

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 02- 0143- 04

•实验研究•

葡萄糖和胰岛素对大鼠血管平滑肌细胞磷脂酶 A₂ 活性的影响廖璞, 廖雪松, 唐维, 康格非¹

(重庆市第三人民医院检验科, 重庆 400014; 1. 重庆医科大学检验系)

[关键词] 肌, 平滑, 血管; 磷脂酶 A₂; 动脉粥样硬化; 胰岛素; 高血糖; 抑制剂

[摘要] 为观察葡萄糖和胰岛素对血管平滑肌细胞磷脂酶活性的影响, 在培养基中分别加入一定浓度的葡萄糖或(和)胰岛素与大鼠血管平滑肌细胞共同孵育 72 h 后, 分别测定培养上清液中磷脂酶 A₂ 活性和 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性, 磷脂酶 A₂ 活性检测采用 [³H] - 油酸标记法, Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性检测采用以 ATP·2Na 为底物的比色法。结果发现大鼠血管平滑肌细胞暴露于高糖或(和)高胰岛素环境中, 上清液中磷脂酶 A₂ 活性增加, 而 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性下降, 并在一定浓度范围内呈剂量依赖性。葡萄糖浓度由 5.6 mmol/L 增加到 33.0 mmol/L, 上清液中磷脂酶 A₂ 活性由 $(4.2 \pm 0.2) \times 10^{12}/(\text{min} \cdot \text{L})$ 增加到 $(9.2 \pm 0.2) \times 10^{12}/(\text{min} \cdot \text{L})$; 而 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性由 $4.8 \pm 1.02 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 下降到 $2.06 \pm 0.99 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。胰岛素浓度由 5.0 Mu/L 增加到 1 000 Mu/L, 上清液中磷脂酶 A₂ 活性由 $(3.8 \pm 0.4) \times 10^{12}/(\text{min} \cdot \text{L})$ 增加到 $(11.8 \pm 0.6) \times 10^{12}/(\text{min} \cdot \text{L})$; 而 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性由 $4.0 \pm 1.68 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 下降到 $2.19 \pm 1.02 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$, 且进一步发现这一效应在作用 24 h 后才显著, 高糖和高胰岛素有协同作用。结果提示磷脂酶 A₂ 活性增高与糖尿病时动脉粥样硬化形成有关, 合理应用磷脂酶 A₂ 抑制剂有助于防止或延缓糖尿病并发动脉粥样硬化的发展。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

Effect of Glucose and Insulin on Phospholipase A₂ Activities of Vascular Smooth Muscle Cells in Rats

LIAO Pu, LIAO Xue- Song, TANG Wei, and KANG Ge- Fei

(Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

MeSH Muscle, Smooth, Vascular; Phospholipase A₂; Atherosclerosis; Insulin; Hyperglycemia; Inhibitor

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect and significance of glucose and insulin on phospholipase A₂ (PLA₂) activities of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** VSMCs in rats were incubated with the DEME which had different concentration glucose or/and insulin for 72 h PLA₂ activities were detected with [³H] - Oleate radioactivity (cpm). **Results** PLA₂ activities increased with high concentration of glucose or/and insulin and there were dose- dependent relationship. **Conclusion** The increased PLA₂ activities were associated with atherosclerosis in diabetes, so treatment with PLA₂ inhibitor could prevent the pathological progress of atherosclerosis in diabetes.

糖尿病患者冠心病的发生率比非糖尿病患者高 2~ 3 倍, 且具有发生早、进展快、预后差的特点, 是当今糖尿病患者致死致残的主要原因, 确切机制尚不清楚, 文献[1, 2] 认为与高血糖、高胰岛素血症等因素有关。磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂) 是一类能催化磷酸甘油酯分子上 Sn - 2 位酰基酯键水解的脂解酶, 新近的研究表明, 磷脂酶 A₂ 与血管平滑肌细

胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块形成有关^[3- 5]。

经文献检索发现关于葡萄糖、胰岛素对 VSMC 释放磷脂酶 A₂ 的影响则稀有报道。为此, 我们以体外培养的大鼠 VSMC 为实验对象, 观察了不同浓度葡萄糖或/和胰岛素对 VSMC 释放磷脂酶 A₂ 的影响, 旨在探讨磷脂酶 A₂ 在糖尿病合并 As 中的作用及可能机制, 为临床治疗提供新思路。

