

# 饮用某 54% vol 白酒对大鼠肾上腺髓质细胞 ADM 及 ACTH 表达的影响\*

陈兴强\*\*，李容蓉，尹 丹，李 杰，夏白娟，梁文妹\*\*\*

(贵州医科大学 组织学与胚胎学教研室，贵州 贵阳 550025)

**[摘要]** 目的：探讨摄入不同剂量某 54% vol 白酒对大鼠肾上腺髓质细胞内肾上腺髓质素(ADM)及促肾上腺皮质激素(ACTH)表达的影响。方法：正常雄性 SD 大鼠 120 只随机法分为正常对照组(NG,  $n = 30$ )和实验组(灌胃白酒,  $n = 90$ )，实验组又分为低剂量组[LG,  $0.8 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]、中剂量组[MG,  $1.6 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]和高剂量组[HG,  $2.4 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]，实验组大鼠于每日 11:00 AM 及 5:00 PM 各灌胃一次，NG 组不予处理；各组大鼠分别于实验第 4、8、12、16 及 20 周末取肾上腺组织，采用免疫组织化学 SABC 法、图像分析法、Western blot 检测大鼠肾上腺髓质中 ADM 及 ACTH 表达。结果：与 NG 相比较，第 4、8、12、16 及 20 周末各实验组，大鼠肾上腺髓质细胞 ADM、ACTH 免疫组织化学染色强度及平均光密度差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )；Western blot 显示，与 NG 组比较，第 4、8、12、16 及 20 周末各实验组大鼠肾上腺组织 ADM、ACTH 蛋白表达水平差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论：在本实验设定的剂量和时长下，摄入该 54% vol 白酒对大鼠肾上腺髓质 ADM 及 ACTH 的表达无明显影响。

**[关键词]** 食用白酒；肾上腺髓质素；促肾上腺皮质激素；肾上腺髓质；免疫组织化学；免疫印记

**[中图分类号]** R155 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)08-0904-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.08.008

## Effect of 54% vol Liquor on Expression of ADM and ACTH in Adrenal Medulla Cell of Rats

CHEN Xingqiang, LI Rongrong, YIN Dan, LI Jie, XIA Baijuan, LIANG Wenmei

(Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of different doses of certain 54% vol Liquor on the expression of adrenomedullin (ADM) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in rat adrenal medulla cells. **Methods:** 120 normal male SD rats were randomly divided into normal control group (NG,  $n = 30$ ) and experimental group (EG,  $n = 90$ ). The experimental group was divided into low dose group [LG,  $0.8 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ], middle dose group [MG,  $1.6 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ] and high - dose group [HG,  $2.4 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]. Rats in the experimental group were given intragastric administration at 11:00 a. m. and 5:00 p. m. daily, but no treatment was given in the normal group. The adrenal tissues of each group were collected at the end of the 4th, 8th, 12th, 16th and 20th week. The expression of ADM and ACTH in the adrenal medulla was detected by immunohistochemical SABC method, image analysis method and Western blot. **Results:** The immunoreactive products of ADM and ACTH in normal and experimental groups were brown or claybank, and distributed in the adrenal medulla cytoplasm/karyon. At the end of the 4th, 8th, 12th, 16th and 20th week., there was no significant difference in im-

\*[基金项目] 贵州省教育厅“125”重大科技专项基金资助[黔教合重大专项字(2012)007]

\*\* 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

\*\*\* 通信作者 E-mail: wenmeiliang@126.com

网络出版时间: 2018-08-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180821.0759.004.html>

munohistochemical staining intensity and average optical density of adrenal medulla cells between the experimental group and the normal control group( $P > 0.05$ ). Western blot showed that there was no significant difference in the expression of ACTH protein in adrenal tissue of rats in the 4th, 8th, 12th, 16th and 20th week compared with the normal control group( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Under the dosage and duration of the experiment, the expression of ADM and ACTH in the adrenal medulla of rats was not significantly affected by the intake of the 54% vol liquor.

