

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0677-03

•实验研究•

4-羟基-2-壬烯酸诱导培养的主动脉内皮细胞 DNA 损伤

徐 坚, 王宁夫, 李佩璋, 徐海鹰, 张邢炜, 吴 欣, 凌 峰

(杭州市第一人民医院心血管科, 浙江省杭州市 310006)

[关键词] 病理学与病理生理学; 4-羟基-2-壬烯酸诱导的内皮细胞 DNA 损伤; 细胞培养; 脂质过氧化反应; DNA 损伤; 内皮细胞, 主动脉

[摘要] 研究 4-羟基-2-壬烯酸对体外培养的主动脉内皮细胞作用, 以探讨动脉粥样硬化的发病机理。采用单细胞凝胶电泳检测 DNA 损伤, 对体外培养的主动脉内皮细胞在不同浓度 4-羟基-2-壬烯酸作用下产生的 DNA 损伤进行检测。结果发现, 体外培养的主动脉内皮细胞分别用 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 4-羟基-2-壬烯酸处理 10 h 后彗星试验的尾距分别为 32.8 ± 1.1 、 44.3 ± 1.0 和 74.6 ± 1.0 , 与未用 4-羟基-2-壬烯酸处理的正常对照组彗星试验的尾距 (6.0 ± 0.7) 比较, 差异有显著性 ($P < 0.001$), 经 1 $\mu\text{mol/L}$ 4-羟基-2-壬烯酸处理后的主动脉内皮细胞彗星试验的尾距为 11.3 ± 0.9 , 与正常对照组比较, 两者之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。结果提示, 4-羟基-2-壬烯酸可导致体外培养的主动脉内皮细胞的 DNA 损伤, 并随着 4-羟基-2-壬烯酸的浓度增高 DNA 损伤加剧。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

4-Hydroxy-2-Nonenal Induced DNA Damage on Cultured Human Aortic Endothelial Cells

XU Jian, WANG Ning-Fu, LI Pei-Zhang, XU Hai-Ying, ZHANG Xing-Wei, WU Xin, and LING Feng

(Department of Cardiology, the First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China)

[KEY WORDS] Lipid Peroxidation; 4-Hydroxy-2-Nonenal; DNA Damage; Endothelial Cells; Atherosclerosis; Single Cell Gel Electrophoresis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) on cultured human aortic endothelial cells so as to explore the mechanism of the pathogenesis of atherosclerosis. **Methods** In single cell gel electrophoresis, quantitative DNA damage detection was used to identify the DNA damage at different concentrations in cultured human aortic endothelial cells.

Results Tail moment was 32.8 ± 1.1 , 44.3 ± 1.0 and 74.6 ± 1.0 when human aortic endothelial cells were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 15 $\mu\text{mol/L}$ of HNE for 10 hours, which were of statistical significance when compared with the normal group (6.0 ± 0.7 , $P < 0.001$ respectively), but when human aortic endothelial cells was treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ of HNE, the tail moment was 11.3 ± 0.9 , which was of no statistical difference compared with the untreated group ($P > 0.05$). **Conclusion**

HNE induces DNA damage of cultured aortic endothelial cells. The DNA damage levels are proportional to the HNE concentrations.

4-羟基-2-壬烯酸(4-hydroxy-2-nonenal, HNE)是一种主要的在细胞膜脂质过氧化过程中产生的 α 、 β 不饱和醛类物质, 是一个重要的脂质过氧化反应的标记物质^[1], HNE 在动脉粥样硬化的各个阶段都证实存在^[2], 而血管内皮细胞的损伤被认为是冠状动脉粥样硬化性心脏病的早期病变的主要因素^[3], 然而, 氧化应激导致的 DNA 损伤在动脉粥样硬化进程中的作用及其机制仍不清楚, 在本研究中, 我们研究了 HNE 对体外培养的主动脉内皮细胞的 DNA 损伤作用。

