

## 【实验研究】

## 大豆异黄酮对肝纤维化大鼠肝损伤保护作用的实验研究\*

赵育芳<sup>1</sup> 黄亦琦<sup>2</sup> 张永生<sup>3</sup> 徐珊<sup>3</sup> 杨辉<sup>2</sup>

1 厦门大学医学院中医系(361005) 2 厦门市医药研究所(361005) 3 浙江中医药大学(310053)

**摘要:**目的 观察大豆异黄酮(SI)对实验性肝纤维化大鼠肝损伤的保护作用,为进一步研究 SI 抗肝纤维化作用提供实验依据。方法 采用 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠模型,造模同时用 SI 水溶液 10ml/kg·d(90mg/kg·d)灌胃进行早期干预,检测血清肝功能(ALT、AST、ALB、TP),光镜下观察肝组织病理变化及炎症活动度。结果 SI 可明显降低大鼠血清 ALT、AST 水平,升高血清 ALB、TP 水平,减轻肝实质的炎症病理损伤。结论 SI 具有一定的保肝护肝作用,有助于预防和阻断肝纤维化的发生。

**关键词:**大豆异黄酮;四氯化碳;肝损伤;肝纤维化

doi:10.3969/j.issn.1003-8914.2010.03.028 文章编号:1003-8914(2010)-03-0604-03

大豆异黄酮(soybean isoflavones SI)是大豆生长过程中形成的次生代谢物,因其具有多种生物活性,且来源广泛、成本低廉,日益受到关注。现代研究已经证实,SI 具有抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗辐射、抗氧化、改善更年期综合征、改善骨质疏松等作用,在防治疾病方面的应用越来越受到重视。近年来,有人开始关注 SI 对肝病以及脏器纤维化的防治作用,认为 SI 可能具有保护肝损伤的作用并有利于肝纤维化的预防和逆转。本实验旨在观察大豆异黄酮对 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠肝损伤的保护作用,为进一步探讨其预防和治疗肝纤维化的作用提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 健康清洁级 SD 大鼠 50 只,雄性,体重 220 ± 20g,由浙江中医药大学实验动物中心提供,普通级饲养条件。

1.1.2 主要试剂 CCl<sub>4</sub> 分析纯:上海凌峰化学试剂有限公司。橄榄油化学纯:国药集团化学试剂有限公司。大豆异黄酮:浙江欣欣生化科技有限公司。肝功能试剂盒:上海生物制品研究所。

1.1.3 主要器材:全自动血生化分析仪:日本日立公司。SN-698B 型智能放免  $\gamma$  测量仪:上海原子能研究所日环仪器一厂。

### 1.2 方法

1.2.1 分组和造模 按照随机数字法随机分为 3 组并编号,即正常组(10 只)、模型组(20 只)、SI 预防组(20 只)。参照经典的 CCl<sub>4</sub> 大鼠肝纤维化模型制备方法<sup>[1]</sup>,将 CCl<sub>4</sub> 和橄榄油按照 4:6 比例配成浓度为 40%

的 CCl<sub>4</sub> 油剂,模型组和 SI 预防组皮下注射 40% CCl<sub>4</sub> 油剂 0.3ml/100g,每周两次,每周称重 1 次,根据体重调整 CCl<sub>4</sub> 油剂用量,共注射 8 周。正常组用相同剂量的 0.9% 生理盐水代替 40% 的 CCl<sub>4</sub> 油剂皮下注射。

1.2.2 各组药物干预及处理 在用 40% 的 CCl<sub>4</sub> 油剂皮下注射造模的同时,SI 预防组用 1.8% 的大豆异黄酮水溶液 10ml/kg/d(90mg/kg/d)灌胃进行预防治疗,持续 8 周。正常组和模型组用相同剂量的 0.9% 生理盐水代替 SI 灌胃。

