

斑马鱼作为慢性酒精性肝病动物模型的研究

昆明第一中学

陈紫楠

摘要：近年来我国由酒精所致肝损害的发病率呈逐年上升趋势，酒精性肝病 (Alcoholic liver disease ,ALD)在人群中已属多发病和常见病。目前已建立了小鼠、大鼠等酒精性肝病动物模型，均为灌胃成模，未见自然饮酒成模，与人自然饮酒成酒精性肝病差异较大，基于此，选用世代周期短、形体小、胚胎发育快、操作简便以及具有和人类相似的基因结构的斑马鱼作为实验材料，在 1.5%(V/V%)的乙醇溶液中饲养。结果发现，在饲养四十天后，血清和肝脏中的 ALT（谷草转氨酶）、AST（谷丙转氨酶）和 MDA（丙二醛）均高于不含酒精饲养的对照组。肝脏病理切片显示：乙醇溶液饲养四十天后，对照组斑马鱼肝细胞排列均匀，细胞质、核结构清晰，无明显病变，而酒精喂养实验组斑马鱼肝组织结构被破坏，肝细胞广泛脂肪变性，出现空泡样变性和气球样变性，细胞体积增大，可见炎症细胞浸润，部分细胞坏死，淤血。上述生化特征和病理特征说明我们已成功构建成酒精性肝病斑马鱼动物模型，为进一步研究酒精性肝病的致病机理提供了新的动物模型，并进一步拓宽了斑马鱼的应用范围。用斑马鱼自然饮酒方法建立斑马鱼酒精性肝病动物模型，经查新未见报道。

关键词：斑马鱼 酒精性肝病 动物模型

小时候，爸爸妈妈给我从花鸟市场买来了一种可爱的小鱼，它们身上有像斑马一样的条纹，叫斑马鱼。我一见就喜欢上了它们，从此就和这种美丽的小精灵结下了不解之缘。由于自己养斑马鱼，所以平时就对一些关于斑马鱼的小知识比较关注，日子长了，对这种小鱼的的了解就更多了一些，知道这种小鱼不仅可供观赏，还可以做科学研究呢。爸爸平时比较爱喝酒，有时有好朋友来兴致一高，难免会多喝，妈妈由于担心爸爸的身体，经常会唠叨几句，说饮酒会造成酒精性肝损伤，可往往收效甚微。一个偶然的的机会，我看到一篇关于斑马鱼作为肿瘤动物模型研究的报道，忽然想，那我能不能用这些小鱼做一个关于酒精损害肝脏的动物模型来教育爸爸呢。碰巧有一个机会，学校组织我们去中国医学科学院医学生物学研究所参观，我趁机请教了那里的专家，把我的这个想法告诉了他们，老师们认为我这个想法即有创新

性也很有意义,操作起来也比较可行。因此我就在中国医学科学院医学生物学研究所进行了该项研究。

通过查阅文献,我了解到酒精性肝病(ALD)是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病。ALD包括轻症酒精性肝病(MAI)、酒精性脂肪肝(AFL)、酒精性肝炎(AH)、酒精性肝纤维化(AHF)和酒精性肝硬化(AC)(王辉等,1998)。酒精滥用和依赖已成为当今世界日益严重的公共卫生问题。对我国4大地区饮酒情况的流行病学调查表明,一般人群的饮酒率为59.5%,其中男性占84.6%,女性占29.4%,人均年饮酒量折合3.6L纯酒精(100%)。酒精对肝脏有明显的毒性作用,重度饮酒者中90%~100%有一定程度的脂肪肝,10%~35%可发展成酒精性肝炎,8%~20%将发展为肝硬化(厉有名等,2003)。美国酒精性肝病死亡居第10位,每年约1500~2000人死于酒精性肝病。我国酒精性肝病在所有肝病中的比例有逐年增加趋势,ALD是西方国家导致肝硬化的最主要病因,也是十大常见死因之一。近年来我国由酒精所致肝损害的发病率亦呈逐年上升趋势,酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损害的第二大病因,在人群中已属多发病和常见病(孙艳等,2006)。

