

文章编号:1001-6880(2014)1-0128-04

巴西蜂胶对磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C 活性的影响

玄红专^{1,2},李振²,张丽²,宋玉冬²,胡福良^{1*}¹浙江大学动物科学学院,杭州 310029; ²聊城大学生命科学学院,聊城 252059

摘要:去除血清和生长因子条件下研究巴西蜂胶对磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C (PC-PLC) 活性的影响。去除血清和生长因子诱导内皮细胞 (VECs) 凋亡, 经 12.5、25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的巴西蜂胶处理 VECs 24 h, MTT 法检测细胞的存活率;以 L- α -卵磷脂为底物测定 PC-PLC 的活性;免疫细胞化学法检测 PC-PLC 的表达。结果表明高浓度的巴西蜂胶降低 VECs 存活率,抑制 PC-PLC 的活性及表达。巴西蜂胶对 VECs 的影响具有剂量依赖性,今后巴西蜂胶应用中应考虑剂量对内皮细胞的影响。

关键词:巴西蜂胶;磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C;存活率

中图分类号:R363

文献标识码:A

Effect of Brazilian Propolis on the Activity of Phosphatidylcholine-specific Phospholipase C

XUAN Hong-zhuan^{1,2}, LI Zhen², ZHANG Li², SONG Yu-dong², HU Fu-liang^{1*}¹College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;²School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

Abstract: To understand the effects of Brazilian propolis on the activity and expression of phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) in vascular endothelial cells (VECs) deprived of serum and basic fibroblast growth factor (FGF-2). Confluent cells were deprived of serum and FGF-2, then the cells were divided for treatment by Brazilian propolis 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. Cell viability was measured by MTT method, the activity of PC-PLC was determined by using L- α -phosphatidylcholine as the substrate, the expression of PC-PLC was tested by immunohistochemistry. Results showed that treatment of Brazilian propolis 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h significantly depressed VECs viability, and the activity and expression of PC-PLC were also decreased by high concentration Brazilian propolis. The effects of Brazilian propolis on VECs had dose-dependent, and considering the safety of using Brazilian propolis, more attention should be paid on the concentration of propolis.

Key words: Brazilian propolis; phosphatidylcholine-specific phospholipase C; cell viability

磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C (PC-PLC) 是多种细胞中普遍存在的一种酶,在细胞信号转导过程中发挥重要作用。PC-PLC 能特异性水解磷脂酰胆碱 (PC) 产生第二信使-二酯酰甘油 (DAG),而 DAG 又可以激活蛋白激酶 C (PKC),进一步把信号传递给丝裂原活化的蛋白激酶,引起细胞增殖、分化、凋亡及自噬等多方面功能的改变^[1]。在凋亡信号转导通路中 PC-PLC 发挥重要作用。在淋巴细胞中活化 PC-PLC 的活性激活 NF- κ B 通路诱导细胞凋亡;在单核白血病细胞株 U937 中抑制 PC-PLC 的活性,诱

导 U937 细胞凋亡;在内皮细胞中苗俊英等研究发现抑制 PC-PLC 的活性可以抑制去除血清和生长因子诱导的内皮细胞凋亡;但也有报道指出在黄樟素化合物诱导内皮细胞凋亡过程中,PC-PLC 活力降低^[2]。由此可见,PC-PLC 在不同细胞凋亡过程中发挥不同的功效。在炎症反应中 PC-PLC 也发挥重要作用。大量研究表明:炎症反应中 PC-PLC 活力升高激活下游信号分子如环加氧酶 (COX2) 等,导致炎性因子如前列腺素 (PGE-2) 的合成释放,因此,抑制 PC-PLC 的活性能够降低炎症的发生^[3]。

蜂胶是西方蜜蜂采集植物树脂并混入唾液腺分泌物经咀嚼加工而成的一种粘稠物质。蜂胶化学成分非常复杂,迄今在蜂胶中至少发现了 300 种以上的成分。蜂胶具有广泛的生物学活性,如抗细菌、抗

收稿日期:2013-02-28 接受日期:2013-06-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31201860);国家蜂产业技术体系建设专项(NCYTX-43);山东省自然科学基金项目(ZR2012CQ003)

* 通讯作者 Tel:86-571-86971952;E-mail:flhu@zju.edu.cn

真菌、抗病毒、抗溃疡、抗炎症、抗肿瘤以及抑制血管生成等^[4]。目前蜂胶普遍应用于食品等行业来预防疾病,增强体质。前期我们在去除血清和生长因子条件下研究了巴西蜂胶对血管内皮细胞(VECs)的影响,发现高浓度的巴西蜂胶促进内皮细胞凋亡^[5]。但巴西蜂胶对 PC-PLC 活性的影响未见报道,鉴于 PC-PLC 在内皮细胞凋亡和炎症中的重要功效,本实验主要研究巴西蜂胶对 PC-PLC 活性和表达的影响,阐明巴西蜂胶对 PC-PLC 活性的影响,为更好的利用巴西蜂胶提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

