

马全鑫,张利棕,戎亦骊,等. 新型高脂血症易感(WSHc)大鼠非酒精性脂肪肝病模型的建立与病理特点研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 314-322.

Ma QX, Zhang LZ, Rong YL, et al. Establishment and pathological characteristics of a non-alcoholic fatty liver disease model in a new type of hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 314-322.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.004

# 新型高脂血症易感(WSHc)大鼠非酒精性脂肪肝病模型的建立与病理特点研究

马全鑫<sup>1</sup>,张利棕<sup>1</sup>,戎亦骊<sup>1</sup>,何蒙娜<sup>2</sup>,郁晨<sup>1</sup>,蔡月琴<sup>1</sup>,陈民利<sup>1\*</sup>

(1. 浙江中医药大学,动物实验研究中心/比较医学研究所,杭州 310053)

2. 浙江大学医学院附属第一医院,超声医学科,杭州 310003)

**【摘要】 目的** 利用一种新型的高脂血症易感(WSHc)大鼠建立非酒精性脂肪肝病(NAFLD)模型,观察其血液生化指标变化及病理特点,探讨其应用与科研价值,为NAFLD疾病动物模型提供新的选择。**方法** 20只7~8周龄的WSHc大鼠,随机平均分为2组,分别饲喂普通饲料和高脂饲料;另取20只同周龄的Wistar大鼠,采取相同处理方式分组作为品系对照。持续饲喂12周后,检测血清TC、TG、ALT和AST水平,并进行弹性超声成像。处死动物后取肝进行HE、油红O、Masson和免疫荧光染色,观察各组大鼠肝大体细胞形态、脂质沉积、炎症反应和纤维化情况,分析高脂饲喂后WSHc大鼠肝的病变特点。**结果** 与饲喂高脂饲料的Wistar大鼠比较,WSHc大鼠经高脂诱导后,血清总胆固醇显著升高并与临床高脂血症患者接近;肝脂质异常沉积并形成大泡性脂滴;脂滴周围有炎症细胞浸润形成炎症灶,巨噬细胞增多;可见散在的纤维化病变。然而,这些病理变化在高脂诱导的Wistar大鼠肝组织中并未发现。**结论** 相较于Wistar大鼠,WSHc大鼠高脂诱导后血脂与肝酶接近临床水平,肝组织中有更严重的脂质沉积和炎症反应,且伴有散在的肝纤维化,因此可作为一种新的、理想的NAFLD动物模型。

**【关键词】** 高脂血症易感大鼠,WSHc大鼠,非酒精性脂肪肝病,动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)03-0314-09

## Establishment and pathological characteristics of a non-alcoholic fatty liver disease model in a new type of hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rats

MA Quanxin<sup>1</sup>, ZHANG Lizong<sup>1</sup>, RONG Yili<sup>1</sup>, HE Mengna<sup>2</sup>, YU Chen<sup>1</sup>, CAI Yueqin<sup>1</sup>, CHEN Minli<sup>1\*</sup>

(1. Animal Experimental Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. Department of Ultrasound Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003)

Corresponding author: CHEN Minli. E-mail: cml991@zcmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To establish a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rat model in a new type of hyperlipidemia (WSHc) rat. We observed the pathological characteristics of the NAFLD model and explored possible research applications, as well as new options for animal models of NAFLD. **Methods** 20 WSHc rats aged 7 - 8 weeks were randomly divided into 2 groups according to whether they would receive a common diet or high-fat diet. Another 20

**【基金项目】** 国家卫生计生委科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技计划项目(2016149056),浙江省自然科学基金(LQ20H180013)。

Funded by National Health Planning Commission Scientific Research Fund-Zhejiang Medical and Health Major Science and Technology Plan Project (2016149056), Zhejiang Natural Fund (LQ20H180013).

**【作者简介】** 马全鑫(1988—),男,实验师,研究方向:实验动物与中药药理。Email:mqx1025@hotmail.com

**【通信作者】** 陈民利(1963—),女,教授,研究方向:实验动物与比较医学。Email:cml991@zcmu.edu.cn

Wistar rats of the same age were then grouped as a strain control, and received the same treatment. After 12 weeks of continuous feeding, blood samples were taken to detect blood biochemical indicators and elastic ultrasound imaging was performed. After execution of the animals, the liver tissue was subjected to HE, oil red "O", Masson, and immunofluorescent staining, and the general cell morphology, lipid performance, inflammatory response, and liver fibrosis stage in each group were observed. The lesion characteristics of the liver of WSHc rats after a high-fat diet were analyzed.

**Results** Compared with Wistar rats on a high-fat diet, WSHc rats showed a significant increase in serum total cholesterol, similar to that seen in patients with clinical hyperlipidemia. We also found that liver lipids were abnormally deposited to form lipid droplets, and that inflammatory cells positioned around the lipid droplets formed an inflammatory lesion. Further, we observed an increase in macrophages and instances of scattered fibrosis. These pathological changes were not found in the liver tissue of high-fat-exposed Wistar rats. **Conclusions** Compared with conventional rats, WSHc rats on a high-fat diet represent a more clinically similar NAFLD animal model, which is characterized by blood biochemical indicators, a severe inflammatory response, and sporadic liver fibrosis approaching clinical levels.

