环磷酰胺所致小鼠肝损伤的动态变化

黄　灿, 何法静, 杨　潇, 官丽欢, 张思敏, 周艳莹, 范仕成,
姚欣鹏, 黄　民*, 毕惠嫦*

(中山大学药学院药物代谢与药动学实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CPA) 是烷化剂类抗肿瘤药物, 在体内由细胞色素 P450 酶代谢为 4-羟基环磷酰胺发挥抗肿瘤作用。CPA 除引起骨髓抑制、膀胱炎等毒性反应外, 还会引起肝损伤。本研究旨在评估 CPA 在小鼠体内产生肝损伤的动态变化过程。雄性 BALB/c 小鼠单次腹腔注射 CPA (200 mg·kg^{-1}), 分别于 0、2、6、12 和 24 h 后采集血清和肝脏样本进行生化和病理检测。动物实验方案经中山大学动物伦理委员会批准。结果表明, 小鼠给予 CPA 2 h 后开始出现肝损伤, 在 12 h 肝损伤最严重, 血清天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和丙二醛 (MDA) 显著升高, 还原型谷胱甘肽 (GSH) 显著下降, 广泛可见肝细胞水肿并伴有空泡变性, 而 24 h 之后肝损伤显著改善。由于 CPA 产生氧化应激损伤, 机体应激性激活核因子红细胞系相关因子-2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, NRF2) 信号通路, 上调 NRF2 下游醌氧化还原酶 1 (quinine oxidoreductase 1, NQO1)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚基 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC) 和谷氨酸半胱氨酸连接酶修饰亚基 (glutamate cysteine modifier subunit, GCLM) 的表达, 从而抵抗氧化应激损伤。本研究阐明了 CPA 所致肝损伤随时间的动态变化过程, 并探讨了 NRF2 介导的机体保护机制的动态变化, 为抵抗 CPA 所致肝损伤提供了科学数据。

关键词: 环磷酰胺; 肝损伤; 氧化应激; 核因子红细胞系相关因子-2

中图分类号: R963　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2019)06-1062-07

Dynamic changes of cyclophosphamide-induced liver injury in mice

HUANG Can, HE Fa-jing, YANG Xiao, GUAN Li-huan, ZHANG Si-min, ZHOU Yan-ying,
FAN Shi-cheng, YAO Xin-peng, HUANG Min*, BI Hui-chang*

(*Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou 510006, China*)

Abstract: Cyclophosphamide (CPA) is one of the most commonly used alkylating agents in the treatment of malignant cancer. CPA is metabolized by cytochrome P450 enzymes into 4-hydroxycyclophosphamide *in vivo* which can exhibit anti-tumor activity. Metabolic activation of CPA can cause adverse reactions such as myelosuppression, cystitis, and liver injury. The aim of this study was to evaluate the dynamic changes of hepatic injury induced by CPA in mice. Male BALB/c mice were injected CPA (200 mg·kg^{-1}) intraperitoneally. Both serum and liver samples were collected at 0, 2, 6, 12 and 24 hours after dosing. The animal experiment protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Sun Yat-sen University. The results showed that hepatotoxicity was observed at 2 hours after CPA dosing, and the most serious liver injury was measured at 12 hours. The level of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and malondialdehyde (MDA) was significantly increased, glutathione (GSH) level was significantly decreased, hepatocyte edema and vacuolar degeneration were widely observed in liver tissue, and began to recover 24 hours after dosing. In addition, due to

收稿日期: 2019-04-03;　修回日期: 2019-04-25.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573489); 广东省自然科学基金资助项目 (2017A030311018).
*通讯作者 Tel: 86-20-39943470, Fax: 86-20-39943000, E-mail: bihchang@mail.sysu.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0237

oxidative stress damage caused by CPA, nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NRF2) signaling pathway was activated and the mRNA and protein expression of its downstream targets such as quinine oxidoreductase 1 (NQO1), heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and glutamate cysteine modifier subunit (GCLM) were up-regulated, which alleviated oxidative stress injury. In a summary, this study demonstrate the dynamic change of CPA-induced liver injury and the NRF2-mediated protective mechanisms, providing new insights into the CPA-induced liver injury.

