

白芥子挥发油对小鼠肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤的抑制作用及其机制研究

吴圣曦, 吴国欣*, 何珊, 林清强
福建师范大学, 福建 福州 350108

摘要: **目的** 探讨白芥子挥发油对肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤的抑制作用及其机制。**方法** 建立小鼠肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤模型。造模 24 h 后小鼠分成 5 组: 模型组, 环磷酰胺 (25 mg/kg) 阳性对照组, 白芥子挥发油低、中、高剂量 (20、40、80 mg/kg) 组, 采用腹腔给药或原位注射给药, 观察白芥子挥发油对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤质量、生存期的影响; HE 染色法以及吖啶橙 (AO) 染色观察肿瘤细胞形态的变化; 免疫组化法检测肿瘤细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达。**结果** 白芥子挥发油显著延长 H₂₂ 荷瘤小鼠生存期并抑制肿瘤生长 ($P < 0.01$); 上调 Bax 的表达、下调 Bcl-2 的表达。白芥子挥发油对 H₂₂ 细胞的抑制作用呈良好的剂量相关性, 但高剂量组毒副作用明显。**结论** 白芥子挥发油能够抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞的生长, 其机制可能与上调 Bax 的表达、下调 Bcl-2 的表达, 进而诱导细胞凋亡有关。

关键词: 白芥子挥发油; 抗肿瘤; 肝癌 H₂₂ 细胞; 细胞凋亡; Bax; Bcl-2

中图分类号: R979.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)21-3024-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.015

Antitumor effect of volatile oil from *Sinapis Albae Semen* on H₂₂-bearing mice and its mechanism

WU Sheng-xi, WU Guo-xin, HE Shan, LIN Qing-qiang
Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

Abstract: Objective To investigate the antitumor effect of volatile oil from *Sinapis Albae Semen* (VOSAS) on H₂₂-bearing mice and to determine the mechanism. **Methods** To establish the H₂₂ implanted hepatocellular carcinoma animal model which was used to analyze the effect of VOSAS on the growth of transplanted tumor. Mice were divided into five groups 24 h after modeling: model, cytoxan (CTX, 25 mg/kg) positive control, low-, mid-, and high-dose (20, 40, and 80 mg/kg) VOSAS groups. The mice were ip administered once daily for 10 d. Morphological changes in H₂₂ solid tumor cells were observed by both Hematoxylin-eosin (HE) and acridine orange (AO) staining. The expression of Bax and Bcl-2 in the tumor tissue was determined using immunohistochemistry. **Results** VOSAS could inhibit the tumor growth and extend the life span of H₂₂-bearing mice ($P < 0.01$); and it could also raise the expression of Bax while suppress the expression of Bcl-2; the antitumor effect of VOSAS on H₂₂-bearing mice demonstrated a good dose-effect relationship, but the high-dose group of the volatile oil has obvious toxicity and side effects on the mice. **Conclusion** VOSAS could inhibit the growth of H₂₂ tumor cells and the mechanism may be related to up-regulating the expression of Bax and down-regulating the expression of Bcl-2, and the induction of apoptosis.

Key words: volatile oil from *Sinapis Albae Semen*; anti-tumor; hepatoma carcinoma cell H₂₂; apoptosis; Bax; Bcl-2

白芥子是十字花科植物白芥 *Brassica alba* (L.) Boiss 的干燥成熟种子, 其挥发油为白芥子中白芥子苷经芥子酶水解的产物, 是无色或淡黄色的油状物, 容易挥发, 有辛辣味。白芥子挥发油中富含异硫氰酸盐类物质, 其中主要成分为异硫氰酸烯丙酯 (AITC) [1]。AITC 对肿瘤细胞, 如人肝癌细胞、子

宫颈癌细胞、结直肠腺癌细胞和肺癌细胞等均有抑制作用 [2-5]。但也有研究表明, AITC 能引起 F344/N 大鼠膀胱移行上皮细胞乳头状瘤, 还可以抑制内毒素脂多糖 (LPS) 诱导的原代大鼠肝细胞凋亡, 且该作用有可能诱导肿瘤产生 [6]。可见 AITC 对肿瘤的影响是复杂的。因此进一步探讨白芥子挥发油的

