3 讨　论

本文结果显示, 1 416 名高校教职工检出高尿酸血症 212 例, 患病率为 15. 0%, 其中男性患病率 19. 4%, 女性患病率 6. 8%, 与文献报道相近[6,7]。男性患病率明显高于女性, 可能与男性参与社交活动较多、生活方式不合理程度较重有关。不同年龄段高尿酸血症患病率不同, 并随年龄增长而增高, 与文献报道一致[7]。这可能与伴随年龄增长, 人体各项生理机能减退、肾小球滤过率下降及高血压等周围血管疾病患病率增高而导致尿酸排泄障碍有关。但男性中 40~ 49 岁高尿酸血症发病率反而高于 50~ 59 岁和 60~ 69 岁组, 分析原因可能与该年龄段中行政管理人员比重大, 社会交往活动相对较多, 经常饮酒及进食高嘌呤高蛋白饮食, 加之运动较少等因素有关, 有待进一步探讨。同时, 50 岁~ 女性高尿酸血症患病率明显增高, 可能与女性更年期后雌激素分泌减少、促尿酸排泄作用减弱[2]有关。< 39 岁患病率为 5. 1%, 提示高尿酸血症呈现出明显年轻化趋势, 可能与部分年轻人酗酒有关。

本文结果显示, 高尿酸血症组伴发高 TG 血症、高 TC 血症、脂肪肝、糖尿病、冠心病、高血压病、肥胖症及肾损害等的发生率均明显高于尿酸正常组人群($P < 0.01$), 提示高尿酸血症在代谢性疾病的发展过程中起着重要作用。

高尿酸血症是心血管病死亡的一个预测因子, 因此, 应注意早期发现、早期防治。加强对社区人群的卫生宣教并开展危险因素的干预工作、调整生活方式(控制摄入核蛋白多的食物、增加体力劳动以降低体重、戒烟限酒等), 定期检查血尿酸浓度, 是控制心血管病、减少高尿酸血症发病率的有效手段。

参考文献

〔1〕 邱朝晖, 曹奕, 郑安琳, 等. 高尿酸血症与高血压的关系[J]. 国外医学心血管分册, 2001, 28(1): 9- 11.
〔2〕 朱文华, 方力争, 李楠, 等. 代谢综合征各组分对高尿酸血症的影响[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(3): 228- 229.
〔3〕 中国高血压防治指南修订委员会. 2004 年中国高血压防治指南(试用本)[J]. 中华心血管病杂志, 2004(32): 1060- 1064.
〔4〕 蒋明, 林孝义, 林宽佳. 痛风及高尿酸血症[M]//中华风湿病学. 北京: 华厦出版社, 2004: 1215- 1216.
〔5〕 血脂异常防治对策专题组. 血脂异常防治建议[J]. 中华心血管杂志, 1997, 25(3): 169- 172.
〔6〕 邵继红, 莫宝庆, 喻荣彬, 等. 南京市社区人群高尿酸血症与痛风的流行病学调查[J]. 疾病控制杂志, 2003, 7(4): 305- 308.
〔7〕 李红. 河南省中老年干部高尿酸血症患病情况调查[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2002, 37(1): 88.

收稿日期: 2007-05-15　　(孔繁学编辑　郑新校对)

文章编号: 1001-0580(2008)01-0119-03　中图分类号: R 151.4+1　文献标志码: A　【论　著】

SAH 抑制内皮细胞增殖和 ER-α 表达作用*

余小平[1,2], 刘驰[1], 夏敏[1], 王庆[1], 迟东升[1], 凌文华[1]

摘　要: 目的　探讨胞内 S- 腺苷同型半胱氨酸(SAH)升高抑制血管内皮细胞增殖和雌激素受体-α(ER-α)表达变化的关系。方法　以永生化的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为研究对象, 经不同浓度的 S- 腺苷同型半胱氨酸水解酶(SAHH)强效抑制剂 3- deazaadenosine(DZA)处理 24, 48, 72 h。利用细胞计数法、流式细胞仪和脱氧核糖核酸转移酶缺口末端标记法(TUNEL)检测细胞的增殖凋亡能力, 蛋白印迹法检测 ER-α 蛋白的表达, 荧光定量- PCR(qRT-PCR)检测其 mRNA 表达, 甲基化特异 PCR 法(MSP)检测 ER-α 基因启动子甲基化状态。结果　经 DZA 处理后, HUVEC 增殖能力降低(主要受阻于 G1/G0 期), 细胞凋亡率增加($P < 0.05$), ER-α mRNA 和蛋白的相对表达量降低($P < 0.05$), 但其启动子甲基化不发生改变。结论　胞内 SAH 升高抑制 HUVEC 的增殖能力与 ER-α 的表达变化有关, 但这种作用不是通过改变 ER-α 基因启动子的甲基化而实现。

