

# 神经肽 Y 对培养的血管平滑肌细胞增殖的影响<sup>①</sup>

陈敏生<sup>1②</sup> 刘建康<sup>2</sup> 黄少华<sup>3</sup>

(1 广州医学院第二附属医院心内科; 广州, 510182 2 广州医学院组织胚胎学教研室

3 广州医学院第一附属医院心脏病研究室)

**摘要** 目的: 研究神经肽 Y 对血管平滑肌细胞增殖的影响。方法: 应用快速自动微量 MTT 比色法和荧光免疫组化定量技术观察缩血管物质神经肽 Y 对体外培养血管平滑肌细胞的 MTT 比色吸光度和细胞核增殖抗原(PCNA)表达的平均荧光值。结果: 神经肽 Y 作用下血管平滑肌细胞的增殖活度和 PCNA 表达比对照组明显升高。MTT 值在 NPY 组和对照组中分别为  $0.2626 \pm 0.0025$  和  $0.2239 \pm 0.0010$ , 两者差异明显 ( $P < 0.01$ ); 而 PCNA 表达的平均荧光值, NPY 组为  $1648.56 \pm 232.71$ , 对照组为  $1542.71 \pm 200.04$ , 两者有差异 ( $P < 0.05$ )。结论: 神经肽 Y 可影响血管平滑肌细胞的增殖活动; 血中神经肽 Y 浓度的变化可能是高血压时血管壁结构变化的重要因素之一。

**关键词** 神经肽 Y; 肌, 平滑, 血管; 增殖, 高血压

**中图分类号** R 554; 331.3

## The Effects of Neuropeptide Y on the Proliferation of Cultured Arterial Smooth Muscle Cells

Chen Minsheng<sup>1</sup> Liu Jiankang<sup>2</sup> Huang Shaohua<sup>3</sup>

(Department of Cardiology of Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510182 2 Department of Histology & Embryology, Guangzhou Medical College 3 Researching unit of Cardiovascular disease, Guangzhou Medical College)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of Neuropeptide Y (NPY) on the proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods:** By using automated colorimetric microassay and quantitative immunocytochemistry method, the absorbance of MTT colorimetric measure (MTT-A) and average fluorescent values of proliferative cellular nuclear antigen (PCNA) expression in VSMC treated with NPY (a kind of vasoconstrictor) were observed. **Results:** MTT-A and PCNA expression in VSMC treated with NPY were obviously higher than that in control group. The MTT values in NPY group and control group were  $0.2626 \pm 0.0025$  and  $0.2239 \pm 0.0010$ , respectively, with significant difference ( $P < 0.01$ ). The average fluorescent values of PCNA expression was  $1648.56 \pm 232.71$  in NPY group and  $1542.71 \pm 200.04$  in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** NPY is probably able to influence the proliferative activity of VSMC, and the change of blood NPY concentration might be one of the important factors that induce changes in vascular vessel in hypertension.

**Subject headings** neuropeptide Y; muscle smooth, vascular; proliferation, hypertension

神经体液因素中神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 对心血管系统的生理调节具有重要意义, 其血浆浓度的变化与多种心血管疾病的发生关系十分密切。我们研究发现, 神经肽 Y 不仅影响血管内皮细胞的形态特征<sup>[1]</sup>, 而且可改变内皮细胞源性血

管收缩与舒张功能间的平衡<sup>[2]</sup>。但神经肽 Y 是否可直接刺激血管平滑肌细胞发生增殖或肥大, 从而引发高血压、动脉粥样硬化等疾病中的血管重塑, 尚无充分证据。本研究将一定浓度的神经肽 Y 加入血管平滑肌的培养体系中, 运用快速自动微量

MTT 比色法和荧光免疫组化定量技术, 观察血管平滑肌增殖活度和细胞内核增殖抗原的表达变化, 以探讨神经肽 Y 在高血压等心血管病发生中的作用。

## 1 材料与方 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 大鼠的胸主动脉<sup>[3,4]</sup>, 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, 于 37 °C、 $\varphi_B = 5\%$  CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。用光镜和免疫化学方法进行鉴定。细胞传代后, 选择生长良好的第 6~7 代血管平滑肌细胞做实验。

