

[文章编号] 1000-4718(2008)11-2126-06

罗格列酮对 ADMA 氧化应激损伤内皮生长晕细胞的影响*

林以诺¹, 张怀勤^{1△}, 虞慧君², 杨德业¹, 黄晓燕¹

(温州医学院¹附属第一医院心内科, 心血管生物和基因研究所, ²附属第二医院产科, 浙江温州 325000)

[摘要] 目的: 观察过氧化物增殖剂激活的受体 γ (PPAR γ) 激动剂罗格列酮对非对称性二甲基精氨酸氧化应激损伤内皮生长晕细胞的影响。方法: 分离脐血中单个核细胞, 采用贴壁培养法培养扩增内皮生长晕细胞(EOCs)。以 10 $\mu\text{mol/L}$ 非对称性二甲基精氨酸(ADMA) 和不同浓度的罗格列酮(0、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 与第 2 代细胞孵育 72 h, 检测细胞的凋亡率、增殖能力、成血管能力, RT-PCR 法检测内皮一氧化氮合酶(eNOS) mRNA 的表达。结果: 采用贴壁法培养的细胞具有多种内皮细胞特性。ADMA 能抑制细胞功能并增加细胞的凋亡率, 1、5 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮能够对抗这种损伤($P < 0.01$) 并能够促进细胞的增殖($P < 0.01$)。但 10 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮的保护作用减弱或丧失, 甚至可以抑制细胞的成血管能力($P < 0.01$)。5 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮浓度组 eNOS 基因表达增强($P < 0.01$), 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 eNOS 基因表达减弱($P < 0.01$)。结论: 低浓度的罗格列酮($< 10 \mu\text{mol/L}$) 能够减轻和保护由 ADMA 所致的内皮生长晕细胞的氧化应激损伤, 并能够促进内皮生长晕细胞增殖, 这种作用部分是通过活化 eNOS 基因实现的。

[关键词] 内皮生长晕细胞; 罗格列酮; 非对称性二甲基精氨酸

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of rosiglitazone on the oxidative stress injury in endothelial outgrowth cells caused by asymmetric dimethylarginine

LIN Yi-nuo¹, ZHANG Huai-qin¹, YU Hui-jun², YANG De-ye¹, HUANG Xiao-yan¹

(¹Institute for Cardiovascular Biology and Gene, Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, ²Department of Obstetrics, The Second Affiliated Hospital, Wenzhou Medical Collage, Wenzhou 325000, China. E-mail: huaiqinzhang@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the effects of rosiglitazone on the oxidative stress injury in endothelial outgrowth cells (EOCs), which caused by asymmetric dimethylarginine(ADMA). **METHODS:** The mononuclear cells were harvested from umbilical cord blood by density gradient centrifugation, and induced into EOCs and expanded *in vitro*. The endothelial characteristics of EOCs were identified by immunostaining and fluorescent staining. The second generation of EOCs was treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA and different concentrations of rosiglitazone (0, 1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h. Then the cells were harvested and the apoptosis rate, reproductive activity and vasculogenesis activity were measured by flow cytometry, MTT assay and Matrix gel vasculogenesis assay, respectively. The endothelial nitric oxide synthase gene expression was assayed by RT-PCR. **RESULTS:** EOCs possessed many endothelial characteristics. Immunostaining showed that the surface antigen factor VIII, CD34 and Flk-1 were positive. The fluorescent staining experiment revealed that EOCs both bound to FITC-UEA-1 and up-took DiI-ac-LDL. Incubation of EOCs with ADMA increased the apoptosis rate and inhibited the reproductive activity and vasculogenesis activity in the cells. Rosiglitazone at concentrations of 1 and 5 $\mu\text{mol/L}$ counteracted such inhibition and stimulated reproductive activity in EOCs ($P < 0.01$), while such protective effects were attenuated or abolished at concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$. In addition, the vasculogenesis activity was inhibited by 10 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone cooperated with ADMA. RT-PCR assay revealed that eNOS gene expression in 5 $\mu\text{mol/L}$ group was up-regulated and that in 10 $\mu\text{mol/L}$ group was down-regulated. **CONCLUSION:** Rosiglitazone at lower concentration

