

大豆異黃酮 genistein 與 daidzein 抗氧化能力之研究

Studies on the Antioxidation of Genistein and Daidzein

洪志宏^{1*} Chih-Hung Hung

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

陳蓓蓉² Pei-Jung Chen

台大醫院竹東分院檢驗醫學科

王淑芬³ Shu-Fen Wang

台北榮總病理檢驗部

王海龍¹ Hai-Lung Wang

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

¹ Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University

² Laboratory Medicine Division, National Taiwan University Hospital Chu-dong Branch

³ Department of Pathology & Laboratory Medicine, Taipei Veterans General Hospital

摘要：自由基常會引起老化作用、心血管疾病、癌症、阿茲海莫症等退化性疾病。大豆 (soybean, *Glycine max*) 富含大豆異黃酮素(isoflavones)又被視為植物性雌激素，具有抗氧化及直接抑制自由基的能力，達到預防動脈硬化、抑制癌細胞增生及誘導癌細胞凋亡，異黃酮素中以 genistein 和 daidzein 為主要具生理功能的成份之一。本實驗中發現大豆中的 genistein 和 daidzein 具有抗氧化能力，在試管(in vitro)試驗中，探討 genistein 和 daidzein 對活性氧(reactive oxygen species, $O_2^{\cdot-}$ 、 OH^{\cdot} 與 H_2O_2)的清除能力，結果 genistein 清除 $O_2^{\cdot-}$ 及 OH^{\cdot} 自由基之 IC_{50} 濃度分別為 $16.14 \pm 1.25 \mu g/ml$ 、 $2.9 \pm 0.24 \mu g/ml$ ，daidzein 清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 OH^{\cdot} 自由基之 IC_{50} 分別為 $196.63 \pm 15.36 \mu g/ml$ 、 $1.1 \pm 0.11 mg/ml$ ，但兩者對 H_2O_2 的作用皆不明顯，由結果得知，兩者均具有清除活性氧 $O_2^{\cdot-}$ 及 OH^{\cdot} 自由基的能力，且 genistein 對於清除 $O_2^{\cdot-}$ 及 OH^{\cdot} 自由基的能力比 daidzein 強。

關鍵字：自由基、genistein、daidzein、抗氧化能力、活性氧

Abstract: Reactive oxygen species and free-radical-mediated reactions have been reported in degenerative or pathological processes such as aging, cancer, coronary heart disease, and Alzheimer's disease. Meanwhile, there are many epidemiological data revealing an association between people who have a diet rich in soybean foods and a decrease in the risk of cardiovascular diseases and certain forms of cancer. Soybean is rich in isoflavones, while genistein and daidzein are reckoned isoflavones to be the primary ingredients given with physiological function. In the present study, the genistein and

*Corresponding author



daidzein were isolated from soybean seed was evaluated for its in vitro scavenging effects on reactive oxygen species ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , and H_2O_2). In scavenging assays the genistein showed to be effective against for $O_2^{\cdot-}$ ($IC_{50} = 16.14 \pm 1.25 \mu\text{g/ml}$) and OH^{\cdot} ($IC_{50} = 2.90 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$). The daidzein showed to be effective against for $O_2^{\cdot-}$ ($IC_{50} = 196.63 \pm 15.36 \mu\text{g/ml}$) and OH^{\cdot} ($IC_{50} = 1.1 \pm 0.11 \text{ mg/ml}$). However, the genistein and daidzein does not have a significant effect on the H_2O_2 . These results provide scientific support for the empirical use genistein and daidzein may play a role as an antioxidant and may be beneficial to health when it is consumed.

Keywords: Free radical; Genistein; Daidzein; Antioxidative activity; Reactive oxygen species

1. 續言

自由基為人體新陳代謝過程產生的副產物，為帶有不成對電子的分子、原子或離子。因具有不成對電子的特性，以致於具有高度反應性。自由基可分為活性氧(reactive oxygen species)及活性氮(reactive nitrogen species)，其中多數以活性氧為主，包括超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基(OH^{\cdot})等。 $O_2^{\cdot-}$ 亦為活性氧之基礎反應產物。活性氧極易與細胞內的脂質、蛋白質、DNA 及 RNA 等生物分子發生作用，並破壞這些分子的結構與正常的生化功能，其中對 DNA 的破壞最易造成基因的突變而導致如癌症之類的疾病發生。除此之外，活性氧並可破壞胞膜系統的磷脂質，造成通透性的改變或有害物質的堆積；也可使蛋白質變性，失去應有的生理功能(趙克然等，2002)。

自由基會引起老化作用(Harman, 1995)及退化性慢性疾病：如關節炎、糖尿病、關節變硬、循環系統疾病、肝硬化、心臟病、動脈硬化、攝護腺病、癌症、巴金森氏病、老年癡呆症、皮膚起皺紋等老化現象等(Maes et al, 2011; Shoham et al, 2008; Diaz et al., 1997; Smith et al., 1996)。細胞膜主要由脂肪及蛋白所組成，容易受到自由基侵襲，若沒有適度的保護，則細胞膜易破損，接著自由基攻擊細胞侵入了細胞核，若攻擊細胞核的基因，則造成基因突變(mutation)進而可能生成癌症。

