

琉球大学学術リポジトリ

[原著] 培養単層血管内皮細胞でのアルブミン透過性
に対する高濃度グルコースの影響

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): albumin transcytosis, endothelial cell monolayer, Evans'blue dye, diabetes mellitus 作成者: 平良, 剛, 田仲, 秀明, 平良, 美香, 新垣, 香代子, 小宮, 一郎, 村上, 啓治, Taira, Tsuyoshi, Tanaka, Hideaki, Taira, Mika, Arakaki, Kayoko, Komiya, Ichiro, Murakami, Keiji メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016110

培養単層血管内皮細胞でのアルブミン透過性に対する高濃度グルコースの影響

平良 剛, 田仲秀明, 平良美香, 新垣香代子, 小宮一郎, 村上啓治*

琉球大学医学部内科学第二講座
*須磨赤十字病院

(1996年3月17日受付, 1997年6月24日受理)

The effect of high glucose concentration on albumin transcytosis determined by cultured vascular endothelial cell monolayer

Tsuyoshi Taira, Hideaki Tanaka, Mika Taira
Kayoko Arakaki, Ichiro Komiya and Keiji Murakami*

Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus
*Suma Red Cross Hospital

ABSTRACT

Increased vascular permeability is one of the characteristics of diabetic patients. The endothelial cells regulate the vascular permeability. We studied the vascular permeability using albumin. We intended to make a model of albumin transcytosis, and to reveal the mechanism of glucose-induced albumin transcytosis. Endothelial cells were cultured on collagen-coated microporous filter to make an endothelial cell monolayer on the filter. This monolayer was placed between the upper well and the lower one. To estimate albumin transcytosis from the upper wells (luminal sides) to the lower wells (basolateral sides), we added Evans' blue dye labeled albumin (EBA) in the upper wells and measured the amount of EBA in the lower wells. The amounts of EBA in the lower wells increased with the hours of incubation at 37 °C, but not at 4 °C. Two or 3 days' incubation with high glucose concentration (20.5 mM) increased the amounts of EBA in the lower wells significantly. Incubation with phorbol myristate acetate (PMA) also increased the amounts of EBA in the lower wells. This may suggest that high glucose levels increased albumin transcytosis through the activation of protein kinase C. This glucose-induced albumin transcytosis may explain in part, the increased vascular permeability in diabetic patients. *Ryukyu Med. J.*, 17(2)89~94, 1997

Key words: albumin transcytosis, endothelial cell monolayer, Evans' blue dye, diabetes mellitus

緒 言

糖尿病では血管透過性が増加している。これに伴う血漿蛋白の血管外漏出や沈着が、糖尿病の主要な合併症である細小血管症に密接に関与する。臨床では、長期罹患例のみならず発症初期や前糖尿病状態においても、毛細血管の基底膜肥厚やアルブミン透過 (transcapillary escape rate of albumin: TER) の増加がある。糖代謝状態を改善することによりこのTER が改善する。この糖代謝改善により TER が改善するものを functional microangiopathy という¹⁻³⁾。実験でも、糖尿病ラット脳血管で罹病期間が長くなるにつれ血清アルブミンの血管透過性が亢進することが明らかになってきた^{4, 5)}。血管の物質透過性の調節は、主として内皮細胞による。内皮細胞における物質透過は主に2つ

に分けられる。即ち、1) 小胞を介し、細胞内を移行する transcytosis、および2) 細胞間隙を移行する junctional transport である⁶⁾。アルブミンは、内皮細胞膜表面に存在する receptor に結合し^{7, 8)}、transcytosis により管腔側 (luminal side) から基底膜側 (basolateral side) へ輸送されると考えられている^{9, 10)}。

一方、高濃度グルコースにより生ずる変化として、グルコースからの *de novo* synthesis による diacylglycerol (DAG) の産生亢進、protein kinase C (PKC) の活性化^{11, 12)}、sorbitol pathway の活性化¹⁴⁾などが知られている。これらの変化がアルブミンの transcytosis に影響を及ぼす可能性が考えられるが、詳細は未だ明らかではない。

