

高脂饮食诱导的非酒精性 脂肪肝病食蟹猴模型

高仕平, 李 锋, 查思凡

(昆明科灵生物科技有限公司, 昆明 650550)

[摘要] 目的 建立高脂饲料诱导非酒精性脂肪肝病(NAFLD)食蟹猴动物模型,分析高脂饲料饲喂时间对动物NAFLD形成的影响,探索高脂饲料饲喂时间与血清中生化指标、肝脏脂肪化及纤维化形成的相关性。方法 实验前对700只健康食蟹猴收集基础血液,然后用高脂饲料饲喂,分别在饲喂1年、2年、3年、4年、5年、6年和7年时,随机抽取部分实验猴,用盐酸氯胺酮麻醉并收集动物血液,检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)指标,并进行肝组织活检。结果 在饲喂高脂饲料2年时,食蟹猴血清ALT、AST、TG、TC、LDL水平均显著升高,HDL水平显著下降($P<0.01$)。高脂饲料饲喂2年及以上时间与ALT、AST、TG、TC、脂肪化、纤维化在0.01水平(双侧)上显著相关(r 分别为0.127、0.121、0.246、0.128、0.306和0.220),与HDL呈负相关($r=-0.298, P<0.05$),与LDL在0.05水平(双侧)上显著相关($r=0.081$)。病理组织学观察显示,随时间推移肝脏发生严重的脂肪变性和气球样变性、脂肪肝,进而发生肝炎、纤维化。结论 高脂饮食可导致食蟹猴血脂及肝酶活性指标明显升高,肝脏脂质聚集,炎性浸润明显,表明高脂饮食能够成功诱导NAFLD食蟹猴模型并促进NAFLD的进展。

[关键词] 食蟹猴; 非酒精性脂肪肝病; 高脂饲料; 动物模型

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)02-0123-05

随着人们饮食习惯的改变,日常生活中高脂食物摄入量增加,非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率逐年上升且呈现低龄化,严重者可导致不同程度的纤维化并逐步演变成肝硬化甚至肝癌^[1]。目前,用于NAFLD的非人灵长类动物模型较少,建立与人类NAFLD疾病相似的动物模型对于NAFLD的发病机制研究、药物治疗和预防控制尤为重要^[2-4]。食蟹猴在组织结构、免疫、生理代谢等方面与人类高度近似,是医学研究中理想的实验动物。本

试验模拟人类不良的饮食习惯,利用高脂饲料持续饲养正常食蟹猴,导致食蟹猴脂代谢紊乱,加快肝脏脂肪化、纤维化进程,从而诱导NAFLD,分析了高脂饲料饲喂不同时间与丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、肝脏脂肪化及纤维化的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲料

700只普通级健康成年雄性食蟹猴,体质量7~9 kg,7~13岁,由昆明亚灵生物有限公司提供[SCXK(滇)K2015-0003]。实验在昆明科灵生物

[收稿日期] 2019-02-12

[作者简介] 高仕平(1992-),女,硕士,兽医技术员,从事非人灵长类动物相关工作。

E-mail: 14787893597@163.com

科技有限公司动物实验设施中进行[SYXK(滇)K2012-0002]。动物饲养于不锈钢单笼内, 室温保持在18~29℃, 相对湿度保持30%~70%。动物自由进食, 自由饮水, 光照每日12 h昼夜循环。实验操作符合昆明科灵生物科技有限公司实验动物伦理委员会的规范要求。

高脂饲料由广州市国龙科技有限公司提供[SCXK(粤)2014-0026], 配方: 15%猪油、30%糖、0.5%胆固醇、5%无营养物质和49.5%基础饲料。

1.2 主要试剂仪器

ALT、AST、TG、TC、HDL和LDL试剂盒由罗氏诊断产品(上海)有限公司提供。氟尼辛葡甲胺注射液(外兽药证字14号)购自法国灵葆雅动物保健品公司, 兽用盐酸氯胺酮注射液[兽字药(2015)]购自江苏中牧倍康药业有限公司。

罗氏全自动生化分析仪(c501), 彩色B超仪(迈瑞M9CV), 半自动活检针(TSK株式会社, 18G), 手动石蜡切片机(RM2235), 光学显微镜(OLYMPUS-BX-51)。

