

· 基础研究 ·

莱菔硫烷对乳鼠心肌细胞缺血缺氧损伤的保护作用

罗则佳¹, 陈 盛^{2△}, 何念海², 陈曙光³

(1. 成都军区总医院医务部, 成都 610083; 第三军医大学西南医院; 2. 儿科; 3. 皮肤科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨莱菔硫烷(SFN)对乳鼠心肌细胞缺血缺氧损伤的保护作用及可能机制。方法 实验随机分为 4 组: 正常对照组、模型组、SFN 低剂量组(10 μmol/L)、SFN 高剂量组(30 μmol/L)。建立心肌细胞缺血缺氧损伤模型, 予以 SFN 干预 6 h 后, AnnexinV 荧光染色检测心肌细胞凋亡, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量, 蛋白印迹法(Western Blot)检测心肌细胞核因子-κB(NF-κB)水平。结果 SFN 减少缺血缺氧心肌细胞的凋亡, 减少 LDH 释放, 降低 MDA 水平, 增加 SOD 水平, 心肌细胞 NF-κB 蛋白表达下降, SFN 高剂量组则更明显。结论 SFN 对心肌细胞缺血缺氧损伤具有保护作用, 作用机制与增强心肌细胞抗氧化能力、抑制 NF-κB 生成有关。

关键词: 肌细胞, 心脏; 缺血缺氧; 抗氧化; 莱菔硫烷

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.05.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)05-0523-03

Protective effects of sulforaphane on cardiomyocyte injury induced by ischemia and hypoxia in neonate rat

Luo Zejia¹, Chen Sheng^{2△}, He Nianhai², Chen Shuguang³

(1. Departments of Medical Administration, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan 610083, China; 2. Department of Pediatric, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the protective effects of sulforaphane on myocardial cells injury induced by ischemia-hypoxia in neonatal rat and its possible mechanism. **Methods** Cultured neonatal rat cardiomyocytes were divided randomly into four groups: control group, model group, low dose of SFN group(10 μmol/L), and high dose of SFN group(30 μmol/L). Cardiomyocytes model was established in vitro. After treated with SFN for 6 hours, cardiomyocyte apoptosis was detected by AnnexinV. The contents of LDH, MDA, and SOD were tested by ELISA. The expression of NF-κB protein in cardiomyocytes was determined by Western blot. **Results** After treatment by SFN, the apoptosis cells reduced, the contents of LDH and MDA decreased, and SOD content increased significantly. The level of NF-κB expression decreased, which was more significant in high concentrations. **Conclusion** SFN can protect myocardial cells from anoxia and ischemic injury, and the mechanism may relate to anti-oxidation effects of SFN and inhibition of NF-κB.

Key words: myocytes, cardiac; ischemia/hypoxia; antioxidation; sulforaphane

心肌细胞缺血缺氧是导致包括心肌梗死、心绞痛、缺血性心脏病等在内多种心脏疾病共同的病理基础, 它不仅可致心肌代谢紊乱、能量供应不足, 严重时还可以引起心肌收缩功能下降、血液输出量降低, 继而导致包括心脏在内的多脏器功能损伤, 容易形成恶性循环^[1]。因此, 寻找安全有效的药物防止缺血缺氧心肌损伤, 是医务工作者所面临的重要任务之一。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是十字花科植物中含有的一种异硫氰酸盐, 自 1992 年被发现具有化学保护作用以来, 逐渐成为国内外研究的热点。研究表明, SFN 能激活核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2), 通过激活 Nrf2-抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)通路调节多种炎症因子的释放, 减轻炎症反应达到抗氧化的作用^[2]。最新研究表明它可对多种组织的氧化损伤起到保护作用, 如保护氧化物对肺泡上皮细胞的损伤^[3], 保护血脑屏障氧化应激损伤等^[4]。除此之外, SFN 还具有抗肿瘤、免疫调节、抗菌等药理作用^[5], 是否对缺血缺氧心肌细胞具有保护作用, 国内外少见相关报道。本文首先建立了心肌细胞缺血缺氧损伤体外模型, 考察 SFN 对缺血缺氧心肌细胞的作用, 并进一步探讨了可能存在的机制, 为临床防治缺血缺氧心血管疾病提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器 实验动物 SD 乳鼠由第三军医大学动物实验中心提供, DMEM 培养基(Gibco 公司, 美国), DMEM 无糖培养基(Gibco 公司, 美国), 标准胎牛血清(Hyclone 公司, 美国), 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)(Sigma 公司, 美国), SFN(Sigma 公司, 美国), AnnexinV 凋亡试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司), 乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 兔抗人核因子-κB(NF-κB)多克隆抗体(北京中山生物公司), 电泳仪(Bio-Rad 公司, 美国), 激光扫描共聚焦成像系统(Leica 公司, 德国), 比浊仪(Siemens 公司, 德国)。

