



# 大豆异黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 L02 细胞损伤的保护作用

郑 峰<sup>1,2</sup>, 金芳多<sup>1</sup>, 金梅花<sup>1</sup>, 张 天<sup>1</sup>, 崔香丹<sup>2</sup>, 尹学哲<sup>2</sup>, 全吉淑<sup>1</sup>

(1. 延边大学 医学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学附属医院, 吉林 延吉 133000)

**摘 要:**为探究大豆异黄酮(soy isoflavones, ISOF)对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的 L02 细胞损伤的保护作用,使用 ISOF 对 L02 对数生长期细胞进行预保护,再用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞氧化损伤,建立细胞损伤模型。采用 CCK-8 法检测 L02 细胞存活率,采用微板法测定 L02 细胞培养液中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)活性以及细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)含量,采用羟胺法测定细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性,采用硫代巴比妥酸(TBA)法检测细胞丙二醛(MDA)水平。结果显示:300 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 L02 细胞 2 h 能够使 L02 细胞存活率降低 51%,并显著增高 L02 细胞 LDH 向细胞培养液的漏出,说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理已造成 L02 细胞的损伤。ISOF 在质量浓度 10~40 mg·L<sup>-1</sup> 时,对 L02 细胞无细胞毒作用,是安全的。安全剂量 ISOF 预处理能够改变 L02 细胞的上述损伤指标,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较,40 mg·L<sup>-1</sup> ISOF 组 L02 细胞存活率增高 28.9% ( $P<0.05$ ),LDH、ALT 和 AST 漏出率分别降低 91.4%、91.7% 和 74.1%,细胞 MDA 生成量降低 118.5%,GSH 含量和 SOD 活性分别增高 184.4% 和 76.2%。结果表明 ISOF 能保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞氧化损伤。

**关键词:**大豆;异黄酮;L02;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;保护作用

## Protective Effect of Soy Isoflavones on Injury of L02 Cells Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ZHENG Feng<sup>1,2</sup>, JIN Fang-duo<sup>1</sup>, JIN Mei-hua<sup>1</sup>, ZHANG Tian<sup>1</sup>, CUI Xiang-dan<sup>2</sup>, YIN Xue-zhe<sup>2</sup>, QUAN Ji-shu<sup>1</sup>

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

**Abstract:** In order to detect the protective effect of soy isoflavones (ISOF) on injury of L02 cells induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), this study established the cellular injury model after the L02 cells were pretreatment with ISOF and induced with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The cell viability was investigated with cell counting kit-8 (CCK-8) assay, the medium activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), and the cellular reduced glutathione (GSH) were tested with the microplate method, superoxide dismutase (SOD) activity was assayed with hydroxylamine method, the malondialdehyde (MDA) content was tested with the thibabaturic acid (TBA) method. The results showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased the viability of L02 cells by 51%, and elevated the LDH leakage to culture medium, indicative of the establishment of oxidative injury model of L02 cells. ISOF had no cytotoxicity within the scope of the concentration of 10–40 mg·L<sup>-1</sup>. However, pretreatment with ISOF could alleviate the above-mentioned damage indicators of L02 cells. Compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury group, the cell viability of L02 was increased by 28.9% ( $P<0.05$ ), the leakage of LDH, ALT, AST was reduced by 91.7%, 91.7% and 74.1%, respectively, the cellular MDA was decreased by 118.5%, and the cellular GSH and SOD were increased by 184.4% and 76.2% respectively in the 40 mg·L<sup>-1</sup> ISOF group. It is suggested that ISOF could protect L02 cells from oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Keywords:** Soybean; Isoflavones; L02; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Protective effect

随着肝脏疾病发病率的逐年上升,肝脏疾病已成为严重危害公民健康的公共卫生问题之一<sup>[1]</sup>。而氧化应激是肝细胞发生损伤的重要因素,是肝损伤、脂肪肝、肝纤维化及肝癌等多种肝脏疾病发生的病理基础之一<sup>[1-2]</sup>。当细胞内氧自由基产生过多

