

· 论 著 ·

莱菔硫烷对常氧条件下成骨细胞活性的影响

陈巧凤* 闻博 谢俊杰 曾冰

福建医科大学附属泉州第一医院骨科,福建 泉州 362000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0472-05

摘要: 目的 了解莱菔硫烷对常氧条件下成骨细胞活性的影响,探讨常氧条件下使用抗氧化剂的合理性。方法 将成骨细胞 hFOB1.19 置于常氧条件(培养箱内含 20% O₂),根据实验分组分别加入 0、5、10、20 μmol/L 的莱菔硫烷,分别培养 24 h 和 48 h,通过 MTT 检测细胞增殖,流式检测细胞凋亡,同时检测细胞内 ROS。结果 24 h 组的 OD 值分别为 0.63±0.02、0.77±0.04、0.91±0.04、0.85±0.01; 48 h 组的 OD 值分别为 0.53±0.04、0.65±0.04、0.82±0.02、0.76±0.04。5 μmol/L、10 μmol/L 的莱菔硫烷可促进细胞增殖,当浓度增加到 20 μmol/L 后增殖速度减缓;24 h 组的细胞凋亡率分别为 3.76%、3.71%、3.38%、3.33%,48 h 组的细胞凋亡率分别为 4.02%、3.49%、3.33%、3.09%,可见莱菔硫烷可减少细胞的凋亡,浓度越高,作用越明显;24 h 组的 ROS 值分别为 3 152.67±118.73、2 762.33±75.25、2 384.67±100.52、2 165.67±196.02; 48 h 组细胞 ROS 值分别为 3 762.33±74.65、3 291±90.02、2 956.67±78.27、2 746.33±82.08。可见莱菔硫烷会减少细胞活性氧,浓度越高,细胞内 ROS 降低越明显。结论 在常氧培养条件下,低浓度的莱菔硫烷可促进成骨细胞的增殖,浓度升高会抑制细胞增殖;莱菔硫烷的应用可以减少细胞凋亡,起到抗氧化作用。

关键词: 成骨细胞;常氧;莱菔硫烷;线粒体

Effects of sulforaphane on osteoblast activity under normoxic conditions

CHEN Qiaofeng*, WEN Bo, XIE Junjie, ZENG Bing

Department of orthopedics, Quanzhou First Hospital Affiliated Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

* Corresponding author: CHEN Qiaofeng, Email: cqf69@163.com

Abstract: **Objective** To understand the effect of sulforaphane on the activity of osteoblasts under normoxic conditions, and to explore the rationality of using antioxidants under normoxia. **Methods** Osteoblasts hFOB1.19 were placed under normoxic conditions (20% O₂ in the incubator). According to the experimental requirements, sulforaphane was added as 0, 5, 10, 20 μmol/L groups, and cultured for 24 h and 48 h, respectively. Cell proliferation was detected by MTT, apoptosis was detected by flow cytometry, and intracellular ROS was detected. **Results** In the 24 h groups, the OD values of 0, 5, 10, 20 μmol/L sulforaphane added groups were 0.63±0.02, 0.77±0.04, 0.91±0.04 and 0.85±0.01, respectively. In the 48 h groups, the OD values were 0.53±0.04, 0.65±0.04, 0.82±0.02 and 0.76±0.04, respectively. While 5 μmol/L and 10 μmol/L sulforaphane promoted cell proliferation, 20 μmol/L sulforaphane slowed down the growth rate. In the 24 h groups, apoptosis rate of 0, 5, 10, 20 μmol/L sulforaphane added groups were 3.76%, 3.71%, 3.38% and 3.33%, respectively. In the 48 h groups, apoptosis rate were 4.02%, 3.49%, 3.33% and 3.09%, respectively. It can be seen that sulforaphane could reduce cell apoptosis. The higher the concentration, the more obvious the effect; In the 24 h groups, the ROS of the cells of 0, 5, 10, 20 μmol/L sulforaphane added groups were 3 152.67±118.73, 2 762.33±75.25, 2 384.67±100.52 and 2 165.67±196.02, respectively, and those were 3 762.33±74.65, 3 291±90.02, 2 956.67±78.27 and 2 746.33±82.08 for the 48 hours group. It can be seen that sulforaphane reduced cellular ROS, and the higher the concentration, the more obvious the decrease. **Conclusion** Under normoxic conditions, low concentrations of sulforaphane can promote cell proliferation, but the increase of concentration inhibits cell proliferation. The application of sulforaphane can reduce apoptosis and play an antioxidant role.