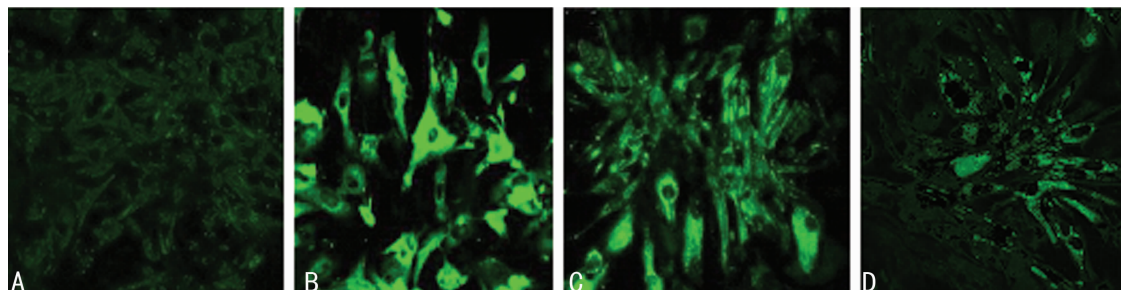
1.2 方法

1.2.1 心肌细胞原代分离与培养^[6] 取 1~2 d 新生的 SD 大鼠, 无菌条件下取出乳鼠心脏, 剥离心房及大血管组织, 迅速置于预冷的不含 Ca²⁺、Mg²⁺的磷酸缓冲液(PBS)中, 反复冲洗 3 次, 将其剪成碎块后放入锥形瓶中, 加入 0.125% 的胰蛋白酶和 0.08% 的胶原酶 I 消化。收集消化后的上清液, 加入含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 终止消化酶的作用。细胞悬液过滤后, 上清液离心 10 min(850 r/min), 弃上清液, 用 DMEM 培养基吹散沉淀细胞, 接种培养瓶中, CO₂ 培养箱(37 ℃,

表 1 各组 LDH、MDA、SOD 和 NF- κ B 检测结果($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	平均荧光强度	LDH(U/L)	MDA(kU/L)	SOD(μ mol/L)	NF- κ B
正常对照组	12.47 \pm 2.14 [#] ▲	587.60 \pm 86.44 ^{**} ▲	7.25 \pm 1.40 ^{**} ▲	98.42 \pm 7.44 ^{**} ▲	0.17 \pm 0.07 ^{**} ▲
模型组	65.35 \pm 6.76	1870.43 \pm 114.58	25.72 \pm 2.38	67.70 \pm 6.52	0.55 \pm 0.12
SFN 低剂量组	45.20 \pm 4.85 ^{**}	1176.38 \pm 83.57 ^{**}	14.26 \pm 0.87 ^{**}	78.17 \pm 5.45 ^{**}	0.36 \pm 0.11 ^{**}
SFN 高剂量组	32.69 \pm 3.66 ^{**} ▲	785.60 \pm 55.34 ^{**} ▲	9.42 \pm 0.59 ^{**} ▲	92.84 \pm 8.30 ^{**} ▲	0.22 \pm 0.08 ^{**} ▲
F	180.609	334.376	249.105	31.788	24.520

