

小鼠高脂血症性脂肪肝的动态研究

胡巢凤¹, 陆大祥¹, 覃莉², 王彦平

(暨南大学医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 组织学与胚胎学教研室, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 建立小鼠高脂血症及脂肪肝模型, 观察高脂血症性脂肪肝程度和时间的动态关系。方法: 采用昆明种小鼠 60 只, 随机分为对照组($n_1 = 30$), 高脂组($n_2 = 30$), 对照组喂普通饲料, 高脂组喂高脂饲料, 分别检测 2~4 周小鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 和肝组织 TG、TC 含量变化; 并观察肝指数, 根据肝脏病理切片 HE 染色和冰冻切片苏丹Ⅲ染色分析肝脏脂变情况。结果: 在喂高脂饲料 2 周后, 小鼠血清 TC、HDL-C、LDL-C、TC/HDL-C 出现明显升高, 肝脏 TG、TC 含量也显著高于对照组, 随后的 3~4 周血脂及肝脂水平保持稳定上升; 肝指数持续增大, 有肝细胞脂肪变性, 肝脏组织细胞脂变程度随喂高脂饲料时间的延长逐渐加重。结论: 高脂饲料喂养的小鼠 4 周内可形成不同脂变程度的脂肪肝, 为抗脂肪肝药物的研究提供了实验依据。

[关键词] 高脂血症; 脂肪肝; 小鼠; 动物模型; 病理

[中图分类号] R575.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)04-0395-04

The dynamic study of hyperlipidemic fatty liver in mice

HU Chao-feng¹, LU Da-xiang¹, QIN Li², WANG Yan-ping¹

(1. Department of Pathophysiology; 2. Department of Histology and Embryology,
Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To establish the hyperlipidemic fatty liver model in mice and observe the dynamic change of hepatic steatosis in different time. **Methods:** 50 Kunming mice were randomly divided into control group ($n_1 = 30$) and high-fat diet (HF) group ($n_2 = 30$). The mice were fed with standard diet and high-fat diet respectively. The serum TC, TG, HDL-C, LDL-C and hepatic TC, TG were detected dynamically from 2 to 4 weeks. At the same time, liver index was observed and hepatic steatosis was analyzed by HE and Sudan III staining. **Results:** The serum TC, HDL-C, LDL-C, TC/HDL-C and hepatic TC, TG were elevated significantly in HF group after 2 weeks. In the following 3~4 weeks, the serum lipid, hepatic lipid and liver index kept rising. Hepatic steatosis was induced, which the degree of steatosis was aggravated with time going on. **Conclusion:** Feeding with high-fat diet, different phases of fatty liver had been developed in 4 weeks, which establishes favourable bases for further study on drugs of anti-fatty liver.

[Key words] hyperlipidemia; fatty liver; mouse; animal model; pathology

近年来高脂血症和脂肪肝的发病率在逐年增加, 流行病学调查和研究表明高脂血症是导致脂肪

[收稿日期] 2008-11-13

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(06025159)

[作者简介] 胡巢凤(1962-), 女, 教授, 研究方向: 疾病的神经内分泌免疫网络调控

通讯作者: 陆大祥, 男, 教授, 博士生导师, Tel: 020-85220004; E-mail: ldx@jnu.edu.cn

肝的重要因素之一^[1],也是导致人类心血管疾病的首要因素^[2]。脂肪肝有可能发展为肝纤维化或肝硬化^[3]。本研究以昆明种小鼠为实验对象,通过喂高脂饲料,跟踪检测其2~4周的血脂及肝脂水平,并对小鼠肝脏病理学动态变化进行观察,为研究高脂饮食性脂肪肝的发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠60只,SPF级,雄性,体质量18~22 g,由广东省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2003-0002,粤监证字:2006A018。

1.2 试剂与仪器

胆固醇、胆酸钠购自广州威佳公司,丙硫氧嘧啶,广东华南药业有限公司产品,猪油购自广州市加益食品有限公司。考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

主要实验仪器包括 Beckman 全自动生化分析仪(美国),低温高速离心机(Centrifug, 5415D, 德国), Leica CM1900 冰冻切片机(德国)。

1.3 高脂饲料配制

按文献[4]的高脂饲料配制方法,配方改良体积分数为2%胆固醇,体积分数为10%猪油,体积分数为0.2%丙硫氧嘧啶,体积分数为0.5%胆酸钠,其余为基础饲料,由广东省实验动物中心加工制作。

