

## 精氨酸加压素、神经降压素和强啡肽对神经母细胞瘤 细胞 cAMP 和 cGMP 的影响

孙晓江\* 蔡 琰 苏 敏 朱 华 陆钦池

(上海第二医科大学附属仁济医院神经生物学实验室 200001)

神经肽是脑内大量并广泛存在的内源性活性物质。到目前为止,已知哺乳类动物中枢神经系统内存在的神经肽约为 200 余种,60%左右的突触联系可能与神经肽有关。在神经系统内神经肽既可作为神经递质,也可作为神经调质。在先前的实验中我们发现精氨酸加压素(AVP),神经降压素(NT)和强啡肽(DYN)可分别引起无血清培养下的神经母细胞瘤细胞的 DNA 和细胞总蛋白含量发生变化(资料另文发表)。为了解神经母细胞瘤细胞通过何种第二信使将上述生物信息传入细胞内部,本实验采用小鼠神经母细胞瘤细胞在无血清条件培养下,以 cAMP 和 cGMP 放射免疫定量测定方法,观察 AVP, NT 和 DYN 对小鼠神经母细胞瘤细胞 cAMP 和 cGMP 的影响。

### 材料与方 法

1. 细胞株 应用 American type culture collection 保存的小鼠神经母细胞瘤细胞株(NBA<sub>2</sub>),由美国新墨西哥大学 Davis 教授提供。

2. 主要试剂 DMEM 为 Life Technologies 产品。[Arg<sup>8</sup>Gly-OH<sup>9</sup>] AVP、[D-Phe] NT 和 (A Fragment 1-8) DYN 均为 Sigma 产品。<sup>125</sup>I-cAMP 和 <sup>125</sup>I-cGMP 放免药盒为上海中医学院产品。

3. 培养液 含血清培养液(FD):含 10%小牛血清(F)的 DMEM,每升另加碳酸氢钠 3.7 克,庆大霉素 5 万单位。无血清培养液(AID):每升 DMEM 中加牛血清白蛋白(A)500 毫克,普通胰岛素(I)5 毫克,庆大霉素 5 万单位。含肽实验培养液:AID 中分别加入 AVP、NT 和 DYN 而配成,三种神经肽浓度分别为 10<sup>-7</sup>mol/L。

4. 实验设备 Hitachi 低温冰箱, Nikon 倒置相差显微镜和 LNA-Ⅲ型二氧化碳培养箱皆为日本制造。r-计数器,同机配备 Apple II 微机,北京理工厂产品。

5. NBA<sub>2</sub> 细胞培养 按本室方法<sup>[1]</sup>。

6. 细胞内 cAMP 和 cGMP 放免测定 传代第三天的细胞经胰蛋白酶消化后用 FD 培养液收集细胞计数,以 0.83 × 10<sup>6</sup>/孔的密度将细胞接种于 24 孔培养板上,37℃,5%二氧化碳条件下培养 24 小时。弃去旧培养液,经 Hanks 液洗细胞三次,加入 AID 培养 24 小时后,再弃去旧培养液,随机分为对照组和实验组,分别加入 AID 和含肽培养液。置 37℃ 恒温箱内分别培养 2、10、20、30 分钟,达到既定时间后立即弃去培养液,加入 -10℃ 的 1% Titon X-100 溶液 500 微升并立刻置于 -20℃ 冰箱内。待各孔均冻结(约 2 小时)后,置于 4℃ 冰箱中过夜,使孔内细胞全部溶解。离心 3000 转/分 × 10;取上清液。放免测定 cAMP 和 cGMP 标准曲线中标准物浓度配制参照上海中医学院的 RIA-KIt 说明。本实验采用的稀释配制为 2000 pmol/0.1 ml,以后对倍稀释成 1000 pmol/0.1 ml……直至 8 pmol/0.1 ml。标准曲线中的 cAMP 和 cGMP 的浓度敏感范围为 2000 pmol—1 fmol/1.7 × 10<sup>5</sup> 细胞。测定数据由 Apple II 微机直接输出。统计学检验采用 POMS 方差分析,经 IBM 微机处理数据。

### 结 果

原始数据经统计学处理,神经肽对 NBA<sub>2</sub> 细胞内 cAMP 和 cGMP 以及 cAMP/cGMP 比值的影响在 2、10 和 30 分钟时与对照组比较无差异,只是在 20 分钟时显示出差别。在此只列出神经肽作用 20 分钟时对细胞 cAMP、cGMP

