

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00040

微血管病性心绞痛患者血小板 L-精氨酸-一氧化氮系统改变及静脉 L-精氨酸输入的逆转效应

田海涛¹, 高连如^{2*}, 张宁坤², 王志国², 陈宇², 朱智明², 费宇行², 杨晔², 唐朝枢³

1. 海军总医院干一科, 北京 100037

2. 海军总医院心内科, 北京 100037

3. 北京大学第一临床医院, 北京 100034

[摘要] **目的:** 观察微血管病性心绞痛(MVA)患者血小板左旋精氨酸(L-Arg)转运动力学、一氧化氮合酶(NOS)活性及一氧化氮(NO)产量, 探讨血小板 L-Arg-NO 系统变化在 MVA 发病中的意义, 及静脉输入 L-Arg 对 L-Arg 转运的逆转效应。 **方法:** 15 例 MVA 患者及 15 例健康对照者, 静脉血制备血小板悬液, 用放射性核素标记法测定 ³H-L-Arg 在血小板的转运动力学特征; 测定血小板 NOS 活性及 NO 产物——亚硝酸盐(NO₂⁻)量; 15 例 MVA 患者基础检查后, 给予静脉滴入 L-Arg 20 g/d, 10 d 后重复上述检查。 **结果:** MVA 患者血小板 L-Arg 转运动能明显减低, 最大转运速率(V_{max})较对照组减低 34.4% (P<0.01); L-Arg 转运米氏常数(Km)值增加 21.4% (P<0.05); NO₂⁻ 产量较对照组减少 47.1% (P<0.05), NOS 活性较对照组减低 25.4% (P<0.01)。而应用 L-Arg 可明显逆转上述改变, 与 MVA 组治疗前比较 V_{max} 增加 11.9% (P<0.01), Km 降低 18% (P<0.05), NO₂⁻ 产量明显增加, 是治疗前的 1.33 倍 (P<0.05), NOS 活性增加为治疗前的 1.2 倍 (P<0.05)。L-Arg 静滴后心绞痛发作及心电图明显改善。 **结论:** MVA 患者存在 L-Arg-NO 系统转运及功能障碍, MVA 患者冠脉微血管内皮依赖性舒张功能障碍可能与 L-Arg-NO 系统障碍有关。L-Arg 的补充可逆转 L-Arg-NO 系统障碍, 在 MVA 治疗上有重要作用。

[关键词] 微血管病性心绞痛; L-Arg-NO 转运系统; 一氧化氮合酶; L-精氨酸**[中图分类号]** R 541.42**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0040-04

Changes of L-arginine-NO pathway in platelets of microvascular angina patients and reversing effects of intravenous L-arginine infusion on L-Arg-NO transport

TIAN Hai-tao¹, GAO Lian-ru^{2*}, ZHANG Ning-kun², WANG Zhi-guo², CHEN Yu², ZHU Zhi-ming², FEI Yu-xing², YANG Ye², TANG Chao-shu³

1. No. 1 Department of Cadres, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

2. Department of Cardiology, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100037

3. The First Clinical Hospital, Beijing University, Beijing 100034

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the L-Arg(L-arginine) transport, the nitric oxide (NO) production, and NO synthase (NOS) activity in platelets, investigate the significance of the L-Arg-NO system in the pathogenesis of microvascular angina (MVA), and to study the reversing effects of intravenous L-Arg infusion on L-Arg transport. **Methods:** The ³H-L-Arg transport, NO production, and NOS activity in platelets were examined in 15 patients with MVA and 15 healthy controls. The 15 patients were given intravenous L-Arg infusion (20 g/d) after basic physical examination and were examined again 10 days later. **Results:** The L-Arg transport in platelets of MVA patients was obviously lower than that in the normal group; the maximum transport velocity (V_{max}) decreased by 34.4% compared with the normal group (P<0.01); and the Michaelis constant (Km) increased by 21.4% (P<0.05). The production of NO₂⁻ and the activity of NOS in platelets were decreased by 47.1% (P<0.05) and 25.4% (P<0.05) compared with the normal group, respectively. Intravenous L-Arg infusion reversed the above changes in MVA patients; it increased the V_{max} by 11.9% (P<0.01) and decreased Km by 18% (P<0.05); it also increased production of NO₂⁻ by 1.33 folds (P<0.05) and NOS activity by 1.2 folds (P<0.05). Especially, the attack of angina and patient ECG were greatly improved after intravenous L-Arg infusion. **Conclusion:** L-Arg-NO pathway is impaired in MVA

[收稿日期] 2008-04-30**[接受日期]** 2008-11-20**[作者简介]** 田海涛, 硕士, 主治医师, E-mail: tianhaitao1973@sina.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 010-66958111, E-mail: lianrugao@yahoo.com.cn

patients, which might be responsible for the endothelium-dependent vascular relaxation in MVA patients. Intravenous L-Arg infusion may benefit the impaired function of L-Arg-NO transport in patients with MVA.

