

硒对 NO 诱导的内皮细胞 内游离钙离子浓度变化的影响*

邓 英 黄开勋 徐辉碧**

(华中科技大学药物研究所, 武汉 430074)

摘要 用 Fura2 显微荧光测钙技术, 研究了用外源性一氧化氮 (NO) 供体 S-亚硝基谷胱甘肽 (GSNO) 诱导的, 人脐静脉内皮细胞系 ECV-304 细胞胞内游离钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 升高以及硒的抑制效应. 结果表明, GSNO 作用于 ECV-304 细胞, 短时间内即可导致其胞内游离钙离子浓度升高. 胞外液换为无钙液或向胞外液中加入 $CdCl_2$ (1 mmol/L) 对 GSNO 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高无影响. 提示, GSNO 刺激主要引起胞内钙库释放. 而且, 一氧化氮清除剂血红蛋白 (Hb) 对这一过程有抑制作用, 说明 GSNO 引起的胞内钙库释放由 NO 介导. 经亚硒酸钠 (1 μ mol/L) 处理的细胞, 其 NO 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高幅度明显被抑制, 说明 NO 的这种作用可能与细胞的氧化还原状态有关.

关键词 NO, S-亚硝基谷胱甘肽, ECV-304 细胞, 硒, 钙离子浓度

学科分类号 Q257

胞内游离钙离子作为细胞内第二信使几乎参与一切外来信号调控细胞功能的信息转导过程. 它对细胞的代谢、肌肉细胞的收缩、内分泌细胞的分泌、神经细胞的递质释放等重要生理功能都有直接调控作用. 研究发现, 在高浓度葡萄糖、 H_2O_2 、氧化型低密度脂蛋白、高渗甘露醇、 β 样淀粉蛋白等因素诱导的血管内皮细胞损伤过程中, 均检测到胞内游离钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 升高^[1~6]. 提示, 血管内皮细胞钙稳态紊乱可能是许多因素致内皮功能障碍相关疾病的最后公共通路.

NO 是一种重要的生物信使分子, 参与多种生理和病理过程. 但过量的一氧化氮具有细胞毒作用, 可导致细胞凋亡或坏死. 研究表明, 一氧化氮通过诱发细胞内钙超载, 导致多种细胞损伤^[7]. 但目前对于血管内皮细胞中过量 NO 与 $[Ca^{2+}]_i$ 之间的相关关系尚不十分清楚. 本文将研究高浓度 NO 对 ECV-304 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响及硒的作用.

1 材料和方法

1.1 试剂

胰蛋白酶、青霉素、链霉素、Fura2/AM、 $CdCl_2$ 、Nifedipine 为 Sigma 公司产品. DMEM、新生牛血清 (NCS) 为 Life Technologies, Inc 产品. 其他试剂均为分析纯. 人脐静脉内皮细胞 (ECV-304) 贴壁生长细胞株购自武汉大学动植物细胞保藏中心. 可编程单色光源 (T. I. L. L. Photonics,

Germany) 倒置荧光显微镜 (Zeiss Axiovert 100, Germany), Macintosh 650 计算机 (Apple Macintosh Quadra 650, USA), 膜片钳放大器 (HEKA, Germany), 电极拉制仪 (Narishige, Japan).

S-亚硝基谷胱甘肽 (GSNO) 参照文献 [8] 方法制备并确定浓度: GSH 24.6 mg, $NaNO_2$ 5.6 mg 加 1 ml 1 mol/L HCl. 反应完毕后加入 0.4 mol/L NaOH 2 ml 得 GSNO, 通过测定紫外吸收光谱标定含量.

胞外液由以下试剂组成: NaCl 140 mmol/L; KCl 2.8 mmol/L; $CaCl_2$ 2 mmol/L; $MgCl_2$ 1 mmol/L; 葡萄糖 10 mmol/L; Hepes 10 mmol/L; pH 7.3.

无钙细胞外液由以下试剂组成: NaCl 140 mmol/L; KCl 2.8 mmol/L; $CaCl_2$ 2 mmol/L; $MgCl_2$ 3 mmol/L; 葡萄糖 10 mmol/L; Hepes 10 mmol/L; pH 7.3.

