

Effect of homocysteine on mitochondrial membrane potential of human umbilical vein endothelial cells

SHI Yun-qi¹, WANG Hao^{1*}, LI Zhan-quan¹, ZHANG Jing-sheng², HU Wen-xu¹

¹ Liaoning Provincial People's Hospital Cardiology, Shenyang 110016, China

².Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

Received: Nov 10, 2013

Accepted: Nov 27, 2013

Published: Dec 22, 2013

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Objective: To observe the changes of endothelial mitochondrial membrane potential (MMP) by building Hcy-induced endothelial impairment model in cultured human umbilical vein endothelial cells and to analyze the mechanism of Hcy-induced apoptosis. **Methods:** (1) Cultured HUVECs of term infant in vitro provide enough experimental materials. (2) The HUVECs are randomly divided into five groups: the control group does not add Hcy, the other groups add 0.01、0.1、1.0、3.0 mmol/L HCY respectively, and put them together for 24 hours to detect the changes of MMP of the HUVECs at 3、6、12、24 hour. **Results:** There is no difference in the level of MMP in the HUVECs stimulated by HCY for 24 hours between the HCY0.01 mmol/L group and the control group. Comparing with the control group, MMP reduces at 24 hour in the HCY0.1 mmol/L group, at 6、12、24 hour in the HCY1.0 mmol/L group and at 3、6 hour ($P<0.05$) and obviously at 12、24 hour ($P<0.01$) in the HCY3.0 mmol/L group. In the same Hcy-induced group, MMP obviously reduces at 24 hour, >12h、6h、3h. At the same time, MMP obviously reduces at 3.0 mmol/L Hcy-induced group, >1.0、0.1、0.01 mmol/L group and the control group. **Conclusion:** (1) HCY can injury endothelial function and induce apoptosis and it relates with concentration and time of HCY. (2) Mechanism of Hcy-induced endothelial apoptosis may relates the reduction of MMP.

Key Words

Homocysteine; Human umbilical vein endothelial cells; Apoptosis; Mitochondrial membrane potential

同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞线粒体膜电位的影响

石蕴琦¹, 王昊^{1*}, 李占全¹, 张静生², 胡文旭¹

¹ 辽宁省人民医院心内科 (*共同第一作者), 辽宁沈阳 110016

² 辽宁中医药大学, 辽宁沈阳, 110032

通讯作者: 石蕴琦 Email: syq5880@126.com

【摘要】目的 探讨同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞线粒体膜电位(MMP)的变化, 了解血管内皮细胞发生细胞凋亡的机制。方法 无菌采集正常足月剖腹产胎儿脐带进行人脐静脉内皮细胞培养, 取对数生长的人脐静脉内皮细胞制成细胞悬液, 加含1%胎牛血清(FCS)的培养基(DMEM)处理细胞24h, 使细胞稳定、同步化。随机分成五组: (1)空白组: 仅加含1% FCS的DMEM 5ml。(2) HCY0.01 mmol/L组: 1% FCS的DMEM+HCY终浓度为0.01 mmol/L 5ml。(3) HCY0.1 mmol/L组: 1% FCS的DMEM+HCY终浓度为0.1 mmol/L 5ml。(4) HCY1.0 mmol/L组: 1% FCS的DMEM+HCY终浓度为1.0 mmol/L 5ml。(5) HCY3.0 mmol/L组: 1% FCS的DMEM+HCY终浓度为3.0 mmol/L 5ml。继续培养24h, 每组3个样本。结果 不9同浓度及时间 HCY 对 HUVECs 线粒体膜电位的影响: MMP 在 HCY0.01 mmol/L 组和空白对照组间无差异性变化; 在 HCY0.1

mmol/L 组于 24h 时出现下降 ($P<0.05$)；在 HCY1.0mmol/L 组于 6h、12h、24h 出现下降 ($P<0.05$)；在 HCY3.0mmol/L 组于 3h、6h 有下降 ($P<0.05$)，12h、24h 明显降低 ($P<0.01$)。同一浓度 HCY 作用 24h 时 MMP 最低，依次 $>12h$ 、 $6h$ 、 $3h$ 。相同时间内，可以看到 HCY 浓度越高 MMP 降低越多，MMP 在 HCY3.0mmol/L 组最低，依次 >1.0 、 0.1 及 0.01 和空白组，结论 HCY 可导致 MMP 发生改变，其浓度及作用时间是影响因素。(1) 相同时间内，HCY 浓度越高 MMP 降低越多。(2) 同一浓度 HCY 作用时间越长 MMP 越低。

