基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.001

TLR4/NF-κB 信号通路在同型半胱氨酸致内皮细胞损伤中的作用研究

徐支芳[1]，于海娇[2]，马琳娜[2]，巩慧慧[2]，梁　宇[2]，姜怡邓[1]
（宁夏医科大学 1.基础医学院病理生理学教研室；2.检验学院生化教研室，银川　750004）

【摘　要】目的：Toll 样受体 4(Toll-like receptor-4，TLR4)/核因子-κB(Nuclear factor kappa B，NF-κB)在同型半胱氨酸(Homocysteine，Hcy)致动脉粥样硬化(Atherosclerosis，AS)过程中损伤内皮细胞的作用机制。方法：体外培养原代人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells，HUVECs)，用 0、50、100、200、500 μmol/L Hcy 和 100 μmol/L Hcy+30 μmol/L(维生素 B12+叶酸)分别与 HUVECs 培养 72 h 后，采用 MTT 法观察 Hcy 对 HUVECs 活性的影响；用分光光度比色法检测各组 HUVECs 中丙二醛(Malondialdehyde，MDA)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase，SOD)；酶免法检测 NF-κB；荧光定量 PCR 和 Western blot 分别测 TLR4 mRNA 和蛋白表达。结果：Hcy 可抑制 HUVECs 的活性，各 Hcy 干预组与对照组比较细胞活性均降低，其中 100、200、500 μmol/L Hcy 组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)，而其他组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)；随 Hcy 浓度增加 MDA 和 NF-κB 含量和 TLR4 mRNA 和蛋白表达明显增加，而各实验组 SOD 活性明显降低，其中，100、200、500 μmol/L Hcy 组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)，其他组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论：TLR4/NF-κB 可能是 Hcy 致 HUVECs 损伤的重要机制之一，其中 MDA 和 SOD 起了重要的作用。

【关键词】人脐静脉内皮细胞；动脉粥样硬化；同型半胱氨酸；Toll 样受体 4；核因子-κB
【中国图书分类法分类号】R363　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-08-18

An investigation on mechanism of the TLR4/NF-κB on Hcy to promote the damage of HUVECs

XU Zhi-fang[1], YU Hai-jiao[2], MA Lin-na[2], GONG Hui-hui[2], LIANG Yu[2], JIANG Yi-deng[1]
(1. Department of Pathophysiology, Basic Medical College; 2. Department of Biochemistry, Inspection Institute, Ningxia Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of TLR4/NF-κB on Hcy to promote the damage of the vein endothelial cells on plaques of atherosclerosis. *Methods*: Cultured HUVECs were treated by 0, 50, 100, 200 μmol/L and 500 μmol/L Hcy, 100 μmol/L Hcy+30 μmol/L(VitaminB12+Folic acid) concentrations of Hcy for 72 h. The activity of HUVECs was examined by MTT assay. The MDA and NF-κB contents and SOD activity were measured by chromatometry and ELISA. The mRNA and protein expressions of TLR4 were detected by fluorescent quantitation PCR and Western blot. *Results*: MTT test showed that Hcy could restrain the activity of HUVECs after being treated by Hcy for 72 h. The activity of 100 to 500 μmol/L Hcy compared to control cells were significant($P<0.05$), but other cells compared to control cells were not significant($P>0.05$); the increasing concentration of Hcy increased MDA and NF-κB contents as well as the mRNA and protein expressions of TLR4, but it reduced the SOD contents. The activity of 100, 200 μmol/L and 500 μmol/L Hcy compared to control cells was significant ($P<0.05$), but other cells compared to control cells were not significant($P>0.05$). *Conclusion*: The TLR4/NF-κB may act as one of important mechanisms in Hcy to promote the damage of HUVECs, in which MDA and SOD may play an important role.

