

同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 生长的抑制作用

周继红¹, 章 尧¹, 孙俊杰², 李 伟³

[摘要] 目的: 观察同型半胱氨酸(Hcy)对人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞生长的影响, 探讨高同型半胱氨酸血症(HHCY)致动脉粥样硬化(As)的机制。方法: 将不同浓度 Hcy 与 ECV-304 细胞体外共培养不同时间, 倒置显微镜下观察细胞形态, MTT 法检测细胞生长抑制率, ³H-TdR 掺入法检测细胞 DNA 合成。结果: 显微镜见对照组细胞呈单层鹅卵石样紧密排列, 而实验组随 Hcy 浓度的升高及作用时间的延长, 细胞排列杂乱, 聚集成团。低浓度 Hcy 对细胞生长的抑制作用不明显, 5.0、10.0 mmol/L Hcy 对细胞生长呈现抑制作用, 且两组浓度作用 72 h 的生长抑制率高于作用 48 h ($P < 0.01$)。5.0、10.0 mmol/L Hcy 作用 48 h、72 h, ³H-TdR 掺入抑制率高于相应对照组和低浓度组, 且作用 72 h 的掺入抑制率显著高于 48 h ($P < 0.01$)。结论: Hcy 对 VEC 具有直接损伤作用, 可以时间及剂量依赖方式抑制 ECV-304 细胞的生长及 DNA 的合成。

[关键词] 动脉粥样硬化; 同型半胱氨酸; ECV-304 细胞

[中国图书资料分类法分类号] R 543.5; Q 517 [文献标识码] A

The inhibitory effect of homocysteine on the growth of ECV-304 cells

ZHOU Ji-hong¹, ZHANG Yao¹, SUN Jun-jie², Li Wei³

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, 2. Department of Nuclear Medicine, Bengbu Medical College; 3. Department of Respiratory Disease, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of homocysteine (Hcy) on ECV-304 cells growth and to probe into a possible mechanism by which hyperhomocysteinemia (HHCY) results in atherosclerosis. **Methods:** ECV-304 cells were incubated with media containing a range of concentrations of Hcy for different time, changes in the morphology of cells were observed under microscope; thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay was performed to examine the growth inhibitory rate of cells; ³H-TdR incorporation test was used to examine DNA synthesis of ECV-304 cells. **Results:** ECV-304 cells were identified by their typical cobblestone morphology when viewed by light microscope in control group, but the arrange of cells became disorderly, congregate with the increase of concentration of Hcy and the extension of time in test groups. No difference was found among 0.1, 1.0, 2.5 mmol/L Hcy groups and control group, but incubation with 5.0, 10.0 mmol/L Hcy produced a significant inhibitory effect compared with control group ($P < 0.05$ — $P < 0.01$). Treated with 5.0 and 10.0 mmol/L Hcy for 48 hour and 72 hour, the inhibitory rate at 72 hour was significantly higher than that at 48 hour ($P < 0.01$). Incubation with 5.0, 10.0 mmol/L Hcy for 48 hour, and 72 hour, the inhibitory rate of DNA synthesis was significantly increased than that in control group and low concentration groups ($P < 0.05$ — $P < 0.01$); and the inhibitory rate of groups which were incubated with 5.0, and 10.0 mmol/L Hcy for 72 hour, was higher than that for 48 hour group ($P < 0.01$). **Conclusions:** Hcy had a direct injurious effect on ECV-304 cells, and an inhibitory effect on the growth and DNA synthesis of ECV-304 cells in time- and concentration-dependent manner.

[Key words] atherosclerosis; homocysteine; ECV-304 cells

自 1969 年 McCully^[1] 研究报道动脉粥样硬化 (As) 的形成与血浆同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 水平具有相关性以来, 高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHCY) 与 As 的关系受到广泛关注。许多流行病学资料和实验研究表明^[2-4], 血中 Hcy 升高可引起动脉粥样硬化和血栓形成。HHCY 作为 As 形成的一个独立危险因子已得到广

泛认同, 但其致病机制尚不完全清楚。本实验以人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 为实验对象, 体外观察不同浓度 Hcy 对培养的血管内皮细胞的生长及 DNA 合成的影响, 以探讨 Hcy 致血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 的损伤效应, 了解其在 As 发病过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640 (Gibco 公司), 小牛血清 (杭州四季青生物公司), Hcy (ICN Biomedicals 公司), 胰酶 (Difco 公司), Hepes (Sigma 公司), 四甲基噻唑氮蓝 (MTT, Fluka 公司), ³H-胸腺嘧啶脱氧核苷 (³H-TdR, 中国原子能研究所)。

