

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.20.001

冠心病介入术患者血管内皮依赖性舒张功能与血小板 L-精氨酸/一氧化氮通路的关系*

问慧娟¹, 李亚芹², 崔玉英^{1△}, 李玉巧¹

(1. 河北大学基础医学院生理系, 河北保定 071000; 2. 河北大学附属医院心内科, 河北保定 071000)

摘要:目的 探讨冠心病患者经皮冠状动脉介入治疗(PCI)手术前、后血小板 L-精氨酸(L-Arg)/一氧化氮合成酶(NOS)/一氧化氮(NO)通路和血管内皮依赖性舒张功能(FMD)的变化和关系。方法 对照组 17 例, 为健康体检者; PCI 组 20 例, 为接受 PCI 成功的冠心病患者。分别于对照组体检当天及 PCI 组术前、术后即刻、术后 24 h 和术后 72 h, 检测肱动脉 FMD、血小板孵育液亚硝酸盐(NO_2^-)水平、NOS 活性及 L-Arg 转运量, 分析 FMD 与血小板 NO、NOS 和 L-Arg 转运量间的关系。结果 PCI 组术前 FMD 和血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性、L-Arg 转运量较对照组显著降低($P < 0.01$); 术后即刻进一步下降($P < 0.01$), 术后 24 h 逐渐恢复, 术后 72 h FMD、 NO_2^- 、NOS、L-Arg 转运均恢复到术前水平($P > 0.05$); PCI 手术前、后 FMD 与血小板 NO_2^- 、NOS、L-Arg 转运改变均呈显著正相关($P < 0.01$)。结论 检测血小板 L-Arg/NO 通路可反映 PCI 血管内皮功能的改变。

关键词:一氧化氮; 经皮冠状动脉介入术; 内皮依赖性舒血管功能; 一氧化氮合酶; L-精氨酸转运

中图分类号: R543.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)20-2545-03

The relation between endothelium-dependent vasodilator function and platelet L-arginine/nitric oxide pathway in patients with percutaneous coronary intervention*

Wen Huijuan¹, Li Yaqin², Cui Yuying^{1△}, Li Yuqiao¹

(1. Department of Physiology, College of Basic Medical, Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China;

2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To investigate alteration and cross link of the vascular endothelium dependent diastolic function(FMD) and platelet endogenous L-arginine/NOS/NO pathway before and after percutaneous coronary intervention(PCI). **Methods** The study included two groups; normal control group(17 cases) and PCI group(20 cases). FMD of brachial artery and NO production, NOS activity, L-arginine transport in platelets were examined respectively before, immediately, 24 h and 72 h after PCI and the relationships between them would subsequently be analysed. **Results** The preoperative FMD, content of NO_2^- , NOS activity and L-arginine of PCI group significantly decreased than the normal control group($P < 0.01$), and further decreased in the immediate post-operative($P < 0.01$). Gradually recovered 24 h after surgery, 72 h after surgery, the FMD, NO_2^- , L-arginine transport, NOS activity restored to the preoperative level($P > 0.05$). The analysis showed the obvious positive correlation between FMD and content of NO_2^- or NOS activity, or L-arginine transport of platelet, respectively($P < 0.01$). **Conclusion** The pathway of platelet L-arginine/NOS/NO was significantly positively correlated with FMD and the detection of platelet L-arginine/NOS/NO can reflect the changes of vascular endothelial function with PCI.

Key words: nitric oxide; percutaneous coronary intervention; vascular endothelium dependent diastolic function; nitric oxide synthase; L-arginine transport

血管内皮功能障碍是冠心病、脑血栓等心脑血管疾病发生、发展的重要环节^[1-2]。经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是冠心病血运重建的有效方法,但球囊和支架对局部血管内皮有一定损伤,是 PCI 术后血栓事件及再狭窄的原因之一^[3-4]。目前临床对内皮功能诊断多采用超声检测外周血管内皮依赖性舒张功能(flow mediated diameter, FMD),间接反映内皮一氧化氮(nitric oxide, NO)释放,进而评价内皮功能,虽然方便易行但精确度差^[5],而剥取患者血管内皮直接检测 NO 生成量又不现实。因此,寻找内皮功

能障碍早期诊治的有效方法是心血管疾病的防治关键。

血小板存在与血管内皮相似的 L-精氨酸(L-Arg)/一氧化氮合酶(NOS)/NO 通路,二者均受到血液理化因素的影响,具有取材简便易行的优势。作者前期在水浸-束缚应激和感染性休克大鼠模型上显示,血小板与血管内皮 L-Arg/NOS/NO 通路的改变呈显著正相关^[6-7]。有报道冠心病 PCI 患者血小板 L-Arg/NOS/NO 通路下调^[8],但冠心病 PCI 患者病程中血小板 L-Arg/NOS/NO 通路与内皮功能改变间的相互关系尚未完全清楚。本研究在冠心病 PCI 手术前、后测定 FMD 和血小

