



高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝模型简介及技术要点探讨^{*}

朱潇旭 段小花 王春霞 秦本单 张超

(云南中医学院民族医药学院,昆明 650500)

摘要:饮食因素是导致非酒精性脂肪肝发生的最主要的环境因素。高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝大鼠模型具有贴近临床、模型稳定的特点,故被广泛运用于非酒精性脂肪肝的研究中。本文简要介绍了非酒精性脂肪肝诱导模型中常用的大鼠脂肪肝模型,并探讨了制作高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝模型的技术要点及体会。

关键词:高脂饮食;非酒精性脂肪肝;大鼠模型

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0073-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.015

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,简称NAFLD)临床高发,正在迅速发展成为一个人类健康问题,经流行病学统计,普通成人的患病率为27%~33%,肥胖症患者的发病率则高达75%~92%^[1]。在我国北京、上海、广州、深圳等发达地区及城市NAFLD发病率达15%^[2],并呈低龄化趋势发展^[3]。为了进一步揭示非酒精性脂肪肝的发病机理,并为临床治疗提供有确切疗效的治疗方法和作用机制研究,充分利用动物模型成为NAFLD研究的主要选择。因此,需要建立具有合理性、稳定性的病理动物模型,为NAFLD的相关研究提供保障。

理想的NAFLD动物模型应该达到的基本要求是能正确反映人NAFLD的肝组织病理学和病理生理学特征^[4];模型需要具有一定病变发展过程、成型率高,死亡率低,且可重复性良好、造模方法简便易行的特点。目前,非酒精性脂肪肝动物模型主要分为五类:营养型脂肪肝模型、药物中毒引起的损伤型脂肪肝模型、由特殊基因导致的特定种系动物的脂肪肝模型、复合型模型以及根据中医证型分类的模型。其中营养型脂肪肝模型因为与人NAFLD具有相似的致病因素和发病过程,所以认可度最高,是使用最为广泛的动物模型。

1 实验动物的选择

非酒精性脂肪肝是指除酒精及其他明确的损肝因素外,导致的脂肪在肝脏大量堆积,形成以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为主要病变特征的临床病理综合征^[5]。营养型脂肪肝模型的造模思路是为实验动物提供过高能量的饲料,导致其营养过剩,机体无法完全吸收和利用,从而发生脂类在肝脏囤积,形成脂肪肝。

现用于建立营养型脂肪肝模型的动物种类主要有啮齿类动物、实验兔、鸡、鸭、猪等。因为啮齿类动物价格适中、易于购买、种源充足,能满足生理学、病理学、药代动力学、免疫组化和分子生物学等研究的要求,所以被大量研究使用。此外,在高达98%的大鼠基因与人类基因同源性的基础上,还具有旺盛的生命力和较强的抗感染力等诸多优点,使得大鼠被广泛运用于营养、代谢性疾病研究^[6]。李巍等^[7]用长爪沙鼠、大鼠和小鼠建立了NAFLD模型并进行了机制研究,发现这些模型在肝功能、脂质代谢和氧化应激等方面有所不同,其中大鼠模型形成了稳定的局灶性脂肪肝炎并伴有高脂血症。

经大量的临床调查、研究发现,男性的NAFLD发生率超过了女性^[8-11],例如在深圳地区每三位

收稿日期:2018-05-27

^{*} 基金项目:云南省傣医药与彝医药重点实验室(No.2017DG006)

作者简介:朱潇旭(1992—),女,研究生,研究方向:民族医学.E-mail:zhuxiaoxu19@163.com

通信作者:张超(1959—),男,主任医师,硕士生导师,研究方向:中医学、民族医学.E-mail:zhangc19@21cn.com

NALFD 患者中有两位为男性^[12]。为贴近临床、结合实际,所以营养型脂肪肝模型多选用雄性大鼠。

国内使用率较高的大鼠是 SD 大鼠和 Wistar 大鼠。随着微卫星(microsatellite & STRs)DNA 多态性分析方法的运用,商海涛等^[13]分析了北京和上海 2 个单位、王立辛等^[14]分析了辽宁 2 个单位的 Wistar 和 SD 大鼠封闭群的遗传质量,得出封闭群内部遗传多样性较好,群间遗传差异较大的结论。SD 大鼠 1925 年由 Wistar 大鼠培育而成,较 wistar 大鼠适应力和抗病能力更强。所以,我们选择健康的青壮年 SD 雄性大鼠进行 NALFD 的模型建造。