或清除缓慢时,肝细胞则处于过量活性氧引发的氧化应激环境中,容易造成细胞膜脂质以及细胞内核酸、蛋白质等重要成分的氧化损伤,使肝细胞结构和功能发生改变,会诱发细胞损伤或异常凋亡,最终导致炎症及肿瘤等疾病的发生和发展<sup>[3-4]</sup>。L02

收稿日期:2020-01-18

基金项目:国家自然科学基金(81760659,81360651)。

第一作者简介:郑峰(1986-),男,博士,主要从事分子药理学研究。E-mail: zhengfeng008@126.com。

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。

细胞系是组织学来源为人正常肝组织且能连续传代的永生化肝细胞,其生长规律、生物学功能与正常肝细胞较为接近,因此常用来构建体外评价肝脏毒性的细胞模型<sup>[5-7]</sup>。大豆异黄酮(soy isoflavones, ISOF)是大豆的重要生物活性物质,主要存在于大豆胚芽中<sup>[8]</sup>。它具有较强的抗氧化活性,且与抗肿瘤、抗心血管疾病、抗病毒、抗炎和免疫调节等药理作用相关<sup>[8-10]</sup>。而清除活性氧自由基是 ISOF 发挥抗氧化作用的主要方式<sup>[11]</sup>。前期研究表明,ISOF 能够体外抑制  $H_2O_2$  诱发的肝组织脂质过氧化,保护  $H_2O_2$  致张氏肝细胞的氧化应激损伤<sup>[12-13]</sup>。大豆异黄酮能否保护 L02 正常肝细胞的氧化损伤尚未见报道。因此,本研究建立了  $H_2O_2$  诱导 L02 细胞损伤模型,以细胞存活率及抗氧化能力为指标,探究 ISOF 对 L02 细胞氧化损伤的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆异黄酮糖苷试样(含大豆苷 45.9%、黄豆苷 21.0%、染料木苷 13.4%、大豆苷元 0.96%、黄豆苷元 0.05%、染料木素 0.02%,纯度 $\geq 80\%$ )(华北制药股份有限公司);N-乙酰半胱氨酸(NAC)(北京索莱宝科技有限公司);L02 细胞株(南京凯基生物科技发展有限公司);DMEM 高糖培养基、胎牛血清(以色列 BioInd 公司);细胞计数盒-8(CCK-8)(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);谷丙转氨酶(ALT)测试盒、谷草转氨酶(AST)测试盒、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(南京建成生物科技有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、还原型谷胱甘肽(GSH)测试盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 主要仪器与设备

SL2123-2 型二氧化碳培养箱(美国 Shellab 公司);RT-6000 型酶标分析仪(深圳 Rayto 公司);FS-600N 型超声波处理器/细胞粉碎机(上海生析超声仪器有限公司);5418R 小型高速台式离心机(德国 Eppendorf 公司)。

### 1.3 试验设计

建立 L02 细胞损伤模型,并进行 ISOF 终浓度梯度试验。设置空白组、损伤组(模型组)、NAC 组(阳性对照组)及 ISOF 高、中、低剂量组。研究 ISOF 对 L02 细胞增殖的影响、ISOF 对  $H_2O_2$  诱导 L02 细胞损伤的影响,以探究 ISOF 对 L02 细胞损伤的保护作

用。研究 ISOF 对  $H_2O_2$  诱导 L02 细胞 MDA、SOD、GSH 水平的影响,以评价 ISOF 对 L02 细胞抗氧化能力的影响。每组样本做 6 个复孔,3 次重复。

### 1.4 方法

1.4.1 ISOF 的制备 将大豆异黄酮糖苷试样用盐酸回流煮沸 4 h,生成的大豆异黄酮苷元产物经乙酸乙酯萃取、减压蒸馏得大豆异黄酮苷元试样,分别含大豆苷元 56.5%、黄豆苷元 25.7%、染料木素 15.9%<sup>[13-15]</sup>,将其配成无菌溶液备用。

