

高同型半胱氨酸血症大鼠冠状动脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的表达

袁 征, 王晓燕, 曾玉梅, 董 伟, 陈多恩, 王国平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院病理研究所, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学; 高同型半胱氨酸血症; 动脉粥样硬化; 冠状动脉内皮细胞; 单核细胞趋化蛋白 1; 叶酸

[摘要] 目的 观察高同型半胱氨酸血症对大鼠冠状动脉内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1 的影响, 以明了冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病机制。方法 24 只大鼠随机分成正常饮食对照组、高蛋白饮食组、高蛋白+叶酸饮食组、高半胱氨酸饮食组。每组 6 只, 分别给予普通饲料; 普通饲料加 1.7% 蛋氨酸; 普通饲料加 1.7% 蛋氨酸和 0.006% 叶酸; 普通饲料加 1.2% 半胱氨酸。饲养 6 周, 采用高效液相色谱荧光检测法测定血浆总同型半胱氨酸浓度, 免疫组织化学染色法检测大鼠冠状动脉左主干和左前降支内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的表达。结果 喂以高蛋白饲料 6 周, 可诱导大鼠高同型半胱氨酸血症。与正常饮食对照组比较, 高蛋白饮食组大鼠血浆总同型半胱氨酸浓度显著升高 ($P < 0.01$), 冠状动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 的表达水平明显增强; 高蛋白+叶酸饮食组大鼠血浆总同型半胱氨酸水平较高蛋白饮食组显著降低 ($P < 0.01$), 其冠状动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 的表达水平也降低; 高半胱氨酸饮食组大鼠血浆总同型半胱氨酸浓度, 以及冠状动脉内皮单核细胞趋化蛋白 1 的表达水平与正常饮食对照组比较差异无显著性。结论 高同型半胱氨酸血症促进了大鼠冠状动脉内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1, 在冠状动脉粥样硬化性心脏病的发生和发展中起着重要的作用。

for 6 weeks. The levels of total plasma homocysteine were measured by high performance liquid chromatography and the expression of monocyte chemoattractant protein 1 on coronary endothelial artery cells of rats was detected by immunohistochemistry.

Results A high methionine diet for 6 weeks induced hyperhomocysteinemia. The plasma homocysteine level was significantly higher in rats of High methionine group than in rats of Control group ($P < 0.01$), and the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in coronary endothelial artery cells was also stronger. During supplementation of folate, normalization of homocysteine levels was accompanied by a marked reduction of monocyte chemoattractant protein 1 expression in coronary endothelial artery cells in rats of High methionine+ folate group ($P < 0.01$), however, there were no significant differences in the plasma homocysteine and the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in coronary endothelial artery cells between the Control group and the High cysteine group. **Conclusions** Hyperhomocysteinemia may play an important role in atherogenesis of coronary artery via stimulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression in the coronary endothelial artery cells.

近年来, 国内外学者对高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 与冠状动脉粥样硬化性

[收稿日期] 2007-10-29 [修回日期] 2008-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金(C30470710); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0711); 湖北省杰出青年基金(2005ABB009)

[作者简介] 袁征, 硕士研究生, 研究方向为心血管病理学, 联系电话为 027-83650551, E-mail 为 yzyz2128@tom.com。王晓燕, 硕士研究生, 研究方向为心血管病理学, E-mail 为 xiaoyanwang214@126.com。通讯作者王国平, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病理学, E-mail 为 wanggp@hotmail.com。

心脏病(简称冠心病, coronary artery disease, CAD) 的关系进行了深入研究^[1-5], 普遍认为 HHcy 与 CAD 具有相关性, 是其一个独立危险因素。但 HHcy 致 CAD 的机制仍不清楚。CAD 的病理改变基础是冠状动脉粥样硬化。目前研究认为, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一个慢性炎症过程, 内皮细胞功能损伤是导致炎症反应的始动环节, 在危险因素作用下多种细胞因子的过度表达加速了 As 的进程^[6-8]。CC 类趋化因子单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP1) 能提高单核细胞和内皮细胞之间的黏附, 并介导单核细胞的趋化和活化, 促进单核细胞穿过内皮屏障并形成泡沫细胞, 在 As 的发生和发展发挥了重要的作用^[8]。在 HHcy 的刺激下, 冠状动脉内皮细胞功能及其生物学行为的改变将直接影响 CAD 的发生。已有实验结果证实, 病理浓度的同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 可刺激主动脉内皮细胞分泌 MCP-1^[9], 但主动脉内皮细胞是否能代表冠状动脉内皮细胞, 有待于探讨。体内原位观察冠状动脉内皮细胞是否受 HHcy 的影响而表达 MCP-1 较为困难, 所以至今尚未见有关文献报道。鉴于体外培养和体内环境的差异, 以及既往有关 HHcy 刺激主动脉内皮细胞表达 MCP1 的结果并不能代表冠状动脉内皮细胞的特点的事实, 本研究旨在从体内实验角度出发, 在大鼠 HHcy 模型中原位观察 As 发病率较高的冠状动脉的左主干和左前降支内皮细胞 MCP1 的表达, 以明了 HHcy 致 CAD 的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要试剂与仪器

