

· 综述 ·

DOI: 10.12449/JCH250932

“二次打击”在酒精性肝病动物模型中的应用

刘萌思^a, 谢艳迪^b

北京大学人民医院 a.教育处, b.肝病科, 北京 100044

通信作者: 谢艳迪, xieyandee@163.com (ORCID: 0000-0001-5002-341X)

摘要: 酒精性肝病(ALD)严重威胁全球饮酒者的健康,构建合适的ALD动物模型是开展疾病相关研究的重要基础。由于啮齿动物与人类在生理和病理生理方面存在差异,单纯饲喂酒精难以诱导出与人类疾病表现高度吻合的模型,因此“二次打击”(即联合采用酒精与另一种肝损伤因素以诱导预期肝损伤状态)得到广泛应用。本文将“二次打击”中较为常用且有效的方案划分为特殊饮食、化学物质、基因工程等3大类,并进一步细分为高脂饮食、高铁饮食、四氯化碳、脂多糖和基因工程5个部分进行综述。这5类“二次打击”模型虽各有优劣,但已能较完整地覆盖ALD疾病谱。未来ALD动物模型的开发可更多聚焦于缩小动物与人类酒精性肝损伤的病理生理差异,以及模拟更为复杂的人类饮酒模式等方向。

关键词: 肝疾病, 酒精性; 模型, 动物; 二次打击

基金项目: 国家自然科学基金(82000557)

Application of the “two-hit” hypothesis in animal models of alcoholic liver disease

LIU Mengsi^a, XIE Yandi^b

a. Department of Education, b. Department of Hepatology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Corresponding author: XIE Yandi, xieyandee@163.com (ORCID: 0000-0001-5002-341X)

Abstract: Alcoholic liver disease (ALD) poses a serious threat to the health of drinkers worldwide, and establishing appropriate animal models of ALD is an important foundation for conducting disease-related research. Due to the physiological and pathophysiological differences between rodents and humans, alcohol feeding alone is difficult to induce a model that closely matches the disease manifestations in humans, and therefore, the “two-hit” hypothesis (combining alcohol with another liver injury factor to induce the expected state of liver injury) has been widely used. This article classifies the more commonly used and effective “two-hit” regimens into three major categories of special diets, chemical substances, and genetic engineering, which are divided into high-fat diet, high-iron diet, carbon tetrachloride, lipopolysaccharide, and genetic engineering for further analysis. Although these five “two-hit” models have their own advantages and disadvantages, they can nearly cover the disease spectrum of ALD. In the future, the development of ALD animal models can focus on narrowing the pathophysiological differences in alcohol-induced liver injury between animals and humans and simulating more complex drinking patterns in humans.

Key words: Liver Diseases, Alcoholic; Models, Animal; Second Hit

Research funding: National Natural Science Foundation of China(82000557)

酒精性肝病(ALD)是一组包含酒精性脂肪肝、肝炎、肝纤维化和肝硬化的疾病谱,其发病机制复杂,涉及脂质代谢、肝肠轴、免疫调节等多方面。Ad libitum(自由饮用)、Lieber-DeCarli液体饮食和TF(Tsukamoto-French)灌胃法均为构建ALD动物模型的常用方案。然而,由于啮

齿动物的酒精代谢能力与基础代谢率显著高于人类,对肠源性脂多糖(LPS)具有更高的耐受性,且存在对酒精的天然厌恶特性^[1],上述传统方案难以在不增加动物死亡率的前提下诱导出足够严重的肝损伤。

“二次打击”指叠加除酒精外的另一个肝损伤因素,

如特殊饮食、化学物质、基因工程等。相比传统方案,“二次打击”模型可在不显著增加动物死亡率的前提下诱导出不同严重程度的ALD,具有良好的应用前景与开发潜力。目前,仅有少数文献较详尽地分析总结啮齿动物ALD“二次打击”模型^[2]。为此,本文总结各类“二次打击”模型的病理生理机制、建模方法和应用效果,并列举代表性的建模示例,旨在为ALD“二次打击”动物模型的临床应用提供理论基础。

