论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2416-03

胰岛素对大鼠血管平滑肌细胞增殖及胶原蛋白合成的影响

王旭升[1],王 燕[2],杨成明[1],付春江[1],张 晔[1],何作云[3] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042,[2]基础医学部医学遗传学教研室,重庆 400038,[3]新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 观察胰岛素对分离培养的大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖及胶原蛋白合成的影响。**方法** 采用大鼠的腹主动脉血管平滑肌细胞分离培养,应用^{3}H-TdR和^{3}H-脯氨酸掺入方法检测胰岛素对大鼠VSMCs干预后,VSMCs内DNA合成以及胶原蛋白合成。**结果** 胰岛素可促进处于静止状态的大鼠VSMCs DNA及胶原蛋白的合成,并呈现明显的浓度依赖关系,在40 nmol/L的浓度时DNA及胶原蛋白的合成达到高峰,DNA及胶原蛋白分别处于36 h和48 h时合成最为显著。**结论** 胰岛素可明显促进培养的VSMCs增殖及胶原蛋白的合成。

关键词: 胰岛素;血管平滑肌细胞;胶原蛋白合成

中图法分类号: R322.12;R329.2;R977.15 **文献标识码:** A

Effect of insulin on proliferation and collagen protein synthesis of rat vascular smooth muscle cells

WANG Xu-kai[1], WANG Yan[2], YANG Cheng-ming[1], FU Chun-jiang[1], ZHANG Ye[1], HE Zuo-yu[3] ([1]Department of Cardiovasology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [2]Department of Moleculer Genetics, College of Medicine, Chongqing 400038, [3]Department of Cardiovascular Disenses, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To understand the role of insulin in the cytobiology of blood vessels. Methods The vascular smooth muscle cells (VSMCs) from SD rat were cultured and respectively treated with 1, 10, 20, 30, 40 nmol/L insulin for 24 h or 30 nmol/L insulin for 12, 24, 36, 48 h, or with DMEM solution containing 10% FBS as blank control. DNA synthesis and collagen protein synthesis of rat VSMCs were detected by ^{3}H-TdR incorporation and ^{3}H-proline incorporation. Results Insulin could significantly promote DNA synthesis and collagen protein synthesis of quiescent rat VSMCs in a dose-dependent manner. DNA synthesis and collagen protein synthesis reached the peak when insulin concentration was 40 nmol/L, and showed significant difference at 36 h and 48 h with that of the blank control. Conclusion Insulin could promote proliferation and collagen protein synthesis of cultured rat VSMCs.

Key words: insulin; vascular smooth muscle cell; collagen protein synthesis

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是构成血管壁的主要细胞成分之一。在血管的动脉粥样硬化病变中,增生的VSMCs是粥样斑块中的主要成分。细胞外基质中的胶原除了是粥样硬化斑块中的重要组成成分外,还影响着VSMCs的增殖及分化[1],因此在动脉粥样硬化形成和发展过程中也起着重要的作用。胰岛素可刺激VSMCs分裂、增殖,与动脉粥样硬化的发生、发展有密切的关系。本实验观察胰岛素对大鼠VSMCs增殖及胶原蛋白合成的影响,以了解胰岛素在血管细胞生物学上的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

1.1.1 试剂 胎牛血清和DMEM购自Gibco公司;羊抗小鼠抗体购自中山公司;胰岛素,抗Ⅲ型胶原单克隆抗体购自Sigma公司;^{3}H-脯氨酸,^{3}H-TdR购自中国医学科学院原子能研究所;免疫组化试剂盒购自北京中山公司。

1.1.2 材料 选用体质量120~140 g 4周龄SD大鼠6只,雌雄各半,购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 VSMCs的培养 SD大鼠的腹主动脉VSMCs采用贴

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170384,30570564)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170384, 30570564)

作者简介:王旭升(1960-),男,山东省蓬莱市人,博士,主任医师,教授,主要从事血管增殖性疾病防治方面的研究,发表论文28篇。电话:(023)68757266,E-mail: wangxuk@163.com

