

## 蜂胶水提物对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞凋亡的影响

王建礼<sup>1,2</sup>, 徐兴华<sup>1</sup>, 司艳红<sup>2</sup>, 桑 慧<sup>2</sup>, 于凤秀<sup>2</sup>, 王家富<sup>2</sup>, 商战平<sup>2</sup>

(1. 济宁医学院病理生理学教研室, 山东省济宁市 272067; 2. 泰山医学院病理生理学教研室, 山东省泰安市 271000)

[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; 细胞凋亡

[摘要] 目的 研究蜂胶水提物对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞凋亡的影响。方法 培养人脐动脉平滑肌细胞, 培养的细胞随机分为五组: 对照组、模型组和三种浓度的蜂胶水提物干预组。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, 从中得出胆固醇酯含量, 根据细胞蛋白定量。采用流式细胞仪 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率。结果 模型组细胞内胆固醇酯含量高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L 蜂胶水提物干预组细胞内胆固醇酯含量均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 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; 模型组细胞凋亡率高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L 蜂胶水提物干预组细胞凋亡率均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 且随蜂胶水提物浓度的增高细胞凋亡率有降低的趋势。细胞内胆固醇酯含量与细胞凋亡率之间存在正相关 ( $r = 0.964, P < 0.01$ )。结论 蜂胶水提物能够降低氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐动脉平滑肌细胞凋亡, 可能与蜂胶水提物抑制细胞内胆固醇酯聚集有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Water Extract Propolis on Apoptosis of Human Umbilical Arterial Smooth Muscle Cells Induced by ox-LDL

WANG Jian-Li<sup>1,2</sup>, XU Xing-Hua<sup>1</sup>, SI Yan-Hong<sup>2</sup>, SANG Hui<sup>2</sup>, YU Feng-Xiu<sup>2</sup>, WANG Jia-Fu<sup>2</sup>, and SHANG Zhan-Ping<sup>2</sup>

(1. Department of Pathophysiology, Jining Medical College, Jining, Shandong 272067, China; 2. Department of Pathophysiology, Taishan Medical College, Taian, Shandong 271000, China)

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

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of water extract propolis (WEP) on apoptosis in human umbilical arterial smooth muscle cell (HUASMC), and explore the mechanism of water extract propolis on inhibition of atherosclerosis and its implications. **Methods** HUASMC were cultured and identified by immunocytochemistry technique. Cultured HUASMC were randomly divided into 5 groups: control group, model group and WEP groups (treated with 50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L WEP respectively). Intracellular total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) were measured by high performance liquid chromatogram, the content of cholesterol ester (CE) was obtained by subtracting the FC from TC. Cellular apoptosis index was tested by flow cytometry. **Results** The content of intracellular CE in model group was more than that in 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 showed the decreasing tendency. The cell apoptosis index in model group was higher than that in control group ( $P < 0.01$ ). The cell apoptosis index in 50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L WEP groups were lower than that in the model group ( $P < 0.01$ ), and with the increase of the concentration of WEP the cell apoptosis index

[收稿日期] 2011-3-18

[基金项目] 泰山医学院课题 (2001086)

[作者简介] 王建礼, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化发病机制方面的研究, E-mail 为 wangjianli003@126.com。通讯作者商战平, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心脑血管疾病发生机制方面的研究, 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方面的研究。

showed the decreasing tendency. The content of intracellular CE was correlated with the cell apoptosis ( $r=0.964$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** WEP can reduce the apoptosis of HUASMC induced by ox-LDL which may be concerned with the inhibition of intracellular CE accumulation.

