

大豆异黄酮的抗氧化作用*

浙江医科大学营养与食品研究中心 郑高利** 朱寿民 刘子贻

摘要 作者观察大豆异黄酮提取物(SIE)对阿霉素(ADR)引起小鼠过氧化损伤的抗氧化作用。小鼠每4 d腹腔注射ADR 5 mg/kg,连续4次,制备小鼠高过氧化病理模型,同时口服SIE,连续14 d。结果SIE 200 mg/kg组小鼠红细胞、肝脏和心肌SOD活性分别提高97.0%、42.0%和97.0% (P 均 <0.01)。心肌GSH-px活性提高122.3%,肝脏GSH增加69.0%,血浆、肝脏和心脏的LPO水平分别下降26.5%、20.1%和17.9% (P 均 <0.01)。50 mg/kg组红细胞、肝脏和心肌的SOD活性分别提高88.0%、33.0%和46.0%,心肌GSH-px活性提高99.4%,肝脏GSH提高44.0% ($P<0.01$),血浆、肝脏和心脏LPO水平降低12.6% ($P<0.05$)、4.4% ($P>0.05$)和15.4% ($P<0.05$)。并且心肌细胞病理损伤程度也明显减轻。结果表明,大豆异黄酮对小鼠过氧化损伤有较强的抗氧化作用。

关键词 异黄酮类;抗氧化剂;大豆

大豆异黄酮主要包括金雀异黄素和大豆甾元及其相应的葡萄糖甾(金雀异黄素和大豆甾)。自四五十年代开始,大豆异黄酮就被当作大豆的抗营养因子。随着近代对它的生物化学作用的深入研究,人们惊奇地发现它又是人体的保健因子,是良好的抗氧化剂^[1]和抑癌剂^[2,3],还能改善脂质代谢^[4]。它的弱雌激素样作用对妇女更年期综合征和骨质丢失有一定的预防作用。本文报道大豆异黄酮提取物对阿霉素引起小鼠过氧化损伤的保护作用。

1 资料和方法

1.1 大豆异黄酮提取物(以下称SIE) 大豆碾磨成粉,过20目,加5倍的80%酒精,加热到70~80℃,搅拌提取3 h,离心,沉淀加3倍的80%酒精,同法提取一次,合并上

清液,加热挥去大部分酒精后,加HCl调pH至1.0,煮沸2 h,冷却后离心。沉淀以3倍的80%甲醇溶解,离心,上清液加3倍的水,NaOH溶液调pH至4.0,离心,此沉淀即为大豆异黄酮提取物,经紫外吸收法测得含总异黄酮19.8 g/100 g干重。

1.2 药品与试剂 大豆甾元、还原型谷胱甘肽(GSH)、邻苯三酚、硫代巴比妥酸(TBA)和四乙氧基丙烷(TEP)均为Sigma产品;二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)为Fluka产品;盐酸阿霉素(ADR):浙江海门制药厂;重结晶十二烷基磺酸钠(SDS):汕头市光华化工厂。

1.3 实验动物 NIH小鼠,由浙江医科大学实验动物中心提供。

1.4 生化测试方法 血浆过氧化脂质(LPO)用微量荧光光度法测定,组织LPO用

* 浙江省卫生厅科研基金资助项目

** 研究生,现工作单位:浙江省医学科学院

TBA 法测定。红细胞和组织超氧化物歧化酶(SOD)活性用邻苯三酚自氧化法测定,血浆谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)用 Hafeman 比色法测定,组织和血浆 GSH 用 DTNB 直接显色法测定。

1.5 动物实验方法 NIH 小鼠 40 只,♀, 20~23 g,按体重随机分成 4 组,每组 10 只,即正常对照组(第 1 组)、ADR 模型组(第 2 组)、SIE 200 mg/kg 组(第 3 组)和 SIE 50 mg/kg 组(第 4 组)。第 2、3、4 三组于实验的第 4、7、10 和 13 天各 4 次腹腔注射 ADR 5 mg/kg,第 1 组以生理盐水代替。第 3 和第 4 组分别每天灌胃给予 SIE 200 mg/kg 和 SIE 50 mg/kg(相当于总异黄酮 40 mg/kg 和 10 mg/kg),连续 14 天,于第 15 天股动脉放血,制备抗凝血用作生化测试。取一小块肝脏和心尖组织作常规病理切片。

2 结果

2.1 对体重和一般状况的影响 ADR 模型组经 ADR 5 mg/kg×4 处理,在 2 周内引起半数(5/10)动物死亡,体重平均减轻 5.2 g,存活的动物,一般情况也极差,多呈濒死状态,皮毛蓬松,行动迟缓,多静卧。同时给予 SIE 的第 3 和第 4 组,对体重的影响与 ADR 模型组相似,一般状态明显改善,动物死亡率明显降低,仅为 1/10,将第 3 和第 4 组合并后作 χ^2 检验, $\chi^2=3.968, P<0.05$,表明经 SIE 处理,能明显降低 ADR 小鼠的死亡率(表 1)。