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (C0410010); 福建省科技厅科技项目基金 (2008F5017)

作者简介: 吴圣曦, 男, 硕士, 研究方向为天然产物和药物。Tel: 18050267882 E-mail: 501723413@qq.com

*通信作者 吴国欣 Tel: 18050267882 E-mail: gxwu@fjnu.edu.cn

抗肿瘤作用, 无论对 AITC 抗肿瘤作用的深入研究, 还是对传统中药的应用与开发都有重要意义。本实验建立肝癌 H₂₂ 移植性肿瘤小鼠模型, 探讨白芥子挥发油的抗肿瘤作用及其作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

白芥子, 购于福州中正医药连锁有限公司第十分店, 经福建师范大学吴国欣教授鉴定为十字花科植物白芥 *Brassica alba* (L.) Boiss 的干燥成熟种子; 环磷酰胺, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 09051921; 高效切片石蜡, 上海华灵康复器械厂; 兔抗 Bax、兔抗 Bcl-2, Santa Cruz Biotechnology 公司; 吖啶橙 (AO), 上海生工生物工程有限公司; 二步法免疫组化检测试剂盒、DAB 显色试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司; 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液 (pH 6.0), 上海生工生物工程有限公司; 甲醛、乙醇、二甲苯等常规试剂均为国产分析纯。

1.2 动物与细胞

昆明种小鼠, 雄性, 体质量 (20±2) g, 清洁级, 由福建医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (闽) 2010-0001。小鼠肝癌 H₂₂ 细胞由福建医科大学药理研究室提供。

1.3 仪器

YB 型电子天平, 上海力能电子仪器公司; Leica RM2016 型石蜡切片机, 上海莱卡仪器有限公司; YS2 型数码显微镜, 日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 白芥子挥发油的制备

白芥子粉碎后, 称取 100 g 置圆底烧瓶中, 加入 500 mL 蒸馏水、5.0 mmol/L 抗坏血酸, 50 °C 恒温水浴锅下酶解 5 h, 用挥发油提取装置提取 2 h, 蒸馏出的淡黄色、具有强烈刺激气味的液体即为白芥子挥发油, 得率 0.2%。GC-MS 分析其主要成分为 2-乙氧基丙烷 (0.309%)、3-丁烯腈 (1.275%)、3-甲基-3-丁烯腈 (0.108%)、2, 3-二羟基丙醛 (0.198%)、异硫氰酸烯丙酯 (89.411%)、异硫氰酸丁酯 (0.507%)、异硫氰酸-3-丁烯酯 (7.364%)、1-异硫氰基-3-甲基-丁烷 (0.143%)、异硫氰酸苯乙酯 (0.684%) 等^[7]。

2.2 对 H₂₂ 腹水型荷瘤小鼠生存期的影响

选择腹腔接种 H₂₂ 细胞 6~8 d、健康状况较好的荷瘤小鼠, 断颈处死, 无菌抽取腹水, 用无菌生理盐水稀释成 1×10⁷/mL 肿瘤细胞悬液, 小鼠腹腔

接种, 每只 0.2 mL。24 h 后随机将小鼠分成 5 组: 模型组 (生理盐水), 环磷酰胺 (25 mg/kg) 阳性对照组, 白芥子挥发油低、中、高剂量 (20、40、80 mg/kg) 组, 每组 10 只, 每天 ip 给药 1 次, 连续给药 10 d, 记录自给药后 30 d 内各组小鼠的死亡数, 生存期超过 30 d 者按 30 d 计算, 实验重复 2 次, 计算生命延长率。

生命延长率 = (给药组平均生存天数 - 模型组平均生存天数) / 模型组平均生存天数

2.3 对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的影响

选择腹腔接种 H₂₂ 细胞 6~8 d、生长较好的 H₂₂ 荷瘤小鼠, 断颈处死, 无菌抽取腹水, 用无菌生理盐水稀释成 1×10⁷/mL 肿瘤细胞悬液, 于健康小鼠右前肢腋部皮下接种瘤液, 每只 0.2 mL。24 h 后按“2.2”项下方法并按体质量将小鼠分组与给药, 每天 ip 给药 1 次, 连续给药 7 d。末次给药 24 h 后, 称小鼠体质量, 观察给药前后小鼠体质量变化; 颈椎脱臼处死小鼠, 剖取腋下瘤组织、脾和胸腺, 分别称质量, 计算抑瘤率及脏器指数。

抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量

脏器指数 = 脏器质量 / 体质量

2.4 原位注射白芥子挥发油对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的影响

按“2.2”项下方法给小鼠接种 H₂₂ 细胞。接种次日, 按体质量随机将小鼠分成 5 组, 即模型组、环磷酰胺阳性对照组、白芥子挥发油 3 个剂量 (20、40、80 mg/kg) 组, 每组 10 只。利用原位注射法^[8]向各给药组小鼠肿瘤内直接注射相应剂量的药物 0.2 mL, 模型组小鼠肿瘤内直接注射生理盐水, 每天原位注射 1 次, 连续注射 7 d。末次给药后 24 h, 称小鼠体质量, 观察给药前后小鼠体质量变化; 之后颈椎脱臼处死小鼠, 剖取腋下瘤组织, 称质量, 计算抑瘤率。

2.5 HE 染色法观察 H₂₂ 实体瘤细胞形态

取“2.4”项下剥取的肿瘤组织块, 4% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察 (×400) 肿瘤细胞形态学的变化。

2.6 AO 荧光染色法观察 H₂₂ 实体瘤细胞形态

按“2.2”项下方法给小鼠接种 H₂₂ 细胞、分组。白芥子挥发油各剂量组和环磷酰胺组每天向小鼠瘤体内直接给予相应药物 1 次 (剂量同“2.2”项), 每次 0.2 mL, 连续给药 7 d。末次给药后 24 h, 颈

椎脱臼处死小鼠，剖取腋下瘤组织，4%中性甲醛固定，常规石蜡切片，脱蜡、复水后，以1%醋酸作用30s，磷酸盐缓冲液(PBS)清洗1min，加入0.01%AO染液避光染色1~5min，PBS冲洗1min，0.1mol/L CaCl₂分化0.5~2min，PBS冲洗3次，每次数秒，甘油-PBS(1:1)封片，荧光显微镜下(×1000)镜检。

2.7 免疫组化法检测肿瘤细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

小鼠接种 H₂₂ 细胞、分组和给药同“2.6”项。末次给药后 24 h，颈椎脱臼处死小鼠，剖取腋下瘤组织，4%中性甲醛固定，常规石蜡包埋、切片，按照二步法免疫组化试剂盒说明进行检测。结果判定：Bax 与 Bcl-2 染色肿瘤细胞膜或胞浆内出现黄色或棕黄色颗粒判断为阳性。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析每张切片(随机选取 10 个 400 倍视野)，计算 1000 个细胞的阳性细胞数。以染色强度与阳性细胞数百分率进行逐层分级：阳性细胞比例 >50%，呈棕褐色，为强阳性(+++)；阳性细胞比例 30%~50%，呈棕黄色，为中度阳性(++)；阳性细胞比例 5%~30%，呈浅黄色，为弱阳性(+); 无阳性细胞，或阳性细胞 <5%，或背景同阴性对照片，为阴性(-)。

2.8 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS13.0 统计分析软件进行统计学处理，组间差异采用方差分析。对免疫组化染色分级结果进行 Kruskal-wallis 秩和检验，比较各组 Bax 与 Bcl-2 的表达差异性。

3 结果

3.1 对 H₂₂ 腹水型荷瘤小鼠生存期的影响

与模型组比较，白芥子挥发油 40、80 mg/kg 组小鼠的生存期均显著延长 ($P < 0.05$ 、 0.01)，环磷酰胺也有显著作用 ($P < 0.01$)，结果见表 1。由图 1 可见，模型组小鼠在 11 d 左右相继死亡；白芥子挥发油 20 mg/kg 组小鼠在 13 d 左右相继死亡，而 40、80 mg/kg 组与环磷酰胺组小鼠在 15~25 d 内相继死亡，与模型组和小剂量组白芥子挥发油 20 mg/kg 组比较差异显著。