**【Keywords】** hyperlipidemia susceptible rats, wshc rats, non-alcoholic fatty liver disease, animal model

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

全球代谢综合征患病率不断上升同时,非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)成为全球最常见的慢性肝病之一<sup>[1]</sup>。导致NAFLD的主要危险因素包括肥胖、2型糖尿病及血脂异常与代谢综合征,其发病机制复杂且目前尚不明确<sup>[2]</sup>。动物模型是研究疾病发病机制、研发治疗药物以及研究防治策略的重要环节。目前已有多种NAFLD动物模型,主要分为膳食动物模型、遗传动物模型和药物诱导模型<sup>[3]</sup>。迄今为止,大多数这些模型的共同之处在于有肝脂质积聚,但没有明显的炎症和纤维化<sup>[4]</sup>。

大小鼠是最常用的实验动物,遗传信息明确且易于获得。但大小鼠模型血清血脂水平、脂蛋白构成、脂质代谢过程与人类存在较大差异,耐受高脂,极难形成肝纤维化<sup>[5]</sup>。Wistar-SD高脂血症易感(Wistar-SD Hyperlipidemia, WSHc)大鼠是本动物实验研究中心发现并培育研究的一种特色实验动物品系。该品系来源于一只自发性突变的Wistar大鼠,这只大鼠经高脂饲料诱导后,血清TC浓度高达20.26 mmol/L。将其与SD大鼠杂交后进行保种传代,经过不断选育,培育至第四代时雌性WSHc大鼠经高脂饲喂2周时,血清TC值大于5.0 mmol/L的发生率约为80%,并在第8周时达到血脂峰值,始终处于高于临床诊断标准的高血脂状态,且易形成心功能受损和早期动脉粥样硬化等心血管并发症<sup>[6]</sup>。该大鼠具有特殊的脂代谢模式,对高脂血症及相关并发症易感,是具有潜力的脂代谢相关疾病的动物模型。

基于此,本研究取培育的第五代WSHc大鼠,筛

选高脂血症易感的雌性大鼠,通过高脂饲料诱导建立WSHc大鼠NAFLD疾病模型,观察该模型肝脂质沉积、炎症反应、纤维化程度,明确该模型发病的一般规律和病理特点,分析其应用与科学价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF级20只7~8周龄雌性Wistar大鼠,来源于上海斯莱克实验有限公司【SCXK(沪)2017-0005】;20只雌性7~8周龄WSHc大鼠,本课题组繁殖,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障实验室【SYXK(浙)2018-0012】,环境温度:(22±2)℃,相对湿度:50%~60%,光照:12 h/12 h明暗交替,噪声<50 dB;在IVC笼内饲养,自由饮食。在实验过程中按“3R”原则给予人道的关怀。浙江中医药大学实验动物伦理审查委员会通过,决议编号:IACUC-20181126-02。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerides, TG)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂,均购自上海申能德赛诊断技术有限公司;苏木色精,购自上海伯奥生物科技有限公司;曙红Y,购自国药集团化学试剂有限公司;天狼星红染色试剂盒,购自Servicebio公司;油红O染料,购自SIGMA公司;CD68抗体,购自美国Santa Cruz公司;Mounting Medium With DAPI,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。普通基础饲

料购自南京爱立默科技有限公司,辐照全营养颗粒饲料。高脂饲料配方:胆固醇 1%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、3 号胆盐 0.5%、基础饲料 78.5%。

Aixplorer 超声成像仪(法国,声科公司);7020 全自动生化分析仪(日本,日立公司);HM335E 半自动石蜡切片机(德国,Microm 公司);Nana Zoomer 2.0RS 数字切片扫描设备(日本,滨松公司);自动染色机(德国,Leica 公司);VS120-S6-W 数字病理切片(荧光)扫描分析仪(日本,Olympus 公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 动物模型的建立

取 20 只 7 ~ 8 周龄的 SPF 级雌性 Wistar 大鼠,随机分为 2 组,分别饲喂普通饲料(standard chows, SC)和高脂饲料(high-fat diet, HFD),每组 10 只,即 Wistar + SC 组和 Wistar + HFD 组。取本中心培育的第五代 7 ~ 8 周龄的雌性 WSHc 大鼠,筛选 10 只高脂诱导 2 周后 TC 水平在 5.0 ~ 9.0 mmol/L 之间的大鼠(发病率约为 80%),为 WSHc + HFD 组,另取 10 只雌性 WSHc 大鼠饲喂普通饲料,即 WSHc + SC 组,持续饲喂高脂饲料时间为 12 周。

### 1.2.2 血液生化检测

动物禁食 12 h,颌下静脉取血,3000 r/min 离心 10 min,分离血清,全自动生化仪检测 TC、TG、ALT、AST 含量。

### 1.2.3 超声瞬时弹性成像检测

使用 Aixplorer 超声成像仪进行实时剪切波检测,Fr 12 Hz 探头,每只动物反复测量肝最大叶 5 次,每次均包括该区的硬度及速度的最大值、最小值和平均值,将 5 次所得数据统计平均值作为最终实验数据。

