

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-04-0312-03

## 细胞内游离钙离子在神经肽 Y 刺激 血管平滑肌细胞增殖中的作用

刘建康, 胡必利<sup>1</sup>, 梁若斯, 陈敏生<sup>2</sup>, 黄少华<sup>3</sup>

(广州医学院组织学与胚胎学教研室, 广州 510182; 2. 附属第二医院心内科;

3. 附属第一医院心脏病研究室; 1. 南华大学基础医学院生理学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 神经肽 Y; 游离钙; 细胞内液; 肌, 平滑; 血管; 增殖; 大鼠

[摘要] 为探讨细胞内游离钙离子在神经肽 Y 刺激血管平滑肌细胞增殖过程中的变化, 以体外培养的血管平滑肌细胞模型为研究对象, 运用激光共聚焦显微镜和免疫荧光组织化学技术, 定量和动态观察了神经肽 Y 对血管平滑肌细胞内游离钙离子浓度与血管平滑肌细胞增殖间的相互关系。结果发现, 神经肽 Y 组中血管平滑肌细胞的增殖活度(MTT 法)和增殖细胞核抗原的表达较对照组明显增强; 与此同时, 神经肽 Y 作用下体外培养的血管平滑肌细胞内游离钙离子浓度也逐渐升高。此结果提示, 神经肽 Y 刺激血管平滑肌细胞增殖的细胞内信号传导机制与神经肽 Y 提高细胞内游离钙离子浓度有关。

[中图分类号] Q253

[文献标识码] A

### Effects of the Intracellular Free Calcium Ion on the Proliferation of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells Stimulated by Neuropeptide Y

LIU Jian-Kang, HU Bi-Li<sup>1</sup>, LIANG Ruo-Si, CHEN Min-Sheng, and HUANG Shao-Hua

(Department of Histology and Embryology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182; 1. Department of Physiology, Basic Medical College of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

**MeSH** Neuropeptide Y; Free Calcium; Intracellular Fluid; Muscle, Smooth, Vascular; Proliferation; Rat

**ABSTRACT** **Aim** To explore the role of intracellular free calcium in the proliferation of cultured vascular smooth cells (VSMC) stimulated by neuropeptide Y (NPY). **Methods** The cultured VSMC of rat were used for experiments at passage 3 to 5. We applied the method of cellular culture, MTT colorimetric assay and quantitative immunocytochemistry through laser scanning confocal microscope (ACAS570) to detect the effect of NPY on the proliferation of VSMC. At the same time, the effect of NPY on the intracellular free calcium concentrations were also quantitatively detected in VSMC. **Results** It was observed that exposure of cultured VSMC to NPY could stimulate the proliferation of VSMC, the MTT OD values and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) increased in cultured VSMC respectively compared with control group ( $P < 0.01$ ). At the same time, the intracellular free calcium concentrations in VSMC were also increased by NPY. **Conclusion** The proliferation of cultured VSMC stimulated by NPY is mediated by intracellular free calcium in cultured vascular smooth muscle cells.

研究资料证实, 神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 因可刺激血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 肥大<sup>[1]</sup>、诱导调控 VSMC 增殖的原癌基因表达<sup>[2]</sup>和改变内皮细胞源性的血管舒缩平衡<sup>[3]</sup>,

而导致血管壁功能紊乱, 而钙离子又是 NPY 血管调节作用的重要信息传递分子, VSMC 内游离钙离子可激活多种酶类, 促进或抑制某些基因的表达, 以调节血管 VSMC 的功能<sup>[4,5]</sup>。因此, 本文用粘附式细胞仪 (ACAS-570, 美国 Median 公司产) 观察 NPY 调控体外培养 VSMC 的增殖活性以及对培养的 VSMC 内游离钙离子浓度的影响, 以阐明神经肽 Y 刺激 VSMC 增殖的细胞内信号传导机制。

[基金项目] 广东省自然科学基金(980466)和广州市科委基础研究(99-J-009-01)资助

[作者简介] 刘建康, 男, 1962 年出生, 理学博士, 副教授, 组织学与胚胎学硕士研究生导师, 主要从事神经肽在心血管病发病学中的作用研究。胡必利, 男, 1948 年出生, 生理学副教授, 主要从事神经感官生理和细胞电生理研究。梁若斯, 女, 1969 年出生, 讲师, 主要从事心血管病发病学基础研究。陈敏生, 男, 1962 年出生, 心内科教授, 主要从事高血压发病机制和临床治疗研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 血管平滑肌细胞的体外培养及实验分组

采用组织贴块法培养 VSMC。无菌条件下分离 SD 大鼠胸主动脉,剪碎后加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM (Gibco 公司产品), 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置贴块培养,待细胞迁移生长以后进行细胞传代,用光镜和免疫化学方法进行细胞鉴定。选择生长良好的第 4~6 代 VSMC,分 NPY 组和对照组。NPY 组培养液中加入 NPY (10<sup>-6</sup> mol/L); 对照组为无血清 DMEM 培养液。

