DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.013

胰岛素对人血管平滑肌细胞增殖的影响*

王 梅** 王旭开 刘光耀 (第三军医大学附属大坪医院心血管内科) 重庆, 400042

提 要 目的: 观察胰岛素对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖及 DNA合成影响,探讨可能的机制。方法: 无菌分离动脉血管,采用复合胶原酶分离和培养人 VSMC,加胰岛素干预,观测 VSMC增殖的影响,用 MTT(四甲基偶氮唑盐)微酶测量法检测细胞增殖能力和 VSMC细胞周期分类的影响。结果: 与对照组比较,胰岛素刺激组细胞生成明显增加,并与浓度梯度有明显关系;流式细胞光度仪对细胞周期分类显示: 胰岛素、佛波酯(PMA)干预组 VSMC处 DNA合成期和分裂期细胞数及百分比均较对照组高($P < 0.05$),而佛波酯组较胰岛素组高。结论: 胰岛素有明显促 VSMC增殖作用,并与浓度梯度有明显依赖关系。

关键词 血管平滑肌细胞;高血压;高胰岛素血症;胰岛素;佛波酯

中图法分类号 R543

大多数原发性高血压病人存在胰岛素抵抗和高胰岛素血症。高血压的发病机制十分复杂,其主要病理改变之一是血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells, VSMC)增生、肥大,造成血管壁肥厚,管腔狭窄。胰岛素在 VSMC增殖中的作用日益引起人们的关注,本实验用体外培养人的 VSMC,进行胰岛素干预实验,观察胰岛素对 VSMC增殖及 DNA合成影响,探讨可能的机制并寻找临床证据。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM培养基、MTT,胶原酶 I型、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、Phorbol ester、胰岛素购于 Sigma公司,其余为市售分析纯。

1.2 方法

先后共检测 12例非心脏病患者(45~65岁)外科手术病人的血管。具体步骤按文献[2]进行;实验用第 8代 VSMC。

1.3 VSMC鉴定

1.3.1 Actin免疫组织化学鉴定 生长在玻片上 VSMC以 Hanks液洗干净培养液,固定(4℃)20 min,再放入 60℃烤箱 4 h,根据 ABC免疫组化进行染色: 滴加特异的兔抗猪 Actin单克隆抗体(1∶50倍),4℃湿盒内过夜,滴加二抗 37℃下孵育 30 min,冲洗后,DAB显色。

1.3.2 透射电镜观察 将收集好的 VSMC悬液低速离心(1000g, 5 min),由此获得细胞团块,4%多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.4)中固定,用 2% 锇酸后固定 1~2 h,逐级酒精脱水,环氧树脂包埋,超薄(600Å)切片,电镜下观察、照相。

1.3.3 VSMC计数 用含 20% FBS/DMEM液将 VSMC悬液调至 2×10⁴个/ml加入 24孔培养板培养,每孔 1ml, 37℃ 5% CO_2孵育 24 h,换含 1% FBS/DMEM培养 24 h,使细胞处同步状态,分对照组,胰岛素组,佛波酯组,Insulin, Phorbol ester加入不同浓度。48 h后用 0.125%胰蛋白酶消化,制细胞悬液,用细胞计数板直接计数。

1.3.4 胰岛素促 VSMC的 DNA合成作用 用 MTT(四甲基偶氮唑盐)微酶测量法,间接检测细胞增殖能力[4]。

1.3.5 细胞的 DNA含量、细胞体积和胞浆体积 流式细胞仪检测。

1.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 VSMC的鉴定

2.1.1 光镜下观察 VSMC呈典型的'谷与峰'样生长。HE染色 VSMC呈梭形,三角形或星形,有一个卵圆形或圆核。

2.1.2 用 Actin单克隆抗体进行特异的免疫组化染色 在光镜下仍呈梭形或长条形,胞质染色呈棕色,Actin染色阳性是 VSMC的特征之一。

2.1.3 透射电镜下观察 可以见到一个细胞核,胞质中充满平行肌丝,有薄层基底膜。

2.2 胰岛素促细胞增殖的作用

2.2.1 胰岛素对 VSMC细胞数的影响 与对照组比较胰岛素刺激组细胞生成明显增加。说明胰岛素有明显促 VSMC增殖作用。并与浓度梯度有明显关系,在 10^{-7} mol/L时增殖最明显。胰岛素对人血管平滑肌细胞增殖的影响及临床意义。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39370312

** 王 梅,女,35岁,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

附表 胰岛素对 VSMC细胞周期分类的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table The effects of insulin on cellular circle catagories of ASMC ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Concentration(C_B/mol·L^{-1})	S period	G_2+M period
Control	2471.6± 109.8	83.3± 31.53
Insulin 1×10^{-6}	3281.4± 98.70**	225.6± 71.0*
1×10^{-7}	3198.3± 113.2**	189.5± 28.4**
1×10^{-8}	3042.9± 0.78**	153.1± 40.22*
1×10^{-9}	2921.3± 154.3**	145.3± 21.73*
PMA 1×10^{-5}	3687.6± 170.2**	311.0± 18.1**
1×10^{-6}	3491.6± 128.1**	291.5± 28.1**
1×10^{-7}	3305.5± 167.9**	218.8± 31.4**
1×10^{-8}	3208.3± 129.3**	180.1± 21.1**