【Key words】human umbilical vein endothelial cells(HUVECs); atherosclerosis; homocysteine; toll-like receptor-4(TLR4); NF-κB

同型半胱氨酸(Homocysteine，Hcy)为含硫氨基酸，是蛋氨酸代谢过程中重要的一碳单位，可发生自氧化，导致一系列活性氧簇(Reactive oxygen species，ROS)生成增多，ROS 可以攻击细胞，从而使其发生结构、性质、功能的变化，成为疾病发生发展的源头。例如通过引起脂质过氧化从而导致细胞膜损伤、产生有毒的醛类化合物如丙二醛(Malondialdehyde，MDA)等，从而引起内皮细胞损伤[1]，进而导致动脉粥样硬化(Atherosclerosis，AS)形成。叶酸(Flolic acid)是 Hcy 代谢过程中的重要决定因子，可减少Hcy 的生成，而维生素B12(Vitamin

作者介绍：徐支芳(1984-)，女，硕士，
研究方向：心血管动脉粥样硬化。
通信作者：姜怡邓，男，副教授，Email：jwcjyd@126.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：30960124)；教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(编号：NECT-10-0916)。

B12,VB12)作为辅助因子可促进叶酸的循环利用[2]。

Toll 样受体 4(Toll-like receptor-4,TLR4)是天然免疫系统的一种模式识别受体,发挥对外来致病微生物的识别作用,构成机体天然的第一道防线,TLR4 与其相应配体结合通过信号转导最终导致核因子-κB(Nuclear factor kappa B,NF-κB)等的激活,引起炎症因子和趋化因子的分泌,参与 AS 的发生发展[3]。Hcy 是 AS 的独立危险因子[4],但其浓度异常升高引起 AS 发病的主要分子机制至今仍不清楚,据此采用体外培养的原代人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)为实验对象,通过采用不同浓度的 Hcy 以及拮抗剂叶酸和 VB12 对 HUVECs 干预 72 h 后,分别对相应指标进行检测来探讨 Hcy 致 HUVECs 损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

M199 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季清),胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、胶原酶Ⅱ、四甲基偶氮唑蓝盐(MTT)、Hcy(Sigma),超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、MDA 测试盒（南京建成),NF-κB 酶免测试盒(Bluegene),RNA 提取试剂 Trizol(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(First Strand cDNA Synthesis Kit LOT 00071511 Fermentas 公司),荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Green qPCR Master Mix LOT 00064710 Fermentas 公司),引物(上海生工公司合成),兔抗人 TLR4 抗体(博世德公司)及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中杉公司),β-actin(博奥森公司),新鲜脐带(宁夏医科大学附属医院产科)。

1.2 方法

1.2.1 HUVECs 的体外培养、鉴定及分组 取健康、足月剖腹产胎儿脐带,置脐带保存液中,6 h 内用于实验。D-Hanks 液冲洗数次至流出清亮液体为止,一端用止血钳夹闭,另一端插入自制 10# 针头,注入 0.1%胶原酶Ⅱ,置 37℃ D-Hanks 液中消化 15 min。吸出消化液,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,加入含 20%胎牛血清的 M199 培养基,重悬,取 1 滴台盼蓝染色后,行细胞计数,保证活细胞数>95%,以 2×10^5 个/ml 接种于培养瓶,37℃,饱和湿度,5%CO_2 培养箱中培养,24 h 后换液,去除未贴壁细胞,整个过程为无菌操作。经细胞形态学观察,从血管壁脱落下来的 HUVECs 为圆形,单个或数个成团存在,表面粗糙。接种后,约 4 h 可见部分细胞贴壁,并伸出伪足。24 h 后完全贴壁,单层排列,形态为圆形、短梭形或多角形,折光性强。约 48~96 h 逐渐生长融合成单层,呈多角形,如铺路石样或鹅卵石样镶嵌排列。应用Ⅷ因子相关抗原免疫组织化学染色鉴定证实为 HUVECs,选第 3 代细胞用于实验。将细胞分别置于终浓度为 0(对照组)、50、100、200、500 μmol/L Hcy 和 100 μmol/L Hcy+30 μmol/L(VB12+叶酸)(简称为:100 μmol/L+V+Y)的培养液中孵育 72 h,以备实验使用。

