

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.15.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20230424.1729.008.html\(2023-04-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20230424.1729.008.html(2023-04-25))

雌马酚对非酒精性脂肪性肝细胞模型的氧化应激作用研究*

崔涵强,倪向敏,张贵明,徐 喆,李 硕,王 建[△]
(陆军军医大学第二附属医院营养科,重庆 400037)

[摘要] 目的 观察雌马酚(Eq)对高脂诱导的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)细胞模型中氧化应激的保护效应,并探讨其作用机制。方法 采用CCK-8法探索合适的油酸钠(NaOL)和Eq的干预浓度。通过NaOL作用于BRL3A细胞,建立NAFLD体外细胞模型,设立对照组(Con组)、模型组(Mod组)、低剂量组(Eq-L组)、中剂量组(Eq-M组)和高剂量组(Eq-H组)。干预24h后,采用尼罗红荧光染色观察细胞内脂滴累积情况,检测细胞内甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)的水平,采用蛋白免疫印迹和实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测细胞内Nrf2、HO-1、NQO1蛋白和mRNA的表达水平。结果 与Con组比较,Mod组细胞内脂质累积增多,TG、TC、ROS、MDA水平升高,SOD、CAT水平降低,Nrf2、HO-1、NQO1蛋白和mRNA表达下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与Mod组比较,Eq-L组、Eq-M组和Eq-H组细胞内脂质累积逐渐减少,TG、TC、ROS、MDA水平降低,SOD、CAT水平增多,Nrf2、HO-1、NQO1蛋白和mRNA表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 Eq通过抑制氧化应激反应改善NAFLD病情,其部分机制可能与Eq调控Nrf2信号通路相关。

[关键词] 雌马酚;氧化应激;非酒精性脂肪肝;核因子E2相关因子;蛋白质印迹法

[中图分类号] R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)15-2241-06

Effect of equol on oxidative stress in a non-alcoholic fatty liver cell model*

CUI Hanqiang, NI Xiangmin, ZHANG Guiming, XU Zhe, LI Shuo, WANG Jian[△]

(Department of Nutrition, the Second Affiliated Hospital of Army Medical

University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of Equol (Eq) on oxidative stress in a cell model of high-fat-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and to explore its mechanism. **Methods** The optimal concentration of sodium oleate (NaOL) and Eq for intervention was determined using the CCK-8 method. The in vitro cell model of NAFLD was established by treating BRL3A cells with NaOL. A control group (Con group), a model group (Mod group), a low-dose group (Eq-L group), a middle-dose group (Eq-M group), and a high-dose group (Eq-H group) were established. After 24 hours of intervention, Nile red fluorescent staining was used to observe the accumulation of intracellular lipid droplets and detect the levels of intracellular triglycerides (TG), total cholesterol (TC), reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT). Western blotting and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and NQO1 proteins and mRNAs in cells. **Results** Compared to the Con group, the Mod group showed an increase in intracellular lipid accumulation. Additionally, the levels of TG, TC, ROS, and MDA increased, while the levels of SOD and CAT decreased. Furthermore, the protein and mRNA expressions of Nrf2, HO-1, and NQO1 were down-regulated. These differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared to the Mod group, the intracellular lipid accumulation in the Eq-L group, Eq-M group, and Eq-H group decreased gradually. The levels of TG, TC, ROS, and MDA also decreased, while the levels of SOD and CAT increased. Additionally, the expressions of Nrf2, HO-1, NQO1 protein, and mRNA were up-regulated, and these differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Eq improves the condition of NAFLD by inhibiting the oxidative stress response, and part of the mechanism may be related to

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81973040);国家自然科学基金青年科学基金项目(81602855)。 作者简介:崔涵强(1992—),在读硕士研究生,主要从事营养与疾病研究。 [△] 通信作者, E-mail: wangjian_1996@aliyun.com。

the regulation of the Nrf2 signaling pathway by Eq.

