

[文章编号] 1000-4718(2008)09-1665-05

· 论 著 ·

血管生成素-1 激活 tyrosine kinase/PI3K 增加血管内皮细胞 $[Mg^{2+}]_i$ *

谢同杰¹, 洪炳哲^{1△}, 李胜范², 王丽萍¹, 朴海南¹, 高立建³, 刘学田¹, 陈毓婷⁴
(大连大学附属新华医院¹心内科,²中心实验室,辽宁 大连 116021;³中国医学科学院,中国协和医科大学
阜外心血管病医院冠心病研究室,北京 100037;⁴延吉市卫生局疾病预防控制中心,吉林 延吉 133000)

[摘要] 目的:探讨血管生成素-1(Ang-1)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)内游离镁离子浓度($[Mg^{2+}]_i$)的调节机制。方法:我们采用荧光指示剂 mag-fura-2,运用 PTi 阳离子测定系统动态测 HUVECs 的 $[Mg^{2+}]_i$ 。结果:Ang-1 诱导的 $[Mg^{2+}]_i$ 增加与细胞外 Mg^{2+} 浓度无关。Ang-1 诱导的 $[Mg^{2+}]_i$ 增加与细胞内 Ca^{2+} 浓度无关。经酪氨酸激酶阻断剂(tyrphostin A23 和 genistein), 磷脂酰 3 激酶阻断剂(wortmannin 和 LY294002)预处理,均显著阻断 Ang-1 诱导的 $[Mg^{2+}]_i$ 增加。但经活化丝裂原激活激酶阻断剂(SB202190 和 PD98059)预处理,不能阻断 Ang-1 诱导的 $[Mg^{2+}]_i$ 增加。结论:Ang-1 通过酪氨酸激酶/磷脂酰 3 激酶信号传递途径使细胞内的 Mg^{2+} 库释放 Mg^{2+} ,从而增加 HUVECs 的 $[Mg^{2+}]_i$ 。

[关键词] 血管生成素 1; 镁; 酪氨酸激酶; 1-磷脂酰肌醇 3-激酶

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Angiotensin-1 increases intracellular free Mg^{2+} by tyrosine kinase/PI3K in HUVECs

XIE Tong-jie¹, HONG Bing-zhe¹, LI Sheng-fan², WANG Li-ping¹, PIAO Hai-nan¹, GAO Li-jian³, LIU Xue-tian¹, CHEN Yu-ting⁴

(¹Department of Cardiology, ²Center Laboratory of Xinhua Hospital, Dalian University Medical School, Dalian 116021, China; ³Section of Coronary Heart Disease Research, Fuwai Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100037, China; ⁴Center for Disease Control, Board of Health of Yanji City, Yanji 133000, China. E-mail: hongbingzhe@hotmail.com)

[ABSTRACT] AIM: The mechanism of angiotensin-1 (Ang-1) in mediating increase in intracellular free magnesium ($[Mg^{2+}]_i$) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was investigated in this study. **METHODS:** The change of $[Mg^{2+}]_i$ in HUVECs was quantitatively detected in intracellular cation measurement system via loaded with the fluorescent magnesium indicator mag-fura-2. **RESULTS:** Ang-1 increased $[Mg^{2+}]_i$, and there was not any significant difference among the groups of 0 mmol/L and 1 mmol/L of extracellular Mg^{2+} . Similar results were obtained in groups done with Ca^{2+} . Pretreatment with tyrosine kinase inhibitors (tyrphostin A23 and genistein), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors (wortmannin and LY294002) blocked the increase in $[Mg^{2+}]_i$ induced by Ang-1. However, mitogen-activated protein kinase inhibitors (SB202190 and PD98059) had no effect on the Ang-1-induced $[Mg^{2+}]_i$ increase. **CONCLUSION:** These results suggest that the increase in $[Mg^{2+}]_i$ by Ang-1 come from intracellular Mg^{2+} pools mediated by tyrosine kinase/PI3K-dependent signaling pathways.