大豆(soybean)，屬於豆目(Liguminales)，是世界普遍食用的一種食物，特別是在亞洲國家。最近研究發現，多食用大豆食品，可降低罹患骨質疏鬆(osteoporosis)、一些慢性疾病、心血管疾病及癌症(McCue and Shetty, 2004)。流行病學及動物實驗得知，多食用大豆食品可降低罹患前列腺癌(Jacobsen et al., 1998; Lee et al., 2003)、乳癌(Guha et al., 2009; Yamamoto et al., 2003)、及子宮頸癌(Goodman et al., 1997)。大豆所含成份中，具有抗癌活性的除了大豆胰蛋白酶抑制劑之外，尚有大豆皂素(saponins)、大豆固醇(soy β -sitosterol)、大豆異黃酮(soy isoflavones)等(Barnes, 2010)。

異黃酮(isoflavones)存在於許多的植物當中，如大豆、紅花苜蓿、棗椰、石榴和紅三葉草等。由於大豆中的含量最多，故普遍又稱之為大豆異黃酮。雖然大豆中含有十二種以上的異黃酮(isoflavones)異構物，其中以 genistein 的含量最多，其次是 daidzein 和 glycitein，主要具生理意義的異黃酮，又以 genistein 被研究的最為透徹(Beavers, 2009)。大豆異黃酮(isoflavones)已有研究發現具有抗氧化(antioxidant)、抗發炎(anti-inflammatory)、恢復血管功能、降低膽固醇及抗癌(anti-cancer)作用。另外，由於其結構類似雌激素，故又有植物雌激素之稱，它能和雌激素接受



器結合，產生類似雌激素之作用，許多婦女已運用大豆異黃酮作為替代荷爾蒙療法。過去研究顯示大豆異黃酮之抗氧化作用可能的機制包含經由誘導酵素(如：catalase、superoxide dismutase、glutathione peroxidase 及 glutathione reductase)增加細胞抗氧化的能力(Cai and Wei, 1996; Suzuki et al., 2002)。已有研究顯示老鼠攝取大豆，能增加 glutathione peroxidase、glutathione reductase 及 glutathione-S-transferase 的濃度，並且 flavonoids 和 isoflavones 能增加還原型 glutathione (GSH) 濃度，並認為 isoflavones 可能扮演控制細胞中 GSH 合成(Appelt and Reicks, 1997; Scharf, 2003; Myhrstad et al., 2002; Guo et al., 2002)。除此之外，isoflavones 可抑制經由 TNF- α 所誘導之細胞黏附因子的表現(例如：ICAM-1 和 VCAM-1)，降低發炎反應，進而達到預防動脈硬化的效果。

此研究主要探討由大豆異黃酮中 genistein 和 daidzein 在 *in vitro* 中是否具有清除活性氧($O_2^{\cdot-}$ 、 OH^{\cdot}) 自由基與 H_2O_2 的能力，進而達到預防動脈硬化及癌症等疾病的生成，並可提昇大豆的價值與應用。

2. 研究方法

2.1 Genistein 和 Daidzein:

Genistein 購自 Sigma-Aldrich, Inc., Cas. No. 446-72-0 和 Daidzein 購自 Sigma-Aldrich, Inc., Cas. No. 486-66-8。

2.2 活性氧清除能力分析

使用體外抗氧化活性(*in vitro* antioxidative activity; AOA)實驗方法，分析 genistein 和 daidzein 的抗氧化能力，來計算出相對的抗氧化效價。本實驗主要對 superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)、hydroxyl radical(OH^{\cdot}) 及 hydrogen peroxide (H_2O_2) 三種自由基抗氧化能力的表現。

2.2.1 測定抗 Superoxide 自由基氧化之方法(Inoescu et al., 1999)

將四種試劑 2.0 mM lucigenin (1.0 ml)、phosphate-buffered saline, pH 7.4 (1.0 ml)、1.0 M arginine (0.05 ml) 和 1.4 μ M methylglyoxal (0.05 ml) 混合均勻後(共 2.1 ml) 加入化學冷光分析儀 (BJL uwCL analyzer) 之圓底石英比色測定管中(該超微弱化學冷光分析儀的敏感度高達 3.3×10^{-15} W/cm²。每日的敏感度校正是利用 ¹⁴C 為光源，在 860 ~ 867 伏特電壓下每秒產生 10,000 光子量，且其再現性的誤差小於 1.0%)。將 lucigenin、methylglyoxal 與 arginine 加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管後 12 分鐘(720 秒)，分別加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein 後，可觀察到突然間不同程度冷光量的減弱，這個現象就是 genistein 和 daidzein 具有不同程度的抗氧化表現，而待冷光量穩定後，再逐次加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein。IC₅₀，係指 genistein 和 daidzein 抗氧化物能抑制 50% superoxide 的濃度，其操作方式是先求得不同濃度的 genistein 和 daidzein 抗氧化物其抑制冷光的量，再分別換算出 genistein 和 daidzein 其 IC₅₀ 的濃度。

2.2.2 測定 Hydroxyl radical (OH^{\cdot}) 之方法(Tsai et al., 2001; Tsai et al., 2003)

利用 Fenton reaction 原理($Fe^{2+} + H_2O_2$)，將四種試劑：3 μ M IBG (indoxyl- β -glucuronide) (先溶於 pH 7.4 的 phosphate-buffered saline, 1.0 ml)、1.0 mM $FeSO_4$ (0.1 ml)、3% H_2O_2 (1.6ml) 及 10 mM EDTA (0.05ml)，混合均勻後(共 2.75 ml) 加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管中。上述四種試劑的添加順序為 EDTA、IBG、 H_2O_2 最後為 $FeSO_4$ 。將 IBG 與 Fenton reagent ($H_2O_2 + Fe^{2+}$)