通讯作者:王 燕,电话:(023)68753670

收稿日期:2005-10-21;修回日期:2006-04-05

块法，见参考文献[2]。实验采用 3～8 代。

1.2.2　细胞接种　　用将 VSMCs 调整细胞数为 2.5×10^4/ml，接种于 24 孔培养板，每孔加入细胞悬液 500 μl，放入 CO_2 培养箱中孵育 24 h，镜下观察细胞基本全部贴壁生长。

1.2.3　^{3}H-TdR 和 ^{3}H-脯氨酸掺入法检测细胞 DNA 合成及胶原蛋白合成　　将贴壁生长的 VSMCs 弃去原培养液，用 DMEM 培养液洗涤细胞 3 次，然后换用含 1% FBS DMEM 培养液继续培养细胞 24 h，使 VSMCs 同步于静止期；弃去原培养液，换入含 10% FBS DMEM 培养液继续培养 24 h。浓度效应组加入 10% FBS DMEM 培养液，同时加入不同浓度的胰岛素，使其终浓度分别为 1、10、20、30、40 nmol/L，培养 24 h。时间效应组加入含有 30 nmol/L 胰岛素的 10% FBS DMEM 培养液，分别培养 12、24、36、48 h。以 10% FBS DMEM 培养液作为空白对照组。每个浓度和每一时间点作 3 个复孔。于培养结束前 8 h 分别加入 1.85×10^4 Bq/孔的 ^{3}H-TdR 和 ^{3}H-脯氨酸，继续孵育细胞 8 h。培养结束后用多头细胞收集仪将细胞收集于玻璃纤维纸上，100 ml/L三氯醋酸、无水乙醇、乙醚洗涤，干燥后置于含有 5 ml 闪烁液的液闪瓶中，在 LS 6500 型闪烁计数仪上进行放射强度测定，结果用 Bq 表示。

1.2.4　免疫组化染色　　将贴壁生长的 VSMCs 弃去原培养液，用 DMEM 培养液洗涤细胞 3 次，然后换用含 1% FBS DMEM 培养液继续培养细胞 24 h，使 VSMCs 同步于静止期，弃去原培养液，换入含 10% FBS DMEM 培养液继续培养 24 h。同时加入 30 nmol/L 的胰岛素，使其终浓度分别培养 24、36、48 h。采用 SABC 法，用Ⅲ型胶原单克隆抗体（1∶200）作免疫组化染色，DAB 显色。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　胰岛素对 SD 大鼠 VSMCs 增殖的影响

结果显示，与对照组相比，1 nmol/L 胰岛素对 VSMCs 合成 DNA 无明显的促进作用（$P>0.05$）。随着胰岛素浓度的增加，VSMCs 合成 DNA 的数量也逐渐增加，在 1～40 nmol/L 的浓度范围内胰岛素对 VSMCs 的 DNA 合成呈现明显的浓度依赖关系，在 40 nmol/L 时 DNA 合成达到高峰（$P<0.05$，$P<0.01$）（表 1）。对照组 12 h 时 VSMCs 的 ^{3}H-TdR 掺入值处于相对较低的水平。24 h 以后 DNA 合成量增多，但 24、36、48 h 其 ^{3}H-TdR 掺入值无明显差别（$P>0.05$）。30 nmol/L 作用于 VSMCs 12 h 时无明显促进细胞 DNA 合成的作用（$P>0.05$）。随着胰岛素作用时间的延长，细胞 DNA 的合成逐渐增多，36 h 时达到高峰（表 2）。

表 1　不同浓度的胰岛素对 VSMCs DNA 及胶原蛋白合成的影响（Bq，$\bar{x}\pm s$）

组别		^{3}H-TdR 掺入	^{3}H-脯氨酸掺入
对照组		21.4±1.5	7.7±1.3
胰岛素	1 nmol/L	32.1±1.4	18.0±1.6
	10 nmol/L	62.2±1.9[b]	24.0±1.7[a]
	20 nmol/L	69.1±1.3[b]	38.9±1.5[b]
	30 nmol/L	87.5±1.4[b]	46.2±1.7[b]
	40 nmol/L	97.6±1.3[b]	50.9±1.3[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.2　胰岛素对 VSMCs 胶原蛋白合成的影响

