

莱菔硫烷对 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

徐 涛 伊 雪 邬鹏宇 王 帅 王耕银 高木火 高毅哲 赖 冬 李占清

【摘要】 目的:探讨莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)对 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。 方法:H9C2 心肌细胞随机分为 3 组:正常对照组、缺氧/复氧组(H/R 组)和 SFN 预处理组(10 μ mol/L SFN 预处理细胞 12 h 后,进行缺氧/复氧处理)。采用倒置显微镜观察各组细胞形态及凋亡程度,CCK8 法检测各组 H9C2 心肌细胞存活率,Western blot 法检测血红素氧化酶 1(HO-1)、醌氧化还原酶 1(NQO1)、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平。 结果:与正常对照组相比,H/R 组和 SFN 预处理组心肌细胞存活率均降低(P 均 <0.01),HO-1、NQO1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平及 Bcl-2/Bax 均升高(P 均 <0.01)。与 H/R 组相比,SFN 预处理组的细胞生长状态较好,细胞存活率明显提高[(76.00 \pm 0.52)%对(55.73 \pm 0.43)%, $P<0.01$],HO-1(3.24 \pm 0.01 对 1.86 \pm 0.01, $P<0.01$)、NQO1(1.67 \pm 0.01 对 0.95 \pm 0.01, $P<0.01$)和 Bcl-2(0.70 \pm 0.00 对 0.48 \pm 0.01, $P<0.01$)蛋白表达水平及 Bcl-2/Bax(1.22 \pm 0.01 对 0.56 \pm 0.00, $P<0.01$)均明显升高,Bax 蛋白表达水平明显降低(0.57 \pm 0.00 对 0.85 \pm 0.01, $P<0.01$)。 结论:SFN 对 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤有保护作用,可能与促进 HO-1、NQO1、Bcl-2 蛋白表达,抑制 Bax 蛋白表达有关。

【关键词】 莱菔硫烷;心肌细胞;缺氧/复氧损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.01.006

Protective effects of sulforaphane on hypoxia-reoxygenation injury of H9C2 myocardial cells XU Tao¹, YI Xue², WU Pengyu¹, WANG Shuai¹, WANG Gengyin¹, GAO Muhuo³, GAO Yizhe³, LAI Dong³, LI Zhanqing³. 1. Department of Cardiothoracic Surgery, The Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Hebei 063000; 2. College of Basic Medical Science of Xiamen Medical College, Fujian 361000; 3. The Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Fujian 361000, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the protective effects of sulforaphane (SFN) on hypoxia-reoxygenation (H/R) injury of myocardial cells. **Methods:** H9C2 cells were randomly divided into 3 groups: Normal control group, H/R group (cells subjected to hypoxia-reoxygenation) and SFN pretreatment group (after pretreatment by 10 μ mol/L SFN for 12 h, hypoxia-reoxygenation was performed). The cell morphology and the degree of apoptosis were observed by inverted microscope. The survival rate of H9C2 cells in each group was detected by CCK8 method, and the protein expressions of HO-1, NQO1, Bcl-2 and Bax was detected by western blot. **Results:** Compared with the normal control group, the survival rates of cells in H/R group and SFN pretreatment group were significantly

基金项目:福建省自然科学基金(2016D014);福建省医学创新课题(2015-CXB-47)

作者单位:063000 唐山,华北理工大学附属医院胸心外科(徐 涛,邬鹏宇,王 帅,王耕银);361000 厦门医学院基础医学院(伊 雪);361000 厦门医学院附属医院(高木火,高毅哲,赖 冬,李占清)

通信作者:李占清,Email:15131552265@163.com

decreased (all $P < 0.05$), and the protein expressions of HO-1, NQO1, Bcl-2 and Bax, and the Bcl-2/Bax were increased (all $P < 0.05$). The growth of cells in SFN pretreatment group were better than that in H/R group. The survival rate of cells in SFN pretreatment group was significantly increased compared with the H/R group $[(76.00 \pm 0.52)\% \text{ vs. } (55.73 \pm 0.43)\%, P < 0.01]$. The protein expressions of HO-1 ($3.24 \pm 0.01 \text{ vs. } 1.86 \pm 0.01, P < 0.01$), NQO1 ($1.67 \pm 0.01 \text{ vs. } 0.95 \pm 0.01, P < 0.01$) and Bcl-2 ($0.70 \pm 0.00 \text{ vs. } 0.48 \pm 0.01, P < 0.01$), and the Bcl-2/Bax ($1.22 \pm 0.01 \text{ vs. } 0.56 \pm 0.00, P < 0.01$) were increased, while the protein expressions of Bax were significantly decreased ($0.57 \pm 0.00 \text{ vs. } 0.85 \pm 0.01; P < 0.01$) in SFN pretreatment group compared with the H/R group.

