

马春霞,陈振东,田旭东. 非酒精性脂肪性肝病动物模型制备及病证结合研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1616-1625.

MA C X, CHEN Z D, TIAN X D. Research progress on the preparation of animal models of non-alcoholic fatty liver disease and combination of disease and syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1616-1625.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.013

非酒精性脂肪性肝病动物模型制备及病证结合研究进展

马春霞¹, 陈振东^{1*}, 田旭东^{2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

【摘要】 非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指多种致病因素引起的, 以脂肪在肝细胞内过度沉积为主要病变特征的代谢综合征。目前, NAFLD 的发病机制尚未完全清楚, 临床上缺乏针对 NAFLD 的特效药物。因此, 建立理想动物模型在 NAFLD 发病机制的明确、特效药物研制及治疗方面显得极为重要。近五年来, 除 NAFLD 动物模型被热议外, 随着中医药事业的不断更新、发展, 与 NAFLD 相关的病证结合模型也相继增多, 现将近五年来常用的 NAFLD 动物模型及其制备和评价方法作一总结, 以期为同道在今后 NAFLD 动物模型制备及病证结合研究方面提供参考。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病; 动物模型; 病证结合模型; 模型评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1616-10

Research progress on the preparation of animal models of non-alcoholic fatty liver disease and combination of disease and syndrome

MA Chunxia¹, CHEN Zhendong^{1*}, TIAN Xudong^{2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: CHEN Zhendong. E-mail: clzdy66@163.com; TIAN Xudong. E-mail: xytxd@163.com

【Abstract】 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a metabolic syndrome caused by a variety of pathogenic factors and characterized by the excessive deposition of fat in liver cells. At present, the pathogenesis of NAFLD is not fully understood, and there is a lack of specific drugs for NAFLD in clinical practice. Therefore, the establishment of an ideal animal model is extremely important for clarifying the pathogenesis of NAFLD and developing specific drugs and treatments. In addition to NAFLD animal models, an increasing number of disease-syndrome combined models related to NAFLD has

【基金项目】 甘肃省科技计划资助-青年科技基金项目 (23JRRA1728), 甘肃省教育厅高校教师创新基金项目 (2023A-093), 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目 (2022KCYB-10), 甘肃省名中医传承工作室 (国中医药规财函[2021]242号), 甘肃中医药大学2024年大学生创新创业训练计划项目 (S202410735030)。

Funded by Science and Technology Program of Gansu Province-Youth Science and Technology Fund Project (23JRRA1728), Gansu Provincial Department of Education Innovation Fund for University Teachers (2023A-093), Scientific Research and Innovation Fund of Gansu University of Traditional Chinese Medicine (2022KCYB-10), Gansu Province Famous Traditional Chinese Medicine Inheritance Studio (Circular on Planning and Finance of Traditional Chinese Medicine Administration [2021] No. 242), Gansu University of Traditional Chinese Medicine College Students' Innovative Entrepreneurial Training Program in 2024 (S202410735030).

【作者简介】 马春霞, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治消化系统疾病。Email: 2824160184@qq.com

【通信作者】 陈振东, 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 中西医结合防治慢性代谢性疾病。Email: clzdy66@163.com;

田旭东, 男, 学士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中西医结合防治消化系统疾病。Email: xytxd@163.com。

* 共同通信作者

emerged with the continuous renewal and development of traditional Chinese medicine over the past five years. This article summarizes the NAFLD animal models commonly used within the past five years, as well as their preparation and evaluation method, to provide a reference for future studies in NAFLD animal model preparation and modeling a combination of disease and syndrome.

[Keywords] non-alcoholic fatty liver disease; animal model; disease-syndrome combination model; evaluation of model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外由酒精和其他对肝有明确损害致病因素所引起的, 以脂肪在肝细胞内过度沉积为主要病变特征的代谢综合征^[1]。其涵盖从脂肪肝变性 (nonalcoholic fatty liver, NAFL) 到非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、不同程度的肝纤维化、肝硬变和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的广泛病理范围^[2]。NAFLD 发病率呈逐年上升趋势, 据统计, 罹患 NAFLD 的人数约占全球总人口的四分之一, 而中国的患病率已超过 29%, 并且呈发展状态^[3-4]。NAFLD 发病机制尚未完全清楚, 目前, 研究认为胰岛素抵抗是 NAFLD 主要的病理生理机制^[5], 同时研究也指出遗传易感性、宿主代谢紊乱和环境因素相互作用的结果也会导致 NAFLD 的形成^[6]。此外, 近年来, 有证据表明肠道微生物参与 NAFLD 的发病机制的调节, 其发病机制随着肠道微生物群的组成而变化并且肠道微生物群及其代谢产物在促进免疫抑制环境的形成方面也发挥作用^[7]。故 NAFLD 被认为是一种复杂的代谢性疾病, 影响其临床表现和疾病进展因素有很多, 包括种族、遗传易感性、饮食习惯、代谢、免疫、肠道菌群和其他因素^[6]。因为是代谢综合征, 所以既往研究发现 47.3% ~ 63.7% 的 2 型糖尿病患者和高达 80% 的肥胖者中可以见到 NAFLD^[8-9]。现阶段尚无针对 NAFLD 的特效药物, 主要从保肝, 抗氧化等方面切入治疗, 可以预见未来 NAFLD 将成为医学界的一个重大挑战^[8-10]。研究发现动物模型有助于探索新的治疗方法, 并且理想的动物模型可以能够非常逼真地再现人类疾病的复杂病理机制^[11], 因此制备有效动物模型在 NAFLD 发病机制的明确, 特效药物研制及治疗方面显得极为重要。目前研究人员利用 NAFLD 动物模型及病证结合模型开展了很多关于 NAFLD 的发病机制, 靶向药物的研究, 且取得了一定的成果。本文从动物与模型选择、模型制备方法、模型评价方法等方面对 NAFLD 动物模型制备及

