

锌对慢性酒精中毒肝损伤再生影响*

肖敏¹, 冯彦红², 董缪武², 吴博¹, 刘重斌¹

摘要:目的 探讨锌对慢性酒精中毒肝损伤再生的影响。方法 健康成年雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 随机分为对照组、慢性酒精中毒、酒精中毒 + 锌及对照 + 锌 4 组, 持续喂养 6 个月, 形成慢性酒精中毒模型性肝病。测定血清和肝组织中锌和铁含量以及谷丙转氨酶 (ALT) 活性, 免疫组织化学检测增殖细胞核抗原 (PCNA) 阳性细胞, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法测定肝细胞核 4 α 因子 (HNF-4 α) mRNA 的表达变化。结果 慢性酒精中毒小鼠肝组织锌含量为 (6.83 \pm 0.82) μ mol/L, 明显减少, 低于对照组的 (15.71 \pm 1.63) μ mol/L ($P < 0.01$); 与对照组 ALT 活性 [(26.2 \pm 1.4) U/L] 比较, 慢性酒精中毒组 ALT 活性 [(60.5 \pm 16.8) U/L] 升高 ($P < 0.05$); 补锌进一步增加了 PCNA 阳性细胞的数目, HNF-4 mRNA 水平因酒精而明显减弱。结论 补充锌能够增强慢性酒精中毒小鼠肝再生, 其机制与肝细胞核 4 α 因子 (HNF-4 α) 的增加有关

关键词: 慢性酒精中毒; 肝损伤; 肝再生; 锌

中图分类号: R 575.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)01-0068-03

Effects of zinc supplementation on liver regeneration in mice exposed to long-term ethanol administration XIAO Min, FENG Yan-hong, DONG Miao-wu, et al. Center of Experimental Animal, Wenzhou Medical College (Wenzhou 325035, China)

Abstract Objective To examine whether dietary zinc supplementation could improve liver regeneration in a mouse model of alcoholic liver disease. **Methods** A adult C57BL/6 mice were fed with ethanol-containing liquid diet for 6 months to induce alcoholic liver disease ascertained by serum alanine transferase activity and histopathological changes. At the same time, the number of proliferation nuclear antigen (PCNA)-positive cell and the expression of hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α) were measured. **Results** Zinc supplementation to ethanol-exposed mice enhanced liver regeneration by increasing the number of proliferation nuclear antigen (PCNA)-positive cell. Zinc-enhanced liver regeneration was associated with an increase in HNF-4 α . **Conclusion** The study provides evidence that zinc supplementation enhances liver regeneration at least in part by HNF-4 α through the up-regulation of cell proliferation-related proteins, suggesting that dietary zinc supplementation may have beneficial effects in alcoholic liver disease.

Key words chronic alcoholism; liver lesion; liver regeneration; zinc

锌是人体内最重要的微量元素之一。饮食缺锌与各种生理缺陷有关, 包括食欲不振, 皮肤溃烂和生长迟缓等^[1-2]。研究表明, 长期摄入酒精后肝的再生能力会被损害^[3-4]。肝细胞核因子 4 α (HNF-4 α), 一种锌指蛋白, 是肝中丰富的转录因子, 参与大多数肝细胞的功能, 包括细胞增殖^[5-6]。但锌在肝再生中的具体作用, 以及锌与慢性酒精性肝病锌指转录因子 HNF-4 α 可能存在的关系尚未确定。本实验通过构建慢性酒精中毒小鼠模型, 探究锌对肝损伤后再生影响, 锌与 HNF-4 α 之间的关系以及 HNF-4 α 在肝再生中的作用, 为酒精性肝病的治疗提供理论依据, 开拓治疗的新途径。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 AA320CRT/N 原子吸收分光光度计 (杭州科晓化工仪器设备有限公司); DLYMPUS AU-2700 全自动生化分析仪 (成都迈克科技有限责任公司); 多克隆兔抗增殖细胞核抗原 (武汉博士德生物工程有限公司); 肝脏 HNF-4 α 及内参 β -actin 的引物 (美国 Invitrogen 公司); 总核糖核酸 RNA 提取试剂 Trizol (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司); Taq 酶 (美国 Takara 公司)。

