

石蕊, 卢猛, 吴锐, 等. 不同蛋氨酸营养水平对胆碱缺乏高脂饲料诱发代谢相关脂肪性肝炎模型建立的影响及效果比较 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 36–42.

Shi R, Lu M, Wu R, et al. Effect of different levels of methionine on the model establishment of metabolic dysfunction-related fatty liver hepatitis induced by choline-deficient high-fat diet and a comparison of their efficacy [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 36–42.

不同蛋氨酸营养水平对胆碱缺乏高脂饲料诱发代谢相关脂肪性肝炎模型建立的影响及效果比较

石蕊¹, 卢猛¹, 吴锐¹, 田园¹, 吴小马¹, 黄克和^{1,2*}

(1. 江苏省协同医药生物工程有限公司, 江苏 南京 211100;

2. 南京农业大学, 江苏 南京 210014)

摘要: 通过比较不同量蛋氨酸对胆碱缺乏高脂纯化饮食诱发的代谢功能障碍相关脂肪性肝炎 (MASH) 模型的影响, 为 MASH 治疗药物的临床开发提供试验依据。选取 48 只雄性 SPF 级健康 C57BL/6J 小鼠, 按体重随机分为 4 组, 分别饲喂蛋氨酸限制胆碱缺乏高脂饲料 (XTMRCD60)、蛋氨酸缺乏胆碱缺乏高脂饲料 (XTMCD60)、蛋氨酸正常胆碱缺乏高脂饲料 (XTCD60) 和对照饲料 (XTMCS10), 连续干预 6 周。结果: 与 XTMCS10 组相比, XTMRC60 组小鼠肝脏指数、血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、甘油三酯 (TG) 和低密度脂蛋白 (LDL) 水平显著升高 ($P<0.05$), 高密度脂蛋白 (HDL) 水平显著降低 ($P<0.05$), 肝脏组织中白细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量显著升高 ($P<0.05$); XTCD60 组小鼠出现明显肥胖, 血清 ALT、AST 和 TG 水平显著升高 ($P<0.05$), HDL 水平显著降低 ($P<0.05$), 肝脏炎症因子水平亦显著升高 ($P<0.05$); XTMCD60 组小鼠肝指数显著降低 ($P<0.05$), 血清 ALT、AST 和 VDL 水平显著升高 ($P<0.05$), 炎症因子含量明显增加 ($P<0.05$)。病理染色显示, XTMRC60、XTMCD60 和 XTCD60 组小鼠肝脏均发生不同程度的脂肪变性和炎症损伤, 成功复制 MASH 模型。综上, 3 种不同量蛋氨酸饲料诱导的 MASH 模型各具特点, 其中, XTMRC60 饲料诱导的模型在造模效率、病理特征完整性及动物福利保障方面更具优势。

关键词: 代谢功能障碍相关脂肪性肝炎; 蛋氨酸; 胆碱; 高脂; 饲料

中图分类号: S816 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)10-0036-07

Effect of different levels of methionine on the model establishment of metabolic dysfunction-related fatty liver hepatitis induced by choline-deficient high-fat diet and a comparison of their efficacy

SHI Rui¹, LU Meng¹, WU Rui¹, TIAN Yuan¹, WU Xiaoma¹, HUANG Kehe^{1,2*}

(1. Jiangsu Xietong Pharmaceutical Bio-engineering Co., Ltd., Nanjing 211100, China;

2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China)

Abstract: To compare the effects of different amounts of methionine on metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) model induced by a choline-def high-fat purified diet and to provide support for clinical development of MASH drugs. Forty-eight healthy male SPF C57BL/6J mice were obtained and randomly divided into four groups based on their body weight, and the rodents were fed with methionine restricted choline deficient high fat diet (XTMRCD60), methionine choline deficient diet (XTMCD60), choline deficient high fat diet (XTCD60), and control diet (XTMCS10) for 6 weeks to establish MASH models. The results showed that, compared with the XTMCS10 group, the XTMRC60 group had significantly elevated their liver index, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) levels ($P<0.05$), significantly decreased their high density lipoprotein (HDL) level ($P<0.05$) and significantly increased the levels of interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in their liver tissue ($P<0.05$). The mice in the XTCD60 group were obviously obese, with significantly increased serum ALT, AST, TG levels ($P<0.05$), significantly decreased HDL level ($P<0.05$), and significantly elevated liver inflammatory factor levels ($P<0.05$). The XTMCD60 group significantly reduced their liver index ($P<0.05$), significantly increased their serum ALT, AST, VLDL levels