关键词: S- 腺苷同型半胱氨酸; 雌激素受体-α; 人脐静脉内皮细胞; 甲基化

Effect of S- adenosylhomocysteine on inhibitory proliferation induced by ER-α expression in endothelial cells

YU Xiaoping, LIU Chi, XIA Min, et al. Department of Nutrition, Public Health School, Sun Yet- sen Unirersity (Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective　To explore the relationship of inhibitory proliferative ability induced by intracellular S- adenosylhomocysteine (SAH) accumulation and the expression of estrogen receptor-α (ER-α) in human umbilical vein endothelial cells. **Methods**　Immortalized HUVEC were treated without (normal) or with different concentration 3- deazaadenosine (DZA), a potent S- adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) inhibitor, for 24, 48 and 72h. The proliferative ability of HUVEC was measured with flow cytometry and TdT mediated dUTP nick ending labelling (TUNEL) methods. The ER-α protein and mRNA expression was analyzed with western blot and quantitative reverse transcription- polymerase chain raction (qRT- PCR) respectively. The promoter methylation of ER-α gene was detected with methylation special PCR (MSP). **Results**　The proliferative ability was decreased (mainly arrested at G_1/G_0 phase), and the apoptotic rate was increased after HUVEC treatment with DZA ($P < 0.05$). The relative expression of ER-α mRNA and protein in HUVEC treated with DZA was lower than that of normal ($P < 0.05$), but there was no changes of ER-α gene promoter methylation. **Conclusion**　The inhibitory proliferative ability induced by intracellular SAH accumulation is correlative with ER-α expression, which not

* 基金项目: 国家自然科学基金(30571568); 中国博士后科学基金(2005037174)
作者单位: 1. 中山大学公共卫生学院营养系, 广州 510080; 2. 成都医学院公共卫生学教研室
作者简介: 余小平(1970-), 男, 重庆人, 讲师, 博士后, 研究方向: 营养与疾病。
作者简介: 凌文华

through altering promoter methylation in HUVEC.

Key words: s- adenosylhomocysteine (SAH); human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); estrogen receptor-α (ER-α); methylation

随着研究的深入,人们逐渐发现同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)与血管疾病间并不一定存在着必然的因果关系,蛋氨酸的另一中间代谢产物 S- 腺苷同型半胱氨酸(S- adenosylhomocysteine, SAH)可能是血管疾病的真正致病因素,而 Hcy 可能只是其中的一个伴随现象[1]。研究发现,动脉粥样硬化(artherosclerosis, As)相关基因启动子甲基化改变导致其转录失调,在 As 形成过程中发挥着重要作用[2]。本实验室先前研究发现 3- deazaadenosine(DZA)是 S- 腺苷同型半胱氨酸水解酶 S- adenosylhomocysteine hydrolase(SAHH)的一种强效抑制剂,能提高人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)内 SAH 含量,导致整体基因组低甲基化[3]。为阐明 SAH 升高促进 As 形成的机制,本文研究了 DZA 对 HUVEC 增殖的影响与 ER-α 基因表达变化及其启动子甲基化的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂 过氧化物酶(peroxidase, POD)原位细胞凋亡检测试剂盒(医学科学研究院生物工程研究所);DZA(美国 Sigma 公司);Hcy 检测试剂盒(美国雅培公司);Cycle TEST™ PLUS DNA 试剂盒(美国 BD Biosciences Pharmingen 公司);Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0[宝生物工程(大连)有限公司];蛋白质西方杂交印迹试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司);EZ DNA Methylation- Gold Kit™ 试剂盒(美国 ZYMO RESEARCH CORP 公司)。

