

## 论著

## 锶矿泉水对人血管内皮细胞的增殖和功能的影响

蔺艳<sup>1</sup>, 张莹茜<sup>1</sup>, 盘强文<sup>1</sup>, 冯志强<sup>1</sup>, 李著华<sup>1</sup>, 赵成涛<sup>2</sup>, 冉兵<sup>1</sup>

(1. 泸州医学院生理教研室, 四川 泸州 646000; 2. 四川省泸州市云峰集团, 四川 泸州 646000)

**摘要:**目的 观察不同浓度的锶矿泉水对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)增殖及分泌的影响, 研究其对血管内皮细胞功能的作用。方法 HUVEC细胞分为2、4、6、8 mg/L锶矿泉水(SMW)组和双蒸水(DDW)组, 以 $4 \times 10^4$ 个/ml的浓度接种于培养板中, 18 h后, 换成条件培养基培养至96 h。分别于24、48、72和96 h时, 以细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法观察细胞的增殖情况。培养72 h的细胞分别用苏木素染色后, 观察细胞生长状态, 以及用BCA蛋白化试剂盒测蛋白含量, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测培养基中血管内皮生长因子(VEGF)、一氧化氮(NO)和内皮素(ET)的含量。结果 培养72 h后, 2和4 mg/L SMW组细胞增殖速度快于DDW组( $P < 0.05$ ); 8 mg/L SMW抑制HUVEC增殖( $P < 0.05$ ); 培养至72 h时, 各浓度的SMW组细胞分泌VEGF的量较DDW组均降低( $P < 0.05$ ), 其组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 2和4 mg/L SMW组分泌ET和NO减少( $P < 0.05$ ), 而6和8 mg/L SMW组分泌增多( $P < 0.05$ ), 但同一浓度下, ET和NO分泌变化呈正相关。4 mg/L SMW组NO/ET值增大( $P < 0.05$ ), 其余各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 一定浓度的锶矿泉水可促进血管内皮细胞增殖, 影响内皮细胞ET和NO分泌, 降低血管紧张性。VEGF并不直接参与锶矿泉水促进血管内皮细胞的增殖。

**关键词:** 锶; 矿泉水; 血管内皮细胞; 增殖; 血管内皮生长因子; 一氧化氮; 内皮素; 食品

中图分类号: O614.232; R155.1; Q503 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)02-0136-04

### Effects of strontium mineral water on proliferation and function of human umbilical vein endothelial cells

Lin Yan, Zhang YingQian, Pan Qiangwen, Feng Zhiqiang, Li Zhuhua, Zhao Chengtao, Ran Bing  
(Department of Physiology, Luzhou Medical College, Sichuan Luzhou 646000, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of strontium mineral water (SMW) on proliferation and secretion of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) at different strontium concentration. **Methods** HUVEC were cultured in vitro. After culturing in a normal Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) for 18 hours, the cells were transferred to the conditioned medium with 2, 4, 6, 8 mg/L strontium mineral waters and double distilled water (DDW) treatment. The proliferation of cells was observed by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay at 24th, 48th, 72nd and 96th hours. Cell growth was observed by hematoxylin staining at 72nd hours. Meanwhile, cell protein was measured by Enhanced BCA Protein Assay kit and levels of extracellular vein endothelial growth factor (VEGF), nitric oxide (NO) and endothelin (ET) were tested by enzyme-linked immuno sorbent assay (Elisa). **Results** The proliferation activity of cells in 2 and 4 mg/L SMW groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while significantly decreased in 8 mg/L SMW group ( $P < 0.05$ ) after 72 hours. Total of extracellular VEGF in SMW groups were lower than DDW group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between SMW groups ( $P > 0.05$ ) after 72 hours. NO and ET of cells in 2 and 4 mg/L groups were hyposecretion, while 6 and 8 mg/L groups were on the contrary. NO/ET ratio of 4 mg/L SMW group was higher than the others ( $P < 0.05$ ), and the difference of NO/ET ratio between the other groups was not significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** A certain concentration of strontium in mineral water is good for proliferation of HUVEC. It could affect HUVEC secretion function of ET and NO, and decrease vascular tone. VEGF was not the direct factor which enhanced the proliferation activity of HUVEC culturing in strontium mineral water.

