

自制研发奶粉对 ox-LDL 诱导平滑肌细胞增殖的影响

尹曼^{1,2}, 王一侠^{1,2}, 唐秉华³, 陈丽萍³, 谷瑞增^{1,2}, 魏颖^{1,2}

(1. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100015) (2. 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

(3. 宏乐集团有限公司, 广东广州 510000)

摘要: 研究自制研发的中老年心血管奶粉对氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的平滑肌细胞增殖与 NO 释放量的影响。用 ox-LDL 诱导血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖, 建立 VSMC 增殖模型, 通过比较自制奶粉与 3 种常见市售奶粉对模型细胞的增殖抑制作用和 NO 释放量的数据结果, 评价实验室自制研发奶粉的功效。结果表明, 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 作用 VSMC 24 h 可极显著的促进细胞增殖并抑制 NO 的释放 ($p < 0.01$), 说明模型构建成功; 在此 VSMC 增殖模型中分别添加奶粉样品, 得出自制奶粉在 200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 均能抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 的增殖, 且在 400 $\mu\text{g/mL}$ 的抑制作用极显著 ($p < 0.01$), 并均能极显著的促进 NO 的释放 ($p < 0.01$)。说明自制研发的中老年心血管奶粉能够抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖模型, 具有较好的预防动脉粥样硬化的功效。

关键词: 中老年奶粉; 血管平滑肌细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 细胞增殖; 动脉粥样硬化

文章编号: 1673-9078(2017)5-47-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.008

Effect of Self-developed Milk Powder on Oxidized-low Density Lipoprotein (ox-LDL)-Induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

YIN Man^{1,2}, WANG Yi-xia^{1,2}, TANG Bing-hua³, CHEN Li-ping³, GU Rui-zeng^{1,2}, WEI Ying^{1,2}

(1. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China) (2. Beijing Engineering Research Center of Protein & Functional Peptides, Beijing 100015, China) (3. WinnerWells Group Limited, Guangzhou 510000, China)

Abstract: The effect of self-developed milk powder on the proliferation and nitric oxide (NO) production of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL) was studied. A VSMC proliferation model was established by inducing the proliferation of VSMC with ox-LDL. The effects of the milk powder developed in our laboratory was evaluated by comparing its inhibitory effect on the proliferation and NO production of the model cells with three kinds of common commercial milk powders. The results indicated that when VSMCs were treated with 30 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL for 24 h, cell proliferation was significantly promoted and NO release was inhibited ($p < 0.01$), indicating that the model was successfully established. In this VSMC model, different amounts of self-developed milk powder were added, and the results showed that solutions of 200, 400, and 800 $\mu\text{g/mL}$ milk powder inhibited ox-LDL-induced VSMC proliferation. In addition, 400 $\mu\text{g/mL}$ milk powder highly inhibited cell proliferation and promoted NO production ($p < 0.01$). The above findings demonstrate that self-developed milk powder inhibited the ox-LDL-induced proliferation in VSMCs; therefore these milk powders may prevent atherosclerosis and be beneficial for middle-aged and older populations.

Key words: milk powder for middle-aged and older population; vascular smooth muscle cell; oxidized-low density lipoprotein; cell proliferation; atherosclerosis

收稿日期: 2016-05-07

基金项目: 十三五国家重点研发计划 (2016YFD0400604); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2013AA102205-02)

