

非酒精性脂肪性肝病实验模型

汪美汐, 彭宗根* (中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要:非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是以肝内细胞脂肪变性和过度沉积为主要特征的临床代谢应激性肝损伤,为常见的慢性肝病,也是导致严重肝病的诱因之一。但由于理想化NAFLD实验模型的匮乏,导致NAFLD的发病机制仍有待深入阐明,治疗药物研发相对滞后。因此,建立接近于临床疾病特征的NAFLD细胞动物实验模型,对于探索其发病机制和筛选评价相关候选药物具有重要意义。笔者将从体内体外角度,分别对NAFLD发展进程中相关实验性模型进行综述并深入分析其优缺点,为防治NAFLD创新药物研究提供充分理论依据和模型选择。

关键词:非酒精性脂肪性肝病;实验模型;疾病进展;药物研究;应用评价

doi:10.11669/cpj.2019.18.001 中图分类号:R965 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)18-1457-06

Experimental Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease

WANG Mei-xi, PENG Zong-gen* (Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT:Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a clinical metabolic stress-induced liver injury, is expressed as a feature of intrahepatic cell steatosis and excessive fatty deposition. NAFLD is a rising cause of common chronic liver disease worldwide. However, due to the lack of idealized NAFLD experimental models, the pathogenesis of NAFLD remains to be elucidated and consequently the research and development of therapeutic drugs against NAFLD has been making a relatively slow progress. Therefore, the establishment of cell and animal models is of great significance for exploring its pathogenesis and screening relevant experimental drugs. In this paper, the experimental models involved in NAFLD are reviewed and its advantages and disadvantages are evaluated further *in vitro* and *in vivo*, which provides a sufficient theoretical basis and model selection for the investigation and development of innovative drugs against NAFLD.

KEY WORDS: nonalcoholic fatty liver disease; experimental model; disease progression; drug research; application evaluation

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是指除酒精和其他明确的肝损伤因素外,所致的以肝细胞脂肪聚集、肝小叶炎症细胞浸润、气球样变为主要特征的肝脏功能失调性病变^[1]。随着肥胖及其相关代谢综合征全球化的流行趋势,NAFLD已发展为全球最常见的慢性肝病之一,对人类健康构成了严重威胁,成为当代医学研究领域的新挑战^[2]。目前我国NAFLD患病率已经超过欧美等发达国家,形势十分严峻^[3]。

NAFLD除了前期表现为非酒精性单纯性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)外,随着疾病的进展会进一步产生非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),甚至诱发肝硬化(hepatic cirrhosis, HC)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[4]。由于NAFLD可引发严重的临床后果,2018年4月欧洲肝脏研究学会指南强调了早期介入

NAFL治疗的重要性和必要性^[5]。然而,临床上针对NAFLD治疗药物严重匮乏,目前尚无小分子靶向药物上市,新药研发相对落后,究其原因多在于理想化实验模型的缺乏,尤其是细胞模型匮乏。基于此我们将分别对NAFLD发展进程中相关实验性模型进行综述并深入分析其优缺点,为选取合适的实验模型研究NAFLD的发病机制及筛选和评价创新新药提供参考依据。

1 NAFL模型

在临床上,肝脏脂肪变性是NAFL的标志性特征,常伴随着血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和(或)谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)的增

基金项目:十三五重大新药创制科技重大专项资助(2018ZX09711001-003-010);中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助(2017-I2M-3-012);中国医学科学院北京协和医学院协和学者特聘教授项目资助(2016)

作者简介:汪美汐,女,博士研究生 研究方向:慢性肝病药物分子药理学 * **通讯作者:**彭宗根,男,博士,研究员,博士生导师
研究方向:抗肝炎病毒药物分子药理学 Tel:(010)63166129 E-mail:pumcpzg@126.com

高^[6]。导致 NAFL 产生的主要机制可能是进食富含高脂的营养食物在小肠消化、吸收后,形成的游离脂肪酸(free fat acid, FFA)经门静脉或淋巴进入肝内血循环并转换为甘油三酯(triglyceride, TG)沉积于肝细胞内^[7];而大量脂类物质的蓄积会影响肝细胞内线粒体的氧化功能和脂肪酶的活性^[8],导致 FFA 氧化和合成极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)减少;从而引发 TG 运出肝细胞减少,进一步加重 TG 在细胞内的蓄积,也加重了肝脏的脂肪变性(图 1)。

