

油酸诱导花鲈肝细胞脂肪沉积模型的建立及二甲双胍对脂肪沉积的影响

李磊, 周文豪, 蔡林森, 鲁康乐, 张春晓

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为研究鱼类脂肪肝的发生机制及控制方法, 以及研究二甲双胍对花鲈肝细胞脂肪沉积的缓解作用, 以花鲈原代肝细胞为研究对象, 通过油酸诱导的方法建立肝细胞脂肪沉积模型, 用不同浓度的油酸(0、0.2、0.4、0.8 mmol/L)培养花鲈原代肝细胞, 并测定细胞内甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)及上清液谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)水平, 确定油酸适宜浓度。同时, 利用此模型观察二甲双胍对脂肪沉积的影响。研究结果显示: 0.4 mmol/L油酸诱导培养肝细胞48 h, 肝细胞TG及TC含量显著高于对照组, 上清液AST、ALT与LDH活性显著高于对照组, 细胞内有明显脂肪滴, 且此时肝细胞存活率较高, 肝细胞变形较多。在此基础上, 观察研究二甲双胍对花鲈肝细胞脂肪沉积的影响, 设对照组、油酸和二甲双胍组, 培养肝细胞48 h, 收集细胞和上清液。结果显示, 二甲双胍可显著降低肝细胞TG、TC的含量, 以及上清液AST、ALT与LDH的活性。综上所述, 用含0.4 mmol/L油酸培养基培养肝细胞48 h可建立肝细胞脂肪沉积模型, 二甲双胍可缓解油酸引起的肝细胞脂肪沉积。

[关键词] 花鲈; 肝细胞; 脂肪沉积; 二甲双胍

[中图分类号] S 963

Oleic Acid Inducing Hepatocyte Steatosis Model in Seabass (*Lateolabrax japonicus*) and Effect of Metformin on Fat Deposition

LI Lei, ZHOU Wenhao, CAI Linsen, LU Kangle, ZHANG Chunxiao

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, primary hepatocyte of seabass (*Lateolabrax japonicus*) was used to establish the hepatocyte steatosis model by oleic acid. Then, based on this, effect of metformin on fat deposition in hepatocyte was studied. Hepatocytes were isolated and purified with trypsin digestion and then cultured with different concentrations of oleic acid(0, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/L) for 48 h, and the supernatants as well as hepatocytes were collected. Triglyceride(TG) and total cholesterol(TC) levels of hepatocytes, and activities of alanine aminotransferase(AST), aspartate aminotransferase(ALT) and lactate dehydrogenase(LDH) in supernatants were measured. Also, the survival rate of hepatocytes was determined using the MTT method. The results showed that treated with 0.4 mmol/L oleic acid for 48 h significantly elevated($P < 0.05$) the levels of TG and TC of hepatocytes and the activities of AST, ALT and LDH in supernatants. Based on this, the effect of metformin on fat

[收稿日期] 2019-03-24

[基金项目] 中国水产科学研究院基本科研业务费和农业部海洋渔业可持续发展重点实验室开放课题(2018HY-XKQ01); 现代农业产业技术体系(CARS-47); 福建省高校杰出青年科研人才计划项目(B17162)

[作者简介] 李磊(1996—), 男, 硕士生, 主要从事鱼类脂质营养与代谢的研究。通信作者: 鲁康乐(1986—), 男, 副教授, 硕导, 从事水产动物营养与饲料的研究。E-mail: lukangle@jmu.edu.cn

deposition was studied. The study was designed with three treatments: control medium, oleic acid (0.4 mmol/L), oleic acid(0.4 mmol/L) and metformin(1 mmol/L). After 48 h culture, the hepatocytes and supernatants were collected and then the biochemical parameters were determined. The results showed that metformin could significantly decrease($P < 0.05$) TG and TC levels of hepatocytes and activities of AST, ALT and LDH in supernatants. In summary, hepatocyte steatosis was established by treating with 0.4 mmol/L oleic acid for 48 h, metformin could attenuate hepatocyte steatosis.