[作者简介] 廖璞, 女, 1966 年 9 月出生, 博士研究生, 主管检验师, 1984~ 1989, 重庆医科大学医学检验系本科; 1989~ 1997, 重庆市第三人民医院检验科工作; 1997~ 1999, 重庆医科大学医学检验系硕士研究生; 1999~, 重庆医科大学医学检验系博士研究生

1 材料和方法

1.1 细胞制备

取3月龄大鼠主动脉腹腔段以组织贴块法在37℃、5% CO₂条件下进行VSMC原代培养,培养基用含20%新生牛血清(NBS)的DMEM培养基,待细胞生长融合成片后,以0.25%胰蛋白酶消化,进行传代培养,选择生长良好的第4~5代细胞进行实验。

1.2 细胞培养和实验分组

经消化的VSMC悬液以 1×10^8 /L密度于96孔培养板内,DMEM(含1%新生牛血清)培养基孵育24h,继换成以含20%新生牛血清的DMEM为基质,加入不同浓度的葡萄糖(5.6~33 mmol/L)或(和)胰岛素(5~1 000 Mu/L)的培养基继续培养。实验共分15组:葡萄糖设6个浓度组;胰岛素设5个浓度组;葡萄糖和胰岛素合用设4个浓度组(表1, Table 1)。每组试验设4孔,重复3次。

1.3 磷脂酶A₂活性测定

各实验组培养72h后,收集上清液于-20℃保存,参照Maki等^[6]方法,测定磷脂酶A₂活性。其原理是以[9, 10(n)-³H]油酸标记的大肠杆菌膜磷脂作底物,经磷脂酶A₂的水解作用,释放出[9, 10(n)-³H]油酸,然后分离并收集该产物,作液体闪烁计数器测定即可求出磷脂酶A₂活性。试验方法为将50 μL上清液与1.0 mL分析混合物(含pH 7.0 100 mmol/L Tris HCl, 3.0 mmol/L CaCl₂, 2.5×10^8 个[9, 10(n)-³H]油酸标记的大肠杆菌)混匀后置37℃振荡水浴反应1h后,加入5 mL改良的Dole试剂终止反应,再加20 mL正庚烷和3 mL三蒸水剧烈振摇使分层,取上层液体作液体闪烁计数器测定,结果以1 L上清液中的每分钟计数值/[$(\text{min} \cdot \text{L})$]表示。

1.4 Na⁺-K⁺依赖式ATP酶活性测定^[7]

上述各组细胞培养72h后,用PBS悬液制作匀浆,取0.1 mL匀浆加1.0 mL孵育液于37℃保温15 min,孵育液的主要成分:200 mmol/L Tris HCl(pH 7.4),左旋咪唑6 mg, 1 mmol/L NaCl, 200 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl₂,底物为ATP·2Na,然后加入15%三氯乙酸1 mL终止反应,离心取上清液1 mL加入钼酸氨0.5 mL、1-2-4氨基萘酚磺酸2 mL,充分混匀15 min后使酶分解产物无机磷呈色,分光光度计测定680 nm处吸光度值,与标准管相比求得Na⁺-K⁺依赖式ATP酶活性。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均值差异用t检验,量效关系间作直线相关分析。

2 结果

2.1 不同浓度的葡萄糖对大鼠血管平滑肌细胞磷脂酶A₂活性的影响

在一定葡萄糖浓度范围(11.0~28.0 mmol/L)内,磷脂酶A₂活性与葡萄糖浓度呈平行趋势($r = 0.6975, P < 0.05$),当葡萄糖浓度为28.0 mmol/L时,磷脂酶A₂活性最大,葡萄糖浓度为33.0 mmol/L时,磷脂酶A₂活性呈下降趋势,但与5.6 mmol/L葡萄糖组相比仍有显著性差异(表1, Table 1)。

表1. 不同培养条件下血管平滑肌细胞磷脂酶A₂和Na⁺-K⁺依赖式ATP酶活性.

Table 1. Activities of PLA₂ and Na⁺-K⁺-ATPase in VSMC cultured with different DEME ($\bar{x} \pm s, n = 4$).

