

非酒精性脂肪性肝病动物模型的研究进展

郑全喜, 王昆, 刘超*

(江苏省中西医结合医院内分泌科, 南京 210028)

[摘要] 非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一系列除外酒精和其他明确损肝因素所致的, 以肝实质细胞脂肪堆积为主要特征的一组代谢性疾病, 包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化及肝硬化等, 这类疾病与肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗等代谢综合征的相关组分关系密切。查阅了近 10 年内国内外相关文献, 对 NAFLD 动物模型的建立进行了阐述。NAFLD 动物模型主要分为营养、药物或毒物等环境因素诱发模型和基因敲除或基因突变等遗传因素诱发模型。由于目前 NAFLD 的发病机制尚未完全明确, 临床治疗上也缺乏有效措施, 因此, 建立高质量的动物模型对于该疾病的发病机制、药物治疗的研究有着重大意义。

[关键词] 非酒精性脂肪肝病; 脂肪性肝炎; 胰岛素抵抗; 动物模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0357-04

Advance on Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease

ZHENG Quan-xi, WANG Kun, LIU Chao*

(Department of Endocrinology and Metabolism, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) refers to a wide spectrum of disorders that range from simple steatosis to steatohepatitis, advanced fibrosis, and cirrhosis. NAFLD is associated strongly with such components of metabolic syndrome as obesity, diabetes and insulin resistance. To date, the pathogenesis of NAFLD has not been well elucidated, and few effective therapeutic approaches for NAFLD are available. Therefore, the development of animal models of NAFLD is very important in order to enhance our understanding of its pathogenesis.

[Key words] nonalcoholic fatty liver disease; steatohepatitis; insulin resistance; animal model

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一系列除外酒精和其他明确损肝因素所致的, 以肝实质细胞脂肪堆积为主要特征性疾病, 可从发病初的单纯性脂肪肝经非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 发展为肝纤维化 (hepatitis fibrosis), 甚至导致肝硬化 (hepatitis cirrhosis)、肝细胞癌 (hepatocellular

carcinoma, HCC) 及肝功能衰竭等终末期肝病^[1-2]。近年来, 我国的 NAFLD 发病率明显上升, 已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病, 但其发病机制尚未完全阐明。目前认为, 肥胖和胰岛素抵抗是导致非酒精性脂肪肝的重要因素。

动物模型是研究人类疾病的重要手段。目前, 国内外用于科学研究的 NAFLD 动物模型主要分为两类, 即营养、药物或毒物等环境因素诱发模型和基因敲除或基因突变等遗传因素诱发模型^[3-5], 其主要原理均集中在肝内脂肪酸摄入、合成、酯化与氧化分解、输出的不平衡上。本文将从这两方面对 NAFLD 动物模型做一介绍。

1 环境因素诱发模型

环境因素的改变可以影响肝脏细胞脂肪的代谢, 或者增加脂肪的生成, 或者减少脂肪的清除, 这

[收稿日期] 20120723(001)

[第一作者] 郑全喜, 硕士, 研究实习员, 从事内分泌代谢病及并发症发病机制研究, Tel: 025-85608778, E-mail: zqx_cumt@163.com

[通讯作者] * 刘超, 博士, 教授, 从事内分泌代谢病及并发症发病机制研究, Tel: 025-85608778, E-mail: liuchao@nfmcn.com

些因素包括营养、药物、毒物等。

1.1 营养诱发模型

1.1.1 高脂饮食 (high fatty diet, HFD) 模型 HFD 诱导的 NASH 模型多合并肥胖、胰岛素抵抗及其他代谢紊乱,因此,在发病机制上与人类 NASH 最为相似。HFD 配方有多种,均采用增加游离脂肪酸的摄取或合成的方法,其主要差别在于饮食中脂肪占供能物质及高碳水化合物化合物的比例。目前,大鼠是国内最常用的 NAFLD 模型动物,部分实验亦采用小鼠作为研究对象。