1 饮食类

1.1 高脂饮食(high-fat diet, HFD) HFD是目前应用较广泛的“二次打击”方案之一,可有效诱导肝脂肪变性。Gäbele等^[3]的研究表明,酒精和HFD可直接激活促纤维化基因,加强I型胶原、转化生长因子 β 等胶原相关蛋白的合成;或以活性氧(ROS)为媒介,激活肝星状细胞,诱导细胞外基质沉积。此外,HFD联合酒精暴露还可诱导内质网应激与肝脏炎症,其中内质网应激可广泛引发脂肪堆积、胰岛素抵抗、炎症与细胞凋亡^[4];肝脏炎症则导致以趋化因子(CXC基序)配体1为代表的各类趋化因子上调及肝组织内中性粒细胞浸润。需注意,HFD本身可诱导中性粒细胞浸润的负反馈抑制,而大量酒精摄入会阻断这一机制,进一步加重炎症性肝损伤^[5]。另有研究发现,乙醇与高脂均能够增加肠道通透性,影响肠道菌群的组成与功能^[6-7],从而引发肝肠相关的内毒素血症。

HFD联合酒精的“二次打击”模型包括一系列建模方法,通常选择雄性Sprague-Dawley大鼠或C57BL/6J小鼠用于建模,其中C57BL/6J小鼠具有高度的酒精依赖性与HFD敏感性。酒精饲喂以灌胃或自由饮用为主,脂肪通常来源于玉米油、猪油和胆固醇。需注意,饱和脂肪与不饱和脂肪可能诱导不同的病理生理特征。饱和脂肪可通过抑制肝脂肪积累、增强肝细胞膜抗氧化应激能力及维持肠道菌群正常生态,降低大鼠的酒精性肝毒性^[8-9]。与之相反,不饱和脂肪饮食可能会增加肠道通透性,加剧酒精诱导的内毒素血症、肝脂肪变性和肝损伤^[10]。

此类模型尚缺乏明确统一的建模方法,以下介绍文献中提及的2种较为有效的建模方式。Sengupta等^[11]设计一种“WASH(西方-酒精性脂肪肝)”饮食,动物饲料由麦芽糖、胆固醇、果糖等按比例混合后溶于1 L水配制而成。雄性C57BL/6J小鼠或雄性Wistar大鼠,在10 d内采用“从开始,每2天增加0.9%,直至4.5% (mL/mL)”的方式逐渐提升饲喂酒精的浓度,并维持该浓度继续喂养5

或7周。此模型模拟西方饮食习惯,可诱导明显的脂肪肝、炎症和纤维化。Schonfeld等^[12]设计的方案中,由脂肪(90%乳脂,10%玉米油)提供40%的饮食热量,并将酒精作为唯一的饮用水来源,在1周内以不同浓度(最高20%)提供给小鼠。

HFD联合酒精“二次打击”模型可诱导显著的肝损伤,表现为ALT、AST等血清标志物升高,以及以炎症、脂肪变性和细胞周围纤维化为代表的肝组织病理学改变^[11-12]。然而,在不同研究中,脂肪肝与肝纤维化的形成时间存在显著差异,前者为5~16周,后者为7~16周^[11-12]。

HFD联合酒精模型的优势在于可建立更符合人类复杂饮酒模式的动物模型。通过将HFD与Ad libitum、单次豪饮、慢性加单次暴饮(NIAAA)等不同饮酒方式结合,研究者可模拟各类饮酒情景。“二次打击”模型发展至今,其应用已不限于加重ALD动物的肝损伤程度。大量饮酒可导致肥胖个体发生急性肝损伤,同时存在酗酒和肥胖可显著增加肝脏相关疾病的发病风险,甚至死亡风险^[13-14]。因此,需通过该类模型将饮酒与人类社会生活中的其他肝损伤因素相结合,以满足临床及科研的进一步需求。

1.2 高铁饮食 铁过载一直被视为强有力的肝损伤因素。遗传性病变(如遗传性血色病)和长期大量输血是造成机体铁过载的2个主要原因。然而,近期研究发现,慢性过量饮酒也可引发肝脏铁过载。铁调素作为铁代谢过程中的核心分子,通过下调十二指肠中铁转运蛋白和二价金属转运蛋白1的表达来抑制铁吸收^[15];而酒精会抑制这种机制,造成机体铁过载^[15-17],进而导致肝脏氧化应激。氧化应激的形成涉及2种机制:(1)与非转铁蛋白结合铁相关,这类游离铁稳定性较低,当转铁蛋白饱和度超过75%时开始积累^[18],且易进入肝细胞;(2)源于酒精诱导肝脏转铁蛋白受体1表达增加,增强细胞铁摄取能力,最终导致肝脏铁沉积。铁过载通过Haber-Weiss反应和Fenton反应产生ROS,引起氧化应激、细胞损伤和铁死亡。