[Key words] equol; oxidative stress; non-alcoholic fatty liver disease; nuclear factor E2-related factors; Western blotting

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝硬化, 晚期可发展为肝癌, 现已成世界范围内慢性肝病的重要病因之一。我国 NAFLD 发病率呈上升趋势, NAFLD 已成为一项重大的公共卫生问题^[1-2]。NAFLD 发病机制复杂, 氧化应激是 NAFLD 发病的重要环节^[3]。因此, 缓解肝脏的氧化应激反应, 可为防治 NAFLD 带来新思路。核因子 E2 相关因子 (nuclear factor-E2 related factor 2, Nrf2) 与氧化应激和炎症反应关系密切。Nrf2 是调控氧化应激反应的关键因子, 被激活后可以从细胞质转移至细胞核中, 促进其下游的抗氧化基因血红素加氧酶-1 (heme oxygenase 1, HO-1)、醌氧化还原酶 (NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO1) 等表达, 发挥抗氧化效应^[4]。有研究表明, Nrf2 在被敲除后可加速肥胖和 NAFLD 发病^[5], Nrf2 信号通路的激活通过改善氧化应激对 NAFLD 发挥保护作用^[6-7]。

雌马酚 (Equol, Eq) 是大豆异黄酮类物质在体内的一种特定代谢产物, 具有较强的抗氧化作用^[8-9], 但 Eq 能否通过调节 Nrf2 信号通路缓解 NAFLD 尚不清楚。本研究旨在通过体外 NAFLD 模型探讨 Eq 能否缓解氧化应激及改善 NAFLD, 并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

BRL3A 细胞、DMEM 基础培养基、胎牛血清购于武汉普诺赛生命科技有限公司; Eq 购于大赛璐药物手性技术有限公司; 油酸钠 (NaOL) 购于西安鲲鹏科技发展有限公司; 尼罗红脂肪荧光染色液购于北京普利莱基因技术有限公司; 放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液、二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 检测试剂盒、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒、超敏增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 细胞核蛋白抽提试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、HO-1 抗体、NQO1 抗体、LaminB1 抗体、GAPDH 抗体、过氧化物酶耦联的二抗、引物购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Nrf2 抗体、SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; 全波长多功能酶标仪购于美国 THERMO 公司; 倒置荧光显微镜购于日本奥林巴斯公司; 超灵敏化学发光成像系统 FluorQuant AC600 购于美国 ACU-

RONBIO 公司; CFX connect 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购于美国 Bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

BRL3A 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中。根据细胞生长情况, 每 2~3 天更换培养液, 当细胞生长密度到 80%~90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞并按 1:3 传代。

1.2.2 细胞活力检测

以 2.0×10^4 个/孔细胞量接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 将 NaOL 和 Eq 以浓度梯度分组给药, 继续培养 24 h, 根据 CCK-8 试剂盒说明书测定细胞活力。

1.2.3 细胞干预与分组

将 BRL3A 细胞接种于 6 孔板中, 2×10^5 个细胞/孔, 分为正常对照组 (Con, 正常培养基培养)、模型组 (Mod, 0.48 mmol/L 的 NaOL 造模), 以及 Eq 低、中、高剂量干预组 (Eq-L、Eq-M、Eq-H, 分别采用 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Eq 干预 24 h)。细胞贴壁后采用无胎牛血清的培养基饥饿 8 h 后进行相应干预。

1.2.4 细胞 TG、TC 含量测定

干预结束后, 收集细胞于 EP 管中, 加入磷酸缓冲盐溶液 (PBS), 超声裂解细胞后取细胞匀浆进行测定。具体操作步骤按测定试剂盒说明书进行。

1.2.5 尼罗红染色

干预结束后, 去除培养基, 采用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 蒸馏水漂洗 3 次, 尼罗红染色工作液染色 10 min, PBS 清洗两次, 于倒置荧光显微镜 (激发光 492~577 nm) 观察细胞脂质蓄积情况, 采用 Image J 软件进行荧光强度分析。

1.2.6 细胞内氧化应激指标测定

测定细胞内 ROS 水平时, 去除培养基, 采用 PBS 漂洗 3 次, 加入含有 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 荧光探针无胎牛血清培养基, 37 °C 孵育 30 min。采用无胎牛血清培养基洗涤 2 次并收集细胞, 荧光酶标仪检测荧光值, 激发光为 488 nm, 发射光为 535 nm。测定细胞内 SOD、MDA、CAT 水平时, 在干预结束后将细胞收集于 EP 管中, 加入 PBS, 超声裂解细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定 SOD、MDA、CAT 水平, 具体操作步骤按测定试剂盒说明书进行。

