

trans C_{18:1} 通过 NOS-NO 系统诱导 内皮细胞损伤研究

邱 斌¹, 刘 蓉¹, 邓泽元^{1,*}, 范亚苇¹, 李 静¹, 胡蒋宁¹, 黎 玉²

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330047)

摘 要: 为了观察 *trans* C_{18:1} 对人脐静脉内皮细胞损伤的影响及其与 NOS-NO 系统的关系, 首先将不同浓度 *trans* C_{18:1} (50、100、200、400 μmol/L) 与人脐静脉内皮细胞共培养 24 或 48 h 后, MTT 法检测细胞存活率; 用 *trans* C_{18:1} (200 μmol/L) 处理内皮细胞 24 h 后, 分别检测一氧化氮含量(NO)及一氧化氮合酶(NOS)活性; 将 *trans* C_{18:1} 与一氧化氮合酶抑制剂亚硝酸左旋精氨酸甲酯(LNAME)及一氧化氮供体(SNP)单一或联合处理内皮细胞, 检测细胞存活率的变化。结果显示: *trans* C_{18:1} 以剂量和时间依赖方式导致内皮细胞的存活率下降; LNAME 与 *trans* C_{18:1} 联合处理内皮细胞后细胞存活率下降, 而 SNP 与 *trans* C_{18:1} 联合处理后细胞存活率上升; *trans* C_{18:1} 可诱导 NO 水平和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性显著下降, 而诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性无显著改变。表明: *trans* C_{18:1} 能通过抑制 eNOS 活性减少 NO 的分泌, 并暗示 NOS-NO 系统可能是 *trans* C_{18:1} 诱导内皮细胞损伤的作用机制之一。

关键词: *trans* C_{18:1}; 人脐静脉内皮细胞; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 损伤

trans C_{18:1}-induced HUVEC Endotheliocyte Damage by NOS-NO System

QIU Bin¹, LIU Rong¹, DENG Ze-yuan^{1,*}, FAN Ya-wei¹, LI Jing¹, HU Jiang-ning¹, LI Yu²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of *trans* C_{18:1}-induced endotheliocyte damage by NOS-NO system, the viability of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) subjected to *trans* C_{18:1} treatments at the concentrations of 50, 100, 200 μmol/L and 400 μmol/L for 24 or 48 h was determined by MTT assay. Meanwhile, the content of NO and the activity of NOS in HUVECs treated with *trans* C_{18:1} at the dose of 200 μmol/L for 24 h were also determined using a commercial kit. Moreover, the viability of HUVECs subjected to treatments of *trans* C_{18:1} coupled with nitric oxide synthase inhibitor *L*-arginine methyl nitrite (LNAME) and/or nitric oxide donor (SNP) were also determined. The results indicated that *trans* C_{18:1} could decrease the viability of HUVECs in a dose- and time-dependent manner. The viability of HUVECs could be decreased by the combinatorial treatment of LNAME and *trans* C_{18:1} but increased by the combinatorial treatment of SNP and *trans* C_{18:1}. *trans* C_{18:1} treatment could induce the secretion of NO and significantly decrease the activity of eNOS, but had no obvious effect on the activity of iNOS in HUVECs. Therefore, *trans* C_{18:1} treatment can reduce the secretion of NO through inhibiting eNOS activity, which suggests that the involvement of NOS-NO system is one of the important mechanisms of *trans* C_{18:1}-induced HUVEC damage.

Key words: *trans* C_{18:1}; human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); NOS; NO; damage

中图分类号: Q256

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0277-05

生产厂家为了提高油脂的稳定性和产品的风味, 通过加氢技术将植物油中顺式不饱和脂肪酸转变为反式脂

肪酸(trans fatty acids, TFA)^[1]。目前研究认为人体摄入 TFA 后, 会诱发系统炎症, 脂质代谢功能障碍和内

收稿日期: 2010-12-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972482); 江西省学术带头人计划项目(2008DD00900);

教育部博士点基金项目(20070403002); 江西省自然科学基金项目(2008GQY0023)

作者简介: 邱斌(1982—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品营养学。E-mail: 422083898@qq.com

* 通信作者: 邓泽元(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为脂肪酸营养。E-mail: dengzy28@yahoo.com.cn