* 基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(11276103D-7);河北省卫生厅重点科技研究计划项目(20100141);河北大学医学学科专项资金建设项目(2013A2001)。作者简介:问慧娟(1968—),讲师,本科,主要从事心脑血管疾病研究。△ 通讯作者, E-mail: yuyingcui@sina.com。

表 1 两组对象 FMD 和血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性和 $L\text{-Arg}$ 转运量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FMD(%)	NO_2^- (nmol·10 ⁸ pt ⁻¹)	NOS(U·10 ⁸ pt ⁻¹ ·min ⁻¹)	$L\text{-Arg}$ 转运(pmol·10 ⁸ pt ⁻¹ ·min ⁻¹)
对照组	17	10.14±3.11	0.68±0.13	8.53±1.18	7.78±1.08
PCI 组术前	20	6.47±1.18*	0.41±0.13*	5.87±1.15*	5.51±0.87*
PCI 组术后即刻	20	4.51±1.06 Δ	0.26±0.09 Δ	4.19±1.21 Δ	4.02±0.83 Δ
PCI 组术后 24 h	20	5.48±1.38 $\#$	0.33±0.12 $\#$	5.01±0.95 $\#$	4.74±0.95 $\#$
PCI 组术后 72 h	20	6.55±0.85	0.47±0.08	5.91±1.13	5.88±1.13

*: $P<0.01$, 与对照组比较; Δ : $P<0.01$, #: $P<0.05$, 与 PCI 组术前比较。

板 NO 水平、NOS 活性、 $L\text{-Arg}$ 转运量, 探讨血小板 $L\text{-Arg}$ /NOS/NO 通路与 FMD 变化的相互关系, 为冠心病患者血管内皮功能障碍的早期诊治、了解疾病的转归提供一个新思路 and 实验方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对照组: 为健康体检者 17 例, 其中男 10 例, 女 7 例, 平均年龄(52.8±9.2)岁, 其血压、血脂、血糖、肝肾功能、X 线胸片、心电图等检查均正常。体检当天采集空腹肘静脉血标本 4 mL(EDTA 抗凝), 测定血小板 NO 水平, NOS 活性和 $L\text{-Arg}$ 跨膜转运, 采血后测定血流介导的 FMD。PCI 组: 接受 PCI 成功的冠心病患者 20 例, 按照 WHO 关于缺血性心脏病的命名和诊断标准, 其中急性心肌梗死(AMI)14 例, 不稳定心绞痛(UAP)6 例; 男 15 例, 女 5 例, 平均年龄(56.1±8.5)岁; 单支血管病变 11 例, 多支血管病变 9 例; 排除严重心力衰竭、急、慢性感染、严重肝肾疾病、严重凝血机制异常、甲状腺功能异常、自身免疫性及炎症性疾病、恶性肿瘤、手术创伤等。PCI 均采用经桡动脉途径行冠状动脉血运重建, 植入支架为雷帕霉素涂层支架。术前给予负荷量氯比格雷 300 mg 和阿司匹林 300 mg, 术后若无禁忌证继续口服上述药物外, 即刻取血及测定 FMD 后开始静脉滴注硝酸甘油和肝素钠及常规服用他汀类药物、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、 β 受体阻滞剂。PCI 组在负荷剂量抗血小板治疗后分别于 PCI 术前、术后即刻、术后 24 h 和术后 72 h 检测 FMD, 同时肘静脉取血, 测定血小板 NO 水平、NOS 活性和 $L\text{-Arg}$ 跨膜转运, 观察 PCI 患者 FMD 改变与血小板 $L\text{-Arg}$ /NOS/NO 通路间的关系。

1.2 方法

1.2.1 血流介导的 FMD 测定 参考文献[9]方法, 患者休息 10 min, 取平卧位, 右上肢外展 15°, 肘上 2~5 cm 的肱动脉为靶动脉, 采用高分辨率彩色多普勒超声仪测量静息时肱动脉舒张期末内径(D_0), 再将袖带放置在右前臂(被测血管远端)充气加压至 250 mm Hg, 维持 4~5 min, 随后放气, 按上述方法测量放气后 45~60 s 时肱动脉舒张期末内径(D_1)。超声探头处于固定位置, 每次均取同一部位。上述每个指标均连续测量 3 个心动周期, 取其平均值。血流介导的 FMD 以相对于基础内径变化的百分率表示, $\text{FMD}=(D_1-D_0)/D_0\times 100\%$ 。

