

大豆异黄酮对过氧化氢诱导的肝细胞损伤的保护作用

尹学哲¹, 金延华¹, 何鑫², 金海南², 全吉淑²

(1. 延边大学附属医院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学 医学院, 吉林 延吉 133000)

摘要: 为探索大豆异黄酮对过氧化氢(H_2O_2)致肝细胞损伤的保护作用, 以 H_2O_2 损伤 Chang Liver 细胞建立肝细胞氧化应激损伤模型, 并以 10、20 和 40 $mg \cdot L^{-1}$ 大豆异黄酮进行干预。采用四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测肝细胞存活率; 以微板法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性和肝细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性, 以及肝细胞还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量; 采用蛋白印迹技术检测肝细胞核因子-E2 相关因子 2(Nrf2)蛋白含量。在 10 ~ 40 $mg \cdot L^{-1}$ 范围内, 大豆异黄酮对 Chang Liver 细胞不显示细胞毒作用。300 $\mu mol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 刺激后, 模型组肝细胞存活率与正常组比较下降, 细胞外液中 ALT、AST、LDH 水平上升, 说明 Chang Liver 细胞损伤显著; 而模型组肝细胞中 SOD 和 GSH 水平与正常组比较下降, 丙二醛水平上升, 说明模型组 Chang Liver 细胞氧化应激增强。大豆异黄酮可剂量依赖性地提高 Chang Liver 细胞存活率, 降低 ALT、AST、LDH 向细胞外液的释放; 降低细胞 MDA 水平, 升高细胞 SOD 和 GSH 水平, 增高核中 Nrf2 蛋白水平。研究结果显示大豆异黄酮对 H_2O_2 致肝细胞氧化应激损伤具有保护作用。

关键词: 大豆异黄酮; H_2O_2 ; 氧化损伤; 肝细胞

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0687

Protective Effect of Soy Isoflavones on Oxidative Damage of Liver Cells Induced by Hydrogen Peroxide

YIN Xue-zhe¹, JIN Yan-hua¹, HE Xin², JIN Hai-nan², QUAN Ji-shu²

(1. Yanbian University Hospital, Yanji 133002, China; 2. Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract: The protective effect of soy isoflavones on oxidative damage induced by hydrogen peroxide(H_2O_2) in liver cells was investigated. Chang Liver cells were exposed to H_2O_2 and used as the model of oxidative damage. Then the antagonist effect of soy isoflavones was detected by pretreatment with 10, 20 and 40 $mg \cdot L^{-1}$ of soy isoflavones prior to H_2O_2 challenge. Cell viability was evaluated with MTT assay. The activities of LDH, ALT, AST in culture fluid, and levels of superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) of liver cells were measured by the microplate technique. The protein expression of nuclear factor erythroid2-related factor 2 (Nrf2) was determined with the immunoblotting technique. The results showed that 300 $\mu mol \cdot L^{-1}$ H_2O_2 inhibited cell viabilities, elevated the leakage of LDH, ALT and AST to culture fluid, reduced the levels of SOD and GSH, and increased MDA content in Chang Liver cells. Soy isoflavones did not exert a toxic effect on Chang Liver cells at the concentrations of 10–40 $mg \cdot L^{-1}$, while H_2O_2 increased oxidative stress and decreased the cell viability. Compared with the model group, cell viabilities of soy isoflavone group increased in a dose-dependent manner. Soy isoflavones also reduced the leakage of LDH, ALT and AST to culture fluid, reduced MDA content, and increased the levels of SOD and GSH. The administration with soy isoflavones up-regulated the protein expression of Nrf2. Taken together, soy isoflavones have the protective effect on cellular oxidative damage induced by H_2O_2 in liver cells.