收稿日期: 2025-10-27; 修回日期: 2026-08-04

第一作者: 石蕊, 女, 硕士

* 通信作者: 黄克和, 博士, 教授, 主要从事动物营养代谢病与营养免疫学研究, E-mail: khhuang@njau.edu.cn。

($P < 0.05$), and significantly increased their inflammatory factor contents ($P < 0.05$). The HE staining and Oil Red O staining showed that, after 6 weeks of feeding with XTMRCD60, XTMRCD60 and XTCD60, the mouse liver developed varying degrees of steatosis and inflammatory lesions, and the MASH models were successfully replicated. In conclusion, the three diet-induced mouse models had their own characteristics. Among them, the XTMRCD60 diet-induced MASH model possessed more advantages in modeling efficiency, integrity of pathological characteristics and animal welfare protection.

Keywords: metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; methionine; choline; high fat; diet

随着人们生活水平的提高,代谢功能障碍相关脂肪变性肝病(metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD)患病率不断上升^[1],并可能发展成代谢功能障碍相关脂肪性肝炎(metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH),伴有肝细胞气球样变性、肝小叶炎症细胞浸润、肝细胞坏死等特征^[2],最终转变成肝纤维化、肝硬化、肝癌和肝衰竭^[3-5],严重威胁着人类的健康。

MASH 的病因复杂,发病机制尚不清晰。最初的解释来源是 Day 等^[6]在 1998 年提出的“二次打击”学说,主要包括各种致病因素引起肝细胞脂肪代谢异常,脂肪在肝脏内不断沉积引起脂肪变性,后在氧化应激和脂质过氧化、细胞因子等作用下逐渐演变成脂肪性肝炎和肝纤维化。Tilg 等^[7]于 2010 年优化了 MASH 的发病机制,提出了“多次打击”理论,更加深刻地阐明了 MASH 病因的复杂性。复杂的发病因素是药物还处在研发阶段的重要原因,此外,理想动物模型的缺乏也是药物未能及时应用于市场的一大因素,因此建立可重复且贴近人类 MASH 发病机制的动物模型至关重要。

目前 MASH 动物模型造模方法主要包括基因工程、饮食诱导和化学诱导等,其中饮食诱导因其操作相对简便、成本较低且能较好地模拟人类 MASH 的病理生理过程而被广泛采用^[8]。在饮食诱导中,胆碱和蛋氨酸是两种关键的营养物质,它们在 MASH 的发生发展中扮演着重要角色。

给予胆碱缺乏饮食是诱导啮齿类动物发生脂肪性肝炎的经典方法之一,其核心机制在于,胆碱是磷脂酰胆碱(细胞膜和低密度脂蛋白(LDL)的重要组成部分)合成的必需前体,而磷脂酰胆碱是肝脏将甘油三酯组装成 LDL 并转运至外周组织的关键物质。胆碱缺乏时,磷脂酰胆碱合成不足,导致 LDL 组装受阻,肝脏内甘油三酯无法有效排出,进而引发脂肪沉积和脂肪变性。同时,胆碱参与体内甲基化反应,对基因表达调控、脂质代谢相关酶的活性调节具有重要意义,胆碱缺乏会破坏肝脏代谢平衡,加重氧化应激和炎症反应,促进 MASH 的病理进展。

与此同时,蛋氨酸作为一种必需氨基酸,其缺乏会从另一途径加剧肝损伤。研究发现,蛋氨酸缺乏会

导致肝脏中 LDL 合成不足,导致肝脏内脂肪无法正常转运至外周组织,从而大量堆积在肝脏,加重脂肪变性,促进肝炎向更严重阶段发展。这一过程导致肝脏脂肪含量显著增加,肝组织切片可见明显的脂肪滴浸润,进一步引发肝细胞损伤和炎症反应^[9]。此外,蛋氨酸参与体内重要的抗氧化物质谷胱甘肽(GSH)的合成。当蛋氨酸缺乏时,GSH 合成受限,使得肝脏对抗氧化应激的能力下降,活性氧(ROS)大量积累。ROS 可攻击肝细胞的脂质、蛋白质和 DNA,造成细胞膜损伤、酶活性改变以及基因表达异常,进而加剧肝脏炎症和损伤,表现为血清转氨酶水平升高,肝组织炎症细胞浸润增多^[10]。在胆碱缺乏背景下,蛋氨酸的摄入水平可能通过影响脂蛋白代谢与氧化应激状态,进一步调控肝脏脂肪变性程度与炎症损伤水平。然而,蛋氨酸严重缺乏本身会导致动物生长受阻、体重下降甚至死亡,影响模型评价。

