

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0493-05

·实验研究·

过量服用蛋氨酸所致高同型半胱氨酸血症 对缺血性血管新生的抑制作用

段俊丽¹, 李月², 王一尘¹, 潘志红¹, 高兴旺¹, 潘永瑜¹, 方根强¹, 室原丰明³

(1. 上海第二医科大学附属新华医院老年医学科, 上海市 200092;

2. 日本 Saitama Medical School 药理学教研室; 3. 日本名古屋大学第一内科)

[关键词] 病理生理学; 高同型半胱氨酸血症对缺血性血管新生的抑制作用; 血管造影计数法; 动脉粥样硬化; 蛋氨酸; 内皮源性一氧化氮; 血管新生

[摘要] 高同型半胱氨酸血症是引起动脉粥样硬化的一种独立危险因素。过量服用蛋氨酸会导致血清中同型半胱氨酸浓度增高、内皮功能受损、血管舒缩功能减弱。本研究使用过量服用蛋氨酸导致高同型半胱氨酸血症大鼠, 与对照组比较, 观察缺血下肢血管新生的情况, 判断高同型半胱氨酸血症对缺血性血管新生的影响。将 36 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠分为两组: 对照组和高同型半胱氨酸血症组。对照组始终给予自来水; 高同型半胱氨酸血症组则给予含有 0.5% 蛋氨酸的饮水。两组动物分别按上述方法给予不同饮水 2 周后, 手术切除左侧股动、静脉, 观察缺血 28 d 内缺血区域血管新生和侧枝血管形成的情况。过量服用蛋氨酸导致的高同型半胱氨酸血症减弱了大鼠下肢慢性缺血性血管新生和侧枝血管的建立, 这可能与高同型半胱氨酸血症减弱内皮源性一氧化氮生物活性有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hyperhomocysteinemia after an Oral Methionine Load Impairs Angiogenesis in Response to Hindlimb Ischemia

DUAN Jun-Li¹, LI Yue², WANG Yi-Chen¹, PAN Zhi-Hong¹, GAO Xing-Wang¹, PAN Yong-Yu¹, FANG Gen-Qiang¹, and Murohara Toyooki³

(1. The Department of Geriatrics, Shanghai Second Medical University; 2. The Department of Pharmacology, Saitama Medical School of Japan; 3. The First Department of Internal Medicine, Nagaya University, Japan)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Methionine; Endothelium-derived Nitric Oxide; Vessel Angiogenesis; Homocysteine; Collateral Vessel

[ABSTRACT] **Aim** Elevated plasma homocysteine impairs vasomotor regulation. Hyperhomocysteinemia (HH) is an independent risk factor for atherosclerosis, which causes peripheral arterial occlusive disease. Thus, we examined whether HH induced by oral methionine load modulated in vivo angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups: the control group was given tap water, and the other group was made HH by daily intake of L-methionine (1 g/kg body weight) in drinking water. At the 14th day of the dietary modification, the left femoral artery and vein were excised, and the extents of angiogenesis and collateral vessel formation in the ischemic hindlimb were examined for subsequent 4 weeks. **Results** Plasma homocysteine levels significantly increased, and plasma levels of nitric oxide and tissue contents of nitric oxide and cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate significantly decreased in the HH group. Serial laser Doppler blood perfusion analysis revealed significant decrease in the ratio of ischemic/normal hindlimb blood perfusion at postoperative days 7, 14, 21 and 28. Postmortem angiography of the ischemic limb revealed a significant decrease in the angiographic score at postoperative day 14 in the HH group. Finally, immunohistochemical examination of the ischemic tissue sections showed a significant decrease in capillary density in the HH group. **Conclusions** In summary, oral methionine-induced HH impairs ischemia-induced angiogenesis and collateral vessel formation in a rat model of chronic hindlimb ischemia. The mechanism appears to be mediated at least in part by decreased bioavailability of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) in the HH state.

