

垂体腺苷酸环化酶激活肽对内皮细胞表面 低密度脂蛋白受体分布的影响

胡黎平 邓满平

(中山医科大学组织胚胎学教研室, 广州 510089)

The Effect of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide on Distribution of Low Density Lipoprotein Receptor of Endothelial Cell Surface

HU Li-Ping and DENG Yi-Ping

(Department of Histology and Embryology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the distribution change of low density lipoprotein (LDL) receptors on the surface of EC effected by PACAP for understanding the potential mechanism of PACAP in atherosclerosis.

Methods EC were cultured with M199 containing 10^{-8} mol/L PACAP (PACAP groups) and M199 (control groups) respectively for 24 h, then incubated with 0.5% BSA-M199-colloidal gold LDL conjugate solution for 2 h at 4°C. In addition, some of EC were warmed to 37°C for 2 h to initiate endocytosis. Sections of 60 nm thickness were cut and observed with a HITACHI-600 transmission electron microscope.

Results Colloidal gold LDL conjugate in control group often appeared in cluster, randomly distributed on the surface of EC and the percentage of clustering appearance was 65%. Effected by PACAP for 24 h, the percentage of single colloidal gold LDL conjugate increase to 50%, compared with control groups ($P < 0.05$). Warmed to 37°C for 2 h, the EC of PACAP groups could decrease endocytosis of colloidal gold LDL conjugate.

Conclusion After PACAP treatment, compared with the control group, the percentage of single colloidal gold LDL conjugate granule appear in each clus-

ter of EC seems to be increased and the endocytosis of colloidal gold LDL conjugate granules decreased.

The change of distribution of single colloidal gold LDL conjugate granule represent less LDL receptors located on the surface of EC and can decrease transportation of LDL though EC when clusters are not formed.

Thus, our results suggest that PACAP play an important role in the function of antiatherosclerosis.

KEY WORDS PACAP; Colloidal gold; Low density lipoprotein; Receptor

摘要 为研究垂体腺苷酸环化酶激活肽对内皮细胞表面低密度脂蛋白受体分布的影响,以胶体金—低密度脂蛋白为示踪物,结合透射电镜技术观察垂体腺苷酸环化酶激活肽作用于体外培养的内皮细胞后,其表面低密度脂蛋白受体分布变化情况。结果表明,垂体腺苷酸环化酶激活肽作用于内皮细胞后,内皮细胞光镜及电镜下的形态与对照组无明显差异,但内皮细胞表面低密度脂蛋白受体分布发生了变化,胶体金—低密度脂蛋白颗粒单独出现率升高($P < 0.05$),内皮细胞内吞胶体金—低密度脂蛋白减少。提示垂体腺苷酸环化酶激活肽可能通过影响内皮细胞表面低密度脂蛋白受体的分布状态而减少低密度脂蛋白入胞代谢,进而减少低密度脂蛋白通过内皮细胞进入内膜下的机会,从而在抗动脉粥样硬化方面发挥作用。

关键词 垂体腺苷酸环化酶激活肽; 胶体金; 低密度脂蛋白; 受体

垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) 是 1989 年由日本学者发现的一种神经肽^[1],具有广泛的生物学效应,而且与心血管系统有着十分密切的关系^[2,3]。有研究表明 PACAP 具有抗低密度脂蛋白 (low density

lipoprotein, LDL)对血管内皮细胞(endothelium, EC)的损伤作用,并在抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)方面发挥作用^[4]。但其与动脉内皮细胞的低密度脂蛋白代谢及低密度脂蛋白受体关系如何,尚未见报道。本文以PACAP作为实验条件,结合胶体金—低密度脂蛋白免疫电镜技术,观察PACAP对正常离体培养的猪主动脉内皮细胞表面低密度脂蛋白受体分布状况的影响,并探讨这种影响在As发病中可能存在的作用。