病证结合研究进行综述。

1 动物选择

NAFLD 动物模型制备常用动物以啮齿动物中的大鼠和小鼠为主, 其中以 SD 大鼠、Wistar 大鼠和 C57BL/6 小鼠使用最为广泛。此外, 近年来沙鼠、金黄地鼠也常用于构建 NAFLD 模型。

SD 大鼠生长发育周期较长, 但生长发育速度快, 繁殖能力强且性周期稳定, 此外其适应性和抗病能力强, 喂养过程中不易因外界环境和疾病而影响实验结果。Wistar 大鼠性周期稳定、具有生长发育快、自发性肿瘤发生率低、对传染性疾病的抵抗力较强等特点, 并且其解剖和生理与人类相似, 因此可以更好的反映人类疾病。C57BL/6 小鼠易于繁殖、干预方便, 但研究发现在使用其不同亚系进行 NAFLD 研究时, 所表现出的疾病病理严重程度是不同的, KAWASHITA 等^[12]对 C57BL/6J (BL6J)、C57BL/6N (BL6N) 两种小鼠亚系进行了比较分析, 他们发现在四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导的 NASH 模型中, BL6J 小鼠在肝中表现出比 BL6N 小鼠更严重的氧化应激和纤维化, 而在高脂饮食 (high fat diet, HFD) 诱导的 NASH 模型中, 相比 BL6N 小鼠, BL6J 小鼠的肝甘油三酯 (triglyceride, TG) 积累更多, 但体重增加和肝损伤更少, 因此在使用 C57BL/6 小鼠进行 NAFLD 研究时, 应考虑到不同小鼠亚系对疾病的影响。沙鼠是一种对脂肪敏感的动物, 易受膳食胆固醇 (cholesterol, TC) 的影响, 形成高胆固醇血症和非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFL), 有研究显示雄性沙鼠在喂食 HFD 2 周后, 其血清中的总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平迅速显著升高^[13]。但也有研究表明即使没有膳食 TC, 其对膳食脂肪酸的血浆脂质反应也比人类更敏感, 除此之外沙鼠有自发发展为糖尿病的倾向, 且既往研究表明 NASH 与代谢综合征有关^[14], 因此沙鼠常用于研

究 NASH 和肝硬化。金黄地鼠表达胆固醇酯转移蛋白,该动物可以更好地复制人类脂蛋白代谢,并且有研究表明该动物对评估药物对脂蛋白代谢的影响更具预测性,因此,与大鼠和小鼠相比,其对促进 NASH 的饮食反应更好,能表现出明显的炎症,肝细胞膨胀和纤维化^[15]。鉴于以上动物特性,故在 NAFLD 模型动物选择时常以上述 4 种啮齿动物为主。

2 模型制备方法

常见的动物模型制备方法有饮食诱导、药物诱导、基因敲除和基因诱导突变等,其中饮食诱导模型制备方法简单,原料容易获取,但其造模周期长且形成的 NAFLD 病理变化有限。药物诱导模型造模周期短,模型小鼠往往表现出较重的病理变化,并且大多数药物能够加速疾病向肝硬化和肝癌的进展。基因敲除或基因诱导突变模型造模周期短,能够在较短时间内成模,与饮食诱导模型饮食结合后能更好的反映 NAFLD 疾病表现及发病过程。

2.1 NAFL 模型

2.1.1 饮食诱导模型

(1) HFD 模型: HFD 是诱导 NAFLD 动物模型的常用饮食,一般由脂肪(60% kcal)组成,主要特点是容易导致模型动物肥胖。肥胖易导致脂肪细胞功能障碍,释放大促炎因子和瘦素,使游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)转移到肝中,FFA 从脂肪组织到肝的外排增加可能会诱导胰岛素信号传导途径的缺陷并导致胰岛素抵抗,进而促进肝损伤及其炎症反应^[16]。MENG 等^[17]用(60% kcal 脂肪 + 等量水)喂养 6 周龄雄性 C57 BL/6J 小鼠,12 周后小鼠体重增加, TG 和 TC 水平增高,且在小鼠肝中观察到脂质蓄积和脂肪变性显著增加,特征为气球样变、空泡化和肝细胞肥大。该类模型的优点是造模原料简单,容易获取,制备方法简单可行,可以较好的模拟人类 NAFLD 的发病机制且能表现出与 NAFLD 肝损伤相一致的病理特征,但其缺点是造模周期长且表现出的 NAFLD 症状较轻。

(2) 高脂、高果糖、高胆固醇饮食(high fat, high fructose, high cholesterol diet, HFFCD)模型: HFFCD 与其他饮食不同在于其含有 TC,通常由高脂高果糖(high fat and high fructose, HFHF)饮食及 TC 构建,其中添加 TC 的量随实验目的不同而变化。近年来,研究发现游离胆固醇(free cholesterol, FC)具有

高度肝毒性,0.5%的 TC 含量似乎足以在合理的时间范围内促进脂肪性肝炎和纤维化的发展,0.2%和 1.0%的 TC 促进自发性肝肿瘤的发展^[18]。ZHAO 等^[19]给金黄地鼠喂食 HFFCD 或对照饮食 6 周。结果表明,模型组动物体重、腹脂、肝指数显著增加, TC、TG、LDL-C 水平显著升高,高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平显著降低。肝组织中的脂质沉积形成大小不一的脂肪空泡。肝代谢组学分析显示,模型大鼠鞘脂、甘油磷脂和精氨酸生物合成的代谢途径紊乱。该模型制备方法简单、耗时短、统一性好,可以模拟常见饮食因素引起的早期脂肪肝,为 NAFLD 的初步发病机制和治疗药物的研究提供了理想的模型。

