

白藜芦醇影响一氧化氮途径对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用

罗景慧¹, 杨迎暴^{2*} (1.南方医院药学部, 广州 510515; 2.南方医科大学药学院药理学系, 广州 510515)

摘要: 目的 研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对酒精性肝损伤后肝组织氧化反应和炎症反应的影响及与一氧化氮(NO)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)通路的关系。方法 大鼠灌胃给予 55 度红星二锅头复制肝损伤模型。大鼠随机分为正常对照组、肝损伤模型对照组、Res 低剂量组(25 mg·kg⁻¹)、Res 中剂量组(50 mg·kg⁻¹)、Res 高剂量组(100 mg·kg⁻¹), 每日 2 次, 连续 7 d。采用试剂盒测定肝组织乳酸脱氢酶(LDH)、活性氧(ROS)、还原型谷胱甘肽(GSH)、NO、iNOS 和血清 IL-10、IFN- γ 水平。Western blot 测定 iNOS 表达, RT-PCR 测定 iNOS mRNA 表达。结果 与正常对照组相比, 酒精性肝损伤模型组肝组织 LDH、ROS、NO 浓度显著升高($P<0.01$)、GSH 显著下降($P<0.01$), 血清 IFN- γ 水平显著升高、IL-10 显著降低($P<0.01$), 肝组织 iNOS 和 iNOS mRNA 表达增加($P<0.01$)。与模型组相比, Res 显著降低肝组织 ROS、LDH、NO 浓度($P<0.01$), 降低血清 IFN- γ 水平和升高血清 IL-10 与肝组织 GSH 含量($P<0.01$), 减少 iNOS 和 iNOS mRNA 表达($P<0.01$)。结论 Res 可能通过 NO 通路, 消除氧化性应激状态, 改变炎症因子水平, 对酒精性肝损伤发挥防治作用。

关键词: 白藜芦醇; 酒精性肝损伤; 氧化应激; 炎症因子; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合成酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)09-0772-06

Protective Effects of Resveratrol on Alcohol-induced Hepatic Injury through Nitric Oxide Pathway in Rats

LUO Jinghui¹, YANG Yingbao^{2*} (1.Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China; 2.Department of Pharmacology, School of Pharmaceutic Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of resveratrol (Res) on alcohol-induced hepatic injury and the relationship with nitric oxide (NO) pathway. **METHODS** The rats were randomly divided into 5 groups, including the normal control group, alcohol-induced hepatic injured model group, Res 25 mg·kg⁻¹ group, Res 50 mg·kg⁻¹ group and Res 100 mg·kg⁻¹ group. The hepatic injured model was imitated by ig 55° Red Star Erguotou. Res was administrated twice daily, continuously for 7 days. The contents of lactate dehydrogenase (LDH), reactive oxygen species (ROS), reduced glutathione (GSH), nitric oxide (NO), induced nitric oxide synthase (iNOS) in liver and the concentrations of serum IFN- γ , IL-10 were determined by the commercial kits. The expression of iNOS was determined by Western blot and the level of iNOS mRNA was measured by real-time RT-PCR. **RESULTS** Compared with the normal control group, the concentrations of LDH, ROS, NO in liver were significantly increased ($P<0.01$) and GSH was significantly reduced ($P<0.01$) in the model group. Meantime, in the model group, the level of serum IFN- γ was significantly augmented and serum IL-10 depressed ($P<0.01$). In addition, the expressions of iNOS and iNOS mRNA were significantly increased ($P<0.01$). Res reduced the levels of LDH, ROS, NO and iNOS in liver and IFN- γ in serum compared with the model group, respectively. Furthermore, Res significantly increased the concentrations of serum IL-10 and hepatic GSH. Additionally, Res significantly suppressed the expressions of iNOS and iNOS mRNA in liver. **CONCLUSION** Res may prevent liver from alcoholic impairment via NO pathway.