Key words: cyclophosphamide; liver injury; oxidative stress; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CPA) 是经典的烷化剂氮芥类衍生物, 在临床上广泛应用于恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、乳腺癌等的治疗[1,2]。环磷酰胺是一种需要代谢活化的前体药物[3], 如图1[4]所示, 约90%的环磷酰胺在体内经由细胞色素P450酶体系CYP2B6、CYP2C9等羟基化产生4-羟基环磷酰胺, 并与其开环后形成的互变异构体醛磷酰胺共存, 醛磷酰胺通过非酶催化的β-消除反应生成两种化合物, 即磷酰胺氮芥和丙烯醛[5,6]。磷酰胺氮芥通过释放烷基化的氮形成链间和链内DNA交联来干扰DNA复制, 阻滞快速增殖组织中的有丝分裂活动, 从而发挥抗肿瘤和免疫抑制的作用, 而丙烯醛是引起出血性膀胱炎等毒性症状的原因[7]。此外, 约10%的环磷酰胺经CYP3A4代谢产生无治疗作用的2-去氯乙基环磷酰胺[8]。

高剂量环磷酰胺可导致多器官毒性如血液 (骨髓抑制)、肝毒性、生殖器官 (性腺衰竭)、心脏毒性、膀胱毒性等[9]。据报道, 有临床患者在初始剂量给药后短时间内即出现肝损伤, 最早的不良反应在给药3 h后出现[9]。此外, 已有研究发现高剂量CPA诱导的肝损伤与其毒性代谢物丙烯醛相关[10,11]。目前, 丙烯醛诱导肝损伤的机制尚不完全清楚, 但有研究表明丙烯醛能迅速消耗正常细胞内的还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的大量累积, 可攻击生物功能大分子, 随后引起氧化应激损伤和脂质过氧化, 进而破坏细胞的正常生理功能, 最终导致细胞死亡[12]。

核因子红细胞系相关因子-2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, NRF2) 是调节和诱导细胞抗氧化基因和肝解毒酶基因表达的一种转录因子[13]。在生理状态下, NRF2与Kelch样ECH相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap1) 的偶联, 锚定在胞浆中。在氧化应激状态下, Keap1被氧化或共价修饰而与NRF2解偶联使得NRF2活化并易位至细胞核, 与抗氧化剂反应元件 (antioxidative response element, ARE) 异二聚化, 启动II相解毒酶、III相转运蛋白和抗氧化蛋白的转录[14,15]。因此, NRF2信号通路在细胞抵御氧化应激反应的机制中具有重要作用。

综上所述, 氧化应激可能是CPA诱导肝损伤的关键, 而NRF2抗氧化应激信号通路对CPA所致肝损伤可能具有保护效应。本研究旨在阐明CPA在体内诱导肝损伤的动态变化过程, 以及NRF2通路在CPA所致肝损伤过程的变化, 为CPA所致肝损伤的基础研究提供科学数据。

材料与方法

仪器　5417-R低温高速离心机 (德国Eppendorf公司); AE260电子天平 (美国Mettler公司); 酶标仪 (美国Thermo公司); 普通梯度PCR仪 (德国Eppendorf公司); ABI7500实时荧光定量PCR仪 (美国Applied Biosystems公司); XW-80A型旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); HH数显恒温水浴锅 (中国金城国胜公司); 台式微量高速离心机 (日本Hitachi Koki Co公司); 微量移液器 (德国Eppendorf公司)。

试剂与材料　环磷酰胺 (批号: WXBC5093V, 纯

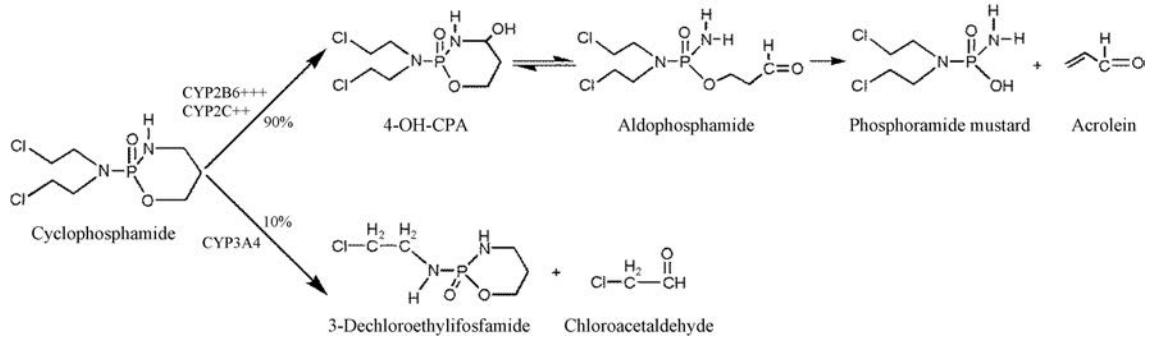

Figure 1　The metabolic pathway of cyclophosphamide[4]