1.2.2 MTT 测细胞抑制率 用胰酶消化对数生长期的 HUVECs,制成细胞悬液 5×10^4 个/ml,加入 96 孔培养板,每孔200 μl,培养 24 h 后,吸出培养液,按计划进行干预后,每孔加入 20 μl MTT(5 mg/ml),置 5%CO_2、37℃的培养箱中作用 4 h,弃上清液,加入 150 μl DMSO 溶解,平板振荡仪振荡 10 min,酶联免疫仪 490 nm 波长测各孔吸光度(A)值。

1.2.3 试剂盒测细胞内 SOD、MDA 和 NF-κB 含量 按试剂盒说明书,采用分光光度计测定 SOD 活力、MDA 含量;按酶免法试剂盒说明书测 NF-κB 蛋白含量。

1.2.4 荧光定量 PCR 法测 TLR4mRNA 的表达 在 NCBI GenBank 数据库中查询 TLR4(AK 290053),采用 Primer Premier5.0 软件设计引物。TLR4:上游, 5'-ATAAGTGTCGAACTCCCTC-3';下游,5'-GCTCATTCCTTACCCAGT-3',扩增产物长度为 138 bp;GAPDH:上游,5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3';下游, 5'-AGGGGCCACAGTCTTC-3',扩增产物长度为 146 bp。收集各组细胞,用 TRizol 提取总 RNA,所提取的 RNA 经核酸分析仪分析 RNA 纯度,以 OD_{260}/OD_{280} 在 1.7~1.9 之间的 RNA 用于后续实验。按逆转录试剂盒(Promega 公司)说明书逆转录合成 cDNA 取产物 1.5 μl,加入以下成分:SYBR Green qpcr Master Mix 12.5 μl,upprimer 1.5 μl,downprimer 1.5 μl,加去离子 DEPC 水使整个反应体系为 25 μl,用以下条件进行 PCR:94℃预变性 3 min,94℃变性 45 s,51℃退火 45 s,72℃延长 45 s,扩增 65 个循环。实验结果根据如下公式计算:目的基因的相对量=$2^{-\Delta\Delta Q}$,Ct 是热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值,△△Ct=[Ct GI(待测样品)-Ct GAPDH(待测样品)]-[Ct GI(校正样品)-Ct GAPDH (校正样品)]。GI 是目的基因,校正样品是任何被选做代表 1 倍目的基因表达量的样品。

1.2.5 Western blot 检测 TLR4 蛋白的表达 在 HUVECs 中加入 PMSF+RIPA 细胞裂解液,冰上裂解数秒,4℃,10 000~12 000 r 离心 3~5 min。取上清液以 BCA 法进行蛋白浓度测定;取等量蛋白与 5×上样缓冲液混合煮沸 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶恒压 80 V,30 min,分离胶恒压120 V,2 h);电转移至 PVDF 膜(恒流 65 V,2 h,4℃);5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,PBST 洗膜;加入兔抗人 TLR4 一抗(1:500)4℃孵育过夜,PBST 洗膜;辣根过氧化物酶(1:3 000)(室温、避光缓慢摇动) 作用 60 min,PBST 洗膜;X 光胶片曝光、显影、定影。扫描 X 线片后,采用 Bio-Rad Quantity 4.5.2 软件分析测定其区带的感光密度,计算各组细胞 TLR4 蛋白表达与内对照 β-actin 的表达量像素灰度的比值作为 TLR4 蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

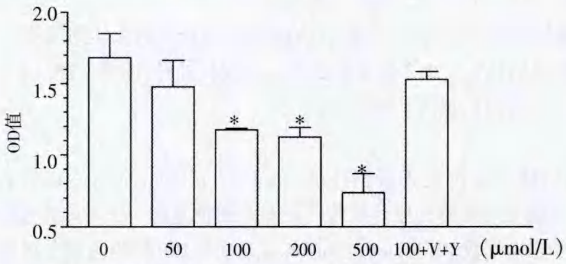
各组样本测得值均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,以统计学软件Prism3.0 进行统计。检验方差齐性,对多个组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *Dunnett* 法检验;方差不齐者,采用 t' 化最大值下的配对比较即 *Dunnett T3* 法检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hcy 对 HUVECs 活性的影响

