

[文章编号] 1007-3949(2010)18-06-0449-04

• 实验研究 •

非对称性二甲基精氨酸通过 Caspase-3信号转导通路诱导晚期内皮祖细胞凋亡

贾红梅, 张怀勤, 夏雪, 林以诺, 叶盛, 黄伟剑, 杨德业

(温州医学院附属第一医院心内科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 非对称性二甲基精氨酸; 晚期内皮祖细胞; 凋亡; Caspase-3

[摘要] 目的 观察非对称性二甲基精氨酸对晚期内皮祖细胞的诱导凋亡作用, 通过检测 Caspase-3的活性探讨其诱导凋亡的信号转导通路。方法 从脐带血中分离培养晚期内皮祖细胞。DiI-ac-LDL和 FITC-UEA-iv双荧光染色法鉴定其内皮属性; 不同浓度非对称性二甲基精氨酸(0、1、5、10和 30 $\mu\text{mol/L}$)作用于细胞 48 h 激光共聚焦显微镜观察细胞形态变化, 流式细胞仪测定细胞凋亡率; 不同浓度非对称性二甲基精氨酸作用于细胞 48 h 或 10 $\mu\text{mol/L}$ 非对称性二甲基精氨酸作用于细胞不同时间(0、3、6和 9 h), 酶标仪测 Caspase-3活性; 加入 Caspase-3特异性抑制剂(ac-DEVD-CHO)半小时后加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 非对称性二甲基精氨酸作用 48 h 流式细胞仪测细胞凋亡率。结果 非对称性二甲基精氨酸作用于晚期内皮祖细胞后, 可见典型的细胞凋亡形态学改变, 且随非对称性二甲基精氨酸浓度增加细胞凋亡增加。在此过程中, Caspase-3被活化, 其活化程度随非对称性二甲基精氨酸浓度增加及作用时间延长而升高。加入 Caspase-3特异性抑制剂后细胞凋亡减少。结论 非对称性二甲基精氨酸可呈浓度依赖性诱导晚期内皮祖细胞凋亡, 此作用可能是通过激活内源性凋亡途径 Caspase-3信号转导通路实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

A symmetric Dimethylarginine Induces Apoptosis via Caspase-3-Dependent Signaling Pathway in Endothelial Outgrowth Cells

JIA Hong-Mei, ZHANG Huai-Qin, XIA Xue, LIN Yi-Nuo, YE Sheng, HUANG Wei-Jian, and YANG De-Ye

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

[KEY WORDS] A symmetric Dimethylarginine, Endothelial Outgrowth Cells, Apoptosis, Caspase-3

[ABSTRACT] **Aim** To observe the apoptosis in endothelial outgrowth cells (EOC) induced by asymmetric dimethylarginine (ADMA) and the relevant signal transduction pathway by detecting the activity of caspase-3. **Methods** EOC were isolated from umbilical cord blood and then cultured. The endothelial characteristic of the cells were identified by DiI-ac-LDL and FITC-UEA-iv double fluorescent staining. Take the 0 $\mu\text{mol/L}$ ADMA group as the control group. The adherent cells were treated with different concentrations of ADMA (0, 1, 5, 10, 30 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, then the morphological changes of cells was observed by the laser scanning confocal microscope. The adherent cells were treated with different concentrations of ADMA for 48 h or with ADMA (10 $\mu\text{mol/L}$) for various periods (3, 6, 9 h), then caspase-3 activity was measured by Microplate Reader. The adherent cells were pretreated for 30 min with ac-DEVD-CHO (100 $\mu\text{mol/L}$)-caspase-3 specific inhibitor, then 10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA was added and incubated for 48 hours. The apoptotic rate of EOC of all the groups was measured by Annexin V-FITC and Propidium iodide (PI) double staining flow cytometry.

Results Typical apoptotic morphological changes can be seen in EOC after treatment of ADMA and the apoptotic rate of EOC risen accompanying with the increase of the concentration of ADMA. The activity of caspase-3 was enhanced in a dose and time dependent manner during this process. Its specific inhibitor ac-DEVD-CHO can attenuate the apoptosis induced by ADMA. **Conclusion** ADMA can induce apoptosis in EOC in a dose-dependent manner. This effect may be achieved by activating the intrinsic apoptotic pathway-caspase-3 signal transduction pathway.

