

胰岛素对血管平滑肌细胞增殖和组织型纤溶酶原激活剂及抑制物活性的影响

刘江华 刘宗汉^① 陈国强^② 张彤^① 文格波
(衡阳医学院附属第一医院内科, 衡阳 421001)

Effects of Insulin on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and the Activity of Tissue Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor

LIU Jiang-Hua, LIU Zong-Han, CHEN Guo-Qing, ZHANG Tong and WEN Ge-Bo
(Department of Internal Medicine, The First Affiliated Hospital, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim To determine the effects of insulin on proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and activity of tissue type plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor (PAI).
Methods The cell proliferation was detected by ³H-thymidine (³H-TdR) incorporation. The activity of tPA and PAI were determined by spectrophotometric assay.
Results Insulin increased the activity of PAI and stimulated cell proliferation. There was no activity of tPA in porcine VSMC.
Conclusion Hyperinsulinemia could be one of the important factors in causing atherosclerosis.
KEY WORDS Insulin; Vascular smooth muscle cells; Tissue type plasminogen activator; Plasminogen activator inhibitor

摘要 以体外培养的猪主动脉平滑肌细胞为实验对象,研究了不同浓度胰岛素对细胞增殖和组织型纤溶

酶原激活剂及抑制物活性的影响。细胞增殖检测采用氚标脱氧胸腺嘧啶核苷掺入法,组织型纤溶酶原激活剂及其抑制物活性测定采用底物显色法。结果发现胰岛素促进血管平滑肌细胞增殖,刺激纤溶酶原激活剂抑制物活性增加,均呈剂量依赖性。而组织型纤溶酶原激活剂活性在猪血管平滑肌细胞体外培养液中不存在,且与胰岛素的刺激与否及作用浓度、时间均无关。此结果提示高胰岛素血症可能是致动脉粥样硬化主要危险因素之一。
关键词 胰岛素; 血管平滑肌细胞; 组织型纤溶酶原激活剂; 纤溶酶原激活剂抑制物

近年来三次规模庞大的前瞻性研究表明^[1]。高胰岛素血症是致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的一个重要独立危险因素。临床研究也发现高血浆胰岛素水平人群冠心病发病率比一般人群高2~3倍^[2],且高胰岛素血症与As发生呈正相关。然而,其确切作用机制至今尚未完全清楚。鉴于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是As斑块中主要的细胞成分。尤为重要的是研究表明,VSMC在As形成中起关键性作用^[3]。为此,我们以体外培养的猪VSMC为实验对象,研究了不同浓度胰岛素对血管平滑肌细胞增殖和组织型纤溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator, tPA)及其抑制物(plasminogen activator inhibitor, PAI)活性的影响,旨在进一步阐明高胰岛素血症致As的可能机制。

1 材料和方法

1.1 血管平滑肌细胞培养与鉴定

取猪胸主动脉以组织贴块法进行VSMC培养,于

① 衡阳医学院心血管病研究所
② 上海市血液病研究所

光镜和电镜下进行鉴定^[4]。选择生长良好的第三代 VSMC 进行实验。

1.2 含胰岛素条件培养液的配制

胰岛素(北京药品生物制品检定所产品,规格 27 ku/g)的标准液以生理盐水配制。实验时以含 5% 胎牛血清的 M199 培养液(购自 Gibco 公司)配制成含不同浓度(0~1.0 mg/L)胰岛素的条件培养液。

1.3 血管平滑肌细胞增殖的测定

应用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法。将 VSMC 以细胞数 5×10^4 /孔接种于培养板内。然后加入含不同浓度胰岛素的条件培养液及氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-thymine deoxyribonucleotide, ³H-TdR, 购自上海原子能研究所) 37 kBq/孔,继续培养 24 h 后,常规消化,制成细胞悬液。取一定量悬液以 Lowry 法测细胞蛋白含量,其它细胞悬液以多头细胞收集器把细胞收集于 49 型玻璃纤维滤纸上,烘干后加闪烁液,以 β -液体闪烁仪测定 cpm 值。

