



3种饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型表型比较

孟庆楠, 张晓芙, 熊雪莲

引用本文:

孟庆楠, 张晓芙, 熊雪莲. 3种饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型表型比较[J]. *中国临床医学*, 2022, 29(4): 669–673.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220548>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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

Effects of *bifidobacteria* on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in C57BL/6 mice

中国临床医学. 2022, 29(3): 473–480 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220242>

综合方法治疗非酒精性脂肪性肝炎临床疗效分析

Clinical efficacy of comprehensive treatments on patients with non-alcoholic steatohepatitis

中国临床医学. 2019, 26(4): 561–567 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190485>

大黄酸对小鼠非酒精性脂肪肝病的治疗效果分析

Therapeutic effect of rhein on non-alcoholic fatty liver disease in mice

中国临床医学. 2021, 28(1): 106–110 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20200155>

强肝胶囊治疗非酒精性脂肪性肝病的临床疗效分析

Analysis of the clinical effect of Qianggan capsule in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease

中国临床医学. 2016, 23(4): 534–536 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160236>

三酰甘油/高密度脂蛋白胆固醇比值对青少年肥胖人群非酒精性脂肪性肝病的预测价值

Diagnostic value of triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio in non-alcoholic fatty liver disease in obese adolescents

中国临床医学. 2019, 26(6): 875–879 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20191033>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220548

· 短篇论著 ·

3种饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型表型比较



孟庆楠, 张晓芙, 熊雪莲*

复旦大学附属中山医院内分泌科, 上海 200032

引用本文 孟庆楠, 张晓芙, 熊雪莲. 3种饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型表型比较[J]. 中国临床医学, 2022, 29(4): 669-673. MENG Q N, ZHANG X F, XIONG X L. Comparison of three diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2022, 29(4): 669-673.

[摘要] **目的** 比较3种饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)小鼠模型的特征, 从而为NASH的机制研究和药物研发提供参考。**方法** 分别用高脂饮食(HFD)喂养24周、Amylin饮食喂养24周、高脂-蛋氨酸胆碱缺乏饮食(HFMCDD)喂养10周, 诱导小鼠NASH表型, 并用正常饮食(CD)小鼠作为对照, 每组10只。喂养结束后分别检测其体重、肝质量, 血清转氨酶(肝脏损伤指标)、肝脏三酰甘油(肝脏脂质沉积指标)、肝脏羟脯氨酸(肝纤维化指标)水平, 以及胰岛素敏感性。对小鼠肝组织切片进行苏木精-伊红(H-E)染色和天狼星红染色, 以观察其组织学变化。**结果** HFD组小鼠发生明显肥胖和胰岛素抵抗, 血清转氨酶升高、肝脏三酰甘油沉积、肝脏羟脯氨酸沉积和肝脏组织炎症病变程度小。Amylin饮食组小鼠发生明显肥胖、胰岛素抵抗、血清转氨酶升高、肝脏三酰甘油沉积、肝脏羟脯氨酸沉积, 以及严重的NASH肝脏组织病理学改变。HFMCDD组小鼠诱导饮食后相对短时间内发生较严重的血清转氨酶上升、肝脏三酰甘油沉积、肝脏羟脯氨酸沉积和肝脏病理学改变, 未发生胰岛素抵抗和肥胖。**结论** 3种饮食诱导的小鼠模型各有其特点, 其中, Amylin饮食诱导的NASH模型更符合人NASH发生发展过程。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎; 高脂饮食; Amylin饮食; 高脂-蛋氨酸胆碱缺乏饮食; 动物模型

[中图分类号] R 575.1 **[文献标志码]** A

Comparison of three diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis

MENG Qing-nan, ZHANG Xiao-fu, XIONG Xue-lian*

Department of Endocrinology and Metabolism, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China