作者简介: 尹曼 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养

通讯作者: 魏颖 (1981-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 功能食品

动脉粥样硬化 (AS) 严重威胁人类健康, 作为一种慢性炎症反应, 其主要分为急性渗出性炎症和慢性增生性炎症, 后者见于 AS 进展期, 伴随有 VSMC 的大量增殖^[1]。低密度脂蛋白 LDL 是导致动脉粥样硬化的关键因素, 其氧化型的 ox-LDL 会通过增加体内 ROS 水平、增加巨噬细胞的吞噬能力、促进细胞泡沫化等一系列行为诱发动脉粥样硬化; VSMC 的增殖与迁移主要由血小板衍生生长因子 PDGFR β 通过磷酸化信号转导来调控, VSMC 与 ox-LDL 共孵育 24 h 会极显著促进细胞 DNA 的合成, 且共孵育 16 h 会造成 PDGFR β 的持续磷酸化, 促进 VSMC 增殖; ox-LDL 还会造成血管内皮细胞的损伤, 极显著激活胞内 NADPH 的活性, 产生 O₂ 进一步氧化 LDL, 造成恶性循环^[2,3]。NO 在血管舒张、内皮细胞再生、抑制白细胞趋化性等方面发挥重要作用, 能够抑制 VSMC 的异常增殖; ox-LDL 导致的内皮受损会抑制 NO 合成酶的活性, 同时 ox-LDL 会通过胞内释放的活性氧解偶联 NO 合成酶, 造成 NO 含量的下降, 导致动脉粥样硬化的发生^[4]。

如上所述, 氧化应激是造成 AS 的主要原因, 因此增强机体的抗氧化能力能在一定程度上预防 AS 的发生。天然植物中富含多种抗氧化成分: 类胡萝卜素、生物类黄酮、阿魏酸、人参属的皂苷和多糖、Vc、V_E 以及来源于豆科植物的染料木黄酮等均有相关预防 AS 的报道; 同时食源性生物活性肽由于具有抗氧化、降血压、降血脂的功效也具有一定预防 AS 的功效^[5-7]。实验室研制奶粉采用等量逐级递增的方式添加了易于人体吸收的食源性生物活性肽, 希望在保证中老年所需的营养物质的同时达到所期望的功效。本实验从构建 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖的模型入手, 探讨 VSMC 增殖模型建立所需 ox-LDL 的最佳诱导浓度与时间, 并通过市售奶粉和自制奶粉直接作用于模型细胞, 评价自制奶粉对 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖及 NO 释放量的影响, 并与市售奶粉的功效进行比较, 为后期自制奶粉配方的进一步调整奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

3 种常见市售奶粉: 购于超市; 心血管奶粉: 自制研发产品; 食源性生物活性肽: 中食海氏生物技术有限公司; DMEM 培养基: Hyclone 公司; 胎牛血清 (FBS): 四季青公司; 胰蛋白酶、Griess 试剂和缓冲液 PBS: 碧云天生物技术研究; 兔主动脉平滑肌细胞 CCC-SMS-1 细胞株: 中国协和医科大学细胞中心;

氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL): yiyuan biotech 公司; MTT: Sigma 公司; DMSO: 西陇化工股份有限公司。

1.2 主要仪器设备

Spectra MR 多功能酶标仪: 美国 Dynex 公司; ESCO AC2-6S1 生物安全柜: 新加坡艺思高科技有限公司; 240i 直热式二氧化碳培养箱: 美国 Thermofisher 公司; BD C6 流式细胞仪。

1.3 试验方法

1.3.1 基础理化分析

1.3.1.1 蛋白质含量的测定^[8]

采用凯氏定氮法测定奶粉蛋白质含量。

1.3.1.2 水分含量的测定^[9]

采用常压干燥法测定奶粉中水分含量。

1.3.2 细胞培养

用含灭活的体积分数 10% FBS 的 DMEM 完全培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 VSMC, 待细胞长满培养瓶瓶底后, 先用 PBS 缓冲液洗 2 次, 再加 0.25% 胰酶消化 3 min, 细胞开始脱落时加入 DMEM 完全培养基终止反应, 将细胞吹打成细胞悬液, 按 1:3 进行传代。

