

# 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

许惠仙, 汪霞, 金延华, 尹学哲

(延边大学 附属医院, 吉林 延吉 133000)

**摘要:** 采用改良 Solt-Faber 法建立大鼠肝癌前病变模型, 以大豆异黄酮和皂甙饲喂大鼠 42 d 后, ELISA 法测定血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 分光光度法测定  $\gamma$ -谷酰胺转氨酶 ( $\gamma$ -GT)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、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) 和一氧化氮 (NO) 含量。结果表明: 大豆异黄酮和皂甙降低肝癌前病变大鼠血清  $\gamma$ -GT、ALT、AST 活性, 升高血清 SOD、CAT、GSH-PX 活性和降低 MDA 以及 NO 水平, 但对血清 TNF- $\alpha$  水平没有显著影响。表明大豆异黄酮和皂甙具有明显的抗氧化致癌作用, 其作用机制可能与增高抗氧化活性有关。

**关键词:** 大豆; 异黄酮; 皂甙; 肝; 癌前病变; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)01-0124-03

## Effect of Soybean Isoflavones and Saponins on Serum Marker Enzymes and Antioxidative Activities of Rat with Hepatic Preneoplasia

XU Hui-xian, WANG Xia, JIN Yan-hua, YIN Xue-zhe

(Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China)

**Abstract:** The hepatic preneoplastic lesions were induced by the modified protocol of Solt and Farber. Rats were administered with soybean isoflavones and saponins for 42 days, then the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was determined with ELISA method. The activities of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT), alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-PX), as well as the contents of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were detected by the spectrometric method. Soybean isoflavones and saponins intake reduced the activities of serum  $\gamma$ -GT, ALT and AST, increased the serum SOD, CAT, GSH-PX activities, and decreased the serum MDA and NO levels in rats with hepatic preneoplastic lesions, however, no significant effect on serum TNF- $\alpha$  level was detected. It is suggested that soybean isoflavones and saponins exhibited an inhibitory effect on formation of hepatic preneoplastic lesions in rats, probably via its antioxidative activity.

**Key words:** Soybean; Isoflavones; Saponins; Hepatic; Preneoplastic lesions; Antioxidative

大豆异黄酮和皂甙是大豆胚轴中重要生物活性成分。近年来, 大豆异黄酮和皂甙的药理作用研究成为热点, 经研究发现具有清除氧自由基能力、抗病毒和保肝作用, 能防治心血管疾病<sup>[1-2]</sup>。其中大豆异黄酮和皂甙的抗癌作用尤其引人注目<sup>[3]</sup>。该文主要探讨大豆异黄酮和皂甙对肝癌前病变大鼠肝脏标志酶及肝脏抗氧化酶的影响, 为大豆异黄酮和皂甙在肿瘤防治中的应用提供实验依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 药物与试剂 大豆为中国东北产大豆。二

乙基亚硝胺 (DEN) 和乙酰氨基苄 (AAF) 均系 Sigma 公司产品; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 均属北京北化康泰临床试剂有限公司, 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)、 $\gamma$ -谷酰胺转氨酶 ( $\gamma$ -GT)、丙二醛 (MDA) 及一氧化氮 (NO) 试剂盒为南京建成生物工程研究所产品; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 试剂盒为武汉博士德公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器设备 恒温水浴、离心机、日立 U-2010 型紫外分光光度仪和 RT-2100 型酶标仪。

收稿日期: 2011-11-23

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: 许惠仙 (1982 -), 女, 在读博士, 主要从事分子肿瘤学研究。E-mail: xuhuixian1982@sina.cn

通讯作者: 尹学哲 (1962 -), 男, 博士, 教授, 主要从事分子肿瘤学研究。E-mail: yinxz@ybu.edu.cn。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆异黄酮和皂甙的制备及成分分析 将大豆胚轴用 50% 甲醇提取,提取液经喷雾干燥得粗粉。将粗粉用 10% 甲醇溶解,上 C<sub>18</sub> 反相层析柱(YMC, ODS-A60-S150, 5 cm × 74 cm),依次用 30%、50% 和 80% 甲醇线性梯度洗脱,收集各洗脱部分。30% 和 80% 洗脱部分分别为大豆异黄酮和皂甙<sup>[4]</sup>。大豆异黄酮和皂甙含量采用高效液相色谱法检测。

