DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.011

Ca^{2+} 在高浓度胰岛素促血管平滑肌细胞增殖中的作用

张学亮* (第三军医大学附属新桥医院内分泌科) 重庆,400037
舒昌达 (重庆医科大学附属第一医院内分泌科) 重庆,400042

提 要 目的:了解 Ca^{2+} 在高浓度胰岛素促血管平滑肌细胞(VSMC)增殖中的作用及钙拮抗剂对其的影响。方法:用含与不含维拉帕米(Ver)的高浓度胰岛素(Ins)DMEM培养液分别培养人血管平滑肌细胞(HVSMC),并以正常糖(5.6 mmol/L葡萄糖)DMEM培养液培养为对照。观察其细胞增殖速度及细胞内游离 Ca^{2+} 水平。结果:100 mu/L、500 mu/L Ins DMEM培养液培养的 HVSMC计数及细胞内游离 Ca^{2+} 水平均显著高于对照($P < 0.001$)。含 10^{-6} mol/L Ver+ 100 mu/L Ins DMEM、10^{-6} mol/L Ver+ 500 mu/L Ins DMEM培养的显著降低($P < 0.05$)。结论:细胞膜上 Ca^{2+} 通道开放、Ca^{2+} 流入细胞内增加导致的细胞内游离 Ca^{2+} 水平增高在高浓度胰岛素促 VSMC增殖中起着重要作用。

关键词 Ca^{2+};血管平滑肌细胞;胰岛素;维拉帕米
中图法分类号 R587.1

动脉粥样硬化的发生与胰岛素(Ins)抵抗状态下的高 Ins血症有关[1],血管平滑肌细胞(VSMC)增殖在动脉粥样硬化发生中起着重要作用。体外培养时,高浓度 Ins具有促进 VSMC增殖的作用[2]。但高 Ins对培养的 VSMC内游离 Ca^{2+} 水平和 Ca^{2+} 通道有无影响及与保 VSMC增殖作用之间的关系还不清楚。本研究通过用含与不含维拉帕米(Ver)的高 Ins DMEM培养液分别培养人 VSMC(HVSMC),了解 Ca^{2+} 及 Ca^{2+} 通道在高 Ins促 VSMC增殖中的作用。

1 材料与方法

人脐动脉平滑肌细胞培养按熊静波等[3]的方法进行。传代后细胞达到一定数量,经计数后,用于实验。取含一定量 HVSMC的细胞培养液 [加药前细胞培养液毫升数 = 加药后细胞计数(×10^8/L)× 加药后细胞培养液毫升数(5ml)÷ 加药前细胞计数],按表中每瓶 5 ml的量,分别加入葡萄糖(Glu)、Ins及 Ver,再加 20% 新生牛血清的 DMEM液到终体积 5 ml,细胞计数为 1×10^8/L,CO_2孵箱 37℃孵育 3.5 d,融合细胞层经胰蛋白酶消化后进行细胞计数。VSMC内游离 Ca^{2+} 测定按 Copalakrishnan等[4]的方法进行[4],Fura-2/AM为上海生理研究所产品。

2 结果

从附表中可以看出,高 Ins培养液培养的 HVSMC计数及细胞内游离 Ca^{2+} 水平均显著高于对照($P < 0.001$);含 10^{-6} mol/L Ver的高 Ins培养液培养的 HVSMC计数及细胞内游离 Ca^{2+} 水平均显著低于无 Ver的高 Ins培养液培养的($P < 0.001$)及对照($P < 0.05$)。

附表 不同浓度 Ins DMEM液培养的 HVSMC计数及细胞内游离 Ca^{2+} 水平($\bar{x} \pm s$)

Table Cell count and free Ca^{2+} level of HVSMC cultured in DMEM with different concentrations of insulin($\bar{x} \pm s$)

DMEM	n	Cell count (1×10^8/L)	$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)
5.6 mmol/L Glu(control)	9	3.83± 0.61	156.80± 18.29
30.7 nmol/L Ins	9	3.89± 0.78	161.88± 18.92
61.5 nmol/L Ins	9	4.00± 0.71	162.88± 15.06
307.5 nmol/L Ins	9	4.33± 0.71	197.47± 39.48*
615.0 nmol/L Ins	9	6.56± 1.01**	309.60± 22.02**
3074.7 nmol/L Ins	9	7.56± 0.88**	320.00± 34.23**
615.0 nmol/L Ins+ 10^{-5} mol/L Ver	9	2.39± 0.78*△△	121.82± 10.14*△△
3074.7 nmol/L Ins+ 10^{-6} mol/L Ver	9	2.56± 1.73*△△	122.63± 17.55*△△

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.001$ vs control;△△: $P < 0.001$ vs HVSMC cultured in DMEM containing 615.0 nmol/L insulin, 3074.7 nmol/L insulin; 1nmol/L insulin = 1.163 mu/L insulin

