

# 萝卜硫素对阿霉素诱导的肝细胞损伤保护作用及其与氧化应激关系的研究

茹仁萍, 纪倩\*, 王琦, 李松龙, 田静, 包剑锋(杭州市西溪医院, 杭州 310023)

**摘要:** 目的 探讨萝卜硫素(sulforaphane, SFN)对阿霉素(adriamycin, ADM)诱导的肝细胞损伤保护作用及其与氧化应激的关系。方法 体外培养人正常肝细胞 L02 和人肝癌细胞株 HepG2, 加入不同浓度的 SFN(6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 培养 48 h; 另取 HepG2 细胞中加入 3.75, 7.5, 15, 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  SFN, 培养 24, 48 h, MTT 法检测培养后细胞抑制率, 计算 50%抑制浓度(IC<sub>50</sub> 值)。体外培养 L02 细胞, 试验组加入不同浓度的 SFN(3.75, 7.5, 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 试验组与模型组分别于 0.5, 1, 2, 3 h 后加入 1.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 ADM, 通过酶联免疫的方法分别对细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)、葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)、核因子 NF-E2 相关因子(Nrf2)进行测定评估。结果 SFN 能显著抑制 HepG2 的体外增殖, 而且呈一定的药物浓度-效应和时间-效应关系。SFN 对 L02 的抑制作用相对较弱, 其 IC<sub>50</sub> 为 47.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 明显高于其对 HepG2 的 IC<sub>50</sub> 值。另外, 与模型组比较, SFN 能够明显降低细胞培养上清液 MDA、LDH、GLUT4、TNF- $\alpha$  的水平, 升高 SOD、Nrf2 水平。结论 SFN 可显著抑制肝癌细胞的体外增殖能力, 对其具有一定的选择性抑制作用, 而且对于 ADM 诱导的肝细胞损伤具有一定的保护作用。可能是通过 Keap1-Nrf2/ARE 通路, 诱导二相抗氧化酶清除体内的致癌物质或其他毒物, 从而减轻肝脏组织的氧化应激和炎症反应。

**关键词:** 肝癌; 萝卜硫素; 阿霉素; 肝细胞损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)07-0799-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.006

引用本文: 茹仁萍, 纪倩, 王琦, 等. 萝卜硫素对阿霉素诱导的肝细胞损伤保护作用及其与氧化应激关系的研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 799-803.

## Protective Effect of Sulforaphane on Adriamycin-induced Hepatocellular Injury and Its Relationship with Oxidative Stress

RU Renping, JI Qian\*, WANG Qi, LI Songlong, TIAN Jing, BAO Jianfeng(Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the protective effect of sulforaphane(SFN) on Adriamycin(ADM)-induced hepatocyte injury and its relationship with oxidative stress. **METHODS** Human normal liver cell(L02) and human hepatoma cell line(HepG2) were incubated in 96-well plates with different concentrations of SFN(6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cultured for 48 h. Another HepG2 cells were added SFN(3.75, 7.5, 15, 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), cultured for 24, 48 h. MTT assay was used to detect the cell inhibition rate. Calculated the 50% inhibitory concentration(IC<sub>50</sub> value). *In vitro* culture of L02, different concentration of SFN(3.75, 7.5, 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were added to the experimental group. 1.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ADM was added to the experimental group and the model group at 0.5, 1, 2, 3 h, respectively. Used the method of enzyme-linked immune in the cell culture supernatant of tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), lactate dehydrogenase(LDH) glucose transporter 4(GLUT4), nuclear factor NF protein-E2 related factor(Nrf2) determination of assessment. **RESULTS** SFN could significantly inhibit the *in vitro* proliferation of HepG2 in a drug concentration-effect and time-effect relationship. The inhibitory effect of SFN on L02 was relatively weak, and its IC<sub>50</sub> was 47.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , which was significantly higher than that of HepG2. Compared with the model group, SFN could significantly decrease the level of MDA, LDH, GLUT4, TNF- $\alpha$  and the rate of apoptosis, increase the level of SOD, Nrf2 in the supernatant of cell culture. **CONCLUSION** SFN can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*, and has a selective inhibitory effect on it. Besides, SFN has a protective effect on ADM-induced hepatocyte injury. Through the Keap1-Nrf2/ARE pathway, biphasic antioxidant enzymes may be induced to eliminate carcinogens or other toxins in the body, thereby reducing oxidative stress and inflammatory reaction in the liver tissue.

