

• 论 著 •

肿瘤坏死因子和蛋白激酶 C 对单个 内皮细胞和白细胞钙的影响*

吴其夏 党 瑛 栾 竞 李 岩^①

(中国医学科学院基础医学研究所病理生理室, 北京 100005)

The Effects of Tumor Necrosis Factor and Protein Kinase C on the Calcium Level in the Single Endothelial Cell and Single White Cell

WU Qi-Xia, DANG Ying, LUAN Jing and LI Yan
(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

ABSTRACT In present experiment the temporal increase of the calcium level both in cytoplasm and nuclear of single culture endothelial cell was observed after stimulation of tumor necrosis factor- α (TNF α , 1 MIU \cdot L $^{-1}$), however, the increase of calcium level was more significant in nuclear and decreased slowly. The calcium level was not changed obviously in white cell after stimulation of TNF α in same dosage. The calcium level both in endothelial cell and white cell increased rapidly and then decreased less than the original level after stimulation of phorbol myristate acetate (3.5 nmol \cdot L $^{-1}$) which is a activator for protein kinase C (PKC). Finally, it was found that the nuclear calcium of endothelial cell was output entirely, but there was calcium residue in the nuclear of white cell. The results suggested that the effects of TNF α stimulation are different on the different kinds of target cells, the changes of calcium level are different in different region of cell, and the PKC plays an important role in the calcium output from inside of the cell, but it may don't participate in the effect of TNF α on the cell calcium. Investigating the calcium change in the single endothelial

cell should benefit the research on the role of Ca $^{2+}$ in the pathogenesis of atherosclerosis.

KEY WORDS Cytosolic calcium; Tumor necrosis factor; Protein kinase C; Laser confocal scanning

摘要 本实验用激光扫描共聚焦技术发现肿瘤坏死因子(1 MIU \cdot L $^{-1}$)使培养的单个血管内皮细胞胞浆区和核区 Ca $^{2+}$ 皆呈现一过性升高, 而且核区上升幅度大, 下降缓慢。同等剂量的肿瘤坏死因子没有引起单个白细胞 Ca $^{2+}$ 水平的明显变化。蛋白激酶 C 的活化剂佛波醇酯(3.5 nmol \cdot L $^{-1}$)可引起两类细胞 Ca $^{2+}$ 水平皆迅速升高, 随后下降, 低于原水平, 最后, 内皮细胞核区 Ca $^{2+}$ 完全被排空, 而白细胞核区仍残留 Ca $^{2+}$ 。结果提示肿瘤坏死因子对不同的靶细胞的刺激效应不同; 细胞不同区的 Ca $^{2+}$ 水平变化效应也不同; 蛋白激酶 C 的作用主要是排出细胞内 Ca $^{2+}$ 。观察单个细胞 Ca $^{2+}$ 变化有助于研究 Ca $^{2+}$ 参与动脉粥样硬化发病机制。

关键词 细胞钙; 肿瘤坏死因子; 蛋白激酶 C; 激光扫描共聚焦

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是以动脉壁内皮细胞(endothelial cell, EC)损伤和平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖变化为主的慢性炎症过程^[1]。血小板、白细胞、以及细胞因子和生长因子参与了此病理过程。细胞内 Ca $^{2+}$ 通过活化一些 Ca $^{2+}$ 依赖酶在许多生理和病理反应中起重要的“信使”调节作用^[2], 包括细胞的激活、损伤和增殖。本实验用激光扫描共聚焦技术初步观察了细胞因子之一肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF α)和蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)对单个内皮细胞和白细胞内 Ca $^{2+}$ 的影响, 以期进一步研究内皮细胞内 Ca $^{2+}$ 在 As 发病中的作用。

* 国家自然科学基金资助项目。

① Meridian 仪器公司

1 材料及方法

1.1 人脐静脉内皮细胞的培养

无菌取新鲜人脐带,放入4℃磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS),并用PBS冲洗脐静脉使之无残留血。注入0.1%胶原酶(Sigma公司),37℃孵育15 min,收集消化液,离心(1 000×g, 8 min),弃上清液,用完全培养基(199培养基、20%胎牛血清、100 μg·L⁻¹内皮细胞生长因子、肝素、青霉素、链霉素, pH 7.0)悬浮内皮细胞。将细胞接种到预先用1%明胶包被30 min的培养皿中,放入CO₂孵箱(日立公司),7~10天长满,用0.125%胰酶消化,弃去胰酶,加入培养基悬起细胞。倒置显微镜观察EC形态,并用辣根过氧化物酶标记的Ⅷ因子相关抗原兔抗人抗血清(华美公司)鉴定内皮细胞。

