

[文章编号] 1007-3949(2007)15-05-0353-05

• 实验研究 •

## 高同型半胱氨酸血症对内皮细胞炎症反应的促发作用及其干预性研究

徐志红<sup>1</sup>, 陆国平, 吴春芳<sup>2</sup>

(上海第二医科大学附属瑞金医院 1. 老年病科; 2. 心脏科, 上海市 200025)

[关键词] 病理学与病理生理学; 同型半胱氨酸; 辛伐他汀; 核转录因子 KB; 内皮细胞; 动脉粥样硬化; 氧化应激

[摘要] 目的 本研究试图了解辛伐他汀对同型半胱氨酸诱导的内皮细胞炎症反应的抑制作用及其分子机制。方法 同型半胱氨酸、辛伐他汀或两者联合处理人脐静脉内皮细胞不同时间点后, 用核转录因子 KB P65 检测系统和凝胶电泳迁移率实验法检测 KB P65 核转录因子的活性, 蛋白质印迹技术分析相关蛋白的表达。结果 在高浓度同型半胱氨酸(3 mmol/L)刺激下, 人脐静脉内皮细胞中核转录因子 KB 的活化高峰出现在作用 30 min 和 6 h 时; 且伴有 IKB $\alpha$  短暂快速的磷酸化及 IKB $\alpha$  和 IKB $\beta$  蛋白水平升高( $P < 0.05$ )。高浓度同型半胱氨酸(3 mmol/L)刺激 24 h 后人脐静脉内皮细胞分泌基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 及白细胞介素 1 $\beta$  显著增加。而辛伐他汀能显著抑制核转录因子 KB 活化及其继发的基质金属蛋白酶 2、基质金属蛋白酶 9 及白细胞介素 1 $\beta$  升高。结论 同型半胱氨酸能引起人脐静脉内皮细胞炎症因子的表达与释放, 这些生物学效应是通过核转录因子 KB 信号通路来实现的; 辛伐他汀能显著抑制上述效应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Promotive Effect of Hyperhomocysteinemia on Endothelial Inflammation and Its Antagonism by Simvastatin

XU Zhi-Hong<sup>1</sup>, LU Guo-Ping<sup>2</sup>, and WU Chun-Fang<sup>2</sup>

(1. Department of Geriatrics, 2. Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Simvastatin; NF- $\kappa$ B; Endothelial cells; Atherosclerosis; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To study how Hcy led to NF- $\kappa$ B activation and induced endothelial inflammation and how simvastatin antagonized the inflammatory response. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were treated with Hcy, with or without simvastatin, for different times. Dynamic changes of NF- $\kappa$ B activation were measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), TransAMTM NF- $\kappa$ B P65 assay system. Western blotting was performed to detect inflammatory proteins expression respectively. **Results** Treatment with both low (0.5 mmol/L) and high (3.0 mmol/L) concentrations of Hcy induced hUVEC NF- $\kappa$ B activation was accompanied by an increased level of MMP-2, MMP-9 and IL-1 $\beta$  expression. The NF- $\kappa$ B activation reached its maximum at 30 min and 6 h induced by high (3.0 mmol/L) concentrations of Hcy. EMSA and Western blotting showed Hcy induced NF- $\kappa$ B activation due to the increased phosphorylation of the inhibitory protein (IKB $\alpha$ ) as well as the degradation of IKB $\alpha$ , while simvastatin almost completely blocked the NF- $\kappa$ B activation as well as the phosphorylation and degradation of IKB $\alpha$ . **Conclusion** Hcy may induce hUVEC inflammation via a pathway involving IKB $\alpha$  and NF- $\kappa$ B and simvastatin can inhibit homocysteine-induced endothelial dysfunction and inflammatory response.

