

肾素(前体)受体在高糖诱发的内皮细胞舒缩功能障碍中的作用及机制

郭然, 宋玮, 张英, 刘莹, 路岩, 姜一农

(大连医科大学附属第一医院心血管内科, 辽宁省大连市 116011)

[关键词] 肾素(前体)受体; 高糖; 内皮细胞; 内皮型一氧化氮合酶; 非对称性二甲基精氨酸

[摘要] **目的** 探讨高糖对内皮细胞舒缩功能障碍等损害过程中是否有肾素(前体)受体((P)RR)的过度激活,并探讨其机制。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞,分别以不同浓度的葡萄糖(15、30 mmol/L)干预细胞 24 h、48 h 后收取细胞,用分子生物学方法测定(P)RR 以及反映血管舒缩功能的生物标记物蛋白和 mRNA 的表达,以 siRNA 的方法抑制(P)RR 的表达后,观察葡萄糖对内皮细胞上述作用的改变,进一步分析其机制。**结果** 高糖显著上调内皮细胞(P)RR 的蛋白和 mRNA 表达;同时上调内皮素 1(ET-1)的表达,抑制一氧化氮(NO)的合成。(P)RR-siRNA 虽能抑制高糖引起的 ET-1 mRNA 表达增高,但不抑制其蛋白表达。(P)RR-siRNA 显著抑制高糖引起的 NO 降低。高糖抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达,增加非对称性二甲基精氨酸(ADMA)的合成,(P)RR-siRNA 能显著抑制高糖对 eNOS 和 ADMA 的影响。**结论** 高糖能够激活内皮细胞(P)RR 的表达;(P)RR 可能通过 ADMA/eNOS 通路介导了高糖诱发的血管内皮舒缩功能障碍。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Roles and Mechanisms of the Prorenin Receptor in Hyperglycemia Mediated Endothelial Dysfunction

GUO Ran, SONG Wei, ZHANG Ying, LIU Ying, LU Yan, and JIANG Yi-Nong

(The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011)

[KEY WORDS] Prorenin Receptor; Hyperglycemia; Endothelial Cell; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Asymmetric Dimethylarginine

[ABSTRACT] **Aim** To detect the role and mechanism of excessive activation of (pro)renin receptor ((P)RR) in hyperglycemia induced endothelial dysfunction. **Methods** Endothelial cells were cultured in vivo and intervened with glucose of different concentrations (15, 30 mmol/L) and different courses (24 h, 48 h). The mRNA and protein levels of (P)RR and markers reflecting vascular function were measured. (P)RR expression was then inhibited by siRNA to observe the corresponding changes mentioned before. **Results** Both protein and mRNA expression of endothelial cells was significantly increased by hyperglycemia. Hyperglycemia upregulated the expression of endothelin-1 (ET-1) and inhibited the synthesis of nitric oxide (NO). (P)RR-siRNA couldn't inhibit the expression of ET-1 protein, although it could inhibit its mRNA elevation in hyperglycemia. (P)RR-siRNA could significantly inhibit NO reduction in hyperglycemia. Hyperglycemia inhibited the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and provoked the synthesis of asymmetric dimethylarginine (ADMA), which could be significantly inhibited by (P)RR-siRNA. **Conclusions** Hyperglycemia activated (P)RR expression in endothelial cells. Hyperglycemia induced vascular endothelial dysfunction might be mediated by (P)RR via ADMA/eNOS pathway.

血管内皮功能异常是动脉粥样硬化始动和发展的关键环节。多种危险因素包括血脂异常、吸

[收稿日期] 2014-02-26

[修回日期] 2015-04-25

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(2013B020)

[作者简介] 郭然,博士,副教授,主要从事高血压、先天性心脏病的基础与临床研究,E-mail 为 guo2652402@163.com。宋玮,博士,主治医师,主要从事高血压、动脉粥样硬化的研究。通讯作者姜一农,主任医师,教授,博士研究生导师,长期从事高血压、动脉硬化的基础与临床研究,E-mail 为 yinongjiang@126.com。