同型半胱氨酸(homocysteinemia, Hcy)是体内一种含硫的氨基酸,它来源于饮食中蛋氨酸。口服蛋

[收稿日期] 2003-05-16

[修回日期] 2003-08-09

[基金项目] The ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan(10770336)和中国留学回国人员科研启动基金(2002-274-02)资助

[作者简介] 段俊丽,女,1961年出生,山西省太原市人,汉族,医学博士,副教授,主要从事血管新生的研究;E-mail: junlishanxi@hotmail.com,电话:(021)65790000-4161,传真:(021)65140305。李月,女,1968年出生,医学博士,主要研究方向为动脉硬化。段俊丽和李月对本研究做了同样多的工作,并列为本文第一作者。王一尘,男,1946年出生,教授,硕士研究生导师,从事动脉粥样硬化的基础与临床研究,为本文通讯作者。

氨酸后在体内通过去甲基化转变为 Hcy, 过量服用蛋氨酸会导致 Hcy 增高, 造成高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HH), 其产生的损害和由于 β -胱硫醚合成酶缺乏所致的遗传性高同型半胱氨酸血症相当^[1]。1989 年 McCully 等人首次报道了遗传性重症 HH 合并有动脉粥样硬化症^[2]。最近发现 40% 脑卒中、心肌梗死和外周血管栓塞性疾病的患者合并有 HH, 这可能与多种因素所致血管壁细胞内 Hcy 增高有关^[3]。在光学显微镜和电子显微镜下观察 HH 的人和动物动脉内皮细胞形态, 发现 Hcy 所致的内皮细胞损伤和动脉硬化有着密切的关系。由于 HH 能使内皮源性一氧化氮 (endothelium derived nitric oxide, EDNO) 灭活, 导致内皮依赖性血管舒张因子功能减弱^[4]; 另外也发现灭活的 EDNO 可使氧自由基生成增多, 反过来抑制 EDNO 的活性^[5]。我们以前的研究表明, EDNO 在调节缺血性血管新生过程中起着非常重要的作用; 使用一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 抑制剂后, 内皮依赖性舒张因子 P、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 明显受到抑制^[6]; 观察缺乏内皮源性 NOS 的小鼠下肢缺血模型发现, 由于内皮源性 NOS 缺乏, 使得 EDNO 生成受阻, 缺血性血管新生明显受到抑制^[7]。人们对 HH 造成的内皮细胞损害已经做了大量的研究, 由于血管新生与内皮细胞功能密切相关, 为了进一步了解 HH 对慢性缺血性血管新生的调节机制, 我们拟用高浓度蛋氨酸建立 HH 的大鼠下肢缺血模型, 观察 HH 对缺血性血管新生的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组和下肢缺血模型的建立

选用雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只 (购自日本医学实验动物中心), 体重 250~300 g, 随机分为两组, 对照组和 HH 组, 每组 18 只。对照组: 动物从实验开始到结束始终给予普通饮水; ④HH 组: 动物从实验开始到结束始终给予含有 0.5% 蛋氨酸的饮水, 每只大鼠每天饮水约 50~60 mL。两组动物分别服用不同的饮水两周后, 制成左下肢缺血模型。方法: 用戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 常规消毒, 切开左下肢皮肤, 分离股动、静脉后, 用 4 号丝线结扎并切断^[8]。术后两组分别按各自的饮水方法继续喂养 4 周。

1.2 体重及血压的观察

于术前和术后 7、14、28 d, 测量所有动物的体

重, 用尾套法观察大鼠血压和心率。

1.3 激光多普勒血流仪观察下肢血流变化

用激光多普勒血流仪检测各动物术前和术后 0、3、7、14、21、28 d 双下肢血流。在室温 26℃ 条件下, 将动物麻醉后, 剃除双下肢至脐平面鼠毛, 在 37℃ 恒温板上俯卧 30 min, 用激光多普勒血流仪测定双下肢血流^[8]。在计算机中根据激光多普勒血流仪显示的不同颜色像素来判断下肢血流的情况。为了减少外界对血流的影响, 采用缺血/非缺血下肢血流比值。

