

## C57BL/6 小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立研究

江 云,高月求,朱明清,李 曼,张 鑫

**[摘要]** **目的:**利用 D12492 高脂饲料建立小鼠非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 模型,为 NAFLD 的研究提供参考依据。**方法:**选用健康雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,随机分组,正常组 20 只采用普通饲料喂养,模型组 20 只采用高脂饲料喂养,建立 NAFLD 模型。分别在第 4 周、第 8 周、第 12 周、第 16 周进行体质量、肝质量、肝组织匀浆检测,观察血清丙氨酸氨基转移酶、总胆固醇、低密度脂蛋白及肝脏三酰甘油等指标变化,并进行肝脏病理学检查。**结果:**模型组小鼠体质量从第 4 周开始高于正常组小鼠 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ),而肝脏质量从第 8 周开始高于正常组小鼠 ( $P < 0.05$ );与正常组小鼠比较,从第 8 周模型组小鼠丙氨酸氨基转移酶增高 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ );各时间点模型组血清总胆固醇、低密度脂蛋白均高于正常组 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ );从第 12 周模型组小鼠肝组织三酰甘油含量升高 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。肝组织 HE 染色示:从第 12 周模型组小鼠肝组织见脂肪变,并散布全肝,肝细胞肿胀,细胞质易见脂肪空泡,肝细胞有炎性改变;至第 16 周模型组小鼠肝脏脂肪变性较前严重,且出现大量炎细胞的浸润。**结论:**通过高脂饮食诱导的非 NAFLD 小鼠模型是理想的动物模型,方法简单,重复性强,可为 NAFLD 的机制研究及药物治疗提供稳定的动物模型。

**[关键词]** 非酒精性脂肪肝;C57BL/6 小鼠;高脂饮食;动物模型

**[中图分类号]** R 575.5 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.05.003

## Establishment of the nonalcoholic fatty liver disease model in C57BL/6 mice

JIANG Yun, GAO Yue-qiu, ZHU Ming-qing, LI Man, ZHANG Xin

(Department of Hepatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) model in C57BL/6 mice using D12492 high-fat feed, and provide the basis in studying the NAFLD. **Methods:** Forty healthy male C57BL/6 mice were randomly divided into the control group and model group (20 mice each group). The control group and model group were fed with the normal feed and high-fat feed, respectively. After 4, 8, 12 and 16 weeks of feed, the body weight, liver weight and liver tissue homogenate were observed, the serum levels of ALT, total cholesterol, low-density lipoprotein and liver triglyceride were detected, and the liver pathology examination was implemented. **Results:** The body weight after 4 weeks of feed and liver weight after 8 weeks of feed in model group were higher than those in control group, respectively ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the serum ALT level in model group after 8 weeks of feed increased ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ). The levels of serum total cholesterol and low-density lipoprotein in model group at each time-point were higher than those in control group ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the content of triglyceride in model group after 12 weeks of feed increased ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). The liver tissue staining showed that the liver tissue steatosis, liver cells swelling, fat cavitation in cytoplasm and liver cells inflammatory change were identified in model group after 12-week of feed, and the liver cells inflammatory change aggravated and a large number of inflammatory cells infiltrated in model group after 16-week of feed. **Conclusions:** The NAFLD model induced by high fat-diet is an ideal animal model, which is easy to establish and repeatable, and can provide stable animal model for the study of mechanism and clinical treatment of NAFLD.

**[Key words]** non-alcoholic fatty liver disease; C57BL/6 mouse; high-fat diet; animal model

**[收稿日期]** 2017-10-20 **[修回日期]** 2018-04-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81403237, 81473477, 81403354, 81473629, 81403351, 81503545); 国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (2012ZX10005004-002); 上海市青年科技启明星计划 (13QA1403500); 上海市科委科技支撑项目 (13401902900); 上海市中医药事业发展三年行动计划项目 (ZYSNXD-CC-ZDYJ015, ZY3-CCCX-3-3027); 上海市卫生局优秀青年人才培养计划 (XYQ2013093); 上海市科委扬帆计划 (14YF1411600, 15YF1412300); 中国肝炎防治基金会王宝恩肝纤维化研究基金 (CFHPC20131045, CFHPC20131046); 上海中医药大学预算内项目 (2013JW40, 2014YSN39)

