

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0210-04

神经肽 Y 对人血管平滑肌细胞脂质代谢的调制作用

梁若斯, 刘建康, 胡必利¹

(广州医学院组织胚胎学教研室, 广东省广州市 510182; 1. 南华大学基础医学院生理学教研室)

[主题词] 神经肽 Y; 肌, 平滑, 血管; 脂/代谢; 受体, 脂蛋白, 低密度; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨神经肽 Y 在血管平滑肌细胞中对脂质代谢是否具有调制作用, 以成人血管平滑肌细胞体外培养模型为研究对象, 经不同浓度的神经肽 Y 作用后, 运用激光扫描共聚焦显微镜和免疫荧光组织化学技术, 定量观察神经肽 Y 对人血管平滑肌细胞的低密度脂蛋白受体表达的影响。结果发现, 对照组人血管平滑肌细胞的低密度脂蛋白受体表达的平均荧光强度为 2443 ± 189 , 而在浓度为 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 和 10^{-5} mol/L 的神经肽 Y 作用下, 各组的平均荧光强度分别为 2015 ± 164 、 1890 ± 145 、 1841 ± 123 和 1786 ± 136 , 与对照组相比分别下降了 17.49%、22.62%、24.64% 和 26.92% ($P < 0.01$), 且各浓度组之间多有显著差异, 呈现一定的剂量依赖效应。结果提示, 神经肽 Y 很可能通过下调人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体的表达, 从而影响血管平滑肌细胞的脂质代谢。

[中图分类号] Q813.1

[文献标识码] A

The Changes of Lipid Metabolism in Human Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Neuropeptide Y

LIANG Ruo-Si, LIU Jian-Kang, and HU Bi-Li

(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; Muscle, Smooth, Vascular; Lipids/metabolism; Receptors, LDL; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of neuropeptide Y on lipid metabolism in human vascular smooth muscle cells.

Methods The human vascular smooth muscle cell culture model was used for experiments. The expression of low density lipoprotein receptor in cultured human vascular smooth muscle cells were quantitatively assayed by the immunofluorescent staining under laser scanning confocal microscope.

Results The averaged fluorescent value in control group was 2443 ± 189 , while the values in neuropeptide Y groups were 2015 ± 164 , 1890 ± 145 , 1841 ± 123 and 1786 ± 136 , decreasing by 26.92%, 24.64%, 22.62% and 17.49% ($P < 0.01$), respectively in 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L concentrations of neuropeptide Y, compared with control group. There was significant differences among the different concentrations neuropeptide Y groups in a dose dependent manner.

Conclusion Neuropeptide Y may influence the lipid metabolism of human vascular smooth cells by downregulating low density lipoprotein receptor in human vascular smooth muscle cells.

脂质代谢紊乱是引发动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的重要危险因素^[1,2], 其中低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)代谢与 As 的关系最为密切, 而 LDL 主要是通过 LDL 受体介导进入细胞内进行代谢的^[3]。神经肽 Y 是主要的参与心血管系统功能调节及与多种心血管疾病发生密切相关的肽类神经调质, 它对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的功能有重要的调制作用^[4,5], 并

与胆固醇代谢有联系^[6]。而 VSMC 是发生 As 的关键细胞, 由此可推测, 神经肽 Y 可能通过调制 VSMC 的脂质代谢来参与 As 的发生机制。本文通过观察神经肽 Y 对人 VSMC 的 LDL 受体表达的影响, 以探讨神经肽 Y 对血管壁脂质代谢的调制作用, 为进一步阐明 As 的发病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和设备

DMEM/F12 干粉(Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所)、胰蛋白酶(Trypsin, Sigma 公司)、神经肽 Y(Sigma 公司)、鼠抗人 LDL 受体(Ab-1)(Oncogene 公司, Cat# LP02/LP02L)、FITC-羊抗鼠 IgG(Jackson 公司)、激光扫描共聚焦显微细胞仪(ACAS 570 UVC 型, 美国 MERIDIAN 公司)、相

[收稿日期] 2002-03-28 [修回日期] 2002-05-10

[基金项目] 广东省自然科学基金(980466)和广州医学院科研基金(9907)资助。

[作者简介] 梁若斯, 女, 1968 年 12 月出生, 医学硕士, 讲师, 主要从事心血管病病因学研究。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的研究。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、细胞电生理和神经调质对动脉粥样硬化的影响研究, 本文通讯作者。

