

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0020-05

联合运用晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附因子-1 mRNA 表达及机制

陶硕秋¹, 徐尚华¹, 巢毅¹, 郑晓新¹, 谢良地², 许昌声²

(福建医科大学 1. 南平市第一医院教学医院心内科, 福建省南平市 353000; 2. 高血压研究所, 福建省福州市 350004)

[关键词] 动脉粥样硬化; 氧自由基; NADPH 氧化酶; 晚期糖基化终产物; 同型半胱氨酸; 血管细胞黏附分子-1

[摘要] **目的** 探讨联合运用晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1 表达的影响和氧化应激的机制。**方法** 酶消化法获取人脐静脉内皮细胞。逆转录聚合酶链反应检测血管细胞黏附分子-1 基因的表达。活性氧检测试剂盒检测细胞内氧自由基的荧光信号强度。**结果** 晚期糖基化终产物 ($10^{-4} \sim 10^{-1}$ g/L) 和同型半胱氨酸 ($1.35 \times 10^{-3} \sim 1.35$ g/L) 组呈浓度依赖性诱导人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1 的表达, 晚期糖基化终产物 (10^{-4} g/L) 和同型半胱氨酸 (1.35×10^{-3} g/L) 联合作用能进一步增加人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1 基因的表达 (1.09 ± 0.18), 与单独晚期糖基化终产物 (0.14 ± 0.07) 和同型半胱氨酸组 (0.18 ± 0.06) 相比其表达分别增加了 7.78 倍和 6.05 倍 ($P < 0.01$); 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶特异性抑制剂二亚苯基碘能显著抑制晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸联合诱导的血管细胞黏附分子-1 基因的表达 (0.20 ± 0.09 比 1.19 ± 0.23 , $P < 0.01$); 晚期糖基化终产物组和同型半胱氨酸组均能增加人脐静脉内皮细胞内氧自由基的荧光信号强度, 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸联合作用时, 细胞内氧自由基的荧光信号强度水平进一步升高, 且二亚苯基碘能明显抑制上述效应。**结论** 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸能增加细胞内氧自由基的荧光信号水平, 使血管细胞黏附分子-1 基因的表达上调, 且两者存在协同效应; 氧自由基水平的增加是导致血管细胞黏附分子-1 基因表达升高的重要因素; 血管细胞黏附分子-1 可能是通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶途径实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Advanced Glycation End Products and Homocystein on the Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 via NADPH Oxidase in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

TAO Shuo-Qiu¹, XU Shang-Hua¹, CHAO Yi¹, ZHENG Xiao-Xin¹, XIE Liang-Di², and XU Chang-Sheng²

(1 Department of Cardiology, First Hospital of Nanping, Fujian Medical University, Nanping, Fujian 353000; 2 Department of Hypertension Research, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004 China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Oxygen Free Radicals; NADPH Oxidase; Advanced Glycation End Products; Homocystein; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of advanced glycation end products (AGE) and homocystein (Hcy) on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mRNA via oxidative stress mechanism in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Methods** Collagenase was used to isolate the endothelial cell from human umbilical vein. RT-PCR was used to examine the expression of VCAM-1 mRNA. Inversion fluorescence microscope was used to observe the level of oxygen free radical. **Results** The expression of VCAM-1 mRNA was induced concentration-dependently by AGE ($10^{-4} \sim 10^{-1}$ g/L) and Hcy ($1.35 \times 10^{-3} \sim 1.35$ g/L); AGE combined with Hcy group could promote the expression of VCAM-1 mRNA respectively 7.78 times and 6.05 times in comparison with AGE group and Hcy group (1.09 ± 0.18 vs 0.14 ± 0.07 , 1.09 ± 0.18 vs 0.18 ± 0.06 , $P < 0.01$); By comparison with AGE combined with Hcy group, the VCAM-1 expression of DPI group was obviously reduced (0.20 ± 0.09 vs 1.19 ± 0.23 , $P < 0.01$); In comparison with control group, AGE group and Hcy group could enhance oxygen free radical in HUVEC; The level of oxygen free radical in AGE combined with Hcy group was higher than that in AGE group and Hcy group. DPI could significantly inhibit the level of oxygen free radical. **Conclusion** AGE and Hcy can enhance the level of oxygen free radical in HUVEC and increase the VCAM-1 expression, and they have the cooperative effect. The enhancement of oxygen free radical is an