1.3 实验方法

高脂饮食之前对700只饲喂正常饲料的食蟹猴在空腹12~14 h后, 用盐酸氯胺酮全身麻醉, 抽取前肢静脉血液3 mL, 肝穿刺进行组织活检, 确认动物血液生化指标处于正常范围, 肝脏处于健康状态。然后, 700只食蟹猴均饲喂高脂饲料, 在饲喂后1年、2年、3年、4年、5年、6年和7年时, 分别抽取34只、160只、284只、81只、62只、30只和49只食蟹猴用于相关检测。

各时间点食蟹猴空腹12~14 h, 用盐酸氯胺酮全身麻醉后, 抽取前肢静脉采血3 mL, 检测血清中ALT、AST、TG、TC、HDL、LDL指

标; 在彩色B超仪的协助下利用半自动活检针对食蟹猴进行肝组织活检, 取肝脏右叶于体积分数10%的中性甲醛溶液中固定, 脱水、石蜡包埋切片后进行苏木精-伊红(HE)染色和天狼星红染色。光学显微镜下观察肝脏组织病理学变化, 判断食蟹猴肝脏是否出现脂肪化和纤维化。每次肝组织活检后, 以2 mg/kg 氟尼辛葡甲胺注射液连续3 d肌肉内注射止疼。

1.4 数据统计

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS17.0统计软件分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 高脂饲料饲喂时间与ALT、AST、TG、TC、HDL、LDL、肝脏脂肪化及纤维化的相关性采用简单相关分析。

2 结果

2.1 高脂饲料饲喂时间与肝脏脂肪化、纤维化发病率

高脂饮食可诱发食蟹猴肝脏发生脂肪变性和纤维化变性, 且随着时间延长, 发病率总体呈现上升趋势, 表明高脂饮食可以推进食蟹猴肝脏脂肪化和纤维化进程(表1)。

2.2 食蟹猴血液生化指标

高脂饮食诱导后食蟹猴各项生化指标与诱导前自身对照, ALT、TG、TC、LDL在饲喂高脂饲料1年大部分指标显著上升, 随后均维持在较高水平; HDL先上升后下降, 在饲喂7年时低于实验前(表2)。

2.3 食蟹猴肝组织病理学观察

图1a和图1b为高脂饮食诱导前食蟹猴正常肝组织HE染色后镜下20倍和40倍的图片, 肝组

表1 食蟹猴高脂饲喂时间与肝脏脂肪化、纤维化发病率

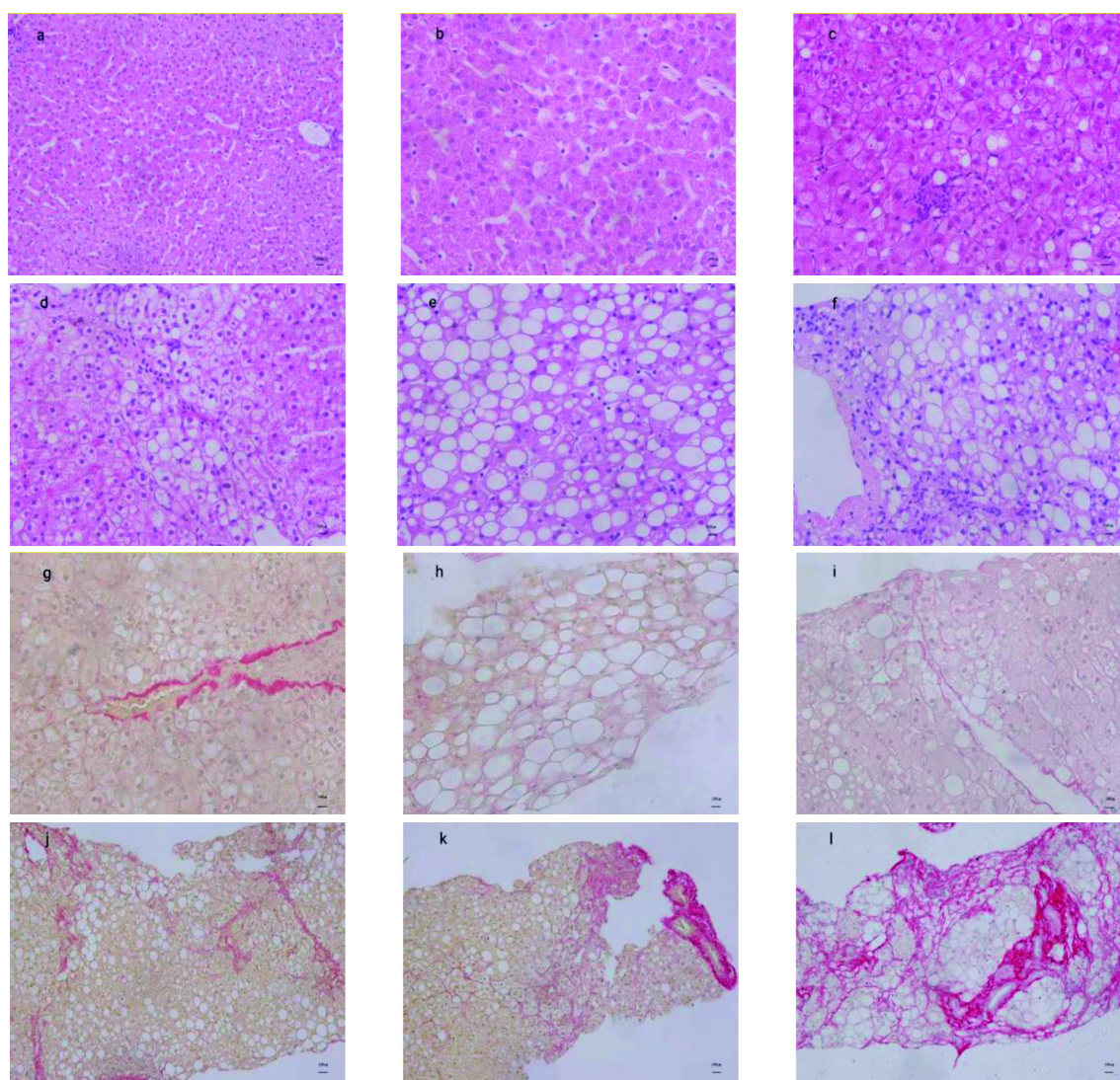
Table 1 High-fat diet feeding time and liver fatty, fibrotic morbidity in cynomolgus monkeys

