

· 基础研究 ·

莱菔硫烷对 ox-LDL 诱导血小板活化的抑制作用

李玮琪¹, 马永洁¹, 黄新惠¹, 周昕榆¹, 伍春婷¹, 牙甫礼^{1,2*}¹大理大学公共卫生学院, ²代谢性疾病转化医学研究院, 云南 大理 671000

[摘要] 目的:探讨莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)对氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)诱导血小板活化的影响及其可能的分子机制。方法:在体外实验中,将健康人纯化血小板与不同浓度的SFN(1.0、2.5、5.0 μmol/L)共同孵育40 min,然后用ox-LDL激活血小板20 min,并检测血小板活化的指标,包括CD62P的表达、胞内血小板因子4(platelet factor 4, PF4)和趋化因子配体5(chemokine ligand 5, CCL5)的释放水平。机制上,用Western blot蛋白免疫印迹法检测血小板肉瘤酪氨酸激酶(sarcoma tyrosine kinase, Src)及其下游的脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)磷酸化水平;用活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒测定胞内总ROS水平。结果:ox-LDL诱导的血小板CD62P的表达以及PF4和CCL5的释放水平均可被SFN显著抑制($P < 0.05$);SFN显著下调ox-LDL诱导的血小板Src和Syk的磷酸化水平以及胞内总ROS水平($P < 0.05$)。此外,ox-LDL诱导的血小板CD62P的表达、PF4和CCL5的释放可被Src家族激酶抑制剂PP2所抑制($P < 0.05$),但PP2与SFN联合使用时,无协同抑制效果($P > 0.05$);Src家族激酶激活剂MLR-1023可逆转SFN对ox-LDL诱导的血小板活化的抑制作用($P < 0.05$)。结论:SFN可显著抑制ox-LDL诱导的血小板活化,其机制可能是下调Src/Syk/ROS介导的信号通路。

[关键词] 莱菔硫烷;氧化低密度脂蛋白;血小板活化;活性氧;Src家族激酶**[中图分类号]** R329.26**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)05-684-07

doi:10.7655/NYDXBNS20230514

The inhibitory effect and mechanism of sulforaphane on ox-LDL-induced platelet activation

LI Weiqi¹, MA Yongjie¹, HUANG Xinhui¹, ZHOU Xinyu¹, WU Chunting¹, YA Fuli^{1,2*}¹School of Public Health, Dali University, ²Institute of Translational Medicine for Metabolic Diseases, Dali University, Dali 671000, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to determine the effects of sulforaphane (SFN) on oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced platelet activation and its possible mechanism. **Methods:** Purified human platelets were treated with SFN (1.0, 2.5, 5.0 μmol/L) for 40 minutes *in vitro*, and then stimulated by ox-LDL for additional 20 minutes. The levels of platelet CD62P expression and intracellular PF4 and CCL5 release were measured to determine the effects of SFN on platelet activation. Moreover, the phosphorylation of sarcoma tyrosine kinase (Src) and its downstream spleen tyrosine kinase (Syk) were measured by Western blot. Reactive oxygen species (ROS) assay kit was used to measure the levels of total intracellular ROS generation. **Results:** The ox-LDL-increased platelet CD62P expression and PF4 and CCL5 release were significantly inhibited by SFN when compared with the control group ($P < 0.05$). SFN treatment greatly down-regulated Src and Syk phosphorylation and ROS generation stimulated by ox-LDL ($P < 0.05$). Furthermore, the ox-LDL-increased the expression of CD62P and release of PF4 and CCL5 were significantly abolished by PP2, a specific inhibitor of Src family kinases, which, nevertheless, showed no synergistic effects when combined with SFN ($P > 0.05$). In addition, the inhibitory effects of SFN on platelet activation induced by ox-LDL were reversed by an activator of Src family kinases MLR-1023. **Conclusions:** SFN attenuates platelet activation induced by ox-LDL possibly by down-regulating Src/Syk/ROS pathway.

[Key words] sulforaphane; oxidized low-density lipoprotein; platelet activation; reactive oxygen species; Src family kinases

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05):684-690]

[基金项目] 国家自然科学基金(82003451);大理大学高层次人才科研启动基金项目(KYBS2021015)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yafuli@yeah.net