**Key words:** Strontium; mineral water; vascular endothelial cell; proliferation; vascular endothelial growth factor (VEGF); nitric oxide(NO); endothelin(ET); food

收稿日期: 2012-12-19

基金项目: 四川省卫生厅课题(090188)

作者简介: 蔺艳 女 讲师 研究方向为肾功能保护 E-mail: ymndemail@sohu.com

通信作者: 冉兵 男 副教授 研究方向为肾功能保护及心肾反射 E-mail: rbf@163.com

锶矿泉水因富含对人体有益的微量元素锶,而越来越被人们关注。研究表明,饮用水中锶水平与高血压、心脏病病死率呈显著负相关<sup>[1]</sup>;且饮用水中锶水平越低,心血管疾病病死率越高<sup>[2]</sup>。有学者曾建议我国饮用水中锶含量的上限应提高到10 mg/L<sup>[3]</sup>,市售的天然高锶矿泉水正逐渐成为市场保健饮品的热点。国外已有关于微量元素锶对心血管疾病影响的相关研究报道<sup>[4-5]</sup>。

血管内皮细胞是循环血液与血管壁之间的分界细胞,可分泌多种活性物质,以维持血管稳态。大量研究发现内皮功能障碍是引起动脉粥样硬

化、血管炎等多种心血管疾病的始发因素<sup>[6-7]</sup>。本试验研究不同浓度的锶矿泉水对人脐静脉血管内皮细胞增殖及分泌的影响,旨在为合理应用天然高锶矿泉水以及心血管疾病的预防保健提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC,泸州医学院药物与功能性食品研究中心提供);天然高锶矿泉水(四川省泸州市云峰集团提供),其主要成分见表1。

表1 高锶矿泉水的主要成分

Table 1 Composition of strontium mineral water

成分	锶 Sr <sup>2+</sup>	偏硅酸 H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	锌 Zn <sup>2+</sup>	钾 K <sup>+</sup>	钠 Na <sup>+</sup>	钙 Ca <sup>2+</sup>	镁 Mg <sup>2+</sup>	pH值
含量(mg/L)	2~8	25~40	≥0.01	≥0.03	≥20	≥15	≥0.4	7.4±0.4

OLYMPUS IX81 显微镜、CO<sub>2</sub>恒温培养箱(日本三洋公司)、酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

DMEM 液体及干粉培养基(高糖,美国 Gibco 公司)、胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、苏木素染液(中杉金桥生物科技有限公司);CCK-8 试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)青链霉素(均购于碧云天生物技术研究);人 VEGF ELISA 试剂盒、人 NO ELISA 试剂盒及人 ET ELISA 试剂盒(均购于美国 RD 公司);双蒸水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试验分组

HUVEC 细胞分为 2、4、6、8 mg/L 锶矿泉水(SMW)组和对照组[即双蒸水(DDW)组]。

#### 1.2.2 条件培养基的制备

分别用锶浓度约为 2、4、6、8 mg/L 的锶矿泉水和双蒸水配制 DMEM 高糖培养基,除菌后加入胎牛血清和双抗。培养基中胎牛血清和双抗的体积各占 10% 和 1%。

#### 1.2.3 细胞培养

第三代 HUVEC 细胞以 4 × 10<sup>4</sup> 个/ml 的浓度接种于培养板,加入 DMEM 液体培养基(高糖),置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育。18 h 后,弃原培养基,分组加入等量的条件培养基。隔天换液。

