

王佳林,王重阳,李杨,等. 饮食诱导非酒精性脂肪性肝病动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 93-96.

Wang JL, Wang CY, Li Y, et al. Advances in animal models of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 93-96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.014

饮食诱导非酒精性脂肪性肝病动物模型的研究进展

王佳林,王重阳,李 杨,陈贤玮,袁中楠,邹朝霞*,邹臣丹*

(哈尔滨医科大学,哈尔滨 150081)

【摘要】 建立科学有效的动物模型是完成疾病研究的关键步骤。饮食诱导是常见的建立非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)疾病动物模型的方法。常见饮食诱导NAFLD的动物模型主要包括高脂高糖饮食诱导模型、高脂高胆固醇饮食诱导模型和胆碱缺乏饮食诱导模型,由于不同造模方式摄入的营养成分不同,使得肝出现脂肪性变形、炎症及纤维化等病理特征不同。此外,不同动物模型的疾病进程、疾病严重程度以及适用的研究亦各有不同。本文通过分析比较常见的不同饮食诱导NAFLD动物模型在造模方式、造模时间、病理学特征、适用研究及相关优缺点,为NAFLD研究者选择动物模型提供参考。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病;啮齿类动物;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0093-04

Advances in animal models of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease

WANG Jialin, WANG Chongyang, LI Yang, CHEN Xianwei, YUAN Zhongnan, ZOU Chaoxia*, ZOU Chendan*
(Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

【Abstract】 The establishment of effective animal models is crucial for disease research. Dietary induction is a common method to establish animal models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The common animal models of diet-induced NAFLD mainly include high fat and sugar, high fat and cholesterol, and choline-deficient diet-induced models. Because of the various nutrients ingested in different modeling method, pathological characteristics of the liver, such as fatty deformation, inflammation, and fibrosis, are different. Additionally, animal models vary in terms of disease progression, disease severity, and applicable studies. This study analyzed and compared the common animal models of NAFLD induced by various diets in terms of modeling method, modeling time, pathological characteristics, applicable research, and related advantages and disadvantages to provide a reference for NAFLD researchers to select animal models.

【Keywords】 non-alcoholic fatty liver disease; rodents; animal model

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

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种连续进展、病程多变的疾病^[1]。NAFLD早期以非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)为主,若不加以有效

干预,随着病程进程,可加重进展为肝纤维化、肝硬化甚至出现肝细胞癌^[2]。NAFLD的发生与多种因素密切相关,如肥胖、细胞凋亡、代谢综合征等均可引起疾病发生。此外,免疫、肠道细菌和表观遗

【基金项目】国家自然科学基金青年科学基金(81900553)。

【作者简介】王佳林(1997—),女,硕士研究生,研究方向:非酒精性脂肪性肝病与不同的造模方式的研究。E-mail:wecghjun@163.com

【通信作者】邹臣丹(1987—),女,博士,讲师,硕士生导师,研究方向:转录后调控在肝疾病发生发展中的功能及机制研究。

E-mail:zouchendan1114@126.com

邹朝霞(1978—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:恶性肿瘤发生发展分子机制的研究。

E-mail:Zouchaoxia006@126.com

* 共同通信作者

传改变也都是引起 NAFLD 发生的重要因素^[3]。

NAFLD 一直是科学家关注的热点研究领域,但关于 NAFLD 的发病机制和药物开发的研究仍然充满巨大的挑战。目前尚无能够全面模拟人 NAFLD 的发病机制、多阶段疾病进展和全部病理生理指标的 NAFLD 动物模型^[4]。肥胖、糖尿病、血脂异常及胰岛素抵抗等因素与人类 NAFLD 发生密切相关,现有的 NAFLD 模型多通过不同方式对营养摄入进行干预,在啮齿类动物中重现上述部分病理指标,以模拟 NAFLD 病理状态。但由于造模原理和方式不尽相同,导致不同模型表现出疾病进展阶段和病理生理指标并不一致。因此,其疾病相关的分子表达与调控机制也可能不同,利用不同动物模型所开展的研究可能会影响对研究结果的判断,因此开展 NAFLD 疾病动物模型评价与分析对 NAFLD 研究具有重要意义。