度≥97%), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 兔抗小鼠 GCLC 一抗 (批号: AD03071727) 和兔抗小鼠 GCLM 一抗 (批号: NG25), 爱必信 (上海)生物科技有限公司; 兔抗小鼠 NRF2 一抗 (批号: 0072280202), 美国 ABclonal 公司; 兔抗小鼠 NQO1 一抗 (批号: GR195043-18) 和兔抗小鼠 HO-1 一抗 (批号: GR325245-3), 美国 Abcam 公司; SYBR Premix Ex TaqTM II (批号: AIF1405A) 和 PrimeScript™ RT reagent Kit (批号: AHE3187A), 日本 TaKaRa 公司; MDA 试剂盒 (批号: 20181101) 和 GSH 试剂盒 (批号: 20181031), 南京建成生物工程研究所。

实验动物 SPF 级雄性 BABL/c 小鼠, 8～9 周龄, 体重 22～24 g, 购于广东省医学实验动物中心, 动物生产许可证号为 SCXK (粤) 2016-0029, 使用许可证号为 SCXK (粤) 2016-0112。小鼠于标准实验条件下饲养: 温度 (20～24 ℃), 湿度 (55%～60%), 明暗交替各 12 h, 自由摄取水和食物。动物方案经中山大学实验动物伦理委员会批准。

造模与分组 30 只小鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 实验前适应性饲养 1 周。CPA 加至 0.9% 生理盐水中配制成 20 mg·mL^{-1} 的新鲜溶液。每只小鼠单次腹腔注射 CPA 溶液 200 mg·kg^{-1}。小鼠分别于给药 0、2、6、12 和 24 h 后处死, 收集血样和肝脏组织。取同一部位大致相同的一小块肝组织, 用预冷生理盐水清洗, 并将其固定于 10% 福尔马林做病理切片检查, 其余肝脏组织于液氮中速冻后置−80 ℃保存。

组织病理学检查 肝组织经福尔马林固定后, 包埋于石蜡中, 切片 (厚度约 3 μm), 置 60 ℃烘箱过夜, 用透明剂脱蜡, 依次经无水乙醇及梯度酒精水化、苏木精-伊红染色 (HE) 染色、梯度酒精脱水、透明剂透明及中性树胶封片。使用 LEICA DM5000B 光学显微镜观察肝细胞受损情况。

ALT、AST 水平的检测 CPA 给药 0、2、6、12 和 24 h 后检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活力。按照试剂盒说明书操作, 采用 Beckman Synchron CX5 全自动生化分析仪测定 ALT 和 AST 酶活力。

GSH、MDA 水平的检测 根据试剂盒说明书使用比色法对肝脏组织匀浆液及肝脏线粒体的还原型谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 进行检测, 从而考察肝细胞氧化应激和抗氧化水平的变化。

RT-qPCR 检测 根据 Trizol 试剂操作说明, 从小鼠肝脏组织中提取总 RNA。按照逆转录试剂盒 (Primer Script RT reagent Kit with gDNA eraser) 的说明纯化 RNA 并将其逆转录得到 cDNA。按照实时荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq II) 的说明进行实验, 定量分析目的基因表达水平。引物序列如列表 1 所示。