本研究在采用胆碱缺乏高脂饲料构建 MASH 动物模型的基础上,通过研究 3 种不同水平蛋氨酸的胆碱缺乏高脂饲料,观察其对模型小鼠生化指标、炎症因子及病理特征的影响,期望通过这一系列综合评估,筛选出一种能够高效、稳定诱发 MASH 典型病理特征的饲料配方,以期为 MASH 发病机制探讨和未来治疗药物的药效学评价提供一个更为可靠和实用的临床前动物模型。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

本试验于 2023 年 3—6 月在南京农业大学实验动物中心完成,所有操作均符合《实验动物管理条例》及动物伦理 3R 原则。

1.2 实验动物与分组

选取 48 只 8 周龄健康雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠(购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司),适应性喂养 1 周后,按体重随机分笼(4 只/笼),每组 12 只,共 4 组,分别饲喂不同饲料(表 1)。试验期间保持恒定环境条件(采用 12 h 光/暗循环,温度 21~23 ℃,湿度 40%~70%),自由摄食、饮水。每周固定时间记录体重、采食量,并观察小鼠状态。

1.3 试验饲料

试验饲料由江苏省协同医药生物工程有限责任公

司定制，4 组试验饲料包括：蛋氨酸限制胆碱缺乏高脂饲料（XTMRCD60）、蛋氨酸缺乏胆碱缺乏高脂饲料（XTMCD60）、蛋氨酸正常胆碱缺乏高脂饲料（XTCD60）和对照饲料（XTMCS10）。具体饲料配方见表 1。

表 1 不同饲料配方和营养成分

项目		饲料种类			
		XTMRCD60	XTMCD60	XTCD60	XTMCS10
原料/‰	麦芽糊精	172.08	172.08	172.08	172.08
	蔗糖	96.30	96.30	96.30	96.30
	纤维素	66.14	66.14	66.14	66.14
	大豆油	33.07	33.07	33.07	20.00
	猪油	324.07	324.07	324.07	25.00
	L-胱氨酸	5.56	5.56	5.56	5.56
	L-异亮氨酸	10.05	10.05	10.05	10.05
	L-亮氨酸	20.90	20.90	20.90	20.90
	L-赖氨酸	17.46	17.46	17.46	17.46
	L-蛋氨酸	1.06	0.00	6.70	6.70
	L-苯丙氨酸	11.11	11.11	11.11	11.11
	L-苏氨酸	9.52	9.52	9.52	9.52
	L-色氨酸	2.78	2.78	2.78	2.78
	L-缬氨酸	12.30	12.30	12.30	12.30
	L-组氨酸	6.08	6.08	6.08	6.08
	L-丙氨酸	6.75	6.75	6.75	6.75
	L-精氨酸	7.94	7.94	7.94	7.94
	L-天冬氨酸	16.01	16.01	16.01	16.01
	L-谷氨酸	50.53	51.59	44.89	44.89
	L-甘氨酸	3.97	3.97	3.97	3.97
	L-脯氨酸	23.54	23.54	23.54	23.54
	L-丝氨酸	13.23	13.23	13.23	13.23
	L-酪氨酸	12.17	12.17	12.17	12.17
	玉米淀粉	0.00	0.00	0.00	309.64
	混合矿物质 S10026B	66.14	66.14	66.14	66.14
	碳酸氢钠	9.92	9.92	9.92	9.92
	混合维生素 V10001C	1.32	1.32	1.32	1.32
	酒石酸氢胆碱	0.00	0.00	0.00	2.50
营养成分/%	蛋白质	23.10	23.10	23.10	23.10
	碳水化合物	26.97	26.97	26.97	57.93
	脂肪	35.71	35.71	35.71	4.50
	蛋氨酸	0.11	0.00	0.67	0.67
	胆碱	0.00	0.00	0.00	0.10