1.2 大鼠白细胞的制备

向Wistar大鼠腹腔注入1%盐水20 ml,3~4 h断椎处死,吸取腹腔液,用kreb's缓冲液洗白细胞三次,悬浮并用胎盘兰鉴定细胞存活率在90%以上。

1.3 Fluo-3/AM 负载细胞

待悬浮的EC和白细胞铺于预先用0.5%明胶包被的18 mm×18 mm的盖玻片上,37℃孵育10 min,用缓冲液洗去未粘附的细胞,将100 μl的Fluo-3/AM(Molecular Probes公司,16 μmol·L⁻¹)滴于玻片,37℃避光孵育40 min后,洗去多余染料,10 min内进行荧光测定。

1.4 荧光测定

用激光扫描共聚焦显微镜(Meridian公司)进行检测。将上述处理的玻片放入测定小室,用倒置显微镜确定检测单个细胞,并在显示器显示。确定扫描间隔和总时间。开始扫描后20 s将刺激剂TNFα或佛波醇酯(phorbol myristate acetate, PMA)滴于小室玻片上,继续观察。Ca²⁺浓度以荧光强度单位(IU)表示,变化用录相磁带和曲线记录。

2 结果

2.1 肿瘤坏死因子-α对单个内皮细胞和白细胞Ca²⁺的影响

肿瘤坏死因子-α(1 MIU·L⁻¹)刺激单个EC,细胞内Ca²⁺呈一过性升高,Ca²⁺荧光强度50 s达高峰,随后下降,2 min恢复到原水平(Figure 1)。大剂量的TNFα(3 MIU·L⁻¹)使EC的Ca²⁺升高更明显,持续时间更长,5 min尚未恢复到原水平。但TNFα(1 MIU·L⁻¹)对

单个白细胞内Ca²⁺无明显影响。脂多糖(150 mg·L⁻¹)作用于EC 6 min仍未见Ca²⁺升高。

内皮细胞荧光强度显示静息状态核区Ca²⁺浓度比胞浆区低。肿瘤坏死因子-α(1 MIU·L⁻¹)刺激后核区Ca²⁺荧光强度上升幅度明显大于胞浆区,峰值也位于50 s,但5 min仍未恢复到原水平(Figure 1)。

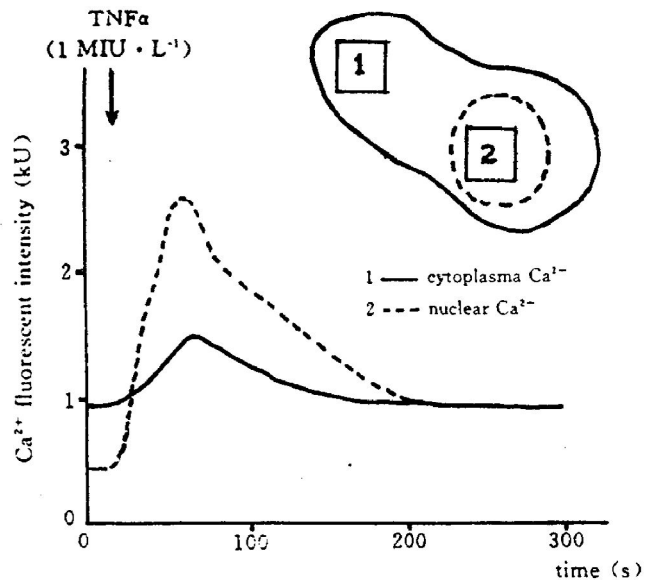


Figure 1. The effects of TNFα on the calcium level in the cytoplasm and nuclear of endothelial cell.