[收稿日期] 2007-08-29 [修回日期] 2008-01-09

* [基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目 (No. 303648)

△通讯作者 E-mail: huaiqinzhang@126.com

(<10 $\mu\text{mol/L}$) protects EOCs from the oxidative stress injury caused by ADMA, and stimulates reproductive activity of EOCs. Such protective effects are partially achieved through the up-regulation of eNOS gene expression.

[KEY WORDS] Endothelial outgrowth cells; Rosiglitazone; Asymmetric dimethylarginine

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)自1997年发现以来^[1],被认为具有在缺血组织形成新生血管的能力,另外,也可能具有预测患者心血管事件危险程度的潜能。2000年, Lin等^[2]从成人外周血中分离出另外一种具有分化为血管内皮细胞能力的细胞。它在细胞体外培养周期中出现较传统EPCs晚1-2周,因此称为内皮生长晕细胞(endothelial outgrowth cells, EOCs)或晚期内皮祖细胞(late endothelial progenitor cells)。与EPCs相比EOCs同样能够内吞乙酰化低密度脂蛋白并结合荆豆凝集素I。但EPCs主要表达CD45,低度表达flk-1、VE-钙黏蛋白;而EOCs则高度表达各种内皮细胞表面标记如flk-1、VIII因子相关抗原、VE-钙黏蛋白但不表达CD45及CD14。这种细胞的单克隆细胞数是传统EPCs的数千倍,在细胞数量上可以倍增100倍左右而不出现衰减,而且拥有高水平的端粒酶活性^[3,4]。EOCs由于具备这种极强的集落形成能力和增殖能力,因此不同于普通的内皮细胞;而且Ingram等^[3]认为与相同条件离体培养的EPCs相比,EOCs更接近于这种细胞在人体内的生物学特性。

非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)是体内一种内源性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂,在高脂血症、动脉粥样硬化、高血压病、慢性肾功能不全、糖尿病的患者体内均会升高。目前已证明它主要通过氧化应激机制损伤血管内皮细胞,导致血管内皮功能障碍。过氧化物体增殖剂激活的受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)激动剂作为一种新型的胰岛素增敏剂在临床上被用于治疗糖尿病。最近的研究发现PPAR γ 激动剂能够改善血管内皮功能,且这种作用不依赖于这类药物的胰岛素增敏作用。目前尚未明确PPAR γ 激动剂对ADMA氧化应激损伤内皮生长晕细胞的影响及其可能的作用机制。本研究旨在研究PPAR γ 激动剂罗格列酮能否保护内皮生长晕细胞对抗ADMA所致的氧化应激反应,并初步探讨其作用是否通过影响一氧化氮合酶基因的表达实现。

材 料 和 方 法

1 材料

EGM-2培养基购自Cambrex,胎牛血清(FBS)

购自Hyclone,人纤连蛋白(human fibronectin, HFN)购自Chemicon, Matrix胶购自BD, 5 g/L浓度胰酶及PBS、Hanks液购自Gibco,非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)、二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和异硫氰基荧光素(FITC)标记荆豆凝集素I(FITC labeled Ulex Europaeus Agglutinin-1, FITC-UEA-I)购自Sigma, Trizol、DiI标记的乙酰化LDL(DiI labeled acetylated low density lipoprotein, DiI-acLDL)购自Invitrogen, I抗小鼠抗flk-1单克隆抗体(mAb)及兔抗VIII因子相关抗原抗体购自Santa Cruz, I抗兔抗CD34抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, ABC免疫组化检测试剂盒和AEC染色试剂盒购自华美生物工程公司, Annexin V-FITC凋亡试剂盒购自南京凯基生物公司, 逆转录试剂盒购自Fermentas, 人淋巴细胞分离液(Ficoll)购自天津灏洋生物公司。流式细胞仪购自Becton Dickson, 型号为FACSC Calibur。