1.2.7 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测

干预结束后将细胞收集至 EP 管中, 加入含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液, 采用超声裂解细胞, 然后以 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 提取细胞总

蛋白。根据试剂盒说明书提取细胞核蛋白。各组取等量蛋白样品,采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳结束进行转膜、封闭,一抗 4 °C 孵育过夜,洗涤后加入二抗,室温孵育 1 h,充分洗涤。最后采用化学发光成像系统进行蛋白显影,采用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.2.8 qPCR 检测

干预结束后将细胞收集至 EP 管中,采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, NanoDrop 2000 分光光度计测量 RNA 浓度和纯度。根据试剂盒说明进行逆转录扩增,合成相应 cDNA。采用 SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒,通过 PCR 仪进行基因表达检测,获取循环阈值(CT 值)后,以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'~3')	长度(bp)
Nrf2	F:TGGCAGAGACATTCCCATTTG	759
	R:CTGCCAAACTTGCTCCATGT	
HO-1	F:ACGCATATACCCGCTACCTG	177
	R:TCTCCAGAGTGTTCATGCGA	
NQO1	F:CCACGCAGAGAGGACATCAT	303
	R:GTTTCAGCTACAATATCCGGGC	
GAPDH	F:GCCAGCCTCGTCTCATAGACA	89
	R:AGAGAAGGCAGCCCTGGTAAC	

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。计数资料以频数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 NaOL 和 Eq 对细胞活力的影响

与 Con 组比较,当 NaOL 浓度到达 0.72 mmol/L 时,细胞活力明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 Con 组比较,当 Eq 浓度达到 100 μ mol/L 时,细胞活力明显受到抑制 ($P < 0.05$),见图 1。

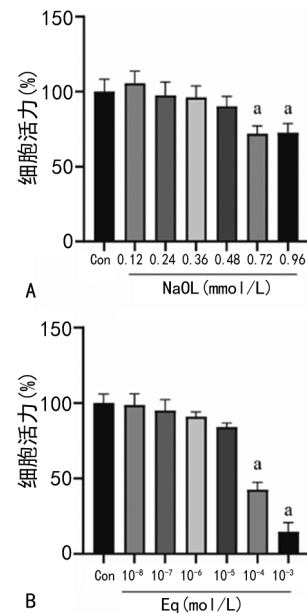
2.2 各组细胞内脂质水平比较

与 Con 组比较,Mod 组细胞内 TG、TC 水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,Eq 干预各组细胞内 TG、TC 水平明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且呈现出一定的剂量效应,见图 2。与 Con 组比较,Mod 组细胞内红色荧光较强;与 Mod 组比较,Eq 干预各组细胞内红色荧光强度较弱,随着 Eq 浓度的增高,细胞内荧光强度逐步减弱,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。

2.3 各组细胞内氧化应激指标的比较

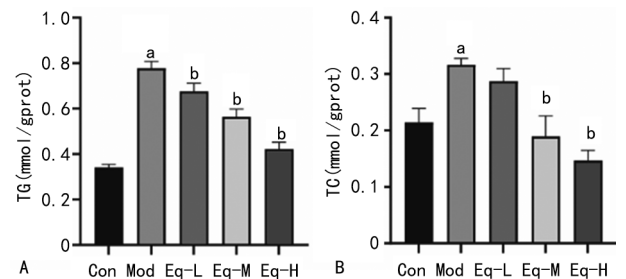
与 Con 组比较,Mod 组细胞内 ROS 水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,Eq 干预各组细胞内 ROS 水平逐渐降低,差异有统计

学意义 ($P < 0.05$),并呈现出一定剂量效应,见图 4A。与 Con 组比较,Mod 组细胞内的 MDA 水平明显升高,SOD、CAT 水平明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,Eq 干预各组细胞内 SOD、CAT 水平升高,Eq-M、Eq-H 组细胞内 MDA 水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4B~D。



