

·基础研究·

不同浓度的烟焦油与尼古丁对脐静脉内皮细胞增殖作用的研究

吴雨径^{1,2}, 张晶^{3*}, 赖斌¹, 李屹¹, 魏玉杰¹, 刘惠亮^{1*}

(1.武警总医院, 北京 100039; 2.武警后勤学院, 天津 300309; 3.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410208)

〔摘要〕目的 研究不同浓度烟焦油与尼古丁对人脐静脉内皮细胞增殖的影响。方法 采用I型胶原酶消化法从人脐静脉中分离人脐静脉内皮细胞, VIII因子免疫细胞化学染色方法鉴定分离、培养的脐静脉内皮细胞(HUVECs), CCK-8法、BrdU染色法检测不同浓度焦油与尼古丁对HUVECs增殖的影响。结果 1、VIII因子免疫细胞化学染色法显示人脐带中分离、培养的HUVECs阳性率大于95%。2、细胞培养至6 h, 50 mg/L焦油组A(450)值低于对照组A(450), 具有统计学意义($P<0.05$); 细胞培养至24 h, 50 mg/L焦油组A(450)值低于其他各组A(450)值, 具有统计学意义($P<0.05$); 而不同浓度尼古丁组6 h、24 h与对照组相比随浓度的升高, A(450)值呈现逐渐升高的趋势, 但无统计学意义。3、细胞培养至6 h, 不同浓度焦油组BrdU阳性率无统计学意义; 细胞培养至24 h, 50 mg/L焦油组BrdU阳性率低于其他各组, 具有统计学意义($P<0.05$); 不同浓度尼古丁组6 h、24 h与对照组相比BrdU阳性率无统计学意义。结论 50 mg/L焦油抑制HUVECs的增殖, 尼古丁具有增强HUVECs增殖的趋势。

〔关键词〕 焦油; 尼古丁; 增殖; 脐静脉内皮细胞**〔中图分类号〕**R285 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.06.007

Study of Cigarette Tar and Nicotine with Different Concentrations on the Proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WU Yujing^{1,2}, ZHANG Jing^{3*}, LAI Bin¹, LI Yi¹, WEI Yujie¹, LIU Huiliang^{1*}

(1. General Hospital of the Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 2. Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China; 3. Medical Department, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) under different tar and nicotine conditions. **Methods** HUVECs were isolated by type I collagenase digestion. After passage cultivation, we used the factor VIII related antibody to identify endothelial cell. CCK-8 assay and BrdU staining were used to estimate the effect of tar and nicotine on proliferation of HUVECs. **Results** 1. VIII related antibody staining showed that more than 95% were endothelial cells in cultured cells. 2. A values at 450 nm of 50 mg/mL tar group were reduced than the control group after culturing for 6 h ($P<0.05$). A value of 50 mg/mL tar group were reduced compared with any other groups after culturing for 24 h ($P<0.05$). With the increasing of nicotine concentration, A values were gradually increased in nicotine groups compared with control group. However, there were no significant differences. 3. BrdU positive rates of HUVECs had no significant difference between tar groups compared with control group after cultivation for 6 h. The BrdU positive rate of

〔收稿日期〕2016-03-10**〔基金项目〕**国家自然科学基金资助项目(81370315)。**〔作者简介〕**吴雨径,女,在读硕士研究生,研究方向:冠心病的防治。**〔通讯作者〕*** 刘惠亮,男,教授,主任医师,博士研究生导师, E-mail:lh1518@vip.sina.com; 张晶,男,医师, E-mail:86413123@qq.com。

50 mg/mL tar group were reduced comparing with any other groups after culturation for 24 hours ($P < 0.05$). There was no significant difference of BrdU positive rate between nicotine groups and control group after cultivation for 6 h and 24 h.

Conclusion The 50 mg/L Tar can inhibit the proliferation of HUVECs, however nicotine has the tendency of stimulate the proliferation of HUVECs.