高脂饲料饲喂时间/年	样本数 <i>n</i>	脂肪化 <i>n</i>	脂肪化发病率/%	纤维化 <i>n</i>	纤维化率/%
实验前	700	0	0.000	0	0.000
1	34	27	0.794	3	0.088
2	160	150	0.938	22	0.138
3	284	271	0.954	46	0.162
4	81	78	0.963	16	0.198
5	62	58	0.935	15	0.242
6	30	29	0.967	12	0.400
7	49	48	0.980	21	0.429

表 2 饲喂高脂饲料食蟹猴生化指标

Table 2 The biochemistry indicators of cynomolgus monkey with high-fat diet

高脂饲料饲 喂时间 / 年	样本数	ALT/ (U · L ⁻¹)	AST/ (U · L ⁻¹)	TG/ (mmol · L ⁻¹)	TC/ (mmol · L ⁻¹)	HDL/ (mmol · L ⁻¹)	LDL/ (mmol · L ⁻¹)
实验前	700	32.94 ± 16.52	25.86 ± 5.94	0.42 ± 0.31	2.68 ± 1.59	1.06 ± 0.51	1.23 ± 0.76
1	34	39.59 ± 6.61**	23.06 ± 2.83	1.12 ± 0.51**	9.22 ± 1.27**	1.36 ± 1.00*	8.46 ± 1.48**
2	160	47.55 ± 3.17**	29.66 ± 1.35**	1.07 ± 0.21**	12.09 ± 0.61**	2.46 ± 0.48**	11.12 ± 0.78**
3	284	40.49 ± 2.29**	26.38 ± 0.98*	1.25 ± 0.18**	11.04 ± 0.44**	3.04 ± 0.50**	10.52 ± 0.51**
4	81	43.82 ± 4.28**	25.24 ± 1.83	1.90 ± 0.33**	9.60 ± 0.83**	2.13 ± 0.51**	8.95 ± 0.96**
5	62	52.90 ± 5.06**	30.87 ± 2.16**	3.62 ± 0.40**	10.37 ± 0.97**	1.54 ± 0.59**	7.98 ± 1.13**
6	30	59.73 ± 7.04**	38.97 ± 3.01**	2.38 ± 0.59**	12.59 ± 1.45**	1.43 ± 0.80**	15.06 ± 1.57**
7	49	61.10 ± 5.51**	32.82 ± 2.35**	3.93 ± 0.42**	13.98 ± 1.08**	0.62 ± 0.72**	14.15 ± 1.23**

注: 与实验前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

a~b: 正常肝组织(HE 染色, ×20, ×40); c~f: 轻、中、重度脂肪化(HE 染色);

g~l: 轻、中、重度纤维化(天狼星红染色)

