

网络出版时间:2016/1/28 14:23:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.018.html>

非酒精性脂肪肝病大鼠 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平的变化

李枫林,张宝,管石侠,侯丽丽,程靖,蒋建华

摘要 目的 探讨血清炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18(IL-18)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平在非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 大鼠中的变化及意义。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为造模组 ($n=12$) 及对照组 ($n=12$), 造模组予以高脂饲料喂养, 对照组予以普通饲料喂养。分别于实验第 4、8 周各处死 6 只大鼠。生物化学法检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C), ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α , 光镜和电镜下观察肝脏病理变化。结果 与同期对照组比较, 造模组的大鼠体重、肝湿重及肝指数均增高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与同期对照组比较, 造模组的 ALT、AST、TC、TG 高, HDL-C 低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。4 周和 8 周的 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 水平均较同期的对照组高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。HE 染色显示造模组有轻-中度的脂肪变性, 电镜下造模组可见大小不等的脂滴。结论 喂食高脂饲料 8 周成功的建立了 NAFLD 大鼠模型。其中 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 可作为肝细胞损伤的标志因子, 在肝脏脂肪变的发生中起到重要作用。

关键词 非酒精性脂肪性肝病; 高脂饮食; 白细胞介素 1 β ; 白细胞介素 18; 肿瘤坏死因子 α

中图分类号 R 589.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0351-04

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种无过量饮酒史和其他确切的肝损伤因素, 并以肝实质细胞脂肪变性和肝脏脂肪贮积为病理特征的临床综合征^[1]。其疾病谱是包括非酒精单纯的肝脏脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎以及最终演变的肝硬化甚至是肝细胞癌^[2]。随着当今生活水平的提高、生活方式的变化和膳食结构的改变, NAFLD 的发病率呈逐年上升趋势, 并且发生率有显著的年轻化趋势^[3]。而 Day^[4] 提出的“二次打击”学说中的胰岛素抵抗 (insulin resist-

ance, IR)、氧化应激和脂质过氧化仍然是目前 NAFLD 发病机制中公认的关键因素。尤其提出是细胞内的脂质毒性导致细胞炎症因子释放增多, 从而促使肝细胞发生炎症坏死等^[5]。该研究旨在探究炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 在大鼠 NAFLD 发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级雄性 SD 大鼠 24 只, 购自安徽医科大学动物实验中心, 约 6 周龄, 体重 140~180 g。

1.1.2 主要试剂 ELISA 试剂盒购自上海源叶生物技术有限公司; 戊二醛溶液购自美国 SPI 公司。

1.1.3 仪器 日立-7600 型生化仪 (瑞士 Roche 公司); μ Quant 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); Universal 320/320 R 型低温高速离心机 (德国 Hettich 公司); LeicaRMZ135 型石蜡切片机 (德国徕卡公司); Olympus BX53 显微镜 (日本 Olympus 公司); JEM-1230 型透射电镜 (日本 JEOL 公司); 电动恒温箱 (上海三发公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 实验动物经普通饲料适应性喂养 1 周后将 SD 大鼠随机分为对照组 12 只和造模组 12 只。对照组喂食普通饲料, 造模组喂食高脂饲料, 分别于第 4、8 周末分批处理各组大鼠 6 只。高脂饲料: 88% 普通饲料 + 10% 猪油 + 2% 胆固醇; 普通饲料及高脂饲料均由安徽医科大学动物实验中心提供并制备。

1.2.2 标本采集及处理 大鼠隔夜禁食, 次日晨腹腔注射 10% 水合氯醛, 于麻醉后腹主动脉取血, 常规制备血清并分装后于 -80℃ 保存备测。迅速取出整块肝脏后称取重量即肝湿重, 计算肝指数 (%) = 肝湿重 (g) / 体重 (g) $\times$ 100%。

1.2.3 血清指标检测 血清生化指标谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆

2015-12-08 接收

基金项目: 安徽省年度科研项目 (编号: 1301043019)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院临床营养科, 合肥 230022

