

大豆异黄酮对实验性肝纤维化大鼠 肝星状细胞活化的影响

The Inhibitory Effect of Soybean Isoflavones on Activation of Hepatic Stellate Cell in Experimental Hepatic Fibrosis Rats

赵育芳, 张永生¹, 徐珊¹, 钱小燕, 黄亦琦², 杨辉²

(厦门大学医学院, 厦门 361005; ¹浙江中医药大学, 杭州 310053; ²厦门市医药研究所, 厦门 361003)

Zhao Yu-fang, Zhang Yong-sheng¹, Xu Shan¹, QIAN Xiao-yan, Huang Yi-qi², Yang Hui²

(Medical College of Xiamen University, Xiamen, 361005; ¹Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053;

²Xiamen Institute of medicine, Xiamen 361003, China)

大豆异黄酮 (soybean isoflavones, SI) 主要存在于大豆中, 具有多种生物学活性, 在防治疾病中已得到广泛应用, 近年来在肝病防治中的应用也越来越受关注。肝纤维化为诸多慢性肝病发展至肝硬化所共有的病理组织学变化, 现已证实肝纤维化可减轻和逆转并在很大程度上改善肝病的预后, 因此, 本实验探讨 SI 以肝星状细胞 (HSC) 作为靶细胞的抗纤维化作用机制。

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 ± 20 g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 普通条件饲养。

1.1.2 试剂: CCl_4 分析纯: 上海凌峰化学试剂公司。橄榄油化学纯: 国药集团化学试剂公司。大豆异黄酮: 浙江欣欣生化科技公司。多克隆浓缩型兔抗鼠 TGF- β 1 抗体: 北京中杉金桥生物技术公司。单克隆浓缩型鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA): 武汉博士德生物试剂公司。即用型 Power Vision™ 鼠 (兔) 二步法免疫组织化学试剂盒: 北京中杉金桥生物技术公司。

1.1.3 器材: 荧光显微镜摄像机: OLYMPUS BX60 型, 日本。HPIAS-1000 彩色病理图文分析系统: 中国武汉同济千屏影像工程公司。

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, 即正常对照组 (N, 10 只)、模型组 (M, 20 只)、SI 预防组 (SI, 20 只)。参照经典的 CCl_4 大鼠肝纤维化模型制备方法^[1], 将 CCl_4 和橄榄油按照 4:6 比例配成浓度为 40% 的 CCl_4 油剂, M 组和 SI 组皮下注射 40% CCl_4 油剂 0.3 ml/100g, 每周 2 次, 每周称重 1 次, 根据体重调整 CCl_4 油剂用量, 共注射 8 w。N 组用相同剂量的 0.9% 生理盐水代替 40% 的 CCl_4 油剂皮下注射。

1.2.2 药物干预及处理: 在用 40% 的 CCl_4 油剂皮下注射造模的同时, SI 组用 1.8% 的大豆异黄酮水溶液 10 ml/(kg·d) [90 mg/(kg·d)] 灌胃进行预防治疗, 持续 8 w。N 组和 M 组用相同剂量的 0.9% 生理盐水代替 SI 灌胃。

1.2.3 标本采集和处理: 大鼠处死前禁食 12h, 称体重。采用 3% 戊巴比妥 1.5 mg/kg·bw 腹腔注射麻醉, 麻醉生效后, 迅速从下腔静脉取血 10 ml, 平卧状态下剖腹, 取肝、脾脏称重, 去肝脏筋膜, 用肉眼观察大鼠肝脏外形、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。

1.2.4 指标观察与检测: (1) 肝组织纤维化程度: 肝组织常规石蜡切片后, 予以苦味酸-天狼红染色显示各组大鼠肝组织胶原纤维增生情况, 按实验动物肝纤维化分级 (VI 级) 方法^[2] 进行分级 (G), 用 2^G 来对纤维化程度进行半定量比较。(2) 肝组织 α -SMA、TGF- β 1 表达: 肝组织常规石蜡切片

收稿日期 2010-01-05

基金项目 厦门市卫生局科研基金资助项目 (No. WSK06)

作者简介 赵育芳 (1977-), 女, 博士, 讲师, E-mail: moonroot@163.com; 通讯作者: 钱小燕

中图分类号 R151.4

文献标识码 B

文章编号 0512-7955 (2010) -03-0295-02

用 Power Vision 二步法免疫组织化学染色, 观察各组大鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1 蛋白的表达。细胞核呈蓝色, 以黄色或棕黄色均匀颗粒状或线状染色为抗原蛋白阳性表达。光镜下每张切片选取 5 个不同视野($\times 200$ 倍), 用 HPIAS-1000 病理图文分析系统(武汉同济千屏影像工程公司), 设视野窗口为 $68939.8 \mu\text{m}^2$, 自动分析测量得每个视野的阳性着色面积百分比, 取 5 个视野的阳性面积百分比均数代表该张切片的阳性表达量。

