

同型半胱氨酸对内皮细胞及脂质过氧化的影响

景冬樱^① 王树人 杨志梅 顾玲 沈学宁 郝刚

(华西医科大学病理生理学教研室, 成都 610041)

主题词 同型半胱氨酸; 内皮, 血管; 细胞培养; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 叶酸; 四氢喋呤; 动脉粥样硬化

摘要 为观察同型半胱氨酸对内皮细胞、内皮细胞一氧化氮系统及脂质过氧化的影响, 在培养兔主动脉内皮细胞中加入兔天然低密度脂蛋白后分为七组; 对照组不加任何药物; 叶酸组; 四氢喋呤 (BH₄) 组, 一氧化氮供体药 SIN-1 组; 同型半胱氨酸组; 同型半胱氨酸加叶酸组和同型半胱氨酸加四氢喋呤组。共孵育 24 h 后结果发现, 同型半胱氨酸组内皮细胞逐渐漂浮起来, 部分内皮细胞发生死亡, 显示脂质过氧化程度的丙二醛含量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 一氧化氮合酶的活性及一氧化氮生成量明显低于叶酸组和四氢喋呤组 ($P < 0.05$), 提示同型半胱氨酸对内皮细胞具有强大的毒性作用及明显的促脂质过氧化作用, 同型半胱氨酸的上述作用可能部分与其对一氧化氮系统的损伤有关。同型半胱氨酸加叶酸组和同型半胱氨酸加四氢喋呤组各项检测指标相似, 较同型半胱氨酸组有所好转, 提示叶酸和四氢喋呤可在一定程度上逆转同型半胱氨酸对内皮细胞的上述损伤作用。

Effects of Homocysteine on Endothelial Cell and Lipid Peroxidation

JING Dong - Ying, WANG Shu - Ren, YANG Zhi - Mei, GU Ling, SHEN Xue - Ning and HAO Gang

(Department of Pathophysiology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

MeSH Homocysteine; Endothelium; Vascular; Cell Culture; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Folic Acid; Tetrahydrobiopterin; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for atherosclerosis (As). The mechanisms through which homocysteine (Hcy) results in As have not been fully understood. For investigation of these mechanisms, the effects of Hcy on lipid peroxidation, the injuries of Hcy to endothelium and its nitric oxide (NO) system were examined. **Methods** Rabbit aorta endothelial cell (EC) were isolated and cultured, then divided into seven groups immediately after adding native rabbit low density lipoprotein (LDL) into the EC medium: ① control group of without any more agents added; ② folic acid group; ③ tetrahydrobiopterin (BH₄) group; ④ SIN-1 group; ⑤ Hcy group; ⑥ Hcy plus folic acid group; ⑦ Hcy plus BH₄ group. All groups were then incubated more 24 hours, and the following items were determined: ① The observation of morphology; ② The Content of malondialdehyde (MDA); ③ The content of NO₂⁻/NO₃⁻; ④ NO synthase (NOS) histochemistry staining. **Results** Hcy had strong effects on lipid peroxidation. The amount of MDA in Hcy group was much higher than the ones in other groups ($P < 0.01$), the morphological appearance of EC had also corresponding changes; the formazan granules which imply the activity of NOS within EC was found dispersion on the EC surface out of the cells; and the production of NO₂⁻/NO₃⁻ has yet decreased. The various effects of Hcy were partially antagonized by folic acid or BH₄ adding: the production of MDA decreased, the amount of NO₂⁻/NO₃⁻ increased, the activity of NOS and the morphological appearance of EC were preserved better. **Conclusion** Hcy showed strong effects on lipid peroxidation and EC injury which were involved the injurious effects of Hcy on NO system of EC. The protective agents of NO system showed alleviative roles against these injuries. Our results did not support that the autoxidation of Hcy, which has been suggested to produce H₂O₂, resulted in the lipid peroxidation and EC injury. The therapeutical mechanisms of folic acid on hyperhomocysteinemia may also involve the protection of NO system.