### 1.2.4 肝大体与病理组织学观察

实验结束后,对大鼠实施安乐死,称取体重与肝重。取大鼠肝最大叶,一式三份,一部分经中性甲醛固定后,常规脱水、石蜡包埋后切片,行 HE 染色,在光镜下观察病变情况;一部分用冰冻切片包埋剂包埋,冰冻切片后,油红 O 染色,观察脂质沉积程度,使用 Masson 染色观察肝纤维化程度;另一部分冻存,用于肝脂质含量测定。

### 1.2.5 肝脂质含量检测

取同部位肝组织 200 mg 左右,并记录重量,加 2 mL 氯仿/甲醇(2:1)混合液,使用生物样本均质机匀浆。4500 r/min 离心 10 min。将上清相转移到新

的离心管中,并加 0.2 倍体积的生理盐水,摇晃 10 min。2000 r/min 离心 5 min,分层。将下层含油脂的液相小心的转移到新的试管中,蒸发至液体挥干(过夜)。用 2 mL 含 10% TritonX-100 的异丙醇溶液溶解油脂。用试剂盒测定溶液中 TC、TG 的浓度,并根据称取的组织重量计算肝 TC、TG 含量。

### 1.2.6 非酒精性脂肪肝活动性(Non-alcoholic fatty liver activity score, NAS)评分

参照美国 NASH 临床研究协作网推荐的半定量诊断方式,对肝的脂肪变性、小叶炎症和肝细胞气球样变 3 项组织学特征进行评分,进而评估脂肪肝受损的严重程度<sup>[7]</sup>。并依据纤维化的范围和形态,分为 4 级(0 ~ 3):0 分(无纤维化);1 分(小叶内局灶性或广泛的窦周/细胞周纤维化);2 分(纤维化扩展到门管区,局灶性或广泛的门管区星芒状纤维化);3 分(纤维化扩展到门管区周围,局灶性或广泛的桥接纤维化)。4 项得分相加即为 NAS 评分总分。

### 1.2.7 巨噬细胞免疫荧光染色

取石蜡切片,脱蜡至水,经修复后,加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液。将稀释后的 CD68 抗体覆盖组织,切片平放于湿盒内,37℃ 孵育 2 h 后,洗涤,加入荧光二抗,37℃ 孵育 1 h 后 DAPI 染色封片,其中激活的巨噬细胞呈红色荧光,蓝色荧光为细胞核。

## 1.3 统计学分析

所有数据用平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 22.0 软件进行 Student *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

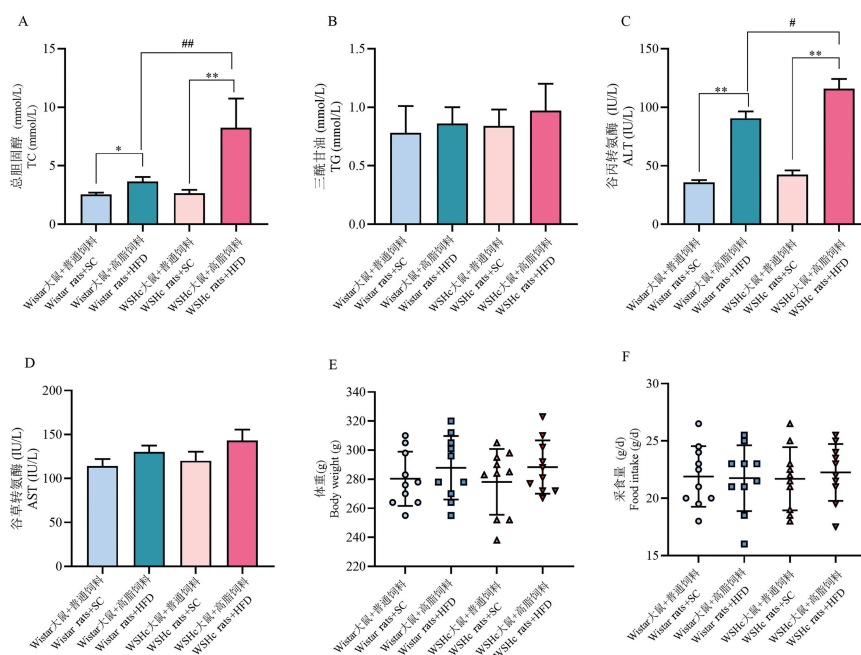
## 2 结果

### 2.1 WSHc 大鼠一般体征与血液生化变化情况

如图 1 所示,高脂诱导 12 周后,各组大鼠体重与采食量无显著差异( $P > 0.05$ ),与对应品系的正常对照组大鼠比较,WSHc + HFD 组与 Wistar + HFD 组大鼠血清 TC 与 ALT 水平均显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且 WSHc + HFD 组 TC 与 ALT 显著高于 Wistar + HFD 组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。各组之间 TG 与 AST 差异不具有显著性( $P > 0.05$ )。

### 2.2 WSHc 大鼠肝弹性成像的变化

由图 2 可见,与对应品系的正常对照组大鼠比较,WSHc + HFD 组肝弹性模量值与剪切波穿透速度显著增加( $P < 0.05$ ),而 Wistar + HFD 组变化无