Conclusion: SFN has protective effects on hypoxia-reoxygenation injury of H9C2 myocardial cells, which may be related to the promotion of HO-1, NQO-1 and Bcl-2 protein expression and the inhibition of Bax protein expression.

【Key words】 Sulforaphane; Myocardial cells; Hypoxia-reoxygenation injury

心肌细胞凋亡、坏死是造成心肌缺血再灌注损伤(IRI)的重要机制^[1]。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是一种异硫氰酸盐,主要来源于十字花科类植物,具有抗氧化^[2]、抗凋亡、抗炎症和清除氧自由基^[3-4]等多种生物学功能,可能与 SFN 能够诱导多种细胞保护蛋白有关,如血红素氧化酶 1(HO-1)、醌氧化还原酶 1(NQO1)、 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)和谷胱甘肽还原酶(GR)等^[5]。研究发现, SFN 通过抑制细胞凋亡实现对离体心脏 IRI 的保护作用^[6]。我们课题组前期初步证实 SFN 对心脏移植中 IRI 有保护作用^[7-8],但未在细胞水平进行研究。本实验通过建立 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤模型^[9],探讨 SFN 的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

H9C2 心肌细胞株由华北理工大学基础医学院提供。SFN(混悬,纯度 $\geq 98\%$)购自美国 LKT Laboratory 公司, CCK 试剂盒购自北京庄盟生物有限公司,兔抗大鼠 β -actin 购自美国 Affinity 公司,兔抗大鼠 HO-1 多克隆抗体、兔抗大鼠 NQO1 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗大鼠 Bax 多克隆抗体购自美国 GeneTex 公司,辣根过氧化物酶(HRP)羊抗兔 IgG 购自美国 KPL 公司。

1.2 H9C2 心肌细胞的培养及分组

H9C2 心肌细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 2~3 d 传代 1 次,将细胞随机分组。正常对照组: H9C2 心肌细胞常规培养; 缺氧/复氧组(H/R 组): 常规细胞培养液换为 D-hanks 液后,将 H9C2 心肌细胞置于缺氧盒中,往缺氧盒中通入 95% N₂、

5% CO₂ 30 min 后密封,再将缺氧盒整体放入 37℃ 培养箱中, 10 h 后将 D-hanks 液换为常规细胞培养液,置于 37℃、5% CO₂ 常规细胞培养箱中继续培养 4 h; SFN 预处理组: 将细胞于 SFN 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液中培养 12 h,后处理同 H/R 组。

1.3 倒置显微镜下观察 H9C2 心肌细胞形态

倒置显微镜下不同倍数、随机视野内观察各组细胞生长状态、形态、细胞存活及凋亡情况。

1.4 CCK-8 (cell counting kit-8) 法检测细胞存活率

将生长状态良好的 H9C2 心肌细胞用胰酶消化计数后,细胞浓度调整至 $4 \times 10^4/\text{mL}$,按每孔 100 μL 接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔。预培养 5 h 后,吸弃各孔培养基,正常对照组和 H/R 组加入 100 μL 常规培养基, SFN 预处理组加入 100 μL SFN 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液,共同培养 12 h 后,再将各组进行相应处理,处理结束后每孔加入 10 μL CCK-8 液,继续培养 2 h,酶标仪 450 nm 处测量吸光度(A)值。细胞存活率 = $[(A_{\text{处理孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{正常对照孔}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$ (空白孔中含常规培养基、CCK-8 液)。

1.5 Western blot 法检测 HO-1、NQO1、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白并定量,凝胶电泳后电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。加入一抗(HO-1、NQO1、Bcl-2、Bax 抗体均为 1 : 1 000, β -actin 1 : 1 500), 4℃ 孵育过夜,洗膜后加入二抗(HRP 羊抗兔 IgG 1 : 3 000),摇床室温孵育 1 h,洗膜后用 ECL 液进行曝光显影, Bio-Rad 成像分析系统进行图像采集及分析,以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 灰度值的比值代表目的蛋白相对表达水平。