作者简介: 李枫林, 女, 硕士研究生;

蒋建华, 女, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: Jjhua@yeah.net

固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 均使用全自动生化分析仪检测;血清炎性细胞因子白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 均使用 ELISA 试剂盒测定,步骤严格按照其说明书操作。用酶标仪在 450 nm 波长下读取各吸光度值,并根据所绘制的标准曲线来计算出相应的浓度值。

1.2.4 肝脏病理学观察 于肝右叶同一部位取组织 1 块,10% 甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察。在肝左叶同一部位取 1 块 1 mm³ 肝组织,用 4 ℃ 2.5% 戊二醛溶液固定,环氧树脂包埋,切超薄片,枸橼酸铅染色,电镜下观察肝细胞超微结构变化,是由安徽省立医院病理科专业人士操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间计量数据比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况的比较 8 周时,对照组的肝脏形态正常,颜色鲜红,质地柔软,表面光滑,边缘锐利;造模组的肝脏体积明显增大,重量也较对照组重,颜色发白,肝脏切面油腻。第 4、8 周造模组的大鼠体重、

肝湿重及肝指数均较同期的对照组显著增高 ($P < 0.01$)。同组间比较,对照组和造模组第 8 周的体重、肝湿重均较第 4 周增加明显,且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 血清生化指标的比较 造模组与同期对照组比较,血清 ALT、AST、TC、TG 水平升高,且第 8 周时显著升高,差异有统计学意义。造模组 HDL-C 水平明显低于同期对照组,差异有统计学意义。而同组间比较,对照组和造模组第 8 组 ALT、AST、TC、TG 均较第 4 周升高,HDL-C 降低,差异有统计学意义。见表 2。

2.3 血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 浓度的比较 与同期对照组比较,造模组血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 浓度升高,差异有统计学意义。而同组间比较,对照组和造模组第 8 周血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 浓度均较第 4 周升高,差异有统计学意义。见表 3。

2.4 肝脏组织病理学结果 光镜下 HE 染色显示,对照组的肝小叶结构清晰完整,肝细胞未见脂肪变性,细胞中央可见细胞核;造模组第 4 周肝细胞广泛肿胀,肝索排列疏松,肝小叶结构不清,部分动物的肝细胞胞质内可见少数大小不等的脂滴,呈现灶脂变或轻度脂变;造模组第 8 周全部大鼠肝组织均呈现轻-中度脂肪变性,肝细胞体积明显增大,胞质疏

表 1 同期一般情况的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

指标	第 4 周			第 8 周		
	对照组	造模组	t 值	对照组	造模组	t 值
体重 (g)	322.12 $\pm$ 3.43	340.63 $\pm$ 6.38 **	-6.262	390.92 $\pm$ 7.41 ^{##}	422.58 $\pm$ 5.10 ** $\Delta\Delta$	-8.621
肝湿重 (g)	10.15 $\pm$ 0.35	14.13 $\pm$ 0.37 **	-19.187	11.57 $\pm$ 0.32 ^{##}	18.11 $\pm$ 0.65 ** $\Delta\Delta$	-22.154
肝指数 (%)	3.15 $\pm$ 0.11	4.15 $\pm$ 0.08 **	-17.407	2.96 $\pm$ 0.06 ^{##}	4.29 $\pm$ 0.14 **	-21.719

与同期对照组比较: * $P < 0.01$; 与第 4 周对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与第 4 周造模组比较: $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

