

L-精氨酸与硝基酯类扩血管药

杨和平

胡隆梅^①

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

摘要 在一氧化氮合成酶的催化下, L-精氨酸胍基末端的氮原子与氧反应而生成一氧化氮, 来源于 L-精氨酸的一氧化氮对高脂血症、动脉粥样硬化、高血压、糖尿病和肾病有广泛的生物学效应。硝基酯类扩血管药的机理也与一氧化氮有关, 但可出现耐药性。本文比较了 L-精氨酸和硝基酯类扩血管药的作用机理。

关键词 L-精氨酸; 硝基酯类; 扩血管药

内皮源性一氧化氮(nitric oxide, NO)由 L-精氨酸代谢生成于血管内皮细胞^[1]。尽管普遍认为 NO 的生成是酶促反应, 至今尚未有肯定的特异酶类被发现。部分学者认为 NO 由 L-精氨酸在内皮细胞胞浆经谷胱甘肽-S-转氨酶催化生成。另有人认为 NO 由 L-精氨酸在内皮细胞微粒体生成, Ca²⁺、细胞色素-P450 系统和巯基类化合物参与其代谢过程^[2]。Michel 等^[3]认为, NO 合成酶具有多种异构体形式, 其催化 NO 生成的作用环节为 L-精氨酸的最终代谢产物胍基氮, 使之氧化分解为瓜氨酸和 NO。一氧化氮是人们熟知的无机小分子化合物, 兼有第二信使和神经调质的功能, 对心血管系统有着广泛的生物学效应和重要的病理生理意义。硝基酯类扩血管药已在临床应用用于治疗心绞痛等疾病达百余年, 但直到八十年代才逐步认识其作用机理与 NO 有关, 硝基酯类的耐药性也不容忽视。

1 血管壁 L-精氨酸——一氧化氮通路

1.1 L-精氨酸类似物

L-精氨酸类似物是研究 L-精氨酸——一氧化氮通路的重要工具, 现广泛应用于 L-精氨酸——一氧化氮通路调节研究的类似物有: N^G-单甲基-L-精氨酸(N^G-monomethyl-L-arginine, L-NMMA)、N-亚胺乙基-L-鸟氨酸(N-iminoethyl-L-ornithine, L-NIO)和 N^G-硝基-L-精氨酸甲基酯(N^G-nitro-L-arginine methylester, L-NAME), L-NMMA、L-NIO 和 L-NAME 均是 NO 生成的抑制剂^[3], L-精氨酸的氨基或羧基被不同的基团

所取代, 从而产生不同的异构体(表 1)。

1.2 L-精氨酸——一氧化氮合成通路

目前已基本证实, 除血管内皮细胞外, 血管平滑肌细胞、血小板、巨噬细胞、中性粒细胞、肝细胞、Kupffer 细胞、胃肠道细胞、脑细胞、肿瘤细胞和非肾上腺素能、非胆碱能神经细胞均存在着 L-精氨酸——一氧化氮通路^[4,5]。目前已纯化和克隆的一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)同功酶至少有 4 种, 有些为可溶性 NOS, 有些为颗粒性 NOS, 有些是由依赖于 Ca²⁺/钙调素的原生 NOS, 有些是由内毒素或白细胞介素诱生、不依赖于 Ca²⁺的诱生 NOS(表 2), 其作用底物均为 L-精氨酸, 且可被 L-NMMA 所抑制。

分别从脑血管内皮细胞及巨噬细胞中提取克隆的组成型及诱生型 NOS 的分子量为 135~155 kDa。这二种同工酶与细胞色素 P450 还原酶在氨基酸序列上高度同源, 结构非常相似, 均有还原型辅酶Ⅱ、黄素腺嘌呤单核苷酸(flavin adenine mononucleotide, FAM)、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)的识别位点和磷酸化位点, 需要还原型辅酶Ⅱ及四氢生物嘌呤作为重要的辅助因子。

已知血管内存在着 L-精氨酸——一氧化氮通路, 下面以乙酰胆碱为例, 说明活性物质激活 L-精氨酸——一氧化氮通路诱导内皮源性 NO 生成、导致血管平滑肌舒张的机制。乙酰胆碱作用于血管内皮细胞的 M₂ 受体, 使内皮细胞的肌醇三磷酸浓度升高, 内皮细胞膜的钙通道开放, 外钙进入细胞使细胞内钙浓度升高。升高的细胞内钙在钙调素存在的情况下, 激活胞内的 NO 合成酶。内皮细胞的 L-精氨酸在 NO 合成酶的作用下生成 NO, 一部分扩散入血管腔, 抑制血小板粘附聚集等; 另一部分作用于内皮细胞邻近的平滑肌细胞, 促进平滑肌细胞舒张。

血管内还有另外途径合成 NO^[6]: ①胍基氮被氧化成 NO 或先生成亚硝基, 继之转变为 NO, 或胺基(—NH₂)先被氧化成氨(NH₃), 后者再被氧化成 NO; ②经酶的降解产生 NO, 如亚硝基降解酶; 含亚硝基的物质, 如亚硝酸酯类药物经酶解后生成 NO, 但现已发

① 广州军区南岳制药厂, 衡阳 421002

表 1 L-精氨酸的异构体

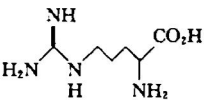
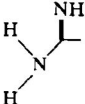
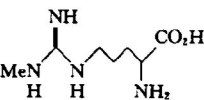
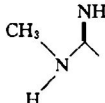
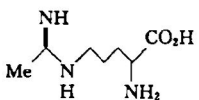
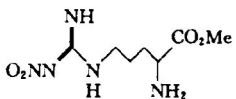
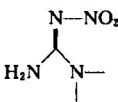
名称	化学结构	氨基基团	羧基基团
L-Arg			
L-NMMA			
L-NIO			
L-NAME			

