

非对称性二甲基精氨酸对高血压病患者 外周血单核细胞趋化活性的影响

陈美芳^{1,3}, 杨天伦², 何晋¹, 陈志雄², 李元建³, 谢秀梅¹

(中南大学 1. 湘雅医院老干科; 2. 湘雅医院心内科; 3. 药学院心血管药理, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 内科学; 单核细胞趋化; 流式细胞仪; 原发性高血压; 非对称性二甲基精氨酸; 内皮功能不全; 单核细胞趋化因子

[摘要] 目的 检测原发性高血压患者血管内皮功能和外周血单核细胞趋化活性, 并探讨一氧化氮合酶抑制剂非对称性二甲基精氨酸在其中所起的作用。方法 在湘雅医院门诊和住院部收集 42 名原发性高血压患者和 40 名门诊健康体检者。检测肱动脉血流介导舒张功能、血浆中非对称性二甲基精氨酸含量、单核细胞趋化因子 1 浓度和外周血单核细胞趋化因子受体 CCR2 蛋白表达。结果 与健康对照组比较, 原发性高血压患者血管内皮依赖性舒张功能障碍, 表现为肱动脉血流介导舒张功能下降、血浆中非对称性二甲基精氨酸水平升高 ($P < 0.05$), 一氧化氮水平下降 ($P < 0.05$), 同时伴有血中单核细胞趋化因子 1 水平升高 ($P < 0.05$)。原发性高血压患者分离的外周血单核细胞上 CCR2 蛋白表达明显高于健康对照组, 给与外源性的非对称性二甲基精氨酸 (30 $\mu\text{mol/L}$) 培养 24 h 后可进一步上调 CCR2 的表达。结论 非对称性二甲基精氨酸可能促进原发性高血压患者的血管内皮功能不全和外周血单核细胞活化的发生。

[中图分类号]

[文献标识码] A

The Effect of Asymmetric Dimethylarginine on the Chemotatic Activity of Peripheral Blood Monocytes in Hypertensive Patients

CHEN Mei-Fang, YANG Tian-Lun, HE Jin, CHEN Zhi-Xiong, LI Yuan-Jian, and XIE Xiu-Mei

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

[KEY WORDS] Internal Medicine; Monocytic Chemokine; Flow Cytometry; Primary Hypertension; Asymmetric Dimethylarginine (ADMA); Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)

[ABSTRACT] **Aim** To determine endothelial function and chemokine activity of peripheral blood monocytes in individuals with primary hypertension, and to explore the role of asymmetric dimethylarginine in this process. **Methods** 42 patients with essential hypertension and 40 healthy controls in the out-patient clinic and admission department of the hospital were enrolled in the present study. Flow-mediated dilation on brachial artery was assessed and the plasma levels of asymmetric dimethylarginine and monocyte chemoattractant protein 1, and the expression of CCR2 protein expression in peripheral blood mononuclear cells were also determined. **Results** Endothelial dysfunction were found in patients with primary hypertension, manifesting that flow-mediated dilation was decreased, the levels of asymmetric dimethylarginine were elevated, and the levels of nitric oxide were decreased ($P < 0.05$). Compared with controls, plasma levels of monocyte chemoattractant protein 1 were markedly elevated and the expression of CCR2 protein in separated peripheral blood mononuclear cells in hypertensive patients was significantly upregulated ($P < 0.05$). Incubation of mononuclear cells with exogenous asymmetric dimethylarginine (30 μM) for 24 h further upregulated the expression of CCR2 protein in hypertensive patients ($P < 0.05$). **Conclusions** Asymmetric dimethylarginine may promote endothelial dysfunction and activation of monocytes existed in patients with essential hypertension.