皮功能损伤, 并与心血管疾病的发生和发展有密切关系^[2-4]。正常生理状态下, 内皮细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)催化合成的 NO 参与维持循环系统的动态平衡, 当 eNOS 受抑制, 造成 NO 的合成障碍和生物利用度下降时, 就会诱发许多心血管系统疾病, 如高血压、动脉粥样硬化等^[5]。目前, 对于 NOS-NO 系统的研究已十分深入, 但关于反式脂肪酸对于内皮细胞 NOS-NO 系统的影响尚未见报道。本实验主要通过 NOS-NO 系统研究 TFA 诱导内皮细胞损伤的机制, 为研究 TFA 与动脉粥样硬化的关系提供新的研究思路 and 科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人脐静脉内皮细胞株由南昌大学医学院赠送。

trans C_{18:1}(反式-9-十八碳烯酸)、胰蛋白酶、一氧化氮合酶阻断剂(亚硝酸左旋精氨酸甲酯, LNAME)、一氧化氮供体(SNP)、MTT 美国 Sigma 公司; DMEM 培养基 美国 Gibco 公司; 新生牛血清 杭州四季青公司; 一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)试剂盒 南京建成科技有限公司。

1.2 仪器与设备

MK3 酶标仪 美国 Thermo 公司; XDS-200C 倒置显微镜 上海蔡康光学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

取人脐静脉内皮细胞细胞株复苏, 于 100mL 培养瓶内培养, 培养基为含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 待铺满培养瓶后, 经胰蛋白酶消化传代, 置于 37℃、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱培养。隔天换培养液, 待细胞铺满培养皿 60%~80% 时, 进行实验分组。

1.3.2 *trans* C_{18:1} 对细胞存活率的影响

将细胞以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔加入细胞悬液 200 μ L, 待细胞长至融合。实验组同时分别加入用 NaOH 溶液溶解的不同浓度的 *trans* C_{18:1}, 使其终浓度分别为 50、100、200、400 μ mol/L, 每个浓度 6 个复孔, 设立空白对照组(细胞培养液中未添加任何试剂)和溶剂对照组(细胞培养液中 NaOH 浓度为 200 μ mol/L), 所有 *trans* C_{18:1} 的溶剂中 NaOH 的最终浓度均为 200 μ mol/L。在培箱内培养 24h 或 48h 后, 每孔加入 0.5mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4h 后, 弃去上清液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO), 振荡使蓝紫色结晶充分溶解, 用酶标仪测定 OD_{490nm} 值。计算各浓度 *trans* C_{18:1} 对细胞存活率的影响。

$$\text{存活率} / \% = \frac{\text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{空白对照组}}} \times 100$$

1.3.3 *trans* C_{18:1} 对细胞形态的影响

利用倒置显微镜, 观察正常培养 24h 后细胞的形态和 *trans* C_{18:1} 作用于内皮细胞 24h 后的形态。

1.3.4 细胞 NO 分泌量和 NOS 活性的测定

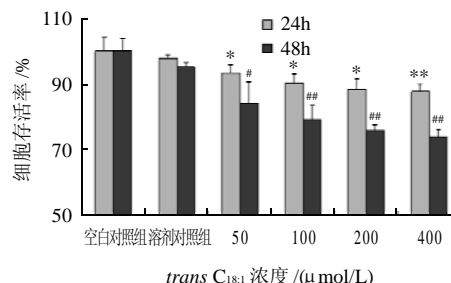
将细胞接种于 6 孔培养板, 待细胞长至融合后, 加入 *trans* C_{18:1}(200 μ mol/L), 继续培养 24h。取细胞培养液上清液用于 NO 含量的检测, NO 试剂盒(采用硝酸还原酶法)测定细胞释放到培养液中的 NO 的含量。另外, 把收集的细胞裂解, 用于 NOS 活性的检测。蛋白含量用考马斯亮蓝法检测。将紫外分光光度计调至波长 550nm 处, 用 NO 试剂盒测定各组培养液上清中 NO 稳定代谢产物 NO₃⁻还原为 NO₂⁻含量, 间接反映 NO 多少。NOS 测得原理: NOS 催化 L-精氨酸和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核物质生成有色化合物, 在波长 530nm 处测定吸光度, 根据吸光度的大小可计算 NOS 活力。具体操作参考试剂盒说明书。

1.3.5 LNAME 和 SNP 对细胞存活率的影响

将细胞以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔加入细胞悬液 200 μ L, 待细胞长至融合后, 先将 LNAME 或 SNP 提前与细胞孵育 4h, 再向细胞培养基内添加 *trans* C_{18:1}(200 μ mol/L) 培养 24h。LNAME 对细胞存活率的影响实验分组如下: 对照组、*trans* C_{18:1}(200 μ mol/L)单独组、LNAME(0.7 μ mol/L)单独组, LNAME(0.1、0.3、0.5 μ mol/L)+*trans* C_{18:1}组(200 μ mol/L)。SNP 对细胞存活率的影响实验分组如下: 对照组、*trans* C_{18:1}(200 μ mol/L)单独组、SNP(0.7 μ mol/L)单独组、SNP(0.05、0.1、0.5 μ mol/L)+*trans* C_{18:1}组(200 μ mol/L)。具体测定方法参考 1.3.2 节。

