

非对称二甲基精氨酸促进大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体表达

何 军, 刘海潮, 马业新

(华中科技大学同济医学院附属同济医院心血管内科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 非对称二甲基精氨酸; 一氧化氮合酶; 受体, 氧化型低密度脂蛋白; 氧化型低密度脂蛋白受体; 实验动物, 大鼠; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察非对称二甲基精氨酸对大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体表达的影响, 探讨其在动脉粥样硬化中的作用。方法 健康成年 Wistar 大鼠 34 只随机分为四组: 对照组 ($n=7$) 正常饲料喂养, 正常饮水。④高脂饲料组 ($n=9$) 用高脂饲料喂养, 正常饮水。④非对称二甲基精氨酸 (简称甲基精氨酸) 组 ($n=9$) 用高脂饲料喂养, 饮水中按体重加入非对称二甲基精氨酸 $[0.2 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ 。L 精氨酸组 ($n=9$) 用高脂饲料喂养, 饮水中按体重加入非对称二甲基精氨酸 $[0.2 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ 和 L 精氨酸 $[12 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ 。18 周后麻醉大鼠, 取主动脉, 以 RT-PCR 和 Western blotting 检测主动脉氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达。结果 甲基精氨酸组氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 表达量 (1.608 ± 0.114) 较对照组 (0.363 ± 0.027) 和高脂饲料组 (0.480 ± 0.065) 增加 (P 均 < 0.001), L 精氨酸组氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 表达量 (0.902 ± 0.037) 较甲基精氨酸组降低 ($P < 0.01$); ④甲基精氨酸组氧化型低密度脂蛋白受体蛋白表达量 (0.662 ± 0.063) 较对照组 (0.111 ± 0.022) 和高脂饲料组 (0.251 ± 0.004) 增加 (P 均 < 0.001), L 精氨酸组 (0.364 ± 0.117) 较甲基精氨酸组氧化型低密度脂蛋白受体蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。结论 非对称二甲基精氨酸促进大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体基因和蛋白表达, 可能与非对称二甲基精氨酸促进动脉粥样硬化有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Asymmetric Dimethylarginine Accelerates the Expression of Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor of Aorta in Rats

HE Jun, LIU Hai-Chao, and MA Ye-Xin

(Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Internal Medicine; Asymmetric Dimethylarginine; Nitric Oxidize Synthase; Oxidized Low Density Lipoprotein; Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor; Atherosclerosis; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) expression, and to investigate the significance of ADMA in atherogenesis. **Methods** 34 Wistar rats were divided into four groups randomly: Control group ($n=7$): Fed by normal diet and water. ④High fat diet group ($n=9$): Fed by high fat diet and normal water. ④ADMA group ($n=9$): Fed by high fat diet, water with ADMA $[0.2 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$. L-Arg group ($n=9$): Fed by high fat diet, water with ADMA $[0.2 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ and L-Arg $[12 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$. 18 weeks later, the rats were anesthetized, and aortas were gathered. The expression of LOX-1 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** The expression of LOX-1 mRNA in ADMA group (1.608 ± 0.114) was higher than that of control group (0.363 ± 0.027) and high fat diet group (0.480 ± 0.065) ($P < 0.001$, either); In L-Arg group (0.902 ± 0.037), LOX-1 mRNA expression decreased compared with ADMA group ($P < 0.01$); ④The expression of LOX-1 protein increased in ADMA group (0.662 ± 0.063) compared with control group (0.111 ± 0.022) and high fat diet group (0.251 ± 0.004) ($P < 0.001$, either), Compared with ADMA group, the expression of LOX-1 protein decreased in L-Arg group (0.364 ± 0.117) ($P < 0.05$). **Conclusion** ADMA accelerates the expression of LOX-1 in rats' aortas, this might be related to atherogenesis.