斑马鱼(*Denio rerio*)——一种热带硬骨鱼,是研究脊椎动物器官发育和人类疾病的重要遗传学模型之一。其显著优势在于:体积小(3~4cm),可在较小的空间大量繁殖;产卵量高(每周产卵可达200多个),发育快,许多组织在受精后24小时开始形成;成熟周期短(3~4个月);体外受精且胚胎透明,发育过程可在体视解剖镜下观察。斑马鱼的这些特点使它适宜作大规模的突变筛选,是研究基因功能和脊椎动物发育机制的重要手段(程烽等,2004)。斑马鱼与人类基因在引起相关疾病时的表型极为相似,由此可将斑马鱼作为研究人类疾病的重要模式生物体(江晓曦等,2004)。目前对ALD发病机制的了解在很大程度上取决于动物模型的可靠性和可重复性,以及模型与人类ALD的相似性,为了深入研究本病的发病机制,筛选防止酒精性肝病的有效药物,改进并完善ALD的实验动物模型是十分必要的(孙艳等,2006)。酒精性肝病的动物模型主要为大鼠、小鼠等,均为灌胃成模,未见自然饮酒成模,与人自然饮酒成酒精性肝病差异较大(徐立等,2006),现有资料表明斑马鱼可作为人类发育与疾病等研究的模式动物(耿波等,2006),文献检索未见有用斑马鱼作酒精性肝病动物模型报道,因此,我采用喂养酒精斑马鱼的方式模拟人类酗酒,从生化和组织病理等方面对其作为慢性酒精性肝病特征进行研究,最终建立了

酒精性肝病斑马鱼动物模型。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂

总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 测定试剂盒, 均由中生北控生物科技股份有限公司生产; 总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB) 测定试剂盒, 均由上海长征一康仁医学科学有限公司生产; 考马斯亮兰、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所生产。

乙醇、二甲苯、石蜡、丙酮等为常规试剂。

玻因 (Bouin) 氏固定液按以下配方配制: 苦味酸饱和水溶液 (0.9%~1.2%) 75ml, 甲醛 25ml, 冰醋酸 5ml (用前加入)。

1.1.2 主要仪器

Lisa 300 全自动生化分析仪, 分光光度计, 电动玻璃匀浆器, 镊子, 手术剪, 载波片, 盖薄片, 自动切片机, 展片器, 倒置显微镜, 干燥箱, 加热棒, 加氧泵。

1.1.3 实验动物

斑马鱼, 500 只, 购自昆明景星街花鸟市场。

1.2 实验方法

1.2.1 酒精饲养浓度的选择及分组

为筛选最佳的酒精饲养浓度, 我们将斑马鱼随机取 60 只用于酒精饲养浓度的选择: 设定四个乙醇浓度条件组: 1%、1.5%、2%、2.5%进行了小量饲养预实验, 每组 15 只。

取 400 只随机分为 2 组, 一组为正常对照组, 另一组为实验组, 每组 200 只。

1.2.2 处理方法

实验组用 2 升 1.5% 的酒精喂养, 用加热泵保持水温约 26℃, 隔天换水, 连续 40 天; 正常对照组在相同条件下用 2 升水喂养, 每组给饵料 2 克/天。

1.2.3 标本采集

各组斑马鱼末次换水后, 自眼球采血, 采集的血每 66 只合并为一组, 实验组及对照组各 3 组, 置于 37℃ 温箱 30min 后, 4℃ 过夜分离血清。采血后即刻处死, 称重,

每组取肝，其中 60 只斑马鱼肝脏加生理盐水制成 10% 肝匀浆，剩余肝脏放入玻因氏固定液中固定。

1.2.4 生化测定方法

采集的血清及肝脏组织，送昆明医学院第二附属医院检验科进行检测。用全自动生化分析仪检测 ALT、AST、TC 和 TG 等；MDA、SOD 采用比色法，按照试剂盒说明进行。