\* 现在河北省承德医学院附属医院神经内科实验室(邮编 067000)。

和 cAMP/cGMP 比值影响的数据。重复 1 次, 获得同样结果。

1. 神经肽对 NBA<sub>2</sub> 细胞内 cAMP 水平的影响, 见表 1。

表 1 神经肽对 NBA<sub>2</sub> 细胞内 cAMP 水平的影响

神经肽 (10 <sup>-7</sup> mol/L)	n	fmol/1.7×10 <sup>5</sup> 细胞		
		$\bar{x}$	±	SD
AID	5	13.2	±	4.9
AVP	5	59.5	±	37.1*
NT	5	6.4	±	3.5
DYN	5	13.4	±	5.8

注: 与 AID 比较, \*p<0.01

由表可见, AVP 使 cAMP 水平明显增高 (P<0.01); NT 使 cAMP 水平下降; 而 DYN 对 cAMP 水平影响不大。

2. 神经肽对 NBA<sub>2</sub> 细胞内 cGMP 水平的影响, 见表 2。

表 2 神经肽对 NBA<sub>2</sub> 细胞内 cGMP 水平的影响

神经肽 (10 <sup>-7</sup> mol/L)	n	fmol/1.7×10 <sup>5</sup> 细胞		
		$\bar{x}$	±	SD
AID	5	10.4	±	3.3
AVP	5	12.4	±	3.6
NT	5	16.8	±	4.9
DYN	5	21.4	±	5.6*

注: 与 AID 比较, \*p<0.01

由表可见, DYN 使 cGMP 水平明显升高 (P<0.01); NT 可使 cGMP 水平有所升高; AVP 对 cGMP 水平影响不大。

3. 神经肽对 NBA<sub>2</sub> 细胞的 cAMP/cGMP 比值的影响, 见表 3。

由表可见, AVP 使 cAMP/cGMP 比值明显升高 (P<0.01); NT 和 DYN 使 cAMP/cGMP 比值有所下降。

## 讨 论

本实验所选用的三种神经肽均为肽类神经

表 3 神经肽对 NBA<sub>2</sub> 细胞 cAMP/cGMP 比值的影响

神经肽 (10 <sup>-7</sup> mol/L)	n	fmol/1.7×10 <sup>5</sup> 细胞		
		$\bar{x}$	±	SD
AID	5	1.25	±	0.13
AVP	5	4.50	±	1.88*
NT	5	0.36	±	0.09
DYN	5	0.61	±	0.10

注: 与 AID 比较, \*p<0.01

递质<sup>[2]</sup>, 在脑中有着广泛的分布<sup>[3~5]</sup>在不同部位产生不同作用, 对代谢、体温、血压、镇痛、感觉、情绪、学习和记忆等生理功能发挥重要的影响<sup>[6~9]</sup>, AVP 和 DYN 还与中枢神经系统的早期发育有关<sup>[10]</sup>。作为神经递质的神经肽因它们的分子较大, 不能直接进入细胞, 而是通过与靶细胞表面的特异性受体相结合, 继而激活信息通路, 通过细胞膜的转导机制将细胞外信息转变为细胞内信息, 后者经过一系列传递机制和放大过程, 产生生物学效应。神经肽为第一信使, 继发的细胞内信息分子为第二信使。神经肽常以 cAMP 或 cGMP 为第二信使调节细胞代谢与功能<sup>[11-12]</sup>。

实验结果显示: AVP 使 NBA<sub>2</sub> 细胞内 cAMP 水平和 cAMP/cGMP 比值显著升高 (P<0.01); NT 引起 cGMP 水平升高, 而 cAMP 和 cAMP/cGMP 比值下降; DYN 致 cGMP 水平升高 (P<0.01), 但 cAMP/cGMP 比值下降。结果提示 AVP、NT 和 DYN 可分别选择性地使 cAMP、cGMP 水平和 cAMP/cGMP 比值发生变化, 并可能通过这些变化使生物信息传入细胞内部进而实现对细胞代谢和功能的调节。

鸟苷酸环化酶(GC)分为两类: 一类位于胞浆内, 称可溶性 GC<sup>[13,14]</sup>, 由氧化氮穿过细胞膜所激活<sup>[15,16]</sup>, 而提高 cGMP 水平。另一类位于细胞膜上, 称为颗粒性 GC<sup>[17~18]</sup>, 大分子多肽与其偶联而激活, 提高 cGMP 水平。本实验中 NT 和 DYN 可引起 cGMP 水平升高, 推