1.2 细胞来源及分组 永生化的 HUVEC 由浙江大学医学院附属第二医院心内科陈鹏教授惠赠,常规培养[4]。考虑 SAH 不能直接通过哺乳动物的细胞膜,应用 SAHH 抑制剂 DZA 阻断 SAH 向 Hcy 的转化,从而升高胞内 SAH 的浓度。DZA 的处理浓度为 50, 100, 200 μmol/L,处理时间为 24, 48, 72 h,对照组用灭菌双蒸水代替 DZA。

1.3 细胞生长曲线绘制 参照文献[5]。按公式计算细胞生长抑制率= (Nc- Nt)/Nc× 100%,其中 Nc 和 Nt 分别为某一时相点对照组和处理组细胞数。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期相分布 按照 BD Biosciences Pharmingen 公司提供的 CycleTESTTM PLUS DNA 试剂盒说明书进行。细胞经处理后送至中山大学免疫教研室用 BD FACScan 流式仪(Macintosh 操作平台, BD CellQuest 1.0 分析软件)分析细胞周期相分布。

1.5 TUNEL 检测细胞凋亡 按照 POD 原位细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。主要步骤:4% 多聚甲醛溶液室温固定 HUVEC 30 min, PBS 洗片, 0.3% H_2O_2 甲醇室温孵育 30 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗片,加通透液(0.1% Triton™ X- 100 溶于 0.1% 枸橼酸钠溶液)在冰浴中孵育 2 min, PBS 冲洗 2 次,滴加 50 μl 的 TUNEL 反应混合液,在湿盒中 37℃孵育 60 min, PBS 冲洗 3 次,在荧光显微镜下观察结果。

1.6 Western blot 法检测 ER-α 蛋白的表达 按照蛋白质西方杂交印迹试剂盒说明书进行。取 40 μg 总蛋白进行凝胶电泳并转移至聚偏(二)氟乙烯膜上, 1% 牛血清白蛋白封闭, 1∶400 ER-α 单抗 4℃过夜, 1∶40 生物素化二抗工作液室温振摇 1 h, 1∶40 稀释辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素三抗工作液室温振摇 1 h, 3, 3′- 二氨基联苯胺显色。

1.7 qRT- PCR 法检测 ER-α mRNA 的表达 参照文献[6]。HUVEC 细胞经处理后送至中山大学达安基因有限公司检测 ER-α mRNA 的表达量。用 TRIZol 提取总 RNA,取 4 μl RNA 模板做逆转录成 cDNA。β- actin 引物:正义链 5′-GCG CGG CTA CAG CTT CA-3′,反义链 5′-TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA T-3′,探针序列 5′-FAM- CAC CAC GGC CGA GCG GGA- TAMRA-3′;ER-α 外引物正义链 5′-TGC CAG GCT TTG TGG ATT TG-3′,反义链 5′-GCC GCT GCA TGA CCT CCT-3′,内引物正义链 5′-TCT CGT CTG GCG CTC CAT-3′,反义链 5′-CTG GTT CCT GTC CAA GAG CAA-3′,探针序列 5′-FAM- CAC CCA GGG AAG CTA CTG TTT GCT CCT AA- TAMRA-3′。引物由上海生工公司合成。ER-α mRNA 的相对表达量为 ER-α 拷贝数与 β- actin 的拷贝数之比。

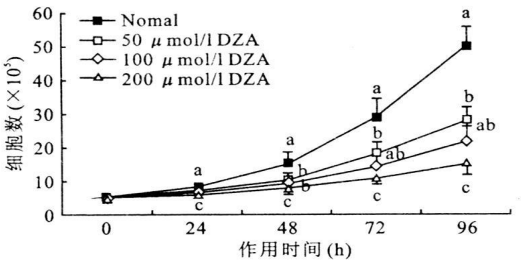
1.8 MSP 法检测 ER-α 基因启动子甲基化 按照 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0(Cat. DV811A)说明书提取 DNA,按照 EZ DNA Methylation- Gold Kit™ 试剂盒(Catalog Nos. D5005)说明书步骤对 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰。通过 Internet 网设计 ER-α 基因启动子富含磷酸胞苷酰(cytidylyl phosphate guanosine, CpG)区域(称为 CpG 岛)甲基化(M)和非甲基化(U)引物,由上海生工公司合成,其中 M 正义链:5′-GAA CGA GTT GGA GTT TTT GAA TG-3′,反义链:5′-CCG ATC TAA CCG TAA ACC TAC G-3′,扩增片段 171bp; U 正义链:5′-GAA TGA GTT GGA GTT TTT GAA TTG T-3′,反义链:5′-AAA AAC CAA TCT AAC CAT AAA CCT ACA-3′,扩增片段 176bp。反应条件:94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 59.5℃30s, 70℃ 30 s, 40 循环,最后 70℃延伸 10min, 2% 凝胶电泳 30min 观察结果。