烟、高血糖及高血压等均可导致内皮细胞的功能异常。肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)广泛分布于动物和人体的多个组织和器官,与高血压、糖尿病、心力衰竭等多种疾病密切相关。长期以来,血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)及其组织上分布的AngⅡ受体1(AT1)被认为是RAAS的主要活性物质。但令我们困惑的是,基础研究和临床实践均显示,无论是阻断影响AngⅡ生成的血管紧张素转换酶,还是AngⅡ赖以起效的AT1受体后,并不能完全阻断AngⅡ的致动脉粥样硬化作用,促使我们进一步思考,是否有其它可能的机制参与调节血管内皮细胞功能。2002年,Nguyen等^[1]最先在体外培养的肾小球系膜细胞中发现肾素(前体)受体((P)RR),它对肾素及肾素前体高度亲和,与二者的结合率相近。有报道,在伴有增殖性肾脏疾病和糖尿病视网膜病变的患者中,液体中肾素前体水平可以升至血浆的100倍,提示肾素前体及其受体可能在糖尿病微血管并发症的发生发展中有重要意义。本研究设想高糖可能通过(P)RR诱发血管内皮舒缩功能障碍,并探其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 标本采集

将手术室无菌取出的健康产妇分娩健康新生儿的脐带约20 cm,放入含有双抗和7500 U肝素的PBS保温瓶中,2 h内消化分离脐静脉内皮细胞,进行培养。3天后,细胞培养基由橙红色变为黄色,倒置显微镜下见细胞覆盖底面>80%,则可以进行细胞传代。选择生长良好的第3~5代细胞用于实验。

1.2 内皮细胞的分选、鉴定、活力检测及同步化

采用磁珠分选方法,应用EasySEPR Human CD34正选试剂盒分离脐静脉细胞。用倒置相差显微镜观察,胞体呈多角形,单层血管内皮细胞呈铺路石样排列。行vWF免疫组织化学染色,镜下见细胞内含大量棕褐色颗粒,从细胞形态学证明其为内皮细胞来源。采用台盼蓝排除法进行细胞活力检测,试验前6 h,通过饥饿细胞使其同步化。

1.3 实验细胞分组

1.3.1 不同浓度葡萄糖干预干预分组 (1)对照组:5.6 mmol/L葡萄糖。(2)15 mmol/L葡萄糖组:以15 mmol/L葡萄糖干预细胞。(3)30 mmol/L葡萄糖组:以30 mmol/L葡萄糖干预细胞。

1.3.2 高糖干预分组 (1)对照组:未加入任何药物培养的细胞。(2)高糖组:每个6 cm皿中加入12

μL转染试剂及2 mL无血清DMEM,CO₂孵箱中37℃孵育48 h,以30 mmol/L葡萄糖干预细胞48 h。(3)siRNA + Glu组:每个6 cm皿中加入12 μL转染试剂和siRNA 12 μL及2 mL无血清DMEM,CO₂孵箱中37℃孵育48 h,以30 mmol/L葡萄糖干预细胞48 h。
1.3.3 siRNA干扰 (P)RR基因序列来自于Genbank(NM_005765.2)。依据基因序列设计合成(P)RR-siRNA引物序列如下:5'-GCU CCG UAA UCG CCU GUU U-3' (sense)和5'-AAA CAG GCG AUU ACG GAG C-3' (antisense)。由Invitrogen(California, USA)合成并购置乱序RNA序列作为对照。将细胞种植于6孔板,密度达70%~80%时,依据Lipofectamine RNAiMAX Reagent试剂说明书(Invitrogen, California, USA)步骤进行转染。

1.4 RT-PCR检测目的基因mRNA表达

收获上述各组细胞,按Trizol试剂盒说明书提取细胞总RNA。使用Takara PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)进行反转录反应,应用随机引物作为反转录反应的引物。取逆转录产物行PCR反应,循环条件如下:94℃预变性5 min,1个循环;94℃变性30 s,56~62℃[(P)RR: 56℃, ET-1: 62℃, eNOS: 62℃]退火30 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃最后延伸10 min,1个循环;上述反应结束后,取反应产物行琼脂糖凝胶电泳,紫外线扫描琼脂糖凝胶。采用SYBR Green嵌合荧光法,在ABI 7500 Real-time PCR System上检测目的基因的表达,用内参基因GAPDH校正。