1.2 实验动物 健康成年雄性 C57BL/6 小鼠 (温州医学院实验动物中心) 40 只 (25 \pm 0.6) g 动物使用许可证: 浙 22-

005234。动物随机分为 4 组 (每组 10 只), 对照组、酒精中毒组、酒精中毒 + 锌组和对照 + 锌组。饮水中乙醇含量 (% W/V) 逐渐增加, 开始为 3%, 每 1 个月增加 0.3%, 最终达到 4%。在饮水中加入硫酸锌 (ZnSO₄) 75 mg/L。实验期间各组小鼠单笼喂养, 自由饮水和进食, 持续喂养 6 个月。每天和每周分别记录食物的摄入量和体重。

1.3 实验方法

1.3.1 锌和铁含量测定 摘眼球取血并分离血清, 置 4℃ 保存。肝组织先测湿重, 用硝酸和过氧化氢冻干并消化肝组织后, 再用盐酸溶解稀释。采用火焰原子吸收分光光度法测定血清和肝组织中锌和铁元素含量。

1.3.2 肝损伤检测 应用全自动生化分析仪测定血清中谷丙转氨酶 (ALT) 活性。肝组织先固定在 10% 福尔马林中, 采用常规的石蜡切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察。

1.3.3 肝再生评估 用增殖细胞核抗原 (PCNA) 免疫组织化学染色, 来评估肝再生情况。肝组织切片微波炉抗原修复后, 采用常规的链霉卵白素-生物素 (SAB) 法染色观察。多克隆兔抗 PCNA 被用作一抗, 在 4℃ 过夜培养。磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。PCNA 阳性细胞可显示颗粒状和弥漫性两种类型核着色, 每张切片高倍镜 ($\times 400$) 下计数 1 000 个肝细胞 PCNA 阳性细胞数, 以百分率表示。

1.3.4 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 肝脏 HNF-4 α 的引物序列 (上游: 5'-GATGCTTCTCGGAGGGTCTG-3' 下游: 5'-TG-GCTTCTGCTTGGTAT-3'), 扩增长度: 580 bp 内参 β -actin 引物序列 (上游: 5'-CTGTCCCTGTATGCTCTG-3' 下游: 5'-ATGT-CAGCACCAGTATTC-3'), 扩增长度: 191 bp RT-PCR 法反应条

* 基金项目: 浙江省科技厅基金 (2009F80004); 浙江省自然科学基金 (Y2080613)

作者单位: 1. 温州医学院实验动物中心, 浙江温州 325035; 2. 温州医学院基础医学院

作者简介: 肖敏 (1966-), 女, 浙江温州人, 实验师, 大学毕业, 主要从事动物微量元素代谢生理研究。

通讯作者: 刘重斌, E-mail: liuchongbin197@126.com

件: 94℃预变性 3min, 94℃变性 30s, 57℃退火 30s, 72℃延伸 35s 循环 28次, 最后 72℃延伸 7min。

1.4 统计分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 所有数据都表示为平均值 $\bar{x} \pm s$ 标准差, 经方差分析和 Newman-Keuls' 多重比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体重比较 (表 1) 12 周之前, 各组动物之间无明显差异。而 12 周之后, 慢性酒精中毒组体重明显低于其他 3 组动物 (均 $P < 0.05$)。各组动物食物的摄入量无明显差异。

表 1 各组动物体重比较 ($g, \bar{x} \pm s$)

