

[文章编号] 1007-3949(2006)14-11-0967-04

• 实验研究 •

原花青素抑制同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞的毒性作用

王计良, 毛朝旭, 薛伟珍, 姜兆秀, 任洁, 王晨, 李瑜林, 宁丽君, 马登峰, 任玉红, 薛晓波

(太原市中心医院心脏中心, 山西省太原市 030009)

[关键词] 病理学与病理生理学; 原花青素; 同型半胱氨酸; 活性氧; 信号传导; 氧化应激; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨原花青素对同型半胱氨酸介导的人脐静脉内皮细胞毒性作用的影响及其作用的分子机制。方法 采用 MTT 及乳酸脱氢酶检测细胞活性, 流式细胞仪检测活性氧的变化, 并用试剂盒检测原花青素对超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性以及丙二醛浓度的影响。Western blot 分析相关蛋白的表达与磷酸化水平。结果 同型半胱氨酸处理细胞 48 h 显著降低细胞的存活率, 升高细胞内活性氧水平与丙二醛含量, 降低超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶的活性; 而预先给予不同浓度的原花青素处理细胞 1 h, 可提高细胞存活率, 并可有效抑制细胞内活性氧水平与丙二醛含量的升高, 维持超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活性。原花青素还显著抑制同型半胱氨酸诱导的细胞外信号调节激酶、p38 和 c-Jun 氨基末端激酶的磷酸化。用特异性抑制剂分析证实, 同型半胱氨酸介导的细胞毒性是丝裂原活化蛋白激酶所依赖的。结论 原花青素能抑制同型半胱氨酸介导的人脐静脉内皮细胞的毒性, 其细胞保护作用可能是通过维持细胞内抗氧化酶活性, 降低细胞内活性氧水平, 最终阻断活性氧激活的丝裂原活化蛋白激酶信号通路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Grasp Seed Procyanidins Protecting Human Umbilical Vein Endothelial Cell From Homocysteine

WANG Ji-Liang, MAO Zhao Xu, XUE Wei Zhen, JIANG Zhao Xiu, REN Jie, WANG Chen, LI Yu-Lin, NING Li-Jun, MA Deng-Feng, REN Yu-Hong, and XUE Xiao Bo

(The Cardio Center of Taiyuan City Hospital, Taiyuan 030009, China)

[KEY WORDS] Grasp Seed Procyanidins; Homocysteine; Reactive Oxidative Species; Signal Transduction; Oxidative Stress; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of grasp seed procyanidins (GSP) on homocysteine (HCY)-induced cell viability in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and related molecular mechanisms. **Methods** Cell viability was analyzed by using MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assay. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx) and malondialdehyde (MDA) were examined by kits and the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined by flow cytometric assay. Proteins and phosphorylation levels were examined by Western blot. **Results** Treatment of cultured HUVEC with HCY for 48 hours induced a significant decrease of cell viability. The levels of intracellular ROS and MDA were enhanced, and the activities of SOD and GSHPx were decreased. However, simultaneous treatment with GSP exhibited cytoprotective effects, reduced formation of the MDA and ROS, maintained the activity of SOD and GSHPx, prevented the phosphorylation of extracellular signal regulated kinase (ERK), p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK). **Conclusion** These results demonstrated that GSP had the protective capacity to antagonize HCY induced cell toxicity in HUVEC. The protective effect of GSP may be partially dependent on an antioxidative stress effects and then inhibition of the activation of mitogen activated protein kinase (MAPK).

大量流行病学调查和临床病例研究已证实, 血中同型半胱氨酸(homocysteine, HCY) 的浓度升高是致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 的独立危险因素^[1]。早期有研究发现血中 HCY 浓度升高可损伤

血管内皮细胞, 并能诱导或抑制内皮细胞中多种基因的表达^[1]。但是, 目前对 HCY 的致病机制还不详, 初步研究表明 HCY 能产生大量超氧化物及过氧化物, 这些物质将损伤血管内皮, 同时还能抑制抗氧化酶的活性, 如抑制谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSHPx) 等的活性^[2, 3]。原花青素(grasp seed procyanidins, GSP) 是一组黄碱素类物质的集合物名称, 它们都是从蓟类植物(左旋)中提取出的。最初将其作为一种有效的保

