

二甲基精氨酸二甲胺水解酶与心血管疾病

李晓晖, 姜德建, 贾素洁, 李元建*
(中南大学药学院药理学系, 湖南 长沙 410078)

摘要: 二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)是一种胞浆蛋白酶,包括 DDAH1 和 DDAH2 两种亚型,能特异性水解内源性一氧化氮合酶(NOS)抑制物非对称二甲基精氨酸而上调 NOS 活性。DDAH 与 NOS 活性之间的相互作用在调节 NO 生成和血管内皮功能中起重要作用。DDAH 还参与血管新生与细胞分化的调节,其活性变化与动脉粥样硬化等多种心血管疾病的发生发展密切相关,可能是一个新的心血管疾病相关蛋白和药物防治靶点。

关键词: 心血管疾病; 二甲基精氨酸二甲胺水解酶; 非对称二甲基精氨酸

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)04-0289-04

内源性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制物非对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)能竞争性地抑制 NOS,减少一氧化氮(nitric oxide, NO)生成,并诱发氧自由基生成,促进炎症反应,是动脉粥样硬化等多种心血管疾病血管内皮功能紊乱的重要因素。多项临床研究显示,急性冠脉综合征患者血浆 ADMA 水平明显升高,独立于其他危险因素,被认为是一种新的心血管疾病危险因子^[1]。1987 年, Ogawa 等^[2]首次发现体内存在一种能直接催化二甲基精氨酸转变为 L-瓜氨酸(L-citrulline)的代谢酶,即二甲基精氨酸二甲胺水解酶(dimethylarginine dimethylaminohydrolase, DDAH)。DDAH 通过调节体内 ADMA 的水平而影响 NOS 的活性,进而调节体内 NO 的生成^[3]。DDAH 活性与多种心血管疾病之间存在密切关系,被认为是新的心血管疾病相关蛋白和药物防治靶点^[1]。本文就 DDAH 生物学特性,与心血管疾病的关系及相关作用机制的研究进展综述如下。

1 DDAH 的生物学特性

1.1 DDAH 的表达与分布

DDAH 为一种胞浆蛋白酶,无明显亚细胞结构特异性分布,其分子量约为 33 ku,等电点为 pH 5.2,归类于 EC3.5.3.18^[4]。

收稿日期: 2006-07-31 接受日期: 2007-02-12

作者简介: 李晓晖,硕士研究生,研究方向为心血管药理;李元建,教授,博士生导师,研究方向为心血管药理。

* 联系作者 E-mail: yuan_jianli@yahoo.com Tel: (0731)

2355078

DDAH 一级结构与精氨酸-甘氨酸脒基转移酶及精氨酸脱亚氨酸酶相似,属于精氨酸修饰酶超家族^[5]。DDAH 已被克隆、纯化及结构鉴定,其结构中存在由半胱氨酸-组氨酸-谷氨酸(Cys-His-Glu)组成的催化活性位点,其中游离的半胱氨酸残基(Cys-249)为 DDAH 活性所必需^[5]。DDAH 存在 DDAH1 和 DDAH2 两个亚型,由不同基因所编码,其中 DDAH1 位于 1p22,而 DDAH2 位于 6p21.3^[6]。与胚胎组织比较,出生后组织中 DDAH2 表达显著增加,而 DDAH1 表达基本无变化^[6]。这两种亚型在体内分布存在差异,其中 DDAH1 多存在于主要表达神经型 NOS(nNOS)的组织如大脑和肾脏等;而 DDAH2 则多存在于以内皮型 NOS(eNOS)表达为主的组织如心脏、血管和肾脏等^[7]。

1.2 DDAH 活性及其测定

DDAH 在体内水解 ADMA 生成 L-瓜氨酸和二甲胺(dimethylamine),具有高度特异性与专一性。Stone 等^[8]将 DDAH 与胍基修饰酶类超家族比较,发现 DDAH 催化机制中可能存在一个保守特征,即生成中间产物 S-alkylthiuronium。在酶蛋白浓度、pH 值一定的条件下,计算 L-瓜氨酸的生成量来反映组织或细胞中 DDAH 的活性,可采用³H 标记 L-瓜氨酸以检测 L-瓜氨酸最大吸光度。高效液相色谱直接测定 ADMA 也是常用的方法。不同种属的 DDAH 酶活性存在差异,不同 DDAH 的亚型对催化反应也有影响,表现为两者反应的 K_m 值不同^[7,9]。