1.4.2 L02 细胞的培养及传代 将 L02 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 抗生素的 DMEM 高糖培养基,于  $CO_2$  体积分数为 5%、饱和湿度条件下,在 37 °C 培养箱中进行常规培养<sup>[16]</sup>。待 L02 细胞汇合度约达到 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化并进行传代<sup>[16]</sup>。取对数生长期 L02 细胞进行后续的试验。

1.4.3  $H_2O_2$  诱导 L02 细胞损伤模型的建立 将 L02 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,每孔接种密度为  $1 \times 10^5$  个 $\cdot mL^{-1}$ 。培养 24 h 使细胞贴壁后,换成含 75,150,300,600 和 1 200  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  的细胞培养液,继续培养 12 h。用 CCK-8 检测 L02 细胞存活率,用 LDH 测试盒检测培养液 LDH 活性<sup>[16]</sup>,其中,细胞存活率(%) =  $OD_{\text{试验组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100$ 。 $H_2O_2$  浓度选定后,观察  $H_2O_2$  作用时间对细胞存活率和培养液 LDH 活性的影响,并选定不同指标的测定时间。

1.4.4 ISOF 对 L02 细胞增殖的影响 将 L02 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,培养 24 h 使细胞贴壁。换成含 ISOF 的细胞培养液,使 ISOF 终浓度分别为 10,20,40 和 80  $mg \cdot L^{-1}$ ,继续培养 12 h。用 CCK-8 检测 L02 细胞存活率,用 LDH 测试盒检测培养液 LDH 活性<sup>[16]</sup>。以细胞存活率 $\geq 90\%$ 、细胞培养液 LDH 活性的增高 $\leq 20\%$ 为基准确定 ISOF 无毒安全剂量<sup>[17-18]</sup>。

1.4.5 ISOF 对  $H_2O_2$  诱导 L02 细胞损伤的影响 取 L02 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,培养 24 h 待细胞贴壁。设置空白组、损伤组(模型组)、NAC 组(阳性对照组)及 ISOF 高、中、低剂量组。损伤组 L02 细胞继续培养 12 h 后,加  $H_2O_2$  使其浓度为 300  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ,继续培养 2 h 以建立损伤模型;NAC 组 L02 细胞用 10  $mmol \cdot L^{-1}$  NAC 处理 12 h 后,再用 300  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  损伤 2 h;ISOF 高、中、低剂量组 L02 细胞分别用 40,20 和 10  $mg \cdot L^{-1}$  ISOF 处理 12 h 后,再用 300  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$  损伤 2 h。用 CCK-8 检

测 L02 细胞存活率,用 LDH 试剂盒、ALT 试剂盒、AST 试剂盒分别检测培养液 LDH、ALT、AST 活性<sup>[17-18]</sup>。

1.4.6 ISOF 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞 MDA、SOD、GSH 水平的影响 将 L02 细胞接种于 6 孔细胞培养板中。收集并裂解细胞,用 MDA 试剂盒、SOD 试剂盒、GSH 试剂盒分别检测细胞 MDA、GSH 含量和 SOD 活性<sup>[17-18]</sup>。

1.5 数据分析

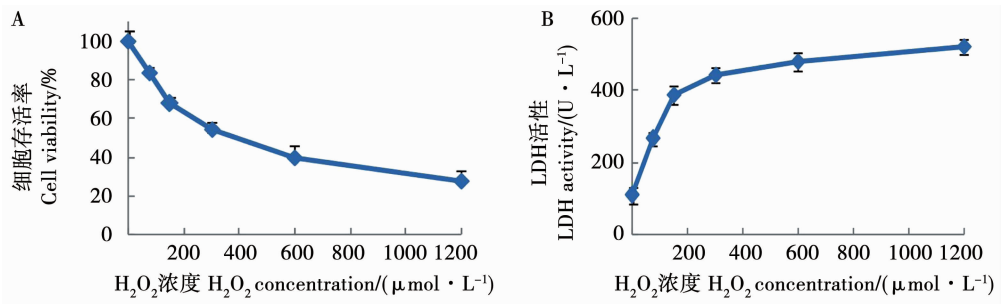
用 SAS 9.0 软件对数据进行处理,采用单因素方差分析( $P < 0.05$ )进行差异分析,结果以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