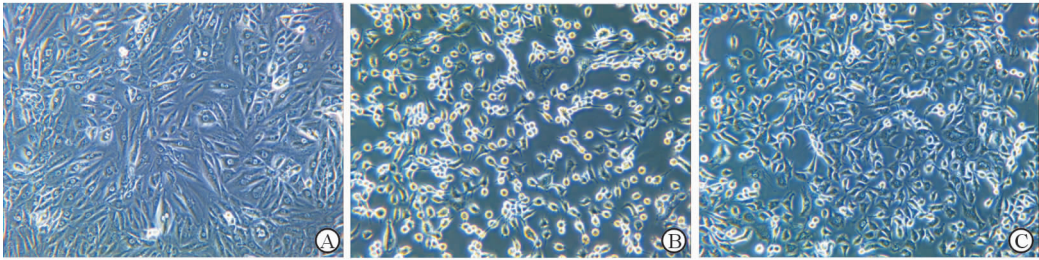
1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。实验数据均采用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFN 对缺氧/复氧损伤心肌细胞形态学的影响
倒置显微镜下观察,正常对照组细胞生长状态

良好,细胞呈梭形,细胞核呈圆形且清晰可见,细胞膜平滑;与正常对照组相比,H/R 组心肌细胞呈现明显的凋亡特征,细胞变圆、皱缩,圆形漂浮细胞达 50%左右,细胞核固缩或呈碎裂状改变,细胞膜虽完整但变形褶皱严重,胞浆浓缩;与 H/R 组相比,SFN 预处理组心肌细胞生长状态较好,凋亡较轻,圆形漂浮细胞在 25%左右。见图 1。



注:A 为正常对照组;B 为 H/R 组;C 为 SFN 预处理组

图 1 各组心肌细胞形态

2.2 SFN 对缺氧/复氧损伤心肌细胞存活率的影响
与正常对照组相比,H/R 组和 SFN 预处理组心肌细胞存活率均降低(P 均 <0.01);与 H/R 组相比,SFN 预处理组心肌细胞存活率明显提高($P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组心肌细胞存活率

组别	细胞存活率/%
正常对照组	99.97±0.46
H/R 组	55.73±0.43 ⁽¹⁾
SFN 预处理组	76.00±0.52 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与正常对照组比较,⁽¹⁾ $P<0.01$;与 H/R 组比较,⁽²⁾ $P<0.01$

2.3 SFN 对缺氧/复氧损伤心肌细胞 HO-1、NQO1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

与正常对照组相比,H/R 组和 SFN 预处理组心肌细胞的 HO-1、NQO1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

水平及 Bcl-2/Bax 均升高(P 均 <0.01);与 H/R 组相比,SFN 预处理组心肌细胞的 HO-1、NQO1 和 Bcl-2 蛋白表达水平及 Bcl-2/Bax 明显升高($P<0.01$),而 Bax 蛋白表达水平则明显降低($P<0.01$)。见图 2、表 2。

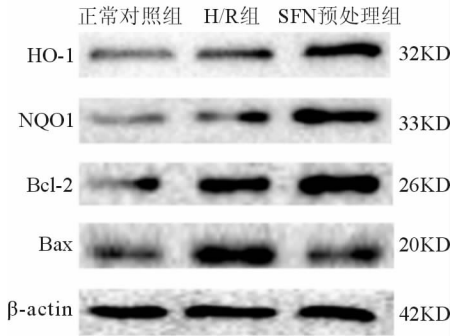


图 2 各组心肌细胞 HO-1、NQO1、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

表 2 各组心肌细胞 HO-1、NQO1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平的比较

组别	HO-1	NQO1	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
正常对照组	1.44±0.02	0.72±0.00	0.22±0.00	0.52±0.01	0.42±0.01
H/R 组	1.86±0.01 ⁽¹⁾	0.95±0.01 ⁽¹⁾	0.48±0.01 ⁽¹⁾	0.85±0.01 ⁽¹⁾	0.56±0.00 ⁽¹⁾
SFN 预处理组	3.24±0.01 ⁽¹⁾⁽²⁾	1.67±0.01 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.70±0.00 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.57±0.00 ⁽¹⁾⁽²⁾	1.22±0.01 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与正常对照组比较,⁽¹⁾ $P<0.01$;与 H/R 组比较,⁽²⁾ $P<0.01$

3 讨论

与其他异硫氰酸盐类似,SFN 不具有直接的抗氧化作用,而是通过激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)-抗氧化反应元件(ARE)信号通路,使 Nrf2

活化并转入细胞核内,与 ARE 基因相结合,诱导内源性Ⅱ相酶、抗氧化酶和解毒酶的表达,清除缺血再灌注等条件下产生的活性氧自由基^[5],减轻 IRI。HO-1 是血红素分解代谢的关键限速酶,可将血红

