

洛沙坦抑制平滑肌细胞增殖和神经肽 Y 作用的关系

高 聪¹, 刘健康², 黄少华³, 陈敏生¹

(广州医学院 1. 第二附属医院神经内科, 2. 组织胚胎学教研室, 3. 第一附属医院心内科, 广东 广州 510260)

摘要: 【目的】探讨洛沙坦(Losartan)对高血压病人血管重塑的作用机制以及肾素-血管紧张素系统和神经肽 Y(NPY)在高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病发生的作用。【方法】实验分为对照组、Losartan 组、NPY 组及 Losartan+NPY 4 组,应用生物化学方法(MTT)和荧光免疫组化定量技术(ACAS 570 共聚焦激光扫描显微细胞仪),每组扫描细胞总数在 200 个以上,观察 Losartan 对体外培养血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响和与 NPY 作用的关系。【结果】对照组、Losartan 组、NPY 组及 Losartan+NPY 4 组 VSMC 增殖活度(吸光度表示)分别为 0.2239 ± 0.0010 、 0.2045 ± 0.0013 、 0.2626 ± 0.0025 、 0.2440 ± 0.0013 , 增殖细胞核抗原(PCNA)荧光值分别为 1543 ± 200 、 1339 ± 233 、 1649 ± 233 、 1545 ± 256 。Losartan 可抑制体外培养和 NPY 作用下 VSMC 的增殖,与对照组相比,VSMC 增殖活度和 PCNA 的表达均明显降低($P < 0.01$)。【结论】Losartan 对高血压的治疗既有 Losartan 对 VSMC 增殖的抑制作用,也有对 NPY 等缩血管因素的拮抗作用。

关键词: 洛沙坦/药理学; 神经肽 Y/药理学; 肌,平滑,血管/药物作用; 免疫荧光定量技术

中图分类号: R972.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-0044-03

The Inhibiting Effects of Losartan on Proliferation of Cultured Arterial Smooth Muscle Cell and Its Relationship with Neuropeptide Y

GAO Cong¹, LIU Jian-kang², HUANG Shao-hua³, CHEN Min-sheng¹

(1. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, 2. Department of Histology and Embryology, 3. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China)

Abstract: 【Objective】To explore the mechanism of action of Losartan on vascular remodelling in hypertension and its relationship with neuroendocrine factor and renin-angiotensin system. 【Methods】The study consisted of control group and other three treatment groups: Losartan group, NPY group, and Losartan+NPY group. More than 200 cells were scanned in each group. The methods of cellular culture, biochemistry and quantitative immunocytochemistry through ACAS570 were applied to investigate the proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC) and the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cultured rat VSMC treated with Losartan and Neuropeptide Y (NPY) stimulation. 【Results】VSMC proliferation (by absorbance) in the control group and other three examined groups: Losartan group, NPY group and Losartan+NPY group were 0.2239 ± 0.0010 、 0.2045 ± 0.0013 、 0.2626 ± 0.0025 、 0.2440 ± 0.0013 , and PCNA (by fluorescence intensity) were 1543 ± 200 、 1339 ± 233 、 1649 ± 233 、 1545 ± 256 . It was observed that losartan could inhibit the VSMC proliferation *in vitro* culture with and without NPY simulation. Compared with the control groups, the VSMC proliferation activity and expression of PCNA were obviously decreased in the losartan treated groups. 【Conclusion】The results demonstrate that losartan has the inhibitive effects on VSMC proliferation and PCNA expression. The results also suggest that losartan has anti-NPY effect on VSMC in vascular remodelling of hypertensive vessels.

收稿日期: 2000-06-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助(980466)

作者简介: 高 聪(1958-), 女, 副主任医师, 中山医科大学 1982 届毕业生校友, 长期从事神经病学专业。

Key words: losartan/ pharmacology; neuropeptide Y/ pharmacology; muscle, smooth, vascular/ drug effect; quantitative immunocytochemistry

