

马晓月,李钦钦,陆华贞,等. 非酒精性脂肪肝动物模型及细胞模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 120-127.
Ma XY, Li QQ, Lu HZ, et al. Research progress on animal and cell models of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 120-127.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.017

非酒精性脂肪肝动物模型及细胞模型研究进展

马晓月¹,李钦钦²,陆华贞³,马继艳⁴,林宇宁⁵,陈婉君⁵,陈永欣^{5*}

(1.广西中医药大学瑞康临床医学院, 南宁 530001;2.广西中医药大学护理学院, 南宁 530200;
3.苏州大学护理学院,江苏 苏州 215006;4.广西中医药大学第一临床医学院, 南宁 530001;
5.广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200)

【摘要】 非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)的建模方法一直是研究的重点,根据不同的实验目的选择合适的动物模型和细胞模型对于研究非酒精性脂肪肝的发病机制具有重要意义。目前常用的造模方法有高脂高糖饲料、胆碱-蛋氨酸缺乏(MCD)、药物诱导、饱和或不饱和脂肪酸诱导等。其中,大鼠、小鼠、基因鼠及细胞在非酒精性脂肪肝模型中使用最频繁,因此本文重点围绕非酒精性脂肪肝的大鼠、小鼠、基因缺陷鼠及细胞模型的研究进展进行综述。

【关键词】 非酒精性脂肪肝;动物模型;细胞模型

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 06-0120-08

Research progress on animal and cell models of nonalcoholic fatty liver disease

MA Xiaoyue¹, LI Qin², LU Huazhen³, MA Jiyun⁴, LIN Yuning⁵, CHEN Wanjun⁵, CHEN Yongxin^{5*}

(1. Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China.
2. School of Nursing, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200. 3. School of Nursing, Suzhou University, Suzhou 215006. 4. the First School of Clinical Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001. 5. Basic Medical College, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200)

【Abstract】 The modeling method of non-alcoholic fatty liver has always been a research focus. The selection of appropriate animal and cell models in accordance with experimental purposes is of great significance to study the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. The commonly used modeling method are high fat and sugar feeding, choline-methionine deficiency, drug induction, and saturated or unsaturated fatty acid induction. Rats, mice, gene-modified mice, and cells are most frequently used to model non-alcoholic fatty liver. This review focuses on the research progress of rats, mice, genetically defective mice, and cell models of non-alcoholic fatty liver.

【Keywords】 nonalcoholic fatty liver; animal model; cell model

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

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD),又称为“富贵病”,是一种以除酒

精和其他明确的损肝因素所致的肝细胞脂肪变性和肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理

【基金项目】广西自然科学基金项目青年科学基金项目 (2020GXNSFBA159043);2022 年自治区级大学生创新创业训练计划项目 (S202210600107,S202210600103);2021 年自治区级大学生创新创业训练计划项目 (S202110600087,S202110600100);广西中医药大学 2019~2021 年广西一流学科建设开放课题项目 (2019XK083);2020 年广西中医药大学一方制药大学生科技创新课题 (2020DXS47)。

【作者简介】马晓月 (2001—),女,在读本科生,研究方向:中医药防治肝病的基础研究。E-mail:2306213932@qq.com

【通信作者】陈永欣 (1988—),女,副教授,硕士研究生导师,硕士,研究方向:中医药防治肝病的基础研究。E-mail:965643897@qq.com

综合征,包括从单纯性脂肪肝 (NAFL) 到非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、非酒精性脂肪性肝硬化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[1-2]。近年来, Eslam 等^[3] 为了更准确地反映其发病机制, 建议将 NAFLD 更名为代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)。据临床调查研究显示, NAFLD 常常与糖尿病、高脂血症及肥胖等疾病相关, 其发生原因与饮食结构、生活方式等有密切联系。NAFLD 一般从病史、临床表现、影像学、血清学和组织病理学进行诊断, 目前普遍将脂肪变性作为其最基本的病理学表现^[4]。肝活检是评价 NAFLD 的金标准, 肝活检标本的肝脂肪变在 5% 以上可诊断 NAFLD, 用肝活检可以区分 NAFL 与 NASH, 并评价肝纤维化程度。NAFLD 的病理过程复杂, 本文就与人类 NAFLD 相似的动物模型与细胞模型研究进展作一综述, 依据不同模型出现的组织病理学改变, 以期进一步研究本病的发病机制与治疗药物。

1 非酒精性脂肪肝大鼠模型

大鼠体型适中, 生育能力与采血能力较强。结合 NAFLD 的发病机制, 可以将大鼠分为营养型模型、药物型模型和特殊品系模型。营养型模型的造模方法是喂养大鼠高糖、高脂、高热量, 或者制造 MCD; 药物型模型通过施加四氯化碳 (CCl₄)、四环素、多氯联苯 118 等药物, 使药物发挥药效甚则引起中毒达到建造模型的目的; 特殊品系模型是选取某些可以自发形成脂肪肝、高脂血症等与 NAFLD 关系密切的疾病或者是可以自发出现 NAFLD 相关症状的大鼠。现阶段实验室构造 NAFLD 疾病常用的大鼠模型有 Wistar 大鼠、SD 大鼠、Zucker 大鼠等。

