

血管生成素 1 在高同型半胱氨酸血症大鼠血浆中高表达及对内皮细胞的保护作用

沈童童¹,周利民¹,董双双¹,王欣欣¹,徐小红¹,刘玉¹,郑凡²,马劭博²,沈兵²

摘要 目的 阐明高同型半胱氨酸(Hcy)血症大鼠血浆蛋白表达谱改变及高表达的血管生成素 1(Ang 1)对内皮细胞的保护作用。方法 建立高 Hcy 血症动物模型,采用 Label-free 蛋白质谱分析血浆蛋白含量差异,细胞划痕和 CCK-8 实验检测 Hcy 及 Ang 1 对内皮细胞迁移和增殖的影响。结果

蛋白质谱结果显示高 Hcy 血症大鼠血浆中有 5 个蛋白上调、17 个蛋白下调,其中 Ang 1 上调。大鼠肠系膜上动脉内皮细胞实验结果显示,采用 30、50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 预处理内皮细胞 24 h 后,细胞的迁移和增殖都被抑制,而 Ang 1(600 ng/ml)阻断了 30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 对内皮细胞迁移和增殖的抑制作用,但对 50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 引起的内皮细胞迁移和增殖抑制作用无阻断效应。结论 高 Hcy 血症可影响血浆蛋白表达谱,血浆中升高的 Ang 1 可代偿一定浓度范围 Hcy 对血管内皮细胞的迁移和增殖的抑制作用。

关键词 同型半胱氨酸;血管生成素 1;血管内皮细胞;Label-free 蛋白质谱;迁移;增殖

中图分类号 R 363.2 + 1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0679-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.002

血管生成素 1(angiotensin 1, Ang 1)由血管壁细胞、周细胞和某些其他细胞生成,主要表达于血管内皮细胞,并与其特异性受体酪氨酸激酶 Tie-2 的配体结合^[1-2]。Ang 1 具有促进血管内皮细胞迁移、增殖、侵袭和防止渗漏等作用^[3-4]。但其在高同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)血症引起的血管内皮功能损伤修复中的作用未见报道。

Hcy 异常升高被广泛认为是心血管疾病的独立危险因素之一。过多的 Hcy 会导致血管内皮功能

损伤,引起血管的新生、收缩、通透性等功能改变,其分子机制复杂^[5]。该研究探讨高 Hcy 饲料喂养的 SD 大鼠血浆中 Ang 1 变化及其对血管内皮细胞迁移和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 Ang 1(货号:13667-H02H1)购自北京义翘神州生物技术有限公司;I 型胶原蛋白酶(货号:SCR103)、Hcy(货号:H4628)购自德国 Merck 公司;CCK-8 试剂(货号:A311-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Label-free 质谱仪 Orbitrap Fusion、液相色谱 Easy nLC/Ultimate 3000 购自美国 Thermo Scientific 公司;倒置显微镜(德国 Zeiss 公司);SpectraMax M5 读板仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.1.2 实验动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠,体重 200~220 g,安徽医科大学动物中心提供。自由进食进水,饲养室温维持(22±1)℃。

1.2 方法

1.2.1 高 Hcy 血症动物模型 对照组和实验组各 4 只 SD 大鼠,对照组大鼠采用 anAIN93M 基础饲料喂养,高 Hcy 血症模型组采用同样基础饲料,但不含叶酸、维生素 B₁₂ 和维生素 B₆。两种饲料都含有 1% 的磺胺噻唑,可以抑制肠道细菌形成叶酸。5 周后成模,CO₂ 窒息处死后迅速进行心脏穿刺取血,采用化学发光法测定血清 Hcy 水平。

1.2.2 Label-free 蛋白质谱分析 将大鼠血浆去除中高丰度蛋白后,低丰度蛋白浓缩冻干,复溶后测浓度,取 60 μg 蛋白溶解后加入胰蛋白酶 37℃ 降解 16 h,样品经过毛细管高效液相色谱分离后进行质谱仪分析,后续再予以 Label-free 分析获得蛋白质信息。

