基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0031-04

# 高脂诱导的 NAFLD 大鼠模型血清 IL-6、TNF-α 等的变化

敬晓琴,袁 喆
(重庆医科大学附属第一医院感染科 重庆市传染病寄生虫病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:白细胞介素 -6(Interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)在非酒精性脂肪肝病(Nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)的形成中具有重要作用。我们探讨在大鼠 NAFLD 发生发展过程中 IL-6 血清浓度的变化及与 TNF-α、胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)的关系,从而更好地了解非酒精性脂肪肝病的发病机理。方法:48 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组和 NAFLD 模型组,正常对照组采用普通饲料喂养,NAFLD 模型组采用高脂饲料喂养,并于第 2、4、6、10 周末分批处死各组大鼠 6 只,并检测其血清 ALT、AST、TG 、TC、空腹血糖(Fasting blood glucose,FBG)、空腹胰岛素(Fasting insulin,FINS)、IL-6、TNF-α 等指标,计算肝指数及胰岛素抵抗指数(Insulin resistance index,IRI),观察肝脏病理变化。结果:模型组大鼠血清 ALT、AST、TG 、TC、FINS、IRI、IL-6、TNF-α 均较对照组升高,其中 TNF-α 自第 4 周起高于对照组($P<0.05$),IL-6 第 6 周起高于对照组($P<0.05$),IL-6 与 TNF-α($r=0.931$,$P<0.05$)、IRI($r=0.946$,$P<0.05$)呈高度正相关。结论:脂肪因子 IL-6 与 TNF-α、IRI 密切相关,与 NAFLD 的形成发展有重要关联。

【关键词】非酒精性脂肪肝;脂肪因子;白细胞介素 -6
【中国图书分类法分类号】R575.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2009-04-29

# Changes of plasma Interleukin-6 and TNF-α in the development of nonalcoholic fatty liver rats induced by high fat diet

*JING Xiao-qin, et al*
(*Key Laboratory of Infections and Parastic Diseases in Chongqing, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: IL-6 and TNF-α play critical roles in the development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). We thus investigated the changes of plasma Interleukin-6 (IL-6) and TNF-α in the nonalcoholic fatty liver of rats and their correlation. This will provide new insight into the pathology of NAFLD. *Methods*: Forty-eight male SD rats were divided in two groups randomly. The NAFLD was induced in male SD rats by feeding the high-lipid nutrition, whereas, the control group was fed with low-fat nutrition. All rats were sacrificed at the end of 2, 4, 6, and 10 weeks. The levels of ALT, AST, TG, TC, FBG, FINS, IL-6 and TNF-α in the sera of rats were measured. The liver index and IRI were counted and the pathologic changes of liver were recorded during experiments. *Results*: Compared with control group, the levels of ALT, AST, TC, TG, FINS, IRI, TNF-α and IL-6 in the sera of NAFLD group all increased significantly($P<0.01$). The levels of TNF-α in NAFLD group started to increase significantly at week 4($P<0.05$), while the levels of IL-6 began to elevate from week 6 ($P<0.05$). From week 2 to week 10, IL-6 was highly positively related to TNF-α ($r=0.931$, $P<0.05$) and IRI ($r=0.946$, $P<0.05$). *Conclusion*: The levels of IL-6 were highly correlated with TNF-α and IRI in the sera of NAFLD mouse models, which indicates that both IL-6 and TNF-α are crucial in the development of NAFLD.