本研究では、*in vitro* におけるアルブミン透過を観察する

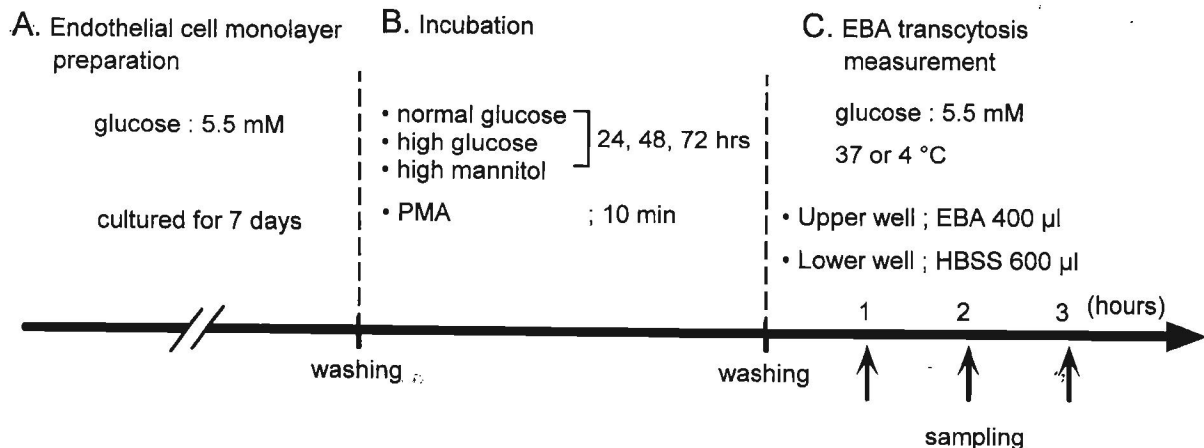


Fig. 1 A: Endothelial cells were cultured in EMEM containing FBS and heparin on the collagen-coated polycarbonate filter for 7 days, when they were attached to the bottom of the well, and reached confluent monolayer. B: At day 7, the endothelial cell monolayers were washed with EMEM, and then incubated with 5.5mM glucose (normal glucose), 20.5mM glucose (high glucose), or 5.5mM glucose+15mM mannitol (high mannitol) for 24, 48, 72 h. Some monolayers were incubated with PMA for 10 min. C: After the incubation, the monolayers were washed with EMEM. Then, 0.58mM EBA was added in the upper well to estimate EBA transcytosis in the presence of 5.5mM glucose. The amounts of EBA in the lower wells and upper ones were measured at 1, 2, and 3 h at 37 or 4 °C.

ために、培養単層血管内皮細胞 (endothelial cell monolayer) をはさんで、上・下の両室からなる装置を用いた。これは上室を luminal side, 下室を basolateral side とみなすことで、物質の透過を定量的に測定することができる^{15,16)}。まず、上室側に Evans' blue dye でラベルしたアルブミンを加え、アルブミン透過量の細胞の有無、温度による変化を検討した。次に、高濃度グルコース培地での incubation によるアルブミン透過への影響をみた。また、PKC の activator である phorbol myristate acetate (PMA) で endothelial cell monolayer を incubate し、アルブミン透過の変化をみた。

材料および方法

Endothelial cell monolayer の作成 (Fig. 1A)

0.3 µm の孔を有する polycarbonate filter (径 8 mm) にて底面を覆われたウェル (Intercell®, Kurabo Co. Ltd., Japan) を実験に用いた。Filter の上面を type I コラーゲン (0.25%, Koken Co., Japan) でコートし紫外線にて一晩滅菌した後、ヒューマンサイエンス振興財団より入手した正常ウシ頸動脈由来血管内皮細胞株¹⁷⁾ (HH; JCRB 0099) を、10%ウシ胎仔血清 (Whittaker Bioproducts, USA) およびヘパリン Na (100 µg/ml; Novo Nordisk, Denmark) を添加した Eagle's minimum essential medium (EMEM; Cosmo Bio. Co. Ltd., Japan) にて、37°C, 5% CO₂ の環境下で培養した。内皮細胞はほぼ1週間で confluent に達し、典型的な敷石状構造を示した (Fig. 2)。