1.1 Wistar 大鼠模型

Wistar 大鼠是我国实验室研究中引进最早、使用最广泛、数量最多的品种。Gheibi 等^[5] 通过对雄性 Wistar 大鼠喂食含有 35% 脂肪 (31.6% 饱和脂肪和 3.2% 不饱和脂肪), 57% 的可代谢能量的高脂饮食持续 14 d 来诱导大鼠 NAFLD 模型。周琪等^[6] 选择健康成年雄性清洁级 Wistar 大鼠进行多氯联苯 118 (PCB118) 与玉米油的对照实验, 持续 13 周, 实验表明, 慢性低浓度 PCB118 以剂量依赖方式诱导肝脏组织, 血清学表现为 ALT、TG、TC、GLU、LDL-C、HDL-C 水平显著增加, IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、MMP-

2、 α -SMA mRNA 水平显著增加, 病理学 HE 染色示肝脏脂肪变性、炎症浸润, 肝小叶结构紊乱, 明显纤维化, 表现出 NAFLD 的症状。Stephen 等^[7] 将 Wistar 大鼠饲养在 (21 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C 的室温、(50 $\pm$ 20)% 的相对湿度和 12 h 的明暗 (L/D) 循环下, 用植物油 (1:1) 稀释的 CCl₄ 1 mL/kg, 每周 2 次腹腔注射, 模型体重升高, 病理学显示肝细胞出现肝毒性, 肝损伤, 血清学 ALT、ALP、AST 和 GGT 等敏感酶升高。孙红爽等^[8] 对清洁级雄性 Wistar 大鼠给予自制高热量饲料 (配方: 22% 猪油+8% 糖+2% 胆固醇+2% 食盐+66% 基础饲料), 饮用自来水, 大鼠食欲减退、肥胖、肝指数显著增大, 病理学显示肝组织发生脂肪变性 with 纤维化, 且 AST、ALT、血糖、血脂、胰岛素及炎性因子 TNF- α 水平均显著升高, 大鼠表现 NAFLD 疾病特征。

Wistar 大鼠有性周期稳定、繁殖力强、易于繁殖、生长发育快、对传染病的抵抗力较强等特点。其优良的抵制传染病能力和低自发性肿瘤发生率, 使其不容易产生其他疾病。该大鼠杂食, 解剖和生理性质与人相似, 生长及代谢快, 对营养缺乏十分敏感, 其特性适用于各种营养、代谢性疾病研究, 但该大鼠的生活习性繁殖规律容易受到外界环境方面的影响, 所以用于建造 NAFLD 的过程中受到外界干扰较大, 很容易影响实验结果, 且世界各地饲养 Wistar 大鼠的遗传状况差异较大, 使用此类大鼠时, 应注意甄别。

1.2 SD 大鼠模型

SD 大鼠是用 Wistar 大鼠培育而成的品种, 拥有许多优点, 也是现阶段 NAFLD 大鼠模型中最常用的大鼠类型, 其中以雄性 SD 大鼠和清洁级大鼠最为多见。Amirinejad 等^[9] 选择 18 只 SD 大鼠进行高脂饮食, 持续 7 周, 模型组体重升高, 食量增加、低密度脂蛋白胆固醇、AST、肝脂肪变性和 NAFLD 在预防阶段结束时均高于其他组, 成功造出大鼠 NAFLD 模型。林敏华等^[10] 选择 16 只 SD 大鼠随机分组后进行普通饲料与高脂饲料的对照喂养, 6 周后病理学发现高脂饲料组中 87.5% 大鼠肝脂肪变程度 > 33%, 肝细胞体积增大, 细胞质中出现大小不等的脂肪空泡, 细胞核被推向一边, 部分区域可见炎细胞浸润, 提示成功造出高脂饮食大鼠 NAFLD 模型。Qin 等^[11] 对成年 SD 大鼠进行常规饮食 (60% 碳水化合物, 25% 蛋白质, 8% 脂肪) 与高脂饮食 (HFD,

50%碳水化合物,15%蛋白质,35%脂肪)对照喂养,5 周后高脂饮食大鼠肝组织病理学显示肝细胞肿胀、局灶性坏死,出现 NAFLD 的相关症状和体征。金毅等^[12]选择 SPF 级雄性 SD 大鼠进行 CCl₄ 组与溶媒组的对照实验,给予 CCl₄ 模型组每周 2 次,每次 2 mL/kg 的 CCl₄ (40% CCl₄ 溶于橄榄油)皮下注射,溶媒组做相同处理,注射部位改为背部皮下,注射用物改为橄榄油,实验持续 4 周,组织病理学观察肝表面发黄,重量增加,以大泡性脂肪变性为主的病变,提示大鼠已经患 NAFLD。陈新群等^[13]将一组大鼠进行胆碱的氨基酸饮食喂养,另一组给予缺乏胆碱的氨基酸饮食建立 NAFLD 模型,结果是缺乏胆碱的氨基酸饮食可诱导大鼠肝组织病理学呈现变性、坏死、再生等形态,出现脂肪肝变,甚至肝纤维化。李易水等^[14]使用 60 只清洁级 SD 雄性大鼠随机分组,喂养高脂饲料(78.8%基础饲料+15%猪油+1%胆固醇+5%蔗糖+0.2%胆酸钠)建立大鼠 NAFLD 模型,以血清中 TC、TG、ALT、AST、TNF- α 以及肝组织中 TC、TG、FFA 的含量或活性、肝脏中 TLR4、MyD88 和 JNK 的 mRNA 和蛋白表达及 p-JNK 的蛋白表达水平显著升高,IL-10 的含量显著降低,病理学大鼠肝细胞内出现大小不一的脂滴空泡和气球样变为造模成功的标准。廖庆辉等^[15]将 24 只 SD 大鼠随机分成正常组和模型组,两组大鼠均正常饮食,模型组另使用 5% CCl₄ 花生油溶液(0.3 mL/10 g)多点皮下注射,每 5 d 1 次,病理学显示肝细胞肿胀,胞质疏散,含脂肪粒,肝细胞核固缩,肝组织 UCP2mRNA 和蛋白表达均明显高于正常组,建立 NAFLD 大鼠模型。车兴影等^[16]对新生 SD 大鼠自出生第 2、4、6、8、10 天皮下注射谷氨酸钠(MSG)溶液,病理学检测肝细胞发生脂肪变性伴炎性细胞浸润,肝重、ALT、AST、ALP 水平升高,诱导产生出 NAFLD 模型。