[Abstract] **Objective** To compare different diet-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) mouse models, so as to provide a reference for NASH related study. **Methods** Mice were randomly divided into four groups with 10 mice in each group. NASH models were established by feeding with high-fat diet (HFD) for 24 weeks, Amylin diet for 24 weeks, and high-fat methionine- and choline-deficient diet (HFMCDD) for 10 weeks, respectively. 10 mice feeding by chow diet (CD) was used as control. After feeding, body weight, liver weight, serum transaminase, liver triglyceride (TG), and liver hydroxyproline levels were measured. Fasting blood glucose and insulin tolerance test (ITT) were used to assess insulin sensitivity. Hematoxylin-eosin (H-E) staining and Sirius red staining were used to indicate pathological changes of liver. **Results** The mice in HFD group had obesity and insulin resistance, mild serum transaminase, liver TG, liver hydroxyproline levels, and inflammatory changes in the liver. The mice in Amylin group occurred obvious NASH accompanied with obesity and severe insulin resistance. The mice in HFMCDD group had severe NASH phenotype changes in a relative short time, without obesity and insulin resistance. **Conclusions** All three diet-induced mouse models show different advantages and disadvantages. NASH models induced by Amylin diet recaptures the key NASH features observed in patients.

[Key Words] nonalcoholic steatohepatitis; high-fat diet; Amylin diet; high-fat methionine- and choline-deficient diet; animal model

[收稿日期] 2022-04-02 **[接受日期]** 2022-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81970740), 上海市科委青年科技启明星计划(20QA1402000I). Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81970740) and Shanghai Rising-Star Program (20QA1402000I).

[作者简介] 孟庆楠, 硕士生. E-mail: 19211210008@fudan.edu.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: xiong.xuelian@zs-hospital.sh.cn

随着肥胖和2型糖尿病人数的增加,非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)已成为全球最常见的慢性肝病,全球患病率约为25%^[1]。在我国,NAFLD患病率已从2000年的23.8%增长到2018年的32.9%,成为我国发病率最高的肝脏疾病^[2]。NAFLD谱由非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化等构成。其中,NASH为较严重阶段,以小叶炎症、肝细胞脂肪变性、肝纤维化和肝细胞死亡为病理特征^[3]。NASH在NAFLD人群中占比较高,且可能进展为肝硬化和肝细胞癌,且已成为肝移植和肝脏相关死亡的主要原因^[4],给全球带来巨大的卫生经济负担。

因此,深入了解NASH的机制、研发相应药物是临床迫切需求,然而目前尚无FDA批准的专门用于治疗NASH的药物。研发NASH药物的主要阻碍之一为缺少理想的动物模型。理想的动物模型应与人类疾病的生化、代谢、组织学、分子通路等多方面特征一致或接近。目前已经通过基因工程、饮食诱导、化学诱导等方法,开发了多种NASH动物模型,然而大多数模型并不能完整复现人类NASH^[5]。因此,在科学研究和药物研发时,需要深入了解各模型的特点,选择合适的动物模型或模型组合,从而提高从动物试验到临床应用的转化性。

本研究建立了高脂饮食(high-fat diet, HFD)、Amylin饮食,以及高脂-蛋氨酸胆碱缺乏饮食(high-fat methionine- and choline-deficient, HFMCD)诱导的NASH小鼠模型,并检测生化、代谢等指标,评估肝脏组织学变化,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料 实验用动物均为SPF级雄性C57BL/6小鼠,8~9周龄,体质量为22~25 g,购于上海实验动物公司。小鼠饲料购于Research Diets公司,分别为普通饲料(D11112201; 65%碳水化合物,20%蛋白质,15%脂肪),HFD饲料(D12492; 60%脂肪,20%碳水化合物,20%

蛋白质),Amylin饲料(D09100301; 40%脂肪,22%果糖,10%蔗糖,2%胆固醇),以及HFMCD饲料(A06071301B; 60%脂肪,无蛋氨酸,无胆碱)。小鼠血清谷氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、血清天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST),肝脏三酰甘油(triglycerides, TG)、肝脏羟脯氨酸检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。血糖检测采用Roche血糖仪及试纸。本研究通过复旦大学附属中山医院动物伦理审批(ZS334)。

1.2 动物饲养 小鼠饲养于复旦大学上海医学院实验动物中心,屏障环境为(22±2)℃,相对湿度保持在40%~60%,给予12 h交替光照,小鼠自由进食、进水。根据饮食分为普通饮食(chow diet, CD)组、HFD组、Amylin组和HFMCD组,每组10只。其中,HFD、Amylin饲料喂养时长为24周,HFMCD饲料喂养时长为10周。喂养期间,通过在实验开始、换笼期间和实验结束时称量食物质量来监测食物消耗。

