

高糖高脂诱导大鼠代谢相关脂肪性肝病模型的建立

倪家敏, 周 飞*, 黄暨生, 陈健钊, 郭秋平

广州医药研究总院有限公司 药物非临床评价研究中心, 广东 广州 510240

摘要: 目的 建立SD大鼠代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD) 模型, 观察大鼠病理变化。方法 用高糖高脂饲料饲喂雄性SD大鼠20周, 检测模型组大鼠血清和肝匀浆相关生化指标的水平、肝脏脏器质量和系数、肝脏组织病理学变化。结果 模型组大鼠饲喂高糖高脂饲料20周后, 与对照组比较, 血清总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 及肝脏TC和三酰甘油 (TG) 的水平均显著升高 ($P<0.01$), 血清TG、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 的水平均显著降低 ($P<0.01$), 肝脏质量及系数显著性增加 ($P<0.01$)。肝组织的病理改变为严重肝细胞脂肪变性及多灶性肉芽肿性炎。结论 高糖高脂饲料饲喂成功建立了合适的MAFLD动物模型, 肝脏病理改变可见广泛的脂肪变性和大量的肉芽肿性炎症, 未见纤维化。

关键词: SD大鼠; 代谢相关脂肪性肝病; 高糖高脂饮食; 肉芽肿性炎; 疾病模型

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 03-0487-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.03.004

Establishment of metabolic associated fatty liver disease model in sprague-dawley rats by high-sucrose-fat diet

NI Jiamin, ZHOU Fei, HUANG Jisheng, CHEN Jianzao, GUO Qiuping

Drug Non-clinical Evaluation Center of Guangzhou Institute of Pharmaceutical Industry, Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou, 510240, China

Abstract: Objectives To establish a model of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD) in Sprague-Dawley rats. **Methods** 30 5-week-old male Sprague-Dawley rats in the model group were fed with high-sucrose-fat diet for 20 weeks, another 30 rats in the control group were fed with normal diet. The following indicators were evaluated: 3 biochemical indexes in the serum and liver homogenate, organ weight and ratio, histopathological changes of the liver. **Results** Compared with the control group, the rats in model group showed significant increase in the level of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum or liver homogenate. Also, the organ weight and ratio of liver in model group were increased significantly. Moreover, severe hepatocyte steatosis and multifocal granulomatous inflammation were observed in the livers of model group. **Conclusions** An appropriate rat model of MAFLD was successfully established by fed with high-sucrose-fat diet for 20 weeks. Severe hepatocyte steatosis and multifocal granulomatous inflammation were observed in the livers of model group and no fibrosis were found.

Key words: sprague-Dawley rats; metabolic associated fatty liver disease (MAFLD); high-sucrose-fat diet; granulomatous inflammation; disease model

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD), 曾用名非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease)^[1-2], 是一系列连续性疾病, 典型特征是肝细胞脂肪变性和脂质贮积, 在没有饮酒或酒精摄入很少时, 超过5%的肝

细胞存在脂肪变性则可诊断为MAFLD^[3]。早期表现为肝细胞的单纯性脂肪变性, 若不加以干预, 则可能发展为非酒精性脂肪性肝炎; 最后还可能走向肝脏纤维化或肝硬化, 甚至肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[4-6]。MAFLD属于肝脏的一种代

收稿日期: 2020-05-27

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制 (2018ZX09721004-001-003)

第一作者: 倪家敏 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为毒性病理。E-mail: jiamin1014@126.com

*通信作者: 周 飞 (1987—), 男, 兽医病理学家, 工程师。E-mail: feika110@hotmail.com

谢综合征,许多诸如肥胖、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、高血糖以及血脂异常等与代谢异常有关的因素都能导致MAFLD^[7-8]。随着全球范围内肥胖病和IR的流行率不断增加,MAFLD逐渐成为成人和儿童慢性肝病的主要形式,约90%的严重肥胖患者被诊断出患有MAFLD^[3,9]。MAFLD患病率高、诊断困难、发病机制复杂,但目前尚缺乏经过批准的治疗MAFLD方法,所以建立MAFLD动物模型成为研究MAFLD的一个重要方向。

