DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.011

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*

王旭开** 王 梅*** 刘光耀 杨成明 (第三军医大学附属大坪医院心血管内科)重庆,400042
万 瑛 (第三军医大学基础医学部分子生物学教研室)重庆,400038

提 要 目的:了解动脉平滑肌细胞(ASMC)的蛋白激酶 C(PKC)含量及亚型分布,以及与细胞增殖的关系。方法:采用点印迹技术及 MTT方法,检测了人 ASMC颗粒部分与胞浆部分 PKC的6种亚型的含量和分布。结果:① 人 ASMC细胞中主要有 PKCα、PKCβ、PKCζ 3种亚型分布,并发现63%分布在胞浆中;② 人 ASMC 细胞 PKC总量随着佛波酯(PMA)、胰岛素浓度的增加而增加,人 ASMC细胞增加数量也随着 PMA、胰岛素的浓度增加而增加。结论:人 ASMC细胞中以 PKCα、PKCβ、PKCζ 3型含量较多,胰岛素可能是通过激活 PKC信号传导途径引起细胞的基因表达增高,导致 ASMC细胞增殖。

关键词 平滑肌;胰岛素;蛋白激酶 C亚型
中图法分类号 R544.1

近来研究提示高血压病的重要病理基础是血管结构异常改变,主要表现为血管纤维化和平滑肌细胞异常增殖。我们前期的研究发现胰岛素可促进动脉平滑肌细胞(ASMC)增生,经胰岛素培养的 ASMC,其 DNA和蛋白质合成量都明显增加[1,2],并证实胰岛素可诱导 ASMC细胞的 c-fos基因的表达。由于蛋白激酶 C(PKC)由多种亚型组成,且在不同组织亚型的分布及生物效应均不同[3],因此了解 ASMC细胞的 PKC含量及亚型分布,以及与细胞增殖的关系,对进一步阐明 PKC在高血压病发生发展中的作用具有重要意义。我们采用近年发展起来的点印迹技术及 MTT方法,研究了人 ASMC 6种 PKC亚型的分布,及其在胰岛素作用下亚型的改变和与细胞增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料

培养用胰岛素、MTT为 Sigma公司产品,PKC亚型抗体(PKCα、β、ζ、ι、δ和 ε),DMEM 培养基均为 GIBCO公司产品,二抗 ABC抗体系列为 Vector公司产品,硝酸纤维素膜为 Amersham公司产品,小牛血清系华西医科大学分子生物学研究室生产。

1.2 方法

1.2.1 人血管平滑肌细胞原代及传代培养 按文献[4]方法进行。

1.2.2 细胞颗粒组份与胞浆组份的分离 参照 Girard[5]方法,将培养满瓶的 ASMC经胰岛素、佛波酯(PMA)干预后,消化收集,加入2 ml细胞匀浆缓冲液(10 mol Tris·HCL,pH 7.5,含10 mmol/L EDTA,25 mmol/L $MgCl_2$,0.3 mmol/L PMSF)冰冷下经超声波粉碎仪(DF-6P3C超声波粉碎仪,宁波科生仪器厂)打成匀浆,10000 r/min离心 10 min并除残渣,上清 20000 r/min离心30 min,上清为匀浆部分,沉淀再加2 ml匀浆缓冲液充分混匀为颗粒部分。

1.2.3 点印迹法测 PKC含量 细胞组份经紫外线分光光度计测定蛋白含量后,参照范本昌[6]的方法,取2μg蛋白点点样于硝酸纤维素膜上,室温干燥后用3% H_2O_2-PBS液浸泡15 min,再用0.3% tween 20-PBS(TPBS)37℃浸泡30 min,加入1:200稀释的 PKC抗体各亚型,置37℃ 60 min,0.01 mol PBS洗2次,每次5 min,加入1:100 ABC复合物 37℃ 60 min,0.01 mol PBS洗2次,每次5 min,DAB显色。用2μg点呈 BSA作阴性对照,每个样品设一个无羊抗的对照。每次均用兔脑匀浆作阳性对照。膜干燥后用 GS-670型光密度(BIO-RAD)在400 nm下扫描,斑点所对应的峰下面积表示 PKC含量,以每张膜上兔脑颗粒部分的6种 PKC总含量(面积和)定为300扫描单位,再计算出其分各点的相对含量。

1.2.4 MTT法 将 ASMC直接培养在载玻片上,并用胰岛素和 PMA干预培养,经4%多聚甲酸固定10 min,分别加1:200稀释的 PKC各亚型抗体,37℃ 30 min,0.01 mol PBS清洗5 min,2次。加入1:200稀释生物素化的羊抗鼠 IgG,37℃ 30 min,0.01 mol PBS清洗2次,每次5 min,加入1:100稀释的 ABC复合物 37℃ 30 min,0.01 mol PBS洗2次,DAB显色,甲基绿复染。

1.2.5 胰岛素、PMA对细胞数量的影响 培养 ASMC细胞,按每孔2×10^4个细胞分装于96孔培养板,37℃ 5% CO_2孵箱中培养48 h后,加入不同浓度的胰岛素及 PMA干预后,每孔

