

蜂胶水提物对平滑肌细胞胆固醇酯聚集的影响

商战平¹, 王建礼², 桑慧¹, 李卫红¹, 于凤秀¹, 康莉¹, 周广海³, 王家富¹

(泰山医学院 1. 病理生理学教研室, 3 生命科学研究所, 山东省泰安市 271000)

2 济宁医学院病理生理学教研室, 山东省济宁市 272013)

[关键词] 血管平滑肌细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 蜂胶水提物; 胆固醇酯

[摘要] **目的** 通过研究蜂胶水提物对氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐动脉平滑肌细胞胆固醇酯聚集的影响, 探讨蜂胶水提物抗动脉粥样硬化作用的可能机制, 为蜂胶的进一步开发应用提供实验依据。**方法** 采用贴块法培养人脐动脉平滑肌细胞, 制备平滑肌源性泡沫细胞模型: 分别以 25、50 和 75 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与平滑肌细胞共同培养, 于 12、24、36、48 及 60 h 检测细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量, 选择 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白作用 48 h 作为制备平滑肌源性泡沫细胞模型的适宜条件。培养的细胞随机分为五组: 对照组、模型组、50、100 和 200 mg/L 蜂胶水提物干预组。对照组加正常培养基; 模型组和蜂胶水提物干预组分别加 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白共同作用 48 h。采用高效液相色谱法测定细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量, 根据细胞蛋白定量, 从中得出平滑肌细胞胆固醇酯含量。**结果** 采用 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与平滑肌细胞共同培养 48 h 细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值 > 50%, 转变为泡沫细胞。模型组细胞内胆固醇酯含量高于对照组 ($P < 0.01$); 50、100 和 200 mg/L 蜂胶水提物干预组细胞内胆固醇酯含量低于模型组 ($P < 0.01$), 且随蜂胶水提物浓度的增高, 细胞内胆固醇酯含量有减少的趋势。**结论** 氧化型低密度脂蛋白可引起体外培养的人脐动脉平滑肌细胞内胆固醇酯聚集, 而转变为泡沫细胞, 蜂胶水提物能够降低氧化型低密度脂蛋白所致的人脐动脉平滑肌细胞内胆固醇酯聚集的程度, 从而抑制泡沫细胞的形成, 可能是蜂胶发挥抗动脉粥样硬化作用的机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Water Extract Propolis on Cholesteryl Ester Accumulation in Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cell

SHANG Zhan-Ping¹, WANG Jian-Li², SANG Hui¹, LI Wei-Hong¹, YU Feng-Xiu¹, KANG Li¹, ZHOU Guang-Hai³, and WANG Jia-Fu¹

(1 Department of Pathophysiology, 3 Institute of Life Sciences, Taishan Medical University, Taian 271000, China; 2 Department of Pathophysiology, Jining Medical University, Jining 272013, China)

[KEY WORDS] Smooth Muscle Cell Oxidized Low Density Lipoprotein Water Extract Propolis Cholesteryl Ester

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of water extract propolis on cholesteryl ester accumulation in human umbilical artery smooth muscle cell (HUASMC), and explore the mechanism of water extract propolis on inhibition of atherosclerosis and its implications. **Methods** HUASMC was cultured by explant method, foam cell model derived from smooth muscle cell was prepared, coculturing HUASMC with ox-LDL in concentration of 25, 50 and 75 mg/L respectively, the intracellular total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) at 12, 24, 36, 48 and 60 h were measured by high performance liquid chromatogram, coculturing HUASMC with ox-LDL in concentration of 50 mg/L for 48 h as the optimum condition for foam cell formation. Cultured HUASMC were randomly divided into 5 groups: control group (without any drug), model group (50 mg/L ox-LDL for 48 h), propolis groups (50 mg/L ox-LDL and 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L WEP respectively for 48 h). Intracellular total cholesterol and free cholesterol were measured by high performance liquid chromatogram, the content of cholesterol ester (CE) was obtained by subtracting the FC from TC. **Results** HUASMC were cocultured with 50 mg/L ox-LDL for 48 h, the ratio of intracellular CE/TC was more than 50%, and the cells were transformed into foam cell. The content of intracellular CE in model group was more than that in the control group ($P < 0.01$); The content of intracellular CE in 50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L WEP groups were less than that in the model group ($P < 0.01$), and with the increase of the concentration of WEP the content of intracellular CE had the tendency of