组别	时间(周)						
	0	4	8	12	16	20	24
对照组	25.0 ± 0.52	26.5 ± 0.26	28.0 ± 0.34	29.6 ± 0.36	33.2 ± 0.41	35.5 ± 0.60	38.2 ± 0.60
对照 + 锌组	25.0 ± 0.25	27.4 ± 0.56	28.2 ± 0.33	30.2 ± 0.36	33.6 ± 0.58	36.0 ± 0.22	38.0 ± 0.48
酒精组	25.0 ± 0.55	26.0 ± 0.46	26.4 ± 0.35	27.0 ± 0.4 ^a	28.8 ± 0.36 ^a	30.8 ± 0.28 ^a	32.4 ± 0.37 ^a
酒精 + 锌组	25.0 ± 0.51	27.4 ± 0.32	27.6 ± 0.41	28.4 ± 0.50	31.5 ± 0.44	33.6 ± 0.25	36.0 ± 0.50

注: 与其他组比较, $aP < 0.05$ 。

2.2 锌和铁元素含量及 ALT 活性 (表 2) 在酒精中暴露 6 个月可以引起肝中锌浓度的明显减少 ($P < 0.01$), 但血清中锌浓度变化不明显 ($P > 0.05$)。饮水中补锌未提高基础水平, 但可以预防酒精引起的肝中锌浓度的减少。同时, 慢性酒

精中毒可引起血清和肝中铁浓度的明显增加 (均 $P < 0.05$)。血清中 ALT 活性有部分被补充的锌抑制, 而慢性酒精中毒则可明显升高其活性 ($P < 0.05$)。

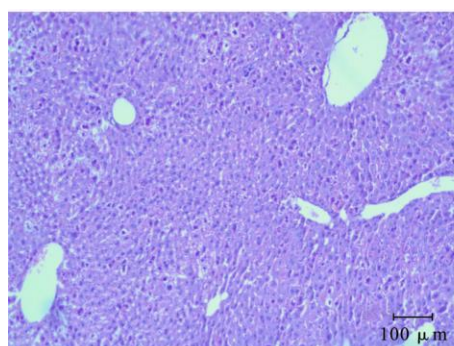
表 2 血清和肝组织中锌和铁元素含量及 ALT 活性

组别	血清			肝组织	
	Zn ($\mu\text{mol/L}$)	Fe ($\mu\text{mol/L}$)	ALT (U/L)	Zn ($\mu\text{mol/L}$)	Fe ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	11.25 ± 0.21	34.28 ± 4.16	26.2 ± 1.4	15.71 ± 1.63	28.12 ± 2.16
对照 + 锌组	14.62 ± 2.67	36.19 ± 6.55	20.8 ± 8.7	16.58 ± 5.24	25.36 ± 7.58
酒精组	10.80 ± 3.09	58.24 ± 10.13 ^a	60.5 ± 16.8 ^a	6.83 ± 0.82 ^b	46.85 ± 8.75 ^a
酒精 + 锌组	12.66 ± 3.52	45.13 ± 8.21	48.6 ± 11.3	11.48 ± 0.57	37.44 ± 5.26

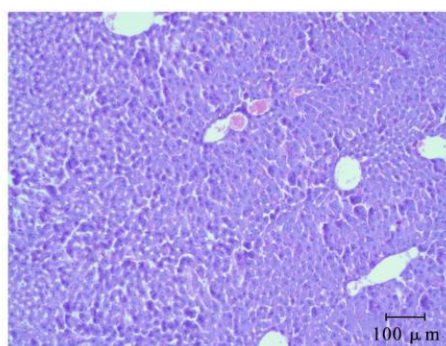
注: 与对照组比较, $aP < 0.05$, $bP < 0.01$ 。

2.3 酒精性肝损伤 (图 1) 组织病理变化显示, 慢性酒精中毒组 (图 1C) 与正常组动物 (图 1A) 比较, 肝组织损伤明显,

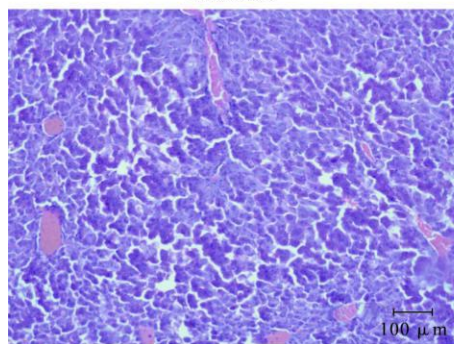
可见大滴性脂肪变性, 肝细胞坏死, 白细胞浸润。这些组织病理学的改变因为补锌而有所减弱 (图 1B 和 D)。