[KEY WORDS] Angiotensin-1; Magnesium; Tyrosine kinase; 1-phosphatidylinositol 3-kinase

镁离子(Mg^{2+})是细胞内第二多的重要的二价阳离子。 Mg^{2+} 是生物体内 320 种以上酶的辅助因子^[1]。健康人的血清 Mg^{2+} 浓度保持稳定。小肠末端受损、长期禁食、酗酒、术后受刺激等常引起低镁血症^[2]。 Mg^{2+} 缺乏或减少成为心血管系统疾病的重

要病因之一,如动脉血栓症、动脉硬化症、心肌缺血、心肌梗死、高血压、心律失常、心衰等危及生命的疾病,补充镁可显著降低血压,稳定心律失常和急性心肌梗死^[3]。虽然人们知道 Mg^{2+} 在细胞内起非常重要的作用,但对细胞内游离形式 Mg^{2+} 浓度($[Mg^{2+}]_i$)的调

[收稿日期] 2007-05-09 [修回日期] 2007-10-29

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30600240)

△通讯作者 Tel: 0411-82111169; E-mail: hongbingzhe@hotmail.com

节机制还不清楚。

血管生成素-1 (angiopoietin-1, Ang-1) 在新血管形成和成熟中起关键性作用^[4]。我们前期研究发现血管形成因子 Ang-1 能增加人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的 $[Mg^{2+}]_i$, 本研究进一步探索 Ang-1 对 HUVECs $[Mg^{2+}]_i$ 的调节机制。

材 料 和 方 法

1 材料

Mag-fura-2, acetoxymethyl (AM) 购于 Molecular Probes。Angiopoietin 1 购于 R & D Systems。M199 培养基、胰蛋白酶、genistein、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、1,2-bis(-2aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis-(acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM) 等购于 Sigma Chemical。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购于 Gibco。Tyrphostin A23、wortmannin、LY294002、SB202190、PD98059 购于 Calbio Chemical。胶原酶 II (Collagenase type II) 购于 Worthington。

2 方法

2.1 血管内皮细胞分离 根据 He 等^[5]描述的方法分离得到 HUVECs。

2.2 血管内皮细胞原代培养 取 24 孔培养板, 每孔内放置载玻片后接种 2×10^3 个 HUVECs, 置于 37°C 、5% CO_2 饱和的培养箱内培养。每隔 2-3 d 传代 1 次, 取 2-4 代 HUVECs 用于实验^[6]。

2.3 离子荧光剂的负荷法 在直径为 3 cm 的培养板内加入 1.5 mL 的无 FBS 的 M199 培养基 (mag-fura-2/AM 的最终浓度为 $3 \mu\text{mol/L}$), 从 24 孔培养板中选择 HUVECs 生长良好的载玻片转移到 3 cm 的培养板, 置于 37°C 、5% CO_2 饱和的培养箱内孵育 30 min, 用无 FBS 的 M199 培养基离心洗涤 3 次 (500 r/min), 去除残存的细胞外 mag-fura-2/AM, 在 HEPES 缓冲液中保存^[6]。

2.4 离子荧光法测定细胞内 Mg^{2+} 浓度 ($[Mg^{2+}]_i$)

mag-fura-2/AM 负荷的 HUVECs 的载玻片, 置于 chamber 中, 倒置荧光显微镜 (Nikon) 锁定单个细胞, 然后利用波长为 340 nm 和 380 nm 紫外线激活离子荧光剂, 475 nm 收集发散光, 离子荧光测定仪 (PTi system) 定量测定 $[Mg^{2+}]_i$ 的动态变化。Mag-fura-2 的 Kd 值是 1.5 mmol/L ^[6]。HEPES 缓冲液的组成是: 145 mmol/L 或 0 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L 或 0 mmol/L (含 5 mmol/L EDTA) MgCl_2 , 11 mmol/L glucose, 10 mmol/L HEPES, pH 7.35。

