DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2018.06.003

·论著:心脑血管疾病专题·

硝化应激参与同型半胱氨酸诱导的血管内皮细胞自噬降低

周 艺[1],严文静[1],甄攀攀[2],张赏月[1],王 雯[1,3*]

(1.首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系,北京 100069;2.首都医科大学附属北京潞河医院病理科;3.代谢紊乱相关心血管疾病北京市重点实验室)

摘 要: 本研究旨在探讨硝化应激与同型半胱氨酸(Hcy)诱导血管内皮细胞自噬降低之间的关系。利用饮食法建立高同型半胱氨酸血症(HHcy)大鼠模型,利用免疫组织化学染色法分别检测大鼠胸主动脉自噬相关蛋白及硝化应激相关蛋白的表达。体外培养人脐静脉内皮细胞,用 Hcy 刺激内皮细胞,提取细胞蛋白,检测自噬相关蛋白及硝化应激相关蛋白的表达。利用 FeTMPyP 预处理 Hcy 刺激的 HUVECs 细胞,检测上述相关蛋白表达的变化。结果显示 HHcy 大鼠模型建立成功,同时其胸主动脉 LC3 表达下降,p62 表达增加,NT 表达增加;Hcy 处理的 HUVECs 自噬水平明显降低,而 FeTMPyP 预处理能够降低 NT 表达,逆转 Hcy 导致的细胞自噬水平降低。本研究表明硝化应激参与了同型半胱氨酸诱导的血管内皮细胞自噬降低。

关键词: 同型半胱氨酸; 自噬; 硝化应激

中图分类号:R33 **文献标识码:**A

Nitrative stress participates in Hcy-induced autopahgic deficiency in vascular endothelial cells

ZHOU Yi, YAN Wenjing, ZHEN Panpan, ZHANG Shangyue, WANG Wen

(*Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing* 100069, *China*)

Abstract: The aim of the study is to explore the relationship between nitrative stress and autophagic deficiency induced by homocystein (Hcy) in vascular endothelial cells. In diet-induced hyperhomocysteinemia (HHcy) rat model, the expression of nitrative stress-related and autophagy-related proteins was detected with immunohistochemistry in thoracic aorta. HUVECs were challenged with Hcy, then the total proteins were extracted to evaluate the autophagy level with Western Blot. Moreover, HUVECs were pre-treated with FeTMPyP, and the expressions of autophagy-related proteins were examined. The diet-induced HHcy rat model was established successfully. As the results showed, the autophagy level was decreased in thoracic aorta of HHcy rats. Meanwhile, the autophagy level was decreased significantly evidenced by decreased LC3 Ⅱ/Ⅰ expression and increased p62 expression. Moreover, the expression of NT were increased in both HHcy rats and Hcy-treated HUVECs. More importantly, pretreatment with FeTMPyP alleviated Hcy-induced autophagic deficiency significantly. These results indicated that elevated nitrative stress was involved in Hcy-induced autopahgic deficiency in vascular endothelial cells.

Key words: homocysteine; autophagy; nitrative stress

同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)是一种含硫氨基酸,当人体血浆 Hcy 水平高于 10 μmol/L 即被认为是高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia,HHcy)[1]。高同型半胱氨酸血症是心脑血管疾病的独立危险因素,参与并导致多种心血管疾病的发生发展[2]。血管内皮功能障碍是许多心血管疾病的发病基础及始动环节。有文献报道,HHcy 能够通过炎症[3]、氧化应激[4]等机制导致严重的血管内皮损伤,最终导致动脉粥样硬化等疾病的发生。自噬是体内高度保守的生物过程,对于维持血管内皮细胞正常功能具有十分重要的作用[5-6]。有研究表明,Hcy 能够损伤血管内皮细胞的自噬水平[7],但其

收稿日期:2018-09-01;**修回日期:**2018-10-22

基金项目:国家自然科学基金(81671382).

*通信作者,E-mail:wangwen@ccmu.edu.cn.