**KEYWORDS:** liver cancer; sulforaphane; adriamycin; hepatocyte injury

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2016ZB106); 杭州市卫生科技计划项目(2015A30, 2018A48)

作者简介: 茹仁萍, 女, 主任药师 Tel: (0571)86481609 E-mail: rrrrrp@126.com \*通信作者: 纪倩, 女, 药师 Tel: (0571)86481623 E-mail: 515610172@qq.com

肝癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在近几年呈现逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。目前,肝癌的主要治疗方法为手术切除<sup>[2]</sup>。但是,该方法存在着术后肿瘤复发率高的问题<sup>[3]</sup>,这也是导致预后不佳的主要原因<sup>[4]</sup>。阿霉素(adriamycin, ADM)是临床上应用较广泛的化疗药物之一,常用于治疗各种恶性肿瘤。但是近期研究表明,包括肝细胞性肝癌在内的多种肿瘤细胞都具有抵抗 ADM 诱导的肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[5]</sup>。萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是一种西兰花的提取物,是抗癌效果最好的植物活性物质之一<sup>[6-7]</sup>。Fimognari 等<sup>[8-9]</sup>研究发现,体外实验中 SFN 能逆转 p53 突变小鼠成纤维细胞对 ADM 的耐药性,从而起到化疗增敏和协同作用。本研究旨在利用体外实验,研究 SFN 对 ADM 诱导的肝细胞损伤保护作用及其与氧化应激关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 细胞株** 人类正常肝细胞 L02 和人类肝癌细胞株 HepG2, 购自美国模式培养物集存库。

**1.1.2 仪器** Forma 3111 型细胞培养箱、A1300 生物安全柜、AC8 洗板机、Sorvall Legend Mach 1.6R 离心机均来自 Thermo 公司; BIO-RAD iMark 酶标仪(上海京工实业有限公司); Milli-Pore Milli-Q 超纯水仪(北京市六一仪器厂); Axiovert200 蔡氏荧光倒置显微镜、YS2-H 光学显微镜均来自日本 NiKon 公司; -80 °C 超低温冰箱(日本 SANYO 公司); 电子天平、酸度计等。

**1.1.3 试剂** RPMI-1640 培养基(批号: 1806130607)、DMEM 培养基(批号: 1803211006)、胰蛋白酶(批号: 18030205)、EDTA(批号: 1804270307)均购自吉诺生物医药技术有限公司; 优级胎牛血清(浙江天杭生物技术股份有限公司, 批号: 20150722); PBS(天津市灏洋生物制品技术有限公司, 批号: BB2004Y-25); SFN(日本, 批号: 20170115LF); ADM(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: D1515)。乳酸脱氢酶(LDH, 批号: 20180613)、超氧化物歧化酶(SOD, 批号: 180506)、丙二醛(MDA, 批号: 180504)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ , 批号: J180611E6)、葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4, 批号: J180611E2)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2, 批号: J180611E5)酶联免疫试剂盒均购自南京建成

