

Hcy 对脐静脉内皮细胞 eNOS 和 caveolin-1 表达影响*

张海洋¹ 张会敏²

摘要:目的 研究不同浓度同型半胱氨酸(Hcy)对静息和钙离子导体(A23187)激活状态下人脐静脉内皮细胞中内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和小凹蛋白-1(caveolin-1)mRNA和蛋白表达的影响。方法 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)随机分4组:对照组、Hcy组(20、50、100、300 μmol/L)、A23187(1 μmol/L)组及上述浓度Hcy分别与A23187(1 μmol/L)共同孵育组,测定各组eNOS和caveolin-1蛋白及mRNA表达情况,同时检测各组一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)含量和eNOS、超氧化物歧化酶(SOD)活力。结果 对照组caveolin-1蛋白表达为1.13,Hcy各组该蛋白为0.21~2.05,呈浓度依赖性增高,差异有统计学意义($F=30.163, P<0.05$);各组eNOS mRNA表达为1.80~2.08,差异无统计学意义;对照组eNOS活力和NO含量分别为1.20 U/mL和122.41 μmol/L,Hcy组eNOS活力和NO含量分别为0.65~0.74 U/mL和65.33~98.91 μmol/L,均呈浓度依赖性降低,差异均有统计学意义($F=5.12、18.91, P<0.05$)。结论 Hcy可能通过增强caveolin-1蛋白表达,使其与eNOS耦联增加,进而抑制了eNOS活力。

关键词: 同型半胱氨酸;小凹蛋白-1;人脐静脉内皮细胞钙离子导体;A23187

中图分类号: R

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)05-0642-03

Effects of homocysteine on expressions of eNOS and caveolin-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells

ZHANG Hai-yang, ZHANG Hui-min. Department of Pediatric Surgery, Xinxiang Medical University (Weihui 453100, China)

Abstract: Objective To study the effects of homocysteine(Hcy) at different concentrations on expressions of endothelial nitric oxide synthase(eNOS) and caveolin-1 mRNA and protein in cultured human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) in base and calcium ionophore activated state. **Methods** HUVECs were divided into four groups: control group, Hcy groups(at different concentrations of 20, 50, 100 and 300 μmol/L), A23187 group(1 μmol/L) and Hcy(at different concentrations of 20, 50, 100, and 300 μmol/L) + A23187 group. After cultured for 24 hours, the expressions of eNOS and caveolin-1 mRNA and protein, nitric oxide(NO), malondialdehyde(MDA) content, eNOS and superoxide dismutase(SOD) activity were detected. **Results** The expressions of caveolin-1 were 1.13 in control group and 0.21~2.05 in Hcy groups with a dose-dependent trend($P<0.05$). The expression of eNOS mRNA was between 1.80~2.08, without differences among the groups($P>0.05$). The eNOS and NO were 1.20 U/mL and 122.41 μmol/L in the control group and 0.65~0.74 U/mL and 65.33~98.91 μmol/L in Hcy groups, with dose-dependent trends($P<0.05$). **Conclusion** There is no relationship between decreased activity of eNOS induced by Hcy and eNOS expression. Hcy may increase the association of caveolin-1 and eNOS by enhancing the expression of caveolin-1 in HUVEC both in base and activated state, which could decrease the activity of eNOS.

Key words: homocysteine; caveolin-1; human umbilical vein endothelial cell; A23187

高血压患病率呈逐年上升趋势,其发病机制与内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)通路传导障碍有关^[1]。有研究表明,eNOS在细胞内有激活和失活2种状态^[2],eNOS与胞膜上的小凹蛋白(caveolin-1)结合处于失活状态,当受到缓激肽、钙离子导体(A23187)等刺激时,细胞内钙离子浓度升高,促进eNOS与caveolin-1脱耦联,使eNOS在细胞内发生转位和激活,即caveolin-1参与eNOS活力调节^[3-4]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)能够导致内皮细胞损伤,但Hcy是否通过caveolin-1和eNOS的变化及其机制尚需进一步研究。本研究旨在原代培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的基础上,配合使用A23187,观察不同浓度Hcy对静息和激活状态下内皮细胞eNOS和Caveolin-1蛋白和mRNA表达的影响,并通过测定eNOS、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力和一氧化氮(nitric oxide, NO)、丙二醛(malonalde-