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

2.2.2 胰岛素促 VSMC DNA合成的作用 用 MTT微酶法测得 OD值在 3组中明显差异,胰岛素、PMA均较对照组高,说明 VSMC能量代谢活跃,产生大量的能量以供合成多种大分子物质和细胞分裂所需。与细胞计数结果相符。阳性对照组 PMA呈逐渐下降的趋势,而胰岛素组则在 10^{-7}mol/L时 DNA合成的能量代谢最活跃。VSMC细胞周期分类的影响:流式细胞光度仪对细胞周期分类显示:胰岛素、佛波酯(PMA)干预组 VSMC处 DNA合成期和分裂期细胞数及百分比均较对照组高($P<0.05$),而佛波酯组较胰岛素组高。胰岛素浓度为 10^{-9} mol/L时上两期细胞数最多,与浓度成反比;佛波酯浓度浓度在 10^{-5}mol/L时则这两期细胞数最低,在 10^{-6} mol/L时则这两期细胞数最多,并随浓度的下降而减少。胰岛素浓度为 10^{-6} mol/L和 10^{-7} mol/L时 G_2期细胞数最多。

3 讨论

胰岛素是多肽激素,由胰腺β细胞分泌经血循环作用靶细胞,属循环内分泌。我们用体外培养人的 VSMC研究表明,胰岛素可促进 VSMC增殖,DNA合成,与文献[5]报道一致,并与旦白激酶激活剂佛波酯的作用平行提示细胞内信息物质为蛋白激酶。

体外研究胰岛素对培养人的 VSMC增殖作用的影响,了解到 VSMC在体外胰岛素具有促细胞生长作用,高浓度的胰岛素与受体结合而调节细胞的生长和 DNA合成,以往有许多动物实验证实这一观点[6,7],本实验观察胰岛素对 VSMC增殖影响,并与 Phorbol及空白对照比较,发现 VSMC增生在 PMA 10^{-5} mol/L时最高,即在最初就有强烈的反应,随着时间的推移其增生的反应也逐渐减弱,提示人 VSMC对 PMA有时间耐受性反应;与空白对照组比较,胰岛素组刺激细胞生成明显增加,但明显较 PMA组低,说明胰岛素有明显促 VSMC增殖作用,并与浓度梯度有明显关系,在 10^{-7} mol/L时增殖最明显,也有随着时间的推移其增生的反应也逐渐减弱的现象。

用 MTT微酶法测得 OD值在 3组中有明显差别,胰岛素、PMA均较对照组高,说明 VSMC能量代谢活跃。与细胞计数结果相符。阳性对照组 PMA呈逐渐下降的趋势,而胰岛素组则在 10^{-7} mol/L的浓度时 DNA合成的能量代谢最活跃。它们都有剂量-增生效应的关系,所不同的是:PMA在开始的时候就达到最高,然后逐渐下降;而胰岛素则有一逐渐升高的过程,达到最高后又渐渐下降。两者的增生峰值不同,提示胰岛素可能仍然是以细胞外激活增生为主。因为其峰值也较靠近 PMA,所以胰岛素也存在胞内的激活机制。这方面的工作需要进一步深入。

VSMC异常增殖导致高血压、动脉粥样硬化等疾病发生[6,7]。VSMC增殖是多种因素作用的结果,胰岛素的作用不容忽视,深入研究其机制,对于治疗和预防与高胰岛素血症和胰岛素抵抗相关的一类疾病有一定临床意义。

参考文献

1 Salvetti A. The inter-relationship between insulin resistance and hypertension. Drugs, 1993; 46(suppl2): 149

2 王旭开,刘光耀,杨成明.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

3 赵三妹.动脉平滑肌细胞的培养方法及其应用.中华病理学杂志,1987; 16(4): 260

4 汪浩川.人动脉平滑肌细胞贴块培养法.华西医科大学学报,1995; 26(1): 105

5 Pepe M G, Donald M, Luce S *et al*. Receptor binding and mitogenic effects of insulin and insulin-like growth factor I and II for human myeloid leakemic cell. J cell physiol, 1987; 133: 219

6 汤 健.原癌基因与心血管疾病.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1990: 33~59

7 陈松苍.细胞钙代谢、癌基因与原发性高血压.国外医学:心血管疾病分册,1995; 22(3): 131

(收稿:1996-06-28;修回:1997-11-12)

(编辑 汪勤俭)

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

Effects of insulin on proliferation of human vascular smooth muscle cells

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

Abstract Objective: To investigate the effects of insulin on proliferation of human mesenteric arterial smooth muscle cells (ASMCs). Methods: After the primary culture of human ASMCs was successfully performed with primary-explant method, it was interfered with insulin. Then the proliferation of ASMCs was detected with MTT micro-enzymatic determination. Results: The proliferation of ASMCs was significantly increased. The cytoflowmetry showed that more ASMCs in insulin-and PMA-interfered groups got into the S and G_2+ M periods as compared to the control. Conclusion: Insulin can promote the proliferation of human ASMCs and the growth of ASMCs depends on the insulin concentration.

