

## 胰岛素样生长因子 1 受体抗体对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

苏海霞, 盛净, 刘德莉, 夏万尧, 成静, 陈朝婷

(上海第二医科大学附属第九人民医院老年科, 上海市 200011)

[关键词] 内科学; 抑制平滑肌细胞增殖; 免疫细胞化学; 胰岛素样生长因子 1 受体抗体; 大鼠颈总动脉; 再狭窄

[摘要] 目的 观察胰岛素样生长因子 1 受体抗体对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响。方法 球囊导管损伤大鼠一侧颈总动脉, 7 天后体外培养受损血管的中膜平滑肌细胞, 以损伤侧血管细胞为实验组, 以对侧正常血管中膜平滑肌细胞为对照组; 采用  $\alpha$ -actin 免疫细胞化学法进行细胞鉴定; 在细胞的培养悬液中加入不同浓度的胰岛素样生长因子 1 受体抗体作用 24 h, 然后采用 5-溴-2-脱氧尿苷细胞增殖检测法检测细胞的增殖程度。结果 大鼠颈总动脉球囊损伤后, 体外培养的中膜平滑肌细胞表现出显著的增殖性(与对照组比较,  $P < 0.01$ ); 胰岛素样生长因子 1 受体抗体可以显著抑制大鼠平滑肌细胞的增殖, 呈现出浓度依赖性特征(组间比较,  $P < 0.01$ )。结论 胰岛素样生长因子 1 受体抗体具有抑制平滑肌细胞增殖的作用, 有望用于治疗平滑肌细胞增殖性疾病。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Effect of Insulin Like Growth Factor-1 Receptor Antibody on Rat Carotid Smooth Muscle Cell Proliferation

SU Hai-Xia, SHENG Jing, LIU De-Li, XIA Wan-Yao, CHENG Jing, and CHEN Zhao-Ting

(Department of Geriatrics, the 9th Shanghai Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China)

[KEY WORDS] Insulin Like Growth Factor-1 Receptor Antibody; Rat; Carotid; Restenosis; Immunocytochemical; Smooth Muscle Cell Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of insulin like growth factor-1 receptor antibody on vascular smooth muscle cell proliferation. **Methods** Seven days after balloon injury, rat's carotid arteries were harvested, smooth muscle cell were cultured in vitro and were evaluated by  $\alpha$ -actin immunocytochemical method. The effects of insulin like growth factor-1 receptor antibody on smooth muscle cell proliferation were observed by BrdU immunocytochemical methods. **Results** Smooth muscle cell derived from injured arteries shows higher proliferation compared with those from normal arteries ( $P < 0.01$ ), insulin like growth factor-1 receptor antibody monoclonal antibody can inhibit smooth muscle cell proliferation concentration dependently ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Insulin like growth factor-1 receptor antibody can inhibit smooth muscle cell proliferation, which deserves to be researched deeply.

平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖是高血压、冠心病和血管成形术后再狭窄等许多心血管疾病的重要病理基础<sup>[1]</sup>, 抑制 SMC 增殖是目前许多研究的主要方向, 越来越多证据表明, 胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)能促进血管 SMC 增殖和心血管疾病的发生和进展<sup>[2]</sup>, 因此作者使用胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)的单克隆抗体对体外培养的 SMC 进行干预, 观察其对 SMC 增殖程度的影响。

[收稿日期] 2005-04-06 [修回日期] 2005-11-30

[作者简介] 苏海霞, 硕士, 主治医师, 研究方向为老年内科学, 联系电话为 020-63138341-5193, E-mail 为 songsum9@sina.com。盛净, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为老年心血管内科学, 联系电话为 020-63138341-5193。刘德莉, 主任技师, 教授, 研究方向为分子生物学技术, 联系电话为 020-63138341-5107。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

IGF-1R $\alpha$  抗体由 Santa Cruz Biotechnology (Inc) 提供; BrdU Cell Proliferation Assay kit 系原癌基因研究产品; F-12 培养基系 GIBCOBRL 生产; 超净台由上海组织工程实验室提供; 小鼠抗人平滑肌-actin 抗体系 DAKO 公司产品。

