

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0095-04

• 实验研究 •

1型糖尿病大鼠骨髓内皮祖细胞衰老与非对称二甲基精氨酸浓度升高有关

袁琼, 吴艳, 刘思好, 胡长平, 彭军, 李元建

(中南大学药学院药理学系, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 糖尿病; 内皮祖细胞; 二甲基精氨酸-二甲胺水解酶; 衰老

[摘要] 目的 研究非对称二甲基精氨酸与1型糖尿病大鼠骨髓内皮祖细胞衰老之间的关系。方法 单次腹腔注射链脲佐菌素(65 mg/kg)建立1型糖尿病大鼠模型,检测血糖、骨髓内皮祖细胞衰老、血浆非对称二甲基精氨酸水平以及内皮祖细胞中二甲基精氨酸-二甲胺水解酶2和SIRT1的mRNA表达。结果 与对照组比较,糖尿病大鼠血浆非对称二甲基精氨酸水平显著升高($0.67 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$ 比 $0.55 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$)、内皮祖细胞衰老率增加($39\% \pm 8\%$ 比 $11\% \pm 2\%$)、二甲基精氨酸-二甲胺水解酶(0.56 ± 0.17 比 1.00 ± 0.22)和SIRT1(0.08 ± 0.17 比 1.00 ± 0.39)的mRNA表达下调。结论 糖尿病大鼠内皮祖细胞衰老与非对称二甲基精氨酸水平升高有关,其机制可能涉及SIRT1/二甲基精氨酸-二甲胺水解酶2途径。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Involvement of Asymmetric Dimethylarginine in Senescence of Endothelial Progenitor Cells from Type 1 Diabetes Mellitus Rat Bone Marrow

YUAN Qiong, WU Yan, LIU Siyu, HU Chang-Ping, PENG Jun, and LI Yuan-Lian

(Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

[KEY WORDS] Diabetes Mellitus; Endothelial Progenitor Cell; Dimethylarginine; Dimethylaminohydrolase; Senescence

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and senescence of endothelial progenitor cells (EPC) in type 1 diabetic rats. **Methods** The rat model of type 1 diabetes mellitus was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 65 mg/kg) for one time. The concentration of fasting blood glucose, the level of ADMA in plasma, the percentage of senescence of EPC from bone marrow and the mRNA expression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) and SIRT1 were detected. **Results** The senescence percentage of EPC ($39\% \pm 8\%$ vs $11\% \pm 2\%$) and the level of ADMA ($0.67 \pm 0.06 \mu\text{mol/L}$ vs $0.55 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$) in plasma were increased and the expression of DDAH2 and SIRT1 mRNA were down-regulated (0.56 ± 0.17 vs 1.00 ± 0.22 , 0.08 ± 0.17 vs 1.00 ± 0.39). **Conclusion** The senescence of EPC was related with the increased level of ADMA in plasma, which may involve the SIRT1/DDAH2 pathway.

糖尿病患者内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 衰老程度增加, 并伴有血管衰老与血管功能减退^[1]。且离体实验证明, 高糖孵育 EPC 能诱导细胞衰老^[2]。然而, 糖尿病时 EPC 衰老的机制尚未阐明。非对称二甲基精氨酸 (asymmetric dimethylarginine, ADMA) 能竞争性抑制一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS), 减少一氧化氮 (nitric oxide,

NO) 合成^[3]。二甲基精氨酸-二甲胺水解酶 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase, DDAH) 能特异性水解 ADMA, 其活性降低可导致 ADMA 水平升高。外源性 ADMA 可诱导内皮细胞衰老^[4], 损伤 EPC 功能^[5], 抑制内皮功能和血管新生^[6]。糖尿病时, 血浆 ADMA 水平升高而 NO 水平下降^[7], 这与 DDAH 活性降低有关^[8]。因此, 我们推测糖尿病 EPC 衰老可能与 ADMA 水平升高有关。SIRT1 是一种新的长寿基因。糖尿病时, EPC 中 SIRT1 表达下调介导了细胞衰老和血管形成功能减退^[9]。SIRT1 可催化内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 去乙酰化, 增加 NO 生成^[10]。DDAH2 与 eNOS 共表达于内皮系统, 两者之间的表达存在相互调节, 很可能调节 eNOS 的蛋白也能参与 DDAH2 功