[KEY WORDS] microvascular angina; L-Arg-NO pathway; nitric oxide synthase; L-arginine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1): 40-43]

目前临床上具有典型心绞痛的患者中 10%~30% 冠状动脉造影完全正常, 这种症候群通常被称为微血管病性心绞痛 (microvascular angina, MVA), 其发病机制不甚清楚, 可能与内皮依赖性舒张功能障碍有关^[1-2]。然而, 血管内皮功能障碍如何导致冠脉微血管舒张功能不良的机制仍然不清楚。

我们已往的工作^[3]证明, 内皮衍生的舒张因子 (EDRF/NO) 在体内血管舒缩功能的调控中起到了关键的作用。除血管内皮细胞外, 血管平滑肌细胞、血小板、红细胞等都能产生 NO, 共同维持及参与调控冠脉血管内皮依赖的舒张功能。血小板内含有一氧化氮合酶 (NOS), 能利用左旋精氨酸 (L-Arg) 合成 NO, NO 不仅参与了血管张力的调控, 而且可直接影响血小板功能, 血小板既是 NO 生成部位, 也是 NO 作用靶点^[4-6]。近期研究^[7]发现, 循环血细胞 L-Arg-NOS-NO 系统功能与机体内皮细胞 L-Arg-NOS-NO 系统功能呈现一致变化, 具有同等的病理生理学意义, 血小板 L-Arg-NOS-NO 系统功能变化可较准确反映内皮功能。然而, 在 MVA 患者血小板的 L-Arg-NO 系统改变及其病理生理学意义, 目前仍不清楚。本研究试图通过测定 MVA 患者血小板 L-Arg 转运动力学, 血小板 NO 含量及 NOS 活性, 探讨 MVA 患者血小板 L-Arg-NO 系统变化, 及在 MVA 发病学上的意义。进而, 静脉输入 NO 合成前体 L-Arg, 观察其对受损的 L-Arg-NO 系统功能的逆转效应, 探讨 L-Arg 在 MVA 治疗上的作用与意义。

1 资料和方法

1.1 试剂 1-[2, 3-³H]L-Arg (比活性为 2.29 TBq/mmol) 购自法国 NEN/Dupont 公司。ADP、L-Arg、L-瓜氨酸、NADPH (还原型辅酶 II)、钙调蛋白、抑肽酶 A、亮抑蛋白酶肽、Dowex AG50W-X8 (离子交换剂) 均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 病例选择及分组 MVA 组诊断标准: (1) 典型心绞痛症状; (2) 心电图运动试验阳性: ST 段缺血型下降 ≥ 0.1 mV, 持续 0.08 s 以上; ST 段呈上坡型下降, 其 J 点下降 > 0.2 mV, 持续 2 min; (3)

冠状动脉造影正常; 对入选的具典型心绞痛症状、运动试验阳性部分伴心肌核素显像动态缺血改变者, 均行常规冠状动脉造影术, 经严格多角度投照, 充分完全展示冠脉形态, 不遗漏病变, 以冠脉影像显示完全正常入选本组。未进行冠状动脉储备功能测定。符合以上标准, 男 7 例, 女 8 例, 平均年龄 (62.9 \pm 7.6) 岁。伴高血压 11 例, 糖尿病 2 例, 高脂血症 4 例, 吸烟 4 例。均具有典型心绞痛症状, 按照加拿大心绞痛分级全部为 III 级。均经院内外积极内科抗凝、抗血小板、抗缺血及调脂治疗, 而症状未能控制。平均左室射血分数 (62.8 \pm 2.3) %。L-Arg 治疗: L-Arg 20 g 加入 5% 葡萄糖 250 ml 静滴, 1 次/d \times 10 d。伴糖尿病者应用生理盐水替代 5% 葡萄糖。

