

· 药理 ·

## 双氢青蒿素对 HepG2 细胞氧化损伤和能量代谢的影响及其与索拉非尼的协同作用

崔钊<sup>1</sup>, 李硕<sup>1,2</sup>, 王华晶<sup>1,2</sup>, 马冀<sup>1,2</sup>, 秦婷婷<sup>1,2</sup>, 石航<sup>1</sup>, 李兰芳<sup>1</sup>,  
于桂花<sup>1</sup>, 李沧海<sup>1,2\*</sup>, 姜廷良<sup>1,2</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院 青蒿素研究中心, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探讨双氢青蒿素(DHA)对 HepG2 细胞的增殖抑制作用,通过细胞氧化损伤及能量代谢交互通路的影响阐明其作用机制;并通过与索拉非尼(Sora)联用,探讨其联合用药的可能性。方法:选用 HepG2 细胞和 SW480 细胞,细胞增殖与活性检测(CCK-8)法分别得到 DHA 与 Sora 的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>);Chou-Talalay 法分析 DHA 与 Sora 联用的联用指数(CI)。选用 HepG2 细胞,分为正常组, DHA 单用组(10 μmol·L<sup>-1</sup>), Sora 单用组(5 μmol·L<sup>-1</sup>)和 DHA 与 Sora 联用组(DHA 10 μmol·L<sup>-1</sup>, Sora 5 μmol·L<sup>-1</sup>), 药物孵育 8~12 h 后,糖酵解速率试剂盒检测细胞糖酵解功能,线粒体压力试剂盒检测线粒体氧化磷酸化功能;DCFH-DA 活性氧(ROS)探针检测细胞内 ROS 水平变化;脂质过氧化物丙二醛(MDA)检测试剂盒检测细胞内 MDA 水平变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞内血红素氧合酶 1(HO-1)和谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)蛋白的水平变化。结果:与正常组比较, DHA 单用组能够显著抑制 HepG2 细胞的线粒体氧化磷酸化 ATP 合成能力和糖酵解速率( $P < 0.01$ ), 升高细胞内 ROS 和 MDA 水平( $P < 0.05$ ), 降低 HO-1, GCLC 水平( $P < 0.05$ ); DHA 与 Sora 联用在 HepG2 和 SW480 细胞中均具有较好的协同抑制细胞增殖作用,其 CI 值  $< 0.9$ ; 与 DHA 单用组比较, DHA 与 Sora 联用组对 HepG2 细胞的线粒体氧化磷酸化 ATP 合成和糖酵解的抑制程度均显著增强( $P < 0.01$ ); 细胞内的 ROS 和 MDA 水平均显著升高( $P < 0.01$ ); 细胞内抗氧化相关蛋白 HO-1, GCLC 水平均显著降低( $P < 0.01$ )。结论: DHA 可能通过降低 HepG2 细胞内的 HO-1, GCLC 水平, 升高 ROS 使 MDA 水平增加, 并造成细胞线粒体氧化损伤, 抑制细胞糖酵解能力以及氧化磷酸化能力, 从而抑制 HepG2 细胞增殖; DHA 与 Sora 联用具有协同抑制 HepG2 细胞增殖的作用, 其机制可能与协同造成细胞氧化损伤从而影响线粒体电子传递链, 抑制细胞能量代谢有关。

**[关键词]** 双氢青蒿素; 索拉非尼; 协同作用; 有氧糖酵解; 线粒体氧化磷酸化; 活性氧(ROS); 血红素氧合酶 1(HO-1); 谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)12-0024-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211202

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210414.1455.005.html>

**[网络出版日期]** 2021-4-14 15:59

## Effect of Dihydroartemisinin on Oxidative Damage and Energy Metabolism of HepG2 Cells and Its Synergistic Effect with Sorafenib

CUI Zhao<sup>1</sup>, LI Shuo<sup>1,2</sup>, WANG Hua-jing<sup>1,2</sup>, MA Ji<sup>1,2</sup>, QIN Ting-ting<sup>1,2</sup>, SHI Hang<sup>1</sup>, LI Lan-fang<sup>1</sup>,  
YU Gui-hua<sup>1</sup>, LI Cang-hai<sup>1,2\*</sup>, JIANG Ting-liang<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. Artemisinin Research Centre, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the inhibitory effect of dihydroartemisinin (DHA) on the

**[收稿日期]** 20210222(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(81641002); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09101002-002-005)

**[第一作者]** 崔钊, 在读硕士, 从事青蒿素类化合物抗肿瘤机制研究, Tel: 010-64041008, E-mail: cuizhao1124@126.com

**[通信作者]** \* 李沧海, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事青蒿素类化合物抗癌机制研究, Tel: 010-64041008, E-mail: chli@icmm.ac.cn

