

神经肽 Y 对血管平滑肌细胞凋亡相关基因表达的诱导作用

刘建康 黄少华 陈敏生^④

(广州医学院组织胚胎学教研室, 广州 510182)

关键词 原癌基因; 凋亡; 激光共聚焦显微镜; 肌, 平滑; 细胞; 血管; 鼠; 细胞培养

摘要 为探讨神经肽 Y 对血管壁平滑肌细胞凋亡相关基因表达的诱导作用, 以体外培养血管平滑肌细胞模型为研究对象, 运用免疫荧光组织化学技术和激光共聚焦显微镜定量研究神经肽 Y 对血管平滑肌细胞凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 表达的影响, 以阐明神经肽 Y 参与高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病发生的分子机制。结果发现, 神经肽 Y 浓度为 10^{-6} mol/L 时, 血管平滑肌细胞凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *bax* 表达的平均荧光值分别为 1834.25 ± 138.55 和 1870.82 ± 162.43 , 明显高于对照组的 1682.87 ± 94.47 和 1688.04 ± 110.91 ($P < 0.01$); 当神经肽 Y 浓度为 10^{-7} mol/L 时, *bcl-2* 和 *bax* 的表达降低 ($P < 0.05$); 而神经肽 Y 浓度为 10^{-8} mol/L 时, *bcl-2* 和 *bax* 的表达已接近对照组的表达水平 ($P > 0.05$)。但 *fas* 仅在神经肽 Y 浓度为 10^{-6} mol/L 时, 其平均荧光值为 1987.68 ± 185.39 , 与对照组的 1882.38 ± 160.84 相比明显增高 ($P < 0.05$)。结果提示, 神经肽 Y 可诱导体外培养的血管平滑肌细胞凋亡相关基因的表达。

The Induction of Neuropeptide Y on Apoptosis and Expression of Related Genes of Cultured Smooth Muscle Cells

LIU Jiankang, HUANG Shaohua and CHEN Minsheng

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

MeSH Protooncogene; Apoptosis; Laser Scanning Confocal Microscope; Muscle, Smooth; Cells; Vascular; Rats; Cell Culture

ABSTRACT **Aim** To explore the effects of neuropeptide Y (NPY) on the expression of apoptosis-related genes in cultured vascular smooth muscle cells. **Methods** The expression of apoptosis-related genes were detected in cultured vascular smooth muscle cells with the immunofluorescent quantitative skill through laser scanning confocal microscope (ACAS 570). **Results** It was found that at the high concentration of NPY (10^{-6} mol/L), *bcl-2* and *bax* were markedly expressed in cultured smooth muscle cells compared with control group, the fluorescent value of *bcl-2* and *bax* were 1834.25 ± 138.55 and 1870.82 ± 162.43 , much higher than 1682.87 ± 94.47 and 1688.04 ± 110.91 in control group respectively ($P < 0.01$). With the concentration becoming down, the expression of related genes were also decreased. But the fluorescent value of *fas* gene was 1987.68 ± 185.39 , higher than 1882.38 ± 160.84 in control group only at the 10^{-6} mol/L concentration ($P < 0.05$). **Conclusion** NPY could induced the expression of apoptosis-related genes such as *bcl-2*, *bax* and *fas* in cultured vascular smooth muscle cells.

以往较多的研究证明, 神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 可影响血管壁细胞形态特征和血管舒缩的平衡功能^[1,2], 并可刺激血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 发生增殖或肥大^[3]。但有关 NPY 在促进 VSMC 增殖的同时, 是否也存在对细胞凋亡的诱导作用, 其研究证据甚少。近年来, 对细胞凋亡概念的提出和研究的深入, 人们发现细胞凋亡广泛存在于胚胎发育、器官退化和组织更新等过程中, 它以一种与细胞分裂完全相反的方式调节着细胞数量的恒定^[4]。本文采用体外培养的 VSMC 模

