

肝纤维化可逆转动物模型研究进展

杜文涛¹, 任万雷², 胡豆豆³, 许雅洁³, 尤文铮³, 姜相君³ (1.潍坊医学院 临床医学院, 山东 潍坊 261053; 2.青岛大学附属青岛市中心医院 中医一科, 山东 青岛 266042; 3.青岛市市立医院 消化内科, 山东 青岛 266011)

摘要: 肝硬化是各种肝脏疾病的终末阶段, 肝硬化能否逆转已争议多年, 越来越多的证据表明, 肝硬化在去除病因、得到有效治疗后可发生一定程度的逆转。肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的重要中间环节, 具有修复和损伤双重性, 肝纤维化可进一步发展为肝硬化甚至肝癌, 严重威胁患者生命。因此, 肝纤维化逆转的研究对于临床诊治具有重要的指导意义。动物实验是生物医学研究的基本手段之一, 也是连接基础研究和临床试验的重要桥梁, 本文总结不同动物模型包括化学损伤性肝纤维化逆转模型、胆管结扎肝纤维化逆转模型和非酒精性脂肪性肝纤维化逆转模型等, 通过归纳不同动物模型的优点与局限性, 为肝纤维化逆转研究提供依据, 以更好地指导临床实践。

关键词: 肝纤维化逆转; 动物模型; 化学损伤性肝纤维化逆转模型; 胆管结扎肝纤维化逆转模型; 非酒精性脂肪性肝纤维化逆转模型

Research progress on reversible animal model of liver fibrosis

Du Wentao¹, Ren Wanlei², Hu Doudou³, Xu Yajie³, You Wenzheng³, Jiang Xiangjun³ (1.School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China; 2.First Department of Traditional Chinese Medicine, Qingdao Central Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266042, Shandong Province, China; 3.Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China)

Abstract: Liver cirrhosis is the final stage of various liver diseases. Whether liver cirrhosis can be reversed has been debated for many years. More and more evidence showed that liver cirrhosis could be reversed to a certain extent after removing the etiology and receiving effective treatment. Liver fibrosis is an important intermediate link in the development of various chronic liver diseases into liver cirrhosis. It has the dual nature of repair and injury, and liver fibrosis can furtherly develop into liver cirrhosis and even liver cancer, and it is a serious threat to the patients. Therefore, the study of liver fibrosis reversal put a very important guiding significance to the diagnosis and treatment of clinical patients with liver cirrhosis. Animal experiment is not only one of the basic means of biomedical research, but also an important bridge between basic research and clinical trials. This paper summarized different animal models, including chemical injury liver fibrosis reversal model, bile duct ligation liver fibrosis reversal model and non-alcoholic fatty liver fibrosis reversal model by summarizing the advantages and limitations of different animal models, and provide evidence for reversal study of liver fibrosis to better guide clinical practice.

Key words: Reversal of liver fibrosis; Animal model; Chemical injury liver fibrosis reversal model; Bile duct ligation reversal model; Non-alcoholic fatty liver fibrosis reversal model

慢性肝病是导致全球死亡相关疾病及医疗资源利用增加的主要原因^[1,2], 慢性肝病导致患者生活质量严重下降, 同时给患者带来严重的经济负担^[3]。统计数据表明, 2015年全球有206万人(每10万人中有28.53人)死于肝脏疾病, 其中肝硬化和肝癌为主

要的致死原因, 二者占全球死亡总数的3.5%^[4,5]。肝纤维化是由各种原因引起的慢性肝脏损伤反应, 常见原因包括饮酒、非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)、病毒性肝炎、自身免疫性肝炎和胆汁淤积性肝病等, 这些因素都可导致肝脏慢性炎症, 形成异常的伤口愈合反应, 使肝功能受损; 晚期慢性纤维化被描述为肝硬化, 伴肝脏结构丧失及肝

