

[文章编号] 1007-3949(2009)17-06-0431-04

· 实验研究 ·

蜂胶水提液对人脐动脉平滑肌细胞增殖作用的影响

桑 慧, 王家富, 商战平, 李卫红, 姚树桐

(泰山医学院病理生理学教研室, 山东省泰安市 271000)

[关键词] 蜂胶水提液; 血管紧张素 II; 人脐动脉平滑肌; 细胞增殖

[摘要] 目的 观察蜂胶水提液对血管紧张素 II 诱导的人脐动脉平滑肌细胞增殖作用的影响。方法 贴块法培养人脐动脉平滑肌细胞, 用 50、100 和 200 mg/L 蜂胶水提液进行干预。细胞计数法检测人脐动脉平滑肌细胞数量; 流式细胞仪检测细胞周期; 免疫细胞化学法观察增殖细胞核抗原; 分光光度计检测培养液中超氧化物歧化酶及丙二醛的含量; 用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记技术检测细胞凋亡。结果 100 mg/L 和 200 mg/L 的蜂胶水提液能减少血管紧张素 II 对细胞的增殖作用, 增加 G₀/G₁ 期细胞的百分比, 降低增殖细胞核抗原阳性率, 蜂胶各浓度组总超氧化物歧化酶活力升高, 而丙二醛含量降低, 凋亡指数降低 ($P < 0.01$)。结论 一定浓度的蜂胶水提液能抑制血管紧张素 II 诱导的人脐动脉平滑肌细胞增殖; 机制可能与蜂胶水提液影响细胞增殖周期、抑制增殖细胞核抗原的表达、提高人脐动脉平滑肌细胞抗氧化能力有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Water Extract Propolis on Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cell Proliferation

SANG Hui, WANG Jia-Fu, SHANG Zhan-Ping, LI Wei-Hong, and YAO Shu-Tong

(Department of Pathophysiology, Taishan Medical College, Taian 271000, China)

[KEY WORDS] Water Extract Propolis; Angiotensin II; Human Umbilical Artery Smooth Muscle; Cell Proliferation

[ABSTRACT] Aim To evaluate the effect of water extract propolis (WEP) on human umbilical artery smooth muscle cell proliferation (HUASMC) induced by angiotensin II (Ang II) in vitro and explore the underlying mechanism.

Methods HUASMC were cultured by the explant method and incubated with 50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L WEP.

HUASMC number was assessed by cell counting; Flow cytometry was used to test cell cycle; Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of HUASMC was detected by immunocytochemistry staining; Superoxide dismutase (SOD) and maleic dialdehyde (MDA) in HUASMC culture medium superior was measured with spectrophotometer; Apoptosis was evaluated by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL).

Results Compared to model group, the numbers, PCNA expression, MDA, Apoptosis Index of 100 mg/L and 200 mg/L WEP were lower ($P < 0.01$), while the Percentage of the Cells in G₀/G₁ phase and SOD was higher ($P < 0.01$). Conclusion Certain concentration of WEP can prevent HUASMC proliferation effect mediated by Ang II; the mechanism about WEP effect may be associated with arresting G₁ to S progression, decreasing PCNA expression and improving the antioxidation of HUSMC.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖是动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, As) 和经皮冠状动脉介入治疗术后血管再狭窄等疾病的主要病理变化^[1], 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 作为肾素-血管紧张素系统中的重要生物活性肽, 可诱导 VSMC 增殖^[2], 干预 Ang II 对 VSMC 增殖的作用已成研究的焦点。蜂胶含有丰富的黄酮类

化合物, 具有扩张冠状动脉血管、增加冠状动脉流量、增强心肌收缩力、抗血小板聚集、抗炎症、降血脂等^[3-5]多重抗 As 的作用, 但蜂胶对于 VSMC 增殖的作用尚在进一步探讨中。本研究旨在观察蜂胶水提液 (water extract propolis, WEP) 是否对 Ang II 诱导的人脐动脉平滑肌细胞 (human umbilical artery smooth muscle cell proliferation, HUASMC) 增殖具有干预作用, 并探讨其可能的机制, 为蜂胶的进一步开发和临床应用提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂

Ang II、胰蛋白酶、台盼蓝、MTT 粉剂及 DMSO

[收稿日期] 2009-03-12 [修回日期] 2009-05-10

[基金项目] 山东省自然科学基金 (Z2002C40)

[作者简介] 桑慧, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 sanghui@163.com。王家富, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为蜂胶抗动脉粥样硬化机制, E-mail 为 jfwang@tsmc.edu.cn。商战平, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化防治机制, E-mail 为 zhshang@tsmc.edu.cn。

均购自 Sigma 公司;氯沙坦购自默沙东公司;WEP 系泰山峰胶,本实验室提取,WEP 中总黄酮含量为 3.35%^[6]。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;小鼠抗人 α -肌动蛋白单克隆抗体、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记技术 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;鼠抗人增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司;即用型免疫组织化学超敏 SP 试剂盒购自中山生物技术开发有限公司;DNA 倍体分析试剂盒购自美国 BD 公司;超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 及丙二醛 (maleic dialdehyde, MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 人脐动脉平滑肌细胞的培养

取离体 3 h 之内的新鲜脐带,无菌分离脐动脉,采用组织块法进行 HUASMC 的培养,经 α -肌动蛋白单克隆抗体鉴定,纯度达 97.0%。取 3~5 代细胞进行实验。HUASMC 随机分成 4 组:对照组不加入任何药物;模型组加入 100 nmol/L 的 Ang II 作用 24 h;蜂胶水提液组分别给予 50、100、200 mg/L 的 WEP 预孵育 2 h 后加入 100 nmol/L 的 Ang II 作用 24 h;氯沙坦组 1.5 μ mol/L 的氯沙坦预孵育 2 h 后加入 100 nmol/L 的 Ang II 作用 24 h。

1.3 细胞计数

常规消化后,调整细胞密度至 5×10^7 个/L,接种于 24 孔板上,48 h 后同步化,施加处理因素干预;倒置显微镜下动态观察细胞形态学的变化,先收集细胞培养液上清,然后消化收集细胞,血细胞计数板计数各组细胞,每孔重复 4 次,求平均值。

1.4 流式细胞仪检测

常规消化后,以 1×10^8 个/L 细胞密度接种于 25 mL 的细胞培养瓶,同步化后按分组加药进行处理。收集处理后的细胞,冷的 PBS 洗细胞 2 次,按试剂盒的说明依次加入试剂 A、试剂 B 和试剂 C,上样,以激发光波长 488 nm,测定细胞 DNA;Cell Quest 软件进行细胞周期分析,计算机自动做图,统计学分析细胞增殖周期中 G_0/G_1 期的细胞所占比例。

1.5 免疫细胞化学法检测增殖细胞核抗原的表达

常规消化 HUASMC,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^8 个/L 接种于含盖玻片的 6 孔培养板中,细胞汇合至 70%~80% 时,同步化后根据分组施加处理因素。取出盖玻片,PBS (pH 7.4) 冲洗 5 min \times 3 次,室温下冷丙酮固定 10 min,然后按 SP

试剂盒的说明书进行免疫细胞染色,PCNA 阳性细胞核染成棕黄色,阴性细胞核为兰色,每张细胞片随机计算 10 个高倍视野中 PCNA 阳性细胞数及 HUA-SMC 总数,求出 PCNA 阳性细胞百分率。

1.6 TUNNEL 法检测细胞凋亡

常规细胞爬片后,按分组处理,根据 TUNNEL 试剂盒的说明染色。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞。

$$\text{PCNA 阳性细胞百分率 (\%)} = \frac{\text{PCNA 阳性细胞数}}{\text{HUASMC 总数量}} \times 100\%$$