[收稿日期] 2009-4-18

[修回日期] 2009-06-29

[基金项目] 泰山医学院课题 (2001086)

[作者简介] 商战平, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病机制研究, E-mail为 zhpsang@tsmc.edu.cn。通讯作者王家富, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病机制研究, E-mail为 blsk@126.com。王建礼, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化发病机制研究。

decreasing **Conclusion** ox-LDL can induce the cholesteryl ester accumulation in cultured HUASMC in vitro and transform it into foam cell simultaneously it can raise the apoptosis index of HUASMC. WEP can reduce the extent of intracellular CE accumulation in HUASMC induced by ox-LDL, and that maybe one of the mechanisms of its anti-atherosclerosis effect

血管平滑肌细胞 (VSMC) 存在于正常人血管的中膜, 是血管壁的重要组成成分。在动脉粥样硬化斑块形成过程中, 中膜平滑肌细胞穿过基底膜进入内膜, 继之增殖分化, 并吞噬脂质形成平滑肌源性泡沫细胞, 是动脉粥样硬化斑块中的重要成分。氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 是动脉粥样硬化病灶中特有的成分, 在泡沫细胞的形成过程中具有极其重要的作用。近年来研究发现蜂胶对心血管系统疾病有较大的影响。有报道蜂胶通过抗氧化、抗自由基、降血糖、降血脂等作用防止动脉粥样硬化的发生发展^[1,2], 但其在影响平滑肌细胞胆固醇酯聚集和平滑肌源性泡沫细胞形成方面的研究未见报道。本实验选用体外培养的人脐动脉平滑肌细胞 (HUA-SMC) 作为研究对象, 观察蜂胶水提物 (water extract propolis WEP) 对 ox-LDL 诱导的 HUASMC 胆固醇酯聚集的影响, 进一步探讨蜂胶水提物抗动脉粥样硬化作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所); DMEM/F12 培养基 (Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (Sigma 公司); 小鼠抗人 α -肌动蛋白单克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 蜂胶水提物来自泰山蜂胶, 由本实验室提取^[3], 蜂胶水提液中 WEP 浓度为 34.6 g/L, WEP 中总黄酮含量为 1.35%; ox-LDL 蛋白含量定量浓度为 1.2 g/L, 其中所含 MDA 根据蛋白定量的值为 17.04 $\mu\text{mol/g}$ (协和医科大学生物化学与分子生物学研究室); BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒 (上海申能博彩生物科技有限公司); 总胆固醇测定试剂盒 (南京建成生物有限公司), 游离胆固醇测定试剂盒 (上海名典生物工程公司)。

1.2 人脐动脉平滑肌细胞的培养及鉴定

参照陈宇等^[4]方法培养 HUASMC。待细胞长至 80% ~ 90% 汇合时进行传代。用相差倒置显微镜常规观察细胞生长形态及生长规律进行形态学鉴定。采用 SABC 法对培养的细胞进行 α -SM actin 免疫细胞化学染色鉴定, 显微镜下观察, 图像采集及分析系统分析。每张切片计数 10 个高倍视野的阳性细胞数和细胞总数, 阳性细胞数与细胞总数之比即为阳性率。第 3 代细胞用于实验。

1.3 蜂胶水提液的制备及浓度测定

称取 50 g 蜂胶, 于锥形瓶中以蜂胶与三蒸水按固液比 1:4 混合, 搅拌混匀, 静置 8 h, 超声清洗器中超声 30 min, 静置 1 h, 超声清洗器中超声 20 min, 静置 2 h, 用 5 层纱布过滤, 用滤纸过滤直至澄清为止, 以 0.22 μm 微孔滤膜过滤 (蜂胶提取液中蜂胶提取率为 2116%, 总黄酮提取率为 7128%, 含铅 1165×10^{-7}), 置于棕色瓶中 4℃ 保存备用。量取一定量蜂胶水提液, 置于干燥箱内将水分蒸干, 称取剩余固体物质质量。用剩余固体物质质量除以蜂胶水提液体积得到蜂胶水提物浓度, 其单位为 mg/L。

