

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-04-0324-03

同型半胱氨酸对血管内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达及氧化型低密度脂蛋白摄取的影响

李全忠, 朱雯霞¹, 赵水平

(中南大学湘雅第二医院心内科, 湖南省长沙市 410011; 1. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 同型半胱氨酸; 内皮细胞; 血凝素; 受体; 脂蛋白, 低密度

[摘要] 为了研究同型半胱氨酸对血管内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达及对氧化型低密度脂蛋白摄取的影响, 分别在培养的人脐静脉内皮细胞中加入不同浓度的同型半胱氨酸孵育 48 h 后, 利用逆转录-聚合酶链反应检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的改变; 采用放射配基法检测细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取。结果发现, 随着同型半胱氨酸浓度的增加, 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达增加; 同时对氧化型低密度脂蛋白的摄取率也增加。提示同型半胱氨酸能促进脐静脉血管内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达和对氧化型低密度脂蛋白的摄取, 此效应可能与同型半胱氨酸致动脉粥样硬化作用有关。

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] A

Effects of Homocysteine on Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 mRNA Expression and Uptake of Oxidized Low Density Lipoprotein in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LI Quar Zhong, ZHU Wen Xia¹, and ZHAO Shui Ping

(Department of Cardiology, the Second Xiang-Ya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 1. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[MeSH] Homocysteine; Endothelium, Vascular; Lectins; Receptors, LDL; Lipoproteins, LDL

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of homocysteine on the lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor (LOX-1) mRNA expression and uptake of ox-LDL in cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC). **Methods**

Total RNA was extracted with Trizol reagent. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to quantify mRNA expression of LOX-1 gene in hUVECs. ox-LDL was radioiodinated with ¹²⁵I to detect the uptake of ox-LDL by hUVEC. **Results** LOX-1 mRNA expression increased after cells were incubated with increasing concentration of homocysteine (0, 1, 10 mmol/L) for 48 hours. The uptake of ox-LDL by hUVEC increased at the same time. **Conclusion** Homocysteine increases the expression of LOX-1 mRNA in hUVEC and uptake of ox-LDL by them which may contribute to the proatherogenic potential of homocysteine.

氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 所致的血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化发生和发展的重要因素^[1]。但氧化型低密度脂蛋白进入内皮细胞的途径还不十分清楚。1997 年日本学者克隆的血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 是最早发现的内皮细胞清道夫受体^[2]。内皮细胞能通过 LOX-1 受体摄取 ox-LDL, 后者激活血管内皮细胞并导致血管内皮细胞损伤和功能紊乱^[3]。流行病学研究证实了高同型半胱氨酸 (homo-

cysteine, HCY) 是动脉粥样硬化和冠心病的危险因素, 可能与其产生的过氧化氢和氧自由基导致的血管内皮细胞损伤有关^[4]。本课题拟用不同浓度的同型半胱氨酸与人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelium cells, hUVEC) 孵育, 观察 HCY 对 hUVEC LOX-1 的表达及对 ox-LDL 摄取的影响, 初步探讨同型半胱氨酸与 LOX-1 的相互作用及其在动脉粥样硬化过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

TRIzol 试剂盒为 Gibco 公司产品; 逆转录-聚合酶链反应试剂盒为 Ferment 公司产品; 同型半胱氨酸为 Sigma 公司产品; 无载体 Na¹²⁵I 购自北京原子能科

[收稿日期] 2001-11-08 [修回日期] 2002-06-15

[作者简介] 李全忠, 男, 1969 年出生, 湖北省麻城县人, 心血管内科博士研究生, 研究方向为血脂与冠心病。朱雯霞, 女, 1972 年出生, 医学学士。赵水平, 男, 1954 年出生, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂与冠心病。

学研究所; LOX-1 基因及内参照 β -actin 基因 PCR 扩增上下游引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 细胞培养及分组

取剖宫产后新鲜无菌脐带, 用 0.25% 胰酶消化分离内皮细胞, 在含 10% 胎牛血清 M199 培养基中培养。相差显微镜下人脐静脉内皮细胞呈铺路卵石样, 经鉴定其 (11) 因子呈抗原阳性。取培养的第 2 代汇合细胞作实验。按加入同型半胱氨酸的浓度将实验分为 4 组, 分别为 0、0.1、1 和 10 mmol/L HCY 组。

1.3 碘标记氧化型低密度脂蛋白的制备

取健康人血经超速密度梯度离心获取低密度脂蛋白 (LDL)^[5], LDL 蛋白定量用 Lowry 氏法。LDL 的氧化修饰采用 CuSO_4 氧化法, 氧化修饰程度用硫代巴比妥酸反应物质表示, 经测定 CuSO_4 氧化的 LDL 丙二醛增加 8 倍。ox-LDL 的 ^{125}I 标记采用一氯化碘法标记, 标记的 ox-LDL 比放射活性为 $(5\sim 7) \times 10^{11}/\text{g}$, 脂质标记 < 5%, 游离碘含量 < 1%。