机制并不十分清楚。在作者前期的研究中发现，HHcy 能够升高机体硝化应激水平，产生大量的过氧亚硝基阴离子（peroxynitrite，$ONOO^-$）等强氧化物质，导致严重的血管内皮损伤[8]。Hcy 是否会通过升高硝化应激水平导致细胞自噬损伤呢？本研究拟探究硝化应激在 Hcy 降低血管内皮细胞自噬中的作用，为阐明 HHcy 导致血管内皮细胞损伤的机制提供新的思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 3 月龄雄性 SD 大鼠均由首都医科大学实验动物中心提供；大鼠血浆 Hcy 酶联免疫检测试剂盒（南京建成，中国）；胎牛血清、DMEM 高糖培养基（Hyclone 公司，美国）；Hcy 试剂（Sigma-Aldrich 公司，美国）；FeTMPyP 试剂（Cayman Chemical 公司，美国）；LC3 抗体、p62 抗体（CST，美国）、3-NT 抗体（Millipore 公司，美国）；GAPDH 抗体、山羊抗兔 IgG/生物素标记和山羊抗小鼠 IgG/生物素标记（Santa Cruz 公司，美国）；兔/小鼠超敏二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥公司；Western blot 电泳仪，Western blot 电转仪，凝胶成像系统（Bio-Rad 公司，美国）。

1.2 主要方法

1.2.1 *HHcy 大鼠模型构建及血浆 Hcy 浓度的检测* 将 SD 大鼠随机分为正常饮食喂养组及 2.5%蛋氨酸饮食喂养组，在喂养 6 个月后，酶联免疫法检测大鼠血浆 Hcy 浓度。实验操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 *细胞培养及给药* 含 10%胎牛血清及 1%双抗的 DMEM 高糖培养基培养 HUVECs 细胞，置于 95% O_2 和 5% CO_2 培养箱 37 ℃孵育。细胞贴壁后，隔天换液培养，当细胞密度达到 70%～80%进行传代至 6 孔板继续培养。当 6 孔板细胞密度达 60%～70%，给予细胞 2.5 μmol/L FeTMPyP 预处理 30 min 后，给予细胞 500 μmol/L Hcy 处理 24 h。加药完成后提取细胞蛋白，进行后续实验。

1.2.3 *免疫组织化学染色* 将胸主动脉石蜡切片常规脱蜡至水后，用 PBS 漂洗；微波炉法进行组织抗原修复，当切片恢复至室温后，用 5% BSA 室温封闭 20 min，甩掉封闭液，分别加入 LC3、p62 及 NT 抗体，4 ℃孵育过夜；次日，取出切片恢复至室温后，PBS 冲洗，使用兔/小鼠超敏二步法检测试剂盒，室温孵育聚合物辅助剂、辣根酶标记抗小鼠 IgG 聚合物各 30 min。镜下观察 DAB 显色液使切片显色情况，苏木精染液染色 5 min 使细胞核着色，使用 1%盐酸酒精脱去非特异性染色。梯度乙醇二甲苯脱水，树脂封片，显微镜观察并拍照。

1.2.4 *Western blot* 取加药后 HUVECs 细胞蛋白用 RIPA 细胞裂解液进行裂解，并超声离心。取蛋白上清检测蛋白浓度。根据浓度配制 10 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳以分离条带，后将蛋白转移至 PVDF 膜上，5%奶粉室温封闭 1 h 后孵育一抗，4℃过夜。洗膜后孵育二抗，ECL 发光试剂曝光，得到显色条带。ImageLab 软件分析条带灰度值。

1.3 统计学分析 数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件，所有数据均用均数±标准差表示。组间的比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HHcy 大鼠模型建立成功 和正常饮食喂养的大鼠相比，2.5%蛋氨酸饮食喂养 6 月组大鼠血浆 Hcy 浓度明显增加，表明 HHcy 大鼠模型建立成功（图 1）。

