

·特约综述·

天然活性异硫氰酸酯类化合物的研究进展

梁浩 李瑞敏 袁其朋

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 异硫氰酸酯类化合物是十字花科蔬菜中重要的化学组分,也是一种潜在的癌症化学预防化合物。本文介绍并比较了异硫氰酸酯类化合物的各种纯化方法,对已报道的异硫氰酸酯类化合物重要的癌症化学预防活性进行了归纳总结,讨论了异硫氰酸酯类化合物的应用、代谢、稳定性和剂型方面的研究新成果。在这些已有研究的基础上,本文提出了天然活性异硫氰酸酯类化合物在癌症化学预防领域未来的研究方向和应用前景。

关键词: 异硫氰酸酯; 硫代葡萄糖苷; 水解; 纯化; 抗癌活性

中图分类号: TQ464.9

引言

癌症的化学预防是指利用天然、合成或生物物质来阻止、减缓或逆转癌症的发生发展过程,从而降低癌症的发生率和死亡率的方法策略。随着研究的深入,癌症的化学预防作用得到逐步确认,已成为癌症研究的一个重要领域^[1]。流行病学研究表明,增加十字花科植物如西兰花、萝卜、白菜、花椰菜、芥菜等的摄入量可降低多种癌症的发生率。十字花科植物含有高含量的硫代葡萄糖苷,当植物组织遭到破坏后,硫代葡萄糖苷可被自身的黑芥子酶催化水解生成具有抗癌活性的异硫氰酸酯类化合物。异硫氰酸酯类化合物在生物体内可以诱导二型解毒酶的生成、抑制癌细胞的增殖、诱导癌细胞凋亡等。此外,异硫氰酸酯还具有抗氧化、抗炎和抗菌的功效。

近年来,随着异硫氰酸酯类化合物的研究不断深入,其卓越的防癌抗癌效果备受关注,已成为目前具有潜力的癌症化学预防天然功能因子之一。本文将从异硫氰酸酯的来源、分离纯化方法、抗癌活性及机制和剂型化等方面对近年来异硫氰酸酯类化合物的研究工作进展进行综述,并以此为基础对未来研究方向提出了自己的观点,希望有助于推动异硫氰酸酯类化合物的研究与开发。

1 异硫氰酸酯的来源

十字花科植物具有较好的癌症化学预防效果,尤其是对肺癌、乳腺癌、结肠癌和膀胱癌等^[2]。十字花科植物的抗癌活性主要归因于异硫氰酸酯类化合物,植物体内并不直接含有异硫氰酸酯类物质,而是含有其前体物质硫代葡萄糖苷。硫代葡萄糖苷是植物中一类重要的次级代谢产物,广泛存在于十字花科植物的根、茎、叶、嫩芽和种子中。硫代葡萄糖苷是由 β -D-硫代葡萄糖基、磺酸盐醛基团和一个来源于氨基酸的侧链组成,根据侧链R氨基酸来源的不同,可将其分为三大类:芳香族硫代葡萄糖苷(侧链来源于苯丙氨酸和酪氨酸),脂肪族硫代葡萄糖苷(侧链来源于甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸)及吲哚族硫代葡萄糖苷(侧链来源于色氨酸)。硫代葡萄糖苷种类繁多,目前仅已经被报道研究过的硫代葡萄糖苷就有120多种。一种十字花科植物中常含有多种硫代葡萄糖苷,植物不同部位硫代葡萄糖苷的种类和含量是不同的,种子中硫代葡萄糖苷的含量最高。然而,在十字花科植物种子发芽的过程中,硫代葡萄糖苷的含量呈下降的趋势,温度、光照等因素也会影响植物体内硫代葡萄糖苷的含量。植物体内硫代葡萄糖苷种类及含量差异将会引起异硫氰酸酯种类及含量的不同,从而导致其抗癌活性的不同。

十字花科植物内存在能够催化硫代葡萄糖苷水解的酶即黑芥子酶,黑芥子酶又称 β -硫代葡萄糖苷水解酶,是一种很稳定的酶,以蛋白复合体的形式存

收稿日期: 2015-01-02

基金项目: 国家自然科学基金(20806005/21176018); 国家“863”计划(2012AA021403)

第一作者: 男, 1979年生, 副教授

E-mail: lianghao@mail.buct.edu.cn

在。在完整的十字花科植物中,硫代葡萄糖苷位于液胞中,而黑芥子酶则位于细胞内特定的蛋白体中,两者是分开存在的。当植物组织遭到破坏,如咀嚼、机械粉碎等方式,硫代葡萄糖便会与黑芥子酶接触,被其催化水解产生一分子葡萄糖和一个糖苷配基,糖苷配基极不稳定,随后重新排列生成多种水解产物,其中研究较多的为异硫氰酸酯和腈类化合物

(见图 1)。常见的异硫氰酸酯类化合物及其母体结构见表 1,其中,莱菔硫烷、莱菔素、烯丙基异硫氰酸酯、苄基异硫氰酸酯研究较为广泛。Matusheski 等^[3]比较了异硫氰酸酯和腈类的生物学活性,结果表明异硫氰酸酯能够很好的激发Ⅱ型解毒酶的产生,而腈类则不具有该活性,在水解过程中提高异硫氰酸酯的含量,抑制腈类的生成具有重要意义。

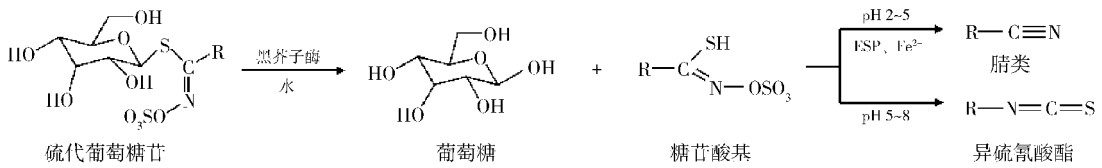


图 1 硫代葡萄糖苷水解过程示意图

Fig. 1 Hydrolysis process of glucosinolates

表 1 常见的异硫氰酸酯及其母体结构图

Table 1 Chemical structure of common isothiocyanates and their parent compounds

类别	名称	结构	母体结构	
脂肪族 异硫氰 酸酯	莱菔硫烷 Sulforaphane			西兰花
	莱菔素 Sulforaphene			萝卜
	烯丙基异硫氰酸酯 AITC			芥菜、山葵
	4-甲基硫基-丁基异硫氰酸酯 Erucin			芝麻菜
芳香族 异硫氰 酸酯	苯基异硫氰酸酯 PITC			辣根
	苄基异硫氰酸酯 BITC			独行菜、木瓜
	苯乙基异硫氰酸酯 PEITC			西洋菜