#### 1.2.4 细胞增殖试验及生长曲线绘制

细胞分组接种于 96 孔板,每组设 8 个复孔,同时每组设 3 个只加入相应条件培养基的空白对照孔。培养至 24、48、72 和 96 h,分别用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)测试细胞活性。每孔加入 10 μl CCK-8 溶液(与起始体积比 1:10),37 °C 孵育 1.5 h,用酶标仪在波长 450 nm 下读取各孔的吸光值(OD 值),

根据以下公式计算吸光值:OD treated - OD blank,以计算出的吸光值绘制生长曲线。

细胞分组接种于 6 孔板中,培养至 72 h,经苏木素染色,观察细胞增殖状态。

#### 1.2.5 蛋白定量试验及培养液中 VEGF、NO、ET 检测

细胞分组接种于 6 孔板,每组设 6 个复孔。18 h 后,分别换成条件培养基,培养至 72 h,收集细胞,用 BCA 蛋白化验试剂盒检测蛋白含量,用 Elisa 法检测上清液中 VEGF、NO、ET 含量。

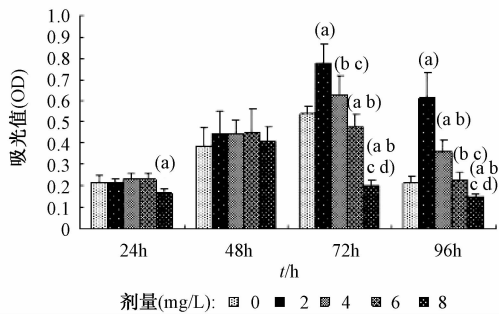
### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,LSD 法进行两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,相关性分析选用 Spearman 双侧检验, $P < 0.05$  为相关性有统计学意义。

## 2 结果

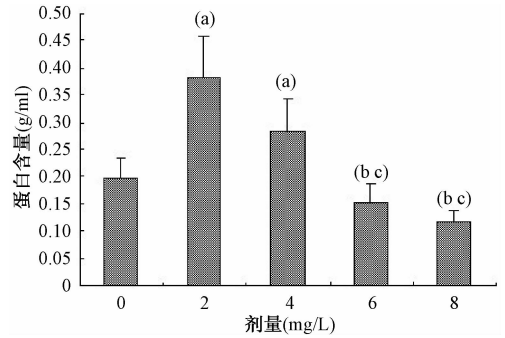
### 2.1 不同浓度的锶矿泉水对 HUVEC 细胞增殖的影响

图 1 显示,培养至 72 h 时,2 和 4 mg/L SMW 组细胞增殖速度快于 DDW 组及 6 mg/L SMW 组( $P < 0.05$ ),8 mg/L SMW 组增殖速度最慢,与各组间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。培养至 96 h 时,细胞增殖整体出现回落,但 2 和 4 mg/L SMW 组细胞增殖速度依然快于 DDW 组和其它各组( $P < 0.05$ )。图 2 中细胞核染色及图 3 中蛋白含量的结果也显示培养至 72 h,2 和 4 mg/L SMW 组细胞的数量和蛋白含量均比 DDW 组多( $P < 0.05$ ),8 mg/L SMW 组细胞数量及蛋白含量少于 DDW 组、2 和 4 mg/L SMW 组( $P < 0.05$ )。



(a) 与 DDW 组比  $P < 0.05$ ; (b) 与 2 mg/L SMW 组比  $P < 0.05$ ; (c) 与 4 mg/L SMW 组比  $P < 0.05$ ; (d) 与 6 mg/L SMW 组比  $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度锶矿泉水对 HUVEC 增殖的影响  
Figure 1 Effects of different strontium mineral water on proliferation of HUVEC



(a) 与 DDW 组比  $P < 0.05$ ; (b) 与 2 mg/L SMW 组比  $P < 0.05$ ; (c) 与 4 mg/L SMW 组比  $P < 0.05$