1 材料与方法

1.1 内皮细胞的培养与鉴定

内皮细胞取自长白与大白杂交小公猪(华南农业大学茅山种猪场提供)的主动脉,经酶消化法获得。用25 mL培养瓶培养主动脉内皮细胞,传至第三代时,细胞生长基本达融合状态(含细胞数 1×10^{13} /L)。消化液为0.125%胰蛋白酶-0.01%EDTA,培养液为含20%胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所)的M199(美国GIBCO)。AgNO₃染色法鉴定内皮细胞的外形特征。VⅢ:Ag的免疫组织化学染色鉴定内皮细胞的免疫学特性。

1.2 人工血浆脂蛋白的分离^[5]

用一次性密度梯度离心法分离正常人血浆中的脂蛋白的成分,经透析、浓缩和过滤除菌后使用。低密度脂蛋白经聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳和琼脂糖免疫双扩散鉴定,达电泳和免疫纯,考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

1.3 实验分组

将培养的细胞随机分成两组,每组5瓶细胞。对照组含基础培养基M199;PACAP组基础培养基中含有终浓度为 10^{-8} mol/L的PACAP(PACAP由日本Kimura博士惠赠)。上述各组细胞经5% CO₂培养箱孵育24 h后,用Hank氏液洗二次,置37℃孵育30 min后转4℃孵育30 min。

1.4 胶体金—低密度脂蛋白实验

1.4.1 胶体金—低密度脂蛋白制备 参照文献^[6,7]制备胶体金—低密度脂蛋白。

1.4.2 细胞标记 将准备好的胶体金—低密度脂蛋白液按1:2比例与0.5% BSA-M199混匀,4℃预冷,加入各组孵育2 h。

1.4.3 细胞内吞胶体金—低密度脂蛋白实验 分

别取上述两组胶体金-LDL标记后的部分细胞再转37℃孵育2 h。

1.4.4 电镜标本制备与观察^[8] 按常规电镜标本制备进行,每一实验条件含4个单独组织块,每个组织块在切片时每隔50 μm捞取1个铜网,切片厚度60 nm。如此反复,每个组织块捞取8个铜网。在电镜(日立H-600)下记录所观察细胞数并对出现带有胶体金-LDL颗粒的阳性细胞记数和拍照。每个铜网所观察细胞数最多不超过95个。

1.5 统计学处理

资料分析分别在40 000倍或60 000倍的照片和电镜视野下进行。对细胞表面的胶体金颗粒进行记数,并对所含颗粒成簇(成群)的数量进行分组,分析各组分布频率差异情况(资料分析采用 χ^2 检验)。

2 结果

2.1 内皮细胞的形态观察

倒置显微镜下,正常培养的内皮细胞呈特征性的“鹅卵石”样外观;AgNO₃染色结果显示内皮细胞具有典型的多边形特征;VⅢ:Ag的免疫组织化学染色呈阳性反应,内皮细胞胞浆中含橙色阳性反应物。PACAP组与对照组细胞形态接近。

2.2 电镜观察

2.2.1 胶体金—低密度脂蛋白 胶体金-LDL颗粒大小均匀,密度大,直径为 19 ± 2 nm。

2.2.2 内皮细胞表面胶体金—低密度脂蛋白颗粒分布特点 4℃时PACAP组细胞胶体金-LDL标记率与对照组相接近($P < 0.05$)(表1, Table 1)。对照组细胞胶体金-LDL颗粒随机分布于内皮细胞表面,并不局限于某一区域,除单个胶体金-LDL颗粒外,胶体金-LDL颗粒常三五成群,在胞膜下陷所形成的小凹中聚集成簇。其中每簇胶体金-LDL颗粒数 >2 个者占大部分(图1, Figure 1),只有少部分呈单个颗粒分布。PACAP组细胞中,单个胶体金-LDL颗粒出现率为21.3%(图2, Figure 2),与对照组相比较差异有显著性意义($P < 0.05$)(表1, Table 1)。上述两组部分细胞转37℃孵育2 h后,细胞表面胶体金颗粒消失,胶体金颗粒出现在内皮细胞内有膜囊泡中,PACAP组内皮细胞

