

# 胰岛素对大鼠平滑肌细胞表达 MMP-9、TIMP-1 及内皮细胞表达 sES 的影响

葛晨亮, 刘厂辉, 唐振旺, 吴洁, 苏华, 王刚, 占凡, 谢楠, 陈仲

( 南华大学附属第一医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001 )

[关键词] 胰岛素; 基质金属蛋白酶 9; 组织抑制因子 1; E-选择素

[摘要] 目的 探讨胰岛素对 SD 大鼠平滑肌细胞表达基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、组织抑制因子 1(TIMP-1) 以及内皮细胞表达可溶性 E-选择素(sES) 的影响。方法 原代培养 SD 大鼠颈内动脉平滑肌细胞及主动脉内皮细胞, 用不同剂量的胰岛素作用后, 以酶联免疫吸附实验(ELISA) 分别测定上清液 MMP-9、TIMP-1 及 sES 的水平。结果 与对照组(无胰岛素) 相比, 胰岛素组 MMP-9 及 sES 水平显著增高, TIMP-1 则显著降低( $P < 0.05$ )。经 Pearson 相关分析显示, 胰岛素浓度与 MMP-9( $r = 0.815, P < 0.001$ ) 及 sES( $r = 0.841, P < 0.001$ ) 呈正相关, 与组织抑制因子 1( $r = -0.740, P < 0.001$ ) 呈负相关。结论 胰岛素促进 SD 大鼠平滑肌细胞 MMP-9 及内皮细胞 sES 表达, 抑制平滑肌细胞 TIMP-1 表达, 并呈剂量依赖性。

[中图分类号] R543.3

[文献标识码] A

## Effect of Insulin on the Expression of MMP9 and TIMP-1 Released from Smooth Muscle Cells and E-selectin Released from Endothelial Cells in SD Rats

GE Chen-Liang, LIU Chang-Hui, TANG Zhen-Wang, WU Jie, SU Hua, WANG Gang, ZHAN Fan, XIE Nan, and CHEN Zhong

(Cardiovascular Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Insulin; Metalloproteinase-9; Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1; E-selectin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of insulin on expression of MMP-9, TIMP-1 and sES. **Methods** Primary cultured smooth muscle cells from the internal carotid artery and endothelial cells from the aorta of SD rats treated with different doses of insulin, MMP-9, TIMP-1 and sES released by cells into medium were quantified by ELISA. **Results** MMP-9 and SES levels were higher in insulin group compared with control group, while TIMP-1 was less than control group ( $P < 0.05$ ). Significant positive correlation was observed between insulin and MMP-9 ( $r = 0.815, P < 0.001$ ) as well as sES ( $r = 0.841, P < 0.001$ ), negative correlation was observed between insulin and TIMP-1 ( $r = -0.740, P < 0.001$ ). **Conclusion** Insulin augmented the secretion of SES and MMP-9, attenuated the secretion of TIMP-1 in dependence on the concentration.

基质金属蛋白酶家族(matrix metallo-proteinases, MMP)是一系列对细胞外基质各种成分有降解作用的酶类,可以降解动脉壁组织中的胶原及弹力蛋白成分,造成动脉壁重塑,进而使动脉壁逐渐扩张形成动脉瘤<sup>[1-3]</sup>。E 选择素是选择素家族的一员,是在炎症过程中最初出现的黏附分子。已有报道

基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)及 E 选择素(E-selectin, sES)可能与主动脉瘤及冠状动脉扩张的发生有关<sup>[4-13]</sup>。组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)能够抑制 MMP-9 的作用<sup>[1]</sup>。临床研究发现,与非冠状动脉扩张病人相比,冠状动脉扩张病人血浆胰岛素水

[收稿日期] 2015-08-07

[修回日期] 2015-11-10

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金(B2012-049)

[作者简介] 葛晨亮,硕士研究生, E-mail 为 458590567@qq.com。通讯作者刘厂辉,博士,主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化性疾病、冠心病介入治疗, E-mail 为 liuchanghui1970@yahoo.com。唐振旺,博士,副主任医师,副教授,研究方向为冠心病及心律失常介入治疗, E-mail 为 tzw7902@163.com。

平更高<sup>[14]</sup>,胰岛素能否促进冠脉扩张的形成尚不清楚。在本研究中,我们将观察胰岛素对SD大鼠颈内动脉平滑肌细胞MMP-9、TIMP-1及及主动脉内皮细胞可溶性E选择素(soluble E-selectin,sES)表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