正常对照组: 经全面体检除外心、脑、肾及内分泌等疾病的健康人 15 例, 其中男 8 例, 女 7 例, 平均年龄 (62.1 \pm 2.8) 岁。

1.3 测定方法

1.3.1 血小板 L-Arg 转运的测定^[8] 晨起肘正中静脉抽血 4.5 ml, 加入 3.8% 枸橼酸钠 0.5 ml 抗凝, 离心制备富血小板血浆 (120 \times g, 15 min), 取上清用 Hepes 液调整血小板数为 5×10^7 /L, 此为血小板悬液。取血小板悬液 50 μ l 分别加入不同浓度的 ³H-L-Arg (5、10、20、40、80、100、200 μ mol/L) 孵育 1 min, 加入终止液 100 μ l (甲醛 270 mmol/L, EGTA 16 mmol/L, NaCl 150 mmol/L), 经 0.45 μ m 孔径微孔滤膜抽滤, 用 Hepes 液 4 ml 冲洗 3 次, 滤膜吹干加入闪烁液, 用液闪仪测 ³H-L-Arg 放射活性, 同时设立不加样本的非特异平行对照管, L-Arg 的血小板转运为总摄入量与非特异结合之差。以 pmol/5 \times 10⁷ 血小板表示。

1.3.2 血小板 NOS 活性测定^[9] 取血小板悬液 150 μ l 加入孵育液 (Tri-HCl 50 mmol/L, NADPH 0.1 mmol/L, CaCl₂ 2 mmol/L, L-Arg 0.05 mmol/L, 钙调蛋白 0.000 019 mmol/L) 100 μ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 20 min, 用 0.2 ml 预冷的终止液 NaAc 20 mmol/L (pH 5.5) 终止反应, 放置 10 min, 经 Dowex AG50-X8Z (Na⁺ 型) 的阳离子交换层析柱, 离心取上清 0.2 ml 加入闪烁液, 液闪测样本放射活性。

1.3.3 血小板 NO 水平测定^[10] 血小板悬液 200 μl 加 *L*-Arg(0.4 mmol/L)5 μl , 加白蛋白(10 mg/L) 5 μl , 孵育(37 $^{\circ}\text{C}$, O_2) 1 h。离心 500 $\times g \times 8$ min, 取一定量 100 μl 上清液待测。将 100 $\mu\text{mol/L}$ 亚硝酸钠依次倍比稀释成 10、5、2.5、1.25、0.625、0 $\mu\text{mol/L}$ 。在酶标板中各孔依次加入亚硝酸钠稀释液各浓度、样品孵育液 100 μl , 再于各孔加入 Greiss 试剂 100 μl , 混匀后, 室温放置 10 min, 以酶标仪于 550 nm 波长读各管 *D* 值, 以亚硝酸钠稀释液浓度及 *D* 值作标准曲线, 求各测定管 NO_2^- 含量, 代表 NO 产量。

1.4 统计学处理 实验数据经 SPSS 统计软件处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组资料用非配对 *t* 检验, 同组治疗前后应用配对 *t* 检验。

2 结果

MVA 组患者经静脉滴注 *L*-Arg 后心绞痛症状明显改善, 心绞痛分级改善 14 例, 占 93.3%; 心电图运动试验改善 8 例, 占 53.3%。

2.1 MVA 患者血小板 *L*-Arg 转运变化及 *L*-Arg 效应 MVA 患者及对照组 *L*-Arg 转运变化见表 1, 血小板对 $^3\text{H-L-Arg}$ 转运呈高亲和载体转运方式, 在不同浓度点 MVA 患者的转运率均低于对照组, MVA 患者血小板 *L*-Arg 最大转运速率 (V_{max}) 较对照组降低 34.4% ($P < 0.01$), 米氏常数 (K_m) 值增加 21.4% ($P < 0.05$)。而应用 *L*-Arg 可明显逆转上述改变, 与 MVA 组比较 V_{max} 增加 11.9% ($P < 0.01$), K_m 降低 18% ($P < 0.05$)。