逆转血管局部肾素-血管紧张素系统(RAS)对血管平滑肌细胞(VSMC)收缩和增殖的促进作用,在高血压疾病的治疗过程中具有十分重要的作用^[1]。洛沙坦(losartan)是临床上第一个用于高血压治疗的非肽类血管紧张素II受体拮抗剂,其药理及临床研究表明:Losartan通过特异性地拮抗肾素血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)受体I亚型舒张血管,从而获得了良好的降压效果^[2]。但是,Losartan的降压作用是否直接抑制VSMC的增殖而引起血管壁结构的重塑,并与血管局部的神经内分泌因素,尤其是神经肽Y(Neuropeptide Y, NPY)活性高低密切相关?这些还有待证实。本研究运用生物化学方法(MTT)和荧光免疫组化定量技术观察Losartan对体外培养VSMC增殖的影响和与NPY作用的关系,以探讨Losartan对高血压病人血管重塑的作用机制以及肾素-血管紧张素系统和NPY在高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 血管平滑肌细胞的体外培养

组织贴块法培养血管平滑肌细胞。无菌条件下分离SD大鼠的脑动脉,剪碎后加入适量含100 mL/L胎牛血清的DMEM(Gibco公司产品)培养液,37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱中静置培养。用光镜和免疫化学方法进行鉴定。选择生长良好的第6代VSMC用于实验。

1.2 实验分组

实验分为对照组、Losartan组、NPY组及Losartan+NPY 4组。Losartan组加入Losartan条件培养液(Merck Co产品),NPY组加入NPY条件培养液(NOVA Biochem产品,Switzerland),Losartan+NPY组分别加入Losartan和NPY两种条件培养液。条件培养液均以无血清的DMEM培养液配制,终浓度分别为10⁻⁵ g/L和10⁻⁶ mol/L。每组扫描细胞总数在200个以上。

1.3 血管平滑肌细胞增殖活性的测定

快速自动微量MTT比色法测定^[3]。选择第6代生长良好的平滑肌细胞,消化传代至96孔培养

板上,传代细胞密度为5.0×10⁷/L。细胞经18 h的预培养和6 h的预处理后,分别将Losartan、NPY及Losartan+NPY条件培养液和无血清DMEM培养液加入治疗组和对照组,37℃、体积分数为5%的CO₂继续培养24 h。平滑肌细胞增殖活性的高低以550 nm波长下酶标仪检测样本中MTT结晶所形成的吸光度A_{MTT}来表示。

1.4 血管平滑肌增殖细胞核抗原的表达

选择第6代生长良好的平滑肌细胞,消化传代至24孔培养板上,传代细胞密度为5.0×10⁷/L。细胞经18 h的预培养和6 h的预处理后,分别将Losartan、NPY及Losartan+NPY条件培养液和无血清DMEM培养液加入治疗组或对照组,37℃、体积分数为5%的CO₂继续培养24 h。吸去培养液,以pH 7.3的PBS洗3次,30 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次。

已固定样品按常规免疫组织化学方法处理。首先,以50 mL/L正常山羊血清封闭,室温孵育30 min;倾去血清,滴加稀释度为1:50鼠抗大鼠增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体(美国Santa Cruz公司产品),4℃冰箱过夜。样品倾去抗体孵育液, PBS洗3次,换加1:10 FITC荧光标记兔抗鼠抗体(天象人公司产品),室温孵育40 min后, PBS充分洗板,每待测样品加入20 μL PBS后,分别置带电脑激光扫描共聚焦显微细胞仪(ACAS575UVC型,美国MERIDIAN公司制造),确定激发光波长(λ)为488 nm,进行样品检测和数据即时的统计学分析处理。

1.5 统计学处理

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 t 检验。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞鉴定

倒置显微镜下,细胞生长呈典型的“谷与峰”结构特征,α-actin单克隆抗体免疫细胞化学显示95%的细胞为阳性VSMC。

2.2 Losartan对VSMC增殖活度的影响及与NPY作用的关系

MTT比色法检测体外培养平滑肌细胞的增殖

活度,其增殖能力的高低以所形成 MTT 结晶的吸光度 A 来表示。Losartan 组 MTT 比色的吸光度 A 明显低于对照组 ($P < 0.01$); NPY 组 MTT 比色的吸光度 A 显著高于对照组 ($P < 0.01$); 而 Losartan+NPY 组中 MTT 比色的吸光度 A 比对照组有所降低 ($P < 0.05$) (见表 1)。实验结果说明 Losartan 抑制 VSMC 的增殖活动; 而当培养体系中加入 NPY 时, VSMC 的增殖活动度提高, 表现出 NPY 对 Losartan 抑制 VSMC 增殖的拮抗作用。