Keywords: Soy isoflavones; H_2O_2 ; Oxidative damage; Liver cells

大豆异黄酮主要存在于大豆胚轴中, 具有多种生物学活性, 对代谢性疾病、心血管疾病及改善妇女更年期综合征等有预防效果^[1-2]。近年来的研究还表明, 大豆异黄酮可用于肝病的预防, 对乙醇和其它化学因素引起的肝损伤均具有保护作用^[2-5]。但是, 目前其保肝作用研究的试验对象主要采用试验动物, 研究大多局限于肝脏整体器官的抗氧化作用^[2-4], 或以肝星状细胞为研究对象^[5], 未能反映

肝实质细胞的客观变化。氧化应激损伤是细胞暴露于活性氧而引起的细胞损伤, 是各种肝脏疾病发生发展过程中共同的病理生理基础^[6-9]。而过氧化氢(H_2O_2)是一种常见活性氧极易透过细胞膜对细胞造成损伤。在 H_2O_2 刺激下, 细胞内氧化应激水平升高, 细胞DNA继而受到损伤, 相关基因的表达发生改变, 进一步导致细胞内蛋白质的损伤, 最终可造成细胞死亡。但刺激适宜时, 在保护剂作用下,

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(81160539)。

第一作者简介: 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。

通讯作者: 全吉淑(1968-), 女, 博士, 教授, 主要从事中药药理学研究。E-mail: quanjs@ybu.edu.cn。

这种损伤是可逆的,有可能被修复。因此,常用于体外细胞氧化应激损伤的制备和保护剂的筛选^[8-9]。Chang Liver 细胞是可传代的人正常肝实质细胞,因此,本研究选其为试验对象,建立 H₂O₂ 氧化应激损伤模型,观察大豆异黄酮对肝细胞氧化损伤的保护作用,并探讨其机制是否通过调控核因子- κ B 相关因子 2 (Nrf2) 发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Chang Liver 细胞由延边大学药学院南极星教授惠赠。大豆异黄酮(ISO,纯度 $\geq 80\%$,华北制药股份有限公司);DMEM 高糖培养基(Gibco 公司);MTT(Sigma 公司产品);兔 Nrf2 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);乳酸脱氢酶(LDH)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成科技有限公司)。

3-30K 型离心机(Sigma 公司);RT-2100 型酶标仪(深圳雷杜公司);Trans-Blot 转印槽(美国 Bio-Rad 公司);UVP 凝胶成像分析仪(美国 UVP 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大豆异黄酮的水解 将购置的大豆异黄酮试样用盐酸酸解 4 h,水解产物经乙酸乙酯提取、减压蒸馏得大豆异黄酮甙元^[2]。用无血清培养液配成所需浓度,过滤除杂除菌备用。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率^[8] Chang Liver 细胞接种于 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清)中,置于 5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中 37℃ 常规培养和传代^[8]。取对数生长期细胞,以 5×10^4 个 \cdot mL⁻¹ 细胞密度接种于 96 孔板中,培养 24 h。加大豆异黄酮溶液使其终浓度分别为 10、20 和 40 mg \cdot L⁻¹。继续培养 24 h 后,MTT 法测定细胞存活率。以高于 90% 的细胞存活率为无毒基准确定药物的安全浓度。

细胞存活率(%) = 实验组/正常组 $\times 100$ 。

另取 Chang Liver 细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h 后分为正常组、模型组及 ISO 低、中、高剂量组(质量浓度分别为 10、20 和 40 mg \cdot L⁻¹)。模型组加入 H₂O₂ 使其浓度为 300 μ mol \cdot L⁻¹ 建立细胞氧化应激模型^[8];ISO 组中加入大豆异黄酮使其质量浓度达到相应值,2 h 后再加入 H₂O₂ 造模。损伤 12 h 后,每孔加入 20 μ L MTT 溶液,MTT 法测定细胞存活率。

1.2.3 细胞培养液中 LDH、ALT、AST 活性的检测 按 1.2.2 方法进行分组和造模细胞,检测培养液中 LDH、ALT 和 AST 活性。

1.2.4 细胞 MDA、GSH 含量和 SOD 活性的测定 按 1.2.2 方法进行分组、造模和裂解细胞,检测细胞中 MDA 水平、GSH 含量和 SOD 活性。

1.2.5 蛋白印迹法检测细胞 Nrf2 蛋白水平 常规消化和收集细胞,并提取总蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转移至 PVDF 膜上。封闭后,一抗孵育过夜,再用二抗体偶联物孵育,ECL 显迹,在 UVP 凝胶成像分析仪中采集图像并进行灰度比值分析。

1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 6$, $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮的安全浓度范围

用 10、20 和 40 mg \cdot L⁻¹ 大豆异黄酮作用于 Chang Liver 细胞时,其细胞存活率分别为(95.1 \pm 6.3)%、(94.2 \pm 9.7)%和(90.6 \pm 10.3)%,均大于 90%,不显示细胞毒作用。