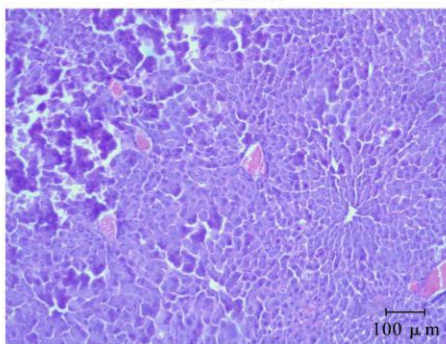
A: 对照组



B: 对照+锌组



C: 酒精组



D: 酒精+锌组

图 1 酒精性肝损伤病理变化

2.4 肝细胞增殖(图 2) 对照组 PCNA 阳性细胞的数量为 (0.48 ± 0.36) (图 2A), 对照 + 锌组为 (0.59 ± 0.4) (图 2B), 慢性酒精中毒增加了肝脏中 PCNA 阳性细胞的数量

(2.68 ± 0.54) (图 2C), 但补锌进一步增加了 PCNA 阳性细胞 (28.56 ± 7.21) (图 2D)。

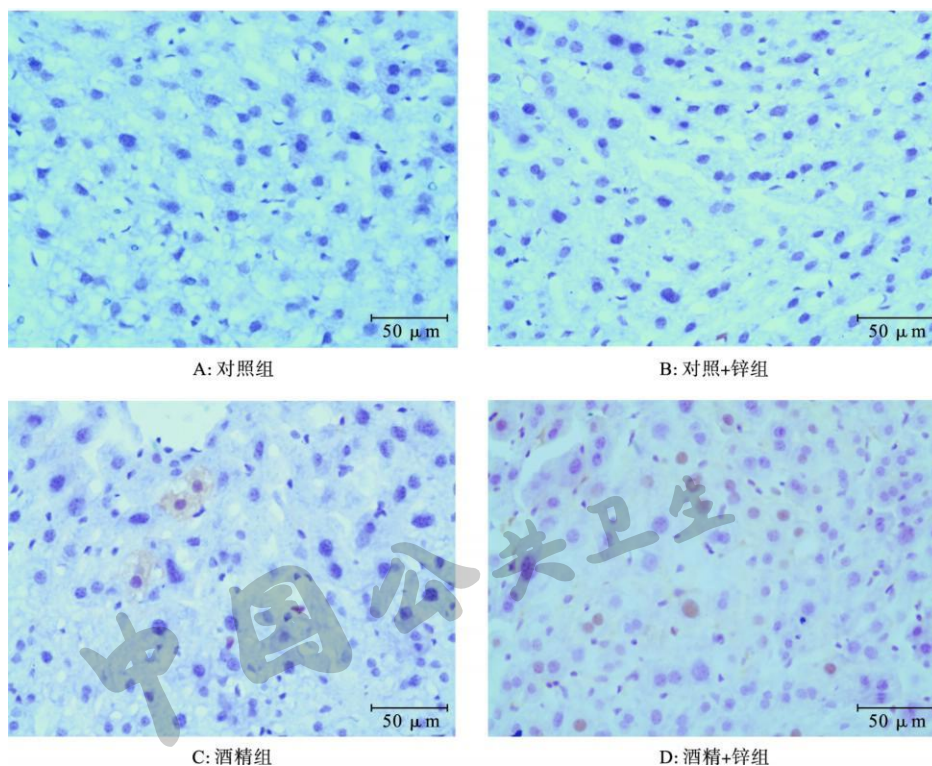
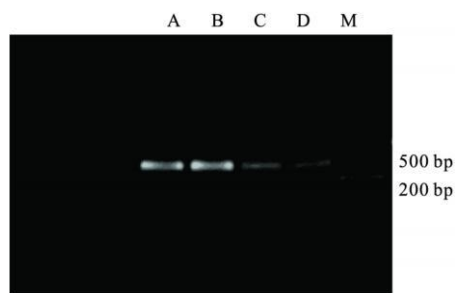