1.4 血清生化指标检测

试验第 6 周结束时，每组随机选取 6 只小鼠，

禁食禁水 12 h 后腹腔注射戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉，通过眼眶后静脉丛采血。血清分离后，采用全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、葡萄糖（GLU）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白（HDL）和低密度脂蛋白（VDL）水平。

1.5 肝脏组织炎症指标和病理学检测

将小鼠抽取血样后，处死，立即摘取肝脏，称量肝重并计算肝指数（肝重/体重×100%）。同时迅速剥离肝脏组织并匀浆，严格按照对应检测试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司）的说明书操作：采用白细胞介素 6（IL-6）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒测定 IL-6 含量，采用白细胞介素 1β（IL-1β）ELISA 试剂盒测定 IL-1β 含量，采用肿瘤坏死因子 α（TNF-α）ELISA 试剂盒测定 TNF-α 含量。另取部分肝组织用 10% 中性甲醛固定，石蜡包埋切片后进行 HE 染色；另一部分肝组织冰冻切片后进行油红 O 染色，光镜下观察脂肪变性及炎症情况。对油红 O 染色切片采用 ImageJ 软件进行半定量分析，即手动勾画肝组织感兴趣区（ROI），避开组织褶皱、破损区域及空白背景；采用统一阈值识别油红 O 阳性脂滴。脂滴面积百分比 = 脂滴阳性面积/ROI 肝组织总面积×100%。

1.6 数据统计和分析

试验数据采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析（One-way ANOVA），组间比较采用 Duncan 氏法，数据以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠体重与肝指数变化

如表 2 所示，试验初始各组小鼠体重无明显差异（ $P>0.05$ ）。试验末时 XTCD60 组小鼠体重显著高于其他各组（ $P<0.05$ ）；XTMCS10 组体重显著高于 XTMRCD60 和 XTMCD60 组（ $P<0.05$ ）；XTMCD60 组体重显著低于其他各组（ $P<0.05$ ）。肝指数方面，XTMRCD60 组显著高于其他各组（ $P<0.05$ ），XTMCD60 组肝指数显著高于 XTCD60 和 XTMCS10 组（ $P<0.05$ ）。

2.2 小鼠血清肝酶活性、血脂及血糖水平

由表 3 可知，血清 GLU 水平在 4 组之间均无显著性差异（ $P>0.05$ ）。肝损伤标志物方面，XTMCD60、XTMRCD60 和 XTCD60 组 AST、ALT 活性均显著高于 XTMCS10 组（ $P<0.05$ ），其中 XTMRCD60 组 AST、ALT 水平在所有组别中最高，XTMCD60 组次之。血脂指标中，与 XTMCS10 相比，XTMRCD60 组血清 TG、LDL 含量显著升高（ $P<$

0.05), XTMCD60 组无显著差异 ($P>0.05$); HDL 水平显著降低 ($P<0.05$), XTCD60 组 HDL 虽略低于呈现相反变化规律, XTMCD60 和 XTMRCD60 组 HDL 对照组, 但二者无显著差异 ($P>0.05$)。

表 2 不同营养水平蛋氨酸对小鼠体重和肝指数的影响

项目	XTMCD60	XTMRCD60	XTCD60	XTMCS10
试验初体重/g	25.42±0.31	25.38±0.29	25.15±0.35	24.77±0.28
试验末体重/g	16.56±0.37 ^d	27.12±0.45 ^e	40.52±0.56 ^a	33.46±0.39 ^b
肝重/g	0.88±0.05 ^e	2.17±0.06 ^a	1.56±0.12 ^b	1.34±0.08 ^b
肝指数/%	5.32±0.23 ^b	8.02±0.35 ^a	3.86±0.19 ^e	4.02±0.21 ^e

注: 同行数据肩标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 字母相同或未标字母表示差异不显著 ($P>0.05$)。下同。