2.2 佛波醇酯对单个内皮细胞Ca²⁺的影响

小剂量PMA(1 nmol·L⁻¹)对单个EC Ca²⁺无影响,1.5 nmol·L⁻¹的PMA使Ca²⁺荧光强度迅速上升,20 s达峰值,随后下降,并低于原水平。大剂量的PMA(3.5 nmol·L⁻¹)使EC Ca²⁺荧光强度上升幅度明显大于1.5 nmol·L⁻¹ PMA的作用,峰值仍位于20 s,随后下降,40 s降至原水平,2 min时降至原水平的50%。继续排出Ca²⁺,核区比胞浆区排Ca²⁺更明显,最后核区钙几乎完全被排空呈“空洞”(Figure 1)。

2.3 佛波醇酯对单个白细胞Ca²⁺的影响

1.5 nmol·L⁻¹的PMA可使单个白细胞Ca²⁺荧光强度出现一过性升高,随后下降,低于原水平(Figure 2)。类似于同等剂量PMA对EC内Ca²⁺的作用。3.5 nmol·L⁻¹的PMA对单个白细胞的作用与细胞Ca²⁺原水平有关。即原Ca²⁺水平较低,PMA可引起一短暂Ca²⁺升

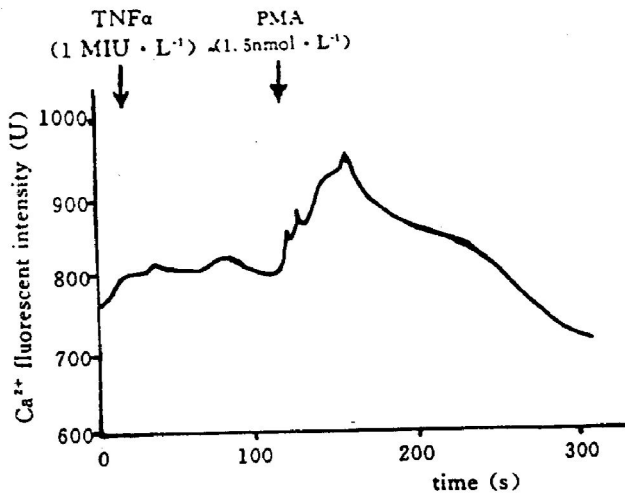


Figure 2. The effects of TNF α and PMA on the calcium level of single white cell.

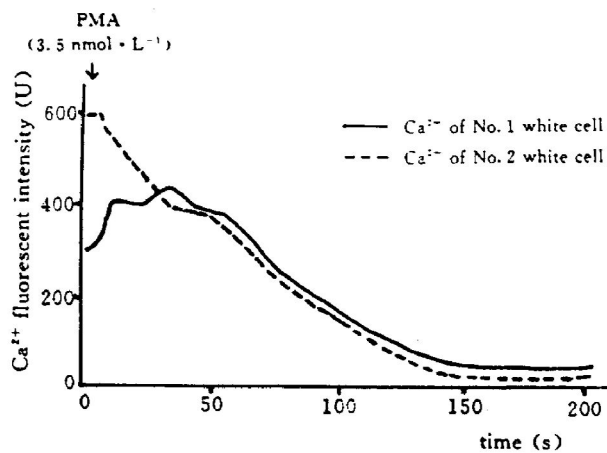


Figure 3. The effects of PMA on the calcium level of two single white cell.

高,随后下降;如果原 Ca^{2+} 水平较高,则大剂量 PMA 直接引起 Ca^{2+} 荧光强度下降(Figure 3)。PMA 作用于白细胞,最后亦出现 Ca^{2+} 被排出现象,但核区仍残存 Ca^{2+} ,没有呈现“空洞”(Figure 3)。

3 讨论

3.1 研究细胞内 Ca^{2+} 变化的报道多数为用荧光探针检测群体细胞胞浆 Ca^{2+} 平均浓度的变化。近年来国外有少数报道用激光扫描共聚焦技术观察单个细胞内 Ca^{2+} 水平的时空变化,使研究 Ca^{2+} 变化规律和调节机理深入了一步^[3]。本实验在国内用此技术初步观察到 TNF α 和 PMA 对单个内皮细胞和白细胞内 Ca^{2+} 的影响。

3.2 肿瘤坏死因子- α 为最早确定的细胞因子

之一,通过其受体使靶细胞激活、损伤、甚至死亡^[4]。肿瘤坏死因子- α 与膜受体结合可水解肌醇磷脂,产生三磷酸肌醇(inositol-1, 4, 5-trisphosphate, IP_3),使细胞内贮钙释放和外钙内流,导致细胞内 Ca^{2+} 水平升高。通过 Ca^{2+} 依赖性蛋白磷酸酶 2B 介导而抑制 IP_3 引起的内贮 Ca^{2+} 释放,结果 Ca^{2+} 水平下降^[5]。因而 TNF α 作用于内皮细胞或白细胞出现一过性 Ca^{2+} 水平升高后下降效应。但不能解释细胞各部位 Ca^{2+} 水平皆下降。