SD大鼠(6~12月龄)雌雄不限,无既往病史,喂养于湿度和温度适中、饮食良好的环境,均由南华大学实验动物中心提供。所有动物实验经南华大学伦理委员会批准。酶联免疫分析试剂盒分别为sES(奥地利Bender-Medsystems公司),MMP-9和TIMP-1(美国Quantikine公司),分光光度以Bio-tech酶标仪测定(A450nm,芬兰)。根据标准管光密度值制定标准曲线,由标准曲线计算样品sES、MMP-9及TIMP-1含量。

### 1.2 细胞培养和处理

因中动脉富含平滑肌细胞,血管平滑肌细胞选用6~12个月龄SD大鼠颈内动脉,严格无菌条件下取单侧颈内动脉,加入5 mL含0.1% I型胶原酶(美国Sigma公司)的无血清DMEM培养液,4℃过夜,收集细胞加入含10%胎牛血清(美国Gibco公司)的DMEM培养液,置37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞生长达80%融合时吸出培养液,进行胰酶

消化传代,经鉴定后第2~3代用于实验。本研究中内皮细胞选用SD大鼠主动脉内皮细胞。无菌条件下取SD大鼠主动脉,将其浸泡于含1×10<sup>6</sup> U/mL肝素钠和20% FBS的DMEM培养基中。去除残余的血管鞘脂肪和结缔组织,剪成宽约2~3 mm的血管环,置于2%明胶预包被的培养皿中,加入含20% FBS,1×10<sup>5</sup> U/L青霉素G,100 mg/L链霉素,1×10<sup>5</sup> U/L肝素的DMEM培养基,置于5% CO<sub>2</sub>(V/V)、37℃培养箱中进行培养,待细胞长至80%-90%融合时,进行胰酶消化传代,经鉴定后第2~3代用于实验。

### 1.3 细胞的鉴定与纯化

血管内皮细胞原代及传代培养过程中,可以诱导成为平滑肌样细胞,因而在培养内皮细胞过程中需仔细鉴定并纯化后再开展实验研究。本研究采用细胞形态学结合免疫细胞荧光的方法鉴定内皮细胞和平滑肌细胞。内皮细胞覆盖在血管腔面,呈单层排列,血管平滑肌细胞在动脉内呈多层排列。体外培养时内皮细胞成典型的铺路石样生长,平滑肌细胞呈“峰-谷”样生长。同时内皮细胞表达CD31,CD31抗体针对的是抗原的胞浆段,故免疫细胞荧光检测呈胞浆鲜红色,平滑肌细胞表达α-SMA和SM22α,这两种抗原均表达在平滑肌细胞的肌丝上,故在免疫细胞荧光染色上,呈现出肌丝的形态,沿细胞的长轴排列(图1)。

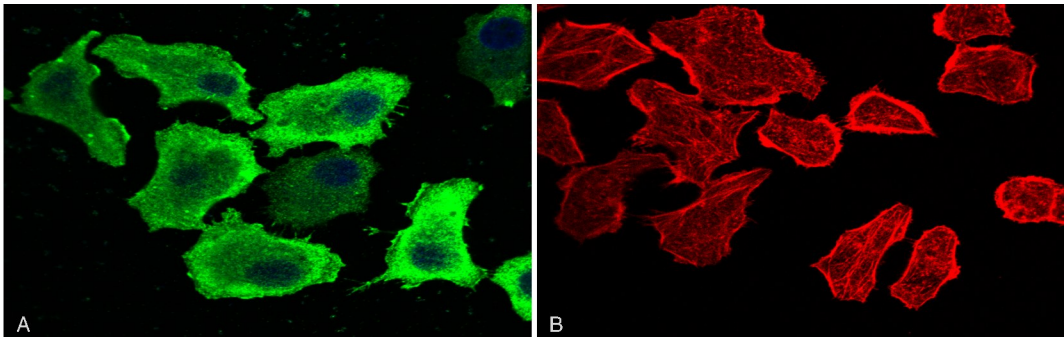


图1. 细胞在显微镜下形态(600×物镜) A为平滑肌细胞,B为内皮细胞。

Figure 1. Appearance of cells under Microscope.

