

同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α

王淑秀, 邓仲端, 倪娟, 瞿智玲

(华中科技大学同济医学院病理学教研室, 湖北省武汉市 430030)

[主题词] 同型半胱氨酸; 内皮, 血管; 巨噬细胞炎性蛋白 1 α ; 聚合酶链反应; 动脉粥样硬化

[摘要] 探讨同型半胱氨酸是否可诱导人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 使培养的人脐静脉内皮细胞暴露于不同浓度的同型半胱氨酸, 采用逆转录聚合酶链反应和免疫细胞化学方法观察其巨噬细胞炎性蛋白 1 α 的表达。结果发现, 培养的人脐静脉内皮细胞可表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α 。暴露于同一浓度(0.1 mmol/L) 同型半胱氨酸, 分别孵育 4、8 和 16 h, 其巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 表达水平分别是对照组的 2.08 倍、3.26 倍和 3.35 倍; 免疫细胞化学发现, 上述各组巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白表达的平均吸光度值分别是 0.071 ± 0.006 、 0.081 ± 0.006 和 0.128 ± 0.009 , 均显著高于对照组(0.049 ± 0.005 , $P < 0.01$)。暴露于不同浓度(0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L) 的同型半胱氨酸, 孵育 8 h 后, 各组巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 表达水平分别是对照组的 2.08 倍、4.35 倍和 4.57 倍, 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白表达的平均吸光度值分别是 0.081 ± 0.006 、 0.110 ± 0.009 和 0.118 ± 0.008 , 均显著高于对照组(0.049 ± 0.005 , $P < 0.01$)。结果提示, 同型半胱氨酸可诱导人脐静脉内皮细胞表达高水平的巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 和蛋白。

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] A

Homocysteine Induces Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 α in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WANG Shu Xiu, DENG Zhong Duan, Ni Juan, and QU Zhi Ling

(Department of Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[MeSH] Homocysteine; Endothelium, Vascular; Macrophage Inflammatory Protein-1 α ; Polymerase Chain Reaction; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether homocysteine (HCY) could induce human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) to express macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α). **Methods** After exposure of the cultured hUVEC to HCY either at a same concentration for different incubation time or at increasing concentrations but for a same incubation time, the MIP-1 α mRNA and protein expression in the cells were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry, respectively. **Results** Cultured hUVEC could express MIP-1 α mRNA and protein. RT-PCR showed that exposure of hUVEC to HCY at a concentration of 0.1 mmol/L for 4, 8 and 16 h, resulted in a 2.08-fold, a 3.26-fold and a 3.35-fold increase in the expression of MIP-1 α mRNA in hUVEC, compared with the control group; meanwhile, exposure of hUVEC to HCY at different concentrations (0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L and 1 mmol/L) for 8 h, resulted in a 2.08-fold, a 4.35-fold and a 4.57-fold increase in the expression of MIP-1 α mRNA in hUVEC as much as the control group, respectively. Immunocytochemistry showed that the absorbance values of MIP-1 α protein expression in hUVEC exposed to HCY at a same concentration but for different incubation time mentioned above were 0.071 ± 0.006 , 0.081 ± 0.006 and 0.128 ± 0.009 (control group 0.049 ± 0.005), respectively. There was a significantly statistical difference between groups ($F = 946.70$, $P < 0.01$). The absorbance values of MIP-1 α protein in hUVEC exposed to HCY at different concentrations but for a same incubation time mentioned above were 0.081 ± 0.006 , 0.110 ± 0.009 and 0.118 ± 0.008 (control group 0.049 ± 0.005), respectively, which also showed significantly statistical difference between groups ($F = 546.89$, $P < 0.01$). **Conclusion** HCY was able to induce a high expression of MIP-1 α mRNA and protein in cultured hUVEC.

