

致糖尿病因素对血管内皮细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

张喆 杜学良 孙瑛 王华 沈传陆 吴其夏

(中国协和医科大学基础医学院 中国医学科学院基础医学研究所 病理生理学教研室, 北京 100005)

Effects of Pathogenic Factors in Diabetes Mellitus on the Intracellular Free Calcium Ion Concentration in Vascular Endothelial Cells

ZHANG Zhe, DU Xue-Liang, SUN Ying, WANG Hua, SHEN Chuan-Lu and WU Qi-Xia

(Department of Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the effects of phorbol myristate acetate (PMA) and some pathogenic factors in Diabetes mellitus, such as high glucose (HG), high insulin (HI), high proinsulin (HPI) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) on free calcium ion in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC).

Methods To detect calcium ion concentration by fluorescent probes and confocal microscopy in this study.

Results HG, HPI and TNF- α could elevate intracellular free calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in hUVEC obviously while HI did not ($P < 0.01$). Under a dynamic observation of ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and intranuclear free calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_n$) in a single endothelial cell (EC) induced by HG, HPI, TNF- α and PMA, we found an obvious ascent of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]_n$ especially in nucleus area. We also observed that TNF- α and HI could induce calcium oscillation in hUVEC, and PMA at high dose caused evacuation of Ca^{2+} which was most obvious in nucleus area.

Conclusion In vascular complications of diabetes many pathogenic factors injured vascular endothelial cells by Ca^{2+} signaling and thus led to the damage of

normal vascular function and structure.

KEY WORDS Endothelial cell; Ca^{2+} ; Diabetes

摘要 应用荧光探针和激光共聚焦扫描技术观察高糖、高胰岛素、高胰岛素原、肿瘤坏死因子及佛波酯类物质等致糖尿病因素对培养的人脐静脉内皮细胞胞内游离钙离子的作用。高糖、高胰岛素原及肿瘤坏死因子(1~3.5 μM /L)可引起群体细胞内钙离子浓度明显升高($P < 0.01$),而0.2 μM /L肿瘤坏死因子作用较弱($P < 0.05$),高胰岛素作用不明显($P > 0.05$)。动态观察可见,高糖、高胰岛素原、肿瘤坏死因子和佛波酯类物质可引起单个内皮细胞胞内钙离子浓度升高,以核区为显著。肿瘤坏死因子和高胰岛素可诱发“钙振荡”,大剂量佛波酯类物质促使细胞排钙。提示在糖尿病血管并发症中许多致病因子可能通过影响内皮细胞胞内、外钙离子水平而导致其一系列功能和结构损害。

关键词 内皮细胞; 钙离子; 糖尿病

糖尿病血管并发症是糖尿病患者致死的主要原因之一,而内皮细胞损伤则是血管病变的基础。近年来的研究表明,高葡萄糖(high glucose, HG)、高胰岛素(high insulin, HI)、高胰岛素原(high proinsulin, HPI)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)可造成内皮细胞(endothelial cell, EC)功能和结构的改变,甚至导致其死亡。但迄今为止这些作用的确切机制并不清楚。在细胞信息传递的各通路中,钙离子是一个重要的信息分子,其变化可激活多种酶类,促进或抑制某些基因的表达,影响细胞骨架,从而在细胞的运动、分泌、增殖和分化等活动中传递信息。已有实验证明,细胞内游离钙离子浓度(intracellular free calcium ion concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$)和细胞核内游离钙离子浓度(intranuclear free calcium ion concentra-

tion, $[Ca^{2+}]_n$ 与细胞的损伤和死亡密切相关^[6]。我们以培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)为靶细胞,观察在高糖、高胰岛素、高胰岛素原和肿瘤坏死因子等刺激物作用下 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_n$ 的变化,以期探讨钙离子是否参与糖尿病血管并发症中内皮细胞损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 内皮细胞培养及鉴定

取正常分娩的新生儿脐带,根据 Jaffer 等^[1]的方法分离并培养。培养基中含 M199 77%;胎牛血清 20% (Gibico);人内皮细胞生长因子 20 mg/L (德国 Boehringer);谷氨酰胺 2 mmol/L (Sigma);Hepes 15 mmol/L (Boehringer);青霉素 100 ku/L;链霉素 100 mg/L。培养的 EC 进行Ⅷ因子相关抗原鉴定。传代培养至第 4 代细胞用于实验。

