

马尾松花粉硫酸酯化多糖对大鼠主动脉平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 调控及增殖的影响

耿 越, 赵 红

山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性生物学重点实验室, 山东 济南 250014

摘 要:目的 研究马尾松花粉多糖 PPM60-A 及其硫酸酯化物 SPPM60-A 对大鼠动脉平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 调控及增殖的影响。方法 常规水提醇沉法制备马尾松花粉多糖, Sephacryl S-400HR 色谱分离得 PPM60-A, 氯磺酸-吡啶法得硫酸酯化物 SPPM60-A, 酯化度为 1.28。酶解法分离制备大鼠动脉平滑肌细胞, 测定酯化前后多糖对其胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和细胞增殖的影响。结果 PPM60-A 和 SPPM60-A 均可以降低 $[Ca^{2+}]_i$, 抑制高 K^+ 和去甲肾上腺素 (NE) 诱导的钙离子升高, 降低高 K^+ 引起的钙离子水平上升, 对 NE 诱导的血管动脉平滑肌细胞增殖具有显著的抑制作用。PPM60-A 作用效果好于 SPPM60-A。结论 PPM60-A 及 SPPM60-A 均能抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 抑制血管平滑肌细胞增殖。

关键词: 松花粉; 硫酸酯化多糖; 动脉平滑肌细胞; 钙离子; 增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)02-0-0

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.

Effect of sulfated polysaccharide from masson pine pollen on $[Ca^{2+}]_i$ regulation and proliferation of arterial smooth muscle cells from rats

GENG Yue, ZHAO Hong

Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Assistance Biology, School of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To explore the effects of polysaccharide PPM60-A from masson pine (*Pinus massoniana*) pollen and its sulfated derivative SPPM60-A on $[Ca^{2+}]_i$ regulation and proliferation of arterial smooth muscle cells from rats. **Methods** Polysaccharide (PPM60-A) was extracted by hot water, classified by 60% ethanol from masson pine pollen and purified by Sephacryl S-400HR. Sulfated polysaccharide (SPPM60-A) was obtained from PPM60-A modified by chlorosulfonic acid-pyridine method and its esterification degree is 1.28. The original generation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) was obtained by enzyme digestion with collagenase from artery of rats. The effects of PPM60-A and SPPM60-A on $[Ca^{2+}]_i$ regulation and cell proliferation were determined. **Results** Both PPM60-A and SPPM60-A could decrease the $[Ca^{2+}]_i$ significantly, inhibit the rising of calcium ion concentration induced by KCl and noradrenalin (NE); reduce the calcium ion level pretreated by KCl; inhibit the VSMCs proliferation induced by NE. **Conclusion** PPM60-A and SPPM60-A could inhibit the influx of calcium ion and the proliferation of VSMCs.

Key words: masson pine pollen; sulfated polysaccharide; arterial smooth muscle cells; calcium ion; proliferation

松花粉又名松黄, 为鲜黄色或淡黄色细粉, 其性味甘平无毒, 历来是我国传统的食药用品, 现已收入 2010 年版《中国药典》。植物多糖是普遍存在于自然植物界中的由许多相同或不同的单糖以 α -或 β -糖苷键所组成的化合物。多糖硫酸酯 (polysaccharide sulfate, PSS) 或称硫酸酯化多糖 (sulfated polysaccharides, SPS) 是指含有硫酸基团的天然及其半合成的酸性多糖, 为聚阴离子化合物。

一般改性后的多糖硫酸酯具有免疫调节、抗病毒、抗凝血和抗肿瘤等多种生物学活性。从马尾松花粉分离得到的多糖及其硫酸酯化物具有多种生理功能^[1-3]。

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的异常增殖是动脉粥样硬化形成、高血压和血管再狭窄共同的细胞病理基础之一。心血管疾病的危险因素可损伤血管内皮功能而导致一些细胞

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y2008D13)

*通信作者 耿 越 (1965—), 男, 博士, 教授, 研究方向为细胞生物学。Tel: (0531) 86180196 E-mail: gengy@sdnu.edu.cn

因子,特别是生长因子的表达而作用于 VSMCs 膜受体,并激活细胞内信号转导通路,最终导致核内基因的表达而促使 VSMCs 的过分增殖。本文采用酶解法分离制备 VSMCs,观察马尾松花粉多糖对其 $[Ca^{2+}]_i$ 和增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 药品试剂