1.2 细胞培养

ECV-304 细胞代数为 10~20 代. 用含 10% 新生牛血清及 100 mg/L 链霉素和 100 mg/L 青霉素的 DMEM 培养基作为培养液, 置于 5% CO_2 培养

* 国家自然科学基金资助项目 (29971012).

** 通讯联系人.

Tel: 027-87543532, E-mail: dengying001@263.net

收稿日期: 2001-04-06, 接受日期: 2001-05-28

箱中 37℃ 恒温培养, 每 2 天更换培养液一次, 生长融合的细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行传代培养。

1.3 实验分组

将细胞在 DMEM (10% NCS) 培养液中培养达亚融合状态, 换入无血清培养液培养 24 h, 然后将细胞分为加硒组与对照组, 加硒组加入含 1 μmol/L 亚硒酸钠的无血清培养液, 培养 24 h。

1.4 单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定

1.4.1 ECV-304 细胞荧光负载: 将细胞接种于含盖玻片的 24 孔培养板上, 按 1.3 方法加硒及不加硒分组培养 24 h 后, 向细胞中加入 Fura2/AM (终浓度为 1 μmol/L), 于 37℃ 培养箱中温育 30 min 后, 吸出培养液, 用胞外液洗涤一次, 除去未负载的 Fura2/AM。取出贴附有细胞的盖玻片置于测定槽内。

1.4.2 加药方式: GSNO 采用微玻璃管吹加给药。加药管尖端距细胞约 50 μm。用 5 ml 注射器施加正压吹药, 注射器给药量控制在 0.6 ml, 吹药 30 s 后, 立即停止吹药。其余药品均在吹加 GSNO 前 30 min 直接加入胞外液中。

1.4.3 单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定: 单细胞 $[Ca^{2+}]_i$

的测定见文献。 $[Ca^{2+}]_i$ 的计算公式如下:

$$[Ca^{2+}]_i = K_{eff} \frac{R - R_{Min}}{R_{Max} - R}$$

$$R = F_{345} / F_{380}$$

其中, F_{345} 、 F_{380} 分别为激发光波长为 345 nm、380 nm 时的发射荧光强度; R_{Min} 是在零钙浓度时的荧光比值; R_{Max} 是在高钙浓度时的饱和荧光比值; K_{eff} 为有效结合常数。 R_{Min} 、 R_{Max} 、 K_{eff} 通过全细胞膜片钳方法得到。

1.5 蛋白质定量

蛋白质浓度按 Bradford 的考马氏亮蓝法测定, 以 BSA 为标准。

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异显著性用 t 检验。

2 结 果

2.1 硒抑制 GSNO 引发的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高

在胞外液中测得静息状态下正常 ECV-304 细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $120\% \pm 25.21\%$; 加硒组细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $100\% \pm 20.21\%$ 。二者之间无显著差异。在本实验条件下, 300 μmol/L、500 μmol/L 及 800 μmol/L 的 GSNO 均可引起正常 ECV-304 细

