

[文章编号] 1000- 4718(2005)02- 0339- 03

# 兔饮食所致高同型半胱氨酸血症血管内皮功能的实验研究\*

边云飞<sup>1</sup>, 高吊清<sup>2</sup>, 高 奋<sup>1</sup>, 肖传实<sup>1</sup><sup>1</sup>山西医科大学第二医院心内科, 山西 太原 030001, <sup>2</sup>山西省儿童医院心内科, 山西 太原 030013)

**[摘要]** 目的: 观察高同型半胱氨酸血症对血管内皮功能的影响。方法: 建立兔高同型半胱氨酸血症模型。将 18 只新西兰兔随机分为: 正常对照组(control 组) 6 只、高蛋白饮食组(M 组) 12 只; 于实验第 4 周始, 将 M 组再随机分为两组, M+ 0 组 6 只, 继续饲高蛋白饮食; M+ F 组 6 只, 在高蛋白饮食基础上, 再加以叶酸、VitB<sub>12</sub>, 继续观察 3 周; 6 周时统一处死动物, 取腹主动脉, 制备主动脉血管环, 比较 M+ 0 组与 M+ F 组及 C 组主动脉血管对 Ach 的最大舒张反应。同时, 对 3 组高同型半胱氨酸血症形成过程中 0 周、3 周、6 周时血清中 Hcy、ET- 1、Ang- II、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 各指标及处死动物时局部血管组织中 ET- 1、Ang- II、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 指标进行检测并比较。结果: (1) M+ 0 组主动脉血管对 Ach 的最大舒张反应性(E<sub>max</sub> = 26.73 ± 4.51) 低于 M+ F 组(E<sub>max</sub> = 47.84 ± 5.62, P < 0.05) 及 control 组(E<sub>max</sub> = 56.42 ± 7.82, P < 0.05); (2) 3 周时, M+ 0 组及 M+ F 组血清中 Hcy、ET- 1、Ang- II 各指标均明显高于对照组及 0 周时(P < 0.05); NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 明显低于对照组及 0 周时(P < 0.05); (3) 6 周时, M+ 0 组上述指标继续升高; M+ F 组血清中 Hcy 低于 M+ 0 组(P < 0.05); NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 高于 M+ 0 组(P < 0.05); ET- 1、Ang- II 各指标与 M+ F 组无明显差异(P > 0.05)。结论: 高同型半胱氨酸血症对血管内皮最大舒张功能具有明显的抑制作用; 其机制可能是通过影响局部血管组织内皮细胞 ET- 1、Ang- II、NO 的分泌而发挥作用的; 早期以叶酸、VitB<sub>12</sub> 干预治疗对血管内皮功能具有一定的拮抗作用。

**[关键词]** 高同种半胱氨酸血症; 内皮, 血管; 叶酸; 维生素 B<sub>12</sub>**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

近年研究发现高同型半胱氨酸血症与动脉粥样硬化性心脑血管疾病的发生密切相关, 并认为是动脉粥样硬化性心脑血管疾病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。血管内皮在防止动脉粥样硬化性心脑血管疾病的发生中起着极为重要的作用, 血管内皮功能异常被认为是动脉粥样硬化性心脑血管疾病发生的始动因素, 并认为是动脉粥样硬化性心脑血管疾病的最早期表现<sup>[2]</sup>。本实验利用兔饮食所致高同型半胱氨酸血症模型, 研究高同型半胱氨酸血症时血管内皮功能的变化。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验动物及分组

选取雄性新西兰兔 18 只, 月龄 4- 6 月, 体重 2.0- 2.5 kg, 随机分成 2 组。正常对照(control) 组 6 只, 喂以标准兔饲料; 高蛋白饮食(M) 组 12 只, 饲料中含 1% 的蛋氨酸; 于实验第 4 周始, 将 M 组又随

机分成两组, M+ 0 组(6 只), 无特殊处理; M+ F 组(6 只), 每只动物叶酸 2.5 mg/d, 将药溶于水中灌入, 每只动物 VitB<sub>12</sub> 25 μg/d, 臀部肌肉注射, 共观察 3 周。