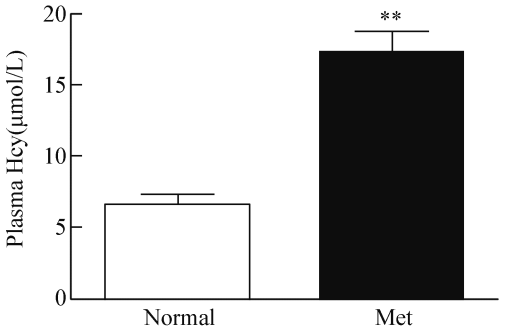

图 1 大鼠血浆 Hcy 浓度 与 Normal 组比较，$**P<0.01$

2.2 HHcy 大鼠胸主动脉自噬相关蛋白及硝化应激相关蛋白的检测 对 HHcy 大鼠胸主动脉切片进行免疫组织化学染色并镜下观察，发现 HHcy 大鼠中硝化应激相关蛋白以及自噬相关蛋白表达均出现明显变化。由于 $ONOO^-$在体内的代谢途径复杂，并且反应十分迅速，因此很难直接测量体内 $ONOO^-$的浓度。目前，使用 NT 的单克隆抗体检测到硝基酪氨酸的存在，被公认为是体内 $ONOO^-$生成的印迹。结果显示，和正常大鼠相比，HHcy 大鼠胸主动脉 NT 的表达明显增加，且集中在内膜，提示 HHcy 大鼠体内硝化应激水平呈明显升高的状态（图 2A）。同时，检测自噬相关蛋白 LC3 发现，HHcy 大鼠 LC3 表达有所降低，而作为自噬底物，p62 的表达却明显升

高(图 2B)。提示 HHcy 大鼠胸主动脉自噬水平明显降低。

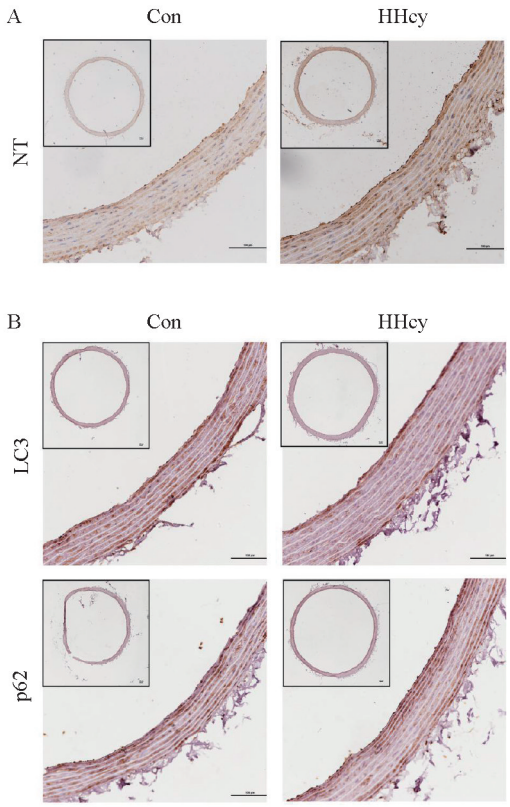

图 2　HHcy 大鼠胸主动脉 NT、LC3 及 p62 免疫组化染色

A:大鼠胸主动脉 NT 的表达(20×);

B:大鼠胸主动脉 LC3、p62 的表达(20×)

2.3　Hcy 对 HUVECs 硝化应激及自噬相关蛋白的影响　为探究 Hcy 对 HUVECs 细胞自噬及硝化应激水平的影响,给予 HUVECs 细胞 Hcy 刺激(500 μmol/L,24 h),并提取细胞蛋白,检测其浓度后进行 Western Blot 实验。结果显示,和对照组相比,Hcy 刺激的 HUVECs 细胞 NT 表达明显增加(图 3A),提示 Hcy 刺激诱导 HUVECs 细胞硝化应激水平增加。而自噬相关蛋白 LC3 Ⅱ/Ⅰ的表达明显降低(图 3B);自噬底物 p62 的表达明显增加(图 3C),以上结果提示 Hcy 刺激 HUVECs 细胞自噬水平降低。

