DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.024
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1673-04

论著

胰岛素对VEC增殖过程中FKBP12基因表达的影响

王耀辉,杨成明,王旭开,刘光耀,石伟彬,张 晔 (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 通过不同浓度胰岛素对血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)增殖过程中胰岛素受体(insulin receptor, InsR)和FK506结合蛋白12(FK506 binding protein 12, FKBP12)及其基因表达等的影响,初步探讨VEC的胰岛素抵抗。方法 在内皮细胞生长因子(endothelial cell growth factor, ECGF)作用下,培养大鼠VEC并传代。检测VEC在增殖过程中不同浓度胰岛素对VEC的InsR和FKBP12及其基因表达、生长曲线和细胞上清液一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)含量等的影响。结果 与对照组相比,1 U/ml胰岛素组VEC的InsR和FKBP12 mRNA表达降低;生长曲线向右下偏移且对数生长期延迟;细胞上清液NO含量下降。结论 VEC是胰岛素敏感细胞;当培养液中胰岛素浓度为1 U/ml时,经16 h的培养后,可使VEC对生理浓度胰岛素的反应性降低,该胰岛素抵抗状态至少维持24 h。FKBP12可能是与VEC胰岛素抵抗相关的重要信息分子。

关键词:血管内皮细胞;胰岛素;胰岛素受体;胰岛素抵抗
中图法分类号:R322.12;R977.15 文献标识码:A

Effects of different concentrations of insulin on the expression of insulin receptor and its mRNA levels in vascular endothelial cell proliferation

WANG Yao-hui, YANG Cheng-ming, WANG Xu-kai, LIU Guang-yao, SHI Wei-bin, ZHANG Ye (Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the insulin resistance in vascular endothelial cells (VECs) by observing the effects of different concentrations of insulin on the expression of insulin receptor (InsR) and FK506 binding protein 12 (FKBP12) and their mRNA expression in VEC proliferation. Methods Rat VECs were cultured with enzyme digestion method and were identified by using immuocytochemical methods with factor Ⅷ antibody. The expressions of InsR mRNA and FKBP12 mRNA were detected by semi-quantitative RT-PCR. The effects of different concentrations of insulin on the expression of InsR, the growth rate of VEC, and the content of nitrogen monoxide (NO) in culture medium were also detected. Results Compared with those in the control group, the expressions of InsRmRNA and FKBP12 mRNA decreased and VEC proliferation and NO production in culture medium were inhibited in 1 U/ml insulin group. Conclusion VECs exposed to 1 U/ml insulin for 16 h may be able to induce a state of insulin resistance which could be maintained for at least 24 h. FKBP12 may play a critical role in insulin resistance of VECs.

Key words: vascular endothelial cell; insulin; insulin receptor; insulin resistance

内皮机能障碍在高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等发病过程中起重要作用,与胰岛素抵抗密切相关[1,2]。在胰岛素抵抗的分子机制中具有共性的是影响胰岛素信号转导级联/网络的功能,最终影响细胞的物质代谢和内分泌活动。本实验通过检测不同浓度胰岛素对血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)胰岛素受体(insulin receptor, InsR)和FK506结合蛋白12(FK506 binding protein 12, FKBP12)及其基因表达、细胞增殖过程、细胞上清液一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)含量等的影响,初步探讨VEC的胰岛素抵抗。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胰蛋白酶,DMEM培养基和胎牛血清(购于Hyclone公司),ECGF(购于Boehringer Mannheim),Ⅷ因子相关抗原抗体、兔抗鼠胰岛素受体抗体、免疫组化试剂盒和DAB显色试剂盒(购于博

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371363)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371363)
作者简介:王耀辉(1970-),男,河南省平顶山市人,硕士研究生,主治医师,主要从事心血管疾病方面的研究。电话:(023)68757266
通信作者:杨成明,电话:(023)68757266;E-mail:yangchmi@cta.cq.cn
收稿日期:2004-02-24;修回日期:2004-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

士德公司), Tripure 分离试剂(购于 Roche 公司), RT-PCR 试剂盒(购于 Takara 公司), 引物由上海生工生物工程公司合成, NO 试剂盒(购于深圳晶美公司)。

1.2 VEC 的原代培养和鉴定

大鼠 VEC 的原代培养和鉴定, 见文献[3]。

1.3 InsR 的检测

将消化后的 VEC 以 2×10^4 细胞/ml 接种于放置有盖玻片的 6 孔板内, 待细胞贴壁 1 d 后, 将 6 孔板各孔培养液吸出, 并更换内含不同浓度胰岛素(0.01、0.1、1 U/ml, 3 ml/孔)的培养液作为实验组, 以更换不含胰岛素培养液组为对照组, 3 ml/孔; 培养 16 h 后冷丙酮固定。采用 S-P 法进行常规免疫组化染色。

