

## 非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型的构建

戴冠齐<sup>1\*</sup>, 林锦涛<sup>1\*</sup>, 李永龙<sup>1,2</sup>, 韩留鑫<sup>3</sup>, 赵文淘<sup>4</sup>, 夏加伟<sup>3</sup>, 李迎春<sup>1</sup>, 黄世豪<sup>1</sup>, 何丹华<sup>1</sup>, 丛金格<sup>1,2</sup>, 贾俊双<sup>1</sup>, 林晓琳<sup>1</sup>, 肖东<sup>1,2</sup>, 申红芬<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>南方医科大学基础医学院肿瘤研究所, 广东 广州

<sup>2</sup>南方医科大学实验动物管理中心, 广东 广州

<sup>3</sup>昆明市第三人民医院(大理大学第六附属医院), 云南 昆明

<sup>4</sup>昆明医科大学第三附属医院(云南省肿瘤医院, 云南省癌症中心)消化肿瘤内科, 云南 昆明

收稿日期: 2022年11月26日; 录用日期: 2022年12月23日; 发布日期: 2022年12月30日

### 摘要

目的: 构建特殊饲料饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)小鼠模型。方法: 将40只8周龄的C57BL6/J雄性小鼠分成四组, 分别予以高脂高果糖高胆固醇饮食(FFC)及对照饮食喂养4个月、6个月, 期间每周称量小鼠体重, 分别于喂养4个月和6个月取材, 取动物血清和肝脏, 进行血清学检测与肝组织病理学检测。结果: 与对照组相比, FFC组体质量( $P < 0.05$ )、肝湿重( $P < 0.01$ )和肝体比( $P < 0.01$ )均显著升高; FFC组脂肪变性明显比对照组严重( $P < 0.001$ ); FFC组肝脏甘油三酯较对照显著升高( $P < 0.001$ ), FFC组血清总胆固醇(TC)显著高于对照组( $P < 0.001$ ), FFC组血清ALT ( $P < 0.05$ )、AST ( $P < 0.001$ )较对照显著升高。而且, FFC饮食喂养6个月比喂养4个月的小鼠具有更为严重的NASH疾病特征。结论: 建立了不同严重程度NASH小鼠模型, 为研究NASH发病机制以及治疗等研究提供模型参考。

### 关键词

非酒精性脂肪性肝炎, 高脂高果糖高胆固醇饮食, 小鼠模型

## Establishment of Non-Alcoholic Steatohepatitis Mouse Model

Guanqi Dai<sup>1\*</sup>, Jintao Lin<sup>1\*</sup>, Yonglong Li<sup>1,2</sup>, Liuxin Han<sup>3</sup>, Wentao Zhao<sup>4</sup>, Jiawei Xia<sup>3</sup>, Yingchun Li<sup>1</sup>, Shihao Huang<sup>1</sup>, Danhua He<sup>1</sup>, Jin'ge Cong<sup>1,2</sup>, Junshuang Jia<sup>1</sup>, Xiaolin Lin<sup>1</sup>, Dong Xiao<sup>1,2</sup>, Hongfen Shen<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, School of Basic Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong

<sup>2</sup>Institute of Comparative Medicine and Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou

\*共同第一作者。

#通讯作者 Email: shenhf12@126.com

文章引用: 戴冠齐, 林锦涛, 李永龙, 韩留鑫, 赵文淘, 夏加伟, 李迎春, 黄世豪, 何丹华, 丛金格, 贾俊双, 林晓琳, 肖东, 申红芬. 非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型的构建[J]. 临床医学进展, 2022, 12(12): 12100-12107.