1.4 实验方法

60只小鼠,实验前小鼠自由饮水进食,在实验环境中适应6 d,体质量(25 ± 5) g,随机分为6组,正常对照3组,基础饲料喂养;高脂组(high-fat diet, HF)3组:喂高脂饲料,连续4周,第2周起,每周处理1组对照组及1组高脂组小鼠,直至第4周。

实验结束后,所有动物禁食12 h称体质量,摘眼球取血,用于测血脂含量。取血后迅速剖腹,将完整的肝脏取出,称量,计算肝指数(肝指数=肝湿质量/体质量 $\times 100\%$);取肝组织,用于测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)含量。

1.5 观察指标及测定方法

(1)观察一般情况及肝指数 肉眼观察肝脏变化;肝指数=肝湿质量/体质量 $\times 100\%$ 。

(2)血脂测定 全自动生化分析仪测血清TC、TG、高密度脂蛋白-C(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)及低密度脂蛋白-C(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)浓度。

(3)肝脂测定 取肝组织称取100 mg,按1:9加异丙醇,在冰水中制成10%的匀浆,4℃抽提24 h,3 000 r/min离心10 min,提取上清液,全自动生化分析仪测定TG、TC质量分数。

(4)肝组织学观察 从肝左叶相同部位切取1块肝组织,冰冻切片,苏丹Ⅲ染色;同时分别从对照组和高脂组肝左、中、右叶相同部位各取1块肝组织,以体积分数为10%甲醛固定后制备石蜡切片,HE染色,在光镜下观察肝组织变化。

1.6 统计学处理

使用SPSS 11.5对实验数据进行分析 and 处理,数据以(均数 \pm 校准差)($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的体质量和肝指数变化

高脂组肝指数于第2周开始明显升高,与正常组比较差异显著($P < 0.01$);第3~4周继续维持在较高水平(表1)。

表1 不同时间各组小鼠肝指数($\bar{x} \pm s$)比较

组别	n	肝指数/%		
		2周	3周	4周
对照组	10	4.67 \pm 0.23	4.97 \pm 0.33	4.31 \pm 0.31
高脂组	10	6.51 \pm 0.70 ¹⁾	5.87 \pm 0.60 ¹⁾	5.70 \pm 0.67 ¹⁾

1) 高脂组与对照组比较, $P < 0.01$

2.2 血脂变化

从第2周开始,高脂组血清TC、LDL-C、HDL-C浓度及TC/HDL-C比值显著高于对照组,第3~4周继续维持在高水平($P < 0.01$);而2~4周高脂组血清TG浓度与对照组比较无显著差异($P > 0.05$), (表2、3、4)。

表2 2周小鼠血脂浓度($\bar{x} \pm s$)的变化

组别	n	c(TC)/(mmol·L ⁻¹)	c(TG)/(mmol·L ⁻¹)	c(HDL-C)/(mmol·L ⁻¹)	c(LDL-C)/(mmol·L ⁻¹)	c(TC)/c(HDL-C)
对照组	10	2.63 \pm 0.35	1.39 \pm 0.91	2.22 \pm 0.44	0.57 \pm 0.68	1.20 \pm 0.17
高脂组	10	4.79 \pm 0.68 ¹⁾	1.23 \pm 0.57	3.11 \pm 0.42 ¹⁾	1.33 \pm 0.46 ¹⁾	1.57 \pm 0.34 ¹⁾

1) 高脂组与对照组比较, $P < 0.01$

表 3 3 周各组小鼠血脂浓度($\bar{x} \pm s$)的变化

组别	n	c(TC)/(mmol·L ⁻¹)	c(TG)/(mmol·L ⁻¹)	c(HDL-C)/(mmol·L ⁻¹)	c(LDL-C)/(mmol·L ⁻¹)	c(TC)/c(HDL-C)
对照组	10	2.54±0.21	1.32±0.23	2.01±0.14	0.26±0.09	1.26±0.03
高脂组	10	4.70±0.78 ¹⁾	1.38±0.45	3.02±0.59 ¹⁾	1.39±0.31 ¹⁾	1.57±0.12 ¹⁾

1)高脂组与对照组比较,P<0.01

表 4 4 周各组小鼠血脂浓度($\bar{x} \pm s$)的变化

组别	n	c(TC)/(mmol·L ⁻¹)	c(TG)/(mmol·L ⁻¹)	c(HDL-C)/(mmol·L ⁻¹)	c(LDL-C)/(mmol·L ⁻¹)	c(TC)/c(HDL-C)
对照组	10	2.58±0.34	1.24±0.21	1.93±0.19	0.40±0.20	1.33±0.09
高脂组	10	4.41±1.14 ¹⁾	1.16±0.26	2.67±0.60 ¹⁾	1.57±0.58 ¹⁾	1.65±0.12 ¹⁾