高血压是一种慢性炎症性疾病, 其可能通过炎症反应促进动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生和发展, 近来研究表明, 内源性一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 抑制剂非对称性二甲基精氨酸

(asymmetric dimethylarginine, ADMA) 可竞争性抑制一氧化氮 (nitric oxide, NO) 合成, 在许多内皮功能不全的心血管疾病如高血压、As 和高胆固醇血症等都有 ADMA 水平的升高, 且发现 ADMA 含量的升高与心血管事件的发生率和病死率呈明显正相关^[1,2]。ADMA 也参与了促 As 发生发展的炎症反应过程, 可能是致 As 的前分子物质。单核细胞是重要的炎性细胞, 也是粥样硬化斑块的主要构成成分。故本研究拟检测未服用降压药物的原发性高血压患者的血管内皮功能和外周血单核细胞趋化活性以及 ADMA

[收稿日期] 2009-01-09 [修回日期] 2009-03-28

[基金项目] 中南大学博士创新课题基金

[作者简介] 陈美芳, 博士, 主要从事高血压和动脉粥样硬化的应用研究, E-mail 为 meifang121@sohu.com。杨天伦, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高血压的防治。通讯作者谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 主要从事老年心血管病的基础和临床研究, E-mail 为 xyxism@sina.com。

在其中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂

ADMA 标准品购自 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基 Gibco 产品; 小牛血清购自杭州四季青; 淋巴细胞分离液(Ficoll) 购自天津鼎国生物技术有限公司; NO 试剂盒购自南京聚力生物有限公司; 单核细胞趋化因子 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 试剂盒购自上海森雄生物有限公司; 鼠抗 CCR2 单克隆抗体、FITC 标记的抗鼠二抗均购自 Abcam 公司。

1.2 研究对象

2005 年 8 月~2006 年 5 月在湘雅医院门诊和住院部收集 42 名原发性高血压患者(未服用降压药物的初诊患者)和 40 名门诊健康体检者(对照组), 年龄 35~60 岁, 男 43 例, 女 39 例。高血压诊断标准依据 1999 年 WHO/ISH 诊断标准, 即在不同日期测量 3 次收缩压 ≥ 140 mmHg 和/或舒张压 ≥ 90 mmHg。排除继发性高血压、恶性高血压, 糖尿病(1 型或 2 型), 既往有晕厥, 严重心律失常, 严重充血性心衰, 脑血管意外史, 妊娠妇女, 严重肝肾功能不全, 心脏瓣膜病患者, 自身免疫疾病, 经临床体格检查、心电图、运动平板、心脏 B 超、SPECT 等证实排除冠心病。目前未服用任何降压药物, 以及降脂和抗血小板药物。健康体检者经门诊体检中心全面体检证实无心、肝、肾、肺、糖尿病等。

1.3 血浆非对称性二甲基精氨酸测定

受检者于肱动脉超声检测当日早晨空腹时取肘静脉血置于含有枸橼酸钠的抗凝管中, 用 3000 r/min 低温离心机离心 15 min, 分离血浆后置 -20°C 冰箱保存同批待测。取血浆 100 μL , 用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC) 法^[3]测定血浆中的 ADMA 含量: 取 10 μL 上清液或标准品加入 100 μL 衍生试剂混匀, 室温下反应 3 min 后进样, 然后用线性梯度洗脱的方式将样品从色谱柱中洗脱(流动相 A 为 0.05 乙酸钠(pH 6.8): 甲醇: 四氢呋喃= 82: 17: 1(V/V/V); 流动相 B 为 0.05 mol/L 乙酸钠: 甲醇: 四氢呋喃= 22: 77: 1(V/V/V), 流速为 1 mL/min), 经预柱处理后, 用 RF-10Axl 型荧光检测器对其及内标 ADMA 进行检测(激发波长为 338 nm; 吸收波长为 425 nm)。

1.4 血浆一氧化氮含量测定

生物系统中 NO 释放后很快转变成代谢产物

NO^{2-} 和 NO^{3-} , 以镉粉将 NO^{3-} 还原成 NO^{2-} , NO^{2-} 通过 Griess 重氮化反应生成有色化合物, 用 722 分光光度计 540 nm 处测定, 然后根据公式计算出 NO^{2-} 含量以此来间接反应上清液中 NO 浓度。

1.5 血浆单核细胞趋化因子 1 测定

严格按照试剂盒的要求, 采用 Elisa 法测定 MCP-1: 在含有抗 MCP-1 抗体包被的 96 孔板, 分别加入 MCP-1 标准品和样品各 100 μL , 37°C 孵育 2 h, 洗板 5 次, 每孔加入 100 μL 酶标二抗, 37°C 温育 1 h, 洗板 5 次, 加入底物 100 μL , 37°C 闭光孵育 15 min, 每孔加入终止液 1 滴, 用酶标仪在 490 nm 处测定吸光值, 根据 MCP-1 标准曲线得到样本 MCP-1 的浓度。

