

萝卜硫素通过增强抗氧化能力抑制髓核细胞铁死亡

王泽^{1,2}, 于涵², 焦磊¹, 王琦², 郑国权², 孙建华¹

¹石河子大学第一附属医院脊柱外科, 新疆石河子 832003; ²解放军总医院第四医学中心骨科, 北京 100048

摘要:背景 椎间盘退变过程中, 髓核细胞铁死亡的发生与氧化应激失衡密切相关。萝卜硫素作为天然抗氧化剂, 其对髓核细胞铁死亡的调控作用及分子机制尚不明确。目的 分析萝卜硫素对Erastin诱导的髓核细胞铁死亡的影响, 并评估萝卜硫素对细胞活力及抗氧化能力的调节作用。方法 以人髓核细胞为研究对象, 分为对照组、Erastin处理组以及不同浓度的萝卜硫素干预组(2.5~40 μmol/L)。通过光学显微镜、流式细胞术、CCK-8试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒、Western blot等方法, 检测细胞形态、病死率(PI⁺率)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平、细胞活力和抗氧化能力以及细胞内Collagen II、Nrf2、GPX4、SLC7A11蛋白的表达情况。结果 Erastin处理组中, 髓核细胞体积增大、形态改变, 并伴随细胞死亡和细胞内ROS水平升高, 提示Erastin成功诱导了髓核细胞的铁死亡($P < 0.001$)。流式细胞术分析结果显示, 与对照组比较, Erastin处理可以使PI⁺细胞比例增加, 从对照组的 $5.11\% \pm 0.04\%$ 升至 $10.11\% \pm 0.58\%$ 。而萝卜硫素5 μmol/L和10 μmol/L处理组可以降低PI⁺细胞比例, 分别为 $5.08\% \pm 0.44\%$ 和 $3.38\% \pm 0.32\%$, 10 μmol/L萝卜硫素组的PI⁺细胞比例低于5 μmol/L萝卜硫素组($P < 0.001$)。以上结果表明, 萝卜硫素在一定浓度下能够显著抑制Erastin诱导的髓核细胞铁死亡, 10 μmol/L萝卜硫素对PI⁺细胞比例的抑制作用更强。Western blot结果进一步证实, 10 μmol/L萝卜硫素处理能够有效增强Nrf2的表达, 并恢复Collagen II、GPX4、SLC7A11蛋白的表达, 逆转Erastin处理引起的蛋白表达下降。结论 萝卜硫素能够通过增强髓核细胞的抗氧化能力, 抑制Erastin诱导的铁死亡, 进而维持细胞活力。

关键词:萝卜硫素; 铁死亡; 髓核细胞; 活性氧; 抗氧化能力

中图分类号: R681.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)04-0354-08

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25021904

引用本文: 王泽, 于涵, 焦磊, 等. 萝卜硫素通过增强抗氧化能力抑制髓核细胞铁死亡 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (4): 354-361.

Sulforaphane inhibits ferroptosis in nucleus pulposus cells by enhancing antioxidant capacity

WANG Ze^{1,2}, YU Han², JIAO Lei¹, WANG Qi¹, ZHENG Guoquan², SUN Jianhua²

¹Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Orthopaedics, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: ZHENG Guoquan. Email: zgq951@aliyun.com SUN Jianhua. Email: 758719985@qq.com

Abstract: Background Ferroptosis in nucleus pulposus cells plays a crucial role in intervertebral disc degeneration, and sulforaphane (SFN), a natural compound, is known for its antioxidant properties. **Objective** To analyze the effects of SFN on Erastin-induced ferroptosis in nucleus pulposus cells and evaluate its regulation of cell viability and antioxidant capacity. **Methods** Human nucleus pulposus cells were used as the study subjects and treated with different groups, including control group, Erastin-treated group, and SFN intervention groups (2.5 μmol/L to 40 μmol/L). Cell morphology, death rate, ROS levels, cell viability, and antioxidant capacity were assessed using optical microscopy, flow cytometry, CCK-8 assay, and Western blotting. **Results** In the Erastin-treated group, cells exhibited increased volume, morphological changes, and significant cell death with elevated ROS levels, indicating successful induction of ferroptosis in nucleus pulposus cells. Flow cytometry analysis showed a significant increase in PI⁺ cell proportion after Erastin treatment, rising from $(5.11 \pm 0.04)\%$ in the control group to $(10.11 \pm 0.58)\%$. However, the PI⁺ cell proportion in the SFN 5 μmol/L and 10 μmol/L groups significantly decreased to $(5.08 \pm 0.44)\%$ and $(3.38 \pm 0.32)\%$, respectively, with the 10 μmol/L SFN group showing a significantly lower proportion compared to the 5 μmol/L SFN group ($P < 0.001$). These results indicated that SFN at certain concentrations could significantly inhibit Erastin-induced ferroptosis, with 10 μmol/L SFN showing the most significant effect in reducing PI⁺ cells. Western blot analysis further confirmed that 10 μmol/L SFN treatment effectively enhanced the expression of Nrf2 and restored the expression of Collagen II, GPX4, and SLC7A11

收稿日期: 2025-02-19

基金项目: 省部级课题

第一作者: 王泽, 硕士, 医师. Email: yibanwangze@163.com

通信作者: 郑国权, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师. Email: zgq951@aliyun.com

孙建华, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师. Email: 758719985@qq.com

proteins, reversing the protein expression decline caused by Erastin treatment. **Conclusion** Sulforaphane can enhance the antioxidant capacity of nucleus pulposus cells and inhibit Erastin-induced ferroptosis, thereby maintaining cell viability, which provides experimental evidence for sulforaphane as a potential therapeutic strategy for intervertebral disc degeneration.

Keywords: sulforaphane; ferroptosis; nucleus pulposus cells; reactive oxygen species; antioxidant capacity

Cited as: Wang Z, Yu H, Jiao L, et al. Sulforaphane inhibits ferroptosis in nucleus pulposus cells by enhancing antioxidant capacity[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(4): 354-361.

