

[文章编号] 1000-2200(2005)02-0101-03

·基础医学·

# 同型半胱氨酸对 ECV-304 细胞 NO 和 ROS 形成的影响

周继红, 章 尧

[摘要] 目的: 观察同型半胱氨酸(Hcy)对 ECV-304 细胞产生一氧化氮(NO)及其对细胞内活性氧(ROS)产生的影响。方法: 将不同浓度的 Hcy 与 ECV-304 细胞体外共培养 24 h, 硝酸还原酶法检测 3 种一氧化氮合酶(NOS)激动剂前后各组 NO 含量; 流式细胞术检测细胞荧光强度, 以反映 ROS 水平。结果: 0.50、1.00 mmol/L Hcy 作用 24 h 时 NO 量明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ); 加入 3 种 NOS 激动剂刺激后, 仍显示 Hcy 对 ECV-304 细胞释放 NO 反应的抑制作用, 1.00 mmol/L Hcy 组与对照组和低浓度组差异均有显著性 ( $P < 0.01$ )。0.50、1.00 mmol/L Hcy 组的荧光强度明显高于对照组和低浓度组 ( $P < 0.01$ )。结论: Hcy 可促进血管内皮细胞内 ROS 的产生, 并抑制 NO 的形成, 且呈剂量-效应关系。

[关键词] 半胱氨酸; ECV-304 细胞; 一氧化氮; 活性氧

[中国图书资料分类法分类号] Q 517 [文献标识码] A

## The effect of homocysteine on the production of nitric oxide and reactivated oxygen species in ECV-304 cells

ZHOU Ji-hong, ZHANG Yao

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of homocysteine on the production of nitric oxide(NO) and reactivated oxygen species(ROS) in ECV-304 cells. **Methods:** ECV-304 cells were incubated with different of concentrations of Hcy for 24 hours. A nitric-acid reductase method was used to detect NO in different groups with and without three stimuli of nitric oxide synthase(NOS), and ROS in cells was detected by flow cytometry(FCM). **Results:** After cells were exposed to 0.5 mmol/L, 1 mmol/L Hcy for 24 hours, NO in cultured media was significantly less than that in control group ( $P < 0.01$ ). Employing three stimuli for NOS, Hcy still resulted in a gradual decline in NO, and 1.0 mmol/L Hcy produced a statistical suppression of NO ( $P < 0.01$ ) compared with low concentration groups and control group. When incubated with 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L Hcy fluorescence in cells detected by FCM was higher than that in control and low concentration groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Hcy can dose-dependently restrain the excretion of NO and promote the production of ROS.

[Key words] homocysteine; ECV-304 cells; nitric oxide; reactivated oxygen species

血管内皮细胞(VEC)损伤在动脉粥样硬化(AS)发生的早期即可发生, 许多诱发 AS 形成的危险因素均对 VEC 产生不同的损伤作用。有研究报告<sup>[1-3]</sup>, 同型半胱氨酸(Hcy)可引起 VEC 内活性氧(ROS)的产生, 释放某些内皮细胞因子, 降低血管内皮释放某些生理活性物质等, 导致内皮细胞结构和功能异常, 从而启动 AS 的形成, 但其作用机制尚不完全清楚。本实验室前期工作已证明<sup>[4]</sup>, Hcy 可以直接损伤 VEC, 抑制 VEC 的增殖及其 DNA 的合成。本研究观察 Hcy 对体外培养的人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞内一氧化氮(NO)和 ROS 形成的影响, 以探讨 Hcy 致 VEC 损伤的机制。

### 1 材料与方法

1.1 主要试剂 同型半胱氨酸(Hcy, ICN Biomedicals 公司), RPMI 1640(Gibco 公司), 小牛血清(杭州四季青生物公司), 胰酶(Difco 公司), 2', 7'-双氯氢化荧光素(DCFH, Sigma 公司); NO 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 主要仪器 二氧化碳培养箱(SHEL LAB 公司), 倒置显微镜(CK40 型, Olympus 公司), 流式细胞仪(FACS Calibur, BD 公司)。

#### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 用 RPMI 1640(内含 L-谷氨酰胺 2 mmol/L、庆大霉素 5 万 u/L)为培养基, 调 pH 值至 7.2, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 用前加 10% 灭活小牛血清。细胞置于 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 孵育培养, 0.25% 的胰酶消化传代。2~3 天传代一次, 所有操作均采用对数生长期细胞。

