

[文章编号] 1007-3949(2003)11-04-0295-04

• 实验研究 •

神经肽 Y 影响人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体表达

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. 南华大学医学院生理学教研室, 湖南省衡阳市, 421001)

[关键词] 生理学; 神经肽 Y 对血管平滑肌细胞的调制作用; 免疫荧光组织化学染色与激光扫描共聚焦显微镜检测法; 血管平滑肌细胞; 低密度脂蛋白受体; 神经肽 Y; 动脉粥样硬化

[摘要] 通过观察神经肽 Y 对人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体表达的影响, 以探讨神经体液因素在动脉粥样硬化发生中的重要作用。将体外培养的人血管平滑肌细胞分成对照组和不同浓度神经肽 Y 组(浓度分别为 10^8 mol/L、 10^7 mol/L、 10^6 mol/L 和 10^5 mol/L), 各组分别培养 6 h、12 h、24 h 和 48 h, 然后经免疫荧光组织化学染色, 在激光扫描共聚焦显微镜下定量检测神经肽 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, 对照组低密度脂蛋白受体表达的平均荧光值在 2 428~2 527 之间, 且不同培养时间无显著性差异($P > 0.05$)。而各神经肽 Y 组低密度脂蛋白受体表达的平均荧光值与对照组之间有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在不同的培养时间中, 10^8 mol/L 神经肽 Y 组平均荧光值在 1 798~2 408 之间; 10^7 mol/L 神经肽 Y 组在 1 783~2 332 之间; 10^6 mol/L 神经肽 Y 组在 1 722~2 281 之间; 10^5 mol/L 神经肽 Y 组在 1 590~2 010 之间。与对照组相比, 分别平均下降 15.59%、19.78%、21.91% 和 26.83%, 且不同浓度神经肽 Y 组之间多有显著性差异($P < 0.05$), 神经肽 Y 对成人血管平滑肌细胞的低密度脂蛋白受体表达的下调作用呈现一定的剂量和时间依赖效应。结果提示, 神经肽 Y 可下调人血管平滑肌细胞的低密度脂蛋白受体表达, 从而导致低密度脂蛋白受体介导途径障碍, 使低密度脂蛋白在血管壁中沉积, 这可能是神经体液因素参与动脉粥样硬化发生的重要机制之一。

[中图分类号] R33

[文献标识码] A

The Effect of the Neuropeptide Y on the Expression of Low Density Lipoprotein Receptor in Human Vascular Smooth Muscle Cells

LIANG Ruosi, LIU Jiankang, and HU Bilili

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

[KEY WORDS] Neuropeptide Y; Vascular Smooth Muscle Cell; Low Density Lipoprotein Receptor; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To detect the effect of neuropeptide Y (NPY) on the expression of low density lipoprotein receptors (LDLR) in human vascular smooth muscle cells (hVSMC). **Methods** The cultured hVSMC in vitro were divided into the control groups and the different concentration NPY groups (the concentrations of NPY were 10^8 mol/L, 10^7 mol/L, 10^6 mol/L and 10^5 mol/L). All groups were cultured for 6 h, 12 h, 24 h and 48 h respectively, then, were stained by the immunofluorescent histochemical staining and quantitatively assayed the effect of NPY on the expression of LDLR in hVSMC under laser scanning confocal microscope. **Results** The averaged fluorescent values of the LDLR expression in hVSMC of control groups were 2 428 to 2 527, and there were no significant differences among the different culture times ($P > 0.05$), while there were significant differences between the averaged fluorescent values in NPY groups and those in control groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The averaged fluorescent values were 1 798 to 2 408 in 10^8 mol/L NPY groups, 1 783 to 2 332 in 10^7 mol/L NPY groups, 1 722 to 2 281 in 10^6 mol/L NPY groups and 1 590 to 2 010 in 10^5 mol/L NPY groups during the different culture times, decreasing averagely by 15.59%, 19.78%, 21.91% and 26.83% compared with control groups respectively, and there were significant differences among most of the different concentration NPY groups ($P < 0.01$). NPY downregulated the expression of LDLR in hVSMC with dose-dependent and time-dependent manner. **Conclusion** Neuropeptide Y could downregulate the expression of LDLR in hVSMC, then it probably resulted in blocking the LDLR-mediated pathway, consequently LDL could accumulated in the vascular wall. This might be the important mechanism that neurofluid factor participated in the occurrence of atherosclerosis.