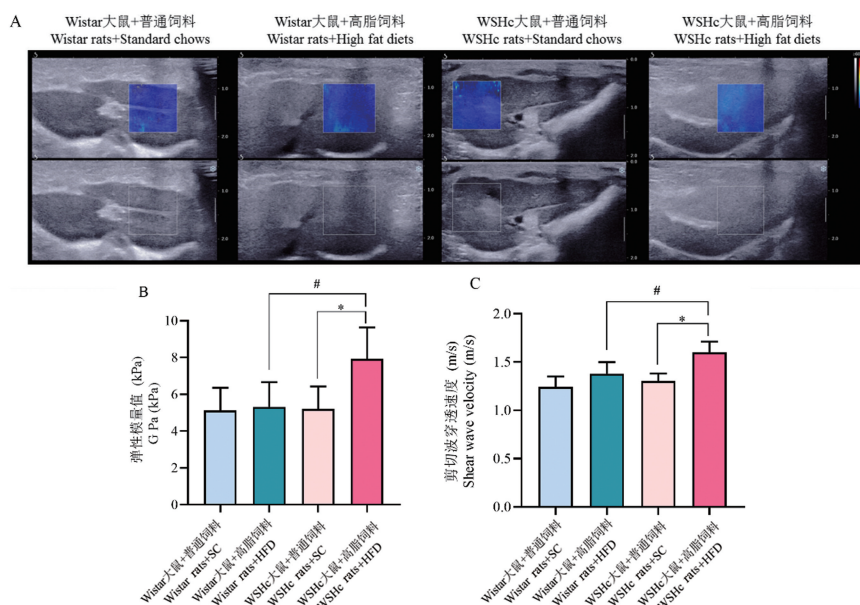


注:A:各组大鼠 TC 含量的变化;B:各组大鼠 TG 含量的变化;C:各组大鼠 ALT 水平的变化;D:各组大鼠 AST 水平的变化;E:各组大鼠体重;F:各组大鼠采食量。与普通饲料组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;高脂饲料饲喂的两组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 各组大鼠一般体征与血液生化变化

Note. A, Changes of TC content of rats in each group. B, Changes of TG content of rats in each group. C, Changes of ALT content of rats in each group. D, Changes of AST content of rats in each group. E, Body weight of rats in each group. F, Food intake of rats in each group. Compared with the ordinary feed group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with the two groups fed with high-fat diet, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ . (The same in the following Figures)

Figure 1 Changes in the general signs and biochemicals of the blood of rats in each group



注:A:各组大鼠肝弹性成像的变化;B:各组大鼠肝弹性模量值的变化;C:各组大鼠肝剪切波穿透速度的变化。

图 2 各组大鼠肝弹性成像与定量分析

Note. A, Changes of weight in ZDF rats. B, Changes in liver elasticity modulus values of rats in each group. C, Changes in the rate of shear wave penetration of rats in each group.

Figure 2 Liver elasticity imaging and quantitative analysis of rats in each group

显著统计学差异( $P > 0.05$ ),说明饲喂高脂饲料的 WSHc 大鼠肝硬度增加。

### 2.3 WSHc 大鼠肝大体观察与脂质含量的变化

由图 3 可见,饲喂普通饲料的 Wistar 与 WSHc 大鼠肝均未见异常,Wistar + HFD 组大鼠肝呈淡黄色,有红色点状散在,稍显油腻;WSHc + HFD 组大鼠肝呈灰黄色,表面油腻。经定量检测后发现,Wistar + HFD 组与 WSHc + HFD 组肝中 TC、TG 含量与肝系数均显著增加( $P < 0.01$ ),且 WSHc + HFD 组脂质含量略高于 Wistar + HFD 组,但差异不具有显著性( $P > 0.05$ )。(见图 3)

### 2.4 WSHc 大鼠肝病理学变化

#### 2.4.1 WSHc 大鼠肝常规病理染色及评分

饲喂普通饲料的 Wistar 与 WSHc 大鼠肝组织结构清晰,小叶中央静脉结构完好,肝索排列整齐,肝窦清晰可见,肝细胞形态正常,胞浆红染,汇管区清晰可见。WSHc + HFD 组与 Wistar + HFD 组肝小叶结构边界不清,肝细胞排列紊乱,索状结构消失,大量肝细胞浊肿,出现小泡性脂肪变性,且 WSHc + HFD 组出现较多炎症细胞浸润,见图 4A。

与对应品系的正常对照组大鼠比较,WSHc +

HFD 组与 Wistar + HFD 组大鼠肝组织脂肪变性、炎症程度、气球样变和纤维化评分均显著升高( $P < 0.01$ ),且 WSHc + HFD 组炎症程度和纤维化程度显著高于 Wistar + HFD 组( $P < 0.05$ ),脂肪变性和气球样变差异不具有显著性( $P > 0.05$ ),见图 4B。