表 3 不同营养水平蛋氨酸对小鼠血清指标的影响

指标	XTMCD60	XTMRCD60	XTCD60	XTMCS10
GLU/ (mmol · L ⁻¹)	2.96±0.21	3.00±0.18	3.28±0.23	3.99±0.25
AST/ (U · L ⁻¹)	76.78±5.32 ^b	170.79±8.45 ^a	17.75±3.18 ^e	8.98±2.46 ^d
ALT/ (U · L ⁻¹)	46.28±4.15 ^b	76.14±6.23 ^a	16.30±2.87 ^e	5.15±2.33 ^d
TG/ (mmol · L ⁻¹)	0.08±0.02 ^b	0.32±0.04 ^a	0.28±0.03 ^a	0.14±0.02 ^b
LDL/ (mmol · L ⁻¹)	0.20±0.03 ^b	0.48±0.05 ^a	0.23±0.03 ^b	0.16±0.02 ^b
HDL/ (mmol · L ⁻¹)	1.01±0.08 ^b	0.68±0.06 ^b	2.10±0.12 ^a	2.90±0.15 ^a

2.3 肝脏组织炎症因子水平比较

如表 4 所示, 与 XTMCS10 组相比, XTMCD60、XTMRCD60、XTCD60 三组小鼠肝脏组织 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量均显著升高 ($P<0.05$), 其中 XTMCD60与 XTMRCD60 组 IL-6、TNF-α 水平无显著

差异, 但均显著高于 XTCD60 组 ($P<0.05$)。提示不同蛋氨酸添加方案均会诱导小鼠肝脏炎症水平上升, 且 XTMCD60、XTMRCD60 对肝脏炎症的刺激作用更强。

表 4 不同营养水平蛋氨酸对小鼠肝脏组织炎症因子含量的影响

pg/mg

炎症因子	XTMCD60	XTMRCD60	XTCD60	XTMCS10
IL-6	156.79±9.45 ^a	148.21±8.76 ^a	117.19±7.32 ^b	89.43±6.28 ^e
IL-1β	27.35±3.12 ^b	35.24±4.21 ^a	17.75±2.87 ^e	12.25±2.15 ^d
TNF-α	232.43±12.56 ^a	245.31±13.42 ^a	159.26±10.87 ^b	85.14±8.35 ^e

2.4 肝脏病理学变化

小鼠肝脏组织病理学结果显示 (图 1), XTMCS10 组小鼠肝脏组织被膜由厚薄均匀的富含弹性纤维致密结缔组织构成, 肝细胞和肝血窦在中央静脉周围大致呈放射状排列, 少见肝细胞小灶性坏死 (红色箭头), 胞核碎裂、溶解, 结构不清晰, 嗜酸性增强, 伴有少量的淋巴细胞浸润 (黑色箭头); 可见多量静脉淤血 (黄色箭头)。

与 XTMCS10 组比较, XTMCD60 组小鼠肝脏组织中广泛可见肝细胞脂肪变性 (绿色箭头), 胞质内可见大小不一的圆形空泡, 细胞体积大, 部分胞核被挤向细胞的一侧; 可见少量肝细胞多灶性坏死 (红色箭头), 胞核固缩、碎裂, 结构不清晰, 伴有少量的

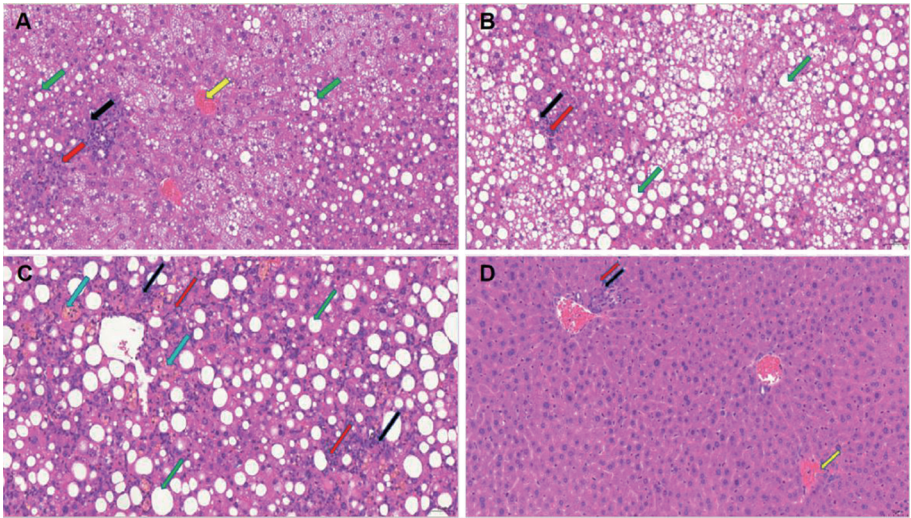
淋巴细胞、粒细胞浸润 (黑色箭头); 可见多量静脉淤血 (黄色箭头)。

XTMRCD60 组小鼠肝脏组织中广泛可见肝细胞脂肪变性 (绿色箭头), 胞质内可见大小不一的圆形空泡, 细胞体积大, 部分胞核被挤向细胞的一侧; 可见少量肝细胞多灶性坏死 (红色箭头), 胞核固缩、碎裂, 结构不清晰, 少量结缔组织轻微增生, 伴有少量的淋巴细胞、粒细胞浸润 (黑色箭头); 可见较多静脉淤血 (黄色箭头)。