Table 1 The primer sequence of real-time PCR

Gene	Species	Primer sequence
Gapdh	Mouse	Forward 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'
		Reverse 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'
Nrf2	Mouse	Forward 5'-CTTTAGTCAGCGACAGAAGGAC-3'
		Reverse 5'-AGGCATCTTGTTTGGGAATGTG-3'
Keap1	Mouse	Forward 5'-TCGAAGGCATCCACCCTAAG-3'
		Reverse 5'-CTCGAACCACGCTGTCAATCT-3'
Ho-1	Mouse	Forward 5'-AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA-3'
		Reverse 5'-GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA-3'
Gclm	Mouse	Forward 5'-CTTCGCCTCCGATTGAAGATG-3'
		Reverse 5'-AAAGGCAGTCAAATCTGGTGG-3'
Gclc	Mouse	Forward 5'-CTACCACGCAGTCAAGGACC-3'
		Reverse 5'-CCTCCATTCAGTAACAACTGGAC-3'
Nqo1	Mouse	Forward 5'-GGAGTGACGGCAAACATGACT-3'
		Reverse 5'-TCGATGCACAACTGGGTGAAC-3'

Western blot 检测 参照实验室先前的报道进行 Western blot 检测[16]。简单而言, 提取总蛋白或核蛋白后按照 BCA 法进行蛋白定量。等量的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转印至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入 NRF2、GCLC、GCLM 等一抗抗体于 4 ℃孵育过夜, 加入相应的二抗于室温孵育 1 h, 运用电化学发光法及 X 射线显影技术检测抗体−蛋白复合物。Image J 软件分析蛋白条带强度。

统计学方法 采用 GraphPad Prism 5 软件分析数据, 结果以 Mean ± SD 表示。通过 unpaired Student's t-test 作两组间比较, P<0.05 表示差异有统计学意义。

结果

1 肝组织病理学的动态变化

小鼠给予 CPA 12 h 后, 观察到肝组织中肝细胞广泛的重度水肿, 细胞肿胀, 胞质呈空泡状 (图 2)。在 2、6 和 24 h 均可见肝组织中少量肝细胞轻度水肿, 细胞肿胀, 胞质疏松淡染。上述结果表明, CPA 能造成小鼠肝损伤, 引起肝脏大面积水肿, 部分出现肝细胞核空泡变性, 并呈现时间依赖性, 在 12 h 损伤最为严重, 24 h 有所缓解。

2 ALT、AST 酶活力的动态变化

血清转氨酶 (ALT、AST) 是反映肝细胞损伤和坏死程度的重要指标。小鼠单次注射 CPA 200 mg·kg^{-1} 后, 其血清 ALT、AST 水平逐渐升高 (图 3)。ALT、AST 均在 12 h 达到峰值, 之后则开始下降。在 CPA 所致的肝损伤过程中, ALT、AST 值呈先升高后降低, 逐渐恢复的趋势。

3 肝脏总 GSH 及线粒体 GSH 的动态变化

给予 CPA 后, 小鼠肝脏总 GSH 和线粒体 GSH 水

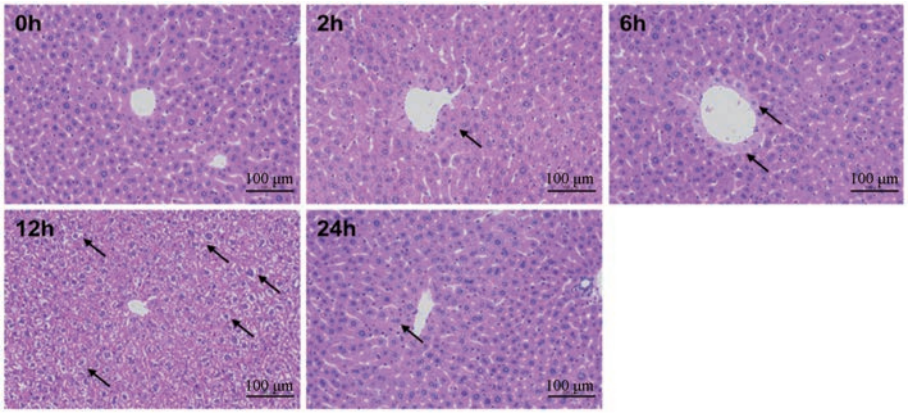

Figure 2　Representative HE-stained liver sections at 0 to 24 h after 200 mg·kg^{-1} cyclophosphamide (CPA) challenge (n = 6, $\bar{x} \pm s$). Hepatic vacuolation of fat type was indicated with arrow