SD 大鼠性格较为暴躁,生长周期较长,所以有较为顽强的生命力,饲养过程中不易死亡,并且生长发育较 Wistar 大鼠更快,繁殖力更强。它对血压及血管阻力对药物反应敏感,使用药物作用在此类动物模型身上,观察其心血管反应取得 NAFLD 的模型效果明显。而且适应性和抗病能力更强,容易饲养并且不容易患其他疾病而影响实验结果,但是其价格较贵,饲养的规模没有 Wistar 大鼠广泛。

1.3 Zucker 大鼠

遗传性肥胖 Zucker 大鼠,它是由 Fa 基因突变

而成的隐性基因 fa 所致,包括瘦型和肥胖型两个亚系,又称 fa/fa 大鼠,是一种肥胖遗传大鼠,为广泛应用的遗传性肥胖病模型,可自发形成糖尿病、肥胖、NAFLD,表现为贪食、肥胖、肝脂肪变性、高胰岛素血症和胰岛素抵抗^[17]。此类大鼠进食量大、食欲亢进,KLP 酶的合成和降解速度加快。肥胖 2 型糖尿病大鼠(Zucker diabetic fatty rats,ZDF 大鼠)是在肥胖型 Zucker 大鼠中发现的能够发展成严重的 2 型糖尿病的大鼠,非常类似于人类肥胖,也经常被用于 NAFLD 模型建造。Matsumoto 等^[18]对照喂养 7 周龄的雄性肥胖 Zucker(fa/fa)大鼠,使用 53%玉米淀粉喂养大鼠,病理数据提示肝细胞中有大脂滴,ALP、ALT 和 AST 等标志物的血浆水平明显升高,大鼠出现 NAFLD 疾病。Hong 等^[19]用肥胖遗传的 Zucker 大鼠喂食含有大豆油的 AIN-93G 饮食,大鼠的采食量、体重均增加,病理学显示肝组织发生明显脂肪变性,ALT、AST 等功能相关的生物标志物升高等 NAFLD 的表现。

该类大鼠是从肥胖基因遗传的角度来建造 NAFLD 动物模型,会自发地形成 NAFLD 相关的症状或疾病,符合人类发生 NAFLD 的过程,同时从基因的独特角度诠释了 NAFLD 的发病,为多角度研究 NAFLD 提供了新思路,同时缩短了建造 NAFLD 的时间,极大地提高了效率。

2 非酒精性脂肪肝小鼠模型

小鼠基因组 93%的区域排列顺序与人类相似,其具有饲养廉价、繁殖迅速、易于造模、个体间差异小便于平行实验的观察等特点,NAFLD 小鼠模型可模拟不同致病因素及 NAFLD 每个阶段的病情发展,指导寻找出 NAFLD 的发病机制和其潜在的治疗靶点,也可用于 NAFLD 药物的筛选评估,与 NAFLD 的研究密切相关。小鼠模型有高脂高糖饲料、皮下注射 CCl₄、灌胃肠营养液等诱导,主要的方式是高脂饮食。当前实验研究中常用的小鼠有 C57BL/6J 小鼠、昆明小鼠、基因缺陷小鼠等。

2.1 C57BL/6J 小鼠

C57BL/6 小鼠对肥胖、2 型糖尿病和 NAFLD 的发展具有固有的方向偏好,是研究 NAFLD 疾病常用的动物模型。石英等^[20]用 32 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠,置于 12 h 的光照下循环和温度控制的环境,高脂肪饮食(Research Diet D12492)24 周后,病理学检测其肝大量脂滴沉积,形成空泡样变,