### 2 血浆及血管组织中指标测定

分别于 0、3、6 周心脏采空腹血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清- 20 °C 冻存, 成批检测; 第 6 周处死动物时每只取 100 mg 血管组织加 0.9 mL 生理盐水, 制成组织匀浆, 台式高速离心机 10 000 r/min 离心 5 min 取上清液, 及时测定各指标。血清总同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy) 测定采用荧光偏振免疫分析仪, 试剂由美国雅佩公司提供。ET- 1、Ang- II 含量测定采用放免法; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (代表一氧化氮水平)、一氧化氮合酶(NOS) 的测定采用酶化学比色法, 试剂购自北京邦定公司。

### 3 主动脉舒张功能测定

处死动物后, 取腹主动脉, 制备成长约 3 mm 的环形标本。将血管条悬挂于 37 °C 的 10 mL 台氏液浴槽中, 连接张力感受器, 用多道生理记录仪记录血管张力的变化。血管环基础张力为 1 g。平衡 1 h 后, 加入去甲肾上腺素(NE) 1 μmol/L 检验标本活性, 冲洗至基线, 稳定 40 min 后, 再加入去甲肾上腺素(NE) 1 μmol/L 直至血管收缩稳定, 以此张力作为 100%。

[收稿日期] 2003- 11- 05 [修回日期] 2004- 02- 04

\* [基金项目] 山西省留学归国人员基金资助项目(No. 2001029)

Tel: 0351- 4071708

给与  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  mol/L 乙酰胆碱(Ach), 制作累积浓度舒张功能曲线。

#### 4 统计学处理

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 软件, 组间比较使用方差分析。

### 结 果

#### 1 各组血清中各指标变化

表 1 各组 Hcy、ET-1、Ang- II、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 水平的变化

Tab 1 Comparison of the level of Hcy, ET-1, Ang- II, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NOS ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

Group	Control	M+ 0	M+ F	
Hcy	0 week	8.20 ± 1.33	8.13 ± 1.46	8.16 ± 2.00
	3 weeks	7.09 ± 1.09	16.26 ± 1.31*	16.19 ± 1.34*
	6 weeks	10.28 ± 1.99	17.11 ± 1.62*	13.45 ± 1.57* <sup>△</sup>
ET-1 (pg/L)	0 week	74.33 ± 10.07	75.33 ± 9.15	72.50 ± 8.65
	3 weeks	74.16 ± 6.43	132.00 ± 10.78*	133.23 ± 9.87*
	6 weeks	73.00 ± 9.14	145.50 ± 11.89*	136.83 ± 14.27*
Ang- II (pg/L)	0 week	267.83 ± 26.29	248.06 ± 44.33	259.61 ± 37.36
	3 weeks	264.52 ± 32.40	342.66 ± 75.59*	347.13 ± 76.82*
	6 weeks	261.83 ± 47.06	391.50 ± 63.59*	349.00 ± 92.75*
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μmol/L)	0 week	74.65 ± 14.91	77.26 ± 14.40	76.11 ± 11.76
	3 weeks	80.01 ± 12.93	63.49 ± 14.23*	62.87 ± 9.85*
	6 weeks	80.01 ± 7.33	47.23 ± 7.09*	57.48 ± 8.71* <sup>△</sup>
NOS (μmol/L)	0 week	2.66 ± 0.95	2.73 ± 1.01	2.56 ± 1.00
	3 weeks	2.94 ± 0.90	1.68 ± 1.04*	1.69 ± 0.84*
	6 weeks	2.74 ± 0.86	0.72 ± 0.38*	1.24 ± 0.42* <sup>△</sup>

\* P < 0.05 vs control group and 0 week; <sup>△</sup> P < 0.05 vs M+ 0 group.

表 1 显示, 第 3 周时, Hcy、ET-1、Ang- II 等指标, M+ 0 组、M+ F 组及对照组与各组 0 周时相比均有增高 (P < 0.05); NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 呈现相反变化; 第 6 周时, M+ 0 组 tHcy、ET-1、Ang- II 仍持续增高; 与 M+ 0 组相比, M+ F 组 Hcy 有所降低 (P < 0.05); M+ F 组 ET-1、Ang- II 与 M+ 0 组比无显著差异 (P > 0.05); M+ F 组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 高于 M+ 0 组 (P < 0.05)。

#### 2 6 周时各组组织中各指标变化

表 2 局部血管组织中各指标含量的比较

Tab 2 Comparison of the level of ET-1, Ang- II, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NOS in regional vascular tissue ( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