2 结果与分析

2.1 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞存活率的影响



*.*trans* C_{18:1} 处理内皮细胞 24h 后, 与空白对照组相比, 差异显著($P < 0.05$); **.*trans* C_{18:1} 处理内皮细胞 24h 后, 与空白对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$); #.*trans* C_{18:1} 处理内皮细胞 48h 后, 与空白对照组相比, 差异显著($P < 0.05$); ##. *trans* C_{18:1} 处理内皮细胞 48h 后, 与空白对照组相比, 差异极显著($P < 0.01$)。

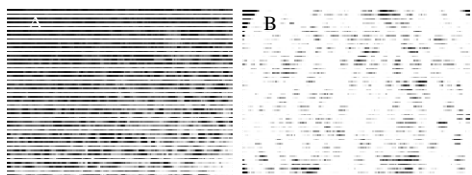
图 1 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of *trans* C_{18:1} treatment on the viability of HUVECs

如图1所示,溶剂对照组与空白对照组相比无显著性差异,50~400 $\mu\text{mol/L}$ 的 *trans* C_{18:1} 作用于内皮细胞24h和48h后,细胞存活率的降低与 *trans* C_{18:1} 呈浓度依赖和时间依赖关系,且 *trans* C_{18:1} 各浓度处理组与空白对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞损伤的形态学观察

培养24h后的对照组细胞,呈扁平状、结构清晰、大小均匀、排列紧密,呈典型铺路石状,完全贴附在培养板内(图2A)。用 *trans* C_{18:1} 处理24h,可以观察到明显的细胞形态变化(图2B),细胞变小、变圆、细胞排列稀疏、紊乱,开始与培养板脱离,而且出现少量细胞坏死现象,可见 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞的生长具有明显的抑制作用。

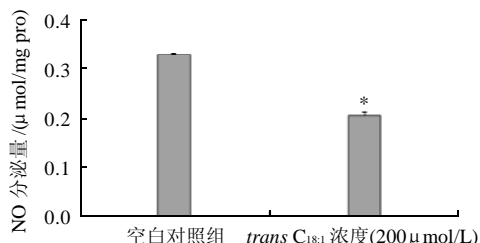


A.空白对照组; B.200 $\mu\text{mol/L}$ *trans* C_{18:1}。

图2 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞形态变化的影响($\times 20$)

Fig.2 Morphological changes of *trans* C_{18:1}-treated HUVECs ($\times 20$)

2.3 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞 NO 分泌量的影响



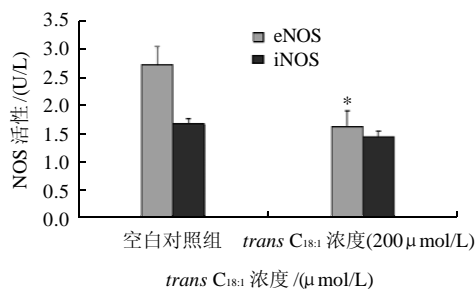
*,与空白对照组相比,差异显著($P < 0.05$)。

图3 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞 NO 分泌量的影响

Fig.3 Effect of *trans* C_{18:1} treatment on the secretion of NO in HUVECs

已知内皮细胞在一氧化氮合酶(NOS)催化下合成、释放的一氧化氮(NO)是一种重要的心血管保护因子。内源性NO是由L-精氨酸在eNOS催化下转化而来,心血管系统内由eNOS合成的NO具有介导血管内皮依赖性舒张、调节血管张力以及抑制血管平滑肌细胞增殖等多种心血管保护作用^[6]。由图3可知, *trans* C_{18:1} 作用于内皮细胞24h后,与空白对照组($0.33 \pm 0.01 \mu\text{mol/mg pro}$)相比,NO的分泌量($0.20 \pm 0.01 \mu\text{mol/mg pro}$)显著下降($P < 0.05$)。