【关键词】同型半胱氨酸；人脐静脉内皮细胞；细胞凋亡；线粒体膜电位

同型半胱氨酸 (HCY) 可诱导内皮细胞发生凋亡，且在动脉粥样硬化的机制中起重要作用^[1,2]。但其确切的发病机制不清，现在普遍认为线粒体是控制细胞凋亡的重要因素，其功能受损可导致 ATP 生成障碍，细胞能量耗竭和死亡^[3]。

本研究通过观察 HCY 诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 线粒体膜电位 (MMP) 的变化，了解血管内皮细胞发生细胞凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 标本采集 无菌随机采集 20 名正常足月剖腹产胎儿脐带 20~35cm，去除脐带血管中的残余血液，立即放入 4℃ 无菌含双抗磷酸盐缓冲液 (PBS) 中，6h 内进行脐静脉内皮细胞分离、培养。

1.2 实验主要试剂 培养基 (DMEM)、优级胎牛血清 (FCS)、胰蛋白酶，美国 GIBCO 公司。磷酸盐缓冲液 (PBS)，欧蒙公司。内皮细胞鉴定试剂，北京中杉金桥生物技术有限公司。线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) C2006 购自碧云天生物技术研究所。

1.3 实验主要仪器 SW-CJ-2D 型 双人单面超净工作台 (苏净集团安泰公司)，Thermo HERAcell50 型 5% CO₂ 恒温培养箱 (HERM 公司)，IX71 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS 公司)，DH2500A 型电热恒温箱 (天津市泰斯特仪器有限公司)，KDC-40 低速离心机 (SIGMA 公司)，MDF-u32v 超低温冰箱 (SANYO 公司)。KDC-40 低速离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司)，FACS Calibur TM 双激光全自动流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐静脉内皮细胞原代及传代培养主要操作方法 原代培养：无菌取出脐带，挤出其内残余血液，剪去损伤及血肿处。用两把止血钳分别夹住脐带两端。放入装有 75% 酒精的弯盘中，2~3min 内用酒精棉球快速消毒脐带。PBS 液 50ml，冲洗脐带。抽取消化液 20ml，适量注入脐带内，见其末端滴出胰酶，夹住尾端。37℃ 水浴 5~10min，取出脐带放入干燥弯盘中，轻揉脐带后，松开尾端止血钳使脐带内液流入离心管中。300g 离心 10min，弃去上清液。倒 5ml DMEM 全培养液，吸管轻柔吹打，制成细胞悬液后，放入 25cm² 一次性培养瓶，盖好其盖。放入 5% CO₂ 恒温培养箱，24h 换液，以后 2~3 天换液。VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定 HUVECs。荧光显微镜下见细胞胞浆中存在较强的黄绿色荧光颗粒，核周尤为明显，证明培养细胞为 HUVECs。人脐静脉内皮细胞传代：原代培养内皮细胞融合成单层 60%~80% 时，倒去其内培养液，PBS 清洗 2 次，翻转培养瓶，加入 0.25% 胰酶细胞消化液少许，待细胞与细胞分开，胞体变圆，细胞皱缩或出现大片分离时，加入含 10% 胎牛血清培养液终止消化，用吸管小心吹散细胞，取 10 μl 细胞悬液滴在血细胞计数板上，显微镜下计数内皮细胞，根据收集细胞的数量，接种到新的培养瓶 (一般采用 1 传 2)，置 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养，反复循环上述操作，取 3~4 代细胞用于实验。

