

神经肽 Y 对血管平滑肌增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和 c- myc 基因表达的影响

刘建康 陈敏生 黄少华^④

(广州医学院组织胚胎学教研室, 广州 510182)

主题词 神经肽 Y; 原癌基因; 免疫细胞化学; 显微镜, 激光共聚焦; 肌, 平滑, 血管; 细胞; 大鼠

摘要 以体外培养的血管平滑肌细胞模型为研究对象, 在运用免疫荧光细胞组织化学技术和激光共聚焦显微镜定量研究神经肽 Y 的作用下, 观察血管平滑肌细胞中增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和 c- myc 原癌基因表达的平均荧光值变化, 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病理机制。结果发现, 对照组中增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和 c- myc 原癌基因表达的平均荧光值分别为 1542.71 ± 200.04 , 815.28 ± 116.48 和 1620.26 ± 174.58 , 神经肽 Y 则可促进增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和 c- myc 原癌基因在血管平滑肌细胞中的表达, 其平均荧光值分别为 1648.56 ± 232.71 , 1225.46 ± 101.84 和 1740.35 ± 205.91 , 其中以血小板源性生长因子的表达差异最为明显 ($P < 0.01$)。结果提示, 神经肽 Y 可促进血管平滑肌细胞的增殖, 并诱导血小板源性生长因子和 c- myc 原癌基因表达增强。

The Effects of Neuropeptide Y on the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen, Platelet-Derived Growth Factor and c- myc Oncogene in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Jian- Kang, CHEN Min- Sheng and HUANG Shao- Hua

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

MeSH Neuropeptide Y; Oncogenes; Immunocytochemistry; Microscopy, Confocal; Muscle, Smooth, Vascular; Cell; Rats

ABSTRACT **Aim** To explore the effects of neuropeptide Y on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), platelet-derived growth factor (PDGF) and c- myc oncogene in cultured vascular smooth muscle cells. **Methods** The combination of immunofluorescent quantitative skill and laser scanning confocal microscope (ACAS570) were employed to detect the changes of fluorescent values of PCNA, PDGF and c- myc oncogene expression in cultured vascular smooth muscle cells by neuropeptide Y. **Results** Under the observation of laser scanning confocal microscope (ACAS570), the fluorescent means of PCNA, PDGF and c- myc oncogene in the control groups were 1542.71 ± 200.04 , 815.28 ± 116.48 and 1620.26 ± 174.58 , respectively neuropeptide Y could promote the expression of PCNA, PDGF and c- myc oncogene in the cultured vascular smooth muscle cells. The fluorescent means of them were 1648.56 ± 232.71 , 1225.46 ± 101.84 and 1740.35 ± 205.91 , the difference of PDGF was especially evident ($P < 0.01$). **Conclusion** Neuropeptide Y had effects on the proliferation of vascular smooth muscle cells and could induce the expression of PDGF and c- myc oncogene.

高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的异常增殖与调控 VSMC 增殖原癌基因的过度表达有关^[1,2]。最新研究资料表明, 高血压时外周循环阻力的增加与神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)刺激 VSMC 发生肥大有一定联系^[3]。我们的研究也发现, 血浆 NPY 含量的变化是导致高血压和动脉粥样硬化时血管功能紊乱的重要致病因素^[4,5], 但 NPY 导致血管功能紊乱、VSMC 增殖或肥大的作用机制目前研究证据并不十分充分。本实验观察 NPY 对 VSMC 增

殖的作用, 同时探讨 NPY 对血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和 c- myc 原癌基因表达的影响, 旨在证明 NPY 血管调节作用的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 血管平滑肌细胞的培养

组织贴块法培养 VSMC。无菌条件下分离 SD 大鼠的胸主动脉, 尽量去除外膜的结缔组织, 动脉剪碎后于 37°C 、5% CO_2 培养箱中静置 4 h, 使组织块贴壁, 然后加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM(Gibco 公司产品)培养液, 继续培养, 并经细胞传代和酶消化法去除少量混杂的成纤维细胞。光镜和免疫化学

广州医学院附属第二医院心内科

④广州医学院附属第一医院心脏病研究室

方法鉴定培养的 VSMC。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 条件培养液的配制

实验分为对照组和 NPY 组。NPY 组加入 NPY (NOVA Biochem 产品, Switzerland) 条件培养液, 对照组为无血清 DMEM 培养液。NPY 条件培养液以无血清的 DMEM 培养液配制, 终浓度为 10^{-6} mol/L。

1.3 神经肽 Y 对血管平滑肌增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和 c-myc 原癌基因表达的影响

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 5.0×10^7 /L。细胞经 18 h 预培养和 6 h 预处理后, 将 NPY 条件培养液和无血清 DMEM 培养液分别加入 NPY 组和对照组, 37℃、5% CO₂ 继续培养 24 h。吸去培养液, 以 pH 7.3 的 PBS 洗 3 次, 3% 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 鼠抗大鼠增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、PDGF 和 c-myc 的单克隆抗体 (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 PBS 20 μL 后, 分别置带电脑激光扫描共焦显微细胞仪 (ACAS575UVC 型, 美国 MERIDIAN 公司) 下, 选用 40× 物镜, 7% 滤光片, 确定激发光波长为 488 nm, 进入 Kinetics-Image Scan 程序, 预扫描后选定最佳参

数, 对选定视野扫描并存储所获信息。扫描细胞总数在 200 个以上。

1.4 统计学处理

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, 计算机自动得出统计结果。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 显著性差异用 *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, α-actin 单克隆抗体免疫细胞化学显示为阳性。