近年来,心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)已经成为威胁我国人民健康的主要问题和突出的公共卫生问题^[1-2]。诱发 CVD 的危险因素很多,其中高脂血症一直受到高度认可与关注,被普遍认为是引起 CVD 最重要的危险因素之一。高脂血症的发生发展涉及错综复杂的病理机制,大量报道证明了血小板在高脂血症中起着重要的作用,由高脂血症导致的血小板活化是高脂血症引起各种心脑血管并发症(如血栓等)的重要病理生理基础^[3]。在高脂血症患者的循环血液中,氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)异常增高是诱导血小板高度活化的主要因素^[3-4]。ox-LDL 通过与血小板表面清道夫受体 CD36 分子结合,可触发一系列胞内信号转导事件,促进血小板活化,如可使血小板表面表达大量的分子标志物(包括 CD62P 和 CD63 等)以及释放 PF4 和 CCL5 等可溶性蛋白,最终导致血小板连接在一起形成聚集体,参与动脉粥样硬化和血栓的形成和发展^[3,5]。

ox-LDL 诱导高脂血症中血小板活化的分子机制是错综复杂的,其中酪氨酸家族蛋白酶的活化是重要的机制之一^[5-6]。ox-LDL 可通过 CD36 激活胞内酪氨酸蛋白酶,其中肉瘤酪氨酸激酶(sarcoma tyrosine kinase, Src)是受 ox-LDL 调控的最重要的酪氨酸激酶,ox-LDL 可使其发生磷酸化,进而促使其下游的脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)和蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)等蛋白发生磷酸化,使得胞内总 ROS 增加,最终诱发血小板发生活化和血栓的形成发展^[6]。抑制高脂血症中血小板活化已经成为防治血栓形成的重要途径之一^[7]。

大量的研究证实,营养干预是预防心血管疾病的重要途径之一^[8-10]。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN),又被称为萝卜硫素,属于异硫氰酸盐类植物化学物,在十字花科蔬菜如西兰花、白花菜、卷心菜、甘蓝和萝卜等中含量十分丰富^[11-12]。SFN 具有多种生物活性作用,包括抗肿瘤、抗氧化、抗炎、代谢解毒以及免疫调节等^[13-14]。近年来, SFN 在防治心血管疾病领域也越来越受关注,大量的流行病学、临床实验和动物实验研究表明, SFN 通过抗炎、抗氧化、改善内皮细胞功能以及改善糖脂代谢紊乱等机制发挥保护心血管的作用^[15-17]。在调控血小板功能方面,有研究发现 SFN 可以有效抑制生理性激动剂(如胶原、二磷酸腺苷)诱导的健康人血小板聚集反应^[18-19]; SFN 还可以抑制胶原诱导的血小板整合素 α II b β 3 的活化和血栓素 A₂ 的释放^[20]。另外, Gillespie 等^[21]在体

内动物实验中发现, SFN 可以显著抑制脂多糖诱导的小鼠血小板聚集反应以及脑微循环血栓的形成。但是, SFN 对 ox-LDL 诱导血小板活化的作用及其可能的分子机制尚不清楚,本研究旨在体外实验中探讨 SFN 对 ox-LDL 诱导血小板活化的影响及其可能的分子机制,为 SFN 防治高脂血症中血栓形成提供新靶点和重要理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

FITC 标记抗人 CD62P 抗体、PF4 和 CCL5 检测试剂盒(eBioscience 公司,美国); SFN、N-乙酰半胱氨酸(NAC)(Sigma-Aldrich 公司,美国); oxLDL(广州奕源生物科技有限公司); 一抗 phospho-Src(Tyr⁴¹⁶)(武汉爱博泰克生物科技有限公司); phospho-Syk(Tyr³²³)、GAPDH 以及二抗羊抗兔(Affinity Bioscience 公司,美国); Src 的家族激酶抑制剂 PP2、Src 的家族激酶激动剂 MLR-1023(Selleck Chemical 公司,美国); 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(Abcam 公司,英国)。

CytoFlex 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,美国); 低温高速离心机(H1650R)、低速离心机(L400)(湖南湘仪实验仪器开发有限公司); 低温冰箱(BCD-4.8.5WGHTDD9DYU1, 青岛海尔有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 研究对象的招募

12 例符合条件的健康志愿者(年龄 25~40 岁)在大理大学校内招募。所有志愿者均自愿参与该项目,并均已签署书面知情同意书。志愿者若出现以下至少一种情况将给予排除: 滥用药物(如头孢菌素类和青霉素类抗菌药和核苷类抗病毒药物等)、酗酒、吸烟半年以上; 现在或曾经患有恶性肿瘤、CVD、免疫缺陷病等病史; 近半年内服用辅酶 Q10、维生素等具有显著改善血小板功能的膳食营养补充剂; 在 2 周内服用抗血小板的药物(如 α II b β 3 受体抑制剂、磷酸二酯酶抑制剂、阿司匹林和 P2Y₁₂ 受体拮抗剂等)^[22-23]。本研究完全按照《赫尔辛基宣言》相关准则进行,并已通过大理大学伦理委员会的批准。

1.2.2 健康人血样及纯化血小板的制备过程

将抽取的 15 mL 肘静脉全血注入含 3.2% 的枸橼酸钠真空抗凝管中(1/9, V/V), 静置 10 min 后, 在 22 °C、150 g 全血离心 20 min, 小心吸取最上层 3/4 的血浆, 即为富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)。用枸橼酸葡萄糖溶液(含 75 mmol/L 柠檬酸钠、