proliferation of HepG2 cells, elucidate the mechanism from the perspectives of oxidative damage and energy metabolism, and discuss the possibility of combined use of DHA with sorafenib (Sora). **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to obtain the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of DHA and Sora on HepG2 and SW480 cells and Chou-Talalay method was used to obtain the combination index (CI) of DHA and Sora. HepG2 cells were classified into the control group, DHA group ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Sora group ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and DHA + Sora group (DHA  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Sora  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and then incubated with corresponding drugs for 8-12 h. Seahorse XF glycolytic rate assay kit and cell mito stress test kit were employed to respectively detect the glycolysis function of cells and oxidative phosphorylation function of mitochondria. DCFH-DA and lipid peroxidation MDA assay kit were separately used to analyze the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA). Western blot was applied to determine the intracellular levels of heme oxygenase-1 (HO-1) and glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC). **Result:** Compared with the control group, DHA alone inhibited the ATP synthesis in mitochondrial oxidative phosphorylation and glycolysis ( $P<0.01$ ), increased the levels of intracellular ROS and MDA ( $P<0.05$ ), and decreased the levels of HO-1 and GCLC ( $P<0.05$ ) in HepG2 cells. DHA and Sora had synergistic inhibitory effect on proliferation of HepG2 and SW480 cells, with  $CI < 0.90$ . The DHA + Sora group showed stronger suppression of ATP synthesis in mitochondrial oxidative phosphorylation and glycolysis ( $P<0.01$ ), higher levels of intracellular ROS and MDA ( $P<0.01$ ), and lower levels of intracellular antioxidation-related proteins HO-1 and GCLC in HepG2 cells ( $P<0.01$ ) than the DHA group. **Conclusion:** DHA may increase the level of MDA by reducing HO-1 and GCLC and increasing ROS in HepG2 cells, which results in mitochondria oxidative damage, restricts cell glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation, and thus finally inhibits the proliferation of HepG2 cells. DHA and Sora have synergistic inhibitory effect on the proliferation of HepG2 and SW480 cells, and the mechanism may be related to the synergistic oxidative damage that affects the mitochondrial electron transport chain and suppresses cell energy metabolism.

**[Key words]** dihydroartemisinin; sorafenib; synergism; aerobic glycolysis; mitochondrial oxidative phosphorylation; reactive oxygen species (ROS); heme oxygenase-1 (HO-1); glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)

原发性肝癌是黄种人易感的恶性肿瘤之一,目前是我国第4位的常见恶性肿瘤及第3位的肿瘤致死病因,严重威胁我国人民的生命和健康<sup>[1]</sup>。索拉非尼(Sora)是目前第1个也是唯一1个获得批准用于肝癌系统性治疗的药物,用于治疗不能手术的晚期肝细胞癌;是一种新的多靶点药物,可以抑制许多癌基因激酶的活性,还被报道用于治疗肺癌、甲状腺癌、胰腺癌和乳腺癌<sup>[2-3]</sup>。虽然Sora提高了肝癌患者的总体生存率,但临床也显示其具有不良反应多,病人耐受性差,易于产生耐药,患者生命延长期较短(平均3个月)等缺点,因此急需新的药物干预治疗策略<sup>[4]</sup>。

近年来大量研究结果证实,青蒿素类化合物(ARTs)具有确切的广谱抗肿瘤疗效<sup>[5-6]</sup>。目前关于ARTs的抗肿瘤机制主要集中于诱导肿瘤细胞的铁死亡等相关方面,关于对肿瘤细胞能量代谢的影响研究较少。例如,青蒿琥酯能够特异性诱导胰腺导

管腺癌细胞的活性氧(ROS)和溶酶体铁依赖细胞死亡<sup>[7]</sup>,并能够通过诱导铁死亡选择性地杀死头颈癌细胞<sup>[8]</sup>。本课题组前期在双氢青蒿素(DHA)的抗疟机制中发现,铁死亡是DHA抗疟机制中的一个重要通路<sup>[9]</sup>。ARTs抗肿瘤作用具有不良反应相对较小,作用机制不同于传统化疗药物,联合当前常用化疗药物可取得良好增效作用<sup>[10-12]</sup>。但由于ARTs特殊的分子结构和化学性质致使该类药物存在着制剂困难等问题。另外,总体来看ARTs存在抗癌效价不高,选择性相对较低等缺憾,但这些特点无疑为联合用药增效减毒提供了广阔的研究空间。

肿瘤是一种代谢性疾病,其能量代谢途径与正常细胞相比发生了一系列重组和调整。在转化过程中,整个新陈代谢网络被重新编排,有氧糖酵解成为肿瘤细胞的主要供能方式,维持癌细胞的生长和增殖<sup>[13-14]</sup>。一直以来人们对肿瘤细胞的糖酵解过程研究较多,而下调的氧化磷酸化产能通路一直不

受重视,直到近年来,一些肿瘤的新研究结果逐渐促使人们改观,该通路又逐渐回归重视。本课题组前期在DHA对疟原虫能量代谢的研究中发现,DHA在0.4~50半数抑制浓度( $IC_{50}$ )剂量下对恶性疟原虫3D7(*Plasmodium falciparum* 3D7)线粒体有氧呼吸均无明显影响;在 $5 \times IC_{50}$ 浓度剂量下,青蒿素(ART),蒿乙醚(ARE)和蒿甲醚(ARM)均能显著提高线粒体最大呼吸<sup>[15]</sup>。虽然疟原虫与肿瘤细胞都以糖酵解为主要的供能方式<sup>[16]</sup>,但二者也有不同之处。例如,线粒体在疟原虫的红内期阶段非必须存在,但在疟原虫的传播阶段发挥至关重要的作用<sup>[17]</sup>。在ARTs抗肿瘤的研究中发现,DHA在体外能够抑制食管鳞状细胞癌细胞以及慢性髓性白血病K562细胞的糖酵解功能,其作用机制与丙酮酸激酶M2(PKM2)及葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)通路的下调有关<sup>[18-19]</sup>。