越来越多的临床资料及流行病学资料均表明, 高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)增加了心血管系统疾病和动脉粥样硬化发生的风险<sup>[1,2]</sup>。基础实验研究亦证明高同型半胱氨酸可以损伤内皮细胞功能, 刺激血管平滑肌细胞增殖, 氧化低密度脂蛋白, 加速动脉粥样硬化的发生和发

展<sup>[3-5]</sup>。核因子 KB 的异常激活是机体炎症反应放大与持续的分子生物学机制, 是动脉粥样硬化发生的始动机制之一。本研究试图通过对核因子 KB 信号通路的较完整的研究来阐明同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)诱导内皮细胞的炎症性损伤效应以及辛伐他汀对内皮细胞功能的影响。

[收稿日期] 2006-09-04 [修回日期] 2007-03-10

[基金项目] 上海市科委重大基础研究项目(054119634)资助

[作者简介] 徐志红, 硕士, 副主任医师, 主要从事冠心病诊治方面的研究, 联系电话为 13916707605, E-mail 为 zhihongx@hotmail.com。通讯作者陆国平, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 联系电话为 64370045-665356, E-mail 为 guoluc@online.sh.cn。吴春芳, 联系电话为 64370045-665444。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂

同型半胱氨酸购自 Sigma 公司, 辛伐他汀购自 Merk 公司(99%, 79902-63-9); 细胞培养基、小牛血

清、胰蛋白酶、胶原酶均购自 GIBICO 公司;抗磷酸化核因子  $\kappa$ B P65 单抗 (75 kDa)、抗  $\text{IKK}\beta$ 、抗  $\text{IKK}\alpha$ 、抗  $\text{IKB}\alpha$ 、抗磷酸化  $\text{IKB}\alpha$  和抗 MMP-2、抗 MMP-9 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;抗  $\text{IL-1}\beta$  抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的第二抗体购自 Santa Cruz 公司;增强化学发光检测试剂盒 (ECL) 购自 BD 公司;NE-PER<sup>R</sup> 核蛋白提取试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、LightShift Chemiluminescent EMSA 试剂盒均购自 Pierce 公司;TransAM<sup>TM</sup> 核因子  $\kappa$ B P65 转录因子试剂盒购自 Active Motif 公司。常规化学试剂为国产分析纯试剂。

## 1.2 人脐静脉内皮细胞分离培养与鉴定

无菌条件下取健康产妇脐带, Hank's 缓冲液反复冲洗后, 加 1% 胶原酶, 37℃ 消化 15 min, 离心后加完全培养基 M199 (10% 小牛血清, 100 ku/L 青霉素, 100 ku/L 链霉素), 置 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养, 24 h 后换液, 待人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, hUVEC) 80% 融合, 用胰蛋白酶-EDTA 消化传代, 经 因子鉴定后, 第 2~10 代用于实验。

## 1.3 实验分组

实验用细胞分为 7 组: 对照组、0.5 mmol/L Hcy 处理组 (0.5Hcy 组)、3 mmol/L Hcy 处理组 (3Hcy 组)、3 mmol/L Hcy+5  $\mu$ mol/L 辛伐他汀处理组 (3Hcy+5 辛组)、3 mmol/L Hcy+10  $\mu$ mol/L 辛伐他汀处理组 (3Hcy+10 辛组)、3 mmol/L Hcy+10  $\mu$ mol/L 辛伐他汀+400  $\mu$ mol/L 甲羟戊酸内酯 (3Hcy+10 辛+400 甲组) 和 400  $\mu$ mol/L 单纯甲羟戊酸内酯处理组。各组细胞设立 3 个复孔, 加药前 24 h 换无血清培养基。药物用完全培养基稀释, 各药物处理时间均为 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、12 h 和 24 h。

## 1.4 TransAM<sup>TM</sup> 检测核因子 $\kappa$ B P65 的活性

先向检测孔中加入 30  $\mu$ L 完全连接缓冲液或 30  $\mu$ L 含有 20 pmol (2  $\mu$ L) 特定寡核苷酸的完全连接缓冲液; 然后再在各孔加入 20  $\mu$ L 完全裂解缓冲液 (空白)、含有 2.5  $\mu$ g Hela 全细胞抽提物的 25  $\mu$ L 完全裂解缓冲液 (阳性对照)、以及含各样本 (质量相同) 总体积为 20  $\mu$ L 的完全裂解缓冲液; 封板, 室温孵育 1 h; 用洗涤缓冲液洗 3 次。每孔中加入 100  $\mu$ L 稀释的核因子  $\kappa$ B P65 抗体 (1:1 000), 封板, 室温孵育 1 h, 洗 3 次。然后二抗 (1:1 000) 封板, 室温孵育 1 h, 洗 4 次。最后每孔加入 100  $\mu$ L 室温的显色剂, 室温避光孵育 2~10 min, 加 50  $\mu$ L 终止液, 5 min 内 450 nm 波长测其吸光度值。每组设 4 个复孔。

