

同型半胱氨酸促进牛主动脉内皮细胞衰老的研究

陈小莉^{1△}, 李雅慧^{2△}, 王 成^{1*}, 李绕明¹, 苏 峰¹, 杨 庆³, 贾凤歧³, 卫立辛^{3*}

(1. 上海市食品药品监督管理局宝山分局, 上海 200940; 2. 国家食品药品监督管理局保健食品审评中心, 北京 100061; 3. 第二军医大学东方肝胆外科研究所肿瘤免疫与基因治疗中心, 上海 200438)

[摘要] **目的:** 体外观察同型半胱氨酸(HCY)是否促进内皮细胞(EC)衰老及可能的作用机制。 **方法:** 胶原酶消化法分离新生牛主动脉内皮细胞, 随机分成 4 组, 对照组不加 HCY, 其余 3 组分别在 DMEM 培养液中加入 HCY, 使终浓度为 0.1、0.5、1.0 mmol/L。连续体外培养 30 d 后, 观察细胞形态、衰老相关的 β-半乳糖苷酶染色, 流式细胞仪检测细胞周期, Southern 杂交分析端粒长度, 同时检测培养上清中一氧化氮(NO)、内皮素(ET)、氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)、丙二醛(MDA)浓度和谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)活性。 **结果:** 各浓度 HCY 组与对照组相比, 细胞体积增大, 胞内颗粒增多; β-半乳糖苷酶染色阳性细胞增多; 细胞周期的分布发生改变, 表现为 G₀/G₁ 期细胞增多(P<0.05), S 期显著减少(P<0.01); 端粒缩短; 培养上清中 NO 浓度降低(P<0.05), ET 和 Ox-LDL 升高(P<0.05); 氧化还原指标 MDA 含量和 GSH-Px 活性没有明显改变。 **结论:** HCY 促进体外培养的 EC 衰老, 其作用机制可能与氧化还原无关。

[关键词] 高半胱氨酸; 内皮细胞; 细胞衰老

[中图分类号] R 589.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0162-04

Homocysteine accelerates senescence of cultured bovine aortic endothelial cells

CHEN Xiao-li^{1△}, LI Ya-hui^{2△}, WANG Cheng^{1*}, LI Rao-ming¹, SU Feng¹, YANG Qing³, JIA Feng-qi³, WEI Li-xin³
(1. Baoshan Branch of Shanghai Food and Drug Administration, Shanghai 200940, China; 2. Center for Health Food Evaluation, State Food and Drug Administration, Beijing 100061; 3. Tumor Immunology and Biotherapy Center, Eastern Institute of Hepatobiliary Surgery, Second Military Medical University, Shanghai 200438)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of homocysteine (HCY) in promoting senescence of cultured endothelial cells (EC) and the underlying mechanism. **Methods:** Bovine aortic endothelial cells were isolated by enzymatic digestion method from new born calf and were randomly divided into 4 groups. Cells in control group were not treated with HCY and those in the other 3 groups were treated with HCY with the final concentrations being 0.1, 0.5, and 1.0 mmol/L. The cultured cells were observed morphologically and stained with β-Gal; the cell cycle was examined with flow cytometric method (FCM) and the telomere length was analyzed by Southern blotting. Meanwhile, the contents of nitric oxide(NO), endothelin (ET), MDA and the activity of GSH-Px were determined in the supernatants. **Results:** Compared with control group, the 3 HCY groups had more β-Gal positive cells and shorter telomere length. Cells of G₀/G₁ phase in the 3 HCY groups were significantly increased than those of control group (P<0.05) and the cells of S-phase were significantly decreased (P<0.01); the contents of NO in supernatants of 3 HCY groups were significantly lower than that of control group(P<0.05) and the contents of ET, Ox-LDL were markedly higher than that of control group(P<0.05); the contents of MDA and the activity of GSH-Px were similar in all groups. **Conclusion:** It is indicated that homocysteine may accelerate senescence in endothelial cells, which is not related to oxygenation and reduction.

