

# 同型半胱氨酸对血管内皮细胞凋亡和核因子- $\kappa$ B 活化的影响

周继红<sup>1</sup>, 章 尧<sup>2</sup>

[摘要]目的:观察同型半胱氨酸(Hcy)对人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞凋亡及核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活化的影响,以探讨 Hcy 致动脉粥样硬化的可能机制。方法:将不同浓度的 Hcy 与 ECV-304 细胞体外共培养不同时间,PI 单染法检测细胞凋亡,免疫组织化学染色法检测细胞内 Bcl-2 的表达及 NF- $\kappa$ B 的细胞内定位,流式细胞术检测细胞核 NF- $\kappa$ B 的表达。结果:Hcy 可诱导细胞凋亡,凋亡指数随 Hcy 浓度增大和作用时间的延长而逐渐升高;10.0 mmol/L Hcy 作用 24 h 后 Bcl-2 表达阳性细胞的均数显著低于 1.0、5.0 mmol/L 组和对照组( $P < 0.01$ );随 Hcy 浓度的升高,NF- $\kappa$ B 由细胞质转位至细胞核,5 mmol/L Hcy 作用 0.5、1、2 h,NF- $\kappa$ B 的核内表达率分别为(16.76  $\pm$  2.55)%、(12.91  $\pm$  1.38)%、(14.15  $\pm$  1.74)%。结论:Hcy 可下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达而诱导细胞凋亡,且存在剂量效应关系。Hcy 可活化 NF- $\kappa$ B,且呈现剂量依赖性。

[关键词] 同型半胱氨酸;动脉粥样硬化;凋亡;核因子- $\kappa$ B

[中国图书资料分类号] Q 517 [文献标识码] A

## Effect of homocysteine on apoptosis and activation of nuclear factor- $\kappa$ B in cultured vascular endothelial cells

ZHOU Ji-hong<sup>1</sup>, ZHANG Yao<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology Bengbu Medical College Bengbu Anhui 233030;

2. Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of homocysteine(Hcy) on apoptosis and activation of nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) in ECV-304 cells and investigate the possible mechanism in Hcy induced atherosclerosis. **Methods:** The apoptosis of ECV-304 cells was detected by PI staining. The expression of Bcl-2 and the location of NF- $\kappa$ B in cells were examined by immunohistochemistry method. The expression of NF- $\kappa$ B in cell nuclear was detected by flow cytometry. **Results:** Hcy induced apoptosis of ECV-304 cells and the apoptosis index were increased with Hcy concentration and treatment time. When the cells were treated with 10.0 mmol/L Hcy for 24 hours, the number of positive cells in expression of Bcl-2 was increased significantly compared with 1.0, 5.0 mmol/L and control group ( $P < 0.01$ ). In control group, NF- $\kappa$ B was located in cytoplasm, when the cells were incubated with 5 and 10 mmol/L Hcy, NF- $\kappa$ B was transferred into cellular nuclear. After incubation with 5 mmol/L Hcy for 0.5, 1, and 2 hours, the expression rate of NF- $\kappa$ B in cell nuclear was (16.76  $\pm$  2.55)%, (12.91  $\pm$  1.38)% and (14.15  $\pm$  1.74)% respectively. **Conclusions:** Hcy can induce apoptosis of ECV-304 cells through reducing the expression Bcl-2 in dose-dependent manner. Hcy can activate NF- $\kappa$ B in a concentration-dependent pattern.

[Key words] homocysteine; atherosclerosis; apoptosis; nuclear factor- $\kappa$ B

大量流行病学调查<sup>[1-3]</sup>已证实高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHCY)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)一种新的独立危险因素,但其致病机制还不清楚。本实验室已证实同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)可抑制离体血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)的生长<sup>[4]</sup>。细胞凋亡是机体重要的生理过程,起着维持内环境稳定的关键作用。有学者<sup>[5]</sup>发现,Hcy可诱导离体的 VEC