## 1.5 凝胶电泳迁移率实验法测定核因子 $\kappa$ B 的活性

按 Pierce 公司提供的试剂盒说明书提取细胞核

蛋白。所有样品 Bradford 法测蛋白浓度, -80℃ 冰箱保存。核因子  $\kappa$ B 同序寡核苷酸探针序列为 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'。核因子  $\kappa$ B 错配寡核苷酸探针序列: 5'-AGT TGA GGC CAC TAA CCC AGG C-3'; 3'-TCA ACT CCG GTG ATT GGG TCC G-5'。采用生物素标记寡核苷酸 3' 末端。蛋白 DNA 结合反应总体积 20  $\mu$ L, 含 5  $\mu$ g 核抽提物、2  $\mu$ L 探针 (2 fmol/L)、甘油、 $\text{MgCl}_2$ 、EDTA、NP-40、Poly (dI-dC) 等, 于室温下反应 20 min。反应结束后, 加入 5  $\mu$ L 5 倍凝胶装载缓冲剂在 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳 1 h 左右 (电压 100 V, 电泳缓冲液为  $0.5 \times \text{TBE}$ )。电泳完毕后转膜、紫外光交联、封闭、杂交、洗膜, 最后 ECL 发光法 X-Ray 成像。

## 1.6 蛋白印迹 (Western Blot) 检测蛋白质表达

收集细胞 ( $1 \times 10^6$ /组), Bradford 法定量后, 加入  $1 \times \text{SDS}$  上样缓冲液, 煮沸 5 min。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 采用电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 15% 脱脂奶粉封闭, 加入相应一抗 4℃ 过夜。TBST 洗涤 3 次, 加入第二抗体 (1:1 000), 室温孵育 2 h, ECL 试剂盒显色, Bio-Rad 公司的 Fluor-STM Multimager 凝胶成像仪摄影, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 应用 Quantity one 软件进行灰度扫描分析。

## 1.7 统计分析

计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示; 计数资料数据以百分比 (%) 表示; 用多因素 Logistic 回归分析方法分析因子间相互关系, 并采用通用线性模型, 行单因素方差分析及两两比较 (LSD 和 S-N-K 法)。所有计算资料在 SPSS 10.0 软件上进行。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 凝胶电泳迁移率实验法检测核因子 $\kappa$ B 活性

凝胶电泳迁移率实验法 (EMSA) 检测不同浓度的 Hcy 刺激内皮细胞后核因子  $\kappa$ B 活性改变以及予以辛伐他汀干预处理细胞后对核因子  $\kappa$ B 活性的影响。图 1A 为生物素标记的核因子  $\kappa$ B 探针亲和性验证; 图 1B 为各组核因子  $\kappa$ B 活性的变化, 表现为低浓度 (0.5 mmol/L) Hcy 刺激时, 核因子  $\kappa$ B 活性开始升高, 至高浓度 (3 mmol/L) Hcy 刺激时核因子  $\kappa$ B 活性显著增高; 而同时予以辛伐他汀干预时, 10  $\mu$ mol/L 处理组效应显著, 核因子  $\kappa$ B 活性明显下降; 当甲羟戊酸内酯与辛伐他汀同时干预细胞时, 核因子  $\kappa$ B 活性有所升高, 说明甲羟戊酸内酯可部分阻断辛伐他汀

的效果,即辛伐他汀抑制核因子  $\kappa\text{B}$  活性的增加部分是通过抑制 HMG-CoA 还原酶而发挥作用的。图 1C 为高浓度(3 mmol/L)Hcy 刺激时各时间点核因子  $\kappa\text{B}$  活性变化,表现为刺激后 30 min 显著升高,并达高