物质代谢与能量代谢是生物体进行一切生命活动的基础。目前来说,关于ARTs与能量代谢的研究报道较少且缺乏系统性。因此本研究以HepG2细胞能量代谢以及细胞氧化损伤为视角,系统地探索DHA对HepG2细胞有氧糖酵解以及氧化磷酸化的影响;并在此基础上将DHA与Sora联合,通过研究联用后对细胞抗氧化系统以及能量代谢的交互影响,阐明协同作用机制。旨在起到增强化疗药物疗效,降低毒性,为DHA与Sora联合用药提供实验依据,并为ARTs联合用药提供新的思路。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 胎牛血清(法国Biowest公司,批号S13934S1580);RPMI 1640培养基,青霉素-链霉素双抗,0.05%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA),L-谷氨酰胺溶液(美国Gibco公司,批号分别为2110284,1103510,1681700,931926);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国MCE公司,批号66147);2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐DCFH-DA探针(美国Invitgen公司,批号2016099);丙二醛(MDA)检测试剂盒(英国Abcam公司,批号GR3333359-1);Seahorse XF细胞线粒体压力测定试剂盒,糖酵解速率测定试剂盒,Seahorse XF RPMI培养基,100 mmol·L<sup>-1</sup>丙酮酸溶液,校正液(美国Agilent公司,批号分别为12887104,16961340,00620006,0006398315,26817001);1.0 mol·L<sup>-1</sup>葡萄糖溶液(北京国药集团化学试剂有限公司,批号20160322);细胞裂解液(英国Abcam公司,批号GR3322627-5);聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白检测试剂盒(北京

索莱宝科技有限公司,批号PC0020);血红素氧合酶1(HO-1)/血红素加氧酶1(HMOX1),谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC), $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin)抗体,羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉Proteintech生物技术有限公司,批号分别为107011,126011,112241,SA000012);超敏增强化学发光法(ECL)发光剂,通用型抗体稀释液(苏州新赛美生物科技有限公司,批号分别为P10100,WB10D);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司,批号IPVH00010);DHA(由中国中医科学院中药研究所杨岚研究员馈赠);Sora(美国Bioruler公司,批号RJ54322);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号037K0766)。

**1.2 仪器** Seahorse XFe96型能量代谢分析仪(美国Agilent公司);Forma 3型三气恒温培养箱(美国Thermo Scientific公司);CKX53型显微镜(日本Olympus公司);DM0412型冷冻高速离心机(美国Scilogex公司);SpectraMAX-i3x型多功能荧光酶标仪(美国Molecular Devices公司);Bio-Rad Mini-Protein型垂直电泳槽及转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 药物溶液配置及细胞培养** 将DHA,Sora分别溶于DMSO中,配置成90 mmol·L<sup>-1</sup>的母液,储存于-80℃冰箱中保存;加样前使用完全培养基进行稀释,使DMSO在细胞培养中的终体积分数小于0.1%。HepG2,SW480细胞系分别在含有10%胎牛血清,100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素和0.1 g·L<sup>-1</sup>链霉素的RPMI-1640培养基中,于37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每2 d更换1次细胞培养液,0.05%胰蛋白酶/EDTA消化传代。

**2.2 肿瘤细胞增殖抑制实验** 将细胞同步化24 h后接种于96孔板中,每孔接种细胞个数为 $5 \times 10^3$ 个。分别设置空白组、正常组和实验组进行实验;空白组加入200  $\mu$ L完全培养基作为空白;正常组接种 $5 \times 10^3$ 个细胞后补足完全培养基至200  $\mu$ L;实验组接种100  $\mu$ L细胞悬液加100  $\mu$ L溶于完全培养基的药物溶液;实验组分为DHA单用组,Sora单用组,以及DHA与Sora联用组。药物作用24,48,72 h后分别弃去培养板中的培养基,向每孔中加入完全培养基100  $\mu$ L及CCK-8溶液10  $\mu$ L,将培养板置于培养箱内孵育2 h后,使用酶标仪测定在450 nm处的吸光度A。

**2.3 药物协同作用分析** 利用Calusyn软件做出药

物对肿瘤细胞的浓度抑制曲线,并得到 $IC_{50}$ 值;为了评价药物的联合作用,通过Calusyn软件进行数据分析,得到联用指数(CI)。 $CI = [D]_a / [Dx]_a + [D]_b / [Dx]_b$ 。( $[D]_a$ 和 $[D]_b$ 是在用2种药物联合治疗显示一定的效果时药物a和药物b的浓度; $[Dx]_a$ 和 $[Dx]_b$ 是药物a和药物b单独使用时显示与2药联用效果等同时的浓度)。

**2.4 细胞线粒体压力测定** 提前1 d在探针板中加入无菌水,放入37℃无CO<sub>2</sub>细胞培养箱中温育过夜,活化探针板。实验当天取同步化24 h后的肿瘤细胞,在XF细胞培养板中每孔接种100 μL细胞悬液,调整细胞个数为每孔 $2 \times 10^4$ 个;放入细胞培养箱中2 h使细胞贴壁;细胞贴壁后,在每孔加入药物溶液100 μL,作用8 h后弃去细胞培养板中溶液,每孔缓慢加入XF RPMI培养液200 μL,弃去,重复清洗2次后加入XF RPMI培养液调整终体积为180 μL;将细胞培养板放入37℃无CO<sub>2</sub>细胞培养箱中1 h等待上机检测;同时取出孵化好的探针板,弃去探针板中无菌水,每孔加入XF校准液200 μL,37℃无CO<sub>2</sub>细胞培养箱孵育45 min;配制线粒体压力试剂盒中的寡霉素(Oligomycin)15 μmol·L<sup>-1</sup>,碳酰氰-4-三氟甲氧基苯腙(FCCP)10 μmol·L<sup>-1</sup>,鱼藤酮/抗霉素A(Rot/AA)5 μmol·L<sup>-1</sup>,加入探针板中。将探针板上机校准20 min,校准完成后将探针板底板换成细胞培养板进行上机检测,检测时长约为70 min。在线粒体呼吸测定曲线中,Rot/AA为线粒体电子传输链抑制剂,可关闭线粒体呼吸,非线粒体呼吸耗氧=加入Rot/AA后得到的氧气消耗速率(OCR);Oligomycin为ATP合酶抑制剂,其中基础呼吸值=加入Oligomycin之前的OCR值-非线粒体呼吸耗氧量,ATP合成值=加入Oligomycin后OCR下降值;FCCP是一种解偶联剂,加入该药会破坏质子梯度和线粒体膜电位,使细胞的耗氧达到最大,其中最大呼吸值=加入FCCP后OCR最大值-非线粒体呼吸耗氧,备用呼吸值=最大呼吸值-基础呼吸值,质子漏=基础呼吸值-ATP合成值。

