

薛静波,杨金凤,黄恺,等. 三种非酒精性脂肪肝炎模型病证特点的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 34-43.

XUE J B, YANG J F, HUANG K, et al. Comparison research of disease characteristics in three non-alcohol steatohepatitis models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 34-43.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.004

三种非酒精性脂肪肝炎模型病证特点 的比较研究

薛静波¹, 杨金凤¹, 黄恺¹, 彭渊¹, 陶艳艳^{1*}, 刘成海^{1,2,3*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203; 2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203; 3. 上海中医药大学肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 比较四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)注射复合高脂饲料饮食(high fat diet, HFD)、蛋氨酸胆碱缺乏饮食(methionine and choline deficient diet, MCD)以及高脂高糖高胆固醇饮食(aymlin liver NASH, AMLN)诱导的三种非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)模型血清学及病理学特征。**方法** 分别采用 CCl₄ 注射复合高脂饲料饮食(CCl₄+HFD)、MCD、AMLN 喂养 10、8 和 6 周, 制备小鼠 NASH 模型。比色法检测血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和血糖(glucose, GLU)的水平及肝组织甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性; 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清胰岛素(fasting insulin, FINS)含量并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistant, HOMA-IR); 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、天狼猩红染色及油红 O 染色观察肝组织炎症、脂滴生成及胶原沉积情况, 并根据非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)活动度评分(NAFLD activity score, NAS)对肝组织脂肪性肝炎分级评分。**结果** 与各正常组小鼠相比, 3 种模型组小鼠血清 ALT、AST 活性、肝 TG、TC、MDA 含量及 SOD 活性均有显著上升; 其中 AMLN 模型组及 CCl₄+HFD 模型组小鼠的血清 FINS、GLU 的含量显著升高, HOMA-IR 指数显著升高; MCD 模型组小鼠血清 FINS、GLU 的含量及 HOMA-IR 指数显著下降。HE 染色、油红 O 染色及 NAS 评分结果显示, 3 种模型组小鼠的肝组织均已进展到脂肪性肝炎阶段, 且 CCl₄+HFD 模型组小鼠肝组织胶原沉积最明显, AMLN 模型组小鼠肝脂滴最丰富。**结论** 上述三种模型均可稳定模拟人类 NASH 疾病的血清学及病理学变化, 其中 AMLN 模型可模拟人类的发病过程及机制, 且胰岛素抵抗、氧化应激等全身代谢紊乱表现, 但耗时较长, 纤维化进展较慢。MCD 饮食 8 周即可模拟 NASH 的血清及病理学特征, 但无肥胖胰岛素抵抗发生。CCl₄ 复合 HFD 模型 10 周即可诱导 NASH 模型, 能模拟其血清学及病理学变化, 且肝组织纤维沉积与氧化应激损伤明显。

【关键词】 非酒精性脂肪肝炎; MCD 模型; AMLN 模型; 胰岛素抵抗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0034-10

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82274305), 上海市临床重点专科建设项目(shslczdk01201)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82274305), Shanghai Key Clinical Specialty of Traditional Chinese Medicine (shslczdk01201).

【作者简介】 薛静波, 女, 硕士, 研究方向: 慢性肝病。Email: iamcynthiaxue@163.com

【通信作者】 陶艳艳, 女, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 中医药治疗慢性肝病的基础。Email: taoyanyan1023@126.com;

刘成海, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中医药治疗慢性肝病的基础与临床。

Email: chenghailiu@hotmail.com。

* 共同通信作者

Comparison research of disease characteristics in three non-alcohol steatohepatitis models

XUE Jingbo¹, YANG Jinfeng¹, HUANG Kai¹, PENG Yuan¹, TAO Yanyan^{1*}, LIU Chenghai^{1,2,3*}

(1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Ministry of Education), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: TAO Yanyan. E-mail: taoyanyan1023@126.com; LIU Chenghai. E-mail: chenghailiu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To compare the serological and pathological characteristics of 3 nonalcoholic steatohepatitis (NASH) models: high-fat diet (HFD) with carbon tetrachloride (CCl₄) injection, methionine and choline deficient diet (MCD), and Aymlin liver NASH (AMLN) diet-induced NASH models. **Methods** 3 NASH models were established by feeding mice an HFD with CCl₄ injection for 10 weeks, MCD for 8 weeks and NASH for 26 weeks. After feeding, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose (GLU), liver triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD) activity were measured. Insulin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the homeostasis model assessment of insulin resistant (HOMA-IR) index was calculated. Hematoxylin-eosin (HE), Sirius red, and oil red staining were used to indicate pathological changes to the liver. The NAS score was used to grade the pathology. **Results** Compared to each normal control (NC) group mice, all mice in the 3 model groups had an obvious increase in serum transaminase and liver TG, TC, MDA levels and SOD activity. The levels of serum FINS, GLU and the HOMA-IR index were significantly increased in the AMLN and CCl₄+ HFD model groups but decreased in the MCD model group. According to the HE, oil red staining and NAS score, mice in all 3 groups had NASH phenotypic changes. Liver collagen deposition was most obvious in mice in the CCl₄+ HFD model group. Liver lipid droplets were most abundant in the AMLN model group. **Conclusions** All the above 3 animal models can stably simulate the serological and pathological changes of NASH in human. The AMLN model can simulate the progress and mechanism of the disease, as well as systemic metabolic disorders such as insulin resistance and oxidative stress. However, it is time-consuming and the fibrosis progression rate is slow. The MCD diet can simulate the serological and pathological features of NASH in 8 weeks, but no obesity or insulin resistance occurred. The CCl₄ combined with HFD model can induce NASH model in 10 weeks, which can simulate its serological and pathological changes, and the liver has obvious fibrous deposition and oxidative stress damage.