1.3 DDAH 活性的调节机制

DDAH 催化活性位点(Cys-His-Glu)上的半胱氨酸残基含有巯基,在氧化应激状态下容易被氧化而失活,而同型半胱氨酸也能与其直接作用生成二硫键,导致 DDAH 活性丧失。巯基阻断剂(如氯汞苯甲酸和 $HgCl_2$)和某些二价金属离子(如 Cd^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+})等可抑制 DDAH 的活性^[6],但 Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对该酶活性无明显影响^[2]。

2 DDAH 的生物学作用

2.1 调节 NO 生成

体内 NO 由 L-精氨酸经 NOS 催化而来,ADMA 是主要的内源性 NOS 抑制物,而 DDAH 能通过水解 ADMA 影响 NOS 的活性进而促进 NO 的生成。研究证明,在某些组织细胞中存在 DDAH 与 NOS 共表达,可能共同调节细胞内 NO 的生成和释放。在培养的内皮细胞,DDAH 抑制剂 4124W 能增加细胞内 ADMA 的积累,抑制 NOS 活性,减少 NO 的生成^[10];而应用 NO 供体增加 NO 浓度的同时表现 DDAH 的活性降低^[11]。这些结果提示 DDAH 和 NOS 两者活性之间存在着负反馈(图 1)。

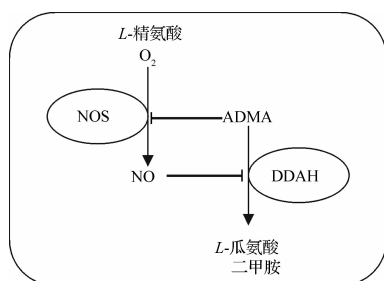


图1. NO生成的细胞内调节

2.2 促进血管新生

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前所知最强的促血管新生因子。最近的研究证明, DDAH 在血管新生的调节中起重要作用, 证据有: ①在 *DDAH1* 转基因小鼠, 后肢缺血诱导的血管新生明显增强; ②在过表达 *DDAH1* 的内皮细胞, VEGF 表达显著增加^[10]。Hasegawa等^[12]最近也报道, DDAH2 能通过内皮细胞特异性 $\beta 1$ 糖蛋白 (Sp1) 转录因子上调 VEGF 表达从而促进内皮细胞生长, 该作用不依赖于 eNOS/NO 途径。DDAH2 的过表达还能增强内皮细胞的增殖和移行^[10]。

2.3 促进细胞分化

出生后组织中 DDAH2 表达增高提示 DDAH 可能参与细胞发育和分化的调节。新近研究证明, 全反式维 A 酸 (all-trans-retinoic acid) 能抑制细胞增生, 促进细胞分化, 在心血管系统发育与成熟过程中发挥重要作用, 其作用与诱导 DDAH 的表达有关^[13]。

3 DDAH/ADMA 系统与心血管疾病

有关 DDAH/ADMA 系统与心血管疾病的研究, 以往主要集中在 ADMA 浓度变化及其作用机制。近年发现, 多种心血管疾病如动脉粥样硬化、高血压、慢性心功能不全和周围动脉闭塞性疾病等与 DDAH 活性变化有关^[1]。DDAH 被认为是新的心血管疾病相关蛋白和药物防治靶点。

3.1 DDAH/ADMA 系统与动脉粥样硬化

多种促动脉粥样硬化因素如高脂血症、高血压和糖尿病等均可影响 DDAH/ADMA。在高胆固醇饲养新西兰兔, 内皮依赖性舒张功能减弱的同时伴有 ADMA 浓度升高与 DDAH 活性降低^[14]。在培养的人脐静脉内皮细胞, 氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 可直接诱发 ADMA 水平升高和 DDAH 活性降低^[14]。这些研究表明, ADMA 水平升高是继发于 DDAH 活性降低。

