

大豆异黄酮抗衰老作用研究

范红艳¹, 顾饶胜^{1*}, 王艳春¹, 任 旷¹, 沈 楠², 常 影¹

(1 吉林医药学院 药理教研室, 吉林 吉林 132013; 2 吉林医药学院 实验中心机能实验室, 吉林 吉林 132013)

摘要:目的 探讨大豆异黄酮 (soybean isoflavon, SI) 抗衰老的作用及其机制。方法 体内实验以 *D*-半乳糖 (*D*-gal) 120 mg/kg 颈背部 sc 6 周, 构建大鼠衰老模型, 次日以 ig 方式给予 SI 100、200、400 mg/kg, 连续 6 周。通过 Morris 水迷宫观察大鼠学习记忆能力的改变; 分光光度法检测脑组织中丙二醛 (MDA) 水平、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、Na⁺、K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性; 酶标仪检测血清中 NO 活性。体外实验建立 H₂O₂ 致 PC12 细胞损伤模型, 给予 0.5、1.0、2.0 mg/mL SI 干预, 采用 MTT 比色法测定细胞存活率, 酶标仪检测细胞上清中 NO 活性, Western blotting 检测各组 PC12 细胞 Bcl2 蛋白的表达。结果 SI 中、高剂量可改善 *D*-gal 致衰老大鼠的学习记忆能力, 增强脑组织中 SOD、Na⁺、K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性, 降低血清中 NO 的量, SI 低、中、高剂量降低大鼠脑组织中 MDA 水平, 同模型组比较有统计学差异 ($P < 0.05, 0.01$)。SI (1.0、2.0 mg/mL) 可抑制 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化损伤及 NO 的增多, 与模型组比较具有统计学意义 ($P < 0.05$); SI 可增加 Bcl2 蛋白表达。结论 SI 可通过抗氧化作用、降低 NO 水平及上调 Bcl2 蛋白表达, 起到抗衰老作用。

关键词:大豆异黄酮; 衰老; *D*-半乳糖; H₂O₂; Bcl2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-2054-03

大豆异黄酮 (soybean isoflavone, SI) 是一种以 3-苯并吡喃酮为母核的双酚类化合物, 多存在于大豆及其制品中。近年来 SI 以其广泛的生物学活性^[1-5], 如促生长、雌激素样作用、增强机体免疫、抗炎、抗肿瘤、血管舒张、保护心肌等作用, 日益受到关注。本研究采用 *D*-半乳糖 (*D*-gal) 建立体内大鼠衰老模型, 观察不同剂量 SI 对大鼠衰老的影响。H₂O₂ 是活性氧族的主要成分之一, 在代谢过程中产生活性氧、自由基导致细胞凋亡, 引起神经元损害。本研究以大鼠嗜铬细胞瘤细胞 PC12 为对象, 采用 H₂O₂ 建立体外氧化损伤细胞模型, 观察 SI 对抗 H₂O₂ 的作用, 并在细胞水平探讨其机制。

1 材料

1.1 动物: Wistar 大鼠, 清洁级, 雌雄兼用, 由吉林大学基础医学部实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂: SI (质量分数 99%), 郑州荔诺生物科技有限公司; *D*-gal, 张家港市华昌药业有限公司; H₂O₂、MTT, 百奥生物技术有限公司; IMDM 和血清, Gibco 公司; 胰蛋白酶, 宝泰克生物科技有限公司; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、ATP 和总蛋白试剂盒, 南京建成生物工程公司; NO 试剂盒, 海门市碧云天生物技术研究; bcl2 抗体, Santa Cruz 公司。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 实验分组和给药: Wistar 大鼠 60 只, 体重 180~220 g, 随机分为 5 组: 对照组、模型组、SI 各剂量 (100、200、400 mg/kg) 组, 每组 12 只。除对照组外, 各组均颈背部 sc *D*-gal 120 mg/kg, 每天 1 次, 连续 6 周, SI 组自第 2 天开始 ig 给药, 每日 1 次, 共 6 周, 对照组和模型组每日给予相同体积的 0.25% 羧甲基纤维素钠溶液。