此外,动物在实验前血液中胆固醇 TC、甘油三酯 TG 的含量与构建模型是否成功密切有关,所以实验所用的大鼠血液中 TC、TG 的含量异常者予以排除,尽可能减少个体差异与实验误差。

因此,为了使动物模型贴近 NALFD 临床致病过程,满足生理学、病理学、药代动力学、免疫组化和分子生物学等的研究要求,并充分考虑患病率的性别差异,我们最终选择排除血液中 TC、TG 的含量异常的健康的青壮年 SD 雄性大鼠,建造 NALFD 的模型。

2 营养型脂肪肝模型的建模方法

营养型脂肪肝模型建模方法较多,主要有高脂饮食法、高脂乳剂灌胃法、高糖饮食法、玉米油注射法和胆碱-蛋氨酸缺乏法等。

2.1 高脂饮食法

高脂饮食喂养主要是将油脂和胆固醇等混合物添加到大鼠的基础饲料中,进行喂养,大鼠自由摄食饮水,模型复制成功率可以达 100%^[15],但实验周期较高脂乳剂灌胃法稍长。高脂饮食法可以形成经典的 NAFLD 模型并伴有肥胖、高代谢综合征等表现。虽然该法形成肝脏纤维化和炎症的程度较轻,但可广泛运用于 NAFLD 的机制研究和药物的筛选干预实验。

2.2 高脂乳剂灌胃法

高脂乳剂灌胃法是将猪油、胆酸、胆固醇、吐温 80 和丙二醇等按比例混合后对大鼠进行灌胃。大鼠自由摄食饮水,饲料为普通基础饲料。大鼠死亡率为 2%,模型构建成功率达 98%^[16-17]。该试验方法需要每天进行灌胃,操作较为繁琐,若操作不当会导致大鼠窒息死亡。若造模同时予以药物治疗,且

给药方式仍为灌胃,则大大增加了大鼠的负担,易导致实验误差。

2.3 高糖饮食法

高糖饮食法是用蔗糖与基础饲料混合而成的高糖饲料对大鼠进行喂养,实验过程中大鼠自由摄食饮水^[18]。苏琳和刘玉兰^[19]将高脂饮食和高糖饮食建立 NALFD 大鼠模型进行对比,发现高脂组的脂肪浸润程度比高糖组的更显著,胰岛素抵抗(HOMA-IR)指数也更高。

2.4 其他建模方法

玉米油注射法^[20]现较少运用。胆碱-蛋氨酸缺乏(MCD)法优势在于造模时间短,但实验动物体质量下降显著,喂养 4 周后体质量降低 35%,且代谢特点与人非酒精性脂肪肝不同^[21]。后经苏冬梅等、张慧芹等^[22-23]研究发现 MCD 饮食法造模的原理主要是由于缺乏必需营养成分——蛋氨酸胆碱,导致肝细胞营养代谢障碍,TG 等脂质物质大量堆积在肝腺泡 1 区的细胞内,从而引起肝细胞脂肪性变、炎症坏死等损伤,所以用 MCD 法造模得到的脂肪肝是以腺泡 1 区肝损伤为先为重的。这与高脂饮食诱导等其他动物模型所表现的以腺泡 3 区炎症坏死为主不同^[24-25]。

经过上述比较,我们选择用高脂饮食法进行 NAFLD 大鼠的建模。

3 营养型脂肪肝动物模型中高脂饲料的选择与制作

通过调查研究得知,目前高脂饲料的制作方式主要为自行制作或请厂家代为加工。两种方式都以提供确定的高脂饲料配方为前提。现常用的高脂饲料配方为基础饲料与添加物(如:猪油、玉米油、鸡蛋、蛋黄粉、胆固醇、胆盐等)充分混合,经搅拌后压制成圆柱状颗粒,进行真空包装并于 -20℃ 保存。经过前期对比实验研究发现,加入过量高脂成分的饲料会出现松脆、易碎等问题,导致大鼠厌食,从而直接影响造模进程。较为成熟的高脂饲料配方主要为基础饲料加入猪油(10%~15%)和胆固醇(1%~2%),其中脂肪供能比例的不同是各个配方的主要区别^[26]。部分改良的高脂饲料中添加胆盐和丙基硫氧嘧啶,以此促进机体对胆固醇的吸收,并抑制胆固醇转化为胆汁酸,增加胆固醇含量^[27]。缺点是过

