

同型半胱氨酸对内皮细胞肌球蛋白轻链激酶表达的影响

吴 燕,王 怡,江巧玲,周佳丽,周 青,汪 渊,朱华庆

摘要 目的 研究同型半胱氨酸(Hcy)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)运动能力以及肌球蛋白轻链激酶(MLCK)表达的影响。方法 不同浓度的Hcy处理人脐静脉内皮细胞后,MTT法检测Hcy对HUVEC增殖的影响,划痕实验检测Hcy对细胞迁移的影响,免疫组化法及Western blot法检测MLCK表达的变化。结果 随着浓度的升高,Hcy对HUVEC的增殖有显著的抑制作用,对HUVEC的迁移有明显的促进作用,免疫组化法及Western blot法结果显示Hcy可以增强MLCK的表达。结论 Hcy对HUVEC的迁移具有促进作用,可能是Hcy通过上调MLCK的表达所致。

关键词 同型半胱氨酸;动脉粥样硬化;人脐静脉内皮细胞;肌球蛋白轻链激酶

中图分类号 R 966; R 541.4; R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)01-0012-04

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是大多数心脑血管疾病的重要病理基础,给人类健康带来极大的威胁,而其发病机制非常复杂,其中内皮细胞损伤被认为是动脉粥样硬化的始动环节^[1-3]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含巯基氨基酸,是人体内甲硫氨酸代谢过程的中间产物,近年来,大量研究^[4]证明同型半胱氨酸可以损伤内皮细胞,是

致AS的一个独立危险因素。肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)是一种钙调素依赖酶,能催化肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)磷酸化,引起内皮细胞收缩,细胞骨架重排,从而调节内皮细胞的通透性^[5]。该研究通过采用同型半胱氨酸处理人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),初步探讨了Hcy对HUVEC增殖、迁移能力的影响以及在此过程中MLCK表达的变化,为Hcy致AS的发生和发展机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVEC购于美国ATCC公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM高糖培养基购于美国Gibco公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hcy购于美国Sigma公司,MTT用PBS配制5%母液,Hcy用纯化水配制成200 mmol/L母液,分别过滤除菌,-20℃避光保存。BCA定量试剂盒、ECL显色试剂盒均购于美国Pierce公司;免疫组化染色试剂盒、DAB试剂盒购于北京中杉金桥公司;鼠抗人β-actin、MLCK均购于美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞,培养于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的高糖DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱。当细胞处于对数生长期时,用0.25% (含0.53 mmol/L EDTA)的胰蛋白酶消化传代。

2014-09-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070232、81270372)

作者单位:安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

作者简介:吴 燕,女,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aydzhq@126.com

ating to cardiac myocytes. **Methods** Appropriate P19 cells were chosen which were cultured *in vitro* with 0.9% dimethyl sulfoxide(DMSO), then the induced cells were collected at different times. Western blot of cardiac troponin I(cTnI) was used to identify cell differentiation, and detect the level of p22-phox before and after the differentiation. **Results** ① On the 8th day cTnI was detected positive in P19 cells which were cultured with 0.9% DMSO, then the expression of cTnI was increased, with statistical significance($P < 0.05$). ② The expression of p22-phox in differentiated P19 cells was higher than that in undifferentiated P19 cells, with statistical significance($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of p22-phox increases during the differentiation of P19 cells to cardiac myocytes, and the level of oxidative stress increases.

Key words P19 cells; cardiac myocytes; cell differentiation; oxidative stress; p22-phox

1.2.2 MTT 法 取对数生长期的 HUVEC, 接种于 96 孔板中(3 000 ~ 4 000 个/孔), 边缘孔用 200 μ l PBS 填充。细胞贴壁后, 吸去原培养液, 每孔加入 200 μ l 含不同浓度的 Hcy(0.1、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mmol/L) 培养液, 每组 4 个复孔, 设立细胞对照组, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。吸去原液, 每孔加入 200 μ l 新鲜 DMEM 培养液及 20 μ l MTT, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h。小心弃去上清液, 每孔加入 100 μ l DMSO, 震荡 10 min 溶解结晶后于 570 nm 测吸光度(optical density, OD)。抑制率(%) = (对照孔 OD₅₇₀ - 试验孔 OD₅₇₀) / 对照孔 OD₅₇₀ $\times$ 100%。

1.2.3 细胞划痕实验 HUVEC 用胰蛋白酶消化后吹打成单细胞悬液, 将细胞悬液均匀接种于 12 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养。待细胞长满后用灭菌白枪头在 12 孔板底部画出井字形, PBS 洗 3 次, 洗去划下的漂浮细胞, 加入培养液后在交叉线处拍照。拍照后换入含有不同浓度 Hcy(0.1、0.5、1.0 mmol/L) 的培养液, 每 12 h 拍照一次, 拍照前后均要换液。Quantity One 软件测量每组细胞划痕边界的距离, 细胞相对迁移率(%) = (药物处理前的距离 - 药物处理后的距离) / 药物处理前的距离。

