

• 研究报告 •

高脂饲料联合四环素腹腔注射复制 非酒精性脂肪肝大鼠模型的实验研究

聂山文¹, 赵文霞², 石艳芬², 董靖², 刘晓彦², 马素平²

(1. 河南省中医院, 河南 郑州 450002; 2. 河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450000)

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种无过量饮酒史, 以肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为病理特征的肝脏疾病^[1]。随着人民生活水平的提高和饮食结构的改变, NAFLD 的发病率不断上升, 甚至出现许多低龄患者^[2], 并且在某些地区已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病, 同时也是健康体检者转氨酶异常升高的主要原因^[3]。由于脂肪肝在世界范围内发病率急剧上升, 且其危害性大、治疗难度高, 对本病防治的研究已成为国内外医学领域的重大课题。本研究通过采用高脂饲料和四环素腹腔注射联合应用, 建立符合人类脂肪肝发病特点的大鼠 NAFLD 模型, 旨在为 NAFLD 实验研究提供一种优良的脂肪肝模型的建立方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物:健康雄性 SD 大鼠 24 只, 购于郑州大学医学院动物实验中心, 动物合格证号: SCXK (沪) 2003-0003, 体重质量 (190±10) g。将大鼠饲养于河南中医学院第一附属医院实验室动物房, 分笼喂养, 自由进食和饮水, 室温 20~25℃, 室内洁净, 通风良好, 自然采光。动物饲料有普通饲料和高脂饲料, 均由郑州大学医学院动物实验中心提供。

1.2 实验试剂:分析纯胆固醇为中国医药 (集团) 上海化学试剂公司产品, 批号: 050317; 天冬氨酸转氨酶 (AST) 试剂盒由四川迈克科技有限责任公司提供, 批号: 050612; 丙氨酸转氨酶 (ALT) 试剂盒由四川迈克科技有限责任公司提供, 批号: 050612; 三酰甘油 (TG) 试剂盒由浙江东瓯生物工程有限公司提供, 批号: 051016; 总胆固醇 (TC) 试剂盒由浙江东瓯生物工程有限公司提供, 批号: 051016; 精炼猪油由双汇集团有限公司提供, 批号: 050912; 四环素粉针为江苏常州动物保健品有限公司产品, 批号: 031012; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 实验仪器:日立 7150 型全自动生化分析仪; PM-10AD 光学显微镜为日本奥林巴斯公司产品; H-750 透射电子显微镜由河北医科大学电镜实验室提供。

1.4 实验分组与模型制备:将大鼠按随机数字表法分成正常对照组、模型组两组, 每组 12 只。常规饲养 7 d 后, 正常对照组给予普通饲料; 模型组给予高脂饲料 (84% 基础饲料 +10% 猪油 +5% 蛋黄粉 +1% 胆固醇), 并于制模后腹腔注射四环素 150 mg/kg, 以后每 6 d 腹腔注射 1 次四环素 100 mg/kg, 共计 6 次, 并于实验前 (0 d) 和制模后 6、12、18、24、30 d 测量体重质量, 并根据体重质量调整给药量。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 标本的采集:第 6 次腹腔注射四环素后 7 d 后, 按照 3 mL/kg 的剂量腹腔内注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 穿刺腹主动脉采血 4~7 mL 于干燥洁净试管内, 静置所采非抗凝血 0.5 h 后, 离心 10 min, 取上清液备用。处死动物摘取肝脏, 观察肝脏标本外观并称重; 于肝左叶取大小约 0.5 cm×1.0 cm×0.3 cm 的组织 2~3 块, 放入 10% 甲醛水溶液中固定备用。

1.5.2 生化指标的测定:分别采用酶学法、比色法在 7150 型全自动生化分析仪上测定血清 ALT、AST、TG、TC 水平, 操作按照试剂盒说明书进行, 由河南中医学院第一附属医院生化室协助完成。

1.5.3 肝指数测定:取新鲜肝组织称重, 计算肝湿重 (g) 占体重质量 (g) 的百分比即为肝指数。

1.5.4 肝脏组织病理学观察:将所取肝组织用石蜡包埋, 以 5 μm 厚度连续切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察肝脏组织病理学变化, 按照文献^[4]的判断标准评估脂肪肝变性的程度分级 (表 1)。