[收稿日期] 2009-12-09 [修回日期] 2010-01-15

[基金项目] 福建省科技厅基金 [(2007) 3129]

[作者简介] 陶硕秋, 硕士研究生, E-mail: shuoqita@163.com. 通讯作者徐尚华, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及其防治, E-mail: xshanghua@126.com.

important factor on the expression of VCAM-1 mRNA; The above process is realized possibly through activating the NADPH oxidase

内皮的损伤是动脉粥样硬化病变的始动因素,晚期糖基化终产物 (AGE) 和高同型半胱氨酸血症 (Hcy) 是致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的危险因素, AGE 和 Hcy 均可导致内皮细胞机能和结构改变, 合成和分泌细胞炎性因子, 从而促进 As 的发生和发展^[1, 2]。血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 是 As 发病的重要炎性因子, 它的增高可促进粥样斑块的形成及增加斑块的不稳定性。近年研究显示^[3, 4], AGE 和 Hcy 均可诱导 VCAM-1 的产生, 且与氧化应激密切相关。但目前鲜见 AGE 和 Hcy 联合作用致 As 方面的报道。本研究拟通过体外培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 观察 AGE 和 Hcy 对内皮细胞炎性因子 VCAM-1 及氧自由基的影响, 并观察 NADPH 氧化酶特异性拮抗剂二亚苯基碘 (DPI) 对 AGE 和 Hcy 联合作用的影响, 探讨 AGE 和 Hcy 是否通过激活 NADPH 氧化酶途径介导氧自由基实现 VCAM-1 表达的增加, 及两者对此过程是否具有协同效应。

1 材料和方法

1.1 标本采集

取福建省妇幼保健院住院育龄健康产妇剖腹产后的新鲜胎儿脐带 15~20 cm, 置于 4℃ 的 M199 培养液中, 立即带回实验室进行分离培养实验。

1.2 试剂

DL-Homocysteine, AGE-BSA 溶液和 DPI (Sigma 公司); M199 培养粉、胎牛血清、OPTI-MEM 和 Trizol (Invitrogen 公司); iv 型胶原酶、胰蛋白酶和 PCRmix (Gibco 公司); RT-PCR 的 M-MLV 第一链合成试剂盒、PCRmix (Fermentas 公司); 内参引物 (上海博尚生物技术有限公司); 目的基因引物 (上海英俊生物技术有限公司); 活性氧检测试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司)。

1.3 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定

在无菌条件下, 取健康产妇剖腹产后新鲜的胎儿脐带 15~20 cm, 用 PBS 缓冲液冲洗尽血迹, 以 0.1% 的 iv 型胶原酶 37℃ 消化 15~20 min, 终止消化后收集消化液离心 10 min, 弃上清。加入 20% 的 M199 完全培养液, 在 5% CO₂、37℃ 培养箱内培养。24 h 换液, 待细胞生长达单层融合状态, 以 0.25% 胰蛋白酶消化及传代, 并在相差显微镜下观察细胞形态呈典型铺路石样生长, 选择生长良好的第 2~3

代细胞用于实验。

1.4 细胞分组

空白对照组: 不加干预因素; ④AGE 组: 不同作用浓度的 AGE (10^{-4} ~ 10^{-1} g/L) 与 HUVEC 共同培养 24 h; ④Hcy 组: 不同作用浓度的 Hcy (1.35×10^{-3} ~ 1.35 g/L) 与 HUVEC 共同培养 24 h; AGE + Hcy 组: HAE 和 Hcy (AGE 和 Hcy 的浓度根据 AGE 组和 Hcy 组 VCAM-1 mRNA 的检测结果确定) 与 HUVEC 共同培养 24 h; DPI 组: DPI 与细胞上清液作用 30 min, 而后加入 AGE 和 Hcy 再与细胞共同培养 24 h。

