

香烟提取物对人脐静脉内皮细胞蛋白亚硝基化的影响及机制

陈玉龙, 贾敏

(陕西省缺血性心血管疾病重点实验室 西安医学院基础与转化医学研究所, 陕西省西安市 710021)

[关键词] 香烟提取物; 人脐静脉内皮细胞; 超氧阴离子; 蛋白亚硝基化

[摘要] **目的** 探讨香烟提取物(CSE)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)蛋白亚硝基化的影响。**方法** 以HUVEC为体外模型,利用免疫荧光染色对细胞蛋白亚硝基化进行检测,并用生物素转化方法对荧光结果进行验证;利用Western blot对蛋白进行了检测;另外,在实验过程中,对超氧阴离子水平也进行了检测。**结果** 不同浓度CSE(0.005%、0.01%、0.02%和0.04%)均能够明显减少蛋白的亚硝基化水平,且随着浓度增加,蛋白亚硝基化水平减少越明显。NO供体药物硝普钠(SNP)、内源性供体亚硝基谷胱甘肽(GSNO)、长效NO供体NO亲和复合体(NONOate)和NADPH氧化酶抑制剂加拿大麻素均能够恢复被CSE所导致的蛋白亚硝基化减少。另外,CSE能够增加超氧阴离子水平,这种作用能够被加拿大麻素所抑制。**结论** CSE能够减少HUVEC蛋白亚硝基化水平。这种作用与其激活NDAPH氧化酶所引起的超氧阴离子积聚和NO产生通路的阻断有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Cigarette Smoke Extracts on Protein S-Nitrosylation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Its Mechanism

CHEN Yu-Long, and JIA Min

(Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Disease & Institute of Basic and Translational Medicine of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China)

[KEY WORDS] Cigarette Smoke Extracts; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Superoxide Anion; Protein S-Nitrosylation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of cigarette smoke extracts (CSE) on protein S-nitrosylation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** The experiments performed in HUVEC. The levels of protein S-nitrosylation were analyzed by using immunofluorescence, and further confirmed by biotin switch method. Protein expression was analysed by Western blot. In addition, superoxide anion were also detected during the experiment. **Results** CSE (0.005%, 0.01%, 0.02% and 0.04%) reduced the levels of protein S-nitrosylation in dose-dependent manner. Sodium nitroprusside (SNP), nitrosoglutathione (GSNO), NONOate and apocnin restored the reduction of protein S-nitrosylation induced by CSE. Moreover, CSE increased levels of superoxide anion, which were inhibited by apocnin.

Conclusion In HUVEC, CSE is able to reduce the protein S-nitrosylation level, which is associated with superoxide anion accumulation and nitric oxide (NO) pathway blockage.

亚硝基化(S-nitrosylation)是一氧化氮(nitric oxide, NO)与蛋白的半胱氨酸巯基共价键可逆性结合,形成亚硝基硫醇的过程^[1]。这是细胞信号传导过程中重要的翻译后蛋白修饰过程。在内皮细胞中,蛋白的亚硝基化参与多种生物学功能,如激活

离子通道、抗氧化应激、抗凋亡和抗炎等^[2]。多种心血管危险因素(如肿瘤坏死因子 α ^[3]、氧化型低密度脂蛋白^[3]、高糖^[4]和同型半胱氨酸^[5])均能够通过下调内皮细胞蛋白亚硝基化水平,导致内皮损伤,触发动脉粥样硬化的发生。吸烟是引起心血管

[收稿日期] 2015-08-07

[修回日期] 2015-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金(81500350);陕西省教育厅自然科学基金专项基金(14JK1630);西安医学院博士科研启动基金资助(2015DOC24)

[作者简介] 陈玉龙,博士后,讲师,主要从事动脉粥样硬化机制研究,E-mail 为 chenylong.0901@stu.xjtu.edu.cn。贾敏,硕士,讲师,主要从事缺血性心血管疾病药理学研究,E-mail 为 jecita2004@hotmail.com。