1.1 NAFL 动物模型

1.1.1 高脂饮食诱导型 高脂饮食诱导模型动物常伴随着体重、肝组织匀浆超氧化物歧化酶活性,血清 ALT、AST、TG、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇等生化指标改变,以及在肝脏病理状态下表现为弥漫性肝细胞大泡样脂肪变和胰岛素抵抗,但无明显炎症、坏死及纤维化(表 1)^[9]。其分子机制可能与参与脂肪生成基因(乙酰辅酶 A 羧化酶,ACC;脂肪酸合成酶, FAS;和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶,SCD1)^[8]和代谢调节转录因子(过氧化物酶体增殖物激活受体 α , PPAR α ;甾醇调节元件结合蛋白-1, SREBP-1)^[8,10]的改变有关。

高脂饮食诱导模型作为经典 NAFL 模型之一,被广泛用于临床前药物药效评价筛选模型,如利拉鲁肽、奥贝胆酸(obeticholic acid, OCA)^[11]。近几年研究建立的动物模型所采用的高脂饲料的配比、建模时长、给药时间和方式均不一致,导致实验重复性不理想,但可以根据需要适当调整以达到不同的参考价值^[12-13]。此模型常用动物包括 SD 大鼠、C57BL/6 小鼠,此外家兔、鸡和猪也可用于建立 NAFLD 模型。尽管小鼠生命周期较短,但由于实验动物体型小,易于饲养和管理等多个优点被越来越多的运用于模型建立。

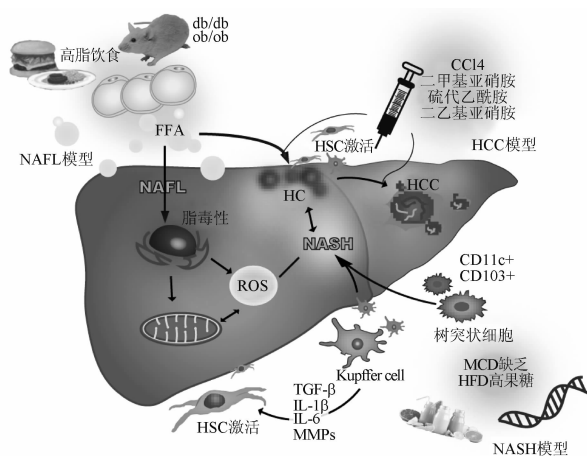


图 1 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)疾病机制总结

NAFLD 诱因较多,包括遗传易感性、代谢综合征或外部因素如饮食等。模型研究中 NAFL 主要由高脂饮食、基因改造技术诱发肝脏产生脂毒性;NASH 的产生则主要由 MCD 饮食诱导,进而产生免疫应激;HC、HCC 模型除饮食模型外,主要采用药物诱导。NAFLD 各种阶段的模型诱导机制间不是孤立存在的,而是相互关联相互促进的

1.1.2 基因缺陷型 目前针对特定的基因改造形成了多个基因缺陷型 NAFL 实验模型,但应用较多、代表性好的主要为 *db/db* 和 *ob/ob* 小鼠。*db/db* 小鼠作为常染色体隐性遗传衍化而来的 II 型糖尿病模型,具有正常或升高的瘦素水平,能通过促进饱腹感来调节喂养行为^[14]。通常这些小鼠患有持续性饮食过多,肥胖和糖尿病;表现出严重的高血糖,高胰岛素血症和血清瘦素水平升高,并发展为大血管性肝脂肪变性。实际上,当喂食正常对照饮食时,*db/db* 小鼠很少显示出 NASH 的特征,但在实验研究中通常将 MCD 饮食喂养 *db/db* 小鼠以显示出明显的肝脏炎症和纤维化,从而更好地复制人 NASH^[14-15]。另外一种缺陷型 *ob/ob* 小鼠同样具有功能性瘦蛋白受体,并表现为严重超重、过度摄食、高胰岛素血症、高血糖和胰岛素抵抗,可发展为自发性肝脂肪变性,但无 NASH 的特征^[16](表 1)。

db/db 和 *ob/ob* 小鼠模型的优点在于它们显示出人类代谢综合征的特征,能发展为明显的肝脏脂肪变性;然而,肥胖人群中由基因突变引起的先天性瘦素缺乏和瘦素抵抗极为罕见,因此 *db/db* 和 *ob/ob* 小鼠模型在反映人类肥胖,胰岛素抵抗和肝脂肪变性的病因方面具有局限性。另外,基因工程改造的动物模型能够导致动物脂肪代谢的紊乱和氧化应激,这种动物具有自发性发生肝腺瘤和原发性肝癌的风险^[17],因此这种动物模型更适用于研究 NASH 和原发性肝癌的发病过程。而且,这些动物模型不符合人类膳食和自然发病情况,发病原理与人类 NAFL 发病机制不尽相同。