hyde, MDA)含量,以进一步阐明Hcy导致内皮细胞功能障碍的机制,为高同型半胱氨酸血症和心血管疾病防治提供科学依据。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 脐带 由石河子市妇幼保健院提供,均为健康孕妇剖宫产胎儿的新鲜脐带,体重、性别不限。

1.1.2 主要试剂 改良Eagle培养基(Dulbecco's modification of eagle's medium, DMEM)(美国Gibco公司);胎牛血清(美国hyclone公司);胶原酶II型、胰蛋白酶、同型半胱氨酸、A23187(美国Sigma公司);兔抗人VIII因子多克隆抗体(北京博士得公司);完全培养液(含90%DMEM、10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)、兔抗人caveolin-1多克隆抗体、兔抗人eNOS多克隆抗体(美国CST公司);Trizol(美国Invitrogen公司);NO、eNOS、MDA、SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所);Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(美国MBI公司)。721紫外分光光度计(上海天普分析仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞培养和鉴定 参照文献[5],取2~3代细胞用于实验。

* 基金项目: 河南省卫生厅医学科技攻关课题(2011020099)

作者单位: 1. 新乡医学院第一附属医院小儿外科,河南 卫辉 453100;

2. 新乡医学院护理学院

作者简介: 张海洋(1979-),男,河南周口人,医师,硕士,研究方向: 高血压发病机制。

通讯作者: 张会敏, E-mail: huimin000@126.com

1.2.2 实验分组及细胞培养液收集 将细胞以 $10^5 \sim 10^6$ / mL 的密度种入 6 孔板,待细胞 85% ~ 融合后,吸去孔内液体,进行随机分组:(1) 对照组:加 DMEM 液;(2) 不同浓度 Hcy 组:加含 Hcy 浓度分别为 20、50、100、300 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 液;(3) A23187 组:加含 A23187 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 液;(4) Hcy + A23187 组:A23187 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$, Hcy 的浓度分别为 20、50、100、300 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 液。24 h 后收集细胞培养液 2 mL, -20°C 保存,待测 NO、eNOS、MDA、SOD 等指标。

1.2.3 HUVECs 内 eNOS 和 caveolin-1 蛋白表达 western blotting 法检测 各组作用 24 h 后,采用 2,2'-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠(bicinchoninic acid,BCA)法^[6]测定蛋白质浓度, -20°C 保存。参照 western blotting 试剂盒说明书测定 eNOS 和 caveolin-1 蛋白表达。用 Bandleader 3.0 软件对条带进行灰度扫描,按下述公式分别计算 3 次实验中样品蛋白的相对含量:蛋白相对含量 = (该蛋白条带的灰度值 - 背景的灰度值) / (对照条带的灰度值 - 背景的灰度值)。

1.2.4 细胞 RNA 提取和逆转录 各组试剂作用 24 h 后,按 Trizol reagent 试剂盒说明书提取总 RNA,紫外分光光度计定量。取 RNA 5 μg 作为模板,参照 Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书合成 cDNA。

1.2.5 eNOS 和 caveolin-1 mRNA 表达的实荧光定量 PCR 测定 eNOS 和 caveolin-1 引物序列为:eNOS 上游引物 5'-CG-GAGAATGGAGAGAGCTT-3',下游引物 5'-CCCTGCACTGTCTGTGTTA-3',探针 AACA CAGACAGTGCAGGG,产物 182bp; caveolin-1 上游引物 5'-CATCTACAAGCCCAACAA-CAAG-3',下游引物:5'-CACATCTTCAAAGTCAATCTTG-3',探针 CAATCTCCTTGGTGTGCGCGTC,产物 145 bp;内参 β -actin:上游引物 5'-GCCAACACAGTGTCT-3',下游引物 5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3',探针 5'-ATCTCCTCTGCATCCTGTC-3'(反向探针),114 bp。