[KEY WORDS] homocysteine; endothelial cells; cell aging

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 162-165]

同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)又称高半胱氨酸,属于含硫氨基酸,是蛋氨酸代谢中间产物。正常人血浆同型半胱氨酸浓度低于 10 μmol/L,严重的高 HCY 血症(高于正常值 10 倍)患者有加速衰老的特征,在生命早期就会出现衰老的一系列症状^[1],如在青少年期间就有视网膜剥离、骨质疏松、动静脉栓塞和记忆力下降等退行性和器质性病变。高 HCY 血症还与一系列老年相关疾病如动脉粥样硬化、认知能力下降等有一定的相关性^[2-4]。上述研究表明,HCY

可能与细胞衰老有一定的内在关系。HCY 是否通过促进血管内皮细胞衰老,从而诱发血管以及全身病变,目前仍然没有明确的实验依据,故本研究拟探讨

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(“973”计划)(G2000057001). Supported by National Program on Key Basic Research Projects(“973” Program)(G2000057001).

[作者简介] 陈小莉,博士,主治医师;李雅慧,博士,副主任医师。
△ 共为第一作者。

* Corresponding author.

HCY 对内皮细胞体外复制性衰老的作用以及可能的机制,为阐述 HCY 的致病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)培养基购自 Gibco 公司,小牛血清是杭州四季青生物工程材料研究所产品,HCY 购自 Sigma 公司,第八因子相关抗原(vWF)抗体购自 DAKO 公司,ABC 试剂盒购于 Vector 公司,一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物公司,内皮素(ET)、氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)试剂盒购自解放军总医院东亚免疫研究所和上海荣盛试剂公司。基因组 DNA 抽提试剂盒购自 Promega 公司,带正电荷尼龙膜、端粒长度分析试剂盒购于 Roche Molecular Biochemicals 公司, RNA 酶、Triton、碘化丙啶(PI)染液购自 Promega 公司, *Hinf*I、*Rsa*I 酶购于 New England Biolabs 公司, X-Gal 购于上海华舜生物公司。

1.2 血管内皮细胞培养及鉴定 牛主动脉内皮细胞原代培养参照文献酶消化法^[5],用 DMEM 培养液培养。待贴壁 12 h 后,按 ABC 试剂盒操作说明检测 vWF,鉴定为阳性后,常规传代,正常对照组用 DMEM 加入 10%小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素,5%CO₂,置 37℃ 孵箱中常规培养;实验组是在对照组基础上,加入 HCY 使终浓度为 0.1、0.5 和 1.0 mmol/L。每组 3 个平行样本。

1.3 β-半乳糖苷酶染色 β-半乳糖苷酶染料依据文献^[6]配制,各组内皮细胞培养 30 d 后,弃去培养液, PBS 冲洗,0.25%戊二醛固定 5 min, PBS 冲洗,β-半乳糖苷酶染液 37℃ 染色 12 h,显微镜下观察。以随机挑选的 100 个细胞中阳性细胞的个数计算阳性率(每组重复 3 次)。

1.4 流式细胞术测定细胞周期 培养 10 d 后,分别

消化内皮细胞,调节细胞密度为 1×10^6 /ml,离心,弃上清液,加 PBS 0.5 ml,搅匀。用注射针头将细胞悬液迅速喷射到在 4℃ 冰箱中预冷的盛有 1.5 ml 乙醇(95%)的离心管中(乙醇终浓度为 70%)固定,置 4℃ 保存。染色前用 PBS 进行离心沉淀去除固定液。加入 RNA 酶,37℃ 水浴 30 min,立即放入冰浴中,再加入 PI 染液混匀,进行 DNA 染色。置 4℃ 避光放置 30 min,然后在流式细胞仪上进行分析。

1.5 Southern 杂交端粒长度检测 细胞培养 30 d 后,收集培养的内皮细胞,依据 Promega Wizard Genomic DNA purification kit 说明提取基因组 DNA;取 1 μg 基因组 DNA, *Hinf*I / *Rsa*I 37℃ 酶切 12 h,0.7%琼脂糖凝胶电泳 4 h,常规碱变性,中和后转膜过夜,80℃ 烤干 2 h, DIG Easy Hyb(Roche Biochem)45℃ 预杂交 30 min; (TTAGGG)₄ 地高辛标记探针委托上海生工生物工程技术有限公司合成,加入杂交液中使终浓度为 100 pmol/L,45℃ 杂交 4 h,严谨条件下洗膜后,根据地高辛检测方法(Roche Biochem)检测。

