

大豆异黄酮对内毒素及 *D*-氨基半乳糖所致小鼠急性肝损伤的保护作用

尹学哲¹, 金延华¹, 金梅花², 金明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:为研究大豆异黄酮对 *D*-氨基半乳糖 (GalN) 和内毒素 (LPS) 联合所致小鼠急性肝损伤的保护作用, 将试验小鼠按体重随机分为 5 组, 即正常组、模型组、水飞蓟素组 (阳性对照组) 及大豆异黄酮高、低剂量组。每日给药 1 次, 连续 7 d。除正常组外, 其余小鼠腹腔注射 GalN 及 LPS 建立急性肝损伤模型, 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肝组织病理学变化, ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 比色法检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 以及肝脏一氧化氮 (NO)、过氧化脂质 (LOOH)、丙二醛 (MDA) 含量和 Caspase-3、Caspase-8 活化水平。结果表明: 大豆异黄酮显著降低 GalN 及 LPS 联合诱发的急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性, 减轻肝组织病理损伤, 降低血清 TNF- α 和肝 NO 水平, 降低肝 LOOH 和 MDA 水平, 降低肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 活化水平。说明大豆异黄酮对 GalN 和 LPS 联合诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用, 其机制可能与其抗炎、抗氧化活性和抗肝细胞凋亡作用有关。

关键词: 大豆异黄酮; 肝损伤; 抗炎; 抗凋亡

中图分类号: R151.41

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)04-0544-04

Protective Effects of Soy Isoflavones on Acute Liver Injury Induced by Lipopolysaccharide and *D*-galactosamine in Mice

YIN Xue-zhe¹, JIN Yan-hua¹, JIN Mei-hua², JIN Ming²

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

Abstract: For the purpose of studying the protective effect of soy isoflavones on acute liver injury induced by *D*-galactosamine (GalN) and lipopolysaccharide (LPS) in mice, the tested mice were randomly assigned to 5 groups: normal control, model control, silymarin (positive control), as well as high and low dose groups of soy isoflavones. Animals were treated once daily for 7 days. GalN and LPS were given intraperitoneally to the mice of groups, then the pathological changes was detected with hematoxylin & eosin (HE) staining, tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by ELISA method, and the alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lipid hydroperoxide (LOOH), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and the activation of Caspase-3 and Caspase-8 were detected by the colorimetric method. The results showed that the soy isoflavones reduced the serum ALT and AST, alleviated the hepatic lesions induced by GalN and LPS, decreased serum TNF- α and hepatic NO levels, reduced the hepatic LOOH and MDA contents, and decreased the Caspase-3 and Caspase-8 activations of liver tissues. It is suggested that soy isoflavones have protective effect on acute liver injury induced by GalN and LPS in mice, probably *via* the anti-inflammatory, antioxidative and anti-apoptotic ability.

Key words: Soybean isoflavones; Liver injury; Anti-inflammatory; Anti-apoptotic

流行病学调查证实, 常食用大豆有助于预防癌症和心血管疾病的发生, 而与大豆中的异黄酮等活性物质密切相关^[1]。大豆异黄酮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^[2-3]。还有研究表明, 大豆异黄酮对四氯化碳或硫代乙酰胺引起的肝纤维化具有保护作用^[4-5]。现通过建立内毒素 (LPS) 及 *D*-氨基半乳糖 (GalN) 联合诱导的小鼠免疫性肝损伤模型, 观察大豆皂苷对肝损伤小鼠的抗氧化应激、抗炎及抗凋亡作用, 旨在为应用大豆异黄酮防治肝病提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药物与试剂 大豆异黄酮 (纯度 $\geq 80\%$) 购于华北制药股份有限公司; 水飞蓟素购于沈阳东陵药业股份有限公司; GalN 及 LPS 购于 Sigma 公司; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA) 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; TNF- α ELISA 试剂盒购于武汉博士德公司。

1.1.2 主要仪器设备 3-30K 型离心机、S22PC 型分光光度计、RT-2100 型酶标仪、ZMN-7803 型组织

收稿日期: 2013-03-22

基金项目: 国家自然科学基金 (30360113)。

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。

包埋机、RM2126 型切片机和 BA200 型生物显微镜。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 将 50 只雄性昆明小鼠 (18 ~ 22 g) 随机分为正常组、模型组、水飞蓟素组 (阳性对照组) 和大豆异黄酮高、低剂量组, 每组 10 只小鼠。每日灌胃给药 1 次, 连续 7 d, 水飞蓟素剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 大豆异黄酮高、低剂量分别为 240 和 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组及模型组小鼠则以等体积生理盐水灌胃。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 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ GalN 和 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS (用无菌生理盐水配制)。造模期间禁食, 不禁水。

