

同型半胱氨酸抑制培养的大鼠血管平滑肌细胞牛磺酸转运

石彦荣, 牛大地¹, 王述姮¹, 高霖¹, 齐永芬, 庞永正, 唐朝枢

(北京大学第一医院心血管病研究所, 北京市 100034; 1. 北京大学心血管研究所, 北京市 100083)

[主题词] 同型半胱氨酸; 肌, 平滑, 血管; H_2O_2 ; 牛磺酸; 转运体

[摘要] 为了研究同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞牛磺酸转运的影响, 采用培养的大鼠血管平滑肌细胞和 3H 标记的牛磺酸, 并测定血管平滑肌细胞牛磺酸转运。实验发现, 同型半胱氨酸呈浓度依赖性抑制血管平滑肌细胞转运牛磺酸, 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸组血管平滑肌细胞牛磺酸转运的最大速率(V_{max})较对照组分别降低 31% ($P < 0.05$) 和 51% ($P < 0.01$), 但组间 K_m 值无显著差异; 5 mmol/L H_2O_2 亦抑制血管平滑肌细胞牛磺酸摄入, V_{max} 较对照组降低 48% ($P < 0.01$), 但 K_m 值增加 45% ($P < 0.01$), 其转运效率(V_{max}/K_m)较 500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸组更低(3.72 ± 0.32 比 5.33 ± 0.69 , $P < 0.01$)。20 mmol/L 牛磺酸和 500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸同时孵育, 血管平滑肌细胞牛磺酸转运较 500 $\mu\text{mol/L}$ 同型半胱氨酸组增加, V_{max} 增加 35% ($P < 0.05$), 两组间 K_m 值亦无显著差异, 转运效率增加 40% ($P < 0.05$)。结果提示, 同型半胱氨酸抑制血管平滑肌细胞牛磺酸转运, 其机制不能用同型半胱氨酸产生过氧化物来解释, 外源性给予牛磺酸可拮抗同型半胱氨酸抑制血管平滑肌细胞牛磺酸转运障碍。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

Homocysteine Inhibits Taurine Transport in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

SHI Yarr-Rong, NIU Da-Di, WANG Shu-Heng, GAO Lin, QI Yong-Fen, PANG Yong-Zheng, and TANG Chao-Shu

(Institute of Cardiovascular Research, the First Hospital, Beijing Medical University, Beijing 10034, China)

[MeSH] Homocysteine; Muscle, Smooth, Vascular; H_2O_2 ; Taurine; Transporter

[ABSTRACT] **Aim** To study effect of homocysteine (Hcy) on taurine uptake in cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** In cultured VSMC of rats, cellular 3H -taurine uptake were determined by 3H -taurine incubation. Taurine transport velocity was measured by radio-ligand method. **Results** Hcy (10~500 $\mu\text{mol/L}$) could inhibit taurine transport in a dose-dependent manner. As compared to control group, 100 and 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy significantly decreased taurine transport.

The maximal transport velocity (V_{max}) decreased by 31% ($P < 0.05$) and 51% ($P < 0.01$), respectively. There were no significant changes in the K_m value. 5 mmol/L H_2O_2 inhibited taurine transport. V_{max} decreased by 48% ($P < 0.01$), but K_m value increased by 45% ($P < 0.01$). Taurine could increase taurine transport that Hcy inhibited. **Conclusions** Hcy could inhibit taurine transport; The exogenous taurine could efficiently inhibit taurine transport dysfunction by Hcy-induced.

高同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 血症是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等心血管疾病的重要独立危险因子^[1], Hcy 具有损伤血管内皮, 刺激血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖, 激活和聚集血小板等多种生物学效应^[2, 3]。牛磺酸 (taurine, Tau) 是体内 β -氨基酸的亚磺酸类似物, 具有调节细胞钙稳态、稳定细胞膜、维持细胞内外渗透压平衡, 抗脂质过氧化损伤, 清除氧自由基等广泛细胞保护作用, 对 As、高血压等心血管疾病具有防治意义^[4]。研究发现, Tau 能防治 Hcy 刺激的 VSMC 增殖, Tau 亦是抗高 Hcy 血症心血管损伤的内源性防护物质^[5]。Tau 的生物学效应很大程度上取

决于其跨细胞膜转运功能^[6]。本研究在培养的大鼠 VSMC 上观察 Hcy 对 VSMC Tau 转运的影响, 以探讨 Hcy 与 Tau 之间的相互关系, 进一步认识 Hcy 细胞损伤的发病机理。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

