

EC-SOD 在同型半胱氨酸致单核细胞源性巨噬细胞氧化应激中的作用研究

和 杨 杨¹, 马 胜 超¹, 刘 现 梅¹, 孔 繁 琪¹, 郭 伟¹, 王 楠¹, 贾 月 霞¹, 杨 晓 明¹, 金 少 举², 姜 怡 邓¹, 曹 军¹

(宁夏医科大学 1.基础医学院, 2.药学院, 宁夏银川市 750004)

[关键词] 细胞外超氧化物歧化酶; 同型半胱氨酸; 巨噬细胞; 氧化应激

[摘要] **目的** 探讨细胞外超氧化物歧化酶(EC-SOD)在同型半胱氨酸(Hcy)致巨噬细胞氧化应激中的作用及机制。**方法** 将 THP-1 单核细胞用佛波酯刺激 48 h 后演变成巨噬细胞, 用 0、50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 作用细胞 72 h, 并加设叶酸+维生素 B12(VitB12)干预组(100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy+30 $\mu\text{mol/L}$ 叶酸+30 $\mu\text{mol/L}$ VitB12)。微板法检测氧化应激指标(H_2O_2 、 O_2^- 、 OH^-)的变化; 实时荧光定量 PCR 检测巨噬细胞中 EC-SOD 的 mRNA 表达水平; Western blot 检测巨噬细胞中 EC-SOD 的蛋白表达水平; EC-SOD 测定试剂盒检测 EC-SOD 活性。分别构建 EC-SOD 重组质粒和干扰质粒转染细胞, 检测 EC-SOD 的 mRNA 及蛋白的表达水平以及超氧阴离子的表达。**结果** 与对照组相比, 100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 H_2O_2 、 OH^- 活性显著增高 ($P<0.01$), EC-SOD mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P<0.01$)。与对照组相比, 100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 EC-SOD 活性分别下降了 13.92%、8.62%、10.32% ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组相比, 叶酸+VitB12 干预组 EC-SOD mRNA 的表达升高了 47%。分别转染 EC-SOD 重组质粒和干扰质粒后, 与 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组相比, EC-SOD 重组组 O_2^- 含量降低了 63.89%, 干扰片段-596 组 O_2^- 含量则增加了 33.59% ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** EC-SOD 参与了 Hcy 导致的单核细胞源性巨噬细胞的氧化应激。在抑制 Hcy 诱导动脉粥样硬化的过程中, EC-SOD 可能发挥着重要的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of extracellular superoxide dismutase on oxidative stress induced by homocysteine in monocyte-derived macrophages

HE Yang-Yang¹, MA Sheng-Chao¹, LIU Xian-Mei¹, KONG Fan-Qi¹, GUO Wei¹, WANG Nan¹, JIA Yue-Xia¹, YANG Xiao-Ming¹, JIN Shao-Ju², JIANG Yi-Deng¹, CAO Jun¹

(1.School of Basic Medical Sciences, 2.College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Extracellular superoxide dismutase; Homocysteine; Macrophage; Oxidative stress

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) on oxidative stress induced by homocysteine (Hcy) in macrophages and its mechanism. **Methods** THP-1 monocyte was stimulated by phorbol ester for 48 hours and evolved into macrophages. The macrophages were dealt with 0, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy for 72 hours, and adding a folate acid+vitamin B12 (VitB12) intervention group (100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy+30 $\mu\text{mol/L}$ folate acid+30 $\mu\text{mol/L}$ VitB12). The changes of oxidative stress indexes (H_2O_2 , O_2^- , OH^-) were detected by microplate test. The mRNA expression of EC-SOD was detected by real-time fluorescence quantitative PCR and the protein expression of EC-SOD was detected by Western blot in macrophages. EC-SOD assay kit was used for detecting EC-SOD activity. EC-SOD recombinant plasmid and interfering plasmid were constructed and transfected into cells, and expressions of EC-SOD mRNA, protein and superoxide anion were detected in macrophages. **Results** Compared with the control group, H_2O_2 and OH^- activities were significantly increased, and EC-SOD mRNA and protein expressions were significantly decreased in 100, 200, 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group ($P<0.01$). Compared with the control group, the EC-SOD activity was respectively

