论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0936-03

外源性高胰岛素血症对血管内皮细胞 sICAM-1 表达的影响

刘兆川,王旭开,杨 立,杨成明 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042)

提 要:目的 通过观察高胰岛素血症对血管内皮细胞可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)表达的影响,探讨其在动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)形成和发展中的作用。**方法** 新西兰白兔40只,随机分为4组:正常对照组、高胰岛素血症组、高糖高胆固醇组、联合组。每日皮下注射胰岛素,建立外源性高胰岛素血症。通过放射免疫法测血清胰岛素水平,酶联免疫吸附实验(ELISA法)测定血清 sICAM-1 水平,免疫组化法测血管内皮细胞 sICAM-1 的表达。**结果** 与对照组相比,高胰岛素血症组、高糖高胆固醇组、联合组3组血清 sICAM-1 水平均明显升高($P<0.05$),联合组显著高于高胰岛素血症组和高糖高胆固醇组;高胰岛素血症组和高糖高胆固醇组 sICAM-1 表达水平相似,但低于联合组。**结论** 胰岛素可增强血管内皮细胞 sICAM-1 表达,且与高糖高胆固醇饮食有协同增强作用。

关键词:高胰岛素血症;黏附分子;可溶性细胞间黏附分子-1;动脉粥样硬化

中图法分类号:R322.12;R446.11;R587 **文献标识码**:A

Effect of exogenous hyperinsulinism on soluble ICAM-1 expression of rabbit vascular endothelial cells

LIU Zhao-chuan, WANG Xu-kai, YANG Li, YANG Cheng-ming (Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40042, China)

Abstract: Objective To explore soluble ICAM-1 (sICAM-1) expression in the vascular endothelial cells and investigate the role of hyperinsulinism in the formation and the progress of artherosclerosis. **Methods** Forty New Zealand albino rabbits were randomly divided into four group ($n=10$ each group): control group in which the rabbits were fed with special forage for rabbits and everyday were subcutaneously injected of physiological saline for 8 weeks, hyperinsulinism group in which the rabbits were of special forage and subcutaneous injection of 6 U/kg insuline, high glucose and cholesterol (HGC) group in which the rabbits were of HGC forage and subcutaneous injection of saline, hyperinsulinism + HGC group in which rabbits were of HGC forage and subcutanous injection of hyperinsulinism. The serum level of sICAM-1 was measured by ELISA before the experiment, 2, 4, 6, 8 weeks after the experiment beginning. The expression of sICAM-1 in the vascular endotheial cells was observed by histochemical method in 8 weeks. **Results** As compared with control group, the serum level of sICAM-1 in hyperinsulinism group, HGC group, hyperinsulinism + HGC group increased significantly with the highest level in hyperinsulinism + HGC group. The expression of sICAM-1 in the vascular endotheial cells was higher in the three groups than control group, and the highest expression were observed in hyperinsulinism + HGC group. **Conclusion** Insuline may augment the expression of sICAM-1 in the vascular endotheial cells, promote the progress of artherosclerosis.

Key words: hyperinsulinism; adhesion molecule; soluble ICAM-1; artherosclerosis

高胰岛素血症(hyperinsulinemia,HIS)存在于糖尿病、肥胖、高血压、高脂血症及冠心病患者。流行病学及临床资料显示,HIS 与动脉粥样硬化的发生率存在正相关,其机制与 HIS 直接致体内脂质代谢紊乱、平滑肌细胞增生、纤溶活性降低及参与高血压形成和发展等有关[1,2]。本实验通过复制外源性高胰岛素血症动物模型,观察高胰岛素血症对血清 sICAM-1 水平和血管内皮细胞 sICAM-1 表达的影响,初步探讨其在动脉粥样硬化发生发展中的可能作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170384)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170384)

作者简介:刘兆川(1978-),男,河北省保定市人,硕士研究生,主要从事心血管疾病方面的研究。电话:(023)68757266, E-mail: zhaochuan-26@163.com

