

非对称性二甲基精氨酸对人脐静脉内皮细胞功能的影响

姚 瑞, 党瑜华, 张菲斐

(郑州大学附属第一医院心内科, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 细胞生物学; 非对称性二甲基精氨酸致内皮功能失调; 酶联免疫吸附法; 可溶性细胞间粘附分子 1; 内皮素 1; 一氧化氮; L-精氨酸

[摘要] 目的 探讨非对称性二甲基精氨酸对人脐静脉内皮细胞表达可溶性细胞间粘附分子 1、内皮素 1、一氧化氮的影响, 并观察不同浓度 L-精氨酸对非对称性二甲基精氨酸效应的拮抗作用。方法 以不同浓度的非对称性二甲基精氨酸(分别为 1、4、8、12 和 16 $\mu\text{mol/L}$)与人脐静脉内皮细胞共育及固定浓度的非对称性二甲基精氨酸(16 $\mu\text{mol/L}$)加不同浓度的 L-精氨酸(分别为 0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 mmol/L)与人脐静脉内皮细胞共育 24 h, 分别用酶联免疫吸附法、硝酸还原酶法、放射免疫法检测培养基中可溶性细胞间粘附分子 1、内皮素 1 及一氧化氮的浓度。结果 非对称性二甲基精氨酸呈剂量依赖性增加人脐静脉内皮细胞可溶性细胞间粘附分子 1 和内皮素 1 的表达, 降低一氧化氮的表达($P < 0.05$), 接近生理范围的非对称性二甲基精氨酸(即 1 $\mu\text{mol/L}$)对内皮功能没有明显的影响; 外源性补充 L-精氨酸可逆转非对称性二甲基精氨酸的效应, 且呈剂量依赖性($P < 0.05$), 但当外源性 L-精氨酸的剂量大到一定程度时即加入 L-精氨酸/非对称性二甲基精氨酸 > 100 时, 内皮功能并不能得到进一步改善。相关分析显示培养基中可溶性细胞间粘附分子 1、一氧化氮、内皮素 1 的表达和加入非对称性二甲基精氨酸的浓度明显相关, 其相关系数 r 分别为 0.943、-0.937 和 0.934($P < 0.01$)。结论 非对称性二甲基精氨酸可通过增加内皮细胞表达可溶性细胞间粘附分子 1 和内皮素 1, 减低内皮细胞产生一氧化氮来导致内皮功能紊乱, 且内皮功能紊乱的程度与非对称性二甲基精氨酸的浓度明显相关; 外源性补充 L-精氨酸可逆转非对称性二甲基精氨酸的效应; 寻找有效的方法调节非对称性二甲基精氨酸的浓度可能是改善内皮功能, 防治心血管疾病的一个新目标。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effects of Asymmetric Dimethylarginine on the Function of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

YAO Rui, DANG Yu-Hua, and ZHANG Fei-Fei

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

[KEY WORDS] Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1; Endothelin 1; Nitric Oxide; L-arginine; Asymmetric Dimethylarginine; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Endothelial Dysfunction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of asymmetric dimethylarginine on the expression of soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1), nitric oxide (NO) and endothelin 1 (ET-1) in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC), and observe whether L-arginine (L-arg) of different dosage can antagonize the effects of ADMA. **Methods** ADMA or ADMA plus L-arg was incubated with hUVEC for 24 h. The levels of sICAM-1, ET-1 and NO in conditioned medium were measured by means of Enzyme-Linked Immunosorbent, Griess and Assay radio-immunosorbent. **Results** ADMA can increase hUVEC to express sICAM-1, ET-1 and decrease hUVEC to generate NO in a concentration dependent manner ($P < 0.05$, respectively), but these effects were gradually dismissed after giving the increasing dosage of L-arg. Compared with the control group, the group of ADMA 1 $\mu\text{mol/L}$ had no significant difference in the expression of sICAM-1, NO and ET-1. Except this group, the other four ADMA groups all had significant difference compared with the control group ($P < 0.05$, respectively). Among the five ADMA groups, they all had significant difference each other ($P < 0.05$, respectively). When the added L-arg/ADMA ratio is big enough (L-arg/ADMA > 100), there are no more improvements of endothelial function. The levels of sICAM-1, NO and ET-1 in conditioned medium were significantly correlated with the levels of ADMA ($r = 0.943, -0.937, 0.934, P < 0.01$, respectively). **Conclusion** ADMA can induce endothelial dysfunction by means of increasing endothelial cells to express sICAM-1, ET-1 and decreasing endothelial cells to generate NO. The degree of endothelial dysfunction is significantly correlated with the levels of ADMA. Giving exogenous L-arginine can antagonize the effects of ADMA. Effective measures to regulate the plasma level of ADMA may be the new aim to improve endothelial function and treat cardiovascular disease.

