DOI: 0.16016/j.1000-5404.201908073

莱菔硫烷对肝细胞的抗氧化能力和线粒体功能的影响

雷 鹏[1],田思聪[1],滕春莹[1],孙 瑶[1],单毓娟[1],李宝龙[2] 150001 哈尔滨,哈尔滨工业大学化工与化学学院食品科学与工程系[1];150040 哈尔滨,黑龙江省中医药大学药物安全评价中心[2]

[摘要] **目的** 探讨莱菔硫烷(sulforaphane,SFN)对肝细胞氧化应激和线粒体损伤的改善作用。**方法** 建立高脂膳食诱导大鼠肝脏氧化应激体内模型和游离脂肪酸诱导 HHL-5 肝细胞氧化应激的体外模型。ELISA 检测肝组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,Western blot 测定大鼠肝脏组织中抗氧化酶血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1),磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶-1(NADH dehydrogenase quinone 1, NQO1)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)的蛋白表达。采用荧光显微镜观察 HHL-5 肝细胞的活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量和线粒体膜电位;ELISA 测定 HHL-5 肝细胞中谷胱甘肽(glutathione, GSH)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的水平。实时定量 PCR 法检测 mtDNA 含量。**结果** SFN 减少由高脂饲料引起 MDA 含量的增多($P<0.05$),并上调大鼠肝组织中的抗氧化酶 HO-1($P<0.05$),NQO1($P<0.05$)和 GST($P<0.05$)的蛋白表达。SFN 降低由 FFA 提高 HHL-5 细胞的 ROS 水平($P<0.05$),并提高其 GSH($P<0.05$)和 SOD($P<0.05$)的水平,以及线粒体膜电位($P<0.05$)。此外,SFN 显著提高 HHL-5 细胞的 mtDNA 含量($P<0.05$)。**结论** SFN 通过增加肝细胞抗氧化能力改善高脂诱导的肝脏氧化应激损伤并对肝脏线粒体功能有保护作用。

[关键词] 莱菔硫烷;高脂膳食;线粒体功能;抗氧化能力

[中图法分类号] R282.71;R322.47;R329.25 [文献标志码] A

Effect of sulforaphane on antioxidant capacity and mitochondrial function of hepatocytes *in vitro* and in rats with hepatic oxidative stress

LEI Peng[1], TIAN Sicong[1], TENG Chunying[1], SUN Yao[1], SHAN Yujuan[1], LI Baolong[2] [1]Faculty of Food Science and Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang Province, 150001; [2]Center of Drug Safety and Evaluation, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang Province, 150040, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of sulforaphane (SFN) on oxidative stress and mitochondrial injury in hepatocytes. **Methods** We examined malondialdehyde (MDA) content by ELISA in the liver tissues and the protein expression of the antioxidant enzymes including hemeoxygenase-1 (HO-1), NADH dehydrogenase quinone 1 (NQO1) and glutathione S-transferase (GST) using Western blotting in the liver tissues from a rat model of hepatic oxidative stress established by high-fat diet. We also assessed the level of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane protential by fluorescence microscopy, tested glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) levels using ELISA, and detected mitochondrial DNA (mtDNA) content using real-time quantitative PCR in cultured hepatocytes (HHL-5 cells) under fatty acid-induced oxidative stress. **Results** In the rat model of hepatic oxidative stress, SFN significantly reduced high-fat diet-induced elevation of MDA level ($P<0.05$) and up-regulated the protein expression of the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573135)

[通信作者] 单毓娟,E-mail: yujuan72@163.com

李宝龙,E-mail: lbl73@163.com

antioxidant enzymes in the liver tissues ($P<0.05$). In cultured HHL-5 cells, SFN obviously reduced free fatty acid-induced elevation of ROS level ($P<0.05$) and increased GSH content ($P<0.05$), SOD level ($P<0.05$), mitochondrial membrane potential ($P<0.05$), and the content of mtDNA ($P<0.05$). **Conclusion** SFN can enhance the antioxidant capacity of hepatocytes to improve high-fat diet-induced hepatic oxidative stress in rats and provide protection of mitochondrial function in the hepatocytes.

