

L-精氨酸抑制非对称性二甲基精氨酸对内皮祖细胞的增殖作用

何 晋, 谢秀梅, 方叶青, 陈晓彬

(中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内科学; 非对称性二甲基精氨酸; L-精氨酸; 内皮祖细胞; 细胞增殖

[摘要] 目的 研究非对称性二甲基精氨酸对人脐带血内皮祖细胞增殖的影响及观测 L-精氨酸对非对称性二甲基精氨酸的抑制作用。方法 从脐带血中分离出单个核细胞, 体外培养 7 天, 在贴壁细胞中加入不同浓度的非对称性二甲基精氨酸(1、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$) 作用不同时间(24、48 和 72 h), 用 MTT 比色法和细胞克隆计数法评价非对称性二甲基精氨酸对内皮祖细胞增殖的影响; 加入 L-精氨酸后采用 MTT 比色法和高倍荧光显微镜下 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白染色细胞计数法分析 L-精氨酸对非对称性二甲基精氨酸作用内皮祖细胞的影响; 硝酸还原酶法测定培养基上清液一氧化氮含量, 采用化学比色法测定培养基上清液总一氧化氮合酶活力。结果 非对称性二甲基精氨酸呈量效和时效性地减少内皮祖细胞数目和增殖能力; 随着 L-精氨酸浓度的增加, L-精氨酸能有效抑制非对称性二甲基精氨酸对内皮祖细胞的作用。结论 非对称性二甲基精氨酸可能通过抑制内皮祖细胞的增殖促进内皮功能不全的发展, 而外源性 L-精氨酸能抑制非对称性二甲基精氨酸的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Depressant Effects of Asymmetric Dimethylarginine on the Proliferation of Endothelial Progenitor Cell and the Antagonism of L-Arginine

HE Jin, XIE Xiu-Mei, FANG Ye-Qing, and CHEN Xiao-Bing

(Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Asymmetric Dimethylarginine; L-Arginine; Endothelial Progenitor Cells; Cell Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the proliferation of endothelial progenitor cell (EPC) of human umbilical cord blood and observe whether L-arginine can antagonize the effects of ADMA.

Methods Mononuclear cells were isolated from fresh cord blood and cultured for 7 days, attached cells were incubated with different concentration of ADMA (1, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$) among different times (24, 48 and 72 h). MTT assay was used and colony forming units (CFU) were quantified to evaluate the proliferation of EPC after treated with ADMA. Meanwhile, MTT assay was used and DiI-acLDL uptake cells under high power field of fluorescence microscopy were quantified to assay effects of L-arginine on ADMA-induced EPC proliferation. Nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in the supernatant were measured by nitrate reductase assay and chemical colorimetry assay.

Results Incubation of EPC with ADMA dose and time dependently decreased the number and the proliferation of EPC. In addition, the depressant effect of ADMA on EPC were dismissed with the increasing dosage of L-arginine.

Conclusions It is suggested that ADMA can promote endothelial dysfunction by means of depressant EPC proliferation and exogenous L-arginine maybe antagonize the effects of ADMA.

冠心病是临床上一种严重危害人类健康的疾病, 冠心病传统的危险因素包括吸烟、高血压、高血脂、高血糖等, 近年来大量的研究证明, 内源性非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA) 含量的升高与动脉粥样硬化的发生、发展密切相关^[1,2]。目前认为, 动脉粥样硬化的中心环节是内皮功能不全, 而内皮功能不全的本质是内皮损伤和修复之间动态平衡的破坏^[3]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC) 在内皮损伤后的修复中起重要作用^[3,4]。本研究旨在探讨 ADMA 对体外培养的内皮祖细胞增殖的影响及 L-精氨酸干预后的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

淋巴细胞分离液 Ficoll-paque 购于天津灏洋生物公司; RPMI 1640 培养基购于 Invitrogen 公司; 胎牛血清购于 Hyclone 公司; 血管内皮生长因子(vascular endothelium growth factor, VEGF) 购于 R&D 公司; 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 购于 Peprotech 公司; 人纤维连接蛋白购于

