

· 基础研究 ·

同型半胱氨酸硫内酯对 ECV-304 细胞凋亡及 ROS 生成的影响

谷伟军 陆菊明 杨国庆 郭清华 母义明 潘长玉

【摘要】 目的 探讨同型半胱氨酸硫内酯(HcyT)对人脐静脉内皮细胞株(HUVEC)的损伤作用及其可能机制。方法 采用倒置显微镜、四唑盐(MTT)比色法及碘化吡啶(PI)染色流式细胞仪检测 HcyT 对细胞毒性作用,以荧光标记流式细胞仪检测细胞内反应性氧类(ROS)的生成。结果 一定剂量 HcyT 刺激后,内皮细胞发生凋亡,且凋亡呈浓度时间依赖性。随着 HcyT 浓度的增加,ROS 的生成逐渐增加。结论 HcyT 通过 ROS 呈时间浓度依赖性地诱导内皮细胞凋亡,这可能是 Hcy 致血管病变的机制之一。

【关键词】 同型半胱氨酸硫内酯; ECV-304 细胞; 凋亡; 反应性氧类

Effects of homocysteine thiolactone on apoptosis and reactive oxygen species of human umbilical vein endothelial cells

GU Weijun, LU Juming, YANG Guoqing, et al

Department of endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 **Objective** To study the possible effect of reactive homocysteine derivative of homocysteine thiolactone (HcyT) on apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Cultured vascular endothelial cells were treated with HcyT at various concentrations. Light microscopy and flow cytometry were applied to detect and observe cell injury and production of ROS. **Results** HcyT induced cell death and cell apoptosis, which occurred in a time- and concentration-dependent manner. HcyT treatment also increased intracellular ROS, which coincided with the increased HcyT concentration. **Conclusion** HcyT exerted its genotoxic effects on HUVEC through an apoptotic pathway, which might be mediated by increased intracellular ROS.

【Key words】 homocysteine thiolactone; ECV-304 cells; apoptosis; reactive oxygen species

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是蛋氨酸代谢中间产物,众多研究表明高同型半胱氨酸是人类心血管疾病的独立危险因素。目前有一些 Hcy 致血管病变机制的研究,但其确切机制还不明了。近来的学者发现同型半胱氨酸硫内酯(homocysteine thiolactone, HcyT),氨基酰-tRNA 合成酶在编辑反应中形成的 Hcy 反应产物,它可能是 Hcy 致血管损伤的原因之一。一些研究表明 HcyT 的形成主要取决于体内 Hcy、蛋氨酸、叶酸等的含量^[1]。HcyT 可诱导人 HL-60 细胞的凋亡,给狒狒缓慢灌注 HcyT 可诱发动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)^[2]。本研究旨在通过观察 HcyT 对培养的人脐静脉内皮细胞(human

umbilical vein endothelial cells, HUVEC)毒性、凋亡及细胞内反应性氧类(reactive oxygen species, ROS)产生的影响,从而为 Hcy 致病机制研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 L-同型半胱氨酸硫内酯(homocysteine thiolactone hydrochloride salt, L-HcyT), 2, 7-二氯二氢荧光素双醋酸盐(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, H₂-DCF)均为 Sigma 公司产品, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)为 Gibco 公司产品;其它试剂均为国外或国产分析纯试剂。Model BB5060 CO₂ 培养箱:上海 Heraeus 公司;IMT-2 相差倒置显微镜:日本 Olympus 公司;FACS Calibur 流式细胞仪:美国 BD;酶标仪:美国 Bio-RAD 公司。

1.2 HUVEC 株 ECV-304 细胞接种于 25cm² 塑料培养皿, DMEM 培养液(美国 Gibco 公司)和 10% 的

收稿日期:2005-01-06

作者单位:100853 北京市,解放军总医院内分泌科

作者简介:谷伟军,女,1976年12月生,山西省大同市人,在读博士研究生

通讯作者:陆菊明, Tel:010-66939881

胎牛血清(Hyclone 公司),置于 37℃5% CO₂ 孵箱内培养。待细胞达对数生长期,分组实验。

1.3 主要试剂的制备 L-HcyT 溶于二甲基亚砜配成 0.1 mol/L 储备液。H₂-DCF 溶于无水乙醇,制备 20 mmol/L 储备液避光保存。

1.4 实验分组 正常对照组:含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液;HcyT 实验组:含 HcyT 终浓度为 50 ~ 2000 μmol/L 的上述培养液。

