

## 氯沙坦保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤与 ADMA 的关系

谢启应 孙泽琳 陈美芳 杨天岑\*

(中南大学湘雅医院心血管内科,长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨氯沙坦对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的内皮细胞损伤的保护作用及其与内源性一氧化氮合酶抑制物非对称性二甲基精氨酸(ADMA)的关系。方法 用 ox-LDL(100 mg/L)孵育人脐静脉内皮细胞株 HUVEC12 24 h 或用  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  mmol/L 的氯沙坦预孵育 HUVEC12 30 min 后再与 ox-LDL 共孵育 24 h,测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、ADMA 含量和细胞内二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)活性。结果 ox-LDL 孵育 HUVEC12 细胞 24 h 后细胞培养液中 LDH 活性、TNF- $\alpha$  和 ADMA 含量明显增加( $P < 0.05$ )同时 NO 含量下降和细胞 DDAH 酶活性受到抑制( $P < 0.05$ )。氯沙坦( $10^{-8} \sim 10^{-6}$  mmol/L)可显著减轻 ox-LDL 诱导的 LDH 活性、TNF- $\alpha$  和 ADMA 含量的增加以及 NO 含量的降低( $P < 0.05$ )并呈浓度依赖性的增加 DDAH 活性( $P < 0.05$ )。结论 氯沙坦对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤具有保护作用,该作用可能与增加 DDAH 活性降低 ADMA 浓度有关。

[关键词] 氯沙坦; 内皮细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 非对称性二甲基精氨酸; 二甲基精氨酸二甲胺水解酶

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-7347(2006)01-0066-04

## Protective effect of losartan on injury induced by ox-LDL in endothelial cells and the relationship with asymmetric dimethylarginine

XIE Qi-ying, SUN Ze-lin, CHEN Mei-fang, YANG Tian-lun\*

(Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract : Objective** To investigate the protective effect of losartan against on injury induced by ox-LDL in endothelial cells and the relationship with asymmetric dimethylarginine (ADMA). **Methods** Endothelial injury was induced by incubation with ox-LDL 100 mg/L in cultured HUVECs for 24 h, and the levels of ADMA, lactate dehydrogenase (LDH), nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the conditioned medium were measured. The activity of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) of cultured endothelial cells was also determined. **Results** Incubation of endothelial cells with ox-LDL 100 mg/L for 24 h induced a marked elevation of the levels of ADMA, LDH and TNF- $\alpha$  in the conditioned medium and a significant decrease in the activity of DDAH and the content of NO ( $P < 0.05$ ). Pretreatment with losartan ( $10^{-8} \sim 10^{-6}$  mmol/L) significantly inhibited the increased levels of ADMA, LDH and TNF- $\alpha$ , attenuated the decreased levels of NO and the decreased activity of DDAH induced by ox-LDL ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Losartan may preserve ox-LDL-induced endothelial cell injury by increasing the DDAH activity and decreasing the ADMA level.

**Key words :** losartan ; endothelial cells ; oxidative low-density lipoprotein ; asymmetric dimethylarginine ; dimethylarginine dimethylaminohydrolase

[ J Cent South Univ ( Med Sci ) , 2006 31( 1 ) 0066-04 ]

非对称性二甲基精氨酸(ADMA)是内源性一氧化氮合酶(NOS)抑制剂,竞争性抑制一氧化氮(NO)的合成,并可增强单核细胞黏附内皮细胞和增加炎症因子的表达<sup>[1]</sup>。大量研究表明,动脉粥样硬化(AS)和高血压等疾病都存在ADMA增加<sup>[2-4]</sup>,且血浆ADMA水平同血管内皮功能不全程度相关,提示ADMA是心血管疾病新的危险因素和药物治疗靶点。实验发现,血管紧张素1(AT1)受体拮抗剂具有降压、抗炎、改善内皮功能、抗AS等作用<sup>[5,6]</sup>。本实验采用氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导内皮细胞损伤,并进一步观察AT1受体拮抗剂氯沙坦(losartan)保护血管内皮的作用是否与降低ADMA水平有关。

