

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.005

高脂饮食诱导肥胖与肥胖抵抗型非酒精性脂肪肝 大鼠模型的建立*

王莹¹ 王鸿² 蔡东联^{1Δ} 张玉珍¹ 黄莺³

(1 第二军医大学附属长海医院营养科 临床营养中心 上海 200422; 2 解放军 461 医院临床护理部 吉林 长春 130021;

3 第二军医大学附属长海医院心内科 上海 200422)

摘要 目的:利用高脂饲料复制肥胖与肥胖抵抗型非酒精性脂肪肝 SD 大鼠模型。**方法:**体质量 100 ± 10 g 的雄性 SD 大鼠 140 只,按照体重随机抽取 120 只用于模型建立,喂食高脂、高能饲料。连续 8 周后,将体质量大于正常对照组平均体质量 +1.96 倍标准差的模型大鼠作为肥胖型非酒精性脂肪肝组(NO 组),体质量小于正常对照组平均体质量 +1.0 倍标准差的作为肥胖抵抗型非酒精性脂肪肝组(NOR 组)。8 周内动态观察大鼠的一般情况、体质量变化,8 周末每组随机取 8 只处死,比较血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平变化及肝指数、脂体比,观察肝脏形态学改变。剩余 20 只作为正常对照组,喂食普通饲料。**结果:**NO 与 NOR 组大鼠体重增长差距逐渐增大,至 8w 末,NO 组体重显著高于 NOR 组及正常对照组($P < 0.01$),脂肪重量和脂体比均显著升高,NO 组脂肪重量显著高于 NOR 组 ($P < 0.05, 0.01$),但脂体比间未见显著差异;NO 与 NOR 组 TG、ALT 显著升高($P < 0.05$),其中 NO 组大鼠血清 TG、TC 显著高于 NOR 组($P < 0.05$);两组肝重量和肝指数均显著升高,NO 组肝重量显著高于 NOR 组($P < 0.05, 0.01$),但肝指数间未见显著差异,两组肝细胞内均弥散大量脂肪空泡。**结论:**利用高脂饲料成功建立肥胖与肥胖抵抗型非酒精性脂肪肝 SD 大鼠模型,与人类发病特征相似,为肥胖与非酒精性脂肪的研究提供更有针对性的动物模型。

关键词:肥胖抵抗;非酒精性脂肪肝;大鼠;动物模型

中图分类号:Q95-33, R589, R575.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)07-1221-04

Induction Method of Non-Alcoholic Fatty Liver Model in Obesity and Obesity-Resistant Rats*

WANG Ying¹, WANG Hong², CAI Dong-lian^{1Δ}, ZHANG Yu-zhen¹, HUANG Ying³

(1 Department of Nutriology, Changhai Hospital, SMMU, Shanghai, 200422, China;

2 Department of Clinical Nursing, PLA 461 Hospital, Changchun, Jilin, 130021, China;

3 Department of Cardiology, Changhai Hospital, SMMU, Shanghai, 200422, China)

ABSTRACT Objective: To establish obesity and obesity-resistant rats model of non-alcoholic fatty liver. **Methods:** 140 male Sprague Dawley rats were randomly divide into group control (20) and model (120), maintained a standard diet and high-energy-fat diet for 8 weeks, respectively. Then the rats of high-energy-fat group were divided into 2 groups s: NO and NOR groups. The rats of body mass higher than nomal +1.96 times standard deviation were divided into NO group and the rats of body mass higher than nomal +1.0 times standard deviation were divided into NOR group. The general conditions and weight changes were dynamically observed for 8 weeks, and then killed 8 rats of different group. The pathological changes of liver tissues were observed by HE staining. The following indexes were compared among the three groups, including serum levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver index, body fat ratio. **Results:** Starting from the fifth week, the weights of rats were significantly decreased in group control and NOR as compared with those in group NO ($P < 0.01$). The serum levels of ALT, TG, liver weight and index, body fat ratio in group NO and NOR were markedly higher than control ($P < 0.05$). The TC, TG levels and weight of liver in group NO were increased significantly compared with group NOR ($P < 0.05$). And there was no significantly difference between group NO and NOR in liver index and body fat ratio. Light microscopy showed a great number of fat vacuoles in liver cell of group NO and NOR. **Conclusion:** The obesity and obesity-resistant rat model of non-alcoholic fatty liver can be successfully established within 8 weeks and basically simulating the occurrence and progression of non-alcoholic fatty liver in human beings.