1.6 ET、NO、Ox-LDL、GSH-Px、MDA 检测 细胞培养 3 d 后,取培养上清 1 ml,分别按照 ET 放射免疫法检测试剂盒,NO、GSH-Px、MDA 酶法测定试剂盒和 Ox-LDL ELISA 法测定试剂盒说明测定培养上清中的含量和活性。

1.7 统计学处理 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析和 *t* 检验;以 $P < 0.05$ 为显著性差异分析。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 镜下可见,HCY 组与正常组相比细胞数量减少,形态不规则、体积增大、立体感差,细胞内颗粒增多。病变随 HCY 浓度升高趋向严重(图 1)。

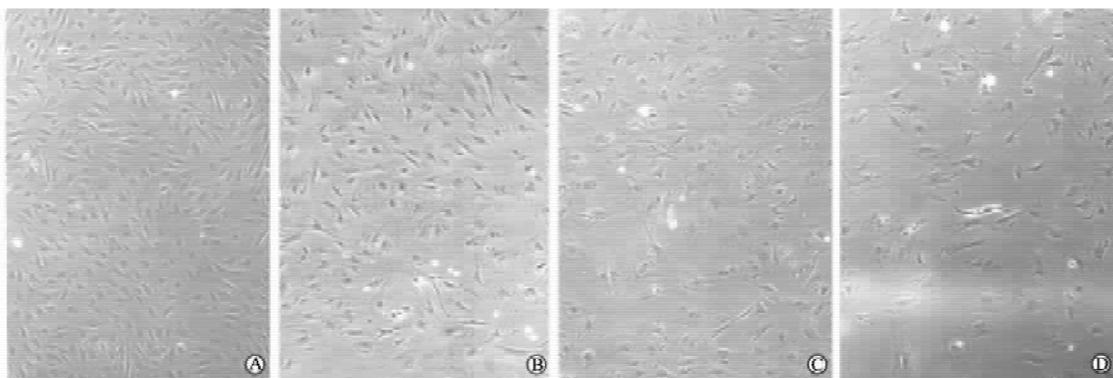


图 1 显微镜下各组细胞形态

Fig 1 Morphology of endothelial cells under microscope(×100)

A : Control group; B: HCY 0.1 mmol/L group; C: HCY 0.5 mmol/L group; D: HCY 1.0 mmol/L group

2.2 β -半乳糖苷酶染色 蓝色为 β -半乳糖苷酶阳性染色,即衰老细胞(图2)。正常对照细胞30 d后,染色阳性率为(4±4)%;而 HCY 组阳性细胞明显增多,0.1、0.5 和 1.0 mmol/L HCY 组阳性率分别

为(41±8)%、(59±6)%、(76±11)%($P<0.01$)。

2.3 细胞周期测定 各浓度 HCY 作用内皮细胞后,S 期比例下降, G_0/G_1 期比例升高,与对照组有显著差异(图3,表1)。

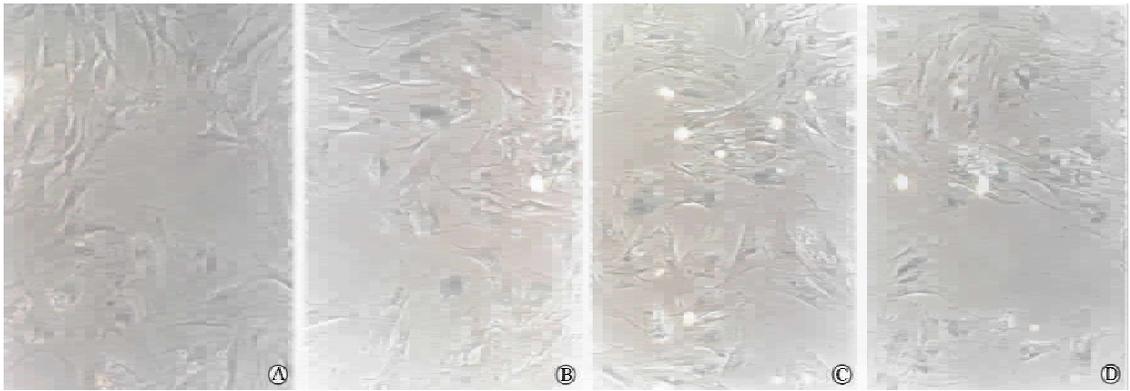


图2 β -半乳糖苷酶染色(蓝色为阳性细胞)