1.4 平滑肌源性泡沫细胞模型的制备

分别以 25 mg/L、50 mg/L 和 75 mg/L ox-LDL 与平滑肌细胞共培养, 于 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 五个时间点检测细胞内总胆固醇 (TC) 和游离胆固醇 (FC) 含量, 以 TC 减 FC 得出胆固醇酯 (CE) 含量, 以正常培养基培养的 HUASMC 作对照, 根据 CE/TC 比值 > 50% 作为泡沫细胞的标志, 对结果进行统计学分析, 选择制备平滑肌源性泡沫细胞模型的适宜的 ox-LDL 作用浓度与时间。

1.5 蜂胶水提物对氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐动脉平滑肌细胞内胆固醇酯聚集的影响

体外组织贴块法培养 HUASMC, 将其随机分为 5 组: 对照组为正常培养基, 模型组为 50 mg/L ox-LDL 作用 48 h, WEP 干预组分别以 50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L WEP 与 50 mg/L ox-LDL 共同作用 48 h。

1.6 高效液相色谱法检测细胞内游离胆固醇及总胆固醇

参照文献 [5] 提供的方法进行测定。将收集的培养细胞以 1000 r/min 离心, 弃上清, 用生理盐水清洗细胞, 然后加入 1 mL 0.9% NaCl 溶液重悬细胞, 在冰浴下使用超声波细胞破碎仪破碎细胞, 破碎条件为: 变幅杆直径 $\Phi 3$ 功率 400 W, 工作时间 2 s, 间歇 5 s, 总时间 1 min。往细胞溶解产物中加入等体积新鲜配制的 15% 乙醇氢氧化钾 (-20℃), 涡旋至细胞溶解产物澄清, 加入 6% 三氯乙酸数滴沉淀蛋白, 涡旋 5 min 至清亮, 再加入等体积正己烷: 异丙醇溶液 (4:1, V/V), 涡旋 5 min 后 1000 r/min 离心 5 min, 收集上层有机相; 将下层水相按上述方法重复抽提 2 次, 将混合的有机相转移到一个带盖的

试管内,再在真空冷冻干燥机中 65℃干燥,在室温中冷却后,加入异丙醇:正庚烷:乙腈比例为 35:12:52的混合溶液,溶解样品,离心 5 min后加样于高效液相色谱仪的上样孔。采用 Gen-Pak 柱,柱温 4℃,对样品进行非梯度洗脱,流速 1 mL/min,226 nm 紫外光检测。胆固醇以峰面积定量,先检测样品中 FC 含量,再用胆固醇酯酶将同一样品中的 CE 完全水解成胆固醇,以高效液相色谱测定 TC 含量,以 TC 含量减去 FC 含量代表 CE 含量,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两样本 *t* 检验,重复测量数据的方差分析,单因素方差分析及组间两两比较的 LSD-*t* 检验等统计学方法对数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 平滑肌源性泡沫细胞模型鉴定

25 mg/L、50 mg/L 和 75 mg/L ox-LDL 组细胞内 CE 含量与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); ox-LDL 作用组各时间点测得的细胞内 CE 含量差异显著 ($P < 0.01$); ox-LDL 浓度与作用时间之间存在交互效应 ($P < 0.01$; 表 1)。25 mg/L、50 mg/L 和 75 mg/L ox-LDL 组细胞内 CE/TC 比值与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。ox-LDL 作用组各时间点细胞内 CE/TC 比值差异显著 ($P < 0.01$)。ox-LDL 作用浓度与作用时间之间存在交互效应 ($P < 0.01$)。以 50 mg/L ox-LDL 作用 48 h 后,细胞内 CE/TC 比值达到 57.38% \pm 1.01%,按泡沫细胞 CE/TC 比值 $> 50\%$ 的标准,此时细胞已转变为平滑肌源性泡沫细胞 (表 2)。

表 1 氧化型低密度脂蛋白对细胞内胆固醇酯含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$ mg/g)

分 组	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
对照组	23.56 \pm 3.96	24.16 \pm 1.79	23.20 \pm 1.56	24.00 \pm 1.73	24.54 \pm 1.81
25 mg/L ox-LDL	41.33 \pm 2.15 ^a	47.80 \pm 1.85 ^{ac}	56.14 \pm 0.49 ^{ac}	69.76 \pm 1.76 ^{ac}	85.43 \pm 1.30 ^{ac}
50 mg/L ox-LDL	56.92 \pm 3.57 ^{ab}	83.17 \pm 2.80 ^{abc}	125.01 \pm 1.90 ^{abc}	191.29 \pm 6.43 ^{ac}	205.69 \pm 2.33 ^{abc}
75 mg/L ox-LDL	71.66 \pm 0.02 ^{ab}	89.77 \pm 0.24 ^{abc}	135.48 \pm 2.21 ^{abc}	207.72 \pm 2.62 ^{ac}	216.57 \pm 0.40 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, ox-LDL 三个浓度组间比较; c 为 $P < 0.01$, ox-LDL 作用不同时间组间比较。