常见的 NAFLD 动物模型主要是高脂高糖饮食诱导模型、高脂高胆固醇饮食诱导模型以及蛋氨酸、胆碱缺乏饮食诱导模型等。本文对目前主流的饮食诱导 NAFLD 动物模型造模方法进行比较分析,以期研究人员选择动物模型提供参考。

1 高脂高糖饮食诱导模型

1.1 反式脂肪联合果糖诱导 C57BL/6 小鼠建模

该模型又被称为美国生活方式诱导肥胖综合征 (American lifestyle-induced obesity syndrome, ALIOS) 模型。果糖会导致肥胖,而反式脂肪 (部分氢化植物油) 的摄入则会导致肝脂肪变性和肝损伤^[5]。果糖是在肝葡萄糖的摄取和糖原合成过程中起调节作用的调节因子,它会干扰葡萄糖的代谢过程,过量的果糖水平会导致甘油三酯水平的升高,肝中脂肪的升高影响了糖原异生,从而引起了脂肪的变性^[6-7]。

研究人员将 5~6 周龄 C57BL/6 雄鼠给予 45% 高脂饲料 (反式脂肪) 和 4.2% 果糖果冻喂食 16 周,果糖水可以增强食欲,提高进食量,加剧胰岛素抵抗。实验组的体重增长很快,到第 1 周时,ALIOS 小鼠的体重已比对照组小鼠增加 4.3%。到 8 周时,ALIOS 小鼠的体重增长开始放缓,随后的体重增长与对照组小鼠平行。16 周时,ALIOS 小鼠的体重比对照组小鼠重 42%,与 ALIOS 小鼠相比,高脂肪饮食中不含反式脂肪并没有显著体重增加。葡萄糖耐量在 2 周内降低,4 周时空腹血糖显著升高,8 周

时胰岛素抵抗明显,16 周时,观察大多数肝细胞出现了脂肪空泡、小叶炎症等 NASH 早期病理特征,但没有出现纤维化^[5]。

高脂高糖饮食诱导的小鼠 NASH 表现为肥胖、体重增加,伴有胰岛素抵抗。与人类饮食诱导的 NASH 模型类似,并且肝脂肪变性明显。一项研究发现反式脂肪诱导大鼠第三区肝脂肪变性,但是没有明显的纤维化,且造模时间相对较短^[8]。该模型被认为是早期的 NAFLD 疾病研究的理想模型,但是在研究中晚期的 NAFLD 变化时,并非首选。

1.2 中链反式脂肪联合果糖诱导 C57BL/6 小鼠建模

研究人员将 6~8 周龄 C57BL/6 雄鼠给予 58% 高脂饲料 (氢化椰子油,一种中链反式脂肪) 和 4.2% 高果糖水喂食 16 周。12 周时空腹血糖和胰岛素显著升高,伴有胰岛素抵抗。在 16 周时,肝细胞可见微泡和大泡脂肪变性、炎症和细胞凋亡明显增多。50% 的小鼠可见明显的纤维化^[9]。虽然高脂饮食会产生代谢综合征等一系列症状,但是果糖的摄入可能是将单纯的肝脂质沉积转移为纤维化的必要条件,另外果糖的摄入形式也影响着纤维化的形成^[9]。该模型出现了 NAFLD 中的肝脂肪变性、炎症、肝纤维化等一系列病理变化,可以作为研究 NAFLD 不同病理阶段及疾病进展的有力工具。

2 高脂高胆固醇饮食诱导模型

2.1 60% 高脂 (60% high Fat, HF60) 联合 2.5% 胆固醇诱导 C57BL/6 小鼠建模

营养过剩和久坐不动是 NASH 发生发展的重要因素,它可以引起体重的增加,进而导致肥胖^[10]。高脂饮食诱导模型可以引起肥胖、胰岛素抵抗和肝细胞损伤^[11]。大量研究证明,饮食中的胆固醇与非酒精性脂肪性肝炎发生发展密切相关^[12-13],并且胆固醇已被证明通过多种病理机制参与 NASH 发展进程^[14]。而且,研究已经证明在肥胖糖尿病小鼠和患者中肝游离的胆固醇累积,降低胆固醇水平的药物可以缓解伴有代谢综合征的小鼠肥胖和糖尿病症状^[15-17]。

