DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.010
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1143-03

论著

体外胰岛素样生长因子结合蛋白-1对人血管内皮细胞生长的抑制作用

魏 平[1],施宗平[1],汪寅章[2],徐东刚[3],彭善云[3],王嘉玺[3] ([1]第三军医大学附属西南医院内分泌科,重庆 400038;[2]解放军总医院内分泌科,北京 100853;[3]军事医学科学院基础所分子遗传实验室,北京 100850)

提 要:目的 观察胰岛素样生长因子结合蛋白-1对人血管内皮细胞的影响及其对胰岛素样生长因子的调节作用。方法 MTT比色法观察IGFBP-1及与IGF-1预混后对脐静脉内皮细胞(ECV304细胞株)生长影响。结果 IGFBP-1对内皮细胞ECV304的生长具有抑制作用且与剂量成正比;预混后各组IGF-1促细胞生长作用明显被抑制。结论 IGFBP-1既可以直接也可以通过调节IGF-1抑制血管内皮细胞生长。

关键词:胰岛素样生长因子结合蛋白-1;胰岛素样生长因子-1;血管内皮细胞
中图法分类号:R322.1+2;R329.2+5;R341.3 文献标识码:A

Inhibitive effect of insulin-like growth factor binding protein-1 on proliferation of cultured human umbilical vein endothelial cells

WEI Ping, SHI Zong-ping, WANG Yan-zhang, XU Dong-gang, PENG Shan-yun, WANG Jia-xi (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the biological activity of the human insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and insulin-like growth factor (IGF-1) on endothelial cell proliferation. Methods The dynamic changes of proliferation of cultured human umbilical vein endothelial cells (ECV304) were determined by MTT method. Results IGFBP-1 had inhibitive effect on the cell growth in a dose-dependent manner. The mixture of IGFBP-1 and IGF-1 resulted in significant inhibition of cell proliferation. Conclusion IGFBP-1 can inhibit endothelial cell growth directly and by means of regulation of IGF-1 as well.

Key words: insulin-like growth factor binding protein-1; insulin-like growth factor-1; endothelial cells

胰岛素样生长因子结合蛋白-1(Insulin-like growth factor binding protein-1,IGFBP-1)是20世纪80年代初发现的蛋白质因子,已证实IGFBP-1参与了多种生理病理过程,它主要通过与胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor-1,IGF-1)结合发挥作用。IGF-1具有降血糖等作用,并已应用于糖尿病治疗,目前发现大量使用IGF-1在降血糖的同时,某些并发症更加明显,特别是微血管并发症,其机制尚不十分清楚,减少或避免这些问题成为IGF-1在治疗糖尿病过程中关注的重点[1]。近年大量临床相关性研究表明IGFBP-1与糖尿病多数并发症呈负相关,这引起了对IGFBP-1生物学作用的重视,目前认为IGFBP-1主要是通过调节IGF-1发挥作用,对IGFBP-1本身的直接作用尚不清楚。

内皮细胞是血管的主要组成部分,它的增殖变化关系到糖尿病血管并发症的形成、发展,同时内皮细胞增殖也是肿瘤生长的重要特征,为此我们观察IGFBP-1对血管内皮细胞生长的影响,有助于阐明和了解IGFBP-1在血管并发症中的作用。

本研究观察了IGFBP-1、IGF-1在体外对人脐静脉血管内皮细胞ECV304细胞生长的影响。目前未见这方面报道。

1 材料和方法

1.1 材料

IGFBP-1购于Cabiochem公司,来源:人羊水,分子质量为34 000,纯度大于90%。用DMEM溶解后备用;重组人IGF-1(1 mg/L):军事医学科学院三所刘农乐惠赠,用DMEM稀释备用;ECV304细胞:系人脐静脉内皮细胞株,军事医学科学院三所3室提供;DMEM培养基:GIBICO公司;小牛血清:北京军区军马场提供;噻唑蓝[MTT]:100 mg+20 ml PBS,0.2 μl滤膜除菌(进口);10%SDS:Sigma公司产品;超净台、CO_2孵箱;96孔培养板:NUNC;Bio-Rad Model 550酶联仪:美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