功能下降, 最终出现危及生命的并发症^[6]。

早在1979年就有学者指出肝硬化可发生逆转^[7]。Morcos等^[8]于1985年成功构建血吸虫肝硬化逆转模型; 2000年Wanless等^[9]研究发现, 在慢性肝病进展过程中, 即使进展至肝硬化阶段, 肝脏结构也在不断进行重塑, 肝脏结构损伤与修复间存在平衡, “天平”的倾斜方向决定结局。该研究首次证实了人类肝硬化可发生逆转, 具有开创性及里程碑意义。近年来, 肝纤维化逆转已经成为一个研究热点, 动物实验是指导临床医学发展的重要手段, 制备标准而理想的动物模型是疾病研究的基础。目前的许多动物模型如CCl₄肝纤维化模型、大鼠胆管结扎梗阻性肝纤维化模型、非酒精性脂肪性肝纤维化模型等都证明了肝纤维化是可逆的^[10-13]。本文现对国内外近年来肝纤维化逆转动物模型的研究进展进行综述, 为研究肝纤维化逆转提供依据。

1 化学药物诱导肝纤维化逆转模型

1.1 CCl₄化学损伤性肝纤维化模型

CCl₄是一种多氯碳氢化合物, 也是一种臭氧消耗物质, 几十年来一直被用作液体溶剂作为中间体^[14]。CCl₄具有肝毒性, 可破坏肝细胞功能, 影响肝脏内脂蛋白合成, 进而影响肝脏脂质代谢, 最终导致肝硬化^[15]。由CCl₄诱导的肝硬化模型在形态学、病理生理学等方面与人类肝纤维化形成过程相似^[16], 且该方法造模途径多样、操作简便、成本低廉、病理特征稳定可靠、成模时间短, 目前在临床研究中应用广泛^[17]。当停止CCl₄注射后, 肝脏通过自我修复, 肝纤维化甚至肝硬化可发生一定程度的逆转。Iredale等^[11]研究发现, 给予雄性Sprague Dawley大鼠腹腔注射CCl₄ (CCl₄和橄榄油比例为1:1) 0.2 ml / 100 g, 共2周, 之后将剂量减至0.1 ml / 100 g, 注射至4周, 后停止腹腔注射并取材, 肝脏病理可见假小叶形成。分别于停止注射后3 d、7 d、28 d取材观察肝硬化逆转情况。结果发现, 逆转7 d时纤维间隔松散, 逆转28 d时纤维性间隔及假小叶基本消失, 仅有少量窦周纤维化。血清学显示, 造模4周时肝脏总羟脯氨酸水平为(2.4 ± 1.4) mmol/g湿重, 逆转28 d时降至(0.78 ± 0.45) mmol/g湿重, 与对照组水平相当。活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是受损肝脏胶原表达增加的主要来源, 也是肝纤维化的主要标志之一^[18]。HSC活化是肝硬化发展的关键环节, 造模4周时每30个高倍镜视野可观察到平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, a-SMA)标记的HSC数量为2850 ± 317, 较正常组增加了500倍; 停止注射CCl₄, HSC数量较肝纤维化组减少了12倍。Issa等^[12]通过持续腹腔注射CCl₄ 6周、8周、12周, 分别诱导不同程度的大鼠肝纤维化模型, 停止CCl₄注射自发逆转366 d, 可见小结节肝硬化不断向大结节型肝硬化转化, 分析肝组织中金属蛋白酶组织抑制因子、基质金属蛋白酶的表达情况及HSC数量, 结果表明在肝纤维

化逆转过程中, 肝组织中胶原-1和金属蛋白酶组织抑制因子的表达显著降低, 大量HSC凋亡, 而基质金属蛋白酶活性增强。CCl₄模型是最为经典的肝硬化模型之一, 目前仍广泛应用于实验研究。肝硬化模型成功构建后, 停止CCl₄注射, 肝脏炎症反应可明显减轻, 且肝纤维化有不同程度逆转, 该模型既可用于肝纤维化研究, 也可用于肝纤维化逆转机制的研究。