[收稿日期] 2010-01-25 [修回日期] 2010-02-18

[基金项目] 中南大学优博扶植基金 (2008yb027) 资助

[作者简介] 袁琼, 博士研究生, 研究方向为糖尿病血管病变及药物治疗, E-mail为 qongyua@hotmail.com。胡长平, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学。彭军, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学。通讯作者李元建, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail为 yuan_jianl@yahoo.com。

能的调节。SIRT1能增加 DDAH2活性,促进 ADMA 水解,抑制内皮细胞衰老^[11]。因此,我们推测糖尿病时 ADMA/DDAH2对 EPC 衰老的调控可能涉及 SIRT1途径。本实验在 1型糖尿病大鼠模型上探讨了 EPC 衰老与 DDAH/ADMA 之间的关系,及该过程是否涉及 SIRT1途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

内皮细胞生长培养基 (endothelial cell growth medium-2, EBM-2) 购于瑞士 Clonetics 公司;纤维连接蛋白、大鼠淋巴分离液、链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、荆豆凝集素 (FITC-ulex europaeus agglutinin-1, FITC-UEA-1) 均购于美国 Sigma 公司;乙酰化低密度脂蛋白 (DiI-acetylated low-density lipoprotein, DiI-acLDL)、Trizol 购于美国 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒、SYBR Green-One 实时定量试剂盒购于大连宝生物工程有限公司;细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购于江苏海门碧云天公司。

1.2 动物及模型制备

雄性 SD 大鼠 (中南大学湘雅医学院实验动物学部提供) 16 只,体重 160~200 g (8~10 周龄)。普通饲料喂养 1 周后随机分组,模型组 ($n=10$) 单次腹腔注射 STZ (65 mg/kg),3 天后尾静脉取血,血糖仪 (强生医疗器材有限公司) 测空腹血糖 (fasting blood sugar, FBS) ≥ 11.1 mmol/L,表示造模成功;对照组 ($n=6$) 腹腔注射等体积的枸橼酸+枸橼酸钠缓冲液。糖尿病模型造模成功 4 周后进行后续实验。

1.3 骨髓内皮祖细胞分离

无菌取大鼠后肢,收集骨髓细胞,1 000 r/min 离心 5 min 弃上清;5 mL PBS 重悬细胞,加入 5 mL 大鼠淋巴分离液,2 500 r/min 离心 15 min,取中间白膜层,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 2 次,离心弃上清;EBM-2 培养基重悬细胞,接种于事先用纤维连接蛋白 (10 mg/L) 包被的培养板。贴壁 3 天后去除悬浮细胞。贴壁细胞继续培养至第 7 天进行相应的指标检测。

1.4 骨髓内皮祖细胞的鉴定

取培养第 7 天贴壁细胞,加入 DiI-acLDL (2.41 g/L) 37℃ 孵育 1 h 以检测 EPC 对 DiI-acLDL 的摄取情况。之后用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, PBS 洗涤 5 min $\times 3$ 次,加入 1 mL FITC-UEA-1 (10 mg/L), 37℃ 避光孵育 1 h。采用倒置荧光显微镜观察

DiI-acLDL (红色) 和 FITC-UEA-1 (绿色) 染色,双阳性细胞 (黄色) 为正在分化的 EPC^[1]。

1.5 β -半乳糖苷酶染色观察骨髓内皮祖细胞衰老

取培养 7 天细胞,去掉上清,用 PBS 洗涤 5 min $\times 3$ 次。按照衰老细胞 β -半乳糖苷酶染色试剂盒中的说明方法配置衰老染色液。细胞用衰老染色液 37℃ 孵育 8 h,用 PBS 洗涤 5 min $\times 3$ 次,倒置显微镜下观察,蓝染细胞为衰老阳性细胞。随机选取 5 个视野,计算阳性细胞百分率。

