

# 褪黑素抑制酒精性脂肪肝发展的动物实验研究

胡奇珍 洪汝涛 高学梅

**摘要** 目的 利用酒精性脂肪肝大鼠模型 探讨褪黑素对酒精性脂肪肝的保护作用和相关机制。方法 42只SD雌性大鼠随机分成4组:模型组12只,正常组、褪黑素低剂量组和褪黑素高剂量组各10只,用酒精灌胃法,持续8周制造出大鼠酒精性脂肪肝模型。褪黑素组大鼠在酒精灌胃后腹腔注射褪黑素。8周实验结束后,HE染色观察大鼠肝脏病理改变,免疫组化法检测肝组织中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素-6(IL-6)的表达。生化法检测各组大鼠谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、胆红素(TBIL)的水平以及大鼠肝匀浆中丙二醛(MDA)的水平和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的活性。结果 与正常组比较,模型组肝细胞可见较多的炎性细胞浸润,脂肪变性明显,大量脂肪空泡出现,而褪黑素各组大鼠肝组织病理变化程度均较模型组减轻。与正常组比较,模型组大鼠血清中肝生化指标(ALT、AST和TBIL)水平明显升高( $P < 0.01$ ),肝匀浆中MDA含量明显升高( $P < 0.01$ ),GPx活性明显降低( $P < 0.01$ ),而褪黑素低、高剂量组大鼠肝生化水平较模型组显著降低( $P < 0.05$ ),肝匀浆MDA含量较模型组显著降低( $P < 0.01$ ),GPx活性较模型组明显升高( $P < 0.01$ )。并且褪黑素能降低大鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达( $P < 0.01$ )。结论 褪黑素可能抑制大鼠酒精性脂肪肝的发展,具体机制与其抵抗氧化应激作用和抑制肝组织中TNF- $\alpha$ 和IL-6等相关因子的表达有关。

**关键词** 褪黑素; 酒精性脂肪肝; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 白介素-6

**中图分类号** R 575.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1115-04

长期大量饮酒可导致肝脏疾病,但酒精对肝脏造成损害的机制尚未完全阐明。酒精的主要代谢器官是肝脏,在肝脏的主要代谢途径是通过肝内的微粒体乙醇氧化系统(microsomal ethanol oxidizing system, MEOS)、乙醇脱氢酶系统(alcohol dehydrogenase, ADH)和过氧化氢酶系统代谢<sup>[1]</sup>。在MEOS途径中,乙醇产生的大量活性氧可造成肝脏损害,在其他途径中,乙醇代谢产生的大量乙醛也对肝脏有

损害作用,因为乙醛是高度反应活性分子,能与蛋白质结合形成乙醛-蛋白加合物,该分子对肝细胞有直接损伤作用。另外,酒精代谢过程中诱导的氧化应激反应,集聚大量氧化产物、脂质过氧化分子、氧自由基、内毒素、细胞因子等有害物质,可进一步导致肝细胞代谢紊乱、Kupffer细胞功能低下,从而导致酒精性脂肪肝发生<sup>[2]</sup>。褪黑素是一种生物活性物质,由松果体分泌,是一种自由基清除因子,有抗氧化作用,同时可以诱导抗氧化酶的表达,而这些抗氧化酶在保护肝脏免受酒精损害中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。故可以推测褪黑素在酒精性肝病的发病过程中,对肝脏可能存在保护作用,而该研究旨在探讨褪黑素对酒精性脂肪肝的保护作用及其相关机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康雌性普通级SD大鼠,180~300g,购自安徽医科大学实验动物中心,标准环境下,给予正常饮食,适应饲养1周。

**1.2 试剂与仪器** 瑞士Roche Modular DPP全自动生化分析仪(瑞士罗氏公司);台式高速离心机(美国Sigma公司);DT600K分析天平(北京友仪四方科技发展有限公司);752N分光光度计(上海绿宇生物科技有限公司);光学显微镜(日本NIKON公司);褪黑素(美国Sigma公司);免疫组化试剂盒、DAB染色液、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)检测试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )兔抗鼠多克隆抗体、白介素-6(interleukin-6, IL-6)兔抗鼠多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

