

大豆黄酮对衰老小鼠脑组织 SOD、LDH 同工酶的影响^{*}

刘文^① 毛 臻^① 陈 龙^② 沈露露^① 程 超^① 郑元林^{①②**}

(^① 徐州师范大学生命科学学院 江苏省药用植物生物技术重点实验室 徐州 221116;

^② 南京师范大学江苏省资源生物技术重点实验室 南京 210008)

摘要: 利用 SOD 和 LDH 同工酶电泳分析, 研究大豆黄酮对衰老小鼠的抗氧化作用。结果显示大豆黄酮没有改变 SOD 和 LDH 同工酶谱的特征, 但对因衰老引起的小鼠脑组织 LDH 和 SOD 同工酶活性、各组分的相对活性和比活力的变化有不同程度的改善作用, 即 LDH 同工酶中 LDH-2、LDH-3 的活性明显下降, LDH-1 的活性下降最为明显, 而 LDH-4 的活性有所下降, 但不显著, LDH-5 的活性几乎没有变化, SOD 同工酶的 SOD-1 和 SOD-2 的活性有不同程度的升高。这表明大豆黄酮是通过抑制 LDH 同工酶 H 亚基的合成来降低 LDH 的活性, 而对 M 亚基的合成没有影响, 并且能够促进 SOD 同工酶 SOD-1 和 SOD-2 的合成, 不影响其遗传稳定性。

关键词: 大豆黄酮; 小鼠; SOD 同工酶; LDH 同工酶

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)05-19-06

Effects of Daidzein on SOD Isoenzymes and LDH Isoenzymes in the Brain of Aged Mice

LIU Wen^① MAO Zhen^① CHEN Long^② SHEN Lu-Lu^① CHENG Chao^① ZHENG Yuan-Lin^{①②}

(^① College of Life Science, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116;

^② Key Laboratory of Resource Biotechnology, Nanjing Normal University, Nanjing 210008, China)

Abstract: In order to study the antioxidant effects of daidzein, we analyzed the SOD isoenzymes and LDH isoenzymes in the brain of aged mice by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results showed that daidzein did not affect the isozyme-spectra of SOD and LDH, but improved to varying degrees the activities of SOD isoenzymes and LDH isoenzymes, as well as the relative activities and specific activities of different subunits. The most evident decrease was observed in the activities of LDH-1 and LDH-2. LDH-3 activity decreased remarkably, LDH-4 activity showed a little decrease, while nearly no change was observed in LDH-5 activity. The activities of SOD-1 and SOD-2 increased to different degrees. The results show that daidzein reduces the activity of LDH by inhibiting the synthesis of H subunit, but promotes the synthesis of SOD-1 and SOD-2 without affecting the stability of inheritance.

^{*} 教育部高等学校骨干教师资助计划项目, 江苏省重点实验室开放基金资助项目 (No. KJS02024), 江苏省教育厅自然科学基金资助项目 (No. 98KJB180003);

^{**} 通讯作者, E-mail: ylzhang@pub.xz.jsinfo.net;

第一作者介绍 刘文, 男, 38 岁, 硕士, 讲师; 主要从事衰老生物化学的研究。

收稿日期: 2004-02-23, **修回日期:** 2004-07-05

Key words: Daidzein; Mice; SOD isoenzymes; LDH isoenzymes

大豆黄酮(daidzein)是一种异黄酮类化合物,是植物雌激素类似物,具有弱的雌激素活性,研究表明大豆黄酮可促进动物生长、增强机体免疫力^[1-3]、具有抗肿瘤^[4,5]和抗氧化作用。Hodgson^[6]和 Hwang^[7,8]的研究证明大豆黄酮可以抑制脂质过氧化、降低胆固醇、阻止动脉硬化。Yeon-Sook^[9]研究发现黄酮类物质不仅可刺激细胞分裂增殖,而且还保护自由基的氧化损伤。SOD 和 LDH 都是氧化还原酶类,在清除自由基和代谢中间产物的毒害中发挥重要的作用。在机体的活动过程中,其同工酶的水平处于动态变化状态,尤其在衰老过程中这种酶水平的变化,反映了机体衰老过程中基因表达水平的改变。本文通过大豆黄酮对衰老小鼠超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)活性和其同工酶水平上的影响研究,探讨了其延缓脑老化的生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和处理 昆明系小白鼠 8 周龄 40 只,体重为(27.5 ± 3.78) g,购自徐州医学院实验动物中心。随机分为 4 组,即生理盐水对照组(对照组 1),衰老对照组(对照组 2),大豆黄酮实验组 1、2(实验组 1、2),每组 10 只,雌雄各半。对照组 1 小鼠注射生理盐水,对照组 2、实验组 1、2 小鼠采用颈部皮下注射 D-半乳糖 50 mg/(kg·d)。从第 7 周开始给实验组 1、2 的小鼠分别灌喂剂量为 5、10 mg/(kg·d)大豆黄酮(大豆黄酮用含 1%吐温-80 助溶),两对照组灌喂 1%吐温-80 水溶液,连续 5 周。