1.5 RT-PCR 检测

收集上述各组细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞 RNA 1 μg 逆转录合成 cDNA (参照试剂盒), 再取逆转录产物 1 μL 进行 PCR 循环。VCAM-1 PCR 的条件为 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 33 个循环; VCAM-1 引物上游 5'-TTC CTA GCC TGT TAC CCC CTT GA-3', 下游 5'-CAG AAA GAG GCT GTA GCT CCC C-3', 共 390 bp。GAPDH PCR 条件为 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; GAPDH 引物序列为上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3', 共 454 bp。上述反应结束后, 取反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, UVP 型凝胶图像分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值, 以两者的比值代表目的基因的表达量。

1.6 氧自由基生成的测定

将各组细胞与 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA 5 μmol/L) 染色剂共同孵育, 培养的内皮细胞氧自由基的产生量由 DCFH-DA 被氧自由基氧化成 2, 7-dichlorofluorescein (DCF) 的程度确定。应用倒置荧光显微镜定性观察氧自由基荧光信号强度, 根据细胞内荧光强度来比较氧自由基的差别。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包统计数据; 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 晚期糖基化终产物对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 mRNA 表达的影响

10^{-4} ~ 10^{-1} g/L AGE 呈浓度依赖性促进 HU-

VEC的 VCAM-1 mRNA 表达 (0.11 ± 0.01 , 0.38 ± 0.09 , 0.60 ± 0.16 和 1.03 ± 0.09), 与对照组 (0.001 ± 0.005)比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 且不同浓度组相比, 差异也有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 1)。

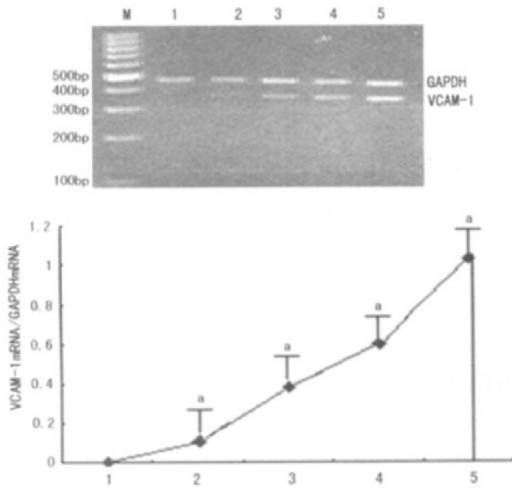


图 1 晚期糖基化终产物对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 mRNA 表达的影响 M 为 Mark, 1 为空白对照组, 2~5 分别为 10^{-4} ~ 10^{-1} g/L AGE 组。a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比。

2.2 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 mRNA 表达的影响

Hcy (1.35×10^{-3} ~ 1.35 g/L) 呈浓度依赖性促进 HUVEC 的 VCAM-1 mRNA 表达 (0.61 ± 0.01 , 0.95 ± 0.14 , 1.04 ± 0.15 和 0.64 ± 0.14), 与对照组 (0.004 ± 0.003) 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 且不同浓度组相比, 差异也有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 1.35×10^{-3} g/L 组与 1.35 g/L 组相比, VCAM-1 mRNA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Hcy 浓度为 1.35×10^{-1} g/L 时 VCAM-1 mRNA 表达达峰值 (图 2)。

2.3 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸联合应用对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 mRNA 表达的影响

根据以上结果选择 AGE 为 10^{-4} g/L 和 Hcy 1.35×10^{-3} g/L 作为联合作用组的浓度。AGE 和 Hcy 联合应用能显著促进 HUVEC 的 VCAM-1 mRNA 表达, 与 AGE (10^{-4} g/L) 组和 Hcy (1.35×10^{-3} g/L) 组相比, VCAM-1 mRNA 表达分别增加了 7.78 倍和 6.05 倍 (图 3 和表 1)。