高铁合并酒精暴露“二次打击”模型应用范围有限,尤其近年来缺乏新的发展与改良。该模型通常将羰基铁以0.04~0.87 mg/mL的浓度混入Lieber-Decarli液体饮食,持续饲喂8~26周。以下列举2种成功诱导肝纤维化的模型。Olynyk等^[19]设计“三阶段”方案,首先在母鼠分娩后饲喂含3%羰基铁的饮食,并持续整个哺乳期(21天);幼鼠断奶后继续摄入相同的含铁饲料直至10周龄,随后转为食用含乙醇(67 mL 95%乙醇/1 000 mL)和0.6 mg/mL羰基铁的Lieber-Decarli液体饮食,持续26周。该方案通过相对

较长的建模周期,成功诱导出铁负载门静脉周围巨噬细胞附近的局灶性纤维化。Tsukamoto等^[20]将高脂与高铁相结合,对雄性Wistar大鼠持续16周饲喂HFD(25%卡路里来自玉米油),并通过灌胃逐渐提升乙醇浓度,实验结束时乙醇摄入量占总热量摄入的49%(每日16 g/kg体质量);同时,在第1周给予0.12 mg/mL羰基铁,从第2周开始将浓度提升至0.25 mg/mL。结果显示,所有模型动物均被诱导出肝纤维化,部分动物甚至进展至微小结节性肝硬化。

然而,高铁合并酒精暴露“二次打击”模型在ALD研究中并不常用。该模型的建模方法较为复杂,高铁摄入与人类常见的饮酒模式存在差异,只有特定遗传病患者或长期大量输血人群才会产生严重的铁过载,因此其建模思路与致病途径并不符合常规人类ALD的病理生理机制。

2 化学物质类

2.1 CCl₄ CCl₄作为一种有效的肝毒性物质,已被广泛用于诱导肝脂肪变、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌。以CYP2E1为核心的细胞色素P450同工酶可将CCl₄转化为CCl₃·,或在氧气存在下进一步转化为CCl₃OO·,干扰细胞正常生命活动。其损伤机制主要包括脂质过氧化(CCl₃OO·比CCl₃·更易启动该过程)与卤烷基化,其中脂质过氧化通过损害膜功能和产生有害代谢中间产物来损伤细胞;卤烷基化则以共价结合方式改变细胞组分的结构及正常功能,尤其通过诱导细胞低甲基化状态来抑制极低密度脂蛋白的合成分泌,引起肝脂肪变^[21]。酒精与CCl₄的协同作用主要体现在乙醇可以诱导CYP2E1高活性^[22],从而促进CCl₄的自由基转化。

将CCl₄作为“二次打击”因素与酒精结合,可构建更符合人类中重度酒精性肝损伤病理特征的啮齿动物模型。CCl₄既可作为饮酒前的预处理持续暴露6~8周,也可直接与酒精混合暴露1~10周,前者常用于研究模型动物肝脏的组织学与细胞分子学,后者则多用于比较不同打击因素的效果差异。CCl₄的给药方式包括腹腔注射、口服、灌胃和吸入等。腹腔注射时,药物会以一定比例溶解于橄榄油或玉米油,频率为每周1~2次,剂量为每次0.1~3 mL/kg体质量。吸入暴露前,动物应连续饮用苯巴比妥(0.3 g/L)1周以诱导肝酶,增强肝损伤效应^[23];暴露时,以2 L/min的流量通入CCl₄气体1 min,随后关闭笼子保持1 min,最后通过抽气罩持续抽除残留CCl₄气体10 min,整个吸入暴露过程通常持续7周(前4周每周1次,后3周每周2次)。口服和灌胃方法近年来应用较少,在此不作详述。

不同的给药方式各具特点。小鼠主要采用腹腔注射,但该方法易引发局部皮肤刺激、腹腔粘连以及膀胱、膈肌或肠道损伤;而大鼠多通过吸入给药,此方式可造成更高浓度的CCl₄滞留,且在近期文献中表现出更优的可重复性^[24-25],但吸入更易引发肝硬化和门静脉高压等并发症;灌胃常导致更高的模型动物早期死亡率,因此不推荐适用。不同品系的小鼠对CCl₄的敏感性和相适的给药方法存在差异。BALB/c近交小鼠对纤维化诱导较敏感,适用于腹腔注射和灌胃;C57BL/6近交小鼠是CCl₄“二次打击”模型中常用的品系,这可能与其较易获得有关。