2.4　FeTMPyP 能够逆转 Hcy 诱导的 HUVECs 细胞自噬降低　为进一步探究 Hcy 诱导的硝化应激升高及自噬降低之间的关系,用 $ONOO^-$ 清除剂 FeTMPyP 对 HUVECs 细胞进行预处理,在预处理 30 min 后加入 Hcy 刺激 24 h。Western blot 结果显示,和 Hcy(-)FeTMPyP(-)细胞相比,Hcy(+)FeTMPyP(-)处理的细胞 NT 表达明显增加,而 FeTMPyP 预处理的细胞能够逆转 NT 表达的增加,几乎降低至正常水平(图 4A),这提示 FeTMPyP 能够清除 $ONOO^-$,以降低细胞的硝化应激水平。同时,FeTMPyP 预处理能够提高 LC3 表达(图 4B),同时降低 p62 表达(图 4C)。这提示 FeTMPyP 能够逆转由 Hcy 引起的自噬水平降低。

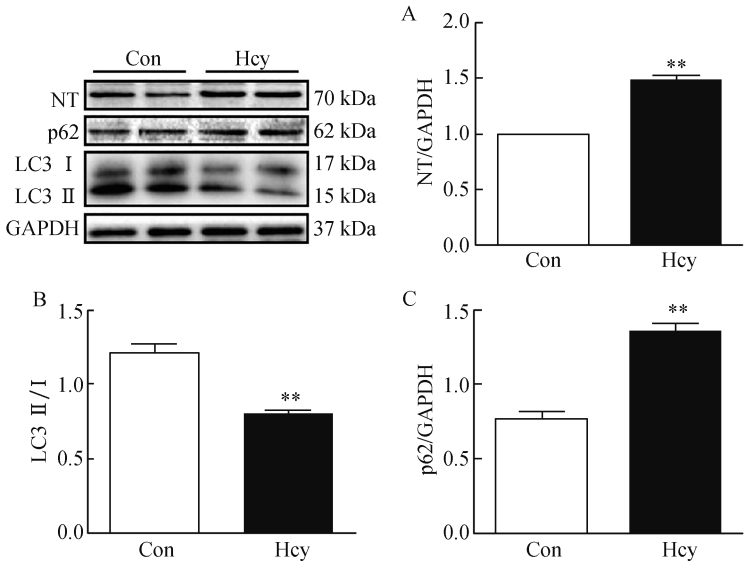

图 3　Hcy 对 HUVECs 细胞 NT、LC3 Ⅱ/Ⅰ及 p62 蛋白表达情况的影响

A:Hcy 刺激下 HUVECs 细胞 NT 的表达;B:Hcy 刺激下 HUVECs 细胞 LC3 Ⅱ/Ⅰ的表达;

