

CT动态观察不同剂量高脂饵料复制非酒精性脂肪肝动物模型效果

王记红¹, 胡小林¹, 高玉玖¹, 朱德文¹, 任永生², 谭华炳³ (1. 湖北医药学院第三临床医学院, 十堰市 442000; 2. 湖北医药学院附属人民医院 生理教研室, 十堰市 442000; 3. 湖北医药学院附属人民医院 感染性疾病科, 十堰市 442000)

摘要: 目的 探讨CT动态观察不同剂量高脂饵料复制非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 动物模型的可行性。方法 选择40只日本大耳白兔随机分为重度NAFLD模型组 (高剂量组)、轻度NAFLD模型组 (低剂量组) 及对照组。高剂量组给予高脂饲料160 g/(兔·d), 低剂量组给予高脂饲料80 g/(兔·d) + 普通饲料80 g/(兔·d), 对照组给予普通饲料160 g/(兔·d)。通过CT观察各组脂肪肝程度。实验结束后处死动物, 留取血和肝脏组织备用。检测血浆和肝组织甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TC)。肝组织进行HE染色并进行观察。结果 高剂量组TC和TG分别为 (32.12 ± 1.25) mmol/L 和 (6.02 ± 2.12) mmol/L, 低剂量组分别为 (18.34 ± 2.10) mmol/L 和 (4.39 ± 1.93) mmol/L, 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组TG和TC高于低剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组、低剂量组和对照组的肝组织TG分别为 (0.71 ± 0.07) mmol/L、(0.52 ± 0.08) mmol/L、(0.29 ± 0.10) mmol/L, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组肝组织TG与低剂量组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组、低剂量组和对照组肝脏CT值分别为 (31.3 ± 2.4) HU、(42.1 ± 3.5) HU、(58.9 ± 1.9) HU, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组肝脏CT值与低剂量组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组肝脏病理学检测结果为重度NAFLD, 低剂量组为轻度~中度NAFLD, 对照组为正常肝脏组织。结论 高脂饵料剂量控制联合CT动态观察可以建立不同程度的兔NAFLD模型。

关键词: 高脂饲料; 剂量控制; CT监测; 非酒精性脂肪性肝病

Dynamic observation on the effect of NAFLD animals model induced by different doses of high-fat baits through CT

WANG Ji-hong¹, HU Xiao-lin¹, GAO Yu-jiu¹, ZHU De-wen¹, REN Yong-sheng², TAN Hua-bing³ (1. The Third Clinical College, Hubei University of Medicine, Shiyan City 442000, China; 2. Department of Physiology, Hubei University of Medicine, Shiyan City 442000, China; 3. Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan City 442000, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of dynamic observation on the effect of NAFLD animal model induced by different doses of high-fat baits through CT. **Methods** Total of 40 Japanese white rabbits were randomly divided into severe group with NAFLD (high dose group), mild group with NAFLD (low dose group), blank control group (blank group). High dose group were given high fat diet with 160 g/(rabbit·day), low dose group were given high fat diet and normal diet with 80 g/(rabbit·day), respectively, blank group were given normal feed with 160 g/(rabbit·day). CT values were detected in order to observe the degree of fatty liver of the high dose group. Animals were executed after the experiment and the blood and liver tissue were reserved. Triglyceride (TG), cholesterol (TC) of plasma and liver tissue were also detected. Liver tissues

基金项目: 湖北省教育厅科技项目 (D20102104); 湖北省卫生厅科研项目 (JX5B75); 十堰市科技局科技项目 (2010st33); 2010年湖北医药学院学生科研项目 (2010XSA19)