1.2 内皮细胞胞内游离钙离子的观察

1.2.1 群体内皮细胞胞内游离钙离子的测定

1.2.1.1 处理及收获 将第三代 hUVEC 接种到塑料培养瓶中,融合生长后分别加入 HG 30 mmol/L (北京化工二厂, A. R.), TNF- α 1 Mu/L (帮定公司), HI 100 nmol/L (Sigma), HPI 100 nmol/L (Sigma) 刺激内皮细胞 72 h, 对照组加等量的空白载体液,然后用 0.1% 的胰蛋白酶与 0.02% EDTA 混合液培养,收获细胞, Dhanks 液 (pH 7.2) 悬浮细胞,台盼蓝活细胞拒染法计数细胞总数及活细胞比例(细胞总数 $\geq 1 \times 10^5$ 个/L,活细胞数占 90%~95%)。

1.2.1.2 Fura-2/AM 负载细胞 将 hUVEC 用悬浮液洗两遍,加 Fura-2/AM (终浓度 2 μ mol/L, Sigma), 37℃ 避光温育 40~60 min,用悬浮液洗去游离的 Fura-2/AM,用荧光分光光度计(日本 HITACHI F-200 型)测定 $[Ca^{2+}]_i$ 。测定条件如下:EM=510 nm, EX=340/380 nm,先测未负载 Fura-2/AM 的空白细胞的自发荧光($Z_1=22.4/340$ nm, $Z_2=20.1/380$ nm),再测负载 Fura-2/AM 内皮细胞的荧光值 F340 和 F380。以终浓度为 0.1% 的 Triton 100 破膜得到钙离子饱和时 F380 的最小值 Ebz,再以终浓度为 3 mmol/L 的 EDTA 整合钙离子得零钙时 F380 的最大值 Ffz,然后用荧光分光光度计的计算机系统自动计算出胞液游离钙离子浓度。

1.2.1.3 Fluo-3/AM 负载细胞及测定 将第 4 代 hUVEC 接种到包被鼠尾胶原的盖玻片上,贴壁生长

后,用 M199 培养基洗两次,加入 Fluo-3/AM 工作液(3 mg/L, Molecule Probe), 37℃、95% 空气-5%CO₂ 下温育 40~60 min, M199 培养基温育两次,10 min 内将盖玻片置入激光共聚焦显微镜(美国 Meridian Aco Uiti-ma 212)图像扫描系统的测定小室中,找到目的细胞,观察并记录细胞内平均荧光强度,钙离子浓度以荧光强度单位(U)表示。

1.2.2 单个内皮细胞胞内游离钙离子浓度测定

1.2.2.1 Fluo-3/AM 负载细胞及测定 用上述方法测定单个内皮细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度。

1.2.2.2 荧光测定 将盖玻片置入激光共聚焦显微镜图像扫描系统的测定小室中,找到目的细胞,定位,分区(胞核、胞浆),确定参数后,在荧光扫描系统中扫描 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_n$ 浓度的动态变化,等基线平稳后,轻轻滴入刺激物高葡萄糖 30 mmol/L, HI 100 nmol/L, HPI 100 nmol/L, TNF- α 100 U, 佛波醇酯(phorbol myristate acetate, PMA)和脂多糖于测定小室中,各刺激物所用浓度依据其对内皮细胞整合素表达影响的有效浓度(另文发表)决定,观察并记录细胞内荧光强度的变化。钙离子浓度以荧光强度单位(U)表示。

1.3 统计处理

所有实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异的显著性采用 t 检验(配对 t 检验和组间 t 检验)。

2 结果

2.1 群体内皮细胞胞内游离 Ca^{2+} 浓度改变

从表 1 (Table 1)可见,人脐静脉内皮细胞经 HG 及 HPI 刺激后,细胞基础 $[Ca^{2+}]_i$ 较对照组均明显增高($P < 0.01$), HI 组虽然基础 $[Ca^{2+}]_i$ 也有增加,但无统计学意义。

如表 2 (Table 2)所示,人脐静脉内皮细胞经 TNF- α (0.2 和 1、2、3.5 Mu/L) 刺激后均可引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),核区荧光强度大于胞浆区。而且 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高程度随 TNF- α 浓度加大而增加($r = 0.9696$, $Y = 84X + 524$, $P < 0.001$)。