机系统(CIR-300, 日本 NIPPON AVIONCS CO)、96 孔塑料培养板(Corning 公司)。

1.2 取材

人血管平滑肌细胞(human vascular smooth muscle cell, hVSMC)取自腹部外科手术中摘除的正常人肠系膜动脉(供体均血压正常、无器质性心血管疾病, 年龄 45 ± 5 岁), 直径约 3 mm, 长约 5 cm。

1.3 人血管平滑肌细胞的培养及鉴定

改良传统的植块贴壁法, 将无菌分离的动脉, 经 37°C D-Hank's 液冲洗血管内外的凝血后, 尽量去除血管外膜组织。然后纵向剪开血管并剪碎成约 $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$ 血管小块, 按 $3 \sim 5$ 块/ cm^2 密度均匀种植入 25 mL 一次性塑料培养瓶。将粘有植块的瓶底朝上, 而少量的含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液在下方, 培养液约 $1 \sim 1.5 \text{ mL/瓶}$ 。放入 37°C 恒温箱干涸 3 h 后, 将培养瓶慢慢翻转, 使植块刚好浸入培养液(培养液的用量仅够保持植块湿润即可)。在 37°C 5% CO_2 培养箱(湿度 100%)内静置培养 3 天后, 换上新鲜培养液, 之后每 3 天换液一次, $1 \sim 2 \text{ mL/次}$, 每次只换 $2/3$ 量, 保留 $1/3$ 的原液。待植块周围生长晕的细胞融合成遍时, 即可传代。传代时, 弃培养液, 用 D-Hank's 液轻轻冲洗细胞两遍, 加入 0.0625% 胰蛋白酶溶液和 0.01% EDTA 混合液约 2 mL, 室温($20 \sim 25^\circ\text{C}$)消化 80 s。弃酶液, 加入新鲜 37°C DMEM/F12 培养液(内含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素)终止消化反应。轻轻将细胞吹打下来调成密度约 $1.5 \times 10^8/\text{L}$ 的细胞悬液, 传入培养瓶中, 每 3 天换液一次, $2 \sim 3 \text{ mL/次}$, 换去 $2/3$ 量, 每次仍留少量原培养液。待细胞长至融合状态后, 又可传代。将培养至第 3~4 代的细胞用透射电镜和免疫组织化学的方法进行鉴定。

1.4 实验分组

实验选用第 3~4 代细胞。消化贴壁生长的 hVSMC, 制成密度为 1×10^8 个/L 的细胞悬液, 然后接种在 96 孔培养板中($200 \mu\text{L/孔}$), 在 37°C 5% CO_2 培养箱内静置培养 24 h, 待细胞生长至半融合状态后再分为 5 组, 并换上相应的培养基: 对照组(control group)为无血清的 DMEM/F12 培养液; ④神经肽 Y-8 组(NPY-8)为含 10^{-8} mol/L 神经肽 Y 的无血清 DMEM/F12 条件培养液;

神经肽 Y-7 组(NPY-7)为含 10^{-7} mol/L 神经肽 Y 的无血清 DMEM/F12 条件培养液;

神经肽 Y-6 组(NPY-6)为含 10^{-6} mol/L 神经肽 Y 的无血清 DMEM/F12 条件培养液;

神经肽 Y-5 组(NPY-5)为含 10^{-5} mol/L 神经肽 Y

的无血清 DMEM/F12 条件培养液。

上述各组分别于 37°C 5% CO_2 培养箱内静置培养 24 h 后, 吸去培养液, 用 0.01 mol/L PBS 液洗涤三次, 3% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 PBS 液洗涤三次, 然后进行荧光免疫组织化学染色。

1.5 荧光免疫组织化学染色

用 10% 羊封闭血清作用 20 min ($20 \mu\text{L/孔}$), 再加入 1:50 鼠抗人 LDLR (一抗) 4°C 过夜 ($50 \mu\text{L/孔}$), 然后弃一抗孵育液, 用 0.01 mol/L PBS 液轻轻洗涤三次, 接着加入 1:10 FITC 一抗抗鼠 IgG (二抗) 室温 2 h ($50 \mu\text{L/孔}$) 后, 用 0.01 mol/L PBS 液轻轻洗涤三次, 然后加入新的 0.01 mol/L PBS 液 ($20 \mu\text{L/孔}$), 以保持细胞湿润。