1.4 组织型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原激活剂抑制物的活性测定

将 VSMC 以细胞数 5×10^4 /孔接种于 Corsta 培养板内,常规培养过夜。然后换含 1% 胎牛血清的 M199 培养液继续培养 72 h,以使细胞能同步于 G₀ 期。用无 Ca²⁺和无 Mg²⁺的 Hank's 液清洗二遍,将含不同浓度胰岛素条件培养液加入培养孔内。培养一定时间后,小心吸取培养液,离心(1 000 r/min, 10 min),收集上清液以 S₂₃₉₀ 发色底物显示法(测定盒由上海医科大学分子遗传学研究室提供),测定 tPA 及 PAI 活性。最后在培养液已取出的各培养孔内加入 0.1 mol/L 的 NaOH (含 0.1% 十二烷基磺酸钠)溶解细胞。按 Lowry 法测细胞蛋白含量。

1.5 统计学处理

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均值差异采用 *t* 检验。量效关系间作线性相关分析。

2 结果

2.1 胰岛素对血管平滑肌细胞增殖与 DNA 合成的影响

血管平滑肌细胞与不同浓度胰岛素及³H-TdR 共同孵育 24 h,³H-TdR 掺入结果见表 1 (Table 1)。可见胰岛素刺激 VSMC 的 DNA 合成,细胞增殖,且呈现剂量依赖性。细胞增殖量与胰岛素浓度呈正相关($r=0.768, P<0.01$)。

Table 1. Effect of insulin on DNA synthesis of VSMC ($\bar{x} \pm s$).

Insulin(mg/L)	n	MCP m/g cell protein
Control	8	51.58±5.67
0.001	8	56.16±4.34 ^a
0.01	8	69.25±1.81 ^b
0.1	8	73.58±1.80 ^b
1.0	8	83.53±4.43 ^b

a: $P>0.05$, b: $P<0.001$; compared with control group.

2.2 胰岛素对血管平滑肌细胞中纤溶酶原激活剂抑制物活性的影响

血管平滑肌细胞(VSMC)与不同浓度胰岛素共同孵育 24 h,检测培养液中 PAI 活性。结果见表 2 (Table 2)。可见胰岛素促使 VSMC 的 PAI 活性增加,其最低效应浓度为 0.01 mg/L ($P<0.01$)。PAI 活性与胰岛素浓度呈正相关($r=0.664; P<0.01$)。

Table 2. Effect of insulin on the activity of PAI produced by VSMC ($\bar{x} \pm s$).

Insulin (mg/L.)	n	Activity of PAI (kAu/g cell protein)
Control	8	16.94±1.84
0.001	8	17.63±1.49 ^a
0.01	8	31.64±1.28 ^b
0.1	8	41.01±2.32 ^b
1.0	8	44.30±1.53 ^b

a: $P>0.05$, b: $P<0.001$; compared with control group.

血管平滑肌细胞(VSMC)与含 0.1 mg/L 胰岛素及不含胰岛素(对照组)的培养液分别孵育 6 h、12 h、24 h 及 48 h 后,检测培养液中 PAI 的活性。结果见表 3 (Table 3)。可见胰岛素组 PAI 活性随孵育时间延长而增加,在 24 h 接近峰值。虽然 48 h 的 PAI 活性较 24 h 稍有增加,但无统计学意义($P>0.05$)。对照组 PAI 活性在各时相变化不大。除 6 h 外,其余各时相胰岛素组 PAI 活性均高于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。

2.3 胰岛素影响组织型纤溶酶原激活剂活性

本组研究显示体外培养的猪 VSMC 培养液中不存在 tPA 活性,且与胰岛素的刺激与否及作用的浓度和时间无关。

Table 3. The change in the activity of PAI(kAu/g cell protein) stimulated by insulin ($\bar{x}\pm s$, n).