[收稿日期] 2007-05-28

[修回日期] 2007-09-01

[作者简介] 何晋, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病的干细胞治疗, E-mail 为 jinharry@163.com。谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管和老年疾病的防治。方叶青, 博士研究生。

Chemicon 公司; DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL) 购于 Molecular Probes 公司; 羟乙基淀粉(HES)、FITC 标记荆豆凝集素 I(FITC-UEA-I) 及 MTT 购于 Sigma 公司。一氧化氮(nitric oxide, NO) 及一氧化氮合酶(NO synthase, NOS) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 脐血内皮祖细胞的培养

人脐血样本取自我院产科, 均为健康足月妊娠, 每次取血 40 mL。采用 6% 羟乙基淀粉沉降法及 Ficoll-paque 分层法联合分离脐血单个核细胞, 以 $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ 密度接种于包被有纤维连接蛋白的 6 孔培养板中, 每孔加入 2 mL 含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 kIU/L)、链霉素 (100 kIU/L) 及庆大霉素 (8 kIU/L) 的 RPMI 1640 培养基中, 同时每孔加入 VEGF 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、bFGF 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。培养的第 4 天, 洗去未贴壁的细胞, 继续培养到第 7 天, 贴壁的细胞形成一个一个的克隆(colony forming units, CFU)^[5], 收集贴壁细胞供实验用。

1.3 实验分组

贴壁细胞随机分组, 分两步进行, 先确定 ADMA 对 EPC 增殖作用的量效和时效关系: 对照组含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基; ④ADMA 各浓度组用 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 并分别加入 1、5 及 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ADMA 培养 24 h。根据量效关系的结果, 选择作用最明显的剂量分别孵育 EPC 24、48 及 72 h。再观察 L-精氨酸对 ADMA 作用的 EPC 增殖的影响: 对照组含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基; ④ADMA 组选择合适的作用剂量和时间; ④ADMA + L-精氨酸组加入不同浓度 (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 及 1 mmol/L) 的 L-精氨酸培养 30 min 后, 再加入 ADMA 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$; L-精氨酸组加入 1 mmol/L L-精氨酸到含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中。

1.4 细胞克隆计数

参照文献[5], 细胞接种到 6 孔板后 48 h, 分别加入 1、5 及 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ADMA, 继续培养到第 7 天, 在高倍镜下分别计算每个孔的细胞克隆数, 每组随机计数 5 个视野。对照组加入 VEGF 及 bFGF。

1.5 内皮祖细胞荧光染色及计数

取生长第 7 天的细胞, 在培养的细胞中加入浓度为 2.4 mg/L DiI-acLDL, 置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中孵育 12 h, 然后用 2% 多聚甲醛固定 30 min, D-Hank's 洗涤 2 次后, 加入 FITC-UEA-I, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 在荧光显微镜下观察, DiI-acLDL 与 FITC-UEA-I 双

染色的细胞为正在分化的 EPC^[6]。细胞随机分组后分别和 DiI-acLDL 一起孵育 2 天, 在荧光显微镜下随机计数 15 个视野($\times 200$) 的 EPC。

1.6 MTT 比色法检测细胞的增殖能力

取培养第 7 天的细胞, 0.5% 胰酶消化, 计数后调整细胞浓度至 $2 \times 10^5/\text{L}$, 按每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板, 设 3 个复孔, 按照实验分组加入不同的药物, 干预前先用无血清 RPMI 1640 培养基培养 24 h, 使细胞达到同步化, 测定前 4 h, 在每个孔中加入 5 g/L MTT 20 μL , 4 h 后吸去细胞上清液再加入二甲亚砜 150 μL , 平板摇床震荡 10 min, 运用酶联免疫检测仪测定 490 nm 吸光度值(OD 值)。设置一个空白对照孔。

1.7 一氧化氮和一氧化氮合酶的检测

采用硝酸还原酶法测定培养基上清液 NO 含量, 采用化学比色法测定培养基上清液总 NOS 活力, 测定方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞的鉴定