形成小鼠 NAFLD 模型。有学者改良了高脂饮食,将普通鼠粮研磨成粉末,蛋黄碾碎用漏斗过筛,豆油和猪油在锅中加热至冒烟,趁热将普通鼠粮(59%)、猪油(15%)、豆油(3%)、绵白糖(18%)、蛋黄(5%)倒入大盆中搅匀,加热水拌好,压成条状,放入鼓风干燥箱中 100℃干燥制成,12 周后,病理学检测肝细胞肿胀,含有大量的脂肪沉积、坏死,细胞间质可以看见有大量的炎细胞聚集^[21]。冯钟文等^[22]每天腹腔注射地塞米松 1 mg/kg,同时联合高脂饲料喂养 23 d,模型组小鼠肝细胞内病理学检测出现大量红色脂滴,血清检测 ALT、AST、TG、TC、LDL 水平显著升高,HDL 水平显著降低,形成小鼠 NAFLD 模型。李晓冲等^[23]除给小鼠喂养高脂饮食外,还给小鼠注射 CCl₄ 溶液,首次给小鼠皮下注射 CCl₄ 溶液时,以 0.72 ml/100 g 剂量注射,接下来的 3 周每周 1 次 0.42 ml/100 g,40%的 CCl₄ 植物油溶液进行皮下注射,病理学发现,4 周后 2/3 以上的肝细胞发生脂肪变性,8 周时有炎性细胞浸润灶,出现纤维化和大量空泡样变的肝细胞,形成小鼠 NAFLD 模型。马浩鑫等^[24]采用 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,先适应性喂养 1 周,再给小鼠灌胃肠营养液(配方为 10%蔗糖、10%猪油、3%鸡蛋黄、2%胆固醇、1%胆酸钠、0.5%丙硫氧嘧啶),为减少灌胃对小鼠的应激反应,从小剂量开始逐渐增加,每天两次,持续 16 周,试验期间小鼠自由采食和饮水,14 周时小鼠 TG、TC 含量显著增加,16 周时,小鼠肝内由大量的脂质沉积,试验末期病理学发现小鼠肝细胞出现脂质空泡(超过 30%),形成典型的 NAFLD 病变。

C57BL/6J 可用作同类系、易于繁殖、体格健壮、干预方便,是使用范围最广、销售最好的一支鼠株品种,现用 C57BL/6J 构造 NAFLD 模型,使用最多的方法是高脂饲料诱导,高脂饲料引起 C57BL/6J 小鼠血脂 TC 和 ALT 升高迅速、明显,适合 NAFLD 模型的制作,但是比较难以达到肝硬化阶段。

2.2 昆明小鼠

昆明小鼠是我国生产量、使用量最大的远交群小鼠,具有适应力强、繁殖力强、造模成活率高等优点,被广泛应用于药理学、毒理学等领域研究以及药品、生物制品的生产与检定。有学者用 6~8 周龄的雄性昆明小鼠,给予高热量饮食(60%脂肪,20%碳水化合物,20%蛋白质),8 周后病理学显示小鼠肝组织中明显的脂肪沉积,NAFLD 模型建立成功^[25]。王俊杰等^[26]给昆明小鼠喂养复合高脂饮食

(基础饲料+2%胆固醇+10%猪油+0.2%丙基硫氧嘧啶+0.5%胆酸钠,构成比均为质量分数)结合腹腔注射 5%CCl₄,病理学显示第 6 周末变形成了典型的脂肪肝病变,第 8 周末部分小鼠出现了典型的肝纤维化病变,提示 NAFLD 模型成功建立。Liu 等^[27]首先给予小鼠自由饮水和标准饲料,14 d 后,腹腔注射化学诱导剂 CCl₄(0.8%,CCl₄:花生油=1:125,v/v),注射后小鼠禁食 24 h,可获得饮用水,血清学检测小鼠血清 TG、TC 水平显著升高,病理学检测肝组织显示大面积坏死细胞,炎症细胞浸润。

昆明小鼠构建模型所需时间短,小鼠适应力很强,死亡率低,而且价格比较便宜,为 NAFLD 的发病机制和药物筛选研究提供了便利,但是目前用昆明鼠造模多采用灌胃或腹腔注射配合高脂饲料,不符合动物伦理,易造成死亡率上升。

2.3 基因缺陷小鼠

ob/ob 小鼠存在 ob(Lepo)纯合突变,易发生肥胖和脂肪变性,联合高脂饮食等,可进展为 NAFLD 模型。ob/ob 小鼠基因由于自然突变,造成瘦素缺乏,其肝纤维化发生率极低,甚至导致抗纤维化的发生,但人类极少出现瘦素缺乏的情况,故该模型与人类 NAFLD 发病机制存在差异。db/db 小鼠表现类似 ob/ob 小鼠,而瘦素含量比 ob/ob 小鼠高,给小鼠喂养 MCD 饮食,肝脏能出现明显的脂肪变性和纤维化,可作为典型的 NAFLD 模型,用于药物筛选评估^[28-29]。ob/ob 小鼠和 db/db 小鼠都是遗传性瘦素缺乏和瘦素抵抗类型。黑皮素 4(melanocortin receptor 4, MC4R)可用于调控动物体重,Mc4r^{-/-}小鼠通过喂食 HFD,20 周后,出现肥胖并有明显的纤维化,该模型具有研究非酒精性脂肪性肝炎晚期肝功能障碍的潜力^[30]。于温温等^[31]给载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠高脂饲料(10.0%猪油、20.0%蔗糖、10.0%蛋黄粉、0.5%胆酸钠和 59.5%常规饲料)喂养 7 周后,小鼠血清 TG、TC 水平显著升高,病理学检查肝可见弥漫性分布的肝细胞大小不均的空泡样变,为显著的肝脂肪变,提示 NAFLD 模型建立。Yang 等^[32]采用西方饮食喂养肝 CGI-58 基因敲除(LivKO)小鼠,14 周后,病理学显示小鼠肝细胞中出现大量脂滴堆积,NAFLD 模型成功建立。