1.4 InsR mRNA 的检测

将消化后的 VEC 以 2×10^4 细胞/ml 接种于 6 孔板内, 待细胞贴壁 1 d 后, 将各孔培养液吸出, 更换含不同浓度胰岛素(0.01、0.1、1 U/ml, 3 ml/孔)的培养液作为实验组, 以更换不含胰岛素培养液组为对照组, 培养 16 h。总 RNA 提取: 采用 Tripure 试剂一步法提取培养 VEC 总 RNA, 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外分光光度计观察 RNA 的完整性并定量。InsR 引物上游: 5′-CTCTGTCCGCATCGAGAA-3′, 下游: 5′-CCACACACTGACCATCCA-3′, 产物 379 bp; 以β-actin 作为内对照, 其引物上游: 5′-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3′, 下游: 5′-GCATTTGCGGTGGACGAT-3′, 产物 564 bp。先将 RNA 逆转录为 cDNA, 再进行 PCR 扩增。扩增条件为 94 ℃ 5 min, 1 循环; 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 74 ℃ 1 min, 进行 30 个循环; 再 72 ℃延伸 10 min。取 6 μl PCR 扩增产物, 琼脂糖凝胶电泳后, 与内对照β-actin 比较, 进行半定量分析。以目的片段与β-actin 的光密度比值作为以目的片段 mRNA 的相对含量。

1.5 FKBP12 mRNA 的检测

将消化后的 VEC 以 2×10^4 细胞/ml 接种于 6 孔板内, 待细胞贴壁 1 d 后, 将各孔培养液吸出, 更换含不同浓度胰岛素(0.01、0.1、1 U/ml, 3 ml/孔)的培养液作为实验组。总 RNA 提取: 采用 Tripure 试剂一步法提取培养 VEC 总 RNA, 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外分光光度计观察 RNA 的完整性并定量。FKBP12 引物上游: 5′-GAGAAAAGCCAGCATAAAGC-3′, 下游: 5′-TCTAGAACTTCGGTGGAAAG-3′, 产物 312 bp; 以β-actin 作为内对照, 其引物同上。先将 RNA 逆转录为 cDNA, 再进行 PCR 扩增。扩增条件为 95 ℃ 2 min, 1 个循环; 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 进行 30 个循环; 再 72 ℃延伸 10 min。取 6 μl PCR 扩增产物, 琼脂糖凝胶电泳后, 与内对照β-actin 比较, 进行半定量分析。以目的片段与β-actin 的光密度比值作为以目的片段 mRNA 的相对含量。

1.6 VEC 增殖情况测定

将消化后的 VEC 以 2×10^4 细胞/ml 接种于 96 孔板内, 细胞贴壁 1 d 后, 将 96 孔板各孔培养液吸出, 更换含不同浓度胰岛素(0.01、0.1、1 U/ml)的培养液作为实验组, 以更换不含胰岛素培养液组为对照组, 培养 16 h。再弃培养液, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 次, 更换 0.01 U/ml 胰岛素培养液。1~8 d, 每 24 h 各取 3 孔细胞, 胰蛋白酶消化后用 0.04%台盼蓝染液染色 2 min, 光学显微镜下计算活细胞数。每孔细胞分别计数 3 次, 以平均值绘制 VEC 增殖过程中的生长曲线。实验重复 2 次。

1.7 细胞上清液 NO 含量测定

将消化后的 VEC 以 2×10^4 细胞/ml 接种于 6 孔板内, 细胞贴壁 1 d 后, 将 6 孔板各孔培养液吸出, 更换含不同浓度胰岛素(0.01、0.1、1 U/ml; 3 ml/孔)的培养液作为实验组, 以更换不含胰岛素培养液组为对照组。培养 16 h 后, 弃培养液, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 5 次, 更换 0.01 U/ml 胰岛素的培养液, 分别孵育 2、8、16、24 h, 收集培养液, 保存待测。用硝酸还原酶法测定上清液 NO 含量, 按试剂盒说明书操作。

1.8 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件进行 F 检验和 q 检验。

2 结果

2.1 VEC 中 InsR 的检测

S-P 免疫组化检测呈阳性染色(图 1): 定量分析采用 Tiger 图像仪, 随机测量 100 细胞含棕黄色阳性颗粒的平均光密度值(A)。结果胰岛素 1 U/ml 组、0.1 U/ml 组、0.01 U/ml 组和对照组 A 值分别为(0.34±0.04)、(0.48±0.01)、(0.51±0.02)、(0.53±0.03), 胰岛素 1 U/ml 组和 0.1 U/ml 组显著低于对照组($P<0.05$)。



