

• 论 著 •

同型半胱氨酸对脐静脉内皮细胞凋亡及活性氧生成的影响

赵高阳, 石蕴琦, 伊桐凝, 张静生

(辽宁中医药大学附属医院检验科, 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨同型半胱氨酸(Hcy)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的损伤作用及机制。方法 培养 HUVECs, Hcy 以不同浓度(0、0.01、0.1、1.0、3.0、5.0 mmol/L)和不同作用时间(3、6、12、24 h)进行干预。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率及活性氧。结果 随着 Hcy 浓度增高或作用时间延长, HUVECs 凋亡率、活性氧生成均明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 Hcy 能诱导内皮细胞凋亡, 且其作用呈浓度和时间的依赖性。

关键词:内皮细胞; 半胱氨酸; 细胞凋亡; 活性氧

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)08-0845-02

Effect of homocysteine on the apoptosis and reactive oxygen species production of human umbilical vein endothelial cells

Zhao Gaoyang, Shi Yunqi, Yi Tongning, Zhang Jingsheng

(Department of Clinical Laboratory, Liaoning Traditional Medical Hospital, Shenyang 110032, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of reactive homocysteine(Hcy) on the apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs). **Methods** HUVECs were cultured and treated with Hcy in different concentration(0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 5.0 mmol/L) within different duration(3, 6, 12, 24 h). The presence of apoptosis and ROS were detected by flow cytometry. **Results** The apoptotic rate and ROS production increased significantly($P < 0.01$) with the increase of the Hcy concentration and treated duration. **Conclusion** Hcy could induce the the apoptosis of HUVECs, with the dependence of Hcy concentration and treated duration.

Key words: endothelial cells; cysteine; apoptosis; reactive oxygen species

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸, 研究显示 Hcy 是心、脑血管疾病的独立危险因素之一^[1-2]。研究 Hcy 对内皮细胞的损伤是目前研究心、脑血管病发生、发展的一个热点。本研究通过人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的原代培养, 建立血管内皮细胞的体外模型。通过观察不同浓度 Hcy、不同时间对 HUVECs 凋亡、活性氧(reactive oxygen species, ROS)的影响, 深入探讨 Hcy 致血管内皮细胞损伤的机制, 为心、脑血管疾病寻求新的诊断和治疗方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基、优级胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司; Hcy 购于 Sigma 公司; 内皮细胞鉴定试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 活性氧、碘化丙啶(PI)和 RnaseA 试剂盒购于碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及鉴定 取健康新生儿脐带, 根据 Jaffe 等^[3]和李琴山等^[4]方法, 磷酸缓冲液(PBS)冲洗脐带数次, 轻柔挤净腔内液体, 0.25%胰蛋白酶灌注消化, 37℃水浴 5~6 min, 血清灭活, 离心, 弃上清液, 加 5 mL M199 全培养液, 放入 25 cm²一次性培养瓶中。细胞融合成单层 60%~80%时, 0.25%胰蛋白酶消化传代。细胞经Ⅷ因子相关抗原免疫荧光染色鉴定呈阳性, 证明为内皮细胞, 见图 1。

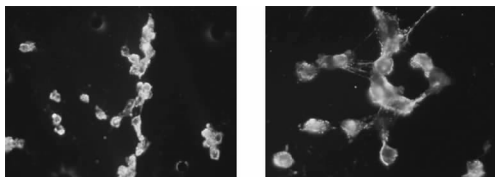


图 1 HUVECs 原代细胞鉴定

1.2.2 实验分组和处理 取传代生长状态良好的 3~4 代 HUVECs 制成细胞悬液, 以 3×10^5 个/毫升传代, 待细胞融合到 70%~80%时, 加入含 1%胎牛血清(FBS)的 DMEM 处理细胞 24 h, 使其稳定、同步化后分成 6 组: 空白组和 0.01、0.1、1.0、3.0、5.0 mmol/L Hcy 组。各组均用含 1%FBS 的 DMEM 和 Hcy 调整至 5 mL。每组 3 个复孔, 每个样本检测 3 次。37℃5% CO₂ 恒温培养箱培养 24 h。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 调整细胞浓度为 3×10^6 个/毫升, 严格按说明书操作, 采用流式细胞仪检测分析。

1.2.4 流式细胞仪检测活性氧 调整细胞浓度为 5×10^5 个/毫升, 严格按说明书操作, 流式细胞仪检测内细胞 FL1 平均荧光强度。

1.3 统计学处理 各实验重复 3 次, 每次测 3 个值。采用 SPSS15.0 统计分析软件处理实验数据。所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。差异显著性检验用方差分析, 组内各浓度两两比较用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 Hcy 对 HUVECs 作用不同时间凋亡率的变化 空白组和 0.01 mmol/L Hcy 组的 HUVECs 存在低比率的凋亡, 随着 Hcy 浓度升高和作用时间的延长, 细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$), 组内、组间比较差异均有统计学意义($F = 118.487, 69.096, P = 0.000$), 见表 1。

2.2 不同浓度 Hcy 作用不同时间对 HUVECs 活性氧的影响 空白组及 0.01 mmol/L Hcy 组对 HUVECs 的活性氧影响不大, 与空白组比较无明显差异。3.0 mmol/L Hcy 作用 HUVECs 3 h 时即见活性氧升高, 与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。随着 Hcy 浓度升高和作用时间的延长, 活性氧生成明显增加($P < 0.05$), 组内、组间比较差异均有统计学意义($F = 101.82, 85.257, P = 0.000$), 见表 2。

表 1 不同浓度 Hcy 对 HUVECs 作用不同时间细胞凋亡率的变化($\bar{x}\pm s, \%$, $n=3$)