Wistar 大鼠 (北京大学医学部实验动物中心), Hcy、DMEM、Tau 及 H_2O_2 (Sigma 公司), 3H -Tau (925 TBq/mol) (DuPont NEN 公司), 余为市售分析纯。

1.2 大鼠血管平滑肌细胞的培养

无菌条件下取大鼠胸主动脉, 剥离血管外结缔组织, 贴块法培养 VSMC^[7]。实验用第 3~5 代细胞。

1.3 实验分组

按 1×10^5 细胞/L 接种于 24 孔板, 37℃ 孵育 2 天, 细胞生长贴壁后, 加入不同药物进行分组: 对

[收稿日期] 2001-12-11 [修回日期] 2002-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金 (39730220) 资助。

[作者简介] 石彦荣, 女, 31 岁, 讲师, 硕士研究生。牛大地, 女, 39 岁, 高级技师。唐朝枢, 男, 56 岁, 教授, 973 首席科学家, 博士研究生导师, 长期从事心血管疾病发病机制和实验治疗研究。

照组: 不做特殊处理; ④10 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组: 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 孵育; ⑤20 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组: 加入 20 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 孵育; 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组: 加入 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 孵育; H_2O_2 组: 加入 5 mmol/L H_2O_2 孵育; Tau 组: 加入 20 mmol/L Tau 和 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 同时孵育。预孵育 2 h, 台盼兰排斥实验检测细胞的存活率, 进一步测 ^3H -Tau 转运。

1.4 血管平滑肌细胞 ^3H -牛磺酸转运的测定^[8]

去除预孵育液, 换用转运缓冲液 (NaCl 135 mmol/L, CaCl_2 1 mmol/L, KCl 2 mmol/L, MgCl_2 5 mmol/L 及 HEPES 5 mmol/L, pH 7.5), 74 kBq ^3H -Tau/每孔, Tau 终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$, 各组均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育不同时间 (5、15、30 及 45 min)。刮取各孔贴壁细胞, 冷氯化胆碱洗涤 3 次。1% SDS 振荡 5~10 min 破碎细胞, 在 Millipore 上经 0.45 μm 滤膜抽滤细胞, β 液体闪烁计数器 (型号 FJ2107) 测量 ^3H -Tau 放射性强度, 换算为 ^3H -Tau 的转运量。按上述方法, 各组细胞与不同浓度 Tau (1~50 $\mu\text{mol/L}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 测定 ^3H -Tau 转运量。按 Bradford^[9] 方法进行蛋白定量。

1.5 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间资料进行 One-way ANOVA 和 subsequent pair-wise 统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞存活率

加入不同药物孵育后, 各组细胞存活率均在 97% 以上, 组间差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

2.2 ^3H -牛磺酸转运的时间效应

VSMC 高亲和性摄入 ^3H -Tau, 随孵育时间延长而增强, 30 min 后逐渐达饱和 (图 1, Figure 1)。

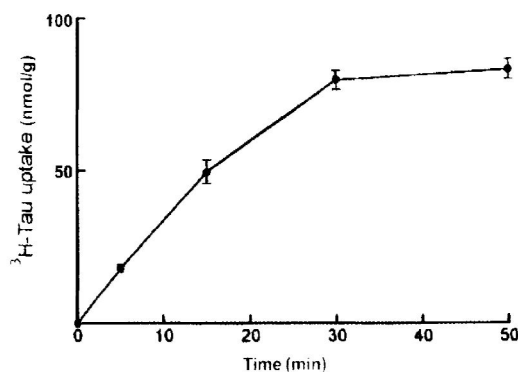


图 1. 血管平滑肌细胞 ^3H -牛磺酸转运的时间效应曲线。

Figure 1. Time course curve of ^3H taurine uptake in VSMC ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

2.3 同型半胱氨酸对 ^3H -牛磺酸转运的影响

Hcy 呈浓度依赖性抑制 VSMC ^3H -Tau 转运, 100 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 VSMC ^3H -Tau 转运的最大速率 (V_{\max}) 较对照组分别降低 31% ($P < 0.05$) 和 51% ($P < 0.01$), 但组间 K_m 值无显著差异。10 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 VSMC ^3H -Tau 转运与对照组相比无显著性差异。5 mmol/L H_2O_2 亦抑制 VSMC ^3H -Tau 摄入, V_{\max} 的降低与 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组相近, 较对照组降低 48% ($P < 0.01$), 但 K_m 值增加 45% ($P < 0.01$), 其转运效率 (V_{\max}/K_m) 较 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组更低 ($P < 0.01$)。20 mmol/L Tau 和 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 同时孵育, VSMC Tau 转运较 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组增加, V_{\max} 增加 35% ($P < 0.05$), 转运效率增加 40% ($P < 0.05$), 两组间 K_m 值亦无显著性差异 (表 1 和图 2, Table 1 and Figure 2)。