外周血单核细胞粘附于内皮并迁入动脉内皮下间隙是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的早期

事件, 该过程受多种源于动脉壁细胞产生的细胞因子、趋化因子的影响, 包括巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)。各种有害因子引起的内皮细胞损伤及功能障碍是 As 的始发病变。高浓度的同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)可损伤血管内皮细胞, 高同型半胱氨酸血症是

[收稿日期] 2001-09-30 [修回日期] 2002-01-16

[基金项目] 国家自然科学基金(39730220)资助。

[作者简介] 王淑秀, 女, 1970 年 2 月出生, 河南济源人, 博士研究生, 讲师。邓仲端, 男, 1927 年 10 月出生, 广西南宁人, 病理学教授, 博士研究生导师, 多年从事动脉粥样硬化发病机制的研究。

As 发生的一个独立危险因素^[1], 但 HCY 导致 As 的机制尚不清楚, 其对内皮细胞的影响可能是重要机制之一。本研究旨在探讨 HCY 是否诱导内皮细胞表达 MIP-1 α , 以阐明 As 的早期发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

RNA 提取试剂盒 (TRIZOL)、逆转录聚合酶链反应 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒、新生小牛血清 (NBCS)、胎牛血清 (FBS)、M199 培养基和 DMEM/F12 培养基均为 Gibco 公司产品。MIP-1 α 和 GAPDH 引物由 Gibco-BRL 公司合成。TaqDNA 聚合酶购自上海 Promega 公司。羊抗人单克隆抗体为 Sigma 公司产品。免疫组织化学染色试剂盒购自中山公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养及分组

用酶消化法分离新鲜脐带的脐静脉内皮细胞^[2], 置 37℃ CO₂ 培养箱中, 用含 10% FBS、5% 人血清和 5% NBCS 的 M199 培养基培养。倒置显微镜下细胞呈典型的铺路石样形态, (1)因子相关抗原间接免疫荧光法阳性。用 0.1% 胰蛋白酶消化传代, 用第 2~3 代细胞进行实验。随机分为六组: 对照组: 培养液为无血清培养基 (DMEM/F12); ④0.1 mmol/L HCY 4 h 组: 无血清培养基中加 0.1 mmol/L HCY, 温育 4 h; ④0.1 mmol/L HCY 8 h 组: 无血清培养基中加 0.1 mmol/L HCY, 温育 8 h; ④0.1 mmol/L HCY 16 h 组: 无血清培养基中加 0.1 mmol/L HCY, 温育 16 h; ④0.5 mmol/L HCY 组: 无血清培养基中加 0.5 mmol/L HCY, 温育 8 h; ④1 mmol/L HCY 组: 无血清培养基中加 1 mmol/L HCY, 温育 8 h。

1.3 逆转录聚合酶链反应

按 TRIZOL 试剂盒说明书提取各组 hUVEC 的总 RNA, 取各组总 RNA 2 μ g, 逆转录合成 cDNA, 取该产物 2 μ L 进行 PCR 循环。94℃温育 3 min, 94℃变性 1 min, 58℃复性 1 min, 72℃延伸 2 min, 共 35 个循环, 末次循环 72℃延伸 10 min。MIP-1 α 的引物序列为: 正链 5' CTGCCCTTGCTGCTCCTCTG 3', 负链 5' CTGCCGGCTTCGCTTGGTA 3', PCR 扩增产物长度为 197 bp^[3]。GAPDH 的引物序列: 正链 5' CCACCCATGGCAAATTCATGGCA 3', 负链 5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC 3', PCR 扩增产物长度为 550 bp^[4]。反应结束后, 取反应产物 10 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化已锭染色, 紫外线拍照, SQ9636

型扫描系统扫描, TITY 图像分析系统检测各组目的基因及 GAPDH 基因的积分吸光度 (absorbance, A) 值, 以二者的比值代表 MIP-1 α mRNA 的表达。

1.4 免疫细胞化学染色

生长于盖玻片上的各组 hUVEC 加 HCY 后, 用乙醇和丙酮 (1:1) 混合液固定。用羊抗人 MIP-1 α 单克隆抗体及免疫细胞化学检测试剂盒进行染色。染色方法按说明书进行。结果进行图像分析, 以平均吸光度 (A) 值代表 MIP-1 α 蛋白的表达。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达