6~8 周雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供; 蛋氨酸、叶酸、半胱氨酸由上海伯奥生物科技有限公司提供; 兔抗大鼠 MCP1 多克隆抗体由武汉博士德生物技术有限公司提供; 免疫组织化学 S-P9001 和 DAB 试剂有北京中杉金桥生物技术有限公司提供。高速台式低温离心机。

1.2 动物模型的复制及分组

雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 120 ± 20 g, 将其随机分为 4 组, 每组 6 只。正常饮食对照组, 仅喂以含蛋氨酸 (0.49%)、叶酸 (0.0006%) 和半胱氨酸 (0.34%) 的普通饲料; 高蛋白饮食组, 喂以加 1.7% 蛋氨酸的普通饲料; 高蛋白饮食+叶酸饮食组, 给予加 1.7% 蛋氨酸和 0.006% 叶酸的普通饲料; 高

半胱氨酸饮食组, 喂以加 1.2% 半胱氨酸的普通饲料。参照文献[9], 高蛋白饮食喂养 SD 大鼠 4 周足以诱导出高同型半胱氨酸血症。设立高蛋白饮食+叶酸饮食组, 主要是为了观察通过补充叶酸能否降低血清 Hcy 的水平, 同时检测补充叶酸饮食对大鼠冠状动脉内皮细胞表达 MCP1 的影响; 加入高半胱氨酸饮食组, 则是为了检测 Hcy 在动物模型中对 MCP1 表达是否具有特异性。

1.3 血浆总同型半胱氨酸测定

SD 大鼠喂养上述饲料 6 周后, 颈外静脉采血 2 mL, 2% EDTA 抗凝, 于 4℃以 3 kr/min 离心 10 min 分离血浆, 于 -20℃冻存、备用。应用高效液相色谱荧光分析法测定大鼠血浆总同型半胱氨酸浓度。采用 Waters515 液相色谱泵, Waters717 自动样品器, Waters474 扫描荧光检测器, C18 反向色谱柱 ODS Hypersil 5 μ m, 125 × 4.6 mm。样本分析采用单元泵洗脱, 流速 1.2 mL/min, 洗脱时间 8 min。荧光检测器激发波长 385 nm, 发射波长 515 nm。流动相为含 1 甲醇的 0.07 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.0)。采用 Millennium 32 分析软件处理结果。

1.4 大鼠冠状动脉免疫组织化学染色

SD 大鼠经 10% 水合氯醛麻醉、颈外静脉放血处死后分离心脏。生理盐水灌注冲洗, 10% 的中性福尔马林液中固定 24 h。取出固定的心脏, 先找到冠状动脉左前降支的起始部位, 然后在其中段和左主干处分别取材, 经脱水、浸蜡、包埋, 切片备用。石蜡切片经微波热抗原修复后分别用 0.3% H_2O_2 -甲醇和山羊血清 37℃下封闭 30 min, 加入的兔抗大鼠 MCP1 的多克隆一抗 (1:80), 4℃冰箱过夜孵育; PBS 洗 5 min × 3 次, 滴加山羊抗兔二抗, 37℃孵育 30 min。PBS 洗 5 min × 3 次, 滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶, 37℃孵育 30 min, PBS 洗 5 min × 3 次, DAB 显色, 苏木精对比染色, 中性树脂封片。用 PBS 代替一抗作空白对照, 阳性对照片由博士德公司提供。切片置于光学显微镜下观察并照相, 以冠状动脉内皮细胞表面不出现棕黄色信号为阴性 (-), 出现棕黄色信号为弱阳性 (+), 出现棕褐色为强阳性 (++)。

1.5 统计学处理

大鼠血浆总同型半胱氨酸浓度数据以均数加减标准差表示。多组间均数比较用单因素方差分析 (Prism 软件 3.0), 组间两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性意义。