1.6 人血管平滑肌细胞的 LDL 受体定量检测

将待测的培养板置于带电脑的紫外激光扫描共聚焦显微镜细胞仪上, 选出合适的视野, 在 $\times 40$ 物镜、7% 滤光片、488 nm 波长激发光的条件下进行预扫描, 以确定最佳细胞扫描参数, 然后进入 Kinetics-Image Scan 程序, 由细胞仪对所选定的检测视野自动进行激光扫描、采集并储存各项实验数据及图象。各组的扫描细胞总数在 200 个左右。数据采集完成后, 进入 Kinetics-Image Analysis 程序, 分析和处理各次实验储存数据, 由电脑进行统计分析, 并自动得出结果。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数差异显著性用 t 检验判定。

2 结果

2.1 细胞培养与鉴定

在倒置显微镜下连续观察, 大约第 10 天左右, 有少许细胞从植块周边爬出。大约第 3~4 周, 植块周围形成明显的生长晕, 细胞围绕植块边缘呈束状向外延伸, 细胞长梭形, 核卵圆居中, 胞质均质透明。约第 4~5 周后, 生长晕不断扩大彼此融合, 细胞平行排列成“峰谷样”的结构特征。传代细胞, 于 20 min 后开始贴壁, 约需 2~3 周后, 细胞铺满培养瓶底。在透射电镜下, 细胞呈长梭形, 细胞膜下陷形成小凹(caveola), 其下方可见质膜小泡和吞饮小泡, 胞质内有成束的肌丝及与其相连的密斑密体, 呈现典型的收缩表型的结构特征, 证实所培养的细胞为平滑肌细胞。 α -actin 单克隆抗体免疫组织化学结果显示 95% 为阳性血管平滑肌细胞。

2.2 神经肽 Y 对人血管平滑肌细胞上 LDL 受体表

达的量效关系

在激光扫描共聚焦显微细胞仪下,可见对照组中被标记 hVSMC 的荧光强度最高;加入神经肽 Y 以后,被标记 hVSMC 的荧光强度低于对照组,并且其荧光强度随着神经肽 Y 作用浓度的增加而逐渐减

弱,其中, 10^5 mol/L 神经肽 Y 浓度组的荧光强度最弱, 10^6 mol/L、 10^7 mol/L 和 10^8 mol/L 浓度组逐渐次之(图 1, Figure 1)。各组被标记 hVSMC 的 LDL 受体表达的平均荧光强度经计算机统计分析后,其结果见表 1 和图 2 (Table 1 and Figure 2)。

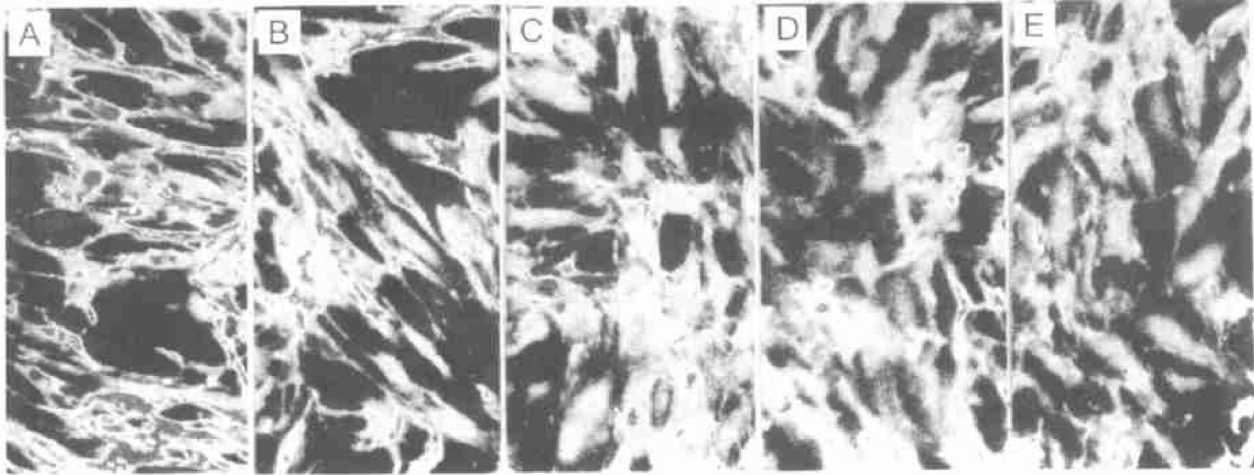


图 1. 人血管平滑肌细胞 LDL 受体表达的荧光图.

Figure 1. The fluorescent picture of the LDL receptor expression in hVSMC. A is the picture of control group. B is the picture of 10^8 mol/L NPY group. C is the picture of 10^7 mol/L NPY group. D is the picture of 10^6 mol/L NPY group. E is the picture of 10^5 mol/L NPY group.