3.2 对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的影响

与模型组比较，白芥子挥发油各剂量组小鼠的肿瘤质量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，且呈现良好的量效关系，实验期间未见小鼠死亡。与模型组比较，白芥子挥发油 20 mg/kg 组小鼠体质量无显著变化，而 40、80 mg/kg 组和环磷酰胺组小鼠体质量明

表 1 白芥子挥发油对 H₂₂ 荷瘤小鼠生存期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of VOSAS on life span in H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	生存时间 / d	生命延长率 / %
模型	—	11.0 ± 1.05	—
白芥子挥发油	20	12.7 ± 1.49	15.45
	40	16.2 ± 3.12**	47.27
	80	17.5 ± 2.17*	59.09
环磷酰胺	25	18.0 ± 3.59**	63.64

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

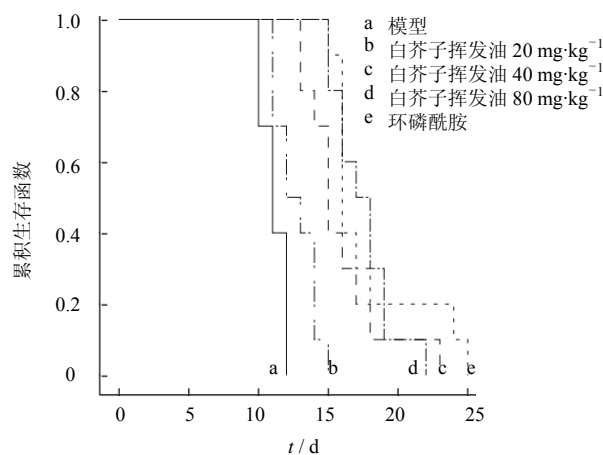


图 1 各组小鼠 Kaplan-Meier 生存曲线图

Fig. 1 Kaplan-Meier survival curve of H₂₂-bearing mice in each group

显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)；白芥子挥发油各剂量组小鼠的胸腺指数虽无显著改变，但 40 mg/kg 组脾脏指数显著下降 ($P < 0.05$)，环磷酰胺组脾脏和胸腺指数均显著下降 ($P < 0.01$)，可见白芥子挥发油对小鼠存在一定的毒副作用。结果见表 2。

3.3 原位注射白芥子挥发油对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的影响

与模型组相比，白芥子挥发油各剂量组对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的肿瘤生长具有显著抑制作用 ($P < 0.01$)；与 ip 给药相比，抑瘤率也显著提高。白芥子挥发油各剂量组小鼠体质量、免疫器官指数与模型组相比无显著差异，表明原位给药法的抑瘤效果更佳，且毒副作用明显降低。结果见表 3。

3.4 HE 染色法观察各组小鼠 H₂₂ 实体瘤细胞形态

HE 染色可见，模型组小鼠肿瘤细胞生长旺盛，

表 2 白芥子挥发油对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of VOSAS on H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	体质量 / g		肿瘤质量 / g	抑瘤率 / %	脾指数 / (mg·g ⁻¹)	胸腺指数 / (mg·g ⁻¹)
		给药前	给药后				
模型	—	18.59±0.84	24.42±1.24	1.19±0.50	—	7.45±2.58	2.59±0.69
白芥子挥发油	20	18.44±0.66	24.83±2.11	1.00±0.53*	16.13	6.11±1.86	2.66±0.44
	40	19.02±0.71	22.67±1.12*	0.67±0.24**	43.51	5.88±1.13*	2.15±0.57
	80	18.75±0.59	18.88±1.88**	0.64±0.36**	46.22	7.45±2.58	2.59±0.69
环磷酰胺	25	18.05±0.44	22.24±2.41*	0.40±0.21**	66.64	3.52±0.80**	1.11±0.48**