[**Key words**] sulforaphane; high-fat diet; mitochondrial function; antioxidant capacity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81573135). Corresponding authors: SHAN Yujuan, E-mail: yujuan72@163.com and LI Baolong, E-mail: lbl73@163.com

高脂膳食(high fatty diet, HFD)可以引起器官内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量累积,会造成器官(肝脏、心脏、肾脏和肌肉等)的氧化应激性损伤[1-2]。抗氧化酶(过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧酶等)和谷胱甘肽还原酶的水平在HFD诱导的肥胖大鼠组中显著减少[3]。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)损伤、线粒体功能的紊乱以及氧化应激也都在HFD喂食的小鼠中发现[4]。HFD导致小鼠肌肉中mtDNA拷贝数减少和线粒体功能紊乱[5]。

莱菔硫烷(sulforaphane,SFN)是一种来源于十字花科蔬的植物化学物,它能激活核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)上调细胞抗氧化能力。SFN明显改善HFD小鼠肝脏脂肪变性、减少血清ALT和AST水平和肝脏中胆固醇、甘油三酯和游离脂肪酸的含量[6-7]。另一方面,SFN增加3T3-L1脂肪细胞线粒体中电子传递链复合物1和柠檬酸合成酶的酶活以促进线粒体功能[8],提示SFN可能提高线粒体功能。SFN是否可以上调肝细胞的抗氧化能力和线粒体功能保护肝细胞,尚不清楚。本研究采用高脂饲料喂食大鼠和混合游离脂肪酸诱导HHL-5肝细胞建立体外氧化应激模型,研究SFN对肝细胞抗氧化能力和线粒体功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

SFN(纯度≥98%)购于美国LKT公司。SFN溶于DMSO,配制成100 mmol/L的储备液,分装于0.6 mL的EP管中,并放置与-20℃冰箱中备用。人肝细胞系HHL-5细胞为本实验室保存的细胞系。RIPA全蛋白提取试剂盒购于北京索莱宝生物技术有限公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒,MDA试剂盒,ROS试剂盒,JC-1线粒体膜电位试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。棕榈酸和油酸购于美国Sigma公司。血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1),磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶-1(NADH dehydrogenase quinone 1, NQO1)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)抗体购于美国Santa Cruz公司。总DNA基因提取试剂盒购于哈尔滨新海基因检测有限公司。谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒和SOD试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司。

油酸和棕榈酸溶于0.01 mol/L NaOH溶液分别形成20 mmol/L游离脂肪酸溶液(free fatty acid, FFA)。油酸溶液,棕榈酸溶液和10% BSA溶液以2∶1∶3混合形成10 mmol/L游离脂肪酸溶液,保存于-4 ℃冰箱。

凝胶成像仪(美国Bio-Rad)公司,超净工作台(上海Healforce公司),垂直电泳槽(北京市六一仪器厂),转膜槽(北京六一仪器厂),荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 高脂膳食大鼠模型

动物实验经过黑龙江中医药大学伦理委员会批准(批准号20160324)。SPF级雄性Wistar大鼠18只(4周龄,体质量为150~200 g)购于北京维通利华实验动物技术有限公司(合格证编号SCXK(京)2016-0032)。动物在黑龙江中医药大学药物安全性评价中心SPF级动物房饲养,饲养环境为:温度为(22±2)℃,空气湿度为(55±5)%,12 h∶12 h明暗交替。大鼠自由摄食和自由饮水,定期更换垫料和饮水瓶。适应性喂养2周后,大鼠分为3组($n=6$),正常食物组(Con),高脂喂食组(HFD)和高脂喂食+SFN(20 mg/kg)组(SFN)。称量一定质量的SFN溶于0.5%的羧甲基纤维素钠溶液中。SFN灌胃剂量为20 mg/kg(按照体质量的1%进行灌胃),每周3次,实验进行10周。当实验结束时,动物处死前禁食12 h,处死当日,称取动物体质量,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,取肝脏于液氮迅速冻存后,保存于-80 ℃冰箱备用。

肝匀浆制备:取约0.5 g肝组织,加入4.5 mL预冷0.85%的生理盐水,冰上匀浆。匀浆液在12 000×g离心力下4 ℃离心30 min。收集上清液保存于-80 ℃冰箱备用。

1.3 FFA诱导HHL-5肝细胞氧化应激模型的建立

HHL-5肝细胞的培养条件:F12培养基(含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素),37 ℃、5%

CO_2。细胞氧化应激模型培养如下:以浓度为 250 μmol/L FFA 作用 HHL-5 肝细胞 4d,诱导细胞产生脂滴。之后给予细胞 10 μmol/L SFN,作用时间为 2 d。

1.4 肝组织 MDA 含量测定

取肝脏组织匀浆,通过分光光度计法测定硫代巴比妥酸反应(thiobarbituric aicd-reacting substance,TBARS)的产物含量代表 MDA 的含量。肝匀浆的蛋白浓度采用 BCA 试剂盒测定。