上述模型中,小鼠的体重明显增加,均发生了肝脂肪变性,但 ob/ob、db/db 小鼠并没有出现肝纤维化和肝的炎症。用基因小鼠缺陷性小鼠制备 NAFLD 模型,成本较高,造模时间长,多用于联合模

型的制造,且多数基因缺陷小鼠与人类 NAFLD 发病机制存在较大的差异,故很少单独用于构建 NAFLD 模型。

2.4 其他鼠类模型

FVB/N 小鼠:喻兆阳等^[33]选择 6 周龄健康雌性 FVB/N 小鼠,通过给小鼠尾静脉高压注射生理盐水和 AKT/SB 质粒 1 次,病理学显示 1 周后胞质内充满大小不等的脂肪空泡,少部分细胞有明显的脂肪沉积,2 周后大部分细胞肿胀,细胞出现明显的脂肪沉积,3 周后肝细胞肿胀,呈中至重度脂肪变,部分小鼠肝脏出现多个炎症坏死灶,但未见明显的肝纤维化发生,成功建立 NAFLD 模型。通过该方法建立的模型用时短、死亡率低、成本低、与人类疾病特征相似,可用于今后的临床研究。

东方田鼠:东方田鼠在实验条件饲养下易发生脂肪肝病变,在基础饲料上添加 5%猪油、0.5%胆固醇、0.1%胆盐喂养东方田鼠,6 周后,病理学显示肝细胞出现脂肪变性,且为弥漫性脂肪变性,并出现了几个较大的脂肪滴,肝细胞核相对大小不均,成功建立 NAFLD 模型,所需时间较短,可以用于早期临床干预等方面的研究^[34]。

ICR 小鼠:Li 等^[35]用 7 周的 ICR 小鼠,先安置在温度(23±3)℃、湿度(50±10)%的受控房间中,光照 12 h/黑暗 12 h 循环,在适应 1 周后,给小鼠高脂饮食(总能量 60%来自脂肪),8 周后,病理学显示大量巨噬细胞浸润肝脂肪组织,结合小鼠血清 TAG、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇等的测定显示造模成功,成功构建模型时间较短,但是国内的 ICR 小鼠由国外引进,研究结果可能受到基因改变等因素的干扰。

沙鼠:沙鼠是良好的肥胖症动物模型,王妍璐等^[36]用清洁级雄性沙鼠,给予定制高脂饲料(89%基础饲料+1%胆固醇+10%猪油),自由进食,单笼喂养,16 周后病理学检查显示肝细胞充满脂滴,胶原纤维大量增生并形成纤维间隔,汇管区出现纤维化,提示造模成功。该试验模拟了人类由肝纤维化到 NAFLD 发展的过程,构建稳定的与人类疾病发展过程高度一致,且造模方法简单,考虑到后续需要取血的实验,成年沙鼠比大小鼠更方便。

长爪沙鼠:余兆硕等^[37]给予长爪沙鼠 80.5%的基础饲料与 19.5%高脂成分(蛋黄粉 10%,猪油 7%,胆固醇 2%,3 号胆盐 0.5%)的高脂饲料喂养,4 周后,病理学显示长爪沙鼠肝组织中出现明显的

肝细胞点状和灶状坏死,甚至有连成片的趋势,成功建立 NAFLD 长爪沙鼠模型。高脂饲料喂养长爪沙鼠形成的模型与临床患者有一定的相似性,且构建模型时间短。

3 非酒精性脂肪肝细胞模型

对于 NAFLD 的研究目前最常采用的是动物模型,但动物模型存在个体差异大、造模周期长、实验条件不易控制、动物本身与人类存在差异等不利因素,而细胞模型能较好地克服上述因素,根据实验要求可始终保持细胞活力,与人类疾病过程相近,可针对性地研究疾病的细胞机制。因此,建立 NAFLD 体外细胞模型对研究其发病机制与疾病发展,为进一步防治 NAFLD 具有重要的理论意义与广泛的应用价值。国内外学者常利用饱和或不饱和脂肪酸等诱导人肝细胞株 L-02(HL-7702)细胞和肝癌细胞株 HepG2 细胞构建 NAFLD 细胞模型。棕榈酸(palmitic acid, PA)是饮食和血清中最丰富的饱和脂肪酸,而油酸(oleic acid, OA)是最丰富的不饱和脂肪酸,将 PA 和(或)OA 加入肝细胞中,诱导肝细胞内的脂质沉积,以此得到的 NAFLD 模型已普遍应用^[38-39]。

