

大豆异黄酮和皂苷对糖尿病大鼠脂蛋白氧化修饰的抑制作用

尹学哲, 许惠仙, 金 花

(延边大学医学院, 吉林延吉 133000)

摘 要:脂质过氧化和低密度脂蛋白的氧化修饰在动脉硬化的发生中起着极其重要的作用。大豆异黄酮和皂甙具有多种药理作用。为研究大豆异黄酮和皂甙对糖尿病大鼠血浆及脂蛋白脂质过氧化水平的影响和低密度脂蛋白氧化易感性的变化,从大豆胚轴提取大豆异黄酮和皂甙,高效液相色谱法(HPLC)分析其有效成分。给糖尿病大鼠饲喂添加 100 g kg⁻¹大豆异黄酮和皂甙的饲料 20 周,观察血浆脂蛋白过氧化脂质(LPO)含量及氧化易感性的变化。结果表明,饲喂大豆异黄酮和皂甙后糖尿病大鼠血总 LPO、LDL 及 HDL-LPO 明显减少;在体外进行氧化修饰时,LDL 氧化延滞时间明显延长。说明大豆异黄酮和皂甙可降低脂蛋白过氧化程度和增强 LDL 抗氧化修饰能力,因此能够起到防治糖尿病及其并发症的积极作用。

关键词:大豆;异黄酮;皂甙;过氧化脂质;氧化易感性;脂蛋白

Inhibition of Soybean Isoflavones and Saponins on Oxidation of Lipoproteins in Diabetic Rats

YIN Xue-zhe, XU Hui-xian, and JIN Hua

(Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China)

Abstract: There is increasing evidence that lipid peroxidation and oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) is important in atherogenesis. Soybean isoflavones and saponins have many pharmacological effects. In this study we investigated the effect of soybean isoflavones and saponins on lipid peroxide (LPO) levels of plasma and lipoproteins in GK diabetic rats, and its efficacy on the reduction of susceptibility of LDL to oxidation. Soybean isoflavones and saponins were extracted from soybean hypocotyl, and detected with high-performance liquid chromatography (HPLC). Diabetic rats were given feed containing 100 g kg⁻¹ soybean isoflavones and saponins for 20 weeks, and lipid peroxide (LPO) levels of lipoproteins and susceptibilities of lipoproteins to oxidation were then investigated. The results showed that LPO levels of blood, LDL and HDL in diabetic rats were significantly decreased after soybean isoflavone and saponin intake; lag phase of LDL oxidation curve in vitro was prolonged noticeably. It is suggested that soybean isoflavones and saponins, which can decrease the peroxidizability of lipoproteins and promote resistance to LDL oxidation, might be useful in prevention and treatment of diabetes mellitus and diabetes-associated diseases.

Key words: Soybean; Isoflavone; Saponin; Lipid peroxide; Oxidative susceptibility; Lipoprotein

流行病学调查证实,常食大豆对预防癌症和心血管疾病发生、增进人体健康有益。这些功效均与大豆中的异黄酮和皂甙等生物活性物质密切相关。大豆异黄酮是一类从大豆中分离的活性成分,具有异黄酮类化合物的典型结构。目前发现的大豆异黄酮共有十二种,分为游离型的苷元(大豆苷元 daidzein、染料木酮 genistein、黄豆苷元 glycitein)和相应的糖苷(大豆苷 daidzin、染料木苷 genistin、黄豆苷

glycitin 以及它们的丙二酰化形式和乙酰化形式)(Wang et al., 1994; Branham et al., 2002)。近年来,大豆异黄酮抗癌作用研究成为热点,有报道开始探索大豆异黄酮的抗氧化作用,发现大豆异黄酮具有清除氧自由基能力,并能阻抑低密度脂蛋白的氧化修饰作用,该作用对动脉硬化的防治具有重要意义(Vedavanam et al., 1999; Kerry and Abbey, 1998)。大豆皂甙是存在于大豆中的一类五环三萜的糖甙,

收稿日期(Received): 2007-11-02; 接受日期(Accepted): 2007-12-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30360113); 吉林省科技发展计划项目(200705428)

作者简介: 尹学哲(1962-), 男, 教授, 博士, 主要研究天然药物对动脉硬化及肺癌的保护作用机制。Tel: 0433-2670312; E-mail: yinxz@ybu.edu.cn