图1 VEC 中 InsR 染色, 可见细胞含棕黄色颗粒 (S-P×400)

Fig 1 Brownish red VECs, indicating the expression of InsR (S-P×400)

2.2 VEC 中 InsR mRNA 的检测

胰岛素 1 U/ml 组、0.1 U/ml 组、0.01 U/ml 组和对照组 InsR mRNA 表达量, 分别为(0.33±0.02)、(0.38±0.01)、(0.41±0.02)、(0.42±0.03), 见图 2。胰岛素 1 U/ml 组和 0.1 U/ml 组显著低于对照组($P<0.05$)。

2.3 VEC 中 FKBP12 mRNA 的检测

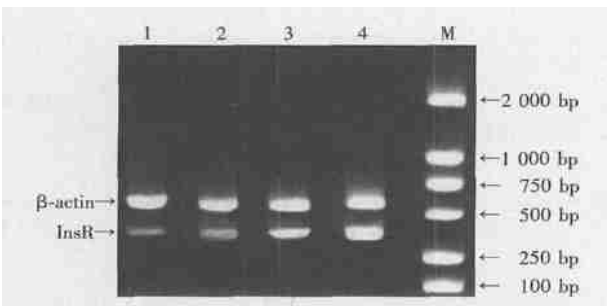
胰岛素 1 U/ml 组、0.1 U/ml 组、0.01 U/ml 组和对照组 InsR mRNA 表达量, 分别为(0.57±0.05)、(0.88±0.04)、(0.92±0.06)、(0.91±0.07), 见图 3。胰岛素 1 U/ml 组显著低于对照组($P<0.05$)。

2.4 不同浓度胰岛素对 VEC 生长曲线的影响

0.01、0.1 U/ml 胰岛素作用后, VEC 生长曲线为典型的"S"

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

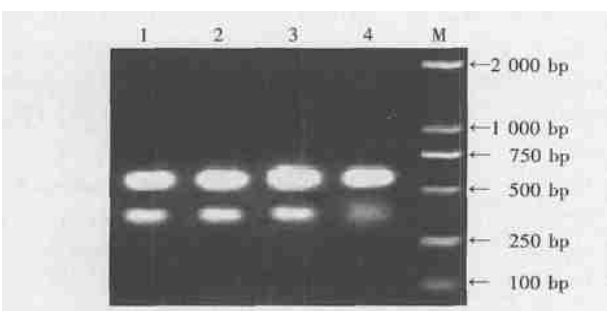
形, 在细胞培养的第 1 天数量有所减少, 第 2 天开始生长, 但速度较慢, 3~4 d 生长最快, 进入对数生长期, 第 5 天生长速度又开始放慢, 6~8 d VEC 基本停止生长。与对照组相比, 0.01 U/ml 组和 0.1 U/ml 组生长曲线均稍向左上偏移, 但无显著差别。而在 0.1 U/ml 组中, 细胞生长速度极其缓慢, 对数生长期延迟, 生长曲线明显向右下偏移, 见图 4。



M: PCR marker; 1: 1 U/ml; 2: 0.1 U/ml; 3: 0.01 U/ml; 4: Control

图 2　VEC 中 InsR 基因的表达

Fig 2　Expression of InsRmRNA in VECs



M: PCR marker; 1: Control; 2: 0.01 U/ml; 3: 0.1 U/ml; 4: 1 U/ml

图 3　VEC 中 FKBP12 基因的表达

Fig 3　Expression of FKBP12 mRNA in VECs

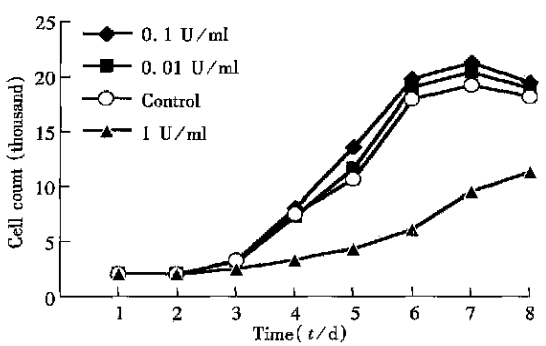


图 4　VEC 生长曲线

Fig 4　Growth curve of VECs

2.5　NO 含量检测结果

与对照组相比, 0.01 U/ml 组上清液 NO 含量在 2 h 有显著升高, 在 8、16 h 和 24 h 无明显差别; 0.1 U/ml 组上清液 NO 含量在 2 h 和 8 h 有显著下降, 在 16 h 和 24 h 无明显差别; 1 U/ml 组上清液 NO 含量在 2、8、16 h 和 24 h 下降非常显著, 见表 1。