1.3.3 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖模型的建立

VSMC 增殖模型的建立参考文献^[10]并稍作调整。将 VSMC 按 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 100 μ L/孔, 于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h, 弃上清, 用 PBS 缓冲液洗 2 次, 再加新鲜配制的含 10、20、30、40、50 μ g/mL ox-LDL 的 DMEM 不完全培养基诱导细胞增殖, 100 μ L/孔, 每组 6 个复孔, 同时设正常培养的细胞作对照。各组加 ox-LDL 干预 24 h 后, 收集上清液, 依据 NO 试剂盒说明书测定 NO 释放量, 同时采用 MTT 法检测细胞增殖情况, NO 检测结果应用细胞增殖检测结果加以校准, 计算单位细胞 NO 释放量。以细胞增殖率和单位细胞 NO 释放量为判断指标, 比较各浓度 ox-LDL 组与正常对照组的细胞增殖率与单位细胞 NO 释放量, 增殖率越高, NO 释放量越低, 说明建立的细胞增殖模型越成功。

1.3.4 奶粉对 VSMC 增殖的影响

$$\text{增值率} = \frac{\text{OD}_{\text{细胞+样品}}}{\text{OD}_{\text{细胞}}} \quad (1)$$

将 VSMC 按 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 100 μ L/孔, 于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h, 将细胞分为空白对照组和奶粉样品组, 更换含有各奶粉样品 (终质量浓度分别为 200、400、800 μ g/mL) 的无血清的 DMEM 培养液继续孵育 24 h, MTT 法检测

细胞活力, 计算各组细胞增殖率, 计算公式如 (1)。

1.3.5 奶粉对 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖的影响

细胞增殖模型建立成功后, 将模型细胞分为样品组和模型组, 同时设空白对照组。除对照组和模型组外, 其他 4 组分别加入含各奶粉样 (终质量浓度分别为 200、400、800 $\mu\text{g/mL}$) 的不完全 DMEM 培养基, 每个质量浓度组设 6 个复孔。样品干预 24 h 后, 依据 NO 试剂盒说明书测定上清 NO 释放量, MTT 法检测细胞增殖情况。与模型组相比增殖率越低, 单位 NO 释放量越高, 说明所对应奶粉样品预防动脉粥样硬化的功效越好。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行处理, 试验

表 1 奶粉基础理化成分

Table 1 Basic chemical composition of milk powder

奶粉名称	总蛋白含量/%	酸溶蛋白含量(肽及氨基酸)%	固形物含量/%
奶粉 1	18.42±0.15	1.08±0.033	95.99±0.20
奶粉 2	18.88±0.17	1.00±0.011	96.41±0.14
奶粉 3	26.44±0.03 ^b	1.24±0.015	95.71±0.37
自制奶粉	31.52±0.28 ^c	5.74±0.067 ^c	94.87±0.31

注: b 表示 $p < 0.05$; c 表示 $p < 0.01$ (与奶粉 1 和奶粉 2 相比较)。

2.2 不同浓度 ox-LDL 对 VSMC 模型的影响

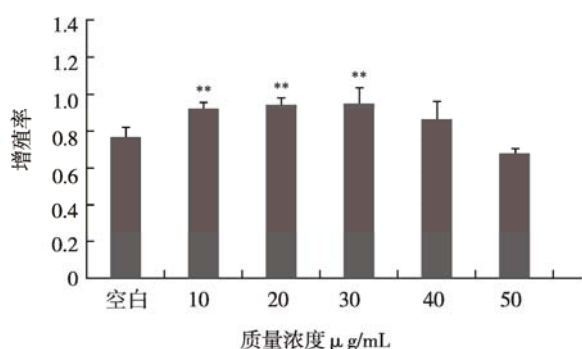


图 1 不同浓度 ox-LDL 对 VSMC 增殖的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of ox-LDL on VSMC proliferation

注: ** $p < 0.01$ (与空白组比较)。

ox-LDL 是诱导 VSMC 增殖的关键因素, 可通过促进细胞磷酸酯酶 D 和 DNA 的合成诱导 VSMC 增殖^[1]; NO 是 VSMC 的松弛因子, NO 合成酶受损发生于动脉粥样硬化早期^[2]。ox-LDL 对 VSMC 增殖和单位细胞 NO 释放量检测结果见图 1 和图 2。ox-LDL 在浓度为 10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ 时诱导 VSMC 24 h 后会极显著的促进细胞增殖 ($p < 0.01$), ox-LDL 在大于 10