峰,此后逐渐下降;4 h 再次开始升高,到 6 h 又达小高峰,此后下降,至 24 h 核因子  $\kappa\text{B}$  活化水平基本降至对照组水平。

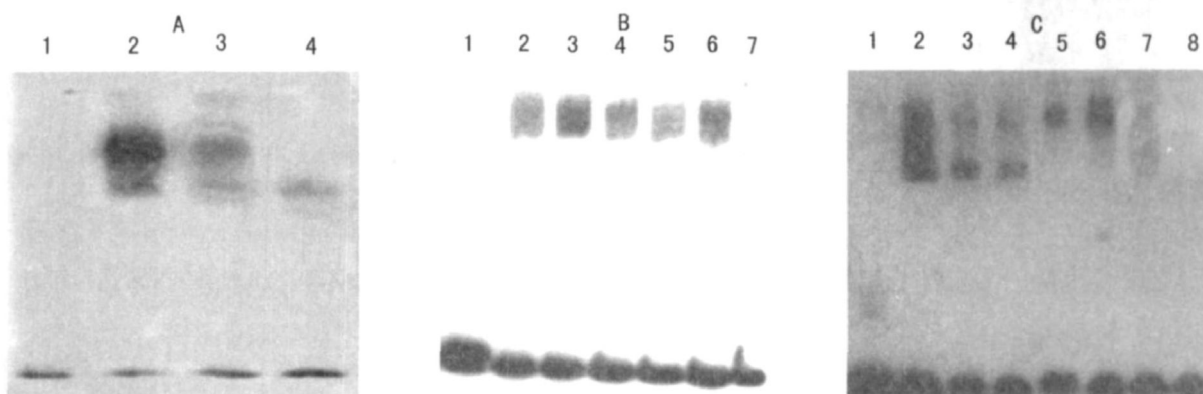


图 1. 凝胶电泳迁移率实验法检测核因子  $\kappa\text{B}$  活性 A 为生物素标记的核因子  $\kappa\text{B}$  探针亲和性验证。1 为生物素标记游离探针, 2 为生物素标记游离探针+核蛋白, 3 为生物素标记游离探针+核蛋白+50 倍竞争探针, 4 为生物素标记游离探针+核蛋白+100 倍竞争探针; B 为不同干预对核因子  $\kappa\text{B}$  活性的变化。1 为对照组, 2 为 Hcy 0.5 mmol/L 刺激组, 3 为 Hcy 3 mmol/L 刺激组, 4 为 Hcy (3 mmol/L)+辛伐他汀(5  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理组, 5 为 Hcy (3 mmol/L)+辛伐他汀(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理组, 6 为 Hcy (3 mmol/L)+辛伐他汀(10  $\mu\text{mol/L}$ )+甲羟戊酸内酯(400  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 7 为甲羟戊酸内酯(400  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理组; C 为高浓度(3 mmol/L)Hcy 刺激时各时间点核因子  $\kappa\text{B}$  活性变化。1 为 0 h 组, 2~8 分别为 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、12 h 和 24 h 组。

## 2.2 TransAM<sup>TM</sup> 系统检测

利用 TransAM<sup>TM</sup> 核因子  $\kappa\text{B}$  P65 活性分析试剂盒定量检测各组核因子  $\kappa\text{B}$  P65 活性结果显示: Hcy(3 mmol/L) 干预的内皮细胞核抽提物的核因子  $\kappa\text{B}$  P65 活性明显升高(曲线较未刺激组显著上移), 而辛伐他汀(10  $\mu\text{mol/L}$ )+Hcy(3 mmol/L) 干预组的内皮细胞 P65 的活性较 Hcy(3 mmol/L) 组显著降低( $P < 0.05$ ), 且对照组各时间点核因子  $\kappa\text{B}$  活性变化不明显。