[ **Key words** ] liquor; adrenomedullin; adrenocorticotrophic hormone; adrenal medulla; Immunohistochemistry; Western blot

肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是一种降压肽,具有多种生物活性。ADM以旁分泌方式作用于肾上腺,不仅可以抑制肾上腺皮质球状带醛固酮的分泌,还能抑制肾上腺髓质儿茶酚胺的分泌<sup>[1]</sup>。促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)是腺垂体分泌的肽类激素,可促进肾上腺皮质发育和皮质醇(cortisol, COR)的合成与释放<sup>[2]</sup>。ADM能通过负反馈作用抑制下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)的分泌从而抑制基础ACTH的分泌<sup>[3]</sup>。酒类饮品的主要成分是乙醇和水,约占总量的98%左右,其余微量成分包括酸类、酯类、醇类、醛类、酚类及其他芳香族化合物,这些微量成分大部分对人体健康有益<sup>[4]</sup>。饮酒不当或饮酒过量不仅有损身体健康,还可能危害公共安全,饮酒与健康的关系已经成为人们关注的热点问题。本研究拟通过模拟正常人的饮酒习惯(饮用量和时间点),建立不同时长及不同剂量饮酒大鼠模型,采用免疫组织化学SABC法、图像分析法、Western blot检测各组大鼠肾上腺髓质组织的ADM及ACTH表达,为健康科学饮酒提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 清洁级雄性SD大鼠120只,体重180~220 g(贵州医科大学实验动物中心提供)。大鼠常规适应性分笼饲养(普通颗粒饲料、自由饮食饮水)。

1.1.2 主要试剂及抗体 兔抗鼠ACTH抗体(Boster公司),兔抗鼠ADM抗体(Boster公司), $\beta$ -Actin(TransGen公司),SABC试剂盒(Boster公司),戊巴比妥钠(美国Sigma公司),54% vol 白酒(贵州某白酒厂)。

1.1.3 仪器与设备 超低温冰箱(德国Thermos

Fisher公司),显微镜Nikon YS型(日本Nikon公司),Leica RM型切片机(德国Leica公司),低温离心机CTRE(日本Hitachi公司),电泳仪DYY-6C, DYCZ-24DN型(北京六一公司),恒温干燥箱GZX-DX-X型(中国新胜公司),多功能成像系统5600型(中国CLINX公司),正置荧光显微镜附图像采集系统(日本Nikon公司),Image-pro plus6.0图像分析系统(美国Media Cybernetics公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理 120只成年雄性SD大鼠适应性喂养一周后,随机分为正常对照组(normal control group, NG)30只和实验组(灌胃白酒)90只,实验组又分为低剂量组[LG, 0.8 mL/(kg·d)]、中剂量组[MG, 1.6 mL/(kg·d)]及高剂量组[HG, 2.4 mL/(kg·d)],每组各30只;各组大鼠设4周、8周、12周、16周组及20周5个观察时间点。实验组大鼠每日以54% vol 白酒灌胃两次(11:00AM, 5:00PM),至取材前1日。NG组予以正常喂养。

1.2.2 取材及标本处理 各组于各时间点前禁食10 h,戊巴比妥钠麻醉后取材。取一侧肾上腺组织,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,4  $\mu$ m连续切片(3张/只),每张切片间隔56  $\mu$ m,以备行免疫组织化学染色及图像分析;取另一侧肾上腺组织-80  $^{\circ}$ C保存,以备用于Western blot测定ACTH及ADM的表达。

1.2.3 肾上腺髓质细胞中ACTH及ADM表达检测 采用免疫组织化学染色显示ACTH和ADM免疫反应阳性细胞。主要步骤为:切片经烤片,脱蜡,乙醇下行入水,10%甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡10 min,正常羊血清(按1:20比例稀释)封闭30 min,加入兔抗鼠ACTH抗体(按1:100比例稀释)、兔抗鼠ADM抗体(按1:100比例稀释)4  $^{\circ}$ C冰箱保存过夜,滴加生物素化IgG(按1:100比例稀释)37  $^{\circ}$ C孵育

