

同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞表达 RANTES 蛋白

王淑秀, 邓仲端, 邹飞雁, 瞿智玲, 倪娟

(华中科技大学同济医学院病理学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 动脉粥样硬化; 同型半胱氨酸; 内皮, 血管; RANTES

[摘要] 为探讨同型半胱氨酸是否诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达 RANTES 蛋白, 使人脐静脉内皮细胞暴露于不同浓度的同型半胱氨酸孵育 8 h 后, 用免疫细胞化学和 Western blot 方法检测 RANTES 蛋白的表达。免疫细胞化学检测结果发现, 培养的人脐静脉内皮细胞能表达 RANTES 蛋白。培养的内皮细胞与 0.1、0.5 及 1 mmol/L 同型半胱氨酸共同孵育 8 h 后, 其 RANTES 蛋白表达的平均吸光度值分别为 0.0434 ± 0.0063 、 0.0788 ± 0.0053 和 0.1061 ± 0.0215 , 均显著高于对照组 (0.0200 ± 0.0032), 方差分析发现, 组间均存在显著性差异 ($P < 0.01$)。Western blot 检测结果发现, 当内皮细胞与 0.1、0.5 和 1 mmol/L 同型半胱氨酸共同孵育 8 h 后, 其免疫染色条带的积分吸光度值分别为 8 873、10 200 和 10 800, 分别是对照组 (3 881) 的 2.29 倍、2.63 倍和 2.78 倍。此结果提示, 培养的人脐静脉内皮细胞表达低水平的 RANTES 蛋白, 同型半胱氨酸能提高其 RANTES 蛋白的表达。

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] A

Homocysteine Induces the Expression of Regulated upon Activation, Normal T expressed and Secreted Protein in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WANG Shu-Xiu, DENG Zhong-Duan, ZOU Fei-Yan, QU Zhi-Ling, and NI Juan

(Department of Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[MeSH] Atherosclerosis; Homocysteine; Endothelium, Vascular; RANTES

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether homocysteine (HCY) can induce cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) to express regulated upon activation, normal T expressed and secreted (RANTES) protein. **Methods** After exposure of the cultured hUVEC to HCY at increasing concentrations for 8 h, the RANTES protein expression was determined by immunocytochemistry and Western blot analysis. **Results** Cultured hUVEC could express RANTES protein. Immunocytochemistry showed the mean absorbance values of RANTES protein expression in hUVEC exposed to HCY at different concentrations (0.1, 0.5 and 1 mmol/L HCY) for 8 h were 0.0434 ± 0.0063 , 0.0788 ± 0.0053 and 0.1061 ± 0.0215 , respectively, which were significantly higher than that of the control group (0.0200 ± 0.0032). Analysis of variance proved a significant difference between groups ($F = 319.03$, $P < 0.01$). Western blot analysis displayed that exposure of hUVEC to HCY at gradient concentrations (0.1, 0.5 and 1 mmol/L) for 8 h resulted in a 2.29-fold, a 2.63-fold and a 2.78-fold increase in the expression of RANTES protein in the cells, compared with the control group. **Conclusions** The cultured hUVEC could express RANTES protein, and HCY was able to induce hUVEC to express RANTES protein at a higher level.

循环血液中的单核细胞和 T 淋巴细胞不断迁入动脉内皮下间隙是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成的重要特点。这两种细胞的迁移受趋化因子及其受体的调控^[1]。在人的 As 病变区, 有 RANTES (regulated upon activation, normal T expressed and secreted) mRNA 表达^[2]。RANTES 属于 CC 型趋化因子, 对 T 淋巴细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞有趋化作用^[3]。

高同型半胱氨酸血症是 As 的一个独立危险因

子^[4]。同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 能使内皮细胞功能紊乱, 但其致 As 的机制尚未明了^[5,6]。本研究通过观察 HCY 是否诱导培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, hUVEC) 表达 RANTES 蛋白, 以探讨 HCY 对 As 形成和发展的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

新生小牛血清 (NBCS)、胎牛血清 (FBS)、M199 培养基和 DME/F12 培养基均为 Gibco 公司产品。0.1 g/L 小鼠抗人 RANTES 单克隆抗体为 Serotec UK 产品。SP 免疫组织化学染色试剂盒及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠 IgG 购自北京中山公司, 十

[收稿日期] 2002-07-05 [修回日期] 2002-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金 (39730220) 资助。

[作者简介] 王淑秀, 女, 1970 年 2 月出生, 河南济源人, 病理学博士, 讲师, 现在河南新乡医学院工作。邓仲端, 男, 1927 年 10 月出生, 广西南宁人, 病理学教授, 博士研究生导师, 多年从事动脉粥样硬化发病机制的研究。邹飞雁, 女, 1963 年出生, 湖南省衡阳县人, 病理学博士, 现在中南大学做博士后研究。

二烷基磺酸钠(SDS)、Tris 碱、苯甲基磺酰氟和抑蛋白酶肽(aprotinin)为 Sigma 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养及分组