1.2 NAFL 细胞模型

使用四环素引起的脂肪肝体外模型作为最早的造模方式可用来研究脂肪沉积的分子机制,比如可以观察到肝细胞内的 TG 沉积与线粒体氧化的下降^[18]。而当肝细胞给予高浓度葡萄糖处理时,调节糖酵解和脂肪酸合成酶基因的表达表现出剂量依赖的上调,这与某些患者体内表现是一样的,

表 1 NAFLD 动物模型总结

类型	肥胖	胰岛素抵抗	脂肪变性	ER Stress	NASH	HC	HCC
饮食模型							
高脂	✓	✓	✓	✓	×	×	×
HFD	✓	✓	✓	✓	×	×	×
MCD	×	×	✓	✓	✓	✓	×
HCD	×	×	✓	✓	✓	✓	×
WD	✓	✓	✓	✓	×	×	×
药物诱导型							
CCl ₄	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓
硫代乙酰胺	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓
二乙基亚硝胺	✓	✓	✓	✓	×	×	✓
基因缺陷型							
<i>db/db</i>	✓	✓	✓	✓	×	×	×
<i>ob/ob</i>	✓	✓	✓	✓	×	×	×
<i>foz/foz</i>	✓	✓	✓	✓	✓	×	×
PTEN	×	✓	✓	✓	✓	×	✓
复合模型							
<i>db/db</i> + MCD	✓	✓	✓	✓	✓	×	×
WD + CCl ₄	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
B6/129 + 高脂	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CDA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

但这种效果不是基于营养状况而是特定诱导因素和特定的葡萄糖刺激形成的^[17]。目前,用于建立非酒精性脂肪肝细胞模型的造模药物多为油酸或油酸与亚油酸混合物,其中油酸是引起肝细胞 TG 累积的最主要脂肪酸。有研究发现,当以油酸-棕榈酸(2:1)作为诱导液诱导 HepG2 细胞株 24 h 后,细胞内存在大小不等的脂滴,且细胞活力及形态较好^[19];但是 HepG2 代谢较快且为肿瘤细胞,与正常生理条件下人的肝细胞差异较大。除 HepG2 肿瘤细胞株外,原代肝细胞、肝细胞株 L02、HepaRG 细胞、鼠原代肝细胞也常用来作为造模细胞株。

2 NASH 模型

NASH 是由各种外部刺激产生的炎症反应,随着脂肪变性的发展,1/3 的 NAFLD 患者会进展为 NASH^[20]。NASH 的发生可能是因为脂毒性诱导的肝细胞释放刺激伤口愈合反应的信号,例如损伤相关的细胞因子^[21]。为了促进再生或修复,肝脏募集并激活肝星状细胞以去除死亡细胞;当其不能抑制伤口愈合时,则会进一步促进炎症产生^[22](图 1)。

2.1 NASH 动物模型

2.1.1 蛋氨酸-胆碱缺乏模型(MCD) MCD 饮食诱发的 NASH 模型最初由 Shinozuka 提出,在国际上被广泛认可,操作简便,成模率高,是研究 NASH 发病机制及防治药物的主要动物模型^[23]。蛋氨酸和胆碱是肝细胞卵磷脂生物合成的必需前体物质,是 VLDL 合成和分泌的重要基底物质^[24],当蛋氨酸胆碱缺乏时,VLDL 的合成和分泌受损,从而使 TG 在肝细胞内积聚迅速沉积,导致肝细胞脂肪变性;另一方面,胆碱蛋氨酸的缺乏,可导致活性甲基减少,使肝内抗氧化物严重缺乏,抗氧化防御屏障受损^[20]。该模型脂肪性肝炎发展速度较快,3 周左右可见明显的脂肪性肝炎病变,8 周可见肝纤维化引起的病理病变;其分子机制可能主要与 CD11c⁺、CD103⁺ 等保护性树突状细胞亚型缺乏引起的免疫反应有关^[21]。

虽然该模型可形成典型的 NASH 病理学改变,且具有造模周期短等优点,但 MCD 模型不符合临床 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。