1.2.2 血小板的制备 肘静脉取血 4 mL(EDTA 抗凝), 800 r/min 离心 10 min(全部离心都在 4 °C 进行), 上清液为富血小板血浆(PRP)。参照文献[6]的方法制备血小板混悬液, 调整血小板数为 1×10^8 pt/mL。

1.2.3 血小板亚硝酸盐(NO_2^-)测定[6-7] 血小板孵育液

NO_2^- 水平可以反映血小板 NO 释放水平。取 1×10^8 pt/mL 的血小板混悬液 1 mL, 分别加入 100 $\mu\text{mol/L}$ $L\text{-Arg}$, 在 95% O_2 、5% CO_2 和 37 °C 恒温条件下持续振荡孵育 2 h 后, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 100 μL , 加入等体积 Greiss 试剂[1% (质量分数)对氨基苯磺胺及 0.1% (质量分数)N-(1-萘基)-乙二胺等体积混合], 室温放置 10 min, 540 nm 波长下测光密度值, 以亚硝酸钠做出标准曲线, 计算样品中的 NO_2^- 水平。

1.2.4 血小板 NOS 活性测定[6-7] 取 1×10^8 pt/mL 的血小板悬液 1 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入酶提取液(0.1 mmol/L EGTA, 1.0 mmol/L DTT, 2 $\mu\text{mol/L}$ PMSF, 1 $\mu\text{mol/L}$ 抑肽酶, 50 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4), 并超声 30 s, 利用化学显色法, 按照南京建成公司 NOS 试剂盒说明书测定。

1.2.5 血小板 $L\text{-Arg}$ 转运测定 取 1×10^8 pt/mL 的血小板悬液 1 mL, 参照文献[6]的同位素示踪技术, 检测 $^3\text{H}\text{-L-Arg}$ 放射活性。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad prism 软件进行统计学分析, 计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组资料采用 t 检验, 多组样本采用 One-way ANOVA 分析, 组间 Newman-Student-Keuls 检验; Person 直线回归作相关性分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组对象 FMD 和血小板 NO、NOS 和 $L\text{-Arg}$ 转运比较 PCI 组术前 FMD 和血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性、 $L\text{-Arg}$ 转运量较对照组显著降低($P<0.01$); 术后即刻进一步下降($P<0.01$), 术后 24 h 逐渐恢复, 术后 72 h FMD、 NO_2^- 、NOS、 $L\text{-Arg}$ 转运均恢复到术前水平($P>0.05$), 见表 1。

2.2 PCI 组血小板 $L\text{-Arg}$ /NOS/NO 通路与 FMD 的关系 PCI 组患者在术前、术后即刻、术后 24 h 和术后 72 h 的 FMD 改变与相同时间点的血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性和 $L\text{-Arg}$ 转运量的改变呈显著正相关, 相关系数分别为 $r=0.77$ 、 0.74 、 0.75 ($P<0.01$)。

3 讨论

NO 是调控心血管系统功能的关键信号分子, 具有舒张血管平滑肌、抑制平滑肌细胞增殖及抑制血小板黏附聚集等生物学作用, NO 合成障碍参与高血压、冠心病等心血管疾病的病理、生理过程[1]。NO 的生成是以 $L\text{-Arg}$ 为底物, 由 NOS 催化产生, 而细胞内的 $L\text{-Arg}$ 依赖于细胞质膜上阳离子氨基酸转运体转运, 从而构成 $L\text{-Arg}$ /NOS/NO 通路, 其中 NOS 的活性和 $L\text{-Arg}$ 转运是 NO 产生的限速步骤[7]。

本研究结果显示, 冠心病患者较健康人 FMD 降低, 同时

血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性和 *L*-Arg 转运量均减少;PCI 患者术前、术后即刻、术后 24 h 和术后 72 h FMD 的改变与血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性和 *L*-Arg 转运量的改变呈显著正相关,表明 PCI 患者病程中血小板 *L*-Arg/NO 通路与血管内皮功能的改变密切相关。其原因可能是血小板和内皮细胞存在相似的 *L*-Arg/NOS/NO 通路,其精氨酸转运体均为 y^+ 和 y^{+L} 型(在血管内皮细胞以 y^+ 为主,而血小板以 y^{+L} 型为主);生理条件下 NOS 均为内皮型 NOS(eNOS),当受到炎症因子刺激可表达诱导型 NOS(iNOS)^[7,10]。由于血小板与血管内皮共处血液环境中,均受到 PCI 内外环境变化的影响,因而血小板和内皮细胞 *L*-Arg/NO 通路呈现相似的改变,提示血小板 *L*-Arg/NO 通路可能间接反映 PCI 内皮功能的改变。在本研究中 PCI 组术前可能由于药物和精神紧张等因素的影响,与健康人的差异需进一步研究。

