

[文章编号] 1007- 3949(2001)- 01- 0021- 03

• 实验研究 •

神经肽 Y 诱导血管平滑肌细胞凋亡相关 基因表达与细胞内液 pH 变化的关系

刘建康, 胡必利¹, 梁若斯, 陈敏生², 黄少华³

(广州医学院组织胚胎学教研室, 2. 附属第二医院心内科,

3. 附属第一医院心脏病研究室; 广州 510182; 1. 南华大学基础医学院生理学教研室)

[关键词] 神经肽 Y; 细胞内液; 酸化; 肌, 平滑, 血管; 凋亡; 大鼠

[摘要] 为探讨细胞内液 pH 在神经肽 Y 诱导血管平滑肌细胞凋亡过程中的变化, 以体外培养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, 定量和动态观察研究神经肽 Y 诱导血管平滑肌细胞凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 表达与细胞内液 pH 变化之间的关系。结果发现, 在神经肽 Y 作用下, 体外培养的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 $1\ 349.67 \pm 108.28$ 和 $1\ 397.50 \pm 104.43$, 与对照组的 986.64 ± 91.22 和 $1\ 060.44 \pm 107.54$ 相比, 差异明显 ($P < 0.01$), bax 与 bcl-2 两者平均荧光值之比为 1.04; 神经肽 Y 还可降低血管平滑肌细胞内液 pH 的平均荧光值, 使细胞浆酸化。此结果提示, 神经肽 Y 诱导血管平滑肌细胞凋亡相关基因的表达与神经肽 Y 降低细胞内液酸碱度、细胞浆酸化有关。

[中图分类号] R338

[文献标识码] A

The Relationship between Expression of Apoptosis- Related Genes Induced by Neuropeptide Y and Changes of Intracellular pH in Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Jian- Kang, HU Bi- Li¹, LIANG Re- 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; Intracellular Fluid; Acidosis; Muscle, Smooth, Vascular; Apoptosis; Rat

ABSTRACT **Aim** To explore the role of changes of intracellular pH in expression of apoptosis- related genes of cultured vascular smooth cells induced by neuropeptide Y. **Methods** The rat vascular smooth muscle cells were used for experiments at passage 4 to 6. The expression of bcl- 2 and bax were quantitatively detected in cultured vascular smooth muscle cells and the intracellular pH were also quantitatively detected with the immunofluorescent quantitative skill through Laser scanning confocal microscope (ACAS570). **Results** It was found that at the action of NPY (10^{-6} mmol/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 $1\ 349.67 \pm 108.28$ and $1\ 397.50 \pm 104.43$, much higher than 921.72 ± 80.31 and $1\ 060.44 \pm 107.54$ in the control group respectively ($P < 0.01$). Intracellular fluid pH in VSMC was decreased by NPY. **Conclusion** The expression of apoptosis- related genes induced by neuropeptide Y is mediated, in part, by intracellular acidosis in cultured vascular smooth muscle cells.

细胞内液 pH 变化是调节血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 张力、平滑肌细胞收

缩性和细胞内液钙离子浓度的重要因素^[1]。研究发现, 神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 影响血管内皮细胞源性舒缩平衡和刺激血管平滑肌细胞增殖^[2,3], 与高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生有着十分密切的关系。但有关 NPY 调节 VSMC 功能活动的信号传导机制, 尤其是 NPY 是否可改变 VSMC 内 pH, 并由此导致 VSMC 上述的功能变化, 目前研究资料较少。本研究采用体外培养的 VSMC 模型, 动态定量观察 NPY 对 VSMC 内酸碱度的变化以及与 VSMC 凋亡相关基因表达之间的关系, 以期阐明 NPY 影响 VSMC 功能的信号传导机制。

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

[作者简介] 刘建康, 男, 1962 年 8 月出生, 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 11 月出生, 生理学副教授, 主要从事神经感官生理和细胞电生理研究, 本文通讯作者。梁若斯, 女, 1969 年 12 月出生, 讲师, 主要从事心血管病病因学基础研究。陈敏生, 男, 1962 年 11 月出生, 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

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) 培养基, 37℃、5% CO₂ 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, 并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 用于实验。实验分 NPY 组和对照组。前组加入 NPY 条件培养基 (NPY 浓度为 10⁻⁶ mol/L), 对照组加入无血清 DMEM 培养基。