Keywords: *Lateolabrax japonicus*; hepatocyte; steatosis; metformin

0 引言

鱼类营养性脂肪肝病是养殖鱼类最常见的营养代谢疾病,其特征为肝脏内脂肪沉积过多、病鱼生长缓慢、饲料系数升高、抗应激能力下降,当遭受高温、高氨氮等环境应激时会导致群体死亡,严重影响鱼类养殖的健康可持续发展^[1-2]。虽然,产业界进行了多年的防控实践,但因对其发生机制缺乏深入了解,不能有效防止其发生。因此,开展鱼类营养性脂肪肝发生机制及调控的研究较为迫切。

为研究鱼类脂肪肝的发生机制,众多学者运用动物模型和体外细胞模型开展相关研究。细胞模型具有条件可控、实验周期短、干扰因素少等优点,被广泛应用于脂肪肝的研究^[3]。因此,本实验旨在建立肝细胞脂肪沉积模型,为研究鱼类脂肪肝的发生机制提供实验材料。花鲈是一种海水肉食性鱼类,因味道鲜美而被广泛养殖,其年产量位居全国海水鱼产量第3位,但在养殖过程中易发脂肪肝,这是限制其健康养殖的主要因素之一^[4-5]。目前对花鲈脂肪肝的研究较少,其体外细胞模型尚未见报道。相比体外细胞模型,活体脂肪肝模型因实验周期长、干扰因素多等原因,使研究存在一定的困难。为此,参考哺乳动物的体外细胞模型的方法,本研究将采用油酸诱导的方法建立花鲈原代肝细胞脂肪沉积模型,为后期研究花鲈的脂肪肝发生提供实验材料。

二甲双胍,为一种医学上最广泛使用的降脂药物^[6]。有研究表明,二甲双胍对哺乳动物的脂肪肝有一定的治疗作用^[7-8],但二甲双胍对鱼类脂肪肝是否有缓解作用尚不得而知。本实验将探讨二甲双胍对鱼类脂肪肝的缓解作用,以期对鱼类脂肪肝的调控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼:体重约为 50 g 的健康花鲈。

实验试剂:L-15 培养基、胎牛血清、PBS 溶液、青链霉素混合液,购自美国 Thermo Fisher 公司;油酸(oleic acid, OA)购自美国 Solarbio 公司;甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒购自南京建成科技有限公司。

1.2 花鲈原代肝细胞的分离与培养

无菌条件下于超净工作台内取花鲈肝脏,用 75% (体积分数) 医用酒精浸泡灭菌 30 s,取出放置于 10 mL 离心管内,加入含 1% (体积分数) 青链霉素混合液的 PBS 缓冲液,用灭菌手术剪剪碎至 1 mm 大小,再用 PBS 缓冲液清洗三次,至上清液澄清;加入 0.25% (体积分数) 的胰蛋白酶,充分吹打,于室温下消化 10~15 min;过 100 目细胞过滤筛,1500 r/min 离心 5 min,弃上清;再加入红细胞裂解液裂解 7 min,1000 r/min 离心 4 min,弃上清,若还有红细胞残留,则重复此步骤;然后加入含 15% (体积分数) 胎牛血清的 L-15 培养基重悬,按细胞悬液与 60% (体积分数) percoll 分离液 1:2 (体积比) 进行分离,4 °C,5000 r/min 离心 3 min,弃上清;用培养基重悬细胞,用细胞计数器计数,细胞接种密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。计数结束后将细胞接种于培养瓶中,于 25 °C 条件下培养。

1.3 不同油酸浓度培养基培养原代肝细胞

将花鲈肝细胞接种于 12 孔板上,将其分为 4 个浓度处理组,每个浓度设置 3 个重复,待细胞完

全贴壁后, 分别加入不同浓度的油酸 (0、0.2、0.4、0.8 mmol/L, 油酸浓度参考文献 [9]), 分别培养细胞 24, 48 h。培养前先将油酸与 NaOH 溶液进行皂化以生成油酸钠, 然后按设定浓度添加到各组培养基中。

1.4 肝细胞存活率测定

培养结束后, 向每个孔内加入 50 μ L 5 mg/mL MTT 溶液, 孵育 4 h, 随后弃上清, 每孔加入 DM-SO 溶液 150 μ L, 于平板摇床上摇匀, 使其形成均一的蓝色溶液, 测定其在 570 nm 波长的吸光度值 A , 计算细胞存活率, 公式为: 细胞存活率 (%) = $[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}})/(A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.5 肝细胞脂肪沉积与生化指标的分析