逆转录聚合酶链反应显示, hUVEC 可表达 MIP-1 α mRNA。hUVEC 暴露于同一浓度 (0.1 mmol/L) HCY, 分别孵育 4、8 及 16 h 后, MIP-1 α mRNA 的表达水平分别是对照组的 2.08 倍、3.26 倍和 3.35 倍 (图 1 和表 1, Figure 1 and Table 1); 暴露于不同浓度 (0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L) HCY 孵育 8 h 后, MIP-1 α mRNA 表达水平分别是对照组的 2.08 倍、4.35 倍和 4.57 倍 (图 1 和表 2, Figure 1 and Table 2)。

表 1. 暴露于同一浓度同型半胱氨酸不同时间后人脐静脉内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达。

Table 1. MIP-1 α mRNA expression in hUVEC exposed to HCY at a same concentration for different incubation time.

Groups	Ratio of the mRNA absorbance value of MIP-1 α to GAPDH
Control	0.3310
4h	0.6882
8h	1.0789
16h	1.1110

表 2. 暴露于不同浓度同型半胱氨酸 8 h 后人脐静脉内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达。

Table 2. MIP-1 α mRNA expression in hUVEC exposed to HCY at different concentrations for a same incubation time.

Groups	Ratio of the mRNA absorbance value of MIP-1 α to GAPDH
Control	0.3310
0.1 mmol/L	1.0789
0.5 mmol/L	1.4391
1 mmol/L	1.5145

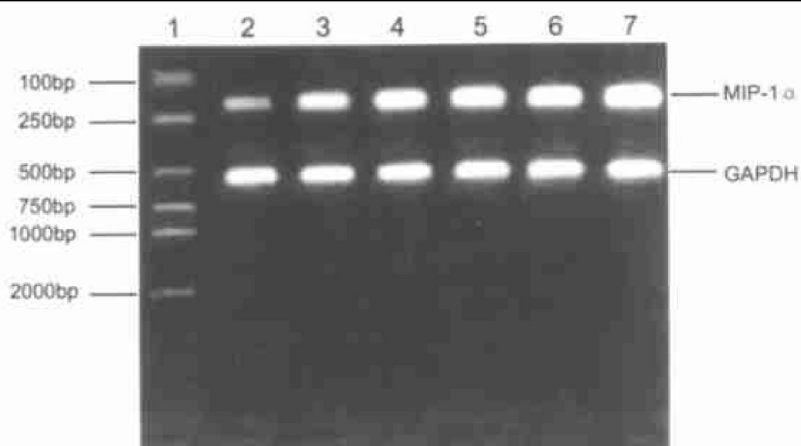


图 1. 同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA.

Figure 1. MIP-1 α mRNA expression in hUVEC induced by HCY. 1: Marker; 2: control; 3: 0.1 mmol/L HCY 4 h; 4: 0.1 mmol/L HCY 8 h; 5: 0.1 mmol/L HCY 16 h; 6: 0.5 mmol/L HCY 8 h; 7: 1 mmol/L HCY 8 h.

2.2 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达

免疫细胞化学显示, hUVEC 均表达 MIP-1 α 蛋白, 表现为胞浆内呈棕黄色颗粒(图 2, Figure 2)。图像分析显示, hUVEC 暴露于 0.1 mmol/L HCY, 作用 4 h、8 h 和 16 h, MIP-1 α 蛋白表达明显增加, 均显

著高于对照组($P < 0.01$), 见表 3(Table 3)。暴露于不同浓度(0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L) HCY 8 h 后, MIP-1 α 蛋白的表达亦明显高于对照组($P < 0.01$), 见表 4(Table 4)。

