

大豆异黄酮和皂甙对大鼠肝癌诱发初期肝脏氧化应激的干预作用

赵文玺, 汪霞, 金爱花, 全吉淑

(延边大学 医学院, 吉林 延吉 133000)

摘要: 利用 Solt-Faber 法制备大鼠肝癌初期模型, 同时以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大豆异黄酮和皂甙干预 42 d。然后处死动物, 制备肝匀浆及肝线粒体提取液。以比色法测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性及丙二醛 (MDA) 含量。结果表明, 大豆异黄酮和皂甙能降低肝癌发生初期大鼠肝脏 ALT、AST、 γ -GT 和 GST 活性, 升高肝脏及肝线粒体 SOD、CAT、GSH-PX 活性和降低 MDA 水平。提示, 大豆异黄酮和皂甙具有减轻肝癌发生初期大鼠肝细胞损伤, 降低其氧化应激的作用。此作用有助于预防肝癌的发生。

关键词: 大豆; 异黄酮; 皂甙; 肝癌; 氧化应激

中图分类号: R154.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)04-0675-03

Effect of Soybean Isoflavones and Saponins on Hepatic Oxidative Stress of Rats in Early Stage of Hepatocarcinogenesis

ZHAO Wen-xi, WANG Xia, JIN Ai-hua, QUAN Ji-shu

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

Abstract: The early stage of hepatocarcinogenesis was established by the method of Solt and Farber, and the rats were administered with $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of soybean isoflavones and saponins for 42 days. At the end of experiment, the animals were killed and the liver homogenates and liver mitochondria were extracted. Then the activities of alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-PX), as well as the content of malondialdehyde (MDA) were detected by colorimetric method. The results showed that the administration with soybean isoflavones and saponins reduced the hepatic activities of ALT, AST, γ -GT and GST, increased the SOD, CAT and GSH-PX and decreased the MDA of liver and liver mitochondria of rats in early stage of hepatocarcinogenesis. It is suggested that soybean isoflavones and saponins could alleviate hepatic injury and reduce hepatic oxidative stress of rats in early stage of hepatocarcinogenesis. This function will be helpful for the prevention of liver cancer.

Key words: Soybean; Isoflavones; Saponins; Hepatocarcinogenesis; Oxidative stress

流行病学调查发现长期食用大豆的东南亚人群中, 癌症发病率明显低于西方, 这些功效均与大豆异黄酮和大豆皂甙密切相关^[1-2]。大豆异黄酮和皂甙主要存在于大豆胚轴中, 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^[3-4]。在本课题组前期工作的基础上, 本文探讨了大豆异黄酮和皂甙对大鼠肝癌发生初期肝脏及其线粒体损伤及氧化应激的影响, 为其在肿瘤防治中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 中国东北产大豆胚轴经 C_{18} 反相层

析技术制备大豆异黄酮和皂甙, 并采用高效液相色谱法检测大豆异黄酮和皂甙含量^[4]。

1.1.2 试剂 二乙基亚硝胺 (DEN) 和乙酰氨基苄 (AAF) 为 Sigma 公司产品, 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA) 及蛋白试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 将 Wistar 雄性大鼠随机分为对照组、模型组、异黄酮组、皂甙组。除对照组外, 其余组以 Solt-Farber 法复制大鼠肝癌初期模型^[4-6]。模型组第 1 天腹腔注射 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DEN, 第 15 天开始饲喂添加 0.008% AAF 的饲料, 第 21

收稿日期: 2012-04-09

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

第一作者简介: 赵文玺 (1987-), 男, 在读硕士, 研究方向为分子肿瘤学。E-mail: zhaowenxi1987@sina.cn。

通讯作者: 全吉淑 (1968-), 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事分子肿瘤学研究。E-mail: quanjs@ybu.edu.cn。