3 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验。

结 果

1 Ang-1 对 HUVECs $[Mg^{2+}]_i$ 的影响

经过测定得出静息状态下 HUVECs 的 $[Mg^{2+}]_i$ 是 $0.52 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$ ($n = 58$)。图 1 表示细胞外分别存在 MgCl_2 1 mmol/L (A 组) 时, 给予 Ang-1 ($10 \mu\text{g/L}$) 后 5 min 开始 $[Mg^{2+}]_i$ 浓度增加, 到 30 min 时达到峰值, 其增高浓度分别为 $0.68 \text{ mmol/L} \pm 0.10 \text{ mmol/L}$ ($n = 10$), 细胞外无 MgCl_2 (0 mmol/L) (B 组) 时, 同样给予 Ang-1 ($10 \mu\text{g/L}$) 后 30 min 时达到峰值, 其增高浓度为 $0.63 \text{ mmol/L} \pm 0.09 \text{ mmol/L}$ ($n = 10$)。A 组与 B 组之间差异均无显著 ($P > 0.05$)。

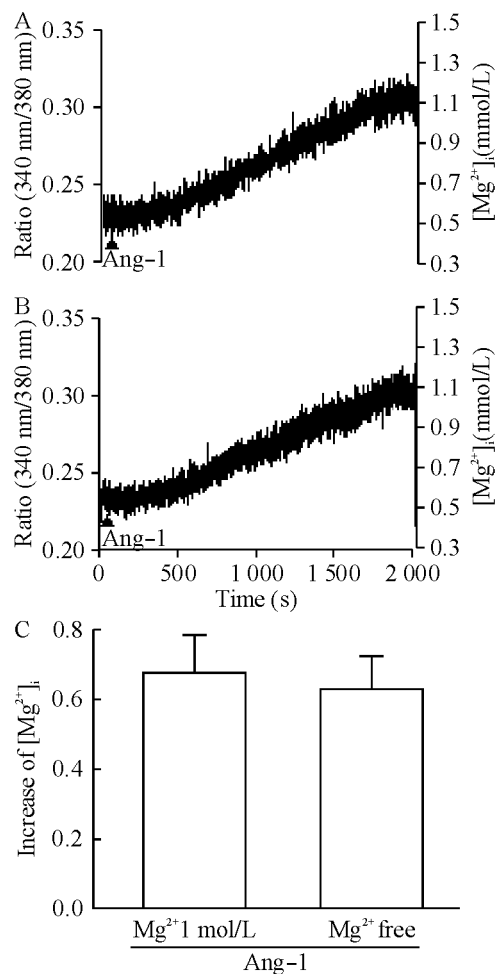


Fig 1 Effect of Ang-1 ($10 \mu\text{g/L}$) on $[Mg^{2+}]_i$ in the absence (B) or presence (A) of extracellular Mg^{2+} (1 mmol/L) in HUVECs loaded with mag-fura-2/AM. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$.

图 1 Ang-1 对 HUVECs $[Mg^{2+}]_i$ 的影响

2 Ang-1 诱导的 $[Mg^{2+}]_i$ 增加与细胞内 Ca^{2+} 浓度相关性

图 2 示 $100 \mu\text{mol/L}$ BAPTA-AM 预处理 20 min 组 (A 组) 和未处理组 (B 组), Ang-1 ($10 \mu\text{g/L}$) 诱导 HUVECs 的 $[Mg^{2+}]_i$ 增加分别是 $0.70 \text{ mmol/L} \pm$

0.07 mmol/L ($n=9$) 和 $0.67 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$ ($n=9$)。A 组与 B 组之间差异无显著 ($P>0.05$)。