[收稿日期] 2003-05-08 [修回日期] 2003-06-22

[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 年出生, 生理学教授, 主要从事神经感官生理和细胞电生理研究, 本文通讯作者。

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是广泛分布于神经系统和心血管系统中的重要神经体液调节因子^[1], 其与心血管系统生理调节及与高血压、冠心病、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生密切相关, 并对血管平滑肌细胞的功能有重要的调节作用^[2,3], 同时也在胆固醇代谢调节过程中具有关键性作用^[4,5]。

众所周知,胆固醇主要由低密度脂蛋白携带,并通过低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的介导途径进入细胞内进行代谢的。可以设想, NPY 是否可能通过调节血管平滑肌细胞的 LDLR 表达, 导致脂质在血管壁中沉积, 从而在动脉粥样硬化的发生中占有重要地位。本研究采用人血管平滑肌细胞体外培养模型, 结合免疫荧光组织化学技术和激光扫描共聚焦显微技术, 定量观察 NPY 对人血管平滑肌细胞 LDLR 表达的影响, 深入探讨 NPY 参与动脉粥样硬化发生发展的重要机制, 以阐明神经体液因素与动脉粥样硬化之间的内在联系。

1 材料与方法

1.1 人动脉血管平滑肌细胞的体外培养和鉴定

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成人肠系膜动脉(供体血压正常、无器质性心血管疾病, 年龄为 45 ± 5 岁)。采用改良的植块贴壁法^[6], 去除血管外膜组织, 将血管剪碎成约 $0.5 \text{ mm}^3 \sim 1 \text{ mm}^3$ 的小块, 按 $3 \sim 5$ 块/ cm^2 种植于培养瓶。 37°C 干涸 3 h 后, 使植块浸入 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 (Gibco 公司) 培养基中静置培养, 待细胞从植块迁移生长并融合成片时, 即可传代。用光镜、透射电镜和免疫组织化学的方法对细胞进行鉴定。

1.2 实验分组

选用第 3~4 代生长良好的 hVSMC 进行实验, 制成密度 1×10^8 个/L 的细胞悬液, 然后接种在 96 孔培养板 (Corning 公司) 中 (200 μL /孔), 在 37°C 5% CO_2 培养箱内静置培养 24 h 后, 分对照组和不同浓度 NPY 组。对照组的培养体系为无血清的 DMEM/F12 培养基, 分别培养 6、12、24 和 48 h。 NPY 组的培养体系为含不同浓度 NPY (Sigma 公司) 的无血清 DMEM/F12 培养基, 包括 10^{-8} mol/L NPY 组、 10^{-7} mol/L NPY 组、 10^{-6} mol/L NPY 组和 10^{-5} mol/L NPY 组, 于 37°C 5% CO_2 培养箱内各分别培养 6 h、12 h、24 h 和 48 h。吸去培养基, 用 10 mmol/L PBS 液洗涤三次, 3% 多聚甲醛固定 30 min 后, 再用 PBS 液洗涤三次, 然后加入少量新的 10 mmol/L PBS 液以保持细胞湿润, 4°C 保存以备荧光免疫组织化学染色。

1.3 荧光免疫组织化学染色

用 10% 羊封闭血清 (北京中山生物技术有限公司) 作用 20 min (20 μL /孔) 后, 加入 1:50 鼠抗人 LDLR (Oncogene 公司, Cat# LP02/LP02L), 50 μL /孔, 4°C 过夜, 然后弃去孵育液, 10 mmol/L PBS 液轻洗三次,

再加入 1:10 FITC 一羊抗鼠 IgG (Jackson 公司), 50 μL /孔, 室温 2 h, 然后 10 mmol/L PBS 液轻洗三次, 再加入少量新的 10 mmol/L PBS 液以保持细胞湿润。

1.4 人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体表达的定量检测

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 (ACAS 570 UVC 型, 美国 MERIDIAN 公司) 上, 选出合适的视野, 在 $\times 40$ 物镜、7% 滤光片、488 nm 激发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像, 图像再由与细胞仪相配的相机系统 (CIR-300, 日本 NIPPON AVIONCS CO) 拍摄。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。本实验的各组 hVSMC 的 LDLR 表达的高低由被标记的 hVSMC 的 LDLR 平均荧光值来反映。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 血管平滑肌细胞的鉴定