Key words: osteoblasts; normoxic; sulforaphane; mitochondria

基金项目: 福建省自然科学基金(2016J0105); 泉州市卫生计生科研资助项目(2015)

* 通信作者: 陈巧凤, E-mail: cqf69@163.com

莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是一种含硫化合物(异硫氰酸酯, ITC),来自十字花科蔬菜,如西兰花和西兰花芽^[1],几项研究报道^[2]指出,ITC 具有抗

肿瘤、抗炎和抗氧化活性的作用。SFN 的抗氧化功能是由增强核因子 2(Nrf2) 依赖性诱导的血红素加氧酶 1(HO-1) 介导的, 保护细胞免受氧化应激的损伤^[3-4]。SFN 由于具有能够通过激活 Nrf2 信号传导途径诱导产生一定浓度的抗氧化酶的能力, 已经受到了大量的关注, 是 Nrf2-ARE 信号通路最有效的诱导剂之一^[5]。

但是在 2000 年, 即 SFN 出现后 8 年, Gamet 等^[6]第一次报道了 SFN 参与线粒体的变化。SFN 似乎存在着相互矛盾的行为: SFN 可以诱导癌细胞线粒体的有害变化, 最终会通过细胞凋亡导致细胞死亡, 但是它也可以保护非癌细胞线粒体免受氧化攻击, 从而阻止了细胞死亡^[7], 莱菔硫烷的这些作用与其调节线粒体活性变化有关。以往的文献都集中在 SFN 对氧化应激条件下细胞的作用, 笔者将探索在常氧条件下 SFN 对成骨细胞的作用, 并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源: 成骨细胞 hfob1.19 购于吉妮欧生物有限公司(中国)。

1.1.2 主要试剂及耗材: RPMI-1640 (SH30809.01B/500 mL, Hyclone, 美国); 胎牛血清 (SV30087.03/500 mL, Hyclone, 美国); 双抗 (SV30010/100 mL, Hyclone, 美国); 胰酶 (SH30042.01/100 mL, Hyclone, 美国); PBS (SN331, 南京生兴生物技术有限公司, 中国); DMSO (C6295-50 mL, Sigma, 中国); 莱菔硫烷 (SFN) (sbj-i0631/20 mg, 南京森贝伽生物科技有限公司, 中国); MTT (5 g, Bisharp, 中国); PI-AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (EMS500FI/300 T, eBioscience, 中国); 活性氧检测试剂盒 (DCFH-DA, S0033, 上海碧云天生物技术有限公司, 中国)。

1.1.2 主要仪器和设备: CO₂ 细胞孵育箱 (Thermo 公司, 美国); 厌氧培养箱 (Thermo 公司, 美国); 多功能酶标仪 (SpectraMax M5, MD 公司, 美国); 流式细胞仪 (FACSCaliburBD Biosciences, 美国); 高速离心机 (Thermo 公司, 美国); 荧光分光光度计 (上海棱光, 中国)。

1.1.3 药液配制: 莱菔硫烷 (SFN) 用二甲基亚砷 (DMSO) 溶解配制成 100 mmol/L 的储存液, 分装后储存于 -20 ℃。根据实验需要, 使用时用 1640 完全

培养液分别按照 1:20 000、1:10 000、1:5 000 的比例稀释成最终浓度为 5、10、20 μmol/L, 直接加入到培养皿或培养板中。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养: hfob1.19 细胞是贴壁细胞, 培养在含 15% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 1640 培养基中, 置于 34 ℃, 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。当 hfob1.19 细胞长至 80%~90% 时, 去除培养基, 加入 PBS 冲洗 1~2 次。去除 PBS 后, 加入 1 mL 胰酶消化 1~3 min, 加入 3 mL 完全培养基中和胰酶终止消化, 将消化的细胞转移至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min, 离心 5 min。倒掉上清后, 加入 3 mL 培养基重悬细胞, 1:3 传代至培养皿中培养。当 hfob1.19 细胞长至 80%~90% 时, 去除培养基, 加入 PBS 冲洗 1~2 次, 去除 PBS 后, 加入 1 mL 胰酶消化 1~3 min, 加入培养基重悬细胞, 用血球计数板对细胞进行计数, 六孔板每孔种 2×10⁶ 个细胞, 将细胞摇晃均匀, 放入培养箱中培养。常氧培养过夜后, 根据实验分组分别加入 SFN 0、5、10、20 μmol/L, 分别培养 24 h 和 48 h。