油红 O 染色: 将油酸处理 24、48 h 后的细胞移除掉培养基, 先用 PBS 清洗两次, 再用 ORO Fixative 固定液固定 30 min; 弃去固定液, 用蒸馏水浸洗两次, 加入 60% (体积分数) 异丙醇浸洗 5 min; 弃去异丙醇, 加入新配制的 ORO Stain, 浸染 20 min; 弃去染液, 水洗三次, 直至无多余染液; 加入 Mayer 苏木素染色液, 复染核 1~2 min; 弃去染液后水洗 2~5 次; 加入 ORO Buffer 1 min, 弃去; 加入蒸馏水覆盖细胞并在显微镜下观察。

上清液 AST、ALT 与 LDH 的测定: 将细胞培养板中的上清液收集在离心管中, 置于离心机中以 1000 r/min 的转速在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min, 得到上清液, 然后参照南京建成试剂盒说明书进行测定。

肝细胞 TG 与 TC 含量的测定: 吸去上清液之后, 使用预冷的 PBS 缓冲液清洗板底 2~3 次, 然后可以使用细胞刮刀将细胞直接刮下来, 或者用 0.25% (体积分数) 的胰蛋白酶室温消化 5 min 左右, 加含血清的新鲜培养基终止消化, 用枪头轻轻吹打使细胞脱落, 再将所有液体吸出转移至离心管后, 1000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃去上清留细胞沉淀, 使用适量预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞, 以同样的条件再次离心, 弃上清保留沉淀待用。TG 与 TC 含量的测定参照南京建成试剂盒说明书。

1.6 二甲双胍对肝细胞脂肪沉积的影响

实验设置 3 个处理组: 对照组、油酸组、二甲双胍组。对照组: 用正常培养基培养花鲈原代肝细胞; 油酸组: 在正常培养基中加入 0.4 mmol/L 油酸 (此浓度根据 1.3 部分筛选); 二甲双胍组: 在油酸组的基础上加入 0.2 mmol/L 的二甲双胍 (据前期研究, 此浓度为对细胞无伤害作用的最高浓度)。培养肝细胞 48 h 后, 收集细胞, 测定相关指标。

1.7 数据统计

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析处理, 采用单因素方差分析法 (one-way ANOVA Duncan) 进行显著性分析, 结果以平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm SE) 表示。

2 结果

2.1 培养基油酸浓度对原代肝细胞存活率的影响

结果如表 1 所示, 培养基油酸的不同浓度显著影响肝细胞存活率。培养 24 h 后, 随油酸浓度的升高, 肝细胞存活率呈下降趋势, 当油酸浓度为 0.4 mmol/L 时, 存活率为 84%; 当油酸浓度为 0.8 mmol/L 时, 细胞存活率只有 41%, 显著低于其他各组。培养 48 h 后, 0.4 和 0.8 mmol/L 油酸组的细胞存活率进一步降低。

表 1 培养基油酸浓度对原代肝细胞存活率的影响

Tab. 1 Effects of oleic acid levels on the survive of primary hepatocytes

培养时间/h Incubation time	培养基油酸浓度 Concentration of oleic acid in cell culture medium/(mmol \cdot L $^{-1}$)			
	0	0.2	0.4	0.8
24	98.00 \pm 1.10 ^a	97.00 \pm 1.00 ^a	84.00 \pm 1.00 ^b	41.00 \pm 3.03 ^a
48	96.00 \pm 2.10 ^a	95.00 \pm 1.01 ^a	67.00 \pm 1.00 ^b	36.00 \pm 1.00 ^a

说明: 同一行上标间不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: In the same row, values with different letter superscripts mean significant differences ($P < 0.05$).

2.2 培养基油酸浓度对原代肝细胞脂肪含量的影响

由表 2 可知: 经不同浓度的油酸处理后, 肝细胞内的 TG 和 TC 含量都有不同程度上升; 油酸浓度为 0.4 mmol/L 时, 培养 24, 48 h 后, 细胞内 TG 和 TC 含量均显著高于其他各组, 说明 0.4 mmol/L 的油酸浓度能够诱导原代肝细胞的脂肪沉积。

