

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)24-0068-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.24.016



莱菔硫烷干预晚期糖基化终末产物诱导血管平滑肌细胞转分化研究*

李进冬^{1,2}, 徐震¹, 张楠³, 高一¹, 瞿建江¹, 季晓慧^{1Δ}

(1. 南京医科大学附属泰州人民医院, 江苏 泰州 225300; 2. 江苏省新药研究与临床药学重点实验室, 江苏 徐州 221004; 3. 南京医科大学附属无锡人民医院, 江苏 无锡 214023)

摘要:目的 探讨莱菔硫烷(SFN)抑制晚期糖基化终末产物(AGE)诱导的大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)向成骨细胞转分化的作用及机制。方法 取细胞培养传代至第5代的VSMC,分为对照组[普通培养基培养2 d+含牛血清白蛋白(BSA)的培养基培养5 d]、AGE组(普通培养基培养2 d+含200 mg/L的AGE培养基培养5 d)、SFN组(含10 μmol/L的SFN培养基培养2 d+含BSA的培养基培养5 d)及SFN+AGE组(含10 μmol/L的SFN培养基培养2 d+含200 mg/L的AGE培养基培养5 d)。检测各组VSMC钙离子、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)水平;采用Western blot法检测细胞内α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、Runx2相关转录因子2(RUNX2)、骨桥蛋白(OPN)、核因子E2相关因子2(Nrf2)、醌氧化还原酶1(NQO1)及血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白的表达水平。结果 与AGE组比较,SFN+AGE组细胞内钙离子、MDA水平均显著降低,SOD水平显著升高($P < 0.05$);OPN和RUNX2蛋白表达水平均显著降低,α-SMA蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);Nrf2,NQO1,HO-1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 SFN可提高细胞抗氧化应激能力,从而抑制AGE诱导的VSMC向成骨细胞转分化,其机制可能与细胞内Nrf2信号通路的激活有关。

关键词: 莱菔硫烷;晚期糖基化终末产物;血管平滑肌细胞;转分化;氧化应激;核因子E2相关因子2信号通路

Intervention of Sulforaphane on Advanced Glycation End Products - Induced Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells

LI Jindong^{1,2}, XU Zhen¹, ZHANG Nan³, GAO Yi¹, QU Jianjiang¹, JI Xiaohui¹

(1. The Affiliated Taizhou People's Hospital of Nanjing Medical University, Taizhou, Jiangsu, China 225300; 2. Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy, Xuzhou, Jiangsu, China 221004; 3. Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu, China 214023)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect and mechanism of sulforaphane (SFN) on the advanced glycation end products (AGEs) - induced transdifferentiation of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) into osteoblasts. **Methods** After subculture, the fifth generation of VSMCs were selected and divided into the control group [cultured in ordinary medium for 2 d and medium containing bovine serum albumin (BSA) for 5 d], the AGE group (cultured in ordinary medium for 2 d and medium

*基金项目:江苏省新药研究与临床药学重点实验室开放课题[KFKT-2108];江苏省泰州市“凤城英才计划”青年科技人才托举工程项目[202210];江苏省泰州市人民医院院级科研项目[ZL202025]。

第一作者:李进冬,男,硕士,主管药师,研究方向为糖尿病及其并发症的防治,(电子信箱)ljd140520@126.com。

Δ通信作者:季晓慧,女,硕士,副主任药师,研究方向为临床药理学,(电子信箱)21061091@qq.com。

- [3] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京:化学工业出版社, 2007:440-443.
- [4] 张冬梅,刘延珍,单淑香,等. 豚鼠和大鼠被动皮肤过敏反应[J]. 动物医学进展,2013,34(12):241-243.
- [5] 袁伯俊,廖明阳,李波. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:242-244.
- [6] 彭双清,郝卫东. 药物安全性评价关键技术[M]. 北京:军事医学科学出版社,2013:130-131.
- [7] 王冲,侯娟,戚文军,等. 大鼠被动皮肤过敏反应影响因素探讨[J]. 天津药学,2016,28(5):1-5.
- [8] 王萍,王功霞,曹冲. 腹腔致敏途径下的大鼠被动皮肤过敏反应影响因素研究[J]. 食品与药品,2019,21(4):312-316.
- [9] 蓝继奎,徐嘉红,徐晓玉. 被动皮肤过敏反应影响因素初步研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(2):108-109.
- [10] 井中旭,张妍妍,冯宇飞. 改良被动皮肤过敏试验方法的建立[J]. 黑龙江中医药,2017,46(1):78-80.
- [11] 陈文培,张子扬,周成浩,等. 大鼠被动皮肤过敏反应实验条件的优化[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(7):747-753.
- [12] 梁宗星,郭琳,梁峰,等. 大鼠被动皮肤过敏试验方法研究[J]. 毒理学杂志,2012,26(3):195-197.
- [13] 戴学栋,方超,戴晓莉,等. SD大鼠被动皮肤过敏反应影响因素的研究[J]. 中国药物警戒,2014,11(1):4-7.
- [14] 孙鸽,李炜宾,岳娟,等. 被动皮肤过敏评价中阳性对照的建立[J]. 中国药物评价,2015,32(3):129-131.
- [15] 曹冲,张岱州,刘宜辉,等. 大鼠被动皮肤过敏试验两种佐剂选择的探讨[J]. 食品与药品,2018,20(4):278-282.