【Key words】nonalcoholic fatty liver disease; adipocytokines; interleukin-6

非酒精性脂肪肝病(Nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)已成为危害人类健康最常见的慢性肝脏疾病之一,是目前国内外医学研究的热点。近年来研究表明脂肪组织已不仅是能量储备场所,更是一个活跃的内分泌器官。在 NAFLD 的形成过程中,脂肪组织分泌的多种脂肪因子可随血液直接进入肝脏,通过影响胰岛素的敏感性,参与糖脂代谢及脂肪变性、炎症坏死、氧化应激等过程,对 NAFLD 起着重要作用。其中脂联素、瘦素、抵抗素、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)与 NAFLD 发病的报道较多,而白细胞介素 -6(Interleukin-6,IL-6)的相关资料较少。本课题旨在通过对大鼠 NAFLD 模型发生发展中的血清 IL-6 水平的变化及与 TNF-α、胰岛素抵抗指数(Insulin resistance index,IRI)等指标的关系研究,探讨脂肪因子 IL-6 在 NAFLD 中的作用。

作者介绍:敬小琴(1984-),女,硕士,
研究方向:感染性疾病及肝病。现工作单位:重庆市长寿区人民医院感染科。
通信作者:袁 喆,男,教授,Email:yuanzhe-1030@163.com。
基金项目:重庆市卫生局课题(编号:2003-31)。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体重 160～180 g(重庆医科大学动物中心提供);胆固醇(广州天马精细化工厂);TNF-α、IL-6 ELISA 试剂盒及胰岛素放免法试剂盒(武汉博士德生物工程公司);DL-5000B-26 型低温超速离心机(上海生产);康宁 560 全自动生化分析仪(美国生产);GC-1200 型自动放免 γ 测量仪(中国科大中佳公司生产);ELx-800UV 型酶标仪(美国生产)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 SD 大鼠 48 只适应性喂养 1 周后随机分为 2 组,每组 24 只。第 1 组为正常对照组,基础饲料喂养(重庆医科大学动物中心配制),第 2 组为 NAFLD 模型组,高脂饲料喂养(基础饲料 84%+2%胆固醇 +14%猪油)。

1.2.2 观察指标及测定方法

1.2.2.1 一般情况 实验期间观察大鼠毛发、行为、粪便、体重情况。分别于第 2、4、6、10 周末处死各组大鼠 6 只。处死前禁食 12 h,称重后用 1%水合氯醛腹腔麻醉,腹主动脉取血,按常规制备血清,-70℃保存待测。完整取出肝脏,观察肝脏外形,称湿重,计算肝指数。肝指数 = 肝湿重(g)/ 体重(g)× 100%。取部分肝右叶组织于 10%甲醛固定保存。

1.2.2.2 血清测定 全自动生化分析仪测定 ALT、AST、TG、TC、FBG,ELISA 法测定 IL-6 及 TNF-α,放免法测定 FINS,按试剂盒规范操作,计算胰岛素抵抗指数(IRI=In(FBS(mmol/L) × FINS(mU/L) /22.5))。所有血清标本同批测定,批内及批间变异系数 <5%。

1.2.2.3 肝组织病理学评价 以 10%甲醛固定肝脏组织,石蜡包埋、切片,HE 染色后光镜下观察肝脏病理学改变。每张切片观察 5 个肝小叶,以平均每个肝小叶内脂肪变性的肝细胞所占比例表示肝脏脂肪变性程度。目前尚无针对大鼠脂肪肝的诊断标准,因此根据中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组 2001 年 9 月拟定的 NAFLD 诊断标准中的组织学诊断标准[1]。

### 1.3 统计法处理

用 SPSS15.0 统计软件分析,计量资料用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 $q$ 检验,两因素间关系判断采用直线回归分析。

## 2 结 果

### 2.1 一般情况

实验期间各组大鼠均无死亡。正常组大鼠皮毛整洁,饮食正常,灵活性好。模型组大鼠毛色偏黄、凌乱,体型较大,懒动。第 4 周末 2 组大鼠体重无明显差异,但肝湿重、肝指数出现统计学差异($P<0.05$),第 6 周和第 10 周末体重出现统计学差别($P<0.05$),肝湿重、肝指数则显著升高($P<0.01$),见表 1。

### 2.2 血清转氨酶、血脂变化

模型组大鼠的血清 ALT、AST、TG 和 TC 均随喂养时间的延长逐渐升高。第 4 周开始模型组 ALT、AST、TG、TC 高于正常组($P<0.05$),至 10 周末时出现显著统计学差异($P<0.01$),见表 2。