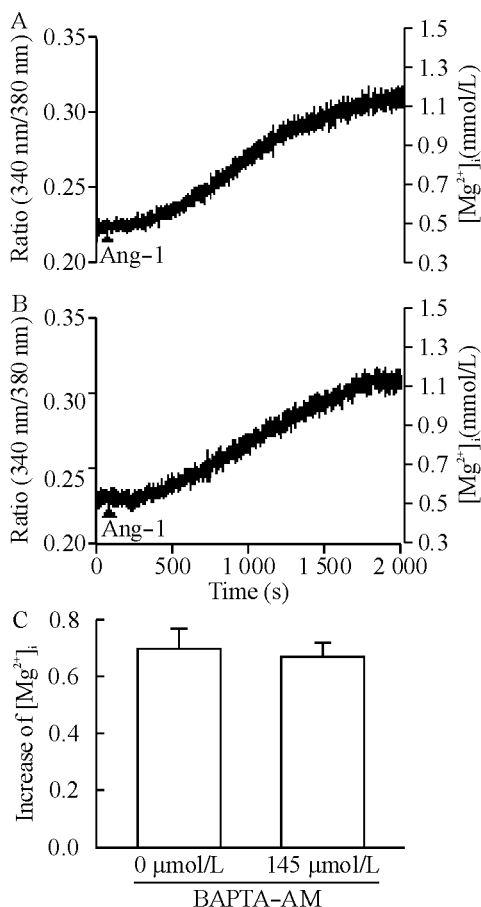


Fig 2 Effect of extracellular BAPTA-AM (100 $\mu\text{mol/L}$) on the Ang-1 (10 $\mu\text{g/L}$) - induced $[\text{Mg}^{2+}]_i$ increase in the absence of extracellular Mg^{2+} . $\bar{x} \pm s$. $n=9$.

图2 Ang-1 诱导的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加与细胞内 Ca^{2+} 浓度相关性

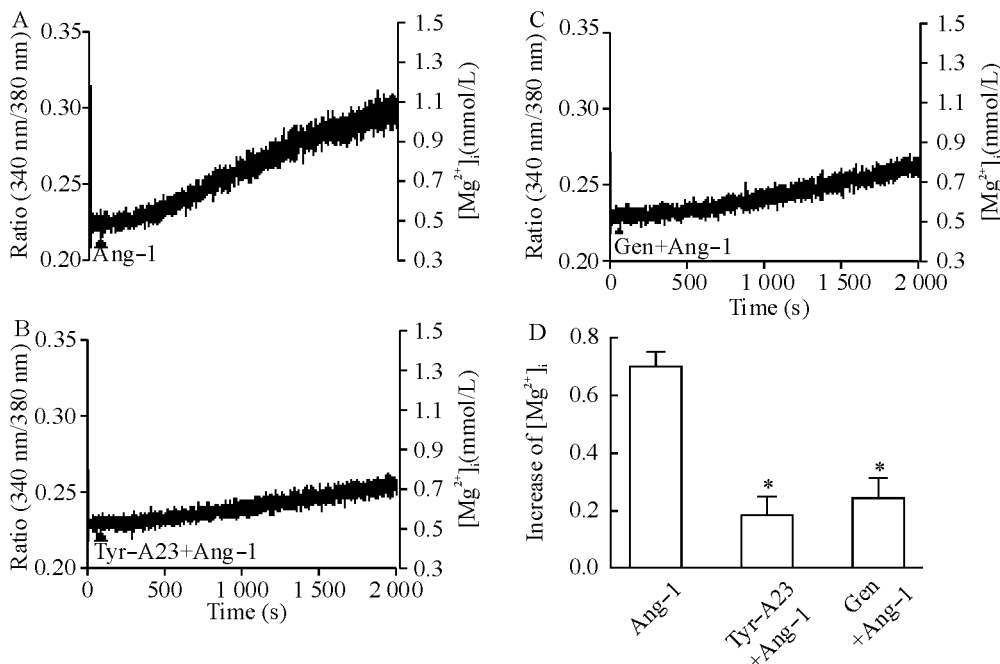


Fig 3 Effect of tyrosine kinase inhibitor tyrphostin A23 (B, 10 $\mu\text{mol/L}$), and genistein (C, 30 $\mu\text{mol/L}$) on the Ang-1 (10 $\mu\text{g/L}$) - induced an increase of $[\text{Mg}^{2+}]_i$ in Mg^{2+} - free extracellular solution. $\bar{x} \pm s$. $n=9$. * $P<0.01$ vs Ang-1 group.