2.4 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸联合应用对氧自由基荧光信号强度的影响

与 AGE (10^{-4} g/L) 组和 Hcy (1.35×10^{-3} g/L) 组相比, AGE + Hcy 联合应用能进一步提高细胞内

氧自由基的荧光信号强度 (图 4)。

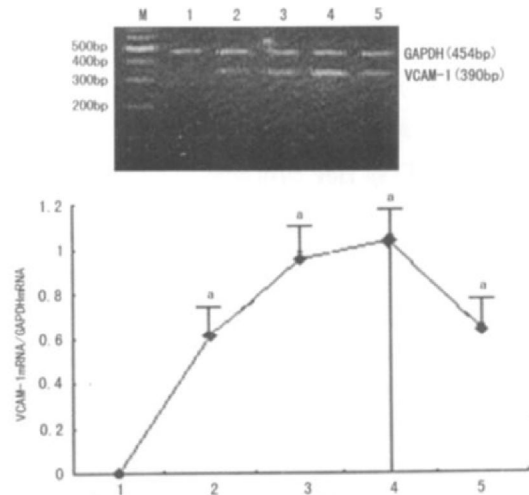


图 2 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 表达的影响 M 为 Mark, 1 为空白对照组, 2~5 依次为 1.35×10^{-3} g/L, 1.35×10^{-2} g/L, 1.35×10^{-1} g/L 和 1.35 g/L Hcy 组。a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比。

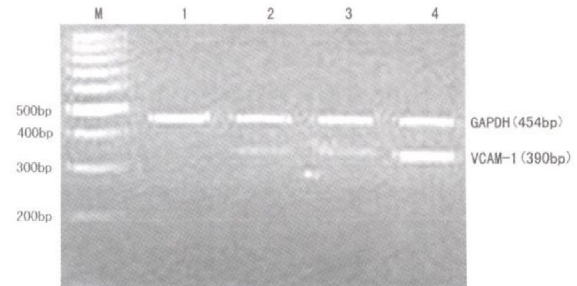


图 3 晚期糖基化终产物联合同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1 mRNA 表达的影响 M 为 Mark, 1 为空白对照组, 2 为 10^{-4} g/L AGE 组, 3 为 1.35×10^{-3} g/L Hcy 组, 4 为 AGE + Hcy 组。

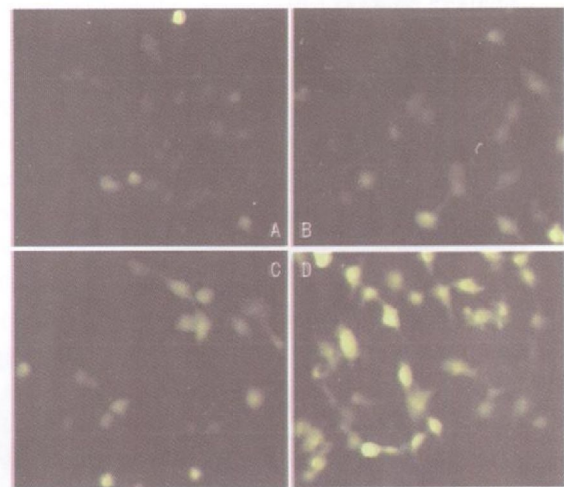


图 4 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞内氧自由基的影响 (物镜 $\times 10$) A 为空白对照组, B 为 AGE 组, C 为 Hcy 组, D 为 AGE + Hcy 组。

表 1 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸联合应用对血管细胞黏附分子 1mRNA 表达的影响

分 组	VCAM-1
对照组	0.01 ± 0.00
AGE 组	0.14 ± 0.07 ^a
Hcy 组	0.18 ± 0.06 ^a
AGE+Hcy 组	1.09 ± 0.18 ^{bc}

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与对照组比; c为 $P < 0.01$, 与 AGE 组和 Hcy 组比。