1.2 血管平滑肌细胞凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 表达

选择生长状态良好的培养细胞, 消化传代至 96 孔培养板上。经 18 h 的预培养和 6 h 的预处理后, 分别加入 NPY 条件培养基和无血清 DMEM 培养基, 5% CO₂ 培养 24 h。弃去培养基, 用 PBS (pH 7.3) 洗 3 次后, 多聚甲醛 (30 g/L) 固定 30 min, PBS 洗 3 次。

固定样品按常规免疫组织化学方法处理。封闭血清为 5% 羊血清, 室温孵育 30 min 后; 倾去血清, 滴加稀释度为 1:50 鼠抗大鼠 bcl-2 和 bax 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司产品), 4℃ 冰箱过夜。二抗为 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。用粘附式细胞仪 (ACAS 570UVC 型, 美国 MERIDIAN 公司) 检测样品中待测抗体的平均荧光强度。检测条件选用 40× 物镜, 7% 滤光片, 确定激发光波长为 488 nm。进入 Kinetics-Image Scan 程序后, 先预扫描样品选定最佳扫描参数和扫描视野, 然后扫描采集和存储各项实验数据。所采集的数据用 Kinetics-Image Analysis 程序分析和处理各次实验数据, 自动得出统计结果。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数差异显著性用 *t* 检验判定。

1.3 血管平滑肌细胞内液酸碱度变化的动态检测

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 培养基继续培养 24~48 h。弃去皿中培养基, 用 DMEM 液轻洗 3 次, 再加入 10 μmol/L snaf1-calcein AM 荧光探针 40 μL, 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

10⁻⁶ mol/L 的 NPY, 做动态观察扫描, 整个扫描时间为 40 min。通过粘附式细胞仪计算机图象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 对血管平滑肌细胞凋亡相关基因的诱导作用

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液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液核酸、蛋白质等被标记物质的变化。因此, 检测细胞内液被标记 bcl-2 和 bax 的平均荧光值即可反映其表达。神经肽 Y 组, bcl-2 和 bax 表达的平均荧光值分别为 1 349.67 ± 108.28 和 1 397.50 ± 104.43; 而对照组分别为 983.64.72 ± 91.22 和 1 060.44 ± 107.54, 两者相比, 差异明显 (*P* < 0.01); 且 bax 表达的平均荧光强度强于 bcl-2, bax 与 bcl-2 平均荧光值之比为 1.04。

2.2 神经肽 Y 对血管平滑肌细胞内液 pH 动态变化的影响

培养 VSMC 内 pH 动态变化的观察是在未加 NPY 测定静息状态下基础荧光强度的基础上进行。静息状态下, VSMC 内液 pH 平均荧光值稳定在 96.5 u 左右, 加入 NPY 后, VSMC 内液荧光值下降, pH 值降低 (图 1, Figure 1), 最低为 14 u, 下降速度较为缓慢, 平均为 0.5 u/s。