1.2.2 动物分组与处理 将 Wistar 雄性大鼠(150 ~ 180 g)随机分为对照组(肝切除组,PH 组)、模型组(DEN-AAF-PH 组)、异黄酮组(DEN-AAF + 异黄酮-PH 组)、皂甙组(DEN-AAF + 皂甙-PH 组)。按改良 Solt-Farber 法<sup>[5-6]</sup>复制大鼠肝癌前病变模型。对照组大鼠以生理盐水代替 DEN 进行腹腔注射,以基础饲料正常饲养;模型组第 1 天腹腔注射 DEN 200 mg·kg<sup>-1</sup>,第 15 天开始基础饲料中添加 0.008% AAF 饲喂;异黄酮组和皂甙组第 1 天腹腔注射 DEN 200 mg·kg<sup>-1</sup>,第 15 天开始基础饲料中添加 0.008% AAF 和 100 mg·kg<sup>-1</sup> 异黄酮或 100 mg·kg<sup>-1</sup> 皂甙饲喂;各组均在第 21 天施行肝切除术,之后继续饲养 42 d。

1.2.3 取材及指标测定 第 56 天处死大鼠,分离血清,并按照试剂盒操作方法测定血清 ALT、AST、γ-GT、SOD、GSH-PX、CAT 活性以及 MDA、NO 和 TNF-α 水平。

1.3 数据分析

数据用 Prism 5.0 统计软件处理,以 *t*-检验和单因素方差分析进行统计。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮和皂甙对大鼠肝癌前病变标志酶及转氨酶活性的影响

由表 1 可见,与对照组相比,模型组大鼠血清 γ-GT、ALT 和 AST 活性显著升高(*P* < 0.05),说明大鼠肝脏癌前病变模型建立成功。分别用大豆异黄酮和皂甙治疗 42 d 后,2 个治疗组大鼠血清

表 1 各组大鼠血清 γ-GT、ALT 和 AST 活性

Table 1 The activities of γ-GT,ALT and AST in serum

组别 Group	γ-GT/U·100 mL <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>
对照 Control	2.6 ± 1.5	58.9 ± 3.9	99.1 ± 2.4
模型 Model	9.6 ± 7.4 *	95.5 ± 15.2 *	124.9 ± 14.3 *
异黄酮 Isoflavone	4.3 ± 2.2 #	77.8 ± 12.3 #	95.6 ± 21.1 #
皂甙 Saponin	5.1 ± 2.4 #	72.9 ± 14.6 #	97.8 ± 24.4 #

(*X* ± *s*), *n* = 12; 与对照组比较, \* : *P* < 0.05; 与模型组比较, # : *P* < 0.05; 下表同。

(*X* ± *s*), *n* = 12; Compared with control, \* : *P* < 0.05; Compared with model, # : *P* < 0.05; the same below.

γ-GT、ALT 和 AST 活性与模型组相比均显著降低(*P* < 0.05),说明大豆异黄酮和皂甙对肝脏化学致癌过程具有一定的抑制作用。

2.2 大豆异黄酮和皂甙对大鼠血清抗氧化相关活性的影响

由表 2 可知,与对照组相比,肝脏癌前病变大鼠血清 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性均显著降低(*P* < 0.05),而 MDA 含量却显著增高(*P* < 0.05),说明肝脏发生癌前病变时,模型组大鼠肝脏抗氧化能力下降,受自由基攻击较严重。大豆异黄酮和皂甙治疗可显著降低 MDA 水平(*P* < 0.05),并使上述抗氧化酶活性回升至接近正常水平(*P* < 0.05)。

表 2 各组大鼠血清 SOD、GSH-PX、CAT 及 MDA 水平

Table 2 The levels of SOD,GSH-PX, CAT and MDA in serum

组别 Group	SOD /U·mL <sup>-1</sup>	GSH-PX /U·mL <sup>-1</sup>	CAT /U·mL <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mL <sup>-1</sup>
对照 Control	182.2 ± 6.9	467.1 ± 44.3	9.8 ± 4.2	19.1 ± 2.9
模型 Model	169.2 ± 11.4 *	110.8 ± 12.8 *	3.9 ± 2.5 *	65.7 ± 30.2 *
异黄酮 Isoflavone	187.1 ± 8.5 #	420.4 ± 6.7 #	7.3 ± 2.4 #	38.5 ± 14.4 #
皂甙 Saponin	179.5 ± 7.7 #	393.1 ± 26.7 #	7.0 ± 2.6 #	40.1 ± 9.9 #

2.3 大豆异黄酮和皂甙对大鼠血清 NO 及 TNF-α 的影响

由表 3 可知,与对照组相比,肝脏癌前病变大鼠血清 NO 水平显著降低(*P* < 0.05),给药后 2 组大鼠血清 NO 较模型组显著增高(*P* < 0.05)。模型组和给药组大鼠血清 TNF-α 虽与对照组相比有增高趋势,但差异无显著变化(*P* > 0.05)。