DOI: 10.12677/acm.2022.12121744

Guangdong

<sup>3</sup>The Third People's Hospital of Kunming (The Sixth Affiliated Hospital of Dali University), Kunming Yunnan

<sup>4</sup>Department of Gastrointestinal Oncology, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University (Yunnan Cancer Hospital, Yunnan Cancer Center), Kunming Yunnan

Received: Nov. 26<sup>th</sup>, 2022; accepted: Dec. 23<sup>rd</sup>, 2022; published: Dec. 30<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

**Objective:** To construct a mouse model of special diet-induced nonalcoholic steatohepatitis NASH. **Methods:** A total of 40 male C57BL6/J mice were divided into four groups, fed a high-fat, high-fructose and high-cholesterol diet (FFC) and a control diet for 4 months and 6 months, during which the body weight of mice was weighed weekly, and samples were collected at 4 months and 6 months respectively. Serum and liver of mice were collected for serological and histopathological detection. **Results:** Compared with the control group, the body mass ( $P < 0.05$ ), liver wet weight ( $P < 0.01$ ) and hepatic body ratio ( $P < 0.01$ ) of the FFC group were significantly increased, the steatosis in the FFC group was significantly more serious than that in the control group ( $P < 0.001$ ), the serum TC in the FFC group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.001$ ), and the serum ALT ( $P < 0.05$ ) and AST ( $P < 0.001$ ) in the FFC group were significantly higher than those in the control group. Furthermore, mice fed the FFC diet for 6 months showed more severe features of NASH disease than those fed the FFC diet for 4 months. **Conclusion:** Mouse models of NASH with different severity were established, which can provide a model reference for further study of the pathogenesis of NASH and the treatment.

## Keywords

Nonalcoholic Steatohepatitis, High Fat, High-Fructose and High-Cholesterol (FFC) Diet, Mouse Model

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

非酒精性脂肪性肝病(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是目前世界范围内最常见的慢性肝病病因,其进展形式非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)已成为肝移植的主要适应症之一[1]。NASH 是一类具有炎症细胞浸润和坏死的严重肝病,其特征在于肝细胞以脂肪变性、气球样变、肝小叶炎症为主要特征,并且有发展为纤维化、肝硬化、肝细胞癌和肝衰竭的风险[2]。然而,针对 NASH 适应症的药物均尚未获得批准,究其原因除发病机制不清,病因复杂外,理想化实验模型的缺乏也是其中的原因之一[3]。现有的实验性模型大多都不能很好地模拟人类 NASH 疾病的发生、发展以及严重程度,严格来说,大多数模型无法模拟非酒精性脂肪性肝炎肝细胞气球样病变和伴随炎症的大泡性脂肪变性[4]。因此,寻求出适用于实验室研究,且与人 NASH 高度相似的 NASH 动物模型,对 NASH 机制研究和治疗具有十分重要的意义。本实验构建了 FFC 饮食诱导的不同严重程度的 NASH 小鼠模型,并对该模型进行了验证。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验动物

选用 SPF 级 C57BL/6/J 雄性小鼠 40 只, 7~8 周龄, 购于广东省实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤) 2016-0041。动物适应性喂养 1 周后再进行实验。小鼠均在 SPF 级环境中自由采食、饮水, 温度控制在 22℃, 照明/黑暗 12 h 循环。对照饮食饲料货号: 国产仿制的 D09100304, 高脂高果糖高胆固醇(FFC)饮食饲料货号: research Dies: D09100310。特殊饲料成分见表 1。本试验符合实验动物管理规范。

**Table 1.** Composition of high-fat, high-fructose and high-cholesterol feed and a control feed

**表 1.** 高脂高果糖高胆固醇饲料与对照饲料的组成成分

Product#	D09100310		D09100304	
	Palm Oil		LF	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Protein	22.5	20	19.2	20
Carbohydrate	44.9	40	67.3	70
Fat	19.9	40	4.3	10
Total		100		100
kcal/gm	4.49		3.85	
Ingredient	gm	kcal	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn Starch				
Maltodextrin 10	100	400	85	340
Fructose	200	800	0	0
Sucrose	96	384	96	384
Dextrose	0	0	169	676
Cellulos, BW200	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225
Lard	20	180	20	180
Palm Oil	135	1215	0	0
MineralMix S10026	10	0	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H <sub>2</sub> O	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0
Cholesterol	18	0	0	0
FD & C Yellow Dye #5	0	0	0.025	0
FD & C Red Dye #40	0.025	0	0.025	0
FD & C Blue Dye #1	0.025	0	0	0
Total	904.05	4056	1055.05	4057