表 1　不同浓度胰岛素对 VEC 上清液 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s$, μmol/L)

Tab 1　Effects of different concentrations of insulin on NO content in VEC culture medium ($\bar{x} \pm s$, μmol/L)

Group	2 h	8 h	16 h	24 h
Control	19.3±0.9	21.3±1.9	25.8±1.3	32.2±1.7
0.01 U/ml	21.4±1.3▲	23.3±1.2	27.0±1.1	33.6±1.4
0.1 U/ml	16.9±0.3▲	18.0±1.0▲	24.7±1.6	29.7±1.5
1 U/ml	155.2±0.7▲▲	17.2±0.8▲▲	21.9±1.2▲▲	26.9±1.1▲▲

▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$, *vs* control

3　讨论

目前流行病学证实, 40 岁以上正常人群中 20%有胰岛素抵抗, 高血压患者中 58%有胰岛素抵抗[4]。Lithell 等[5] 对 2 322 例中年男性作了 30 年的纵向研究, 提出胰岛素抵抗是高血压的一种先兆, 葡萄糖耐量降低先于高血压发生, 认为胰岛素抵抗是高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等的重要危险因素。产生胰岛素抵抗的主要原因是 InsR 数目减少及受体后缺陷, 肝细胞、肌细胞和脂肪细胞是胰岛素敏感细胞和产生胰岛素抵抗的主要部位。我们用免疫组化法证实 VEC 亦存在 InsR; 将 VEC 置于不同浓度胰岛素的培养液中 16 h(时间过长影响内皮细胞存活), 发现当培养液中胰岛素浓度为 1 U/ml 时 InsR 及其 mRNA 下降明显, 说明 VEC 在超生理浓度胰岛素存在时, 该受体数目不但受胰岛素水平的调节, 而且 InsR 下降可能由于该酶基因转录水平减弱所致, 超生理浓度胰岛素抑制 VEC InsR 水平的强弱可能与胰岛素浓度和作用时间有关, 因此, VEC 亦是胰岛素敏感细胞。

作为胰岛素的敏感细胞, VEC 的物质代谢和内分泌活动亦受胰岛素作用的影响。Gousseva 等[6] 认为胰岛素通过诱导早期快反应基因、锌脂转录蛋白和早期生长反应因子的表达和转录活性, 促进主动脉 VEC 的 DNA 合成和增殖。本研究观察了超生理浓度(1 U/ml)胰岛素作用后 VEC 在生理浓度胰岛素作用下的生长曲线, 发现该曲线明显向右下偏移, 且对数生长期延迟。提示超生理浓度胰岛素作用后 VEC 表面 InsR 数目下调, 可使 VEC 在生理浓度胰岛素作用下的物质合成代谢发生障碍。另外, 我们已经证实 FKBP12 既可作为 VEC 的标志物, 又反映 VEC 的增殖情况[3]。本研究提示超生理浓度胰岛素作用后, 在生理浓度胰岛素作用下培养 1 d, VEC 的 FKBP12 基因下调, 并与其物

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

质合成代谢发生障碍的程度相一致。说明超生理浓度胰岛素可能通过抑制大鼠VEC的FKBP12 mRNA的表达,使其物质合成代谢发生障碍。

FKBP12与RyR和IP3R存在生理学的联系并调节Ca^{2+}释放。Kohler等[7]认为,介导Ca^{2+}释放的IP3 R和RyR3可能是内皮Ca^{2+}原位信号传导和完整VEC功能的重要的组成部分。而产生NO的两个来源(羟胺和S-亚硝基L-半胱氨酸(S-nitroso-L-cysteine,NO-CYS)均受细胞内Ca^{2+}浓度的影响[8]。本研究提示超生理浓度胰岛素作用后,并在生理浓度胰岛素作用下培养24 h,NO的分泌较对照组显著减少,而且VEC的FKBP12基因下调与NO分泌的抑制的程度相一致。说明超生理浓度胰岛素可通过对FKBP12的影响而调节Ca^{2+}释放,最终引起NO分泌的抑制。