在100 mm^3培养瓶中复苏ECV304细胞株,37 ℃,5%CO_2

作者简介:魏 平(1963-),男,安徽省芜湖市人,博士,主治医师,讲师,主要从事糖尿病诊断治疗方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754718

收稿日期:2002-08-05;修回日期:2003-03-03

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

培养，待细胞生长良好时，胰蛋白酶消化、用无血清 DMEM 洗涤 2 次、计数后稀释至 1.1× 10^5 /ml，种入 96 孔培养板中，每孔细胞终浓度为 9× 10^4 /mm。①空白对照（调零用）：100 μl DMEM；②阴性对照：80 μl 细胞稀释液＋20 μl DMEM；③单用 IGFBP-1 组（共分 3 小组）：IGFBP-1 终浓度分别为 2 μg/ml（B1 组）；1 μg/ml（B2 组）；0.5 μg/ml（B3 组）；④ IGFBP-1/IGF-1 预混组：为模拟体内真实状况，将 IGF-1 和 IGFBP-1 在实验前按一定比例混合，使二者充分结合，中和 IGF-1 的作用，达到观察 IGFBP-1 对 IGF-1 的调节作用。根据文献[2]报道，IGFBP-1 与 IGF-1 混合比例，在体内 IGF-1 与 IGFBP-1 物质的量之比大约为 1∶5。我们观察了 IGF-1∶IGFBP-1 的物质的量之比为 1∶5（AB 组）及 1∶2.5（BA 组）预混后对 ECV304 生长的影响，见表 1。

表1 预混各组中 IGF-1、IGFBP-1 终浓度

Tab 1 The final concentrations of IGF-1 and IGFBP-1 in various premixed groups

Group	IGF-1(ρ_B /μg·ml^{-1})	IGFBP-1(ρ_B /μg·ml^{-1})
AB1	0.050	1.0
AB2	0.025	0.5
AB3	0.100	2.0
BA1	0.100	1.0
BA2	0.050	0.5
BA3	0.200	2.0

每组 3 孔；培养 48 h 后，每孔加 MTT 20 μl（5 mg/ml），4 h 后，加 100 μl 10% SDS 终止反应，37 ℃，5% CO_2 培养至次日晨，用酶联仪比色（A 值）。共重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计学分析采用统计软件 SPSS10.0 作配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 IGFBP-1 对 ECV304 生长的影响

IGFBP-1 对内皮细胞 ECV304 的生长具有抑制作用且与剂量成正比，见图 1。

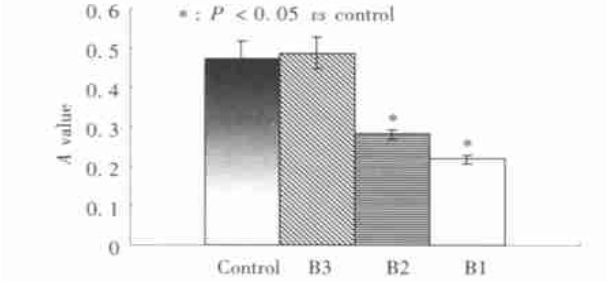


图 1 MTT 法观察不同剂量 IGFBP-1、IGF-1 对 ECV304 生长影响（$\bar{x}\pm s$）

Fig 1 Effect of different doses of IGFBP-1 and IGF-1 on ECV304 growth observed by MTT（$\bar{x}\pm s$）

2.2 IGFBP-1 对 IGF-1 促 ECV304 生长作用的影响

预混后各组 IGF-1 促细胞生长作用明显被抑制，提示 IGFBP-1 具有抑制 IGF-1 促细胞增殖作用，见图 2。

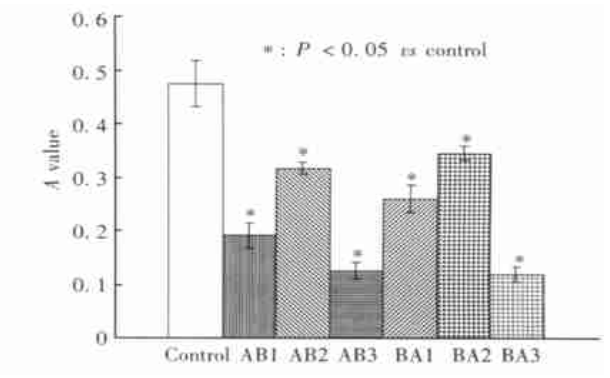


图 2 MTT 法观察不同剂量的预混 IGFBP-1/IGF-1 对 ECV304 生长影响（$\bar{x}\pm s$）

Fig 2 Effect of different doses of mixed IGFBP-1/IGF-1 on ECV304 growth observed by MTT（$\bar{x}\pm s$）