1.2.2 MTT 检测细胞增殖: 用血球计数板计 5 000 个细胞分别加入 96 孔板中。根据实验分组分别加入 SFN 0、5、10、20 μmol/L, 分别培养 24 h 和 48 h 后, 去掉培养基, 每孔加入 50 μL MTT, 在细胞培养箱中继续培养约 3 h。每孔加入 150 μL DMSO, 摇晃均匀, 在 570 nm 处测定吸光度。

1.2.3 流式检测细胞凋亡: 在六孔板中分别种 2×10⁶ 个细胞, 根据实验分组分别加入 SFN 0、5、10、20 μmol/L, 分别培养 24 h 和 48 h 后, 用胰酶消化收集细胞。用预冷的 PBS 洗三次细胞, 4 ℃, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 1 mL binding buffer 洗细胞, 4 ℃, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 100 μL binding buffer 重悬细胞, 加入 5 μL PI 和 5 μL FITC-Annexin V, 混合均匀, 常温避光孵育 15 min, 加入 400 μL binding buffer 混匀, 立刻用流式细胞仪检测。

1.2.4 检测细胞内 ROS 形成: hfob1.19 细胞进行培养过夜后, 根据实验分组分别加入 SFN 0、5、10、20 μmol/L, 分别培养 24 h 和 48 h, 常规消化细胞, 收集细胞沉淀, 制备细胞悬液。按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μmol/L。收集细胞后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 细胞浓度为 100 万~2 000 万/mL, 37 ℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀一下, 使探针和细

胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。使用488 nm激发波长,525 nm发射波长,在荧光分光光度计检测荧光强度。

2 结果

2.1 MTT 检测细胞增殖

24 h 组的 OD 值分别为 0.63 ± 0.02 , 0.77 ± 0.04 , 0.91 ± 0.04 , 0.85 ± 0.01 , 而 48 h 组的 OD 值分别为 0.53 ± 0.04 , 0.65 ± 0.04 , 0.82 ± 0.02 , 0.76 ± 0.04 。结果表明,在常氧条件下,当 SFN 作用浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 时细胞的 OD 值增加明显,当浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 时曲线趋于平缓甚至下降(图 1)。实验至少独立重复 3 次,数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

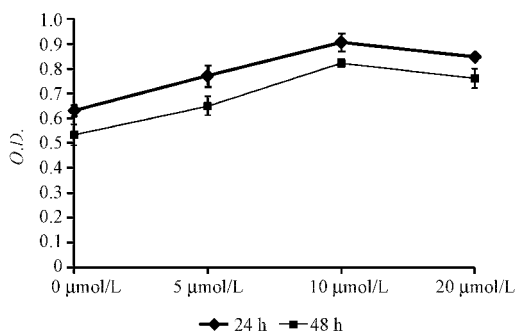


图 1 常氧下不同浓度 SFN 作用 hFOB1.19 的 OD 值

Fig. 1 OD values of hFOB1.19 cultivated under normoxia conditions with different concentrations of SFN addition

2.2 流式检测细胞凋亡

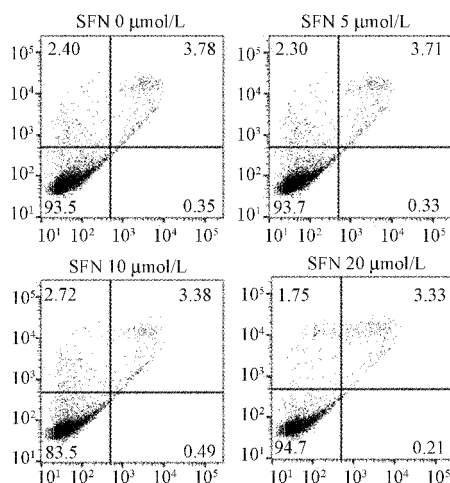


图 2 常氧条件下不同浓度 SFN 作用 hFOB1.19 细胞 24 h 细胞流式细胞仪检测结果(与 $0 \mu\text{mol/L}$ SFN 组相比,*** $P < 0.001$)