1.7 测定培养液中总超氧化物歧化酶的活性及丙二醛含量

将收集到的各组细胞培养液离心 10 min (1 krpm),取上清作为待测样品。按试剂盒说明书进行吸光度检测。总 SOD 活力计算公式:

$$\text{总 SOD 活力 (kU/L)} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \div 50\% \times$$

$$\text{反应体系的} \times \frac{\text{样本测试前的}}{\text{稀释倍数}}$$

根据公式计算 MDA 含量:

$$\text{MDA 含量} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}} \times$$

$$\text{标准品浓度} \times \frac{\text{样本测试前的}}{\text{稀释倍数}}$$

1.8 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐动脉平滑肌细胞培养及鉴定

HUASMC 形态以长梭形为主,具有“峰-谷”状生长特征,经 α -肌动蛋白单克隆抗体鉴定,胞浆内肌动蛋白呈棕黄色,丝状顺细胞长轴平行排列,细胞核不着色,阴性对照见胞浆均为蓝色,无阳性着色,纯度达 97.0% (图 1)。各组细胞加药前后细胞形态学无明显变化,0.1% 台盼蓝染色,计数细胞存活率均达 95.0% 以上,表明所加药物无细胞毒性。

2.2 蜂胶水提液对细胞计数和细胞周期的影响

细胞计数和流式细胞仪检测结果表明,加入 Ang II 后细胞增殖加快,细胞较对照组增加 43.46%,突破 G_1 -S 限制点进入 S 期细胞增加, G_0/G_1 期细胞比例下降 11.49% ($P < 0.01$);与 Ang II 单独作用相比,加入 Ang II 的拮抗剂氯沙坦后细胞减少,停留在 G_0/G_1 期细胞比例增加 12.09% ($P < 0.01$);采用 WEP 预处理后,Ang II 对细胞增殖作用降低,100 mg/L 和 200 mg/L WEP 组降低明显 ($P < 0.01$),且 G_0/G_1 期细胞比例增加 9.87% 和 16.

22% ; 200 mg/L WEP 预处理的效果与氯沙坦组相当(表 1,图 2)。

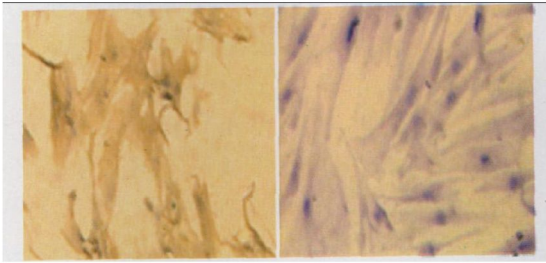


图 1. 人脐动脉平滑肌细胞培养及鉴定(200 ×) 左图为 α-肌动蛋白阳性,右图为 α-肌动蛋白阴性。

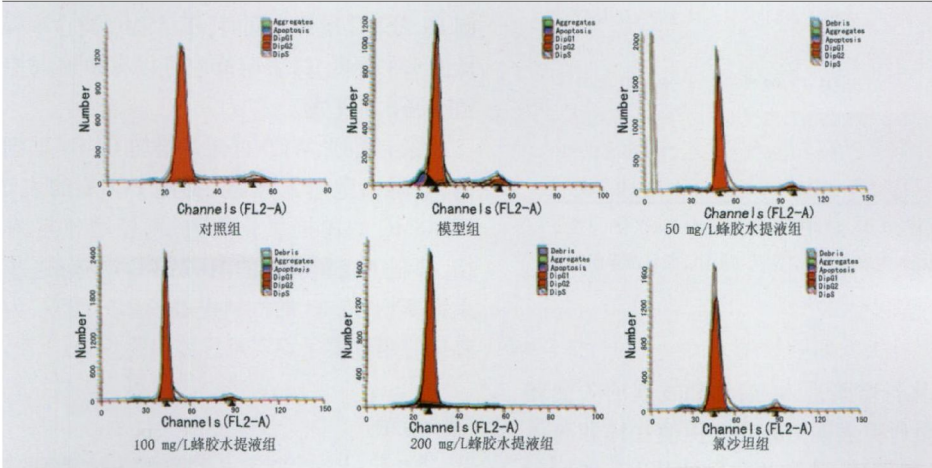


图 2. 流式细胞仪检测结果

表 1. 蜂胶水提液对细胞计数和细胞周期的影响(n=4)

分 组	细胞计数 (× 10 ⁶ /L)	G ₀ /G ₁ 期细胞 百分比
对照组	249.2 ± 9.5 ^c	91.09% ± 0.83% ^c
模型组	357.5 ± 31.2 ^{bc}	80.62% ± 4.93% ^{bc}
蜂胶水提液组		
50 mg/L	336.3 ± 16.6 ^{bc}	85.28% ± 1.41% ^{cd}
100 mg/L	300.8 ± 17.9 ^{bce}	88.58% ± 1.05% ^c
200 mg/L	263.8 ± 21.0 ^c	93.70% ± 3.75% ^c
氯沙坦组	255.8 ± 13.0 ^c	90.37% ± 1.82% ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与氯沙坦组比较。