1)高脂组与对照组比较,P<0.01

2.3 小鼠肝脂变化

从第 2 周开始,高脂组肝组织 TC、TG 质量分数

明显高于对照组,第 3~4 周继续维持在高水平(P<0.01)(表 5)。

表 5 不同时间各组小鼠的肝脂($\bar{x} \pm s$)比较

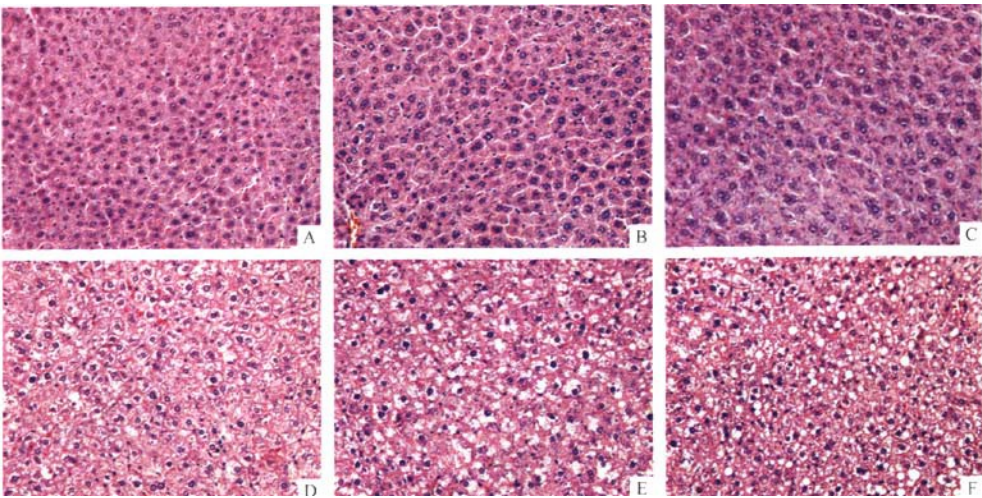
组别	n	w(TC)/(mg·g ⁻¹)			w(TG)/(mg·g ⁻¹)		
		2 周	3 周	4 周	2 周	3 周	4 周
对照组	10	5.65±1.46	5.88±1.27	55.85±1.69	14.69±3.06	18.76±4.18	17.52±4.22
高脂组	10	17.92±4.04 ¹⁾	19.72±3.04 ¹⁾	20.38±3.20 ¹⁾	63.54±5.35 ¹⁾	63.15±8.32 ¹⁾	64.69±7.33 ¹⁾

1)高脂组与对照组比较,P<0.01

2.4 肝脏病理学变化

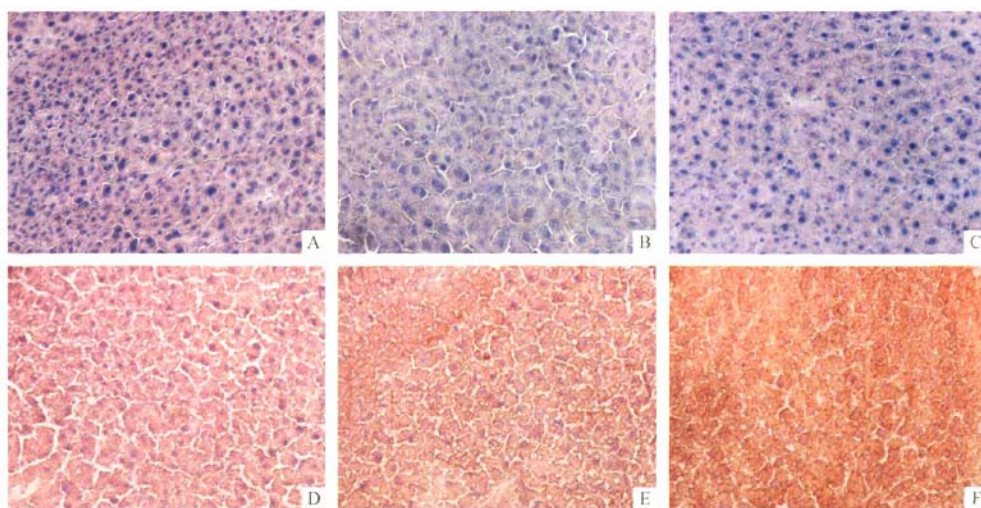
对照组肝脏外观呈暗红色,质地柔软,弹性好,边缘锐,切面光滑。高脂组肝脏体积增大,边缘圆钝,第 2 周开始肝脏体积明显增大,质软而脆,颜色苍白。光镜下对照组肝脏肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐。高脂组在第 2 周时出现轻度脂肪变性,以小泡脂肪变为主,部分肝细胞发生脂肪变性,肝细胞肿大变圆,形态不规则;第 3 周肝细胞肿胀明