表 1 肝细胞脂肪变性程度分级判断标准

分级	肝细胞脂变程度
无 (-)	肝细胞基本无脂变
轻度 (+)	30%~50% 的肝细胞发生脂变
中度 (++)	51%~75% 的肝细胞发生脂变
重度 (+++)	76% 以上的肝细胞发生脂变

1.6 统计方法:计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 等级资料采用 Ridit 分析, 采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况:实验结束时, 因灌胃操作不当正常对照组剩余大鼠 11 只, 大鼠皮毛鲜亮, 正常活动, 进食量、粪便均正常; 模型组制模初期出现烦躁、易激惹、少活动等表现, 1 h 左右恢复正常, 4 周后模型组进食量减少, 毛色普遍晦暗, 性情暴躁, 捕捉时剧烈挣扎。

2.2 两组大鼠体重质量、肝指数比较 (表 2):两组大鼠体重质量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组大鼠肝指数显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)。

2.3 肝脏组织大体标本及镜下组织病理学变化观察:正常对照组大鼠肝脏呈暗红色, 包膜光滑, 边缘锐利, 切面光洁; 镜下肝脏结构清楚, 肝细胞未见异常, 肝小叶、肝细胞索、汇

管区均呈放射状排列,肝组织形态学基本正常。模型组大鼠腹腔内有大量脂肪组织,肝脏呈灰黄色,体积明显增大,包膜紧张,边缘圆钝,肝脏切面有油腻感;镜下肝细胞均发生脂变,以中、重度为主,肝小叶分界不清,肝细胞索紊乱,可见大小不等的脂滴充满胞质,肝细胞核部分被挤向一边,肝窦基本消失,汇管区有大量炎性细胞浸润。

2.4 两组大鼠血清 ALT、AST、TG 及 TC 的检测结果比较(表 2):模型组 ALT、AST、TG 及 TC 水平均较正常对照组明显升高(均 $P<0.01$)。

2.5 两组大鼠肝脏脂肪变程度比较(表 3):模型组脂变率较正常对照组明显升高($P<0.01$)。

表 2 两组大鼠体重、肝指数及血清 ALT、AST、TG、TC 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	体重(g)	肝指数(%)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
正常对照组	11	398.27±30.01	3.24±0.13	42.45±11.77	86.73±10.32	0.73±0.09	1.52±0.38
模型组	12	406.08±55.74	4.07±0.30 ^a	128.67±11.96 ^a	144.92±15.57 ^a	1.25±0.20 ^a	2.93±0.69 ^a

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$

表 3 两组大鼠肝脏脂肪变程度比较

组别	动物数	肝脏脂肪变程度分级(例)				脂变率 [% (例)]
		-	+	++	+++	
正常对照组	11	11	0	0	0	0 (0)
模型组	12	0	0	3	9	100 (12) ^a

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$

3 讨论

NAFLD 是一种由环境、遗传等多因素所致的代谢性疾病,它的发病机制复杂,目前仍然有很多环节尚不清楚^[5]。肥胖、高脂血症、糖尿病、肝炎和药物损害等在本病的发生发展中起着重要作用,伴有炎症的脂肪肝均能够演变为肝纤维化和肝硬化^[6]。近年来,脂肪肝的发病率在逐年增高,有关脂肪肝的病因学、预防和治疗已经成为目前的研究热点。要深入研究脂肪肝性肝病的病因病机,必须要有稳定可操作性较强的动物模型。

目前 NAFLD 模型国内外已有较多报道,总结国内外关于 NAFLD 制备方法的实验报道,主要有先天性、转基因和化学物质诱导 3 种^[7-9],前两种由于来源困难和代价昂贵,而且与临床上人类脂肪肝的形成特点(饮食环境因素造成)相距较远,限制了其在实验研究中的应用。化学药物制模具有耗时短和病变典型的优点,但长时间或大剂量、短时间注射易引起动物死亡^[10]。