1.2 试剂与仪器 D-半乳糖购自上海试剂二厂,大豆黄酮由南京农业大学农业部动物生理生化重点实验室陈杰教授提供,蛋白质、SOD 和 LDH 测定试剂盒系南京建成生物工程研究所生产,Acr、Bis、TEMED 系 Sigma 公司产品,NBT、PMS、NAD⁺等系上海生物工程公司进口分装。

紫外-可见分光光度计(日本岛津公司,型号为 UV-2501 PC),电泳槽由北京六一仪器厂

生产。生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司,型号为 FR-980A)。

1.3 样品制备 将小鼠拉断颈椎处死后。迅速打开颅骨取脑,取大脑,分开左右半脑即可看到边缘清晰的椭圆形海马组织,用镊子轻轻取出海马,剩余部分再切取部分大脑皮质,分别称重,加预冷生理盐水匀浆,制成 1%的海马和大脑皮质组织生理盐水匀浆液,离心(8 000 r/min, 10 min, 4℃),分别收集上清液待测。

1.4 指标测定

1.4.1 蛋白质含量测定 利用考马斯亮兰法分别测定样品中蛋白质的含量(mg/ml)。

1.4.2 小鼠不同脑区 SOD、LDH 比活力测定 取出脑组织上清液 40 μ l 按试剂盒上说明加入检测试剂,温浴,显色。分别在波长 550 nm、440 nm 处比色,测定各管吸光度,计算出样品中的 SOD 比活力(U/mg prot)和 LDH 比活力(U/g prot)。

1.4.3 不同脑区 SOD 与 LDH 同工酶分析 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离同工酶,浓缩胶 4%,分离胶 7.5%,按伯乐公司提供的方法制备,每个加样孔每次进样 10 μ l, 4℃条件下电泳,起始电流 20 mA,当样品进入分离胶后,改变电流 40 mA。持续 3 h。

SOD 染色采用活性负染色法,黑暗条件下,分别经过 NBT、含有 TEMED 和核黄素的磷酸缓冲液浸泡,再在日光灯照射下,于磷酸缓冲液中显色;LDH 的活性染色采用 NAD⁺、乳酸钠、氯化钠、NBT、PMS、磷酸缓冲液配置的染色液,在 37℃条件下显色。

电泳图谱利用凝胶图像分析系统测定同工酶的相对活性。

1.5 数据处理 各组数据用平均值标准差表示,组间差异显著性用 *t*-检验法检验。

2 结果

2.1 对衰老小鼠不同脑区 SOD 与 LDH 活性影响 由表 1 可知,在大脑皮质和海马组织中,

对照组 2 的小鼠与对照组 1 的小鼠相比 SOD 比活力分别下降了 24.23% ($P < 0.01$) 和 23.68% ($P < 0.01$), 而在大脑皮质和海马组织中两组 LDH 的比活力变化则相反, 对照组 2 小鼠的 LDH 比活力比对照组 1 小鼠的 LDH 分别提高了 35.37% ($P < 0.01$) 和 37.78% ($P < 0.01$)。灌喂大豆黄酮后, 与对照组 2 比较, 两实验组小鼠大脑皮质和海马组织中 SOD 与 LDH 的比活力均有变化, 实验组 1 的 SOD 的比活力分别增

加 13.81% ($P < 0.05$) 和 6.77% ($P < 0.05$), LDH 的比活力分别下降 9.69% ($P < 0.05$) 和 9.04% ($P < 0.05$); 实验组 2 的 SOD 的比活力分别增加 22.41% ($P < 0.05$) 和 14.60% ($P < 0.05$), LDH 的比活力分别下降 13.15% ($P < 0.05$) 和 13.44% ($P < 0.05$)。表明大豆黄酮可以增加衰老小鼠脑组织中 SOD 活性, 降低过高的 LDH 的活性。

