

大豆皂甙抗血浆脂质过氧化和红细胞保护作用的研究

李天, 刘淑萍, 全吉淑

(延边大学 医学部, 吉林 延吉 133000)

摘要:用分光光度法测定大豆皂甙的总抗氧化能力(T-AOC)和抗活性氧能力(ROSSC),用八木变法测定血浆过氧化脂质(LOOH)含量,用硫代巴比妥酸(TBA)法测定血浆丙二醛(MDA)含量,用分光光度法测定红细胞溶血程度,以期研究大豆皂甙的体外抗脂质过氧化和红细胞保护作用。结果表明:大豆皂甙具有较强的体外总抗氧化能力和抗活性氧能力,可抑制血浆和红细胞膜脂质过氧化作用,减少红细胞溶血程度。说明大豆皂甙具有体外抗血浆脂质过氧化和红细胞保护作用。

关键词:大豆;皂甙;体外;脂质过氧化;红细胞保护

中图分类号:R965.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)06-1067-04

Anti-plasma Lipid Peroxidative and Erythrocyte Protective Effects of Soyasaponins

LI Tian, LIU Shu-ping, QUAN Ji-shu

(Health Science Center of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China)

Abstract:The anti-lipid peroxidative and erythrocyte protective effects of soyasaponins were investigated *in vitro*. The total antioxidant activity(T-AOC)and the reactive oxygen species scavenging capacity(ROSSC)were detected by spectrophotometric method,the content of lipid hydroperoxide(LOOH)was measured by Yagi's method,the content of malonyldialdehyde(MDA)was measured by thiobarbituric acid(TBA) assay,the hemolysis of erythrocytes was detected by spectrophotometric method. The result showed that soyasaponins exerted the high total antioxidant activity and the ROS scavenging acitivity *in vitro*,inhibited the lipid peroxidation of plasma and erythrocyte membrane,and suppressed the hemolysis of erythrocytes. It is suggested that soyasaponins have the anti-plasma lipid peroxidative and erythrocyte protective effects *in vitro*.

Key words:Soybean;Saponins;*in vitro*;Lipid peroxidation;Erythrocyte protection

大豆皂甙是一类五环三萜的糖甙,主要分为A类、B类、E类和DDMP皂甙。其中A类皂甙是以大豆皂醇A为配基的二糖链皂甙,B类和E类皂甙是分别以大豆皂醇B和E为配基的单糖链皂甙,DDMP皂甙则以B作为配基,C-22位上结合有DDMP基团,是天然存在的真正大豆皂甙。已有很多研究表明,大豆皂甙具有多种药理作用,如抗癌、防治心血管疾病、抗病毒及保肝等作用^[1-5]。大豆皂甙的抗氧化作用已有许多研究,而在体外对血液及肝组织过氧化脂质生成的影响还尚未见到报道。研究大豆皂甙体外对血液及肝脏抗脂质过氧化能力的影响,为开发天然抗氧化功能食品提供试验数据

和理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆皂甙为华北制药股份有限公司产品,纯度为80%。活性氧试剂盒购自南京凯基生物技术公司,总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒和丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,过氧化脂质(LOOH)检测试剂盒购自日本协和公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器设备

YAMATO GA32型喷雾干燥机、IWAKI REN-1

收稿日期:2009-06-26

基金项目:吉林省科技发展计划资助项目(No.200705428)。

第一作者简介:李天(1981-),男,在读硕士,研究方向为天然活性物质的药理作用。

通讯作者:全吉淑,副教授。Email:quanjs@ybu.edu.cn。

型旋转蒸发仪、EYELA FDU-830 型冷冻干燥仪、HITACHI U-2010 型紫外分光光度仪、HITACHI Hima-cp 100 α 超速离心机和 RT-2100 型酶标仪。

1.3 试验方法

1.3.1 动物及血液样品的处理 将家兔(由延边大学医学部动物科提供)用乙醚麻醉,经颈动脉取血,肝素抗凝,离心分离血浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存以备用。将红细胞用冷生理盐水洗3次,制成0.5%红细胞悬浮液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存以备用。

另取新鲜红细胞,以生理盐水洗3次。放入35倍体积的低渗磷酸缓冲液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜溶血。溶血完全后20 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心40 min,收集沉淀。洗涤4次(4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心40 min)后可得白色絮状的红细胞膜。用PBS缓冲液稀释成蛋白浓度为1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的红细胞膜悬浮液保存备用。