**1.3 造模及动物处理** 大鼠分组如下:正常组(10只)、模型组(12只)、褪黑素低剂量组(10只)、褪黑素高剂量组(10只),模型组和褪黑素组大鼠的酒精摄入量为8g/(kg·d),酒精体积比为40%( $v/v$ ),考虑到大鼠胃内容量体积局限,每天灌胃2次,中间间隔8h,共造模8周。在第2次酒精灌胃后1h,给予褪黑素低剂量组和高剂量组老鼠腹腔注射褪黑素10、20mg/kg至8周末。实验最后,大鼠腹主动脉

2015-04-24 接收

基金项目:安徽省年度科研计划项目(编号:10020503084)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院消化内科,安徽省消化疾病重点实验室,合肥 230032

作者简介:胡奇珍,女,硕士研究生;

洪汝涛,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: hongrutoao@aliyun.com

取的血标本,离心后获得血清标本。取新鲜肝脏组织,获得肝脏标本。

**1.4 大鼠血清生化、MDA 和 GPx 活性检测** 全自动生化分析仪测定大鼠血清中谷丙转氨酶( alanine-transaminase, ALT)、谷草转氨酶( aspartate aminotransferase, AST)、胆红素( total bilirubin, TBIL) 的水平。按照试剂盒说明书步骤,制备新鲜肝脏组织匀浆液,生理盐水稀释,离心,取上清液,进行蛋白定量,再用分光光度法得光密度值( optical density, OD),计算出 MDA 含量和 GPx 活性。

**1.5 病理检测方法** 取肝脏左叶部分组织,在 10% 的甲醛中固定至少 24 h,石蜡包埋,再切至 5  $\mu\text{m}$  厚组织薄片,HE 染色后,在光学显微镜下观察大鼠肝脏组织病理学改变。对切片按照如下标准进行分级评估:0 级(正常肝细胞),1 级( $<1/4$  肝细胞出现脂肪变性),2 级( $1/4 \sim 1/2$  肝细胞出现脂肪变性),3 级( $1/2 \sim 3/4$  肝细胞出现脂肪变性),4 级( $>3/4$  肝细胞出现脂肪变性)<sup>[4]</sup>。

**1.6 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的免疫组化检测及阳性细胞** 严格按照试剂盒说明书操作步骤,标本切片脱蜡、水化、抗原修复,再灭活组织内源性过氧化物酶,血清封闭孵化后,滴加一抗,在 4 ℃ 环境下孵育过夜,次日加入二抗,然后 DAB 染色,分别设立阳性对照和阴性对照,阴性对照一抗改用 PBS 液替代,最后镜下摄片分析结果。TNF- $\alpha$  和 IL-6 阳性均表达在肝细胞的胞质内,免疫组化染色后胞质内可见较强的棕黄色阳性反应颗粒。每张切片在电子显微镜( $\times 400$ )下随机选取 5 个高倍视野,再用 Image-Pro Plus 影像分析器进行图像分析,获得定量资料,进行统计分析。

**1.7 统计学处理** 运用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析( One-Way ANOVA),两组间比较采用 LSD 方法检验。等级资料(病理分级)采用 Ridit 分析进行统计分析。

## 2 结果

**2.1 肝脏病理学改变** Ridit 分析总体等级资料,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。正常组大鼠肝脏病理可见肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,肝细胞无坏死、炎症,无纤维化等明显病理改变。模型组大鼠肝脏镜下可见明显脂肪空泡,一些细胞肿胀变形,汇管区出现炎性细胞浸润,肝小叶界限模糊。与模型组比较,褪黑素组大鼠肝脏结构镜下显示肝细胞肿胀明显减轻,脂肪变性炎性细胞浸润程度明显降低,肝组织总体病理变化程度明显减轻。见图 1。