髓核细胞是椎间盘的重要组成部分,其功能与健康状态直接影响着脊柱的生物力学性能^[1-2]。随着年龄的增长和各种外部因素的影响,髓核细胞逐渐受到损伤,导致椎间盘退变。近年来,铁死亡作为一种新型的细胞死亡方式,已被发现与多种疾病的进展密切相关,在椎间盘退变中同样起着关键作用^[3-4]。铁死亡的特点是铁离子积累和活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成,并在细胞内引发氧化应激,导致细胞死亡。现有研究表明,髓核细胞在退变过程中,铁死亡可能是其中重要的致病机制^[5]。萝卜硫素作为一种天然植物化合物,已被证实有抗氧化和抗炎作用^[6]。萝卜硫素能通过调节体内的抗氧化酶系统,减少氧化应激和自由基损伤,从而对细胞起到保护作用^[7]。但萝卜硫素抑制髓核细胞铁死亡的效果和机制尚不明确。本研究旨在通过体外实验探讨萝卜硫素在抑制 Erastin 诱导的髓核细胞铁死亡中的作用。通过深入理解萝卜硫素的作用机制,有望为椎间盘退变的临床治疗提供有益参考,并推动相关生物治疗方法的应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究使用的人髓核组织标本来源于2024年8月5日石河子大学第一附属医院脊柱外科椎间孔镜手术取得的5例患者髓核组织。本研究经石河子大学第一附属医院伦理委员会审查批准(伦理批件号:KJ2023-177-01)。术前患者已签署知情同意书。

1.2 实验试剂

DMEM/F12完全培养基(含10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素)、酶试剂:胰蛋白酶(Gibco,美国);II型胶原酶(Sigma,美国)。流式试剂:PI染料、DCFH-DA探针(碧云天,中国)。化学试剂:Erastin(MCE,中国)、萝卜硫素(MCE,中国)。细胞增殖检测:CCK-8溶液(兰博利德生物,中国)。RIPA(强)组织细胞快速裂解液(索莱宝,中国)、Loading buffer(4×)(BIO-RAD,美国)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、彩色预染蛋白质分子量标准

(10~180 kU)、ECL化学发光试剂(碧云天,中国)、聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)转移膜(Cytiva,美国)。

(1)一抗:Collagen Type II Polyclonal antibody (28459-1-AP)、NRF2, NFE2L2 Polyclonal antibody (16396-1-AP)、SLC7A11/xCT Polyclonal antibody (26864-1-AP)、GPX4 Monoclonal antibody (67763-1-Ig)、 β actin Monoclonal antibody (66009-1-Ig)(Proteintech,中国)。(2)二抗:HRP-conjugate Goat Anti-Rabbit (SA00001-2)、HRP-conjugate Goat Anti-Mouse (SA00001-1)(Proteintech,中国)。

1.3 仪器设备

倒置荧光显微镜购自Leica公司,酶标仪购自杭州奥盛公司,流式细胞仪购自Beckman公司,电泳仪购自BIO-RAD公司,全自动化学发光分析仪购自上海天能公司。

1.4 Erastin及萝卜硫素溶液配制

取1 mg的萝卜硫素粉末,溶解于0.182 8 mL DMSO中,得到10 mmol/L储备液,过滤分装于200 μ L EP管中,-80 $^{\circ}$ C避光保存,根据所需浓度梯度用完全培养基稀释为0.5 μ mol/L、1 μ mol/L、2 μ mol/L细胞培养液备用。

取1 mg的萝卜硫素粉末,溶解于0.564 0 mL DMSO中,得到10 mmol/L储备液,过滤分装于200 μ L EP管中,-20 $^{\circ}$ C避光保存,根据所需浓度梯度用完全培养基稀释为2.5 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L细胞培养液备用。

1.5 原代髓核细胞提取与培养

于石河子大学第一附属医院脊柱外科手术室取得新鲜人髓核组织,使用0.9%氯化钠注射液冲洗后,放入装有少量DMEM/F12培养液的无菌培养瓶,置入冰盒内迅速带回实验室。在超净台内,将髓核组织用无菌PBS冲洗3次去除血污,弃去纤维环。将胶冻样或软骨样髓核组织在EP管内剪成尽可能小的碎块。37 $^{\circ}$ C下用0.2%(m/v)的II型胶原酶消化4 h,期间不间断振荡,至组织块基本消失。1 000 r/min离心5 min,去除上清液,用DMEM/F12培养液重悬细胞。用计数板进行细胞计数,以

1×10^6 /mL的细胞密度接种于直径T25培养瓶中,加入6 mL含10%胎牛血清、1%青霉素及链霉素的DMEM/F12完全培养基。于37°C、5% CO₂培养箱中培养。每2~3 d换液1次,未较好贴壁时可采用半换液,每2 d用倒置相差显微镜进行观察、拍照。90%融合后用胰酶消化后1:2传代。取第3~5代细胞进行实验。

1.6 实验分组及干预

将生长良好的髓核细胞随机分为对照组(NC组)、Erastin刺激组(0.5 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L)、萝卜硫素干预组(2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L)、Erastin(1 μmol/L)+萝卜硫素(5 μmol/L、10 μmol/L)共刺激组。NC组不做任何处理,其他组依次给予不同浓度Erastin、萝卜硫素,继续培养12 h。

1.7 细胞活力检测

CCK-8法取生长良好的髓核细胞,以 1×10^4 /孔的细胞密度接种于96孔板,每组3个复孔,培育24 h至全部贴壁。根据分组进行不同处理,处理结束后,按CCK-8试剂盒说明书,每孔加入100 μL CCK-8溶液,37°C孵育1 h后,使用酶标仪检测各组髓核细胞吸光度值,采用酶标仪在450 nm波长处读取吸光度值。细胞活力=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%,空白组只加培养液、不加细胞。