A:不同 NaOL 浓度对细胞活力的影响;B:不同 Eq 浓度对细胞活力的影响;^a: $P < 0.05$,与 Con 组比较。

图 1 NaOL 和 Eq 对细胞活力的影响



A:各组 TG 水平;B:各组 TC 水平;^a: $P < 0.05$,与 Con 组比较;^b: $P < 0.05$,与 Mod 组比较。

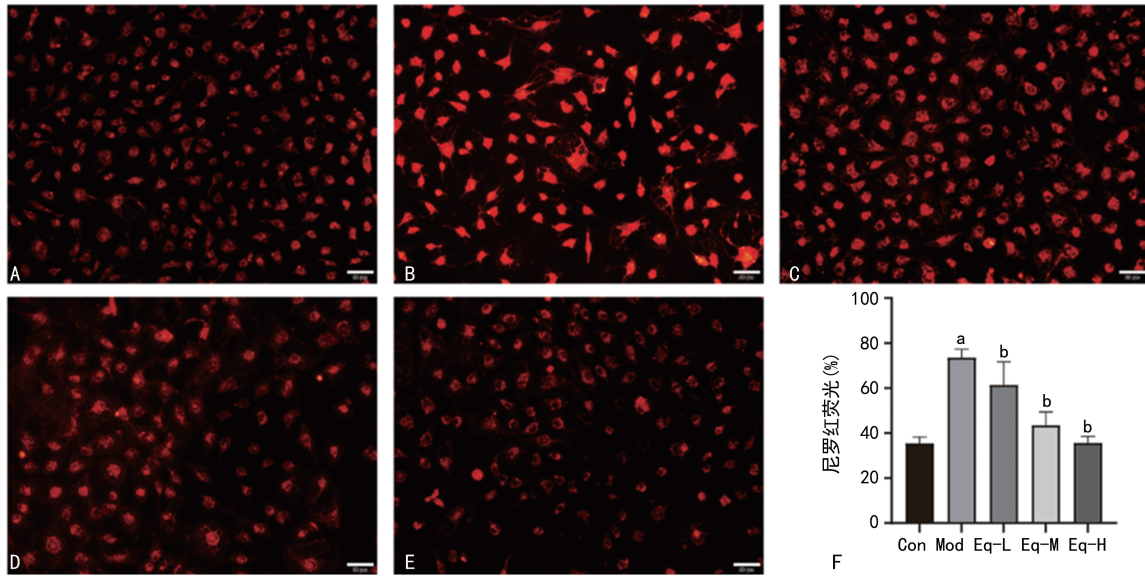
图 2 各组细胞 TG、TC 水平比较

2.4 各组细胞 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达水平

与 Con 组比较,Mod 组 Nrf2(nucleus)、HO-1、NQO1 表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,Eq 干预各组 Nrf2(nucleus)、HO-1、NQO1 表达水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且 Eq 随浓度的增高呈逐步上升趋势,见图 5。

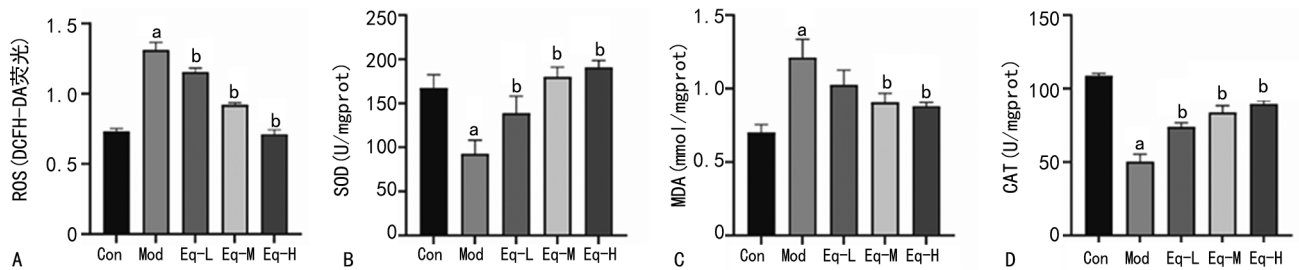
2.5 各组细胞 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 表达水平

与 Con 组比较,Mod 组 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 表达水平明显下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 Mod 组比较,Eq 干预各组 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达水平明显上调,Eq-M、Eq-H 组 NQO1 mRNA 表达水平明显上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 6。