1.2.3 肠系膜动脉内皮细胞原代培养 将健康雄性 SD 大鼠 CO₂ 窒息处死,用剪刀解剖大鼠腹部,一次性针筒插入左心室,用无菌生理缓冲液灌流直至肝脏变白,剥离其肠系膜动脉血管,分离多余的脂肪组织,将肠系膜动脉血管剪碎,用 I 型胶原蛋白酶消

2022-02-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570403);滁州市科技计划项目(编号:2019ZN008)

作者单位:¹安徽医科大学附属滁州市第一人民医院(滁州市第一人民医院)心内科,滁州 239000

²安徽医科大学基础医学院生理教研室,合肥 230032

作者简介:沈童童,男,博士,副主任医师,责任作者,E-mail:37024942@qq.com;

沈兵,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:shenbing@ahmu.edu.cn

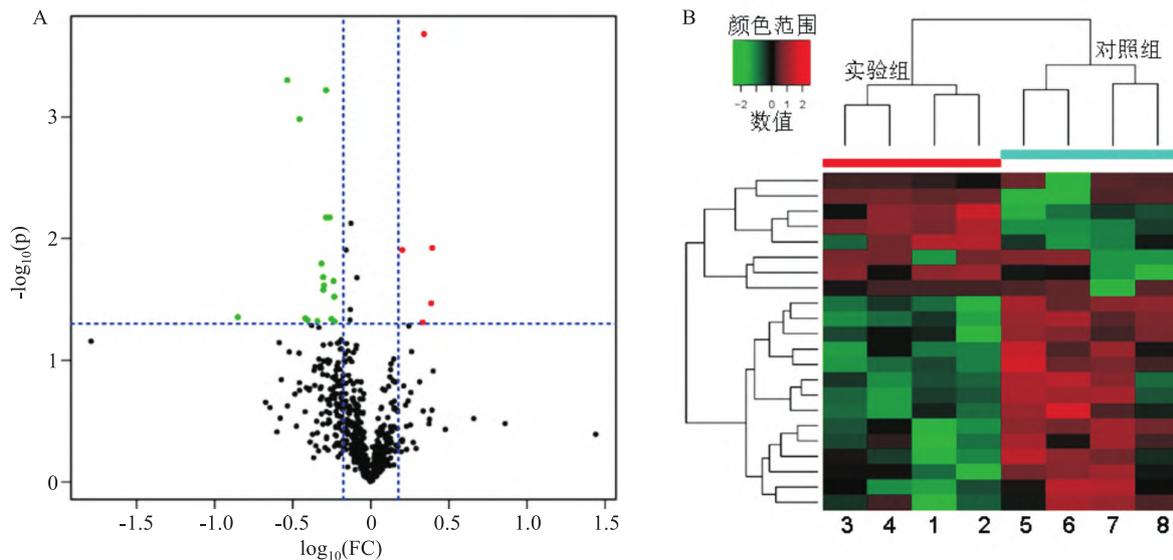


图1 蛋白质谱火山图和热点图

A:蛋白质谱火山图;红色点:上调的蛋白;绿色点:下调的蛋白;黑色点:无显著性差异的蛋白;B:蛋白质谱热点图;1~4:实验组;5~8:对照组;红色:上调;绿色:下调

化(37 °C, 10 min),离心后弃上清液,加入1 ml 培养基,吹打混匀,移至培养皿中,1 h后换液。

1.2.4 细胞划痕实验 用Marker笔在6孔板背后沿着直尺大约每隔0.5 cm划一道线,横穿过孔(每孔5~6条线),每孔加入约5 × 10⁵个细胞,37 °C培养箱过夜培养,第2天用200 μl枪头沿着直尺与标记线垂直的方向划两条平行线,用无菌PBS洗去划掉的细胞,加入培养基放入培养箱(37 °C、5% CO₂),按0、24 h用倒置显微镜观察,拍照。