高同型半胱氨酸血症已被确定为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生的一个独立危险因素^[1,2], 且同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 的血浆浓度与 As 危险率呈量-效关系, 其危险度与脂质异常、吸烟、高血压等相似。Hcy 导致 As 的机制目前仍不清楚, 其中对内皮细胞 (endothelial cell, EC) 的影响

可能是重要机制之一。EC 损伤是 As 发生的早期事件, 也是非常关键的因素^[3], 许多诱发 As 的危险因素都对 EC 有不同损伤作用。目前研究发现, Hcy 亦对 EC 有损伤作用, 但损伤机制尚不清楚^[4]。此外, EC 合成分泌的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 成为近年来研究内皮功能的一个重要领域, NO 具有多种抗 As 的功能, 其合成障碍亦是 As 发生的重要机制之一。上述 Hcy、EC 和 NO 三者都与 As 发生发展密

① 现在解放军兰州医学高等专科学校中心实验室 兰州 730020)

切相关,但三者之间有否关联,据本课题组文献检索,目前尚未见报道。本文拟从细胞水平就 Hcy 对 EC 的损伤,对脂质过氧化和 EC 合成分泌 NO 功能的影响及它们三者之间的关系进行探索,以期为 As 的发生机制提供一些新的认识。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器及药品

实验仪器主要有:CO₂ 孵箱 (Heraeus Germany)、倒置显微镜 (Olympus Japan)、超净工作台 (YJ-1450, 苏州)、超速离心机 (Beckman USA)、751 分光光度计 (惠普上海分析仪器有限公司)等。细胞培养及实验用药品主要购自美国 Sigma 公司和德国 Boehringer Mannheim 公司,常规用生物化学试剂均为国产分析纯。

1.2 兔主动脉内皮细胞培养

细胞取材于健康、体重 1.5~2 kg 家兔的胸主动脉,用 0.1% 胶原酶消化、1 000 r/min 离心后,在含 20% 小牛血清的 M199 培养基中,37℃、5% CO₂ 条件下常规培养。细胞传代用 0.25% 胰蛋白酶加等量的 EDTA,第 2~3 代细胞用于实验。

1.3 内皮细胞鉴定

光镜下 EC 贴壁生长,呈放射状延伸,铺满处呈 Cobblestone 样排列;电镜下可见 EC 特异结构 Weibel-Palade (W-P) 小体。

1.4 兔天然低密度脂蛋白分离、提取及蛋白定量

采用一次性密度梯度超速离心法分离血浆脂蛋白^[5],用 NaBr 调血浆密度至 1.4000 kg/L,隔夜后不同密度液铺样,超速 (50 kr/min) 离心 5.5 h,提取天然低密度脂蛋白 (native low density lipoprotein, nLDL) 层清液,聚乙二醇 (分子质量 20 000) 浓缩后,在 4℃,含 2.0 g/L EDTA, pH 7.4 的 PBS 中透析 72 h。蛋白浓度定量采用考马斯亮兰蛋白浓度测定法。以牛血清白蛋白为标准,将测定结果带入直线回归方程 $Y = a + bx$ 绘制标准曲线 (图 1, Figure 1),再由标准曲线得出测定管蛋白浓度,最后过滤除菌,2 周内使用。

1.5 脂质过氧化测定

以硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 法^[6]测定细胞培养基脂质过氧化终产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量,结果以 $\mu\text{mol/L}$ 硫代巴比妥酸反应物质表示。

1.6 一氧化氮合酶活性测定—依赖还原型辅酶 II 黄递酶组织化学染色

一氧化氮合酶 (NO synthase, NOS) 催化精氨酸氧化生成 NO 的过程以 NADPH 为供氢体,依赖黄素单核苷酸 FAD 和 FMN 为电子传递体,因此 NOS 属依赖 NADPH 的黄递酶类,利用依赖 NADPH 的黄递酶组织化学染色可准确地显示 NOS 的活性^[7]。底物 NBT 被还原后生成的兰色 Formazan 颗粒与酶活性成正相关。颜色越深酶活性越高。