**[作者单位]** 上海中医药大学附属曙光医院 肝病科, 201203

**[作者简介]** 江 云 (1980-), 女, 硕士, 副主任医师。

**[通信作者]** 高月求, 博士研究生导师, 主任医师, 教授。E-mail: gaoyueqiu@hotmail.com

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外长期大量饮酒和其他损伤肝脏因素所引起的以肝脏脂肪沉积为主要表现的临床综合征<sup>[1]</sup>, 病人肝脏脂肪代谢功能出现明显障碍, 导致大量脂肪类物质蓄积于肝细胞, 肝细胞发生脂肪变, 从单纯性脂肪变性发展为脂肪性肝炎

(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 最终发展为肝纤维化、肝硬化和终末期肝病, 甚至肝癌<sup>[2-4]</sup>。虽然在中国 NAFLD 流行性较低, 但是在过去的 20 年 NAFLD 的发病率也增加了一倍<sup>[5]</sup>。

NAFLD 的发病机制目前并不清楚, 由单纯性脂肪肝发展为 NASH 的过程亦不清晰<sup>[6]</sup>。此外, 在诊断和治疗这些疾病上也存在很大的问题<sup>[7]</sup>。因此, 通过建立脂肪肝的动物模型研究该病的发病机制来解决这些问题势在必行。NAFLD 作为一种代谢性疾病, 与肥胖、2 型糖尿病、高血压和胰岛素抵抗密切相关<sup>[8]</sup>。高脂饮食、不积极的生活方式、肠道微生物和基因背景都是 NAFLD 发病过程中的危险因素<sup>[9]</sup>。本文主要目的是建立与人类 NAFLD 相匹配的动物模型, 包括代谢、组织学和基因特点等。采用 Reacher Diets; D12492 饲料分别喂养 C57BL/6 小鼠 4 周、8 周、12 周、16 周来观察小鼠各个时期的变化, 确立 C57BL/6 小鼠 NAFLD 造模最合适的时间。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 选择 40 只健康雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 19 ~ 23 g, 均购于上海必凯实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: 合格证号 SCXK(沪) 2008-0016, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 5 只/盒分配于 SPF 级屏障系统中, 温度 (22 ± 2) °C, 湿度 50% ~ 60%, 12 h 循环照明, 小鼠自由摄取食、水。实验动物中心使用许可证号: SYXK(沪) 2009-0069。

1.2 仪器与试剂 采用贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司生产的全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(LDL)等生化指标。试剂盒与质控品均为配套原装试剂, 试剂厂家和批号分别为: ALT 试剂盒(贝克曼库尔特生化分析系统, 批号: 20120423), TG 试剂盒(上海执诚生物科技有限公司, 批号: 20130221), TC 试剂盒(日本世诺临床诊断制品株式会社, 批号: 20080707), LDL-C 试剂盒(和光纯药工业株式会社, 批号: 20140320)。仪器 CQX25-12 超声波清洗器(上海必能超声有限公司), RM2035 轮转切片机(德国 Leica 公司), HII220 烤片机(德国 Leica 公司), HII210 恒温水浴(德国 Leica 公司), 隔水式电热恒温培养箱(上海市跃进农场医疗器械厂), LG100B 理化干燥箱(上海实验仪器总厂), ASP300 自动脱水机(LEICA), EG1160 石蜡包埋机(LEICA)。

## 1.3 方 法

1.3.1 动物模型制备 采用高脂饮食诱导 NAFLD 模型, 造模用饲料货号为 D12492(60kcal% Fat), 购自 Research Diets 有限公司, 批号: 17010802, 分别造模 4 周、8 周、12 周、16 周。