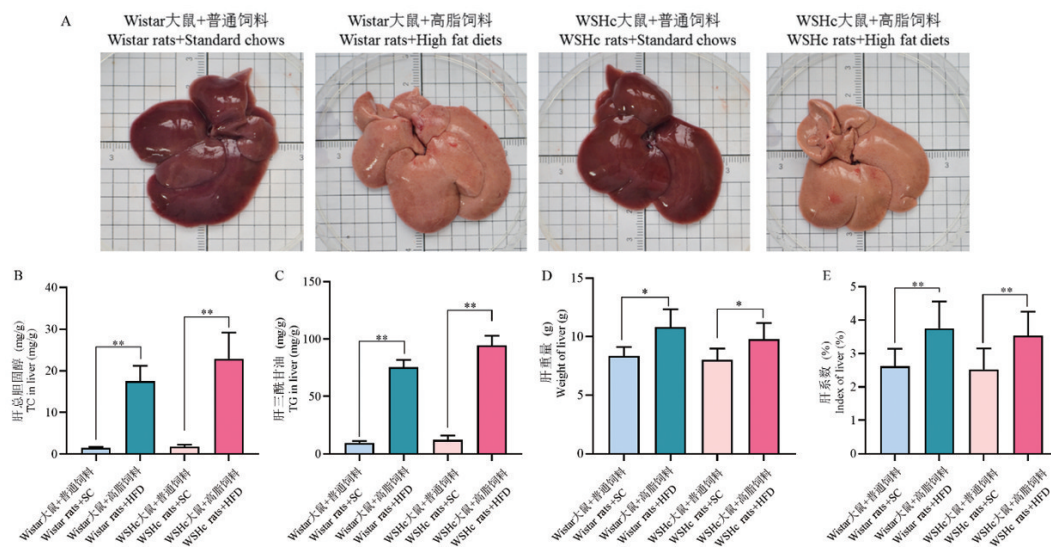
#### 2.4.2 WSHc 大鼠肝油红 O 染色与 Masson 染色

油红 O 染料可与脂质结合,呈红色。由图 5A 可见,饲喂普通饲料的 Wistar 与 WSHc 大鼠肝均未见阳性染色,Wistar + HFD 组肝阳性染色呈小颗粒散在分布,WSHc + HFD 组肝阳性染色汇聚成较大颗粒。

Masson 染色中,胶原沉积呈蓝色。由图 5B 可见,饲喂普通饲料的 Wistar、WSHc 大鼠及 Wistar + HFD 组大鼠肝均未见异常胶原沉积,WSHc + HFD 组肝小叶内可见局灶性的窦周胶原沉积存在。

#### 2.4.3 WSHc 大鼠巨噬细胞染色结果

如图 6 所示,CD68 标记激活的巨噬细胞。免疫荧光结果可见,饲喂普通饲料的 Wistar 与 WSHc 大鼠肝 CD68 阳性表达较少,Wistar + HFD 组与 WSHc + HFD 组阳性表达显著增多,且 WSHc + HFD 组阳性表达显著多于 Wistar + HFD 组。

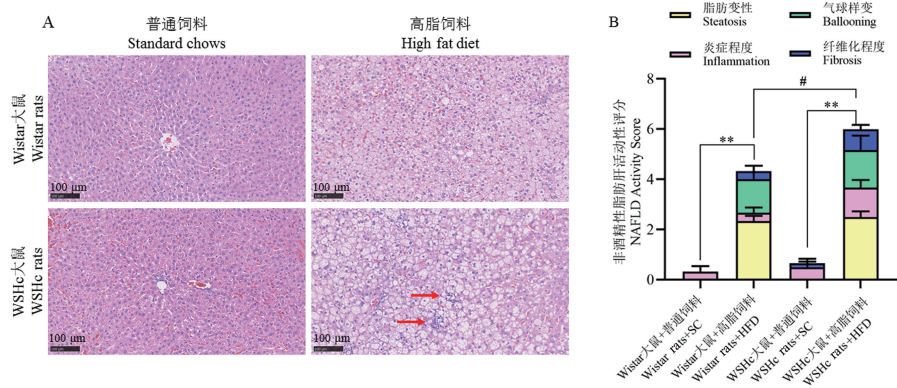


注:A:各组大鼠肝大体观察;B:各组大鼠 TC 含量的变化;C:各组大鼠 TG 含量的变化;D:各组大鼠肝重量的变化;E:各组大鼠肝系数的变化。

图 3 各组大鼠肝大体与脂质含量变化

Note. A, Livers in each group of rats were generally observed. B, Changes in TC content of rats in each group. C, Changes in TG content of rats in each group. D, Changes in liver weight of rats in each group. E, Changes in liver index of rats in each group.