脐血中单个核细胞培养 7 天, 细胞由单个的小圆形变成一个个细胞集落, 集落中心为圆形细胞, 周围为呈放射状分布的梭形细胞(图 1)。荧光显微镜下, 细胞摄取 DiI-acLDL 后呈红色, FITC-UEA-I 染色后呈绿色, 双染色细胞为正在分化的 EPC, 呈黄色, 98% 以上的细胞为双染色阳性细胞(图 2)。

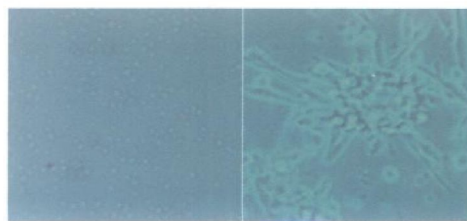


图 1. 培养的内皮祖细胞形态学变化

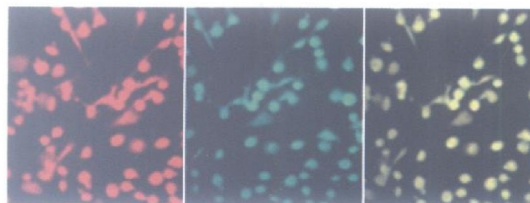


图 2. 内皮祖细胞的鉴定

2.2 非对称性二甲基精氨酸对内皮祖细胞增殖的抑制作用

10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 对 EPC 的抑制作用有显著差异 ($P < 0.01$; 表 1)。10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用 24、48 及 72 h 后, OD 值呈时间依赖性下降, 组间差异显著 ($P < 0.01$; 表 2)。10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组 CFU 数量下降 ($P < 0.01$; 图 3)。

表 1. 非对称性二甲基精氨酸对内皮祖细胞增殖的量效关系

ADMA 浓度	OD 值
0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)	0.278 \pm 0.023
1 $\mu\text{mol/L}$	0.276 \pm 0.009
5 $\mu\text{mol/L}$	0.250 \pm 0.010 ^a
10 $\mu\text{mol/L}$	0.235 \pm 0.019 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2. 非对称性二甲基精氨酸对内皮祖细胞增殖的时效关系

分 组	24 h	48 h	72 h
对照组	0.288 \pm 0.019	0.325 \pm 0.016	0.351 \pm 0.009
ADMA 组	0.236 \pm 0.014 ^a	0.219 \pm 0.008 ^a	0.163 \pm 0.002 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 不同浓度 L-精氨酸拮抗非对称性二甲基精氨酸抑制内皮祖细胞增殖的作用

随着 L-精氨酸浓度的增大, 对 ADMA 孵育的 EPC 的拮抗作用逐渐增强。1 mmol/L L-精氨酸对 EPC 增殖的促进作用差异有显著性 ($P < 0.05$; 图 4)。1 mmol/L L-精氨酸组细胞数量较 ADMA 组增加 ($P < 0.05$); 但与空白组比较差异无统计学意义(图 5)。与空白组比较, 10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组 NO 水平及

NOS 活性显著下降 ($P < 0.01$), 1 mmol/L L-精氨酸+ADMA 组和 1 mmol/L L-精氨酸组 NO 水平及 NOS 活性较 10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组显著增加 ($P < 0.01$)。

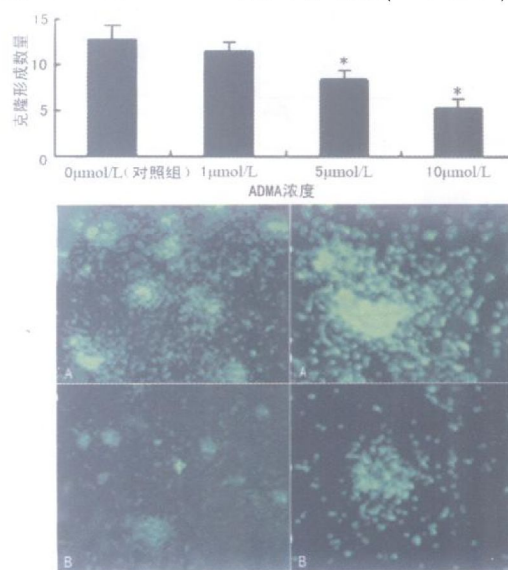


图 3. 不同浓度的非对称性二甲基精氨酸对细胞数量的影响 ($n = 3$) A 为加入 VEGF 10 $\mu\text{g/L}$ 和 bFGF 2 $\mu\text{g/L}$, B 为加入 ADMA 10 $\mu\text{mol/L}$ 。* 为 $P < 0.01$ 。