2.1.2 基因突变模型

db/db 小鼠模型:瘦素(leptin, Lep)是由脂肪组织分泌的一种激素,其在血清中的含量与动物脂肪组织大小成正比^[20],Lep 通过增加饱腹感以减少对食物的脂质摄入来发挥其调节能量平衡的作用。既往研究表明尽管 Lep 水平正常,但瘦素受体(leptin receptor, LEPR)功能损伤后,仍会导致 Lep 信号传导受损,使其同样不能发挥作用。db/db 小鼠由于受体基因中携带点突变,因而可以导致 LEPR 功能受损。ZHANG 等^[21]给小鼠喂食普通饲料,12 周后,db/db 小鼠肝血清天冬氨酸转移酶(aspartateaminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)或碱性磷酸酶水平显著升高,并且表现出严重的肝脂肪变性,显示 NAFLD 模型建立成功。该模型可以自发的出现肝损伤的表现,并且能够较好的展现人类 NAFLD 的发病过程,但缺点在于这些小鼠在喂食普通食物时不会发生纤维化,故不能很好的用于研究 NASH。

2.2 NASH 模型

2.2.1 饮食诱导模型

(1) 胆碱缺乏型 L-氨基饮食(cholinedeficient amino acid defined diet, CDAA)模型: CDAA 是构建 NASH 小鼠模型的常用饮食,一般由蛋白质(11%)和脂肪(31%)构建,不含有 TC 和胆碱。胆碱和蛋氨酸均为必须营养素,二者缺乏可导致极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)颗粒产生受损,造成肝损伤。胆碱缺乏后肝 VLDL 的分泌功能受损,造成肝细胞坏死、肝内脂肪堆积;此外也可导致肝氧化应激以及细胞、脂肪因子发生变化,造成肝发生炎症和纤维化,进而加速肝损伤。蛋氨酸缺

乏后通过转硫途径减少谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的生物合成,其后引起氧化应激进而导致脂肪肝病进展^[22]。TØLBØL 等^[23]给雄性 Wistar 大鼠喂食不含 TC 的 CDAA (蛋白质 11%,脂肪 31%,碳水化合物 58%),结果显示 CDAA 喂养 4 周后,大鼠已经出现显著的肝肿大和纤维化。该模型优点在于可以在较短时间内出现严重的肝纤维化,能够很好的反映了人类 NASH 表型和疾病进展^[24],并且表型可以在较短时间内稳定诱导,因此该模型可以作为表征 NASH 新治疗的有价值的工具。

(2) 蛋氨酸和胆碱缺乏饮食 (methionine choline deficient, MCD) 模型: MCD 常由高糖以及适量脂肪组成,除与 CDAA 饮食一样缺乏胆碱外,还缺乏蛋氨酸。胆碱和蛋氨酸均为必须营养素,二者缺乏可导致 VLDL 颗粒产生受损,造成肝损伤。蛋氨酸缺乏后通过转硫途径减少 GSH 的生物合成,然后引起氧化应激并促进脂肪肝病进展^[22]。LI 等^[25]用 MCD 饮食喂养雄性 C57BL/6 小鼠 4 周,小鼠表现典型的 NASH 特征,如肝脂肪变性和炎症细胞浸润,并且小鼠肝中 TG 含量增加。有研究表明肠道微生物群在 NASH 的发生发展中起着关键作用,调节微生物组是可作为治疗 NASH 的一种有前途的策略^[11]。该实验证实了 MCD 饮食喂养可诱导肠道菌群失调,即小鼠的厚壁菌门和拟杆菌门的比例显著增加,故 MCD 模型已被用于研究肠道微生物群和免疫反应在 NAFLD 中的作用。

(3) 动脉粥样硬化模型饮食 (Atherogenic diet, ATH) 模型: ATH 通常由高 TC 和高胆酸盐构成。TC 及胆酸盐饮食可导致氧化应激和脂质过氧化,进而造成肝损伤,既往常用于制备 ATH 模型。OMAGARI 等^[26]将 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为 N 组 (正常饮食, 69.5% MF) 与 H 组 (HFC 饮食, 28.75% 棕榈油、1.25% TC 和 0.5% 胆酸钠) 两组进行喂养,9 周后结果显示,肝重量/体重比、AST、ALT 水平,以及肝 TG 和 TC 浓度 H 组显著高于 N 组,此外 H 组的肝脂肪变性、小叶炎症、肝细胞气球样变和纤维化明显高于 N 组。该模型的优点在于可以表现出与人类 NAFLD 相一致的病理结果,产生 NAFLD 特征性的病变,如肝细胞气球样与纤维化,缺点是体重减轻,代谢模式与 NAFLD 不一致。

(4) 高脂肪、高糖饮食 (high fat, high carbohydrate diet, HFFD) 模型: HFFD 原料简单,在 NAFLD 小鼠模型制备中常用,由 60% kcal 脂肪和

30% v/v (体积比) 高果糖玉米糖浆组成。肝是果糖代谢的主要场所,近 60% 的果糖在肝被氧化,同时果糖会对肝造成有害损伤^[11]。有研究发现果糖和葡萄糖的混合物可能比单独的果糖更有效地促进肝脂肪变性。高果糖玉米糖浆为游离葡萄糖和果糖的独特组合,其在脂肪生成和增加肝脂肪变性方面要比单糖作为蔗糖结合在一起时更有效^[18]。WAYAL 等^[27]用含 60% kcal 脂肪的高脂肪和 30% v/v (体积比) 的高果糖玉米糖浆的饮食喂养 C57BL/6 小鼠,8 周后小鼠身体、肝和脾重量的显著增加,血清 ALT、TG、TC、FFA 和 VLDL 水平显著增加,长期喂养出现内脏肥胖、肝损伤、空腹高血糖、高胰岛素血症和高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG)。另外有研究指出感染会增加 HFFD 喂养的仓鼠中 NAFLD 的严重程度^[28]。该模型的优点是造模周期较 HFD 模型短,NAFLD 相关指标显著增加,炎症表现明显,并且既往研究表明 HFFD 模型能很好地概括 NAFLD 的人类表型^[29]。