生物工程研究所。

### 1.2 方 法

**1.2.1 SFN 的细胞毒性试验** 体外培养 L02 和 HepG2 细胞, 对数生长期细胞配成  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  单个细胞混悬液, 每孔 100  $\mu\text{L}$  分别接种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 加入不同浓度的 SFN(6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 每个浓度组设 6 个复孔, 每孔终体积 200  $\mu\text{L}$ , 培养 48 h 后, MTT 法检测吸光度( $A$  值)。另取 HepG2 细胞加入不同浓度的 SFN(3.75, 7.5, 15, 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 每个浓度设 6 个复孔, 每孔终体积 200  $\mu\text{L}$ , 培养 24, 48 h 后, MTT 法检测  $A$  值。于酶联免疫分析仪上检测 201 nm 处  $A$  值, 计算细胞抑制率 =  $[1 - (A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}})] / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。重复 3 次取平均值。求出 50% 抑制浓度( $\text{IC}_{50}$  值)。

### 1.2.2 L02 肝细胞造模及给药

**1.2.2.1 建立 ADM 肝损伤细胞模型** 以 L02 细胞为实验对象, 用预实验最佳浓度 1.25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ADM 诱导 L02 肝细胞凋亡。

**1.2.2.2 SFN 对 ADM 损伤 L02 肝细胞的作用** 体外培养 L02 细胞, 4 d 后将对数生长期细胞配成  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  单个细胞混悬液, 每孔 100  $\mu\text{L}$  分别接种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 设正常组为空白 L02 细胞, SFN 对照组加入 3.75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  SFN, 试验组加入不同浓度的 SFN(3.75, 7.5, 15  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 试验组与模型组分别于 0.5, 1, 2, 3 h 后加入 1.25  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 ADM, 每个浓度组设 6 个复孔, 每孔终体积 200  $\mu\text{L}$ 。检测细胞培养上清液中 LDH、SOD、MDA、TNF- $\alpha$ 、GLUT4 和 Nrf2 水平。

**1.2.3 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 假定检测水平为 0.05, 2 组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 SFN 对于 L02 和 HepG2 的细胞毒性试验

SFN 对 L02 细胞的抑制作用相对较弱, 其  $\text{IC}_{50}$  为 47.7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 明显高于其对 HepG2 的  $\text{IC}_{50}$  值 14.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 提示 SFN 对肝癌细胞具有一定的选择性抑制作用。结果见表 1。

### 2.2 SFN 对于 HepG2 细胞体外增殖的抑制作用

当采用不同浓度的药物(3.75, 7.5, 15, 31.25,

62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )处理肝癌细胞 HepG2 24, 48 h 后, 细胞生长受到明显抑制, 当药物浓度达 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, HepG2 细胞存活率为 50.15% (24 h)和 48.07%(48 h)。表明 SFN 处理肿瘤细胞后, 细胞存活率明显降低, 且这种现象存在一定的药物浓度-效应和时间-效应关系。结果见图 1。

表 1 SFN 对 L02 和 HepG2 的抑制率

Tab. 1 Inhibition rate of SFN against L02 and HepG2

细胞名称	SFN 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
L02	6.25	7.15±1.23	47.7±5.88
	12.5	20.45±6.07	
	25	25.56±7.98	
	50	57.45±13.32	
	100	91.34±19.10	
HepG2	6.25	15.52±4.89	14.1±1.53
	12.5	49.24±11.56	
	25	62.75±16.10	
	50	90.58±18.23	
	100	99.23±19.78	