水解产物的形成原因较为复杂,研究表明水解液的 pH 值对产物的生成有较大影响^[4],在 pH 5~8 的中性条件范围内,糖苷配基重排主要生成异硫氰

酸酯;在 pH 2~5 的酸性条件下,有亚铁离子和特异硫蛋白(ESP 蛋白质)同时存在时,产物主要为腈类化合物。

金属离子对水解产物的形成也有一定的影响,本课题组^[5]通过在西兰花种子水解体系中外源添加金属离子的方式,研究了 6 种金属离子(Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+})对莱菔硫烷生成及黑芥子酶活性的影响,结果表明 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 能减少莱菔硫烷的生成,对黑芥子酶的活性也有一定的抑制作用。 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 的存在能显著降低莱菔硫烷的生成量,Williams 等^[6]发现 Fe^{2+} 是 ESP 蛋白质发挥活性的关键因素,有助于腴类物质的生成。 Ca^{2+} 能提高黑芥子酶活力,但是也能抑制糖苷配基中间体生成莱菔硫烷。只有 Zn^{2+} 能够提高黑芥子酶的活性,并能够促进糖苷配基生成莱菔硫烷。因此,在硫代葡萄糖苷水解的过程中通过添加 Zn^{2+} 或者金属离子螯合剂去除其他金属离子的影响是提高异硫氰酸酯产量的有效途径。

ESP 蛋白质比黑芥子酶更热不稳定^[7],加热处理西兰花可能会使其中 ESP 蛋白质失活而保留黑芥子酶的活性,从而抑制腴类物质的生成。Wang 等^[8]发现研究了水煮、蒸汽、微波 3 种传统的热处理方式对西兰花中主要硫代葡萄糖苷 glucoraphane 的 2 种水解产物莱菔硫烷和莱菔硫烷腴类产量的影响,结果表明蒸汽处理西兰花芽苗 1~3 min 是最优的方式,莱菔硫烷的含量较新鲜西兰花中莱菔硫烷的含量得到显著提高。所以蒸汽短时间处理过后的西兰花更有益于人类的健康。

此外,异硫氰酸酯生成过程中的自降解也是影响异硫氰酸酯含量的另一主要因素。本课题组^[9]发现在萝卜种子硫代葡萄糖苷 glucoraphane 水解过程中生成的莱菔素极其不稳定,在 2 h 内基本完全降解;莱菔素的降解机制研究表明其可以与萝卜种子自身产生的 H_2S 发生反应,形成含硫杂环化合物(如图 2);而且 pH2.0 的酸性环境或者在水解体系中添加 Zn^{2+} 离子可以有效的抑制莱菔素的降解。

2 异硫氰酸酯的分离纯化

异硫氰酸酯类化合物在十字花科植物中含量很低,传统分离纯化方法难以有效去除杂质,获得高纯度的产品。目前,研究较多且普遍采用的分离纯化方法有溶剂萃取法、大孔树脂吸附法、低压柱色谱法、制备色谱法等。

2.1 异硫氰酸酯类化合物的分离纯化方法

2.1.1 有机溶剂萃取法

有机溶剂萃取法是利用化合物在 2 种互不相容

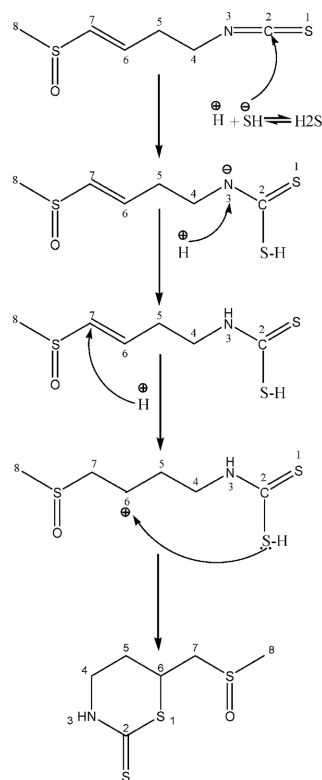


图 2 莱菔素的降解机制示意图^[9]

Fig. 2 The proposed degradation pathway of sulforaphane^[9]

的溶剂中溶解度的不同,使化合物从一种溶剂转移到另一种溶剂中,经过多次萃取后,将目标产物提取出来。异硫氰酸酯的萃取通常采用的有机溶剂为二氯甲烷和乙酸乙酯。二氯甲烷或乙酸乙酯萃取后能够除去种子水提物中部分极性较强的杂质,但不能将弱极性的杂质分离出去。值得注意的是,一种十字花科植物中通常会含有多种硫代葡萄糖苷,经黑芥子酶水解后会产生多种异硫氰酸酯,溶剂萃取法很难获得单一的高纯度的异硫氰酸酯。所以,有机溶剂萃取法常用作样品的预处理,是其他纯化方法的基础。

2.1.2 大孔树脂吸附法

大孔树脂吸附法是一种工艺简单、成本较低的分方法。本课题组^[10]对采用大孔树脂吸附法从西兰花种子水解液中分离莱菔硫烷的工艺进行了研究与优化。首先对 4 种大孔树脂的吸附和解析性能进行了研究,发现 SP850 树脂能有效分离莱菔硫烷。进一步对吸附和解析过程中的参数进行优化发现上样时流速为 5 BV/h,温度为 25 °C, pH 为 2 时,吸附率最高;采用乙醇-水作为洗脱液(体积比为 4:6),且洗脱液的流速为 6 BV/h 时,解析效果达到最好。

在此最优的条件下,莱菔硫烷得到较好的纯化,纯度可达 85.9%。

2.1.3 低压柱色谱法

本课题组^[11]利用低压硅胶柱色谱法采用梯度洗脱的方式成功地从西兰花种子水解液中纯化得到莱菔硫烷,莱菔硫烷纯度大于 90%。用低压柱色谱法纯化异硫氰酸酯较大的优点为成本较低,但是这种方法也存在一个较大的问题,硅胶层析属于正相层析,硅胶易吸附强极性的物质,洗脱过程中这些强极性的物质很难被洗脱下来,使柱子的柱效降低。

2.1.4 制备型高效液相色谱法

制备型高效液相色谱现已成为制备异硫氰酸酯的一种重要方法。Kore 等^[12]先采用凝胶过滤法纯化样品,之后采用制备型高效液相色谱成功分离出了西兰花中主要硫代葡萄糖苷的几种主要水解产物。Matusheski 等^[13]先后采用二氯甲烷萃取和制备型高效液相色谱法纯化出了西兰花种子中主要硫代葡萄糖苷 glucoraphanin 的 2 种水解产物莱菔硫烷和莱菔硫烷腈类。该工艺采用二氯甲烷萃取法来初步纯化样品,取得了很好的效果,但是二氯甲烷萃取法耗时较长,并且需消耗大量的有机溶剂。