2.2.2 基因敲除模型

(1) 载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 基因敲除模型: APOE 是一种双亲性血浆蛋白,其主要作用是通过与膜受体结合介导循环脂蛋白和组织之间的脂质转移^[30]。ApoE 敲除后的小鼠,血浆中 TC 和脂蛋白调节出现异常,使其抗炎和抗氧化能力低下。于温温等^[31]用高脂饲料 (10.0% 猪油、20.0 蔗糖、10.0% 蛋黄粉、0.5% 胆酸钠) 喂养 ApoE 基因敲除 (APOE^{-/-}) 小鼠,7 周后,结果显示 HFD 诱导的 APOE^{-/-}小鼠体重及体重增长率显著增高,血清中 TG、TC 水平极显著分别升高,并且组织形态学显示小鼠肝可见大小不均的脂质液泡弥散分布,证明存在显著的肝脂肪变性,表明 NAFLD 模型成功建立。载脂蛋白 A5 (apolipoprotein A5, ApoA5) 主要由肝合成和分泌,是脂蛋白脂肪酶活性和富含甘油三酯脂蛋白的关键调节剂。研究发现用常规饮食喂食缺乏 ApoA5 的金黄地鼠后,地鼠出现 HTG, TG 水平显著升高,肝脂肪变性, HFD 喂食后, ApoA5 地鼠易患重度 HTG 和 NASH^[32]。该模型不足在于动物不会自发的出现 NAFLD 相关表现,但在喂食 HFD 的情况下能促进肝脂肪变性,炎症的发展。

(2) miR-223 基因敲除模型: 脂毒性肝细胞周围的中性粒细胞浸润是 NASH 的标志,其在促进肝细胞损伤中起着重要的作用。微小核糖核酸

(microRNA, miRNA) 作为表观遗传因子调节着中性粒细胞活化和功能, 其中抗炎 *microRNA-223* (*miR-223*) 在中性粒细胞中以最高水平表达, 在减弱中性粒细胞成熟和活化中起关键作用。HE 等^[33] 给雄性 *miR-223*^(-/-) (雄性 *miR-223* KO) 小鼠喂食 HFD (60 kcal% 脂肪), 发现与野生型 *miR-223*^(+/+) 小鼠相比, 雄性 *miR-223* KO 小鼠出现更严重的 NASH 伴纤维化特征, 并且 *miR-223* KO 小鼠对肝癌具有更大的易感性, 长期 HFD 喂养后表现出更强的肝纤维化和炎症反应。既往研究显示, *miR-223* 的基因缺失促进了小鼠中 HFD 或 MCD 诱导的 NASH 以及长期 HFD 诱导的肝癌的进展^[30]。

2.3 NASH 肝硬化模型

2.3.1 饮食诱导模型

高脂肪、高胆固醇饮食 (high fat, high cholesterol diet, HFHCD) 模型: LI 等^[14] 给沙鼠喂食 HFHCD 24 周, 结果显示与对照组相比 9 周后沙鼠的 ALT、AST、TG、TC、空腹血糖和体重升高, 12 周后 Kupffer 细胞增加显著, 在形态学观察中发现沙鼠肝肿胀变硬变淡黄色, 肝缘变钝状, 肝表面出现形状不规则的结节, 且肝组织学显示肝细胞中有许多脂肪滴和液泡的形成。Kupffer 细胞和肝星状细胞通常被认为是纤维化和肝硬化形成中的关键细胞, 由此沙鼠 NAFLD 肝硬化模型建立成功。由于沙鼠的本身对脂肪敏感的特性加之饮食作用使该模型具有稳定的纤维化阶段, 故可用于研究进展期 NAFLD, 特别是肝硬化阶段, 以更好地了解疾病的病理生理过程。

2.3.2 药物诱导模型

(1) CCl_4 + HFHCD 模型: CCl_4 是一种肝毒性化学物质, 研究发现其可导致实验动物肝损伤、肝纤维化和肝硬化^[11], 进入动物体内 CCl_4 , 可直接进入肝细胞, 溶解线粒体膜脂质, 影响线粒体的结构和功能, 减少酶蛋白的合成, 引起酶的破坏和释放, 从而影响代谢和能量的产生, 最终使肝细胞变性坏死^[34]。西方饮食 (western diet, WD) 是一种包含高脂、高糖和 TC 的饮食模式, 此种饮食模式与肠道微生物相互作用产生的代谢产物, 通常会加速 NAFLD 的发展。TSUCHIDA 等^[35] 给雄性 C57BL/6J 小鼠喂食 WD (21.1% 脂肪、41% 蔗糖和 1.25% TC) + 腹腔内注射 CCl_4 (0.2 $\mu\text{L}/\text{g}$ 体重的剂量), 持续 12 周和 24 周。结果显示喂养 12 周和 24 周后小鼠的肝重量增加, 血清 ALT 和 AST 升高, 12 周时发生 3 期纤维化, 24 周时发生 HCC。此类模型优势在于其易用

性和可重复性高、制备时间短, 能够很好的概括了人类脂肪肝疾病的进展阶段, 即从简单的脂肪变性到炎症, 纤维化和癌症, 并且此类模型中基因表达和免疫异常的功能途径与人类疾病非常相似, 但是该模型小鼠显示出胰岛素抵抗减弱, 使其在相关胰岛素抵抗机制研究中使用受限。

(2) FFC + 链脲霉素 (streptozotocin, STZ) 模型: STZ 可以对胰岛 β 细胞产生毒性作用, 导致胰岛损伤和发生炎症反应, 最终使胰岛素分泌障碍, 发生糖尿病。FFC 和 WD 相似, 是一种富含高脂、高糖与高 TC 饮食模式。研究发现, STZ 可加速 FFC 诱导的肝功能障碍和代谢紊乱, ZHENG 等^[36] 用 FFC (高脂、高果糖和高 TC 饮食) 喂养的 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 + 腹腔内注射 150 mg/kg STZ, 12 周后小鼠的体重急剧下降, 血清 ALT、AST、TC 显著增加, 组织学结果显示小鼠各肝小叶出现大量脂质沉积, 并伴有气球样变性和肝细胞肿胀坏死。20 周时脂肪性肝炎和轻度纤维化伴偶尔 HCC。该模型优势在于造模周期短, 肝病理组织学表现明显且可出现 HCC, 不足在于 NAFLD 相关表现较重。