## 2.2. 仪器与试剂

### 2.2.1. 主要仪器

轮转式切片机(德国莱卡公司)、包埋机(德国莱卡公司)、全自动组织脱水机(德国莱卡公司)、正置显微镜(Nikon)、AU680 全自动生化分析仪(贝克曼)、高速离心机(艾本德)、样品冷冻研磨仪。

### 2.2.2. 实验试剂

1%戊巴比妥钠, 苏木素试剂, 伊红试剂。

## 2.3. 方法

### 2.3.1. 动物饲养及分组

将 40 只小鼠随机分为 4 组, 分别予以 FFC 及对照饮食喂养 4 个月、6 个月取材, 构建不同程度 NASH 小鼠模型。小鼠自由采食、饮水, 照明/黑暗 12 h 循环。饲料每 2 d 更换 1 次。

### 2.3.2. 标本采集

所有动物隔夜空腹后称体质量, 称后麻醉, 摘除眼球采血, 测量肝脏湿重, 统一对肝左叶取材后用 4% 的多聚甲醛固定, 脱水机脱水, 包埋机石蜡包埋, 制备肝脏石蜡切片。精确称取 0.1 g 肝中叶肝组织, 加入 900  $\mu$ L 的 PBS, 采用冷冻研磨仪制成匀浆(预冷后进行)。

### 2.3.3. 肝组织病理学检测

石蜡切片行苏木精-伊红(H & E)染色, 根据肝组织脂肪空泡浸润程度, 进行 NAFLD 活动度评分 (NAFLD activity score, NAS), 评分标准见表 2 [5]。

### 2.3.4. 小鼠血清及肝组织匀浆检测

采用全自动生化分析仪测定肝脏甘油三酯(TC)、血清总胆固醇(TC)、血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)。

Table 2. NAFLD activity score

表 2. NAFLD 活动度评分

		<5%	0
	肝细胞脂肪变性	5%~33%	1
		34%~66%	2
		>67%	3
		无	0
NAS (0~8 分)	小叶内炎症 (200 倍镜下计数坏死灶)	<2	1
		2-4	2
		>4	3
		无	0
	肝细胞气球样变	少见	1
		多见	2

注: NAS 为半定量评分系统, 不属于诊断程序, NAS < 3 可排除 NASH, NAS  $\geq$  5 可诊断为 NASH, 介于二者之间为 NASH 可能。规定不伴小叶内炎症, 肝细胞气球样变和纤维化, 但肝脂肪变 > 33% 为 NAFL, 脂肪变但未达此程度为肝细胞脂肪变性。

