

## 同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉 内皮细胞分泌白细胞介素 8

刘建民, 胡燕燕<sup>1</sup>, 李金珉<sup>2</sup>, 李秀昌<sup>1</sup>

(山东省卫生学校, 山东省济南市 250002; 1. 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012;

2. 新汶矿业集团莱芜医院心内科, 山东省莱芜市 271103)

[关键词] 细胞生物学; 内皮细胞白细胞介素 8 的分泌; 酶联免疫吸附测定; 同型半胱氨酸; 细胞培养; 叶酸; 牛磺酸

[摘要] 为探讨同型半胱氨酸对内皮细胞分泌白细胞介素 8 的影响, 及叶酸和牛磺酸对同型半胱氨酸作用的影响, 将人脐静脉内皮细胞培养于不同浓度同型半胱氨酸中, 采用酶联免疫吸附试验测定培养基中白细胞介素 8 水平。结果发现, 培养于同型半胱氨酸(0.1 mmol/L)中 4 h、6 h、8 h 和 12 h, 白细胞介素 8 分泌水平分别是对照组的 1.85 倍、1.88 倍、2.22 倍和 1.56 倍( $P < 0.01$ ); 在不同浓度(0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L)同型半胱氨酸中培养 8 h, 各组内皮细胞白细胞介素 8 的分泌水平分别是对照组的 1.43 倍、2.16 倍、2.57 倍和 2.88 倍( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 并呈剂量依赖性; 同型半胱氨酸与叶酸(0.05 mmol/L)或牛磺酸(5 mmol/L)共同培养细胞, 各组内皮细胞白细胞介素 8 的分泌水平无显著差异( $P > 0.05$ )。以上结果提示, 病理浓度的同型半胱氨酸能刺激内皮细胞分泌白细胞介素 8 增加, 这可能是同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制之一; 叶酸和牛磺酸可能阻断同型半胱氨酸的这一作用。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

### Homocysteine Induces Secretion of Interleukin-8 in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LIU Jian-Min, HU Yan-Yan<sup>①</sup>, LI Jin-Min<sup>②</sup>, and LI Xiu-Chang

(Health School of Shandong Province, Jinan 250002; Department of Cardiology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012; ②Laiwu Hospital of Xinwen Group Corp of Mineral, Laiwu 271103, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Cell Culture; Folic Acid; Taurine; Endothelium, Vascular; Interleukin 8; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of homocysteine on interleukin 8 production in endothelial cells, and the effect of folic acid and taurine on the role of homocysteine. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were incubated with homocysteine at a same concentration for different time or at increasing concentrations but for a same duration, and were incubated with homocysteine and folic acid or taurine for different time, then the interleukin 8 protein in the culture medium were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Enzyme-linked immunosorbent assay showed that exposure of cells to homocysteine (0.1 mmol/L) for 4, 6, 8 and 12 hours, resulted in a 1.85-fold, a 1.88-fold, a 2.22-fold and a 1.56-fold increase respectively in interleukin 8 production, compared with the control group ( $P < 0.01$ ); meanwhile, exposure of cells to homocysteine at different concentrations (0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L and 1 mmol/L) for 8 hours, resulted in a 1.43-fold, a 2.16-fold, a 2.57-fold and a 2.88-fold increase respectively in secretion of interleukin 8, compared with the control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); however, exposure of cells to homocysteine (0.1 mmol/L) and folic acid (0.05 mmol/L) or taurine (5 mmol/L) for different time, resulted in no significant difference in interleukin 8 production between groups. **Conclusion** Homocysteine induces secretion of interleukin 8 in cultured endothelial cells; and this role can be inhibited by folic acid and taurine.

高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的一个独立危险因素<sup>[1]</sup>, 同型半胱

氨酸(homocysteine, Hcy)致 As 的机制尚不清楚, 其对内皮细胞的影响可能是致 As 的重要机制之一。本研究旨在探讨 Hcy 对内皮细胞分泌白细胞介素 8(interleukin 8, IL-8)的影响, 以揭示 Hcy 致 As 的可能机制。

[收稿日期] 2002-10-22 [修回日期] 2003-06-05

[基金项目] 山东省科委科研基金(981216510)资助

[作者简介] 刘建民, 男, 1973 年出生, 山东省莱芜市人, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail: jnliujm@tom.com。胡燕燕, 女, 1953 年出生, 河北省黄骅市人, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病。李金珉, 女, 1969 年出生, 山东省泰安市人, 学士, 主治医师。

### 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

实验仪器主要有: CO<sub>2</sub> 孵箱 (TABAI SNA-320D 型, 日本)、相差显微镜 (Olympus, 日本)、超净工作台 (SW-GJ-IC 标准型, 苏州净化设备厂)、低温离心机 (Hermle ZK380, 德国) 和全自动酶标仪 (550 型, BIO-RAD 公司)。