表 2 培养基油酸浓度对原代肝细胞甘油三酯(TG)和胆固醇(TC)含量的影响

Tab. 2 Effects of oleic acid levels on TG and TC contents of primary hepatocytes

指标 Index	培养时间/h Incubation time	培养基油酸浓度 Concentration of oleic acid in cell culture medium/(mmol · L ⁻¹)			
		0	0.2	0.4	0.8
$\rho(\text{TG})/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	24	58.16 ± 0.32 ^a	61.33 ± 0.65 ^b	112.17 ± 1.05 ^d	84.40 ± 0.64 ^c
	48	56.77 ± 0.83 ^a	133.70 ± 0.95 ^c	145.47 ± 0.53 ^d	123.43 ± 0.49 ^b
$\rho(\text{TC})/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	24	51.71 ± 0.88 ^a	63.30 ± 1.2 ^b	91.40 ± 0.55 ^d	73.71 ± 1.76 ^c
	48	53.00 ± 2.04 ^a	96.71 ± 0.23 ^b	114.50 ± 0.91 ^d	103.00 ± 1.15 ^c

说明: 表格中同行上标间不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: In the same row, values with different letter superscripts mean significant differences ($P < 0.05$).

2.3 上清液中 AST、ALT 与 LDH 活性

由表 3 可知: 经不同浓度的油酸处理后, 上清液的 AST、ALT 与 LDH 活性 (z) 都有不同程度上升。油酸浓度为 0.4 mmol/L 时, 培养 24, 48 h 后, 上清液的 AST、ALT 活性均显著高于其他各组, 说明这一处理的肝细胞损伤较严重; 而上清液 LDH 活性, 油酸 0.2 mmol/L 组显著高于其他各组。

表 3 培养基油酸浓度对上清液中 AST、ALT 和 LDH 活性的影响

Tab. 3 Effects of oleic acid levels on AST, ALT and LDH activities in supernatant

酶活性 Enzyme activity	培养时间/h Incubation time	培养基油酸浓度 Concentration of oleic acid in cell culture medium/(mmol · L ⁻¹)			
		0	0.2	0.4	0.8
$z(\text{AST})/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	24	5.95 ± 0.22 ^a	14.53 ± 0.46 ^b	20.01 ± 0.46 ^c	14.15 ± 0.51 ^b
	48	5.32 ± 0.34 ^a	6.87 ± 0.34 ^b	9.04 ± 0.44 ^c	11.47 ± 0.26 ^d
$z(\text{ALT})/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	24	8.57 ± 0.32 ^a	14.76 ± 0.21 ^b	18.07 ± 0.75 ^d	11.66 ± 0.49 ^c
	48	7.53 ± 0.55 ^a	24.90 ± 0.55 ^c	27.14 ± 0.37 ^d	20.42 ± 0.55 ^b
$z(\text{LDH})/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	24	20.11 ± 0.64 ^a	36.49 ± 0.98 ^d	24.57 ± 1.29 ^b	29.41 ± 1.34 ^c
	48	18.24 ± 0.98 ^a	32.39 ± 1.71 ^c	26.44 ± 1.34 ^b	23.08 ± 1.34 ^b

说明: 表格中同行上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: In the same row, values with different letter superscripts mean significant differences ($P < 0.05$).

2.4 二甲双胍对花鲈原代肝细胞脂肪沉积的影响

由表 4 可知: 与对照组相比, 油酸组 TG、TC 含量均有不同程度升高, AST、ALT、LDH 活性上升; 二甲双胍组相比高脂组, 其各项数据均下降。由此可见, 二甲双胍可缓解由油酸引起的肝细胞脂肪沉积与肝细胞损伤。