Figure 3 Changes in the gross and lipid content of liver in each group of rats

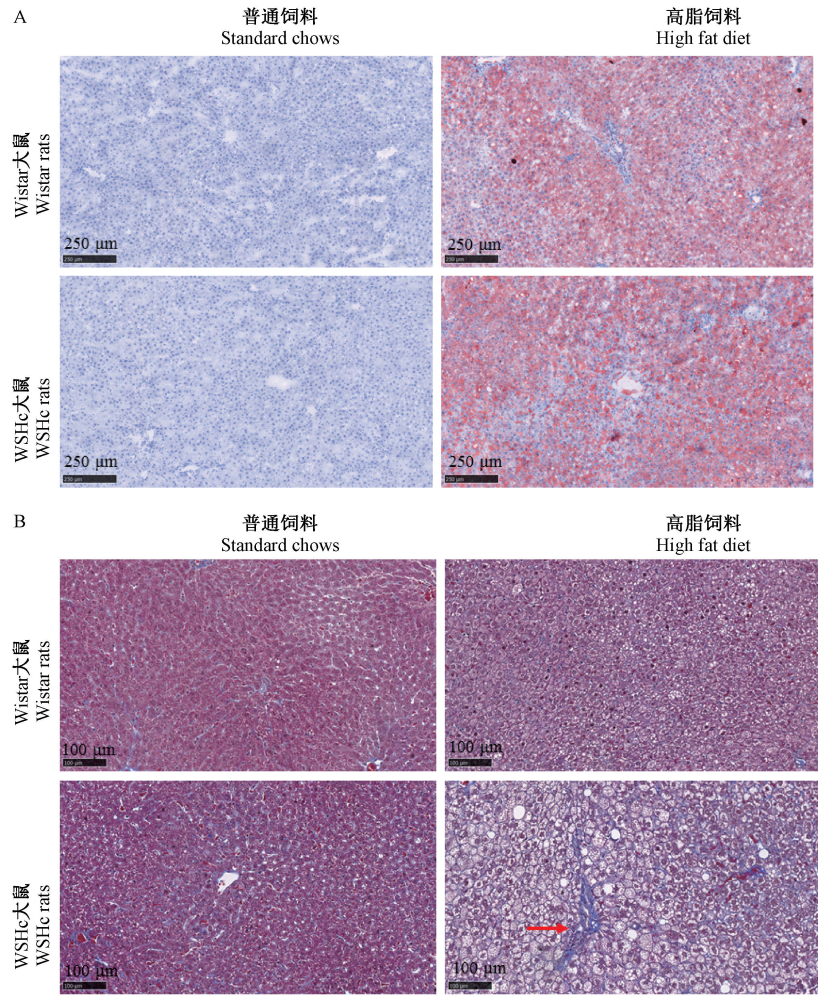


注:A:各组大鼠肝 HE 染色),红色箭头所指为炎症细胞浸润;B:各组大鼠 NAS 评分。

图 4 各组大鼠肝 HE 染色结果与 NAS 评分

Note. A, HE staining of liver in each group of rats, the red arrow refers to inflammatory cells immersion. B, NAS score of rats in each group.

Figure 4 HE staining results and NAS score of liver in each group of rats



注:A:各组大鼠肝油红 O 染色;B:各组大鼠肝油红 Masson 染色,红色箭头所指为胶原沉积。

图 5 各组大鼠肝特殊染色结果

Note. A, Oil red “O” staining of liver in each group of rats. B, Oil red Masson staining of liver in each group of rats, the red arrow refers to collagen deposition.