1.4 髂动脉造影

术后第 14 天, 将动物麻醉, 开腹, 通过腹主动脉插入 22 号软头硅胶管, 从导管注入含有肝素的生理盐水 (肝素浓度为 10 ku/L) 3~4 mL 冲洗 2~3 次。将动物处死后, 注入 3 mL 消化道造影用钡剂, 进行 X 线摄片^[8]。用血管造影计数法计算侧枝血管的数量。方法: 用透明纸作成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的方格子, 置于下肢血管造影内侧 10 cm × 5 cm 的范围, 计算毛细血管与透明格子线交叉的点数。

1.5 测定下肢肌肉内毛细血管密度

术后第 14 天, 麻醉后分别取出左右下肢内收肌 0.5 cm³ 大小的肌肉 2~3 块, 用甲醇固定, 石蜡包埋后, 切成 5 μ m 厚的组织切片。用抗 (II) 因子单克隆抗体 (anti-vWF MAB) 染色后, 在高倍显微镜 ($\times 400$) 下观察, 鉴定肌肉组织中内皮细胞毛细血管并计数^[8]。比较缺血下肢和非缺血下肢肌肉内皮细胞毛细血管数, 间接获得微循环水平的血管形成状况。

1.6 血清中生物化学指标的检测

于术后第 14 天由腹主动脉采血, 测定血清总胆固醇、甘油三酯、一氧化氮、环磷酸鸟苷和同型半胱氨酸的含量。

1.7 缺血肌肉组织中一氧化氮和环磷酸鸟苷测定

于术后第 14 天取缺血下肢内收肌 0.2~0.3 cm³, 去除其内脂肪组织后, 将此肌肉搅拌成匀浆, 加入 10 倍体积的 6% 三氯醋酸, 用 2 000 r/min 速度离心 15 min。收集其上清液, 用乙醚冲洗 4 次, 收取上清液, 每毫升加入 0.05 mol/L 醋酸钠 (pH 5.8), 分别用一氧化氮和环磷酸鸟苷免疫测定盒测定缺血组织中一氧化氮和环磷酸鸟苷的含量^[8]。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 10.0 统计软件分析, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 两组动物的体重、心率和收缩期血压 (表 1, Table 1)。

两组动物在相同时间段内没有发现显著性差别

表 1. 两组动物的体重、心率和血压

Table 1. Basal data of animals

分 组	术 前			术后 7 d			术后 14 d		
	体重	心率	收缩压	体重	心率	收缩压	体重	心率	收缩压
对照组	332 ± 5	352 ± 18	120 ± 5	336 ± 4	351 ± 13	132 ± 7	379 ± 3	348 ± 10	127 ± 5
HH 组	328 ± 7	350 ± 10	117 ± 4	335 ± 6	346 ± 10	128 ± 4	371 ± 5	343 ± 13	124 ± 3

HH: 高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia)。

2.2 激光多普勒血流仪测定下肢血流灌注

在术前和术后 0、7、14、21、28 d 分别测定双下肢血流。用激光多普勒血流仪观察大鼠 28 d 内双下肢血流变化,从血流图可看出,对照组中缺血部位血流恢复较快,而 HH 组下肢血流灌注明显低于对照组。通过电脑分析观察术前和术后 0、7、14、21、28 d 的缺血/非缺血下肢血流变化(图 1, Figure 1)。

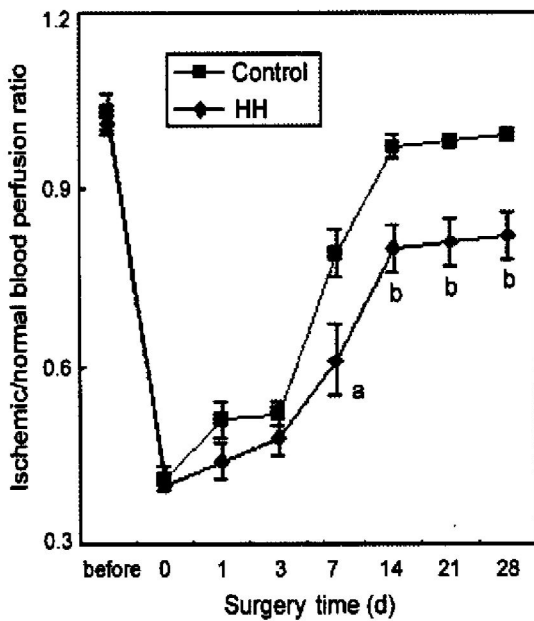


图 1. 缺血/非缺血下肢血流比值变化 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照(Control)组比较。