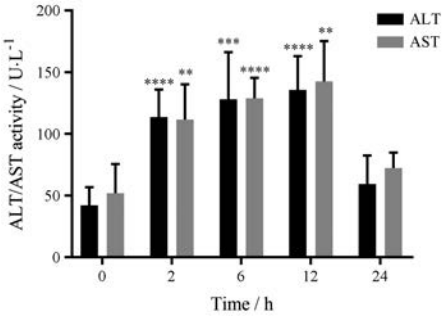

Figure 3　Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities at 0 to 24 h after 200 mg·kg^{-1} CPA challenge (n = 6, $\bar{x} \pm s$). $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001, $^{****}P$<0.000 1 *vs* 0 h

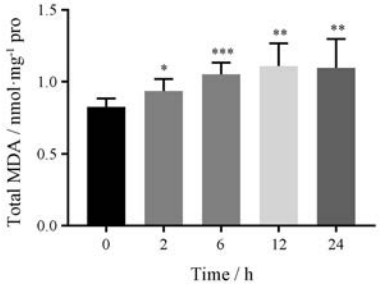

Figure 5　Total liver malondialdehyde (MDA) levels at 0 to 24 h after 200 mg·kg^{-1} CPA challenge (n = 6, $\bar{x} \pm s$). $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001 *vs* 0 h

平显著地降低 (图 4), 这提示 CPA 所致肝损伤的发生过程中肝细胞内源性 GSH 迅速耗竭, 在 6 h 下降至最低值。线粒体 GSH 比肝脏总 GSH 更为敏感, 其在 2 h 已降至最低。随着时间的推移, 肝脏总 GSH 有逐渐恢复的趋势。

4　肝脏脂质过氧化水平的动态变化

MDA 是脂质过氧化的关键指标。肝脏 MDA 含量测定的结果表明 (图 5), 小鼠肝脏 MDA 水平在给予 CPA 后逐渐上升, 在 24 h 依然高于正常水平。从肝脏 MDA 水平变化趋势可以看出在 CPA 所致肝损伤的发生过程中, 氧化应激程度很高, 随着 GSH 的耗竭, 脂质过氧化逐渐加重, MDA 在肝细胞内累积。

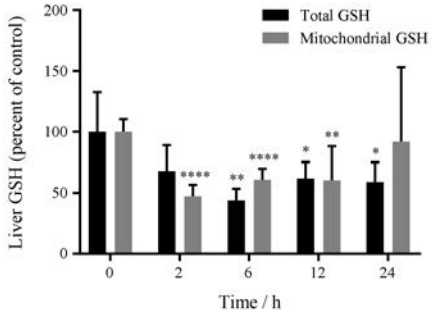

Figure 4　Total liver and mitochondrial glutathione (GSH) levels at 0 to 24 h after 200 mg·kg^{-1} CPA challenge (n = 6, $\bar{x} \pm s$). $^{*}P$< 0.05, $^{**}P$<0.01, $^{****}P$<0.000 1 *vs* 0 h

5　NRF2 通路基因 mRNA 表达的动态变化

小鼠给予 CPA 后肝脏组织的 *Keap1* 基因的 mRNA 表达水平被下调, 6 h 下降到最低值, 随后开始上升, 24 h 逐渐高于正常水平。CPA 可以诱导小鼠肝脏 *Nrf2* 表达, 并在 6 h 出现峰值, *Nrf2* 在后续时间点逐渐降低但仍高于 0 h。此外, NRF2 下游的抗氧化基因和二相代谢酶的 mRNA 表达显示, *Ho-1*、*Gclc* 和 *Gclm* 在给予 CPA 后显著上升, 并在 6 h 达到峰值, 随后逐渐降低。*Nqo1* 表达结果显示在给予 CPA 后 2～12 h 呈上调趋势, 12 h 达到峰值, 24 h 仍高于正常水平 (图 6)。这些结果表明 *Nrf2* 及下游靶基因的 mRNA 在 CPA 产生肝损伤时均被上调, 以抵抗 CPA 所致的氧化应激损伤, 从而促进肝修复。

6　NRF2 通路蛋白表达的动态变化

小鼠给予 CPA 后肝脏 NRF2 和 NQO1 蛋白表达上调, 与 mRNA 的变化一致, 并分别在 6 和 12 h 出现峰值, NRF2 在后续时间点逐渐降低, 但仍高于正常