1.2.5 CCK-8 细胞增殖实验 首先在无血清的培养基中同步化细胞,继而在96孔板中配制100 μl/孔的细胞悬液,将培养板在培养箱中预培养24 h(37 °C, 5% CO₂)。弃除培养基,向培养板加入100 μl/孔不同浓度的Hcy标准品,在培养箱孵育24 h,向每孔加入10 μl CCK-8溶液,在培养箱中孵育4 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度值。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用GraphPad软件进行独立样本t检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高Hcy血症大鼠血浆蛋白改变 蛋白质谱实验共检测到对照组和高Hcy血症组大鼠血浆中555个蛋白,其中5个蛋白(Mmrl、Tgfb1、Ctsa、Ang 1、Golgb1)在血浆中的表达量上调,17个蛋白(RGD1565617、Psmbl、Psmal6、Jchain、Tfrc、Lamp2、Igh-6、LOC103690319、Sell、Cd51及7个未知蛋白)

表达量下调(图1A);将两组出现差异表达的蛋白进行聚类分析,两组样本具有较一致的变化趋势(图1B)。

2.2 高Hcy血症大鼠血浆Ang 1蛋白浓度表达变化 高Hcy血症大鼠血浆Hcy浓度比对照组升高[(3.72 ± 0.43) μmol/L vs (36.82 ± 6.22) μmol/L, $n = 4, t = -5.309, P < 0.05$]。在蛋白质谱检测结果中,对照组和高Hcy血症组大鼠血浆Ang 1蛋白含量差异如图2所示,与对照组相比,实验组大鼠血浆中Ang 1蛋白含量升高($t = -3.748, P < 0.05$)。