结果以均值±标准偏差 (Mean±SD) 表示。采用组间 t 检验, $p < 0.05$ 具有显著性差异, $p < 0.01$ 具有极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 奶粉基础理化性质分析

由实验得出的奶粉基础理化指标结果见表 1, 结果均为质量分数。自制研发奶粉中总蛋白含量占 31.52±0.28%, 其中酸溶蛋白即包括肽及氨基酸等较低分子量的蛋白水解物占 5.741±0.067%, 均极显著高于市售奶粉组, 此结果表明, 自制奶粉含有较高易于人体吸收的小分子蛋白, 更易于中老年群体补充所需的蛋白质, 发挥其生理功效。

$\mu\text{g/mL}$ 时会降低 VSMC 单位细胞 NO 的释放量, 且在 30 $\mu\text{g/mL}$ 时单位细胞的 NO 的释放量相对对照组显著降低 ($p < 0.05$)。综合 MTT 检测结果和 NO 释放量, 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 既能极显著的促进 VSMC 增殖, 又能显著的降低单位细胞 NO 释放量, 故确定 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 作用 24 h 为最佳细胞增殖模型。

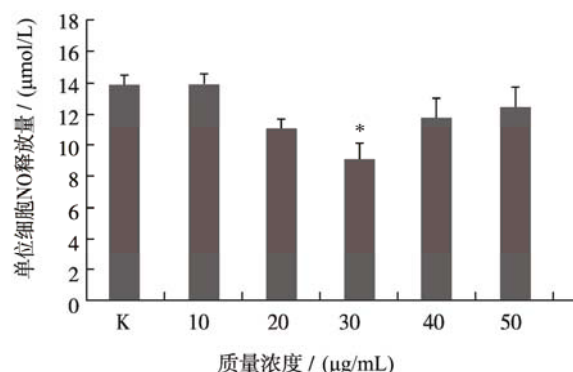


图 2 不同浓度 ox-LDL 对 VSMC 上清 NO 释放量的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of ox-LDL on VSMC NO production

注: ** $p < 0.01$ (与空白组比较)。

2.3 奶粉对 VSMC 增殖的影响

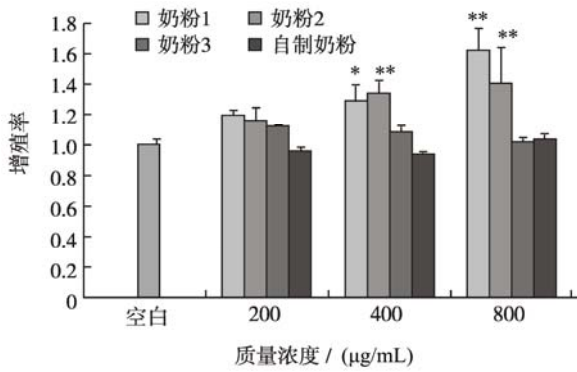


图3 奶粉对 VSMC 增殖的影响

Fig.3 Effect of milk powder on VSMC proliferation

注: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (与空白组比较)。

奶粉对 VSMC 增殖的影响见图 3。如图所示, 与空白对照相比, 奶粉 1 和奶粉 2 在 3 个浓度下对 VSMC 的增殖均有一定的促进作用; 奶粉 3 和自制奶粉在 3 个浓度下对 VSMC 增殖均有一定的抑制作用, 并且随浓度的增加增殖率呈降低趋势, 但相比于空白组而言并没有显著性差异。说明所选 3 种浓度不会对细胞正常生长产生影响。