2.2 单个内皮细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_n$ 改变的动态观察

2.2.1 肿瘤坏死因子的影响 从图 1 (Figure 1)可见,0.2 Mu/L 肿瘤坏死因子- α 作用下的 hUVEC 胞内钙离子水平先略有下降,短

时间内开始恢复, 荧光强度渐强, 但幅度不大, 在 400~500 s 后逐渐下降。TNF- α 1 Mu/L 有类似正弦曲线的钙振荡(sinsoidal oscillation)至 700 s, 多数细胞未见 $[Ca^{2+}]_i$ 水平下降至基线。从图 2(Figure 2)可见细胞对 2 Mu/L TNF- α 的反应主要有两种: 第一是 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速大幅度地升高, 短时间(40~60 s)内达到峰值, 以后较快地下降至一个较基线略高的水平, 并维持在此水平; 第二是 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高较晚且缓慢, 在 500~700 s 时突然上升到峰值, 然后突然下降, 形成一个尖峰(spike), 继而在高于基线水平出现类似瞬变型的钙振荡(transient oscillation)。3.5 Mu/L TNF- α 作用于 hUVEC, 可见 $[Ca^{2+}]_i$ 水平缓慢上升, 400~200 s 达到一个最高值, 以后稍有下降, 持续维持在一个远高于基线的水平, 钙振荡不明显, 仅有小的波动。

Table 1. The change of the basal $[Ca^{2+}]_i$ of hUVEC stimulated by HG, HPI and HI (nmol/L, $\bar{x} \pm s$).

Groups	$[Ca^{2+}]_i$
Control	172 \pm 16
HG	896 \pm 45 ^b
HPI	382 \pm 42 ^b
HI	251 \pm 61 ^a

a: $P > 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group.

Table 2. The change of the basal $[Ca^{2+}]_i$ of hUVECs stimulated TNF- α (Mu/L, $\bar{x} \pm s$).

TNF- α (Mu/L)	Fluorescent intensity
Control	473 \pm 4
0.2	520 \pm 11 ^b
1	650 \pm 34 ^a
2	669 \pm 30 ^a
3.5	821 \pm 44 ^a

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with control group.

以上各实验组, 细胞核区及胞液钙离子的变化基本与整个细胞的钙离子水平改变一致, 但 $[Ca^{2+}]_n$ 大于 $[Ca^{2+}]_i$, 且前者上升幅度比后者高, 并且不下降至基线而持续维持在一个高

于基线的水平。

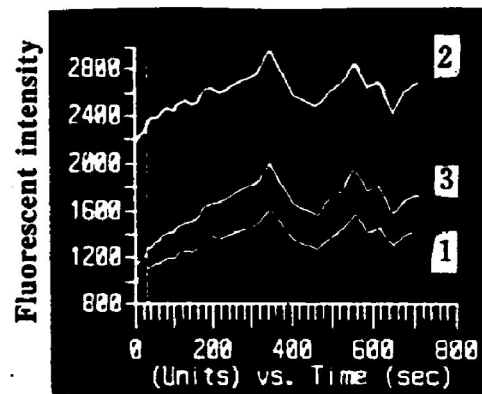


Figure 1. Kinetic curves of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_n$ changes in a single HUVEC under TNF- α (1 Mu/L) stimulation. 1: whole, 2: nuclear area, 3: cytoplasmic area.

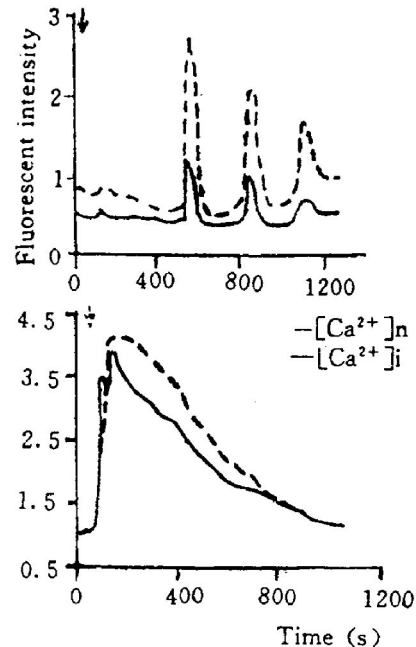


Figure 2. Kinetic curves of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_n$ changes hUVEC under TNF- α (0.2 Mu/L) stimulation.