图3 Ang-1 诱导的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加受酪氨酸激酶阻断剂影响

3 Ang-1 诱导的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加受酪氨酸激酶阻断剂影响

图3表示 Ang-1 (10 $\mu\text{g/L}$) 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加是 $0.70 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$ ($n=10$) (A 组), 而用酪氨酸激酶阻断剂 tyrphostin A23 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 genistein (30 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 20 min 后 Ang-1 (10 $\mu\text{g/L}$) 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加分别是 $0.18 \text{ mmol/L} \pm 0.07 \text{ mmol/L}$ ($n=10$, B 组) 和 $0.13 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$ ($n=10$, C 组), 几乎完全阻断 Ang-1 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加, A 组与 B 组或 A 组与 C 组之间差异均显著 ($P<0.01$)。

4 Ang-1 诱导的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加受磷脂酰 3 激酶阻断剂影响

图4表示 Ang-1 (10 $\mu\text{g/L}$) 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加是 $0.65 \text{ mmol/L} \pm 0.09 \text{ mmol/L}$ ($n=10$) (A 组), 而用磷脂酰 3 激酶阻断剂 wortmannin (30 nmol/L) 和 LY294002 (25 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 20 min 后 Ang-1 (10 $\mu\text{g/L}$) 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加分别是 $0.14 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$ ($n=10$, B 组) 和 $0.15 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$ ($n=10$, C 组), 几乎完全阻断 Ang-1 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加, A 组与 B 组或 A 组与 C 组之间差异均显著 ($P<0.01$)。

5 活化丝裂原激活酶阻断剂对 Ang-1 诱导的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加的影响

图5表示 Ang-1 (10 $\mu\text{g/L}$) 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加是 $0.71 \text{ mmol/L} \pm 0.06 \text{ mmol/L}$ ($n=10$) (A 组), 而用活化丝裂原激活酶阻断剂 SB202190 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 PD98059 (30 $\mu\text{mol/L}$) 预

