

大豆异黄酮抗大鼠 T 细胞衰老及抗氧化作用研究

黄 琼 杨杏芬 李文立 李 志 黄俊明 杨国光 黄建康 张 波
(广东省疾病预防控制中心,广东 广州 510300)

摘 要:为研究大豆异黄酮抗大鼠 T 细胞衰老和抗氧化作用,选用老龄 SD 大鼠,观察大豆异黄酮对 T 细胞 CD28 表达水平及肝脏氧化应激水平的影响。实验设立青年对照组、老龄对照组和大豆异黄酮 0.33、0.99 g/kg BW 剂量组,其中剂量组按剂量灌胃给予大豆异黄酮,对照组灌胃给予等量纯净水。4 周后,分别制备肝细胞匀浆和肝单细胞悬液,用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定肝匀浆中丙二醛(MDA)含量,分光光度法测定超氧化物歧化酶(SOD)活力,用流式细胞仪结合双氢罗丹明 123(Rh123)和双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(H₂DCFDA)染色法分别检测肝细胞线粒体膜电位(MMP)及活性氧(ROS)水平;另取外周血测定 T 淋巴细胞表面 CD8/CD28 表达情况。结果显示:青年对照组及大豆异黄酮剂量组的肝组织 MDA 含量均较老年对照组低,而 SOD 活力及肝细胞 MMP 水平均较老年对照组高($P < 0.05$);大豆异黄酮剂量组肝细胞内的 ROS 水平较老年对照组低($P < 0.01$)。老年对照组大鼠外周血 CD28⁺和 CD28⁺/CD8⁺ T 细胞比例低于青年对照组,而 CD28⁺/CD8⁺ T 细胞比例高于青年对照组,给予大豆异黄酮样品组三者比例均介于两对照组之间。提示衰老大鼠外周血 T 细胞 CD28 表达降低,肝细胞线粒体膜稳定性下降,氧自由基清除能力下降,过氧化脂质分解的终产物增多;大豆异黄酮可提高老龄大鼠 T 细胞 CD28 表达水平,增加肝细胞抗氧化酶活性,稳定线粒体膜电位,减少活性氧产生。
关键词:异黄酮类;抗原,CD8;抗原,CD28;线粒体,肝;活性氧组分;超氧化物歧化酶;丙二醛

Study on anti-senescence and anti-oxidation effects of soybean isoflavones in rats

HUANG Qiong, YANG Xing-fen, LI Wen-li, LI Zhi, HUANG Jun-ming,
YANG Guo-guang, HUANG Jian-kang, ZHANG Bo

(Guangdong Provincial Center for Disease Prevention and Control, Guangdong Guangzhou 510300, China)

Abstract: To explore the anti-senescence and anti-oxidation effects of soybean isoflavones, aged SD rats were given various doses of soybean isoflavone and the change in their CD28 T-cell expression and MDA content in liver were observed. Thirty 12-month-old female rats were divided randomly into 3 groups: aged control and 0.33, 0.99 g/kg BW soybean isoflavones groups. Another ten 2-month-old female rats were used as a young

[4] 何来英,严卫星,楼密密,等. 保健食品抗疲劳作用测试方法研究[J]. 中国食品卫生杂志 1997, 9 (4): 1-8.

[5] 李宁川,金其贯,孙新荣. 力竭性游泳训练对建立过度训练动物模型的作用[J]. 体育与科学, 2000, 21 (1): 53-55.

[6] 杨玉梅,许翠英,刘苏星,等. 增血速口服液的抗疲

劳与耐缺氧作用研究[J]. 中草药, 1998, 29 (9): 616-617.

[7] 黄芳,吴小南,汪家梨,等. 大黑蚂蚁乙醇提取液对健康小鼠抗疲劳作用的影响[J]. 中国公共卫生, 2000, 16 (3): 220-221.