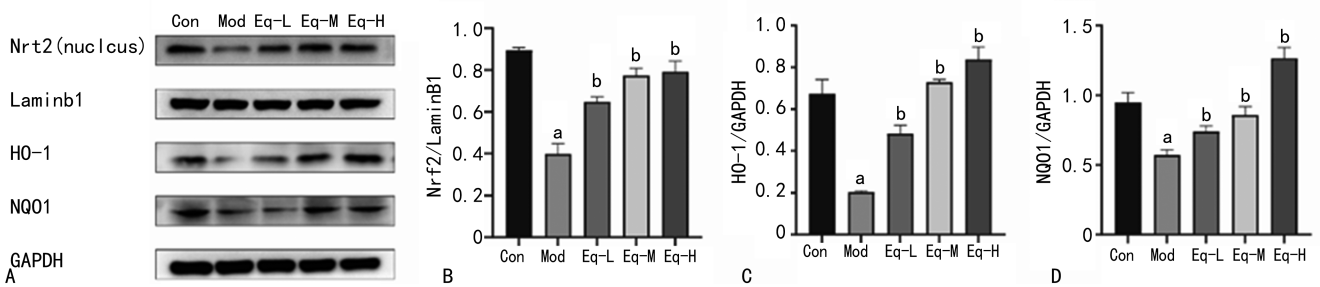
A: Con 组细胞内脂质积累情况; B: Mod 组细胞内脂质积累情况; C: Eq-L 组细胞内脂质积累情况; D: Eq-M 组细胞内脂质积累情况; E: Eq-H 组细胞内脂质积累情况; F: 各组荧光强度分析; ^a: $P < 0.05$, 与 Con 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 Mod 组比较。

图 3 尼罗红染色观察各组细胞内脂质积累 (200×)



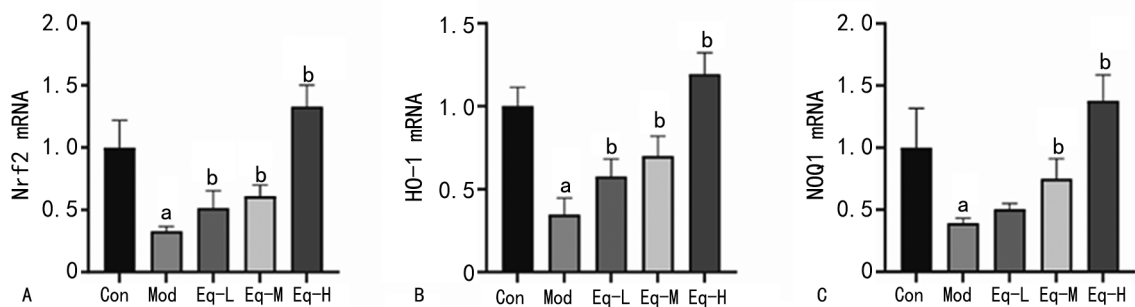
A: 各组 ROS 水平; B: 各组 SOD 水平; C: 各组 MDA 水平; D: 各组 CAT 水平; ^a: $P < 0.05$, 与 Con 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 Mod 组比较。

图 4 各组细胞氧化应激指标的比较



A: Western blotting 结果; B: Nrf2 蛋白分析结果; C: HO-1 蛋白分析结果; D: NQO1 蛋白分析结果; ^a: $P < 0.05$, 与 Con 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 Mod 组比较。

图 5 各组细胞 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白的表达



A: Nrf2 mRNA 相对表达量; B: HO-1 mRNA 相对表达量; C: NQO1 mRNA 相对表达量; ^a: $P < 0.05$, 与 Con 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 Mod 组比较。