[收稿日期] 2016-03-22

[修回日期] 2016-04-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360052、81560084、81460080); 2014 年度校级优势学科群项目(XY201415)

[作者简介] 和 杨 杨, 硕士研究生, 主要从事心血管病理生理研究, E-mail 为 863523972@qq.com。通讯作者曹军, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病理生理研究, E-mail 为 jydcan@126.com。

decreased by 13.92%, 8.62%, 10.32% in 100, 200, 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group, the expression of EC-SOD mRNA was increased by 47% in folate acid+VitB12 intervention group. After transfection of EC-SOD recombinant plasmid and interfering plasmid, compared with the 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group, O_2^- content was decreased by 63.89% in EC-SOD recombinant group, while O_2^- content was increased by 33.59% in interfering fragment -596 group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** EC-SOD is involved in the oxidative stress induced by Hcy in monocyte-derived macrophages. EC-SOD may play an important role in the inhibition of atherosclerosis induced by Hcy.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)所致的心脑血管疾病是当今严重危害人类生命健康的疾病,是发展中国家和发达国家主要的致死、致残原因^[1-2],因此关于As发生、发展的分子机制日益受到国内外学者的重视。As是由多种遗传和环境因素在多层次上综合作用的复杂病变,在其众多的致病因素中,氧化应激与As的发生发展密切相关^[3]。流行病学和临床病例证实,血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)升高是As发生发展的独立危险因素^[4],Hcy在代谢过程中其含有的巯基(-SH)可自动氧化生成活性氧——过氧化氢(H_2O_2)、超氧化物阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基(OH^-),使体内氧化物质含量升高,打破了氧化与抗氧化的平衡,进一步发生氧化应激^[5]。提示氧化应激可能是Hcy致As的重要发病机制之一。在机体抗氧化酶防御体系中,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)在抗氧化损伤方面发挥着重要的作用,超氧阴离子自由基在它的催化作用下能够产生歧化反应而被清除,保护细胞免受自由基的攻击和损害^[6-7]。SOD家族主要包括Cu/Zn-SOD、Mn-SOD及细胞外超氧化物歧化酶(extracellular superoxide dismutase, EC-SOD),目前针对EC-SOD的研究尚未受到足够的重视,EC-SOD作为由巨噬细胞分泌、是唯一分布在细胞外发挥抗氧化功能的酶,在Hcy致As中,EC-SOD是否受到了Hcy的调控并改变了其表达及其具体的作用目前尚不完全清楚。因此,本研究旨在探讨Hcy致巨噬细胞参与As形成过程中是否发生了氧化应激,以及Hcy是否可通过调控EC-SOD的表达与活性诱导巨噬细胞氧化应激。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

CO_2 培养箱(德国 Heraeus 公司);BX51TF型荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Mastercycler® gradient 梯度PCR仪(美国 Perkin-Elmer 公司);FTC-3000 荧光定量基因扩增仪(加拿大峰岭公司);高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司);凝胶成像

系统(美国 Bio-Rad 公司);BS110S 型精密天平(德国 Sartorius 公司);Model G-560 涡旋振荡器(Scientific Industries Inc);5415D 型微量台式离心机(德国 Eppendorf 公司);相差显微镜(日本 Nikon 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)等。Hcy、佛波酯、二甲基亚砷(德国 Sigma 公司);RNA 提取 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);Taq DNA 聚合酶、dNTP (Takara 公司);DNA 纯化回收试剂盒(Axygen 公司);逆转录试剂盒、荧光PCR试剂盒(英国 Fermentas 公司); O_2^- 、 OH^- 、 H_2O_2 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);EC-SOD 抗体(Abcam 公司);FITC 标记山羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);基因引物全部由上海生工生物有限公司合成。

1.2 细胞培养及分组

从液氮罐中取出冻存的 THP-1 单核细胞株,迅速置于 37°C 水浴中,连续晃动使之均匀受热,待完全溶解后加入适量 RPMI-1640 培养基,1500 r/min 离心 3 min,弃去上清;加入 5 mL 含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,转移至细胞培养瓶中,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养;待细胞增殖到一定数量后传代,于 25 cm^2 培养瓶中接种,细胞数约为 4×10^6 个;每瓶加入 500 nmol/L 佛波酯 6 mL,于 37°C 、5% CO_2 的环境下培养 48 h。光学显微镜下观察细胞呈贴壁状态,形态不规则且有伪足伸出,证实 THP-1 单核细胞已分化成为巨噬细胞。将细胞分别置于浓度为 0(对照组)、50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 和 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy+30 $\mu\text{mol/L}$ 叶酸+30 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 B12(vitamin B12, VitB12)(叶酸+VitB12 干预组)的培养液中孵育 72 h,以备实验使用。

