



长爪沙鼠 NAFLD 模型的建立及其遗传学的研究

刘月环¹, 吴旧生², 应华忠¹, 徐承富², 石巧娟¹, 余陈欢¹

(1. 浙江省医学科学院, 杭州 310013; 2. 浙江大学, 杭州 310058)

【摘要】 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 已成为目前主要代谢性疾病之一, 针对传统的动物模型的缺陷, 本研究首次建立了与人类 NAFLD (从单纯脂肪肝到脂肪性肝炎, 再进展到肝纤维化、肝硬化) 极为相似、饲料配方简便的长爪沙鼠 NAFLD 模型, 阐明了长爪沙鼠肝脏脂肪快速沉积的特征, 揭示长爪沙鼠脂肪肝易感的分子机制、主要的调控靶点和网络作用特征, 为临床治疗及新药研发提供一种背景相对清晰, 耗时短的新型脂肪肝动物模型, 同时也为 NAFLD 发病机制及药效新靶点的研究提供实验动物支撑, 为选育近交系 NAFLD 长爪沙鼠奠定了理论与实践基础。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病; 长爪沙鼠模型; 遗传基础

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0009-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.004

Preliminarily genetic characterizations of nonalcoholic fatty liver disease mongolian gerbil

LIU Yue-huan¹, WU Jiu-sheng², YING Hua-zhong¹, XU Cheng-fu²,
SHI Qiao-juan¹, YU Chen-huan¹

(1. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2. Zhejiang university, Hangzhou 310058)

【Abstract】 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become one of the major metabolic diseases. In view of the defects of traditional animal models, this study was the first to establish the NAFLD model of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) with simple feed formula which is similar to human (from simple fatty liver to steatohepatitis, fibrosis, Liver cirrhosis). This study discussed the mechanism of rapid fatty liver deposition in Mongolian gerbil, revealed its molecular mechanism, main regulatory target and network function of fatty liver susceptibility. We provide a new animal model of NAFLD with relatively clear background and less time-consuming for clinical treatment and new drug development. The theoretical and practical basis for the breeding of inbred strain NAFLD gerbil was established.

【Key words】 Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); Mongolian gerbil; Genetic Characterizations

1 研究背景

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的病理谱包括单纯性脂肪肝

(Simple fatty liver)、脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化 (hepatic Fibrosis) 和肝硬化 (hepatocirrhosis) 等一系列相互联系病程变化, 其发生与肥胖、高血压、高血糖、血脂异常

【基金项目】 浙江省自然科学基金 (Y3080126, Y3110366, LY16H030011); 浙江省科技厅公益技术应用研究项目 (2011C37096, 2015C37102); 浙江省医药卫生平台重点项目 (2011ZDA002); 浙江省医药卫生优秀青年人才基金 (2007QN001); 浙江省医学科学院优秀青年科技人才基金 (A80703Q)。

【通讯作者】 刘月环, 女, (1974-), 博士后, 副研究员, 研究方向: 生物技术与医学实验动物模型。E-mail: yuehuanliu@163.com

等代谢性疾病密切相关。伴随着我国人口老龄化日益严重、生活水平的提高和肥胖的产生, NAFLD 发病率越来越高。因此, 探讨 NAFLD 的发病机制及防治手段已成为我国医学研究的重点之一。由于传统模型的缺陷, 使得该病的研究尚未有实质性突破。实验动物遗传育种学是基于动物本身的遗传特性, 利用传统和现代的生物技术手段, 培育新的动物品种品系, 也包括将家养动物和野生动物进行实验动物化, 以服务于研究与应用。自 1978 年以来, Z:ZCLA 长爪沙鼠逐渐从野生到实验动物化, 建群封闭群及保种工作也已完善, 从 2003 年到 2015 年间连续获国家科技支撑计划的支持, 被列入国家保种试点, 但对封闭群的定向培育一直未开展。