2.1.2 高胆固醇(HCD)模型 人类食用的许多食物中含有高水平的胆固醇,最新报道表明,膳食胆固醇是动物模型和人类脂肪性肝炎进展的关键因素^[20]。单独喂食 HCD(1%)的小鼠表现出血清胰岛素水平显著增加,但肝脏重量, TG 水平, FFA 水平和血清 ALT 水平仅略微增加^[25]。然而,当大量胆固醇与大量脂肪或大量胆酸盐结合时, NASH 的特征更为明显^[26]。

2.1.3 高果糖模型(HFD) 人类从富含果糖的食物中摄取大量卡路里,这与肥胖和 NASH 发展密切相关^[27]。在比较喂食 HFD 或高脂肪高果糖(HFHF)饮食的 C57BL/6 小鼠时,发现果糖摄入对于肝脏脂肪沉积向纤维化发展是必要的;因为尽管两组体重增加和肝脏脂肪变性极为相似,但是肝脏氧

化应激,转化生长因子- β 1 驱动的纤维化和胶原沉积在喂食 HFHF 饮食的小鼠中显著增加^[26]。

2.1.4 基因缺陷型 *db/db* 小鼠在用 MCD 喂养时表现出显著 NASH 样特征,同时最近的一项研究发现,*db/db* 小鼠在铁超负荷情况下也可导致 NAFL 进展为 NASH 和纤维化,表现为肝细胞膨胀,纤维发生,肝脏氧化应激增加,肝脏炎症免疫细胞活化,肝脏线粒体脂肪酸 β -氧化受损^[28]。因此,增加肝脏脂肪酸摄取和减少 VLDL 分泌是 MCD 饮食促进 *db/db* 小鼠肝脏脂肪变性的两个重要分子机制^[29]。

foz/foz 小鼠具有突变的 *ALMS1* 基因,其作为初级纤毛体系中的编码蛋白质对于正常的初级纤毛功能至关重要,虽然其功能尚未完全阐明,但它在细胞内转运和食欲调节中可能具有非常重要的作用^[30]。像 *ob/ob* 和 *db/db* 小鼠一样,*foz/foz* 小鼠也显示出肥胖,胰岛素抵抗和脂肪变性。同时, HFD 还可通过加重 *foz/foz* 小鼠的代谢并发症来促进 NAFL 向严重纤维化的 NASH 转变^[20](表 1)。

2.2 NASH 细胞模型

虽然 NASH 动物模型日渐成熟,但是动物模型个体差异、环境因素、实验周期过长等也为研究带来了障碍,而细胞模型是进行 NASH 发病机制及防治药物筛选和评价研究的重要手段和必要补充。

目前,在 NASH 细胞模型建立中,多采用 FFA 刺激人 Huh-7 细胞、HepG2 细胞,能够成功诱导 NASH 体外模型^[31]。高浓度长时间的 FFA 作用会增加细胞脂肪样变,引起肝细胞的炎症反应及凋亡等,同时伴随着有毒物质的合成对肝细胞进行损伤^[31]。此外,不同浓度脂肪乳剂干预正常 L02 肝细胞,可以观察到细胞明显脂肪变性,并伴随培养液中 ALT、AST 的显著升高^[32]。该体系为了进一步模拟出体内过氧化物增多引发的二次打击导致 NASH 的发病过程,在肝细胞脂肪变性基础上又继续予以含脂肪乳剂培养基培养进行刺激,但是这也不可避免的造成了大量细胞的凋亡。纵观已有的 NASH 体外模型,缺少对整个造模过程的动态观察数据,因此有必要对 NASH 细胞模型进行深入研究。

3 NAFLD 诱导的肝硬化(HC)模型

NASH 持续的肝损伤极可能诱发肝纤维化并导致 HC。在临床病理组织学上,肝硬化患者疾病进展通常伴随着广泛的肝细胞坏死、结缔组织增生与纤维隔形成,进而导致肝小叶结构破坏,肝脏逐渐变形、变硬从而发展为 HC^[33]。HC 的发生原因在于肝脏中纤维组织的大量积聚,静息肝星状细胞(HSC)和肝脏肌成纤维细胞是肝细胞外基质的主要来源,其过度增殖和迁移在发病机制中起关键作用^[34]。目前常用诱导物为四氯化碳(CCl_4)和硫代乙酰胺(TAA)。