[**Keywords**] tar; nicotine; proliferation; umbilical vein endothelial cells

吸烟是心血管疾病的独立危险因素。有报道称急性冠脉综合征猝死患者超过三分之二为吸烟人群,而戒烟可明显减少这类心血管事件的发生^[1]。在美国、英国及法国等地城市颁布公共场所禁烟令后,急性冠脉血栓事件的发生明显减少。在临床实践及以往文献报道^[2]发现吸烟可以引起血管内血栓形成,引起急性心肌梗死的发生,是急性冠脉综合征的独立危险因素。烟草中尼古丁增加心肌细胞对儿茶酚胺类的敏感性,焦油增加血液中血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)含量,并且对内皮细胞产生细胞毒性^[3-5]。但吸烟导致血管内血栓形成的机制仍不清楚^[6]。血管内皮细胞在维持血流通畅、抵抗血栓形成等方面发挥着关键作用。焦油、尼古丁作为烟草中两种重要的有害物质,被人们广泛研究,但罕见报道其对内皮细胞的影响。本研究拟明确烟草中焦油和尼古丁对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖的影响,以期为进一步研究焦油、尼古丁导致血管内血栓形成的机制做出重要的前期研究。

1 材料与方法

1.1 材料

Medium200 培养基、低血清生长添加剂(LSGS)、胰蛋白酶、I 型胶原酶购自美国 Gibco 公司,尼古丁购自美国 Sigma 公司;焦油由中国科学院烟草研究所惠赠;TNF- α 购自以色列 ProSpec 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司;羊抗鼠 IgG FITC 抗体、BrdU 抗体购自英国 Abcam 公司;兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体、DAB 显色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 原代细胞培养、传代及鉴定

由武警总医院妇产科提供健康产妇剖宫产脐带,从脐带脐静脉中分离培养原代 HUVECs,第 2~3 代细胞用于实验。

1.2.1 原代 HUVECs 分离培养,参照文献^[7]方法并加以改进 武警总医院剖宫产术后,无菌条件取健康产妇的新鲜脐带,放入盛有 4 ℃生理盐水的无菌烧杯中;超净台紫外灭菌 30 min,将脐带放在小托盘内,用无菌剪剪去两端被钳夹的血肿部位,生理盐水将脐带冲洗干净,尽量挤净脐带内的残留血凝块;生理盐水冲洗脐带两头,于脐静脉一端固定结扎三通管(入口),生理盐水经三通管冲洗脐静脉内腔;脐静脉另一端再固定结扎三通管(出口),由三通管入口处注入 37 ℃ 0.1% I 型胶原酶,见出口处流出淡黄色液体后,关闭出口处三通管;继续注入 I 型胶原酶液,脐带膨胀后,关闭入口处三通管,将脐带放入已盛有 37 ℃生理盐水的无菌烧杯中,静置消化 20 min;将消化液收集至 50 mL 离心管中;1 000 r/min 4 ℃离心 10 min,加入 10% FBS 的内皮细胞培养基重悬,按 1×10^5 /mL 的细胞密度种入 25 cm² 培养瓶中,37 ℃,5%CO₂ 孵箱内培养;每 2~3 d 换液 1 次,5~6 d 观察细胞融合 80%~90%时传代。

1.2.2 HUVECs 传代培养 吸出培养瓶中培养液,加入 2 mL 0.25%胰蛋白酶,低倍镜下观察细胞皱缩变圆时,将培养瓶直立,迅速吸出胰酶;加入 37 ℃ 10%FBS 的内皮细胞培养基 12~15 mL 终止消化;轻柔吹打均匀,1:3 传代。

1.2.3 HUVECs 鉴定 按 1×10^5 /mL 的细胞浓度传代至 6 孔板内 2 mL,观察孔内细胞 80%融合后弃上清,PBS 漂洗 3 次 \times 2 min;4%多聚甲醛固定 5 min,PBS 漂洗 3 次 \times 5 min;3% H₂O₂ 室温孵育 5 min,PBS 漂洗 3 次 \times 5 min;每孔加入封闭液

2 mL,室温静置 1h;吸出封闭液,加入兔抗人Ⅷ因子多克隆抗体工作液,湿盒内 4℃过夜,PBS 漂洗 3 次×5 min;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG,湿盒内室温 60 min,PBS 漂洗 3 次×5 min;加入 DAB 显色液,显色 5-10 min,光镜下观察染色效果,PBS 漂洗以终止显色;苏木素复染,PBS 漂洗 3 次×5 min,晾干后光镜下摄片。