30 min,SABC 复合物(按 1:100 比例稀释) 37 ℃ 孵育 20 min,DAB 显色,苏木精复染细胞核,常规封片。1% PBS 缓冲液代替特异性抗体作为阴性对照,其余步骤同上。

1.2.4 肾上腺组织匀浆 ACTH 及 ADM 表达检测

取-80 ℃冰箱保存的肾上腺组织,于匀浆器中裂解,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min 后取上清。测定样品总蛋白浓度(BCA 法),SDS-PAGE(5 ×)制样,沸水浴 5 min,-20 ℃保存备用,行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭,加入兔抗鼠 ACTH 抗体(按 1:400 比例稀释)、兔抗鼠 ADM 抗体(按 1:500 比例稀释),4 ℃孵育过夜,羊抗兔 IgG-HRP(按 1:5 000 比例稀释)和兔抗鼠 IgG-HRP(按 1:5 000 比例稀释)孵育 1.5 h,洗膜(1 × TBST),ECL 混合液化学发光(Millipore 公司),经曝光(CLINX 凝胶成像系统)后用 Image-pro plus6.0 图像分析系统对各条带相对积分光密度分析,以  $\beta$ -actin 为内参照。

1.3 统计学分析

实验数据以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )形式表示,采

用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)分析。 $P < 0.05$  时差异具有统计学意义。

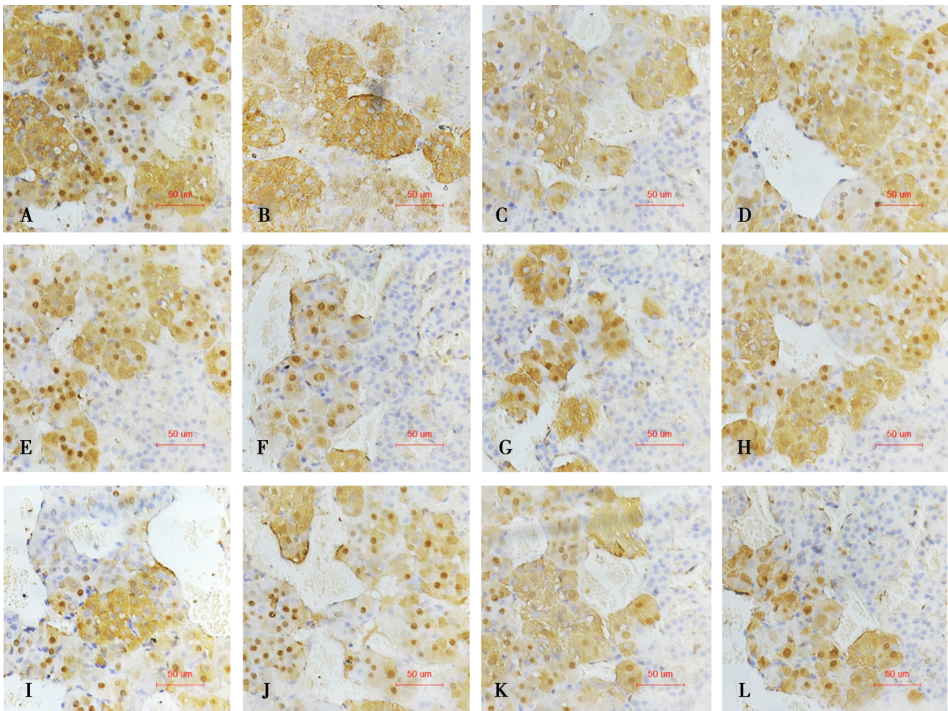
2 结果

2.1 肾上腺髓质细胞 ACTH 及 ADM 表达

NG 组及各实验组肾上腺 ACTH 及 ADM 免疫反应产物呈棕褐色或棕黄色细颗粒状,分布于肾上腺髓质细胞胞质或细胞核内,所有阴性对照未见免疫反应阳性产物。实验第 4、8、12、16 及 20 周末时,各实验组肾上腺髓质细胞 ACTH 及 ADM 免疫反应阳性产物位置及强度与 NG 组比较,未见明显变化(见图 1,图 2)。