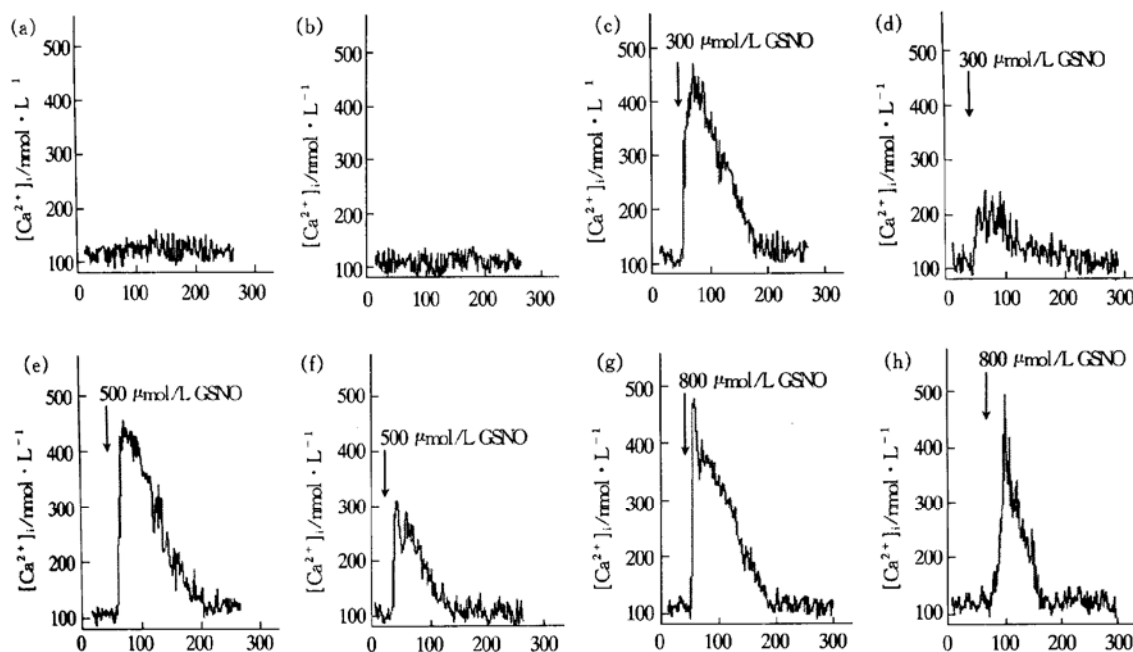


Fig. 1 Effect of selenium on GSNO-induced single cell $[Ca^{2+}]_i$ increase

Cells were pretreated with or without sodium selenite (1 μmol/L) for 24 h. Different concentrations of GSNO (300 μmol/L, 500 μmol/L, 800 μmol/L) solution were puffed to the cells and maintained for 30 s. The $[Ca^{2+}]_i$ was measured by Fura2 as a fluorescence probe. (a) normal cell; (b) selenium supplied cell; (c) normal cell puffed with 300 μmol/L GSNO; (d) selenium supplied cell puffed with 300 μmol/L GSNO; (e) normal cell puffed with 500 μmol/L GSNO; (f) selenium supplied cell puffed with 500 μmol/L GSNO; (g) normal cell puffed with 800 μmol/L GSNO; (h) selenium supplied cell puffed with 800 μmol/L GSNO; ↑: the time start to puff GSNO to the cell.

胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高 (图 1c、e、g; 图 2). $[Ca^{2+}]_i$ 在吹加 GSNO 后立即开始升高, 并随着吹药时间的延长持续上升, 随着 GSNO 作用的解除, $[Ca^{2+}]_i$ 迅速下降, 1~2 min 内恢复到基础值水平. 由结果可见, 不同浓度的 GSNO 均引起 $[Ca^{2+}]_i$ 在 400~600 nmol/L 范围内升高, 但不存在浓度效应. 相同条件下, 300 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 及 800 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSNO 对加硒组 ECV-304 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响见图 1d、f、h 及图 2. 结果表明, 细胞中硒可明显抑制 300 $\mu\text{mol/L}$ 及 500 $\mu\text{mol/L}$ GSNO 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高. 以下实验若无特殊说明, 所用 GSNO 剂量均为 500 $\mu\text{mol/L}$.

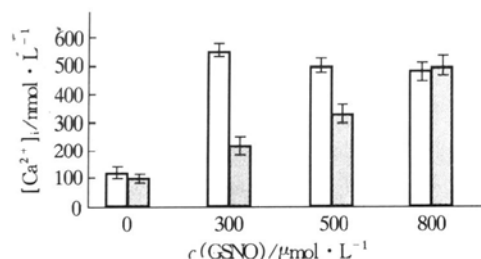


Fig. 2 Statistical result of the effect of selenium on GSNO-induced single cell $[Ca^{2+}]_i$ increase

Cells were pretreated with or without sodium selenite (1 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Different concentrations of GSNO (300 $\mu\text{mol/L}$, 500 $\mu\text{mol/L}$, 800 $\mu\text{mol/L}$) solution were puffed to the cells and maintained for 30 s. The $[Ca^{2+}]_i$ was measured by Fura-2 as a fluorescence probe ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$). □: normal cell; ■: 1 $\mu\text{mol/L}$ Na_2SeO_3 .