2 方法

2.1 细胞的分离培养 收集(2006/12-2007/2)弃用的健康新生儿脐带血液5例(温州医学院附属第一医院和附属第二医院产科),每次采集脐血量约30 mL。采用密度梯度离心法收集脐血中的单个核细胞接种在包被有HFN 10 cm^2 培养皿中。加入3 mL含10% FBS EGM-2培养液,24 h后更换全部培养液。此后7 d内每天更换一半培养液,7 d后每3 d更换全部培养液,同时观察细胞生长情况。等待原代细胞生长汇合后传代进行下一步实验。

2.2 免疫细胞染色法 取第2代细胞接种至24孔板中,培养至贴壁。采用40 g/L多聚甲醛固定20 min, 0.3% H_2O_2 -甲醇液封闭内源性过氧化物酶10 min, PBS浸洗后分别加1:100稀释的I抗小鼠抗flk-1 mAb,兔抗VIII因子相关抗原抗体及兔抗CD34抗体于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。II抗结合参照ABC免疫组化检测试剂盒说明书进行,之后用AEC染色试剂染色,苏木素复染,在倒置相差显微镜下($\times 200$)观察染色结果。为排除假阳性或假阴性结果,免疫组化染色检测设空白对照(PBS代替I抗)、阴性对照(血管平滑肌细胞株A10)和阳性对照(人脐静脉内皮细胞株ECV-304)。

2.3 细胞荧光染色 在上述细胞中加入DiI-ac-

LDL (10 mg/L) 37 °C 孵育 4 h, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 浸洗后将 FITC - UEA - I (10 mg/L) 加于上述标本 37 °C 孵育 1 h。采用荧光显微镜观察染色结果。DiI - ac - LDL 和 FITC - UEA - I 双染色阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞。为排除假阳性、假阴性结果及自发荧光干扰, 免疫荧光染色设空白对照、阴性对照(血管平滑肌细胞株 A10)、阳性对照(人脐静脉内皮细胞株 ECV - 304)和自发荧光对照。

2.4 实验分组 取第 2 代细胞分为 5 组:(1) 正常组: 使用配制罗格列酮和 ADMA 溶剂(含 0.5% DM-SO EBM - 2 培养基)与细胞共同孵育 72 h;(2) 罗格列酮各浓度干预组(共 3 组): 分别用 1、5、10 μmol/L 罗格列酮及 10 μmol/L ADMA 与细胞共同孵育 72 h;(3) ADMA 处理组: 单用 10 μmol/L ADMA 与细胞共同孵育 72 h。

2.5 细胞凋亡的流式检测 细胞培养 72 h 后以 0.05% 胰酶消化收集贴壁细胞, 计数 1×10^5 个细胞按照 Annexin V - FITC 凋亡试剂盒说明书对细胞进行 Annexin V - FITC 和碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染色。使用流式细胞仪进行检测(激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm), 并使用 Cellquest V3.2 软件系统分析各组细胞凋亡率。最终结果按照公式: 各组细胞凋亡率 / 正常组细胞凋亡率计算。

2.6 细胞增殖能力检测 细胞培养 72 h 后以 0.05% 胰蛋白酶消化收集贴壁细胞, 加入 1 mL 培养液重悬后计数。以 5 000 cells/well 接种到包被 HFN 的 96 孔培养板, 每孔加 3 g/L MTT 30 μL, 培养 4 h 后, 吸弃上清液, 加入二甲基亚砷(100 μL/well), 于微量振荡器充分振荡 10 min, 置酶标仪测 A_{570} 值。