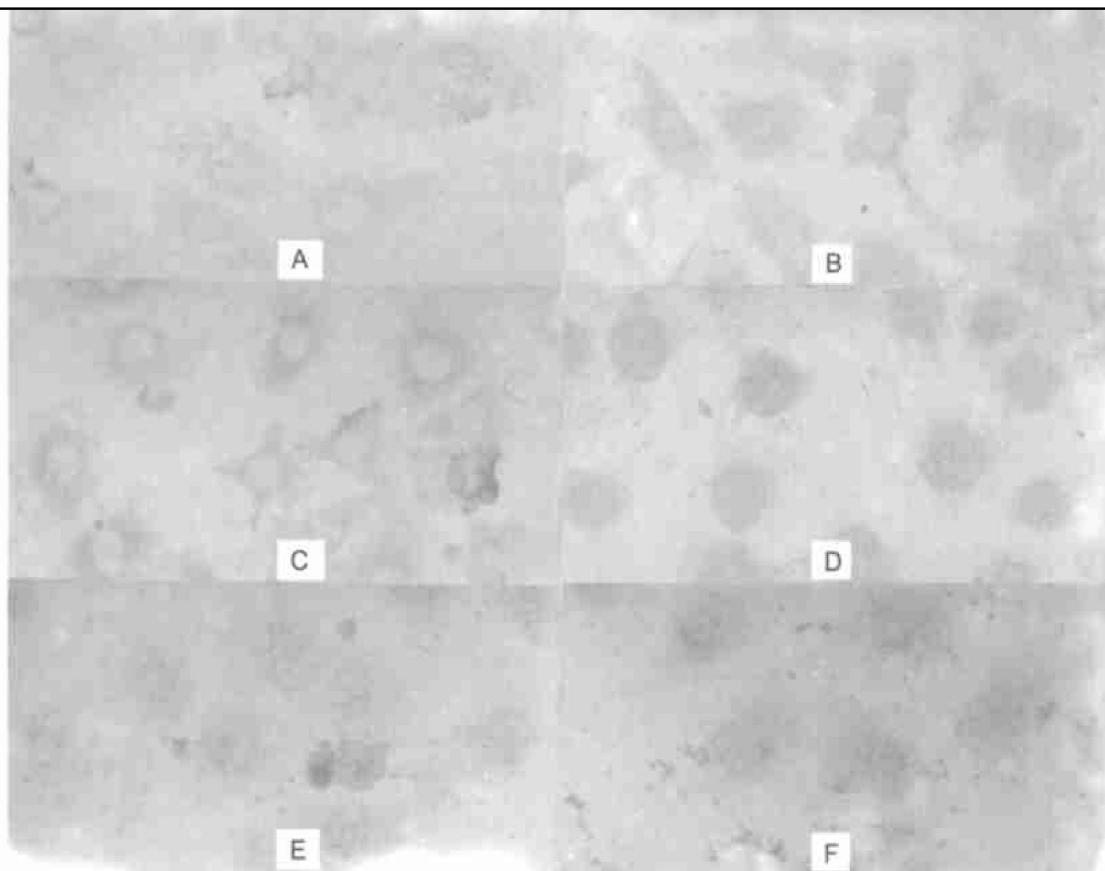


图 2. 免疫细胞化学染色.

Figure 2. Immunocytochemistry (SP \times 260). A: control. B: 0.1 mmol/L HCY 4 h. C: 0.1 mmol/L HCY 8 h. D: 0.1 mmol/L HCY 16 h. E: 0.5 mmol/L HCY 8 h. F: 1 mmol/L HCY 8 h.

表 3. 暴露于同一浓度同型半胱氨酸不同时间后人脐静脉内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达.

Table 3. The expression of MIP-1 α protein in hUVEC exposed to HCY at a same concentration for different incubation time ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$).

Groups	Mean absorbance values
Control	0.049 \pm 0.005
4 h	0.071 \pm 0.006 ^a
8 h	0.081 \pm 0.006 ^{ab}
16 h	0.128 \pm 0.009 ^{abc}

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with 4 h group; c: $P < 0.01$ compared with 8 h group.

表 4. 暴露于不同浓度同型半胱氨酸 8 h 后人脐静脉内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达。

Table 4. The expression of MIP-1 α protein in hUVEC exposed to HCY at different concentrations for a same incubation time ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$).