天施行 2/3 肝切除术,之后继续饲养 42 d。异黄酮组和皂甙组于第 15 天开始同时灌胃 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 异黄酮或皂甙,其余处理方法相同。对照组以生理盐水代替 DEN 进行腹腔注射,并以基础饲料正常饲养。

1.2.2 取材及指标测定 实验末期,处死大鼠,取出肝脏。常规方法制备肝匀浆和肝线粒体^[7]。按试剂盒上操作方法测定肝脏 ALT、AST、 γ -GT、GST、SOD、GSH-PX、CAT、MDA 以及蛋白质水平。

1.3 数据分析

数据用 SPSS 11.5 统计软件处理,以单因素方差分析进行统计。

2 结果与分析

2.1 肝癌标志酶、转氨酶及解毒酶活性

在实验性肝癌发生模型中 γ -GT 是肝癌初期标志酶^[8],而 ALT 和 AST 则反映肝脏功能状况。由表 1 可知,模型组大鼠肝脏 γ -GT、ALT 和 AST 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$),说明大鼠肝癌初期模型建立成功。大豆异黄酮和皂甙治疗后,大鼠肝脏 γ -GT、ALT 和 AST 活性与模型组相比均显著降低,提示大豆异黄酮和皂甙对肝细胞损伤有保护作用,改善肝功能。GST 是机体的 II 相解毒酶^[5,10]。本实验中观察到肝癌诱发初期,模型组肝脏 GST 活性显

表 1 大豆异黄酮和皂甙对大鼠肝脏 γ -GT、ALT、AST 和 GST 活性的影响

Table 1 Effects of soybean isoflavones and saponins on hepatic activities of γ -GT,ALT,AST and GST in rats ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$)

组别 Group	γ -GT	ALT	AST	GST
对照 Control	1.17 ± 0.31	118.3 ± 19.7	29.6 ± 6.1	12.3 ± 1.5
模型 Model	$2.61 \pm 1.01^*$	$161.0 \pm 23.0^*$	$37.3 \pm 6.0^*$	$25.1 \pm 4.2^*$
异黄酮 Isoflavone	2.02 ± 0.95	$108.5 \pm 13.8^{\#}$	37.2 ± 6.0	$19.8 \pm 2.9^{\#}$
皂甙 Saponin	$1.75 \pm 0.24^{\#}$	$114.7 \pm 24.2^{\#}$	$24.1 \pm 7.4^{\#}$	$14.5 \pm 2.1^{\#}$

($\bar{x} \pm s$), $n=12$; * 表示与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$);[#]表示与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$);下同。

($\bar{x} \pm s$), $n=12$; * indicates the difference is significant ($P < 0.05$) as compared with the control;[#] indicates the difference is significant ($P < 0.05$) as compared with the model; the same below.

著高于对照组 ($P < 0.05$),而大豆异黄酮和皂甙可显著降低肝脏 GST 活性 ($P < 0.05$)。

2.2 肝脏及其线粒体氧化应激反应

研究表明自由基的产生和消除失衡与肿瘤的发生发展有一定的关系^[4,6,11-12]。SOD、GSH-PX、CAT 是体内清除自由基的酶类,与抗氧化剂组成一个自由基的防御系统。而 MDA 是脂质过氧化物的主要分解产物,其含量可反映组织受自由基攻击的

严重程度^[5]。由表 2 和表 3 可知,肝癌诱发初期,模型组肝脏及线粒体 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$),而 MDA 含量均显著高于对照组 ($P < 0.05$),说明肝脏发生癌变初期,大鼠肝脏抗氧化能力下降,氧化应激则增高。而大豆异黄酮和皂甙治疗可明显回升大鼠肝脏 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性,显著降低肝脏 MDA 水平 ($P < 0.05$),改善大鼠肝脏的氧化应激。

表 2 大豆异黄酮和皂甙对大鼠肝匀浆 SOD、GSH-PX、CAT 及 MDA 水平的影响

Table 2 Effects of soybean isoflavones and saponins on SOD,GSH-PX,CAT and MDA levels in rat liver homogenates