### 1.4 统计学方法

应用SPSS 18.0统计软件包进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数比较用单因素方差分析,两组间比较用LSD-t检验,用Pearson相关分析检验两变量之间关系,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胰岛素对大鼠颈内动脉平滑肌细胞MMP-9和TIMP-1的影响

SD大鼠颈内动脉平滑肌细胞在血糖浓度为10 mmol/L的培养基培养1天后,用不同浓度的胰岛素

直接作用 30 min 后,测定不同胰岛素浓度下 MMP-9、TIMP-1 的水平。与对照组(无胰岛素)比,胰岛素组 MMP-9 的浓度显著增高(图 2A),而 TIMP-1 的浓度显著降低(图 2B)。为排除血糖的干扰,将平滑肌细胞在无糖培养基培养 1 天后,用不同浓度的

胰岛素直接作用于细胞 30 min 后,测定不同胰岛素浓度下 MMP-9 和 TIMP-1 的水平。与对照组(无胰岛素培养基)比,胰岛素组 MMP-9 的浓度显著增高(图 2C),而 TIMP-1 的浓度显著降低(图 2D)。

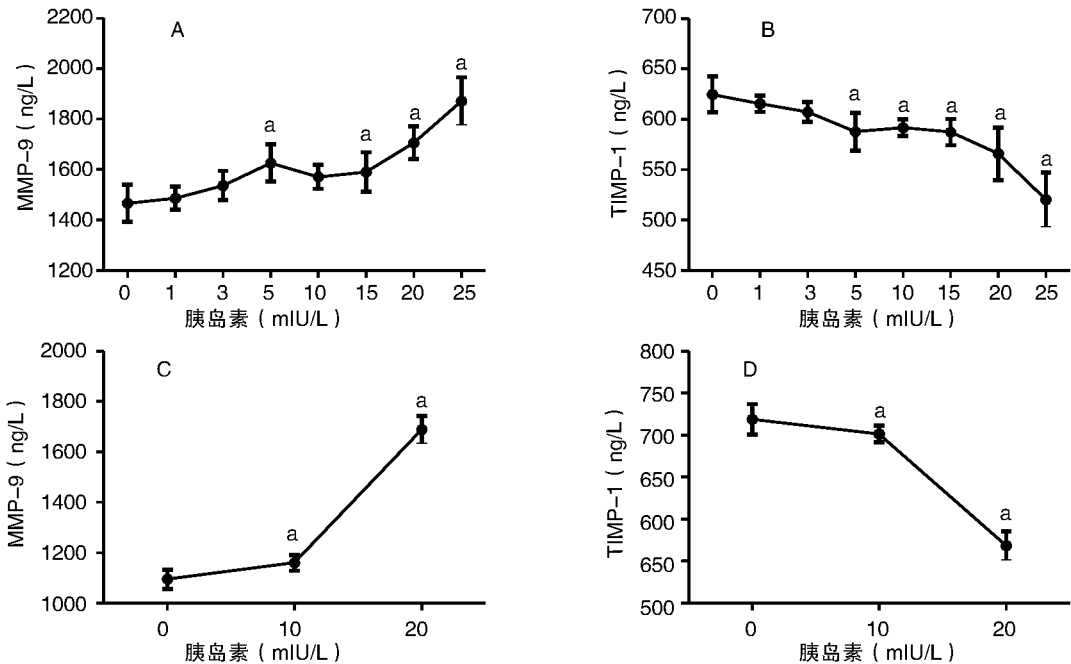


图 2. 胰岛素对 SD 大鼠平滑肌细胞 MMP-9、TIMP-1 表达的影响 A 和 B 培养基中血糖浓度为 10 mmol/L,C 和 D 为无糖培养基。a 为  $P < 0.05$ ,与无胰岛素组相比; $n = 3$ 。

Figure 2. Effect of insulin on expression of MMP-9 and TIMP-1 in SD rats smooth muscle cells

2.2 胰岛素刺激 SD 大鼠主动脉内皮细胞 sES 分泌

SD 大鼠主动脉内皮细胞在血糖浓度为 10 mmol/L 的培养基培养 1 天后,用不同浓度的胰岛素直接作用 30 min 后,测定不同胰岛素浓度下 sES 的含量。与对照组(无胰岛素)比,胰岛素组 sES 的

浓度显著增高(图 3A)。为排除血糖的干扰,将内皮细胞在无糖培养基培养 1 天后,用不同浓度的胰岛素直接作用于细胞 30 min 后,测定不同胰岛素浓度下 sES 的水平。与对照组(无胰岛素培养基)比,胰岛素组 sES 的浓度显著增高(图 3B)。