CCl_4 是实验室动物中用于诱导肝纤维化肝硬化的最经典和最广泛使用的毒素之一,传统方法常用 CCl_4 皮下注射法构建大鼠肝硬化模型^[35]。 CCl_4 被细胞色素 P450 代谢活化以形成 $\cdot\text{CCl}_3$ 自由基,进而引发细胞中的脂质过氧化并造成细胞外基质的沉积。当同时添加铁元素时,则有助于加速暴露

于 CCl₄ 亚毒性剂量动物的肝硬化进展^[36]。

TAA 是一个众所周知的肝毒物,可通过单次注射诱导肝小叶中心坏死和长期重复注射产生肝纤维化或肝硬化。TAA 诱导的大鼠在发生肝硬化的同时并伴有大量含铁血黄素沉积,并且在超微结构水平上频繁出现纤维化细胞,血浆细胞和肥大细胞^[37]。有研究认为 TAA 诱导的大鼠之所以具有进行性肝硬化,是在于其持续的肝细胞损伤和单核细胞炎症^[38],而 FXR 激动剂 OCA 在 TAA 给药期间能减少肝脏炎症和纤维发生,并对肝硬化具有逆转作用^[39]。

4 NAFLD 诱导的肝癌(HCC)模型

HCC 是最常见和致命的癌症之一,最初归因于丙型肝炎病毒的出现和传播^[40];但是最新统计发现 50% 的新诊断 HCC 患者属于无病毒患者,其中大部分患有 HAFLD,更常见的是 NASH。目前 NAFLD 和 NASH 的小鼠模型大多不能复制从脂肪肝, NASH 和纤维化到 HCC 的病理进展。HCC 在长期肝硬化中出现的机制已被广泛描述,并且通常以肝细胞死亡和代偿性再生的循环周期为特征,伴有促进肿瘤发展的细胞增殖。然而, HCC 与肥胖、NAFLD 相关的机制仍不清楚^[41]。

4.1 饮食诱导模型

仅喂食一种饮食的模型具有明显的局限性, Wolf 等^[42]提出了一种结合胆碱缺乏饮食和 HFD 的混合饮食模型,该模型能显著表现为肝脏脂肪变性,代谢综合征和肝脏损害的特征,以及血清 ALT 和 AST 水平升高。在另一种组合饮食模型中,喂食胆碱缺乏的 L-氨基酸(CDAA)的 C57BL/6 小鼠发展成肝损伤,其模仿 NASH 特征并在喂养 9 个月后发展为 HCC,该模型很好地模拟了人疾病进展的过程,可能成为很好的 HCC 临床前模型。

4.2 化学诱导型

CCl₄ 作为传统造模药而被广泛运用,当喂食 CDAA 饮食并接受低剂量腹腔内注射 CCl₄ 的 C57BL/6 小鼠具有更显著的 NASH 和 HCC 特征(表 1)。与单独喂食 CDAA 饮食的小鼠相比,小鼠具有更大的脂肪变性,小叶炎症和纤维产生^[42]。

二乙基亚硝胺(DEN)介导的实验性肝细胞癌模型^[43],克服了免疫缺陷和缺乏异质性的限制。然而,肿瘤形成的时间和肿瘤大小可以根据小鼠品系而显著变化,并且通常可能发生多种肿瘤病变。但是,值得一提的是 DEN 在腹腔注射 12 周可以诱导肝硬化并在持续 16 周时诱导肝癌发生,这从某种程度上可以作为研究 NAFLD 疾病整个过程的有效模型(表 1)。

4.3 基因缺陷型

磷酸酶和张力蛋白同系物(PTEN)作为肿瘤抑制因子在许多人类癌症中发生突变,当其缺失时会导致细胞增殖,抗凋亡和肿瘤发生^[44]。肝细胞特异性 PTEN 缺陷小鼠具有与人类 NASH 和 NASH 相关的 HCC 相似的特征。在 44 周左右时,PTEN 缺陷小鼠的肝脏中便存在肿瘤。因此,该模型不仅

可用于了解 NASH 的发病机制,还可用于了解 NASH 向 HCC 的进展^[45](表 1)。

5 复合模型

目前,大多数研究不仅仅局限于 NAFLD 发展的某个阶段时期,而更多的是关注疾病发展的整个过程,这也就对新的复合模型提出了要求;复合模型的建立能观察到疾病发展过程的各个时期中肝脏的变化,给研究带来了新的视角。