内的胶体金颗粒减少(图 3 和图 4, Figure 3 and 4),而且 PACAP 组细胞阳性标记率较对照组降低($P<0.05$) (表 2, Table 2)。

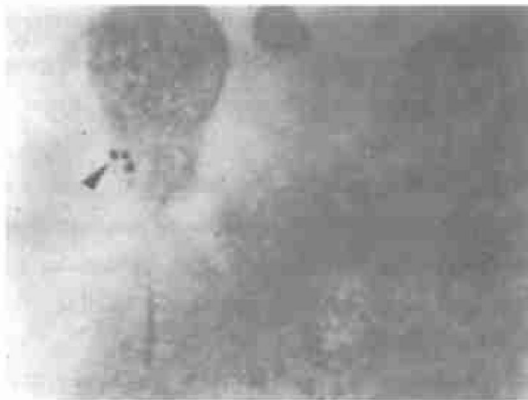


Figure 1. Colloidal gold LDL conjugate on the surface of control EC (TEM×40 000).



Figure 2. Colloidal gold LDL conjugate on the surface of EC treated with PACAP (TEM×60 000).

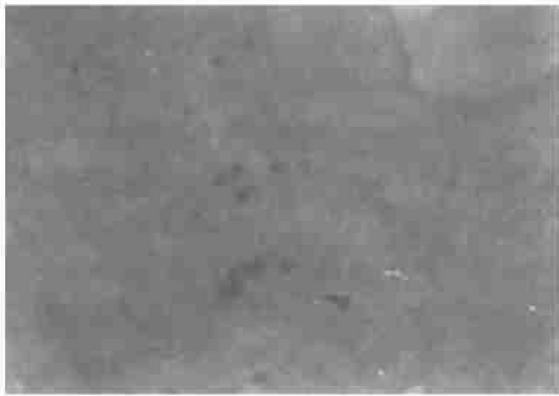


Figure 3. Endocytosis of colloidal gold conjugates of control EC at 37 °C for 2 h (TEM×60 000).

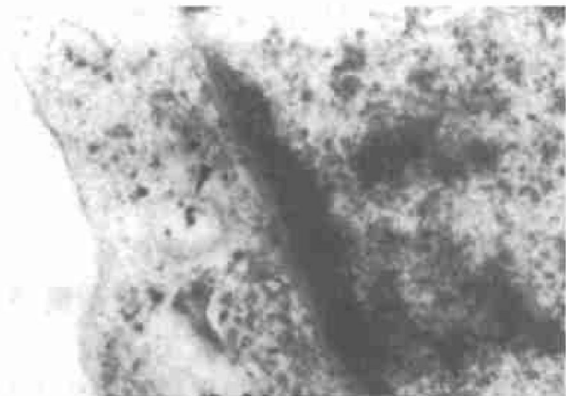


Figure 4. Endocytosis of colloidal gold LDL conjugates of EC treated with PACAP at 37 °C for 2 h (TEM×40 000).

Table 1. Distribution of colloidal gold LDL conjugate granules on EC at 4 °C.

Groups	n	1 (%)	2~3 (%)	4~6 (%)	Total (%)
Control	737	112(15.2)	158(21.4)	50(6.8)	320(43.4)
PACAP	480	102(21.3) ^a	90(18.8)	12(2.5)	204(42.6)

a : $P<0.05$, compared with control group. 1, 2~3, 4~6; number of granule in each cell.

Table 2. Percentage of EC endocytosis of colloidal gold LDL conjugate granules at 37 °C.