CCl₄联合酒精“二次打击”模型造成的主要病理生理变化为肝纤维化。研究发现,CCl₄可在2周内诱导出肝纤维化相关表现,尤其是在门静脉周围和间隔区^[26],同时还可引起轻度细胞坏死、脂肪积累、炎症反应,并最终损害肝功能。多项研究证实,慢性酒精摄入与CCl₄的结合可显著增强共同的肝毒性。Bosma等^[27]发现,CCl₄预处理可增强酒精摄入后的胶原沉积。

CCl₄联合酒精“二次打击”模型兼具优势与劣势。其优势在于可诱导与人类重症酒精性肝炎类似的转录变化,尤其在免疫系统、细胞周期和有丝分裂、信号传导级联的上调方面^[28],且是少数能诱导出显著肝纤维化的方法,同时具有建模效率高的特点,因此在“二次打击”模型中占据重要地位。但其劣势在于不适合模拟人类复杂饮酒情景,且存在动物死亡率高的问题。

2.2 LPS LPS联合酒精“二次打击”模型具有独特性。与CCl₄等化学药剂或高铁等特殊饮食不同,LPS在人类ALD的自然病程中占有重要的地位。长期饮酒可改变肠道微生物组的组成和功能,提高肠壁的通透性^[6],促使细菌产物更易从肠道入血,形成内毒素血症。血液中的LPS可通过脂多糖结合蛋白与Kupffer细胞表面的白细胞分化抗原14结合,进而并被转移至Toll样受体-4髓样分化蛋白2复合物,激活髓样分化因子88依赖性的级联反应^[29],最终导致丝裂原活化蛋白激酶(如ERK1、ERK2、JNK、p38)与核因子-κB(NF-κB)等分子的激活^[30]。随后,Kupffer细胞释放ROS、黏附分子(如ICAM-1、VCAM-1)、趋化因子(如IL-8、CCL2)和促炎细胞因子(如TNF-α、IL-1、IL-6),诱导肝脏炎症反应^[31-32]。

目前,研究人员已探索出一套常见的建模方法。模型动物通常选用雄性Wistar大鼠、雄性Sprague-Dawley大鼠和雌性C57BL/6小鼠,雌性比雄性更易受到酒精诱导的肝损伤影响^[33]。Lieber-Decarli液体饮食或NIAAA模型常用于搭配LPS暴露,其中NIAAA模型更常见,可能是因其具有更强的致炎能力。建模流程如下:先建

立NIAAA模型,即饲喂含5 mg/mL乙醇的饮食4周,随后经口摄入3.2 g/kg体质量的乙醇1次[32 mg/mL乙醇溶于盐水缓冲液];再对每只实验动物进行单次LPS暴露,剂量为0.5~2 mg/kg体质量,药物溶于PBS缓冲液后经腹腔注射给药,注射6 h后处死动物。实验显示,LPS注射后6 h,血浆中ALT、AST和GGT水平显著上升;3种炎症相关细胞因子(TNF、IL-6和IL-1 α)水平在注射后1~6 h达到峰值^[34]。有研究曾尝试建立慢性LPS暴露模型(在皮肤下植入微型泵持续注射LPS,共4周),但长期持续LPS暴露并未显著增加与慢性酗酒相关的组织损伤标志物含量,反而使机体产生耐受,减少急性暴露可能带来的潜在损伤^[35]。

LPS联合酒精“二次打击”模型引起的肝损伤偏向于肝脏炎症反应。组织病理学上的变化主要包括局灶性凝固性坏死、多形性中性粒细胞浸润和脂肪变性,也可见肝小叶结构紊乱、细胞增殖活跃以及局灶性胶原沉积。

该模型在损伤机制上更贴合人类ALD的致病机制。LPS透过受损肠壁进入血液,刺激促炎细胞因子、趋化因子等释放,促进肝脏炎症反应,因此适用于酒精性肝炎的研究。由于仅需单次注射LPS,该模型操作简便,周期短,不易造成实验动物死亡,但也难以诱导出显著的肝纤维化和肝硬化,仅适合于酒精性肝炎早期阶段的研究。

3 基因工程类

通过敲除或转入ALD致病通路上的关键基因,可直接、明确地诱导目标疾病。Xu等^[36]发现敲低调节肝脏甘油酸酯代谢的羧酸酯酶1基因,可加重酒精性脂肪肝炎;脂肪特异性蛋白27过表达也可诱导肝损伤,且在机制上与酒精存在协同作用^[37]。

