

氧自由基在血管紧张素 II 诱导 ECV304 细胞增殖中的作用

李 雄¹⁾, 张 旋²⁾, 王殿华²⁾

(1) 77206 部队 60 分队卫生所, 云南昆明 650202; 2) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨氧自由基在血管紧张素 II 诱导 ECV304 细胞增殖中的作用. **方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞株 (ECV304), 实验分为 Ang II 处理组、NAC 干预组和正常对照组. 采用改良 MTT 法、Fenton 反应和硝酸酶还原法分别观察 Ang II 处理组、NAC 干预组和正常对照组的 ECV304 细胞的增殖率和细胞产生氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的量. **结果** 一定浓度的 Ang II (0.03125 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$) 作用 12 h 时 ECV304 细胞增殖率增加, 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); Ang II 可诱导 ECV304 细胞产生氧自由基 ($\cdot\text{OH}$), 氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的含量与 ECV304 细胞增殖率呈显著负相关; 10 mmol/L NAC 可抑制 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 对 ECV304 细胞的增殖作用, 与正常对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$). **结论** Ang II 可诱导 ECV304 细胞产生氧自由基 ($\cdot\text{OH}$), 氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 含量与 Ang II 呈时间和剂量依赖性; NAC 可抑制 Ang II 对 ECV304 细胞的增殖作用, 这可能与减少氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的含量有关; 氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 可能是 Ang II 诱导 ECV304 细胞增殖的主要信号转导分子之一.

[关键词] N-乙酰半胱氨酸; 血管紧张素 II; 氧自由基 ECV304 细胞; 增殖

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0053-06

Role of Oxygen Free Radical in the Proliferation of ECV304 Induced by Ang II

LI Xiong¹⁾, ZHANG Xuan²⁾, WANG Dian-hua²⁾

(1) The Hospital of 77206 Army, Kunming 650202; 2) Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of oxygen free radicals in the proliferation of ECV304 induced by Ang II. **Methods** The lines of human umbilical vein endothelial cell (ECV304) cultured in vivo were divided into three groups which were treated by Ang II, Ang II +N-acetyl-L-cysteine (NAC), and normal culture medium. First we observed the proliferous effect of ECV304 induced by Ang II at different concentration with improved MTT and microscope. Then the contents of oxygen free radicals ($\cdot\text{OH}$) in three groups were detected by spectrophotometer. **Results** ECV304 incubated with Ang II (0.03125 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$) for 12 hours increased the proliferation rate ($P < 0.05$ vs. control group); It was significant that the negative correlation between proliferation rate and the content of oxygen free radicals; NAC (10mmol/L) inhibited the proliferation of ECV304 induced by Ang II ($P > 0.05$ vs. control group). **Conclusions** ECV304 induced by Ang II can produce oxygen free radicals ($\cdot\text{OH}$), and the contents of oxygen free radicals ($\cdot\text{OH}$) increase with the prolongation of time and the enlargement of dose; Antioxidant NAC can inhibit the proliferation of ECV304 induced by Ang II, this effect may be related with reducing the content of oxygen free radicals ($\cdot\text{OH}$); oxygen free radicals ($\cdot\text{OH}$) may be one of the major molecules which play an important role in the signal transduction of ECV304 proliferation.

[作者简介] 李雄 (1961 ~), 男, 云南南华县人, 医学学士, 主治医师, 主要从事急诊急救研究及临床工作.

[Key words] NAC; Ang II; Oxygen free radicals; ECV304; Proliferation

血管内皮是心血管疾病危险因子的靶点, 其功能障碍构成许多心血管疾病的病理基础。目前认为血管自稳态的调节取决于血管内皮自身的氧化还原状态^[1,2]。大量研究表明, 氧化应激产生的各种氧自由基 (oxygen free radicals) 对血管内皮具有细胞毒性作用, 是许多心血管疾病发生的重要机理^[3,4]。然而, 新近文献报道氧化应激产生的氧自由基在一定量时, 可作为血管内皮信号转导分子, 参与调节细胞功能^[5]。本研究以血管紧张素 II (Ang II) 作为血管氧化应激的诱导剂, 观察 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 对人脐静脉内皮细胞株 (ECV304) 增殖作用的影响, 探讨氧自由基在血管紧张素 II 诱导 ECV304 细胞增殖中的作用, 为心血管疾病的防治提供新的理论依据, 启示新药研发和应用的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

ECV304 (人脐静脉内皮细胞株) 购自中国科学院上海药物研究所; Ang II、NAC 和 MTT (批号 9710) 购自 Sigma 公司; 特级无支原体新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所 (批号 20020114); $\cdot\text{OH}$ 测定试剂盒购自南京建成生物

$$\text{细胞增殖率 (\%)} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{对照组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100 \%$$