发生凋亡,但参与 Hcy 致细胞凋亡过程的相关基因及调控因子尚不明了。核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是一种广泛存在的转录因子,主要调控凋亡相关基因及炎症基因的表达。有研究<sup>[6]</sup>表明,血管平滑肌细胞中 Hcy 诱导炎症介质白细胞介素-6 的表达部分是通过激活 NF- $\kappa$ B 通路实现的,但 NF- $\kappa$ B 在 Hcy 损伤 VEC 致 AS 过程中的作用尚未见报道。本研究旨在探讨 Hcy 对 VEC 中凋亡相关因子和 NF- $\kappa$ B 活化的影响。

### 1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞的培养  
ECV-304 细胞购自上海细胞所,含 10% 新生牛血清培养基购自杭州四季青公司,含 4 万 U/L 庆大霉

[收稿日期] 2010-09-20

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2001KJ170)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 生物化学与分子生物学教研室,安徽 蚌埠 233030; 2. 皖南医学院,安徽 芜湖 241002

[作者简介] 周继红(1978-)女,硕士,讲师。

[通讯作者] 章尧,硕士研究生导师,教授,研究方向:肿瘤分子生物学。

素、2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液均购自 GIBCO 公司。细胞在 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育培养, 用 0.25% 的胰酶消化传代。本实验所用细胞均为对数生长期细胞。

1.2 细胞凋亡测定 调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  /ml, 接种 24 孔培养板, 每孔 1 ml。待细胞贴壁后吸弃原培养液, 实验组分别加入终浓度为 1.0、5.0 和 10.0 mmol/L Hcy 的 RPMI 1640 培养液 1 ml, 对照组加不含 Hcy 的培养液 1 ml。每组设 5 个平行孔。继续培养 24、48 h 后收集细胞, PI 单染法检测细胞凋亡, Cell Quest 软件记录实验结果。

1.3 免疫组织化学染色法检测抗凋亡基因 Bcl-2 表达和 NF- $\kappa$ B 的胞内定位 调整细胞浓度至  $3 \times 10^5$  /ml, 接种于已置细胞爬片的 6 孔板, 每孔 3 ml。细胞贴壁后吸弃原培养液, 实验组分别加入终浓度为 1.0、5.0 和 10.0 mmol/L Hcy 的培养液 3 ml, 对照组加入无 Hcy 的培养液 3 ml。(1) 检测 Bcl-2 表达: 每组设 4 个复孔; 继续培养 24 h。取出已有贴壁细胞的爬片, 放入 95% 乙醇中固定约 20 min。爬片进行免疫组织化学染色, 按试剂盒说明书进行操作(福州迈新生物技术开发公司), 所用一抗为鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司)。显微镜下每组每张爬片随机计数 1 000 个细胞, 记录其中阳性细胞数, 计算每组阳性率, 并直接拍摄记录。(2) 检测 NF- $\kappa$ B 的胞内定位: 每组设 3 个复孔, 继续培养 24 h。取出已有贴壁细胞的爬片, 放入 95% 乙醇中固定约 20 min。然后对爬片进行免疫组织化学染色, 按试剂盒说明书进行操作(福州迈新生物技术开发公司), 所用一抗为鼠抗人 NF- $\kappa$ B P65

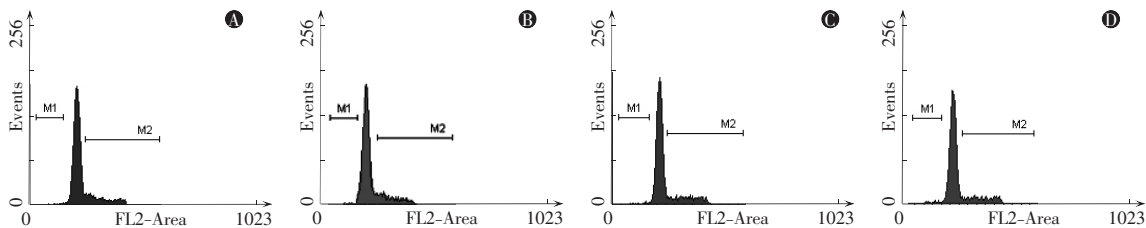
的单克隆抗体。细胞质或细胞核内出现棕色颗粒即为阳性。显微镜下观察棕色颗粒的胞内分布, 并拍片记录结果。