表 3. 不同浓度 L-精氨酸对非对称性二甲基精氨酸处理的内皮祖细胞增殖的影响 ($n = 3$)

分 组	OD 值
空白对照组	0.277 \pm 0.068
ADMA	0.164 \pm 0.0015 ^b
ADMA+ 100 $\mu\text{mol/L}$ L-精氨酸	0.184 \pm 0.0226
ADMA+ 500 $\mu\text{mol/L}$ L-精氨酸	0.232 \pm 0.0484
ADMA+ 1 mol/L L-精氨酸	0.265 \pm 0.0699 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 ADMA 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较。

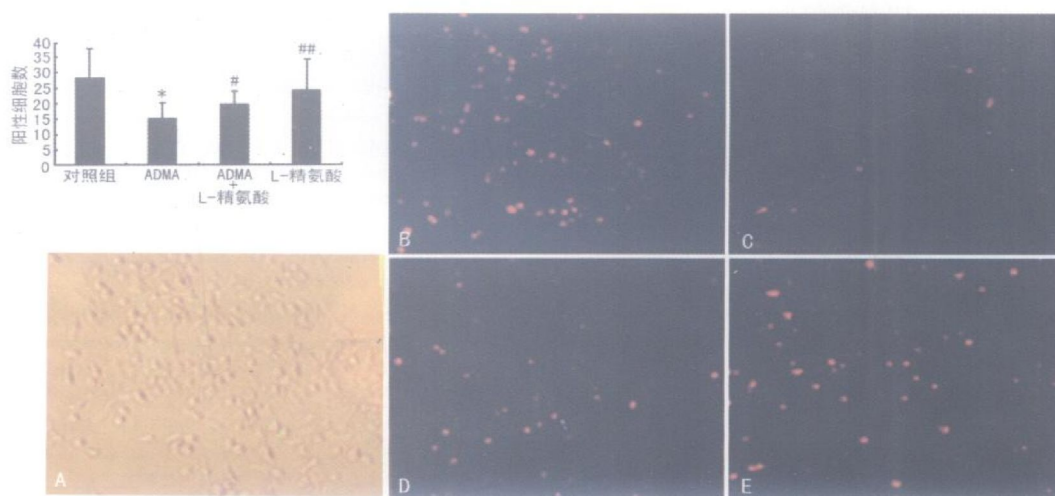


图 4. L-精氨酸对非对称二甲基精氨酸处理的内皮祖细胞细胞数的影响 ($n = 3$) A 和 B 为对照组, C 为 ADMA 组, D 为 ADMA+L-精氨酸组, E 为 L-精氨酸组。* 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; # 为 $P < 0.05$, ## 为 $P < 0.01$, 与 ADMA 组比较。

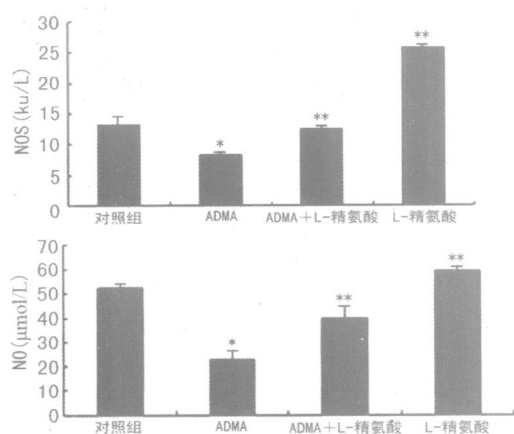


图 5. L-精氨酸对非对称性二甲基精氨酸处理的内皮祖细胞培养上清液中一氧化氮合酶活力和一氧化氮水平的影响 ($n = 6$) * 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; ** 为 $P < 0.01$, 与 ADMA 组比较。