1.2.5 统计处理: 采用 SPSS13.0 软件, 组间比较用非参数检验 (Nonparametric Test)。

2 结果

2.1 大鼠死亡情况

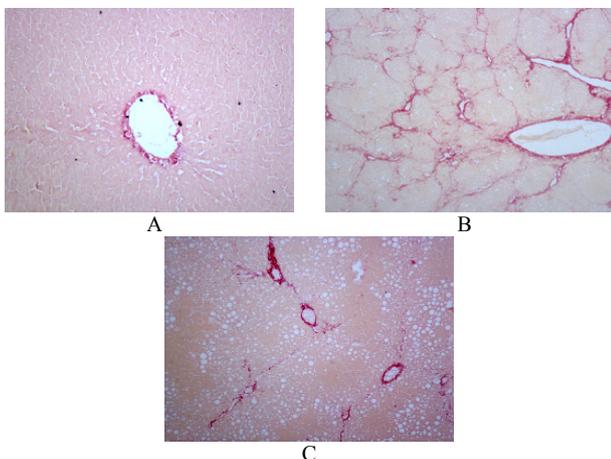
实验中, N 组大鼠无死亡; M 组死 11 只 (其中灌胃致死 1 只); SI 组死 8 只 (其中灌胃致死 2 只)。非灌胃致死的大鼠中, 13 只有不同程度消瘦, 腹大明显, 尸检肝大、色灰白、边缘钝或有结节、大量腹水, 其中 2 只有严重贫血, 耳、眼、爪色白、极度虚弱、无力站立、叫不出声、尸检肝色灰白。另外 3 只大鼠消瘦和肝脏变化不明显, 可能是由于药物不慎注入血管致死。

2.1 肝组织纤维化程度(表 1, 图 1)

Table 1 The grade of hepatic fibrosis

| Group | n | Grade | | | | | | |
|-------|----|-------|---|----|-----|----|---|----|
| | | 0 | I | II | III | IV | V | VI |
| N | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M | 9 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 1 | 0 |
| SI | 12 | 0 | 5 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 |

N: normal control; M: Model control; SI: Soybean isoflavones; the same in table 2,3



A: N group; B: M group; C: SI group respectively

Fig. 1 Hepatic fibrosis of Rat

天狼红染色光镜下观察, N 组大鼠肝组织小叶间未见明显增生的纤维组织, 仅在肝窦及中央

静脉周围可见少量胶原着色(图 1A); M 组大鼠肝组织可见小叶间不同程度明显增生的纤维组织, 纤维间互相连接包绕肝小叶, 以大方型为主、或以大圆或小圆型为主(图 1B); SI 组大鼠肝组织可见少量胶原纤维自汇管区或中央静脉向外延伸(图 1C), 但未互相连接包绕肝小叶。

各组大鼠纤维化程度比较见表 2, M 组肝纤维化程度比 N 组明显增高, SI 组肝纤维化程度比 M 组明显减轻, SI 组与 N 组比较也有明显差异(均 $P < 0.05$)。

Table 2 Effect on liver tissue fibrosis

| Group | n | 2^G |
|-------|----|----------------------|
| N | 10 | 1.00 ± 0.00 |
| M | 9 | 12.44 ± 8.82^b |
| SI | 12 | 4.17 ± 2.48^{ac} |

2.2 肝组织 α -SMA、TGF- β 1 蛋白表达(表 3)

Table 3 Effect on the expression of α -SMA and TGF- β 1

| Group | n | α -SMA (%) | TGF- β 1 (%) |
|-------|----|--------------------|--------------------|
| N | 10 | 0.65 ± 0.16 | 0.07 ± 0.09 |
| M | 9 | 16.01 ± 8.07^a | 14.78 ± 7.43^b |
| SI | 12 | 5.18 ± 2.54^c | 5.85 ± 3.20^c |

α -SMA 在胞浆表达, 正常对照组只表达于小动脉及小静脉, 在胆管无表达。M 组 α -SMA 大量表达, 主要位于汇管区及纤维间隔, 且呈长椭圆形或梭形。SI 组仅见少量表达。TGF- β 1 多呈胞浆表达, 偶尔胞膜也有表达。N 组 TGF- β 1 仅肝细胞膜有轻微表达, 少量表达于肝组织的间质细胞内, 主要分布于汇管区基质, 中央静脉血管壁周围。M 组 TGF- β 1 表达明显增强, 阳性细胞数目增多, 主要分布在中央静脉周围、汇管区、增生的纤维间隔、以及星状细胞、炎性细胞和空泡变性的肝细胞胞浆内。SI 组表达量较 M 组明显减轻, 主要分布于汇管区及增生的纤维间隔及炎性细胞内, 在纤维间隔内间质细胞和炎细胞胞质阳性染色程度减轻, 阳性细胞数目减少。

关键词: 大豆异黄酮; 肝星状细胞; α 平滑肌肌动蛋白; 转化生长因子 β

Key words: soybean isoflavones; hepatic stellate cells; α -smooth muscle actin; transforming growth factor β

[参考文献]

- 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.
- 王宝恩, 王惠吉, 朱家璇, 等. 中药复方丹参不同剂型治疗肝纤维化的实验研究与临床观察[J]. 肝病杂志, 1993, 1: 69-72.