39 mmol/L 柠檬酸和 135 mmol/L 葡萄糖, pH 6.5) 对 PRP 进行 3 倍稀释, 同时加入 0.1 U/mL 的三磷酸腺苷双磷酸酶, 防止血小板在离心过程中发生活化, 对血小板 PRP 进行离心 (22 °C、800 g、10 min), 弃上清后用台式缓冲液 (137 mmol/L 氯化钠、12 mmol/L 碳酸氢钠、2 mmol/L 氯化钾、0.34 mmol/L 磷酸氢二钠、1 mmol/L 氯化镁、5.5 mmol/L 葡萄糖、5 mmol/L 乙磺酸, pH 7.4) 重悬血小板, 可得到纯化血小板 (血小板纯度 >98%), 置于 37 °C 恒温箱中备用^[24-25]。以下实验中的样本均来自单独志愿者的纯化血小板。

1.2.3 流式细胞术检测血小板表面 CD62P 的表达

用不同浓度的 SFN (1.0、2.5、5.0 μmol/L) 或溶剂对照 (0.05% DMSO) 与纯化血小板 (5×10⁶ 个/mL) 孵育 40 min 后, 用 50 μg/mL 的 ox-LDL 刺激血小板 20 min, 然后加入 FITC 偶联的 CD62P 抗体, 避光孵育 20 min 后用 1% 的多聚甲醛固定, 最后用流式细胞仪检测血小板 CD62P 的表达^[8]。SFN 和 ox-LDL 干预浓度和干预时间的选择依据已发表文献^[6,20]。

1.2.4 血小板 PF4 和 CCL5 释放水平的测定

分别用不同浓度的 SFN (1.0、2.5、5.0 μmol/L) 或溶剂对照以及 ox-LDL (50 μg/mL) 处理纯化血小板 (1×10⁸ 个/mL) 后, 在 4 °C、12 000 g 的条件下离心 5 min, 弃沉淀, 用酶联免疫吸附法测定上清液中 PF4 和 CCL5 水平, 具体方法参照制造商提供的说明书。当探讨 Src/Syk/ROS 信号通路在 SFN 调控 PF4 和 CCL5 释放中的作用时, Src 家族激酶抑制剂 PP2 (20 μmol/L) 或激动剂 MLR-1023 (1 μmol/L) 与血小板预孵育 20 min, 然后加入 SFN (5 μmol/L) 和血小板继续孵育 40 min, ox-LDL 激活血小板 20 min 后进行 PF4 和 CCL5 释放水平的测定。

1.2.5 血小板总 ROS 生成水平的测定

分别用不同浓度的 SFN (1.0、2.5、5.0 μmol/L) 或溶剂对照以及 ox-LDL (50 μg/mL) 处理纯化血小板 (1×10⁶ 个/mL) 后, 在各组血小板悬液中加入 20 μmol/L 荧光探针 DCFH-DA, 避光孵育 20 min, 离心 (12 000 g、4 °C、5 min) 后用酶标仪在发射波长 525 nm 和激发波长 490 nm 的条件下读取荧光值, 用来反映血小板内总 ROS 水平^[22]。

1.2.6 Western blot 蛋白免疫印迹分析

健康人纯化血小板 (2.5×10⁸ 个/mL) 经不同浓度的 SFN (1.0、2.5、5.0 μmol/L) 和 ox-LDL (50 μg/mL) 处理后, 在 4 °C、12 000 g 的条件下离心 10 min, 弃上清得到血小板沉淀, 对血小板进行裂解后, 常规提取血小板蛋白, 经蛋白浓度测定后, 对样本进行十二

烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 将蛋白转到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 后, 用 5% 的脱脂奶粉溶液封闭 1.5 h, TBST 洗膜 3 次后于 4 °C 避光孵育一抗 phospho-Src (1:1 000)、phospho-Syk (1:1 000) 和 GAPDH (1:10 000) 过夜, 洗膜后室温避光孵育二抗羊抗兔 (1:20 000) 1.5 h, 最后用自动化学发光图像分析系统对条带进行曝光, 以检测血小板 Src、Syk 的磷酸化水平。条带灰度用 Quantity One 分析软件进行分析^[8,22-23]。实验重复 3 次, 每次实验的样本均来自独立的志愿者。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 差异显著后采用 Tukey 法进行组间两两比较, 双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。实验数据用平均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 表示, 统计数据至少来自 3 个独立的志愿者样本。