(3) DIAMOND 模型: DIAMOND 小鼠具有 C57BL6/J 和 S129S1/svImJ 小鼠的稳定等基因品系, 其中近 60% 的基因来自 C57BL6/J 背景, 其不含任何已知的基因突变^[37]。ASGHARPOUR 等^[37] 给该模型小鼠喂食具有生理学相关 TC 的 HFD, 结果显示小鼠发展为进行性 NAFLD, 导致 NASH 伴晚期纤维化和 HCC, 肝组织学检查显示 4 周后出现大泡性脂肪变性, 8 ~ 16 周后进展为脂肪性肝炎伴炎症、肝细胞气球样变和 Mallory-Denk 小体形成。DIAMOND 小鼠模型优点是可以发生与人类 NASH 一致肥胖、胰岛素抵抗、血脂异常和转氨酶升高。

2.4 中医病证结合模型制备方法

近年来随着中医药事业的发展, 中医病证结合模型逐渐兴起, 该模型将西医学的“病”和中医学的“证”很好的结合在一起, 对深入研究中医学证的本质和加深西医对特定疾病的认识具有重要的临床价值。此外, 有学者也指出建立病证结合的动物模型相较于单纯的疾病模型或单纯的证候模型而言更有说服力, 更符合中医辨病辨证结合的诊疗特色, 促进中药新药开发与药效机制的研究^[38]。目前 NAFLD 病症结合模型研究较少, 主要以肝郁脾虚证、痰湿证、脾虚瘀滞证、气滞血瘀证模型等为主。

2.4.1 肝郁脾虚证模型

NAFLD 肝郁脾虚证患者多表现为右肋肋部胀满或走窜作痛, 每因烦恼抑郁而诱发, 腹胀、便溏、腹痛欲泻、乏力、胸闷、善太息等症状。李若瑜等^[39]用高脂高糖饲料 + 饥饿失常法 + 慢性束缚应激刺激 + 夹尾法建立 NAFLD 肝郁脾虚证模型, 结果显示大鼠出现明显厌食、体重减轻、行动迟缓、弓背静卧、体毛散乱无光泽、粪便溏软, 肝细胞胞质内有大小不等的脂肪空泡、肝小叶、门管区炎细胞浸润; 肝郁脾虚证指标检测结果: 血糖、血脂升高、去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和 D-木糖排泄率显著降低。该模型中饥饿失常法易致大鼠脾胃功能失司、进而发展为脾胃虚弱; 慢性束缚应激 + 夹尾法刺激可激怒大鼠, 使其相互厮打而烦躁恼怒, 最终导致大鼠气机不畅、肝气郁滞, 出现厌食、体重减轻、粪便溏软等表现, 上述一系列表现表明 NAFLD 肝郁脾虚证模型建立成功。

2.4.2 痰湿证模型

NAFLD 痰湿证患者兼有痰和湿两种病理产物, 故多表现为右肋肋部胀痛、胸脘痞满、疲乏、恶心、纳呆、周身困重、大便黏腻、舌质红、苔黄腻等症状。古人有言“肥人多痰多湿”, 故痰湿证多见于肥胖患者。张浩然等^[40]用高脂饲料 (基础饲料 + 2% TC、10% 猪油) 喂养大鼠, 8 周后, 大鼠的体质量、肝重、血清 TC、TG、ALT、AST 较正常组明显偏高, 大鼠嗜睡、毛松散暗淡无光、活动量减少、大便黏腻臭秽。该模型中大鼠体重增加, 肥胖、大鼠嗜睡、活动量减少、大便黏腻臭秽等表现符合湿阻气机、湿性黏滞的特征, 故 NAFLD 痰湿证模型成功建立。

2.4.3 脾虚瘀滞证模型

NAFLD 作为慢性病, 根据“久病多虚, 久病多瘀”理论, 该病患者常出现虚和淤诸证, 其中以脾虚淤证滞证最为常见, 该证患者表现为右肋肋部痞块、食欲减退、腹胀、乏力、大便稀淌、面色暗沉, 舌淡暗等。刘梦瑶等^[41]用 HFFD 喂养 + 腹腔注射 30 mg/kg STZ 制备 NAFLD 脾虚瘀滞证模型, 结果显示大鼠体重先增加后减轻、多饮、多食、排泄次数增加且质溏、皮毛黄暗沉坠缺少光泽、精神状态不佳、少动易惊、爪甲暗淡温低、且大鼠血清 ALT、AST、TC、TG、LDL-C 水平升高, 肝细胞胞浆中存在炎性浸润。脾胃为后天之本、气血生化之源, 脾虚运化失常, 饮食消化吸收障碍, 故大鼠出现体重先增加后减轻,

排泄次数增加且质溏等表现; 脾虚无力行血, 血液淤滞, 导致大鼠皮毛黄暗沉坠缺少光、爪甲暗淡温低。上述特征符合脾虚瘀滞证表现, 因此 NAFLD 脾虚瘀滞证模型构建成功。

2.4.4 气滞血瘀证模型

NAFLD 为本虚标实之证, 随着疾病的发展, 多累及气血, 临床多表现为烦躁易怒、胸胁胀闷、走窜疼痛, 甚或刺痛、痛处固定, 大便溏结不调、面色晦暗、舌质紫暗或有瘀斑、脉涩等。石贺^[42]以高脂饲料配合绑腿刺激及试剂干预法制备 NAFLD 气滞血瘀型模型, 8 周后大鼠出现毛色暗淡、皮毛光泽度降低、情绪暴躁易怒、粪便时干时稀、肝指数升高、弥漫性肝细胞脂肪浸润、不同程度的大泡性、小泡性脂肪变性及两者混合变性, 偶见炎性细胞浸润及坏死灶。大鼠出现气滞血瘀证表现如: 毛色暗淡、情绪暴躁易怒、粪便时干时稀, 同时具有与 NAFLD 一致的病理表现, 由此表明 NAFLD 气滞血瘀型模型成功建立。