2.2 Hb 对 GSNO 引起细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响

胞外液中加入一氧化氮清除剂 Hb, 能抑制 GSNO 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 说明这一过程是由 NO 介导 (图 3).

2.3 GSNO 引起 ECV-304 细胞胞内钙库释放

胞外无钙条件, 对 GSNO 诱导的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高几乎无影响 ($n = 10$) (图 4). 而且, 向胞外液中滴加非特异性钙离子通道阻断剂 CdCl_2 (1 mmol/L), 使之与细胞作用 5~30 min 后, 记录细胞 $[Ca^{2+}]_i$, 发现其对 GSNO 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高无影响 ($n = 10$). 图 4 是一例细胞在胞外液有钙、换为无钙、再换为有钙并滴加 CdCl_2 时, 500 $\mu\text{mol/L}$ GSNO 作用正常细胞的结果. 以上结果表明, NO 引起 ECV-304 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高主要是由于胞内钙库释放.

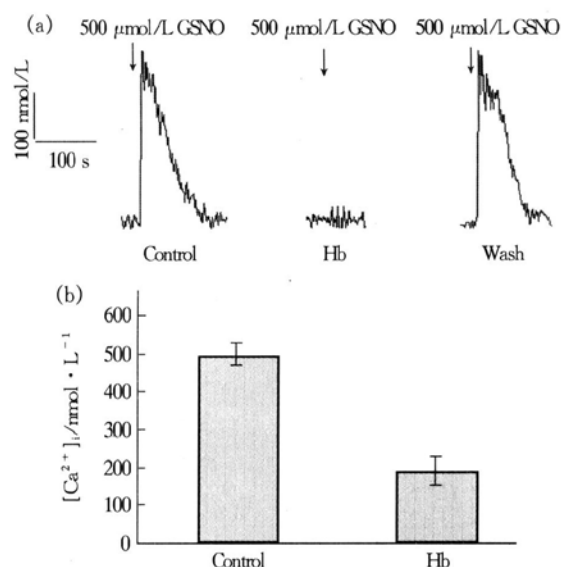


Fig. 3 Effect of Hb on GSNO-induced single cell $[Ca^{2+}]_i$ increase

Cells were pretreated with or without Hb (5 $\mu\text{mol/L}$) for 3 h. 500 $\mu\text{mol/L}$ GSNO solution was puffed to the cells and maintained for 30 s. The $[Ca^{2+}]_i$ was measured by Fura-2 as a fluorescence probe. (a) result of one single cell, ↓: indicates the time starting to puff GSNO to the cell; (b) statistical result of five cells ($n = 5$).

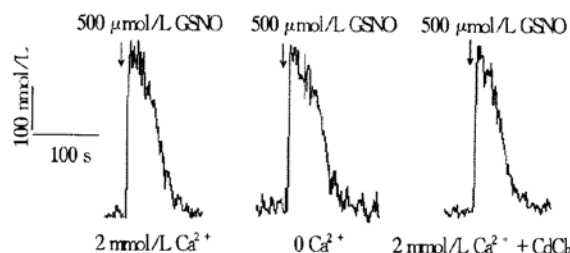


Fig. 4 Effect of GSNO in Ca^{2+} free bath on single cell $[Ca^{2+}]_i$

500 $\mu\text{mol/L}$ GSNO solution was puffed to the cells and maintained for 30 s. The $[Ca^{2+}]_i$ was measured by Fura-2 as a fluorescence probe. ↓: the time start to puff GSNO to the cell.

3 讨 论

细胞正常生理功能的发挥依赖于细胞内外钙离子浓度维持在一一定的比例, 钙信号失调必然导致机体生理功能的紊乱. 胞内钙离子浓度对外界刺激十分敏感, 测定胞内钙离子浓度变化能够反映细胞受外界刺激的程度. 近年来研究表明, 过量 NO 及其与超氧阴离子的反应产物 ONOO^- 引起细胞内游离钙离子浓度升高是其造成细胞损伤的机制之一^[9].