人源化CYP2E1敲入的小鼠模型值得关注。人源化指在实验动物体内植入功能性人体细胞或组织,使得所建立的模型更贴合人类的病理生理特点。CYP2E1作为肝脏氧化应激中的关键蛋白,其敲入可使实验动物在饮酒后出现应激相关基因的表达及明显的肝损伤^[38-39],但研究人员需注意动物自身免疫系统及人源细胞在异种生物体内的分化成熟障碍问题。

4 小结与展望

本文总结用于构建ALD啮齿动物模型的“二次打击”方案(表1),主要分为饮食类、化学物质类和基因工程类。开发“二次打击”模型的根本原因在于,啮齿动物与人类在酒精偏好、代谢能力、肝脏炎症模式及肠源性LPS的耐受性等方面均存在差异,需依靠额外因素诱导肝损伤。表1中的5种建模方案已较全面地覆盖脂肪肝、肝炎、肝纤维化、肝硬化等ALD疾病谱。

表1 ALD啮齿动物“二次打击”模型的建模方法及应用效果
Table 1 Modeling method and application effect of "second-hit" model in rodents with ALD

| 项目 | 高脂饮食 | 高铁饮食 | CCl ₄ | LPS | 基因工程 |
|-------|------------------------------|---|--------------------------|---|--|
| 建模方法 | | | | | |
| 动物类型 | C57BL/6J小鼠 | 雄性 Sprague-Dawley 大鼠; 雌性 Wistar 大鼠; C57BL/6J 小鼠 | BALB/c 小鼠; C57BL/6 小鼠 | 雄性 Sprague-Dawley 大鼠; 雌性 Wistar 大鼠; 雌性 C57BL/6 小鼠 | C57BL/6 小鼠; SV129 小鼠; GR floxed 小鼠 |
| 时间(周) | 7~24 | 8~26 | 1~10 | 4 | 3~8 |
| 剂量 | | 0.04~0.87 mg/mL | 剂量差异较大,与给药方式有关 | 0.5~2 mg/kg 体质量 | |
| 酒精摄入 | 灌胃; Ad libitum | Lieber-Decarli 液体饮食 | 灌胃; Ad libitum | NIAAA 模型; Lieber-DeCarli 液体饮食 | NIAAA 模型; 灌胃; Ad libitum |
| 应用效果 | | | | | |
| 病理表现 | 肝脂肪变;肝炎; 细胞周纤维化 | 肝脂肪变;肝纤维化; 微小结节性肝硬化 | 肝脂肪变; 肝炎; 肝纤维化 | 肝脂肪变;肝炎;局灶性 坏死及胶原沉积 | 与涉及的具体基因相关 |
| 适用疾病 | 脂肪肝 | 肝纤维化 | 肝纤维化 | 肝炎 | 与涉及的具体基因相关 |
| 优点 | 更生活化地模拟酒精性肝损伤;更灵活地诱导不同程度的ALD | 能引起较严重的损伤,如肝硬化 | 建模时间成本低;能引起较严重的损伤,如肝纤维化 | 更贴合人类ALD病理生理机制;实验动物死亡率低;建模时间成本低 | 直接、明确地通过某种机制致病;能更自由地诱导各类疾病 |
| 缺点 | 建模时间较长 | 建模方法较复杂;不太贴合人类ALD的病理生理机制 | 可能增加实验动物死亡率 | 无法造成严重的肝损伤 | 更加昂贵、复杂;存在脱靶、转基因细胞发育不良等风险 |

然而,该领域长期存在一个难题,即难以明确区分“二次打击”因素单独作用与联合酒精作用造成的肝损伤,由此引发模型能否反映ALD真实病理特点的质疑。笔者认为,“二次打击”不仅可用于单纯ALD的建模,还适用于构建符合人类复杂饮酒模式的ALD的动物模型。例如,以往研究通常会严格区分ALD与代谢相关脂肪性肝病,而我国及欧洲肝病学会最新指南中均已更新代谢相关脂肪性肝病合并ALD的内容^[40-41]。这表明,将饮酒与“二次打击”因素相结合,即便无法完全模拟ALD真实病理特点,仍符合科研与临床需求,具有良好的发展潜力。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 刘萌思负责设计论文框架,起草论文,绘制图表;谢艳迪负责论文修改,拟定写作思路,指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

