

การเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับในหนูทดลอง

ชรินญา พิมพ์สอน¹, กนกวรรณ จารุกัจฉา²

Received: 6 September 2013

Accepted: 15 March 2014

บทคัดย่อ

ภาวะไขมันพอกตับเกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย ที่มีไขมันโดยเฉพาะไตรกลีเซอไรด์พอกหรือสะสมอยู่ในเซลล์ตับโดยไม่ได้เป็นผลจากการดื่มสุราก่อให้เกิดความเสียหายต่อดังกล่าว บางระยะของการพัฒนาการของโรคอาจพบการอักเสบของเนื้อตับร่วมด้วย ส่งผลให้เกิดภาวะตับแข็งและลุกลามกลายเป็นมะเร็งได้ในที่สุด การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับในหนูทดลอง โดยการกระตุ้นให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างการสร้างไขมันและการดูดกลับของกรดไขมันอิสระในร่างกายส่งผลให้ไขมันมาพอกสะสมที่เซลล์ตับเกิดเป็นภาวะไขมันพอกตับที่มีพยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยาที่ใกล้เคียงกับในมนุษย์ แบบจำลองการเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับมี 2 รูปแบบใหญ่ คือ การดัดแปลงพันธุกรรมยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะไขมันพอกตับ ได้แก่ หนูไมซ์ทรานส์เจนิค SREBP-1c หนูไมซ์ ob/ob หนูไมซ์ db/db หนูไมซ์ KK-Ay หนูไมซ์ PTEN10 และ หนูไมซ์น็อคเอาต์ PPAR- α เป็นต้น เป็นหนูไมซ์ที่ถูกปรับแต่งหรือไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหรือผลิตไขมันและ/หรือวิถีที่เกี่ยวข้อง ทำให้ไม่สามารถสร้างหรือผลิตไขมันได้เป็นปกติ ส่วนอีกลักษณะหนึ่งเป็นการเหนี่ยวนำด้วยอาหารประเภทต่างๆ ได้แก่ อาหารที่ขาดเมไทโอนีนและโคลีน อาหารไขมันสูง คลอเรสเตอรอลร่วมกับซอคโคแลต หรือน้ำตาลฟรุกโตส เป็นต้น การเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับแต่ละรูปแบบให้พัฒนาการของพยาธิสภาพของโรคได้แตกต่างกันและใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน ดังนั้น การพิจารณารูปแบบการเหนี่ยวนำให้ได้ภาวะไขมันพอกตับที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการวิจัย จึงเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อความถูกต้องแม่นยำและประสิทธิผลของการวิจัย

คำสำคัญ: การเหนี่ยวนำในหนูทดลอง โรคไขมันพอกตับ NAFLD ไขมันเกาะตับ ไขมันพอกตับแบบมีการอักเสบร่วม

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2557; 10(1): 16-31

¹ นักศึกษาปริญญาเอก หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น

² Ph.D. รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น

* ติดต่อผู้พิมพ์: รองศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา โทรศัพท์ +66 4320 2305 โทรสาร +66 4320 2379 Email: kanok_ja@kku.ac.th

Induction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice

Charinya Pimson¹, Kanokwan Jarukamjorn^{2*}

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a metabolic syndrome in which excess fat accumulates in the liver without history of alcoholic abuse. NAFLD is the most frequent cause of liver damage which is classified into steatosis, steatohepatitis, and may progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Induction of hepatic transformation in mice manipulates by stimulating imbalance between lipid catabolism and free fatty acid reabsorption resulting in accumulation of fat especially triglyceride in the liver with hepatic pathophysiology and histopathology as that in human. The animal models of NAFLD are divided by NAFLD-inducible methods into 2 patterns, namely genetic modified and dietary supplement models. The genetic modified models are mice which have been configured or knocked out lipid synthesis related gene(s) including transgenic SREBP-1c, ob/ob, db/db, KK-Ay, PTEN10 null, PPAR- α knockout mice. On the other hand, the dietary supplement models are inducible by several patterns of diet, *i.e.*, methionine and choline deficient food, high fat diet, cholesterol and chocolate, or fructose. The progress or development of NAFLD in each mouse model depends on the method and period of induction. Hence, the progress of NAFLD mice employed should be accordingly considered to the research objectives to achieve a precise and accurate result, and effectiveness of the outcome.

Keywords: Animal model, Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD, Steatosis, Steatohepatitis

IJPS 2014; 10(1): 16-31

¹ Ph.D.Candidate in Biomedical Sciences program, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

² Ph.D., Associate Professor, Research Group for Pharmaceutical Activities of Natural Products using Pharmaceutical Biotechnology (PANPB), Division of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

* **Corresponding author:** Associate Professor Dr.Kanokwan Jarukamjorn Tel: +66 4320 2305; Fax: +66 432 02379; E-mail: kanok_ja@kku.ac.th

บทนำ

โรคไขมันพอกตับ (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease หรือ NAFLD) เกิดจากภาวะความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมที่มีอยู่แต่กำเนิดหรือเกิดจากความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน (Shulman and Mangelsdorf, 2005) โดยมีสาเหตุจากหลายปัจจัย อาทิ โรคอ้วน โรคเบาหวานที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน ภาวะไขมันในเลือดสูงและความดันโลหิตสูงร่วมกับสาเหตุอื่นๆ การวินิจฉัยไขมันพอกตับตามแนวทางของ National Cholesterol Education Program/Adult Treatment

Panel III (ATPIII) และ International Diabetes Federation (IDF) (ตารางที่ 1) สามารถแบ่งภาวะไขมันพอกตับตามลักษณะอาการแสดงได้เป็นหลายระยะ เช่น ระยะสตีโตซิส (steatosis) เป็นระยะของโรคที่มักพบการเกาะรวมตัวของไขมันในเนื้อเยื่อตับ สามารถพัฒนาไปสู่ภาวะไขมันพอกตับแบบมีการอักเสบร่วม (nonalcoholic steatohepatitis หรือ NASH) ซึ่งมีพังผืดแทรกในเซลล์ตับ ส่งผลเกิดตับแข็งและกลายเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด (Ratzu *et al.*, 2010)

ตารางที่ 1 แนวทางการวินิจฉัยโรคไขมันพอกตับของ National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III (ATPIII) และ International Diabetes Federation (IDF) (Angulo, 2002)

	ATPIII	IDF
Numbers of abnormalities	≥3 of abnormalities	≥2 of abnormalities
Fasting serum glucose	≥110 mg/dL (6.1 mmol/L) or diagnosis/therapy for T2DM	≥100 mg/dL (5.6 mmol/L) or diagnosis/therapy for T2DM
Serum HDL cholesterol	<40 mg/dL (≤1.03 mmol/L) (men) <50 mg/dL (≤1.3 mmol/L) (women) or concurrent specific drug therapy for low HDL-C	
Serum triglyceride	≥150 mg/dL (≥1.7 mmol/L) or concurrent specific drug therapy for elevated triglyceride	
Blood pressure	≥130/85 mmHg or concurrent specific drug therapy for hypertension	
Waist circumference	≥94 cm (men), ≥80 cm (women)	

หมายเหตุ. T2DM, เบาหวานชนิดที่ 2; HDL-C, คอลเลสเตอรอลชนิดดี (high density lipoprotein cholesterol)

โรคไขมันพอกตับ

โรคไขมันพอกตับหมายถึง ภาวะที่มีไขมันโดยเฉพาะไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) พอกหรือสะสมอยู่ในเซลล์ตับที่ไม่ได้เป็นผลจากการดื่มสุรา โดยระยะแรกมักไม่ก่อให้เกิดความเสียหายหรือการอักเสบเฉียบพลันต่อดับเรียกว่า ไขมันเกาะตับ (steatosis หรือ fatty liver) ถ้าเนื้อตับมีการอักเสบร่วมด้วยเรียกกลุ่มอาการนี้ว่า ภาวะไขมันเกาะตับแบบมีการอักเสบของตับร่วมด้วย (nonalcoholic steatohepatitis หรือ NASH) ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) และลุกลามกลายเป็นมะเร็งได้ในที่สุด ภาวะดื้ออินซูลินทำให้เกิดความผิดปกติในการเคลื่อนย้ายกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ส่งผลให้มีการนำส่งกรดไขมันอิสระไปที่ตับมากขึ้นจนเกิดการสะสมในรูปของไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระที่รวมกันอยู่ในตับเป็นจำนวนมากนี้ทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินในตับ (intrahepatic insulin resistance) ซึ่งจะไปยังยังกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (β -oxidation) ของกรดไขมันอิสระเป็นเหตุให้ตับไม่สามารถย่อยสลายไขมันออกจากเซลล์ได้เกิดภาวะไขมันสะสมที่ตับตามมา

นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันนำไปสู่การอักเสบของเซลล์ตับและกระตุ้น stellate cell ทำให้เกิดการอักเสบจนกลายเป็นพังผืด (fibrosis) ของตับและพัฒนามาจนกลายเป็นภาวะตับแข็งและมะเร็งตับได้ ระดับน้ำตาลในเลือดของคนปกติถูกควบคุมโดยอินซูลินซึ่งผลิตจากตับอ่อน เมื่อน้ำตาลในเลือดสูง ตับอ่อนจะหลั่งอินซูลินออกมามากขึ้นโดยอินซูลินออกฤทธิ์ที่ตับ กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมันเพื่อให้มีการนำน้ำตาลไปใช้ ดังนั้นการมีภาวะดื้ออินซูลินยิ่งเพิ่มมากขึ้นก็ยิ่งทำให้ตับมีการสะสมไขมันเพิ่มมากขึ้น

ภาวะไขมันพอกตับสามารถแบ่งความรุนแรงตามปริมาณไขมันที่แทรกในเซลล์ตับได้เป็น 3 ระยะ โดยระยะแรกพบไขมันแทรกอยู่ในเซลล์ตับประมาณ 5-10 % ในขณะที่ระยะกลางและระยะรุนแรงพบไขมันแทรกอยู่ในเซลล์ตับ 10-25 % และ 30% ตามลำดับ การตัดชิ้นเนื้อตับเพื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (liver biopsy) มักใช้สีย้อม hematoxylin and Eosin (H&E) stain สี silver reticulin สี Masson trichrome สี Sirius red for collagen 21 และสี Perls stain หากตรวจพบ

mallory bodies ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มของเส้นใยเคราติน (cytokeratin intermediate filaments) ที่รวมตัวกับโปรตีนชนิดต่างๆ สะสมในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ แสดงว่ามีการอักเสบและการแทรกตัวของเซลล์อักเสบเกิดขึ้น ซึ่งความรุนแรงของโรคสามารถจำแนกได้จากค่าคะแนนดังแสดงในตารางที่ 2 (Dixon *et al.*, 2001)

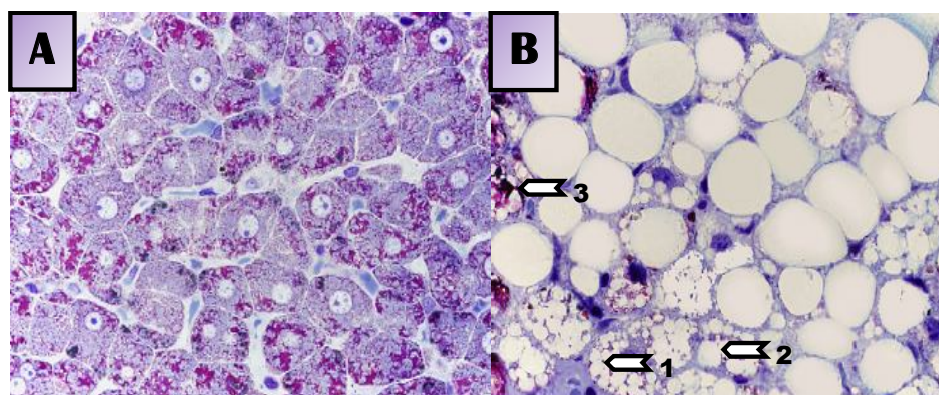
ลักษณะอาการทางคลินิกและการวินิจฉัย

ผู้ป่วยมักไม่มีอาการแสดงใดๆ ในระยะแรกจนเมื่อโรคพัฒนารุนแรงขึ้นจะมีอาการแสดงของโรคตับ (liver disease) เช่น ท้องกาง (ช่องท้องด้านขวาส่วนบน) ตับขยายขนาดและมีภาวะตับโต (hepatomegaly) ซึ่งอาจพบ acanthosis nigricans ได้ หากเรื้อรังสามารถพัฒนาไปสู่โรคตับแข็งได้ โรคไขมันพอกตับระยะแรกจนถึงระยะกลางนั้นระดับของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ในเลือดจะยังอยู่ในระดับปกติ โดยอัตราส่วนระหว่าง AST และ ALT จะน้อยกว่า 1 ค่าเอนไซม์เหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดพังผืดในเนื้อตับ (Angulo *et al.*, 1999) ในขณะที่เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) และ เอนไซม์ gamma-glutamyltransferase (GGT) จะยังคงอยู่ในระดับปกติ และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีภาวะโปรตีนอัลบูมินในเลือดต่ำ (hypoalbuminemia) ภาวะที่การแข็งตัวของเลือดมีระยะยาวนาน (prolonged prothombin time) และภาวะบิลิรูบินในเลือดสูง (hyperbilirubinemia) ร่วมกับภาวะไขมันพอกตับระยะรุนแรงที่พัฒนาไปเป็นโรคตับแข็ง (cirrhotic-stage nonalcoholic fatty liver disease) (Debaere *et al.*, 1998) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคจึงจำเป็นต้องใช้หลายวิธีการร่วมกัน เช่น อัลตราซาวด์พบไขมันแทรกในเนื้อเยื่อตับ เกิด echogenicity ทำให้ภาพจากอัลตราซาวด์ปรากฏสีขาวชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะข้างเคียง Computed tomographic (CT scan) พบการแทรกตัวของเซลล์ไขมัน (fatty infiltration) และเซลล์ parenchyma แบบความหนาแน่นต่ำ การผ่าตัดชิ้น

เนื้อตับเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (liver biopsy) มักพบเซลล์อักเสบ (inflammatory-cell infiltration) ปะปนกับเซลล์ตับปกติ (hepatocyte) (รูปที่ 1A) เซลล์เกิดการอักเสบและตาย (necrosis) กลายเป็นเซลล์ที่มีช่องว่างเรียกว่า hepatocyte ballooning เกิด glycogen nuclei รวมถึง Mallory's hyaline และกลายเป็นพังผืด (รูปที่ 1B) เมื่อนิวเคลียสของเซลล์ตับถูกเบียดไปอยู่ด้านข้างทำให้เกิดการอักเสบ (inflammation) และการตายของเนื้อตับตามมา (รูปที่ 2A) การเกิดพังผืดในเส้นเลือดฝอยของตับ (perivenular fibrosis) และผนังหลอดเลือดของตับ (perisinusoidal fibrosis) เนื่องจากคอลลาเจนที่มีในเซลล์ตับถูกดึงเข้าไปสะสมในช่องว่างระหว่างเซลล์ใกล้เคียง กับเส้นเลือดดำใหญ่ของตับและรอบๆ ผนังท่อหลอดเลือดของตับส่งผลให้ความยืดหยุ่นของส่วนต่างๆ เหล่านี้ลดลงและเกิดเป็นพังผืดในตับ (รูปที่ 2B) ส่วนของท่อตับ (portal tracts) มักมีการอักเสบเกิดขึ้นในระยะแรกของพัฒนาการความรุนแรงของโรคไปจนถึงกลายเป็นภาวะตับแข็งโดยจะพบกระบวนการพอกของไขมัน (steatosis activity) และกระบวนการอักเสบที่ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ (necroinflammatory activity) ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบการแทรกเข้ามาของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีนิวเคลียสเดี่ยวลักษณะกลม (mononuclear cells) เช่น ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์ที่มีนิวเคลียสหลายรูปร่าง (polymorphonuclear cells) เช่น นิวโตรฟิล หรืออาจพบเซลล์ทั้งสองชนิดร่วมกัน รวมถึงอาจพบหย่อมการตายของเซลล์ (spotty necrosis) ได้เช่นกันซึ่งการพบเซลล์ต่างๆ เหล่านี้สามารถบ่งชี้ถึงระยะของการเกิดไขมันพอกตับได้ จากการวิเคราะห์สาเหตุการเกิดโรคจากชิ้นเนื้อตับ 673 ตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคตับพบว่าร้อยละ 66 เกิดพังผืดจากโรคไขมันพอกตับ (Ratzu *et al.*, 2000) ดังนั้นสาเหตุส่วนใหญ่ของการเกิดพังผืดในเนื้อตับของผู้ป่วยโรคตับมาจากภาวะไขมันพอกตับก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นตับแข็งและมะเร็งตับในที่สุด

