

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0529-04

•实验研究•

叶酸对同型半胱氨酸损伤内皮细胞的保护作用及可能机制

景冬樱¹, 吴越芳², 王树人³

(1. 中国人民解放军第 411 医院海军药物研究中心, 上海市 200434; 2. 兰州化学工业公司职工医院药剂科, 甘肃省兰州市 736000; 3. 四川大学华西基础与法医学院病理生理学教研室, 四川省成都市 610040)

[关键词] 病理学与病理生理学; 叶酸与同型半胱氨酸对内皮细胞的相互作用; 低密度脂蛋白; 叶酸; 四氢喋呤; 动脉粥样硬化; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

[摘要] 为探索叶酸治疗高同型半胱氨酸血症的可能机制, 将培养兔主动脉内皮细胞加入兔天然低密度脂蛋白后分为 6 组: 对照组、叶酸组、四氢喋呤组、同型半胱氨酸组、叶酸同型半胱氨酸组和四氢喋呤同型半胱氨酸组。以不同时间内脂质过氧化程度、一氧化氮生成量及一氧化氮合酶的活性为检测指标。结果发现, 叶酸同型半胱氨酸组和四氢喋呤同型半胱氨酸组相似, 皆显示出对同型半胱氨酸损伤内皮细胞各项作用的拮抗效应, 脂质过氧化程度降低、一氧化氮的生成量明显增加 ($P < 0.01$, 与同型半胱氨酸组相比), 一氧化氮合酶活性增高 (+ +)。此结果提示叶酸具有和四氢喋呤同样的效应, 可能通过对一氧化氮系统的保护作用拮抗同型半胱氨酸和低密度脂蛋白对内皮细胞的协同损伤作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effects and Possible Mechanisms of Folic Acid in the Injury of Homocysteine to Endothelial Cell

JING Dong-Ying¹, WU Yue-Fang², and WANG Shu-Ren³

(1. Research Center of Pharmacology, Navy 411 Hospital of PLA, Shanghai, 200434; 2. Hospital of Lanzhou Chemical Industry Company, Lanzhou, 736000; 3. College of Basic and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610040, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Endothelial Cell; Lipoprotein, LDL; Folic Acid; Tetrahydrobiopterin; Atherosclerosis; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** To study the possible mechanisms of folic acid on hyperhomocysteinemia. **Methods** Rabbit aorta endothelial cell (EC) were isolated and cultured, then divided into six groups after adding native rabbit low density lipoprotein (nLDL) into the EC medium: control group (without any more agents added), folic acid group, tetrahydrobiopterin (BH₄) group, homocysteine (Hcy) group, folic acid plus Hcy group and BH₄ plus Hcy group. The following items were determined that is the degree of lipid peroxidation, ④the amounts of NO₂⁻/NO₃⁻, and ④the activity of NO synthase (NOS). **Results** Folic acid plus Hcy group were similar with BH₄ plus Hcy group. The various effects of Hcy were antagonized in both groups. Compare with Hcy group, the degree of lipid peroxidation significantly decreased ($P < 0.01$), the amounts of NO significantly increased ($P < 0.01$). The activity of NOS also increased (+ +). **Conclusion** There were same effects both folic acid and BH₄. They may inhibit the co-injure of Hcy and LDL on EC by protecting effects of NO system.

高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 发生的一个独立危险因素, 其致 As 的机制之一是对内皮细胞(endothelial cell, EC) 的损伤及脂质过氧化(lipid peroxide, LPO)^[1-5]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy) 与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 共同作用于 EC 后具有协同损伤作用并导致 EC 凋亡^[5,6]。EC 分泌的一氧化氮(nitric oxide, NO) 具有多种抗 As 的功能, 其合成障碍也是 As 的重要发生机制之一。高 Hcy 血症的一种有效