通讯作者: 谭华炳 Email: renmthb@163.com; 任永生 Email: renmthb@163.com

were detected with HE staining to observe pathological changes. **Results** TC and TG level of high dose group were (32.12 ± 1.25) mmol/L and (6.02 ± 2.12) mmol/L, respectively, which were (18.34 ± 2.10) mmol/L and (4.39 ± 1.93) mmol/L of low dose group, the differences were both significant compared with blank group ($P < 0.01$). TG and TC of high dose group were higher than that in low dose group, with the difference significant ($P < 0.01$). TG levels of liver tissue in high dose group, low dose group blank group were (0.71 ± 0.07) mmol/L, (0.52 ± 0.08) mmol/L and (0.29 ± 0.10) mmol/L, respectively, with a significant difference among the three groups ($P < 0.01$). Also the difference was significant between high dose group and low dose group ($P < 0.01$). CT values of high dose group and mild group were (31.3 ± 2.4) HU and (42.1 ± 3.5) HU, respectively, both with significant differences compared with blank group (58.9 ± 1.9) HU ($P < 0.01$). Also the difference between high dose group and low dose group was significant ($P < 0.01$). Liver pathology in high dose group was detected as severe NAFLD and mild to moderate NAFLD in low dose group, which was normal in blank group. **Conclusions** Different doses of high-fat baits and dynamic observation with CT can establish different degree of NAFLD rabbit model.

Key words: High-fat baits; Dose control; CT observation; Nonalcoholic fatty liver disease

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝实质细胞脂肪变性为病理特征,无过量饮酒史,除外其他肝病的临床综合征。其病理类型包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)及NASH相关肝硬化,后者可发展为肝癌^[1-3]。NAFLD已成为发达国家和地区的第一大肝病,在我国亦可能成为慢性肝病的首要病因^[4]。前期相关研究发现,NAFLD兔模型的胰岛素、血糖水平升高,且与NAFLD程度有关^[5];NAFLD兔模型存在血液流变学改变、CRP升高、内皮素-1的异常^[6-8],进而导致动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)。NAFLD防治一直是发达国家和地区的研究热点,近年在我国也成为研究热点。

NAFLD防治研究的基础是NAFLD模型的建立,本课题组在多年的NAFLD防治研究中摸索出高脂饵料“剂量控制”联合CT动态肝脏观察可建立不同程度NAFLD兔模型,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物、场地、饲料、试剂 实验兔由湖北医药学院动物实验中心提供(合格证号:No.00006546),实验场地在湖北省十堰市实验动物中心(实验设施使用证明号:No.00008391)。饲料配方由课题组提供,湖北医药学院动物实验中心加工。根据实验需要使用原厂试剂或购买专用试剂^[9]。

1.2 实验仪器 应用全自动生化检测仪(瑞士生

产Roche/Hitache7600),Olympus DP-70显微摄影系统(日本奥林巴斯公司产品),Leica CMI900冰冻切片机(德国生产),螺旋CT(美国生产GE Lightspeed 16层螺旋CT)及匀浆机、低温离心机等常规实验设备。

1.3 实验模型的建立

1.3.1 动物分组与饲养 高剂量组喂饲高脂饲料160 g,低剂量组喂饲高脂饲料及普通饲料各80 g,对照组喂饲普通饲料160 g,全部饲料分早、晚两次投入。重度高脂血症组饲养至9周时死亡1只,由于无相关血液标本,统计时将高剂量组死亡动物在实验前剔除,各组动物数量实为13只^[10,11]。

1.3.2 饲养周期与NAFLD程度的监测 常规麻醉、固定、CT检测脂肪肝的程度^[12]。13周后,高剂量组实验动物达到重度脂肪肝,即确定实验周期为13周,且全部实验动物进行CT检测。

1.4 血液的采集与检测 常规麻醉,从腹主动脉采集血液并离心^[9,10],按照实验要求检测甘油三酯及胆固醇。

1.5 肝脏CT值检测 10%水合氯醛耳缘静脉麻醉,兔仰卧固定于木制手术台上,进行肝脏CT检测,计算肝组织CT值。

1.6 肝脏标本的采集与肝脏病理学检测 常规麻醉,暴露肝脏,切取肝脏组织进行HE常规染色;制作10%的肝匀浆,检测肝匀浆甘油三酯含量^[9,10]。

1.7 统计学处理 所有数据采用SPSS 9.0统计学软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后组内及组间比较用

t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血浆TG、TC变化比较 对照组饲养前后TG、TC比较无显著差异。饲养后高剂量和低剂量组TG、TC均升高, 与饲养前比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。饲养后高剂量组TG、TC均高于低剂量组, 两组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 见表1。