ตารางที่ 2 หลักการจำแนกระยะของภาวะไขมันพอกตับ (Dixon *et al.*, 2001)

ระยะ	คะแนน	รอยโรค
Steatosis	0	ไม่มีการพอกของไขมันในเซลล์ตับ
	1	เซลล์ไขมันแทรกตัวในเนื้อเยื่อพาราเนโครมาของเซลล์ตับ 5%
	2	เซลล์ไขมันแทรกตัวในเนื้อเยื่อพาราเนโครมาของเซลล์ตับ 5–25%
	3	เซลล์ไขมันแทรกตัวในเนื้อเยื่อพาราเนโครมาของเซลล์ตับ 25–75%
	4	เซลล์ไขมันแทรกตัวในเนื้อเยื่อพาราเนโครมาของเซลล์ตับ 75%
Inflammation	0	ไม่พบการอักเสบของเซลล์ตับ
	1	พบการอักเสบในโซนที่ 3 ของเนื้อเยื่อตับบ้างเล็กน้อย
	2	พบการอักเสบในโซนที่ 3 ของเนื้อเยื่อตับบางส่วน
	3	พบการอักเสบในโซนที่ 3 ของเนื้อเยื่อตับแบบสังเกตเห็นได้ชัดเจน
	4	พบการอักเสบในโซนที่ 3 ของเนื้อเยื่อตับเป็นวงกว้าง
Fibrosis	0	เนื้อเยื่อตับปกติ
	1	มีพังผืดเป็นจุดในเนื้อตับบริเวณโซนที่ 3
	2	มีพังผืดบริเวณต่อตับและเนื้อเยื่อตับโซนที่ 2-3 อาจพบพังผืดบริเวณต่อหลอดเลือดแดง
	3	ใหญ่ของตับ
	4	มีพังผืดกระจายเต็มบริเวณเนื้อตับและต่อตับแต่ไม่พบภาวะตับแข็ง
		พบภาวะตับแข็ง

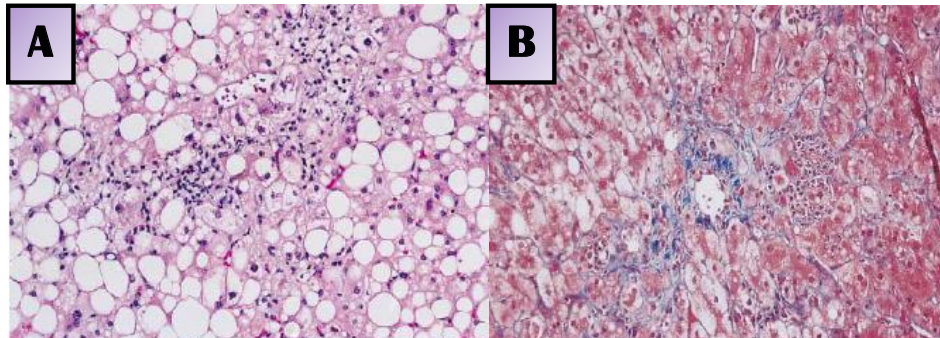


รูปที่ 1 เซลล์ตับปกติ (A) และเซลล์ไขมัน (B) ประกอบด้วย (1) เซลล์ไขมันที่มีช่องว่างขนาดเล็ก (microvesicular) (2) เซลล์ไขมันที่มีช่องว่างขนาดใหญ่ (macrovesicular) และ (3) Mallory's hyaline ในเซลล์ตับ (ดัดแปลงจาก Grattagliano *et al.*, 2008)

กลไกการเกิดโรค

กลไกการเกิดโรคไขมันพอกตับยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่จากสมมุติฐานพบว่าภาวะไขมันเกาะตับจะเกิดควบคู่ไปกับพัฒนาการของโรคอื่นๆ ในลักษณะสวนทางกับระบบต้านอนุมูลอิสระและระบบการสร้างไขมันในร่างกาย โดยกระบวนการกักเก็บไขมันใน

เซลล์ตับจะเริ่มจากการเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ เมื่อเกิดภาวะความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย เช่น ภาวะดื้อต่ออินซูลิน จะไปรบกวนการดูดซึม การสังเคราะห์ และการขับออกของไขมันภายในเซลล์ตับ (Abiru *et al.*, 2006)



รูปที่ 2 Hepatic steatosis (A) และการเกิดพังผืดในเส้นเลือดฝอยของตับทั้งในเซลล์ตับและผนังหลอดเลือดของตับ (B) (ดัดแปลงจาก Paul, 2002)

ในภาวะปกติร่างกายจะสังเคราะห์กรดไขมันอิสระ โดยการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในร่างกายให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระและไตรกลีเซอไรด์ เมื่อกระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติจะกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และเบต้าออกซิเดชันให้เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการสะสมไขมันอิสระในร่างกายมากขึ้น ไขมันเหล่านี้จะถูกนำเข้าสู่เซลล์ตับ เพื่อเปลี่ยนไปเป็น Very Low Density lipoprotein (VLDL) นำไปใช้งาน ดังนั้น เมื่อเซลล์ตับไม่สามารถเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ไปเป็น VLDL ได้ จึงพบไตรกลีเซอไรด์พอกหรือสะสมในเซลล์ตับ ส่งผลรบกวนการทำงานของเซลล์ตับทั้งการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (differentiation) ตลอดจนการขนส่งหรือลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์ อีกทั้งยังรบกวนกระบวนการส่งสัญญาณและการตอบสนองต่อสัญญาณของโปรตีน (signal transduction) ได้อีกด้วย เซลล์ตับถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ ไขมันอิสระที่เกิดขึ้นยังมีผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของ

ไกลโคโปรตีนที่มียีน *PC-1* บรรจุอยู่ ซึ่งยีนนี้มีผลทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลินตามมา ทำให้เซลล์เปราะและแตกง่าย โดยทั้ง *Rad* และ *PC-1* ที่ลดลงจะกระตุ้นการทำงานของไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) โดยภาวะดื้อต่ออินซูลินที่เกิดขึ้นมีผลกระตุ้นไทโรซีนไคเนสให้หลั่งมากขึ้น (Maddux *et al.*, 1995) กระตุ้นให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น นิวโทรฟิล ลิ้มโฟไซต์ และแมคโครฟาจเข้ามาในเซลล์ตับมากขึ้น เกิดกระบวนการอักเสบจนเกิดการตายของเซลล์ตับข้างเคียงตามมา ส่งผลลดการทำงานของเลปติน (leptin) ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดดีโพลาไรเซชัน (depolarization) ของอินซูลินรีเซปเตอร์ซับสเตรท 1 (insulin receptor substrate-1) ซึ่งเป็นขบวนการที่ไม่ได้ออกฤทธิ์ใช้ในการผลิต ATP เพื่อใช้ในการหายใจของเซลล์ ซึ่งการทำงานของเลปตินที่ลดลงทำให้ ไมโทคอนเดรียขาดพลังงานเกิดการแตกของไมโทคอนเดรีย เซลล์ตับเกิดความเสียหายและตายในที่สุด นอกจากนี้ยังรบกวนการทำงานของเซลล์ไขมัน โดยไขมันทำหน้าที่ยับยั้งการนำอินซูลินเข้าสู่เซลล์

