

胰岛素对血管平滑肌细胞增殖及 原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达的影响

宋钦辉 赵进军 邹颖秀 田野 王岚峰 黄永麟^① 傅世英

(哈尔滨医科大学第二医院心内科, 哈尔滨 150086; ^①第一医院心内科)

Effects of Insulin on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and the Expression of Proto-oncogene *c-fos* and *c-myc*

SONG Qin-Hui, ZHAO Jin-Jun, ZHOU Ying-Xiu,
TIAN Ye, WANG Lan-Feng, HUANG Yong-Lin^① and
FU Shi-Ying

(The Second Hospital of Haerbin Medical University, Haerbin
150086; ^①The First Hospital of Haerbin Medical University,
Haerbin 150001, China)

ABSTRACT

Aim This study is to investigate whether insulin may stimulate the proliferation of vascular smooth muscle cells and the expression of proto-oncogene *c-fos* and *c-myc* in the DMEM which had different concentration insulin.

Methods The human umbilical arterial smooth muscle cells were incubated with the DMEM which had different concentration insulin. (0, 10, 100, 1 000, 10 000 $\mu\text{g/l}$). We used trypan blue staining to count the cells and cultured the third SMC with ³H-thymidine, then determined the DNA in a liquid-scintillation. *c-fos*、*c-myc* mRNA levels were measured by Northern hybridization. The results were showed by tables.

Results The data (Table 1, 2, 3 and 4) showed the cell number, DNA synthesis, *c-fos* mRNA and *c-myc* mRNA all increased with insulin concentration. There is dose-dependent relationship.

Conclusion The results provide that insulin can stimulate the proliferation of vascular smooth muscle cells and the expression of proto-oncogene *c-fos* and *c-myc*.

KEY WORDS Insulin; Smooth muscle cells; Proto-oncogene *c-fos* and *c-myc*

摘要 用³H-胸腺嘧啶核苷掺入实验及细胞计数法等观察了胰岛素对体外培养的人血管平滑肌细胞DNA合成、细胞增殖及原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达的影响。结果发现,在培养基中加入不同浓度的胰岛素后,血管平滑肌细胞增殖,细胞DNA合成增加,原癌基因 *c-fos*、*c-myc* 表达增加,上述三者均具有胰岛素剂量依赖性,呈现量-效关系。实验结果表明,高胰岛素血症可能通过促进平滑肌细胞增殖和原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达和来加速动脉粥样硬化的发生与发展的。

关键词 胰岛素; 原癌基因 *c-fos*、*c-myc*; 血管平滑肌细胞

许多年前人们就发现糖尿病(diabetes)易合并心血管疾病,且糖尿病患者的动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生较早,进展较快^[1]。糖尿病之所以能加速心血管疾病的进展,这或许与高胰岛素血症(hyperinsulinemia)密切相关。人类流行病学的调查结果^[2]及动物糖尿病模型实验结果^[3]均表明高胰岛素血症的产生和作用机制并不完全取决于糖代谢的紊乱。1989年美国学者Reaven将存在高胰岛素血症或胰岛素抵抗性的疾病及代谢紊乱概括统称为Reaven综合征(综合征X),该综合征包括高血压、高血脂、肥胖和糖尿病等^[4~6],而这些疾病及代谢紊乱均为动脉粥样硬化的易患因素和危险因素。高胰岛素血症如何加速动脉粥样硬化的产生与发展,其机理尚不十分清楚,目前除认为高胰岛素血症影响血脂代谢外,还认为它可能影响血管平滑肌细胞的增殖,而血管平滑肌细胞的增殖在动脉粥样硬化病变的发生发展过

程中又处于关键地位^[7]。本文取人脐动脉血管平滑肌细胞体外培养,观察不同浓度的胰岛素对平滑肌细胞增殖的影响及该过程中原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 的表达。

1 材料与方法

1.1 细胞分离和培养

取人脐动脉中层平滑肌组织,将其剪成 1 mm^2 的小块,将这些小块用 0.1% 的胶原酶消化 1~3 h,然后置于含 20% 小牛血清,100 ku/L 的青霉素,100 mg/L 链霉素的 DMEM (购于美国 Grand Island, NW) 培养基中,在 37°C 5% 的 CO_2 培养箱中培养。待细胞长成后,用 0.25% 胰蛋白酶和 0.04% EDTA 溶液等量混合消化传代,传代的平滑肌细胞仍用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液培养。