## 2.3 同型半胱氨酸对 $\text{IKB}$ 蛋白水平的影响及辛伐他汀的干预效应

免疫印迹结果显示: 当高浓度 Hcy(3 mmol/L) 刺激后, 磷酸化核因子  $\kappa\text{B}$  P65 和磷酸化  $\text{IKB}\alpha$  蛋白水平在 30 min 即显著升高( $P < 0.05$ ), 并达高峰, 2 h 后基本恢复至基线水平; 在 6 h 左右又出现小幅增高( $P < 0.05$ )。而  $\text{IKB}\alpha$  总蛋白水平无明显变化。提示  $\text{IKB}\beta$  磷酸化的显著增加导致核因子  $\kappa\text{B}$  的核移位及活化。 $\text{IKB}\alpha$  蛋白的上游调节蛋白  $\text{IKK}\alpha$  和  $\text{IKK}\beta$  被同步检测, 结果显示在 Hcy 刺激 30 min 后两者蛋白水平较对照组亦有所上升( $P < 0.05$ ), 表明 Hcy 诱导的内皮细胞核因子  $\kappa\text{B}$  的活化可能是通过  $\text{IKK}\alpha$  和

$\text{IKK}\beta$  介导的(图 3 和表 1)。

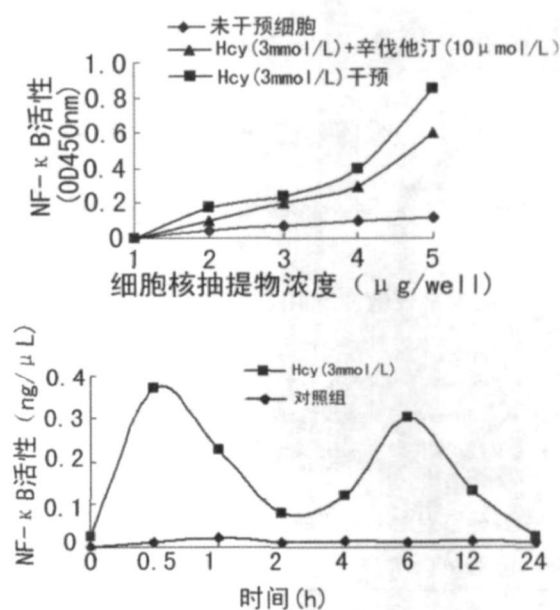


图 2. TransAM<sup>TM</sup> 系统检测核因子  $\kappa\text{B}$  活性

在 0.5 h 时间点, 如图 4 和表 2 所示, 同步予以辛伐他汀(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理后, 由 Hcy 所诱导的核因子  $\kappa\text{B}$  的激活作用被完全取消, 且 Hcy 对  $\text{IKB}\alpha$  磷酸化及  $\text{IKB}\alpha$  蛋白的降解效应几乎完全被抑制。且当甲羟戊酸内酯与辛伐他汀同时干预细胞时, 核因子

κB 活性有所升高,说明甲羟戊酸内酯可部分阻断辛伐他汀的效果,即辛伐他汀抑制核因子 κB 活性的增加部分是通过抑制 HMG-CoA 还原酶而发挥作用的。

#### 2.4 辛伐他汀对 Hcy 诱导的炎症因子表达的影响

免疫印迹结果显示: MMP-2、MMP-9 和 IL-1β 的蛋白表达水平在低浓度 Hcy (0.5 mmol/L) 刺激时升高不明显,当高浓度 Hcy (3 mmol/L) 刺激 24 h 后,三者较对照组均显著升高 ( $P < 0.05$ )。然而同步予以辛伐他汀 (10 μmol/L) 处理后,由高浓度 Hcy 刺激诱导的 MMP-2、MMP-9 和 IL-1β 的表达明显被抑制 ( $P < 0.05$ ),且甲羟戊酸内酯可部分阻断辛伐他汀的效果(图 5 和表 3)。

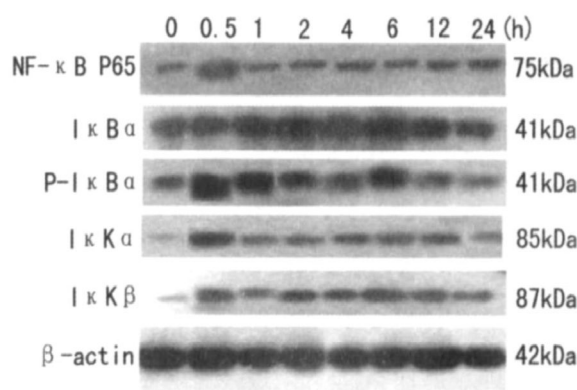


图 3. 各时间点 Hcy 对核因子 κB 及其 IκB 活性的影响

表 1. 各时间点 Hcy 对核因子 κB 及其 IκBs 活性表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