2.7 体外成血管能力的检测 将 Matrix 胶置于 4 °C 溶解, 取 50 μL/well 加入 96 孔板中, 37 °C 孵育 1 h 成胶。消化贴壁细胞并重悬于培养液中, 按 10 000 cells/well 接种细胞。37 °C 培养 24 h 后每孔随机选取 4 个视野($\times 200$) 计数小管数, 细胞拉长变形, 长度是宽度的 4 倍以上即可认为形成小管^[5]。

2.8 一氧化氮合酶基因的检测 从 GenBank 取得人 eNOS 和 ET - 1 的全长序列, 运用 primer 设计软件程序设计特异性引物。eNOS: 上游引物 5' - GGA GGT GCT GGA GCA GTT C - 3', 下游引物 5' - CAG CCC TTT GCT CTC AAT G - 3', 扩增 376 bp 片段; ET - 1: 上游引物 5' - CAG CGC GGT GGG TGA GAA CG - 3', 下游引物 5' - CAA ATG ATG TCC AGG TGG TGG CAG AAG TAG - 3', 扩增 134 bp 片段。用 Trizol 提取各组细胞总 RNA, 用紫外分光光度计测定

其纯度和含量, 取总 RNA 2 μg 逆转录成 cDNA 然后进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 预变性 94 °C 5 min, 然后 94 °C 30 s、56 °C 30 s、72 °C 1 min, 循环 32 次, 最后 72 °C 10 min。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后照相, 再经 Quantity One 凝胶图像分析系统以 eNOS 与 ET - 1 扩增条带的吸光度比值来评定 eNOS mRNA。

3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间资料采用 ANOVA 检验。

结 果

1 内皮生长晕细胞的鉴定

用免疫细胞染色法对细胞染色后发现细胞表面 VIII 因子相关抗原、CD34、Flk - 1 表达均为阳性(图 1)。采用 DiI - ac - LDL 和 FITC - UEA - I 荧光染色后于荧光显微镜观察, 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EOCs(图 2)。空白对照、阴性对照和自发荧光对照均为阴性结果。

2 罗格列酮对氧化应激致细胞凋亡的影响

ADMA 所致的氧化应激作用增加 EOCs 的凋亡率(与正常组比较 $P < 0.05, n = 3$), 见表 1、图 3。1、5、10 μmol/L 罗格列酮能够减少 ADMA 所致的细胞凋亡。但 10 μmol/L 浓度组保护作用较 5 μmol/L 组降低($P < 0.01, n = 3$), 与 1 μmol/L 组接近($P > 0.05, n = 3$)。

3 罗格列酮对氧化应激致细胞增殖能力损伤的影响

采用 MTT 比色法检测各组细胞的增殖能力变化, 结果显示: 对照组细胞增殖能力较正常组减弱($P < 0.05, n = 5$), 见表 1。低浓度罗格列酮($< 10 \mu\text{mol/L}$) 对 ADMA 所致的细胞增殖能力损伤有保护作用, 而且能够进一步促进细胞增殖。在罗格列酮浓度为 5 μmol/L 这种效应最为显著。但 10 μmol/L 罗格列酮的这种保护作用丧失(与对照组比较 $P > 0.05, n = 5$)。

4 罗格列酮对氧化应激致细胞体外成血管能力损伤的影响

通过体外成血管实验检测各组细胞的成血管能力变化, 结果显示: 对照组细胞成血管能力较正常组明显减弱($P < 0.01, n = 5$), 见表 1、图 4。1、5 μmol/L 罗格列酮能够保护 EOCs 体外成血管功能受 ADMA 损伤, 且这种增强作用呈一定的量效关系: 在罗格列酮浓度为 5 μmol/L 这种效应最为显著。但 10 μmol/L