3 讨论

本结果提示,高 Ins促进 VSMC增殖及增高细胞内游离 Ca^{2+} 水平,这种作用可被 10^{-6} mol/L钙通道阻滞剂 Ver所阻止,表明这种作用主要是通过钙通道开放及 Ca^{2+} 内流增加而实现的。在生理状况下,人空腹血 Ins水平为 30.7~153.8 nmol/L(5~25 mu/L),餐后血 Ins高峰延迟出现且高峰时间延长;因而,615

* 张学亮,男,40岁,主治医师,讲师,博士

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

nmol/L(100 mu/L)相当于 Ins抵抗时的餐后血 Ins高峰水平。高浓度 Ins使 VSMC内 Ca^{2+} 水平增高,使蛋白激酶 C保持最大活性[5],导致 DNA及蛋白质合成,VSMC增殖 Ver是 Ca^{2+} 通道阻滞剂,通过抑制高 Ins的促 Ca^{2+} 内流作用,而起到抑制细胞增殖的作用。因而细胞膜上 Ca^{2+} 通道开放、Ca^{2+} 内流增加使细胞内游离 Ca^{2+} 水平增高在高 Ins促培养的 VSMC增殖中起着重要作用。

参考文献

1 Haffner S M. The insulin resistance syndrome revisited. Diabetes Care, 1996; 19(3): 275

2 Stout R W. Insulin as a mitogenic factor: role in pathogenesis of cardiovascular disease. Am J Med, 1990; (Suppl 2A): 62S

3 熊静波,彭永正,康格非.人脐动脉平滑肌细胞贴块培养法.重庆医科大学学报, 1996; 21(4): 311

4 Copalakrishnan V, Xu Y, Sulakhe P V *et al*. Vasopression (V_1) receptor characteristics in rat aortic smooth muscle cells. Am J Physiol, 1991; 261(6): H1927

5 孙志贤.现代生物化学理论与研究技术.北京.军事医学科学出版社, 1995 317~338

(收稿: 1997-06-16;修回: 1997-12-17)

(编辑 汪勤俭)

Role of Ca^{2+} in proliferation of vascular smooth muscle cells promoted by high concentration of insulin

Zhang Xueliang, Shu Changda (Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To explore the role of Ca^{2+} in proliferation of vascular smooth muscle cells promoted by high concentration of insulin and the effects of calcium channel blocker on it. Methods: Human umbilical arterial smooth muscle cells (HVSMCs) were respectively cultured in DMEM with high concentration of insulin (Ex I), DMEM with high concentration of insulin plus 10^{-6} mol/L verapamil (Ex II) and DMEM with 5.6 mmol/L glucose (Control). Cell count and free Ca^{2+} level of HVSMCs were determined. Results: The cell count and free Ca^{2+} level of HVSMCs were significantly higher in Ex I and Ex II than in the control ($P < 0.05$). Conclusion: Elevation of free Ca^{2+} level in HVSMCs caused by opening of calcium ionic channel on cellular membrane and increase of calcium flowing into the cells plays an important role in the proliferation of vascular smooth muscle cells promoted by high concentration of insulin.

Key words Ca^{2+}; proliferation vascular smooth muscle; insulin; verapamil

骨形态发生蛋白修复骨缺损实验研究

An experimental study on the repairment of bone defect with bone morphogenetic protein

谭祖键* 李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科)重庆, 400038

骨缺损修复是骨科一大难题,多年来一直采用骨传导方法。1965年 Urist骨诱导实验的成功及其后骨诱导理论的提出为骨缺损治疗提供了一种新的思路及方法。但因成骨因子 BMP的诱导成骨机制、免疫排斥反应以及理想载体等问题尚未得到根本解决,应用受到很大限制。本研究针对以上问题设计,采用原位杂交、X线片、胶原氨基酸分析、组织学及电镜观察等手段,初步探讨了 BMP诱导成骨过程中 TGFβ1的 mRNA表达,从氨基酸水平观察了诱导成骨的组织衍化过程,检测了异种 BMP的免疫排斥反应及 TGFβ1的免疫抑制作用,进行了聚乳酸 PLA作为 BMP载体的可行性研究及成骨效果观察,结论如下。

(1) TGFβ1是一种重要的骨生长调节因子,其在缺损内的含量可以间接反应成骨能力的强弱,本实验发现在骨缺损修复早期,组织内有 TGFβ1的 mRNA高效表达,BMP可使这种表达明显增强,但其能否翻译、以蛋白形态发挥生物功能有待于进一步研究。但这至少给我们以下揭示:在 BMP诱导成骨过程

(下转 36页)

* 谭祖健,男,34岁,主治医师,博士研究生

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