### 2.3 FBG、FINS、IRI 的变化

在第 2、4、6、10 周末比较两组大鼠 FBG 均无统计学差异 ($P>0.05$);FINS 比较显示在第 4 周末即出现统计差异($P<0.05$),并随时间延长差异增大,至第 6 周和 10 周末出现显著统计学差异($P<0.01$);IRI 则在第 4 周出现显著差异($P<0.01$),见表 3。

### 2.4 血清 TNF-α、IL-6 变化

模型组血清 TNF-α、IL-6 总体呈升高趋势,并随着建模时间延长进行性升高,4 周时与同期正常组比较 TNF-α 有统计学差异($P<0.05$),IL-6 无差别($P>0.05$),6 周时 IL-6 出现统计学差异($P<0.05$)而 TNF-α 存在显著差异($P<0.01$),至第 10 周两者均有显著性差异($P<0.01$),见表 4。

### 2.5 直线相关性分析

直线相关分析结果显示血清 IL-6 与 TNF-α ($r=0.931$, $P<0.05$)、IRI ($r=0.946$, $P<0.05$)呈高度正相关,见表 5 及图 1、2。

### 2.6 肝组织病理学变化

正常组肝脏肉眼观红润、光滑,质软,边缘锐利,切面无油腻感,模型组肝脏表面部分呈浅黄色,体积明显增大,包膜紧张,质饱满,边缘变钝,切面油腻。病理切片显示,正常组大鼠肝脏小叶结构正常,无肝细胞脂肪变性和炎症细胞浸润

表 1 2 组大鼠体重、肝湿重及肝指数变化($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 组别 | 例数 | 体重 | 肝湿重 | 肝指数 |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 周 | 正常组 | 6 | 184.67 ± 7.39 | 4.58 ± 0.45 | 2.47 ± 0.21 |
| | 模型组 | 6 | 191.33 ± 8.52 | 4.95 ± 0.38 | 2.58 ± 0.33 |
| 4 周 | 正常组 | 6 | 208.33 ± 8.28 | 5.23 ± 0.25 | 2.51 ± 0.16 |
| | 模型组 | 6 | 222.17 ± 9.87 | 6.12 ± 0.41* | 2.72 ± 0.28* |
| 6 周 | 正常组 | 6 | 261.17 ± 15.66 | 6.62 ± 1.08 | 2.57 ± 0.33 |
| | 模型组 | 6 | 293.17 ± 13.69* | 8.82 ± 1.15** | 2.99 ± 0.27** |
| 10 周 | 正常组 | 6 | 311.33 ± 12.97 | 7.78 ± 1.80 | 2.49 ± 0.27 |
| | 模型组 | 6 | 342.17 ± 17.41* | 10.68 ± 1.44** | 3.12 ± 0.19** |

注:与同期正常组比较,*$P<0.05$, **$P<0.01$

表 2 2 组大鼠血清肝功、血脂的变化($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 组别 | 例数 | TG(mmol/L) | TC(mmol/L) | ALT(U/L) | AST(U/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 周 | 正常组 | 6 | 0.75 ± 0.12 | 1.58 ± 0.25 | 40.38 ± 5.42 | 107.52 ± 14.28 |
| | 模型组 | 6 | 0.82 ± 0.17 | 1.73 ± 0.38 | 44.27 ± 6.15 | 114.83 ± 15.42 |
| 4 周 | 正常组 | 6 | 0.77 ± 0.16 | 1.60 ± 0.31 | 43.85 ± 6.47 | 112.27 ± 15.84 |
| | 模型组 | 6 | 1.08 ± 0.19* | 2.16 ± 0.52* | 60.82 ± 8.46* | 146.75 ± 17.76* |
| 6 周 | 正常组 | 6 | 0.80 ± 0.15 | 1.64 ± 0.27 | 42.47 ± 7.15 | 115.76 ± 15.53 |
| | 模型组 | 6 | 1.24 ± 0.20* | 2.57 ± 0.63* | 75.20 ± 10.6* | 184.67 ± 20.51* |
| 10 周 | 正常组 | 6 | 0.82 ± 0.13 | 1.62 ± 0.30 | 44.56 ± 6.34 | 118.29 ± 15.94 |
| | 模型组 | 6 | 1.45 ± 0.25** | 3.44 ± 0.76** | 89.41 ± 11.2** | 205.39 ± 17.11** |