指 标	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
P65	1.00 ± 0.12	2.40 ± 0.71 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.87	1.40 ± 0.75	2.00 ± 0.40	1.40 ± 0.54	1.60 ± 0.50	1.50 ± 0.60
IκBα	1.00 ± 0.21	0.75 ± 0.45 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.36	1.20 ± 0.30	1.30 ± 0.26	1.25 ± 0.44	1.22 ± 0.41	1.12 ± 0.28
P-IκBα	1.00 ± 0.12	3.00 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.15	1.20 ± 0.21	1.12 ± 0.22	2.00 ± 0.12	1.02 ± 0.18	0.98 ± 0.24
IκKα	1.00 ± 0.22	3.00 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.19	1.20 ± 0.16	1.25 ± 0.21	1.18 ± 0.24	1.22 ± 0.11	1.08 ± 0.20
IκKβ	1.00 ± 0.18	2.00 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.16	1.70 ± 0.20	2.50 ± 0.22	1.20 ± 0.23	1.18 ± 0.18	1.15 ± 0.12

a 为  $P < 0.05$ , 与 0 h 组比较。

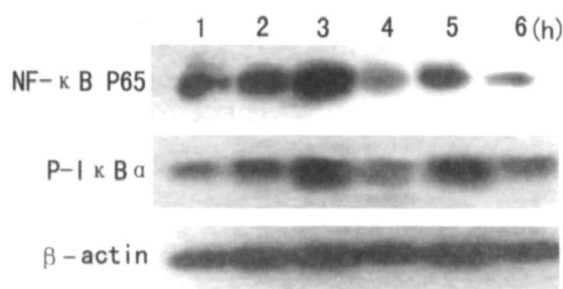


图 4. 30 min 时辛伐他汀对 Hcy 诱导的核因子 κB P65 及 P-IκBα 的影响 1 为 Hcy 0 mmol/L (对照) 组, 2 为 Hcy 0.5 mmol/L 组, 3 为 Hcy 3 mmol/L 组, 4 为 Hcy (3 mmol/L) + 辛伐他汀 (10 μmol/L) 组, 5 为 Hcy (3 mmol/L) + 辛伐他汀 (10 μmol/L) + 甲羟戊酯 (400 μmol/L) 组, 6 为甲羟戊酯 (400 μmol/L) 组。

表 2. 辛伐他汀对 Hcy 诱导的核因子 κB P65 及 P-IκBα 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

分 组	p65	P-IκBα
对照组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03
0.5 Hcy 组	2.00 ± 0.22	1.50 ± 0.15
3 Hcy 组	5.00 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.12 <sup>a</sup>
3 Hcy 组+ 10 辛组	0.80 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.02 <sup>b</sup>
3 Hcy 组+ 10 辛+ 400 甲组	1.50 ± 0.08	3.50 ± 0.25
400 μmol/L 甲羟戊酸内酯组	1.08 ± 0.12	1.05 ± 0.11

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 3 Hcy 组比较。

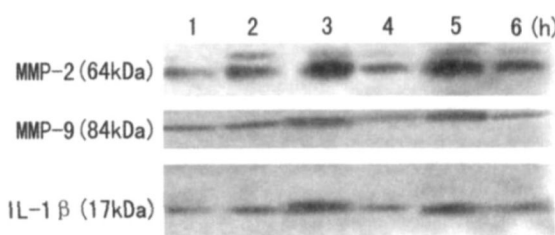


图 5. 辛伐他汀对 Hcy 诱导的细胞炎症因子的抑制效应

1 为 Hcy 0 mmol/L (对照) 组, 2 为 Hcy 0.5 mmol/L, 3 为 Hcy 3 mmol/L 组, 4 为 Hcy (3 mmol/L) + 辛伐他汀 (10 μmol/L) 组, 5 为 Hcy (3 mmol/L) + 辛伐他汀 (10 μmol/L) + 甲羟戊酯 (400 μmol/L) 组, 6 为甲羟戊酯 (400 μmol/L) 组。