2.1.2 学习记忆能力的测定: 于给药结束后次日进行 Morris 水迷宫行为测试。水迷宫直径 150 cm、高 60 cm、水深 30 cm, 水温 (22±1) °C, 加适量二氧化钛使水呈乳白色, 将平台放在西南象限正中距池壁 22 cm 处, 迷宫中液面高于平台 1 cm, 训练期间环境安静, 迷宫外参照物不变。每天 8:00—10:00 时每组分别训练 1 次, 连续训练 4 d。大鼠头部涂以黄色染料, 训练时每天从东侧入水点将大鼠面向池壁放入水池, 同时启动记录装置, 记录大鼠寻找平台的时间 (逃避潜伏期), 设定 120 s 为最长逃避潜伏期, 120 s 后自动停止记录。若大鼠在 120 s 内仍未找到平台, 则将其引至平台并停留 10 s, 潜伏期记为 120 s。于第 5 天行定位航行试验和空间探索试验。定位航行试验: 将大鼠于西南象限面向池

收稿日期: 2010-07-07

基金项目: 吉林省教育厅“十一五”科技计划项目资助课题 (2008402)

作者简介: 范红艳 (1975—), 女, 吉林省人, 硕士, 讲师, 研究方向为神经药理、心血管药理学。

Tel: (0432) 64560470 E-mail: fanhongyan1975@yahoo.com.cn

* 通讯作者 顾饶胜 E-mail: gurs@163.com

壁放入水中,自动记录大鼠找到平台的潜伏期,检测大鼠的学习能力。空间探索试验:定位航行试验结束后撤除平台,选择西南象限的中心作为入水点,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录 120 s 内大鼠在原平台所在象限的停留时间以及穿越原平台次数,以检验大鼠的记忆能力。

2.1.3 标本的采集: Morris 水迷宫试验结束后禁食不禁水 12 h,以 10% 水合氯醛 ip 麻醉,腹主动脉取血,静置 30 min,3 000 r/min 离心 15 min 分离得血清备用;迅速在冰上取脑组织,用 4 °C 生理盐水洗涤脑组织,吸干,精确称量 0.2 g,加 2 mL 生理盐水,在冰浴下制成 10% 组织匀浆,3 000 r/min,离心 15 min,取上清液备用。

2.1.4 脑组织 MDA 水平、SOD 活性和血清 NO 水平的测定:取 10% 脑组织匀浆上清液严格按试剂盒说明测定 MDA;取 1% 脑组织匀浆上清液严格按 SOD 试剂盒说明测定其活性。取血清,严格按试剂盒说明用酶标仪检测血清中 NO 的量。

2.1.5 脑组织 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性的测定:取 10% 脑组织匀浆上清液,严格按 ATP 酶试剂盒说明测定其 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性。

2.2 体外实验

2.2.1 PC12 细胞培养、处理方法:PC12 细胞由吉林大学实验动物中心提供,培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,选取对数生长期细胞分组进行实验。H₂O₂ 处理按如下程序实施:细胞常规培养 48 h,给予 20 μmol/L H₂O₂ 作用 4 h 后终止反应。SI 在 H₂O₂ 损伤前 24 h 加入培养液。

2.2.2 实验分组和给药:PC12 细胞根据要求分为:对照组、H₂O₂ 模型组、SI 药物(低、中、高剂量)处理组。各组细胞无血清培育 24 h 后,药物治疗组同时给予 SI 24 h,终质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/mL,对照组和模型组给予 1% 血清的 IMDM 培养基,给予 SI 24 h 再给予 20 μmol/L H₂O₂ 4 h 后,测定各项指标。

2.2.3 MTT 法测定细胞增殖:将处于对数生长期的 PC12 细胞制成细胞悬液,各组细胞以 4 × 10⁵/mL 浓度接种于 96 孔培养板,每组设 10 个复孔,每孔 200 μL。分别给予不同的处理因素作用 28 h,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL,37 °C 继续培养 4 h,终止培养,每孔加入 150 μL DMSO,震荡 10 min 后酶标仪上测吸光度(A)值,测定波长