通讯作者:王旭开,电话:(023)68757266, E-mail:wangxuk@163.com

收稿日期:2006-01-20;**修回日期**:2006-02-27

1　材料与方法

1.1　实验动物和分组

纯种新西兰白兔 40 只（第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供），体质量 2～2.5 kg，随机分为 4 组，每组 10 只：正常对照组、高胰岛素血症组、高糖高胆固醇组、联合组。正常对照组和高胰岛素血症组喂饲兔专用常规饲料，由第三军医大学实验动物中心配制。高糖高胆固醇和联合组喂饲高糖高胆固醇饲料（80% 兔专用常规饲料 +3% 胆固醇粉 +10% 猪油 +7% 蔗糖）。实验期间，动物自由饮水、进食。喂饲 8 周后，处死取材。

1.2　外源性高胰岛素血症动物模型的建立

高胰岛素血症组和联合组，每日皮下注射胰岛素，6 U/kg；正常对照组和高糖高胆固醇组，每日皮下注射等容量生理盐水。

1.3　血清胰岛素和血清 sICAM-1 水平的测定

在实验前、实验第 2、4、6、8 周，分次从兔耳缘静脉取血，用放射免疫法测血清胰岛素水平；酶联免疫吸附实验（ELISA 法）测定血清 sICAM-1 水平，具体操作参照试剂盒说明书。试剂由上海森雄实业有限公司提供。

1.4　血管内皮细胞 sICAM-1 表达水平的测定

取新鲜主动脉血管立即进行石蜡切片，常规脱蜡，水化。用 3% 过氧化氢孵育 5～10 min，消除内源性过氧化物酶的活性。PBS 洗，5 min × 2。微波修复，中火 5 min，低火 15 min。10% 正常山羊血清封闭 10 min，吸去血清，滴加 sICAM-1 一抗（每次均设阴性对照），4 ℃过夜，PBS 冲片 3 次，滴加 1% BSA-PBS 1∶300 稀释的二抗，37 ℃孵育 30 min，PBS 冲洗 3 次，37 ℃ DAB 显色 15～30 min，自来水冲洗，苏木精复染，中性树胶封片，置显微镜下观察，阳性时在标记处可见棕色颗粒沉积。试剂由武汉博士德公司提供。

1.5　其他指标测定

酶法测定血清总胆固醇（TC）和甘油三酯（TG）；免疫比浊法测定高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）；以上测定均在 Beckman-LX20 全自动生化分析仪上进行，按照试剂盒所附说明书操作。同时根据公式计算动脉粥样硬化指数 AI = (TC- HDL)/HDL。

1.6　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行多组间单因素方差分析。多组间两两比较，方差齐用 Tukey 法检验，若方差不齐用 Tamhane's T2 检验。

2　结果

2.1　血清胰岛素水平

实验前，各组之间的血清胰岛素水平无显著差异；2、4、6 和 8 周时，与对照组相比，其余 3 组血清胰岛素水平均显著升高，且差异显著（$P<0.05$），见表 1。表明通过每日皮下注射胰岛素可以很好地建立外源性高胰岛素血症动物模型。

2.2　第 8 周时各组之间动脉粥样硬化指数变化

根据第 8 周时各组之间的总胆固醇及高密度脂蛋白水平计算出动脉粥样硬化指数。由表显示出高胰岛素血症组（4.26 ±0.47）、高糖高胆固醇组（5.87 ±0.68）、联合组（7.41 ±0.84）均与正常对照组（0.34 ±0.01）有明显差异（$P<0.05$），并且 3 组动脉粥样硬化指数说明新西兰白兔体内存在高度动脉粥样硬化风险。

表 1　各组血清胰岛素水平随时间的变化［$n=10$，μmol/L，($\bar{x} \pm s$)］

组别	时间（周）				
	0	2	4	6	8
正常对照组	6.51 ±0.32	6.74 ±0.50	6.66 ±0.62	7.25 ±0.71	7.02 ±0.58
高胰岛素血症组	6.82 ±0.46[a]	12.34 ±1.32[a]	15.37 ±1.81[a]	18.45 ±1.03[a]	19.31 ±0.89[a]
高糖高胆固醇组	6.76 ±0.53[a]	8.79 ±0.57[a]	10.39 ±0.86[a]	11.58 ±0.96[a]	14.89 ±1.46[a]
联合组	6.68 ±0.61[ab]	17.24 ±1.26[ab]	18.93 ±1.54[ab]	21.59 ±1.68[ab]	25.44 ±2.13[ab]