主要实验材料: 胎牛血清 (杭州四季青生物制品公司)、DMEM 培养基 (GIBCO-BRL, 美国)、胰蛋白酶、D, L-同型半胱氨酸、叶酸、牛磺酸 (Sigma 公司, 美国)、IL-8 酶联免疫吸附测定试剂盒 (晶美生物工程有限公司)。

### 1.2 内皮细胞培养与鉴定

取健康产妇剖腹产分娩的新生儿脐带, 根据 Jaffe 等<sup>[2]</sup> 方法分离新生儿脐静脉内皮细胞并培养。培养细胞在电镜下可见特异结构 Weibel-Palade (WP) 小体, 确认为内皮细胞。传代培养, 第 2 至 4 代细胞用于实验。

### 1.3 实验分组

人脐静脉内皮细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 37℃、饱和湿度条件下培养, 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成细胞悬液, 接种于 24 孔培养板, 每孔细胞计数  $1 \times 10^5$ 。待细胞均匀铺满孔底后, 分组实验: 对照组不含同型半胱氨酸, 实验组同型半胱氨酸终浓度为 0.1 mmol/L, 细胞培养 2、4、6、8、12 和 24 h 后, 取细胞培养上清液测定白细胞介素 8 水平; 细胞培养于不同浓度同型半胱氨酸 (0.02、0.05、0.1、0.5 和 1 mmol/L) 8 h 后, 取上清液测 IL-8; 用 Hcy (0.1 mmol/L) 与叶酸 (0.05 mmol/L) 或牛磺酸 (5 mmol/L) 共同培养细胞 4、8、12 和 24 h 后, 取上清液测白细胞介素 8 水平。各组均取 4 个标本。

### 1.4 内皮细胞分泌白细胞介素 8 的测定

应用双抗体夹心法酶联免疫吸附法测定培养基中白细胞介素 8 的含量, 操作方法按照试剂盒说明书进行。

### 1.5 统计学处理

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 同型半胱氨酸对内皮细胞分泌白细胞介素 8 的影响

实验组培养基中 IL-8 浓度 4~12 h 显著高于对照组, 8 h 达高峰 (表 1, Table 1)。

0.02、0.05、0.1、0.5 和 1 mmol/L 同型半胱氨

酸分别培养细胞 8 h 时, 培养基中 IL-8 水平分别是对照组 (培养基中不含同型半胱氨酸) 的 1.15 倍 ( $P > 0.05$ )、1.43 倍 ( $P < 0.05$ )、2.16 倍 ( $P < 0.01$ )、2.57 倍 ( $P < 0.01$ ) 和 2.88 倍 ( $P < 0.01$ ), Hcy 的作用呈剂量依赖性。

表 1. 0.1 mmol/L 同型半胱氨酸培养细胞不同时间白细胞介素 8 分泌情况 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

Table 1. Secretion of IL-8 in cells exposed to Hcy (0.1 mmol/L) for different time

时 间 (h)	对照组	实验组
2	94 ± 22	126 ± 23
4	132 ± 20	244 ± 26 <sup>a</sup>
6	262 ± 34	493 ± 59 <sup>a</sup>
8	349 ± 29	774 ± 171 <sup>a</sup>
12	430 ± 59	668 ± 51 <sup>a</sup>
24	685 ± 53	694 ± 35

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

### 2.2 叶酸和牛磺酸对同型半胱氨酸作用的干预作用

叶酸和牛磺酸分别与 Hcy 共同培养内皮细胞不同时间, 实验组培养基中 IL-8 水平与对照组差异无显著性 ( $P > 0.05$ , 表 2, Table 2)。

表 2. 叶酸和牛磺酸对同型半胱氨酸作用的拮抗作用 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

Table 2. Inhibition of folic acid and taurine on the role of homocysteine

分 组	4 h	8 h	12 h	24 h
对照组	132 ± 20	349 ± 30	430 ± 59	685 ± 53
Hcy+ 叶酸组	159 ± 35	325 ± 38	460 ± 45	670 ± 51
叶酸组	120 ± 24	308 ± 31	482 ± 59	629 ± 49
Hcy+ 牛磺酸组	121 ± 19	364 ± 38	437 ± 37	736 ± 71
牛磺酸组	146 ± 23	327 ± 36	452 ± 43	706 ± 68

## 3 讨论

诸多研究公认高同型半胱氨酸血症是 As 的一个独立危险因素, 血浆同型半胱氨酸升高 5 μmol/L, 引起 As 的危险相当于胆固醇增加 0.52 mmol/L<sup>[1]</sup>。高同型半胱氨酸血症引起 As 的机制目前尚不清楚, 可能与内皮细胞毒性、平滑肌细胞增殖、促脂质过氧化和促血栓形成等有关<sup>[3]</sup>。

