

神经肽 Y 和血管活性肠肽对内皮源性 血管收缩和舒张功能的调节作用

刘建康 邓漪平^①

(广州医学院组织学与胚胎学教研室, 510182)

The Regulating Effect of Neuropeptide Y and Vasoactive Intestinal Peptide on Endothelium-derived Constricting or Relaxing Functions

LIU Jian-Kang and DENG Yi-Ping

(Department of Histology and Embryology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

ABSTRACT

Aim Using cultured porcine endothelial cells with sensitive quantitative methods, this study aims to investigate the regulating effect of neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on endothelial functions. The work should be optional for better understanding the possible role of neurocrine factors in atherogenesis.

Methods A specific and sensitive diazotization assay and radioimmunoreactive analysis were used respectively to measure the release of nitric oxide (NO) and endothelin (ET) from porcine aorta endothelial cells grown in culture.

Results NPY and VIP could affect the release of NO and ET from cultured endothelial cells. Under the influence of NPY, the content of NO_2^- and ET in endothelium-conditioned medium were increased with NPY concentration ($P < 0.05$), but the increase of ET was larger than NO in NPY group. In VIP group, the content of ET in endothelium-conditioned medium was decreased with VIP concentration ($P < 0.05$).

Conclusion The first, NPY may stimulate cultured porcine aorta endothelial cells to release the NO and

ET, but the increase of ET is more than NO. The second, VIP may inhibit the secretion of ET from cultured endothelial cells.

KEY WORDS Neuropeptide Y; Vasoactive intestinal peptide; Vasoactive substances; Atherogenesis

摘要 通过观察神经肽 Y 和血管活性肠肽对培养血管内皮细胞功能的影响, 探讨神经体液因素在动脉粥样硬化发生中的作用。培养的内皮细胞来自小公猪主动脉, 内皮源性舒张因子——一氧化氮含量采用酶标比色法测定亚硝酸盐来表示, 内皮素采用放射免疫法测定。结果发现, 神经肽 Y 可刺激内皮细胞分泌释放内皮源性舒张因子和内皮素 ($P < 0.05$); 但对内皮素分泌释放的刺激作用明显强于内皮源性舒张因子, 使神经肽 Y 表现出血管收缩的综合效应。血管活性肠肽则抑制内皮细胞分泌释放内皮素 ($P < 0.05$), 降低血管对缩血管物质的敏感性。上述研究结果说明, 神经体液因素中神经肽 Y 和血管活性肠肽等肽类物质可影响血管内皮细胞的功能而参与动脉粥样硬化的发生。

关键词 神经肽 Y; 血管活性肠肽; 血管活性物质; 动脉粥样硬化发生

对动脉粥样硬化发病机制的研究, 其焦点主要集中在脂质代谢紊乱、血管壁细胞生物学行为及细胞间的相互作用上, 对内部的、源自神经系统的作用和影响所知甚少。有资料表明, 神经系统通过多种途径影响心血管系统的功能活动。其中, 那些既存在于神经系统, 又见于心血管系统的肽类物质, 调节着血管壁细胞的生长、增殖和功能^[1]。对这些肽类物质与血管内皮细胞功能间相互作用的研究有助于阐明神经体液因素在动脉粥样硬化发生中的作用。本文通过

① 中山医科大学组织学与胚胎学教研室, 广州 510089

观察两种血管作用完全相反的神经肽类物质—神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)对外培养血管内皮细胞功能的影响,探讨神经体液因素在动脉粥样硬化发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

长白与大白杂交良种小公猪由华南农业大学茅山种猪场提供,体重 8~12 kg。

1.1.2 实验试剂

胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所提供);Medium 199(M199, Gibco 公司产品);神经肽 Y(NPY, Sigma 公司产品);血管活性肠肽(VIP, Sigma 公司产品);胰蛋白酶(Trypsin, Difco 公司产品);D-Hank's 液(无钙镁离子的 Hank's 液)。

1.1.3 实验器材

CO₂ 培养箱(5410 型, Napco 公司);酶标检测仪(DYNATECH, MR4000);25 mL 玻璃细胞培养瓶等。

1.2 实验方法

1.2.1 主动脉内皮细胞的培养 无菌条件分离剪取实验动物离子的主动脉, D-Hank's 液冲去残留血块, 剔除血管外膜组织。纵向剪开血管, 内膜向下与培养皿上的胰蛋白酶液相贴, 37℃、消化 15 min 后, 轻轻刮下内皮细胞, 用含 20% 胎牛血清的 M199 培养液收集内皮细胞, 将细胞密度调至 (1~2) × 10⁵/L, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。4 h 后, 换液除去未贴壁细胞和细胞碎片, 继续培养, 细胞生长至融合状态时即可传代培养。用 V 因子相关抗原免疫组织化学鉴定培养的内皮细胞。