巴西蜂胶购于巴西 Minas Gerais 州,主要的植物来源是酒神菊属 (*Baccharis dracunculifolia* DC.) ; M199(美国 Amresco 公司);培养基和胎牛血清(美国 Hyclone 公司);碱性生长因子(中国 Essex-Bio 公司);L- α -卵磷脂(美国 Sigma 公司)、PC-PLC 抗体由山东大学发育与细胞生物学实验室馈赠; FITC-IgG 二抗(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)。其它试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

超净工作台(苏州净化设备厂);低温冰箱、CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司);共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 蜂胶样品的制备

粗巴西蜂胶经冷冻、粉碎、无水乙醇室温浸提 24 h,减压过滤,旋转蒸发仪浓缩到恒定质量,使用时用无水乙醇溶解,配成相应浓度,乙醇提取的巴西蜂胶(EEBP)贮存在 4 ℃。

1.3.2 人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)培养

HUVECs 由山东大学发育与细胞生物学实验室馈赠。HUVECs 培养在添加 20% 胎牛血清和 2 μ L/mL 碱性生长因子(FGF-2)的 M199 培养基中。孵育条件为:5% CO₂、37 ℃、饱和湿度 CO₂ 培养箱中。每隔一天换液。倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 实验分组

待 HUVECs 细胞长满,将细胞分为三组:正常组(nor)、对照组(ctrl)和巴西蜂胶组。正常组细胞是在正常培养条件下培养;对照组细胞是在去除血清和 FGF-2 条件下加入酒精溶剂培养;巴西蜂胶组

细胞是在去除血清和 FGF-2 的同时用不同浓度的巴西蜂胶(12.5、25 和 50 μ g/mL)处理。

1.3.4 细胞存活率的测定

将长势良好的 HUVECs 种植到 96 孔板,37 ℃,5% CO₂ 孵育,至细胞长满。按照实验分组,在处理时间结束之前 4 h,直接向各组每孔中分别加入 20 μ L MTT 贮液,置于培养箱内继续培养 4 h,然后吸出各孔上清液,分别加入 100 μ L DMSO,室温下置于摇床上摇 20 min,以空白组为准调零,酶标仪检测各样品于 570 nm 下的 OD 值。

$$\text{细胞存活率:存活率} = (\text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

1.3.5 细胞中 PC-PLC 活性的测定

参考吴兴中的方法测定^[6]。即以 L- α -卵磷脂为 PC-PLC 的底物,在 660 nm 处检测吸光值。

1.3.6 PC-PLC 表达的检测

不同处理的细胞经 0.1 M PBS 轻轻冲洗细胞,4% 多聚甲醛固定 15 min;弃多聚甲醛,经 0.1 M PBS 轻洗 3 次,加入正常血清封闭液,室温封闭 20 min;弃封闭液,加入一抗,湿盒中过夜;弃一抗,0.1 M PBS 冲洗 3 次,加入二抗,37 ℃ 孵育 50 min;弃二抗,0.1 M PBS 冲洗 3 次,在激光扫描共聚焦下观察、分析结果^[7]。

1.4 统计学处理

测定结果采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理,用 t 检验比较两组均数间差异, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 巴西蜂胶对细胞存活率的影响

去除血清和 FGF-2 培养 24 h 后,细胞会逐渐变圆,细胞膜出泡形成凋亡小体,最终细胞脱离培养皿底部凋亡。如图 1 所示,经不同浓度的巴西蜂胶处理 24 h 后,MTT 分析表明 12.5 μ g/mL EEBP 对细

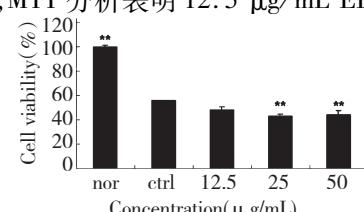


图 1 巴西蜂胶对 VECs 存活率的影响

Fig. 1 Effect of Brazilian propolis on cell viability of VECs

注:与 ctrl 组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。下同。

Note: compare with ctrl group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Below is the same.