Group	Control	M+ 0	M+ F
ET-1 (pg/L)	42.21 ± 6.45	60.19 ± 6.98*	52.13 ± 7.28*
Ang- II (pg/L)	14.14 ± 3.21	23.01 ± 3.89*	19.87 ± 3.11*
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μmol/L)	30.63 ± 5.53	18.09 ± 3.11*	26.16 ± 4.18* <sup>△</sup>
NOS (μmol/L)	0.98 ± 0.11	0.46 ± 0.12*	0.76 ± 0.14* <sup>△</sup>

\* P < 0.05 vs control group; <sup>△</sup> P < 0.05 vs M+ 0 group.

表 2 结果显示, M+ 0 组及 M+ F 组局部血管组织中 ET-1、Ang- II 明显高于 control 组, 而 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 明显低于 control 组 (P < 0.05); 经叶酸、VitB<sub>12</sub> 治疗后, M+ F 组 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NOS 高于 M+ 0 组 (P < 0.05)。

#### 3 血管条对 Ach 的内皮依赖性舒张反应

M+ 0 组血管条对 Ach 的最大舒张反应 (E<sub>max</sub> = 26.73 ± 4.51) 低于 M+ F 组 (E<sub>max</sub> = 47.84 ± 5.62, P < 0.05) 及 control 组 (E<sub>max</sub> = 56.42 ± 7.82, P < 0.05), 累积浓度舒张功能曲线见图 1。

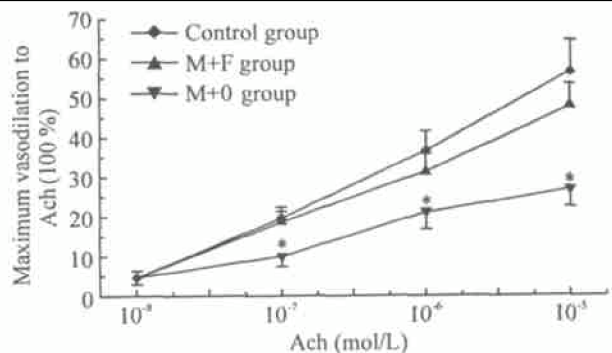


Fig 1 Maximum vasodilation to Ach ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L) in the isolated aortic rings.  $\bar{x} \pm s$ , n = 6. \* P < 0.05 vs control group and M+ F group.

图 1 主动脉血管条对 Ach ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  mol/L) 最大舒张反应的变化

### 讨 论

动脉粥样硬化是由于血管内皮细胞损伤引发脂质浸润, 平滑肌细胞大量增殖而引起的; 在动脉粥样硬化性心脑血管疾病的发生中, 血管内皮细胞的损伤至关重要。Jones 等<sup>[3]</sup>报道, Hcy 对体外培养的内皮细胞有损伤作用。本实验中也发现, 在高 Hcy 血症期, 血管内皮依赖性舒张功能即发生明显异常, 这也进一步证实增高的 Hcy 对血管内皮功能确实存在一定的损伤作用。

血管内皮细胞具有重要的内分泌功能。在体内, 血管内皮细胞通过分泌许多重要的生物活性物质, 以维持血管的正常舒缩功能。在血管内皮细胞分泌的许多生物活性物质中, 以 ET-1、Ang- II 及 NO 最为重要。在我们的研究中也发现, 在高 Hcy 血症期, 血浆及局部血管组织中缩血管物质 ET-1、Ang- II 水平明显增高, 而 NOS 活性明显下降, NO 释放减少, 我们推测这可能是 Hcy 导致血管内皮舒缩功能异常的机制。Hcy 有可能通过损伤血管内皮细胞, 直接使其合成及分泌 NO 减少。我们的研究中发现, 局部血管组织中 NOS 的活性明显下降。高 Hcy 时,

ET-1、Ang-Ⅱ增加的机制目前尚不清楚,但可能与血管内皮细胞的直接与间接损伤有关。总之,在高Hcy血症期,Hcy可能通过局部血管组织及循环血中升高的ET-1、Ang-Ⅱ和减少的NO来发挥其致动脉粥样硬化作用。有研究发现ET-1、Ang-Ⅱ能促进平滑肌细胞增殖<sup>[4,5]</sup>。而NO则可通过抑制氧化过程,维持血管内皮的完整性;此外,NO还可通过抑制血小板、中性粒细胞在血管内皮的粘附而防止血栓形成,从而防止动脉粥样硬化的发生<sup>[6]</sup>。