1.4.2 实验分组和处理 取对数生长的 HUVECs 制成细胞悬液,以 3×10^5 传代,待细胞生长到 70%~80%时,加含 1%FCS 的 DMEM 处理细胞 24h,使细胞稳定、同步化。随机分成五组:(1)空白组:仅加含 1%FCS 的 DMEM 5ml。(2)HCY0.01mmol/L 组:1%FCS 的 DMEM+HCY 终浓度为 0.01 mmol/L 5ml。(3)HCY0.1 mmol/L 组:1%FCS 的 DMEM+HCY 终浓度为 0.1mmol/L 5ml。(4)HCY1.0 mmol/L 组:1%FCS 的 DMEM+HCY 终浓度为 1.0 mmol/L 5ml。(5)HCY3.0mmol/L 组:1%FCS 的 DMEM+HCY 终浓度为 3.0 mmol/L 5ml。继续培养 24h,每组 3 个样本。

1.4.3 线粒体膜电位的检测 所有细胞用 0.25%胰酶消化,用全培养液中和,并收集细胞,300g 5min 离心后,弃掉上清液,加无血清 DMEM 调整细胞数为 5×10^5 悬液,取其 0.5ml。选取空白组中 1 管加入试剂盒阳性刺激剂 CCCP $0.5 \mu\text{l}$ 作用 20min。所有样本中加入 0.5ml JC-1 染色工作液,颠倒数次混匀。避光 37°C 水浴 20min。600g 4°C 离心 4min,弃上清。JC-1 染色缓冲液 (1×) 冲洗 2 次。加入 1ml 染色工作液 (1×),选用流式细胞仪检测。激发波长为 488 nm,每个样本检测 10000 个细胞,测定门控内相对荧光强度,平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI) 代表 MMP 的状态。JC-1 的单体(绿光)和聚合物(红光)荧光信号分别在 FL1 和 FL2 探测器上获得。由于 JC-1 发射双波长,使用电子补偿以纠正绿色荧光和红色荧光的重叠部分。FL1-H、FL2-H 分别代表绿色荧光强度、红色荧光强度,采用 CellQuest 功能软件进行分析。本实验考虑到绿色荧光影响因素较多,以红色荧光强度下降(FL2-H)为观察指标。

1.5 统计学处理 每次实验至少有 3 个重复值,所得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。实验结果采用 SPSS15.0 软件分析,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

由表 1、图 1、图 2 不难看出 MMP 在 HCY0.01mmol/L 组和空白对照组间无差异性变化;在 HCY0.1mmol/L 组于 24h 时出现下降($P < 0.05$);在 HCY1.0mmol/L 组于 6h、12h、24h 出现下降($P < 0.05$);在 HCY3.0mmol/L 组于 3h、6h 有下降($P < 0.05$),12h、24h 明显降低($P < 0.01$)。不同浓度及时间 HCY 对 HUVECs 对于 MMP 的影响:(1)相同时间内,HCY 浓度越高 MMP 降低越多,MMP 在 HCY3.0mmol/L 组最低,依次 > 1.0、0.1 及 0.01 和空白组。(2)同一浓度 HCY 作用 24h 时 MMP 最低,依次 > 12h、6h、3h。

表 1 JC-1 检测不同浓度和时间 HCY 作用 HUVECs 线粒体膜电位的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	JC-1 (FL2 荧光强度)			
	3h	6h	12h	24h
control	1142.56±23.21	1053.21±13.13	987.67±12.13	952.33±16.13
0.01mmol/L	1081.46±15.18	1081.46±15.18	941.28±19.18	879.21±17.18
0.1mmol/L	1026.57±21.25	934.72±24.25	825.71±16.25	719.68±18.25*
1.0mmol/L	927.32±18.14	679.23±21.14*	612.95±19.21*	51.39±21.14*
3.0mmol/L	845.82±0.21*	632.46±20.21*	526.10±20.21**	434.31±11.13**

注: compare with control group, * $P < 0.05$, compare with control group, ** $P < 0.01$

3 讨论

HCY 已成为心血管疾病死亡的独立危险因子^[4]，细胞凋亡同样在心血管疾病的发生、发展中起着重要作用。现代的实验结果表明线粒体参与细胞凋亡，在细胞凋亡过程中起着枢纽作用。细胞凋亡时，线粒体膜通透性转化孔（MPTP）开放，进而引起 MMP 下降，其氧化磷酸化功能障碍，导致细胞凋亡^[5]。Zamzami 等证