表 1 大豆黄酮对衰老小鼠脑组织 SOD 与 LDH 活性的影响

| 组别 | n | SOD 比活力(U/mg prot) | | LDH 比活力(U/g prot) | |
|-------|----|--------------------|------------------|-------------------|-----------------|
| | | 大脑皮质 | 海 马 | 大脑皮质 | 海 马 |
| 对照组 1 | 10 | 182.53 ± 15.34 | 198.45 ± 20.57 | 7 463 ± 1 032 | 7 256 ± 1 032 |
| 对照组 2 | 10 | 138.31 ± 13.78* | 151.45 ± 15.65* | 10 103 ± 1 423* | 9 997 ± 1 571* |
| 实验组 1 | 10 | 157.42 ± 14.56** | 161.70 ± 16.47** | 9 124 ± 1 349** | 9 093 ± 1 349** |
| 实验组 2 | 10 | 169.31 ± 14.97** | 173.56 ± 18.43** | 8 774 ± 1 365** | 8 653 ± 1 365** |

* $P < 0.01$ (与对照组 1 比较), ** $P < 0.05$ (与对照组 2 比较)

2.2 对衰老小鼠脑组织 LDH 与 SOD 同工酶相对活性的影响 LDH、SOD 同工酶电泳图谱 (图 1, 2) 的结果显示, 大脑皮层组织的 8 组 LDH 同工酶图谱均显示 5 条带, 按迁移率大小排序即 LDH-1、LDH-2、LDH-3、LDH-4、LDH-5, SOD 同工酶只有两条带, 即 SOD-1、SOD-2。不同组间 LDH、SOD 相应同工酶谱带都处于同一

泳动线上, 表明其迁移率一致。LDH、SOD 同工酶电泳图谱光密度分析结果 (图 3, 4) 显示, 8 组对应的 LDH、SOD 同工酶相对活性也没有显著的差异, 海马组织也有相似的结果, 表明大脑皮质和海马之间对应同工酶没有明显差异。暗示 D-半乳糖或大豆黄酮对大脑皮质和海马组织 LDH、SOD 同工酶的影响是同步的。

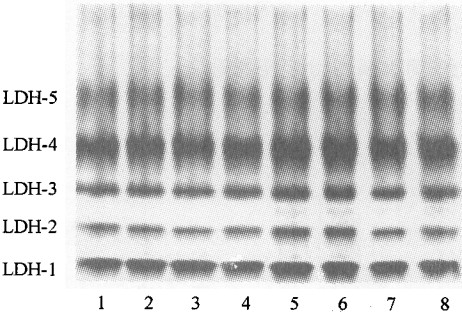


图 1 大脑皮质 LDH 同工酶图谱

1. 对照组 1(♂); 2. 对照组 1(♀); 3. 对照组 2(♂); 4. 对照组 2(♀); 5. 实验组 1(♂); 6. 实验组 1(♀); 7. 实验组 2(♂); 8. 实验组 2(♀)

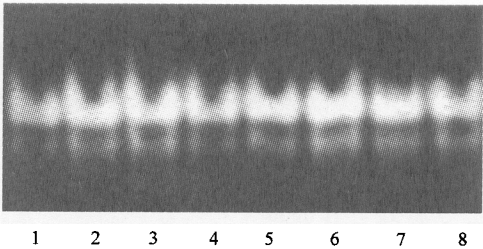


图 2 大脑皮质 SOD 同工酶图谱

同一脑区组间的对照组 2 与对照组 1 比较发现, 大脑皮质的 LDH 和 SOD 各同工酶相对活性都发生了同向的变化, 即 LDH-1、LDH-2 的相对活性增强, LDH-4、LDH-5 的相对活性减弱, 其中 LDH-1 呈现显著增强 ($P < 0.05$)、LDH-5 显

示显著减弱 ($P < 0.05$), LDH-3 没有表现出差异; SOD 同工酶的 SOD-1 的相对活性减弱, SOD-2 的相对活性增强, 且变化显著 ($P < 0.05$)。灌喂大豆黄酮的实验组与对照组 1、2 分别比较, 可以看出 LDH 和 SOD 同工酶各组分的相对活

性有远离对照组 2、向对照组 1 靠近的趋势,而且 LDH-1、LDH-5 和 SOD-1、SOD-2 的同工酶表现出显著变化 ($P < 0.05$), 海马组织中的 SOD