素降解为一氧化碳(CO)、胆绿素和游离铁离子,这些产物可明显减少一氧化氮合酶(iNOS)、前列腺素E2(PGE2)、活性氧自由基、环氧合酶-2(COX-2)等物质的产生,并有效对抗细胞内游离铁的蓄积,进而起到减轻炎症反应和对抗细胞凋亡的作用^[10]。NQO1 属黄素蛋白酶,其不仅能够降解生成活性氧自由基所必须的醌类物质及衍生物,并且能够催化胞内双电子还原反应。心肌发生 IRI 时,HO-1 和 NQO1 对各种代谢引起的氧化应激反应具有保护作用^[11-12]。Bcl-2 是最早发现的具有抗凋亡作用的蛋白,广泛存在于线粒体内膜等处,能够抑制多种因素导致的细胞凋亡^[13]。心肌发生 IRI 时,Bax 蛋白被激活,与 Bcl-2 蛋白在线粒体内膜处形成异源二聚体,进而抑制 Bcl-2 蛋白活性,产生促凋亡作用^[14]。本实验通过建立 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤模型,发现经 SFN 预处理后,心肌细胞凋亡明显减少,细胞存活率明显提高,SFN 显著降低了心肌细胞的缺氧/复氧损伤。其可能的机制为 SFN 诱导 HO-1、NQO1 蛋白表达,同时上调 Bcl-2 蛋白表达,抑制 Bax 蛋白表达,提高 Bcl-2 与 Bax 蛋白的比值。SFN 抗氧化、抗凋亡的具体机制尚需进一步研究,本实验只选择了 SFN 10 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度和 12 h 的预处理时间,没有考虑药物剂量和处理时间对 SFN 保护作用的影响,后续研究需完善。

参 考 文 献

- [1] Toldo S, Breckenridge DG, Mezzaroma E, et al. Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in the mouse[J]. J Am Heart Assoc, 2012, 1(5): e002360.
- [2] Piao CS, Gao S, Lee GH, et al. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K (ATP) channels[J]. Pharmacol Res, 2010, 61(4):342-348.
- [3] Leoncini E, Malaguti M, Angeloni C, et al. Cruciferous vegetable phytochemical sulforaphane affects phase II enzyme expression and activity in rat cardiomyocytes through modulation of Akt signaling pathway[J]. J Food Sci, 2011, 76(7):H175-181.
- [4] Lee YJ, Lee SH. Sulforaphane induces antioxidative and

- antiproliferative responses by generating reactive oxygen species in human bronchial epithelial BEAS-2B cells[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(11):1474-1482.
- [5] Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, et al. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances[J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(5):503-508.
- [6] Mukherjee S, Lekli I, Ray D, et al. Comparison of the protective effects of steamed and cooked broccolis on ischaemia-reperfusion-induced cardiac injury[J]. Br J Nutr, 2010, 103(6):815-823.
- [7] 李占清, 伊 雪, 邬鹏宇, 等. 莱菔硫烷对大鼠心脏移植冷缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2014, 30(4): 234-237.
- [8] 李占清, 韩 燕, 邬鹏宇, 等. 莱菔硫烷通过 Nrf2-ARE 通路减轻大鼠移植心脏冷缺血再灌注损伤[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2015, 31(7):419-421.
- [9] Zhou XL, Wan L, Xu QR, et al. Notch signaling activation contributes to cardioprotection provided by ischemic preconditioning and postconditioning [J]. J Transl Med, 2013, 11:251.
- [10] Lee JA, Lee MY, Shin IS, et al. Anti-inflammatory effects of Amomum compactum on RAW 264. 7 cells via induction of heme oxygenase-1 [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(4): 739-746.
- [11] Heiss EH, Schachner D, Zimmermann K. et al. Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression [J]. Redox Biol, 2013, 1(1): 359-365.
- [12] Kim JH, Choi YK, Lee KS, et al. Functional dissection of Nrf2-dependent phase II genes in vascular inflammation and endotoxic injury using keap1 siRNA [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(3):629-640.
- [13] Kelkel M, Cerella C, Mack F, et al. ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(11):2162-2171.
- [14] Browne G, Nesbitt H, Ming L, et al. Bicalutamide-induced hypoxia potentiates RUNX2-mediated Bcl-2 expression resulting in apoptosis resistance[J]. Br J Cancer, 2012, 107(10):1714-1721.

(收稿:2016-08-09 修回:2016-11-24)

(本文编辑:胡晓静)