1.6 血浆非对称二甲基精氨酸水平测定

采用高效液相色谱法检测血浆 ADMA 水平^[12]。

1.7 内皮祖细胞二甲基精氨酸-二甲胺水解酶和 SIRT1 的 mRNA 表达

用 Trizol 法提取总 RNA,取 0.5 μ g 总 RNA 逆转录后进行 Real time PCR 反应。DDAH2 上游引物为 5'-AAA GCC GTC AGG GCA ATG-3',下游引物为 5'-CGT CAT CTG GGA GGG TCA GA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C-3',下游引物为 5'-GGC CTC TCT CTT GCT CTC AGT ATC-3'; SIRT1 上游引物为 5'-TCC TTT CAG AAC CAC CAA-3',下游引物为 5'-GGC GAG CAT AAA TAC CAT-3'。反应条件为 94℃ 变性 10 s, 95℃ 退火 5 s, 60℃ 延伸 31 s,共 40 个循环。反应结束后确认 Real time PCR 的扩增曲线和融解曲线,以 GAPDH 为内参,计算 DDAH2 和 SIRT1 的 mRNA 表达。

1.8 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用 Student *t* 检验,双侧 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖

糖尿病大鼠 FBS (15.67 \pm 2.57 mmol/L) 显著高于正常对照组 (5.00 \pm 0.61 mmol/L, $P < 0.01$),提示 1 型糖尿病造模成功。

2.2 大鼠骨髓来源内皮祖细胞的鉴定

分化的 EPC 可以摄取 DiI-acLDL 并结合 FITC-UEA-1, 98% 以上的细胞为双染阳性细胞 (图 1)。

2.3 内皮祖细胞衰老情况

分离的大鼠 EPC 进行 β -半乳糖苷酶染色,蓝色的细胞为衰老阳性细胞 (图 2)。模型组大鼠骨髓 EPC 的衰老率显著高于正常对照组 (39% \pm 8% 比 11% \pm 2%, $P < 0.05$)。

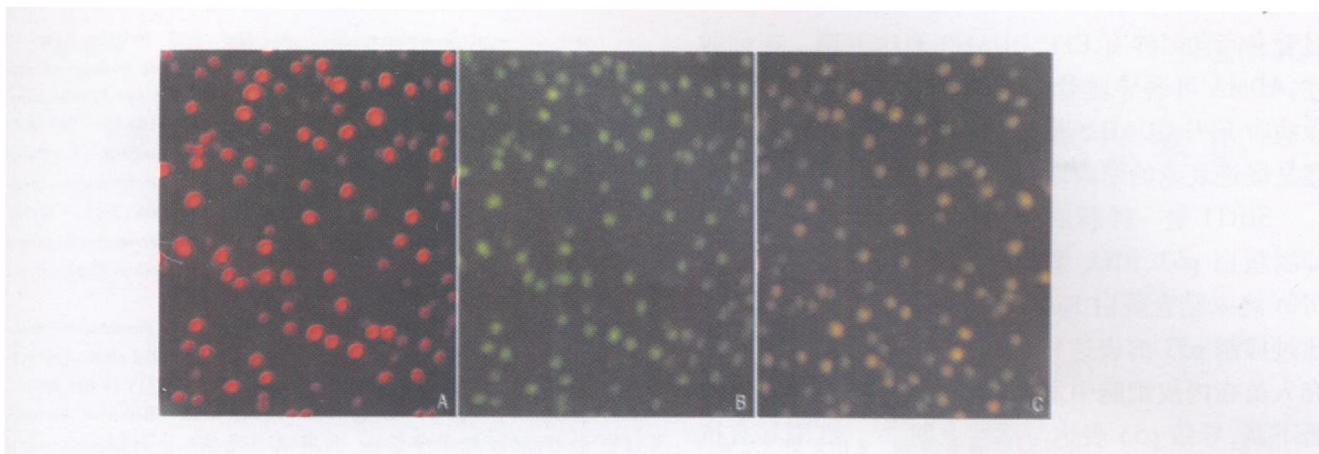


图 1 骨髓来源的内皮祖细胞的鉴定 ($\times 400$ 第 7 天) A 为 EPC 吸附 DiI-acLDL, B 为 EPC 吸附 FITC-UEA-1, C 为 EPC 同时吸附 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1。