KEY WORDS: resveratrol; alcoholic hepatic injury; oxidative stress; inflammatory cytokines; NO; iNOS

人类饮酒的历史绵延上千年, 逢年过节、走亲访友, 无酒不成席。但是, 饮酒不仅引起酒精滥用、依赖等常见社会现象, 同时, 饮酒引发严重健康问题对人类影响更为严重且久远。众所周知, 短时间内大量摄取酒精, 可造成急性肝损伤, 长期大量饮酒则造成酒精性肝脏疾病, 最终发展成慢性活动性肝炎甚至肝硬化。近年来, 酒精滥用引起的疾病全球增加 3 倍, 已成为全球公共卫生问题之一^[1-2], 因此, 酒精性肝损伤的防治已成为临床医药工作者亟

待解决的临床课题。

白藜芦醇(resveratrol, Res) 是中药虎杖的主要活性成分之一, 具有广泛而重要的生物学活性。研究表明, Res 是一种天然抗氧化剂, 具有降低血液黏稠度保持血液畅通、预防癌症的发生及发展、抗过敏、抗突变、抗炎症、调节免疫等药理活性, 被广泛应用于医药、保健品、化妆品和食品添加剂等领域^[3]。近年来, Res 对肝脏功能的影响逐渐引起研究者的注意。最近研究发现, Res 对过氧化氢、

作者简介: 罗景慧, 女, 博士 Tel: (020)61642170
Tel: (020)62789417 E-mail: yangyb@fimmu.com

E-mail: luojinghui@fimmu.com

*通信作者: 杨迎暴, 男, 博士, 教授

四氯化碳、酒精等所致肝损伤具有抑制作用, 且对肝纤维化和肝癌的治疗有重要的潜在意义^[4-7], 但是, Res 防治酒精性肝损伤的机制尚有待进一步研究。本研究拟通过大鼠急性酒精性肝损伤模型, 研究 Res 对酒精性肝损伤的保护作用及与一氧化氮(nitric oxide, NO)通路的影响, 探讨 Res 防治酒精性肝损伤的作用机理, 为开发 Res 及其类似物提供实验资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠, 40 只, ♀ ♂ 各半, 体重 200~250 g, 由南方医科大学动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(粤)2006-0015。

1.2 药品与试剂

55 度红星二锅头白酒为市售: 北京红星股份有限公司产品, 批号: 20070202; Res: 西安冠宇生物技术有限公司产品, 纯度: 99 %, 批号: 040701, 临用前用 1% 的羧甲基纤维素钠分别配制成 2.5, 5, 10 mg·mL⁻¹ 的混悬液; LDH、ROS、GSH、NO、iNOS 试剂盒: 南京建成生物工程研究所产品, 批号分别为 20080612、20080622、20080711、20080715 和 2008218; IFN- γ 、IL-10 试剂盒: 晶美生物工程公司, FRK0002 和 FRK0007。蛋白抑制剂 cocktail 购自 Sigma-Aldrich, 磷酸酶抑制剂 cocktail 购自 Roche, 兔抗 iNOS 购自 Santa Cruz, HRP-IgG 二抗购自 Pierce。TRIZOL Reagent 试剂盒购自 Invitrogen, First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Roche, QuantiTect™ SYBR PCR 试剂盒购自 QIAGEN。mRNA 引物序列通过 Primer 5.0 软件设计, 经 GenBank BLAST 同源性检索后, 由上海生物技术工程有限公司合成。iNOS 基因上游引物为 5'-CAGAGTACAAGGATTGGAAGTTCA G-3', 下游引物为 5'-ATTTCTTCCTGATAGACGTG GTCCT-3', 内参 GAPDH 上游引物为 5'-TGGT GAAGG TCGGTGTGAAC-3', 下游引物为 5'-TTC CCATTC TCAGCCTTGAC-3'。

1.3 方法

1.3.1 分组与给药 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为 5 组, 每组 8 只, 含正常对照组、模型对照组、Res 低剂量组(25 mg·kg⁻¹)、Res 中剂量组(50 mg·kg⁻¹)、Res 高剂量组(100 mg·kg⁻¹)。药物以羧甲基纤维素钠助溶(终浓度为 1%), 生理盐水稀释, 灌胃给予, 早、晚各 1 次, 连续 7 d。空白组和模型

组给予等剂量 1% 的羧甲基纤维素钠, 给药量为 1 mL·100 g⁻¹。

1.3.2 急性酒精性肝损伤模型制备 SD 大鼠灌胃给予 55 度红星二锅头, 每次 0.75 mL·100 g⁻¹, 每日 2 次, 连续灌胃 7 d, 进食进水不限, 复制大鼠急性酒精性肝损伤模型, 断头放血处死正造模大鼠 3 只, 取肝左叶同一部位组织, 常规 HE 染色, 光镜观察, 肝细胞出现大面积水样变性, 细胞增大或肿胀, 表明造模成功^[7-8]。

