

大豆异黄酮和皂甙对扑热息痛诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

尹学哲¹, 金明², 金延华¹, 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 133002)

摘要: 研究了大豆异黄酮和皂甙对扑热息痛(APAP)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用。将实验小鼠随机分为正常组、模型组、大豆异黄酮组、大豆皂甙组及联苯双酯组(阳性对照组)。每日给药1次,连续7d。实验末期,腹腔注射APAP建立急性肝损伤模型,比色法检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、白蛋白(ALB)以及肝脏诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、一氧化氮(NO)、过氧化脂质(LOOH)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量和过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结果表明,大豆异黄酮和皂甙显著降低APAP诱发的急性肝损伤小鼠血清ALT、AST和ALP活性,增高血清ALB水平,降低肝iNOS活性和NO水平,减少肝LOOH和MDA含量,升高肝组织CAT、GPx、SOD活性和GSH水平。提示,大豆异黄酮和皂甙对APAP诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与抗炎和抗氧化作用有关。

关键词: 大豆;异黄酮;皂甙;肝损伤;抗炎;抗氧化

中图分类号: S 565.1; Q 593.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)12—1266—04

Protective Effects of Soy Isoflavones and Saponins on Acute Liver Injury Induced by Acetaminophen in Mice

YIN Xue-zhe¹, JIN Ming², JIN Yan-hua¹, QUAN Ji-shu²

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

Abstract: The protective effect of soy isoflavones and saponins on acute liver injury induced by acetaminophen (APAP) in mice was investigated in this manuscript. The mice were randomly assigned to the normal control, model control, soy isoflavone, saponin and bifendate (positive control) groups. Animals were treated once daily for 7 days. APAP were given intraperitoneally to the mice of groups, then the alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), albumin (ALB), inducible nitric oxide synthase (iNOS), nitric oxide (NO), lipid hydroperoxide (LOOH), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), catalase (CAT), glutathione

收稿日期: 2013-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30360113; 81160539)。

作者简介: 尹学哲(1962—), 男, 朝鲜族, 吉林延吉人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中草药分子药理学研究。

E-mail: yinxz@ybu.edu.cn

peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) were detected by the colorimetric method. The administration with soy isoflavones and saponins could (1) reduced the serum ALT,AST and ALP; (2) increased the serum ALB level; (3) decreased hepatic iNOS activity and NO level, (4) decreased the hepatic LOOH and MDA contents, and (5) increased the CAT,GPx,SOD activities and GSH level of liver in mice with acute liver injury. Those results demonstrated that soy isoflavones and saponins have protective effects on acute liver injury induced by APAP in mice, probably via anti-inflammatory and anti-oxidative activities.

Keywords: soy, isoflavones, saponins, liver injury, anti-inflammatory, anti-oxidative

流行病学调查证实,常食大豆有助于预防癌症和心血管疾病的发生,而这些均与大豆中的异黄酮和皂甙等活性物质密切相关^[1]。大豆异黄酮和皂甙主要存在于大豆胚轴中,它们以其广泛的生物学活性,如增强机体免疫、抗氧化、抗癌和防治心血管疾病等作用日益受到关注^[1-5]。研究还表明,大豆异黄酮和皂甙以及二者为主要成分的大豆复合物对动物肝脏的脂质过氧化反应均具有明显抑制作用,并对多种毒素引起的肝损伤和肝纤维化具有保护作用^[3-5]。本实验通过扑热息痛(APAP)诱导的小鼠免疫性肝损伤模型,观察大豆异黄酮和皂甙对肝损伤小鼠的抗氧化应激作用,为大豆在肝病防治中的利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆异黄酮和皂甙(纯度 $\geq 80\%$),购于华北制药股份有限公司;APAP购于Sigma公司;联苯双酯,购于北京协和药厂;白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)及蛋白质试剂盒,购于南京建成科技有限公司;过氧化脂质(LOOH)试剂盒,购于日本协和公司。3-30K型离心机,德国Sigma公司提供;S22PC型分光光度计,上海精密科学仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 采用雄性昆明小鼠(体重22~26 g)。大豆异黄酮是天然植物雌激素,为了避免雌激素干扰,本研究只采用雄性小鼠。将50只小鼠随机分为正常组、模型组、大豆异黄酮组、大豆皂甙组和联苯双酯组(阳性对照组)。大豆异黄酮组