【Keywords】 non-alcoholic steatohepatitis; MCD model; amylin model; insulin resistance

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

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 发病率逐年升高, 其可从单纯脂肪肝逐渐进展为非酒精性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化, 甚至导致肝硬化、肝癌、肝功能衰竭等终末期肝病, 已成为全球最常见的肝病^[1]。但是目前尚无 NASH 治疗药物获批。NASH 的新药研发依赖合适的动物模型, 目前常见的 NASH 动物模型主要分为纯饲料诱导、饲料复合化学药物诱导以及基因编辑动物模型三类。高脂饮食 (high fat diet, HFD) 模型是一种常见的扰乱脂质代谢, 导致脂肪肝变性, 诱

导 NASH 发生的造模方法。小鼠对高脂饲料较敏感, 长期喂养后容易出现高脂血症、高胰岛素血症异常的变化, 从而模拟人类 NAFLD 的组织病理学和发病机制; 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 能诱导肝发生氧化应激反应, 导致有毒脂质和过氧化产物的积累, 造成广泛性肝损伤, 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 的水平也明显升高^[2]。CCl₄ 与 HFD 相结合制备复合 NASH 模型, 可以促进小鼠 NASH 和肝纤维化的发展^[3]。蛋氨酸胆碱缺乏饮

食(methionine and choline deficient diet, MCD)模型的脂肪性肝炎发展速度快,其病理病变与人类 NASH 类似,其发病机制是由于蛋氨酸和胆碱的缺乏,导致低密度脂蛋白胆固醇合成减少,因此无法将甘油三酯运出肝外而在肝内累积形成脂肪肝^[4-5]。并且胆碱缺乏也会引起肝线粒体内部活性氧增加,最终导致肝的氧化应激损伤^[6]。含高脂高糖高胆固醇(amylin liver NASH, AMLN)饮食模型由 Amylin Pharmaceuticals 公司研发的一种西方饮食(western diet, WD)模型,能快速稳定增加小鼠体质量与脂肪,其含有的反式脂肪也能促进小鼠肝脂肪变性^[7-8]。

本研究比较了 CCl₄ 复合高脂饮食(CCl₄ + HFD)、蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)及高脂高糖高胆固醇饮食(AMLN)三种常用的小鼠 NASH 模型,并初步探讨上述模型的病理特征及发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只,6 周龄,18 ~ 20 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2022-0004】,饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】,在恒温(22 ~ 25 ℃),恒湿(相对湿度 50% ~ 60%),12 h 循环照明的 SPF 级环境下饲养,自由饮食和水。本实验通过上海中医药大学伦理委员会审批(PZSHUTCM210813009)。

1.1.2 主要试剂与仪器

高脂饲料(60 kcal%脂肪热量高脂鼠粮,货号 HF60-5 kg)、蛋氨酸及胆碱缺乏饲料(货号 MCD-5 kg)、蛋氨酸及胆碱充足饲料(MCD 对照鼠粮,货号 MCS-5 kg)和高脂高糖高胆固醇饲料(反式脂肪(40%)胆固醇(2%)果糖(22%),货号 AMLN-10kg),以上均购自 DYETS 公司;普通饲料购自普路腾公司;ALT 测试盒(Cat No. C009-1)、AST 测试盒(Cat No. C010-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(Cat No. A001-3-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、血糖(glucose, GLU)试剂盒(Cat No. A154-2-1)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(Cat No. 10004160)、油红 O 染色试剂盒(Cat No. D027-1-2),均购自南京

建成生物研究所;TG 试剂盒(Cat No. A0-10027)、TC 试剂盒(Cat No. A0-10017),购自浙江东瓯诊断产品有限公司。

3-18KS 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);BSA3202SCW 型电子天平(德国 Sartorius 公司);数字病理扫描仪(日本 Olympus 公司);ASP300 自动脱水机、EG1160 石蜡包埋机、RM2035 切片机、CM1850 冰冻切片机、HI1220 烤片机(德国 LEICA 公司);全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司);Powerwave XS 全波长酶标仪(美国 Biotek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模方法

(1) CCl₄ + HFD 模型:雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,随机分为 CCl₄ + HFD 正常组与 CCl₄ + HFD 模型组,每组 10 只。CCl₄ + HFD 正常组小鼠给予普通饲料;CCl₄ + HFD 模型组小鼠给予 HFD 4 周,于第 5 周开始腹腔注射 2 mL/kg 15% CCl₄,第 6 周开始腹腔注射 2 mL/kg 10% CCl₄,每周 2 次,同时高脂饲料喂养 10 周。

(2) MCD 模型:雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,随机分为 MCD 正常组和 MCD 模型组,每组 10 只。MCD 正常组小鼠给予蛋氨酸胆碱充足饲料(methionine-choline sufficient, MCS);MCD 模型组小鼠 MCD 喂养 8 周。