1.2.4 免疫组化实验 取处于对数生长期的 HUVEC, 胰酶消化后接种于含有灭菌圆形盖玻片的 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜。次日细胞贴壁后分别加入含不同浓度 Hcy(0.1、0.5、1.0 mmol/L) 的培养液, 并设立细胞对照组及阴性对照组(PBS 代替一抗孵育) 培养 48 h。取出 6 孔板, 多聚甲醛固定细胞 1 h, PBS 洗 3 遍, 将盖玻片取出置于载玻片上, 吸干盖玻片周围 PBS, 山羊血清封闭 10 min, 加一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。二抗孵育 15 min, PBS 洗 3 遍, 加入链霉卵白素孵育 15 min, PBS 洗后 DAB 显色。自来水冲洗后苏木精复染, 自来水返蓝, 分别经 95% 乙醇、无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察、拍照。

1.2.5 Western blot 将细胞均匀接种于细胞培养瓶中, 待细胞贴壁生长后用不同浓度 Hcy(0.1、0.5、1.0 mmol/L) 处理 48 h。冰 PBS 洗涤细胞后, 加入蛋白提取液(Tris-HCl, pH 7.14; 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton, 0.1% SDS, 5 mg/ml Leupeptin, 1 mmol/L PMSF), 冰上裂解 30 min, 用细胞刮轻轻将细胞刮下置 -80 $^{\circ}$ C 及 4 $^{\circ}$ C 冰箱反复冻融 2 ~ 3 次。14 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min 后吸

取上清液进行 BCA 定量, 将所有样本调整为相同浓度并加入 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液后煮沸, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。配制 10% 的凝胶, 加样后恒压进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后恒流将蛋白转移至 PVDF 膜上, 3% ~ 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h, PBS 洗 3 次后置于一抗 [MLCK (1 : 500) 或 β -actin (1 : 1 000)] 中孵育过夜。加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h, PBS 洗 3 遍, 在暗室中将等比例混合后的 ECL 试剂 A 液和 B 液均匀涂于膜上, 覆盖 X 线片曝光, 显影, 定影。片子扫描后, 用 Quantity One 软件对其进行灰度值分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料采用成组设计的方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 Hcy 对 HUVEC 增殖的影响 MTT 结果显示 Hcy 能明显抑制 HUVEC 在体外的增殖, 并且抑制效果随 Hcy 浓度的升高而增强, 提示 Hcy 抑制 HUVEC 的增殖呈明显的剂量依赖性($F = 13.866$), 见表 1。

表 1 不同浓度 Hcy 对 HUVEC 增殖的影响($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	OD ₅₇₀ 值	抑制率(%)
细胞对照	1.07 $\pm$ 0.08	-
Hcy(mmol/L)		
0.1	1.00 $\pm$ 0.08	12.85*
0.4	0.92 $\pm$ 0.10	29.27*
0.6	0.83 $\pm$ 0.03	46.59*
0.8	0.81 $\pm$ 0.08	46.70*
1.0	0.77 $\pm$ 0.05	58.00*
2.0	0.75 $\pm$ 0.02	62.07*

与细胞对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 Hcy 对 HUVEC 迁移的影响 HUVEC 在加药处理 24 h 和 36 h 后, Hcy 组划痕处的细胞明显比细胞对照组多, 且随着药物浓度的升高划痕间隙越来越小, 说明 Hcy 可以明显促进 HUVEC 的迁移, 且随着药物浓度的升高迁移效果越明显($F = 56.61$), 见图 1。

2.3 细胞免疫组织化学法检测 MLCK 的表达 免疫组织化学结果显示细胞对照组仅有极少量细胞着色且着色很浅; 0.1 mmol/L Hcy 处理细胞后棕黄色的 MLCK 表达量增强; 0.5 mmol/L Hcy 处理后可见细胞胞质大量着色, 且着色更深; 1.0 mmol/L Hcy 组染色细胞阳性表达最强, 胞质呈深棕黄色, 见图 2。

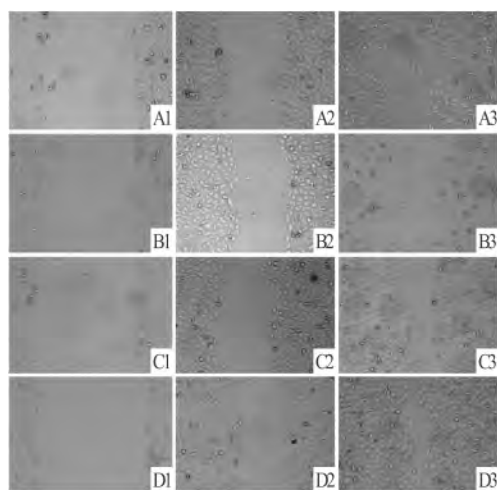


图1 划痕实验检测 Hcy 对 HUVEC 迁移的影响 × 100

A: 细胞对照组; B: 0.1 mmol/L Hcy 组; C: 0.5 mmol/L Hcy 组; D: 1.0 mmol/L Hcy 组; 1: 0 h; 2: 24 h; 3: 36 h; 与同一时间细胞对照组比较: * $P < 0.05$

