

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0134-03

同型半胱氨酸经由 N-甲基-D-天冬氨酸受体 -Cyclin D 通路诱导血管平滑肌细胞增殖

焦玉蓉, 韦丽华, 邱云峰, 王树人

(四川大学华西基础与法医学院病理生理学教研室, 四川省成都市 610041)

[关键词] N-甲基-D-天冬氨酸; 同型半胱氨酸; 细胞周期; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 探讨同型半胱氨酸可否经由 N-甲基-D-天冬氨酸受体通路诱导血管平滑肌细胞增殖及其可能的终末靶分子。方法 以同型半胱氨酸诱导血管平滑肌细胞增殖, 并合用 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂 MK801 以观察其对血管平滑肌细胞增殖的影响。应用 MTT 法检测血管平滑肌细胞增殖; 流式细胞术测定细胞周期; 逆转录聚合酶链反应检测 Cyclin D1 mRNA 的表达。结果 同型半胱氨酸显著刺激血管平滑肌细胞增殖、促进血管平滑肌细胞从 G0/G1 向 S 期转换, 并上调 Cyclin D1 mRNA 的表达。而 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂 MK801 同步抑制血管平滑肌细胞增殖及血管平滑肌细胞从 G0/G1 向 S 期转换, 同时降低 Cyclin D1 mRNA 的表达, 上述效应皆具明显的剂量-效应关系。结论 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞的促增殖效应可能部分是通过 N-甲基-D-天冬氨酸受体介导, 并最终经由 Cyclin D 通路实现。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Homocysteine Through N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Cyclin D Pathway

JIAO Yu-Rong WEI Lihua DI Yun-Feng and WANG Shu-Ren

(Department of Pathophysiology, College of Preclinical Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[KEY WORDS] N-methyl-D-aspartate Homocysteine Cell Cycle Vascular Smooth Muscle Cell

[ABSTRACT] **Aim** To explore the possibility of homocysteine-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation via N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and its possible terminal target molecules. **Methods** VSMC proliferation was induced by homocysteine and the VSMC was treated with NMDA receptor antagonist MK801. The rate of proliferation of VSMC were detected by the way of MTT. Cell cycle distribution were determined by flow cytometer. The cyclin D1 mRNA expression in cultured VSMC were measured by RT-PCR. **Results** Homocysteine significantly stimulated VSMC proliferation, promoted VSMC convert from the G0/G1 to S phase and increased cyclin D1 mRNA expression. MK801, however, inhibited the proliferation of VSMC by homocysteine, the conversion from G0/G1 to S phase and the expression of cyclin D1 mRNA were synchronously inhibited. All these effects showed significant dose-dependent manner. **Conclusion** The proliferation-promoting effect of homocysteine on VSMC might be partly mediated by NMDA receptor and ultimately achieved through the cyclin D pathway.

同型半胱氨酸 (Hcy) 引起内皮细胞凋亡, 但却促进血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖, 两者都与动脉粥样硬化 (As) 的发病密切相关。其具体机制并不清楚。Poddar 等^[1]发现, Hcy 诱导神经细胞死亡经由 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体介导的细胞外信号调节激酶 (ERK) -MAPK 通路引起 ERK 磷酸化, 而抑制 ERK 的磷酸化可减弱 Hcy 诱导的神经细

胞死亡。但 Doronzo 等^[2]在 VSMC 发现, Hcy 亦经由 NMDA 受体介导的 ERK-MAPK 通路发挥作用。本研究在 VSMC 探讨 ERK-MAPK 通路后、且与增殖直接相关的信号分子 Cyclin 对 Hcy 的反应; 同时以 NMDA 受体拮抗剂 MK801 与 Hcy 共同作用于培养的 VSMC, 观察其对 VSMC 的增殖、Cyclin D1 的表达是否产生同步的影响, 以期对 Hcy 促 VSMC 增殖的机制提供新的认识。

[收稿日期] 2009-12-28

[修回日期] 2010-02-05

[作者简介] 焦玉蓉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。Email 为 jiaoyurong84@163.com。通讯作者王树人, 博士生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, Email 为 wangshuren1945@yahoo.com.cn。韦丽华, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂和仪器

DMEM-F12 培养基、小牛血清和 0.25% 胰蛋白

酶 (Gibco 公司); RT-PCR 试剂盒 (北京天根); D, L-Hcy, MK801, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 和碘化丙啉 (PI) 购自 Sigma 公司; 引物由英俊公司合成; CO₂ 孵箱 (Heraeus, Germany); PCR 仪 (Biotra, Germany); 倒置相差显微镜 (Nikon, Japan); 酶标仪 (Bio-RAD, America); 流式细胞仪 (ELITE ESP coultter America); 凝胶成像系统 (DBT-08 EEC 公司)。

1.2 大鼠主动脉平滑细胞的培养

取 8 周龄雄性 SD 大鼠 (四川大学动物中心提供), 在无菌条件下分离胸主动脉, 去除内外膜, 将中膜剪碎后以贴块法置于含 20% 小牛血清的 DMEM-F12 培养基中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱 (湿度 100%) 内静置进行原代培养和传代培养, 取 3~5 代细胞用于实验。