Incubation (Fig. 1B)

培養単層血管内皮細胞を EMEM にて2度洗浄した後、5.5mM mol/Lグルコース (normal glucose: control), 20.5mmol/L グルコース (high glucose群), 15mmol/L マンニトール+5.5 mmol/L グルコース (high mannitol 群) の各濃度に調製した培養液に変更し、各々24, 48, 72時間 incubation した。

PKC incubation は以下のように行った。内皮細胞を培養して confluent に達した後、培養液を除去し、EMEMで2

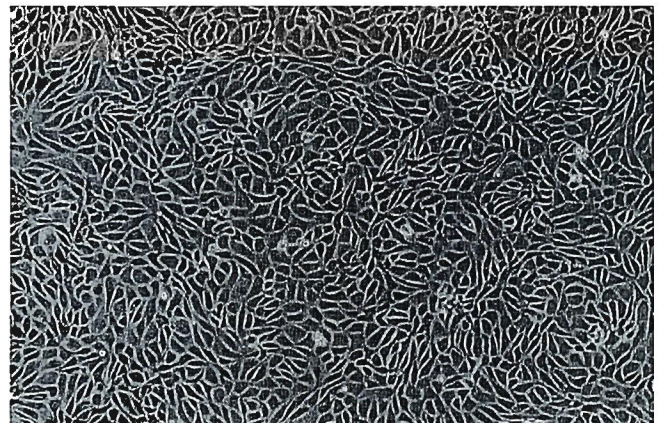


Fig. 2 Phase-contrast microscopy of confluent endothelial cell monolayer on day 7. Endothelial cells were seeded on the collagen-coated polycarbonate filter and cultured in EMEM containing 10% FBS and heparin at 37°C, 5% CO₂. Endothelial cells reached confluent monolayer after 5 days' culture. They showed typical cobblestone appearance (x 200).

度洗浄後、10⁻¹⁰ から 10⁻⁶ mol/L までの各濃度の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma, USA) を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて10分間 incubation した。Incubation 終了後再び EMEM で2度洗浄し、下記の方法で EBA の透過量を測定した (Fig. 1C)。

EBA 透過量の定量 (Fig. 1C)

アルブミンの定量のために、Evans' blue dye にてアルブミンを標識した。これを Evans' blue-albumin complex (EBA) と呼ぶ。Evans' blue dye (Sigma, USA) を HBSS で溶解して 1.16mmol/L とした。これと HBSS で溶解した 8%ウシ血清アルブミン (Fraction V, Sigma, USA) 溶液を等量ずつ混和 (終濃度0.58 mmol/L) した後、約2時間攪拌してEBAを作成した¹⁸⁾。

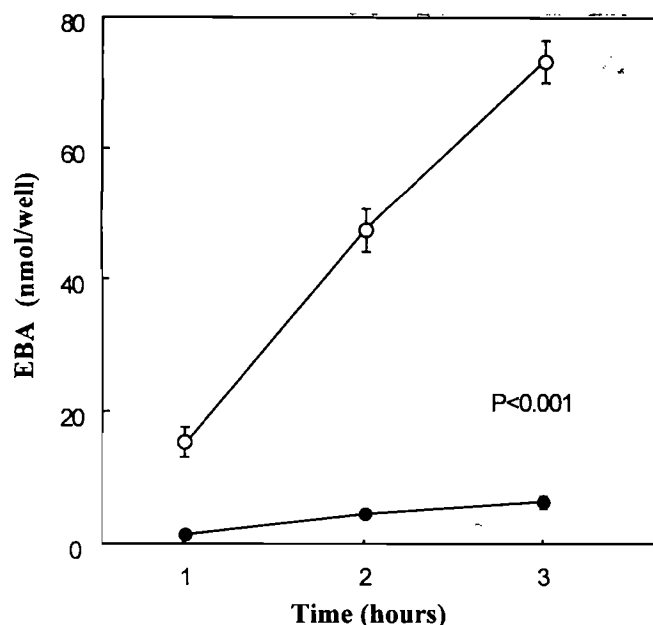


Fig. 3 Barrier function of endothelial cell monolayer on the collagen-coated filter. The movement of EBA from the upper wells to the lower ones were studied for 1, 2, and 3h. The amounts of EBA in the lower well are less with endothelial cells (●) than without them (○) at 37 °C. Each point is the mean \pm SEM of 4 determinations.