现在认为 As 是一种炎症性疾病, 内皮细胞受

损,释放一系列细胞因子,尤其是引起白细胞(单核细胞和T淋巴细胞)趋化聚集的细胞因子,在As发生发展过程中起关键作用<sup>[4]</sup>。Sung等<sup>[5]</sup>发现,同型半胱氨酸诱导内皮细胞表达、分泌单核细胞趋化蛋白1,提高单核细胞的趋化性,国内也发现,同型半胱氨酸诱导培养的内皮细胞高水平表达巨噬细胞炎症蛋白1 $\alpha$ <sup>[6]</sup>,这些均是同型半胱氨酸致As的可能机制。本研究发现,在培养的人脐静脉内皮细胞中,同型半胱氨酸(0.02~1 mmol/L)能诱导细胞因子白细胞介素8分泌增加,且在临床病理浓度下(20~50  $\mu$ mol/L)发挥作用,呈现剂量依赖性,于8 h达分泌高峰,24 h恢复到基础水平。细胞培养时同型半胱氨酸的刺激是一过性的,而在人体内,同型半胱氨酸的刺激则是持久性的,其诱导白细胞介素8分泌的作用可能呈持续高水平状态。白细胞介素8是一种CXC型趋化因子,它不仅趋化、激活中性粒细胞和T淋巴细胞,还刺激平滑肌细胞增殖、迁移,诱导单核细胞趋化、粘附于血管内皮,在As形成发展中起重要作用<sup>[7]</sup>。同型半胱氨酸可能通过上调白细胞介素8的表达和分泌,使白细胞粘附于血管内皮,促使As发生、发展。同型半胱氨酸诱导白细胞介素8表达的机制可能与其引起细胞内氧化应激和激活核因子- $\kappa$ B等有关<sup>[8]</sup>。

叶酸在蛋氨酸循环中起重要作用,人体内叶酸缺乏,可致同型半胱氨酸堆积。临床研究证明,叶酸能有效降低高同型半胱氨酸血症的同型半胱氨酸水平<sup>[9]</sup>。本实验中,叶酸能显著抑制同型半胱氨酸诱导内皮细胞分泌白细胞介素8的作用,其机制可能是叶酸促进同型半胱氨酸甲基化,降低同型半胱氨酸水平,另外,叶酸还有较强的抗氧化能力<sup>[10]</sup>。牛磺酸是组织内生成的一种含硫氨基酸,它是一种广泛的细胞保护剂。本研究发现,牛磺酸能有效抑制同型半胱氨酸诱导的内皮细胞白细胞介素8的分泌,说明牛磺酸可拮抗同型半胱氨酸的内皮损伤作

用,其机制可能与牛磺酸的抗氧化和清除氧自由基有关<sup>[11]</sup>。

本研究发现,同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉内皮细胞分泌细胞因子白细胞介素8,这是同型半胱氨酸致As的可能机制之一;叶酸、牛磺酸则抑制同型半胱氨酸的这一作用,这为As的预防和治疗提供了一条新思路。

#### [参考文献]

- [1] Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 1991, **324** (17): 1 149-155
- [2] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 1973, **52** (11): 2 745-756
- [3] Choy PC, Mymin D, Zhu Q, Dakshinamurti K, Kamin O. Atherosclerosis risk factors: the possible role of homocysteine. *Mol Cell Biochem*, 2000, **207** (1/2): 143-148
- [4] Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [5] Sung FL, Siow YL, Wang GP, Lynn EG, Kamin O. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in endothelial cells leading to enhanced monocyte chemotaxis. *Mol Cell Biochem*, 2001, **216** (1/2): 121-128
- [6] 王淑秀, 邓淑端, 倪娟, 瞿智玲. 同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$ . *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 101-104
- [7] Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lin YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone M A, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 1999, **398** (6729): 718-724
- [8] Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SZ, Pamidi S, Podor TJ, Li J, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*, 1999, **94** (3): 959-967
- [9] Vermeulen EGJ, Stehouwer CDA, Twisk JWR, Berg MV, Jong SC, Mackaay A JC, et al. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B6 on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2000, **355** (9203): 517-522
- [10] Verhaar MC, Stroes E, Rabelink TJ. Folate and cardiovascular disease. *Vasc Biol*, 2002, **22** (1): 6-13
- [11] Murakami S, Kondo Y, Sakurai T, Kitaama H, Nagate T. Taurine suppresses development of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *Atherosclerosis*, 2002, **163** (1): 79-87

(此文编辑 朱雯霞)