1.5 Western Blot方法检测目的蛋白的表达

收集细胞,提取总蛋白,按照BCA试剂盒(AP-PLYGEN)说明制备不同浓度的蛋白标准品。绘制标准曲线,根据标准品的蛋白浓度,计算出样品的蛋白浓度。根据测定的结果,将所有蛋白样品调整至相等浓度,行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳及蛋白免疫印迹。扫描胶片图像或PVDF蛋白膜经凝胶成像系统生成的图片,做灰度分析,通过软件对图像进行半定量分析。

1.6 ELISA法测定上清液内皮素1水平

采用双抗体夹心法检测标本中人内皮素1(ET-1)的水平。固相抗体由纯化的人ET-1抗体包被微孔板而成,向包被单抗的微孔内加入ET-1,再与HRP标记的羊抗人抗体相结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,彻底洗涤后加入底物TMB显色。在HRP酶的催化下TMB转化成蓝色,并在酸的作用下进一步转化成黄色。复合物颜色的深浅与样品中ET-1的量呈正相关。用酶标仪测定450 nm波长下吸光度值,再

通过标准曲线计算样品中人 ET-1 的浓度。

1.7 硝酸还原酶法检测一氧化氮含量

采用硝酸还原酶法检测一氧化氮(NO)含量。按以下公式计算 NO 含量: $\text{NO}(\mu\text{mol/L}) = (\text{样品管吸光度} - \text{空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \times \text{标准品浓度}(100 \mu\text{mol/L}) \times \text{样品测试前稀释倍数}$ 。每个样本设 4 个复孔,重复测定 4 次。

1.8 高效液相色谱法测定非对称性二甲基精氨酸

色谱柱为 Atlantics C18, LC-12AmvP; 取 50 μL 样品加入 50 μL 邻甲苯二醛,混匀。流动相由 95% 水(0.1% 甲酸)-5% 乙腈(0.1% 甲酸)组成,流速 1 mL/min,进样量 5 μL 。经预柱后,通过荧光检测仪对样品及内标进行测定。

1.9 统计学处理

用 SPSS13.0 软件进行统计学处理;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和独立样本 *t* 检验,多重比较采用 LSD 和 SNK 法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高糖上调内皮细胞(P)RR 表达

以不同浓度葡萄糖干预体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),作用 48 h,结果表明,(P)RR 的 mRNA 及蛋白表达较对照组显著升高,提示高糖干预内皮细胞后,(P)RR 表达增高(*P* < 0.01;图 1)。

2.2 不同浓度葡萄糖抑制脐静脉内皮细胞 NO 合成

收集细胞上清液,利用硝酸还原酶法 NO 检测试剂盒检测上清 NO 浓度,结果表明,15 mmol/L 葡萄糖组($70.97 \pm 0.45 \mu\text{mol/L}$)和 30 mmol/L 葡萄糖组($67.45 \pm 0.51 \mu\text{mol/L}$)NO 浓度较对照组($97.68 \pm 0.80 \mu\text{mol/L}$)显著降低(*P* < 0.01, *n* = 4),提示 48 h 后内皮细胞 NO 的合成显著受抑。

2.3 不同浓度葡萄糖对脐静脉内皮细胞产生 ET-1 的影响

与对照组相比,15 mmol/L 葡萄糖和 30 mmol/L 葡萄糖都能使 ET-1 的 mRNA 表达和蛋白表达明显增加(*P* < 0.01;图 2 和表 1)。推测葡萄糖诱导脐静脉内皮细胞 ET-1 mRNA 和蛋白的表达。

2.4 (P)RR-siRNA 对高糖诱导的 ET-1 mRNA 和蛋白表达的影响

siRNA + Glu 组 ET-1 的 mRNA 表达显著低于高糖组(*P* < 0.01),说明抑制(P)RR 的表达能下调高糖所致的 ET-1 mRNA 增高。siRNA + Glu 组 ET-1

蛋白与高糖组相比虽出现下降趋势($65.47 \pm 1.69 \text{ ng/L}$ 比 $68.34 \pm 2.06 \text{ ng/L}$),但未达统计学差异(*P* = 0.055),说明高糖上调 ET-1 mRNA 表达有可能是通过(P)RR 激活所致(图 3)。