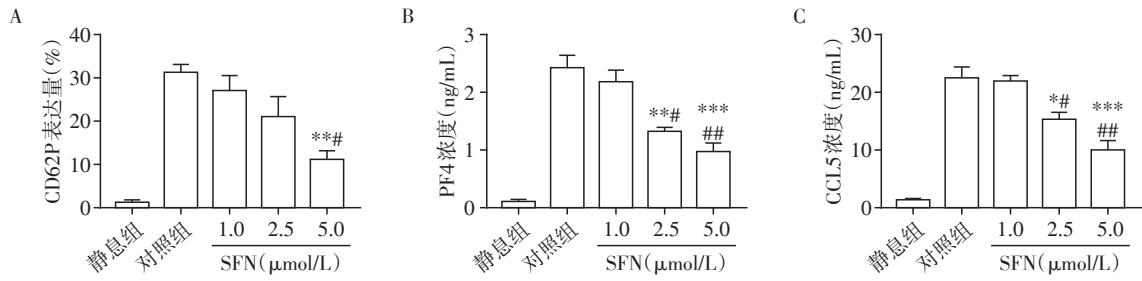
2 结果

2.1 SFN 对 ox-LDL 诱导的血小板活化的影响

通过检测血小板表面 CD62P 的表达和 PF4 和 CCL5 的释放水平来评价 SFN 对血小板活化的影响。流式细胞术结果表明, 与对照组相比, 仅高浓度的 SFN (5.0 μmol/L) 可显著降低 ox-LDL 诱导的血小板表面 CD62P 的表达水平, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1A); 而更低浓度的 SFN (1.0 μmol/L 和 2.5 μmol/L) 虽有抑制 CD62P 表达的趋势, 但是与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 此外, 各浓度 SFN 间的比较结果发现, 5.0 μmol/L 浓度的抑制作用要比 1.0 μmol/L 的更为显著 ($P < 0.05$, 图 1A)。同时, 酶联免疫吸附实验结果表明, 与对照组相比, 2.5 μmol/L 和 5.0 μmol/L 浓度的 SFN 均可显著抑制 ox-LDL 诱导的血小板 PF4 和 CCL5 的释放 ($P < 0.05$, 图 1B、C); 相对于 1.0 μmol/L 浓度, 2.5 μmol/L 和 5.0 μmol/L 浓度的 SFN 作用更加显著 ($P < 0.05$)。以上结果说明, SFN 可抑制 ox-LDL 诱导的血小板活化。

2.2 SFN 对 ox-LDL 诱导的血小板 Src/Syk/ROS 信号通路活化的影响

已有研究证实, Src/Syk/ROS 信号通路在 ox-LDL 诱导血小板活化过程中发挥重要作用^[6]。与对照组相比, 2.5 μmol/L 和 5.0 μmol/L 的 SFN 均可显著下调 ox-LDL 诱导的血小板 Src (Tyr⁴¹⁶) 和 Syk (Tyr³²³) 发生磷酸化和 ROS 生成, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2A~C), 然而更低浓度的 SFN (1.0 μmol/L) 干预后无显著效果 ($P > 0.05$)。2.5 μmol/L 和 5.0 μmol/L 浓



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SFN 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n=3$)。

图1 不同浓度的SFN对50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL诱导的血小板表面CD62P的表达(A)以及PF4和(B)CCL5(C)释放的影响
Figure 1 Effects of SFN of different levels on platelet CD62P expression (A) and PF4 (B) and CCL5 release induced (C) by ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$)

度的SFN比1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度对Src和Syk磷酸化水平和ROS生成的抑制作用更加显著($P < 0.05$),但2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和5.0 $\mu\text{mol/L}$ 两浓度间差异无统计学意义($P > 0.05$)。ROS的清除剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)对ox-LDL诱导ROS生成的抑制作用比SFN(5.0 $\mu\text{mol/L}$)更为显著($P < 0.05$,图2D),但两者联合使用时未见协同效果($P > 0.05$)。此外,Src家族激酶激活剂MLR-1023(1.0 $\mu\text{mol/L}$)可完全逆转SFN对ox-LDL诱导的血小板总ROS生成的抑制作用

($P < 0.001$,图2E),说明SFN抑制总ROS生成受Src/Syk信号通路的调控作用。以上结果说明SFN可抑制ox-LDL诱导的血小板Src/Syk/ROS信号通路的活化。

2.3 SFN经Src/Syk/ROS信号通路调控ox-LDL诱导的血小板活化的影响

Src家族蛋白激酶抑制剂PP2可显著抑制ox-LDL诱导的血小板CD62P的表达、PF4和CCL5释放($P < 0.001$,图3A~C),且PP2的抑制效果与5.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓

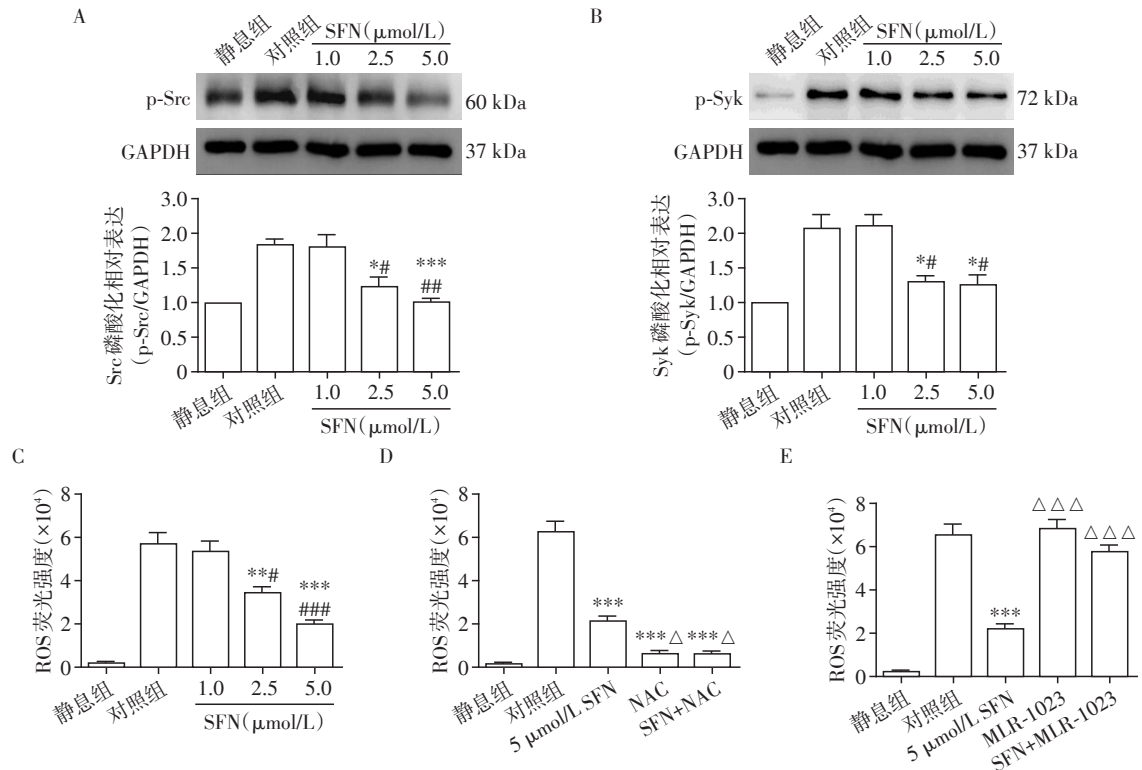


图2 不同浓度的SFN对50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL诱导的血小板Src/Syk/ROS信号通路活化的影响
Figure 2 Effects of SFN of different levels on ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) induced platelet Src/Syk/ROS signalling pathway

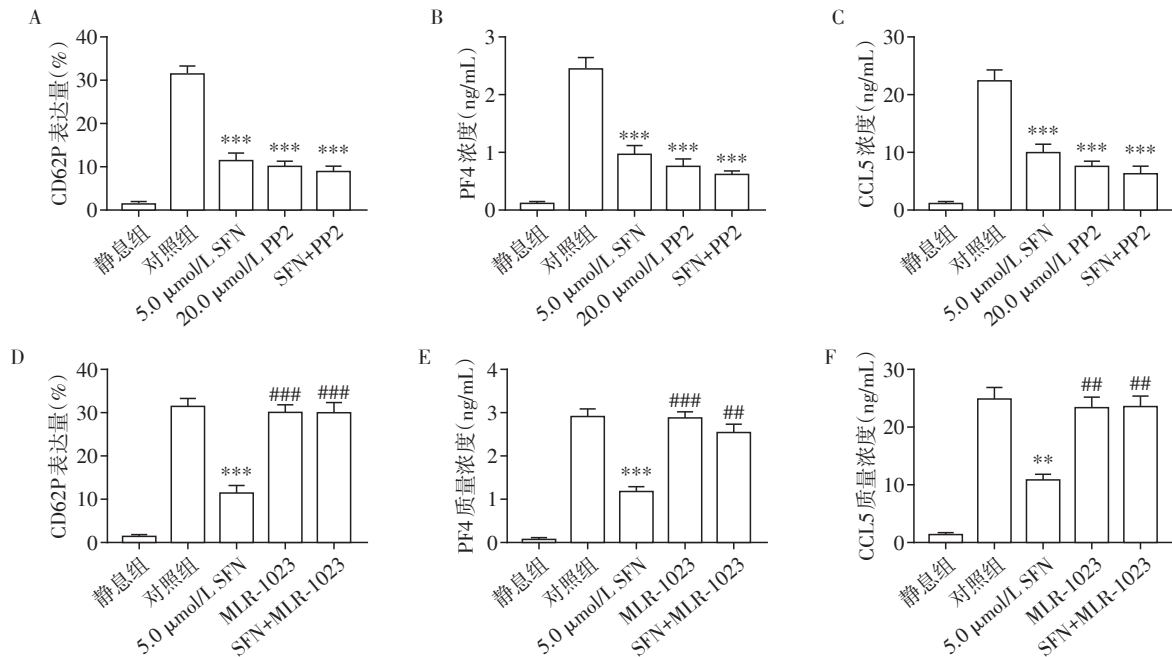
A:Src磷酸化相对表达情况;B:Syk磷酸化相对表达情况;C:ROS生成情况;D:NAC作用后ROS生成情况;E:MLR-1023作用后ROS生成情况。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与1.0 $\mu\text{mol/L}$ SFN组比较,* $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与5 $\mu\text{mol/L}$ SFN组比较,△ $P < 0.05$,△△△ $P < 0.001$ (A、B: $n=3$;C、D: $n=4$)。