量的胆固醇会导致大鼠腹泻^[15],不利于实验。我们选用 79%基础饲料,将 10%猪油、10%鸡蛋和 1%胆固醇作为高脂饲料添加物。

4 营养型脂肪肝动物模型造模成功的标志或参考标准

现公认的营养型脂肪肝动物模型造模成功标志包括:肝脏湿重增加、体积明显增大。肝脏经肉眼观察可见,表面的包膜紧张,肝叶锋利的边缘消失,肝脏颜色变浅、整体发黄合并斑点状花纹,部分大鼠肝脏因局灶性脂肪沉积会出现浅黄色的斑块。触摸时其硬度接近泥块,并有油性感觉。参考临床 NAFLD 的血液生化参数,动物模型血液中这些相关标志物的变化表现为模型组中 TC 水平和 TG 水平增加,较正常组显著升高($P < 0.05$)。肝组织病理学 HE 染色切片结果是营养型脂肪肝动物模型造模成功标志的金标准,其中脂肪变性的肝细胞占单位面积的 1/3 以上^[28];或采用油红 O 染色后电镜观察细胞内的脂滴,细胞质内出现红色的脂滴的肝细胞为脂肪变性细胞,并对其进行计数。

经实验证实,完整造模周期(12 周)可得到稳定的 NAFLD 大鼠模型。

5 营养型脂肪肝动物模型技术要点及注意事项

NAFLD 模型是研究非酒精性脂肪肝的必备前提条件,模型复制中的各个细节均会对模型成功与否造成影响,从而直接导致相关机制研究和药效学研究的成败。通过比较研究得出:(1).实验选用雄性 SD 大鼠,其体质量应控制在 180~200 g 之间,适应性喂养(7 天),测定血液中甘油三酯和胆固醇的含量,排除异常者后,再进行随机分组。此法比适应性喂养后直接根据体质量进行随机分组更能减少实验误差,保证结果。(2).实验过程中保持实验动物自由摄食、饮水。因为高脂饮食中的油脂有润滑作用,可使大鼠粪便质软。大鼠的饮用水根据国家规定:清洁级大鼠使用 pH2.5~2.8 的酸化水或无菌水,SPF 大鼠使用灭菌水。(3).高脂饲料配方中猪油及胆固醇的含量不宜过高,否则大鼠每日进食量

会有所降低,影响造模进展。(4).若高脂饲料配方中加入胆盐,其含量最好控制在 1%左右,避免大鼠腹泻。(5).实验过程中为了方便实验人员对实验的动态把控,可计算大鼠每日进食量(进食量=大鼠给食量-饲料剩余量),并定时检测大鼠的体质量变化和血液中 TC、TG 含量。所以,尽可能优化 NAFLD 模型的制备条件,将实验步骤标准化、规范化,使建模方法简单、容易实现。这可以提供更高的模型成型率,降低大鼠死亡率,以获得具有良好的可重复性和典型可靠的 NAFLD 模型。

参考文献

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the american association for the study of liver diseases, American college of gastroenterology, and the American gastmentemlogical association [J]. *Hepatology*, 2012, **55** (6): 2005-2023.
- [2] Chiloiro M, Caruso M G, Cisternino A M, *et al.* Ultrasound evaluation and correlates of fatty liver disease: a population study in a Mediterranean area [J]. *Metab syndr Relat Disord*, 2013, **11** (5): 349-358.
- [3] 王小燕, 刘志峰, 金玉, 等. 41 例学龄儿童非酒精性脂肪肝病代谢综合征分析. *儿科药学杂志*, 2016, **22** (1): 20-22.
- [4] Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, **18** (19): 2300-2308.
- [5] Pappachan J M, Antonio F A, Edavalath M, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease: a diabetologist's perspective [J]. *Endocrine*, 2014, **45** (3): 344-353.
- [6] 何诚. 实验动物学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006.
- [7] 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+99.
- [8] 李秀池, 阮改清, 吕加恩, 等. 某 IT 企业员工非酒精性单纯性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎的初步调查及特征分析 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, **33** (7): 1324-1327.
- [9] 张荫娥, 崔立平, 马艳波, 等. 12729 例高校教职工高血压、脂肪肝及相关因素分析 [J/OL]. *中国医院药学杂志*, 2016-11-01. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.R.20161101.1436.568.html>.
- [10] 李雅丽, 何鹏义, 周晶, 等. 乌鲁木齐地区非酒精性脂肪肝患病率及危险因素分析 [J]. *中国临床保健杂志*, 2017, **20** (5): 574-578.
- [11] 杨曦, 梁红亮. 老年住院病人脂肪肝的流行病学特征及危险因素 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, **37** (14): 3542-3545.
- [12] 邵桂霞, 张献共, 黄志平, 等. 深圳地区 21671 例不同性别年龄体重指数与血脂、脂肪肝关系的探讨 [J]. *临床内科杂志*,