1.3.2 检测培养液中 NO 胰酶消化细胞, 用细胞

[收稿日期] 2004-06-22

[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] 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 周继红(1978-), 女, 安徽淮南人, 硕士, 助教, 研究方向: 动脉粥样硬化。

培养液调整浓度至  $1 \times 10^5$ /ml, 接种 24 孔培养板, 每孔 1 ml, 于 5% CO<sub>2</sub> 37℃ 饱和湿度的细胞培养箱中过夜, 细胞贴壁生长, 吸弃原培养液。实验组分别加入终浓度为 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mmol/L Hcy 的 RPMI 1640 培养液 1 ml, 对照组加 1 ml 不含 Hcy 的培养液, 每组设 5 个复孔。继续培养 24 h, 直接吸取各组培养液 1 ml, -20℃ 保存。各孔再分别用 3 种一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 激动剂: 缓激肽 (BK, 终浓度为 10 μmol/L)、钙离子载体 A<sub>23187</sub> (A<sub>23187</sub>, 终浓度为 5 μg/ml)、L-精氨酸 (L-arg, 终浓度为 1 mmol/L) 刺激, 吸取各孔培养液 1 ml, 用 NO 试剂盒检测培养液中 NO 含量。

1.3.3 检测细胞内的 ROS 消化细胞用培养液调整浓度至  $3 \times 10^5$ /ml, 接种 6 孔培养板, 每孔 3 ml, 待细胞贴壁后吸弃原培养液。实验组分别加入终浓度为 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mmol/L Hcy 的 RPMI 1640 培养液 3 ml, 对照组加 3 ml 不含 Hcy 的培养液, 每组设 5 个复孔。继续培养 24 h, 胰酶消化, PBS 洗 2 次, 用 400 μl PBS 重悬细胞, 加入 DCFH (终浓度 10 μmol/L), 流式细胞仪检测双氯荧光素 (DCF) 的荧光强度, 其可间接反映细胞内 ROS 的含量。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

## 2 结果

2.1 Hcy 对 ECV-304 细胞分泌 NO 的影响 未加入刺激物时, Hcy 对 ECV-304 细胞释放 NO 反应可产生抑制作用, 其中 0.50、1.00 mmol/L Hcy 组与对照组差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ), 加入 NOS 激动剂后, 仍显示 Hcy 对 ECV-304 细胞释放 NO 反应的抑制作用, 其中加入 L-arg 刺激后 0.50 mmol/L Hcy 组与相应对照组和 0.05 mmol/L Hcy 组差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ), 1.00 mmol/L 组 NO 均低于对照组、0.05、0.10 和 0.25 mmol/L 组 ( $P < 0.01$ ); 而加入 A<sub>23187</sub> 和 BK 刺激后, 在 0.50 mmol/L Hcy 组与相应对照组和 0.05 mmol/L 组差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 而 1.00 mmol/L 组 NO 均明显低于对照组、0.05、0.10 和 0.25 mmol/L 组 ( $P < 0.01$ ) (见表 1, 图 1)。

2.2 Hcy 对 ECV-304 细胞内 ROS 形成的影响 Hcy 与 ECV-304 细胞共培养 24 h 后加入非荧光探针 DCFH, 检测细胞内荧光强度, 间接反映出细胞内的 ROS。细胞内 ROS 的水平随 Hcy 浓度的增大而逐渐升高, 其中 0.50、1.00 mmol/L Hcy 组与对照组和 0.05、0.10 和 0.25 mmol/L 组差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ) (见表 2, 图 2)。

表 1 Hcy 对 ECV-304 细胞产生 NO 的影响 ( $n_i=5; \bar{x} \pm s$ )

Hcy (mmol/L)	NO (μmol/L)			
	未加刺激物	L-arg 刺激	A <sub>23187</sub> 刺激	BK 刺激
对照组	213.21±20.42 <sup>##</sup>	304.97±26.14 <sup>##</sup>	345.09±33.77 <sup>##</sup>	269.21±23.12 <sup>##</sup>
0.05	207.40±18.64 <sup>##</sup>	289.94±23.74 <sup>##</sup>	324.37±30.09 <sup>##</sup>	259.88±22.83 <sup>##</sup>
0.10	194.67±17.91 <sup>##</sup>	277.45±22.00 <sup>##</sup>	319.27±27.75 <sup>##</sup>	248.60±21.98 <sup>##</sup>
0.25	185.53±17.19 <sup>##</sup>	272.00±21.49 <sup>##</sup>	311.03±25.89 <sup>##</sup>	236.61±20.22 <sup>##</sup>
0.50	147.76±14.17	242.55±19.01	286.30±24.49	214.30±18.72 <sup>#</sup>
1.00	114.42±11.62	182.18±17.98	206.59±20.97 <sup>*</sup>	151.88±15.03 <sup>##</sup>
F	25.84	20.26	20.03	21.80
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS <sub>组内</sub>	286.084	479.561	521.655	420.675

q 检验: 与 0.50 mmol/L 组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 1.00 mmol/L 组比较<sup>##</sup>  $P < 0.01$