1.4 流式细胞术(FCM)检测 NF- $\kappa$ B 的核内表达 调整细胞浓度至  $3 \times 10^5$  /ml, 接种于 6 孔培养板, 每孔 3 ml, 待细胞贴壁后吸弃原培养液。实验组每孔加入终浓度为 5.0 mmol/L Hcy 的培养液 3 ml, 同时设对照组, 分别培养 0.5、1、2 h, 每个时间段设 4 个复孔, 提取细胞核, 用 TM-2 缓冲液(0.01 mol/L Tris-HCl(pH 7.4)、0.002 mol/L MgCl<sub>2</sub>、0.05 mol/L PMSF) 加 150  $\mu$ l 染色缓冲液(含 5% NBS、0.1% NaN<sub>3</sub> 的 PBS) 重悬, 每组平均分为空白对照管、荧光标记二抗对照管和测定管。每孔测试管中加 2  $\mu$ l 鼠抗人 NF- $\kappa$ B P65 单克隆抗体, 37 °C 作用 30 min。PBS 洗 2 次, 二抗对照管及测试管中加入 2  $\mu$ l FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 室温下避光作用 15 min。加 1% 多聚甲醛 400  $\mu$ l, FCM 检测。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

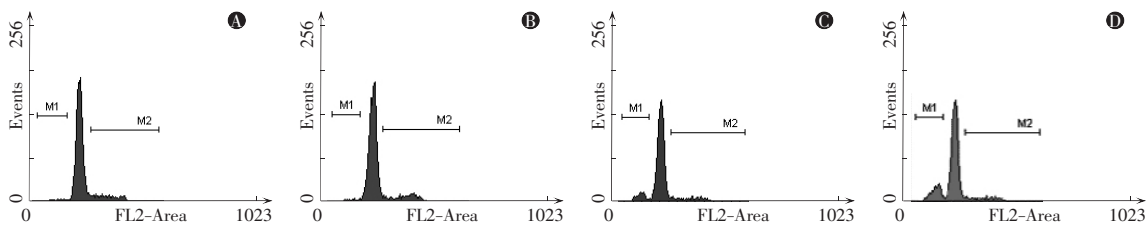
## 2 结果

2.1 Hcy 对 ECV-304 细胞凋亡的影响 将 ECV-304 细胞与不同浓度的 Hcy 共培养 24、48 h, PI 单染, 结果可见, 对照组和 1.0 mmol/L Hcy 组均为正常的二倍体峰形, 而 5.0 mmol/L Hcy 作用 48 h 即出现亚二倍体峰(凋亡峰), 且随 Hcy 浓度的上升而逐渐增大(见图 1、2)。同时 AI 随 Hcy 浓度的增大和作用时间的延长而升高, 5.0、10.0 mmol/L Hcy 组在 24、48 h 与对照组和低浓度组(1.0 mmol/L) 比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见表 1)。



A: 对照组 24 h; B、C、D 分别为 1.0、5.0、10.0 mmol/L Hcy 作用 24 h

图 1 不同浓度 Hcy 作用 24 h 的流式细胞术 DNA 直方图



A: 对照组 48 h; B、C、D 分别为 1.0、5.0、10.0 mmol/L Hcy 作用 48 h

图 2 不同浓度 Hcy 作用 48 h 的流式细胞术 DNA 直方图

2.2 Hcy 对 ECV-304 细胞 Bel-2 表达的影响 细胞质内出现棕色颗粒即为阳性,结果显示,随 Hcy 浓度的升高,阳性细胞数逐渐减少(见图 3)。随 Hcy 浓度的增大,ECV-304 细胞 Bel-2 表达阳性细胞数逐渐下降,10.0 mmol/L Hcy 组与 1.0、5.0 mmol/L 组和对照组差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(见表 2)。

2.3 Hcy 对 ECV-304 细胞内 NF-κB 胞内定位的影响 对照组及 1.0 mmol/L Hcy 组中 NF-κB 仅表达于细胞质中,5.0、10.0 mmol/L Hcy 组中 NF-κB 在细胞质和细胞核中均有表达(见图 4)。