破壁马尾松 *Pinus massoniana* Lamb.花粉(破壁率>90%)由烟台新时代健康产业集团提供。采用常规水提醇沉法制备粗多糖,60%乙醇沉淀得马尾松花粉多糖组分(PPM60),Sephacryl S-400HR 色谱分离得到单一组分 PPM60-A,氯磺酸-吡啶法制备马尾松花粉多糖硫酸酯化物(SPPM60-A),红外光谱证实酯化成功,酯化度为 1.28。

胶原酶 I,胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);兔抗大鼠 α -actin 抗体、FITC-羊抗兔抗体(北京博奥森公司);高糖 DMEM 干粉、胎牛血清(美国 Gibco 公司)。

1.2 大鼠主动脉平滑肌细胞制备培养

取 150 g 左右的 Wistar 大鼠,乙醚麻醉后脱臼处死,无菌条件下解剖分离主动脉。将干净光滑的血管中膜剪成 1 mm^2 大小的组织块,置于培养瓶中。加入适量 0.15% 的胶原酶 I 进行消化,每消化 1 h 左右取出培养瓶,轻轻吹打组织块,使得细胞从松散的组织中游出。吸取含有细胞的酶液,1 000 r/min 离心 5~8 min,将酶液上清倒回组织块继续消化,重复 3~5 次,合并收获的细胞, α -actin 免疫细胞化学分析鉴定细胞纯度。经原代培养、鉴定得到大鼠主动脉平滑肌细胞(VSMCs),用 20%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液(含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素)于 37°C ,5% CO_2 环境下培养,待细胞生长至 80%融合时将细胞传代,取 4~10 代细胞进行实验。

1.3 对平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

待对数期 VSMCs 生长至 60%融合时,胰酶消化,离心收集细胞。将细胞密度调整为 $3 \times 10^6/\text{mL}$,细胞悬液先于 37°C 培养箱中预温 5 min,每 2 mL 细胞加入 Fura-2/AM 2 μL (终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$), 37°C 避光孵育 45 min 左右。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入无血清 DMEM 培养液重悬细胞,重复上面步骤 2~3 次,以除去细胞外未负载上的探针。检测时用无血清 DMEM 培养液(含 Ca^{2+} 浓度为 1.8 mmol/L)配制的 PPM60-A 和 SPPM60-A (终

浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$)重悬细胞。采用文献报道的方法测定 $[Ca^{2+}]_i$ [4]。

1.4 对 VSMCs 增殖的影响

实验分为(1)空白组:含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液;(2)模型组:在空白组中加入去甲肾上腺素(NE)(终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$);(3)NE (1 $\mu\text{mol/L}$) + PPM60-A (终质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$)组;(4)NE (1 $\mu\text{mol/L}$) + SPPM60-A (终质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$)组。用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,于 5% CO_2 、 37°C 、饱和湿度培养箱中培养 24、48 h。MTT 法检测 PPM60-A、SPPM60-A 对 NE 诱导的 VSMCs 增殖的影响;台盼蓝染色法计数细胞。

1.5 数据处理

采用 SPSS18.0 统计学软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 VSMCs 的免疫组化鉴定

酶解法分离培养得到的 VSMCs,光镜下贴壁的原代细胞大小不等,形状多样,有长条形、带状三角形或星形等,细胞之间有突起相连。经 α -actin 免疫细胞化学分析后于光镜下观察,可见 VSMCs 细胞胞浆显绿色荧光,核区不着色(图 1)。

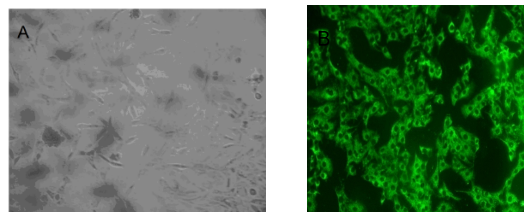


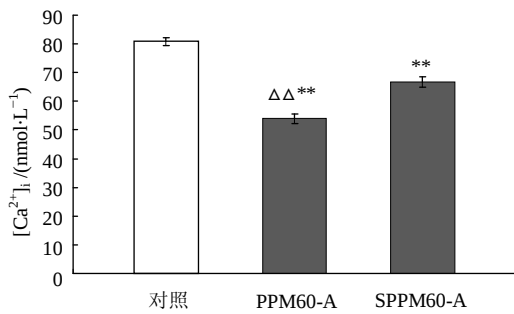
图 1 酶解法原代培养的 VSMCs (A) 及 α -actin 鉴定结果 (B)
Fig. 1 Primary culture VSMCs hydrolyzed by enzyme (A) and tested by α -actin (B)