1.8 Collagen II、Nrf2、GPX4、SLC7A11蛋白表达检测

Western blot法检测Collagen II、Nrf2、GPX4、SLC7A11蛋白表达情况。细胞取出后使用提前预冷的无菌PBS清洗3次,加入Ripa裂解液于冰上充分裂解30 min,使用超声波破碎仪于冰上破碎细胞30 s×15次,12 000 r/min离心后取上清,加入Loading buffer (4×),100°C孵育10 min。使用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,湿转至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入一抗(稀释比均为1:1 000)与膜4°C孵育过夜,TBST洗膜3次,加入二抗(稀释比为1:10 000)与膜室温孵育1 h,洗膜3次后加入化学发光试剂,置于全自动化学发光分析仪中检测。通过TANON GIS软件读取相关条带,Image J分析灰度值,每组实验重复3次。

1.9 细胞死亡率及活性氧水平检测

采用流式细胞术进行检测。在处理结束后,使用无菌PBS清洗12孔板中的细胞3次,使用无

EDTA 0.25%胰酶将髓核细胞消化后收集于流式管中,4°C下离心5 min;弃上清后加入3 mL PBS重悬细胞,4°C下离心5 min;弃上清后加入500 μL的结合缓冲液重悬;加入5 μL碘化丙啶(propidium iodide, PI)混匀;室温下避光反应10 min。于1 h内上机检测PI荧光强度(每组20 000个细胞)。用FlowJo软件分析细胞,根据对照组(不加入任何染料)区分不同状态比例和数目,获得各组细胞死亡率,每组实验重复3次。或加入0.5 μL DCFH-DA(1:1 000)溶液,室温下避光反应10 min。于1 h内上机检测细胞活性氧水平(每组20 000个细胞)。用FlowJo(v10.8.1)软件分析细胞平均荧光强度,每组实验重复3次。

1.10 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间差异分析,为减少统计误差,单因素方差分析后进一步进行Tukey's HSD检验。数据的统计分析均采用GraphPad Prism 9.5.1软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人原代髓核细胞的培养与鉴定

2.1.1 细胞形态观察 将消化完全的人原代髓核细胞接种于T25培养瓶中,37°C、5% CO₂条件下培养,于第1天(D1)、第3天(D3)、第5天(D5)和第7天(D7)在倒置光学显微镜下观察。结果显示,D1仅见少量细胞贴壁,细胞形态较圆;D3细胞数量增多并逐渐呈梭形或多边形;D5融合度进一步提高;D7融合度可达80%~90%,此时可进行传代或后续实验。见图1。

2.1.2 Collagen II免疫荧光鉴定 采用免疫荧光检测Collagen II表达情况,结果显示,细胞胞浆中Collagen II呈红色荧光,与DAPI(蓝色)染色的细胞核相对应,对照组(无一抗)未见明显荧光信号,提示所培养细胞为人原代髓核细胞。见图2。

2.2 Erastin刺激导致铁死亡

2.2.1 光学显微镜观察 将人原代髓核细胞分别以0.5 μmol/L、1 μmol/L、2 μmol/L的Erastin处理12 h后,与对照组相比,Erastin处理组细胞体积增大,出现空泡样变性,细胞边缘不规则,且有少量细胞脱落,细胞损伤程度随Erastin浓度升高而加重。见图3。

2.2.2 PI染色检测细胞死亡 采用流式细胞术结合PI染色检测Erastin处理后的人原代髓核细胞

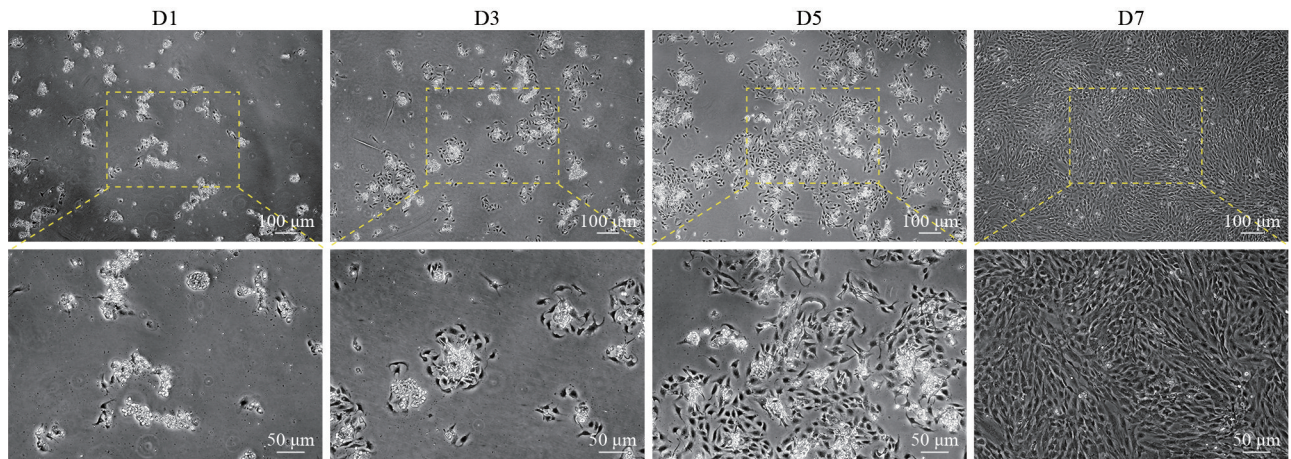


图 1 人原代髓核细胞在不同培养时间的形态变化(上图 40 ×, 下图 100 ×)

Fig. 1 Morphological changes of human nucleus pulposus cells at different culture days