主要分为 A 类、B 类、E 类和 DDMP 皂甙。已有很多研究表明,大豆皂甙具有多种药理作用,如抗癌、防治心血管疾病、抗病毒及保肝等作用 (Konoshima, 1996; Rodrigues et al., 2005; Yoshikoshi et al., 1996; Hayashi et al., 1997; Kinjo et al., 1998), 其中皂甙的抗癌作用尤其引起人们的注目。因此,本文从大豆胚轴提取大豆异黄酮和皂甙为原料,研究食用大豆异黄酮和皂甙后糖尿病大鼠血浆脂蛋白脂质过氧化水平及氧化易感性的变化,为大豆异黄酮和皂甙防治心脑血管疾病研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大豆为中国东北产大豆。高效液相色谱用试剂为色谱纯, LPO 试剂盒为日本协和公司产品, 其余试剂均为日本试药特级。

1.2 仪器设备

YAMATO GA32 型喷雾干燥机、IWAKI REN-1 型旋转蒸发仪、EYELA FDU-830 型冷冻干燥仪、HITACHI U-2010 型紫外分光光度仪、HITACHI himac cp 100 α 超速离心机、HITACHI 高效液相色谱系统和 Waters 高效液相色谱系统。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆异黄酮和皂甙的提取 大豆冷冻干燥后剥离胚轴。将大豆胚轴研磨粉碎, 用 15 L 50% 甲醇提取, 提取液经喷雾干燥得粗粉。将粗粉用等体积正丁醇-水溶液萃取, 取正丁醇层, 经减压蒸馏、冷冻干燥, 得总糖甙。

1.3.2 大豆皂甙的高效液相色谱条件 参照全吉淑等 (2007) 的方法。检测用单元为 HITACHI 高效液相色谱系统 (包括自动进样器、智能柱温箱、双波长检测器), 采用 ODS-AM-303 柱 (YMC, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 流动相为含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-水, 通氦气。用 40% 乙腈洗脱 45 min, 流速为 1 mL min $^{-1}$, 进样量 10 μ L, 信号放大比为 6, 检测波长为 210 nm。

1.3.3 大豆异黄酮的高效液相色谱条件 参照全吉淑等 (2004) 的方法。色谱柱: ODS-AM-303 柱 (YMC, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 含 0.1% 三氟乙酸的水溶液 (A 溶液) 和含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液 (B 溶液), 高纯氦气脱气; 洗脱程序: 在 45 min 内 B 溶液浓度从 15% 线性递增至 35%, 之后继续以 35% 浓度洗脱 10 min; 流速: 1 mL min $^{-1}$; 检

波长: 260 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。

1.3.4 动物分组和饲养 实验动物为 GK/Jcl 雄性大鼠 (2 型糖尿病模型), 5~6 周龄, 体重 82~95 g。由日本 CLEA 株式会社提供。取 GK/Jcl 糖尿病大鼠 16 只, 随机分为两组: 对照组喂以普通饲料, 实验组则在普通饲料中加入 100 g kg $^{-1}$ 的大豆胚轴总糖甙。各组动物均分笼饲养, 饮用自来水, 实验周期为 20 周, 实验期间自由摄食和饮水。

1.3.5 血浆脂蛋白过氧化脂质含量和氧化易感性的检测 实验终期断头取血, 制备血浆, 采用哈贝尔序列超速离心分离法 (Havel et al., 1955) 分离血浆脂蛋白。用 Markwell 的改良 Lowry 法 (Markwell et al., 1978) 检测脂蛋白含量, 用八木别法测定脂蛋白 LPO 含量。LDL 用 pH7.4, 0.01 mol L $^{-1}$ PBS 充分透析过夜去除 EDTA, 在 0.1 g protein L $^{-1}$ LDL 中加入 CuSO $_4$ 溶液至其终浓度为 5 μ mol L $^{-1}$, 并测定多不饱和脂肪酸氧化产生的共轭双烯随时间变化。扫描波长 234 nm, 时间 2.5 h, 温度 28 $^{\circ}$ C。根据共轭双烯量 (以 A_{234} 表示) 随时间变化绘制氧化曲线, 以氧化延滞时间表示 LDL 氧化易感性, 以最大光密度差 (ΔA_{\max}) 表示共轭双烯生成量 (Esterbauer et al., 1989)。