Groups	Mean absorbance values
Control	0.049 \pm 0.005
0.1 mmol/L	0.081 \pm 0.006 ^a
0.5 mmol/L	0.110 \pm 0.009 ^{ab}
1 mmol/L	0.117 \pm 0.009 ^{abc}

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with 0.1 mmol/L HCY group; c: $P < 0.01$ compared with 0.5 mmol/L HCY group.

3 讨论

同型半胱氨酸是一种含硫氨基酸, 是甲硫氨酸的中间代谢产物^[1]。高浓度的同型半胱氨酸(> 1 mmol/L)可损伤血管内皮细胞, 抑制凝血酶调节蛋白的分泌和蛋白 C 的激活, 减少组织纤维蛋白溶酶原激活剂的细胞结合位点, 削弱内皮源性的血管舒张作用^[5]。受到 HCY 刺激的血管内皮细胞可吸引单核细胞, 同时可产生细胞因子和生长因子, 后者作用于邻近的血管平滑肌细胞, 促进其生长。受损的血管内皮细胞也能促使血小板粘附于血管壁并促进血栓形成。因此, 高同型半胱氨酸血症是 As 的一个独立危险因素^[6-8]。

我们的实验证明, 人脐静脉内皮细胞可表达 MIP-1 α mRNA 和蛋白, HCY 可显著增强人脐静脉内皮细胞 MIP-1 α 的表达, 且与人脐静脉内皮细胞暴露

于 HCY 的时间及浓度呈正相关。MIP-1 α 属于 C-C 型趋化因子, 其主要功能是对单核细胞的趋化作用^[9], MIP-1 α 在体内可引起单核细胞及淋巴细胞的浸润, 并可活化内皮细胞^[10]。MIP-1 α 还可刺激巨噬细胞分泌 IL-1 α 和 TNF α , 刺激成熟组织中巨噬细胞的增殖^[11]; 亦能增加单核细胞表面 $\alpha_4\beta_1$ 及 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的亲和力^[12]。HCY 能促进人脐静脉内皮细胞表达 MIP-1 α , 而 MIP-1 α 又可活化内皮细胞, 使单核细胞紧密粘附于血管内皮, 单核细胞在 MIP-1 α 及 MCP-1 等趋化因子的协同作用下, 源源不断穿过内皮进入动脉内膜, 分化成巨噬细胞; 这些巨噬细胞通过清道夫受体摄取脂质, 由于该受体无下调功能, 致使摄取的脂质愈来愈多, 终致形成泡沫细胞。大量泡沫细胞聚集于内皮下间隙, 而形成脂纹病变。

[参考文献]

- [1] Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (14): 6369-373
- [2] 阮秋蓉, 邓仲端, 徐增绶, 等. 培养的人脐静脉内皮细胞产生单核细胞趋化因子. *中华病理学杂志*, 1991, **20** (3): 205-208
- [3] Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (3): 397-403
- [4] Chau LY, Peck K, Yen HH, et al. Agonist induced down regulation of platelet activating factor receptor gene expression in U937 cells. *Biochem J*, 1994, **301** (pt3): 911-916
- [5] Wang H, Yoshizumi M, Lai K, et al. Inhibition of growth and P21^{ras} methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem*, 1997, **272** (40): 25380-385
- [6] Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, et al. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterio and Thromb*, 1993, **13** (9): 1327-333
- [7] Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, et al. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocysteine. *Atherosclerosis*, 1997, **132** (2): 177-185
- [8] 李静梅, 高 奋, 肖传实. 心肌梗死患者同型半胱氨酸与冠心病传统危险因素的比较. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 137-139
- [9] Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, et al. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes. *Eur J Immunol*, 1995, **25** (1): 64-68
- [10] Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein 1 α induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol*, 2000, **164** (6): 3392-401
- [11] Fahey TJ, Fracey KJ, Tekamp Olson P, et al. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol*, 1992, **148**: 2764-769
- [12] Weber C, Alon R, Moser B, et al. Sequential regulation of $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ integrin avidity by CC chemokines in monocytes: Implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol*, 1996, **134**: 1063-073

(此文编辑 文玉珊)