治疗药物是叶酸[四氢喋呤(tetrahydrobiopterin, BH₄) 类似物], 其药理治疗机制除作为 Hcy 降解时的甲基供体外(Hcy 降解途径中重新合成蛋氨酸的甲基供体), 是否可能通过其他机制拮抗 Hcy 致 As 的作用? 本文以 EC 为研究对象, 进一步探讨叶酸拮抗 Hcy 致 As 的其他机制, 现予报道。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器及药品

超净工作台(YJ-1450, 苏州), CO₂ 孵箱(Heraeus Germany), 倒置显微镜(Olympus Japan), 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。细胞培养及实验用品主要购自美

[收稿日期] 2002-08-31

[修回日期] 2003-05-01

[作者简介] 景冬樱, 女, 1963 年出生, 江苏省南京市人, 医学硕士, 讲师, 研究方向为中药新药制剂开发及质量控制。吴越芳, 女, 1966 年出生, 江苏无锡市人, 药学专业毕业, 副主任医师。王树人, 男, 1945 年出生, 河南省洛阳市人, 病理生理学教授, 博士研究生导师。

国 Sigma 公司和德国 Boehringer Mannheim (BM) 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与鉴定

取健康、体重 1.5~2 kg 家兔胸主动脉,用 0.1% 胶原酶消化内膜,1 000 r/min 离心 10 min 后收集细胞,在含 20% 小牛血清 M199 培养基中,37℃、5% CO₂ 条件下常规培养。光镜下 EC 贴壁生长,呈放射状延伸,铺满处呈鹅卵石样排列;电镜下可见 EC 特异结构 Weibel-Palade (W-P) 小体。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 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清脂蛋白^[7]。常规采取健康兔血清,NaBr 调血清密度至 1.400,隔夜后铺样,超速(50 000 r/min)离心 5.5 h,提取 LDL 层溶液,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 中稀释 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,再由标准曲线得出测定管蛋白浓度,最后过滤除菌,4℃冰箱保存,2 周内使用。

1.4 脂质过氧化测定

以硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)法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 μmol/L TBARS 表示。

1.5 一氧化氮合酶活性测定—依赖还原型辅酶⑤ 黄递酶组织化学染色

将孵育液滴染于已吹干的培养细胞盖玻片上,置 37℃恒温箱中孵育 1.5~2 h。孵育液由 NBT 液(含 NBT 10 mg 2.5 mL, 200 mmol/L tris 缓冲液 pH 7.4 2.5 mL, 50 mmol/L MgCl₂ 1 mL, 双蒸馏水 3 mL)、双蒸馏水 1 mL 和 NADPH 20 mg 组成。孵育结束用冷的 100 mmol/L PBS 冲洗盖玻片,吹干,盖玻片正面朝下置载玻片上,加拿大树胶封片,光镜下观察细胞内紫兰色 Formazan 沉淀。Formazan 沉淀处系酶活性部位,颜色越深酶活性越高。

1.6 Griess 试剂比色法间接测定一氧化氮含量

一氧化氮(NO)是一种气体自由基,极不稳定(半衰期在 1 min 以内),在中性水溶液中迅速与氧反应,转化生成稳定代谢产物 NO₂⁻/NO₃⁻,因此,测定细胞培养基中 NO₂⁻/NO₃⁻ 的浓度能间接反应 NO 的含量^[8,9]。本实验用镉粉将 NO₃⁻ 还原成 NO₂⁻,NO₂⁻

与 Griess 试剂反应生成有色化合物,颜色深浅与反应体系中 NO₂⁻/NO₃⁻ 的含量呈正比。

1.6.1 镉粉还原 去蛋白细胞上清液 1 mL+ 甘氨酸溶液 1 mL+ 镉粉 150 mg,混匀震荡 90 min,使 NO₃⁻ 完全还原成 NO₂⁻。

1.6.2 Griess 试剂反应 测定液、标准液(10 μmol/L NaNO₂)、空白液(以蒸馏水代替上清液)各取 1 mL,分别加入 Griess 试剂(由 1% 对氨基苯磺酸 1 mL、0.1% N-(1-萘基)乙二胺 1 mL 组成),混匀室温下静置 60 min,在 530 nm 处读取各管吸光度值(A)。