1.3 血清指标检测 喂养结束时,取小鼠眼眶静脉血;血液静置于无内毒素试管2 h,在4℃、1 000×g条件下离心10 min后取上清液(血清)。血清ALT、AST,肝脏TG、肝脏羟脯氨酸检测均按照试剂盒说明书进行。小鼠禁食10 h后,尾尖采血,用血糖仪测定其空腹血糖值。胰岛素耐量试验(insulin tolerance test, ITT):小鼠禁食4 h后所测血糖值记为0 min血糖,随后腹腔注射胰岛素(0.75 U/kg),分别检测注射胰岛素后15、30、45、60、90、120 min时间点的血糖并用0 min血糖值校正,绘制曲线。

1.4 肝组织石蜡切片及病理检查 取血后,用颈椎脱位法处死小鼠,剥离肝脏。肝脏称质量后,取1 cm×1 cm×0.5 cm大小肝组织,浸于4%多聚甲醛固定24 h,随后用浓度递增乙醇逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,最后切片。肝指数=肝脏质量/小鼠体质量。

苏木精-伊红(H-E)染色:将石蜡切片梯度脱蜡后,用苏木精染色1 min,水洗,1%盐酸乙醇分化数秒,水洗,1%氨水返蓝30 s,再次水洗,

用伊红染液染色 2 min, 洗涤; 常规用梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察。天狼星红染色: 将石蜡切片梯度脱蜡后, 用 Weigert 铁苏木精染液染色 10 min, 水洗, 天狼星红染液滴染 1 h, 水洗; 常规脱水, 透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察。

1.5 统计学处理 用 GraphPad Prism 9.0.0 软件作图与进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 小鼠体质量和肝脏重量 HFD 组、Amylin 组小鼠体质量显著高于 CD 组 ($P < 0.0001$); HFMCD 组体质量与 CD 组差异无统计学意义。

HFD 组、Amylin 组、HFMCD 小鼠肝脏质量均高于 CD 组 ($P < 0.01$)。Amylin 组、HFMCD 组小鼠肝指数高于 CD 组 ($P < 0.01$); HFD 组小鼠肝指数与 CD 组差异无统计学意义。Amylin 组肝脏质量、肝指数较 CD 组的升高倍数明显更大(表 1)。
2.2 生化指标 饮食诱导组小鼠的血清 ALT 水平均高于 CD 组 ($P < 0.05$), 其中 HFD 组升高程度较小; Amylin 组和 HFMCD 组小鼠血清 AST 高于 CD 组 ($P < 0.01$), HFD 组与 CD 组 AST 差异无统计学意义。饮食诱导组肝脏 TG 含量均高于 CD 组 ($P < 0.01$), 其中 Amylin 组升高程度最大。Amylin 组与 HFMCD 组肝脏羟脯氨酸水平高于 CD 组 ($P < 0.01$), HFD 组和 CD 组肝脏羟脯氨酸水平差异无统计学意义(表 2)。

表 1 各组小鼠的体质量、肝脏质量和肝指数比较

指标	CD 组	HFD 组	Amylin 组	HFMCD 组
体质量/g	26.50 ± 0.408	45.30 ± 4.858***	45.78 ± 2.369***	26.20 ± 1.182
肝脏质量/g	1.038 ± 0.0585	2.081 ± 0.3184**	5.260 ± 0.8364***	1.555 ± 0.2308**
肝指数/%	3.910 ± 0.199	4.607 ± 0.663	11.440 ± 1.281***	5.918 ± 0.622**

CD: 普通饮食; HFD: 高脂饮食; Amylin: Amylin 饮食; HFMCD: 高脂-蛋氨酸胆碱缺乏饮食。* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.0001$ 与 CD 组相比。