Groups	Phospholipase A ₂ [$\times 10^{12}/(\text{min} \cdot \text{L})$]	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase [$\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$]
Glucose (5.6 mmol/L)	4.2 ± 0.2	4.8 ± 0.02
Glucose (11.1 mmol/L)	6.5 ± 0.4 ^a	3.1 ± 0.97 ^a
Glucose (16.7 mmol/L)	7.8 ± 0.1 ^b	2.8 ± 0.54 ^a
Glucose (22.0 mmol/L)	9.8 ± 0.4 ^b	2.6 ± 0.43 ^b
Glucose (28.0 mmol/L)	13.4 ± 0.3 ^b	1.98 ± 0.65 ^b
Glucose (33.0 mmol/L)	9.2 ± 0.2 ^b	2.06 ± 0.99 ^b
Insulin (5 Mu/L)	3.8 ± 0.4	4.0 ± 1.68
Insulin (10 Mu/L)	5.9 ± 0.5 ^c	3.3 ± 0.45 ^c
Insulin (100 Mu/L)	7.6 ± 0.2 ^d	2.8 ± 0.60 ^d
Insulin (500 Mu/L)	10.2 ± 0.4 ^d	2.4 ± 0.94 ^d
Insulin (1000 Mu/L)	11.8 ± 0.6 ^d	2.19 ± 1.02 ^d
G (22.0) + I (100)	15.7 ± 0.5d ^c	1.45 ± 0.34 ^{de}
G (22.0) + I (500)	17.9 ± 0.4d ^c	1.32 ± 0.56 ^{de}
G (28.0) + I (100)	18.2 ± 0.6d ^c	1.24 ± 0.77 ^{de}
G (28.0) + I (500)	18.0 ± 0.3d ^c	1.30 ± 0.48 ^{de}

G: glucose (mmol/L); I: insulin (Mu/L). a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with glucose of 5.6 mmol/L group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with glucose of high concentration groups; e: $P < 0.01$, compared with insulin of high concentration groups.

2.2 不同浓度的胰岛素对大鼠血管平滑肌细胞磷脂酶A₂活性的影响

从表1 (Table 1)可见,随着胰岛素浓度增加,磷脂酶A₂活性亦增加($r = 0.7482, P < 0.05$),表明胰岛素对磷脂酶A₂活性有促进作用且呈剂量依赖性,其最低效应浓度为10 Mu/L。

2.3 葡萄糖和胰岛素合用对大鼠血管平滑肌细胞磷脂酶A₂活性的影响

葡萄糖和胰岛素合用组较单纯高糖、高胰岛素组磷脂酶 A₂ 活性显著增高,表明葡萄糖和胰岛素对磷脂酶 A₂ 活性影响有协同作用(表 1, Table 1)。

2.4 葡萄糖或(和)胰岛素对大鼠血管平滑肌细胞磷脂酶 A₂ 活性影响的动态观察

从表 2 (Table 2) 可见, 4 组上清液中磷脂酶 A₂ 活性均随孵育时间延长而增加, 在孵育 12 h 后, 5.6 mmol/L 葡萄糖组与实验组间差别无显著性意义, 24 h 后, 5.6 mmol/L 葡萄糖组磷脂酶 A₂ 活性明显低于

其它实验组, 单纯高糖或高胰岛素组, 磷脂酶 A₂ 活性在孵育 72 h 时接近峰值, 96 h 时磷脂酶 A₂ 活性虽较 72 h 增加, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), 葡萄糖和胰岛素合用组在孵育 48 h 时接近峰值。结果提示葡萄糖和胰岛素对大鼠血管平滑肌细胞磷脂酶 A₂ 活性影响在作用 24 h 后才显著, 峰值在作用 72 h 左右。葡萄糖和胰岛素合用使效应作用增强, 峰值提前。

表 2. 葡萄糖和/或胰岛素对磷脂酶 A₂ 影响的动态观察。

Table 2. The change of phospholipase A₂ activities in VSMC cultured with different DEME ($\bar{x} \pm s, n = 4$) [$\times 10^{12}/(\text{min} \cdot \text{L})$].

Groups	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Glucose (5.6 mmol/L)	1.8 ± 0.4	2.6 ± 0.3	3.4 ± 0.4	4.2 ± 0.2	4.9 ± 0.6
Glucose (22.0 mmol/L)	2.0 ± 0.3	4.2 ± 0.5 ^a	7.5 ± 0.2 ^a	9.8 ± 0.4 ^b	10.7 ± 0.4 ^b
Insulin (100 Mu/L)	1.9 ± 0.6	3.8 ± 0.4 ^a	5.2 ± 0.3 ^a	7.6 ± 0.2 ^a	8.2 ± 0.6 ^b
Glucose + Insulin [*]	2.2 ± 0.5	6.4 ± 0.3 ^a	11.9 ± 0.6 ^b	12.3 ± 0.5 ^b	12.2 ± 0.6 ^b

* Concentration of glucose is 22.0 mmol/L and concentration of insulin is 100 Mu/L. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with glucose of 5.6 mmol/L group.