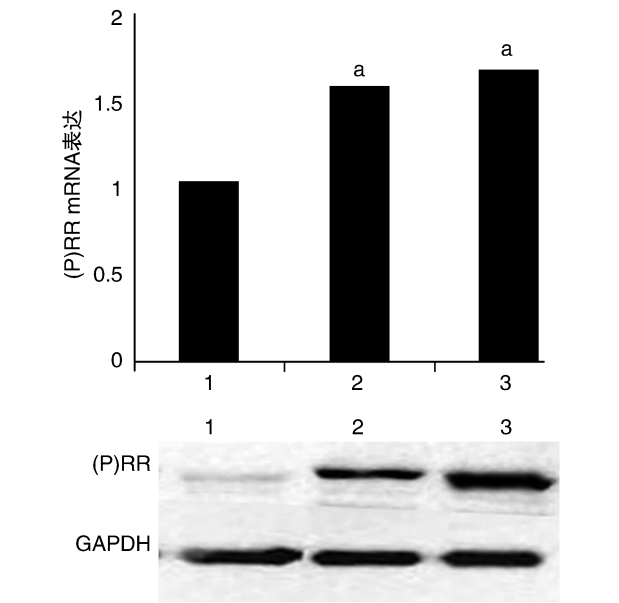


图 1. 高糖干预后(P)RR 的 mRNA(上图)和蛋白(下图)表达(*n* = 4) 1 为对照组,2 为 15 mmol/L 葡萄糖组,3 为 30 mmol/L 葡萄糖组。a 为 *P* < 0.01,与对照组比较。

Figure 1. mRNA and protein expression of (P)RR in HUVEC by high glucose intervention(*n* = 4)

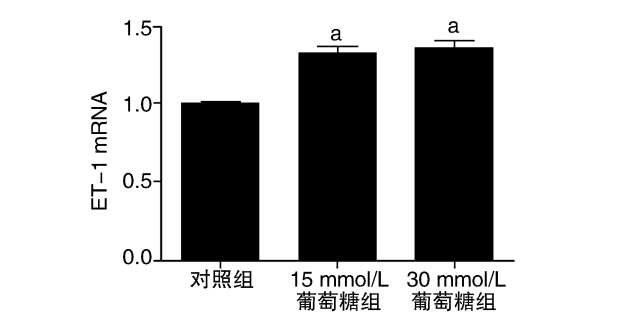


图 2. 不同浓度葡萄糖对 ET-1 mRNA 表达的影响(*n* = 4) a 为 *P* < 0.01,与对照组比较。

Figure 2. Effect of glucose with different concentration on ET-1 mRNA expression(*n* = 4)

表 1. 不同浓度葡萄糖对 ET-1 蛋白表达的影响

Table 1. Effect of glucose with different concentration on ET-1 protein expression

分 组	ET-1 (ng/L)
对照组	40.24 ± 2.36
15 mmol/L 葡萄糖组	64.09 ± 1.54 ^a
30 mmol/L 葡萄糖组	71.23 ± 1.82 ^a

a 为 *P* < 0.01,与对照组比较。

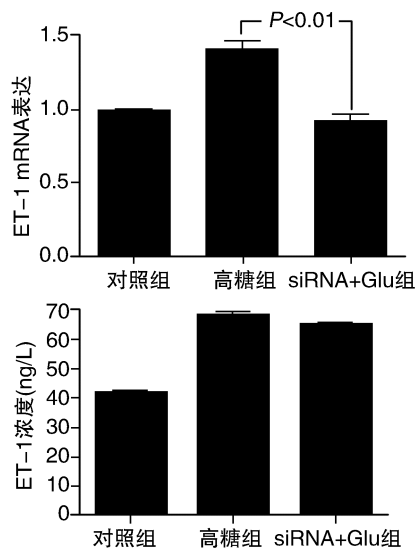


图 3. (P) RR-siRNA 对 ET-1 mRNA 及蛋白表达的影响($n = 4$)
Figure 3. Effect of (P) RR-siRNA on expressin of ET-1 mRNA and protein($n = 4$)