和 LDH 也有类似的变化。提示大豆黄酮可以改善脑老化时大脑皮质和海马的 LDH、SOD 同工酶组分相对活性的变化。

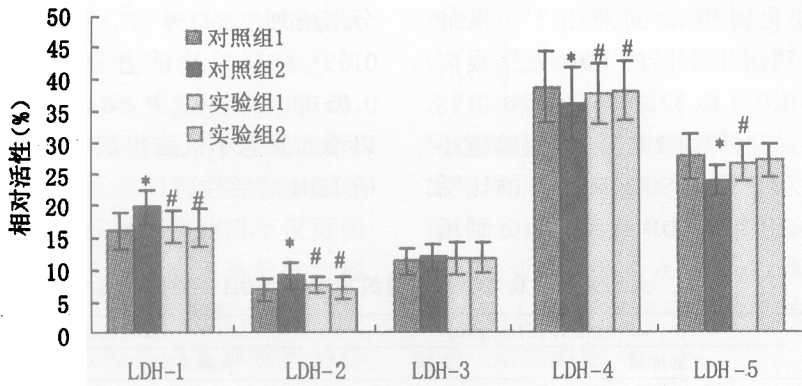


图 3 大豆黄酮对衰老小鼠大脑皮质 LDH 同工酶相对活性的影响
* $P < 0.01$ (与对照组 1 比较), # $P < 0.05$ (与对照组 2 比较)

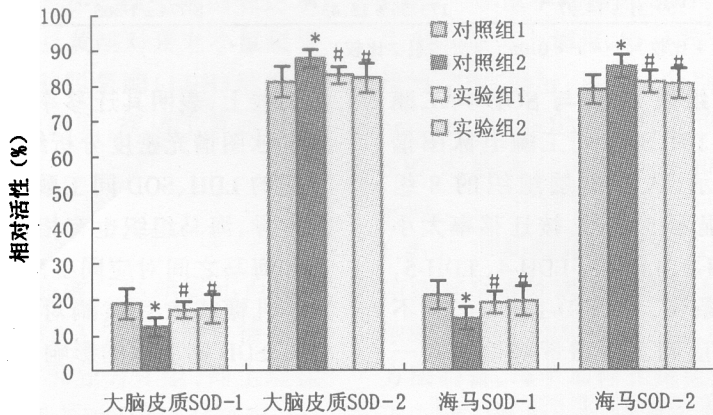


图 4 大豆黄酮对衰老小鼠不同脑区 SOD 同工酶相对活性的影响
* $P < 0.01$ (与对照组 1 比较), # $P < 0.05$ (与对照组 2 比较)

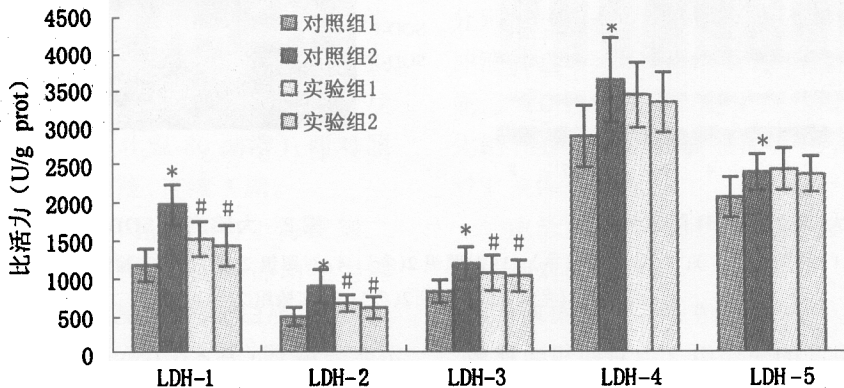


图 5 大豆黄酮对衰老小鼠大脑皮质 LDH 同工酶比活力的影响
* $P < 0.01$ (与对照组 1 比较), # $P < 0.05$ (与对照组 2 比较)