EBA 透過量の測定のため、上述のウェルを24穴プレート (Falcon 3047, Becton Dickinson Co., USA) に懸架した。ウェル側、即ち上室を luminal side として 0.58mmol/L EBA 400 μ l を加え、プレート側、即ち下室は basolateral side として HBSS のみ 600 μ l を加えた。なお、実験中は恒温槽中で実験装置を37あるいは4 °C に維持し、magnetic stirrer にて下室を常に攪拌した。1から3時間目まで1時間毎に、上室からは50 μ l、下室からは200 μ l ずつサンプリングし、マイクロプレートリーダー (KP500, Kurabo Co. Ltd., Japan) を用いて 620nm における吸光度を測定した。あらかじめ求めた標準直線より両室の EBA 濃度を得て、この値より上室から下室への EBA 透過量を算出した。尚、透過量は各ウェルあたりの絶対値 (nmol/well) で表現した。

統計学的検定

各データは mean \pm SEM で示した。統計学的検定については、2群間の検定の場合は Student の対応のない t 検定、3群ないしそれ以上の場合には分散分析 (Analysis of variance: ANOVA) を用い検討した。P < 0.05 を有意の違いがあると判定した。

結 果

Endothelial cell の有無による EBA 透過量の差

Fig. 1 に従って normal glucose (5.5mM) で72時間 incubation した後、EBA 透過量を測定した。コラーゲンをコートしたフィルターを通して上室から下室への EBA 透過量は、細胞のない場合、1時間で 14.9 \pm 1.6, 2時間で 47.4 \pm 2.7, 3時間で 73.5 \pm 2.6 nmol/well であった (Fig. 3, ○)。一方、このフィルター上に血管内皮細胞を単層培養し、下室の EBA

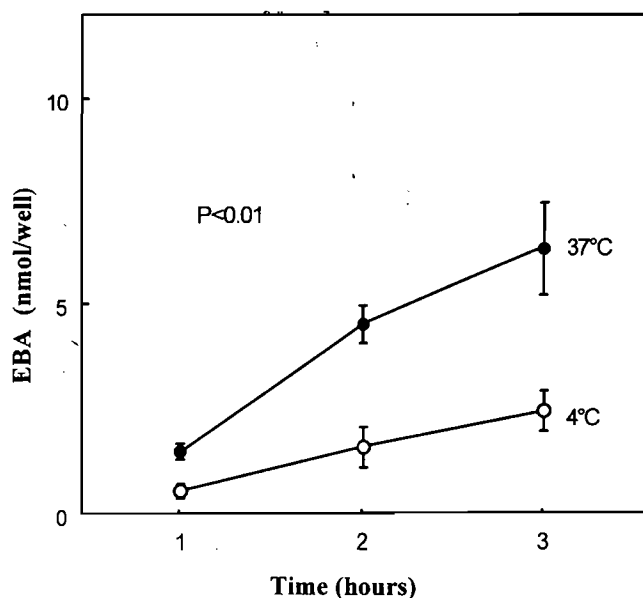


Fig. 4 The effects of 37°C and 4 °C on the albumin transcytosis measurement. The amounts of EBA in the lower wells at 37°C (●) were more than those at 4 °C (○). Each point is the mean \pm SEM of 4 determinations.