## 1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 (1)人脐静脉内皮细胞株:HUVEC12(北京医科大学肿瘤研究所)(2)主要仪器:722分光光度计(上海第三分析仪器厂),高效液相色谱仪(Shimadzu公司,日本)(3)主要试剂:氯沙坦原粉(美国默沙东公司馈赠),ADMA标准品(Sigma公司),RPMI 1640(Gibco公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),NO试剂盒(南京聚力生物医学工程研究所),LDH试剂盒(南京聚力生物医学工程研究所),TNF- $\alpha$ 试剂盒(北京东亚免疫技术研究所)。

1.2 ox-LDL制备 取健康人新鲜血液,按照参考文献用密度梯度超速离心法分离制备LDL并测定其含量<sup>[7]</sup>;LDL中加入10  $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub>氧化24 h,0.2 mmol/L EDTA终止氧化反应。采用TBARS间接反映LDL氧化程度。LDL和ox-LDL的TBARS值分别是(5.26  $\pm$  0.96)  $\mu$ mol/g和(26.03  $\pm$  5.26)  $\mu$ mol/g。

1.3 细胞培养及实验分组 人脐静脉内皮细胞株HUVEC12解冻复苏后接种于含15%小牛血清的RPMI 1640培养液的培养瓶中,置于含5% CO<sub>2</sub>,95%空气的培养箱中培养,37  $^{\circ}$ C孵育。待细胞长满瓶底80%左右时将细胞转移至24孔培养板(1  $\times$  10<sup>6</sup>/孔),无血清的RPMI 1640培养基中培养24 h,换液后随机分组进行下一步实验。将24孔板中的细胞分为5组:正常对照组(control);ox-LDL组,终浓度为100 mg/L的ox-LDL孵育内皮细胞24 h;低、中、高剂量氯沙坦组,分别加入终浓度为10<sup>-8</sup>,10<sup>-7</sup>和10<sup>-6</sup> mmol/L的氯沙坦孵育HUVEC12 30 min后,再加入终浓度为100 mg/L的ox-LDL与内皮细胞共孵育24 h。收集各组培养液,待测LDH活性以及NO,TNF- $\alpha$ 和ADMA含量;取细胞裂解液测DDAH

活性。

1.4 LDH活性及NO,TNF- $\alpha$ 含量的测定 按照试剂盒说明,采用常规比色法测定细胞培养液中LDH活性,以反映细胞损伤程度。采用Griess重氮化反应测定NO含量,用722分光光度计在540 nm处测定,通过计算NO<sub>2</sub>含量以反映NO浓度。采用放射免疫法测定细胞培养液中TNF- $\alpha$ 含量。

1.5 ADMA含量测定 取细胞培养液0.5 mL,加入5-磺基水杨酸沉淀蛋白,混匀,离心后取上清液按参考文献<sup>[8]</sup>方法用高效液相色谱(HPLC)测定细胞培养液中ADMA含量。

1.6 二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)活性测定 按参考文献<sup>[8]</sup>方法测定DDAH活性。冰浴下将细胞裂解液分为2组,加入终浓度为500  $\mu$ mol/L的ADMA,一组立即加入30% 5-磺基水杨酸灭活DDAH;另一组37  $^{\circ}$ C孵育2 h后再加入30% 5-磺基水杨酸灭活DDAH。用HPLC法测定各组的ADMA水平,2组的ADMA差值反映DDAH活性。

1.7 统计学处理 所有数据用以均数  $\pm$  标准差表示,采用SPSS11.0软件进行统计学处理。多组间比较用单因素方差分析,采用 $q$ 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 细胞培养液中LDH活性 ox-LDL(100 mg/L)孵育内皮细胞24 h可显著增加细胞培养液中LDH活性( $P < 0.05$ )。预先予氯沙坦(10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-6</sup> mmol/L)孵育30 min后再与ox-LDL(100 mg/L)共孵育24 h能显著降低细胞培养液中LDH活性( $P < 0.05$ );随着氯沙坦浓度增加,LDH活性有降低趋势(表1)。

2.2 细胞培养液中NO含量 ox-LDL(100 mg/L)孵育内皮细胞24 h显著降低细胞培养液中NO含量。预先予氯沙坦(10<sup>-7</sup> ~ 10<sup>-6</sup> mmol/L)孵育30 min能逆转该作用( $P < 0.05$ );随着氯沙坦浓度增加,NO含量逐渐增加(表1)。