(3) AMLN 模型:雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,随机分为 AMLN 正常组与 AMLN 模型组,每组 10 只。AMLN 正常组小鼠给予普通饲料;AMLN 模型组给予 AMLN 喂养 26 周。

1.2.2 动物处理

所有小鼠采用 3%戊巴比妥钠以 30 mg/kg 腹腔注射进行麻醉,打开腹腔,下腔静脉取血,室温静置 2 h,以 4 ℃,3000 r/min,离心 15 min,收集血清,4 ℃保存。采血后剪断下腔静脉,摘取小鼠的肝、脾并称重记录。留取约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 大小肝组织,10%甲醛溶液固定,另留取约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 大小肝组织,OCT 包埋冷冻,其余肝组织于-80 ℃保存。

1.2.3 观察指标及检测方法

(1) HE 染色:选取肝最大叶中部同区域 5 mm 见方组织 1 块,10%中性福尔马林固定,自动脱水机逐级乙醇脱水,二甲苯透明,包埋,切

片,观察肝组织的病理变化。采用 HE 染色观察肝组织学损伤。由本研究所两位病理专家盲法阅片计算 NAFLD 活动度积分 (NAFLD activity score, NAS) 评分。

(2) 采用美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组指南的 NAS 积分^[9],见表 1。纤维化等级评价采用 2005 年美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组优化的 NAFLD 分级评分标准^[9],详见表 2。

表 1 非酒精性脂肪性肝病 NAS 评分表

Table 1 NAFLD activity scoring system				
项目 Item	评分标准 Standard of scoring			
	0 分 0 piont	1 分 1 piont	2 分 2 pionts	3 分 3 pionts
肝细胞脂肪变比例/% Proportion of steotosis grade/%	< 5%	5% ~ 33%	34% ~ 66%	> 66%
小叶内炎症坏死灶数量/个 (× 20) Number of lobular inflammation/numbers (× 20)	0	< 2	2 ~ 4	> 4
肝细胞气球样变 Ballooning degeneration	无 None	少见 Few	多见 Many	-

表 2 肝纤维化分级标准
Table 2 Liver fibrosis grading

分级 Grade	纤维化程度 Fibrosis stage
F0	无 None
F1a	轻度,3 区窦周 Mild, zone 3, perisinusoidal
F1b	中度,3 区窦周 Moderate, zone 3, perisinusoidal
F1c	汇管区 Portal/periportal
F2	汇管区周围窦周 Portal/periportal and perisinusoidal
F3	桥接 Bridging
F4	肝硬化 Cirrhosis

(3) 油红 O 染色:将准备好的 OCT 冰冻组织切片后,室温回温 10 min,放入装有试剂 1 应用液的染缸中染色 10 ~ 15 min,用 37 ℃ 蒸馏水洗 5 ~ 20 s。试剂 2 复染液染色 3 ~ 5 min,水洗 30 ~ 60 s,未待表面水干透,即可滴加已 60 ℃ 预热至液态的试剂 3 水性封固剂于玻片表面,进行封片。

(4) 天狼星红染色:肝组织固定,常规脱水包埋;切片,常规脱蜡至水,天狼星红染色液滴染,流水冲洗,去除切片表面染液,Mayer 苏木素染色

液染细胞核,流水冲洗,常规脱水透明,中性树胶封固。

(5) 血清生化指标检测:血清 ALT 活性通过试剂盒采用赖氏法检查;血清 AST 活性通过试剂盒采用比色法检测。

(6) 血清 GLU、胰岛素、脂联素:GLU 含量通过试剂盒采用葡萄糖氧化酶法检查;血清胰岛素 (fasting insulin, FINS) 和脂联素 (adiponectin, ADP) 含量通过 ELISA 检查。胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment of insulin resistant, HOMA-IR) 计算公式为: $HOMA - IR = GLU \times FINS / 22.5$ 。

(7) 肝脂质含量检测:肝组织 TG、TC 含量测定,取肝组织制备为肝组织匀浆,通过试剂盒进行检测。

(8) 肝脂质过氧化指标检测:取肝组织制备为肝组织匀浆,通过试剂盒,检测 SOD、MDA 等指标。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad prism 9.0 软件对数据进行统计分析。统计描述中的测量数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并使用计数数据。当满足方差的正态性和同质性时,通过两组间 *t* 检验比较, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。等级分组资料的比较通过 Radit 分析来计算;计量资料多组间比较,采用单因素方差分析 (One way ANOVA)。

2 结果

2.1 三种 NASH 模型小鼠的一般情况

造模期间,各正常组小鼠状态良好,毛发光泽,反应敏锐,体质量缓慢增加。各模型组小鼠造模后活动量减少,精神状态变差,毛发欠光滑,反应迟钝。CCl₄ + HFD 及 AMLN 模型组小鼠体质量较其正常组增长快;而 MCD 模型组小鼠体质量较正常组减少明显,小鼠均无死亡。AMLN 模型组小鼠的肝体比较 AMLN 正常组显著增加,而在另外两个模型组中,肝体比无显著变化 (详见表 3)。

