

神经肽 Y 对炎症及低氧环境下不同癌细胞活力的影响

王 霞 周江睿 蒋春雷[△]

(第二军医大学军事航海医学教研室 上海 200433)

摘要 目的:研究神经肽 Y 对炎症反应及其对在低氧培养条件下的不同癌细胞活力的影响,探讨应激影响癌症发展的机制。方法:不同浓度神经肽 Y (0, 10^{-12} M, 10^{-10} M, 10^{-8} M) 与 100 ng/ml LPS 共孵育巨噬细胞 24h 后检测 NO 的浓度及 iNOS 表达的变化;不同浓度神经肽 Y (0, 10^{-9} M, 10^{-8} M) 刺激低氧培养条件下的肝癌细胞株 HepG2 与乳腺癌细胞株 MCF-7 36h,采用 cck-8 检测细胞活力变化;不同浓度神经肽 Y (0, 10^{-9} M, 10^{-8} M) 与 LPS 共孵育巨噬细胞 24 h 后取上清液离心,采用上清液培养两种癌细胞,并置于低氧条件下 36 h, cck-8 检测细胞活力。结果:实验结果显示,神经肽 Y 可以抑制巨噬细胞 NO 的释放 ($P<0.05$),并降低 iNOS 的表达 ($P<0.05$);单独的神经肽 Y 对低氧培养条件下两种癌细胞的活力没有明显影响 ($P>0.05$);但在低氧培养条件中,相比于 LPS 组的条件培养基, LPS 加神经肽 Y 组的条件培养基可明显增强 MCF-7 的活力 ($P<0.05, P<0.01$),而 HepG 2 的活力则没有统计学差异。结论:神经肽 Y 可能通过抑制炎症反应,从而增强乳腺癌细胞 MCF-7 在低氧环境下的活力。

关键词 神经肽 Y; 一氧化氮; 炎症; 肿瘤; 低氧

中图分类号: R737.9, R392.6 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)27-5241-03

The Effect of Neuropeptide Y on Inflammation and the Viability of the Different Carcinoma Cells under Hypoxia

WANG Xia, ZHOU Jiang-rui, JIANG Chun-lei[△]

(Department of Nautical Medicine, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of neuropeptide Y on inflammation and the viability of different carcinoma cells under hypoxia condition and to investigate the mechanism of stress on carcinoma cells. **Methods:** Macrophage cells were incubated in culture with different concentrations (0, 10^{-12} M, 10^{-10} M, 10^{-8} M) NPY combined with 100 ng/ml LPS for 24 h and then detected the NO release and iNOS expressions; HepG 2 and MCF-7 cells were incubated in culture with different concentrations (0, 10^{-9} M, 10^{-8} M) NPY under hypoxia condition (37 °C, 5 % CO₂, 1% O₂) for 36 h. The viability of carcinoma cells were in different groups detected by cck-8. Macrophage cells were incubated in culture with different concentrations (0, 10^{-9} M, 10^{-8} M) NPY combined with 100ng/ml LPS for 24 h and then the media were centrifuged. HepG 2 and MCF-7 cells were cultured with the conditioned media under hypoxia condition for 36 h. cck-8 was used for detecting the viability of carcinoma cells. **Results:** Neuropeptide Y markedly reduced the release of NO ($P<0.05$) and inhibited the expression of iNOS ($P<0.05$). NPY had no obvious effects on the viability of HepG 2 and MCF-7 cells under hypoxia. But the conditioned media which LPS and NPY treated macrophage markedly increased the viability of MCF-7 ($P<0.01, P<0.05$), and had no effects on HepG 2. **Conclusion:** NPY inhibits macrophage cells releasing NO and inhibits the expression of iNOS and then increases the viability of MCF-7 under hypoxia.