a：$P<0.05$，与对照组比；b：$P<0.05$，与高胰岛素血症组、高糖高胆固醇组比

2.3　血清 sICAM-1 水平

随着时间延长，高胰岛素血症组、高糖高胆固醇组、联合组 3 组血清 sICAM-1 水平均明显升高，在 2、4、6 周和 8 周时，与对照组相比，3 组血清 sICAM-1 水平均显著升高，且差异显著（$P<0.01$）；高胰岛素血症组和高糖高胆固醇组与联合组相比，联合组血清 sICAM-1 水平升高显著（$P<0.05$）；而高胰岛素血症组和高糖高胆固醇组相比，差异不显著（$P>0.05$），见表 2。

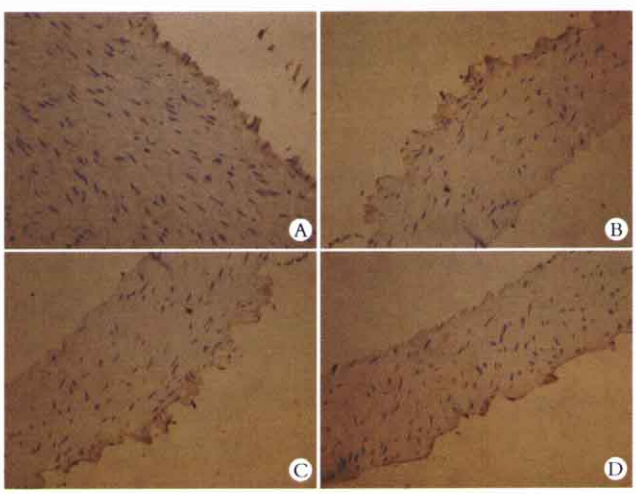
表 2　各组血清 sICAM-1 水平随时间的变化［$n=10$，mg/ml，($\bar{x} \pm s$)］

组别	时间（周）				
	0	2	4	6	8
正常对照组	25.32 ±6.74	24.65 ±5.21	30.12 ±6.53	28.45 ±7.12	33.4 ±8.42
高胰岛素血症组	26.82 ±7.56	50.67 ±12.21[a]	86.47 ±11.36[a]	165.38 ±13.28[a]	185.37 ±15.25[a]
高糖高胆固醇组	23.78 ±5.53	45.74 ±9.87	91.49 ±10.15	143.26 ±14.24	196.02 ±18.57
联合组	28.68 ±6.81	81.28 ±11.03[ab]	120.46 ±13.57[ab]	197.36 ±16.64[ab]	227.35 ±22.45[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比；b：$P<0.05$，与高胰岛素血症组、高糖高胆固醇组比

2.4　血管内皮 ICAM-1 表达情况

ICAM-1 免疫组化在对照组新西兰白兔胸主动脉极微弱表达（图 1A），相反高胰岛素组和高糖高胆固醇组 ICAM-1 表达明显增强同时两组之间相似（图 1B，C），而联合组呈强阳性表达（图 1D）。



A：正常组；B：高胰岛素血症组；C：高胆固醇高糖组；D：联合组

图 1　ICAM-1 在兔胸主动脉免疫组化的表达　(S-P ×400)

3 讨论

动脉粥样硬化是一慢性炎性疾病并伴随着内皮细胞黏附分子的表达[3]。可溶形式内皮细胞黏附分子水平发现与各种心血管风险因素相关，如吸烟，高血压，低高密度脂蛋白，高胆固醇血症和高甘油三酯血症。可溶性细胞间黏附分子-1（sICAM-1）是细胞粘附家族的重要成员之一，属免疫球蛋白超家族，是一种分子质量为 $80\times10^3\sim110\times10^3$ 的跨膜糖蛋白，其主要功能是介导白细胞与血管内皮细胞之间的粘附，在炎症反应中发挥着重要的作用[4]。sICAM-1 促使单核细胞与内皮细胞粘附，使大量单核细胞浸润到内皮细胞间隙，促进动脉粥样硬化形成。sICAM-1 水平增高，还可使白细胞粘附到血管内皮细胞及诱导微血管收缩，形成小栓子，阻塞微循环，引起组织缺血和损伤。同时，粘附于血管内皮细胞的白细胞相互激活，产生并释放氧自由基、血管活性物质，引起血管内皮细胞损伤，血管破坏，直接破坏组织细胞，导致组织损伤，而引起血管病变[5-7]。很多研究都把 sICAM-1 作为未来冠心病事件的有意义的预测因子[8]。