在倒置显微镜下, 细胞长梭形, 核卵圆居中, 胞质均质透明, 细胞平行排列成“峰谷样”的结构特征。在透射电镜下, 细胞膜形成小凹, 胞质内有成束的肌丝及与其相连的密斑密体, 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发现, 95% 的阳性细胞为血管平滑肌细胞。

2.2 神经肽 Y 对人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体表达的影响

在激光扫描共聚焦显微细胞仪下, 对照组中被标记的 hVSMC LDLR 表达的荧光强度最强, 经 NPY 处理后的 hVSMC LDLR 表达的荧光强度低于对照组。在相同培养时间下, 随着 NPY 作用浓度的增加, 被标记 hVSMC 的 LDLR 表达的荧光强度逐渐减弱, 其中 10^{-5} mol/L NPY 组的荧光强度最弱, 10^{-6} mol/L NPY 组、 10^{-7} mol/L NPY 组和 10^{-8} mol/L NPY 组逐渐次之 (图 1, Figure 1)。在 NPY 作用浓度相同的情况下, 被标记 hVSMC LDLR 表达的荧光强度也随着作用时间延长而呈现下降趋势, 6 h 的荧光强度最强, 48 h 的荧光强度最弱 (图 2, Figure 2)。各组被标记 hVSMC 的 LDLR 表达的平均荧光值经计算机统计分析后, 得出的结果见表 1 (Table 1)。

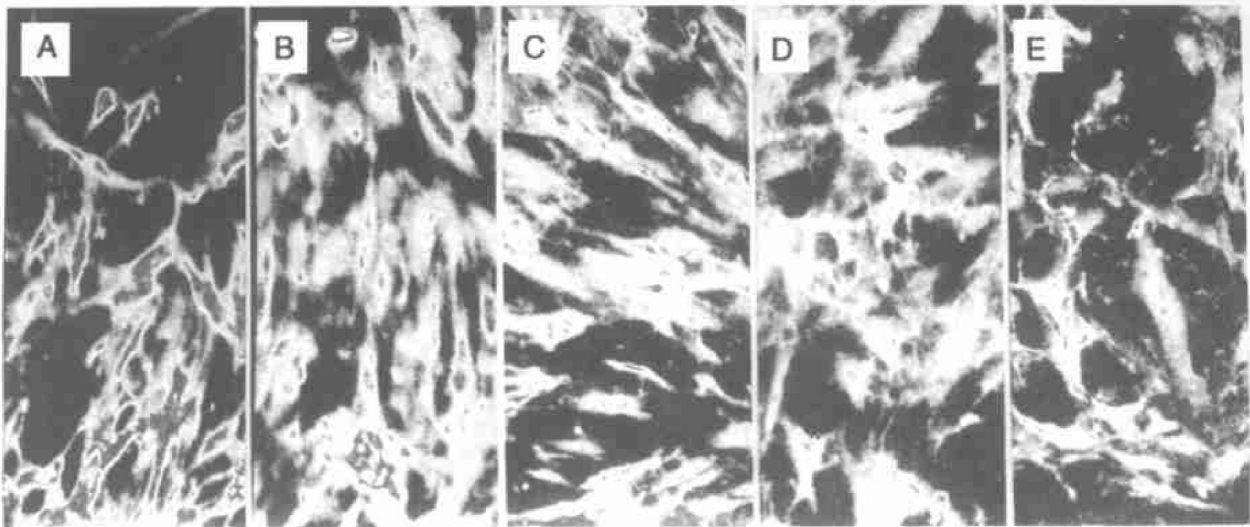


图 1. 不同浓度的神经肽 Y 孵育 48 h 人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体表达的荧光图 A 为对照, B 为 10^{-8} mol/L NPY, C 为 10^{-7} mol/L NPY, D 为 10^{-6} mol/L NPY, E 为 10^{-5} mol/L NPY。

Figure 1. The fluorescent picture of the LDLR expression in hVSMC dealed with NPY of different concentration for 48 h

表 1. 不同浓度的神经肽 Y 处理的人血管平滑肌细胞在不同时间的低密度脂蛋白受体表达的荧光值

Table 1. The fluorescent values of the LDLR expressions in hVSMC dealed with NPY of different concentration for 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h