Figure 1. Ischemic/normal hindlimb blood perfusion ratio

2.3 髂动脉造影和血管造影计数法定量分析

为了检查 HH 是否影响动物中缺血部位侧枝循环的建立和血流,在术后第 14 天实行髂动脉造影。用血管造影计数法(angiographic score)定量分析缺血大腿内收肌处毛细血管的情况,其结果为 HH 组明显低于对照组(1.90 ± 0.06 比 3.20 ± 0.25 , $P < 0.001$) (图 2, Figure 2)。

(表 1, Table 1)。

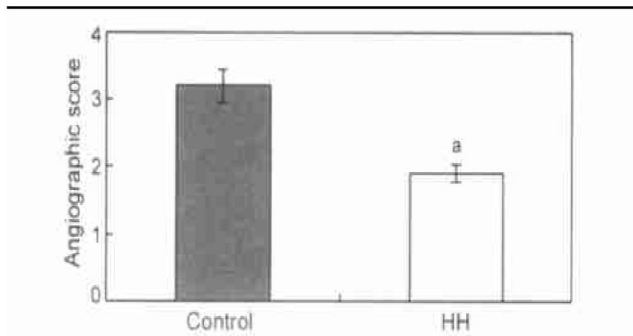


图 2. 术后第 14 天血管造影后毛细血管计数 a: $P < 0.001$, 与对照(Control)组比较。

Figure 2. Angiographic score at the 14th days after operation

2.4 免疫组织化学染色法鉴定毛细血管内皮细胞和毛细血管密度

为了进一步了解 HH 组中减弱的侧枝血管是否与抑制微血管水平的血管新生有关,取术后第 14 天缺血和非缺血下肢内收肌的肌肉切片,用抗第 8 因子单克隆抗体染色后鉴定肌肉中的毛细血管内皮细胞,在光学显微镜下(放大 400 倍)观察第 8 因子呈阳性的毛细血管。结果表明,HH 组缺血下肢毛细血管密度明显低于对照组(17.0 ± 0.8 比 30.3 ± 1.2 , $P < 0.001$) (图 3, Figure 3);而非缺血下肢两组毛细血管密度则无显著差别(29.0 ± 0.3 比 30.0 ± 1.6 , $P > 0.05$) (图 4, Figure 4)。

2.5 血清生物化学分析

术后第 14 天,用蛋氨酸喂养的 HH 组的动物,血清中 Hcy 明显高于对照组,一氧化氮明显低于对照组;两组叶酸、维生素 B₁₂、总胆固醇、甘油三酯无明显差别(表 2, Table 2)。

2.6 缺血组织中一氧化氮和环磷酸鸟苷的含量

为了检验缺血组织中 HH 与一氧化氮生成间的关系,测定了缺血组织中一氧化氮和环磷酸鸟苷的含量。结果显示,HH 组缺血组织中一氧化氮和环磷酸鸟苷含量明显低于对照组(表 3, Table 3)。

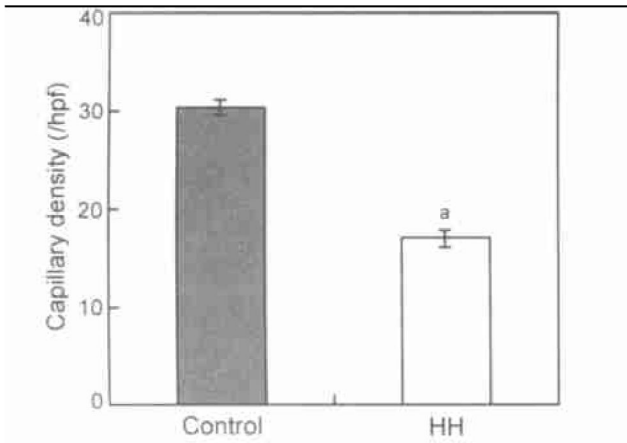


图 3. 术后 14 d 缺血下肢毛细血管密度 /hpf: 每高倍视野 (per high power field)。a: $P < 0.01$, 与对照 (Control) 组比较。