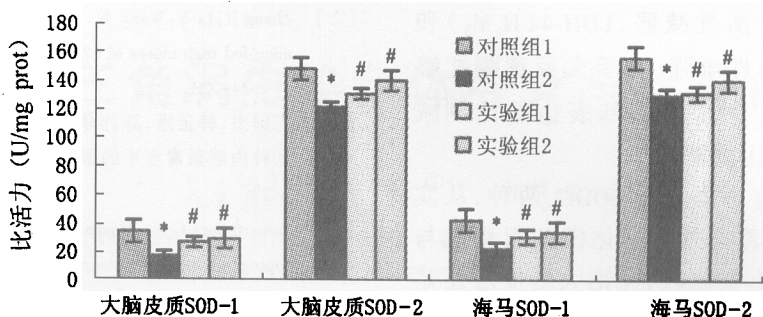


图 6 大豆黄酮对衰老小鼠不同脑区 SOD 同工酶比活力的影响

* $P < 0.01$ (与对照组 1 比较), # $P < 0.05$ (与对照组 2 比较)

2.3 对衰老小鼠脑组织 LDH 与 SOD 同工酶

比活力的影响 实验结果(图 5,6)显示。注射 D-半乳糖后大脑皮质的对照组 2 的 LDH 同工酶各组分的比活力较对照组 1 都显著升高 ($P < 0.05$), 相反 SOD 同工酶两种组分的比活力都明显下降 ($P < 0.05$)。灌喂大豆黄酮后, 实验组与对照组 2 比较, LDH 同工酶的 LDH-1 的活性下降非常明显 ($P < 0.01$), LDH-2、LDH-3 的活性明显下降, LDH-4 有下降趋势, 但不显著, LDH-5 几乎没有变化; SOD 同工酶的 SOD-1、SOD-2 都升高。实验组与对照组 1、对照组 2 分别比较, 各组分的变化都在两对照组之间。实验结果还显示, 大脑皮质和海马的 LDH 和 SOD 同工酶比活力也没有明显的组织差异性, 而且衰老和大豆黄酮对大脑皮质和海马的 LDH 和 SOD 相应的同工酶比活力影响程度也没有明显的组织差异性。上述结果表明, 大豆黄酮可以部分改善大脑皮质和海马的衰老引起的小鼠 LDH 同工酶 LDH-1、LDH-2、LDH-3、LDH-4 和 SOD 同工酶 SOD-1、SOD-2 的脑老化性变化, 但对 LDH 同工酶 LDH-5 没有影响。

3 讨 论

脑细胞氧化损伤是造成脑功能退行性变化的重要原因, 其主要靶标是 DNA、蛋白质和细胞膜上的脂质。具体表现是反映自由基代谢产物水平和脂质过氧化程度的丙二醛(MDA)的含量呈现增龄性升高, 而抗氧化酶 SOD 活性随年龄增长而下降^[10], LDH 活性出现增龄性升

高^[11]。因此, 提高抗氧化酶的活性, 保障机体充沛的抗氧化能力, 降低氧化胁迫作用是延缓脑老化的有效措施。我们的实验显示大豆黄酮可提高脑组织 SOD 的活性, 降低 LDH 的活性, 增强脑组织的抗氧化能力, 表明大豆黄酮增强脑组织抗氧化能力的途径之一是诱导抗氧化酶类的基因表达或激活抗氧化酶类的活性, Kameoka^[12]的研究也发现大豆黄酮可以促进人肠 Caco-2 细胞抗氧化蛋白 SOD 基因的表达。

LDH 同工酶适合于有氧代谢, 还是无氧代谢, 取决于 H 亚基和 M 亚基的相对含量, H 亚基含量高的 LDH 同工酶 LDH-1 (H_4)、LDH-2 (H_3M_1) 有利于有氧代谢; M 亚基含量高的 LDH 同工酶 LDH-4 (H_1M_3), LDH-5 (M_4) 则有利于无氧代谢。在组织培养实验中已经证明^[13]: 无氧条件下细胞合成较多的 LDH-5 (M_4)。H 和 M 亚基的氨基酸组成和顺序不同, 且有两个独立的基因编码。这也暗示组织中的 LDH 同工酶的比例, 至少部分地为氧的张力所控制, 进一步的研究还显示, LDH 同工酶随着年龄增长而变化, Kanungo^[14]等研究发现 96 周龄大鼠心脏中的 LDH-5 (M_4) 的比例比 30 周龄大鼠中的低得多, 骨骼肌和脑中 LDH-5 (M_4) 也存在类似的降低现象, 与此相反, 在老年鼠中 LDH-1 (H_4) 的比例升高。LDH 同工酶谱的这种变化有着十分重要的生理意义, 当年老时 LDH-5 (M_4) 比例降低, 减少组织抵抗无氧状态的能力, 组织因此由于缺乏能量而受损伤的机会增多。本实验也得到类似的结果, 灌喂大豆黄酮后, LDH-1 (H_4) 和