非对称二甲基精氨酸 (asymmetric dimethylarginine, ADMA) 与心血管疾病的关系近年备受关注, 动

物和人体实验均证实, 高血压、高血脂、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)、心力衰竭和高同型半胱氨酸血症时血浆 ADMA 水平升高, 已被推荐列为心血管疾病的危险因素^[1]。ADMA 是一氧化氮合酶 (nitric oxidize synthase, NOS) 的内源性竞争抑制剂, 与 NOS 的底物左旋精氨酸 (L-arginine, L 精氨酸) 竞争 NOS 的结合位点。经大量基础和临床研究, ADMA 在 As

[收稿日期] 2006-04-30

[修回日期] 2006-12-09

[作者简介] 何军, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病的防治, 现在宁夏医学院附属医院, 联系电话 13871570904, E-mail 为 moon101828@sina.com。刘海潮, 博士研究生, 医师, 研究方向为冠心病的防治。马业新, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病与心力衰竭的防治, 尤其是擅长冠心病的介入治疗。

中的作用已逐渐被人们认识。目前较为明确的观点是:ADMA 可使血管内皮细胞损伤和平滑肌细胞增殖,由此促进 As,但 ADMA 对脂质沉积的影响研究较少,具体机制也不清楚。本研究观察 ADMA 对大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体(oxidized low density lipoprotein receptor, LOX-1)表达的影响,探讨其在脂质沉积中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

胆固醇、胆酸钠和 L 精氨酸购自 Amresco,ADMA 购自 Sigma,丙基硫氧嘧啶购自上海复星朝晖药业有限公司,维生素 D3 购自上海通用药业股份有限公司,Trizol 购自上海华舜生物工程有限公司,丙烯酰胺购自 Amersco,硝酸纤维素膜购自 Millipore,氟仿、异丙醇、乌拉坦均为国产分析纯产品。RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas,引物由上海生工生物工程技术公司合成,ECL 发光试剂盒购自 PIERCE,兔抗 β -Actin 多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记兔抗山羊 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司,山羊抗 LOX-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz。贝克曼 DU650 型分光光度计,Bio-Rad 梯度 PCR 仪,Bio-Rad 蛋白分离及图像分析系统。

1.2 实验动物分组及其处理

成年 Wistar 大鼠(清洁级)34 只,体重 183.9 ± 36.7 g,雌雄不限,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。随机分为对照组($n=7$)、高脂饲料组($n=9$)、ADMA 组($n=9$)和 L 精氨酸组($n=9$)。对照组予标准大鼠饲料,正常饮水。高脂饲料组根据文献[2]给予高脂饲料,即 3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、5% 白糖、10% 猪油和 81.3% 标准大鼠饲料,正常饮水。ADMA 组予高脂饲料,饮水中按体重加入 ADMA [$0.2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]。L 精氨酸组予高脂饲料,饮水中按体重加入 ADMA [$0.2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]和 L 精氨酸[$12 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]。除对照组外,其余三组在喂养开始时按体重一次性腹腔注射维生素 D3 $0.6 \text{ MIU}/\text{kg}^{[2]}$,对照组注射等体积的生理盐水。所有动物饲养 18 周。

1.3 取材

18 周后以 20% 乌拉坦($1.5 \text{ g}/\text{kg}$)腹腔注射麻醉大鼠,自主动脉根部至髂动脉分支处剥离主动脉全长,去除血管外的脂肪组织,用 4°C 生理盐水冲洗干净,以滤纸吸去水分,迅速投入液氮中,4 h 后转入 -80°C 冰箱保存。