1.6 肱动脉超声检测

肱动脉内皮依赖性血流介导的舒张功能(flow-mediated dilation, FMD) 检测: 参考文献[4] 方法, 稍加改良: 患者休息 10 min 以后, 取平卧位, 右上肢外展 15° , 采用美国惠普 5500 彩色多普勒超声诊断仪, 将血管超声探头放在患者右侧肘窝上 2~5 cm 处, 探头频率 7.0 MHz, 对肱动脉进行纵向扫描, 使动脉前后壁内膜显示清楚, 测量静息时的肱动脉舒张末期内径 D_0 (心电图 R 波出现时)。再取袖带放置在右前臂(被测血管远端)充气加压至 250 mmHg 后, 维持 5 min, 随后放气, 按上述方法测量放气后 60~90 s 时的肱动脉舒张末期内径 D_1 。FMD= $(D_1 - D_0) / D_0$ 。

1.7 外周血单个核细胞的分离与培养

严格无菌条件下于肘静脉取血 15 mL, 加入抗凝管中混匀, 等量 Hanks 液稀释。小心而缓慢地将细胞悬液加在人淋巴细胞分离液(Ficoll, 比重为 1.077) 分离液上面, 2000 r/min 水平离心 20 min。单个核细胞悬于分离液的表面, 呈乳白色层, 用毛细吸管将该层细胞吸出, 移入另一个无菌离心管中, 用 Hank's 液离心洗涤单个核细胞 2~3 次, 每次离心速度 1000 r/min, 10 min。最后用 RPMI 1640 培养基离心洗涤 1 次, 去除上清。加入 1 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基, 混匀。进行细胞计数, 并用 2% 苔盼蓝染色, 计数活细胞数, 活细胞数 $> 95\%$ 用于实验。然后调整细胞数目为 10^6 个/mL, 接种于 6 孔培养板, 5% CO_2 , 37°C 潮湿 CO_2 孵箱, 培养 24 h 后去除未粘附的细胞, 贴壁的细胞为单核细胞。

1.8 外周血单核细胞 CCR2 蛋白表达

外周血单核细胞 CCR2 蛋白表达测定采用流式细胞术: 分离培养病人和正常对照组的单核细胞, 加或不加 ADMA (30 $\mu\text{mol/L}$) 培养 24 h 后收集细胞, 用

6%多聚甲醛固定细胞,再用 PBS 重悬制成 100 μ L 细胞悬液(含 5×10^5 个细胞),取抗 CCR2 单抗原液稀释 50 倍,加入 100 μ L 一抗稀释液混匀,4 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h 左右,2500 r/min 离心 6 min 去除上清,PBS 洗涤后用抗小鼠二抗 100 μ L(二抗原液稀释 20 倍)混匀,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 左右,2500 r/min 离心 6 min 去除上清,PBS 洗涤后加入适量的 PBS 重悬,上机检测。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理。两组比较用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析进行检验。双侧 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高血压组与对照组一般临床资料的比较

两组在年龄和性别构成上无明显差异,体重指数、血脂、血糖两组间亦无统计学差异,两组间具有可比性。高血压组患者收缩压和舒张压均较健康对照组高,两组间具有统计学差异($P < 0.01$,表 1)。

2.2 高血压组与对照组各相关指标比较

高血压组患者血浆中 ADMA、MCP-1 水平明显高于健康对照组,NO 水平显著降低($P < 0.05$)。肱动脉 FMD 检测过程中,高血压组 29 例、健康对照组 30 例完成该项检查。两组相比,肱动脉基础内径差异无显著性,而加压释放后的内径在高血压组降低($P < 0.05$),FMD 即肱动脉血流介导舒张功能较健康对照组明显降低($P < 0.01$,表 2)。