加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管後，18 分鐘(1,080 秒)，分別加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein 後，可觀察到突然間不同程度冷光量的減弱，而待冷光量穩定後，再逐次加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein。利用上述方法，及可求出 genistein 和 daidzein 其 IC₅₀的濃度。

2.2.3 測定 Hydrogen peroxide (H₂O₂)之方法(Chiou et al., 2000; Ionescu et al., 1999)

將三種試劑 2 mM luminol (無須冷凍，保存於 4°C，內含 sodium borate, pH 7.3, 1.0 ml)、PBS, pH 7.4 (1.0 ml)、及 1.2% H₂O₂ (每日新鮮配製，1.0 ml)，混合均勻後(共 3.00 ml)加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管中。利用 BJL 化學冷光分析儀測量其冷光量。將 Luminol 與 H₂O₂ 加入化學冷光分析儀之圓底石英比色測定管後 10 分鐘(600 秒)，分別加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein 後，可觀察到突然間不同程度冷光量的減弱，而待冷光量穩定後，再逐次加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein。利用上述方法，亦可求出 genistein 和 daidzein 其 IC₅₀的濃度。

2.3 統計分析

本實驗結果所有數據均採用平均值±標準誤差(mean standard error)表示，每次比較的差異性，依實驗性質採用 pair-test 或 ANOVA，比較結果時當 P< 0.05 方具有統計意義。

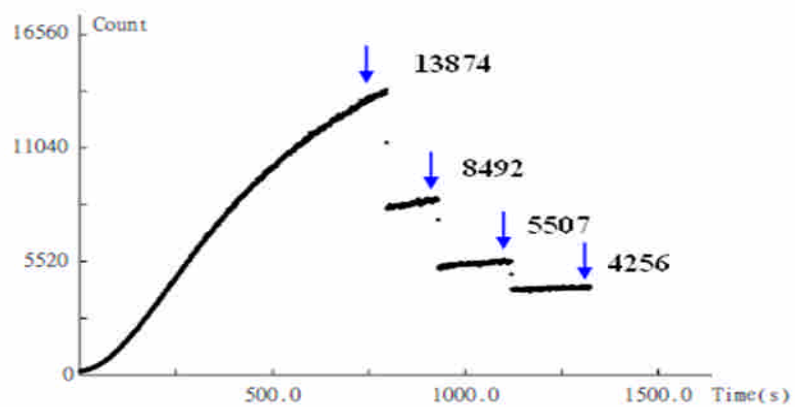
3. 實驗結果

3.1 Genistein 和 Daidzein 清除自由基能力分析

以 AOA assay (Antioxidative activity assay)原理偵測 genistein 及 daidzein 清除自由基的能力。清除自由基能力分析是利用純化學反應製造出各種高自由基濃度的環境，藉由加入受測物評估其清除自由基的能力，在實驗中我們測試 genistein 和 daidzein 對於環境中常見 O₂^{·-}、OH· 二種自由基與 H₂O₂ 的清除能力。在 genistein 及 daidzein 清除 O₂^{·-} 之分析，將四種試劑 2.0 mM lucigenin (1.0ml)、phosphate-buffered saline, pH 7.4 (1.0ml)、1.0 M arginine (0.05ml)和 1.4 μ M methylglyoxal (0.05ml) 混合均勻，會產生 O₂^{·-}，而後各加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein，可以分別觀察到冷光量降低，而待冷光量穩定後，再逐次加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein，可以觀察到在加入 genistein 後，冷光量由 13874 逐漸降低到 8492、5507 及 4256。當 genistein 終濃度為 0 μ g/ml、11.8 μ g/ml、23.6 μ g/ml 及 35.4 μ g/ml 時，冷光減少量分別為 0、5382、8367 及 9618，將冷光減少量除以未加入 genistein 冷光量，計算出自由基清除能力百分比，結果分別為 0%、38.8%、60.3% 及 69.3%，進而換算其 IC₅₀ 為：16.14 ± 1.25 μ g/ml (圖 1)。同樣地，在加入 daidzein 後，冷光量由 14268 逐漸降低到 12892、12075、10615、9518、8879、8241、7816、7294 及 6835，當 daidzein 終濃度為 0 μ g/ml、23.7 μ g/ml、47.4 μ g/ml、71.1 μ g/ml、94.8 μ g/ml、118.5 μ g/ml、142.2 μ g/ml、165.9 μ g/ml、189.6 μ g/ml、及 213.3 μ g/ml 時，冷光減少量分別為 0、1376、2193、3653、4750、5389、6027、6452、6974 及 7433，而清除自由基之百分比為 0%、9.6%、15.4%、25.6%、33.3%、37.8%、42.2%、45.2%、48.9% 及 52.1%，換算其 IC₅₀ 為：196.63 ± 15.36 μ g/ml (圖 2)，每個實驗樣品濃度，重複三次。



(a)



(b)