1.3.6 统计学分析 采用统计软件进行 *t*-检验。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮和皂甙的提取及 HPLC 分析结果

由于大豆异黄酮和皂甙在正丁醇中溶解度较大, 因此用正丁醇: 水 = 1:1 溶剂体系来萃取其有效成分效果很好。在萃取过程中, 粗粉中含有的大量糖类将进入水相, 从而达到除亲水性杂质的目的。大豆异黄酮和皂甙总收率约为 7%, 其中含大豆皂甙 57.9%, 大豆异黄酮 18.6%。其大豆皂甙和大豆异黄酮的 HPLC 图见图 1 和图 2。大豆皂甙主要有 A1、A2、Ba、Bb、Bd、Be、 α g 和 β g, 各皂甙峰面积比例依次为 5:8:1:10:1:4:4:15; 大豆异黄酮以大豆苷元、大豆黄素和染料木酮比例计算, 约为 57:28:15, 主要形式为丙二酰化糖苷, 占异黄酮总量的 71%, 糖苷占 18%, 游离苷元仅为 11%。

2.2 大豆异黄酮和皂甙对糖尿病大鼠血浆脂蛋白 LPO 水平的影响

结果见表 1。实验组血浆总 LPO、HDL-LPO 和 LDL-LPO 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$); 实验组 VLDL-LPO 水平虽低于对照组, 但差异不具有显著

性($P > 0.05$)。

表 1 糖尿病大鼠血浆脂蛋白 LPO 水平的变化

Table 1 Change of LPO levels of lipoproteins in diabetic rats ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

组别 Group	n	Blood-LPO	VLDL-LPO	LDL-LPO	HDL-LPO
对照组 Control group	8	21.4 ± 3.5	11.3 ± 3.1	3.6 ± 0.8	5.4 ± 0.9
实验组 Experimental group	8	17.1 ± 2.2 ^a	10.9 ± 2.0	2.8 ± 0.6 ^a	3.9 ± 0.7 ^a

^a与对照组相比较, $P < 0.05$ ^a $P < 0.05$, compared with control group

2.3 大豆异黄酮和皂甙对糖尿病大鼠 LDL 氧化易感性的影响

结果见表 2。大豆异黄酮和皂甙明显降低 LDL 初始过氧化值($P < 0.05$), 显著延长 LDL 氧化延滞时间($P < 0.05$)。共轭双烯总生成量(最大光密度差值)虽有降低, 但差异不具有显著性($P > 0.05$)。

表 2 LDL 氧化易感性的变化

Table 2 Change of susceptibility of LDL to oxidation

组别 Group	n	初始过氧化脂质 Initial lipid peroxide/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	氧化延滞时间 Lag phase of oxidation/min	最大光 密度差 ΔA_{max}
对照组 Control group	6	3.2 ± 0.6	83 ± 27	1.872 ± 0.784
实验组 Experimental group	6	2.3 ± 0.4 ^a	120 ± 36 ^a	1.554 ± 0.637

^a与对照组相比较, $P < 0.05$ ^a $P < 0.05$, compared with control group

3 讨论

当机体内产生过多活性氧自由基时, 各血浆脂蛋白存在着明显的氧化应激, 尤其 LDL 氧化修饰作用增强, 极易转化为氧化低密度脂蛋白, 它是动脉粥样硬化最重要的致病因素。HDL 是体内重要的抗动脉粥样硬化脂蛋白, 具有抑制 LDL 氧化的功能, 而 2 型糖尿病患者 HDL 组分抑制 LDL 氧化能力却显著下降(许跃龙等, 2000)。研究结果表明, 大豆异黄酮和皂甙明显降低糖尿病大鼠血总过氧化脂质水平, 尤其降低 LDL-LPO 及 HDL-LPO 水平。同时, 摄入大豆异黄酮和皂甙后 LDL 氧化修饰的延滞时间显著延长, 说明它能够有效地推迟 LDL 氧化修饰的启动时间, 即对 LDL 的氧化修饰具有抑制作用, 此作用对防治心脑血管疾病具有尤其重要意义。