不同浓度的Hcy干预HUVECs 72 h后,Hcy抑制HUVECs

的生长，HUVECs 的活性与 Hcy 呈剂量依赖关系，随着Hcy浓度的增加，HUVECs 活性降低，其中 100、200、500 μmol/L Hcy 组分别是对照组活性的 69.84%、66.86%、43.87%，与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；叶酸和 VB12 与对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）（图 1）。



注：采用 *Dunnett T3* 法检验，*，$P<0.05$ 与对照组比较

图 1　Hcy 对 HUVECs 活性的影响(72 h OD 值，$n=5$)

2.2　Hcy 对 HUVECs 中 SOD、MDA 和 NF-κB 的影响

Hcy 与HUVECs培养72 h后，结果显示，SOD活力、MDA 和 NF-κB 含量随 Hcy 浓度的增加而改变，且呈剂量依赖关系，其中 100、200、500 μmol/L Hcy 组中 SOD 活力、MDA 和NF-κB 含量与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$），其他组与对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），表明 Hcy 对 HUVECs 有一定的损伤作用而叶酸和 VB12 在此过程中可能起到拮抗 Hcy 的作用（表 1）。

表 1　Hcy 对 HUVECs 中 SOD、MDA 和 NF-κB 的影响

（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	SOD（U/mg prot）	MDA（nmol/mg prot）	NF-κB（μg/ml）
0	156.30 ± 10.35	24.52 ± 2.29	176.00 ± 6.86
50	148.23 ± 7.40	27.90 ± 2.00	193.05 ± 12.37
100	135.96 ± 6.25*	30.59 ± 1.79*	282.83 ± 9.71*
200	111.90 ± 6.18*	38.49 ± 3.57*	332.35 ± 14.28*
500	103.40 ± 4.89*	39.23 ± 3.81*	401.90 ± 12.23*
100+VB12+Folic acid	141.80 ± 6.43	28.66 ± 2.62	193.82 ± 8.18
F	42.98	23.07	350.39
P	<0.05	<0.05	<0.05

注：*，$P<0.05$，与对照组比较

2.4　Hcy 对 HUVECs 中 TLR4 mRNA 和蛋白表达的影响

图 2、表 2 所示，不同浓度的 Hcy 处理细胞 72 h 后，干预组中 TLR4 mRNA 表达随 Hcy 浓度的增加而增多，其中 100、200 μmol/L 和 500 μmol/L Hcy 组与对照组比较明显增多，差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），其他组与对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。这与 Western blot 检测 TLR4 蛋白表达结果是一致的，且叶酸和 VB12 也起到了拮抗 Hcy 的作用。

3　讨　论

AS 的形成涉及到很多病理过程，例如：内皮细胞损伤，平滑肌细胞增殖，局部单核巨噬细胞和血小板粘附，泡沫细胞

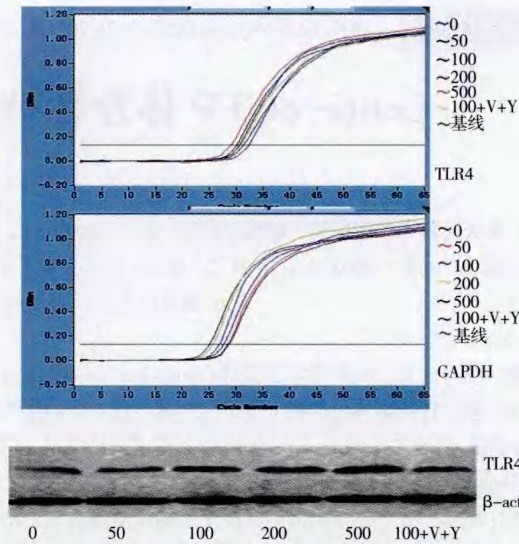


图 2　Hcy 对 HUVECs 中 TLR4 mRNA 和蛋白表达的影响(72 h)