注:与同期正常组比较,*$P$<0.05, **$P$<0.01

表 3 2 组大鼠 FBG、FINS、IRI 的变化($\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 组别 | 例数 | FBG(mmol/L) | FINS(mU/L) | IRI |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 周 | 正常组 | 6 | 4.59 ± 0.27 | 25.01 ± 3.19 | 1.62 ± 0.16 |
| | 模型组 | 6 | 5.01 ± 0.30 | 27.83 ± 4.88 | 1.80 ± 0.12 |
| 4 周 | 正常组 | 6 | 4.67 ± 0.47 | 24.66 ± 5.06 | 1.61 ± 0.11 |
| | 模型组 | 6 | 5.25 ± 0.69 | 34.39 ± 3.85* | 1.96 ± 0.21** |
| 6 周 | 正常组 | 6 | 4.70 ± 0.55 | 25.80 ± 5.61 | 1.66 ± 0.12 |
| | 模型组 | 6 | 5.38 ± 0.45 | 47.86 ± 5.56** | 2.43 ± 0.10** |
| 10 周 | 正常组 | 6 | 4.87 ± 0.52 | 26.10 ± 5.75 | 1.71 ± 0.15 |
| | 模型组 | 6 | 5.71 ± 0.49 | 64.79 ± 7.17** | 2.79 ± 0.17** |

与同期正常组比较,*$P$<0.05, **$P$<0.01

表 5 血清 IL-6 与 IRI、TNF-α 直线相关分析结果

| | | IRI | TNF-α |
|---|---|---|---|
| IL-6 | 相关系数 $r$ | 0.946 | 0.931 |
| | $P$ 值 | <0.05 | <0.05 |

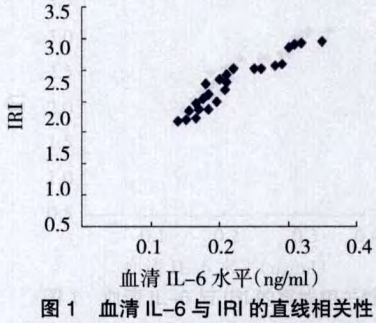



图 1 血清 IL-6 与 IRI 的直线相关性

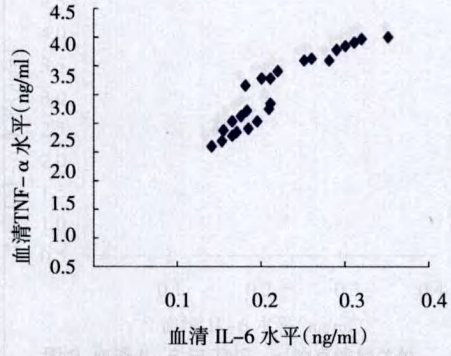



图 2 血清 IL-6 与 TNF-α 的直线相关性

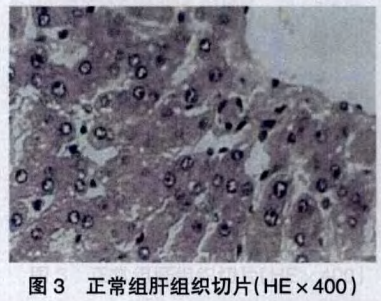


图 3 正常组肝组织切片(HE×400)

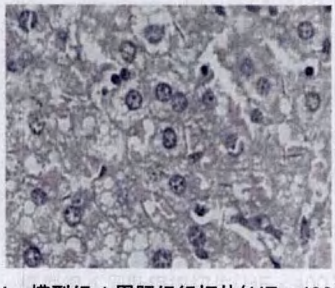


图 4 模型组 4 周肝组织切片(HE×400)