2.3 蜂胶水提液对增殖细胞核抗原的表达、凋亡指数的影响

加入 Ang II 后 PCNA 阳性率、凋亡指数均最高, 远高于对照组、氯沙坦组 ($P < 0.01$); 采用 WEP 预处理后, PCNA 阳性率下降, 伴随细胞凋亡比例下降, 100 mg/L 和 200 mg/L WEP 组降低明显 ($P < 0.01$); 100 mg/L 和 200 mg/L WEP 预处理的效果与氯沙坦组相当 (表 2)。

表 2. 蜂胶水提液对增殖细胞核抗原的表达、凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

分 组	增殖细胞核抗原	凋亡指数
对照组	20.95% ± 1.03% ^c	5.41% ± 0.70% ^c
模型组	24.93% ± 0.95% ^b	10.16% ± 1.17% ^{bd}
蜂胶水提液组		
50 mg/L	23.08% ± 1.09% ^a	9.08% ± 0.99% ^{bd}
100 mg/L	22.10% ± 1.46% ^c	6.75% ± 0.73% ^c
200 mg/L	21.68% ± 1.79% ^c	5.75% ± 1.11% ^c
氯沙坦组	21.80% ± 1.17% ^c	6.39% ± 0.87% ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; d 为 $P < 0.01$, 与氯沙坦组比较。

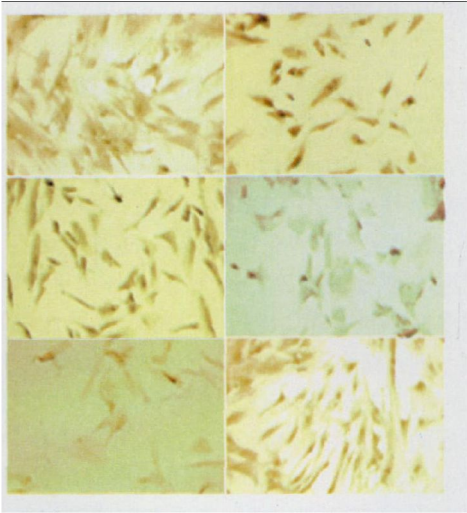


图 3. TUNEL 染色结果 上图左为对照组,右为模型组,中图左为 50 mg/L 蜂胶水提液组,右为 100 mg/L 蜂胶水提液组,下图左为 200 mg/L 蜂胶水提液组,右为氯沙坦组。

2.4 蜂胶水提液对总超氧化物歧化酶活力及丙二醛含量的影响

模型组总 SOD 活力较对照组降低 33.38% (P

<0.01),而MDA含量升高27.07%($P<0.01$);加入氯沙坦预处理后总SOD活力恢复、MDA含量降低,与对照组差异无显著性;加入WEP预处理后,三种剂量的WEP均引起总SOD活力升高,较模型组、对照组和氯沙坦组明显升高($P<0.01$),而MDA含量降低,且100 mg/L和200 mg/L WEP组MDA含量降低较氯沙坦组更显著(表3)。

表3. 蜂胶水提液对总超氧化物歧化酶活力及丙二醛含量的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

分组	T-SOD (×kU/L)	MDA (μmol/L)
对照组	14.53±2.60 ^d	3.846±0.248 ^d
模型组	9.68±2.44 ^{be}	4.887±0.167 ^{bf}
蜂胶水提液组		
50mg/L	20.03±2.93 ^{bdf}	4.281±0.309 ^{ad}
100mg/L	26.27±1.82 ^{bdf}	3.550±0.335 ^{df}
200mg/L	27.94±1.26 ^{bdf}	3.270±0.247 ^{bdf}
氯沙坦组	14.01±1.93 ^c	4.161±0.319 ^d

a为 $P<0.05$,b为 $P<0.01$,与对照组相比;c为 $P<0.05$,d为 $P<0.01$,与模型组相比;e为 $P<0.05$,f为 $P<0.01$,与氯沙坦组相比。

