doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.013

## 高脂及 MCD 饮食诱导非酒精性脂肪性肝炎动物模型的比较\*

续 畅 刘泽洲 许可嘉 李 健 杨美娟 牛建昭 唐炳华<sup>△</sup> (北京中医药大学基础医学院 北京100029)

摘要目的:对高脂饮食诱发的大鼠 NASH 模型与蛋氨酸胆碱缺乏饮食诱发的小鼠 NASH 模型进行血清学及病理学比较,并初步 探讨两种模型的发病过程及机制。方法:高脂饮食喂养 SD 大鼠 8 周,蛋氨酸胆碱缺乏饮食喂养 C57BL/6 小鼠 2 周,以制备 NASH 模型。取材后,血清用比色法对 TG、CHO、FPG 的含量进行检测,用放免法对 FINS 的含量进行检测,并对 HOMA-IR 指数进行计 算;肝组织制成石蜡切片及冰冻切片进行 HE 及油红 O 染色,并根据"NAFLD 活动度积分"对各组肝组织进行 NASH 分级评估。 结果:高脂饮食大鼠血清中 TG、CHO、FPG、FINS 的含量显著升高,经计算 HOMA-IR 指数显著升高;MCD 小鼠血清中 TG、CHO 的含量显著下降,FPG、FINS 的含量未发生显著性改变,经计算 HOMA-IR 指数未发生显著性改变。HE 染色、油红 O 染色及 NAFLD 活动度积分结果显示,高脂饮食大鼠及 MCD 小鼠的肝组织均已发展到 NASH 阶段。结论:两种造模方法均可稳定的模 拟人类 NASH 疾病的血清学及病理学变化,其中高脂饮食诱发的大鼠 NASH 模型可模拟人类的发病过程及机制,能够复制胰岛 素抵抗、氧化应激等人类全身代谢紊乱表现,在 NASH 研究领域更占优势。

关键词:非酒精性脂肪性肝炎;动物模型;比较;病理学;血清学

中图分类号:Q95-336 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)18-3451-05

# Comparison of High-fat Diet and Methionine-choline Deficient diet induced by non-alcoholic Steatohepatitis Animal Model\*

XU Chang, LIU Ze-zhou, XU Ke-jia, LI Jian, YANG Mei-juan, NIU Jian-zhao, TANG Bing-hua

(Basic Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

**ABSTRACT** Objective: Comparison of high-fat diet and methionine-choline deficient diet induced by non-alcoholic steatohepatitis animal model in serology and pathology, and explore the pathogenesis and mechanism. **Methods:** SD rats feed high-fat diet and C57BL/6 mice feed methionine-choline deficient diet to become model of non-alcoholic steatohepatitis. Liver tissue and blood were harvested after 8 weeks (rats) and 2 weeks (mice), which were detected by TG, CHO, FPG, FINS, HE and oil-red O. At last, the rats were assessed by NAFLD Activity Score (NAS) and HOMA-IR. **Results:** The levels of serum TG, CHO, FPG, FINS, HOMA-IR were significantly increased in NASH rats. The levels of serum TG, CHO were significantly decreased in NASH mice. The results of HE, oil-red O and NAS show liver tissue of rats and mice have been developed to NASH. **Conclusion:** Two methods can be simulated human NASH disease in serology and pathology, high-fat diet induced by NASH model can simulate the process and mechanism of human NASH disease, and this model can copy insulin resistance and oxidative stress, so this method have more advantage in NASH research field.

Key words: Non-alcoholic steatohepatitis; Animal model; Comparison; Serology; Pathology

Chinese Library Classification: Q95-336 Document code: A Article ID: 1673-6273(2014)18-3451-05

## 前言

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 是无过量饮酒史条件下,以肝实质细胞脂肪变性及脂肪贮积为 特征,伴弥散性肝小叶轻度炎症和(或)肝中央静脉、肝窦周围胶 原沉积的临床综合征<sup>[1]</sup>。研究表明,NASH 是单纯性脂肪肝向肝 纤维化、肝硬化过渡的关键环节,是隐源性肝硬化的重要病因 之一<sup>[2]</sup>。流行病学调查显示,肥胖人群中 NASH 发病率高达 18.5%<sup>[3]</sup>,其中约 33%的患者在 3~4 年内可进展为肝纤维化<sup>[4]</sup>, 2%~8%的患者最终发生肝硬化<sup>[5]</sup>,9%~26%的患者在随访的 4~10年内死亡<sup>[6]</sup>。因此,NASH发病机制及防治的研究成为大 家关注的热点。