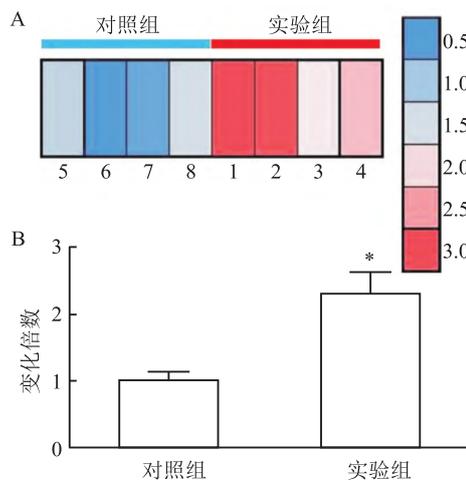


图2 大鼠血浆Ang 1蛋白表达水平

A:两组大鼠血浆Ang 1蛋白质谱结果热点图;1~4:实验组;5~8:对照组;B:变化倍数统计数据;与对照组相比较,* $P < 0.05$

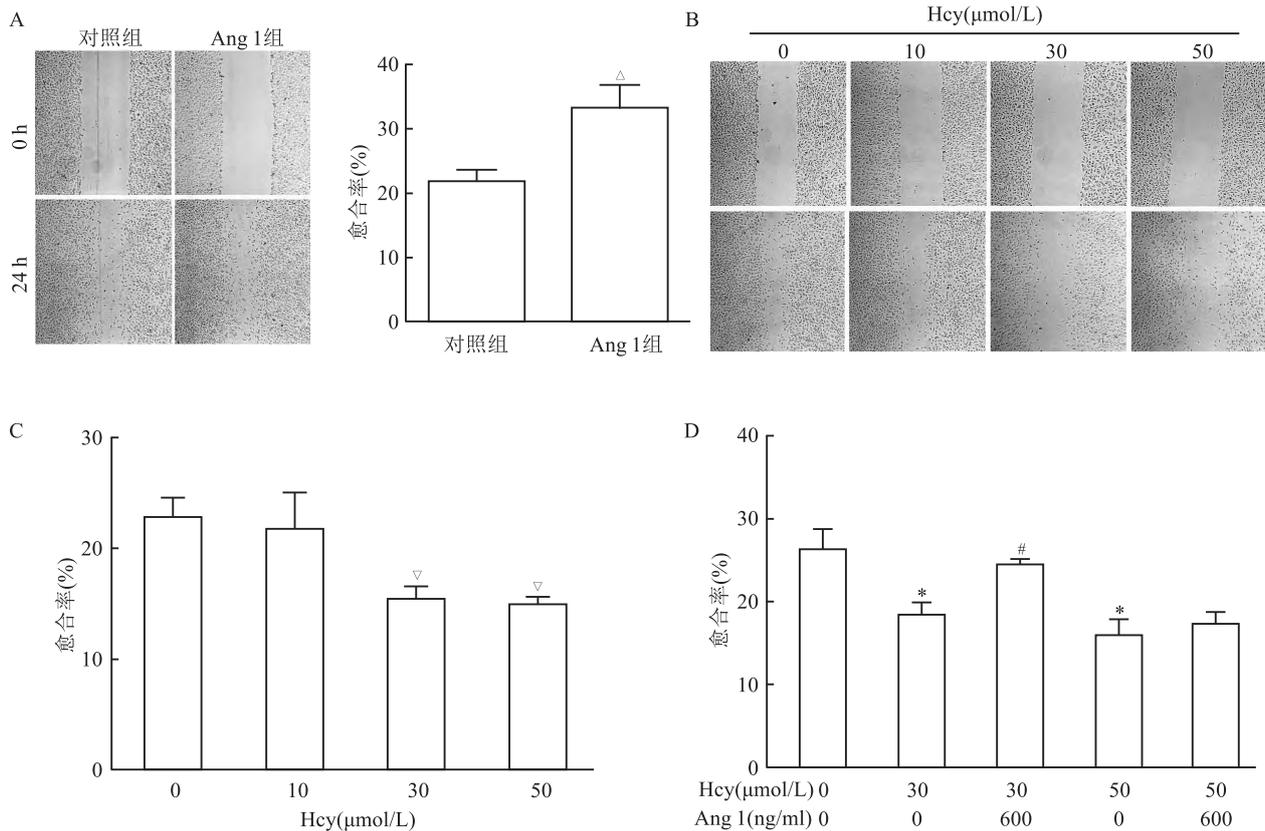


图3 Ang 1对Hcy抑制的肠系膜动脉内皮细胞迁移的阻断作用

A: Ang 1对肠系膜动脉内皮细胞迁移的影响($n=8$);与对照组比较; $\Delta P<0.05$;B、C:不同浓度Hcy对肠系膜动脉内皮细胞迁移的影响($n=8$);与0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy组比较; $\nabla P<0.05$;D: Ang 1对不同浓度Hcy抑制的肠系膜动脉内皮细胞迁移的阻断作用($n=8$);与0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + 0 ng/ml Ang 1组比较; $* P<0.05$;与30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + 0 ng/ml Ang 1组比较; $\# P<0.05$

2.3 Ang 1对Hcy抑制的大鼠肠系膜动脉内皮细胞迁移的影响 Ang 1(600 ng/ml)处理内皮细胞24 h后,与对照组相比,血管内皮细胞划痕后的愈合率增强[(21.76% \pm 1.71%) vs (33.18% \pm 3.61%)], $n=8, t = -2.859, P<0.05$](图3A);另一组采用0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的Hcy处理内皮细胞24 h,结果显示30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的Hcy处理组划痕后的愈合率受到抑制(图3B、C);第三组采用0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + 溶剂对照、30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy、30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + Ang 1(600 ng/ml)、50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy、50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + Ang 1(600 ng/ml)分别处理内皮细胞24 h,结果显示Ang 1阻断了30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy引起的划痕后愈合抑制效应,但Ang 1没有阻断50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy引起的划痕后愈合抑制效应(图3D)。