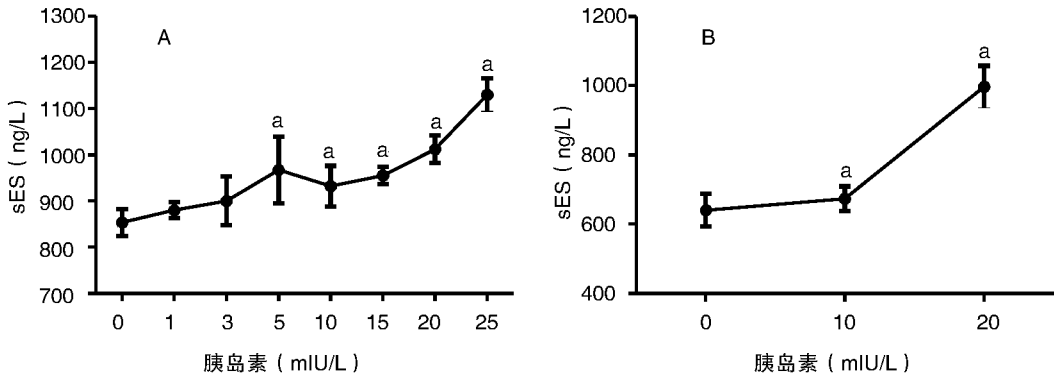


图 3. 胰岛素对大鼠内皮细胞 sES 表达的影响 A 培养基中血糖浓度为 10 mmol/L,B 为无糖培养基。a 为  $P < 0.05$ ,与无胰岛素组相比; $n = 3$ 。

Figure 3. Effect of insulin on expression of sES in SD rats endothelial cells

### 2.3 胰岛素对 MMP-9、sES 和 TIMP-1 表达的影响呈剂量依赖性

经 Pearson 相关分析显示,胰岛素与 MMP-9 ( $r = 0.815, P < 0.001, n = 24$ ) 及 sES ( $r = 0.841, P < 0.001, n = 24$ ) 呈正相关(图 4A 和图 4C),与 TIMP-1

( $r = -0.740, P < 0.001, n = 24$ ) 呈负相关(图 4B)。为探讨 MMP-9、TIMP-1 和 sES 水平随时间变化情况,分别在 30 min、2 h、24 h 测定各指标值,结果显示在 2 h、24 h 时 MMP-9 及 sES 水平明显高于对照组(30 min),TIMP-1 则显著降低(图 4D)。

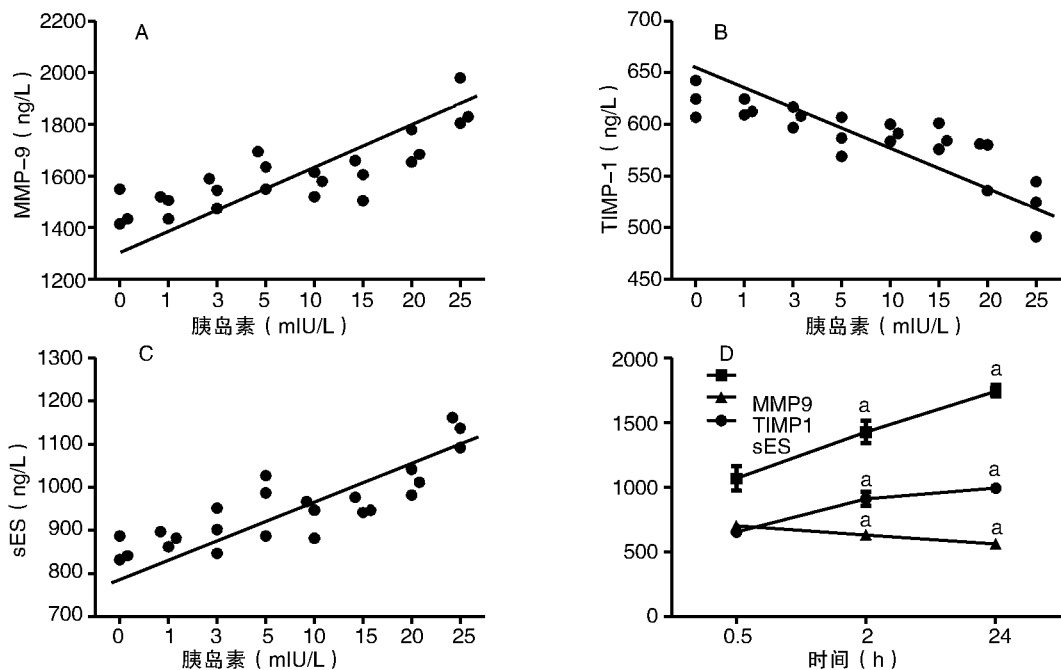


图 4. 胰岛素浓度与 MMP-9、TIMP1 及 sES 的相关性(ABC) 时间对 MMP-9、TIMP-1 及 sES 分泌的影响(D)。 a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比,  $n = 3$ 。