2.5 (P) RR-siRNA 显著抑制高糖引起的 NO 降低
siRNA + Glu 组 NO 含量 ($85.33 \pm 1.64 \mu\text{mol/L}$) 显著高于高糖组 ($69.83 \pm 3.47 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.001$), 说明 (P) RR-siRNA 抑制 (P) RR 表达后降低葡萄糖对 NO 的抑制作用。但 siRNA + Glu 组与对照组 ($87.53 \pm 2.15 \mu\text{mol/L}$) 相比差异无统学意义 ($P = 0.144$, $n = 4$)。

2.6 (P) RR-siRNA 显著增加内皮细胞 eNOS 表达
收集各组细胞提取总 RNA 检测 eNOS 的 mRNA 表达, 结果表明 30 mmol/L 葡萄糖显著抑制内皮细胞 eNOS mRNA 表达 ($P < 0.01$), siRNA + Glu 组 eNOS mRNA 表达显著高于高糖组 ($P < 0.01$), 但 siRNA + Glu 组与对照组比较差异无显著性 ($P = 0.078$)。说明 (P) RR-siRNA 抑制 (P) RR 表达显著降低葡萄糖对 eNOS mRNA 的下调作用 (图 4)。

提取细胞总蛋白, 检测 eNOS 蛋白生成, 结果表明高糖组 eNOS 的蛋白表达显著低于对照组, 而 siRNA + Glu 组 eNOS 蛋白表达显著高于高糖组, (P) RR-siRNA 抑制葡萄糖对 eNOS 的影响 (图 4)。由此推测高糖通过上调 (P) RR 的表达抑制 eNOS 的 mRNA 和蛋白合成。

2.7 (P) RR-siRNA 显著抑制内皮细胞非对称性二甲基精氨酸生成

收集各组细胞上清液, 以 HPLC 方法测定非对称性二甲基精氨酸 (ADMA) 蛋白含量。结果表明, 与对照组 ($23.87 \pm 2.62 \mu\text{mol/L}$) 比较, 30 mmol/L

的葡萄糖显著增高内皮细胞 ADMA 蛋白的生成 ($36.84 \pm 2.47 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$); siRNA + Glu 组 ADMA 蛋白 ($27.72 \pm 1.99 \mu\text{mol/L}$) 与高糖组相比显著降低 ($P < 0.01$), 但与对照组相比仍显著增高 ($P = 0.048$, $n = 4$)。由此我们推测高糖通过上调 (P) RR 的表达上调 ADMA 蛋白的合成。

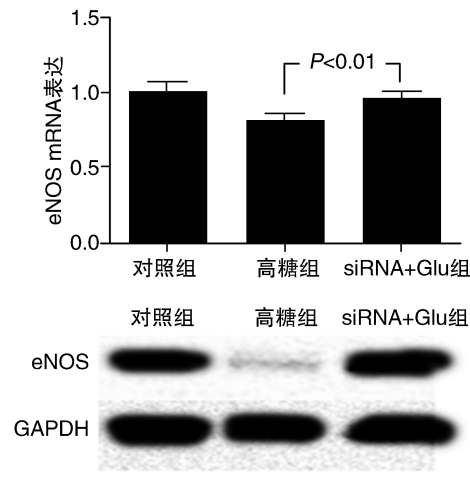


图 4. (P) RR-siRNA 对 eNOS mRNA (上图) 和蛋白 (下图) 表达的影响 ($n = 4$)
Figure 4. Effect of (P) RR-siRNA on expressin of eNOS mRNA and protein($n = 4$)