2 结果

2.1 血浆总同型半胱氨酸浓度

先前的研究表明^[9],通过喂养高蛋白饮食 4 周,在大鼠体内可诱导出 HHcy。本实验中大鼠在喂养 6 周后,正常饮食对照组、高蛋白饮食组、高蛋白+叶酸饮食组、高半胱氨酸饮食组血浆总同型半胱氨酸水平变化明显。与正常饮食对照组($5.8 \pm 0.9 \mu\text{mol/L}$)相比,高蛋白饮食组血清 Hcy 水平升高显著($24.3 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$),差异有显著性意义($P < 0.01$);与高蛋白饮食组相比,高蛋白+叶酸饮食组血清 HCY 浓度明显降低($8.2 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$),提示增加叶酸可以减少高蛋白饮食导致的 Hcy 升高。而高半胱氨酸组($7.3 \pm 1.5 \mu\text{mol/L}$)与对照组血

清同型半胱氨酸浓度差异无显著性。

2.2 大鼠冠状动脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 表达

正常饮食组冠状动脉内皮细胞无 MCP1 的表达,而蛋氨酸组则见明显阳性,阳性信号呈线状,连续或不连续,位于内皮细胞表面,显著强于对照组;补充叶酸能减少蛋氨酸饮食诱导的 HHcy 所致的冠状动脉内皮细胞 MCP1 的表达,该组大鼠冠状动脉内皮细胞表面仍可见棕黄色阳性信号,但呈不连续线状;而高半胱氨酸组与对照组差异不明显。在部位上,各阳性表达组中,左冠状动脉主干和左冠状动脉前降支之间表达差异不明显(图 1)。

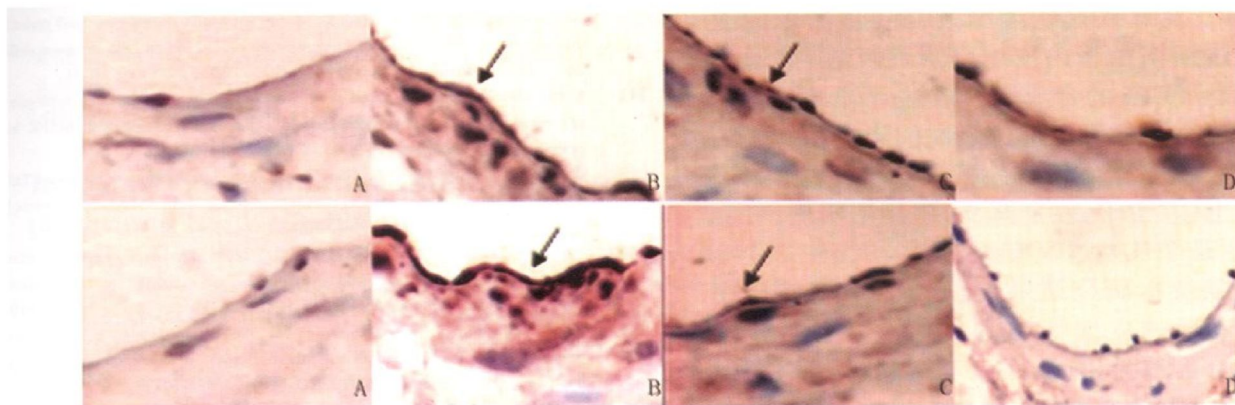


图 1. 各组大鼠冠状动脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 表达

左图为左主干,右图为左前降支。A 为正常饮食对照组, B 为高蛋白

饮食组, C 为高蛋白+叶酸饮食组, D 为高半胱氨酸饮食组。

3 讨论

冠心病已成为危害人类生命健康的最严重疾病之一。近年的临床研究发现,HHcy 与 CAD 的发病具有明显的相关性,是 CAD 的一个独立危险因素^[1-5]。但 HHcy 致 CAD 的机制尚不清楚。研究认为,HHcy 可通过损害血管内皮^[10],促进平滑肌细胞增殖^[11]、血小板活化^[12]及胆固醇的合成^[13]等促进 As 的发展。

研究显示动脉粥样硬化斑块中含有大量炎症细胞浸润,可见 As 病变实际上是对内膜损伤作出的一系列炎症反应的结果^[8]。单核细胞黏附于血管壁并穿入内皮下形成泡沫细胞被认为是 As 病变的早期事件。趋化因子对于招募外周血单核细胞、淋巴细胞进入内皮下间隙至关重要。其中作用最明显的是 MCP-1^[8]。MCP1 是趋化细胞因子家族中的 B 家族(即 C-C 亚家族)成员之一,可诱导表达于内皮细

胞、平滑肌细胞和单核细胞,具有趋化单核细胞移动的功能,对血管内皮细胞粘附分子的表达也有调节作用。在动脉粥样硬化斑块中检测到 MCP1 等趋化因子含量增高,而抗 MCP1 基因治疗敲除载脂蛋白 E 基因的小鼠,其动脉粥样硬化的进程明显延缓^[14]。可见 MCP1 在 As 形成和发展中发挥着重要作用。