2 结果与分析

2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度及作用时间对 L02 细胞活力及培养液中 LDH 漏出的影响

用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 L02 细胞后,L02 细胞存活率及培养液上清 LDH 活性的变化如图 1 和 2 所示。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够显著降低 L02 细胞存活率( $P < 0.05$ ),并增高细胞培养液中 LDH 活性( $P < 0.05$ ),与 Wang

等<sup>[6,19-20]</sup>研究有相同规律,说明肝细胞损伤模型已成功建立。当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度小于 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞存活率及培养液 LDH 活性分别与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度呈线性关系( $R^2$  分别为 1.000 和 0.995);H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度大于 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,细胞存活率及培养液 LDH 活性随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的变化趋势同上,但变化缓慢。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,L02 细胞存活率约为 54%,因此,后续研究中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度选定为 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时间  $< 1 \text{ h}$  时,细胞存活率及培养液 LDH 活性分别与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度呈线性关系( $R^2$  为 0.949 和 0.995);当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时间  $> 1 \text{ h}$  时,细胞存活率及培养液 LDH 活性随时间的变化趋势同上,但变化缓慢;作用时间  $> 4 \text{ h}$  时,变化大幅减小,接近零级反应(平台期)。当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、作用时间为 2 h 时,L02 细胞存活率约为 51%,接近半数抑制率,因此,后续的细胞活力及毒性检测条件选择为 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 2 h。结合前人研究<sup>[6,19-20]</sup>,细胞抗氧化活力、细胞凋亡及其相关蛋白表达检测条件选定为 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h<sup>[6,20-21]</sup>。



A:细胞存活率;B:培养液 LDH 活性。下同。  
A:Cell survival rate; B: LDH activity of culture medium. The same below.

图1 不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度下 L02 细胞活力及 LDH 漏出

Fig. 1 Viabilities and LDH leakage of L02 cells at different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

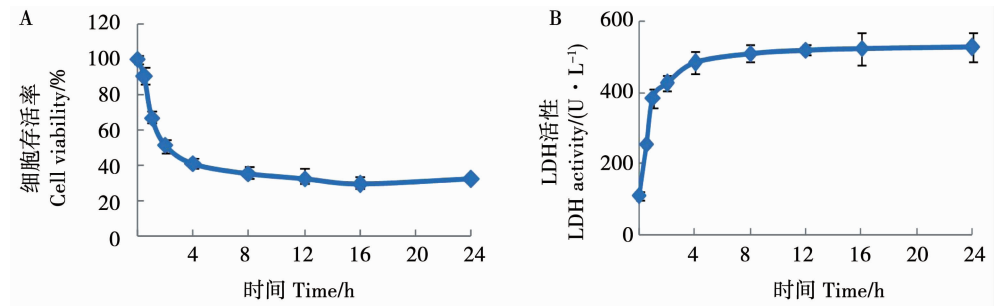


图2 不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时间下 L02 细胞活力及 LDH 漏出

Fig. 2 Viabilities and LDH leakage of L02 cells at different treatment time of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

2.2 ISOF 对 L02 细胞活力及培养液中 LDH 漏出的影响

为探究 ISOF 对 L02 细胞生长的影响,并找出无 L02 细胞毒作用的安全使用剂量,观察不同质量浓度 ISOF 处理 L02 细胞时细胞存活率及培养液中 LDH 活性的变化,结果如图 3 所示:ISOF 浓度为 10 ~ 40 mg · L<sup>-1</sup> 时,L02 细胞存活率 ≥ 90%,培养液中

