

不同剂量甲醛对人脐静脉内皮细胞一氧化氮含量的影响

尹蔚兰, 邹丽君, 贺彬琪, 让欧艳, 李 良, 贺栋梁, 让蔚清

(南华大学药物药理研究所和环境医学研究所, 衡阳市衡南县 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 甲醛; 人脐静脉内皮细胞; 一氧化氮; 对胺基豚敏感性胺氧化酶; 内皮型一氧化氮合酶; 诱导型一氧化氮合酶

[摘要] 目的 观察不同剂量甲醛对人脐静脉内皮细胞一氧化氮含量的影响, 分析甲醛诱导内皮细胞损伤在心血管疾病发病中的意义。方法 将人脐静脉内皮细胞株分别与不同浓度甲醛(分别为 0、5、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$)的 DMEM 培养基孵育, 同时以过氧化氢(100 $\mu\text{mol/L}$)为阳性对照组, 抗氧化剂维生素 C(100 mg/L)为保护组。共培养 24 h 后, 分光光度法检测乳酸脱氢酶漏出量; 硫代巴比妥法检测细胞上清液中丙二醛浓度; 硝酸还原酶法测定培养液中一氧化氮浓度; 生化分析法测定内皮细胞一氧化氮合酶活性; 免疫细胞化学法测定内皮型一氧化氮合酶和诱导型一氧化氮合酶的蛋白表达; RT-PCR 法测定内皮型一氧化氮合酶和诱导型一氧化氮合酶的 mRNA 表达。结果 不同浓度甲醛呈剂量依赖性地促进细胞乳酸脱氢酶漏出, 促进内皮细胞上清液丙二醛和一氧化氮的产生; 降低内皮型一氧化氮合酶的活性, 抑制内皮型一氧化氮合酶在蛋白和基因水平的表达; 增加诱导型一氧化氮合酶活性, 促进诱导型一氧化氮合酶在蛋白和基因水平的表达。结论 甲醛诱导人脐静脉内皮细胞损伤, 机制可能与其抑制内皮型一氧化氮合酶的活性及表达, 诱导诱导型一氧化氮合酶的活性及表达, 从而诱导内皮细胞产生过多的一氧化氮有关; 维生素 C 通过降低一氧化氮产生, 减轻甲醛诱导的内皮细胞损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Change of Nitric Oxide In Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Different Dose of Formaldehyde

YIN Wei-Lan, ZOU Li-Jun, HE Bin-Qi, RANG Ou-Yan, LI Liang, HE Dong-Liang, and RANG Wei-Qing

(Institute of Environmental Medicine and Radio-Hygiene, School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Pathophysiology; Formaldehyde; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase; Nitric Oxide; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Inducible Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** To explore the change of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells induced by different dose of formaldehyde and the mechanisms of the nitric oxide change. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (hUVECs-12) were cultured in dulbecco's minimum essential medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum. At 80% confluence, cells were washed with D-Hank's fluid and cultured in DMEM containing 1% fetal bovine serum for 24 h. Cells were incubated in the presence or absence (control) of formaldehyde. In order to test the dose-effect of formaldehyde-induced endothelial cells change of nitric oxide, the cells were treated with formaldehyde at the dose of 0.0 $\mu\text{mol/L}$ and 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h respectively. To explore the injuring mechanism of formaldehyde on endothelial cells, hydrogen peroxide (100 $\mu\text{mol/L}$), a potent free radical, was selected as a positive control; Vitamin C (100 mg/L), an antioxidant medicine, was selected as a protective group. After 24 h, the transudation content of lactate dehydrogenase was observed by colorimetry reaction, the level of malondialdehyde in supernatant-conditioned media of cells was measured by thiobarbituric acid reaction (TBA) method, the level of nitric oxide in the culture medium was observed to evaluate the influence feature of formaldehyde by nitrate reductase method, the nitric oxide synthase activity was measured by biochemical method, the protein and mRNA level of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase were examined by immunohistochemistry and RT-PCR approach respectively to elucidate the injuring mechanism. **Results** Formaldehyde conspicuously inhibited the activity of Endothelial nitric oxide synthase, expression of endothelial nitric oxide synthase protein and endothelial nitric oxide synthase mRNA. Formaldehyde induced the activity of inducible nitric oxide synthase, expression of inducible nitric oxide synthase protein and inducible nitric oxide synthase mRNA, and increased the production of nitric oxide, malondialdehyde and the transudation content of lactate dehydrogenase on Human umbilical vein endothelial cells in dose-dependent manner; Vitamin C inhibited the activity of inducible nitric oxide synthase, expression of inducible nitric oxide synthase protein and inducible nitric oxide synthase mRNA, and increased the