1.2 其他药物

硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)和二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)也是诱导肝硬化模型常用的化学药物, 有研究表明, 通过CCl₄、TAA、DMN构建的肝纤维化模型均适用于肝纤维化研究^[19]。经TAA诱导的大鼠肝硬化模型死亡率较CCl₄低、并发症少, Liu等^[20]研究表明, 通过口服0.03% TAA 16周诱导大鼠肝硬化模型, 在停止TAA给药后2周可观察到肝硬化自发逆转, 停止给药超过6周后, 可观察到几乎正常的肝脏。DMN的肝毒性较强, 具有强致癌性, 造模时死亡率较高, 这限制了DMN在肝纤维化逆转研究中的应用。

2 胆管结扎机械梗阻性肝纤维化逆转模型

胆管结扎模型是另一种常用的诱导肝纤维化及肝硬化的实验动物模型, 该模型通过结扎胆总管造成肝外胆道梗阻, 各种炎症因子激活, 引起肝脏广泛的炎症细胞浸润; 高浓度胆酸和胆红素对肝细胞产生毒性, 肝细胞缺血和坏死, 大量胶原沉积, 分隔正常肝脏结构, 肝纤维化逐渐加重, 最终形成肝硬化^[21,22]。胆管结扎是目前诱导胆汁淤积性肝纤维化模型研究胆道梗阻相关疾病的常用方法, 在一定时间内解除胆道梗阻可使纤维化甚至肝硬化逆转。

2.1 传统的胆管结扎逆转模型

传统的胆管结扎逆转模型是在胆管结扎基础上实施二次手术, 行内引流或外引流解除胆道梗阻, 从而实现肝纤维化逆转。早在1990年, Abdel-Aziz等^[22]通过结扎大鼠胆总管构建了胆汁淤积性肝硬化模型, 肝硬化形成后, 通过胆总管十二指肠吻合术解除胆总管梗阻来实现肝硬化逆转。此方法应用广泛, 一直沿用至今。Li等^[23]选用雄性Sprague Dawley大鼠作为研究对象, 通过结扎并离断胆总管的方法建立胆管结扎模型, 造模1周后二次开腹, 通过内引流和外引流的方法解除梗阻。内引流是通过软管连接膨大胆管与十二指肠。外引流则是将一段软管插入膨大的胆管中固定, 另一端穿过皮下到达体外, 将软管固定于颈背部实现胆汁外引流, 造模7 d, 病理提示轻度胆管增生, 汇管区及汇管区周围炎症细胞浸润; 造模21 d, 胆管增生明显, 纤维间隔包裹分割肝实质。经内引流或外引流后7 d, 胆管增生减少, 小叶结构逐渐恢复。Huang等^[24]同样选用雄性Sprague Dawley大鼠作为研究对象, 将大鼠随机分成4组, 每组8只。假手术组只进行剖腹手术, 另外3组大鼠进行胆总管结扎以诱导梗阻性黄疸, 结扎7 d后,

通过胆总管十二指肠吻合术及胆总管端端吻合术解除梗阻。其中进行胆总管十二指肠吻合术内引流的一组为对照内引流(ID-C)组,通过胆总管端端吻合术进行内引流的一组为(ID-N)组,并设立长期内引流(ID-L)组,以观察这种方法的长期引流效果。结果表明, ID-C组1只大鼠死亡, 2只大鼠出现管堵塞相关并发症, 而ID-N和ID-L组大鼠均未死亡或出现并发症, 长期观察ID-L组, 其引流管保持通畅, 病理学显示ID-C组大鼠的门静脉炎症及胆管增生程度较ID-N组更严重。胆总管端端吻合术的内引流方法适合可逆性梗阻性黄疸的长期或连续研究。传统的胆总管内外引流模型仍然是目前常用的研究肝纤维化逆转的模型, 其原理和方法易被实验者所接受, 应用较为广泛, 但也存在手术操作难度大、手术死亡率较高及易发生感染等不足。