高脂肪,高果糖和高胆固醇(WD)作为加速器与每周低剂量的腹腔注射 CCl₄ 相结合能近似模拟疾病发展进程^[46](表 1)。CCl₄ 的加入加剧了由 WD 诱导的 NASH,纤维化和肿瘤发展的组织学特征,并在 12 周时的表现为 3 期纤维化和 24 周时发展为 HCC。整个肝转录组学分析也表明 WD/CCl₄ 组小鼠免疫学特征与人 NASH 的相似。该模型概括了人类脂肪肝疾病的进展阶段,从简单的脂肪变性和炎症,纤维化和癌症。

Asgharpour 等^[47]最近报道了一种饮食诱导的 NAFLD 动物模型,该模型概括了人类与 NASH 相关的关键 HCC 特征。来源于 C57BL/6J 和 129S1/SvImK 的杂交小鼠喂食高脂肪,高碳水化合物饮食的 B6/129 小鼠在 4~8 周内依次发生脂肪变性,16~24 周时出现 NASH,第 52 周出现 HCC,这可能是 NASH 相关 HCC 的理想临床前模型(表 1)。

另外,现在许多实验动物模型是结合了基因自然突变或者特定靶基因修饰和饮食或者药物诱导后形成的复合性模型,这样使得 NAFLD 动物模型的组织病理学和发病机制与人更接近。例如:用于 NASH 研究的 SREBP-1 转基因小鼠^[48],PPAR α 转基因小鼠^[49],蛋氨酸腺苷转移酶(MAT1A)缺陷小鼠^[50]等,但这种小鼠模型多针对特定靶点,具有一定局限性。

6 总结与展望

NAFLD 作为一种多系统疾病^[51],其诱导因素较多(图 1),NAFLD 相关药物研发竞争异常激烈,大约有 95 种药物正处于研发的不同阶段,其中代表性的 10 多种药物已进入临床试验的后期阶段,包括 OCA、elafibranor、aramchol^[52]。但临床生物标志物的缺乏以及过度依赖动物模型等均增加了 NAFLD 药物转化的挑战。纵观当前研究中所运用的 NAFLD 实验模型(表 1),虽种类繁多但各有优缺点,研究者应该根据不同的实验目的选取代表性实验模型,如抑制肝脏脂肪堆积的药物 OCA,作为胆汁酸 FXR 受体药物主要针对 HFD 模型^[53];免疫调节剂 demethylenoberberine 主要激活 AMPK 从而选择 MCD 饮食诱导的 db/db 小鼠 NASH 模型^[54]。

传统的单一模型虽然可能很好地模拟出 NAFLD 某个典型特征,但在代表 NAFLD 的完整疾病谱中都具有个体限制,有的复制了 NAFLD 的组织病理学而不是生理学特性,有的复制了疾病的生理特性而不是组织病理学,即使是在单因素持续刺激作用下也并不能进一步囊括和契合人疾病发展的过程。复合模型的兴起从一定程度上解决了单一模型疾病

进展的问题,有的甚至表现出与人类 NASH 相同的转录组学特征,但其疾病进展的各个阶段并没有明显和一致的区分界线。尽管复合模型也存在缺点,其仍然是目前研究 NAFLD 发病机制和进展的强有力的工具和最佳选择。理想的 NAFLD 模型无论是对疾病机制的研究还是新药的发现都意义重大,其必须具有以下特征:①复制人类肝疾病组织学、形态学等典型特征;②病变为进展性,以及在病程发展中存在一个可逆与不可逆的阶段性的演进过程;③模型成功率高,重复性好;④造模方法简便易行,经济实用。随着全球 NAFLD 的盛行以及临床小分子靶向药物的匮乏,都使得寻找研究合适、理想化的 NAFLD 实验模型迫在眉睫。相信随着认识的不断深入和突破,一定能研究出涵盖人类整个疾病谱的理想 NAFLD 实验模型,用于致病机制的研究和加快创新药物的研发。