1.3 EC-SOD 活性检测及 H_2O_2 、 OH^- 、 O_2^- 检测

操作方法均按照南京建成生物工程公司提供的检测试剂盒说明书进行。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测 EC-SOD 的 mRNA 表达

采用 Primer 5.0 软件设计引物:EC-SOD 引物上游:5'-AATGATAGCCCTTGC-3',下游:5'-TTCCCAAATGAGCC-3',扩增产物长度 132 bp。GAPDH 引物上游:

5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTC-3',下游:5'-AGGGGC-CACAGTCTTC-3',扩增产物长度 146 bp。收集各组细胞,Trizol 抽提细胞总 RNA,按说明书逆转录合成 cDNA,用以下条件进行 PCR:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 45 s,46℃ 退火 45 s,72℃ 延长 45 s,扩增 50 个循环。实验结果根据宁夏医科大学心脑血管重点实验室的计算方法^[8]获得目的基因的相对表达量。

1.5 Western blot 检测 EC-SOD 的蛋白表达

按凯基全蛋白提取试剂盒提取各组细胞蛋白,以 BCA 法测蛋白浓度;取等量蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳;转膜,封闭后,加入一抗(1:500),4℃ 过夜;辣根过氧化物酶(1:5000)作用 2 h 后曝光。用 Bio-Rad Quantity 4.5.2 软件分析测定其区带的感光密度,以 EC-SOD 的灰度值与 β -actin 灰度值的比值作为 EC-SOD 蛋白表达水平。

1.6 EC-SOD 的基因组载体构建及细胞转染

Trizol 抽提巨噬细胞总 RNA 作为模板,EC-SOD 基因编码区域序列,上游引物:5'-CCCAAGCTTAT-GCTGCGGTACTGTGTTTC-3'(划线处为 Hind III 酶切位点);下游引物:5'-CGGAATTCTCAGGCG-GCGACTTCTCG-3'(划线处为 EcoR I 酶切位点),产物大小为 718 bp。反应体系如下:GC 缓冲液 12.5 μ L,cDNA 1 μ L,dNTP 4 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,H₂O 6.25 μ L。PCR 反应参数为:95℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,扩增 35 个循环;72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。将 PCR 产物电泳后回收目的片段。载体质粒 pCDNA 3.1 和目的片段分别酶切。酶切后回收产物,按照如下反应体系进行连接:T4 DNA 连接酶 2 μ L,pCDNA 3.1 载体质粒 2 μ L,目的片段 8 μ L,缓冲液 3 μ L,H₂O 5 μ L。将连接反应产物转化入 DH5 α 感受态细胞,接种到含氨苄青霉素的 LB 培养基上 37℃ 培养过夜。将阳性的菌落接种 LB 培养基中摇菌过夜。提取重组质粒,并行双酶切鉴定。

按质粒 DNA(μ g)与 LipofectamineTM 2000(μ L) 1:2 的比例,将 DNA 于 500 μ L 无血清培养基中稀释;LipofectamineTM 2000 使用前轻轻混匀,取适量稀释在 500 μ L 无血清培养基中并与稀释的质粒 DNA 混合后将混合物加到培养瓶中,培养 5 h 后弃去转染液,换用 10% 胎牛血清的培养液继续培养 24 h,用荧光显微镜观察重组载体在细胞中的表达情况,收集细胞作进一步分析。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数间比较采用

Student's *t* 检验,多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验,组间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 Hcy 对巨噬细胞内氧化应激指标的影响