[收稿日期] 2004-09-02

[修回日期] 2005-05-18

[作者简介] 姚瑞, 硕士研究生, 主要研究方向为冠心病的预防及治疗, E-mail 为 yryaorui@gs.zzu.edu.cn。党瑜华, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的治疗。张菲斐, 博士, 副教授, 主要研究方向为急性冠状动脉综合征的发病机理。

血管内皮通过产生和释放血管活性物质对维持心血管稳态起到中心作用,许多心血管疾病与内皮功能不全有关,逆转失调的内皮功能是心血管疾病防治的新趋势^[1]。非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)是一种甲基化精氨酸,是内源性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂,可竞争性抑制一氧化氮(nitric oxide, NO)的合成^[2]。研究发现,血浆ADMA水平在动脉粥样硬化、冠心病、高血压等心血管疾病患者体内都明显增高,从而导致内皮衍生的血管活性物质如NO、内皮素、细胞粘附因子等生成的改变,引起血管舒缩异常,张力增加,血小板粘附、聚集、血栓形成及动脉中膜血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖,因此ADMA水平增高可能是内皮功能失调的一个标志,是潜在的心血管疾病的危险因素^[2,3]。然而,ADMA对血管内皮的直接作用如何,报道甚少。本研究将ADMA与培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)共育,观察后者表达粘附分子、NO、内皮素的变化,以及L-精氨酸作用后的变化,为心血管疾病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM高糖培养基(GIBCO),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),胰酶、ADMA、L-精氨酸(Sigma),NO酶法检测试剂盒、内皮素1放射免疫检测试剂盒(南京建成生物研究所),可溶性细胞间粘附分子1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)酶联免疫检测试剂盒(北京晶美生物工程有限公司),酶标仪(英国Tecan公司),核酸紫外测定仪(日本U-2001)。

1.2 细胞培养

本实验中所用的细胞为hUVEC株EVC304。用DMEM培养基(含15%胎牛血清)在含5%CO₂的细胞培养箱中37℃常规培养,实验采用5~8代细胞。

1.3 实验分组

本实验分两步进行: ①观察ADMA对细胞内皮功能的影响,共分6组,对照组及不同浓度的ADMA组(培养基中分别加入1、4、8、12及16 μmol/L ADMA); ②观察L-精氨酸对ADMA所致内皮功能失调的拮抗作用,共分6组,ADMA 16 μmol/L组及ADMA 16 μmol/L加不同浓度的L-精氨酸组(分别为0.2、0.4、0.8、1.6及3.2 mmol/L,即加入的L-精氨酸/AD-

MA之比分别为12.5:1、25:1、50:1、100:1及200:1)。

1.4 条件培养

将传代的hUVEC按10⁸/L接种于24孔板和96孔板内,至汇合状态时,Hank's液洗涤细胞3次,按每组4复孔分别加入不同浓度的ADMA或ADMA+L-精氨酸,继续培养24 h,离心收集培养基。