图 6 各组细胞 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 的表达

3 讨 论

随着人们生活水平的提高、饮食结构和生活方式的改变,以及影像诊断技术的发展,NAFLD 的发病率日益增高。目前,尚无特异性治疗 NAFLD 的药物,控制饮食和改善生活方式是 NAFLD 防治的基础,但多数人难以长期坚持^[10]。研究表明,食用大豆食品对 NAFLD 具有保护作用,这种有益作用可能归因于其代谢产生的大豆异黄酮^[11]。Eq 是大豆异黄酮在体内的代谢产物,在动脉粥样硬化、癌症、围绝经期症状和骨质疏松等方面具有保护效应^[12]。据报道,Eq 可以减轻多种细胞和组织中的氧化应激和细胞损伤^[13-14],而且它在所有已知的异黄酮类中具有较强的抗氧化活性^[15]。氧化应激反应对 NAFLD 的发展具有促进作用,Nrf2 与氧化应激反应密切相关,但是目前还没有研究报道 Eq 是否可以调控 Nrf2 信号通路及对 NAFLD 发挥保护作用。本研究通过 BRL3A 细胞建立体外 NAFLD 模型,研究 Eq 对细胞内氧化应激的作用和机制。

本研究发现,Mod 组细胞内 TG、TC、ROS、MDA 水平升高,SOD、CAT 水平降低,Nrf2 信号通路相关蛋白和 mRNA 表达降低,表明体外 NAFLD 氧化应激细胞模型建立成功。Eq 干预后可见细胞内脂滴明显减少,TG、TC 水平降低,提示 Eq 对 NAFLD 具有保护作用。ROS 可诱导多种炎症细胞因子表达,促进氧化应激,形成炎症-坏死循环,加重肝组织损伤^[16]。SOD 和 CAT 是细胞内重要的抗氧化酶,能够有效清除自由基及 ROS,抑制过氧化反应,发挥保护作用。MDA 为自由基参与脂质过氧化反应产生的毒性物质,其表达过多可严重破坏细胞膜结构,引起细胞肿胀、坏死,加重细胞损伤^[17]。本研究结果表明,Eq 可以降低细胞内 ROS 的产生和 MDA 水平,提高抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性,且随着 Eq 浓度增高,细胞抗氧化能力不断增强。GOU 等^[18]的研究表明,Eq 可通过降低 MDA 和增加 SOD、CAT 表达,抑制脂多糖诱导的细胞内氧化应激反应;CHOI 等^[19]研究发现,Eq 可以提高 HepG2 细胞内 SOD、CAT 水平,发挥抗氧化作用。这与本研究结果一致,提示 Eq 可通过抗氧化作用,减轻 NAFLD 体外模型中氧化应激的进展,发挥肝保护作用。

Nrf2 通路是机体抵御氧化应激的重要信号通路。在生理条件下,Nrf2 主要存在与细胞质中,在受到亲电体或氧化应激刺激后,Nrf2 转移到细胞核,促进下游抗氧化反应原件和各种抗氧化酶的表达^[20]。HO-1 可以通过催化血红素降解为胆绿素 IX α 、一氧化碳和铁,调节氧化还原反应,还具有抗炎和抗细胞凋亡作用^[21];NQO1 可以催化内源和外源苯醌化合物及其衍生物的电子还原,同时具有抗炎与抗肿瘤作用^[22]。ZHANG 等^[23]研究发现,Eq 可上调 Nrf2 在小鼠主动脉组织和人脐静脉内皮细胞中的表达,发挥抗氧化和

抗动脉粥样硬化作用;WIDYARINI 等^[24]研究发现,Eq 可以通过上调 HO-1 表达,呈剂量依赖地抑制紫外线诱导小鼠皮肤中的脂质过氧化。本研究结果显示,Mod 组细胞中的 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白和 mRNA 表达均下降,推测为氧化应激条件下细胞损伤,蛋白合成受到抑制,Eq 可以上调上述 Nrf2 及其下游蛋白表达和 mRNA 合成,提示 Eq 是通过激活 Nrf2 信号通路发挥其抗氧化作用。

综上所述,本研究发现,大豆异黄酮类物质 Eq 对体外 NAFLD 细胞具有保护作用,可以减轻脂质累积,并通过激活 Nrf2 信号通路,抵抗细胞内氧化应激,这对异黄酮类物质在肥胖人群中的应用和膳食指导有重要意义。本研究仍值得改进,Eq 是通过何种分子信号介导激活 Nrf2 通路产生影响仍不清楚,Eq 的保护作用仍需在国内和人群试验中得到进一步验证。