表 3 各组大鼠血清 NO 及 TNF-α 含量

Table 3 The levels of NO and TNF-α in serum

组别 Group	NO/μmol·L <sup>-1</sup>	TNF-α/μg·L <sup>-1</sup>
对照 Control	6.0 ± 2.0	36.0 ± 15.6
模型 Model	3.0 ± 1.7 *	56.5 ± 11.8
异黄酮 Isoflavone	10.6 ± 5.1 #	50.6 ± 6.7
皂甙 Saponin	8.3 ± 4.5 #	50.5 ± 7.9

3 讨论

DEN 诱发肝癌前病变过程中,γ-GT 是肝癌前病变的标志之一,而 AST 和 ALT 则反映肝脏功能状况<sup>[6]</sup>。该实验结果显示,与对照组相比化学致癌初期模型组和给药组 γ-GT、ALT 和 AST 均有所上升,肝脏都存在不同程度的损伤和病变,但与模型组相比大豆异黄酮和皂甙治疗可明显降低这些酶活性,对肝脏癌前病变具有一定保护作用。SOD, GSH-

PX, GST 是体内清除自由基的酶类, 它们与体内其它酶类及抗氧化剂组成一个自由基的防御系统, 以清除体内过多的自由基。而 MDA 是脂质过氧化物的主要分解产物, 其含量常常反映组织脂质过氧化程度, 也间接反映组织受自由基攻击的严重程度<sup>[5-6]</sup>。该实验结果表明, 肝脏发生癌前病变时, 大鼠肝脏抗氧化酶活性下降, 肝组织脂质过氧化严重。这一结果与文献报道的结果基本相符<sup>[5,7]</sup>。大豆异黄酮和皂甙使上述肝抗氧化酶活性回升至接近正常水平, 并降低肝组织脂质过氧化水平, 说明大豆异黄酮和皂甙可通过清除自由基起到抗化学致癌作用。丰平等<sup>[8]</sup>报道 DEN 引起肝癌前病变大鼠肝脏线粒体结构异常改变, 引起线粒体内膜损伤, 进而破坏内膜调节机制。此效应与肝脏抗氧化活性和组织脂质过氧化程度的关系还有待于进一步研究。此外, NO 和肿瘤坏死因子等炎性成分对肿瘤的生长具有双重作用<sup>[6,9]</sup>。该试验所测的 2 种炎症介质在大鼠肝脏化学致癌初期的变化规律不完全一致。在大鼠肝脏化学致癌初期血清 NO 含量明显减少, 而大豆异黄酮和皂甙将其降至接近正常水平。相反, 该实验中模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$  较对照组有增高趋势, 但组间差异均不具统计学意义。研究表明某些中药具有的抗肿瘤以及增强免疫力作用与其能诱生 TNF 有关<sup>[10]</sup>。因此, 大豆异黄酮和皂甙对肝癌前病变大鼠肿瘤免疫的影响需进一步研究。总之, 大豆异黄酮和皂甙可增高肝脏抗氧化酶活性, 并具有一定的抗化学致癌作用。

## 参考文献

- [1] Quan J S, Yin X Z, Kanazawa T. Effect of soybean hypocotyl extract on lipid peroxidation in GK rats[J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2009, 44(3): 212-217.
- [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] 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.)
- [4] 全吉淑, 尹学哲, 工藤重光. 大豆胚轴中大皂甙的提取及其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(10): 4-6. (Quan J S, Yin X Z, Kudou S. Isolation and purification of soyasaponins from soybean hypocotyl[J]. Food Research and Development, 2006, 27(10): 4-6.)
- [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] 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.)
- [8] 丰平, 刘树红, 李霞, 等. 榭芪散对肝癌前病变大鼠肝脏线粒体结构的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(1): 56-57. (Feng P, Liu S H, Li X, et al. Effects of Huqisan on chondriosome structure in hepatic precancerosis of rats[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2008, 24(1): 56-57.)
- [9] Sagar S M, Singh G, Hodson D I, et al. Nitric oxide and anti-cancer therapy[J]. Cancer Treatment Reviews, 1995, 21: 159-181.
- [10] 肖顺汉, 刘明华, 钟琳, 等. 克癌新对荷瘤小鼠 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 82-86. (Xiao S H, Liu M H, Zhong L, et al. Effects of Keaixin on the level of IL-2, IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$  in tumor-bearing mice[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2008, 24(2): 82-86.)