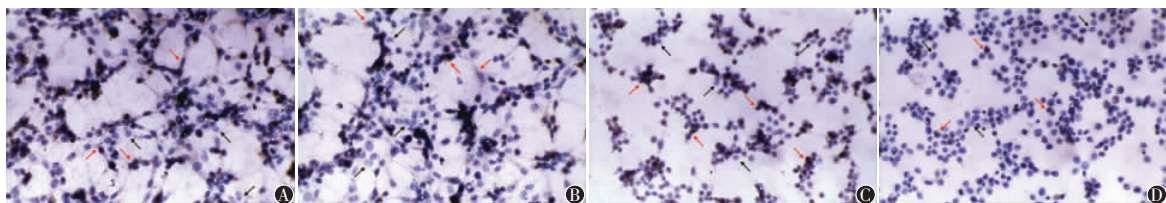
2.4 Hcy 对 ECV-304 细胞内 NF-κB 核内表达的影响 FCM 分析结果见图 5。结果显示,5.0 mmol/L Hcy 作用 0.5 h,NF-κB 在细胞核中的表达率最高,

其后各组略有下降,但均高于对照组( $P < 0.01$ )(见表 3)。

表 1 Hcy 对不同培养时间 ECV-304 细胞凋亡的影响 ( $n_i = 5; \bar{x} \pm s$ )

Hcy (mmol/L)	24 h AI (%)	48 h AI (%)
0.0 (对照组)	1.43 ± 0.10	1.59 ± 0.12
1.0	1.45 ± 0.11	1.76 ± 0.14
5.0	2.31 ± 0.17 <sup>##</sup> *	14.97 ± 1.59 <sup>##</sup> *
10.0	3.63 ± 0.20 <sup>##</sup> *△△	22.35 ± 3.86 <sup>##</sup> *△△
<i>F</i>	235.33	120.54
<i>P</i>	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	0.023	4.365

*q* 检验:与对照组比较\*\* $P < 0.01$ ;与 1.0 mmol/L 组比较# $P < 0.01$ ;与 5.0 mmol/L 组比较△△ $P < 0.01$



A:对照组;B、C、D 分别为 1.0、5.0、10.0 mmol/L Hcy 组

图 3 Hcy 对 ECV-304 细胞 Bel-2 表达的影响

表 2 Hcy 对 ECV-304 细胞 Bel-2 表达的影响( $n_i = 4; \bar{x} \pm s$ )

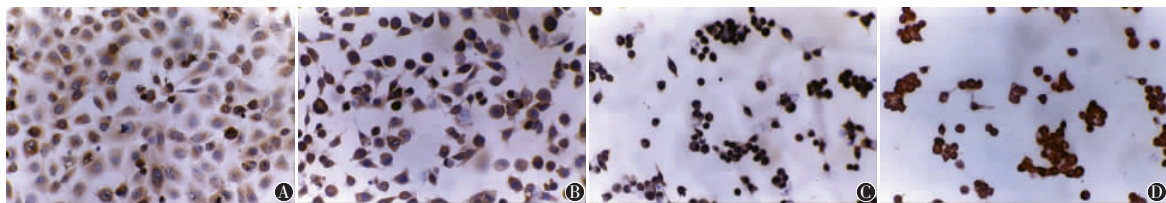
Hcy (mmol/L)	阳性率 (%)	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
0.0 (对照组)	52.8 ± 4.7			
1.0	48.8 ± 4.6	15.19	<0.01	18.625
5.0	44.8 ± 4.1			
10.0	33.3 ± 3.8 <sup>##</sup> *△△			

*q* 检验:与对照组比较\*\* $P < 0.01$ ;与 1.0 mmol/L 组比较## $P < 0.01$ ;与 5.0 mmol/L 组比较△△ $P < 0.01$

表 3 Hcy 对 ECV-304 细胞内 NF-κB 核内表达的影响 ( $n_i = 4; \bar{x} \pm s$ )