NASH 的发病机制十分复杂,大量基础性研究工作需要深入开展,因而建立符合临床疾病特点的实验动物模型至关重要。目前,国内外学者广泛认同的 NASH 动物模型主要有 2 种: 胆碱 - 蛋氨酸缺乏饮食诱导模型(MCD 模型)和高脂饮食诱导模型。2 种模型的制备原理、发病机制、病理特征及演变规律均有较大差别,在防治疾病及探讨机制的研究中需要有针对性的

 <sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81273884);高等学校学科创新引智计划资助项目(B07007) 作者简介:续畅,在读研究生,研究方向:肝病的机制与干预,E-mail:664107538@qq.com,电话:010-64286762
△通讯作者:唐炳华,教授,硕士生导师,E-mail: tangbinghua\_bucm@qq.com
(收稿日期:2014-01-11 接受日期:2014-02-10)

选择和应用。为此,系统对比2种模型的发病机制及病理学特征十分关键。本文基于课题组前期研究工作,从脂代谢、胰岛素抵抗及肝组织病理3个方面比较了高脂及 MCD 饮食诱导 NASH 模型病生理的异同点。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

1.1.1 **实验动物** SD 大鼠(SCXK-京-2012-0001)及 C57BL/6 小鼠(SCXK-京-2013-0001)购自北京维通利华实验动物有限 公司。

1.1.2 试剂及耗材 甘油三酯(Triglyceride,TG)总胆固醇 (Cholesterol total,CHO)、空腹血糖(Fasting plasma glucose, FPG)比色法试剂盒,购自中生北控股份有限公司。空腹胰岛素 (Fasting insulin,FINS)放免法试剂盒,购自北京华英生物技术 研究所。高脂饲料配方:88%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司;MCD 饲料配方:L-氨 基酸 175.7 g/kg、蔗糖 441.9 g/kg、玉蜀黍淀粉 150.0 g/kg、右旋 麦芽糖 50.0 g/kg、纤维素 30.0 g/kg、玉米油 100.0 g/kg、碳酸氢 钠 7.4 g/kg、盐混合物 35.0 g/kg、维生素混合物 10.0 g/kg,购自 江苏南通特洛菲饲料有限公司。

## 1.2 实验方法

## 1.2.1 动物模型制备及评价

1.2.1.1 高脂饮食诱导大鼠 NASH 模型的方法 依照本实验室 常规方法<sup>[7]</sup>,20 只 SD 大鼠饲喂普通维持饲料 1 周后随机分为 2 组,其中正常饮食对照组 10 只,饲喂普通维持饲料;高脂饮 食模型组 10 只,饲喂高脂饲料,自由摄食、饮水,均持续 8 周。 每天观察动物进食、饮水、行为、精神状态、毛发及二便情况,并 于每周末计量体重1次。8周后,禁食12小时,称重麻醉,腹主 动脉取血、多聚甲醛固定肝组织以制作石蜡切片、OCT固定肝 组织以制作冰冻切片。

1.2.1.2 MCD 饮食诱导小鼠 NASH 模型的方法 依照本实验 室常规方法<sup>[7]</sup>,20 只 C57BL/6 小鼠饲喂普通维持饲料 1 周后随 机分为 2 组,其中 MCS 对照组 10 只,饲喂 MCS 饲料;MCD 模 型组 10 只,饲喂 MCD 饲料,自由摄食、饮水,均持续 2 周。每 天观察动物进食、饮水、行为、精神状态、毛发及二便情况,并于 每周末计量体重 1 次。2 周后,禁食 12 小时,称重麻醉,摘眼球 取血、多聚甲醛固定肝组织以制作石蜡切片、OCT 固定肝组织 以制作冰冻切片。

1.2.2 **血脂含量测定** 采用比色法,全自动生化分析仪依照常 规方法检测血清中甘油三酯(Triglycerid,TG)及总胆固醇 (Cholesterol,CHO)的含量。

1.2.3 胰岛素抵抗水平测定 比色法检测血清中空腹血糖 (Fasting Plasma Glucose, FPG)的含量,放免法检测血清中空腹 胰岛素(Fasting Insulin, FINS)的浓度,根据公式计算 HOMA-IR 指数,即 HOMA-IR=空腹血糖(FPG, mmol/L)×空腹胰岛素 (FINS, mIU/L)/22.5。