MAFLD动物模型不仅可以为理解疾病的发病机制和进展提供重要指导,还可以在建立动物模型的过程中发现可能的治疗靶标。据相关文献报道^[10],MAFLD动物模型主要分为转基因技术造模、饮食诱导造模两类,目前研究比较热门的造模方法还是饮食诱导造模,即通过高糖高脂饮食诱发动物MAFLD。近年来,已经在大鼠、小鼠等常见啮齿类实验动物中成功建立了众多高糖高脂型MAFLD疾病模型,但这些MAFLD模型中肝脏的病理改变都不尽相同,有的是轻度的空泡变性^[11],有的是大面积的空泡变性^[12],有的是微小空泡^[13],有的是大空泡^[12],有的伴有纤维化^[11],少数会伴有轻微炎症^[12,14]。本研究选用SD雄性大鼠,结合以上造模方法,通过饲喂高糖高脂饲料诱发肥胖病,模拟人类MAFLD自然发病,建立大鼠MAFLD模型,观察大鼠病理变化。

1 材料

1.1 实验动物与饲养环境

60只SPF级雄性SD大鼠,约5周龄,体质量180~220g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2016-0002。饲养于广州医药研究总院有限公司屏障系统,实验动物使用许可证号为SYXK(粤)2018-0003。对动物的所有操作和检查过程均遵从广州医药研究总院有限公司的标准操作规程,符合NMPA-GLP及AAALAC相关规范,福利伦理委员会批准文号为IA-PD2019001-01。

1.2 主要试剂

常规饲料,购自上海普路腾生物科技有限公司,沪饲证(2018)04001。高糖高脂饲料,购自广东省医学实验动物中心,粤饲证(2019)05073,配方(质量分数):蔗糖20%、猪油15%、胆固醇1.2%、胆酸钠0.2%、酪蛋白10%、磷酸氢钙0.6%、石粉0.4%、预混料0.4%、基础饲料52.2%;质量组成:蛋白质19%、脂肪18%、碳水化合物50%;热量组成:蛋白质17%、脂肪37%、碳水化合物46%。

油红O染色液、苏木素-伊红染色液,均购自珠海贝索生物技术有限公司;OCT冷冻切片包埋剂,购自美国樱花公司;血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)检测试剂盒(直接法),均购自浙江伊利康生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

全自动生化分析仪(日本HITACHI公司);ASP300S型脱水机、EG1160型石蜡包埋机、RM2235型轮转式切片机、CM1850型冷冻(冰冻)切片机、ST5020/CV5030型全自动染色/封片工作站(德国Leica公司);BX53+DP73型荧光生物显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 造模

动物随机均分为2组,对照组和模型组,各30只。对照组给予常规饲料,模型组给予高糖高脂饲料,各组大鼠饲喂周期为20周。实验期间因操作导致模型组1只大鼠死亡。

2.2 血清相关生化指标测定

饲喂20周后,称取所有大鼠体质量。动物处死前禁食12h、不禁水,麻醉后经腹主动脉采血后放血处死。20℃、2000×g离心15min后吸取血清,使用全自动生化分析仪检测血清中TC、TG、HDL-C、LDL-C的含量。

2.3 肝脏相关指标测定

采血后,对大鼠进行剖检,取大鼠的肝脏称质量并计算肝脏系数。取部分肝脏进行组织匀浆,离心后取上清,使用全自动生化分析仪检测肝组织TG、TC含量。取部分肝脏组织用于冰冻切片的制作并进行油红O染色。剩余肝脏组织固定于体积分数为10%的中性缓冲福尔马林固定液中,进行常规病理组织切片,进行HE染色。

2.4 统计学方法

所有数据分析采用SPSS 11.5统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本均数比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 大鼠血清生化指标

与对照组比较,模型组大鼠血清中TC、LDL-C的含量均显著升高($P < 0.01$),TG、HDL-C的含量均显著降低($P < 0.01$),表明该模型成立。结果见表1。

3.2 肝匀浆生化指标

与对照组比较,模型组大鼠肝组织匀浆中TC和TG的含量均显著升高($P < 0.01$)。结果见表2。

表1 血清TC、TG、HDL-C、LDL-C的含量($\bar{x}\pm s$)Table 1 Content of TC, TG, HDL-C and LDL-C in serum($\bar{x}\pm s$)

组别	n/只	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	30	1.89±0.46	1.68±0.83	0.55±0.11	0.35±0.15
模型	29	2.85±1.02**	0.83±0.28**	0.45±0.15**	0.69±0.34**