[#]: $P < 0.05$, ^{**}: $P < 0.01$, 与模型组比较; ^Δ: $P < 0.05$, [▲]: $P < 0.01$, 与 SFN 低剂量组比较。



A: 正常对照组; B: 模型组; C: SFN 低剂量组; D: SFN 高剂量组。

图 1 AnnexinV 荧光染色检测心肌细胞凋亡(荧光探针 $\times 400$)

5% CO₂, 95% 空气) 中静置培养 85 min, 将培养液转移至 6 孔培养板, CO₂ 培养箱中继续培养, 做激光共聚焦的将细胞单层接种于 20 cm \times 20 cm 的盖玻片上, 24 h 隔天换培养液, 前 3 天加入 0.1 mmol/L BrdU 抑制成纤维细胞生长。取培养 72 h 的单层细胞进行实验。

1.2.2 建立心肌细胞缺氧损伤模型^[7] 模拟缺氧: 将密闭容器作为缺氧培养装置, 将密闭容器内充入已制备好的含 95% N₂、5% CO₂ 的气体, 充气 10 min 后, 同时关闭进气口和出气口, 使容器内氧终浓度为 1%。模拟缺血: 缺氧刺激前更换培养液为无糖的 DMEM 培养液。

1.2.3 SFN 的干预 实验分组: 实验随机分为 4 组: 正常对照组、模型组、SFN 低剂量组、SFN 高剂量组, 每组 8 只。未干预前作为空白对照组; 模型组放入氧终浓度为 1% 密闭容器, 同时将培养液更换为无糖的 DMEM 培养液; SFN 低剂量组按模型组方法并同时加入含终浓度为 10 μ mol/L 的 SFN; SFN 高剂量组则加入终浓度为 30 μ mol/L 的 SFN。各实验组于干预后 6 h 收集相应样本进行检测。

1.2.4 AnnexinV 荧光染色检测心肌细胞凋亡 培养细胞经 PBS 漂洗后加入 AnnexinV 结合液(10 mmol/L HEPES, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, pH7.4), AnnexinV 与结合液比例为 1:25, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min 后, PBS 漂洗 3 次, 共约 5 min 后, 激光共聚焦显微镜观察(激发光 543 nm, 检测光 568 nm)。用荧光强度代表细胞凋亡的程度。

1.2.5 LDH、MDA 和 SOD 的检测 LDH、MDA 和 SOD 的检测均按检测试剂盒说明书进行。LDH 活力按下列公式计算: LDH 活力=(测定管-测定空白管)/(标准管-标准空白管) \times 2 000 U/L。

1.2.6 Western-Blot 检测 NF- κ B 蛋白 取 50 μ g 核蛋白, 先用电泳仪进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 让蛋白分离。然后将分离好的 PAGE 胶转印至 PVDF 膜上, 用封闭液 1.5 h, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下加入兔抗人 NF- κ B 多克隆抗体(1:500)孵育过夜, 再置入加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1:5 000), 每平方厘米膜加 0.1 mL, 封好塑料袋, 在室温下轻轻振荡 1 h, 将配制好的发光液均匀滴在 PVDF 膜上, 在 Gel Doc2000 凝胶成像系统上显影、分析、摄像处理。采用 Quantity One 软件分析各条带光

密度值, 内参照采用 GAPDH, 蛋白含量以 NF- κ B 蛋白和 GAPDH 的平均光密度(OD) \times 面积(mm²)的比值来表示。

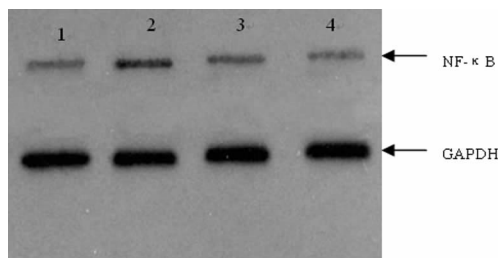
1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间的均数比较采用一元方差分析(One-Way ANOVA), 均数之间的多重比较采用 Scheffe 方法(方差齐)或者 Tamhane 方法(方差不齐)进行。