1.2 主要仪器 二氧化碳培养箱 (SHEL LAB 公

[收稿日期] 2004-06-20

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2001kj170)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 生物化学与分子生物学教研室, 2. 核医学教研室, 安徽蚌埠 233003; 3. 蚌埠医学院附属医院呼吸病科, 安徽蚌埠 233004

[作者简介] 周继红 (1978—), 女, 安徽淮南人, 硕士, 研究方向: 动脉粥样硬化发病机制。

司), 倒置显微镜(CK40 型, Olympus 公司), 酶联免疫检测仪(DG 3022 型, 南京华东电子管厂), 液体闪烁计数器(FJ-2107P 型, 西安二六二厂), 多头细胞样品收集器(ZT-II 型, 浙江绍兴东浦医疗仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 (购自上海细胞所), 培养基为 RPMI 1640 (内含 L-谷氨酰胺 2 mmol/L、庆大霉素 5 万 u/L), 调 pH 值至 7.2, 用前加 10% 灭活小牛血清。细胞在 5% CO₂ 37 °C 培养箱中孵育培养, 0.25% 胰酶消化传代。所有操作均采用对数生长期细胞。

1.3.2 细胞形态学观察 将细胞消化计数, 接种于 24 孔培养板, 细胞浓度为 1×10^5 /ml, 每孔 1 ml, 待细胞贴壁后吸弃原培养液。实验组每孔分别加入终浓度为 1.0、5.0 和 10.0 mmol/L Hcy 的培养液 1 ml, 对照组加不含 Hcy 的培养液 1 ml, 继续培养 24 h、48 h 后取出, 倒置显微镜下观察内皮细胞形态, 用 WinFast PV R 软件记录结果并直接拍摄。

1.3.3 MTT 比色法 消化细胞调整浓度至 5×10^4 /ml, 接种 96 孔培养板, 每孔 100 μ l, 培养过夜, 细胞贴壁生长, 吸弃原培养液。实验组设置五个浓度组, 分别加入终浓度为 0.1、1.0、2.5、5.0 和 10.0 mmol/L Hcy 的 RPMI 1640 培养液 100 μ l, 对照组加不含 Hcy 的培养液 100 μ l, 每组设 4 个复孔; 同时设空白对照(只有培养液, 无细胞)。继续培养 48 h、72 h, 每孔分别加入 5 μ l MTT (5 mg/ml), 置 5% CO₂ 37 °C 孵育 4 h 后, 加溶解剂每孔 100 μ l (20%

SDS+50% DMF), 二氧化碳培养箱中继续培养 14 h, 镜下观察甲磺结晶全部溶解后, 以空白孔调零, 酶标仪检测 570 nm 处的吸光度值(A₅₇₀)。

抑制率(%)=(对照孔 A 值-实验孔 A 值)/对照孔 A 值 \times 100%
1.3.4 ³H-TdR 掺入法 消化细胞调整浓度至 5×10^4 /ml, 接种 96 孔培养板, 每孔 100 μ l。培养箱中培养, 待细胞贴壁后吸弃原培养液。实验组分别加入终浓度为 1.0、5.0 和 10.0 mmol/L Hcy 的培养液 100 μ l, 对照组加 100 μ l 不含 Hcy 的培养液, 每组设 4 个复孔; 继续培养 48 h、72 h。在结束培养前 12 h 每孔加入 ³H-TdR 0.25 μ Ci, 继续培养 12 h。取出 96 孔板, 胰酶消化, 10% 三氯乙酸固定细胞, 多头细胞收集器收集细胞于 49 型的玻璃纤维滤纸上, 烘箱烘干。将烘干的滤纸置于闪烁杯中, 加闪烁液, 用液体闪烁计数器检测每孔每分钟放射性计数(cpm)。计算 ³H-TdR 掺入抑制率。