2.4 奶粉对 VSMC 增殖模型的影响

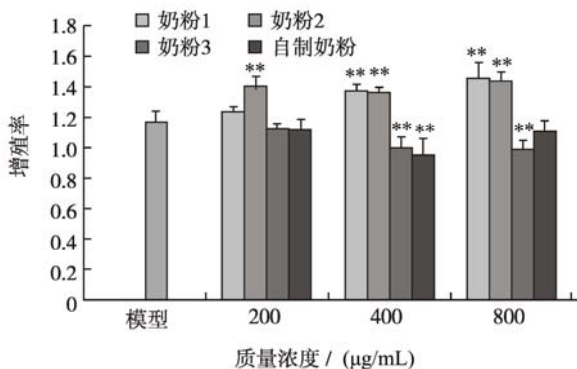


图4 奶粉对 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖的影响

Fig.4 Effect of milk powder on ox-LDL-induced VSMC proliferation

注: ** $p < 0.01$ (与模型组比较)。

通过建模过程中添加奶粉, 各奶粉组对模型细胞增殖的影响见图 4。奶粉 3 和自制奶粉组较奶粉 1 和奶粉 2 对模型细胞的增殖抑制作用效果更好, 奶粉 3 在 400 $\mu\text{g/mL}$ 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 时能极显著的抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖 ($p < 0.01$), 自制奶粉在 400 $\mu\text{g/mL}$ 能极显著抑制细胞增殖 ($p < 0.01$), 而在 200 $\mu\text{g/mL}$ 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 虽也能抑制细胞增殖, 但抑制效果相比模型组而言并没有统计学意义上的差异。奶粉 1 和奶粉 2 在 3 个浓度下均促进了 ox-LDL 诱导的 VSMC 的增殖, 与实验预期结果相反。其中, 奶粉 3 中添加了植物甾醇, 有研究表明灌胃大鼠高脂饲料和植物甾醇,

植物甾醇可显著降低高脂饲料组大鼠体内总胆固醇及低密度脂蛋白的含量, 并能有效降低血清中脂质过氧化物 MDA 的形成^[13]; 自制奶粉中添加了食源性生物活性肽, 关于食源性生物活性的抗氧化功效也已于大量的文献报道; 且有研究表明抗氧化类药物可抑制 ox-LDL 诱导的平滑肌细胞的增殖与迁移, 抑制平滑肌细胞由易于增殖的合成型向正常状态下增殖率极低的收缩型的转变^[14], 奶粉 3 和自制奶粉对平滑肌细胞增殖模型的抑制作用可能与二者相关。

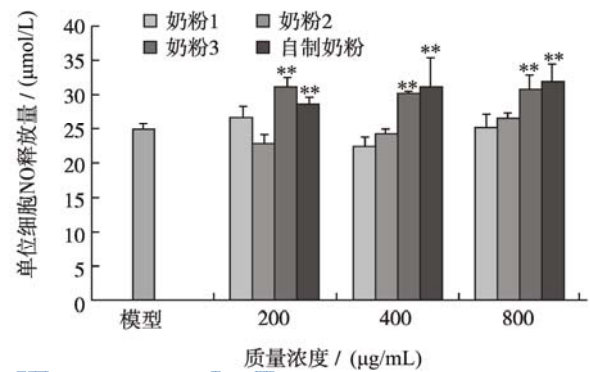


图5 奶粉对 ox-LDL 诱导的 VSMC NO 释放量的影响

Fig.5 Effect of milk powder on ox-LDL-induced NO production by VSMCs

注: ** $p < 0.01$ (与模型组比较)。

奶粉对 ox-LDL 诱导的 VSMC 的 NO 释放量的结果如图 5。由图可知, 自制奶粉和奶粉 3 能极显著的促进 VSMC 释放 NO ($p < 0.01$), 奶粉 1 和奶粉 2 对 NO 释放量的影响无统计学意义, 说明自制奶粉和奶粉 3 具有较好促进 VSMC 释放 NO 的功效。