图 1 高脂饲料饲喂食蟹猴肝组织病理学观察

组织结构正常,肝窦清晰,细胞核位于细胞中央,肝细胞无脂肪变性。之后图片为饲喂高脂饲料后食蟹猴肝脏组织不同程度病理变化。图 1c 为轻度脂肪肝,少量肝细胞脂肪变性,少量肝细胞肿大变圆呈气球样变,形态不规则,并且伴有炎症细胞浸润(HE);图 1d 为中度脂肪肝,大量肝细胞脂肪变性,肝细胞肿大气球样变更明显,并伴随明显炎症细胞浸润,肝窦不明显,已可见部分纤维化(HE);图 1e 为重度脂肪肝,几乎所有肝细胞都呈脂肪变性,胞质被大泡型和小泡型脂泡占据,细胞核大量消失,肝窦消失,肝索解(HE);图 1f 为重度脂肪肝,几乎所有肝细胞都呈脂肪变性,胞质被大泡型和小泡型脂泡占据,细胞核大量消失,肝窦消失,肝索解离,炎症细胞浸润更加明显,纤维化明显(HE);图 1g 为血管周围肝细胞脂肪变性,且伴有少量纤维,呈淡红色(天狼星红染色);图 1h 为变性的肝脏脂肪细胞(除血管外),可见淡红色增粗纤维(天狼星红染色);图 1i 为中度纤维化,可见静脉壁周围和窦周纤维增粗,且伴有小泡型脂肪变性(天狼星红染色);图 1j 可见静脉周围和窦周纤维明显增粗增多,延伸至肝脏组织其他部位,形成纤维桥,纤维化发生部位常见于静脉及汇管区周围,且伴有小泡型脂肪变性(天狼星红染色);图 1k 可见汇管区周围细胞胞质被大泡型和小泡型脂泡占据,纤维从汇管区延伸至其他气球样变细胞,纤维增粗,连接成纤维桥(天狼星红染色);图 1l 为重度纤维化,可见纤维从汇管区弥漫至整条肝脏组织,周围肝细胞被大泡型脂泡占据,炎症细胞浸润显著,细胞核变少(天狼星红染色)。

2.4 高脂饲料饲喂时间与生化指标和肝脂肪化、纤维化相关性

高脂饲料饲喂时间与 ALT、AST、TG、TC、脂肪化、纤维化在 0.01 水平(双侧)上显著相关(r 值分别为 0.127、0.121、0.246、0.128、0.306、0.220),与 HDL 呈负相关($r=-0.298$, $P<0.05$),与 LDL 在 0.05 水平(双侧)上显著相关($r=0.081$)。

3 讨论

由于人体各组织器官的复杂性和实验动物的

种族差异性,且受动物年龄、性别、当地气候、饲料选择、造模时间限制,以及模型判定指标仍然缺乏相对标准,使任何一种实验动物模型都不能全面、准确地反映脂肪肝的本质,因此,建立一个完全能够反映人类脂肪肝的动物模型比较困难^[5]。供选择的实验动物模型的种类很多,但各种造模方法各有其不足,所以应该依据不同的实验来选择相应的实验动物。杨威等^[6]给大鼠喂食单纯高脂饲料,6 周后大鼠表现为典型的 NAFLD,呈现显著的肝脏脂肪浸润,但是肝脏纤维化及炎症改变较轻。王昀等^[7]使用乙硫氨酸灌胃法,刘峰等^[8]使用四氯化碳腹腔注射法,均可以导致小鼠脂质代谢出现障碍,肝细胞形成明显脂滴,但他们建立的小鼠模型与人类的脂肪肝和纤维化发病机制和病程变化存在较大差异,并且药物毒性强,动物死亡率高。高脂诱导 NAFLD 的研究水平和层次在不断提高和深入,但其发病机制目前尚不明确。高脂饮食显著增加脂质异常,是高脂血症的主要诱因^[9]。Wong 等^[10]研究证实,在非肥胖人群中,老龄与 NAFLD 显著肝纤维化的发生率增加呈正相关。而本研究选用中年食蟹猴进行实验,排除了老龄对实验结果的影响。本试验中高脂饲料导致食蟹猴血清 TG、TC、LDL-C 含量升高,导致肝脏大量脂质堆积,进而发生脂肪肝;而且随着长期大量脂肪的摄入,肝组织损伤逐渐加重,ALT、AST 活性升高。综合多年以来的研究,NAFLD 是一种多因素作用下产生的疾病,进一步深入研究其发病机制和自然病程,将有助于筛选高危患者。