Key words: Obesity-resistant; Non-alcoholic fatty liver; Rats; Animal model

* 基金项目:上海市科委基金项目(024119048)

作者简介:王莹(1979-),女,临床营养学博士,主治医师、讲师,主要研究方向:疾病营养治疗和营养代谢研究,

电话:021-31161215, 13817197764, E-mail: viviannutrition@yahoo.cn

Δ 通讯作者:蔡东联,电话:021-31161208, E-mail: nutrition1226@sohu.com

(收稿日期:2013-05-14 接受日期:2013-06-10)

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R589, R575.5 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1221-04

前言

近年来,我国非酒精性脂肪肝(NAFLD)的发病率呈上升趋势,特别是由于饮食结构的不合理引起的肥胖与NAFL的相关性,已成为新的研究热点。在NAFLD动物模型建立的研究中发现,同一品系、同一批次大鼠,用配方相同的高脂饲料同时喂养,部分体重增加,部分体重不增加甚至降低。对于这一现象,将前者定义为肥胖倾向(obesity prone, OP),而后者被定义为肥胖抵抗(obesity resistance, OR)^[1],有学者认为是摄食量不同造成的,也有人认为是对营养素的利用不同造成的,但其具体机制目前尚不明确。为深入研究NAFLD与肥胖、肥胖抵抗的相关性及其发病机制,建立与人类自然发病规律相似的动物模型,我们进行了本研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性清洁级SD大鼠,体质量 100 ± 10 g, 6只/笼,饲养于干燥、通风、安静的环境,购自第二军医大学实验动物中心。

1.1.2 饲料配方 (1)高脂饲料:基础饲料78.9%、蛋黄粉10%、胆酸盐0.1%、胆固醇1%、猪油10%,能量密度20.75 kJ/g; (2)基础饲料:普通鼠料,能量密度14.56 kJ/g。饲料均由第二军医大学海军医学研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与喂养 140只雄性SD大鼠实验前称重,随机抽取其中20只作为正常对照组(C组),饲喂普通鼠料;其余120只用于建立大鼠NAFLD肥胖与肥胖抵抗模型,饲喂高脂

饲料。连续喂养8w后称重,体质量大于C组平均体质量+1.96倍标准差的大鼠分为NO组,体质量小于C组平均体重+1.0倍标准差的大鼠分为NOR组^[2-4]。

1.2.2 标本采集 喂养8w后,每组随机取8只禁食12小时,通过眼球后静脉丛取血,制备血清待测,取睾周、肾周脂肪垫、肝脏称重,观察肝脏病理形态变化。

1.2.3 一般情况观察 8w喂养期间,所有大鼠每周称重1次,每天称量饲料的摄入量,观察大鼠毛色、光泽度、食欲食量、行动、粪便等变化以及对外界刺激的反应情况。

1.2.4 肝组织 HE 染色 用10%中性甲醛溶液固定肝脏组织,脱水、包埋、4℃保存,进行常规HE染色,光镜下观察大鼠肝脏脂肪变性情况。

1.2.5 血清生化指标 血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆固醇(TC)、总三酰甘油(TG),采用日立7600-020型全自动生化分析仪检测。

1.2.6 生理学指标 肝指数(liver index)=肝脏重量(g)/体重(g)×100%; 脂体比(%)=[肾周脂肪量(g)+睾周脂肪量(g)]/体重(g)×100%。

1.3 统计分析

所有数据应用SPSS 13.0软件包进行统计分析,以计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用方差分析进行处理, $P < 0.05$ 差异有显著性, $P < 0.01$ 差异非常显著。

2 结果

2.1 一般情况

造模组大鼠饮水和尿量与正常组大鼠比较均明显增多,部分大鼠出现大便稀软、排泄物异味重的现象,毛色偏黄,体毛光

表1 大鼠体重变化

Table 1 Body weight of 3 groups (n=20, $\bar{x} \pm s$)

Group	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week
NOR	104.9± 7.9	144.2± 11.9	181.7± 15.7	213.2± 44.9	257.1± 36.4
NO	107.8± 7.1	149.3± 10.2	199.4± 11.4	248.1± 12.2	278± 11.7
C	105.8± 11.6	131.5± 13.8	173.2± 13.0	211.5± 14.7	252.7± 20.3