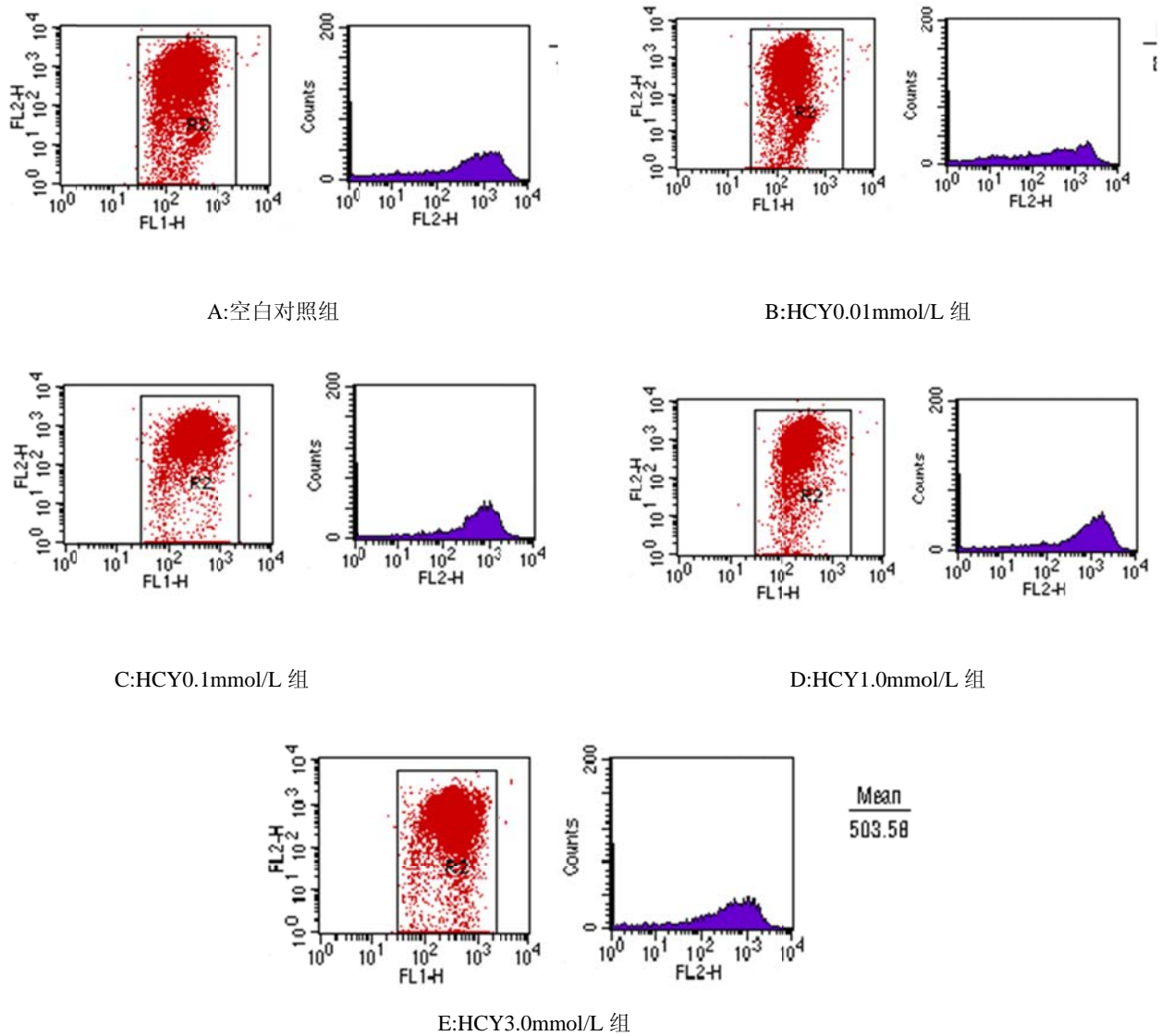


图 1 HCY 刺激 HUVECs JC-1 流式细胞仪检测图

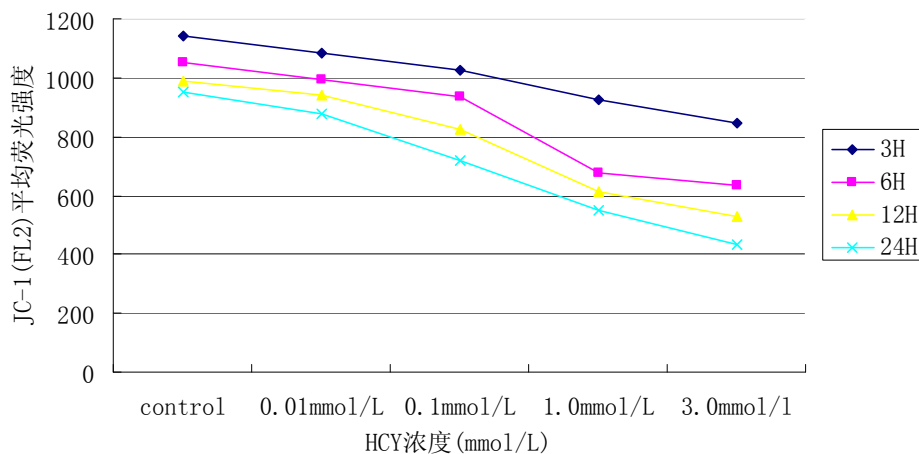


图2 HCY 致 HUVECs 线粒体膜电位 JC-1(FL2)荧光强度的变化

实细胞发生凋亡的早期即可出现 MMP 的降低,说明 MMP 下降为凋亡早期阶段,为细胞凋亡的特异性改变^[6]。因此,可以认定 MMP 的消失较早地并且是不可逆转的决定了细胞凋亡的命运。

本实验通过对 HCY 对于 MMP 作用的研究,发现随着 HCY 浓度的增加、作用时间的延长, HUVECs 培养液中 MMP 下降显示细胞凋亡增加。HCY 与 MMP 时间、浓度相关性也反应了 HCY 与细胞凋亡联系。HCY 是诱发线粒体参与的细胞凋亡的因素之一, HCY 与细胞凋亡以及心血管疾病存在密切相关性,这种相关性体现在时间、浓度方面。

目前最新线粒体膜电位的检测手段是应用流式细胞术检测线粒体膜电位的变化,可多指标、多参数同时检测^[7],并能同时反映大量细胞的改变,当细胞发生凋亡这样缓慢和不一致的过程时,流式细胞仪的检测更准确。因此检测结果可靠,敏感性更高^[8],本实验采用此方法检测 MMP,建立了 HCY 与 MMP 之间的关系,在相同浓度的 HCY 组中, JC-1 检测 MMP 方法可用于早期发现细胞凋亡, HCY 可导致 MMP 发生改变,其作用时间是影响因素。提示 HCY 的作用时间可影响凋亡的发生、发展,为今后细胞凋亡的研究提供了新的方法。

综上所述, HCY 可诱发细胞发生凋亡,其浓度及作用时间是影响因素。其凋亡机制可能是通过早期降低了血管内皮线粒体的膜电位,而诱发了细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] Ma K, Lv S, Liu B, et al. CTLA4-IgG ameliorates homocysteine-accelerated atherosclerosis by inhibiting T-cell overactivation in apoE(-/-) mice[J]. Cardiovasc Res, 2013,97(2):349-359.
<http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvs330>
- [2] Wang X, Cui L, Joseph J, et al. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012,52(3):753-760.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.12.009>
- [3] Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation[J]. Adv Exp Med Biol, 2012,942:287-308.

http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_13

- [4] Tehlivets Oksana. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: is its conversion to s-adenosyl-L-homocysteine the key to deregulated lipid metabolism? [J]. *J Lipids* 2011,2011:702853-702853
- [5] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo [J]. *J Exp Med*, 1995, 181: 1661-1672.
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.181.5.1661>
- [6] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death [J]. *J Exp Med*, 1995, 182 (20) : 367—337.
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.182.2.367>
- [7] 周春喜, 牛蕴蕴, 梁学颖, 等. 早期细胞调亡的流式细胞术分析 [J]. *军医进修学院学报*, 2004, 25(1): 10-11.
- [8] Perelman A, Wachtel C, Cohen M, et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 22;3:e430.