490 nm,计算细胞存活率。

细胞存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 × 100%

2.2.4 NO 水平测定:取第 3 代 PC12 细胞制成细胞悬液,以 4 × 10⁵/mL 浓度接种于 96 孔板,每孔 0.2 mL。各因素处理后,吸取细胞上清液按照试剂盒说明用酶标仪检测细胞上清液中 NO 水平。

2.2.5 Western blotting 检测 Bcl-2:整个检测过程按规定操作步骤严格进行。提取各组 PC12 细胞蛋白,Lowry 法测定蛋白水平,进行电泳、转膜、显色。Band lecd 图像分析系统进行条带分析。

2.3 统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 *q* 检验进行。

3 结果

3.1 体内实验

3.1.1 对 D-gal 致衰老大鼠学习记忆能力的影响:结果表明,模型组大鼠出现学习记忆功能障碍、空间定位记忆障碍,表现为模型组大鼠逃避潜伏期较对照组明显延长、穿越平台次数减少,差异有统计学意义(*P* < 0.05, 0.01)。SI 中、高剂量(200, 400 mg/kg)组与模型组比较,其逃避潜伏期显著缩短、经过平台次数增加(*P* < 0.05, 0.01),表明 SI 可以改善衰老大鼠的学习记忆能力,但尚未达到对照组水平,见表 1。

表 1 SI 对 D-gal 致衰老大鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 12)

Table 1 Effect of SI on deficit of learning and memory of rats induced by D-gal ($\bar{x} \pm s$, *n* = 12)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
对照	-	25.75 ± 17.62	4.10 ± 2.92
模型	-	55.42 ± 40.89*	1.88 ± 1.59*
SI	100	49.68 ± 39.68	3.00 ± 2.39
	200	34.62 ± 27.33#	3.91 ± 2.81#
	400	30.42 ± 28.03##	4.00 ± 3.16#

与对照组比较: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

与模型组比较: # *P* < 0.05 ## *P* < 0.01 (下表同)

* *P* < 0.05 ** *P* < 0.01 vs control group

P < 0.05 ## *P* < 0.01 vs model group

(following tables are same)

3.1.2 对 D-gal 致衰老大鼠脑组织 MDA 水平、SOD 活性和血清中 NO 水平的影响:结果表明,SI 各剂量组大鼠脑组织中 MDA 减少,SI 中、高剂量组大鼠脑组织中 SOD 活性增强,血清中 NO 降低,与模型组比较具有统计学差异(*P* < 0.05, 0.01),见表 2。

3.1.3 对 D-gal 致衰老大鼠脑组织中 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性的影响:结果表明,模

型组大鼠脑组织中 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶的活性明显低于对照组 ($P < 0.05, 0.01$)。SI 中、高剂量 (200、400 mg/kg) 组大鼠脑组织中 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性明显高于模型组, 具有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$), 说明 SI 具有一定的提高 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性的作用, 见表 3。

表 2 SI 对 D-gal 致衰老大鼠脑组织 MDA 水平、SOD 活性和血清中 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of SI on content of MDA, activity of SOD in brain tissue and content of NO in serum of D-gal induced seniled rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	NO/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	-	1.70 ± 0.42	111.53 ± 56.83	1.20 ± 0.29
模型	-	2.39 ± 0.52*	58.95 ± 19.97**	1.95 ± 0.73*
SI	100	1.82 ± 0.72#	75.97 ± 25.50	1.50 ± 0.73
	200	1.79 ± 0.43##	89.73 ± 44.57#	1.33 ± 0.35#
	400	1.74 ± 0.42##	93.56 ± 29.72##	1.27 ± 0.50#

表 3 SI 对 D-gal 致衰老大鼠脑组织 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effects of SI on activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase of brain tissue in D-gal induced seniled rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Na^+ , K^+ -ATP 酶活性/ ($\mu\text{molPi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ca^{2+} -ATP 酶活性/ ($\mu\text{molPi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
对照	-	0.30 ± 0.14	0.37 ± 0.10
模型	-	0.20 ± 0.05*	0.23 ± 0.05**
SI	100	0.20 ± 0.08	0.23 ± 0.07
	200	0.29 ± 0.11#	0.31 ± 0.12#
	400	0.31 ± 0.07##	0.32 ± 0.06##

3.2 体外实验

3.2.1 对 H_2O_2 致 PC12 细胞氧化损伤的影响: MTT 结果表明, H_2O_2 氧化损伤模型组细胞存活率显著低于对照组 ($P < 0.01$), 提示线粒体脱氢酶的活性降低, 活细胞数目较少; 经 SI (1.0、2.0 mg/mL) 作用后, 细胞存活率增加, 与模型组相比有统计学差异 ($P < 0.05, 0.01$), 且随剂量增加作用逐渐增强, 提示线粒体脱氢酶的活性升高, 活细胞数目增多, SI 具有细胞保护作用, 见表 4。