表 2 SFN 对 L02 细胞上清液 LDH、SOD、MDA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab. 2 Effects of SFN on LDH, SOD, MDA in L02 cell superntant ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	0.5 h			1 h		
	LDH/IU·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>	LDH/IU·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>
正常组	69.44±8.25	19.49±8.06	1.18±0.15	69.44±11.58	19.49±2.89	1.18±0.18
模型组	152.00±39.52 <sup>1)</sup>	18.88±5.92 <sup>1)</sup>	1.65±0.19 <sup>2)</sup>	150.56±39.52 <sup>1)</sup>	18.15±5.92 <sup>1)</sup>	1.95±0.25 <sup>2)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	112.66±23.6 <sup>1)</sup>	10.93±3.52 <sup>1)</sup>	1.49±0.29 <sup>1)</sup>	108.24±37.14 <sup>1)</sup>	11.29±3.54 <sup>1)</sup>	1.42±0.25 <sup>1)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	148.55±25.40	19.93±5.30	1.59±0.35	145.72±32.38	20.29±4.85	1.50±0.32 <sup>3)</sup>
SFN 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	145.29±34.80 <sup>3)</sup>	19.84±6.23 <sup>3)</sup>	1.48±0.28 <sup>3)</sup>	142.81±34.03 <sup>3)</sup>	20.88±6.28 <sup>3)</sup>	1.43±0.27 <sup>3)</sup>
SFN 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	142.66±31.05 <sup>3)</sup>	20.90±4.98 <sup>3)</sup>	1.38±0.23 <sup>3)</sup>	138.85±30.09 <sup>3)</sup>	22.63±3.02 <sup>4)</sup>	1.35±0.25 <sup>3)</sup>
组别	2 h			3 h		
	LDH/IU·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>	LDH/IU·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>
正常组	69.45±10.82	19.48±3.05	1.18±0.19	69.44±10.2	19.48±3.80	1.18±0.25
模型组	148.52±39.52 <sup>1)</sup>	17.97±5.92 <sup>1)</sup>	2.12±0.27 <sup>2)</sup>	146.25±29.51 <sup>1)</sup>	17.47±5.92 <sup>1)</sup>	2.38±0.16 <sup>2)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100.55±25.40 <sup>1)</sup>	12.66±3.44	1.32±0.18 <sup>2)</sup>	94.72±32.38	13.29±2.57 <sup>2)</sup>	1.18±0.15 <sup>2)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	142.66±38.38 <sup>3)</sup>	20.66±4.89 <sup>3)</sup>	1.52±0.25 <sup>3)</sup>	140.24±37.14 <sup>3)</sup>	21.17±3.21 <sup>3)</sup>	1.48±0.28 <sup>3)</sup>
SFN 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	138.37±30.08 <sup>3)</sup>	21.48±5.78 <sup>3)</sup>	1.44±0.26 <sup>3)</sup>	137.01±24.36 <sup>3)</sup>	23.20±3.58 <sup>3)</sup>	1.39±0.25 <sup>3)</sup>
SFN 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	130.29±28.06 <sup>3)</sup>	23.07±3.98 <sup>4)</sup>	1.312±0.35 <sup>3)</sup>	129.61±21.24 <sup>3)</sup>	24.45±3.85 <sup>4)</sup>	1.21±0.30 <sup>4)</sup>

注: 与正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

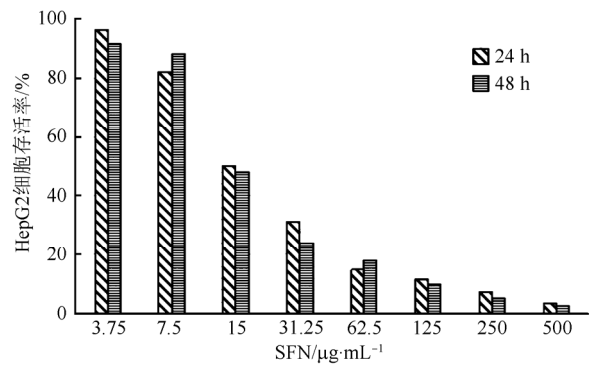


图 1 SFN 对人类肝癌细胞 HepG2 体外增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect of SFN on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 *in vitro*

### 2.3 SFN 对 L02 细胞上清液 LDH、SOD、MDA、Nrf2、TNF- $\alpha$ 、GLUT4 的影响

经过 ADM 作用后, L02 细胞上清液 LDH、MDA 的水平显著上升( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), SOD 水平明显下降( $P<0.05$ ), Nrf2、GLUT4、TNF- $\alpha$  水平增加( $P<0.05$ )。经过不同浓度的 SFN(3.75, 7.5, 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )处理后, 与模型组比, MDA、LDH、TNF- $\alpha$  和 GLUT4 水平显著降低, SOD、Nrf2 显著升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 且这种现象存在一定的药物浓度-时间效应关系, 随着浓度增大, 时间延长趋于稳定。结果见表 2~3。