大鼠模型:雄性 Wistar 或 Sprague-dawley (SD) 大鼠,以高脂饲料 (基础饲料 + 1% ~ 2% 胆固醇、10% 猪油或 5% 蛋黄粉) 喂养 8 ~ 12 周后可形成中至重度大泡性肝脂肪变,伴谷丙转氨酶 (ALT) 增高,脂肪肝复制率为 100%^[6]。Xu 等^[7]报道,应用 HFD (标准饲料 88 g,猪油 10 g,胆固醇 2 g) 饲养雄性 SD 大鼠,4 周时出现肝脂肪变;8 周时呈现单纯性脂肪肝;12 周时形成脂肪性肝炎,伴 ALT 水平升高;24 周时出现明显窦周纤维化;36 ~ 48 周纤维化加剧,并出现胰岛素抵抗。

小鼠模型:HFD 喂养的 C57BL-6 小鼠可作为复制代谢综合征的较好模型。随年龄增长,该小鼠易形成肥胖、高胰岛素血症、糖耐量受损,给予脂肪占 55% 的饮食喂养 6 月,上述表现加重,并伴小泡或大泡性肝脂肪等组织学改变,同时出现固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP)-1c, SREBP-2 及酰基-辅酶 A 去饱和酶 1 (Acyl-CoA desaturase, ACD) 表达增加^[6]。

HFD 模型制作方法简便、重复性好、价格低廉、动物死亡率低、复制率高,病变有渐进性发展过程,造模停止后病变逆转缓慢便于药物干预研究,为国内外最常用的脂肪肝模型。但该方法也有所用饲料与中国居民以糖类为主的饮食结构有别,饲料中掺入胆固醇、猪油等物质,致使饲料性质发生改变,动物易出现厌食、腹泻,造模所需时间长、病变轻等不足。

1.1.2 胆碱-蛋氨酸缺乏 (choline-methionine deficiency, MCD) 模型 MCD 模型是经典的非酒精性脂肪性肝炎动物模型,主要用于 NSAH 及肝纤维化的机制及药物干预研究。Farrell 等^[8]利用 MCD 饮食喂养雌性 Wistar 大鼠 4 周,并设有等热量喂养酒精性肝炎和自由进食两个对照组,结果提示, MCD 饮食组和等热量喂养酒精性肝炎组具有相同的病理遗传学特性,但营养性脂肪肝的肝再生不受非酒精性脂肪性肝炎形成的影响。MCD 饮食喂养

的大鼠,起始阶段肝组织出现腺泡 3 区严重脂肪变,随后可见以淋巴细胞和多形核白细胞浸润为主的坏死性炎症,最后形成细胞周围及中央静脉周围纤维化^[9]。其造模机制与蛋氨酸、胆碱缺乏导致线粒体 β -氧化功能障碍和极低密度脂蛋白合成减少有关。然而,该模型的缺点是 MCD 饮食价格昂贵,且不符合人类膳食结构。

1.1.3 高碳水化合物饮食诱发模型 高碳水化合物饮食诱发模型形成机制与我国部分人群、尤其是女性不良饮食习惯导致的脂肪肝相似。Zvi 等^[10]给予 SD 大鼠富含果糖的饮食喂养 5 周,结果形成大泡和小泡混合性肝脂肪变。肝内脂肪含量增加 28%,其中,甘油三酯增加 19%,胆固醇增加 89%,伴有高甘油三酯血症和高血压。