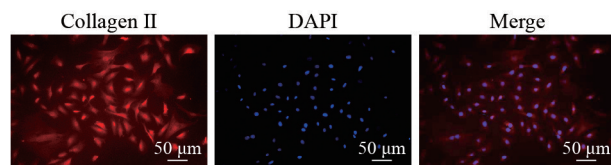


图 2 人原代髓核细胞 Collagen II 免疫荧光鉴定结果(100 ×)

Fig. 2 Collagen II immunofluorescence identification of human nucleus pulposus cells (100 ×)

死亡情况。结果显示, 与对照组比较, Erastin 组 PI 阳性率升高 ($P < 0.01$), 且随 Erastin 浓度升高 (0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$) 而进一步上升, 提示 Erastin 可有效诱导细胞死亡并呈一定剂量依赖性。见图 4。

2.2.3 ROS 水平检测 采用流式细胞术结合 DCFH-DA 探针检测细胞内活性氧水平。结果显

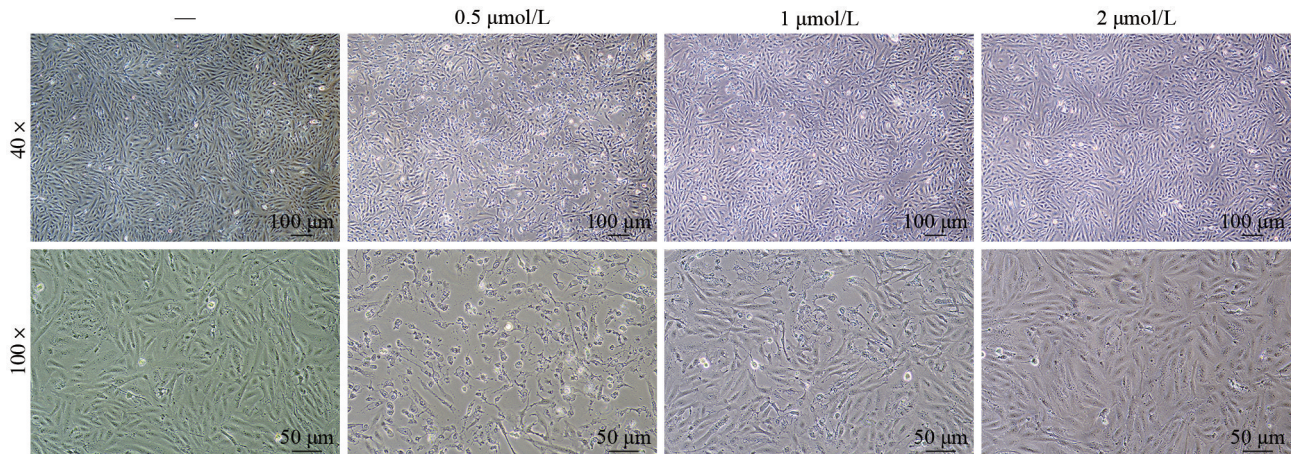
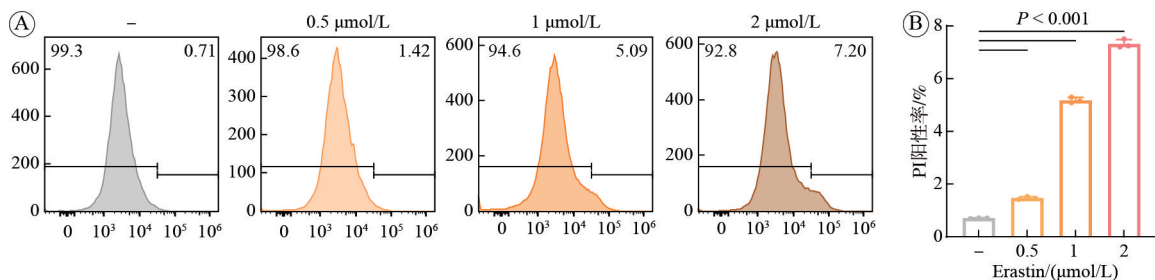


图 3 不同浓度 Erastin 处理后人原代髓核细胞的形态变化(上图 40 ×, 下图 100 ×)

Fig. 3 Morphological changes of human nucleus pulposus cells under different concentrations of Erastin

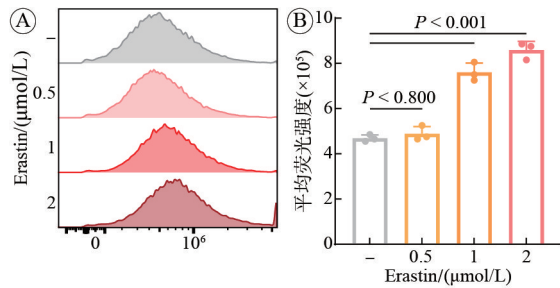


A: 流式检测不同浓度 Erastin 后细胞 PI 阳性率; B: 统计结果(n=3)。

图 4 Erastin 处理后人原代髓核细胞 PI 染色结果

Fig. 4 PI staining analysis of human nucleus pulposus cells after Erastin treatment

示, 对照组细胞 ROS 阳性信号较弱; Erastin 组随着浓度增加, ROS 峰值逐渐右移($P < 0.05$), 其中 $2 \mu\text{mol/L}$ 组 ROS 强度约为对照组的 2 倍($P < 0.001$)。提示 Erastin 刺激可提高细胞内氧化应激水平并促使铁死亡发生。见图 5。



A: 流式检测不同浓度 Erastin 后 ROS 阳性信号; B: 统计结果($n=3$)。

图 5 Erastin 处理后人原代髓核细胞 ROS 水平变化

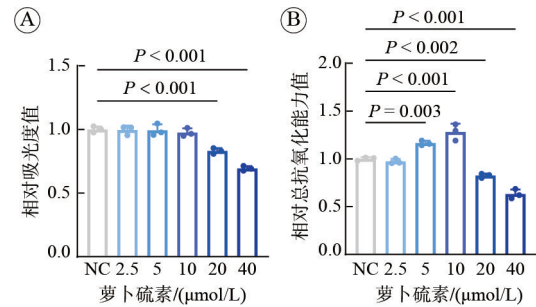
Fig. 5 Changes in ROS levels of human nucleus pulposus cells after Erastin treatment