1.3 实验分组

将 VSMC 培养于 25 cm² 培养瓶中, 用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基培养接近汇合时, 换无血清培养基培养 24 h。实验用细胞分为 5 组: 空白对照组、Hcy 对照组、10 μmol/L MK801 组、50 μmol/L MK801 组及 100 μmol/L MK801 组, 分别预处理 90 min, 再向 2~5 组中加入 100 μmol/L Hcy, 空白对照组不加 MK801, 37℃ 孵箱继续培养 36 h。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

收集细胞, 以 5×10^3 /L 细胞密度接种于 96 孔板, 置 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 24 h 后, 分别按分组设计加入 MK801 和 Hcy。继续培养 36 h 后, 每孔加入 20 μL MTT (5 g/L)。4 h 后弃去培养液, 每孔加入二甲基亚砷 150 μL, 振荡混匀后, 酶联免疫仪 490 nm 波长检测各孔吸光度值。

1.5 细胞周期测定

细胞经上述处理培养 36 h, 用胰蛋白酶消化收集细胞后离心, 弃上清, PBS 洗涤 2 次, 70% 冷乙醇 (4℃) 固定, 储存于 4℃ 冰箱中备检。染色前以 PBS 离心沉淀去除固定液, 加入 PI/RNase 染液, 避光染色 30 min, 流式细胞仪进行细胞周期测定。

1.6 Cyclin D1 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 溶于少量无

RNase 水中, 紫外分光光度计测定其浓度和纯度。Cyclin D1 上游 5'-CGC CTT CCG TTT CTT ACT TCA-3', 下游 5'-AAC TTC TCG GCA GTC AGG GGA-3', 扩增产物长度 251 bp β-actin 上游 5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG AT-3', 下游 5'-TTG CTG ATC CAC ATC TGC TG-3', 扩增产物长度 145 bp 反应体系为 25 μL。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 50 s, 57℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 50 s, 35 次循环后再 72℃ 延伸 5 min。取 5 μL 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统记录电泳结果, 以目的基因与内参照的灰度面积比值为半定量资料进行统计分析。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 同型半胱氨酸和 MK801 对血管平滑肌细胞增殖的影响

Hcy 显著促进 VSMC 增殖, 但该增殖可被 NM-DA 受体拮抗剂 MK801 所抑制, 且 MK801 的抑制效应呈明显的量效关系 (表 1)。

表 1 MTT 法所测 VSMC 细胞增殖 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	OD 值	增殖率
空白对照组	0.205 ± 0.011	100%
Hcy 组	0.507 ± 0.040	247.3% ± 55.7% ^a
Hcy+ 10 μmol/L MK801 组	0.346 ± 0.158	168.8% ± 12.6% ^b
Hcy+ 50 μmol/L MK801 组	0.247 ± 0.022	120.5% ± 34.5% ^b
Hcy+ 100 μmol/L MK801 组	0.217 ± 0.019	105.9% ± 29.9% ^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 Hcy 组比较。

2.2 同型半胱氨酸和 MK801 对血管平滑肌细胞周期的影响

加入 100 μmol/L Hcy 36 h 后, G₀/G₁ 期细胞减少, 而 S 期细胞增加。而 MK801 抑制 Hcy 对 VSMC 从 G₁ 期进入 S 期 (表 2)。

表 2 Hcy 和 MK801 对 VSMC 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ M
空白对照组	85.33% ± 0.71%	7.57% ± 2.72%	7.10% ± 2.23%
Hcy 组	72.37% ± 5.88% ^a	19.10% ± 1.87% ^a	8.53% ± 4.30%
Hcy+ 10 μmol/L MK801 组	78.47% ± 1.25% ^b	14.17% ± 3.79%	7.37% ± 2.70%
Hcy+ 50 μmol/L MK801 组	80.30% ± 1.31% ^c	11.03% ± 3.80% ^b	8.67% ± 3.70%
Hcy+ 100 μmol/L MK801 组	83.30% ± 0.56% ^c	10.00% ± 4.10% ^c	6.70% ± 3.76%

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 Hcy 组比较。

2.3 同型半胱氨酸和 MK801 对血管平滑肌细胞 Cyclin D1 mRNA 表达的影响

Hcy 组 Cyclin D1 mRNA 表达显著上调, 而经 MK801 干预后, Cyclin D1 mRNA 表达逐渐下降 (图 1 和表 3)。

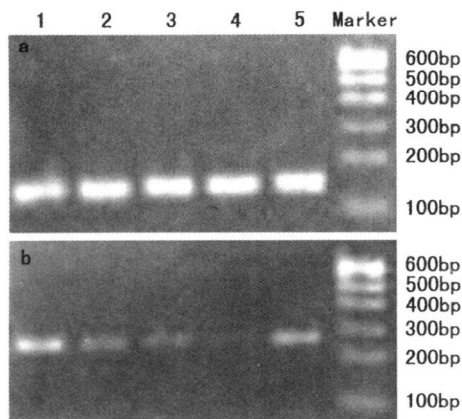


图 1 Hcy 和 MK801 对 VSMC Cyclin D1 mRNA 表达的影响

a 为 β -actin, b 为 Cyclin D1; 1 为 Hcy 组, 2 为 Hcy + 10 μ mol/L MK801 组, 3 为 Hcy + 50 μ mol/L MK801 组, 4 为 Hcy + 100 μ mol/L MK801 组, 5 为空白对照组。