[收稿日期:2005 - 01 - 15]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2005)05 - 0404 - 04

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2002087);广东省重点医学科技攻关专项[粤卫[2003]246号]
作者简介:黄琼 女 主管医师 硕士

This work was supported by the Medicine of the Science and Technology research (A2002087) and the Major Medicine of the Science and Technology Program Funds [Yuewei [2003] 246hao] of the Province of Guangdong, China.

control group. The soybean isoflavone groups were given soybean isoflavones (0.33, 0.99g/kg BW) by gavage (1 ml/100 g BW) and the 2 control groups were given purified water of same volume by gavage once a day. After 4 weeks, the content of MDA and the activity of SOD in liver were measured by reagent kits; levels of MMP and ROS in liver cells were measured by FACS; peripheral blood samples were collected for counting of CD28⁺ T cell. Compared with the aged control group, the results showed that the contents of MDA in the liver of young control group and soybean isoflavone groups were significantly decreased ($P < 0.05$), the SOD activities, levels of MMP in the liver were significantly increased ($P < 0.05$) and the levels of ROS in liver cells of soybean isoflavone groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the young control group, the count of CD28⁺ and CD28⁺/CD8⁺ ratio in the aged control group were lower and the CD28⁺/CD8⁺ ratio were higher. Compared with the aged control group, the count of CD28⁺ and the CD28⁺/CD8⁺ ratio in the soybean isoflavone groups were higher and the ratio of CD28⁺/CD8⁺ T cell lower. The results suggested that, in aged rats, the CD28 expression level, the stability of liver mitochondrial membrane and the ability to eliminate oxygen free radicals were all decreased and the end products of lipid peroxidation was increased. It is concluded that soybean isoflavones can enhance the CD28 expression, increase the activity of antioxidant enzyme in liver and the stability of liver mitochondrial membrane and decrease the levels of ROS in liver cells of aged rats.

Key word: Legumes; Isoflavones; Antigens, CD8; Antigens, CD28; Mitochondria, Liver; Reactive Oxygen Species; Superoxide Dismutase; Malondialdehyde

大豆异黄酮 (Soybean isoflavones) 属类黄酮化合物,具有双酚类结构,广泛存在于豆科植物中。近年来,关于大豆异黄酮的研究集中在其预防和治疗骨质疏松以及抑制肿瘤方面,一方面认为与其在生物体内通过与甾体雌激素受体以低亲和力结合而发挥弱的雌激素样效应,同时也对雌激素表现一定的拮抗作用有关;另一方面认为与大豆异黄酮的抗氧化性、消除自由基作用有关^[1]。目前,Harman 提出的衰老的自由基学说已得到公认^[2],衰老的线粒体学说也不断得到证实^[3],而这两种学说又是相辅相成的。另外,衰老可导致免疫功能异常,包括 T、B 淋巴细胞的衰老等表现。基于大豆异黄酮具有抗氧化性,但其对衰老个体体内氧化应激系统影响的研究较少见这一现状,本研究通过建立衰老的动物模型,检测老龄大鼠肝组织超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、肝细胞内活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 及线粒体膜电位 (Mitochondrial membrane potential, MMP) 的变化,了解大豆异黄酮对老龄大鼠肝脏氧化应激系统的影响;同时观察其抗大鼠 T 细胞衰老的作用。为大豆延缓衰老的保健功效提供一定的实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和实验室 SPF 级 SD 种雌性大鼠,2 月龄 (体重:180~220 g) 及 20 月龄 (体重:400~500 g),由第一军医大学实验动物中心提供,动物合

格证号 2002A040。颗粒饲料由第一军医大学实验动物中心提供。动物实验室:SPF 级,合格书粤检证号 2001C059。室温 (22 ± 2) °C;湿度 60%~80%。

1.1.2 仪器和试剂 流式细胞仪 (FACS Calibur) 为美国 Becton Dickinson 公司产品;LABORTECHNIK T-25 型高速剪切乳化分散机为美国 IKA 公司产品;UV-1206 型紫外可见分光光度计为日本岛津公司产品。CD28 (PE)、CD8 (FITC) 单克隆抗体、同型对照以及溶血素均为美国 BD (PharMingen) 公司产品,由深圳晶美公司经销;H₂DCFDA 和 Rh123 均为美国 Molecular Probes 公司产品,由深圳晶美公司提供。SOD、MDA 测定和蛋白质定量试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。受试样品大豆异黄酮类提取物为类三角形片剂 (异黄酮类含量为 12%),由广东省某保健品公司提供。