Hcy 干预巨噬细胞培养 72 h 后,与对照组相比,100、200、500 μ mol/L Hcy 组的细胞内抗 O₂⁻活力分别降低了 39.46%、50.12%、80.12% ($P < 0.05$, $P < 0.01$),在 100 μ mol/L Hcy 组抗 O₂⁻活力降低已显现明显的统计学意义,故选择 100 μ mol/L Hcy 作为后续的处理浓度。在 100 μ mol/L Hcy 的基础上给予叶酸和 VitB12 干预后,抗 O₂⁻活力较 100 μ mol/L Hcy 组增加了 38.31%。100、200、500 μ mol/L Hcy 组的细胞内 OH⁻活性与对照组相比分别增加了 102.12%、118.50%、139.81% ($P < 0.01$),在 100 μ mol/L Hcy 的基础上给予叶酸和 VitB12 干预后,OH⁻活性较 100 μ mol/L Hcy 组降低了 42.54% ($P < 0.01$),H₂O₂ 含量与 OH⁻活性变化一致 ($P < 0.01$;表 1)。

表 1. Hcy 对巨噬细胞中 H₂O₂、抗 O₂⁻活力和 OH⁻活性的影响($n=3$)

Table 1. Effect of Hcy on the activity of H₂O₂, OH⁻ and resistance to O₂⁻ vitality in macrophages ($n=3$)

分 组	H ₂ O ₂ (mmol/g prot)	抗 O ₂ ⁻ 活力 (U/g prot)	OH ⁻ (kU/L)
对照组	0.425±0.093	7.787±0.635	18.860±1.680
50 μ mol/L Hcy 组	0.766±0.080	9.255±0.888	29.480±2.438
100 μ mol/L Hcy 组	1.396±0.144 ^b	4.714±0.989 ^a	38.120±0.996 ^b
200 μ mol/L Hcy 组	2.615±0.703 ^b	3.885±0.368 ^b	41.210±1.906 ^b
500 μ mol/L Hcy 组	1.393±0.185 ^b	1.549±0.514 ^b	45.230±1.063 ^b
叶酸+VitB12 干预组	1.274±0.197	6.520±0.811	21.900±1.841 ^c

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与对照组相比;c 为 $P < 0.01$,与 100 μ mol/L Hcy 组相比。

2.2 Hcy 作用下巨噬细胞中 EC-SOD 的 mRNA 及蛋白表达变化

Hcy 作用巨噬细胞 72 h 后,与对照组相比,100、200、500 μ mol/L Hcy 组中 EC-SOD mRNA 分别下降了 70%、57%、73%,差异具有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同时在叶酸+VitB12 干预组中 EC-SOD mRNA 表达量与 100 μ mol/L Hcy 组相比则升高了 47%;Western blot 检查 EC-SOD 蛋白表达,显示与 EC-SOD mRNA 表达趋势一致(图 1)。

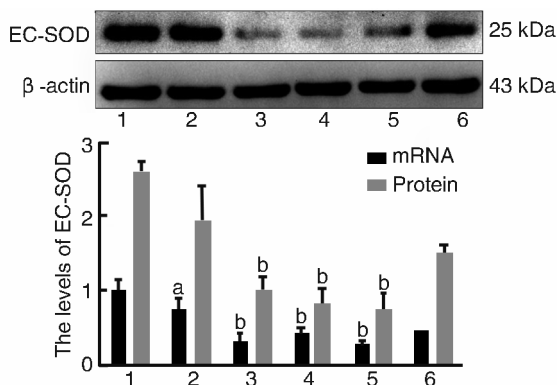


图 1. Hcy 对巨噬细胞中 EC-SOD 表达的影响 上图为 EC-SOD 的蛋白条带;下图为 EC-SOD 的 mRNA 和蛋白统计图。1 为对照组,2 为 50 μmol/L Hcy 组,3 为 100 μmol/L Hcy 组,4 为 200 μmol/L Hcy 组,5 为 500 μmol/L Hcy 组,6 为叶酸+VitB12 干预组。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组相比。

Figure 1. Effect of Hcy on the expression of EC-SOD in macrophages

2.3 Hcy 致巨噬细胞氧化应激时对 EC-SOD 活性的影响

EC-SOD 的活性随 Hcy 浓度的增加而降低,其中 100、200、500 μmol/L Hcy 组中 EC-SOD 的活性与对照组相比分别下降了 13.92%、8.62%、10.32%,差异具有显著性 ($P<0.05$, $P<0.01$),叶酸+VitB12 干预组中 EC-SOD 的活性与 100 μmol/L Hcy 组相比增加了 11.91% ($P<0.01$;图 2)。

