

## 维生素 D<sub>3</sub> 对酒精性肝损伤小鼠的保护作用

王惠惠, 王晓宇, 龚渭轶, 程文秀, 高晶鑫, 胡纯秋

**摘要** 目的 探讨维生素 D<sub>3</sub> 对酒精性肝损伤小鼠的保护作用。方法 40 只小鼠随机分为 4 组: 正常对照组 (Control 组)、单纯维生素 D<sub>3</sub> 组 (VitD<sub>3</sub> 组)、酒精组 (EtOH 组) 及酒精 + 维生素 D<sub>3</sub> 组 (EtOH + VitD<sub>3</sub> 组)。采用 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料喂养小鼠制备酒精性肝损伤模型, 检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平以及肝指数, HE 染色观察肝脏病理形态学改变, qRT-PCR 检测肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、白细胞介素 (IL)-6 和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 相对表达水平, Western blot 检测肝脏 NF- $\kappa$ B p65 和 NF- $\kappa$ B p50 蛋白表达。结果 与 Control 组比较, EtOH 组小鼠血清 ALT、AST 活力、肝指数及肝组织 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  mRNA 水平显著升高, EtOH 组肝细胞索排列紊乱, 肝小叶界限不清, 肝细胞出现明显炎性细胞浸润和脂肪空泡, NF- $\kappa$ B p65 和 NF- $\kappa$ B p50 蛋白表达水平显著升高; 与 EtOH 组比较, EtOH + VitD<sub>3</sub> 组小鼠血清 ALT、AST 活力、肝指数及肝组织 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  mRNA 水平显著降低, 且病理染色结果显示肝细胞炎性细胞浸润和脂肪空泡数量减少, 肝脏恢复正常细胞结构, 同时 NF- $\kappa$ B p65 和 NF- $\kappa$ B p50 蛋白表达水平显著降低。结论 维生素 D<sub>3</sub> 对酒精性肝损伤小鼠具有一定的保护作用, 其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 降低机体炎症反应有关。

**关键词** 维生素 D<sub>3</sub>; 酒精性肝损伤; NF- $\kappa$ B 信号通路; 炎症

**中图分类号** R 151.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0707-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.001

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是由于长期大量饮酒所致的肝脏疾病<sup>[1]</sup>。初期通常表现为脂肪肝, 进而可发展成酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化; 严重酗酒时可诱发广泛肝细胞坏死, 甚至肝功能衰竭。ALD 是我国常见的肝脏

疾病之一, 严重危害人类健康。因其发病机制复杂, 至今尚未发现有效的治疗药物。维生素 D 经典的生物学作用是调节钙磷稳态, 维持骨骼健康<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>显示, 维生素 D<sub>3</sub> 具有抗炎、抗氧化等生物学作用。动物研究<sup>[4]</sup>发现, 维生素 D<sub>3</sub> 对异烟肼联合利福平所致小鼠肝损伤具有明显的保护作用。该课题组前期研究<sup>[5]</sup>发现, 维生素 D 缺乏可加重酒精性肝损伤。该研究旨在观察并探讨维生素 D<sub>3</sub> 对酒精性肝损伤小鼠的保护作用及其可能的分子机制。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 40 只 6 周龄 C57BL/6J 雄性健康小鼠, 普通级, 体质量 (23.5 ± 0.6) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物房温度 20 ~ 25 °C, 湿度 (50 ± 5) %, 光照周期 12 h/12 h 昼夜交替。实验过程中给予小鼠人文关怀, 灌胃、眼球取血等操作均由技术熟练人员操作。实验方案经安徽医科大学实验动物伦理审查委员会审核通过 (动物伦理编号: 17-0014)。

**1.2 动物饲料** 所有饲料 (Lieber-DeCarli 液体饲料) 购自南通特洛菲饲料科技有限公司。液体对照饲料喂养 (编号: TP4030C), 饲料供能比: 碳水化合物 47%, 蛋白质 18%, 脂肪 35%; 酒精液体饲料喂养 (编号: TP4030B), 饲料供能比: 碳水化合物 19%, 蛋白质 18%, 脂肪 35%, 酒精供能比为 28%。