1.9 统计分析 采用 SPSS 10.0 软件进行分析,各组间的差异性比较用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 HUVEC 细胞生长增殖能力(图 1) 从 HUVEC 细胞的生长曲线反应 DZA 对血管内皮细胞生长增殖能力的影响。按公式计算显示, DZA 处理 24~ 96h 对 HUVEC 细胞的生长抑制率为 24.1% ~ 69.6%,提示胞内 SAH 升高能抑制 HUVEC 细胞生长增殖($P < 0.05$),这种抑制效应具有时间和浓度依赖性。

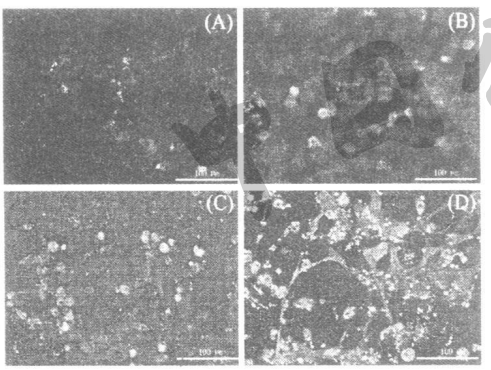
2.2 细胞周期相分布 经 3 种不同浓度的 DZA 分别处理 24, 48, 72 h 后,细胞周期相的百分比分布发生不同的变化,其中 G_1/G_0 期随着 DZA 浓度的增加和作用时间的延长,由正常对照的(53.46 ± 12.35)% 上升至(58.21 ± 13.24)% ~ (86.20 ± 13.57)%;S 期由正常对照的(35.19 ± 8.96)% 下降至(33.18 ± 8.55)% ~ (8.10 ± 2.46)%,而 G_2/M 期的变化无规律,提示胞内 SAH 升高主要使 HUVEC 细胞周期受阻于 G_1/G_0 期($P < 0.05$),而 S 期减少($P < 0.05$)。



注: 同一时相点各组间差异性, a, b, c $P < 0.05$。

图 1　细胞计数法绘制 **HUVEC** 生长曲线

2.3　HUVEC 细胞凋亡结果(图 2)　利用 TUNEL 法检测细胞凋亡时, 在荧光显微镜下观察到凋亡的细胞呈阳性。本实验中对照组可见少量荧光染色呈阳性的凋亡细胞, 200 μM DZA 处理 24, 48, 72 h 后, 荧光染色的强度逐渐增加, 特别是作用 72 h 后荧光强度最强, 提示胞内 SAH 升高能使 HUVEC 血管内皮细胞产生凋亡。



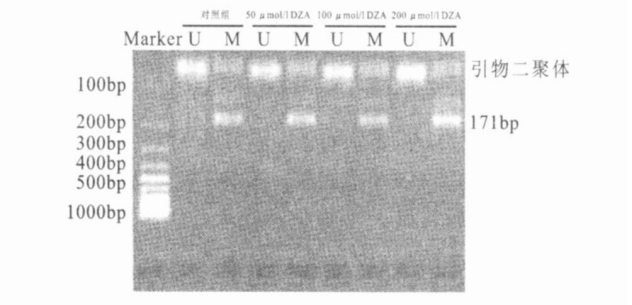
注: A: 对照组; B, C, D: 50, 100 和 200 μmol/l DZA 处理组。

图 2　**TUNEL** 法检测 **HUVEC** 凋亡

2.4　ER-α 蛋白表达　Western Blot 法检测 ER-α 蛋白的表达结果以 PVFD 膜上染色条带的深浅来判断蛋白表达的高低。实验结果显示, 对照组染色条带最深, 50, 100, 200 μmol/L DZA 处理 24 h 后, 染色条带强度逐渐减弱, 利用图片扫描仪分析结果显示, ER-α 蛋白的相对表达量随着 DZA 浓度的增加而降低($P < 0.01$), 提示胞内 SAH 升高能抑制促增殖基因 ER-α 蛋白的表达。