表 3 Hcy 和 MK801 对 VSMC Cyclin D1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	Cyclin D1/ β -actin
空白对照组	1.80 \pm 0.07
Hcy 组	2.33 \pm 0.18 ^a
Hcy + 10 μ mol/L MK801 组	1.48 \pm 0.10 ^b
Hcy + 50 μ mol/L MK801 组	1.15 \pm 0.06 ^b
Hcy + 100 μ mol/L MK801 组	0.31 \pm 0.02 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 Hcy 组比较。

3 讨论

VSMC 增殖是 As 最主要的病理特征之一, 而 Hcy 具明显地促 VSMC 增殖的特性。有研究报道, Hcy 引起 VSMC 雌激素受体 α (ER α) 基因启动子区的甲基化程度升高, 并下调 ER α mRNA 和蛋白的表达, VSMC 在 Hcy 作用下随着 ER α 活性的下降而出现增殖, 认为 Hcy 对 ER α 的抑制与其促 VSMC 增殖相关^[3]。生育年龄的妇女由于较高的雌激素水平而显示对 As 的抗性可能与此有关^[4], 但在男性, Hcy 是否仍主要经由抑制 ER α 通路促进 VSMC 增殖尚待证实。

NMDA 受体作为一种兴奋性氨基酸受体, 主要

配体为谷氨酸, 在中枢神经系统功能的研究中受到广泛的关注, 被认为与学习、记忆、中枢神经系统疼痛的传导、大脑创伤后神经元的死亡及术后 (麻醉后) 认知障碍 (POCD) 等有重要关系。Hcy 亦可经由 NMDA 受体的激活而与心衰、卒中等相关^[5,6]。Hcy 可否经由 NMDA-R 通路刺激 VSMC 增殖? 本研究结果发现, Hcy 对 VSMC 增殖的促进效应可被 NMDA 受体拮抗剂 MK801 显著抑制, 且 MTT 法和流式细胞术的结果显示出高度的一致性, 表明 Hcy 对 VSMC 的促增殖效应至少部份是经由 NMDA 受体通路, 且该效应在细胞周期的作用位点应在 G1 \rightarrow S 期的转换。细胞周期 G1 \rightarrow S 期的转换调控因子主要有: 正调控因子如 Cyclin-D-CDK4/6 和 Cyclin-E-CDK2 负调控因子、抑癌基因 Rb 和 P16 产物。本研究结果发现, Hcy 促进 Cyclin D1 mRNA 的表达增加, 而 NMDA 受体拮抗剂 MK801 则显著抑制 Cyclin D1 mRNA 的表达, 表明 Hcy 诱导 VSMC 增殖很可能部份经由 NMDA 受体-Cyclin D 通路。

细胞周期是细胞增殖的效应环节, 因此, Hcy 对 Cyclin D1 的影响是 Hcy 诱导 VSMC 增殖的关键环节。在本研究的剂量范围内, MK801 仅能部份阻断 Hcy 诱导的 VSMC 增殖及其 G1 \rightarrow S 期转换, 表明 Hcy 诱导 VSMC 增殖可能部份经由 NMDA 受体-Cyclin D 通路实现。

[参考文献]

- [1] Poddar R, Paul S. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal regulated kinase leads to neuronal cell death [J]. *Neurochem*, 2009, **110** (3): 1095-106.
- [2] Doronzo G, Russo I, DelMese P, et al. Role of NMDA receptor in homocysteine-induced activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in cultured human vascular smooth muscle cells [J]. *Thromb Res*, 2009 [Epub ahead of print].
- [3] Yushan HUANG, Kejun PENG, Juan SU, et al. Different effects of homocysteine and oxidized low density lipoprotein on methylation status in the promoter region of the estrogen receptor gene [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2007, **39** (1): 19-26.
- [4] 孙明晓, 郭立新, 周迎生, 等. 男性及绝经后女性雌激素受体基因多态性与糖尿病大血管病变的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 189-193.
- [5] DiMicco J, Monroe AJ. Stimulation of metabotropic glutamate receptors in the dorsomedial hypothalamus elevate heart rate in rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1996, **270** (5): R1115-121.
- [6] Folbergrova J. NMDA and not non-NMDA receptor antagonists are protective against seizures induced by homocysteine in neonatal rats [J]. *Exp Neurol*, 1994, **130** (2): 344-350.

(此文编辑 文玉珊)