[收稿日期] 2007-03-13

[修回日期] 2007-12-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572191)

[作者简介] 尹蔚兰, 硕士, 讲师, 主要从事食物药物毒理研究。邹丽君, 硕士研究生, 主要从事食物药物毒理研究。贺彬琪, 硕士研究生, 主要从事食物药物毒理研究。通讯作者让蔚清, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管药理与食物药物毒理研究, 联系电话为 0734-8281615 或 13787733498。E-mail 为 nhurangweiqing@yahoo.com.cn。

activity of endothelial nitric oxide synthas.

Conclusion Formaldehyde can conspicuously cause change of nitric oxide on human umbilical vein endothelial cells when the concentration is between 5 and 80 $\mu\text{mol/L}$. This change is related to reducing the activity and expression of endothelial nitric oxide synthas, and increasing the activity and expression of inducible nitric oxide synthase.

心血管疾病和糖尿病是严重威胁人类健康的重大疾病^[1], 此类慢性疾病的科学防治对有效降低其发病率和死亡率具有重要的现实意义。血管动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心血管疾病和糖尿病等血管病变的共同病理机制, 内皮细胞受损导致的血管内皮功能不全As发生的始动环节。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种重要的信使分子, 内皮损伤导致NO代谢紊乱(NO减少或异常增加); 进一步加重内皮功能不全^[2]。流行病学资料显示对胺基酶敏感性胺氧化酶(semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO)与心血管疾病和糖尿病的关系密切, 可作为一种独立的预后因素来判断疾病的发生发展^[3,4]。且心血管疾病和糖尿病等疾病的严重程度与体内内源性甲醛(formaldehyde, FA)增多有关, 并伴随内皮细胞损伤^[5], 内源性甲醛是SSAO酶催化生成的重要代谢产物之一, 但是内源性甲醛损伤内皮的机制不明。本实验利用甲醛与人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC-12)共培养, 建立细胞实验模型, 观察低剂量甲醛诱导hUVEC-12细胞的损伤情况与NO含量的变化, 探讨内源性甲醛致血管内皮损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株hUVEC-12由中南大学心血管省重点实验室惠赠; 甲醛、过氧化氢和维生素C均为国产分析纯; 达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)购于Hyclone公司; 新生小牛血清为杭州四季青公司产品; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶(nitric oxides synthase, NOS)活性及考马斯亮兰蛋白定量检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所; SABC免疫细胞化学试剂盒购于武汉博士德公司; 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)一抗购于北京中山生物工程公司; 逆转录试剂盒(两步法抽提)由Promega公司提供的产品; Trizol、eNOS引物、iNOS引物、GAPDH引物、PCR扩增试剂盒等购于上海生物工程公司。

1.2 细胞培养和样本处理

人脐静脉内皮细胞株hUVEC-12, 用含10%新生

小牛血清的DMEM培养基(含100 u/L链霉素和100 u/L青霉素)传代培养, 在37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的CO₂培养箱中培养, 用0.25%胰蛋白酶进行消化传代。将细胞密度调整为 1×10^8 个/L的hUVEC-12细胞接种在5 mL 10%小牛血清的DMEM培养基细胞培养瓶中, 待细胞长至80%融合状态时用含1%血清的DMEM培养基培养24 h进行同步化处理。加入不同处理因素, 培养24 h终止实验。取细胞上清液测定LDH、丙二醛和NO含量; 取细胞经无钙镁PBS缓冲液反复冻融裂解, 收集细胞裂解液测定细胞内NOS的活性; 收集细胞, 测定eNOS mRNA和iNOS mRNA表达。另将密度调整后为 1×10^8 个/L的细胞悬液加至含盖玻片的6孔板内, 按设计要求细胞爬片行免疫组织化学测定。

