

# 不对称二甲基精氨酸对体外培养内皮祖细胞数量和功能的影响\*

余华<sup>1</sup> 张怀勤<sup>1</sup> 肖方毅<sup>1</sup> 肖刚峰<sup>2</sup> 黄晓燕<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**观察不对称二甲基精氨酸(ADMA)对体外培养内皮祖细胞(EPCs)数量和功能的影响。**方法:**密度梯度离心法获取外周血单个核细胞,培养6 d后,收集贴壁细胞并分别加入ADMA 1、5、10 μmol/L 干预培养72 h。激光共聚焦显微镜和流式细胞仪鉴定EPCs,分别观察EPCs的数量、增殖及黏附和产生一氧化氮的能力。**结果:**与对照组相比,不同浓度的ADMA可显著抑制外周血EPCs扩增、黏附增殖能力和产生NO的能力。**结论:**ADMA可抑制培养EPCs的数量和功能。

**[关键词]** 冠状动脉疾病;不对称二甲基精氨酸;内皮祖细胞

**[中图分类号]** R543.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1439(2007)06-0454-03

## Effects of asymmetrical dimethylarginine on number and activity of endothelial progenitor cells in vitro

YU Hua<sup>1</sup> ZHANG Huaiqin<sup>1</sup> XIAO Fangyi<sup>1</sup> XIAO Gangfeng<sup>2</sup> HUANG Xiaoyan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325000, China; <sup>2</sup>Department of ICU, the Second Hospital of Ningbo)

**Abstract Objective:** To investigate whether asymmetrical dimethylarginine (ADMA) can reduce the number of endothelial progenitor cells (EPCs) and inhibit their function. **Method:** Mononuclear cells (MNCs) from peripheral blood were isolated by Ficoll density gradient centrifugation, and cultured in vitro. After cultured six days, the attached cells were added with ADMA (1, 5, and 10 μmol/L) for 72 hour. The cells were identified by confocal laser scanning microscope and flow cytometry. EPCs proliferation was assayed with CCK-8 kit assay. EPCs adhesion assay was performed by replating cells on fibronectin-coated dishes, and then adherent cells were counted. NO production was assayed by Griess nitric oxide assay kit. **Result:** Compared with control group, ADMA can reduce the number of EPCs and inhibit the function of its proliferation, adhesion and excreting NO. **Conclusion:** ADMA can inhibit EPCs number and their function in vitro.

**Key words** Coronary disease; Asymmetrical dimethylarginine; Endothelial progenitor cells

不对称二甲基精氨酸(ADMA)是一种内源性的一氧化氮合酶(NOS)抑制剂,与内皮功能不全密切相关;血浆ADMA水平的升高可以预测冠心病的突发事件和病死率,已被证实为是冠心病的一个新的危险因素<sup>[1]</sup>。内皮祖细胞(EPCs)是一类能分化为血管内皮细胞的前体细胞。近来随着EPCs促进血管新生、修复损伤血管内膜作用的相继揭示,其在冠心病防治上的作用已经受到关注<sup>[2]</sup>。为此,我们观察了ADMA对EPCs在体外培养中数量和功能的影响,旨在探讨冠心病患者EPCs数量减少和功能受损的机制,以及ADMA独立预测冠心病危险事件的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人纤维连接蛋白(Roche公司),血管内皮生长

因子(Pepro Tech EC公司),培养基M199、胎牛血清、胰酶(Gbico公司),DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiFac-LDL)(Molecular probe公司),FITC标记的荆豆凝集素I(FITC-UEA-I lectin)、人淋巴细胞分离液(Ficoll,密度1.0773)和ADMA标准品,纯度>99.99%(Sigma公司),CCK-8检测试剂盒(上海同仁化学研究所),NO检测试剂盒(江苏碧云天公司),其余均为市售试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 ADMA标准液配置** ADMA标准品为白色固体粉末,分子量为275.18,先将10 mg的ADMA标准品溶于2 ml的0.9%的氯化钠溶液中,再用0.9%的氯化钠溶液稀释至36.3 ml,即得1 mmol/L的标准液。用时分别取标准液1、5、10 μl加入含1 ml培养液的培养孔内即得终浓度分别为1、5、10 μmol/L的实验干预组。

