文章编号:1000-5404(2014)24-2485-04

论著

尿毒症血清蛋白对血管内皮细胞的损伤作用

梁 新[1],吴 军[2],韦杏雪[1],丁 瑜[1],周宝尚[1],王代红[1],王沂芹[1],袁发焕[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:肾内科,重庆市肾脏病研究所,全军肾脏病中心[1],健康管理科[2])

[摘要] **目的** 研究尿毒症血清蛋白对人血管内皮细胞的损伤作用,探讨蛋白结合尿毒症毒素对人血管内皮细胞的损伤作用。**方法** 采集维持性血液透析尿毒症患者和正常健康人的静脉血,经过血清分离、透析、低温真空冻干等处理提取血清蛋白,以不同浓度的尿毒症血清蛋白溶液或正常血清蛋白溶液(0.4%、1%、2%、4%)刺激人脐静脉内皮细胞(HUVEC)不同时间(24、48、72 h),设置空白对照组。倒置相差显微镜观察细胞形态,CCK-8 检测细胞增殖抑制率,一氧化氮(NO)试剂盒、一氧化氮合酶(NOS)试剂盒分别检测细胞培养上清液 NO 浓度和细胞 NOS 活性,流式细胞仪检测内皮细胞膜微粒(EMPs)产生率、细胞凋亡率。**结果** 与正常血清蛋白溶液组、空白对照组比较,尿毒症血清蛋白溶液组细胞折光性差,细胞间隙增宽,细胞膜表面毛糙,细胞突起明显增多,细胞形态各异,胞浆颗粒明显增加。不同浓度的尿毒症血清蛋白溶液处理 HUVEC 的细胞增殖率均显著低于相应正常血清组和空白对照组($P<0.05$)。与正常蛋白溶液组、空白对照组比较,尿毒症蛋白溶液组细胞培养上清液中 NO 浓度降低、细胞 NOS 活性明显降低($P<0.05$)。尿毒症蛋白溶液组 EMPs 产生率为(62.57±1.59)%,显著高于空白对照组(7.3±0.57)%和正常蛋白溶液组(13±0.94)%($P<0.05$)。尿毒症蛋白溶液对 HUVEC 细胞凋亡无明显影响。**结论** 尿毒症血清蛋白溶液能使内皮细胞形态发生变化,抑制内皮细胞增殖,损伤内皮细胞分泌功能,导致内皮细胞功能受损。

[关键词] 蛋白结合尿毒症毒素;人脐静脉内皮细胞;一氧化氮合酶;内皮膜微粒
[中图法分类号] R322.12;R361.3;R692.502 [文献标志码] A

Damage effect of uremic serum protein on vascular endothelial cells

Liang Xin[1], Wu Jun[2], Wei Xingxue[1], Ding Yu[1], Zhou Baoshang[1], Wang Daihong[1], Wang Yiqin[1], Yuan Fahuan[1] ([1]Department of Nephrology, [2]Department of Health Management, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the damage effect of protein-bound uremic toxins on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were cultured in growth medium with the addition of different concentrations (0.4%, 1%, 2% and 4%) of proteins collected from the uremic patients or the normal persons for different time (24, 48 and 72 h), and the blank control group was established. The cell morphology was observed with an inverted phase contrast microscope. The cell proliferation rate, nitric oxide (NO) concentration and nitric oxide synthase (NOS) activity were detected by respective assay kits. The cell apoptotic rate and the level of endothelial microparticles (EMPs) were detected by flow cytometry (FCM). **Results** Compared with the normal group and the blank control group, the uremic group showed irregular cell morphology, lower cell proliferation rate ($P<0.05$), less NO in culture supernatant ($P<0.05$), and lower NOS activity ($P<0.05$). The level [(62.57±1.59)%] of the EMPs in the uremic group was significantly higher than that [(7.3±0.57)%] in the blank control group and that [(13±0.94)%] in the normal group ($P<0.05$). However, the uremic protein solution had no effect on cell apoptosis. **Conclusion** The serum protein solution from the uremic patients may change the HUVEC morphology, inhibit the HUVEC proliferation and NO secretion, decrease the NOS activity, and promote the released EMPs from the HUVECs, which may lead to the dysfunction of the vascular endothelial cells.

