

大豆异黄酮对油酸致大鼠肝损伤的干预作用

高爽^{1#} 谭金龙^{1#} 罗启慧^{1,2} 黄超¹ 刘文涛^{1,2} 陈正礼^{1,2*}

(¹四川农业大学动物医学院, 动物疾病模型实验室, 成都 611130; ²四川农业大学预防兽医研究所, 成都 611130)

摘要 为了探究大豆异黄酮(soybean isoflavone, SIF)对油酸致大鼠肝损伤的影响, 该研究对6周龄SD(sprague dawley)大鼠尾静脉注射油酸构建肝损伤模型, 应用血液生化检查法、苏木精-伊红染色法、免疫组织化学法、实时荧光定量PCR法探究油酸引起的肝损伤以及大豆异黄酮的干预作用, 对大鼠进行血液中ALT、AST含量检测、肝组织形态学观察和肝组织中TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-6 (interleukin-6)蛋白阳性分布检测及其mRNA的转录水平检测。研究结果显示, 与基础对照组相比, 溶媒对照组的血液中ALT、AST含量显著升高, 肝细胞显示出较严重的弥漫性水肿、空泡变性, 以及少量坏死, SIF干预后, 高、中、低剂量组的血液中ALT、AST含量显著降低, 肝细胞病理情况显著改善。免疫组织化学结果显示, 与基础对照组相比, 溶媒对照组肝细胞显示出TNF- α 、IL-6的高表达, SIF干预后, 高、中、低剂量组TNF- α 、IL-6的表达显著降低。实时荧光定量PCR结果显示, 目的基因TNF- α 和IL-6的mRNA转录水平与免疫组织化学结果中其蛋白表达基本一致。以上结果表明, 不同剂量大豆异黄酮在持续灌胃一段时间后, 减轻了油酸诱导的肝组织TNF- α 、IL-6表达, 改善了油酸性肝损伤, 进一步探究大豆异黄酮对油酸性肝损伤的确切作用机制有利于SIF的临床开发与应用。

关键词 肝损伤; 大豆异黄酮; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

Study on Effects of Soybean Isoflavone on Oleic Acid-Induced Liver Injury in Rats

GAO Shuang^{1#}, TAN Jinlong^{1#}, LUO Qihui^{1,2}, HUANG Chao¹, LIU Wentao^{1,2}, CHEN Zhengli^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ²Institute of Preventive Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract To investigate the effect of SIF (soy isoflavone) on oleic acid-induced liver injury in rats, the rat model of liver injury was established by injecting oleic acid into tail vein of SD (sprague dawley) rats at 6 weeks old. Blood biochemical examination, hematoxylin eosin staining, immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative PCR were used to explore the liver injury caused by oleic acid and the intervention of soybean isoflavone, the content of ALT and AST in blood, the morphology of liver tissue, the positive distribution of TNF- α and IL-6 protein in liver tissue and the transcription level of their mRNA were detected. The results showed that compared with the basal control group, the content of ALT and AST in the blood of the vehicle control group was

收稿日期: 2020-01-18 接受日期: 2020-04-01

四川省国际科技创新合作项目(批准号: 20GJHZ0081)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 13308168367, E-mail: chzhli75@163.com

Received: January 18, 2020 Accepted: April 1, 2020

This work was supported by the Project of Sichuan International Science and Technology Innovation Cooperation (Grant No.20GJHZ0081)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13308168367, E-mail: chzhli75@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5246>

increased significantly, and the liver cells showed more serious diffuse edema, vacuolation, and a small amount of necrosis, after SIF intervention, ALT and AST contents in blood of high, middle and low dose groups were significantly reduced, and pathology of liver cells were significantly improved. The results of immunohistochemistry showed that compared with the basal control group, the liver cells of the vehicle control group showed high expression of TNF- α and IL-6, after the intervention of SIF, the expression of TNF- α and IL-6 in the high, middle and low dose groups decreased significantly. The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the mRNA transcription level of *TNF- α* and *IL-6* was basically consistent with the protein expression of immunohistochemistry. The above results showed that after continuous gavage for a period of time, different doses of soy isoflavone can reduce the expression of TNF- α and IL-6 in liver tissue induced by oleic acid, and improve oleic acid induced liver injury. Further exploration of the exact mechanism of action of soybean isoflavones on oleic acid liver injury is beneficial to the clinical development and application of SIF.

Keywords liver injury; soybean isoflavone; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

肝脏是动物体内重要的代谢器官, 当肝脏代谢异常时, 容易引起肝细胞内甘油三酯(triglyceride, TG)的过多蓄积^[1], 进而引发脂肪肝。肥胖症作为常见的慢性疾病, 肝脏的代谢稳态在肥胖的进程中充当重要角色。

近年来, 已有大量研究报道了肥胖与肝功能异常密切相关^[2-4]。当肥胖进程发展到一定阶段, 脂肪组织已无法储存过多积聚的甘油三酯, 导致脂肪水解为游离脂肪酸进入血液, 再通过血液进入其他组织器官中, 如肝脏、肾脏等^[5]。伴随着循环内游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)的增加, FFA通过血液流入肝细胞内^[6]。过多的FFA因超过肝脏的氧化能力, 被酯化为TG, 并在肝脏内蓄积, 最终损伤线粒体膜和细胞膜, 介导肝内炎症细胞浸润, 造成肝损伤^[7-8]。油酸(oleic acid, OA)作为一种单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MFA)天然存在于各种动植物油脂中, 可充当细胞能源, 并充当膜和信号脂质的前体^[9]。研究表明, 过多的OA会导致肝细胞脂质累积进而显著增加肝细胞中TG含量, 表明油酸诱导了肝脏的脂肪酸积累并可能引发肝脏炎性损伤^[10]。

目前能够有效抑制肥胖导致的非酒精性肝损伤的天然激素类药物较少。大豆异黄酮(soybean isoflavone, SIF)主要成分为染料木黄酮、大豆素和大豆苷元, 作为与雌二醇结构相似的类雌激素物质, 被列为国际上唯一安全有效的天然植物雌激素^[11]。SIF已经被报道能够改善肥胖, 并对高胆固醇血症等疾病有潜在的保护作用^[12]。但SIF对油酸诱导的肝损伤的具体干预机制还未有相关研究, 本实验主要通过研究大豆异黄酮对油酸诱导的大鼠肝损伤的干预作用,