(收稿日期:2023-02-24;修回日期:2023-08-21)

containing 200 mg / L of AGE for 5 d), the SFN group (cultured in medium containing 10 μ mol / L of SFN for 2 d and medium containing BSA for 5 d), and the SFN + AGE group (cultured in medium containing 10 μ mol / L of SFN for 2 d and medium containing 200 mg / L of AGE for 5 d). VSMCs in each group were collected to detect the calcium ion, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels and the expression levels of α - smooth muscle actin (α - SMA), Runt - related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin (OPN), nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 (Nrf2), NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and heme oxygenase - 1 (HO - 1) proteins by the western blot. **Results** Compared with those in the AGE group, the calcium ion and MDA levels in the SFN + AGE group were significantly lower, the SOD level was significantly higher ($P < 0.05$); the expression levels of OPN and RUNX2 proteins were significantly lower, the expression level of α - SMA protein was significantly higher ($P < 0.05$); the expression levels of Nrf2, NQO1 and HO - 1 proteins were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** SFN can improve the anti - oxidative stress ability of cells, thereby inhibiting AGE - induced transdifferentiation of VSMCs into osteoblasts, its mechanism may be related to the activation of the intracellular Nrf2 signaling pathway.

Key words: sulforaphane; advanced glycation end product; vascular smooth muscle cell; transdifferentiation; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 signaling pathway

机体内氧化应激反应的失衡可损伤胰岛细胞功能,同时降低外周组织对胰岛素的敏感性,是导致糖尿病的重要因素^[1]。氧化应激损伤可促进2型糖尿病患者动脉硬化发生,故成为动脉硬化干预的重要手段^[2]。核因子E2相关因子2(Nrf2)在氧化应激防御系统中发挥着重要作用。当机体在病理状态下发生氧化应激反应时,细胞质中的Nrf2会转移至细胞核内,激活下游醌氧化还原酶1(NQO1)、血红素加氧酶-1(HO-1)等基因的表达,从而增强机体的抗氧化应激能力,达到抗氧化的目的。研究表明,在多种因素刺激下,血管平滑肌细胞(VSMC)可由收缩表型转化为合成表型,VSMC向成骨细胞转分化是一个主动、可逆转、受高度调控且可预防的过程,在动脉硬化病变的发生、发展中起到重要作用^[3]。晚期糖基化终末产物(AGE)可通过刺激VSMC发生氧化应激反应,从而由收缩表型向成骨细胞转分化,最终引起动脉硬化^[4]。莱菔硫烷(SFN)属异硫氰酸盐类化合物,具有抗氧化、抗肿瘤、心血管保护等治疗作用,在多种器官及组织中可激活Nrf2相关信号通路,提高组织抗氧化应激能力,从而发挥保护作用^[5]。本研究中以大鼠VSMC为研究对象,探讨了SFN在AGE诱导的VSMC向成骨细胞转分化中所起的作用及其机制,以期为临床预防及治疗糖尿病患者动脉硬化提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:DNM-9602型酶标仪(北京普朗新技术有限公司);TG16W型微量高速离心机(德国Eppendorf公司);GBOX-CHEMI-XX9-E型高性能荧光、化学发光成像系统(基因有限公司)。

试剂:SFN(美国MedChemExpress公司,批号为HY-13755); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(美国BioWorld公司,批号为BS70000);Runt相关转录因子2