表 2　Hcy 对 HUVECs 中 TLR4 mRNA 和蛋白表达的影响

（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	TLR4 mRNA 表达	TLR4蛋白表达
0	0.032 ± 0.008	0.453 ± 0.031
50	0.056 ± 0.010	0.501 ± 0.023
100	0.498 ± 0.279*	0.601 ± 0.051*
200	0.559 ± 0.051*	0.630 ± 0.059*
500	0.911 ± 0.132*	0.673 ± 0.050*
100+ VB12+Folic acid	0.167 ± 0.065	0.544 ± 0.162
F	85.76a	11.87
P	<0.05	<0.05

注：a，采用 *Dunnett T3* 法检验；*，$P<0.05$ 与对照组比较表

形成等，其中内皮细胞损伤是 AS 发生发展的始动环节[5]。Hcy 是近几年发现的致 AS 独立危险因子，Hcy 浓度较高时，其产生的 ROS 超出了细胞的清除能力，破坏了细胞的防御性保护反应，故出现内皮细胞的损伤[6]，这可能是 Hcy 致 AS 机制的一个重要方面，但 Hcy 引起 AS 的发病机制并不完全清楚及如何防治仍是国内外学者研究的热点。

本文 MTT 实验结果显示，不同浓度的 Hcy 干预 HUVECs 72 h 后，HUVECs 受损，活性显著降低，500 μmol/L Hcy 组受损尤为显著，说明Hcy通过各种途径对内皮细胞有损伤作用，从而导致 AS 的发生，表明本课题采用 Hcy 干预 72 h 使 HUVECs 受损，复制细胞模型是成功的。

Hcy 在代谢过程中可引发细胞内 ROS 的产生，并因此形成脂质过氧化物 MDA 等。MDA 可间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度，而 SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力[7]。本文结果提示，MDA 含量随 Hcy 浓度的增加表达增加，而 SOD 活性相应降低，而拮抗剂组无此变化，这正印证了这一点，由此可知，Hcy 引起的 MDA 含量和 SOD 活性的改变也是内皮细胞受损的原因之一。

在 AS 形成过程中，血管壁炎症为其主要特征，Hcy 可增加细胞内 ROS 的产生，ROS 与各促炎症细胞因子往往在炎症部位同时存在，ROS 能够通过激活 NF-κB 上调促炎症细

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.002

Lenti-eGFP 体外转染兔角膜上皮细胞的实验研究

王继东[1],马晓辉[2],兰　芬[3],王　健[4],陈　余[5],范原铭[6],杜之渝[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆　400016;2. 山东省胸科医院呼吸内科,济南　250000;3. 重庆医科大学附属第二医院眼科,重庆　400010;4. 山东淄矿集团中心医院消化内科,淄博　255120;5. 山东淄矿集团中心医院普外科,淄博　255120;6. 重庆医科大学附属第一医院内分泌外科,重庆　400016)

【摘　要】目的:观察慢病毒载体(Lentivirus vectors,LVs)介导的增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescence protein,eGFP)基因转染离体兔角膜上皮细胞对其生理功能的影响。方法:角膜上皮细胞的原代及传代培养并细胞鉴定。分正常细胞组(对照组)与转染细胞组。LVs 介导的 eGFP 基因(Lenti-eGFP)以最适感染复数(Multiples of infection,MOI)=100 转染角膜上皮细胞并成功传代,倒置荧光显微镜观察 eGFP 的表达情况。HE 染色光镜观察及透射电子显微镜观察 2 组细胞的形态及超微结构变化;计算 2 组细胞在传代第 2、3、4 天的细胞增殖率;流式细胞技术(Flow cytometer,FCM)检测 2 组角膜上皮细胞凋亡率的变化。结果:eGFP 于转染 48 h 即开始有表达,随着转染时间的延长其在角膜上皮细胞内的表达增强。细胞成功传代后,eGFP 仍明显表达于角膜上皮细胞。在最适感染复数,即 MOI=100 时,HE 染色光镜观察见转染组细胞形态规则,无异常核分裂像,与对照组角膜上皮细胞形态一致;透射电子显微镜观察转染组细胞超微结构与对照组细胞无明显差别。2 组细胞分别在传代第 2、3、4 天的增殖率差异无统计学意义($P>0.05$)。FCM 检测细胞凋亡率 2 组间无明显差异($P>0.05$)。结论:Lenti-eGFP 可以有效转染离体兔角膜上皮细胞,但对上皮的影响需要进一步探讨。