探究大豆异黄酮在油酸致肝损伤中的治疗潜力。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理

6周龄SD雄性大鼠60只, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 随机分成基础对照组、溶媒对照组、高、中、低剂量组, 每组12只, 适应性饲喂1周, 实验前禁食禁饮12 h, 称重后除基础对照组外尾静脉注射油酸0.15 mL/kg, 基础对照组尾静脉注射生理盐水0.15 mL/kg。实验中对动物的处置符合《关于善待实验动物的指导性意见》。动物福利符合“美国国家卫生研究院实验室动物饲养管理和使用指南(The National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animal)”的要求。本实验由四川农业大学伦理委员会批准。肝损伤大鼠造模成功后即开始每日定时灌服SIF溶液(SIF溶液使用羧甲基纤维素钠增加溶解度), 基础对照组灌胃生理盐水, 溶媒对照组灌胃羧甲基纤维素钠, 高、中、低剂量组灌胃不同浓度SIF, 即高(500 mg/kg)、中(158 mg/kg)、低(50 mg/kg)剂量组, 高、中、低剂量组各组内再随机分为3组, 每组4只, 分别灌胃3天、6天、9天。于第9天将大鼠断尾采血后置于冰上快速处死, 进行解剖, 并留取肝病标本。

1.2 材料和仪器

丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; TNF- α 和IL-6家兔单克隆抗体、牛血清白蛋白封闭液、山羊抗家兔IgG、即用型SABC-AP

表1 实时荧光定量PCR引物序列
Table 1 The sequences of real-time fluorescence quantitative PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length /bp
<i>TNF-α</i>	F: CCA CGC TCT TCT GTC TAC TG R: GC TAC GGG CTT GTC ACT C	145
<i>IL-6</i>	F: CCA CTG CCT TCC CTA CTT R: TTG GTC CTT AGC CAC TCC	499
<i>β-actin</i>	F: GAG GGA AAT CGT GCG TGA C R: CTG GAA GGT GGA CAG TGA GG	445

试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)棕色显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司; SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)、RNAiso-Plus购自宝生物工程(大连)有限公司。

RM2235手动轮转式切片购自Leica公司; BX41光学显微镜购自Olympus公司; DS-Ri1生物数码显微镜购自Nikon公司; CFX96荧光定量PCR仪购自Bio-Rad公司)。

1.3 肝功能的检测

每组实验动物采血, 使用酶试剂盒检测大鼠血清中ALT和AST含量。

1.4 肝组织石蜡切片制备

切取各组大鼠肝脏的组织块, 置于4%多聚甲醛固定液中固定24 h待用。将已固定的组织切块切为0.5 cm³的方块, 置于包埋盒内标号并置于流水中冲洗24 h, 常规脱水, 石蜡包埋, 石蜡标本连续切片10片, 切片厚5 μm, 裱片于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 于烘箱处理5 h。

1.5 苏木精-伊红染色法

每只大鼠肝组织切片取3张, 经脱蜡、复水后, 进行常规苏木精-伊红染色, 封片, 镜检, 观察肝组织形态变化。

1.6 SABC免疫组化法

用SABC免疫组化法检测肝组织中TNF-α、IL-6蛋白含量, 将固定后的肝组织石蜡包埋, 每只动物每个组织随机选取5张切片, 切片按照常规步骤处理, 经抗原修复、封闭, 进行抗体孵育, DAB显色后观察切片阳性反应。每张切片随机选取5个视野, 在光镜200倍视野下测量阳性细胞平均光密度值和阳性产物面积, 取其平均值作为每只动物该核团组织的最终数据。

1.7 实时荧光定量PCR法

内参基因β-actin及目的基因TNF-α、IL-6的

引物基因序列通过GeneBank获得, 引物设计通过Primer Premier 5.0软件完成, 引物序列信息见表1, 由宝生物工程(大连)有限公司合成。

用Trizol法提取肝组织中总mRNA进行反转录、荧光实时定量PCR, 采用CFX96序列系统, 总反应体系为25 μL, 进行如下扩增: 95 °C预变性3 min; 95 °C 30 s, 61 °C 30 s(*TNF-α*)、54.5 °C 30 s(*IL-6*)、59.5 °C 30 s(*β-actin*), 72 °C 45 s共进行33个循环; 最后72 °C延伸10 min。待测样品分别以内参基因(*β-actin*)作为对照, 每个样品3次重复, 以3次得到的Ct值的平均值为最终测定结果。

1.8 统计学处理

将制得的切片在光学显微镜400倍下拍照观察记录HE染色结果, 每张片子随机选取3个视野, 每组3张, 观察肝脏组织形态学变化。用江苏捷达801形态分析软件分析免疫组化结果, 每张片子随机选取三个视野, 每组3张, 测定免疫组化阳性反应的平均积分光密度值。数据结果均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。mRNA基因相对表达水平用LIVAK等^[13]建立的2^{-ΔΔCt}法计算, 公式为: ΔΔCt=实验组(Ct目的基因-Ct内标基因)-对照组(Ct目的基因-Ct内标基因), 所有样品重复3次, 目的基因相对表达量用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据均使用SPSS 20.0统计软件进行单因素方差分析所得, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝功能的變化

每组实验动物采血, 使用酶试剂盒检测大鼠血清中ALT和AST含量。对血清中ALT和AST含量统计, 结果显示, 在灌胃大豆异黄酮第3天时, 溶媒对照组较基础对照组显著升高, 低剂量组与中剂量组较溶媒对照组显著降低, 高剂量组较溶媒对照组极显著降低; 在灌胃大豆异黄酮第6天时, 溶媒对照组较

表2 大鼠血清天门冬氨酸氨基转移酶与丙氨酸氨基转移酶含量的变化/ $\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$ Table 2 Changes of serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase content in rats / $\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$

项目 Items	时间 Time	组别($n=8/\text{组}$) Group ($n=8/\text{group}$)				
		B	C	L	M	H
AST content in serum	Third day	47.12±2.30	79.67±5.22	54.97±2.37	54.43±4.47	45.84±3.24
	Sixth day		68.84±5.27	58.21±4.71	39.75±0.80	57.20±1.78
	Ninth day		53.49±3.26	41.27±3.62	51.59±1.27	81.43±3.03
ALT content in serum	Third day	32.71±1.91	65.85±2.43	54.11±1.75	51.28±3.59	39.45±1.51
	Sixth day		63.03±1.56	37.42±1.12	30.59±2.41	69.47±4.84
	Ninth day		56.06±3.46	32.81±2.30	44.58±2.08	83.51±3.20

B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group.