1.3.2 动物分组 C57BL/6 小鼠 40 只, 适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法随机分为正常组、模型组, 每组 20 只。每周称质量, 并在 4 周、8 周、12 周、16 周 4 个时间点分别处死正常组及模型组小鼠各 5 只。

1.3.3 标本采集及处理 在各个时间点实验结束后, 称取小鼠体质量, 用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 仰卧位于动物实验台上, 固定四肢, 脱毛后暴露胸腹部, 采用心脏穿刺采血方法。4 °C 静置 2 h 后, 3 000 r/min, 离心 15 min, 吸取血清, 分装在 1.5 mL 离心管内, -70 °C 低温保存。取出小鼠肝脏, 0.9% 氯化钠注射液冲洗, 滤纸吸干后称质量。在肝右叶同一位置切取 1 块 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 肝组织, 其中一块置入 10% 甲醛缓冲液中固定, 24 h 后逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 60 °C 石蜡包埋, 用于 HE 染色。其余肝组织分装于 1.5 mL 离心管中, -70 °C 低温保存。

1.4 观察指标 (1) 一般状况观察。造模结束后处死小鼠, 称量各组小鼠体质量和肝质量。(2) 测定血清 ALT、TC、LDL 水平。(3) 肝组织 TG 含量测定。称取一块 100 mg 的肝组织, 置于 900 μL 无水乙醇中, 然后冰浴下制成 10% 的组织匀浆。匀浆离心 10 000 r/min, 10 秒/次, 3 次, 4 °C 静置过夜。然后 4 °C 离心, 3 000 r/min, 15 min, 取上清液分装于 1.5 mL 离心管中用于肝组织 TG 含量测定。(4) 肝脏 HE 染色。在显微镜下观察肝组织脂肪变性程度, 并进行分级和评分<sup>[10]</sup>(见表 1)。

表 1 显微镜下肝组织病理变化分级及评分标准

| 分级   | 含脂滴细胞数/总细胞数比值 | 评分 |
|------|---------------|----|
| -    | 0             | 0  |
| +    | <1/3          | 1  |
| ++   | 1/3 ~ 2/3     | 2  |
| +++  | 2/3 ~ 1       | 3  |
| ++++ | ≈1            | 4  |

1.5 统计学方法 采用 *t* (或 *t'*) 检验。

## 2 结 果

2.1 2 组小鼠一般情况、体质量及肝质量的变化 实验过程中各组小鼠均状态良好, 食欲旺盛。正常

组小鼠性情较为温顺,皮毛光滑,活动正常。模型组小鼠体质量增长迅速,且性情较为温顺,不喜动。至第 4 周、第 8 周、第 12 周和第 16 周时模型组小鼠的体质量与正常组比较均升高( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ );而肝质量至第 12 周和第 16 周时与正常组比较均升高( $P < 0.05$ )(见表 2)。

表 2 2 组小鼠体质量及肝质量变化的比较( $\bar{x} \pm s; g$ )

| 分组       | <i>n</i> | 4 周          | 8 周          | 12 周         | 16 周         |
|----------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 体质量      |          |              |              |              |              |
| 正常组      | 5        | 24.70 ± 1.56 | 29.40 ± 1.07 | 32.00 ± 2.05 | 31.40 ± 1.13 |
| 模型组      | 5        | 27.50 ± 1.67 | 43.40 ± 3.47 | 45.60 ± 3.19 | 44.30 ± 2.82 |
| <i>t</i> | —        | 2.74         | 8.62*        | 8.02         | 9.49         |
| <i>P</i> | —        | <0.05        | <0.01        | <0.01        | <0.01        |
| 肝质量      |          |              |              |              |              |
| 正常组      | 5        | 1.32 ± 0.33  | 1.47 ± 0.09  | 1.47 ± 0.14  | 1.41 ± 0.10  |
| 模型组      | 5        | 1.18 ± 0.08  | 1.98 ± 0.47  | 2.12 ± 0.45  | 2.25 ± 0.61  |
| <i>t</i> | —        | 0.92         | 2.38         | 3.08         | 3.04         |
| <i>P</i> | —        | >0.05        | >0.05        | <0.05        | <0.05        |