Figure 3. Capillary density of ischemic hindlimb at the 14th days after operation

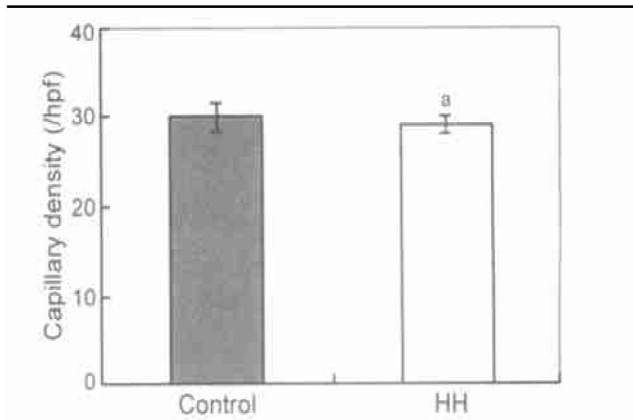


图 4. 术后 14 d 非缺血下肢毛细血管密度 /hpf: 每高倍视野 (per high power field)。a: $P > 0.05$, 与对照 (Control) 组比较。

Figure 4. Capillary density of nonischemic hindlimb at the 14th days after operation

表 2. 有关血清生物化学分析

Table 2. Serum biochemical parameters

分 组	同型半胱氨酸 ($\mu\text{mol/L}$)	一氧化氮 ($\mu\text{mol/L}$)	叶酸 ($\mu\text{g/L}$)	维生素 B ₁₂ ($\mu\text{g/L}$)	总胆固醇 (mg/dL)	甘油三酯 (mg/dL)
对照组	4.3 ± 0.6	13.5 ± 0.8	47.2 ± 2.3	1 047 ± 27	47.0 ± 2.5	85 ± 11
HH 组	8.0 ± 0.5 ^a	9.6 ± 0.6 ^a	37.8 ± 1.9	1 100 ± 73	47.0 ± 1.6	91 ± 10

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。HH: 高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia)。

表 3. 术后 14 d 缺血组织中一氧化氮和环磷酸鸟苷的含量

Table 3. The contents of nitric oxide and cyclic guanosine 3, 5-monophosphate in ischemic tissue at the 14th days after operation

分 组	一氧化氮 (nmol/g 组织)	环磷酸鸟苷 (fmol/g 组织)
对照组	17.30 ± 2.69	2.21 ± 0.49
HH 组	11.69 ± 2.04 ^a	1.18 ± 2.20 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。HH: 高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia)。

3 讨论

本研究表明: 过量服用蛋氨酸可以使血清中 Hcy 含量增高; ④食用蛋氨酸导致的 HH 可以抑制在体大鼠下肢缺血部位的血管新生、侧枝血管形成和血流的再灌注; ④被 HH 抑制的血管新生与缺血组织中一氧化氮和环磷酸鸟苷减少有关。

同型半胱氨酸由含硫的必需氨基酸——蛋氨酸在体内转换而成, 过量食用蛋氨酸后, 会引起血清中 Hcy 的含量增高。Durand 等人^[9] 观察过量服用蛋氨酸所致的 HH, 会使血小板积聚率增高、血栓素形成增多和巨噬细胞源组织因子激活增加, 服用 0.5%

蛋氨酸饮水 4 周后发现内皮依赖性舒张因子——乙酰胆碱和胆胺明显受到抑制, 而且血清中 Hcy 的浓度较正常对照组增高 2 倍左右。

高同型半胱氨酸血症组血清中维生素 B₁₂、叶酸与对照组相比无显著差别, 此结果表明, 过量食用蛋氨酸导致的 HH 对缺血性血管新生的抑制作用至少不是因叶酸和维生素 B₁₂ 变化所引起的。本研究显示, 过量食用蛋氨酸可制备 HH 大鼠模型; 由于微血管形成减少, 导致缺血下肢血流灌注、毛细血管密度和血管造影毛细血管计数均较对照组明显减少。