3 模型评价方法

现阶段对于动物模型的评价主要从血液生化、组织病理学, 肝脂质、肝弹性成像等方面进行。

血液生化学评价方面主要包括肝功能及血脂异常, ALT 是肝细胞中丰富的酶, 肝细胞损伤后血清 ALT 水平升高, AST 是另一种肝损伤的生化标志物, 在肝损伤后释放到血流中, 因此, ALT 和 AST 通常是 NAFLD 患者肝炎症和损伤的标志, 血清中 ALT 和 AST 水平常用于评估肝功能^[43]。NAFLD 组织学特征主要包含脂肪变性、肝细胞气球样变、炎症和纤维化^[44]。其中 NAFL 最常见的特征是肝脂肪变性 (> 5% 的肝细胞具有脂肪浸润) 而没有额外的肝细胞损伤^[1]。脂质含量, 肝功能及病理学显示肝脂肪变性常作为该疾病阶段模型建立成功与否的评价指标。如 MENG 等^[17]用 HFD 喂养 6 周龄雄性 C57 BL/6J 小鼠, 12 周后结果显示小鼠体重增加, TG 和 TC 水平增高, 且病理显示小鼠肝中脂质蓄积和脂肪变性显著增加, 特征为气球样变、空泡化和肝细胞肥大, 即 NAFL 模型建立成功。NASH 的特征性是脂肪变性、球囊增生和小叶炎症, 其他组织学改变, 包括门静脉炎症、多形核浸润、Mallory-Denk 小体、凋亡小体^[45]。随着病情的进展, NASH 患者通常会在单个或肝细胞群周围出现典型的“鸡丝状”纤维化, 称为“细胞周围纤维化”, 它可以进一步

扩散到门静脉区域,随后导致隔膜纤维化甚至肝硬化^[44]。除上述组织学表现外,近年来研究者常用苏木素-伊红(HE)染色,油红“O”染色(ORO)、免疫组化、天狼猩红染色或马松(Masson)染色来评价模型建立情况,通过 HE 和 Masson 染色评估肝脂肪变性、炎症和纤维化,采用 ORO 和脂质提取分析检测小鼠肝脂肪含量,用免疫组化观察炎症因子的表达。HUANG 等^[46]给 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠喂食 MCD 以诱导 NASH,5 周后模型组小鼠肝/体重比的增加,HE 染色肝切片表现出中度脂质积累,Masson 染色显示模型组队列中有明显的肝胶原沉积,ORO 结果显示,肝中性脂质的积累,且脂质提取分析证实了这一点,此外小鼠的 TG 和 TC,ALT 和 AST 水平升高,故该模型建立成功。YANG 等^[47]用 HFFD 喂食大鼠 16 周后,与对照组相比,模型组的肝系数显著增加($P < 0.01$),肝切片有肝细胞肿胀、气球变性、不同大小的脂滴和肝髓变化,ORO 染色在模型组的肝切片中观察到弥漫性和颗粒状脂滴,Masson 三色染色表明模型组大鼠没有出现肝纤维化。除侵入性肝活检检查外,非侵入性检查也常用于模型评价,一维瞬时弹性成像(transient elastography,TE)是一种基于非侵入性超声的方法,它使用横波速度,提供受控衰减参数(controlled attenuation parameter,CAP)来评估脂肪变性,相比于肝活检,TE 好处在于测量的区域更大^[48]。

中医病证结合模型评价主要从血液生化、血液流变学、血黏度等方面进行评价。

血液生化指标,特别是脂质、肝功能等与中医证型关系密切。脂质代谢紊乱是 NAFLD 的重要特征之一,既往有研究表明中医痰湿证与其发生发展密切相关。一项研究通过对痰湿证大鼠进行脂质组学研究,发现 NAFLD 患者肝及血清中 TG、甘油二酯、磷脂与肝氧化应激反应、线粒体和过氧化酶功能异常存在相关性,故作者推测这些脂质有可能作为 NAFLD 痰湿证的重要标志物^[40]。肝郁脾虚证 NAFLD 大鼠也存在脂质代谢方面的异常,冯立辉等^[49]建立肝郁脾虚证 NAFLD 大鼠,发现模型组大鼠血清中 TC、TG、FFA、ALT、AST 的水平明显增高。此外,现代医学研究认为,脑组织神经递质分泌紊乱和小肠吸收功能异常是肝郁脾虚证的本质,而 NE、5-HT 是反应神经变化的主要神经递质,D-木糖排泄率可用于诊断脾虚,故 NE 和 5-HT 可用于评价 NAFLD 肝郁脾虚证模型,李若瑜等^[39]用建立

NAFLD 肝郁脾虚证模型,结果显示:血糖、血脂升高、NE、5-HT 和 D-木糖排泄率显著降低,表明其模型构建成功。

血液流变学、血黏度等常作为中医血瘀证的检测指标。NAFLD 常伴随脂质代谢的紊乱,这导致大量脂质与蛋白质结合形成脂蛋白,脂蛋白在红细胞表面吸附导致红细胞之间形成桥联,减少了红细胞表面负电荷,增加了红细胞的刚性,降低了其变形能力,使其容易相互聚集;同时,NAFLD 存在胰岛素抵抗,造成的高血糖可使红细胞膜上的脂蛋白成分改变,红细胞变得僵硬,增加了全血黏度和其他血液流变学的改变。因此在 NAFLD 模型制备过程中,检测血液流变学指标的水平,有利于对模型进行评价。此外,有研究表示 NAFLD 患者均存在血液流变学变化,且血液流变学变化与中医血瘀证关联,提示血液流变学指标可作为非酒精性脂肪性肝病早期血瘀证诊断的客观指标之一^[50]。故在建立血瘀证相关模型时可以将血液流变学指标变化作为模型成功建立的指标,如朱晓宁等^[51]采用 HFD + 伤湿法 + 外界声光刺激等构建 NAFLD 痰瘀互结模型,10 周后模型组动物体重增长迅速,形体肥胖,舌象评分、肝酶学指标、血脂、血液流变学指标均升高,符合 NAFLD 和中医痰瘀互结证表现,提示模型建立成功。