3.2 DDAH/ADMA 系统与肺动脉高压

最近研究发现, 肺动脉高压发病过程中涉及 DDAH/ADMA 系统, DDAH 在肺血管生成、结构重建方面可能发挥重要作用。在肺动脉高压大鼠模型, 肺组织 ADMA 含量为对照组的 2.3 倍, DDAH 表达和活性均有降低^[15]; 肺动脉高压患者血浆 ADMA 水平明显升高, DDAH 活性明显降低^[16];

DDAH2 也与新生儿持续性肺动脉高压的发生密切相关^[17]。

3.3 DDAH/ADMA 系统与高血压

ADMA 可能是促进高血压发病发展的重要影响因素。人体每天产生大约 300 μmol ADMA, 绝大部分经 DDAH 代谢, DDAH 活性对于体内 ADMA 的蓄积十分重要^[18]。人体直接给予低剂量 ADMA 能导致平均动脉压升高, 全身 ADMA 水平同血压高低密切相关^[18]。动物实验表明, 外源性 NOS 抑制剂可诱发高血压^[19]。临床研究表明, 高血压患者血中 ADMA 显著升高, 某些抗高血压药物在降低血压的同时显著降低 ADMA 水平^[20]。DDAH 的表达与活性存在个体差异, 可能主要与 *DDAH* 基因存在多态性有关。Jones 等^[21]发现 *DDAH2* 基因中 6 处多态现象, 其中位于 -871 处核心启动区的一个插入/缺失 (6G/7G) 突变影响 *DDAH2* 的转录, 7G 突变者 *DDAH2* 表达明显上调。该突变在受试人群中的发生率为 1%。最近研究发现, *DDAH* 基因的突变与心血管疾病存在紧密联系。在 1609 名芬兰中年男性参加的心脏疾病风险因子研究中, 发现 13 名 *DDAH1* 某功能基因突变携带者, 与非突变者相比, 前者心血管疾病发生率是后者的 50 倍以上, 高血压发生率几乎达到 5 倍。对携带者进行家族研究发现, 50% 家族成员也为该突变的携带者, 提示突变可能具有遗传性^[22]。

4 DDAH 与药物治疗

药物对 DDAH 活性的调节涉及两个水平, 即翻译后水平和转录水平, 前者主要是基于对 DDAH 催化活性位点氧化修饰的抑制, 而后者则通过作用于 *DDAH* 基因启动子的转录因子结合位点。如前所述, 由于 DDAH 催化活性位点上有含巯基的半胱氨酸残基, 因此容易被氧化而失活。ox-LDL、肿瘤坏死因子 α 和同型半胱氨酸和高糖等都能诱导氧化应激, 抑制 DDAH 活性。血管紧张素转换酶抑制药、抗氧化药、天然药物、雌激素和阿司匹林等的内皮保护效应与抑制氧化应激, 改善 DDAH 的活性, 降低 ADMA 水平有关 (表 1)。在 LDL 诱导的大鼠血管内皮功能不全模型, 含巯基的卡托普利 (captopril) 能显著改善 DDAH 活性, 降低血浆 ADMA 水平, 而不含巯基的依那普利 (enalapril) 不影响 DDAH 活性^[20]。在培养的内皮细胞, 细胞内抗氧化药聚乙二醇-超氧化物歧化酶 (polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase, PG-SOD) 能抑制高糖引起的 DDAH 活性降低和 ADMA 水平升高^[23]。此外, 抗氧化药维生素 E 和普罗布考 (probucol) 均能阻止 LDL 诱导的内皮细胞损伤和血管舒张功能障碍, 其作用与改善内皮细胞 DDAH 活性、降低 ADMA 水平有关^[24-25]。天然药物吡酮 (xanthenes) 属于多酚类化合物, 能保护高脂诱导的内皮功能不全, 其作用与抗氧化而增高 DDAH 活性, 进而降低 ADMA 水平有关^[25]。在培养的人或鼠的血管内皮细胞, 17 β -雌二醇能显著增加 DDAH 活性和降低 ADMA 水平^[26]。小剂量阿司匹林对 LDL 诱导的血管内皮损伤有