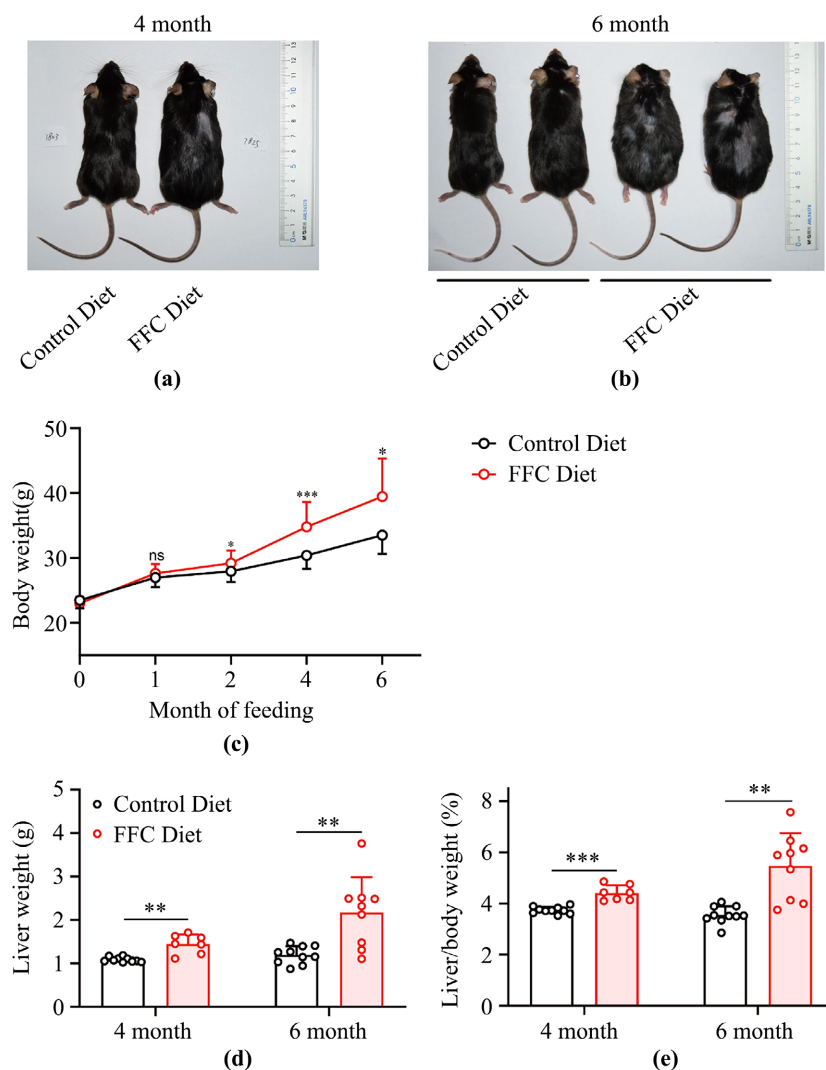
### 2.3.5. 统计学处理

实数据采用 Image J 和 GraphPad 8.0 进行分析, 数据以平均数  $\pm$  标准差表示, 采用两独立样品 T 检验分析计量资料, 曼-惠特尼 U 检验分析计数资料, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 小鼠的体质量、肝湿重和肝体比变化

各组小鼠体质量均逐渐增加, 与对照组比较, FFC 组体质量、肝湿重和肝体比均明显升高( $P < 0.05$ ), 造模 6 个月的小鼠, FFC 组小鼠与对照组相比, 体质量、肝湿重和肝体比增长相对于造模 4 个月的小鼠更明显(图 1)。通过对小鼠体型、肝脏的大体图片及肝组织病理学观察, 可以佐证这一点( $P < 0.01$ ) (图 1)。