1.2.3 标本的采集和处理 大鼠处死前禁食 12h,称量体重。采用 3% 的戊巴比妥 1.5mg/kg 腹腔注射麻醉,麻醉生效后,迅速从下腔静脉取血 10ml,平卧状态下剖腹,取肝脏、脾脏称重,去肝脏筋膜,用肉眼观察大鼠肝脏的外形、体积、颜色、质地改变,将肝脏置于冰生理盐水中充分洗涤后,部分固定于 10% 中性福尔马林溶液中,其余肝组织迅速置于液氮中保存备用。取出的静脉血常温下在试管中静置 2 小时后,吸取上清液,移至 eppendorf 小管中,放入 -20℃ 冰箱保存待测。肝组织用 10% 中性福尔马林溶液固定 24 小时后,按照 1cm × 1cm × 0.2cm 大小取材,放入取材框中,标记后流水充分冲洗 > 30 分钟,梯度酒精脱水,二甲苯透明后浸蜡,常规石蜡包埋,连续切片,予以苏木素-伊红染色。

### 1.2.4 指标观察与检测

1.2.4.1 各组大鼠肝组织病理变化和炎症损伤情况 光镜下观察大鼠肝组织病理变化。依据组织病理学炎症活动度半定量计分系统(SSS)<sup>[2]</sup>,对每张切片进行计分统计,反映其炎症活动程度,并作比较。

1.2.4.2 血清肝功能检测:按照说明书操作。

1.3 统计方法 用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素

\* 基金项目:厦门市卫生局科研项目(No: WSK06)

方差分析,均数间两两比较当方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。

## 2 结果

2.1 各组大鼠体重变化情况 见表 1、插图 1。正常组大鼠体重增长速度明显比其它两组快,模型组大鼠进食量下降、体重下降、有软便等现象,模型组大鼠体重第 4 周开始总体下降明显,预防组大鼠体重平稳增长,但增长幅度和速度小于正常组。

表 1 各组大鼠体重变化情况比较

时间	正常组		模型组		SI 预防组	
	n	体重(g)	n	体重(g)	n	体重(g)
0 周	10	220.90 ± 15.96	20	216.60 ± 11.39	20	206.65 ± 12.59
2 周	10	328.20 ± 19.33	12	271.69 ± 27.67	14	242.62 ± 24.56
4 周	10	371.20 ± 26.03	10	300.42 ± 39.89	13	289.09 ± 24.17
6 周	10	413.40 ± 36.21	9	305.33 ± 54.19	12	316.55 ± 33.60
8 周	10	427.30 ± 29.60	9	293.70 ± 50.76**	12	339.36 ± 50.48

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

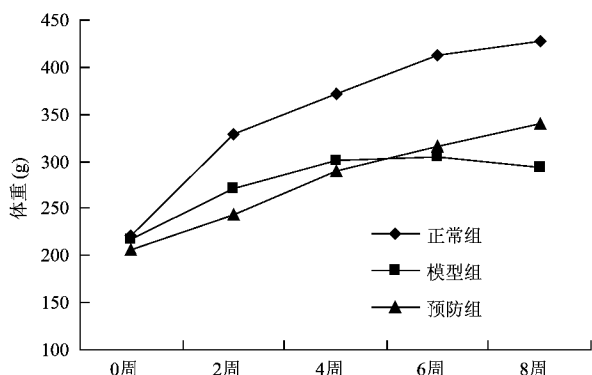


图 1 各组大鼠体重变化图

2.2 各组大鼠肝、脾指数比较 见表 2。模型组大鼠肝、脾指数高于正常组;SI 预防组大鼠肝指数高于正常组,但比模型组低;SI 预防组大鼠脾指数低于模型组。

表 2 各组大鼠肝、脾指数比较

组别	动物数(n)	肝指数 / (100g 体重)	脾指数 / (100g 体重)
正常组	10	2.88 ± 0.18	0.22 ± 0.03
模型组	9	5.70 ± 0.51**	0.29 ± 0.09*
SI 预防组	12	4.71 ± 0.94#	0.22 ± 0.05#

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

2.3 各组大鼠肝组织病理变化 肉眼观察,正常组大鼠肝脏颜色深红,表面光滑,边缘锐利,质地较软;模型组大鼠肝脏增大,颜色浅,边缘钝,质地硬,表面有粗颗粒状表现,与周围器官粘连广泛;SI 预防组大鼠肝脏

