

# 大豆异黄酮对糖尿病大鼠心肌自由基损伤的保护作用

马善峰<sup>1,2</sup>, 方迎艳<sup>2</sup>, 关宿东<sup>2</sup>, 汪思应<sup>1</sup>

[摘要] 目的: 探讨大豆异黄酮对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠心肌损伤的保护作用。方法: SD大鼠 48只, 随机分为正常对照组(NC)、糖尿病对照组(DC)、低剂量大豆异黄酮治疗组(L-SI)、中剂量大豆异黄酮治疗组(M-SI)、高剂量大豆异黄酮治疗组(H-SI)、尼尔雌醇治疗组(NT)。后5组应用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 50 mg/kg 腹腔注射, 制备DM模型。第5周起, NC、DC组予0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 10 ml·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃, L-SI、M-SI、H-SI组分别予大豆异黄酮30、60、120 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃, NT组予尼尔雌醇混悬液0.1 mg/kg, 每周2次(周一、四), 其余时间同NC、DC组灌胃。每天灌胃2次, 体积均为10 ml/kg。第10周末, 测空腹血糖及心肌组织乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。结果: 与DC组比较, H-SI组大鼠体重、心肌组织LDH、CK、SOD活性显著升高( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。结论: 高剂量大豆异黄酮可显著提高糖尿病大鼠体重、心肌组织LDH、CK、SOD活性, 从而对心肌自由基损伤产生保护作用。

[关键词] 糖尿病; 大豆异黄酮; 心肌损伤; 自由基; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 587.1; Q 505 [文献标识码] A

## Role of soy isoflavones in protecting diabetic rats from myocardial injury caused by free radicals

MA Shan-feng, FANG Ying-yan, GUAN Su-dong, WANG Si-ying

(Department of Pathologic Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of soy isoflavones(SI) in preventing and treating myocardial injury of experimental diabetic rats. **Methods:** Forty-eight SD rats were randomly divided into six groups; normal control group(NC), diabetic control group(DC), three SI treatment groups(L-SI, M-SI, H-SI) and nilestriol treatment group(NT). All the rats were given streptozotocin(STZ) intraperitoneal injection(ip) except NC group rats, and the dosages were all 50 mg/kg. After 4 weeks, SI 30, 60, 120 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> were given in L-SI, M-SI, H-SI groups, nilestriol 0.2 mg·kg<sup>-1</sup>·wk<sup>-1</sup> was given in NT group, and natural solutions were given in NC and DC groups. Volumes in all groups were 2 ml·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. Drugs were all orally administered using stomach tubes. The level of body weight(BW) and blood glucose(BG) were measured. LDH, CK, SOD activities and MDA contents in myocardial tissue were also measured. **Results:** Compared with DC group, LDH, CK, SOD activities in myocardial homogenate and the level of BW were significantly increased in H-SI group( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ). **Conclusions:** High-doses soy isoflavones can increase LDH, CK, SOD activities in myocardial homogenate and the level of BW in diabetic rats.

[Key words] diabetes mellitus; soy isoflavones; myocardial injury; free radicals; rats

自1972年Rubler<sup>[1]</sup>首次提出糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy)的概念以来, 虽有许多不同角度的研究, 但其发生机制仍不清楚。有研究显

示链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠存在自由基代谢异常<sup>[2]</sup>, 促使对糖尿病心肌的损伤。应用某些抗自由基损伤的药物对糖尿病并发症的防治有一定的疗效<sup>[3]</sup>。雌激素治疗糖尿病患者可降低心肌梗死发生率, 对心肌细胞有保护作用<sup>[4]</sup>。但由于其副作用较大, 限制了临床应用。植物雌激素如大豆异黄酮(soy isoflavones, SI)是存在于植物中具有雌激素效能的天然化合物, 因此SI能否替代雌激素防治糖尿病性心肌病是一重要课题。

[收稿日期] 2003-12-08

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2003KJ003ze)

[作者单位] 1. 安徽医科大学 病理生理学教研室, 安徽 合肥 230032; 2. 蚌埠医学院 生理学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 马善峰(1971-), 男, 安徽临泉县人, 讲师。