表 2 氧化型低密度脂蛋白对细胞内胆固醇酯与总胆固醇比值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$ %)

分 组	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
对照组	20.07 \pm 2.79	20.58 \pm 1.24	19.69 \pm 1.12	20.29 \pm 1.48	20.98 \pm 1.38
25 mg/L ox-LDL	31.92 \pm 1.50 ^a	32.92 \pm 1.07 ^{ac}	34.60 \pm 0.20 ^{ac}	38.28 \pm 0.82 ^{ac}	39.75 \pm 1.74 ^{ac}
50 mg/L ox-LDL	36.25 \pm 1.96 ^{ab}	40.22 \pm 1.03 ^{abc}	47.70 \pm 1.02 ^{abc}	57.38 \pm 1.01 ^{abc}	58.20 \pm 0.63 ^{abc}
75 mg/L ox-LDL	38.40 \pm 0.74 ^{ab}	41.50 \pm 0.19 ^{abc}	48.39 \pm 0.90 ^{ac}	58.30 \pm 0.42 ^{ac}	58.80 \pm 0.11 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, ox-LDL 三个浓度组间比较; c 为 $P < 0.01$, ox-LDL 作用不同时间组间比较。

2.2 蜂胶水提物对平滑肌细胞内胆固醇酯含量的影响

50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L WEP 干预组细胞内 CE 含量与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。随着 WEP 干预浓度的增高,细胞内 CE 含量有递减趋势 ($P < 0.01$; 表 3)。

3 讨论

近年来,随着对动脉粥样硬化发病机制研究的不断深入,ox-LDL 已被证实是动脉粥样硬化发生发展中的一种独立危险因素。本实验中采用 50 mg/L

表 3 蜂胶水提物对细胞内胆固醇酯含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$ mg/g)

分 组	CE 含量
对照组	24.46 \pm 3.07
模型组	191.29 \pm 6.43 ^a
50 mg/L 蜂胶水提物	133.38 \pm 6.26 ^b
100 mg/L 蜂胶水提物	90.77 \pm 1.93 ^{bc}
200 mg/L 蜂胶水提物	46.15 \pm 3.53 ^{bc}

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较; b 为 $P < 0.01$,与模型组比较; c 为 $P < 0.01$,蜂胶水提物三个浓度组间比较。

ox-LDL与 HUASMC共培养 48 h后,应用高效液相色谱仪对细胞内胆固醇含量进行测定,CE/TC比值为 $57.38\% \pm 1.01\%$,根据泡沫细胞的细胞学定义,细胞内胆固醇酯含量超过总胆固醇含量的 50%,说明平滑肌细胞已经泡沫化。