图2 不同浓度的SFN对50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL诱导的血小板Src/Syk/ROS信号通路活化的影响

Figure 2 Effects of SFN of different levels on ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) induced platelet Src/Syk/ROS signalling pathway

度的SFN抑制效果相当。SFN和PP2联合使用时,对ox-LDL诱导的血小板CD62P的表达、PF4和CCL5释放的抑制作用无协同效果($P > 0.05$)。Src家族激酶激活剂MLR-1023 (1.0 $\mu\text{mol/L}$)可逆转

SFN对ox-LDL诱导的血小板CD62P的表达、PF4和CCL5释放的抑制作用($P < 0.01$,图3D~F)。以上结果说明SFN主要通过下调Src/Syk/ROS信号通路抑制ox-LDL诱导的血小板活化。



A~C: PP2对CD62P的表达和PF4、CCL5释放的影响;D~F: MLR-1023对CD62P的表达和PF4、CCL5释放的影响。与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与5.0 $\mu\text{mol/L}$ SFN组比较, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 SFN经Src/Syk/ROS信号通路调控50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL诱导的血小板活化的影响

Figure 3 SFN regulates platelet activation induced by ox-LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) via Src/Syk/ROS signalling pathway

3 讨论

高脂血症是心血管疾病的重要危险因素之一,高脂血症诱导的血小板高反应性是导致血栓形成的主要原因^[26]。ox-LDL被认为是高脂血症中诱导血小板活化的关键蛋白,本研究体外实验表明,植物化学物SFN经Src/Syk/ROS信号通路抑制ox-LDL诱导的血小板活化,为SFN改善脂代谢紊乱,防治心血管疾病提供新的分子机制和重要的实验依据。

在高脂血症患者的循环血液中,ox-LDL显著升高,其可通过识别并结合到血小板表面的清道夫受体CD36分子,进而引发细胞内一系列的信号转导事件,最终导致血小板异常活化,如诱发血小板表面CD62P的表达和释放多种趋化因子^[3-4]。这些分子可介导血小板-血小板、血小板-白细胞、血小板-内皮细胞间的炎症反应,在动脉粥样硬化和血栓形成过程中发挥关键作用^[27]。例如,血小板可通过其表面表达的CD62P与单核细胞表面的P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)结合,形成血小板-单核细胞聚

集体,加速动脉粥样硬化的形成^[4];另外,血小板活化时释放的趋化因子如PF4和CCL5,可募集白细胞到达损伤的血管内皮处,促进白细胞和内皮细胞的活化、分化甚至凋亡以及分泌炎症介质等,加剧血小板-白细胞-内皮细胞聚集体的形成,促进动脉粥样硬化和血栓形成^[28]。之前的研究发现,SFN可抑制生理性激动剂(如胶原)诱导的血小板聚集和其表面CD62P的表达以及抑制脑血栓的形成^[19,21],在本研究中发现SFN可显著抑制ox-LDL诱导的血小板CD62P的表达以及PF4和CCL5的释放,这提示SFN可能在高脂血症中抑制血小板高反应性,防治血栓形成中发挥重要作用^[14]。此外,SFN还可以直接调控单核细胞的功能,而单核细胞也是ox-LDL重要的靶细胞,因此SFN可能通过调控多种细胞的功能共同发挥抗心血管疾病的作用^[29]。SFN对血小板-白细胞-内皮细胞间相互作用的调控作用尚不清楚,仍需进一步深入探讨。此外,膳食补充SFN对高脂血症中动脉粥样硬化和血栓的调控作用需在今后的动物实验中做深入探讨。