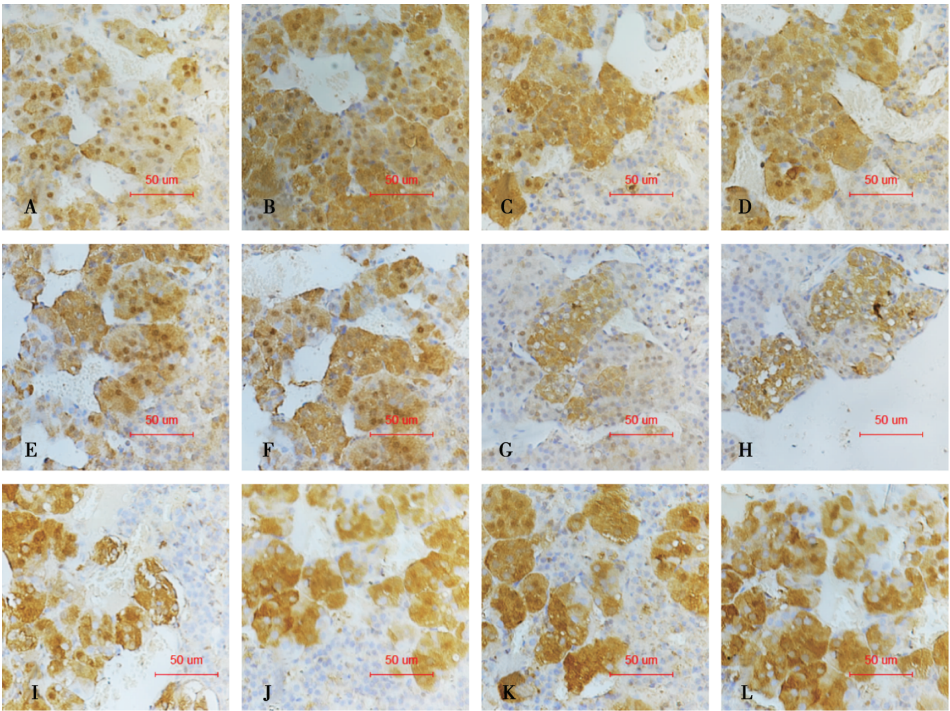
2.2 肾上腺髓质 ACTH 及 ADM 阳性细胞光密度

第 4、8、12、16 和 20 周各实验组肾上腺髓质 ACTH 阳性细胞的平均光密度与 NG 组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。第 4、8、12、16 和 20 周各实验组肾上腺髓质 ADM 阳性细胞的平均光密度与 NG 相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。



A、B 分别为 4 周 NG、MG;C、D 分别为 8 周 NG、HG;E、F 分别为 12 周 LG、MG;  
G、H 分别为 16 周 LG、HG;I、J、K、L 分别为 20 周 NG、LG、MG、HG  
图 1 各组大鼠肾上腺髓质 ACTH 阳性细胞(SABC, ×400)

Fig. 1 ACTH positive cells in adrenal medulla of rats in each group



A、B 分别为 4 周 NG、MG；C、D 分别为 8 周 NG、HG；E、F 分别为 12 周 LG、MG；  
G、H 分别为 16 周 LG、HG；I、J、K、L 分别为 20 周 NG、LG、MG、HG

图 2 各组大鼠不同时间肾上腺髓质 ADM 阳性细胞(SABC, ×400)