1.3.3 样本采集与指标检测 于第 7 天末次灌胃给药后, 禁食不禁水 12 h, 各组动物称重, 取血, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 分离血清备用; 进行肝脏灌流, 于肝脏左叶最大边缘 5 mm 处取 1 cm×0.5 cm×0.5 cm 肝脏组织 3 块, 其中 1 块以无菌滤纸吸净肝脏表面水分和血液后快速冷冻于液氮中备用; 1 块称重后, 以生理盐水为缓冲液制备 10% 肝匀浆, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清备用; 1 块以 4 % 多聚甲醛溶液固定, 包埋、切片, 进行 HE 染色, 光镜下观察肝组织病理学改变。

1.3.4 肝组织 LDH、ROS、GSH、NO、iNOS 的测定 按照试剂盒说明书进行操作。简言之, 精确称取肝组织 100 g, 提取总蛋白, 定蛋白含量后, 分别测定 LDH、ROS、GSH、NO 和 iNOS 水平, 并以每个样品蛋白含量进行含量校正。

1.3.5 血清 IFN- γ 、IL-10 的测定 应用 ELISA 检测试剂盒检测血清中 IFN- γ 、IL-10 的含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.6 Western blot 测定 iNOS 表达 取肝组织 100 mg 在冰冻下研成粉末, 以 1 mL 缓冲液[1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠, 150 mmol·L⁻¹ NaCl 和 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0]匀浆, 其中含苯甲磺酰氟(PMSF, 1 μ mol·L⁻¹)、蛋白抑制剂 cocktail 和磷酸酶抑制剂 cocktail, 匀浆液在 4 °C 以 12 500 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液即为蛋白提取液, -80 °C 保存备用。取蛋白提取液, Folin-酚进行蛋白质定量, 取相当于 15 μ g 蛋白量的蛋白提取液样本上样, 然后按常规进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转移至 PVDF 膜, 以含 5% 脱脂奶粉的 TBS 室温下封闭 2 h, 在膜上加入兔抗 iNOS(1:500), 4 °C 下孵育过夜。弃一抗, 以 TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min。加入 TBS 稀释的 HRP-IgG 二抗中(1:5 000), 室温孵育 2 h。弃二抗, 以 TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 发光剂, 室温下孵育 5 min 后用 X 线感

光胶片曝光,显影和定影。用凝胶成像分析系统对 iNOS 蛋白条带与相应的内参照 β -actin 条带进行灰度扫描,以两者扫描强度比值作用 iNOS 蛋白的相对表达量。

1.3.7 RT-PCR 测定 iNOS mRNA 表达 取肝组织,以 TRIZOL Reagent 试剂盒提取总 RNA,按逆转录反应试剂盒说明书操作合成 cDNA 第一条链,然后用 QuantiTect™ SYBR Green PCR 试剂盒于 Light Cycler 仪上进行实时定量 RT-PCR,所有样品都是复管检测。PCR 反应体系为 20 μ L,其中含有 10 μ L 2 $\times$ QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix、7 μ L Rnase Free Water、2 μ L 引物对混合液(3 μ mol $\cdot$ L⁻¹)和 1 μ L cDNA(100 ng)。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预热变性 7 min,94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,读板,检测荧光值。在完成 40 个循环的扩增反应后,以 0.2 $^{\circ}$ C $\cdot$ s⁻¹ 的间隔从 65 $^{\circ}$ C 到 90 $^{\circ}$ C 读板,获得融解曲线。以标准曲线标定扩增反应正确率,并以对照 mRNA 评价扩增反应的特异性,以溴化乙啶染色琼脂糖凝胶验证 PCR 产物。数据处理采用 Light Cycler 软件(版本 3.3.9),作出融合曲线、iNOS 和 GADPH 的标准曲线作为

模板,然后,计算出每个样品 iNOS 对 GADPH 的比率,即表示 iNOS mRNA 的相对表达水平。

1.4 数据分析

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 进行组间数据比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结果