1.7 实验分组

将第 2 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,待细胞均匀铺满孔底盖玻片后,进行实验。实验前一日换液,改为无血清培养基(CHO-S-SFM ⑥ Gibco),EC 内加入兔 nLDL(48 g/L)后分为 6 组(表 1),各实验组在加入不同药品后共同孵育,分别于 12 h 和 24 h 后进行指标检测。

表 1. 实验分组及各组药物浓度

分 组	药 物	浓度(μmol/L)
对照组		
叶酸组	叶酸	100
四氢喋呤组	BH4	0.02
同型半胱氨酸组	Hcy	20
叶酸同型半胱氨酸组	Hcy+ folic acid	20+ 100
四氢喋呤同型半胱氨酸组	Hcy+ BH4	20+ 0.02

1.8 统计方法

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

2 结 果

2.1 脂质过氧化程度测定

以各实验组 EC 培养上清液中测得的 TBARS 含量代表脂质过氧化程度,12 h 和 24 h 结果基本相似,表 2 (Table 2) 为 24 h 实验结果。Hcy 组 TBARS 含量约为对照组的 7 倍,说明 Hcy 具有明显的促脂质过氧化作用;叶酸同型半胱氨酸组与四氢喋呤同型半胱氨酸组实验结果相似, TBARS 含量明显低于同型半胱氨酸组($P < 0.01$)。

2.2 一氧化氮含量间接测定

以 EC 培养上清液中 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量间接反映 NO 含量,12 h 和 24 h 实验结果见表 3 (Table 3)。对

照组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量明显低于叶酸组和四氢喋呤组 ($P < 0.01$), 充分说明叶酸和 BH_4 对 NOS 有保护作用。Hcy 组在最初可能由于 Hcy 对 NOS 的刺激作用 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量有所升高, 12 h 时高于对照组 ($P < 0.01$), 但随着时间的延长 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量逐渐开始下降, 24 h 时 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量已低于对照组并明显低于叶酸同型半胱氨酸组和四氢喋呤同型半胱氨酸组 ($P < 0.01$), 再次证明出叶酸和 BH_4 对 NOS 的保护作用。

表 2. 各组内皮细胞培养上清液中硫代巴比妥酸反应物质含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 2. TBARS contents in culture supernatants of ECs	
分 组	TBARS ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	0.64 ± 0.167
叶酸组	0.487 ± 0.154
四氢喋呤组	0.538 ± 0.269
同型半胱氨酸组	5.026 ± 0.641^a
叶酸同型半胱氨酸组	4.000 ± 0.513
四氢喋呤同型半胱氨酸组	3.978 ± 0.513

a: $P < 0.01$, 与其它各组比较。

表 3. 各组内皮细胞培养上清液中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量

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

分 组	12 h	24 h
对照组	30.63 ± 3.35	28.54 ± 13.53
叶酸组	71.00 ± 18.11^a	72.33 ± 15.00^a
四氢喋呤组	75.13 ± 16.67^a	75.98 ± 3.00^a
同型半胱氨酸组	51.85 ± 12.44	26.58 ± 16.16
叶酸同型半胱氨酸组	60.45 ± 12.74	58.15 ± 12.64^b
四氢喋呤同型半胱氨酸组	61.91 ± 11.66	69.54 ± 10.76^b

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与同型半胱氨酸组比较

2.3 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 (++)。结果发现, 对照组 12 h 和 24 h 均为淡兰色记 (+), Hcy 组 12 h 时颜色深兰记 (++) , 24 h 时颜色淡兰记 (+)。其余各组 12 h 和 24 h 结果相似, 均为深兰色 (++)。表明 NOS 酶分布情况与 NO 生成量相吻合。

实验还发现, 加入叶酸(叶酸同型半胱氨酸组)的效应与加入四氢喋呤(四氢喋呤同型半胱氨酸组)的效应相似, 脂质过氧化程度明显降低、NO 含量明

显增高 ($P < 0.01$ 与同型半胱氨酸相比); NOS 活性增高(深兰色)。充分说明叶酸和四氢喋呤也可能通过对 NO 系统的保护作用拮抗 Hcy 对 EC 的损伤。