1.3 实验分组

实验分为: 正常对照组(甲醛浓度为0, 加等体积的D-hanks液)、甲醛处理组(终浓度分别为5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛)、药物保护组(终浓度为100 mg/L维生素C预处理30 min后, 加入终浓度为40 $\mu\text{mol/L}$ 的甲醛处理24 h)、阳性对照组(终浓度100 $\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢)。甲醛、维生素C和过氧化氢用D-hanks液稀释成以上浓度。

1.4 细胞上清液中乳酸脱氢酶活性测定

采用乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒进行测定, LDH能催化乳酸生成丙酮酸, 丙酮酸与2, 2-硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙, 在碱性溶液中呈棕红色, 通过比色可求出酶活性(单位是U/dL)。实验时, 取100 μL 上清液, 测定LDH活性。

1.5 细胞上清液丙二醛浓度测定

取100 μL 上清, 按南京建成生物公司提供的丙二醛测定试剂盒说明书提供的操作方法测定。

1.6 细胞上清液中一氧化氮含量测定

硝酸还原酶法测定培养液中NO₂⁻和NO₃⁻的总量来反映内皮细胞分泌NO含量。实验时, 人脐静脉内皮细胞与甲醛等处理因素共培养24 h后, 取上清液100 μL 测定NO含量, 测定步骤按一氧化氮试剂盒提供的操作说明进行。

1.7 细胞内一氧化氮合酶活性的测定

一氧化氮合酶(NOS)以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide-reduced, NADH)为辅酶, 催化左旋精氨酸合成NO。建立一个底物和辅酶都过量的反应体系, 测定反应体系中底

物 NO 的生成量来反映总 NOS 活性(单位是 U/mg prot)。根据结构型 NOS (eNOS) 依赖钙离子, 而 iNOS 是非钙离子依赖性的原理, 在反应体系中加入钙离子螯合剂, 测定 iNOS 活性, 总 NOS 活性减去 iNOS 活性即为 eNOS 的活性。

用 1 mL 无钙镁磷酸缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 缓冲液, 反复冻融法裂解细胞, 收集细胞裂解液。取 100 μ L 细胞裂解液用考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 另取 100 μ L 细胞裂解液测定 NOS 活性, 所有操作按试剂盒说明书提供的方法进行。根据试剂盒提供的方法计算总 NOS 活性和 iNOS 活性。

1.8 免疫细胞化学检测内皮型一氧化氮合酶和诱导型一氧化氮合酶蛋白的表达

取细胞涂片, 按免疫组织化学常规方法(试剂)与使用说明操作。一抗分别为兔抗人 eNOS 多抗, 兔抗人 iNOS 多抗, 二抗为羊抗兔 IgG, DAB 染色。以细胞胞浆内的棕黄色颗粒为阳性, 用病理图文分析系统自动计算灰度值; 用背景灰度值校正, 统计分析结果。

1.9 RT-PCR 扩增内皮型一氧化氮合酶 mRNA 和诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达

内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) mRNA 和 iNOS mRNA 测定的步骤包括引物设计、逆转录-聚合酶链反应。GAPDH、eNOS、iNOS、各引物序列参考文献[6-8]。序列如下: GAPDH 引物正义链 5'-ATG AGA AGT ATG ACA ACA GCC-3', 反义链 5' TGA GTC CTT CCA CGA TAC C-3', 扩增片段长度 114 bp; eNOS 引物: 正义链 5'-AAG ATC TCC GCC TCG CTC A-3', 反义链 5'-GCT GTT GAA GCG GAT CTT A-3', 扩增片段长度 336 bp; iNOS 引物: 正义 5'-TCT TGG TCA AAG CTG TGC TC-3', 反义 5'-CAT TGC CAA ACC TAC TGG TC-3', 扩增片段长度 237 bp。