和大豆皂甙组小鼠按200 mg/(kg·d)剂量灌胃给药,联苯双酯组按100 mg/(kg·d)剂量灌胃给药,正常组及模型组小鼠则以等体积生理盐水灌胃,每日1次,连续7 d。末次给药1 h后,除正常组腹腔注射无菌生理盐水外,其余各组小鼠腹腔注射给予300 mg/kg APAP。造模期间禁食,不禁水。

1.2.2 血清及肝组织生化指标测定 造模16 h后处死小鼠,分离血清,检测小鼠血清ALT、AST、ALP活性和ALB含量。取小鼠肝组织,4℃裂解细胞,离心取上清。按照各试剂盒操作方法测定NO、iNOS、SOD、CAT、GSH-Px、GSH、LOOH、MDA水平。

1.2.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 11.5统计软件进行t-检验和方差分析。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮和皂甙对急性肝损伤小鼠血清ALT、AST、ALP活性和ALB含量的影响

如表1所示,与正常组比较,模型组小鼠血清ALT、AST和ALP活性显著升高($P < 0.05$),ALB含量显著减少($P < 0.05$),表明小鼠急性肝损伤模型制备成功。大豆异黄酮组、大豆皂甙组和联苯双酯组小鼠血清ALT、AST活性与模型组比较显著降低($P < 0.05$),ALB含量显著增高($P < 0.05$),提示大豆异黄酮和皂甙对APAP所致肝损伤具有保护作用。

2.2 大豆异黄酮对急性肝损伤小鼠肝iNOS活性及NO水平的影响

如表2所示,与正常组比较,模型组小鼠肝iNOS和NO水平显著升高($P < 0.05$);而大豆异黄酮组、大豆皂甙组和联苯双酯组小鼠肝iNOS和NO水平与模型组比较显著降低($P < 0.05$)。

2.3 大豆异黄酮和皂甙对急性肝损伤小鼠肝组织脂质过氧化水平的影响

如表3所示,与正常组比较,模型组小鼠肝匀

浆 LOOH 和 MDA 含量显著增高 ($P<0.05$), 说明 APAP 引起小鼠肝组织氧化应激。大豆异黄酮和皂

甙可降低小鼠肝匀浆 LOOH 和 MDA 水平, 降低小鼠肝组织氧化应激。

表 1 大豆异黄酮和皂甙对血清 ALT、AST、ALP 和 ALB 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of soy isoflavones and saponins on ALT, AST, ALP and ALB levels of serum ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALP/(U/L)	ALB/(g/L)
正常组	—	20.9±2.3	52.6±12.9	92.7±15.3	32.7±4.2
模型组	—	434.5±52.5*	304.3±44.2*	176.5±31.8*	22.3±3.1*
大豆异黄酮组	200	250.4±27.2 [#]	163.2±25.7 [#]	145.2±26.6	28.7±3.0 [#]
大豆皂甙组	200	284.5±30.8 [#]	182.6±29.1 [#]	134.5±27.8 [#]	26.5±2.9 [#]
联苯双酯组	100	136.6±17.4 [#]	128.5±30.5 [#]	120.4±31.2 [#]	30.2±4.3 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 2 大豆异黄酮和皂甙对肝 iNOS 活性和 NO 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of soy isoflavones and saponins on hepatic iNOS and NO levels ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	iNOS/(U/mg)	NO/(μmol/g)
正常组	—	0.16±0.04	1.3±0.4
模型组	—	0.53±0.08*	5.8±1.2*
大豆异黄酮组	200	0.34±0.05 [#]	2.2±0.5 [#]
大豆皂甙组	200	0.38±0.04 [#]	3.1±0.8 [#]
联苯双酯组	100	0.29±0.04 [#]	2.3±0.7 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.4 大豆异黄酮和皂甙对急性肝损伤小鼠肝组织抗氧化活力的影响