1.5 观察指标测定

1.5.1 一氧化氮浓度测定 亚硝酸/硝酸根离子为NO的稳定代谢产物,已经被证实为指示NO的优良指标,分别收集各组细胞培养基,测定亚硝酸/硝酸根离子的含量,测定方法按NO试剂盒(酶法)说明书操作。

1.5.2 内皮素1浓度测定 按内皮素1放射免疫试剂盒说明书操作。

1.5.3 可溶性细胞间粘附分子1浓度测定 取上清培养基离心,酶联免疫吸附法(ELISA)法检测,操作步骤严格按说明书进行。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个均数间比较采用方差分析,然后进行两两比较的 q 检验;相关性采用直线相关分析。采用SPSS10.0软件操作, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 非对称性二甲基精氨酸对人脐静脉内皮细胞表达可溶性细胞间粘附分子1、内皮素1、一氧化氮的影响

与对照组相比,随着ADMA浓度的增加,hUVEC产生NO的量逐渐降低,而产生内皮素1和sICAM-1的量逐渐增加,除低浓度组ADMA(1 μmol/L)外,各实验组与对照组间均有显著性差异($P < 0.01$),且各实验组间也有显著性差异($P < 0.05$)。相关分析显示,sICAM-1、NO、内皮素1的表达与ADMA的量明显相关(r 分别为0.934、-0.937及0.943, $P < 0.01$)。见表1(Table 1)。

2.2 不同浓度L-精氨酸对非对称性二甲基精氨酸损伤人脐静脉内皮细胞的拮抗作用

与对照组相比,随着加入L-精氨酸/ADMA的增加,hUVEC产生NO的量逐渐增加,而产生内皮素1和sICAM-1的量逐渐减少,各实验组与对照组相比均有显著性差异($P < 0.01$)。除高浓度L-精氨酸组之间(即L-精氨酸/ADMA为100和200),其余各实验组间亦有显著性差异($P < 0.05$;表2, Table 2)。

表 1. 不同浓度非对称性二甲基精氨酸对内皮细胞表达可溶性细胞间粘附分子 1、内皮素 1 和一氧化氮的影响

Table 1. Effects of ADMA in different dosage on the expression of sICAM-1, endothelin-1 and NO in hUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

分 组	sICAM-1 (ng/L)	内皮素 1 (ng/L)	NO (μ mol/L)
对照组	108 \pm 27	34.80 \pm 6.99	80.68 \pm 8.74
ADMA 组 (μ mol/L)			
1	123 \pm 26 ^b	40.81 \pm 6.52 ^b	75.96 \pm 9.77 ^b
4	174 \pm 23 ^{ab}	52.29 \pm 8.24 ^{ab}	64.22 \pm 6.23 ^{ab}
8	224 \pm 32 ^{ab}	64.11 \pm 7.32 ^{ab}	52.98 \pm 7.02 ^{ab}
12	274 \pm 42 ^{ab}	75.70 \pm 7.72 ^{ab}	41.55 \pm 5.95 ^{ab}
16	325 \pm 38 ^{ab}	87.17 \pm 6.78 ^{ab}	30.31 \pm 5.55 ^{ab}

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, ADMA 组间比较。

表 2. 不同浓度 L-精氨酸对非对称性二甲基精氨酸所致内皮细胞表达可溶性细胞间粘附分子 1、内皮素 1 和一氧化氮的影响

Table 2. Effects of L-arg in different dosage plus ADMA on the expression of sICAM-1, NO and endothelin-1 in hUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

分 组	sICAM-1 (ng/L)	内皮素 1 (ng/L)	NO (μ mol/L)
对照组	325 \pm 38	87.17 \pm 6.78	30.31 \pm 5.55
ADMA+ L-精氨酸 (mmol/L)			
0.2	269 \pm 48 ^{ab}	72.71 \pm 7.87 ^{ab}	42.08 \pm 7.21 ^{ab}
0.4	217 \pm 31 ^{ab}	60.37 \pm 7.56 ^{ab}	53.65 \pm 8.11 ^{ab}
0.8	165 \pm 27 ^{ab}	48.24 \pm 8.14 ^{ab}	65.20 \pm 8.30 ^{ab}
1.6	113 \pm 24 ^{ab}	36.28 \pm 5.16 ^{ab}	77.41 \pm 7.71 ^{ab}
3.2	103 \pm 19 ^a	32.10 \pm 6.02 ^a	82.13 \pm 7.36 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 不同浓度 L-精氨酸组间比较。