[**Key words**] protein-bound uremic toxins; human umbilical vein endothelial cells; nitric oxide synthase; endothelial microparticles

Corresponding author: Yuan Fahuan, E-mail: yuanfh023@126.com

[通信作者] 袁发焕,E-mail:yuanfh023@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1623.032.html(2014-11-06)

慢性肾脏疾病(chronic kidney dielace, CKD)发病率逐年增加,其最主要的并发症及致死原因为心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)[1]。研究表明,心血管疾病发病风险不仅在终末期肾病明显增加,甚至在轻微肾功能不全也有所增加。然而传统的心血管危险因素并不能完全解释该临床现象,因此有学者提出尿毒症危险因素对CVD的发生有促进作用[2]。尿毒症毒素(其作为尿毒症对CKD的危险因素之一)逐渐引起大家的重视。尿毒症毒素根据其蛋白质结合能力,可分为游离尿毒症毒素(water-soluble uremic toxins)和蛋白结合尿毒症毒素(protein-bound uremic toxins),常规血液透析不能清除蛋白结合尿毒症毒素[3]。流行病学研究发现,尿毒症患者进行规律的血液透析治疗后,其CVD的发病率及致死率仍居高不下。作为新的透析方式——高截留透析(high cut-off hemodialysis, HCO-HD)治疗却能明显降低患者死亡率[4]。HCO-HD与其他血液透析的不同在于置换出部分血清蛋白,故有理由推测尿毒症患者体内的血清蛋白上结合的尿毒症毒素与患者的高死亡率有密切关系。因血清蛋白上结合的尿毒症毒素与血管内皮细胞接触的机会多,故有可能引起内皮细胞损伤。本实验以人脐静脉内皮细胞为对象,观察尿毒症血清蛋白对血管内皮细胞的毒性作用,探讨蛋白结合尿毒症毒素在慢性肾脏病患者并发CVD发生机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC,中国典型培养物保藏中心),DMEM高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰酶(美国Gibco公司),CD144抗体(美国EB),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(美国BD),CCK-8试剂盒(日本同仁),NO、NOS试剂盒(碧云天),透析袋(50×10^3,美国光谱公司)。

1.2 血清蛋白的提取及血清蛋白溶液配制

根据蛋白质纯化方法[5]取我院肾内科透析室维持性透析的20例尿毒症患者全血各10 mL,男女各10例;纳入标准:规律透析时间>6个月,每周透析3次(含2次血液透析,1次血液透析滤过),基础疾病为慢性肾炎,近期无急慢性感染等活动性疾病(采集于2014-03-11);同样的方法取我院健康管理科的20例健康志愿者全血各10 mL,男女各10例(采集于2014-03-15),全血经低温离心分离获取血清;于4 ℃下将血清置于透析袋中透析[血清:透析液(PBS)=1∶100],2 h/次,共3次;其后低温真空冻干血清溶液获得血清蛋白干粉,将尿毒症患者血清蛋白干粉、正常血清蛋白干粉分别用完全培养基配制成4%的蛋白溶液,4 ℃保存备用。

1.3 细胞培养与分组

将HUVEC置于含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,于37 ℃、5% CO_2条件下孵育,常规传代培养。待细胞生长至对数期时,以2×10^4个/cm^2分组接种于6孔板或者96孔板中,细胞贴壁融合至为50%~60%时,换为无血清培养基饥饿过夜后,PBS洗涤2次,加入含有不同浓度(0.4%、1%、2%、4%)尿毒症血清蛋白溶液(尿毒症组)或含有不同浓度(0.4%、1%、2%、4%)正常血清蛋白溶液(正常组)或完全培养基(空白对照组)。