**1.3 药物与试剂** 维生素 D<sub>3</sub> 购自美国 Cayman 公司, 95% 药用级酒精购自南京化学试剂股份有限公司, 25(OH)D 放射免疫试剂盒购自意大利 Diasorin 公司, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-6 和 IL-1 $\beta$  引物由美国 Invitrogen 公司合成, qRT-PCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, Lamin A/C、NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p50 一抗购自英国 Abcam 公司, HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.4 方法

2022-12-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81402676); 安徽省高等学校科学研究项目 (编号: 2022AH040094)

作者单位: 安徽医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 合肥 230032

作者简介: 王惠惠, 女, 硕士研究生;

胡纯秋, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: huchqiu@163.com

**1.4.1 动物模型的建立与给药** 40 只小鼠随机分为 4 组:正常对照组 (Control 组)、单纯维生素 D<sub>3</sub> 组 (VitD<sub>3</sub> 组)、酒精组 (EtOH 组) 及酒精 + 维生素 D<sub>3</sub> 组 (EtOH + VitD<sub>3</sub> 组), 每组 10 只。Control 组和 VitD<sub>3</sub> 组小鼠均采用液体对照饲料喂养, EtOH 组和 EtOH + VitD<sub>3</sub> 组均使用酒精液体饲料喂养。为提高酒精肝损伤造模效果, EtOH 组和 EtOH + VitD<sub>3</sub> 组采用 2 周过渡喂养法 (对照液体饲料与酒精液体饲料混合比例 2 : 1、1 : 1、1 : 2 各喂养 4 d), 然后以酒精液体饲料喂养, 整个造模过程共计 6 周。喂养过程中 VitD<sub>3</sub> 组和 EtOH + VitD<sub>3</sub> 组每天灌胃给予 80 IU/只的维生素 D<sub>3</sub> (用大豆油溶解) 对小鼠进行灌胃, Control 组和 EtOH 组给予等量大豆油进行灌胃。末次给药后小鼠禁食不禁水 12 h, 眼球取血分离血清, 剖杀后取肝脏组织, -80 °C 保存备用。

**1.4.2 血清 25(OH)D 含量检测** 收集小鼠血清, 采用放射免疫分析法检测小鼠血清 25(OH)D 水平, 具体步骤按照试剂盒要求操作。

**1.4.3 血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平测定** 小鼠眼球取血后, 室温静置 2 h, 3 500 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 使用全自动生化分析仪测定 ALT、AST 水平。

**1.4.4 肝脏组织病理形态观察** 肝脏组织经 4% 多聚甲醛固定、脱水、包埋后, 切成 5 μm 厚切片, HE 染色后, 中性树脂封片, 光学显微镜观察肝组织病理改变并拍照。

**1.4.5 qRT-PCR 实验** 取 30 mg 小鼠肝脏组织, 用 TRIzol 法提取 RNA, 测定 RNA 纯度并稀释至 500 ng/μl, 按照 RT&qPCR Kit 试剂盒说明书配置逆转录反应体系后在逆转录 PCR 仪中进行反应, 条件为: 42 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 冷却, 生成 cDNA 后配成相应体系上机扩增, 条件为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 5 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 45 个循环, 37 °C 降温 30 s, 4 °C 冷却保存。以 18 S 作为内参, 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 TNF-α、TGF-β、IL-6 和 IL-1β mRNA 相对表达水平, 基因引物序列见表 1。

**1.4.6 Western blot 实验** 取 30 mg 肝脏组织, 加入 500 μl 蛋白提取液 A 匀浆后, 4 °C、2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 向沉淀中加入 200 μl 蛋白提取液 B, 涡旋震荡至无明显沉淀, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为核蛋白, 并进行 BCA 蛋白定量分析。将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 随后将蛋白转至 PVDF 膜上, 将膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭

表 1 各基因的引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
18 S	F:GTAACCCGTTGAACCCATT R:CCATCCAATCGGTACTAGCG	151
TNF-α	F:CCCTCCTGGCCAACGGCATG R:TGGGGCAGCCTTGTCCCTT	109
TGF-β	F:CGGGAAGCAGTGCCTCAACC R:GGGGTTCAGCAGCCGTTAC	147
IL-6	F:AGACAAAGCCAGAGTCTTCAGAGA R:GCCACTCCTTCTGTACTCCAGC	146
IL-1β	F:GCCTCGTGTGTCGGACCCATAT R:TCCTTTGAGCCCAAGGCCACA	143