ลดการเหนี่ยวนำกระบวนการ phosphorylation ของ อินซูลินรีเซปเตอร์ชนิด 1 และลดการแสดงออกของ ยีน Insulin dependent glucose transport molecule (*GLUT4*) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการนำเข้าหรือขับออกน้ำตาลกลูโคสในเซลล์ตับ ทำให้มีการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ตับมากยิ่งขึ้น จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงกลูโคสไปเป็น กรดไขมันอิสระมากขึ้นตามไปด้วย เปรียบเสมือน เป็นการทำให้เซลล์ตับทางอ้อมอีกเช่นกัน จากสาเหตุ เหล่านี้ส่งผลให้ภาวะดื้อต่ออินซูลินรุนแรงขึ้น น้ำตาล ในเลือดสูงขึ้น เมื่อเซลล์ตับไม่สามารถย่อยสลายไขมัน ออกจากเซลล์ได้เกิดไขมันสะสมในเซลล์ตับ กลายเป็น ภาวะไขมันเกาะตับที่ส่งผลต่อเนื่องให้เกิดภาวะเครียด ออกซิเดชันที่นำไปสู่การอักเสบของเซลล์ตับ และกระตุ้น stellate cell ให้เกิดการอักเสบจนกลายเป็นพังผืดของ ตับเกิดภาวะตับแข็งและกลายเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด

การยับยั้ง tumor necrosis factor α (TNF- α), *Rad*, *PC-1*, เลปติน และการเกิดกรดไขมันอิสระที่เพิ่ม ขึ้นจะนำไปสู่การสะสมไขมันในเซลล์ตับด้วยสองกลไก โดยกลไกแรกเป็นการเพิ่มกระบวนการ lipolysis ทำให้ มีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันในหลอดเลือด ร่วมกับการ เกิดภาวะอินซูลินในเลือดสูง (hyperinsulinemia) จึงเพิ่ม การนำกรดไขมันอิสระเข้าสู่เซลล์ตับ ทำให้กระบวนการ mitochondrial β -oxidation เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิด การสะสมของกรดไขมันในเซลล์ตับมากขึ้น กรดไขมันใน เซลล์ตับเหนี่ยวนำให้ไมโทคอนเดรียผลิตเอนไซม์ lipoxigenases ออกมามากขึ้นเป็นเหตุให้ CYP2E1 และ CYP4A ถูกกระตุ้นให้ทำงานมากขึ้น ส่งผลให้ระดับของ CYP2E1 และ CYP4A มีค่าสูงขึ้น เป็นเหตุให้มีการผลิต อนุมูลอิสระออกมามากขึ้น รวมถึงการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ตับเพิ่มขึ้นอีกด้วย อีกทั้งภาวะอินซูลินในกระแสเลือดที่สูงขึ้นยังมีผลต่อ การเกิดกลไกแบบที่สอง คือ การเพิ่มขึ้นของกระบวนการ glycolysis ของเซลล์ตับจากการสร้าง apolipoprotein β -100 ที่ลดลง ทำให้เกิดการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ ในเซลล์ตับเพิ่มมากขึ้น (Leclercq *et al.*, 2000)

เมื่อเกิดพิษต่อเซลล์ เซลล์ตับจะฟอร์มตัวด้วย ปฏิกิริยา microsomal ω -oxidation มีการเมแทบอลิซึม ของกรดไขมันที่ไมโทคอนเดรียด้วยปฏิกิริยา peroxisomal β -oxidation และกระบวนการ mitochondrial β -oxidation หากขาดเอนไซม์ที่จำเป็นต่อปฏิกิริยา peroxisomal β -oxidation จะก่อให้เกิด microvesicular steatosis และ steatohepatitis ได้ (Fan *et al.*, 1998) นอกจากนั้นการขาดเอนไซม์ acyl-coenzyme A oxidase จะรบกวนกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันสาย ยาว (very-long chain fatty acid) และกรดจำพวก dicarboxylic acid นำไปสู่การเกิด microvesicular steatosis และ steatohepatitis ได้เช่นเดียวกัน ในภาวะที่ร่างกาย ขาดเอนไซม์เหล่านี้ จะกระตุ้นให้ยีน peroxisome-pro liferator activated receptor- α (PPAR- α) ทำงาน มากขึ้น เนื่องจาก PPAR- α ทำหน้าที่ในการส่งเสริม การสังเคราะห์สายของโปรตีน (uncoupling protein-2) ในเซลล์ตับ ดังนั้น PPAR- α จึงเป็นยีนที่มีการแสดงออก มากขึ้นหนึ่งในตับผู้ป่วย NAFLD (Chavin *et al.*, 1999) การเพิ่มขึ้นของระดับกรดไขมันภายในเซลล์ตับส่งผลให้ เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ เกิดการพัฒนาจากภาวะไขมันเกาะตับไปสู่ภาวะไขมัน เกาะตับแบบมีการอักเสบร่วมด้วยและตับแข็งในที่สุด ซึ่ง reactive oxygen species (ROS) ที่ถูกผลิตใน ไมโทคอนเดรียสามารถนำไปสู่การเกิดภาวะไขมันเกาะ ตับแบบมีการอักเสบร่วมด้วยและการเกิดพังผืดได้ด้วย 3 กลไกหลัก คือ lipid peroxidation การกระตุ้นไซโตไคน์ (cytokine induction) และการเหนี่ยวนำของ Fas ligand กระบวนการ lipid peroxidation ที่ถูกกระตุ้นโดย ROS นั้นเซลล์จะหลั่งสาร malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxynonenal (HNE) ออกมา MDA และ HNE เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตายจากการกระตุ้นการสร้าง โปรตีนที่นำไปสู่การเกาะกลุ่มกันของ Mallory's hyaline รวมถึงกระตุ้น stellate cell ที่มีหน้าที่ในการควบคุม การสังเคราะห์คอลลาเจน (Leonarduzzi *et al.*, 1997) นอกจากนี้ HNE ยังสามารถหลั่งสารกระตุ้นการทำงานของนิวโทรฟิลที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบเกิดเพิ่มมา

ขึ้น นอกจากนี้แล้ว ROS ยังกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ต่าง ๆ ได้แก่ TNF- α และ growth factor β (TGF- β) รวมถึง interleukin-8 (IL-8) ซึ่ง TNF- α และ TGF- β ทำให้การทำงานของเซลล์ตับเสียไป และเป็นสาเหตุการตายของเซลล์ตับ (Inayat-Hussain *et al.* 1997) โดย TGF- β กระตุ้น stellate cell ให้สังเคราะห์คอลลาเจน และกระตุ้น transglutaminase ในเนื้อเยื่อซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeletal proteins) ส่งผลให้ Mallory's hyaline ทำงานเพิ่มมากขึ้น ส่วน IL-8 จะดึงดูดนิวโทรฟิลเข้ามาในเซลล์ตับ และ TNF- α จะถูกเหนี่ยวนำโดย ROS ที่มีอยู่แล้วให้ผลิต ROS เพิ่มขึ้นในไมโทคอนเดรีย ในขณะที่เซลล์เกิดกระบวนการหายใจ ROS จะทำลายสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ดังนั้นเมื่อมีการสะสมของ ROS ในไมโทคอนเดรียมากขึ้น จะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ Fas ligand ในเซลล์ตับบริเวณเยื่อหุ้มของ Fas receptor โดย Fas ligand ที่อยู่ในเซลล์ตับหนึ่งเซลล์สามารถก่อปฏิกิริยากับ Fas ligand ที่อยู่ในเซลล์ตับเซลล์ข้างๆ ได้ทำให้เกิดการตายอย่างต่อเนื่อง เรียกว่าการตายในลักษณะนี้ว่า fractional killing (Hug *et al.*, 1997) เซลล์ตับที่อยู่ในภาวะไขมันเกาะตับแบบมีการอักเสบร่วมจะพบรอยโรคที่เรียกว่า ultrastructural mitochondria lesion และยังสามารถพบ linear crystalline inclusions ซึ่งเกิดเป็นผลึกคริสตอลแขวนลอยในไมโทคอนเดรีย ทำให้ไมโทคอนเดรียมีขนาดใหญ่ (megamitochondria) ได้ด้วย (Caldwell *et al.*, 1999) ซึ่งไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่จะไม่พบในผู้ป่วยไขมันเกาะตับระยะแรกหรือผู้ที่มิสุขภาพดี นอกจากนี้รูปร่างของตับผู้ป่วยในภาวะไขมันเกาะตับแบบมีการอักเสบร่วมจะใช้น้ำตาลฟรุกโตสในการสังเคราะห์ ATP เป็นผลให้ ATP ถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วและเกิดภาวะไม่สมดุลกันของ ATP เป็นผลทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดการบาดเจ็บและเกิดการตายของเซลล์ตับในที่สุด (Sanyal *et al.*, 2001)