1.4 细胞形态镜下观察

选取4%尿毒症组、4%正常组和空白对照组HUVEC进行实验,培养72 h后,直接于倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.5 细胞增殖率测定

选取尿毒症组(0.4%、1%、2%、4%)、正常组(0.4%、1%、2%、4%)和空白对照组HUVEC进行实验,设置3个复孔;分别培养24、48、72 h。孵育到相应时间点,弃尽上清,PBS洗涤2次,配制检测反应液(CCK8:完全培养基=1∶9),100 μL/孔,避光孵育4h,酶标仪于450 nm波长处检测各孔光密度值[$D(450)$],以无细胞组作为调零组。

1.6 细胞NO分泌量、NOS活性测定

选取4%尿毒症组、4%正常组和空白对照组HUVEC进行实验,设置3个复孔。分别培养24、48、72 h,孵育至相应时间点后,分别吸取各组上清液于1.5 mL EP管中备用;然后PBS洗涤2次,按NOS试剂盒配置检测反应液,每孔加入100 μL,避光孵育2 h后,置于荧光酶标仪中(激发波长495 nm、发射波长515 nm)检测荧光强度。从EP管中分别吸取50 μL上清液于96孔板中,设置3个复孔;按NO试剂盒说明书依次加入检测试剂,最后置于酶标仪中在540 nm处测其光密度值[$D(540)$]。

1.7 内皮细胞膜微粒(EMPs)检测

选取4%尿毒症组、4%正常组和空白对照组HUVEC进行实验。培养72 h后,收集上清液,4 ℃、800×g离心5 min;再取上清液,4 ℃、$1\times10^5\times g$离心1 h;其后弃上清液,加入1 mL PBS重悬沉淀的膜微粒;取其中100 μL,加入10 μL CD144抗体,气浴恒温振荡器100 r/ min,室温下孵育30 min;最后加入300 μL PBS混匀后,流式细胞仪检测。

1.8 细胞凋亡率检测

选取4%尿毒症组、4%正常组和空白对照组HUVEC进行实验。孵育72 h后,收集细胞(包括上清液中的细胞),PBS洗涤3次,按照AnnexinV/PI双染细胞凋亡检测试剂盒操作加入各检测试剂,其后流式细胞仪分析检测。

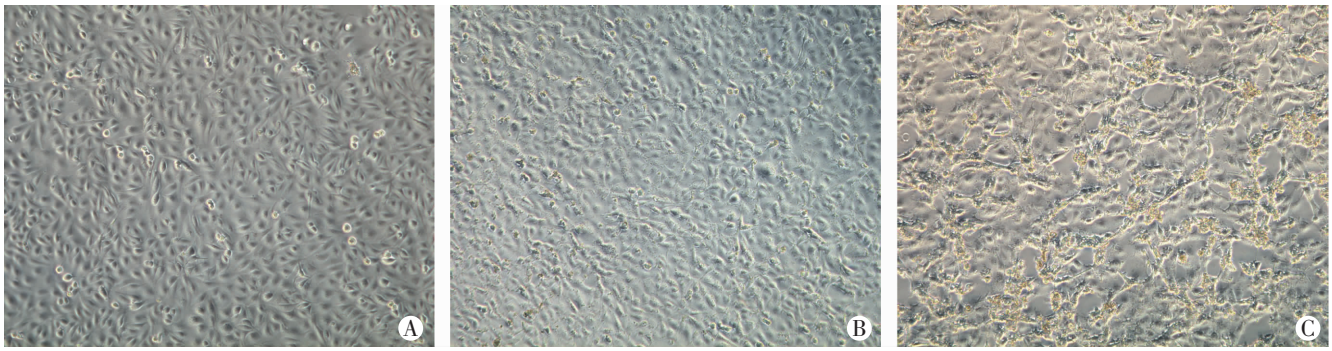
1.9 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