Figure 4. Correlation between insulin and MMP-9, TIMP1, sES. Time course studies on MMP-9, TIMP1 and sES

### 3 讨论

MMP-9 能够降解Ⅲ、Ⅳ型胶原酶,纤维连接蛋白和层黏连蛋白,使细胞外基质增加,并导致弹性肌层破坏降解,进而引起血管顺应性扩张能力增强,导致血管扩张。MMP-9 在主动脉瘤及冠状动脉扩张的发生中发挥了重要作用<sup>[7-8,11,15-17]</sup>。ES 作为黏附分子选择素家族成员之一,其主要介导中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性细胞和血小板与内皮细胞的黏附。研究报道 ES 可能参与冠状动脉扩张形成的病理过程<sup>[5-6,18]</sup>,sES 是内皮细胞膜表面 ES 表达后 24 h 内释放入血的。MMP-9 与 TIMP-1 能够反映平滑肌细胞的受损情况,sES 能反映内皮受损及炎症向中膜的侵犯,选择这三个指标作为检测的标志物,能够反映炎症对血管壁的损伤。

我们发现,胰岛素能刺激 MMP-9 的分泌,这与 Fiscoeder 等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。Arne 等将不同剂量的胰岛素作用于人单核细胞,证明胰岛素能促

进 MMP-9 分泌,并具有浓度依赖性<sup>[19]</sup>。胰岛素与血糖有交互作用,为排除血糖的干扰,我们在无糖环境下观察胰岛素对 MMP-9、TIMP1 及 sES 分泌的影响,证明胰岛素能独立影响 MMP-9、TIMP1 及 sES 的表达。

Murase 等<sup>[14]</sup>通过比较患有冠状动脉扩张与非冠状动脉扩张的家族性高胆固醇血症患者,发现冠状动脉扩张组的血浆胰岛素水平显著高于非冠状动脉扩张组,但两者的血糖水平无明显差异,提示胰岛素可能参与血管扩张的形成。

研究已证明若积极补充胰岛素可延缓冠状动脉弥漫性狭窄病变的进程<sup>[20-21]</sup>,是否与胰岛素升高 MMP-9/TIMP-1 及 sES 有关尚不清楚。在临床中,我们发现,低血浆胰岛素水平的糖尿病患者合并有冠心病时,其冠状动脉虽也表现为弥漫性狭窄及广泛钙化,却极少见到冠状动脉扩张病变,我们推测低胰岛素降低了 MMP-9 及 sES 的表达,进而避免冠状动脉病变向扩张方向发展。



基于本实验仅是一个初步性的探究,因而我们仅检测了胰岛素对细胞分泌功能的影响,以期为我们后续的研究提供一定的理论依据。本实验结果表明胰岛素能独立影响 SD 大鼠血管平滑肌细胞 MMP-9、TIMP1 及内皮细胞 sES 的表达,并在一定浓度范围内呈剂量依赖性;但胰岛素对血管平滑肌细胞及内皮细胞的其它功能是否有一定影响,以及其作用机制如何这些尚不清楚。接下来我们将深入探讨胰岛素对平滑肌细胞的增殖、迁移或分化等相关功能的影响及对内皮细胞结构、炎症等的影响,必要时完善其作用机制的研究,并进一步在动物体内加以证实,从而为冠状动脉扩张及弥漫性狭窄病变的治疗提供新的方向。