在此基础上本课题组^[14]建立了固相萃取和制备型高效液相色谱联用制备莱菔硫烷的工艺,所得到的莱菔硫烷产品纯度可达 95% 以上。固相萃取是基于固液萃取的原理,先将西兰花种子提取物溶解在己烷-乙酸乙酯(体积比为 8:2)溶液中,将溶液转移至固相萃取小柱(硅胶填料),用乙酸乙酯淋洗去除大量杂质,之后用乙醇将异硫氰酸酯及与之极性相似的物质洗脱下来,用制备型高效液相色谱法进一步纯化。固相萃取法可同时完成样品的富集与净化,能除去大量的干扰组分,操作简单,节约溶剂,为制备型高效液相色谱的高效分离准备了很好的基础。

固相萃取所得莱菔硫烷粗提液的制备型高效液相色谱图见图 3,由此液相图可知,莱菔硫烷与粗提液中的其他组分得到了很好的分离。此外,本课题组^[15]还开发了大孔树脂吸附和制备型高效液相色谱联用的方法用于从莱菔子水解液中纯化莱菔素,该法可使莱菔素得到较好的分离,产品纯度可达到 96.5%。

2.1.5 高速逆流色谱法

高速逆流色谱法(HSCCC)是一种新型的、连续高效的液液分配色谱技术,是建立在单向性流体动

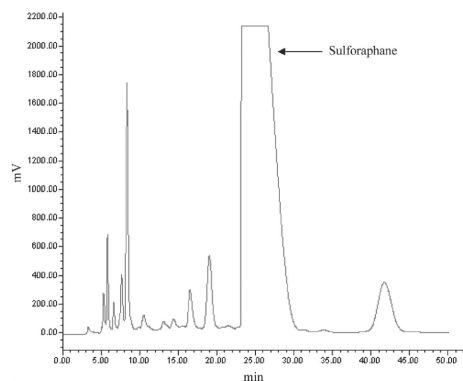


图 3 固相萃取所得莱菔硫烷粗提液的制备型高效液相色谱图^[14]

Fig. 3 Preparative HPLC chromatogram of the sulforaphane-rich extract obtained by solid-phase extraction^[14]

力平衡体系之上的一种逆流色谱分离方法。本课题组^[16]研究了利用高速逆流色谱法纯化异硫氰酸酯的工艺,并取得了一定的成果。溶剂系统的选择是影响高速逆流色谱分离效率的关键因素。通过对多种溶剂系统的筛选,选定正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水(体积比为 1:5:1:5)系统用于分离西兰花种子水解液中的莱菔硫烷,通过高速逆流色谱莱菔硫烷得到完全分离,产品的纯度高于 97%。高速逆流色谱法纯化前后莱菔硫烷溶液的高效液相色谱图见图 4。

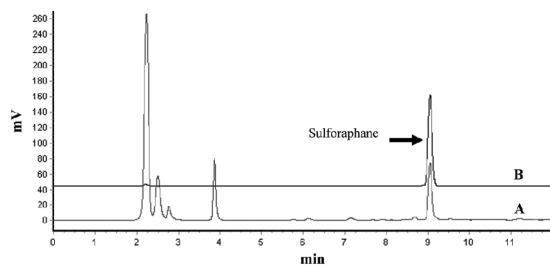


图 4 高速逆流色谱法纯化前(A)后(B)莱菔硫烷溶液的液相图^[16]

Fig. 4 Analytical HPLC chromatograms of sulforaphane obtained by crude extraction (A) and HSCCC (B)^[16]

高速逆流色谱法也成功用于莱菔素的纯化中,以莱菔子为原料制备得到的莱菔素纯度达到 96.9%^[17]。

2.2 异硫氰酸酯常用纯化方法的比较

有机溶剂萃取法是根据物质的极性和溶解性进行分离,常用做样品的预处理,是其他纯化方法的基础。大孔树脂吸附法纯化异硫氰酸酯可以取得不错的效果,但是所得产品的纯度较低,达不到药物活性评价的标准。低压硅胶柱色谱法属于正相色谱,杂质的不可逆吸附会较大程度影响柱子的分离效果。目前高纯度异硫氰酸酯的制备常采用制备型高效液

相色谱法和高速逆流色谱法。但是,制备型高效液相色谱法样品前处理过程繁杂,样品需要通过液液萃取、固相萃取、大孔树脂吸附等方法纯化后才能使用,且制备型高效液相色谱法生产规模较小,成本较

高,通常用于实验室样品的纯化。高速逆流色谱法制备得到的产品纯度高、工艺简单、分离成本低且生产能力强,为工业化大规模生产异硫氰酸酯提供了条件。异硫氰酸酯各种纯化方法的比较详见表 2。

表 2 异硫氰酸酯的纯化方法比较
Table 2 Comparison of different methods for preparing pure isothiocyanate

异硫氰酸酯纯化方法	参考文献	产品纯度	优点	缺点
有机溶剂萃取法	—	低	操作简单	产品纯度低,溶剂消耗大、适用于样品的前处理过程
大孔树脂吸附法	[10], 2008	85.9%	成本低,操作简单	产品纯度不高,分离时间较长
低压逆流色谱法	[11], 2005	>90%	系统压力较低,成本低	杂质不可逆吸附,使柱子柱效降低
制备型高效液相色谱法	凝胶过滤 + 制备型 HPLC	[12], 1993	N/A	
	溶剂萃取 + 制备型 HPLC	[13], 2001	99%	成本较高、样品处理过程复杂、
	固相萃取 + 制备型 HPLC	[14], 2007	95%	适合实验室小规模制备使用
	大孔树脂吸附 + 制备型 HPLC	[15], 2013	96.5%	
高速逆流色谱法	[16], 2008	97%	不需要固相载体,样品处理简单,	溶剂系统复杂,设备昂贵、需要专业人员操作
	[17], 2013	96.9%	分离效率高、分离速度快、适合大规模生产	

3 异硫氰酸酯抗癌活性研究

3.1 激活 Keap 1-Nrf2-ARE 通路

Nrf2 转录因子在细胞应激反应和疾病治疗中起重要作用,许多基因编码的细胞保护蛋白都是通过 Keap-Nrf2-ARE 通路转录的。正常生理状态下,Nrf2 与胞浆蛋白 Keap1 结合,Nrf2 被泛素化后与 Keap1 解离,随后被泛素蛋白酶体迅速降解。Keap 1 蛋白质是由 62 个氨基酸组成的多肽,含有多个负电性的半胱氨酸残基,当半胱氨酸残基受到修饰后,Nrf2 便会和 Keap1 蛋白解离^[18],并进入细胞核与 Maf 转录因子结合,识别抗氧化反应元件 ARE 上的 DNA 序列,启动Ⅱ型解毒酶和抗氧化应激蛋白相关基因的转录工作。异硫氰酸酯是一类含有(N=C=S)基团的物质,由于电子云的偏移作用,中间的碳原子显正电性,可以与亲电性物质发生相互作用。研究发现莱菔硫烷可以和 Keap1 蛋白结合并可修饰 Keap1 蛋白的半胱氨酸残基,从而诱导Ⅱ型解毒酶的生成^[19]。此外,莱菔硫烷还可以激活丝裂原活化蛋白激酶通路(MAPK),将细胞外刺激信号传导至细胞及其核内,其中 ERK、JNK、p38 激酶在此信号通路中发挥重要作用^[20](如图 5)。莱菔硫烷的作用位点引起了人们的广泛研究,Zhang 等^[21]将 Keap1 蛋白 C151 突变成一个丝氨酸后用莱菔硫烷给药发现