REFERENCES

- [1] BRUNT E M, WONG V W, NOBILI V, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1:15080.
- [2] ARAB J P, ARRESE M, TRAUNER M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13:321-350.
- [3] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER_TETRI B A, RINELLA M, *et al.* Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2018, 24:908-922.
- [4] YE P, XIANG M, LIAO H, *et al.* Dual-specificity phosphatase 9 protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice via ASK1 suppression[J]. *Hepatology*, 2019, 69(11):76-93.
- [5] WILLEBRORDS J, PEREIRA I V, MAES M, *et al.* Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research[J]. *Prog Lipid Res*, 2015, 59:106-125.
- [6] NATIONAL WORKSHOP ON FATTY LIVER AND ALCOHOLIC LIVER DISEASE, FATTY LIVER EXPERT COMMITTEE. Guideline of prevention and treatment for nonalcoholic fatty liver disease;a 2018 update[J]. *J Mod Med Health*, 2018, 34(5):641-649.
- [7] ANSTEE Q M, GOLDIN R D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research[J]. *Int J Exp Pathol*, 2006, 87(1):1-16.
- [8] ZHOU Y, DING Y L, ZHANG J L, *et al.* Alpinetin improved high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) through improving oxidative stress, inflammatory response and lipid metabolism[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97:1397-1408.
- [9] FABBRINI E, SULLIVAN S, KLEIN S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic and clinical implications[J]. *Hepatology*, 2010, 51(3):679-689.
- [10] SEKIYA M, YAHAGI N, MATSUZAKA T, *et al.* Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression[J]. *Hepatology*, 2003, 38(6):1529-1539.
- [11] TØIBØI K S, KRISTIANSEN M N, HANSEN H H, *et al.* Metabolic and hepatic effects of liraglutide, obeticholic acid and elafibranor in diet-induced obese mouse models of biopsy-confirmed nonalcoholic steatohepatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(2):179-194.
- [12] SINGH D P, KHARE P, ZHU J, *et al.* A novel probiotic-based preventive approach against high-fat diet-induced adiposity, non-alcoholic fatty liver and gut derangement in mice[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2016, 40(3):487-496.
- [13] LIEBER C S, LEO M A, MAK K M, *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(3):502-509.
- [14] LAU J K, ZHANG X, YU J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances[J]. *J Pathol*, 2017, 241(1):36-44.
- [15] TRAK-SMAYRA V, PARADIS V, MASSART J, *et al.* Pathology of the liver in obese and diabetic *ob/ob* and *db/db* mice fed a standard or high-calorie diet[J]. *Int J Exp Pathol*, 2011, 92(6):413-421.
- [16] FELLMANN L, NASCIMENTO A R, TIBIRICA E, *et al.* Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 137(3):331-340.
- [17] XIONG L, CHEN L, ZHANG L L. Mechanism of high glucose-induced hepatic steatosis[J]. *China Health Care Nutr(中国保健营养)*, 2013, 9:22-24.
- [18] YAN S Y. The biochemical mechanism studied on tetracycline-induced nonalcoholic fatty liver disease[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2014.
- [19] ZHANG Z B. Effects and mechanisms of improvement of emodin on Simple hepatic steatosis of non-alcoholic fatty liver[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2012.
- [20] SANTHEKADUR P K, KUMAR D P, SANYAL A J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(2):230-237.
- [21] HEIER E C, MEIER A, JULICH-HAERTEL H, *et al.* Murine CD103(+) dendritic cells protect against steatosis progression towards steatohepatitis[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(6):1241-1250.
- [22] GIUSTO M, BARBERI L, DI S F, *et al.* Skeletal muscle myopenia in mice model of bile duct ligation and carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis[J]. *Physiol Rep*, 2017, 5(7):e13153.
- [23] LIU Y, SONG H, WANG L, *et al.* Hepatoprotective and antioxidant activities of extracts from *Salvia-Nelumbinis naturalis* against nonalcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet in mice[J]. *J Transl Med*, 2014, 12:315.
- [24] CORBIN K D, ZEISEL S H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28(2):159-165.
- [25] SAVARD C, TARTAGLIONE E V, KUEVER R, *et al.* Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1):81-92.
- [26] CHEN Y Z, CHEN C L, TIAN X, *et al.* Research advances in animal models based on the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Clin Hepatol(临床肝胆病杂志)*, 2017, 33(12):2457-2461.
- [27] HANAFI M Y, ZAHER E L M, EL-ADELY S E M, *et al.* The therapeutic effects of bee venom on some metabolic and antioxidant parameters associated with HFD-induced non-alcoholic fatty liver in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6):5091-5099.
- [28] HANDA P, MORGAN-STEVENSON V, MALIKEN B D, *et al.* Iron overload results in hepatic oxidative stress, immune cell activation, and hepatocellular ballooning injury, leading to nonalcoholic steatohepatitis in genetically obese mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 310(2):117-127.
- [29] RINELLA M E, ELIAS M S, SMOLAK R R, *et al.* Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(5):1068-1076.
- [30] LEGRY V, VAN R D M, LAMBERT B, *et al.* Endoplasmic reticulum stress does not contribute to steatohepatitis in obese and insulin-resistant high-fat-diet-fed *foz/foz* mice[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2014, 127(7):507-518.
- [31] WANG Y L, LI J, LIU L J, *et al.* A cell model of nonalcoholic steatohepatitis induced by FFA: establishment and dynamic moni-