**2.5 细胞糖酵解速率测定** 探针板活化后,实验当天取同步化24 h后的肿瘤细胞,在XF细胞培养板中每孔接种100 μL细胞个数为每孔 $3 \times 10^4$ 个;放入细胞培养箱中2 h使细胞贴壁;细胞贴壁后,在每孔加入药物溶液100 μL,作用8 h后弃去培养板中溶液,每孔缓慢加入XF RPMI培养液200 μL,弃去,重复清洗2次后加入XF RPMI培养液调整终体积为180 μL;将细胞培养板放入37℃无CO<sub>2</sub>细胞培养箱

中1 h等待上机检测;同时取出孵化好的探针板,弃去探针板中无菌水,每孔加入XF校准液200 μL,37℃无CO<sub>2</sub>细胞培养箱孵育45 min;配制糖酵解速率试剂盒中的Rot/AA 5 μmol·L<sup>-1</sup>及2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)500 μmol·L<sup>-1</sup>分别加入探针板中。将探针板上机校准20 min,校准完成后将探针板底板换成细胞培养板进行上机检测,检测时长约为50 min。在糖酵解速率测定曲线中,Rot/AA可抑制线粒体的氧气消耗,加入后记录的数值即为糖酵解生成的质子流出速率(PER);2-DG是一种葡萄糖类似物,通过与葡萄糖己糖激酶竞争结合来抑制糖酵解,加入后PER的降低为确定加入2-DG前产生的PER主要是由糖酵解产生提供了定性依据。

**2.6 细胞ROS的检测** 将DCFH-DA粉末溶解在DMSO中,得到10 mmol·L<sup>-1</sup>的母液,贮存于-80℃备用,在使用前进一步稀释。将HepG2细胞定量接种于96孔酶标板中,药物孵育12 h后,用PBS洗涤2次,然后用10 μmol·L<sup>-1</sup>DCFH-DA在37℃避光孵育30 min后,PBS洗涤1次,使用荧光酶标仪在480 nm/525 nm处检测。

**2.7 脂质过氧化物MDA的检测** 根据脂质过氧化物MDA检测试剂盒说明书配置硫代巴比妥酸(TBA)溶液;药物孵育12 h后,使用胰蛋白酶消化细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞2次,收集 $1 \times 10^7$ 个细胞;同时配置MDA标准溶液,在对照品及样品中分别加入TBA试剂,95℃下孵育60 min,冰浴10 min,冷却至室温。使用荧光酶标仪在532 nm/553 nm处检测。

**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HO-1, GCLC蛋白表达水平** 药物作用细胞12 h后,使用胰蛋白酶消化细胞,PBS洗涤细胞2次,收集细胞。裂解缓冲液裂解细胞,室温下孵育细胞10~20 min,1 500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min(离心半径6.215 cm)。取上清液提取总蛋白,BCA法测定蛋白质含量。规定蛋白量为40 μg,进行10% SDS-PAGE电泳分离,转至PVD膜,在5%脱脂牛奶封闭1 h,TBST缓冲液洗膜3次,加入HO-1(1:3 000),GCLC(1:5 000),α-tubulin(1:1 000)一抗,4℃孵育过夜,二抗(1:2 000)常温下孵育1 h,TBST缓冲液洗膜3次,ECL法显色,α-tubulin为内参,Image Pro Plus 6.0图像分析软件测定各电泳条带的灰度值。

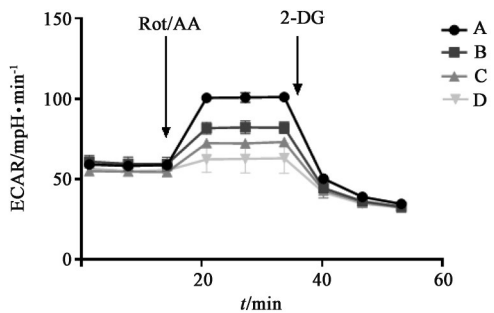
**2.9 统计学分析** 采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用回归分析和概率统计,组间比较采用单因素方差分析,Graph Pad

Prism 7.0软件绘制拟合曲线、折线图 and 柱状图。统计检验均采用双侧检验,每组数据均重复3次及以上,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 DHA对HepG2细胞的糖酵解功能的影响

DHA不同剂量作用于HepG2细胞后,检测分别在14 min时加入Rot/AA和在35min时加入2-DG抑制线粒体的氧气消耗后的细胞的细胞外酸化速率(ECAR),见图1,通过分析ECAR值,可以得到糖酵解PER值。与正常组比较,DHA在10, 20, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量时均能显著降低细胞的糖酵解PER ( $P<0.01$ );并具有剂量依赖性,与DHA 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,DHA在20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量时细胞的糖酵解PER明显降低 ( $P<0.05$ ),与DHA 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,DHA在30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量时细胞的糖酵解PER明显降低 ( $P<0.05$ )。见表1。