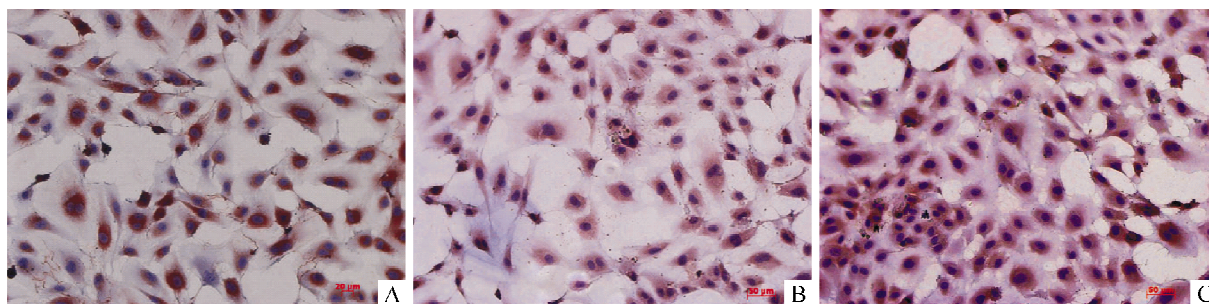


Fig 1 Identification of EOCs by immunostaining (×200). The endochylema of cells stained with brown color were considered as immunostaining positive. A; factor VIII positive; B; CD34 positive; C; Flk - 1 positive.

图 1 内皮生长晕细胞的免疫组织化学染色鉴定

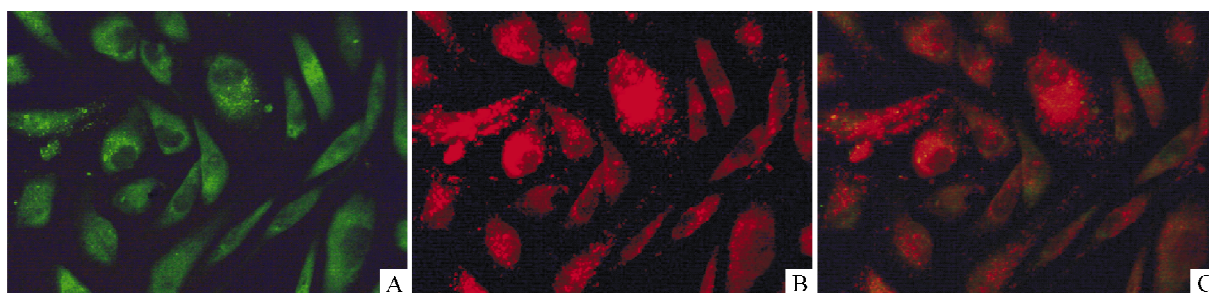


Fig 2 Identification of EOCs by DiI - ac - LDL and FITC - UEA - 1 double fluorescent staining (×200). EOCs bind to FITC - UEA - 1 (A, manifested green) and both uptake DiI - ac - LDL (B, manifested red), C shows dual positive cells (manifested yellow).

图 2 内皮生长晕细胞的 DiI 标记乙酰化低密度脂蛋白和异硫氰基荧光素标记荆豆凝集素 I 双荧光染色鉴定

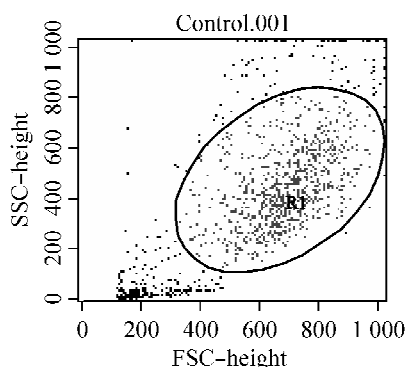


Fig 3A EOCs are gated in RL. EOCs generated in the presence of the Annexin V and PI is gated for the further analysis based on the morphologic parameters (side vs forward scatter) of cells.