表 2 同期血清生化指标的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

指标	第 4 周			第 8 周		
	对照组	造模组	t 值	对照组	造模组	t 值
ALT (U/L)	38.67 $\pm$ 12.19	71.00 $\pm$ 46.54	-1.646	43.33 $\pm$ 8.64	95.67 $\pm$ 31.06 **	-3.976
AST (U/L)	121.83 $\pm$ 49.64	145.00 $\pm$ 31.72	-0.963	135.00 $\pm$ 37.65	215.50 $\pm$ 56.76 * Δ	-2.895
TC (mmol/L)	0.61 $\pm$ 0.07	2.86 $\pm$ 0.85 **	-8.400	0.99 $\pm$ 0.16 ^{##}	4.57 $\pm$ 1.97 **	-4.438
TG (mmol/L)	0.25 $\pm$ 0.07	0.33 $\pm$ 0.14	-1.359	0.32 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.12 * * Δ	-3.306
HDL-c (mmol/L)	1.64 $\pm$ 0.03	1.28 $\pm$ 0.04 **	19.727	1.16 $\pm$ 0.04 ^{##}	0.94 $\pm$ 0.04 * * $\Delta\Delta$	10

与同期对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与第 4 周对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与第 4 周造模组比较: Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

表 3 同期血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 浓度的比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

指标	第 4 周			第 8 周		
	对照组	造模组	t 值	对照组	造模组	t 值
IL-1 β (pg/ml)	21.50 $\pm$ 1.32	26.83 $\pm$ 1.05 **	-7.079	23.51 $\pm$ 1.78	31.17 $\pm$ 2.41 * * Δ	-5.720
IL-18 (pg/ml)	18.75 $\pm$ 1.03	24.85 $\pm$ 1.40 **	-7.835	23.47 $\pm$ 1.27 ^{##}	70.80 $\pm$ 4.14 * * $\Delta\Delta$	-24.415
TNF- α (pg/ml)	29.77 $\pm$ 5.80	46.29 $\pm$ 2.02 *	-6.013	40.51 $\pm$ 2.62 [#]	52.46 $\pm$ 3.77 * * Δ	-5.824

与同期对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与第 4 周对照组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与第 4 周造模组比较: Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

松,内含大小不等的脂滴空泡,尚未见炎性细胞浸润、坏死灶。见图1。透射电镜下可见,对照组肝细胞核周隙正常,线粒体丰富且形态正常,内质网排列整齐,细胞质内未见脂滴;造模组第4周肝细胞内质网排列整齐,线粒体增大但结构尚完整,胞质内可见少量脂滴;造模组第8周细胞体积明显增大,肝细胞内质网形态尚正常,线粒体明显肿胀,少数线粒体嵴消失,胞质内有多数脂滴。见图2。