1.3.2 血浆总抗氧化能力(T-AOC)的测定^[6] 取1 mL血浆,加入不同浓度大豆皂甙溶液0.1 mL,混匀,在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min后,参照总抗氧化能力试剂盒说明书方法测定 $A_{520\text{nm}}$,计算总抗氧化能力。每分钟每毫升样品溶液使反应体系得吸光度值每增加0.01时,定义为一个总抗氧化能力单位(U)。对照以0.1 mL生理盐水代替大豆皂甙溶液。

1.3.3 血浆清除活性氧能力(ROSSC)的测定^[7] 取1 mL稀释20倍的小鼠血浆,加入不同浓度大豆皂甙溶液0.1 mL,混匀,在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min后,按试剂盒说明书方法测定反应体系 $A_{550\text{nm}}$,计算抗活性氧单位。每毫升样品溶液在37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应1 min,使反应体系中 H_2O_2 浓度降低1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 定义为一个抗活性氧单位(U)。对照以0.1 mL生理盐水代替大豆皂甙溶液。

1.3.4 Cu^{2+} 诱导的血浆脂质过氧化作用的测定 取新鲜血浆1 mL,药物组加不同浓度大豆皂甙0.1 mL和0.06 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴6 h。取0.1 mL反应液按试剂盒说明书测定LOOH,并计算抑制率。剩余反应液中加入15%三氯乙酸(TCA)1 mL终止反应,再加0.67%硫代巴比妥酸(TBA)1 mL,于沸水浴中显色15 min,冷却后离心,于532 nm测上清液吸光值 $A_{532\text{nm}}$,并计算MDA生成量和抑制率(IR)。IR计算公式为:

$$\text{IR}(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.3.5 $\cdot\text{OH}$ 诱导的红细胞膜脂质过氧化作用的测定^[8] 取1 mL红细胞膜悬浮液,加大豆皂甙

0.1 mL,在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min后,再加入0.1 mL 60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 和0.1 mL 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 诱导产生羟基自由基。继续在37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴2 h后,加15% TCA 1 mL终止反应。按TBA法(参见1.3.4)测定MDA生成量并计算抑制率。

1.3.6 红细胞氧化溶血作用的测定^[7] 取0.5%红细胞悬液1 mL,加入不同浓度大豆皂甙0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴24 h后,加生理盐水稀释3倍,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液于415 nm处测定吸光度 $A_{415\text{nm}}$,以对照组为100%溶血,计算溶血度(HD)和抑制率(IR)。

$$\text{HD}(\%) = A_{\text{测定}} / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

$$\text{IR}(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

另取0.5%红细胞悬液1 mL,加入不同浓度大豆皂甙0.1 mL,最后加入60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 0.1 mL启动反应,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴1 h后,加生理盐水稀释3倍,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,测定上清液吸光度 $A_{415\text{nm}}$,以对照组为100%溶血,计算溶血度和抑制率。

2 结果与分析

2.1 大豆皂甙的总抗氧化能力

在化学模拟体系中大豆皂甙的总抗氧化能力较强,以100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ VC作为对照考察了大豆皂甙的总抗氧化能力时,相同浓度大豆皂甙的总抗氧化能力为3.8 U,是等浓度VC总抗氧化能力的1.1倍(数据未列出)。此基础上,考察大豆皂甙对血浆总抗氧化能力的影响,发现大豆皂甙可提高血浆总抗氧化能力,其总抗氧化能力随大豆皂甙浓度升高而增高,呈量效关系(表1)。

表1 大豆皂甙对血浆总抗氧化能力和抗活性氧能力的影响
Table 1 Effects of soyasaponins on the total antioxidant activity and the ROS scavenging capacity of plasma

组别 Group	浓度 Concentration / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	总抗氧化能力 T-AOC / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	抗活性氧能力 ROSSC / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$
正常组 Control	-	15.6	102.5
皂甙组 Saponin	42	16.3	108.6
	83	17.1	343.3
	167	17.6	662.1
	333	18.4	994.5

2.2 大豆皂甙的抗活性氧能力

同样由表 1 可看出,在所测浓度范围内,大豆皂甙可提高血浆活性氧清除能力,其能力随大豆皂甙浓度升高而增高,呈明显的量效关系。

2.3 大豆皂甙对 Cu^{2+} 诱导的血浆脂质过氧化的抑制作用

由表 2 可见,经 Cu^{2+} 诱导后,模型组 MDA 和 LOOH 含量均明显增高,而药物组 MDA 和 LOOH 生成量明显减少,说明大豆皂甙可抑制血浆脂质过氧化作用,且抑制作用随浓度的增高而增强,呈良好的量效关系。