- 2003, (12):636-638.
- [13] 商海涛,魏泓,岳秉飞,等.应用微卫星 DNA 标记对 Wistar 和 SD 大鼠封闭群的遗传学研究[J].分子细胞生物学报,2008,(1):28-34.
- [14] 王立辛,苏玉虹,韩喜彬,等.Wistar 大鼠和 SD 大鼠的遗传特征分析[J].畜牧与兽医,2013,45(12):57-61.
- [15] 钟岚,范建高.非酒精性脂肪肝动物模型[J].国外医学(消化系疾病分册),1999,(3):175-178.
- [16] 张瑜,李琳琳,张嫣之,等.非酒精性脂肪肝大鼠模型的建立[J].新疆中医药,2007,(2):7-9.
- [17] 丁洁,王亮,李娟,等.高脂乳剂灌胃构建大鼠非酒精性脂肪性肝病模型可靠性的再研究[J].临床肝胆病杂志,2012,28(7):531-534.
- [18] 韩然,于燕妮,杨丹.高糖饮食致大鼠非酒精性脂肪肝模型的建立[J].胃肠病学和肝病杂志,2015,24(11):1354-1356+1360.
- [19] 苏琳,刘玉兰.高糖饮食及高脂饮食建立非酒精性脂肪肝大鼠模型的比较[J].实验动物科学,2009,26(3):14-17,23.
- [20] Terrazos-Luch J, Corona-Garcia S, Zentella-de Pina M, *et al.* Butylated hydroxytoluene prevents hepatic damage induced by food oil [J]. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 1997,40:97-99.
- [21] Larter C Z, Yeh M M. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right [J]. J Gastroenterol Hepatol,2008,23(11):1635-1648.
- [22] 苏冬梅,诸葛丽,李健,等.蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型的建立及动态监测[J].世界华人消化杂志,2011,19(11):1122-1129.
- [23] 张慧芹,刘泽洲,续畅,等.小檗碱对胆碱-蛋氨酸缺乏饮食诱导非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝组织巨噬细胞表型转化的调节作用[J].解剖学报,2014,45(5):633-638.
- [24] 王建青,李俊,邹宇宏,等.非酒精性脂肪性肝炎模型的建立[J].安徽医科大学学报,2006,(1):61-63.
- [25] 温秀梅,陈芝芸,严茂祥,等.大鼠非酒精性脂肪性肝炎形成中脂质代谢的变化[J].中华中医药学刊,2008,(9):1987-1989.
- [26] 黄海燕,辛永宁,姜曼,等.非酒精性脂肪性肝病动物实验模型研究进展[J].临床肝胆病杂志,2014,30(9):948-953.
- [27] 敬梦辉,蒋元烨,范伏岗,等.非酒精性脂肪性肝病动物实验模型最新研究进展[J].现代中西医结合杂志,2017,26(18):2049-2052.
- [28] 钱伯初,史红,吕燕萍.非酒精性脂肪肝与脂肪性肝炎动物模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2007(7):426-430.

Brief Introduction to High Fat Diet-Induced Rat Non-alcoholic Fatty Liver Model and Discussion on Technical Points

ZHU Xiaoxu, DUAN Xiaohua, WANG Chunxia, QIN Bendan, ZHANG Chao

(School of Ethnic Medicine, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

Abstract: Dietary factors are the most important environmental factors leading to the occurrence of non-alcoholic fatty liver disease. The non-alcoholic fatty liver model induced by high-fat diet has the characteristics of being close to the clinical and stable model, so it is widely used in non-alcoholic fatty liver research. This article briefly introduced the model of fatty liver in rats commonly used in the non-alcoholic fatty liver inducing model, and discussed the technical points and experience of the non-alcoholic fatty liver model induced by high-fat diet.

Key words: high-fat diet; non-alcoholic fatty liver disease; rat model