2.4 Ang 1对Hcy抑制的大鼠肠系膜动脉内皮细胞增殖作用的影响 实验以肠系膜动脉内皮细胞为研究对象,结果显示,0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的Hcy处理内皮细胞24 h后,30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的Hcy抑制了内皮细胞增殖(图4A);另一组采用0 $\mu\text{mol/L}$ Hcy +

溶剂对照、30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy、30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + Ang 1(600 ng/ml)、50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy、50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy + Ang 1(600 ng/ml)分别处理内皮细胞24 h,结果显示,Ang 1阻断了30 $\mu\text{mol/L}$ Hcy引起的增殖抑制效应,但对50 $\mu\text{mol/L}$ Hcy抑制的增殖无阻断作用(图4B)。

3 讨论

美国心脏协会在2014年将Hcy血浆水平 $>10 \mu\text{mol/L}$ 作为高Hcy血症的临床诊断标准^[5]。2018年修订版的《中国高血压防治指南》中将血浆中Hcy水平修订为 $\geq 15 \mu\text{mol/L}$ 作为诊断高Hcy血症的临床标准^[6]。血浆中过高的Hcy可引起血管内皮功能损伤,参与动脉粥样硬化的发生发展,从而引起一系列心脑血管疾病^[7-9],因此,阐明高Hcy血症在高血压及各种心脑血管疾病发生发展中的作用具有重要意义。

研究^[10]显示,Hcy可通过增加细胞内的活性氧引起线粒体途径的凋亡,参与心脑血管疾病的发生

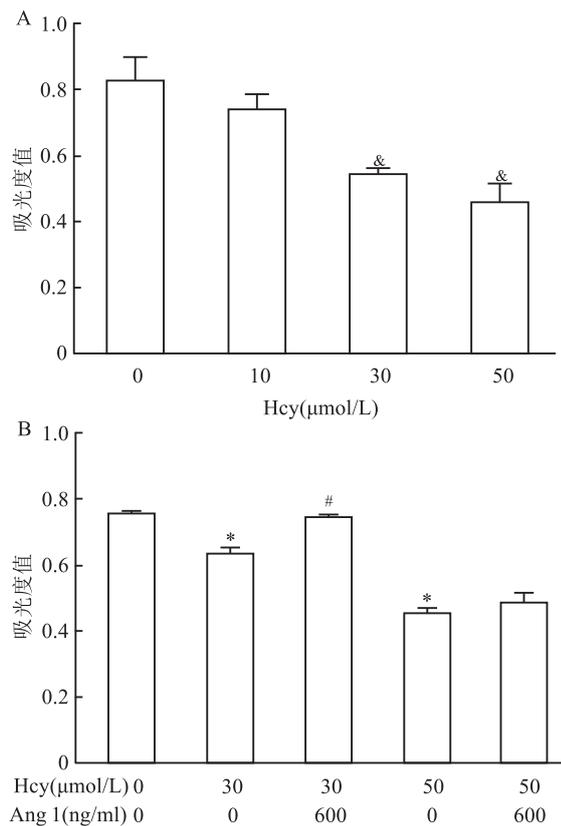


图4 Ang 1对Hcy抑制的肠系膜动脉内皮细胞增殖的阻断作用
 A:不同浓度Hcy对肠系膜动脉内皮细胞增殖的影响(n=3);与0 μmol/L Hcy组比较;[&]P<0.05;B:Ang 1对不同浓度Hcy抑制的肠系膜动脉内皮细胞增殖的阻断作用(n=6),与0 μmol/L Hcy+0 ng/ml Ang 1组比较;^{*}P<0.05;与30 μmol/L Hcy+0 ng/ml Ang 1组比较;[#]P<0.05