2.2 PPM60-A 及 SPPM60-A 对 VSMCs $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

PPM60-A 及 SPPM60-A 均可显著降低 $[Ca^{2+}]_i$,酯化后的 SPPM60-A 抑制作用明显下降(图 2)。

2.3 对高 K^+ 升高 VSMCs $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

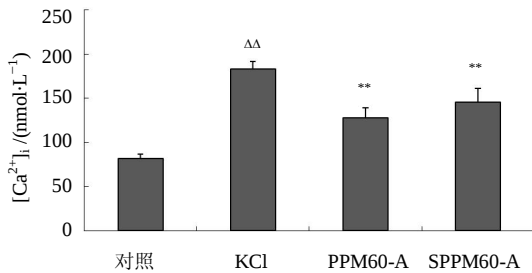
在培养的大鼠 VSMCs 中预先分别加入 PPM60-A (200 $\mu\text{g/mL}$)、SPPM60-A (200 $\mu\text{g/mL}$)作用 5 min 后,在细胞悬液中加入 KCl (终浓度为 40 mmol/L),检测 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的变化。PPM60-A 及 SPPM60-A 组 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高幅度比只加 KCl 的模型组分别下降了 30.4%、20.4% ($P < 0.01$),降幅明显,但仍高于对照组。见图 3。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 SPPM60-A 组比较: ΔΔ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ΔΔ $P < 0.01$ vs SPPM60-A

图2 PPM60-A 及 SPPM60-A 对 VSMCs [Ca²⁺]_i 的影响
Fig. 2 Effect of PPM60-A and SPPM60-A on [Ca²⁺]_i of VSMCs



与对照组比较: ΔΔ $P < 0.01$; 与 KCl 组比较: ** $P < 0.01$

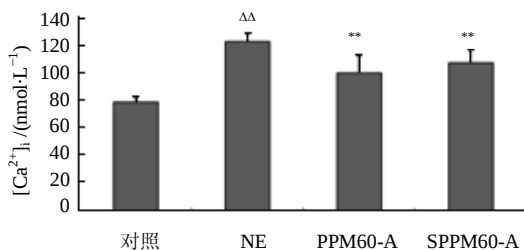
ΔΔ $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs KCl group

图3 PPM60-A、SPPM60-A 对高 K⁺促 VSMCs [Ca²⁺]_i 的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of PPM60-A and SPPM60-A on [Ca²⁺]_i promoted by high K⁺ level

2.4 对 NE 引起 VSMCs [Ca²⁺]_i 升高的抑制作用

在培养的大鼠 VSMCs 中预先分别加入 PPM60-A (200 μg/mL)、SPPM60-A (200 μg/mL) 作用 5 min 后, 在细胞悬液中加入 NE (终浓度为 1.2 μmol/L), 检测 [Ca²⁺]_i 升高的变化。PPM60-A、SPPM60-A 组 [Ca²⁺]_i 的升高幅度比只加 NE 的模型组分别下降了 18.5%、12.6% ($P < 0.01$)。见图 4。



与对照组比较: ΔΔ $P < 0.01$; 与 NE 组比较: ** $P < 0.01$

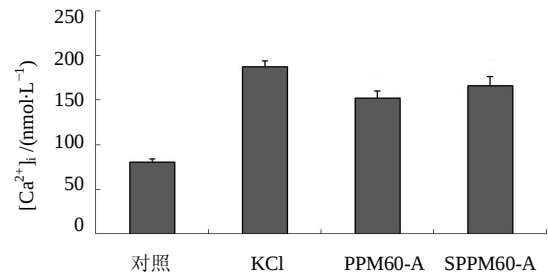
ΔΔ $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs NE group

图4 PM60-A、SPPM60-A 对 NE 引起 VSMCs [Ca²⁺]_i 升高的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of PPM60-A and SPPM60-A on [Ca²⁺]_i promoted by NE

2.5 对高 K⁺引起 VSMCs [Ca²⁺]_i 预升高的抑制作用

在孵育了探针的细胞悬液中加入终浓度为 40 mmol/L 的 KCl 后, [Ca²⁺]_i 迅速升高, 且 15 min 内 [Ca²⁺]_i 能维持在较高的水平而不会下降。然后再分别加入 200 μg/mL 的 PPM60-A、SPPM60-A, 作用 5 min 后检测 [Ca²⁺]_i 的变化。结果胞内 Ca²⁺ 高浓度有所下降, 抑制率分为 18.8%、11.3% ($P < 0.01$)。见图 5。