4 总结

NAFLD 是以肝细胞内脂肪过度沉积为特征的一类病理综合征,研究发现,其与代谢紊乱有关,胰岛素抵抗、缺血性肥胖、2 型糖尿病或血脂异常在其发病机制中起着至关重要的作用^[52]。NAFLD 作为内科常见慢性病之一,若早期未进行干预治疗,将严重威胁到病人健康,甚至发展为 HCC。动物模型作为近年来的研究热点,其在更好的理解疾病的发生发展以及寻求更加安全有效治疗方式中起着至关重要的作用。鼠类动物作为与人类病理生理相似的啮齿动物之一,广泛用于疾病于研究中。用于构建 NAFLD 动物模型包括饮食诱导模型、药物诱导模型、基因模型以及病证结合模型,其中饮食诱导模型制备最为简单且成本低,但其造模周期较长;药物诱导模型加快 NAFLD 向肝硬化、HCC 的发展;基因模型大多与饮食相结合,其造模周期短且疾病表现与 NAFLD 相似度高,但因基因缺陷动物造价高且获得途径来源少,故该模型制备常受限。中

医病症结合模型能够很好的将西医学的“病”与中医学的“证”相结合,对中西医对 NAFLD 的研究提供了一个很好的途径,但因国内外对其研究较少,尚缺乏统一的评判标准,不能很好的推广使用。为了优化 NAFLD 动物模型,研究者常从血液生化、组织病理学,肝脂质、肝弹性成像以及血液流变学,血黏度出发对模型进行评价,以突出其优缺点。综上,尽管各类动物模型的制备都有其局限性,且模型评价方法尚缺乏统一的评价指标,但其仍是现阶段 NAFLD 发病机制以及治疗方法研究的关键途径。因此在今后的研究中,仍需研究者进行大量实验,以期获得与 NAFLD 病理及疾病表现更为相似的低成本,短造模周期动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the american association for the study of liver diseases [J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 328–357.
- [2] BERNÁ G, ROMERO-GOMEZ M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: pathophysiology and management [J]. *Liver Int*, 2020, 40: 102–108.
- [3] COTTER T G, RINELLA M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1851–1864.
- [4] ZHOU J, ZHOU F, WANG W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851–1864.
- [5] POUWELS S, SAKRAN N, GRAHAM Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss [J]. *BMC Endocr Disord*, 2022, 22(1): 63.
- [6] RONG L, ZOU J, RAN W, et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 13: 1087260.
- [7] MOURIES J, BRESCIA P, SILVESTRI A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(6): 1216–1228.
- [8] POLYZOS S A, KOUNTOURAS J, MANTZOROS C S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 82–97.
- [9] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, DE AVILA L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 793–801.
- [10] ISSA D, PATEL V, SANYAL A J. Future therapy for non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2018, 38(1): 56–63.
- [11] FANG T, WANG H, PAN X, et al. Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(15): 5681–5697.
- [12] KAWASHITA E, ISHIHARA K, NOMOTO M, et al. A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 204.
- [13] LI C, GUO H, DAI F, et al. SREBP-2 expression pattern contributes to susceptibility of mongolian gerbils to hypercholesterolemia [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3288–3296.
- [14] LI W, GUAN Z, BRISSET J C, et al. A nonalcoholic fatty liver disease cirrhosis model in gerbil: the dynamic relationship between hepatic lipid metabolism and cirrhosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(1): 146–157.
- [15] BRIAND F, BROUSSEAU E, QUINSAT M, et al. Obeticholic acid raises LDL-cholesterol and reduces HDL-cholesterol in the diet-induced NASH (DIN) hamster model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 449–456.
- [16] 肖伟松, 乐滢玉, 曾胜澜, 等. 非酒精性脂肪性肝病的发病机制研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(8): 1874–1879.
- XIAO W S, LE Y Y, ZENG S L, et al. Research advances in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Hepatol*, 2020, 36(8): 1874–1879.
- [17] MENG F, SONG C, LIU J, et al. Chlorogenic acid modulates autophagy by inhibiting the activity of ALKBH5 demethylase, thereby ameliorating hepatic steatosis [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(41): 15073–15086.
- [18] ENG J M, ESTALL J L. Diet-induced models of non-alcoholic fatty liver disease: food for thought on sugar, fat, and cholesterol [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1805.
- [19] ZHAO C Z, JIANG L, LI W Y, et al. Establishment and metabonomics analysis of nonalcoholic fatty liver disease model in golden Hamster [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2022, 77(5–6): 197–206.
- [20] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908–922.
- [21] ZHANG Y, WU X, XU M, et al. Comparative proteomic analysis of liver tissues and serum in db/db mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9687.
- [22] KIM S H, LIM Y, PARK J B, et al. Comparative study of fatty liver induced by methionine and choline-deficiency in C57BL/6N