细胞收集后用 D-hanks 液洗涤 2 次, 按照 Promega 公司提供的逆转录试剂盒(两步法抽提)提供的使用说明书提细胞 mRNA。按说明进行 RNA 的质量鉴定, 具体步骤即直接加 Trizol 提取 RNA, 用紫外分光光度计测量总 RNA 纯度和浓度, A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.0 之间; 采用 promega 公司的 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。然后进行 PCR 扩增: 25 μ L 反应体系(25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 $\times$ buffer 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.25 μ L; ddH₂O 17.75 μ L); eNOS 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s $\rightarrow$ 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min; iNOS 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后

94 $^{\circ}$ C 变性 30 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min; GAPDH 分别与 eNOS 和 iNOS 分管同时扩增。PCR 产物各取相同体积混合在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Alpha-mager TM2200 图像分析系统对其进行吸光度测量并分析, 以 eNOS/GAPDH 和 iNOS/GAPDH 进行半定量分析。

1.10 统计学处理

所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 处理组间数据用 SPSS 11.0 统计软件作单因素方差分析和相关性检验, $P < 0.05$ 表示统计学上差异有显著性。

2 结果

2.1 低剂量甲醛对人脐静脉内皮细胞上清液中乳酸脱氢酶的影响

随着甲醛浓度增加, 细胞上清液中 LDH 漏出量逐渐增高; 各不同浓度甲醛组 LDH 漏出量明显高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。维生素 C 保护组与相同浓度甲醛组比较 ($P < 0.01$)。过氧化氢组 LDH 漏出量明显高于对照组 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 不同浓度甲醛对人脐静脉内皮细胞上清液中乳酸脱氢酶的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

分 组	LDH (U/L)
正常对照	243 $\pm$ 92
5 μ mol/L 甲醛	412 $\pm$ 95 ^a
10 μ mol/L 甲醛	560 $\pm$ 71 ^b
20 μ mol/L 甲醛	716 $\pm$ 91 ^b
40 μ mol/L 甲醛	949 $\pm$ 168 ^b
80 μ mol/L 甲醛	1 106 $\pm$ 105 ^b
40 μ mol/L 甲醛+ 100 mg/L 维生素 C	725 $\pm$ 133 ^c
100 μ mol/L 过氧化氢	1 120 $\pm$ 156 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 40 μ mol/L 甲醛组比较。

2.2 低剂量甲醛对人脐静脉内皮细胞上清液中丙二醛的影响

随着甲醛浓度增加, 细胞上清液中脂质过氧化产物丙二醛含量逐渐增高, 丙二醛含量明显高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Vit C 保护组与相同浓度甲醛组比较, 丙二醛含量明显降低 ($P < 0.05$)。过氧化氢组的丙二醛含量明显高于对照组 ($P < 0.01$; 表 2)。

2.3 低剂量甲醛对人脐静脉内皮细胞上清液一氧化氮含量的影响

内皮细胞经不同浓度甲醛培养 24 h 后, 低浓度

甲醛组内皮细胞生成的 NO 较正常对照组减少, 此后, 随甲醛浓度增加, 内皮细胞生成 NO 明显增加, 从 $245.98 \pm 7.44 \mu\text{mol/L}$ 增至 $675.32 \pm 7.93 \mu\text{mol/L}$ 。维生素 C 能降低甲醛诱导的 NO 生成(表 2)。

表 2. 不同浓度甲醛对人脐静脉内皮细胞上清液中丙二醛和一氧化氮含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