在高脂血症中, ox-LDL 诱导血小板活化的机制十分复杂, 目前尚未研究清楚, 但现有研究结果一致认为, Src 家族蛋白激酶在其中扮演重要角色。ox-LDL 结合血小板表面 CD36 分子后, 进一步激活 Src 家族蛋白激酶(如 Src 和 Fyn 等), 使得下游的 Syk 分子发生磷酸化, 随后引起 PLC γ 2 和 PKC 的活化; PKC 的磷酸化可导致 NADPH 氧化酶-2 发生激活, 促进胞内 ROS 生成, 进而激活 ERK5, 最终导致血小板活化和血栓形成^[6,30-31]。本研究发现, SFN 可显著下调 ox-LDL 诱导的血小板 Src 和 Syk 磷酸化水平, 同时显著降低其诱导的胞内总 ROS 生成水平; Src 家族蛋白激酶的抑制剂 PP2 可显著抑制 ROS 生成和血小板活化, SFN 与 PP2 联合使用时, 对胞内总 ROS 生成和血小板 PF4 和 CCL5 释放水平的抑制作用无协同或相加效应; 此外, Src 家族蛋白激酶的激动剂 MLR-1023 可完全逆转 SFN 对 ox-LDL 诱导的血小板 PF4 和 CCL5 释放的抑制作用, 说明 SFN 抑制 ox-LDL 诱导的血小板活化主要通过下调 Src/Syk/ROS 信号通路实现的。此外, 研究发现 ox-LDL 通过调控血小板活化的机制还可能包括 cGMP/PKG、cAMP/PKA 和 Src/Syk/JNK2 等信号通路^[6,32-33]。有研究提示 SFN 可通过增加胞内 cAMP 水平来抑制生理性激动剂如凝血酶等诱导的血小板活化^[34]。至于 SFN 是否通过调控 cAMP/PKA 等其他信号通路发挥抑制 ox-LDL 诱导血小板活化的作用则需要我们今后进行更多的实验进一步探讨。同时, 膳食补充含 SFN 的食物(如西兰花等)是否对高脂血症动物和人群中 ox-LDL 浓度和血小板活化等具有抑制作用, 则需要体内研究更深入地探讨。

SFN 在西兰花、白花菜、卷心菜、甘蓝和萝卜等十字花科蔬菜中含量十分丰富, 因此在平时的日常生活中也很容易摄取。人群研究发现, 健康志愿者服用 100 g 的西兰花(含 SFN 约 61.3 mg)后, 血浆中 SFN 的浓度最高可达 7.4 $\mu\text{mol/L}$; 另外, 健康志愿者口服摄入 200 $\mu\text{mol/L}$ 西兰花芽异硫氰酸酯 1 h 后, 血浆中 SFN 的浓度可达 0.9~2.3 $\mu\text{mol/L}$ ^[35]。已有相关研究发现, 在体外实验中 SFN 作用于血小板的剂量高达 200 $\mu\text{mol/L}$ 时未见显著的细胞毒性作用^[19,37], 本体外实验使用的 SFN 浓度范围在 1.0~5.0 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 而且对 ox-LDL 诱导血小板活化产生抑制作用的剂量是 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$, 该浓度在生理剂量范围之内。然而, SFN 是否有望开发成为安全的抗血小板药物需更多的实验证实。总之, 本研究从营养膳食或从功能食品途径为 SFN 防治心血管疾

病提供新的分子机制和重要的实验依据。

[参考文献]

- [1] JANKOWSKI J, FLOEGE J, FLISER D, et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease: pathophysiological insights and therapeutic options [J]. *Circulation*, 2021, 143(11):1157-1172
- [2] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(3):209-220
- [3] STEVEN S, DIB M, HAUSDING M, et al. CD40L controls obesity-associated vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction in mice-translational aspects for man[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(2):312-323
- [4] KATTOOR A J, GOEL A, MEHTA J L. LOX-1: regulation, signaling and its role in atherosclerosis [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(7):218
- [5] XUE Y, CHEN, H L, ZHANG, S H, et al. Resveratrol confers vascular protection by suppressing TLR4/Syk/NLRP3 signaling in oxidized low-density lipoprotein-activated platelets[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:8819231
- [6] MAGWENZI S, WOODWARD C, WRAITH K S, et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade[J]. *Blood*, 2015, 125(17):2693-2703
- [7] LI L, ZHOU J W, WANG S, et al. Critical role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in promoting platelet hyperreactivity and thrombosis under hyperlipidemia[J]. *Haematologica*, 2022, 107(6):1358-1373
- [8] YA F L, XU X R, SHI Y I, et al. Coenzyme Q10 UPREGULATES PLatelet cAMP/PKA pathway and attenuates integrin α IIb β 3 signaling and thrombus growth[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(23):e1900662
- [9] MARTINEZ-GONZALEZ M A, GEA A, RUIZ-CANELA M. The mediterranean diet and cardiovascular health [J]. *Circ Res*, 2019, 124(5):779-798
- [10] MJZ A, PO B, SHMC D, et al. Almond oil for patients with hyperlipidemia: a randomized open-label controlled clinical trial[J]. *Complement Ther Med*, 2019, 42:33-36
- [11] ANAGNOSTIS P, PASCHOU S A, GOULIS D G, et al. Dietary management of dyslipidaemias. Is there any evidence for cardiovascular benefit? [J]. *Maturitas*, 2018, 108:45-52
- [12] FAHEY J W, ZALCMANN A T, TALALAY P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56(1):5-51
- [13] BRIONES-HERRERA A, EUGENIO-PEREZ D, REYES-OCAMPO J G, et al. New highlights on the health-improving effects of sulforaphane [J]. *Food Funct*, 2018, 9(5):