[收稿日期] 2006-03-27 [修回日期] 2006-10-20

[作者简介] 王计良, 硕士, 主任医师, 在心脏冠状动脉搭桥术及复杂先天性心脏病外科治疗、瓣膜置换术方面有很高造诣, 电话 0351-5656192, E-mail 为 cardiowj111@sina.com。毛朝旭, 主任医师, 擅长经皮冠状动脉介入治疗及心电生理技术。薛伟珍, 硕士, 副主任医师, 擅长心血管疾病的诊治, 尤其是经皮冠状动脉介入治疗术。

肝药物,随着临床应用深入,GSP在心血管方面表现出显著的作用^[4,5]。但是,GSP对HCY介导的内皮细胞毒性作用的影响,目前尚无相关的研究报道。本研究拟探讨GSP对HCY诱导的内皮细胞毒性的保护作用,并进一步探讨其作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

原花青素由中国医学科学院药物研究所提供。GSPx、SOD、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒为Promega公司产品;二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA)、MTT为Sigma公司产品;DMEM与胎牛血清购买于Calbiochem公司;抗细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal regulated kinase, ERK1/2)、p38和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N terminal kinase, JNK)磷酸化与非磷酸化抗体均为Santa Cruz公司产品。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒为Cell Signaling公司产品。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养

无菌条件下取健康产妇分娩后3 h内脐带20~30 cm,将脐静脉一端插管,另一端用止血钳钳紧,用D-Hank's液反复灌洗脐静脉3~5次,尽量将脐静脉内余血冲净。将残留D-Hank's液排尽后,灌入0.25%胰蛋白酶5 mL,将整条脐带置于无菌容器内,37℃消化6~10 min,离心管收集消化液,用含20%小牛血清的培养基(含20%胎牛血清、100 mg/L内皮细胞生长因子、300 mL/L L₂谷氨酰胺、100 mg/L肝素、10⁵ u/L青霉素和10⁵ u/L链霉素)10 mL灌洗脐静脉,并将其收集到同一离心管中,室温下1 000 r/min离心10 min,将上清弃尽,加入适量含20%胎牛血清的培养基,使细胞重悬。取一滴细胞悬液,用台盼兰染色后,计数活细胞,调整活细胞浓度为5×10⁸/L,将细胞悬液分装于培养瓶中,置于37℃和5%CO₂的细胞培养箱中培养,每天定时在倒置显微镜下观察细胞形态学改变,每2~3天换液一次。待细胞汇合时进行传代,取第4、5代亚汇合状态的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)分组进行后续实验。

1.3 实验细胞的分组和处理

用台盼蓝染色排斥法来评估细胞的存活情况。存活率>98.0%的内皮细胞用于实验。取培养的第2~3代细胞进行实验。待细胞汇合达70%~80%后,换用含1%胎牛血清的DMEM培养基培养24 h后,对实验细胞进行随机分组,加入各处理因素作

用。正常对照组:以含1%胎牛血清的DMEM培养基培养细胞作为正常对照。HCY组:HCY的终浓度分别为0.1、0.5、1 mmol/L。HCY+GSP组:1 mmol/L HCY+GSP(5 g/L);1 mmol/L HCY+GSP(10 g/L);1 mmol/L HCY+GSP(20 g/L)。

1.4 二苯基四氮唑法测定细胞增殖

取生长良好的3~8代细胞制成细胞悬液,以5×10¹⁰/L密度接种于96孔板,待细胞长至80%汇合时,用含0.1%新生牛血清的DMEM培养24 h,随机分组,每组设6个平行孔,加入不同处理因素继续孵育48 h,GSP在给HCY前1 h加入(以下实验皆同)。在培养结束前4~6 h每孔加入5 g/L MTT 10 μL,DMSO终止反应,震荡混匀后用酶链免疫仪在570 nm读取吸光度值,以吸光度(A)值反映细胞增殖情况。

1.5 乳酸脱氢酶释放率的测定

通过测定释放到培养基中LDH的量来判断细胞损伤状况。收集培养的内皮细胞并调节细胞密度为1×10⁸/L,接种于24孔板(每孔1 mL),待细胞达70%~80%后,分组同上。各实验组作用后收集培养上清液,同时还收集每孔上清液中的脱落细胞,加入100 μL细胞裂解液后混入相应各孔。每孔加入0.5 mL细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 150 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100, pH 8.0),40℃静置15 min后振荡数分钟,收集细胞裂解液,比色法测定培养上清液和细胞裂解液中LDH浓度。