[通讯作者] 汪思应, 博士, 教授, E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

本文从心肌自由基损伤方面探讨SI的心肌保护机制。

## 1 材料与方

1.1 实验材料 (1) 动物: 纯种SD大鼠48只, 雌雄兼用, 体重210~230g, 由本院实验动物科提供。(2) 药物: 链脲佐菌素(STZ)为美国Sigma公司产品, 大豆异黄酮(SI)为大连绿峰天然生物制品有限公司产品, 批号20021010, 含SI 41.56%, 其中大豆甙(daidzin) 16.42%, 大豆甙原(daidzein) 1.03%, 金雀异黄酮(genistin) 22.63%, 金雀黄素、染料木素(genistein) 1.48%。临用时配成所需浓度。阳性对照药尼尔雌醇(nilestriol, NT), 上海华联制药有限公司生产, 批号030201, 制成0.1%蒸馏水混悬液。SI溶于0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成0.15%、0.3%、0.6%SI溶液。(3) 主要试剂: 乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物制品有限公司。(4) 主要仪器: 电子分析天平, One touch II型血糖仪(美国强生公司)。

1.2 实验方法 (1) DM模型的建立与分组: SD大鼠48只, 随机分出8只作为正常对照组(NC), 其余用于造模。(2) 造模: DM模型以一次性腹腔注射STZ 50mg/kg诱发, STZ临用时以0.05 mmol/L、pH 4.5的柠檬酸缓冲配成2%浓度, 在冰水中进行。注射前大鼠禁食12h, 注射72h后尾静脉采血测血糖(One Touch II型血糖仪), 隔日1次, 连续3次, 以血糖>16.7 mmol/L确定为DM模型。DM大鼠分笼饲养, 固定饲料, 自由饮水。4周后随机分为5组: 糖尿病对照组(DC), 低、中、高剂量SI治疗组(L-SI, M-SI, H-SI), 尼尔雌醇治疗组(NT), 每组8只。实验期间, 因血糖过高、麻醉意外死亡4只。(3) 给药方法: 从病程第5周开始给药, 持续6周。NC组予0.5%CMC-Na灌胃, 低、中、高剂量SI治疗组分别予SI 30、60、120 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃, NT组予0.1 mg/kg NI混悬液灌胃, 每周2次(周一, 周四), 其余时间以0.5%CMC-Na灌胃。各组每天灌胃2次, 给药体积10 ml/kg。(4) 血液生化指标的测定: 从颈总动脉放血, 测空腹血糖, 检测仪器为Beckman全自动生化分析仪。(5) 心肌组织生化指标测定: 将动物断头处死, 迅速开胸, 摘取心脏, 在冰生理盐水中取心肌组织, 制备1%匀浆, 取上清液作

浆蛋白含量测定。取匀浆3 000 r/min离心10 min后取上清液-20℃保存, 待测上述各指标。测定时按说明书要求操作, 其中LDH测定采用比色法, CK测定采用NAC激活法(酶偶联法), MDA测定采用TBA法, SOD测定采用羟胺法, 蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 $q$ 检验。

## 2 结果

2.1 各组大鼠体重、血糖的变化 DC组大鼠体重明显低于NC组和H-SI组( $P < 0.01$ ), 与其他各组差异均无显著性( $P > 0.05$ )。另外H-SI组大鼠体重显著高于L-SI组、M-SI和NT组( $P < 0.01$ )。DC组大鼠空腹血糖明显高于NC组( $P < 0.01$ ), 各治疗组虽有降低, 但与DC组差异均无显著性( $P > 0.05$ ) (见表1)。

2.2 心肌组织生化指标的测定 DC组心肌组织LDH活性低于NC组、M-SI和H-SI组( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ), 但L-SI组和NT组与DC组差异均无显著性( $P > 0.05$ ), M-SI组与H-SI组间差异无显著性( $P > 0.05$ )。NC组和H-SI组CK活性高于DC组( $P < 0.05$ ), 且与H-SI差异无显著性( $P > 0.05$ )。DC组SOD活性低于NC组、H-SI和NT组( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ); L-SI组SOD活性亦低于NC组( $P < 0.05$ )。DC组MDA活性高于NC组( $P < 0.05$ ), 其余各组间SOD活性和MDA活性间差异均无显著性( $P > 0.05$ ) (见表2)。