LDH 活性的增高 ≤ 20%,对细胞生长的影响不显著,说明无显著细胞毒性;而当 ISOF 浓度 > 40 mg · L<sup>-1</sup> 时,L02 细胞存活率 < 90%,培养液 LDH 活性增高, > 20%,表明具有显著的细胞毒作用。因此,本研究选定 10,20 和 40 mg · L<sup>-1</sup> 为后续试验中 ISOF 干预的安全剂量。

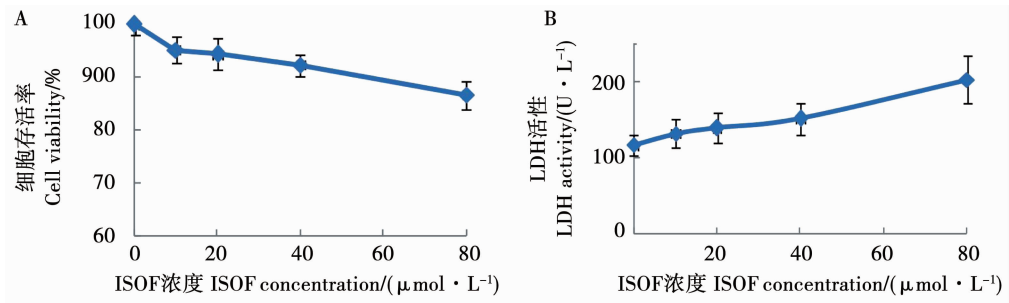


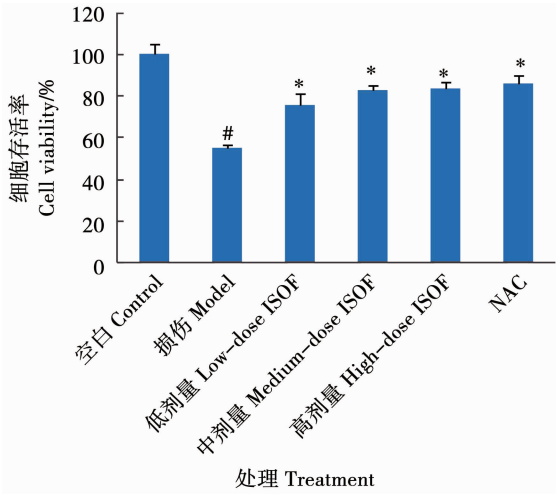
图 3 不同 ISOF 浓度下 L02 细胞活力及 LDH 漏出  
Fig. 3 Viabilities and LDH leakage of L02 cells at different concentration of ISOF

2.3 ISOF 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞活力的影响

由图 4 可知:ISOF 预处理显著增高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 L02 细胞存活率( $P < 0.05$ ),当 ISOF 浓度分别为 20 和 40 mg · L<sup>-1</sup> 时,L02 细胞存活率分别为 82.5% 和 83.6%,较损伤组分别增高 27.8% 和 28.9%,细胞保护作用相近,剂量效应不显著( $P > 0.05$ )。与 NAC 组比较,ISOF 组细胞存活率呈降低趋势,但差异无统计学意义。

2.4 ISOF 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞 LDH、ALT、AST 漏出的影响

如表 1 所示:ISOF 预处理显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞 LDH、ALT、AST 向培养液的漏出( $P < 0.05$ ),当 ISOF 浓度为 20 和 40 mg · L<sup>-1</sup> 时,培养液 LDH 活性分别下降 75.7% 和 91.4%,ALT 活性分别下降 83.3% 和 91.7%,而培养液 AST 活性分别下降 73.8% 和 74.1%,表明 ISOF 能够有效保护 L02 细胞膜的完整性,ISOF 高剂量组的保护作用稍优于中剂量组,与 NAC 组接近。



# : 与空白组相比,在  $P < 0.05$  水平存在显著差异;  
\* : 与损伤组相比,在  $P < 0.05$  水平存在显著差异。下同。  
# : There is significant difference at  $P < 0.05$  level compared with control group; \* : There is significant difference at  $P < 0.05$  level compared with model group. The same below.