A. 正常组; B. DHA 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. DHA 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. DHA 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图1 DHA对HepG2细胞糖酵解功能的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig. 1 Effect of DHA on glycolysis of HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

#### 3.2 DHA对HepG2细胞线粒体氧化磷酸化功能的影响

最大呼吸代表了细胞能够实现的呼吸速率,备用呼吸代表细胞对能量需求的潜在响应能力,质子漏表示细胞部分氧气消耗未偶联ATP合

表2 DHA对HepG2细胞线粒体氧化磷酸化功能的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	最大呼吸	备用呼吸	质子漏	ATP合成
正常		286.7 $\pm$ 20.3	101.7 $\pm$ 31.1	27.1 $\pm$ 9.8	157.8 $\pm$ 9.4
DHA	8	204.7 $\pm$ 16.3 <sup>2)</sup>	44.2 $\pm$ 4.5 <sup>2)</sup>	61.2 $\pm$ 16.9 <sup>2)</sup>	99.3 $\pm$ 15.8 <sup>2)</sup>
	12	199.8 $\pm$ 20.2 <sup>2)</sup>	39.6 $\pm$ 13.5 <sup>2)</sup>	67.9 $\pm$ 9.6 <sup>2)</sup>	92.3 $\pm$ 14.3 <sup>2)</sup>
	16	200.5 $\pm$ 19.4 <sup>2)</sup>	30.7 $\pm$ 14.3 <sup>2)</sup>	70.8 $\pm$ 10.9 <sup>2)</sup>	99.1 $\pm$ 13.7 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

3.3 DHA联合Sora对HepG2以及SW480细胞的协同抑制作用 在HepG2和SW480细胞中,分别在固定药物浓度比例(DHA-Sora, 1.45:1和3:1)组合

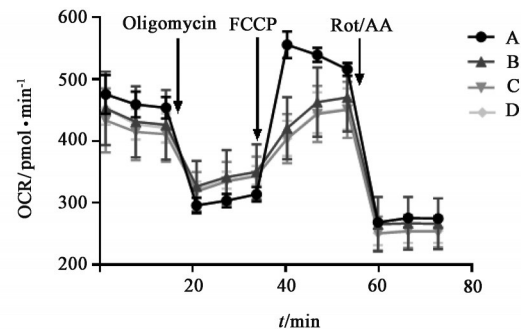
表1 DHA对HepG2细胞糖酵解功能的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of DHA on glycolysis of HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PER/ $\text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}$
正常		884.7 $\pm$ 16.5
DHA	10	719.7 $\pm$ 35.4 <sup>2)</sup>
	20	639.8 $\pm$ 17.7 <sup>2,3)</sup>
	30	550.4 $\pm$ 80.9 <sup>2,5)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与DHA 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;与DHA 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ ,<sup>6)</sup> $P<0.01$ 。

成,可作为线粒体损伤的标志,ATP合成代表了线粒体满足细胞能量需求ATP的合成能力。DHA不同剂量作用于HepG2细胞后,检测细胞的线粒体氧化磷酸化能力,得到线粒体压力曲线,见图2。与正常组比较,DHA在8, 12, 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量时均显著降低细胞的最大呼吸能力 ( $P<0.01$ )以及备用呼吸能力 ( $P<0.01$ ),降低细胞氧化磷酸化过程中ATP合成能力 ( $P<0.01$ ),并增加质子漏 ( $P<0.01$ ),造成线粒体功能损伤。见表2。



A. 正常组; B. DHA 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. DHA 12  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. DHA 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图2 DHA对HepG2细胞线粒体氧化磷酸化功能的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig. 2 Effect of DHA on oxidative phosphorylation of mitochondria in HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

下,两药联合CI值分别居于0.65~0.78及0.62~0.88,显示了中等强度的协同作用;在非固定浓度比模式下,在HepG2和SW480细胞中两药联合CI值分别

居于0.66~0.89及0.74~0.85,同样呈现较明显的协同作用。剂量降低指数(DRI)是指达到一定抑制率所需单一药物的剂量与联合用药时该药的剂量比。在药物浓度DHA-Sora 1.45:1固定药物浓度比例下,DHA和Sora的DRI值分别在2.91~3.74和2.20~

2.79;而在3:1固定药物浓度比例下,DHA和Sora的DRI分别在1.92~5.21和1.93~8.02;例如,在SW480细胞非固定浓度比例模式中,向Sora中添加0.4~6.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DHA可使Sora剂量降低2~8倍。见表3,4。

表3 DHA联合Sora协同抑制HepG2增殖(n=3)

Table 3 DHA in combination with Sora causes synergistic inhibition of growth in HepG2 cancer cell lines (n=3)

组别	DHA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Sora/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CI ( $\bar{x}\pm s$ )	DRI(DHA)	DRI(Sora)
DHA-Sora(1.45:1)	4.8	3.3	0.70±0.01	2.91	2.78
	6.4	4.4	0.65±0.06	3.45	2.79
	8.0	5.5	0.65±0.11	3.74	2.70
	9.6	6.6	0.70±0.09	3.50	2.43
	11.2	7.7	0.78±0.16	3.28	2.20
DHA-Sora(非固定浓度比)	3.2	6.8	0.89±0.14	4.92	1.57
	6.4	6.8	0.86±0.03	3.72	1.83
	9.6	6.8	0.74±0.19	3.95	2.19
	12.8	6.8	0.66±0.19	4.39	2.51
	16.0	6.8	0.71±0.17	3.44	2.50