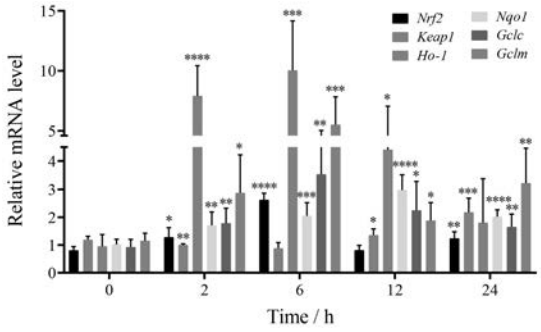

Figure 6 Q-PCR analysis of *Nrf2*, *Keap-1*, *Nqo1*, *Ho-1*, *Gclc*, *Gclm* mRNA expression in CPA-treated mice liver after CPA challenge (n = 6, $\bar{x} \pm s$). $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001, $^{****}P$<0.000 1 *vs* 0 h

水平。NRF2蛋白表达结果显示在CPA肝损伤过程中呈先上调后降低的现象, 在给予CPA后2～6 h呈上调趋势, 12 h开始下降。表明NRF2及下游靶基因被显著上调以抵抗CPA所致的氧化应激性肝损伤, 其中HO-1、NQO1、GCLM蛋白在12 h被显著上调, 而GCLC蛋白在2 h被显著上调; HO-1蛋白表达在12 h达峰值, 在24 h表达显著下调 (图7)。

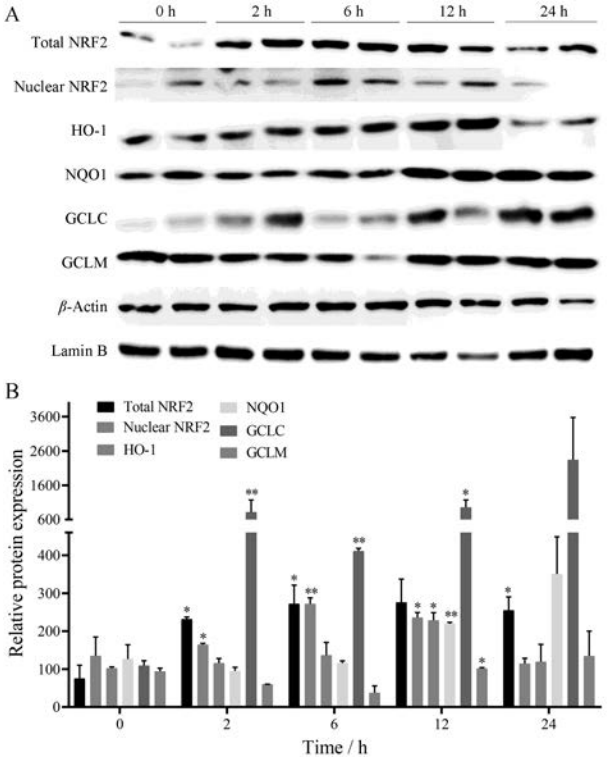

Figure 7 Dynamic regulation of NRF2 signaling pathway was involved in CPA-induced liver injury. (A) Western blot analysis of total NRF2, nuclear NRF2, HO-1, NQO1, GCLC, GCLM, β-actin, Lamin B protein expression in CPA-treated mice liver after CPA challenge. (B) Densitometric analysis of western blots and normalized to β-actin. n = 6, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P$ <0.05, $^{**}P$ < 0.01 *vs* 0 h

讨论

环磷酰胺 (CPA) 具有显著的抗肿瘤疗效和强免疫抑制作用, 预后良好, 因此在临床上被广泛使用, 其主要不良反应是骨髓抑制和生殖毒性。近年来, 研究发现CPA会引发不同程度的肝损伤[17]。相关临床病例报道表明[9,18-25], 大多数患者在第1次服药后造成轻微肝损伤, 而连续第2次服药会导致急性肝炎的发生。如果早期停药, 药源性肝损伤的预后通常较好。但当表现为急性肝损伤时, 可能出现不可逆的暴发性肝衰竭, 导致高死亡率。因此, 了解CPA产生肝损伤的发生过程, 对于早诊断早治疗CPA所致肝损伤具有重要意义。本研究给予小鼠一次性腹腔注射 (200 mg·kg^{-1}) 环磷酰胺溶液, 并分别于不同时间点检测肝功能各项指标, 以充分考察CPA所致肝损伤的动态变化, 并在分子水平探究NRF2通路对CPA所致肝损伤的保护机制。