型, 对 NPY 作用下 VSMC 凋亡相关基因的表达进行研究, 以期从 VSMC 凋亡方面探讨 NPY 在高血压和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 大鼠的胸主动脉, 剪碎后加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM (Gibco 公司产品) 培养液, 37℃、5% CO₂ 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 VSMC 用于实验。

1.2 实验分组及神经肽 Y 培养液的配制

本课题为广东省自然科学基金(980466)资助项目

广州医学院附属第一医院心脏病研究室

④广州医学院附属第二医院心内科

实验分为对照组和 NPY 组。NPY 组为加入不同浓度的 NPY (NOVA Biochem 产品, Switzerland) 培养液, 对照组为无血清 DMEM 培养液。NPY 培养液以无血清的 DMEM 培养液配制, 培养液中 NPY 的终浓度分别为 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L 及 10^{-8} mol/L。

1.3 神经肽 Y 对血管平滑肌细胞凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 表达的影响

选择生长良好的第六代平滑肌细胞, 消化传代至 96 孔培养板上, 传代细胞密度为 5.0×10^7 /L。细胞经 18 h 的预培养和 6 h 的预处理后, 分别用不同浓度的 NPY 条件培养液和无血清 DMEM 培养液培养 NPY 组和对照组的平滑肌细胞, 37°C 、5% CO_2 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, 5% 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 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 的单克隆抗体(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 μL PBS 后, 分别置带电脑激光扫描共焦显微细胞仪(ACAS 575 UVC 型, 美国 MERIDIAN 公司)下, 选用 $\times 40$ 物镜, 7% 滤光片, 确定激发光波长为 488 nm, 进入 Kinetics- Image Scan 程序, 预扫描后选定最佳细胞扫描参数, 选定视野激光扫描并存储所采集的各项实验数据。细胞扫描总数在 200 个以上。

1.4 统计学分析

数据采集完成以后, 进入 Kinetics- Image Analysis 程序, 分析和处理各次实验存储数据, 自动得出统计结果。结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

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, a- actin 单克隆抗体免疫细胞化学显示为阳性。

2.2 神经肽 Y 对血管平滑肌细胞凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 表达的影响

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核酸和蛋白质的变化, 样品中被检测物质的多少是以其检测物质被荧光标记的平均荧光值来表示。不同浓度 NPY 对培养的 VSMC 凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 表达水平的影响存在一定差别(表 1, Table 1)。其主要表现在高浓度的 NPY (10^{-6} mol/L) 可刺激 VSMC 凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 表达明显升高。NPY 组 *bcl-2* 和 *bax* 表达的平均荧光值与对照组相比存在明显的差异($P < 0.01$), 而 *fas* 表达的平均荧光值与对照组相比也显示出一定差异($P < 0.05$)。随着 NPY 作用浓度的降低, VSMC 凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *bax* 表达水平也呈现逐渐下降的趋势。当 NPY 浓度降至 10^{-8} mol/L 时, 上述两种基因的表达水平基本接近对照组的表达水平。*fas* 在 NPY 浓度为 10^{-7} mol/L 及 10^{-8} mol/L 时, 其表达与对照组无明显的差异($P > 0.05$)。

表 1. 神经肽 Y 对血管平滑肌细胞凋亡相关基因表达的诱导作用

Table 1. The Induction of NPY on *bcl-2*, *bax* and *fas* expressions in cultured vascular smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	<i>bcl-2</i>	<i>bax</i>	<i>fas</i>
NPY			
10^{-6} mol/L	1834.25 \pm 138.55 ^a	1870.82 \pm 162.43 ^a	1987.68 \pm 185.39 ^b
10^{-7} mol/L	1753.33 \pm 111.70 ^b	1780.96 \pm 122.04 ^b	1950.68 \pm 198.11
10^{-8} mol/L	1725.46 \pm 105.95	1704.97 \pm 118.10	1942.88 \pm 146.48
Control	1682.87 \pm 94.47	1688.04 \pm 110.91	1882.38 \pm 160.84

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with control group

3 讨论

细胞凋亡是调节血管壁平滑肌细胞数量的重要方式^[4]。对血管功能的调节, 短期是影响血管的舒缩平衡^[2], 而长期效应则作用于血管壁结构, 参与血管壁结构的重塑^[5]。有研究资料证明, 高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病的发生, 除交感神经系统