1.5 HE 染色

取新鲜肝脏组织投入福尔马林,福尔马林固定后的肝脏组织进行修整,在自动脱水机中进行梯度酒精脱水,浸蜡包埋,将蜡片组织块切成 5 μm 厚的薄膜,随后进行水化,染核,细胞质染色和封片。使用倒置光学显微镜观察肝脏组织的病理学变化。肝脏组织学由黑龙江中医药大学的病理学专家完成。并用 Image J 软件分析脂滴空泡的数量。

1.6 线粒体膜电位检测

线粒体膜电位采用碧云天线粒体膜电位试剂盒(JC-1)进行测定。HHL-5 细胞种于 6 孔板中,实验完后,加入 JC-1 染色工作液孵育 20 min,JC-1 洗涤液冲洗 2 次。荧光显微镜观察拍照,Image J 软件分析。

1.7 ROS 测定

HHL-5 细胞的 ROS 含量采用碧云天 ROS 检测试剂盒进行测定。HHL-5 细胞种于 6 孔板,实验完后,加入 DCFH-DA 染色工作液孵育 20 min,PBS 洗涤后,采用荧光显微镜观察并拍照,Image J 软件分析 ROS 含量。

1.8 GSH 含量和 SOD 酶活测定

实验结束后,将 HHL-5 细胞进行破碎,离心提取上清后根据 GSH 和 SOD 的试剂盒说明书进行测定,并采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.9 线粒体 DNA 含量测定

线粒体 DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)的含量采用 ABI 7300 qPCR 仪器进行测定。总 DNA 基因组采用组织细胞 DNA 基因组提取试剂盒提取。18S rRNA 作为内参基因,线粒体 D-loop 作为线粒体基因。18S rRNA 引物序列:5′-3′ CATTCGAACGTCTGCCCTATC(上游),5′-3′ CCTGCTGCCTTCCTTGGA(下游);D-loop 引物序列:5′-3′GCGTCCTTGCCCTATTACTATC(上游),5′-3′ CTTACTGGTTGTCCTCCGATTC(下游)。qPCR 程序:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,58 ℃ 30 s,42 个循环。根据引物的溶解曲线和扩增曲线确定引物的特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mtDNA 的拷贝数。

1.10 Western blot 检测

采用蛋白提取试剂盒提取大鼠肝脏组织蛋白,并用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。配制 10%分离胶和浓缩胶。电泳条件:浓缩胶 80V 30 min,分离胶 120 V 1.5 h。200 mA 恒流湿转 90 min。转膜完后,2%的 BSA 室温封闭 1 h,一抗 GST(1∶500)、NQO1(1∶800)、HO-1(1∶500)和 GAPDH(1∶1 000)4 ℃过夜孵育。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。采用 BCIP 和 NBT 进行显色。Image J 计算灰度值,各组结果与 GAPDH 进行比。

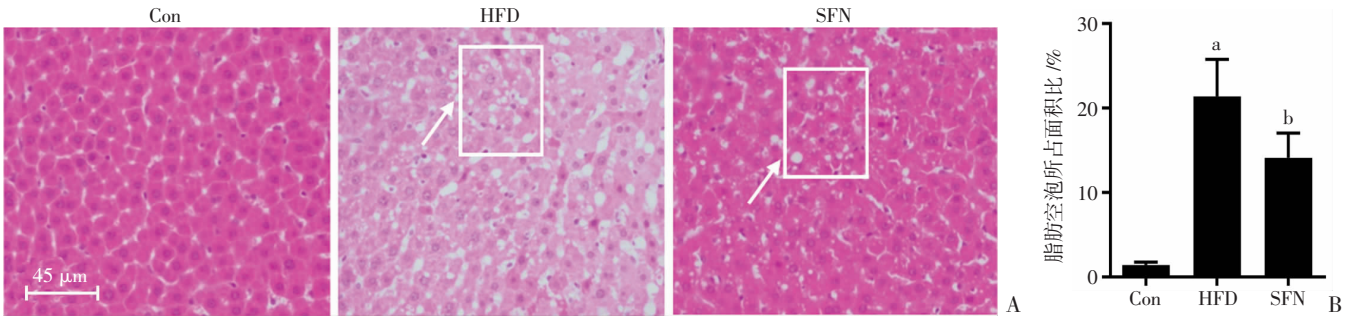
1.11 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用 GraphPad Prism 6 进行绘图和统计学分析。符合正态分布的数据采用单因素方差(One-way ANOVA),检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 SFN 改善大鼠肝脏组织的形态变化