1 材料与方法

1.1 人体主动脉内皮细胞培养

人体主动脉内皮细胞购自美国圣迪哥细胞应用公司。培养于 DMEM 培养基中, 细胞培养基中含有 10% 的灭活小牛血清、2 mmol/L 左旋谷氨酸、2 mmol/L 丙酮酸钠、20 mmol/L HEPES、1% 非必须氨基酸、100 mg/L 链霉素和 100 kU/L 青霉素。细胞培养基 DMEM 和灭活小牛血清、左旋谷氨酸、丙酮酸钠、HEPES 以及非必需氨基酸均购自 Invitrogen 公司。细胞培养在 8 孔细胞培养板上, 每天换液一次, 每 2~3 天消化传代一次, 所用的细胞是细胞培养第 3 代细胞, 所有的实验在 2 周内完成并汇总。

1.2 4-羟基-2-壬烯酸的处理

4-羟基-2-壬烯酸购自 Calbiochem 公司, 为更好地使 HNE 与细胞膜蛋白结合, 将 HNE 溶解在没有小牛血清的培养基中, 在加入 HNE 之前, 先用含有

[收稿日期] 2004-04-14 [修回日期] 2004-11-10

[作者简介] 徐坚, 硕士, 副主任医师, 主要从事心血管内科及动脉粥样硬化的基础和临床研究及冠心病的介入治疗, E-mail 为 Xujian_2000@163.net。王宁夫, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事心血管内科临床及冠心病的介入治疗。李佩璋, 主任医师, 主要从事心血管内科的临床工作。

钙、镁离子和葡萄糖的磷酸盐缓冲液洗去细胞培养基,分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 HNE 后孵育 10 h,并设立空白对照组。

1.3 单细胞凝胶电泳分析

凝胶电泳试剂盒购自 Trevigen 公司,用来检测单细胞 DNA 损伤。在细胞培养基中分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 15 $\mu\text{mol/L}$ HNE,继续孵育 10 h,再用 0.25% 胰蛋白酶将细胞与培养基分离,进行细胞计数后,将细胞加入低熔点的琼脂糖中 (1×10^8 个细胞/L, 1:10 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$),再将混合物用移液管以 75 μL 为单位移到玻片上并在黑暗中形成凝胶,然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中将载有细胞的凝胶糖玻片浸沉于新鲜配制裂解液中 (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂ EDTA, 10 mmol/L Tris, 10% 肌氨酸钠, pH=10, 用前加入 1% TritonX-100 和 10% DMSO),裂解时间为 90 min,随后在室温、黑暗条件下,从裂解液中取出玻片,用蒸馏水洗去过度的盐,室温晾干后,置于水平电泳槽中,将新配制的碱性电泳缓冲液 (1 mmol/L Na₂-EDTA, 300 mmol/L NaOH, pH=13) 倒入电泳槽中,液面高于载玻片 2.5 mm,盖上盖子,避光静置 45 min,使 DNA 解螺旋,在水平电泳槽中电泳 (1 V/cm; 30 min) 后,再在 95% 酒精中浸泡脱水 5 min,电泳后的玻片在空气中完全干燥,用 SYBR 染色^[4],荧光显微镜下观察、摄片。

1.4 单细胞凝胶电泳的图像分析

将凝胶电泳玻片随机编号,进行图像分析。图像用与电脑和显微镜相连接的电荷偶联显微摄影相机 (CCD) 拍摄,选择激发波长 460~500 nm,光栅波长 510~560 nm。每张片子随机选择 100 个凝胶电泳的图像,用 Euclid 软件分析凝胶电泳的尾距 (即尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头尾部中心间距的乘积),用 Prism 软件进行数据处理,数据表达为均值 \pm 标准差, $P < 0.001$ 为差异有显著性。

2 结果

应用凝胶电泳分析 HNE 处理过的培养的人体主动脉内皮细胞 DNA 损伤时,可见明显的拖尾现象 (图 1, Figure 1),不同浓度的 HNE 导致不同的拖尾现象。当用 15 $\mu\text{mol/L}$ HNE 处理 10 h 后,90%~100% 的主动脉内皮细胞显示拖尾现象 (每次实验观察 100 个核,共行 5 次实验)。与之相反,未经 HNE 处理的对照组细胞核呈正常形态,个别细胞核出现晕区,考虑是胰蛋白酶的作用和高速离心时产生的非特异性损伤现象,拖尾的长短与 DNA 损伤呈正相