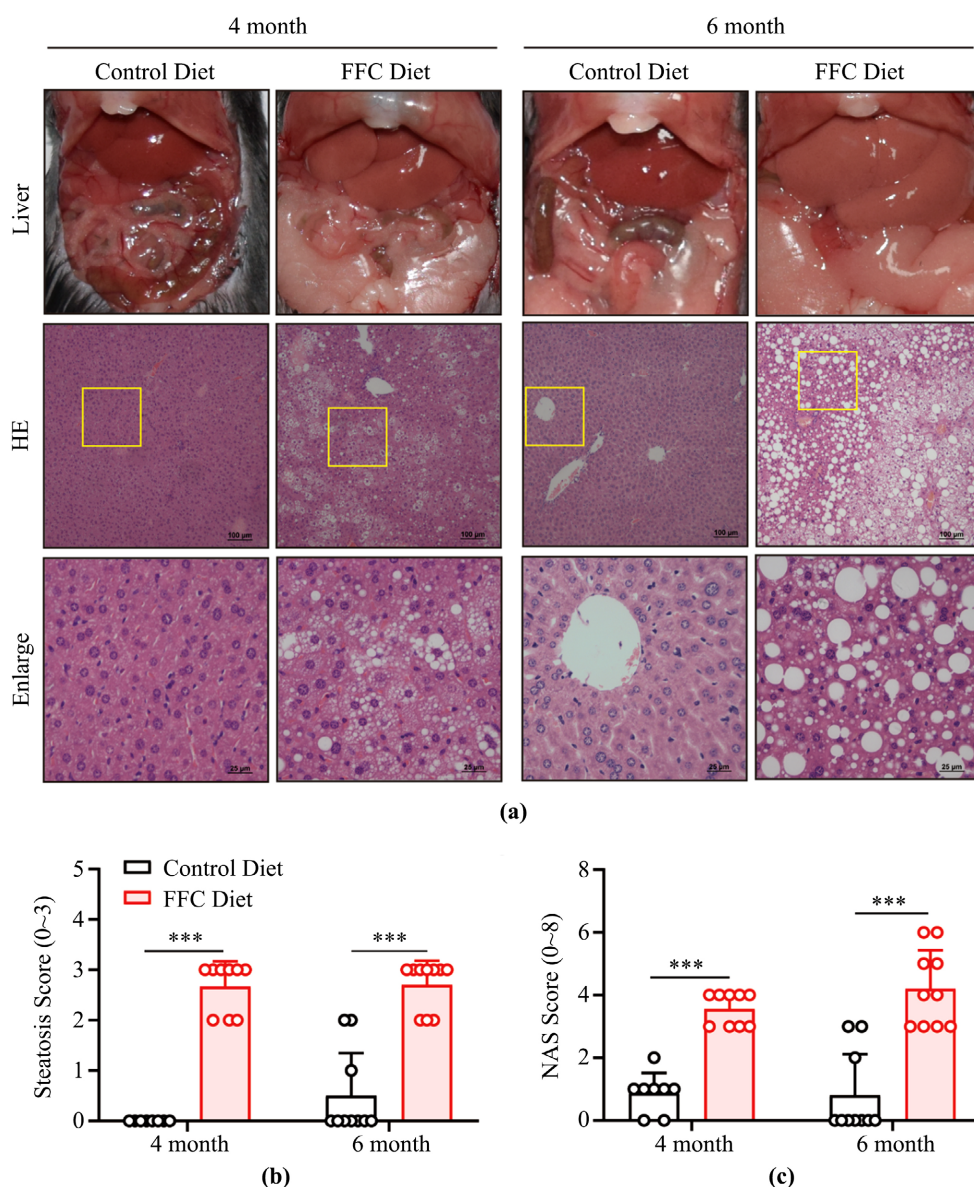


**Figure 1.** Appearance, body weight, liver weight, and liver index of FFC diet-induced fatty liver mouse model. (a) (b) Appearance of mice after 4 and 6 months of FFC dietary induction; (c) Body weight change of mice after FFC dietary induction; (d) (e) body weight and liver index of mice after 4 and 6 months of FFC dietary induction. All data are shown as mean  $\pm$  standard deviation, \*\*\* $P < 0.001$

**图 1.** FFC 饮食诱导的脂肪肝小鼠模型大体外观、体重、肝重及肝指数。(a) (b) FFC 饮食诱导的 4 月龄和 6 月龄小鼠大体外观; (c) FFC 饮食诱导的小鼠体重变化; (d) (e) FFC 饮食诱导的 4 月龄和 6 月龄小鼠体重及肝指数。所有数据均展示平均数 $\pm$ 标准差, \*\*\* $P < 0.001$

### 3.2. 肝组织病理学变化

H-E 染色显示, 造模 4 月对照组小鼠肝细胞正常, 肝索排列整齐, 未见肝细胞脂质空泡 NAS 评分低于 3 分; 造模 4 月 FFC 组肝细胞排列紊乱, 发生中度脂肪变性和肝细胞气球样变, NAS 评分为 4 分, 很可能为 NASH; 造模 6 月对照组小鼠肝细胞正常, 肝索排列整齐, 不少肝细胞发生脂肪变, NAS 为 3 分; 造模 6 月 FFC 组小鼠肝细胞排列非常紊乱, 肝细胞脂肪变性程度逐渐加重, 脂肪变性的肝细胞占 2/3 以上, 见大量脂质空泡, NAS 为 6 分, 可诊断为 NASH (形态学变化见图 2, NAS 评分见表 2)。