1.2.6 培养液中 NO、MDA 含量和 eNOS、SOD 活力检测 均参照试剂盒说明书进行操作。

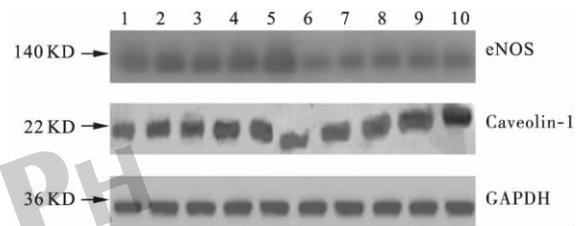
1.3 统计分析 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,将原始数据(Ct 值)换算为基因的相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$);应用 SPSS13.0 软件进行 *t* 检验和方差分析 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 eNOS 和 caveolin-1 mRNA 表达情况 对照组

eNOS mRNA 和 caveolin-1 mRNA 为 1.89 和 1.22,Hcy 组 2 者表达分别为 1.89 ~ 2.08 和 1.21 ~ 1.28,差异均无统计学意义。A23187 组 eNOS mRNA 和 caveolin-1 mRNA 为 1.99 和 1.33,A23187 + Hcy 组二者分别为 1.80 ~ 1.87 和 1.13 ~ 1.20,差异均无统计学意义。

2.2 各组 eNOS 和 caveolin-1 蛋白表达情况(图 1) eNOS 蛋白分子量为 140 kD,各组表达无差异;内参 GAPDH 分子量为 36 kD,各组蛋白表达无差异;caveolin-1 蛋白分子量为 22 kD,静息状态下,与对照组比较,20 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 caveolin-1 蛋白表达明显增高($t = 29.093, P < 0.05$),Hcy 浓度 $> 20 \mu\text{mol/L}$ 时,Hcy 呈现剂量依赖性上调 caveolin-1 蛋白表达。20 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 caveolin-1 蛋白表达为 (0.21 ± 0.02) ,300 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 caveolin-1 蛋白表达为 (0.47 ± 0.05) ,差异有统计学意义($t = 10.796, P < 0.05$)。在钙离子导体 A23187 激活后,施加不同浓度 Hcy,Hcy 依然上调 caveolin-1 蛋白表达($F = 30.163, P < 0.05$),并且随着 Hcy 浓度升高,caveolin-1 也呈现浓度依赖性的表达增强趋势。A23187 + 300 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 caveolin-1 蛋白表达为 (0.45 ± 0.06) ,明显高于 A23187 组的 (0.12 ± 0.03) ($t = 9.000, P < 0.05$)。



注:1:对照组;2~5:Hcy 组(20、50、100、300 $\mu\text{mol/L}$);6:A23187 组;7~10:A23187 + Hcy 组(20、50、100、300 $\mu\text{mol/L}$)。

图 1 各组 eNOS 和 Caveolin-1 蛋白表达情况

2.3 各组 HUVECs 培养液中 NO、MDA 含量和 eNOS、SoD 活力(表 1) 与对照组比较,Hcy 组 eNOS 活性和 NO 含量均呈浓度依赖性降低,差异均有统计学意义($F = 10.53, 23.81, P < 0.05$);与对照组比较,Hcy 各组 MDA 含量和 SOD 活力均呈现浓度依赖性增高,差异有统计学意义($F = 23.81, 6.39, P < 0.05$);与 A23187 组比较,A23187 + Hcy 各组 eNOS、NO 均呈浓度依赖性降低($F = 5.12, 18.91, P < 0.05$),MDA 呈浓度依赖性增高($F = 4.16, P < 0.05$),而各组 SOD 活力差异无统计学意义。