发展。抗氧化剂可缓解Hcy引起氧化应激并激活VEGF-VEGFR-FAK信号通路导致的内皮功能损伤^[11]。也有研究^[12]报道补充Hcy代谢调节中的叶酸可抑制Hcy引起的脐静脉内皮细胞凋亡。在Hcy对血管生成素影响方面,仅有文献报道Hcy处理可显著抑制脐静脉内皮细胞的Ang 1和2的表达^[13],但血管生成素对高Hcy引起的内皮功能损伤的抑制作用国内外文献未见报道。因此,阐述血管生成素对高Hcy引起的内皮功能损伤的调节作用具有重要的理论意义和应用价值。蛋白质谱检测方法可以从一个样本中同时鉴定多种蛋白质类型及其表达水平,是蛋白质组学研究的重要手段^[14],本研究采用蛋白质谱方法从动物水平研究显示,高Hcy血症大鼠血浆蛋白表达谱出现改变,多个蛋白出现上调或下调,其中Ang 1在高Hcy血症大鼠血浆中也上调。而Ang 1具有促进血管内皮细胞迁移、增殖、侵袭和防止渗漏等内皮保护作用,因此猜测,在高Hcy血

症大鼠中,Ang 1可能为反射性的升高,从而阻断高Hcy引起的内皮功能损伤,是一种内皮保护性的代偿机制。为证实该推测,本实验以与血压形成密切相关的阻力血管,即肠系膜上动脉为研究对象,通过原代培养肠系膜上动脉内皮细胞并进行实验验证。结果显示,Hcy可浓度依赖地抑制内皮细胞迁移和增殖,说明一定浓度的Hcy可引起内皮细胞功能损伤。但是,当一定浓度的Ang 1与Hcy共同处理内皮细胞时,阻断了低浓度Hcy抑制的内皮细胞迁移和增殖,但不能阻断高浓度Hcy引起的内皮损伤。说明Ang 1只能在一定范围内对Hcy引起的内皮损伤有修复作用。本研究中的高Hcy血症大鼠血浆中,Hcy浓度为36.82 μmol/L左右,与本研究细胞实验中Ang 1有效阻断Hcy引起内皮功能损伤的Hcy浓度接近,说明Ang 1在高盐饮食情况下会起到一定的血管内皮功能保护作用。因此,高Hcy血症一方面可引起血管内皮损伤,另一方面可引起细胞合成和分泌蛋白增强或减弱。其中,高Hcy反射性引起Ang 1在血浆中含量升高,而升高的Ang 1可在一定程度上阻断了高Hcy引起的内皮功能损伤,可能参与高Hcy血症时内皮功能的代偿机制。另一方面,该结果也提示Ang 1在Hcy血症引起的血管内皮功能损伤中也具有潜在治疗价值。但本研究仍未阐明,在高Hcy血症大鼠血浆中升高的Ang 1通过何种细胞内信号通路抑制Hcy引起的血管内皮细胞损伤以及Ang 1来自于何种组织细胞。

综上所述,高Hcy血症可显著影响部分血浆蛋白分泌,且高Hcy血症模型大鼠血浆中升高的Ang 1可在一定浓度范围内参与阻断高Hcy引起的血管内皮功能损伤。该研究揭示了一种高Hcy血症血管内皮功能代偿机制,也为Ang 1在Hcy血症引起的血管内皮功能损伤治疗中提供潜在的新方法和新靶点。

参考文献

[1] Chiang W C, Huang Y C, Fu T I, et al. Angiotensin II influences ischemic reperfusion renal injury via modulating endothelium survival and regeneration[J]. Mol Med,2019,25(1):5.
 [2] 霍亚杰,温玉洁,刘陶文,等. 血清Ang/Tie2、VEGF在糖尿病肾病病情评估中的应用价值[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(4):508-11.
 [3] Yun J H, Han M H, Jeong H S, et al. Angiotensin II attenuates interleukin-6-induced endothelial cell permeability through SHP-1[J]. Biochem Biophys Res Commun,2019,518(2):286-93.
 [4] Moxon J V, Trollope A F, Dewdney B, et al. The effect of angiotensin-II upregulation on the outcome of acute ischaemic stroke in