2.2 各组肝组织TG变化比较 饲养后, 高剂量组和低剂量组肝组织TG含量均升高, 与对照组比较均显著升高, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组与低剂量组比较, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 见表1。

2.3 各组肝脏CT值变化比较 饲养后, 高剂量组和低剂量组动物肝脏CT值均下降, 分别与对照组比较, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。高剂量组CT值低于低剂量组, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 见表1、图1。

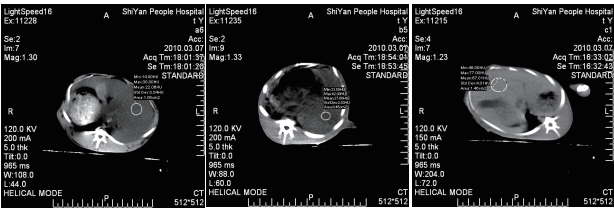


图 1 三组实验动物肝脏CT值
注: A为22.06HU; B为37.8HU; C为67.01HU

2.4 肝脏病理学 肉眼观察高剂量组肝脏较对照组明显增大, 表面油腻, 边缘变钝, 色黄, 质脆、易碎, 见图2。低剂量组肝脏较对照组增大, 颜色较高剂量组红润, 质地较柔软; 对照组肝脏红润、柔软, 边缘锐。光镜下高剂量组肝脏达到重度NAFLD, 低剂量组肝脏为NAFLD轻度~中

度, 对照组为正常肝脏。实验造模成功, 达到预期目的^[10]。



图 2 实验动物重度NAFLD肝脏大体观

3 讨论

据《中国居民营养与健康现状》报道, 我国成人血脂异常比率为18.6%^[13], 且流行病学调查研究表明高脂血症是导致脂肪肝的重要因素之一^[14]。高脂饮食可导致高脂血症的发生^[15]。本研究根据已有研究结果, 摸索出通过“剂量控制”人为控制实验兔脂质摄入量及血脂代谢紊乱程度, 在同等时间内建立不同程度高脂血症模型, 进而建立不同程度的NAFLD模型, 为研究NAFLD提供精确的动物模型。

高脂血症时, 输入肝脏的脂质及脂肪酸过多, 肝脏脂蛋白主要是低密度脂蛋白(VLDL)合成代谢发生障碍, 无法将TG运出肝外, 肝细胞内充满脂肪酸, 氧化不足, 引起肝内脂肪堆积, 形成脂肪变性, 从而导致NAFLD。本研究将血液TG、TC、肝组织TG值和肝脏病理学等因素进行比较, 检测结果均提示不同程度高脂血症及NAFLD动物模型已经建立, 达到通过“剂量控制”建立不同程度NAFLD模型的目的。

根据NAFLD影像学诊断标准, 经彩色多普勒超声检查诊断NAFLD的敏感性、特异性均不高,

表 1 3组饲养后TG、TC及肝脏CT值变化 ($\bar{x} \pm s$)

	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	肝组织TG (mmol/L)	肝脏CT值 (HU)
对照组 (n = 13)	1.13 ± 0.20	0.84 ± 0.26	0.29 ± 0.10	58.9 ± 1.9
低剂量组 (n = 13)	18.34 ± 2.10 ^a	4.39 ± 1.93 ^a	0.52 ± 0.08 ^a	42.1 ± 3.5 ^a
高剂量组 (n = 13)	32.12 ± 1.25 ^{ab}	6.02 ± 2.12 ^{ab}	0.71 ± 0.07 ^{ab}	31.3 ± 2.4 ^{ab}