LDH-2(H_3M_1) 相对活性减弱、LDH-4(H_1M_3) 和 LDH-5(M_4) 相对活性增强, 显示大豆黄酮能够影响 LDH 的表达, 使其 H 亚基表达的比例减弱、M 亚基表达的比例增加。

SOD 同工酶有 SOD-1 和 SOD-2 两种, 从实验结果来看, D-半乳糖致脑老化模型组小鼠与生理盐水对照组小鼠比较, 无论大脑皮层还是海马的 SOD-1、SOD-2 的活性都出现脑老化性降低。但是它们的降低程度不同, 其组成比例有了变化, SOD-1 的比例减少、SOD-2 的比例相对升高。这说明 SOD-1 的抗氧化活性比 SOD-2 高, 有关 SOD 同工酶比例的脑老化性变化未见报道, 至于其生理学意义还有待于进一步的研究。灌喂大豆黄酮后, SOD 的同工酶 SOD-1 的相对活性升高、SOD-2 相对活性则降低, 表明大豆黄酮可以延缓脑老化引起的 SOD 同工酶组分相对活性的变化。

进一步研究 LDH 和 SOD 同工酶组分的比活力的变化, 发现衰老小鼠的 LDH 同工酶组分的比活力较年轻小鼠都高, SOD 同工酶组分的比活力都降低, 说明衰老与 SOD 和 LDH 同工酶各亚基的基因表达或成熟酶的构建受到抑制有关。但是同工酶的相对活性比例发生变化的程度不同, 表明对各组分间的影响程度不一样。由实验结果可以看出, 大豆黄酮部分改善衰老小鼠 LDH 同工酶 LDH-1、LDH-2、LDH-3 和 LDH-4 和 SOD 同工酶 SOD-1 和 SOD-2 的脑老化性变化, 但对 LDH 同工酶 LDH-5 没有影响, 表明大豆黄酮可以增加衰老小鼠 LDH 同工酶 H 亚基基因的表达, 而对 M 亚基的没有影响。并提高 SOD 同工酶 SOD-1 和 SOD-2 基因的表达, 其具体的调控机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J. Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal Steroid Biochem Mol Biol*, 1992, **41**(3-8): 331 ~ 337.
- [2] Zhang R, Li Y, Wang W. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutrition Cancer*, 1997, **29**(1): 24 ~ 28.
- [3] 王国杰, 韩正康, 陈伟华. 大豆黄酮对大鼠肌肉生长和几种内源激素水平的影响. *动物学研究*, 1995, **16**(1): 23 ~ 29.
- [4] Lamartiniere C A, Moore J B, Brown N M, *et al.* Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis*, 1995, **16**(1): 2 833 ~ 2 840.
- [5] Adlercreutz C H, Goldin B R, Gorbach S L, *et al.* Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *Nutr*, 1995, **125**(3): 757s ~ 770s.
- [6] Hodgson J M, Croft K D. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996, **7**(12): 664 ~ 669.
- [7] Hwang J, Sevanian A, Hodis H. Sunergistic inhibition of LDL oxidation by phytoestrogens and ascorbic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, **29**(1): 79 ~ 89.
- [8] Hwang J, Wang J, Morazzoni P, *et al.* The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, **34**(10): 1 271 ~ 1 282.
- [9] Lee Y S, Chen X W, Anderson, *et al.* Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Nutrition Research*, 2001, **21**(9): 1 287 ~ 1 298.
- [10] Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci*, 1981, **78**(11): 7 124 ~ 7 128.
- [11] Wilson P D. Enzyme patterns in young and old mouse livers and lungs. *Gerontologia*, 1972, **18**(1): 36 ~ 54.
- [12] Kameoka S, Leavitt P, Chang C, *et al.* Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cell treated with dietary flavonoids. *Cancer Letters*, 1999, **146**(2): 161 ~ 167.
- [13] Goodfriend T L, Sokol D M, Kaplan N O. Control of synthesis of lactic acid dehydrogenases. *J molec Biol*, 1966, **15**(1): 18 ~ 31.
- [14] Kanungo M S, Singh S N. Effect of age on the isozymes of lactic dehydrogenase of the heart and the brain of rat. *Biochem Biophys Res*, 1965, **21**(5): 454 ~ 459.