

胰岛素对高糖条件下人脐静脉内皮细胞凋亡及小窝蛋白-1表达的影响

张 慧¹, 陈向芳², 叶福林^{3*}

(¹解放军九七医院内分泌科, 江苏 徐州 221004; ²第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003; ³解放军九七医院心胸外科, 江苏 徐州 221004)

[摘要] 目的:探讨不同浓度的胰岛素对高糖条件下人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)凋亡及小窝蛋白(caveolin, Cav)-1表达的影响。方法:体外培养 HUVEC,分为A组(对照组,葡萄糖浓度 5.5 mmol/L)、B组(高糖组,葡萄糖浓度 33.3 mmol/L)、C组(高糖+低浓度胰岛素组,葡萄糖浓度 33.3 mmol/L+胰岛素浓度 20 mU/L)、D组(高糖+高浓度胰岛素组,葡萄糖浓度 33.3 mmol/L+胰岛素浓度 1 000 mU/L)。采用流式细胞仪检测细胞凋亡比例及细胞周期,免疫组化检测 HUVEC 的 Cav-1 表达。结果:在高糖条件下, HUVEC 凋亡比例显著升高,停滞于 G₀/G₁ 期细胞增加, Cav-1 表达减少;低浓度胰岛素使细胞凋亡比例减少, Cav-1 表达增加;加入高浓度胰岛素不能改变细胞凋亡比例及细胞周期, Cav-1 表达亦无明显改变。结论:低浓度胰岛素可抑制高糖导致的内皮细胞凋亡,而高浓度胰岛素无此作用,其机制可能与 Cav-1 表达有关。

[关键词] 胰岛素; 凋亡; 小窝蛋白

[中图分类号] R587

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1337-05

doi:10.7655/NYDXBNS20141010

Effects of insulin on apoptosis of cultured human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) and expression of caveolin in HUVECs

Zhang Hui¹, Chen Xiangfang², Ye Fulin^{3*}

(¹Department of Endocrinology, the 97th Hospital, PLA, Xuzhou 221004; ²Department of Endocrinology, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200003; ³Department of Cardiothoracic Surgery, the 97th Hospital, PLA, Xuzhou 221004, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the effect of insulin on apoptosis of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by hyperglycemia and the expression of caveolin-1 in HUVECs. **Methods:** HUVECs were cultured and randomized into group A (the controlled group, glucose concentration 5.5 mmol/L), group B (the hyperglucose group, glucose concentration 33.3 mmol/L), group C (the hyperglucose and low concentration of insulin group, glucose concentration 33.3 mmol/L+insulin concentration 20 mU/L), group D (the hyperglucose and high concentration of insulin group, glucose concentration 33.3 mmol/L+insulin concentration 1 000 mU/L). Flow cytometry was applied to determine cell apoptosis ratio and cell cycle. Cav-1 expression of HUVEC was detected by immunohistochemistry analysis. **Results:** High concentration of glucose induced significantly increased apoptosis of HUVEC which was associated with the arrest of the cell cycle of G₀/G₁, and the expression of cav-1 was decreased. Low concentration of insulin reduced the apoptosis of HUVEC and increased cav-1 expression. While high concentration of insulin had no effects on the cells apoptosis, cell cycle and cav-1 expression. **Conclusions:** Low concentration of insulin inhibited the apoptosis induced by hyperglycemia, while high concentration of insulin had no effects on the apoptosis induced by hyperglycemia, and its mechanism may be related to the expression of cav-1.