**1.2.2 人外周血EPCs的分离、培养** 取健康成人外周血20 ml,用密度梯度离心法获取单个核细胞,以 $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于包被有人纤维连接蛋白的24孔培养板中,每孔中加入1 ml的M199培

\*基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No:303648)

<sup>1</sup>温州医学院附属第一医院心内科 温州医学院心血管生物和基因研究所(温州,325000)

<sup>2</sup>宁波市第二医院ICU科

通讯作者:张怀勤, E-mail: huaiqinzhang@163.com

养液(含 20% 胎牛血清、VEGF 10 μg/L、青霉素 1 × 10<sup>5</sup> U/L、链霉素 1 × 10<sup>5</sup> U/L),置 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 3 d 后,用 Hank 液洗掉未贴壁细胞,换培养液继续培养<sup>[3,4]</sup>。

**1.2.3 EPCs 的双染色试验** 在培养的第 6 天,将细胞与 DiFac-LDL (2.4 mg/L) 一起于 37 °C 避光孵育 2 h,1% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 冲洗 2 次,再加入 FITC-UEA -I lectin (10 mg/L) 继续避光孵育 1 h。采用多波长激光共聚焦显微镜观察鉴定双染色阳性的细胞。

**1.2.4 EPCs 的细胞表型检测** 在培养的第 6 天,用 0.25% 的胰酶消化搜集贴壁的细胞,制成 1 × 10<sup>9</sup>/L 的单个细胞悬液,加入 FITC-标记的 CD34 和 CD133 单克隆抗体及 PE 标记的 VEGFR-2 单克隆抗体,避光孵育 30 min,用 PBS 洗 1 次,然后制成 200 μl 的 PBS 悬液,上流式细胞仪检测。

**1.2.5 实验分组** 在培养的第 6 天用含 3% 胎牛血清的 M199 培养液培养 24 h,再以 0.25% 胰酶消化贴壁细胞,制成单个细胞悬液,以 1 × 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 的密度接种到 24 孔板,分为对照组(常规条件培养液加 0.9% 氯化钠溶液)和 ADMA 组(含 1、5、10 μmol/L ADMA 的条件培养液),每组设 6 个复孔,培养 72 h 后,进行数量和功能的测定。重复实验 3 次。

**1.2.6 细胞计数** 干预培养 72 h 后,在倒置相差显微镜下随机 10 个视野(×200)计数各组、各孔贴壁梭形细胞数。

**1.2.7 黏附能力的测定** 各组细胞以 0.25% 胰酶消化后,制成细胞悬液并计数。再将等量 EPCs 接种到 48 孔培养板,置 37 °C 培养箱中培养 30 min,洗去各孔未贴壁细胞,倒置相差显微镜下随机 10 个视野(×400)计数重贴壁细胞数。

**1.2.8 增殖能力的测定** CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力是二苯基四氮唑溴盐(MTT)法的替代方法,具体方法参考文献[5]。各组细胞以 0.25% 胰酶消化后,制成细胞悬液,再将等量 EPCs 接种到

96 孔培养板,每孔加 CCK-8 10 μl,培养 4 h 后,置酶标仪上于 450 nm 处测吸收度 A 值,参比波长 600 nm。

**1.2.9 NO 的检测** 采用 Griess 法测定培养基中 NO 的浓度<sup>[6]</sup>,NO 标准曲线(0~100 μmol/L)由碧云天提供的 NO 检测试剂盒及 NaNO<sub>2</sub> 标准品获得。将干预培养 72 h 后,各组每孔各吸取 50 μl 的上清液加入 96 孔培养板,然后依次加入 Griess Reagent 各 50 μl,混匀 15 min 后置酶标仪上 570 nm 处测 A 值。