2 结 果

2.1 各组心肌细胞凋亡检测结果 正常心肌细胞未见明显凋亡, AnnexinV 染色荧光强度低(12.47 \pm 2.14); 缺血缺氧 6 h 后, 模型组心肌细胞凋亡明显增加, 荧光强度明显增强(65.35 \pm 6.76, $P < 0.01$); 使用 SFN 干预后, 凋亡心肌细胞较模型组显著减少($P < 0.05$), 荧光强度有明显减弱, 高浓度组减弱更明显($P < 0.01$)。表明 SFN 能减少由缺血缺氧导致的心肌细胞的凋亡, 对心肌细胞具有保护作用。见表 1、图 1。

2.2 各组 LDH、MDA、SOD 和 NF- κ B 检测结果 心肌细胞缺血缺氧后, LDH 明显升高, 使用不同浓度的 SFN 均能抑制 LDH 的释放, 高浓度组作用更明显($P < 0.01$); 缺血缺氧心肌细胞 MDA 产生明显增多, SFN 能抑制 MDA 的产生, 高浓度组作用更明显($P < 0.01$); SFN 能增加抗氧化酶 SOD 水平, 高浓度组较低浓度组更明显($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 各组 NF- κ B 蛋白检测结果 正常对照组心肌细胞表达低水平的 NF- κ B, 模型组 NF- κ B 显著升高, 经 SFN 干预后, NF- κ B 表达下降, 高浓度组较低浓度下降更明显($P < 0.05$)。见表 1、图 2。



1: 空白对照组; 2: 模型组; 3: SFN 低剂量组; 4: SFN 高剂量组。

图 2 Western-Blot 检测各组心肌细胞 NF- κ B 的表达

3 讨 论

缺血缺氧性心脏病是一种严重的心血管系统疾病, 不仅导

致心功能不全,还可导致全身其他组织器官的损害。本实验首先建立了缺血缺氧心肌受损体外模型,研究了 SFN 对缺血缺氧受损心肌细胞的作用。研究表明,SFN 抑制了由缺血缺氧导致的心肌细胞的凋亡和 LDH 释放,并呈现出一定的剂量依赖性。凋亡指机体细胞通过胞内基因及其产物的调控而发生的一种程序性细胞死亡,缺血缺氧心肌细胞的凋亡受到了多种途径调控,包括腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号转导途径、内质网应激途径、线粒体途径等。除此之外,NF- κ B 因子的激活也会诱导缺氧心肌细胞的凋亡。通过抑制 NF- κ B 的表达可以抑制血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、心肌细胞的凋亡^[8-10]。本研究发现 SFN 对缺血缺氧心肌细胞凋亡的抑制作用推测与对 NF- κ B 抑制作用有关。LDH 在正常心肌细胞只有少许的漏出,当其受到损伤时,LDH 会大量从细胞中泄漏出来,造成心肌细胞代谢紊乱,并进一步加重心肌损伤,其水平与心肌受损程度相一致。本实验用 SFN 干预后,LDH 水平降低,表明 SFN 对缺血缺氧心肌细胞具有保护作用。

缺血缺氧条件下,细胞内自由基的产生系统和清除系统的平衡遭到破坏,过氧化物(如 MDA、H₂O₂ 等)产生增多,氧自由基清除剂(如 SOD、GSH 等)则减少。本研究考察了 SFN 对缺血缺氧心肌细胞 MDA、SOD 表达的影响,研究发现,SFN 能使心肌细胞缺血缺氧损伤后上清液中的 MDA 含量明显降低,而 SOD 活性则显著升高,表明 SFN 具有较强的抗氧化能力,能对缺血缺氧心肌细胞起到保护作用。SFN 是 Nrf2 重要的激活剂,它能通过修饰作用使 Nrf2 与 Keap1 解耦连,Nrf2 与 ARE 结合,正向调控 II 相解毒酶的表达,达到清除自由基、稳定细胞膜、减少 Ca²⁺ 内流和抑制细胞凋亡的作用^[11]。其抑制细胞凋亡的作用与作者前面的研究结果相一致。