2.2 三种 NASH 模型小鼠血清生化及肝脂质含量的比较

三种 NASH 模型小鼠的血清 ALT、AST 水平与肝组织 TG、TC 含量均显著增加 (表 4)。其中在 AMLN 模型组小鼠血清 ALT、AST、GLU 水平、

表 3 各组造模前后体质量及肝体比($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Body weight before and after modeling and liver body mass ratio in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	造模前体质量/g Body mass before modeling/g	造模后体质量/g Body mass after modeling/g	肝体比/% Liver body mass ratio/%
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	22.02 ± 0.55	28.77 ± 1.90	4.69 ± 0.16
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	23.36 ± 1.21	30.21 ± 1.64	4.86 ± 0.68
MCD 正常组 MCD NC group	25.28 ± 1.29	27.06 ± 1.11	4.31 ± 0.29
MCD 模型组 MCD model group	25.69 ± 1.47	14.85 ± 0.67 ^{##}	4.06 ± 0.45
AMLN 正常组 AMLN NC group	22.80 ± 1.30	32.05 ± 3.34	4.24 ± 0.27
AMLN 模型组 AMLN model group	22.93 ± 1.57	41.29 ± 2.92 ⁺⁺	8.57 ± 1.61 ⁺⁺

注:与 MCD 正常组相比,^{##} $P < 0.01$;与 AMLN 正常组相比,⁺⁺ $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with MCD NC group,^{##} $P < 0.01$. Compared with AMLN NC group,⁺⁺ $P < 0.01$. (The same in the following tables)

表 4 各组血清 ALT、AST 水平及肝组织 TG、TC 含量($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Serum ALT、AST and liver TG、TC level in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	谷丙转氨酶/(U/L) ALT/(U/L)	谷草转氨酶/(U/L) AST/(U/L)	总胆固醇/(mg/g) TC/(mg/g)	甘油三酯/(mg/g) TG/(mg/g)
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	22.64 ± 9.26	24.39 ± 5.70	2.93 ± 1.57	15.08 ± 2.93
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	247.74 ± 61.23 ^{**}	112.92 ± 43.58 ^{**}	5.14 ± 1.62 [*]	29.91 ± 3.25 ^{**}
MCD 正常组 MCD NC group	13.87 ± 8.15	21.69 ± 11.57	2.37 ± 0.73	21.84 ± 0.33
MCD 模型组 MCD model group	137.78 ± 41.73 ^{##}	65.96 ± 26.53 ^{##}	3.31 ± 1.27	33.02 ± 3.53 ^{##}
AMLN 正常组 AMLN NC group	13.21 ± 2.11	17.51 ± 2.70	2.34 ± 0.31	35.73 ± 3.91
AMLN 模型组 AMLN model group	170.20 ± 66.03 ⁺⁺	68.33 ± 30.48 ⁺⁺	9.55 ± 2.07 ⁺⁺	53.67 ± 4.92

注:与 CCl₄+ HFD 正常组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with CCl₄+ HFD NC group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$. (The same in the following tables)

HOMA-IR 指数和肝 TC 含量增加最为显著,较正常组分别升高约 15、10、0.5、2.5 和 3.0 倍。在 CCl₄+ HFD 模型组中,小鼠血清 FINS 水平和肝 TG 含量上升最为显著,约为 CCl₄+ HFD 正常组的 1 倍,且 SOD 与 MDA 的变化尤为显著。而 AMLN 模型小鼠的肝 TC 含量增加最为明显,约为 AMLN 正常组的 3 倍,且其血清 GLU 及 HOMA-IR 指数上升最为显著(表 5)。

2.3 三种 NASH 模型小鼠血糖代谢的比较

如表 6 可见,CCl₄+ HFD 模型组和 AMLN 模型组小鼠的血清 GLU、FINS、HOMA-IR 等指标均有显著增加($P < 0.05$),且 AMLN 模型组比 CCl₄+ HFD 模型组的上升更为明显(表 5)。但在 MCD 诱导的 NASH 模型中,GLU、FINS 含量及

HOMA-IR 指数显著下降(见表 6)。在 MCD 模型组及 AMLN 模型组中,小鼠血清 ADP 较其正常组均有下降,而在 CCl₄+ HFD 模型组中,ADP 水平没有显著差异(见表 5、7)。

2.4 三种造模方法小鼠肝组织脂滴形成的变化

采用美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组指南的 NAS 积分,对三种造模方法进行比较 NAS 评分(详见表 7)。结果显示三种 NAS 模型成功建立,其中 MCD 模型组的 NAS 评分最高,AMLN 模型组的 NAS 评分比其余两组略低。三种模型组的 HE 染色及油红 O 染色,均可见肝细胞有明显脂肪变性,小叶内有大量炎症细胞浸润、胞内有大小不一的脂滴形成(图 1),其中

AMLN 模型组形成的脂滴最多最大, CCl₄ + HFD 模型组的炎性浸润和纤维化程度最严重, 详见表 5。

表 5 各模型组与其正常组相比的血清生化
和肝脂质含量的变化率(*n* = 10, %)