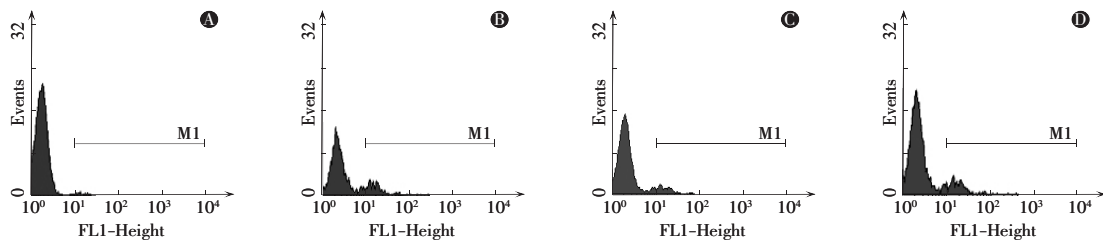
作用时间 (h)	NF-κB 表达阳性率 (%)	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
0	3.88 ± 0.36	43.36	<0.01	2.891
0.5	16.76 ± 2.55 <sup>**</sup>			
1	12.91 ± 1.38 <sup>#</sup> **			
2	14.15 ± 1.74 <sup>**</sup>			

*q* 检验:与 0 h 比较\*\* $P < 0.01$ ;与 0.5 h 组比较# $P < 0.05$



A:对照组;B、C、D 分别为 1.0、5.0、10.0 mmol/L Hcy 组

图 4 Hcy 对 ECV-304 细胞 NF-κB 胞内定位的影响



A:对照组;B、C、D 分别为 5.0 mmol/L Hcy 作用 0.5、1、2 h

图 5 Hcy 对胞核 NF-κB 表达的影响

### 3 讨论

自从1969年 McCully 首次提出 HHCY 能够引起 AS 以来, HHCY 与 AS 的关系受到广泛关注。目前已确定 HHCY 是 AS 的一种新的独立危险因素, 但其致病机制尚不完全清楚, 其中 Hcy 对 VEC 的损伤是 AS 形成和发展的关键<sup>[7]</sup>。而人类血管性疾病病理学的普遍特征是细胞凋亡, 王伟等<sup>[5]</sup> 确认 Hcy 可诱导离体的大鼠 VEC 发生凋亡。本实验以人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 为对象, 体外将不同浓度的 Hcy 与之共培养 24、48 h, 发现 5.0 mmol/L Hcy 作用 48 h 细胞 FCM DNA 直方图上出现细胞凋亡特有的亚二倍体峰, 且 AI 随 Hcy 浓度的升高及作用时间的延长而逐渐增加, 表明 Hcy 能以时间和剂量依赖方式诱导体外培养的 VEC 发生凋亡。

细胞凋亡是受基因控制度细胞自主性“自杀”过程, Bcl-2 作为重要的凋亡抑制基因, 其表达产物 Bcl-2 蛋白位于线粒体外膜、核被膜和内质网膜, 其通过稳定线粒体膜电位, 阻止细胞色素 C 的释放, 进而阻断半胱天冬酶的激活而抗凋亡<sup>[8]</sup>。本实验发现, 10.0 mmol/L Hcy 作用 24 h 后, Bcl-2 表达阳性的细胞数明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 与 Hcy 诱导 ECV-304 细胞凋亡的结果相一致。表明 Hcy 可能通过下调 Bcl-2 的表达而诱导 VEC 发生凋亡。Chang 等<sup>[9]</sup> 发现, Hcy 能通过 G 蛋白介导通路诱导内皮细胞凋亡, 同时导致启动子 DNA 甲基化水平的改变及成纤维细胞生长因子转录水平的抑制。可见, Hcy 诱导 VEC 发生凋亡是多途径的。