1.2.4 ECV304 细胞光镜形态学观察 分别用含有 Ang II (浓度分别为 0.0625 和 1 $\mu\text{mol/L}$)、NAC (1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II + 10 mmol/L NAC) 的培养基和完全培养基培养, 12 h 后置倒置显微镜下观察细胞形态学变化。

1.2.5 ECV304 细胞内 $\cdot\text{OH}$ 含量测定 将上述所得的细胞悬液与不同浓度的 Ang II 分别共同培养 12 h 和 24 h, 应用检测试剂盒, 按试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 统计学处理 应用 SPSS11.5 软件包进行分析, 组间比较采用方差分析和 q 检验; 对不同时间 (12 h 和 24 h) 的氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 含量相比进行配对 t 检验; 对氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的含量与

工程研究所 (批号 20030625)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 ①Ang II 处理组: a. 不同作用时间 (4 h、12 h 和 24 h); b. 不同浓度 (Ang II 终浓度浓度分别为, 0.03125 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0625 $\mu\text{mol/L}$ 、0.125 $\mu\text{mol/L}$ 、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 $\mu\text{mol/L}$); ②NAC 干预组: Ang II 1 $\mu\text{mol/L}$ + NAC 10 mmol/L ; ③正常对照组: 加入等量完全培养基。

1.2.2 ECV304 细胞传代培养 ECV304 细胞在含 20% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 空气的培养箱中培养。台盼蓝染色后计算细胞存活率 (Via = 99%), 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个细胞 / mL 备用。

1.2.3 改良 MTT 法测定 ECV304 细胞增殖率 将备用的细胞悬液接种于 96 孔板, 90 μL / 孔, 每组设 4 个复孔。4 h 细胞完全贴壁后加入受试药物, 10 μL / 孔 (倍比稀释 Ang II, 使其终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.125 $\mu\text{mol/L}$ 、0.0625 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.03125 $\mu\text{mol/L}$)。置于培养箱中分别培养 4 h、12 h 和 24 h, 之后每孔加入 MTT 液 (5 mg/mL) 10 μL , 4 h 后分别在每孔加入三联液 100 μL / 孔, 置于培养箱中 12 h 后, 用 EL340 酶联免疫仪在 570 nm 单波长下测定每孔的 OD 值。

ECV304 细胞增殖率的关系进行相关分析, 结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 对 ECV304 细胞增殖作用的影响

不同浓度的 Ang II 作用 ECV304 细胞 4 h 时, 细胞增殖不明显, 与正常对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$); 作用时间为 12 h 时, 不同浓度 Ang II (0.03125 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$) 均可促细胞增殖, 与正常对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 促细胞增殖率达到最大, 随 Ang II 浓

度的增大,细胞增殖率反而逐渐减小;作用时间为24 h时,细胞呈负增殖,随Ang II浓度的增大,增殖率逐渐降低.Ang II作用细胞12 h时,与相同浓度组作用时间4 h相比,细胞增殖率有显著性差异($P < 0.05$),见表1.

表1 Ang II在不同时间对 ECV304 细胞增殖作用的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of Ang II on the proliferation of ECV304 in different time ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖率(%)		
	4 h	12 h	24 h
Ang II处理组			
0.03125 $\mu\text{mol/L}$	3.53 \pm 0.09	5.61 \pm 1.12 [▲]	-7.73 \pm 1.24
0.0625 $\mu\text{mol/L}$	4.34 \pm 0.09	41.93 \pm 5.03 [▲]	-8.05 \pm 2.31
0.125 $\mu\text{mol/L}$	4.27 \pm 0.09	36.31 \pm 6.01 [▲]	-12.57 \pm 3.10
0.25 $\mu\text{mol/L}$	3.86 \pm 0.05	29.64 \pm 4.05 [▲]	-16.81 \pm 2.07
0.5 $\mu\text{mol/L}$	5.21 \pm 0.07	23.35 \pm 3.02 [▲]	-14.97 \pm 2.38
1 $\mu\text{mol/L}$	4.99 \pm 0.11	19.27 \pm 1.05 [▲]	-27.21 \pm 4.27
正常对照组	3.11 \pm 0.06	3.47 \pm 0.07	3.29 \pm 0.07

与正常对照组相比, [▲] $P < 0.05$; 与4 h相同浓度组相比, ^{*} $P < 0.05$.

2.2 NAC对Ang II诱导 ECV304 细胞增殖的抑制作用

与Ang II处理组相比细胞增殖率有显著性差异($P < 0.01$), 10 mmol/LNAC可抑制1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II对 ECV304 细胞的增殖作用, 而与正常对照组相比无显著性差异($P > 0.05$), 见表2.