Table 5 Level change in serum biochemical indexes and liver lipid in each model group compared with the NC group(<i>n</i> = 10, %)			
指标 Item	CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	MCD 模型组 MCD model group	AMLN 模型组 AMLN model group
谷丙转氨酶变化率 ΔALT	↑ 994. 30	↑ 893. 40	↑ 1503. 00
谷草转氨酶变化率 ΔAST	↑ 359. 20	↑ 204. 10	↑ 979. 00
总胆固醇变化率 ΔTC	↑ 75. 40	↑ 39. 70	↑ 308. 10
甘油三酯变化率 ΔTG	↑ 98. 30	↑ 51. 20	↑ 50. 20
葡萄糖变化率 ΔGLU	↑ 18. 60	↓ 49. 06	↑ 48. 40
胰岛素变化率 ΔFINS	↑ 100. 00	↓ 92. 03	↑ 141. 50
胰岛素抵抗指数变化率 ΔHOMA-IR	↑ 98. 70	↓ 95. 51	↑ 257. 10
超氧化物歧化 酶变化率 ΔSOD	↓ 24. 81	↓ 13. 00	↓ 22. 16
丙二醛变化率 ΔMDA	↑ 120. 60	↑ 48. 30	↑ 76. 50
脂联素变化率 ΔADP	↓ 0. 21	↓ 14. 43	↓ 16. 14

注: ↑: 增加; ↓: 下降。
Note. ↑. Up. ↓. Down.

表 6 各组 GLU、FINS、HOMA-IR 和 ADP 水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 GLU, FINS, HOMA-IR and ADP level in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)				
组别 Groups	葡萄糖/(mmol/L) GLU/(mmol/L)	胰岛素/(ng/mL) FINS/(ng/mL)	胰岛素指数 HOMA-IR	脂联素/(ng/mL) ADP/(ng/mL)
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	6. 98 ± 0. 94	2. 38 ± 0. 88	0. 75 ± 0. 17	145. 29 ± 17. 06
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	8. 28 ± 1. 10**	4. 76 ± 1. 05**	1. 49 ± 0. 34**	144. 99 ± 17. 70
MCD 正常组 MCD NC group	7. 99 ± 0. 95	2. 51 ± 2. 67	0. 89 ± 0. 20	150. 08 ± 24. 85
MCD 模型组 MCD model group	4. 07 ± 1. 03##	0. 20 ± 0. 15##	0. 04 ± 0. 01##	128. 43 ± 12. 93#
AMLN 正常组 AMLN NC group	8. 82 ± 1. 78	1. 42 ± 0. 76	0. 56 ± 0. 13	291. 10 ± 39. 41
AMLN 模型组 AMLN model group	13. 09 ± 2. 71**	3. 43 ± 1. 35**	2. 00 ± 0. 46**	244. 13 ± 40. 38

注: 与 MCD 正常组相比, **P* < 0. 05。(下表同)
Note. Compared with MCD NC group, **P* < 0. 05. (The same in the following tables)

2.5 三种 NASH 模型小鼠肝组织胶原沉积的比较

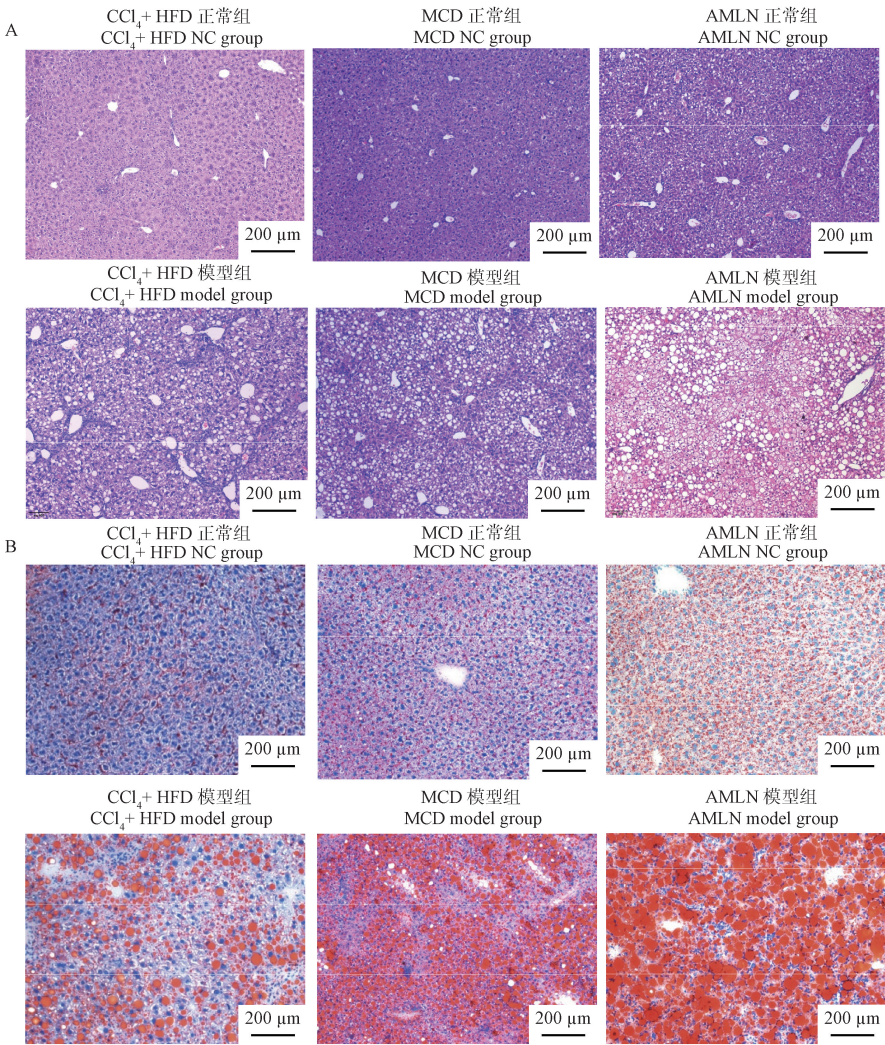
肝纤维化等级评价采用 2005 年美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组优化的 NAFLD 分级评分标准^[9]。三种 NASH 模型的肝纤维化分级, 其中 CCl₄ + HFD 模型组的纤维化评分最高, MCD 模型组小鼠肝纤维化评分最低(表 8)。结合天狼猩红染色可见, CCl₄ + HFD 模型组较其余两组胶原纤维沉积更明显(图 2)。