组别 Group	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$	GSH-PX/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$
对照 Control	79.3 ± 8.2	270.6 ± 21.8	70.4 ± 5.6	0.75 ± 0.10
模型 Model	$56.8 \pm 7.6^*$	$215.9 \pm 23.6^*$	$43.8 \pm 6.5^*$	$1.29 \pm 0.47^*$
异黄酮 Isoflavone	$95.0 \pm 9.8^{\#}$	$293.4 \pm 48.5^{\#}$	65.2 ± 2.2	$0.82 \pm 0.10^{\#}$
皂甙 Saponin	$85.9 \pm 2.4^{\#}$	$234.7 \pm 27.5^{\#}$	$53.1 \pm 3.3^{\#}$	$0.66 \pm 0.02^{\#}$

表 3 大豆异黄酮和皂甙对大鼠肝线粒体 SOD、GSH-PX、CAT 及 MDA 水平的影响

Table 3 Effects of soybean isoflavones and saponins on SOD,GSH-PX,CAT and MDA levels in rat liver mitochondria

组别 Group	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$	GSH-PX/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$
对照 Control	60.0 ± 4.6	181.6 ± 10.6	38.0 ± 3.0	3.30 ± 0.38
模型 Model	$49.0 \pm 8.2^*$	$154.3 \pm 22.3^*$	$31.9 \pm 4.2^*$	$3.81 \pm 0.20^*$
异黄酮 Isoflavone	$80.2 \pm 10.7^{\#}$	197.6 ± 35.9	$42.3 \pm 6.1^{\#}$	$3.23 \pm 0.96^{\#}$
皂甙 Saponin	61.2 ± 10.8	187.0 ± 33.7	$47.2 \pm 5.7^{\#}$	$3.01 \pm 0.45^{\#}$

3 结论与讨论

化学致癌是诱发肝癌的一个重要因素,其中 DEN 诱发肝癌与人体肝癌发生过程较为相似。它是一个复杂的多阶段的过程,一般经历诱癌、促癌、演变 3 个阶段。研究表明,诱癌是不可逆地将正常细胞转变成肿瘤细胞的起始过程,而促癌启动细胞克隆连续过度增生的过程,通常认为是可逆的,因此是阻断癌变的理想靶点^[5-6]。 γ -GT 是胚胎肝细胞合成的酶,成熟肝细胞则不表达,当肝细胞损伤后,新生的和癌变的肝细胞 γ -GT 水平则会重新升高,因此在实验性肝癌发生过程中 γ -GT 的出现被认为是肝癌初期的标志之一^[8]。AST、ALT 则反映肝脏功能状况的主要酶。ALT 在胞浆内合成,AST 则在线粒体内合成。血清 ALT 浓度增高提示肝细胞破坏,细胞膜通透性增强,AST 浓度增高常提示肝细胞线粒体损伤^[9]。本实验中,模型大鼠肝癌标志酶和转氨酶活性均有增高,成功完成了肝癌初期的造模过程。

肿瘤的发生发展与宿主的自由基水平及其代谢产物有关^[4-6,11-12]。机体内抗氧化酶类与其它酶类及抗氧化剂组成一个防御系统,以清除体内过多的自由基。其中 CAT 和 GSH-PX 能清除 H_2O_2 ,SOD 则能消除单线态氧,从而减轻和阻断脂质过氧化反应的引发作用^[4]。GST 是一类解毒酶,许多非亲水性药物及毒物,通过 GST 与亲水性物质结合,水溶性增加,易从细胞内移出,解除抗癌药物对癌细胞的毒性作用。GST 还能使亚硝基药物脱亚硝基,清除阿霉素和其它抗癌药物产生的过氧化物,亦可自身结合细胞毒物质,从而保护细胞。当机体受到 DEN 等化学致癌物影响时,GST 活性代偿性增高,以此来保护机体免受损伤^[5,10]。实验结果显示,肝癌初期大鼠肝脏及其线粒体抗氧化酶活性降低,解毒酶活性升高,脂质过氧化水平升高,说明大鼠肝细胞存在一定氧化应激和损伤。这一结果与文献报道的结果基本相符^[11-12]。而大豆异黄酮和皂甙可减轻肝癌初期大鼠肝细胞损伤和改善肝脏及其线粒体氧化应激。此作用有利于防止肝癌的发生与发展。