Group	5 week	6 week	7 week	8 week
NOR	285.1± 31.7	312.2± 33.3	319.9± 23.4	328.4± 12.3
NO	318.5± 17.4	343.1± 24.1*#	374.2± 13.9**▲	398.4± 13.7**▲
C	270.6± 14.1	294± 23.3	314.8± 21.3	318.8± 17.3

表2 大鼠血清 TC、TG、ALT、AST 浓度变化

Table 2 Serum contents TC, TG, ALT and AST ($\bar{x} \pm s$)

Group	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
NOR	1.66± 0.24	1.32± 0.28 *	74.81± 16.82*	158.90± 21.53
NO	1.96± 0.17*#	1.67± 0.24**#	77.63± 20.71*	151.21± 20.62
C	1.63± 0.12	0.94± 0.22	60.52± 12.37	145.64± 16.61

Note: * $P < 0.05$ vs C group; ** $P < 0.01$ vs C group; # $P < 0.05$ vs NOR group; ▲ $P < 0.01$ vs NOR group.

泽度减退,活动减少。

2.2 对大鼠体重影响

每周称大鼠体重,动态观察其体质量的变化情况(表1)。选取NO组体重增加最多的20只大鼠和NOR组体重增加最少的20只大鼠作为研究对象,结果显示不同时间点的体重间的差异具有统计学意义($P<0.01$);进行多样本均数的两两比较,从第5周开始,NO组体重明显增加,自第6周开始,NO组体

重与NOR组、C组之间均有显著性差异($P<0.05$),NOR组与C组间体重比较无显著性差异。

2.3 对血清生化指标的影响

实验8w末,与C组相比,NO组大鼠血清TC、TG、ALT均有显著升高($P<0.05$),NOR组大鼠血清TG、ALT显著升高($P<0.05$)。与NOR组相比,NO组大鼠血清TC、TG显著升高($P<0.05$),(见表2)。

表3 肝重、体重及肝指数

Table 3 The liver index in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

Group(n=8)	Weight(g)	Liver(g)	Liver index(%)
NOR	332.61± 9.37	11.84± 2.24*	3.51± 0.11 **
NO	394.59± 13.30***▲	14.12± 0.91 **#	3.56± 0.18 **
C	324.28± 16.41	9.51± 1.32	2.93± 0.30

Note:* $P<0.05$ vs C group; ** $P<0.01$ vs C group; # $P<0.05$ vs NOR group; ▲ $P<0.01$ vs NOR group.

2.4 对肝指数的影响

由表3可见,NO组和NOR组与C组相比,大鼠肝脏重量及肝指数均显著升高($P<0.05$);与NOR组相比,NO组大鼠肝脏重量及体重显著升高($P<0.05$),但是肝指数之间未见显著性差异。

2.5 对脂体比、睾周和肾周体脂含量的影响

由表4可见,实验8w末,NO组和NOR组大鼠脂体比均显著高于C组($P<0.05$),但两组间比较未见显著性差异。NO组和NOR组大鼠睾周脂肪垫、肾周脂肪垫重量显著高于C组($P<0.01$),NO组同时显著高于NOR组($P<0.05$)。

表4 大鼠体脂含量及脂体比

Table 4 Body fat and ratio in 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

Group(n=8)	Body fat ratio(%)	Testicle fat(g)	Perirenal fat(g)
NOR	4.56 ± 0.55*	9.25± 1.53**	6.12± 0.94*
NO	4.92 ± 0.59*	11.21± 1.40***#	8.53± 1.41***#
C	3.21± 0.43	5.89± 1.01	4.44± 0.63

Note:* $P<0.05$ vs C group; ** $P<0.01$ vs C group; # $P<0.05$ vs NOR group; ▲ $P<0.01$ vs NOR group.

2.6 肝脏组织病理变化

8w末实验结束时,C组大鼠肝小叶结构完整、颜色红润、包膜完整、表面光滑,无异常,NO组和NOR组肝脏体积增大,质脆,局部呈奶黄色,有油腻感,表面散在分布白色脂滴。光学显微镜下观察肝脏组织HE染色病理切片,C组细胞结构清晰、完整,细胞核位于细胞中央,无脂肪变性;NO组和NOR组脂肪变性明显,可见肝细胞肿大变圆,胞浆疏松,呈弥散性肝细胞空泡变性,内含大的脂肪滴,但未见炎性细胞浸润、坏死灶及肝纤维化组织(见图1B、C)。根据《非酒精性脂肪肝诊断标准》,确定NAFLD模型建立成功。