1.2.5 肝组织病理检测

玻因固定液固定的肝脏依次用 80% 酒精、95% 酒精、纯酒精、丙酮、二甲苯、石蜡处理脱水后，将已脱水的肝脏取出，用 56~58℃ 的热石蜡进行包埋，包埋后制成蜡块，在切片机上切成厚度 6~7 μm 的切片后，苏木精-伊红染色（HE 染色），显微镜观察肝细胞的结构和病理改变。（姜元庆，2002）

1.2.6 肝指数计算公式 肝指数=肝脏重量/体重。

1.2.7 统计学方法 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组之间的比较用 T 检验。（孙振球，2006）

2 结果

2.1 酒精饲养浓度的选择

实验发现，2% 和 2.5% 浓度组，饲养 7 天后有大量斑马鱼死亡，而 1% 和 1.5% 浓度组未见死亡，因此我们最后确定使用 1.5% 乙醇浓度作为最终饲养浓度。

表 1 酒精浓度对斑马鱼的影响

| 组别 | 动物数量 | 斑马鱼存活状态（7 天） |
|----------|------|--------------|
| 1% 酒精组 | 15 条 | 存活 15 条 |
| 1.5% 酒精组 | 15 条 | 存活 15 条 |
| 2% 酒精组 | 15 条 | 死亡 13 条 |
| 2.5% 酒精组 | 15 条 | 死亡 15 条 |

2.2 外部形态特征

饲养 40 天时，酒精饲养的斑马鱼游泳状态出现游速缓慢，进食量减少，有的出现身体微微侧偏，正常对照组游动速度较快，较活泼，进食量正常。因此我们选择酒精饲养 40 天进行生化和病理特征研究。酒精饲养组外观与正常对照的斑马鱼对比，

体重无显著差异，腹部略微发白（图 1）。解剖后对比肝脏，两组肝脏均呈红色（图 2）。



图 1 饲养 40 天后的斑马鱼（箭头所示）
A. 正常对照；B. 酒精饲养

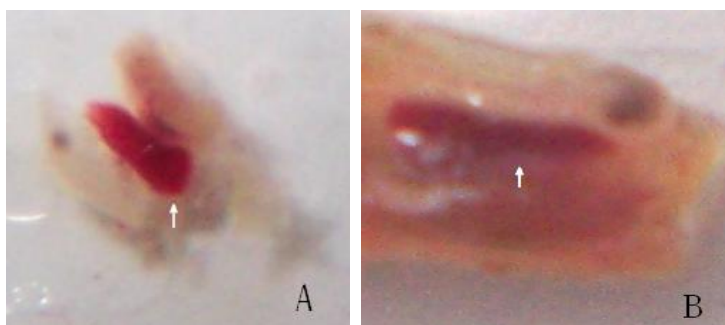


图 2 饲养 40 天后的斑马鱼肝脏（箭头所示）
A. 正常对照；B. 酒精饲养

2.3 肝指数

酒精饲养 40 天后肝指数大于正常对照组，说明酒精饲养对斑马鱼肝脏造成一定的损伤(表 2)。

表 2 酒精对斑马鱼肝损伤肝指数的影响

| 组别 | 动物数 | 体重(g) | 肝脏重量(g) | 肝指数(g/g) |
|-------|-----|-------------|---------------|--------------|
| 正常对照组 | 20 | 0.354±0.062 | 0.0068±0.0007 | 0.0192±0.005 |
| 酒精饲养组 | 21 | 0.348±0.047 | 0.0073±0.0009 | 0.021±0.006 |

2.4 MDA 和 SOD 变化特征

结果显示, 实验组斑马鱼的血清和肝组织匀浆中 MDA 的水平显著高于对照组, 并且实验组斑马鱼的血清和肝组织匀浆中 SOD 的水平显著低于对照组(表 3)。说明饮酒后引起自由基的过量产生, 造成损伤。