首先基于血清中ALT、AST动态变化的结果表明CPA在12 h内引发明显的肝损伤。肝细胞中AST、ALT逸出导致其在血液中的水平升高[26]。在2 h血清中ALT、AST较空白组显著升高, 在12 h达到峰值, 24 h下降至接近正常水平, 这表明给予环磷酰胺能造成急性肝损伤, 2～12 h是肝损伤发生的关键时间。研究发现[27]用不同剂量的CPA在小鼠上造模, 剂量为200 mg·kg^{-1}时小鼠肝脏中肝细胞肿胀、血窦充血、肝细胞呈气球样变性、门静脉和中央静脉正常, 未见炎性浸润。同样地, 本文研究结果也表明在给予环磷酰胺2 h后出现明显的肝细胞水肿, 在12 h肝细胞可见广泛的重度水肿、细胞肿胀、胞质呈空泡状变性, 这与血清中AST、ALT变化趋势一致。GSH在保护细胞免受氧化损伤方面起着至关重要的作用, 已有研究表明[28,29], 环磷酰胺的毒性代谢产物丙烯醛能迅速耗竭肝脏GSH, 导致细胞抵抗自由基能力下降, 引起细胞坏死或凋亡[26,30,31]。检测氧化应激指标结果显示, 在给予小鼠环磷酰胺2 h后, 肝脏总GSH和线粒体GSH水平显著降低, 在6 h达到最低值, 直至24 h未能恢复到正常水平。CPA引起的自由基激增可以攻击脂质并导致细胞膜结构和功能的严重改变, 从而引起脂质过氧化[32], MDA是细胞损伤和氧化应激的可靠指标[33]。因此, 进一步检测了肝脏中脂质过氧化代谢产物MDA的含量, 结果表明给予CPA后肝脏中MDA水平在24 h内持续上升。上述结果表明环磷酰胺造成肝脏氧化应激损伤并引起了脂质过氧化。

已有研究表明细胞氧化应激和ROS累积均可激活NRF2, NRF2入核与DNA结合并诱导抗氧化基因的转录[34,35]。进一步检测了小鼠体内抗氧化应激通路

NRF2信号在给予环磷酰胺后的变化情况, 结果发现2 h开始NRF2的基因和蛋白的表达均被上调。此外在6 h细胞核内NRF2表达也在给予CPA后增加, 同时其下游靶基因的表达增加, 逆转GSH耗竭, 清除ROS, 帮助机体抵抗氧化应激损伤。

综上所述, 环磷酰胺给药后, 小鼠在2 h开始出现肝损伤, 在12 h时肝损伤最严重, 24 h后肝损伤有显著改善。氧化应激在CPA所致的肝损伤中具有重要作用, 机体在氧化应激刺激下, 抗氧化通路NRF2被激活, 从而抵抗氧化应激损伤。这些研究结果为CPA所致肝损伤的基础研究提供了科学数据, 为预防和治疗CPA所致肝损伤提供了潜在的用药策略。

References

[1] Jones SE, Collea R, Paul D, et al. Adjuvant docetaxel and cyclophosphamide plus trastuzumab in patients with HER2 -amplified early stage breast cancer: a single-group, open-label, phase 2 study [J]. Lancet Oncol, 2013, 14: 1121-1128.

[2] Geisler CH. Cyclophosphamide for CLL: to be or not CYP2B activated? [J]. Blood, 2013, 122: 4156-4157.

[3] Chen LY, Wang XD, Huang M. Advances in the research of pharmacogenomics of cyclophosphamide [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2014, 49: 971-976.

[4] Zhang J, Tian Q, Zhou SF. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide [J]. Curr Drug Ther, 2006, 1: 55-84.

[5] Xie HJ, Yasar U, Lundgren S, et al. Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation [J]. Pharmacogenomics J, 2003, 3: 53-61.

[6] Ekhart C, Gebretensae A, Rosing H, et al. Simultaneous quantification of cyclophosphamide and its active metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS / MS) [J]. J Chromatogr B, 2007, 854: 345-349.

[7] Lehman TJ, Singh C, Ramanathan A, et al. Prolonged improvement of childhood onset systemic lupus erythematosus following systematic administration of rituximab and cyclophosphamide [J]. Pediatr Rheumatol Online J, 2014, 12: 3.