1.2.4 **肝组织病理学检测** 常规石蜡包埋、石蜡切片(4μm)及 HE 染色、光镜观察并摄片;冰冻切片(10μm)行常规油红 O 染 色、光镜观察并摄片。NASH 病理诊断标准采用 NAFLD 活动 度积分<sup>[8]</sup>(NAFLD Activity Score, NAS)进行评估。NAS 组织学 评分系统对 14 项病理改变,3 项指标进行了半定量评估计分 (如表 1)。

#### 表1 NAFLD 活动度积分(NAS)组织学评分判断标准

程度评分	肝脂肪变	小叶内炎症	肝细胞气球样变
Score	Hepatic steatosis	Inflammation in hepatic lobule	Ballooning degeneration of liver cells
0	<5%	无病灶 without lesion	无 without
1	5%~33%	~2	少量气球样细胞 a few of ballooning degeneration
2	34%~66%	2~4	较多 / 显著气球样变 most of ballooning degeneration
3	>66%	>4	

注:NAS≥ 5 分者可明确 NASH 的诊断;NAS<3 分则可排除NASH;两者之间者为 NASH 可能。

Note: NAS≥ 5 diagnosed with NASH; NAS<3 ruled out NASH; 3≤ NAS<5 suspected NASH

#### 1.3 统计学分析及数据处理

定量数据采用 SPSS18.0 软件对血清生化指标检测结果进 行统计学分析。不同组间差异以表示,对符合正态分布的计量 资料组间比较采用独立样本 T 检验,P<0.05 表示差异有统计 学意义,P<0.01 表示差异有显著统计学意义。

## 2 结果

## 2.1 一般情况

各组大鼠及小鼠实验期间均无死亡。正常饮食对照组大鼠 及 MCS 对照组小鼠毛发柔顺、有光泽,精神状态良好,取材时 肉眼观察肝脏颜色红润,与周边脏器边缘清晰(图 1-A、1-C)。 高脂饮食模型组大鼠体重在前4周快速增长,4周后增长速度 显著下降,8周后毛发紊乱、无光泽,精神萎靡,取材时肉眼观 察肝脏颜色变黄,肝脏肿大,肝表面可见结节及与周边组织黏 连(图1-B)。MCD模型组小鼠体重在2周内持续下降,2周后 局部有毛发脱落,易怒,喜争斗,取材时肉眼观察肝脏萎缩,颜 色变黄,肝脏表面出现大量结节,并与周边组织黏连严重(图 1-D)。

#### 2.2 血脂含量检测结果

如表2所示,与大鼠正常饮食对照组比较,高脂饮食模型 组血清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHO)的含量均显著升高 (P<0.05)。



图 1 各组肝脏整体形态观察 Fig. 1 Observation of the whole liver in each group 注:A:大鼠正常饮食对照组 B:大鼠高脂饮食模型组 C:小鼠 MCS 对照组 D:小鼠 MCD 模型组 Note: A:the normal group of rat B:the model group of rat C:the MCS group of mouse D:the MCD group of mouse

表 2 SD 大鼠血清中 TG、CHO 的含量(x± s,n=10) Table 2 The content of TG, CHO in the SD rat serum

组别 Group	TG(mmol/L)	CHO( mmol/L )	
正常饮食对照组	0.56+ 0.04	1.68+ 0.10	
The normal group	0.301 0.04	1.08± 0.19	
高脂饮食模型组	0.65+ 0.02*	2 81+ 0 70*	
The model group	0.03± 0.02	2.81± 0.79	

注:\* 表示与大鼠正常饮食对照比较,P<0.05。

Note: \* represent compared with the normal group of rat, P<0.05.

如表 3 所示, 与小鼠 MCS 对照组比较, MCD 模型组血清 中甘油三酯(TG)及总胆固醇(CHO)的含量显著降低。

#### 表 3 C57BL/6 小鼠血清中 TG、CHO 的含量(x± s,n=10)

Table 3 The content of TG, CHO in the C57BL/6 mouse serum

组别 Group	TG( mmol/L )	CHO( mmol/L )	
MCS 对照组	02.06+.0.74	3 46+ 1 10	
the MCS Control group	02.001 0.74	5.401 1.10	
MCD 模型组	1 20+ 0 16*	1 /8+ 0 27*	
the MCD Model group	1.271 0.10	1.401 0.27	

#### 注:\* 表示与小鼠 MCS 对照组比较, P<0.05。

Note: \* represent compared with the MCS group of mouse, P<0.05.