1.1 实验长爪沙鼠的驯化、两个级别封闭群的建立及第一次产业化

ZCLA 长爪沙鼠是浙江省实验动物中心自 1978 年以来从野生驯养到实验动物的啮齿类动物, 朱智勇等于 1983 年起用该动物研制并生产了人用流行性出血热疫苗, 产值曾过亿元, 为我国的流行性出血热疫病防控起了重大作用, 获 2000 年度国家科技进步一等奖。到 2000 年前后 ZCLA 建立了屏障系统核心群, 完成开放与屏障两个封闭生产群的生物学特性研究, 获 2002~2003 浙江省科技进步奖和浙江省医药卫生科技创新奖。2003~2015 年间又列入国家科技支撑计划资助的特种实验动物保种试点(长爪沙鼠保种点)。到目前为止, 该封闭群已成为国内保种维持时间最长、特性稳定、应用单位最多、使用量最大、其基本生物学特性研究较系统的第一个封闭群^[1]。虽然前 30 年里该动物在实验动物领域取得一定成绩, 但随着实验动物行业的成长, ZCLA 长爪沙鼠在资源利用的深度、广度方面还有待于进一步提升。因此, 为了提高其利用的科技含量, 就需从其特有的性能出发, 利用最新的技术对其深入的研究与定向选育。

1.2 NAFLD 动物模型

全国血脂异常的人群大于 1.6 亿, 而确诊为非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的人数约占成人的 20%^[2], 因此研究 NAFLD(高脂血症)探索发病机理和筛选治疗药物是今后的一项长期工作。理想的 NAFLD 动物模型是研究工作获得进展与成功的前提之一^[3], 包括具备人类 NAFLD 的特征, 相对明显的病程分期: 单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化, 符合人类脂肪肝的演变过程; 造模方法

简易, 成模率高, 死亡率低; 造模停止后病变逆转有一个过程, 便于实施药物干预试验。

目前国内实验室使用最多的是小鼠, 但小鼠缺乏胆固醇转运蛋白(CETP), 血清脂蛋白构成(HDL-C 占 70%)、脂质代谢过程与人类存在较大差异^[4]。兔和豚鼠因是草食动物且血清 HDL 比例过高, 脂类代谢的其他成份与人类相差大。金黄地鼠模型是易形成高 TG 血症, 但未见有 NAFLD 的报道^[5]。大动物如猴、猪、犬等的病变与人类相似, 但繁殖周期长, 使用成本高。高脂诱导的禽类模型因脂代谢与人类差异大而仅在上个世纪用于早期脂肪肝研究。即使是目前最常用的大鼠也与人类有较大区别, 血清 HDL-C 比例高达 80% (人类只占 30%), 血浆中 CETP 的活性仅为人类的 14%, 耐受高脂, 极难形成肝纤维化, 在连续高脂饲养 48 周以上才能形成 NAFLD 肝纤维化但存活率不足 10%^[6], 而 CCl₄ 诱发的大鼠肝纤维化无法连续观察脂肪性肝纤维化发生发展的动态过程。Hegsted 等^[7]、Sullivan 等^[8]及钟民涛等^[9]相继证实沙鼠对高脂敏感且能维持高脂血症。作者课题组自 2005 年来开始了长爪沙鼠高脂血症的研究, 建立了长爪沙鼠 NAFLD 模型^[10], 特色是成模时间短(1~12 周)、性状典型(脂质以 LDL 颗粒为主, 血清游离胆固醇含量约占总含量 30% 左右, 能形成单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化, 与人类 NAFLD 极为相似)、饲料配方简便(不需要抑制甲状腺药物)。另外多年封闭的 ZCLA 老龄沙鼠有自发性高脂血症现象, 且存在家系及性别间的差异。因此有必要从三个方面对 ZCLA 长爪沙鼠进行研究: 一是模型的建立及检测方法; 二是特色评价, 即成模的机理方面(诱发型快速成模与自发型成模); 三是对模型易感的遗传学研究, 以最终建立近交系为目的而进行高效的遗传标记的筛选和评价。

2 研究目的

针对后基因组时代, 长爪沙鼠也需要用新技术进行深入研究才能可持续发展。目前使用的动物模型不同程度地存在着诸多缺陷, 寻求与人类病程极为相似, 方法简便易行, 成模率高并且在评价封闭群遗传结构的基础上, 能为近交系的选育确定遗传标记成为我们的主要目的。