与模型组比较: *P<0.05 **P<0.01, 下表同

*P<0.05 **P<0.01 vs model group, same as below

表 3 原位注射白芥子挥发油对 H₂₂ 实体瘤荷瘤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of VOSAS by *in situ* injection on H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	体质量 / g		肿瘤质量 / g	抑瘤率 / %	脾脏指数 / (mg·g ⁻¹)	胸腺指数 / (mg·g ⁻¹)
		给药前	给药后				
模型	—	19.64±0.82	29.54±4.25	1.70±0.31	—	12.77±3.37	2.78±0.52
白芥子挥发油	20	20.43±0.87	26.16±2.77	1.06±0.14**	37.88	12.63±1.87	2.60±0.74
	40	20.25±1.24	27.34±2.42	0.91±0.59**	46.57	11.72±1.81	2.24±0.44
	80	20.44±1.13	28.03±1.96	0.58±0.23**	65.83	11.22±2.18	1.73±0.68*
环磷酰胺	25	20.19±1.19	26.72±2.61	0.80±0.45**	52.86	8.43±1.78**	1.12±0.45**

细胞核大、深染且大小不一，总体上细胞生长分布均匀且紧密，肿瘤组织间隙有大量毛细血管纵深分布。白芥子挥发油各剂量组肿瘤细胞有不同程度的空泡，空泡数随药物剂量的增加而明显增多，肿瘤组织的排列更为疏松；环磷酰胺组肿瘤细胞明显减少，分布散在，周围空泡遍布。结果见图 2。

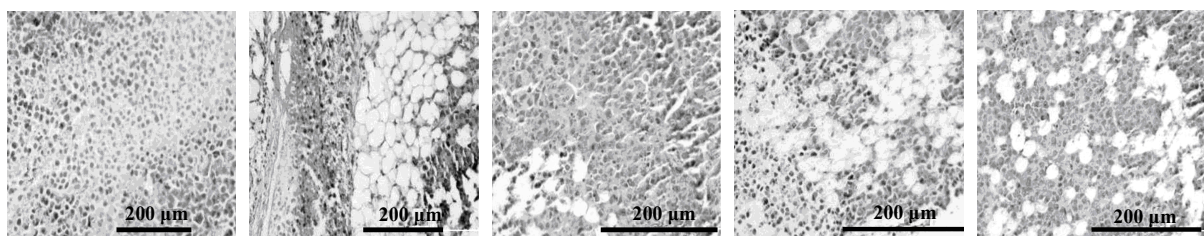
3.5 AO 荧光染色观察 H₂₂ 实体瘤细胞形态

荧光显微镜下可见，模型组小鼠肿瘤细胞圆润饱满，未见凋亡小体产生。白芥子挥发油各剂量组和环磷酰胺组肿瘤细胞出现凋亡小体，白芥子挥发油 80 mg/kg 组和环磷酰胺组可见肿瘤细胞核固缩，

形状不规则，且出现致密浓染的颗粒，有些细胞核内可见新月体或环状荧光，有些细胞核裂解成碎块。结果见图 3。

3.6 对肿瘤细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

与模型组比较，各给药组肿瘤细胞 Bax 蛋白显著增加 (P<0.01)，表明白芥子挥发油和环磷酰胺对小鼠 H₂₂ 实体瘤促细胞凋亡基因 bax 表达有一定的促进作用。与模型组比较，各给药组肿瘤细胞 Bcl-2 蛋白的表达显著减少 (P<0.01)，表明白芥子挥发油和环磷酰胺对小鼠 H₂₂ 实体瘤细胞凋亡抑制基因 bcl-2 表达有一定抑制作用。结果见表 4、图 4。