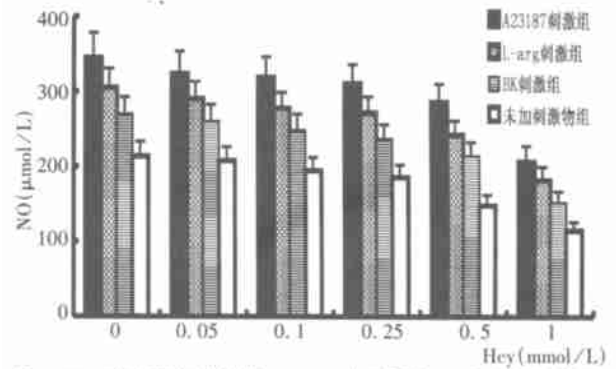


图 1 Hcy 对不同激动剂刺激 ECV-304 细胞释放 NO 反应的抑制作用

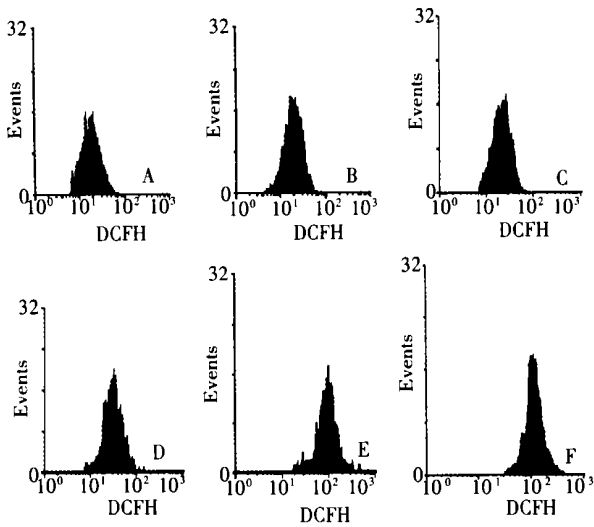
表 2 Hcy 对 ECV-304 细胞 ROS 含量的影响 ( $n_i=5; \bar{x} \pm s$ )

Hcy (mmol/L)	ROS (DCF 荧光强度)	F	P	MS <sub>组内</sub>
对照组	21.00±3.60			
0.05	23.23±3.79			
0.10	25.33±3.50	179.94	<0.01	56.444
0.25	33.15±4.61			
0.50	105.13±11.15 <sup>**</sup>			
1.00	119.20±12.39 <sup>**</sup>			

q 检验: 与对照组、0.05、0.10 和 0.25 mmol/L 组比较 \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

NO 是一种内皮源性血管舒张因子, 在 VEC 中由 L-arg 和 O<sub>2</sub> 经 NOS 催化产生, 它既是一种有效的血管扩张剂, 又能抑制血小板聚集、平滑肌细胞增殖、单核细胞黏附和有关黏附分子的表达等, 对血管正常功能的维持发挥重要的调节作用。有学者报道<sup>[3,5]</sup>, 正常 VEC 释放的 NO 可与 Hcy 结合形成 S-亚硝基同型半胱氨酸 (S-nitroso-homocysteine), 通过抑制 Hcy 自身氧化过程中活性氧 (如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 的产生而消除 Hcy 的细胞毒性作用, 但延长与 Hcy 接触时间或提高 Hcy 的浓度, NO 的保护性作用将被抵消。



A: 对照组 B: 0.05 mmol/L Hcy 组 C: 0.10 mmol/L Hcy 组 D: 0.25 mmol/L Hcy 组 E: 0.50 mmol/L Hcy 组 F: 1.00 mmol/L Hcy 组

图 2 Hcy 对 ECV-304 细胞 ROS 的影响 (流式直方图)

Jin 等<sup>[3]</sup>用牛主动脉内皮细胞与不同浓度的 Hcy 共培养,发现 NO 含量呈浓度依赖性降低。本实验将 Hcy 与 ECV-304 细胞共培养 24 h, 细胞内 NO 含量同样随 Hcy 浓度增大而逐渐下降, 存在剂量效应关系; 其中 0.50、1.00 mmol/L Hcy 组与对照组差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )。