表 1 SIE 对 ADR 处理小鼠死亡率和体重的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	死亡率	体重(g)
正常对照组	0/10	21.2±2.3
ADR 模型组	5/10	16.0±0.7
ADR+SIE 200 mg/kg	1/10	16.6±1.3
ADR+SIE 50 mg/kg	1/10	16.6±1.5

2.2 对 LPO 水平的影响 ADR+SIE 200

mg/kg 组的血浆、肝脏和心肌的 LPO 分别比 ADR 模型组降低了 25.6%、20.1% 和 17.9%。ADR+SIE 50 mg/kg 组的 LPO 水平分别降低了 12.6%、4.4% 和 15.4%。结果提示 SIE 能显著降低小鼠体内 LPO 含量(表 2)。

表 2 SIE 对 ADR 处理小鼠血浆、肝脏和心肌 LPO 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	血浆 LPO (10^{-6} mol/L)	肝脏 LPO (10^{-9} mol/g)	心肌 LPO (10^{-9} mol/g)
正常对照组	11.6±4.0	262±30	76.1±7.7
ADR 模型组	19.9±3.4	343±21	100.3±5.6
ADR+SIE 200 mg/kg	14.8±2.8**	274±21**	82.3±8.4**
ADR+SIE 50 mg/kg	17.4±2.9*	328±27	84.6±7.0**

与 ADR 模型组比较(t 检验) * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.3 对 SOD 活性的影响 ADR+SIE 200 mg/kg 组的红细胞 SOD 活性比 ADR 模型组高 97.0%,接近正常组,肝脏和心肌的 SOD 活性比模型组分别提高了 42.0% 和 97.0%。ADR+SIE 50 mg/kg 也使红细胞、肝脏和心肌的 SOD 活性分别提高了 88.0%、33.0% 和 46.0%(表 3)。

表 3 SIE 对 ADR 处理小鼠红细胞、肝脏和心肌 SOD 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	SOD 活性		
	红细胞(U/ml)	肝脏(U/g)	心肌(U/g)
正常对照组	307±17	257±25	129±30
ADR 模型组	152±46	190±46	78±25
ADR+SIE 200 mg/kg	300±31*	270±9*	154±35*
ADR+SIE 50 mg/kg	285±38*	253±25*	114±25*

与 ADR 模型组比较(t 检验) * $P<0.01$

2.4 对 GSH-px 活性的影响 ADR+SIE 200 mg/kg 组的心肌 GSH-px 活性比 ADR 模型组高 122.3%,ADR+SIE 50 mg/kg 组使之提高 99.4%。SIE 对肝脏 GSH-px 活性影响相对较小,仅分别增加了 10.8% 和 8.0%,且无统计意义(表 4)。

表 4 SIE 对 ADR 处理小鼠肝脏和心肌组织 GSH-px 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	心肌(U/g)	肝脏(U/g)
正常对照组	3.61±0.59	10.55±1.42
ADR 模型组	1.84±0.59	8.23±1.90
ADR+SIE 200 mg/kg	4.09±0.36*	9.12±1.42
ADR+SIE 50 mg/kg	3.67±0.47*	8.89±2.25

与 ADR 模型组比较(*t* 检验) * $P<0.01$

2.5 对肝脏 GSH 水平的影响 ADR 模型组肝脏的 GSH($0.97\pm0.20\ \mu\text{mol/g}$)比对照组($1.60\pm0.46\ \mu\text{mol/g}$)低 39.4%,而给 SIE 200 mg/kg 和 50 mg/kg 的两组肝脏 GSH 分别提高到 1.64 ± 0.24 ($P<0.01$)和 $1.40\pm0.38\ \mu\text{mol/g}$ ($P<0.01$),增加 69.0%和 44.0%。

2.6 对心肌细胞病理损伤的影响 ADR 模型组心肌病理损伤比较严重,主要表现为心肌细胞空泡样变性,均质化和脂褐素沉着,病理损伤指数为 1.80 ± 0.84 。而同时口服 SIE 200 mg/kg 组和 50 mg/kg 组心肌细胞病变指数分别为 0.46 ± 0.36 和 0.59 ± 0.49 ,比 ADR 模型组明显减轻。

3 讨 论

1931 年 Walz 发现大豆中含有雌激素样物质,后证明是大豆异黄酮。70 年代以后,人们陆续发现大豆异黄酮的各种保健和治疗作用,如抗肿瘤^[2,3]、降低血脂、软化血管^[4]等。体外实验表明大豆异黄酮具有抗氧化作用。金雀异黄素对促癌剂 TPA^[5]和 PMA^[6]诱导的肿瘤细胞产生 H₂O₂ 均有明显的抑制作用,也能抑制由 Fenton 反应或紫外线照射引起的 DNA 氧化产生 8-OHdG(8 羟基脱氧鸟苷)^[7],防止 DNA 分子发生突变。但大豆异黄酮对整体动物的抗氧化作用的报道相对较少,Qinyin Cai 报告^[1],金雀异黄素使小鼠肝脏、肾脏、小肠、皮肤及血液的抗氧化酶活性有一定的提高,但强度不大,多数指标仅有增加的趋势。这可能是因为所选用正常年轻动物本身的抗氧化作用就比较强,不利于抗氧