分 组	丙二醛 ($\mu\text{mol/L}$)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
正常对照	1.10 ± 0.20	280.90 ± 7.50
5 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	1.40 ± 0.30^a	259.10 ± 34.80^a
10 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	2.70 ± 0.20^b	322.80 ± 11.70^b
20 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	3.10 ± 0.20^b	495.70 ± 10.10^b
40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	4.00 ± 0.30^b	644.20 ± 11.20^b
80 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	4.40 ± 0.40^a	675.30 ± 7.90^b
40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛+		
100 mg/L 维生素 C	3.30 ± 0.20^c	397.70 ± 10.90^c
100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢	4.20 ± 0.40^b	651.10 ± 19.20^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛组比较。

2.4 低剂量甲醛对人脐静脉内皮细胞一氧化氮活性的影响

甲醛能降低 hUVEC-12 细胞 eNOS 活性, 增加 hUVEC-12 细胞 iNOS 的活性, 且具有浓度依赖性, 各实验组与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 维生素 C 保护组与相同浓度甲醛组比较, eNOS 活性明显增加(差异有显著性); iNOS 活性明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.01$; 见表 3)。

2.5 甲醛对人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶蛋白表达的影响

eNOS 定位于胞膜和胞浆, 棕黄色颗粒表示 eNOS 蛋白表达为阳性; iNOS 定位于胞膜和胞浆, 棕黄色颗粒表示 iNOS 蛋白表达为阳性。随着甲醛浓度的增加, eNOS 蛋白表达呈浓度依赖性降低, 各组

与对照组比, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 维生素 C 保护组 eNOS 蛋白的表达也受到明显抑制, 与相同浓度甲醛组比较差异无显著性 ($P > 0.05$; 图 1)。

正常 hUVEC-12 细胞 iNOS 的表达极低, 甲醛与 hUVEC-12 细胞共培养后, iNOS 蛋白表达升高, 且呈浓度依赖性关系, 各组与对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 维生素 C 保护组 iNOS 蛋白表达受到明显抑制, 与相同浓度甲醛组比较差异有显著性 ($P < 0.01$; 图 2)。

2.6 甲醛对人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶基因 mRNA 表达的影响

用 RT-PCR 方法检测了甲醛对 eNOS mRNA 和 iNOS mRNA 表达的影响。结果显示, 不同浓度甲醛处理 hUVEC-12 细胞 24h 后, 随着甲醛浓度的增高, eNOS mRNA 的表达呈浓度依赖性降低, 而 iNOS mRNA 的表达呈浓度依赖性升高, 维生素 C 能下调甲醛诱导的 iNOS mRNA 的表达, 但对 eNOS mRNA 的表达无明显影响(图 3)。

表 3. 不同浓度甲醛对人脐静脉内皮细胞一氧化氮活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, kU/g)

分 组	NOS 活性	eNOS 活性	iNOS 活性
正常对照	11.5 ± 0.7	7.5 ± 1.1	4.0 ± 0.9
5 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	10.0 ± 0.7^b	5.2 ± 0.7^b	4.5 ± 0.3^a
10 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	13.2 ± 0.9^b	5.4 ± 0.3^b	7.8 ± 0.7^b
20 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	6.3 ± 0.4^b	4.4 ± 0.5^b	11.9 ± 0.7^b
40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	18.2 ± 0.3^b	3.6 ± 0.5^b	14.4 ± 0.5^b
80 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛	18.9 ± 0.6^b	3.1 ± 0.40^b	15.8 ± 0.2^b
40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛+			
100 mg/L 维生素 C	15.8 ± 0.5^c	6.7 ± 0.3^c	9.1 ± 0.6^c
100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢	18.4 ± 0.8^b	3.6 ± 0.1^b	14.8 ± 0.8^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛组比较。