**1.3 统计学处理**

所有结果都以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 软件包,单因素方差分析比较各组均数。

**2 结果**

**2.1 EPCs 的鉴定**

培养到第 6 天的贴壁细胞形成了梭形的内皮样细胞。通过激光共聚焦显微镜鉴定,吞噬 DiFac-LDL 的细胞激发红色荧光,结合 FITC-UEA -I lectin 的细胞激发绿色荧光,双染色阳性的细胞显示为黄色荧光<sup>[3,4]</sup>,为正在分化的 EPCs(见图 1)。用流式细胞仪检测贴壁细胞表型标志,结果显示其表达 CD34 阳性细胞比例为(73.13 ± 8.51)%,CD133 阳性细胞比例为(5.15 ± 2.15)%,VEGFR-2 阳性细胞比例为(7.16 ± 1.31)%。

**2.2 ADMA 对 EPCs 数量、黏附和增殖能力及产生 NO 的影响**

ADMA 对 EPCs 数量、黏附和增殖能力及产生 NO 的影响见表 1。与对照组相比,ADMA 可明显降低贴壁 EPCs 的数量( $P < 0.01$ ),ADMA 组 1.0 μmol/L 组与 5.0、10.0 μmol/L 组之间差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而 5.0 μmol/L 组和 10.0 μmol/L 组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与对照组相比不同浓度的 ADMA 均可明显抑制 EPCs 的黏附能力( $P < 0.05$ ),不同浓度的 ADMA 干预组之间均差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与对照组

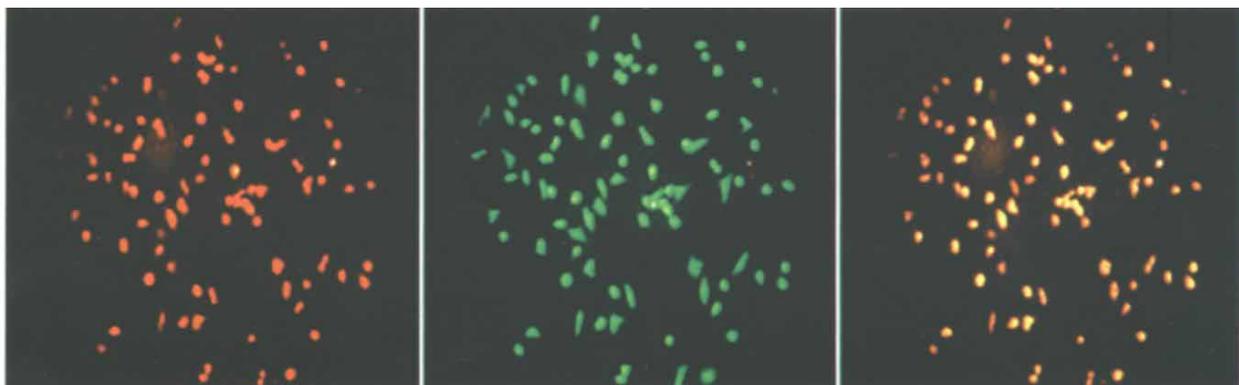


图 1 EPC 双染色结果(×200)

表1 ADMA对EPCs数量、黏附和增殖能力和产生NO能力的影响

n = 6,  $\bar{x} \pm s$ 

分组	贴壁 EPCs 数 ( $\times 200$ 视野下)	重贴壁 EPCs 数 ( $\times 400$ 视野下)	增殖能力的 A 值	培养液中 NO 含量/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
对照组	14.30 $\pm$ 5.20	10.91 $\pm$ 1.97	0.284 3 $\pm$ 0.009 2	5.896 0 $\pm$ 0.893 9
ADMA 组				
1 $\mu\text{mol/L}$	9.28 $\pm$ 1.79 <sup>1)</sup>	7.65 $\pm$ 1.09 <sup>3)</sup>	0.233 0 $\pm$ 0.005 7	4.111 8 $\pm$ 0.412 6
5 $\mu\text{mol/L}$	5.21 $\pm$ 1.50 <sup>2)</sup>	5.65 $\pm$ 1.03 <sup>2)</sup>	0.212 5 $\pm$ 0.009 7 <sup>2)</sup>	2.592 0 $\pm$ 0.198 2 <sup>2)3)</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$	3.39 $\pm$ 1.91 <sup>1)2)</sup>	3.60 $\pm$ 0.82 <sup>2)3)</sup>	0.182 0 $\pm$ 0.007 5 <sup>2)3)</sup>	1.534 7 $\pm$ 0.302 8 <sup>2)3)</sup>