1.3 实验分组

(1)对照组:单纯培养液中加入一定体积的甲醇溶液同步培养;(2)不同浓度焦油 6 h 组:焦油终浓度分别为 50 mg/L、20 mg/L、10 mg/L、1 mg/L,共同孵育 6 h;(3)不同浓度焦油 24 h 组:焦油终浓度分别为 50 mg/L、20 mg/L、10 mg/L、1 mg/L,共同孵育 24 h;(4)不同浓度尼古丁 6 h 组:尼古丁终浓度分别为 10~3 mol/L、10~5 mol/L、10~7 mol/L、10~9 mol/L,共同孵育 6 h;(5)不同浓度尼古丁 24 h 组:尼古丁终浓度分别为 10~3 mol/L、10~5 mol/L、10~7 mol/L、10~9 mol/L,共同孵育 24 h。

1.4 CCK-8 法检测焦油与尼古丁对 HUVECs 增殖的影响

HUVECs 以 1×10^5 /mL 细胞密度接种至 96 孔板,100 uL/孔;每组设 5 个平行孔,待分组培养结束后,每孔加入 10 uL CCK-8 溶液 37℃,5%CO₂ 孵箱内培养 4 h,酶标仪 450 nm 波长测定吸光度 A 值,实验重复 3 次。

1.5 BrdU 染色法检测焦油与尼古丁对 HUVECs 增殖的影响

HUVECs 以 1×10^5 /mL 细胞密度接种至 24 孔板,1 mL/孔;待细胞培养至 6 h 及 24 h 后加入 BrdU 掺入剂(使 BrdU 终浓度为 20 μM/L),培养 2 h 后 4%多聚甲醛固定 30 min。PBS 缓冲液清洗 5 min ×3 次;2 mol/L HCl 室温处理 12 min;用 0.1 mol/L 硼酸钠(pH=8.5)中和 12 min,并用 PBS 缓冲液冲洗 10 min×3 次;Triton-PBS 缓冲液进行细胞打孔 30 min;1% BSA 溶液稀释的 BrdU 抗体(1:100)进行一抗孵育,4℃过夜;PBS 缓冲液清洗 5 min×3 次;加入抗鼠-Cy3 二抗,于室温条件下

避光孵育 2 h;PBS 缓冲液清洗 5 min×3 次;用 DAPI 染料浸染细胞核,避光条件下室温孵育 15 min;PBS 缓冲液清洗 5 min×3 次后甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以 Means 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),Levene's 法检验多组间方差齐性,SNK-q 检验比较多组间两两差异;方差不齐,用 Kruskal-Wallis H 检验比较各组间差异,Nemenyi 法检验比较每两组间差异。用 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 原代 HUVECs 细胞形态及鉴定

成功从脐带中分离、培养及传代 HUVECs。细胞呈多角形或者短梭形,融合为单层,核仁清晰可见(图 1A)。Ⅷ因子免疫细胞化学染色阳性,可见 95% 以上的内皮细胞胞浆内含有棕色颗粒,可以证实培养的细胞为内皮细胞(图 1B)。

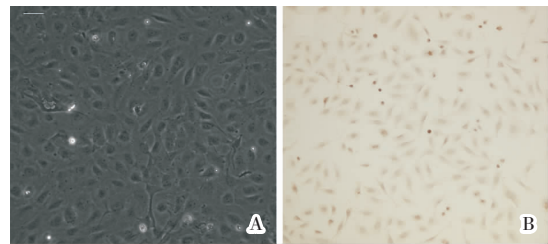


图 1 A:原代人脐静脉内皮细胞;B:经免疫组化染色Ⅷ因子鉴定的人脐静脉内皮细胞(10×10)

2.2 CCK-8 法检测焦油与尼古丁对 HUVECs 增殖的影响

酶标仪检测不同浓度焦油与尼古丁孵育 HUVECs 6 h、24 h 后对 HUVECs 增殖的影响,结果以吸光度 A 值表示,见(表 1-2)。细胞培养至 6 h,50 mg/L 焦油组 A(450)值低于对照组 A(450),具有统计学意义($P < 0.05$);细胞培养至 24 h,50 mg/L 焦油组 A(450)值低于其他各组 A(450)值,具有统计学意义($P < 0.05$);而不同浓度尼古丁组 6 h、24 h 与对照组相比随浓度的升高,A(450)值呈现逐渐升