图 3A 根据细胞形态参数(侧向 vs 前向散射)对内皮生长晕细胞进行射门

罗格列酮反而抑制 EOCs 的体外成血管功能(与对照组比较 $P < 0.01$, $n = 5$)。

5 罗格列酮对内皮一氧化氮合酶基因的影响

通过 RT - PCR 法检测各组细胞 eNOS 基因的表达情况(表 1、图 5),发现 ADMA 组和 $1 \mu\text{mol/L}$ 组 eNOS 基因表达与正常组之间差异无显著($P > 0.05$, $n = 5$)。与正常组比较 $5 \mu\text{mol/L}$ 组细胞 eNOS 基因表达受活化($P < 0.01$, $n = 5$),而 $10 \mu\text{mol/L}$ 组明显受抑制($P < 0.01$, $n = 5$)。

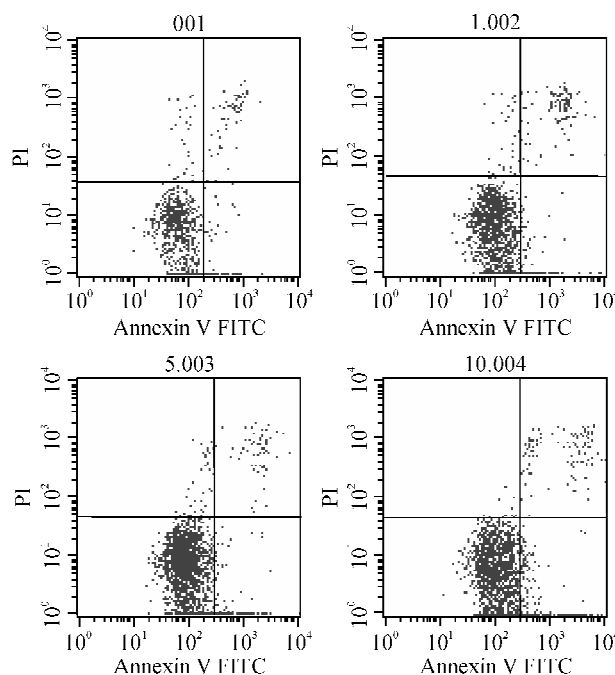


Fig 3B The apoptosis rate of each groups. ADMA can increase the apoptosis rate of EOCs. Rosiglitazone at the concentrations of $1, 5 \mu\text{mol/L}$ counteract such effect, while such protective effect is attenuated at the concentration of $10 \mu\text{mol/L}$. The lower - right zone represents apoptosis cells. 001: ADMA group; 1.002: ADMA + $1 \mu\text{mol/L}$ rosiglitazone group; 5.003: ADMA + $5 \mu\text{mol/L}$ rosiglitazone group; 10.004: ADMA + $10 \mu\text{mol/L}$ rosiglitazone group.

图 3B 实验组和对照组细胞凋亡率的比较

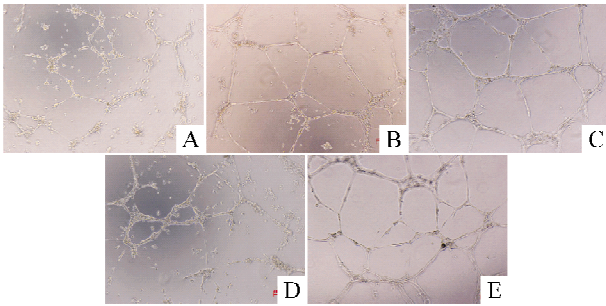


Fig 4 The vasculogenesis activity measured by matrix gel vasculogenesis assay (×200) revealed that ADMA attenuated the vasculogenesis activity of EOCs, 1,5 μmol/L rosiglitazone counteract such effect while 10 μmol/L rosiglitazone inhibited such ability cooperated with ADMA. A: ADMA group; B: ADMA + 1 μmol/L rosiglitazone group; C: ADMA + 5 μmol/L rosiglitazone group; D: ADMA + 10 μmol/L rosiglitazone group; E: control group.