表 1 各组 eNOS、SOD 活力和 NO、MDA 含量比较

组别	Hcy 浓度($\mu\text{mol/L}$)	eNOS (U/mL)	NO ($\mu\text{mol/L}$)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/mL)
对照组	0	1.20 \pm 0.21	122.40 \pm 12.3	5.40 \pm 0.65	7.71 \pm 1.04
Hcy 组	20	0.74 \pm 1.33	98.91 \pm 9.05	7.65 \pm 0.67	8.96 \pm 1.19
	50	0.65 \pm 0.09	84.46 \pm 8.89	8.58 \pm 0.95	10.01 \pm 1.21
	100	0.62 \pm 0.08	71.65 \pm 5.63	9.05 \pm 0.88	10.05 \pm 1.14
	300	0.60 \pm 0.12	65.33 \pm 6.58	9.98 \pm 0.94	11.08 \pm 1.21
A23187 组	0	1.46 \pm 0.46	190.11 \pm 35.22	4.42 \pm 0.71	9.98 \pm 0.89
A23187 + Hcy 组	20	0.87 \pm 0.21	120.69 \pm 13.05	6.01 \pm 0.89	9.73 \pm 0.77
	50	0.65 \pm 0.07	109.33 \pm 10.58	6.68 \pm 1.15	9.84 \pm 0.75
	100	0.57 \pm 0.04	101.79 \pm 11.25	7.09 \pm 1.08	9.67 \pm 0.88
	300	0.49 \pm 0.05	99.07 \pm 11.08	7.86 \pm 1.04	9.80 \pm 0.81

3 讨论

Hcy 是心血管疾病的独立危险因素,其可能机制与其影响了 eNOS 和 caveolin-1 的细胞内的相互作用有关⁽²⁾。本研究结果表明,对照组和 A23187 组 eNOS mRNA 分别为 1.89 和 1.99,而 Hcy 各组与 A23187 + Hcy 各组为 1.89 ~ 2.08 和 1.80 ~ 1.87,各组无明显差异,表明 Hcy 不影响 eNOS mRNA 表达。本研究还表明,Hcy 同样不影响各组该蛋白表达,即 Hcy 对静息和激活状态下 HUVECs 中 eNOS mRNA 和蛋白表达均无影响,与文献(7-8)报道一致。caveolin-1 是内皮细胞中 caveolae 的主要结构和调节蛋白,eNOS 与 caveolin-1 结合后处于失活状态,当细胞内钙离子浓度升高时,促进 eNOS 与 caveolin-1 脱耦联,有利于 eNOS 转位后的激活⁽⁷⁾。有研究表明,较多病理过程通过影响 caveolin-1 蛋白的表达和 eNOS 的转位调节 eNOS 活力及 NO 生成,促进心血管疾病的发生发展⁽⁸⁾;eNOS 在 caveolae 上的正确定位更容易与信号转导蛋白接近有利于酶的激活、NO 的产生,eNOS 的正确亚细胞定位是其活化的第一步,定位错误将使激动剂诱导的 NO 生成减少,caveolae 数目减少势必影响到 eNOS 的正确定位。本研究通过检测 caveolin-1 蛋白和 mRNA 表达,发现 Hcy 能够上调静息和激活状态下内皮细胞中该蛋白表达,同时 NO 含量减少、eNOS 活力降低、MDA 含量增加,可能与 caveolin-1 蛋白表达增高,进一步与 eNOS 偶联增加,从而抑制了 eNOS 活力,进一步影响了 NO 的生成减少和 MDA 生成增加有关,与文献(9-10)报道一致。综上所述,Hcy 引起的 eNOS 活力降低可能与 eNOS 转录和蛋白表达无关;Hcy 可能通过增强 caveolin-1 蛋白表达,使得 caveolin-1 和 eNOS 耦联增加,从而抑制了 eNOS