1.6 二氯荧光素氧化法测定活性氧

取对数生长期hUVEC,用10%胎牛血清DMEM培养基按1×10⁵/孔接种于6孔培养板中,37℃5%CO₂孵箱中培养48 h,待细胞生长单层汇合后,换无血清培养基,不同浓度药物(HCY 0.1~1 mmol/L)或预先加入不同浓度的GSP(5~20 g/L)与细胞孵育1 h,然后再加入0.25 mmol/L HCY继续作用1 h。每组设平行3孔,对照组只加相应培养液;干预1 h后,弃孔内培养上清液。然后用PBS洗细胞1次,加入含10 μmol/L DCFH-DA的无血清DMEM培养基1 mL,避光,30℃孵育5 min。PBS洗细胞2次后,用0.5 mL PBS悬浮上流式细胞仪检测。

1.7 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性以及丙二醛浓度检测

细胞经药物处理后,粘附细胞用PBS洗3遍,加入0.25%胰酶-0.02%EDTA(1:1, pH7.2)进行消化后收集并混入培养上清液中的脱落细胞,制成细胞悬液,4 000 r/min×5 min离心收集细胞,用PBS洗涤细胞3次,加入细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 150

mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100, pH8.0), 用振荡器振荡使细胞溶解, 于 4℃下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 参照试剂盒说明书测定细胞内 SOD 和 GSHPx 活性和丙二醛含量。细胞蛋白质定量采用酚试剂(Lowry)法。

1.8 Western blot

用 Bradford 法测定总蛋白的含量。取适量样品, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。电泳时浓缩胶恒压 80 V, 分离胶恒压 120 V, 电泳约 80 min。PVDF 膜用甲醇活化 15 min 后, 在电转移架上从负极到正极方向依次铺上滤纸—胶—PVDF 膜—滤纸, 恒压 100 V 转移 120 min。用化学发光法分别检测 PVDF 膜上各种蛋白的表达。同样用 VILBER LOURMAT 凝胶图像分析系统对条带密度扫描, 以 GAPDH 为内参照, 测定各样品的蛋白表达。

1.9 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用统计软件 SPSS10 进行方差齐性检验, 若方差不齐, 采用平方根反正弦或对数变量变换, 达到方差齐性要求后再作方差分析。

2 结果

2.1 原花青素对同型半胱氨酸介导的人脐静脉内皮细胞毒性作用的影响

同型半胱氨酸作用 48 h 后导致 hUVEC 存活率下降了 78.9%, 而 GSP 预处理 1 h 后(5~20 g/L)明显抑制 HCY 所造成的细胞死亡, 并呈现一定的剂量依赖性(表 1)。LDH 检测结果与 MTT 结果一致。

2.2 原花青素对同型半胱氨酸诱导的活性氧产生的影响

当 hUVEC 与 0.1~1 mmol/L HCY 作用 1 h 后, 细胞内 DCF 含量剂量依赖性地升高。说明 HCY 可刺激细胞产生活性氧。而当 hUVEC 预先与不同浓度的 GSP 作用 1 h 后, 活性氧的量显著减少, 这种作用也呈现剂量依赖性。结果如表 1 所示。

2.3 原花青素对超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性以及丙二醛浓度的影响

不同浓度的 HCY 与内皮细胞共同孵育 48 h 后, 各组 SOD 和 GSHPx 的活性随 HCY 浓度升高而降低; 而各组细胞内丙二醛含量则随着 HCY 浓度的升高而相应增加。但是, 经 GSP 处理后, 各组 SOD 和 GSHPx 的活性却不随着 HCY 浓度升高而降低, 而是维持在一个较高的水平。而丙二醛的含量则维持在一个较低的水平, 接近正常组(表 1)。

2.4 原花青素对同型半胱氨酸诱导的丝裂原活化蛋白激酶活性的影响

不同浓度的 HCY 刺激后磷酸化的 ERK1/2、p38 及 JNK 水平明显升高, 1 mmol/L HCY 作用 60 min 后达最高峰。而总的 ERK1/2、p38 及 JNK 表达水平没变。但是, GSP 预处理后, 由 HCY 刺激诱导的 ERK1/2、p38 及 JNK 的磷酸化几乎被完全取消了(图 1)。用 ERK1/2、p38 及 JNK 的特异性抑制剂 PD98059、SB203580 及 SP600125 作用后, 由 HCY 刺激诱导的细胞毒性均被显著抑制(表 2)。