3 结论

体外构建了 VSMC 增殖模型, 并对自制研发奶粉和 3 种常见市售中老年奶粉对 VSMC 增殖模型的作用结果进行了比较研究。结果表明: 综合 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖和 NO 释放量的检测结果, 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 诱导 24 h 既能极显著的促进细胞增殖 ($p < 0.01$), 又能显著的降低 NO 的释放 ($p < 0.05$), 故 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 作用 24 h 为最佳 VSMC 增殖模型。对模型细胞添加奶粉样品, 奶粉 3 和自制奶粉均能抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 的增殖, 极显著的促进细胞 NO 的释放 ($p < 0.01$); 自制奶粉组在 400 $\mu\text{g/mL}$ 时既能极显著的抑制细胞增殖又能促进 NO 释放 ($p < 0.01$), 而在 200 $\mu\text{g/mL}$ 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 抑制细胞增殖的效果相比模型组虽没有统计学意义上的差异, 却能极显著促进 NO 的释放 ($p < 0.01$)。本研究结果提示: 自制研发的奶粉具有较好的抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖和促进 NO 释放的作用, 其功效亚于奶粉

3 却优于奶粉 1 和奶粉 2,说明自制奶粉具有相对较好的预防动脉粥样硬化的功效,这可能与含有小分子生物活性肽有关。后期可通过调整配方,通过生物活性肽、功能性物质(抗氧化成分)等的加入与调配,进一步提高产品的功效,同时奶粉 3 植物甾醇的添加也为奶粉配方的调整提供参考。

参考文献

- [1] 刘俊田.动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J].西安交通大学学报(医学版),2015,36(2):141-152
LIU Jun-tian. The research progress of inflammation mechanism of atherosclerosis [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2015, 36(2): 141-152
- [2] Jan Galle, Thomas Hansen-Hagge, Christoph Wanner, et al. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells [J]. Atherosclerosis, 2006, 185(2): 219-226
- [3] Cecile Vindis, Isabelle Escargueil-Blanc, Koji Uchida, et al. Lipid oxidation products and oxidized low-density lipoproteins impair platelet-derived growth factor receptor activity in smooth muscle cells: implication in atherosclerosis [J]. Redox Report, 2007, 12(1/2): 96-100
- [4] Claudio Napoli, Filomena de Nigris, Sharon Williams-Ignarro, et al. Nitric oxide and atherosclerosis: An update [J]. Nitric Oxide-Biology and Chemistry, 2006, 15(4): 265-279
- [5] Graziano Riccioni M D, Lorenza Speranza, Mirko Pesce, et al. Novel phytonutrient contributors to antioxidant protection against cardiovascular disease [J]. Nutrition, 2012, 28(6): 605-610
- [6] Yuan S M. Potential cardioprotective effects of Ginseng preparations [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 28(3): 963-971
- [7] 赵谋明,任娇艳.食源性生物活性肽结构特征与生理活性的研究现状与趋势[J].中国食品学报,2011,11(9):69-87
ZHAO Mou-ming, REN Jiao-yan. Foodborne biological active peptide structure characteristics and the status of research on physiological activity and trends [J]. Journal of Chinese Food, 2011, 11(9): 69-87
- [8] GB/T 22492-2008,大豆肽粉[S]
GB/T 22492-2008, Soy peptides powder [S]
- [9] GB 5009.3-2010,食品中水分的测定[S]
GB 5009.3-2010, Determination of moisture in foods [S]
- [10] 杨佩颖,吴薇,魏颖,等.刺玫果多酚对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J].食品科技,2011,36(10):191-195,199
YANG Pei-ying, WU Wei, WEI Ying, et al. Inhibition effect of rose hip polysaccharide on proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(10): 191-195, 199
- [11] E Luk A I, Gottlieb. Atherosclerosis [J]. Pathobiology of Human Disease, 2014: 2970-2985
- [12] Ignarro L J, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 1999, 34(6): 879-886
- [13] 戴毅.植物甾醇降血脂作用的研究[D].西安:第四军医大学,2010
DAI Yi. Effects of plants sterol on plasma lipids and liver lipids in high-fat diet rat [D]. Xian: Fourth Military Medical University, 2010
- [14] 宁俊杰.他汀类药物与抗氧化药物对血管平滑肌细胞生物学行为的影响[D].上海:复旦大学,2014
NING Jun-jie. Effects of statins and antioxidants on the biological behaviors of vascular smooth muscle cells [D]. Shanghai: Fudan University, 2014