2.1 Res 对急性酒精性肝损伤后肝组织形态学的影响

肉眼观察可见,模型组肝脏较正常组体积稍增大,胞膜紧张,典型水样变性;用药组各肝脏体积、色泽与正常对照组接近。病理切片在光镜下观察可见,正常对照组肝组织小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,呈放射状,无坏死,无炎症细胞浸润,见图 1-A, B;模型对照组肝组织明显损伤,肝细胞呈现不同类型和不同程度的变性改变,部分区域水样变性,胞内的脂滴融合成较大的脂滴,汇管区炎性细胞浸润,见图 1-C, D; Res 组与模型组相比,肝组织损伤均有不同程度减轻,水样变性及间质炎症表现均减轻,中、高剂量组效果显著,见图 1-E~J。

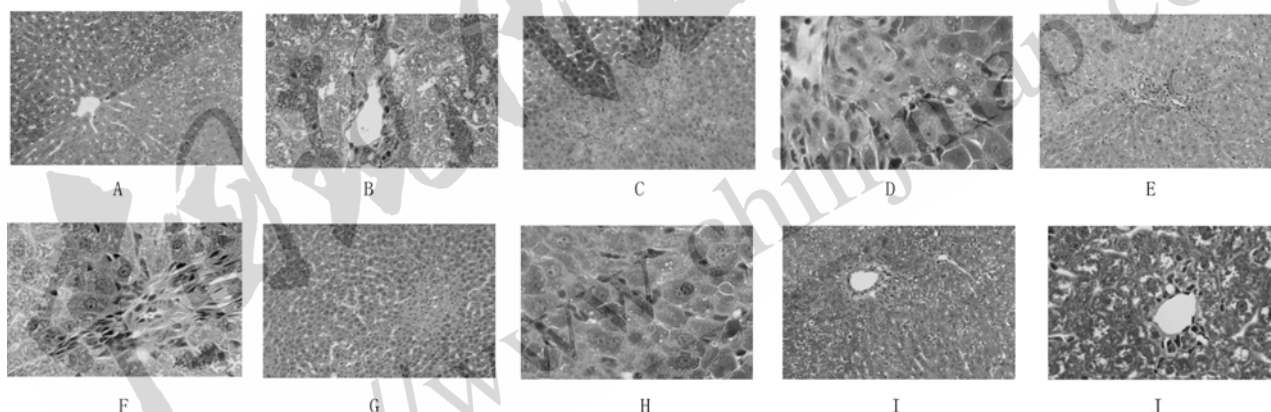


图 1 白藜芦醇对急性酒精性肝损伤后肝组织形态学的影响

正常对照组: A(100 $\times$), B(400 $\times$); 模型对照组: C(100 $\times$), D(400 $\times$); Res 低剂量组: E(100 $\times$), F(400 $\times$); Res 中剂量组: G(100 $\times$), H(400 $\times$); Res 高剂量组: I(100 $\times$), J(400 $\times$)

Fig 1 Effect of Res on live morphology in alcoholic hepatic injured rats

Normal control group: A(100 $\times$), B(400 $\times$); model group: C(100 $\times$), D(400 $\times$); low dosage group of Res: E(100 $\times$), F(400 $\times$); middle dosage group of Res: G(100 $\times$), H(400 $\times$); high dosage group of Res: I(100 $\times$), J(400 $\times$)

2.2 Res 对大鼠肝组织中 LDH 的影响

模型组大鼠肝组织中 LDH 含量明显升高,与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.05$); Res 低剂量对 LDH 具有降低作用,但无统计学意义; Res 中剂量组和高剂量组显著降低肝组织 LDH,与模型组相比有显著性差异($P < 0.01$),高剂量组与正常对照组

相比无显著性差异。结果见表 1。

2.3 Res 对大鼠肝组织中 ROS、GSH 的影响

模型组大鼠肝组织中 ROS 明显升高、GSH 明显降低,与正常对照组比较均有显著性差异($P < 0.01$); Res 低剂量组显著升高 GSH($P < 0.05$),对 ROS 具有降低趋势,但无统计学意义; Res 中

剂量组和高剂量组显著降低肝组织 ROS 水平、增加 GSH 含量,与模型组相比均有显著性差异($P<0.01$),高剂量组与正常对照组相比无显著性差异。结果见表 2。

表 1 Res 对大鼠肝组织 LDH 水平的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of Res on the level of LDH in liver ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	—	7 832.8±623.4
模型对照组	—	9 774.5±758.2 ¹⁾
Res 低剂量组	25	8 945.1±712.0
Res 中剂量组	50	8 392.6±913.8 ²⁾
Res 高剂量组	100	7 902.5±734.4 ²⁾