表 3. 辛伐他汀对细胞炎症因子表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

分 组	MMP-2	MMP-9	IL-1β
对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02
0.5 Hcy 组	2.00 ± 0.04	1.05 ± 0.13	1.10 ± 0.06
3 Hcy 组	4.00 ± 0.25 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.17 <sup>a</sup>
3 Hcy 组+ 10 辛组	1.08 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.01 <sup>b</sup>
3 Hcy 组+ 10 辛+ 400 甲组	3.80 ± 0.06	1.50 ± 0.02	1.40 ± 0.07
400 μmol/L 甲羟戊酸内酯组	1.10 ± 0.11	1.00 ± 0.05	0.96 ± 0.03

a 为  $P < 0.05$ , 与第 1 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与第 3 组比较。

### 3 讨论

同型半胱氨酸(Hcy)引起动脉粥样硬化主要是

由于其对内皮细胞损伤以及刺激血管平滑肌细胞增殖所致,而 Hcy 对内皮细胞的损害机制至今尚未完全阐明。本研究表明 Hcy 能诱导 hUVEC 中 I $\kappa$ B 激酶的磷酸化而激活核因子  $\kappa$ B 系统。动脉粥样硬化实质上是一种复杂、缓慢进展的炎症反应过程。炎症反应在动脉粥样硬化的发生、发展及最后斑块表面破裂并发血栓形成的所有阶段均具有重要作用。核因子  $\kappa$ B 的异常激活是机体炎症反应放大与持续的分子生物学机制,是动脉粥样硬化发生的始动机制之一。以往研究结果表明体内活性氧如过氧化产物等能刺激内皮细胞和血管平滑肌细胞 I $\kappa$ B $_{\alpha}$  降解和核因子  $\kappa$ B 激活,被认为是核因子  $\kappa$ B 激活和细胞因子表达的第二信使<sup>[3]</sup>。研究发现 Hcy 可以诱导产生过氧化物,活化 I $\kappa$ B 激酶,使 I $\kappa$ Bs 磷酸化进而被降解,导致核因子  $\kappa$ B 迅速而短暂的升高,引起血管壁细胞损害<sup>[3]</sup>。

在正常情况下  $\kappa$ B 抑制剂家族 (inhibitors  $\kappa$ ap-paB, I $\kappa$ Bs) 控制核因子  $\kappa$ B 的活化,与核因子  $\kappa$ B 二聚体结合,掩盖其核定位序列,使其以无活性或微弱活性的形式存在于细胞浆中。在 T 核因子  $\alpha$ 、脂多糖、机械应力等多种刺激因素的作用下,激酶复合体磷酸化和活化,使 I $\kappa$ Bs 迅速泛素化,成为蛋白酶体降解的靶标。随着 I $\kappa$ Bs 降解,核因子  $\kappa$ B 激活,从细胞浆移位至细胞核,激活一系列与血管壁病理生理相关的靶基因如细胞因子、趋化因子、白细胞黏附分子基因,进而调节细胞增殖、迁移和细胞凋亡<sup>[6,7]</sup>。

本实验中 Hcy 的浓度是根据临床高 Hcy 血症患者血清 Hcy 的浓度,并参考国内外文献而确定的。本实验 EMSA 和 TransAM<sup>TM</sup> 系统检测结果证实,在高浓度 Hcy (3 mmol/L) 刺激下, hUVEC 中核因子  $\kappa$ B 的活化高峰出现在作用 0.5 h 和 6 h 时;同时可以观察到磷酸化 I $\kappa$ B $_{\alpha}$  的短暂快速的升高,提示 I $\kappa$ B $_{\alpha}$  磷酸化的显著增加导致核因子  $\kappa$ B 的核移位及活化。I $\kappa$ B $_{\alpha}$  蛋白的上游调节蛋白 I $\kappa$ K $_{\alpha}$  和 I $\kappa$ K $_{\beta}$  被同步检测,结果显示在 Hcy 刺激 0.5 h 后两者蛋白水平较对照组亦有所上升 ( $P < 0.05$ ),表明 Hcy 诱导的内皮细胞核因子  $\kappa$ B 的活化可能是通过 I $\kappa$ K $_{\alpha}$  和 I $\kappa$ K $_{\beta}$  介导的。