表 1 *L*-Arg 治疗前后血小板各项指标的变化

Tab 1 Changes of patient parameters before and after *L*-Arg treatment

(Platelet count 5×10^7 ; $n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

Group	V_{max} ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO_2^- (pmol)	NOS activity ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$)
Control	24.4 \pm 8.4	13.9 \pm 2.6	29.74 \pm 4.8	23.83 \pm 9.2
MVA				
Before treatment	18.2 \pm 5.5**	17.7 \pm 1.1*	19.2 \pm 2.6**	19.0 \pm 8.4*
After treatment	20.6 \pm 4.9 $\Delta\Delta$	15.0 \pm 4.2 Δ	25.7 \pm 3.8 $\Delta\Delta$	22.8 \pm 8.0 Δ

V_{max} : Maximum transport velocity; K_m : Michaelis constant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs before treatment

2.2 MVA 患者血小板 NO 产量、NOS 活性及 *L*-Arg 的逆转效应 如表 1 所示, MVA 组患者 NO 产量 (NO_2^-) 较对照组减少 47.1% ($P < 0.01$), NOS 活性较对照组减少 25.4% ($P < 0.01$); 而应用 *L*-Arg 后 NO_2^- 明显增加, 是 MVA 组 1.33 倍 ($P < 0.05$), NOS 活性增加为治疗前的 1.2 倍 ($P < 0.05$)。

3 讨论

目前, 随着冠脉造影技术的普及, 世界每年数百万人行冠脉造影, 即使有典型心绞痛或平静或运动心电图异常者, 其冠脉造影结果仍有 10%~30% 是正常的, 甚至在许多大医院诊断为不稳定心绞痛者有 11% 冠脉造影结果为正常。因而, 这是一组常见的症候群, 其名称与定义仍不确切, 称之为“心脏 X 综合征”、“微血性心绞痛”、“冠脉正常心绞痛”等, 其发病机制仍然不清楚^[1-2]。

NO 是生物体内具有多重功能的信息分子和效应分子, 是调控心血管系统功能的关键信号分子。

NO 参与许多心血管疾病的病理生理过程, 这一发现使人们从一个全新的视角看待心血管疾病发病机制, 寻求新的治疗靶点^[11]。

NO 是以 *L*-Arg 为底物, 在 NOS 催化下生成的一种参与多种生物功能调节的信号分子, 具有抑制血小板聚集、抑制平滑肌细胞增生、调节血管张力、尤其在维持和调节冠脉微血管的舒缩及灌注中起到关键作用^[3-6, 12]。血小板具有独立的 *L*-Arg-NOS-NO 系统, 在血小板外 *L*-Arg 通过高亲和性非 Na^+ 依赖性 Y^+ 蛋白氨基酸载体转运到细胞内, 与分子氧在血小板内 NOS 作用下生成 NO。 *L*-Arg 和 NOS 是 NO 生物合成的关键限速步骤。本研究试图探讨是否血小板 *L*-Arg-NOS-NO 系统参与了冠状动脉的舒张功能不良的发生与发展, 结果观察到 MVA 患者血小板 NO 产生量较正常人减低 47.1%, NOS 活性亦较正常对照组减低 25.4%, 血小板 *L*-Arg 转运功能较正常对照明显降低。表明 MVA 患者存在 *L*-Arg-NOS-NO 系统功能受损, 反映了血小板 *L*-

Arg 转运功能不良, NOS 活性减低, 及 NO 产量不足等 L-Arg-NO 系统功能障碍。正是由于 NO 介导的冠状动脉舒张功能障碍, 导致了心肌缺血, 心绞痛发作。这可较充分地解释在冠状动脉无解剖狭窄情况心肌缺血产生的机制。

本研究进而探讨了是否补充 NO 合成前体 L-Arg 可以逆转或改善受损的血小板 L-Arg-NO 系统功能。本组 15 例 MVA 患者经检测证实存在 L-Arg-NO 系统功能缺陷后, 经静脉每日给予补充 L-Arg 20 g (0.125 g/min), 10 d 后发现血小板 NOS 活性、L-Arg 转运功能与正常人已无差异, NO 产量明显增加。尤其是伴随实验数据改善, 患者临床状况也明显改善, 心绞痛分级 93.3% 得以改善, 心电图运动试验改善率达 53.3%。更有意义的是本组患者均已抗缺血治疗(如硝酸酯、 β -受体阻断剂、及部分 Ca^{2+} 拮抗剂)10 d 以上, 心绞痛仍未改善, 而应用 L-Arg 后症状明显改善, 提示补充 L-Arg 可能通过逆转 MVA 患者 L-Arg-NOS-NO 系统功能, 增加 NO 产量, 使冠脉微血管内皮依赖的舒张功能改善, 从而使 MVA 患者心绞痛症状及心肌缺血得以改善。