2.6 三种 NASH 模型小鼠脂质过氧化的比较

如表 9 可见, 三种模型组小鼠肝组织 SOD 活性均有所下降, 同时 MDA 含量均有所增加(*P* <

表 7 三种非酒精性脂肪性肝炎模型的 NAS
评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 NAS score in three of NASH animal models ($\bar{x} \pm s, n = 10$)	
组别 Groups	NAS 评分 NAS score
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	0. 00 ± 0. 00
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	6. 10 ± 1. 29**
MCD 正常组 MCD NC group	0. 00 ± 0. 00
MCD 模型组 MCD model group	6. 73 ± 0. 65##
AMLN 正常组 AMLN NC group	0. 00 ± 0. 00
AMLN 模型组 AMLN model group	4. 78 ± 0. 78**



注:A:HE 染色;B:油红 O 染色。

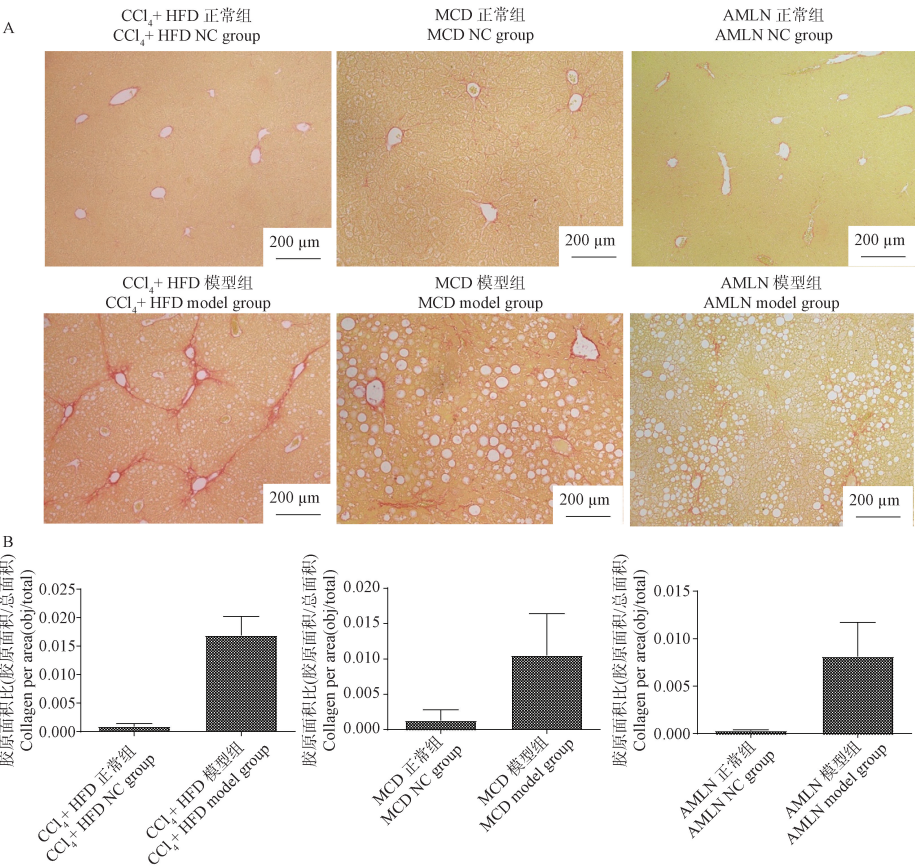
图 1 三种 NASH 模型小鼠肝 HE 及油红 O 染色

Note. A. HE staining. B. Oil red staining.