1 h 后, 将膜分别放入一抗 Lamin A/C (1 : 2 000)、NF-κB p65 (1 : 1 000)、NF-κB p50 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 60 000) 孵育 60 min。TBST 洗膜 3 次, 使用化学发光系统曝光条带。使用 Image J 测量条带的灰度值。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析, 所有实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验平行重复 3 次, 对符合正态分布的计量资料采用单因素方差分析, 两两组间比较采用 SNK 法,  $P < 0.05$  示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠血清 25(OH)D 水平** 与 Control 组比较, VitD<sub>3</sub> 组小鼠 25(OH)D 水平 [(73.57 ± 2.22) ng/ml] 较高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与 EtOH 组比较, EtOH + VitD<sub>3</sub> 组小鼠 25(OH)D 水平较高 [(79.12 ± 3.12) ng/ml vs (51.68 ± 3.53) ng/ml], 差异有统计学意义 ( $F = 21.30, P < 0.01$ )。

**2.2 维生素 D<sub>3</sub> 对酒精性肝损伤小鼠肝指数的影响** 与 Control 组比较, EtOH 组小鼠肝指数升高 ( $P < 0.01$ ); 与 EtOH 组比较, EtOH + VitD<sub>3</sub> 组小鼠肝指数降低 ( $F = 60.74, P < 0.05$ )。见表 2。

**2.3 维生素 D<sub>3</sub> 对酒精性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 水平的影响** 与 Control 组比较, EtOH 组小鼠 ALT、AST 水平升高 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); 与 EtOH 组比较, EtOH + VitD<sub>3</sub> 组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平降低 ( $F_{ALT} = 20.50, F_{AST} = 5.96$ , 均  $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.4 维生素 D<sub>3</sub> 对酒精性肝损伤小鼠病理组织学的影响** Control 组和 VitD<sub>3</sub> 组肝细胞索以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝小叶结构清晰, 肝细胞结构正常, 无炎性细胞浸润和脂肪变性; EtOH 组肝细胞索排列紊乱, 肝小叶界限不清, 肝细胞出现明显炎性

表2 维生素D<sub>3</sub>对小鼠肝指数及血清ALT、AST的影响(n = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肝指数(%)	ALT(U/L)	AST(U/L)
Control	4.32 ± 0.05	31.22 ± 1.71	140.9 ± 10.38
EtOH	5.48 ± 0.08**	69.60 ± 4.75**	205.3 ± 19.33*
VitD <sub>3</sub>	4.03 ± 0.06	30.75 ± 1.92	141.5 ± 6.39
EtOH + VitD <sub>3</sub>	4.57 ± 0.08#	58.70 ± 6.05#	162.1 ± 6.84#

与Control组比较: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与EtOH组比较: #P < 0.05

细胞浸润和脂肪空泡; EtOH + VitD<sub>3</sub>组肝细胞炎性细胞浸润和脂肪空泡数量减少, 肝脏恢复正常细胞结构。见图1。

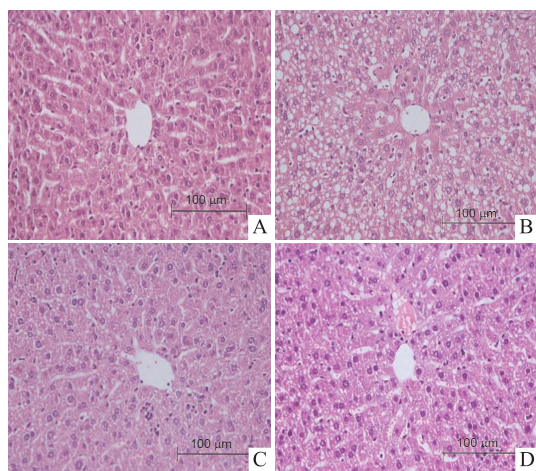


图1 小鼠肝脏病理组织学HE染色 ×200

A: Control组; B: EtOH组; C: VitD<sub>3</sub>组; D: EtOH + VitD<sub>3</sub>组

**2.5 维生素D<sub>3</sub>对酒精性肝损伤小鼠肝脏炎性细胞因子基因表达的影响** 与Control组比较, EtOH组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 和IL-6 mRNA的表达升高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 维生素D<sub>3</sub>可降低酒精性肝损伤小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 和IL-6 mRNA水平( $F_{\text{TNF-}\alpha} = 25.71$ ,  $F_{\text{TGF-}\beta} = 15.03$ ,  $F_{\text{IL-6}} = 9.524$ ;  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。EtOH组小鼠肝组织中IL-1 $\beta$  mRNA水平有所升高, 维生素D<sub>3</sub>补充对其表达有一定程度降低, 但差异无统计学意