1.5 实验方法

1.5.1 倒置显微镜观察细胞生长状态。

1.5.2 MTT 法检测细胞活力 消化细胞,调整细胞密度,将其均匀接种于 24 孔板,37℃ CO₂ 孵箱内培养,待细胞长满至 70% ~ 80%,加入 L-HcyT 终浓度为 50,250,500,1000,2000 μmol/L 的培养液,同时设立正常对照。作用 24,48,72 h 后,吸弃培养液,每孔加入 40 μl MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h 进行显色反应。弃上清,100%二甲基亚砜 200 μl/每孔,振荡摇匀,吸至 96 孔板,酶联检测仪测定 490 nm 处的光密度值(OD)。细胞存活率(%) = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

1.5.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 ①50,250,500,1000,2000 μmol/L 的 L-HcyT 与细胞孵育 48 h 后收集细胞,同时设立正常对照。②1 mmol/L L-HcyT 与细胞孵育 0,3,6,12,24 h 后收集细胞。碘化丙锭(propidium iodide,PI)染色,氩离子激发 PI 荧光,激发光波长为 488 nm,发射光波长 > 630 nm,产生红色荧光,在 G₁/G₀ 期前出现一亚二倍体峰细胞为凋亡细胞。获取细胞 1 × 10⁴/样品,用流式细胞仪检测凋亡细胞,获得凋亡率。具体方法:待检细胞 70%的冰乙醇 4℃固定过夜,PBS 漂洗后,加 PI(50 μg/L)5 μl,4℃避光染色 15 ~ 30 min,上流式细胞仪检测。

1.5.4 琼脂糖凝胶电泳分析 1 mmol/L、2 mmol/L HcyT 与细胞孵育 24 h 后,消化收集细胞,制成细胞悬液,常规酚/氯仿抽提,同时设立正常对照。紫外分光光度计测定 DNA 浓度,1.8% 琼脂糖凝胶,100 V 电泳 40 min。

1.5.5 细胞内 ROS 检测 20 μmol/L H₂-DCF 与 50 ~ 2000 μmol/L HcyT 同时加入培养液中,37℃孵育 24 h 后,收集细胞,冰 PBS 漂洗,置于冰上待检,流式细胞仪测定细胞荧光强度,每样品测定 1 万个细胞,用相对荧光强度表示细胞的相对氧化强度,反映细胞内 ROS 的含量,激光波长 488 nm,检测绿色荧光的波长范围为 525 nm。

2 结 果

2.1 光镜下细胞形态的观察 正常 HUVEC 形状为多角形,单层生长,呈典型的鹅卵石样镶嵌排列。高浓度 HcyT 作用 24 h 后,可见细胞普遍收缩、间隙增大、细胞变小边圆,并有片状细胞脱失区。

2.2 HcyT 与细胞存活率 细胞的存活率与 HcyT 呈时间和剂量依赖性关系,即随着培养时间的增加和剂量的增大,对细胞的毒性作用逐渐增强。较低浓度 HcyT 对细胞存活无显著影响,0.5 mmol/L HcyT 与细胞培养 48 h 后表现出明显的细胞毒作用,2 mmol/L HcyT 在培养 72 h 后对细胞存活率的抑制率最大(图 1)。

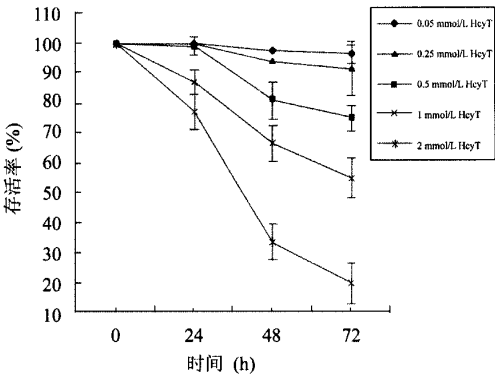


图 1 HcyT 对细胞存活率的影响

2.3 HcyT 诱导的细胞凋亡 HcyT 可以诱导 HUVEC 发生凋亡,孵育 48 h 时,细胞凋亡率随着 HcyT 浓度的增加而增加,0.5 mmol/L HcyT 即可导致细胞发生显著性凋亡(表 1)。HcyT 对细胞凋亡诱导呈时间依赖性。与正常对照比较,1 mmol/L HcyT 与细胞作用 12 h 后,凋亡率显著升高(表 2)。

表 1 不同浓度 HcyT 对细胞凋亡的影响
(n = 3; $\bar{x} \pm s$, 孵育 48 h)

组 别	凋亡率(%)
对照组	1.06 ± 0.07
实验组 1(HcyT 0.05 mmol/L)	1.77 ± 0.57
实验组 2(HcyT 0.25 mmol/L)	3.57 ± 0.58
实验组 3(HcyT 0.50 mmol/L)	15.89 ± 2.50*
实验组 4(HcyT 1 mmol/L)	29.60 ± 3.63*
实验组 5(HcyT 2 mmol/L)	57.77 ± 14.02*
F 值	27.452
P 值	0.000