Key words: Neuropeptide; Nitric oxide; Inflammation; Carcinoma cells; Hypoxia

Chinese library classification: R737.9, R392.6 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)27-5241-03

前言

近年来,心理社会因素在肿瘤发生发展中的作用越来越引起学者的关注,临床流行病学资料表明心理因素与肿瘤的发生发展密切相关。长期恶性的心理应激和不良生活环境促进肿瘤发生发展已成为定论^[1]。缺氧是实体瘤中普遍存在的现象,肿瘤细胞在低氧环境下其转化、侵袭能力以及对能量的利用方式^[2-4]均与常氧条件下有所不同。

神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY) 是一种由 36 种氨基酸组

成的一种的多肽,最早是在 1982 年由瑞典 Karolinska 学院的 Tatemoto 和 Mutt 从 400kg 猪脑组织中纯化出来的。NPY 广泛分布于中枢及外周神经系统中,主要存在于交感节后神经中,且一般与去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)共存。研究表明,在慢性应激或者冷刺激后, NPY 浓度升高^[5]。神经系统释放的一些神经递质可通过其免疫细胞上的受体影响免疫系统,有研究报道,一类神经肽,如 VIP, urocortin, ghrelin 等可以抑制炎症反应^[6]。

目前,尚无关于 NPY 影响巨噬细胞 NO 释放的报道,本研究以 RAW264.7 为研究对象,观察 NPY 对巨噬细胞在 LPS 刺激下 NO 释放及 iNOS 酶表达的影响。同时观察 NPY 是否由于影响炎症反应而对低氧环境下的肝癌细胞株 HepG 2 与乳腺癌细胞株 MCF-7 的活力也产生影响。

作者简介:王霞(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:应激医学与神经免疫学, Tel: 15000699868, E-mail: youfre@163.com

△通讯作者:蒋春雷, E-mail: cljiang@vip.163.com

(收稿日期: 2012-03-23 接受日期: 2012-04-18)

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞 HepG2 细胞株, 乳腺癌细胞 MCF-7 细胞株由本实验室保存, RAW264.7 细胞购自中国科学院细胞库, 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 并置于 37℃, CO₂ 体积分数为 5%的培养箱中, 在饱和湿度条件下常规培养。取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.1.2 主要试剂 神经肽 Y 购自 TOCRIS(Cat.No:1153), 脂多糖购自 Sigma 公司, DMEM 高糖培养基与胎牛血清均购自 PAA 公司, iNO 检测试剂盒与 CCK-8 试剂盒均购自碧云天, TRNzol Reagent, Quant cDNA 第一链合成试剂盒以及 SYBR Green 试剂盒均购自 Takara 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 神经肽 Y 对巨噬细胞 RAW264.7 分泌 NO 的检测 RAW264.7 细胞消化离心后, 配置为 5×10⁵ 个/mL 的悬浮液, 在 96 孔板中每孔加入 100 μL 悬浮液, 24 h 后用于实验。实验分组为 100 ng LPS 对照组, 100 ng LPS 分别加入不同浓度 (10⁻⁸M, 10⁻¹⁰M, 10⁻¹²M) 的神经肽 Y 组, 每组分别为 10 个重复, 24h 后 Griess 法检测其上清 NO₂⁻ 的含量, 用于反映 NO 水平。

1.2.2 实时荧光定量 RT-PCR 测定 iNOS mRNA 的表达 RAW 264.7 消化后配为悬浮液, 铺于 24 孔板中, 24 h 后用于实验。实验分组为 100 ng/mL LPS 组, 100 ng/mL LPS 加 10⁻⁸M 的神经肽 Y 组, 24 h 后提取总 RNA, 反转录后进行 RT-PCR 检测。以 β-actin 为内参基因, iNOS 基因引物序列为上游: TTG ACG CTC GGA ACT GTA G; 下游为 GAC CTG ATG TTG CCA TTG T, β-actin 引物序列为上游: GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C; 下游: GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C, 荧光定量 PCR 反应条件为: 95℃ 5min, 95℃ 5s, 60℃ 30 s, 40 个循环。RT-PCR 结果经过 2^{-△△Ct} 计算比较。

1.2.3 神经肽 Y 对低氧条件下肿瘤细胞活力的检测 肝癌细胞株 HepG 2, 乳腺癌细胞 MCF-7 分别消化后配为悬浮液, 浓度为 5×10⁴ 个/mL, 分别在 3 块 96 孔板中加入 100 μL 悬浮液, 24 h 后用于实验。实验分组为空白组, 不同浓度的神经肽 Y 组 (10⁻⁷M, 10⁻⁸M, 10⁻⁹M), 细胞加入药物后置于 1%的低氧培养箱中培养 36 h 后, 采用 cck-8 检测细胞活力。

1.2.4 条件培养基的置备 RAW 264.7 消化后配为悬浮液, 铺于 12 孔板中, 24 h 后用于实验。药物处理分组为: 空白组, 100 ng/mL LPS, 100 ng/mL LPS 与不同浓度的神经肽 Y (10⁻⁷M, 10⁻⁸M, 10⁻⁹M) 共孵育组, 药物作用 24 h 后取上清离心后 -80℃ 保存备用。