表 1. 人血管平滑肌细胞的 LDL 受体表达的平均荧光强度.

Table 1. The average fluorescent intensity of the LDL receptor expressions in hVSMC.

Groups	NPY	n	$\bar{x} \pm s$
Control	0	206	2443 \pm 189
NPY- 8	10^8 mol/L	180	2015 \pm 164 ^a
NPY- 7	10^7 mol/L	219	1890 \pm 145 ^a
NPY- 6	10^6 mol/L	199	1841 \pm 123 ^a
NPY- 5	10^5 mol/L	205	1786 \pm 136 ^a

a: $P < 0.01$ compared with control group, $P < 0.05$ among NPY groups.

从表 1 和图 2 (Table 1 and Figure 2) 可见, 对照组中 hVSMC 的 LDL 受体表达的平均荧光强度最高; 各神经肽 Y 组平均荧光强度显著低于对照组 ($P < 0.01$), 其中以浓度为 10^5 mol/L 的神经肽 Y 组作用最强, 其 hVSMC 的 LDL 受体表达的平均荧光强度最低。与对照组相比, 10^5 mol/L 神经肽 Y 组 LDL 受体表达的平均荧光强度下降 26.92%、 10^6 mol/L 神经肽 Y 组下降 24.64%、 10^7 mol/L 神经肽 Y 组下降 22.62%、 10^8 mol/L 神经肽 Y 组下降 17.49%, 且各神经肽 Y 浓度组之间多有显著性差异 ($P < 0.05$), 显示出随着神经肽 Y 浓度的增高, hVSMC 的 LDL 受体表达呈现逐步下降趋势, 具有一定的剂量依赖效应。

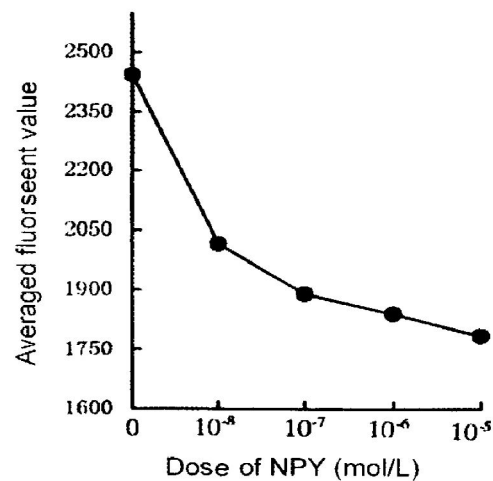


图 2. 神经肽 Y 影响人血管平滑肌细胞的 LDL 受体表达的量效曲线.

Figure 2. The dose dependent manner curve of the LDL receptor expression in hVSMC induced by NPY.

3 讨论

3.1 成人血管平滑肌细胞体外培养模型的建立

血管平滑肌细胞 (VSMC) 的体外培养, 作为探讨心血管疾病发生机制的重要而有效的研究手段, 正被广泛地应用。然而成人血管平滑肌细胞 (hVSMC)

培养难度很大,其主要原因是 hVSMC 分离后休眠期长、进入分裂期细胞少而不易在体外生长增殖,而且其体外培养条件要求高,细胞生长缓慢,细胞经数次传代后即发生细胞退化与凋亡。因此,目前国内外多数实验室仍选用动物的动脉作为 VSMC 体外培养来源,也有少数选用胎儿脐动脉,而成人动脉来源的 hVSMC 在体外培养成功率则较低。本实验反复摸索和改进传统的植块贴壁法:改变了植块的大小、以 DMEM/F12 培养基代替以往的 M199 或 DMEM 培养基、植块贴壁干涸时间改为 3 h、原代培养初期培养液用量不超过 3 mL、换培养液时保留 1/3 的原液、传代时酶消化时间定为 80 s 等关键环节,成功建立了稳定的成人血管平滑肌细胞体外培养模型。该培养方法简便可靠,可在体外传代后 hVSMC 的基本特性仍维持不变,其成功率从原来不到 10% 提高至 90% 以上,并且重复性好、细胞产量较大。该体外培养模型不但克服了成人 hVSMC 培养难的问题,更重要的是利用成人 hVSMC 所研究出来的实验结果,比起用动物的 VSMC 所得的结果,要更具说服力,更有意义,更切合人体的实际情况。