1.4 逆转录—聚合酶链反应

取 10^6 hUVEC 分别与 0、0.1、1 和 10 mmol/L 的同型半胱氨酸水溶液孵育 48 h, 用 TRIzol 按常规方法抽提细胞总 RNA, 经电泳鉴定无降解, 紫外分光光度计测定 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 后, 取 1 μg 细胞总 RNA, 在 37℃ 孵育 1 h 反转录合成 cDNA 链, 72℃ 终止反应, 取 2 μL 反转录产物, 1 μL LOX-1 基因的上下游引物 (5'-TTACTCTCCATGGTGGTGCC-3' 和 5'-AGCTTCTTCTGCTTGTGCG-3'), 94℃ 变性 40 s \rightarrow 55℃ 退火 1 min \rightarrow 72℃ 延伸 1 min, 共 32 个循环, 预计扩增产物长度 193 bp; 同时取 2 μL 反转录产物, 1 μL β -actin 基因的上下游引物 (5'-TCGAATTCTGGAGAAGA GC-TATGAGCTGCCG-3' 和 5'-TCGGATCCGTGC-CACCAGACAGCACTGTGTTG-3'), 95℃ 变性 60 s \rightarrow 50℃ 退火 1 min \rightarrow 72℃ 延伸 1 min, 共 32 个循环作为内对照, β -actin 基因的预计扩增产物长度 201 bp^[6]。将扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于 GDS-7600 (UVP) 凝胶分析系统扫描, 计算 LOX-1 基因与 β -actin 基因扩增产物的灰度比值, 代表 LOX-1 基因在转录水平的相对表达。

1.5 碘标氧化型低密度脂蛋白摄取率的测定

约 10^6 hUVEC 分别与 0、0.1、1 和 10 mmol/L 的同型半胱氨酸水溶液孵育培养 48 h, 细胞在 pH 7.4 HEPES 缓冲液中预冷 30 min, 加 ^{125}I -ox-LDL 至终浓度为 10 mg/L, 4℃ 孵育 2 h, 用含有 2 g/L BSA、150 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris 和 2 mmol/L EDTA 的缓冲液在冰上洗 3 次, 再用不含 BSA 的冷盐水洗涤, 最后在室温下用 0.5 mol/L NaOH 溶解, 取溶解液用

γ 计数器测量 ox-LDL 的结合量^[6]。

1.6 统计学处理

所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

2.1 同型半胱氨酸对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

理论设计 LOX-1 PCR 产物为 193 bp, β -actin PCR 产物长度为 201 bp。如图 1 (Figure 1) 所示, LOX-1 的 PCR 产物比 200 bp 稍短, β -actin 的 PCR 产物长度接近 200 bp, 与理论设计基本符合。如表 1 (Table 1) 所示, 同型半胱氨酸具有诱导 LOX-1 mRNA 表达的作用, 且随同型半胱氨酸浓度的升高而升高, 显示同型半胱氨酸诱导 LOX-1 mRNA 表达呈剂量依赖性。