作者还进一步研究了 SFN 对 NF- κ B 蛋白表达的影响,发现 SFN 能降低缺血缺氧心肌细胞 NF- κ B 表达水平,高浓度组更明显。NF- κ B 对多种炎症因子的释放起调控作用,如一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶 2(COX2)、IL-1 β 和 TNF- α 等。SFN 抑制由 NF- κ B 介导的炎症因子的过度释放有利于减轻对细胞损伤^[8,12]。除此之外,NF- κ B 亚单位 p65 可竞争性地与共激活因子 CREB 结合蛋白(CBP)结合,导致 Nrf2 不能与 CBP 结合,从而抑制了由 ARE 介导的基因转录^[13]。与此同时,某些 Nrf2 下游因子也可抑制 NF- κ B 的转录能力,如血红素加氧酶-1(HO-1)、NQO1、硫氧还蛋白(TRX)等^[14]。由此可见,NF- κ B 与 Nrf2 之间存在相互作用、相互影响的关系。SFN 对缺血缺氧心肌细胞保护作用一方面与激活 Nrf2-ARE 信号通路、增强抗氧化作用有关,另一方面是通过直接或间接抑制 NF- κ B 的表达来发挥作用。

总之,本研究结果表明,SFN 对缺血缺氧心肌细胞具有强大的保护作用,可作为治疗缺血缺氧心肌损伤的临床药物,但其更深入的作用机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Cohn JN, Bristow MR, Chien KR, et al. Report of the national heart, lung, and blood institute special emphasis panel on heart failure research[J]. *Circulation*, 1997, 95(4):766-770.

[2] Chen YT, Shi D, Yang D, et al. Antioxidant sulforaphane and sensitizer trinitrobenzene sulfonate induce carboxyl-

terase-1 through a novel element transactivated by nuclear factor-E2 related factor-2[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(6):864-871.

- [3] Zheng Y, Tao S, Lian F, et al. Sulforaphane prevents pulmonary damage in response to inhaled arsenic by activating the Nrf2-defense response[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 265(3):292-299.
- [4] Xiang J, Alesi GN, Zhou N, et al. Protective effects of isothiocyanates on blood-CSF barrier disruption induced by oxidative stress[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012, 303(1):1-7.
- [5] 陈盛,何念海. 莱菔硫烷的药理研究进展[J]. *重庆医学*, 2008, 37(6):644-646.
- [6] 张琳,李东野,王志荣,等. 新生大鼠心肌细胞原代培养方法的改良[J]. *徐州医学院学报*, 2008, 28(5):343-345.
- [7] Chlopčikova S, Psotova J, Miletova P. Neonatal rat cardiomyocytes- a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart[J]. *Biomed Pap Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2001, 145(2):49-55.
- [8] Kivelä AM, Mäkinen PI, Jyrkkänen HK, et al. Sulforaphane inhibits endothelial lipase expression through NF- κ B in endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(1):122-128.
- [9] Kim BO, Moon EY, Rhee DK, et al. Sulforaphane suppresses vascular adhesion molecule-1 expression in TNF- α -stimulated mouse vascular smooth muscle cells; involvement of the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways[J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 56(3/4):131-141.
- [10] Yeh CH, Chen TP, Lee CH, et al. Cardioplegia-induced cardiac arrest under cardiopulmonary bypass decreased nitric oxide production which induced cardiomyocytic apoptosis via nuclear factor κ B activation[J]. *Shock*, 2007, 27(4):422-428.
- [11] Myzak MC, Dashwood RH. Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1[J]. *Cancer Lett*, 2006, 33(2):208-218.
- [12] Song MY, Kim EK, Moon WS, et al. Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced beta-cell damage by suppressing the NF- κ B pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 235(1):57-67.
- [13] Ziady AG, Sokolow A, Shank S, et al. Interaction with CREB binding protein modulates the activities of Nrf2 and NF- κ B in cystic fibrosis airway epithelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(11):1221-1231.
- [14] Mukherjee S, Gangopadhyay H, Das DK. Broccoli; a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily[J]. *Agric Food Chem*, 2008, 56(2):609-617.