非对称性二甲基精氨酸 (asymmetric dimethylarginine, ADMA) 是一种内源性一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 抑制剂, 可导致内皮功能失调,

抑制血管发生, 是未来主要心血管事件或死亡的独立预测指标^[1]。内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 在内皮损伤后的修复中起重要作用。EPC 分为早期 EPC 和晚期 EPC 两种类型。晚期 EPC 又称为内皮生长晕细胞 (endothelial outgrowth cells, EOC), 为 2000 年 Lin 等^[2]从骨髓移植患者外周血分离并培养出的具备内皮特性同时有极强克隆增殖能力的细胞。Thum 等^[3]发现 ADMA 能随剂量

[收稿日期] 2010-04-30 [修回日期] 2010-06-16

[基金项目] 温州市科技局基金项目 (H20080024)

[作者简介] 贾红梅, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的防治, E-mail 为 songjm@qq.com。通讯作者张怀勤, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 zhanghuaiqin@126.com。夏雪, 硕士研究生。

增加抑制外周血 EPC 的动员、分化和体外成血管功能。另有研究^[4]发现 ADMA 呈量效和时效性减少 EPC 的数目和抑制它的增殖能力。余华等^[5]研究发现 ADMA 可显著抑制外周血 EPC 的扩增、黏附增殖能力和产生一氧化氮 (NO) 的能力。细胞凋亡是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 Caspase 级联反应事件的结果, Caspase-3 被证实处于该级联反应的下游, 它通过降解细胞内相应底物使细胞死亡。本研究通过观察 ADMA 对 EOC 的诱导凋亡作用, 并通过测定 Caspase-3 的活性及应用其特异性抑制剂后细胞凋亡的变化来初步探讨其诱导凋亡的信号转导通路。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人淋巴细胞分离液 (ficoll) 购自天津灏洋生物公司, 胎牛血清、0.05% 胰酶、Hank's 液、D-Hank's 液、PBS 液购自美国 Gibco 公司, EGM-2 培养基购自美国 Cambrex 公司, Caspase-3 活性检测试剂盒、ac-DEVD-CHO 购自南京凯基生物公司, Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司, ADMA、FITC 标记的荆豆凝集素 iv (FITC-UEA-iv) 购自美国 Sigma 公司, DAPI 染色液购自碧云天生物技术公司, DiI 标记的乙酰化 LDL (DiI-ac-LDL) 购自美国 Molecular probe 公司, 纤维连接蛋白购自美国 Chemicon 公司。脐血取自本院分娩室, 均来自健康足月顺产产妇。

1.2 细胞培养和鉴定

采集脐血 20 mL, ficoll 密度梯度离心法收集单个核细胞, Hank's 液洗涤 2 次, 离心收集细胞于 10% 胎牛血清的 EGM-2 培养液中, 接种于包被入纤维连接蛋白的 6 孔板中, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 1 天后用 Hank's 液洗掉未贴壁细胞, 换培养液继续培养。将贴壁细胞用 0.05% 胰酶消化后进行细胞爬片, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 次日加入 DiI-ac-LDL 使终浓度为 10 mg/L。避光孵育 4 h, PBS 洗涤后 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min 再用 PBS 浸洗, 将 FITC-UEA-iv (10 mg/L) 加于上述标本于 37℃ 下避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 激光扫描共聚焦显微镜下观察。

1.3 激光扫描共聚焦显微镜观察凋亡细胞形态学变化

用 0.05% 胰酶消化收集细胞, 将细胞爬片, 待细胞贴壁后加入 1 mL 培养液, 随机将玻片分为 0 μmol/L、10 μmol/L 和 30 μmol/L ADMA 组, 培养

48 h, 免疫染色固定液固定 15 min, DAPI 染色 20 min, 吸除染液, PBS 洗两次, 用抗荧光淬灭剂封片, 激光扫描共聚焦显微镜观察细胞核形态。