表 2 大豆皂甙对 Cu^{2+} 诱导的血浆脂质过氧化的影响

Table 2 Effects of soyasaponins on lipid peroxidation of plasma induced by Cu^{2+}

组别 Group	浓度 Concentration /mg · L ⁻¹	MDA /μmol · L ⁻¹	抑制率 IR/%	LOOH /μmol · L ⁻¹	抑制率 IR/%
正常组 Control	-	4.9	-	17.3	-
模型组 Model	-	15.4	-	34.1	-
皂甙组 Saponin	42	15.0	3.8	25.8	49.7
	83	13.9	14.3	24.6	56.6
	167	11.4	38.1	23.9	60.7
	333	10.7	44.8	17.3	100.0

表 4 大豆皂甙对红细胞氧化溶血的影响

Table 4 Effects of soyasaponins on hemolysis of erythrocytes

组别 Group	浓度 Concentration/mg · L ⁻¹	自发性溶血 auto-hemolysis		H_2O_2 诱导溶血 H_2O_2 -induced hemolysis	
		溶血度 HD/%	抑制率 IR/%	溶血度 HD/%	抑制率 IR/%
皂甙组 Saponin	42	45.8	54.2	75.6	26.7
	83	32.7	67.3	63.8	39.7
	167	29.8	70.3	50.1	54.6
	333	25.5	74.5	43.0	62.4

大豆皂甙还可抑制红细胞的自发性氧化损伤,溶血度随皂甙浓度的增加而降低,呈显著的量效关系。

3 结论

众所周知,自由基损伤参与多种疾病的病理生理过程,如炎症、免疫失调、动脉粥样硬化、恶性肿瘤、衰老等。自由基和活性氧可导致脂质过氧化,引发脂质过氧化链式反应产生 MDA。即在自由基和活性氧作用下,诱发多不饱和脂肪酸氧化,破坏生物

2.4 大豆皂甙对 $\cdot\text{OH}$ 诱导的红细胞膜脂质过氧化的抑制作用

从表 3 可知,在所测浓度范围内,大豆皂甙对 $\cdot\text{OH}$ 诱导的红细胞膜 MDA 生成具有明显抑制作用,其抑制作用呈良好的量效关系。

表 3 大豆皂甙对 $\cdot\text{OH}$ 诱导的红细胞膜脂质过氧化的影响

Table 3 Effects of soyasaponins on lipid peroxidation of erythrocyte membrane induced by $\cdot\text{OH}$

组别 Group	浓度 Concentration /mg · L ⁻¹	MDA /μmol · mg ⁻¹ protein	抑制率 IR/%
正常组 Control	-	83.3	-
模型组 Model	-	306.2	-
皂甙组 Saponin	42	125.0	81.3
	83	159.2	66.0
	167	213.6	41.5
	333	259.6	20.9

2.5 大豆皂甙对红细胞氧化溶血的抑制作用

红细胞经 H_2O_2 诱发后模型对照组吸光值增加,由正常组的 0.078 增至 0.898,说明 H_2O_2 可以氧化红细胞膜。如表 3 所示,药物组溶血度显著低于模型对照组,表明大豆皂甙可抑制红细胞的氧化损伤,保护红细胞膜,且溶血度随皂甙浓度的增高而降低。

膜的结构和功能,从而造成组织细胞及机体的病变和死亡。LOOH 代表血浆脂蛋白中脂质过氧化物的含量,MDA 则是脂质过氧化物的主要分解产物,二者含量常常反映血浆脂质过氧化程度,也间接反映血浆受自由基攻击的严重程度。所以测定 LOOH 和 MDA 可以判断受试物是否具有阻断自由基链式反应的能力和抗氧化的损伤效应^[9]。

研究大豆皂甙的体外抗血浆脂质过氧化和红细胞保护作用,结果证明了大豆皂甙具有较强

的抗氧化能力和抗活性氧能力,可以抑制血浆脂质过氧化发生,保护红细胞膜系统免受损伤,抑制红细胞溶血。可以认为大豆皂甙抗氧化的机理可能主要是通过清除活性氧自由基,从而抑制活性氧所致脂质过氧化发生,保护血浆脂质成分及红细胞膜膜系统免受损伤。研究结果对开发以大豆皂甙为原料的抗氧化功能食品有一定的参考价值。

参考文献

- [1] Konoshima T. Anti-tumor-promoting activities of triterpenoid glycosides; cancer chemoprevention by saponins[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1996, 404:87-100.
- [2] Rodrigues H G, Diniz Y S, Faine L A, et al. Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2005, 56(2):79-85.
- [3] Yoshikoshi M, Yoshiki Y, Okubo K, et al. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts[J]. *Planta Medica*, 1996, 62(3):252-255.