2.2 可重复的钛夹内引流模型 传统的胆总管结扎后二次手术诱导肝纤维化逆转模型术后死亡率高、手术复杂。针对这一缺点, Kirkland等^[25]选用CD1雄性小鼠作为实验对象, 利用1 mm钛夹夹闭胆总管诱导小鼠胆管结扎模型, 分别于造模后5 d、10 d拆除钛夹、解除梗阻, 逆转40 d后取材, 钛夹夹闭胆总管诱导的胆管结扎小鼠术后10 d体质量下降15%, 胆囊增大, 表面有炎性渗出, 部分小鼠出现腹腔积液。组织病理学显示, 胆囊壁厚度较假手术组增加了7倍, 同时伴有白细胞浸润、血管增生。拆除钛夹后, 小鼠体质量逐渐恢复、毛发黄染减退。组织病理学显示胆囊炎症减轻、胆囊壁变薄; 肝脏炎症细胞浸润及胆管增生减少, 肝小叶结构逐渐恢复正常。血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和总胆红素(total bilirubin, TBil)在解除梗阻后均逐渐恢复正常。该实验模型手术方法简单、可重复性高, 动物死亡率低(30%), 适用于梗阻性黄疸早期逆转研究。同样, 该模型也存在不足, 如钛夹易脱落, 导致梗阻性黄疸诱导不完全。

2.3 套管结扎内引流模型 另一种简单易操作的胆管结扎逆转模型为Oruc等^[26]发明的一种套管技术。该研究选用Wistar大鼠构建肝纤维化模型, 将一根塑料套管沿长轴纵向切开后套于大鼠胆总管上, 然后用3.0缝线结扎, 留下线结, 诱导胆道梗阻, 后通过剪断线结解除梗阻。实验过程中观察大鼠毛发、皮肤等改变并检测TBil、直接胆红素(direct bilirubin, DBil)及ALP水平, 经套管结扎胆总管后, 大鼠毛发失去光泽, 眼球、耳朵及全身皮肤黄染, 活动迟缓, 伴有体质量下降。TBil、DBil及ALP水平均显著高于假手术组。解除梗阻后TBil和DBil分别下降了3倍、2倍。该模型手术并发症少, 且二次手术易于操作, 技术复杂性较低, 易于被研究者接受, 但该研究观察指标单一、缺乏病理学观察对照, 并且与钛夹模型类似, 可能会导致梗阻不

全, 故该模型也不适合于肝硬化逆转的长期研究。**2.4 可吸收缝合线诱导内引流模型** Kahramansoy等^[27]提出了一种不需要二次手术即可实现胆总管再通的方法, 即可吸收缝合线诱导内引流模型。该文献提到2种可吸收缝线, 包括Polyglytone 6211 (PGL)和Irradiated Polyglactine 910 (IrPG)。其中PGL可在2周内失去50%~80%的抗拉强度, 在8周内完成水解; 而IrPG在14 d就可发生降解。该研究根据缝线种类进行分组, 3组(不可吸收缝线组、PGL组、IrPG组)分别于结扎后5 d和21 d观察生物化学指标和肝脏病理学变化。血清学显示, 应用可吸收缝线结扎21 d后, 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -glutamyltransferase, GGT)、TBil和DBil水平与结扎5 d后相比均显著降低(P 均 < 0.05)。病理学可见使用可吸收缝线结扎后21 d, 由于缝线吸收降解, 汇管区周围炎症、桥接坏死、肝小叶局灶坏死程度较结扎后5 d明显减轻(P 值分别为0.043、0.033、0.027)。该模型方法新颖, 通过可吸收缝线的降解来实现胆管再通, 是一种不需要二次手术即可实现肝纤维化逆转的动物模型, 且动物存活率为100%。但该模型的缺点是时间依赖性较大, 只能根据缝线材料选择特定的时间点来实现肝纤维化逆转, 且不能观察与控制缝线降解过程中胆管梗阻程度的变化, 故该实验模型有待进一步完善。