3 讨论

2002 年, Nguyen 等^[1] 在体外培养的肾小球系膜细胞中克隆出了一种跨膜区域蛋白, 由 350 个氨基酸组成。其氨基末端非糖基化且高度疏水, 尾部由 20 个氨基酸构成, 氨基末端与肾素和肾素前体的结合有关。蛋白和基因测序表明它没有同源体, 国际上将其命名为肾素 (前体) 受体 ((P) RR), 随后在心脏、大脑、眼睛、脂肪组织和血管平滑肌细胞相继发现该受体。它对肾素及肾素前体高度亲和, 与二者的结合率相近。肾素和肾素前体与 (P) RR 结合后, 可使血管紧张素原生成 Ang II 的效率提高 4 倍^[2], 细胞膜表面 Ang II 的生成使 Ang II 可以立即与 AT1 受体结合, 而不需要分泌至细胞间质中。随后 Schefe 等^[3] 通过共定位技术进行研究, 提出不同的看法, 他们认为完整的 (P) RR 主要存在于细胞和周围的胞浆中, 并与内质网标志蛋白共定位, 但 Schefe 并未否定 (P) RR 存在于细胞膜的可能。我们团队的研究首次应用免疫组织化学法证实, 在 HUVEC 中存在 (P) RR 的表达, (P) RR 在 HUVEC 中的定位, 主要分布在细胞膜和细胞浆中, 提示 (P) RR 可

进入细胞内发挥生物学效应,为后续研究奠定了基础^[4]。

在经典 RAAS 中,肾素被认为除了发挥酶活性使血管紧张素原转变成 Ang I 继而生成 RAAS 主要的效应分子 Ang II 外,无其他生物学效应^[5]。目前关于(P)RR 的作用研究显示,(P)RR 可提高肾素的酶活性,激活信号通路,上调促纤维化基因表达,促进肾小球硬化^[6-7]。仅平滑肌细胞过度表达(P)RR的转基因鼠,可发生高血压;普遍过度表达(P)RR的转基因鼠,在无高血压糖尿病的情况下,可出现蛋白尿和肾小球硬化。无论是局部还是普遍过度表达(P)RR 都不改变血浆肾素和血管紧张素原浓度,仅表现为血浆醛固酮水平升高。在(P)RR增多的高血压大鼠中,也观察到血管和间质纤维化样的病理改变。(P)RR 的发现为研究肾素、肾素前体的功能带来了新的活力。

血管内皮功能不全的一个重要特征是 NO/ET-1 比例下降。NO 和 ET-1 是血管内皮分泌的最重要的血管舒缩因子^[8]。高血压、高血糖、高血脂等因素对血管内皮细胞的损伤可以导致 NO 减少,可能影响 NO 的合成或者导致 NO 消耗增多。还有报道称高糖诱导的氧化应激下调二甲基精氨酸二甲基氨基脱氢酶的活性,导致 ADMA 降解减少,竞争性抑制 eNOS 活性,增加内皮细胞凋亡,降低血管内皮的完整性。ADMA/精氨酸比例增高是动脉粥样硬化的预测因子之一^[9-10]。

临床研究显示,高血糖持续时间与 ADMA 升高的程度相关,血糖水平与 ADMA/精氨酸比例正相关。提示高血糖可能通过限制精氨酸可利用度、增加 ADMA/精氨酸比例来抑制 NO 的生物合成。有文献证实糖耐量异常患者的血浆 ADMA 水平升高^[11-12]。在接受冠状动脉造影人群中,发现 ADMA 可以预测糖耐量状态(正常,糖耐量损害或糖尿病)^[13-14]。存在糖耐量异常的肥胖妇女 ADMA 水平高于单纯肥胖妇女,而节食减肥可改善胰岛素敏感性,并降低 ADMA 水平^[15]。罹患单纯 2 型糖尿病的患者,血浆 ADMA 水平升高,而在并发白蛋白尿和微血管病变的患者中升高尤其明显。晚近有研究证实糖尿病大鼠模型中肾素前体显著增高。(P)RR是肾素和肾素前体的共同受体,因此得出结论:当肾素前体血浆浓度增高时,能激活(P)RR,导致糖尿病大鼠左心室肥厚、蛋白尿增多等病理反应。这些研究佐证了我们的结论,并由此推测糖尿病高肾素(前体)水平的患者,可能通过激活(P)RR,导致 ADMA 生成增加,从而抑制 eNOS 活