1.4 氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 表达的检测

取主动脉 $50 \sim 100 \text{ mg}$,常规 Trizol 法提取总 RNA,分光光度计测 OD260/OD280 在 $1.8 \sim 2.0$ 之间。取总 RNA $3 \mu\text{g}$ 逆转录合成 cDNA,取 $1.5 \mu\text{L}$ cDNA 分别与 LOX-1 和 β -actin 的上下游引物各 $1 \mu\text{L}$ 进行扩增。LOX-1 引物序列:正义链 $5'$ -GAC TGG ATC TGG CAT AAA GA- $3'$,反义链 $5'$ -CCT TCT TCT GAC ATA TGC TG- $3'$,扩增产物长 361 bp ,反应条件为 94°C 变性 $30 \text{ s} \rightarrow 46^\circ\text{C}$ 退火 $30 \text{ s} \rightarrow 72^\circ\text{C}$ 延伸 60 s ,30 次循环。内参照 β -actin 引物序列正义链 $5'$ -CAT CAC TAT CGG CAA TGA GC- $3'$,反义链 $5'$ -GAC AGC ACT GTG TTG GCA TA- $3'$,扩增产物长 159 bp ,反应条件为 94°C 变性 $30 \text{ s} \rightarrow 57^\circ\text{C}$ 退火 $30 \text{ s} \rightarrow 72^\circ\text{C}$ 延伸 45 s ,30 次循环。将扩增产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离,摄像,采用 gel pro3.0 软件分析,以 LOX-1 与 β -actin 条带的密度比表示 LOX-1 在转录水平的相对表达。

1.5 氧化型低密度脂蛋白受体蛋白表达的检测

三去胍法提取主动脉总蛋白,按 Bradford 法测蛋白浓度。按每泳道 $30 \mu\text{g}$ 上样,经 12% SDS-PAGE 分离胶电泳分离蛋白,将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上,1:100 山羊抗 LOX-1 多克隆抗体 4°C 孵育过夜,封闭液洗膜,1:2 000 辣根酶标记兔抗山羊 IgG 室温封闭 3 h,TBST 洗膜后与 ECL 试剂室温孵育 $2 \sim 5 \text{ min}$,曝光 10 s ,洗片,摄像,gel pro3.0 软件进行分析。以 β -actin 蛋白表达为内参照,用 LOX-1 与 β -actin 条带的密度比表示 LOX-1 蛋白的相对表达。

1.6 统计学处理

全部数据采用 SPSS10.0 统计软件包处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 表达的比较

大鼠主动脉 LOX-1 mRNA 表达的检测结果见表 1。与对照组比较,ADMA 组 LOX-1 mRNA 半定量值明显升高,差异有显著性($P < 0.001$),此值也高于高脂组,差异有显著性($P < 0.001$),L 精氨酸组 LOX-1 mRNA 值较 ADMA 组降低,二者相比差异有显著性($P < 0.01$)。提示 ADMA 能增强大鼠主动脉 LOX-1 mRNA 表达,而 L 精氨酸可部分减弱 ADMA 的这一效应。

表 1. 大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	0.363 \pm 0.027	0.111 \pm 0.022
高脂组	0.480 \pm 0.065	0.251 \pm 0.004
ADMA 组	1.608 \pm 0.114	0.662 \pm 0.063
L 精氨酸组	0.902 \pm 0.037	0.364 \pm 0.117

2.2 大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体蛋白的表达比较

大鼠主动脉 LOX-1 蛋白表达的检测结果见表 1。与对照组比较, ADMA 组 LOX-1 蛋白表达量明显增加($P < 0.001$), 此值也高于高脂组, 差异有非常显著性统计学意义($P < 0.001$), L 精氨酸组 LOX

-1 蛋白表达量较 ADMA 组减弱, 二者相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。表明 ADMA 能上调大鼠主动脉 LOX-1 蛋白表达, 而 L 精氨酸可抑制该效应。

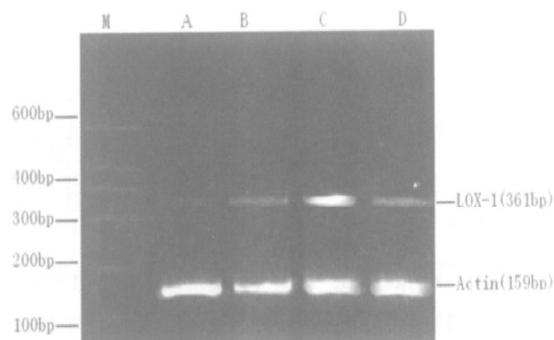


图 1. 大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 电泳图

M 为 Marker, 从上到下依次为 600 bp、400 bp、300 bp、200 bp 和 100 bp; A 为对照组, B 为高脂组, C 为 ADMA 组, D 为 L 精氨酸组。