Fig. 2 Results of different concentrations of SFN on hFOB1.19 cells for 24 h by flow cytometry

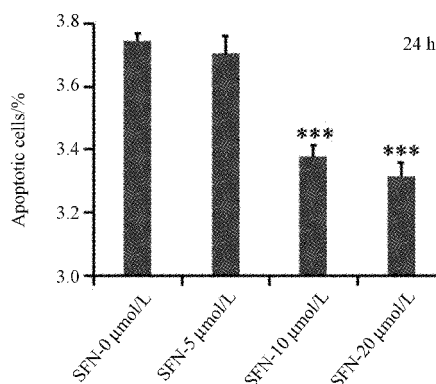
经流式细胞仪检测细胞凋亡后发现 24 h 组的细胞凋亡率分别为 3.76%、3.71%、3.38%、3.33%,与 $0 \mu\text{mol/L}$ SFN 组对比, $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 组有统计学意义;在常氧条件下 SFN 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡减少明显。与 $0 \mu\text{mol/L}$ SFN 组对比,实验组之间有统计学意义($P < 0.001$),见图 2;48 h 组的细胞凋亡率分别为 4.02%、3.49%、3.33%、3.09%,结果显示与 $0 \mu\text{mol/L}$ SFN 组对比,各组均有统计学意义($P < 0.001$),见图 3;在常氧条件下, $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ SFN 分别作用于成骨细胞时,细胞凋亡减少。实验至少独立重复 3 次,数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

2.3 检测细胞内 ROS 形成

24 h 组的细胞 ROS 值分别为 3152.67 ± 118.73 , 2762.33 ± 75.25 , 2384.67 ± 100.52 , 2165.67 ± 196.02 ;48 h 组的细胞 ROS 值分别为 3762.33 ± 74.65 , 3291 ± 90.02 , 2956.67 ± 78.27 , 2746.33 ± 82.08 。结果显示,不同浓度的 SFN 会降低细胞内的活性氧水平,在浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 时,降低更为明显。实验至少独立重复 3 次,数据以均数 $\pm$ 标准差表示。见图 4。

3 讨论

氧化应激的概念最早源于人类对衰老的认识。1956 年英国学者 Harmna 首次提出自由基衰老学说,该学说认为自由基(free radical)攻击生命大分子造成组织细胞损伤,是引起机体衰老的根本原因,也是诱发肿瘤等恶性疾病的重要起因。缺血再灌注损伤是许多疾病(急性心肌梗塞,中风)或手术环境



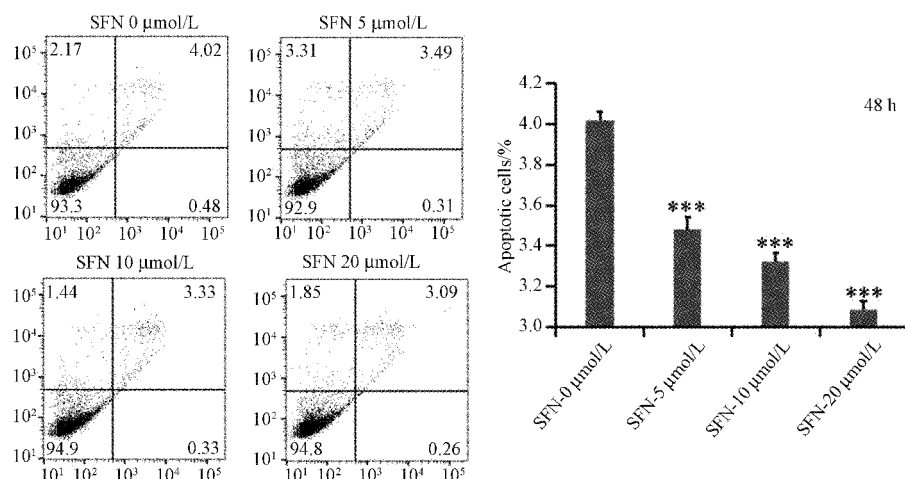


图3 常氧条件下不同浓度 SFN 作用 hFOB1.19 细胞 48 h 细胞流式细胞仪检测结果 (与 0 μmol/L SFN 组相比, *** $P < 0.001$)

Fig.3 Results of different concentrations of SFN on hFOB1.19 Cells for 48 h by flow cytometry