- [1] BRANDON-WARNER E, SCHRUM LW, SCHMIDT CM, et al. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men[J]. *Alcohol*, 2012, 46(8): 715-725. DOI: 10.1016/j.alcohol.2012.08.004.
- [2] TSUKAMOTO H, MACHIDA K, DYNNYK A, et al. “Second hit” models of alcoholic liver disease[J]. *Semin Liver Dis*, 2009, 29(2): 178-187. DOI: 10.1055/s-0029-1214373.
- [3] GÄBELE E, DOSTERT K, DORN C, et al. A new model of interactive effects of alcohol and high-fat diet on hepatic fibrosis[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2011, 35(7): 1361-1367. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2011.01472.x.
- [4] ZHANG XQ, XU CF, YU CH, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(7): 1768-1776. DOI: 10.3748/wjg.v20.i7.1768.
- [5] HWANG S, REN TY, GAO B. Obesity and binge alcohol intake are deadly combination to induce steatohepatitis: A model of high-fat diet and binge ethanol intake[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2020, 26(4): 586-594. DOI: 10.3350/cmh.2020.0100.
- [6] BISHEHSARI F, MAGNO E, SWANSON G, et al. Alcohol and gut-derived inflammation[J]. *Alcohol Res*, 2017, 38(2): 163-171.
- [7] KIRPICH IA, MILLER ME, CAVE MC, et al. Alcoholic liver disease: Update on the role of dietary fat[J]. *Biomolecules*, 2016, 6(1): 1. DOI: 10.3390/biom6010001.
- [8] CHEN P, TORRALBA M, TAN J, et al. Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 203-214.e16. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.09.014.
- [9] CHEN YL, PENG HC, WANG XD, et al. Dietary saturated fatty acids reduce hepatic lipid accumulation but induce fibrotic change in alcohol-fed rats[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2015, 4(3): 172-183. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.04.
- [10] KIRPICH IA, PETROSINO J, AJAMI N, et al. Saturated and unsaturated dietary fats differentially modulate ethanol-induced changes in gut microbiome and metabolome in a mouse model of alcoholic liver disease[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(4): 765-776. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.11.017.
- [11] SENGUPTA M, ABUIRQEBA S, KAMERIC A, et al. A two-hit model of alcoholic liver disease that exhibits rapid, severe fibrosis[J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0249316. DOI: 10.1371/journal.pone.0249316.
- [12] SCHONFELD M, O'NEIL M, VILLAR MT, et al. A Western diet with alcohol in drinking water recapitulates features of alcohol-associated liver disease in mice[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2021, 45(10): 1980-1993. DOI: 10.1111/acer.14700.
- [13] PARKER R, KIM SJ, GAO B. Alcohol, adipose tissue and liver disease: Mechanistic links and clinical considerations[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(1): 50-59. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.116.
- [14] GAO B, XU MJ, BERTOLA A, et al. Animal models of alcoholic liver disease: Pathogenesis and clinical relevance[J]. *Gene Expr*, 2017, 17(3): 173-186. DOI: 10.3727/105221617X695519.
- [15] HARRISON-FINDIK DD, KLEIN E, CRIST C, et al. Iron-mediated regulation of liver hepcidin expression in rats and mice is abolished by alcohol[J]. *Hepatology*, 2007, 46(6): 1979-1985. DOI: 10.1002/hep.21895.
- [16] OHTAKE T, SAITO H, HOSOKI Y, et al. Hepcidin is down-regulated in alcohol loading[J]. *Alcoholism Clin & Exp Res*, 2007, 31(S1): S2-S8. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2006.00279.x.
- [17] BRIDLEK, CHEUNGTK, MURPHYH, et al. Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury: Implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006, 30(1): 106-112. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2006.00002.x.
- [18] SIKORSKA K, STALKE P, ROMANOWSKI T, et al. Liver steatosis correlates with iron overload but not with HFE gene mutations in chronic hepatitis C[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2013, 12(4): 377-384. DOI: 10.1016/s1499-3872(13)60059-4.
- [19] OLYNYK J, HALL P, REED W, et al. A long-term study of the interaction between iron and alcohol in an animal model of iron overload[J]. *J Hepatol*, 1995, 22(6): 671-676. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80222-3.
- [20] TSUKAMOTO H, HORNE W, KAMIMURA S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(1): 620-630. DOI: 10.1172/JCI118077.
- [21] NISHIMAKI-MOGAMI T, SUZUKI K, TAKAHASHI A. The role of phosphatidylethanolamine methylation in the secretion of very low density lipoproteins by cultured rat hepatocytes: Rapid inhibition of phosphatidylethanolamine methylation by bezafibrate increases the density of apolipoprotein B48-containing lipoproteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1304(1): 21-31. DOI: 10.1016/s0005-2760(96)00100-2.
- [22] GRUEBELE A, ZAWASKI K, KAPLAN D, et al. Cytochrome P450E1- and cytochrome P450B1/2B2-catalyzed carbon tetrachloride metabolism: Effects on signal transduction as demonstrated by altered immediate-early (c-Fos and c-Jun) gene expression and nuclear AP-1 and NF-kappa B transcription factor levels[J]. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24(1): 15-22.
- [23] SCHOLTEN D, TREBICKA J, LIEDTKE C, et al. The carbon tetrachloride model in mice[J]. *Lab Anim*, 2015, 49(S1): 4-11. DOI: 10.1177/002367-7215571192.
- [24] DOMENICALI M, CARACENI P, GIANNONE F, et al. A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse[J]. *J Hepatol*, 2009, 51(6): 991-999. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.09.008.
- [25] LIEDTKE C, LUEDDE T, SAUERBRUCH T, et al. Experimental liver fibrosis research: Update on animal models, legal issues and translational aspects[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013, 6(1): 19. DOI: 10.1186/1755-1536-6-19.
- [26] FACCIOLI LAP, DIAS ML, PARANHOS BA, et al. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents[J]. *Life Sci*, 2022, 301: 120615. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120615.
- [27] BOSMA A, BROUWER A, SEIFERT WF, et al. Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis[J]. *J Pathol*, 1988, 156(1): 15-21. DOI: 10.1002/path.1711560106.
- [28] WEBER LWD, BOLL M, STAMPFL A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33(2): 105-136. DOI: 10.1080/713611034.
- [29] COHEN JI, NAGY LE. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Interactions between parenchymal and non-parenchymal cells[J]. *J Dig Dis*, 2011, 12(1): 3-9. DOI: 10.1111/j.1751-2980.2010.00468.x.
- [30] GUHA M, MACKMAN N. LPS induction of gene expression in human monocytes[J]. *Cell Signal*, 2001, 13(2): 85-94. DOI: 10.1016/s0898-6568(00)00149-2.
- [31] GAO B, BATALLER R. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1572-1585. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.09.002.