Figure 1 Mice liver HE and oil red stainingin in three of NASH models

表 8 小鼠肝纤维化程度分期评价($n = 10$)						
Table 8 Liver fibrosis staging evaluation of mice($n = 10$)						
组别 Groups	胶原纤维增生程度分级 Liver fibrosis staging evaluation					R
	F0	F1	F2	F3	F4	
CCl ₄ + HFD 正常组	10	0	0	0	0	-
CCl ₄ + HFD NC group						
CCl ₄ + HFD 模型组	0	0	0	8	2	0.000**
CCl ₄ + HFD model group						
MCD 正常组	10	0	0	0	0	-
MCD NC group						
MCD 模型组	2	6	1	1	0	0.000##
MCD model group						
AMLN 正常组	10	0	0	0	0	-
AMLN NC group						
AMLN 模型组	2	7	1	0	0	0.000+ +
AMLN model group						

表 9 小鼠肝组织 MDA 含量和 SOD 活性($\bar{x} \pm s, n = 10$)		
Table 9 Liver MDA level and SOD activity in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)		
组别 Groups	超氧化物歧化酶/(U/mgprot) SOD/(U/mgprot)	
	丙二醛/(nmol/mgprot) MDA/(nmol/mgprot)	
CCl ₄ + HFD 正常组	245.37 ± 17.06	1.99 ± 0.34
CCl ₄ + HFD NC group		
CCl ₄ + HFD 模型组	184.49 ± 21.64 [#]	4.39 ± 1.38 [#]
CCl ₄ + HFD model group		
MCD 正常组	255.51 ± 5.51	2.42 ± 0.10
MCD NC group		
MCD 模型组	222.29 ± 13.88 ^{##}	3.59 ± 0.40 [#]
MCD model group		
AMLN 正常组	203.32 ± 8.14	1.66 ± 0.51
AMLN NC group		
AMLN 模型组	158.27 ± 27.06 ^{##}	2.93 ± 1.31 [#]
AMLN model group		



注:A:天狼星红染色;B:胶原面积半定量图。

图 2 三种非酒精性脂肪性肝炎模型的天狼星红染色及胶原面积半定量

Note. A. Sirius red staining. B. Collagen semi-quantitative area.

Figure 2 Mice liver sirius red staining and collagen semi-quantitative area in three of NASH models

表 10 三种 NASH 模型的特征比较

Table 10 Characteristic comparison in three of NASH animal models

指标 Item	CCl ₄ +HFD 模型组 CCl ₄ +HFD model group	MCD 模型组 MCD model group	AMLN 模型组 AMLN model group
体质量 Body mass	+	-	++
炎症 Inflammation	++	+	+++
脂肪积聚 Adiposis	++	+	++
纤维化 Fibrosis	++	+	+
过氧化 Peroxidation	+++	+	++
胰岛素抵抗 Insulin resistant	+	-	++
耗时 Time cost	+	+	++

注:+++;强阳性;++;中等阳性;+,弱阳性;-:阴性。
Note. +++. Strong positive. ++. Moderate positive. +. Weak positive. -. Negative.

0.05);CCl₄+HFD 模型组与 AMLN 模型组小鼠的指标变化更为显著(见表 10)。

3 讨论

3.1 常用 NASH 动物模型的现状

目前常见的 NASH 动物模型主要分为纯饲料诱导、饲料复合化学药物诱导和基因编辑诱导这三类。纯饲料诱导模型中常用的是 WD 模型和营养缺乏模型。常见的 WD 模型又分为 HFD 模型、高脂高胆固醇饮食 (high-fat high-cholesterol HFHC) 模型、高脂高糖饮食 (american lifestyle-induced obesity syndrome, ALIOS) 模型、AMLN 模型等。这些 WD 饮食诱导模型接近人类肥胖致病的过程,模拟了疾病代谢特征,但造模时间普遍较长,需要 26 周以上^[10]。其中 AMLN 模型综合了 HFD 模型、ALIOS 模型、HFHC 模型的特点,含有高脂肪 (含反式脂肪) 高糖高胆固

醇,是广泛使用的纯饲料诱导模型。本研究造模 26 周,出现了炎症、脂肪变及轻度纤维化等 NASH 典型特征,但在病理上出现了一定的异质性,与文献一致^[7],如想要更严重的纤维沉积,可能需要延长模型到 30 周以上。由于 2018 年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和欧洲开始禁止使用反式脂肪作为食品添加剂, AMLN 饲料的改良版 Gubra Amylin NASH(GAN) 饲料应运而生,用棕榈油取代反式脂肪。GAN 模型的脂肪变性、NAS 评分和纤维化程度与 AMLN 模型相似,可完美替代^[11-12]。MCD 模型是最常见的营养缺乏饮食诱导 NASH 模型,可在短期内(8 周)发展出与人类 NASH 类似的病理病变,如脂肪变性、炎症以及纤维化等。由于蛋氨酸与胆碱的缺乏,负责运输 TG 的低密度脂蛋白胆固醇合成下降,脂肪在肝内累积并导致活性氧的增加造成肝损伤^[4-6]。其发病机制却与人类大相径庭,模型小鼠体质量下降明显,且没有胰岛素抵抗^[4,13]。本研究用 MCD 诱导造模 8 周,病理可见明显的炎症、脂肪变性与轻度纤维化,但没有胰岛素抵抗,与文献一致。