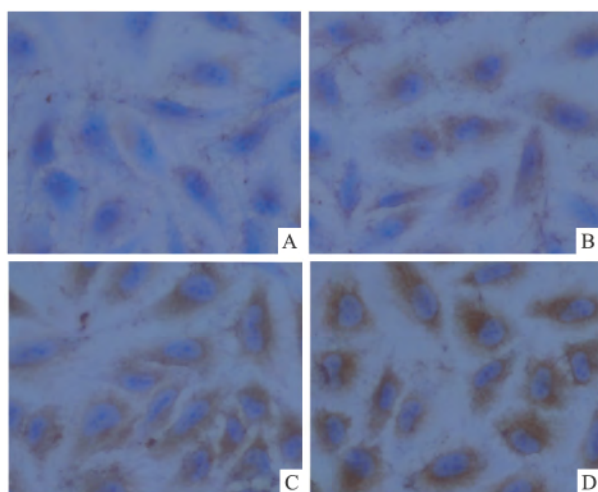
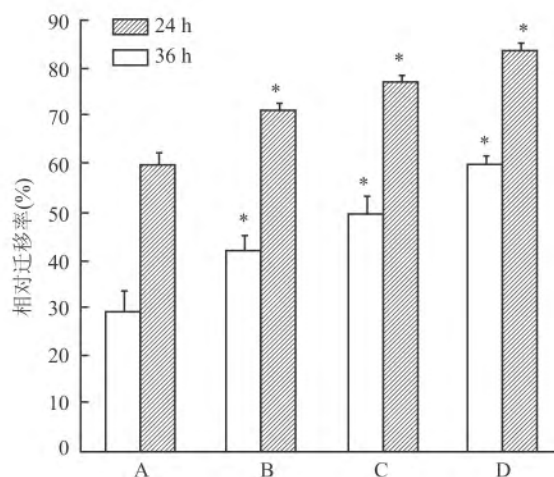


图2 免疫组化法检测 Hcy 对 HUVEC 中 MLCK 表达的影响 × 400

A: 细胞对照组; B: 0.1 mmol/L Hcy 组; C: 0.5 mmol/L Hcy 组; D: 1.0 mmol/L Hcy 组

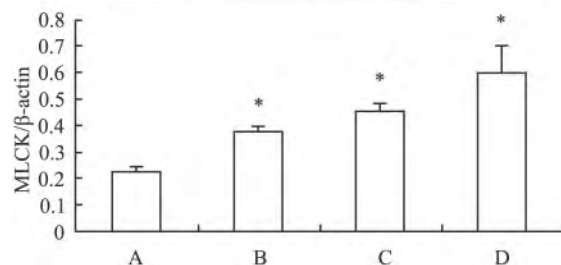
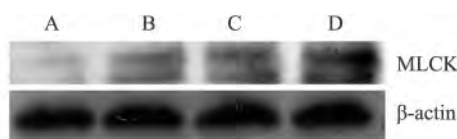


图3 Western blot 检测 Hcy 对 HUVEC 中 MLCK 表达的影响

A: 细胞对照组; B: 0.1 mmol/L Hcy 组; C: 0.5 mmol/L Hcy 组; D: 1.0 mmol/L Hcy 组; 与细胞对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 Western blot 检测 MLCK 的表达 不同浓度的 Hcy 作用于 HUVEC 48 h 后,结果显示与细胞对照组相比 Hcy 处理后的细胞 MLCK 表达显著增强,且随着 Hcy 浓度的升高,细胞中 MLCK 的表达量逐渐加强($F = 62.276$),见图 3。

3 讨论

在人体内,Hcy 主要是甲硫氨酸脱甲基后的产物。Hcy 有两种代谢途径,一方面可以通过转硫作用生成半胱氨酸和 α -酮丁酸,另一方面可以发生甲基化,重新形成甲硫氨酸,以保持体内 Hcy 的平衡。与 Hcy 体内合成和代谢相关的酶、叶酸、维生素 B12

等的缺乏都可能引起高同型半胱氨酸血症^[5]。AS 是由多种因素共同参与的一种疾病,包括高血压、高血脂、糖尿病、吸烟等,而高同型半胱氨酸血症是导致 AS 的一个重要因素,目前其机制尚未完全明确。