本研究自行配制了简便的饲料, 首次建立快速成模的诱发型 NAFLD 模型, 对于封闭群进行长期的

观察,首次发现了老龄自发型模型,并采用临床常用的血清电泳检测技术对模型进行分型与评价,同时建立了评价模型的肠道微生物的 PCR-DGGE 技术;其次用转录组测序技术,对诱发型长爪沙鼠模型及自发型长爪沙鼠模型进行深度测序,找出与长爪沙鼠快速成模及自发成模的一些高表达基因和差异显著的 pathways;第三,从经典的理论与密切相关的基因出发,用候选基因法,免疫组化法预测功能来评定基因与沙鼠高脂血症的相关性;最后,在 ZCLA 封闭群中取大样本,涵盖了两个微生物等级的生产群,对选定的基因的 SNP 进行遗传多样性评价,确定其作为 NAFLD 遗传标记进行近交系选育的潜力。

3 创新点

首次建立了长爪沙鼠 NAFLD 模型,阐明了长爪沙鼠肝脏脂肪快速沉积的特征,揭示了长爪沙鼠脂肪肝易感的分子机制、主要的调控靶点和网络作用特征,为临床治疗及新药研发提供一种背景相对清晰,耗时短的新型脂肪肝动物模型,同时也为 NAFLD 发病机制及药效新靶点的研究提供依据和实验动物支撑,为选育近交系 NAFLD 长爪沙鼠奠定了理论与实践基础。

4 讨论

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)模型目前采用比较多的做法是对常用的封闭群动物,引入高脂、高糖饮食法或化学肝损、药物肝损等控制因素,使之形成脂肪肝,或采用改造基因组等办法(即转人源基因、自身基因敲除等形成的特定近交系),但 NAFLD 的形成是多基因所致,很难归咎于单基因异常,另外由于同时删除两个或两个以上基因的动物模型在技术上操作难度大等一系列原因使其未能成为质优价廉的 NAFLD 动物模型。本研究促进科技的作用表现在:利用高脂饲料诱导并建立了沙鼠

NAFLD 模型,用肠道微生物的特征来评价造模成功的方法,获得了沙鼠模型基因转录水平的 10 个特色,初步阐明了其遗传学基础。同时结合老龄动物自发高脂血症倾向,用候选基因法研究了 APOE, LCAT 两个候选基因与长爪沙鼠高脂血症(非酒精性肝病)的相关性,为将其作为培育近交系的遗传标记打下了基础,这些均是在国外首次开展与报道。

参考文献:

- [1] 刘月环. 长爪沙鼠 β -防御素基因(def β 1-83)的克隆与鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 70-74.
- [2] FAN JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China[J]. J Hepatol, 2009, 50(1): 204-210.
- [3] Kris-Etherton PM, Dietschy J. Design criteria for studies examining individual fatty acid effects cardiovascular disease risk factors: human and animal studies[J]. Am J Clin Nutr, 1997, 65(suppl): 1590S-1596S.
- [4] Moghadasian MH, Frohlich JJ, McManus BM. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis[J]. Lab Invest, 2001, 81(9): 1173-1183.
- [5] 施新猷, 顾为望. 人类疾病动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 342-345.
- [6] Temmerman AM, Vonk RJ, Niezen-Koning K, et al. Effects of dietary cholesterol in the Mongolian gerbil and the rat: a comparative study[J]. Laboratory Animals, 1997, 23, 30-35.
- [7] Hegsted DM, Gailagher A. Dietary fat and cholesterol and serum cholesterol in the gerbil[J]. J Lipid Res, 1967, 8(3): 210-214.
- [8] Sullivan MP, Cerda JJ, Robbins FL, et al. The gerbil, Hamster, and Guinea pig as rodent models for hyperlipidemia[J]. Lab Anim Sci, 1993, 43(6): 575-578.
- [9] 钟民涛, 王迎, 卢静, 等. 长爪沙鼠的高脂血症与动脉粥样硬化相关性分析[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6): 321-324.
- [10] 徐黎明, 石巧娟, 徐磊, 等. 蒙古沙鼠非酒精性脂肪性肝病模型的建立与评价[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(11): 1-2, 7.

[收稿日期] 2016-12-30