如表 4 所示,与正常组比较,模型组小鼠肝匀浆 SOD、CAT、GSH-Px 和 GSH 水平显著降低 ($P<$

0.05),说明 APAP 所致的急性肝损伤降低了小鼠肝脏抗氧化能力。大豆异黄酮和皂甙治疗可回升小鼠肝匀浆 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 GSH 含量,提高肝组织抗氧化活性 ($P<0.05$)。

表 3 大豆异黄酮和皂甙对肝组织 LOOH 和 MDA 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effects of soy isoflavones and saponins on hepatic LOOH and MDA levels ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	LOOH/(μmol/g)	MDA/(μmol/g)
正常组	—	3.82±0.46	1.62±0.41
模型组	—	7.25±0.89*	3.17±0.63*
大豆异黄酮组	200	5.48±1.12 [#]	2.46±0.48 [#]
大豆皂甙组	200	4.69±1.03 [#]	2.24±0.45 [#]
联苯双酯组	100	4.55±0.83 [#]	1.92±0.34 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 4 大豆异黄酮和皂甙对肝组织 SOD、CAT、GSH-Px 和 GSH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of soy isoflavones and saponins on hepatic SOD, CAT, GSH-Px and GSH levels ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	CAT/(U/mg)	GSH-Px/(U/mg)	SOD/(U/mg)	GSH/(μmol/g)
正常组	—	14.8±2.2	162.7±25.8	167.5±25.1	34.7±3.6
模型组	—	9.7±2.0*	103.1±17.5*	122.1±15.3*	16.8±2.5*
大豆异黄酮组	200	12.8±2.4 [#]	148.5±25.4 [#]	146.2±25.3 [#]	25.7±3.2 [#]
大豆皂甙组	200	13.1±3.2 [#]	149.2±23.6 [#]	159.4±26.1 [#]	24.9±2.7 [#]
联苯双酯组	100	13.5±2.8 [#]	139.2±21.3 [#]	139.4±23.2	28.5±2.3 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨论

APAP 是最常用的解热镇痛药。在治疗剂量时疗效显著,用药安全。但在过量或特殊情况下(如饮酒、饥饿、合用某种药物等)会对机体的肝脏造成严重的损伤,甚至死亡^[6]。当大剂量 APAP 进入体内,

葡萄糖醛酸和硫酸结合反应的解毒途径趋于饱和,过剩的 APAP 经肝脏 P450 酶系代谢生成亲电子产物乙酰苯醌亚胺(NAPQI)。过量服用 APAP 会产生大量 NAPQI,导致肝脏 GSH 储备耗竭^[7]。其代谢过程中产生的大量 NAPQI 超过了 GSH 的解毒能力,于是未被清除的 NAPQI 与肝细胞大分子如蛋白质

共价结合,引起肝细胞坏死,细胞通透性增强,使转氨酶释放入血,造成转氨酶升高^[8]。本实验中,腹腔注射 APAP 后模型组小鼠血清 ALB 含量降低,ALT、AST 和 ALP 水平均升高,而大豆异黄酮和皂甙可显著增高 APAP 所致急性肝损伤小鼠血清 ALB 含量,降低血清 ALT、AST 和 ALP 活性,提示大豆异黄酮和皂甙可减轻 APAP 所致小鼠肝损伤。

iNOS 由内毒素及多种炎症细胞因子刺激合成,常存在于巨噬细胞、中性粒细胞、血管平滑肌细胞、纤维母细胞及气道上皮细胞。iNOS 可诱导机体产生大量 NO,对组织细胞具有损伤作用,参与许多疾病的发病过程。在炎症反应中,NO 大量释放也被人们关注和广泛研究。本实验结果表明,APAP 处理可增高肝损伤小鼠肝 iNOS 活性和 NO 水平,而大豆异黄酮和皂甙预处理可降低肝 iNOS 活性和 NO 水平,从而减少炎症反应的发生。