血管内皮细胞是附着于血管壁的单层表皮细胞,是血液和组织液之间的转运屏障,能合成和分泌多种活性物质,保证血管正常的收缩和舒张,使循环血液保持流动状态,防止血栓形成。AS 与内皮细胞之间具有密切的联系,AS 的产生始于内皮细胞的损伤。有研究^[6-7]表明 Hcy 可以通过巯基发生自身氧化,产生的过氧化氢、超阴离子和羟自由基等活性氧诱导氧化应激反应,导致内皮细胞的直接损伤,同时,释放的大量炎症因子会破坏血管内皮,引起内皮功能紊乱,进一步加剧 AS 的发展。该研究采用体

外培养 HUVEC,经不同浓度 Hcy 处理后,MTT 结果显示与细胞对照组相比较,Hcy 组细胞的增殖受到明显抑制,且抑制效果呈浓度依赖性。

近年来研究^[8]显示 MLCK 在调节内皮细胞收缩以及血管内皮屏障功能中发挥着重大作用,是 MLC 磷酸化的重要调节蛋白。MLC 磷酸化水平与骨架收缩活动直接相关,MLCK 表达增加可以上调 MLC 磷酸化水平,导致内皮细胞收缩加剧,通透性增加,细胞形态和功能完整性遭到破坏,脂质更容易发生浸润^[9]。该研究 Western blot 以及免疫组化结果显示,与细胞对照组相比,Hcy 处理组细胞中 MLCK 的表达量显著上升,且随着药物浓度的升高而增加,提示 Hcy 可以上调 MLCK 的表达。MLC 的磷酸化水平与细胞迁移也是密切相关的,MLCK 诱导细胞周边和前端 MLC 磷酸化,磷酸化的 MLC 加强肌球蛋白和肌动蛋白微丝的相互作用,增强细胞的运动能力,从而促进细胞的迁移^[10]。划痕实验显示 Hcy 处理 HUVEC 24 h 及 36 h 后,在显微镜下可以观察到划痕距离的缩短,且随着药物浓度的升高,划痕距离的缩短更加显著,从而提示 Hcy 可以促进 HUVEC 的迁移。

参考文献

- [1] Anca V S, Camelia S S, Maya S, et al. Vascular endothelium in atherosclerosis [J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335(1): 191–203.
[2] Hong D, Bai Y P, Gao H C, et al. Ox-LDL induces endothelial

cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235(2): 310–7.

- [3] Zhang D H, Chen Y Q, Xie X N, et al. Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(4): 487–96.
[4] Yu Y, Lv N, Lu Z, et al. Deletion of myosin light chain kinase in endothelial cells has a minor effect on the lipopolysaccharide-induced increase in microvascular endothelium permeability in mice [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 279(8): 1485–94.
[5] Kerkeni M, Tnani M, Chuniaud L, et al. Comparative study on in vitro effects of homocysteine thiolactone and homocysteine on HUVEC cells: Evidence for a stronger proapoptotic and proinflammatory homocysteine thiolactone [J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 291(1–2): 119–26.
[6] Wang W, Sun Y, Liu J, et al. Protective effect of theaflavins on homocysteine-induced injury in HUVEC cells *in vitro* [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(5): 434–40.
[7] 王春艳,孙雪林. 动脉粥样硬化内皮细胞炎症反应及他汀类药物的干预作用 [J]. *中国医学工程*, 2012, 20(1): 150–1.
[8] Wang H, Zhu H Q, Wang F, et al. MicroRNA-1 prevents high-fat diet-induced endothelial permeability in apoE knock-out mice [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 378(1–2): 153–9.
[9] 高峻岭,杜勇,左莉. 胰岛素对糖尿病大鼠动脉壁肌球蛋白轻链激酶表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(6): 519–22.
[10] Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, et al. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts [J]. *Cell Biol*, 2004, 164(3): 427–39.

The effect of homocysteine on the expression of MLCK in human umbilical vein endothelial cells

Wu Yan, Wang Yi, Jiang Qiaoling, et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology, Anhui Medical University, Dept of Key Laboratory, Gene Resource Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect of homocysteine (Hcy) on movement ability and expression of myosin light chain kinase (MLCK) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** MTT assay was detected to measure the proliferation of HUVEC treated with different concentrations of homocysteine. The effect of Hcy on migration of HUVEC was measured by wound healing assay. The expression of MLCK was analyzed by immunohistochemistry and Western blot. **Results** With the increase of concentration, Hcy could inhibit the proliferation of HUVEC and promote the migration of HUVEC remarkably. Immunohistochemistry and Western blot showed that Hcy could enhance the expression of MLCK significantly. **Conclusion** Hcy can promote the migration of HUVEC, which may relate to the up-regulation of expression of MLCK

Key words Hcy; atherosclerosis; HUVEC; MLCK