1.2 方法

1.2.1 分组与给样 实验大鼠在实验室条件下观察 1 周后,设 10 只 2 月龄大鼠为青年对照组,另外 30 只 20 月龄大鼠采取随机分组方法分为 3 组,分别为老年对照组和 2 个受试物组 (0.33、0.99 g 大豆异黄酮片/kg BW),每组各 10 只动物。各组每天按 1 ml/100 g BW 量灌胃,其中青年、老年对照组给予纯净水,受试物组按剂量给予受试样品 (样品用纯净水调配成各剂量所需浓度),连续灌胃 4 周后进行各项试验。

1.2.2 标本前处理及观察指标

1.2.2.1 大鼠外周血 T 淋巴细胞 CD8/CD28 亚群比

值检测^[4]

双色免疫荧光标记 采大鼠颈静脉血,肝素抗凝,取 50 μ l 全血与 4 μ l CD8(FITC)单抗和 9 μ l CD28(PE)单抗混合,室温下避光孵育 30 min,用 0.5 ml 溶血素准确裂解红细胞 10 min,离心(1 300 r/min 5 min)获取有核细胞,用 PBS 洗涤 2 次后上机分析。

流式细胞仪分析 标记的细胞经前向散射(Forward scatter, FSC)和侧向散射(Side scatter, SSC),在二维 Dot-Plot 图中划出淋巴细胞区,然后对淋巴细胞作 FITC 和 PE 荧光强度检测,其中 FITC 为荧光 1(FL1),滤光片带通为 530/30 nm,PE 为荧光 2(FL2),滤光片带通为 585/42 nm,数据显示于双色散点图(FL1/FL2)中。测定时各荧光通道均以相同类型(Isotype) IgG 染色作为同型对照,计数 10 000 个淋巴细胞,全部数据经 FACS Calibur 流式细胞仪及 CellQuest 软件获取和分析。

1.2.2.2 大鼠肝脏单细胞悬液制备及肝组织匀浆制备

机械法制备肝细胞悬液 实验结束后,取 1 cm^3 大小肝组织于 D-Hank's 液中,用磨砂玻片研磨,经 200 目钢筛过滤后,用 D-Hank's 液洗涤 3 次(1 300 r/min 5 min),用 RMP11640 调整细胞浓度到 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

肝细胞匀浆制备 实验结束后,取 0.2 g 肝组织,生理盐水冲洗、拭干后剪碎,置匀浆器中,加入预冷生理盐水,以 2 000 r/min 匀浆 3 次,间隔 30 s,每次持续 10 s,制成 10%肝组织匀浆(质量体积分数)。4 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行肝组织 MDA 含量和 SOD 活力的测定。

1.2.2.3 肝细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位(MMP)的测定参照文献方法^[5,6]

双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(H_2DCFDA)是一种荧光探针,它可快速地通过细胞膜进入细胞,在细胞内酯酶作用下释放出 DCFH,当细胞内存在 ROS 时,DCFH 立即被氧化为二氯荧光黄(DCF),其荧光强

度与细胞内的 ROS 生成量成正比。双氢罗丹明 123(Rh123)是一种线粒体吸收的亲脂性阳离子荧光染料,它能顺利通过活细胞的胞膜和线粒体膜,选择性地富集在线粒体上,富集的量取决于线粒体膜电位的高低,一定的膜电位形成一定的荧光值,因此荧光值的高低可反映线粒体膜电位的大小。

实验时,取 1 ml 肝细胞悬液加入 20 μ l H_2DCFDA 负载液,使其终浓度达 20 $\mu\text{mol/L}$,另取 1 ml 肝细胞悬液加入 20 μ l Rh123,使其终浓度达 100 $\mu\text{mol/L}$,37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次(1 300 r/min,5 min)后上机分析。

流式细胞仪分析 标记的细胞经前向散射(Forward scatter, FSC)和侧向散射(Side scatter, SSC),在二维 Dot-Plot 图中划出肝细胞区,然后对肝细胞做 FITC 荧光强度检测,485 nm 为激发波长,530 nm 为发射波长,数据显示于直方图中。每份样本获取 10 000 个肝细胞,CellQuest 软件分析 DCF 和 Rh123 的平均荧光强度。