与对照组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 1  $\mu\text{mol/L}$  组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 5  $\mu\text{mol/L}$  组比较,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 

相比不同浓度的 ADMA 均可明显抑制 EPCs 的增殖能力 ( $P < 0.05$ ),不同浓度的 ADMA 组之间也均差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );对照组相比不同浓度的 ADMA 均可明显抑制 EPCs 产生 NO 的能力 ( $P < 0.01$ ),不同浓度的 ADMA 组之间均差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

#### 4 讨论

EPCs 是一群能增殖分化为成熟血管内皮细胞,并参与出生后血管新生及内皮损伤修复的前体细胞。内皮损伤被认为是动脉粥样硬化形成的始动因子。内皮损伤后的修复过程除了相邻成熟内皮细胞延展修复外,还有一部分是通过外周血中的 EPCs 分化为成熟内皮细胞完成的<sup>[7]</sup>,表明 EPCs 在冠心病等缺血性疾病的发生、发展中扮演了重要角色。Hill 等<sup>[4]</sup>研究证实冠心病患者循环中的 EPCs 数量下降和功能受损,并与危险因子的数目成反向线性关系。但引起冠心病患者 EPCs 数量减少的确切机制尚不明确,可能与患者长期暴露于冠心病的危险因素有关。

近来研究认为内皮型 NOS(eNOS)来源的 NO 在 EPCs 的动员、分化及功能发挥过程中起了关键的作用<sup>[8,9]</sup>。ADMA 是内源性的 NOS 抑制剂,可以抑制 eNOS 的活性,减少 NO 的产生。因此 ADMA 势必对 EPCs 产生一定抑制作用。本研究以高出正常血浆水平的不同 ADMA 浓度作为独立干预因素,发现 ADMA 对 EPCs 的数量、增殖黏附能力及产生 NO 的能力均存在明显的抑制作用。因此可以认为冠心病患者循环 EPCs 数量下降和功能受损部分原因可能是由于血浆 ADMA 水平升高所致;并且这种抑制作用可以部分解释为什么 ADMA 可以预测心血管危险事件,即通过减少循环 EPCs 的水平来增加心血管危险事件的发生。因此,如何有效降低冠心病患者血浆 ADMA 水平,会为冠心病的预防和治疗提供一种新方法、新策略。

#### 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 Athero gene Study [J]. Circ Res, 2005, 97:e53 - e59.

[2] 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 - 2987.

[3] VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, 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: E1 - E7.

[4] HILL J M, ZALOS G, HALCOX J P, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. N Engl J Med, 2003, 348: 593 - 600.

[5] HAMAMOTO R, FURUKAWA Y, MORITA M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells[J]. Nat Cell Biol. 2004, 6:685 - 687.

[6] YU L Y, LIN B O, ZHANG Z I, et al. Direct transfer of A20 gene into pancreas protected mice from streptozotocin-induced diabetes1 [J]. Acta Pharmacol Sin. 2004, 25: 721 - 726.

[7] WERNER N, JUNK S, LAUFS U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury [J]. Circ Res, 2003, 93:e17 - 24.

[8] AICHER A, HEESCHEN C, MILDNER-RIHM C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells [J]. Nat Med, 2003, 9:1370 - 1376.

[9] LANDMESSER U, ENGBERDING N, BAHLMANN F H, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase [J]. Circulation, 2004, 110: 1933 - 1939.

(收稿日期:2006-12-11)