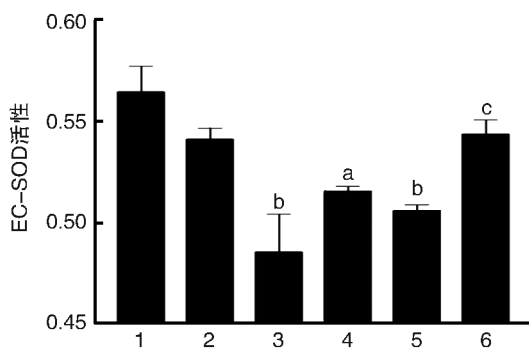


图 2. Hcy 对 EC-SOD 活性的影响 ($n=3$) 1 为对照组,2 为 50 μmol/L Hcy 组,3 为 100 μmol/L Hcy 组,4 为 200 μmol/L Hcy 组,5 为 500 μmol/L Hcy 组,6 为叶酸+VitB12 干预组。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组相比;c 为 $P<0.01$,与 100 μmol/L Hcy 组相比。

Figure 2. Effect of Hcy on the activity of EC-SOD ($n=3$)

2.4 EC-SOD 在 Hcy 致巨噬细胞氧化应激中的作用

为了验证 EC-SOD 在 Hcy 致巨噬细胞氧化应激中的作用,本文分别构建了 EC-SOD 的重组和干扰质粒,利用脂质体转染入巨噬细胞后分别以 100 μmol/L Hcy 作用细胞 24 h,检测氧化应激主要指标

O_2^- 的产生量。转染重组 EC-SOD 质粒后的细胞有大量的绿色荧光表达,对照组没有荧光表达(图 3)。分别用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测转染后的巨噬细胞中 EC-SOD 表达发现:与对照组相比,转染重组质粒组中 EC-SOD mRNA 和蛋白分别升高了 1.93 倍和 0.62 倍;而与空质粒组相比则分别升高了 2.79 倍和 0.81 倍,差异具有显著性 ($P<0.01$;图 4)。为了进一步研究 EC-SOD 的作用,本文运用 RNA 干扰技术阻断 EC-SOD 的表达,与对照组相比,各干扰质粒组中 EC-SOD mRNA 表达均有所下降,其中-247 和-596 组中分别下降了 67.31% 和 87.96%,变化具有显著性 ($P<0.05$, $P<0.01$);同时蛋白表达检测也显示,在-247 和-596 组中 EC-SOD 蛋白表达与对照组相比分别下降了 41.21% 和 56.55%,差异具有显著性 ($P<0.01$;图 5)。转染重组和干扰 EC-SOD 质粒后,100 μmol/L Hcy 作用 24 h,检测各组中 O_2^- 的含量。与 100 μmol/L Hcy 组相比,-596 组中 O_2^- 含量增加了 33.59%,而在 EC-SOD 重组组中 O_2^- 含量则降低了 63.89%,差异具有显著性 ($P<0.05$, $P<0.01$);而与-596 组相比,EC-SOD 重组组中 O_2^- 含量下降了 72.96%,差异具有显著性 ($P<0.01$;图 6)。

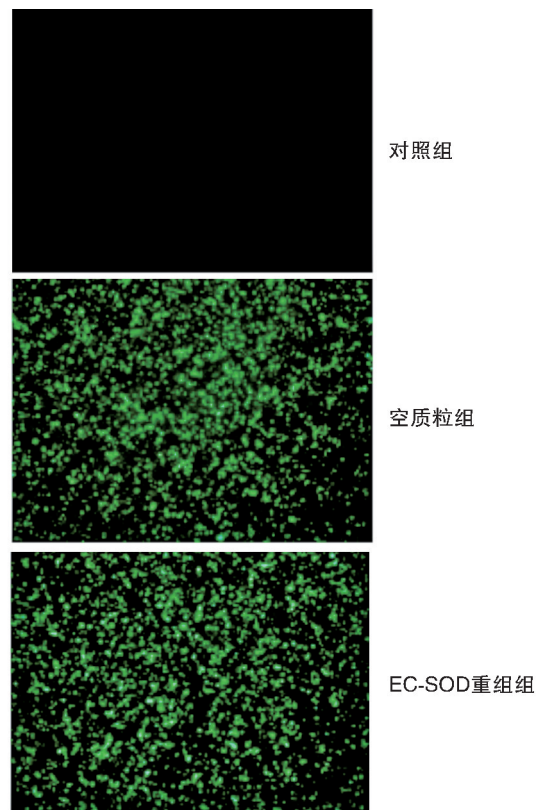


图 3. EC-SOD 重组质粒的细胞转染 (100×)