抑制率(%)=(对照孔 cpm-实验孔 cpm)/对照孔 cpm \times 100%

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 ECV-304 细胞的形态学改变 将 ECV-304 细胞与不同浓度 Hcy 共培养 24 h、48 h 后, 倒置显微镜下可见: 对照组和 1.0 mmol/L Hcy 组中细胞呈单层鹅卵石样紧密排列, 而实验组随 Hcy 浓度的升高和作用时间的延长, 细胞排列变得杂乱, 聚集成团, 细胞内代谢产物增多。而 10.0 mmol/L Hcy 作用 48 h 的培养液中出现死亡悬浮细胞(见图 1、2)。

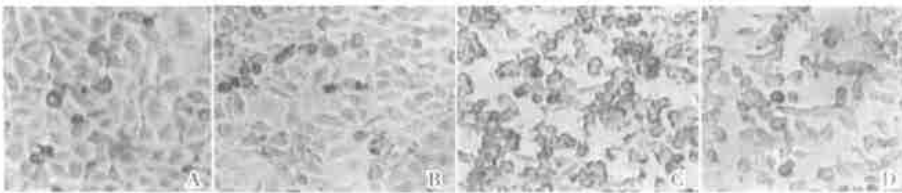


图 1 不同浓度 Hcy 作用 24h 细胞形态变化(A. 对照组, B. 1 mmol/L Hcy, C. 5 mmol/L Hcy, D. 10 mmol/L Hcy)

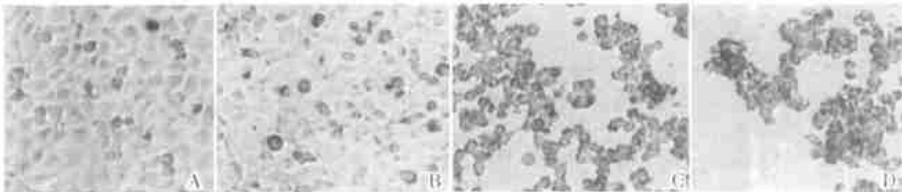


图 2 不同浓度 Hcy 作用 48h 细胞形态改变(A. 对照组, B. 1 mmol/L Hcy, C. 5 mmol/L Hcy, D. 10 mmol/L Hcy)

2.2 Hcy 对 ECV-304 细胞生长的抑制作用 将 ECV-304 细胞与不同浓度 Hcy 共培养 48 h、72 h, MTT 法检测, 酶标仪测定 A₅₇₀, 并计算各组抑制率。Hcy 对 ECV-304 细胞生长具有抑制作用, 作用相同时间随 Hcy 浓度的增加, 生长抑制率逐渐升高。

5.0、10.0 mmol/L Hcy 作用 48 h 的抑制率与对照组差异均有显著性 ($P < 0.01$), 而作用 72 h 后, 两组抑制率与相应对照组及低浓度组比较, 差异均有显著性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 且两浓度组作用 72 h 的抑制率也均显著大于 48 h ($P < 0.01$) (见表 1)。

表1 Hcy 对 ECV-304 细胞生长的影响 ($n_i=4, \bar{x} \pm s$)

Hcy (mmol/L)	A 值		抑制率(%)	
	48h	72h	48h	72h
对照组	0.68±0.05	0.71±0.05	—	—
0.1	0.66±0.02 [#]	0.69±0.02 ^{##}	2.57±2.51 ^{##}	2.34±2.19 ^{##}
1.0	0.65±0.03 [#]	0.67±0.03 [#]	4.04±3.68 ^{##}	5.99±3.70 ^{##}
2.5	0.64±0.02 [#]	0.65±0.02 [#]	6.62±3.50 ^{##}	8.45±2.57 ^{##}
5.0	0.62±0.03	0.54±0.03 ^{△△}	9.19±5.01	23.95±4.15 ^{△△}
10.0	0.56±0.03 [*]	0.45±0.03 ^{△△}	17.65±4.33	36.97±3.88 ^{△△}
F	7	41.35	12.03	73.71
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS组内	0.001	0.001	11.774	11.474

q 检验: 与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5.0 和 10.0 mmol/L 浓度组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 48 h 比较 △△ $P < 0.01$

2.3 Hcy 对 ECV-304 细胞 DNA 合成的影响 将 ECV-304 细胞与不同浓度 Hcy 共培养 48 h、72 h, $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测细胞 DNA 的合成。用液体闪烁计数器测量 cpm 值, 计算掺入抑制率。结果可见, $^3\text{H-TdR}$ 掺入抑制率随 Hcy 浓度增大和作用时间延长而逐渐增高。5.0、10.0 mmol/L Hcy 组在不同时间与相应对照组和低浓度组比较差异均有显著性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 且两组浓度作用 72 h, 其 $^3\text{H-TdR}$ 掺入抑制率明显高于 48 h ($P < 0.01$) (见表 2)。