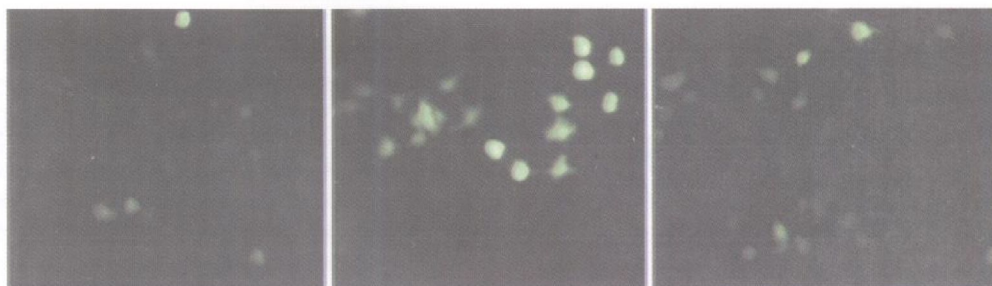


图 5 NADPH 氧化酶特异性抑制剂二亚苯基碘对人脐静脉内皮细胞内氧自由基水平的影响 (物镜 × 10) 从左到右依次为空白对照组、AGE+Hcy 组和 DPI 组。

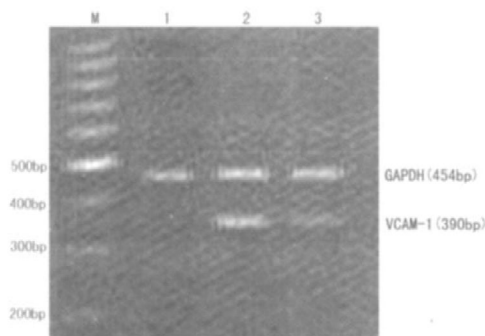


图 6 NADPH 氧化酶特异性抑制剂二亚苯基碘对人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子 1mRNA 表达的影响 M 为 Mark, 1 为空白对照组, 2 为 AGE+Hcy 组, 3 为 DPI+AGE+Hcy 组。

3 讨论

晚期糖基化终产物 (AGE) 是致动脉粥样硬化的危险因素^[5], 而衰老、高血糖、肾功能衰竭等因素均可促进 AGE 的形成^[6]。高同型半胱氨酸血症 (HHcy) 在人群中的发病率是 5% ~ 7%, 当体内血浆浓度达到 15 μmol/L 时即可导致血管内皮的损伤, 徐志红等^[7]的研究结果显示, HHcy 对内皮细胞的炎症反应有促发作用。由此可见, AGE 和 Hcy 能导致内皮细胞功能和结构改变, 通过合成和分泌一些细胞因子^[1,2], 促进动脉粥样硬化的发生。但目前对 AGE 和 Hcy 协同作用致动脉粥样硬化病变方面的报道鲜见。

VCAM-1 是目前研究较多的一种细胞因子, 它

2.5 二亚苯基碘对人脐静脉内皮细胞的氧自由基荧光强度及血管细胞黏附分子 1mRNA 表达的影响

与 AGE+Hcy 组相比, DPI 组能明显抑制 AGE+Hcy 诱导的氧自由基荧光强度升高效应 (图 5)。与 AGE+Hcy 组相比, DPI 组 VCAM-1 mRNA 的表达明显降低 (0.20 ± 0.09 比 1.19 ± 0.23 $P < 0.01$; 图 6)。

可介导白细胞在内皮细胞的黏附, 促进粥样斑块的形成及增加斑块的不稳定性。近年的研究表明^[8,9], VCAM-1 的表达可由对氧化还原敏感的一些步骤调节, 且抗氧化剂能消除这种诱导作用。Carluccio 等^[4]的研究结果显示, Hcy 可通过核因子 κB 或 NADPH 氧化酶途径介导的氧自由基诱导 HUVEC 的 VCAM-1 产生。有学者报道^[10,11], AGE 可通过激活氧化应激途径增加氧自由基的产生及炎症因子的释放 (VCAM-1 和单核细胞趋化蛋白 1 等), 进而在冠心病中起潜在的致病作用。