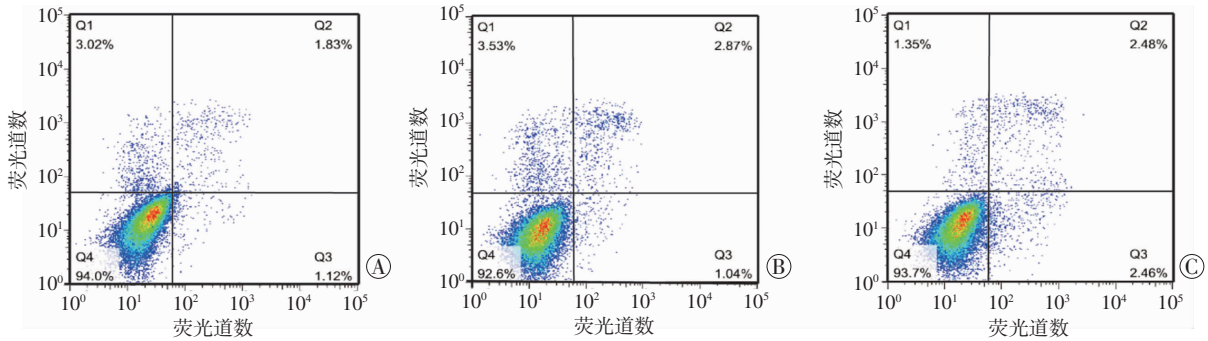
2.1 对细胞形态的影响

倒置相差显微镜观察可见:空白对照组细胞呈短梭形,大小均一,边界清楚,呈单层铺路石样排列;4%尿毒症组与空白对照组、4%正常组相比,细胞折光性差,细胞间隙增宽,细胞膜表面毛糙,突起明显增多,形态各异,胞浆颗粒明显增加。见图1。



A:空白对照组;B:4% 正常组;C:4% 尿毒症组

图 1　各组培养 72 h 后对 HUVEC 细胞形态的影响　(倒置相差显微镜×100)



A:空白对照组;B:4% 正常组;C:4% 尿毒症组

图 3　流式细胞仪检测各组培养 72 h 后对 HUVEC 细胞凋亡的影响

2.2　对细胞增殖的影响

CCK-8 检测显示:同一时间点,与空白对照组、正常组相比,尿毒症组细胞增殖率明显下降($P<0.05$);同一时间点,随着血清蛋白溶液浓度的增加,尿毒症组细胞受抑制的程度明显增加($P<0.05$);同一浓度的血清蛋白溶液,随时间的增加,尿毒症组细胞增殖率明显下降($P<0.05$,表 1)。

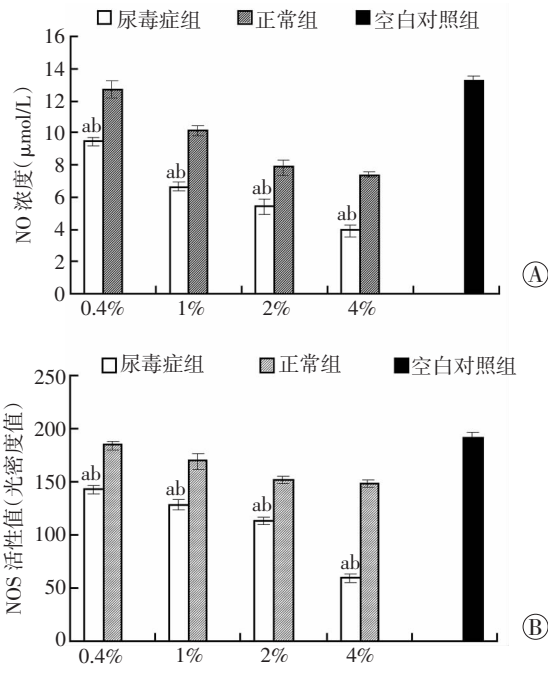
表 1　不同浓度的血清蛋白溶液作用 HUVEC 不同时间后平均光密度值比较($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清蛋白溶液浓度	24 h	48 h	72 h
空白对照组		1.31±0.04	1.79±0.03	2.14±0.15
尿毒症组	0.04%	1.11±0.02^{abc}	1.41±0.03^{abc}	1.33±0.03^{abc}
	1.0%	0.95±0.04^{abc}	1.28±0.03^{abc}	1.10±0.08^{abc}
	2.0%	0.81±0.01^{abc}	1.13±0.06^{abc}	0.89±0.02^{abc}
	4.0%	0.76±0.02^{abc}	0.98±0.01^{abc}	0.69±0.01^{abc}
正常组	0.04%	1.20±0.03	1.70±0.01	1.92±0.03
	1.0%	1.12±0.02	1.51±0.02	1.68±0.03
	2.0%	1.01±0.05	1.32±0.04	1.52±0.03
	4.0%	0.89±0.02	1.19±0.02	1.37±0.04