以前的实验表明,HHcy 可刺激培养的主动脉内皮细胞表达 MCP1,从而诱导 As 的发生发展。但由于冠状动脉内皮细胞的特殊性,这一结果对其是否同样适用,仍有待探讨。临床研究发现,HHcy 可以通过损伤血管内皮功能,促进 CAD 的发生与发展,但并没有阐明血管内皮损伤的可能机制。有文献表明,因 CAD 死亡的病人冠状动脉粥样斑块中可检出 MCP1 的表达^[15],然而是否有 HHcy 参与未见文献报道。基于以上,本研究首先建立 HHcy 动物模型,然后在体内原位观察冠状动脉的左主干和左前降支内皮细胞 MCP1 的表达情况,从而更直接的阐明了

HHcy 致冠状动脉内皮损伤的可能机制。

在研究中,大鼠给予高蛋白饮食 6 周后诱导 HHcy 与正常饮食组比较差异有显著性,提示本试验模型建立成功。同时补充叶酸后,HHcy 水平显著下降,HHcy 诱导冠状内皮细胞表达 MCP1 的这种作用可以被叶酸所拮抗。B 族维生素(维生素 B12、维生素 B6、叶酸)是同型半胱氨酸代谢中必要的辅助因子。本研究证实补充叶酸在降低血浆同型半胱氨酸水平的同时,也显著降低了 HHcy 诱导的大鼠冠状动脉内皮表达 MCP1 的水平。这种有益效应除了与补充叶酸显著降低血浆同型半胱氨酸含量直接有关以外,可能还与叶酸本身的抗氧化特性有关^[16]。MCP1 在正常血管壁中几乎未见表达,但在血管内皮细胞发生损害的早期即在血管壁细胞中表达增加,表明 HHcy 发挥致冠状动脉粥样硬化的效应至少部分是通过损伤血管内皮增强炎症反应,如通过刺激内皮表达 MCP1 的合成和释放达到的。冠状动脉粥样硬化最主要的发生部位是左前降支、右主干、左主干,左旋支等。本研究中发现,各组 MCP1 表达在发病部位上(左主干,左前降支)差异不明显,可能与 As 的发生是个长期过程有关。

结合文献及本研究结果,推测 HHcy 可能是通过诱导冠状动脉内皮细胞表达 MCP1 的增加,介导单核细胞的趋化和活化,从而启动冠状动脉粥样硬化的发生、发展而参与 CAD。

[参考文献]

- [1] Gauthier GM, Keevil JG, McBride PE. The association of homocysteine and coronary artery disease [J]. *Clin Cardiol*, 2003, **26** (12): 563-568.
- [2] Guo H, Lee JD, Ueda T, et al. Plasma homocysteine levels in patients with early coronary artery stenosis and high risk factors [J]. *Jpn Heart J*, 2003, **44** (6): 865-871.
- [3] Gravin-Taddei CF, Batlouni M, Sarteschi C, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for coronary atherosclerotic diseases in the elderly [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2005, **85** (3): 166-173.
- [4] Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M, et al. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2006, **26** (6): 38.
- [5] 李莉英,姜德谦,刘赵云,等. 冠心病患者血浆同型半胱氨酸及亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 基因多态性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 210-214.
- [6] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126.
- [7] Poredos P. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease [J]. *Athorphysiol Haemost Thromb*, 2002, **32** (5-6): 274-277.
- [8] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease [J]. *Circ Res*, 2004, **95** (9): 858-866.
- [9] Wang G, Woo CW, Sunq FL, et al. Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1777-783.
- [10] Weiss N, Hevdrick S, Zhanq YY, et al. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine betasynthase deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (1): 34-41.
- [11] Kartal Ozer N, Taha S, Azzi A. Homocysteine induces DNA synthesis and proliferation of vascular smooth muscle cells by interfering with MAPK kinase pathway [J]. *Bifactors*, 2005, **24** (1-4): 193-199.
- [12] Unqviri Z, Sarkadir-Nagy E, Baqi Z, et al. Simultaneously increased TxA(2) activity in isolated arterioles and platelets of rats with hyperhomocysteinemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (5): 1203-208.
- [13] Woo CW, Siow YL, Pierce GN, et al. Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, **288** (5): E1002-010.
- [14] Ni W, Eqsahira K, Kitamoto S, et al. New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Circulation*, 2001, **103** (16): 2096-101.
- [15] 李静,孙雷,庄永杰,等. 单核细胞趋化蛋白-1 和核因子- κ B 与巨噬细胞浸润及动脉粥样硬化斑块形成的关系[J]. *大连医科大学学报*, 2007, **29** (1): 14-18.
- [16] 景冬樱,吴越芳,王树人. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 529-532.

(此文编辑 李玲玲)