1.2 药物诱发模型 药物诱发模型多采用四环素,其主要机制是四环素沉积于肝细胞线粒体,抑制线粒体 DNA 复制,干扰 mRNA 翻译成载脂蛋白,继而影响肝内 TG 的转运及线粒体脂肪酸 β -氧化,诱发肝细胞脂肪变性。Yin 等^[11]给 2 组雄性 CD-1 (ICR) BR Swiss 大鼠一次性口服四环素 0.1 g·kg⁻¹ 或 1 g·kg⁻¹ 后,高剂量组大鼠在 24 h 即可见肝细胞小泡性脂肪变,伴胆固醇、TG 合成增加及脂肪酸 β -氧化受抑制。另有报道称^[12],经四环素单次诱导即可使肝脏 TG 水平增加 270%,并出现小泡性脂肪变。Letteron 等^[13]采用腹腔注射四环素 0.25 mmol·kg⁻¹ 的方法也获得了类似结果。Ito 等^[14]采用高脂饮食 (60% 热卡的脂肪) 喂养 10 周,然后腹腔注射四环素 (30 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 10 d 建立了模拟“二次打击”学说的 C57BL/6 小鼠脂肪性肝炎模型。小鼠肝内 TG 含量显著增加,多种炎症细胞因子基因表达增强,血清 ALT 水平增高,肝组织学观察见多灶性炎症细胞浸润。

1.3 毒物诱发模型 毒物诱发模型常采用四氯化碳 (CCl₄),其主要机制可能与 CCl₄ 诱导 CYP2E1 激活及严重脂质过氧化反应造成肝细胞结构和功能破坏有关。Chung 等^[15]给大鼠皮下注射 CCl₄ 0.5 mL·kg⁻¹,每周 3 次,短时间内即可观察到中央静脉周围中重度大泡性肝细胞脂肪变,伴炎症及坏死;6 周可出现肝纤维化;12 周可见肝硬化。

2 遗传学因素模型

肝脏细胞脂肪的生成与清除受多种基因的调控。这些基因的突变、缺失、过度表达或修饰都可影响脂肪的代谢,增加肝脏脂肪的生成或减少肝脏脂肪的清除,从而形成脂肪肝。人为地对动物的基因进行这方面的干预,就可造出特定的脂肪肝动物

模型。

2.1 肝脏脂肪生成增加模型 Soga 等^[16]通过同系交配方法建立了一种无过度摄食、不出现肥胖和糖尿病而伴有脂肪肝的新品种,命名为 FLS (fatty liver shionogi)。新生 FLS 小鼠全小叶肝细胞内均含有脂滴。随鼠龄增长,脂滴进行性增大,肝内甘油三酯 (triglyceride, TG) 的含量为正常小鼠的 5 倍,伴血清天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 增高,并易自发形成肝细胞癌,可作为肝脂肪变发生肝癌的病因学研究模型之一。Boison 等^[17]研究发现,肝脏高水平表达的腺苷激酶 (adenokines, ADK) 能有效转化腺苷为一磷酸腺苷,以保持腺嘌呤核苷酸的正常水平,并在腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移、腺苷酸的排除过程中具有重要作用。

Ob/ob 小鼠存在 ob 基因 (瘦素编码基因) 自发突变,使得瘦素合成障碍,出现许多与人类 NAFLD 一致的特征,与人类 NAFLD 不同,ob/ob 小鼠虽有明显胰岛素抵抗,但不能自发地由单纯性脂肪肝发展至 NASH,只有在给予 MCD 饮食或 HFD 或在内毒素、酒精、缺血再灌注损伤等损肝因素的“二次打击”下,方可演变为显著 NASH,并见促炎与抑炎细胞因子失衡,甚至动物可出现急性死亡,这表明脂肪变使肝脏易于遭受氧化应激及活性氧 (reactive oxidative species, ROS) 介导的损伤^[6]。