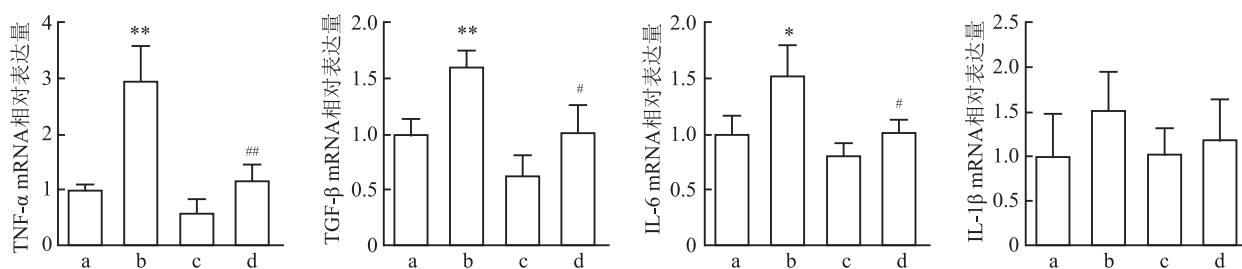
义。见图2。

**2.6 维生素D<sub>3</sub>对酒精性肝损伤小鼠NF- $\kappa$ B炎症信号通路的影响** 与Control组比较, EtOH组小鼠肝脏NF- $\kappa$ B p65和NF- $\kappa$ B p50蛋白表达水平增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与EtOH组比较, EtOH + VitD<sub>3</sub>组下调了以上两种蛋白表达水平( $F_{\text{NF-}\kappa\text{B p65}} = 5.54$ ,  $F_{\text{NF-}\kappa\text{B p50}} = 8.26$ , 均 $P < 0.05$ )。见图3。

### 3 讨论

酗酒是一个全球性健康问题, 尽管目前对ALD的病理和发病机制研究取得重大进展, 但ALD的许多特征仍未确定, 需要进一步研究。目前, 应用最广泛的酒精性肝损伤模型是连续喂养含酒精的Lieber-DeCarli液体饲料4~6周<sup>[6]</sup>。本研究采用Lieber-DeCarli酒精液体饲料构建小鼠酒精性肝损伤模型, 结果显示, 与Control组比较, EtOH组小鼠肝指数、血清ALT、AST及肝脏TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 和IL-6 mRNA水平显著升高, 且病理学结果发现肝脏出现明显的炎性细胞浸润和脂肪空泡。以上结果表明, 本研究成功构建了小鼠酒精性肝损伤模型。

肝脏慢性炎症在ALD的形成中起重要作用<sup>[1,7]</sup>。在动物模型和慢性饮酒的人肝活检标本中检测发现, TLR4介导的NF- $\kappa$ B激活诱导的促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的产生均增加<sup>[1]</sup>。Li et al<sup>[8]</sup>研究表明, 酒精肝患者血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6等炎性细胞因子明显升高。Ambade et al<sup>[9]</sup>研究发现ALD小鼠IL-1 $\beta$ 和IL-6水平明显升高。课题组前期研究<sup>[10]</sup>也发现酒精暴露导致小鼠肝脏IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$  mRNA升高。研究<sup>[1,11]</sup>证明, 维生素D具有抗炎活性。本研究结果显示, EtOH组TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-6 mRNA水平显著高于Control组, 维生素D<sub>3</sub>明显逆转了酒精性肝损伤小鼠肝脏TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IL-6 mRNA水平的升高。另外, 肝脏HE染色结果也表明维生素D<sub>3</sub>可显著改善酒精性肝损伤小鼠