【关键词】慢病毒载体;基因转染;增强型绿色荧光蛋白;角膜上皮;细胞实验

【中国图书分类法分类号】Q789;R322.9　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-06-17

作者介绍:王继东(1979-),男,主治医师,博士,研究方向:妇科生殖与内分泌。

通信作者:杜之渝,男,教授,Email: kuanrenyk@yahoo.com.cn。

胞因子的表达,引发炎症,而炎症又能够诱导活性氧的生成,形成恶性循环[8]。Sarir 等[9]人的实验中,ROS 大量产生的同时细胞内 TLR4 表达也显著上升,而抗氧化剂可以抑制这一现象,提示氧化应激可以增加 TLR4 表达。TLR4 识别配体后经过细胞内一系列信号转导过程,最终活化 NF-κB,诱导靶基因表达。NF-κB 是一个多向性核转录调节因子,可调节与炎症、免疫及生长调控有关的蛋白基因的表达[10,11]。本实验结果提示在 Hcy 的作用下细胞内 NF-κB 含量以及 TLR4mRNA 和蛋白的表达都增加,而 Hcy 拮抗剂组无此相应改变,因而认为 HUVECs 在 Hcy 作用下产生大量 ROS,进而激活 TLR4/NF-κB 的表达引发炎症,这可能是 AS 发生发展的始动机制之一。

综上所述,Hcy 引起 HUVECs 损伤与 TLR4、NF-κB、MDA 和 SOD 等的表达密切相关,其中氧化应激起了重要的作用,这可能是 Hcy 引起 HUVECs 损伤又一重要机制。

参 考 文 献

[1] Kaul S,Zadeh A A,Shah P K.Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease:Not validated[J].JAm Coll Cardiol,2006,48(5):914-923.

[2] Taban-shomal O,Kilter H,Wagner A,et al.The cardiac effects of prolonged vitamin B12 and folic acid ficiency in rats[J].Cardiovasc Toxicol,2009,9(2):95-102.

[3] 王虹艳,曲　鹏,吕　申,等.Toll 样受体 4/核因子-κB 和氧化低密度脂蛋白受体 LOX-1 对单核内皮细胞粘附的影响[J].中华心血管杂志,2005,33(9):827-831.

[4] Kang Y J.Copper and homocysteine in cardiovascular diseasesκ[J].Pharmacol Ther,2011,129(3):321-331.

[5] 李　薇,杜军保.动脉粥样硬化发病机制研究进展[J].实用儿科临床杂志,2009,24(1):58-60.

[6] Lentz S R.Mechanism of homocysteine induced atherothrombosis[J].Thromb,2010,3(8):1646-1654.

[7] 蒋　晖,黄德嘉.同型半胱氨酸在动脉粥样硬化过程中的作用[J].华西医学,2003,18(4):604-605.

[8] 麦嘉仪,沈新南,魏　延,等.叶黄素对 D-半乳糖致小鼠氧化损伤的保护作用[J].中国预防医学杂志,2010,11(4):346-349.

[9] Sarir H,Mortaz E,Karimi K,et al.Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human maerophages[J].J Inflamm(Lond),2009,5(6):12.

[10] Dirks S H,van Deventer S J,Peppelenbosch M P.Lipopolysaccharide recognition,internalisation,signaling and other cellular effects[J].J Endotoxin Res,2001,571(1):55-61.

[11] Guha M,Mackman N.LPS induction of gene expression in human monocytes[J].Cell Signal,2001,13(2):85-94.

（责任编辑:冉明会）