表1 SI、NT对糖尿病大鼠体重、血糖的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	体重(g)	血糖(mmol/L)
NC	8	363.8±49.0	6.3±1.1
DC	6	193.3±52.0**	24.2±3.6**
L-SI	6	230.0±34.6**#	23.8±4.2**
M-SI	8	266.3±64.1**#	23.6±2.9**
H-SI	8	350.0±55.8 $\Delta\Delta$	21.8±2.9**
NT	8	248.8±41.2**#	23.0±2.8**
$F$	—	12.68	43.11
$P$	—	< 0.01	< 0.01
$MS_{组内}$	—	2 598.738	8.792

$q$  检验: 与NC组比较 \*\* $P < 0.01$ ; 与DC组比较  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与M-SI组比较 # $P < 0.01$

## 3 讨论

人体内的自由基可引发多价不饱和脂肪酸过氧

化而生成 LPO, 其最终产物为 MDA, 后者能使蛋白质、核酸、脂质发生交联, 使生物膜变性、细胞突变、衰老和死亡。SOD 是体内主要的自由基清除剂, 它可以促进  $O_2^-$  的歧化反应, 清除  $O_2^-$  的毒性作用, 减轻和防止脂质过氧化作用, 可阻断自由基促使产生 LPO 的链式反应, 从而保护细胞不受自由基的损害。

表 2 SI、NT 对糖尿病大鼠心肌组织 LDH、CK、SOD 活性和 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LDH (U/gprot)	CK (U/mgprot)	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/gprot)
NC	8	6 238.2 ± 698.4	153.5 ± 39.4	152.0 ± 20.9	8.4 ± 2.5
DC	6	4 885.0 ± 594.4 * *	96.2 ± 22.7 *	98.5 ± 23.7 * * *	14.2 ± 3.1 *
L-SI	6	4 921.4 ± 316.5 * *	123.5 ± 17.8	111.3 ± 15.8 *	12.2 ± 2.3
M-SI	8	5 835.8 ± 451.7 $\Delta$ $\Delta$ $\Delta$ ##	135.6 ± 17.2	121.5 ± 16.3	12.1 ± 2.8
H-SI	8	6 164.8 ± 274.3 $\Delta$ $\Delta$ $\Delta$ ##	140.1 ± 25.1 $\Delta$	145.0 ± 20.5 $\Delta$	10.1 ± 1.8
NT	8	5 247.9 ± 336.9 * *	132.2 ± 20.3	134.4 ± 26.4 $\Delta$	11.0 ± 2.9
F	—	11.79	3.88	6.53	4.15
P	—	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
MS 组内	—	221 873.182	641.915	441.964	6.702

q 检验: 与 NC 组比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 DC 组比较  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与 L-SI 组比较 # $P < 0.01$ ; 与 NT 组比较 + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$

自由基代谢异常在糖尿病心血管并发症中起重要作用。糖尿病时, 不仅自由基生成增多, 而且对自由基的清除能力减低, 从而造成自由基大量蓄积, 引起心肌组织的严重损伤, 其损伤程度可通过 MDA 含量变化及 SOD 活性变化间接评定<sup>[5]</sup>。研究表明, 在长期高糖环境下, 心肌组织中的 SOD 发生非酶糖基化 (NEG) 反应而失去其活性, 造成超氧化物阴离子  $O_2^-$  的产生, 由于  $O_2^-$  的毒性作用, 氧自由基攻击不饱和脂肪酸, 使膜中磷脂发生过氧化, 使膜的流动性、通透性改变, 严重者导致这些生物膜溶解和细胞死亡<sup>[6]</sup>, 心肌酶 LDH、CK 渗出增多。