2.2 大豆异黄酮对肝细胞存活率的影响

H₂O₂ 损伤 12 h 后,模型组的细胞存活率与正常组比较显著降低,降为 45.2% ($P < 0.05$);经大豆异黄酮干预后,ISO 低、中、高剂量组的细胞存活率分别增高至 64.9%、72.5% 和 74.6% ($P < 0.05$)。说明大豆异黄酮干预能降低 H₂O₂ 所致的肝细胞氧化损伤。

2.3 大豆异黄酮对 LDH、ALT、AST 释放的影响

如表 1 所示,H₂O₂ 损伤 12 h 后,模型组培养液 LDH、ALT、AST 活性较正常组升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,ISO 各剂量组培养液 LDH、ALT、AST 活性降低 ($P < 0.05$)。说明大豆异黄酮干预能有效降低细胞损伤。

2.4 大豆异黄酮对肝细胞 MDA、GSH 含量和 SOD 活性的影响

如表 2 所示,H₂O₂ 损伤 12 h 后,模型组细胞 MDA 水平较正常组升高 ($P < 0.05$),而 GSH 和 SOD 水平下降 ($P < 0.05$);与模型组相比,ISO 各剂量组 MDA 含量降低 ($P < 0.05$),GSH 含量和 SOD 活性均升高 ($P < 0.05$)。表明,大豆异黄酮组的细胞氧化应激降低,抗氧化活力增高。

表 1 大豆异黄酮对培养液中 ALT、AST 和 LDH 释放的影响
Table 1 Effect of soy isoflavones on the releases of ALT ,AST and LDH(U·L⁻¹)

组别 Group	ALT	AST	LDH
正常 Control	8.7 ± 1.7	14.5 ± 2.0	159.2 ± 13.4
模型 Model	20.5 ± 2.6 [#]	35.4 ± 5.1 [#]	601.5 ± 24.8 [#]
ISO 低剂量 Low-dose ISO	17.6 ± 2.0 [*]	21.9 ± 4.6 [*]	512.6 ± 48.5 [*]
ISO 中剂量 Medium-dose ISO	15.3 ± 1.8 [*]	18.7 ± 4.3 [*]	439.0 ± 25.3 [*]
ISO 高剂量 High-dose ISO	10.3 ± 1.5 [*]	17.9 ± 5.7 [*]	401.5 ± 28.4 [*]

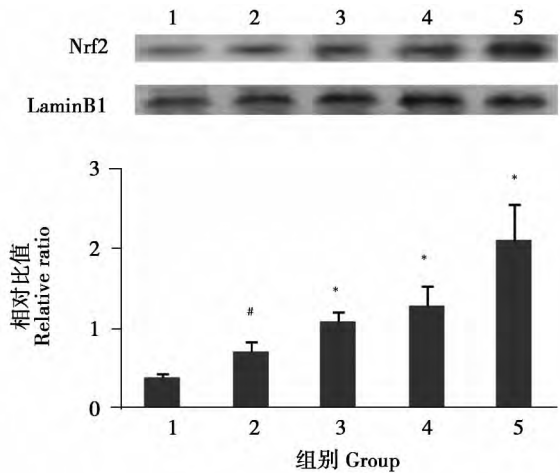
#: 与正常组比较 $P < 0.05$; *: 与模型组比较 $P < 0.05$ 。下同。
#: Compared with control group $P < 0.05$; *: Compared with model group $P < 0.05$. The same below.

表 2 大豆异黄酮对细胞 GSH、MDA 含量和 SOD 活性的影响
Table 2 Effect of soy isoflavones on the levels of SOD ,GSH and MDA

组别 Group	MDA /nmol·g ⁻¹	GSH /mg·g ⁻¹	SOD /U·g ⁻¹
正常 Control	5.1 ± 0.9	9.9 ± 1.3	219.1 ± 14.9
模型 Model	8.6 ± 1.0 [#]	4.6 ± 1.0 [#]	103.1 ± 16.3 [#]
ISO 低剂量 Low-dose ISO	6.1 ± 0.8 [*]	6.2 ± 1.1 [*]	171.0 ± 20.1 [*]
ISO 中剂量 Medium-dose ISO	5.5 ± 0.7 [*]	7.3 ± 0.6 [*]	178.6 ± 27.3 [*]
ISO 高剂量 High-dose ISO	5.3 ± 1.0 [*]	8.4 ± 1.2 [*]	196.7 ± 38.9 [*]