## 1.2 血管平滑肌细胞增殖活性的检测(自动微量 MTT 比色法)<sup>[6]</sup>

选择第 5 代生长良好的 VSMC,消化传代种植于 96 孔培养板上,细胞密度为  $5.0 \times 10^7/L$ 。细胞经 18 h 的预培养和 6 h 的预处理后,分别将无血清、无酚红 NPY 条件培养液和 DMEM 培养液加入 NPY 组和对照组, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,再加入 0.5% 四甲基偶氮唑盐 (Sigma, 美国,简称 MTT) 50  $\mu$ L,继续培养 4 h 后,加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 北京化工厂) 150  $\mu$ L 终止培养,震荡 2 min 后,以 550 nm 波长在自动酶标仪下检测每孔样品中 MTT 结晶所形成的吸光度值(OD 值)。

## 1.3 平滑肌细胞增殖细胞核抗原表达水平的检测

选择生长状态良好的 VSMC,消化传代至 24 孔培养板上,传代细胞密度为  $5.0 \times 10^7/L$ 。培养条件同上。实验完成时,吸去培养液,pH 7.3 的 PBS 洗 3 次,用 3% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 再洗 3 次。

固定后样品按常规免疫组织化学方法处理。一抗为 1:50 稀释度的鼠抗大鼠增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司),二抗为 1:10 FITC 荧光标记兔抗鼠抗体 (天象人公司产品)。PBS 充分洗板后,放置于粘附式细胞仪下进行检测。所采集的数据用 Kinetics-Image Analysis 程序分析和处理,自动得出统计结果。数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数差异的显著性用 *t* 检验判定。

## 1.4 平滑肌细胞内钙离子浓度变化的动态检测<sup>[7]</sup>

将生长状态良好的 VSMC 接种于 Petri 培养皿上,待细胞贴壁后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24~48 h。弃培养液,用 DMEM 液轻洗 3 次,加入 10  $\mu$ mol/L Fluor-3-AM 荧光探针 40  $\mu$ L,避光 37℃孵育 30 min,用 Hepes 平衡盐溶液 (pH 7.2~7.4) 洗去染液,加入 1.0 mL Hepes 平衡盐溶液后,将 Petri 培养皿置于粘附式细胞仪载物台上,选定适宜的扫描参数和视野,以 488 nm 波长紫外光激发细胞发出荧光,并进入 Kinetics-Image Scan 程序对细胞进行扫描成像,每隔 20 s 扫描一次。在测定基础荧

光强度后,加入终浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L 的 NPY,做动态观察扫描,整个扫描时间为 40 min。通过粘附细胞仪计算机图像分析软件将扫描结果转换成荧光强度-时间曲线。

## 2 结果

### 2.1 神经肽 Y 作用下血管平滑肌细胞增殖活性的变化

MTT 比色法检测体外培养 VSMC 的增殖活性,其增殖能力的高低以所形成 MTT 结晶的 OD 值来表示。NPY 组和对照组的 MTT 结晶 OD 值分别为  $0.2617 \pm 0.0025$  和  $0.2235 \pm 0.0010$ , NPY 组比对照组高出 14.5%,差异具极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 神经肽 Y 作用下血管平滑肌细胞中增殖细胞核抗原表达的变化

粘附式细胞仪借助免疫荧光显示技术可对单个粘附式细胞内的各种动态和静态参数进行扫描和数据采集,通过对采集图像的分析处理准确地定量细胞内核酸、蛋白质等被标记物质的变化。因此,细胞内 PCNA 的平均荧光值即可反映其表达。神经肽 Y 组中,PCNA 的平均荧光值为  $2347.35 \pm 118.14$ ,对照组为  $2119.71 \pm 107.31$ ,两者相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 神经肽 Y 对血管平滑肌细胞内钙离子动态变化的影响

荧光探针 Fluor-3-AM 与钙离子有高度亲和力,进入细胞后 Fluor-3 与钙离子的结合可被一定波长的紫外光激发产生荧光,其荧光强度与  $[Ca^{2+}]_i$  的高低呈正比。待测定静息状态下培养的 VSMC  $[Ca^{2+}]_i$  后,方可进行 NPY 作用下  $[Ca^{2+}]_i$  的动态变化观测。静息状态下,VSMC  $[Ca^{2+}]_i$  的平均荧光值稳定在 70.5 u,加入 NPY 后,VSMC 内荧光强度逐步增强,细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  升高 (图 1, Figure 1),平均荧光值的峰值为 102 u,升高速度平均为 0.45 u/s。

## 3 讨论

神经肽 Y (NPY) 可通过受体介导作用于 VSMC,使血管收缩、增强血管对缩血管物质的敏感性和刺激 VSMC 的增殖<sup>[1,3,5]</sup>。但有关 NPY 作用于 VSMC 的信号传导机制,目前还较少有文献报道,且由于实验动物来源、血管种类的不同,NPY 作用的观察结果差异较大,作用机制也不完全相同。本实验以体外培养的 VSMC 为研究对象,采用粘附细胞仪 (ACAS 570) 观察研究 NPY 促进 VSMC 增殖与 NPY 作用下