2.4 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞 NOS 活性的影响



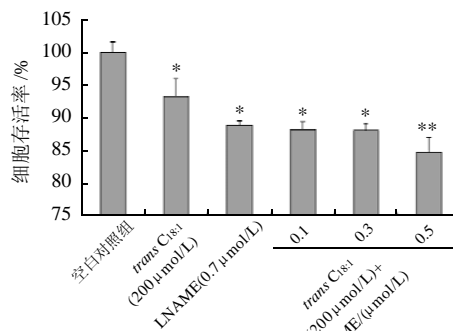
*,eNOS 活性与空白对照组相比,差异显著($P < 0.05$)。

图4 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞 NOS 活性的影响

Fig.4 Effect of *trans* C_{18:1} treatment on NOS activity in HUVECs

由图4可知, *trans* C_{18:1} 作用于内皮细胞24h后,与空白对照组($(2.73 \pm 0.31) \text{U/L}$)相比,eNOS的活性($(1.66 \pm 0.27) \text{U/L}$)显著下降($P < 0.05$),而iNOS的活性($(1.61 \pm 0.09) \text{U/L}$ vs $(1.44 \pm 0.09) \text{U/L}$)没有显著性差异($P > 0.05$)。根据结果可知, *trans* C_{18:1} 主要是通过抑制eNOS的活性导致内皮细胞损伤的。

2.5 LNAME 对 *trans* C_{18:1} 处理的内皮细胞存活率的影响

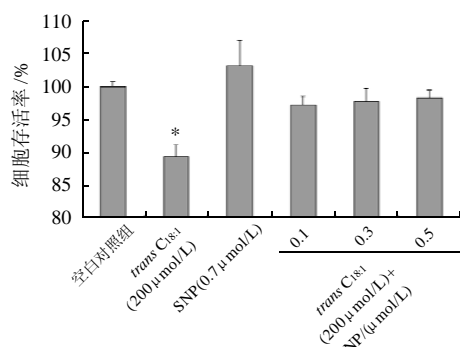


*,与空白对照组相比,差异显著($P < 0.05$); **,与空白对照组相比,差异极显著($P < 0.01$)。下同。

图5 LNAME 对 *trans* C_{18:1} 处理的内皮细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of NOS inhibitor on cell viability of *trans* C_{18:1}-treated HUVECs

LNAME 是一种广谱 NOS 抑制剂,它是L-精氨酸的类似物,可以竞争性占领底物L-精氨酸的结合部位,对NOS的活性有特异性的抑制作用。将一氧化氮合酶抑制剂LNAME加入培养基4h后,然后加入 *trans* C_{18:1} 作用24h,发现LNAME (0.1、0.3、0.5 $\mu\text{mol/L}$) + *trans* C_{18:1} 组的内皮细胞存活率均比 *trans* C_{18:1} 单独处理组明显降低($P < 0.05$),且与空白对照组相比也均显著降低($P < 0.05$),其中LNAME (0.5 $\mu\text{mol/L}$) + *trans* C_{18:1} 组与空白对照组相比差异极显著($P < 0.05$)。以上结果说明LNAME可以通过抑制一氧化氮合酶的活性,加剧 *trans* C_{18:1} 对内皮细胞的损伤。

2.6 SNP对 *trans* C_{18:1} 处理的内皮细胞存活率的影响图6 SNP对 *trans* C_{18:1} 处理的内皮细胞存活率的影响Fig.6 Effect of NO donor on cell viability of *trans* C_{18:1}-treated HUVECs

NO的生物半衰期极短,在正常生理状态下,为了维持各系统的机能,机体可产生适当水平的NO,但许多慢性疾病如高血压、动脉粥样硬化等可造成血管内皮细胞损伤,使NO产生减少,补充外源性NO是一种必要的治疗措施,NO供体(SNP)正是因这种临床需求而产生的。NO供体是一类能在生物体内释放出NO的前体药物,不需经NOS催化自行或与其他物质作用产生NO。

将一氧化氮供体SNP加入培养基4h后,然后加入 *trans* C_{18:1} 作用24h,发现SNP(0.1、0.3、0.5 μmol/L)+*trans* C_{18:1} 组的内皮细胞存活率均比 *trans* C_{18:1} 单独处理组明显升高($P < 0.05$),与空白对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。说明SNP可以通过提供NO,保护内皮细胞免受 *trans* C_{18:1} 损伤。