图 4 不同处理组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞活力  
Fig. 4 Cell viabilities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced L02 cells in different groups

表 1 不同处理组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞 LDH、ALT、AST 漏出

Table 1 LDH, ALT, AST leakage of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced L02 cells in different groups (U · L <sup>-1</sup> )			
组别 Group	LDH	ALT	AST
空白 Control	104 ± 22	2. 6 ± 0. 4	2. 01 ± 0. 29
损伤组 Model	384 ± 25 <sup>#</sup>	6. 2 ± 0. 6 <sup>#</sup>	4. 64 ± 0. 43 <sup>#</sup>
ISOF 低剂量 Low-dose ISOF	206 ± 21 <sup>*</sup>	3. 7 ± 0. 5 <sup>*</sup>	2. 87 ± 0. 36 <sup>*</sup>
ISOF 中剂量 Medium-dose ISOF	172 ± 19 <sup>*</sup>	3. 2 ± 0. 4 <sup>*</sup>	2. 70 ± 0. 34 <sup>*</sup>
ISOF 高剂量 High-dose ISOF	128 ± 20 <sup>*</sup>	2. 9 ± 0. 4 <sup>*</sup>	2. 69 ± 0. 30 <sup>*</sup>
NAC	147 ± 24 <sup>*</sup>	3. 0 ± 0. 5 <sup>*</sup>	2. 71 ± 0. 33 <sup>*</sup>

2.5 ISOF 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞 MDA、SOD、GSH 水平的影响

如表 2 所示:ISOF 预处理显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞 MDA 生成量( $P<0.05$ ),显著升高 L02 细胞 GSH 含量和 SOD 活性。当 ISOF 浓度为 40 mg·L<sup>-1</sup>

时,L02 细胞 MDA 生成量降低 118.5%,GSH 含量和 SOD 活性分别增高 184.4%和 76.2%,表明 ISOF 能够有效增高 L02 细胞抗氧化能力,降低细胞氧化应激水平。从 MDA 指标来看,ISOF 组抗细胞氧化应激水平稍弱于 NAC 组。

表 2 不同处理组 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 L02 细胞 MDA、GSH 和 SOD 水平

Table 2 MDA, SOD and GSH levels in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced L02 cells in different groups			
组别 Group	MDA	GSH	SOD
	/(nmol·g <sup>-1</sup> prot)	/(mg·g <sup>-1</sup> prot)	/(U·g <sup>-1</sup> prot)
空白 Control	0.75 ± 0.22	9.7 ± 1.7	36.1 ± 2.9
损伤组 Model	1.56 ± 0.34 <sup>#</sup>	5.2 ± 1.0 <sup>#</sup>	23.1 ± 5.3 <sup>#</sup>
ISOF 低剂量 Low-dose ISOF	0.72 ± 0.17 <sup>*</sup>	8.3 ± 1.9 <sup>*</sup>	29.8 ± 2.1 <sup>*</sup>
ISOF 中剂量 Medium-dose ISOF	0.62 ± 0.16 <sup>*</sup>	11.4 ± 2.6 <sup>*</sup>	33.8 ± 3.0 <sup>*</sup>
ISOF 高剂量 High-dose ISOF	0.60 ± 0.18 <sup>*</sup>	13.5 ± 3.2 <sup>*</sup>	33.0 ± 2.0 <sup>*</sup>
NAC	0.45 ± 0.17 <sup>*</sup>	14.7 ± 2.6 <sup>*</sup>	34.8 ± 3.7 <sup>*</sup>