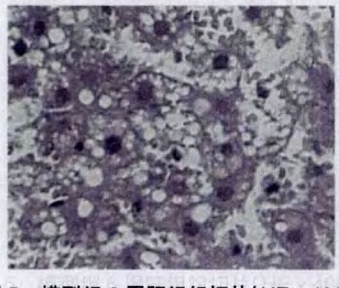


图 5 模型组 6 周肝组织切片(HE×400)

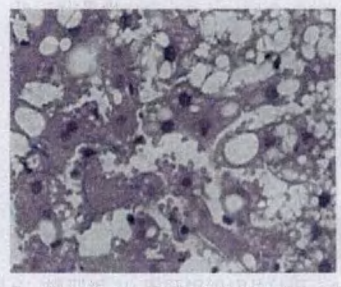


图 6 模型组 10 周肝组织切片(HE×400)

(图 3),模型组第 4 周末出现轻微的肝细胞脂肪变性,脂变肝细胞比例小于肝小叶的 1/3; 第 6 周末表现为以小泡性变性为主的混合性脂肪变,脂肪变性的肝细胞占肝小叶的 1/3 以上,炎症细胞浸润不明显;第 10 周末时,出现以大泡性为主的脂肪变性,肝小叶内脂肪变性的肝细胞比例大于 2/3,胞浆内有大量脂滴空泡,小叶内可见炎症细胞浸润,达到重度脂肪肝标准,并有一定程度的 NASH 病理学表现,见图 4~6。

## 3 讨 论

NAFLD 是一类无过量饮酒史和其他明确肝损因素所致的以肝细胞大泡性脂变为主要病理改变的临床综合症,现认为这是一种遗传 - 环境 - 代谢应激相关性疾病。近年来随着生活水平的提高和不良生活方式的增加,NAFLD 的发病率逐年上升,并愈来愈引起人们的重视,然而其明确的发病机制尚不清楚,目前较公认的假说是"二次打击"学说[2],它认为 IR 是 NAFLD 发生发展的关键环节。而近年来研究发现脂肪细胞分泌的脂肪因子在诱导和加重 IR 有重要作用。

本实验应用改良高脂饲料建立 NAFLD 大鼠模型,成功率 100%。并从生化指标、病理改变两方面呈现了正常肝脏在高脂饮食介导下发展为单纯性脂肪肝并进展为脂肪性肝炎的病变过程。TNF-α 于 1993 年被认为亦是一种脂肪因子,是脂肪细胞中最先鉴定出来的炎症因子,它是介导肝细胞损伤的脂源性因子中最重要的一种,在局部脂肪组织中的表达与肥胖程度有一定正相关[3]。TNF-α 及其受体在 IR 中的关键作用已得到公认,而 IR 正是二次打击中的第一次。同时 TNF-α 又可增加肝内活性氧产生,增加 IL-6 等其他炎症因子的释放而加重肝损伤,这就导致了第 2 次打击。本实验亦证实了 TNF-α 在第 4 周起即首先升高,且随着时间延长而持续显著升高,并与 IL-6 呈高度正相关。但第 4 周时 2 组大鼠体重尚无明显差异,模型组已出现明显的 IR,表明TNF-α 的升高并非简单的就是肥胖的结果,而更可能与 NAFLD 形成有关。