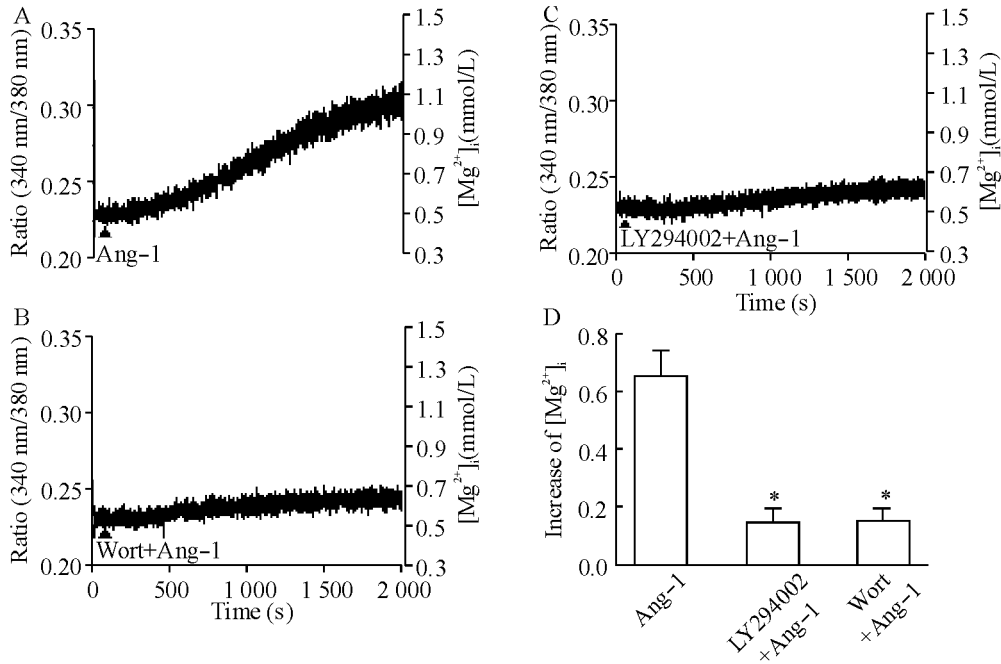


Fig 4 Effect of PI3K inhibitor [wortmannin(B), 30 $\mu\text{mol/L}$ and LY294002(C), 25 $\mu\text{mol/L}$] on the Ang - 1 (10 $\mu\text{g/L}$) - induced increase of $[\text{Mg}^{2+}]_i$ in Mg^{2+} - free extracellular solution. $\bar{x} \pm s$. $n = 9$. * $P < 0.01$ vs Ang - 1 group.

图 4 Ang - 1 诱导的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加受磷脂酰 3 激酶阻断剂影响

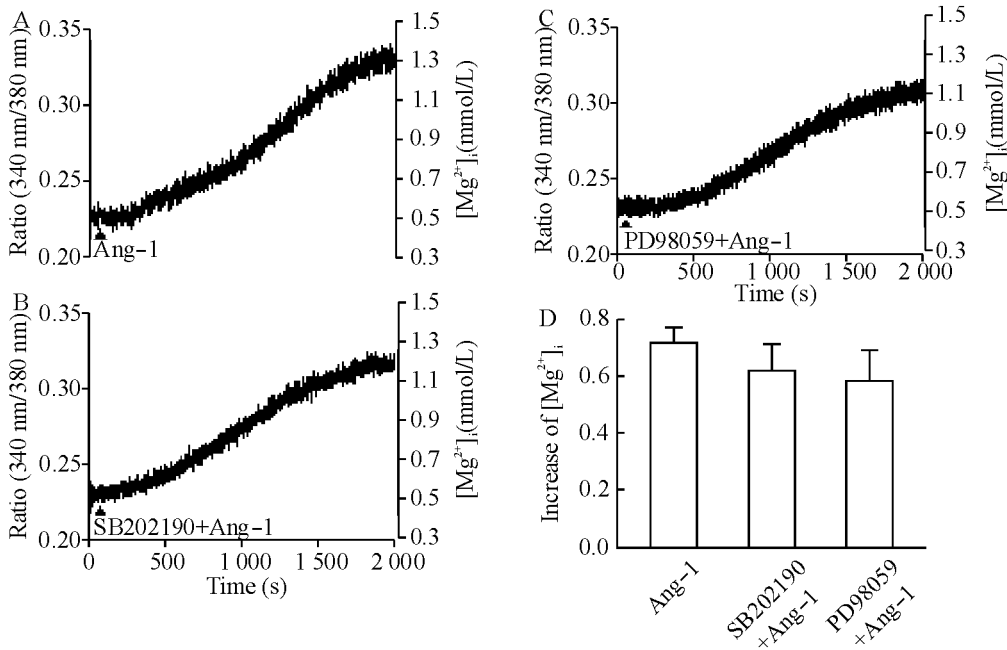


Fig 5 Effect of MAPK inhibitor (SB202190, 10 $\mu\text{mol/L}$ and PD98059, 30 $\mu\text{mol/L}$) on the Ang - 1 (10 $\mu\text{g/L}$) - induced increase of $[\text{Mg}^{2+}]_i$ in Mg^{2+} - free extracellular solution. $\bar{x} \pm s$. $n = 9$.