模型 环磷酰胺 白芥子挥发油 20 mg·kg⁻¹ 白芥子挥发油 40 mg·kg⁻¹ 白芥子挥发油 80 mg·kg⁻¹

图 2 HE 染色法观察各组小鼠 H₂₂ 实体瘤细胞形态

Fig. 2 HE staining of cellular morphology of H₂₂-bearing mice in each group

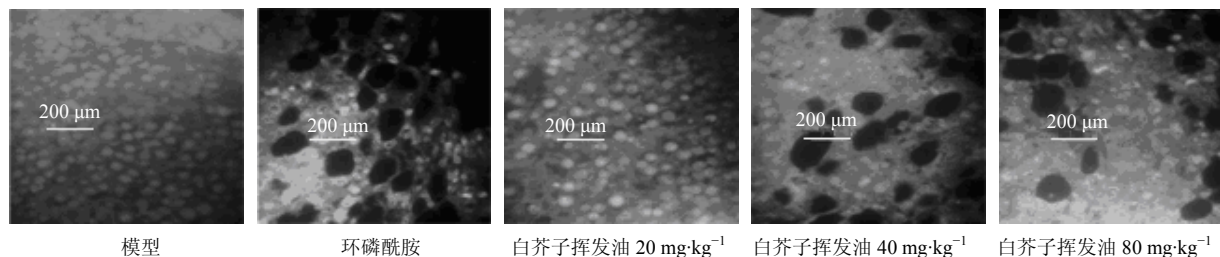


图 3 AO 荧光染色法观察各组小鼠 H₂₂ 实体瘤细胞形态

Fig. 3 AO fluorescence staining of H₂₂-bearing mice in each group

表 4 白芥子挥发油对小鼠 H₂₂ 实体瘤细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of VOSAS on expression of Bax and Bcl-2 proteins in H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	Bax 蛋白				Bcl-2 蛋白			
		+++	++	+	-	+++	++	+	-
模型	—	0	2	2	6	7	2	1	0
白芥子挥发油	20	2	2	4	2	4	4	1	1
	40	3	3	2	2	2	2	3	3
	80	4	4	2	0	1	2	3	4
环磷酸胺	25	5	3	1	1	1	2	2	5

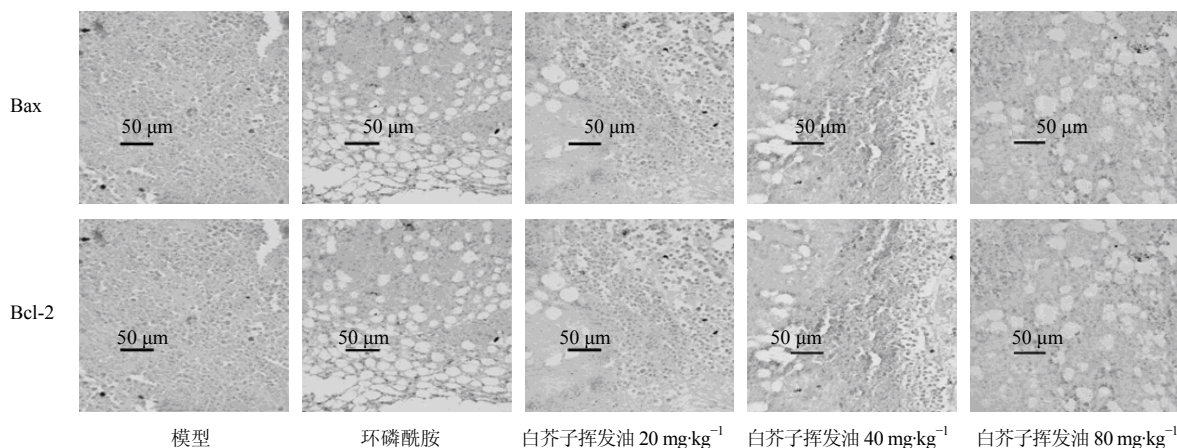


图 4 白芥子挥发油对小鼠 H₂₂ 实体瘤细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of VOSAS on expression of Bax and Bcl-2 proteins in H₂₂-bearing mice

4 讨论

腹水瘤模型及实体瘤模型是抗肿瘤实验应用较广的肿瘤模型，造模技术成熟，模型稳定^[9-10]。本实验采用这 2 种肿瘤模型研究白芥子挥发油的抗肿瘤作用，结果表明白芥子挥发油能够有效抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤的生长，延长小鼠的生存期，且呈良好的量效关系。然而白芥子挥发油也存在明显的毒副作用，ip 给药过程中，白芥子挥发油 80 mg/kg 组小鼠出现脱毛、呕吐等现象。许多抗肿瘤药物在发挥抗肿瘤作用的同时，对免疫系统产生较大的影响，

常引起胸腺指数、脾脏指数等免疫指标的异常^[11]。本实验结果表明，白芥子挥发油 40、80 mg/kg 组小鼠的体质量明显减轻，脾脏指数和胸腺指数也显著下降；当采用原位给药时，其毒副作用显著降低，可见给药方式对抗肿瘤药物的合理应用是值得探讨的课题。