3 讨论

NAFLD动物模型对于其发病机制及防治的研究非常重要,所以国内外已有多种方法建立该模型,但原理和方式不尽相同,可以主要归纳为4类:(1)特殊品系动物型,如先天性、转基因型脂肪肝模型^[56]。(2)化学诱导型,如抑制 β 氧化或干扰线粒体DNA的复制、转录,通过降低脂肪酸的代谢,诱导肝细胞脂肪变性^[78]。(3)蛋氨酸缺乏型,通过胆碱和蛋氨酸缺乏饲料诱导脂肪肝形成,饲养成本较高。(4)高能、高脂饮食诱导型,通常以雄性Wistar或SD大鼠为模型动物,饲以高脂、高能饲料,

8~12周后,可复制脂肪肝模型,形成脂肪肝变性并伴有ALT增高^[9-11]。该方法虽然周期较长,但相对简便、费用适宜,死亡率低,复制率高,与人类疾病特征相似而广泛使用。

本实验采用了高脂饮食诱导NAFLD大鼠模型的方法,8w后检测大鼠血清生化指标,显示模型组大鼠ALT、TG水平明显高于正常对照组,肝指数升高,光镜下观察肝组织病理切片存在脂肪变性,且未进展到肝纤维化和肝硬化阶段,表明成功复制实验性大鼠NAFLD模型。在实验期间,每周称量大鼠体重,动态观察体重变化情况,结果显示5w开始,NO组体重开始显著升高,6w后NO组体重增长与NOR组、正常对照组之间发生显著性差异,而NOR组与正常对照组间无显著性差异。提示虽然同样饲喂高脂饲料,但部分大鼠出现肥胖,部分体重未增加,模型组的大鼠体重出现明显分化。

肥胖的发生与长期机体能量摄入大于消耗导致的慢性能量平衡失调密切相关^[12]。在运用高脂饮食造模的过程中,由于食物能量密度增加,同样摄食量的情况下,引起体重增加是正常现象^[13]。但在我们建立模型的过程中,发现还有部分大鼠发生脂肪肝但体重并未增加,以往这部分群体往往被忽略,被认为是造模不成功,但是随着肥胖抵抗概念的提出,越来越多的研究证实了通过高脂饮食诱导,会有肥胖抵抗的现象存在^[14-19]。

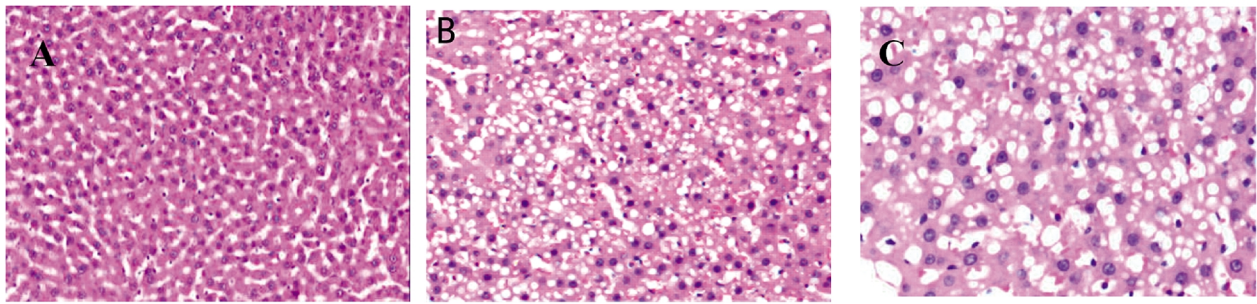


图1 光镜下观察大鼠肝脏组织病理变化 (HE× 200)

Fig.1 Pathological changes in liver tissues of rats observed by light microscopy (H-E staining× 200)

A: C group; B: NO group; C: NOR group

刘荣等^[20]的研究中发现,在肥胖造模的过程中,肥胖与肥胖抵抗大鼠约各占 30%,但本研究在 NAFLD 模型造模过程中发现,造模成功后,NO 组大鼠为 67 只(55.8%),NOR 组为 24 只(20%),相对于肥胖大鼠,肥胖抵抗大鼠较少。