を測定すると、EBA はわずかに認められるに過ぎなかった (Fig. 3, ●)。下室の EBA は細胞のない時に比べて有意に少なかった。このことは血管内皮細胞には barrier function があることを示している。

EBA 透過量測定時の温度の影響

Endothelial cell monolayer を通しての、EBA transcytosis 測定時の温度 (37, 4 °C) の EBA 透過量への影響をみた。Fig. 1 に従って37および4 °C の両条件下にて EBA の透過量を測定した (Fig. 4)。4 °C に比べて較べて、37 °C では1, 2, 3時間で有意に下室の EBA は多かった。

高濃度グルコース incubation の EBA 透過量への影響

Glucose 濃度の EBA transcytosis に及ぼす影響をみた。Fig. 1 に従って high glucose で24, 48, 72時間 incubate した後、37 °C での EBA 透過量を測定すると、0時間では 6.1 \pm 0.4 nmol/well, 24時間では 5.8 \pm 0.3 nmol/well, 48時間では 7.7 \pm 0.7 nmol/well, 72時間では 11.6 \pm 2.0 nmol/well と、48時間以降では incubation が長くなるに従い、透過量の増加を示した (Fig. 5-A)。しかし、normal glucose および high mannitol 群ではこのような incubation period に応じた透過量の増加は認められなかった。なお、high mannitol 群の72時間目で透過量が若干増加していたが、有意な増加ではなかった。

一方、normal glucose 群、high glucose 群、high mannitol 群で24, 48, 72時間 incubate した後、4 °C での EBA 透過量を測定した場合、high glucose 群では各 incubation period による影響、normal glucose での4 °C における透過量共に差を認めなかった。High mannitol 群でも同様の結果であった (Fig. 5-B)。

以上、血管内皮細胞を通してのアルブミン透過性の増加はグルコースにより引き起こされている。この現象は37 °C では

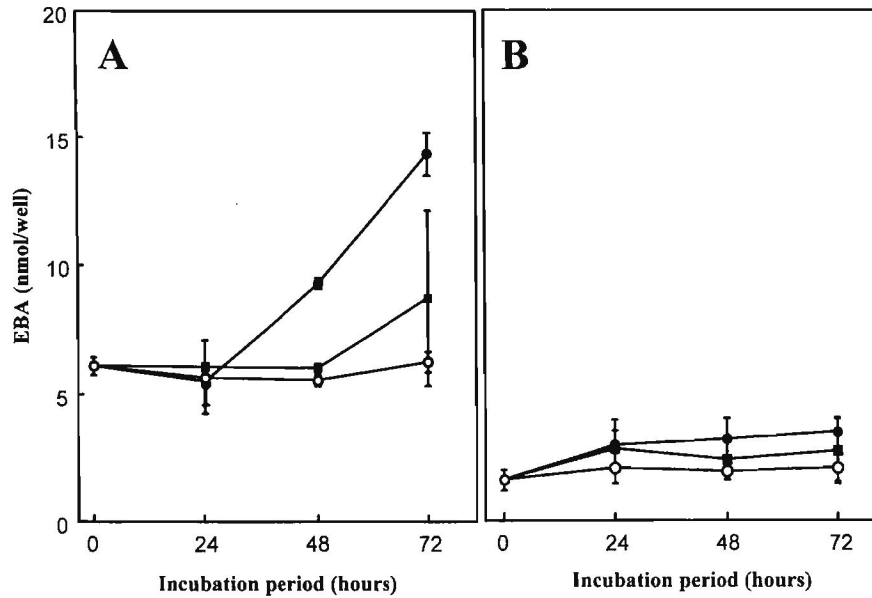


Fig. 5 Effect of high glucose incubation on the amounts of EBA in the lower wells. A: Endothelial cell monolayers were incubated with high glucose (20.5 mM; ●), high mannitol (5.5mM glucose+15mM mannitol; ■) or normal glucose (○) for 24, 48 and 72 h, as indicated in Fig. 1. Then, the amounts of EBA in the lower well at 1, 2 and 3 h at 37°C were measured; EBA at 2 h were illustrated. After 48 and 72 h incubation, the amounts of EBA in the lower well with high glucose incubation were more than those with high mannitol or normal glucose. B: Endothelial cell monolayers were incubated with high glucose, high mannitol or normal glucose for 24, 48 and 72 h. Then, the amounts of EBA at 4°C were measured. The amounts of EBA were not significantly different in each group. Each point is the mean±SEM of 4 determinations.