1.2.2 取材及指标测定 造模 1.5 h 后处死小鼠, 分离血清, 检测小鼠血清 TNF- α 。造模 8 h 后处死小鼠, 分离血清, 检测小鼠血清 ALT、AST 活性。取小鼠肝左叶, 固定于 10% 福尔马林溶液中, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 在光镜下观察肝组织病理学变化。4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解肝细胞, 离心取上清。按照各测

试盒操作方法测定 LOOH、MDA、NO 水平以及肝细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 的相对活化程度。

1.2.3 数据分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件, 以单因素方差分析和 Turkey's 多因素 *t* 检验进行组间均数比较。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮对急性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响

由表 1 可知, 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 活性较正常组显著升高 ($P < 0.05$), 表明小鼠急性肝损伤模型制备成功。大豆异黄酮高、低剂量组和水飞蓟素组小鼠血清 ALT、AST 活性较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 说明大豆异黄酮和水飞蓟素对 GalN/LPS 所致肝损伤具有保护作用, 且大豆异黄酮对转氨酶的抑制超过或接近于水飞蓟处理, 说明其保肝活性与水飞蓟素基本相当。

表 1 大豆异黄酮对血清 ALT 和 AST 活性的影响

Table 1 Effect of soy isoflavones on ALT and AST activities of serum

组别 Group	剂量 Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常 Control	-	56.1 ± 6.3	59.3 ± 4.1
模型 Model	-	$368.1 \pm 38.4^{\#}$	$94.1 \pm 15.9^{\#}$
异黄酮 Isoflavone	120	$280.6 \pm 20.7^*$	$65.4 \pm 8.9^*$
	240	$270.3 \pm 55.5^*$	$65.8 \pm 12.2^*$
水飞蓟素 Silymarin	50	$298.4 \pm 18.0^*$	$68.4 \pm 14.4^*$

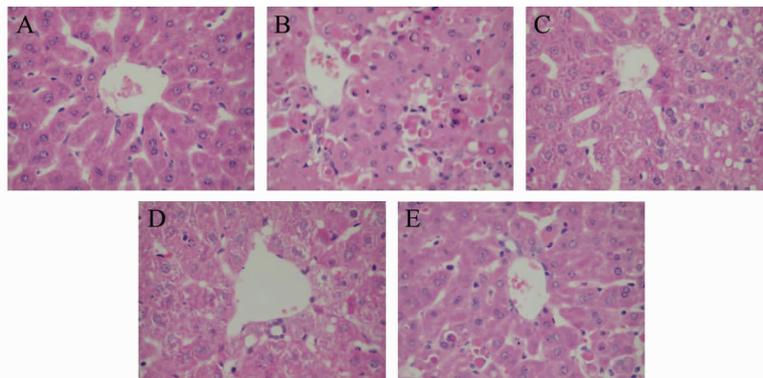
($\pm s$), $n = 10$; 与正常组比较, $^{\#}: P < 0.05$; 与模型组比较, $^*: P < 0.05$; 下图表同。

($\pm s$), $n = 10$; Compared with control, $^{\#}: P < 0.05$; Compared with model, $^*: P < 0.05$; the same below.

2.2 大豆异黄酮对急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响

由图 1 可知, 模型组小鼠肝小叶结构模糊, 肝细胞索排列紊乱, 可见肝细胞坏死, 伴有炎细胞浸润。肝细胞核明显大小不等, 呈不同程度的固缩, 凋亡严

重。与模型组比较, 大豆异黄酮和水飞蓟素干预均能减轻上述肝组织病理学损伤, 偶尔有凋亡细胞, 且大豆异黄酮干预组小鼠肝细胞凋亡数接近水飞蓟素组, 二者效果基本相当。



A: 正常组; B: 模型组; C: 异黄酮低剂量组; D: 异黄酮高剂量组; E: 水飞蓟素组
A: Control; B: Model; C: Low-dose isoflavone; D: High-dose isoflavone; E: Silymarin

图 1 肝组织病理学观察 (HE $\times 400$)

Fig. 1 Pathological observation of liver sections (HE $\times 400$)

2.3 大豆异黄酮对急性肝损伤小鼠血清 TNF- α 及肝 NO 水平的影响

由表 2 可知,模型组小鼠血清 TNF- α 和肝 NO

水平较正常组显著升高 ($P < 0.05$);而大豆异黄酮高、低剂量组和水飞蓟素组小鼠血清 TNF- α 和肝 NO 水平较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