注:与正常对照组比较:¹⁾ $P<0.05$;与模型对照组比较:²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.01$

表 2 Res 对大鼠肝组织 ROS、GSH 水平的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of Res on the level of ROS and GSH in liver($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	ROS/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	—	124.3±9.64	516.5±18.4
模型对照组	—	589.7±28.6 ¹⁾	168.67±8.16 ¹⁾
Res 低剂量组	25	460.2±15.0	234.6±12.8 ²⁾
Res 中剂量组	50	331.5±13.4 ³⁾	346.0±12.0 ³⁾
Res 高剂量组	100	185.8±10.1 ³⁾	490.7±23.1 ³⁾

注:与正常对照组比较:¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较:²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

2.4 Res 对大鼠血清 IFN- γ 、IL-10 水平的影响

模型组大鼠血清 IFN- γ 、IL-10 水平与正常对照组相比,IFN- γ 显著升高,IL-10 显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),Res 中剂量组和高剂量组血清 IFN- γ 水平明显降低、IL-10 水平则明显增高,与模型组相比具有极显著性差异($P<0.01$)。低剂量组与模型组相比无显著性差异,高剂量组与正常对照组相比无显著性差异。结果见表 3。

表 3 Res 对大鼠血清 IFN- γ 、IL-10 水平的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of Res on the level of IFN- γ and IL-10 in serum($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IFN- γ / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-10/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	—	62.84±5.25	771.75±30.12
模型对照组	—	101.02±4.16 ²⁾	670.23±41.68 ¹⁾
Res 低剂量组	25	90.26±4.51	684.26±22.04
Res 中剂量组	50	71.44±3.85 ³⁾	724.02±52.06 ³⁾
Res 高剂量组	100	60.80±6.28 ³⁾	769.14±34.75 ³⁾

注:与正常对照组比较:¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较:³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.01$

2.5 Res 对大鼠肝组织中 NO、iNOS 的影响

模型组大鼠肝组织中 NO、iNOS 水平明显升高,与正常对照组比较均有极显著性差异($P<0.01$);Res 低剂量组对 NO 水平的影响无统计学差异,但可显著降低 iNOS 水平($P<0.05$);Res 中剂量和高剂量组明显降低肝组织 NO、iNOS 含量,与模型组相比均有显著性差异($P<0.01$),高剂量组与正常对照组相比无显著性差异。结果见表 4。

表 4 Res 对大鼠肝组织 NO、iNOS 水平的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of Res on the level of NO and IL-10 in liver($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	iNOS/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	—	61.24±9.42	10.12±2.24
模型对照组	—	142.11±8.14 ¹⁾	38.76±5.62 ¹⁾
Res 低剂量组	25	126.55±5.82	31.45±7.82 ²⁾
Res 中剂量组	50	102.05±7.03 ³⁾	23.26±4.05 ³⁾
Res 高剂量组	100	78.80±6.62 ³⁾	15.74±2.19 ³⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

2.6 Res 对大鼠肝组织中 iNOS 蛋白与 iNOS mRNA 表达的影响

模型组肝组织 iNOS 蛋白表达和 mRNA 表达均显著高于正常对照组,Res 呈剂量依赖性地减少 iNOS 表达和 iNOS mRNA 表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结果见图 2。

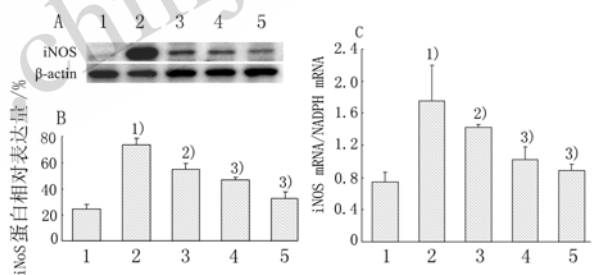


图 2 Res 对大鼠肝组织 iNOS 蛋白和 iNOS mRNA 表达的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

A, B—western blot 结果; C—RT-PCR 结果; 1—正常对照组; 2—模型对照组; 3—Res 低剂量组; 4—Res 中剂量组; 5—Res 高剂量组

注:与正常对照组比较:¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较:²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

Fig 2 Effect of Res on the expression of iNOS protein and iNOS mRNA in liver($n=8, \bar{x} \pm s$)