(RUNX2)抗体(批号为WL03358)、骨桥蛋白(OPN)抗体(批号为WL00691),均购自沈阳万类生物科技有限公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、钙离子的检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A003-1-2、A001-3-2、C004-2-1);Nrf2抗体(美国Proteintech公司,批号为16396-1-AP);NQO1抗体(批号为ab80588)、HO-1抗体(批号为ab189491),均购自英国Abcam公司;RIPA裂解液(批号为P0013B),苯甲基磺酰氟(PMSF,批号为ST506-2)、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(批号为P0015),均购自上海碧云天生物技术有限公司;AGE(南京医科大学附属泰州人民医院中心实验室制备^[6])。

细胞:大鼠VSMC(上海中乔新舟生物科技有限公司,批号为ZQ0847)。

1.2 分组与处理

取细胞培养传代至第5代的VSMC适量,按细胞密度每孔 2×10^5 个均匀接种于6孔培养板中。实验分为对照组[普通培养基培养2 d + 含牛血清白蛋白(BSA)的培养基培养5 d]、AGE组(普通培养基培养2 d + 含200 mg / L的AGE培养基培养5 d)、SFN组(含10 μ mol / L的SFN培养基培养2 d + 含BSA的培养基培养5 d)、SFN + AGE组(含10 μ mol / L的SFN培养基培养2 d + 含200 mg / L的AGE培养基培养5 d)。

1.3 评价指标

钙离子、MDA含量及SOD活性:取培养完成后各组细胞适量,按试剂盒说明书进行检测。平行操作3次。

蛋白表达水平:采用Western blot法。取培养完成后各组细胞适量,加入细胞裂解液[RIPA-PMSF(100:1, V / V)],提取总蛋白,按4:1比例加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C下加热10 min。取适量蛋白进行SDS-PAGE,转膜,以5%脱脂牛奶封闭,孵育 α -SMA、RUNX2、OPN、Nrf2、NQO1、HO-1、GAPDH及 β -actin的一抗孵

育(均以 1:1 000 稀释)过夜(4 ℃),洗脱,室温孵育二抗 1 h,显影、定影。采取半定量分析法解读结果,以内参 GAPDH 及 β -actin 信号强度为基准,校正检测蛋白的相对表达量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,两组间比较行 t 检验,多组间比较行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

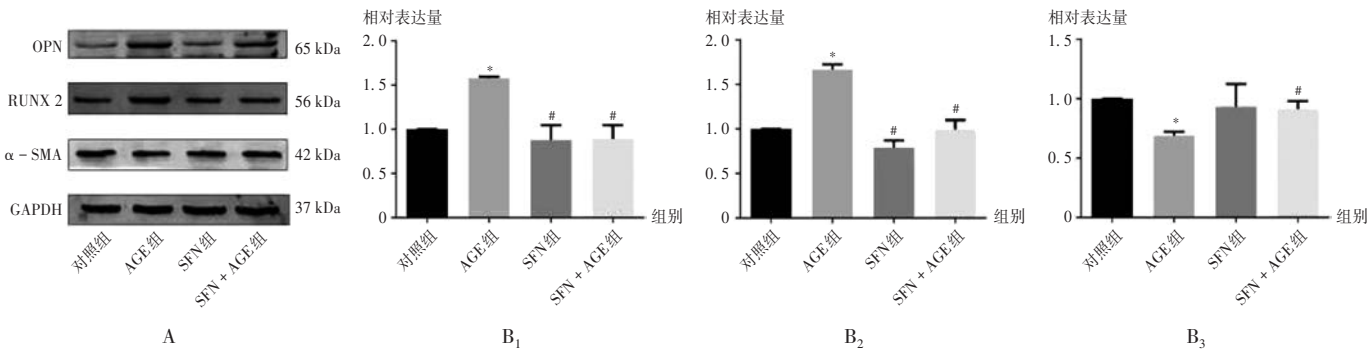
2 结果

2.1 钙离子、MDA 含量及 SOD 活性

与对照组比较,AGE 组细胞内钙离子、MDA 水平均显著升高,SOD 水平显著降低($P < 0.05$);与 AGE 组比较,SFN + AGE 组细胞内钙离子、MDA 水平均显著降低,SOD 水平显著升高($P < 0.05$)。详见表 1。

2.2 OPN,RUNX2, α -SMA 蛋白表达水平

与对照组比较,AGE 组细胞内 OPN 和 RUNX2 蛋白表达水平均显著升高, α -SMA 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与 AGE 组比较,SFN + AGE 组细胞内 OPN 和 RUNX2 蛋白表达水平均显著降低, α -SMA 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。详见图 1。

