

不同浓度过氧化氢对人脐静脉内皮细胞增殖活性的影响

吴芳园 廖海涛 韦义萍

摘要 目的 建立氧化应激损伤模型,研究过氧化氢(H_2O_2)对内皮细胞增殖活性的影响,为深入探讨氧化应激致血管内皮细胞损伤机制奠定基础。方法 以 0、50、100、150、300、400 和 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于人脐静脉内皮细胞(HUVEC),在 8、12 和 24h 时间段内采用 MTT 法测定细胞的增殖活性。结果 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 8h 对 HUVEC 活性无影响,与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各浓度各时间段内, H_2O_2 均可引起细胞活性降低,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各两组比较,8h 组与 12h 组、24h 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);12h 组与 24h 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。12h 的 IC_{50} 为 133.3 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 在一定浓度时间范围内, H_2O_2 对 HUVEC 有增殖抑制作用,150 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 12h 为最佳实验浓度时间。

关键词 过氧化氢 浓度 内皮细胞 增殖

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.013

Effect of Different Concentrations of Hydrogen Peroxide on Proliferation of Human Umbilical Endothelial Cells. Wu Fangyuan, Liao Haitao, Wei Yiping. Nursing College of Guangxi Medical University, Guangxi 530021, China

Abstract Objective To establish oxidative stress injury model and investigate the effect of hydrogen peroxide on proliferation of endothelial cells, in order to lay a foundation for further research on the mechanism of oxidative stress induced damage to vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) were induced by 0, 50, 100, 150, 300, 400 and 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , and MTT assay was used to determine the proliferation of endothelial cells in 8h, 12h and 24h. **Results** There was no effect on HUVEC cells activity after induced by 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 8h, compared to the control group, and the difference was not statistically significant($P > 0.05$). H_2O_2 could cause HUVEC cells activity decreased with other concentration of each time, compared to the control group, and the difference was great statistically significant($P < 0.01$). In multiple comparisons, the difference between 8h group and 12h group, 24h group was statistically significant($P < 0.05$); the difference between 12h group and 24h group was not statistically significant($P > 0.05$). The IC_{50} of 12h was 133.3 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** In a certain time and concentration range, H_2O_2 had proliferative effect on HUVEC cells. The best experimental H_2O_2 concentration and time were 150 $\mu\text{mol/L}$ and 12h.

Key words Hydrogen peroxide; Concentrations; Endothelial cells; Proliferation

血管内皮细胞是血流与血管壁之间的屏障结构和物质转运通道,其可产生和释放各种活性物质,协助血管平滑肌参与血管重构,参与炎症反应,维持凝血功能平衡和血液流动状态,具有调节血管张力和血管通透性的功能^[1]。研究表明,内皮细胞损伤导致的功能障碍与多种心血管疾病的发生、发展密切相关,包括高血压、动脉粥样硬化、冠状动脉性心脏病、糖尿病等^[2]。氧化应激是一种由体内活性分子如氧自由基(oxygen derived free radicals, OFR)产生过多和

(或)清除减少,造成体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)类生成与抗氧化防御之间的平衡紊乱的细胞应激反应,被认为是导致内皮细胞损伤的主要病理因素,参与了内皮细胞病理变化过程的各个环节,如增加血管内皮细胞的通透性、增加白细胞的浸润、影响细胞的增殖活性、引起细胞的死亡和凋亡、干扰细胞内信号转导等^[3,4]。ROS 主要有超氧阴离子、氢过氧基、 H_2O_2 、羟自由基等,其中 H_2O_2 相对稳定且能自由通过细胞膜,直接造成细胞的氧化损伤。以往对 H_2O_2 造成细胞损伤的研究较多,如心肌细胞、肾细胞和脑细胞等,但缺乏 H_2O_2 对血管内皮细胞最佳浓度筛选及模型建立的详细内容。本实验以 H_2O_2 为介导诱导血管内皮细胞损伤,以期建立稳定有效的氧化

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260290)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学护理学院

通讯作者:韦义萍,教授,硕士生导师,电子信箱:cnwyp@126.com

应激损伤模型,为深入研究氧化应激损伤内皮细胞的病理机制和筛选抗氧化剂药理模型提供实验基础。

材料与方法

1. 细胞株:人脐静脉内皮细胞(HUVEC):购自中科院上海细胞库。

2. 试剂:胎牛血清、RPMI1640 培养基均购自 Hyclone 公司,胰蛋白酶购置 Gibco 公司,青霉素-链霉素溶液购置吉诺公司,噻唑蓝(MTT)购置 Sigma 公司,二甲基亚砜(DMSO)购置 Invitrogen 公司。

3. 仪器:细胞培养箱(Thermo Scientific 8000),光学显微镜(XDS-1A),低速离心机(上海卢湘仪 TDZ4B-WS),酶标检测仪(Thermo MK3 型),摇床(Qilinbeier TS-1000)。