2.3 不同浓度萝卜硫素干预对细胞活力和抗氧化的影响

2.3.1 细胞活力 根据 CCK-8 检测结果, 萝卜硫素 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 组的细胞相对吸光度值分别为 1.00 ± 0.03 和 1.00 ± 0.04 , 与对照组 (1.00 ± 0.03) 比较, 差异无统计学意义($P=0.999$, $P=0.998$)。萝卜硫素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组的相对吸光度值为 1.02 ± 0.04 , 与对照组差异无统计学意义($P=0.815$)。萝卜硫素 $20 \mu\text{mol/L}$ 和 $40 \mu\text{mol/L}$ 组的相对吸光度值分别为 0.83 ± 0.05 和 0.69 ± 0.06 , 低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.001$)。见图 6A。

2.3.2 总抗氧化能力 根据 T-AOC 检测结果, 萝卜硫素 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较, 差异无统计学意义($P=0.9130$)。萝卜硫素 $5 \mu\text{mol/L}$ 组和 $10 \mu\text{mol/L}$ 组的 T-AOC 值分别为 1.08 ± 0.03 和 1.12 ± 0.04 , 均高于对照组($P=0.003$, $P < 0.001$)。萝卜硫素 $20 \mu\text{mol/L}$ 组和 $40 \mu\text{mol/L}$ 组的相对 T-AOC 值分别为 0.83 ± 0.04

和 0.69 ± 0.05 , 均低于对照组($P=0.002$, $P < 0.001$)。见图 6B。



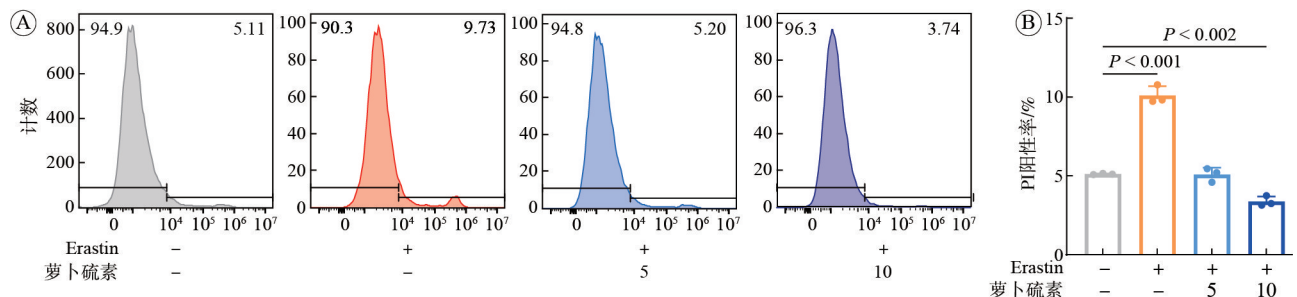
A: CCK-8 法检测不同浓度萝卜硫素处理后细胞吸光度; B: 流式细胞术检测总抗氧化能力(T-AOC)统计结果($n=3$)。

图 6 不同浓度萝卜硫素处理后细胞吸光度和总抗氧化能力变化
Fig. 6 Changes in absorbance and total antioxidant capacity after treatment with different concentrations of SFN

2.4 Erastin 与萝卜硫素联合处理对细胞死亡和活力的影响

2.4.1 PI^+ 细胞比例分析 流式细胞术结果显示, Erastin 处理组 PI^+ 细胞比例增加, 表明 Erastin 诱导了较高的铁死亡水平。对照组(无 Erastin 和单独萝卜硫素处理) PI^+ 细胞比例较低, 为 $5.11\% \pm 0.04\%$ 。加入 Erastin 后, PI^+ 细胞比例升高, 为 $10.11\% \pm 0.58\%$ 。加入萝卜硫素后, $5 \mu\text{mol/L}$ 组和 $10 \mu\text{mol/L}$ 组的 PI^+ 细胞比例降低, 分别为 $5.08\% \pm 0.44\%$ 和 $3.38\% \pm 0.32\%$, 且 $10 \mu\text{mol/L}$ 组的比例低于 $5 \mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.001$)。这些结果表明, 萝卜硫素能够抑制 Erastin 诱导的铁死亡, 且 $10 \mu\text{mol/L}$ 萝卜硫素对 PI^+ 细胞比例的抑制作用更强。见图 7A、图 7B。

2.4.2 Western blot 检测 Collagen II、SLC7A11、GPX4 蛋白表达 Western blot 检测结果显示, 对照组细胞中 Collagen II 表达水平较高, GPX4、SLC7A11 亦维持在较高水平; 经 Erastin(+) 刺激后, Collagen II 表达有所下降, GPX4、SLC7A11 表达下调, 提示铁死亡发生并伴随细胞活力降低; 加入萝卜硫素后(Erastin+萝卜硫素组), 上述蛋白表



A: 流式细胞术检测不同浓度萝卜硫素($0 \mu\text{mol/L}$, $5 \mu\text{mol/L}$, $10 \mu\text{mol/L}$)处理后, Erastin ($1 \mu\text{mol/L}$) 诱导的 PI^+ 阳性细胞比例; B: 统计结果($n=3$)。

图 7 Erastin 和不同浓度萝卜硫素处理后 PI^+ 阳性细胞比例

Fig. 7 PI^+ positive cell percentage after Erastin and different concentrations of SFN treatment

达均较 Erastin 组回升($P < 0.05$), 提示萝卜硫素可逆转 Erastin 诱导的铁死亡并维持细胞活力; β -actin 作为内参蛋白, 在各组中表达稳定。见图 8。