3.1 L-02(HL-7702)细胞

L-02(HL-7702)细胞是人正常肝细胞,该细胞群体增殖迅速,倍增时间约为 20 h,呈现上皮样细胞形态,在电子显微镜下,可显示出桥粒和张力原纤维。尉捷等^[40]在正常人的 L02 细胞株中加入游离脂肪酸的混合物(OA:软脂酸=2:1),在培养 24 h 后,L02 细胞肝脂肪堆积,成功建立 NAFLD 细胞模型。王晨薇^[41]用 0.4 mmol 和 0.8 mmol 浓度 PA 处理 L02 细胞,72 h 后,L02 细胞中有大量脂质沉积,成功建成 NAFLD 模型。张艳玲^[42]通过体外培养 HL-7702 细胞,饥饿处理 24 h 后加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 OA,培养 24 h,病理学显示细胞内出现大面积脂肪变性,结合细胞内 TC、SOD 活性等指标,提示建模成功。吴鸿儒等^[43]用 50%胎牛血清、OA 分别建立 HL-7702 细胞脂肪肝的离体细胞模型,并通过检测细胞活性、细胞内脂滴数量、细胞内 TG 含量,0.5 mmol/ml OA 组和 50%胎牛血清组都能建立较好的肝细胞脂肪变性模型,但 0.5 mmol/ml OA 诱导的细胞脂变更为明显、更具有实用性和可重复性。上述实验中,PA 浓度越高,作用时间越长,L02 细胞的存活率越低,PA 处理细胞可导致 L-

02(HL-7702)细胞的凋亡;OA 诱导细胞脂滴积累明显,实验现象显著,但是其凋亡率较高。

另有学者采用脂肪乳来诱导,王炳芳等^[44]采用正常人的肝细胞 HL-7702,在其细胞培养液中加入静脉营养脂肪乳剂,病理学显示肝细胞产生明显中性脂肪堆积,传代培养两代发现肝细胞损伤,产生炎症性损伤,建立 NAFLD 细胞模型。陈益耀等^[45]采用人 L02 细胞,加入 20%脂肪乳的 1640 培养液培养,24 h 后传代继续加入相同培养液培养,24 h 后病理学显示 L02 细胞内出现大量橘红色脂滴,且细胞形态及活力均好,形成 NAFLD 模型。王曦^[46]采用肝 L02 细胞用 5%医用脂肪乳造模,24 h 后,细胞内产生脂滴,建立 NAFLD 模型。相比于普通脂肪乳,医用脂肪乳诱导 L-02(HL-7702)肝细胞,脂变率高、脂变细胞形态好、成功构建模型时间短,适合 L-02(HL-7702)肝细胞 NAFLD 模型的建立。

L-02(HL-7702)是最常用的构建 NAFLD 的细胞模型,现使用建模的方法主要为 PA、OA、脂肪乳诱导,脂肪酸诱导需要找到所需的最佳溶度,高溶度易造成细胞凋亡,医用脂肪乳可用于造模溶度与培养时间的研究。

3.2 HepG2 细胞

HepG2 细胞属于肝细胞系,保留着肝细胞的众多生物学特性,体外便于培养。杨妙婷等^[47]利用 OA 和 PA 以 2:1 比例混合制备成 1 mmol/L 游离脂肪酸混合液,添加入在大鼠血清中培养的 HepG2 细胞中,24 h 后,病理学显示 HepG2 细胞脂滴明显增加,发生脂肪变性,成功建成 NAFLD 模型。肖素军等^[48]采用含 0.4 mmol 油酸的 1%无脂肪酸 BSA-MEM 培养 Hep G2 细胞 24 h,病理学检测细胞内脂质沉积明显,细胞发生脂肪变性,成功构建体外 NAFLD 模型。高月等^[49]在含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养 HepG2 细胞于含 5%CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中,当孔板内细胞密度达到 70%~80% 时,加入 OA 和 PA 混合物(OA:PA=2:1),培养 24 h,细胞内脂质 A、TG 含量极显著增加,形成脂滴,模型构建成功。吴鹏波等^[50]用含 10%胎牛血清的培养基培养,置于温度为 37℃、含有 5%CO₂ 的细胞培养箱中,取对数生长期的 HepG2 细胞,接种于培养皿中,培养细胞过夜,加入 0.6 mmol/L OA 处理 8 h,病理学检测大量脂滴密集分布,脂质沉积明显,模型构建成功。

构建 HepG2 细胞 NAFLD 模型,大多数为脂肪

酸直接诱导,方法较简单,模型构建所需时间短。做实验时,应做好预实验,找准脂肪酸最佳溶度,减少细胞死亡率。

4 小结

通过不同方法、不同因素诱发的脂肪肝动物模型、细胞模型对脂肪肝的发病机制研究和药物治疗开发尤为重要。在上述多种构建 NAFLD 的动物模型中,高脂饲料诱导的 NAFLD 模型具有操作简便、成本较低、死亡率低,且形成的 NAFLD 模型与人类患病的病理生理方面较为相似等优点,是国内外研究者较常选用的造模方法。分析动物种类,其中基因型可通过基因的改变自发形成脂肪肝,在 NAFLD 的患病程度和疾病相关的代谢特征上有一定优势,但综合价格、培养时间、实验难易程度等多方面因素,Wistar 大鼠、SD 大鼠和 C57BL/6J 小鼠是构造模型最常用的老鼠种类。相对于动物模型,细胞构建模型在时间上占了很大的优势,其中 PA、OA 诱导是细胞模型最常选用的方法,L02 细胞与 HepG2 细胞是最常用的细胞种类。细胞模型实验步骤简单,可以较为细致地研究 NAFLD 的分子机制,有利于基因功能分子水平的探索,但细胞模型缺乏模拟人类疾病的经过。