表 2 大豆异黄酮对血清 TNF- α 和肝 NO 水平的影响

Table 2 Effect of soy isoflavones on serum TNF- α and hepatic NO levels

组别 Group	剂量 Dose/mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹
正常 Control	-	11.6 \pm 5.9	6.1 \pm 1.7
模型 Model	-	261.7 \pm 20.6 [#]	21.8 \pm 4.4 [#]
异黄酮 Isoflavone	120	146.8 \pm 48.9 [*]	9.5 \pm 2.9 [*]
	240	96.5 \pm 28.8 [*]	8.8 \pm 2.2 [*]
水飞蓟素 Silymarin	50	92.6 \pm 17.1 [*]	10.9 \pm 3.1 [*]

2.4 大豆异黄酮对急性肝损伤小鼠肝组织脂质过氧化水平的影响

由图 2 可知,GalN/LPS 显著增高模型组小鼠肝匀浆 LOOH 和 MDA 含量 ($P < 0.05$),说明 GalN/LPS 能引起脂质过氧化损伤。大豆异黄酮和水飞蓟素可降低小鼠肝匀浆 LOOH 和 MDA 水平,降低小鼠肝组织氧化应激。

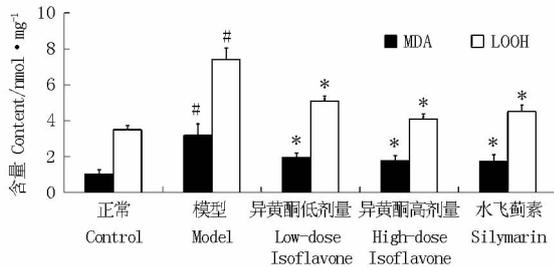


图 2 大豆异黄酮对肝组织 LOOH 和 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effects of soy isoflavones on hepatic LOOH and MDA content

2.5 大豆异黄酮对急性肝损伤小鼠肝 Caspase-3 和 Caspase-8 活化的影响

由图 3 可见,GalN/LPS 可显著提高模型组小鼠肝细胞 Caspase-3 和 Caspase-8 相对活性 ($P < 0.05$),而大豆异黄酮和水飞蓟素可降低急性肝损伤小鼠肝 Caspase-3 和 Caspase-8 相对活性 ($P < 0.05$)。

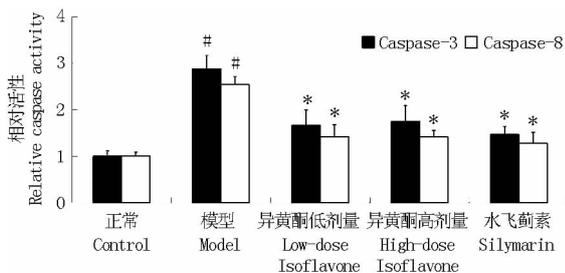


图 3 大豆异黄酮对肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 活性的影响

Fig. 3 Effect of soy isoflavones on Caspase-3 and Caspase-8 activities of liver tissues

3 讨论

GalN 诱发的动物肝组织损伤在形态学和功能学上与人类急性重症肝炎相似,而小剂量 LPS 可诱导 GalN 致敏小鼠发生急性肝功能衰竭^[6]。因此, GalN/LPS 诱导的肝损伤小鼠是研究急性肝损伤十分理想的动物模型。本试验结果显示大豆异黄酮可显著降低 GalN/LPS 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性,说明大豆异黄酮可减轻 GalN/LPS 诱导的肝细胞损伤。

血清 TNF- α 在炎症反应的发生、发展过程中发挥关键作用。单核细胞或巨噬细胞在致炎因子的作用下,向肝脏积聚并致敏,并释放 TNF- α 等炎性介质,继而诱发炎症反应并造成肝细胞损伤^[7]。在炎症反应中,NO 大量释放也被人们关注和广泛研究。NO 是一种细胞信使分子和细胞毒性分子,对肝细胞具有毒性效应,是组织损伤的诱发因子和各种病变的增强因子,能引起肝损伤^[8]。本试验结果表明,GalN/LPS 处理可增高肝损伤小鼠血清 TNF- α 和肝 NO 水平,而大豆异黄酮预处理可降低血清 TNF- α 和肝 NO 水平,从而减少炎症反应的发生。

活性氧自由基引发的氧化应激是肝病发病的共同病理生理基础,因此,对氧化应激导致肝细胞损伤的研究便成为治疗肝脏疾病的一个重要途径^[8-9]。本试验中模型组小鼠肝脏脂质过氧化水平升高,而大豆异黄酮可抑制脂质过氧化反应,减少肝组织氧化应激。