基础对照组显著升高, 低剂量组与高剂量组较溶媒对照组显著降低, 中剂量组较溶媒对照组极显著降低; 在灌胃大豆异黄酮第9天时, 溶媒对照组较基础对照组显著升高, 低剂量组较溶媒对照组极显著降低, 中剂量组较溶媒对照组显著降低, 高剂量组较溶媒对照组显著升高(表2)。统计结果表明, 不同浓度的SIF在一定作用时间内, 能显著抑制肝脏损伤, 高浓度的SIF长时间作用可加剧肝脏损伤。

2.2 肝脏的形态学观察

选取肝组织切片, 常规HE染色, 可见对照组肝脏表面光滑, 呈暗红色, 弹性好。光镜下, 基础对照组肝脏结构正常。注射油酸的其余4组肝肿大明显, 表面呈暗紫色, 个别可见血性液体渗出。光镜下观察可见, 正常对照组肝脏结构完整, 未见明显病理变化; 在第3天, 第6天, 第9天, 都显示出了注射油酸的溶媒对照组大鼠肝细胞弥漫性水肿, 肝细胞中央静脉周围肝细胞胞质疏松, 小叶周围肝细胞胞质空泡化, 在低中高剂量的大豆异黄酮干预之后, 肝细胞水肿及空泡化减轻, 肝索结构更加清晰, 较好地恢复了肝脏的基础对照组织形态(图1)。结果表明, SIF对肝损伤有恢复作用, 且高、中、低剂量组分别在第3天、第6天、第6天有最好恢复效果。

2.3 SIF对肝组织中TNF- α 、IL-6蛋白含量的影响

选取大鼠肝组织切片进行免疫组织化学染色, 阳性反应显色为黄褐色或棕黑色, 分布于肝细胞核内(图2~图7)。

对TNF- α 在肝细胞中的平均积分光密度统计, 结果显示, 在灌胃大豆异黄酮第3、6、9天时, 溶媒对照组均较基础对照组极显著升高。在灌胃大豆异黄酮第3天与第6时低、中、高剂量组较溶媒

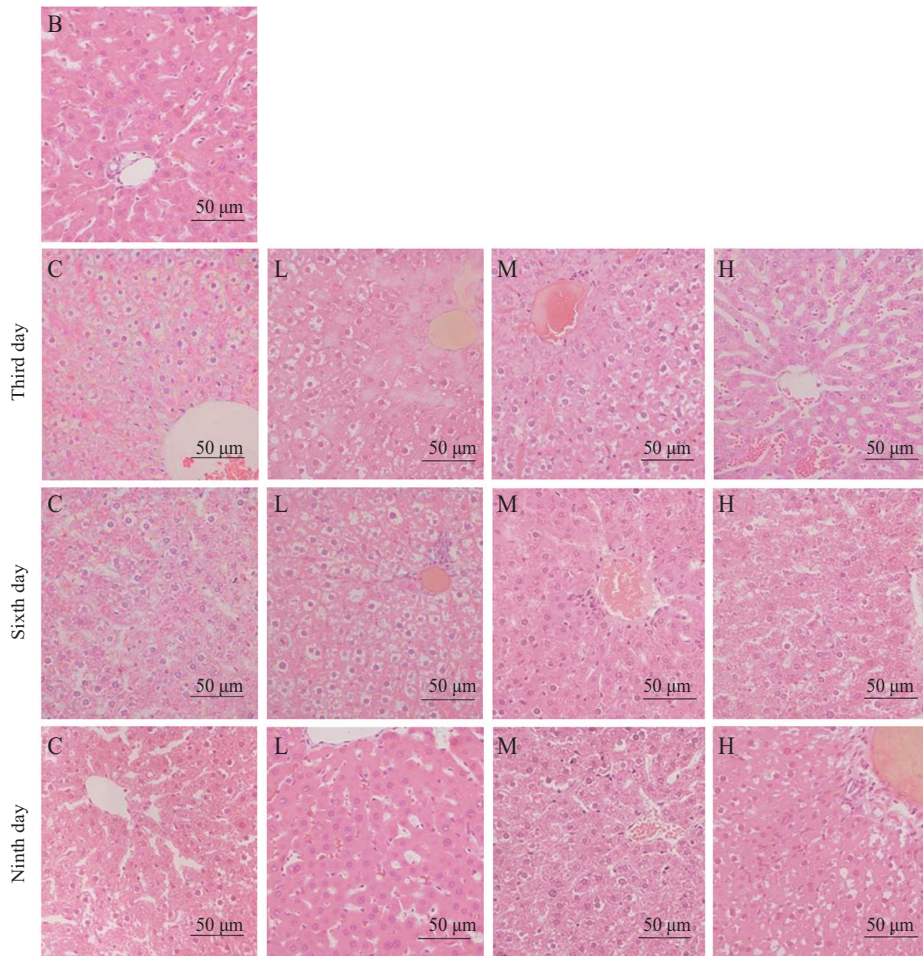
对照组极显著降低; 在灌胃大豆异黄酮第9天时, 低剂量组较溶媒对照组极显著降低, 高剂量组较溶媒对照组显著升高(图8)。对IL-6在肝细胞中的平均积分光密度统计, 结果显示, 与TNF- α 在肝细胞中的平均积分光密度统计结果基本一致(图9)。统计结果表明, 不同浓度的SIF在一定作用时间内, 能显著降低TNF- α 和IL-6在肝细胞内的分布, 高浓度的SIF长时间作用可促进TNF- α 和IL-6在肝细胞内的分布。