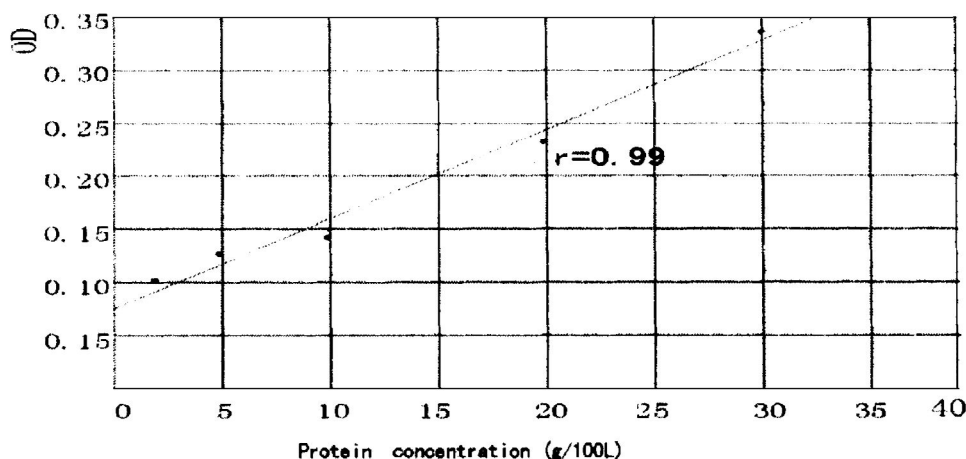


图 1. 蛋白质浓度的标准曲线

Figure 1. The standard curve of protein concentration

1.7 Griess 试剂比色法间接测定一氧化氮含量

生物系统中 NO 释放后很快转变成稳定代谢产物 NO₂⁻ 和 NO₃⁻, 以镉粉将 NO₃⁻ 还原成 NO₂⁻, NO₂⁻

通过 Griess 重氮化反应生成有色化合物, 以分光光度法测定, 可间接反应出 NO 的生成量^[8], 结果以 $\mu\text{mol/L}$ NO₂⁻ 与 NO₃⁻ 表示。

表 1. 实验分组及各组基础药物浓度

Table 1. The grouping of the experiment and concentration of drugs each group

组别 (Groups)	Concentration of drugs (mmol/L)
对照组 (Control)	0
叶酸组 (folic acid)	100
四氢喋呤组 (BH4)	0.02
一氧化氮供体药组 (SIN-1)	100
同型半胱氨酸组 (Hcy)	20
同型半胱氨酸加叶酸组 (Hcy + Folic acid)	浓度同上
同型半胱氨酸加四氢喋呤组 (Hcy + BH4)	浓度同上

1.8 实验分组及检测指标

将第 2~3 代培养 EC 消化计数后,接种于 24 孔培养板,每孔提前放一灭菌盖玻片,待细胞均匀铺满瓶底后,进行实验。由于血清成份的不确定性和批次间波动可能影响检测结果,实验前一日换液,改为无血清培养基 (CHO-S-SFM II, Gibco)。实验分组是在 EC 内加入兔 nLDL 后分为 7 组 (表 1, Table 1), 各组每孔总容量为 1 mL, LDL 加入量为 48 mg/L。各实验组加入药品后共同孵育 12 h, 每孔分别加入 30% H₂O₂ 16.5 μL, 24 h 后检测:①细胞形态学变化;

②硫代巴比妥酸反应物质含量;③NO₂⁻ / NO₃⁻ 含量;④NOS 酶组织化学染色,半定量分析。

1.9 统计分析

实验数据用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,显著性检验用方差分析 (*F* 检验, *q* 检验), *P* < 0.05 有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

各实验组 EC 与不同处理因素共同孵育 24 h 后,出现了不同的细胞形态特点 (图 2, Figure 2)。可见对照组 (Figure 2B) 细胞贴壁不牢固,细胞周边发生萎缩,提示高浓度 LDL 对 EC 具有一定程度的损伤效应。叶酸组、BH4 组和 SIN-1 组细胞形态相似 (Figure 2C), 细胞贴壁情况及周边萎缩现象较对照组有所好转,提示叶酸和 BH4 具有拮抗 LDL 损伤 EC 的效应, SIN-1 组为 NO 供体药组,提示 NO 亦对 EC 有保护作用。Hcy 组 (Figure 2D) 细胞已漂浮在培养基中,形态发生完全改变,提示 Hcy 对 EC 具强大毒性作用,细胞损伤越重,漂浮量越多。Hcy + 叶酸组和 Hcy + BH4 组结果相似 (Figure 2E), 细胞漂浮量明显少于 Hcy 组,提示叶酸和 BH4 对 Hcy 的毒性作用有一定抑制效应。