#### 1.2 动物模型的建立

SD 雄性大鼠 6 只(由上海农学院提供), 体重 300~350 g, 2.5% 戊巴比妥钠麻醉(50 mg/kg)下分离颈总动脉至分叉处; 用动脉夹夹闭左颈总动脉, 自颈外动脉刺入球囊导管, 扩张球囊来回拖拉剥脱内皮, 退出导管, 结扎颈外动脉, 松开动脉夹恢复血流; 关闭手术切口, 动物送动物房继续喂养。

### 1.3 平滑肌细胞培养和鉴定

球囊损伤后第7天无菌条件下取出双侧颈总动脉,分别立即置于4℃ PBS中反复清洗,剥除血管外膜和内膜,剪成1 mm<sup>3</sup>组织块,铺于无菌培养皿,加培养基,置入5% CO<sub>2</sub>、37℃饱和湿度孵育箱内培养。3~7天待细胞长至70%汇合后,用0.25%胰蛋白酶进行消化传代。取2~8代细胞进行检测。

培养后的细胞95%丙酮固定,0.25% TritonX-100、5% DMSO-PBS和0.75% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS消除非特异因素,绵羊血清封闭非特异性抗原,滴加一抗4℃过夜,加生物素化二抗,DAB显色,苏木精胞核衬染,迅速过盐酸-酒精分化,酒精梯度脱水,二甲苯透明,树胶封片,光镜观察。

### 1.4 细胞增殖的测定

0.25%胰蛋白酶常温消化使细胞悬浮,PBS调细胞数为1×10<sup>8</sup>/L,接种于96孔板,培养12h后按照BrdU细胞增殖检测试剂盒中的步骤进行检测。每孔细胞加BrdU Label 20 μL;37℃培育12h;弃BrdU Label,加入200 μL固定/变性液,室温作用30min;弃固定/变性液,4℃保存一周;加100 μL抗BrdU抗体,室温作用1h;弃BrdU抗体,Wash Buffer充分洗涤;加过氧化物酶标记的二抗100 μL,室温作用30min;弃二抗液,Wash buffer充分洗涤;加入dH<sub>2</sub>O作用5min;弃dH<sub>2</sub>O加入显色液100 μL,于黑暗中室温作用15min;加终止液终止显色;30min内酶标仪检测吸光率,波长450~540 nm。

实验组和对照组各6盘细胞,每盘细胞复种16孔,均按照上述步骤进行细胞增殖检测,每盘细胞取平均值进行统计分析。

参照文献[3]方法选择IGF-1受体抗体的浓度梯度为0、10、50、100 μg/L和150 μg/L,取实验组6盘细胞,每盘细胞复种90孔,加入不同浓度的IGF-1R抗体,每个浓度复种18孔,之后按照上述步骤进行细胞增殖检测,每个浓度取平均值进行统计分析。

### 1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性比较采用单因素方差分析,由SAS统计软件完成。

## 2 结果

### 2.1 球囊损伤后大鼠颈总动脉组织学变化

大鼠颈总动脉球囊损伤后,未见明显炎症细胞粘附和血栓形成,中膜SMC增殖旺盛,新生内膜和中膜连成一体,血管壁的主要细胞成分是SMC,一周内血管壁增厚达正常的3~4倍<sup>[11]</sup>。

### 2.2 平滑肌细胞的体外培养和鉴定结果

组织块培养3~7天后,发现SMC呈圆形,透明,贴壁后细胞向两极伸展,形成梭形或不规则三角形,中央为椭圆形的细胞核,胞质向外伸出突起。细胞大量自组织块上涌出,形成火焰状外观(图1)。

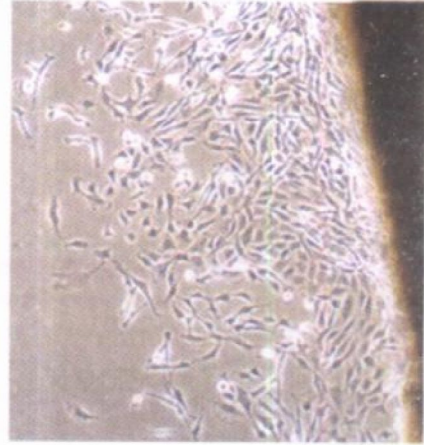


图1. 大鼠颈动脉平滑肌细胞原代培养(HE×100)