2.4 SIF对肝组织中TNF- α 、IL-6 mRNA的表达的影响

采用实时荧光定量PCR检测方法, 检测了肝组织中TNF- α 、IL-6的mRNA的表达量, 结果如图10和图11所示。TNF- α 的mRNA表达量, 在灌胃大豆异黄酮第3、6、9天时, 溶媒对照组均较基础对照组极显著升高。在灌胃大豆异黄酮第3天时, 低、中剂量组较溶媒对照组极显著升高, 高剂量组较溶媒对照组极显著降低; 在灌胃大豆异黄酮第6天时, 中剂量组较溶媒对照组极显著降低, 高剂量组较溶媒对照组极显著升高; 在灌胃大豆异黄酮第9天时, 低剂量组较溶媒对照组极显著降低, 中、高剂量组较溶媒对照组极显著升高(图10)。IL-6的mRNA表达量, 结果显示, 与TNF- α 在肝细胞中的平均积分光密度统计结果基本一致(图11)。统计结果表明, 不同浓度的SIF在作用不同时间后能抑制目的基因的表达, 高浓度的SIF长时间作用可促进目的基因的表达。

3 讨论

近年来, 大豆异黄酮的弱雌激素作用吸引了国内外的广泛关注。SIF因来源广泛, 且具有较大治疗

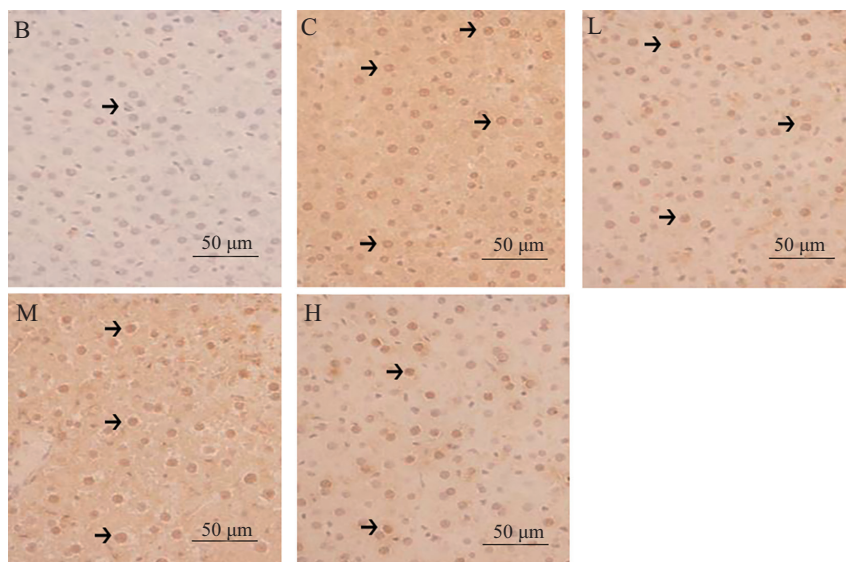


B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group.

图1 各组大鼠肝组织光镜图像HE染色

Fig.1 Observation of liver tissue optical images

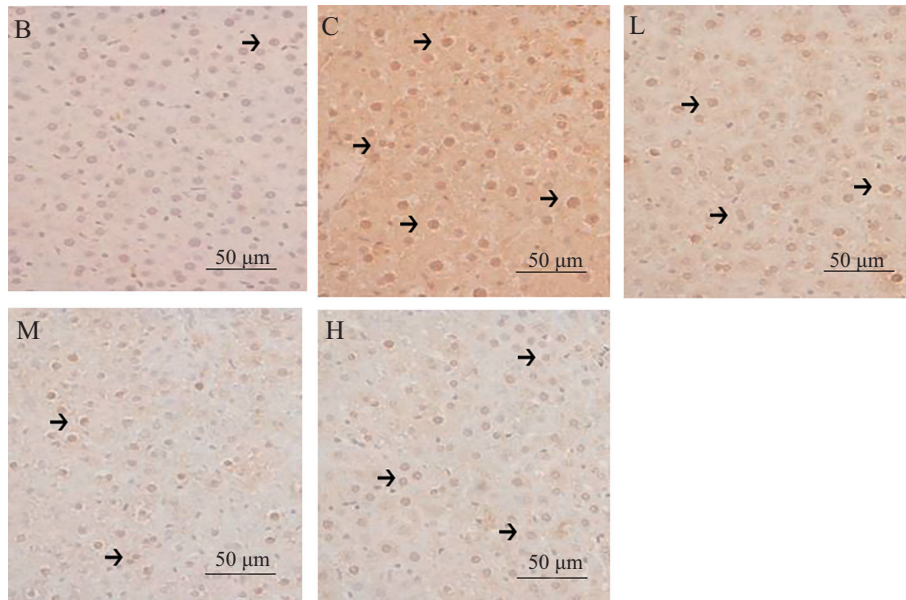


B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组; →: 阳性产物。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group; →: positive product.

图2 SIF干预第3天大鼠肝细胞中TNF-α分布的免疫组化染色图

Fig.2 Immunohistochemical staining of TNF-α distributing in rat liver cells on the third day after SIF intervention

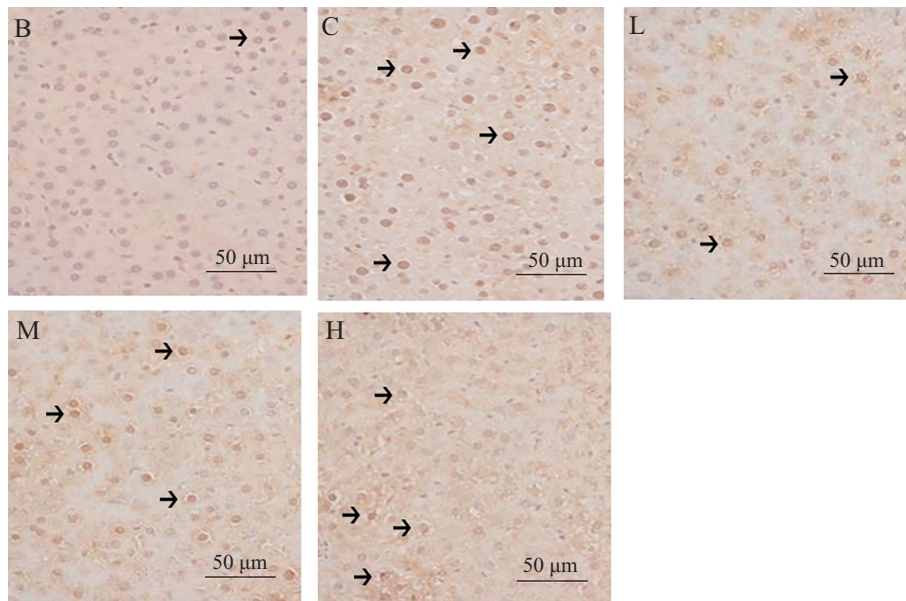


B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组; →: 阳性产物。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group; →: positive product.