2.3 Ang II对 ECV304 细胞形态学变化的影响

正常对照组培养的 ECV304 细胞, 4 h后大部分细胞贴壁. 早期细胞呈小多角, 球形, 少数细胞伸展, 12 h时, 细胞逐渐生长呈梭形, 有些细胞鱼贯状相连. 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ Ang II作用 ECV304 细胞12 h后, 可诱导细胞增殖, 核清晰, 呈圆形或椭圆形, 核分裂相多见, 胞浆丰富, 内含小颗粒, 细胞呈单层铺路石状排列. 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II作用 ECV304 细胞12 h后, 核分裂相减少, 部分细胞变圆, 贴壁力减弱甚至消失. NAC干预组培养的 ECV304 细胞, 核分裂相不明显, 细胞生长与正常对照组相当.

2.4 NAC对Ang II诱导 ECV304 细胞·OH含量的抑制作用

不同浓度的Ang II作用 ECV304 细胞12 h时, Ang II作用 ECV304 细胞产生·OH的含量与Ang II呈剂量和时间依赖性, 随着浓度的增大和时间的延长, ECV304 细胞的·OH含量逐渐增加, 与正常对照组相比有显著性差异($P < 0.05$). 相同浓度Ang II作用12 h与24 h时·OH含量相比, 有显著性差异($P < 0.05$). NAC干预组与Ang II处理组的·OH含量相比, 有显著性差异($P < 0.05$), 而与正常对照组相比无显著性差异($P > 0.05$), 见表3、表4.

表2 NAC对Ang II诱导 ECV304 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Inhibition of NAC on the proliferation of ECV304 induced by Ang II ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖率(%)		
	4 h	12 h	24 h
Ang II处理组	4.99 \pm 0.11	19.27 \pm 1.05	-27.21 \pm 4.27
NAC干预组	4.63 \pm 0.12	4.13 \pm 0.37 ^{**}	4.58 \pm 0.21
正常对照组	4.11 \pm 0.06	4.01 \pm 0.07	4.29 \pm 0.07

与Ang II处理组相比, ^{**} $P < 0.01$. Ang II处理组: Ang II浓度为1 $\mu\text{mol/L}$; NAC干预组: 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II + 10 mmol/LNAC

表3 Ang II对 ECV304 细胞·OH含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effect of Ang II on the content of ·OH in ECV304 ($\bar{x} \pm s$)

组别	·OH含量(U/mL)	
	12 h	24 h
Ang II处理组		
0.03125 $\mu\text{mol/L}$	376.70 \pm 34.16 [▲]	1460.52 \pm 175.45
0.0625 $\mu\text{mol/L}$	412.82 \pm 41.28 [▲]	1465.60 \pm 153.21
0.125 $\mu\text{mol/L}$	1305.54 \pm 140.98 [▲]	1546.74 \pm 152.63
0.25 $\mu\text{mol/L}$	1651.27 \pm 175.11 [▲]	2535.63 \pm 306.25
0.5 $\mu\text{mol/L}$	1800.92 \pm 202.96 [▲]	2702.98 \pm 283.42
1 $\mu\text{mol/L}$	2038.29 \pm 196.45 [▲]	2743.55 \pm 282.32
正常对照组	314.78 \pm 22.02	415.84 \pm 34.27

与正常对照组相比, [▲] $P < 0.05$; 与24 h相同浓度组相比, ^{*} $P < 0.05$.

表4 NAC对Ang II诱导ECV304细胞·OH含量的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Inhibition of NAC on the content of ·OH in ECV304 induced by Ang II ($\bar{x} \pm s$)

组别	·OH含量(U/mL)	
	12 h	24 h
Ang II处理组	2038.29 ± 196.45	2743.55 ± 282.32
NAC干预组	371.54 ± 32.42 [△]	450.73 ± 11.33
正常对照组	314.78 ± 22.02	415.84 ± 34.27

与Ang II处理组相比, [△] $P < 0.05$. Ang II处理组: Ang II浓度为1 $\mu\text{mol/L}$; NAC干预组: 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II + 10 mmol/L NAC

2.5 ECV304细胞的·OH含量与细胞增殖率关系的评价

不同浓度Ang II (0.0625–1 $\mu\text{mol/L}$)作用ECV304细胞12 h时, ·OH的含量与细胞增殖率呈显著负相关, ($r = -0.800$, $P < 0.01$), 见图1.

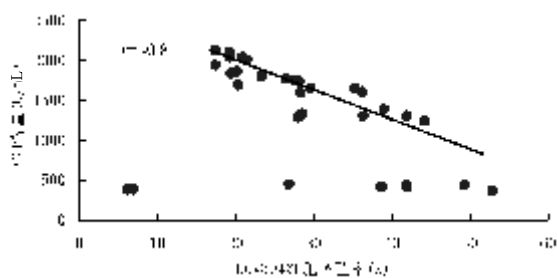


图1 ECV304细胞·OH含量与细胞增殖率的相关性

Fig.1 The correlation between the proliferation of ECV304 and the content of ·OH

3 讨论

血管内皮细胞发生氧化应激反应, 在其特定的组织位点上氧化作用和抗氧化作用的平衡失调, 蓄积产生氧自由基; Ang II被认为是血管氧化应激的主要诱导剂, 可通过NADPH氧化还原酶诱导血管内皮细胞产生超氧阴离子, 经自由基链反应, 产生·OH^[6,7]. 新近文献报道氧化应激产生的氧自由基在一定量时, 可作为血管内皮信号转导分子, 参与调节细胞功能^[5].