3 讨论

本研究的目的是分析萝卜硫素通过抗氧化机制对细胞活力的保护效果, 并探讨其抑制 Erastin 诱导的髓核细胞铁死亡的作用。铁死亡作为一种铁依赖性程序性细胞死亡方式, 被广泛认为与椎间盘退变密切相关, 前期研究结果显示, Erastin 处理能够增加髓核细胞内 ROS 水平, 引发细胞死亡^[8-10]。本研究选择了常用的 12 h 刺激时间, 并在刺激后观察到明显的细胞形态变化。Erastin 诱导的髓核细胞损伤表现为细胞体积增大、形态改变、细胞死亡和 ROS 水平升高, 表明 Erastin 通过诱导氧化应激促使髓核细胞发生铁死亡, 与既往研究结果一致。最终我们选取了 1 $\mu\text{mol/L}$ Erastin 作为本实验刺激浓度。

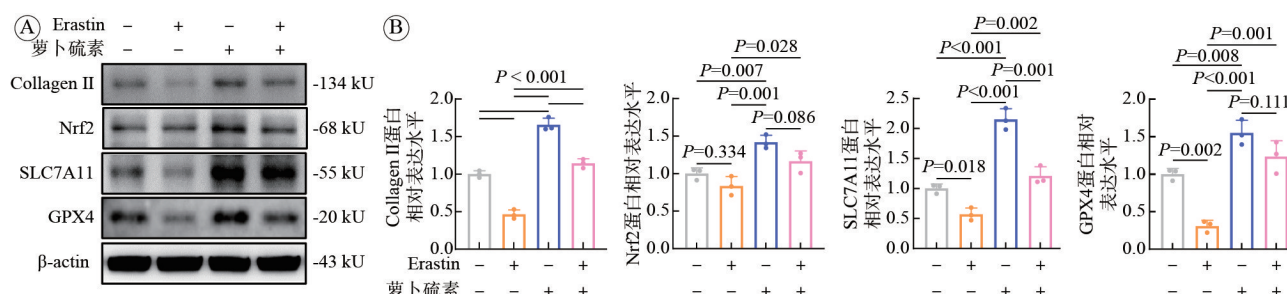
前期研究发现, 萝卜硫素具有抗氧化作用, 可减轻 TNF- α 诱导的 Caco-2 细胞单层透化和炎症^[6], 能够通过激活 KEAP1-Nrf2 通路增强抗氧化、减少炎症信号以治疗银屑病^[11], 还能够通过激活 Nrf2 保护肾^[12]。现有研究表明, 抗氧化剂可以通过减少氧化应激, 减轻细胞损伤和铁死亡。我们发现文献中大多使用 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 等浓度的萝卜硫素干预原代细胞, 故在本实验中选取 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度验证髓核细胞的最适刺激浓度。我们发现萝卜硫素浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞的活力有所下降, 推测可能是由于高浓度所产生的细胞毒性, 或是由于 0.2%、0.4% DMSO 所造成的细胞毒性。故我们最终选择萝卜硫素 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的刺激浓度。本研

究中, 萝卜硫素的干预(5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$)有效提高了细胞的总抗氧化能力, 减少了 Erastin 引起的细胞死亡。这验证了萝卜硫素可以增加细胞内抗氧化酶(如 GPX4)的活性, 减少了自由基的积累, 抑制氧化应激。

Western blot 实验进一步证实, 萝卜硫素可增强 Nrf2 的表达, 萝卜硫素通过降低 Nrf2 启动子初始 15 个 CpGs 的甲基化增强 Nrf2 的转录, 还可以通过化学修饰 Kelch 样环氧氯丙烷(ECH)相关蛋白-1(Keap1)的半胱氨酸残基(主要是 Cys151), 阻止 Keap1 和 Nrf2 的结合, 进而阻断 Nrf2 的泛素化和降解, 使 Nrf2 的积累和依赖 Nrf2 调控的下游基因转录增强^[13-14]。萝卜硫素能够有效逆转 Erastin 引起的细胞活力下降(Collagen II), 并改善 Erastin 引起的 GPX4、SLC7A11 等铁死亡相关蛋白的下降, 表明萝卜硫素不仅通过增强抗氧化能力保护细胞活力, 还可能通过调节铁代谢相关蛋白抑制铁死亡的发生, 这与既往研究结果一致^[11, 15-16]。这一机制也代表了萝卜硫素抑制椎间盘退变的潜力。

近年来, 铁死亡作为一种新型的细胞死亡方式, 已被广泛研究并被认为与多种疾病的发生发展密切相关。在椎间盘退变的研究中, 铁死亡被认为是重要机制之一^[5, 8], 并作为缓解椎间盘退变的新型纳米材料的重要靶点^[17]。与其他抗氧化剂(如白藜芦醇、茶多酚等)相比, 萝卜硫素以其较低的毒性, 成为一种有良好临床应用前景的化合物^[18-19]。本研究中的数据与既往研究结果一致, 表明萝卜硫素在抗氧化和抗铁死亡方面具有显著的保护效果^[12, 14, 20-22]。

此外, 萝卜硫素的作用还可能与其对细胞内多种信号通路的调节有关, 研究指出, 萝卜硫素能够通过激活 Nrf2 通路, 增强抗氧化酶的表达, 从而提高细胞对氧化应激的耐受性^[11, 16, 23-25]。本研



A: Western blot 检测 Erastin (1 $\mu\text{mol/L}$) 与萝卜硫素(10 $\mu\text{mol/L}$)处理后蛋白表达情况; B: 统计结果($n=3$)。

图 8 Erastin 和萝卜硫素处理后 Collagen II、Nrf2、SLC7A11 和 GPX4 表达水平的 Western blot 检测与定量分析

Fig. 8 Western blot detection and quantitative analysis of protein expression levels of Collagen II, Nrf2, SLC7A11, and GPX4 in human nucleus pulposus cells after Erastin and SFN treatment