Piatti 等^[13] 给予 9 例有典型心绞痛、心电图 ST 压低 ≥ 1 mm、冠脉造影正常的 MVA 患者, 完全随机经静脉输入 L-Arg (0.125 g/min) 或生理盐水, 在输入 60 min 时重复检测患者前臂血流、血浆 NO_x 、cGMP、内皮素 1 水平时发现, 与生理盐水静注相比, L-Arg 静滴者内皮素水平减低 29.8%, NO_x 增加 8% ($P < 0.05$), cGMP 增加 63% ($P < 0.01$), 前臂血流增加 25%, 而生理盐水输入无此改变, 提示 L-Arg 增加了 NO 产量, 改善了血管内皮功能。Pallosi 等^[14] 给予 13 例有典型心绞痛、心电图运动试验阳性、冠脉造影正常, 同时有高血压的 MVA 患者口服 L-Arg 2 g, 3 次/d, 共 4 周, 结果显示: 心绞痛明显改善(心绞痛分级改善), 生活质量提高, 前臂血流增加, 血浆 L-Arg、L-Arg 与不对称甲基精氨酸 (ADMA) 比值及血浆 cGMP 水平等明显增加, 再次证明 L-Arg 在 MVA 治疗上的重要作用。

血小板的 L-Arg-NOS-NO 系统作为一个窗口, 可反映整个机体 NO 生成的变化。本工作发现 MVA 患者存在血小板 L-Arg-NOS-NO 系统障碍, 提示 MVA 患者的冠脉微血管内皮依赖性舒张功能不良可能与机体血小板 L-Arg 转运障碍、NOS 活性减低、NO 产量减少密切相关。NO 合成前体 L-Arg

的补充可逆转 L-Arg-NO 系统障碍, 可作为 MVA 治疗的新靶点。

[参考文献]

- [1] Kaski J C. Pathophysiology and management of patients with chest pain and normal coronary arteriograms (cardiac syndrome X)[J]. *Circulation*, 2004, 109:568-572.
- [2] Hurst T, Olson T H, Olson L E. Cardiac syndrome X and endothelial dysfunction; new concepts in prognosis and treatment [J]. *Am J Med*, 2006, 119:560-566.
- [3] 高连如, 刘国仗, 赵云涛. 内皮衍生舒张因子合成前体降压机制的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 1996, 24:245-249.
- [4] Warren J B, Pons F, Brady A J. Nitric oxide biology; implications for cardiovascular therapeutics[J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28:25-30.
- [5] Chiang T M, Woo-Rasberr V, Cole F. Role of platelet endothelial form of nitric oxide synthase in collagen-platelet interaction; regulation by phosphorylation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1592:169-174.
- [6] Moncada S, Palmer R M, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology[J]. *Pharmacol Rev*, 1991, 43:109-142.
- [7] 张宝妮, 汪波, 姚兴海, 张永刚, 曹军, 张钧华, 等. 动脉粥样硬化家兔主动脉壁与红细胞 L-精氨酸/一氧化氮系统变化[J]. *中华心血管病杂志*, 2002, 30:302-304.
- [8] Kim Y K, Suarez J, Hu Y, McDonough P M, Boer C, Dix D J, et al. Deletion of the inducible 70-kDa heat shock protein genes in mice impairs cardiac contractile function and calcium handling associated with hypertrophy[J]. *Circulation*, 2006, 113:2589-2597.
- [9] Martina V, Masha A, Gigliardi V R, Brocato L, Manzato E, Berchio A, et al. Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2008, 2:110-118.
- [10] Bryan N S, Calyert J W, Elrod J W, Gundewar S, Ji S Y, Lefer D J. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:19144-19149.
- [11] Sorello R. Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries[J]. *Circulation*, 1998, 98:2365-2366.
- [12] Schulz R, Rassaf T, Massion P B, Kelm M, Balligand J L. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis[J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 108:225-256.
- [13] Piatti P M, Fragasso G, Monti L D, Setola E, Lucotti P, Fermo I, et al. Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms[J]. *Circulation*, 2003, 107:429-436.
- [14] Pallosi A, Fragasso G, Piatti P, Monti L D, Setola E, Valsecchi G, et al. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries [J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93:933-935.