2.3 细胞培养液中TNF- $\alpha$ 含量 ox-LDL(100 mg/L)孵育内皮细胞24 h显著增加细胞培养液中TNF- $\alpha$ 含量。预先予氯沙坦(10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-6</sup> mmol/L)孵育30 min能显著降低细胞培养液中TNF- $\alpha$ 含量( $P < 0.05$ );随着氯沙坦浓度增加,TNF- $\alpha$ 含量有降低趋势(表1)。

2.4 细胞培养液中ADMA含量 ox-LDL(100 mg/L)孵育内皮细胞24 h显著增加细胞培养液中ADMA含量[(104.90  $\pm$  31.23) nmol/L vs (46.76  $\pm$  14.51) nmol/L,  $P < 0.05$ ]。预先予氯沙坦(10<sup>-8</sup> ~

$10^{-6}$  mmol/L) 孵育 30 min 能显著降低细胞液中 ADMA 含量的增加 [(60.07 ± 7.34) nmol/L vs (104.90 ± 31.23) nmol/L,  $P < 0.05$ ]; 随着氯沙坦浓度增加, ADMA 含量有降低趋势(表 2)。

2.5 内皮细胞 DDAH 的酶活性 ox-LDL(100 mg/L) 与内皮细胞孵育 24 h 显著降低细胞 DDAH 酶

活性 (51.70 ± 0.53)% vs (100.00 ± 18.03)%,  $P < 0.05$ 。预先予氯沙坦( $10^{-8}$  ~  $10^{-6}$  mmol/L) 孵育 30 min 能阻断该作用; 并且随着氯沙坦浓度的增加, DDAH 酶活性从(48.01 ± 16.35)% 逐渐恢复至 (88.96 ± 5.01)% ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 1 LDH 活性及 NO 和 TNF- $\alpha$  含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	LDH (U/mL)	NO ( $\mu$ mol/L)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
Control	6	10.02 ± 8.05	337.21 ± 11.16	0.35 ± 0.05
ox-LDL (100 mg/L)	4	33.73 ± 9.98*	273.87 ± 36.13*	0.74 ± 0.20*
+ Losartan ( $10^{-8}$ mmol/L)	4	12.14 ± 2.70 <sup>#</sup>	287.05 ± 56.32	0.44 ± 0.21 <sup>#</sup>
+ Losartan ( $10^{-7}$ mmol/L)	4	12.03 ± 2.17 <sup>#</sup>	323.42 ± 32.79 <sup>#</sup>	0.36 ± 0.10 <sup>#</sup>
+ Losartan ( $10^{-6}$ mmol/L)	4	9.44 ± 2.70 <sup>#</sup>	327.93 ± 4.61 <sup>#</sup>	0.35 ± 0.20 <sup>#</sup>

与 Control 比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 ox-LDL 比较 #  $P < 0.05$

表 2 ADMA 含量和 DDAH 活性 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ADMA (nmol/L)	DDAH (%)
Control	6	46.76 ± 14.51	100.00 ± 18.03
ox-LDL (100 mg/L)	4	104.90 ± 31.23*	51.70 ± 0.53*
+ Losartan ( $10^{-8}$ mmol/L)	4	60.07 ± 7.34 <sup>#</sup>	48.01 ± 16.35 <sup>#</sup>
+ Losartan ( $10^{-7}$ mmol/L)	4	53.73 ± 5.78 <sup>#</sup>	77.33 ± 5.16 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
+ Losartan ( $10^{-6}$ mmol/L)	4	53.25 ± 6.99 <sup>#</sup>	88.96 ± 5.01 <sup>#<math>\Delta</math><math>\blacktriangle</math></sup>

与 Control 比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 ox-LDL 比较 #  $P < 0.05$ ; 与 ox-LDL + Losartan  $10^{-8}$  mmol/L 比较,  $\Delta$   $P < 0.05$ ; 与 ox-LDL + Losartan  $10^{-7}$  mmol/L 比较,  $\blacktriangle$   $P < 0.05$