表 3 酒精对斑马鱼血清及组织中 MDA 和 SOD 的影响 ($\bar{x}+s$, mmol/ml, n=3)

| 组别 | MDA | | SOD | |
|-------|------------|------------|-----------|-----------|
| | 血清 | 肝组织匀浆 | 血清 | 肝组织匀浆 |
| 正常对照组 | 7.83±3.42 | 7.71±2.27 | 186±43.71 | 3.63±1.22 |
| 实验组 | 13.25±4.85 | 21.63±5.72 | 153±19.31 | 2.47±0.83 |

2.5 血清 ALT、AST、TC、TG 的变化特征

饮酒后斑马鱼肝功能 ALT 和 AST 水平显著高于正常对照组, TG 水平显著高于对照组, TC 水平低于对照组 (表 4)。说明饮酒后酒精对肝脏造成损伤。

表 4 酒精饲养对斑马鱼血清生化学的影响 ($\bar{x}+s$, n=3)

| 组别 | ALT(U/L) | AST(U/L) | TC(mmol/L) | TG(mmol/L) |
|-------|------------|-------------|------------|------------|
| 正常对照组 | 52.3±2.85 | 162.6±31.7 | 2.52±0.85 | 1.26±0.61 |
| 酒精饲养组 | 64.2±8.76* | 241.5±35.5* | 2.49±0.73 | 2.31±0.77* |

注: 与正常组比较, *P<0.05

2.6 病理检测结果

显微镜下观察, 正常对照组斑马鱼肝细胞排列均匀, 细胞质、核结构清晰, 无明显病变 (图 3A)。而酒精饲养实验组斑马鱼肝组织结构被破坏, 肝细胞广泛脂肪变性, 出现空泡样变性和气球样变性, 细胞体积增大, 可见炎症细胞浸润, 部分细胞坏死, 淤血 (图 3B-G)。