3 非酒精性脂肪性肝纤维化逆转模型

近年来, NAFLD患病率不断升高, 已成为世界范围内的常见慢性肝病。统计数据表明, 亚洲NAFLD患病率约为25%, 中国NAFLD患病率自2008年至2018年激增至29.2%^[28,29]。目前已有临床研究通过控制饮食与减肥来实现NAFLD逆转^[30,31], Holmer等^[32]将74例NAFLD患者分为3组, 分别予以低碳水化合物高脂肪饮食、间歇性热量限制饮食及正常饮食, 通过磁共振波谱测量肝脂肪变性程度来观察NAFLD改善情况, 结果表明低碳水化合物高脂肪饮食及间歇性热量限制饮食均对NAFLD有改善作用。关于实验动物模型, Ding等^[33]通过喂养高脂饮食(含40%脂肪、25%果糖以及2%胆固醇)诱导非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠模型, 喂养高脂食物254 d后, 肝脏病理表现为肝脏脂肪变性、肝细胞气球样变以及窦周纤维化, 且伴ALT、AST、胆固醇、甘油三酯和金属蛋白酶组织抑制因子1水平升高。而停止喂养高脂饮食112 d后, 血清学指标水平显著减低, 肝脏脂肪变性、肝细胞气球样变逐渐消退。但值得注意的是窦周纤维化并未随纤维化逆转而减轻($P < 0.01$)。目前针对非酒精性脂肪性肝纤维化逆转动物模型的研究仍较少, 且缺乏长时间逆转的系统观察, 需进一步探索。

4 结论与展望

随着研究的不断深入,肝纤维化逆转证据更加充分。动物模型是临床试验研究的载体,也是指导基础医学和临床医学的重要手段,按需要选取不同动物模型作为人类疾病的“复制品”以了解疾病全过程能够更好地为临床研究提供依据。然而,动物实验不能完全代替临床试验,动物实验得出的结论是否适用于人类还需要进一步探究。可选择与人类某些方面最为相似的动物作为研究对象,以更好地指导临床研究,促进转化医学的不断发展。

肝纤维化逆转模型的研究为指导临床实践、辅助肝纤维化及肝硬化治疗提供了新的思路与方向。对于许多慢性肝病患者来说,肝硬化可能不再是终末期阶段,针对肝硬化病因进行适当干预,去除致病因素,可改变其原有的病理阶段,向更好的结局发展,最终实现肝硬化的逆转与治疗。目前对于肝纤维化逆转的研究仍比较缺乏,肝纤维化逆转的新动物模型的构建对于肝纤维化逆转研究意义重大。本文综述多种肝纤维化可逆转动物模型研究,对比各种动物模型研究方法,为更完善、更成熟动物模型的构建提供依据。上述几种动物模型各有优缺点,需根据不同情况选择不同的实验模型进行相关研究。然而,目前酒精性肝纤维化、遗传及免疫等原因所致肝纤维化的逆转研究较少,相关实验证据不够充分,未来需进一步探索。

参考文献

- MARCELLIN P, KUTALA BK. Liver diseases: a major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening[J]. *Liver Int*,2018,38(Suppl 1):2-6.
- YOUNOSSI Z, HENRY L. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality[J]. *Gastroenterology*,2016,150(8):1778-1785.
- YOUNOSSI ZM, GOLABI P, HENRY L. A comprehensive review of patient-reported outcomes in patients with chronic liver diseases[J]. *J Clin Gastroenterol*,2019,53(5):331-341.
- SUN Y, CHANG J, LIU X, et al. Mortality trends of liver diseases in mainland China over three decades: an age-period-cohort analysis[J]. *BMJ Open*,2019,9(11):1-9.
- ASRANI S K, DEVARBHAVI H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. *J Hepatol*,2019,70(1):151-171.
- AYDIN MM, AKÇALI KC. Liver fibrosis[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2018,29(1):14-21.
- PÉREZ-TAMAYOR. Cirrhosis of the liver: a reversible disease?[J]. *Pathol Annu*,1979,14 Pt 2:183-213.
- MORCOS S H, KHAYYAL M T, MANSOUR M M, et al. Reversal of hepatic fibrosis after praziquantel therapy of murine schistosomiasis[J]. *Am J Trop Med Hyg*,1985,34(2):314-321.
- WANLESS I R, NAKASHIMA E, SHERMAN M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis[J]. *Arch Pathol Lab Med*,2000,124(11):1599-1607.
- BATALLER R, BRENNER D A. Liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*,2005,115(2):209-218.
- IREDALE JP, BENYON RC, PICKERING J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis