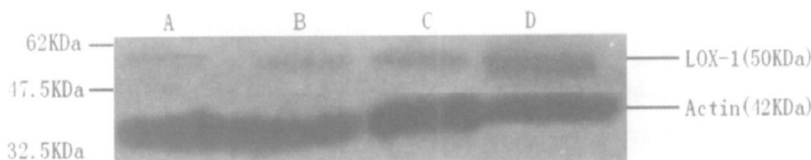


图 2. 大鼠主动脉氧化型低密度脂蛋白受体蛋白表达 Western blotting 检测结果

A 为对照组, B 为高脂组, C 为 L 精氨酸组, D 为 ADMA 组。

3 讨论

动脉粥样硬化 (As) 与冠心病、高血压、糖尿病等多种疾病密切相关, 目前认为, 血管内皮细胞损伤、平滑肌细胞增殖和巨噬细胞泡沫化是粥样斑块形成的三个环节, 其中巨噬细胞泡沫化是关键步骤。ADMA 在 As 中的作用是近年研究的热点, 它是从包含甲基化精氨酸残基的蛋白质中由蛋白精氨酸二甲基转移酶水解而来。已有众多的证据表明, ADMA 可引起血管内皮功能紊乱, 平滑肌细胞增殖, 促进 As, 但 ADMA 对巨噬细胞形成泡沫细胞这一环节的影响研究较少, 国内尚未见报道。

生理状态下, 低浓度胆固醇可以增强 NOS 活性, 促进 NO 合成, 而长期高脂饮食可使体内胆固醇含量升高, 高浓度胆固醇抑制 NOS 活性, 减少 NO 合成, 促进 As; 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 还可通过氧化应激降低二甲基精氨酸二甲基氨基水解酶活性, 使 ADMA 的降解减少, 同时, 高脂血症时, 蛋白精氨酸二甲基转移酶基因表达增强, 使 ADMA 合成增多, 因此血清中 ADMA 水平升高^[3]。ADMA 是 L 精氨酸的类似物, 是 NOS 的内源性竞争性抑制剂, 它通过使 NOS 与 L 精氨酸之间的电子传递解偶联而竞争 NOS 的

结合位点, 减少 NO 合成, 增加氧化强度^[4], 使内皮细胞损伤, 分泌活性改变, 释放炎症因子和细胞间黏附分子, 诱导单核/巨噬细胞侵入血管内皮。

氧化应激在 As 的整个形成过程中起作用, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是氧化应激的生物标记物。高脂血症与增多的 ADMA 均可使机体氧化应激增强, LDLC 被氧化修饰为 ox-LDL, ox-LDL 比 LDLC 有更强的毒性作用。“修饰的低密度脂蛋白假说”认为, As 中细胞摄入的脂质必定经过了某种修饰, 使巨噬细胞不断摄入大量修饰的 LDL 而不受调控, 最终成为泡沫细胞, 导致脂质条纹的形成^[5]。以往的研究认为, ox-LDL 通过多种清道夫受体, 如 SR-A iv/ $\text{CD}36$ 、SR-B iv、macrosialin/ $\text{CD}68$ 和 SREC 被单核/巨噬细胞摄取, 但近年研究发现 LOX-1 才是 ox-LDL 的特异性受体。LOX-1 属 C 型细胞膜蛋白, 是 C 型血凝素家族的成员, 因而也被称为血凝素样受体 1 (Lectin-like receptor 1)。Sawamura 等^[6] 1997 年首先在牛主动脉内皮细胞中分离鉴定了 LOX-1。LOX-1 主要在内皮细胞表达, 巨噬细胞和平滑肌细胞也有少量表达, ox-LDL、肿瘤坏死因子 α 、血流剪切应力、内皮素和血管紧张素 II 均可增强 LOX-1 的表达。本研究发现, AD-