Groups	6 h	12 h	24 h	48 h
Control	14.93 \pm 0.96(4)	15.90 \pm 1.58(4)	16.74 \pm 2.05(8)	17.24 \pm 0.58(4)
Insulin(0.1 mg/L)	15.83 \pm 2.08(4)	22.75 \pm 1.98 ^b (4)	41.01 \pm 2.32 ^c (6)	42.15 \pm 1.83 ^c (4)

b, $P<0.01$, c, $P<0.001$; compared with control group.

3 讨论

高胰岛素血症的病理学意义已受到广泛重视。现越来越多证据提示高胰岛素血症可能是糖尿病,肥胖,高血压及高脂血症致As的一个共同危险因子。但高胰岛素血症参与As形成机制至今尚未完全间明。

最近研究结果揭示高胰岛素血症患者普遍存在的纤溶活性降低是因为血浆PAI水平升高所致。Juhan等^[5]发现人血浆PAI水平与空腹胰岛素水平间存在显著正相关,进一步研究则发现胰岛素对体外培养的人血管内皮细胞的PAI生成并无影响^[6]。由于纤维蛋白在血管壁的沉积和影响血管内膜纤维蛋白溶解的活性物质tPA与PAI间平衡失调在As形成中具有十分重要作用,且血管VSMC分泌的PAI对血管壁局部纤溶调节具有重要意义。那么,高胰岛素血症是否可能通过影响VSMC的PAI生成而致纤溶活性降低呢?本组研究结果予以了证实。且进一步发现胰岛素刺激VSMC的PAI活性增加呈现剂量依赖性。本组研究还显示猪VSMC体外培养液中不存在tPA活性,且与胰岛素的刺激与否及作用时间、浓度均无关。因此,胰岛素刺激VSMC的PAI活性增加和tPA活性变化无关。

大血管内皮细胞虽然也存在胰岛素受体,但胰岛素对这些细胞的代谢与增殖并无作用。内皮细胞只能作为保护细胞,免受循环中胰岛素影响,而VSMC是As形成的关键细胞。所以推测高胰岛素血症可能是通过作用VSMC这一环节促使As形成。这设想已得到本组系列研究的支持,并揭示了高胰岛素血症致As的几个可能的重要作用途径。当血管内皮细胞因某些因素作用受损伤时,胰岛素就能直接作用

于血管壁中膜VSMC,引起VSMC增殖,且向内膜游移;增加PAI活性,抑制纤溶活力,导致纤维蛋白沉积于血管壁;同时高胰岛素血症可能直接改变生物膜脂质成份,使之易受氧自由基攻击,发生脂质过氧化,产生大量脂过氧化物(LPO)^[7],同时抑制VSMC的前列环素(PGI₂)生成^[4],促使血液凝固性增加,诱发血栓形成;从而促使As的发生发展。

参考文献

1 Fontbonne A, Charles MA, Thibult N, et al. Hyperinsulinaemias a predictor of coronary heart disease mortality in a healthy population; the Paris prospective study, 15 year follow-up. *Diabetologia*, 1991, **34**: 356.

2 King GL, Goodman AD, Buzney S, et al. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulin-like growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J Clin Invest*, 1985, **75**: 1 028.

3 Ryuichi Fujiwara, Tsuguhiko Nakai. Effects of glucose, in-smlin, and insulin-like growth factor-I on glucose transport activity in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1996, **127**: 49~57.

4 刘江华, 刘宗汉, 陈国强, 等. 胰岛素对猪主动脉平滑肌细胞的增殖和前列环素合成的影响. *中国糖尿病杂志*, 1995, **3**: 148.

5 Juhan Vague I, Alessi MC, Vague P, et al. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between resistance and atherothrombosis. *Diabetologia*, 1991, **34**: 458~460.

6 Alessi MC, Juhan-Vague I, kooistra T, et al. Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 by the human hepatocellular cell line HepG2. *Thromb Haemostas*, 1988, **60**: 491~494.

7 刘江华, 刘宗汉, 陈国强, 等. 胰岛素对猪主动脉平滑肌细胞内LPO含量及其生成PGI₂的影响. *当代医师杂志*, 1996, **1**: 24~25.

(1997-12-04 收到, 1998-02-21 修回)