参照文献[7]进行 hUVEC 的原代培养及鉴定。生长至汇合时,随机分为对照组和实验组。后者分别加入含 0.1、0.5 和 1 mmol/L HCY 的 DME/F12,对照组不给 HCY,温育 8 h,进行下一步实验。

1.3 免疫细胞化学检测

生长在盖玻片表面的 hUVEC 加入 HCY 后,用乙醇和丙酮(1:1)混合液固定。用鼠抗人 RANTES 单克隆抗体及免疫组织化学检测试剂盒进行染色。结果进行图像分析,以平均吸光度值代表 RANTES 蛋白的表达。

1.4 Western blot 检测

当 hUVEC 暴露于 HCY 后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,往培养瓶中加入悬浮缓冲液(含 0.1 mol/L NaCl、0.01 mol/L Tris-Cl、0.001 mol/L EDTA、1 mg/L 抑蛋白酶肽和 100 mg/L 苯甲基磺酰氟),细胞裂解后,4℃ 12 000 r/min 离心 2 min,上清即为总蛋白。取每组总蛋白样品各 50 μg,与等体积 2×SDS 凝胶加样缓冲液(含 100 mmol/L Tris-Cl、pH 6.8,4% SDS,20% 甘油,0.2% 溴酚蓝,10% β-巯基乙醇)混合,充分混匀后,置于沸水浴中变性 3~5 min,冷却后进行蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕,将蛋白质从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上转移至硝酸纤维素滤膜上。然后,用小鼠抗人 RANTES 单克隆抗体(1:100 稀释)和辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 进行免疫学染色。用 HPIAS-1000 型图像分析系统检测各组染色条带的积分吸光度值。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 免疫细胞化学检测结果

免疫染色发现,RANTES 蛋白为分布于细胞质的棕黄色颗粒,对照组 hUVEC 染色较弱,而各实验组细胞染色均较对照组加深。图像分析发现,hUVEC 分别与 0.1、0.5 及 1 mmol/L HCY 孵育 8 h 后,其 RANTES 蛋白表达增强,有呈剂量依赖性增加趋势。方差分析发现,各组间均存在显著性差异($P < 0.01$;表 1,Table 1)。

表 1. 暴露于不同浓度同型半胱氨酸 8 h 后人脐静脉内皮细胞的 RANTES 蛋白表达的免疫细胞化学显示检测结果。

Table 1. Immunocytochemistry showed the expression of RANTES protein in hUVEC exposed to HCY at different concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$).

Groups	Absorbance values
Control	0.0200 ± 0.0032
0.1 mmol/L HCY	0.0434 ± 0.0063 ^a
0.5 mmol/L HCY	0.0788 ± 0.0053 ^{ab}
1 mmol/L HCY	0.1061 ± 0.0215 ^{abc}

a: $P < 0.01$, compared with the control group; b: $P < 0.01$, compared with 0.1 mmol/L HCY group; c: $P < 0.01$, compared with 0.5 mmol/L HCY group.

2.2 Western blot 检测结果

所提取的蛋白质,经电泳、转膜和免疫染色后,硝酸纤维素膜的各组泳带显示出深浅不一的棕黄色(图 1, Figure 1)。图像分析发现,各组 hUVEC 分别与 0.1、0.5 和 1 mmol/L HCY 孵育 8 h 后,其 RANTES 蛋白的表达均明显高于对照组,分别是对照组的 2.29、2.63 和 2.78 倍(表 2, Table 2)。

表 2. 暴露于不同浓度同型半胱氨酸 8 h 后人脐静脉内皮细胞的 RANTES 蛋白表达 Western blot 检测结果。

Table 2. Western blot showed the expression of RANTES protein in hUVEC exposed to HCY at different concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$).

Groups	Integral absorbance values
Control	3 881
0.1 mmol/L HCY	8 873
0.5 mmol/L HCY	10 200
1 mmol/L HCY	10 800

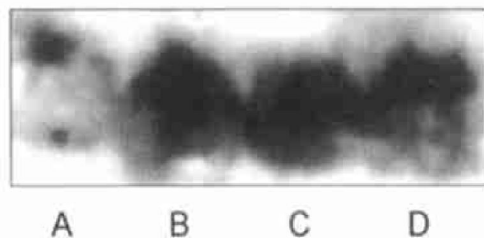


图 1. Western blot 硝酸纤维素膜上的各组泳带。

Figure 1. Western blot: The lanes of different groups on the nitrocellulose membrane. A: Control; B: 0.1 mmol/L HCY; C: 0.5 mmol/L HCY; D: 1 mmol/L HCY.