表 4 二甲双胍对肝细胞脂肪沉积的影响

Tab. 4 Effects of metformin on fatty deposition of hepatocytes

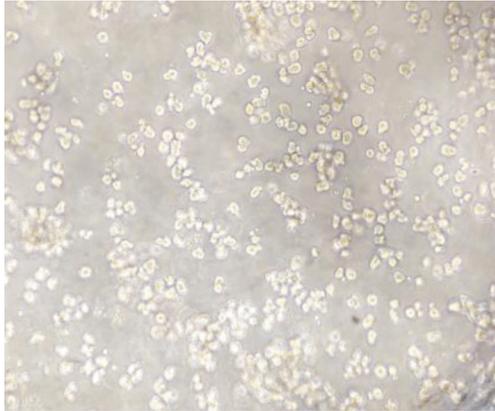
指标 Index	对照组 Control group	0.4mmol/L 油酸组 Oleic acid group	二甲双胍组 Metformin group
$\rho(\text{TG})/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	47.25 ± 0.17 ^a	56.94 ± 0.72 ^c	50.71 ± 0.95 ^b
$\rho(\text{TC})/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	80.11 ± 2.10 ^a	110.01 ± 2.01 ^c	96.00 ± 1.10 ^b
$z(\text{AST})/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	4.42 ± 0.16 ^a	6.14 ± 0.25 ^c	5.25 ± 0.22 ^b
$z(\text{ALT})/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	8.99 ± 0.46 ^a	13.90 ± 0.28 ^c	10.66 ± 0.38 ^b
$z(\text{LDH})/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	17.05 ± 0.41 ^a	26.44 ± 1.34 ^b	20.12 ± 0.65 ^a

说明: 同行上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

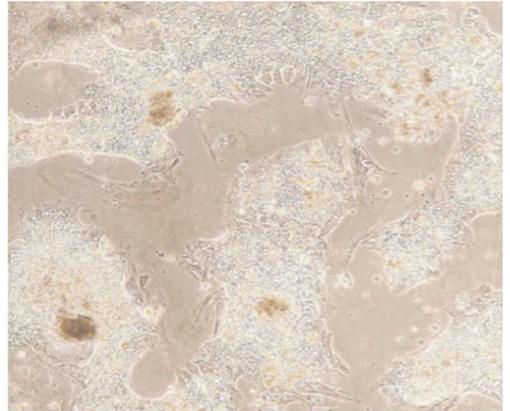
Note: In the same row, values with different letter superscripts mean significant differences ($P < 0.05$).

2.5 花鲈原代肝细胞的形态学观察

如图 1a 所示, 用胰蛋白酶消化法分离的原代肝细胞生长状态良好, 刚消化下来的细胞形态圆润, 单个散在分布, 呈透明球形。接种后 6 h 开始贴壁, 24 h 后基本全部贴壁, 少数未贴壁细胞为消化过度而死亡的细胞。48 h 后, 细胞变形显著、代谢旺盛、活力强, 贴壁后的细胞相互联结, 细胞扁平呈铺路石样 (见图 1b)。此外, 油红 O 染色结果显示, 空白对照组细胞内可见少量脂滴, 用 0.4 mmol/L 油酸培养基培养肝细胞 24 h 后, 细胞内脂滴数显著增加, 肝细胞脂肪滴沉积较多 (见图 2b)。



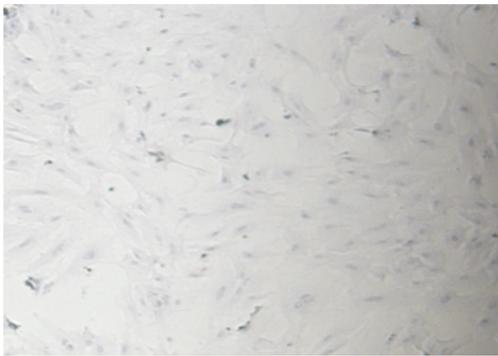
a) 刚分离的肝细胞
Newly isolated hepatocytes



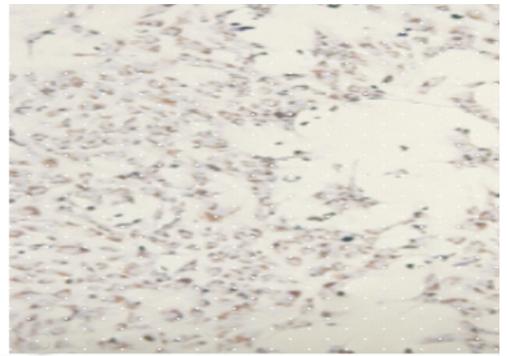
b) 培养 48 h 的原代肝细胞
Primary hepatocytes cultured for 48 hours