- [4] Hayashi K, Hayashi H, Hiraoka N, et al. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication *in vitro*[J]. *Planta Medica*, 1997, 63(2):102-105.
- [5] Kinjo J, Imagire M, Udayama M, et al. Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone[J]. *Planta Medica*, 1998, 64(3):233-236.
- [6] 唐瑛. 藤茶总黄酮的体外抗氧化作用研究[J]. *中国药师*, 2006, 9(8):716-718. (Tang Y. Antioxidative effect of total flavonoids from *Ampelopsis Grossedentata* (AGTF) *in vitro* [J]. *China Pharmacist*, 2006, 9(8):716-718.)
- [7] 李俊丽, 王运强, 向长萍. 南瓜水溶性多糖的体外抗氧化作用[J]. *华中农业大学学报*, 2007, 26(2):256-259. (Li J L, Wang Y Q, Xiang C P. The anti-oxidative effect of pumpkin polysaccharide *in vitro* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(2):256-259.)
- [8] Fernando D, Etelvino J H. Aminoacetone induced iron-mediated oxidative damage to isolated rat liver mitochondria[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 430:284-289.
- [9] Nordberg J, Arner E S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 31:1287-1312.

(上接第 1066 页)

参考文献

- [1] 张亚慧, 于文吉. 大豆蛋白胶粘剂在木材工业中的研究与应用[J]. *高分子材料与工程*, 2008, 24(5):20-27. (Zhang Y H, Yu W J. Soybean adhesives application in the wood industry [J]. *Polymer Materials Science and Engineering*, 2008, 24(5):20-27.)
- [2] 高强, 李建章, 张世峰. 木材工业用大豆蛋白胶粘剂研究与应用现状[J]. *大豆科学*, 2008, 27(4):679-683. (Gao Q, Li J Z, Zhang S F. Progress in study and application of soy protein adhesives for wood industry [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(4):679-683.)
- [3] Kumar R, Choudhary V, Mishra S, et al. Adhesives and plastics based on soy protein products [J]. *Industrial Crops and Products*, 2002, 16(3):155-172.
- [4] Huang W N, Sun X Z. Adhesive properties of soy proteins modified by sodium dodecyl sulfate and sodium dodecylbenzene sulfonate [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2000, 77(7):705-708.
- [5] Zhong Z K, Sun X S, Fang X H, et al. Adhesive strength of sodium dodecyl sulfate-modified soy protein to fiberboard [J]. *Journal of Adhesive Science and Technology*, 2001, 15(12):1417-1427.
- [6] Zhong Z K, Sun X S, Wang D H, et al. Wet strength and water resistance of modified soy protein adhesive and effects of dyeing treat-

ment [J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2003, 11(4):137-144.

- [7] Li X, Li Y H, Zhong Z K, et al. Mechanical and water soaking properties of medium density fiberboard with wood fiber and soybean protein adhesive [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(14):3556-3562.
- [8] Matsuda S, Iwata H, Se N, et al. Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 45(1):20-27.
- [9] Park S K, Bae D H, Rhee C. Soy protein biopolymers cross-linked with glutaraldehyde [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2000, 77(8):879-884.
- [10] Wang Y, Mo X Q, Sun X S, et al. Soy Protein adhesive enhanced by glutaraldehyde crosslink [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 104(1):130-136.
- [11] Laemmli U K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄ [J]. *Nature*, 1970, 227:680-685.
- [12] 孟令芝, 龚淑玲, 何永炳. 有机波谱分析[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2003. (Meng L Z, Gong S L, He Y B. *Organic spectral analysis* [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2003.)
- [13] 李临生, 张淑娟. 戊二醛与蛋白质反应的影响因素和反应机理[J]. *中国皮革*, 1997, 26(12):8-12. (Li L S, Zhang S J. Influence factors on reactions of glutaraldehyde with protein and the reaction mechanism [J]. *China Leather*, 1997, 26(12):8-12.)