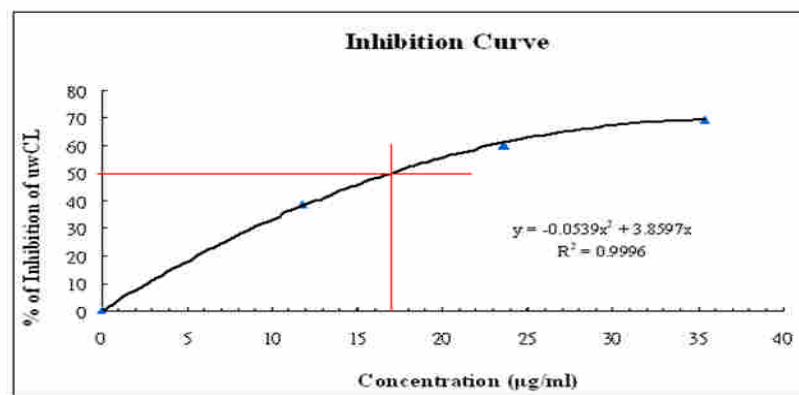


圖 1 Genistein 清除 $O_2\cdot$ 自由基活性分析：(a) 箭頭所指示的是加入 $10\ \mu\text{l}$ $2.5\ \text{mg/ml}$ genistein 之時間點，可觀察到冷光會突然減弱，表示具有清除 $O_2\cdot$ 自由基的活性，待冷光量穩定後，才逐次加入 $10\ \mu\text{l}$ $2.5\ \text{mg/ml}$ genistein。(b) genistein 的濃度為 X 軸，冷光抑制百分比為 Y 軸，可做成一抑制曲線，genistein 濃度與抑制冷光之相關性為 $R^2=0.9996$ ，且計算出 genistein 清除 $O_2\cdot$ 自由基之 IC_{50} 為： $16.14 \pm 1.25\ \mu\text{g/ml}$ 。



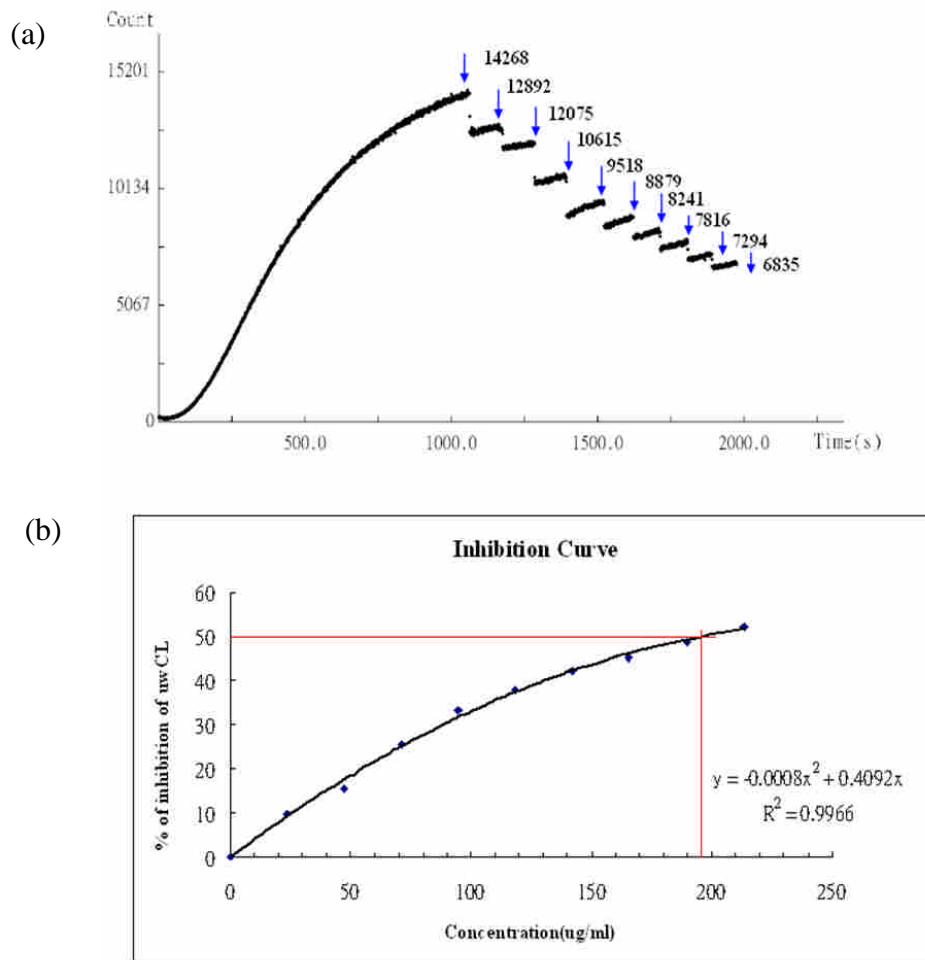


圖 2 Daidzein 清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基活性分析：(a) 箭頭所指示的是加入 10 μ l 5 mg/ml daidzein 之時間點，可觀察到冷光會突然減弱，表示具有清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的活性，待冷光量穩定後，才逐次加入 10 μ l 5 mg/ml daidzein。(b) daidzein 濃度為 X 軸，冷光抑制百分比為 Y 軸，可做成一抑制曲線，daidzein 濃度與抑制冷光之相關性為 $R^2=0.9966$ 且計算出 daidzein 清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基之 IC_{50} 為：196.63 \pm 15.36 μ g/ml。