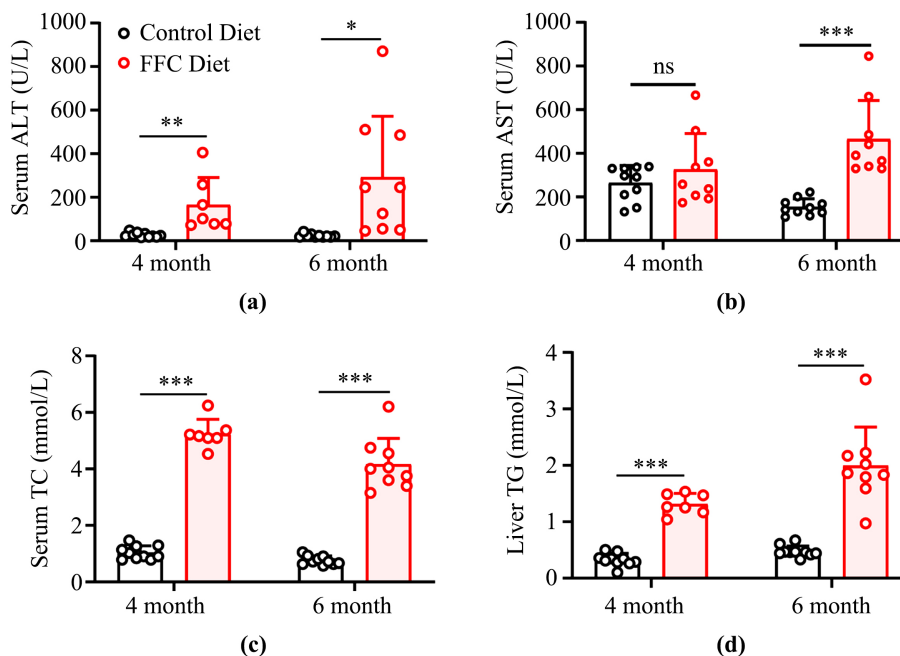


**Figure 2.** Liver and abdominal fat appearance, histomorphological changes, and NASH related score in FFC diet-induced mouse model (scale 100 μm, magnification picture scale 25 μm). (a) Liver and abdominal fat appearance and HE staining of liver tissue in mice; (b) Liver fatty change score in mice; (c) NASH activity score in mice. All data are shown as mean  $\pm$  standard deviation, \*\*\* $P < 0.001$

**图 2.** FFC 饮食诱导的小鼠模型肝脏及腹部脂肪外观、组织形态学改变及 NASH 相关评分(标尺 100 μm, 放大图片标尺: 25 μm)。 (a) 小鼠肝脏及腹部脂肪外观及肝组织 HE 染色; (b) 小鼠肝脏脂肪变程度评分; (c) 小鼠 NASH 活动度评分。所有数据均展示平均数 $\pm$ 标准差, \*\*\* $P < 0.001$

### 3.3. 血清学及肝组织匀浆指标

FFC 组肝组织 TG 含量显著高于对照组( $P < 0.001$ ), FFC 组血清 TC 显著高于对照组( $P < 0.001$ ), FFC 组血清 ALT、AST 显著高于对照组( $P < 0.01$ ) (图 3)。



**Figure 3.** Serum biochemical indexes & liver triglyceride levels in FFC diet-induced mouse model. (a) serum alanine aminotransferase level; (b) serum aspartate aminotransferase level; (c) serum total cholesterol level; (d) liver triglyceride level. All data are shown as mean  $\pm$  standard deviation, ns: none significance, \*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$

**图 3.** FFC 饮食诱导的小鼠模型血清生化指标及肝脏甘油三酯水平。注: (a) 血清谷丙转氨酶水平; (b) 血清谷草转氨酶水平; (c) 血清总胆固醇水平; (d) 肝脏甘油三酯水平。所有数据均展示平均数 $\pm$ 标准差, ns: 无显著性, \*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$