表2 Hcy 对 ECV-304 细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的影响 ($n_i=4, \bar{x} \pm s$)

Hcy (mmol/L)	48 h		72 h	
	cpm 值	掺入抑制率(%)	cpm 值	掺入抑制率(%)
对照组	4 095±228	—	4 314±246	—
1.0	3 833±162	6.40±3.95	3 958±186	8.27±4.30
5.0	3 509±170 ^{**}	14.32±4.15 [#]	2 862±174 ^{△△} ^{##}	33.67±4.03 ^{△△} ^{##}
10.0	3 106±172 ^{**}	24.15±4.20 ^{##}	2 401±203 ^{△△} ^{##}	44.34±4.69 ^{△△} ^{##}
F	21.32	18.80	77.89	72.63
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS组内	34 178.000	16.822	41 649.250	18.909

q 检验: 与对照组比较 * * $P < 0.01$; 与 1.0 mmol/L 比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与相应指标 48 h 比较 △△ $P < 0.01$

3 讨论

同型半胱氨酸是一种含硫氨基酸, 是蛋氨酸代谢中重要的中间产物^[4], 有研究表明^[5], Hcy 可引起血管内皮细胞结构和功能的改变, VEC 的损伤在 As 形成和发展的早期即可发生, 许多诱发 As 形成的危险因素均对 VEC 产生不同程度的损伤作用。

本实验将不同浓度的 Hcy 与人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞体外共培养 24 h、48 h, 倒置显微镜下可见细胞形态学发生改变, 且具有时间和浓

度的依赖性, 结果与王玉芳等^[6]通过培养离体人脐静脉内皮细胞的结论一致。陈景开等^[7]在喂食甲硫氨酸诱导 Hcy 动物模型的体内实验中也观察到 VEC 的损伤。表明无论在体外培养的 VEC 还是在体内的动物试验中, Hcy 均可直接损伤血管内皮细胞。

MTT 法是利用活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物, 并沉积在细胞中, 溶解细胞中的蓝紫色结晶物, 其吸光度值可间接反映活细胞数量。本实验用 MTT 法检测 Hcy 对 ECV-304 细胞生长增殖的影响, 结果显示, 0.1、1.0 和 2.5 mmol/L Hcy 对细胞生长的抑制作用与对照组差异无显著性 ($P > 0.05$), 当 Hcy 浓度升至 5.0、10.0 mmol/L 时, 则呈现抑制效应 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 且两浓度组作用 72 h 的生长抑制率与 48 h 比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。可见, Hcy 对 VEC 生长的抑制作用呈时间和剂量的依赖性。

进一步用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测 Hcy 对 ECV-304 细胞 DNA 合成的影响, 结果显示, 5.0、10.0 mmol/L Hcy 作用 48 h、72 h 时, 细胞掺入抑制率高于相应对照组和低浓度组, 差异有显著性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 且两浓度组作用 72 h 的掺入抑制率明显高于 48 h ($P < 0.01$)。表明 Hcy 以剂量和时间依赖的方式抑制 ECV-304 细胞内 DNA 的合成, 使细胞生长增殖受抑, 从而限制了 VEC 功能的正常发挥, 进一步表明 Hcy 对 VEC 具有直接损伤作用。

[参 考 文 献]

- [1] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia; Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis [J]. *Am J Pathol*, 1969, 56 (1): 111~128.
- [2] Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease; Plasma levels in health, disease, and drug therapy [J]. *J Lab Clin Med*, 1989, 114(5): 473~501.
- [3] Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia: A common and easily reversible risk factor for occlusive atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1990, 81(6): 2 004~2 006.
- [4] 杨立华, 田清萍, 唐朝枢等. 同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制 [J]. 北京医科大学学报, 1998, 30(2): 112.
- [5] Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(2): 168~175.
- [6] 王玉芳, 王树人, 陈海艳等. 同型半胱氨酸对培养内皮细胞损伤的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(3): 268~270.
- [7] 陈景开, 周辽军, 赵秋良等. 甲硫氨酸诱导高同型半胱氨酸血症对内皮细胞的损伤作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2001, 3(1): 47~49.