疾病的重要危险因素之一^[6]。吸烟所产生的烟雾颗粒含有 4000 种以上化学成分,其中包括尼古丁、一氧化碳、丙烯醛及多种氧化剂等^[7-8]。研究显示,内皮细胞损伤可能是吸烟促进心血管疾病发生发展的重要机制。氧化应激所导致的 NO 水平下调在其中发挥至关重要的作用^[9]。已有文献报道,水溶性香烟提取物(cigarette smoke extracts, CSE)能够通过诱导活性氧的产生,抑制 NO 的水平,引起内皮细胞的损伤^[10]。然而,其详细机制尚不清楚。因此,本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究模型,通过检测总蛋白的亚硝基化水平,深入探讨 CSE 诱导内皮损伤机制,这将为吸烟引起的内皮细胞损伤研究提供新视角。

1 材料与方法

1.1 HUVEC 的培养

取健康胎儿剖宫产的脐带,用 PBS 冲洗脐静脉至无血迹,注入 I 型胶原酶(1 g/L),37℃ 消化 15 min 后,用无血清的 M199 溶液冲洗,液体一并收集入离心管,1500 r/min 离心 5 min 后弃去上清,用 M199 完全培养基调整细胞浓度后置于培养瓶中培养。细胞作用前饥饿 20 h,利用免疫荧光染色技术对细胞进行血管性假血友病因子(von Willebrand factor, vWF)鉴定。实验所用为 2~3 代细胞^[5]。该研究得到西安医学院伦理委员会的许可。

1.2 免疫荧光染色

细胞爬片后,丙酮固定 10 min, Triton X-100 透化 10 min, 5% 的山羊血清封闭 30 min, 滴加抗亚硝基化的半胱氨酸多克隆抗体或抗 vWF 单克隆抗体, 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 避光滴加标记 FITC 的二抗, 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 封片, 荧光显微镜照相。

1.3 CSE 的制备

根据参考文献^[10]制备 CSE, 具体方法如下: 将香烟(品牌: 万宝路)去除过滤嘴后, 插入特殊塑料管道口内(管道含一金属圈通), 其中塑料管道另一端与真空泵相连, 打开真空泵, 同时点燃香烟, 抽取所有烟雾颗粒, 最后, 将两根香烟所收集的烟雾颗粒直接缓慢注入 50 mL 的 M199 培养基中, 氢氧化钠调节 pH 值至 7.4 后, 0.22 μmol/L 滤器过滤除菌即可获得浓度为 10% 的 CSE 溶液。最后, 分别利用 M199 培养基将所得 10% CSE 溶液稀释成终浓度为 0.005%、0.01%、0.02% 和 0.04% 溶液对细胞进行

处理后, 检测相应指标。

1.4 超氧阴离子检测

细胞内超氧阴离子通过超氧阴离子荧光探针(购自碧云天生物技术研究所在所)进行检测。实验步骤按照试剂说明书进行。

1.5 Western blot

提取细胞蛋白, 并对其进行定量, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 湿转 60 min, 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h, 抗 β-actin 或抗生物酰化抗体孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 加 HRP 标记的二抗 37℃ 孵育 60 min, 最后利用 ECL 显色, 照相。

1.6 生物素转化方法

在避光条件下先提取细胞蛋白, 并对其进行定量, 利用缓冲液调整相同蛋白浓度。利用 MMTS 阻断自由巯基, 同时加入维生素 C 和 bio-HPDP 溶液, 以利用 bio-HPDP 取代 MMTS, 至此将易分解的亚硝基化蛋白转化成稳定的生物酰化的蛋白。检测生物酰化的蛋白即可间接反映亚硝基化蛋白水平。最后, 利用 Western blot 检测生物素化蛋白^[5]。

2 结果

2.1 HUVEC 细胞形态及鉴定

我们成功提取原代的 HUVEC, 细胞培养 7 天左右, 倒置显微镜下可观察到贴壁生长的原代内皮细胞呈典型的铺路石样排列(图 1A)。vWF 是 HUVEC 表面特异性因子, 据此我们利用免疫荧光(vWF 因子)对 HUVEC 进行了鉴定。结果显示, 细胞胞浆均呈现绿色荧光, 整个细胞轮廓清楚, 证实培养的细胞为内皮细胞, 且纯度较高。这表明我们培养的细胞为 HUVEC(图 1B)。