3 讨论

非对称性二甲基精氨酸(ADMA)是一种内源性 NOS 抑制剂,血浆中 ADMA 水平的升高可导致血管舒张功能下降,内皮细胞粘附性增加,同时还抑制血管新生,促进动脉内膜增厚^[4],已被推荐列为一种新的心血管疾病的危险因素^[5]。正常人血浆中 ADMA 的水平约为 $1.0 \pm 0.1 \mu$ mol/L,在病理情况下,可以增加几倍到十几倍^[2](此处为选择 ADMA 浓度的依据)。研究表明,ADMA 在病理生理高范围 $3 \sim 15 \mu$ mol/L 时,能明显抑制内皮细胞产生 NO,导致内皮功能紊乱^[6]。ADMA 导致内皮功能紊乱的机制可能有二:一是 ADMA 导致 NOS 活性解偶联^[2]。NOS 活性解偶联后,不能催化 L-精氨酸的双电子氧化生成

NO。二是 ADMA 在 NOS 的活性部位起竞争性抑制作用^[7]。目前,能够有效逆转 ADMA 效应的制剂或药物有 L-精氨酸、血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)、血脂调节药物普罗布考、血管紧张素 ET 受体拮抗剂 1 等^[8]。

一氧化氮(NO)和内皮素 1 是血管内皮细胞衍生的两种重要的血管活性物质,维持血管基础张力。NO 和内皮素 1 的合成、释放失衡是影响血管基础张力、冠状动脉血流储备的关键。sICAM-1 是细胞粘附因子之一,主要介导单核细胞粘附到内皮细胞上,在冠心病的发生发展过程中扮演着重要的角色^[9]。L-精氨酸是一种半必需氨基酸,是 NOS 的底物,正常血浆中浓度约 $30 \sim 100 \mu$ mol/L,与 ADMA 比值约 $30 \sim 100$ ^[10](选择 L-精氨酸浓度的依据)。据报道,分离并部分纯化的内皮细胞 NOS 的 K_m 值为 2.9μ mol/L,该值(Michaelis-Menten 常数)表示酶半最大反应速率所需要的底物浓度^[11]。按此 K_m 值推测,L-精氨酸在生理浓度下,NOS 将完全被底物 L-精氨酸所占据。而实际上用高浓度 L-精氨酸可以改善内皮功能,这与理论上缺乏这样的作用之间的矛盾,称为“L-精氨酸反常”。其原因可能是细胞内用以合成 NO 的 L-精氨酸不是来源于细胞内储存的 L-精氨酸,而是直接从细胞外经特异性转运体运输入细胞内的 L-精氨酸,内源性 NOS 抑制剂也经此转运体进入细胞内^[12]。因此,补充外源性 L-精氨酸可以逆转 ADMA 导致的内皮功能不全。本实验采用 ADMA 的浓度和病理生理状态下相近,故有一定的临床意义。

本研究结果发现,hUVEC 与 ADMA 共育后,其产生内皮素 1、sICAM-1 的量显著增加,NO 的量显著减少,加入 L-精氨酸后,可逆转此情况;且在 ADMA 低浓度(1μ mol/L)时,尽管内皮素 1、sICAM-1、NO 的量与对照组相比有所改变,但两者之间并无显著差异;当 L-精氨酸/ADMA > 100 时,其作用效果与 L-精氨酸/ADMA = 100 时并无显著差异。这些说明,接近生理状态下的 ADMA 浓度对细胞内皮功能并无明显影响,在病理情况下,随着 ADMA 浓度的升高,细胞内皮功能破坏的进一步加重,加入 L-精氨酸后,随着加入 L-精氨酸/ADMA 的增大,细胞内皮功能逐渐改善,但当 L-精氨酸/ADMA 大到一定程度时,细胞内皮功能基本恢复正常,此时继续加大 L-精氨酸的量无进一步改善作用。