2.5 各组 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性

各组孵育 72 h 后, 5.6 mmol/L 葡萄糖组 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性明显高于各实验组(胰岛素浓度为 5 Mu/L 组除外), 葡萄糖和胰岛素合用组明显低于其它实验组, 表明葡萄糖和胰岛素都能抑制 VSMC 的 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性, 且二者有相加作用(表 1, Table 1)。

3 讨论

糖尿病的血管病变是临床上至今尚未解决的重要课题, 现已普遍认为糖尿病是冠心病发病的独立危险因素, 高血糖、高胰岛素血症、血管平滑肌细胞及 As 四者之间存在密切关系, 随着免疫组织化学、细胞培养、细胞分子生物学技术的应用, 此方面的工作取得了可喜的进展, 证实了高血糖、高胰岛素血症均为 As 的易患和危险因素, 而血管平滑肌细胞的增殖在 As 病变的发生发展过程中处于关键地位, 但详细机制尚未阐明。磷脂酶 A₂ 是体内重要磷脂酶, 可催化磷脂裂解产生游离的花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 和溶血磷脂, 后者是体内前列腺素、血栓素 A₂、血小板活化因子等血管活性物质及炎性介质的合成前体, 具有调节和影响血管的多种生理功能。根据结构和特异性, 磷脂酶 A₂ 可分为不同类型, iv 型磷脂酶 A₂ 主要由胰腺产生并且有消化功能, 结构

特点上在 11 位和 77 位半胱氨酸残基之间有二硫键相连。在急性胰腺炎等病理状况下可释放入循环血液, 造成全身性组织损伤。Ⓢ型磷脂酶 A₂ 存在于不同体液及某些蛇毒中, 在哺乳动物中主要由单核细胞、巨噬细胞、多形核白细胞、血管内皮细胞等分泌产生, 参与机体的抗菌作用, 大量活化后可参与机体的炎症损伤过程。结构上与 iv 型相似, 区别在于无 11 和 77 位半胱氨酸间的二硫键, 而在中间 C 环上有一个与末端 7 个氨基酸残基构成的二硫键。iv、Ⓢ型统称为分泌型磷脂酶 A₂, 分子质量为 14 kDa, 由 144 个氨基酸组成。相反, 胞浆中磷脂酶 A₂ 则主要存在于细胞中或游离于胞液或作为膜蛋白的成分之一存在于分隔膜和细胞膜上, 分子质量约为 85 kDa, 与分泌型磷脂酶 A₂ 无序列同源性, 由 749 个氨基酸组成, 主要介导受体依赖的花生四烯酸的代谢, 参与生物膜的转化、信号传递及细胞毒作用^[8]。根据动物实验、细胞培养和临床研究结果, Vadas 等^[9]认为血管平滑肌细胞是体内磷脂酶 A₂ 的主要来源。此结果促使人们将磷脂酶 A₂ 与上述四者联系起来, 探讨高糖和高胰岛素血症能否影响血管平滑肌细胞的磷脂酶 A₂ 活性, 且磷脂酶 A₂ 活性改变是否与 As 形成有关? Xia 等^[10]观察到体外培养的血管平滑肌细胞暴露于高糖环境中, 磷脂酶 A₂ 活性增加。本实验得出了相同的结果, 且进一步发现, 葡萄糖和胰岛素都能促进磷脂酶 A₂ 活性增加, 并在一定范围内呈

剂量依赖倾向,但二者这一效应在作用 24 h 后才明显,高糖和高胰岛素有协同作用。高糖和高胰岛素血症都是通过激活蛋白激酶 C (PKC) 通路促进磷脂酶 A₂ 的磷酸化而使其活性增加,但二者激活蛋白激酶 C 的生物化学机制是不同的,前者是通过二酯酰甘油(DAG)途径引起蛋白激酶 C 活化,后者是通过酪氨酸蛋白激酶活化导致 Ca²⁺ 通道的开放,促使蛋白激酶 C 活化。

本文进一步观察了高糖或(和)胰岛素导致磷脂酶 A₂ 活性增加时对血管平滑肌细胞的 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性的影响,发现与 5.6 mmol/L 葡萄糖组相比,各实验组 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性降低,其机制可能为磷脂酶 A₂ 活性增高促使花生四烯酸及其产物油酸的释放增多,后者已被证实可抑制 Na⁺ - K⁺ 依赖式 ATP 酶活性^[11],该酶是构成钠泵的必要成分,在细胞完整性的维持及细胞功能等的调节中起重要作用,其活性下降势必引起血管平滑肌细胞一系列生理过程的异常。