显,肝细胞发生明显脂肪变性,细胞核被细胞内脂肪油滴挤压;第 4 周组织出现大量脂肪变性,肝细胞内大脂滴将细胞核挤向一侧(图 1)。苏丹Ⅲ染色显示:对照组肝细胞内无红色脂滴;高脂组第 2 周开始肝细胞内可见散在大小较均匀的淡红色脂滴,第 3 周肝细胞内出现大量红色脂滴,第 4 周肝细胞内可见弥漫性红色脂滴(图 2)。



A:对照组(2 周); B:对照组(3 周); C:对照组(4 周); D:高脂组(2 周); E:高脂组(3 周); F:高脂组(4 周)

图 1 肝组织切片(×400)



A:对照组(2周); B:对照组(3周); C:对照组(4周); D:高脂组(2周); E:高脂组(3周); F:高脂组(4周)

图2 肝组织苏丹Ⅲ染色($\times 400$)

3 讨论

脂肪肝以肝细胞内 TG 蓄积过多为主要病理改变,当肝细胞内脂质蓄积超过肝湿质量的 5% 时称为脂肪肝。脂肪肝的确切发病机理尚未明确,高脂血症性脂肪肝形成主要由于进食脂肪过多或各种原因引起脂肪代谢障碍,导致脂肪在肝细胞内积聚而成。

LDL 主要将肝脏合成的胆固醇转运至肝组织外,而 HDL 则将肝外胆固醇转运至肝组织;LDL 过高易于将肝脏合成的 TC 转运至肝组织外,促进动脉粥样硬化的形成。本实验结果显示,高脂组 2 周开始 TC、LDL-C 浓度显著升高,第 3~4 周继续维持在高水平;HDL-C 虽然也增加,但 TC/HDL-C 比值明显高于对照组,说明 HDL-C 在 TC 中的比值下降,动脉粥样硬化指数上升。而 2~4 周高脂组血清 TG 浓度与对照组比较无显著差异,上述血脂改变符合小鼠饮食性高脂血症的改变^[5],属于 II a 型高脂血症。此外,高脂组从第 2 周开始肝指数明显升高;肝组织 TC、TG 浓度也显著上升,并在随后的 3~4 周维持稳定。表明脂质在肝细胞内蓄积,导致脂肪肝。

肝病理切片结果显示,对照组 2~4 周肝脏无异常变化,肝小叶清晰可见;高脂组在第 2 周时出现轻度脂肪变性;第 3 周肝组织呈明显的脂肪变性;第 4 周出现变性的肝细胞弥漫累及大部分肝小叶。苏丹 III 染色证实,对照组肝细胞内无红色脂滴;而高脂组第 2 周开始肝细胞内可见淡红色脂滴,第 3~4 周肝细胞内出现明显红色脂滴,说明第 2 周时小鼠脂肪肝已经形成,在实验过程中肝脂肪变程度随时间的持续而逐渐加重。本实验结果中对对照组血脂、肝脂

在各时间点无明显差异,与肝病理变化一致。高脂组从第 2 周开始血脂、肝脂显著高于对照组,但 2~4 周血脂、肝脂的水平维持稳定,各时间点无显著差异,说明高脂组血脂、肝脂的水平与肝病理变化不完全呈正相关。肝活检是脂肪肝临床诊断的金指标,脂肪肝实验室改变与肝活检相关性差,但实验室检查有助于判断其病因、病理类型及预后^[6]。本研究中小鼠脂肪肝病理切片显示了脂肪肝发展的各个阶段,为阐明高脂饮食性脂肪肝的发病机制及抗脂肪肝的新药研究提供帮助。

【参考文献】

- [1] 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(3): 338-340.
- [2] SUZUKI M, YAMAMOTO D, SUZUKI T, et al. Effect of fructose-rich high-fat diet on glucose sensitivity and atherosclerosis in nonhuman primate[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2006, 28(9): 609-617.
- [3] BRADBURY M W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(2): G194-G198.
- [4] 王 倩,管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(11): 1219-1224.
- [5] 潘永勤,李 菁,朱伟杰,等. 丝瓜降血脂及抗氧化作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(5): 873-877.
- [6] 范建高,曾民德. 脂肪性肝病[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 367-368.

[责任编辑:朱颖娜]