究的结果进一步验证了这一观点,提示萝卜硫素可能通过Nrf2信号通路调节下游GPX4、SLC7A11等相关抗氧化蛋白的表达,在后续实验中我们将继续明确在髓核细胞中萝卜硫素与Nrf2的关系,进一步阐述萝卜硫素对腰椎间盘突出髓核的保护作用。

本研究为萝卜硫素抑制髓核细胞铁死亡的作用提供了初步的实验依据,但存在一定局限。本研究主要在体外细胞模型中进行,尽管结果较为一致,但是否能够在体内模型中得到同样的效果仍需进一步验证。未来的研究应在动物模型中进一步验证萝卜硫素的作用,并评估其对椎间盘退变等疾病的潜在疗效。

铁死亡已被证实与多种疾病密切相关,尤其是椎间盘退变和神经退行性疾病。因此,寻找能够有效抑制铁死亡的方法具有重要的临床意义。萝卜硫素作为一种天然植物化合物,具有较低的毒性和较好的生物相容性,为其在临床中的应用提供了理论基础^[26]。未来的临床研究可以将萝卜硫素作为辅助治疗药物,用于铁死亡相关疾病的治疗,如椎间盘退变、阿尔茨海默病等^[27]。

综上所述,本研究揭示了萝卜硫素在椎间盘髓核细胞中的抗氧化能力,其能够抑制Erastin诱导的铁死亡,进而维持细胞活力。萝卜硫素作为一种天然化合物,具有良好的临床应用潜力,未来的研究应进一步探索萝卜硫素在动物模型中的临床效果。

作者贡献 王泽: 论文整体构思与设计,文献检索,整理并撰写论文初稿;于涵、王琦、焦磊: 提出研究思路,文献检索,设计研究方案,对初稿进行修订;郑国权、孙建华: 论文的质量控制及审校,对论文整体负责。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 同意在文章出版后共享研究中收集的所有去标识化个体数据以及研究方案、统计分析计划、知情同意书、临床研究报告和统计代码。Email: yibanwangze@163.com。

参考文献

- Jiang WS, Glaeser JD, Kaneda G, et al. Intervertebral disc human nucleus pulposus cells associated with back pain trigger neurite outgrowth in vitro and pain behaviors in rats [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15 (725): eadg7020.
- Gu HW, Li Q, Liu ZC, et al. SPP1-ITGa5/β1 accelerates calcification of nucleus pulposus cells by inhibiting mitophagy via ubiquitin-dependent PINK1/PARKIN pathway blockade [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12 (7): e2411162.
- Wu JJ, Qin TY, Han WT, et al. GLS1-mediated glutamine

- metabolism mitigates oxidative stress-induced matrix degradation, ferroptosis, and senescence in nucleus pulposus cells by modulating Fe²⁺ homeostasis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 228: 93-107.
- Lu X, Li DC, Lin ZD, et al. HIF-1α-induced expression of the m6A reader YTHDF1 inhibits the ferroptosis of nucleus pulposus cells by promoting SLC7A11 translation [J]. *Aging Cell*, 2024, 23 (9): e14210.
- Xiang ZQ, Zhang PF, Jia CW, et al. Piezo1 channel exaggerates ferroptosis of nucleus pulposus cells by mediating mechanical stress-induced iron influx [J]. *Bone Res*, 2024, 12 (1): 20.
- Zhu W, Cremonini E, Mastaloudis A, et al. Glucoraphanin and sulforaphane mitigate TNFα-induced Caco-2 monolayers permeabilization and inflammation [J]. *Redox Biol*, 2024, 76: 103359.
- Zou QM, Zhou XF, Lai JQ, et al. Targeting p62 by sulforaphane promotes autolysosomal degradation of SLC7A11, inducing ferroptosis for osteosarcoma treatment [J]. *Redox Biol*, 2025, 79: 103460.
- Zhu DX, Wang ZH, Li YH, et al. Humanin reduces nucleus pulposus cells ferroptosis to alleviate intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo study [J]. *J Orthop Translat*, 2025, 50: 274-294.
- Lian SL, Huang J, Zhang Y, et al. The effect of platelet-rich plasma on ferroptosis of nucleus pulposus cells induced by Erastin [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2024, 41: 101900.
- Jin J, Chen Y, Chen XM, et al. Beyond a ferroptosis inducer: erastin can suppress nutrient deprivation induced cell death in the intervertebral disc [J]. *Spine J*, 2025, 25 (3): 597-608.
- Zhang Y, Wu QF, Liu J, et al. Sulforaphane alleviates high fat diet-induced insulin resistance via AMPK/Nrf2/GPx4 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152: 113273.
- Aranda-Rivera AK, Cruz-Gregorio A, Amador-Martínez I, et al. Sulforaphane protects from kidney damage during the release of unilateral ureteral obstruction (RUO) by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2): Role of antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic mechanisms [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 212: 49-64.
- Li D, Shao R, Wang N, et al. Sulforaphane Activates a lysosome-dependent transcriptional program to mitigate oxidative stress [J]. *Autophagy*, 2021, 17 (4): 872-887.
- Ma CJ, Gu CD, Lian PP, et al. Sulforaphane alleviates psoriasis by enhancing antioxidant defense through KEAP1-NRF2 Pathway activation and attenuating inflammatory signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14 (11): 768.
- Zheng ZJ, Xu JF, Mao Y, et al. Sulforaphane improves post-resuscitation myocardial dysfunction by inhibiting cardiomyocytes ferroptosis via the Nrf2/IRF1/GPX4 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 179: 117408.
- Deng XH, Lin BF, Wang F, et al. Mangiferin attenuates osteoporosis by inhibiting osteoblastic ferroptosis through Keap1/Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155282.
- Yang X, Chen Y, Guo JD, et al. Polydopamine nanoparticles targeting ferroptosis mitigate intervertebral disc degeneration via reactive oxygen species depletion, iron ions chelation, and GPX4 ubiquitination suppression [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10 (13): e2207216.
- Ruiz-Alcaraz AJ, Baquero L, Pérez-Munar PM, et al. In vitro study of the differential anti-inflammatory activity of dietary phytochemicals upon human macrophage-like cells as a previous