化作用的观察。

ADR 在细胞内经氧化还原循环产生超氧阴离子自由基、过氧化氢和羟自由基^[8]等,并降低血及组织中 SOD 和 GSH-px 活性,提高脂质过氧化物水平^[9,10]。业已证明 ADR 引起的过氧化损伤是其心脏毒性的主要原因。本文在 ADR 引起的过氧化损伤的动物模型上,发现大豆异黄酮有比较强的抗氧化作用,能使血和组织中的抗氧化酶活性提高,脂质过氧化物水平下降,提示大豆异黄酮可能有良好的应用前景。除 ADR 外,正定霉素、博来霉素和丝裂霉素等许多抗肿瘤抗生素的细胞毒性均与过氧化损伤有关,而后者不利于其抗肿瘤作用,因此有可能利用大豆异黄酮的抗氧化作用,防治 ADR 等肿瘤化疗药物引起的毒副作用。考虑到大豆异黄酮本身就有明确的抑制肿瘤作用,能否通过食用富含异黄酮的豆制品,与某些抗癌药发挥协同抗肿瘤作用,很值得进一步研究。

参 考 文 献

1. Qinyin Cai, et al. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer*, 1996,25(1):1

2. Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells; independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991,179(1):661

3. Yanagihara K, et al. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res*, 1993,53(23):5815

4. Balmor F, et al. Soybean isoflavones influence serum lipid levels in rats. *J Nutr*, 1995,125(3):805s

5. Wei H, et al. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995,208(1):124

6. Steele VE, et al. Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nutr*, 1995,125(3):713s

7. Wei H, et al. Inhibition of UV light and Fenton reaction induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis*, 1996,17(1)73

8. Doroshow JH, Davies KA. Redox cycling of anthracy-

clines by cardiac mitochondria. I, Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. J Biochem, 1986, 261(7):3068

9. 马春力,等. 阿霉素心脏毒性中谷胱甘肽过氧化物酶活性

的研究. 佳木斯医学院学报,1992,15(3):9

10. 马春力,等. 阿霉素对大鼠全血和心肌超氧化物歧化酶活性的影响. 佳木斯医学院学报,1992,16(2):7

(1997年4月2日收稿,同年6月24日修回)

THE ANTIOXIDATIVE EFFECT OF SOYBEAN ISOFLAVONES

Zheng Gaoli, Zhu Shoumin, Liu Ziyi

Research Center of Food and Nutrition, Zhejiang Medical University

The antioxidative activity of soybean isoflavone extract was observed in high peroxidative mouse model induced by adriamycin(ADR). Mice was administered with 5 mg/kg ADR ip once every four days four times in two weeks. Soybean isoflavone extract was administered orally each day for 14 d. Soy bean isoflavone extract at dose of 200 mg/kg increased SOD activities in mouse erythrocytes, liver and heart by 97. 0%, 42. 0% and 97. 0% respectively. At the dose of 50 mg / kg soybean isoflavone increased SOD activities in erythrocyte, liver and heart by 88. 0%, 33. 0% and 46. 0% respectively. The GSH-px activities in heart were increased by 122. 3% and 99. 4% in the two treated groups. GSH levels in liver were increased by 69. 0% and 44. 0% respectively. LPO levels in plasma, liver and heart were lowered by 26. 5%, 20. 1% and 17. 9% in group 3 and by 13. 0%, 4. 4% and 16. 0% in group 4. The results suggested that soybean isoflavone extract demonstrated antioxidative activities.

KEY WORDS Isoflavones; Antioxidants; Soybean

(上接第 195 页)

Hu Fuqiang, Liang Wenquan, Song Jifen

School of Pharmacy, Zhejiang Medical University

The effects of vehicles with different solubility parameters on the percutaneous penetration of testosterone were investigated. The solubility of testosterone in various vehicles and the fluxes through rat abdomen skin were determined. Values for experimental permeability coefficient(p) corresponding to the respective fluxes were also determined. These values were then compared with those for the respective partition coefficient(k) which were calculated from the known solubility parameters for the vehicles($\delta_{v(n)}$), testosterone(δ_t), and skin (δ_s). There was a good correlation between the values for theoretical $\log k - 4.589$ and experimental $\log p$ for the delivery of testosterone.

KEY WORDS Testosterone/admin; Percutaneous administration; Skin; Osmosis; Solubility; Rat