表 2 各组小鼠血清 ALT、AST, 肝脏三酰甘油、羟脯氨酸和空腹血糖比较

指标	CD 组	HFD 组	Amylin 组	HFMCD 组
ALT/(U·L ⁻¹)	13.96 ± 10.82	54.38 ± 25.15*	421.52 ± 70.87***	456.04 ± 166.63**
AST/(U·L ⁻¹)	56.70 ± 13.94	68.71 ± 21.92	310.44 ± 41.85***	255.76 ± 100.22**
肝脏三酰甘油/(mg·g ⁻¹)	33.70 ± 7.85	61.39 ± 12.46**	132.96 ± 51.62**	92.22 ± 19.50**
肝脏羟脯氨酸/(mg·g ⁻¹)	0.0725 ± 0.0206	0.0914 ± 0.0285	0.3589 ± 0.0964**	0.2871 ± 0.0659**
空腹血糖/(mg·L ⁻¹)	1002.50 ± 56.79	1778.57 ± 267.30**	1734.4 ± 132.68***	733.33 ± 148.14**

CD: 普通饮食; HFD: 高脂饮食; Amylin: Amylin 饮食; HFMCD: 高脂-蛋氨酸胆碱缺乏饮食; ALT: 谷氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.0001$ 与 CD 组相比。

2.3 空腹血糖和 ITT HFD 组和 Amylin 组小鼠空腹血糖水平升高, HFMCD 组小鼠空腹血糖水平降低 ($P < 0.01$, 表 2)。ITT 试验中, Amylin 组各时间点血糖水平高于 CD 组 ($P < 0.001$), 且升高最明显; HFMCD 组各时间点血糖水平与 CD 组差异无统计学意义(图 1)。

2.4 肝脏组织学 H-E 染色(图 2A)显示: CD 组肝脏组织结构完整, 肝小叶清晰; 饮食诱导组均出现肝脂肪变性及肝小叶炎性浸润, 脂肪变性严重程度依次为 Amylin 组、HFMCD 组、HFD 组。天狼星红染色(图 2B)显示: 饮食诱导组均有胶原

纤维形成, 其中 HFMCD 组、Amylin 组胶原纤维形成较多, 说明肝纤维化严重。

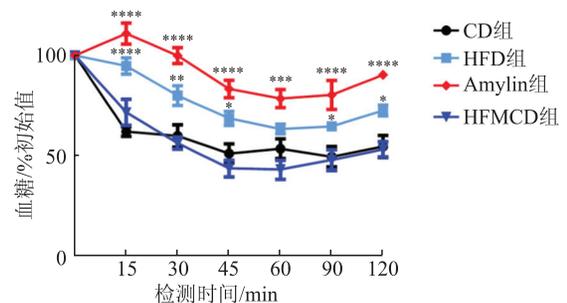


图 1 各组小鼠的 ITT 测试结果

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 与 CD 组相比。

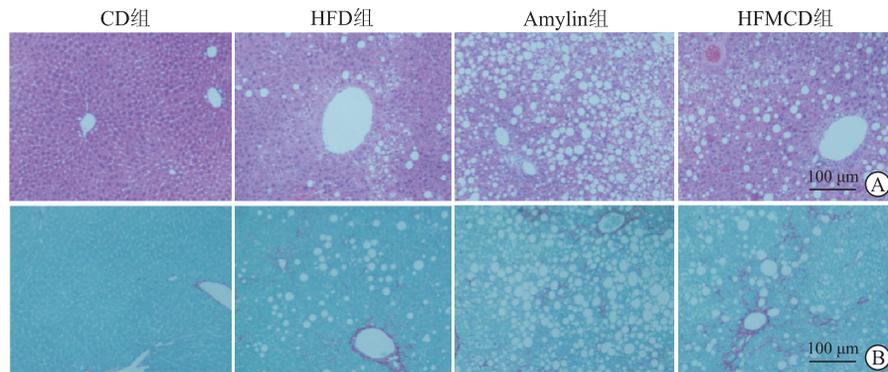


图2 各组小鼠肝脏切片的H-E染色(A)及天狼星红染色(B)

3 讨论

NASH已成为全球性的健康问题,而动物模型无法很好模拟人类疾病阻碍了相关药物的研发。因此,需要正确选择或组合动物模型,从而更准确地预测药物在人体内的反应^[6]。将不同模型相结合以利用各自的优势是NASH研究的常用方法,例如db/db、ob/ob基因突变小鼠常用于研究与早期NAFLD相关的代谢综合征,蛋氨酸胆碱缺乏(methionine- and choline-deficient, MCD)模型常用于研究短时间内NASH肝脏的晚期纤维化^[7]。本研究建立了3种饮食诱导的NASH小鼠模型,比较NASH相关指标,旨在评估各模型的临床可转化性。