表 1. DDAH 与药物治疗作用

药物	DDAH	治疗作用	参考文献
卡托普利	增强活性	改善 LDL 诱导的内皮功能不全	[20]
依那普利	不影响	无明显作用	[20]
PG-SOD	增强活性	抑制高糖引起的 DDAH 活性降低和 ADMA 水平升高	[23]
维生素 E	增强活性	阻止 LDL 诱导的内皮细胞损伤和血管舒张功能障碍	[24-25]
普罗布考	增强活性	阻止 LDL 诱导的内皮细胞损伤和血管舒张功能障碍	[24]
山酮类	增强活性	保护高脂诱导的内皮功能不全	[25]
17 β -雌二醇	增强活性	促进血管内皮细胞 NO 的生成	[26]
阿司匹林	增强活性	保护 LDL 诱导的血管内皮损伤	[27]
全反式维 A 酸	上调表达	增加内皮细胞 NO 的生成	[13]
罗格列酮	上调表达	降低血浆 ADMA 浓度	[13]
吡咯列酮	上调表达	降低血浆 ADMA 浓度	[28]

保护作用,其保护作用与增加 DDAH 活性和降低 ADMA 浓度有关^[27]。

DDAH 基因启动子含 STAT、NF- κ B、PPAR/PXR 和 IRF1 等多个转录因子结合位点。全反式维 A 酸能通过作用于 PPAR/PXR 位点,上调 DDAH2 的表达而增加内皮细胞 NO 的生成^[13]。吡咯列酮 (pioglitazone) 作为 PPAR- γ 受体激动剂降低血浆 ADMA 浓度的效应可能也与作用于 DDAH2 基因启动区 PPAR/PXR 位点有关^[13, 28]。

5 结语

综上所述,DDAH 能通过代谢 ADMA 影响 NOS 活性进而上调体内 NO 的生成,对血管内皮功能起着重要的调节作用。此外,在慢性肾功能不全、肿瘤、糖尿病以及肝脏疾病等的发生发展过程中也涉及 DDAH/ADMA 系统,如在肾功能不全患者,血浆 ADMA 浓度显著提高,透析患者最明显^[29];DDAH1 或 DDAH2 的过量表达会促进肿瘤生长和肿瘤血管的发生^[30];在糖尿病模型大鼠和暴露于高糖环境的内皮细胞,DDAH 活性降低^[23]。同时 DDAH 还参与氧化应激、血管生成和细胞凋亡等多种疾病的病理生理过程。目前研究 DDAH 与疾病、药物治疗之间关系深入到了 DDAH 基因水平,将有助于揭示 DDAH 作用机制,开发调节(上调或下调)DDAH 活性的药物。DDAH 作为新的药物靶点为研究防治心血管疾病提供了新途径。

6 参考文献:

- [1] Jiang DJ, Li YJ. Asymmetric dimethylarginine - a new risk factor for cardiovascular disease and a new target of drug therapy[J]. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 2005, **13**(3):379-382.
- [2] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of N^G , N^G -dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, **148**(2):671-677.
- [3] Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway[J]. *Atheroscler Suppl*, 2003, **4**(4):33-40.
- [4] Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, N^G , N^G -dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney[J]. *J Biol Chem*, 1989, **264**(17):10205-10209.
- [5] Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase[J]. *Nat Struct Biol*, 2001, **8**(8):679-683.
- [6] Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins[J]. *Genomics*, 2000, **68**(1):101-105.
- [7] Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases[J]. *Biochem J*, 1999, **343**(Pt 1):209-214.
- [8] Stone EM, Person MD, Costello NJ, Fast W. Characterization of a transient covalent adduct formed during dimethylarginine dimethylaminohydrolase catalysis[J]. *Biochemistry*, 2005, **44**(18):7069-7078.
- [9] Qin J, Chen YZ, Tu ZG. Study of the enzyme assay of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rabbit kidney[J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, **19**(3):348-351.
- [10] Smith CL, Birdsey GM, Anthony S, Arrigoni FI, Leiper JM, Vallance P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGF expression, and cell phenotype[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **308**(4):984-989.
- [11] Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(21):13527-13532.
- [12] Hasegawa K, Wakino S, Tanaka T, Kimoto M, Tatsumatsu S, Kanda T, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(7):1488-1494.
- [13] Achan V, Tran CT, Arrigoni F, Whitley GS, Leiper JM, Vallance P. All-trans-retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase[J]. *Circ Res*, 2002, **90**(7):764-769.
- [14] Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase[J]. *Circulation*, 1999, **99**(24):3092-3095.