2.2.2 高葡萄糖的影响 高葡萄糖可在瞬间(15~20 s)使内皮细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, $[Ca^{2+}]_n$ 增加速度比 $[Ca^{2+}]_i$ 还快, 幅度更大。

2.2.3 高胰岛素和高胰岛素原的影响 在高胰岛素作用下, $[Ca^{2+}]_i$ 水平在基线水平上下波动, 表现为瞬变型钙振荡。HPI 作用与 HG 相似, 只是 $[Ca^{2+}]_n$ 增加和下降速度均较快。

2.2.4 PMA 的影响 1 nmol/L PMA 对 hUVEC 的细胞内游离钙离子无影响, 1.5

nmol/L PMA 先引起 hUVEC $[Ca^{2+}]_i$ 上升, 20 s 内即达到高峰, 然后下降至低于原细胞内钙离子浓度的水平。大剂量 PMA (3.5 nmol/L) 使 hUVEC $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度上升幅度明显大于 1.5 nmol/L PMA 的作用, 峰值仍在 20 s 处, 随后下降, 40 s 降至原水平, 2 min 降至原水平的 50%。4.5 nmol/L 的 PMA 对 hUVEC $[Ca^{2+}]_i$ 水平的影响更明显, 尤其是核区, 先是一个短暂而显著的升高, 而最后钙又被几乎完全排空。100 mg/L 脂多糖对 hUVEC 无明显作用。

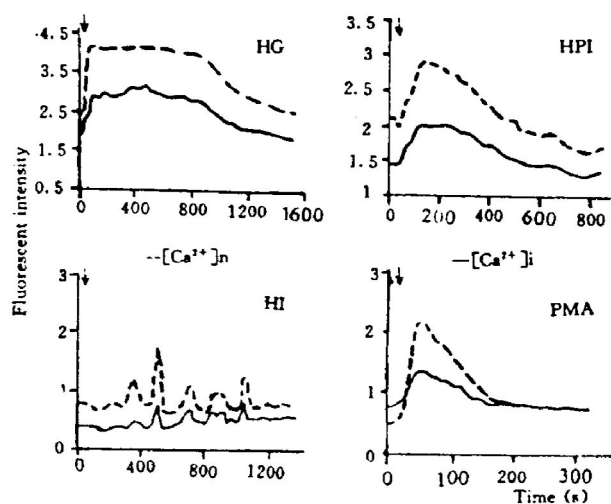


Figure 3. Kinetic curves of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_n$ changes in a single hUVEC under HG, HPI, HI and PMA stimulation.

3 讨论

已有文献报道, HG、HI 和 HPI 使内皮依赖性血管舒张反应下降, NO 释放减少^[13], 血管张力增加, 在糖尿病动物模型可见毛细血管内皮细胞消失加速并伴有形态和功能改变^[4], 细胞间连接松散^[5]。本实验证明 HG、HPI、TNF- α 和 HI 作用于 EC 均引起 $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_n$ 的变化, 推测 Ca^{2+} 参与了它们对 EC 的作用机制。

细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的增加可因胞内 Ca^{2+} 从钙库释放造成。胞内 Ca^{2+} 的释放往往由第二信使介导, 胞外 Ca^{2+} 的内流除受第二信使调控外, 还直接与钙离子通道有关。HG、HPI 和

TNF- α 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能与二者均有关系。以 TNF- α 为例, 它可激活磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA₂) 通过花生四烯酸途径引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 还可能激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 通过三磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP3) 促使细胞内钙库释放 Ca^{2+} 而影响 $[Ca^{2+}]_i$ ^[7,8]。HG 和 HPI 影响胞内 Ca^{2+} 的确切途径尚不清楚。本实验观察了对蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 高亲和的 PMA 对 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用, 并与 HG、HPI 和 TNF- α 的作用进行对比。PMA 结构类似甘油二酯, 可直接进入完整细胞并激活 PKC, 同时引起 Ca^{2+} 内流, 而 PKC 激活后可使 IP3 受体蛋白磷酸化进而抑制贮池钙水平降低^[9,10]。实验中我们看到随 PMA 剂量增加, 胞内 Ca^{2+} 水平进行性下降尤其核区为显著, 可见细胞排钙现象与 PKC 激活密切相关。而 HG、TNF- α 和 HPI 对胞内钙的影响与之明显不同: 大剂量的 HPI 使 EC $[Ca^{2+}]_i$ 和 $[Ca^{2+}]_n$ 上升后并不回降至原水平以下, 而 HG 和 TNF- α 则使钙离子浓度持续维持在高于基线的水平, 均未出现 PMA 引起的明显的胞内 Ca^{2+} 排空现象, 提示 HG、TNF- α 和 HPI 对 Ca^{2+} 的作用不涉及 PKC 激活。