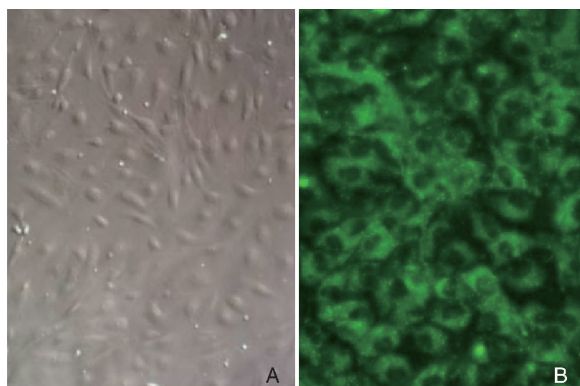


图 1. HUVEC 典型的细胞形态及鉴定 A 为 HUVEC 光镜下的细胞形态(100×), B 为 HUVEC 表面特异性因子 vWF 的免疫荧光染色(200×)。

Figure 1. Morphology and identification of HUVEC

2.2 CSE 对 HUVEC 蛋白亚硝基化的影响

我们利用不同浓度的 CSE 对 HUVEC 处理 24 h,免疫荧光检测细胞的蛋白亚硝基化水平(荧光强弱表示表达的高低),并利用生物素转化方法对荧光结果进行了验证。结果显示,不同浓度 CSE

(0.005%、0.01%、0.02%和 0.04%)均能够明显减少蛋白的亚硝基化水平,且剂量越大,其蛋白亚硝基化水平越少(图 2A)。最后,生物素转化(全条带灰度的深浅表示 HUVEC 总蛋白亚硝基化水平的高低)的结果也验证了我们的发现(图 2B)。

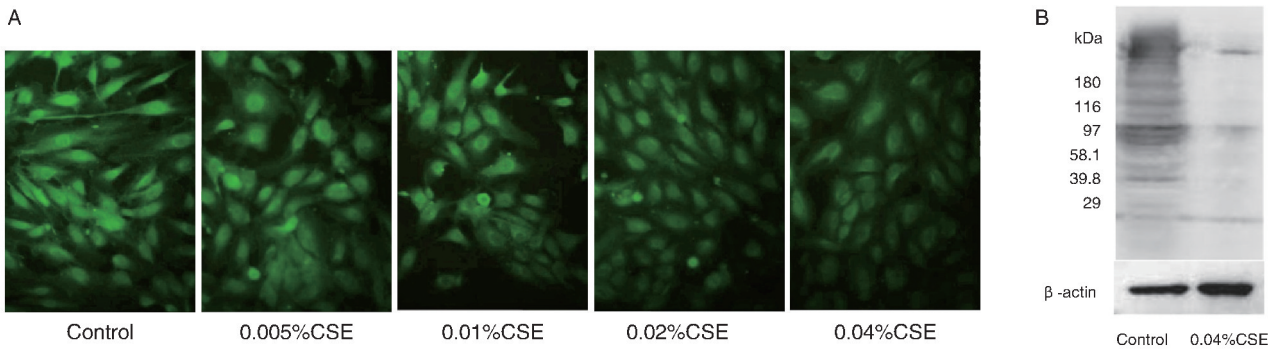


图 2. CSE 下调 HUVEC 蛋白亚硝基化水平 A 为亚硝基化半胱氨酸免疫荧光染色检测整体细胞蛋白亚硝基化水平(200×,n=3);B 为生物素转化方法对免疫荧光(0.04%CSE)结果的验证(n=3)。

Figure 2. The CSE attenuated protein S-nitrosylation in HUVEC

2.3 CSE 通过 NO 通路影响 HUVEC 蛋白亚硝基化水平

为了观察 NO 在 CSE 下调蛋白亚硝基化水平的作用,我们分别利用 NO 供体药物硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)(100 μmol/L)^[10]、内源性供体亚

硝基谷胱甘肽(nitrosoglutathione, GSNO)(100 μmol/L)^[5]和长效 NO 供体 NO 亲和复合体(NONOate)(100 μmol/L)^[11]与 CSE 共同处理 HUVEC 24 h,结果表明,CSE 所引起的蛋白亚硝基化水平减少能够被 SNP、GSNO 和 NONOate 所完全恢复(图 3)。