颜色较红,体积略增大,表面欠光滑。有的大鼠肝脏表面不平,可见细颗粒状表现。

HE 染色光镜下观察,正常组大鼠肝组织肝细胞索结构清晰、排列整齐,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞无明显变性坏死,肝小叶结构完好,汇管区无扩大,未见明显的纤维组织增生及炎细胞浸润;模型组大鼠肝组织肝细胞排列紊乱,并出现弥漫空泡变性,有散在的小坏死灶,肝窦及中央静脉明显扩张,肝索排列紊乱,门管区及肝小叶内可见明显的灶性淋巴细胞浸润,肝小叶结构大部分被破坏,可见间质细胞大量弥漫性增生,形成纤维间隔,分隔包绕肝细胞,有假小叶形成;SI 预防组肝细胞空泡变性和坏死减轻,仍可见排列整齐的肝细胞,可见散在的炎细胞浸润,少量纤维组织增生。

炎症活动度评分结果比较见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织炎症活动度评分结果

组别	动物数(n)	炎症活动度计分
正常组	10	1.05 ± 0.85
模型组	9	6.67 ± 1.73**
SI 预防组	12	4.67 ± 1.23##

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

2.4 各组大鼠血清肝功能的比较 见表 4。各组大鼠血清肝功能检测表明:与正常组相比,模型组大鼠 ALT、AST 明显增高,血清 ALB 含量明显降低;SI 预防组大鼠 ALT、AST 与预防组相比明显降低,血清 ALB 明显升高。

表 4 各组大鼠血清肝功能比较

组别	n	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)
正常组	10	35.90 ± 5.04	103.50 ± 16.24	36.30 ± 1.16	28.00 ± 1.41
模型组	9	740.22 ± 250.29**	957.89 ± 369.23**	29.78 ± 3.73**	23.11 ± 3.59*
预防组	12	239.17 ± 120.48##	373.33 ± 180.21##	34.58 ± 2.47#	27.50 ± 2.43#

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

## 3 讨论

肝细胞损伤引起的炎症反应是促成肝纤维化形成的直接因素<sup>[3-5]</sup>,受损的肝细胞释放 ROS 和成纤维样介质,并通过炎症趋化反应导致炎细胞的聚集。炎性细胞,包括淋巴细胞和多形核细胞,可以激活 HSC 分泌胶原。活化的 HSC 又可分泌炎症趋化因子,表达细胞粘附分子,并调控淋巴细胞的活化状态,形成炎性细胞和纤维生成细胞相互刺激的恶性循环。只要炎症等病理因素刺激持续存在,肝纤维化病程就会延续。目前,阻断和逆转肝纤维化的必要途径有二<sup>[6]</sup>:一是去

除致病因子、控制原发病,二是以 HSC 作为靶细胞的抗纤维化治疗。病因治疗是最根本的治疗手段,也是目前抗肝纤维化最有效的治疗手段<sup>[7]</sup>。病因治疗的目的主要是通过减轻肝损伤和肝脏实质的炎症坏死,减少肝星状细胞活化,从而减少 ECM 的产生和分泌,最终在一定程度上抑制肝纤维化进程。

以往的实验已经证实 SI 具有抗氧化、抗炎、抑制免疫激活等作用,关于 SI 对于肝病和脏器纤维化的作用也有报道。动物实验研究表明 SI 对小鼠急性肝损伤有明显的保护作用<sup>[8]</sup>,还可以抑制单侧输尿管梗阻大鼠肾 TGF-β mRNA 的表达<sup>[9]</sup>,对实验性大鼠肾间质纤维化有一定的防治作用<sup>[10]</sup>。体外实验研究表明 4,5,7-三羟基异黄酮可以抑制肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞增殖、促进其合成一氧化氮<sup>[11]</sup>,4,5,6-三羟基异黄酮可以抑制体外培养的 HSC 的增殖<sup>[12]</sup>、抑制激活 HSC 的胞浆内游离钙水平、并使其细胞骨架蛋白 β-actin 受损伤<sup>[13]</sup>。本次实验研究表明,用 SI 早期干预,可以改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠体重等一般情况,减轻大鼠肝脏实质的炎症细胞的浸润、减少肝细胞的变性和坏死、减轻肝小叶结构破坏等,并可以明显改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化大鼠的肝脏功能。炎症和肝细胞损伤是肝纤维化的启动因素,减轻肝脏炎症,保护细胞,防止肝损伤,必然有助于阻断肝纤维化的发生。这些都为我们进一步探讨 SI 预防和治疗肝纤维化作用提供了一定的依据。

参考文献

[1] 程明亮,杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床[M]. 2 版. 北京:

人民卫生出版社,2002:20-72.