胞存活率没有显著影响;25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴西蜂胶降低细胞存活率,与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

2.2 巴西蜂胶对 PC-PLC 活性的影响

如图 2 所示,经不同浓度的巴西蜂胶处理 24 h 后,通过测定 PC-PLC 活力表明:25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴西蜂胶处理的细胞中 PC-PLC 活力与对照组相比显著降低(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$);而 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴西蜂胶处理的细胞中 PC-PLC 活力与对照组相比差异不显著。

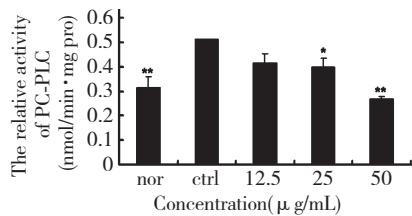


图 2 巴西蜂胶对 PC-PLC 活性的影响

Fig. 2 Effect of Brazilian propolis on activity of PC-PLC

2.3 巴西蜂胶对 PC-PLC 表达的影响

如图 3 所示,经不同浓度的巴西蜂胶处理 24 h 后,通过免疫细胞化学法检测了 PC-PLC 表达,结果表明 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴西蜂胶处理的细胞中 PC-PLC 表达与对照组相比显著降低($P < 0.01$);而 12.5 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴西蜂胶处理的细胞中 PC-PLC 表达与对照组相比差异不显著。

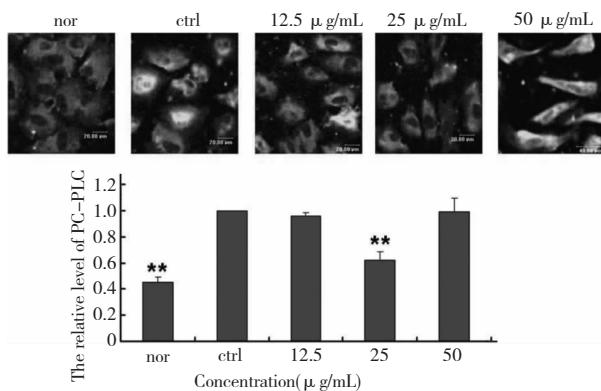


图 3 巴西蜂胶对 PC-PLC 表达的影响

Fig. 3 Effect of Brazilian propolis on expression of PC-PLC

3 讨论

PC-PLC 是磷脂酶 C 家族中的重要一员,参与哺乳动物多种细胞反应,如细胞生长、分化、老化以及凋亡等。我们前期实验结果表明,高浓度的巴西蜂胶诱导内皮细胞凋亡。本研究进一步揭示,高浓

度的巴西蜂胶降低 PC-PLC 的活力和表达,抑制细胞存活率。由此我们推测:巴西蜂胶通过调节 PC-PLC 的活力影响内皮细胞凋亡。

此外,值得注意的是尽管长期以来人们利用巴西蜂胶作为一种传统药物,但 Banskota 等指出,由于巴西蜂胶含有苯并呋喃衍生物,因而具有细胞毒性;对巴西绿胶进行的体外毒性试验也指出,低剂量的巴西绿胶具有抗突变的功效,高剂量的巴西绿胶具有致突变的功效^[8]。Pereira 等最近报道,过度服用巴西绿胶对小鼠的血细胞产生了突变功效^[9]。此外,Munari 等建议巴西绿胶主要植物来源(*Baccharis dracunculifolia*)提取物最有效的使用剂量是 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[10]。通过本次实验,我们的研究结果也表明,在去除血清和 FGF-2 的条件下高剂量的巴西蜂胶抑制内皮细胞存活率,而低剂量的巴西蜂胶对内皮细胞存活率没有影响。由此可见,巴西蜂胶对内皮细胞的影响具有剂量依赖性。内皮细胞凋亡在许多疾病如动脉粥样硬化以及肿瘤发挥重要的作用。内皮细胞凋亡不利于动脉粥样硬化疾病的治疗,然而却促进肿瘤细胞的凋亡。结合前期实验结果我们推断:高剂量的巴西蜂胶(25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)可以诱导 VECs 细胞凋亡,这有利于抑制肿瘤细胞的生长,而肿瘤的发生常伴随炎症的发生,PC-PLC 活力作为一种新的炎症标志物^[3],高浓度的巴西蜂胶降低 PC-PLC 的活力和表达,这可能是高浓度的巴西蜂胶抗肿瘤的一种作用机理。

参考文献

- Li H, Zhang L, Yin D, et al. Targeting phosphatidylcholine-specific phospholipase C for atherogenesis therapy. *Trends Cardiovasc Med*, 2010, 20:172-176.
- Dong ZW(董志武), Su L(苏乐), Miao JY(苗俊英). Molecular mechanisms study progress of PC-PLC on regulating inflammatory reactions and cell physiology. *Chin J Curr Adv Gen Surg(中国现代普通外科进展)*, 2007, 10:430-433.
- Zhang L, Zhao J, Su L, et al. D609 inhibits progression of preexisting atheroma and promotes lesion stability in apolipoprotein $^{\text{-}}$ mice: a role of phosphatidylcholine-specific phospholipase in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30:411-418.
- Sforzin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*, 2011, 133: 253-260.

(下转第 76 页)