与对照组比较:** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group表2 肝匀浆TC、TG含量($\bar{x}\pm s$)Table 2 Content of TC and TG in homogenized liver($\bar{x}\pm s$)

组别	n/只	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	30	0.93±0.14	2.54±0.44
模型	29	3.10±0.34**	3.69±0.63**

与对照组比较:** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group

3.3 肝脏系数的变化

与对照组比较,模型组大鼠体重、肝脏质量和系数均显著性升高($P<0.01$)。结果见表3。

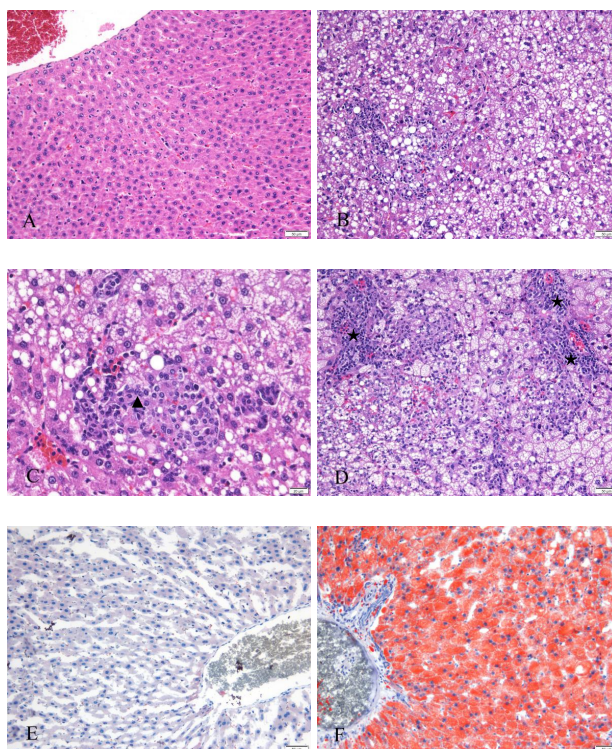
表3 体重、肝脏的脏器质量及系数($\bar{x}\pm s$)Table 3 Body weight, liver organ weight and ratio($\bar{x}\pm s$)

组别	n/只	体重/g	脏器质量/g	肝脏系数/%
对照	30	632±54	14.74±2.05	2.33±0.22
模型	29	706±59**	30.03±4.56**	4.23±0.49**

与对照组比较:** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group

3.4 组织病理学观察

与对照组大鼠肝脏(图1A)比较,模型组广泛的肝细胞中可见大量空泡。有些胞浆中可见一个边界清晰的大空泡占据整个肝细胞,胞核被挤到一边;有些胞浆中为无数细小空泡,胞核居中;有些胞浆中可见混合型空泡,即大空泡和小空泡均可见(图1B)。此外,在模型组大鼠肝脏中还可可见多灶性的肉芽肿性炎(图1C),血管周及肝窦内可见大量单核细胞浸润(图1D)。肉芽肿性炎呈岛屿样分布在肝脏中,其中可见大量单核细胞聚集,少量的出血及坏死的肝细胞或肝细胞碎片。肉芽肿性炎中的单核细胞中可见单个或多个边界清晰的圆形空泡。对对照组和模型组的肝脏分别进行油红O染色,对照组的肝脏切片油红O染色显示为阴性(图1E);而模型组的肝脏切片可见肝细胞中的空泡被染成橘红色,呈现强阳性反应(图1F),证明模型组肝细胞中大量的空泡变性为中性脂肪,提示肝细胞的空泡变性为脂肪变性。



A: 对照组肝脏(HE染色, $\times 200$); B: 模型组肝脏, 肝细胞空泡变性(HE染色, $\times 200$); C: 模型组肝脏, 肉芽肿性炎(图中“▲”所示出, HE染色, $\times 400$); D: 模型组肝脏, 单核细胞浸润(图中“★”所示出, HE染色, $\times 200$); E: 对照组肝脏(油红O染色, $\times 200$); F: 模型组肝脏(油红O染色, $\times 200$)