1.2.5 条件培养基对低氧条件下肿瘤细胞活力的检测 肝癌细胞 HepG2, 乳腺癌细胞 MCF-7 分别消化后配为悬浮液, 浓度为 5×10⁴ 个/mL, 分别在 3 块 96 孔板中加入 100 μL 悬浮液, 24 h 后将原培养其吸走, 加入条件培养基 100 μL, 置于 1%的低氧培养箱中培养 36 h 后, 采用 cck-8 检测细胞活力。

1.2.6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件包, 数据用 mean±sd 表示, 统计方法采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检。

2 结果

2.1 神经肽 Y 对巨噬细胞 RAW264.7 分泌 NO 及 iNOS 表达的影响

不同组别处理巨噬细胞 RAW264.7 后, LPS 与神经肽 Y 共孵育组的 NO 明显低于单独 LPS 组 (P<0.05), 且呈现剂量依赖性。见表 1。同样, 100 ng/mL LPS 加 10⁻⁸M 神经肽 Y 后, iNOS 表达明显低于单独 LPS 组 (P<0.05), 图 1。

2.2 神经肽 Y 及条件培养基对低氧条件下不同癌细胞活力的影响

不同浓度 NPY 刺激低氧条件下 HepG 2, MCF-7 后其活力无统计学差异; 肝癌细胞株 HepG 2 在低氧环境下加入条件培养基后, 活力无统计学差异, 乳腺癌细胞株 MCF-7 在加入 LPS 与神经肽 Y 的条件培养基后其活力明显高于单独 LPS 组, 具有统计学差异 (P<0.05, P<0.01), 见表 2&3。

3 讨论

表 1 各组细胞 NO 水平的比较(OD mean± sd)

Table 1 Comparison of NO of each group(OD mean± sd)

Group	OD Value
LPS	0.0812± 0.003
LPS+NPY10 ⁻¹²	0.0742± 0.004
LPS+ NPY10 ⁻¹⁰	0.0629± 0.01
LPS+ NPY10 ⁻⁸	0.053± 0.007 *

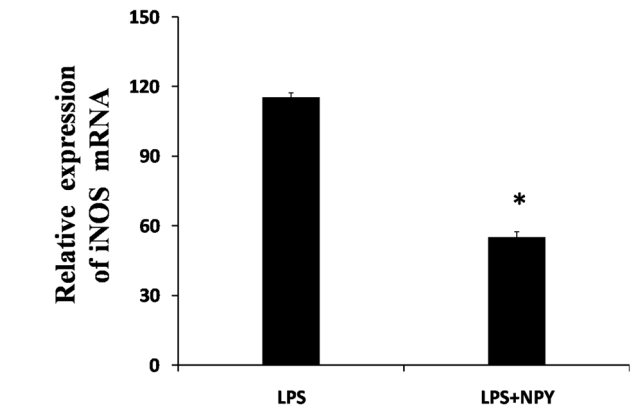


图 1 各组细胞 iNOS 表达的比较
Fig. 1 Comparison of iNOS expressions of each group

早在 1988 年的一项研究发现^[7], 在应激的情况下, 存在于交感神经末梢的 NPY 和 NE 共同释放, NPY 可能存在应激激素的作用。随后相继有研究发现了在慢性应激的情况下 NPY 及其 Y1 受体在动脉粥样硬化形成中的作用^[8], 以及 NPY 及 Y2 受体在应激引起的肥胖和代谢综合症中的作用^[9], 证明了 NPY 确实能够以 " 应激激素 " 的形式在心血管系统和物质代谢中发挥作用。有研究表明, 在脾脏中, 交感神经末梢与脾脏中的巨噬细胞发生类似 " 突触 " 样的连接, 在应激情况下, 交感神经末梢释放的 NPY 能够第一时间作用于其附近的巨噬细胞^[10]。

NO 是一种可调节细胞功能的信息分子, 具有介导细胞免疫和炎症反应的功能。NO 以左精氨酸(L-arginine, L-Arg)为底

表 2 NPY 对低氧环境下肿瘤细胞活力的影响(OD mean± sd)
Table 2 Effects of NPY on carcinoma cells under hypoxia (OD mean± sd)