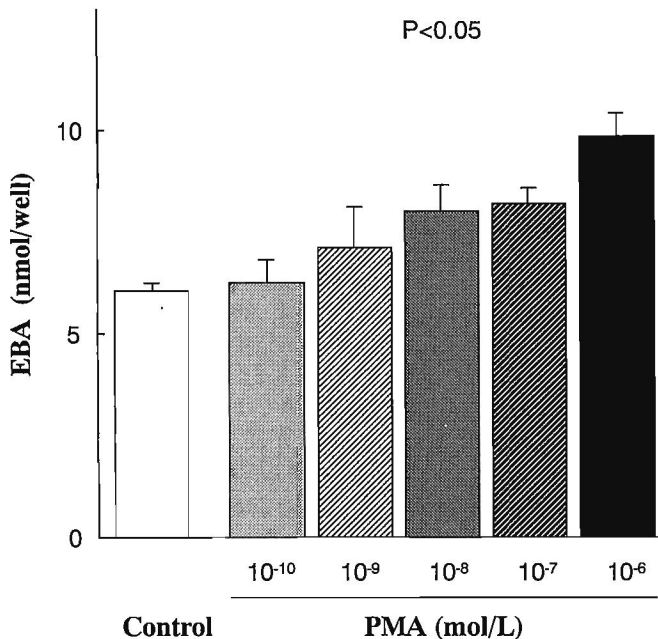


Fig. 6 Effect of PMA in the incubation (Fig. 1B) on the EBA transcytosis on the amounts of EBA in the lower well (Fig. 1C). Endothelial cell monolayers were incubated with PMA at indicated doses for 10 min, as indicated in Fig. 1B and washed twice. Then, the amounts of EBA in the lower wells during 2 h at 37°C were measured. Each bar is the mean±SEM of 4 determinations.

みられたが、4°Cでは認められなかった。

PKC の影響

Fig. 1での incubation 時の PMA の, EBA transcytosis に及ぼす影響をみた。PKC のアルブミン透過性に対する影響を検討するため、単層血管内皮細胞を PKC の activator である PMA にて10分間 incubation し、EBA 透過量の 2 時間値をみた (Fig. 6)。各 PMA 濃度での透過量はそれぞれ PMA を高濃度にするに従い増加した ($P < 0.05$; Fig. 6)。Ca²⁺ ionophore である ionomycin についても EBA 透過への影響を検討したが、コントロールに比較して明らかな透過量の変化は認められなかった。

考 察

糖尿病においてはアルブミン透過性が亢進している。このアルブミン透過性を *in vitro* にて定量するモデルを作製した。このモデルは endothelial cell monolayer をはさんで、上室を luminal side, 下室を basolateral side としてアルブミンの透過を定量的に測定することが可能であった。

このモデルを用いて、アルブミンを Evans' blue dye でラベルすることによりアルブミン透過を定量した。アルブミンは 4°C に比べ 37°C では透過量が増加した。高濃度グルコースでの培養により、さらにアルブミン透過量が増加する。この透過性亢進は PKC 系を介する可能性があると考えられた。

今回、アルブミンのラベリングに用いた Evans' blue dye は、Patterson らの検討によれば、アルブミンとの結合前後

でその吸光度 (620nm) が変化せず, その結合能も¹²⁵I-アルブミンと比較して強い¹⁰⁾. 従来, 同様の研究においては RI でラベルした ligand を用いて測定することが多く, 扱いに慎重を要した. Evans' blue dye を用いても RI と同様の感度を有しており, 透過量の定量に対して非常に有用であると考えられた.

培養内皮細胞は, 光顕による観察では生体内と同様に単層構造を維持している (Fig. 2). 高濃度グルコースあるいは高濃度マンニトール培養液で72時間目まで培養しても明らかな形態上の変化は認められなかった. さらに Fig. 3 で示したように, 細胞の存在により明らかに下室へのEBA透過量が減少していることから, バリアーとしての機能を維持しているものと考えられた. アルブミンの血管透過性に関してはこれまでにいくつかの報告がある. *In Situ* における電顕での観察では^{9,10)}, 金コロイドでラベルしたアルブミンを血管内へ注入すると, そのほとんど全ては vesicular transport により血管外へ輸送されており, 細胞間隙からの漏出はほとんど認められなかった. *In vitro* での研究でも, アルブミンは transcytosis により輸送されていること, 特異的なアルブミン結合蛋白が存在すること^{8,12,20)}, などが報告されている. 我々の結果において, EBA の透過が温度依存性, 即ちエネルギー依存性を示したことは, アルブミンがエネルギー依存性に輸送されることを示唆する.