注:与对照组相比,* P < 0.05, # P < 0.01

表 2 1 mmol/L HcyT 作用不同时间对细胞凋亡的影响
($n=3$; $\bar{x} \pm s$)

时间(h)	凋亡率(%)
0	1.08 ± 0.06
3	2.18 ± 0.28
6	$5.00 \pm 0.65^*$
12	$10.30 \pm 0.62^{\#}$
24	$20.79 \pm 3.36^{\#}$
<i>F</i> 值	53.501
<i>P</i> 值	0.001

注:与 0 h 组相比, * $P < 0.05$, $^{\#} P < 0.01$

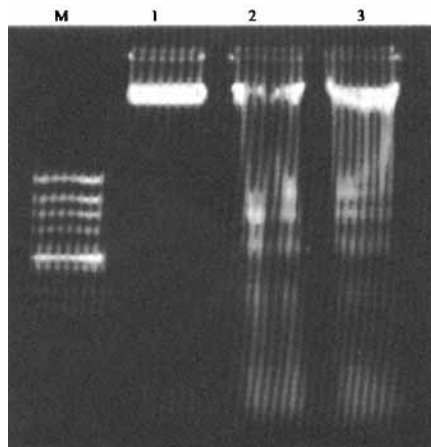


图 2 HcyT 诱导 HUVEC 凋亡的 DNA 琼脂糖凝胶电泳

M: marker; 1: 正常对照; 2: 1 mmol/L HcyT; 3: 2 mmol/L HcyT; 孵育 24 h

2.4 HcyT 诱导 HUVEC 凋亡的 DNA 琼脂糖凝胶电泳 1, 2 mmol/L HcyT 组可见有“梯状带(ladder)”出现,而对照组无上述类似变化(图 2)。

2.5 HcyT 对细胞 ROS 产生的影响 流式细胞仪测定结果如图 3, 正常对照组细胞内相对荧光强度为 32.12%, 随着 HcyT 浓度的增加, 细胞荧光峰值逐渐右移, 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2 mmol/L HcyT 所对应的荧光强度分别为 38.59%、46.71%、50.58%、68.24%、79.32%。按照细胞内相对荧光强度变化, HcyT 呈浓度依赖性地诱导细胞内 ROS 的产生。

3 讨论

细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种死亡形式, 指细胞在生理或病理情况下发生有序的主动的非炎症死亡, 又称程序性死亡。大量实验证实, 易发生