目前常用的饲料复合化学药物诱导 NASH 模型是链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导模型和 CCl₄ 诱导模型,两者均须复合高脂饮食饲养。STZ 诱导模型常见于诱导 I 型糖尿病,胰岛 β 细胞功能被破坏,约 12 周内出现脂肪性肝炎与纤维化,20 周时可高发肝癌。该模型与人类 NASH 组织病理学相似,但不会导致胰岛素抵抗^[14]。CCl₄ 单独诱导模型仅能导致肝纤维化,而不发生肥胖和胰岛素抵抗等病变,但联合高脂饲料后,CCl₄ 可促进高脂饮食对 NASH 和肝纤维化的发展^[15]。但此模型小鼠体质量下降,与人类肥胖导致 NASH 的成因不同。

ob/ob 和 db/db 小鼠是最常见的基因编辑诱导的 NASH 模型,一般与高脂饲料联用,可用于诱导 II 型糖尿病。肥胖基因(OB 基因)表达瘦素可调节体质量和脂肪沉积,而糖尿病相关基因(DB 基因)表达瘦素受体。因此 OB 或 DB 纯合小鼠由于瘦素缺失极易引起肥胖和胰岛素抵抗,造成肝脂质蓄积、炎症和纤维化^[16],然而先天性瘦素缺乏或瘦素抵抗在人类 NASH 患者中并不多见。

3.2 三种 NASH 模型的生化、病理特点及潜在

机制的比较

本研究中 AMLN 模型组小鼠 ALT、AST 及 TC 水平升高最为显著,约为其正常组小鼠的 15、10 和 3 倍,且从油红 O 染色来看,其肝内形成的脂滴液最多。AMLN 模型组小鼠的血清 GLU、FINS 及 HOMA-IR 指数的上升最为显著。以上这些表明模型组小鼠与人类肥胖致病相似,产生了明显的炎症、脂肪变型与胰岛素抵抗^[16]。HFD 复合 CCl₄ 模型组小鼠 TG 升高和肝纤维化最为明显,且其肝 SOD 和 MDA 的变化最为显著,提示氧化应激可能是造成此模型肝损伤的主要机制。CCl₄ 经 P450 酶代谢激活,生成自由基及一系列过氧化产物诱发肝持续产生氧化应激,造成过氧化产物的积累从而导致肝损伤^[15]。与另外两种模型不同,MCD 模型组小鼠体质量与血清中的 GLU、FINS 含量明显减少,没有产生胰岛素抵抗,与之前报道一致。其发病机制与人类不同,是由于蛋氨酸和胆碱的缺乏,影响小鼠体内脂肪和胆固醇代谢,从而促进脂质在肝内蓄积^[13,4]。

另外三个模型中,AMLN 模型在炎症、脂肪蓄积和胰岛素抵抗上,最接近人类发病过程,但其耗时最长,造模 26 周后,肝的胶原沉积比较轻微,要想看到显著纤维化可能需要造模 30 周以上。MCD 模型与 HFD 复合 CCl₄ 模型耗时较少,但 MCD 模型完全没有胰岛素抵抗,而 HFD 复合 CCl₄ 模型在诱发肝纤维化方面的优势比较明显。

综上所述,三种方法均可成功建立 NASH 模型,各组在生化指标、肝病理及基本机制上各有特点。可根据临床具体研究方向来挑选适合的一种或多种模型来进行实验。针对非肥胖型的脂肪肝研究可选择 MCD 模型,由于毒物引起的脂肪肝研究可优先选择 HFD 复合 CCl₄ 模型,而由高脂饮食引起的传统脂肪肝研究可优先考虑 AMLN 模型,更接近人类肥胖胰岛素抵抗的发病机制。

参 考 文 献(References)

- [1] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20.
- [2] ZHAN Y Y, WANG J H, TIAN X, et al. Protective effects of seed melon extract on CCl₄-induced hepatic fibrosis in

- mice [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 193: 531–537.
- [3] KUBOTA N, KADO S, KANO M, et al. A high-fat diet and multiple administration of carbon tetrachloride induces liver injury and pathological features associated with non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2013, 40(7): 422–430.
- [4] ITAGAKI H, SHIMIZU K, MORIKAWA S, et al. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12): 2683–2696.
- [5] JHA P, KNOFF A, KOEFELER H, et al. Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(7): 959–970.
- [6] HENSLEY K, KOTAKE Y, SANG H, et al. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria [J]. Carcinogenesis, 2000, 21(5): 983–989.
- [7] CLAPPER J R, HENDRICKS M D, GU G, et al. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 305(7): G483–G495.
- [8] TREVASKIS J L, GRIFFIN P S, WITTMER C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302(8): G762–G772.
- [9] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN NATTA M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313–1321.
- [10] IM Y R, HUNTER H, DE GRACIA HAHN D, et al. A systematic review of animal models of NAFLD finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human NAFLD [J]. Hepatology, 2021, 74(4): 1884–1901.
- [11] BOLAND M L, ORÓ D, TØLBØL K S, et al. Towards a standard diet-induced and biopsy-confirmed mouse model of non-alcoholic steatohepatitis: impact of dietary fat source [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(33): 4904–4920.
- [12] HANSEN H H, ÆGIDIUS H M, ORÓ D, et al. Human translatability of the GAN diet-induced obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis [J]. BMC Gastroenterol, 2020, 20(1): 210.
- [13] RINELLA M E, GREEN R M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance [J]. J Hepatol, 2004, 40(1): 47–51.
- [14] FUJII M, SHIBAZAKI Y, WAKAMATSU K, et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma [J]. Med Mol Morphol, 2013, 46(3): 141–152.
- [15] TSUCHIDA T, LEE Y A, FUJIWARA N, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer [J]. J Hepatol, 2018, 69(2): 385–395.
- [16] 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.

[收稿日期] 2024–01–17