1.2.2.4 肝匀浆丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定肝匀浆中丙二醛(MDA)含量,分光光度法测定超氧化物歧化酶(SOD)活力,采用考马斯亮兰法测定组织蛋白含量。

1.3 统计分析 实验数据经 SPSS10.0 统计软件包处理并进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大豆异黄酮对老龄大鼠外周血 T 淋巴细胞表面 CD8/CD28 比例的影响 结果显示老年对照组大鼠外周血 $\text{CD}28^+$ 和 $\text{CD}28^+/\text{CD}8^+$ T 细胞比例低于青年对照组,而 $\text{CD}28^-/\text{CD}8^+$ T 细胞比例高于青年对照组,给予大豆异黄酮样品组三者比例均介于两对照组之间。结果见图 1。

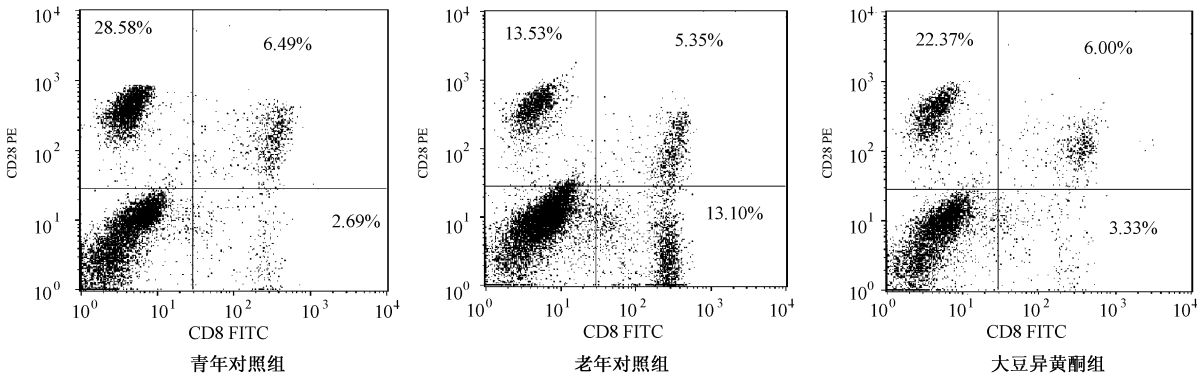


图 1 大豆异黄酮对大鼠外周血 T 细胞表面 CD28 表达水平的影响 (n = 4)

2.2 大豆异黄酮片对老龄大鼠肝组织丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

从表1可见,老龄对照组肝组织过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)含量较青年对照组高,而大豆异黄酮剂量组的肝组织MDA含量均较老年对照组低,差异均有显著性意义($P < 0.05$);老龄对照组肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活力较青年对照组低,而大豆异黄酮剂量组的SOD活力较老年对照组高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 大豆异黄酮片对老龄大鼠肝细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位(MMP)的影响

从图2、图3及表2可见,老龄对照组肝细胞内线粒体膜电位(MMP)水平较青年对照组低,而大豆异黄酮剂量组肝细胞内MMP水平较老龄对照组高,差异有显著性

表1 大豆异黄酮片对老龄大鼠肝组织MDA含量及SOD活力的影响			
(x̄ ± s)			
组别	n	MDA含量 (mmol/g. Prot)	SOD活力 (NU/mg. Prot)
青年对照组	10	2.17 ± 0.28	185.13 ± 19.80
老年对照组	10	3.47 ± 0.54 ^a	144.42 ± 18.55 ^a
0.33g/kg BW	10	2.89 ± 0.50 ^c	177.81 ± 16.76 ^c
0.99g/kg BW	10	2.90 ± 0.47 ^b	164.95 ± 19.63 ^b

注:a与青年对照组比较 $P < 0.01$;b与老年对照组比较 $P < 0.05$;
c与老年对照组比较 $P < 0.01$ 。

意义($P < 0.05$);老龄对照组肝细胞内活性氧(ROS)含量较青年对照组高,而大豆异黄酮剂量组肝细胞内的ROS含量较老龄对照组低,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