1.4 流式细胞仪测定细胞凋亡率

不同浓度的 ADMA (0.1、5、10 和 30 μmol/L) 作用于贴壁细胞 48 h, 胰酶消化收集细胞, 用 PBS 洗涤并收集 1×10^5 个细胞, 加入 100 μL 的 Binding Buffer 重悬, 各加入 5 μL Annexin V-FITC 及 5 μL PI 混匀, 室温避光反应 15 min 后加入 400 μL 的 Binding Buffer, 用流式细胞仪测细胞凋亡率。设对照组凋亡率为 100%, 凋亡率 = 实验组 / 对照组 $\times 100\%$ 。

1.5 Caspase-3 活性测定

不同浓度 ADMA 作用于贴壁细胞 48 h 或 10 μmol/L ADMA 作用于贴壁细胞不同时间 (0.3、6 和 9 h), 0.05% 胰酶消化收集细胞, PBS 洗两次, 在收集的细胞沉淀中加入 50 μL Lysis Buffer 吹打均匀, 冰上裂解 1 h, 4℃ (10 000 r/min) 离心 1 min 吸取上清, 测蛋白浓度, 取 50 μL 含 200 μg 蛋白的细胞裂解上清, 加入 50 μL 2 \times Reaction Buffer, 加入 5 μL Caspase-3 Substrate 于 37℃ 避光孵育 4 h, 酶标仪在 $\lambda = 405$ nm 测定吸光度值。

1.6 抑制剂干预

在贴壁细胞中加入 100 μmol/L ac-DEVD-CHO, 半小时后与不加抑制剂组同时加入 10 μmol/L ADMA 作用 48 h 后用 1.4 相同方法收集细胞, 流式细胞仪测定细胞凋亡。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件系统进行统计学分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较各组均数, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养及鉴定

培养到第 6 天的贴壁细胞形成了梭形的内皮样细胞 (图 1A), 晚期内皮祖细胞呈现铺路石样排列。激光扫描共聚焦显微镜下可见, 摄取 DiI-ac-LDL 的细胞激发红色荧光, 与 FITC-UEA-1 结合的细胞激发绿色荧光, 双染色阳性的细胞显示为黄色荧光, 为正在分化的 EPC (图 1)。

2.2 凋亡细胞形态学改变

激光扫描共聚焦显微镜下可见对照组细胞形态正常, 核区表现均一的蓝色荧光, 细胞核染色质分布均匀; ADMA 诱导后的细胞镜下可见核内呈现出亮蓝色, 部分染色质出现凝集固缩并趋边缘化 (图 2)。

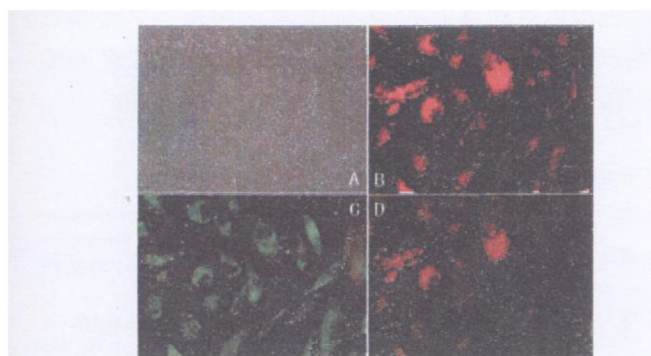


图 1. 内皮祖细胞的培养和鉴定 A 为培养第 6 天出现的 EOC 集落 ($\times 50$), B 为摄取 DiI-ac-LDL 的 EOC ($\times 100$), C 为结合 FITC-UEA-I 的 EOC ($\times 100$), D 为双染色阳性的 EOC ($\times 100$)。



图 2. 激光扫描共聚焦显微镜下观察凋亡细胞形态学变化 从左到右依次为对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用组和 30 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用组。

2.3 流式细胞仪检测不同浓度非对称性二甲基精氨酸对晚期内皮祖细胞凋亡的影响

与对照组比较, ADMA 作用组细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), 且随 ADMA 浓度增加细胞凋亡率上升, 各组间比较差异有统计学意义 (表 1)。