Nrf2 仍处于抑制状态,从而推测 C151 是莱菔硫烷的作用位点。Malhotra 等^[22]采用生物素转换法、分子模型及基因突变实验证明了上述观点。随着检测技术的不断进步,研究发现除了 C151 位点,莱菔硫烷还可以修饰 Kelch 区半胱氨酸残基。最近研究发现^[23]莱菔硫烷和苯乙基异硫氰酸酯不仅可以通过 Keap1-Nrf2-ARE 途径降低紫外损伤皮肤细胞的氧化应激作用,增加紫外损伤皮肤细胞内 Nrf2 的活性,还可以增加 Nrf2 相关基因 γGCS, HO-1, NQO1 的表达。更有趣的是 Mathew 等^[24]发现长期用莱菔硫烷刺激人皮肤纤维母细胞,会使 Nrf2 系统更敏感易被激活,从而能更好的保护细胞免受电离辐射的危害。

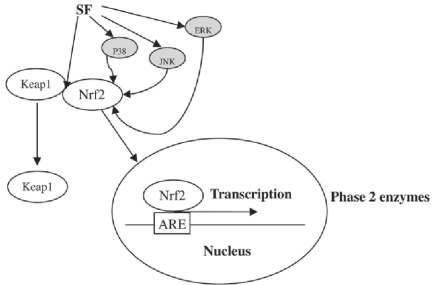


图 5 莱菔硫烷激活 Keap 1-Nrf2-ARE 途径(SF 代表莱菔硫烷)^[25]
Fig. 5 Keap1-Nrf2-ARE pathway activated by sulforaphane (SF represents sulforaphane)^[25]

3.2 调节体内的代谢酶

在致癌物质形成的初始阶段,通过有效调节体内的代谢酶可以抑制癌症的发生,异硫氰酸酯对代谢酶的调节作用方式主要包括两方面:抑制 I 型酶的活性和诱导 II 型解毒酶的生成。

3.2.1 抑制 I 型酶的活性

I 型酶可调节体内内源性或外源性物质(如药物、酒精、环境污染物等)的代谢,但代谢过程中有时会产生一些亲电体物质,将对体内的大分子如 DNA 造成损伤。细胞色素 P450 酶系(CYP)是主要的 I 型酶。莱菔硫烷可以抑制细胞色素 P450 酶的活性,从而阻断致癌物质的形成^[26]。此外,研究发现^[27]苯乙基异硫氰酸酯对细胞色素 P450 酶也有一定的抑制作用。

3.2.2 诱导 II 型酶的生成

II 型解毒酶可以保护组织和细胞免受致癌物质如体内反应产生的亲电中间体的损伤,II 型解毒酶可以催化致癌物与内源性配体如谷胱甘肽、UDP-葡萄糖醛酸等结合,增加致癌物的溶解性,促进它们代谢排出体外。异硫氰酸酯类物质可以通过 Keap 1-Nrf2-ARE 途径诱导 II 型解毒酶的生成。人体内比较重要的 II 型解毒酶有谷胱甘肽硫转移酶、UDP-葡萄糖醛酸转移酶、醌类氧化还原酶-1、谷胱甘肽还原酶及过氧化物酶^[28]、血红素加氧酶-1 等。Wu 等^[29]发现饮食摄入十字花科蔬菜西兰花芽苗可以增加心脏、肾脏、动脉血管中谷胱甘肽的浓度,增强谷胱甘肽还原酶及过氧化物酶的活性,从而降低心血管系统的氧化压力和炎症。之后,Mukherjee 等^[30]让心脏局部贫血的小鼠摄入西兰花 30 天,小鼠心脏功能增强、心急衰弱区域减少,并发现西兰花可以防止小鼠心脏内硫氧还蛋白、谷氧还蛋白、过氧化物酶、血红素加氧酶-1 和超氧化物还原酶 SOD 的活性的降低,还可以诱导多种生存信号蛋白,如 Nrf2、Bcl1, Akt、胞外信号调节激酶等的生成,同时可下调死亡信号通路中蛋白质的合成。而 Konsue 等^[31]则发现苯乙基异硫氰酸酯对 II 型酶的诱导作用存在细胞和组织特异性,用苯乙基异硫氰酸酯处理肝脏细胞 12 h 后,利用生物芯片检测发现细胞内谷胱甘肽硫转移酶、谷胱甘肽还原酶的含量均有所上调,但苯乙基异硫氰酸酯对小鼠肺及肾脏组织的作用效果不明显。异硫氰酸酯类化合物作用的特异性有待进一步的探索。最近研究显示,异硫氰酸酯对神经系统疾病有一定的治疗作用,用 6-亚砷己基异硫氰酸酯(6-

MSITC)处理 6-羟多巴胺诱导的帕金森病小鼠(5 mg/kg,每周 2 次),4 周后,和对照组小鼠相比,6-MSITC 给药小鼠细胞内谷胱甘肽硫转移酶活性增加了 38.6%,谷胱甘肽还原酶的活性增加了 60.5%^[32]。

3.3 异硫氰酸酯对体外细胞、癌症组织及实验动物的作用

3.3.1 异硫氰酸酯对体外细胞的抗增殖和诱导凋亡作用

抑制癌细胞增殖和诱导癌细胞凋亡是异硫氰酸酯抗癌活性的重要作用机制。异硫氰酸酯对多种肿瘤细胞,如肺癌细胞^[33]、膀胱癌细胞^[34]、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、白血病细胞等有直接的抗增殖和诱导凋亡作用。细胞生长期可分为细胞分裂间期和分裂期(M),间期包括 3 个阶段:DNA 合成前期(G1 期)、DNA 合成期(S 期)与 DNA 合成后期(G2 期)。有关异硫氰酸酯对细胞生长周期的 G1 期、S 期、G2/M 期的阻滞作用均已报道。异硫氰酸酯诱导细胞凋亡主要是通过线粒体介导细胞凋亡和死亡受体介导的细胞凋亡 2 种途径。本课题组^[33]研究了莱菔硫烷和苯乙基异硫氰酸酯对肺癌细胞 LTP-A2 的作用,发现莱菔硫烷和苯乙基异硫氰酸酯均可诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞,通过流式细胞仪发现莱菔硫烷的细胞周期阻滞主要发生 G2/M 期。此外发现 2 种异硫氰酸酯对细胞的作用均依赖于给药浓度和给药时间。对于肺癌细胞 LTP-A2,莱菔硫烷较苯乙基异硫氰酸酯更为有效,莱菔硫烷 24 h 的 IC₅₀ 值为 6.25 μmol/L,苯乙基异硫氰酸酯为 20 μmol/L。