图3 SIF干预第6天大鼠肝细胞中TNF- α 分布的免疫组化染色图

Fig.3 Immunohistochemical staining of TNF- α distributing in rat liver cells on the sixth day after SIF intervention



B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组; →: 阳性产物。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group; →: positive product.

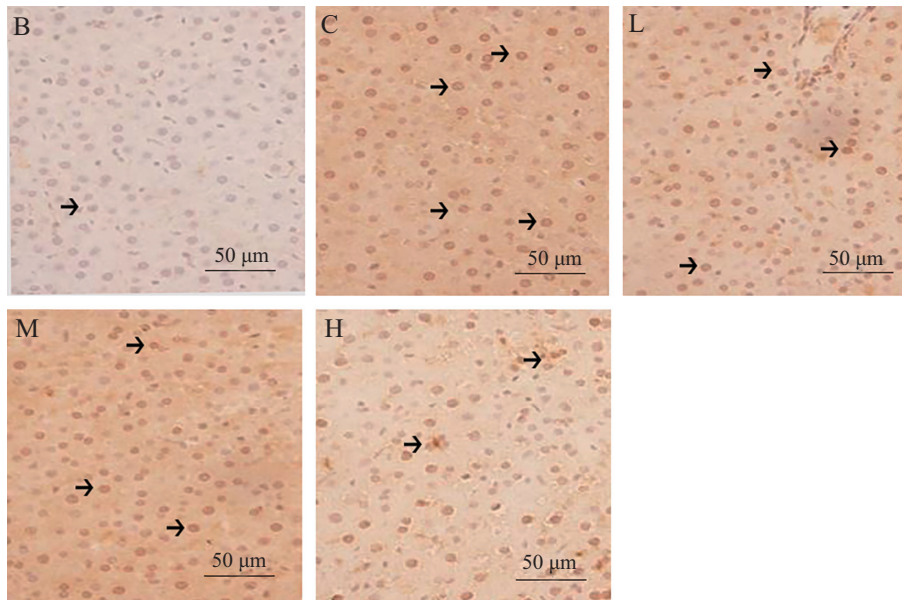
图4 SIF干预第9天大鼠肝细胞中TNF- α 分布的免疫组化染色图

Fig.4 Immunohistochemical staining of TNF- α distributing in rat liver cells on the ninth day after SIF intervention

意义也成为我国研究的热点之一^[11]。

已有许多研究表明,油酸在体外可诱导肝细胞内游离性脂肪酸增多^[14-15],但油酸在体内致肝损伤的研究甚少,本实验结果表明,静脉注射油酸可使大鼠血清中ALT、AST含量增高,这是肝损伤的显著标志之一,HE染色结果可见大量肝细胞出现较严重

弥漫水肿、空泡变性,证实了油酸可致大鼠肝损伤。灌胃SIF后,高、中、低剂量组分别在第3、6、9天内显示了血清中ALT、AST含量接近于基础对照组,组织学观察可见肝组织基本恢复,证明SIF的干预剂量和干预时间的调整可不同程度地改善油酸性肝损伤。

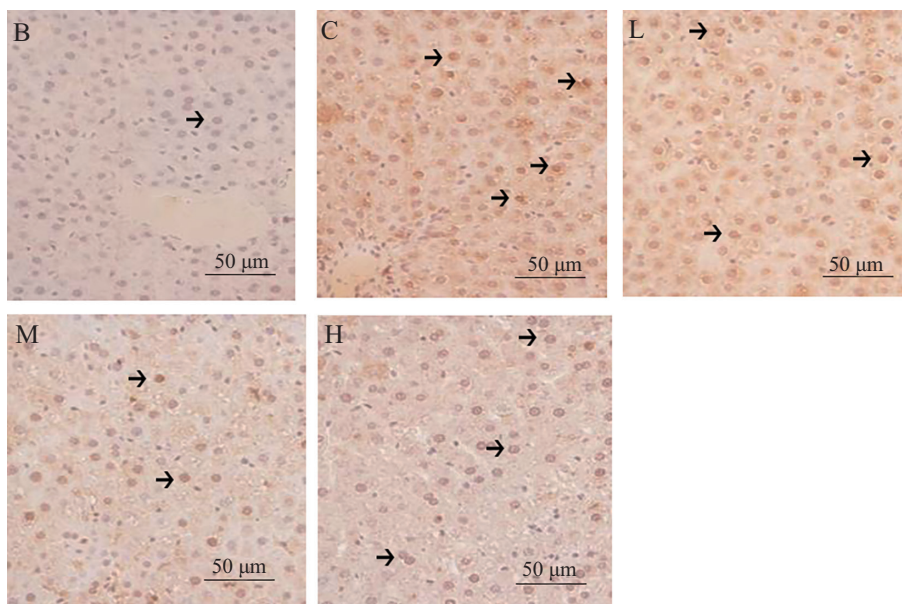


B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组; →: 阳性产物。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group; →: positive product.