3 讨论

在 IGFBP 家族中，根据发现的先后顺序，分别命名为 IGFBP-1～6。其中 IGFBP-1 是惟一的呈现快速、昼夜周期性变化的结合蛋白，和胰岛素特征非常相似。现已证实胰岛素是 IGFBP-1 主要调控因子，它的调控序列结构和调节糖异生的关键酶磷酸烯醇丙酮酸羧激酶（PEPCK）的启动子结构很相似，提示 IGFBP-1 和糖代谢关系密切。综合现有研究结果显示 IGFBP-1 是其家族中与糖代谢及糖尿病关系最为密切，对糖尿病及其并发症有着重要影响的因子。大量临床研究也显示了 IGFBP-1 参与了多种糖尿病病理过程，如：胰岛素抵抗、黎明现象、血管并发症等[3]。

IGF-1 已经用于临床，目前阻碍其广泛应用于治疗糖尿病的重要因素之一是其促使某些并发症进展，特别是血管并发症，如何减少或避免这些问题成为研究重点[4]。IGFBP-1 扮演着调节 IGF-1 作用，因此 IGFBP-1 是否对糖尿病并发症也有影响成为人们关注的重点之一[5]。我们研究显示：IGFBP-1 在体外对 IGF-1 促内皮细胞生长的作用具有明显的抑制作用，更值得重视是 IGFBP-1 在 IGF-1 不存在条件下同样具有抑制内皮细胞生长的作用，并且与剂量正相关；也就是说 IGFBP-1 抑制内皮细胞的生长可以不通过抑制 IGF-1 实现，而是直接的作用。目前众多研究 IGFBP-1 对组织、细胞的影响都是观察其与 IGF-1 的关系为主，比如：血管平滑肌、骨骼肌等。我们的研究表明 IGFBP-1 不仅通过与 IGF-1 结合达到抑制内皮细胞的生长，而且游离状态下的 IGFBP-1 对抑制新生血管形成同样具有重要意义，这与 Krsek 等[6]的临床研究结果一致。此外，我们设想如果能够使体内结合状态下的 IGF-1/IGFBP-1 分

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

离可能是一个非常有效的既降低血糖又增加游离 IGFBP-1 的途径，从而达到减少并发症的目的，这可能成为糖尿病治疗新的途径和方法。我们的实验显示若有 IGF-1 存在条件下，IGFBP-1 可以更明显抑制一些组织、细胞的生长，这与 Gustafsson 等[7] 的研究基本一致，他们发现 500 ng/ml 的 IGFBP-1 可以强烈抑制 IGF-1 刺激的蛋白质合成，并认为在 IGFBP 家族中对 IGF-1 抑制效应最强的是 IGFBP-1。

IGFBP-1 在体内存在两种形式-磷酸化、非磷酸化，根据文献[8] 报道，这两种形式的 IGFBP-1 的生物学作用截然相反，磷酸化的 IGFBP-1 具有抑制 IGF-1 作用。我们使用的 IGFBP-1 是从人羊水中提取的，它主要是以磷酸化的形式的存在，所以我们的研究支持这一观点。

总之，根据我们研究的结果，IGFBP-1 可以抑制血管内皮细胞生长、增殖并对 IGF-1 促生长的作用都有重要影响，有助于我们了解 IGF-1、IGFBP-1 在糖尿病并发症发生发展中的作用。

参考文献：

[1] Thrailkill K M. Insulin-like growth factor-Ⅰ in diabetes mellitus: its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility[J]. Diabetes Technol Ther, 2000, 2(1): 69－80.

[2] Gockerman A, Prevette T, Jones J I, *et al*. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the smooth muscle cell migration responses to IGF-Ⅰ and IGF-Ⅱ[J]. Endocrinology, 1995, 136(10): 4168－4173.