高的趋势,但无统计学意义(表 1-2)。

表 1 不同浓度焦油对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

组别	CCK-8(A450)	
	$(\bar{x}\pm s, n=15)$	
	6 h	24 h
对照组	1.281±0.120	1.373±0.127
1 mg/L 焦油组	1.235±0.102	1.328±0.157*
10 mg/L 焦油组	1.165±0.109	1.319±0.122*
20 mg/L 焦油组	1.163±0.145	1.270±0.198*
50 mg/L 焦油组	1.135±0.138 [△]	1.058±0.124 [△]

注:与对照组比,△ $P<0.05$;与 50 mg/L 焦油组比,* $P<0.05$ 。

2.3 BrdU 染色检测焦油与尼古丁对 HUVECs 增殖的影响

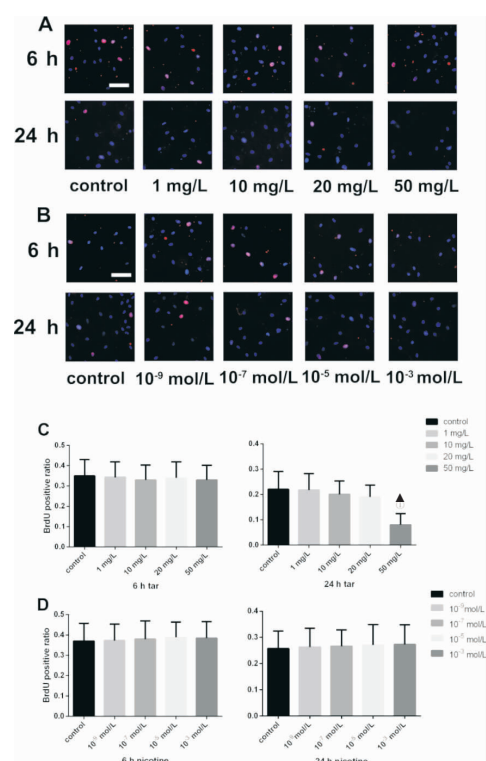
BrdU 阳性染色检测不同浓度焦油与尼古丁孵育 HUVECs 6 h、24 h 后对 HUVECs 增殖的影响,结果如图 2 所示。细胞培养至 6 h,各焦油组 BrdU 阳性率与对照组相比没有统计学意义;细胞培养至 24 h,50 mg/L 焦油组 BrdU 阳性率低于其他各组,具有统计学意义($P<0.05$);不同浓度尼古丁组 6 h、24 h 与对照组相比,BrdU 阳性率无统计学意义。

表 2 不同浓度尼古丁对人脐静脉内皮细胞增殖的影响

组别	CCK-8(A450)	
	$(\bar{x}\pm s, n=15)$	
	6 h	24 h
对照组	1.197±0.109	1.247±0.139
10-9 mol/L 尼古丁组	1.182±0.121	1.292±0.120
10-7 mol/L 尼古丁组	1.213±0.103	1.321±0.175
10-5 mol/L 尼古丁组	1.273±0.114	1.345±0.107
10-3 mol/L 尼古丁组	1.312±0.098	1.371±0.109

3 讨论

吸烟是心血管疾病的重要危险因素。研究发现急性冠脉综合征患者术后发生支架内血栓的几率吸烟者明显大于不吸烟者^[8]。这引起了研究者们对烟草中重要成分:焦油及尼古丁,与心血管疾病之间关系的探究兴趣。焦油、尼古丁作为烟草中两种重要的有害物质被人们广泛研究,它们在诱发各种机体反应中起着十分重要的作用,不仅可以激活血管 NADH/NADPH 氧化酶系统、活化炎性细胞、改变抗氧化酶系统的活性、减少 NO 的产生并降低其生物活性、增加血液中内皮素含量,而且还能调控细