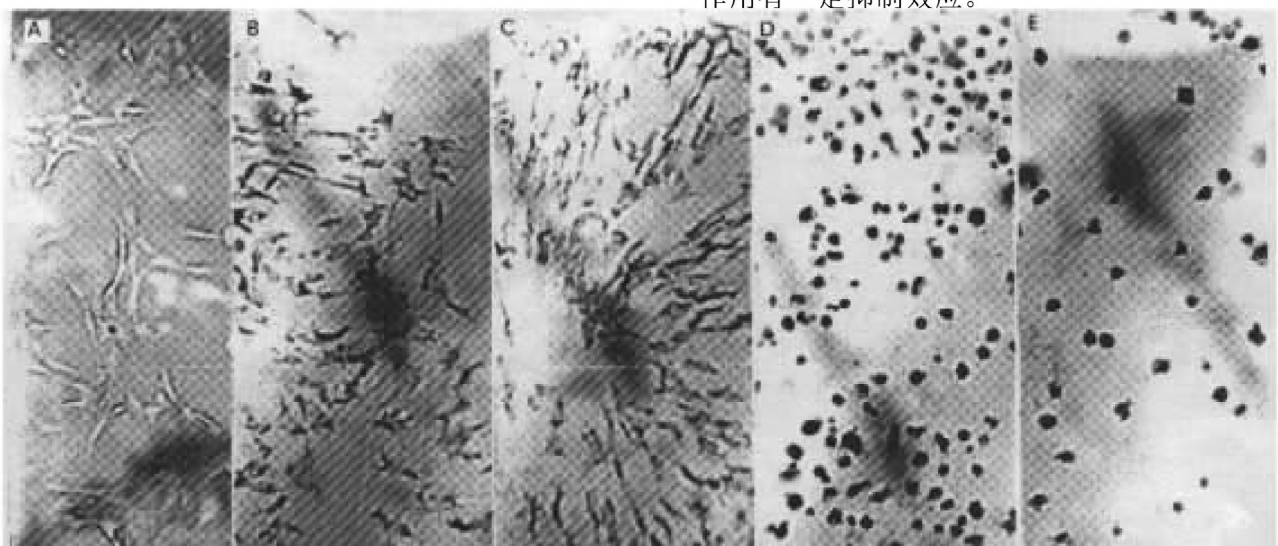


图 2. 各组内皮细胞形态的光镜照片

Figure 2. Light micrograph of various groups EC show the morphological changes

A: Normal EC; B: Control group; C: BH4 (or folic acid, NO) group; D: Hcy group; E: Hcy plus folic acid or BH4 group

2.2 脂质过氧化程度测定

以各实验组 EC 培养基中丙二醛含量 (以硫代巴比妥酸反应物质表示) 代表脂质过氧化程度, 结果见表 2 (Table 2)。可见 Hcy 组硫代巴比妥酸反应物质含量约为对照组的 7 倍, 显示出 Hcy 明显的促脂质

过氧化作用; Hcy + 叶酸组和 Hcy + BH4 组在加入 Hcy 的基础上再分别加入叶酸和 BH4 后, 硫代巴比妥酸反应物质含量降低。与 Hcy 组相比, 差异有高度显著性意义 (*P* < 0.01)。提示叶酸和 BH4 对 Hcy 的促脂质过氧化作用具有相似的拮抗效应。而未加

Hcy 的各组硫代巴比妥酸反应物质含量显著低于加 Hcy 的各组 ($P < 0.01$)。

表 2. 各组内皮细胞条件培养基中硫代巴比妥酸反应物质含量

Table 2. TBARS content of EC conditioned medium of various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Groups	TBARS (nmol/L)
Control	0.64 ± 0.167
Folic acid	0.487 ± 0.154
BH4	0.538 ± 0.269
SIN-1	0.449 ± 0.154
Hcy	5.026 ± 0.641^b
Hcy + folic acid	4.000 ± 0.513^{bd}
Hcy + BH4	3.978 ± 0.513^{bd}

b: $P < 0.01$, compared with control group; d: $P < 0.01$, compared with Hcy group