## 2.3 血清中胰岛素抵抗程度检测结果

如表4所示,与大鼠正常饮食对照组比较,高脂饮食模型 组血清中空腹血糖(FPG)及空腹胰岛素(FINS)的含量均显著 升高(P<0.05),经计算 HOMA-IR 值显著升高(P<0.05)。

如表 5 所示,与小鼠 MCS 对照组比较,MCD 模型组血清 中空腹血糖(FPG)及空腹胰岛素(FINS)的含量虽有所降低但并 未出现显著性差异,经计算 HOMA-IR 值未出现显著性差异。 表 4 SD 大鼠血清中 FPG、FINS 含量及 HOMA-IR 指数(x± s,n=10) Table 4 The content of FPG FINS HOMA-IR in the SD rat serum

Table 4 The content of FTO, FINS, HOMA-IK in the SD fat seruin					
组别 group	FPG( mmol/L )	FINS( mIU/L )	HOMA-IR		
正常饮食对照组	3 15+ 0 67	14 39+ 0.69	2 56+ 0 50		
the normal group	5.151 0.07	14.571 0.07	2.501 0.50		
高脂饮食模型组	4 74+ 2 20*	10 201 0 00*	2 77+ 2 18*		
the model group	4.74± 2.20°	18.381 0.80	3.72± 2.18		

注:\* 表示与大鼠正常饮食对照比较,P<0.05。

Note: \* represent compared with the normal group of rat, P<0.05.

表 5 C57BL/6 小鼠血清中 FPG、FINS 含量及 HOMA-IR 指数(x± s,n=10) Table 5 The content of FPG, FINS, HOMA-IR in the C57BL/6

mouse	serum

组别 group	FPG( mmol/L )	FINS( mIU/L )	HOMA-IR
MCS 对照组 the	5 91+ 2 62	11 00+ 2 25	3 04+ 1 25
MCS group	5.911 2.02	11.901 2.25	5.041 1.25
MCD 模型组 the	3 52+ 2 37	9.02 + 1.74	1 47+ 1 10
MCD group	3.321 2.37	3.02± 1.74	1.4/1.19

注:\* 表示与小鼠 MCS 对照组比较, P<0.05。

Note: \* represent compared with the MCS group of mouse, P<0.05.

## 2.4 肝组织病理学检测结果

SD 大鼠肝组织石蜡切片经 HE 染色后于光镜下可见:正 常饮食对照组肝组织着色均匀,肝细胞索排列规则,肝细胞结 构清晰完整(图 2-A);高脂饮食模型组肝组织发生大面积脂肪 样变,中央静脉周边肝细胞严重空泡化,局部区域发生严重的 炎性反应(图 2-B)。为显示肝细胞内脂滴的多少与分布,本课 题组对肝组织冰冻切片进行了油红 O 染色(红色示脂滴)。染 色结果显示,正常饮食对照组肝组织不着色(图 2-C);高脂饮食 模型组肝组织可见大量脂滴广泛分布 (图 2-D)。NAS 组织学病 理评分结果显示:高脂饮食模型组 NAS 为 7.80± 0.45(>5),这 表明其肝组织已达到 NASH 阶段,具体结果见表 6。



图 2 SD 大鼠肝组织病理检测结果(× 100) Fig. 2 The result of pathology in SD rat liver tissue(× 100) 注:A:正常饮食对照组 HE 染色 B:高脂饮食模型组 HE 染色 C:正常 饮食对照组油红 O 染色 D:高脂饮食模型组油红 O 染色 Note: A:HE-stained in the normal group B:HE-stained in the model group C:Oil red O-stained in the normal group D: Oil red O-stained in the model

#### 表 6 SD 大鼠肝组织 NAFLD 活动度积分(NAS)组织学评分(x± s,n=10)

Table 6 NAS in the liver tissue of SD rat					
	旺脂肪态	小叶内炎症	肝细胞气球样变	NAS 🛎 🕁	
group	加加加支	inflammation in hepatic	ballooning degeneration of	Total of NAS	
	nepatic steatosis	lobule	liver cells	Total of INAS	
正常饮食对照组	0+ 0.00	0.60± 0.55	0+ 0.00	0.60± 0.55	
the normal group	01 0.00	0.00± 0.35	0± 0.00	0.00± 0.33	
高脂饮食模型组	3.0+ 0.00	2 80+ 0 45	2.0+.0.00	7 80+ 0 45	
the model group	he model group	2.001 0.45	2.01 0.00	7.60± 0.45	

注:NAS≥ 5 分者可明确 NASH 的诊断;NAS<3 分则可排除 NASH;两者之间者为 NASH 可能。

Note: NAS $\geq$  5 diagnosed with NASH; NAS $\leq$ 3 ruled out NASH; 3 $\leq$  NAS $\leq$ 5 suspected NASH.