Ca^{2+} 螯合剂 BAPTA-AM 以及钙激活中性蛋白酶 calpain 可阻断过量外源性 NO 供体 SNAP 诱导的胰岛 β 细胞损伤^[10]. 本文采用 Fura-2 显微荧光测钙法, 在单个细胞上记录了 GSNO 对 ECV-304 细胞胞内钙离子浓度的影响. GSNO 是一种 NO 缓释剂, 其特点是在细胞培养液中可持续、稳定地释放 NO^[11]. 本实验条件下, 当向细胞表面持续吹药时, GSNO 释放的 NO 刺激细胞, 导致细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高并在 5s 内达到其峰值. 吹药 30 s 后, 停止吹药, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速下降, 在 1~2 min 内恢复到基值, 这可能有两方面的原因: a. 用于吹药的微玻璃管电极尖直径仅为几微米, 故吹出的 GSNO 仅有几微升, 这些 GSNO 在 1 ml 的胞外液中迅速扩散, 导致其浓度被迅速稀释; b. 扩散进入胞外液中的 GSNO 释放出 NO, NO 的半衰期极短, 大约为 3~5 s, 在培养液中很快就被代谢为硝酸盐和亚硝酸盐. 用 NO 特异性清除剂 Hb 可显著抑制 GSNO 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 进一步证实了这一过程中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是由 NO 介导的. 这一结果与外源性 NO 供体 (包括 GSNO、SNAP) 对嗜中性粒细胞的作用结果一致^[12]. 提示 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高可能参与 NO 及其衍生物诱导的内皮细胞损伤.

有报道认为, 活性氧通过 Ca^{2+} 通路增加 Ca^{2+} 传递及抑制 Ca^{2+} 泵, 使内皮细胞胞质中 IP_3 依赖的 Ca^{2+} 释放, 抗氧化剂对这一过程具有抑制作用^[13,14]. NO 是一种脂溶性的小分子, 具自由基活性, 可以自由扩散透过细胞膜、线粒体膜, 与某些蛋白质的血红素辅基及铁硫中心相互作用, 影响蛋白质的构象, 抑制线粒体呼吸链酶活性, 并可抑制过氧化氢酶活性导致线粒体内源性 H_2O_2 生成和积累, H_2O_2 与 NO 在超氧化物歧化酶的作用下, 快速反应, 进一步生成过氧化亚硝基等过氧化物, 并扩散进细胞周围, 导致线粒体功能障碍^[15], 释放 Ca^{2+} ^[16]. 而通常情况下, 大多数内源性活性氧 (如 O_2^- 、 $\text{OH}^\bullet$ 和 H_2O_2 等) 的有害效应可被细胞内有关酶和低分子质量的抗氧化物质所拮抗, 细胞具有与氧化物质相配的抗氧化酶系统, 包括 MnSOD、CuZnSOD、过氧化氢酶以及依赖硒的谷胱甘肽过氧化物酶等. 本实验条件下, 加硒组细胞中, 相同条件下, 300 $\mu\text{mol/L}$ GSNO 可导致部分细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高, 但其峰值均在 150~220 nmol/L 间, 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSNO 可导致细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高至 250~330 nmol/L, 而

800 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSNO 导致的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高, 其峰值均在 480~680 nmol/L 之间, 说明细胞中的硒在一定程度上, 可调节 NO 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高. 这可能是因为细胞中包括线粒体中依赖于硒的谷胱甘肽过氧化物酶催化 H_2O_2 生成 H_2O , 从而缓解 NO 导致的 H_2O_2 积累, 减轻其对线粒体的损伤. 从而抑制 Ca^{2+} 释放.

我们在实验中还观察到, 胞外钙离子浓度及钙离子通道阻断剂对 GSNO 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高无影响, 说明 GSNO 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是其作用于胞内钙库的结果. 这进一步提示 NO 介导的胞内钙离子浓度升高可能与胞内重要钙库线粒体受损有关.