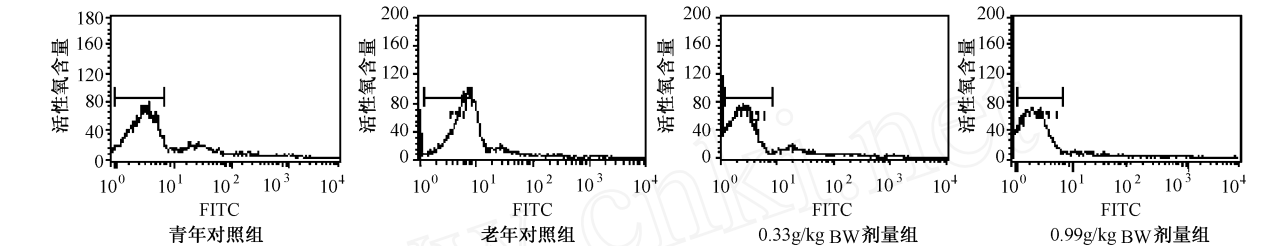


图2 大豆异黄酮片对老龄大鼠肝细胞内ROS的影响(DCF直方图)

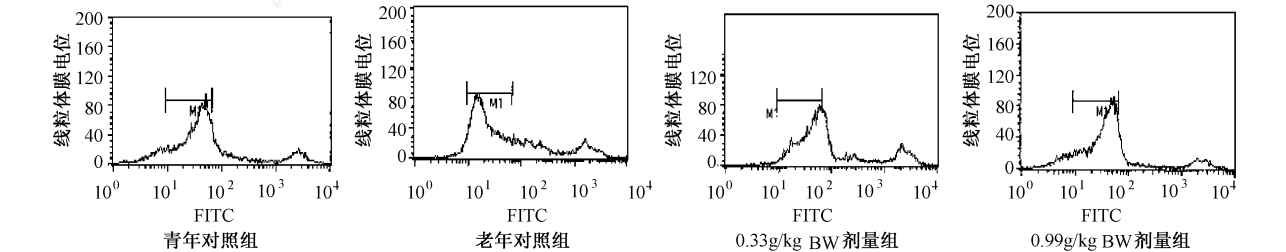


图3 大豆异黄酮片对老龄大鼠肝细胞内MMP的影响(Rh123直方图)

表2 大豆异黄酮片对老龄大鼠肝细胞内ROS及MMP的影响			
(x̄ ± s)			
组别	n	DCF(FI)	Rh123(FI)
青年对照组	5	4.06 ± 0.89	35.67 ± 3.16
老年对照组	5	5.19 ± 1.71	28.44 ± 4.46 ^a
0.33 g/kg BW	5	3.00 ± 0.18 ^c	36.82 ± 5.21 ^b
0.99 g/kg BW	5	3.20 ± 0.28 ^b	37.28 ± 5.28 ^b

注:FI:荧光强度,a与青年对照组比较 $P < 0.05$;b和c分别表示与老年对照组比较 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 大豆异黄酮对老龄大鼠外周血T淋巴细胞表面CD8/CD28表达水平的影响

有文献报道,CD28⁺在CD4⁺和CD8⁺T细胞表面随增龄而表达降低^[7]。CD28⁺T细胞多为CD8⁺T细胞,该亚群参与抗病毒免疫。老龄对照组结果显示,老年对照组大鼠外周血CD28⁺和CD28⁺/CD8⁺T细胞比例低于青年对照组,而CD28⁺/CD8⁺T细胞比例高于青年对照组,给予大豆异黄酮样品组三者比例均介于两对照组之