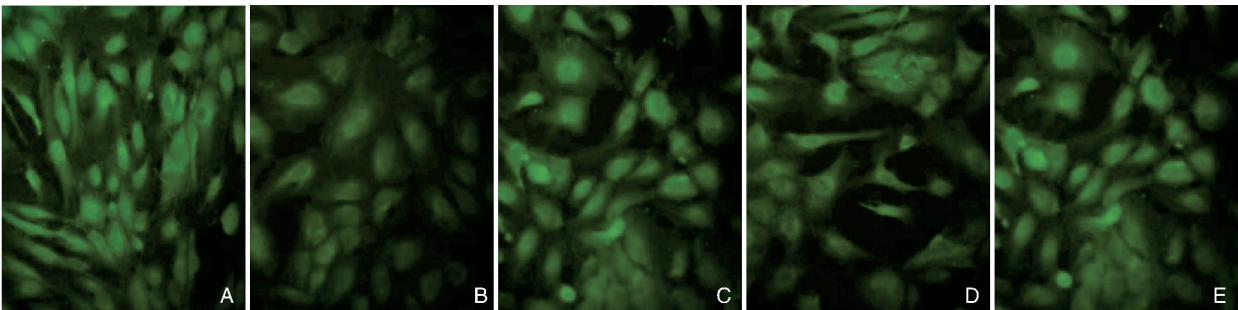


图 3. 不同 NO 供体能够恢复 CSE 所下调的蛋白亚硝基化水平(200×,n=3) A 为对照组,B 为 0.04% CSE 组,C 为 0.04% CSE+SNP 组,D 为 0.04% CSE+GSNO 组,E 为 0.04% CSE +NONOate 组。

Figure 3. The different NO donors could restore levels of protein S-nitrosylation down-regulated by CSE (200×,n=3)

2.4 CSE 对 HUVEC 中超氧阴离子的影响

为了探讨 NADPH 氧化酶在 CSE 引起的 HUVEC 超氧阴离子聚集作用中的影响,我们利用 NADPH 氧化酶抑制剂加拿大麻素(500 μmol/L)和 CSE 共同处理细胞。结果表明,CSE 明显增加超氧阴离子水平,这种作用能够被加拿大麻素所抑制(图 4)。

2.5 超氧阴离子在 CSE 影响 HUVEC 蛋白亚硝基化中的作用

为了探讨超氧阴离子在 CSE 下调 HUVEC 蛋白亚硝基化水平中的作用,我们利用加拿大麻素(500 μmol/L)和 CSE 共同处理细胞^[4]。结果表明,加拿大麻素能够恢复 CSE 所导致的蛋白亚硝基化水平减少(图 5)。

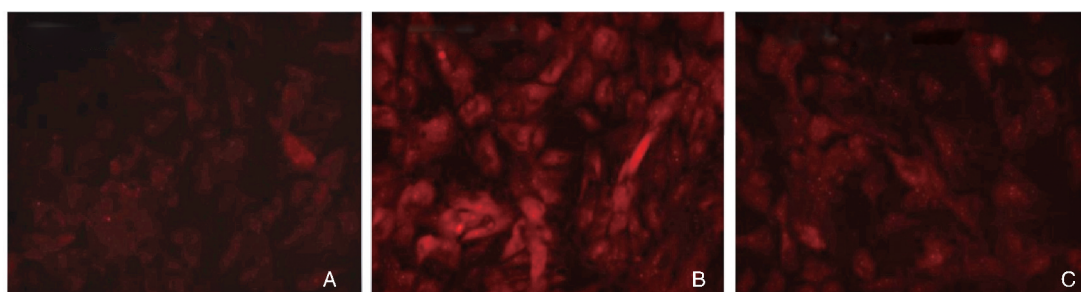


图 4. 加拿大麻素能够抑制 CSE 引起的细胞内超氧阴离子聚集 (200 \times , $n=3$) A 为对照组, B 为 0.04% CSE 组, C 为 0.04% CSE+加拿大麻素组。

Figure 4. The apocninin could inhibit superoxide anion accumulation induced by CSE (200 \times , $n=3$)