1.2 平滑肌细胞增殖

取第 3 代平滑肌细胞悬液 $2 \times 10^7/\text{L}$ 分别加入 24 孔细胞培养板中,每孔 0.5 ml,即每孔含 SMC 1×10^4 个,这些细胞先用含 0.5% 小牛血清及 0.25% 牛血清白蛋白的 DMEM 培养 20h,然后换成含有 0、10、100、1 000、10 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的胰岛素的 DMEM 培养基培养 3 天,用 0.25% 胰蛋白酶 0.04% EDTA 混合液消化分离细胞,用 0.1% 台盼蓝 (trypan blue) 染色计数,上述实验重复三次,取其平均值做为实验结果。

1.3 DNA 合成

第三代血管平滑肌细胞在含有各种浓度胰岛素的 DMEM 培养基中培养 24h 后,再加入 2.0 kci/L ^3H -胸腺嘧啶核苷, 37°C 5% CO_2 温箱中培养 6h,培养后,培养板用水冷却,移去培养液,用 10 ml PBS 缓冲液对单层细胞冲洗四次后细胞浸于 3 ml 10% SDS 中,再用 10% Tris HCl 沉淀之,沉淀物收集于 2.4 cm whatman CF/F 过滤器,用 0.4 ml NCS 过滤液处理 10 min,然后用含有 9.5 ml 甲苯和 0.5 ml liquiflor 混合液的液体闪烁计数器,测定 ^3H -胸腺嘧啶核苷的掺入量。

1.4 原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 的表达

取在各种不同浓度的胰岛素中培养 30 min 及 120 min 的 SMC,提取细胞总 RNA^[8],以 260 nm 的紫外光吸收率测定 RNA 含量,重复测定 3 次。取 10~15 μg RNA 在含有甲醛的凝胶上进行 RNA 电泳,然后,将变性的 RNA 转移到硝酸纤维素滤膜上。用随机引物法将 ^{32}P 标记于 *c-fos* 和 *c-myc* 的 DNA 上成为探针。之后进行杂交和放射自显影,再将曝光后 X 光片用 590nm 的波长进行薄层扫描,以得出各杂交点对杂交反应强度

的相对数值。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞体外培养前后的形态

本实验取人脐动脉中层平滑肌细胞,培养前后经光镜及电镜检查,二者在形态上一致,未发现有明显变化。

2.2 平滑肌细胞增殖试验

2.2.1 胰岛素对平滑肌细胞增殖的影响

不同浓度的胰岛素对培养基中平滑肌细胞计数的影响见 Table 1。可见随着胰岛素浓度增加,培养的平滑肌细胞数亦增加,二者有正相关关系 ($r=0.7286$, $P<0.05$)。说明胰岛素对平滑肌细胞可能有促有丝分裂作用,这个作用有剂量依赖性倾向。

Table 1. Effect of insulin on number of smooth muscle cell ($\bar{x} \pm s$).

Insulin concentration ($\mu\text{g}/\text{L}$)	number of smooth muscle cell ($\times 10^4/\text{well}$)
0	0.97 ± 0.03
10	1.08 ± 0.02
100	1.25 ± 0.05
1 000	1.68 ± 0.04
10 000	1.78 ± 0.06

2.2.2 胰岛素对平滑肌细胞 DNA 合成的影响

胰岛素对培养的平滑肌细胞 DNA 合成的影响见 Table 2。通过测定 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入量发现,随着胰岛素浓度增加,平滑肌细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷的量亦增加。两者有正相关关系 ($r=0.6863$, $P<0.05$)。表明胰岛素能促进平滑肌细胞 DNA 的合成。

2.2.3 胰岛素对人血管平滑肌细胞原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达的影响

如 Table 3 所示,血管平滑肌细胞在含有各种不同浓度胰岛素培养基分别培养 30 min 和 120 min 后,提取细胞总 RNA,经 Northern 分析后发现,随着胰岛素浓度增加,平滑肌细胞表达 *c-fos* 和 *c-myc* 也增加,两者有正相关关系 (分别为 $r=0.667$

6, $P < 0.05$; $r = 0.7322$, $P < 0.05$ 。

Table 2. Effect of insulin on DNA synthesis of smooth muscle cell ($\bar{x} \pm s$).