本实验将肥胖与肥胖抵抗发生的规律与 NAFLD 的建立相结合,利用其模型建立中均需高能、高脂饲料诱导的特性,成功地将非酒精性脂肪肝大鼠模型在体重的差异上进行分类,从而建立肥胖与肥胖抵抗型 NAFLD 大鼠模型。该模型对深入研究 NAFLD 发病机制、肥胖与 NAFLD 的相关性具有一定意义,为肥胖与 NAFLD 防治的研究提供简便易行、贴近疾病发生规律的动物模型。

参考文献(References)

- [1] Clapper JR, Athanacio J, Wittmer C, et al. Effects of amylin and bupropion/naltrexone on food intake and body weight are interactive in rodent models. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1-3): 292-298
- [2] 王舒然, 麻微微, 赵丹, 等. 高脂饮食诱导肥胖与肥胖抵抗动物模型建立[J]. *中国公共卫生*, 2007, 7(23): 774-775
Wang Shu-ran, Ma Wei-wei, Zhao Dan, et al. Establishment of obesity prone and obesity resistant rats induced by high-fat diet [J]. *Chin J Public Health*, 2007, 7(23): 774-775
- [3] Subash AK, Augustine A. Hypolipidaemic effects of methanol extract of *holoptelea integrifolia* (Roxb.) planchon bark in diet-induced obese rats[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(2): 546-553
- [4] Gupta P, Mehla J, Gupta YK. Antiobesity effect of Safoof Mohazzil, a polyherbal formulation, in cafeteria diet induced obesity in rats[J]. *Indian J Exp Biol*, 2012, 50(11): 776-784
- [5] Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, et al. Metformin reverses fatty liver disease in obese leptin-deficient mice[J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(9): 998-1003
- [6] Seo DY, Lee S, Figueroa A, et al. Aged garlic extract enhances exercise-mediated improvement of metabolic parameters in high fat diet-induced obese rats[J]. *Nutr Res Pract*, 2012, 6(6): 513-519
- [7] Yin HQ, Kim M, Kim JH, et al. Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline[J]. *Toxicological Sci*, 2006, 94(1): 206-216
- [8] Lieber CS, Leo MA, Mak KM, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(3): 502-509
- [9] Dong H, Lu FE, Gao ZQ, et al. Effects of emodin on treating murine nonalcoholic fatty liver induced by high caloric laboratory chaw[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(9): 1339-1344
- [10] Fan JG, Xu ZJ, Wang GL. Effect of lactulose on establishment of a rat non-alcoholic steatohepatitis model [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(32): 5053-5056
- [11] Zou Y, Li J, Lu C, et al. High-fat emulsion-induced rat model of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Life Sci*, 2006, 79(11): 1100-1107
- [12] Subash AK, Augustine A. Hypolipidemic effect of methanol fraction of *Aconitum heterophyllum* wall ex Royle and the mechanism of action in diet-induced obese rats[J]. *J Adv Pharm Technol Res*, 2012, 3(4): 224-228
- [13] 王重建, 杨年红, 许明佳, 等. 肥胖和肥胖抵抗大鼠神经肽 Y 及其受体基因表达的研究[J]. *营养学报*, 2006, 2(26): 116-119
Wang Chong-jian, Yang Nian-hong, Xu Ming-jia, et al. Hypothalamic neuropeptide Y and its receptors mRNA expression in diet-induced obese and resistant rats[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2006, 2(26): 116-119
- [14] Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types [J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 36(3): 485-501
- [15] Cintro DE, Costa AV, Peluzio Molo C, et al. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin[J]. *Nutrition*, 2006, 22(2): 197-205
- [16] Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity[J]. *Hypertension*, 2006, 48(1): 65-72
- [17] Dourmashkin JT, Chang GQ, Hill JO, et al. Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-term propensity for obesity in Sprague-Dawley rats[J]. *Physiol Behav*, 2006, 87(4): 666-678
- [18] Zhou CJ, Huang S, Liu JQ, et al. Sweet tea leaves extract improves leptin resistance in diet-induced obese rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 386-392
- [19] Shaker OG, Sadik NA. Vaspilin gene in rat adipose tissue: relation to obesity-induced insulin resistance [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 373(1-2): 229-239
- [20] 刘荣, 孙长颢, 王舒然, 等. 饮食诱导肥胖抵抗和饮食诱导肥胖大鼠的对比研究[J]. *中国公共卫生*, 2003, 5(19): 563-566
Liu Rong, Sun Chang-hao, Wang Shu-ran, et al. Study on obesity related index between DIO-R and DIO of rats [J]. *Chin J Public Health*, 2003, 5(19): 563-566