2.3 Losartan 对 VSMC 中 PCNA 表达的影响及与 NPY 作用的关系

将免疫荧光显示技术和带电脑激光扫描共聚焦显微细胞仪的检测技术结合起来可较为准确地

定量细胞中核酸和蛋白质的变化。样品中被检测物质标记荧光的强度 (FI) 以平均荧光值来表示, 并以其反映细胞中 PCNA 表达的高低。在激光扫描共聚焦显微细胞仪下见 Losartan 组被标记细胞和标记荧光强度均弱于对照组; NPY 组被标记细胞荧光强于对照组; 而 Losartan+NPY 组的荧光强度则较 Losartan 组有所增强, 但却与对照组无差异 ($P > 0.05$)。Losartan 组与对照组相比, PCNA 平均荧光值明显降低, 差异显著 ($P < 0.01$); NPY 组 PCNA 平均荧光值高于对照组 ($P < 0.05$)。而 Losartan+NPY 组中 PCNA 平均荧光值与 Losartan 组相比明显降低, 但却与对照组无差异 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 Losartan 抑制平滑肌细胞增殖和 NPY 作用的关系

Table 1 The inhibiting effects of losartan on smooth muscle cell proliferation and its relationship with Neuropeptide Y ($\bar{x} \pm s$)

Group	Losartan	NPY	Losartan+NPY	Control
A_{MTT}	$0.2045 \pm 0.0013^{1)}$	$0.2626 \pm 0.0025^{1)}$	$0.2440 \pm 0.0013^{2)}$	0.2239 ± 0.0010
FI of PCNA	$1339 \pm 233^{1)}$	$1649 \pm 233^{2)}$	$1545 \pm 256^{3)}$	1543 ± 200

Compared with control group: 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$, 3) $P > 0.05$

3 讨论

原发性高血压病的发生与血浆局部肾素-血管紧张素 II 的活性和浓度水平高低密切相关^[4]。Ang II 通过作用于 VSMC 的 Ang II 受体, 提高细胞内游离钙离子浓度, 从而引起血管的收缩和 VSMC 的异常增殖, 并导致高血压时血管壁结构的重塑。因此, 阻断或抑制 Ang II 受体的作用可以降低血压、逆转血管壁结构异常, 从而发挥抗高血压的治疗作用。

Losartan 是 90 年代合成的 AT1 受体阻断剂, 它与其他非肽类受体阻断剂 (如 Saralasin) 相比, 具有作用机制新颖、治疗效果良好的特异性强等特点, 并且没有部分激动作用, 在治疗高血压药物中占有重要地位^[6]。在本实验中, 用 MTT 比色法和激光扫描共聚焦显微细胞仪观察 Losartan 对 VSMC 的作用时发现: Losartan 可明显降低 VSMC 的增殖活性和 VSMC 中 PCNA 的表达。MTT 比色法是通过显示细胞线粒体代谢酶活性的高低, 间接反映细胞的增殖活性。PCNA 则是细胞核中 DNA 聚合酶的附属蛋白, 其主要生物学作用是促进细胞核中 DNA 链的合成与延伸, 促进细胞的生

长和增殖^[7]。MTT 的吸光度和 PCNA 表达水平的高低至少说明通过抑制 VSMC 的增殖很可能也是 Losartan 治疗高血压的作用机制之一。但是, 实验结果中用低于正常血药浓度的 Losartan (10 g/L), 其 MTT 比色的吸光值和 PCNA 的平均荧光值降低的幅度并不很大。我们推测 Losartan 的这种抑制作用很可能与低浓度下的 Losartan 抑制 VSMC 中 DNA 或蛋白质的合成有关, 即抑制 VSMC 的肥大。

NPY 在外周神经系统中主要与去甲肾上腺素共存分布于血管壁上的交感神经纤维末梢, 直接引起 VSMC 的收缩, 并增强血管对缩血管物质的敏感性。目前已发现血管紧张素 II 受体功能状态与去甲肾上腺素或 NPY 在交感神经纤维末梢中的释放密切相关, 抑制血管紧张素 II 的产生就可抑制去甲肾上腺素或 NPY 的释放^[8]。因此, Losartan 的降压作用是否有 NPY 的参与是值得研究的。