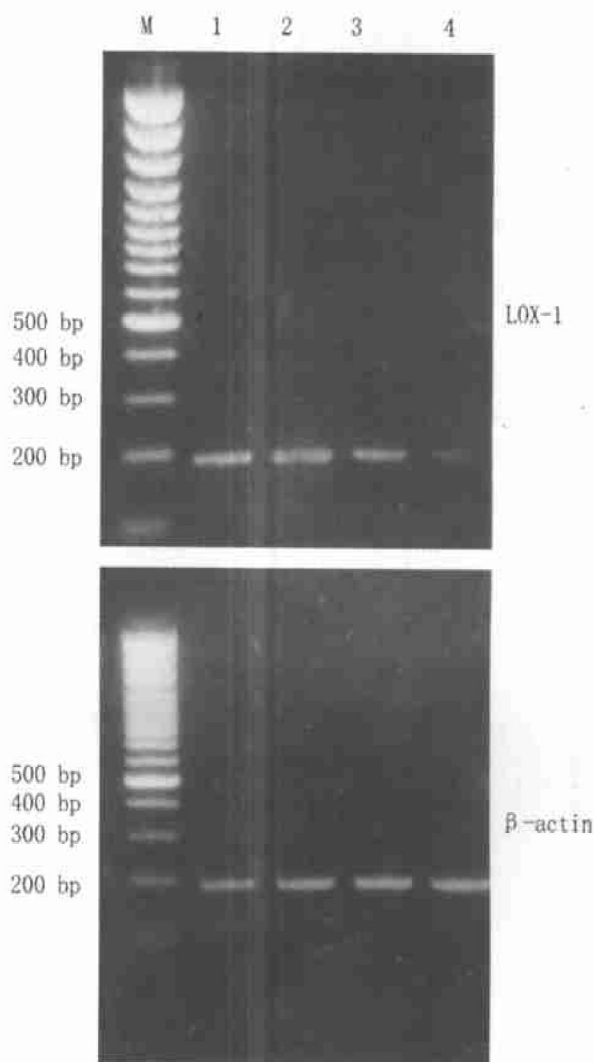


图 1. 逆转录—聚合酶链反应产物电泳结果。

Figure 1. Agarose electrophoresis of RT-PCR products for LOX-1 mRNA. M: Marker, 1: Hcy 10 mmol/L, 2: Hcy 1 mmol/L, 3: Hcy 0.1 mmol/L, 4: Hcy 0 mmol/L.

2.2 同型半胱氨酸对氧化型低密度脂蛋白摄取的影响

如表 1(Table 1) 所示, 随着同型半胱氨酸浓度的升高, hUVEC 对 ox-LDL 的摄取逐渐增加, 提示同型半胱氨酸能促进内皮细胞对 ox-LDL 的摄取。同型半胱氨酸促进 hUVEC 对 ox-LDL 摄取的作用也呈剂量依赖性, 且与 LOX-1 mRNA 的表达基本平行。

表 1. 同型半胱氨酸对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因表达和对人脐静脉内皮细胞摄取氧化型低密度脂蛋白的影响。

Table 1. Effects of HCY on LOX-1 gene expression and ox-LDL uptake by hUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n=4$).

Groups	LOX-1/ β -actin	125 I-ox-LDL uptake (cpm/mg)
0 mmol/L HCY	0.05 \pm 0.02	21 \pm 2
0.1 mmol/L HCY	0.15 \pm 0.04 ^a	29 \pm 4 ^a
1 mmol/L HCY	0.24 \pm 0.05 ^a	37 \pm 5 ^a
10 mmol/L HCY	0.34 \pm 0.06 ^a	43 \pm 6 ^a

a: $P < 0.05$, compared with 0 mmol/L HCY group.

3 讨论

高血脂症是动脉粥样硬化和冠心病的主要危险因素之一。氧化型低密度脂蛋白所致的内皮细胞激活和功能紊乱可能是其始动环节。氧化型低密度脂蛋白能抑制内皮细胞产生一氧化氮^[7], 诱导内皮细胞表达粘附分子^[8]和血管平滑肌细胞生长因子^[9]等, 均与动脉粥样硬化的发生有关。氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤至少部分通过内皮细胞清道夫受体血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 起作用。事实上, 最近不但发现血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 在 WHHL 兔^[10]和自发性高血压大鼠^[11]的血管内皮细胞有表达, 还发现血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 在人动脉粥样硬化斑块中也有表达^[12]。氧化型低密度脂蛋白还能通过血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 诱导血管内皮细胞凋亡^[13]。流体切应力^[14]和肿瘤坏死因子 α ^[15]能上调血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的表达。本实验结果发现同型半胱氨酸能呈浓度依赖性地上调氧化型低密度脂蛋白血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 在血管内皮细胞上的表达, 并促进血管

内皮细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取。血管内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的上调及对氧化型低密度脂蛋白摄取的增加将促进氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤, 干扰其正常功能。血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 介导的内皮细胞对氧化型低密度脂蛋白的结合和摄取的病理生理意义还有待进一步阐明, 我们推测同型半胱氨酸对血管内皮细胞表面清道夫受体血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的上调作用可能与同型半胱氨酸促进动脉粥样硬化的发生有关。

[参考文献]

- [1] Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 23-28
- [2] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 1997, **386**: 73-77
- [3] Kita T, Kume N, Yokode M, et al. Oxidized-LDL and atherosclerosis. Role of LOX-1. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **902**: 95-100
- [5] 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**: 257-260
- [6] Li DY, Zhang YC, Philips MI, et al. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res*, 1999, **84**: 1043-1049
- [7] Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysophosphatidylcholine in modified low-density lipoproteins. *Nature*, 1990, **334**: 160-162
- [8] Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1138-1144
- [9] Kume N, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 907-911
- [10] Chen M, Kakutani M, Minami M, et al. Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (4): 1107-1115
- [11] Nagase M, Hirose S, Sawamura T, et al. Enhanced expression of endothelial oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237** (3): 496-498
- [12] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation*, 1999, **99** (24): 3110-3117
- [13] Li D, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (4): 1116-1122
- [14] Murase T, Kume N, Korenaga R, et al. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res*, 1998, **83**: 328-333
- [15] Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, et al. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF- α . *FEBS Lett*, 1998, **440** (1-2): 29-32

(此文编辑 胡必利)