Figure 3. Cell transfection of EC-SOD recombinant plasmid (100×)

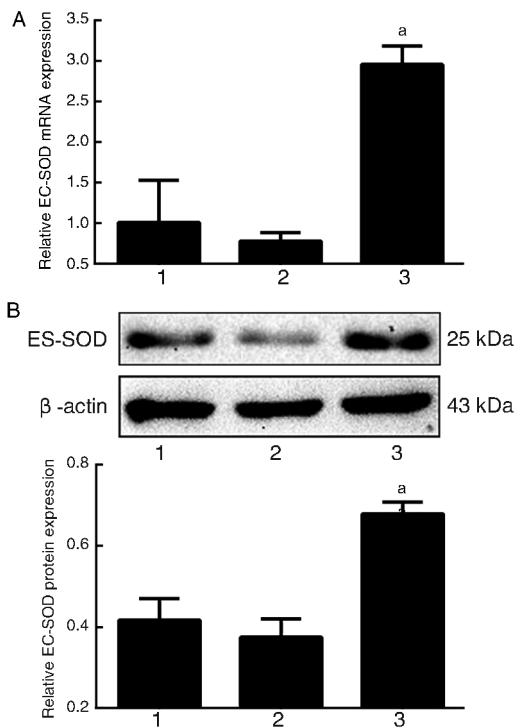


图 4. 转染 EC-SOD 重组质粒后 EC-SOD 的表达 A 为 EC-SOD 的 mRNA 表达;B 为 EC-SOD 的蛋白表达。1 为对照组,2 为空质粒组,3 为 EC-SOD 重组组。a 为 $P<0.01$,与对照组相比。
Figure 4. Expression of EC-SOD after transfection of EC-SOD recombinant plasmid

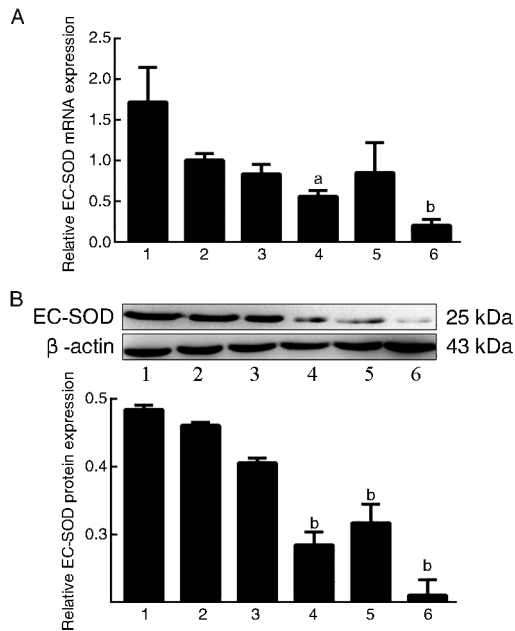


图 5. 各干扰质粒转染后 EC-SOD 的表达 A 为 EC-SOD 的 mRNA 表达;B 为 EC-SOD 的蛋白表达。1 为对照组,2 为阴性对照组,3 为羧基荧光素组,4 为-247 组,5 为-427 组,6 为-596 组。阴性对照组为不能与目的基因 EC-SOD 结合的无意义序列,对 EC-SOD 的表达没有影响,其主要作用是作为目的片段的对照组;羧基荧光素组带有荧光,主要用于标示转染效率。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组相比。
Figure 5. Expression of EC-SOD after transfection of each interfering plasmid