Figure 5 Special staining results of liver in each group of rats

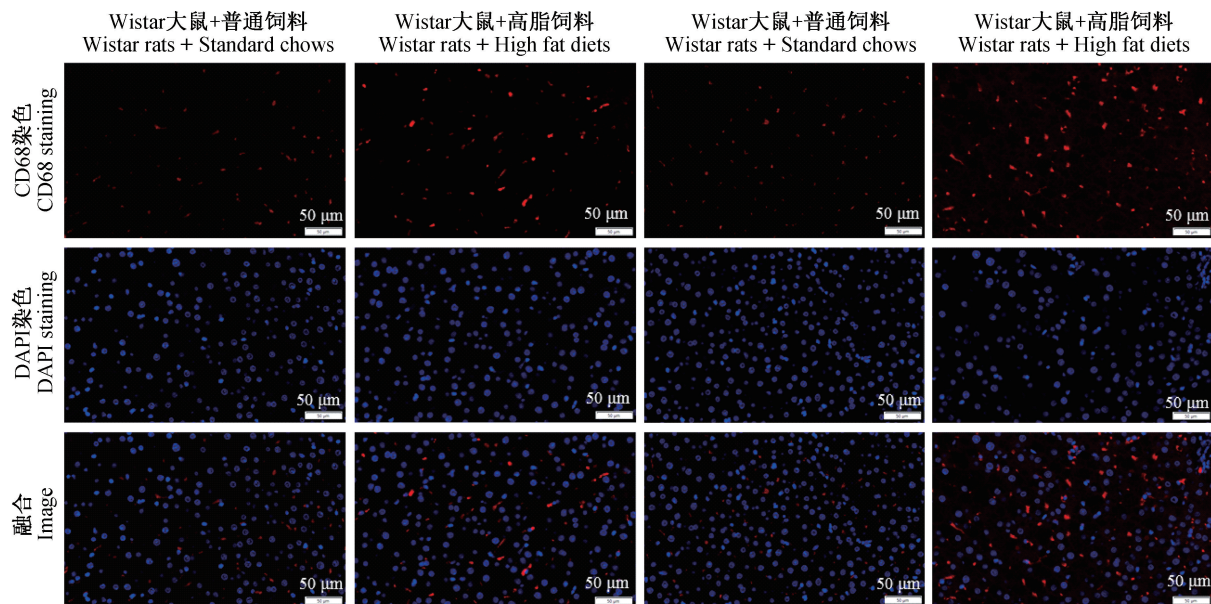


图 6 各组大鼠肝巨噬细胞染色结果

Figure 6 Macrophage staining results of liver in each group of rats

### 3 讨论

NAFLD 是全球最常见的慢性肝病,普通成人 NAFLD 患病率介于 6.3% ~ 45%<sup>[8]</sup>。NAFLD 的病理生理过程目前尚不能完全阐述,理想的动物模型在研究 NAFLD 的发病机制中发挥重要作用。然而,目前常用的大小鼠动物模型均无法较好的模拟人类 NAFLD 的发生发展和病理特征<sup>[9]</sup>。Wistar-SD 高脂血症易感(WSHc)大鼠是本动物实验研究中心目前自主培育并研究的一个大鼠新品系,来源于本课题组偶然发现的一只 Wistar 大鼠,该大鼠经 4 周高脂饲料诱导后血清 TC 浓度高达 20.26 mmol/L,而此时同一批次的其余 Wistar 大鼠 TC 平均值仅为  $(2.20 \pm 0.34)$  mmol/L。将该大鼠与 SD 大鼠交配后进行保种传代,目前已形成一定数量的封闭群。该群第四代大鼠经过高脂诱导后,约 75% 的雌性大鼠 TC 水平在 5.0 ~ 14.9 mmol/L 之间,虽然低于始发现的大鼠,却依然具有高胆固醇血症的特性,并能长期保持稳定<sup>[6]</sup>。而雄性大鼠 TC 水平与常规大鼠无显著差异。提示 WSHc 大鼠存在性别差异,遗传模式可能为伴性遗传。本课题组对 WSHc 大鼠肝基因表达分析时发现,WSHc 大鼠肝 Srebp1 基因表达异常升高。文献报道,Srebp1 在肝脂质代谢中起关键作用,持续高表达会加速 NAFLD 的发生<sup>[10]</sup>。由此可见,WSHc 大鼠作为高脂血症易感大鼠,具有

独特的脂代谢模式,在 NAFLD 模型的建立和应用方面具有一定的优势和潜力。本研究通过高脂饲料诱导建立 WSHc 大鼠 NAFLD 疾病模型,检测血液生化并观察病理特征,分析高脂诱导 WSHc 大鼠 NAFLD 模型的特点和价值。

血脂紊乱是 NAFLD 的重要危险因素<sup>[11]</sup>。NAFLD 患者肝内游离脂肪酸氧化增加,肝糖原利用受到抑制,表现为脂质成分在肝细胞中沉积,进一步发生血脂紊乱<sup>[12]</sup>。本实验研究发现,Wistar 大鼠经高脂诱导后,TC 水平有一定程度的上升,但与临床上的高脂血症标准相距甚远。而 WSHc 大鼠经高脂诱导后,TC 平均水平能达到 8.0 mmol/mL 以上,表明高脂环境下,WSHc 大鼠血脂水平较常规大鼠更接近临床,推测其原因可能是 WSHc 大鼠经高脂诱导发生了肝细胞损伤。ALT 与 AST 在肝细胞中承担转运氨基酸的作用,两者均是肝细胞损伤的标记物。临床研究发现,NAFLD 患者与严重的肝纤维化患者血清 ALT 水平均显著高于正常人群,且 ALT/AST 比值异常<sup>[13]</sup>。本研究发现,WSHc 大鼠经高脂诱导后,ALT 水平显著上升,而在 Wistar 大鼠中未见这一现象,提示高脂环境下,WSHc 大鼠更易发生肝细胞损伤。

NAFLD 涉及一系列广泛的肝组织病理变化,如脂质异常沉积、炎症细胞浸润和纤维化,根据肝不同病理变化进行疾病分期诊断依然是目前临床诊

断的金标准。肝脂质沉积是 NAFLD 最具特征性的病变,病症不同阶段,脂质沉积的部位和数量不同。临床研究表明<sup>[14]</sup>,在单纯肝脂质沉积阶段,肝细胞脂肪沉积呈小泡状;而脂肪性肝炎阶段则表现为肝细胞大泡性或以大泡性为主的混合型脂肪变。本实验通过肝脂质成分定量检测发现,WSHc 大鼠与 Wistar 大鼠经高脂诱导后,均有大量脂质沉积于肝组织,但通过观察肝内脂滴形态可见,高脂饲养的 Wistar 大鼠肝组织中,脂滴细密均匀,而高脂饲养的 WSHc 大鼠肝中则多见大泡性脂滴,提示 WSHc 大鼠肝除了单纯的脂肪变性之外,还发生了脂肪肝炎病变。

目前,超声弹性成像技术已被用于多种肝疾病的诊断<sup>[15]</sup>,如病毒性肝炎性肝纤维化、肝硬化等,具有良好的灵敏度及特异度。而剪切波弹性成像(shear wave elastography, SWE)是临床上一种新兴的超声弹性成像技术,可通过剪切波的穿透速度测算设定区域的肝弹性模量值。多项研究表明,随着 NAFLD 的发生发展,肝细胞发生脂肪变性、坏死,继而出现胶原沉积形成肝纤维化,肝纤维化形成后,肝组织硬度逐渐增加,继而可反映在剪切波穿透速度和肝弹性值模量值上<sup>[16]</sup>。本实验研究发现,饲养高脂饲料的 Wistar 大鼠弹性模型值无显著增加,而饲养高脂饲料的 WSHc 大鼠弹性模型值显著增加,进一步 Masson 染色可见,高脂饲养的 WSHc 大鼠肝纤维化程度显著提高,提示 WSHc 大鼠相比于 Wistar 大鼠,更易受高脂饲料诱导形成肝胶原异常沉积。