细胞凋亡是 LPS 诱导 GalN 致敏小鼠最重要的肝细胞死亡形式^[10-12]。而胱天蛋白酶的级联反应是推动细胞凋亡程序的核心事件。本试验结果显示,GalN 和 LPS 能诱导肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 活性增高,而大豆异黄酮显著降低肝组织 Caspase-3 和 Caspase-8 活性,说明大豆异黄酮可抑制急性肝损伤小鼠肝细胞凋亡。

综上所述,大豆异黄酮对 GalN/LPS 诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与其减少炎症反应、提高抗氧化活性及抑制细胞凋亡作用有关。

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] 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.)
- [3] 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.
- [4] 赵育芳,黄亦琦,张永生,等.大豆异黄酮对肝纤维化大鼠肝损伤保护作用的实验研究[J].光明中医,2010,25(4):604-606. (Zhao Y F, Huang Y Q, Zhang Y S, et al. Protective effects of soybean isoflavones on liver injury in rats with hepatofibrosis [J]. Guangming Journal of Chinese Medicine, 2010, 25(4): 604-606.)
- [5] 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].肝胆外科杂志,2009, 21(2):118-121,125. (Li J F, Chen B C, Yu Z, 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.)
- [6] 宋志伟,吴艳玲,朴惠善.桦褐孔菌对小鼠急性肝组织损伤的保护作用[J].延边大学医学学报,2007,30(1):34. (Song Z W, Wu Y L, Piao H S. Protective effects of extracts of *Inonotus obliquus* on acute hepatic failure in mice [J]. Journal of Medical Science Yanbian University, 2007, 30(1): 34-36.)
- [7] 邓秀兰,钟相根,张晓晶,等.痰热清注射液对小鼠免疫性肝损伤的防护作用[J].中国中药杂志,2011,36(5):636-638. (Deng X L, Zhong X G, Zhan X J, et al. Protective effect of Tan-reqing injection on immune liver injury in rats [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(5): 636-638.)
- [8] 周燕,翟羽佳,何蓉蓉,等.荆条子乙醇提取物对小鼠免疫性肝炎及急性炎症的影响[J].中国中药杂志,2011,36(17):2404-2408. (Zhou Y, Zhai Y J, He R R, et al. Effect of vitex negundo var. heterophylla seeds ethanol extract (VSE) on mice model of immunological hepatitis and acute inflammation [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(17): 2404-2408.)
- [9] 宋军,赵军宁,王晓东,等.芍甘多苷对四氯化碳亚急性肝损伤大鼠肝细胞线粒体保护作用[J].中国中药杂志,2011,36(7):931-937. (Song J, Zhao J N, Wang X D, et al. Protective effects of Shaoganduogan on hepatocyte mitochondria in subacute liver injury rat induced by carbon tetrachloride [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(7): 931-937.)
- [10] 杨振凯,杨阳,张亚男,等.草苈蓉正丁醇及水萃取物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].延边大学医学学报,2011,34(2):105-107. (Yang Z K, Yang Y, Zhang Y N, et al. Protective effects of butanol soluble and aqueous fractions of *Boschniakia rossica* on acute liver injury in mice [J]. Journal of Medical Science Yanbian University, 2011, 34(2): 105-107.)
- [11] Liu D, Li C, Chen Y, et al. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279: 48434-48442.
- [12] 朴龙,杨振凯,杨阳,等.草苈蓉环烯醚萜对内毒素诱导 D-半乳糖致敏小鼠肝细胞凋亡的影响[J].前沿科学,2011,5(2):11-14. (Piao L, Yang Z K, Yang Y, et al. Protective effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on lipopolysaccharide-induced hepatocyte apoptosis in D-galactosamine-sensitized mice [J]. Frontier Science, 2011, 5(2): 11-14.)

欢迎订阅《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。前身可追溯到 1919 年创办的《中华农学会丛刊》。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科具基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果,为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从 1999 年起连续 12 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助。2006 - 2013 年连续 8 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B类)”资助。从 2002 年起连续 11 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2013 年被新闻出版广电总局评为“百强科技期刊”,2011 年获“第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖”,2005 年获“第三届国家期刊奖提名奖”。2008 和 2011 年被中国科学技术信息研究所授予“中国精品科技期刊”称号。2009 年被中国期刊协会和中国出版科学研究所授予“新中国 60 年有影响力的期刊”称号。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览》(2004、2008 和 2011 年版)登载,《作物学报》被列入“农学、农作物类核心期刊表”的首位。

《作物学报》为月刊,定价 50 元/册,全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅,刊号:ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号:82-336。也可向编辑部直接订购。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号,中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

电话:010-82108548;传真:010-82105793;网址:<http://zxwb.chinacrops.org/>

E-mail: zxwb301@caas.cn; xbzw@chinajournal.net.cn