的作用外, 神经体液因素中一些生物活性肽类物质, 如 NPY 不仅对血管壁舒缩平衡具有较强的调节作用^[2], 而且也可刺激 VSMC 发生增殖^[3], 从而参与高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病的发生与发展。但是, 有关 NPY 在高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病的发生中是否导致细胞凋亡, 参与血管壁结构

重塑的分子生物学机制,尚有待进一步研究和阐明。

本实验采用激光共聚焦显微镜及荧光免疫组织化学技术观察 NPY 对体外培养的 VSMC 凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 表达的影响。结果发现,较高浓度的 NPY (10^{-6} mol/L) 作用于 VSMC 时,其 *bcl-2*、*bax* 和 *fas* 的表达水平均高于对照组,以 *bcl-2* 和 *bax* 最为明显;但随着 NPY 浓度的降低,*bcl-2*、*bax* 和 *fas* 的表达水平也减低,当 NPY 浓度为 10^{-8} mol/L 时,其表达水平与对照组相比基本上已无差别。在 VSMC 的增殖与凋亡的基因调控中,*bcl-2*、*bax* 和 *fas* 都是与细胞凋亡相关的基因。*bcl-2* 通过与促细胞凋亡蛋白 *bax* 结合形成二聚体,抑制细胞凋亡,阻止细胞死亡过程的发生,但不影响细胞的增殖。*bax* 与 *bcl-2* 属同一家族,但其作用完全相反,为凋亡诱导基因,*fas* 也通过与 *fas* 受体的相互作用介导细胞死亡信号的传递。一些文献[3]报道虽已证实 NPY 对 VSMC 增殖的刺激作用,本实验中也观察到 NPY 可显著增强 VSMC 中 *bcl-2* 的表达,抑制细胞凋亡。

但更值得注意的是,高浓度 NPY (10^{-6} mol/L) 作用下的 VSMC,与 *bcl-2* 作用完全相反的 *bax* 基因和 *fas* 基因也有较高水平的表达。有研究证明,在动脉粥样硬化斑块中,增殖的 VSMC 也常存在着细胞的凋亡,但增殖与凋亡之间的平衡失调^[6]。本实验结果中观察到 *bcl-2* 和 *bax* 基因表达同时增高,所以推测这很可能反映了 NPY 在动脉粥样硬化发生的不同阶段对 VSMC 增殖与凋亡的影响。最近的研究发现^[6,7],VSMC 的增殖与凋亡始终伴随着动脉粥样硬化发病的全过程,在动脉粥样硬化发病早期,

VSMC 的增殖超过了细胞的凋亡,VSMC 数量增加,并导致动脉粥样硬化斑块和纤维帽的形成,但发病晚期 VSMC 的凋亡有可能超过细胞增殖,使斑块和纤维帽中的 VSMC 的数量明显减少。本实验结果显示 NPY 可诱导细胞凋亡相关基因的表达。因此,我们推测 VSMC 增殖与凋亡的平衡失调很可能是 NPY 导致高血压和动脉粥样硬化血管重塑的重要机制之一。但有关 NPY 刺激 VSMC 增殖或引起 VSMC 凋亡的基因调节途径和方式还有待于进一步研究。

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): 1-6
- 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): 42-45
- 3 吴翠环,任大宏,陈多恩. 神经肽 Y 对培养的发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): 19-21
- 4 Aesim C, David W, Courtman B, et al. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. Circ Res, 1995, 76: 168-175
- 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): 272-276
- 6 柴锡庆,温进坤,韩梅. 动脉粥样硬化斑块中平滑肌细胞凋亡与凋亡相关基因的表达. 中国动脉硬化杂志,1997,5(4): 283-286
- 7 David K, Han M, Handenschild CC, et al. Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in a rat vascular injury model. Am J Pathol, 1995, 147: 267-277

(此文 1999-05-24 收到,1999-08-30 修回)

(此文编辑 文玉珊)