图 5 Ang - 1 诱导的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加受活化丝裂原激活酶阻断剂影响

处理 20 min 后 Ang - 1 (10 $\mu\text{g/L}$) 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加分别是 0.62 mmol/L \pm 0.09 mmol/L ($n = 10$, B 组) 和 0.58 mmol/L \pm 0.11 mmol/L ($n = 10$, C 组), 基本不阻断 Ang - 1 诱导 HUVECs 的 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 增加, A 组与 B 组或 A 组与 C 组之间差异无显著 ($P > 0.05$)。

讨 论

Mg^{2+} 是细胞内钙离子 (Ca^{2+}) 的天然拮抗剂, 缺

血缺氧状态时易引起细胞内的钙超载, 而细胞内 Mg^{2+} 使肌浆网(内质网)抑制 Ca^{2+} 释放和促进 Ca^{2+} 重吸收, 还有促进向细胞外转运、降低细胞内 Ca^{2+} 浓度、抑制钙超载, 同时清除氧自由基的作用^[7]。根据报道, Mg^{2+} 缺乏成为心肌缺血、心肌梗死等心血管缺血性疾病的重要病因, 补充 Mg^{2+} 可稳定急性心肌梗死。报道认为, 血管内皮生长因子可能通过增加 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 促进新生血管的形成^[6,8]。目前关于

[Mg²⁺]_i 的调节机制尚不清楚。本课题首先发现 Ang-1 促使 [Mg²⁺]_i 变化与细胞外 Mg²⁺ 的浓度无关,提示 Ang-1 诱导的 [Mg²⁺]_i 增加可能源于细胞内 Mg²⁺ 库的释放,而不是从细胞外获得。Gotoh 等^[9]报道,细胞内 Ca²⁺ 浓度增加促使 [Mg²⁺]_i 增加。BAPTA-AM 是一种 Ca²⁺ 特异性强效螯合剂,具有脂溶性 AM 易通过细胞膜,因而可在细胞内起到稳定 Ca²⁺ 浓度的作用。本实验应用 BAPTA-AM 观察到 Ang-1 诱导的 [Mg²⁺]_i 增加与细胞内 Ca²⁺ 浓度无关。

Ang-1 是强效的血管形成因子,其在体外促进内皮细胞生长。HUVECs 膜的 Tie-2 受体是酪氨酸激酶相关的受体,这两种受体是由横跨胞膜的蛋白质构成,细胞外有衔接 Ang-1 区域,细胞内有嵌入酪氨酸激酶区域^[10]。有趣的是,我们研究发现细胞外无 Mg²⁺ 时,Ang-1 增加 HUVECs 的 [Mg²⁺]_i 作用被酪氨酸激酶抑制剂几乎完全阻断,提示 Ang-1 作用于 Tie-2 受体激活受体细胞内侧酪氨酸激酶诱导细胞内的 Mg²⁺ 库释放 Mg²⁺,从而增加 HUVECs 的 [Mg²⁺]_i。这结果与 Ishijima 等^[11]报道的韩蛙皮素通过激活酪氨酸激酶途径增加 Swiss 3T3 细胞内游离形式 Mg²⁺ 浓度的机制相吻合。

Ang-1 作用于 Tie-2 受体激活酪氨酸激酶可下行激活磷脂酰 3 激酶,磷脂酰 3 激酶激活可使细胞膜上的 PIP₂ 磷酸化为 PIP₃,PIP₃ 下行激活 Akt 等细胞内信号传递途径^[12]。本研究发现细胞外无 Mg²⁺ 时,Ang-1 增加 HUVECs 的 [Mg²⁺]_i 作用被磷脂酰 3 激酶抑制剂几乎完全阻断,提示 Ang-1 作用于 Tie-2 受体激活受体细胞内侧酪氨酸激酶下行激活磷脂酰 3 激酶诱导细胞内的 Mg²⁺ 库释放 Mg²⁺,从而增加 HUVECs 的 [Mg²⁺]_i。Ang-1 作用于 Tie-2 受体激活酪氨酸激酶可下行激活丝裂原激活激酶。Ang-1 增加 HUVECs 的 [Mg²⁺]_i 与丝裂原激活激酶激活无关。