A: Liver of a control rat (HE staining, $\times 200$); B: Liver of a model rat with vacuolar degeneration (HE staining, $\times 200$); C: Liver of a model rat with granulomatous inflammation (HE staining, $\times 400$); D: Liver of a model rat with monocyte infiltration (HE staining, $\times 200$); E: Oil Red-O staining was negative in liver of a normal rat ($\times 200$); F: Oil Red-O staining was strongly positive in liver of a model rat ($\times 200$)

图1 大鼠肝脏的病理学观察

Fig. 1 Histopathological appearance of rat livers

4 讨论

在本研究中,通过对SD大鼠饲喂高糖高脂饲料20周模拟临床MAFLD,结果显示,与对照组比较,模型组大鼠血清TC、LDL-C水平及肝组织匀浆TC和TG的水平均显著性升高,血清TG、HDL-C水平显著性降低,大鼠体重、肝脏质量及系数显著性增加,肝脏发生严重脂肪变性伴肉芽肿性炎及单

核细胞浸润的组织病理学变化,均表现出典型的MAFLD特征。许多学者^[11-14]通过给动物饲喂高脂或高糖高脂饲料均诱发了肝脏脂肪变性,但在炎症反应及是否出现纤维化等方面存在不同,具体造模差异详见表4。通过对比以上动物模型,本试验模型大鼠肝脏同样出现了广泛的肝细胞脂肪变性,但

未见纤维化,此外炎症反应也较明显,并存在多灶性的肉芽肿性炎;而其他模型动物肝脏的组织病理学变化有些只有单纯的脂肪变性空泡,有些就直接出现纤维化,很少观察到进行中的炎症反应,基本没有见到肉芽肿性炎。各模型中出现的差异可能是因为动物种属、饲料配比及造模周期等的不同。

表4 不同MAFLD模型的病理特征

Table 4 Histopathological characteristics of different MAFLD models

动物种属	高脂或高糖饮食主要热量配比	造模周期	脂肪变性特征	纤维化	炎症
本试验SD大鼠	37%脂肪、46%碳水化合物和17%蛋白质	20周	大面积、空泡大小不一	没有	多灶型的肉芽肿性炎、单核细胞浸润
SD大鼠 ^[10]	71%脂肪、11%碳水化合物和18%蛋白质	3周	大面积、大空泡	没有	单核细胞浸润
C57BL/6小鼠 ^[11]	40%脂肪、32%碳水化合物和27%蛋白质	25周	中等面积、微小空泡	没有	几乎没有
C57BL/6小鼠 ^[11]	23%脂肪、57%碳水化合物和20%蛋白质	25周	大面积、空泡大小不一	轻微纤维化	轻微炎症反应
Wistar大鼠 ^[9]	45%脂肪、42%碳水化合物和1%蛋白质	14周	少量、大空泡	没有	没有
Wistar大鼠 ^[12]	51%的脂肪、32.8%的碳水化合物和16.2%的蛋白质	16周	大面积、微小空泡	没有	坏死性炎症

一些学者^[15-17]认为,“二次打击”理论假说是MAFLD从肝细胞单纯性脂肪变性发展为脂肪性肝炎到肝硬化的主要原因。“第一击”是肝细胞中脂肪的过度积聚,使肝细胞对“第二击”敏感,“第二击”是肝脏氧化应激,导致肝细胞中的脂质过氧化,脂质过氧化产物可激活NF- κ B和COX-2相关信号通路,从而上调炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1、IL-6)的表达,致使脂肪性肝炎、纤维化及MAFLD的后续发展。这可能也解释了本试验模型大鼠肝脏中明显的肉芽肿性炎症。

临床医学研究通常会因为临床上健康组织和患病组织供应有限而受到限制,所以动物模型常常成为人们研究疾病发病机制的重要工具^[18]。除了高糖高脂诱导法,有研究^[19]还报道蛋氨酸-胆碱缺乏(methionine and choline deficient, MCD)饲料也能够诱导MAFLD。虽然MCD诱导法也可以使模型动物产生肝脏脂肪变性、炎症和纤维化等MAFLD典型的病理改变,与本试验高糖高脂诱导法不同的是,MCD模型并不会导致动物肥胖,相反,还可能会导致动物严重的体质量减轻和恶病质,在临床MAFLD中不常见;但MCD模型的肝脏从脂肪变性发展到炎症、纤维化、肝细胞凋亡的进程更快,也更严重,适用于研究人类MAFLD病理改变和机制^[19]。另外,从转基因技术造模这一方面来讲,db/db小鼠和ob/ob小鼠是常用的MAFLD动物模型。与饮食