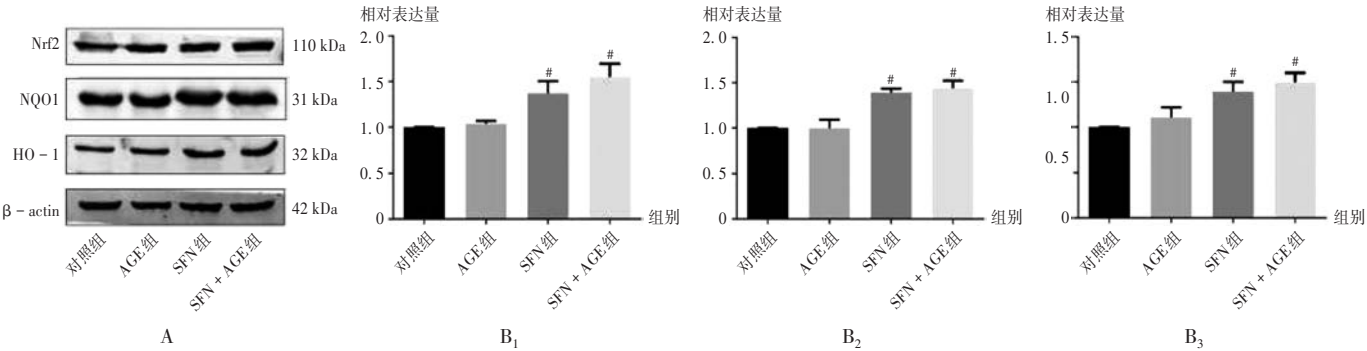


A. 电泳图 B₁,B₂,B₃. 数据统计(B₁. OPN B₂. RUNX2 B₃. α -SMA)

图 1 细胞内 OPN、RUNX2 及 α -SMA 蛋白表达水平

A. Electropherograms B. Data statistics (B₁. OPN B₂. RUNX2 B₃. α -SMA)

Fig. 1 Expression levels of intracellular OPN,RUNX2 and α -SMA proteins



A. 电泳图 B₁,B₂,B₃. 数据统计(B₁. Nrf2 B₂. NQO1 B₃. HO-1)

图 2 细胞内 Nrf2、NQO1 及 HO-1 蛋白表达水平

A. Electropherograms B. Data statistics (B₁. Nrf2 B₂. NQO1 B₃. HO-1)

Fig. 2 Expression levels of intracellular Nrf2,NQO1 and HO-1 proteins

表 1 各组细胞内钙离子、MDA 及 SOD 水平比较($\bar{X} \pm s, n = 3$)

Tab.1 Comparison of intracellular calcium ion,MDA and SOD levels in each group ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	钙离子(mmol/L)	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
对照组	1.23 ± 0.05	1.95 ± 0.08	429.91 ± 23.68
AGE 组	2.52 ± 0.19*	3.22 ± 0.24*	310.01 ± 28.35*
SFN 组	1.21 ± 0.04	1.84 ± 0.11	458.50 ± 31.33
SFN + AGE 组	1.71 ± 0.15#	2.50 ± 0.27#	402.97 ± 24.61#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 AGE 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 1、图 2 同。

Note:Compared with those in the control group,* $P < 0.05$. Compared with those in the AGE group,# $P < 0.05$ (for Tab. 1 and Fig. 1 - 2).

2.3 Nrf2,NQO1,HO-1 蛋白表达水平

与 AGE 组比较,SFN + AGE 组细胞内 Nrf2,NQO1,HO-1 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。详见图 2。

3 讨论

动脉硬化是糖尿病的常见并发症,其引起的心血管疾病可严重影响该类患者的长期生存率。研究表明,多种原因引起的氧化应激损伤在糖尿病患者动脉硬化形成中发挥着重要作用^[7]。

VSMC 通常位于动脉中膜内,以收缩表型存在,主

要作用为维持血管的弹性和收缩血管。在受到氧化应激损伤等刺激时,其由收缩表型向合成表型转分化,从而促进动脉硬化的发生与发展。在这一过程中,细胞收缩表型标志物 α -SMA、平滑肌-22 α 等丢失,而合成表型标志物OPN、RUNX2、碱性磷酸酶等增加^[8]。糖尿病患者通常合并糖代谢异常。在糖尿病患者体内,AGE的表达量明显增加,而AGE可通过刺激细胞发生氧化应激损伤从而引起VSMC转分化^[9]。本研究结果显示,VSMC经AGE刺激后,细胞内钙离子水平,成骨细胞标志物OPN,RUNX2蛋白表达水平均显著高于对照组, α -SMA蛋白表达水平显著低于对照组,细胞出现明显转分化现象。