血脂含量受生活地区、膳食、年龄、性别、职业以及代谢等因素的影响,波动范围较大。血脂异常往往伴随着冠心病、心肌梗死、脑梗死、动脉粥样硬化的发生,导致食蟹猴死亡率上升。血清中 TC、HDL、LDL、TG 的含量可在一定程度上反映机体脂肪代谢状况,是监测血脂变化的重要指标;ALT 主要分布在肝细胞质,AST 主要分布在肝细胞质和肝细胞线粒体中,对食蟹猴肝功能的监测具有重要意义。

综上所述,应加大对血脂水平异常偏高人群的健康教育力度,鼓励人们及时监测自己的身体状况,积极发现和治疗疾病,并且注意调整饮食

结构,避免高脂饮食,防止和纠正过度肥胖,倡导健康的生活方式。

参考文献:

- [1] Parash O, Hamid S. Are we ready for a new epidemic of under recognized liver disease in South Asia especially in Pasistin non alcoholic fatty liver disease[J]. J Park Med Assoc, 2013,63(3):95-99.
- [2] Nnaji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis[J]. Clin Liver Dsi, 2004, 8(3):559 -574.
- [3] Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis[J]. Semin Liver Dis, 2001, 21(1):89-104.
- [4] 杨坤,孔华丽. 脂肪肝动物实验模型的方法学研究进展[J]. 解放军药学报, 2005, 21(5):374-376.
- [5] 赵敏,陈光亮. 中药治疗非酒精性脂肪肝的实验研究进展[J]. 安徽医药, 2007, 11(3):256-257.
- [6] 杨威,徐闯,陈媛媛,等. 大鼠非酒精性脂肪肝模型的建立[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29(3):15-19.
- [7] 王昀,陈蜜,江振洲,等. 鸡骨草总黄酮碳苷对乙硫氨酸导致的小鼠脂肪肝的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(1):1-7.
- [8] 刘峰,向志钢,许继凡,等. 高脂饲料结合 CCl₄ 诱导小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立[J]. 江苏医药, 2010, 36(1):69-71.
- [9] 冯淑芝. 高脂饮食加饮酒对大鼠动脉硬化的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2009.
- [10] Wong RJ, Liu B, Bhuket T. Significant burden of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis in the US: A cross-sectional analysis of 2011-2014 National Health and Nutrition Examination Survey[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2017, 46(10):974-980.

High-fat Diet Induced Cynomolgus Monkey Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease

GAO Shiping, LI Feng, ZHA Sifan

(Kunming Biomed International Ltd., Kunming 650550, China)

[Abstract] Objective To establish non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) animal model induced by high-fat diet, and to analysis the effect of high-fat feeding time for animal NAFLD formation, exploring the correlation between feeding time of high-fat diet and serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), fatty liver, and fibrosis formation. **Methods** Before the experiment, basic blood samples were collected from 700 healthy cynomolgus monkeys, then fed with high-fat diet, some of the monkeys were sampled at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 years respectively after being fed with high-fat diet and anaesthetized with ketamine hydrochloride, and the blood were collected for detection of ALT, AST, TG, TC, HDL and LDL indicators, and liver tissue biopsy was performed. **Results** After 2 years of high-fat feed, the serum ALT, AST, TG, TC and LDL levels of cynomolgus monkeys were significantly increased ($P<0.01$), and HDL level was significantly decreased ($P<0.01$). The feeding time of high-fat feed was significantly correlated with ALT, AST, TG, TC, liver adipose and fibrosis at the level of 0.01 (bilateral) ($r=0.127, 0.121, 0.246, 0.128, 0.306, 0.220$), but negatively correlated with HDL ($r=-0.298, P<0.05$), and significantly correlated with LDL at the level of 0.05 (bilateral) ($r=0.081$). Histopathology showed that serious fatty degeneration and balloon-like degeneration occurred in the liver over time, fatty liver followed by hepatitis and fibrosis. **Conclusion** The high-fat diet can significantly increase blood lipid and liver enzyme activity indexes in cynomolgus monkeys, the liver lipid aggregation and inflammatory infiltration are obvious, indicating that high-fat diet can successfully induce NAFLD model and promote the development of NAFLD.

[Key words] Cynomolgus monkeys; No-alcoholic fatty liver disease; High-fat diet; Animal models