在 genistein 及 daidzein 清除 OH^{\cdot} 之分析，利用 Fenton reaction 原理($Fe^{2+} + H_2O_2$)，將四種試劑：10 mM EDTA (0.05ml)、3 μ M IBG (先溶於 pH 7.4 的 phosphate-buffered saline, 1.0 ml)、3% H_2O_2 (1.6 ml) 及 1.0 mM $FeSO_4$ (0.1 ml) 混合均勻，會產生 OH^{\cdot} ，而後各加入 10 μ l 2.5 mg/ml 的 genistein 或 5 mg/ml daidzein，可以分別觀察到冷光量降低，待冷光量穩定後，再逐次加入 10 μ l 2.5mg/ml genistein 或 5 mg/ml daidzein。可以觀察到在加入 genistein 後，冷光量由 30398 逐漸降低到 13445、7038 及 4809。當 genistein 終濃度為 0 μ g/ml、2.7 μ g/ml、4.6 μ g/ml 及 6.4 μ g/ml 時，冷光減少量分別為 0、16953、23360 及 25589，將冷光減少量除以未加入 genistein 冷光量，計算出自由基清除能力百分比，結果分別為 0%、55.8%、76.9% 及 84.2%，進而換算其 IC_{50} 為 2.90 \pm 0.24 mg/ml (圖 3)。同樣地，在加入 daidzein 後，冷光量由 8144 逐漸降低到 7086、6162、5560、4980、4547、4114、3778 及 3425，當 daidzein 終濃度為 0 mg/ml、0.18 mg/ml、0.36 mg/ml、0.54 mg/ml、0.72 mg/ml、0.9 mg/ml、1.08 mg/ml、1.26 mg/ml、及 1.44 mg/ml 時，冷光減少量



分別為 0、1058、1982、2584、3164、3597、4030、4366 及 4719，而清除自由基之百分比為 0%、13%、24.3%、31.7%、38.9%、44.2%、49.5%、53.6% 及 57.9%，換算其 IC_{50} 為 1.1 ± 0.11 mg/ml (圖 4)，每個實驗樣品濃度，重複三次。

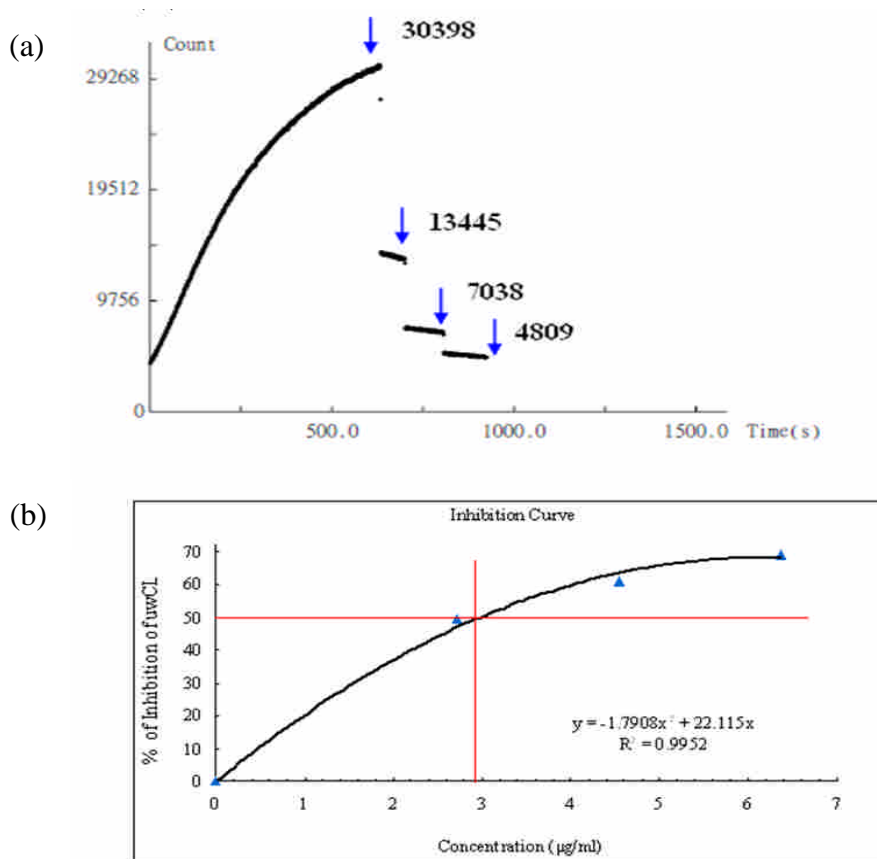


圖 3 Genistein 清除 OH 活性分析：(a) 箭頭所指示的是加入 $10 \mu\text{l}$ 2.5 mg/ml genistein 之時間點，發現冷光會突然減弱，表示具有清除 OH 自由基的活性，待冷光量穩定後，才逐次加入 $10 \mu\text{l}$ 2.5 mg/ml genistein。(b) genistein 濃度為 X 軸，冷光抑制百分比為 Y 軸，可做成一抑制曲線，genistein 與抑制冷光之相關性為 $R^2=0.9952$ ，且計算出 genistein 清除 OH 之 IC_{50} 為 $2.90 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$ 。