注:与其他各组比,▲ $P<0.05$ 。

图 2 A: 不同浓度焦油组 HUVECs 的 BrdU 染色; B: 不同浓度尼古丁组 HUVECs 的 BrdU 染色 (标尺:80 μm); C: 不同浓度焦油组 BrdU 染色阳性率比较; D: 不同浓度尼古丁组 BrdU 染色阳性率比较。

胞凋亡与增殖^[9]。本研究通过 BrdU 染色实验显示细胞培养 6 h,50 mg/L 焦油组与对照组相比无统计学意义,细胞培养 24 h,1 mg/L、10 mg/L、20 mg/L 组与对照组没有统计学意义,这与 CCK-8 实验不一致,但能观察到随着焦油浓度的升高其抑制内皮细胞增殖的趋势越明显。CCK-8 实验是通过 WST-8 在电子耦合试剂存在的情况下,被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臞产物,颜色的深浅与细胞的增殖成正比,与细胞毒性成反比。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值,间接反映活细胞数量,而 BrdU 阳性细胞则是直接代表细胞的增殖情况,所以 50mg/L 焦油组抑制脐静脉内皮细胞的增殖。

既往研究^[10]也发现焦油中有害成分可以明显使内皮细胞损伤甚至死亡,这可能是吸烟导致血管内血栓形成的机制之一。本研究还观察到随着尼古丁浓度的升高其增加内皮细胞增殖的趋势越明显。以往研究^[11]报道在对内皮细胞急性刺激干预 6 h,尼古

丁可增加内皮细胞增殖,抑制内皮细胞凋亡,其研究观察到尼古丁急性刺激干预可上调内皮细胞氮氧合酶(eNOS)的表达,升高局部NO浓度,进而促进其增殖,但其损害内皮细胞的功能,同样可导致血管内血栓的形成,这与本研究结果一致。现有的抗血栓治疗主要针对血栓形成过程的干预^[12],期待开发保护内皮功能等药物的研制,从血栓形成的上游因素阻碍血栓的形成。

另外,本研究因为选用的最长时间仅24h,所以只是研究了焦油、尼古丁短时间内对内皮细胞增殖的作用效果,并未研究其慢性暴露后的可能变化,这是本研究的局限性之一,期待进一步研究证实焦油、尼古丁对内皮细胞长期作用的影响,并且进一步阐明其可能机制及其下游效应。

参考文献:

- [1] Méndez D, Alshanteety O, Warner KE. The potential impact of smoking control policies on future global smoking trends[J]. *Tob Control*, 2013,22(1):46-51.
- [2] Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, et al. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study[J]. *Lancet*. 2006,368(9536): 647-58.
- [3] Blann AD, McCollum CN. Adverse influence of cigarette smoking on the endothelium [J]. *Thromb Haemost*, 1993,70 (4):707-11.
- [4] D'Alessandro A, Boeckelmann I, Hammwhoner M, et al. Nicotine, cigarette smoking and cardiac arrhythmia: an overview[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2012,19(3):297-305.
- [5] Zhang G, Xu X, Su W, et al. Smoking and risk of venous thromboembolism: a systematic review[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2014,45(3):736-745.
- [6] Barua RS, Ambrose JA. Mechanisms of coronary thrombosis in cigarette smoke exposure [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013,33(7):1 460-1 467.
- [7] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973,52(11):2 745-2 756.
- [8] Cornel JH, Becker RC, Goodman SG, et al. Prior smoking status, clinical outcomes, and the comparison of ticagrelor with clopidogrel in acute coronary syndromes -insights from the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial[J]. *Am Heart J*, 2012,164(3):334-342.
- [9] Mongirdiene A, Viezheliene D, Kurshvetene L. Effect of nicotine and tar present in cigarette smoke on the process of atherogenesis[J]. *Kardiologia*, 2012,52(9):87-93.
- [10] Sharma A, Patil JA, Gramajo AL, et al. Effects of hydroquinone on retinal and vascular cells in vitro [J]. *Indian J Ophthalmol* 2012,60(3):189-193.
- [11] Park HS, Cho K, Park YJ, et al. Chronic nicotine exposure attenuates proangiogenic activity on human umbilical vein endothelial cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011,57(3):287-293.
- [12] 石 雕,彭延古.抗血栓中药的研究现状[J].*湖南中医药大学学报*, 2011,31(9):75-78.

(本文编辑 李 杰)