目前世界公认的检测胰岛素敏感性的"金指标"是钳夹试验[9],其中血糖钳的输注速率(glucose infusin rate,GIR)反映了组织对外源胰岛素的敏感性,它可从总体上评价机体对胰岛素的反应性;有研究者将在含5×10^{-7} mol/L胰岛素的培养液中孵育16 h的细胞称为胰岛素抵抗细胞模型,但这些实验反映的仅是胰岛素的糖代谢效应。而胰岛素还有促进蛋白质合成、促进脂肪合成、抑制脂肪分解、抑制肝糖产生及输出以及抗生酮等生理效应。近年来对脂肪细胞,特别是腹部内脏脂肪细胞抑制脂肪分解作用抵抗的研究与日俱增[10]。然而VEC与胰岛素抵抗关系的研究多限于体内实验[11]。我们从VEC的物质代谢和内分泌活动入手,观察到超生理浓度胰岛素(1 U/ml)作用16 h后使VEC对生理浓度胰岛素的反应性降低,引起VEC增殖和NO的分泌活动受到抑制,这种状态至少维持24 h。与胰岛素抵抗的经典定义(正常剂量的胰岛素产生低与正常生物学效应的一种状态)相比,在某种程度上形成了VEC的胰岛素抵抗。在此过程中VEC增殖和NO的分泌活动受到抑制的程度与VEC的FKBP12基因下调程度相一致。因此,我们认为超生理浓度胰岛素可通过抑制大鼠VEC的FKBP12基因表达,使FKBP12在蛋白水平下调,导致VEC在生理浓度胰岛素作用下的物质代谢和分泌活动受到抑制,最终形成自身胰岛素抵抗;FKBP12可能是与VEC胰岛素抵抗相关的重要信息分子。这对于解释肾移植患者应用FK506比CsA能更有效的控制心血管疾病的发生率和经FKBP12介导发挥免疫抑制作用的雷帕霉素可减少动物模型中新生内膜的形成提供了新的思路[12,13]。但利用基因敲除技术的直接证据以及FKBP12上游和下游的信号传导及其与InsR的关系有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Fukuda N, Nakayama M, Jian T, *et al*. Leukocyte angiotensin Ⅱ levels in-patients with essential hypertension: relation to insulin resistance[J]. Am J Hypertens, 2003, 16(2): 129—134.

[2] Dandona P. Insulin resistance and endothelial dysfunction in atherosclerosis: implications and interventions[J]. Diabetes Technol Ther, 2002, 4(6): 809—815.

[3] 王耀辉, 杨成明, 王旭开, 等. 内皮细胞生长因子诱导大鼠血管内皮细胞增殖过程中FKBP12的表达[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(24): 2205—2207.

[4] Bonora E, Kiechl S, Willeit J, *et al*. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study[J]. Diabetes, 1998, 47(10): 1643—1649.

[5] Lithell H, Sundstrom J, Arnlov J, *et al*. Epidemiological and clinical studies on insulin resistance and diabetes[J]. Ups J Med Sci, 2000, 105(2): 135—150.

[6] Gousseva N, Kugathasan K, Chesterman CN, *et al*. Early growth response factor-1 mediates insulin-inducible vascular endothelial cell proliferation and regrowth after injury[J]. J Cell Biochem, 2001, 81(3): 523—534.

[7] Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, *et al*. Expression of ryanodine receptor type 3 and TRP channels in endothelial cells: comparison of in situ and cultured human endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(1): 160—168.

[8] Lonart G, Johnson K M. Characterization of nitric oxide generator-induced hippocampal [^{3}H] norepinephrine release. Ⅱ. The role of calcium, reverse norepinephrine transport and cyclic 3′, 5′-guanosine monophosphate[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1995, 275(1): 14—22.

[9] Saruc M, Yuceyar H, Ayhan S, *et al*. The association of dehydroepiandrosterone, obesity, waist-hip ratio and insulin resistance with fatty liver in postmenopausal women-a hyperinsulinemic euglycemic insulin clamp study[J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(51): 771—774.

[10] Kawai Y, Ishizuka T, Kajita K, *et al*. Inhibition of PKCbeta improves glucocorticoid-induced insulin resistance in rat adipocytes[J]. IUBMB Life, 2002, 54(6): 365—370.

[11] Hsueh W A, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on progression of insulin resistance and cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol, 2003, 92(4A): 3J—9J.

[12] Abou Jaoude M M, Ghantous I, Almawi W Y. Tacrolimus (FK506) versus cyclosporin A microemulsion (Neoral) maintenance immunosuppression: effects on graft survival and function, infection, and metabolic profile following kidney transplantation (KT)[J]. Mol Immunol, 2003, 39(17—18): 1095—1100.

[13] Zohlnhofer D, Klein C A, Richter T, *et al*. Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation[J]. Circulation, 2001, 103(10): 1396—1402.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net