关,HNE 的浓度越高,DNA 损伤就越严重 (图 2, Figure 2),经 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 15 $\mu\text{mol/L}$ HNE 处理后彗星试验的尾距分别为 32.8 ± 1.1 , 44.3 ± 1.0 和 74.6 ± 1.0 ,与未用 HNE 处理的正常对照组彗星试验的尾距 (6.0 ± 0.7) 比较,差异有显著性 ($P < 0.001$),经 1 $\mu\text{mol/L}$ HNE 处理后主动脉内皮细胞的彗星试验的尾距为 11.3 ± 0.9 ,与正常对照组比较,两者之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

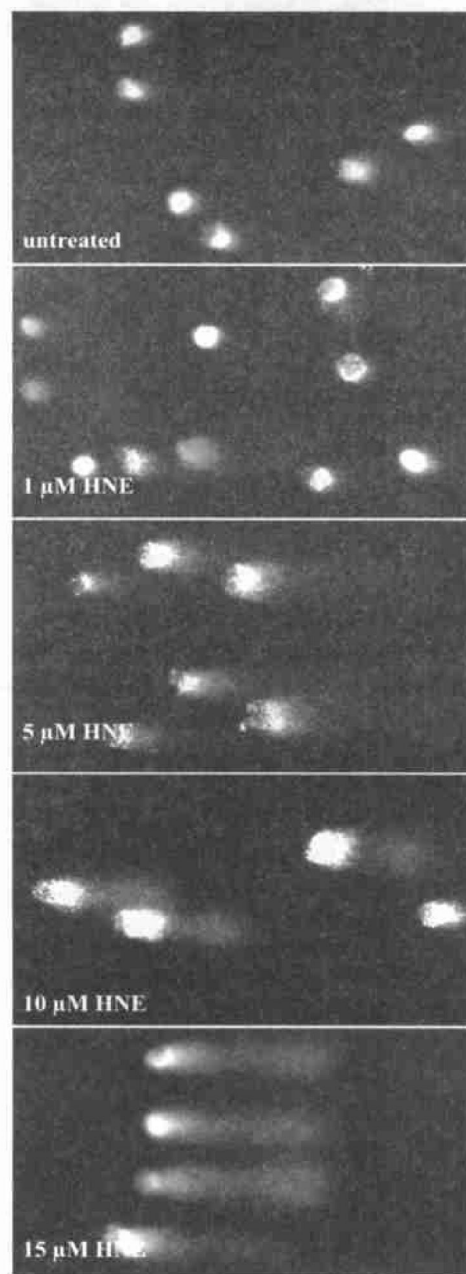


图 1. 不同浓度 4-羟基-2-壬烯酸对体外培养的主动脉内皮细胞 DNA 损伤的影响

Figure 1. The effect of different concentration HNE to DNA damage on cultured human aortic endothelial cells

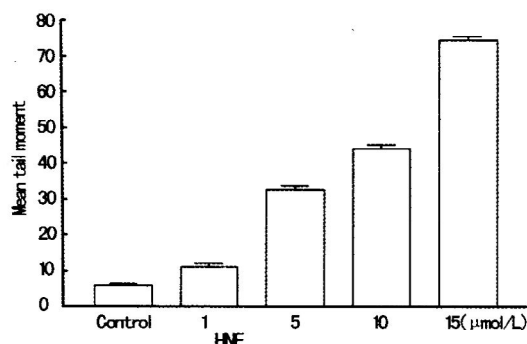


图 2. 不同浓度 4-羟基-2-壬烯酸对体外培养的主动脉内皮细胞尾距的影响

Figure 2. The effect of different concentration HNE to the tail moment on cultured human aortic endothelial cells