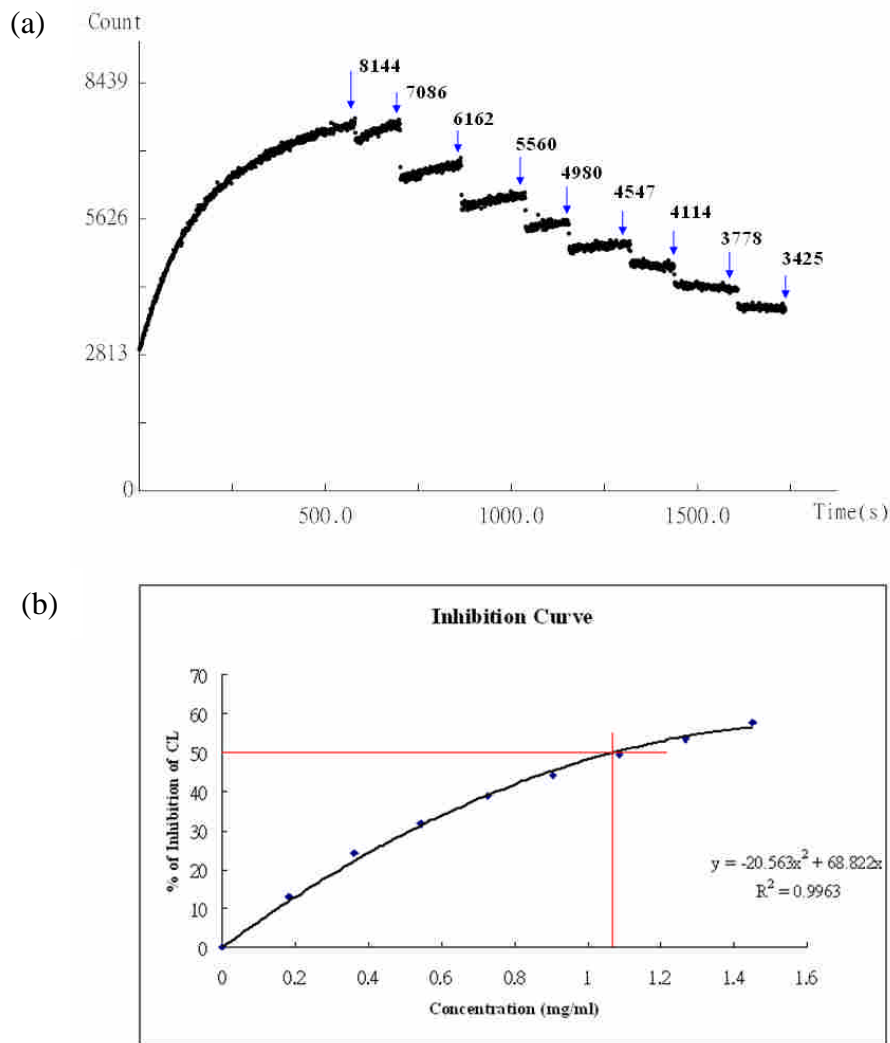


圖 4 Daidzein 清除 OH[·] 活性分析：(a) 箭頭所指示的是加入 10 μl 5 mg/ml daidzein 之處，發現冷光會突然減弱，表示具有清除 OH[·] 自由基的活性，待冷光量穩定後，才逐次加入 10 μl 5 mg/ml daidzein。(b) daidzein 濃度為 X 軸，冷光抑制百分比為 Y 軸，可做成一抑制曲線，daidzein 與抑制冷光之相關性為 $R^2=0.9963$ ，且計算出 daidzein 清除 OH[·] 之 IC₅₀ 為：1.1±0.11 mg/ml。

3.2 Genistein 和 Daidzein 清除 H₂O₂ 能力分析

Genistein 及 daidzein 清除 H₂O₂ 的能力，在最終濃度達到 2.5 mg/ml 時，效果仍不顯著，分別為 10.17% ± 1.25%，15.25% ± 1.35%，所以無顯示在結果圖中。顯示 genistein 及 daidzein 對清除 H₂O₂ 的能力無明顯之效果。

4. 討論

食物中攝取的類黃酮(flavonoids)和其他多酚類(polyphenols)被用來作為有益的影響於多種疾病，包含癌症、心血管疾病、神經退行性疾病。可能的機制包含經由誘導酵素(例：catalase、



superoxide dismutase、glutathione peroxidase 及 glutathione reductase)增加細胞抗氧化的能力 (Hernandez-Montes et al., 2006)。除此之外，類黃酮的結構亦使其具有抗氧化能力有關，其 4' 碳上具有-OH 基以及 5,7-dihydroxy 提供此特性。人類體內正常代謝所產生的自由基，往往會引起許多的慢性疾病形成，其中又以活性氧 ROS 最為常見。在我們的抗氧化實驗中，以 AOA assay 研究 genistein 和 daidzein 對二種常見的自由基($O_2\cdot^-$ 與 $\cdot OH$)及 H_2O_2 之清除能力，結果顯示 genistein 和 daidzein 對清除 $O_2\cdot^-$ 之 IC_{50} 分別為 $16.14 \pm 1.25\mu g/ml$ 和 $196.63 \pm 15.36\mu g/ml$ ，而對清除 $\cdot OH$ 之 IC_{50} 分別為 $2.9 \pm 0.24\mu g/ml$ 和 $1.1 \pm 0.11 mg/ml$ 。由結果發現 genistein 的清除自由基能力較 daidzein 好，而二者對 H_2O_2 清除能力皆沒有顯著影響，所以無顯示在結果圖中。genistein 的清除自由基能力較 daidzein 好，可能的原因在於 genistein 與 daidzein 結構上的差異，genistein 碳 5 上接羥基(OH)而 daidzein 碳 5 上接氫(H)(Yen and Lai, 2003)，因此異黃酮結構上羥基的數量與清除自由基能力呈現正相關性。