C57BL/6 小鼠肝组织石蜡切片经 HE 染色后于光镜下可 见:MCS 对照组肝组织均匀粉染,中央静脉周围肝细胞呈放射 状排列,未出现炎性病灶(图 3-A);MCD 模型组肝组织发生了 严重的脂肪样变,肝细胞普遍出现空泡化现象,多处出现严重 的炎性病灶(图 3-B)。油红 O 染色结果显示,MCD 对照组肝组 织基本不着色(图 3-C);MCD 模型组肝组织中央静脉周围出现 大量脂滴(图 3-D)。NAS 组织学病理评分结果显示:MCD 模型 组 NAS 为 7.60± 0.89(>5),这表明其肝组织已达到 NASH 阶 段,具体结果见表 7。

#### 表7 C57BL/6 小鼠肝组织 NAFLD 活动度积分(NAS)组织学评分(x± s,n=10)

组别 group	肝脂肪变 hepatic steatosis	小叶内炎症 inflammation in hepatic lobule	肝细胞气球样变 ballooning degeneration of liver cells	NAS 总分 Total of NAS
MCS 对照组	0± 0.00	0.40± 0.55	0± 0.00	0.40± 0.55
the MCS group				
MCD 模型组	3.0+ 0.00	2.60± 0.89	2.0± 0.00	7 60+ 0 89
the MCD group	5.01 0.00			7.001 0.89

## Table 7 NAS in the liver tissue of C57BL/6 mouse

注:NAS≥ 5 分者可明确 NASH 的诊断;NAS<3 分则可排除 NASH;两者之间者为 NASH 可能。

Note: NAS≥ 5 diagnosed with NASH; NAS<3 ruled out NASH; 3≤ NAS<5 suspected NASH.



图 3 C57BL/6 大鼠肝组织病理检测结果(× 100) Fig. 3 The result of pathology in C57BL/6 mouse liver tissue(× 100) 注:A:MCS 对照组 HE 染色 B:MCD 模型组 HE 染色 C:MCS 对照组 油红 O 染色 D:MCD 模型组油红 O 染色

Note: A:HE-stained in the MCS group B:HE-stained in the e group C:Oil red O-stained in the MCS group D: Oil red O-stained in the MCD group

## 3 讨论

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是主要发生于肝小叶的,以 弥散性肝细胞大泡性脂肪变性及弥散性肝小叶炎症为病理特 征的临床病理综合征<sup>10</sup>,发病机制至今尚未明确。在众多假说 中,"二次打击"学说现得到广泛认可<sup>100</sup>。该学说认为,第一次打 击源于肝细胞的脂肪变性,其核心病理机制是胰岛素抵抗<sup>109</sup>; 进而,肝组织出现脂质过氧化、氧自由基损伤、线粒体功能障碍 以及炎性细胞因子增多等病理过程,形成对肝脏的第二次打击 <sup>111</sup>。

高脂饮食诱发的 SD 大鼠 NASH 模型,即是通过增加饮食 中对脂质的摄入量,从而显著提高血液中游离脂肪酸(free fatty acid,FFA)的含量<sup>[16-18]</sup>。过剩的FFA一方面可引起机体脂肪酸 代谢紊乱,导致肝细胞内甘油三脂(TG)蓄积;另一方面可诱发 胰岛素抵抗,对肝脏形成"第一次打击";脂肪酸代谢紊乱及胰 岛素抵抗又将增加肝细胞对各种损伤因素及炎症的敏感性,易 产生大量活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS),进而 启动氧化应激,形成对肝脏的"第二次打击",最终导致 NASH 的发生<sup>[12]</sup>。与此不同的是,蛋氨酸-胆碱缺乏(MCD)饮食诱发 的 C57BL/6 小鼠模型的造模原理是通过饮食中蛋氨酸与胆碱 的缺乏造成线粒体β-氧化功能障碍和极低密度脂蛋白合成与 分泌减少,从而使甘油三酯(TG)在肝细胞内迅速大量堆积,导 致肝细胞脂肪变性,造成"第一次打击"[13;进而,由于肝细胞的 脂肪变性,线粒体减少对游离脂肪酸(FFA)的摄入,促使 FFA 的 β- 氧化增加,导致活性氧自由基(ROS)的合成和脂质过氧 化反应,形成对肝脏的"第二次打击"<sup>[4]</sup>,最终导致 NASH 的发 生[15]。