不同浓度的胰岛素对 VSMCs 胶原蛋白合成时 ^{3}H-脯氨酸掺入值的变化与 DNA 合成时的变化相似。随着胰岛素浓度增加，VSMCs 的 ^{3}H-脯氨酸的掺入值也逐渐增加，且呈现出一种浓度效应关系。VSMCs 的胶原蛋白合成在 40 nmol/L 时达到高峰（表 1）。观察 30 nmol/L 的胰岛素对 VSMCs 作用不同时间点胶原蛋白合成时 ^{3}H-脯氨酸掺入值的变化，结果显示，对照组随着时间的延长，VSMCs ^{3}H-脯氨酸的掺入值有增多的趋势。24、36、48 h 时其胶原蛋白合成的数量变化不大（$P>0.05$）。30 nmol/L的胰岛素可明显促进 VSMCs 胶原蛋白的合成，36 h 时 VSMCs 合成胶原蛋白达到高峰（$P<0.01$），提示胰岛素在促进 VSMCs 细胞增殖的同时也促进其胶原蛋白的合成（表 2）。

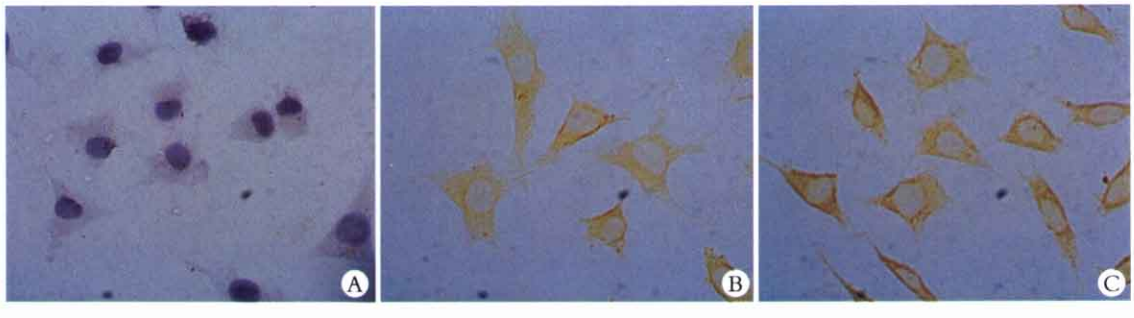
表 2　胰岛素作用时间对 VSMCs DNA 及胶原蛋白合成的影响（Bq，$\bar{x}\pm s$）

时间（t/h）	^{3}H-TdR 掺入		^{3}H-脯氨酸掺入	
	对照组	胰岛素	对照组	胰岛素
12	20.6±1.3	26.7±1.6	12.6±1.3	16.2±1.2
24	41.0±1.1	38.0±1.3[a]	13.2±1.1	38.2±1.4[a]
36	28.7±1.3	22.0±1.2[a]	12.1±1.3	49.1±1.2[a]
48	21.8±1.6	20.1±1.5[a]	13.9±1.4	38.4±1.6

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.3　胰岛素作用于 SD 大鼠 VSMCs 的Ⅲ型胶原免疫组化结果