4. 方法:(1)HUVEC 的培养:取冻存的 HUVEC,于 37℃ 水浴锅中快速解冻后,1000r/min 离心 5min,用培养基清洗 1~2 次(因为在冷冻的过程中加入了对细胞繁殖生长有害的物质),用培养基重悬后再离心,加入完全培养基置于培养箱(37℃,5% CO₂)中培养 2~3 天。于倒置相差显微镜下观察,待细胞生长贴壁融合至 80% 时,弃去瓶内旧培养基,用 PBS 清洗 2~3 次。添加 0.25% 胰蛋白酶消化液 1.5ml 至培养瓶中,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 2min,倒置显微镜下观察,细胞回缩变圆、间隙增大时弃去消化液,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基终止消化,用吸管轻轻吹打细胞,使其从瓶壁脱落形成细胞悬液。置于离心管中,1000r/min 离心 5min,弃去上清液,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养充分吹打均匀。细胞计数板进行计数,调整细胞密度为 1×10⁵ 个/毫升,接种于培养瓶中,置于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养。约 24h 后待细胞生长贴壁融合时即可用于实验。(2)MTT 法检测细胞活性:选择对数生长期的细胞,用胰酶消化制成细胞悬液,调整细胞密度为 5×10⁴/ml,接种于 96 孔培养板,每孔 100μl,于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养 24h。用 RPMI1640 完全培养基将 H₂O₂ 配制成 0、50、100、150、300、400 和 600μmol/L 不同药物梯度浓度后分别加入到 96 孔板中,每孔 150μl,每组 3 个复孔,分别作用 8、12 和 24h 后,每孔加入 15μl 的 MTT,于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养避光孵育 4h,吸净孔内的液体,加入 200μl DMSO,室温于摇床震荡 10min。酶标仪 492nm 波长测出同一时间点 A 值,用测得的 A 值进行细胞增殖影响的分析。据下面的公式计算细胞抑制率,细胞抑制率(%)=(空白组 A 值-对照组

A 值)/空白组 A 值×100%,并计算出细胞半数抑制浓度(IC₅₀值)。

5. 统计学方法:采用统计软件 SPSS 17.0 进行资料统计,进行单因素方差分析及两两比较,实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

由表 1 可以看出,随着给药浓度的增加和作用时间的延长,A 值逐渐降低,说明不同浓度 H₂O₂ 对 HUVEC 的增殖都有一定程度的抑制作用,并且具有浓度时间依赖性。50μmol/L H₂O₂ 作用 HUVEC 8h 的 A 值与对照组(浓度为 0μmol/L)相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其余各浓度各时间段内的 A 值与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明 H₂O₂ 可显著抑制 HUVEC 增殖。各两组比较,8h 组与 12h 组、24h 组各浓度 A 值相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);12h 组与 24h 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明作用 12h 后,随着时间的延长,H₂O₂ 对 HUVEC 的增殖抑制效应并无明显时间效应,应选用 12h 作为最佳作用时间。

按照改良 Karber 公式计算得出,12h 的 IC₅₀ 为 133.3μmol/L、100μmol/L 和 150μmol/L 为接近此 IC₅₀ 的浓度^[5]。经计算,100μmol/L 和 150μmol/L H₂O₂ 作用 HUVEC 12h 的细胞生长抑制率分别为 40.09% 及 65.02%,应选用细胞生长抑制率 > 50% 的 150μmol/L 作为最佳作用浓度。

表 1 H₂O₂ 对 HUVEC 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

浓度 (μmol/L)	A 值		
	8h	12h	24h
0	0.632 ± 0.012	0.752 ± 0.005	0.818 ± 0.006
50	0.625 ± 0.009	0.556 ± 0.011 *	0.574 ± 0.011 *
100	0.493 ± 0.004 *	0.449 ± 0.003 *	0.417 ± 0.006 *
150	0.473 ± 0.005 *	0.262 ± 0.010 *	0.217 ± 0.007 *
300	0.266 ± 0.005 *	0.178 ± 0.004 *	0.157 ± 0.006 *
400	0.257 ± 0.008 *	0.135 ± 0.006 *	0.122 ± 0.008 *
600	0.247 ± 0.008 *	0.106 ± 0.005 *	0.103 ± 0.001 *

与对照组相比,* $P < 0.01$

讨 论

氧化应激诱导内皮细胞损伤与多种疾病的发生密切相关。研究表明,高糖可通过激活蛋白激酶 C 通路、多元醇通路、己糖胺通路和晚期糖基化终末产物形成通路导致血管内皮细胞损伤,从而引发糖尿病血管并发症的发生^[6]。2004 年,Brownlee 提出了糖