参 考 文 献

- 1 Wu Q D, Wang J H, Fennessy F, *et al.* Taurine prevents high-glucose induced human vascular endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol*, 1999, **277** (6 Pt 1): C1229~1238
- 2 Shimura H, Yamaguchi M, Kuzume M, *et al.* Prevention of reactive oxygen-induced endothelial cell injury by blocking its process. *Eur Surg Res*, 1999, **31** (5): 390~398
- 3 Lin C P, Lynch M C, Kochevar I E. Reactive oxidizing species produced near the plasma membrane induce apoptosis in bovine aorta endothelial cells. *Exp Cell Res*, 2000, **259** (2): 351~359
- 4 Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, *et al.* Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol*, 1998, **123** (3): 565~573
- 5 Malek A M, Goss G G, Jiang L, *et al.* Mannitol at clinical concentrations activates multiple signaling pathways and induces apoptosis in endothelial cells. *Stroke*, 1998, **29** (12): 2631~2640
- 6 Suo Z, Fang C, Crawford F, *et al.* Superoxide free radical and intracellular calcium mediate A beta (1-42) induced endothelial toxicity. *Brain Res*, 1997, **762** (1~2): 144~152
- 7 Nakata M, Uto N, Maruyama I, *et al.* Nitric oxide induces apoptosis via Ca^{2+} -dependent processes in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Cell Struct Funct*, 1999, **24** (6): 451~455
- 8 Stefan F, Birgit S, Heiko K. Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like tyrosine kinase is mediated by nitric oxide in rat renal mesangial cells. *Biochem J*, 1999, **338**: 367~374
- 9 Brown G C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1411** (2~3): 351~369
- 10 Nakata M, Uto N, Maruyama I, *et al.* Nitric oxide induces apoptosis via Ca^{2+} -dependent processes in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Cell Struct Funct*, 1999, **24** (6): 451~455
- 11 Anne C L, Gwyn T W, John H B, *et al.* Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. *FEBS Letters*, 1997, **400** (3): 285~288
- 12 Loitto V M, Nilsson H, Sundqvist T, *et al.* Nitric oxide induces dose dependent $\text{CA}(2+)$ transients and causes temporal morphological hyperpolarization in human neutrophils. *J Cell Physiol*, 2000, **182** (3): 402~413
- 13 Shimura H, Yamaguchi M, Kuzume M, *et al.* Prevention of

- reactive oxygen-induced endothelial cell injury by blocking its process. *Eur Surg Res*, 1999, **31** (5): 390~ 398
- 14 Lorenz B, Schluter T, Bohnensack R, *et al.* Effect of flupirtine on cell death of human umbilical vein endothelial cells induced by reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol*, 1998, **56** (12): 1615~ 1624
- 15 Brown G C, Borutaite V. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp*, 1999, **66**: 17~ 25
- 16 Richter C. Nitric oxide and its congeners in mitochondria: implications for apoptosis. *Environ Health Perspect*, 1998, **106** (Suppl 5): 1125~ 1130

Effects of Selenium on NO-induced Intracellular Free Calcium Concentration Change in Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

DENG Ying, HUANG Kai-Xun, XU Hui-Bi**

(Pharmaceutical Institute, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract The NO-induced intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) rise and the inhibiting effect of selenium on this process were determined by using Fura-2/AM fluorescence measurement method in a human umbilical vein endothelial cell line: ECV-304. Experimental results indicated that there was a fast rise of $[Ca^{2+}]_i$ by the treatment of S-nitrosoglutathione (GSNO), a donor of NO. The rise of $[Ca^{2+}]_i$ was inhibited by Hb, a scavenger of NO. These results suggested that this rise of $[Ca^{2+}]_i$ was induced by NO. There was no effect on $[Ca^{2+}]_i$ response to NO by removing calcium ion from bath, or by adding the non-selective calcium channel antagonist, $CdCl_2$ (1 mmol/L) to the bath. When the cells were pretreated by sodium selenite (1 μ mol/L), the rise of $[Ca^{2+}]_i$ induced by NO was obviously inhibited. This result suggested that selenium can inhibit calcium store release.

Key words NO, S-nitrosoglutathione, ECV-304 cell, selenium, $[Ca^{2+}]_i$

* This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (29971012).

** Corresponding author. Tel: 86-27-87543532, E-mail: dengying001@263.net

Received: April 6, 2001 Accepted: May 28, 2001