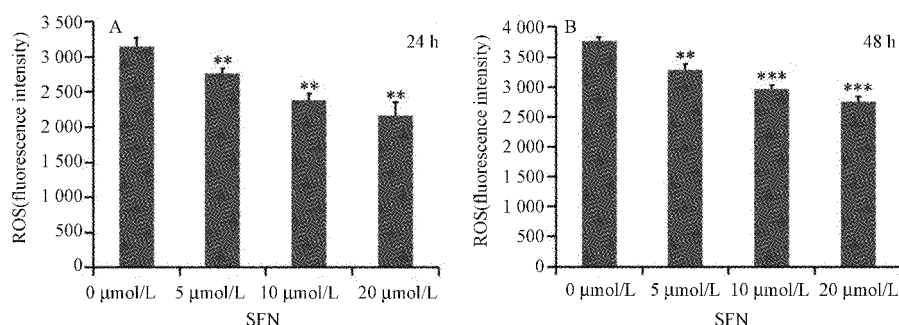


图4 常氧条件下不同浓度 SFN 作用成骨细胞 24 h 和 48 h 后 hFOB1.19 细胞内活性氧水平 (A:24 h 组; B:48 h 组。与 0 μmol/L SFN 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig.4 The intracellular levels of reactive oxygen species of hFOB1.19 cells were detected after different concentrations of SFN acted for 24 h and 48 h on normoxic conditions

(移植,止血带相关手术)的常见并发症,其会产生氧化应激,有潜在的有害和致残后果。缺血再灌注在骨科各种临床操作中都能遇到,比如骨折愈合期间损伤血管的修复及新生血管的形成和生长,其产生的作用将影响成骨细胞的增殖和矿化。实验^[8]表明,缺氧及缺氧再复氧环境会降低成骨细胞活性,增加细胞凋亡率,而且缺氧再复氧环境会加重缺氧状态下成骨细胞损伤。

目前对于成骨细胞缺氧的机制及治疗研究较多,莱菔硫烷在实验中也证实具有抗氧化还原的作用,在骨折愈合及骨质疏松的治疗中有作用,但其对常氧下成骨细胞作用未见报道。

莱菔硫烷的抗氧化作用主要是通过 Nrf2-ARE 信号通路发挥重要作用。Nrf2 核转位并且结合核酸序列上的抗氧化反应元件 ARE,活化 Nrf2-ARE

信号通路并启动下游的Ⅱ相解毒酶、抗氧化酶系等的转录,从而减轻活性氧和亲电子物质引起的细胞损伤,使细胞处于稳定状态,维持机体氧化还原动态平衡^[9]。莱菔硫烷的最大特点是其由于中心碳的亲电性而引起化学反应性的异硫氰酸酯基团,异硫氰酸酯基团与含硫、氮和氧的亲核试剂容易发生反应^[10]。细胞中最常见的是异硫氰酸盐与蛋白质中的半胱氨酸残基和谷胱甘肽结合的可逆反应^[11],它可以诱导转录因子 Nrf2 转移到细胞核中,细胞核随后与抗氧化剂反应元件结合,导致抗氧化基因的转录,包括血红素加氧酶 1, NAD(P)H 醌氧化还原酶 1, 谷胱甘肽-S-转移酶和谷氨酸半胱氨酸连接酶^[12]。莱菔硫烷是 Nrf2 途径的有效激活剂,可以调节许多抗氧化酶,防止氧化损伤。

线粒体是有氧细胞体内的能量发生器,为细胞

提供大部分的 ATP。当 ATP 充足时,体内需求/产生与电子传递链的最佳能力相结合。当体内处于低氧或者受到外部条件刺激时(比如氧化应激状态),需氧细胞在代谢过程中产生一系列活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),包括:过氧化氢(H_2O_2)、氧自由基(O_2^-)、羟自由基(OH^-)等^[14]。ROS 产生增加,糖酵解和 ROS 形成之间存在正反馈^[13],消耗大量的 ATP^[15]。在生理条件下,ROS 形成和抗氧化系统消除之间有一个平衡^[16],常氧培养下成骨细胞内的活性氧随时间变化不大,细胞凋亡比例也少。本实验发现在常氧培养条件下,不同浓度的莱菔硫烷均有降低体内活性氧,减少细胞凋亡的作用。但笔者认为在常氧条件下培养的成骨细胞产生的活性氧对机体影响并不大,常氧下莱菔硫烷的抗氧化还原临床意义不大。