NO 的合成和释放受体依赖性的血管舒张剂 BK、内皮依赖的钙离子载体  $A_{23187}$  及转运体依赖的血管舒张剂 L-arg 等 NOS 激动剂的影响<sup>[4]</sup>。Zhang 等<sup>[7]</sup>用兔微血管内皮细胞研究证实, Hcy 可以抑制上述激动剂介导 VEC 的 NO 释放反应。李夏等<sup>[8]</sup>通过直接检测 NOS 活性也证实, Hcy 在 1 mmol/L 浓度时能降低 VEC 内 NOS 活性, 并呈剂量依赖性降低 VEC 内 L-arg 的转运。本实验在加入三种 NOS 激动剂后, 结果显示, 0.50、1.00 mmol/L Hcy 组, L-arg 刺激产生的 NO 量与对照组和低浓度组差异均有显著性 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ );  $A_{23187}$  和 BK 刺激组在 1.00 mmol/L Hcy 组与对照组和低浓度组差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 进一步验证了 Hcy 可抑制激动剂介导的 VEC 合成和释放 NO 的反应, 表明 NOS 激动剂并不能逆转 Hcy 对 NO 合成和释放的抑制效应, 推测 NO 的降低可能是 Hcy 抑制 NOS 活性所致。Hcy 对 VEC 内 L-arg/NOS/NO 途径的抑制作用, 可降低 NO 的形成及其生物学功能, 是导致 VEC 损伤的重要机制之一。

多数学者认为<sup>[5,9]</sup>, Hcy 上的自由巯基很容易自身氧化形成二硫键, 同时产生包括超氧化物阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 及羟自由基 ( $\cdot OH$ ) 等活

性氧 (ROS), 进而引起细胞膜及血浆脂质过氧化; 形成的  $O_2^{\cdot-}$  与 NO 结合一方面生成具有强烈细胞毒性的过氧亚硝酸盐 ( $ONOO^-$ ), 另一方面降低了 NO 的生物利用度; 同时 ROS 还可以氧化 NOS 中的巯基而降低其 NO 的产生能力。Lang 等<sup>[10]</sup>研究证实, Hcy 可以剂量依赖方式提高猪主动脉内皮细胞内的  $O_2^{\cdot-}$  水平。我们根据 ROS 可以氧化 DCFH 产生荧光产物双氯荧光素 (DCF), 检测不同浓度的 Hcy 与 ECV-304 细胞共培养 24 h 后的细胞内荧光强度, 可间接反映细胞内 ROS 的水平, 结果显示 0.50、1.00 mmol/L Hcy 组细胞内荧光强度明显高于对照组和低浓度组 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ), 表明 Hcy 能以剂量依赖方式增加血管内皮细胞内 ROS 的形成。在 Hcy 浓度较高时, 其产生的过氧化物等超出了细胞的清除能力, 破坏了细胞的防御性保护反应, 而引起血管内皮细胞的损伤。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 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.
- [ 2 ] Stamler JS, Osborne JA, Jamaki O, *et al.* Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen [ J ]. *J Clin Invest*, 1993, 91(1): 308 ~ 318.
- [ 3 ] Jin L, Abou-Mohamed G, Caldwell RB, *et al.* Endothelial cell dysfunction in a model of oxidative stress [ J ]. *Med Sci Monit*, 2001, 7(4): 585 ~ 591.
- [ 4 ] 周继红, 章尧, 孙俊杰, 等. 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 [ J ]. 蚌埠医学院学报, 2005, 30(1): 14 ~ 16.
- [ 5 ] Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia [ J ]. *J Clin Invest*, 1996, 98(1): 5 ~ 7.
- [ 6 ] Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: Clinical relevance [ J ]. *Heart*, 2001, 85(3): 342 ~ 350.
- [ 7 ] Zhang XH, Li H, Jin HL, *et al.* Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production [ J ]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 279(4): 671 ~ 678.
- [ 8 ] 李夏, 刘乃奎, 蒋宏峰, 等. 同型半胱氨酸抑制人血管内皮细胞精氨酸转运 [ J ]. 北京大学学报 (医学版), 2002, 34(2): 159 ~ 162.
- [ 9 ] Lynch SM, Frei B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein [ J ]. *Lipid Res*, 1993, 34(10): 1745 ~ 1753.
- [ 10 ] Lang D, Kredan MB, Moat SJ, *et al.* Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: Role for superoxide anions [ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(2): 422 ~ 427.