NF- $\kappa$ B 是一种能与 DNA 结合的二聚体蛋白, 多数细胞中 NF- $\kappa$ B 在胞质内与抑制性蛋白质 ( $I\kappa$ B) 结合形成无活性的复合物。通过磷酸化  $I\kappa$ B, 使其与 NF- $\kappa$ B 分离, NF- $\kappa$ B 转位至胞核内与靶基因的结合位点结合, 启动或抑制有关基因的表达<sup>[10]</sup>。Zheng 等<sup>[11]</sup> 发现, Hcy 能诱导血管平滑肌细胞中 NF- $\kappa$ B 的核易位, 因此认为 Hcy 可能通过 NF- $\kappa$ B 活化途径调节 VSMC 的功能。但有关 NF- $\kappa$ B 在 Hcy 诱导 VEC 损伤中的作用尚未见文献报道。本实验发现, 对照组和 1.0 mmol/L Hcy 组中, NF- $\kappa$ B 仅在胞质中分布; 当 Hcy 浓度升至 5.0 mmol/L 时, NF- $\kappa$ B 部分由胞质转位至细胞核。进一步用 FCM 定量动态检测核内 NF- $\kappa$ B 的表达, 可见 5.0 mmol/L Hcy 作用 0.5 h, NF- $\kappa$ B 在核内的表达率最高, 达到  $(16.76 \pm 2.55)\%$ ; 其后各时间段略有下降, 可能与 NF- $\kappa$ B/ $I\kappa$ B 负反馈有关<sup>[12]</sup>。表明 Hcy 能活化 NF- $\kappa$ B, 促使

其向细胞核转移, 使核内表达增加而与靶基因结合, 发挥调控作用。而 NF- $\kappa$ B 一旦活化, 可诱导并激活白细胞黏附分子、趋化因子等的基因表达, 促使单核粒细胞聚集到动脉内膜, 产生血管壁的慢性炎症, 从而促进 AS 的发生<sup>[13]</sup>。因此, Hcy 对 NF- $\kappa$ B 的活化可能是 Hcy 致 VEC 损伤而致 AS 形成的重要机制之一。

细胞凋亡与 NF- $\kappa$ B 密切相关, NF- $\kappa$ B 在不同细胞类型、不同环境中, 对细胞凋亡发生截然相反的作用<sup>[14]</sup>。Hcy 诱导细胞凋亡与对 NF- $\kappa$ B 的活化是否存在协同作用, NF- $\kappa$ B 在细胞凋亡通路中的作用均有待我们进一步的探讨。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, *et al.* A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes [J]. JAMA, 1995, 274(13): 1049-1057.
- [2] Temple ME, Luzier AB, Kazierad DJ. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis [J]. Ann Pharmacother 2000, 34(1): 57-65.
- [3] Durand P, Prost M, Loreau N, *et al.* Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease [J]. Lab Invest, 2001, 81(5): 645-672.
- [4] 周继红, 章尧, 孙俊杰, 等. 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 生长的抑制作用 [J]. 蚌埠医学院学报, 2005, 30(1): 14-16.
- [5] 王伟, 黄体钢, 周丽娟, 等. 同型半胱氨酸诱导离体培养的血管内皮细胞凋亡 [J]. 天津医科大学学报, 2003, 9(1): 53-55.
- [6] Zhang L, Jin M, Hu XS, *et al.* Homocysteine stimulates nuclear factor  $\kappa$ B activity and interleukin-6 expression in rat vascular smooth muscle cells [J]. Cell Biol Int, 2006, 30(7): 592-597.
- [7] Yang RX, Huang SY, Yan FF, *et al.* Danshensu protects vascular endothelia in a rat model of hyperhomocysteinemia [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(10): 1395-1400.
- [8] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family [J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 4): 437-441.
- [9] Chang PY, Lu SC, Lee CM, *et al.* Homocysteine inhibits arterial endothelial cell growth through transcriptional downregulation of fibroblast growth factor-2 involving G protein and DNA methylation [J]. Circ Res, 2008, 102(8): 933-941.
- [10] Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.
- [11] Zheng LR, Zhu JH, Zhang L. Effect of homocysteine on NF- $\kappa$ B activity in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2004, 33(3): 255-268.
- [12] Ting AY, Endy D. Signal transduction. Decoding NF- $\kappa$ B Signaling [J]. Science, 2002, 298(5596): 1189-1190.
- [13] Collins T, Cybulsky MI. NF- $\kappa$ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis [J]. Clin Invest, 2001, 107(3): 255-264.
- [14] Burstein E, Duckett CS. Dying for NF- $\kappa$ B control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery [J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 732-737.