3 讨论

内皮细胞是循环血液中的单核细胞最先接触的

动脉壁细胞^[8], 极易受各种损伤因子的刺激而发生功能紊乱, 并产生趋化因子, 在单核细胞向内皮下间隙的迁移中起重要作用。HCY 是蛋氨酸代谢的中间产物, 是一种含硫氨基酸, 易发生自身氧化, 产生氧自由基和 H₂O₂, 使内皮细胞膜上的多不饱和脂肪酸发生过氧化^[9]; 它还可通过使内皮细胞的蛋白质发生同型半胱氨酸化, 使内皮细胞损伤^[10]。HCY 与腺苷结合, 生成 S-腺苷同型半胱氨酸, 后者是甲基转移酶的抑制剂, 导致内皮细胞中的 P21^{ras} 低甲基化, 使其生长受抑制^[11]。

同型半胱氨酸(HCY)能诱导培养的人主动脉内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1 和白细胞介素 8^[12] 以及培养的 hUVEC 表达高水平的单核细胞趋化蛋白 1 α ^[7]。巨噬细胞炎性蛋白 1 和巨噬细胞炎性蛋白 1 α 对单核细胞和 T 淋巴细胞均有趋化作用; IL-8 对 T 淋巴细胞和嗜中性粒细胞有趋化作用, 并可促进血管生成, 是血管平滑肌细胞的有丝分裂原, 对其有趋化活性^[8]。单核/巨噬细胞和淋巴细胞在动脉内皮下间隙的聚集以及血管平滑肌细胞的迁移和增殖导致了脂纹和纤维斑块的形成^[11]。

RANTES 蛋白的分子质量为 8 kDa, 具有 CC 型趋化因子的结构特点, 它含有一个多肽链, 并含有 4 个保守半胱氨酸, 且 N 端最前面的两个半胱氨酸相邻。RANTES 首先在 T 细胞中被发现, 以后发现血小板、成纤维细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞中均有表达^[13]。当内皮细胞受到 TNF- α 和 IFN- α 共同刺激后, 其 RANTES mRNA 的表达明显增强^[13]; 细胞间粘附分子-1 与其抗体结合后亦可诱导血管内皮细胞表达 RANTES^[14]; As 斑块中有大量的 TNF- α 和细胞间粘附分子-1^[11], 它们可能促进 As 斑块中的内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞表达 RANTES。RANTES 对单核细胞、T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞具有较强的趋化作用。As 病变中的 T 细胞主要是 CD4 阳性 T 细胞, 它是 RANTES 主要的靶细胞^[3]。目前, 有关 RANTES 在迟发性超敏反应病变中的表达^[13] 及其抑制人类免疫缺陷病毒感染的研究较多^[15], 而对其在 As 病灶形成中的作用鲜见报道。本研究首次证明, 培养的 hUVEC 表达较低水

平的 RANTES 蛋白, 当其受 HCY 刺激后, 其 RANTES 蛋白表达显著增强, 且与 HCY 的剂量呈依赖性增长趋势。提示, HCY 有可能通过诱导内皮细胞表达 RANTES、单核细胞趋化蛋白 1、巨噬细胞炎性蛋白 1 α 和白细胞介素 8 等趋化因子, 吸引更多的单核细胞和 T 淋巴细胞进入内皮下间隙, 加速 As 的发展。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (3): 397-403
- [3] Jordan NJ, Watson ML, Williams RJ, et al. Chemokine production by human vascular smooth muscle cells: modulation by IL-13. *British J Pharm*, 1997, **122** (4): 749-757
- [4] Duell PB, Malinow MR. Homocyst(e)ine: An important risk factor for atherosclerotic vascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 1997, **8** (1): 28-34
- [5] Zhang C, Cai Y, Adachi MF, et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem*, 2001, **276** (38): 35 867-874
- [6] Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (14): 6 369-373
- [7] 王淑秀, 邓仲端, 倪娟, 等. 同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α . *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 101-104
- [8] Reape TJ, Groot PHE. Chemokine and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **147** (1): 213-225
- [9] Jones BG, Rose FA, Tudball N. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. *Atherosclerosis*, 1994, **105** (2): 165-170
- [10] Jakubowski H, Zhang L, Bardeguz A, et al. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Cir Res*, 2000, **87** (1): 45-51
- [11] Wang H, Yoshizumi M, Lai L, et al. Inhibition of growth and P21^{ras} methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem*, 1997, **272** (40): 25 380-385
- [12] Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello P, et al. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*, 2001, **103** (22): 2 717-723
- [13] Marfaing-Koka A, Devergne O, Gorgone G, et al. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN- γ plus TNF- α and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol*, 1995, **154** (4): 1 870-878
- [14] Sano H, Nakagawa N, Chiba R, et al. Cross-linking of intercellular adhesion molecule-1 induces interleukin-8 and RANTES production through the activation of MAP kinases in human vascular endothelial cells. *Bioch Biophys Res Commun*, 1998, **250** (3): 694-698
- [15] Owais M, Arya SK. Antiviral chemokines: intracellular life of recombinant G-C chemokine RANTES. *J Hum Virol*, 1999, **2** (5): 270-282

(此文编辑 文玉珊)