糖尿病血管并发症发生的统一机制学说,该学说认为葡萄糖超载导致线粒体过量产生活性氧是高糖激活四条血管内皮细胞损伤通路的共同上游信号事件^[7,8]。动脉粥样硬化(AS)的发病机制复杂,其中 Ross 提出的氧化损伤-炎性反应学说得到一致公认,该学说认为血浆中氧化低密度脂蛋白引起的内皮细胞氧化损伤是 AS 发生的始动环节^[9]。还有研究表明,氧化应激可以使血管舒张因子一氧化氮(NO)失活,进而损害血管舒张功能,引起内皮功能障碍,促使血管张力改变,阻力增加,以致血管重构,引起高血压^[10]。除以上疾病外,氧化应激诱导内皮细胞损伤还可导致其他多种心血管疾病的发生与发展。因此,建立氧化应激损伤模型,研究血管内皮细胞损伤机制,对于预防和改善心血管疾病具有重大意义。

1983 年, Mosmann^[11] 发明了 MTT 法,用于测定细胞的活性。其原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原成水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚并沉积在细胞中,而死细胞无此功能,用有机溶剂如 DMSO 溶解甲瓚结晶,然后用酶标仪测定其吸光度值^[12]。在一定细胞数范围内,吸光度值与活细胞数量呈正相关,从而反映了活性细胞数量及代谢水平^[13]。H₂O₂ 是氧化应激研究的重要介质,其可产生羟自由基,引起脂质过氧化反应,并可自由穿过细胞膜和核膜,对细胞造成较大损伤^[14]。

本实验研究发现, 50 μmol/L H₂O₂ 作用 8h 对 HUVEC 的吸光值并无影响,即并未表现出细胞损伤,可能为 HUVEC 内的抗氧化酶能够将 H₂O₂ 产生的自由基清除有关。但是在一定范围内,随着 H₂O₂ 作用浓度的增加及作用时间的延长, HUVEC 内抗氧化酶活性下降,过多的氧自由基不能被及时清除而堆积在细胞内,致使它们与细胞内的一些生物高分子,如蛋白质、核酸、脂质等发生反应,生成大量氧化物或过氧化物,影响细胞物质和能量代谢的正常进行,抑制细胞增殖^[15]。各浓度 H₂O₂ 作用 12h 后,随着时间的延长, HUVEC 的增殖抑制效应并无明显的时间反应,说明 12h 作用下的细胞既可以达到损伤效果又不影响后续实验的培养及干预; 150 μmol/L H₂O₂ 为接近此时间 IC₅₀ 的浓度,且细胞生长抑制率 > 50%,所以

确定 150 μmol/L H₂O₂ 处理 12h 为最佳实验浓度时间。

综上所述,用 150 μmol/L H₂O₂ 处理 HUVEC 12h 能较好地模拟氧自由基损伤内皮细胞,建立细胞损伤模型,为从细胞水平深入研究氧化应激相关疾病、探讨内皮细胞损伤机制和筛选内皮细胞保护药物提供了良好的模型支持。

参考文献

- 米宁,高允生. 血管内皮细胞的功能与损伤机制的研究进展[J]. 泰山医学院学报, 2011, 32(10): 790-792
- 罗晓佳,陈晓平. 血管内皮细胞损伤与高血压[J]. 心血管病学进展, 2010, 31(4): 573-577
- 高蒙蒙,孙桂波,斯建勇. 红车轴草总黄酮对 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 201-207
- 杜正光. 血管内皮损伤的机制、评估及保护[J]. 中原医刊, 2006, 33(22): 60-62
- 车小群,李英勇,温宝宁. 5-氟尿嘧啶对人类绒毛膜 JAR 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(36): 5468-5472
- Reddy MA, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications[J]. Cardiovasc Res, 2011, 90(3): 421-429
- Paneni F, Beckman JA, Creager MA, *et al.* Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I[J]. Eur Heart J, 2013, 34(31): 2436-2443
- 梁馨予. 二氢杨梅素调控自噬保护高糖诱导血管内皮细胞损伤的作用研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2014
- 金鑫. 飞燕草素葡萄糖苷在血管内皮细胞的摄取利用及损伤保护效应研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2013
- 毛文星,李冰,王志梅,等. 氧化应激、血管内皮功能障碍与高血压[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(19): 3770-3774
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1-2): 55-63
- 徐静,吴锋,梅铭慧. 应用 MTT 法检测肿瘤化疗药物的敏感性[J]. 华夏医学, 2004, 1(18): 140-143
- 赵宝全,李前,郭艳茹. MTT 法检测 rhEGF 生物活性[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(6): 827-829
- 李建宽. 杜鹃素对氧化应激诱导血管内皮细胞损伤的保护作用及分子机制研究[D]. 太原:山西医科大学, 2014
- 周健洪,黎晖,宋述财. 过氧化氢对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响[J]. 广东医学, 2005, 26(9): 1199-1200

(收稿日期: 2016-05-05)

(修回日期: 2016-05-07)