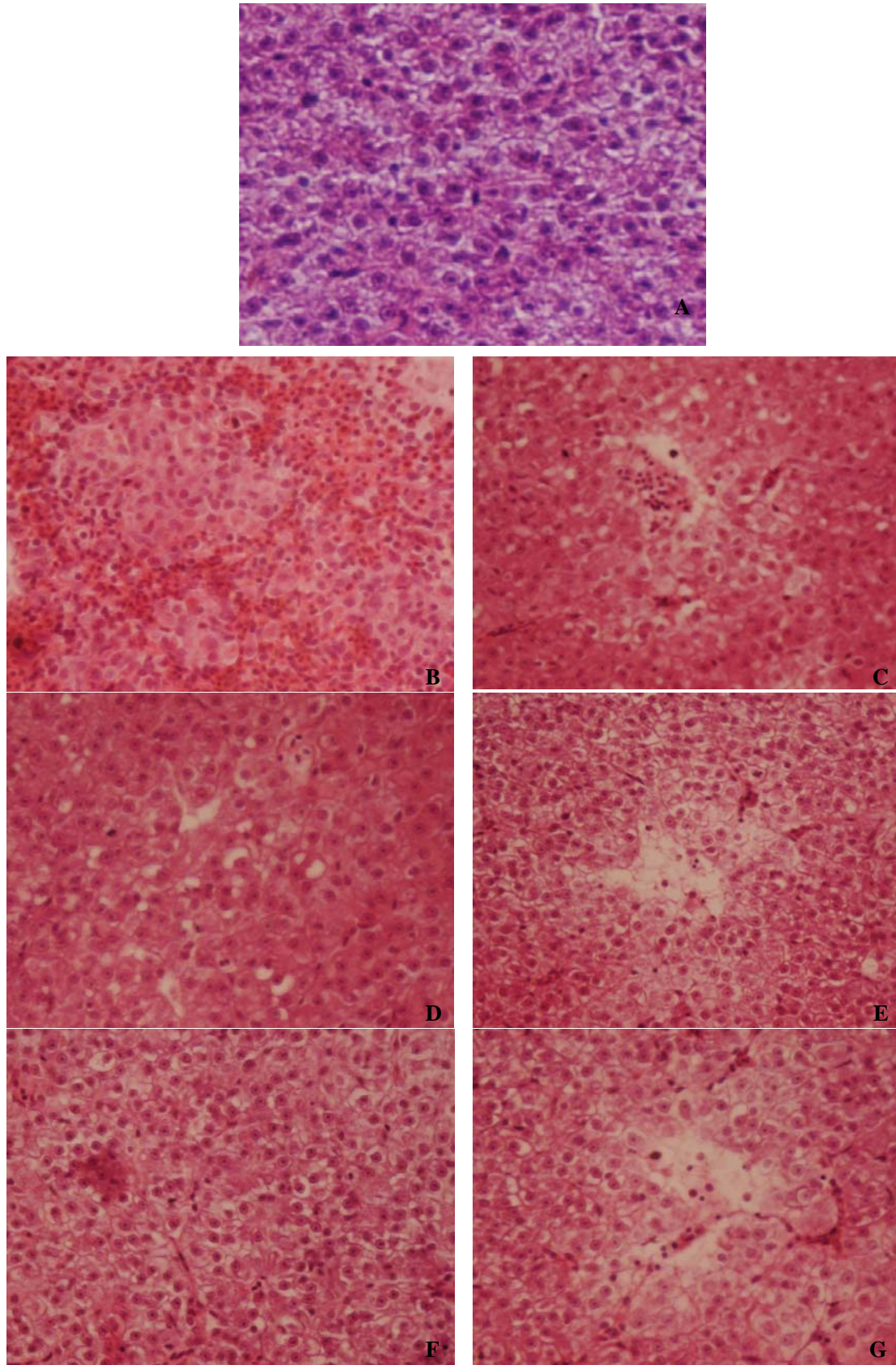


图 3 酒精饲养后斑马鱼肝脏病理特征变化

A 正常对照组斑马鱼肝细胞切片(×400)

B 肝脏淤血, 肝细胞肿大(×200) C 肝细胞脂肪变性, 肝细胞空泡样变性(×200) D 肝

细胞肿胀, 气球样空泡样变性(×200) E 肝细胞坏死, 肝细胞空泡肿胀(×200)

F 肝细胞气球样变性, 淤血(×200) G 肝细胞坏死, 肝细胞肿大, 炎症细胞浸润(×200)

3 讨论

本实验通过用 1.5%酒精饲养斑马鱼，从模拟人类酒精性肝病发生的角度，对慢性酒精性肝病的动物模型进行了探索性研究。结果显示，1.5%饲养酒精可以使斑马鱼的血清 ALT、AST、MDA 明显增高。肝组织病理结果显示，正常对照组肝细胞排列整齐，细胞质清晰，肝细胞无明显病变；实验组肝细胞则出现广泛性的空泡样变性，表现为细胞体积增大，胞浆疏松、浅染，乃至清亮、透明，部分肝细胞呈典型的气球样变性。以上结果说明，我们成功用斑马鱼建立了慢性酒精肝的动物模型。ALD 的临床分型及其病理诊断标准分为(1)轻型 ALD:肝内可见 ALD 的几种基本病变,但程度较轻;(2)酒精性脂肪肝:肝小叶内>30%肝细胞发生脂肪变,依脂肪变范围分轻、中和重度;(3)酒精性肝炎:肝细胞呈气球样变和透明性变,细胞浆内可见酒精性透明小体;(4)酒精性肝硬化:早期结节甚为细小,晚期再生结节增大,界限清楚,绕以致密纤维组织(丁晔等, 2006)。从病理结果分析,我们所建立的斑马鱼酒精肝模型属于酒精性肝炎。

与常见的酒精性肝病动物模型(黄哲等, 1998)相比较,我们建立斑马鱼慢性酒精肝动物模型的特点是:(1)实验中给动物饲喂酒精的过程在一定程度上模拟了人喝酒的状态,而其它常用的动物模型中常使用灌胃等强迫性手段;(2)建模的周期较其它动物模型短,只需要 40 天,而其它动物模型则多需要较长的时间才能显效;(3)建模成功的动物相关生化检测指标变化及病理特征明显,易于评价;(4)斑马鱼的基因与人类相似且相对简单,易于操作,便于在分子水平研究疾病发生发展的机理。