Fig 2 β -Gal staining of endothelial cells (blue indicating positive cells, $\times 200$)

A: Control group; B: HCY 0.1 mmol/L group; C: HCY 0.5 mmol/L group; D: HCY 1.0 mmol/L group

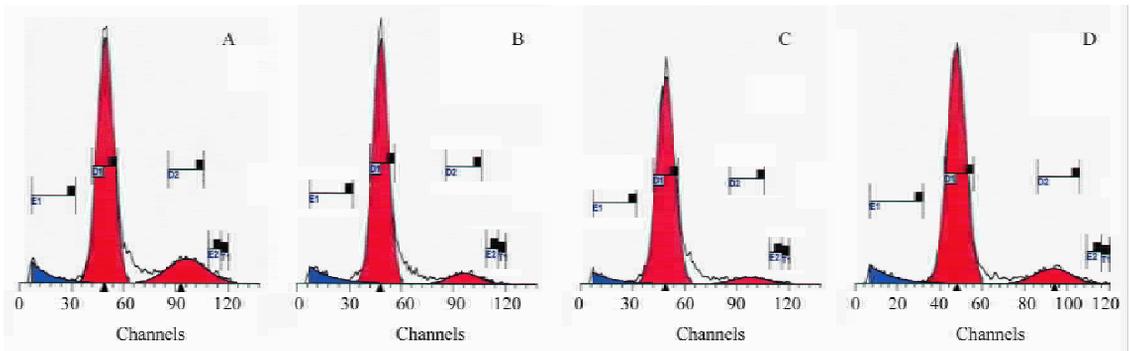


图3 流式细胞仪测定细胞周期结果

Fig 3 Cell cycle result of endothelial cells with FCM

A: Control group; B: HCY 0.1 mmol/L group; C: HCY 0.5 mmol/L group; D: HCY 1.0 mmol/L group

表1 HCY 对内皮细胞周期的影响结果

Tab 1 Effect of homocysteine on cell cycle of endothelial cells

($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	G_0/G_1	S	G_2/M	G_2/G_1
Control	73.09±3.21	16.27±2.91	10.65±1.23	2.02±0.33
HCY 0.1 mmol/L	85.63±5.81*	11.94±1.98**	2.43±0.21**	2.11±0.11
HCY 0.5 mmol/L	87.40±6.11*	10.80±0.92**	1.80±0.20**	2.04±0.19
HCY 1.0 mmol/L	88.70±6.23*	8.38±1.64**	2.92±0.30**	1.97±0.12

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

2.3 端粒长度分析 0.1 和 0.5 mmol/L HCY 作用内皮细胞 30 d 后,与对照组相比,端粒缩短,同时杂交信号减弱(图4),1.0 mmol/L HCY 组细胞杂交信号消失。

2.4 ET、NO、Ox-LDL、GSH-Px、MDA 检测结果

实验组血管舒张因子 NO 含量明显低于对照组,收缩因子 ET 含量显著增高, Ox-LDL 升高(表2),提示内皮细胞功能受损。实验组细胞培养上清中的 GSH-Px 活性和 MDA 含量与对照组相比均无明显改变(表3)。

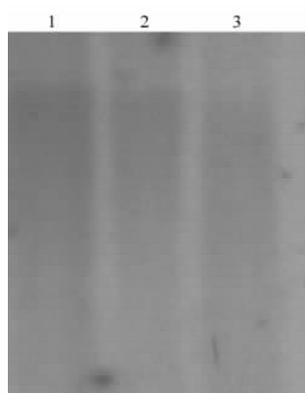


图4 端粒长度分析测定结果

Fig 4 Telomere length assay result of endothelial cells

1: Control group (30 d, 10 passage); 2: HCY 0.1 mmol/L group (30 d, 6 passage); 3: HCY 0.5 mmol/L group (30 d, 6 passage)