研究人员将 C57BL/6 雄鼠给予 HF60 鼠粮、2.5% 胆固醇喂食 12 周,出现了肝脂肪变性、炎症和明显的纤维化^[18]。高脂高胆固醇饮食诱导模型造模周期相对较短,可以作为短期内研究 NAFLD 病理变化和机制的首选模型。

2.2 高脂高胆固醇 (high-fat/high-cholesterol, HFHC) 诱导 ApoE 敲除小鼠建模

喂食西方饮食的 ApoE 敲除小鼠已经被广泛用作啮齿动物动脉粥样硬化模型^[19]。许多研究表明, ApoE 敲除的小鼠在适当的代谢环境下可能发展出人类 NASH 特征的全谱肝病^[20-21]。

研究人员将 ApoE 敲除雄鼠给予 HFHC 喂食 12 周, 小鼠模型出现典型的 NASH 病理特征, 出现脂肪变性、炎细胞浸润, 但是肝细胞纤维化不明显, 伴随肥胖及相关代谢综合征的发展, 包括体重增加、糖耐量受损和动脉粥样硬化。该模型显示了与人类 NASH 相似的肝表型, 包括肝脂肪变性、氧化应激、促炎细胞因子产生增加和血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine amino transferase, ALT) 水平升高。此外, 这些肝症状与人类代谢综合征相似, 包括肥胖、高胰岛素血症、葡萄糖不耐受和血脂异常^[22]。因此, 由 HFHC 饲料喂食的 ApoE 敲除小鼠适合作为研究肥胖和代谢综合征背景下单纯性脂肪变性向 NASH 的进展的动物模型。

3 胆碱缺乏饮食诱导模型

3.1 胆碱缺乏氨基酸饮食 (choline deficient diet, CDAA) 诱导 C57BL/6 小鼠建模

胆碱缺乏饮食诱导模型是研究 NASH 的经典模型。胆碱是磷脂酰胆碱的前体物质。胆碱缺乏导致肝不能以极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 的形式转运甘油三酯, 导致甘油三酯在肝中迅速堆积, 引起肝脂肪变性^[23]。将 8 周龄的 C57BL/6 雄鼠给予 CDAA 鼠粮喂食 22 周, 除了产生脂肪性炎症, CDAA 诱导产生了体重增加、胰岛素抵抗、炎细胞浸润及纤维化, 这些表现与人类 NASH 病理过程一致^[24]。虽然此模型产生的病理变化与人类 NASH 类似, 但是它造模周期较长, 且没有同时出现肥胖、高血糖症和高甘油三酯血症等代谢综合征的特点, 尚需进行进一步优化, 以建立全面模拟人类 NASH 病理特征动物模型。

3.2 蛋氨酸和胆碱缺乏饮食 (methionine and choline deficient diet, MCDA) 模型

MCD 是 NAFLD 研究中最常用饮食之一, 它可以在最短时间内产生最严重的 NASH 表型。这种高蔗糖 (40%) 和高脂肪 (10%) 但缺乏蛋氨酸和胆碱的饮食可以在 2~4 周内迅速诱导小鼠和大鼠出现可测量的 NAFLD 特征, 如肝脂肪变性 (主要是大泡

性), 并在此后不久发展为炎症和纤维化^[25-26]。此外, 与其他饮食动物模型相比, MCD 饮食改变了葡萄糖代谢, 但没有胰岛素抵抗, 影响肝脂质代谢, 导致脂肪酸摄取显著增加, VLDL 分泌减少, 并诱导显著纤维化^[27-29]。虽然 MCD 模型在相对较短的时间内复制了人类 NASH 的组织学表型, 但相关体重减轻和缺乏全身性胰岛素抵抗使其与人类 NAFLD 有很大不同。因此, MCD 模型的使用受到其与人类 NASH 代谢参数差异的限制。重要的是, 该模型中差异表达基因与人类 NASH 之间的一致性较差。

研究人员将 8~10 周龄 db/db 雌鼠给予 MCD 饲料喂食 4 周, 小鼠出现了体重、血清 TC 及 TG 降低, ALT 升高。病理结构类似于人类 NASH, 保留部分胰岛素抵抗, 体重轻微降低, 部分弥补了 MCD 饲料诱导 C57BL/6 小鼠 NASH 模型的不足^[29]。