参考文献

[1] 金梅花,许惠仙,金花,等.大豆异黄酮和皂甙对结肠癌细胞增

- 殖和凋亡的研究[J].大豆科学,2008,27(6):1028-1031. (Jin M H,Xu H X,Jin H,et al. Effect of soybean isoflavones and saponins on proliferation and apoptosis of colon carcinoma cell HT-29 [J]. Soybean Science,2008,27(6):1028-1031.)
- [2] Ishii Y,Tanizawa H. Effects of soyasaponins on lipid peroxidation through the secretion of thyroid hormones[J]. Biological Pharmaceutical Bulletin,2006,29:1759-1763.
- [3] Wiegand H,Wagner A E,Boesch-Saadatmandi C,et al. Effect of dietary genistein on phase II and antioxidant enzymes in rat liver [J]. Cancer Genomics Proteomics,2009,6(2):85-92.
- [4] 许惠仙,汪霞,金延华,等.大豆异黄酮和皂甙对肝癌前病变大鼠血清标志酶及抗氧化活性的影响[J].大豆科学,2012,31(1):82-84. (Xu H X,Wang X,Jin Y H,et al. Effect of soybean isoflavones and saponins on serum marker enzymes and antioxidative activities of rat with hepatic preneoplasia [J]. Soybean Science,2012,31(1):82-84.)
- [5] Yin Z Z,Jin H L,Shen M H,et al. Inhibitory effect of *Boschniakia rossica* on DEN induced precancerous hepatic foci and its antioxidative activities in rats[J]. Chinese Journal of Cancer Research,1999,11:169-173.
- [6] 汪霞,周微,李天,等.草苈蓉环烯醚萜对肝癌前病变大鼠血清标志酶及抗氧化活性的影响[J].食品科技,2010,35(7):242-245. (Wang X,Zhou W,Li T,et al. Effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on serum marker enzymes and antioxidative activities of rat with hepatic preneoplasia [J]. Food Science and Technology,2010,35(7):242-245.)
- [7] 尹学哲,李天,汪霞,等.大豆皂醇抗脂质过氧化作用的研究[J].食品工业科技,2010,31(7):143-145. (Yin X Z,Li T,Wang X,et al. Anti-lipid peroxidative effects of soyasapogenols [J]. Science and Technology of Food Industry,2010,31(7):143-145.)
- [8] Wiechestein M,Meisel E. Histochemistry of hepatic phosphatases at physiological pH with special reference to demonstration of bile canaliculi[J]. American Journal of Clinical Pathology,1957,27:13-23.
- [9] Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation;eicosanoid formation and their regulation by antioxidative nutrients[J]. Toxicology,2003,189:113-127.
- [10] Sato K. Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia[J]. Advances Cancer Research,1989,52:205-255.
- [11] 郭维心,刘明堂,郑书勤,等.胃癌患者 SOD 活性与 LPO 含量观察[J].癌症,1993,12(2):115-117. (Guo W X,Liu M T,Zheng S Q,et al. The observation of SOD activity and LPO content on the patients of gastric cancer [J]. Chinese Journal of Cancer,1993,12(2):115-117.)
- [12] 李文惠,陈卫,李亢宗,等.肿瘤患者血 GSH-PX 活性变化的研究[J].肿瘤防治研究,1995,22(3):159,161. (Li W H,Chen W,Li K Z,et al. The research of blood GSH-PX activity in the patients with tumour [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment,1995,22(3):159,161.)