注:当CI=0.1~0.3时,两药具有强协同作用;当CI=0.3~0.7时,两药具有协同作用;当CI=0.7~0.85两药具有中度协同作用;当CI=0.85~0.90时,两药具有轻微协同作用;当CI=0.9~1.1时,两药几乎相加效果;当CI=1.1~1.2时,两药具有轻微拮抗作用;当CI=1.2~1.45时,两药具有中度拮抗作用;当CI=1.45~3.3时,两药具有拮抗作用<sup>[20]</sup>(表4同)。

表4 DHA联合Sora协同抑制SW480增殖(n=3)

Table 4 DHA in combination with Sora causes synergistic inhibition of growth in SW480 cancer cell lines (n=3)

组别	DHA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Sora/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CI ( $\bar{x}\pm s$ )	DRI(DHA)	DRI(Sora)
DHA-Sora(3:1)	1.2	0.4	0.62±0.06	2.10	8.02
	2.3	0.8	0.74±0.05	1.92	5.00
	4.7	1.6	0.81±0.04	2.02	3.28
	9.4	3.1	0.88±0.03	2.35	2.24
	18.8	6.3	0.72±0.09	5.21	1.93
DHA-Sora(非固定浓度比)	8.8	8.8	0.85±0.03	4.47	1.65
	8.8	10.1	0.84±0.06	6.00	1.59
	13.0	9.4	0.74±0.06	4.60	1.77
	13.0	8.8	0.75±0.05	4.23	1.84

**3.4 DHA联合Sora对HepG2细胞能量代谢的影响** DHA联合Sora作用于HepG2细胞后,分别检测细胞的线粒体氧化磷酸化以及糖酵解能力。与DHA组比较,DHA与Sora联用组使HepG2细胞的糖酵解PER显著降低( $P<0.01$ )。见表5。与DHA组比较,DHA与Sora联用组能显著降低HepG2细胞的线粒体最大呼吸能力,备用呼吸能力,ATP合成能力( $P<0.01$ ),并能够加速损伤线粒体引起质子漏( $P<0.05$ )。见表6。

**3.5 DHA联合Sora对HepG2细胞内的ROS及MDA水平的影响** 与正常组比较,DHA组和Sora

表5 DHA联合Sora对HepG2细胞糖酵解功能的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of DHA in combination with Sora on glycolysis of HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PER/ $\text{mpH}\cdot\text{min}^{-1}$
正常		884.7±16.5
DHA	10	639.8±17.7 <sup>2)</sup>
Sora	5	568.2±34.2 <sup>2)</sup>
DHA+Sora	10+5	486.3±64.2 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与DHA 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表6~8同)。

组均能明显升高细胞内ROS水平( $P<0.05$ );与DHA组比较,DHA与Sora联用组ROS水平显著升高( $P<$

表 6 DHA 联合 Sora 对 HepG2 细胞线粒体氧化磷酸化功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	最大呼吸	备用呼吸	质子漏	ATP 合成
正常		141.7±7.7	69.7±6.3	4.5±2.6	67.5±5.2
DHA	10	103.2±6.5 <sup>2)</sup>	45.6±8.3 <sup>2)</sup>	15.6±5.3 <sup>1)</sup>	50.3±10.5 <sup>2)</sup>
Sora	5	88.8±6.5 <sup>2)</sup>	37.1±7.5 <sup>2)</sup>	12.4±2.5 <sup>1)</sup>	43.3±2.6 <sup>2)</sup>
DHA+Sora	10+5	60.5±11.1 <sup>2,4)</sup>	8.6±3.4 <sup>2,4)</sup>	28.3±5.3 <sup>1,3)</sup>	23.7±4.6 <sup>2,4)</sup>

0.01);与正常组比较,DHA组和Sora组均升高细胞内MDA水平( $P<0.05$ );与DHA组比较,DHA与

Sora 联用组 MDA 水平显著升高 ( $P<0.01$ )。见表 7。

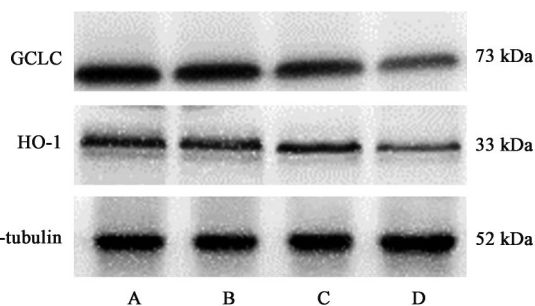
表 7 DHA 联合 Sora 对 HepG2 细胞 ROS 和 MDA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ROS/MFI	MDA/nmol·L <sup>-1</sup>
正常		22 134.40±521.36	0.72±0.02
DHA	10	32 365.12±5 986.12 <sup>1)</sup>	0.97±0.09 <sup>1)</sup>
Sora	5	32 568.25±4 123.87 <sup>1)</sup>	1.06±0.11 <sup>1)</sup>
DHA+Sora	10+5	63 985.59±4 325.96 <sup>2,4)</sup>	1.79±0.16 <sup>1,4)</sup>

3.6 DHA 联合 Sora 对 HepG2 细胞 HO-1 及 GCLC 蛋白水平的影响 与正常组比较,DHA组与Sora组均能明显降低 HepG2 细胞 GCLC 蛋白水平( $P<0.05, P<0.01$ );与DHA组比较,DHA与Sora联用组 GCLC 蛋白水平显著降低( $P<0.01$ );与正常组比较,DHA组与Sora组均能明显降低 HepG2 细胞 HO-1 蛋白水平( $P<0.05$ );与DHA组比较,DHA与Sora联用组 HO-1 蛋白水平显著降低( $P<0.01$ )。见图 3,表 8。