3.2 神经肽 Y 对人血管平滑肌细胞脂质代谢的影响及与动脉粥样硬化的关系

动脉粥样硬化的病理变化主要表现为脂质代谢紊乱、脂质在血管壁中沉积,而构成动脉管壁主要细胞成份的血管平滑肌细胞,其异常的脂质代谢作用是促进动脉粥样硬变形成的主要危险因素^[1,2]。其中经由 LDL 受体介导途径是血管平滑肌细胞清除沉积在血管壁中的 LDL 的重要代谢方式^[3]。一些研究表明,LDL 受体数量增加可促进 LDL 在动脉中膜层吸收和降解^[8],而 LDL 受体基因表达水平的降低与动脉粥样硬化的形成有关^[9]。有学者曾观察到高胆固醇血症和冠心病患者中的 LDL 受体表达明显降低^[10],在动脉粥样硬化斑块中也发现血管平滑肌细胞的 LDL 受体转录水平明显低于正常动脉组织^[11]。这些都提示了动脉粥样硬化的形成与 LDL 受体的低表达有着直接和密切的关系。而许多临床观察研究发现:动脉粥样硬化、冠心病、高血压等心血管疾病患者血浆中神经肽 Y 的浓度水平均明显升高,并且血浆神经肽 Y 升高的程度与高血压、动脉粥样硬化病变程度成正比^[12];而且体外实验也发现神经肽 Y 对 hVSMC 生物学特性具有调节作用^[4,5]。神经肽 Y 除了具有心血管效应外,还在胆固醇代谢调节过程中具有重要作用^[6]。神经肽 Y

作为与心血管系统关系密切的神经肽类物质,却未见其与血管平滑肌细胞脂质代谢关系的相关报道。本研究旨在通过定量观察神经肽 Y 对人血管平滑肌细胞 LDL 受体表达的影响,来探讨神经肽 Y 对血管壁脂质代谢的调节作用,以阐明神经肽 Y 与动脉粥样硬化之间的内在联系。从本实验观察到神经肽 Y 可下调人血管平滑肌细胞 LDL 受体表达的结果来看,可以设想神经肽 Y 有可能通过影响 LDL 受体的表达,导致 LDL 代谢途径的障碍,造成 LDL 不能通过 LDL 受体的介导作用而被细胞摄取进行代谢、降解和清除,致使 LDL 在细胞外大量积聚,从而使脂质在动脉壁内沉积,继而由沉积的脂质引发一系列病理变化,进一步促进动脉粥样硬化的发展。虽然有不少报道表明神经肽 Y 与动脉粥样硬化等心血管疾病关系密切,但其二者之间的内在联系尚不明确,本研究正是从神经肽 Y 调节血管平滑肌细胞脂质代谢的角度,来证明了神经肽 Y 在动脉粥样硬化发生发展中的重要地位。

[参考文献]

- [1] Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand*, 1998, **164** (4): 623-635
- [2] 巴莉, 司志国, 王顺道, 等. 843 例中风病患者血脂测定分析. 中西医结合实用临床急救, 1996, **3** (1): 15-17
- [3] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986, **232** (4746): 34-47
- [4] 刘建康, 胡必利, 梁若斯, 等. 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. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (1): 21-23
- [5] 刘建康, 陈敏生, 黄少华. 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. 中国动脉硬化杂志, 1999, **7** (4): 323-325
- [6] Unsitupa MI, Karvonen MK, Pesonen U, et al. Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. *Ann Med*, 1998, **30** (6): 508-510
- [7] Horike K, Yoshizumi M, Kitagawa T, et al. Neuropeptide Y as a stimulator of Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux from freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 1997, **356** (6): 756-762
- [8] Cumi PA, Renaud G, Juan L, et al. Role of LDL receptors in the in vitro uptake and degradation of LDL in the media of rabbit thoracic aorta. *Circ Res*, 1989, **64** (5): 957-967
- [9] 秦树存, 王士雯. 低密度脂蛋白受体基因表达研究进展. 国外医学-老年医学分册, 1996, **17** (1): 4-8
- [10] Le Gras TD, Gherardi E, Bowyer DE. A sensitive RAase protection assay for the quantitation of the mRNAs for the LDL receptor and HMG-CoA reductase in human total RNA. *Atherosclerosis*, 1991, **90** (1): 81-90
- [11] Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T, et al. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions. Marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation*, 1998, **97** (11): 1 079-086
- [12] 曾春雨, 刘光耀, 王旭开, 等. 心血管系统疾病患者血浆神经肽 Y 检测的临床意义. 中国危重病急救医学, 1999, **11** (1): 32-33

(此文编辑 朱雯霞)