在细胞增殖方面,SFN 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 时可促进细胞的增殖,但当浓度提升到 20 $\mu\text{mol/L}$,细胞增殖曲线趋于平缓甚至有所下降。考虑其原因,可能此时莱菔硫烷的应用改变了线粒体的结构和功能,影响了成骨细胞的活性。大量文献报道,莱菔硫烷通过参与线粒体复合物氧化损伤、细胞凋亡的线粒体途径、线粒体膜电位改变、线粒体生物合成以及内质网-线粒体紊乱等途径调控线粒体代谢。Sohel 等^[17]在不同浓度的 SFN 诱导颗粒细胞(GC)中的抗氧化和凋亡作用的实验中发现 SFN 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时没有观察到线粒体活性的变化;然而,在高浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)下显著降低了线粒体的活性。低浓度的 SFN 激活与细胞存活途径相关的基因,而高浓度诱导参与抗增殖和凋亡途径的基因的表达。Zanichelli 等^[18]证明低浓度的 SFN(0.25~5 $\mu\text{mol/L}$)促进了人类间充质干细胞的增殖并保护它们免于细胞凋亡和衰老,而较高浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)具有细胞毒性作用,导致细胞进入细胞周期停滞,程序性细胞死亡和衰老。

因此,SFN 是否在不同的细胞生存条件下发挥不同的药物作用,还是直接与细胞结合,发生代谢调控作用,这些都是未来进一步研究的热点,也将为临床在常氧条件下是否需要使用抗氧化剂及抗氧化剂使用剂量等提供参考。

4 结论

在常氧培养条件下,低浓度的莱菔硫烷可促进细胞的增殖,浓度升高反而会抑制细胞增殖;莱菔硫烷对成骨细胞可以起到抗氧化作用。

【参 考 文 献】

- [1] Zhang Y, Talalay P, Cho CG, et al. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(6):2399-2403.
- [2] Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane: translational research from laboratory bench to clinic [J]. *Nutr Rev*, 2013, 71(11):709-726.
- [3] Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Ulfuraphane and other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016;7857186.
- [4] Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(6):337-347.
- [5] Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, et al. Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane [J]. *Top Curr Chem*, 2013, 329:163-177.
- [6] Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, et al. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5):1426-1433.
- [7] Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Tapia E, et al. Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013 (65): 1078-1089.
- [8] 金常娥,吴迪,何正强,等.阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与骨质疏松症的相关性分析 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(1):63-66.
- [9] Kundu JK, Surh YJ. Nrf2-Keap1 signaling as potential target for chemoprevention of inflammation-associated carcinogenesis [J]. *Pharm Res*, 2010, 27(6):999-1013.
- [10] Mi L, Di Pasqua AJ, Chung FL. Proteins as binding targets of isothiocyanates in cancer prevention [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 2(10):1405-1413.
- [11] Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Kostov RV, et al. KEAP1 and Done? Targeting the NRF2 Pathway with Sulforaphane [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2017, 69(Pt B):257-269.
- [12] Carrasco-Pozo C, Tan KN, Borges K. Sulforaphane is anticonvulsant and improves mitochondrial function [J]. *J Neurochem*, 2015, 135(5):932-942.
- [13] Farrugia G, Balzan R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast [J]. *Front Oncol*, 2012, 20(2):64.
- [14] Hou KL, Lin SK, Chao LH, et al. Sirtuin 6 suppresses hypoxia-induced inflammatory response in human osteoblasts via inhibition of reactive oxygen species production and glycolysis-A therapeutic implication in inflammatory bone resorption [J]. *Biofactors*, 2017, 43(2):170-180.
- [15] 郑洁,袁普卫.骨性关节炎的代谢机制研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(3):406-410.
- [16] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. *Nature*, 2000, 408(6809):239-247.
- [17] Sohail MMH, Konca Y, Akyuz B, et al. Concentration dependent antioxidative and apoptotic effects of sulforaphane on bovine granulosa cells in vitro [J]. *Theriogenology*, 2017, 97:17-26.
- [18] Zanichelli F, Capasso S, Cipollaro M, et al. Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect [J]. *Age (Dordr)*, 2012, 34(2):281-293.

(收稿日期:2018-07-26;修回日期:2018-10-23)