肝脏组织病理学结果如图 1 所示,Con 组中肝细胞细胞核明显、结构完整,不存在脂肪空泡现象;HFD 组的肝细胞出现轮廓不规则,肝细胞中存在较多的脂肪空泡,脂肪空泡面积约占整个病理切片的视野的 20%($P<0.05$),这说明大量的脂质在肝脏组织中聚集,造成了脂肪病变。SFN 组的肝组织仍然存在脂肪空泡,但所占面积显著减少($P<0.05$)。

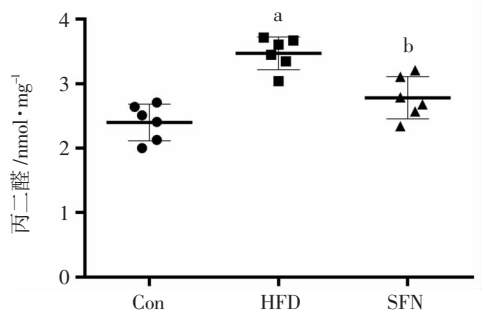


A:HE 染色观察结果 白色方框区域为脂肪空泡区;B:脂肪空泡所占面积比较 Con 组:正常对照组;HFD 组:高脂喂养组;SFN 组:萊菔硫烷组;a:$P<0.05$,与 Con 组相比;b:$P<0.05$,与 HFD 组相比

图 1 大鼠肝脏组织病理学变化

2.2　SFN 对大鼠肝脏 MDA 水平的影响

HFD 组的 MDA 的含量显著高于 Con 组,约为 Con 的 1.47 倍(P<0.05);相比于 HFD,SFN 显著减少大鼠肝组织的 MDA 含量(P<0.05,图 2)。



Con 组:正常对照组;HFD 组:高脂喂养组;SFN 组:莱菔硫烷组;a:P<0.05,与 Con 组相比;b:P<0.05,与 HFD 组相比

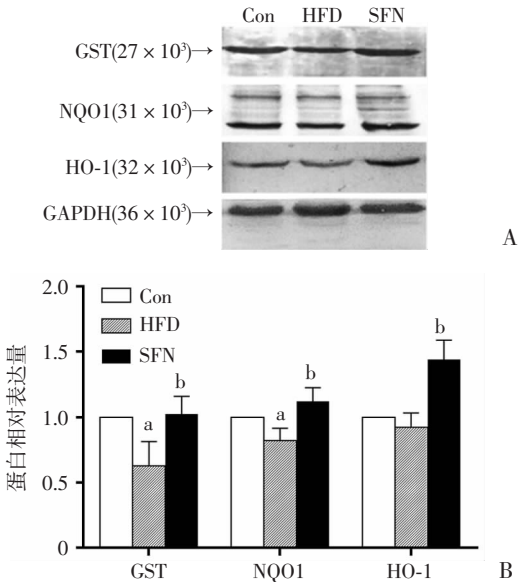
图 2　SFN 对大鼠肝脏组织内 MDA 生成的影响

2.3　SFN 提高抗氧化酶含量

Western blot 检测肝脏组织中抗氧化酶 GST、NQO1 和 HO-1 的蛋白表达结果如图 3,HFD 显著减少 GST 和 NQO1 的蛋白水平,分别是 Con 组表达量的 0.63%(P<0.05)和 0.82%(P<0.05)。SFN 略下调 HO-1 的蛋白水平,但无统计学差异(P>0.05)。与 HFD 组相比,SFN 显著上调大鼠肝脏中 GST、NQO1 和 HO-1 的蛋白水平(P<0.05)。

2.4　SFN 减少 ROS 含量

HHL-5 细胞中胞内 ROS 含量如图 4 所示,Con 组中存在一定量的 ROS;FFA 显著增加 HHL-5 细胞的 ROS 含量(6.30±1.32),约为对照组(1.00±0.00)的 6.3 倍(P<0.05)。相比 FFA 组,SFN 显著减少 HHL-5 细胞的 ROS 含量(3.60±0.63)(P<0.05)。