NAFLD 的发展过程中,伴随着炎症细胞的浸润和肝巨噬细胞的激活和极化<sup>[17]</sup>。当肝发生损伤时,巨噬细胞大量增殖,并与其他定居细胞等共同招募循环中的单核细胞迁移至炎症灶并分化成更多的巨噬细胞<sup>[18]</sup>。巨噬细胞的增多在严重的炎症反应中发挥重要的作用,会进一步加重肝毒性,巨噬细胞的数量可反应肝损伤与炎症程度<sup>[19]</sup>。本实验研究发现,高脂诱导的 WSHc 大鼠肝中存在较多的白细胞浸润,尤其是在较大脂滴的富集,常常可见明显的炎症灶;通过免疫荧光染色可见,高脂饲养的 WSHc 大鼠肝中活化的巨噬细胞显著增多,而高脂诱导的 Wistar 大鼠则增多不明显,进一步证实了高脂环境下 WSHc 大鼠较常规大鼠易产生炎症反应和肝组织损伤。

综上所述,WSHc 大鼠经高脂诱导后,血清总胆固醇显著升高并与临床高脂血症患者接近;肝脂质异常沉积并形成大泡性脂滴;脂滴周围有炎症细胞浸润形成炎症灶,巨噬细胞增多;可见散在的纤维化病变。然而,这些病理变化在高脂诱导的 Wistar 大鼠肝组织中并未发现。由此可见,相较于常规大鼠,高脂诱导 WSHc 大鼠可建立一种更接近临床的 NAFLD 动物模型,其特色在于与临床水平接近的血液生化指标、严重的炎症反应和肝纤维化。其发病机制尚不明确,需进一步研究探讨。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Liu A, Galoosian A, Kaswala D, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: epidemiology, liver transplantation trends and outcomes, and risk of recurrent disease in the graft [J]. J Clin Transl Hepatol, 2018, 6(4): 420-424.
- [2] Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Annu Rev Pathol, 2018, 13: 321-350.
- [3] Lau JKC, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances [J]. J Pathol, 2017, 241(1): 36-44.
- [4] Moghadasian MH, Frohlich JJ, McManus BM. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis [J]. Lab Invest, 2001, 81(9): 1173-1183.
- [5] Sanches SCL, Ramalho LN, Augusto MJ, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a search for factual animal models [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015.
- [6] 马全鑫, 陈姣姣, 郁晨, 等. 一种新型高脂血症易感大鼠的血脂水平与心血管并发症 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 25-31.  
Ma QX, Chen JJ, Yu C, et al. Study on blood lipid level and cardiovascular complication in a new type of hyperlipidemia susceptible rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 25-31.
- [7] Bedossa P, Flip pathology consortium. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2014, 60(2): 565-575.
- [8] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84.
- [9] 李巍, 石巧娟, 郭红刚, 等. 三种啮齿类动物非酒精性脂肪肝形成及机制探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(1): 76-80.  
Li W, Shi QJ, Guo HG, et al. Formation and mechanism of non-alcoholic fat liver disease in three species of rodents [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(1): 76-80.
- [10] Dorn C, Riener MO, Kirovski G, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Int J Clin Exp Med, 2010, 3(5): 505-514.
- [11] Deeb A, Attia S, Mahmoud S, et al. Dyslipidemia and fatty liver

- disease in overweight and obese children [J]. *J Obesity*, 2018, 2018; 1–6.
- [12] Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease [J]. *Nutrients*, 2013, 5(5): 1544–1560.
- [13] Verma S, Jensen D, Hart J, et al. Predictive value of ALT levels for non - alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non - alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Liver Int*, 2013, 33(9): 1398–1405.
- [14] Palekar NA, Naus R, Larson SP, et al. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2006, 26(2): 151–156.
- [15] Park CC, Nguyen P, Hernandez C, et al. Magnetic resonance elastography vs transient elastography in detection of fibrosis and noninvasive measurement of steatosis in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(3): 598–607. e2.
- [16] Vuppalanchi R, Siddiqui MS, Van Natta ML, et al. Performance characteristics of vibration - controlled transient elastography for evaluation of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 134–144.
- [17] 樊林花, 刘建新, 李丹, 等. 糖代谢异常对大鼠肝脏组织中巨噬细胞移动抑制因子及 C-Jun 氨基端激酶表达水平的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2): 165–170.
- Fan LH, Liu JX, Li D, et al. Effect of abnormal glucose metabolism on the expression of macrophage migration inhibitory factor and JNK in the rat liver [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(2): 165–170.
- [18] Carpino G, Nobili V, Renzi A, et al. Macrophage activation in pediatric nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) correlates with hepatic progenitor cell response via Wnt3a pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157246.
- [19] Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5): 306–321.

[收稿日期] 2019–11–21