[Key words] insulin; apoptosis; caveolin

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10):1337-1341]

糖尿病早期高胰岛素血症和外源性胰岛素的应用使得胰岛素和动脉粥样硬化的关系存在很大争议。有研究认为,高胰岛素血症具有促动脉粥样硬化形成的作用,其机制与高胰岛素血症直接致体

[基金项目] 南京军区卫生科技项目(12MB011)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yflin@sohu.com

内脂质代谢紊乱、平滑肌细胞增生、纤溶活性降低及参与高血压形成和发展等有关^[1];但也有研究认为胰岛素具有抗炎、抗动脉粥样硬化及保护心脏的作用^[2]。Cav-1 是细胞质膜微囊形成的嵌膜蛋白,其表达异常与肿瘤、肌营养不良、动脉硬化、糖尿病等许多疾病有关^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料

重组人胰岛素粉剂(礼来公司,美国),人脐静脉内皮细胞(南京凯基生物合成有限公司),DMEM 培养基(含 5.5 mmol/L 葡萄糖)、青/链霉素(100 U/ml)、0.25% 糜蛋白酶+1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、10 × PBS(Gibco 公司,美国),胎牛血清(FBS,Hyclone 公司,美国),胰蛋白酶、葡萄糖粉、四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司,美国);凋亡试剂盒(BD 公司,美国),浓缩型兔抗人 Cav-1 多克隆抗体(编号 ZS-894,工作浓度 1:250,北京中杉金桥生物技术有限公司)。免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 HUVEC 分离、传代后,制备细胞爬片至对数生长期时,将细胞分为 4 组:A 组(对照组,葡萄糖浓度 5.5 mmol/L)、B 组(高糖组,葡萄糖浓度 33.3 mmol/L)、C 组(高糖+低浓度胰岛素组,葡萄糖浓度 33.3 mmol/L+胰岛素浓度 20 mU/L)、D 组(高糖+高浓度胰岛素组,葡萄糖浓度 33.3 mmol/L+胰岛素浓度 1 000 mU/L),每组 6 个复孔,持续培养 48 h 后终止培养。

1.2.2 细胞周期及凋亡检测

细胞凋亡和细胞周期采用流式细胞仪(美国 BD FACSCalibur)检测,严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.3 免疫组化

将制备好的含单层细胞的玻片(选用同一批次)以 10%福尔马林固定后,用 PBS 洗涤 5 min×3 次,3% H_2O_2 及纯甲醇封闭灭活内源性过氧化物酶,5%BSA 室温封闭,加抗 Cav-1 多克隆抗体 4℃过夜,PBS 洗涤 3 次,滴加生物化羊抗兔 IgG(1:50),37℃ 反应 20 min,PBS 洗涤 3 次。DAB 显色,苏木素核复染。以阳性细胞比例和着色强度计分综合判定反应强弱程度。Cav-1 以胞质和胞膜,MIB-1/Ki-67 以胞核出现淡黄色为弱阳性(计 1 分),棕黄色为阳性(计 2 分),棕褐色为强阳性(计 3 分),不着色为阴

性(计 0 分);阳性细胞数 1%~25%计 1 分,26%~50%计 2 分,51%~75%计 3 分,76%~100%计 4 分。2 个得分之乘积为该抗体的反应强度积分:0 分为不表达,1~4 分为弱表达,5~8 分为中表达,9~12 分为强表达。

1.2.3 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛素对 HUVEC 凋亡的影响

高葡萄糖浓度使 HUVEC 凋亡细胞比例明显升高($P < 0.01$),加入低浓度胰岛素使得凋亡细胞数显著低于高糖组($P < 0.05$),而加入高浓度胰岛素其凋亡细胞数与高糖组比较无统计学差异($P > 0.05$,表 1,图 1)。

表 1 胰岛素对 HUVEC 凋亡的影响

Table 1 The effect of insulin on apoptosis of HUVEC
($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡比例(%)
A 组	0.38 ± 0.06
B 组	1.12 ± 0.21**
C 组	0.57 ± 0.17* $\Delta\Delta$
D 组	1.06 ± 1.32**

与 A 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 B 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2 胰岛素对 HUVEC 细胞周期的影响

高浓度葡萄糖作用于 HUVEC 后,停滞在 G_0/G_1 期的细胞所占比例达 64.07%,与 A 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);在低浓度胰岛素的作用下,各期细胞与 A 组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);而在高浓度胰岛素作用下停滞在 G_0/G_1 期的细胞所占比例高达 70.48%,与 A 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