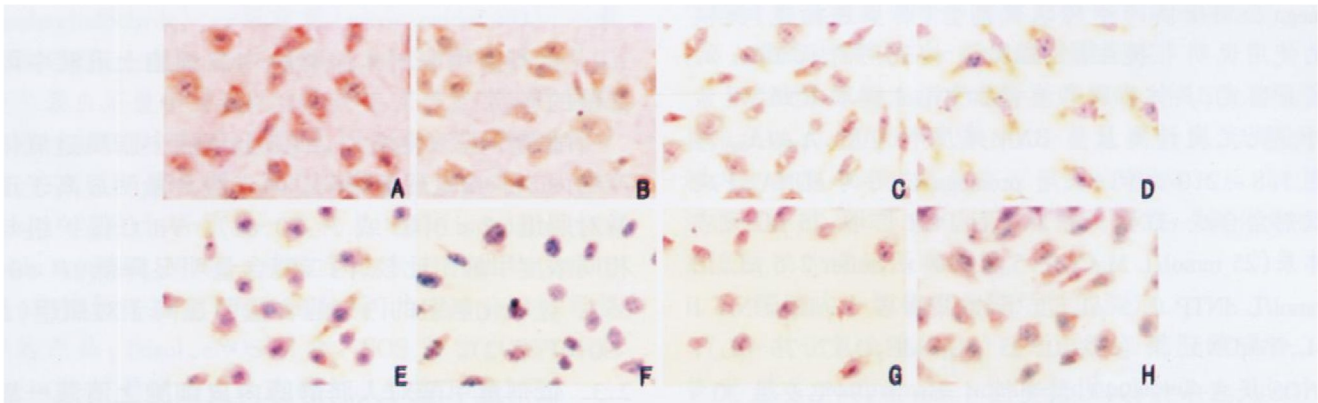


图 1. 内皮型一氧化氮合酶免疫组织化学染色图 ($\times 200$)
mg/L 维生素 C + 40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛组, H 为 100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组。

A 为正常对照组, B~ F 分别为 5、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛, G 为 100

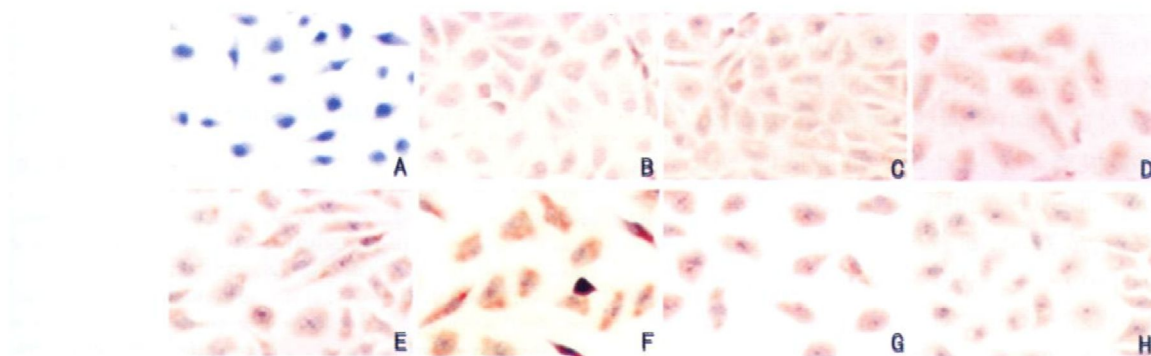


图 2. 诱导型一氧化氮合酶免疫组织化学染色 ($\times 400$)
维生素 C+ 40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛组, H 为 100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组。

A 为正常对照组, B-F 分别为 5、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛组, G 为 100 mg/L

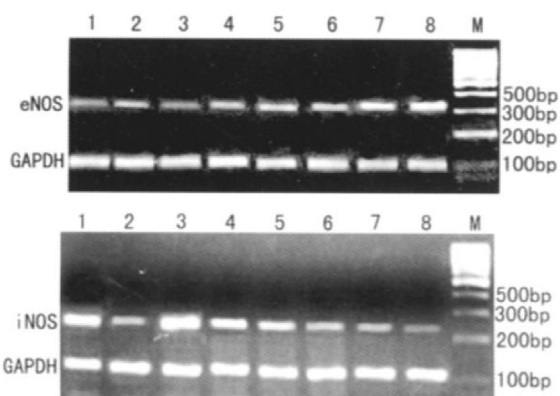


图 3. 不同浓度甲醛对人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响
1 为正常对照组, 2~6 分别为 5、10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛组, 7 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛+ 100 mg/L 维生素 C 组, 8 为 100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组, M 为 Marker。