SM  $\alpha$ actin免疫细胞化学反应显示,在对照组SMC,胞浆内可见大量染成棕色的肌丝,颜色深而浓;在实验组SMC,胞浆内也有染色成黄棕色的肌丝,但颜色浅而稀薄(图2)。显示出收缩型和合成型SMC的特征。

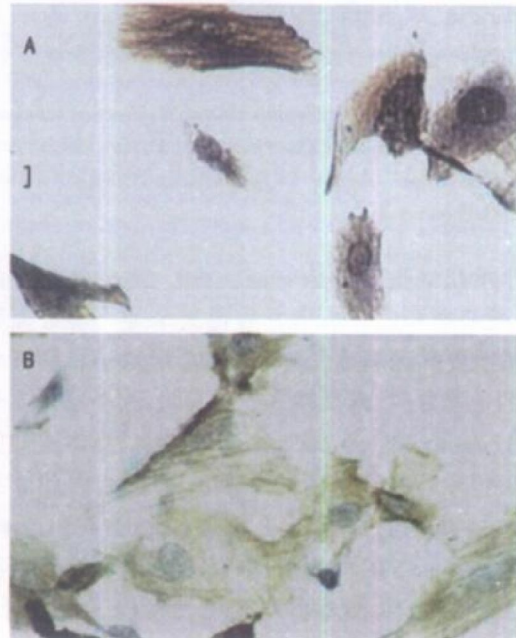


图2. 大鼠颈动脉平滑肌细胞 $\alpha$ actin免疫细胞化学结果  
A为对照组,B为实验组。

### 2.3 不同组平滑肌细胞增殖程度的比较

如表1所示,与对照组相比,实验组SMC增殖

率明显增高 ( $P < 0.01$ ), 加入 IGF-1R 抗体后, 细胞增殖率降低, 50  $\mu\text{g/L}$  时开始起效, 浓度越高, 降低越明显, 呈浓度依赖性特征 ( $P < 0.01$ )。

表 1. 各组平滑肌细胞增殖程度的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	VSMC 吸光率
对照组	0.72 $\pm$ 0.12
实验组	
0 ( $\mu\text{g/L}$ )	1.43 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
10 ( $\mu\text{g/L}$ )	1.35 $\pm$ 0.20
50 ( $\mu\text{g/L}$ )	1.02 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
100 ( $\mu\text{g/L}$ )	0.62 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
150 ( $\mu\text{g/L}$ )	0.41 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较, b 为  $P < 0.01$ , 与前一浓度比较。

### 3 讨论

正常血管 SMC 呈非增殖性的收缩表型, 在神经及激素刺激下调节血管壁张力, 维持组织血流量。血管壁损伤后, SMC 转化为合成型, 合成分泌多种血管活性物质、生长因子及细胞外基质, 自身 SMC 肥大、增殖和迁移, 最终导致血管壁增厚、管腔狭窄、血管顺应性降低和血管重构, 在高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等血管平滑肌增殖性疾病的发生与发展中起重要作用<sup>[4]</sup>。

球囊损伤后引发的血管 SMC 表型和功能改变过程中, IGF-1 起着重要作用。IGF-1 系统包括 IGF-1、IGF-1R 和其结合蛋白 (IGFBP), 主要通过自分泌/旁分泌的方式影响血管。在大鼠颈总动脉损伤后生成的新生内膜中, 可以检测到 IGF-1 的免疫活性远远高于正常 VSMC, 特别是在血管损伤后的早期; RT-PCR 发现: 在人类再狭窄病变组织中, IGF-1 和 IGFBP-1~5 的 mRNA 均增多; 在 IGF-1 过度表达的转基因鼠 VSMC 增殖活跃。血管损伤后 VSMC 的增殖还涉及到多种生长因子和细胞因子及一系列基质蛋白和细胞外蛋白酶的协同作用, 他们共同调节 SMC 的表型改变和增殖反应, 如 PDGF、FGF、Ang<sup>①</sup> 以及凝血酶等, 但它们的作用过程均离不开 IGF-1 的参与<sup>[5]</sup>。所以, IGF-1 不仅是 SMC 强有力的分裂促进剂和化学趋化剂, 而且也是 SMC 增殖促进因子。