图4 不同浓度罗格列酮及非对称性二甲基精氨酸对内皮生长晕细胞成血管能力的影响

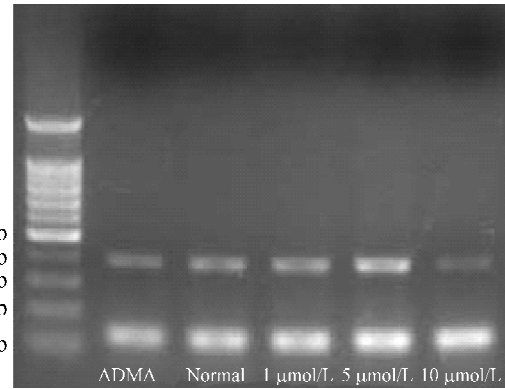


Fig 5 Effect of different concentrations of rosiglitazone and ADMA on expression of eNOS in EOCs. 1 μmol/L; 1 μmol/L rosiglitazone + ADMA group; 5 μmol/L; 5 μmol/L rosiglitazone + ADMA group; 10 μmol/L; 10 μmol/L rosiglitazone + ADMA group.

图5 不同浓度罗格列酮以及非对称性二甲基精氨酸对内皮生长晕细胞中的一氧化氮合酶基因表达的影响

表1 罗格列酮对ADMA致EOC功能障碍的影响以及eNOS基因表达的影响

Tab 1 Effects of rosiglitazone on the EOC disfunction caused by ADMA and the expression of eNOS in EOCs($\bar{x} \pm s$)

Group	Apoptosis rate	Reproductive activity	Vasculogenesis activity	eNOS gene expression
ADMA($n=3$)	4.03 ± 0.05	0.27 ± 0.02	8.25 ± 0.96	0.19 ± 0.02
ADMA + 1 μmol/L rosiglitazone($n=3$)	2.64 ± 0.06 **	0.35 ± 0.02 **	11.00 ± 0.82 **	0.23 ± 0.02
ADMA + 5 μmol/L rosiglitazone($n=3$)	1.63 ± 0.04 **	0.38 ± 0.03 **	13.00 ± 2.31 **	0.33 ± 0.02 ^{△△}
ADMA + 10 μmol/L rosiglitazone($n=3$)	2.72 ± 0.19 **	0.27 ± 0.05	5.00 ± 1.16 **	0.08 ± 0.01 ^{△△}
Control($n=5$)	1.00 ± 0.00 **	0.31 ± 0.02 *	16.25 ± 1.71 **	0.21 ± 0.01

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ADMA group; ^{△△} $P < 0.01$ vs control group.

讨 论

ADMA 是体内一种内源性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂,在高脂血症、动脉粥样硬化、高血压病、慢性肾功能不全、糖尿病的患者体内均会升高,并且在靶组织中的浓度可进一步达到 3-15 μmol/L^[6]。Schnabel 等^[7]研究证明 ADMA 是心血管疾病的一个新的危险因素。目前认为,ADMA 抑制 NOS 活性,减少 NO 合成可能是体内冠心病危险因素致内皮功能障碍的主要机制。多个冠心病危险因素如高血压、高胆固醇血症、高半胱氨酸血症等都通过氧化应激机制增加体内超氧负离子来影响 ADMA 在体内的生成和降解^[8];增多的超氧负离子既可以促进蛋白精氨酸甲基转移酶的活性增强,使 ADMA 合成增多;又可以抑制二甲基精氨酸二甲氨水解酶的活性,使 ADMA 的降解减少,从而提高细胞内的 ADMA 浓度。高浓度 ADMA 使 NOS 的催化活性出现失偶联,抑制 NOS 把电子传递给 L-精氨酸产生 NO,而促进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 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。

罗格列酮属于过氧化物体增殖剂激活的受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ) 激动剂,在临床上作为胰岛素增敏剂用于治疗糖尿病。但是大量的研究证明罗格列酮除了降低血糖以外,还具有多种不依赖其降血糖作用的效应,包括:改善血管内皮功能;抑制血管的炎症作用;降低 C-反应蛋白的血浆水平从而间接地抑制动脉粥样硬化的形成;另外还能够在球囊致动脉内膜损伤的动物模型中,抑制糖尿病和非糖尿病动物动脉内膜过度增生等^[9]。本研究旨在观察罗格列酮是否能够增强内皮祖细胞(研究中选用内皮生长晕细胞)的抗氧化应激能力,并初步探讨其可能的机制。