3.2.2 对 H_2O_2 致 PC12 细胞氧化损伤的细胞上清中 NO 的影响: 模型组细胞上清中 NO 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$)。SI 1.0、2.0 mg/mL 可抑制 H_2O_2 氧化损伤的 PC12 细胞上清中 NO 增多 ($P < 0.05, 0.01$), 见表 4。

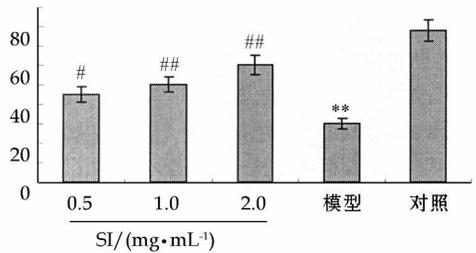
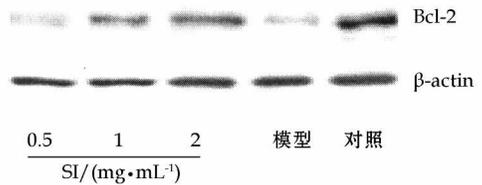
3.2.3 SI 对 H_2O_2 氧化损伤的 PC12 细胞 Bcl-2 表

达的影响: Western blotting 检测各组 PC12 细胞 Bcl-2 蛋白表达, 结果可见, SI (0.5、1.0、2.0 mg/mL) 可增加 Bcl-2 蛋白表达。见图 1。

表 4 SI 对 H_2O_2 氧化损伤的 PC12 细胞存活率、上清液中 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of SI on survival rate and NO content in PC12 cell supernatants injured by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ρ / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%	NO / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	-	100.03 ± 8.45	0.53 ± 0.25
模型	-	50.05 ± 10.97**	0.99 ± 0.30*
SI	0.5	55.38 ± 9.66	0.83 ± 0.24
	1.0	63.42 ± 9.16#	0.66 ± 0.27#
	2.0	87.22 ± 12.37##	0.57 ± 0.21#



与对照组比较: ** $P < 0.01$

与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 1 SI 对 H_2O_2 氧化损伤的 PC12 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of SI on Bcl-2 expression of PC12 cell injured by H_2O_2

4 讨论

D-gal 所致大鼠亚急性衰老模型主要是过量的 D-gal 在醛糖还原酶催化下还原成半乳糖醇, 其不能被进一步代谢而堆积在细胞内, 影响正常渗透压, 导致细胞肿胀, 功能障碍, 代谢紊乱, 破坏并消耗机体抗氧化防御系统, 使自由基积聚, 而过氧化脂质等增高出现衰老^[6]。机体衰老的基础是细胞衰老, 而细胞水平的改变主要表现在细胞膜上。 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶是细胞膜上重要的膜蛋白, 其活性改变是反映机体早期生理功能衰退极为敏感的指标。 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶的部分亚基都暴露在细胞膜外层, D-gal 可以与其功能部

位结合产生膜毒性,导致离子流紊乱,能量供给匮乏,引起脑组织损伤。近年研究发现细胞内 Ca^{2+} 的超载与衰老密切相关,而 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶的活性是 Ca^{2+} 正常分布的基础,现已作为观察衰老的新指标^[7]。本研究体内实验结果表明,模型组大鼠脑组织中 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶活性降低,且出现明显的学习记忆障碍,表现为逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数明显减少,表明衰老模型复制成功。经 SI 治疗 6 周后,SI 中、高剂量 (200、400 mg/kg) 组大鼠脑组织中 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶的活性增强,逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数明显增加,说明 SI 通过稳定细胞膜,改善脑组织能量代谢,保护细胞免受损伤,而减弱了 *D*-gal 导致的衰老作用,增强了大鼠的学习记忆能力。SOD 和 MDA 被公认是抗衰老药物研究的重要指标。NO 可调节脑血流量及神经递质释放,突触可塑性的发育,参与癫痫、疼痛、学习记忆、缺氧缺血性脑损伤过程。但在过量时,NO 可与超氧化阴离子发生反应,生成氧化亚硝基阴离子,直接对组织细胞产生神经毒性作用,导致神经细胞坏死或凋亡^[8,9]。