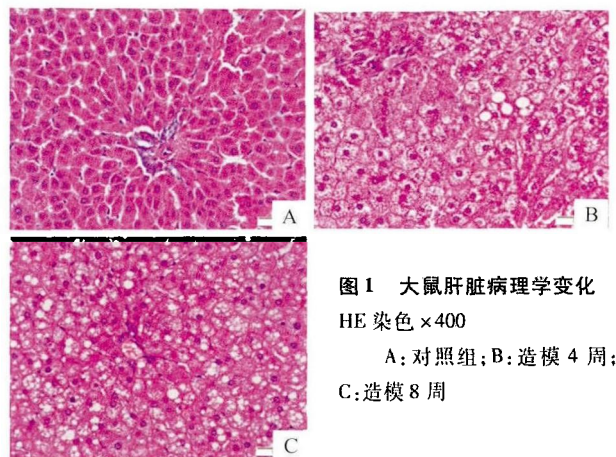


图1 大鼠肝脏病理学变化
HE染色×400
A:对照组;B:造模4周;
C:造模8周

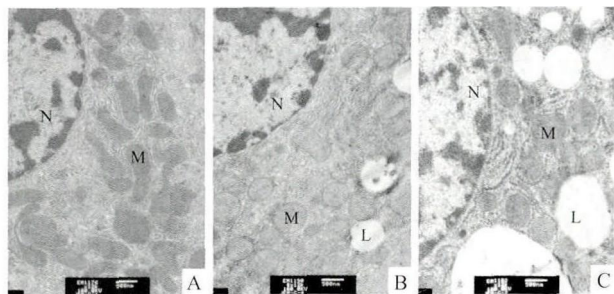


图2 大鼠肝脏电镜改变 ×12 000

A:对照组;B:造模4周;C:造模8周;N:细胞核;M:线粒体;L:脂滴

3 讨论

随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变,NAFLD已逐渐发展成为慢性肝病的首位病因,并且其发病率呈逐年上升的趋势,表明NAFLD的防治已经成为当前研究的重要课题。当今人们饮食摄入中的脂肪含量不断增加,而脂肪便是饮食中能量最高的营养物质,能量摄入过多是导致脂肪肝、IR等发生率不断上升的重要因素^[6]。脂肪摄入过多可导致三酰甘油在肝细胞内聚集,从而引起脂肪变性。而脂肪过量堆积会引起血清游离脂肪酸增多,对肝细胞和胰岛有“脂毒性”作用,而产生IR^[7]。从本研究结果来看,造模组大鼠的体重、肝湿重明显高于同

期对照组,造模组ALT、AST、TC、TG较同期对照组明显升高,HDL-C明显降低。肝脏HE染色和电镜结果均表明造模组的肝组织有一定的脂质沉积。表明长期的高脂饮食可诱发肝脏的脂肪变性。而同组间比较,对照组和造模组第8周的大鼠体重、肝湿重及生化指标ALT、AST、TC、TG均较第4周高,HDL-C明显降低。并且造模组各项指标升高和降低的幅度明显大于对照组,说明高脂饮食可加快肝脏脂肪变性的速度。

NAFLD的发病机制比较复杂,IR是其中心环节,而细胞因子的异常在其发病过程中起着重要作用。IL-18作为重要的前炎症细胞因子参与炎症反应,在炎症反应过程中起着关键作用。IL-18是T细胞介导肝损伤的必须媒介,IL-18在肝脏中除了由库普弗细胞表达外,还可以由损伤的肝细胞合成^[18]。由于IL-18在分泌 γ -干扰素的同时也产生了很多的TNF- α 、IL-8等炎症细胞因子从而加剧了代谢紊乱及免疫功能损伤,此外,IL-18还促进T淋巴细胞的增殖和分化,而直接介导肝细胞的损伤^[9-10]。Vecchie et al^[11]发现NAFLD患者与正常人比较,血浆IL-18水平升高,提示IL-18可能是脂肪变性损害和肝脏炎症中的一个重要发病因素。与本研究造模组IL-18水平较对照组显著升高相符合。肝脏也是TNF- α 重要的靶器官,TNF- α 是介导肝脏损伤的重要炎症因子,在机体免疫损伤中发挥着细胞毒作用^[12]。TNF- α 可以刺激脂肪细胞分泌瘦素引起IR,还可以和肝细胞上的TNF- α 受体作用而影响肝脏脂肪代谢,抑制胰岛素受体酪氨酸激酶活性,而致IR加重^[13]。此外,TNF- α 可减弱线粒体的呼吸功能,导致线粒体跨膜电位降低及其内外膜间的通透转换孔道开放,而加强线粒体氧化活性物质和过氧化脂质的形成^[10]。库普弗细胞还可产生IL-1 β 而加剧肝脏炎症及脂肪变性,因IL-1 β 促进胰岛 β 细胞的一氧化氮生成和细胞凋亡而导致胰岛 β 细胞选择性的破坏,从而进一步诱导胰岛素抵抗^[14-15]。本研究中,造模组中IL-18、TNF- α 、IL-1 β 的水平都随着高脂饮食引起肝脏病理表现的加重而升高,提示IL-18、TNF- α 、IL-1 β 可作为肝细胞受损的标志因子。

综上所述,高脂饮食喂养大鼠可致肝功能降低、肝脏脂质沉积,说明高脂饮食是NAFLD发展的危险膳食因素。IL-18、TNF- α 、IL-1 β 在NAFLD发病中起着重要的作用,通过血清IL-18、TNF- α 、IL-1 β 浓度的变化,结合肝脏病理变化,可以反映肝脏损伤的严