Ang-1 作用于 Tie-2 受体激活磷脂酰 3 激酶/Akt 等细胞内信号转导途径促进新生血管形成^[12]。细胞内 Mg²⁺ 在促进核酸的聚合、促进 DNA 的复制、调节核酸的转录、增强 mRNA 与核糖体的结合、促进蛋白质合成中起重要作用^[13,14]。因此,Ang-1 通过 [Mg²⁺]_i 增加可能在促进新生血管形成中起重要作用。在动物研究和临床实践中都证实外源性 Ang-1 能促进缺血区侧枝循环的建立,并能改善血流^[15],因此,Ang-1 可能通过增加 [Mg²⁺]_i 促进心肌缺血区新生血管的形成。

[参 考 文 献]

[1] Saris NE, Meryaala E, Karppanen H, et al. Magnesium

an update on physiological, clinical and analytical aspects [J]. Clin Chim Acta, 2000, 294(1-2):1-26.

- [2] Paolisso G, Barbagallo M. Hypertension, diabetes mellitus, and insulin resistance; the role of intracellular magnesium[J]. Am J Hypertens, 1997, 10(3):345-355.
- [3] Chakraborti S, Chakraborti T, Mandal M, et al. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases; A review [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 238(1-2):163-179.
- [4] Tsigkos S, Koutsilieris M, Papapetropoulos A. Angiopoietins in angiogenesis and beyond[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2003, 12(6):933-941.
- [5] He H, Venema VJ, Gu X, et al. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src [J]. J Biol Chem, 1999, 274(35):25130-25135.
- [6] 洪炳哲,朴海南,李胜范,等. 血管内皮生长因子 165 诱导血管形成中镁离子作用的研究[J],中华心血管病杂志,2007,35(3):260-264.
- [7] Chakraborti S, Chakraborti T, Mandal M, et al. Protective role of magnesium in cardiovascular diseases; A review[J]. Mol Cell Biochem, 2002, 238(1-2):163-179.
- [8] 洪炳哲,李胜范,王江宁,等. bFGF 诱导血管形成中 Mg²⁺ 重要作用的研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(5):629-634.
- [9] Gotoh H, Kajikawa M, Kato H, et al. Intracellular Mg²⁺ surge follows Ca²⁺ increase during depolarization in cultured neurons[J]. Brain Res, 1999, 828(1-2):163-168.
- [10] Thurston G. Role of angiopoietins and tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Cell Tissue Res, 2003, 314(1):61-68.
- [11] Ishijima S, Tatibana M. Rapid mobilization of intracellular Mg²⁺ by bombesin in Swiss 3T3 cells: mobilization through external Ca²⁺ - and tyrosine kinase - dependent mechanisms[J]. J Biochem, 1994, 115(4):730-737.
- [12] Babaei S, Teichert KK, Zhang Q, et al. Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide [J]. Am J Pathol, 2003, 162(6):1927-1936.
- [13] Newby LM, Vocker E, Redemann S, et al. Mg²⁺ - induced compaction of single RNA molecules monitored by tethered particle microscopy [J]. Biophys J, 2006, 90(10):3672-3685.
- [14] Goldschmidt V, Didierjean J, Ehresmann B, et al. Mg²⁺ dependency of HIV-1 reverse transcription, inhibition by nucleoside analogues and resistance [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(1):42-52.
- [15] Zacharek A, Chen J, Zhang C, et al. Nitric oxide regulates angiopoietin1/tie2 expression after stroke [J]. Neurosci Lett, 2006,404(1-2):28-32.