- toring[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*(中西医结合肝病杂志), 2013, 23(4):225-227.
- [32] DAI N, ZHOU P, ZHANG Y Y, *et al.* Effect of aloe-elodin on non-alcoholic steatohepatitis cells model [J]. *J Jiangsu Univ (Med Ed)* (江苏大学学报:医学版), 2014, 24(6):478-482.
- [33] BARNETT R. Liver cirrhosis [J]. *Lancet*, 2018, 392(10144):275.
- [34] JIANG T, WANG L, LI X, *et al.* Inositol-requiring enzyme 1-mediated endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and fibrosis formation in liver cirrhosis rat models [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4):2941-2946.
- [35] CAI Y, LU D, ZOU Y, *et al.* Curcumin protects against intestinal origin endotoxemia in rat liver cirrhosis by targeting PCSK9 [J]. *J Food Sci*, 2017, 82(3):772-780.
- [36] AREZZINI B, LUNGI B, LUNGARELLA G, *et al.* Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(4):486-495.
- [37] ABDUL-HAMID M, AHMED R R, MOUSTAFA N, *et al.* The antifibrogenic effect of etanercept on development of liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2017, 41(1):23-35.
- [38] ATARASHI M, IZAWA T, MORI M, *et al.* Dietary iron overload abrogates chemically-induced liver cirrhosis in rats [J]. *Nutrients*, 2018, 10(10):E1400.
- [39] VERBEKE L, MANNAERTS I, SCHIERWAGEN R, *et al.* FXR Agonist obeticholic acid reduces hepatic inflammation and fibrosis in a rat model of toxic cirrhosis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:33453.
- [40] HARDY T, OAKLEY F, ANSTEE Q M, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum [J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11:451-496.
- [41] MARENGO A, ROSSO C, BUGIANESI E. Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis [J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67:103-117.
- [42] WOLF M J, ADILI A, PIOTROWITZ K, *et al.* Metabolic activation of intrahepatic CD8 + T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(4):549-564.
- [43] REIBERGER T, CHEN Y, RAMJIWAN R R, *et al.* An orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma with underlying liver cirrhosis[J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(8):1264-1274.
- [44] ALVAREZ-GARCIA V, TAWIL Y, WISE H M, *et al.* Mechanisms of PTEN loss in cancer: it's all about diversity [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019.
- [45] WATANABE S, HORIE Y, KATAOKA E, *et al.* Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(suppl 1):96-100.
- [46] TSUCHIDA T, LEE Y A, FUJIWARA N, *et al.* A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(2):385-395.
- [47] ASGHARPOUR A, CAZANAVE S C, PACANA T, *et al.* A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer[J]. *J Hepatol*, 2016, 65(3):579-588.
- [48] KOHJIMA M, HIGUCHI N, KATO M, *et al.* SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(4):507-511.
- [49] BATATINHA H A, LIMA E A, TEIXEIRA A A, *et al.* Association between aerobic exercise and rosiglitazone avoided the NAFLD and liver inflammation exacerbated in PPAR-alpha knock-out mice[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(5):1008-1019.
- [50] CANO A, BUQUE X, MARTINEZ-UNA M, *et al.* Methionine adenosyltransferase 1A gene deletion disrupts hepatic very low-density lipoprotein assembly in mice[J]. *Hepatology*, 2011, 54(6):1975-1986.
- [51] BYRNE C D, TARGHER G. NAFLD: a multisystem disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(1):S47-S64.
- [52] COLE B K, FEAVER R E, WAMHOFF B R, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) models in drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13(2):193-205.
- [53] ROTMAN Y, SANYAL A J. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Gut*, 2017, 66(1):180-190.
- [54] QIANG X, XU L, ZHANG M, *et al.* Demethyleneberberine attenuates non-alcoholic fatty liver disease with activation of AMPK and inhibition of oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(4):603-609.

(收稿日期:2019-03-06)