间,说明大豆异黄酮有抗T细胞衰老作用。

3.2 大豆异黄酮对肝组织MDA、SOD、肝细胞内ROS的影响

本研究通过建立衰老的动物模型,检测大鼠肝组织SOD、MDA及肝细胞内ROS的变化来了解大豆异黄酮对老龄大鼠肝脏氧化应激系统的影响,结果表明给予大豆异黄酮后的老龄大鼠,无论是肝细胞内ROS含量还是MDA水平均较老年对照组低,同时肝组织SOD活力较老年对照组高,这说明大豆异黄酮有抗氧化作用,可减轻自由基对机体的损伤,从而达到延缓衰老的功效。青年对照组肝组织MDA含量及ROS均较老年对照组低,而肝组织SOD活力较老年对照组高,这一结果再次证实氧自由基及其在体内诱发氧化反应的水平均随年龄的增加而增高,而清除体内自由基的能力却随年龄的增加而降低。

3.3 大豆异黄酮对肝细胞线粒体功能的影响

本

实验结果表明,老年对照组肝细胞线粒体膜电位明显低于青年对照组,与已有文献报道相符^[8,9]。而给予大豆异黄酮后的老龄大鼠肝细胞线粒体膜电位较老年对照组高,甚至较青年对照组略高,显示大豆异黄酮有极好的稳定线粒体膜电位,改善衰老机体细胞内线粒体的作用,从而达到辅助延缓衰老的功能。

参考文献

[1] 陈峰,励建荣,主编.现代生物与食品技术[M].北京:中国轻工业出版社,113-116.
[2] Aahok B T, Ali T. The aging paradox: free radical theory of aging[J]. Exp Gerontol, 1999,34(3):293-303.
[3] Lowald A. The mitochondrial theory of aging: do damaged mitochondria accumulate by delayed degradation? [J]. Exp Gerontol, 1999,34(5):605-612.
[4] Nociari M M, Telford W, Russo C. Postthymic development of CD28⁻ CD8⁺ T cell subset: age-associated expansion and

shift from memory to native phenotype[J]. J Immunol, 1999, 11:229-241.
[5] Smith J A, Weidemann M J. Further characterization of neutrophil oxidative burst by flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1993,162:261-268.
[6] 杨杏芬,庄志雄,魏青,等.铅对肾上腺皮质细胞线粒体的氧化损伤[J]. 中山医科大学学报,2001,22(2):14-18.
[7] 宋淑霞,吕占军. T,B 细胞衰老及其分子机制研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2002,18(3):307-309.
[8] Ames B N, Shigenaga M K, Hagen T M. Mitochondrial decay in aging[J]. Biochem Biophys Acta, 1995,1271:165-170.
[9] Beckman K B, Ames B N. The free radical theory of aging natures[J]. Physiol Rev, 1998,78:547-581.
[10] 沈关心,主编.现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998:349-351.

[收稿日期:2005 - 02 - 22]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2005)05 - 0407 - 05

《中国食品卫生杂志》2006 年征订启事

《中国食品卫生杂志》(ISSN 1004 - 8456/CN 11 - 3156/R)系中华预防医学系列杂志,公开发行,双月刊,96 页。所设栏目论文部分有:论著、实验技术与方法、监督管理、调查研究、综述、食物中毒、CAC 专栏、网络信息等;法规文件部分刊登有关食品卫生的国家法律、法规、标准、行政答复、通告等。读者可以通过本刊及时掌握国家新颁布的食品卫生法律、法规,了解最新食品卫生科研成果,解决工作中遇到的问题,提高论文水平。

本刊可通过邮局订阅,邮发代号:82 - 450;亦自办发行并常年办理订阅。
自办发行办法如下,2006 年《中国食品卫生杂志》全年售价 80 元(含邮费)。从邮局汇款时请注明订阅册数、详细的收件人地址、单位、邮编、姓名;通过银行汇款的单位,请在汇款的同时寄函或电传我所以下内容:订阅册数、详细收件人地址、邮编、单位、姓名,以便准确邮寄。
希望挂号投寄期刊的用户,每期杂志需加挂号费 3 元,全年合计挂号费 18 元,并请寄款时同时说明要求挂号。
汇款地址:北京市宣武区南纬路 29 号 《中国食品卫生杂志》编辑部
邮 编:100050 联系人:姜人怡
电 话:(010)83132658 电 传:(010)83132658
银行汇款:工商银行北京潘家园支行 账 号:0200022709008904285
户 名:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所 请注明“《中国食品卫生杂志》订约款”

《中国食品卫生杂志》编辑部
2005 年 9 月