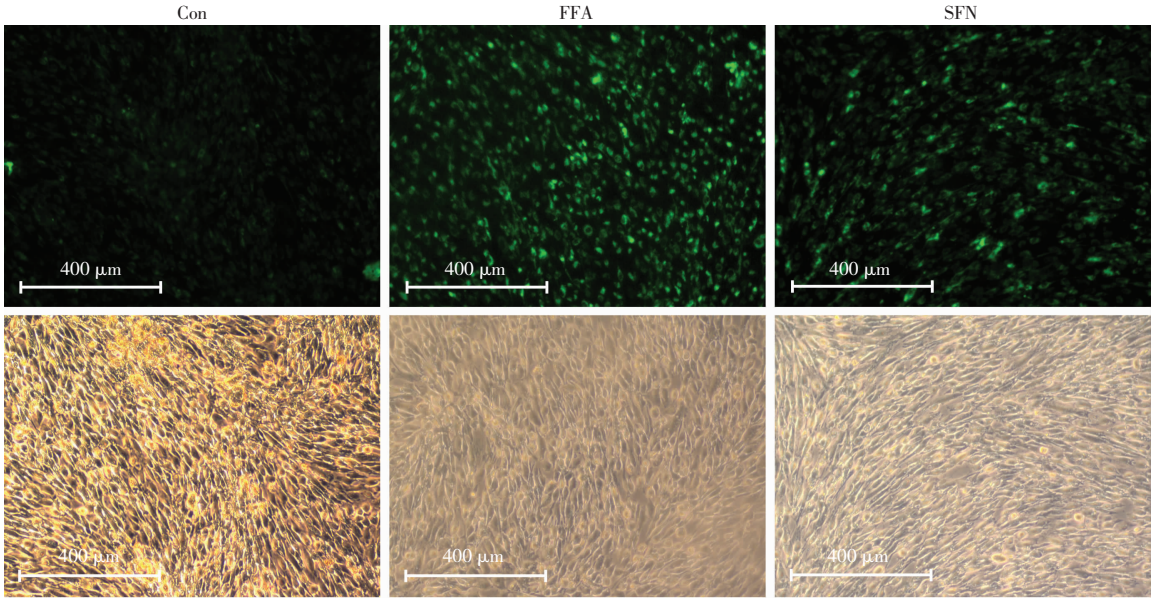


A:Western blot 检测;B:半定量分析　Con 组:正常对照组;HFD 组:高脂喂养组;SFN 组:莱菔硫烷组　a:P<0.05,与 Con 组相比;b:P<0.05,与 HFD 组相比

图 3　SFN 对大鼠肝脏组织抗氧化酶蛋白表达的影响

2.5　SFN 提高 HHL-5 肝细胞的抗氧化能力

如图 5 所示,FFA 明显减少 HHL-5 细胞中 GSH 和 SOD 的水平,分别是 Con 组的 56%(P<0.05)和 64%(P<0.05)。SFN 显著增加 HHL-5 细胞中 GSH 的含量(P<0.05)和 SOD(P<0.05)的酶活。结果提示,SFN 可以明显改善 FFA 诱导的氧化应激水平。