3 讨论

血管内皮功能不全是 As 发生发展的始动环节, 血管内皮细胞损伤是 As 的早期特征之一, 动物实验证实内源性甲醛通过诱导血管内皮细胞损伤导致 As, 提示内源性甲醛是 As 一个潜在的危险因素^[5], 内源性甲醛可能与心血管疾病及糖尿病的严重程度密切相关。内源性甲醛是人体内甲胺经 SSAO 氧化脱氨的主要代谢产物之一, 能与蛋白质和单链 DNA 形成不可逆的交联复合物, 具有细胞毒性^[9]。但甲醛损伤内皮的机制不清。本实验利用甲醛与内皮细胞共培养建立细胞实验模型, 测定细胞上清液中 NO 的含量, 细胞内 NOS、eNOS 和 iNOS 的活性及表达, 结果发现: (1) 低剂量甲醛 (0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)

L) 与内皮细胞共培养时, 甲醛呈剂量依赖性地促进细胞 LDH 漏出, 诱导内皮细胞上清液中丙二醛含量增高, 说明甲醛诱导内皮细胞膜通透性、细胞脂质过氧化和内皮细胞损伤。(2) 甲醛降低 eNOS 活性及表达, 抑制 NO 生理活性, 诱导 iNOS 的活性及表达, 产生过量的病理性 NO。(3) 抗氧化剂 VitC 能不同程度逆转甲醛对 eNOS 和 iNOS 的影响。提示甲醛可通过影响内皮细胞 NO 合成影响内皮细胞的功能。

文献提示, 在内皮细胞分泌的血管活性物质中, NO 对血管内皮细胞具有保护和毒性双重作用^[10]。生理条件下, 内皮细胞在低表达的 eNOS 催化下产生适量的 NO, 通过细胞内环磷酸鸟苷 (cGMP) 途径调节平滑肌细胞的张力、舒张血管、调节血压和血流分布。病理条件下, iNOS 被诱导, 内皮细胞产生过量 NO 并聚积, NO 作为一种自由基能与 O_2^- 相互反应生成毒性更强的 ONOO^- , 对细胞产生毒性作用, 使细胞功能异常、代谢障碍及能量耗竭, 导致细胞损伤或死亡。因此, NO 代谢紊乱对 As 的发生发展具有重要意义。

一氧化氮合酶 (NOS) 是 NO 生成的关键酶。血管内皮细胞 NOS 酶系包括诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 两种亚型。生理条件下, NO 主要由 eNOS 催化生成, 如果 eNOS 的活性降低或表达下调, NO 合成减少, 将导致血管收缩, 血压上升, 是 As 发病的重要机理之一^[11-13]。iNOS 为非 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖性, 在病理条件下被诱导激活, 持续产生大量的 NO, 造成细胞的损伤和死亡^[10]。本实验研究发现, 随着甲醛浓度的增高, eNOS 的活性总体降低, 10 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛与 hUVEC-12 细胞共培养, eNOS 的活性有小幅上升, 可能与机体

的低剂量适应性保护机制有关;而 iNOS 的活性一路上升,且甲醛呈浓度依赖性地下调 hUVEC-12 细胞 eNOS 蛋白和 eNOS mRNA 的表达,上调 iNOS 蛋白和 iNOS mRNA 的表达。5 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛与 hUVEC-12 细胞共培养,与正常对照组相比,NO 生成降低(按细胞培养基中的总硝酸根离子浓度计算),推测此时 NO 主要由 eNOS 合成,而 eNOS 受甲醛影响活性和表达有所降低导致 NO 合成减少;随着甲醛浓度的增高,NO 生成逐渐增加,80 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛与 hUVEC-12 细胞共培养,NO 浓度明显高于阴性对照组,推测是高浓度的甲醛激活 iNOS 释放大量的 NO 所致。