注: TG: 甘油三酯; TC: 胆固醇。饲养后与对照组比较^a $P < 0.01$; 与低剂量组比较^b $P < 0.01$

且不能量化脂肪肝的程度。MRI在脂肪肝的诊断中亦存在敏感性、特异性不高的问题。而肝脏CT检测是NAFLD最佳诊断指标的观念已得到医学界的公认,随脂肪肝程度加重肝脏的CT值下降。

本研究结果显示,高剂量组和低剂量组肝脏CT值均下降,与对照组比较,差异均有显著统计学意义。高剂量组与低剂量组的肝脏CT值比较,差异亦有显著统计学意义,表明肝脏CT检测可作为量化NAFLD程度的有效指标。

理想的动物模型应与人类疾病特征相似,病变应具有一定的发展过程,形成率高,病死率低且重复性好,造模方法简便易行^[15]。动物实验过程中NAFLD程度观察是实验成功与否的关键。既往对小型动物常以处死动物观察肝脏情况的方法存在盲目性。显然,探索应用无创型、可反复用于检测同一动物NAFLD的检查方法,对动物实验科研的精确性具有重要意义。

综上所述,通过高脂饵料饲养建立不同程度NAFLD兔模型具备以上特点且可通过CT检测进行动态观察,此方法是研究NAFLD的较好选择。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14:161-163.
- [2] Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, et al. Asia-Pacific Working Party on NAFLD. Guidelines for the assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary[J]. J Gastroenterol Hepatol,2007,22:775-777.
- [3] American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology,2002,123:1702-1704.
- [4] 周婷婷,秦波,郑天鹏,等. 非酒精性脂肪肝患者血浆 FGF21 水平及与肥胖、胰岛素抵抗关系研究[J]. 第三军医大学学报,2010,32:265-268.
- [5] 谭华炳,李金科,胡波,等. 非酒精性脂肪性肝病兔胰岛素水平变化及其机理探讨[J]. 西南国防医药,2010,20:937-939.
- [6] 谭华炳. 绞股蓝对兔高脂血症与血液流变学影响的研究[J]. 第三军医大学学报,2007,29:1497-1499.
- [7] 谭华炳,鲁四德,钟晓东. 绞股蓝对高脂饲料饲养致兔高脂血症、C反应蛋白升高的干预研究[J]. 实用诊断与治疗杂志,2006,20:796-797,800.
- [8] 谭华炳,匡颖文. 绞股蓝干预食饵兔动脉粥样硬化过程中对内皮素-1和C反应蛋白的影响研究[J]. 山西医药杂志,2006,35:866-868.
- [9] 谭华炳,王一平,许丽,等. 非酒精性脂肪性肝病兔肝组织硫化氢与一氧化氮的关系[J]. 中国比较医学杂志,2011,21:42-46.
- [10] 谭华炳,朱德文,谢杏榕,等. 非酒精性脂肪性肝病兔脂肪肝程度与肝组织硫化氢浓度的关系[J]. 第三军医大学学报,2010,32:2440-2443.
- [11] 谭华炳,李金科,胡波,等. 非酒精性脂肪性肝病兔胰岛素水平变化及其机理探讨[J]. 西南国防医药,2010,20:937-939.
- [12] 谭华炳,贺琴. 肝脏CT值与动脉粥样硬化关系[J]. 中国比较医学杂志,2008,18:19-22.
- [13] 中华人民共和国卫生部,中华人民共和国科学技术部,中华人民共和国国家统计局. 中国居民营养与健康现状[J]. 中国心血管病研究杂志,2008,18:19-22.
- [14] 李李,孙业恒,吴系科,等. 脂肪肝危险因素的病例对照研究[J]. 现代预防医学,2004,31:338-340.
- [15] Rutkowski B, Stevenson FT, Atkinson DN. The role of lipogenesis in the development of uraemic hyperlipidemia[J]. Am J Kidney Dis,2003,41(3 Suppl 1):S84-S86.
- [16] Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol,2002,16:679-690.

收稿日期: 2011-07-25