2.2 神经肽 Y 对血管平滑肌增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和 c-myc 原癌基因表达的影响

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前检测物质被荧光标记的平均荧光值来表示。对照组中 PCNA、PDGF 和 c-myc 原癌基因的平均荧光值分别为 1542.71 ± 200.04 、 815.28 ± 116.48 和 1620.26 ± 174.58 , 而 NPY 组中 PCNA、PDGF 和 c-myc 原癌基因的平均荧光值则分别为 1648.56 ± 232.71 、 1225.46 ± 101.84 和 1740.35 ± 205.91 (表 1, Table 1)。与对照组相比, NPY 组中 PDGF 的平均荧光值明显升高, 差异显著 ($P < 0.01$); 且 PCNA 和 c-myc 原癌基因的平均荧光值也高于对照组, 有一定差异 ($P < 0.05$)。

表 1. 神经肽 Y 对血管平滑肌增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和 c-myc 原癌基因表达的影响

Table 1. The effects of NPY on the expression of PCNA, PDGF and c-myc oncogene in vascular smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	PCNA	PDGF	c-myc
NPY	296	1648.56 ± 232.71^b	1225.46 ± 101.84^a	1740.35 ± 205.91^b
Control	279	1542.71 ± 200.04	815.28 ± 116.48	1620.26 ± 174.58

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

3 讨论

血管活性物质对血管调节的短期效应是影响血管的舒缩平衡, 长期效应则作用于血管壁结构, 参与血管壁结构的重塑^[6]。近年来, 一些研究资料证明, 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^[5], 而且也可刺激 VSMC 发生增殖^[3]。但是, 在高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病发生血管平滑肌细胞增殖及血管壁结构重塑的过

程中, 神经体液因素尤其是 NPY 对其的作用机制并不十分清楚。

本实验利用体外培养的细胞模型, 用激光扫描共焦显微细胞仪观察 NPY 对培养的 VSMC 增殖及癌基因表达的影响。结果发现, 在 NPY 作用下, VSMC 中 PCNA 的表达比对照组有明显增加 ($P < 0.05$)。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^[7]; PCNA 表达水平的

增高说明了 NPY 可影响 VSMC 的增殖。

但是,值得注意的是:实验中 PCNA 表达的平均荧光值升高的幅度并不很大,提示 NPY 对 VSMC 增殖活性的影响存在着一定差异,故推测 NPY 的这种影响很可能与 NPY 促进 VSMC 中 DNA 或蛋白质的合成有关,即 NPY 的作用是使 VSMC 发生肥大,而并不出现细胞数量的增多^[10]。这可解释高血压时阻力性动脉中层增厚很可能是由于 VSMC 在 NPY 或其他神经体液因素作用下发生肥大的结果^[3]。

本研究结果还发现, NPY 在刺激体外培养的 VSMC 中 PCNA 表达增高的同时, PDGF 和 c- myc 原癌基因的表达也有明显增加,与对照组相比以 PDGF 的表达差异最为明显($P < 0.01$),可见 NPY 对血管功能的调节作用,尤其是对 VSMC 增殖的影响涉及到癌基因环节的调控。原癌基因 c- myc 是一种重要的核蛋白调控基因,与细胞增殖密切相关^[1], c- myc 基因的表达受 PDGF 的调节^[8]。而 PDGF 的主要作用是通过自分泌或旁分泌机制,促进动脉中膜 VSMC 向内膜迁移和增殖^[2]。据报道, VSMC 膜上存在 NPY 受体,血液中 NPY 与 VSMC 膜上的 NPY 受体结合,通过第二信使,使细胞内钙离子浓度升高,同时引起调控细胞增殖的癌基因表达,从而促进 VSMC 的增殖^[9]。因此,本实验结果提示, NPY 通过 PDGF 和 c- myc 原癌基因的介导作用,引起 VSMC 的增殖。由于 NPY 刺激 VSMC 中 PDGF 过度表达而很可能使 NPY 对 VSMC 迁移具有较强的调控作用,并由此增强 c- myc 基因的表达而促进 VSMC 的增殖。故 NPY 分泌或释放异常,可能引起 VSMC 癌基因过度表达,从而导致 VSMC 发生增殖,并引发高血

压和动脉粥样硬化等心血管疾病的发生。综上所述, NPY 的血管调节作用与促进 VSMC 增殖的作用相协同,该作用可能与癌基因的调控有关。

参考文献

- 1 Elazer RE, Michael S, Martin G, et al. C- myc in vasculoproliferative disease. *Cir Res*, 1995, **76** (2): 176- 179
 - 2 Volkhard L, Cecilia MG, Stephen MS, et al. A subpopulation of smooth muscle cells in injured arteries expresses platelet- derived growth factor mRNA. *Cir Res*, 1995, **76** (6): 951- 959
 - 3 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- 21
 - 4 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
 - 5 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
 - 6 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
 - 7 Siltonen SM, Isola JJ, Rantala IS, 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**: 226- 231
 - 8 顾水明, 陈万春, 金立红. 曲尼司特对血管平滑肌细胞增殖及 c- myc 基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (3): 211- 214
 - 9 Neild TO, Lewis CJ. Reduction of vasoconstriction mediated by neuropeptide Y Y2 receptors in arterioles of the guinea- pig small intestine. *Br J Pharmacol*, 1995, **115**: 220- 224
 - 10 陈敏生, 刘建康, 黄少华. 神经肽 Y 对培养的血管平滑肌细胞增殖的影响. *中山医科大学学报*, 1999, **20** (3): 207- 209
- (此文 1999- 05- 03 收到, 1999- 10- 27 修回)
(此文编辑 文玉珊)