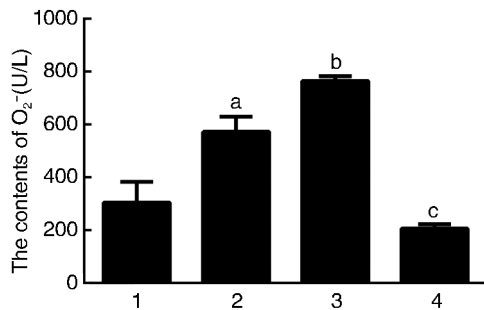


图 6. 分别转染 EC-SOD 重组和干扰质粒后 O₂⁻ 的产生量
1 为对照组,2 为 100 μ mol/L Hcy 组,3 为-596+100 μ mol/L Hcy 组,4 为 EC-SOD 重组+100 μ mol/L Hcy 组。a 为 $P<0.05$,与对照组相比;b 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与 100 μ mol/L Hcy 组相比。
Figure 6. Production of O₂⁻ after respective transfection of EC-SOD recombinant plasmid and interfering plasmid

3 讨论

随着人民生活水平提高和饮食习惯改变,As 已经逐渐成为东西方国家的主要死亡原因。As 的发生发展是多因素在多层次上综合作用的结果。Hcy 作为蛋氨酸代谢的中间产物,是一种非蛋白成分的含硫氨基酸,当空腹血浆中 Hcy>16 μ mol/L 时称之为高同型半胱氨酸血症;高同型半胱氨酸血症大概有 5% 存在于正常人群中,13%~40% 出现在有症状的 As 患者人群中。以往大量的研究表明,Hcy 非生理性升高与 As 呈正相关并被公认为是致 As 的独立危险因子;Hcy 可通过多种途径导致 As,其中氧化应激是重要的途径之一^[9]。氧化应激是指机体受到外来的有害刺激时,体内产生了过多的活性氧物质,使得其生成速率大于清除速率,导致超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢等活性氧物质在体内的聚集。正常情况下人体存在抗活性氧自由基的保护机制,如 SOD,在生理条件下维持氧化与抗氧化之间的平衡,但是当这种平衡被打破,引起两种状态的失衡,就会导致组织的损伤。在 As 形成过程中,过多生成的活性氧自由基氧化修饰内皮间隙下的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),生成氧化型低密度脂蛋白,被单核巨噬细胞吞噬,引起巨噬细胞内胆固醇酯的聚集和泡沫细胞的形成,促进脂质斑块的形成,加重了 As 的发展^[10]。因此,在 Hcy 致 As 过程中,深入研究单核巨噬细胞的作用和氧化应激的发生机制,是阐明 As 形成机制的重要环节。

由 SOD 表达改变而引起的氧化与抗氧化状态的失衡进而发生的氧化应激是 Hcy 致 As 的主要原因。SOD 是机体内存在的一种抗氧化酶类,功能是

清除细胞生命过程中产生的超氧阴离子,作为抗氧化酶类其对于氧化应激的发生起着重要的防御作用。人体内有3种主要的SOD: Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、EC-SOD,其中EC-SOD作为一种弱水性的分泌型糖蛋白,在血管中过量表达会使LDL加速氧化,LDL氧化过程中会产生溶血卵磷脂,可显著增加EC-SOD在细胞中的表达,但对Cu/Zn-SOD、Mn-SOD均没有此作用,表达的EC-SOD在细胞外与细胞表面硫酸乙酰肝素结合,使 O_2^- 歧化生成 H_2O_2 , H_2O_2 在过氧化氢酶的作用下生成水,清除了 O_2^- ,可以有效的保护细胞免受氧化损伤^[11-12],阻止了As的形成。

本实验在THP-1单核细胞的基础上成功构建了巨噬细胞模型,并用不同浓度Hcy刺激巨噬细胞,首先观察到EC-SOD的表达及活性随着Hcy浓度的升高而下降。因Hcy在体内代谢有3种途径:再甲基化途径、转硫途径及直接释放到细胞外液^[13],而叶酸和VitB12通过参与再甲基化途径,在蛋氨酸合成酶的作用下,以VitB12为辅助因子,以5-甲基四氢叶酸为供体提供甲基,再甲基化合成蛋氨酸,故叶酸和VitB12可以拮抗Hcy的部分作用^[14-15]。本实验在100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy的基础上给予叶酸和VitB12干预后,与100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy组相比较,叶酸+VitB12干预组EC-SOD表达及活性均有所上升,表明Hcy能够降低EC-SOD的表达并抑制其活性,而叶酸和VitB12可以缓解Hcy的负效应;Hcy通过线粒体损伤、NADPH氧化酶表达增加、硫化氢还原蛋白降低等机制诱导了氧化应激的发生^[16]。本实验检测细胞内氧化应激指标的活性时发现:与对照组相比,Hcy刺激下 H_2O_2 、 OH^- 活性升高,抗 O_2^- 活力下降,与100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy组相比,给予叶酸和VitB12干预后 H_2O_2 、 OH^- 活性下降,抗 O_2^- 活力升高,研究也证实了Hcy能够刺激氧化应激的发生。转染EC-SOD的各干扰片段,我们发现-596片段对于EC-SOD蛋白、mRNA表达的干扰作用最显著,故我们选择-596作为主要的干扰片段。本实验中,我们在100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy组的基础上分别构建EC-SOD重组质粒和EC-SOD -596片段干扰质粒并转染巨噬细胞,发现干扰EC-SOD的表达后超氧阴离子表达升高,氧化应激状态加重。这也就意味着在抑制Hcy诱导As的过程中,EC-SOD可能发挥着重要的作用。