Hcy的增高与叶酸、VitB<sub>12</sub>的缺乏有关,及时补充叶酸、VitB<sub>12</sub>有可能降低Hcy,从而减轻Hcy对内皮细胞的损伤,防止动脉粥样硬化的发生。本研究中发现,通过补充叶酸、VitB<sub>12</sub>,Hcy的增高过程有所减慢,而且局部组织及血浆中ET-1、Ang-Ⅱ的水平有所减低,NOS的活性有所提高,这也提示补充叶酸、VitB<sub>12</sub>对Hcy介导的血管内皮损伤具有一定的拮抗作用。

#### [参 考 文 献]

[1] Giles WH, Croft JB, Greenlund KJ, et al. Association be-

tween total homocysteine and the likelihood for a history of acute myocardial infarction by race and ethnicity: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Am Heart J*, 2000, 139(3): 446-453.

[2] Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. *Am J Cardiol*, 1995, 75(6): 71B-74B.

[3] Jones BG, Rose FA, Tudball N. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity [J]. *Atherosclerosis*, 1994, 105(2): 165-170.

[4] 丁宜,张圣明,王家富,等. 胰岛素和内皮素协同促进平滑肌细胞增殖 [J]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16(10): 1008.

[5] 李秀华,徐标. S-亚硝基谷胱甘肽对血管紧张素Ⅱ诱导的大鼠血管平滑肌增生的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(10): 1027-1028.

[6] Wever RF, Thomas F, Luscher FC, et al. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 1998, 97(1): 108-112.

## Effect of hyperhomocysteine on endothelial cell function in rabbits

BIAN Yun-fei<sup>1</sup>, GAO Diao-qing<sup>2</sup>, GAO fen<sup>1</sup>, XIAO Chuan-shi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology, The Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

<sup>2</sup>Department of Cardiology, Shanxi Children's Hospital, Taiyuan 030013, China)

[**ABSTRACT**] **AIM:** To investigate the effect of hyperhomocysteine on endothelial cell function. **METHODS:** By establishing hyperhomocysteinemia model, 18 male New Zealand rabbits were divided into control group (control group) and high-methionine-diet group (M group). At the end of 3 weeks, M group was divided again into M+0 group (continuing high methionine-diet) and M+F group (high-methionine-diet plus folic acid, vitamin B<sub>12</sub>). At the end of 6 weeks, isolated aortic rings were made and the maximum vasodilation of the aortic rings to Ach was investigated. Meanwhile, the plasma concentrations of Hcy, NO, ET-1, Ang II at 0 week, 3 weeks and 6 weeks and the contents of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Ang II, ET-1, NOS in regional vascular tissue at 8 weeks were also measured. **RESULTS:** (1) In contrast to M+F group and control group, the maximum vasodilation to Ach were decreased ( $E_{max} = 26.73 \pm 4.51$  vs  $47.84 \pm 5.62$ ,  $56.42 \pm 7.82$ ,  $P < 0.05$ ) in M+0 group. (2) At the end of 3 weeks, the plasma concentration of Hcy, Ang II, ET-1 were increased in M group compared with C group and at 0 week ( $P < 0.05$ ), NO and NOS were decreased ( $P < 0.05$ ). (3) At the end of 6 weeks, the plasma concentration of Hcy, Ang II, ET-1 were continually increased in M+0 group. In M+F group, by folic acid and vitamin B<sub>12</sub> treatment, the level of Hcy was decreased compared with M+0 group ( $P < 0.05$ ). The levels of NO and NOS were increased ( $P < 0.05$ ). However, ET-1, Ang II were not obviously changed. **CONCLUSIONS:** Hyperhomocysteinemia obviously restrains the endothelial vasodilation. The effect is initiated by changing the tissue regional level of ET-1, Ang II and NO. By early folic acid and vitamin B<sub>12</sub> treatment, the endothelial cell function may be protected.

[**KEY WORDS**] Hyperhomocysteinemia; Endothelium, vascular; Folic acid; Vitamin B<sub>12</sub>