同型半胱氨酸(Hcy)可以增加  $Ca^{2+}$  内流,激活蛋白激酶 C (protein kinase c, PKC), PKC 通过减少 I $\kappa$ B mRNA 的表达参与核因子  $\kappa$ B 活化<sup>[8]</sup>。以上研究表明 Hcy 既可以通过诱导产生过氧化产物又可以通过激活 PKC 使核因子  $\kappa$ B 活化,促进下游炎症因子如血管细胞黏附分子 (VCAM-1)、细胞间黏附分子 (ICAM-1)、单核细胞趋化因子 (MCP-1)、基质金属蛋

白酶(MMP)和白细胞介素 1、6 和 8 等的大量产生,启动局部的炎症反应<sup>[9]</sup>。本研究亦证实了高浓度 Hcy (3 mmol/L) 刺激后 24 h 细胞分泌 MMP-2、MMP-9 及白细胞介素 1 $\beta$  显著增加。

理论上分析他汀类药物的非调脂作用诸如改善炎症反应,保护内皮功能,降低基质金属蛋白酶表达,稳定动脉粥样硬化斑块等,可对高同型半胱氨酸的血管毒性作用起到防护作用。本实验中作者发现辛伐他汀能显著抑制 Hcy 介导的核因子  $\kappa$ B 活化及其继发的 MMP-2、MMP-9 及 IL-1 $\beta$  升高,从而起到保护血管内皮、稳定粥样斑块的作用。且本实验采用 HMG-CoA 还原酶反应产物甲羟戊酸直接干预,显示甲羟戊酸内酯可部分阻断辛伐他汀的效果,提示辛伐他汀抑制核因子  $\kappa$ B 活化及其继发的炎症效应部分是依赖 HMG-CoA 还原酶的。

综上所述,Hcy 能引起 hUVEC 炎症因子的表达与释放,这些生物学效应是通过核因子  $\kappa$ B 信号通路来实现的;辛伐他汀能显著抑制上述效应。这对干预 Hcy 是一条新的思路,亦拓展了他汀类非调脂作用的范围,且对于伴有高 Hcy 血症的高危心血管疾病患者的防治具有重要的指导价值。

#### [参考文献]

- [1] Yagura C, Takamura N, Kadota K, Nakazumi T, Morishita Y, Nakazato M, et al. Evaluation of cardiovascular risk factors and related clinical markers in healthy young Japanese adults [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, **45** (2): 220-225.
- [2] 刘伟峰, 张步延, 黄文增, 关红蕾. 高同型半胱氨酸血症致血管炎症作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 464-466.
- [3] Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis [J]. *Clin Biochem*, 2003, **36** (6): 431-441.
- [4] Au-Yang KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor- $\kappa$ B in endothelial cells via oxidative stress [J]. *Circ Res*, 2004, **94** (1): 28-36.
- [5] 汤群, 陆国平, 吴春芳. 同型半胱氨酸与叶酸、维生素 B12 及维生素 B6 的关系 [J]. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (9): 812-815.
- [6] Li YQ, Zhang ZX, Xu YJ, Ni W, Chen SX, Yang Z, et al. N-Acetylcysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages by different mechanisms [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, **27** (3): 339-346.
- [7] 刑扬波, 郭航远, 马孝泉, 何红. 同型半胱氨酸对大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 2 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (6): 508-510.
- [8] Xiao-kun ZENG, You-fei GUAN, Daniel G REMICK, Xian WANG. Signal pathways underlying homocysteine induced production of MCP-1 and IL-8 in cultured human whole blood [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, **26** (1): 85-91.
- [9] Johnson JL, Baker AH, Kazuhiro Oka, Chan L, Newby AC, Jackson CL, et al. Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2 involvement of macrophage migration and apoptosis [J]. *Circulation*, 2006, **113** (20): 2435-444.

(此文编辑 李小玲)