3 讨论

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝细胞损伤中氧化应激是其主要损伤机制之一,表现为肝细胞内生成过量氧自由基,最终造成肝细胞损伤甚至死亡<sup>[13,18,21]</sup>。随着肝细胞通透性发生变化或细胞完整性遭到破坏,损伤肝细胞内的重要胞内酶,如 LDH、ALT 和 AST,这些酶可释放到培养液中,造成其培养液上清中 LDH、ALT、AST 活性增高<sup>[18,22]</sup>。同时,肝细胞内生成的过量氧自由基,可引发细胞膜的脂质过氧化反应,导致细胞内 MDA 生成增多,SOD 等抗氧化酶活性以及内源性抗氧化剂——GSH 水平降低<sup>[34,18]</sup>。本研究通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞制备肝细胞氧化损伤模型,探讨了 ISOF 对 L02 细胞氧化损伤的保护作用。结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导能够降低 L02 细胞存活率,并增高 L02 细胞 LDH 向培养液的漏出,说明肝细胞损伤模型已成功建立,该结果与 Wang 等<sup>[6,19-20]</sup>研究结果相一致。

ISOF 在质量浓度 10 ~ 40 mg·L<sup>-1</sup>时,对 L02 细胞无细胞毒作用。但安全剂量 ISOF 预处理 L02 细胞后,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比较,L02 细胞存活率增高,LDH、ALT 和 AST 漏出率降低,细胞 MDA 生成量降低,GSH 含量和 SOD 活性增高。此研究结果与张氏肝细胞中的表现趋势相同,与体外肝匀浆研究结果也相吻合<sup>[12-13]</sup>。研究结果表明 ISOF 能够有效提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 L02 细胞的抗氧化能力,并能够有效保护 L02 细胞氧化损伤。

4 结论

ISOF 能够增高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 L02 细胞的增殖,降低 L02 细胞胞内酶释放,提高 L02 细胞抗氧化能力。提示 ISOF 能够有效保护 L02 细胞氧化损伤。

参考文献

[1] 韩延忠,周永峰,桑秀秀,等. 氧化苦参碱对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 细胞损伤的抑制作用及其机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1302-1307. (Han Y Z, Zhou Y F, Sang X X, et al. Protective effects of oxymatrine against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage in L02 cells[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(7): 1302-1307. )

[2] 王倩,王晓红,安晶晶,等. 番茄红素对人肝 L02 细胞氧化损伤的保护作用及其机制[J]. 卫生研究, 2018, 47(2): 281-285. (Wang Q, Wang X H, An J J, et al. Lycopene's protective effect on oxidative damage of L02 cells and its mechanism [J]. Journal of Hygiene Research, 2018, 47(2): 281-285. )

[3] 孔怡琳,李工,张玉佩,等. 白藜芦醇对过氧化氢诱导的 L02 肝细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 广东医学, 2017, 38(20): 3070-3073. (Sun Y L, Li G, Zhang Y P, et al. Protective effect of resveratrol on oxidative injury of L02 cells induced by hydrogen peroxide[J]. Guangdong Medical Journal, 2017, 38(20): 3070-3073. )

[4] 龚灵芝. 基于自由基的动物繁殖机能的损伤与修复机理及其调控技术研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009: 5. (Gong L Z. Study on injury and repair mechanisms of animal reproductive function and ragulative technology based on free radical [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2009: 5. )