3.3.2 异硫氰酸酯对癌症组织及实验动物的治疗作用

细胞实验是抗癌药物的发现及抗癌机理研究的重要工具,然而在临床前阶段,动物实验对于研究药物在体内发挥作用的效力、毒副作用及代谢方式是非常必要的。莱菔硫烷是异硫氰酸酯类化合物中的重要一员,其抗癌活性得到了广泛的研究且取得了国际上的认可。莱菔硫烷对癌症组织及实验动物的治疗作用及研究成果总结于表 3。此外,莱菔硫烷的抗肿瘤临床试验已取得一定的研究成果^[35]。本课题组在莱菔硫烷对癌症组织的作用及剂型开发方面也做了一定的工作,将肺癌细胞系 LTPA2 移植至裸鼠体内,腹腔注射莱菔硫烷发现,莱菔硫烷可以降低肿瘤的发生率,且对肿瘤的生长有一定的抑制作用,可显著降低肿瘤组织的重量^[33];莱菔硫烷片

剂选择羟丙甲基纤维素 K4M 和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)作为赋形剂,且当 PVP 比例为 45% 时取得最

佳实验效果,莱菔硫烷可以在胃中以最小的治疗浓度持续稳定释放 12 h,药物释放指数可达到 0.6949。

表 3 莱菔硫烷对实验动物肿瘤组织的治疗作用

Table 3 Treatment effects of tumors in experimental animals by sulforaphane

组织	诱因	剂量及给药方式	疗效	参考文献
结肠病灶	氧化偶氮甲烷	5、20 μmol/次 每周 3 次,持续 2 月	病灶个数由 153 个降至 109 至 120 个	[36], 2000
胃癌	苯并芘	7.5 μmol/d 口服	肿瘤的数量减少了 39% ($p<0.001$)	[37], 2002
肺癌	烟草病毒	1.5 mmol/kg 口服	肿瘤发病率降低了 26%,肿瘤的多重性由 1 个/鼠降至 0.3 个/鼠	[38], 2005
	移植	50、100 mg/kg 腹腔注射	肿瘤重量分别降低了 40%、70%,和对对照组小鼠相比,小鼠总重量物显著变化	[33], 2008
乳腺癌	二羟甲基丁酸	75 或 150 μmol/d	推迟了肿瘤形成时间,且肿瘤的发生率、多重性及肿瘤的重量均有显著降低	[39], 1994
胰腺癌	邻苯二甲酰丁辛酯	80×10^{-6} 口服	胰腺损伤引起的非典型性增生和恶性腺瘤得到显著的抑制	[40], 2006
皮肤肿瘤	紫外线辐射	0.3 或 1.0 μmol 局部治疗	肿瘤的负荷、发生率、多重性降低了 50%	[41], 2006
	对苯二甲酸	0.5 或 1.0 μmol 局部治疗	肿瘤的发生的到抑制,抑制依赖于莱菔硫烷的浓度	[42], 2006
膀胱癌	联苯胺	10、40 μmol/d, 持续 5 d	莱菔硫烷可显著抑制联苯胺诱导的 DNA 损伤	[43], 2010
爆发性肝功能衰竭	D-半乳糖胺、脂多糖	3 mg/kg 腹腔注射	莱菔硫烷显著减轻了肝损伤和发病率,上调了血清中转氨酶含量、脂质过氧化作用、谷胱甘肽含量及Ⅱ型解毒酶活性,下调了肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素-6 水平	[44], 2014
神经系统记忆缺陷	莼苕碱	10、50 mg/kg, 持续 14 d 口服	莱菔硫烷可以上调乙酰胆碱水平、增加乙酰胆碱转移酶的活性降低乙酰胆碱酯酶的活性,缓解莼苕碱诱发的记忆缺陷。	[45], 2014

4 异硫氰酸酯体内代谢途径及联合用药

异硫氰酸酯类物质进入细胞后,会迅速与细胞内的巯基类物质结合。谷胱甘肽是细胞内含量最高的巯基类物质,异硫氰酸酯在谷胱甘肽硫转移酶的作用下与谷胱甘肽结合,异硫氰酸酯-谷胱甘肽结合物通过硫醇尿酸途径代谢生成半胱氨酸和氮乙酰半胱氨酸的结合物,最终被排出体外(见图 6)。Zhang 等^[47]用 100 μM 莱菔硫烷处理小鼠肝癌细胞,30 min 后发现细胞内 95% 以上的莱菔硫烷都是以莱菔硫烷和谷胱甘肽结合物的形式存在,并证明了

癌细胞对于莱菔硫烷的摄取速度受细胞内谷胱甘肽含量的影响。目前,异硫氰酸酯的跨膜运输机制尚不明确,但代谢途径中形成的 3 种结合物异硫氰酸酯和谷胱甘肽的结合物 (ITC-GSH)、异硫氰酸酯和半胱氨酸的结合物 (ITC-Cys)、异硫氰酸酯和氮乙酰半胱氨酸的结合物 (ITC-NAC) 引起了人们的研究兴趣。Jiao 等^[48]研究了苯乙基异硫氰酸酯 (PEITC) 及其与硫醇物质的结合物 PEITC-GSH、PEITC-Cys、PEITC-NAC 对肝微粒细胞色素 P450 酶活性的抑制作用,结果表明 PEITC-GSH、PEITC-Cys、PEITC-NAC 均能抑制人和小鼠肝微粒细胞

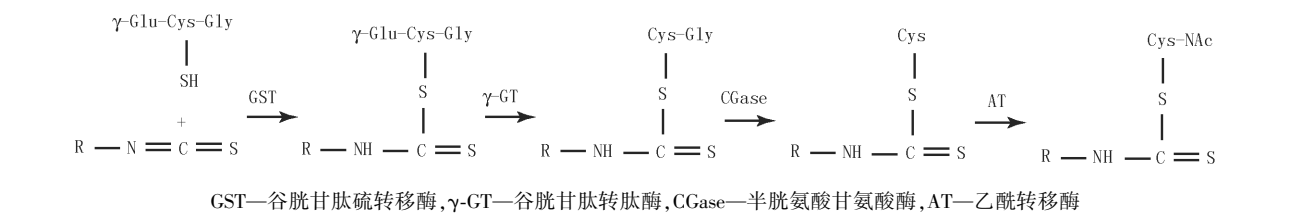


Fig. 6 Metabolism of isothiocyanates in vivo^[46]