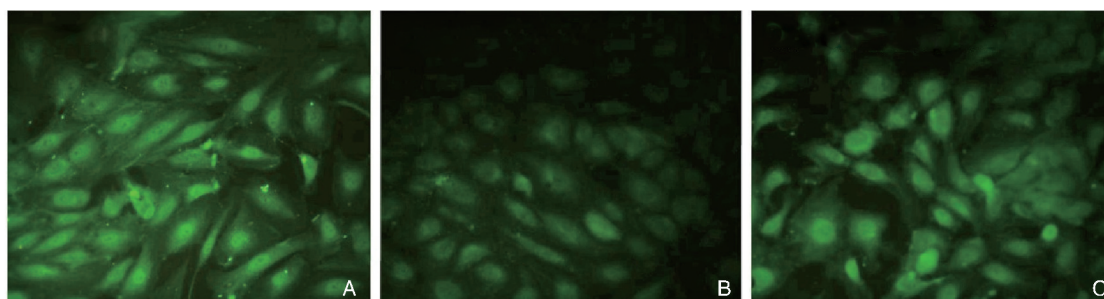


图 5. 加拿大麻素能够恢复 CSE 所导致的蛋白亚硝基化水平减少 (200 \times , $n=3$) A 为对照组, B 为 0.04% CSE 组, C 为 0.04% CSE+加拿大麻素组。

Figure 5. The apocninin could restore reduction of protein S-nitrosylation level induced by CSE in HUVEC (200 \times , $n=3$)

3 讨论

当前的研究表明, CSE 处理 HUVEC 时, 随着其剂量的增加, 细胞总蛋白亚硝基化水平减少。其机制可能与 NADPH 氧化酶/超氧阴离子/NO 信号通路有关。我们的研究结果显示, CSE 通过激活 NADPH 氧化酶产生超氧阴离子, 从而抑制内皮细胞 NO 的产生, 进而下调蛋白的亚硝基化水平。据已有文献报道, 本研究在国内外还属首次。

NO 是保护内皮功能完整性的重要调控因子, NO 生物利用度的减少参与多种疾病引起的内皮细胞功能障碍。NO 对蛋白亚硝基化修饰是其主要机制。蛋白的亚硝基化是机体广泛存在的调控多种生物学功能的翻译后修饰过程。迄今为止, 在内皮细胞中已鉴定出 100 多种亚硝基化蛋白^[2]。

以往研究表明, CSE 能够减少 NO 生物利用度, 诱导内皮细胞功能障碍^[10]。在当前的研究中, 我们发现, CSE 能够以剂量依赖的方式减少 HUVEC 的蛋白亚硝基化水平。这种作用能够同时被内源性 NO 供体 GSNO 和外源性 NO 供体 NONoate 所完全恢复。因此, 我们认为, CSE 通过减少 NO 的生物利用度, 下调内皮细胞的亚硝基化水平。

另外, CSE 还能够促进氧化应激, 诱导内皮细胞功能障碍和损伤。研究表明, CSE 通过激活 NADPH 氧化酶活性, 引起超氧阴离子在内皮细胞内积聚^[12]。我们的研究结果表明, CSE 能够明显促进超氧阴离子在细胞内的积聚, 而这种作用能够被 NADPH 氧化酶的抑制剂加拿大麻素所抑制。这说明 CSE 是通过激活 NADPH 氧化酶, 促进氧化应激。这与以前的报道一致^[12]。另外, 研究者还发现, CSE 还通过激活氧化应激通路, 减少内皮细胞 NO 的产生^[10]。基于此, 我们探讨了 CSE 所引起的氧化应激与内皮细胞亚硝基化的关系。我们发现 CSE 所导致的蛋白亚硝基化减少, 能够被加拿大麻素所恢复。这表明, CSE 引起的内皮细胞亚硝基化减少与 NADPH 氧化酶的激活所导致超氧阴离子积聚, 以及最终引起的 NO 产生通路阻断有关。

综上所述, 我们的研究显示, CSE 能够减少 HUVEC 蛋白亚硝基化水平。其机制可能与 CSE 激活 NADPH 氧化酶所引起的超氧阴离子积聚和 NO 产生通路的阻断有关。该研究将为吸烟诱导内皮功能障碍机制提供新视角。

(下转第 938 页)