Groups	n	Labeled cells	Percentage (%)
Control	174	52	29.6
PACAP	281	61	21.7 ^a

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

3 讨论

血液中的高水平低密度脂蛋白是 As 发生的基础,低密度脂蛋白在内皮下聚集及泡沫细胞形成是 As 的典型特征。而低密度脂蛋白进入血管壁必须先通过血管壁与血浆接触的屏障—内皮细胞。有人通过胶体金—低密度脂蛋白标记示踪术结合冷冻蚀刻复型术发现低密度脂蛋白可被内皮细胞内吞并在内膜下聚集,血浆高水平低密度脂蛋白使内皮细胞下低密度脂蛋白聚集增多^[7]。实验资料证实,内皮细胞能转运低密度脂蛋白至血管内膜下储积,这种转运因在

血管不同部位而有不同表现^[9],说明某些因素可影响低密度脂蛋白受体介导的低密度脂蛋白入胞及转运作用。正常情况下,低密度脂蛋白通过细胞膜表面受体的介导而被细胞摄取进行代谢,低密度脂蛋白受体必需有 50%~80%聚集在细胞表面的被覆小凹(coated pit)才可介导低密度脂蛋白入胞^[10],这种受体介导的入胞作用是低密度脂蛋白通过内皮细胞转运的主要途径^[11]。低密度脂蛋白在内膜下大量储积,可引发血管壁多种成分的改变而致 As 发生,其可能原因之一是低密度脂蛋白受体的分布状态及功能发生了变化。

本文通过胶体金—低密度脂蛋白标记法结合透射电镜技术观察到正常状态的内皮细胞(4℃)表面胶体金—低密度脂蛋白标记物大多三五成群存在,垂体腺苷酸环化酶激活肽作用于内皮细胞后,发现在细胞阳性标记率相近的情况下,内皮细胞表面胶体金—低密度脂蛋白颗粒单个出现频率升高,而且随机观察发现,37℃时内皮细胞内吞胶体金—低密度脂蛋白颗粒减少($P<0.05$)。这一结果说明,垂体腺苷酸环化酶激活肽可减少内皮细胞内吞低密度脂蛋白,这种作用可能是通过改变内皮细胞表面低密度脂蛋白受体分布状况而实现的,垂体腺苷酸环化酶激活肽可能通过影响内皮细胞表面低密度脂蛋白受体在被覆小凹聚集成簇,从而抑制低密度脂蛋白通过内皮细胞的转运,减少低密度脂蛋白在内皮细胞下的储积。

综上所述,垂体腺苷酸环化酶激活肽可通过影响内皮细胞表面受体的分布特性而影响低密度脂蛋白经受体介导进入内皮细胞的代谢。提示垂体腺苷酸环化酶激活肽可能间接地具有抑制内皮细胞转运低密度脂蛋白的作用,并在抗 As 方面发挥作用。

参考文献

- 1 Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulate adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 164(1): 567~569.
- 2 Cardell LO, Uddman R, Luts A, et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in guinea-pig lung: distribution and dilatery effects. *Regul Pept*, 1991, 36(3): 379.
- 3 Nandha KA, Benito-Orfila Ma, Smith DM, et al. Action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on the rat vascular system: effects on blood pressure and receptor binding. *J Endocrinol*, 1991, 129(1): 69.
- 4 常青, 邓满平. 神经肽 PACAP 拮抗低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤. *中国病理生理杂志*, 1997, 13(1): 81~83.
- 5 张华林, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21(3): 257.
- 6 Dean AH, Cynthia MA, Larry D, et al. Colloidal gold-low density lipoprotein conjugates as membrane receptor probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(1): 368~371.
- 7 Nievelstein PP, Mottino G, Fogelman A. An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. *Arterioscler Thomb*, 1994, 14(7): 1151~1161.
- 8 樊景禹, 卫之涓, 刘智. Ehlich 腹水癌细胞表面负电荷与 ConA 受体分布的定量电子显微镜研究. *生物化学与生物物理进展*, 1983, (2): 40~44.
- 9 Kao CH, Chen JK, Kuo JS, et al. Visualization of the transport of low density lipoproteins across the endothelial cells in the branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis*, 1995, 116(1): 27~41.
- 10 Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 1979, 279: 679~684.
- 11 Ritter TE, Fajardo O, Matsue H, et al. Folate receptors targeted to clathrin-coated pits cannot regulate vitamin uptake. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 3824~3828.

(1998-01-24 收到, 1998-05-12 修回)