Key words human arterial smooth muscle cell; insulin; atherosclerosis; proliferation

(上接 18页)

常。显然,相应机制的研究与阐明,可为认知功能紊乱性疾病的诊断、治疗及病因揭示奠定基础。目前,神经化学因素对 P3波的影响机制尚不清楚,相关研究较少。为此,本题在已建立 Oddball方案被动条件记录听诱发兔 P3波研究模型基础上,针对与 P3波起源、认知功能紊乱性疾病的发生密切相关的海马结构,从受体亚型、递质、细胞与分子水平探讨该结构内 NMDAR GABAAR GABABR活动及病理条件下 Glu, GABA, NO等变化对兔 P3波的影响机制。

主要方法、结果与结论如下:

(1)采用海马 CA1区微量注入 GABAAR选择性拮抗剂 Bicuculline, GABABR激动剂 BacLofen,观察 GABA受体亚型对兔 P3波的作用。结果发现: Bicuculline(3.6.12 umol/L)呈一定量效依赖衰减 P3b波电压振幅, Baclofen(6.25 12.5 25 mmol/L)呈明显量效依赖延长、阻抑 P3b波。外源性 GABA (100 mmol/L)可翻转 Bicuculline(12 umol/L)、Baclofen(25 mmol/L)对 P3b波振幅的抑制,但其潜伏期延长。结果提示:海马 CA1区 GABAAR IPSP可能即是 P3b波振幅的重要组成。CA1区 GABABR的活动可通过减弱 P3b波发生相关神经元兴奋的易化,故主要延长其潜伏期,最终也可完全抑制 P3b波。外源性 GABA可通过增强 GABAAR IPSP使 P3b波电压振幅恢复,但同时作用于 GABABR等,又延长其潜伏期。

(2)采用 NMDAR竞争性拮抗剂 AP-5(3.125 6.25 12.5 mmol/L)在海马 CA1、CA3区微量注入,以推测 NMDAR EPSP活动对兔 P3波的作用。结果发现: AP-5在 CA1区呈一定量效依赖延长 P3a波潜伏期。AP-5在 CA1、CA3区为明显量效依赖延长 P3b波潜伏期。AP-5在 CA1、CA3区对 P3a、P3b波电压振幅无明显影响。结果提示: CA1区 NMDAR EPSP活动是 P3a波发生相关神经元兴奋的易化因素之一,可能是海马实施对 P3a波潜伏期调节的重要机制。CA1、CA3区 NMDAR EPSP可能共同对 P3b波发生相关神经元兴奋起易化作用,故可影响其潜伏期。

(3)隔区损毁后不同时相点记录兔 P3波电位,随后用 BecKman-6200型高效氨基酸测定仪分析相应海马 Glu, GABA, Asp, Tau含量,并结合分析相关性,研究这些递质变化在 P3波异常中的意义。结果表明:隔损毁后 P3a、P3b波潜伏期、电压振幅分别呈不同程度的延长、衰减。海马 Glu逐渐降低,并与 P3a、P3b波潜伏期延长呈一定意义负相关。GABA下降则与 P3b波振幅变化呈一定意义正相关。在本实验隔损毁后,海马 Asp、Tau无明显变化。结果提示:隔损毁后,海马兴奋性氨基酸 Glu降低,可能通过减弱 P3a、P3b波发生相关神经元的易化与激活使其潜伏期延长。海马抑制性 GABA下降,其相应 IPSP活动减弱可能是 P3b波振幅衰减的原因。海马 Asp、Tau可能未参与隔损毁后兔 P3波损害过程。

(4)隔损毁后不同时相点记录兔 P3波电位,以 bcNOSmRNA原位杂交、NADPH-d组化、Nissl染色技术,结合药物干预手段,观察海马 bcNOS异常表达,推测在此条件下 NO对 P3波可能的影响。结果显示:隔损毁后,海马 bcNOSmRNA、NADPH-d表达逐渐增强、增加,乃至 NADPH-d阳性神经元自身结构紊乱及海马 CA1、CA2区锥体细胞 Nissl体大量溶解、消失。这一病理过程可能与 P3b波的消失有关。在连续应用低剂量非选择性 NOS抑制剂 L-NAME后,可干预上述病理过程,使 P3b波消失延缓。结果提示:隔损毁后诱发海马 bcNOS表达的动态增多、增高,其过量产生的 NO致使 bcNOS神经元自身和海马 CA1、CA2区锥体细胞选择性损伤,该病理过程可能损害 P3b波电位发生的最后环节,可能是隔损毁后 P3b波消失的重要机制。

关键词　P3;海马;递质; NMDAR; GABAAR; GABABR; Glu GABA

中图法分类号　R322.81

(收稿: 1997-12-10;修回: 1997-12-17)

(编辑　王　红)

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