3 讨论

VSMC的移行增殖是As启动和发展的关键环节之一^[1],大量研究表明Ang II能促使在体和离体培养的VSMC的增殖,预防Ang II对VSMC的增殖作用具有重要意义。蜂胶对心血管疾病的预防作用多有报道,但蜂胶水提取液对VSMC增殖作用目前尚无定论。本研究结果表明WEP预处理后,随WEP浓度的升高,Ang II促HUASMC增殖作用减弱,细胞数减少,100 mg/L和200 mg/L WEP能明显降低Ang II的促细胞增殖作用。

WEP预处理HUASMC后,突破G₁-S限制点、由G₀/G₁期进入S、M期的细胞减少,滞留于G₀/G₁期的细胞增加,尤其是200 mg/L WEP作用更明显,这与槲皮素抑制VSMC增殖^[7]及蜂胶抗肿瘤机制^[8]一致。进入细胞周期S期后PCNA开始表达,因而PCNA可以看作是影响VSMC增殖的多种因素作用的最后的共同通路,本实验中,Ang II可诱导PCNA的表达,WEP干预后,PCNA阳性率降低,这说明PCNA蛋白表达受到抑制,流式细胞仪测定结果也是这一抑制作用的间接反映。

研究显示,Ang II诱使的增殖反应至少部分是通过与膜结合的NAD(P)H氧化酶来源的活性氧(reactive oxygen species,ROS)介导的^[9]。在本试验,Ang II作用后总SOD活力最低,而MDA含量最

高;WEP干预后,HUASMC总SOD活力明显提高,清除氧自由基作用增强,MDA含量明显降低,即WEP可能通过提高SOD活性、清除自由基、抗脂质过氧化、减少MDA生成,干扰ROS介导的Ang II促细胞增殖作用。

在As的发生发展过程中,VSMC凋亡与增殖相伴并行。Bennett等^[10]研究发现,在体外培养的人或大鼠的VSMC及人动脉粥样硬化斑块中的VSMC都存在细胞凋亡的现象,而且细胞增殖活性越高,其伴随凋亡活性也越高。本研究发现模型组Ang II促进HUASMC增殖的同时,伴随的凋亡也增加,但增殖远远超过凋亡,导致细胞数量增加,而WEP在抑制HUASMC增殖的同时,HUASMC凋亡率保持在较低的水平降低,这表明蜂胶可以有效地调控细胞增殖和凋亡的平衡。

综上所述,WEP可通过增加G₀-G₁期细胞的比例、阻碍细胞进入S期,抑制PCNA的表达,增强HUASMC的抗氧化能力,调控增殖与凋亡的平衡,抑制Ang II诱导的HUASMC增殖,这些研究结果为WEP抗As的机制提供了新的线索,为蜂胶的临床应用提供了切实可靠的实验基础。

[参考文献]

[1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362** (6 423): 801-809.

[2] 程铁群, 李晓辉, 张海港. G蛋白抑制肽对血管紧张素II诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **9** (14): 763-766.

[3] 张云香, 李伟, 李清, 等. 在流动状态下蜂胶对血小板与胶原粘附功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **6** (13): 714-716.

[4] Gardjeva PA, Dimitrova SZ, Kostadinov ID, et al. A study of chemical composition and antimicrobial activity of Bulgarian propolis [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2007, **49** (3-4): 63-69.

[5] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly [J]. *J Food Sci*, 2008, **73** (9): R117-124.

[6] 张云香, 杨志孝, 安蔚, 等. 不同溶剂对蜂胶黄酮提取率影响的研究[J]. *时珍国医国药*, 2006, **1** (17): 9-10.

[7] Moon SK, Cho GO, Jung SY, et al. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells; role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **301** (4): 1 069-078.

[8] Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo [J]. *Cancer Lett*, 2005, **234** (2): 199-208.

[9] Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells/implications in cardiovascular disease [J]. *J Med Biol Res*, 2004, **37** (8): 1 263-273.

[10] Bennett MR, Even GI, Schwartz SM, et al. Apoptosis of human vascular smooth muscle cell derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95** (2): 2 266-274.

(此文编辑 李小玲)