- step for dietary intervention [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (19): 10728.
- 19 Hernández-Cruz EY, Aparicio-Trejo OE, Eugenio-Pérez D, et al. Sulforaphane exposure prevents cadmium-induced toxicity and mitochondrial dysfunction in the nematode *Caenorhabditis elegans* by regulating the insulin/insulin-like growth factor signaling (IIS) pathway [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13 (5): 584.
- 20 Psefteli PM, Morris JK, Ehler E, et al. Sulforaphane induced NRF2 activation in obese pregnancy attenuates developmental redox imbalance and improves early-life cardiovascular function in offspring [J]. *Redox Biol*, 2023, 67: 102883.
- 21 Htut NW, Onkokoong T, Saelim M, et al. Live-cell imaging Unveils stimulus-specific dynamics of Nrf2 activation in UV-exposed melanoma cells: Implications for antioxidant compound screening [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 211: 1-11.
- 22 Bernuzzi F, Maertens A, Saha S, et al. Sulforaphane rewires central metabolism to support antioxidant response and achieve glucose homeostasis [J]. *Redox Biol*, 2023, 67: 102878.
- 23 Liu JW, Huang C, Liu JM, et al. Nrf2 and its dependent autophagy activation cooperatively counteract ferroptosis to alleviate acute liver injury [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106563.
- 24 Zhang DD. Thirty years of NRF2: advances and therapeutic challenges [J/OL]. <https://doi.org/10.1038/s41573-025-01145-0>.
- 25 Li BW, Ming H, Qin SY, et al. Redox regulation: mechanisms, biology and therapeutic targets in diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10: 72.
- 26 Wang YN, He XY, Cheng N, et al. Unveiling the nutritional veil of sulforaphane: with a major focus on glucose homeostasis modulation [J]. *Nutrients*, 2024, 16 (12): 1877.
- 27 Minuti A, Mazzon E, Iori R, et al. Bioactivated glucoraphanin improves cell survival, upregulating phospho-AKT and modulates genes involved in DNA repair in an in vitro Alzheimer's disease model: a network-transcriptomic analysis [J]. *Nutrients*, 2024, 16 (23): 4202.

(责任编辑:孟晓彤)

(上接第346页)

- 23 Liao ZH, Lan HQ, Jian XT, et al. Myofiber directs macrophages IL-10-Vav1-Rac1 efferocytosis pathway in inflamed muscle following CTX myoinjury by activating the intrinsic TGF- β signaling [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21 (1): 168.
- 24 Ismael A, Kim JS, Kirk JS, et al. Role of transforming growth factor- β in skeletal muscle fibrosis: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (10): 2446.
- 25 Yao H, Qian J, Bian XT, et al. miR-27b-3p reduces muscle fibrosis during chronic skeletal muscle injury by targeting TGF- β 1/Smad pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19 (1): 329.
- 26 Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-mediated regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy [J]. *Cells*, 2020, 9 (9): 1970.
- 27 Baht GS, Bareja A, Lee DE, et al. Meteorin-like facilitates skeletal muscle repair through a Stat3/IGF-1 mechanism [J]. *Nat Metab*, 2020, 2 (3): 278-289.
- 28 Zhang M, Zhou Q, Liang QQ, et al. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17 (1): 100-106.
- 29 Zhu QY, Huang X, Deng BT, et al. Tumor micro-environment induced TRAIL secretion from engineered macrophages for anti-tumor therapy [J]. *Cell Immunol*, 2024, 403/404: 104857.
- 30 Yi LX, Weng TJ, Nie PH, et al. Overexpression of interleukin-10 in engineered macrophages protects endothelial cells against LPS-induced injury in vitro [J]. *FEBS Open Bio*, 2022, 12 (3): 605-615.

(责任编辑:孟晓彤)

(上接第353页)

- 13 Zhang ZR, Su CC, Meng JG, et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy for evaluating high-altitude pulmonary edema in canines [J]. *Heliyon*, 2023, 9 (12): e22378.
- 14 Dehnert C, Berger MM, Mairbäurl H, et al. High altitude pulmonary edema: a pressure-induced leak [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007, 158 (2/3): 266-273.
- 15 Gojkovic M, Darmasaputra GS, Veliça P, et al. Deregulated hypoxic response in myeloid cells: a model for high-altitude pulmonary oedema (HAPE) [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2020, 229 (2): e13461.
- 16 Woods P, Alcock J. High-altitude pulmonary edema [J]. *Evol Med Public Health*, 2021, 9 (1): 118-119.
- 17 袁牧, 邢伟, 徐祥. 高原肺水肿新型生物标记物的研究 [J]. *医学信息*, 2023, 36 (15): 12-18.
- 18 李天天. 不同剂量1, 25二羟维生素D3对SD大鼠高原肺水肿的防治效果研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2023.
- 19 林雪, 雷有芳, 蒲小燕. 不同低氧胁迫方式构建SD大鼠高原肺水肿模型的比较研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40 (5): 367-373.
- 20 Wang YL, Shen ZR, Pei CX, et al. Eleutheroside B ameliorated high altitude pulmonary edema by attenuating ferroptosis and necroptosis through Nrf2-antioxidant response signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 156: 113982.
- 21 Li N, Li QY, Bai JR, et al. The multiple organs insult and compensation mechanism in mice exposed to hypobaric hypoxia [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2020, 25 (5): 779-791.
- 22 Bhattacharya S, Shrimali NM, Mohammad G, et al. Gain-of-function Tibetan PHD2D4E; C127S variant suppresses monocyte function: a lesson in inflammatory response to inspired hypoxia [J]. *EBioMedicine*, 2021, 68: 103418.

(责任编辑:孟晓彤)