## 4. 讨论分析

饮食因素在 NASH 膳食动物模型中也起着至关重要的作用[6]。近年来,膳食动物模型主要分为 4 种,分别是蛋氨酸和胆碱缺乏(methionine-choline deficient, MCD)饮食模型,高胆固醇和高胆酸盐(high-cholesterol and high-cholate, HChCh)模型,果糖及高碳水化合物模型和高脂饮食(high-fat diet, HFD)模型[7]。

本实验利用多种饮食因素的协同作用,给小鼠饲养高脂高果糖高胆固醇饮食和对照组饮食,建立了程度更为严重的 NASH 小鼠模型。符合 NASH 的自然病程经过,提示高脂、高果糖与高胆固醇的协同作用会加快 NASH 的发生、发展,加重 NASH 程度[8] [9] [10]。且造模时间较短,可为进一步研究 NASH 发病机制以及治疗方面的研究提供模型参考。然而对于 NASH 进一步发展为肝纤维化甚至肝癌的病理学特征,还有待于进一步充实和完善。

## 基金项目

广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515012477), METTL14 通过 m6A 甲基化修饰脂肪酸转位酶 FAT 调控脂肪肝形成的研究。

广东省医学科研基金(B2014238), 小鼠诱导性多潜能干细胞(mIPScell)对肝损伤修复的研究。

- 1) 国家自然科学基金(82060425), miR-26a-5p 靶向转录因子 DCUN1D1 调控个旧矿工肺癌进展的研究。
- 2) 云南省基础研究专项基金(202201AT070044), ZBTB48 靶向 MTP18 促进线粒体分裂抑制肝癌细胞存活和干性的机制研究。
- 3) 云南省科技厅地方高校联合专项基金(202001BA070001-043), 蛋白激酶 MST4 负向调控 PI3K/AKT 通路抑制肺癌迁移和侵袭的机制研究。
- 4) 云南省科技厅地方高校联合专项基金(202001BA070001-063), 利用肝脏特异性敲除 ZNF173 的转基因小鼠解析转录因子 ZNF173 在肝癌发生中的作用。

## 参考文献

- [1] Caussy, C., Reeder, S.B., Sirlin, C.B. and Loomba, R. (2018) Noninvasive, Quantitative Assessment of Liver Fat by MRI-PDFF as an Endpoint in NASH Trials. *Hepatology*, **68**, 763-772. <https://doi.org/10.1002/hep.29797>
- [2] Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., et al. (2016) Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology*, **64**, 73-84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
- [3] 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.
- [4] Santhekadur, P.K., Kumar, D.P. and Sanyal, A.J. (2018) Preclinical Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Hepatology*, **68**, 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.031>
- [5] Tamaki, N., Munaganuru, N., Jung, J., Yonan, A.Q., Bettencourt, R., Ajmera, V., Valasek, M.A., Behling, C. and Loomba, R. (2021) Clinical Utility of Change in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Activity Score and Change in Fibrosis in NAFLD. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **19**, 2673-2674.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.11.005>
- [6] Tsuchida, T., Lee, Y.A., Fujiwara, N., et al. (2018) A Simple Diet- and Chemical-Induced Murine NASH Model with Rapid Progression of Steatohepatitis, Fibrosis and Liver Cancer. *Journal of Hepatology*, **69**, 385-395. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.011>
- [7] 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年1月修订) [C]//广东省肝脏病学会. 第二届广东省脂肪肝专题研讨会论文汇编. 广东省肝脏病学会: 广东省科学技术协会科技交流部, 2010, 15(11): 6-16+5.
- [8] Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Malhi, H., et al. (2016) Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Digestive Diseases and Sciences*, **61**, 1325-1336. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>
- [9] Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., et al. (2011) Fast Food Diet Mouse: Novel Small Animal Model of NASH with Ballooning, Progressive Fibrosis, and High Physiological Fidelity to the Human Condition. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **301**, G825-G834. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00145.2011>
- [10] Wu, X., Poulsen, K.L., Sanz-Garcia, C., et al. (2020) MLKL-Dependent Signaling Regulates Autophagic Flux in a Murine Model of Non-Alcohol-Associated Fatty Liver and Steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, **73**, 616-627. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.023>