表 1. 对照组和高血压组临床资料和生化指标的比较

指标	对照组($n=40$)	高血压组($n=42$)
性别(男/女)	23/17	22/20
年龄(岁)	45.3 \pm 7.5	46.8 \pm 6.8
BMI (kg/m^2)	22.7 \pm 2.5	23.5 \pm 2.7
TC (mmol/L)	4.56 \pm 0.62	4.77 \pm 0.66
TG (mmol/L)	1.12 \pm 0.35	1.22 \pm 0.34
LDLC (mmol/L)	2.58 \pm 0.55	2.74 \pm 0.54
HDLC (mmol/L)	1.51 \pm 0.34	1.42 \pm 0.41
FBS (mmol/L)	5.07 \pm 0.62	5.27 \pm 0.56
BUN (mmol/L)	4.76 \pm 0.82	5.03 \pm 0.91
GPT (U/L)	18.3 \pm 16.4	20.1 \pm 12.2
SBP (mmHg)	118.3 \pm 9.8	157.2 \pm 12.5 ^b
DBP (mmHg)	74.9 \pm 8.0	99.5 \pm 9.9 ^b
ADMA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.72 \pm 0.20	0.84 \pm 0.26 ^a
NO ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	24.34 \pm 3.35	16.91 \pm 1.49 ^a
MCP-1 (ng/L)	15.93 \pm 6.78	19.94 \pm 8.95 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2. 对照组和高血压组肱动脉血流动力学参数比较

指标	健康对照组($n=30$)	高血压组($n=29$)
基础内径(mm)	3.28 \pm 0.55	3.31 \pm 0.64
充气后内径(mm)	3.68 \pm 0.64	3.52 \pm 0.68 ^a
FMD	11.23% \pm 1.86%	6.56% \pm 2.57% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 非对称性二甲基精氨酸对外周血单核细胞 CCR2 蛋白表达的影响

收集原发性高血压和健康对照组各 6 例,采集外周血并分离单核细胞进行培养和干预。30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ADMA 孵育健康对照组外周血单核细胞 24 h 后,细胞上 CCR2 蛋白表达没有明显变化,说明 ADMA 对健康人外周血单核细胞 CCR2 蛋白表达影响不大。而高血压组患者外周血单核细胞 CCR2 蛋白表达明显高于对照组,30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ADMA 培养 24 h 后进一步促进单核细胞 CCR2 的蛋白表达(表 3)。

表 3. 非对称性二甲基精氨酸对外周血单核细胞 CCR2 蛋白表达的影响

分 组	CCR2 蛋白表达
对照组	21.34 \pm 1.16
健康对照组+ 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ADMA	22.43 \pm 1.08
高血压组	25.63 \pm 3.44 ^a
高血压+ 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ADMA	30.90 \pm 3.96 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较, b 为 $P < 0.05$, 与高血压组比较。

3 讨论

高血压的发生和发展与血管内皮功能不全有关。本研究收集了 42 名未经降压药物治疗的高血压患者,对其内皮功能进行了一系列的检测,结果发现与对照组比较,高血压患者血中 ADMA 显著升高,肱动脉 FMD 显著降低,说明高血压患者在没有发生明显的临床并发症前即已存在内皮功能不全。NO 是由 L-精氨酸经 NOS 催化合成,被认为是一种内源性抗 As 的物质;ADMA 为内源性 NOS 抑制剂,抑制 NO 合成,是内皮功能不全的标志因子。研究显示,外源性给予 ADMA 可明显抑制内皮细胞 NO 的生成,增加氧自由基形成,加速内皮细胞的衰老,促进内皮细胞凋亡^[5];在培养的内皮细胞,ADMA 通过增加可溶性细胞间粘附分子和内皮素的表达,减低 NO 生成导致内皮功能紊乱^[6]。在实验性高血压、原发性高血压、青少年高血压、妊娠高血压和白大衣高血压患者血中 ADMA 水平均明显升高^[1,7];国

内有学者采用体外高静水压模拟体内高血压模型,研究发现高静水压可促使内皮细胞释放 ADMA 增加高达 6 倍,升高的 ADMA 继而导致 NO 合成减少,促进内皮损伤,作者故推测高血压与 ADMA 互为因果,共同促进高血压病变的进展^[8]。临床研究发现高血压患者血中 ADMA 升高的同时血管细胞粘附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和血管假性血友病因子也有明显升高,促炎因子进一步介导内皮粘附分子在血管内皮上的表达增加以及增强炎症细胞与内皮细胞的粘附^[7]。因而推测 ADMA 可能通过一种内皮激活机制造成内皮损伤,继而促进单核细胞粘附到受损部位。