### 3 讨论

LDL 和 ox-LDL 可减少血管内皮 NO 的产生, 直接或间接引起内皮依赖性舒张功能障碍, 因此高脂血症是 AS 独立的危险因素。ADMA 是内源性血管紧张素转化酶 NOS 抑制剂, 在 AS、高血压、高脂血症及高同型半胱氨酸血症等多种疾病都存在 ADMA 增加<sup>[2-4, 9]</sup>, 提示内源性 ADMA 的增加与内皮功能障碍和心血管疾病的发生有关。研究发现 ADMA 在内皮细胞中浓度最高。笔者之前的研究发现, ox-LDL 损伤内皮细胞功能可能与增加 ADMA 含量有关<sup>[10]</sup>。ox-LDL 可激活内皮细胞 NF- $\kappa$ B<sup>[10]</sup>, NF- $\kappa$ B 的激活将进一步诱导内皮细胞炎症因子的表达。研究显示, TNF- $\alpha$  是一种重要的炎症介质<sup>[11]</sup>, 可通过抑制 DDAH 活性增加 ADMA 含量。本研究中 ox-LDL 孵育 HUVEC12 24 h 后 LDH 活性显著增加, 提示 ox-LDL 可损伤内皮细胞; 同时增加 TNF- $\alpha$  和 ADMA 含量, 降低 NO 含量, 从而导致内皮细胞功能障碍, 与既往的研究结果一致<sup>[10]</sup>。

ADMA 主要有随尿排泄和经 DDAH 酶代谢 2 种途径从体内清除, 目前认为以 DDAH 酶代谢为主。DDAH 酶广泛存在于人体多种组织细胞中, 在血管内皮细胞中活性最高。本研究中 ox-LDL 孵育 HUVEC12 24 h 显著抑制 DDAH 酶活性, 同时 ADMA 含

量增加。与 Ito 等<sup>[11]</sup>研究一致。这提示体外 ox-LDL 可能通过降低 ADMA 代谢酶 DDAH 活性, 诱导内皮细胞 ADMA 含量升高。

原发性高血压患者体内氧化应激和 LDL 氧化增加, 同时伴有内皮依赖性血管舒张功能受损。血管紧张素转化酶抑制药和 AT1 受体拮抗药在降低血压的同时可显著降低血浆 ADMA 和 von Willebrand 因子(vWF)水平, 改善血管内皮功能, Napoli 等<sup>[12, 13]</sup>认为这与降低氧化应激和增加 NO 有关。文献报道辛伐他汀(simvastatin)可通过降低炎症因子 TNF- $\alpha$  含量保护 LDL 和 ox-LDL 所致的内皮功能损害, 但对 ADMA 和 DDAH 酶活性无影响<sup>[14]</sup>。本研究发现, 氯沙坦能显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LDH 活性和 TNF- $\alpha$  含量的增加, 以及 NO 含量的降低, 同时抑制 ADMA 含量增加和 DDAH 酶活性降低。提示氯沙坦具有保护 ox-LDL 所致的内皮功能损伤的作用, 该作用可能不仅与减少炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达有关, 而且与降低 ADMA 含量有关。最近发现, 抗氧化剂 PDTC 可抑制 ox-LDL 诱导的 ADMA 含量增加和 DDAH 酶活性降低, 提示氧化应激增加导致 DDAH 酶活性降低是 ox-LDL 诱导 ADMA 增加的原因之一<sup>[10]</sup>。然而氯沙坦保护 ox-LDL 所致内皮功能损伤的具体机制是否通过降低氧化应激尚需进一步研究。

参考文献：

[ 1 ] 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 Cardiol* , 2000 , 36( 7 ) : 2287-2295.

[ 2 ] Curgunlu A , Uzun H , Bavunoglu I , et al. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethylarginine ( ADMA ) in white coat hypertension[ J ]. *J Hum Hypertens* , 2005 , 19( 8 ) : 629-633.

[ 3 ] Kreml TK , Maas R , Sydow K , et al. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events[ J ]. *Eur Heart J* , 2005 , 26( 18 ) : 1846-1851.