A and B—the result of western blot; C—the result of RT-PCR; 1—normal control group; 2—model group; 3—Res 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; 4—Res 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; 5—Res 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

3 讨论

肝脏是酒精的代谢器官,肝细胞对酒精及其衍生物乙醛的影响极为敏感。长期过度饮酒,致使大量酒精进入体内,乙醇及其代谢产物使肝细胞造成反复脂肪变性、坏死和再生,导致酒精性肝病的发生。酒精性肝损伤包括原发性损伤与继发性损伤,前者为酒精作用下脂肪在肝细胞蓄积,后者机制尚未完全阐明,但目前认为与氧化应激和炎症反应的关系最为密切^[9]。

在酒精性肝损伤的病理过程中,氧化应激状态的形成表现为促氧化物增多和抗氧化物减少从而导致 ROS 大量蓄积。本研究结果表明,模型组 ROS 显著增多、典型抗氧化物 GSH 显著减少,表明一方面自由基产生增加,另一方面自由基清除体系受损,引起自由基在肝组织蓄积,肝细胞受自由基攻击的严重程度随之增加,氧化过程和抗氧化过程平衡被破坏,氧化应激状态是酒精性肝损伤继发性反应的基础,这与先前的研究结果一致^[7]。同时,酒精性肝损伤模型组中,活性氧 ROS 水平增加,肝细胞损伤指标 LDH 水平显著升高,提示在氧化应激状态下,肝细胞被严重破坏,细胞中 LDH 大量释放进入循环系统。施用 Res 则使 ROS 水平降低, GSH 含量恢复, LDH 活性抑制,表明对氧化反应有很强的抑制作用,降低肝脏组织中自由基含量,减少自由基的积累,提示 Res 干预可使酒精引起的肝细胞氧化应激状态抑制或解除,保护肝脏免受损坏。

另一方面,酒精在肝脏组织诱导产生的氧化应激状态可以引起与炎症反应相关的细胞因子释放,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)、干扰素(IFN)等,触发炎症因子与抗炎性因子平衡紊乱。酒精性肝损伤时循环系统中不同细胞因子在肝损伤病理过程中所起的作用是不同的,一方面炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等水平升高^[10],另一方面,抗炎性反应细胞因子如 IL-10 等水平下降^[11],不仅增多的炎症因子对肝细胞具有直接损伤作用及减少的抗炎性因子不能对肝细胞提供保护作用,而且抗炎因子的减少可以使炎症因子的作用相对增强,以致肝脏受到进一步损害^[12-14]。本研究中,酒精性肝损伤模型组大鼠血清 IFN- γ 水平显著上升和血清 IL-10 水平显著下降,与上述报道相符。IFN- γ 是一种对细胞功能具有调节作用的小分子多肽,其可以参加细胞免疫与体液免疫环节,在炎症反应的粒细

胞浸润过程中起着重要的调节作用;IL-10 是一种多效细胞因子,在炎症和免疫反应中发挥着重要的作用,其调控炎症反应、减轻肝细胞损伤、抑制胶原合成、刺激胶原酶产生、阻止肝纤维化的发生、发展^[15], IFN- γ 和 IL-6 保护肝脏免于损伤的作用已在多种肝损伤模型中得到证实^[16]。研究结果表明, Res 可阻止酒精性肝损伤时继发 IFN- γ 释放增加和 IL-6 水平降低,从而抑制炎症因子水平和提高抗炎性因子水平,发挥对酒精性肝损伤的保护作用。

NO 是一个多功能分子,正常情况下,肝脏仅由结构型 NOS 即 eNOS 诱导产生低水平 NO,作为肝脏微循环功能调节的重要信使;但是,在氧化性应激状态下,诱生型 NOS 即 iNOS 激活,持续大量 NO 被合成、释放,具有显著肝细胞毒作用,是使肝细胞产生氧化应激的关键分子之一,是多种类型肝损伤炎症、感染发生、发展过程的重要促进和效应因子^[17-18]。NO 还可与超氧阴离子反应形成过氧亚硝阴离子 ONOO⁻,其介导多种氧化反应,并进一步增强氧化应激状态,是介导氧化性细胞毒性作用的关键物质。本实验结果表明,酒精性肝损伤模型大鼠肝脏 NO 和 iNOS 水平比正常对照组显著升高, Res 显著降低肝脏组织升高的 iNOS 水平和 NO 浓度,减少自由基产生,消除损伤的氧化应激状态,提示 iNOS 诱导产生 NO 在肝损伤中发挥作用, Res 则通过抑制 iNOS 表达,减少 NO 生成,阻止 NO 在氧化性应激中所起的作用。