与对照组比较: ΔΔ $P < 0.01$; 与 KCl 组比较: ** $P < 0.01$

ΔΔ $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs KCl group

图5 PM60-A、SPPM60-A 对高 K⁺引起 VSMCs [Ca²⁺]_i 预升高的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of PPM60-A and SPPM60-A on [Ca²⁺]_i pre-promoted by high K⁺ level

2.6 对 NE 诱导的 VSMCs 增殖的影响

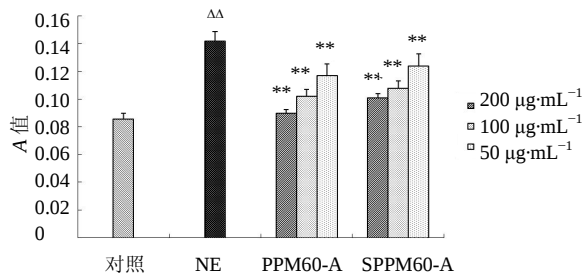
2.6.1 MTT 法 作用 24 h 后 NE 组与对照组相比吸光度 (A) 值上升 65.7% ($P < 0.01$), 说明增殖模型建立成功。随质量浓度增加 (50、100、200 μg/mL), PPM60-A 及 SPPM60-A 均能抑制 NE 诱导的 VSMCs 的增殖, 与质量浓度正相关。200 μg/mL 时的抑制率分别为 36.6% 和 28.7% ($P < 0.01$)。结果见图 6。

2.6.2 细胞计数法 与对照组相比, NE 组 24、48 h 的细胞数量分别上升了 69.9%、54.6% ($P < 0.01$)。PPM60-A 及 SPPM60-A 均能对 NE 促 VSMCs 的增殖起到抑制作用。作用 24 h 后抑制率分别为 36%、30% ($P < 0.01$); 作用 48 h 后抑制率分别为 34.4%、33.1% ($P < 0.01$)。见表 1。

3 讨论

Ca²⁺ 在肌细胞兴奋-收缩偶联中起关键作用, 参与调节平滑肌的舒缩活动。血管平滑肌细胞收缩所需要的 Ca²⁺ 源于外钙内流和内钙释放。

PPM60-A 酯化前后对 VSMCs [Ca²⁺]_i 的影响差异较大 ($P < 0.01$), PPM60-A 降低 VSMCs [Ca²⁺]_i 的作用要强于 SPPM60-A。高钾刺激时, 细胞膜去极化, 激活细胞膜上的电压依赖性钙通道。预先加入 KCl 后 VSMCs [Ca²⁺]_i 立即升高, 并维持在较高



与对照组比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 与 NE 组比较: ^{**} $P < 0.01$
^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs NE group

图 6 PPM60-A、SPPM60-A 对 NE 诱导的 VSMCs 增殖的影响 (24 h)

Fig. 6 Inhibition of PPM60-A and SPPM60-A on proliferation of VSMCs induced by NE (24h)

表 1 PPM60-A、SPPM60-A 对 NE 促 VSMCs 增殖的作用
 Table 1 Inhibition of PPM60-A and SPPM60-A on proliferation of VSMCs induced by NE

组 别	细胞数/($\times 10^5$)	
	24 h	48 h
对照	1.96 $\pm$ 0.268	2.93 $\pm$ 0.249
NE	3.33 $\pm$ 0.108 ^Δ	4.53 $\pm$ 0.125 ^Δ
PPM60-A	2.13 $\pm$ 0.178 [*]	2.97 $\pm$ 0.236 [*]
SPPM60-A	2.33 $\pm$ 0.178 [*]	3.03 $\pm$ 0.249 [*]

与对照组比较: ^Δ $P < 0.01$; 与 NE 组比较: ^{*} $P < 0.01$
^Δ $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.01$ vs NE group

的水平不变 (15 min 内)。再加入 PPM60-A 或 SPPM60-A 作用后, $[Ca^{2+}]_i$ 下降。说明在胞内高钙状态下 PPM60-A、SPPM60-A 可以通过增加钙库贮存或促进钙排出起到降低胞内钙浓度的作用, 从而避免钙超载的损害, 对细胞内正常 $[Ca^{2+}]$ 水平的维持起到平衡作用。比较而言, 酯化前的 PPM60-A 比 SPPM60-A 效果更明显。