表 3 SFN 对 L02 细胞上清液 Nrf2、GLUT4、TNF- $\alpha$  的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab. 3 Effects of SFN on Nrf2, GLUT4, TNF- $\alpha$  in L02 cell supernatant ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	0.5 h			1 h		
	Nrf2	GLUT4	TNF- $\alpha$	Nrf2	GLUT4	TNF- $\alpha$
正常组	131.77 $\pm$ 82.53	34.25 $\pm$ 18.25	306.93 $\pm$ 5.99	131.78 $\pm$ 60.55	34.25 $\pm$ 10.58	306.85 $\pm$ 8.25
模型组	134.48 $\pm$ 49.53 <sup>1)</sup>	39.52 $\pm$ 12.82 <sup>1)</sup>	338.52 $\pm$ 21.56 <sup>1)</sup>	137.69 $\pm$ 45.68 <sup>1)</sup>	41.85 $\pm$ 7.54 <sup>1)</sup>	343.52 $\pm$ 16.85 <sup>1)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	95.32 $\pm$ 8.03 <sup>3)</sup>	31.52 $\pm$ 9.52 <sup>3)</sup>	225.56 $\pm$ 28.25 <sup>3)</sup>	107.25 $\pm$ 31.856 <sup>2)</sup>	29.85 $\pm$ 11.50 <sup>3)</sup>	210.22 $\pm$ 20.19 <sup>3)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	135.61 $\pm$ 45.21	37.24 $\pm$ 5.92	325.56 $\pm$ 23.74 <sup>3)</sup>	139.58 $\pm$ 35.26 <sup>3)</sup>	36.15 $\pm$ 14.23 <sup>3)</sup>	315.22 $\pm$ 21.55 <sup>3)</sup>
SFN 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	138.33 $\pm$ 36.85 <sup>3)</sup>	35.96 $\pm$ 12.12	312.89 $\pm$ 26.54 <sup>3)</sup>	142.81 $\pm$ 38.16 <sup>3)</sup>	33.35 $\pm$ 10.30 <sup>3)</sup>	308.81 $\pm$ 21.54 <sup>3)</sup>
SFN 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	140.66 $\pm$ 34.94 <sup>3)</sup>	32.95 $\pm$ 12.05 <sup>3)</sup>	310.36 $\pm$ 20.57 <sup>3)</sup>	149.85 $\pm$ 38.28 <sup>3)</sup>	31.89 $\pm$ 11.22 <sup>3)</sup>	305.56 $\pm$ 22.87 <sup>3)</sup>
组别	2 h			3 h		
	Nrf2	GLUT4	TNF- $\alpha$	Nrf2	GLUT4	TNF- $\alpha$
正常组	131.86 $\pm$ 38.50	34.24 $\pm$ 18.28	306.88 $\pm$ 15.2	131.78 $\pm$ 60.55	34.25 $\pm$ 11.83	306.75 $\pm$ 9.56
模型组	141.48 $\pm$ 42.14 <sup>1)</sup>	45.95 $\pm$ 11.96 <sup>1)</sup>	350.82 $\pm$ 18.86 <sup>1)</sup>	145.48 $\pm$ 49.53 <sup>1)</sup>	48.77 $\pm$ 11.96 <sup>1)</sup>	354.82 $\pm$ 10.57 <sup>1)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	119.85 $\pm$ 32.17 <sup>2)</sup>	26.12 $\pm$ 8.14 <sup>3)</sup>	197.58 $\pm$ 23.1 <sup>3)</sup>	130.85 $\pm$ 21.59	24.52 $\pm$ 5.25 <sup>3)</sup>	185.55 $\pm$ 21.57 <sup>3)</sup>
SFN 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	143.38 $\pm$ 32.17	37.28 $\pm$ 13.25 <sup>3)</sup>	303.22 $\pm$ 21.28 <sup>3)</sup>	149.23 $\pm$ 25.45	38.27 $\pm$ 13.53 <sup>3)</sup>	298.55 $\pm$ 20.68 <sup>3)</sup>
SFN 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	146.47 $\pm$ 31.55 <sup>3)</sup>	31.53 $\pm$ 7.21 <sup>3)</sup>	298.79 $\pm$ 22.35 <sup>3)</sup>	152.89 $\pm$ 34.85 <sup>3)</sup>	32.18 $\pm$ 11.05 <sup>3)</sup>	288.45 $\pm$ 25.12 <sup>3)</sup>
SFN 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +ADM	152.88 $\pm$ 32.22 <sup>3)</sup>	30.88 $\pm$ 9.14 <sup>4)</sup>	285.35 $\pm$ 26.54 <sup>3)</sup>	160.25 $\pm$ 42.33 <sup>4)</sup>	28.11 $\pm$ 8.21 <sup>4)</sup>	282.13 $\pm$ 21.77 <sup>4)</sup>