3 讨论

自从低密度脂蛋白的氧化修饰在动脉粥样硬化发展中的作用报道以来, 已有许多关于动脉粥样硬化的自然过程的深入研究, 其中提出一些证据支持: 脂质的过氧化反应和氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 对动脉粥样硬化的生成和恶化扮演着极为重要的角色, 艾宝民等^[5] 研究认为: ox-LDL 在致动脉粥样硬化的病理过程中起关键的作用, ox-LDL 会经特异的受体路径即所谓的清道夫受体路径很快被巨噬细胞吸收, 而清道夫受体不象 LDL 受体对于 LDL 的代谢有限制的调节作用, 这使得 ox-LDL 的无限制吸入, 最后变成充满脂质的泡沫细胞, 这些泡沫细胞会促进脂质条纹甚至是纤维斑块的形成。脂质的过氧化反应极为复杂, 牵涉一连串的反应, 目前有关最新研究认为: 脂质受自由基的氧化导致了一个链锁反应, 而产生不同的乙醛最终产物, 如: 4-羟基-2-壬烯酸、丙二醛和己醛, 其中 HNE 是脂质过氧化反应作用最强、影响范围最广的物质。

Esterbauer 等^[6] 首先发现体内 HNE 的存在, 并研究证实: HNE 是脂质过氧化反应的主要醛类代谢产物和脂质过氧化反应最重要的标记, HNE 可以在不同类型的细胞导致不同的细胞组织学和细胞病理学作用, 在氧化应激中 HNE 对细胞病理学作用也被认为有极其重要的意义^[7], 而发挥这些作用是因为其

对多种生物学分子有高度的反应性, 特别是那些包含巯基和氨基酸组 (例如: DNA 聚合酶和 DNA 脱氢酶)^[7,8]。在氧化应激过程中产生的自由基和脂质过氧化反应的产物可以损伤不同的细胞结构如: 细胞膜、蛋白质和 DNA。Botto 等^[9] 报道在冠心病病人中, DNA 氧化损伤的增强和疾病的严重程度与一些致动脉粥样硬化的危险因素相关, DNA 的氧化损伤可能是动脉粥样硬化发病机理的重要因素。

我们首次应用 HNE 处理培养的人体主动脉内皮细胞, 探讨 HNE 诱导的脂质过氧化反应在主动脉内皮细胞中产生的 DNA 损伤作用机理。研究显示: HNE 呈剂量依赖性地对培养的人体主动脉内皮细胞 DNA 直接造成断裂损伤, 使断裂的 DNA 片断在碱性环境中电泳时迁移速度加快, 脱离未断裂的双链 DNA, 形成明显的拖尾现象, 不同浓度的 HNE 导致不同的拖尾现象。当用 15 μmol/L HNE 处理 10 h 后, 90%~100% 的主动脉内皮细胞显示拖尾现象, 而没有损伤的 DNA 则没有明显的移动, 以上提示, HNE 诱导的氧化应激在体外培养的主动脉内皮细胞中导致 DNA 的氧化损伤, HNE 的使用剂量和 DNA 氧化损伤水平成比例。

[参考文献]

- [1] Tanaka N, Tajima S, Ishibashi A. Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Arch Dermatol Res*, 2001, **293**: 363-367
- [2] Jürgens G, Chen Q, Esterbauer H. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein (a). *Arterioscl Thromb*, 1993, **13**: 1689-699
- [3] Tomvall P. Autoantibodies against modified low-density lipoprotein in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2003, **167**: 347-353
- [4] Frasier TR, Wilson PJ, White BN. Rapid screening of microsatellite markers for polymorphisms using SYBR green I and a DNA sequencer. *Biotechniques*, 2004, **36** (3): 408-409
- [5] 艾宝民, 夏敏, 唐志红, 凌文华. 氧化型低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇蓄积的影响及可能机制. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 114-117
- [6] Esterbauer H, Schur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad Biol Med*, 1991, **11**: 81-128
- [7] Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signaling. *Free Radical Res*, 1998, **28**: 553-560
- [8] Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr*, 1993, **57**: 779S-785S
- [9] Botto N, Masetti S, Petrozzi L. Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis*, 2002, **13** (5): 269-274

(此文编辑 朱雯霞)