MA 组大鼠主动脉中 LOX-1 基因和蛋白表达较对照组和高脂组增强, 其差异有显著性 (P 均 < 0.001), 机制可能是高脂与 ADMA 增强了氧化应激, $\alpha\omega$ -LDL 水平升高, 可能还同时伴有内皮素和血管紧张素 ② 水平升高, 使 LOX-1 表达上调。主动脉 LOX-1 表达增强, 诱导血管内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞大量吞噬 $\alpha\omega$ -LDL, 形成泡沫样细胞沉积在血管内壁, 这些泡沫细胞最终趋于死亡, 是构成粥样斑块的重要成分^[7]。有研究认为, LOX-1 与 $\alpha\omega$ -LDL 结合后, 通过激活丝裂素活化的蛋白激酶和蛋白激酶, 使核因子 κB 激活^[8]。核因子 κB 能促进生长因子如巨噬细胞集落刺激因子、血小板源生长因子, 趋化因子如单核细胞趋化蛋白 1、白细胞介素 8, 细胞黏附分子如血管细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 1 等合成^[9], 诱导白细胞迁移进入血管内皮下层, 促进单核细胞增殖分化为巨噬细胞, 并吞噬脂质成为泡沫细胞, 最终形成粥样斑块。ADMA 组 LOX-1 mRNA 和蛋白表达更显著上调, 可能是由于外源性增加 ADMA 使内皮损害和氧化应激更趋激烈, 促进了 LOX-1 进一步表达, 而 L 精氨酸组 LOX-1 mRNA 和蛋白表达较 ADMA 组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 可见外源性增加 L 精氨酸可削弱 ADMA 的效应。L 精氨酸是一种半必需氨基酸, 是 NOS 的唯一底物, 生理状态下, L 精氨酸与 ADMA 血浆浓度的比值约为 30~100, 外源性补充 L 精氨酸可以与 ADMA 竞争 NOS 的结合位点, 逆转 ADMA 的促 As 作用, 李玉光等^[10]的研究发现, L 精氨酸明显抑制高脂喂饲大鼠主动脉核因子 κB 的合成。

我们认为, ADMA 可以促进大鼠主动脉 $\alpha\omega$ -LDL 受体—LOX-1 基因和蛋白表达。LOX-1 与 $\alpha\omega$ -LDL 结合后, 可能通过多种细胞信号转导通路激活核因子 κB , 诱导单核/巨噬细胞向损伤内皮处迁移并吞噬脂质转化为泡沫细胞, 这可能是 ADMA 促进 As 发生发展的机制之一, 适当阻断 LOX-1 与 $\alpha\omega$ -LDL 结合可能是防治 As 的新靶点。

[参考文献]

- [1] Boger RH, Vallance P, John P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase [J]. *Atheroscler Suppl*, 2003, 4 (4): 1-3.
- [2] 杨鹏远, 芮耀诚, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24 (7): 802-804.
- [3] Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (9): 2 032-037.
- [4] Tse-Min Lu, Yur-An Ding, Shing-Jong Lin, Werr-Shin Lee, Hor-Chang Tai. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention [J]. *Eur Heart J*, 2003, 24 (21): 1 912-919.
- [5] 倪晓晴, 朱健华, 孙承龙. 低密度脂蛋白免疫复合物对单核细胞源性巨噬细胞胆固醇代谢及低密度脂蛋白受体表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (4): 461-463.
- [6] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein [J]. *Nature*, 1997, 386 (6): 73-77.
- [7] 王庸晋, 魏武, 王治平, 公惠平. 氧化型极低密度脂蛋白诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (1): 19-22.
- [8] Mehta JL. The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis [J]. *Can J Cardiol*, 2004, 20 (Suppl B): 32B-36B.
- [9] Hanfang Zhang, Connie Snead, Catravas JD. Nitric oxide differentially regulates induction of type II nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells versus macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21 (4): 529-535.
- [10] 李玉光, 袁文金, 张元春. L 精氨酸抑制高脂喂饲大鼠动脉核因子 κB 的合成[J]. 中国循环杂志, 2003, 18 (2): 146-148.

(此文编辑 胡必利)