表 8 DHA 联合 Sora 对 HepG2 细胞 HO-1 和 GCLC 蛋白水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GCLC/ $\alpha$ -tubulin	HO-1/ $\alpha$ -tubulin
正常		1.17±0.07	1.24±0.11
DHA	10	0.89±0.13 <sup>1)</sup>	1.01±0.07 <sup>1)</sup>
Sora	5	0.71±0.09 <sup>2)</sup>	0.98±0.10 <sup>1)</sup>
DHA+Sora	10+5	0.47±0.10 <sup>2,4)</sup>	0.67±0.06 <sup>2,4)</sup>



A. 正常组;B.DHA组;C.Sora组;D.DHA+Sora组

图 3 DHA 联用 Sora 能够协同降低 HepG2 细胞内的 GCLC 和 HO-1 水平

Fig. 3 Combination of DHA and Sora can synergistically decrease level of GCLC and HO-1 in HepG2 cells

#### 4 讨论

Otto Warburg 通过观察发现在氧气存在下,肿瘤细胞具有吸收葡萄糖并将其发酵为乳酸的不同寻常的特性<sup>[13-14]</sup>。这种特性即有氧糖酵解,是指在氧气充足的条件下,肿瘤细胞不是以产生 ATP 更多

的线粒体氧化磷酸化方式,而是偏好于采用糖酵解方式进行葡萄糖代谢;这样有利于肿瘤细胞快速产生足量能量以适应其快速增殖,释放更多乳酸维持其酸性微环境,逃避免疫监视以及易于转移等<sup>[13-14]</sup>。因此 Warburg 提出线粒体呼吸缺陷是有氧糖酵解和癌症的潜在基础<sup>[13-14]</sup>。新陈代谢改变是癌细胞的一个显著特征,在实际应用中,“Warburg 效应”是临床广泛使用的氟脱氧葡萄糖正电子发射计算机断层扫描术(FDG-PET)肿瘤成像的基础<sup>[21]</sup>。目前,ARTs 的抗肿瘤机制主要集中于诱导肿瘤细胞的铁死亡等方面<sup>[7-8,11]</sup>,关于能量代谢的研究报道较少且缺乏系统性。因此本研究对 DHA 作用于 HepG2 细胞后的能量代谢系统包括糖酵解以及氧化磷酸化功能进行了系统检测。关于糖酵解的变化结果表明,与正常组比较,DHA 作用于 HepG2 细胞后,其糖酵解功能被抑制,表现为糖酵解 PER 的显著降低。关于线粒体氧化磷酸化的结果表明,与正常组比

较,DHA作用于HepG2细胞后,其线粒体损伤,氧化磷酸化功能受到抑制,具体表现为线粒体损伤导致的质子流出速率增加,细胞所具有最大呼吸能力降低,细胞适应环境变化的备用呼吸能力降低,以及ATP合成减少。

细胞的生存或死亡很大程度上取决于线粒体的功能状态<sup>[22]</sup>。ROS是细胞代谢过程中不可避免的产物,其能作用于线粒体,是引起线粒体损伤主要的途径之一。机体内ROS一旦增多而没能被细胞分解后,ROS就会影响线粒体呼吸链复合物的活力<sup>[23]</sup>,从而影响线粒体的氧化磷酸化而降低细胞内ATP的合成<sup>[24]</sup>。线粒体也是自由基产生的重要场所,其在肿瘤能量代谢过程近来得到重新重视。关于线粒体损伤使ROS生成增多的机制研究也较广泛<sup>[25]</sup>。HO-1是Ⅱ相解毒酶之一,它所引发的下级信号通路对多脏器具有抗氧化应激的保护作用。HO-1联合还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)及细胞色素P450,通过胆绿素还原酶(BVR)降解血红素并生成胆绿素,CO和Fe<sup>2+</sup>,构成内源性保护物质来调节细胞氧化、凋亡等多种生物细胞活动<sup>[26]</sup>。研究发现HO-1还可抑制线粒体的结构及功能障碍,以此对抗氧化应激损伤<sup>[27]</sup>。GCLC主要调节谷胱甘肽的从头合成,在细胞抗氧化防御系统中发挥着重要作用,大量证据表明GCLC表达与癌症发生、发展有关<sup>[28]</sup>。脂质过氧化是细胞膜损伤的物质基础,MDA是脂质过氧化的重要代表产物,其水平的高低可以间接反映出氧自由基对细胞的损伤程度。本研究结果显示,与正常组比较,DHA作用于HepG2细胞后,细胞内ROS水平升高,氧化终产物MDA水平升高,说明细胞内出现氧化损伤,膜脂质受损;同时细胞内的抗氧化相关蛋白HO-1以及GCLC水平降低,细胞的抗氧化能力减弱;因此本研究推测,DHA的作用机制与抑制HepG2细胞糖酵解,降低HepG2细胞内的抗氧化相关蛋白HO-1,GCLC水平,增加ROS造成线粒体损伤,线粒体损伤又会增加自由基的泄露,继而加剧膜脂质过氧化,从而抑制线粒体氧化磷酸化有关。

药物联合研究和他们之间的相互作用是药理学研究中的重要组成部分,在癌症,艾滋病等重大疾病的治疗中不同的药物组合已经广泛使用。协同作用的可能有利的结果包括,提高治疗效果;减少剂量,但增加或保持相同的疗效,避免毒性反应;尽量减少或减缓发展的耐药性等<sup>[29]</sup>。DRI是指达到一定抑制率所需单一药物的剂量与联合用药时该