平滑肌源性泡沫细胞的凋亡在动脉粥样硬化斑块脂质中心的形成及影响斑块稳定性方面具有重要的作用。其凋亡后以脂质为主的胞浆内容物释放并堆积形成脂质池,同时由于斑块区大量平滑肌细胞凋亡,不能分泌足量的细胞外基质维持组织结构,因而局部组织相对薄弱易于破裂,最终导致严重的临床合并症<sup>[1,2]</sup>。研究显示不稳定性斑块脂质核心内氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)浓度高于稳定性斑块,提示脂质氧化与斑块稳定性有关。Tabas 等<sup>[3]</sup>研究表明,经氧化修饰后的低密度脂蛋白具有较强的细胞毒性,ox-LDL 被内吞后,产生的过氧化脂质、氧化固醇等能够引起细胞内蛋白修饰,诱发氧化应激反应,脂质过氧化物的产生通过一系列的细胞信号转导和基因表达改变诱导细胞凋亡。人类进展期斑块中,ox-LDL 阳性区域没有或只有极少的血管平滑肌细胞,说明该区域血管平滑肌细胞凋亡增加,因而粥样斑块内高浓度的 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞凋亡是影响斑块稳定性的一个重要因素。因此,在动脉粥样硬化晚期,阻止 ox-LDL 等因素诱导的平滑肌细胞的凋亡对防止严重临床并发症的发生具有积极的意义。

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<sup>[4,5]</sup>,但在其影响 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞凋亡方面的研究未见报道。本研究选用体外培养的人脐动脉平滑肌细胞(HUASMC)作为研究对象,观察蜂胶水提物(water extract propolis, WEP)对 ox-LDL 诱导的 HUASMC 凋亡的影响,进一步探讨 WEP 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);WEP 来自泰山蜂胶,由本实验室提取<sup>[6]</sup>,蜂胶水提液中 WEP 的浓度为 34.6 g/L,即每升蜂胶水提液中含 WEP 的量为 34.6 g, 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,其中所含的丙二醛(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(TC)测定试剂盒(南京建成生物有限公司),游离胆固醇(FC)测定试剂盒(南京建成生物有限公司);Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

### 1.2 实验分组

参考陈宇等<sup>[7]</sup>的培养方法,体外组织贴块法培养 HUASMC,第 3 代细胞用于实验。将所培养的细胞随机分为 5 组:对照组采用正常培养基;模型组以 50 mg/L ox-LDL 作用 48 h;WEP 干预组分别以 50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L WEP 与 50 mg/L ox-LDL 共同作用 48 h。

### 1.3 高效液相色谱法检测细胞内游离胆固醇及总胆固醇

按文献[8]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( $-20^{\circ}\text{C}$ ),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  $65^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$ ,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胆固醇酯(CE)完全水解成胆固醇,以高效液相色谱测定 TC,TC 含量减去 FC 含量为 CE 含量,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

### 1.4 Annexin V/PI 双染流式细胞仪分析细胞凋亡率

胰蛋白酶消化分离细胞,以含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液调整细胞密度至  $1 \times 10^8$  个/L,按每瓶 2 mL 接种于 25 mL 的细胞培养瓶,培养 24 h 后,无血清培养 12 h 后使细胞同步化于 G0 期,然后

按分组分别加药进行处理。取经过处理后的细胞,加入 PBS,离心 2000 r/min,5 min,收集约  $5 \times 10^5$  个细胞;吸取 250  $\mu\text{L}$  2  $\times$  Binding Buffer 和 250  $\mu\text{L}$  灭菌去离子水,混匀;用上述的 500  $\mu\text{L}$  的 1  $\times$  Binding Buffer 悬浮细胞;加入 1  $\mu\text{L}$  Annexin V-EGFP 混匀后,加入 5  $\mu\text{L}$  PI,然后混匀;避光室温反应 5 min;用流式细胞仪检测 ( $E_x = 488 \text{ nm}$ ,  $E_m = 530 \text{ nm}$ ) 细胞凋亡情况。

### 1.5 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析及组间两两比较的 SNK- $q$  检验及 Spearman 秩相关分析等统计学方法对数据进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 WEP 对细胞内 CE 含量的影响

模型组细胞内 CE 含量高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L WEP 干预组细胞内 CE 含量均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 且随 WEP 浓度的增高细胞内 CE 含量有减少的趋势 (表 1)。

### 2.2 WEP 对细胞凋亡率的影响

模型组细胞凋亡率高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L WEP 干预组细胞凋亡率均低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 且随 WEP 浓度的增高细胞凋亡率有降低的趋势 (表 2 和图 1)。