注: 与正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ .

### 3 讨论

ADM 是应用最多的化疗药物之一, 具有形成超氧化自由基的功能, 并有特殊的破坏细胞膜结构和功能的作用。进入体内迅速分布于心、肾、肝、脾、肺组织中, 主要在肝内代谢。ADM 对正常细胞(心脏、肝脏、肾脏等细胞)的不良反应严重制约 ADM 的临床应用。有文献报道, ADM 可使小鼠肝脏出现明显的组织空泡, 引起肝脏损害。临床上大剂量使用 ADM, 引起肝细胞功能障碍, 通常表现为急性过程, 多见既往有活动性肝炎等肝病患者。虽然已有相关的保肝药, 如甘草酸二铵、古胱甘肽、联苯双脂等合用, 起到减少肝脏不良反应的作用, 但临床上还没有有效的增效减毒药。最新研究发现<sup>[10]</sup>, SFN(1-异硫氰酸-4-甲磺酰基丁烷)是抗癌效果最好的植物活性物质之一<sup>[11]</sup>, 又是常见的抗氧化剂, 能够清除氧自由基, 其机制主要是通过抑制阶段 I 药物代谢酶、激活阶段 II 药物代谢酶、激活 NrQ-Keapl 系统、NF- $\kappa$ B 信号通路失活、抑制组蛋白去乙酰化酶等减少肝损伤<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示, SFN 对正常肝细胞 L02 的抑制作用相对较弱, 其 IC<sub>50</sub> 明显高于对肝癌细胞 HepG2 的 IC<sub>50</sub> 值, 说明 SFN 对肝癌细胞具

有一定选择性杀伤和抑制作用, 在抑制肝癌细胞增殖的同时, 对正常肝细胞无明显影响。

另外, ADM 对于正常肝细胞的不良反应机制也可以用氧化应激反应来解释。本研究结果显示, 经过 ADM 作用后, 模型组 L02 细胞上清液 MDA、LDH 含量显著上升( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), SOD 含量下降( $P<0.05$ ), 说明 ADM 能够增加正常肝细胞的氧化应激反应, 从而导致细胞毒性。同时, 上清液 Nrf2 含量增加( $P<0.05$ ), 提示 ADM 作用后 L02 细胞 Nrf2 在一定程度上被激活。GLUT4、TNF- $\alpha$  含量增加( $P<0.05$ ), 提示糖代谢升高, 炎症反应明显。有研究报道<sup>[14]</sup>, SFN 通过激活 Nrf2 信号通路对肝损伤起到保护作用。另有报道<sup>[15]</sup>, Nrf2 参与了 ADM 所致心脏毒性的调控作用。本研究证实了 ADM 上调肝脏细胞 Nrf2 转录因子, 改变其下游抗氧化酶表达, 提示 ADM 在致肝脏毒性的同时亦启动 Nrf2-抗氧化酶通路, 该通路对 ADM 所致肝脏毒性发挥抑制作用。