图 2 PCNA 免疫组织化学染色

2.5 HNF-4 α mRNA 水平(图 3) 对肝中的 HNF-4 α mRNA 水平测定显示, 在一些肝细胞核中, HNF-4 α mRNA 水平因酒精而显著减弱, 但补锌会抑制此作用。

表明肝细胞凋亡与细胞增殖之间存在不平衡。本实验结果显示, 暴露于乙醇 6 个月的小鼠有较多数量的 PCNA 阳性肝细胞, ALT 活性有明显下降。表明长期摄入酒精的确会诱导肝细胞增殖, 但并不足以弥补由酒精引发的肝损伤, 补锌可以增强小鼠再生肝细胞数。



注: A: 对照, B: 对照 + 锌, C: 酒精组, D: 酒精 + 锌, M: Marker

图 3 HNF-4 α mRNA 水平测定

3 讨论

研究表明, 长期摄入酒精影响肝再生的进程。与细胞周期相关的蛋白质, 包括周期蛋白 D1、D3、cdk-1 和 p53 的诱导均被乙醇所抑制, 而氨基端激酶 (JNK) 可被肝部分切除术或细胞生长因子, 如表皮生长因子, 胰岛素, 肝细胞生长因子 (HGF) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 所诱导^[7-8]。

本研究结果显示, 酒精性肝损伤与肝脏缺锌密切相关, 补锌不仅补充肝脏锌含量, 而且还增强了肝再生。增强的肝脏再生能力同肝中 HNF-4 α 的储存量有关。它是通过维持 HNF-4 α 的活性来调节细胞中与增殖相关蛋白质而实现的。研究表明, 酗酒的慢性疾病患者与控制饮酒的慢性病患者相比较, 其细胞凋亡指数和细胞增殖数均较高, 表明肝损伤可以诱导肝细胞增殖^[9]。而细胞增殖数目少于细胞凋亡数目, 则

参考文献

- [1] Zhou Z, Sun X, Lambert JC, et al Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury [J]. *Am J Pathol* 2002; 160: 2267-2274.
- [2] 周义军, 曹玉广. 乙醇对大鼠脑、肝金属硫蛋白浓度的影响 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(6): 679-680.
- [3] Pfaffl MW, Gerstmayr B, Bosio A, et al Effect of zinc deficiency on the mRNA expression pattern in liver and jejunum of adult rats monitoring gene expression using cDNA microarrays combined with real-time RT-PCR [J]. *J Nutr Biochem*, 2003, 14: 691-702.
- [4] 孙永波, 周建波, 李庆蔓. 锌与酒精性肝损害的相关性研究 [J]. *医学综述*, 2006, 12(1): 94-95.
- [5] Zhou Z, Kang X, Jiang Y, et al Preservation of hepatocyte nuclear factor-4 is associated with zinc protection against TNF- α hepatotoxicity in mice [J]. *Exp Biol Med*, 2007, 232: 622-628.
- [6] Cheriyan MG, Kang YJ Metallothionein and liver cell regeneration [J]. *Exp Biol Med* 2006, 231: 138-144.
- [7] Kang XQ, Song ZY, McClain CJ, et al Zinc supplementation enhances hepatic regeneration by preserving hepatocyte nuclear factor-4 α in mice subjected to long-term ethanol administration [J]. *Am J Pathol* 2008, 172: 916-925.
- [8] 解雪芬, 庞炜, 党怀欣. 肝细胞核因子 4 和 SREBP 在 db/db 小鼠肝脏中的调节作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(7): 535.
- [9] 吴静, 张素华, 倪银星. 2 型糖尿病大鼠肝脏肝细胞核因子 (HNF)-4 α 、HNF-1 α 基因表达研究 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2005, 21(4): 325-326.

收稿日期: 2010-09-02

(解学魁编辑 孔繁学校对)