2.5 大豆异黄酮对肝细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

如图 1 所示 ,H₂O₂ 损伤 12 h 后 模型组细胞核 Nrf2 蛋白水平与正常组相比显著增高($P < 0.05$); 而大豆异黄酮处理进一步增强 Nrf2 蛋白的核转移 ($P < 0.05$) 。



1: 正常组; 2: 模型组; 3: ISO 低剂量组; 4: ISO 中剂量组; 5: ISO高剂量组; #: 与正常组比较 , $P < 0.05$; *: 与模型组比较 , $P < 0.05$ 。

1: Control group; 2: Model group; 3: Low-dose ISO; 4: Medi-um-dose ISO; 5: High-dose ISO; #: Compared with control group , $P < 0.05$; *: Compared with model group , $P < 0.05$.

图 1 大豆异黄酮对细胞核 Nrf2 蛋白水平的影响
Fig. 1 Effect of soy isoflavones on the nuclear level of Nrf2 protein

3 结论与讨论

H₂O₂ 诱导的肝细胞损伤中氧化应激是其重要损伤机制^[8]。当肝细胞受到氧化应激时 ,细胞内生成的活性自由基会引发细胞膜的脂质过氧化 ,使细胞膜结构和功能发生改变 ,导致细胞可逆或不可逆的损伤甚至死亡。ALT、AST、LDH 是肝细胞胞内酶 ,且含量丰富 ,当受损肝细胞膜破裂或通透性增强时 ,这些胞内酶会释放到细胞外 ,因此常作为衡量肝细胞毒作用大小的有效指标^[8-9]。同时 ,肝细胞氧化应激损伤发生时 ,为了平衡细胞内氧化还原状态 ,细胞将大量损耗细胞内抗氧化剂和抗氧化酶 ,造成细胞内脂质过氧化物不能及时有效清除 ,导致细胞膜脂质过氧化反应的终产物 MDA 的增高^[6-9]。SOD 是细胞内重要抗氧化酶 ,可保护细胞结构和功能的完整 ,而 GSH 是细胞内源性巯基抗氧化剂 ,能有效防止脂质过氧化 ,从而减轻氧化应激损伤^[8-9]。因此 ,常用于描述氧化应激损伤模型的功能。本研究表明: H₂O₂ 可降低肝细胞存活率 ,增高细胞培养液中 ALT、AST 和 LDH 活力 ,升高细胞 MDA 含量和降低 SOD 和 GSH 水平; 而大豆异黄酮处理能提高细胞存活率 ,降低 LDH、ALT 和 AST 向细胞外的释放 ,降低细胞 MDA 水平 ,增高细胞 SOD 和 GSH 水平 ,对肝细胞氧化应激损伤具有保护作用。

Nrf2 是细胞抵抗氧化应激或亲电子剂应激伤害的关键调控机制^[10]。细胞处于氧化应激条件下, Nrf2 及其介导的下游抗氧化基因在维持细胞氧化还原内环境稳定中起着重要的作用^[10]。本研究表明: 氧化应激发生时核中 Nrf2 增高; 而大豆异黄酮可使核中 Nrf2 进一步增高。提示大豆异黄酮可调控 Nrf2 的核转移, 使其介导的抗氧化系统被激活, 从而降低细胞氧化应激状态。

综上所述, 大豆异黄酮对 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤具有保护作用, 此作用可能与其增强 Nrf2 核转移有关。