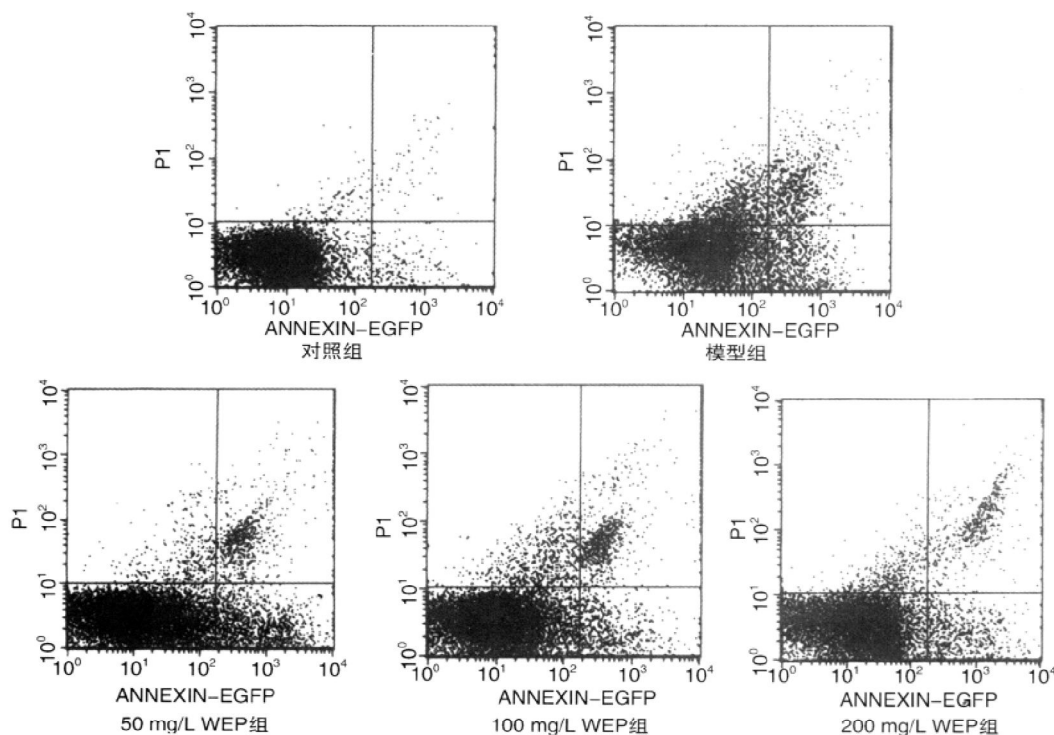


图 1. WEP 对细胞凋亡率的影响

Figure 1. Effect of WEP on the rate of cell apoptosis

表 1. WEP 对细胞内 CE 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Table 1. Effect of WEP on the content of intracellular CE

分 组	CE 含量 (mg/g)
对照组	$24.46 \pm 3.07$
模型组	$191.29 \pm 6.43^a$
50 mg/L WEP 组	$133.38 \pm 6.26^b$
100 mg/L WEP 组	$90.77 \pm 1.93^{bc}$
200 mg/L WEP 组	$46.15 \pm 3.53^{bd}$

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与 50 mg/L WEP 组比较; d 为  $P < 0.01$ , 与 100 mg/L WEP 组比较。

表 2. WEP 对细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Table 2. Effect of WEP on the rate of cell apoptosis

分 组	细胞凋亡率
对照组	$5.598\% \pm 0.061\%$
模型组	$28.020\% \pm 1.267\%^a$
50 mg/L WEP 组	$22.591\% \pm 0.964\%^b$
100 mg/L WEP 组	$13.651\% \pm 0.771\%^{bc}$
200 mg/L WEP 组	$10.236\% \pm 0.640\%^{bd}$

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与 50 mg/L WEP 组比较; d 为  $P < 0.01$ , 与 100 mg/L WEP 组比较。