参考文献

- [1] WONG S, TING Y, CHAN W. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma and its implications[J]. *JGH Open*, 2018, 2(5): 235-241.
- [2] WU Y, ZHENG Q, ZOU B, et al. The epidemiology of NAFLD in Mainland China with analysis by adjusted gross regional domestic product: a meta-analysis[J]. *Hepatol Int*, 2020, 14(2): 259-269.
- [3] ARROYAVE-OSPINA J C, WU Z, GENG Y, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: implications for prevention and therapy[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 174.
- [4] SOLANO-URRUSQUIETA A, MORALES-GONZALEZ J A, CASTRO-NARRO G E, et al. NRF-2 and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Ann Hepatol*, 2020, 19(5): 458-465.
- [5] AKIYAMA K, WARABI E, OKADA K, et al. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously results in the development of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Exp Anim*, 2018, 67(2): 201-218.
- [6] HOSSEINI H, TEIMOURI M, SHABANI M, et al. Resveratrol alleviates non-alcoholic fatty liver disease through epigenetic modification of the Nrf2 signaling pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 119: 105667.
- [7] SHEN B, ZHAO C, WANG Y, et al. Aucubin inhibited lipid accumulation and oxidative

- stress via Nrf2/HO-1 and AMPK signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 4063-4075.
- [8] LIN X, JIANG S, JIANG Z, et al. Effects of equol on H₂O₂-induced oxidative stress in primary chicken intestinal epithelial cells [J]. *Poult Sci*, 2016, 95(6): 1380-1386.
- [9] MA Y, SULLIVAN J C, SCHREIHOFFER D A. Dietary genistein and equol(4',7 isoflavandiol) reduce oxidative stress and protect rats against focal cerebral ischemia[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 299(3): 871-877.
- [10] European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity. EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6): 1388-1402.
- [11] ZHANG S, KUMARI S, GU Y, et al. Soy food intake is inversely associated with newly diagnosed nonalcoholic fatty liver disease in the TCLSIH cohort study [J]. *J Nutr*, 2020, 150(12): 3280-3287.
- [12] MAYO B, VAZQUEZ L, FLOREZ A B. Equol: a bacterial metabolite from the daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2331.
- [13] KANG J S, YOON Y D, HAN M H, et al. Equol inhibits nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression through down-regulating the activation of Akt [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(4): 491-499.
- [14] LEPHART E D. Skin aging and oxidative stress: equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms [J]. *Ageing Res Rev*, 2016, 31: 36-54.
- [15] SETCHELL K D, CLERICI C. Equol: pharmacokinetics and biological actions [J]. *J Nutr*, 2010, 140(7): 1363-1368.
- [16] PIZZINO G, IRRERA N, CUCINOTTA M, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1-13.
- [17] AYALA A, MUNOZ M F, ARGUELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 360438.
- [18] GOU Z, JIANG S, ZHENG C, et al. Equol inhibits LPS-induced oxidative stress and enhances the immune response in chicken HD11 macrophages [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(2): 611-621.
- [19] CHOI E J, KIM G H. The antioxidant activity of daidzein metabolites, O-desmethyldaidzein and equol, in HepG2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1): 328-332.
- [20] CHAMBEL S S, SANTOS-GONCALVES A, DUARTE T L. The dual role of Nrf2 in non-alcoholic fatty liver disease: regulation of antioxidant defenses and hepatic lipid metabolism [J]. *BioMed Res Int*, 2015, 2015: 1-10.
- [21] WU J, LI S, LI C, et al. The non-canonical effects of heme oxygenase-1, a classical fighter against oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2021, 47: 102170.
- [22] LEE W S, HAM W, KIM J. Roles of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in diverse diseases [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(12): 1301.
- [23] ZHANG T, HU Q, SHI L, et al. Equol attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting endoplasmic reticulum stress via activation of Nrf2 in endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e167020.
- [24] WIDYARINI S, DOMANSKI D, PAINTER N, et al. Photoimmune protective effect of the phytoestrogenic isoflavonoid equol is partially due to its antioxidant activities [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2012, 11(7): 1186-1192.

(收稿日期: 2022-10-26 修回日期: 2023-02-14)

(编辑: 张芃捷)