近年对 HIS 研究的重要发现是其与 AS、冠心病、高血压、肥胖及糖尿病关系密切。最新研究表明 HIS 是冠心病的一种独立危险因素。胰岛素可通过机体脂质代谢紊乱、纤溶活性降低、平滑肌细胞增生、血压升高等促进或加 AS[2]，但其是否通过影响 EC 的 sICAM-1 表达，在国内外尚少报道。

本实验通过成功建立外源性高胰岛素血症动物模型，观察了高胰岛素血症对 sICAM-1 的影响。通过动脉粥样硬化指数观察间接反映出高胰岛素、高糖、高脂对粥样硬化形成及发展的进程。在实验中，与正常对照组相比，高胰岛素血症组、高糖高胆固醇组和联合组血清 sICAM-1 水平都显著升高；高胰岛素血症组和高糖高胆固醇组相比，血清 sICAM-1 升高差异不显著，表明胰岛素对血清 sICAM-1 水平升高作用与高糖高胆固醇饮食相似；而联合组血清 sICAM-1 升高明显高于高胰岛素血症组和高糖高胆固醇组，表明胰岛素和高糖高胆固醇对血清 sICAM-1 水平升高有协同增强作用。免疫组化的结果也表明高胰岛素血症组内皮细胞 sICAM-1 呈阳性表达，与高糖高胆固醇组相似，而弱于联合组。这表明高胰岛素血症可显著地影响 sICAM-1 的表达。本实验建立的外源性高胰岛素血症动物模型与传统的高糖高胆固醇饮食动物模型相比，对 sICAM-1 表达影响相似，而二者联合有协同增强作用。胰岛素可直接损伤血管内皮细胞，影响其功能，并导致脂质代谢和糖代谢水平紊乱，可能在增强 sICAM-1 表达，促进动脉粥样硬化形成和发展中有重要作用，其详细机制尚有待于进一步研究。

参考文献：

[1] CARNETHON M R, FORTMANN S P, PALANIAPPAN L, *et al*. Risk factors for progression to incident hyperinsulinemia: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987－1998[J]. Am J Epidemiol, 2003, 158(11): 1058－1067.

[2] BALTALI M, KORKMAZ M E, KIZILTAN H T, *et al*. Association between postprandial hyperinsulinemia and coronary artery disease among non-diabetic women: a case control study[J]. Int J Cardiol, 2003, 88(2－3): 215－221.

[3] STANGL V, LORENZ M, LUDWIG A, *et al*. The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets[J]. J Nutr, 2005, 135(2): 172－178.

[4] LIBEREK T, CHMIELEWSKI M, LICHODZIEJEWSKA-NIEMIERKO M, *et al*. Transmigration of blood leukocytes into the peritoneal cavity is related to the upregulation of ICAM-1 (CD54) and Mac-1 (CD11b/CD18) adhesion molecules[J]. Perit Dial Int, 2004, 24(2): 139－146.

[5] OKOUCHI M, OKAYAMA N, OMI H, *et al*. Cerivastatin ameliorates high insulin-enhanced neutrophil-endothelial cell adhesion and endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibiting mitogen-activated protein kinase activation[J]. J Diabetes Complications, 2003, 17(6): 380－386.

[6] NOUTSIAS M, HOHMANN C, PAUSCHINGER M, *et al*. sICAM-1 correlates with myocardial ICAM-1 expression in dilated cardiomyopathy[J]. Int J Cardiol, 2003, 91(2－3): 153－161.

[7] WANG Y, WANG L, AI X, *et al*. Nicotine could augment adhesion molecule expression in human endothelial cells through macrophages secreting TNF-alpha, IL-1beta[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(13): 1675－1686.

[8] KOWALSKA I, STRACZKOWSKI M, SZELACHOWSKA M, *et al*. Circulating E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in men with coronary artery disease assessed by angiography and disturbances of carbohydrate metabolism [J]. Metabolism, 2002, 51(6): 733－736.

（编辑 栾 嘉）