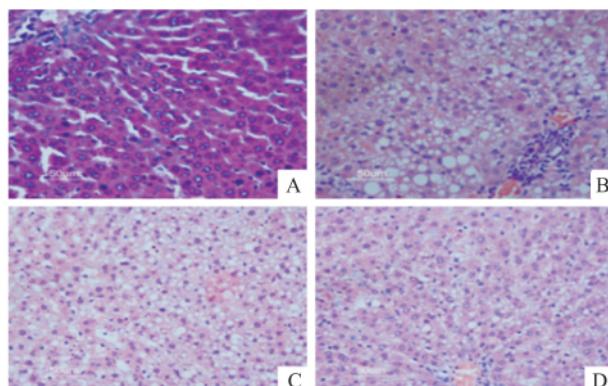


图 1 各组大鼠肝脏病理切片 HE  $\times 400$

A: 正常组; B: 模型组; C: 褪黑素低剂量组; D: 褪黑素高剂量组

**2.2 大鼠血清肝功能检测结果** 方差分析结果显示大鼠血清 ALT、AST、TBIL 差异有统计学意义( $F = 9.54, 5.58, 11.24, P < 0.05$ ),与正常组相比,模型组大鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 明显升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,褪黑素组大鼠肝功能水平有所降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.3 大鼠肝匀浆 MDA 水平及 GPx 活性的检测结果** 方差分析结果显示,各组 MDA 含量及 GPx 活性差异有统计学意义( $F = 24.42, 16.37, P < 0.05$ ),与正常组比较,模型组大鼠肝匀浆 MDA 水平显著升高( $P < 0.01$ ),GPx 活性显著下降( $P < 0.01$ )。各剂量褪黑素能显著降低酒精性脂肪肝模型大鼠肝匀浆中 MDA 水平( $P < 0.01$ ),可升高肝匀浆中 GPx 活性( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 各组大鼠血清中 ALT、AST、TBIL 水平( $\bar{x} \pm s$ )

项目	正常组( $n = 7$ )	模型组( $n = 8$ )	褪黑素低剂量组( $n = 7$ )	褪黑素高剂量组( $n = 6$ )
ALT( U/L)	$35.14 \pm 4.95$	$44.00 \pm 4.60^{**}$	$38.43 \pm 3.26^{\#}$	$38.07 \pm 4.50^{\#}$
AST( U/L)	$91.86 \pm 11.77$	$118.62 \pm 10.07^{**}$	$105.29 \pm 9.71^{\#}$	$103.83 \pm 5.56^{\#}$
TBIL( U/mg prot)	$0.37 \pm 0.09$	$0.59 \pm 0.08^{**}$	$0.48 \pm 0.10^{\#}$	$0.46 \pm 0.10^{\#}$

与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

表2 各组大鼠肝匀浆中 MDA、GPx 的水平( $\bar{x} \pm s$ )

项目	正常组( <i>n</i> =7)	模型组( <i>n</i> =8)	褪黑素低剂量组( <i>n</i> =7)	褪黑素高剂量组( <i>n</i> =6)
MDA( nmol/mg prot)	1.47 ± 0.32	2.29 ± 0.40 **	1.70 ± 0.43 ##	1.50 ± 0.25 ##
GPx( nmol/mg prot)	50.46 ± 2.97	34.71 ± 3.80 **	38.91 ± 4.20 #	41.52 ± 6.87 ##

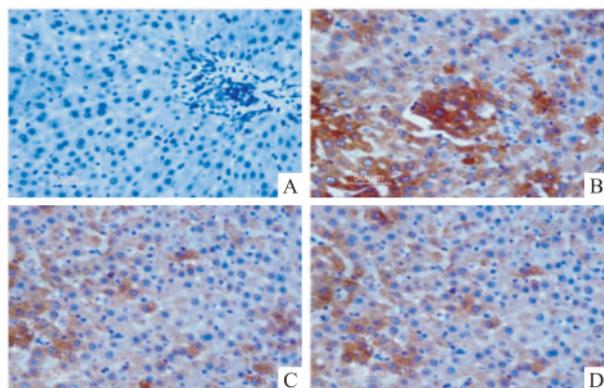
与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