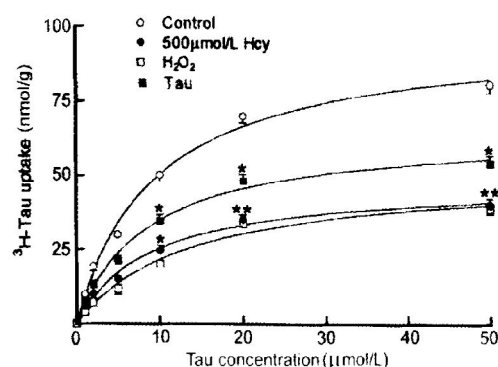


图 2. Hcy 和 H_2O_2 对培养的 VSMC 牛磺酸转运的影响。

Figure 2. Effect of Hcy and H_2O_2 on taurine uptake in VSMC ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, compared with control.

表 1. 牛磺酸转运的动力学分析。

Table 1. Kinetics of taurine uptake ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

Groups	V_{\max} (nmol/g)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{\max}/K_m
Control	98.14 \pm 4.26	9.50 \pm 1.14	10.33 \pm 2.11
10 $\mu\text{mol/L}$ Hcy	96.70 \pm 4.69	9.67 \pm 1.29	10.00 \pm 2.32
100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy	67.52 \pm 3.23 ^a	9.03 \pm 1.21	7.47 \pm 1.96 ^a
500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy	48.39 \pm 2.53 ^b	9.08 \pm 1.33	5.33 \pm 0.69 ^a
H_2O_2	51.32 \pm 4.34 ^b	13.7 \pm 2.89 ^b	3.7 \pm 0.32 ^b
Tau	65.51 \pm 3.0 ^{ac}	8.81 \pm 1.2	7.44 \pm 0.49 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.05$, compared with 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group.

3 讨论

Hcy 是体内蛋氨酸代谢的中间产物^[10], 血中 Hcy 浓度升高是遗传因素和环境因素共同作用的结果。

果, 心血管疾病时血浆 Hcy 可高达 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上^[11]。高 Hcy 血症在心血管疾病中的发病机制目前尚未完全阐明, 可能与其硫氢基促进过氧化物生成、诱导内皮细胞凋亡和刺激 VSMC 丝裂作用等多种机制有关。

本研究结果显示, 培养的大鼠 VSMC Tau 摄入呈时间依赖性, 在 30 min 内呈线性关系。Hcy 呈浓度依赖性抑制 VSMC 转运 Tau, 高浓度 Hcy (100 及 500 $\mu\text{mol/L}$) 组 VSMC $^3\text{H-Tau}$ 最大转运速率显著降低, 但 K_m 值无明显改变。正常血浆浓度 Hcy (10 $\mu\text{mol/L}$) 不影响 VSMC $^3\text{H-Tau}$ 转运。当孵育液中有 Tau 存在时, Hcy 抑制 VSMC 转运 Tau 的作用明显减弱, 提示 Tau 可以拮抗 Hcy 对 VSMC 膜牛磺酸转运体 (taurine transporter, TAUT) 的损伤作用。本实验各组细胞存活率相近 (> 97%), 表明所测 Hcy 对 VSMC $^3\text{H-Tau}$ 转运减少, 反映 Tau 跨膜转运功能受抑制, 而不是细胞死亡的后果。