血管平滑肌细胞外钙内流主要通过电压依赖性钙通道 (VDC)、受体操作性钙通道 (ROC) 以及静息时的 Ca^{2+} 内流完成; 而细胞内 Ca^{2+} 的释放主要来自肌浆网, 主要是通过 IP3 通道和 RYR 受体通道^[5-6]。有关多糖及其酯化物与钙离子调控的研究并不多见, Landeira 曾报道在海参内质网中提取一种天然的硫酸酯化多糖能抑制 Ca^{2+} -ATPase 的活性^[7]。

对于高 K^+ 去极化引起的细胞内游离钙升高, PPM60-A、SPPM60-A 均有明显的抑制作用。PPM60-A、SPPM60-A 对于 NE 通过其相应受体介导引起的细胞内游离钙升高也有明显的抑制作用,

说明二者对 VSMCs 膜上电压依赖性钙通道 (VDC) 和受体操作性钙通道 (ROC) 均有明显的抑制作用, 同样 PPM60-A 的效果好于 SPPM60-A, 但均在正常水平之上。

VSMCs 是一种兴奋性细胞, 作为血管壁的重要构成成分, VSMCs 由收缩表型向合成表型的转化是增殖的先决条件。其过度增殖是血管增生性疾病形成的重要步骤, 如动脉粥样硬化和血管再狭窄过程等^[8]。目前对于 VSMCs 增殖的研究表明, 多种生长因子、活性物质以及离子 (如 Ca^{2+}) 都能影响 VSMCs 的增殖。

细胞计数与 MTT 结果均证实 PPM60-A 和 SPPM60-A 对去甲肾上腺素诱导的血管平滑肌细胞增殖具有抑制作用, 呈剂量相关性, 二者之间差异不大。变化趋势与 Ca^{2+} 的变化有密切相关性。王大新等^[9]认为壳多糖对兔主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用有可能通过抑制小牛血清 (NBS) 刺激的血管 SMC c-myc mRNA 的表达而实现的。朱海波等^[10]发现来自褐藻的海洋硫酸多糖 DPS 对 VSMC 增殖有抑制作用, 其机制可能与增加一氧化氮合成及降低血管紧张素 II 和内皮素-1 的生成或释放有关。马尾松花粉多糖调控 $[Ca^{2+}]_i$ 及抑制 VSMCs 增殖的具体机制有待进一步探索。

PPM60-A 及 SPPM60-A 均能通过抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 使 VSMCs 胞内缺乏足够的 Ca^{2+} , 结果导致细胞收缩力下降, 血管松弛, 血压下降, 具有一定的临床应用意义。

参考文献

- [1] Chu H L, Mao H, Feng W, et al. Effects of sulfated polysaccharide from Masson pine (*Pinus massoniana*) pollen on proliferation and cell cycle of HepG2 cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 55: 104-108.
- [2] 刘月冉, 冯 淮, 耿 越. 马尾松花粉酯化多糖对 MIN6 细胞胰岛素分泌和 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 [J]. *药物生物技术*, 2013, 20(2): 137-140.
- [3] 毛 华, 楚慧丽, 刘月冉, 等. 马尾松花粉硫酸酯化多糖调控脾细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(10): 1460~1464.
- [4] 耿 越, 刘 媛. 马尾松花粉多糖硫酸酯化前后对小鼠脾细胞钙离子浓度的影响 [J]. *药物生物技术*, 2011, 18(5): 396-398.
- [5] Bers D M, Perez E. Ca^{2+} channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 42: 339-360.
- [6] Delbridge L M, Satoh H, Yuan W, et al. Cardiac myocyte

- volume, Ca^{2+} fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272: H2425-2435.
- [7] Landeira-Fernandez A M, Aiello K R, Aquino R S, *et al.* A sulfated polysaccharide from the sarcoplasmic reticulum of sea cucumber smooth muscle is an endogenous inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase [J]. *Glycobiology*, 2000, 10(8): 773-779.
- [8] Owens G K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle [J]. *Physiol Rev*, 1995, 75(3): 487-517.
- [9] 王大新, 吴宗贵, 周 斌, 等. 壳多糖抑制兔主动脉平滑肌细胞增殖机制的探讨 [J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(2): 159-160.
- [10] 朱海波, 耿美玉, 管华诗, 等. 海洋硫酸多糖 DPS 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及其机制的探讨 [J]. 药学学报, 2001, 36(1): 19-24.