组别	凋亡率			
	3 h	6 h	12 h	24 h
空白组	0.70±0.19	0.90±0.13	1.33±0.33	2.73±0.33
0.01 mmol/L Hcy 组	0.78±0.14	0.94±0.12	1.39±0.26	2.87±0.38
0.1 mmol/L Hcy 组	0.82±0.17	1.22±0.23	4.44±0.45	5.43±0.33
1.0 mmol/L Hcy 组	0.92±0.24	5.35±0.23	11.66±0.59 *	11.96±0.50 *
3.0 mmol/L Hcy 组	3.47±0.27	10.64±0.48 *	17.27±0.26 *	17.30±0.32 *
5.0 mmol/L Hcy 组	6.43±0.32	13.75±0.62 *	26.33±0.32 *	26.71±0.55 *

* : $P<0.05$, 与空白组比较。

表 2 不同浓度 Hcy 作用不同时间对 HUVECs 活性氧水平的影响($\bar{x}\pm s$, channel, $n=3$)

组别	活性氧(FL1 荧光强度)			
	3 h	6 h	12 h	24 h
空白组	43.39±1.72	49.89±2.70	57.40±2.53	66.54±8.32
0.01 mmol/L Hcy 组	44.39±1.50	50.05±6.11	62.84±8.28	70.71±11.38
0.1 mmol/L Hcy 组	46.78±7.61	53.45±11.26	88.57±5.40 *	109.00±12.01 *
1.0 mmol/L Hcy 组	49.64±7.36	72.80±7.85 *	114.62±25.51 *	251.92±47.18 *
3.0 mmol/L Hcy 组	57.40±6.23 *	161.23±36.96 *	301.62±12.01 *	406.60±31.12 *
5.0 mmol/L Hcy 组	80.52±7.18 *	180.52±27.82 *	402.66±21.24 *	520.44±62.91 *

* : $P<0.01$, 与空白组比较。

3 讨 论

近年来,Hcy 对心、脑血管疾病患者血管硬化的影响备受关注^[5-6]。体外内皮细胞培养也显示 Hcy 能诱导内皮细胞凋亡,提示 Hcy 可能通过内皮细胞凋亡而促进动脉粥样硬化^[7-8]。目前,对 Hcy 引起内皮细胞凋亡的机制认识尚不完全清楚。

研究表明,Hcy 可通过增加活性氧的产生诱导内皮细胞凋亡^[9]。活性氧是氧气代谢过程中产生的一些中间产物,具有高度的化学活性,其对于细胞增殖、分化、凋亡的调控和胚胎的正常发育、机体的稳态调节具有重要的意义^[10]。当活性氧过度产生,超过了机体抗氧化防御系统的清除能力,并抑制细胞抗氧化能力时,氧化应激即发生,进而引起细胞凋亡^[11-12]。本实验通过不同浓度 Hcy 和不同作用时间对细胞内活性氧以及细胞凋亡率的检测发现,由 Hcy 诱导的 HUVECs 凋亡中,3.0 mmol/L 的 Hcy 作用 3 h, HUVECs 活性氧水平即有增加。本研究显示,活性氧的产生以及凋亡率均具有浓度和时间依赖性,结论与王玉芳等^[13]和杨红玲等^[14]的结果一致,且在活性氧产生增加的同时,细胞凋亡率也增加,提示细胞凋亡的过程与活性氧有一定的关系,但其作用机制还有待于进一步的实验研究。

参考文献

[1] Kaul S,Zadeh AA,Shah PK. Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease; not validated [J]. J Am Coll Cardiol,2006,48(5):914-923.

[2] Zou CG,Banerjee R. Homocysteine and redox signaling[J]. Antioxid Redox Signal,2005,7(5/6):547-559.

[3] Jaffe EA,Nachman RL,Becker CG,et al. Culture of human endothelial cell derived from umbilical vein; indentification by morphologic and im-

munologic criteria[J]. J Clin Invest,1973,52(11):2745.

[4] 李琴山,冯赞杰,刘洋,等. 一种改进的人脐静脉内皮细胞的培养方法[J]. 第四军医大学学报,2007,28(3):276-278.

[5] 王杨,王金和,程佩兰. 同型半胱氨酸的致病机理及临床应用[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(2):137-139.

[6] Myles PS,Chan MT,Kaye DM,et al. Effect of nitrous oxide anesthesia on plasma homocysteine and endothelial function[J]. Anesthesiology,2008,109(4):657-663.

[7] Chambers JC,Obeid OA,Kooner JS. Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,1999,19(12):2922-2927.

[8] 何志勇,叶小军,邵胜敏. 同型半胱氨酸对内皮细胞凋亡及 JNK 表达的影响[J]. 心血管病防治,2009,9(2):100-102.

[9] 鲍晓梅. 高同型半胱氨酸血症致血管内皮损伤与早期动脉粥样硬化[J]. 医学综述,2009,15(2):191-193.

[10] 谢利霞,王殿华. 活性氧与血管内皮细胞的信号转导[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册,2004,24(2):153-155.

[11] 吴蕊,涂玲. 氧化应激与心血管疾病[J]. 心血管病学进展,2007,28(1):110-112.

[12] 赵婷,黎健. 内皮祖细胞与氧化应激[J]. 医学分子生物学杂志,2008,5(4):344-347.

[13] 王玉芳,周桥,王树人,等. 同型半胱氨酸诱导内皮细胞凋亡及叶酸的拮抗机制 Caspase3 及其抑制蛋白 c-IAP1 和 c-IAP2 的作用[J]. 卫生研究,2004,33(3):310-313.

[14] 杨红玲,张敏,甘萍,等. 同型半胱氨酸诱导人脐静脉血管内皮细胞活性氧升高的机制研究[J]. 昆明医学院学报,2009,30(6):19-22.