图5 SIF干预第3天大鼠肝细胞中IL-6分布的免疫组化染色图

Fig.5 Immunohistochemical staining of IL-6 distributing in rat liver cells on the third day after SIF intervention



B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组; →: 阳性产物。

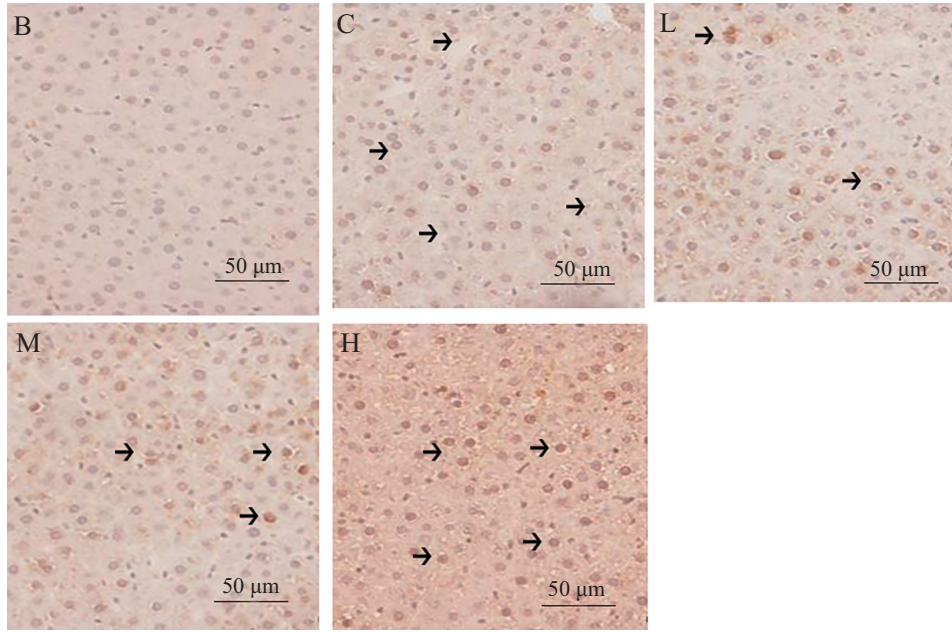
B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group; →: positive product.

图6 SIF干预第6天大鼠肝细胞中IL-6分布的免疫组化染色图

Fig.6 Immunohistochemical staining of IL-6 distributing in rat liver cells on the sixth day after SIF intervention

油酸性肝损伤包括非酒精性脂肪性肝炎, 研究发现TNF- α 、IL-6等炎症因子是非酒精性脂肪性肝炎患者发生慢性炎症的早期标志物^[16-17]。IL-6是主要由单核巨噬细胞、Th2细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞产生细胞因子。炎症反应的刺激和诱导, 可造成单核巨噬细胞为主的免疫活性细胞产生大量

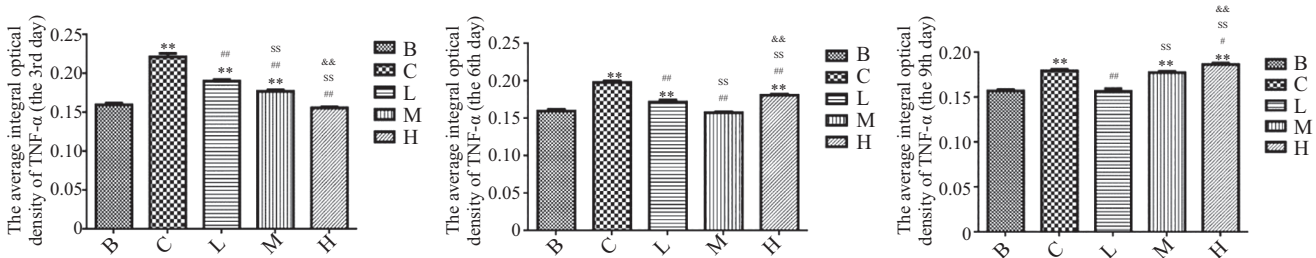
IL-6, 并释放到血循环中^[18]。血清中IL-6含量变化可敏感地反映出肝组织损伤的程度^[19]。TNF- α 主要是由活化的巨噬细胞、NK细胞及T淋巴细胞产生的细胞因子。TNF- α 对介导炎症、抗肿瘤、免疫调节和脂质代谢均可发挥作用, 肝脏是其重要的靶器官^[20]。TNF- α 作用于肝脏时可诱导氧自由基的产生及脂质



B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组; →: 阳性产物。
 B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group; →: positive product.

图7 SIF干预第9天后大鼠肝细胞中IL-6分布的免疫组化染色图

Fig.7 Immunohistochemical staining of IL-6 distributing in rat liver cells after on the ninth day after SIF intervention

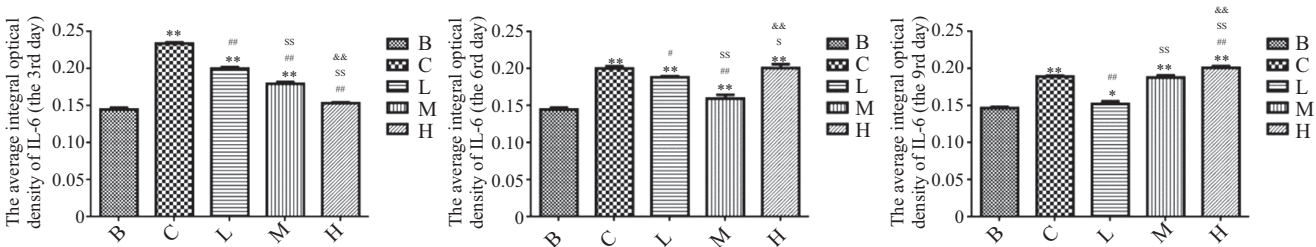


B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。 ** $P < 0.01$, 与B组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与C组比较; $^{SS}P < 0.01$, 与L组比较; && $P < 0.01$, 与M组比较。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group. ** $P < 0.01$ vs B group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs C group; $^{SS}P < 0.01$ vs L group, && $P < 0.01$ vs M group.