3.3 佛波醇酯为佛波酯类物质,结构类似于甘油二酯,可直接进入完整细胞激活 PKC。蛋白激酶 C 对细胞内 Ca^{2+} 可有双重作用,但本实验观察到 PKC 主要是使 Ca^{2+} 水平下降。可能由于活化的 PKC 一方面可使 IP_3 受体蛋白磷酸化而抑制内质网内贮钙释放;另一方面可激活膜系统的钙泵而排出 Ca^{2+} ^[6,7]。

3.4 大剂量 PMA 引起的 Ca^{2+} 排空现象在胞浆区和核区不同,在核区 Ca^{2+} 的排空又因细胞类型不同而不同,并与细胞激活状态(原胞内 Ca^{2+} 水平高低)有关。目前尚未见文献报道此现象,对其意义和 Ca^{2+} 在核内外转移的机理尚不了解。但此现象提示 Ca^{2+} 可能参与调节核内 DNA 合成蛋白质的过程。有人提出 PKC 可作为核信息的转换器^[8],但是否通过影响核 Ca^{2+} 水平有待研究。

观察单个细胞 Ca^{2+} 变化将有助于探讨 Ca^{2+} 参与动脉粥样硬化发病机理。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801~809.
- 2 Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 1993, **361**: 315~325.
- 3 Kasai H, Li YX, Miyashita Y. Subcellular distribution of Ca^{2+} release channels underlying Ca^{2+} waves and oscillation in exocrine pancreas. *Cell*, 1993, **74**: 667~677.
- 4 Smith CA, Frrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins; activation, costimulation and death. *Cell*, 1994, **76**: 959~962.
- 5 An G, Tesfaigzi J, Chun Y-J, Wu R. Isolation and characterization of the human spr 1 gene and its regulation

of expression by phorbol ester and cyclic AMP. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 10 977~11 001.

6 Stojilleovic SS, Iida T, Merelli F, et al. Interactions between calcium and protein kinase C in the control of signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 10 377~84.

7 Irita K, McConnell R, Cuatrecasas P, et al. Differences between the calcium and the phorbol ester induced association of PKC with phospholipid membrane. *Int J Biochem*, 1991, **23**: 301~304.

8 Olsen EN, Burgess R, Slaudinger J. Protein kinase C as a transducer of nuclear signals. *Cell Groth Differ*, 1993, **4**: 699~705.

7 Irita K, McConnell R, Cuatrecasas P, et al. Differences (本文 1995-01-23 收到)

1995 年中国病理生理学会活动计划

会 议 名 称	时 间	地 点	人 数	联 系 人
1. 中国病理生理学会第 6 届全国代表大会暨学术交流大会	1995 年 10 月 10 日~13 日	大连	250~400	钱振超, 大连医学院 病理生理教研室 (116023)
2. 中国科协第二届青年学术年会 卫星会	1995 年 10 月 10 日~13 日	大连		
3. 首届中日双边病理生理学术会议	1995 年 10 月 10 日~12 日	大连		
4. 中国病理生理学会第 6 届第一次 理事会及常务理事会议	1995 年 10 月 10 日~13 日			
5. 中国病理生理杂志编辑委员会	1995 年 10 月 10 日~13 日			
6. 动脉粥样硬化专业委员会第 4 届代表 大会暨学术讨论会	1995 年 8 月 4 日~8 日	张家界	80~110 人	涂玉林, 衡阳医学院 科研处, 湖南衡阳, 421001
7. 动物病理生理专业委员会第 3 次代表 大会暨第 7 次学术会议	1995 年 8 月 或 9 月	苏州或 扬州	50~80 人	郑世民, 哈尔滨市东 北农业大学动物医 学系(150030)
8. 首届海峡两岸心血管科学研讨会(中国 生理, 药理, 病理生理学会联合举办)	1995 年 10 月 25 日~28 日	北京	200~250 人	陆榴娟, 北京医科大 学中国病理生理学 会办公室(100083)