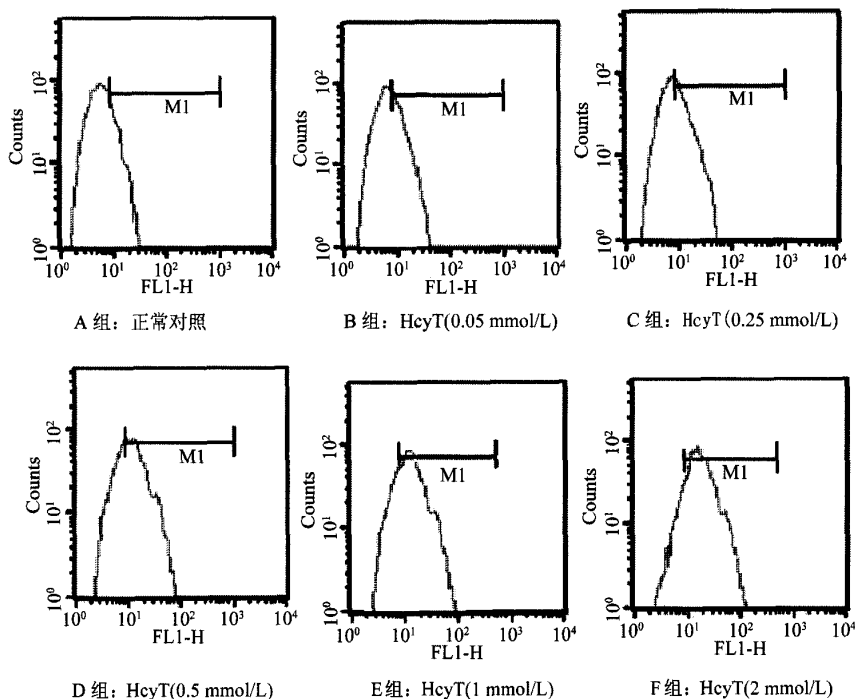


图 3 HcyT 对细胞 ROS 产生的影响

AS 的局部血管的内皮细胞具有更新增加的现象,说明内皮细胞更新和此前的细胞凋亡与 AS 斑块形成有关。凋亡加速使内皮细胞更新增加,从而改变内皮细胞功能,诱发 AS 发生。血管内皮细胞的凋亡可能是 AS 形成的始发步骤^[3]。由于凋亡细胞的 DNA 在内源性核酸酶的作用下裂解成 200 bp 或与之成倍的寡核苷酸,故在细胞经去垢剂在膜上打孔后,小片段 DNA 会泄漏出来,因此凋亡细胞的 DNA 含量比正常细胞少,在经过染色后显示 DNA 峰时,会在正常 2 倍体 DNA 峰 G_1 之前出现一个小峰 A_0 ,可以根据此峰的大小推测出发生凋亡细胞的量。本研究经 PI 染色流式细胞分析仪检测到亚二倍体的凋亡内皮细胞,且细胞凋亡率与 HcyT 呈时间浓度依赖性关系。细胞与 1 mmol/L HcyT 共同孵育 12 h,即可发生显著性凋亡。凋亡细胞 DNA 在内源性核酸酶的作用下与核小体连接处发生断裂,DNA 随之裂解成 200 bp 或与之成倍的寡聚核小体。而坏死细胞中无这种核酸内切酶活化,其细胞 DNA 只是发生随机断裂。故而在核酸琼脂糖电泳时,凋亡的细胞 DNA 表现出一种特殊的,状如“楼梯”的电泳条带,而坏死细胞则无这种梯带出现。本研究核酸琼脂糖电泳结果证实 HcyT 可诱导 HUVEC 发生凋亡性损伤。目前,HcyT 致血管病变的机制还不很明确,相关研究发现 HcyT 在体内还可与蛋白质发生反应,使其同型半胱氨酸化,同型半胱氨酸化低密度脂蛋白不仅易被巨噬细胞所摄取,还可以增加人主动脉血管内皮细胞的脂质过氧化损伤^[4]。Jakubowski^[5]发现人血管内皮细胞蛋白质同型半胱氨酸化程度依赖于 Hcy/Met(依赖于叶酸)。

HcyT 在体内代谢转化过程中,可以使生化反应

中的自由基调控机制失活,导致 ROS 的生成与堆积。本实验以 H_2 -DCF 为 ROS 捕获剂,直接显示细胞内 ROS 水平。结果显示,细胞内 ROS 水平随 HcyT 浓度增加而增加,且与细胞凋亡率相关,这提示 ROS 可能参与了 HcyT 诱导细胞凋亡的过程。ROS 是介导细胞凋亡的物质,当细胞受到理化和生物因素刺激时,它通过细胞膜上 NADPH 氧化酶系统产生大量 ROS。过多的 ROS 通过损伤 DNA、蛋白质,脂质过氧化等多种途径诱发细胞发生凋亡^[6]。

本实验结果显示 HcyT 通过 ROS 诱导细胞凋亡,这可能是 Hcy 致血管病变的机制之一。

参考文献

- 1 Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells. *Circ Res*, 2000, 87:45.
- 2 Huang RF, Huang SM, Lin BS, et al. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci*, 2001, 68:2799-2811.
- 3 Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM, et al. Apoptosis of endothelial cells: contribution to the pathophysiology of atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9:697-698.
- 4 Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, et al. Effect of homocysteinylation of low density lipoprotein on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem*, 2004, 92:351-360.
- 5 Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *Nutrition*, 2000, 130:377S-381S.
- 6 Wang L, Medan D, Mercer R, et al. Vanadium induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: role of reactive oxygen species. *J Cell Physiol*, 2003, 195:99-107.

• 消 息 •

欢迎从邮局订阅《中华放射肿瘤学杂志》(邮发代号:82-240)

《中华放射肿瘤学杂志》(ISSN 1004-4221; CN 11-3030/R)双月刊,邮局发行,大 16 开正文 72 页,定价:每期(册)15 元,全年 90 元。读者可随时向当地邮局订阅(本刊可破订)。漏订的期册可向本刊补订。本刊地址:北京市朝阳区潘家园南里 17 号;邮编:100021;电话:(010)67700737;87788294;联系人:余耘。

本刊为中华医学会主办的全国惟一的放射肿瘤治疗专业学术期刊,基本不与其他学科交叉,以肿瘤放射治疗、放射生物、放射物理、热疗为主要内容,及时报道本专业领域内领先的临床诊疗经验和科研成果,以及与临床密切结合并对临床有指导意义的基础研究结果。欢迎订阅和投稿。

本刊从 1987 ~ 2004 年共 18 年 74 期的全文检索光盘(两张)已正式出版,定价:100 元(邮购者需另加邮费:10 元)。