2.3 胰岛素对 Cav-1 表达的影响

B 组 Cav-1 表达显著低于对照组($P < 0.05$),C 组及 D 组 Cav-1 表达与对照组比较无统计学差异($P > 0.05$);C 组及 D 组 Cav-1 表达均显著高于 B 组(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$);C 组与 D 组间比较无统计学差异($P > 0.05$,表 3,图 2)。

3 讨论

机体高胰岛素血症多由于胰岛素抵抗或外源性注射胰岛素导致。1998 年 Reaven^[4,5]首先提出胰

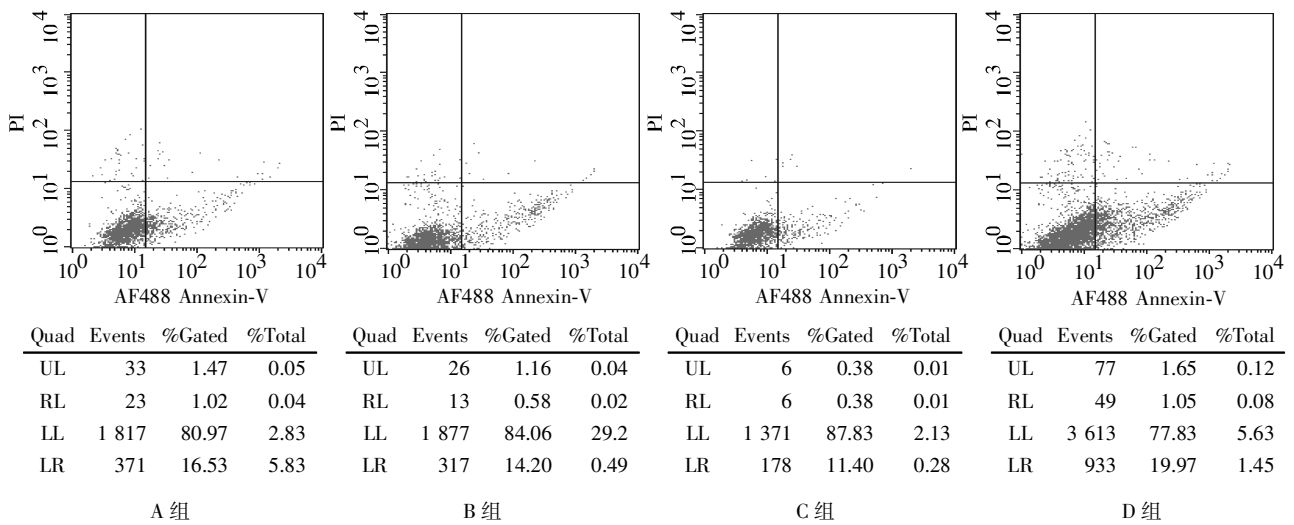


图 1 胰岛素对 HUVEC 凋亡的影响

Figure 1 The effect of insulin on apoptosis of HUVEC

表 2 胰岛素对 HUVEC 细胞周期的影响

Table 2 The effect of insulin on cell cycle of HUVEC ($\bar{x} \pm s$)

	G ₁	G ₂	S
A 组	40.71 ± 9.04	23.59 ± 2.05	35.70 ± 7.24
B 组	64.07 ± 5.49*	24.02 ± 4.94	13.57 ± 2.77*
C 组	46.45 ± 7.85	17.78 ± 19.93	35.77 ± 12.09
D 组	70.48 ± 2.16*	19.52 ± 1.99	10.00 ± 0.17*

与 A 组比较, *P < 0.05。

表 3 胰岛素对 Cav-1 表达的影响

Table 3 The effect of insulin on Cav-1 expression (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	平均强度积分
A 组	7.83 ± 1.22
B 组	5.83 ± 0.56*
C 组	8.50 ± 1.83 ^Δ
D 组	6.83 ± 1.83