表3 各组大鼠肝组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

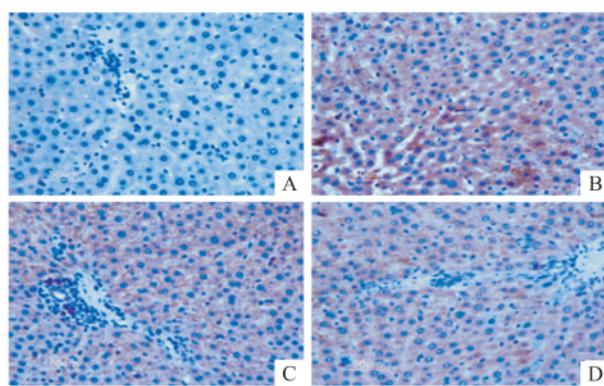
项目	正常组( <i>n</i> =7)	模型组( <i>n</i> =8)	褪黑素低剂量组( <i>n</i> =7)	褪黑素高剂量组( <i>n</i> =6)
TNF- $\alpha$	0.343 ± 0.041	0.545 ± 0.049 **	0.456 ± 0.036 ##	0.398 ± 0.025 ##
IL-6	0.404 ± 0.055	0.640 ± 0.056 **	0.567 ± 0.053 #	0.488 ± 0.048 ##

与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.4 免疫组化检测 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达** 方差分析结果显示 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达差异有统计学意义( $F = 46.18, 29.36, P < 0.05$ ) ,光镜下可见正常组大鼠肝脏组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 有微量表达,仅表现在细胞质中可见淡黄色颗粒。而模型组有抗原的明显表达( $P < 0.01$ ), TNF- $\alpha$  和 IL-6 表现为细胞质内出现清晰的颗粒状棕黄色物质。与模型组相比,褪黑素能显著降低 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3、图 2、3。

图2 各组大鼠的 TNF- $\alpha$  表达水平  $\times 400$ 

A: 正常组; B: 模型组; C: 褪黑素低剂量组; D: 褪黑素高剂量组

图3 各组大鼠 IL-6 的表达水平  $\times 400$ 

A: 正常组; B: 模型组; C: 褪黑素低剂量组; D: 褪黑素高剂量组

### 3 讨论

酒精性脂肪肝是酒精性肝病的早期阶段,其脂肪代谢已受到影响,肝脏组织中可出现空泡脂肪变性,可进一步发展为肝硬化<sup>[5]</sup>。本研究模型组大鼠肝脏病理观察到典型的酒精性脂肪肝改变如脂肪变性、炎性细胞浸润等,说明此次造模成功,为下一步实验提供良好基础。另外,本实验显示褪黑素能不同程度减轻大鼠肝脏病理学改变,降低酒精性脂肪肝大鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 水平,以及大鼠肝组织中脂质过氧化产物 MDA 的含量,说明褪黑素对酒精性脂肪肝有保护作用。

氧化应激在酒精诱导的细胞反应中发挥重要作用,可引起脂质的过氧化和细胞膜损伤,产生大量活性氧,与酒精代谢产生的内毒素一起刺激激活肝脏 Kupffer 细胞产生多种促炎因子和免疫调节因子,如核转录因子  $\kappa$ B (unclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、前列腺素 E2 和 TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  可诱发肝细胞发生坏死和凋亡<sup>[6]</sup>,并引起线粒体功能障碍,刺激过氧化物及其他炎性因子发挥作用,造成肝脏损害<sup>[7-8]</sup>。NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  可反过来刺激肝脏 Kupffer 细胞释放大量细胞 IL-6、IL-8 等炎症因子,与 TNF- $\alpha$  等一起参与肝细胞的变性、坏死<sup>[9]</sup>。在本实验中,模型组大鼠肝脏 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达较正常组大鼠明显增强,该结果与相关报道符合,认为酒精性脂肪肝的发生与 TNF- $\alpha$  的过度表达以及相关炎症介质、细胞因子大量释放有密切关系。

褪黑素的分泌受到昼夜节律的调节,在很多生物损伤模型中,表现出强大的器官保护作用。褪黑素作为一种自由基清除剂,能清除大量活性氧,并具有提高抗氧化酶的作用<sup>[3, 10]</sup>。相关实验描述了褪黑素在缺血再灌注肝损伤和免疫性肝损伤大鼠模型中显现了肝脏保护作用,大鼠转氨酶水平和自由基清除能力的变化均通过实验得到证实<sup>[11-12]</sup>。但褪黑