- and endothelial progenitor cell function [J]. *J Hum Hypertens*, 2011, 25: 57-62.
- [7] Duda DG, Fukumura D, Rakesh KJ. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10: 143-145.
- [8] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to post-natal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 3 964-972.
- [9] 周音频, 黄 岚, 宋耀明, 等. 粒细胞集落刺激因子动员骨髓内皮祖细胞促进损伤血管内皮修复[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (3): 169-172.
- [10] Forte P, Kneale BJ, Milne E, et al. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men[J]. *Hypertension*, 1998, 32: 730-734.
- [11] James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8)[J]. *JAMA*, 2014, 311 (5): 507-520.
- [12] Yang Z, Xia WH, Zhang YY, et al. Shear stress-induced activation of Tie2-dependent signaling pathway enhances in vivo re-endothelialization capacity of human endothelial progenitor cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52 (5): 1 155-163.
- [13] Yang Z, Xia WH, Su C, et al. Regular exercise-induced upregulation of circulating endothelial progenitor cells attenuated age-related decline in arterial elasticity in healthy men [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 165 (2): 247-254.
- [14] Kissel CK, Anderson TJ. Role of endothelin-1 and endothelial dysfunction in prehypertension [J]. *Can J Cardiol*, 2012, 28: 251-253.
- [15] DiStefano R, Barsotti MC, Felice F, et al. Endothelial progenitor cells in prehypertension[J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17 (28): 3 002-019.
- [16] Weil BR, Stauffer BL, G reiner JJ, et al. Prehypertension is associated with impaired nitric oxide-mediated endothelium dependent vasodilation in sedentary adults[J]. *Am J Hypertens*, 2011, 24 (9): 976-981.
- [17] Alexandra A, Christopher H, Dim meler S. The role of NOS3 in stem cell mobilization[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10: 421-425.
- [18] Sorrentino SA, Bahlmann FH, B esler C, et al. Oxidant stress impairs in vivo reendothelializa tion capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restorat ion by the peroxisome proliferator-activated receptor agonist rosiglitazone[J]. *Circulation*, 2007, 116: 163-173.
- [19] Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al. Estrogen-mediated endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury[J]. *Circulation*, 2003, 108: 3 115-121.
- [20] Zago AS, Park JY, Fenty-Stewart N, et al. Effects of aerobic exercise on the blood pressure, oxidative stress and eNOS gene polymorphism in prehypertensive older people[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2010, 110 (4): 825-832.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 892 页)

[参考文献]

- [1] Yang L, Calay ES, Fan J, et al. S-Nitrosylation links obesity-associated inflammation to endoplasmic reticulum dysfunction [J]. *Science*, 2015, 349(6247): 500-506.
- [2] Maron BA, Tang SS, Loscalzo J. S-nitrosothiols and the S-nitroso proteome of the cardiovascular system [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(3): 270-827.
- [3] Hoffmann J, Haendeler J, Zeiher AM, et al. TNF alpha and oxLDL reduce protein S-nitrosylation in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(44): 41 383-387.
- [4] Wadham C, Parker A, Wang L, et al. High glucose attenuates protein S-nitrosylation in endothelial cells: role of oxidative stress [J]. *Diabetes*, 2007, 56(11): 2 715-721.
- [5] Chen Y, Zhao S, Wang Y, et al. Homocysteine reduces protein S-nitrosylation in endothelium [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(5): 1 277-285.
- [6] Barua RS, Ambrose JA. Mechanisms of coronary thrombosis in cigarette smoke exposure[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (7): 1 460-467.
- [7] Xu CB, Lei Y, Chen Q, et al. Cigarette smoke extracts promote vascular smooth muscle cell proliferation and enhances contractile responses in the vasculature and airway [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107(6): 940-948.
- [8] Csordas A, Bernhard D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2013, 10 (4): 219-230.
- [9] Guarino F, Cantarella G, Caruso M, et al. Endothelial activation and injury by cigarette smoke exposure [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2011, 25(2): 259-268.
- [10] Michaud SE, Dussault S, Groleau J, et al. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(2): 275-284.
- [11] Chen Y, Liu R, Zhang G, et al. Hypercysteinemia promotes atherosclerosis by reducing protein S-nitrosylation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 70: 253-259.
- [12] Orosz Z, Csiszar A, Labinskyy N, et al. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(1): H130-H139.
- (此文编辑 许雪梅)