3 讨论

内源性 ADMA 是以细胞内一些甲基化蛋白为底物,通过蛋白精氨酸甲基化转移酶 (PRMT) 催化而成,主要被二甲基精氨酸二甲胺水解酶 (DDAH) 代谢生成 L-瓜氨酸和二甲胺排出体外^[7]。ADMA 引起内皮功能不全的机制可能是: 在体内通过和 L-精氨酸竞争性抑制 NOS 活性,减少 NO 的生成,引起血管舒张功能障碍导致内皮功能不全;④ADMA 诱导 NOS 活性失偶联,NOS 活性失偶联后,不能催化 L-精氨酸的双电子氧化生成 NO,而使超氧离子生成增加^[1,8]。

内皮祖细胞 (EPC) 作为内皮细胞的前体细胞,不仅参与新生血管形成,同时也参与内皮再生化过程。内皮再生化的过程和 NO 的调节有关^[9],同时,NO 在 EPC 的动员和分化中起了重要作用^[10,11]。因此,NO 的减少影响到 EPC 的数量和内皮再生化。本研究采用 MTT 比色法和 CFU 计数法测定细胞数量的变化,提供了 ADMA 刺激培养的 EPC 抑制增殖的直接证据;加入 ADMA 后 NO 水平和 NOS 活性显著下降。这些结果均表明 ADMA 通过抑制 NOS 活性降低 NO 水平,从而抑制 EPC 增殖,并呈明显的剂量和时间依赖性。这样的结果与 Thum 等^[5]发现 ADMA 能随剂量增加抑制外周血 EPC 的动员、分化和体外成血管功能一致。

L-精氨酸是一种半必需氨基酸,是 NOS 的底物,它虽然不能使体内的 ADMA 水平下降,但能有效拮抗 ADMA 效应,达到改善内皮功能的目的。本

研究发现,加入 L-精氨酸后,随着加入 L-精氨酸浓度的增大,对 EPC 的增殖起到了促进作用;DiI-acLDL 荧光染色细胞后计数,同样发现 L-精氨酸能拮抗 ADMA 对 EPC 的抑制作用。另外,加入 L-精氨酸后 NOS 活力和 NO 水平显著上升。分析可能与 L-精氨酸通过竞争性与 NOS 的活性部位结合,逆转 ADMA 的效应,达到促进 EPC 增殖的效果。但是,在加入 L-精氨酸后并不能促进正常的 EPC 的增殖,分析可能与外源性 L-精氨酸只增加 NO 合成而并不影响肾 ADMA 清除率有关,提示 ADMA 可能竞争性抑制 NOS,而外源性 L-精氨酸与内源性 NOS 抑制剂 ADMA 相竞争,从而恢复 NO 合成^[12]。

综上所述,ADMA 能抑制脐血 EPC 的体外增殖,对内皮再生化产生影响,从而促进内皮功能不全的发展。而给与外源性的 L-精氨酸能拮抗 ADMA 对 EPC 增殖的抑制作用。

[参考文献]

- [1] 姜德建,李元建. 非对称性二甲基精氨酸—新的心血管疾病危险因子和药物防治靶点[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (3): 379-382.
- [2] Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e) inemia or hypercholesterolemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (12): 1 557-564.
- [3] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348 (7): 593.
- [4] Walter DH, Rittig K, Bahlmann F H. Statin therapy accelerate reendothelialization [J]. *Circulation*, 2002, 105 (25): 3 017.
- [5] Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46 (9): 1 693-701.
- [6] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2001, 89 (1): E1-7.
- [7] 熊燕,李元建. 内源性一氧化氮合酶抑制物: 一种新的内皮功能不全预测因子[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14 (3): 161-166.
- [8] Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes [J]. *J Am Coll*, 2000, 36 (7): 2 287-295.
- [9] Camen U, Stefanie D. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology [J]. *Circ Res*, 2004, 95: 343-353.
- [10] Aicher A, Heeschen C, Mildner Rihm C. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 1 370-376.
- [11] Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Bohm M, Laufs U. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 192 (1): 67-74.
- [12] Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA)—a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 1998, 98: 1 842-847.

(此文编辑 文玉珊)