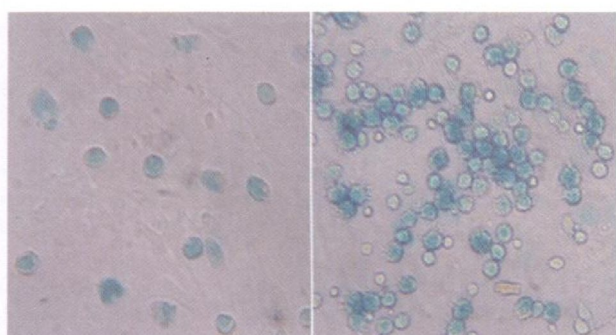


图 2 1 型糖尿病大鼠骨髓内皮祖细胞衰老 β 半乳糖苷酶染色图片 ($\times 400$) 左为正常对照组, 右为糖尿病组。

2.4 大鼠血浆非对称二甲基精氨酸水平及内皮祖细胞中二甲基精氨酸-二甲胺水解酶和 SIRT1 的 mRNA 表达

与正常对照组大鼠相比, 糖尿病大鼠血浆中 ADMA 水平显著升高, EPC 中 DDAH2 和 SIRT1 的 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 1 型糖尿病大鼠血浆非对称二甲基精氨酸水平以及 DDAH2 和 SIRT1 的 mRNA 表达

指 标	正常对照组	糖尿病组
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	0.55 ± 0.07	0.67 ± 0.06^a
DDAH2 mRNA	1.00 ± 0.22	0.56 ± 0.17^a
SIRT1 mRNA	1.00 ± 0.39	0.08 ± 0.17^a

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比。

3 讨论

糖尿病周围血管病变是其重要并发症之一, 血管修复和新生能力减弱导致的血管功能减退是其发生与发展的重要原因。血管病变与 EPC 功能受损密切相关。临床研究发现, 糖尿病患者循环 EPC 数

目减少; 激活 p53 能促进 EPC 衰老; 在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸介导下氧化应激产生的超氧离子能减弱 NO 生物活性, 损伤 EPC 诱导的血管形成^[13, 14]。细胞实验证实, 高糖能诱导 EPC 衰老并抑制 EPC 增殖、黏附迁移和血管生成能力^[14, 15]。本实验发现 1 型糖尿病大鼠模型中骨髓来源 EPC 衰老率显著高于正常对照组。提示, EPC 从骨髓动员并迁移至外周血的能力减弱, 从而导致糖尿病大鼠血管修复能力降低。

DDAH 存在 DDAH1 和 DDAH2 两种亚型, 分别由不同基因编码, hDDAH1 位于 1p22 而 hDDAH2 位于 6p21.3 区。DDAH1 和 DDAH2 氨基酸序列相似, 但在组织分布上有所不同, DDAH 与 NOS 呈亚型特异性共表达, DDAH2 主要存在于表达 eNOS 和诱导型 NOS (induced nitric oxide synthase, NOS) 的组织如心脏、血管等。胚胎时期 DDAH2 的表达较高, 而成人组织中则表达下降。本实验室首次发现大鼠骨髓来源 EPC 能表达 DDAH2, 提示 EPC 自身存在着 DDAH2/ADMA 系统并调节自身功能。

研究发现, 心血管疾病的病理生理过程涉及 DDAH2/ADMA 途径, ADMA 被认为是一种新的心血管危险因素。ADMA 可诱导内皮细胞炎症反应与细胞凋亡^[16], 加快内皮细胞衰老, 其作用与激活氧自由基-p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径有关, 该途径也参与 EPC 功能与衰老的调控^[4, 17]。DDAH2/ADMA 途径可能与糖尿病血管内皮损伤密切相关。动物与临床研究发现, 糖尿病血浆 ADMA 水平升高^[18, 19]; 动物实验证明, 糖尿病大鼠血管 DDAH2 表达和活性降低^[7]; 细胞实验证实, 高糖诱导的氧化应激产生活性氧 (ROS) 抑制 DDAH2 蛋白表达和活性, 升高 ADMA 水平^[8]。本实验发现, 糖尿病大鼠血浆 ADMA 水平

显著升高同时伴有 EPC DDAH2 表达下调。正如前述, ADMA 可诱导血管内皮细胞衰老^[20], 这提示糖尿病时 EPC DDAH2 表达下调与 ADMA 水平升高可能是促进衰老的原因之一。