1.2.2 主动脉内皮细胞的分组及实验处理 选择生长良好的第三代内皮细胞用于实验。内皮细胞融合后, 用无酚红、无血清 M199 培养液对内皮细胞预处理, 即 37℃、5% CO₂ 培养 6 小时, 使内皮细胞的生长状态处于同一水平。实验共分为三组: 对照组的细胞预处理后, 培养液中不添加任何实验因素, 仅为无酚红、无血清 M199 培养液, 液体总量为 1 mL/瓶; NPY 组在培养液中分别加入 10⁻⁶ mol/L、10⁻⁷ mol/L 和 10⁻⁸ mol/L 的 NPY; VIP 组的培养液中加入与 NPY 相同浓度的 VIP。上述各组在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h。

1.2.3 内皮源性舒张因子/一氧化氮(endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide, EDRF/NO) 的测

定^[2] 体外培养内皮细胞产生的 NO, 其性质不稳定, 在酸性条件下可很快转化为稳定的亚硝酸盐 NO₂, 通过测定培养液中的 NO₂ 即可间接反应内皮细胞产生 NO 的多少。

用亚硝酸盐标准品制作和绘出亚硝酸盐标准浓度与光密度值对应的标准浓度曲线。收集对照组、NPY 组和 VIP 组的条件培养液各 100 μL, 加入 96 孔酶标比色板中, 与等量的 Griess 试剂混合, 室温静置 10 min 后, 在 550 nm 波长下测定上述样品的光密度值, 亚硝酸盐 NO₂ 浓度可从已知的亚硝酸盐标准浓度曲线中比较查得。

1.2.4 内皮素含量的放射免疫测定 收集对照组、NPY 组和 VIP 组的条件培养液 100 μL, 加入 1.2 μL 10% EDTA 二钠和 2 μL 抑肽酶(1 000 IU), 混匀后, 低温保存, 待所测样品收集齐以后再进行内皮素放射免疫测定(¹²⁵I 标记试剂盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所提供)。

2 结果

2.1 神经肽 Y 和血管活性肠肽作用下内皮细胞源性血管舒张因子的含量变化

用测定 EDRF/NO 氧化代谢产物亚硝酸盐 NO₂ 来反应 EDRF/NO 生成的多少, 其方法稳定可靠, 且具特异性。从表 1(Table 1)可以看出, 随着 NPY 浓度的升高, 内皮细胞条件培养液中 NO₂ 含量也逐渐增多(P<0.05); 10⁻⁶ mol/L NPY 组, NO₂ 的量比对照组高出两倍。VIP 对内皮细胞 NO₂ 的分泌释放无影响(P>0.05)。

Table 1. Changes of NO in Endothelium-conditioned Medium(mg/L, $\bar{x} \pm s$).

Groups	n	NO ₂
10 ⁻⁶ mol/L NPY	10	1.4902±0.3230*
10 ⁻⁷ mol/L NPY	12	0.9198±0.1569*
10 ⁻⁸ mol/L NPY	14	0.7690±0.1131
Control	12	0.7556±0.1029
10 ⁻⁶ mol/L VIP	14	0.7688±0.1626
10 ⁻⁷ mol/L VIP	10	0.7427±0.1872
10 ⁻⁸ mol/L VIP	12	0.7544±0.0598

a: P<0.05, compared with control group.

2.2 神经肽 Y 和血管活性肠肽作用下内皮细胞分泌释放内皮素含量的变化

表 2(Table 2)显示, NPY 和 VIP 都可促进体外培养的血管内皮细胞分泌内皮素。在 NPY 组中, 内皮细胞条件培养液中内皮素含量随 NPY 浓度升高而逐渐增加, 与对照组相比, 10^{-6} mol/L NPY 浓度组中内皮素含量升高约三倍。但 VIP 组, 内皮细胞条件培养液中内皮素含量随 VIP 浓度的增加而逐步减少。

Table 2. Changes of endothelin in endothelium-conditioned medium (ng/L, $\bar{x} \pm s$).

Groups	n	Endothelin
10^{-6} mol/L NPY	6	15.8402 ± 2.1132^a
10^{-7} mol/L NPY	6	10.5908 ± 1.5268^a
10^{-8} mol/L NPY	6	7.8655 ± 1.2434
Control	6	5.7818 ± 1.0151
10^{-6} mol/L VIP	6	2.8048 ± 0.4487
10^{-7} mol/L VIP	6	3.3048 ± 0.6933
10^{-8} mol/L VIP	6	3.8733 ± 0.3878

a: $P < 0.05$, compared with control group.