高同型半胱氨酸血症可抑制在体缺血性血管新生。HH 对血管新生的抑制可能由以下几个方面所致。第一, HH 导致内皮细胞损伤和/或 EDNO 形成减少, 从而使得血管新生受到抑制。我们知道 EDNO 在调节血管新生过程中起着非常重要的作用。如内皮依赖性血管舒缩因子 P 物质、血管内皮生长因子均明显受到抑制。EDNO 维持着血管内皮细胞稳定性, 从而促进内皮细胞的迁移、增殖^[10]。在体外, 培养皿中内皮细胞长时间暴露于 Hcy 中, 会使其生物活性减弱。体内研究发现, EDNO 减少既影响小动脉也影响微动脉生成^[11]。过量喂食蛋氨酸所致大鼠 HH, 致 EDNO 生成减少, 这是局部骨骼肌小

动脉形成受抑制的主要原因之一。在 HH 体内, 内皮损伤和/或 EDNO 形成减少可能是导致缺血性血管新生受抑制的主要因素之一^[12]。第二, Hcy 代谢所产生的氧自由基对缺血性血管新生也有抑制作用, 因为 Hcy 减弱了细胞内抗氧化酶对内皮细胞过氧化物的解毒能力^[13]。虽然本研究没有研究 HH 状态下是否会影响氧自由基, 但其他人研究表明, HH 会使氧自由基增多, 进一步使 EDNO 降解^[14]。第三, HH 直接抑制了内皮细胞的增生和/或迁移, 影响缺血性血管新生。

本研究表明, 过量服用蛋氨酸可引起 HH, 在 HH 状态下缺血区域的血管新生减少, 侧枝血管的形成明显受到抑制。HH 与动脉粥样硬化疾病有关。在 HH 大鼠体内, EDNO 生物活性减少是 HH 缺血性血管新生受抑制的主要原因之一。本研究的结果对临床工作有相当重要的指导意义。其一, 患缺血性心脑血管疾病伴有 HH 者, 侧枝血管的形成明显受到抑制, 同时还发现 40% 的动脉粥样硬化的病人伴有 HH; 其二, 缺血性疾患的病人, 必须注意饮食中蛋氨酸的摄入, 以防止血清中 Hcy 含量的增高, 同时可以服用叶酸等以降低 Hcy 水平, 从而改善内皮细胞的功能, 增加缺血性血管新生和侧枝血管的形成。

综上所述, Hcy 所致的 EDNO 生物活性减弱, 可能是 HH 状态下减弱缺血性血管新生的主要原因。

[参考文献]

[1] Matthias D, Becker CH, Riezler R, Kindling PH. Homocysteine induced arte-

riosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis*, 1996, **122**: 201-216

- [2] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*, 1969, **56**: 111-128
- [3] 周剑涛, 潘秋香. 血浆总同型半胱氨酸与血管性疾病. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 366-368
- [4] Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, Wong PW, Coull B, Inahara T. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, 1989, **79**: 1 180-188
- [5] Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 1991, **324**: 1 149-155
- [6] Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest*, 1996, **98**: 5-7
- [7] Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 2 036-044
- [8] Murohara T, Asahara T, Silver N, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 1998, **101**: 2 567-578
- [9] Durand P, Lussier-Cacan S, Blache D. Acute methionine load induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J*, 1997, **11**: 1 157-168
- [10] Duan J, Murohara T, Ikeda H, Katoh A, Shintani S, Sasaki K, et al. Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia: nitric oxide dependent mechanism. *Circulation*, 2000, **102** (Suppl 4): **370-376**
- [11] Duan J, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shintani S, Akita T, et al. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 2 579-585
- [12] 赵志鸿. 一氧化氮与缺血性脑血管病. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 542-544
- [13] Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzendichler B, Kearney M, et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med*, 1997, **3**: 879-886
- [14] Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 1 156-161

(此文编辑 曾学清)