- [32] ZIMA T, KALOUSOVÁ M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2005, 29(11 Suppl): 110S-115S. DOI: 10.1097/01.alc.0000189288.30358.4b.
- [33] REYES-GORDILLO K, SHAH R, ARELLANES-ROBLEDO J, et al. Akt1 and Akt2 isoforms play distinct roles in regulating the development of inflammation and fibrosis associated with alcoholic liver disease[J]. Cells, 2019, 8(11): 1337. DOI: 10.3390/cells8111337.
- [34] PENNINGTON HL, HALL PM, WILCE PA, et al. Ethanol feeding enhances inflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-induced hepatitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1997, 12(4): 305-313. DOI: 10.1111/j.1440-1746.1997.tb00426.x.
- [35] de la M HALL P, LIEBER CS, DECARLI LM, et al. Models of alcoholic liver disease in rodents: a critical evaluation[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2001, 25(5 Suppl ISBRA): 254S-261S. DOI:10.1097/00000374-200105-051-00041.
- [36] XU JS, XU Y, LI YY, et al. Carboxylesterase 1 is regulated by hepatocyte nuclear factor 4 α and protects against alcohol- and MCD diet-induced liver injury[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24277. DOI: 10.1038/srep24277.
- [37] XU MJ, CAI Y, WANG H, et al. Fat-specific protein 27/CIDEA promotes development of alcoholic steatohepatitis in mice and humans[J]. Gastroenterology, 2015, 149(4): 1030-1041. e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.06.009.
- [38] LU YK, WU DF, WANG XD, et al. Chronic alcohol-induced liver injury and oxidant stress are decreased in cytochrome P4502E1 knockout mice and restored in humanized cytochrome P4502E1 knock-in mice [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(9): 1406-1416. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.026.
- [39] BUTURA A, NILSSON K, MORGAN K, et al. The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model[J]. J Hepatol, 2009, 50(3): 572-583. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.10.020.
- [40] Hepatology Branch of the Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of metabolism-related (non-alcoholic) fatty liver disease (2024 edition) [J]. J Prac Hepatol, 2024, 27(4): 494-510. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20240327-00163. 中华医学会肝病学分会. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2024, 27(4): 494-510. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20240327-00163.
- [41] TACKE F, HORN P, WONG VW, et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) [J]. J Hepatol, 2024, 81(3): 492-542. DOI: 10.1016/j.jhep.2024.04.031.