3 讨论

高 Hcy 血症已被确定为 As 发生的一个独立危险因素。本实验及相关研究亦证实 Hcy 可损伤 EC 并导致脂质过氧化^[10,11]。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。此外, Hcy 与 LDL 对 EC 具有协同损伤作用并导致 EC 凋亡^[5,6]。Hcy 致 EC 损伤的一个可能机制是促进 EC 脂质过氧化。实验结果发现, Hcy 组 TBARS 生成量是对照组的 7~8 倍, 说明 Hcy 具有对 EC 强大的脂质过氧化作用。

高 Hcy 血症的一种有效治疗药物是叶酸, 本实验形态学证据^[1,6]亦显示, 加入叶酸后, 细胞受损程度及凋亡都减少, 明确地证实了叶酸对 Hcy 毒性的拮抗效应。叶酸对高 Hcy 血症的药理治疗机制的目前解释是: 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, 从而造成 EC 的损伤。但叶酸是否可通过其它机制拮抗 Hcy 的毒性作用尚未见报道。在本实验条件下, 最初可能由于 Hcy 对 NOS 的刺激作用, Hcy 组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量有所升高, 12 h 时高于对照组 ($P < 0.01$), 但随着时间的延长 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量逐渐开始下降, 24 h 时 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量已低于对照组并明显低于叶酸同型半胱氨酸组和四氢喋呤同型半胱氨酸组 ($P < 0.01$); 此外叶酸组和四氢喋呤组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的含量明显高于对照组 ($P < 0.01$), 充分显示出叶酸和 BH_4 对 NOS 的保护作用, 含有叶酸的实验组, 不但 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 的生成量增加, 且 NOS 的活性亦增高。NO 是血管内皮细胞的一种重要信号和保护性机制, 可拮抗 As 的发生。因此, 叶酸很可能还通过对 NOS 的保护机制拮抗 Hcy 的毒性作用。

正常情况下, NOS 需要 BH_4 为辅因子, BH_4 对 NOS 具有保护作用。而叶酸与 BH_4 为类似物, 两者结构相似, 参与的递氢, 递甲基反应亦相似, 催化的酶亦相同^[12], 叶酸在细胞内很易被还原为四氢叶酸。因此, 叶酸很可能是作为 BH_4 的替代物对 NOS 起保护作用。在本实验中, 加入叶酸的效果与加入 BH_4 的效果非常相似, 论题支持上述推论。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。

[参考文献]

- [1] 景冬樱,王树人,杨志梅,顾玲,沈学宁,郝刚. 同型半胱氨酸对内皮细胞及脂质过氧化的影响. 中国动脉硬化杂志, 1999, **7** (2): 128-132
- [2] Blundell G, Jones BG, Rose FA, Tulball N. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis*, 1996, **122** (2): 163-172
- [3] Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *JACC*, 1996, **27** (3): 517-527
- [4] 王淑秀,邓仲端,倪娟,瞿智玲. 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
- [5] 李全忠,朱雯霞,赵水平. 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. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (4): 324-326
- [6] 景冬樱,王树人,王廷华,杨志梅,顾玲,邓峰美. 同型半胱氨酸和低密度脂蛋白对内皮细胞的协同损伤作用. 中国病理生理杂志, 2000, **16** (6): 522-526
- [7] 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
- [8] 许宏岳,李爱红,汪晓稼,胡明香. 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
- [9] 顾玲,杨志梅,景冬樱,王树人. 镉还原法测定一氧化氮稳定代谢产物的影响因素研究. 华西医科大学学报, 1999, **30** (3): 340-342
- [10] Wall RT, Harlan JM, HarKer LA, Striker. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res*, 1980, **18** (1-2): 113-121
- [11] Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. Oxidation of low density lipoprotein by thios: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res*, 1993, **34** (12): 2 051-061
- [12] 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

(此文编辑 胡必利)