\*示 *t* 值

2.2 2 组小鼠血清 ALT、TC 及 LDL 水平的变化  
与正常组比较,第 8 周、第 12 周和第 16 周时模型组小鼠血清 ALT 均明显升高( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ );与正常组比较,第 4 周、第 8 周、第 12 周和第 16 周时模型组小鼠血清 TC 和 LDL 水平均升高( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )(见表 3)。

表 3 2 组小鼠血清 ALT、TC 及 LDL 变化的比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 分组                    | <i>n</i> | 4 周           | 8 周           | 12 周          | 16 周          |
|-----------------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ALT/( $\mu\text{L}$ ) |          |               |               |               |               |
| 正常组                   | 5        | 42.40 ± 23.62 | 34.20 ± 5.54  | 35.60 ± 4.39  | 39.70 ± 7.88  |
| 模型组                   | 5        | 44.80 ± 6.64  | 72.20 ± 25.70 | 67.40 ± 26.23 | 87.50 ± 28.12 |
| <i>t</i>              | —        | 0.22          | 3.23          | 3.51          | 3.66          |
| <i>P</i>              | —        | >0.05         | <0.05         | <0.01         | 0.05          |
| TC/(mmol/L)           |          |               |               |               |               |
| 正常组                   | 5        | 3.07 ± 0.22   | 3.58 ± 0.11   | 3.30 ± 0.24   | 3.66 ± 0.09   |
| 模型组                   | 5        | 4.37 ± 0.13   | 5.40 ± 0.53   | 6.28 ± 0.52   | 6.94 ± 0.64   |
| <i>t</i>              | —        | 11.37         | 7.52*         | 11.64         | 11.35*        |
| <i>P</i>              | —        | <0.01         | <0.01         | 0.01          | 0.01          |
| LDL/(mmol/L)          |          |               |               |               |               |
| 正常组                   | 5        | 0.20 ± 0.03   | 0.22 ± 0.02   | 0.17 ± 0.03   | 0.13 ± 0.01   |
| 模型组                   | 5        | 0.29 ± 0.02   | 0.46 ± 8.13   | 0.61 ± 0.05   | 0.36 ± 0.09   |
| <i>t</i>              | —        | 5.58          | 4.08*         | 16.87         | 5.68          |
| <i>P</i>              | —        | <0.01         | <0.05         | <0.01         | <0.01         |

\*示 *t* 值

2.3 2 组小鼠肝组织 TG 含量的变化 与正常组比较,第 12 周、第 16 周模型组小鼠肝组织 TG 含量均

升高( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )(见表 4)。

表 4 2 组小鼠肝组织 TG 变化的比较( $\bar{x} \pm s; \text{mg/gprot}$ )

| 分组       | <i>n</i> | 4 周         | 8 周         | 12 周        | 16 周        |
|----------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 正常组      | 5        | 0.18 ± 0.03 | 0.48 ± 0.14 | 0.80 ± 0.18 | 0.84 ± 0.18 |
| 模型组      | 5        | 0.34 ± 0.11 | 0.55 ± 0.03 | 1.37 ± 0.81 | 2.79 ± 0.48 |
| <i>t</i> | —        | 2.14        | 1.09        | 3.54        | 8.51        |
| <i>P</i> | —        | >0.05       | >0.05       | <0.05       | <0.01       |

#### 2.4 2 组小鼠肝脏大体观察及肝组织病理观察

正常组肝表面颜色普遍黯红,色泽鲜亮,边缘锐利,无油腻感;模型组肝脏随时间推移,表面颜色发黄,肝脏体积逐渐增大,包膜紧张,切面有油腻感;至 12 周时肝脏表面颜色较前有很大变化,颜色发黄,体积增大;至 16 周时,体积增大较前明显(见图 1)。HE 染色显微镜下可见正常组小鼠肝组织结构完整清晰,肝小叶结构正常,肝细胞排列成肝索,在中央静脉周围呈放射状分布,细胞中央有大而圆的核,细胞质均匀,无脂滴;与正常组相比,第 12 周模型组小鼠肝脏脂肪变性明显,肝细胞肿大变圆,细胞质疏,内含大的脂肪滴,部分细胞可见细胞核挤向细胞膜,呈以大泡性为主的脂肪变性,并可见淋巴细胞浸润,肝脏轻度脂肪肝占 100%;至第 16 周模型组小鼠肝脏脂肪变性较前严重,出现明显大泡状变性且可见明显炎性细胞浸润,大部分为中重度脂肪肝(见图 2)。