ผู้ป่วยเบาหวานทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 รวมถึงผู้ป่วยที่มีภาวะของโรคไขมันพอกตับร่วมนั้น จะมีปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์ตับเพิ่มขึ้น รวมถึงการ

ทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), Copper-zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) และ Glutathione peroxidase (GPx) ที่เพิ่มมากขึ้นด้วยในปี 1996 Giuglione และคณะ รายงานว่าผู้ป่วยเบาหวานจะมีปริมาณ oxidized LDL เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณวิตามินซีในเลือดของผู้ป่วยที่ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าปริมาณของ α -tocopherol ในเลือดของผู้ป่วยจะมีปริมาณที่ต่ำกว่าปกติอย่างไม่ชัดเจน ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่ลดลงของกระบวนการต้านออกซิเดชันในผู้ป่วยเบาหวาน

การเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับในหนูทดลอง

งานวิจัยในระยะแรกมักเป็นกรณีศึกษาในผู้ป่วย แต่พบว่าไม่สามารถระบุระยะที่แน่นอนของการเกิดโรคได้ และหากมีการบวกรบบบางอย่างตามธรรมชาติ พัฒนาการของโรคจากระยะ steatosis ไปสู่ระยะ NASH จะหยุดชะงักทันที จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้มีการพัฒนาหนูทดลองเป็นแบบจำลอง (model) ในการศึกษาเนื่องจากมีพยาธิสภาพและจุลพยาธิวิทยาที่ใกล้เคียงกับมนุษย์มาก การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับในหนูทดลองให้มีไขมันมาพอกหรือสะสมที่เซลล์ตับ โดยการกระตุ้นให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างการสร้างไขมันและการดูดกลับของกรดไขมันในร่างกาย โดยมักจะพัฒนาจากระยะ steatosis intralobular inflammation ไปสู่ hepatocellular ballooning และในที่สุดสามารถพบระยะ perisinusoidal fibrosis ได้ในโซนที่ 3 ของเซลล์ตับ นำไปสู่การเกิดเนื้องอกที่ตับ (liver tumors) และสุดท้ายนำไปสู่การเกิดมะเร็งตับ ซึ่งหนูทดลองที่มีความผิดปกติของกระบวนการการเมแทบอลิซึม อาทิ การถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอ้วน การเกิดการดื้อต่ออินซูลิน หรือการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดหลังอาหารมีระดับสูง (fasting hyperglycemia) และภาวะไขมันในเลือดสูง (dyslipidemia) ก็สามารถบวกรบบ adipokine ได้เช่นเดียวกัน การเลือกหนูสายพันธุ์ใดหรือลักษณะใดนั้นขึ้นกับวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัย โดย

ตัวแบบที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ หนูไมซ์ที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรมให้การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการทำงานของโปรตีน sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c transgenic mice) มากขึ้น ส่งผลให้ดื้อต่ออินซูลินและพัฒนาเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไขมันและไขมันถูกกระตุ้นให้ไปสะสมในเซลล์ตับในระยะ steatosis และพัฒนาไปสู่ระยะ steatohepatitis ได้ในที่สุด (Nakayama *et al.*, 2007) หรือหนู phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN 10 null mice) เป็นหนูไมซ์ที่ถูกทำลายยีน PTEN10 ทำให้เกิดภาวะตับโตและเกิดไขมันพอกตับในระยะ steatohepatitis (Sato *et al.*, 2006) หรือหนู ob/ob หนู db/db และหนู KK-Ay mice ที่มักไม่พบการพัฒนาถึงระยะ steatohepatitis ส่วนอีกลักษณะหนึ่งของการเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD จะเกี่ยวข้องกับรูปแบบอาหาร (dietary model) ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำที่ยาวนานกว่าแต่ประหยัดค่าใช้จ่ายกว่ามาก

การเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD โดยการดัดแปลงพันธุกรรมของสัตว์ทดลองหนูไมซ์ที่ถูกปรับแต่งยีนที่ควบคุมการทำงานของโปรตีน SREBP-1c (SREBP-1c transgenic mice) โปรตีน SREBP-1c พบในเนื้อเยื่อไขมันของหนูไมซ์ ทำหน้าที่ควบคุมปฏิกิริยา lipogenic ซึ่งควบคุมการสร้างและผลิตไขมัน เมื่อยีนนี้ถูกดัดแปลงให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นจะทำให้มีการแตกของเซลล์ไขมัน กรดไขมันอิสระที่อยู่ภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นปฏิกิริยา glycolysis ในเซลล์ตับ เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินและเบาหวานชนิดที่ 2 ตามมา ตรวจพบการสะสมของไขมันในเซลล์ตับหนูไมซ์ 8 วันหลังจากหนูที่ถูกดัดแปลงยีนดังกล่าวได้รับอาหารปกติ และพบพัฒนาการของโรคไขมันพอกตับระยะ steatosis ร่วมกับการอักเสบของท่อตับ (lobular inflammation) และการเกิดพังผืดที่ท่อหลอดเลือดและเซลล์ตับที่เวลาประมาณ 20 สัปดาห์นอกจากนี้พบ hepatic ballooning และ Mallory's hyaline ร่วมด้วย (Hashinaga *et al.*, 2007)

จากการศึกษาของ Knebel และคณะในปี 2012 พบว่าหนูไมซ์สายพันธุ์ C57Bl6 ที่ถูกดัดแปลงยีน SREBP-1c มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับไปสู่ระยะต่างๆ และตับมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังให้อาหารปกติ 2 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูไมซ์ปกติสายพันธุ์เดียวกัน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือเซลล์ไขมันของหนูไมซ์และเซลล์ไขมันของมนุษย์มีลักษณะที่แตกต่างกันจึงยังเป็นรูปแบบที่มีการประยุกต์ใช้ค่อนข้างน้อย

หนูไมซ์ ob/ob ที่ถูกปรับแต่งยีนที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนเลปติน (ob/ob mice) หนู ob/ob เป็นหนูไมซ์ที่ถูกปรับแต่งยีนเลปตินเพื่อให้เกิดภาวะขาดเลปติน (leptin-deficient) โดยไปรบกวนการทำงานของไฮโปทาลามัส ซึ่งเลปตินเป็นส่วนหนึ่งของขบวนการ adipokine ที่ทำหน้าที่ผลิตเนื้อเยื่อไขมัน (white adipose tissue) หนูที่ถูกดัดแปลงยีนชนิดนี้จะมีภาวะความอยากอาหารที่เพิ่มมากขึ้น (hyperphagic) ร่วมกับภาวะอ้วน (obese) ระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) และระดับของอินซูลินในกระแสเลือดสูง (hyperinsulinemia) (Bray and York, 1979) เซลล์ตับมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ steatosis แต่อาจพัฒนาไม่ถึงระยะ steatohepatitis หากเหนี่ยวนำด้วยรูปแบบอาหารร่วมด้วย เช่น อาหารที่ขาด methionine หรือ choline หรืออาหารไขมันสูงสามารถช่วยให้มีพัฒนาการไปสู่ระยะ steatohepatitis ได้ รูปแบบการเหนี่ยวนำนี้พบว่ามีการนำไปใช้จริงน้อยมาก เนื่องจากการพัฒนาการของโรคที่ไม่สอดคล้องกับการพัฒนาการของโรค NAFLD ในมนุษย์