Insulin concentration ($\mu\text{g/L}$)	^3H -thymidine incorporation ($\times 10^3\text{cpm/well}$)
0	0.77 ± 0.02
10	1.10 ± 0.01
100	1.30 ± 0.04
1 000	1.71 ± 0.03
10 000	1.82 ± 0.05

Table 3. Effect of insulin on expression of proto-oncogene *c-fos* and *c-myc* ($\bar{x} \pm s$).

Insulin concentration ($\mu\text{g/L}$)	mRNA(%)	
	<i>c-fos</i>	<i>c-myc</i>
0	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.01
10	0.34 ± 0.01	0.38 ± 0.02
100	0.60 ± 0.02	0.53 ± 0.02
1 000	0.86 ± 0.03	0.82 ± 0.03
10 000	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.02

3 讨论

目前的研究表明,无论是在人动脉粥样硬化斑块的标本,还是动物动脉粥样硬化的模型,均证明血管平滑肌细胞增殖在动脉粥样硬化的发生中起着关键作用。同时 SMC 增殖亦为经皮冠状动脉腔内成形术后再狭窄的主要原因^[9]。

许多年来,人们在长期的临床实践中发现糖尿病病人易合并心血管疾病,尤其是糖尿病病人易合并 As 且 As 发生早进展快。近年来,高胰岛素血症被认为是 As 性疾病发病的一个重要独立危险因素^[10,11],并认为胰岛素是通过刺激 SMC 增殖而促进 As 等疾病的发展。做为细胞生长促进因子的胰岛素对血管平滑肌细胞生长有促进作用。Nirmal 等^[2]1989 年报道,胰岛素和胰岛素样生长因子能促进原癌基因 *c-myc* 的表达,促进家兔胸主动脉 SMC DNA 合成增加,使体外培养的 SMC 数目增多。本研究

也取得类似结果,将不同浓度的胰岛素加入人血管平滑肌细胞的培养液中,随着胰岛素浓度的增加,原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* mRNA 表达水平逐渐升高, ^3H -胸腺嘧啶核苷的掺入量及 SMC 的数目也随着胰岛素浓度增加而增加。即胰岛素能促进原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 表达、DNA 合成及 SMC 的增殖,且这些作用存在着剂量-效应关系。

所以,我们推测胰岛素促进原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 的表达,促进 SMC DNA 的合成及 SMC 数目的增加,这也许是高胰岛素血症促进 As 等疾病发生与发展的一条途径。

参考文献

- Strandness DW, Priest RW, Gibbons GE. Combined clinical pathologic study of diabetes and nondiabetes peripheral disease. *Diabetes*, 1996, 13: 336~372.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC. Blood lipids and the role of obesity in coronary heart disease risk in woman, the Framingham study. *Arter Med*, 1979, 87: 393~397.
- Stout RW. Diabetes and atherosclerosis-the role of insulins. *Diabetologia*, 1979, 16: 141~150.
- Reaven DM. The role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 1988, 37: 1 595~607.
- Merimee TJ. Diabetic retinopathy: a synthesis of perspectives. *N Engl J Med*, 1990, 332: 987~984.
- Kaplan NM. The deadly quartet: upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypension. *Arch Intern Med*, 1989, 149: 1 514~520.
- Ross R. Atherosclerosis and artery smooth muscle cell. *Science*, 1979, 1 809: 1 332~339.
- Chirgwin J, Przybyla AE, McDonld R. Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 1979, 1: 5 294~299.
- Jonathan D. Induction of PDGF-responsive gene in vascular smooth muscle. *Circulation*, 1992, 86: 53~60.
- 王罗得, 董寿祺, 王 丽. 高血压病患者的高胰岛素血症. 中华心血管病杂志, 1993, 21(1): 29~30.
- 顾复生. 胰岛素抵抗和高胰岛素血症与高血压和冠心病. 中华心血管病杂志, 1993, 21(5): 259.
- Nirmal K, Bebecca TA, Karen ZE. Characterization of induction of proto-oncogene *c-myc* and cellular growth in human disease vascular smooth muscle cells by insulin and IGF-I. *Diabetes*, 1989, 38: 123~129.

(1995-11-03 收到, 1996-05-21 修回)