[5] 叶秀珍,朱德厚,沈鼎武. 体外连续培养的成人肝细胞的超显微结构[J]. 实验生物学报, 1980, 13(4): 361-369. (Ye X

- Z, Zhu D H, Shen D W. Ultrastructure of continuously cultured adult human liver cell[J]. Acta Biologica Experimentalis Sinica, 1980, 13(4): 361-369. )
- [6] Wang C, Liao Y, Wang S, et al. Cytoprotective effects of diosmetin against hydrogen peroxide-induced L02 cell oxidative damage via activation of the Nrf2-ARE signaling pathway[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 7331-7338.
- [7] 吴刚, 闫歌, 巫国谊, 等. 内毒素体外诱导人肝细胞凋亡的研究[J]. 泸州医学院学报, 2004, 27(4): 289-291. (Wu G, Yan G, Wu G Y, et al. The study of lipopolysaccharide-induced apoptosis of human hepatocyte *in vitro* [J]. Journal of Luzhou Medical College, 2004, 27(4): 289-291. )
- [8] 贾乃堃. 大豆异黄酮的纯化工艺研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2004: 1-3. (Jia N K. The study on the purification process of soybean isoflavones[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2004:1-3. )
- [9] Uifălean A, Schneider S, Ionescu C, et al. Soy isoflavones and breast cancer cell lines: Molecular mechanisms and future perspectives[J]. Molecules, 2015, 21(1): E13.
- [10] Mace T A, Ware M B, King S A, et al. Soy isoflavones and their metabolites modulate cytokine-induced natural killer cell function [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 5068.
- [11] 刘科梅, 聂挺, 潘栋梁, 等. 4 种异黄酮抗氧化活性的构效关系[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 1-6. (Liu K M, Nie T, Pan D L, et al. Structure-activity relationship of four isoflavones for scavenging free radicals evaluated by quantum chemistry calculation[J]. Food Science, 2016, 37(23): 1-6. )
- [12] 陈丽艳, 李天, 刘淑萍, 等. 大豆异黄酮体外抗脂质过氧化活性的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 157-159. (Chen L Y, Li T, Liu S P, et al. Anti-lipid peroxidative effects of soybean isoflavones *in vitro* [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(9): 157-159. )
- [13] 尹学哲, 金延华, 何鑫, 等. 大豆异黄酮对过氧化氢诱导的肝细胞损伤的保护作用[J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 687-690. (Yin X Z, Jin Y H, He X, et al. Protective effect of soy isoflavones on oxidative damage of liver cells induced by hydrogen peroxide[J]. Soybean Science, 2016, 35(4): 687-690. )
- [14] Jin M, Shen M H, Jin M H, et al. Hypoglycemic property of soy isoflavones from hypocotyl in Goto-Kakizaki diabetic rats [J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2018, 62(2): 148-154.
- [15] 全吉淑, 尹学哲, 工藤重光. C18 柱层析法提取大豆胚轴中异黄酮苷元[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 136-138. (Quan J S, Yin X Z, Kudou S. Extraction of isoflavone aglycones from soybean hypocotyl with C18 column chromatography[J]. Food Science, 2004, 25(4): 136-138. )
- [16] 刘莉园. 草苈蓉多糖对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响及其机制[D]. 延吉: 延边大学, 2019: 6. (Liu L Y. Effect of *Boschniakia rossica* polysaccharides on LPS-induced inflammation of RAW264.7 macrophages[D]. Yanji: Yanbain University, 2019: 6. )
- [17] Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1 $\beta$  in mouse macrophage[J]. The Journal of Immunology, 2008, 180(11): 7147-7157.
- [18] 何鑫, 刘春彦, 尹基峰, 等. 祁州漏芦通过下调 JNK 和 NF- $\kappa$ B 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致肝细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1189-1193. (He X, Liu C Y, Yin J F, et al. *Rhaponticum uniflorum* inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of liver cells via JNK and NF- $\kappa$ B pathways[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(6): 1189-1193. )
- [19] Wang X, Cui YJ, Qi J, et al. Fucoxanthin exerts cytoprotective effects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in L02 cells[J]. BioMed Research International, 2018(16): 1-11.
- [20] Ma J, Li M, Kalavagunta P K, et al. Protective effects of cichoric acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury in hepatocytes and larval zebrafish models[J]. Biomedicine and pharmacotherapy, 2018, 104: 679-685.
- [21] 张欣, 赵新淮. 几种多酚化合物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 CCl<sub>4</sub> 诱导人肝细胞损伤的保护[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 262-266. (Zhang X, Zhao X H. Protective effects of some polyphenol compounds on human hepatocyte damages induced by hydrogen peroxide or carbon tetrachloride [J]. Food Science, 2009, 30(3): 262-266. )
- [22] 郭宇航, 黄仁彬, 蒋伟哲, 等. 牛磺酸对原代培养大鼠肝细胞的毒性作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(5): 392-394. (Guo Y H, Huang R B, Jiang W Z, et al. Taurine toxicity on rat hepatocytes in primary culture[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2007, 23(5): 392-394. )