Nrf2是机体调节抗氧化应激能力的重要转录因子,下游NQO1及HO-1是机体内重要的抗氧化酶,可维持细胞的稳定性,调节机体的抗氧化应激反应^[10]。当机体遭受氧化应激损伤时,外源性刺激物可激活机体Nrf2基因,并进一步上调NQO1,HO-1基因的表达,从而提高机体的抗氧化应激能力以减轻损伤^[11]。SFN可激活多种组织内Nrf2基因的表达,从而减轻氧化应激引起的损伤,包括血管内皮细胞损伤^[12]、肝脏缺血再灌注损伤^[13]及心肌缺血再灌注损伤^[14]等。本研究中发现,经AGE刺激后VSMC内氧化损伤显著,表现为MDA水平升高,SOD水平下降。SFN+AGE组细胞内钙离子水平显著降低,OPN、RUNX2蛋白表达水平均显著降低, α -SMA蛋白表达水平显著升高,表明SFN能减轻AGE诱导的细胞钙化;且细胞内MDA水平下降,SOD水平升高,Nrf2,NQO1,HO-1蛋白表达水平均显著升高,表明AGE可能通过激活细胞氧化应激反应而引起细胞钙化,SFN可提高细胞的抗氧化应激能力,从而减轻AGE引起的细胞钙化,其机制可能与SFN激活Nrf2通路进而诱导抗氧化酶NQO1和HO-1的表达有关。

综上所述,SFN可增强细胞抗氧化应激能力,从而抑制AGE诱导的VSMC向成骨细胞转分化,其机制可能与细胞内Nrf2信号通路的激活有关。不足,本研究仅涉及细胞实验,后续需在动物层面更进一步阐明SFN对糖尿病引发的动脉粥样硬化的保护机制。

参考文献

- [1] SOKOLOVA M, SAHRAOUI A, HØYEM M, et al. NLRP3 inflammasome mediates oxidative stress - induced pancreatic islet dysfunction [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 315(5):E912 - E923.
- [2] FOLLI F, CORRADI D, FANTI P, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro - and macrovascular complications: avenues for a mechanistic - based therapeutic approach [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2011, 7(5): 313 - 324.
- [3] JAMINON A, REESINK K, KROON A, et al. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification - Related Processes [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22):5694.
- [4] XING YJ, PAN S, ZHU L, et al. Advanced Glycation End Products Induce Atherosclerosis via RAGE / TLR4 Signaling Mediated - M1 Macrophage Polarization - Dependent Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Conversion [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:9763377.
- [5] LIEBMAN SE, LE TH. Eat Your Broccoli: Oxidative Stress, NRF2, and Sulforaphane in Chronic Kidney Disease [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1):266.
- [6] 刘超,谭若芸,殷长军,等. 晚期糖基化终末产物诱导大鼠主动脉平滑肌细胞转分化的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(5):905 - 907.
- [7] GIACCO F, BROWNLEE M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9):1058 - 1070.
- [8] ZHANG F, GUO X, XIA YP, et al. An update on the phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79(1):6.
- [9] JIN DH, LIN LH, XIE YX, et al. NRF2 - suppressed vascular calcification by regulating the antioxidant pathway in chronic kidney disease [J]. *FASEB J*, 2022, 36(1):e22098.
- [10] SHAHCHERAGHI SH, SALEMI F, PEIROVI N, et al. Nrf2 Regulation by Curcumin: Molecular Aspects for Therapeutic Prospects [J]. *Molecules*, 2021, 27(1):167.
- [11] THIRUVENGADAM M, VENKIDASAMY B, SUBRAMANIAN U, et al. Bioactive Compounds in Oxidative Stress - Mediated Diseases: Targeting the NRF2 / ARE Signaling Pathway and Epigenetic Regulation [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(12):1859.
- [12] ZHANG Q, LIU J, DUAN HXY, et al. Activation of Nrf2 / HO - 1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34:43 - 63.
- [13] CHEN L, ZHANG WL, XIE DQ, et al. Sulforaphane alleviates hepatic ischemia - reperfusion injury through promoting the activation of Nrf - 2 / HO - 1 signaling [J]. *Transpl Immunol*, 2021, 68:101439.
- [14] TIAN H, XIONG Y, ZHANG Y, et al. Activation of NRF2 / FPN1 pathway attenuates myocardial ischemia - reperfusion injury in diabetic rats by regulating iron homeostasis and ferroptosis [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 27(2):149 - 164.

(收稿日期:2023-03-02;修回日期:2023-06-29)