### 3 讨论

目前建立 NAFLD 模型包括转基因动物、化学诱导、病毒诱导及高脂饮食诱导等方式<sup>[11]</sup>。而理想的动物模型应具备以下条件:与人类疾病特征相似;病变有一定的发展过程,与人类疾病发病过程相近;形成率高,病死率低,重复性好;造模方法简便易行<sup>[12]</sup>。因此只有高脂饮食诱导的方式与人类 NAFLD 发病过程相似,成功率高、死亡率低,方法简单易行,容易重复<sup>[13]</sup>。对于不同种属、不同系别的动物采用不同的组分饲料喂养不同的时间形成脂肪肝动物模型在国内外已有很多报道,但是很多饲料都是研究者自己的配方,配方也是多种多样。Research Diets 公司的 D12492 饲料有明确的配方,且在研究脂肪肝、肥胖及炎症小鼠模型中已经得到了广泛使用。本文就是为了确定 C57BL/6 小鼠喂养 D12492 饲料产生脂肪肝所需时间。结果表明高脂饲料喂养至第 12 周时肝组织出现明显的脂肪变性,血清 ALT、TC 及 LDL 升高,肝组织 TG 水平升高,成功建立了脂肪肝动物模型,为后期脂肪肝的实

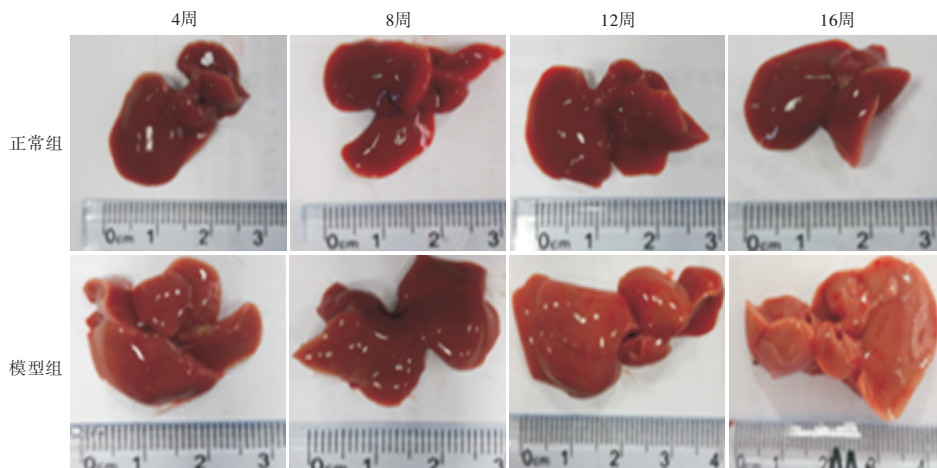


图1 小鼠在不同时间点的肝脏大体

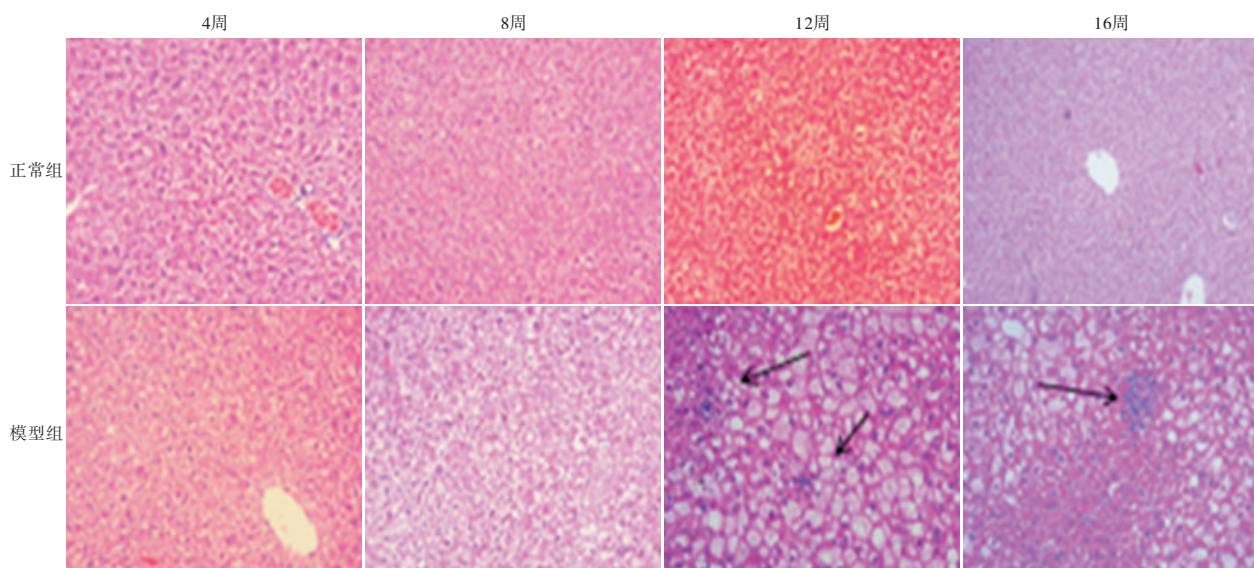


图2 小鼠肝脏HE染色

验研究打下坚实的基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] BASHIARDES S, SHAPIRO H, ROZIN S, *et al.* Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota [J]. *Molecular Metabolism*, 2016,5(9):782.
- [2] ABENAVOLI L, MILIC N, DI RENZO L, *et al.* Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2016,22(31):7006.
- [3] ZHU JZ, HOLLIS-HANSEN K, WAN XY, *et al.* Clinical guidelines of non-alcoholic fatty liver disease;a systematic review [J]. *World J Gastroenterol*, 2016,22(36):8226.
- [4] HSU WF, SHEEN LY, LIN HJ, *et al.* A review of western and traditional chinese medical approaches to managing nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016,2016(9):6491420.