重程度,对判断 NAFLD 的发展及预后有一定的意义。

参考文献

- [1] Alkhouri N, Tamimi T A, Yerian L, et al. The inflamed liver and atherosclerosis: a link between histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease and increased cardiovascular risk [J]. *Dig Dis sci*, 2010, 55(9): 2644 – 50.
- [2] Te Sligte K, Bourass I, Sels J P, et al. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem [J]. *Eur J Intern Med*, 2004, 15(1): 10 – 21.
- [3] 王素琴, 黄 缘. 非酒精性脂肪肝病的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 23: 3410 – 5.
- [4] Day C P. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem [J]. *Clin Med*, 2011, 11(2): 176 – 8.
- [5] 张羽萍, 华 静. 库普弗细胞在非酒精性脂肪性肝病中的作用 [J]. *国际消化病杂志*, 2008, 28(4): 315 – 7.
- [6] Bertolotti M, Leonardo A, Mussi C, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and aging: epidemiology to management [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(39): 14185 – 204.
- [7] Shih C M, Wu J S, Ko W C, et al. Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by cadmium in normal human lung cells [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(2): 335 – 47.
- [8] 李 岚, 刘慧霞, 贺 丹, 等. IL-18 对大鼠非酒精性脂肪肝病形成的作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(17): 1764 – 7.
- [9] 周冬生, 刘博峰. 细胞因子与非酒精性脂肪肝关系的研究进展 [J]. *华夏医学*, 2014, 27(4): 128 – 31.
- [10] 程 勇, 赵亚敏, 苏 剑, 等. 非酒精性脂肪性肝病患者血清白介素-18、白介素-8、肿瘤坏死因子- α 水平变化的临床意义 [J]. *医学研究与教育*, 2009, 26(3): 18 – 20.
- [11] Vecchiet J, Falasca K, Cacciatore P, et al. Association between plasma interleukin – 18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non – alcoholic fatty liver disease [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2005, 35(4): 415 – 22.
- [12] 魏永杰. 细胞因子在非酒精性脂肪性肝炎发病机制中的作用 [J]. *国际消化病杂志*, 2006, 26(1): 14 – 6.
- [13] 陈春莲. 脂肪因子与非酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. *华夏医学*, 2012, 25(6): 927 – 30.
- [14] Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, et al. Toll-like receptor9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 β in mice [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(1): 323 – 34.
- [15] 陈艳丽, 张 宝, 管石侠, 等. IL-18、IL-1 β 水平与非酒精性脂肪性肝病的关系 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(2): 181 – 4.

The changes of IL-1 β , IL-18 and TNF- α levels in NAFLD rats

Li Fenglin, Zhang Bao, Guan Shixia, et al

(Dept of Clinical Nutriology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the changes and significance of serum inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into model group and control group. The model group (12 rats) were fed with a high-fat diet, and the control group (12 rats) were fed with normal diet. After feeding for 4 and 8 weeks, 6 rats were randomly selected to be killed from each group. The serum alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured with biochemical method. ELISA was used to test the levels of IL-1 β , IL-18 and TNF- α . The liver pathological changes were observed under light microscopy and transmission electron microscope. **Results** The level of weight, liver-wet weight and liver index of rats were significantly higher in the model group than the concurrent control group in 4th or 8th week ($P < 0.01$). The levels of ALT, AST, TC, TG were significantly higher and HDL-C was significantly lower in the model group than the concurrent control group in 4 or 8 week ($P < 0.05$). The level of IL-1 β , IL-18 and TNF- α were significantly higher in the model group than the concurrent control group in 4th or 8th week ($P < 0.05$). HE staining showed mild-to-moderate hepatic steatosis in the model group. Under transmission electron microscope showed lipid droplets in different number. **Conclusion** The NAFLD rats model is established successfully by feeding high-fat diet for 8 weeks. IL-1 β , IL-18 and TNF- α are symbolic inflammatory factors of hepatocyte damage, and may play important roles in the progress of hepatic steatosis.

Key words non-alcoholic fatty liver disease; high-fat diet; interleukin-1 β ; interleukin-18; tumor necrosis factor- α