经过不同浓度的 SFN(3.75, 7.5, 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 处理后, MDA、LDH 显著低于模型组, SOD 高于模型组, 说明 SFN 可以改善 ADM 诱导的 L02 细胞氧化应激反应及脂质过氧化所致的肝损伤程

度, TNF- $\alpha$  水平和 GLUT4 水平下降, 提示 SFN 具有增强人体糖代谢的调节能力, 抑制 TNF- $\alpha$  的产生从而减少肝细胞损伤或凋亡的作用。Nrf2 是细胞氧化应激反应中的关键因子, 研究结果显示, Nrf2 水平明显升高, 又由于氧化应激水平下降, 提示 SFN 通过 Keap1-Nrf2/ARE 通路, 诱导二相抗氧化酶来清除体内的致癌物质或其他毒物, 上调下游基因 HO-1 蛋白表达, 产生强大的抗炎抗氧化作用, 从而减轻肝脏组织的氧化应激和炎症反应。

## REFERENCES

- [1] OZAKYOL A. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma(HCC Epidemiology) [J]. J Gastrointest Cancer, 2017(48): 238-240.
- [2] RABINEL P, DOUSSE D, MUSCARI F, et al. Management of liver cancer. The Surgeon's point of view [J]. Rep Pract Oncol Radiother, 2017, 22(2): 176-180.
- [3] KANG K J, AHN K S. Anatomical resection of hepatocellular carcinoma: A critical review of the procedure and its benefits on survival [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(7): 1139-1146.
- [4] DÍAZ-GONZÁLEZ Á, REIG M, BRUIX J. Treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Dig Dis, 2016, 34(5): 597-602.
- [5] ASGHAR U, MEYER T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? [J]. J Hepatol, 2012, 56(3): 686-695.
- [6] ABBAOUI B, RIEDL K M, RALSTON R A, et al. Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: characterization, metabolism, and interconversion [J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(11): 1675-1687.
- [7] JIA K, HE Y C, HONG J, et al. Sulforaphane derived from broccoli inhibit proliferation and invasion of lung cancer A549 cells *in vitro* [J]. China Health Care Nutr(中国保健营养), 2014(7): 4589-4590.
- [8] FIMOGNARI C, HRELIA P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer [J]. Mutat Res, 2007, 635(2/3): 90-104.
- [9] FIMOGNARI C, LENZI M, SCIUSCIO D, et al. Combination of doxorubicin and sulforaphane for reversing doxorubicin-resistant phenotype in mouse fibroblasts with p53Ser220 mutation, 2007, 1095(1): 62-69.
- [10] ABBAOUI B, RIEDL K M, RALSTON R A, et al. Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: Characterization, metabolism, and interconversion [J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(11): 1675-1687.
- [11] JIA K, HE Y C, HONG J, et al. Sulforaphane derived from broccoli inhibit proliferation and invasion of lung cancer A549 cells *in vitro* [J]. China Health Care Nutr(中国保健营养), 2014(7): 4589-4550.
- [12] TORTORELLA S M, ROYCE S G, LICCIARDI P V, et al. Dietary sulforaphane in cancer chemoprevention: The role of epigenetic regulation and HDAC inhibition [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(16): 1382-1424.
- [13] OH C J, KIM J Y, PARK K R A, KIM H J, et al. Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor mediated inhibition of transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(3): 671-682.
- [14] CHI X, ZHANG R, SHEN N, et al. Sulforaphane reduces apoptosis and oncosis along with protecting liver injury-induced is chemic reperfusion by activating the Nrf2/ARE pathway [J]. Hepatol Int, 2015, 9(2): 321-329.
- [15] Thompson K L, Rosenzweig B A, Zhang J, et al. Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2010, 66(2): 303-314.

收稿日期: 2018-09-07

(本文责编: 沈倩)