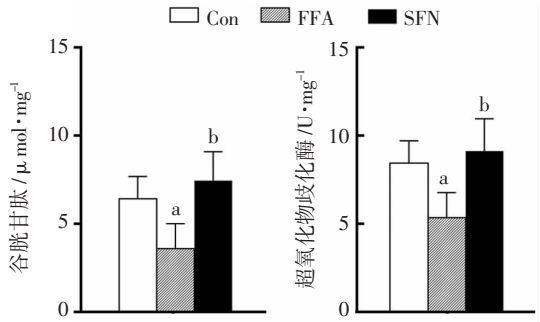


Con 组:正常对照组;FFA 组:游离脂肪酸组;SFN 组:莱菔硫烷组;a:P<0.05,与 Con 组相比;b:P<0.05,与 FFA 组相比

图 4　SFN 对 FFA 诱发肝细胞 ROS 积累的抑制作用

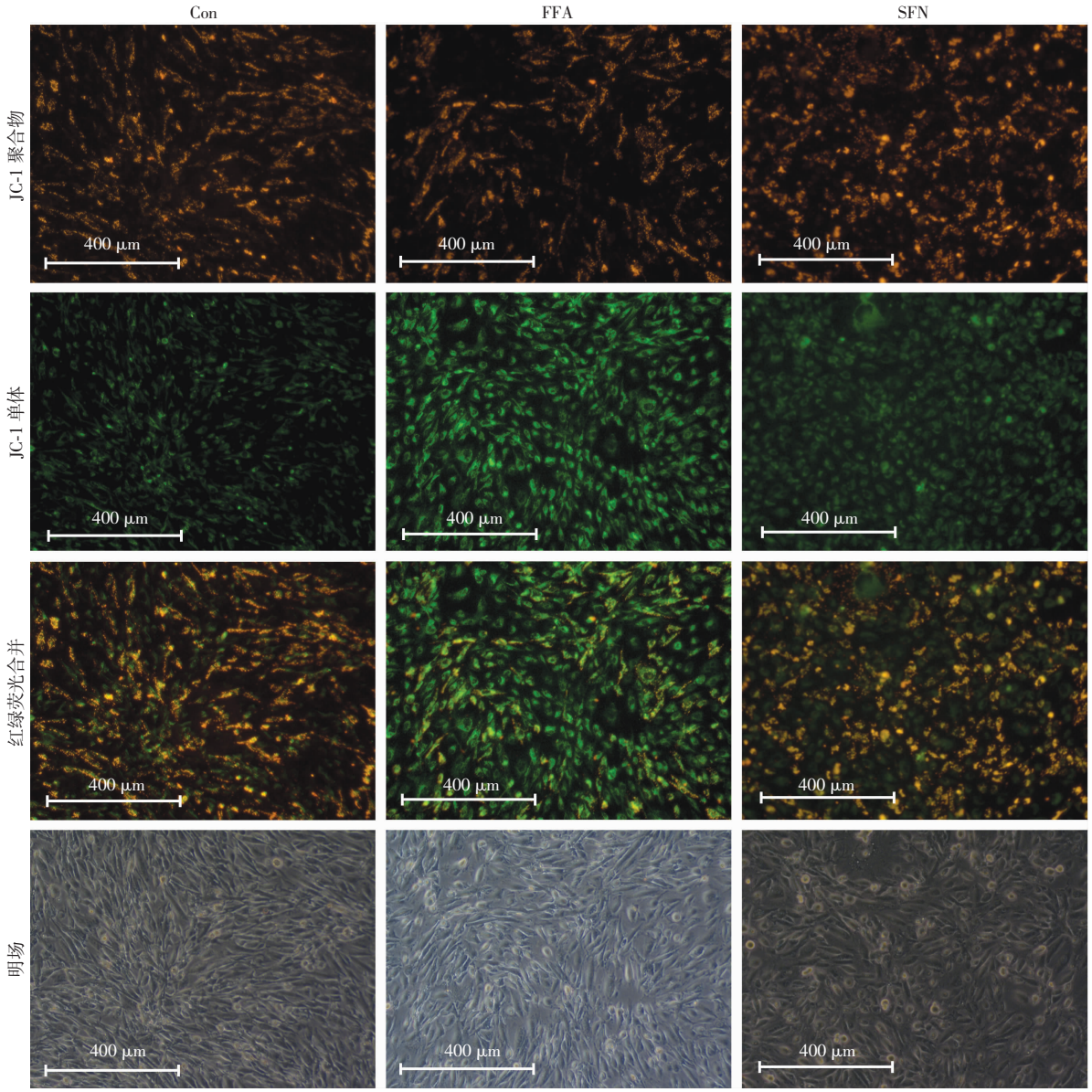
2.6　SFN 恢复线粒体膜电位

过多的 ROS 会攻击线粒体的内外膜并最终破坏线粒体的膜完整性,导致线粒体膜电位降低。JC-1 是用于检测线粒体膜电位的荧光探针,当线粒体膜电位较高时,JC-1 在线粒体的基质中聚集形成聚合物,产生红色荧光,当线粒体膜电位较低时,JC-1 不能存在线粒体的基质中,此时 JC-1 属于单体,产生绿色荧光。因此通过荧光颜色的变化来显示线粒体膜电位的变化。如图 6 所示,与 Con 组(3.06±0.65)相比,FFA 明显地降低 HHL-5 细胞的线粒体膜电位(0.55±0.14)($P<0.05$);SFN 恢复线粒体膜电位(1.64±0.42)($P<0.05$)。



Con 组:正常对照组;FFA 组:游离脂肪酸组;SFN 组:萝卜硫烷组;GSH:谷胱甘肽;SOD:超氧化歧化酶;a:$P<0.05$,与 Con 组相比;b:$P<0.05$,与 FFA 组相比

图 5　SFN 提高 HHL-5 肝细胞中 GSH 和 SOD 的水平



Con 组:正常对照组;FFA 组:游离脂肪酸组;SFN 组:萝卜硫烷组;a:$P<0.05$,与 Con 组相比;b:$P<0.05$,与 FFA 组相比

图 6　SFN 对 HHL-5 肝细胞线粒体膜电位影响的荧光观察

2.7 SFN 对 mtDNA 拷贝数的影响

本研究采用实时定量 PCR 测定 HHL-5 肝细胞的 mtDNA 拷贝数。FFA 组的 mtDNA 水平(0.71±0.08)显著低于 Con 组(1.00±0.00)($P<0.05$),而 SFN 提高 HHL-5 细胞中 mtDNA 的含量(1.20±0.19)($P<0.05$)。