本实验结果表明,高脂饮食及蛋氨酸-胆碱缺乏(MCD)饮 食确可造成相应实验动物的 NASH 模型, 但病理变化截然相 反:高脂饮食模型可造成外周甘油三酯(TG)及总胆固醇 (CHO)的升高,并引起胰岛素抵抗,与人类 NASH 的病理表现 相似;而 MCD 模型外周血中甘油三酯(TG)及总胆固醇(CHO) 的含量并未发生改变,也未发生胰岛素抵抗。由此可见,高脂饮 食模型可模拟人类 NASH 的发病过程及机制,能够复制胰岛 素抵抗、氧化应激等全身代谢紊乱表现,NASH 的发生发展具 有渐进性、阶段性等特点,且饲料制作简便,重复性好,动物死 亡率低,是模拟目前临床常见的营养过剩型 NASH 的动物模 型。但该法的造模周期较长,肝脏脂肪变性、炎症及纤维化程度 取决于饲料中的脂肪含量及种类、实验动物对实验操作的耐受 力等。而 MCD 模型虽不符合临床 NASH 患者的膳食结构,无 法复制外周胰岛素抵抗、代谢综合征等临床病理表现,故不宜 用于营养过剩型 NASH 的发病机制研究; 但该模型可形成典 型的 NASH 病理学改变,且具有造模周期短、成模率高等优 点,是国际公认的经典 NASH 动物模型<sup>[19,20]</sup>,可用于各种药物 防治 NASH 的药效学研究。

诚然,本文仅对2种 NASH 模型的病理学及血清学进行 了初步观察,其深入的发病机制探讨正在进行中,尤其在 PPAR-γ通路诱发 NASH 的分子机制上开展了大量实验研究, 相关研究成果将陆续报道。

#### 参考文献(References)

- Hubscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease [J].Histopathology, 2006, 49(5): 450-465
- Kashi MR, Torres DM, Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Semin Liver Dis, 2008, 28(4): 396-406
- [3] Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors[J]. Hepatology, 1990, 12(5):1106-1110
- [4] Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, et al. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies[J]. J Hepatol, 2005, 42(1): 132-138
- [5] Powell E, Cooksley WG, Hanson R, et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis--a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years [J]. Hepatology,1990, 11(1): 74-80
- [6] Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, et al. Similarities and differences in

outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C[J]. Hepatology, 2006, 43(4):682-689

- [7] Solt D, Farber E. New Principle for the Analysis of Chemical Carcinogenesis[J]. Nature, 1976, 263(5580): 701-703
- [8] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313-1321
- [9] Day C.P, James O. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845
- [10] Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, et al. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome [J]. Hepatology, 2002, 35(2): 373-379
- [11] Andrea E Reid. Nonalcoholic Steatohepatitis [J]. Gastroenterology, 2001, 121(3): 710-723
- [12] Zou Y, Li J, Lu C, et al. High-fat emulsion-induced rat of model of nonalcoholic steato- hepatitis [J]. Life Sci, 2006, 79(11): 1100-1107
- [13] Quentin M Anstee, Robert D Goldin. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research [J]. Int. J. Exp Path, 2006, 87(1): 1-16
- [14] Maxwell Afari Gyamfi, Ivan Damjanov, Samuel French. The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver enjury [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75 (4): 981-995
- [15] Su Dong-mei, Zhu Ge-li, Li Jian. A mouse model of nonalcoholic steatohepatitis induced by feeding a methionine-choline-deficient diet: establishment and dynamic monitoring [J]. World Journal of Gastroenterology, 2011,19(11): 1122-1129
- [16] London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models [J]. Clin Liver Dis, 2007, 11(1): 55-74
- [17] Chung H, Hong DP, Kim H J, et al. Differential gene expression profiles in the steatosis/fibrosis model of rat liver by chronic administration of carbon tetrachloride [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 208(3): 242-254
- [18] Lieber CS, Leo MA, Mak KM, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitsis [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(3): 502-509
- [19] Lee GS, Yan JS, Ng RK, et al. Polyunsaturated fat in the methionine choline deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury [J]. J Lipid Res, 2007, 48(8): 1885-1896
- [20] Hatsugai K, Ohkohchi N, Fukumori T, et al. Mechanism of primary graft non-function in a rat model for fatty liver transplantation [J]. Transpl Int, 2000,13(1): S583-590