4 结论

长期食用大豆异黄酮和皂甙可显著降低糖尿病大鼠血液总过氧化脂质水平和低密度脂蛋白及高密度脂蛋白过氧化脂质水平; 明显延长体外 LDL 氧化延滞时间, 降低 LDL 氧化易感性。因此, 能够起到预防糖尿病及其动脉粥样硬化症的积极作用。

References

- Branham W S, Dial S L, Moland C L, Hass B S, Blair R M, Fang H, Shi L, Tong W, Perkins R G, and Sheehan D M. 2002. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. The Journal of Nutrition, 132(4): 658-664
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, and Jurgens G. 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. Free Radical Research Communications, 6(1): 67-75
- Hayashi K, Hayashi H, Hiraoka N, and Ikeshiro Y. 1997. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro. Planta Medica, 63(2): 102-105
- Havel R J, Eder H A, and Bragdon J H. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. The Journal of Clinical Investigation, 34(9): 1345-1353
- Kerry N, and Abbey M. 1998. The isoflavone genistein inhibits copper and peroxyl radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro. Atherosclerosis, 140(2): 341-347
- Kinjo J, Imagire M, Udayama M, Arai T, and Nohara T. 1998. Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. Planta Medica, 64(3): 233-236
- Konoshima T. 1996. Anti-tumor-promoting activities of triterpenoid glycosides; cancer chemoprevention by saponins. Advances in Experimental Medicine and Biology, 404: 87-100
- Markwell M A, Haas S M, Bieber L L, and Tolbert N E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Analytical Biochemistry, 87(1): 206-210
- Quan J S, Yin X Z, and Kudou T. 2004. Determination of soybean isoflavones by HPLC. Chinese Journal of Public Health, 20(1): 104 (全吉淑, 尹学哲, 工藤重光. 2004. 高效液相色谱法检测大豆异黄酮. 中国公共卫生, 20(1): 104)
- Quan J S, Yin X Z, and Kudou T. 2007. Determination of soyasaponins from soybean hypocotyl by HPLC. Food Science and Technology, 186(4): 172-174 (全吉淑, 尹学哲, 工藤重光. 2007. 高效液相色谱法测定大豆胚轴中各类皂甙的含量. 食品科技, 186(4): 172-174)
- Rodrigues H G, Diniz Y S, Faine L A, Galhardi C M, Burneiko R C, Almeida J A, Ribas B O, and Novelli E L. 2005. Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56(2): 79-85

(下转 180 页)

