

叶酸抑制同型半胱氨酸诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖的研究

陈雯, 陈颖, 许国根(杭州市第一人民医院, 杭州 310009)

摘要:目的 探讨叶酸抑制同型半胱氨酸致大鼠血管平滑肌细胞增殖的研究。方法 培养大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞(VSMC), 流式细胞仪检测 VSMC 周期, $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入测定 VSMC 的 DNA 合成。结果 同型半胱氨酸以剂量依赖关系使 VSMC 周期中的 G_0/G_1 期细胞比例明显减少, S 期细胞比例显著增多, 增加 VSMC 的 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入。叶酸可明显抑制同型半胱氨酸诱导的作用。结论 同型半胱氨酸能诱导 VSMC 增殖, 叶酸能抑制同型半胱氨酸诱导的 VSMC 增殖。

关键词: 叶酸; 同型半胱氨酸; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 基因表达

中图分类号: R972.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)03-0190-03

Inhibition of folic acid on the homocysteine-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells

CHEN Wen, CHEN Yin, XU Guo-geng(*The First Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibition of folic acid on the homocysteine induced proliferation of vascular smooth muscle cell(VSMC). **METHODS** Vascular smooth muscle cell was cultured. Cell cycle was examined with flow cytometry. The DNA synthesis was determined by $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ incorporation. **RESULTS** Flow cytometric DNA analysis revealed that homocysteine significantly decreased the number of VSMCs at G_0/G_1 phase and increased the number of VSMCs at S phase in a dose dependent manner. Homocysteine increased $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ incorporation in VSMC in a dose dependent manner. Folic acid inhibited the effect of homocysteine. **CONCLUSION** 1. Homocysteine increases the proliferation of VSMC. 2. Folic acid inhibits the homocysteine-induced proliferation.

KEY WORDS: folic acid; homocysteine; vascular smooth muscle cell; cell proliferation

血管平滑肌细胞(VSMC)增殖是动脉粥样硬化、高血压、冠心病、经皮冠状动脉腔内血管成形术后再狭窄的病理基

础,所以探讨促进 VSMC 增殖的因素成为人们研究的热点。近年来,大量的临床研究表明高同型半胱氨酸血症是冠心病的危险因素,但具体机制不是很清楚^[1]。本实验通过观察从细胞分子生物学方面来探讨同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制及叶酸可能的干预作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

叶酸(美国 Santa Cruz 公司产品),同型半胱氨酸(美国 Santa Cruz 公司产品),胎牛血清(FBS)和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司产品),[³H]-TdR(中科院上海原子能所,放射活度 962GBq·mol⁻¹),SM-α actin 单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 血管平滑肌细胞的体外培养、鉴定及细胞毒性实验

组织贴块法培养 VSMC,无菌条件下分离 SD 大鼠(浙江省医学科学院动物中心)的胸主动脉,剪碎后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液,放 37℃,5% CO₂培养箱中静置培养。用光镜和免疫化学方法进行鉴定 VSMC。实验用第 4~6 代细胞。细胞毒性实验采用台盼蓝染色,细胞计数方法。本研究所用叶酸浓度无毒性,细胞存活率达 95.0% 以上。

1.3 细胞周期测定

细胞经上述无 FBS 的 DMEM 培养 24h 后加入 10% FBS 和终浓度为 0.25,0.5,1.0mmol·L⁻¹ 同型半胱氨酸;1.0 mmol·L⁻¹ 同型半胱氨酸加 0.1mmol·L⁻¹ 叶酸;对照组加入等量 10% FBS,作用 24h 后,将细胞制成单细胞悬液;收集后 70% 冷乙醇(4℃)固定,经离心,0.5mL·L⁻¹ 碘化丙啶(propidine iodide)染色和 300 目筛网过滤处理后,用流式细胞仪(Coulter, Berkman 公司)进行细胞周期测定。

表 1 同型半胱氨酸对 VSMC 细胞周期和 [³H]-TdR 掺入的作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effect of homocysteine on cell cycle and [³H]-TdR incorporation of VSMC($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	剂量(mmol·L ⁻¹)	G ₀ /G ₁ 期(%)	S 期(%)	G ₂ /M 期(%)	cpm 值
对照组		48.43±0.75	49.35±2.97	2.22±2.95	13489±712
同型半胱氨酸	0.25	38.02±5.67*	58.02±3.12*	3.91±1.41	16534±983*
	0.5	25.56±4.76*	71.90±3.41*	2.53±1.78	18676±674*
	1.0	15.4±0.26**	81.67±1.74**	2.87±1.25	21347±869**
叶酸	0.1	41.62±4.79**	46.02±3.12**	2.47±1.41	15435±856**

注: * 与对照组相比较, $P<0.05$; ** 与对照组相比较, $P<0.01$

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

3 讨论

同型半胱氨酸是一种含巯基的氨基酸,它是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中一个重要的中间产物,近来的研究表明高同型半胱氨酸血症能够导致血管内皮损害,促进低密度脂蛋白的氧化、血小板的聚集、血管平滑肌细胞增殖,从而导致动脉粥样硬化的发生。

叶酸是体内重要的辅酶,为一碳单位的载体参与嘌呤、嘧啶等重要物质的合成,体内的活性形式为 5-甲基四氢叶酸,是同型半胱氨酸复甲基化的甲基单位提供者,而且在嘌呤和嘧啶碱基的合成及氨基酸的转换中发挥重要的作用。且文献报道叶酸能明显抑制同型半胱氨酸致动脉粥样作