与 A 组比较, *P < 0.05; 与 B 组比较, ^ΔP < 0.05。

胰岛素抵抗的概念, 是指胰岛素分泌量在正常水平时, 胰岛素作用的靶器官、组织对胰岛素的反应降低而产生的一系列病理和临床表现, 此时机体需要超过正常量的胰岛素才能在胰岛素的效应器官产生正常生理效应。目前已有大量研究证实了胰岛素抵抗是糖尿病及心脑血管疾病的独立危险因素^[6-8]。但也有研究认为胰岛素抵抗与动脉粥样硬化之间不存在相关性, 甚至存在反相关性^[9,2]。而随着近年来糖尿病患者的胰岛素应用越来越受到重视, 长期注射胰岛素的患者也在逐年增加, 但高胰岛素血症是否会导致内皮功能紊乱及动脉粥样硬化多年来也一直存在争议^[10-11]。王旭开等^[12]提出胰岛素的高日用量可作为独立的冠脉事件危险因素而发挥作用。

糖尿病血管并发症的发生与高糖状态可诱导内皮细胞的凋亡有关^[13], 其机制复杂, 可能与氧化应激、炎症因子、终末糖基化产物等多种因素有关^[14+15], 但难以形成定论。

小窝蛋白(caveolin)是生物膜的组成部分, 属整合膜蛋白, 其家族包括 Cav-1、Cav-2、Cav-3 3 种, 其中 Cav-1 是主要的组成蛋白, 它参与多种信号的接收和转运, 其生理功能主要表现在维持胆固醇进出平衡, 参与细胞增殖、迁移和信号传递。Cav-1 的功能异常和肿瘤、动脉硬化、糖尿病、阿尔兹海默病等许多疾病有关。目前小窝蛋白对凋亡调控的研究报道不一^[16]。Yang 等^[17]报道 Cav-1 能抑制前列腺癌细胞中 c-myc 诱导的凋亡, 从而促进癌细胞的存活和淋巴转移。而 Liu 等^[18]报道, 减少 Cav-1 的含量, NIH3T3 纤维母细胞的凋亡被抑制, Cav-1 含量恢复, 纤维母细胞的凋亡被抑制; Cav-1 含量恢复, 纤维母细胞对凋亡的刺激也恢复敏感, 其机制可能与 Cav-1 使聚集在胞膜小窝的生长增殖信号通路受到抑制有关。Cav-1 与胰岛素抵抗关系密切, 其通过影响糖、脂质代谢及葡萄糖转运子参与胰岛素依赖性葡萄糖摄取, 从而调节胰岛素的敏感性, 有望成为治疗糖尿病的新靶点^[19]。再者, Cav-1 可与三磷酸鸟苷连接蛋白、促分裂原活化蛋白激酶、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)等多种分子结合, 参与体内多种生物学过程。当内皮细胞中 eNOS 与 Cav-1 发生作用后, eNOS 作用活性降低, 当内皮细胞受到刺激时, 钙调蛋白就会将 Cav-1 从 eNOS-cav 复合物中置换出来并激活 eNOS, 从而增加最强的血管舒张因子一氧化氮(NO)的合成^[20], 从而参与了抗氧化作