在模型动物的选择方面,选用大鼠则有饲养方便、抵抗力强和食性与人相似的优点,且形成的病理改变与成人早期相似^[11]。因此,本研究采用大鼠作为实验动物。采用单纯高脂饮食复制大鼠 NAFLD 模型是目前的经典方法,相对稳定、操作方便,但耗时较长,实验成本较高,推广并不理想。四环素类药物可以导致肝细胞的脂肪变性,而且肝毒性较小,造成肝脏脂肪变性机制明确,主要表现在:①抑制微粒体三酰甘油转移蛋白(MTP)活性,阻断极低密度脂蛋白(VLDL)组装,导致脂质不能以脂蛋白的形式运出肝脏,引起 TG 分泌减少;②抑制肝线粒体脂肪酸 β -氧化和三羧酸循环^[12]。因此本实验选用四环素腹腔注射联合高脂饲料复制 NAFLD 模型,并且逐渐减少四环素的用量,使该模型

尽量符合人类脂肪肝形成特点。脂质代谢异常被公认为是脂肪肝肝病的一个最基础和关键环节^[13],而血清 ALT、AST 水平一直被作为反映肝细胞损伤的敏感生化检测指标;临床上,血脂水平的变化是评价脂肪肝药物治疗的重要标准之一^[14]。因此,实验结束时,重点观察大鼠肝脏病理组织学和血清 ALT、AST、TG、TC 水平的变化,结果表明,高脂饲料联合四环素腹腔注射建立大鼠 NAFLD 模型的方法耗时短,模型稳定,病理变化典型,动物死亡率低,是一种较为理想的制模方法。

参考文献

- [1] 贾程之.降脂平肝汤对非酒精性脂肪性肝病患者降脂保肝作用的临床观察.中国中西医结合急救杂志,2012,19(1):26-28.
- [2] 林雪,尚玉红,周斌.净肝祛脂汤治疗非酒精性脂肪肝的临床研究.中国中西医结合急救杂志,2008,15(2):98-100.
- [3] 范建高,田丽艳.非酒精性脂肪性肝病的诊断与治疗.现代实用医学,2003,15(1):5-7.
- [4] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病组.非酒精性脂肪性肝病诊断标准.中华肝脏病杂志,2003,11(2):71.
- [5] 李刚,李尤玲,盛国光.活血化瘀方对大鼠非酒精性脂肪肝模型脂肪因子的影响.湖北中医药大学学报,2012,14(5):14-17.
- [6] 付静,杨素珍.中西医结合治疗非酒精性脂肪肝的临床观察.中国中西医结合急救杂志,2004,11(3):185.
- [7] Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. Clin Liver Dis, 2004, 8(3): 559-574.
- [8] Lieber CS, Leo MA, Mak KM, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. Am J Clin Nutr, 2004, 79(3): 502-509.
- [9] 张顺财,孙剑勇.脂肪肝的动物模型.肝脏,2001,6(3):192-194.
- [10] 阎向东,郑珊,熊晓燕.四氯化碳与乙醇经口所致小鼠肝损伤病理模型重现性的比较.毒理学杂志,2005,19(2):136-138.
- [11] 王安才,王春雷,杨尚印,等.左旋精氨酸对高脂血症大鼠血清一氧化氮影响的观察.中国危重病急救医学,1998,10(11):676-677.
- [12] Lettérón P, Sutton A, Mansouri A, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. Hepatology, 2003, 38(1): 133-140.
- [13] Moreno Sánchez D. Pathogenesis of primary nonalcoholic fatty liver disease. Med Clin (Barc), 2005, 124(17): 668-677.
- [14] 邓厚波,隋晓丹,刘铁军.肝脂溶颗粒治疗非酒精性脂肪肝模型大鼠的实验研究.中国实用医药,2013,8(25):245-246.

(收稿日期:2013-03-07)

(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

- ① 广东天普药业:绿色方舟计划 封二
- ② 天津红日药业:血必净注射液 插页
- ③ 珠海健帆:血液灌流器 插页
- ④ 天津生化制药:琥珀氢可 封三
- ⑤ 江苏新晨:艾贝宁®盐酸右美托咪定注射液 封四