CYP2E1, CYP2B1, CYP1A1 和 CYP1A2 的活性。这表明异硫氰酸酯和硫醇类物质的结合物可作为独立的药物发挥药效。异硫氰酸酯和半胱氨酸的结合物不仅能够降低异硫氰酸酯的毒性,而且对于部分癌细胞的防治效果比单独使用异硫氰酸酯更好。烯丙基异硫氰酸酯和半胱氨酸结合物对于白血病细胞 HL60 生长抑制作用增强,在无血清的培养基中,效果更为显著^[49]。铂类化合物是一类化疗药物,对肾组织有一定程度的损伤,可激活半胱天冬酶,诱导细胞凋亡。最近, Tayem 等^[50]报道了两种水溶性的异硫氰酸酯和半胱氨酸结合物,苄基异硫氰酸酯-半胱氨酸结合物(BITC-Cys)和苯丙基异硫氰酸酯-半胱氨酸结合物(PPITC-Cys),能上调血红素加氧酶 HO-1 水平,能减缓铂类化合物引起的细胞凋亡,体内实验结果显示, BITC-Cys 和 PPITC-Cys (25 mg/kg)能够消除由铂类化合物导致的血清肌酐和尿素水平偏高的现象。此外,异硫氰酸酯类物质在体内的代谢较为迅速,半衰期短,通过将异硫氰酸酯类和硫醇类物质结合可达到在体内缓慢释放异硫氰酸酯类药物的效果,有望解决异硫氰酸酯类物质在人体内代谢快、半衰期短、血药浓度难以维持的问题,同时可降低其毒副作用。

2 种药物合理搭配可能会产生协同和互补的作用,联合用药可达到更好的治疗效果。异硫氰酸酯与其他抗癌药物联合用药引起了研究者的关注,莱菔硫烷和白藜芦醇联合给药可以抑制癌细胞的增殖和转移,诱导乳酸脱氢酶的释放,激活半胱天冬酶-3 的活性,诱导癌细胞的凋亡^[51]。莱菔硫烷和吉西他滨联合给药,可以协同发挥药效^[52]。顺铂类化疗药物长期给药后,细胞易产生耐药性, Hunakova 等^[53]采用顺铂和莱菔硫烷联合给药的方式来处理卵巢癌 A2780 和 SKOV3 细胞,MTT 比色法显示,对于 A2780 细胞,莱菔硫烷和顺铂产生协同效应,而 SKOV3 细胞中 2 种药物产生拮抗作用;对这种现象做了进一步研究发现,差异产生的原因主要在于 2 种细胞内莱菔硫烷对 Nrf-2 途径的激活能力不同,在 SKOV3 细胞中,莱菔硫烷可以显著地激活 Nrf-2 途径,对细胞起一定的保护作用,从而与顺铂产生了拮抗作用。此外, Yang 等^[54]用脂质体将苯乙基异硫氰酸和顺铂包裹制成纳米微粒,该纳米微粒对 NCI-H569 非小细胞肺癌细胞的致死率比单独使用两种药物增加了 20.7%。纳米微粒具有较高的负 Zeta 电位,结构比较稳定,在体内可以长时间循环,

可有效降低肿瘤的负担及药物的毒副作用。联合用药的研究有望解决单种药物耐药性、毒副作用强的问题,从而达到更优的治疗效果。

5 异硫氰酸酯的稳定性及包合物的开发

异硫氰酸酯类化合物含有($\text{N}=\text{C}=\text{S}$)基团,其稳定性较差,容易发生降解。其中,莱菔硫烷在高温、富氧或碱性条件下易降解生成二甲基二硫醚、S-甲基硫代亚磺酸、S-甲基硫代磺酸盐等产物,大大降低其抗癌活性及药用价值。莱菔硫烷的降解遵循一级反应动力学规律,降解速率随着温度、溶液 pH 值的增大而增大,低温及酸性食物基质有利于莱菔硫烷的保存^[55]。本课题组^[56]通过共沉淀法利用羟丙基- β -环糊精包裹莱菔硫烷,制备包合物并对包合物的稳定性进行了验证,结果显示莱菔硫烷抗氧化、耐热、耐碱的性质都得到了很大提高,为莱菔硫烷的保存及其活性的保持提供了一个重要的方法。同样,烯丙基异硫氰酸酯(AITC)的结构也不稳定,并且还具有较强的刺激性和挥发性。这使其应用受到了限制。而烯丙基异硫氰酸酯的这些缺陷可以通过惰性高聚物包埋法有效克服,通过包埋法可制备形成水包油型纳米颗粒、微型胶囊、纳米薄膜等稳定形式(见图 7),将烯丙基异硫氰酸酯包裹在高聚物内,可以抑制其降解,利于活性的保持,并且烯丙基异硫氰酸酯的包合物仍具有较强的抑菌活性,为烯丙基异硫氰酸酯的高效利用提供了有效的方法。烯丙基异硫氰酸酯包合物的研究进展详见表 4。

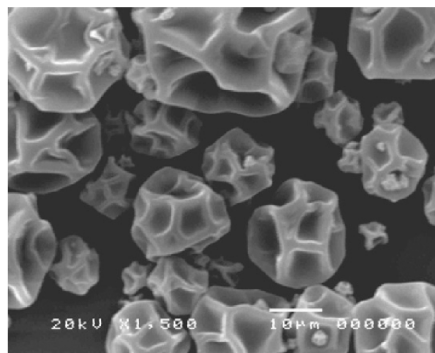


图 7 AITC-阿拉伯胶-壳聚糖微囊的扫描电镜图^[57]

Fig. 7 Scanning electron micrograph (SEM) of AITC-loaded gum Arabic-chitosan microparticles^[57]

6 结束语

随着研究的不断进展,异硫氰酸酯的抗肿瘤生物学活性得到进一步的证实,尤其是莱菔硫烷的研

表 4 烯丙基异硫氰酸酯(AITC)包合物的制备及性能研究
Table 4 Preparation and performance of complexes of AITC and high polymers

性能	包合物形式	高分子材料	制备方法	效果	参考文献
稳定性	复合体	α,β -环糊精	共沉淀法	包埋率可达 100%, 控释效果受环境湿度的影响, 湿度越大, 药物越容易释放; α -环糊精-AITC 复合物中 AITC 的释放速度较慢	[58], 2006
	凝胶小球	壳聚糖-藻酸钙凝胶小球	机械乳化	包埋率较低(56%), 结构稳定, 在模拟胃肠液中 AITC 的保留率较高。	[59], 2007
	纳米乳	矿物油, Tween 80 和 Span 80	乳液转化点法	制备形成纳米乳, 纳米粒的直径为 137 ~ 215 nm; 结构稳定, 放置 6.5 月后, 纳米粒数仅减少 4% ~ 13%; 抑制了 AITC 的降解。	[60], 2015
抑菌活性	微囊	阿拉伯胶、壳聚糖、Tween 20	高压匀质法	AITC 微囊可显著抑制泡菜中明串柱菌和乳酸菌的生长, 改善泡菜的质地, 延长其贮藏寿命	[57], 2012
	纳米薄膜	碳纳米管	膜乳化法	碳纳米管可有效的防止 AITC 的挥发, AITC 可从纳米薄膜自由扩散至食品中, 减少微生物的污染, 抗氧化, 防止食品变色。	[61], 2013
	微囊	阿拉伯胶、明胶	复凝聚法	包裹率高于 90%, 有效控制了 AITC 的释放, 降低了其刺激性, 微囊可有效延长蔬菜的保存时间, 其不影响蔬菜的品质。	[62], 2014
	静电纺丝纳米纤维	AITC-环糊精复合物、聚乙烯醇纳米纤维	机械乳化、静电纺丝	包裹率高, 稳定性好, 可达到对 AITC 的缓释效果, 该复合物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有显著的抑制作用	[63], 2014