[2] 中华肝脏病学学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 药品评价 2007,4(4):265-266.

[3] Casini A, Ceni E, Salzano R, et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide [J]. Hepatology, 1997 25(2):361-367.

[4] Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation [J]. Hepatology, 2003, 38(4):919-929.

[5] Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system [J]. Semin Liver Dis, 2001, 21(3):417-426.

[6] 王宝恩. 肝纤维化及肝硬化的可逆性 [J]. 医学研究通讯 2003, 32(6):3-5.

[7] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J clin invest 2005, 115:209-218.

[8] 曾靖,刘春棋,江丽霞,等. 大豆异黄酮对小鼠实验性肝损伤的保护作用 [J]. 时珍国医国药,2005,16(10):989-990.

[9] 滕丽新,张璟,刘胜学. 大豆异黄酮对单侧输尿管梗阻鼠肾间质纤维化的影响 [J]. 中华肾脏病杂志,2004,20(1):67-68.

[10] 滕丽新,张璟,刘胜学,等. 大豆异黄酮对 UUO 大鼠 TGF-β 的抑制作用 [J]. 第三军医大学学报,2004,26(19):1738-1741.

[11] 刘小菁,黄明慧,成娘. 4,5,7-三羟基异黄酮对肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞窗孔、增殖及合成一氧化氮的影响 [J]. 中华肝病病杂志 2002,10(3):200-203.

[12] 王琼,王一平,刘小菁,等. 4,5,6-三羟基异黄酮对大鼠肝星状细胞细胞周期的影响 [J]. 中华肝病病杂志 2003,11(1):53.

[13] 杨丽,刘小菁,王琼,等. 4,5,6-三羟基异黄酮对大鼠肝星状细胞骨架及胞浆内游离钙的作用 [J]. 中华肝病病杂志 2003,11(10):634-635.

(本文校对:卢大为 收稿日期:2009-08-27)

# 辛味化痰通络对脑梗死大鼠脑组织微血管密度的影响

齐宝芳 邱幸凡 张六通 湖北中医学院(武汉 430065)

摘要:目的 研究辛味化痰通络对脑梗死大鼠脑组织微血管密度的影响,为中医络病的化痰通络治疗提供相应的实验数据和应用基础。方法 线栓法复制脑梗死大鼠模型。随机分为正常组、模型组、辛味低剂量组、辛味高剂量组、非辛味低剂量组、非辛味高剂量组。灌胃治疗 7 天后,运用免疫组化法检测大鼠脑组织 CD31 蛋白表达。采用 Weidner 方法进行微血管判定及计数。结果 各化痰通络组与模型组有非常显著差异(P<0.01);辛味各剂量组与非辛味各剂量组有显著差异(P<0.05)。结论 化痰通络能促进脑梗死大鼠脑组织半暗带区血管新生,并且辛味化痰通络的作用更加明显。

关键词:辛味化痰通络;非辛味化痰通络;血管新生;微血管密度(MVD)

doi:10.3969/j.issn.1003-8914.2010.03.029 文章编号:1003-8914(2010)-03-0606-03

脑梗死(cerebral infarction, CI)是指由于脑部血液供应障碍,缺血缺氧而引起的局限性脑组织的缺血性坏死或脑软化,约占全部脑卒中的 80%<sup>[1]</sup>,属于中医学“中风病”范畴。中医学认为中风之病位在脑络,

基本病理改变为脑络瘀阻,治疗则以化痰通络为主。对于通络药物,清代医家叶天士提出“络以辛为泄”、“酸苦甘膩不能入络”,指出了以药物五味而言,辛味药对疏通络脉具有重要作用。本实验采用线栓法复制