1.4 [³H]-TdR 参入量测定

选用生长良好的第 4 至第 6 代 VSMC,用培养液调整细胞密度为每毫升 1×10⁵ 个细胞,接种于 24 孔培养板,每孔 1mL。培养 24h 后更换无 FBS 的 DMEM 培养 24h,然后加入 10% FBS 和 0.25,0.5,1.0mmol·L⁻¹ 同型半胱氨酸;1.0mmol·L⁻¹ 同型半胱氨酸加 0.1mmol·L⁻¹ 叶酸。孵育 16 h 后每孔内加入 37MBq·L⁻¹ [³H]-TdR,孵育 8h,加入冷 PBS 液终止反应,并用 10% 三氯醋酸固定,1mol·L⁻¹ 氢氧化钠裂解,加入闪烁液在液闪计数仪上测定 [³H]-TdR 参入量(cpm 值)。重复 3 次,每次取 3 复孔平均值。

1.6 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 差表示,组间差异比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 同型半胱氨酸对血管平滑肌细胞周期和 [³H]-TdR 掺入的作用

从表 1 可见,加入 0.25,0.5,1.0mmol·L⁻¹ 同型半胱氨酸 24h 后,G₀/G₁ 期细胞所占比例均显著少于对照组,而 S 期细胞均高于对照组,G₂/M 细胞在加入同型半胱氨酸 24h 后无明显变化,说明加入同型半胱氨酸后细胞停滞于 S 期。1.0mmol·L⁻¹ 同型半胱氨酸组与 1.0mmol·L⁻¹ 同型半胱氨酸组加 0.1mmol·L⁻¹ 叶酸组相比,叶酸能使 G₀/G₁ 期细胞所占比例显著增加,而 S 期细胞所占比例显著减少,能抑制同型半胱氨酸使细胞停滞于 S 期。同型半胱氨酸呈剂量依赖关系促进 VSMC [³H]-TdR 掺入,与对照组(cpm 值为 16 534±983)相比,0.25mmol L⁻¹ (cpm 值为 18 676±674),0.5 mmol L⁻¹ (cpm 值为 21 347±869) 同型半胱氨酸即能产生显著差异($P<0.05$)、1.0mmol L⁻¹ (cpm 值为 8 265±564) 则差异更显著($P<0.01$)。

用^[2]。

细胞增殖是取决于增殖细胞在细胞外信号的影响下细胞周期的有序进展,细胞周期主要依次由 G₁, S, G₂ 和 M 4 个期组成,且存在两个限制点,即 G₁-S 限制点和 G₂-M 限制点,这其中 G₁-S 限制点更为重要,是细胞中很多调节因子及胞外刺激作用的位点^[3-4]。

本实验结果显示同型半胱氨酸能使 G₀/G₁ 期细胞数明显减少,S 期细胞数明显增多,而且能有效增加 VSMC 的 [³H]-TdR 参入,说明同型半胱氨酸能使 VSMC 增殖周期停滞于 S 期来促进 VSMC 的增殖。叶酸能明显抑制同型半胱氨酸诱导的 G₀/G₁ 期细胞数减少,S 期细胞增多,同时也能抑制

同型半胱氨酸诱导 VSMC 的 $[^3\text{H}]$ TdR 参入,与 Buemi 等^[5]报道叶酸能抑制同型半胱氨酸诱导的 VSMC 增殖的实验结果相类似。Brennan J 等报道同型半胱氨酸呈剂量依赖性增加 VSMC 的 DNA 的合成和细胞增殖,叶酸能明显抑制其作用,但维生素 B₆和维生素 B₁₂不能抑制其作用与本实验报道相类似^[6]。

细胞周期是控制细胞增殖的关键环节,同型半胱氨酸通过对细胞周期的调控,使细胞停滞于 S 期来促进 VSMC 的增殖可能是其致动脉粥样硬化的主要机制,叶酸能明显抑制同型半胱氨酸诱导的血管平滑肌细胞增殖,为其在心血管疾病防治中的应用提供理论依据。

参考文献

- [1] Welch G N, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis[J]. N Eng J Med, 1998, 338(15):1042-1050.
- [2] Zak A, Zeman M. Consequences of moderate hyperhomocysteine-

mia in the internal medicine [J]. Cas Lek Cesk. 2004;143(6): 367-374.

- [3] Hou YZ, Yang J, Zhao GR, *et al.* Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II [J]. Eur J Pharmacol. 2004;499(1-2):85-90.
- [4] Zhang YH, Fang LH, Ku BS. Fangchinoline inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression through inhibition of ERK1/2 activation and c-fos expression [J]. Biochem Pharmacol. 2003;66(9):1853-1860.
- [5] Buemi M, Marino D, di Pasquale G, *et al.* Effects of homocysteine on proliferation, necrosis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture and influence of folic acid [J]. Thromb Res. 2001;104(3):207-213.
- [6] Carmody BJ, Arora S, Avena R, *et al.* Folic acid inhibits homocysteine-induced proliferation of human arterial smooth muscle cells [J]. J Vasc Surg: 1999, 30(6):1121-1128.

收稿日期:2005-02-22