XTCD60 组小鼠肝脏组织中广泛可见肝细胞脂肪变性 (绿色箭头), 胞质内可见大小不一的圆形空泡, 胞核被挤向细胞的一侧, 细胞结构不清晰, 排列不规则; 可见少量肝细胞多灶性坏死 (红色箭头),

胞核固缩、碎裂，结构不清晰，周围少量结缔组织增生（灰色箭头），伴有少量的淋巴细胞、粒细胞浸润

（黑色箭头）；可见较多色素沉积（蓝色箭头），可见较多静脉淤血（黄色箭头）。

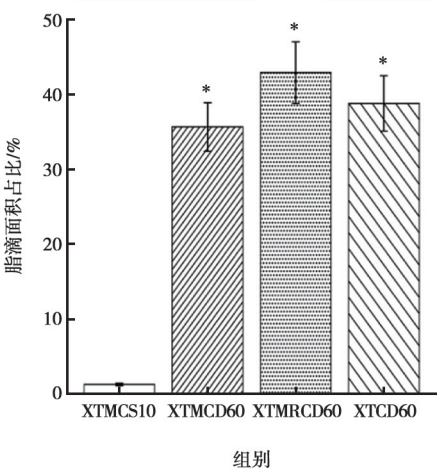
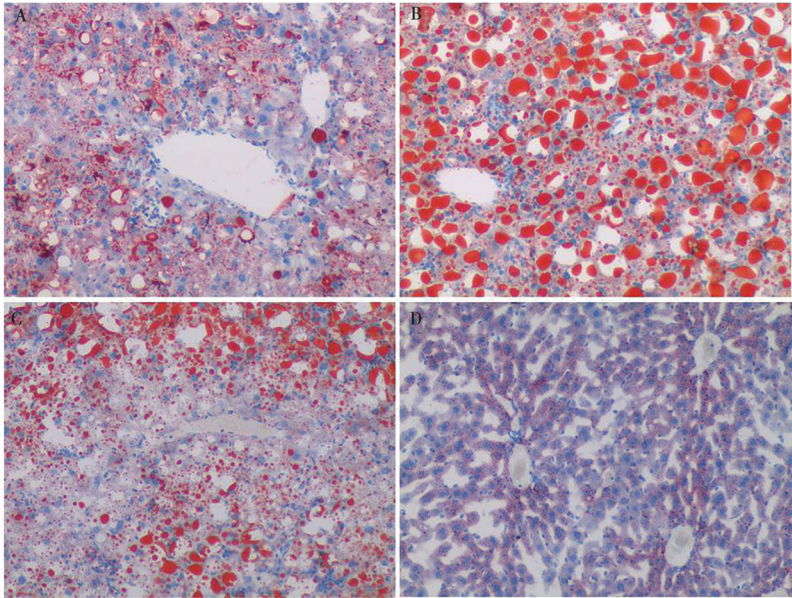


A. XTMCD60 组；B. XTMRCD60 组；C. XTCD60 组；D. XTMCS10 组。

图 1 不同营养水平蛋氨酸对小鼠肝脏组织结构的影响（HE 染色，200×）

油红 O 染色显示（图 2），XTMCS10、XTMCD60、XTMRCD60 和 XTCD60 组的油红 O 染色脂滴面积百分比分别为 $(1.25 \pm 0.18)\%$ 、 $(35.62 \pm 3.25)\%$ 、 $(42.87 \pm 4.12)\%$ 和 $(38.75 \pm 3.68)\%$ 。与 XTMCS10

组比较，XTMCD60、XTMRCD60 和 XTCD60 组小鼠肝组织油红 O 染色脂滴面积百分比显著增加（ $P < 0.05$ ），且 XTMRCD60 组脂滴沉积面积显著高于 XTMCD60 组（ $P < 0.05$ ）。