2.2 肝脏脂肪清除减少模型 幼年内脏脂肪变小鼠 (juvenile visceral steatosis mouse, JVS) 存在原发性肉碱缺乏,使脂肪酸转运入线粒体的过程受阻,脂肪酸在肝细胞浆内积聚,小鼠在幼龄时即出现脂肪肝^[18]。Jones 等^[19]通过芳香酶基因 Cyp9 敲除 (aromatase knockout, ArKO) 的方法建立了小鼠脂肪肝模型,ArKO 小鼠不能合成内源性雌激素,无论雌性或雄性鼠,腹腔内脂肪细胞的体积和数量显著高于野生型同窝鼠,提示雌激素在维持脂肪代谢中具有重要作用。过氧化物酶体增生物激括受体 (PPAR) 是肝内富含的参与调节线粒体和过氧化物酶体 β 氧化的基因转录的转录因子,可调节肝脏等组织的 ATP 的产生。PPAR 基因缺失的小鼠随年龄表现为肥胖和脂肪肝。

脂肪酸转位酶 (FAT/CD36) 是介导长链脂肪酸跨膜转运的重要膜蛋白,主要表达于外周的肌肉及脂肪组织^[17]。FAT/CD36 缺失小鼠脂肪酸储存和利用减少 60% 以上,循环中脂肪酸及 TG 水平显著上升,过多的脂肪酸转运至肝脏,超过其 β -氧化能

力,引起肝脏脂质代谢紊乱及胰岛素抵抗,形成脂肪肝^[20-21]。

线粒体三功能蛋白酶 (mitochondrial trifunctional protein, MTP) 是线粒体脂肪酸 β -氧化的关键酶。研究发现^[22-23],杂合子若存在 MTP α 亚单位突变,血清 ALT 水平随年龄增长进行性升高,9 ~ 10 月时出现肝脂肪变、高胰岛素血症、胰岛素抵抗及糖耐量受损。该小鼠在表型上与人类 NAFLD 很相似,并伴有肝脏氧化应激增强,主要体现在超氧化物歧化酶抗氧化活性增加、谷胱甘肽 (glutathion, GSH) 水平降低及 CYP2E1 表达增强。

3 结语

HFD 模型模拟了人类 NASH 的致病机制,能出现胰岛素抵抗、代谢综合征等全身代谢紊乱表现,肝脏病变多具有渐进性发展的特点,但其成型时间较长,NASH 及纤维化程度还取决于动物品系、饮食中脂肪所占比例及诱导时间长短。MCD 饮食模型虽能产生典型的 NASH 和肝纤维化的组织学改变,但不符合人类 NASH 患者的膳食结构,不能复制代谢综合征,且动物出现体质量减轻正好与人类肥胖相关 NASH 相反。药物或毒物诱导模型具有成型时间短、方法简便、病变明显等特点,但其最大缺陷是未出现肥胖和胰岛素抵抗,这与人类 NAFLD 的病理生理特点差异较大,且动物肝损伤严重,死亡率高。特殊品系动物模型因基因突变或缺失,引起脂肪酸代谢障碍,能自发形成脂肪肝,且伴肥胖、胰岛素抵抗等代谢综合征相关组分,易形成 HCA 或 HCC,但多缺乏 NASH 和肝纤维化的自然演变过程,仅适合 NAFLD 特定发病机制的研究。

因此,不同致病因素所致脂肪肝动物模型的形成机制及病理改变各异,根据实验研究的需求,可选择符合人类脂肪肝形成过程及病变特征,模型形成快,动物死亡率低,复制率高,重复性好,方法较简便的动物模型进行相关研究。另外,为了弥补环境因素诱发模型和遗传因素模型的表型均与人类 NASH 存在一定差异,不能完全涵盖人类 NAFLD 的疾病谱及发病机制的不足,在遗传因素模型的基础上联合应用营养、药物诱发模型建立复合模型,可以使新模型的表型与人类 NAFLD 更接近,并能反映疾病从单纯性脂肪肝向 NASH 进展,NASH 向肝纤维化进展的过程。此复合模型最大程度地模拟了人类 NAFLD 的复杂性,病理变化显著,是一种极具潜力的 NASH 模型。