- mice originating from three different sources [J]. *Lab Anim Res*, 2017, 33(2): 157-164.
- [23] TØLBØL K S, STIERSTORFER B, RIPPMMANN J F, et al. Disease progression and pharmacological intervention in a nutrient-deficient rat model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(5): 1238-1256.
- [24] FARRELL G, SCHATTEBERG J M, LECLERCQ I, et al. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis: toward optimization of their relevance to human nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2019, 69(5): 2241-2257.
- [25] LI C, ZHOU W, LI M, et al. *Salvia-Nelumbinis naturalis* extract protects mice against MCD diet-induced steatohepatitis via activation of colonic FXR-FGF15 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111587.
- [26] OMAGARI K, UCHIDA M, TAGAWA Y, et al. Influence of fasting time on serum and hepatic lipid profiles in a sprague-dawley rat model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2022, 68(5): 409-419.
- [27] WAYAL V, HSIEH C C. Bioactive dipeptides mitigate high-fat and high-fructose corn syrup diet-induced metabolic-associated fatty liver disease via upregulation of Nrf2/HO-1 expressions in C57BL/6J mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115724.
- [28] CHAIDEE A, ONSURATHUM S, INTUYOD K, et al. *Opisthorchis viverrini* infection augments the severity of nonalcoholic fatty liver disease in high-fat/high-fructose diet-fed hamsters [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2019, 101(5): 1161-1169.
- [29] IM Y R, HUNTER H, DE GRACIA HAHN D, et al. A systematic review of animal models of NAFLD finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human NAFLD [J]. *Hepatology*, 2021, 74(4): 1884-1901.
- [30] HUEBBE P, RIMBACH G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 37: 146-161.
- [31] 于温温, 张金华, 刘云娜, 等. 贻贝多糖对高脂饮食诱导的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠非酒精性脂肪肝的改善作用 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(24): 369-376.
- YU W W, ZHANG J H, LIU Y N, et al. Improvement effect of mussel polysaccharide α -D-glucan on non-alcoholic fatty liver apolipoprotein E knockout mice induced by high fat diet [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(24): 369-376.
- [32] GUO J, MIAO G, ZHANG W, et al. Depletion of ApoA5 aggravates spontaneous and diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by reducing hepatic NR1D1 in hamsters [J]. *Theranostics*, 2024, 14(5): 2036-2057.
- [33] HE Y, HWANG S, CAI Y, et al. MicroRNA-223 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and cancer by targeting multiple inflammatory and oncogenic genes in hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1150-1167.
- [34] LIU T, TAN F, LONG X, et al. Improvement effect of Lotus leaf flavonoids on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(2): 41.
- [35] 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.
- [36] ZHENG Q, ZHU M, ZENG X, et al. Comparison of animal models for the study of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Lab Invest*, 2023, 103(7): 100129.
- [37] ASGHARPOUR A, SANYAL A J. Generation of a diet-induced mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [M]. New York, NY: Springer US, 2022.
- [38] 黄越燕. 病证结合动物模型的研究现状与思考 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(10): 1459-1462.
- HUANG Y Y. Research status and thoughts on the animal model of the integration of disease and syndrome [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2018, 13(10): 1459-1462.
- [39] 李若瑜, 苗宇船, 苏赵威, 等. 基于 1H-NMR 技术寻找非酒精性脂肪肝脾郁脾虚证的差异代谢标志物 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(3): 334-336, 357.
- LI R Y, MIAO Y C, SU Z W, et al. Exploration of differential metabolic markers on the non alcoholic fatty liver liver stagnation and spleen deficiency syndrome on the basis of 1H-NMR technology [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2018, 24(3): 334-336, 357.
- [40] 张浩然, 李毓秋, 田琪, 等. 基于 LC-MS 技术非酒精性脂肪肝痰湿证大鼠肝的脂质组学分析 [J]. *环球中医药*, 2023, 16(10): 1959-1966.
- ZHANG H R, LI Y Q, TIAN Q, et al. Lipidomic analysis of the liver in rats with nonalcoholic fatty liver disease with syndrome of phlegm-dampness based on LC-MS [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2023, 16(10): 1959-1966.
- [41] 刘梦瑶, 张贺芳, 牛明明, 等. 健脾理气活血方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病的保护作用 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(23): 3246-3251, 3268.
- LIU M Y, ZHANG H F, NIU M M, et al. Protective effects of decoction for strengthening spleen, tonifying Qi, activating blood in rats with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2022, 31(23): 3246-3251, 3268.
- [42] 石贺. 化痰软肝胶囊对气滞血瘀型非酒精性脂肪性肝病大鼠糖脂代谢相关酶及氧化产物的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药

- 大学; 2019.
- SHI H. Effect of HYRG capsule on glucose and lipid metabolism-related enzymes oxidation products in rats with qi and blood stasis type nonalcoholic fatty liver disease [D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine; 2019.
- [43] CHEN G, WANG X, ZHU Y, et al. Zbtb14 promotes non-alcoholic fatty liver disease-associated fibrosis in gerbils via the β -catenin pathway [J]. *Front Biosci*, 2023, 28(9): 205.
- [44] JIANG M, WU N, CHEN X, et al. Pathogenesis of and major animal models used for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(4): 1453–1466.
- [45] XU X, POULSEN K L, WU L, et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH) [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 287.
- [46] HUANG R, GUO F, LI Y, et al. Activation of AMPK by triptolide alleviates nonalcoholic fatty liver disease by improving hepatic lipid metabolism, inflammation and fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 92: 153739.
- [47] YANG J M, SUN Y, WANG M, et al. Regulatory effect of a Chinese herbal medicine formula on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(34): 5105–5119.
- [48] CAMPOS-MURGUÍA A, RUIZ-MARGÁIN A, GONZÁLEZ-REGUEIRO J A, et al. Clinical assessment and management of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(39): 5919–5943.
- [49] 冯丽辉, 万雪峰, 郑忠蕊, 等. 柴苓术芍饮对肝郁脾虚型非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织氧化应激及炎症因子的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2022, 29(3): 360–363.
- FENG L H, WAN X F, ZHENG Z R, et al. Effects of chailing Zhushao Decoction on oxidative stress and inflammatory factors in liver tissue of non-alcoholic fatty liver disease rats with liver stagnation and spleen deficiency [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*, 2022, 29(3): 360–363.
- [50] 汤江磊. 基于血液流变学指标变化研究非酒精性脂肪性肝病与血瘀证关系[D]. 昆明: 云南中医药大学; 2021.
- TANG J L. Study on the relationship between nonalcoholic fatty liver disease and blood stasis syndrome based on the changes of hemorheological indicators [D]. Kunming: Yunnan University of Chinese Medicine; 2021.
- [51] 朱晓宁, 汪静, 郑丁, 等. 非酒精性脂肪性肝病痰瘀互结证大鼠模型的构建及评价 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(22): 1953–1956.
- ZHU X N, WANG J, ZHENG D, et al. Construction and evaluation of rat model of nonalcoholic fatty liver disease with intermingled phlegm and blood stasis syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 58(22): 1953–1956.
- [52] TOKUSHIGE K, IKEJIMA K, ONO M, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020 [J]. *J Gastroenterol*, 2021, 56(11): 951–963.

[收稿日期] 2024-2-25