2.3 一氧化氮含量间接测定

以 EC 培养基中 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 含量间接反映 NO 含量, 结果见表 3 (Table 3)。可见 SIN-1 组 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 含量显著高于其它各组 ($P < 0.01$), 对照组由于 LDL 对 EC 的毒性作用, 该组 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 含量最低 ($P < 0.01$), Hcy 组 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 含量明显低于叶酸组和 BH4 组 ($P < 0.05$) 和 SIN-1 组 ($P < 0.01$)。Hcy + 叶酸组和 Hcy + BH4 组在加入 Hcy 的基础上再分别加入叶酸、BH4 后, $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 的含量亦升高, 与 Hcy 组相比, 虽无显著性差异, 但也呈现明显上升趋势。上述结果提示叶酸和 BH4 对 Hcy 损伤 EC 合成分泌 NO 功能的作用有一定的拮抗效应。

表 3. 各组内皮细胞条件培养基中 $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 的含量

Table 3. $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ content of EC Conditioned medium of various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Groups	$\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ (nmol/L)
Control	30.63 ± 3.35^b
Folic acid	71.00 ± 18.11^{ab}
BH4	75.13 ± 16.67^{ab}
SIN-1	145.55 ± 12.43
Hcy	51.85 ± 12.44^b
Hcy + folic acid	60.45 ± 12.74^b
Hcy + BH4	61.91 ± 11.66^b

a: $P < 0.05$, compared with Hcy; b: $P < 0.01$, compared with SIN-1 group1 and group2

2.4 一氧化氮合酶活性测定

Formazan 兰色沉淀处系 NOS 分布部位, 酶活性

以颜色深浅表示, 进行半定量分析。颜色淡兰记 +, 颜色深兰记 ++, 结果见表 4 (Table 4)。由此可见 NOS 酶分布与含量测定吻合, 即对照组与 Hcy 组活性较低, 其它各组活性较高。

表 4. 各组内皮细胞 NOS 着色结果

Table 4. The results of NOS staining of EC in various groups ($n = 9$)

Groups	Activity of NOS
Control	+
Folic acid	++
BH4	++
SIN-1	++
Hcy	+
Hcy + folic acid	++
Hcy + BH4	++

3 讨论

3.1 同型半胱氨酸对内皮细胞的毒性作用和明显的促脂质过氧化作用

高 Hcy 血症已被确定为 As 发生的一个独立危险因素。实验研究亦证实 Hcy 可损伤 EC 并导致脂质过氧化^[9,10]。Hcy 含有一个还原性的-SH (巯基), 理论上应对脂质过氧化具有保护作用, 有的实验研究亦显示一定浓度的 Hcy 确对脂质过氧化有保护作用^[11], 何以出现上述矛盾的结果, 目前尚无满意的解释。在本实验体系和所用 Hcy 浓度下, Hcy 对体外培养兔主动脉 EC 显示出明确的损伤作用, 经 Hcy 处理后, 贴壁 EC 逐渐漂浮起来, 形态发生改变。Hcy 致细胞损伤的一个可能机制是促进脂质过氧化。实验结果证实, Hcy 组 TBARS 生成量是于对照组的 7 ~ 8 倍, 说明 Hcy 具有强大的脂质过氧化作用。目前对含有还原性-SH 的 Hcy 致脂质过氧化机制的解释是, 认为-SH 可发生歧化反应, 生成 H_2O_2 , 从而导致脂质过氧化。但本实验中, 外源性加入的 H_2O_2 与 Hcy 相比, 其 TBARS 的生成量 (对照组) 比 Hcy 组所产生的 TBARS 低近一个数量级, 因此, 本文认为, Hcy 促进脂质过氧化的机制, 自歧化产生 H_2O_2 可能不是一个重要因素。

3.2 同型半胱氨酸对一氧化氮合酶的损伤可能是其细胞损伤和促脂质过氧化的机制之一

同型半胱氨酸 (Hcy) 损伤细胞和致脂质过氧化的另一个可能机制是对 NO 系统的损伤。NO 作为一种氮自由基, 虽然亦可能产生氧化损伤^[12], 但目

前的普遍认识^[3~15]是 EC 生成的一定量 NO 主要作为氧自由基的清除剂,终止自由基的链式反应,而由巨噬细胞激活时爆发生成的高浓度 NO 才产生氧化损伤。本实验中,外源性加入微摩尔浓度的 NO 供体药 SIN-1 后,NO₂⁻/NO₃⁻ 的生成量明显增高 ($P < 0.01$),并未显示出对细胞的损伤和使 TBARS 升高的促脂质过氧化作用,表明在实验条件下,NO 并未以起损伤作用的氮自由基面貌出现,亦间接与目前的普遍认识相符。