許多現代的「致命疾病」如心臟血管疾病、癌症、過敏症、糖尿病及關節炎等慢性病，都可能起因於體內過量的自由基和它們所造成的連鎖反應。人體細胞中常見能清除自由基的酵素包括超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、麩胱甘肽過氧化酶(Glutathione Peroxidase, GPx)、過氧化氫酶 (catalase)，全面保護人體免受自由基的破壞。除了這些酵素外，我們還可以由飲食中攝取如維他命 A、C、E、 β -胡蘿蔔素及硒等天然的抗氧化物質，以協助體內清除自由基。蔬菜水果中也含有許多其它的抗氧化物質，這些物質被稱為自然的植物營養素或植物化學成份 (phytochemicals)，例如黃酮類(flavonoids)、吲哚類(indoles)、大豆中的 genistein、daidzein、番茄紅素(lycopene)及多酚類(Rice-Evans et al., 1997)。

藉由飲食抑制發炎反應以減輕疾病機轉，一直是科學界研究的重點。研究指出大豆所含成份中，大豆皂素(saponins)、大豆固醇(soy β -sitosterol)、大豆異黃酮(soy isoflavones) (Messina and Barnes, 1991) (genistein 和 daidzein 是大豆中主要的異黃酮)都具有抗氧化、抗發炎和抗凝血能力，及 Kunitz-type 大豆胰蛋白酶抑制劑 (soybean trypsin inhibitor) 也具有清除自由基的能力(洪志宏等, 2008)，因此多食用大豆食品能做為國人預防心血管相關疾病及抗癌之健康保健食品(Nestel, 2004; Chin-Dusting et al., 2001; Wong et al, 1998)。

參考文獻

- [1] 洪志宏，王淑芬，蔡慧思，蔡文翔，黃兆君，王海龍，「大豆胰蛋白酶抑制劑之抗氧化能力分析」，元培學報，第15期，民國97年，25-36頁。
- [2] 趙克然，楊毅軍，曹道俊，胡淼琳，氧自由基與臨床，初版，台灣：合記出版社，民國91年。
- [3] Appelt, L. C. and Reicks, M. M., "Soy Feeding Induces Phase II Enzymes in Rat Tissues," *Nutrition and cancer*, Vol. 28, 1997, pp. 270-275.
- [4] Barnes S., "The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and Their Food Products," *Lymphatic Research and Biology*, Vol. 8, 2010, pp. 89-98.
- [5] Beavers, K. M., Jonnalagadda, S. S. and Messina, M. J., "Soy Consumption, Adhesion Molecules, and Pro-inflammatory Cytokines: a Brief Review of the Literature," *Nutrition reviews*, Vol. 67, 2009, pp. 213-221.



- [6] Cai, Q. and Wei, H., "Effect of Dietary Genistein on Antioxidant Enzyme Activities in SENCAR Mice," *Nutrition and cancer*, Vol. 25, 1996, pp. 1-7.
- [7] Chin-Dusting, J. P. R., Fisher, L. J., Lewis, T. V., Piekarska, A., Nestel, P. J. and Husband, A., "The Vascular Activity of Some Isoflavone Metabolites: Implication for a Cardioprotective Role," *British Journal Pharmacology*, Vol. 133, 2001, pp. 595-605.
- [8] Chiou, J. F., Kao, C. Y. and Chen, S. H., "Ultra-weak Chemiluminescence Analysis on the Mechanism of Producing and Releasing Nitric Oxide in PMA-stimulated Macrophage," *Journal of Biomedical & Laboratory Sciences*, Vol. 12, 2000, pp. 89-94.
- [9] Diaz, M. N.; Frei, B., Vita, J. A. and Keaney, J. F., "Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease," *New England Journal of Medicine*, Vol. 337, 1997, pp. 408-416.
- [10] Goodman, M. T., Wilkens, L. R., Hankin, J. H., Lyu, L. C., Wu, A. H. and Kolonel, L. N., "Association of Soy and Fiber Consumption with the Risk of Endometrial Cancer," *American Journal of Epidemiology*, Vol. 146, 1997, pp. 294-306.
- [11] Guo, Q., Rimbach, G., Moini, H., Weber, S. and Packer, L., "ESR and Cell Culture Studies on Free Radical-scavenging and Antioxidant Activities of Isoflavonoids," *Toxicology*, Vol. 179, 2002, pp.171-180
- [12] Guha, N., Kwan, M.L., Quesenberry, C. P. Jr, Weltzien, E. K., Castillo, A. L. and Caan, B. J., "Soy Isoflavones and Risk of Cancer recurrence in a Cohort of Breast Cancer Survivors: the Life after Cancer Epidemiology Study." *Breast Cancer Research Treatment*, Vol. 118, 2009, pp. 395-405.
- [13] Harman, D., "Role of Antioxidant Nutrients in Aging: Overview," *Age*, Vol. 18, 1995, pp. 51-62.
- [14] Hernandez-Montes, E., Pollard, S. E., Vauzour, D., Jofre-Montseny, L., Rota, C. and Rimbach, G., "Activation of Glutathione Peroxidase via Nrf1 Mediates Genistein's Protection against Oxidative Endothelial Cell Injury," *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 346, 2006, pp. 851-859.
- [15] Inoescu, J. G., Weber, D. and Bradford, R., "Clinical Application of Free Radical Assessment in Blood and Serum Samples by Enhanced Chemiluminescence I. Methodology and Results in Different Clinical Conditions," *Journal of Biomedical & Laboratory Sciences*, Vol. 11, 1999, pp. 103-109.
- [16] Ionescu, G., Merk, M. and Bradford, R., "Simple Chemiluminescence Assays for Free Radicals in Venous Blood and Serum Samples: Results in Atopic, Psoriasis, MCS and Cancer Patients," *Research in Complex Medical*, Vol. 6, 1999, pp. 294-300.
- [17] Jacobsen, B. K., Knutsen, S. F. and Fraser, G. E., "Does High Soy Milk Intake Reduce Prostate Cancer Incidence? The Adventist Health Study (United States)," *Cancer Causes Control*, Vol. 9, 1998, pp.553-557.
- [18] Lee, M. M., Gomez, S. L., Chang, J. S., Wey, M., Wang, R.T. and Hsing, A.W., "Soy and Isoflavone Consumption in Relation to Prostate Cancer Risk in China," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. 12, 2003, pp.665-668.