2.4 Caspase-3 在非对称性二甲基精氨酸致晚期内皮祖细胞凋亡过程中的作用

与对照组比较, 不同浓度 ADMA 作用于贴壁细胞 48 h 后 Caspase-3 活性明显增加 ($P < 0.01$), 且其活性随 ADMA 浓度升高而升高, 各浓度组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。用 10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用于贴壁细胞不同时间 (0、3、6 和 9 h) 后亦能显著增加 Caspase-3 活性, 且随作用时间延长 Caspase-3 活性增加, 不同时间组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。加入 Caspase-3 特异性抑制剂 ac-DEVD-CHO (100 $\mu\text{mol/L}$) 后 ADMA (10 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的 EOC 凋亡率明显下降 (ac-DEVD-CHO 组、ADMA 组和对照组凋亡率依次为: 132.70% \pm 5.96%、295.35% \pm 6.28% 和 100.00% \pm 0.00%, $P < 0.05$)。

表 1 不同浓度非对称性二甲基精氨酸对晚期内皮祖细胞凋亡及 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

ADMA 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞凋亡率	Caspase-3 活性
0 (对照组)	100.00% \pm 0.00%	0.045 \pm 0.002
1	116.91% \pm 6.63% ^a	0.094 \pm 0.003 ^a
5	195.43% \pm 9.48% ^{ac}	0.243 \pm 0.024 ^{ab}
10	295.35% \pm 6.28% ^{ad}	0.633 \pm 0.020 ^{ad}
30	363.27% \pm 4.01% ^{ac}	0.844 \pm 0.027 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 1 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 5 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组比较; e 为 $P < 0.01$, 与 10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组比较。

表 2 10 $\mu\text{mol/L}$ 非对称性二甲基精氨酸作用晚期内皮祖细胞不同时间 Caspase-3 活性变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

作用时间 (h)	对照组	ADMA 组
0	0.0493 \pm 0.008	0.0521 \pm 0.007
3	0.0493 \pm 0.009	0.0780 \pm 0.009 ^{ab}
6	0.0493 \pm 0.009	0.1848 \pm 0.005 ^{ac}
9	0.0492 \pm 0.007	0.2403 \pm 0.008 ^{ad}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组同时时间比; b 为 $P < 0.05$, 与本组作用 0 h 比; c 为 $P < 0.01$, 与本组作用 3 h 比; d 为 $P < 0.01$, 与本组作用 6 h 比。

3 讨论

Schnabel 等^[1]证实了 ADMA 是一种新的独立起作用的冠心病危险因素。ADMA 含量的升高与动脉粥样硬化的发生、发展密切相关^[6,7]。正常人体内血浆 ADMA 浓度大约是 1 $\mu\text{mol/L}$, 在高脂血症、动脉粥样硬化、高血压病、慢性肾功能不全、糖尿病的患者体内 ADMA 水平均升高, 在靶组织中的浓度可达 3~15 $\mu\text{mol/L}$ ^[8]。Schmidt 等^[9]报道循环 EPC 水平的降低可以预测冠心病危险事件的发生。

内皮祖细胞能促进血管新生, 修复受损血管内膜, 在冠心病防治上已受到关注。另有多项研究已初步证实 EPC 在缺血性心脏修复^[10]、改善糖尿病患者血管形成^[11]、作为基因治疗导向载体和靶细胞^[12]、抑制肿瘤血管生成^[13]等多个领域有广阔的应用前景。一些小规模的自身 EPC 移植治疗冠心病急性心肌梗死临床试验报道 EPC 作为急性心肌梗死后的细胞治疗具有临床可行性和安全性。EPC 捕获支架也在临床试验中。

细胞凋亡的发生和发展概括为 3 个阶段: 信号传递阶段、中央调控阶段和结构改变阶段^[14]。内外多因子复杂的相互作用诱导产生凋亡信号, 传递至 Caspase 并使其活化。活化的 Caspase 酶裂解许多细胞内酶, 引发蛋白底物裂解、细胞解体, 从而完成

细胞凋亡这一过程。

我们的研究发现 ADMA 可以导致 EOC 凋亡,且随 ADMA 浓度升高细胞凋亡率越高。国外以及我们实验团队的研究已证明 ADMA 能够通过氧化应激损伤 EPC。ADMA 引起内皮功能不全的机制可能是^[6 15]: 在体内通过与 L 精氨酸竞争性抑制 NOS 活性,减少一氧化氮(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,抑制 NOS 把电子传递给 L 精氨酸产生 NO,而促进 NOS 将电子传递给氧产生过氧化物,导致超氧负离子堆积。增多的超氧负离子又加剧内皮型一氧化氮合酶(eNOS)解偶联生成更多的氧化应激产物,从而形成一个恶性循环,导致并加剧细胞的氧化应激损伤。