诱导造模相比,饲喂正常饲料的db/db小鼠和ob/ob小鼠仅会产生肥胖、肝脏脂肪变性的MAFLD特征,而不会出现肝脏炎症和纤维化的病理改变,除非受到高糖高脂或MCD饮食的诱导,因此db/db小鼠和ob/ob小鼠适用于单纯研究MAFLD的发病机制^[20]。

高糖高脂饮食诱导MAFLD的动物模型是最接近于大多数人类自然发病的模型,具有在人类MAFLD患者中观察到的标志性特征,即肥胖和IR,能够模拟人类MAFLD的组织病理学和发病机制,且造模方法简单易操作,重复性好,成本低,便于推广;但此类模型肝脏没有或仅能产生轻度的纤维化^[21]。当前的动物模型在模拟MAFLD的多因素疾病机制上都有其各自的局限性。一些模型复制了MAFLD的组织病理学特征,但没有复制其生理特性;而另一些复制了MAFLD的生理学特性,而不能复制其组织病理学特征。尽管这些动物模型有缺点,但它们仍是研究MAFLD的发病机制和进展,并揭示潜在治疗靶点的重要工具,未来需要更准确、精确地模拟MAFLD疾病谱的理想动物模型来做进一步的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Eslam M, Sanyal A J, George J, et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2020,

- 158(7): 1999-2014.
- [2] 薛茵, 范建高. 代谢相关脂肪性肝病新定义的国际专家共识简介 [J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(3): 457-460.
Xue R, Fan J G. Brief introduction of an international expert consensus statement: a new definition of metabolic associated fatty liver disease [J]. J Prac Hepatol May, 2020, 23(3): 457-460.
- [3] Park E J, Lee Y S, Kim S M, et al. Beneficial effects of lactobacillus plantarum strains on non-alcoholic fatty liver disease in high fat/high fructose diet-fed rats [J]. Nutrients, 2020, 12(2): 542.
- [4] Singh S, Osna N A, Kharbanda K K. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(36): 6549-6570.
- [5] Segal-Salto M, Barashi N, Katav A, et al. A blocking monoclonal antibody to CCL24 alleviates liver fibrosis and inflammation in experimental models of liver damage [J]. JHEP Rep, 2020, 2(1): 100064.
- [6] Li Y, Jiang H T, Han L B, et al. MiR-195 regulates CD40 to maintain Th17/Treg balance in rats with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 109930.
- [7] Berna G, Romero-Gomez M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: pathophysiology and management [J]. Liver Int, 2020, 40 Suppl 1: 102-108.
- [8] Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease [J]. Nutrients, 2013, 5(5): 1544-1560.
- [9] Younossi Z M. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective [J]. J Hepatol, 2019, 70 (3): 531-544.
- [10] Lau J K, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances [J]. J Pathol, 2017, 241(1): 36-44.
- [11] Romestaing C, Piquet M A, Bedu E, et al. Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats [J]. Nutr Metab (Lond), 2007, 4: 4.
- [12] Lieber C S, Leo M A, Mak K M, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79 (3): 502-509.
- [13] Charlton M, Krishnan A, Viker K, et al. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(5): G825-834.
- [14] Fakhoury-Sayegh N, Trak-Smayra V, Khazzaka A, et al. Characteristics of nonalcoholic fatty liver disease induced in wistar rats following four different diets [J]. Nutr Res Pract, 2015, 9(4): 350-357.
- [15] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845.
- [16] Cai D, Yuan M, Frantz D F, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB [J]. Nat Med, 2005, 11(2): 183-190.
- [17] Chen J, Liu D, Bai Q, et al. Celecoxib attenuates liver steatosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis induced by high-fat diet in rats [J]. Mol Med Rep, 2011, 4 (5): 811-816.
- [18] Xu Z J, Fan J G, Ding X D, et al. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(4): 931-940.
- [19] Larter C Z. Not all models of fatty liver are created equal: understanding mechanisms of steatosis development is important [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(9): 1353-1354.
- [20] 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.
- [21] Sanches S C, Ramalho L N, Augusto M J, et al. nonalcoholic steatohepatitis: a search for factual animal models [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 574832.

[责任编辑 兰新新]