SIRT1 是一种新的长寿基因, 靶基因包括肿瘤抑制蛋白 p53、RNA 聚合酶 iv 转录因子 TAF168 和 DNA 终末结合蛋白 Ku70 等。许多研究发现 SIRT1 通过抑制 p53 的表达和活性, 延缓细胞衰老^[21]。研究人员在内皮细胞中发现衰老的细胞 SIRT1 表达显著下调, 导致 p53 表达与活性上调^[22]。红酒具有抗氧化作用的主要活性物质之一为白藜芦醇, 它是 SIRT1 的天然激动剂。内皮细胞实验证实, 给予红酒干预, 能激动 SIRT1, 抑制 p53 介导的细胞衰老, 其机制涉及 DDAH2/ADMA 途径^[22]。高糖所致 EPC 损伤时, SIRT1 表达下调并伴有去乙酰化活性降低^[9]。基于 SIRT1 对 ADMA/DDAH2 的调节作用以及 SIRT1 对 EPC 衰老与功能的调控, 我们推测糖尿病时 EPC 衰老可能与 SIRT1 表达下调进而影响 DDAH2/ADMA 途径有关。本实验结果显示, 糖尿病大鼠骨髓 EPC 中 SIRT1 表达下调, 然而, 确切的结论还需进一步的实验证实。

综上所述, 本实验结果提示 1 型糖尿病大鼠中骨髓 EPC 衰老与 ADMA 水平升高有关, 其机制可能涉及 SIRT1/DDAH2 途径。

[参考文献]

- [1] Wang CY, Wen MS, Wang HW, et al. Increased vascular senescence and impaired endothelial progenitor cell function mediated by mutation of circadian gene Per2 [J]. *Circulation*, 2008 **118** (21): 2166-173.
- [2] Kuki S, Inanishi T, Kobayashi K, et al. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Circ J*, 2006 **70** (8): 1076-081.
- [3] De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule [J]. *Med Sci Monit*, 2009 **15** (4): RA91-101.
- [4] Scalera F, Borlak J, Beckmann R, et al. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl-L-arginine accelerates endothelial cell senescence [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004 **24** (10): 1816-822.
- [5] Thum T, Bauersachs J. ADMA, endothelial progenitor cells and cardiovascular risk [J]. *Circ Res*, 2005 **97** (8): e84.
- [6] Achan V, Ho HK, Heeschen C, et al. ADMA regulates angiogenesis genetic and metabolic evidence [J]. *Vasc Med*, 2005 **10** (1): 7-14.
- [7] Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase [J]. *Circulation*, 2002 **106** (8): 987-992.
- [8] Sorrenti V, Mazza F, Campisi A, et al. High glucose mediated imbalance of nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression in endothelial cells [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2006 **3** (1): 49-54.
- [9] Balestrieri ML, Rienzo M, Felice F, et al. High glucose downregulates endothelial progenitor cell number via SIRT1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008 **1784** (6): 936-945.
- [10] Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007 **104** (37): 14855-860.
- [11] Scalera F, Fülge R, Martens-Lobenhoffer J, et al. Red wine decreases asymmetric dimethylarginine via SIRT1 induction in human endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Res Commun*, 2009 **390** (3): 703-709.
- [12] Chen MF, Xie XM, Yang TL, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in inflammatory reactions by angiotensin II [J]. *J Vasc Res*, 2007 **44** (5): 391-402.
- [13] Fadini GP, Morin M, Facco M, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005 **45** (9): 1449-457.
- [14] Rosso A, Balsano A, Gambino R, et al. p53 mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes [J]. *J Biol Chem*, 2006 **281** (7): 4339-347.
- [15] Chen YH, Lin SJ, Lin FY, et al. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms [J]. *Diabetes*, 2007 **56** (6): 1559-568.
- [16] Jiang JL, Wang S, Li NS, et al. The inhibitory effect of simvastatin on the ADMA-induced inflammatory reaction is mediated by MAPK pathways in endothelial cells [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007 **85** (1): 66-77.
- [17] Wang M, Cristofano PR, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006 **291** (4): R880-884.
- [18] Pawa H, Lehtinaki T, Laakso J, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in type 2 diabetes associate with glycaemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy [J]. *Metabolism*, 2003 **52** (3): 303-307.
- [19] Xiong Y, Fu YF, Fu SH, et al. Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003 **42** (2): 191-196.
- [20] Bode-Boger SM, Scalera F, Martens-Lobenhoffer J. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence [J]. *Vasc Med*, 2005 **10** (Suppl 1): S65-71.
- [21] Funakawa A, Tada-Okawa S, Kawanishi S, et al. H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2007 **20** (1-4): 45-54.
- [22] Ota H, Akishita M, Eto M, et al. Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007 **43** (5): 571-579.

(此文编辑 许雪梅)