图 1 培养的花鲈原代肝细胞

Fig.1 Cultured primary hepatocytes of *Lateolabrax japonicus*



a) 对照组
Control group



b) 0.4 mmol/L 油酸组
0.4 mmol/L oleic acid group

图 2 油酸培养的原代肝细胞油红 O 染色

Fig.2 Oil red O staining of primary hepatocytes cultured with oleic acid

3 讨论

鱼类脂肪肝给养殖业带来巨大的经济损失^[10-11], 但目前因对发生机制缺乏了解而不能有效遏制其发生。为了准确、方便地研究脂肪肝的发生机制, 合适的实验材料不可或缺, 因此本实验以花鲈原代肝细胞作为实验材料来构建肝细胞脂肪过度沉积模型, 可以模拟在体鱼类肝脏脂肪沉积, 使实验材料获取便利, 同时缩短筛选抗脂肪物质的实验周期。已有科研工作者使用酒精、化学药物、脂肪乳等成功构建了肝细胞脂肪过度沉积模型^[3,12-14]。因鱼类脂肪肝发生的主要原因是脂肪摄入过多, 本研究用油酸作用于花鲈肝细胞, 能更好地模拟实际养殖过程中的脂肪沉积现象。

本研究设置不同浓度油酸 (0, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/L) 与花鲈原代肝细胞共培养 24, 48 h, 诱导肝细胞发生脂肪沉积。从脂肪沉积的效果看: 油酸浓度为 0~0.4 mmol/L 范围内时, 脂肪沉积随油

酸浓度升高而升高,但当油酸浓度为 0.8 mmol/L 时,脂肪沉积反而会较 0.4 mmol/L 时低,这可能是由于过高的油酸浓度会导致肝细胞凋亡或死亡增多,或者负反馈而抑制脂肪的吸收。本实验中的肝细胞存活率也进一步证实了这点,当油酸浓度为 0.8 mmol/L 时,肝细胞的存活率会显著低于其他各组。综合细胞存活率和脂肪沉积的指标,当油酸浓度为 0.4 mmol/L 时,比较适合构建花鲈原代肝细胞脂肪沉积模型。此外,对肝细胞的形态进行分析发现,当培养 48 h 后,肝细胞变形增多,细胞呈岛状,比较符合原代肝细胞特征,且细胞存活率大于 60%,能够达到细胞收集的要求。因此,油酸浓度为 0.4 mmol/L 培养 48 h 的肝细胞比较适合作为研究花鲈肝细胞脂肪沉积的体外模型的实验材料。

谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 是临床上常被用来判定肝脏是否损伤的经典指标,在肝炎、脂肪肝等疾病测定时均有重要的指示意义,这两种转氨酶在血清中活性的升高,常作为肝脏功能异常的依据^[15-17]。同时本实验测定了上清液中 AST、ALT 的活性,在培养 24 h 后,各浓度油酸组的转氨酶活性均高于对照组,说明肝细胞已经受到了损伤,而导致转氨酶释放到上清液中,这也与用高脂饲料投喂鱼体会导致血清转氨酶活性增高的现象一致^[18]。此外,乳酸脱氢酶 (LDH) 是广泛存在于肝、肾等组织中的酶,任何原因导致的肝细胞损伤都可以导致 LDH 从胞质内逸出,导致培养液中的 LDH 含量升高^[19-20]。本实验测定的各油酸组 LDH 活性均高于对照组,也证实了油酸培养会导致肝细胞的损伤,而这种损伤正是由于脂肪过度沉积导致的,与活体养殖实验相似。且 0.2 mmol/L 油酸组上清液中 LDH 活性最高,显著高于其他各组。低浓度油酸组反而会比高浓度油酸组 LDH 活性高的原因在于,高浓度的油酸组有较低的细胞存活率,细胞数量少了使所产生 LDH 的量也会减少,因此上清液中活性会低。

二甲双胍是一种经典的降脂药物,它通过抑制线粒体复合物 I 和线粒体的氧化磷酸化,激活 AMPK 途径,促进脂肪酸进行 β 氧化,减少脂肪合成,从而达到对脂肪代谢的改善作用^[21-23]。本实验为了进一步探究鱼类脂肪肝的防治方法,也选用了二甲双胍,研究其对肝细胞脂肪沉积的改善作用。本实验结果表明,二甲双胍对油酸诱导的花鲈肝细胞脂肪沉积模型有缓解作用,可作为鱼类脂肪肝防治的药物之一。