分 组	6 h		12 h		24 h		48 h	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
对照组	197	2 527 ± 209	213	2 477 ± 210	206	2 443 ± 189	182	2 428 ± 191
10^{-8} mol/L NPY	186	2 408 ± 183	187	2 116 ± 191	180	2 015 ± 164	206	1 798 ± 188
10^{-7} mol/L NPY	203	2 332 ± 193	193	1 927 ± 138	219	1 890 ± 145	195	1 783 ± 168
10^{-6} mol/L NPY	228	2 281 ± 175	232	1 879 ± 154	199	1 841 ± 123	219	1 722 ± 143
10^{-5} mol/L NPY	185	2 010 ± 167	199	1 845 ± 128	205	1 786 ± 136	188	1 590 ± 113

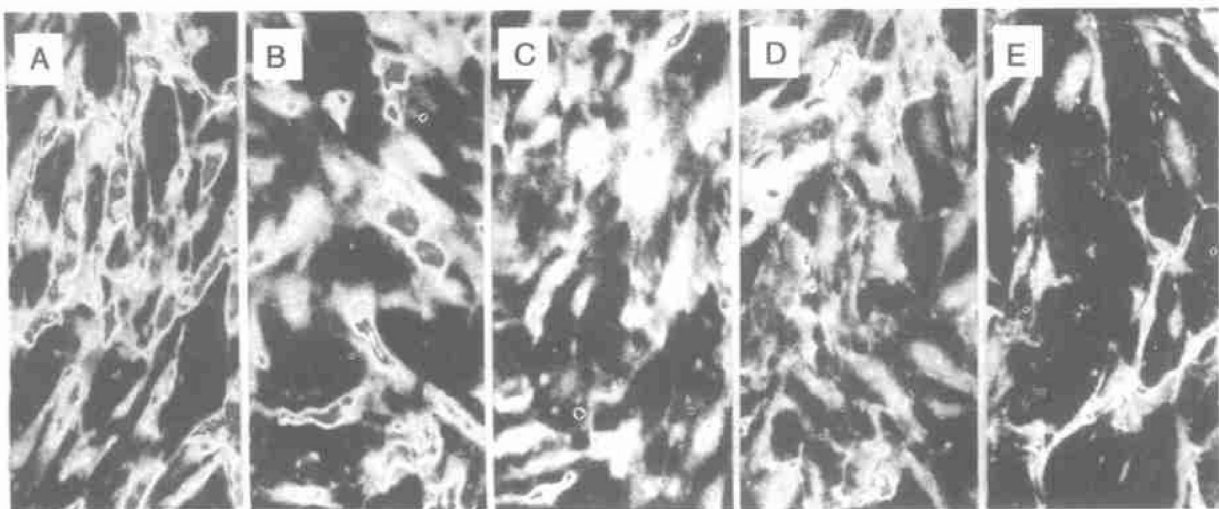


图 2. 10^{-5} mol/L 神经肽 Y 孵育 6 h、12 h、24 h 和 48 h 人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体表达的荧光图 A 为对照, B 为孵育 6 h, C 为孵育 12 h, D 为孵育 24 h, E 为孵育 48 h。

Figure 2. The fluorescent picture of the LDLR expression in hVSMC dealed with NPY of 10^{-5} mol/L for 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h.

从表 1 可见, 对照组 hVSMC 的 LDLR 表达的平均荧光值在各培养时间中最高, 且各培养时间之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。各 NPY 组平均荧光值显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在相同培养时间下, 随着 NPY 浓度增加, hVSMC 的 LDLR 表达逐渐下降, 具有一定的剂量效应[6 h、12 h、24 h 和 48 h 的相关系数分别为 -0.9056 ($P < 0.01$)、-0.4861、-0.4881 和 -0.5083]。在相同浓度下, 随着培养时间延长, hVSMC 的 LDLR 表达逐渐下降, 具有一定的时间效应[10^8 mol/L、 10^7 mol/L、 10^6 mol/L 和 10^5 mol/L 的相关系数分别为 -0.9264 ($P < 0.01$)、-0.7766 ($P < 0.05$)、-0.7901 ($P < 0.05$) 和 -0.9640 ($P < 0.01$)]。与对照组相比, 10^8 mol/L NPY 组 LDLR 表达的荧光值平均下降 15.59%、 10^7 mol/L NPY 组平均下降 19.78%、 10^6 mol/L NPY 组平均下降 21.91%、 10^5 mol/L NPY 组平均下降 26.83%, 且各 NPY 浓度组之间多有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