A. XTMCD60 组；B. XTMRCD60 组；C. XTCD60 组；D. XTMCS10 组。与对照组比，* 表示 $P < 0.05$ 。

图 2 不同营养水平蛋氨酸对小鼠肝脏脂滴沉积面积的影响（油红染色，200×）

3 讨论

近来, MASH 正在不断危害全人类的健康, 而目前尚无有效的应对措施。因此, 为了更好更深入地研究 MASH 的发生、发展过程, 提出有效的预防和治疗方案、建立理想的 MASH 动物模型显得格外重要。在饮食因素诱导 MASH 的过程中, 高脂、高糖、高碳水化合物、高胆固醇以及蛋氨酸和胆碱缺乏等饲料因素起着至关重要的作用^[11]。本研究建立了 3 种不同水平蛋氨酸的胆碱缺乏高脂饲料诱导的 MASH 小鼠模型, 比较 MASH 相关指标, 旨在评估 3 种饲料的优缺点, 为新药的研发提供更优的实验动物造模饲料。

蛋氨酸缺乏和胆碱缺乏饲料常用于在短时间内复刻 MASH^[12]。蛋氨酸缺乏和胆碱缺乏饲料不仅造模时间短, 而且造模成功率较高, 可以很好地复现人类 MASH 炎症、纤维化和肝细胞凋亡等病理表现。因此, 蛋氨酸缺乏和胆碱缺乏饲料也常用于 MASH 的组织学进展及其炎症和纤维化机制研究^[13], 但蛋氨酸缺乏和胆碱缺乏饲料饲喂小鼠容易引起小鼠体重的下降^[14], 甚至死亡, 严重违背了动物福利的准则, 同时蛋氨酸和胆碱均缺乏饲料也不符合正常的饲料情况, 引起小鼠血清 TG 水平的变化也不完全符合 MASH 的病变特征^[15]。Itagaki 等^[16]利用蛋氨酸胆碱均缺乏饲料饲喂 C57BL/6J 小鼠, 结果发现小鼠采食蛋氨酸胆碱均缺乏饲料 2 周后便可出现严重的脂肪性肝炎, 并伴随着 ALT 和 AST 的显著增高, 但小鼠未出现胰岛素抵抗, 这与本试验的结果相符。在本试验中, 小鼠采食 XTMCD60 饲料 6 周后体重下降了 34.85%, 主要是因为 XTMCD60 饲料中蛋氨酸缺乏和胆碱缺乏, 小鼠摄入的营养不足。蛋氨酸是合成载脂蛋白的前体物, 胆碱的缺乏也会导致软磷脂合成不足, 从而引起极 LDL 的合成量下降, 导致 TG 无法运送出肝外, TG 在肝脏内堆积, 引起脂肪变性^[17]。

高脂饲料喂养小鼠是 MASH 造模常采用的方法^[18], 可以有效模拟人类饲料, 但高脂饲料导致小鼠 MASH 发生的时间可长达 3~5 个月, 甚至可达 1 年之久^[19], 无法满足药物的快速筛选的需求。蛋氨酸缺乏胆碱缺乏高脂饲料是以蛋氨酸和胆碱均缺乏饲料为背景的高脂饲料^[20], 研究表明蛋氨酸缺乏胆碱缺乏高脂饲料不仅可以在短时间内引起小鼠的肝脏出现损伤、脂肪堆积, 而且小鼠的体重不会显著变化^[21]。在本试验中, XTMRC60 和 XTCD60 饲料不仅可以在短时间内引起小鼠肝脏脂肪沉积、肝细胞脂肪病变以及炎症反应, 而且小鼠的体质量也未下降, 大大缩减了 MASH 的成模时间, 提高了成模率和动物福