表2 培养液中 ET、NO、Ox-LDL 含量

Tab 2 Contents of ET, NO, and Ox-LDL in culture media
($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	ET ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	NO(D)	Ox-LDL(D)
Control	0.81 ± 0.02	0.150 ± 0.041	0.156 ± 0.026
HCY 0.1 mmol/L	3.10 ± 0.6*	0.139 ± 0.021*	0.182 ± 0.016*
HCY 0.5 mmol/L	4.86 ± 0.9*	0.134 ± 0.018*	0.193 ± 0.021*
HCY 1.0 mmol/L	5.35 ± 0.6*	0.131 ± 0.010*	0.200 ± 0.038*

ET: Endothelin; NO: Nitric oxide; Ox-LDL: Oxidized low density lipoprotein; * $P < 0.05$ vs control group

表3 培养上清中 MDA 含量和 GSH-Px 活性

Tab 3 MDA content and GSH-Px activity in supernatant
($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	MDA ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Control	2.29 ± 0.11	288 ± 32
HCY 0.1 mmol/L	2.17 ± 0.31	301 ± 26
HCY 0.5 mmol/L	2.32 ± 0.42	312 ± 11
HCY 1.0 mmol/L	2.11 ± 0.19	314 ± 16

3 讨论

血浆 HCY 升高是引起心血管疾病的重要且独立的危险因素^[2]。内皮细胞是血管壁和血液之间第一道通透性屏障,其结构和功能损伤是血管性疾病发病过程中重要一环。衰老内皮细胞结构改变,功能受损,因此我们探讨 HCY 能否促进内皮细胞衰老。

细胞的形态、 β -半乳糖苷酶活性、细胞周期和端粒长度均是细胞衰老的指标。实验中 HCY 组细胞形态不规则、体积变大、胞内颗粒增多; β -半乳糖苷酶染色阳性细胞明显增多;细胞周期发生改变,细胞集中在 G_0/G_1 期,而 S 期减少;细胞端粒长度缩短,同时杂

交信号减弱。提示 HCY 促进内皮细胞衰老。

NO、ET 分别是内皮细胞合成和分泌的舒张、收缩因子,当内皮细胞功能受损时,NO 的生成和释放下降,平衡倾向于 ET,从而导致体内血管收缩呈优势,舒张功能下降,而血管舒张功能降低是动脉粥样硬化最早的表现^[7-8]。实验中可见 HCY 组 ET 显著升高,而 NO 明显下降,提示 HCY 组内皮细胞功能受损。

氧化还原学说是细胞衰老学说之一,HCY 是否通过改变氧化还原状态损伤内皮细胞功能尚存在分歧^[9-10]。本实验中各 HCY 组的 MDA 含量和 GSH 活性无明显改变,提示 HCY 似乎不是通过改变氧化还原状态影响细胞衰老。实验中观察到 HCY 抑制 NO 合成和释放,而有报道^[11]认为,NO 可以激活端粒酶活性从而延缓内皮细胞衰老,因此,HCY 是否通过 NO 的途径导致细胞衰老有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] McCracken C, Hudson P, Ellis R, et al. Methylmalonic acid and cognitive function in the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84: 1406-1411.
- [2] Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, et al. Age-related influence on thiol, disulfide, and protein-mixed disulfide levels in human plasma[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006, 61: 1030-1038.
- [3] Feng L, Ng T P, Chuah L, et al. Homocysteine, folate, and vitamin B-12 and cognitive performance in older Chinese adults: findings from the Singapore Longitudinal Ageing Study [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84: 1506-1512.
- [4] Corder E H, Beaumont H. Susceptibility groups for Alzheimer's disease (OPTIMA cohort): integration of gene variants and biochemical factors[J]. *Mech Ageing Dev*, 2007, 128: 76-82.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 119-120.
- [6] Dimri G P, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 9363-9367.
- [7] Persa C, Pierce A, Ma Z, et al. The presence of a transsulfuration pathway in the lens: a new oxidative stress defense system[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79: 875-886.
- [8] Faeh D, Chioloro A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about [J]? *Swiss Med Wkly*, 2006, 136(47-48): 745-756.
- [9] Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, et al. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 35785-35793.
- [10] Kawanishi S, Oikawa S J. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1019: 278-284.
- [11] Vasa M, Breitschopf K, Zeiher A M, et al. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence [J]. *Circ Res*, 2000, 87: 540-542.

[收稿日期] 2006-12-25

[修回日期] 2007-01-21

[本文编辑] 孙岩