3 讨论

血管内皮细胞分泌释放一氧化氮(nitric oxide, NO)和内皮素(endothelin)是维持血管舒缩平衡的重要血管活性物质^[3]。有资料表明: 刺激动物下丘脑, 可导致血管出现类似于早期动脉粥样硬化的病理改变; 将该动脉血清加入到血管平滑肌细胞的培养基中, 也可引起平滑肌细胞的增殖和迁移, 且其活性与血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、高血脂和胰岛素无任何关系^[4]。这说明神经系统与动脉粥样硬化间的联系, 也提示了神经体液因素在其中的作用。

神经肽 Y(NPY)和血管活性肠肽(VIP)是心血管系统中分布广、数量多而作用完全相反的两神经肽, 由神经中枢或分布于血管周围的神经纤维末梢分泌入血, 经血液循环以激素样方式直接作用于血管内皮细胞, 改变其血管活性物质的分泌与释放^[5,6]。本文实验结果说明, NPY 可刺激血管内皮细胞同时产生 E-

DRF/NO 和内皮素, 但其量有所不同。 10^{-6} mol/L NPY 浓度时, 内皮素分泌量的增加幅度是对照组的三倍, 而 EDRF/NO 为二倍。对 NPY 缩血管效应有报道证实, NPY 引起血管收缩、增强去甲肾上腺素缩血管作用是依赖于血管的内皮细胞^[7]; 但对其作用机制并不清楚, 仅推测与 NPY 激活内皮细胞中花生四稀酸代谢机制, 产生缩血管物质血栓素₂(TXA₂)有关^[8]。我们的实验结果表明, NPY 的内皮源性缩血管作用有可能与 NPY 促进内皮细胞分泌释放更多的内皮素有关。对 NPY 促进内皮细胞分泌释放 EDRF/NO, 虽然目前国内研究资料还未见报道, 但我们推测这可能是 NPY 作用下内皮细胞对血管收缩作用的一种调节机制, 以反馈性调节血管的收缩强度。

血管活性肠肽(VIP)是一种血管扩张剂^[9]。对 VIP 的舒血管机制多数人认为是 VIP 直接作用于血管平滑肌细胞, 无需内皮细胞参与^[10]。但近年来的研究^[11]发现在血管内皮细胞表面存在着密集的 VIP 受体, 内皮细胞很可能参与对血管的调节作用。本研究结果表明, VIP 抑制内皮细胞源性缩血管物质—内皮素的产生, 从而降低血管的收缩强度。但 VIP 的舒血管作用是否有其他舒血管物质的参与还需更进一步观察研究。

总之, 动脉粥样硬化的发病因素很多。通过对血管内皮细胞的作用, NPY 和 VIP 发挥着对血管舒缩功能的调节作用。这都提示神经体液因素与血管内皮细胞功能间的联系以及在动脉粥样硬化发生中的作用。

参考文献

- Ganten D. Peptidergic system; Effects on blood vessles. *J Cardiovas Pharmacol*, 1984, 6(Suppl 4): 598~611.
- Termin A, Hoffmann M, Bing RJ. A simplified method for the determination of nitrate oxide in biological solution. *Life Sci*, 1992, 51: 1 621~629.
- 尹小川, 刘建康, 周序琬, 等. 三七总皂甙对猪主动脉内皮细胞释放一氧化氮的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1996, 4(1): 20~23.
- Gustein WH, Wang CH, Ladislav K, et al. Proliferation

- of smooth muscle cell incubated in serum from brain-stimulated rats. *Life Sci*, 1984, **34**: 2 627~631.
- 5 Kawamura K, Smith TL, Qi Zhou, et al. NPY stimulates prostacyclin production in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **179**(1): 309~313.
- 6 Chen H, Felscher C, Schafer RF, et al. Effects of norepinephrine and neuropeptide Y on rat mesenteric microvessel contraction. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1996, **353** (3): 314~323.
- 7 Hieble JP, Dusler JG, Daly R. Effects of neuropeptide Y on the response of isolated blood vessels to norepinephrine and sympathetic field stimulation. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, **250**: 523~528.
- 8 Martin SE, Kuvin JT, Offenbacher S, et al. Neuropeptide Y and coronary vasoconstriction. Role of thromboxane A_2 . *Am J Physiol*, 1993, **263**:H1 045 053~.
- 9 Absoud A. Vascular effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide: a comparison with vasoactive intestinal peptide. *Regl Pept*, 1992, **40**: 323~330.
- 10 Larry L, Gaffney FA, Lane LD, et al. Cardiovascular effects of vasoactive intestinal peptide in health subjects. *Am J Cardiol*, 1987, **60**: 1 356~361.
- 11 Pasyk E, Mao YK, Ahmad S, et al. An endothelial cell-line contains functional vasoactive intestinal polypeptide receptors; They control inwardly rectifying K^+ channels. *Eur J Pharmacol*, 1992, **212**(2~3): 209~214.
- (1997-10-13 收到, 1998-02-10 修回)