参考文献

- [1] 陶利, 李禾. 大豆异黄酮的药理作用[J]. 解放军药学报, 2011, 27(4): 360-362. (Tao L, Li H. Pharmacological action of soybean isoflavone [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2011, 27(4): 360-362.)
- [2] 尹学哲, 赵文玺, 金爱花, 等. 大豆异黄酮对四氯化碳致小鼠肝脏氧化应激和 DNA 损伤的干预作用[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 214-218. (Yin X Z, Zhao W X, Jin A H, et al. Intervention effect of soy isoflavones on hepatic oxidative stress and dna damage induced by carbon tetrachloride in mice [J]. Food Science, 2014, 35(1): 214-218.)
- [3] 王力, 刘辉, 张梦媛, 等. 三羟异黄酮对全氟辛酸暴露的小鼠肝脏抗氧化能力的影响[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 937-940. (Wang L, Liu H, Zhang M Y, et al. Effects of genistein on relevant enzyme activity in liver of mice exposed to perfluorooctanoic acid [J]. Soybean Science, 2014, 33(6): 937-940.)
- [4] Li J F, Chen B C, Lai D D, et al. Soy isoflavone delay the progression of hepatic fibrosis in thioacetamide-induced model in rats [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2011, 46(3): 341-349.
- [5] 赵育芳, 张永生, 徐珊, 等. 大豆异黄酮对实验性肝纤维化大鼠肝星状细胞活化的影响[J]. 营养学报, 2010, 32(3): 295-296. (Zhao Y F, Zhang Y S, Xu S, et al. The inhibitory effect of soybean isoflavones on activation of hepatic stellate cell in experimental hepatic fibrosis rats [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2010, 32(3): 295-296.)
- [6] 李健, 韩林, 马玉芳, 等. 黄芪 3 种成分对 Chang Liver 细胞氧化应激的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 318-323. (Li J, Han L, Ma Y F, et al. Inhibiting effects of three components of *Astragalus membranaceus* on oxidative stress in Chang Liver cells [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(2): 318-323.)
- [7] 高健美, 陆国辉, 李艳茹, 等. 天麻素通过 SIRT1/PGC-1 α 信号通路抗叔丁基过氧化氢诱导的 HL7702 细胞氧化损伤[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4): 32-35. (Gao J M, Lu G H, Li Y R, et al. Effects of gastrodin against tert-butyl hydroperoxide-induced injury in HL7702 cells via SIRT1/PGC-1 α pathway [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2014, 30(4): 32-35.)
- [8] 尹学哲, 王玉娇, 尹基峰, 等. 草苁蓉提取物对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 173-178. (Yin X Z, Wang Y J, Yin J F, et al. Protective effects of *Boschniakia rossica* extract on HepG2 cells with oxidative damage [J]. Food Science, 2015, 36(15): 173-178.)
- [9] 金明, 王玉娇, 金梅花, 等. 两种细胞建立肝细胞氧化损伤模型比较[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 324-326. (Jin M, Wang Y J, Jin M H, et al. Comparative study of liver cell models with oxidative damage using two cell lines [J]. Chinese Journal of Public Health, 2015, 31(3): 324-326.)
- [10] 张婷. 抗氧化基因在大豆异黄酮抑制内皮细胞氧化应激损伤中的作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2012. (Zhang T. Mechanisms of activation of antioxidant genes in soy isoflavone-mediated attenuation in oxidative stress-induced cell injury in EA.hy 926 cells [D]. Chongqing: The Third Military Medical University, 2012.)

黑龙江省启动 2015 年度大豆目标价格补贴资金发放

经省政府批准, 省物价监督管理局、省财政厅、省统计局联合下发了《关于做好 2015 年度大豆目标价格补贴资金发放工作的通知》, 标志着我省 2015 年度大豆目标价格补贴资金发放工作正式启动。

《通知》明确 2015 年度我省大豆目标价格补贴标准为每亩 130.87 元。此标准既是省对市(地)、县(市、区)、单位拨付大豆目标价格补贴资金的标准, 也是市县向大豆合法实际种植面积的实际种植者兑付补贴资金的标准, 任何地方和单位都不得降低补贴标准。

《通知》要求, 各市县在接到省级财政拨付的补贴资金后 15 日内, 根据同级统计部门提供的补贴对象, 大豆合法实际种植面积和全省统一补贴标准计算补贴额, 通过粮食补贴“一折(卡)通”将补贴资金足额兑付给补贴对象。

《通知》强调, 大豆目标价格补贴发放工作是大豆目标价格改革试点工作的关键一环。各市县要严格按照大豆合法实际种植面积发放补贴, 任何地方和单位都不得擅自变更补贴标准, 也不得变相降低补贴标准, 禁止集体代领“一折通”“一卡通”或补贴资金, 禁止用补贴资金抵扣相关费用, 确保把补贴资金及时足额发放到农民手中。各市县要设立监督电话, 及时了解和处理群众反映的问题, 对于弄虚作假、挤占、截留、挪用和套取补贴资金的单位和个人将严肃问责, 并按有关规定严肃处理。

转自黑龙江人民政府网 <http://www.hlj.gov.cn>