机体在排除毒物、防御电离辐射等情况下,活性氧(reactive oxygen species ROS)多数由酶促反应生成。线粒体作为能量代谢的重要细胞器,是细胞内产生 ROS 的主要部位,同时也是氧化损伤的靶点,与动脉粥样硬化病变形成和发展有关^[16]。线粒体细胞色素 C 可通过对凋亡信号的传导和放大作用调控细胞凋亡。ADMA 引起内皮损伤后死亡信号经细胞内外两条途径传递至 Caspase 并使其活化。在细胞外途径中,激活的 Caspase-8 可间接或直接作用于 Caspase-3 及其他下游的 Caspase,在细胞内途径中,细胞内的死亡信号可诱发线粒体释放细胞色素 C。细胞色素 C 和 dATP、Caspase-9 酶原等结合使 Caspase-9 激活,接着下游的 Caspase-3 和 7 等被激活。在 dATP 存在时 Caspase-9 也可直接活化 Pro-caspase-3 介导细胞凋亡。我们的研究发现在 ADMA 导致 EOC 凋亡过程中,Caspase-3 活性随 ADMA 作用浓度增加和作用时间的延长而升高,加入 Caspase-3 特异性抑制剂后细胞凋亡减少,由此可见 Caspase-3 参与了 ADMA 致 EOC 凋亡的过程。但在此过程中线粒体功能是否正常,线粒体 ROS 是否增加,凋亡是否与线粒体内 NOS 有关等有待进一步研究。

对 ADMA 及 EOC 的研究可为冠心病的一级、二级预防及如何进一步降低血浆 ADMA 浓度,从而使高危人群延缓冠心病的发生和发展,同时减少冠心病危险事件的发生等提供一种新策略、新方法,也为

其他因内皮功能不全引起的疾病的治疗提供新的思路。Caspase-3 及其抑制剂的研究和应用可成为控制不适当凋亡所致疾病药物设计的理论依据。

[参考文献]

- [1] Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene study [J]. *Circ Res* 2005; **97** (5): 53-59.
- [2] Lin Y, Weisbord DJ, Solovey A, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood [J]. *J Clin Invest* 2000; **105** (1): 71-77.
- [3] Thum T, Tsikas D, Stein S, 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): 1693-701.
- [4] 何晋, 谢秀梅, 方叶青, 等. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (10): 751-754.
- [5] 余华, 张怀勤, 肖方毅, 等. 不对称性二甲基精氨酸对体外培养内皮祖细胞数量和功能的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2007; **23** (6): 454-456.
- [6] 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.
- [7] Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, et al. 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): 1557-564.
- [8] Boger RH, Bode-Boger SM. Asymmetric dimethylarginine: derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway and cardiovascular diseases [J]. *Semin Thromb Hemost* 2000; **26** (5): 539-545.
- [9] Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair [J]. *Circulation*, 2005; **111**: 2981-987.
- [10] Kawamoto A, Gwon H-C, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2001; **103** (5): 634-637.
- [11] Schattenman GC, Hankin HD, Jiao C, et al. Blood-derived angioblasts accelerate blood flow restoration in diabetic mice [J]. *J Clin Invest* 2000; **106** (4): 571-578.
- [12] Griese DP, Achatz S, Batzlsperger CA, et al. Vascular gene delivery of anticoagulants by transplantation of retrovirally-transduced endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Res* 2003; **58** (2): 469-477.
- [13] Wei J, Blum S, Unger M, et al. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery [J]. *Cancer Cell* 2004; **5** (5): 477-488.
- [14] Golstein P. Controlling cell death [J]. *Science* 1997; **275** (5303): 1081-082.
- [15] Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, et al. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes [J]. *J Am Coll* 2000; **36** (7): 287-295.
- [16] Ballinger SV, Patterson C, Knight-Lozano CA, et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis [J]. *Circulation*, 2002; **106** (5): 544-549.

(此文编辑 许雪梅)