本研究说明,ADMA 可以直接导致内皮功能失调,也进一步证实 ADMA 是一种新的心血管疾病危险因素;补充 L-精氨酸可改善由 ADMA 升高引起的内皮功能失调。文献[3, 13]报道,在高脂血症、高血

压、充血性心力衰竭、2型糖尿病、周围血管疾病、慢性肾功能衰竭、冠状动脉疾病、X综合征、高同型半胱氨酸血症等患者及血管再生的内皮细胞,均伴有内皮依赖性血管舒张功能减退,ADMA水平升高,且内皮功能失调的严重程度和血浆ADMA水平明显相关。因此,药物调节ADMA浓度可能是心血管疾病的一个新的治疗方向。

[参考文献]

- [1] Hornig B, Drexler H. Reversal of endothelial dysfunction in humans. *Coron Artery Dis*, 2001, **12** (6): 463-473
- [2] Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*, **59** (4): 824-833
- [3] Piatti P, Fragasso G, Monti L, Lucilla D, Setola E, Lucotti P, et al. Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves arteriograms: correlation with asymmetric dimethylarginine levels. *Circulation*, 2003, **107** (3): 429-436
- [4] John P. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (9): 2 032-037
- [5] Böger RH, Vallance P, John P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atherosclerosis Supplements*, 2003, **4** (4): 1-3
- [6] Böger RH, Bode-Böger SM. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway and cardiovascular disease. *Semin Thromb Hemost*, 2000, **26** (5): 539-545
- [7] Andrew JM. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 2002, **6** (2): 101-124
- [8] 邹燕, 李向平. 内源性一氧化氮合酶抑制剂与血管内皮功能. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 178-180
- [9] Verna S, Anderson TJ. Fundamental of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002, **105** (5): 546-549
- [10] Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (6): 1 023-030
- [11] Tsikas D, Böger RH, Sandmann J, Stefanie M, Bode-Böger, Frllich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett*, 2000, **478** (1-2): 1-3
- [12] McDermid KK, Zharikov S, Block ER. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric oxide synthase may explain the 'L-arginine paradox'. *Biochem*, 1997, **272** (10): 31 213-216
- [13] 熊燕, 苑利伟, 付云峰, 付四海, 周宏源. 糖尿病大鼠病程的不同时期血中一氧化氮合酶抑制物含量变化. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 22-26

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

关于汉字文稿中名词术语使用英文缩写词的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,本刊亦不例外。然而在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题: ①同一个英文名词术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生;②缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白 (apolipoprotein), 缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;③用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,本刊对汉字文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请遵照执行。

1 名词术语在 3 个 (含 3 个) 汉字内,一律使用汉文;多于 3 个汉字的,才可使用英文缩写词;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用汉字;但冠心病、肺心病等例外。

2 文题、摘要、关键词、正文中的各层次标题、插图和表格标题中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。

3 段首的名词术语可用缩写词时,为了阅读方便,可在缩写词左右加圆括号,左半圆括号之前写出汉字名词术语全称。

4 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写: 汉文全称 (英文全称, 缩写词)。如极低密度脂蛋白胆固醇 (very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等。

5 英文缩写词在汉字文稿中不用复数。

6 书写时缩写词字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符 (用半字线),如 II-1。

7 名词术语的英文缩写词不移行。

8 汉字文稿中不宜过多使用英文缩写词,本刊规定文献综述可用 4~6 个,其它文稿限 4 个内。

以上规定请共同遵照执行。

(胡必利起草、修订)