图 3 72 h 时各组蛋白含量情况  
Figure 3 Protein concentration of each group on 72nd hour

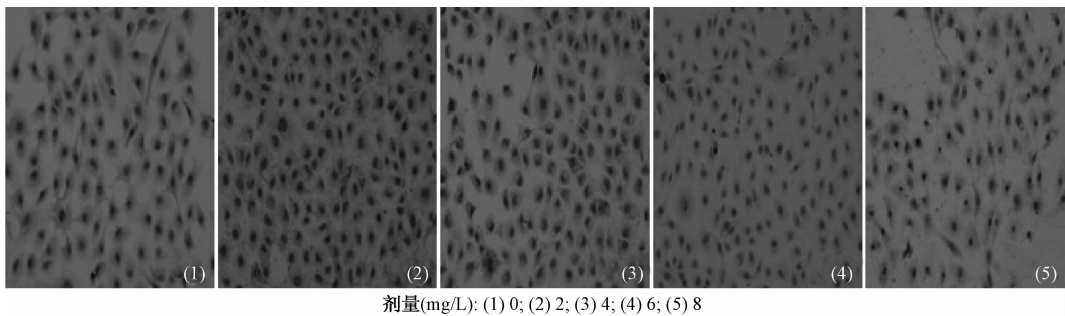


图 2 HUVEC 培养至 72 h 时的增殖状态 (苏木素  $\times 200$ )  
Figure 2 Proliferation status of HUVEC on 72nd hour (hematoxylin  $\times 200$ )

### 2.2 不同浓度的锶矿泉水对 HUVEC 细胞分泌 VEGF、NO 和 ET 的影响

表 2 的结果显示,细胞培养至 72 h 时,各浓度的 SMW 组分泌 VEGF 的量较 DDW 组均减少 ( $P < 0.05$ ),但 SMW 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。ET 和 NO 分泌呈正相关,相关系数为 0.829,  $P <$

0.01。2 和 4 mg/L SMW 组 ET 和 NO 的分泌能力较 DDW 组均降低 ( $P < 0.05$ ),其中 4 mg/L SMW 组 ET 降低最明显 ( $P < 0.05$ ),而 6 和 8 mg/L SMW 组 ET 和 NO 均增加 ( $P < 0.05$ );4 mg/L SMW 组 NO/ET 值明显增大 ( $P < 0.05$ ),其余各组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组细胞培养至 72 h 时 VEGF 和 NO/ET 的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 VEGF, NO and ET's levels of each group on 72nd hour

剂量 (mg/L)	VEGF (pg/ml)	NO (pg/g)	ET (pg/g)	NO/ET
0	291.60 $\pm$ 20.33	1713.41 $\pm$ 241.3	2595.85 $\pm$ 103.89	0.66 $\pm$ 0.11
2	218.75 $\pm$ 14.42 <sup>(a)</sup>	846.90 $\pm$ 179.63 <sup>(a)</sup>	1196.73 $\pm$ 159.85 <sup>(a)</sup>	0.71 $\pm$ 0.11
4	209.86 $\pm$ 38.22 <sup>(a)</sup>	779.41 $\pm$ 106.17 <sup>(a)</sup>	664.02 $\pm$ 55.85 <sup>(a,b)</sup>	1.18 $\pm$ 0.2 <sup>(a,b)</sup>
6	208.92 $\pm$ 14.78 <sup>(a)</sup>	2201.34 $\pm$ 120.54 <sup>(a,b,c)</sup>	4157.85 $\pm$ 302.92 <sup>(a,b,c)</sup>	0.53 $\pm$ 0.07 <sup>(c)</sup>
8	194.19 $\pm$ 12.34 <sup>(a)</sup>	2403.33 $\pm$ 275.63 <sup>(a,b,c)</sup>	3996.23 $\pm$ 378.47 <sup>(a,b,c)</sup>	0.61 $\pm$ 0.12 <sup>(c)</sup>

注: (a) 与 DDW 组比  $P < 0.05$ ; (b) 与 2 mg/L SMW 组比  $P < 0.05$ ; (c) 与 4 mg/L SMW 组比  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