a:$P<0.05$,与同时间点空白对照组及正常组比较;b:$P<0.05$,相同浓度尿毒症组、不同时间点比较;c:$P<0.05$,相同时间点、不同浓度尿毒症组比较

2.3　对细胞 NO 分泌、细胞 NOS 活性的影响

与正常组、空白对照组相比,尿毒症组 NO 分泌量明显下降($P<0.05$),且随着血清蛋白溶液浓度的增加,尿毒症组细胞的 NO 分泌量减少;同时对于细胞 NOS 活性而言,尿毒症组明显下降,与正常组、空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。



a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与正常组比较

图 2　各组培养 72 h 后对 HUVEC 细胞 NO 分泌(A)和 NOS 活性(B)的影响

2.4　对内皮细胞源性膜微粒(EMPs)产生的影响

流式细胞仪分析示:细胞膜微粒(其为内皮细胞损伤标志物之一)的产生率在空白对照组、正常组和尿毒症组分别为(7.30±0.57)%、(13.0±0.94)%、(62.57±1.59)%,尿毒症组较空白对照组及正常组明显升高($P<0.05$)。

2.5 对细胞凋亡的影响

流式细胞仪分析示:空白对照组、正常组和尿毒症组细胞凋亡率分别为(4.44±1.74)%、(5.49±1.57)%、(6.2±1.17)%,组间比较差异无统计学意义(图3)。

3 讨论

尿毒症毒素是指肾脏功能下降而潴留于体内的有毒物质,根据毒素分子量的大小,分为小分子毒素(分子量<500)、中分子毒素(500~5 000)和大分子毒素(>5000);根据毒素是否与蛋白质结合,分为游离毒素和蛋白结合毒素(现已发现100余种)[6-7]。尿毒症患者即使经过规律血液透析,其心血管疾病的发病率和致死率仍居高不下。采用新的透析方式--高截留量透析(high cut-off hemodialysis, HCO-HD),CKD的发病率和死亡率较传统血液透析明显降低。普通透析只能清除游离在血浆中的尿毒症毒素,而HCO-HD还能清除部分血浆白蛋白及其白蛋白结合的尿毒症毒素。因此,HCO-HD改善透析患者CKD的发病率和死亡率的作用,直接缘于对蛋白结合毒素的清除。

血管内皮细胞作为血管内皮的结构和功能单位,血管内皮细胞损伤及其功能障碍是血管疾病的始动环节。导致血管内皮细胞损伤的因素很多,除了已知的高脂、高糖、高血压、炎症、血浆游离的尿毒症毒素[8-10]等因素,本实验证明尿毒症患者的血浆蛋白结合毒素也是不可忽视的因素之一。本研究发现在尿毒症患者血清蛋白溶液的刺激下,内皮细胞的形态发生了显著改变,细胞间隙增宽,细胞膜表面毛糙,胞浆颗粒增加,细胞增殖受到抑制,细胞的NO分泌减少、NOS酶活性下降;同时蛋白浓度越高,对内皮细胞的毒性越强,毒性作用呈浓度依赖性。NO是内皮细胞在NOS作用下分泌的最重要的血管舒张因子。NO产生减少,可引起血管舒缩障碍、血管张力增加。内皮细胞损伤后释放的细胞间粘附因子,能使白细胞贴壁,促进炎症反应,诱导血管平滑肌细胞的增殖与迁移,从而加剧心血管事件的发生与发展[11-12]。