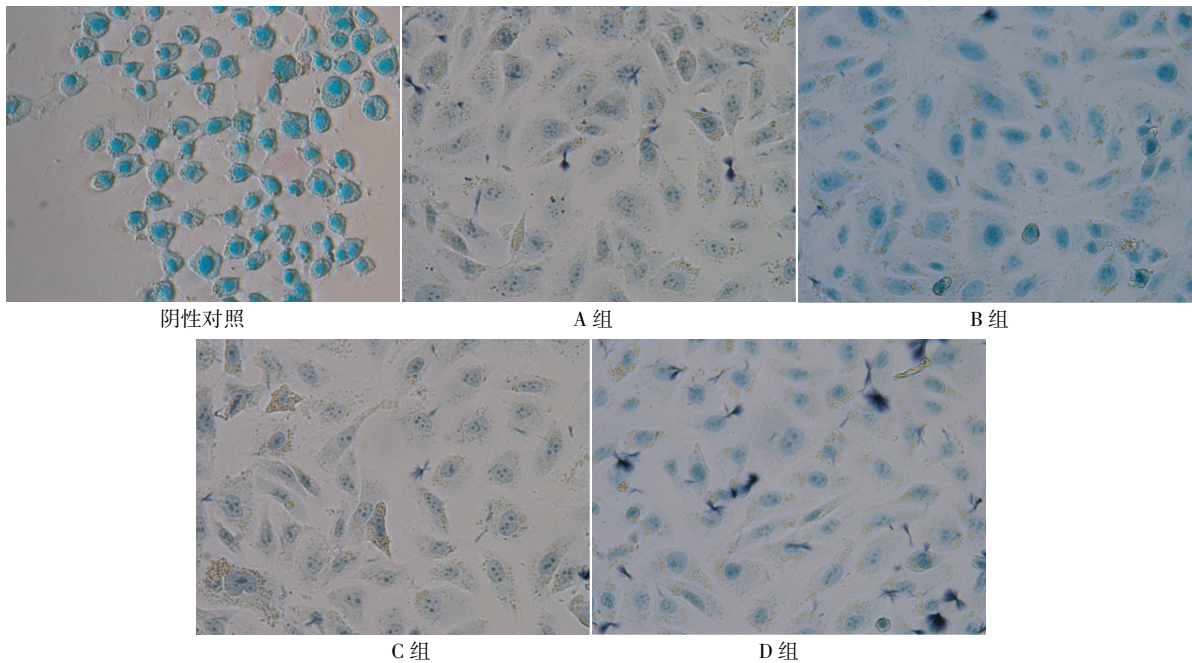


图2 胰岛素对 Cav-1 表达的影响

Figure 2 The effect of insulin on Cav-1 expression

用。因此,Cav-1 对内皮功能的调节机制复杂,现日益成为糖尿病及动脉硬化领域研究的新热点^[21-22]。

本研究选取人血浆葡萄糖正常值范围内 5.5 mmol/L 和极高值 33.3 mmol/L 作为对照组和高糖组的葡萄糖浓度,胰岛素浓度选择正常人血清胰岛素浓度 20 mU/L 和极高值 1 000 mU/L 作为低浓度胰岛素组和高浓度胰岛素的胰岛素浓度。本研究结果显示在高糖条件下,低浓度胰岛素有保护内皮细胞的作用,与改善高糖导致的内皮细胞凋亡有关,其机制与 Cav-1 的抗凋亡作用有一定关联,而高浓度胰岛素无此作用。因此,作者认为临床长期大剂量胰岛素应用,并不能使患者受益于胰岛素的内皮保护作用,是否会导致或加重动脉粥样硬化尚需更深入研究。

[参考文献]

- [1] 涂晶,洪涛,文格波. 高胰岛素血症与动脉粥样硬化研究现状与进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2013,21(1):79-83
- [2] Kim T, Chan KK, Dhaliwall JK, et al. 体内胰岛素的抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2005,13(6):744
- [3] Fujimoto T. Cell biology of caveolin and its implication for clinical medicine[J]. Nagoya J Med Sci,2003,63(1-2):9-18
- [4] Reaven GM. Insulin resistance may or may not play a role in blood pressure regulation[J]. J Intern Med, 1998,244(4):359-360
- [5] Reaven GM. Insulin resistance, cardiovascular disease, and the metabolic syndrome; how well do the emperor's clothes fit[J]. Diabetes Care,2004,27(4):1011-1012
- [6] Lorenzo C, Haffner SM. Performance characteristics of the new definition of diabetes; the insulin resistance atherosclerosis study[J]. Diabetes Care,2010,33(2):335-337
- [7] 张燕,谢玉萍,张俊琦. 胰岛素抵抗与动脉粥样硬化关系的研究现状[J]. 西南国防医药,2010,20(12):1378-1380
- [8] Raghavan VA. Insulin resistance and atherosclerosis[J]. Heart Fail Clin,2012,8(4):575-587
- [9] Barrett-Connor EL, Ferrara A. Is insulin really a heart disease risk factor[J]. Diabetes Care,1995,18(9):1299-1304
- [10] Draznin B. Mitogenic action of insulin: friend, foe or "frenemy"[J]. Diabetologia,2010,53(2):229-233
- [11] Raz I. Exogenous hyperinsulinemia and atherosclerosis in type 1 diabetic patients[J]. J Diabetes Complications, 2013,27(1):2-3
- [12] 王旭开,杨成明,王红勇,等. 医源性不同胰岛素剂量对中年2型糖尿病患者合并冠状动脉事件的作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2005,13(3):345-347
- [13] 孟东,陈樱,卫丽君,等. 高糖对人脐静脉内皮细胞凋亡及 bcl-2, bax 和 eNOS 表达的影响[J]. 天津医药, 2005,33(3):335-337
- [14] 李晶,于德民. 高血糖、高胰岛素对内皮细胞凋亡及