3 讨论

氧化应激是由于 ROS 的平衡稳态遭到破坏以及细胞内抗氧化物的耗竭导致,进而导致组织损伤。肝脏是 ROS 产生的主要场所之一,同时也极易受到 ROS 攻击。本研究表明 FFA 显著诱导 HHL-5 肝细胞产生 ROS。此外,HFD 组的抗氧化酶 GST 和 NQO1 含量显著减少($P<0.05$),并且 FFA 组中 GSH 和 SOD 显著减少($P<0.05$),说明 HFD 或 FFA 可诱导氧化应激。MDA 是一种强毒性的脂质过氧化产物,可加重氧化应激。SFN 能显著减少 MDA 的水平,可能由于 SFN 改善了 HFD 的脂类代谢,或者是 SFN 提高了抗氧化能力。CHEN 等[9]研究表明 SFN 可减少由 HFD 导致小鼠肝脏脂肪空泡,本研究的 HE 染色结果与其一致,说明 SFN 减少肝脏脂质堆积。另一方面,SFN 通过激活 Nrf2 途径提高细胞的抗氧化能力(HO-1,NQO1、GST、GSH 和 SOD)[10],防止肝脏氧化应激损伤。一项采用多酚提取物干预 HFD 小鼠的实验发现,多酚提取物并没有增加抗氧化酶如 SOD1、GSH-Px 和 SOD2 的活性,但是其肝脏组织中 MDA 含量则明显减少[11]。该结果提示多酚抑制脂质过氧化的机制可能是由于多酚直接中和 ROS 的结果。与多酚抗氧化物的机制不同,SFN 属于间接抗氧化物,它通过激活 Nrf2 途径,上调抗氧化酶的表达而发挥间接抗氧化作用。SFN 通过激活 Nrf2 途径,诱导 HHL-5 细胞的硫氧还蛋白还原酶表达,进而增强机体抗氧化防御系统机能[12]。由此可知,SFN 通过提高细胞抗氧化能力有效抑制高脂饮食诱导的小鼠肝组织氧化应激水平。

GSH 缺少可导致线粒体脂肪酸氧化水平的下降,反之,GSH 含量增多可恢复脂肪酸氧化水平[13]。此外,线粒体抗氧化能力的减弱可导致线粒体损伤(线粒体膜电位的破坏,呼吸链复合物的酶活力下降,ATP 产量减少)[14-15]。可见机体抗氧化对维持线粒体功能完整性有着重要作用。SFN(20 mg/kg)处理 HFD 大鼠后,肝脏中抗氧化酶(GST,NQO1 和 HO-1)的表达显著增多($P<0.05$)。此外,SFN 显著减少 HHL-5 肝细胞中 ROS 含量,提高 GSH 和 SOD 的水平以及线粒体膜电位。这提示 SFN 对线粒体膜电位具有保护作用。类似地,骨骼肌和心脏组织中,线粒体功能的下降能够导致甘油三酯的聚集[16],这是由于线粒体功能的受损导致脂肪酸代谢受阻。ARRUDA 等[17]报道 HFD 可导致小鼠肝脏中 mtDNA 的拷贝数减少。本研究发现 mtDNA 的拷贝数在 FFA 组中减少,并且 SFN 增加 HHL-5 细胞中的 mtDNA 的拷贝数。已报道 Nrf2 可诱导线粒体生物合成基因 NRF1(Nuclear Respiratory Factor 1)的转录[18],进而促进 mtDNA 合成。SFN 不仅增加 3T3-L1 脂肪细胞的线粒体数量,而且提高柠檬酸合成酶和线粒体复合物 1 的酶活,以及增加 NRF1 和解偶联蛋白 1(Uncoupling protein 1)的蛋白表达[8]。由此可见,SFN 增加线粒体功能并不是仅仅通过抗氧化途径,深入揭示 SFN 保护线粒体功能的机制将有助于 SFN 的功能开发和应用。

课题组前期研究发现,SFN 通过抑制高脂所致的肝细胞内质网应激,降低内质网应激元件 XBP1 及 PERK 的表达,抑制甘油三酯合成酶及脂肪酸合成酶的表达,最终抑制脂类的异常蓄积[19]。本研究则进一步发现,SFN 通过诱导抗氧化酶表达,修复线粒体功能及增加线粒体拷贝数,对高脂所致的肝脏氧化损伤发挥保护作用。这些发现将进一步肯定 SFN 在预防和改善 NAFLD 中的有益作用,为 SFN 防治 NAFLD 中的应用提供理论基础。

参考文献:

[1] NOEMAN S A, HAMOODA H E, BAALASH A A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats[J]. Diabetol Metab Syndr, 2011, 3(1): 17. DOI: 10.1186/1758-5996-3-17.