内皮细胞源性膜微粒(endothelial microparticles, EMPs)是从细胞膜表面以生芽方式脱落形成的微小磷脂囊泡结构,起着细胞信息交流、信号启动、受体转换、细胞联系等作用。循环中的EMPs可通过调控内皮细胞的NO和PGI2通路,也可通过产生TXA2对平滑肌细胞产生直接影响;同时EMPs也可对主动脉环中的NO的生成产生影响[13]。研究表明EMPs也能加剧内皮细胞自身的损伤[14]。本实验发现在尿毒症血清蛋白溶液刺激下,EMPs生成明显增加,提示蛋白结合尿毒症毒素能损伤内皮细胞,从而增加尿毒症患者心血管事件的发生。

本研究还发现,尿毒症血清蛋白溶液对内皮细胞凋亡无明显影响,与我们以前研究发现对甲酚[15]对HUVEC细胞凋亡无影响相吻合。按照一般的常识,毒素应能导致细胞凋亡,而我们的结果却与一般常识相悖,其原因有待进一步研究。

综上所述,尿毒症血清蛋白溶液能抑制HUVEC增殖,改变内皮细胞的形态,抑制NO分泌,促进EMPs脱落增加,导致内皮细胞损伤,提示蛋白结合尿毒症毒素可能是尿毒症患者心脑血管并发症高发病率和致死率的重要危险因素。

参考文献:

[1] Go A S, Chertow G M, Fan D, *et al*. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization[J]. N Engl J Med, 2004, 351(13): 1296-1305.

[2] Liabeuf S, Drueke T B, Massy Z A. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies[J]. Toxins (Basel), 2011, 3(7): 911-919.

[3] Niwa T. Update of uremic toxin research by mass spectrometry[J]. Mass Spectrom Rev, 2011, 30(3): 510-521.

[4] Gondouin B, Hutchison C A. High cut-off dialysis membranes: current uses and future potential[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2011, 18(3): 180-187.

[5] 吕宪禹. 蛋白质纯化实验方案与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2010: 29-30.

[6] 胡炀琳,俞雨生. 尿毒症相关毒素研究进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2010, 19(1): 78-83.

[7] Rossi M, Campbell K L, Johnson D W, *et al*. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease[J]. Arch Med Res, 2014, 45(4): 309-317.

[8] Dou L, Bertrand E, Cerini C, *et al*. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair[J]. Kidney Int, 2004, 65(2): 442-451.

[9] 曾薇, 罗志锋, 齐伟, 等. 内质网应激在尿毒症血清致内皮细胞功能异常中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2011,36(2): 133-136.

[10] 张耀全, 袁发焕, 冯兵, 等. 慢性肾衰竭血清对兔主动脉内皮细胞泛素-蛋白酶体途径的影响[J]. 解放军医学杂志, 2010,35(10): 1192-1195.

[11] Kheirandish-Gozal L, Wang Y, Duggan R C, *et al*. Nitric oxide production by monocytes in children with OSA and endothelial dysfunction[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 127(5): 323-330.

[12] Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(3): 509-515.

[13] 吴志宏, 郑敏哲, 李辉, 等. 细胞膜微粒对内皮细胞凋亡影响的研究[J]. 中国骨与关节外科, 2011, 4(2): 141-145.

[14] Takeshita J, Mohler E R, Krishnamoorthy P, *et al*. Endothelial cell-, platelet-, and monocyte/macrophage-derived microparticles are elevated in psoriasis beyond cardiometabolic risk factors[J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(1): e000507.

[15] 李莉, 光丽霞, 王代红, 等. 对甲酚对人脐静脉内皮细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2013, 29(9): 676-680.

(**收稿**:2014-07-25;**修回**:2014-08-18)

(编辑 龙 亮)