以往对动脉粥样硬化的病因研究, 多强调外源性因素(如吸烟、饮食)对血管内皮细胞和平滑肌细胞相应的影响, 而对内源性因素(如神经体液因素)在动脉粥样硬化中的作用却未予以足够的重视。近年一些研究资料证实神经体液因素与动脉粥样硬化发生有密切的联系, 曾有国外学者观察电刺激动物的下丘脑, 可引起血管壁内皮细胞和平滑肌细胞发生类似于动脉粥样硬化早期的病理变化; 在血管平滑肌的培养基中加入来自电刺激下丘脑的动物血清, 也可促使培养的平滑肌细胞增殖, 而一些神经体液调节因子(如神经肽 Y)会在精神压力和应激状态下释放^[7]。随着生活水平的提高, 工作压力的增加、社会环境的变迁, 神经体液因素对动脉粥样硬化发生发展的影响势必更大。

作为心血管系统中神经体液重要调节因素的神经肽 Y, 其在动脉粥样硬化发生中的作用最受学者们注意, 它广泛分布于神经系统和心血管系统之中, 且是交感神经末梢分泌的神经递质之一, 与心血管系统正常生理功能调节和各种心血管系统疾病的发生有密切关系^[8]。有研究资料报道^[9], 高脂血症可促使血管壁上神经肽 Y 能神经纤维的大量增生, 而

增生的神经肽 Y 能神经纤维还与血管平滑肌细胞形成了某种非突触联系, 而且高脂血症还导致血管壁平滑肌细胞对神经肽 Y 的敏感性增高; 对来自高脂血症患者血浆中神经肽 Y 和 LDL 的临床检测结果也显示, 神经肽 Y 血浆浓度变化与 LDL 血浆水平之间存在着正相关^[10], 而且神经肽 Y 和高胆固醇血症之间, 在基因调节水平上存在着某种联系^[5], 所有这些研究资料均提示神经肽 Y 可能调节血管壁脂质代谢并参与动脉粥样硬化的发生。本研究以神经肽 Y 作为神经体液因素的代表, 旨在阐明神经体液因素与动脉粥样硬化发生发展的内在联系及其在动脉粥样硬化发生中的重要地位。本实验结果发现出神经肽 Y 能下调人血管平滑肌细胞的低密度脂蛋白受体表达, 从而可推测神经肽 Y 通过降低血管平滑肌细胞的低密度脂蛋白受体表达, 来影响血管壁正常 LDL 代谢的低密度脂蛋白受体途径, 造成 LDL 不能及时被清除和降解, 并在血管壁内沉积, 提示了这可能是神经体液因素参与动脉粥样硬化发生的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, et al. Neuropeptide Y: A novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res*, 1998, **83**: 187-195
- [2] 刘健康, 胡必利, 梁若斯, 陈敏生, 黄少华. 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
- [3] 刘健康, 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
- [4] Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, et al. Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. *Nat Med*, 1998, **4** (12): 1434-1437
- [5] 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
- [6] 梁若斯, 陈德. 成人动脉平滑肌细胞体外培养模型的建立. *中国现代医学杂志*, 2002, **12** (10): 31-34
- [7] Zukowska-Grojec Z, et al. Stress-induced mesenteric vasoconstriction in rats is mediated by neuropeptide Y Y1 receptors. *Am J Physiol*, 1996, **270**: H796-H800
- [8] 曾春雨, 刘光耀, 王旭开, 王宝文. 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
- [9] 郭国庆, 魏洪, 邝国壁. 高脂血症大鼠肠系膜上动脉 NPY 免疫反应性神经纤维的变化. *解剖学报*, 1998, **29** (3): 260-263
- [10] Nystrom F, Nilsson P, Olsson AG, et al. A population study of plasma neuropeptide Y: correlations with components of the metabolic syndrome. *Blood Press*, 1996, **5** (6): 349-353

(此文编辑 文玉珊)