[2] HE H J, WANG G Y, GAO Y, *et al*. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice[J]. World J Diabetes, 2012, 3(5): 94-104. DOI: 10.4239/wjd.v3.i5.94.

[3] CARMIEL-HAGGAI M, CEDERBAUM A I, NIETO N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats[J]. FASEB J, 2005, 19(1): 136-138. DOI: 10.1096/fj.04-2291fje.

[4] YUZEFOVYCH L V, MUSIYENKO S I, WILSON G L, *et al*. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice[J]. PLoS ONE, 2013, 8(1): e54059. DOI: 10.1371/journal.pone.0054059.

[5] CHOI J W, OHN J H, JUNG H S, *et al*. Carnitine induces autophagy and restores high-fat diet-induced mitochondrial

dysfunction[J]. Metab Clin Exp, 2018, 78: 43-51. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.09.005.

[6] CHEN Y J, MYRACLE A D, WALLIG M A, *et al*. Dietary broccoli protects against fatty liver development but not against progression of liver cancer in mice pretreated with diethylnitrosamine[J]. J Funct Foods, 2016, 24: 57-62. DOI: 10.1016/j.jff.2016.03.028.

[7] YANG G, LEE H E, LEE J Y. A pharmacological inhibitor of NLRP3 inflammasome prevents non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model induced by high fat diet[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24399. DOI: 10.1038/srep24399.

[8] ZHANG H Q, CHEN S Y, WANG A S, *et al*. Sulforaphane induces adipocyte Browning and promotes glucose and lipid utilization[J]. Mol Nutr Food Res, 2016, 60(10): 2185-2197. DOI: 10.1002/mnfr.201500915.

[9] CHEN Y J, WALLIG M A, JEFFERY E H. Dietary broccoli lessens development of fatty liver and liver cancer in mice given diethylnitrosamine and fed a Western or control diet[J]. J Nutr, 2016, 146(3): 542-550. DOI: 10.3945/jn.115.228148.

[10] HAYES J D, DINKOVA-KOSTOVA A T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(4): 199-218. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.

[11] ANHÊ F F, NACHBAR R T, VARIN T V, *et al*. A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss[J]. Mol Metab, 2017, 6(12): 1563-1573. DOI: 10.1016/j.molmet.2017.10.003.

[12] 李丹, 暴永平, 吴坤. 莱菔硫烷诱导人肝细胞硫氧还蛋白还原酶表达[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(2): 189-191. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-0580.2009.02.032.
LI D, BAO Y P, WU K. Induction of TR1 by sulforaphane in human immortalized hepatocytes[J]. Chin J Public Health, 2009, 25(2): 189-191. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-0580.2009.02.032.

[13] NGUYEN D, SAMSON S L, REDDY V T, *et al*. Impaired mitochondrial fatty acid oxidation and insulin resistance in aging: novel protective role of glutathione[J]. Aging Cell, 2013, 12(3): 415-425. DOI: 10.1111/acel.12073.

[14] PIAO C S, GAO S, LEE G H, *et al*. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels[J]. Pharmacol Res, 2010, 61(4): 342-348. DOI: 10.1016/j.phrs.2009.11.009.

[15] GRECO T, SHAFER J, FISKUM G. Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(12): 2164-2171. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.017.

[16] PETERSEN K F, BEFROY D, DUFOUR S, *et al*. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance[J]. Science, 2003, 300(5622): 1140-1142. DOI: 10.1126/science.1082889.

[17] ARRUDA A P, PERS B M, PARLAKGÜL G, *et al*. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity[J]. Nat Med, 2014, 20(12): 1427-1435. DOI: 10.1038/nm.3735.

[18] 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. DOI: 10.1161/01.RES.0000338597.71702.ad.

[19] TIAN S C, LI B L, LEI P, *et al*. Sulforaphane improves abnormal lipid metabolism via both ERS-dependent XBP1/ACC &SCD1 and ERS-independent SREBP/FAS pathways[J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(6): e1700737. DOI: 10.1002/mnfr.201700737.

(**收稿**:2019-08-12;**修回**:2019-11-05)

(编辑 王 红)