素与慢性酒精损害相关的研究报道不多。在本次酒精性肝损伤实验中,褪黑素有效的提高抗氧化酶GPx的活性,能明显降低作为衡量脂质过氧化程度的MDA水平。同时褪黑素组大鼠肝脏TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达较模型组减少,认为褪黑素能有效抑制酒精性脂肪肝的发生发展,并且提示褪黑素防治酒精性脂肪肝的作用机制之一与降低TNF- $\alpha$ 和IL-6等细胞因子的产生有关。

### 参考文献

- [1] Zima T, Kalousova M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29(11 Suppl): 110S-5S.
- [2] Beier J I, McClain C J. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease [J]. *Biological chemistry*, 2010, 391(11): 1249-64.
- [3] Allegra M, Reiter R J, Tan D X, et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species [J]. *Pineal Res* 2003, 34(1): 1-10.
- [4] Nanji A, Jokelainen K, Tipoe G, et al. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B dependent genes [J]. *Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284(2): G321-7.
- [5] Hoek J B, Pastorino J. Cellular signaling mechanisms in alcohol-induced liver damage [J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(3): 257-72.
- [6] OShea R S, Dasarathy S, McCullough A J. Alcoholic liver disease [J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 307-28.
- [7] 金武丕, 孟繁平, 权修权, 等. 酒精性肝病细胞凋亡的相关机制研究 [J]. 中国现代医学杂志 2007, 17(23): 2871-4.
- [8] 莫成林. 细胞因子在酒精性肝炎中的作用 [J]. 国外医学药学分册 2003, 30(3): 171-5.
- [9] Tiberio G A, Tiberi L, Benentti A, et al. Interleukin-6 sustains hepatic regeneration in cirrhotic rats [J]. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(75): 873-83.
- [10] Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. Melatonin as antioxidant under pathological processes [J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2007, 1(1): 63-82.
- [11] 王华, 沈玉先, 魏伟, 等. 褪黑素对免疫性肝损伤小鼠自由基和细胞因子的影响 [J]. 中国药理学通报 2002, 18(3): 331-4.
- [12] 甄允方, 孙麻林, 顾志成, 等. 褪黑素对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 苏州大学学报 2007, 27(1): 41-2.

## Animal studies of melatonin suppression alcoholic fatty liver development

Hu Qizhen, Hong Rutao, Gao Xuemei

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,

Key Laboratory of Disease of Anhui Province, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the protective effects of melatonin and possible mechanisms on rats with alcoholic fatty liver (AFL). **Methods** All rats were randomly divided into 4 groups: normal group ( $n=10$ ), model group ( $n=12$ ) and melatonin groups (10 mg/kg, 20 mg/kg;  $n=10$ , respectively). The model of rats' alcoholic fatty liver was induced by intragastric infusion of ethanol for 8 weeks. The melatonin groups' rats received melatonin by intraperitoneal injection after intragastric infusion of ethanol. Histopathological changes were evaluated by hematoxylin and eosin staining. The expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) were detected by immunohistochemical methods. The detection of aspartate aminotransferase (AST) levels and alanine transaminase (ALT) levels and the total bilirubin (TBIL) levels in serum were provided by routine laboratory methods using an autoanalyzer. The levels of malondialdehyde (MDA) and activities of glutathione peroxidase (GPx) were measured by spectrophotometry. **Results** Compared with the normal group, the liver cells of the model group showed obvious steatosis and significant swelling. However, less degree and less extensive of steatosis and swelling were observed in the melatonin groups. Compared with the normal group, the levels of ALT, AST and TBIL in serum and the levels of MDA in liver homogenates were significantly increased in the model group ( $P < 0.01$ ), and the activities of GPx were distinctly decreased in the model group ( $P < 0.01$ ). But in the melatonin groups, the levels of ALT, AST and TBIL in serum and the levels of MDA in liver homogenates were decreased ( $P < 0.01$ ), and the activities of GPx were increased ( $P < 0.01$ ). Additionally, melatonin lessened the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in liver obviously ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Melatonin may inhibit the development of alcoholic fatty liver and its possible mechanism is the ability to resist oxidative stress and lessen the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 and other relevant factors in liver.

**Key words** melatonin; alcoholic fatty liver; necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-6