综上所述,酒精性肝损伤时肝细胞氧化性应激状态发生,炎症因子释放、抗炎性因子水平下降,同时, iNOS 通路活跃,其活性增加,诱导产生 NO 增多; Res 可抑制 iNOS 表达,使 NO 产生减少,阻断氧化应激状态的产生,降低促炎症因子水平、提高抗炎性因子水平,消除酒精性肝损伤过程中继发性反应,对酒精性肝损伤提供保护作用,从而为临床开发应用 Res 及其类似物防治酒精性肝损伤提供了依据。

REFERENCES

- [1] WILLIAMS R. The pervading influence of alcoholic liver disease in hepatology [J]. Alcohol Alcohol, 2008, 43(4): 393-397.
- [2] BRUHA R, DVORÁK K, DOUSA M, et al. Alcoholic liver disease[J]. Prague Med Rep, 2009, 110(3): 181-190.
- [3] BAUR J A, SINCLAIR D A. Therapeutic potential of resveratrol: *in vivo* evidence [J]. Nat Rev Drug Discovery, 2006, 5(6): 493-506.
- [4] YU H L. The physiological function and application future of

- resveratrol [J]. Bull Biol (生物学通报), 2005, 40(11): 12-13.
- [5] MO Z X, SHAO H X. Protective effects of pilydatin on mouse hepatocyte injury induced by hydrogen peroxide *in vitro* [J]. Chin Pharm Bull (药学报), 2000, 16(5): 519-521.
- [6] ZHONG F, LUO S J, TANG S M. Progress in study on mechanism of resveratrol inhibiting cell proliferation [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2003, 34(5): 2-4.
- [7] ZHANG J, XIONG L Q, CHENG H N, et al. Effects of resveratrol on acute alcoholic hepatic injury [J]. Chin J Public Health (中国公共卫生学报), 2009, 56(S8): 56-58.
- [8] ZHU P S, PANG Y L, WANG Y L, et al. Study of lipoperoxidation in acute alcoholic hepatic injury model in rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2006, 21(6): 376-377.
- [9] LALOR P F, FAINT J, AARBODEM Y, et al. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(2): 173-193.
- [10] MCVICKER B L, TUMA D J, KHARBANDA K K, et al. Effect of chronic ethanol administration on the *in vitro* production of proinflammatory cytokines by rat Kupffer cells in the presence of apoptotic cells [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2007, 31(1): 122-129.
- [11] HILL D B, D' SOUZA N B, LEE E Y, et al. A role for interleukin-10 in alcohol-induced liver sensitization to bacterial lipopolysaccharide [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2002, 26(1): 74-82.
- [12] DAS S K, VARADHAN S, GUPTA G, et al. Time-dependent effects of ethanol on blood oxidative stress parameters and cytokines [J]. Indian J Biochem Biophys, 2009, 46(1): 116-121.
- [13] MELEK I M, ERGOGAN S, CELIK S, et al. Evaluation of oxidative stress and inflammation in long term *Brucella melitensis* infection [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 293(1/2): 203-209.
- [14] DAS S K, GUPTA G, RAO D N, et al. Effect of lecithin with vitamin-B complex and tocopheryl acetate on long-term effect of ethanol induced immunomodulatory activities [J]. Indian J Exp Biol, 2007, 45(8): 683-688.
- [15] HUANG Y H, SHI M N, ZHENG W D, et al. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(9): 1386-1391.
- [16] MCCLAIN C J, BARVE S, DEACIUC I, et al. Cytokines in alcoholic liver disease [J]. Semin Liver Dis, 1999, 19(2): 205-219.
- [17] ANAYA-PRADO R, TOLEDO-PEREYRA L H, GUO R F, et al. The attenuation of hemorrhage-induced liver injury by exogenous nitric oxide, L-arginine, and inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. J Invest Surg, 2003, 16(5): 247-261.
- [18] HONG J Y, SATO E, HIRAMOTO K, et al. Mechanism of liver injury during obstructive jaundice: role of nitric oxide, splenic cytokines, and intestinal flora [J]. J Clin Biochem Nutr, 2007, 40(3): 184-193.

收稿日期: 2010-02-04