4 总结和展望

随着生活水平的提高和饮食结构的改变, NAFLD 的患病率不断提高, 若不加以有效干预, 将严重影响国民身体健康, 是亟需解决的临床问题^[2]。影响 NAFLD 疾病发生、发展的因素包含有很多种, 其中脂质代谢紊乱引起肝脂沉积是 NAFLD 发生的关键环节, 通过饮食诱导的方法建立理想的 NAFLD 研究动物模型以模仿上述病理特征, 为研究疾病发病机制、疾病进展、生物标志物、治疗靶点和临床试验设计提供重要支撑^[30-31]。本文比较了多种饮食诱导的 NAFLD 模型, 其中在高脂高糖饮食诱导模型中, 如果糖以果冻的形式摄入, 小鼠肝脂肪变性明显, 但是没有出现明显的纤维化; 而果糖以碳水化合物的形式摄入, 则小鼠肝发生脂肪变性、炎症和纤维化^[18]; 在高脂高胆固醇饮食诱导模型中, 小鼠出现 NAFLD 病理变化的周期变短, 可以作为短期内研究 NAFLD 发病机制的重要选择, 但纤维化不明显^[22]; 而在胆碱缺乏饮食诱导模型中, 虽然它的造模周期长, 但该模型与人的 NAFLD 的病理生理特征极为相似^[24]。针对 NAFLD 不同的病理阶段及研究目的, 选择合适的动物模型对科学研究成果的完成至关重要。本文希望基于对以上动物模型比较分析, 为研究人员针对不同研究目的选择适合的动物模型提供参考。

参考文献:

- [1] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies

- [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [2] 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.
- [3] Kanda T, Goto T, Hirotsu Y, et al. Molecular mechanisms: connections between nonalcoholic fatty liver disease, steatohepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1525.
- [4] Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell*, 2021, 184(10): 2537-2564.
- [5] Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(5): G987-G995.
- [6] Armutcu F, Coskun O, Gürel A, et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38(6): 540-547.
- [7] Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice [J]. *Hepatology*, 2009, 50(4): 1094-1104.
- [8] Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types [J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 36(3): 485-501.
- [9] Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2010, 52(3): 934-944.
- [10] 蔡江帆, 陈民利. 非酒精性脂肪肝炎动物模型的研究概况 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 128-136.
- [11] 王芄芄, 黄磊, 伍晓雄, 等. 高脂饮食对小鼠脂质代谢和 leptin 基因表达水平的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(1): 40-44.
- [12] Van Rooyen DM, Gan LT, Yeh MM, et al. Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 144-152.
- [13] Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, et al. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(9): 1626-1635.
- [14] Marí M, Caballero F, Colell A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis [J]. *Cell Metab*, 2006, 4(3): 185-198.
- [15] Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, et al. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(4): 1393-1403.
- [16] Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, et al. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(4): 789-796.
- [17] Min HK, Kapoor A, Fuchs M, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(5): 665-674.
- [18] Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 81-92.
- [19] Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(8): 1706-1721.
- [20] Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(11): 1635-1648.
- [21] Tous M, Ferré N, Camps J, et al. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 268(1-2): 53-58.
- [22] Ye D, Li FY, Lam KS, et al. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice [J]. *Gut*, 2012, 61(7): 1058-1067.
- [23] Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(1): 323-334.
- [24] Yang L, Miura K, Zhang B, et al. TRIF differentially regulates hepatic steatosis and inflammation/fibrosis in mice [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 3(3): 469-483.
- [25] Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, et al. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(1): G264-G273.
- [26] Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111(6): 1645-1653.
- [27] Machado MV, Michelotti GA, Xie G, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127991.
- [28] Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance [J]. *J Hepatol*, 2004, 40(1): 47-51.
- [29] Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(5): 1068-1076.
- [30] Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis [J]. *Hepatology*, 2010, 52(5): 1836-1846.
- [31] 姜慧玲, 关桥伟, 龚林, 等. 微量元素总改善大鼠非酒精性脂肪肝的机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(2): 7-14.