C:Hcy 刺激 HUVECs 细胞 p62 的表达　　与 Con 组比较,$^{**}P<0.01$

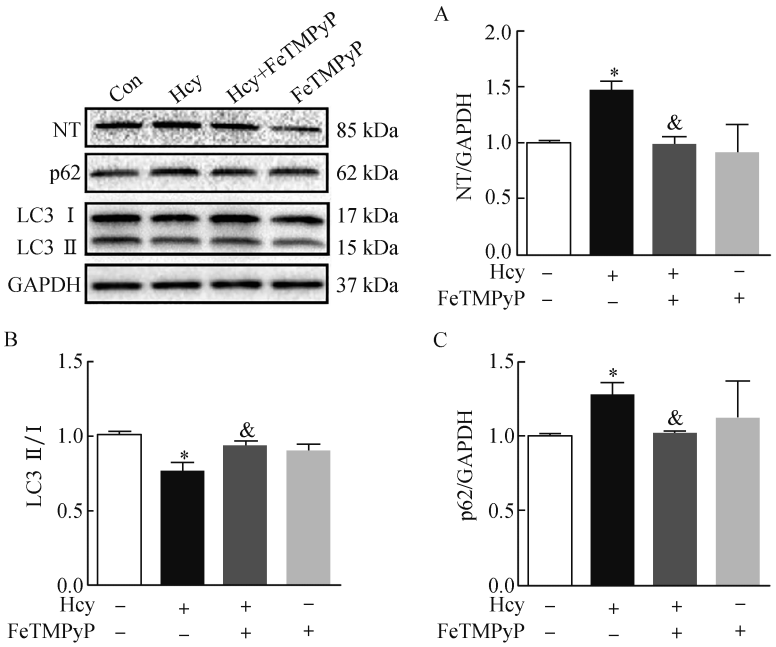

图 4　FeTMPyP 处理对 Hcy 刺激 HUVECs 细胞 NT、LC3 Ⅱ/Ⅰ及 p62 蛋白表达情况的影响

A：FeTMPyP 处理对 Hcy 刺激 HUVECs 细胞 NT 表达的影响；B：FeTMPyP 处理对 Hcy 刺激 HUVECs 细胞 LC3 Ⅱ/Ⅰ表达的影响；C：FeTMPyP 处理对 Hcy 刺激 HUVECs 细胞 p62 表达的影响　　与 Con 组比较，$**P<0.01$

3　讨　　论

HHcy 是心血管疾病的独立危险因素[2]。目前对于 HHcy 促进心脑血管疾病发生发展的机制研究尚不完全清楚。自噬作为哺乳动物体内高度保守的细胞自我保护机制，对于维持心脑血管功能的稳定具有十分重要的意义[9-10]。有文献报道，HHcy 能够影响不同细胞的自噬水平。在本文作者前期研究中发现，Hcy 能够通过激活 mTOR 通路降低乳鼠心肌细胞中的自噬水平[11]；也有文献报道，HHcy 能够通过增强对神经细胞毒性作用过度提高神经元自噬水平，导致脑缺血后细胞死亡的发生[12]。已有文献表明，Hcy 在低浓度时提高自噬水平，而高浓度的 Hcy 则抑制自噬水平[7]。造成这一现象的原因可能是当 Hcy 这一损伤因素存在时，细胞能够代偿性地提高自噬以抵抗损伤；高浓度 Hcy 的持续刺激造成累积的严重损伤，细胞处于失代偿，进一步促进损伤的发生。有研究表明，HHcy 可能通过 mTOR 通路影响自噬水平[11,13]，而关于 HHcy 如何影响血管内皮细胞自噬的研究少之又少。

本研究通过免疫组织化学染色法以及 Western blot 技术检测了 HHcy 大鼠以及 Hcy 处理的 HUVECs 细胞中 NT 的表达水平，以及自噬相关蛋白的表达水平，分别在在体水平及离体水平验证硝化应激及细胞自噬的变化。结果表明，无论是 HHcy 大鼠的胸主动脉中还是 Hcy 处理细胞中 NT 的表达水平明显增加，NT 被公认为是体内 $ONOO^-$ 生成的印迹，能够反映体内 $ONOO^-$ 的浓度及硝化应激的水平[14]。HHcy 大鼠的胸主动脉及 Hcy 处理细胞中硝化应激水平明显增加，而自噬水平被明显抑制。为进一步验证 HHcy 通过提高硝化应激降低自噬水平，本文作者在给予细胞 Hcy 处理的基础上，加入 $ONOO^-$ 的清除剂 FeTMPyP 预处理细胞，以降低硝化应激水平。结果显示，FeTMPyP 预处理组细胞能够明显降低 NT 的表达。更为重要的是，当 FeTMPyP 降低硝化应激水平后，进一步逆转了由 Hcy 引起的自噬降低。

综上，本研究表明 HHcy 可能通过升高硝化应激水平以抑制血管内皮细胞自噬水平，这可能是 HHcy 导致心脑血管疾病的重要机制之一。本研究完善了 HHcy 对细胞自噬调控的可能机制，为防治 HHcy 导致的血管内皮细胞损伤提供了新的思路和实验依据。

（下转第 579 页）

预后,这仍需更深入的研究。

参考文献:

[1] Liu X,Yuan L,Chen F,et al. Circulating miR-208b: A potentially sensitive and reliable biomarker for the diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction [J]. Clin Lab,2017,63(1):101-9.