我们将 NPY 加入到 Losartan 的培养体系中去, 探讨 NPY 在 Losartan 降压机制中的作用, 结果发现 NPY 可提高被抑制 VSMC 的 MTT 的吸光度和 PCNA 表达的平均荧光值。这提示 Losartan 降压机制中有 NPY 的参与。抑制 NPY 的作用或减少 NPY 的释放很可能产生对 VSMC 增殖的抑制

作用, 从而改善血管壁结构的异常。这对高血压时的血管重塑是十分重要的。

综上所述, 我们认为 Losartan 对高血压的治疗既有 Losartan 对 VSMC 增殖的抑制作用, 也有对 NPY 等缩血管因素的拮抗作用。

参考文献:

- [1] 杜 宜, 高 聪. 氯氟地平对老年高血压病人左心室肥厚的逆转作用[J]. 广东药学院学报, 1996, 12(3): 163.
- [2] Bauer J H, Reams G P. The angiotensin II type I receptor antagonists: a new class of antihypertensive drugs [J]. Arch Intern Med, 1995, 55(10): 1361.
- [3] 郑永唐, 袁昆龙. 测定细胞抑制和增殖的 MTT 方法的建立[J]. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266.
- [4] Touyz R M, Schiffin E. Angiotensin II regulates vascular smooth muscle cell pH, contraction and growth via tyrosine kinase-dependent signaling pathways [J]. Hyperten-

sion, 1997, 30(2): 222.

- [5] Berk B C, Corson M A. Angiotensin II signal transduction vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. Circ Res, 1997, 80(5): 607.
- [6] Wong P C, Price W A, Chiu A T, *et al.* Nonpeptide angiotensin II receptor antagonist: studies with EXP9270 and Du753 [J]. Hypertension, 1990, 15(6 pt 2): 823.
- [7] Siltanen S M, Isola J J, Rantala I S, *et al.* Intratumour variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis [J]. Am J Clin Pathol, 1993, 99(3): 226.
- [8] van Valdhuissen D J, Brodde O E, van Gilst W H, *et al.* Relation between myocardial beta-adrenoceptor density and hemodynamic and neurohumoral changes in a rat model of chronic myocardial infarction: effects ibopamine and captopril [J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(3): 346.

(编辑 刘清海)

(上接第 43 页)

甙在体内的实际生物学过程中是否也具有体外这样一些生物活性仍需进一步研究, 而且积雪草甙药物治疗瘢痕的作用机理也可能是多方面的, 要完全阐明, 还有很多工作有待深入探讨。

(本实验得到病理教研室文剑明教授及张萌老师的大力帮助, 在此一并致谢)

参考文献:

- [1] 罗思剂. 积雪草甙的分离与鉴定 [J]. 中草药, 1981, 11(6): 244.
- [2] 鄂 征. 组织培养技术 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 2~235.
- [3] Sargent J M, Taylor C G. Appraised of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia [J]. Br J Cancer, 1989, 60(3): 206.
- [4] Laurent G J. Rates of collagen synthesis in lung, skin and muscle obtained *in vivo* by a simplified method using [³H]-proline [J]. Biochem, 1982, 15, 206(3): 535.
- [5] 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 222~223.

- [6] Diegelmann R F, Cohen I K, McCoy B J. Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro [J]. J Cell Physiol, 1979, 98(2): 341.
- [7] Peltonen J, Larjava H, Jaakkola S. Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin; variable expression in basal and squamous cell carcinomas [J]. J Clin Invest, 1989, 84(6): 1916.
- [8] Granstein R D, Deak M R, Tacques S L, *et al.* The systemic administration of gamma interferon inhibits collagen synthesis and acute inflammation in a murine skin wounding model [J]. J Invest Dermatol, 1989, 93(1): 18.
- [9] Paulsson Y, Hammacher A, Heldin C, *et al.* Possible positive autocrine feedback in the prereplication phase of human fibroblast [J]. Nature, 1987, 328(6132): 715.
- [10] Reghu G, Masta S, Meyers D, *et al.* Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblast and the effect of TGF-β [J]. Am Rev Respir Dis, 1989, 140(1): 95.

(编辑 张敏瑞)