本研究体内实验结果表明,模型组大鼠脑组织中 SOD 活性降低,MDA 增高及血清中 NO 增加,说明衰老与脂质过氧化作用及 NO 过量产生细胞毒性作用密切相关。本研究体内实验采用 SI 治疗 6 周,在 100~400 mg/kg 剂量范围内可见衰老大鼠学习记忆能力的提高,同时大鼠脑组织中 SOD 活性增强,MDA 减少、血清中 NO 减少。结果表明:SI 改善学习记忆作用可能与其提高机体 SOD 等抗氧化酶活力,减少 MDA 等代谢产物的产生,增强其对自由基的清除能力,抑制脂质过氧化作用,保护脑神经细胞免受自由基的损害有关,也与降低 NO 水平,从而减弱其神经毒性作用有关。

PC12 细胞是肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系,具有神经元细胞的诸多特征,因而成为研究神经元细胞常用的模型^[10]。 H_2O_2 可直接攻击膜性结构,导致细胞膜、线粒体膜损伤,使其通透性增高,同时由于 ATP 合成不足,导致 Ca^{2+} 泵失灵,细胞内 Ca^{2+} 超载,以及线粒体受损后细胞色素 C 和其他凋亡诱导因子的产生和释放,出现级联式凋亡反应^[11-12]。本研究体外实验以 H_2O_2 建立 PC12 细胞氧化应激损伤模型,发现给予 20 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 4 h 后使 PC12 细胞存活率下降,细胞培养液上清 NO 增多,说明 PC 12 细胞凋亡模型成立。SI 预处理后提高了细

胞的存活率,减轻细胞膜的损伤,恢复细胞膜的形态,SI 可降低 H_2O_2 诱导的细胞凋亡及 NO 增多,表明 SI 在抑制凋亡的同时也能抑制 NO 的增加,进而抑制衰老。

Bcl-2 蛋白的生理功能主要是抑制细胞凋亡,延长细胞寿命。本实验结果显示 H_2O_2 可以使 PC12 细胞抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显降低,SI 低、中、高剂量可不同程度地促进 Bcl-2 蛋白表达,说明 SI 对抗大鼠 H_2O_2 损伤作用与调控 Bcl-2 蛋白的表达有关。

综上所述,SI 作为一种植物雌激素^[13,14],其抗衰老作用与稳定细胞膜、抗氧化、减少 NO 的生成、上调 Bcl-2 蛋白有关。

参考文献:

- [1] Mao Z, Zheng Y L, Zhang Y Q, *et al.* The anti apoptosis effects of daidzein in the brain of *D*-galactose treated mice [J]. *Molecules*, 2007, 12(7): 1455-1470
- [2] 毛峻琴, 宓鹤鸣. 大豆异黄酮的研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(1): 61-64.
- [3] 王红娟, 马欣, 白宇飞, 等. 大豆黄酮血管舒张作用与血管内皮的关系 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(8): 946-949
- [4] 周俐, 刘建新, 周青, 等. 大豆异黄酮对大鼠心肌肥厚与纤维化的保护作用 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1673-1676
- [5] 任国峰, 汤凌, 杨爱青, 等. 大豆异黄酮对前列腺增生大鼠生长因子及受体的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1497-1501
- [6] Wei H, Li L, Song Q, *et al.* Behavioural study of the *D*-galactose induced aging model in C57BL/6J mice [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 157(2): 245-251
- [7] 李笑萍, 喻培先, 赵冬. *D*-半乳糖衰老模型观察的新指标 [J]. 中国现代应用药杂志, 2004, 21(6): 422-424
- [8] Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long term synaptic depression in the cerebellum [J]. *Nature*, 1991, 349(6307): 326-328
- [9] Jacintho J D, Kovacic P. Neurotransmission and neurotoxicity by nitric oxide, catecholamines, and glutamate: unifying themes of reactive oxygen species and electron transfer [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(24): 2693-2703
- [10] Shafer T J, Atchison W D. Transmitter ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies [J]. *Neurotoxicology*, 1991, 12(3): 473-492
- [11] Shapiro H M. Membrane potential estimation by flow cytometry [J]. *Methods*, 2000, 21(3): 271-279
- [12] Luo Y, Umegaki H, Wang X, *et al.* Dopamine induces apoptosis through an oxidant-involved SAPK/JNK activation pathway [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(6): 3756-3764
- [13] Glazier M G, Bowman M A. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy [J]. *Arch Intern Med*, 2001, 161(9): 1161-1172
- [14] 杨红, 陈伟强, 赵宇红, 等. 大豆异黄酮活性组分对阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 885-886