研究表明, Ang II可诱导血管平滑肌细胞产

生内源性氧自由基引起细胞增殖, 在心血管疾病的发生发展中具有重要作用^[8,9]. 但Ang II是否通过一定的氧化还原敏感信号转导途径促进血管内皮细胞增殖, 以前的研究尚未证实. 本实验结果发现: 不同浓度的Ang II作用ECV304细胞4 h时, 细胞增殖不明显; 作用时间为12 h时, 不同浓度Ang II (0.03125 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$) 均可促细胞增殖, 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ Ang II促细胞增殖率达到最大, 随Ang II浓度的增大, 细胞增殖率反而逐渐减小; 作用时间为24 h时, 细胞呈负增殖. 在Ang II诱导血管内皮细胞增殖过程中, 伴随有氧自由基(·OH)含量的变化, 并且与内皮细胞的增殖率呈显著负相关. 结果表明, Ang II是ECV304细胞氧化应激产生氧自由基(·OH)的诱导剂, 可诱导ECV304细胞产生氧自由基(·OH), 氧自由基(·OH)含量与Ang II呈时间和剂量依赖性, 一定量的氧自由基(·OH)有促进细胞增殖作用, 随着氧自由基(·OH)含量的增多, 细胞呈负增殖, 提示氧自由基(·OH)在调控细胞增殖中起重要作用.

NAC常被用于研究自由基在体内外的生物化学作用. NAC对细胞具有抗氧化保护作用^[10,11]. 本研究结果发现, 抗氧化剂NAC明显减少Ang II诱导的ECV304细胞产生的氧自由基(·OH)含量, 并且明显抑制Ang II诱导的ECV304细胞增殖. 这提示氧自由基(·OH)可能是Ang II诱导的ECV304细胞增殖的主要信号转导分子之一.

[参考文献]

- [1] STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW T E, et al. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase atherogenicity [J]. N Engl J Med, 1999, 320: 915–920
- [2] ALEXANDER W. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective [J]. Hypertension, 1995, 25: 155–161
- [3] MARUIN, OFFERMANN MK, SWERLICK R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through endothelial cells [J]. J Clin Invest, 1993, 92: 1866–1874

- [4] HERB S T, U, TOBOREK M, KAISEV S, et al. 4-Hydroxynomenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181: 295-303
- [5] KUNSC H C, MEDFORD R M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature [J]. *Circ Res*, 1999, 85: 753-766
- [6] HEPING Z, CHANG-YANG Y, BURTON T, et al. Recursive partitioning for tumor classification with gene expression microarray data [J]. *Proc Natl Acad USA*, 2001, 12: 6730-6735
- [7] WARNHOLTZA, NICKENIG G, SCHULZ E, et al. Physiological society symposium impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: Roles for nitric oxide [J]. *Department of pharmacology*, 1997, 82: 369-376
- [8] IAFARI A M, USHIO Fukai M, AKERS M, et al. Role of NADH/NADPH oxidase -derived H_2O_2 in angiotensin II -induced vascular hypertrophy [J]. 1998, 32: 488-495
- [9] 谢利霞, 姚树明, 张旋, 等. 活性氧对 ECV304 细胞生长和凋亡的相关基因表达谱研究 [J]. *中国病理生理学杂志*, 2006, 22 (10): 2055-2058
- [10] BLEECKER ER, POSTMA DS, MEYERS DA, et al. Evidence for multiple genetic susceptibility for asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 165: pps113-116
- [11] DIMMELER S, HERMANN C, ZEIHNER A M. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9: 697-698

(2007-9-16 收稿)

(上接第 52 页)

- [8] MCGEE D H, DEMBINSKA O, GRUEBEL M M. Evaluation of triamcinolone acetonide following intravitreal injection in New Zealand white rabbits [J]. *Int J Toxicol*, 2005, 24 (6): 419-425
- [9] YUSY, DAMICO F M, VIOLA F, et al. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide: a morphological study [J]. *Retina*, 2006, 26 (5): 531-536
- [10] MOSHFEGHI D M, KAISER P K, SCOTT I U, et al. Acute endophthalmitis following intravitreal triamcinolone acetonide injection [J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 136 (5): 791-796

(2007-08-10 收稿)