活性氧的产生, 在 DM 自由基损伤过程中起重要作用。植物雌激素是植物中具有雌激素效能的天然化合物, 在预防和治疗心血管疾病中有重要作用<sup>[7]</sup>, 其中 SI 能减弱细胞的过氧化状态<sup>[8]</sup>, 对损伤心肌细胞有保护作用<sup>[9]</sup>。SI 成分中, 金雀异黄酮含 5、7、4' 三个酚羟基, 大豆甙含 7、4' 二个酚羟基。酚羟基作为代氢体能与自由基反应使之形成相应的离子或分子, 灭活自由基, 终止自由基的连锁反应。

金雀异黄酮和大豆甙均能明显抑制 Fe-ADP-NADPH 系统引发的大鼠肝微粒体脂过氧化物形成, 对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统引发的  $O_2^-$  也有明显抑制作用。金雀异黄酮甙也可抑制  $H_2O_2$ 。郑高利等<sup>[10]</sup> 观察 SI 提取物对阿霉素引起小鼠过氧化损伤有抗氧化作用, 大豆异黄酮提取物增加小鼠红细胞、肝脏和心肌 SOD 活性, 降低血浆、肝脏和心脏的 LPO 水平, 对小鼠过氧化损伤有较强的抗氧化作用。

本实验结果表明, 糖尿病大鼠心肌组织抗自由基损伤作用减弱, 脂质过氧化反应增强。高剂量大豆异黄酮组能提高糖尿病大鼠心肌组织 SOD 活性, 减少心肌酶 LDH、CK 渗出, 提示其可通过提高内源性抗氧化酶活性, 抑制脂质过氧化过程而减轻氧自由基的损伤。由于在糖尿病心肌损伤机制中, 继发于糖代谢异常而引起的损伤已不是唯一的因素, 自由基损伤也起了重要作用。因此, 对糖尿病患者长期应用 SI 可防治自由基的心肌损伤。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis [ J ]. *Am J Cardiol*, 1972, 30 ( 6 ): 595 ~ 602.
- [ 2 ] 赵 明, 王亦根, 张 雯, 等. 超氧化物歧化酶对链脲佐菌素诱发糖尿病自由基代谢的影响 [ J ]. *中国糖尿病杂志*, 1995, 3 ( 1 ): 44 ~ 46.
- [ 3 ] Sinclair AJ, Lunec J, Girling AJ, et al. Modulators of free radical activity in diabetes mellitus: Role of ascorbic acid [ J ]. *EXS*, 1992, 62: 342 ~ 352.
- [ 4 ] Kaplan RC, Heckbert SR, Weiss NS, et al. Postmenopausal estrogens and risk of myocardial infarction in diabetic women [ J ]. *Diabetes Care*, 1998, 21 ( 7 ): 1 117 ~ 1 121.
- [ 5 ] 赵 新. 实验性心肌缺血引起的脂质过氧化反应和抗氧化剂的抑制作用 [ J ]. *西安医科大学学报*, 1987, 2 ( 2 ): 133 ~ 135.
- [ 6 ] 邱 进. 糖网方对糖尿病视网膜病变大鼠抗氧化损伤的研究 [ J ]. *中医药学刊*, 2003, 21 ( 9 ): 1 507.
- [ 7 ] 迟晓星. 植物雌激素及其对雄性生殖系统影响的研究进展 [ J ]. *国外医学·卫生学分册*, 2001, 28 ( 6 ): 346 ~ 348.
- [ 8 ] 闫祥华, 顾景范, 孙存普. 大豆异黄酮对大鼠血脂和过氧化状态的影响 [ J ]. *营养学报*, 2000, 22 ( 1 ): 31 ~ 35.
- [ 9 ] Deodato B, Altavilla D, Squadrito G, et al. Cardioprotection by the phytoestrogen genistein in experimental myocardial ischaemia - reperfusion injury [ J ]. *Br J Pharmacol*, 1999, 128 ( 8 ): 1 683 ~ 1 690.
- [ 10 ] 郑高利, 朱寿民, 刘子贻, 等. 大豆异黄酮的抗氧化作用 [ J ]. *浙江医科大学学报*, 1997, 26 ( 5 ): 196 ~ 199.