蜂胶是蜜蜂从植物的新生枝条、叶、芽或树皮等组织上采集的树脂状分泌物,混入蜂蜡和唾液分泌物中的酶而成的一种粘胶物质。用原子吸收-分光光度法检测了蜂胶提取物中铅含量均小于 1 ppm,符合国家卫生食品法标准。有研究证实含有不同浓度蜂胶水提物的完全培养基培养细胞 72 h,经台盼蓝染色,细胞成活率 95% 以上^[6],可以安全应用于体内外试验研究。近年来研究发现蜂胶对心血管系统疾病有较大的影响。本实验室已研究证实蜂胶水提物能抑制肿瘤坏死因子诱导的内皮细胞凋亡^[7],并能抑制血管紧张素 Ang II 引起的平滑肌细胞增殖^[8],还具有抑制血小板与胶原黏附的作用^[9]。动物实验发现蜂胶能减小高脂饮食导致的兔动脉粥样硬化斑块的面积^[10]。本实验选用体外培养的 HUA-SMC作为研究对象,分别采用终浓度为 50 mg/L、100 mg/L和 200 mg/L WEP与 50 mg/L ox-LDL共同作用 48 h,结果发现细胞内 CE含量比模型组减少,且随蜂胶水提物浓度的增加细胞内 CE含量有降低趋势,故蜂胶水提物对 ox-LDL引起的细胞内 CE聚集具有抑制作用,从而抑制平滑肌源性泡沫细胞的形成,发挥其抗动脉粥样硬化作用。目前研究证实影响泡沫细胞形成的因素很多,包括细胞对脂蛋白的摄取增多,细胞内胆固醇代谢失衡,胆固醇流出受阻,胆固醇酯化的增加和水解的减少,导致胆固醇酯在细胞内大量聚集^[11]等方面。ox-LDL也可以引起平滑肌细胞表面清道夫受体 A 表达的增加^[12]。由于此受体不受细胞内胆固醇含量的反馈调节,从而通过清道夫受体过度摄取脂蛋白,而使细胞内 CE发生聚集,促使泡沫细胞的形成。若采用干预因素抑制清道夫受体的表达,可能使得脂蛋白的摄取减少,从而起到抑制细胞内 CE聚集阻止泡沫细胞形成的目的。SMC上还有低密度脂蛋白受体 (LDLR)和低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP)表达,据报道,在动脉粥样硬化病变部位平滑肌细胞 (SMC)

上 LRP表达增强^[13],因在 SMC过量摄取脂蛋白脂质形成泡沫细胞的过程中起关键作用的受体可能是 LRP,因为 LRP受胆固醇的上调,故细胞可通过 LRP无限制摄取脂蛋白,导致 SMC内脂质堆积。在泡沫细胞形成过程中,酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶和中性胆固醇酯水解酶共同调节 CE的形成,因此可通过抑制胆固醇酰基转移酶 (ACAT)活性,或可通过阻止 CE的合成及刺激 CE的水解来减少泡沫细胞中 CE的积累。至于蜂胶水提物降低 ox-LDL所致的平滑肌细胞内 CE聚集程度的确切机制尚需进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, et al. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus [J]. *Pharmacol Res* 2005; **51** (2): 147-152.
- [2] Yoshizumi K, Nishioka N, Tsuji T. Xanthine oxidase inhibitory activity and hypouricemia effect of propolis in rats [J]. *Yakugaku Zasshi* 2005; **125** (3): 315-321.
- [3] 张云香,杨志孝,尹迎春,等.泰山蜂胶的提取方法及总黄酮的测定 [J]. *实用医药杂志*, 2005; **22** (10): 915-916.
- [4] 陈宇,贺玉泉,杨玉双.应用植块法培养人脐动脉平滑肌细胞 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2003; **16** (5): 287-288.
- [5] Cullen P, Fobker M, Tegelkamp K, et al. An improved method for quantification of cholesterol and cholesteryl esters in human monocyte-derived macrophages by high performance liquid chromatography with identification of unassigned cholesteryl ester species by means of secondary ion mass spectrometry [J]. *J Lipid Res* 1997; **38** (2): 401-409.
- [6] Liao HF, Chen YY, Liu JJ, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis [J]. *Agric Food Chem*, 2003; **51** (27): 7907-912.
- [7] 张云香,王家富,李伟.蜂胶水提液对 TNF- α 诱导的血管内皮细胞凋亡的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; **13** (7): 81-82.
- [8] 桑慧,王家富,商战平,等.蜂胶水提液影响血管紧张素 Ang II 促血管平滑肌细胞增殖作用的研究 [J]. *中国临床康复*, 2006; **10** (35): 57-59.
- [9] 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; **13** (6): 714-716.
- [10] 司艳红,王家富,商战平,等.蜂胶对高脂饲料诱导的动脉粥样硬化家兔的干预效应 [J]. *中国临床康复*, 2005; **9** (35): 82-84.
- [11] Yancey PG, Bielicki JK, Johnson WJ, et al. Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides [J]. *Biochemistry*, 1995; **34** (24): 7955-965.
- [12] METUS-snyder M, Gowe MS, Pitas RE. Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cell by oxidized low density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 2000; **275** (23): 17661-670.
- [13] Lupu F, Hein D, Bachmann F, et al. Expression of LDL receptor-related protein /alpha2-macroglobulin receptor in human normal and atherosclerotic arteries [J]. *Arterioscler Thromb* 1994; **14** (9): 1438-444.

(此文编辑 文玉珊)