### 2.3 细胞内 CE 含量与细胞凋亡率之间的关系

细胞内 CE 含量与细胞凋亡率之间存在正相关关系 ( $r=0.964, P<0.01$ ; 图 2)。

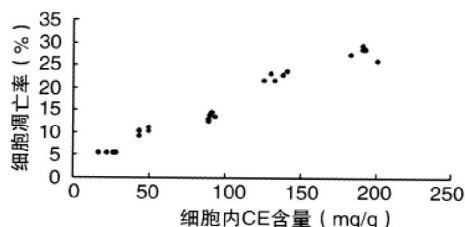


图 2. 细胞内 CE 含量与细胞凋亡率之间的关系

Figure 2. The relationship between the content of intracellular CE and the rate of cell apoptosis

## 3 讨论

动脉粥样硬化斑块内细胞增殖与凋亡伴随斑块发生和发展的全过程,组织学研究发现,动脉粥样硬化早期、中期细胞增殖大于凋亡,后期则凋亡大于增殖,细胞凋亡在斑块易损性中发挥了重要的作用,特别是血管平滑肌细胞凋亡。动脉粥样斑块中平滑肌细胞凋亡促进脂质核心的形成<sup>[9]</sup>,当斑块中脂核体积超过 50% 时,斑块破裂的风险明显增加。斑块纤维帽的主要成分是细胞外基质,包括胶原纤维和弹性蛋白,主要是由血管平滑肌细胞合成与分泌,血管平滑肌细胞凋亡增加会导致细胞基质的合成和分泌减少,纤维帽的胶原修复障碍,纤维帽变薄,使斑块稳定性下降,在外力的作用下斑块易于破裂<sup>[1]</sup>。

诱导血管平滑肌细胞凋亡的因素是多方面的,其机制也是复杂的,ox-LDL 就是诱导平滑肌细胞凋亡的一个非常重要的因素。在体外实验中 ox-LDL 对细胞的作用与其氧化程度及作用时间有关,小剂量和短程应用的 ox-LDL 具有显著的促增殖作用,而大剂量和长程应用的 ox-LDL 则诱导血管平滑肌细胞凋亡<sup>[10]</sup>。本研究采用 50 mg/L ox-LDL 与平滑肌细胞共培养 48 h,流式细胞仪 Annexin V/PI 双染法测得细胞凋亡率为  $28.020\% \pm 1.267\%$ ,与正常培养的平滑肌细胞凋亡率 ( $5.589\% \pm 0.061\%$ ) 明显增加;分别用 50 mg/L、100 mg/L 及 200 mg/L WEP 进行干预,使 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞凋亡率明显减少。且有随 WEP 浓度的增加其降低细胞凋亡率的作用有增加的趋势。

参与 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞凋亡有关的因素很多,但其确切的机制尚未完全清晰。本研究采用 WEP 对 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞内 CE 聚集及

凋亡的作用进行干预,发现蜂胶在降低细胞内 CE 含量的同时也降低了细胞凋亡率;通过对细胞内 CE 含量与细胞凋亡率的相关分析得到,细胞内 CE 与细胞凋亡率之间存在正相关关系,因此推测,ox-LDL 诱导平滑肌细胞凋亡与使细胞内脂质代谢失衡,CE 聚集增加有关。WEP 之所以能降低 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞凋亡率,可能与其抑制 CE 在细胞内聚集有关,但是否能影响到细胞凋亡相关基因的表达及影响情况还需要进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Stoneman VE, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications [J]. Clin Sci, 2004, 107(4): 343-354.
- [2] Kolodgie FD, Narula J, Haider N, et al. Apoptosis in atherosclerosis. Does it contribute to plaque instability [J]? Cardiol Clin, 2001, 19(1): 127-139.
- [3] Tabas L. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implication [J]. J Clin Invest, 2002, 110(7): 905-911.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Jovinge S, Crisby M, Thyberg J, et al. DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(10): 2225-231.
- [10] Salvayre R, Auge N, Benoist H, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1585(2-3): 213-221.

(此文编辑 文玉珊)