收稿日期: 2025-01-04; 录用日期: 2025-03-21

本文编辑: 林姣

引证本文: LIU MS, XIE YD. Application of the "two-hit" hypothesis in animal models of alcoholic liver disease[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(9): 1925-1930. 刘萌思, 谢艳迪. "二次打击"在酒精性肝病动物模型中的应用[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(9): 1925-1930.

· 消息 ·

(上接第1895页)

三、加强综合防控, 阻断源头传播

(三) 加快全面消除乙肝母婴传播。医疗卫生机构按规定为所有孕产妇尽早提供乙肝检测, 为符合治疗条件的乙肝病毒感染孕产妇提供规范抗病毒治疗。在12小时内, 尽早为乙肝病毒表面抗原阳性产妇所生婴儿接种乙肝疫苗、注射乙肝免疫球蛋白, 并按要求做好定期随访工作, 及时评估预防乙肝母婴传播效果, 同步推进艾滋病、梅毒、乙肝母婴阻断工作, 尽早实现消除“艾梅乙”母婴传播目标。

(四) 持续强化感染防控和血液安全。医疗卫生机构强化医源性感染管理意识和责任, 充分发挥感染防控科室作用, 加强开展血液透析、口腔诊疗及有创和侵入性诊疗等服务项目重点科室的院内感染控制管理, 严格消毒透析设备、肠镜、胃镜、手术器械、牙科器械等医疗器械, 严格规范注射、静脉输液、侵入性诊断治疗等医疗行为。血站持续落实临床用血乙肝、丙肝病毒核酸检测全覆盖的措施。卫生监督机构依法加强对医疗卫生机构和医疗美容机构院内感染防控、血站人员资质及消毒隔离制度规范等执行情况的监督执法。

(五) 加强危险因素综合干预。大力开展爱国卫生运动, 健全城乡生活垃圾和污水处理设施, 不断改善城乡环境卫生, 加强食品卫生和饮用水卫生管理, 持续减少甲肝、戊肝经饮食饮水传播。卫生健康、疾控、公安和司法行政等部门持续巩固注射吸毒人群戒毒药物维持治疗、清洁针具交换、社区戒毒、社区康复等工作成效。加强文身、文眉、修脚等行业针具、工具和用品卫生消毒管理。

四、加强检测监测, 及时发现传染源

(六) 加大检测发现力度。各地疾控部门研究适合本地区的病毒性肝炎检测策略, 分类实施, 促进病毒性肝炎感染者早检测、早发现。结合艾滋病和性病防治工作, 推进开展“多病共检”。针对重点地区、重点人群, 探索通过健康体检等方式, 提高病毒性肝炎检测发现率。利用现代信息技术, 探索自我检测等主动检测模式。医疗卫生机构为病毒性肝炎感染高风险人群以及不明原因肝脏生化检测异常者提供检查服务。对检查发现的阳性者提供必要的确诊及抗病毒治疗等服务, 不具备条件的要及时转诊。公安、司法行政部门做好监管场所被监管人员中艾滋病病毒感染者和易感染艾滋病危险行为人群的乙肝病毒表面抗原和丙肝抗体检测工作。除职业特殊确需检测外, 不得要求在入学、就业体检中开展乙肝项目检测。二级及以上综合医院和传染病专科医院、各级疾控机构应加强乙肝病毒表面抗原、丙肝抗体、乙肝和丙肝病毒核酸检测能力建设, 同级医疗卫生机构互认检测结果。医疗卫生机构强化实验室质量控制, 定期组织开展实验室检测质量评估。

(七) 强化信息管理和监测评估。依托国家和省统筹区域传染病监测预警和应急指挥信息平台, 建立完善覆盖病毒性肝炎等重大和重点传染病管理信息系统, 充分发挥信息化支撑作用, 按照卫生行业诊断标准正确分类和报告病毒性肝炎病例。加强重点人群和医疗机构哨点监测工作, 及时掌握病毒性肝炎流行情况。强化急性病例和5岁以下儿童病例流行病学调查, 做好乙肝、丙肝耐药及相关不良临床结局监测, 加强分析研判, 指导完善防治策略措施。

(下转第1948页)