血管内皮细胞的增殖和迁徙可以促进内皮的修复以及新生血管的形成,对维持血管功能的完整性起着重要的作用<sup>[6]</sup>。本试验中内皮细胞在浓度为 2 和 4 mg/L 的 SMW 中增殖至 72 h 及以后,其增殖状态明显优于 DDW 组,表明 SMW 有促进血管内皮细胞增殖的作用。这对血管抗损伤和损伤后修复及新生血管有着重要意义。VEGF 对内皮细胞有

高度特异性,并是强有力的促细胞分裂素<sup>[8]</sup>,是血管生成过程中的关键因子,可有效刺激内皮细胞的分裂增殖<sup>[9]</sup>。鉴于此,本试验观察了内皮细胞的 VEGF 情况, HUVEC 在 SMW 组中增殖至 72 h 时,分泌的 VEGF 量总体低于 DDW 组,与增殖并无正相关,提示 VEGF 可能并不直接参与 SMW 促进离体培养的血管内皮细胞的增殖。

锶参与线粒体的构成<sup>[2]</sup>,可促进  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$

酶的活性<sup>[10]</sup>,利于细胞代谢;且  $\text{Sr}^{2+}$  与  $\text{Ca}^{2+}$  属同族元素, $\text{Sr}^{2+}$  可通过细胞膜钙泵进入细胞,与胞内磷酸肌醇受体( $\text{IP}_3\text{R}$ )结合,激活  $\text{IP}_3\text{R}$ ,引起胞浆中  $\text{Ca}^{2+}$  升高<sup>[11]</sup>,进而促进细胞有丝分裂<sup>[12]</sup>。由此,笔者推测,本试验观察到 2 和 4 mg/L 的 SMW 促 HUVEC 增殖的效应,很可能与  $\text{Sr}^{2+}$  通过上述途径引起的促增殖作用有关。但又有研究表明锶过量会干扰钙的吸收与代谢<sup>[2]</sup>,对动脉内皮细胞造成影响<sup>[4]</sup>。故 8 mg/L 的 SMW 因  $\text{Sr}^{2+}$  浓度较高,可能会干扰内皮细胞对钙离子的摄取与代谢,进而抑制其增殖,但具体机制是否如此,尚待进一步研究。

血管内皮细胞能分泌多种血管活性物质,其中 NO 和 ET 作为维持血管舒缩活动的重要物质,分别具有舒血管和缩血管作用,其比值 NO/ET 可反映血管紧张性大小。正常情况下 ET 的分泌可促进一氧化氮合成酶(NOS)的表达,进而促进 NO 的分泌,来对抗 ET 的缩血管效应<sup>[13]</sup>。ET 受体和 NOS 在基因水平精确地调节着 ET 和 NO 的平衡<sup>[14]</sup>,以维持血管的紧张性和功能状态<sup>[15]</sup>。ET 和 NO 失衡将引起内皮功能紊乱,尤其是 ET 表达增多,而 NO 释放减少<sup>[16]</sup>,最终会导致动脉硬化、血压升高等多种疾病<sup>[14]</sup>。调节 NO 和自由基清除剂则可防止内皮细胞衰老从而有利于动脉粥样硬化的恢复<sup>[17]</sup>。本试验中,2 和 4 mg/L 的 SMW 抑制 ET 和 NO 分泌,6 和 8 mg/L 的 SMW 则正相反,但 ET 和 NO 分泌始终呈正相关。表明 SMW 对 ET 和 NO 分泌有影响,但并不影响它们之间的平衡。这可能是因为 SMW 主要是影响 ET 的分泌,进而造成 NO 的分泌呈现相应的变化。较低浓度的 SMW 抑制 ET 分泌而较高浓度 SMW 促进其分泌,可能也与不同浓度的  $\text{Sr}^{2+}$  对  $\text{Ca}^{2+}$  代谢的不同影响有关,但具体机制尚待进一步研究。4 mg/L SMW 组 NO/ET 值明显增大,主要是因为该浓度下 SMW 对 ET 分泌的抑制作用最明显,而 NO 分泌并未完全成比例变化,故而使得 NO/ET 增大。提示一定浓度 SMW 可提高血管内皮细胞分泌 NO/ET 值,降低血管紧张性,防止动脉硬化和预防高血压等。