หนูไมซ์ db/db ที่ถูกปรับแต่งยีนที่ควบคุมการทำงานของตัวรับโปรตีนเลปติน (db/db mice) หนู db/db ถูกปรับแต่งยีนเลปตินรีเซปเตอร์ (leptin receptor (*Ob-Rb*) gene) ส่งผลให้หนูชนิดนี้มีระดับของเลปตินที่ปกติ แต่ไม่สามารถนำเลปตินไปใช้ประโยชน์ได้ (Chen *et al.*, 1996) ดังนั้น จะมีภาวะอ้วน ภาวะเบาหวาน รวมถึงภาวะดื้อต่ออินซูลินพบการแทรกตัวของไขมันที่มีช่องว่างขนาดใหญ่ในเซลล์ตับเกิดเป็นภาวะไขมันพอกตับชนิด steatosis หากเหนี่ยวนำด้วยรูปแบบอาหาร

ร่วมด้วย เช่น อาหารที่ขาด methionine หรือ choline สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพังผืดในเซลล์ตับได้มากกว่า หนูไมซ์ ob/ob แต่ข้อจำกัดของรูปแบบนี้คือ ไม่สามารถเหนี่ยวนำไปสู่ระยะ NASH ได้ด้วยรูปแบบนี้เพียงอย่างเดียวจึงมีการนำไปใช้ในการวิจัยน้อยเช่นกัน (Sahai *et al.*, 2004)

หนูไมซ์ KK-Ay ที่ถูกปรับแต่งยีนที่ควบคุมการทำงานของยีน KK-Ay/a (KK-Ay mice) หนูไมซ์ถูกปรับแต่ง agouti gene หรือ KK-Ay/a ทำให้ปริมาณของเม็ดสี (melanocortin) ที่ขนเปลี่ยนแปลงส่งผลต่อพฤติกรรมการกินที่ผิดปกติ มีภาวะความอยากอาหารที่เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากการทำงานของไฮโปทาลามัสถูกรบกวน (Schattenberg *et al.*, 2010) ร่วมกับการมีภาวะอ้วน (obese) และภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) จึงมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับเข้าสู่ระยะ steatosis แต่อาจพัฒนาไม่ถึงระยะ steatohepatitis การพัฒนาสู่ระยะ NASH ได้ จำเป็นต้องเหนี่ยวนำด้วยรูปแบบอาหารร่วมด้วย เช่น อาหารที่ขาด methionine หรือ choline สามารถช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดพังผืดในเซลล์ตับได้

หนูไมซ์ที่ขาดยีน PTEN 10 (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 หรือ PTEN 10 null mice) ยีน *PTEN* 10 เป็นยีนที่ควบคุมการทำงานของปฏิกิริยา lipid phosphatase ซึ่งทำหน้าที่ผลิตสาร phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) การขาดยีน *PTEN* 10 จะรบกวนการส่งสัญญาณของระบบต่างๆ เช่น phosphatidylinositol 3-kinase serine-threonine protein kinase B ทำให้เซลล์ตาย โดยเฉพาะเซลล์เนื้องอกหรือมะเร็ง (Stiles *et al.*, 2004) หนูที่ถูกดัดแปลงให้ขาดยีน *PTEN* (PTEN flox/flox mice) จะมีตับขนาดใหญ่ขึ้น (hepatomegaly) พบภาวะ steatohepatitis ที่มีพัฒนาการของโรคคล้ายกับมนุษย์ (Sato *et al.*, 2006) ระยะ steatosis สามารถพบภายใน 10 สัปดาห์ ส่วนระยะ steatohepatitis และพังผืด จะสังเกตได้ใน 35-40 สัปดาห์ นอกจากนี้สามารถพบเซลล์เนื้องอกในตับ (hepatocellular adenomas) ได้

ถึง 47% ในเวลา 44 สัปดาห์ และพบกระจายเต็มบริเวณภายใน 74-78 สัปดาห์ ซึ่งเกินกว่า 66% ของเซลล์เนื้องอกนี้พัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ (hepatocyte carcinomas) หนูไมซ์ PTEN 10 จะไวมากขึ้นต่ออินซูลินและมีการเกิดปฏิกิริยา lipogenesis และ β -oxidation ซึ่งสามารถใช้รูปแบบนี้เป็นตัวแทนการเกิด NAFLD ในมนุษย์ได้ แต่มีข้อจำกัดเล็กน้อยคือ หนูไมซ์ PTEN 10 มีความไวต่ออินซูลินที่มากกว่าปกติ (Horie *et al.*, 2004)

หนูไมซ์น็อคเอาต์ยีน *PPAR- α* (Peroxisome proliferator-activated receptor- α หรือ *PPAR- α knockout mice*) *PPAR- α* เป็นยีนที่พบทั้งในไมโครโซม ไมโทคอนเดรีย และในระบบ microsomal fatty acid oxidation systems ของตับ สามารถพบการแสดงออกของยีนชนิดนี้เพิ่มขึ้นได้ในการเหนี่ยวนำหลายๆ รูปแบบ แต่ไขมันอาจไปสะสมที่ตับได้น้อย การเหนี่ยวนำรูปแบบนี้เป็น การเพิ่มการสะสมของไขมันที่ตับให้มากขึ้น เปรียบเทียบได้กับรูปแบบการให้อาหารที่มีไขมันสูง (Svegliati-Baroni *et al.*, 2006)

การเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD โดยการใช้อาหาร

การให้อาหารเหนี่ยวนำภาวะ NAFLD ทำให้เซลล์ตับมีไขมันมาสะสมเกิดระยะต่างๆ ของภาวะไขมันพอกตับแบบค่อยเป็นค่อยไป

รูปแบบอาหารที่ขาดเมไทโอนีนและโคลีน (Methionine and choline deficient food: MCD) รูปแบบนี้ถูกใช้มาเป็นระยะเวลานาน โดยการให้อาหารที่ขาด methionine หรือ choline ทำให้หนูทดลองถูกเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับได้อย่างรวดเร็ว พบการเกิดช่องว่างขนาดใหญ่ในเซลล์ตับจากการแทรกตัวของเซลล์ไขมัน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวพบได้ภายในระยะเวลา 2-4 สัปดาห์ และมีพัฒนาการต่อเนื่องจนเกิดการอักเสบและเกิดพังผืดต่อไปได้ในระยะเวลานาน เนื่องจากอาหารรูปแบบนี้กระตุ้นให้มีการหลั่ง lipoprotein ที่มีความหนาแน่นต่ำมาก (Very low density lipoprotein หรือ VLDL) เพิ่มขึ้น จากการที่อาหารทำให้กระบวนการสังเคราะห์ phosphatidyl choline synthesis ลดลงหรือ