### 1.2 实验分组和神经肽 Y 培养液的配制

实验分为对照组和神经肽 Y 组。神经肽 Y 组加入神经肽 Y 培养液 (NOVA biochem 产品, Switzerland), 而对照组为无血清 DMEM 培养液。神经肽 Y 培养液以无血清的 DMEM 培养液配制, 终浓度为  $10^{-6}$  mol/L<sup>[2,9]</sup>。我们曾分别以  $10^{-6}$  mol/L,  $10^{-7}$  mol/L,  $10^{-8}$  mol/L 三种浓度的神经肽 Y 加入体外培养的血管平滑肌细胞。但  $10^{-7}$  mol/L,  $10^{-8}$  mol/L 两种浓度的神经肽 Y 对血管平滑肌细胞无影响。

### 1.3 血管平滑肌细胞增殖活性的测定

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  $5.0 \times 10^7$  个/L。细胞经 18 h 的预培养和 6 h 的预处理后, 分别将神经肽 Y 培养液和 DMEM 培养液加入实验组和对照组, 37 °C、 $\varphi_B = 5\%$  CO<sub>2</sub> 继续培养 24 h。平滑肌细胞增殖活度以 550 nm 波长下酶标仪检测样本中 MTT 结晶所形成的吸光度 A 来表示。

### 1.4 血管平滑肌细胞核增殖抗原的表达

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  $5.0 \times 10^7$  个/L。细胞经 18 h 预培养和 6 h 预处理后, 分别将神经肽 Y 培养液和 DMEM 培养液加入实验组和对照组, 37 °C  $\varphi_B = 5\%$  CO<sub>2</sub> 继续培养 24 h。吸去培养液, 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, 50 ml/L 正常山羊血清封闭, 室温孵育 30 min; 倾去血清, 加 1:50 鼠抗大鼠 PCNA 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司产品), 4 °C 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  $\mu$ L PBS 后, 置带电脑激光扫描共焦显微细胞仪 (ACAS 575 UVC 型, 美国 MERIDIAN 公司制造) 下进行样品检测和数据的即时分析处理, 扫描细胞总数在 200 个以上。

### 1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异用 *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,  $\alpha$ -actin 单克隆抗体免疫细胞化学显示 95% 为阳性血管平滑肌细胞。

### 2.2 神经肽 Y 对血管平滑肌细胞增殖活度和 PCNA 表达的影响

MTT 比色法显示神经肽 Y 实验组 MTT 结晶 A 值高于对照组, 神经肽 Y 组值为  $0.2626 \pm 0.0025$ , 对照组为  $0.2239 \pm 0.0010$ , 前者比后者增加 14.7%, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。而 PCNA 在神经肽 Y 组中平均荧光值为  $1648.56 \pm 232.71$ , 对照组仅为  $1542.71 \pm 200.04$ , 两者之间有差异 ( $P < 0.05$ )。荧光免疫结果见图 1, 图 2。

## 3 讨 论

因血管壁平滑肌细胞的异常增殖或肥厚所导致血管壁结构的重塑是原发性高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病发病的主要原因。对其发病机制的研究, 除神经系统的作用外, 神经内分泌因素中一些神经调节肽类物质的作用更引人注目<sup>[5]</sup>。一些实验研究资料发现神经肽 Y 浓度在  $10^{-6}$  mol/L 时, 可引起血管收缩<sup>[1]</sup>、促进平滑肌细胞增殖<sup>[6]</sup>, 因而推测在高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生中神经肽 Y 具有重要作用。

MTT 比色法<sup>[7]</sup>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; 而血管平滑肌细胞中 PCNA 表达的高低则以被标记的荧光强度来表示, 将免疫荧光显示技术和带电脑激光扫描共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的平均荧光值, 并以此反映细胞中 PCNA 表达的高低。本实验研究用 MTT 比色法和

激光扫描共焦显微细胞仪证实,神经肽 Y 可刺激平滑肌细胞的增殖活性,提高细胞中细胞核增殖抗原(PCNA)的表达水平。PCNA 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<sup>[8]</sup>; MTT-A 和 PCNA 表达水平的升高至少说明神经肽 Y 对血管平滑肌增殖的促进作用。但是,实验结果中反映细胞增殖的指标—PCNA 的平均荧光值升高的幅度并不很大( $P < 0.05$ )。我们推测神经肽 Y 对血管平滑肌的作用很可能与神经肽 Y 促进血管平滑肌细胞中 DNA 或蛋白质的合成有关,即促使血管平滑肌细胞发生肥大,而不导致细胞数量的增多。这与国内学者吴翠环等的推测是一致的<sup>[9]</sup>。这也可解释高血压时阻力性动脉中层增厚很可能是由于血管壁平滑肌细胞在神经肽 Y 或其它神经体液因素作用下发生肥大的结果<sup>[9]</sup>。