究已经进入临床阶段。异硫氰酸酯在新型抗癌药物开发方面具有很大的潜力, 基于异硫氰酸酯的研究现状, 笔者认为以下几方面可能成为未来异硫氰酸酯类化合物研究的主要方向: (1) 异硫氰酸酯在体内的生物利用度及药物剂型的开发, 异硫氰酸酯类和硫醇类结合物抗肿瘤活性、毒性研究及其在体内的代谢和作用机制的研究; (2) 异硫氰酸酯和其他类抗癌药物联合用药的研究, 使两种药物发挥协同作用, 降低抗癌药物的毒副作用; (3) 基于异硫氰酸酯的前体物质-硫代葡萄糖苷在生物体内的合成途径, 找到硫代葡萄糖苷合成的相关基因, 利用基因工程的方法生产硫代葡萄糖苷, 将会大大扩大异硫氰酸酯的来源, 降低异硫氰酸酯的成本; (4) 由于异硫氰酸酯来源于十字花科植物, 寻找十字花科蔬菜最优的食用方法以及合理膳食搭配, 使人们获得最佳的癌症化学预防效果。

参考文献:

[1] Techapiesancharoenkij N, Fiala J L A, Navasumrit P, et al. Sulforaphane, a cancer chemopreventive agent, induces pathways associated with membrane biosynthesis in response to tissue damage by aflatoxin B₁ [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2015, 282: 52-60.

[2] Latté K P, Appel K E, Lampen A. Health benefits and possible risks of broccoli-An overview [J]. Food and

Chemical Toxicology, 2011, 49: 3287-3309.

[3] Matusheski N V, Jeffery E H. Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 5743-5749.

[4] Vaughn S F, Berhow M A. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification [J]. Industrial Crops and Products, 2005, 21: 193-202.

[5] Liang H, Yuan Q P, Xiao Q. Effects of metal ions on myrosinase activity and the formation of sulforaphane in broccoli seed [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43: 19-22.

[6] Williams D J, Critchley C, Pun S, et al. Key role of Fe²⁺ in epithiospecifier protein activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 8512-8521.

[7] Matusheski N V, Juvik J A, Jeffery E H. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 1273-1281.

[8] Wang G C, Farnham M, Jeffery E H. Impact of thermal processing on sulforaphane yield from broccoli. (brassica oleracea L. ssp. italica) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 6743-6748.

[9] Song D, Liang H, Kuang P Q, et al. Instability and

- structural change of 4-methylsulfinyl-3-butenyl isothiocyanate in the hydrolytic process[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61: 5097–5102.
- [10] Li C F, Liang H, Yuan Q P, et al. Optimization of sulforaphane separation from broccoli seeds by macroporous resins[J]. *Separation Science and Technology*, 2008, 43: 609–623.
- [11] Liang H, Yuan Q, Xiao Q P. Purification of sulforaphane from brassica oleracea seed meal using low-pressure column chromatography[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 828: 91–96.
- [12] Kore A M, Spencer G F, Wallig M A. Purification of the ω -(methylsulfinyl) alkyl glucosinolate hydrolysis products: 1-isothiocyanato-3-(methylsulfinyl) propane, 1-isothiocyanato- 4-(methylsulfinyl) butane, 4-(methylsulfinyl) butanenitrile, and 5-(methylsulfinyl) pentanenitrile from broccoli and *lesquerella fendleri*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41: 89–95.
- [13] Matusheski N V, Wallig M A, Juvik J A, et al. Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from brassica oleracea[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, 49: 1867–1872.
- [14] Liang H, Li C, Yuan Q, et al. Separation and purification of sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55: 8047–8053.
- [15] Kuang P Q, Song D, Yuan Q P, et al. Separation and purification of sulforaphane from radish seeds using macroporous resin and preparative high-performance liquid chromatography[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136: 342–347.
- [16] Liang H, Li C, Yuan Q, Vriesekoop F. Application of high-speed countercurrent chromatography for the isolation of sulforaphane from broccoli seed meal[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 7746–7749.
- [17] Kuang P Q, Song D, Yuan Q P, et al. Preparative separation and purification of sulforaphane from radish seeds by high speed countercurrent chromatography[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136: 309–315.
- [18] Baird L, Swift S, Lières D, et al. Monitoring Keap1-Nrf2 interaction in single live cells[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32: 1133–1144.
- [19] Dinkova-Kostova A T, Holtzclaw W D, Cole R N, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 11908–11913.
- [20] Shan Y, Wang X, Wang W, et al. p38 MAPK plays a distinct role in sulforaphane-induced up-regulation of ARE-dependent enzymes and down-regulation of COX-2 in human bladder cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23: 1133–1138.
- [21] Zhang D D, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 8137–8151.
- [22] Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: 5718–5734.
- [23] Kleszczynski K, Ernst I M A, Wagner A E, et al. Sulforaphane and phelethyl isothiocyanate protects human skin against UVR-induced oxidative stress and apoptosis: role of Nrf2-dependent gene expression and antioxidant enzymes[J]. *Pharmacological Research*, 2013, 78: 28–40.
- [24] Mathew S T, Bergstrom P, Hammarsten O. Repeated Nrf2 stimulation using sulforaphane protot fibroblasts from ionizing radiation[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 276: 188–194.
- [25] Liang H, Yuan Q P. Natural sulforaphane as a functional chemopreventive agent: including a review of isolation, purification and analysis methods[J]. *Critical Review in Biotechnology*, 2012, 32(3): 218–234.
- [26] Yoxall V, Kentish P, Coldham N, et al. Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: implications for its chemopreventive activity[J]. *Int J Cancer*, 2005, 117: 356–362.
- [27] Gupta P, Wright S E, Kim S H, et al. Phenethyl isothiocyanate: a comprehensive review of anti-cancer mechanisms[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1846: 405–424.
- [28] Santana-Martinez R A, Galvan-Arzate S, Hernandez-Pando R, et al. Sulforaphane reduces the alterations induced by quinolinic acid: modulation of glutathione levels[J]. *Neuroscience*, 2014, 272: 188–198.
- [29] Wu L, Noyan-Ashraf M H, Facci M, et al. Dietary approach to attenuate oxidative stress hypertension and inflammation in the cardiovascular system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7094–7099.