维生素 C 是一种抗氧化营养素,能与自由基相互作用而减轻组织的氧化损伤,对体内自由基致细胞损伤具有保护作用。该实验还观察到,维生素 C 能不同程度地逆转甲醛引起的 eNOS 活性的下降,但对 eNOS mRNA 表达无明显影响;提示维生素 C 有降低甲醛诱导的 iNOS 的活性与表达进而降低 NO 生成,或降低过多 NO 产生的 ONOO⁻ 等自由基。

本实验观察了低剂量甲醛与内皮细胞共培养的细胞模型中 NO 合成的变化及 NOS 的活性与表达,说明内源性甲醛能影响 eNOS⁻ iNOS 的活性和表达,下调 eNOS,上调 iNOS,造成 NO 代谢紊乱,提示低剂量甲醛通过改变 NOS 的活性和表达致 NO 代谢紊乱可能是甲醛诱导内皮细胞损伤的机制之一。NOS 的活性不但与其 mRNA 和蛋白的表达有关,还与 NOS 的抑制物有关,内源性甲醛能否通过影响 NOS 的抑制物致 NO 代谢紊乱而诱导内皮细胞损伤有待进一步实验论证。高剂量甲醛是通过影响 NOS 的活性

还是通过氧化损伤等其他途径而诱导内皮细胞损伤则需扩大剂量范围做更深入的实验研究。

[参考文献]

- [1] 余小平,张媛,凌文华. 动脉粥样硬化 DNA 异常甲基化研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (1): 70-72.
- [2] 张成秋,杨纯珍,葛志明. 糖尿病心血管病变与一氧化氮及一氧化氮合酶的关系[J]. 中国老年学杂志, 2006, 3 (26): 419-421.
- [3] Istva'n Kara'di, Zsuzsa Me'sza'ros, Tama's Szombathy, et al. Serum Semicarbazide-sensitive Amine Oxidase (SSAO) Activity is an Independent Marker of Carotid Atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 323 (1-2): 139-146.
- [4] Somfai GM, Knippel B, Ruzicska E, et al. semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity is related to oxidative stress and subchronic inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Neurochem Int*, 2006, 48 (8): 746-752.
- [5] Related Articles, LinksUnzeta M, Sol M, et al. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and its possible contribution to vascular damage in Alzheimer's disease [J]. *J Neural Transm*, 2007, 114 (6): 857-862.
- [6] Banerjee S, Saxena N, Sengupta K, et al. WISP-2 gene in human breast cancer: estrogen and progesterone inducible expression and regulation of tumor cell proliferation [J]. *Neoplasia*, 2003, 5 (1): 63-73.
- [7] Winfried G, Ross manith, Ulrike Hoffmeister, et al. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta [J]. *Molecular Human Reproduction*, 1999, 5 (5): 487-494.
- [8] Binion DG, FU S, Ramanujam KS, et al. iNOS expression in human intestinal microvascular endothelial cells inhibits leukocyte adhesion [J]. *Am J Physiol*, 1998, 9 (3Pt1): 592-603.
- [9] Peter H. Yu, Shannon Wright, Ellen H. Fan, et al. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1674 (1-2): 193-199.
- [10] 郭国庆,查彩慧. 一氧化氮和动脉粥样硬化的关系[J]. 心血管病学进展, 2001, 22 (3): 178-180.
- [11] ZhiHong Yang, Xiufen Ming. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. *Clin Med Res*, 2006, 1 (4): 53-65.
- [12] 卢雪玲,谢自敬,王宁,等. 2型糖尿病患者动脉粥样硬化若干危险因素分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (5): 426-427.
- [13] 游咏,杨天伦,李传昶,等. 冠状动脉严重狭窄患者侧支循环形成与血清非对称性二甲基精氨酸和细胞间粘附分子 1 水平的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (5): 441-443.

(此文编辑 李小玲)