的活力。

参考文献

- (1) 张立华,徐志鑫.高血压及高危因素社区综合干预效果评价[J].中国公共卫生 2011 27(8):1069-1070.
- (2) Hung MJ,Cherng WJ,Hung MY,et al. Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells[J]. Journal of Hypertension 2010 28(5):940-951.
- (3) 冉胤威,杜俊蓉,白波,等.高胆固醇上调 Caveolin-1 的表达[J].生物医学工程学杂志 2004 21(2):276-279.
- (4) 郭玉,朱炳阳,严奉祥,等.金粉藤素对甲萘醌损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用[J].中国病理生理杂志 2003 19(1):10-13.
- (5) 张会敏,何芳,邓峰美,等.人脐静脉内皮细胞原代培养方法的建立[J].石河子大学学报 2006 24(5):572-575.
- (6) Brenner AJ,Harris ED. A quantitative test for copper using bicinchoninic acid[J]. Anal Biochem 1995 226(1):80-84.
- (7) Zhang X,Li H,Jin H,et al. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production[J]. Am J Physiol Renal Physiol 2000 279(4):F671-F678.
- (8) Meye C,Schumann J,Wagner A,et al. Effects of homocysteine on the levels of caveolin-1 and eNOS in caveolae of human coronary artery endothelial cells[J]. Atherosclerosis 2006 190(2):256-263.
- (9) 张瑞芬,凌文华,马静,等.慢性轻度高同型半胱氨酸血症对大鼠 NO 影响[J].中国公共卫生 2005 21(12):1466-1467.
- (10) 王振焕,胡清华,钟华,等.小凹蛋白-1 在脐静脉内皮细胞 CaR 介导 NO 生成中的作用和机制[J].中国病理生理杂志,2011 27(5):934-938.

收稿日期:2011-08-23

(王奕编辑 李贵福校对)

【实验研究】

呼吸机导管内细菌生物被膜抗吞噬作用

王欢¹,刘新²,张佩¹

摘要:目的 探讨侵入性导管内细菌生物被膜抗吞噬作用。方法 于 2010 年 7 月-2011 年 12 月收集新生儿 ICU 病房危重新生儿病例呼吸机导管标本 32 份,对导管内壁细菌分离鉴定,选择生物膜模式菌株模拟导管中液体流动状态重建细菌生物被膜,观察细菌生物被膜形态结构及吞噬细胞与细菌生物被膜的相互作用,分析导管细菌生物被膜形成与导管伴生感染的关系。结果 32 例导管标本经细菌分离培养和 ATB 生化鉴定,显示鲍曼不动杆菌 14 株,铜绿假单胞菌 9 株,葡萄球菌 6 株,真菌 3 株;14 例鉴定的鲍曼不动杆菌标本中有 8 株产生生物被膜菌株;患者侵入性导管容易被细菌粘附形成生物被膜,扫描电镜可用于观察细菌生物被膜形成情况,生物被膜具有明显抗吞噬作用。结论 生物被膜抗吞噬作用是感染难治的重要因素。

关键词:呼吸机;生物被膜;导管;抗吞噬

中图分类号:R 446.5

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2012)05-0644-03

Anti-phagocytosis effect of bacterial biofilm in invasive catheter WANG Huan, LIU Xin, ZHANG Pei. Department of Immunology and Pathogen Biology Liaoning Medical College (Jinzhou 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-phagocytosis effects of bacterial biofilm in invasive catheter. **Methods** From July 2010 through December 2011, 32 samples of critical ventilator catheter specimens were collected from neonatal intensive care unit (NICU). The bacteria in inner membrane of the catheter were isolated and selected to simulate the biofilm in the catheter of the NICU under clinic usage. We observed the bio-membrane morphology and interactions between phagocytic cells and bacterial biofilm, and analyzed the relationship of catheter bio-membrane formation and catheter related infection. **Results** Totally 14 strains of *Acinetobacter baumannii*, a strains of *Pseudomonas aeruginosa*, 6 strains of *Staphylococ-*

作者单位:1. 辽宁医学院免疫与病原生物学教研室,辽宁 锦州 121001; 2. 沈阳医学院病原生物学教研室

作者简介:王欢(1984-),女,辽宁抚顺人,硕士在读,研究方向:抗感染免疫学。

通讯作者:张佩, E-mail: jyzhangpei@163.com