同型半胱氨酸 (Hcy)若损伤 NO 系统,则会使内皮细胞对氧化损伤的保护系统受损。反之,加入 NO 系统的保护因子则可降低细胞对氧化损伤的敏感性。本实验中,在培养的 EC 中加入 NOS 限速辅因子 BH4 后,NOS 活性升高,NO₂⁻/NO₃⁻ 的生成量亦增加,提示 BH4 对 NOS 具有一定的保护作用。此外,Hcy 组、Hcy + BH4 组结果显示,EC 经 Hcy 处理后,NOS 活性下降,NO₂⁻/NO₃⁻ 的生成量降低,而在加入 Hcy 的基础上再加入 BH4 后,NOS 的活性上升,NO₂⁻/NO₃⁻ 的生成量增加,同时 TBARS 生成量下降,内皮细胞的形态学损伤亦减轻。这一结果提示 Hcy 对 NOS 的损伤可能是其损伤内皮细胞和促脂质过氧化的机制之一。

3.3 叶酸对高同型半胱氨酸血症治疗作用的机制之一可能与它对 NOS 的保护有关

高 Hcy 血症的一种有效治疗药物是叶酸,其治疗药理机制的目前解释是:叶酸在细胞内可转化为甲基四氢叶酸,后者是 Hcy 降解途径中重新合成蛋氨酸的甲基供体,由此而降低 Hcy 的浓度。叶酸缺乏导致代谢通路受阻,血中 Hcy 累积,成为高 Hcy 血症。叶酸和 BH4 为类似物,两者结构相似,参与的递氢、递甲基反应相似,催化的酶亦相同^[6]。叶酸在细胞内很易被还原为四氢叶酸,那么叶酸是否也可作为 BH4 的替代物对 NOS 起保护作用呢?本实验中,叶酸对 NOS 的活性增加效果及 NO₂⁻/NO₃⁻ 生成量与 BH4 相似;同时,在加入 Hcy 的基础上再分别加入叶酸和 BH4 后各项检测指标亦相似,提示叶酸治疗高 Hcy 血症的机制,除作为 Hcy 降解时的甲基供体外,还可能通过对 NO 系统的保护作用来完成。

当然,本实验结果亦显示,叶酸和 BH4 对 Hcy 致 EC 损伤和脂质过氧化的保护作用有限,提示 Hcy 的上述两种损害作用还可能与其它机制,值得进一步探索。

参考文献

- Clark R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 1991, **324**: 149 - 155
- Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *JACC*, 1996, **27**: 517
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature*, 1993, **362** (29): 801 - 809
- Blundell G, Jones BG, Rose FA, et al. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis*, 1996, **122**: 163 - 172
- 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1989, **21** (3): 257 - 260
- Ohkawa H, Ohiahi N, Yangi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95** (2): 351 - 358
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, et al. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 2 811 - 814
- 许宏岳,李爱红,汪晓,等. 比色法测定血清亚硝酸盐和硝酸盐及初步临床应用. *临床检验杂志*, 1996, **14** (1): 28
- Wall RT, Harlan JM, HarKer LA, et al. Homocysteine - induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res*, 1980, **18**: 113
- Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, et al. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide - dependent and - independent mechanisms. *J Lipid Res*, 1993, **34**: 2 051 - 061
- Halvorsen B, Brude I, Drevon CA, et al. Effect of homocysteine on copper ioncatalyzed, azo compound - initiated, and mononuclear cell - mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Lipid Res*, 1996, **37**: 1 591 - 600
- Darley - Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, et al. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comm*, 1992, **17** (1): 9 - 20
- Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **195** (2): 539 - 544
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite - dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem*, 1994, **269** (42): 26 066 - 075
- Wink DA, Cook JA, Krishna MC, et al. Nitric oxide protects against alkyl peroxide - mediated cytotoxicity: Further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **19**: 402 - 407
- Peter Karlson. 见:张增明(译), 生化学精华. 上海:上海科学普及出版社, 1988: 172, 338

此文 1998 - 07 - 07 收到, 1999 - 03 - 25 修回)

此文编辑 胡必利)