NAFLD 是一种进行性的涉及多种肝损伤的代谢性疾病,对于其了解从单纯的“二次打击”学说发展到多重打击学说,由一开始认为的脂质代谢紊乱到联合细胞功能障碍、线粒体障碍、氧化应激、肠源性细菌毒素等多种因素相互促进,共同推动了 NAFLD 的发展。随着 NAFLD 的发病机制不断加深,其最主要的因素还是在现代人们的生活方式上,该疾病的治疗药物多集中在靶向治疗方向,而个体化饮食管理与生活方式的改变是治疗的基础,由于其复杂的发病机制,从代谢、炎症、肠道菌落等不同方面分别调控,联合用药理论上优于单一用药,可以更快控制多因素的影响。且肝活检为金标准的临床确诊,存在着有创等缺陷,引入无创肝检查将为临床试验与药效评估提供更直观的评判标准。

疾病实验模型对于疾病的药物研发和治疗起着十分重要的作用,实验模型的成功与否与整个实验的准确性和代表性息息相关,但不同致病因素所形成的 NAFLD 机制与临床病理变化存在差异,造模时间也有所不同。因此,根据需求选择合适的实验模型至关重要。

参考文献:

- [1] 樊亚东, 贾建伟, 张晓雨, 等. 非酒精性脂肪性肝病发病机制和临床治疗研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(1): 93-96.
- [2] Cariello M, Piccinin E, Moschetta A. Transcriptional regulation of metabolic pathways *via* lipid-sensing nuclear receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(5): 1519-1539.
- [3] Eslam M, Sanyal AJ, George J. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2020, 158(7): 1999-2014.
- [4] Hashimoto E, Tokushige K, Ludwig J. Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: current concepts and remaining challenges [J]. Hepatol Res, 2015, 45(1): 20-28.
- [5] Gheibi S, Gouvarchin Ghaleh HE, Motlagh BM, et al. Therapeutic effects of curcumin and ursodexycolic acid on non-alcoholic fatty liver disease [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108938.
- [6] 周琪, 许文立, 王莉, 等. 多氯联苯 118 诱导大鼠非酒精性脂肪肝病的研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(5): 659-663.
- [7] Stephen Robert JM, Peddha MS, Srivastava AK. Effect of silymarin and quercetin in a miniaturized scaffold in wistar rats against non-alcoholic fatty liver disease [J]. ACS Omega, 2021, 6(32): 20735-20745.
- [8] 孙红爽, 李鹏霖, 刘永双, 等. 大黄素对大鼠非酒精性脂肪肝及肝组织 11 β -羟类固醇脱氢酶 1 表达的影响 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(3): 22-26, 32.
- [9] Amirinejad A, Hekmatdoost A, Ebrahimi A, et al. The effects of hydroalcoholic extract of spinach on prevention and treatment of some metabolic and histologic features in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Sci Food Agric, 2020, 100(4): 1787-1796.
- [10] 林敏华, 邓桂清, 欧宇轩, 等. 高脂饲料诱导幼鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 医学理论与实践, 2019, 32(15): 2321-2323, 2326.
- [11] Qin H, Chen H, Zou Y, et al. Systematic investigation of the mechanism of *Cichorium glandulosum* on type 2 diabetes mellitus accompanied with non-alcoholic fatty liver rats [J]. Food Funct, 2019, 10(5): 2450-2460.
- [12] 金毅, 邢伟, 吕爱贞, 等. 不同方法诱导大鼠非酒精性单纯性脂肪肝模型的 CYP 酶活性比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 75-83.
- [13] 陈新群, 徐丽姝, 李东风, 等. GLP-1 对胆碱缺乏氨基酸饮食介导的非酒精性脂肪肝纤维化大鼠的治疗作用 [J]. 循证医学, 2017, 17(3): 163-170.
- [14] 李易水, 储心乔, 彪雅宁, 等. 当归芍药散对非酒精性脂肪肝大鼠 TLR4/MyD88/JNK 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 24-31.
- [15] 廖庆辉, 郭中秋, 赖康保, 等. 维格列汀对大鼠非酒精性脂肪肝的影响 [J]. 广州医科大学学报, 2019, 47(2): 22-24, 36.
- [16] 车兴影, 韩继武. FGF21 对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞 TLR4/p38MAPK 通路的影响 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(5): 130-135.
- [17] LaBranche TP, Kopec AK, Mantena SR, et al. Zucker lean rats with hepatic steatosis recapitulate asymptomatic metabolic syndrome and exhibit greater sensitivity to drug-induced liver injury compared with standard nonclinical sprague-dawley rat model [J]. Toxicol Pathol, 2020, 48(8): 994-1007.
- [18] Matsumoto Y, Fujita S, Yamagishi A, et al. Brown rice inhibits development of nonalcoholic fatty liver disease in obese zucker (*fa/fa*) rats by increasing lipid oxidation *via* activation of retinoic acid synthesis [J]. J Nutr, 2021, 151(9): 2705-2713.
- [19] Hong L, Zahradka P, Cordero-Monroy L, et al. Dietary docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) operate by different mechanisms to modulate hepatic steatosis and hyperinsulemia in *fa/fa* zucker rats [J]. Nutrients, 2019, 11(4): 917.
- [20] 石英, 拉巴普尺, 张丹瑛, 等. 双歧杆菌对高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠非酒精性脂肪肝的影响 [J]. 中国临床医学, 2022, 29(3): 473-480.
- [21] 李美菓, 田书云, 张迪. 非酒精性脂肪肝 C57BL/6J 小鼠模型建立 [J]. 山东化工, 2021, 50(20): 162-164, 167.
- [22] 冯钟文, 庞丽君, 陈思韵, 等. 香蜂草苷对地塞米松诱导 C57BL/6J 小鼠非酒精性脂肪肝的保护作用及其机制 [J]. 中药材, 2021, 44(4): 961-965.
- [23] 李晓冲, 张秀英, 徐尚, 等. C57BL/6J 小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(1): 6-8.
- [24] 马浩鑫, 朱桂达, 张晓霞, 等. 一种非酒精性脂肪肝小鼠模型的建立方法 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(14): 80-84.
- [25] Huang X, Gao Y, Cao H, et al. Effects of scoparone on non-alcoholic fatty liver disease revealed by RNA sequencing [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 1004284.
- [26] 王俊杰, 方会龙, 李经纬, 等. 非酒精性脂肪肝模型小鼠的建立 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(24): 4395-4399.
- [27] Liu T, Tan F, Long X, et al. Improvement effect of lotus leaf flavonoids on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. Biomedicines, 2020, 8(2): 41.
- [28] Trak-Smayra V, Paradis V, Massart J, et al. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet [J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(6): 413-421.
- [29] Wang B, Chandrasekera P, Pippin J. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes [J]. Curr Diabetes Rev, 2014, 10(2): 131-145.
- [30] Yamada T, Kashiwagi Y, Rokugawa T, et al. Evaluation of hepatic function using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in melanocortin 4 receptor-deficient mice as a model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Magn Reson Imaging,