- and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors[J]. *J Clin Invest*,1998,102(3):538-549.
- ISSA R, ZHOU X, CONSTANDINO C M, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking[J]. *Gastroenterology*, 2004,126(7):1795-1808.
 - ISSA R, WILLIAMS E, TRIM N, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: Involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors[J]. *Gut*,2001,48(4):548-557.
 - SAYED EA, BADR G, HASSAN K A, et al. Induction of liver fibrosis by CCl₄ mediates pathological alterations in the spleen and lymph nodes: the potential therapeutic role of propolis[J]. *Saudi J Biol Sci*,2021,28(2):1272-1282.
 - MOHI-UD-DIN R, MIR R H, SAWHNEY G, et al. Possible pathways of hepatotoxicity caused by chemical agents[J]. *Curr Drug Metab*,2019,20(11):867-879.
 - GROUX B, SARRA-BOURNET F, LEDUC M, et al. PBI-4050 reduces stellate cell activation and liver fibrosis through modulation of intracellular ATP levels and the liver kinaseB1/AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2018,367(1):71-81.
 - SCHOLTEN D, TREBICKA J, LIEDTKE C, et al. The carbon tetrachloride model in mice[J]. *Lab Anim*,2015,49(1 Suppl):4-11.
 - TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2017,14(7):397-411.
 - PARK H J, KIM H G, WANG J H, et al. Comparison of TGF- β , PDGF, and CTGF in hepatic fibrosis models using DMN, CCl₄, and TAA[J]. *Drug Chem Toxicol*,2016,39(1):111-118.
 - LIU E H, CHEN M F, YE H T S, et al. A useful model to audit liver resolution from cirrhosis in rats using functional proteomics[J]. *J Surg Res*,2007,138(2):214-223.
 - CHILVER Y S, BANSOD S, SAIFI M A, et al. Piperlongumine attenuates bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice via inhibition of TGF- β 1/Smad and EMT pathways[J]. *Int Immunopharmacol*,2020,88:106909.
 - ABDEL-AZIZ G, LEBEAU G, RESCAN P Y, et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat[J]. *Am J Pathol*,1990,137(6):1333-1342.
 - LI W, CHUNG S C. An improved rat model of obstructive jaundice and its reversal by internal and external drainage[J]. *J Surg Res*,2001,101(1):4-15.
 - HUANG X, LI C H, ZHANG A Q, et al. A simple rat model of in situ reversible obstructive jaundice in situ reversible obstructive jaundice model[J]. *Ann Surg Treat Res*,2017,92(6):389-395.
 - KIRKLAND J G, GODFREY C B, GARRETT R, et al. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice[J]. *J Surg Res*,2010,164(2):221-227.
 - ORUÇ M T, OZMEN M M, HAN U. A new technique for inducing and releasing obstructive jaundice in rats[J]. *Eur Surg Res*,2009,43(4):354-359.
 - KAHRAMANSOY N, ERKOL H, YILMAZ E E, et al. A new model of reversible obstructive jaundice using rapidly absorbable suture materials[J]. *Clin Invest Med*,2012,35(6):E351-E357.
 - ZHOU F, ZHOU J, WANG W, et al. Unexpected rapid increase in the burden of NAFLD in China from 2008 to 2018: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hepatology*,2019,70(4):1119-1133.
 - FAN J G, KIM S U, WONG V W. New trends on obesity and NAFLD in Asia[J]. *J Hepatol*,2017,67(4):862-873.
 - VILAR-GOMEZ E, MARTINEZ-PEREZ Y, CALZADILLA-BERTOT L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Gastroenterology*, 2015,149(2):367-378.
 - THOMA C, DAY C P, TRENELL M I. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review[J]. *J Hepatol*,2012,56(1):255-266.
 - HOLMER M, LINDQVIST C, PETERSSON S, et al. Treatment of NAFLD with intermittent calorie restriction or low-carb high-fat diet - a randomised controlled trial[J]. *JHEP Rep*,2021,3(3):100256.
 - DING Z M, XIAO Y, WU X, et al. Progression and regression of hepatic lesions in a mouse model of NASH induced by dietary intervention and its implications in pharmacotherapy[J]. *Front Pharmacol*,2018,9:410.

收稿日期: 2021-06-11