Fig. 2 ADM positive cells in adrenal medulla of rats in each group

表 1 各组大鼠不同时间肾上腺髓质 ACTH 阳性细胞的平均光密度( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Average optical density of ACTH positive cells in adrenal medulla of rats in each group				
时间	NG	LG	MG	HG
4 周	0. 139 ± 0. 017	0. 126 ± 0. 014	0. 133 ± 0. 016	0. 121 ± 0. 007
8 周	0. 141 ± 0. 010	0. 132 ± 0. 016	0. 139 ± 0. 017	0. 129 ± 0. 012
12 周	0. 138 ± 0. 016	0. 140 ± 0. 010	0. 152 ± 0. 008	0. 131 ± 0. 008
16 周	0. 137 ± 0. 012	0. 138 ± 0. 009	0. 135 ± 0. 009	0. 131 ± 0. 014
20 周	0. 138 ± 0. 008	0. 139 ± 0. 011	0. 136 ± 0. 013	0. 138 ± 0. 013

表 2 各组大鼠不同时间肾上腺髓质 ADM 阳性细胞的平均光密度( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Average optical density of ADM positive cells in adrenal medulla of rats in each group				
时间	NG	LG	MG	HG
4 周	0. 421 ± 0. 026	0. 391 ± 0. 017	0. 405 ± 0. 027	0. 392 ± 0. 022
8 周	0. 415 ± 0. 030	0. 377 ± 0. 012	0. 364 ± 0. 031	0. 372 ± 0. 029
12 周	0. 418 ± 0. 024	0. 375 ± 0. 012	0. 395 ± 0. 019	0. 392 ± 0. 022
16 周	0. 407 ± 0. 026	0. 376 ± 0. 017	0. 258 ± 0. 017	0. 384 ± 0. 020
20 周	0. 411 ± 0. 023	0. 382 ± 0. 034	0. 287 ± 0. 033	0. 391 ± 0. 019

2.3 肾上腺组织匀浆中 ACTH 及 ADM 表达

ACTH、ADM、β-actin 蛋白分别在 29 kD、22 kD、42 kD 处显示出特异性条带(如图 3)。与 NG 组相比,第 4、8、12、16 及 20 周各剂量组大鼠肾上腺组织内 ACTH、ADM 表达水平比较,差异无统计学意义( $P>0. 05$ )。