Group	HepG2	MCF-7
Con	0.659± 0.019	0.744± 0.013
NPY10 ⁻⁹	0.651± 0.007	0.726± 0.011
NPY10 ⁻⁸	0.683± 0.012	0.732± 0.099

表 3 条件培养基对低氧环境下肿瘤细胞活力的影响(OD mean± sd)
Table 3 Effects of conditioned media on carcinoma cells under hypoxia (OD mean± sd)

Group	HepG2	MCF-7
CON	0.584± 0.013	0.733± 0.016
LPS	0.384± 0.011	0.499± 0.008
LPS+NPY10 ⁻⁹	0.384± 0.009	0.538± 0.008*
LPS+NPY10 ⁻⁸	0.370± 0.008	0.601± 0.012**

物,在一氧化氮合酶(nitric oxidio synthase ,NOS)催化下合成。NOS 主要有 2 种类型 结构型(constructive NOS ,cNOS)和诱导型(inducible NOS ,iNOS)。iNOS 主要存在于巨噬细胞 ,正常条件下钙 / 钙调蛋白非依赖的 NOS 无活性表达 ,在受到感染时 ,iNOS 的表达会增加 ,而造成大量 NO 的释放^[11]。NO 的大量生成与炎症反应有密切的关系^[12] ,过量的 NO 会与 O²⁻ 反应形成过氧亚硝酸盐中毒 ,使细胞结构与功能严重损坏。我们的研究表明神经肽 Y 可以通过抑制巨噬细胞 iNOS 的表达而降低 NO 的释放 ,从而抑制炎症的发展。

低氧是恶性肿瘤微环境的特征之一 ,低氧诱导因子(Hypoxia inducible factor 1 ,HIF-1) 是缺氧条件下普遍存在于哺乳动物和人体内的一种异源二聚体核转录因子^[13] ,其在人类的多种肿瘤细胞中表达。对维持肿瘤细胞的能量代谢、新生血管形成以及促进肿瘤的增殖生长、侵袭和转移及肿瘤耐药方面起着重要作用^[14]。本研究的结果表明 NPY 可以抑制炎症反应 ,并增强乳腺癌细胞株 MCF-7 在低氧环境下的活力。这很可能是由于 NPY 影响了炎症反应 ,进而影响肿瘤细胞 HIF-1 表达的结果。但在本研究中也发现 ,条件培养基对肝癌细胞株并没有明显的影响 ,其中的机制还有待于我们进一步的研究。

参 考 文 献(References)

[1] Maddock C, Pariante CM. How does stress affect you? An overview of stress, immunity, depression and disease [J]. Epidemiol Psychiatr Soc, 2001,10(3):153-162

[2] Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism [J]. Curr. Opin. Genet. Dev.,2010,20:51-56

[3] Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth [J]. Genes Dev.,2009,23:537-548

[4] DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, et al. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation

[J]. Cell Metab,7:11-20

[5] Morris MJ, Russell AE, Kapoor V, et al. Increases in plasma neuropeptide Y concentrations during sympathetic activation in man [J]. Journal of the Autonomic Nervous System,1986,17:143-149

[6] Mario Delgado, Doina Ganea. Anti-inflammatory neuropeptides: A new class of endogenous V [J]. Brain, Behavior, and Immunity,2008, 22:1146-1151

[7] Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, et at. International Union of Pharmacology recommedations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors [J]. Pharmacol Rev,1998,50:143-150

[8] Zukowska-Grojec Z, Konarska M, McCarty R. Differential plasma catecholamine and neuropeptide Y responses to acute stress in rats [J]. Life Sci,1988,42:1615-1624

[9] Li L, Jonsson-Rylander AC, Abe K, et al. Chronic stress induces rapid occlusion of angioplasty-injured rat carotid artery by activating neuropeptide Y and its Y1 receptors [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005,25:2075-2080

[10] Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome [J]. Nat Med,2007,13:03-11

[11] Cook H, Cattell V. Role of nitric oxide in immune-mediated diseases [J]. Clin Sci,1996,91(4):375-384

[12] Coello MC, Luketich JD, Litle VR, et al. Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer,2004,5(4):214-225

[13] Guan Y, Ramasamy Reddy K, Zhu Q, et al. G-rich oligonucleotides inhibit HIF-1 alpha and HIF-2 alpha and block tumor growth [J]. Mol Ther,2010,18(1):188-197

[14] Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology [J]. Trends Mol Med,2001,7(8):345-350