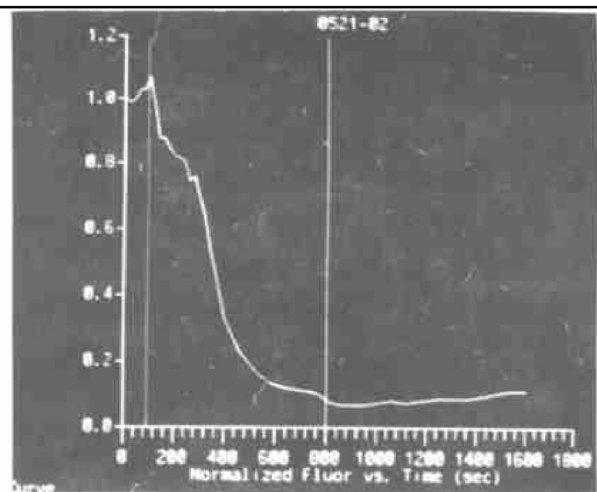


图 1 神经肽 Y 对培养血管平滑肌细胞 (VSMC) 内液 pH 变化的影响

Figure 1 The effects of NPY on changes of intracellular pH in cultured VSMC

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^[1]。研究表明,在动脉粥样硬化斑块或高血压血管壁增厚、管腔狭窄等病变中,VSMC 异常增殖常伴有 VSMC 的凋亡^[5]。神经肽 Y 在心血管系统中分布广泛,其作用不仅可强烈收缩血管,而且可作用于血管内皮细胞产生类似动脉粥样硬化的形态学改变^[6],并影响内皮细胞源性的血管舒缩平衡功能和刺激 VSMC 的增殖^[2,3];近来研究发现神经肽 Y 还可诱导体外培养 VSMC 凋亡^[7],并发现,神经肽 Y 刺激血管平滑肌细胞增殖的作用受细胞内液游离 Ca^{2+} 的影响^[8]。本实验通过观察 VSMC 凋亡相关基因的表达,发现 NPY 可诱导 VSMC 中 bax 和 bcl-2 的表达,其水平明显高于对照组 ($P < 0.01$),而且, bax 的表达水平高于 bcl-2,两者之比为 1.04。从分子生物学的角度出发^[8], bcl-2 和 bax 都是与细胞凋亡相关的基因。bcl-2 抑制细胞凋亡,阻止细胞死亡过程的发生; Bax 与 bcl-2 属同一家族,但其作用完全相反,为凋亡诱导基因。Oltvai 等^[9]实验证实 bax 与 bcl-2 的比值是细胞接受刺激信号后存活或凋亡的决定因素, bax 过量表达,则 bcl-2 被抑制,凋亡被诱导,细胞死亡; bcl-2 过度表达, bax 受抑制,则凋亡被抑制,细胞存活。因此,本实验所观察到 bax 强于 bcl-2 的表达,很可能提示 NPY 诱导体外培养 VSMC 的凋亡与此有关。

细胞内液酸化与细胞凋亡和其凋亡相关基因的表达密切相关。一些研究资料表明^[10,11],各种外源性理化刺激在诱导不同细胞发生细胞凋亡时都伴随着细胞浆的酸化,并进一步影响到细胞凋亡相关基因的表达。用放线菌酮诱导 T 淋巴细胞凋亡,不仅可导致细胞浆酸化,而且细胞内凋亡相关基因 bcl-2 的表达受到抑制;蛋白激酶抑制剂 Staurosporine 对细胞凋亡的诱导也与细胞浆的酸化和 bcl-2 的表达受到抑制有关。因此,本实验结果中 bax 表达增强说明 NPY 所诱导体外培养 VSMC 的凋亡,很可能与 NPY 影响细胞内液 pH 变化,使细胞浆酸化,并进一步改变血管平滑肌细胞中细胞凋亡相关基因 bax 和 bcl-2 表达间的相互平衡有关。

胞浆酸化是细胞发生凋亡过程中的一种细胞内液信号变化,它促进细胞凋亡有以下几个方面实验事实的支持。用特异性 $Na^+ - H^+$ 抑制剂促使细胞浆酸化可诱导细胞凋亡^[12];细胞内液存在有使核小体 DNA 断裂,导致细胞凋亡的核酸内切酶^[13],而细

胞内液酸化则能提高该酶的催化活性。此外,许多与细胞凋亡有关的酶和蛋白质,在酸性条件下其活性也明显增强。所有这些都说明细胞内液酸化作为一种细胞内液信号变化介导细胞凋亡的发生。

参考文献

- [1] Smith GL, Austin C, Crichton C, et al. A review of the actions and control of intracellular pH in vascular smooth muscle [J]. *Cardiovas Res*, 1998, **38**: 316- 331
- [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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**(1): 42- 45
- [3] 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
- [4] Aesim C, David W, Courtman B, et al. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb [J]. *Circ Res*, 1995, **76**: 168- 175
- [5] Bennet MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 266- 274
- [6] 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 [J]. *广州医学院学报*, 1997, **25**(5): 1- 6
- [7] 刘建康, 黄少华, 陈敏生. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7**(3): 212- 214
- [8] 刘建康, 胡必利, 梁若斯, 等. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**(4): 312- 314
- [9] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide [J]. *Science*, 1995, **267**: 1 445- 449
- [10] Oltvai ZN, Millman CI, Korsmeyer SJ. Bcl- 2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, **74**: 609- 613
- [11] Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, et al. Event in apoptosis: Acidification is downstream of protease activation and bcl- 2 protection [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(27): 16 260- 262
- [12] Reynolds JE, Li J, Craig RW, et al. Bcl- 2 and MCL- 1 expression in chinese Hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by Staurosporine [J]. *Exp Cell Res*, 1996, **225**(2): 430- 436
- [13] Perez- Sala D, Collado- Escobar D, Mollinedo F. Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony- stimulating factor [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(16): 12 084- 091
- [14] Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis [J]. 1993, **300**(1): 440- 450

(此文 2000- 03- 13 收到, 2000- 11- 30 修回)

(此文编辑 文玉珊)