国内外学者经过数十年的努力,使 NAFLD 动物模型的研究有了很大进展,许多动物模型已用于

NAFLD 发病机制及药物防治的研究中,并取得一定成绩,但至今仍缺乏能涵盖人类 NAFLD 整个疾病谱的单一动物模型。今后的研究应更多地致力于纯系动物的培养及营养饮食配方的改良,并引进新技术探索新的造模方法,使动物模型更符合人类疾病的特点及研究的需要。此外,尚需建立统一的动物模型标准评价体系,更客观地反映动物模型的复制率、稳定性及科研应用价值。总之,建立更理想的动物模型,为科研提供高质量的研究材料,有助于广大学者对 NAFLD 进行更深入的研究,最终阐明其发病机制。

[参考文献]

- [3] Alina P, Ralucais, Vlad R. An overview of nonalcoholic steatohepatitis: past, present and future directions [J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2010, 19(4): 415.
- [4] 翁小刚,朱晓新,杨庆,等. 非酒精性脂肪肝的实验研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(11): 104.
- [5] London R, George J. Pathogenesis of NASH: animal models [J]. *Clin Liver Dis*, 2007, 11(1): 55.
- [6] 徐芳,刘颖,王斌胜,等. 调脂合剂对大鼠高脂血症性脂肪肝的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 267.
- [7] 齐艳平,李曼,孙学华,等. 参葛方防治大鼠非酒精性脂肪肝的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(12): 156.
- [8] Anstee Q M, Goldin R D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research [J]. *Int J Exp Pathol*, 2006, 87(1): 1.
- [9] Xu Z, Fan J, Ding X, et al. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(4): 931.
- [10] Zhang B H, Weltman M, Farrell G C. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(2): 133.
- [11] Fan J, Qiao L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(3): 233.
- [12] Zvi A, Mor O, Maria G, et al. Fructose-induced fatty liver disease hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction [J]. *Hypertension*, 2005, 45(5): 1012.
- [13] Yin H Q, Kim M, Kim J H, et al. Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 94(1): 206.
- [14] Nanji A A. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis [J]. *Clin Liver Dis*, 2004, 8(3): 559.
- [15] Letteron P, Sutton A, Mansouri A, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice [J]. *Hepatology*, 2003, 38(5): 133.
- [16] Ito M, Suzuki J, Sasaki M, et al. Development of nonalcoholic steatohepatitis model through combination of high-fat diet and tetracycline with morbid obesity in mice [J]. *Hepatol Res*, 2006, 34(2): 92.
- [17] Chung H, Hong D P, Kim H J, et al. Differential gene expression profiles in the steatosis/fibrosis model of rat liver by chronic administration of carbon tetrachloride [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 208(3): 242.
- [18] Soga M, Kishimoto Y, Kawaguchi J, et al. The FLS mouse: a new inbred strain with spontaneous fatty liver [J]. *Lab Anim Sc*, 1999, 49(6): 269.
- [19] Hatsugai K, Ohkohchi N, Fukumori T, et al. Mechanism of primary graft non-function in a rat model for fatty liver transplantation [J]. *Transpl Int*, 2000, 13(1): 583.
- [20] Shekhawat P, Yang H, Benne I, et al. Carnitine content and expression of mitochondrial beta-oxidation enzymes in placentas of wild-type (OCTN2 +/+) and OCTN2 NuU (OCTN2/-) mice [J]. *Pediatr Res*, 2004, 56(3): 323.
- [21] Jones M E, Thorburn A W, Britt K L, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 79(1/5): 3.
- [22] Goudriaan J R, Boer M A, Rensen P C, et al. CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(6): 2175.
- [23] Goudriaan J R, Dahlmans V E, Teusink B, et al. CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice [J]. *J Lipid Res*, 2003, 44(3): 2270.
- [24] Ibdah J A, Perlegas P, Zhao Y, et al. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(8): 1381.
- [25] Wei Y, Rector R S, Thyfault J P, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(6): 193.

[责任编辑 邹晓翠]