血管平滑肌细胞的增殖迁移是 As 形成的关键,新近的研究表明磷脂酶 A₂ 与血管平滑肌细胞的增殖迁移有关,并证实主要是 85 kDa 的磷脂酶 A₂ 介导的花生四烯酸释放在血管平滑肌细胞增殖中起关键作用,使用针对 85 kDa 的磷脂酶 A₂ 抑制剂可抑制血管平滑肌细胞增殖并呈剂量依赖性,但详细机制还不清楚,现有的资料表明花生四烯酸既不影响血管平滑肌细胞的细胞周期也不影响凋亡^[3]。细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的速度为正常低密度脂蛋白(LDL)的数倍至数十倍,故氧化型低密度脂蛋白可加速泡沫细胞形成,是促使 As 形成的另一个重要因素,Cane 等^[4]的研究表明磷脂酶 A₂ 可通过水解释放花生四烯酸,产生氧自由基使低密度脂蛋白发生氧化修饰形成氧化型低密度脂蛋白。此外,磷脂酶 A₂ 对低密度脂蛋白还可通过其它形式的修饰导致泡沫细胞形成^[6]。使人感兴趣的是,Elinder 等^[12]用免疫组织化学技术在 As 斑块区的动脉壁上直接发现了磷脂酶 A₂ 的存在,进一步检测发现,iv 型分泌型磷脂酶 A₂ 在正常和 As 动脉壁上均不存在,而 ㊟型分泌型磷脂酶 A₂ 在二者均呈阳性,但胞浆型磷脂酶 A₂ 仅在 As 动脉壁中发现,并且主要在内膜区造成炎症损害,此结果为磷脂酶 A₂ 参与 As 形成提供了直接证据。

糖尿病(DM)合并 As 的发生是一个复杂的病理过程,本文的研究结果提示了磷脂酶 A₂ 活性增高与糖尿病时 As 形成有关。因此,临床在有效控制葡萄糖和降低避免高胰岛素血症的同时,合理应用磷脂酶 A₂ 抑制剂对预防和延缓糖尿病合并 As 的发生发展具有积极的临床意义。

参考文献

- [1] Strandness DW, Priest RW, Gibbons GE. Combined clinical pathologic study of diabetes and nondiabetes peripheral disease [J]. *Diabetes*, 1996, **13**(2): 336-372
- [2] Ryuichi Fujiwara, Tsuguhiko Nakai. Effects of glucose transport activity in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **127**(1): 49-57
- [3] Anderson KM, Roshark A, Winkler JD, et al. Cytosolic 85- kDa phospholipase A₂- mediated release of arachidonic acid is critical for proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**(48): 30 504- 511
- [4] Cane A, Breton M, Koumanov K, et al. Oxidant- induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1998, **274**(4 Pt 1): c1040- 046
- [5] Eckey R, Menschikowski M, Lattke P, et al. Minimal oxidation and storage of low density lipoproteins result in an increased susceptibility to phospholipid hydrolysis by phospholipase A₂[J]. *Atherosclerosis*, 1997, **132**(2): 165- 176
- [6] Marki F, Franson R. Endogenous suppression of neutral- active and calcium- dependent phospholipase A₂ in human polymorphonuclear leukocytes [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1986, **879**(2): 149- 156
- [7] 蒋涛,汪恕萍,周波,等. 高葡萄糖介导 MDCK 细胞蛋白激酶 C 活性变化[J]. *重庆医科大学学报*, 1999, **24**(3): 236
- [8] Bonventre JV. Phospholipase A₂ and signal transduction [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1992, **3**: 128
- [9] Vadas P, Pruzanski W. Induction of phospholipase A₂ expression and pathogenesis of the sepsis syndrome [J]. *Circ Shock*, 1993, **39**(2): 160- 167
- [10] Xia Pu. Hyperglycemia decrease Na⁺ /K⁺ - ATPase activity by activation of protein kinase C and phospholipase A₂[J]. *Diabetes*, 1995, **44**(1): 62A
- [11] 顾卫群,许曼英. 维生素与糖尿病[J]. *国外医学内分泌学分册*, 1998, **18**(4): 196- 197
- [12] Elinder LS, Dumitrescu A, Larsson P, et al. Expression of phospholipase A₂ isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**(10): 2 257- 263

(此文 1999- 11- 22 收到, 2000- 04- 28 修回)

(此文编辑 胡必利)