- [19] Maes, M., Galecki, J.P, Chang, Y. S. and Berk, M., “A Review on the Oxidative and Nitrosative Stress (O&NS) Pathways in Major Depression and Their Possible Contribution to the (Neuro) Degenerative Processes in That Illness,” *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol. 29, 2011, pp. 676-92.
- [20] Mariana, D. A. and Winrich, B., “Glycated Proteins Can Enhance Photooxidative Stress in Aged and Diabetic Lenses,” *Free Radical research*, Vol. 36, 2002, pp. 1251-1259.
- [21] McCue, P. and Shetty, K., “Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: a Review,” *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, Vol. 44, 2004, pp. 361-367.
- [22] Myhrstad, M. C., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R. and Moskaug, J. Ø., “Flavonoids Increase the Intracellular Glutathione Level by Transactivation of the Gamma-glutamylcysteine Synthetase Catalytical Subunit promoter,” *Free radical biology & medicine*, Vol. 32, 2002, pp. 386-393.
- [23] Nestel, P., “Isoflavones: Effects on Cardiovascular Risk and Functions,” *International Congress Series*, Vol. 1262, 2004, pp. 317-319.
- [24] Rice-Evans, C. A., Miller, N. and Paganga, G., “Antioxidant Properties of Phenolic Compounds,” *Trends in Plant Science*, Vol. 2, 1997, pp. 152-159.
- [25] Scharf, G., Prustomersky, S., Knasmuller, S., Schulte-Hermann, R. and Huber, W. W., “Enhancement of Glutathione and G-glutamyl Cysteine Synthetase, the Rate Limiting Enzyme of Glutathione Synthesis, by Chemoprotective Plant-derived Food and Beverage Components in the Human Hepatoma Cell Line HepG2,” *Nutrition and cancer*, Vol. 45, 2003, pp. 74-83.
- [26] Shoham, A., Hadziahmetovic, M., Dunaief, J. L., Mydlarski, M. B. and Schipper, H. M., “Oxidative Stress in Diseases of the Human Cornea,” *Free Radic Biology and Medicine*, Vol. 45, 2008, pp.1047-55.
- [27] Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F. and Kowal, N., “Oxidative Damage in Alzheimer’s,” *Nature*, Vol. 382, 1996, pp. 120-121.
- [28] Suzuki, K., Koike, H., Matsui, H., Ono, Y., Hasumi, M. and Nakazato, H., “Genistein, a Soy Isoflavone, Induces Glutathione Peroxidase in the Human Prostate Cancer Cell Lines LNCaP and PC-3,” *International journal of cancer*, Vol. 99, 2002, pp. 846-852.
- [29] Tsai, C. H., Arnold, S., Chiou, J. F., Chern, C. L. and Liu, T. Z., “Rapid and Specific Detection of Hydroxyl Radical Using an Ultra Weak Chemiluminescence Analyzer and a Low-level Chemiluminescence Emitter: Application to Hydroxyl Radical-scavenging Ability of Aqueous Extracts of Food Constituents,” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 49, 2001, pp. 2137-2141.
- [30] Tsai, C. H., Chang, R. C., Chiou, J. F. and Liu, T. Z., “Improved Superoxide-generating System Suitable for the Assessment of the Superoxide-scavenging Ability of Aqueous Extracts of Food Constituents Using Ultra Weak Chemiluminescence,” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 51, 2003, pp. 58-62.
- [31] Wong, W., Smith, E., Stuff, J., Hachey, D., Heird, W. and Pownell, H., “Cholesterol-lowering



Effect of Soy Protein in Normocholesterolemic and Hypercholesterolemic Men,” *American Journal Clinical Nutrition*, Vol. 68, 1998, pp. 1385S-1389S.

- [32] Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S. and Tsugane, S., “Soy, Isoflavones, and Breast Cancer Risk in Japan,” *Journal of National Cancer Institute*, Vol. 95, 2003, pp. 906-913.
- [33] Yen, G. C. and Lai, H. H., “Inhibition of Reactive Nitrogen Species Effects in Vitro and in Vivo by Isoflavones and Soy-based Food Extracts,” *Journal Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 51, 2003, pp.7892-7900.