利。ALT 和 AST 是评价动物体肝脏损伤的常用指标^[22]。在本试验中, XTMCD60、XTMRC60 和 XTCD60 饲料均引起小鼠血清 AST 和 ALT 水平的显著升高, 表明小鼠采食这些饲料后肝脏出现明显损伤。本试验中, XTMRC60 饲料诱导的模型更符合新药快速研发需求, 其核心依据如下: 第一, 造模效率高, 6 周即可形成典型的 MASH 病理特征, 包括显著的肝脏脂肪变性、炎症细胞浸润及肝细胞损伤, 而传统高脂饲料造模需 3~5 个月; 第二, 病理特征全面, 该模型同时表现出肝脏指数升高、血清转氨酶 (ALT、AST) 显著升高、炎症因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 大量释放及脂滴沉积明显等多重 MASH 关键病理指标异常, 能更全面地模拟临床 MASH 的病理生理过程, 便于多维度评价药物疗效; 第三, 动物福利更优, 与 XTMCD60 组小鼠体重显著下降 (死亡率风险增加) 相比, XTMRC60 组小鼠体重稳定, 无明显死亡风险, 符合动物伦理 3R 原则; 第四, 模型稳定性好, 组内小鼠的生化指标、病理变化一致性高, 组间差异显著, 能有效区分药物的干预效果, 提高试验重复性。

本试验所构建的利用不同量蛋氨酸胆碱缺乏饲料 XTMCD60、XTMRC60 和 XTCD60 诱导 MASH 雄性 C57 小鼠模型具有造模时间短、模型成功率高、操作简单便捷等特点, 其中 XTMRC60 饲料诱导的肝炎模型还有小鼠病死率低、病变有渐进性过程、便于药物干扰等特点, 为 MASH 发病机制和寻求临床治疗策略的研究提供了强有力的支撑, 是理想的 MASH 动物模型的造模饲料。

参考文献:

- [1] Liu A, Galoosian A, Kaswala D, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: epidemiology, liver transplantation trends and outcomes, and risk of recurrent disease in the graft [J]. J Clin Transl Hepatol, 2018, 6 (4): 420-424.
- [2] Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: an overview [J]. Hepatol Commun, 2020, 4 (4): 478-492.
- [3] Younossi Z M, Koenig A B, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. Hepatology, 2016, 64 (1): 73-84.
- [4] Bhala N, Jouness R, Bugianesi E. Epidemiology and natural history of patients with NAFLD [J]. CPD, 2013, 19 (29): 5169-5176.
- [5] Athyros V G, Boutari C, Stavropoulos K, et al. Statins: an under-appreciated asset for the prevention and the treatment of NAFLD or NASH and the related cardiovascular risk [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2018, 16 (3): 246-253.

- [6] Day C P, James O F W. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114 (4): 842–845.
- [7] Tilg H, Moschen A R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis [J]. *Hepatology*, 2010, 52 (5): 1836–1846.
- [8] Nanji A A. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis [J]. *Clin Liver Dis*, 2004, 8 (3): 559–574.
- [9] Oz H S, Chen T S, Neuman M. Methionine deficiency and hepatic injury in a dietary steatohepatitis model [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53 (3): 767–776.
- [10] Baskol G, Baskol M, Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Clin Biochem*, 2007, 40 (11): 776–780.
- [11] Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (6): 11963–11980.
- [12] Rinella M E, Green R M. The methionine–choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance [J]. *J Hepatol*, 2004, 40 (1): 47–51.
- [13] Machado M V, Michelotti G A, Xie G, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (5): e0127991.
- [14] George J, Pera N, Phung N, et al. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2003, 39 (5): 756–764.
- [15] 吴婷. 非酒精性脂肪性肝病合并病毒性肝炎小鼠模型的建立及其免疫学损伤机制的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [16] Itagaki H, Shimizu K, Morikawa S, et al. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine–choline–deficient diet in C57BL/6 mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6 (12): 2683–2696.
- [17] 李文岗, 张学文, 何尔斯泰, 等. 大鼠脂肪肝模型的建立 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2004, 30 (2): 233–235.
- [18] Pinterić M, Podgorski I I, Popović Hadžija M, et al. Chronic high fat diet intake impairs hepatic metabolic parameters in ovariectomized Sirt3 KO mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (8): 4277.
- [19] Cortez-Pinto H, Borralho P, Machado J, et al. Microbiota modulation with synbiotic decreases liver fibrosis in a high fat choline deficient diet mice model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *GE Portuguese J Gastroenterol*, 2016, 23 (3): 132–141.
- [20] Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Int J Exp Pathol*, 2013, 94 (2): 93–103.
- [21] Lee S, Kwak J H, Kim S H, et al. Comparative study of liver injury induced by high-fat methionine– and choline–deficient diet in ICR mice originating from three different sources [J]. *Lab Anim Res*, 2019, 35: 15.
- [22] Zhang S, Lu B, Han X, et al. Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55: 60–69.