测可能是这两种神经肽与细胞膜上的颗粒性GC结合并使其激活所致。而AVP引起cAMP水平升高,可能为AVP与位于细胞膜上的特异性受体相结合,在鸟苷酸结合蛋白的参与下激活腺苷酸环化酶所致。AVP、NT和DYN对NBA<sub>2</sub>细胞内cAMP、cGMP水平及cAMP/cGMP比值影响的机制尚有待于进一步研究。

小鼠神经母细胞瘤细胞在无血清培养条件下由分裂增殖变为分化成熟,显示出神经细胞的特征,从而可做为神经细胞老化实验研究的模型<sup>[1]</sup>。本实验采用这一系统使NBA<sub>2</sub>细胞向分化成熟方向发展,希望能够借此了解AVP、NT和DYN对神经细胞内cAMP、cGMP水平和cAMP/cGMP比值的影响。

### 摘 要

本文报道小鼠神经母细胞瘤细胞在无血清培养条件下,用cAMP和cGMP放射免疫测定方法,观察AVP、NT和DYN对小鼠神经母细胞瘤细胞内cAMP和cGMP水平及cAMP/cGMP比值的影响。结果发现:AVP使cAMP水平和cAMP/cGMP比值显著升高( $P < 0.01$ );DYN使cGMP水平升高( $P < 0.01$ ),但cAMP/cGMP比值下降;NT使cAMP水平和cAMP/cGMP比值下降,同时又使cGMP水平升高。结果提示:这三种神经肽可以分别对神经母细胞瘤细胞内cAMP、cGMP水平和cAMP/cGMP比值产生影响。

### 参 考 文 献

- [1] 蔡琰等. 1985, 实验生物学报, 18: 454—461.
- [2] Eccles, J. C. 1990, *J. Neurosci.*, 10: 3769—3781.
- [3] Landgraf, R. et al., 1991, *Brain Res.*, 544: 287—291.
- [4] Shipley, M. T. et al., 1987, *J. Neurosci.*, 7: 2025—2030.
- [5] Yoshino, M. et al., 1990, *J. Med. Chem.*, 33: 206—212.
- [6] Sato, M. et al., 1990, *Develop. Brain Res.*, 54: 249—253.
- [7] Row, L. M and R. Pfaff., 1988, *Ann. Rev. Pharmac. Toxicol.*, 28: 163—188.
- [8] Dumont, M. et al., 1990, *Neuropeptides*, 18: 43—48.
- [9] Obika, L. F. O and J. F. Laycock., 1989, *Clin. Sci.*, 76: 667—671.
- [10] Guenot, D. S. et al., 1990, *Develop. Brain Res.*, 54: 249—253.
- [11] Brown, D. R. et al., 1991, *Regul. Peptides*, 29: 31—47.
- [12] Pincus, D. W., et al., 1990, *Brain Res.*, 514: 355—357.
- [13] Kamisaki, Y., et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 7236—7241.
- [14] Lincoln, T. M. et al., 1989, *Pharmac. Ther.*, 41: 479—512.
- [15] Nawy, S and C. E. Jahr., 1990, *Nature*, 346: 269—271.
- [16] Goy, M. F., 1989, *Trans Neurosci.*, 14: 293—299.
- [17] Bentley, J. K. et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 14859—14862.
- [18] Schultz, S. et al., 1989, *FASEB J.*, 3: 2026—2030.

**简讯** 上海振生科技实业公司成立于1992年12月。中国科学院上海植物生理研究所是公司的上级主管单位。

公司全民所有制,独立核算,自主经营,自负盈亏,技工贸一体高新技术企业。

公司现有职工50余人,专业人员占70%以上。王国强任董事长,胡开先任总经理(法人代表),史文宣任副总经理。公司下设技术开发部、经营部、技术工程部、技术合作部、仪器维修部。

公司的经营范围是微生物、植物、生物工程、仪器专业领域内的技术咨询、开发、转让、服务、培训、承包、中介、入股及新产品的研制、试销。公司经营部有仪器仪表、文教用品的批发业务,兼营日用百货、食品、烟酒等零售。

公司开发的产品和技术主要是:大豆蛋白粉的应用及生产工艺;纤维素酶、核黄素、谷氨酸等发酵工艺;基因工程技术的推广应用;疗效化妆品、营养口服液、保健食品的开发等。

公司本部:上海市枫林路300号;邮政编码200032,电话4372090,传真4332385,电报挂号3234。