- Mn-SOD 表达的研究[J]. 天津医药,2007,35(11):842-843
- [15] 黄修猷,李利华,吴新华. 血管内皮细胞与动脉粥样硬化[J]. 医学综述,2010,9(18):2724-2726
- [16] 郭贵明,吕 智. Caveolin-1 在肿瘤中的研究进展[J]. 实用骨科杂志,2009,15(1):33-35
- [17] Yang G, Timme TL, Frolov A, et al. Combined c-myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression[J]. J Cancer, 2005,103(6):1186-1194
- [18] Liu J, Lee P, Galbiati F, et al. Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001,280(4):823-835
- [19] 赵 玮,王 绵. Caveolae 与胰岛素抵抗[J]. 国际病理科学与临床杂志,2009,29(1):77-81
- [20] 刘海梅,王庭槐. 小窝蛋白在心血管系统中的作用[J]. 新医学,2006,37(5):345-346
- [21] Carrillo-Sepulveda MA, Goulopoulou S, Matsumoto T, et al. Type 2 diabetes-induced vascular dysfunction is associated with caveolin-1 and NADPH oxidase[J]. FASEB J, 2012,26(4):1057-1059
- [22] Kronstein R, Seebach J, Grobklaus S, et al. Caveolin-1 opens endothelial cell junctions by targeting catenins[J]. Cardiovasc Res, 2012,93(1):130-140
- [收稿日期] 2014-04-11

(上接第 1319 页)

- [6] Doganci A, Sauer K, Karwot R, et al. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2005,28(3): 257-270
- [7] Rusca N, Dehò L, Montagner S, et al. MiR-146a and NF-kappaB1 regulate mast cell survival and T lymphocyte differentiation [J]. Mol Cell Biol, 2012,32(21): 4432-4444
- [8] Fenger JM, Bear MD, Volinia S, et al. Overexpression of miR-9 in mast cells is associated with invasive behavior and spontaneous metastasis [J]. BMC Cancer, 2014,14(1): 84
- [9] Yamada Y, Kosaka K, Miyazawa T, et al. miR-142-3p enhances FcepsilonRI-mediated degranulation in mast cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014,443(3): 980-986
- [10] Berry M, Brightling C, Pavord I, et al. TNF-alpha in asthma [J]. Curr Opin Pharmacol, 2007,7(3):279-282
- [11] Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases [J]. Int J Biol Sci, 2012,8(9): 1281-1290
- [12] 李 城,戴爱国. MicroRNA 在支气管哮喘中作用的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志,2012,32(19):1485-1488
- [13] Mayoral RJ, Deho L, Rusca N, et al. MiR-221 influences effector functions and actin cytoskeleton in mast cells [J]. PLoS One, 2011,6(10):e26133
- [14] Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K, et al. miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing Spred1 [J]. Genes Cells, 2011,16(7): 803-814
- [15] Yamamoto M, Singh A, Ruan J, et al. Decreased miR-192 expression in peripheral blood of asthmatic individuals undergoing an allergen inhalation challenge [J]. BMC Genomics, 2012,13: 655
- [收稿日期] 2014-05-03