表 1. 各实验组细胞活性、活性氧水平及乳酸脱氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶活性和丙二醛浓度测定结果

分 组	细胞活性	LDH (u/L)	丙二醛 (mmol/L)	GSHPx (u/g)	SOD (ku/g)	活性氧
对照组	100.0%	258 ± 61 ^c	1.17 ± 0.02 ^c	47.5 ± 6.7 ^c	31.2 ± 2.3 ^c	100.0% ^c
0.1 mmol/L HCY 组	84.2% ± 7.3% ^a	267 ± 52 ^c	1.3 ± 0.07 ^{ac}	41.7 ± 3.4 ^c	29.5 ± 1.8 ^c	128.6% ± 20.6% ^{ac}
0.5 mmol/L HCY 组	47.5% ± 4.6% ^b	495 ± 88 ^{bc}	2.53 ± 0.11 ^{bc}	31.2 ± 3.6 ^{ac}	23.1 ± 2.4 ^{bc}	267.3% ± 42.1% ^{bc}
1 mmol/L HCY 组	22.1% ± 3.6% ^b	869 ± 82 ^b	4.33 ± 0.15 ^b	16.3 ± 2.8 ^b	14.3 ± 1.2 ^b	428.3% ± 30.6% ^b
HCY+ 5 μg/LGSP 组	63.4% ± 5.2% ^b	265 ± 44 ^c	1.23 ± 0.02 ^{ac}	30.4 ± 3.8 ^a	25.1 ± 1.7 ^{bc}	123.5% ± 22.6% ^{ac}
HCY+ 10 μg/L GSP 组	76.4% ± 6.2% ^a	250 ± 51 ^c	1.23 ± 0.02 ^c	40.5 ± 4.1 ^c	27.6 ± 2.7 ^{ac}	117.5% ± 12.3% ^c
HCY+ 20 μg/L GSP 组	87.8% ± 5.3%	248 ± 34 ^c	1.18 ± 0.03 ^c	43.9 ± 3.1 ^c	29.3 ± 2.1 ^c	104.6% ± 11.2% ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比; c 为 $P < 0.01$, 与 1 mmol/L 同型半胱氨酸组比。

3 讨论

原花青素(GSP)是一种很强的抗氧化剂, 大量研究表明 GSP 具有显著心血管保护作用, 同时还是一种有效的保肝药物, 随着临床应用深入, GSP 在降血脂、保护心肌、保护脑缺血以及抗炎、糖尿病治

疗等方面表现出显著的作用^[4-6]。而 GSP 对 HCY 介导的毒性作用目前尚未见报道。本研究发现 GSP 通过维持细胞内抗氧化酶活性而降低细胞内活性氧水平, 最终阻断活性氧激活的 MAPK 信号通路, 抑制 HCY 介导的 HUVEC 的细胞毒性。提示 GSP 对

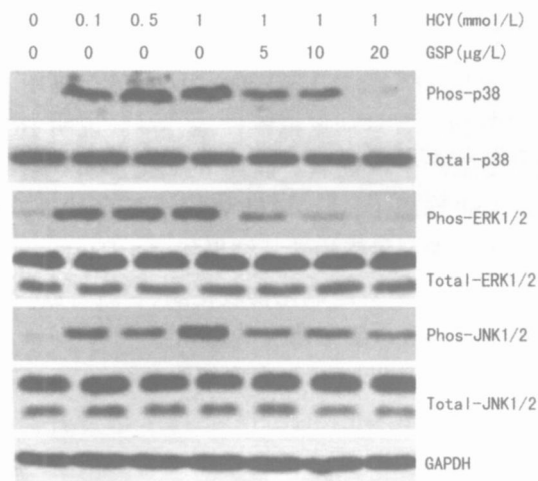


图 1. 原花青素抑制同型半胱氨酸诱导的丝裂原活化蛋白激酶激活

表 2. 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对细胞活性的影响

分 组	细胞活性
对照组	100.0%
1 mmol/L HCY 组	18.4% ± 2.4% ^a
1 mmol/L HCY + PD98059 组	87.6% ± 3.5% ^b
1 mmol/L HCY + SB203580 组	88.2% ± 3.2% ^b
1 mmol/L HCY + SP600125 组	89.4% ± 2.8% ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与 1 mmol/L 同型半胱氨酸组比。