Tau 是维持机体自稳态的重要的细胞保护物质之一^[4]。Tau 是可兴奋组织 (神经、肌肉等) 细胞含量最丰富的自由氨基酸, 大部分在细胞内, 细胞内 Tau 含量约为血浆的数十至数千倍以上, 这是 Tau 通过细胞膜上 TAUT 将血浆 Tau 主动跨膜转运而来。TAUT 存在细胞膜上, 为 599~638 个氨基酸残基的蛋白质, 相对分子质量 74 kDa 左右, 目前至少已克隆出 5 种 TAUT 亚型, 多为 Na^+ 、 Cl^- 依赖转运体, 各型的组织分布不同, 导致各组织细胞摄入 Tau 量不同^[12]。氧自由基 (H_2O_2 等) 可直接氧化损伤膜蛋白和/或引起膜磷脂过氧化间接影响膜蛋白功能, 而抑制 TAUT 转运功能。本研究结果显示, 5 mmol/L H_2O_2 抑制 VSMC Tau 转运, V_{max} 降低近 50%, 其程度与 500 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 效应相近, 但 H_2O_2 显著增加 Tau 转运的 K_m 值, 以及其转运效率更大程度降低, 这表明 Hcy 抑制 VSMC Tau 跨膜转运机制不能仅用 Hcy 产生过氧化物来解释。文献[13]报道, 许多因素如细胞外高渗、EPO、cAMP 等可上调 TAUT 活性, 而高浓度葡萄糖、酒精、PMA、内皮素、白细胞介素-1、肿瘤坏死因子等均能抑制 TAUT 的功能。近年发现, 抑制 TAUT 的细胞内信号传导途径为蛋白激酶 C (PKC) 激活, 位于 TAUT 细胞内第 4 跨膜区的丝氨酸-322 (Ser-322) 是 PKC 磷酸化关键位点, 活化的 PKC

可使 Ser-322 位点磷酸化, 而使 TAUT 转运活性降低^[14]。Dalton 等^[15]证实 Hcy 刺激大鼠 VSMC PKC 激活, Hcy 抑制 VSMC Tau 转运是否与其激活 PKC 有关, 有待进一步研究。

Tau 是机体内源性保护物质, Hcy 抑制 VSMC 转运 Tau, Hcy 损伤 Tau 的内源性防御机制是 Hcy 致病机制之一。外源性给予 Tau 可拮抗 Hcy 抑制 VSMC Tau 转运障碍, 可能是 Tau 抗 Hcy 损伤机理之一。注意到 Tau 与 Hcy 的相互关系, 是防治 Hcy 细胞损伤的一个靶点。在 Tau 防治高血压、As、血栓形成、急性心肌梗死等心脑血管疾病时, 尚能恢复 Tau 的细胞保护作用, Tau 应用于临床将有很好的前景。

[参考文献]

- [1] Taylor BV, Oudit GY, Evans M. Homocysteine, vitamins, and coronary artery disease. *Can Fam Physician*, 2000, **9**: 462-236-245
- [2] Jones BG, Rose FA, Tudball N. Lipid peroxidation and homocysteine-induced toxicity. *Atherosclerosis*, 1994, **105** (2): 165-170
- [3] Blundell G, Jones BG, Rose FA, et al. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis*, 1996, **122** (2): 163-172
- [4] Huxtable RJ. Physiological action of taurine. *Physiological reviews*, 1992, **72** (1): 101-146
- [5] 薛林, 李载权, 唐朝枢, 等. L-精氨酸和牛磺酸对同型半胱氨酸诱导平滑肌细胞增殖的抑制作用. *北京医科大学学报*, 1999, **31** (5): 472-474
- [6] Sturman JA. Taurine in development. *J Physiol Rev*, 1993, **73** (1): 119-124
- [7] Begum N, Song Y, Rienzie J, et al. Vascular smooth muscle cell growth and insulin regulation of mitogen-activated protein kinase in hypertension. *Am J Physiol*, 1998, **275** (44): C42-C49
- [8] Qian X, Vinnakota S, Edeards C, et al. Molecular characterization of taurine transport in bovine aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1** **509**: 324-334
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254
- [10] House JD, Jacobs RL, Stead LM, et al. Regulation of homocysteine metabolism. *Adv Enzyme Regul*, 1999, **39**: 69-91
- [11] Fodinger M, Wagner OF, Horl WH, et al. Recent insights into the molecular genetics of the homocysteine metabolism. *Kidney Int*, 2001, **59** (78): 238-242
- [12] Stevens MJ, Hosaka Y, Masterson JA, et al. Downregulation of the human taurine transporter by glucose in cultured retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol*, 1999, **277**: E760-771
- [13] Takeuchi K, Toyohara H, Sakaguchi M. A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell encodes Na^+ - and Cl^- -dependent high affinity taurine transporter. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1** **464**: 219-230
- [14] Han X, Budreau AM, Chesney RW. Ser-322 is a critical site for PKC regulation of the MDCK cell taurine transporter (pNCT). *J Am Soc Nephrol*, 1999, **10**: 1874-879
- [15] Dalton ML, Gadson PF, Wrenn RW, et al. Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. *FASEBJ*, 1997, **11**: 703-711

(此文编辑 文玉珊)