HFD被广泛用于诱导实验动物发生NASH。HFD模型与人类NASH多种表型相似,包括肥胖、胰岛素抵抗、血脂异常等^[8]。然而,该模型表型受动物品系、饮食中脂肪的含量、各类脂肪的组成以及诱导持续时间等影响^[9]。而且,HFD诱导的肝损伤常不严重^[10]。本研究显示,与CD组相比,HFD组体质量升高,并出现明显的胰岛素抵抗,但是肝细胞受损指标ALT、肝纤维化指标羟脯氨酸升高不明显,肝组织染色也显示小鼠NASH的特征性病理表现不如其他饮食诱导模型严重。

Amylin饮食能可靠诱导类似人类疾病生化、代谢和组织学等特征的动物模型^[11]。本研究中,Amylin组小鼠体质量、肝脏质量、胰岛素敏感性下降及肝脏病变程度均高于CD组,NASH表型与人类类似。因此,Amylin饮食诱导的NASH具

有较高的临床可转化性。然而,近期FDA禁止将反式脂肪作为食品添加剂。目前已研发出可替代Amylin饮食的Gubra Amylin NASH(GAN)饮食,GAN与Amylin饮食具有相同的能量比例和类似的诱导效果^[12]。

HFMCD是近期新建立的NASH诱导饮食,为HFD和MCD两种饮食结构的结合^[13]。MCD已被广泛用于NASH研究,能快速诱导多个严重的NASH表型,但不能诱导胰岛素抵抗^[14]。既往研究^[15]评估了HFMCD的诱导效果,发现其能迅速诱导肝损伤、脂肪累积、炎症反应和纤维化,不导致显著的体质量改变,但使肝指数增加。然而,HFMCD同样不能导致胰岛素抵抗^[16]。本研究得出相似结果。

目前,国内外鲜见研究对上述3种饮食模型进行比较。本研究结果说明,3种饮食诱导的NASH小鼠模型各有优劣势:HFD能有效诱导肥胖、胰岛素抵抗等NASH患者常见的代谢紊乱,但难以导致严重的肝脏病变;Amylin饮食不仅能引起显著的肥胖和胰岛素抵抗,其诱导的肝脏病变也较严重;HFMCD相较于前2种模型,能更迅速引起明显的NASH特征,但不能导致肥胖和胰岛素抵抗。

综上所述,本研究为NASH机制研究和药物研发中临床前模型的选择提供了一定参考。未来可通过分析各动物模型中人类NASH中的关键信号通路(如炎症信号、凋亡信号)的变化,并从转录组、代谢组学角度评价动物模型,以进一步改进动物模型,进而更好地服务于临床。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [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] ZHOU J H, ZHOU F, WANG W X, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China[J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.
- [3] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease- Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [4] YOUNOSSI Z M. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3): 531-544.
- [5] SANTHEKADUR P K, KUMAR D P, SANYAL A J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(2): 230-237.
- [6] HUNDERTMARK J, TACKE F. How effective are nonalcoholic fatty liver disease models for drug discovery?[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15(11): 1237-1240.
- [7] 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.
- [8] NAKAMURA A, TERAUCHI Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 21240-21257.
- [9] KANURI G, BERGHEIM I. *In vitro* and *in vivo* models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11963-11980.
- [10] OMAGARI K, KATO S, TSUNEYAMA K, et al. Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(12): 3206-3212.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] MATSUMOTO M, HADA N, SAKAMAKI Y, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Int J Exp Pathol*, 2013, 94(2):93-103.
- [14] 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.
- [15] LEE S, KWAK J H, KIM S H, et al. Comparative study of liver injury induced by high-fat methionine- and choline-deficient diet in ICR mice originating from three different sources[J]. *Lab Anim Res*, 2019, 35: 15.
- [16] WIDJAJA A A, SINGH B K, ADAMI E, et al. Inhibiting interleukin 11 signaling reduces hepatocyte death and liver fibrosis, inflammation, and steatosis in mouse models of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(3): 777-792,e14.

[本文编辑] 姬静芳