EC-SOD是Hcy介导巨噬细胞内氧化与还原失衡

的主要基因,因此我们的研究对As的早期诊断及治疗具有重要意义,为预防和治疗As开辟了新的视角。

[参考文献]

- [1] Bloomfield GS, DeLong AK, Akwanalo CO, et al. Markers of atherosclerosis, clinical characteristics, and treatment patterns in heart failure: A case-control study of middle-aged adult heart failure patients in rural Kenya[J]. Glob Heart, 2016, 11(1): 97-107.
- [2] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2012 Update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2012, 125(1): 188-197.
- [3] 孙琳, 黄彦生, 卢建敏, 等. 氧化应激与炎症在动脉粥样硬化发生发展中的作用及相关治疗药物研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(21): 127-129.
- [4] 巩慧慧, 王菊, 孙玮玮, 等. HHcy对ApoE^{-/-}鼠动脉粥样硬化的影响及叶酸、维生素B12的干预效应[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 23(36): 4493-496.
- [5] 蒋兴亮, 刘素兰, 易婷婷, 等. 高同型半胱氨酸血症患者氧化应激指标的研究[J]. 检验医学, 2014, 29(2): 125-129.
- [6] Call JA, Chain KH, Martin KS, et al. Enhanced skeletal muscle expression of extracellular superoxide dismutase mitigates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy by reducing oxidative stress and aberrant cell signaling[J]. Circ Heart Fail, 2015, 8(1): 188-197.
- [7] Chen WM, Shaw LH, Chang PJ, et al. Hepatoprotective effect of resveratrol against ethanol-induced oxidative stress through induction of superoxide dismutase in vivo and in vitro[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(4): 1231-238.
- [8] 孔繁琪, 马胜超, 张辉, 等. MMP-9/TIMP-1在HHcy致ApoE^{-/-}小鼠肾脏损伤中的作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(6): 541-548.
- [9] Vesentini N, Kusmic C, Battaglia D, et al. Modulation of erythrocyte sensitivity to oxidative stress by transient hyperhomocysteinemia in healthy subjects and in patients with coronary artery disease[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008, 18(6): 402-407.
- [10] 阎雨, 何阳阳, 方莲花, 等. 巨噬细胞在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(1): 7-10.
- [11] Makino J, Nii M, Kamiya T, et al. Oxidized low-density lipoprotein accelerates the destabilization of extracellular-superoxide dismutase mRNA during foam cell formation[J]. Arch Biochem Biophys, 2015, 575(1): 54-60.
- [12] Nihei S, Tasaki H, Yamashita K, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with human coronary atherosclerosis through the reduction of the ratio of endothelium-bound to basal extracellular superoxide dismutase[J]. Circ J, 2004, 68(9): 822-828.
- [13] Zhao LP, You T, Chan SP, et al. Adropin is associated with hyperhomocysteinemia and coronary atherosclerosis[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(3): 1065-070.
- [14] 隋利军, 桑建, 朝亚. 叶酸、维生素B12对老年高血压患者血浆同型半胱氨酸水平及血管内皮功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 125-127.
- [15] Liu Y, Tian T, Zhang H, et al. The effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on flow-mediated vasodilation in patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Atherosclerosis, 2014, 235(1): 31-35.
- [16] Scherer EB, Da Cunha AA, Kolling J, et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage[J]. Int J Dev Neurosci, 2011, 29(7): 693-699.

(此文编辑 曾学清)