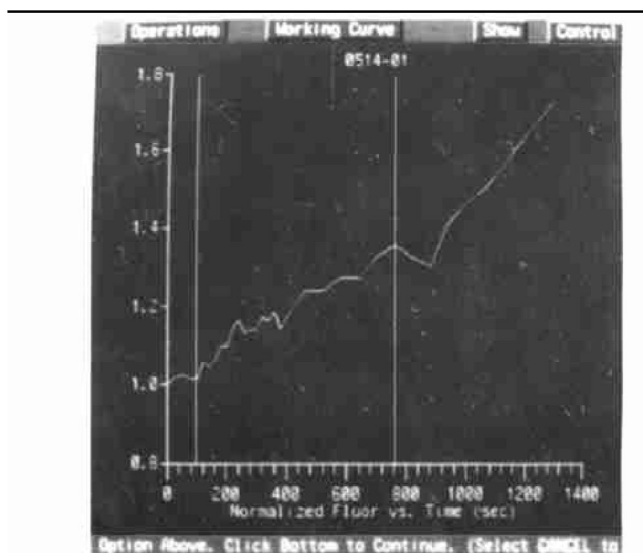


图1 神经肽Y作用下体外培养的血管平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 动态曲线

**Figure 1** Kinetic curves of  $[Ca^{2+}]_i$  in VSMC affected by NPY. Y-axis (ordinate) is average fluorescent values and x-axis (abscissa) is time (second)

细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化之间的相互关系,结果发现, NPY可促进体外培养VSMC形成MTT结晶的OD值和PCNA表达的平均荧光值均明显高于对照组,其中,MTT比色OD值较对照组增加14.5%。MTT比色法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PCNA则是细胞核中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-OD值和PCNA表达水平的升高说明NPY对VSMC增殖的刺激作用。与此同时,运用粘附细胞仪(ACAS 570)观察VSMC中 $[Ca^{2+}]_i$ 动态变化时,发现NPY同时也促使反映细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的平均荧光值逐渐增强,使细胞内游离钙离子浓度水平不断升高。因此,实验结果提示, NPY刺激体外培养VSMC增殖活性的增高很可能与NPY促使VSMC内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平升高有关。

目前认为 $Ca^{2+}$ 是调节VSMC功能活动的重要信号传导递质,但有关 $Ca^{2+}$ 调节作用的强弱和作用机制却存在争议<sup>[7]</sup>。有人认为NPY对VSMC功能活动

的调节可能与细胞外 $Ca^{2+}$ 的内流有关,而使用 $Ca^{2+}$ 阻断剂或清除细胞外 $Ca^{2+}$ 以后, NPY的作用却依然存在<sup>[9]</sup>;也有人认为NPY通过受体的介导激活磷脂酶C (phospholipase C, PLC),将细胞膜上磷酸肌醇水解成三磷酸肌醇( inositol triphosphate, IP3),由IP3作为第二信使调节细胞内游离 $Ca^{2+}$ 的储存与释放,使细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度升高<sup>[10]</sup>。受实验方法的限制,本实验未能同时观察NPY对VSMC内IP3生成的影响,因此,仅推测实验中培养VSMC内 $[Ca^{2+}]_i$ 的平均荧光值的逐渐增强也可能是NPY通过动员细胞内 $Ca^{2+}$ 来实现的,并由此介导NPY对VSMC增殖的刺激作用。

### 参考文献

- [1] 刘建康,黄少华,陈敏生. 神经肽Y刺激血管平滑肌细胞增生和losartan的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(1): 46-49
- [2] 刘建康,黄少华,陈敏生. 神经肽Y对血管平滑肌细胞增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子和c-myc基因表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7(4): 323-325
- [3] 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(1): 42-46
- [4] Trump BE, Bere Zeeky. Calcium-mediated cell injury and cell death[J]. FASEB J, 1995, 9(2): 210-228
- [5] Thulin T, Erlinge D. Neuropeptide Y and hypertension[J]. Nutrition, 1995, 11(5 Suppl): 495-497
- [6] 郑永唐,贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的MTT方法的建立[J]. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266-269
- [7] 张薇,朴英杰,鲍永跃,等. 粘附式细胞仪测试高温对培养巨噬细胞内游离钙的方法[J]. 第一军医大学学报, 1994, 14(1): 43-45
- [8] Siltanen 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[J]. Am J Clin Pathol, 1993, 99: 226-248
- [9] Beech DJ. Action of neurotransmitters and other messengers on  $Ca^{2+}$  channels and  $K^{+}$  channels in smooth muscle cells[J]. Pharmacol Ther, 1997, 73(2): 91-119
- [10] Sandrew R. Calcium channels expressed in vascular smooth muscle[J]. Circulation, 1992, 86(Suppl ④): 61-69

(此文2000-04-10收到,2000-12-10修回)

(此文编辑 朱雯霞)