- dase of potato. Journal of Gansu Agriculture University, 2:190-191 (李敏, 刘磊, 郭玉蓉. 2005. 马铃薯多酚氧化酶的特性研究. 甘肃农业大学学报, 2:190-191)
- Miao Y C. 2001. Hydrogen peroxide is a signal molecule of plant. Magazine of Biology, 18(2):4-7 (苗雨晨. 2001. 过氧化氢—植物体内的一种信号分子. 生物学杂志, 18(2):4-7)
- Sscheck R, Rieber P, and Bauuerle P A. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparentes as apparently widely used messengers in the activation of the NF- KB transcription factor and HIV- 1. EMBO J, 10:2247
- Wang A G, Luo G H, and Shao C B. 1983. Study on superoxide dismutase of soybean seed. Journal of Plant Physiology, 9(1):77-84 (王爱国, 罗广华, 邵从本. 1983. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, 9(1):77-84)
- Write group of Seed Workbook. 1977. Seed Workbook. People Press, China, Shanghai, pp. 370-371 (种子工作手册编写组, 著. 1977 种子工作手册. 上海人民出版社, 中国, 上海, pp. 370-371)
- Wu X H, Chang Z M, and He S M. 2002. Effects on mung bean rooting of the plumular axis bottom by cutting with hydrogen peroxide. Journal of Science of Teachers * College and University, 22(3):63-65 (吴旭红, 常志敏, 何士敏. 2002. 过氧化氢对绿豆种子下胚轴插条生根的影响. 高师理科学刊, 22(3):63-65)
- Xie W H. 1985. Study of cucumber seeds dormancy and Hydrogen peroxide for cucumber germinating effect. Vegetable China, 2:1-4 (谢文华. 1985. 黄瓜种子休眠及过氧化氢对其萌发效应的研究. 中国蔬菜, 2:1-4)
- Xu S X, Tang X H, and Fu J R, eds. 1987. Study advance of seed physiology. Zhongshan University Press, China, Guangzhou, pp. 120-122 (徐是雄, 唐锡华, 傅家瑞, 著. 1987. 种子生理研究进展. 中山大学出版社, 中国, 广州, pp. 120-122)
- Xu Z, and Mao W J. 2006. Soybean trade of Brazil and opportunity facing of China. Test and Quarantine of China, 1:47-50 (徐铮, 毛维军. 2006. 巴西大豆贸易和中国面临的机遇. 中国检验检疫, 1:47-50)
- Yu J Y, Jiang Y, and Wang S L, eds. 2005. Experimental technology of biochemistry. Chemical Industry Press, China, Beijing, pp. 266-268 (俞建瑛, 蒋宇, 王善利, 著. 2005. 生物化学实验技术. 化学工业出版社, 中国, 北京, pp. 266-268)
- Zhang D X. 1996. Effects of hydrogen peroxide seeds soaking on rice and corn seeds germinating. Journal of Plant Physiology, 32(3):115-117 (张东向. 1996. H₂O₂ 浸种对水稻和玉米种子萌发的影响. 植物生理学通讯, 32(3):115-117)
- Zhang D X, He Y L, and Zheng W H. 1996. Effects of H₂O₂ on wheat seeds activity and some physical characteristic. Journal of Qiqihaer Teachers' University, 16(4):49-50 (张东向, 赫延龄, 郑蔚虹. 1996. 过氧化氢对小麦种子活力及某些生理特性的影响. 齐齐哈尔师范学院学报, 16(4):49-50)
- Zhang X L, Li R L, and Shi F C. 2007. Effect of salt stress on seed germination characteristics of *Glycine soja*. Seed, 26(8):21-23 (张秀玲, 李瑞利, 石福臣. 2007. 盐胁迫对大豆种子萌发特性的影响. 种子, 26(8):21-23)
- Zhang Z L. 2003. Experimental guiding of plant physiology. Higher Education Press, China, Beijing, pp. 213-214, 123-124, 120 (张志良. 2003. 植物生理学实验指导. 高等教育出版社, 中国, 北京, pp. 213-214, 123-124, 120)
- Zheng W H, and Leng J M 2003. Effects of H₂O₂ and KMnO₄ seeds soaking on Hippophae seeds germinating and seedling growing. Seed, (6):21-22 (郑蔚虹, 冷建梅. 2003. 青霉素、过氧化氢和高锰酸钾浸种对沙棘种子萌发及幼苗生长的影响. 种子, (6):21-22)
- bility of serum lipoproteins and effects of high-density lipoprotein against oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. Journal of Medical Postgraduate, 13(5):304-307 (许跃龙, 张春妮, 庄一义, 万瑛. 2000. 2 型糖尿病患者血清脂蛋白氧化易感性及高密度脂蛋白抗氧化能力分析. 医学研究生学报, 13(5):304-307)
- Yoshikoshi M, Yoshiki Y, Okubo K, Seto J, and Sasaki Y. 1996. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. Planta Medica, 62(3):252-255
- bean (*Glycine max* L.). Plant Cell Report, 7:348-351
- Zhang Z, Guo Z, and Shou H. 2000. Assessment of conditions affecting Agrobacterium-mediated soybean transformation and routine recovery of transgenic soybean. Plant Genetic Engineering, 88-94

(上接 172 页)

- Vedavanam K, Sriyayanta S, O'Reilly J, Raman A, and Wiseman H. 1999. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). Phytotherapy Research, 13(7):601-608
- Wang H J and Murphy P A. 1994. Isoflavone contents in commercial soybean foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(8):1666-1673
- Xu Y L, Zhang C N, Zhuang Y Y, and Wan Y. 2000. Oxidative suscepti-

(上接 175 页)

- Trick H N, Dinkins R D, Santarn E R, Di R, Samoylov V, Meurer C A, Walker D R, Parrott W A, Finer J J, and Collins G B. 1997. Recent advances in soybean transformation. Plant Cell Tissue Organ Culture, 3:9-26
- Wei Z M, and Xu X. H. 1988. Plant regeneration from protoplast of soy-