[3] Heald A H, Cruickshank J K, Riste L K, *et al*. Close relation of fasting insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) with glucose tolerance and cardiovascular risk in two populations[J]. Diabetologia, 2001, 44(3): 333－339.

[4] Chiarelli F, Santilli F, Mohn A. Role of growth factors in the development of diabetic complications[J]. Horm Res, 2000, 53(2): 53－67.

[5] 于学军，何作云，戚文航. 心肌组织内 IGF-1 和 TGF-β_1 在高血压不同发病阶段的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2001，23(4)：410－412.

[6] Krsek M, Prazny M, Skrha J, *et al*. IGFBP-1 and its protective role in the pathogenesis of microangiopathy in type 1 diabetes mellitus[J]. Cas Lek Cesk, 2001, 140(8): 234－237.

[7] Gustafsson T, Andersson P, Arnqvist H J. Different inhibitory actions of IGFBP-1, -2 and -4 on IGF-Ⅰ effects in vascular smooth muscle cells[J]. J-Endocrinol, 1999, 161(2): 245－253.

[8] Yu J, Iwashita M, Kudo Y, *et al*. Phosphorylated insulin-like growth factor (IGF)- binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits while non-phosphorylated IGFBP-1 stimulates IGF-induced amino acid uptake by cultured trophoblast cells[J]. Growth Horm IGF Res, 1998, 8(1): 65－70.

（编辑 张 宁）

文章编号：1000-5404(2003)13-1145-01

个案与短篇

2 型糖尿病周围神经病变的临床分析

Clinical analysis of peripheral neuropathies in type 2 Diabetes Mellitus

于化梅[1]，张 玲[1]，姜友昭[2]，王海惠[2]，陈 兵[2]（第三军医大学附属西南医院：[1] 预防保健科；[2] 内分泌科，重庆 400038）

有些糖尿病病例常首先出现神经系统损害症状，比较容易误诊。现就 2 型糖尿病合并周围神经损害的早期发现、诊断及相关因素分析如下。

1 资料和方法

2 型糖尿病人 110 例，糖尿病诊断符合 1985 年 WHO 标准，糖尿病周围神经病变(Diabetic peripheral neuropathy, DPN)的诊断参照 1988 年 San Antonio 的标准[1]。植物神经病变的诊断标准参照张红总结的标准[2]。临床症状：对称性肢体麻木 41 例，刺痛 19 例，感觉异常 32 例，腱反射减弱或消失 58 例。按病程分 5 组，采用肌电图仪(Nicolet Viking Ⅳ型)测量肢体正中神经，腓总神经的运动传导速度(MCV)和感觉传导速度(SCV)。

2 结果

110 例中，MCV 异常 54 例(49%)，SCV 异常 66 例(60%)，肌电图异常 31 例(28%)。病程 5 年以上者，神经电生理检查异常率超过 60%。神经症状与神经电生理检查异常之间明显相关，有神经症状者 67 例，MCV 异常 32 例(48%)，SCV 异常 50 例(75%)，肌电图异常 21 例(31%)；无神经症状的 43 例，MCV 异常 18 例(42%)，SCV 异常 13 例(30%)，肌电图异常 7 例(16%)。

62 例植物神经病变的患者全部合并周围神经病变，病例在 10 年以上者发病率高达 97%；各组间有显著差异($\chi^2=23.625$, $P<0.005$)。

3 讨论

糖尿病周围神经病变是糖尿病常见的慢性并发症之一，其发病机制尚未完全明确。目前认为高血糖引起山梨醇、果糖在神经细胞中的蓄积可引起胞内渗透压增高，造成水钠潴留，致使神经细胞水肿、变性、坏死，引起神经纤维脱髓鞘和轴突变性；高血糖可竞争性地抑制一种调控肌醇运输系统的钠依赖载体，使细胞对肌醇的摄取减少，此代谢环路的变化可导致 Na^+/K^+-ATP 酶活性下降，直接影响神经组织中 Na^+ 依赖性的氨基

（下转 1148 页）

作者简介：于化梅(1971－)，女，四川省平昌市人，医师。电话：(023)68753507
收稿日期：2003-03-16；修回日期：2003-06-04

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