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39370312
** 王旭开,男,37岁,副教授,博士研究生 *** 进修生,解放军324医院心血管内科,重庆,400020
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加入 10% SDS-0.01NHCL 100μl过液。用(BTO-RAD)酶联仪测 570~ 630的 D_x(OD)值,以无细胞孔调零,值越大表明细胞数越多。

1.2.6 统计处理　应用计算机 POMS应用统计系统采用两样本均数的 t检验,数据用 $\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 ASMC细胞 PKC亚型的分布

ASMC细胞各组份的 PKC及其亚型含量,见表 1

表 1 胰岛素 PMA对 PKC总量和 PKC亚型在 ASMC各组份中的分布($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Distrbution of subtypes of PKC in ASMC(n= 4, 100 mg/L insulin= 10^{-6} mol/L) ($\bar{x}\pm s$)

Cell fraction		PKCα	PKCβ	PKCζ	PKCγ	PKCδ	PKCε	Total
Particulate	PMA	178.5± 24.2	124.6± 21.2	149.4± 23.2	92.1± 24.1	78.4± 16.7	87.4± 15.9	576.8± 125.3
	Insulin	169.5± 23.1	102.2± 20.2	159.3± 22.1	87.1± 24.2	67.3± 17.5	80.3± 16.3	665.7± 123.4
Cytosolic	PMA	213.2± 21.3	278.8± 18.6	168.7± 19.8	87.8± 22.3	72.6± 17.2	94.6± 16.2	915.2± 115.4
	Insulin	185.3± 29.5	231.3± 21.6	178.6± 21.7	78.3± 19.8	59.4± 16.8	87.5± 15.9	820.4± 120.3
Whole	PMA	394.7± 22.1	403.4± 19.7	318.1± 21.7	179.1± 23.4	150.1± 16.2	162.1± 16.3	1498.2± 119.5
	Insulin	355.8± 27.2	333.5± 39.7	339.8± 44.8	165.4± 22.8	127.7± 16.9	168.8± 16.4	1486.1± 124.1

在 ASMC中,总 PKC约 63%在胞浆中,各型之间有差异,其中 PKCα、PKCβ、PKCζ在细胞中分布明显高于 PKCγ、PKCδ PKCε, $P<0.01$;而 PKCγ、δε 3组份各占 1/3; PKCα、PKCβ、PKCζ之间及 PKCγ、PKCδ PKCε之间差异不明显。PMA和胰岛素刺激后的 ASMC细胞中 PKC各亚型之间差异不明显。

2.2 胰岛素对 ASMC中 PKC亚型与增殖的浓度的影响

用不同浓度的胰岛素、PMA对 ASMC干预培养后,发现随着 PMA胰岛素浓度的增高,各细胞组份中 PKC亚型α、β、ζ有逐渐增加的趋势,与空白对照组相比 $P<0.01$,而 PMA和胰岛素组间差异不明显, PKC亚型 δεγ 亚型变化与细胞对照组相比无统计学意义,见表 2

表 2 不同浓度 PMA, Insulin对 ASMC总 PKC的影响(n= 4, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The effects of different concentration of PMA, insulin on total PKC in ASMC(n= 4, $\bar{x}\pm s$)

Cell fraction	PMA (10^{-9} mg/L)	Insulin ($\times 10^{-8}$ mol/L)	PMA (10^{-8} mg/L)	Insulin ($\times 10^{-7}$ mol/L)	PMA (10^{-7} mg/L)	Insulin ($\times 10^{-6}$ mol/L)	Control
Particulate	592.3± 116.7	634.1± 121.2	703.1± 117.3	728.2± 119.7	914.5± 118.4	931.7± 120.1	582.3± 119.3
Cytosolic	943.4± 117.8	962.1± 19.8	1214.5± 121.3	1243.1± 120.8	1403.6± 122.1	1480.7± 121.1	891.4± 115.7
Whole	1535.7± 118.2	1596.2± 120.3	1917.6± 119.3	1971.3± 120.3	2318.1± 120.1	2412.1± 120.6	1473.7± 117.5

2.3 胰岛素对 ASMC PKC亚型分布的影响

用免疫细胞化学法,观察胰岛素对 ASMC PKC亚型分布影响,用各亚型抗体对胰岛素、PMA干预培养 ASMC,发现 PKC亚型γ、δεζ分布与未经胰岛素、PMA处理的 PKC亚型分布无变化。而 PKC亚型α、β经胰岛素、PMA处理后,细胞膜上的染色阳性明显增加。组织片经图像分析,结果见表 3