[2] 张红梅. 急性心肌梗死对血清补体水平及其预后影响的相关性研究[J]. 中国循证心血管医学杂志,2017,9(10):1250-2.

[3] Yasojima K,Schwab C,McGeer EG,et al. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques [J]. Am J Pathol,2001,158(3):1039-51.

[4] Persson L,Borén J,Robertson AK,et al. Lack of complement factor C3, but not factor B, increases hyperlipidemia and atherosclerosis in apolipoprotein $E^{-/-}$ low-density lipoprotein $receptor^{-/-}$ mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2004,24(6):1062-7.

[5] Thygesen K,Alpert JS,Jaffe AS,et al. Third universal definition of myocardial infarction [J]. J Am CollCardiol, 2012, 60(3): 1581-98.

[6] Riedemann NC,Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury [J]. Am J Path01,2003,162(2):363-7.

[7] Collard CD,Agah A,Stahl GL. Complement activation following reoxygenation of hypoxic human endothelial cells: role of intracellular reactive oxygen species, NF-kappaB and new protein synthesis [J]. Immunopharmacology,1998,39(1):39-50.

[8] 邵爱红,齐新,李琦,等. 急性冠脉综合征患者补体水平动态变化及与心肌损伤的关系[J]. 中华危重病急救医学,2017,29(6):515-9.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 575 页)

参考文献:

[1] 刘力生, 吴兆苏, 朱鼎良, 等. 中国高血压防治指南2010年修订版[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-43.

[2] SHINAWI M. Hyperhomocysteinemia and cobalamin disorders[J]. Mol Genet Metab, 2007, 90(2): 113-21.

[3] HOFMANN MA, LALLA E, LU Y, et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model[J]. J Clin Invest, 2001, 107: 675-83.

[4] HAYDEN MR, TYAGI SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus and atherosclеropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation[J]. Nutr J, 2004, 3:4.

[5] RAZANI B, FENG C, COLEMAN T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression[J]. Cell Metal, 2012, 15(4):534-44.

[6] WEI DH, JIA XY, LIU YH, et al. Cathepsin L stimulates autophagy and inhibits apoptosis of ox-LDL-induced endothelial cells: potential role in atherosclerosis[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(2):400-6.

[7] 刘建兰,张东红,朱毅. 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞自噬的影响及其意义[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 11:2034-5.

[8] DONG Y, SUN Q, LIU T, et al. Nitrative stress participates in endothelial progenitor cell injury in hyperhomocysteinemia[J]. PLoS One, 2016;11(7):e0158672.

[9] OSONOI Y, MITA T, AZUMA K, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis [J]. Autophagy, 2018:14(11):1991-2006.

[10] SCIARRETTA S, FORTE M, FRATI G, et al. New insights into the role of mTOR signaling in the cardiovascular system[J]. Circ Res, 2018:122(3):489-505.

[11] 徐嘉惠, 周艺, 王雯. 同型半胱氨酸对乳鼠心肌细胞自噬水平及mTOR信号通路的影响[J].中南医学科学杂志, 2018, 46(1):56-60.

[12] ZHAO Y, HUANG G, SHUANG C, et al. Homocysteine aggravates cortical neural cell injury through neuronal autophagy overactivation following rat cerebral ischemia-reperfusion[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1196.

[13] KHAYATI K, ANTIKAINEN H, BONDER EM, et al. The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal proteins in human neurons and mice [J].The FASEB Journal, 2017, 31(2): 598-609.

[14] BRANDES RP, FLEMING I, BUSSE R. Endothelial aging[J]. Cardiovasc Res, 2005, 66(2):286-94.

(本文编辑:蒋湘莲)