图8 SIF干预不同时间后TNF-α的平均积分光密度

Fig.8 The Average integrated optical density of TNF-α after different time of SIF intervention

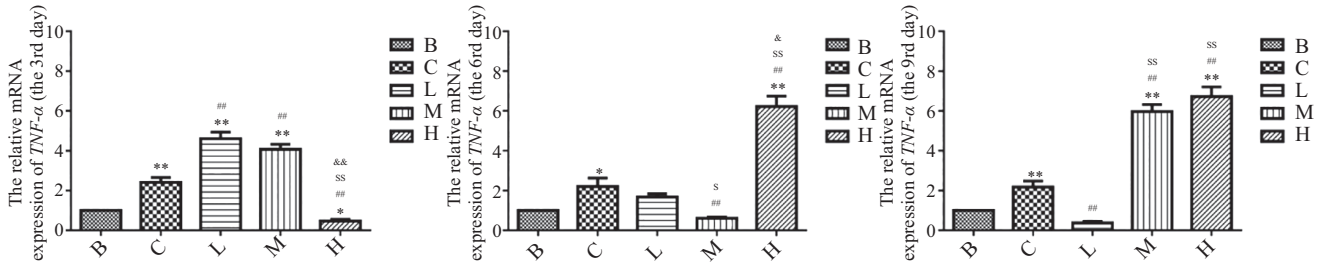


B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与B组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与C组比较; $^SP < 0.05$, $^{SS}P < 0.01$, 与L组比较; && $P < 0.01$, 与M组比较。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs B group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs C group; $^SP < 0.05$, $^{SS}P < 0.01$ vs L group, && $P < 0.01$ vs M group.

图9 SIF干预不同时间后IL-6的平均积分光密度

Fig.9 The Average integrated optical density of IL-6 after different time of SIF intervention

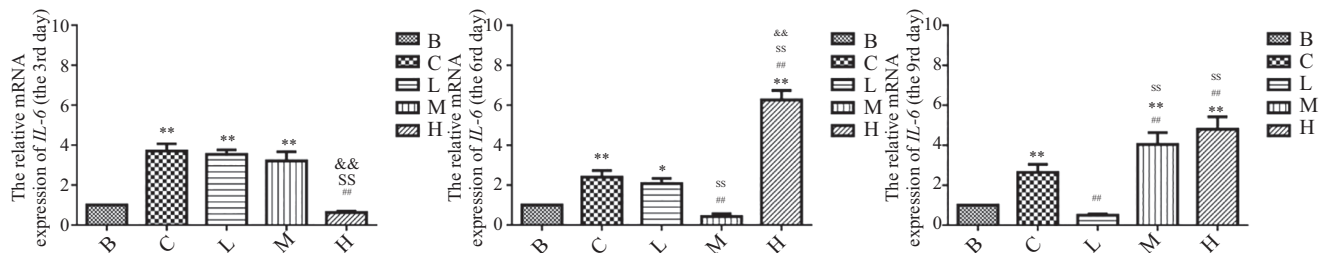


B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与B组比较; $^{##}P < 0.01$, 与C组比较; $^SP < 0.05$, $^{SS}P < 0.01$, 与L组比较; $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&}P < 0.01$, 与M组比较。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs B group; $^{##}P < 0.01$ vs C group; $^SP < 0.05$, $^{SS}P < 0.01$ vs L group; $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&}P < 0.01$ vs M group.

图10 SIF干预不同时间后大鼠肝组织中TNF- α mRNA的表达情况

Fig.10 Expression of TNF- α mRNA in rat liver after different time of SIF intervention



B: 基础对照组; C: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与B组比较; $^{##}P < 0.01$, 与C组比较; $^{SS}P < 0.01$, 与L组比较; $^{\&\&}P < 0.01$, 与M组比较。

B: basal control group; C: vehicle control group; L: low dose group; M: middle dose group; H: high dose group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs B group; $^{##}P < 0.01$ vs C group; $^{SS}P < 0.01$ vs L group; $^{\&\&}P < 0.01$ vs M group.

图11 SIF干预不同时间后大鼠肝组织中IL-6 mRNA的表达情况

Fig.11 Expression of IL-6 mRNA in rat liver after different time of SIF intervention

过氧化, 诱导肝实质细胞、枯否氏细胞及窦状内皮细胞产生大量NO, 从而导致肝脏损伤。同时TNF- α 增多导致炎症连锁反应被启动, 促进其他细胞因子持续性释放, 包括IL-2、IL-6等, 这些因子又增强了TNF- α 的作用, 高水平的IL-6与TNF- α 协同作用^[21], 加重肝功能损伤。

已有研究表明, SIF能够在体内和体外实验中影响TNF- α 等炎症因子的表达^[22-23]。朱志宁等^[24]指出SIF并非直接对TNF- α 的表达水平进行调控, 而是随着大豆异黄酮干预时间的延长, 有效抑制TNF- α 的表达。本实验中, 在第9天, 低剂量SIF组TNF- α 与IL-6的蛋白表达水平及其mRNA转录水平较对照组极显著降低, 与前人的报道一致。但高剂量SIF组TNF- α 与IL-6的蛋白表达水平及其mRNA转录水平在第3天较对照组极显著降低, 在第9天较对照组极显著升高, 表明不同浓度的SIF对TNF- α 的表达的干预作用因时间而异。此外, 长时间高剂量SIF干预可导致TNF- α 与IL-6在肝细胞内显著高表达, 这表明

了过量SIF干预可能引发了免疫系统的负反馈调节。不同浓度的SIF在一定的浓度范围内有抑制炎症的作用, 对肝损伤有治疗效果。

探究SIF的确切使用剂量与作用时间有利于SIF对油酸诱导的肝损伤的治疗。本实验结果表明, SIF可能通过抑制TNF- α 与IL-6的表达, 从而改善油酸诱导的非酒精性肝损伤。这显示, SIF有望成为油酸诱导的肝损伤进程中的抑制剂, 并作为缓解油酸性肝损伤的有效药物。但是, 本实验仅表明SIF能够在表观上减轻油酸诱导的炎症因子增加, SIF在油酸诱导的肝脏炎症损伤中的确切机制仍不明确。之前的报道显示, SIF可通过NF- κ B途径抑制单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)的表达, 从而减轻单核巨噬细胞募集, 进一步抑制TNF- α 与IL-6等炎症因子的表达^[25]。此外, 也有研究表明, SIF可通过天然免疫模式识别受体——Toll样受体调控炎症, SIF通过抑制TLR4/MyD88信号减轻炎症损伤^[26]。引发机体炎症所涉及途径广泛, 如炎症小体

通路、氧化应激所诱导的炎症损伤途径等。进一步探究SIF通过何种信号转导机制调控油酸诱导的肝脏炎性损伤有利于SIF作为药物的开发与应用。

参考文献 (References)