表 3 PKC激活剂对 PKC亚型 α、β 的影响

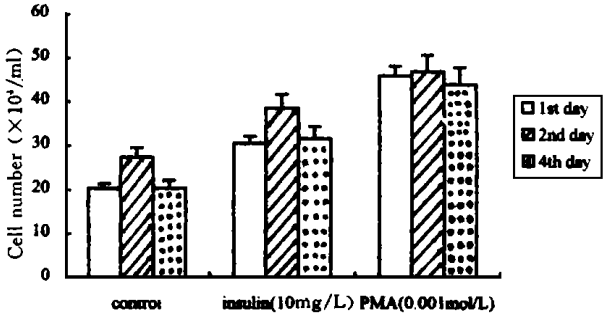
Tab 3 The effects of PKC activator on PKC subtypes α, β

	Control	PMA(1.0×10^{-9} mg/L)	Insulin($\times 10^{-8}$ mol/L)
PKCα	18.22± 1.12	24.65± 1.64*	21.14± 1.43*
PKCβ	19.32± 0.98	22.19± 1.24*	23.78± 1.25*

* : $P<0.01$ *vs* control

2.4 胰岛素对 ASMC数的影响

用胰岛素、PMA干预培养的 ASMC后,观察细胞生长情况,发现随着 PMA,胰岛素浓度升高, ASMC明显增加,见附图。



附图 胰岛素、PMA对人 ASMC细胞数的影响

Fig The effects of insulin and PMA on human ASMCs number

3 讨论

胰岛素可促进 ASMC增生、增殖[1,2],利用胰岛素体外对培养的人 ASMC内 PKC亚型分布进行研究,

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

本实验结果提示,经胰岛素、PMA干预培养的人ASMC,PKC亚型α、β、ζ含量随着PKC、胰岛素的浓度增大而逐渐增加,所测人ASMC增殖的变化与之相一致。即随着PMA、胰岛素浓度增加,ASMC数量增多。这一结果说明胰岛素使人ASMC增殖与激活PKC信号传导通路有关。

由于PKC由多种亚型组成,在不同组织亚型的分布及生物效应均不同,PKCα广泛分布于许多组织的细胞类型,可能在细胞增殖和分化中担任一重要角色,PKCβ主要分布在脑及肝、肾、脾、心肺等组织细胞中,而PKCα、ε、δ主要分布在脑组织中,本结果证实人ASMC中的PKCα、β、ζ为主要PKC亚型并随着胰岛素浓度的增加,此3个亚型的分布含量也增加。外界某种信号一般只导致一种或几种PKC同功酶亚型的转位而并非全部,而且不同的生物、不同组织来源的细胞、不同的PKC亚型对不同的外界刺激反应也不同,这可能是由于各PKC同功酶变化所调节的[7,8]。

参考文献

1 王旭开,王 梅,刘光耀等.人胰岛素样生长因子-Ⅰ对高血压病人胃网膜动脉平滑肌细胞增殖周期的影响.中国高血压杂志,1997;5(2):103

2 王旭开,王 梅,刘光耀.成人肠系膜动脉血管平滑肌细胞增殖模型的稳定性研究.第三军医大学学报,1997;19(5):411

3 Cooper D R, Watson J E, Dao M L. Decreased expression of protein kinase-C alphabeta and epsilon in soleus muscle of zucker obese(fa/fa) rats. Endocrinology, 1993; 133(5): 224

4 王旭开,刘光耀,杨成明等.复合胶原酶法分离人血管平滑肌细胞的新方法.第三军医大学学报,1993;15(4):357

5 Girard P R, Mezzei G J, Kuo J F. Immunological guantion of phospholipid/calcium-dependent protein kinase and its fragmants. J Biol Chem, 1986; 261(1): 370

6 范本昌.生物大分子印迹技术和应用.上海:上海科学技术文献出版社,1989:191~193

7 Stumpo D J, Haupt D M, Blackshear P J. Protein kinase-C isozyme distribution and down-regulation in relation to insulin-stimulated c-fos induction. J Biol Chem, 1994; 169(33): 211184

8 Berra E, Diaz Meco M T, Dominguez I *et al*. Protein kinase-C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. Cell, 1993; 74(3): 555

(收稿:1997-02-18;修回:1997-12-25)

(编辑 王 红)

Effects of insulin on distribution and content of protein kinase-C isoforms in human arterial smooth muscle cells*

Wang Xukai, Wang Mei, Liu Guangyao, Yang Chengming, Wan Ying (Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the effects of insulin on distribution and content of protein kinase-C isoforms (PKCIs) in human arterial smooth muscle cells (ASMCs). Methods: Dot blot hybridization and MTT micro-enzymatic determination were used to detect the distribution of six subtypes of PKCIs and then to explore the relationship between the changes of subtypes and the proliferation of human ASMCs after the interference of insulin. Results: ① human ASMCs mainly contained PKCI subtypes alpha, beta and epsilon and 63% of them were distributed in cytoplasm; ② The total PKCIs in human ASMCs and ASMC count were increased along with the increase of concentration of insulin and PMA. Conclusion: Most of the PKCIs in ASMCs belong to subtypes alpha, beta and epsilon. Insulin induces the proliferation of ASMCs through activating the PKCI signal pathway.

Key words arterial smooth muscle cell; insulin; protein kinase-C isoform; subtype

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39370312

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