图2 维生素D<sub>3</sub>对酒精性肝损伤小鼠肝脏炎性细胞因子基因表达的影响

a: Control组; b: EtOH组; c: VitD<sub>3</sub>组; d: EtOH + VitD<sub>3</sub>组; 与Control组比较: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与EtOH组比较: #P < 0.05, ##P < 0.01

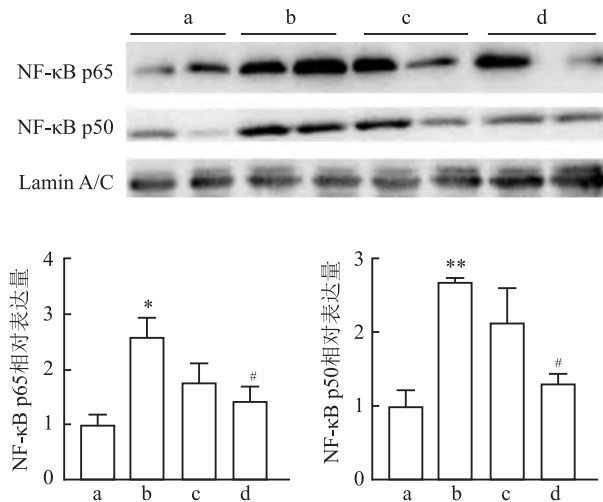


图3 维生素D<sub>3</sub>对酒精性肝损伤小鼠肝脏NF-κB p65和NF-κB p50蛋白表达的影响

a: Control组; b: EtOH组; c: VitD<sub>3</sub>组; d: EtOH + VitD<sub>3</sub>组; 与Control组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与EtOH组比较: #  $P < 0.05$

肝脏炎症反应。以上结果表明,维生素D<sub>3</sub>改善酒精性肝损伤与降低酒精诱发的炎症反应相关。

众所周知,核因子NF-κB是炎症反应的重要调节因子<sup>[12]</sup>。在大多数静息细胞中,NF-κB蛋白通过与抑制蛋白IκB结合,在细胞质中保持不活跃<sup>[13]</sup>。当机体受到促炎信号等的刺激,NF-κB会释放至细胞核进行转录激活,NF-κB的激活可以进一步增加TNF-α、IL-1β、IL-6等炎性细胞因产生和释放<sup>[14]</sup>。为了探究维生素D<sub>3</sub>是否通过抑制NF-κB通路,从而降低炎症反应减轻小鼠酒精性肝损伤,本研究测定酒精性肝损伤小鼠肝脏NF-κB p65和NF-κB p50的蛋白表达。结果提示,维生素D<sub>3</sub>逆转了酒精诱导的NF-κB p65和NF-κB p50的蛋白表达的升高。

综上所述,维生素D<sub>3</sub>对酒精性肝损伤小鼠具有一定的保护效应,其机制可能与调控NF-κB信号通路,降低机体炎症反应有关。本研究为ALD的预防和治疗提供一定的研究思路。

## Protective effect of vitamin D<sub>3</sub> on alcohol-induced liver injury in mice

Wang Huihui, Wang Xiaoyu, Gong Weiyi, Cheng Wenxiu, Gao Jingxin, Hu Chunqiu

(Dept of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the protective effect of vitamin D<sub>3</sub> on alcoholic liver injury in mice. **Methods**

Forty mice were randomly divided into 4 groups: normal Control (Control) group, vitamin D<sub>3</sub> (VitD<sub>3</sub>) group, alcohol model (EtOH) group and alcohol + vitamin D<sub>3</sub> (EtOH + VitD<sub>3</sub>) group. The mice were fed with the DeCarli

(下转第717)