- [5] WANG XL, LIU ZP, WANG K, *et al.* Additive effects of the risk alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in a Chinese population[J]. *Front Genet*, 2016,7:140.
- [6] KÖROĞLU E, CANBAKAN B, ATAY K, *et al.* Role of oxidative stress and insulin resistance in disease severity of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2016,27(4):361.
- [7] WANG X, LIU Z, WANG K, *et al.* An animal model for the juvenile non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis[J]. *PLoS One*, 2016,11(7):e0158817.
- [8] MARCHESINI G, BUGIANESI E, FORLANI G, *et al.* Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome[J]. *Hepatology*, 2003,37(4):917.
- [9] YU J, MARSH S, HU J, *et al.* The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: interplay between diet, gut microbiota, and genetic background [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016(2016):ID2862173.
- [10] 葛麟, 谭正怀, 唐大轩, 等. 轻肝颗粒对小鼠非酒精性脂肪肝的作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2009,25(2):94.
- [11] 南月敏, 王蕾, 李良宵, 等. 非酒精性脂肪肝动物模型研究进展[J]. *河北医科大学学报*, 2007,28(1):67.
- [12] 吴利春, 尹梦, 候梦莹, 等. 高脂联合地塞米松诱导小鼠急性脂肪肝模型的实验研究[J]. *重庆医学*, 2017(17):2383.
- [13] 潘磊, 张金彪, 崔荣岗, 等. 非酒精性脂肪肝 C57BL/6 小鼠模型的建立[J]. *中国组织工程研究*, 2016,20(40):6054.

( 本 文 编 辑 周 洋 )