糖尿病では血管透過性が増加している. 高血糖状態での血管内皮細胞内の変化としては, 1) sorbitol pathway の律速段階である aldose reductase の活性亢進による細胞内 sorbitol の蓄積¹⁴⁾, 2) *de novo* synthesis による diacyl glycerol (DAG) の合成亢進, それに引き続くPKCの活性化^{11,13)}, 3) 糖尿病状態に伴う酸化的ストレスの増加^{22,23)}, などが認められている. しかし, これらと血管透過性, 特に transcytosis への影響に関してはこれまでほとんど報告がなかった. 今回の研究において, 内皮細胞を高濃度グルコースの培地で incubate することによりアルブミンの透過量が増加すること, 同じ浸透圧の高濃度マンニトール培地ではこのような変化は起こらないことより, 糖尿病における血管透過性の増加は高濃度グルコースにより特異的に引き起こされていると考えられた. 高濃度グルコース群でも4℃ではEBA透過量の変化を認めなかったことから, この透過量の増加は細胞間隙の開大など, 細胞間透過によるものではなく, transcytosis の亢進によるものと考えられた.

さらに, PMA により高濃度グルコース培養と同様なEBA透過の増加を示したことより, アルブミン transcytosis に関して PKC が関与している可能性が示唆された. これまでの, 血管透過性とPKCの関連についての *in vitro* における検討では, PKC による細胞形態の変化²⁶⁾ や細胞間接着の開大²⁶⁾ により細胞間透過が増加する可能性が指摘されているが, transcytosis について検討した成績はない. 我々の成績からは, 高濃度グルコースによる incubation では48時間以上で増加してきたこと²⁷⁾, Ca²⁺ ionophore による透過性の増加を認めなかったことより, グルコースからの DAG の産生増加を介した PKC の活性亢進により, 細胞内輸送が亢進する可能性も考えられた.

文 献

- 1) Alpert J.S., Coffman J.D., Balodimos M.C., Koncz L. and Soeldner J. S.: Capillary permeability and blood flow in skeletal muscle of patients with diabetes mellitus and genetic prediabetes. *N. Engl. J. Med.* 286: 454-460, 1972.
- 2) Parving H.H., Noer I., Deckert T., Evrin P.E., Nielsen S.L., Lyngsøe J., Mogensen C.E., Rørth M., Svendsen P.A., Trap-Jensen J. and Lassen A.: The effect of metabolic regulation on microvascular permeability to small and large molecules in short-term juvenile diabetes. *Diabetologia* 12: 161-166, 1976.
- 3) Cunha-vaz J.G., Gray J.R., Zeimer R.C., Mota M.C., Ishimoto B.M. and Leite E.: Characterization of the early stages of diabetic retinopathy by vitreous fluorophotometry. *Diabetes* 34: 53-59, 1985.
- 4) Uezu Y. and Murakami K.: A Possible mechanism for increased cerebrovascular permeability in diabetic rats: effects of insulin and 2-Deoxy-Glucose. *Gen. Pharmac.* 24: 95-100, 1993.
- 5) Tanaka H., Murakami K. and Mimura G.: Effects of insulin-induced hypoglycemia on cerebrovascular permeability in diabetic rats. *Ryukyu Med. J.* 12: 226-234, 1992.
- 6) Simionescu M.: Receptor-mediated transcytosis of plasma molecules by vascular endothelium: endothelial cell biology in health and disease (Simionescu N. and Simionescu M., ed), pp69-104, Plenum Press, New York, 1988.
- 7) Hashida R., Anamizu C., Kimura J., Ohkuma S., Yoshida Y. and Takano T.: Transcellular transport of lipoprotein through arterial endothelial cells in monolayer culture. *Cell Struct. Funct.* 11: 31-41, 1986.
- 8) Siflinger-Birnboim A., Schnitzer J., Lum H., Blumenstock F.A., Shen C.P., Del-Vecchio P.J. and Malik A.B.: Lectin binding to gp60 decreases specific albumin binding and transport in pulmonary artery endothelial monolayers. *J. Cell Physiol.* 149: 575-584, 1991.
- 9) Ghitescu L., Fixman A., Simionescu M. and Simionescu N.: Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J. Cell Biol.* 102: 1304-1311, 1986.
- 10) Milici A.J., Watrous N.E., Stukenbrok H. and Palade G.E.: Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J. Cell Biol.* 105: 2603-2612, 1987.
- 11) Wolf B.A., Williamson J.R., Eason R.A., Chang K., Sherman W.R. and Turk J.: Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J. Clin. Invest.* 87: 31-38, 1991.
- 12) Shiba T., Inoguchi T., Sportsman J.R., Heath W. F., Bursell S. and King G. L.: Correlation of

- diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am. J. Physiol.* 265: E783-93, 1993.
- 13) Inoguchi T., Battan R., Handler E., Sportsman J.R., Heath W. and King G.L.: Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11059-63, 1992.
 - 14) Winegard A.I.: Does a common mechanism induce the diverse complications of diabetes? *Diabetes* 36: 396-406, 1987.
 - 15) Siflinger-Birnboim A., Del-Vecchio P.J., Cooper J.A., Blumenstock F.A., Shepard J.M. and Malik A.B.: Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. *J. Cell Physiol.* 132: 111-117, 1987.
 - 16) Audus K.L. and Borchardt R.T.: Characterization of and in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharm. Res.* 3: 81-87, 1986.
 - 17) Hagiwara H., Shimonaka M., Morisaki M., Ikekawa, N. and Inada Y.: Sitosterol-stimulative production of plasminogen activator in cultured endothelial cells from bovine carotid artery. *Thromb. Res.* 33: 363-370, 1984.
 - 18) Patterson C.E., Rhoades R.A. and Garcia J.G.: Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J. Appl. Physiol.* 72: 865-73, 1992.
 - 19) Antohe F., Dobrila L., Heltianu C., Simionescu N. and Simionescu M.: Albumin-binding proteins function in the receptor-mediated binding and transcytosis of albumin across cultured endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 60: 268-275, 1993.
 - 20) Schnitzer J.E., Carley W.W. and Palade G.E.: Specific albumin binding to microvascular endothelium in culture. *Am. J. Physiol.* 254: H425-H437, 1988.
 - 21) Schnitzer J.E. and Phil O.: Antibodies to SPARC inhibit albumin binding to SPARC, gp60, and microvascular endothelium. *Am. J. Physiol.* 263: H1872-H1879, 1992.
 - 22) Kashiwagi A., Asahina T., Ikebuchi M., Tanaka Y., Takagi Y., Nishio Y., Kikkawa R. and Shigeta Y.: Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high-glucose medium. *Diabetologia* 37: 264-269, 1994.
 - 23) Arai K., Maguchi S., Fujii S., Ishibashi H., Oikawa K. and Taniguchi N.: Glycation and inactivation of human Cu, Zn-superoxide dismutase: identification of the in vitro glycated sites. *J. Biol. Chem.* 262: 16969-16972, 1987.
 - 24) Yoshida K., Hirokawa T., Tagami S., Kawakami Y., Urata Y. and Kondo T.: Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 38: 201-210, 1995.
 - 25) Lynch J.J., Ferro T.J., Blumenstock F.A., Brockenauer A.M. and Malik A.B.: Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J. Clin. Invest.* 85: 1991-1998, 1990.
 - 26) Lum H. and Malik A.B.: Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am. J. Physiol.* 267: L223-L241, 1994.
 - 27) Inoguchi T., Xia P., Kunisaki M., Higashi S., Feener E.P. and King G.L.: Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am. J. Physiol.* 267: E369-379, 1994.