在本研究中, 我们发现 AGE 和 Hcy 呈浓度依赖性促进 VCAM-1 mRNA 的表达, 当 Hcy 的浓度达到 1.35 g/L 时, VCAM-1 mRNA 的表达下降, 这与 Yamagishi 等^[12]和 Carluccio 等^[4]的研究结果一致。实验中, 我们还发现, 与 AGE 和 Hcy 单独作用组相比, AGE 和 Hcy 联合作用细胞内氧自由基的荧光信号强度及 VCAM-1 mRNA 的表达明显升高; 我们观察 AGE 和 Hcy 对 HUVEC 中氧自由基表达的影响, 发现单独 AGE 和 Hcy 作用组细胞内氧自由基的荧光信号呈中等强度, 而 AGE 和 Hcy 联合应用组细胞内氧自由基的荧光信号强度明显进一步增加, 实验过程中加入 NADPH 氧化酶特异性抑制剂 DPI 后, 细胞内氧自由基的荧光信号强度明显减低, VCAM-1 mRNA 的表达也显著降低。据此, 我们推测 AGE 可能协同 Hcy 通过提高 VCAM-1 mRNA 的表达在冠

状动脉粥样硬化的发病中起重要作用,此过程中NADPH氧化酶途径介导的氧自由基可能起主要的作用。本实验结果提示AGE可能协同Hcy通过氧化应激途径导致内皮损伤,加速动脉粥样硬化的发展。临床和基础研究发现,在肾功能衰竭患者的代谢紊乱中,Hcy和AGE的含量都明显增高,尤其是合并动脉粥样硬化的患者^[13]。AGE和Hcy与糖尿病肾病的发展也密切相关^[14-15]。随着年龄的增长,体内Hcy及AGE也会增加,说明Hcy和AGE可能共同参与了动脉粥样硬化、肾功能衰竭患者动脉粥样硬化病变、糖尿病肾病及衰老等疾病的发生和发展。本实验通过对体外Hcy和AGE协同作用方面的研究,希望为衰老、动脉粥样硬化、肾功能衰竭合并动脉粥样硬化患者及糖尿病肾病患者的病理机制和临床防治提供一些理论基础及新思路。

[参考文献]

- [1] Jandeleit-Dahm K, Watson A, Som-Paavonen A. The AGE/RAGE axis in diabetes-accelerated atherosclerosis [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008 **35** (3): 329-334
- [2] Lin CP, Chen YH, Lin WT, et al. Direct effect of statins on homocysteine-induced endothelial adhesiveness: potential impact to human atherosclerosis [J]. *Eur J Clin Invest* 2008 **38** (2): 106-116
- [3] Basta G, Lazzarini G, DelTurco S, et al. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 **25** (7): 1401-407
- [4] Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, et al. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of mediterranean diet polyphenolic antioxidants [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 **293** (4): H2344-354
- [5] Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease [J]. *Curr Pharm Des* 2008 **14** (10): 979-986
- [6] Herold K, Moser B, Chen Y, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone away in the primal response to stress [J]. *J Leukoc Biol* 2007 **82** (2): 204-212
- [7] 徐志红, 陆国平, 吴春芳. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (5): 353-357
- [8] Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 **23** (4): 622-629
- [9] Csiszar A, Smith K, Labinsky N, et al. Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 **291** (4): H1694-699
- [10] Som-Paavonen A, Watson AM, Li J, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes [J]. *Diabetes* 2008 **57** (9): 2461-469
- [11] Takahashi HK, Mori S, Wake H, et al. Advanced glycation end products subselectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 **330** (1): 89-98
- [12] Yamagishi S, Matsui T, Nakanura K, et al. Minodronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, inhibits advanced glycation end product-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells by suppressing reactive oxygen species generation [J]. *Int J Tissue React* 2005 **27** (4): 189-195
- [13] 易斌, 张浩, 黄志军. 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸对内皮细胞的协同损伤作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2008 **18** (11): 1552-556
- [14] Miyata T, Iizuhara Y. Inhibition of advanced glycation end products: an implicit goal in clinical medicine for the treatment of diabetic nephropathy [J]. *Ann NY Acad Sci* 2008 **1126**: 141-146
- [15] Jiang Z, Liang Q, Luo G, et al. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma amino acids: application to studies of diabetic nephropathy [J]. *Talanta* 2009 **77** (4): 1279-284

(此文编辑 许雪梅)