染色 3 个时间点均可见Ⅲ型胶原的阳性反应，24 h 组阳性率很低，36 h 组和 48 h 组阳性率均达 100 %（图 1）。



A：作用 VSMCs 24 h；B：作用 VSMCs 36 h；C：作用 VSMCs 48 h

图 1　30 nmol/L 胰岛素作用于 SD 大鼠 VSMCs 的Ⅲ型胶原免疫组化结果　（SABC×200）

3 讨论

VSMCs 是血管壁重要组成细胞，细胞外基质在维持血管的正常结构、新陈代谢和生物学功能等方面也发挥非常重要的作用。在动脉粥样硬化的形成和发展过程中，细胞的增殖与分化以及细胞外基质合成的增加在其发展过程中起着重要的作用[3-5]。胰岛素是一种极强的促细胞生长因子，在细胞的增殖、转化、及动脉粥样硬化的形成中均起重要的作用。本实验采用细胞培养的方法，排除在体内情况下神经、体液及代谢等方面的影响，以^{3}H-TdR 和^{3}H-脯氨酸掺入标记的VSMCs，观察胰岛素对 VSMCs 细胞增殖以及胶原蛋白合成的影响。为了较精确的观察 VSMCs 细胞增殖以及胶原蛋白合成的情况，实验在加入胰岛素前，用无血清 DMEM 培养细胞 24 h，使细胞生长周期同步于 $G_0 \sim G_1$期。实验结果显示，胰岛素可明显促进 VSMCs 的 DNA 合成，且在 1 ~40 nmol/L 的浓度范围内存在着浓度依赖效应。胰岛素促进 VSMCs DNA 的合成还存在着时间效应。在胰岛素的作用初期，细胞 DNA 合成就开始增加。随着作用时间的延长，细胞 DNA 的合成增多，36 h 达到高峰。胰岛素可明显促进 DNA 的合成，可能通过诱导早期基因如 *c-myc*，*c-fos* 和 *c-jun* 等癌基因的表达，其激活的受体的酪氨酸磷酸化等作用促进细胞的有丝分裂[6,7]，胰岛素还可使处于 $G_0 \sim G_1$期的细胞具有复制 DNA 的潜能，即成为“感受态”细胞，进而在某些其他因子如生长介素 C 的作用下，使 $G_0 \sim G_1$期细胞进入 S 期而发生有丝分裂[8]。胰岛素除了促进某些细胞 DNA 合成外，同时还促进一些细胞的蛋白质和胶原的合成。胰岛素可特异性地刺激成纤维细胞合成 V 型胶原，并调节Ⅲ型胶原的合成，同时胰岛素可促进血栓黏合素的分泌[9]，而血栓黏合素被认为在细胞分裂和细胞外基质相互作用中是十分重要的。细胞外基质对维持组织、细胞的结构和正常功能有着十分重要的作用。本实验结果显示，胰岛素可明显促进 VSMCs DNA 及胶原的合成，也呈现出一种浓度效应关系。胰岛素在促进 VSMCs DNA 及胶原合成的时间上有所不同，DNA 合成在 36 h 时达到高峰，胶原蛋白合成在48 h时达到高峰，胶原蛋白合成落后于 DNA 的合成。在动脉粥样硬化斑块形成中除了细胞的增殖和迁移以及脂质沉积外，还有结缔组织大分子，包括胶原的大量形成。胰岛素可促进 VSMCs 的增殖及胶原的合成，对于动脉粥样硬化的形成有一定的意义。

参考文献：

[1] KATSUDA S, OKADA Y, MINAMOTO T, *et al*. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies[J]. Arterioscler Thromb, 1992, 12(4): 494 - 502.

[2] 王旭升，王 梅，刘光耀，等. 胰岛素对蛋白激酶 C 亚型在人动脉平滑肌细胞中分布和含量的影响[J]. 第三军医大学学报，1998，20(2)：118 - 120.

[3] MOON S K, CHO G O, JUNG S Y, *et al*. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(4): 1069 - 1078.

[4] MOON S K, KIM H M, KIM C H. PTEN induces G1 cell cycle arrest and inhibits MMP-9 expression *via* the regulation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 421(2): 267 - 276.

[5] STAWOWY P, KALLISCH H, KILIMNIK A, *et al*. Proprotein convertases regulate insulin-like growth factor 1-induced membrane-type 1 matrix metalloproteinase in VSMCs *via* endoproteolytic activation of the insulin-like growth factor-1 receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(3): 531 - 538.

[6] FUKUDA N, SATOH C, HU W Y, *et al*. Endogenous angiotensin II suppresses insulin signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. J Hypertens, 2001, 19(9): 1651 - 1658.

[7] 王旭升，王 燕，何作云，等. MAPK 对胰岛素介导的人血管平滑肌细胞 PKCα 的影响[J]. 中国应用生理学杂志，1999，15(4)：346 - 349.

[8] YAMADA H, TSUSHIMA T, MURAKAMI H, *et al*. Potentiation of mitogenic activity of platelet-derived growth factor by physiological concentrations of insulin *via* the MAP kinase cascade in rat A10 vascular smooth muscle cells[J]. Int J Exp Diabetes Res, 2002, 3(2): 131 - 144.

[9] RUEF J, RAO G N, LI F, *et al*. Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal[J]. Circulation, 1998, 97(11): 1071 - 1078.

（编辑 栾 嘉）