- [30] Mukherjee S, Gangopadhyay H, Das D K. Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56: 609–617.
- [31] Konsue N, Ioannides C. Tissue differences in the modulation of rat cytochromes P450 and phase II conjugation systems by dietary doses of phenethyl isothiocyanate[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 3677–3683.
- [32] Morroni F, Sita G, Tarozzi A, et al. Neuroprotection by 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate in a 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease[J]. *Brain Research*, 2014, 1589: 93–104.
- [33] Liang H, Lai B T, Yuan Q P. Sulforaphane induces cell-cycle arrest and apoptosis in cultured human lung adenocarcinoma LTP-A2 cells and retards growth of LTP-A2 xenografts in vivo[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 1911–1914.
- [34] Savio A L V, Silva G N D, Camargo E A D, et al. Cell cycle kinetic, apoptosis rate, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil) [J]. *Mutation Research*, 2014, 762: 40–46.
- [35] The United States National Institutes of Health. Sulforaphane in clinical trials[EB/OL]. [2014–12–01] <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Sulforaphane>.
- [36] Chung F L, Conaway C C, Rao C V, et al. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 2287–2291.
- [37] Fahey J W, Haristoy X, Dolan P M, et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo(a) pyrene-induced stomach tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7610–7615.
- [38] Conaway C C, Wang C X, Pittman B, et al. Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 8548–8557.
- [39] Zhang Y S, Kensler T W, Cho C G, et al. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3147–3150.
- [40] Kuroiwa Y, Nishikawa A, Kitamura Y, et al. Protective effects of benzyl isothiocyanate and sulforaphane but not resveratrol against initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters[J]. *Cancer Lett*, 2006, 241: 275–280.
- [41] Dinkova-Kostova A T, Jenkins S N, Fahey J W, et al. Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts[J]. *Cancer Lett*, 2006, 240: 243–252.
- [42] Gills J J, Jeffery E H, Matusheski N V, et al. Sulforaphane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion[J]. *Cancer Lett*, 2006, 236: 72–79.
- [43] Ding Y, Paonessa J D, Randall K L, et al. Sulforaphane inhibits 4-aminobiphenyl-induced DNA damage in bladder cells and tissues[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(11): 1999–2003.
- [44] Sayed R H, Khalil W K B, Salem H A, et al. Sulforaphane increases the survival rate in rats with fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide[J]. *Nutrition Research*, 2014, 34: 982–989.
- [45] Lee S, Kim J, Seo S G, et al. Sulforaphane alleviates scopolamine-induced memory impairment in mice[J]. *Pharmacological Research*, 2014, 85: 23–32.
- [46] Dinkova-Kostov R A, Kostova R V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2012, 18: 337–347.
- [47] Zhang Y S. Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(6): 1175–1182.
- [48] Jiao D, Conaway C C, Wang M H, et al. Inhibition of N-nitrosodimethylamine demethylase in rat and human liver microsomes by isothiocyanates and their glutathione, L-cysteine, and N-acetyl-L-cysteine conjugates[J]. *Chem Res Toxicol*, 1996, 9: 932–938.
- [49] Xu K, Thornalley P J. Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 60: 221–231.
- [50] Tayem Y, Green C J, Motterlini R, et al. Isothiocyanate-cysteine conjugates protect renal tissue against cisplatin-induced apoptosis via induction of heme oxygenase-1[J]. *Pharmacological Research*, 2014, 81: 1–9.
- [51] Jiang H, Shang X, Wu H T, et al. Combination treatment with resveratrol and sulforaphane induces apoptosis in human U251 glioma cells[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35: 152–161.
- [52] Sharma C, Sadrieh L, Priyani A, et al. Anti-carcinogenic effects of sulforaphane in association with its apoptosis-inducing and anti-inflammatory properties in human cervical

- cancer cells[J]. *Cancer Epidemiol*, 2011, 35: 272–278.
- [53] Hunakova L, Gronesova P, Horvathova E, et al. Modulation of cisplatin sensitivity in human ovarian carcinoma A2780 and SKOV3 cell lines by sulforaphane[J]. *Toxicology Letters*, 2014, 230: 479–486.
- [54] Yang Y T, Shi Y, Jay M, et al. Enhanced toxicity of cisplatin with chemosensitizer phenethyl isothiocyanate toward non-small cell lung cancer cells when delivered in liposomal nanoparticles[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2014, 27: 946–948.
- [55] Wu Y F, Mao J W, You Y R, et al. Study on degradation kinetics of sulforaphane in broccoli extract[J]. *Food Chemistry*, 2014, 155: 235–239.
- [56] Wu H H, Liang H, Yuan Q P, et al. Preparation and stability investigation of the inclusion of complex of sulforaphane with hydroxypropyl- β -cyclodextrin[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82: 613–617.
- [57] Ko J A, Kim W Y, Park H J. Effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AITC) on the extension of the shelf-life of *kimchi*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153: 92–98.
- [58] Li X H, Jin Z Y, Wang J. Complexation of allyl isothiocyanate by α - and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics[J]. *Food chemistry*, 2007, 103: 461–466.
- [59] Kim W T, Chung H, Shin I S, et al. Characterization of calcium alginate and chitosan-treated calcium alginate gel beads entrapping allyl isothiocyanate[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71: 566–573.
- [60] Li Y, Teng Z, Chen P, et al. Enhancement of aqueous stability of allyl isothiocyanate using nanomulsions prepared by an emulsion inversion point method[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, 438: 130–137.
- [61] Dias M V, Soares N D F, Borges S V, et al. Use of allyl isothiocyanate and carbon nanotubes in an antimicrobial film to package shredded, cooked chicken meat[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141: 3160–3166.
- [62] Hua W, Na X, Chang-liang H, et al. Microcapsule preparation of allyl isothiocyanate and its application on mature green tomato preservation[J]. *Food Chemistry*, 2015, 175: 344–349.
- [63] Aytac Z, Dogan S Y, Tekinay T, et al. Release and antibacterial activity of allyl isothiocyanate/ β -cyclodextrin complex encapsulated in electrospun nanofibers[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 120: 125–131.

Recent progress in the study of natural active isothiocyanates

LIANG Hao LI RuiMin YUAN QiPeng

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Isothiocyanates are phytochemical constituents of cruciferous vegetables and have been widely studied in recent years as potential chemopreventive compounds. This review summarizes and compares different isolation and purification methods employed in isothiocyanate research. The major chemopreventive properties of isothiocyanates are also reviewed and discussed. The potential applications of isothiocyanates, and the metabolism, stability and formulation of isothiocyanates are discussed. New research opportunities are identified based on the review of existing studies of isothiocyanates, and these may lead to new methods of chemopreventive therapy.

Key words: isothiocyanate; glucosinolate; hydrolysis; purification; anticancer activity