本实验中 HG、TNF- α 和 HPI 引起的 $[Ca^{2+}]_n$ 上升比 $[Ca^{2+}]_i$ 更明显, $[Ca^{2+}]_n$ 的升高并非简单地因为胞浆 Ca^{2+} 进入细胞核, 还与核内 IP3 介导的核内钙贮池中 Ca^{2+} 释放有关^[12], 可能核内 Ca^{2+} 有其独立的调节系统, 这从侧面提示 $[Ca^{2+}]_n$ 的重要性。目前认为在细胞损伤中 $[Ca^{2+}]_n$ 的升高也起关键作用^[13]。

动态观察中发现 TNF- α 和 HI 可引起 EC 钙振荡。钙振荡的产生是由于胞内 Ca^{2+} 节律性的释放, 其波型在不同类型的细胞, 甚至同一类细胞对不同刺激物的反应常不相同。“正弦曲线型振荡”常出现在 $[Ca^{2+}]_i$ 上升到最高水平, 往往意味着 $[Ca^{2+}]_i$ 的持续升高; 而“瞬变型”钙振荡是指基线水平发生的不连续的瞬间钙波动, 与 IP3 调节胞内贮存 Ca^{2+} 释放密切相关^[14]。有关钙振荡的生物学效应还不清楚。有观点认为它可能仅仅是调节胞内 Ca^{2+} 的负反馈机制作

用的结果,这种调节可使胞内 Ca^{2+} 维持较低水平,从而避免 Ca^{2+} 毒性作用^[16]。最近有报道它在内皮细胞的迁移中有重要作用^[17]。总之,这些致病因子作用于 EC 引发的钙振荡可能参与血管 EC 损伤的机制,值得进一步研究。

高胰岛素在本实验中未引起 EC 游离 Ca^{2+} 水平的明显升高,但它对于 EC 的损伤作用是为许多实验证实。提示我们虽然在糖尿病血管并发症中许多致病因子可能通过使血管 EC 的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 $[\text{Ca}^{2+}]_n$ 增高进而导致其功能和结构的改变,但也有一些致病因子对内皮细胞的损伤并非由于胞内 Ca^{2+} 的增加。是否可能存在另外的途径,有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Tooke JR. Microvascular function in human diabetes; A physiological perspective. *Diabetes*, 1995, 44(7): 721~726.
- 2 Gagliano D, Eriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease which role for oxidative stress. *Metabolism*, 1995, 44(3): 363~368.
- 3 Pieper GM, Meier DA, Hater SR. Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol*, 1995, 269 (3 Pt 2): H 845~850.
- 4 Meraji S, Jayakody L, Senaratne MPJ, et al. Endothelin dependent relaxation in aorta of BB rat. *Diabetes*, 1987, 36 (12): 978~981.
- 5 Dlgov VV, Eaikina OE, Bondarenko MF, et al. Aortic endothelium of alloxan diabetic rabbits; a quantitative study using scanning electron microscopy. *Diabetologia*, 1982, 22: 338~342.
- 6 Trump BF, Bere Zesky. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J*, 1995, 9(2): 219~228.
- 7 Tracey KJ, Ceramj A. Tumor necrosis factor; An updated review of its biology. *Crit Care Med*, 1993, 21(10): S415~422.
- 8 Fiers W. Tumor necrosis factor characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*, 1991, 285(2): 199~212.
- 9 Stojilkovic SS, Lida T, Merelli F, et al. Interaction between calcium and protein kinase in the control of signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *J Biol Chem*, 1991, 266(16): 10 377~384.
- 10 Irita K, Mclonell 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(1): 301~304.
- 11 Schwartz MA. Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. *J Cell Biol*, 1993, 120(4): 1 003~010.
- 12 Himpens B, Smedt DH, Casteels R. Relationship between Ca^{2+} changes in nucleus and cytosol. *Cell Calcium*, 1994, 16: 239~246.
- 13 Bellomo G, Perotti M, Taddei F, et al. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca^{2+} concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res*, 1992, 52(2): 1 342~346.
- 14 Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, et al. Integrin $\beta 1$ - and $\beta 3$ -mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol*, 1993, 121(1): 163~170.
- 15 Conforti G, Eanetti A, Pasquali RI, et al. Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition. *J Biol Chem*, 1990, 265(7): 4 011~019.
- 16 Berridge MJ. Calcium oscillation. *J Biol Chem*, 1990, 265: 9 583~586.
- 17 Hermanowaki VA, Aan Sreijp AB, Swiggard WJ, et al. Integrin modulating factor-1; a lipid that alter the function of leukocyte integrins. *Cell*, 1992, 68(1): 341~352.

(1997-03-04 收到, 1997-06-10 修回)