3 讨论

适量饮酒可使动脉血管扩张从而导致血压下降,其对于患轻微高血压及血液循环不良患者有益<sup>[5]</sup>。还有研究报道,适量饮酒可以降低冠心病、



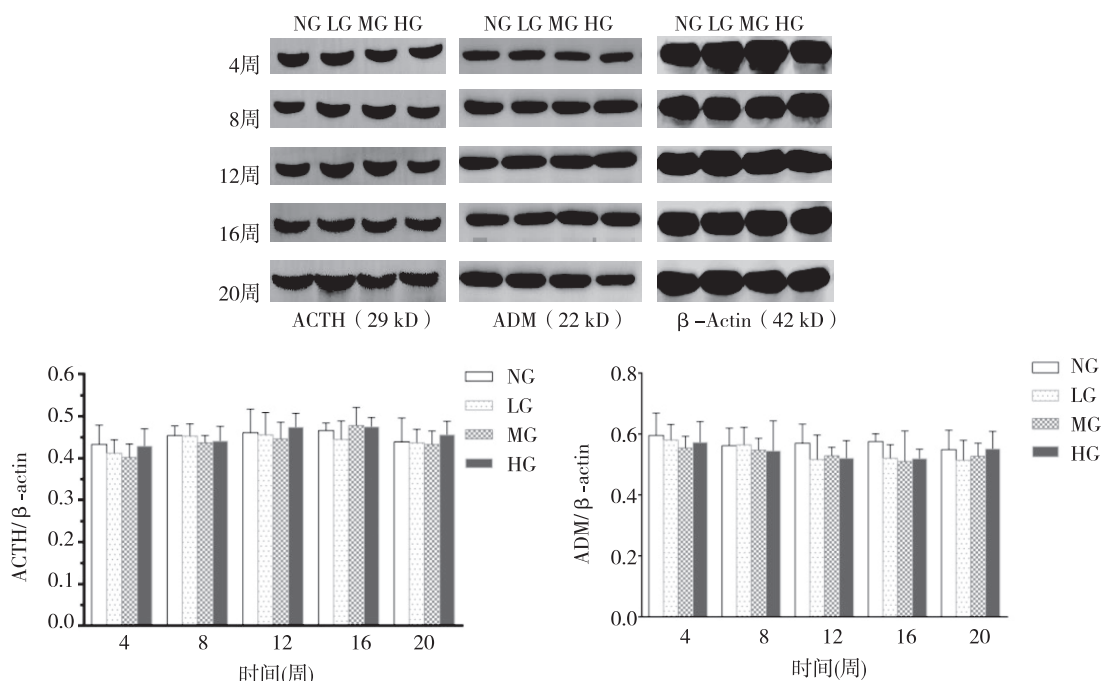


图3 各组大鼠不同时间肾上腺组织匀浆中 ACTH 及 ADM 表达水平

Fig. 3 The expression levels of ACTH and ADM in adrenal tissue homogenate of rats in each group

心肌梗塞、心力衰竭、心肌缺血性中风的风险<sup>[6]</sup>。过量饮酒对机体可造成严重的危害,也可以使癌症的发生率和死亡率均上升<sup>[7-8]</sup>。有研究证明,当酒依赖者遇到饮酒相关环境时,易产生类似应激的反应,出现一系列生理指标的改变<sup>[9-10]</sup>。大量饮酒可使 ACTH 以及肾上腺皮质激素的分泌增加,导致应激水平改变。

ACTH 在机体中具有十分广泛的生理作用,其中包括体温调节、心血管功能调节、神经损伤恢复与再生等多种生理功能<sup>[11]</sup>。在应激状态下,ACTH 磷酸化水平急剧升高。有研究认为,只有磷酸化后的 ACTH 才具有生理活性。大鼠长期饮酒可以导致机体下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)功能发生严重紊乱,此时糖皮质激素的合成与分泌可能不再受 ACTH 的调控<sup>[12]</sup>。

ADM 参与多种生理、病理过程的调节,特别是在调节心血管和肾功能的稳态方面发挥重要生物学效应<sup>[13]</sup>。乙醇引起的各组织损害主要是通过促进自由基生成的结果。氧自由基可以促进 AMD 的合成与分泌<sup>[14]</sup>。而氧自由基清除剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)可以抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 ADM 合成的促进作用,并几乎完全阻断 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的协同作用。

本实验大鼠灌胃剂量分为 0.8 mL/(kg·d)、1.6 mL/(kg·d)及 2.4 mL/(kg·d)。经换算后相当于正常成年人(60 kg)每日饮酒 7.8 mL、15.6 mL

及 23.4 mL。前期研究也表明,在该设定条件下该 54% vol 白酒对大鼠肝脏的功能无明显影响<sup>[15-16]</sup>。在本实验设定的剂量和时长下,大鼠肾上腺髓质 ACTH、ADM 表达没有发生显著改变,即对肾上腺髓质功能无明显影响。

## 4 参考文献

- [1] 华明明, 李竹琴, 王岚峰. 肾上腺髓质素心血管保护作用研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(20): 3344 - 3346.
- [2] ODEON M M, YAMAUCHI L, GROSMAN M, et al. Long-term effects of repeated maternal separation and ethanol intake on HPA axis responsiveness in adult rats[J]. Brain Research, 2017(1657):193 - 201.
- [3] MIMOTO T, NISHIOKA T, ASABA K, et al. Effects of adrenomedullin on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release in pituitary cell cultures and on ACTH and oxytocin responses to shaker stress in conscious rat[J]. Brain Research, 2001, 922(2): 261.
- [4] 崔利. 中国白酒的营养成分及对人体健康的作用[J]. 酿酒, 2008, 35(1): 15 - 18.
- [5] FAN A Z, ZHOU Y. Alcohol intake and high blood pressure[M]. City: Humana Press, 2013:321 - 327.
- [6] GILES T D, WEBER M A, BASILE J, et al. Efficacy and safety of nebivolol and valsartan as fixed-dose combination in hypertension: a randomised, multicentre study [J]. Lancet, 2014, 383(9932): 1889.

(下转第 923 页)