综上所述,一定浓度的锶矿泉水可促进血管内皮细胞增殖,影响内皮细胞 ET 和 NO 分泌,降低血管紧张性。这为心血管疾病的预防保健提供了新的思路,也为锶矿泉水的开发和利用提供参考依据。

## 参考文献

- [ 1 ] 秦法俊,潘伟清,华栋.微量元素与心血管疾病 II.微量元素在心血管病中的可能作用及机制[J].广东微量元素科学,2002,9(12):1-19.
- [ 2 ] 梁子羽,杨萍,李忠诚.锶与心血管疾病关系的研究进展[J].人民军医,2007,50(12):768-769.
- [ 3 ] 秦法俊,潘伟清.饮用天然矿泉水的锶限量指标[J].广东微量元素科学,2001,11(1):16-22.
- [ 4 ] Bernhard D, Rossam A, Henderson B, et al. Increased serum cadmium and strontium levels in young smokers; Effects on arterial endothelial cell gene transcription [J]. Arterioscler Thromb, 2006,26(4):833-838.
- [ 5 ] Baivert V, Baumgartner S, Pollinger B, et al. Three-year clinical follow-up after strontium-90/yttrium-90 beta-irradiation for the treatment instant coronary restenosis [J]. Am J Cardiol, 2005, 96(10):1399-1403.
- [ 6 ] 索荣,姜志胜.硫化氢与血管内皮细胞的功能[J].心血管病学进展,2012,33(1):54-56.
- [ 7 ] T Tesauro, C Cardill. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome[J]. Acta Physiological, 2011, 203(1):279-286.
- [ 8 ] Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis and therapeutic strategies [J]. Surv Ophthalmol, 2003, 48(3):257-293.
- [ 9 ] 卢秀珍,华宏生,崔彦.血管内皮生长因子与促血管生成素 1 对大鼠血管内皮细胞的作用[J].中国组织工程研究,2012,16(2):247-251.
- [ 10 ] 蔺艳,盘强文,冯志强,等.锶矿泉水对人肾小管上皮细胞增殖及 ATP 酶活性的影响[J].中国组织工程研究,2012,16(15):2801-2804.
- [ 11 ] Tomashov M R, Tchetchik D, Eldar A, et al. Strontium-induced rat egg activation[J]. Reproduction, 2005, 130(4):467-474.
- [ 12 ] Scméo. CLV Leal. JM Garcia, et al. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium[J]. Animal reproduction science, 2004, 81(2):35-46.
- [ 13 ] 孙启国.脑震荡早期血清中 NO 浓度与脑血流变化关系[J].中国实验诊断学,2011,12(15):2075-2076.
- [ 14 ] 张蕾,阮君山,严令耕,等.内皮素和一氧化氮致血管损伤性疾病的分子机制及药物研发策略[J].中国药理学通报,2012,28(2):162-165.
- [ 15 ] Kawanabe Y, Nauli S M. Endothelin [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(2):195-203.
- [ 16 ] Pradhan L, Mondal D, Chandra S, et al. Molecular analysis of cocaine-induced endothelial dysfunction; role of endothelin-1 and nitric oxide [J]. Cardiovascular Toxicology, 2008, 8(4):161-171.
- [ 17 ] Hayashi T, Iguchi A. Possibility of the regression of atherosclerosis through the prevention of endothelial senescence by the regulation of nitric oxide and free radical scavengers [J]. Geriatr Gerontol Int, 2010, 10(2):115-130.