- [15] Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, *et al.* Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Circulation*, 2003, **108**(12):1493–1498.
- [16] Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinckel R, Haredza P, Klepetko W, *et al.* Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension[J]. *FASEB J*, 2005, **19**(9):1175–1177.
- [17] Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM. Metabolism of asymmetric dimethylarginines is regulated in the lung developmentally and with pulmonary hypertension induced by hypobaric hypoxia[J]. *Circulation*, 2003, **107**(8):1195–1201.
- [18] Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, *et al.* Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**(8):1455–1459.
- [19] Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, Wada Y, *et al.* Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension[J]. *Hypertension*, 1997, **29**(1 Pt 2):242–247.
- [20] Jiang JL, Zhu HQ, Chen Z, Xu HY, Li YJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent LDL-induced endothelial dysfunction by reduction of asymmetric dimethylarginine level[J]. *Int J Cardiol*, 2005, **101**(1):153–155.
- [21] Jones LC, Tran CT, Leiper JM, Hingorani AD, Vallance P. Common genetic variation in a basal promoter element alters DDAH2 expression in endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **310**(3):836–843.
- [22] Valkonen VP, Tuomainen TP, Laaksonen R. DDAH gene and cardiovascular risk[J]. *Vasc Med*, 2005, **10**(Suppl 1):S45–S48.
- [23] Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, *et al.* Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase[J]. *Circulation*, 2002, **106**(8):987–992.
- [24] Jiang JL, Li NS, Li YJ, Deng HW. Probucol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, **135**(5):1175–1182.
- [25] Jiang DJ, Hu GY, Jiang JL, Xiang HL, Deng HW, Li YJ. Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, **11**(23):5171–5177.
- [26] Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, Whitley GS. Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine[J]. *Circulation*, 2003, **108**(13):1575–1580.
- [27] Deng S, Deng PY, Jiang JL, Ye F, Yu J, Yang TL, *et al.* Aspirin protected against endothelial damage induced by LDL: role of endogenous NO synthase inhibitors in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2004, **25**(12):1633–1639.
- [28] Wakino S, Hayashi K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Kanda T, *et al.* Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats[J]. *Hypertens Res*, 2005, **28**(3):255–262.
- [29] Fleck C, Schweitzer F, Karge E, Busch M, Stein G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases[J]. *Clin Chim Acta*, 2003, **336**(1–2):1–12.
- [30] Kostourou V, Robinson SP, Cartwright JE, Whitley GS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis[J]. *Br J Cancer*, 2002, **87**(6):673–680.

Dimethylarginine dimethylaminohydrolase and cardiovascular diseases

LI Xiao-Hui, JIANG De-Jian, JIA Su-Jie, LI Yuan-Jian*

(Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) including DDAH1 and DDAH2 subtypes is the specific hydrolase of asymmetric dimethylarginine (ADMA), a major inhibitor of endogenous nitric oxide synthase (NOS). There is a degenerative feedback between the activities of DDAH and NOS, which play a key role in modulation of NO production and vascular endothelial function. Also, DDAH participates the regulation of angiogenesis and cell differentiation. The activity of DDAH is closely correlated with the some car-

diovascular diseases including atherosclerosis. DDAH is likely to be a new responsible protein of cardiovascular diseases and a novel target of drug therapy.

Key words: cardiovascular diseases; dimethylarginine dimethylaminohydrolase; asymmetric dimethylarginine

* Corresponding author.