胰岛素促进小鼠颈内动脉平滑肌细胞 MMP-9 及 SD 大鼠主动脉内皮细胞 sES 表达,抑制小鼠颈内动脉平滑肌细胞 TIMP-1 的表达,并呈剂量依赖性。

#### [参考文献]

- [1] Papazafropoulou A, Tentolouris N. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases [J]. Hippokratia, 2009, 13(2): 76-82.
- [2] Serra R, Grande R, Montemurro R, et al. The role of matrix metalloproteinases and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in central and peripheral arterial aneurysms [J]. Surgery, 2015, 157(1): 155-162.
- [3] Dahi S, Karliner JS, Sarkar R, et al. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-2 induces coronary artery ectasia [J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(1): 50-56.
- [4] Daoud EM, Abdelaziz AA, Hassan NA. Isolated coronary artery ectasia debate: Inflammation versus atherosclerosis [J]. Egypt Heart J, 2012, 64(4): 185-190.
- [5] Brunetti ND, Salvemini G, Cuculo A, et al. Coronary artery ectasia is related to coronary slow flow and inflammatory activation [J]. Atherosclerosis, 2014, 233(2): 636-640.
- [6] Adiloglu AK, Ocal A, Tas T, et al. Increased expression of CD11a and CD45 on leukocytes and decreased serum TNF-alpha levels in patients with isolated coronary artery ectasia [J]. Clin Lab, 2011, 57(9-10): 703-709.
- [7] Korematsu S, Ohta Y Fau - Tamai N, Tamai N Fau - Takeguchi M, et al. Cell distribution differences of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in patients with Kawasaki disease [J]. Pediatr Infect Dis J, 2012, 31(9): 973-974.
- [8] Zhang T, Xu J, Li D, et al. Salvianolic acid A, a matrix metalloproteinase-9 inhibitor of Salvia miltiorrhiza, attenuates aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Phytomedicine, 2014, 15(10): 1 137-145.
- [9] Chung AW, Au Yeung K, Sandor GG, et al. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and

- 9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome [J]. Circ Res, 2007, 101(5): 512-522.
- [10] Ciavarella C, Alviano F Fau - Gallitto E, Gallitto E Fau - Ricci F, et al. Human Vascular Wall Mesenchymal Stromal Cells Contribute to Abdominal Aortic Aneurysm Pathogenesis Through an Impaired Immunomodulatory Activity and Increased Levels of Matrix Metalloproteinase-9 [J]. Circ J, 2015, 79(7): 1 460-469.
- [11] Zhang T, Xu J, Li D, et al. Salvianolic acid A, a matrix metalloproteinase-9 inhibitor of Salvia miltiorrhiza, attenuates aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Phytomedicine, 2014, 21(10): 1 137-145.
- [12] Dogan A, Tuzun N Fau - Turker Y, Turker Y Fau - Akcay S, et al. Matrix metalloproteinases and inflammatory markers in coronary artery ectasia: their relationship to severity of coronary artery ectasia [J]. Coron Artery Dis, 2008, 19(8): 559-563.
- [13] Triantafyllidi H, Rizos I, Rallidis L, et al. Aortic distensibility associates with increased ascending thoracic aorta diameter and left ventricular diastolic dysfunction in patients with coronary artery ectasia [J]. Heart Vessels, 2010, 25(3): 187-194.
- [14] Murase Y, Yagi K, Kobayashi J, et al. Association of coronary artery ectasia with plasma insulin levels in Japanese men of heterozygous familial hypercholesterolemia with the low-density lipoprotein receptor gene mutation K790X [J]. Clin Chim Acta, 2005, 355(1-2): 33-39.
- [15] Duellman T, Warren Cl Fau - Peissig P, Peissig P Fau - Wynn M, et al. Matrix metalloproteinase-9 genotype as a potential genetic marker for abdominal aortic aneurysm [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2012, 5(5): 529-537.
- [16] Roggerio A, Sambiasi NV, Palomino SA, et al. Correlation of bacterial coinfection versus matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in aortic aneurysm and atherosclerosis [J]. Ann Vasc Surg, 2013, 27(7): 964-971.
- [17] Dogan A, Tuzun N, Turker Y, et al. Matrix metalloproteinases and inflammatory markers in coronary artery ectasia: their relationship to severity of coronary artery ectasia [J]. Coron Artery Dis, 2008, 19(8): 559-563.
- [18] Triantafyllis AS, Kalogeropoulos As Fau - Rigopoulos AG, Rigopoulos Ag Fau - Sakadakis EA, et al. Coronary artery ectasia and inflammatory cytokines; link with a predominant Th-2 immune response? [J]. Journal Article Cytokine, 2013, 64(1): 427-432.
- [19] Fischeoeder A, Meyborg H, Stibenz D, et al. Insulin augments matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes [J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(4): 841-848.
- [20] Kim JA, Montagnani M Fau - Koh KK, Koh Kk Fau - Quon MJ, et al. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms [J]. Circulation, 2006, 113(15): 1 888-904.
- [21] Armato J, DeFronzo RA, Abdul-Ghani M, et al. Successful treatment of prediabetes in clinical practice: targeting insulin resistance and beta-cell dysfunction [J]. Endocr Pract, 2012, 18(3): 342-350.