在研究中观察到 10 μmol/L ADMA 与 EOCs 共同孵育 72 h 后降低 EOCs 在体外的增殖和成血管能力,并增加细胞的凋亡率。上述结果证明 ADMA 确能够损伤 EOCs 功能。而低浓度罗格列酮能够对抗

这种氧化应激损伤,且 5 $\mu\text{mol/L}$ 组的保护效应强于 1 $\mu\text{mol/L}$ 组,因而呈现一定的量效关系。研究中发现 1、5 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮能够主动促进 EOCs 的增殖,且这种促进作用要强于 ADMA 对增殖作用的抑制。这与 Wang 等^[10]的研究结果相符合:该研究认为罗格列酮能够促进外周血中骨髓来源的成血管祖细胞向内皮细胞系分化并促进内皮细胞集落形成。Xin 等^[11]认为 PPAR γ 激动剂 15d-PGJ₂ 和环格列酮呈浓度依赖性地抑制人脐静脉内皮细胞在体外形成管状结构,并且 Galli 等^[12]的研究证明高浓度罗格列酮(该实验中采用 20 $\mu\text{mol/L}$)具有抗肿瘤作用。本研究中也得到与上述实验类似的结果:10 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮在降低细胞凋亡、促进细胞增殖能力均不同程度减弱,且与 ADMA 协同抑制细胞成血管能力。

关于 PPAR γ 激动剂增强细胞抗氧化应激能力的机制目前仍未明确阐明:Calnek 等^[13]认为 15 d-PGJ₂ 以及环格列酮促进内皮细胞释放 NO 作用不通过增加 eNOS 基因表达;Polikandriotis 等^[14]进一步研究认为在罗格列酮作用的内皮细胞中 eNOS 与热休克蛋白 90 的相互作用增强,同时出现 eNOS 177 位丝氨酸磷酸化增强。本研究发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮无明显增强 eNOS 基因的表达,但 5 $\mu\text{mol/L}$ 组 eNOS 的基因表达略有增强而 10 $\mu\text{mol/L}$ 组减弱。因此,低浓度的罗格列酮在一定程度上通过增强 eNOS 基因的表达增强细胞抗氧化应激能力。罗格列酮是否还通过影响其它基因如 PPAR γ 基因、细胞凋亡相关基因的表达来影响细胞功能有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [2] Lin Y, Weisdorf 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] Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood [J]. *Blood*, 2004, 104(9): 2752-2760.
- [4] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 288-293.
- [5] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures [J]. *Circulation*, 2002, 106(22): 2781-2786.
- [6] Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59(4): 824-833.
- [7] Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease [J]. *Circ Res*, 2005, 97(5): e53-e59.
- [8] Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress [J]. *Atheroscler Suppl*, 2003, 4(4): 41-51.
- [9] 李春蕊, 张 晶, 刘文励, 等. 罗格列酮对实验性 2 型糖尿病合并高脂血症大鼠骨骼肌组织 IRS-1 及 GLUT4 表达的调节 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(5): 900-903.
- [10] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage a new paradigm in glitazone pleiotropy [J]. *Circulation*, 2004, 109(11): 1392-1400.
- [11] Xin XH, Yang SY, Kowalski J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands are potent inhibitors of angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(13): 9116-9121.
- [12] Galli A, Ceni E, Crabb DW, et al. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPAR γ independent mechanisms [J]. *Gut*, 2004, 53(11): 1688-1697.
- [13] Calnek DS, Mazzella L, Roser S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(1): 52-57.
- [14] Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent mechanisms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(9): 1810-1816.