斑马鱼作为模型生物已广泛应用人类重大疾病模型的建立,具有发育周期短、基因结构清楚的特点,适合于研究疾病的发生发展的机理,我们的进一步研究设想是:(1)研究酒精肝发生过程中基因的相互作用;(2)引起其它并发症的基因特征及其相互作用。

4 心得体会

在项目开始,我觉得科学研究是深不可测的,是离我很遥远的事情。但是,好奇心促使我不断地查找资料,询问专家,如同学校老师所说,发现科学研究都是从问题的提出开始。通过实验我发现科学研究是很辛苦的,它需要严谨的态度、科学

的方法。在研究过程中，我也遇到了挫折。但是为了获得研究结果，我牺牲了很多的休息时间，提高了学习的效率，懂得了很多课本上没有提及的专业知识，掌握了科学研究的方法以及创新的思维。

在这个项目的完成过程中，我学会了如何利用相关的文献检索工具检索和查阅文献。懂得了如何设计实验，比如：实验中必须设立合理的对照，否则实验数据就没有说服力，也不科学。还认识到科学实验不仅仅是满足个人的好奇心，还需要有扎实的知识功底、过硬的实验技术和丰富的实践经验，再加上充分的准备和缜密的科学思维才能设计出科学、合理的实验。实验结果的处理也是个非常严密的过程，需要认真对比、分析才能得出可靠的结论。经过这次亲身体会，我深刻感受到科学探索是个非常艰辛的过程，必须付出艰苦的努力才能获得一点点成就，也不是人们所看到的鲜花和荣誉常伴左右，更多的时候需要信念的支撑和默默地坚持。另外，要想在科学上有新的突破和新的发现，除了扎实的功底和艰苦的努力之外，还要有一颗好奇的心，好奇心是科学研究的原动力，它是一种力量，驱使着你去拨开荆棘看个究竟，推动你去不断开拓创新。这次研究，大大提高了我对科学的浓厚兴趣，树立了我们要克服困难的决心，我还会在科学的道路上继续前进。

致谢：中国医学科学院医学生物学研究所兰芸、王庆林、陈巍、王道军等专家为项目的研究提供的实验场所、仪器、材料，以及对论文撰写提供的帮助。

参考文献：

程烽，陈竺. 2004. 斑马鱼:一种造血系统的遗传学研究模型动物. 国外医学.输血及血液学分册. 27(3):200-202.

丁晔，高志安. 2006. 酒精性肝病的研究进展. 锦州医学院学报. 27(2):84, 94.

耿波，曹顶臣，孙效文等. 2006. 斑马鱼-新型的实验动物. 水产学杂志. 19(2):105-108.

黄哲，田德路，原爱红. 1998. 酒精性肝病的实验动物模型的研究. 华人消化杂志. 6(8):712-713.

江晓曦，郑文岭，崔东等. 2004. 斑马鱼——一种理想的分子生物学研究的脊椎动物模型. 中国比较医学杂志. 4(2):74.

姜元庆. 病理检验技术. 人民卫生出版社. 2002年8月第一版.

- 厉有名, 陈卫星, 虞朝辉等. 2003. 浙江省酒精性肝病流行病学调查概况. 中华肝脏病杂志. 11(11):647-649.
- 孙艳, 吴阳, 刘兵等. 2006. 酒精性肝病的研究进展. 吉林大学学报(医学版), 32(4): 733-736.
- 孙振球. 医学统计学. 人民卫生出版社. 2006年8月第二版.
- 王辉, 王江滨. 1998. 肝炎病毒感染与酒精性肝硬化关系的研究(附182例酒精性肝病临床病例报告). 白求恩医科大学学报, 24(6): 652-653.
- 徐立, 史恺, 邓仪昊. 2006. 酒精性肝损伤的实验动物模型的制模进展. 四川解剖学杂志 14(3):51-52.