[8] de Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, et al. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide [J]. Clin Pharmacokinet, 2005, 44: 1135-1164.

[9] Subramaniam SR, Cader RA, Mohd R, et al. Low-dose cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity [J]. Am J Case Rep, 2013, 14: 345-349.

[10] de Jonge ME, Huitema ADR, Beijnen JH, et al. High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy [J]. Br J Cancer, 2006, 94: 1226-1230.

[11] McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, et al. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation [J]. Blood, 2003, 101: 2043-2048.

[12] Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity [J]. J Lipid Res, 2016, 57: 1976-1986.

[13] Ishii T, Itoh K, Takahashi S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 16023-16029.

[14] Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers [J]. Mutat Res, 2004, 555: 133-148.

[15] Min KJ, Kim JH, Jou I, et al. Adenosine induces hemeoxygenase-1 expression in microglia through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor E2-related factor 2 [J]. Glia, 2008, 56: 1028-1037.

[16] Fan X, Chen P, Tan H, et al. Dynamic and coordinated regulation of KEAP1-NRF2-ARE and p53 / p21 signaling pathways is associated with acetaminophen injury responsive liver regeneration [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42: 1532-1539.

[17] Uskudar Cansu D, Oztas E, Yilmaz E, et al. Cyclophosphamide-induced severe acute hepatitis in a rheumatic disease: case-based review [J]. Rheumatol Int, 2019, 39: 377-385.

[18] Snyder LS, Heigh RI, Anderson ML. Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in a patient with Wegener's granulomatosis [J]. Mayo Clin Proc, 1993, 68: 1203-1204.

[19] Pinto N, Ludeman SM, Dolan ME. Drug focus: pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy [J]. Pharmacogenomics, 2009, 10: 1897-1903.

[20] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions [J]. Clin Pharmacol Ther, 1981, 30: 239-245.

[21] Mok CC, Wong WM, Shek TW, et al. Cumulative hepatotoxicity induced by continuous low-dose cyclophosphamide therapy [J]. Am J Gastroenterol, 2000, 95: 845-846.

[22] Martinez-Gabarron M, Enriquez R, Sirvent AE, et al. Hepatotoxicity following cyclophosphamide treatment in a patient with MPO-ANCA vasculitis [J]. Nefrologia, 2011, 31: 496-498.

[23] Gustafsson LL, Eriksson LS, Dahl ML, et al. Cyclophosphamide-induced acute liver failure requiring transplantation in a patient with genetically deficient debrisoquine metabolism: a causal relationship? [J]. J Intern Med, 1996, 240: 311-314.

[24] Cleland BD, Pokorny CS. Cyclophosphamide related hepatotoxicity [J]. Aust N Z J Med, 1993, 23: 408.

[25] Bacon AM, Rosenberg SA. Cyclophosphamide hepatotoxicity in a patient with systemic lupus erythematosus [J]. Ann Intern Med, 1982, 97: 62-63.

[26] Meister A, Anderson ME. Glutathione [J]. Annu Rev Biochem, 1983, 52: 711-760.

[27] Bhat N, Kalthur SG, Padmashali S, et al. Toxic effects of

different doses of cyclophosphamide on liver and kidney tissue in swiss albino mice: a histopathological study [J]. Ethiop J Health Sci, 2018, 28: 711-716.

[28] Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity [J]. Cancer Treat Rev, 1997, 23: 209-240.

[29] Bhatia K, Kaur M, Atif F, et al. Aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and cyclophosphamide in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44: 1744-1750.

[30] Srivastava A, Shivanandappa T. Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats [J]. Food Chem, 2010, 118: 411-417.

[31] Anderstam B, Vaca C, Harms-Ringdahl M. Lipid peroxide levels in a murine adenocarcinoma exposed to hyperthermia: the role of glutathione depletion [J]. Radiat Res, 1992, 132: 296-300.

[32] Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem [J]. Drugs, 1991, 42: 781-795.

[33] Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage [J]. Clin Chem, 1995, 41: 1819-1828.

[34] Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1 [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46: 1279-1287.

[35] Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, et al. The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity [J]. Handb Exp Pharmacol, 2010, 196: 233-266.