ขาดหายไป (Kulinski *et al.*, 2004) และสามารถเห็นย่นำพัฒนาการของโรคไปจนถึงระยะ NASH ได้เมื่อสลับมาใช้อาหารที่ขาด choline เพียงอย่างเดียว (Mu *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามหนูที่ได้รับอาหารรูปแบบนี้น้ำหนักตัวจะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากได้รับแคลอรีจากอาหารลดลงและไม่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน จึงแตกต่างจากในมนุษย์ที่ระยะ NASH จะพบภาวะอ้วนและภาวะดื้อต่ออินซูลินร่วมด้วย รูปแบบ MCD นี้มักมีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบสำคัญ โดย Pickens และคณะ ในปี 2009 พบว่าน้ำตาลซูโครสกระตุ้นการสะสมของไขมันที่ตับและกระตุ้นระดับ ALT ในตับเพิ่มสูงขึ้นและพบการอักเสบของเซลล์ตับ 3 วันหลังจากได้รับอาหาร MCD ระยะ steatosis จะพัฒนาขึ้นภายในระยะ 1-2 สัปดาห์ จากนั้นจะพบการอักเสบร่วมกับการตายของเซลล์ตับในเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการเกิดพังผืดที่ท่อของเซลล์ตับ steatohepatitis จะพบได้ประมาณ 10 วันหลังจากตรวจพบพังผืด และพบพังผืดในช่องว่างระหว่างเนื้อตับภายในระยะเวลา 8-10 สัปดาห์ (Wouters *et al.*, 2008) หากยังคงได้รับรูปแบบอาหารนี้อย่างต่อเนื่องนานกว่า 10 สัปดาห์ จะพบการสะสมของไขมันโมเลกุลใหญ่กระจายเติมพื้นที่ของเซลล์ตับร่วมกับการแพร่กระจายของเซลล์อักเสบเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันตามมา ส่งผลให้มีการทำลายไมโทคอนเดรีย ทำให้เซลล์แตกและเกิดกระบวนการสร้างพังผืดได้มากกว่าการเห็นย่นำด้วยรูปแบบอาหารชนิดอื่นๆ แต่ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับ ชนิด คุณสมบัติ และสายพันธุ์ของหนูทดลองด้วย ในปี 2003 Kirsch และคณะ เปรียบเทียบรูปแบบอาหาร MCD ในหนูทดลองสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ หนูแรทสายพันธุ์ Wistar, Long-Evans และ Sprague-Dawley และหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 ทั้งสองเพศพบว่าหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดระยะ steatosis ได้ดีกว่าหนูแรทสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนหนูไมซ์สายพันธุ์ C57BL/6 เพศผู้มีการอักเสบและการตายของเซลล์ตับที่สามารถพัฒนาไปสู่ระยะ NASH ได้ดีที่สุด แต่ข้อเสียของรูปแบบนี้ คือ การเปลี่ยนแปลงของขบวนการเมแทบอลิซึมมีรูปแบบที่ตรงข้ามกับการเปลี่ยนแปลงในมนุษย์

กล่าวคือ หนูไมซ์ที่ได้รับอาหาร MCD จะมีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (มากถึง 20% ของน้ำหนักตัวภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์) การที่ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลงอย่างรวดเร็วส่งผลต่อการทำงานของอินซูลิน แต่ไม่ทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยภาวะที่มีอินซูลินและเลปตินในกระแสเลือดค่อนข้างต่ำจะทำให้ระดับของ adiponectin ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้น อาจจำเป็นต้องใช้ร่วมกับหนูทดลองตัวแบบที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (genetic model) ได้แก่ หนูไมซ์ ob/ob หรือหนูไมซ์ db/db อย่างไรก็ตามรูปแบบอาหาร MCD นับเป็นวิธีที่ประยุกต์ใช้ได้ค่อนข้างง่าย (Anstee and Goldin, 2006) รูปแบบอาหารไขมันสูง (High fat diet: HF)

ปี คศ. 2004 Lieber และคณะ เห็นย่นำภาวะ NASH โดยการให้อาหารที่มีไขมันสูง (HF) แก่หนูแรทนาน 3 สัปดาห์ โดยอาหาร HF ประกอบด้วยส่วนที่ให้พลังงานจากไขมัน 71% จากคาร์โบไฮเดรต 11% และจากโปรตีน 18% พบว่าหนูแรทมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน พบร่องรอยของ panlobular steatosis คือ เกิดไขมันสะสมบริเวณกลีบตับและมีการสะสมของไขมันในเนื้อเยื่อตับ เมื่อทำการปรับการให้อาหารโดยเพิ่มเป็นสองครั้งต่อวันและควบคุมมาตรฐานของสัดส่วนพลังงานเป็นจากไขมัน 35% จากคาร์โบไฮเดรต 47% และจากโปรตีน 18% เลียนแบบสัดส่วนพลังงานในอาหารทั่วไปของมนุษย์ พบว่า ตับของหนูแรทเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากภาวะไขมันพอกตับระยะ steatosis ถึงแม้จะพบการอักเสบของเซลล์ตับลดลงแต่มีพัฒนาการของภาวะไขมันพอกตับไปจนถึงระยะ NASH คล้ายกับในมนุษย์ได้ (Deng *et al.*, 2005) ส่วนการศึกษาของ Ito และคณะ ในปี 2007 โดยการให้อาหาร HF (ที่มีพลังงานจากไขมัน 60%) แก่หนูไมซ์ C57BL/6J เพศผู้ นาน 9 สัปดาห์พบการเกิดภาวะไขมันพอกตับระยะ steatohepatitis ซึ่งความรุนแรงของโรคสามารถพัฒนาไปได้ถึงระยะ NASH หนูไมซ์มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นถึง 71% เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง อินซูลินในเลือดสูง รวมถึงเลปตินในเลือดเพิ่มสูง ร่วมกับภาวะดื้อต่ออินซูลินระดับ ALT ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นประมาณ 9-10 เท่า

และตรวจพบนิวโตรฟิลแทรกตัวในเซลล์ตับ เกิดพังผืดในช่องว่างระหว่างเนื้อตับคล้ายพัฒนาการของโรค NASH ในมนุษย์มีการแสดงออกของยีน TNF- α และเลปตินที่เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของ adiponectin ลดลง การเหนี่ยวนำด้วยรูปแบบอาหารนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่การแสดงออกของโรคในระยะต่างๆขึ้นกับสายพันธุ์ของหนูทดลองและปริมาณไขมันในอาหาร อาทิ หนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไขมันพอกตับในระยะ steatohepatitis คือมีการพอกของไขมันและการอักเสบของเนื้อตับร่วมด้วยได้ด้วยรูปแบบอาหารนี้ ในขณะที่ไม่พบผลสำเร็จดังกล่าวในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Romestaing *et al.*, 2007) รูปแบบคลอเรสเตอรอลและชอคโกแลต (Cholesterol and chocolate)

ในปี 2007 Matsuzawa และคณะให้อาหารที่มีคลอเรสเตอรอลสูงที่มีผลทำลายหลอดเลือด (atherogenic diet) ซึ่งประกอบด้วยคลอเรสเตอรอล 1.25% และชอคโกแลต 0.5% แก่หนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c นาน 24 สัปดาห์ พบการพอกสะสมของไขมันที่ตับที่พัฒนาไปสู่ระยะ steatosis มีการอักเสบของเซลล์ตับและมีพังผืดเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 6-24 สัปดาห์ รูปแบบนี้สามารถพบ hepatic ballooning ได้ซึ่งลักษณะพัฒนาการใกล้เคียงกับในมนุษย์และเมื่อเพิ่มปริมาณไขมันเนย (cocoa butter) เป็น 60% สามารถพบ hepatic ballooning ได้เร็วขึ้นคือภายใน 12 สัปดาห์ แต่อาหารที่ทำลายหลอดเลือดนี้มักจะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันตามมา หากให้ร่วมกับอาหาร HF การพัฒนาการของโรค NAFLD จะคล้ายกับในมนุษย์มากยิ่งขึ้น กล่าวคือพบภาวะดื้อต่ออินซูลินร่วมด้วย แต่การพัฒนาไปสู่ระยะ NASH ในหนูทดลองอาจแตกต่างจากมนุษย์ เนื่องจากเมื่อให้อาหารรูปแบบนี้ไปเป็นระยะเวลานานหนูจะมีแนวโน้มน้ำหนักตัวที่ลดลงเนื่องจากเยื่อไขมันในร่างกายหนูทดลองมีขนาดเล็กจึงฝ่อ รวมถึงมีระดับไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดต่ำลงตามมาจึงมักไม่นิยมใช้รูปแบบนี้สำหรับการทดลองที่ใช้ระยะเวลานาน

รูปแบบน้ำตาลฟรุคโตส (Fructose)

ปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มักใช้โมเดลนี้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไขมันพอกตับและการเกิดภาวะเมแทบอลิซึมที่ผิดปกติอื่นๆ ในปี 2009 Kawasaki และคณะให้น้ำตาลฟรุคโตสเข้มข้น 70% แก่หนูแรท นาน 5 สัปดาห์พบการสะสมของไขมันอิสระโมเลกุลขนาดใหญ่ในเซลล์ตับและการอักเสบของท่อตับ ตับมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์สะสมอยู่ในตับมากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ อย่างไรก็ตามรูปแบบพัฒนาการของโรคอาจแตกต่างจากมนุษย์ กล่าวคือ หนูแรทมักพบการเกาะหรือพอกของไขมันบริเวณเนื้อเยื่อตับโซนที่ 1 ขณะที่ในมนุษย์มักพบในโซน 3 นอกจากนี้พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน IL-6 และ TNF- α ด้วย ในปี 2005 Ackerman และคณะให้อาหารที่มีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นส่วนผสม 60% แก่หนูแรท เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley พบการแทรกตัวของไขมันทั้งชนิดที่มีช่องว่างขนาดใหญ่และขนาดเล็กในเซลล์ตับในระยะ steatosis สอดคล้องกับรายงานของ Armutcu และคณะในหนูแรท เพศผู้ สายพันธุ์ Wistar albino ที่ได้รับน้ำที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 10 วัน ที่พบการแทรกตัวของเซลล์ไขมันในลักษณะเดียวกันในระยะ steatosis แต่ไม่พบการอักเสบของเซลล์ตับ

บทสรุป

การเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับอาจจำเป็นต้องใช้การดัดแปลงพันธุกรรมร่วมกับรูปแบบอาหารชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้ตัวแบบหนูทดลองที่สามารถบ่งชี้ภาวะของโรคได้อย่างแม่นยำส่งผลให้งานวิจัยมีประสิทธิภาพ ให้ผลการศึกษาที่มีความถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้ยังมีรูปแบบการเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับในหนูทดลองอีกมากมายที่ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาแต่ละรูปแบบของการเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับในหนูทดลองมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป (ตารางที่ 3) สามารถเหนี่ยวนำให้หนูทดลองมีพัฒนาการของโรคในระยะที่แตกต่างกัน นอกจากนี้แล้ว ความสำเร็จของการเหนี่ยวนำไปสู่ระยะของภาวะโรคที่ต้องการยัง

ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของหนูทดลองอีกด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและพัฒนารูปแบบการเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับในหนูทดลองต่อไปเพื่อให้ได้ตัวแบบหนูทดลองที่สามารถกำหนดระยะของภาวะไขมัน

พอกตับที่ถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการจำลองการศึกษาภาวะไขมันพอกตับในมนุษย์ต่อไป

ตารางที่ 3 สรุปแบบจำลองการเหนี่ยวนำภาวะไขมันพอกตับในหนูทดลองและระดับพัฒนาการของโรค

แบบจำลอง	ภาวะอ้วน	ภาวะดื้อต่ออินซูลิน	Steatosis	Steatohepatitis	Fibrosis
รูปแบบดัดแปลงพันธุกรรมของสัตว์ทดลอง					
SREBP-1c transgenic mice	✗	✓	✓	✓	✓
ob/ob mice	✓	✓	✓	-	-
db/db mice	✓	✓	✓	-	-
KK-Ay mice	✓	✓	✓	-	-
PTEN 10 null mice	-	-	✓	✓	✓
PPAR- α knockout mice	-	-	✓	-	-
รูปแบบอาหาร					
Methionine and choline deficient food (MCD)	-	-	✓	✓ (severe)	✓
High fat diet (HF)	✓	✓	✓	✓ (mild)	✓
Cholesterol and chocolate	-	-	✓	✓	✓
Cholesterol and chocolate + HF	-	✓	✓	✓	✓
Fructose	-	-	✓	✓, -	-
High fat+ Fructose	✓	✓	✓	✓	✓
รูปแบบดัดแปลงพันธุกรรมร่วมกับอาหาร					
ob/ob mice + MCD/HF	✓	✓	✓	✓	-
db/db mice + MCD	✓	✓	✓	✓	✓
KK-Ay mice + MCD	✓	✓	✓	✓	✓

References

Abiru S, Migita K, Maeda Y, *et al.* Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 39–45.

Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M, *et al.* Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma trigly

ceride reduction. *Hypertension* 2005; 45(5): 1012-1018.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346(16): 1221-1231.

Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30(6): 1356-1362.

- Armutcu F, Coskun O, Gürel A, *et al.* Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* 2005; 38(6): 540-554.
- Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87(1): 1-16.
- Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* 1979; 59(3): 719-809.
- Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, *et al.* Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 430-434.
- Chavin KD, Yang SQ, Lin HZ, *et al.* Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 1999; 274(9): 5692-5700.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84(3): 491-495.
- Debaere C, Rigauts H, Laukens P. Transient focal fatty liver infiltration mimicking liver metastasis. *J Belge Radiol* 1998; 81(4): 174-175.
- Deng QG, She H, Cheng JH, *et al.* Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 2005; 42(4): 905-914.
- Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology* 2001; 121(1): 91-100.
- Fan CY, Pan J, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Steatohepatitis spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase: implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 1998; 273(25): 15639-15645.
- Giuglione D, Paolisso G, Cerillo A. Oxidative stress and diabetes vascular complication. *Diabetes Care* 1996; 19(3): 257-267.
- Grattagliano I, Caraceni P, Calamita G, *et al.* Severe liver steatosis correlates with nitrosative and oxidative stress in rats. *Eur J Clin Invest*. 2008; 38(7): 523-530.
- Hashinaga T, Wada N, Yamada K, *et al.* Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* 2007; 56(4): 470-475.
- Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, *et al.* Hepatocyte specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1774-1783.
- Hug H, Strand S, Grambihler A *et al.* Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem* 1997; 272(45): 272-281.
- Inayat-Hussain SH, Couet C, Cohen GM, Cain K. Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 1997; 25(6): 1516-1526.

- Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, *et al.* Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res* 2007; 37(1): 50-57.
- Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, *et al.* Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr* 2009; 139(2): 2067-2071.
- Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, *et al.* Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(11): 1272-1282.
- Knebel B, Haas J, Hartwig S, *et al.* Liver Specific Expression of Transcriptionally Active SREBP-1c Is Associated with Fatty Liver and Increased Visceral Fat Mass. *Pros One* 2012; 7: 1-15.
- Kulinski A, Vance DE, Vance JE. A choline-deficient diet in mice inhibits neither the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 23916-23924.
- Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000; 105(8): 1067-75.
- Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, *et al.* The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J* 1997; 11(11): 851-857.
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, *et al.* Model of non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(3): 502-509.
- Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, *et al.* Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1995; 373(6513): 448-451.
- Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, *et al.* Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 2007; 46(5): 1392-1403.
- Mu Y-ping, Ogawa T, Kawada N. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. *J Tech Pathol* 2010; 90(2): 245-556.
- Nakayama H, Otabe S, Ueno T *et al.* Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* 2007; 56(4): 470-475.
- Paul A. Non alcoholic liver disease. *New Engl J Med* 2002; 346(16): 1221-1228.
- Pickens MK, Yan JS, Ng RK, *et al.* Dietary sucrose is essential to the development of liver injury in the methioninecholine- deficient model of steatohepatitis. *J Lipid Res* 2009; 50(10): 2072-2082.
- Ratzliff V, Charlotte F, Bernhardt C, *et al.* Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology* 2010; 51(2): 445-453.

- Ratzliff V, Giral P, Charlotte F, *et al.* Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000; 118(6): 1117-1123.
- Romestaing C, Piquet MA, Bedu E, *et al.* Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. *Nutr Metab (Lond)* 2007; 4(4): 1-14.
- Sahai A, Malladi P, Pan X, *et al.* Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(5): G1035-G1043.
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120(5): 1183-1192.
- Sato W, Horie Y, Kataoka E, *et al.* Hepatic gene expression in hepatocyte-specific Pten deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge. *Hepatol Res* 2006; 34(4): 256-265.
- Schattenberg JM, Galle PR. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig Dis* 2010; 28(1): 247-254.
- Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 2005; 353(6): 604-615.
- Stiles B, Wang Y, Stahl A, *et al.* Liver specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 107(7): 2082-2087.
- Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, *et al.* A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169(3): 846-860.
- Wouters KV, Gorp PJ, Bieghs V, *et al.* Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008; 48(2): 474-486.