此外,APAP 在肝内代谢过程中产生自由基引

起肝细胞膜脂质过氧化,而肝脏细胞的相代谢,包括解毒酶和抗氧化酶,是清除体内有害物质的重要途径^[7]。本实验中,APAP 使模型组小鼠肝组织 LOOH 和 MDA 水平升高,肝脏 GSH 水平降低,肝组织 CAT、GPx、SOD 活性降低,表明急性肝损伤小鼠肝细胞存在一定程度的氧化应激损伤。而大豆异黄酮和皂甙可降低肝损伤小鼠肝组织 LOOH 和 MDA 水平,增高 GSH 含量和多种抗氧化酶活性,提示大豆异黄酮和皂甙可抑制脂质过氧化产物生成。

4 结 语

本研究进一步证实,大豆异黄酮和皂甙增高急性肝损伤小鼠肝组织抗氧化酶活力,减轻自由基对肝组织的氧化损伤,这可能是大豆异黄酮和皂甙保肝作用机制之一。综上所述,大豆异黄酮和皂甙对 APAP 致急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与其抗氧化作用有关。

参考文献:

- [1] 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 Hui-xian,WANG Xia,JIN Yan-hua,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.(in Chinese)
- [2] 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 Yu-fang,ZHANG Yong-sheng,XU Shan,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.(in Chinese)
- [3] 杨丽娜,郭英,陈秋丽,等. 大豆复合物对四氯化碳致大鼠肝损伤的防护作用[J]. 中国老年学杂志,2009,29(3):559-560.
YANG Li-na,GUO Ying,CHEN Qiu-li,et al. Effect of soybean compounds on liver injury induced by carbon tetrachloride in rats[J]. *Chinese Journal of Gerontology*,2009,29(3):559-560.(in Chinese)
- [4] 李建芳,陈必成,余震,等. 染料木素对硫代乙酰胺诱导的肝纤维化大鼠 PDGF-BB 表达的影响[J]. 肝胆胰外科杂志,2009,21(2):118-121,125.
LI Jina-fang,CHEN Bi-cheng,YU Zhen,et al. Effect of genistein on the expression of PDGF-BB in hepatic fibrosis of rats induced by thioacetamide[J]. *Journal of Hepatopancreatobiliary Surgery*,2009,21(2):118-121,125.(in Chinese)
- [5] 杨修仕. 大豆皂苷对急性酒精性肝损伤的保护作用研究[D]. 太原:山西大学,2011.
- [6] 梁英丽,章叶发,张程,等. 褪黑素减轻对乙酰氨基酚的急性肝脏毒性[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(2):138-141.
LIANG Ying-li,ZHANG Ye-fa,ZHANG Cheng,et al. Melatonin alleviates acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*,2013,48(2):138-141. (in Chinese)
- [7] 李鹏飞,范远景,黄南山,等. 三羟异黄酮与葡萄糖醛酸内酯解毒保肝的比较研究[J]. 营养学报,2012,34(6):595-598.
LI Peng-fei,FAN Yuan-jing,HUANG Nan-shan,et al. Comparative study on detoxifying and protective effects of genistein and glucurulatone against liver injury[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*,2012,34(6):595-598.(in Chinese)
- [8] 张真,扶艳,梁信芳,等. 虾青素对对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国新药与临床杂志,2010,29(6):433-436.
ZHANG Zhen,FU Yan,LIANG Xin-fang,et al. Protective effect of astaxanthin on paracetamol-induced hepatic damage in mice [J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*,2010,29(6):433-436.(in Chinese)