冠心病 PCI 术后内皮损伤和血小板活化在术后局部血栓形成和冠状动脉再狭窄中起重要作用^[11]。本研究 PCI 术后即刻血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性、*L*-Arg 转运量和 FMD 均降低,与文献报道相符^[4,11]。其原因可能是手术导管、球囊及支架等造成局部血管内皮损伤,而手术、应激刺激及缺血缺氧引起血管紧张素 II、儿茶酚胺激素、活性氧的明显升高,通过多途径降低 *L*-Arg 的跨膜转运和 NOS 活性而减少 NO 生成^[7,12-14],因而亦可提示内皮功能受损和 NO 减少,对血小板黏附聚集的抑制作用减弱是 PCI 术后血小板活化及血栓形成的重要原因之一,保护 *L*-Arg/NO 通路可能减少局部血栓形成和血管再狭窄等并发症的发生。

另外,张宝妮等^[8]报道术后 6 d 血小板 *L*-Arg/NOS/NO 通路活性仍低于术前,而本研究发现血小板 NO_2^- 水平、NOS 活性、*L*-Arg 转运量及 FMD 在 PCI 术后 24 h 逐渐恢复,72 h 与术前差异无统计学意义($P > 0.05$)。原因可能是采用经桡动脉入路途径的冠状动脉介入治疗较过去传统的股动脉入路途径的介入治疗对血管的创伤小,范围相对局限^[15];而新型药物涂层支架的应用和技术水平的提高以及器材的发展完善使手术操作及球囊、支架对血管内皮的损伤明显减轻;另外,随着术后心脏血运重建使心肌及全身组织供血供氧明显改善,相关损伤因素逐渐减弱,使全身血管内皮和血小板功能明显恢复,因而术后内皮功能的修复时间缩短。

总之,血小板和血管内皮存在相似的 *L*-Arg/NOS/NO 通路,均受到血液理化性质改变的影响。本研究显示,冠心病 PCI 患者 FMD 与血小板 *L*-Arg/NOS/NO 通路呈显著正相关,提示通过检测冠心病患者血小板 *L*-Arg/NOS/NO 通路,能间接反映 FMD,进而反映血管内皮功能的改变。而血小板孵育液 NO_2^- 测定又具有简便易行、易取材,以及对患者无损伤的优势,因而对于指导临床工作具有一定意义。由于本文例数偏少,进一步研究十分必要。

参考文献:

[1] Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, et al. Endothelial

dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update[J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(9): 920-932.

- [2] Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors[J]. Biomark Med, 2010, 4(3): 351-360.
- [3] Hamasaki S, Tei C. Effect of coronary endothelial function on outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. J Cardiol, 2011, 57(3): 231-238.
- [4] 杨雨峰, 吕吉元, 贾永平. 经皮冠状动脉介入治疗对急性冠状动脉综合征患者内皮功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(4): 487-490.
- [5] 孙妍, 王国干. 血管内皮功能的预测价值及其临床意义[J]. 中国综合临床, 2005, 21(1): 93-94.
- [6] 崔玉英, 唐朝枢, 耿彬, 等. 感染性休克下调大鼠血管内皮和血小板 *L*-精氨酸/一氧化氮通路[J]. 中国病理生理学杂志, 2008, 24(3): 470-475.
- [7] 崔玉英, 唐朝枢, 耿彬. 束缚应激大鼠血小板及血管内膜的 *L*-精氨酸/一氧化氮合酶/一氧化氮通路下调[J]. 北京大学学报: 医学版, 2006, 38(3): 231-235.
- [8] 张宝妮, 苏家林, 李夏, 等. 经皮冠状动脉腔内支架植入术后血小板 *L*-精氨酸/一氧化氮途径的变化[J]. 中国介入心脏病学杂志, 1997, 5(4): 145-147.
- [9] Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, et al. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease[J]. Circulation, 1997, 96(10): 3378-3383.
- [10] Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation[J]. Circ Res, 2007, 101(7): 654-662.
- [11] 陈章强, 洪浪, 王洪, 等. 急性冠状动脉综合征患者介入术前后血小板活化及血管内皮功能的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(5): 381-384.
- [12] Higashi Y. Mechanisms of impairment of endothelial cell[J]. Nihon Rinsho, 2012, 70(9): 1519-1523.
- [13] Bendall JK, Damy T, Ratajczak P, et al. Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase - derived nitric oxide in β -adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction - induced heart failure in rats[J]. Circulation, 2004, 110(16): 2368-2375.
- [14] Frstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function[J]. Eur Heart J, 2012, 33(7): 829-837.
- [15] 李晓光, 杨宁, 潘杰, 等. 经桡动脉途径在血管内介入诊疗中的应用[J]. 实用放射学杂志, 2006, 22(1): 78-79.

(收稿日期: 2014-02-11 修回日期: 2014-03-15)