- rodent models: a meta-analysis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019,39(12):2343-54.
- [5] 中国高血压防治指南修订委员会, 高血压联盟(中国), 中华学会心血管病学分会, 等. 中国高血压防治指南(2018年修订版)[J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24(1):24-56.
- [6] Balint B, Jepchumba V K, Guéant J L, et al. Mechanisms of homocysteine-induced damage to the endothelial, medial and adventitial layers of the arterial wall[J]. *Biochimie*, 2020, 173:100-6.
- [7] Kernan W N, Ovbiagele B, Black H R, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2014, 45(7):2160-236.
- [8] Zhang T, Jiang Y, Zhang S, et al. The association between homocysteine and ischemic stroke subtypes in Chinese: a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(12):e19467:1-8.
- [9] Sreckovic B, Sreckovic V D, Soldatovic I, et al. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2017, 11(3):179-82.
- [10] Kaplan P, Tatarkova Z, Sivonova M K, et al. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7698.
- [11] Wang X J, Tian D C, Wang F W, et al. Astaxanthin inhibits homocysteine-induced endothelial cell dysfunction via the regulation of the reactive oxygen species-dependent VEGF-VEGFR2-FAK signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6):4753-60.
- [12] Cui S C, Wang P Y, Lv X, et al. Folic acid inhibits homocysteine-induced cell apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 444(1-2):77-86.
- [13] Pan L, Yu G, Huang J, et al. Homocysteine inhibits angiogenesis through cytoskeleton remodeling[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(5):BSR20170860.
- [14] 李倩, 张立宇, 蒋正轩, 等. iTRAQ 法分析原发性慢性闭角型青光眼患者血浆中蛋白质组学变化[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(4):640-44.

Study on the high expression of angiotensin 1 in plasma of hyperhomocysteinemia rats and its protective effect on endothelial cells

Shen Tongtong¹, Zhou Limin¹, Dong Shuangshuang¹, Wang Xinxin¹,

Xu Xiaohong¹, Liu Yu¹, Zheng Fan², Ma Shaobo², Shen Bing²

[¹Dept of Cardiology, The Affiliated Chuzhou Hospital of Anhui Medical University (The First People's Hospital of Chuzhou), Chuzhou 239000; ²Dept of Physiology, School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032]

Abstract Objective To investigate the changes of plasma protein expression profile in hyperhomocysteinemia rats and the protective effect of highly expressed angiotensin 1 in plasma on endothelial cells. **Methods** The hyperhomocysteinemia animal model was established. The difference in plasma protein content was analyzed by label-free protein spectroscopy. The effects of homocysteine and angiotensin 1 on endothelial cell migration and proliferation were detected by wound healing and CCK-8 proliferation assay. **Results** The results of protein profiling showed that 5 proteins were significantly up-regulated and 17 proteins were significantly down-regulated in the plasma of hyperhomocysteinemia rats, among which angiotensin 1 was significantly up-regulated. In endothelial cells in the superior mesenteric artery of rats, treatment with 30 or 50 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine for 24 h significantly inhibited the migration and proliferation. Angiotensin 1 (600 ng/ml) significantly reduced the migration and proliferation of endothelial cells inhibited by 30 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine, but had no significant effect on the migration and proliferation of endothelial cells inhibited by 50 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine. **Conclusion** Hyperhomocysteinemia can significantly affect the protein expression profile in plasma. Angiotensin 1 in plasma can compensate for the damage of vascular endothelial migration and proliferation function caused by homocysteine in a certain concentration range.

Key words homocysteine; angiotensin 1; vascular endothelial cells; label-free protein spectrum; migration; proliferation