神经肽 Y 通过与存在于血管平滑肌细胞膜上的神经 Y 受体结合,调节血管平滑肌细胞内游离钙浓度,从而发挥其一系列生物学效应<sup>[10]</sup>。高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病中,神经肽能神经纤维在动脉壁上分布密度或血浆中神经肽 Y 浓度均表现异常<sup>[11]</sup>,这种内源性钙通道调节作用的异常很可能使细胞内游离钙浓度升高,不仅引起血管平滑肌收缩,而且可导致平滑肌细胞的增生或肥大。但是,神经肽 Y 是否可在基因水平上调节与增殖有关基因的表达或其它缩血管物质的作用,尚需进一步研究。

(本文图见插图 4)

#### 参 考 文 献

1 刘建康,邓漪平. 神经肽 Y 和血管活性肠肽对培养内

- 皮细胞形态特征的影响. 广州医学院学报, 1997, 25(5): 1
- 2 刘建康,邓漪平. 神经肽 Y 和血管活性肠肽对内皮源性血管舒缩功能的调节作用. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(1): 42
- 3 Cohen A, Weidbrod R M. Endothelium inhibits norepinephrine release from adrenergic nerves of rabbit carotid artery. *Am J Physiol*, 1988, 254: H871
- 4 Tesfamanian B, Weisbrod Rm, Cohen R A. Endothelium inhibits responses of rabbit carotid artery to adrenergic nerve stimulation. *Am J Physiol*, 1987, 253: H792
- 5 刘建康,邓漪平. 内皮细胞和神经系统间相互作用与动脉粥样硬化. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(3): 272
- 6 吴翠环,任大宏,陈多恩. 神经肽 Y 对培养的自发性高血压大鼠动脉平滑肌细胞的影响. 同济医科大学学报, 1998, 27(1): 19
- 7 郑永唐,贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266
- 8 Siltonen 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. *Am J Clin Pathol*, 1993, 99(2): 226
- 9 黄少华,苏城坚,曾超华. 西拉普利对自发性高血压大鼠超微结构损害的逆转作用. 中国高血压杂志, 1995, 3(2): 101
- 10 Odar C F, Ericsson F, Theodorsson E, *et al*. Is neuropeptide Y a contributor to volume-induced hypertension? *Am J Kidney Dis*, 1998, 31(5): 803
- 11 Padrazzini T, Seydoux J, Kunstner P, *et al*. Cardiovascular response feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat Med*, 1998, 4(6): 722

(1999-03-18 收稿 1999-06-09 修回)

#### 重要通知

### 《中山医科大学学报》改双月刊

为了满足中山医科大学整体科研水平的快速提高、科研论文和成果激增的需要,同时也为了加快科研信息的传递周期,缩短本刊出版周期,经本刊编委会和校领导讨论通过及省新闻出版局同意,《中山医科大学学报》自 2000 年起改为双月刊。有关新闻出版的手续正在办理中。届时,敬请广大科学研究和临床工作人员赐稿。投稿时请参照本刊 1999 年第 1 期的稿约有关要求,以免耽误您的审稿时间。谢谢支持与合作!

(本刊编辑部)