性,NO 水平下降,引起血管内皮舒张功能障碍,启动动脉粥样硬化病变。而针对 ADMA 与冠心病的发病与预后的多项前瞻和病例对照研究,如 CARDIAC 研究、AtheroGene 研究、The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study 等都得出了 ADMA 水平与冠状动脉粥样硬化的发生及进展相关的结论^[16-19]。Joyal 等^[20]报道冠状动脉粥样斑块病变远端 ADMA 浓度较高,较近端有明显差异($2.39 \pm 1.27 \mu\text{mol/L}$ 比 $1.52 \pm 0.68 \mu\text{mol/L}$, $P=0.005$),提示斑块病变释放 ADMA,而局部 ADMA 蓄积可能导致与冠状动脉病变高度相关的内皮功能障碍^[21]。二甲双胍治疗可以使 2 型糖尿病患者原本增高的 ADMA 水平降低 30%^[22],并改善内皮功能。

我们的研究结果显示,抑制(P)RR 能够抑制高糖引起 ADMA 的上调及 eNOS 的下调作用,从而恢复 NO 水平,同时 ET-1 也出现了下降的趋势。由此可见,高糖可能通过激活(P)RR 导致 ADMA/eNOS 通路对 NO 的调节,引起血管舒缩功能障碍。这可能是糖尿病患者动脉粥样硬化形成的可能机制之一。

[参考文献]

- [1] Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to rennin [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109 (11): 1 417-427.
- [2] Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms [J]. *Kidney Int*, 2006, 69 (1): 105-113.
- [3] Scheffé JH, Menk M, Reinemund J, et al. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein [J]. *Circ Res*, 2006, 99 (12): 1 355-366.
- [4] Song W, Zhang Y, Jia C, et al. Up-regulation of TGF- β via the activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 induced by prorenin in human renal mesangial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(1): 223-227.
- [5] Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system [J]. *Circulation*, 1993, 87 (6): 1 816-828.
- [6] Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114 (8): 1 128-135.

- [7] Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, et al. Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17 (9): 2 495-2503.
- [8] Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor [J]. *JAMA*, 2002, 106: 987-992.
- [9] Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine [J]. *Lancet*, 2001, 358: 2 127-128.
- [10] Jawalekar SL, Karnik A, Bhutay A. Risk of cardiovascular diseases in diabetes mellitus and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine [J]. *Biochem Res Int*, 2013, 2013: 189 430.
- [11] Mittermayer F, Kautzky-Willer A, Winzer C, et al. Elevated concentrations of asymmetric dimethylarginine are associated with deterioration of glucose tolerance in women with previous gestational diabetes mellitus [J]. *J Intern Med*, 2007, 261: 392-398.
- [12] Anderson JL, Carlquist JF, Roberts WL, et al. Asymmetric dimethylarginine, cortisol/cortisone ratio and C-peptide: markers for diabetes and cardiovascular risk [J]. *Am Heart J*, 2007, 153: 67-73.
- [13] Sahinarslan A, Cengel A, Biberoglu G, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine level and extent of lesion at coronary angiography [J]. *Coron Artery Dis*, 2006, 17: 605-609.
- [14] Cavusoglu E, Ruwendec C, Chopra V, et al. Relationship of baseline plasma ADMA levels to cardiovascular outcomes at 2 years in men with acute coronary syndrome referred for coronary angiography. *ACS [J]. Coron Artery Dis*, 2009, 20: 112-117.
- [15] McLaughlin T, Stühlinger M, Lamendola C, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations are elevated in obese insulin-resistant women and fall with weight loss [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91: 1 896-900.
- [16] Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, et al. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study [J]. *Am Heart J*, 2006, 152 (493): e1-8.
- [17] Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study) [J]. *Clin Chem*, 2007, 53: 273-283.
- [18] Wang Z, Tang WH, Cho L, et al. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks: potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29: 1 383-391.
- [19] Zeller M, Korandji C, Guillard JC, et al. Impact of asymmetric dimethylarginine on mortality after acute myocardial infarction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: 954-960.
- [20] Joyal D, Leya F, Obada Al-Chekakie M, et al. Presence of asymmetric dimethylarginine gradients across high-grade lesions in patients with coronary artery disease [J]. *Coron Art Dis*, 2007, 18: 471-475.
- [21] Elesber AA, Solomon H, Lennon RJ, et al. Coronary endothelial dysfunction is associated with erectile dysfunction and elevated asymmetric dimethylarginine in patients with early atherosclerosis [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27: 824-831.
- [22] Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, et al. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes [J]. *Metabolism*, 2002, 51: 843-846.
- (此文编辑 许雪梅)