2.5　ER-α mRNA 表达　不同浓度的 DZA 处理 72 h 后, 与对照组相比, HUVEC 细胞 ER-α mRNA 的相对表达量(与 β-actin 拷贝数的比值) 显著降低, 随着 DZA 浓度的增加, 其表达量下降越明显($P < 0.05$), 提示胞内 SAH 的升高能抑制促增殖基因 ER-α mRNA 的表达。

2.6　ER-α 基因启动子甲基化(图 3)　对照组 HUVEC 细胞



注: U: 未甲基化引物; M: 甲基化引物。

图 3　**MSP** 法检测 **ER-α** 基因启动子甲基化

ER-α 基因启动子 U 引物未见扩增产物(176bp), 而 M 引物的扩增产物在 171bp 处有一亮带, 表明 ER-α 基因启动子处于甲基化状态, 经 50, 100, 200 μmol/L DZA 处理 72 h 后, 其甲基化状态仍未发生改变, 提示 DZA 并不能改变 ER-α 基因启动子甲基化状态。

3　讨　论

研究表明, 血管内皮细胞功能的损伤并不总是随着循环系统中总同型半胱氨酸浓度的增加而增加[2,5]。本研究发现, 应用 DZA 在降低 HUVEC 细胞内 Hcy 含量的同时升高 SAH 含量条件下, 细胞的生长增殖能力下降, 主要受阻于 G_1/G_0 期, 凋亡率增加, 提示 SAH 升高能抑制血管内皮细胞的生长。

目前, 有关特异基因启动子甲基化导致其表达变化在 As 中只有对 ER-α、ec-sod 及 p53 等少数几个基因的报道[7]。ER-α 属于核受体家族[8]。Post WS 等[9]采用 Southern blot 方法研究表明, 在右心房和 As 斑块中 ER-α 基因甲基化增加, 而在体外培养人动脉内皮细胞 ER-α 基因甲基化却保持较低。此外, 在培养动脉平滑肌细胞中 ER-α 基因甲基化水平较高。另有研究也发现, ER-α 基因甲基化与老龄化 As 呈明显相关性[10]。提示血管组织中 ER-α 基因甲基化致其表达失活在 As 形成中发挥重要作用[10]。然而, 本实验结果显示, 对照组 HUVEC 细胞 ER-α 基因处于甲基化状态, 胞内 SAH 升高对 ER-α 基因的甲基化状态没有明显的改变, 但进一步降低了 ER-α 蛋白和 mRNA 的表达, 提示 SAH 升高对 ER-α 的调节作用不是通过改变启动子甲基化实现的, 是通过何种途径还有待进一步探讨。总之, 本研究结果提示, SAH 可能是动脉粥样硬化形成过程中的标志物。

参考文献

〔1〕 Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, et al. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment[J]. Circulation, 2004, 109(23 Suppl 1): 15-19.

〔2〕 Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? [J]. Am J Clin Nutr, 2000; 72: 315-323.

〔3〕 余小平, 凌文华. 胞内 SAH 升高对人脐静脉内皮细胞的损伤效应与 DNA 甲基化的关系[D/R]. 中国博士后出站报告, 2006, 45-59.

〔4〕 边昶, 赵葵, 童国新. 端粒酶催化亚单位和猿猴病毒 40 大 T 抗原致人脐静脉内皮细胞永生化[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(2): 166-169.

〔5〕 杜海英, 刘晓梅, 刘颖, 等. 氯化镉对人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(2): 194-195.

〔6〕 汤立旦, 黄河, 孙洁, 等. 端粒调控因子及端粒酶逆转录酶相关分析[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(2): 149-150.

〔7〕 余小平, 张媛, 凌文华. 动脉粥样硬化 DNA 异常甲基化研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(1): 70-72.

〔8〕 Kortelainen ML, Huttunen P. Expression of estrogen receptors in the coronary arteries of young and premenopausal women in relation to central obesity[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004, 28(4): 623-627.

〔9〕 Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(4): 985-991.

〔10〕 Hiltunen MO, Yla-Herttuala S. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(10): 1750-1753.

收稿日期: 2007-05-24　(文涛编辑　郑新校对)