4 结论

本实验用油酸诱导法建立了花鲈肝细胞脂肪沉积模型,当油酸浓度为 0.4 mmol/L,与肝细胞培养 48 h,肝细胞脂肪沉积严重,与活体呈现相同的脂肪肝症状。这为研究花鲈的脂肪肝发病机制提供了实验材料。此外,本实验发现二甲双胍能缓解肝细胞脂肪沉积,为鱼类脂肪肝的防治提供了理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] 杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考 [J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1628-1638.
- [2] 李钰, 何凤旭, 张震, 等. 斑马鱼营养性脂肪肝模型构建 [J]. 水产学报, 2017, 41(5): 138-147.
- [3] 丁倩雯, 张震, 冉超, 等. 油酸诱导斑马鱼肝脏细胞脂滴形成与降解模型的建立 [J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(2): 129-138.
- [4] LU K L, JI Z L, RAHIMNEJAD S, et al. De novo assembly and characterization of seabass *Lateolabrax japonicus* transcriptome and expression of hepatic genes following different dietary phosphorus/calcium levels [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2017, 24(1): 51-59.
- [5] LU K L, RAHIMNEJAD S, JI Z L, et al. Comparative analysis of vertebral transcriptome in Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) fed diets with varying phosphorus/calcium levels [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2019, 230(1): 49-55.
- [6] 王珍, 秦旭平. 二甲双胍药理作用及其机制研究进展 [J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(3): 326-328.
- [7] 马毅, 曹军平, 徐丽, 等. 黄连素联合二甲双胍对实验性高脂血症的降血脂作用 [J]. 实验动物与比较医学,

2014, 34(3): 228-231.

- [8] 刘怀昌, 肖磊, 徐智立, 等. 他汀类降脂药联合胰岛素增敏剂对非酒精性脂肪肝的疗效及动脉弹性的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(17): 82-85.
- [9] 杜金梁, 曹丽萍, 贾睿, 等. 油酸诱导建鲤 (*Cyprinus carpio var. Jian*) 肝细胞脂肪变性模型的建立 [J]. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 107-113.
- [10] LU KL, XU WN, LIU WB, et al. Association of mitochondrial dysfunction with oxidative stress and immune suppression in Blunt Snout Bream (*Megalobrama amblycephala*) fed a high-fat diet [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2014, 26(1): 100-112.
- [11] 周阳, 王友发, 沈伟良, 等. 大黄鱼肝脏的显微及超微结构 [J]. 宁波大学学报 (理工版), 2017, 30(1): 42-46.
- [12] 张红锋, 杨慧萍, 王耀发. 乙醇和软脂酸诱导的脂肪肝离体细胞模型 [J]. 华东师范大学学报 (自然科学版), 2002(4): 88-95.
- [13] 杨林辉, 陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立 [J]. 重庆医学, 2007, 36(8): 698-700.
- [14] 廖于, 李龙辉, 左国庆, 等. 体外诱导的酒精性脂肪肝细胞模型的建立、鉴定及机制探讨 [J]. 重庆医学, 2010, 39(8): 902-904.
- [15] 李瑞芳. 血清 AST/ALT 比值, γ -GT, ALP 及 AFP 联合检测对原发性肝癌的诊断价值 [J]. 临床医药实践, 2015, 10(1): 757-758.
- [16] DAI Y J, CAO Y F, ZHANG D D, et al. Chronic inflammation is a key to inducing liver injury in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed with high-fat diet [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2019, 97(1): 28-37.
- [17] 卢荣华, 梁旭方, 孙君君, 等. 草鱼肝细胞脂变模型的建立及脂代谢基因表达分析 [J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 24-32.
- [18] 鲁康乐. 高脂日粮诱导团头鲂脂肪肝发生机制及黄连素调控的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [19] JIA R, CAO L P, DU J L, et al. Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152(2): 11-19.
- [20] GUPTA V, MARIA X J, GARCIA C, et al. Oily fish, coffee and walnuts: dietary treatment for nonalcoholic fatty liver disease [J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(2): 10621-10635.
- [21] 董爱梅, 高妍. 二甲双胍对脂肪肝作用机制的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(4): 284-288.
- [22] 陈玉华, 武革, 郭中秋, 等. 二甲双胍对大鼠 2 型糖尿病并发非酒精性脂肪肝治疗作用的实验研究 [J]. 中国医师杂志, 2011, 13(1): 1014-1018.
- [23] 徐静, 李楠, 王俊红, 等. 二甲双胍对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠肝脏 SIRT1 和 UCP2 表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 38(9): 882-887.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)