对细胞凋亡的调控是一个非常复杂的过程，有许多基因和蛋白产物参与其中，包括一些促细胞凋亡基因、抑制细胞凋亡基因和一些死亡受体及其配体等。bcl-2 基因及其家族 (bax、bcl-x、bad、bak、

bag、mcl-1 等) 是细胞凋亡研究中最受重视的基因之一^[12]。bcl-2 家族中各成员虽然氨基酸序列同源性高, 但功能却不尽相同, 甚至于相反, 如 bax、bak 等具有 BH1-3 结构区域, 编码的蛋白可促进细胞凋亡; 而 bcl-x、mcl-1 等具有 BH1-4 保守结构区域, 编码的蛋白可抑制细胞凋亡^[13]。Bcl-2 和 Bax 可通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡, 当 Bcl-2 与 Bax 形成同源二聚体, 则诱导细胞凋亡^[14]。

Bax/Bcl-2 的值决定肿瘤细胞生死, 可作为肿瘤治疗效果的检验标准之一^[15-17]。本实验结果表明, 白芥子挥发油各剂量组大鼠肿瘤细胞中 Bax 蛋白的表达均显著增强, 而 Bcl-2 蛋白的表达受到抑制, Bax/Bcl-2 的值增大, 上述作用呈量效关系, 推测白芥子挥发油能够调节 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞中 Bax 与 Bcl-2 蛋白的表达, 进而促使肿瘤细胞凋亡, 达到抑制肿瘤细胞生长的效果。白芥子挥发油是否通过诱导细胞凋亡致使肿瘤细胞死亡还需要进一步的研究证实。

参考文献

- [1] 刘 强, 张 璐, 易延彦, 等. 炒制对白芥子挥发油成分的影响 [J]. 中成药, 2007, 29(10): 1473-1475.
- [2] Basten G P, Bao Y, Williamson G. Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(8): 1399-1404.
- [3] Hasegawa T, Nishino H, Iwashima A. Isothiocyanates inhibit cell cycle progression of HeLa cells at G₂/M phase [J]. *Anticancer Drugs*, 1993, 4(2): 273-279.
- [4] Wilkinson I T, Morse M A, Kresty L A, et al. Effect of alkyl chain length on inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine induced esophageal tumorigenesis and DNA methylation by isothiocyanates [J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(5): 1011-1015.
- [5] Nakamura Y, Ohigashi H, Masuda S, et al. Redoxregulation of glutathione-transferase induction by benzyl isothiocyanate: correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 219-225.
- [6] 宗耀广. 功能性食品 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [7] 吴圣曦, 赖兰香, 吴国欣, 等. 白芥子挥发油提取工艺优化及其化学成分鉴定 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 681-682.
- [8] 李维方, 周定标, 余新光, 等. 联合 VEGF-AON 和 PDGF-TFO 对大鼠脑胶质瘤增殖和细胞凋亡的作用效果 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(11): 831-835.
- [9] 吴细丕, 钱林法, 牛青霞, 等. 实验动物与肿瘤研究 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000.
- [10] 庞建新, 马仁强, 刘兰梅, 等. 博落回总碱对肝癌细胞的毒性作用和体内抗肿瘤作用 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(3): 325-333.
- [11] 洪 阁, 沈 秀, 刘培勋, 等. 槐属植物生物碱衍生物施普睿达抗肿瘤作用的研究 [J]. 天津药学, 2006, 18(6): 4-6.
- [12] 郭青龙. 肿瘤药理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [13] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [14] Lalier L, Cartron P F, Juin P, et al. Bmitochondrial insertion during apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 887-896.
- [15] Korsmeyer S J, Shutter J R, Veis D J, et al. Bcl-2/Bax: a activation and a rheostatthat regulates an antioxidant pathway and cell death [J]. *Semin Cancer Biol*, 1993, 4(6): 327-332.
- [16] Mackey T J, Borkowski A, Amin P, et al. Bcl-2 /Bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patientswith prostate cancer [J]. *Urology*, 1998, 52(6): 1085-1090.
- [17] Narayan S, Chandra J, Sharma M, et al. Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Hematology*, 2007, 12(1): 39-43.