[ 4 ] Bae SW , Stuhlinger MC , Yoo HS et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in newly diagnosed patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris during two weeks of medical treatment[ J ]. *Am J Cardiol* , 2005 , 95( 6 ) : 729-733.

[ 5 ] Fliser D , Buchholz K , Haller H. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation[ J ]. *Circulation* , 2004 , 110( 9 ) : 1103-1107.

[ 6 ] Koh KK , Han SH , Chung WJ , et al. Comparison of effects of losartan , irbesartan , and candesartan on flow-mediated brachial artery dilation and on inflammatory and thrombotic markers in patients with systemic hypertension[ J ]. *Am J Cardiol* , 2004 , 93( 11 ) : 1432-1435 , A1410.

[ 7 ] Guan S , Wang B. Effects of fosinopril and valsartan on expressions of ICAM-1 and NO in human umbilical vein endothelial cells[ J ]. *Chin Med J( Engl )* , 2003 , 116( 6 ) : 923-927.

[ 8 ] 姜德建 , 江俊麟 , 谭桂山 , 等. 川东獐牙菜素 A 保护溶血性磷

脂酰胆碱诱导的内皮细胞损伤 [ J ]. *中南药学* , 2003 , 1( 2 ) : 75-79.

[ 9 ] Paroni R , Fermo I , Fiorina P , et al. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in plasma of hyperhomocysteinemic subjects[ J ]. *Amino Acids* , 2005 , 28( 4 ) : 389-394.

[ 10 ] Yang TL , Chen MF , Luo BL , et al. Fenofibrate decreases asymmetric dimethylarginine level in cultured endothelial cells by inhibiting NF-kappaB activity [ J ]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* , 2005 , 371( 5 ) : 401-407.

[ 11 ] Ito A , Tsao PS , Adimoolam S et al. Novel mechanism for endothelial dysfunction : dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase[ J ]. *Circulation* , 1999 , 99( 24 ) : 3092-3095.

[ 12 ] Delles C , Schneider MP , John S et al. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N( G ) , N( G )-dimethylarginine in human essential hypertension[ J ]. *Am J Hypertens* , 2002 , 15( 7 Pt 1 ) : 590-593.

[ 13 ] Napoli C , Sica V , de Nigris F , et al. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension[ J ]. *Am Heart J* , 2004 , 148( 1 ) : 172-179.

[ 14 ] Jiang JL , Jiang DJ , Tang YH et al. Effect of simvastatin on endothelium-dependent vaso-relaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor[ J ]. *Acta Pharmacol Sin* , 2004 , 25( 7 ) : 893-901.

( 本文编辑 郭 征 )

( 上接第 55 页 )

参考文献：

[ 1 ] Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia[ J ]. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* , 2001 , 7( 4 ) : 229-234.

[ 2 ] Hallett PJ , Standaert DG. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson 's disease[ J ]. *Pharmacol Ther* , 2004 , 102( 2 ) : 155-174.

[ 3 ] Monyer H , Burnashev N , Laurie DJ , et al. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors[ J ]. *Neuron* , 1994 , 12( 3 ) : 529-540.

[ 4 ] Nath P , Scott M , Nadimpalli R , et al. Activation of apoptosis-

linked caspase( s ) in NMDA-injured brains in neonatal rats[ J ]. *Neurochem Int* , 2000 , 36( 2 ) : 119-126.

[ 5 ] 黑明燕 , 旷寿金 , 殷萍. 以 TTC 方法浅析 SD 大鼠及 C57 小鼠 HIE 模型脑损伤的异同 [ J ]. *中国现代医学杂志* 2003 , 13( 5 ) : 22-25.

[ 6 ] 谢集建 , 常燕群 , 陈宝芳 , 等. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后学习记忆和海马神经元超微结构的研究 [ J ]. *中华急诊医学杂志* 2001 , 10( 6 ) : 155-157.

[ 7 ] Xin WK , Kwan CL , Zhao XH , et al. A functional interaction of sodium and calcium in the regulation of NMDA receptor activity by remote NMDA receptors[ J ]. *J Neurosci* , 2005 , 25( 1 ) : 139-148.

( 本文编辑 傅希文 )