- 2019, 57: 210–217.
- [31] 于温温, 张金华, 刘云娜, 等. 贻贝多糖对高脂饮食诱导的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠非酒精性脂肪肝的改善作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 369–376.
- [32] Yang P, Wang Y, Tang W, et al. Western diet induces severe nonalcoholic steatohepatitis, ductular reaction, and hepatic fibrosis in liver CGI-58 knockout mice [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4701.
- [33] 喻兆阳, 何阳, 罗伟, 等. AKT 基因介导的小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2016, 45(2): 170–175.
- [34] 杨玉琴, 冯洁, 柏熊, 等. 东方田鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 34–38, 封 2.
- [35] Li Z, Jin H, Oh SY, et al. Anti-obese effects of two *Lactobacilli* and two *Bifidobacteria* on ICR mice fed on a high fat diet [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 480(2): 222–227.
- [36] 王妍璐, 彭伟康, 梁嘉乐, 等. 高脂饮食诱导沙鼠非酒精性脂肪肝性纤维化模型的建立 [J]. 广东医科大学学报, 2022, 40(3): 263–266, 271.
- [37] 余兆硕, 汪惠勤, 高观祯, 等. 河蚬汤食源纳米颗粒对非酒精性脂肪肝长爪沙鼠的影响 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 116–120.
- [38] Lee MR, Yang HJ, Park KI, et al. *Lycopus lucidus* Turcz. ex Benth. Attenuates free fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells and non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice [J]. Phytomedicine, 2019, 55: 14–22.
- [39] Jiang H, Guan Q, Xiao Y, et al. Strontium alleviates endoplasmic reticulum stress in a nonalcoholic fatty liver disease model [J]. J Med Food, 2018; Nov 17.
- [40] 尉捷, 董艳敏, 王辉, 等. 五味子乙素对 NAFLD 细胞模型肝脂质堆积、内质网应激信号通路蛋白及脂肪酸合成相关基因表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(12): 45–49.
- [41] 王晨薇. LPS 对 PA 诱导的脂质沉积的肝细胞的影响及 PPAR δ 的作用和机制的体外研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [42] 张艳玲. 丁酸钠与小檗碱联合应用对非酒精性脂肪性肝病改善作用的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [43] 吴鸿儒, 陈韶华, 卢轶, 等. 两种非酒精性肝细胞脂肪变性模型的比较 [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(4): 297–299.
- [44] 王炳芳, 朱韶杰, 田培营. 脂肪肝细胞模型的建立及其生物学特性 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(35): 3674–3677.
- [45] 陈益耀, 陈轶, 何周桃, 等. 原儿茶酸、白杨素对非酒精性脂肪肝细胞模型的抗氧化作用 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2018, 28(5): 294–296, 后插 1.
- [46] 王曦. 基于线粒体功能调节的滇黄精缓解非酒精性脂肪肝药效及机制探究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2019.
- [47] 杨妙婷, 陈芝娟, 肖淳欣, 等. 护肝清脂片药物血清对非酒精性脂肪肝细胞模型内质网应激的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(11): 1277–1287.
- [48] 肖素军, 肖亚君, 吴培赛, 等. 水飞蓟宾缓解油酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积的机制探讨 [J]. 中国临床新医学, 2021, 14(11): 1092–1096.
- [49] 高月, 黄文祥, 章述军, 等. 人参皂苷 Rg1 对非酒精性脂肪肝 HepG2 细胞脂质摄取和氧化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 100–106.
- [50] 吴鹏波, 宋琪, 俞媛洁, 等. 姜黄素对非酒精性脂肪肝细胞模型保护作用以及机制研究 [J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(3): 324–327.

[收稿日期]2022–10–28