HCY 介导的内皮损伤有很好的保护作用。

为了阐明 GSP 的作用机制,我们检测了 GSP 对 HCY 作用后细胞内丙二醛及活性氧水平的影响。结果发现,各组细胞内丙二醛含量随 HCY 浓度增加而增加。这些毒性产物可作用于细胞膜内不饱和脂肪酸,启动膜脂过氧化链式反应,破坏细胞的完整性,导致内皮细胞功能改变,甚至死亡脱落。在脂质过氧化反应中产生的有细胞毒性的脂质过氧化产物还可进一步加重 HCY 对内皮细胞的氧化损伤。但是,经 GSP 处理后,活性氧水平及丙二醛含量的升高被明显抑制了。进一步研究发现,随着 HCY 作用浓度增加,各组细胞内 SOD 和 GSHPx 活性逐渐下降。胞内 SOD 和 GSHPx 活性的降低表明 HCY 作用下可能通过降低细胞内活性氧清除酶活性,削弱了机体抗氧化保护机制,使得 H_2O_2 与氧自由基不能被及时清除,蓄积于细胞内,引发细胞脂质过氧化,导致细胞受损。由于脂质过氧化产物增加以及细胞抗氧化功能不断下降,可能共同促进了血管内皮细胞的氧化应激损伤。而 GSP 处理后,SOD 与 GSHPx 的

活性维持在接近正常水平。可见,GSP 是通过维持 SOD 与 GSHPx 等抗氧化酶的活性,从而降低活性氧与丙二醛的水平,起到抗氧化作用。

在细胞水平,氧化应激可直接激活多种细胞信号通路,导致细胞的不同反应。MAPK 是细胞内重要的信号传导系统之一,目前被认为主要参与调控细胞的应激和凋亡过程^[7-9]。为了证明 HCY 引起细胞损伤是否也与 MAPK 通路活化有关,我们检测了 MAPK 亚家族成员中 ERK、p38 及 JNK 在 HCY 作用下的变化情况,结果发现不同浓度的 HCY 作用后,ERK、p38 及 JNK 总蛋白的表达量并不受影响,而磷酸化的 ERK、p38 及 JNK 表达呈剂量依赖性地增加。为进一步证实 ERK、p38 及 JNK 参与 HCY 介导的内皮细胞毒性作用,我们用 p38 特异性抑制剂 SB203580、ERK 特异性抑制剂 PD98059 及 JNK 特异性抑制剂 SP600125 后,HCY 介导的细胞毒性作用显著降低。提示 HCY 介导的细胞毒性作用是 MAPK 通路依赖的。GSP 处理后,ERK、p38 及 JNK 的磷酸化状态被完全抑制了。

综上所述,GSP 对 HCY 致 hUVEC 损伤具有明显保护作用,其作用机制可能是通过维持抗氧化酶的活性,降低细胞活性氧的生成及脂质的过氧化,从而阻断活性氧激活的 MAPK 信号通路来实现的。由此可推断 GSP 对防治内皮损伤性 As 性病变的发生发展具有积极意义。

[参考文献]

- [1] Kaul S, Zadeh AA, Shah PK. Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease: not validated [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, **48** (5): 914-923
- [2] Boot MJ, Steegers-Theunissen RP, Poelmann RE, van Iperen L, Gittenberger-de Groot AC. Cardiac outflow tract malformations in chick embryos exposed to homocysteine [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **64** (2): 365-373
- [3] Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease [J]. *Cell Death Differ*, 2004, **11** (Suppl 1): S56-S64
- [4] Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, **7** (11-12): 1630-647
- [5] Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract [J]. *Mutat Res*, 2003, **523-524**: 87-97
- [6] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, **957**: 260-270
- [7] Moshal KS, Sen U, Tyagi N, Henderson B, Steed M, Ovechkin AV, et al. Regulation of homocysteine-induced MMP-9 by ERK1/2 pathway [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **290** (3): C883-C891
- [8] Leoncini G, Bruzzese D, Signorello MG. Activation of p38 MAPK/cPLA2 pathway in homocysteine-treated platelets [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, **4** (1): 209-216
- [9] Akasaka K, Akasaka N, Di Luozzo G, Sasajima T, Sumpio BE. Homocysteine promotes p38-dependent chemotaxis in bovine aortic smooth muscle cells [J]. *J Vasc Surg*, 2005, **41** (3): 517-522

(此文编辑 许雪梅)