药的剂量比,若比值愈大,表明要达到单一药物相同的疗效,联合用药时该药的剂量降低愈显著,由于降低了该药的剂量,必然减少该药对机体的毒性。本研究结果显示,当两种药物以恒定比例时,在HepG2和SW480细胞中的CI值分别为0.65~0.78,0.62~0.88;当两种药物以非恒定比例时,CI值分别为0.66~0.89,0.74~0.85。总体显示出了中等程度的协同作用。DRI分析表明,在SW480及HepG2细胞中,达到相同抑制效果时,向Sora中添加DHA可使Sora剂量降低1.5~8倍,结果提示二者联合应用可明显降低用药剂量,有可能大大减少不良反应。此外,DHA与Sora联用后,与DHA单用时相比,HepG2细胞的糖酵解速率进一步降低,细胞内ROS,MDA水平升高,抗氧化相关蛋白HO-1,GCLC水平降低,质子流出速率增加,最大呼吸能力降低,备用呼吸能力降低,ATP合成减少。说明Sora与DHA联用起到了协同损伤线粒体电子传递链,抑制能量代谢的作用。

综上所述,DHA的抗肿瘤机制可能与降低HepG2细胞内HO-1以及GCLC水平,ROS增加导致的细胞内氧化还原系统失衡,引起线粒体损伤,抑制肿瘤细胞的有氧糖酵解以及氧化磷酸化有关;此外,DHA与Sora联用后能够协同抑制HepG2细胞增殖,其机制可能与协同造成细胞氧化损伤从而影响线粒体电子传递链,抑制细胞能量代谢有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 68 (6) : 394-424.
- [2] PALMER D H. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359 (23) : 2498-2499.
- [3] SIEGEL A B, OLSEN S K, MAGUN A, et al. Sorafenib: where do we go from here? [J]. *Hepatology*, 2010, 52(1):360-369.
- [4] ABDEL-RAHMAN O, LAMARCA A. Development of sorafenib-related side effects in patients diagnosed with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: a systematic-review and Meta-analysis of the impact on survival [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 11(1):75-83.
- [5] LU X, EFFERTH T. Repurposing of artemisinin-type

- drugs for the treatment of acute leukemia [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.05.016.
- [ 6 ] EFFERTH T. From ancient herb to modern drug: artemisia annua and artemisinin for cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 46: 65-83.
- [ 7 ] ELING N, REUTER L, HAZIN J, et al. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Oncoscience*, 2015, 2(5): 517-532.
- [ 8 ] LIN R, ZHANG Z, CHEN L, et al. Dihydroartemisinin (DHA) induces ferroptosis and causes cell cycle arrest in head and neck carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(1): 165-175.
- [ 9 ] XU W, WANG H, TANG T, et al. Effect of dihydroartemisinin on plasmodium NADH-dependent glutamate synthase: the implication in malaria management [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(6): 1325-1343.
- [ 10 ] EFFERTH T. Cancer combination therapies with artemisinin-type drugs [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 139: 56-70.
- [ 11 ] LI Z J, DAI H Q, HUANG X W, et al. Artesunate synergizes with sorafenib to induce ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(2): 301-310.
- [ 12 ] 赵丽凤, 李晓强, 任汝静, 等. 三氧化二砷联合双氢青蒿素对 THP-1 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17): 42-48.
- [ 13 ] WARBURG O. On respiratory impairment in cancer cells [J]. *Science*, 1956, 124(3215): 269-270.
- [ 14 ] WARBURG O. On the origin of cancer cells [J]. *Science*, 1956, 123(3191): 309-314.
- [ 15 ] 马冀, 崔钊, 王华晶, 等. 不同抗疟药物对红内期恶性疟原虫 3D7 线粒体呼吸的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(11): 1201-1213.
- [ 16 ] COBBOLD S A, VAUGHAN A M, LEWIS I A, et al. Kinetic flux profiling elucidates two independent acetyl-CoA biosynthetic pathways in *Plasmodium falciparum* [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(51): 36338-36350.
- [ 17 ] KE H, LEWIS I A, MORRISEY J M, et al. Genetic investigation of tricarboxylic acid metabolism during the *Plasmodium falciparum* life cycle [J]. *Cell Rep*, 2015, 11(1): 164-174.
- [ 18 ] LI S, HUANG P, GAN J, et al. Dihydroartemisinin represses esophageal cancer glycolysis by down-regulating pyruvate kinase M2 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854: 232-239.
- [ 19 ] GAO P, SHEN S, LI X, et al. Dihydroartemisinin inhibits the proliferation of leukemia cells K562 by suppressing PKM2 and GLUT1 mediated aerobic glycolysis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 2091-2100.
- [ 20 ] CHOU T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 621-681.
- [ 21 ] GALLAMINI A, ZWARTHOD C, BORRA A. Positron emission tomography (PET) in oncology [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(4): 1821-1889.
- [ 22 ] BRAS M, QUEENAN B, SUSIN S A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(2): 231-239.
- [ 23 ] PIANTADOSI C A, ZHANG J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat [J]. *Stroke*, 1996, 27(2): 327-331.
- [ 24 ] AVERY S V. Molecular targets of oxidative stress [J]. *Biochem J*, 2011, 434(2): 201-210.
- [ 25 ] BLAJSZCZAK C, BONINI M G. Mitochondria targeting by environmental stressors: implications for redox cellular signaling [J]. *Toxicology*, 2017, 391: 84-89.
- [ 26 ] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [ 27 ] PIANTADOSI C A, CARRAWAY M S, BABIKER A, et al. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1 [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1232-1240.
- [ 28 ] LU S C. Regulation of glutathione synthesis [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(1/2): 42-59.
- [ 29 ] 王士群, 朱宇珍, 郑学宝. Chou-Talalay 在抗肿瘤联合用药中的研究应用概况 [J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(4): 449-453.

[责任编辑 周冰冰]