3 结 论

NO作为循环系统功能调节的重要气体信号分子,能够舒张血管平滑肌、抑制平滑肌细胞增殖、调控心肌收缩力及阻碍血小板黏附聚集等。早期的研究表明,炎症感染或炎性细胞因子是主动脉外膜NO生成增加的重要刺激因素,NO分泌量的变化是检测细胞是否受到损伤的一个重要指标。NOS能够以L-精氨酸和分子氧为底物,生成NO和副产物L-肌氨酸^[7]。目前公认的李S被分为两个亚型,一种是“结构性”NOS(cNOS),包括eNOS和nNOS,eNOS主要分布于内皮细胞,nNOS主要分布于神经细胞和骨骼细胞,cNOS的表达主要是被Ca²⁺调控;另一种是“诱导型”NOS(iNOS),iNOS的表达是被基因转录调控,主要分布于平滑肌细胞、巨噬细胞等多种细胞^[8]。在正常条件下,内皮细胞内eNOS催化产生的少量NO主要参与调节血管张力、血流分布和维持循环系统的稳态平衡^[9-11],而iNOS表达甚少,但在某些外界刺激物的刺激下,iNOS表达增高,iNOS活化后通过细胞膜在短时间内排出大量NO,过量的NO反而对细胞膜有一定的损伤^[12]。

有研究表明:随着eNOS mRNA水平的降低,eNOS蛋白翻译水平受到抑制,进而导致NO的分泌量相应减少,最终造成动脉血管的舒张功能受损^[13]。本研究发现, *trans* C_{18:1} 作用于内皮细胞后,eNOS的活性受到抑制,而iNOS的活性基本没有变化,同时NO的分泌量显著下降。因此认为 *trans* C_{18:1} 诱导内皮细胞的损伤可能是通过下调eNOS活性进而诱导NO分泌量的下降导致的, *trans* C_{18:1} 是通过NOS-NO系统诱导内皮损伤的。实验结果与文献报道相符^[14-15]。并且本研究还发现硝普钠(SNP-NO供体)可以保护内皮细胞免受 *trans* C_{18:1} 造成的损伤,而LNAME(NOS抑制剂)则加剧了 *trans* C_{18:1} 造成的内皮细胞损伤,这进一步说明NOS-NO系统是 *trans* C_{18:1} 造成内皮细胞损伤的重要机制之一。实验结果表明, *trans* C_{18:1} 造成的内皮细胞损伤机制与NOS-NO系统有关。本实验以NOS-NO系统通作为研究切入点,为研究反式脂肪酸与动脉粥样硬化的关系提供一定的研究思路。

参考文献:

- [1] 邓泽元,周满奇,黄玉华,等.中国居民20年间食物脂肪酸摄入量调查分析[J].食品与生物技术学报,2008,27(1):7-19.
- [2] WILLETT W C, MOZAFFARIAN D. Trans fats in cardiac and diabetes risk:an overview[J]. Current Cardiovascular Risk Reports, 2007, 1: 16-23.
- [3] MICHA R, MOZAFFARIAN D. Trans fatty acids: effects on cardiometabolic health and implications for policy[J]. PLEFA, 2008, 79: 147-152.
- [4] 杨学礼,冯娟.一氧化氮的生物效应及其作用机制的研究[J].生理科学进展,2008,39(1):91-93.
- [5] 于化泓,李湘梅,刘蓉.蛋白质组学在反式脂肪酸和心血管疾病关系研究中的进展[J].食品科学,2011,32(1):256-259.
- [6] MOZAFFARIAN D. Trans fatty acids: effects on systemic inflammation and endothelial function[J]. Atheroscler Suppl, 2006, 7: 29-32.
- [7] 陈瑞娟,汪道文.内皮源性一氧化氮合酶的活性调节[J].中国分子心脏病学杂志,2005,5(3):549-551.
- [8] HOSSAIN G S, van THIENEN J V, WERSUCK G H, et al. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia[J]. Biol Chem, 2003, 278(32): 30317-30327.
- [9] 李彬,王英.高脂血症与血管内皮细胞功能实验检测指标研究进展[J].包头医学院学报,2007,23(6):659-661.
- [10] NASSEM K M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases[J]. Mol Aspects Med, 2005, 26: 33-65.
- [11] CANNON III R O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium[J]. Clinical Chemistry, 1998, 44: 1809-1819.
- [12] HOLTHE MR, ANDERSSON Y, LYBERG T. Lack of pro-inflammatory effects of free fatty acids on human umbilical cord vein endothelial cells and leukocytes[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005, 84: 672-678.
- [13] IMRIE H, ABBAS A, KEARNEY M. Insulin resistance, lipotoxicity and endothelial dysfunction[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801: 320-326.
- [14] 王卫东,徐江平,程毓华,等.成年大鼠弥漫性脑损伤后海马齿状回神经前体细胞增殖的NOS-NO通路机制研究[J].中国急救医学,2004,24:25-27.
- [15] 崔玉英,唐朝枢,耿彬.束缚应激大鼠血小板及血管内膜的L-精氨酸/一氧化氮合酶/一氧化氮通路下调[J].北京大学学报:医学版,2006,38:231-235.