- [1] SCHREUDER T C, VERWER B J, VAN NIEUWKERK C M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(16): 2474-86.
- [2] 侯梦, 邵继红, 薛颖. 儿童单纯性肥胖血清Ghrelin、nesfatin-1水平与TC、TG及FBG的相关性分析[J]. *中国妇幼保健*(HOU M, SHAO J H, XUE Y. Correlation analysis of serum ghrelin and nesfatin-1 levels with TC, TG and FBG in children with simple obesity [J]. *Maternal and Child Health care in China*), 2018, 33(18): 4177-9.
- [3] 李善鹏, 薛晓蕾, 段海平. 青岛市老年人群肝功能异常与代谢综合征关系的研究[J]. *中国公共卫生管理*(LI S P, XUE X L, DUAN H P. Study on the relationship between liver dysfunction and metabolic syndrome in the elderly in Qingdao [J]. *Public Health Management in China*), 2016, 32(5): 678-80.
- [4] MANTENA S K, KING A L, ANDRINGA K K, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(7): 1259-72.
- [5] 鲍轶. 免疫细胞在非酒精性脂肪性肝病中的作用机制及研究进展[J]. *中华肝脏病杂志*(BAO Y. Mechanism and research progress of immune cells in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chinese Journal of Liver Diseases*), 2017, 25(7): 553-6.
- [6] 高美英. 非酒精性脂肪性肝病的发病机制与治疗研究进展[J]. *医药导报*(GAO M Y. Research progress in pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Medical Report*), 2011, 30(12): 1543-5.
- [7] BJÖRNSSON E, ANGULO P. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2007, 42(9): 1023-30.
- [8] MCCULLOUGH A J. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2006, doi: 10.1097/01.mcg.0000168645.86658.22.
- [9] PARK E J, LEE A Y, CHANG S H, et al. Role of p53 in the cellular response following oleic acid accumulation in Chang liver cells [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(1): 114-20.
- [10] CHEUNG O, SANYAL A J. Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Semin Liver Dis*, 2008, 28(4): 351-9.
- [11] 祝春梅. 大豆异黄酮对大鼠下丘脑-垂体-脾脏ER α 、NGF、IL-2、AR表达的影响 [D]. 成都: 四川农业大学, 2008.
- [12] MUNRO I C, HARWOOD M, HLYWKA J J, et al. Soy isoflavones: a safety review [J]. *Nutr Rev*, 2003, 61(1): 1-33.
- [13] DELCLOS K B, BUCCI T J, LOMAX L G, et al. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats [J]. *Reprod Toxicol*, 2001, 15(6): 647-63.
- [14] 董丽红, 张瑞芬, 黄菲. 油酸诱导单纯性肝脂肪变性细胞模型的建立及应用[J]. *中国药理学通报*(DONG L H, ZHANG R F, HUANG F. Establishment and application of oleic acid induced simple hepatic steatosis cell model [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2017, 33(11): 1622-6.
- [15] 杜金梁, 曹丽萍, 贾睿. 油酸诱导建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. *渔业科学进展*(DU J L, CAO L P, JIA R. Establishment of fatty degeneration model of *Cyprinus carpio* var. Jian induced by oleic acid [J]. *Progress in Fishery Science*), 2017, 38(2): 107-13.
- [16] YOUNOSSI Z M, JARRAR M, NUGENT C, et al. A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *Obes Surg*, 2008, 18(11): 1430-7.
- [17] 曾惠娟, 张振, 林江虹. 新诊断2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病患者血浆白细胞衍生趋化因子2水平变化及意义[J]. *实用医学杂志*(ZENG H X, ZHANG Z, LIN J H. Changes and significance of plasma leukocyte derived chemokine-2 levels in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Journal of Practical Medicine*), 2017, 33(7): 1090-4.
- [18] 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征研究现状与展望[J]. *解放军医学杂志*(QIAN G S. Research status and prospect of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. *Journal of PLA Medicine*), 2003, 28(2): 97-101.
- [19] 徐玉莲, 冯春艳, 李闻捷. 血清IL-6及IL-8水平与肝脏储备功能[J]. *现代检验医学杂志*(XU Y L, FENG C Y, LI W J. Serum IL-6 and IL-8 levels and liver reserve function [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*), 2004, (6): 5-6.
- [20] DUVNJAK M, LEROTIC I, BARSIC N, et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(34): 4539-50.
- [21] ARTIGAS A, BERNARD G R, CARLET J, et al. The american-european consensus conference on ARDS, part 2: ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(4 Pt 1): 1332-47.
- [22] AZADBAKHT L, KIMIAGAR M, MEHRABI Y, et al. Soy consumption, markers of inflammation, and endothelial function: a cross-over study in postmenopausal women with the metabolic syndrome [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(4): 967-73.
- [23] SATSU H, HYUN J S, SHIN H S, et al. Suppressive effect of an isoflavone fraction on tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in human intestinal epithelial Caco-2 cells [J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2009, 55(5): 442-6.
- [24] 朱志宁, 郝振荣, 王明. 大豆异黄酮对高产奶牛泌乳后期乳腺肥大细胞分泌肿瘤坏死因子- α 和表面型免疫球蛋白A水平的影响[J]. *动物营养学报*(ZHU Z N, HAO Z R, WANG M. Effects of soybean isoflavones on the secretion of TNF- α and surface immunoglobulin A by mastocytes in the late lactation of high-yield dairy cows [J]. *Journal of Animal Nutrition*) 2011, 23(1): 112-21.
- [25] 陈前芬, 朱旭友, 吕鸿燕. 大豆异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织NF- κ B和TNF- α 表达的影响[J]. *中国病理生理学会*(CHEN Q F, ZHU X Y, LV H Y. The effect of soybean isoflavone on the expression of NF- κ B and TNF- α in brain tissue after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chinese Society of Pathophysiology*), 2010, 26(10): 2042.
- [26] GARCES-RIMON M, GONZALEZ C, URANGA J A, et al. Pepsin egg white hydrolysate ameliorates obesity-related oxidative stress, inflammation and steatosis in Zucker fatty rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151193.