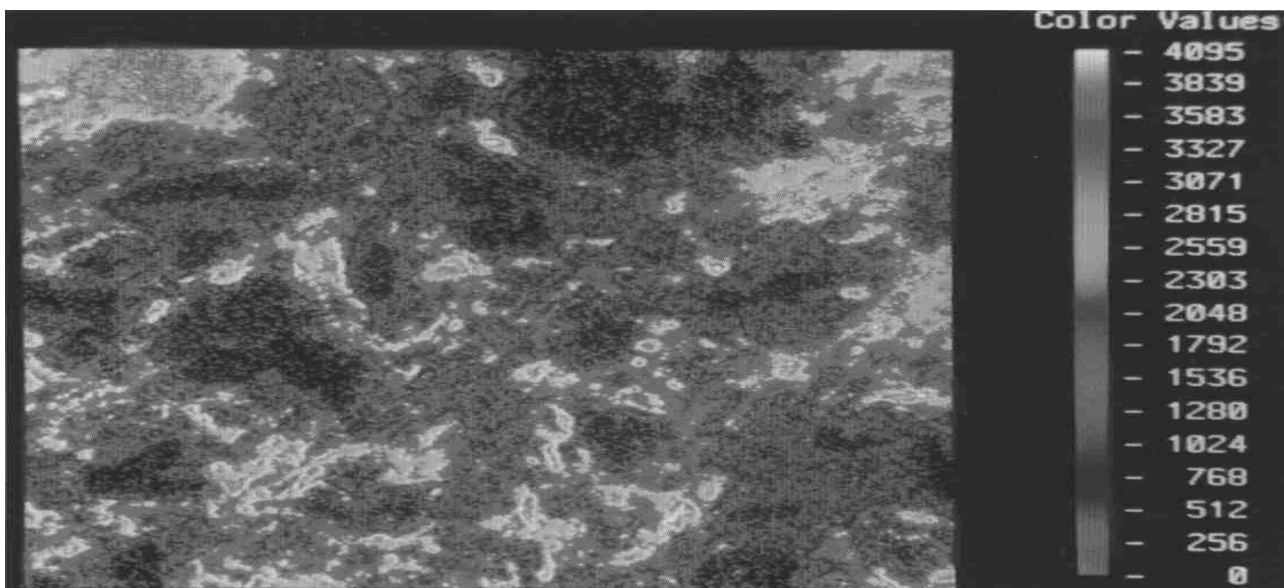


图 1 神经肽Y对体外培养血管平滑肌细胞 PCNA 的表达效果

Fig. 1 The effect of neuropeptide Y an expression of PCNA in vascular smooth muscle cell

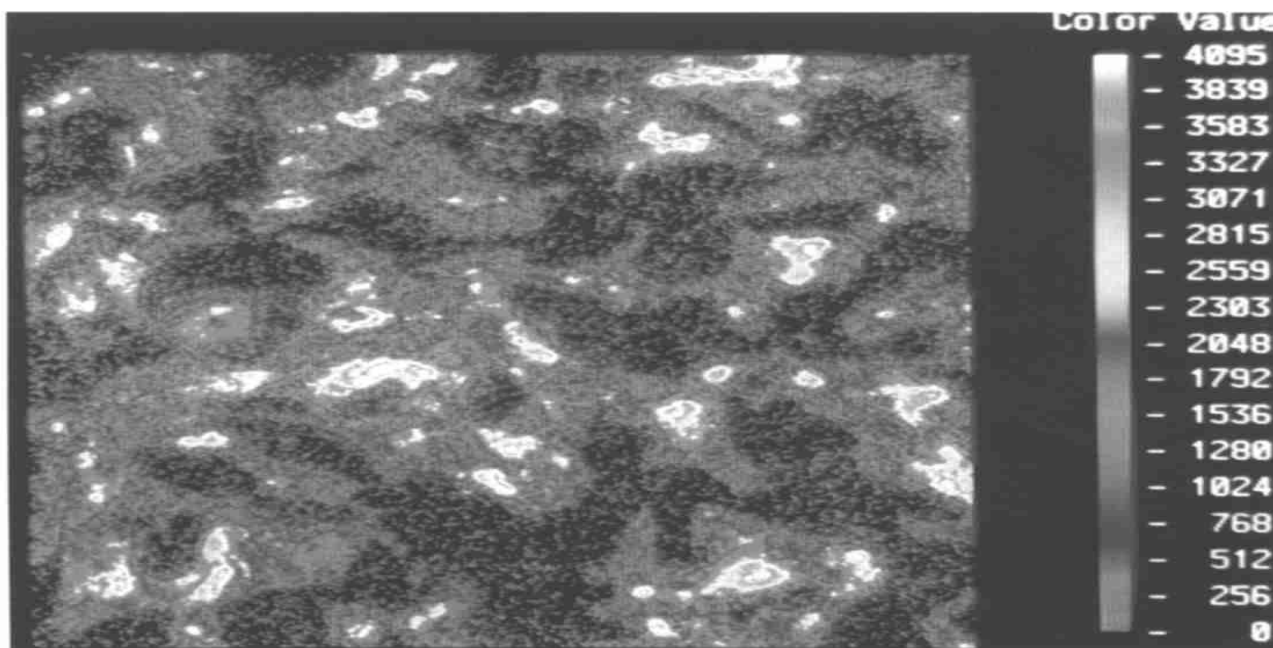


图 2 对照组血管平滑肌细胞中 PCNA 的表达

Fig. 2 Vascular smooth muscle cell in contorol group with PCNA expression