## 参考文献

- [1] Seitz H K, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 16.
- [2] Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator [J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1656.
- [3] Chen J, Tang Z, Slominski A T, et al. Vitamin D and its analogs as anticancer and anti-inflammatory agents [J]. Eur J Med Chem, 2020, 207: 112738.
- [4] 宋佳奇, 汪求真, 迟菁华, 等. 维生素D<sub>3</sub>对异烟肼联合利福平所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(8): 1183-4.
- [5] 胡纯秋, 徐德祥, 王国秀, 等. 维生素D缺乏对酒精性肝损伤小鼠影响[J]. 营养学报, 2020, 42(5): 465-71.
- [6] Bertola A, Mathews S, Ki S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) [J]. Nat Protoc, 2013, 8(3): 627-37.
- [7] He Y, Hwang S, Ahmed Y A, et al. Immunopathobiology and therapeutic targets related to cytokines in liver diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(1): 18-37.
- [8] Li X, Liu Y, Guo X, et al. Effect of Lactobacillus casei on lipid metabolism and intestinal microflora in patients with alcoholic liver injury [J]. Eur J Clin Nutr, 2021, 75(8): 1227-36.
- [9] Ambade A, Lowe P, Kodys K, et al. Pharmacological inhibition of CCR2/5 signaling prevents and reverses alcohol-induced liver damage, steatosis, and inflammation in mice [J]. Hepatology, 2019, 69(3): 1105-21.
- [10] 孙玉, 王惠惠, 王晓宇, 等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群在酒精性肝损伤小鼠中的变化[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(6): 860-6.
- [11] El-Sharkawy A, Malki A. Vitamin D signaling in inflammation and cancer: molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. Molecules, 2020, 25(14): 3219.
- [12] Mitchell J P, Carmody R J. NF-κB and the transcriptional control of inflammation [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2018, 335: 41-84.
- [13] Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, et al. NF-κB: at the borders of autoimmunity and inflammation [J]. Front Immunol, 2021, 12: 716469.
- [14] Zusso M, Lunardi V, Franceschini D, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF-κB pathway [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 148.

## Molecular characterization and tissue expression of g-type lysozyme in glytothorax zanaensis

Wang Yunjiao, Lv Meng, Cai Shasha

[ Graduate School, Shandong First Medical University(Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250000 ]

**Abstract Objective** To identify and characterize the g-type lysozyme in *G. zanaensis* and analyze its role in host immune system. **Methods** GzLysG cDNA sequence was cloned by Nest PCR technology. Bioinformatics analysis of the GzLysG protein was carried out by ExPASy, SignalP 5.0, CDD, Cluster Omega and other online software. The GzLysG gene expression pattern in *G. zanaensis* tissues was detected by RT-qPCR. **Results** The results showed that open reading frame of GzLysG cDNA was 558 bp in length, encoding 185 amino acids. The molecular weight and theoretical isoelectric point of the reduced protein was 20 478. 20 and 9. 16, respectively. GzLysG was predicted to be a basic and hydrophilic protein, had no signal peptide and contained the typical catalytic active site, GEWL domain and SLT domain of g-type lysozyme. Advanced structural analysis revealed that GzLysG protein was mainly composed of  $\alpha$ -helix and random coil. There was a long and narrow crack on GzLysG molecular surface which was closely related to lysozyme activity. Lysozyme was highly conserved in evolution, with GzLysG showing a close topologic relationship with lysozyme from *Danio rerio*. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis indicated that GzLysG ubiquitously existed in all examined tissues, with higher mRNA expression levels observed in skin, muscle and gill. **Conclusion** All those results suggest that GzLysG plays a key role in *G. zanaensis* immune defensive system.

**Key words** *G. zanaensis*; g-type lysozyme; bioinformatics analysis; tissue expression profile

(上接第 710 页)

alcohol liquid diet to establish alcoholic liver injury model. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver index were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver. The relative expression levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) mRNA were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expressions of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) p65 and NF- $\kappa$ B p50 in liver were detected by Western blot. **Results** The serum ALT, AST vitality, liver index and hepatic TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA in EtOH group were significantly higher than those in Control group. EtOH group disorganized hepatocyte and hepatic lobules boundary was not clear, and the hepatocytes showed apparent inflammatory cells infiltration of liver cells and fat cavitation. NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ B p50 protein expression increased significantly. Compared with EtOH group, the serum ALT, AST vitality, liver index and hepatic TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA in EtOH + VitD<sub>3</sub> group decreased significantly. The pathological staining results showed that inflammatory cells infiltration and decrease in the number of fat vacuoles, and the liver cells returned to normal liver cell structure. At the same time the NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ B p50 protein expression level decreased significantly. **Conclusion** Vitamin D<sub>3</sub> has a certain protective effect on alcohol-induced liver injury in mice, and its main mechanisms are related to the inhibition of NF- $\kappa$ B pathway and the reduction of inflammatory response.

**Key words** vitamin D<sub>3</sub>; alcoholic liver injury; NF- $\kappa$ B pathway; inflammation