胰岛素样生长因子 1 通过 IGF-1R 发挥作用。IGF-1R 是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白质, 由两个  $\alpha$  亚单位和两个  $\beta$  亚单位组成。 $\alpha$  亚单位位于细胞膜外侧,  $\beta$  亚单位位于细胞膜内侧, IGF-1 首先与  $\alpha$  亚单位结合, 将信号传递细胞内, 启动细胞内一系列的信号传递级联反应, 具体的传递机制尚不

清楚。研究结果发现, 可能的机制有如磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI<sub>3</sub>-kinase) 途径<sup>[6]</sup>、细胞膜 1 型基质金属蛋白酶 (MT1-MMP) 途径<sup>[7]</sup>、有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 途径<sup>[8]</sup>、整合素  $\alpha$  (v $\beta$ 3) 途径<sup>[9]</sup> 等。最近, 国外有研究使用转基因方法竞争抑制 IGF-1R, 不仅促进 VSMC 凋亡, 抑制 VSMC 分裂, 而且显著抑制血管新生内膜增生, 显示了良好的前景<sup>[10]</sup>。

以前的研究表明, 大鼠 SMC 增殖性强, 适合用于 SMC 增殖性疾病的研究<sup>[11]</sup>, 所以作者选择大鼠建立颈总动脉球囊损伤模型, 体外培养受损动脉 SMC, 然后加入不同浓度的 IGF-1R 单克隆抗体, 观察 SMC 增殖能力的改变。结果发现, 大鼠颈总动脉球囊损伤后, 体外培养的中膜 SMC 继续表现出旺盛的增殖性 (与对照组相比,  $P < 0.01$ ); IGF-1R 单克隆抗体可以明显抑制大鼠 SMC 的增殖, 浓度越高抑制作用越强, 呈现出浓度依赖性特征 ( $P < 0.01$ )。因此作者认为, IGF-1R 抗体具有抑制 SMC 增殖的作用, 有望用于治疗 SMC 增殖性疾病, 值得进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Pauletto P, Sartore S, Pessina AC. Smooth muscle cell proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis [J]. *Clin Sci*, 1994, **87**: 467-479
- [2] Antoni BG, Cheryl AC, Robert SS. Insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis [J]. *Circ Res*, 2000, **86**: 125-130
- [3] 庞荣清, 潘兴华, 龙沛然. 灯盏花素对兔血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 395-398
- [4] 苏海霞, 盛净. 血管损伤后平滑肌细胞表型转变及其研究进展 [J]. *国外医学·心血管病学分册*, 2002, **29** (1): 10-12
- [5] Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (3): 435-444
- [6] Zahradka P, Litchie B, Storie B, Helwer G. Transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by angiotensin II mediates downstream signaling from the angiotensin II type 1 receptor to phosphatidylinositol 3-kinase [J]. *Endocrinology*, 2004, **145** (6): 2 978-987
- [7] Stawowy P, Kallisch H, Kilimnik A, Margeta C, Seidah NG, Chretien M, et al. Proprotein convertases regulate insulin-like growth factor I-induced membrane type 1 matrix metalloproteinase in VSMC via endoproteolytic activation of the insulin-like growth factor-1 receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321** (3): 531-538
- [8] Xin X, Hou YT, Li L, Schmiedlir Ren P, Christman GM, Cheng HL, et al. IGF-I increases IGFBP-5 and collagen alpha1(I) mRNAs by the MAPK pathway in rat intestinal smooth muscle cell [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, **286** (5): G777-783
- [9] Maile LA, Clemmons DR. The alphaV beta3 integrin regulates insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor phosphorylation by altering the rate of recruitment of the Src-homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase 2 to the activated IGF-I receptor [J]. *Endocrinology*, 2002, **143** (11): 4 259-264
- [10] Lim HJ, Park HY, Ko YG, Lee SH, Cho SY, Lee EJ, et al. Dominant negative insulin-like growth factor-1 receptor inhibits neointimal formation through suppression of vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and induction of apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **325** (3): 1 106-114
- [11] 苏海霞, 盛净. 大鼠和兔颈动脉再狭窄模型比较 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 332-334 (此文编辑 朱雯霞)