- 2589-2606
- [14] MANGLA B, JAVED S, SULTAN M H, et al. Sulforaphane: a review of its therapeutic potentials, advances in its nanodelivery, recent patents, and clinical trials [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(10): 5440-5458
- [15] SHEHATOU G S, SUDEK G M. Sulforaphane attenuates the development of atherosclerosis and improves endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Exp Biol Med(Maywood)*, 2016, 241(4): 426-436
- [16] BAI Y, WANG X L, ZHAO S, et al. Sulforaphane protects against cardiovascular disease via Nrf2 activation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 407580
- [17] LIU H, TALALAY P. Relevance of anti-inflammatory and antioxidant activities of exemestane and synergism with sulforaphane for disease prevention [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(47): 19065-19070
- [18] KU S K, BAE J S. Antithrombotic activities of sulforaphane via inhibiting platelet aggregation and FIIa/FXa [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(11): 1454-1463
- [19] CHUANG W Y, KUNG P H, KUO C Y, et al. Sulforaphane prevents human platelet aggregation through inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(6): 1120-1130
- [20] OH C H, SHIN J I, MO S J, et al. Antiplatelet activity of L-sulforaphane by regulation of platelet activation factors, glycoprotein IIb/IIIa and thromboxane A₂ [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2013, 24(5): 498-504
- [21] GILLESPIE S, HOLLOWAY P M, BECKER F, et al. The isothiocyanate sulforaphane modulates platelet function and protects against cerebral thrombotic dysfunction [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(16): 3333-3346
- [22] 牙甫礼, XIN YU, 张春梅, 等. 姜黄素对 H₂O₂ 诱导血小板凋亡的抑制作用及分子机制 [J]. *食品科学*, 2021, 42(13): 151-157
- [23] 牙甫礼, 张春梅, 陈彬林, 等. 辅酶 Q10 经蛋白激酶 A/胞浆型磷脂酶 A₂ 信号通路抑制血小板血栓素 A₂ 的生成 [J]. *食品科学*, 2021, 42(9): 130-136
- [24] PAN G X, CHANG L, ZHANG J J, et al. GSK669, a NOD2 receptor antagonist, inhibits thrombosis and oxidative stress via targeting platelet GPVI [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 183: 114315
- [25] ZHANG S, LIU Y Y, WANG X f, et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19 [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 120
- [26] OH R C, TRIVETTE E T, WESTERFIELD K L. Management of hypertriglyceridemia: common questions and answers [J]. *Am Fam Physician*, 2020, 102(6): 347-354
- [27] JOSHI S, BANERJEE M, ZHANG J, et al. Alterations in platelet secretion differentially affect thrombosis and hemostasis [J]. *Blood Adv*, 2018, 2(17): 2187-2198
- [28] BAKOGIANNIS C, SACHSE M, STAMATELOPOULOS K, et al. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis [J]. *Cytokine*, 2019, 122: 154157
- [29] QIN S, YANG C, HUANG W, et al. Sulforaphane attenuates microglia-mediated neuronal necroptosis through down-regulation of MAPK/NF- κ B signaling pathways in LPS-activated BV-2 microglia [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 133: 218-235
- [30] YANG M, COOLEY B C, LI W, et al. Platelet CD36 promotes thrombosis by activating redox sensor ERK5 in hyperlipidemic conditions [J]. *Blood*, 2017, 129(21): 2917-2927
- [31] YANG M A, KHOLMUKHAMEDOV A, SCHULTE M L, et al. Platelet CD36 signaling through ERK5 promotes caspase-dependent procoagulant activity and fibrin deposition in vivo [J]. *Blood Adv*, 2018, 2(21): 2848-2861
- [32] CAMMISOTTO V, BARATTA F, CASTELLANI V, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 inhibitors reduce platelet activation modulating ox-LDL pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 7193
- [33] BERGER M, RASLAN Z, ABURIMA A, et al. Atherogenic lipid stress induces platelet hyperactivity through CD36-mediated hyposensitivity to prostacyclin: the role of phosphodiesterase 3A [J]. *Haematologica*, 2020, 105(3): 808-819
- [34] JAYAKUMAR T, CHEN W F, LU W J, et al. A novel anti-thrombotic effect of sulforaphane via activation of platelet adenylate cyclase: *ex vivo* and *in vivo* studies [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(6): 1086-1095
- [35] GASPER A V, AL-JANOBI A, SMITH J A, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli [J]. *Am J Clin Nutr*, 2005, 82(6): 1283-1291
- [36] YE L, DINKOVA-KOSTOVA A T, WADE K L, et al. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 316(1-2): 43-53
- [37] GILLESPIE S, HOLLOWAY P M, BECKER F, et al. The isothiocyanate sulforaphane modulates platelet function and protects against cerebral thrombotic dysfunction [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(16): 3333-3346

[收稿日期] 2022-06-30

(本文编辑:唐震)