趋化因子 MCP-1 在体内及体外均有强大的诱导单核、巨噬细胞聚集、附壁和游走的功能。在 MCP-1 的作用下,循环中的单核细胞与内皮细胞粘附,促进粘附分子的表达,参与并扩大炎症反应,形成炎症瀑布。MCP-1 在血管斑块的形成中也有重要作用,研究发现 As 病灶内 MCP-1 及其受体 mRNA 表达呈阳性^[9];在雄性 Wistar 大鼠静脉注射 MCP-1 的单克隆中和抗体可消除 MCP-1 引起的单核细胞聚集。CCR2 是 MCP-1 的特异受体,对介导 MCP-1 的作用必不可少,在 CCR2 基因敲除小鼠,血管紧张素Ⅱ诱导的单核巨噬细胞浸润和聚集几乎完全阻断^[10]。在体研究表明在高脂血症患者,循环中单核细胞的 CCR2 mRNA 表达增加^[11]。以上研究结果表明 MCP-1/CCR2 这对趋化因子系统的激活对促进 As 血管病变的发生发展起重要作用。本研究结果发现在未服用降压药物的原发性高血压患者血浆中 MCP-1 水平明显增加,外周血单核细胞 CCR2 表达明显上调,提示高血压患者在出现血管并发症的临床表现之前即已存在血管炎症病变和单核细胞的活化。

内皮受损时合成 NO 减少,而 NO 有抑制单核细胞与内皮细胞粘附的作用,内皮受损时 NO 的减少可增加两者的粘附性。以往的研究也发现,在培养的单核细胞和内皮细胞,ADMA 均可以通过诱导氧化应激上调趋化因子受体的表达,促进单核内皮细胞粘附^[12-13]。这些研究说明 NO 缺乏在活化单核细胞、诱导单核细胞炎症反应过程中起着重要调节作

用。本研究发现,在临床未经治疗的高血压病人,ADMA 可明显上调外周血中单核细胞 CCR2 蛋白表达,促进单核细胞活化,因而推测高血压患者血中高水平的 ADMA 可能促进 As 的发生和发展,但这一结论有待于大规模的前瞻性临床研究进一步证实。

总之,没有明显临床并发症的原发性高血压患者体内即已存在内皮功能不全和外周血单核细胞活化,ADMA 可能促进高血压患者内皮功能不全的发生和上调单核细胞趋化因子受体的表达。

[参考文献]

- [1] Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, **33** (4): 652-658.
- [2] Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine [J]. *Lancet*, 2001, **358** (9 299): 2 127-128.
- [3] Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N(G), N(G)-dimethylarginine in human plasma by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci*, 1997, **692** (2): 467-471.
- [4] Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2001, **19** (3): 415-420.
- [5] Jiang DJ, Jia SJ, Dai Z, et al. Asymmetric dimethylarginine induces apoptosis via p38 MAPK/caspase 3-dependent signaling pathway in endothelial cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, **40** (4): 529-539.
- [6] 姚瑞,党瑜华,张菲斐. 非对称性二甲基精氨酸对人脐静脉内皮细胞功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 471-474.
- [7] Goonasekera CD, Shah V, Rees DD, Dillon MJ. Vascular endothelial cell activation associated with increased plasma asymmetric dimethyl arginine in children and young adults with hypertension: a basis for atheroma [J]? *Blood Press*, 2000, **9** (1): 16-21.
- [8] 饶芳,苏海,李菊香,等. 高静水压对血管内皮细胞 ADMA 水平的影响及 RAS 的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, **22** (7): 1 370-372.
- [9] de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein 1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes [J]. *Circulation*, 2003, **107** (5): 690-695.
- [10] Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein 1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling [J]. *Circ Res*, 2004, **94** (9): 1 203-210.
- [11] Han KH, Han KO, Green SR, et al. Expression of the monocyte chemoattractant protein 1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function [J]. *J Lipid Res*, 1999, **40** (6): 1 053-063.
- [12] Chen MF, Xie XM, Yang TL, et al. Involvement of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reaction by angiotensin II [J]. *J Vasc Res*, 2007, **44** (5): 391-402.
- [13] 陈美芳,谢秀梅,杨天伦,等. 氯沙坦通过下调单核细胞趋化蛋白 1 受体表达抑制单核细胞活化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (1): 51-53.

(此文编辑 陈临溪,李小玲)