IL-6 既是脂肪因子也是一种免疫调节因子,正常人脂肪组织可分泌 IL-6,而肥胖者脂肪组织分泌的 IL-6 可达血液中的 25%~30%。IL-6 是肝脏合成 C 反应蛋白的强诱导剂,同时浓度升高的 IL-6 又可促进巨噬细胞释放 IL-1、TNF-α 等,由此形成恶性循环,但我们观察到 TNF-α 的升高早于 IL-6 的增多,亦有报道指出 IL-6 和 TNF-α 有一定的协同作用[4]提示 TNF-α 可能是引起 IL-6 等其他脂肪因子变化的始发因素,但两者又互相影响,相互促进,共同影响 NAFLD 的形成,这也可能是本实验中 IL-6 和 TNF-α 持续升高的原因之一。然而另有研究证实 IL-6 可降低脂变的肝细胞对缺血/再灌注损伤的敏感性,改善肝脏微循环,促进肝细胞再生,故有改善脂肪肝的作用[5,6]。也有实验认为 IL-6 的中枢浓度与肥胖呈负相关,提示 IL-6 在外周和中枢对能量代谢的影响是不同的[7]。在儿童 NAFLD 者发现 IL-6 水平与正常儿童并无明显差别[8],这与成人的统计结果相反,说明 IL-6 在儿童和成人的作用可能也是不同的。以上这些研究均提示 IL-6 在 NAFLD 的机理效应尚存在较大争议[9],这也是本实验选取 IL-6 作为观察指标的重要原因。在本实验中我们可观察到模型组 IL-6 的水平从第 6 周开始出现差异并持续升高,其发展趋势同肝酶、血脂的增高及肝脏脂肪变性的发展程度一致。虽然第 6 周时模型组大鼠体重及血清 IL-6 均开始出现统计学差异,从此方面似乎很难看出 IL-6 的升高是肥胖的结果还是与 NAFLD 形成有关,但肥胖本身即是 NAFLD 的重要危险因素,同时通过其与 TNF-α、IRI 的相关性分析,证明本实验虽同其他一些相关文献报道一致,均观察到 IL-6 在 NAFLD 模型中的升高,但我们发现 IL-6 在 NAFLD 形成中加剧了肝脏的脂变、IR 和炎症程度,而非保护性作用。但它对 NAFLD 的影响是直接作用还是通过诸如 TNF-α 等其他因子来间接发挥作用或者两者均存在,IL-6 对外周和中枢的不同效应以及在成人和儿童中的观察到的相反结果又是通过怎样的途径和机理实现的,这些都还需要进一步的研究证实。

目前少有关于 NAFLD 不同阶段 TNF-α 尤其是 IL-6 变化情况的相关报道,本实验从不同时间点动态观察了 2 种重要脂肪因子的水平并分析了其关系,结果表明脂肪因子在 NAFLD 发病环节起着重要作用,并且相互关联、相互影响,形成复杂网络系统,进一步研究它们的作用规律将为 NAFLD 的机理、诊断、治疗和预防、预测提供新思路。

## 参 考 文 献

[1] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组.NAFLD 诊断标准[J]. Mod Pract Med,2002,1(14):100.

[2] Day C P,James O F W.Steatohepatitis:a tale of two "hit"[J]?Gastroenterol,1998,114(4):842-845.

[3] Fantuzzi G.Adipose tissue,adipokines,and inflammation[J].Allergy Clin Immunol,2005,115(5):911-919.

[4] Bastard J P,Maachi M,Lagathu C,et al.Recent advances in the relationship between obesity,inflammation,and insulin resistance[J].Eur Cytokine Netw,2006,17(1):4-12.

[5] Hong F,Radaeva S,Pan H N,et al.Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease[J]. Hepatology,2004,40(4):933-941.

[6] Sun Z,Klein A S,Radaeva S,et al.In vitro interleukin-6 treatment prevents mortality associated with fatty liver transplants in rats[J].Gastroenterol,2003,125(1):202-215.

[7] Kershaw E E.Flier J S.Adipose tissue as an active endocrine organ: rencent advances[J].Clin Endocrinol Metabol,2004,89(6):2548-2556.

[8] Louthan M V,Barve S,McClain C J,et al.Decreased serum adipon ectin:an early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease[J].J Pediatr,2005,147(6):835-838.

[9] 陈名道.脂肪组织和脂肪因子:是"敌"还是"友"[J]?中华内科杂志,2006,45(2):148-149.

(责任编辑:冉明会)