表 2 NOS 同功酶的种类和性质^[5]

类型	辅助因子	依赖性	分子量	主要分布
Ia (可溶性)	NADPH, BH ₄ FAD/FMN	Ca ²⁺ /钙调素	155 kDa	脑、小脑细胞、NIE-115 成神经细胞, 瘤细胞
Ib (可溶性)	NADPH	Ca ²⁺ /钙调素	135 kDa	内皮细胞
Ic (可溶性)	NADPH, BH ₄ FAD	Ca ²⁺ (不含钙调素)	150 kDa	中性粒细胞
II (可溶性)	NADPH, BH ₄ FAD/FMN	未明 (内毒素/细胞运动诱导)	125 kDa	巨噬细胞
III (颗粒性)	NADPH, BH ₄ FAD/FMN	Ca ²⁺ /钙调素	135 kDa	内皮细胞
IV (颗粒性)	NADPH	未明 (内毒素/细胞运动诱导)	?	巨噬细胞

注: BH₄ 四氢生物喋呤

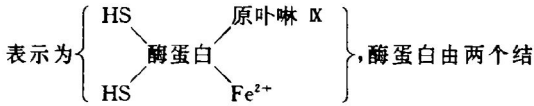
现人类血管中无该酶活性的存在;③非酶的降解途径, 生成 NO 的供体通过巯基及酸化后生成 NO(后述)。

2 L-精氨酸防治心血管病的作用机理

2.1 L-精氨酸舒张血管的作用机理

我们曾多次报道 L-精氨酸能舒张血管^[7,8]。L-精氨酸舒张血管是通过 NO 实现的。细胞中至少存在 3 种鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC),即可溶性的、与细胞膜结合的以及与细胞支架有关的 GC^[9]。可溶性 GC

是含有亚铁原卟啉(heme)基团和巯基的酶蛋白^[10],可



构不同的亚单位组成,每个亚单位均有催化活性部位,这两个亚单位均参与该酶的催化并可被NO所激活。血管内皮细胞合成的NO合成,因其亲脂性而以扩散的方式迅速进入邻近的血管平滑肌细胞中,与可溶性GC中亚铁原卟啉的 Fe^{2+} 有高度亲和力,并与其结合形成NO-亚铁原卟啉复合物。该复合物的形成使 Fe^{2+} 从亚铁原卟啉的卟啉环中被拉出,导致卟啉环的构型改变,这样就对 Fe^{2+} 与酶蛋白的轴向结合键施加张力,进而使该结合键断裂,而留下亚铁原卟啉的卟啉环(原卟啉 α)与酶蛋白的牢固结合,这正是可溶性GC被激活的信号。因此血管内皮细胞功能或形态异常时,其L-精氨酸—一氧化氮通路受影响,NO的合成减少,从而NO与可溶性GC形成 $\text{HS} > \text{酶蛋白}-\text{原卟啉}-\alpha \xrightarrow{\text{NO}} \text{Fe}^{2+}$ 复合物减少,使构型发生改变的酶蛋白数量减少,最终影响可溶性GC的激活。

已知激活的可溶性GC催化三磷酸鸟苷(GTP)转变为环一磷酸鸟苷(cGMP),导致细胞内cGMP水平迅速升高,后者激活依赖于cGMP的蛋白激酶,使胞浆 Ca^{2+} 向胞外流动或贮存于细胞内 Ca^{2+} 库中,并抑制 Ca^{2+} 的内流,导致胞浆游离 Ca^{2+} 含量降低,从而抑制 Ca^{2+} /钙调素中介的肌球蛋白轻链的磷酸化。此外,cGMP尚可通过其它途径而抑制肌球蛋白轻链的磷酸化,从而抑制肌动蛋白与肌球蛋白的结合,导致血管平滑肌舒张。高血压、高胆固醇血症、动脉粥样硬化和糖尿病患者体内均有不同程度的内皮功能不良,还可能出现L-精氨酸底物缺乏^[10],因此补充L-精氨酸以增加NO的产生,从而改善内皮细胞的功能和舒张血管。

2.2 L-精氨酸抗高胆固醇血症内皮细胞粘附的作用机理

高胆固醇喂养灵长目动物1周时,出现单核细胞粘附于内皮,并出现内皮下白细胞浸润和迁移^[11,12],高胆固醇血症或高甘油三酯血症分离的单核细胞粘附于人脐静脉内皮细胞的能力较健康人的强^[13];同时,当人脐静脉内皮细胞用高胆固醇血症家兔的血浆^[14]或 Cu^{2+} 修饰的氧化型LDL^[15,16]孵育后,能增强结合正常单核细胞的能力。这种内皮细胞改变或功能不良增加单核细胞粘附的机制尚不完全清楚,很可能内皮粘附分子和趋化蛋白的表达起重要作用^[17,18],而Tsao等^[19]实验表明:内皮源性NO在调节粘附分子和/或趋化蛋

白的表达方面起重要作用。外源性NO能抑制单核细胞粘附培养的猪主动脉内皮细胞^[20],同时也能抑制其趋化性;NOS的抑制能增加单核细胞趋化蛋白-1的表达和分泌。上述资料说明:内源性NO可以调节内皮细胞—单核细胞的相互作用,高胆固醇血症的动物和人类出现的内皮功能不良同NO-依赖性血管舒张低下有关,而且这种异常可以出现在血管明显的形态学改变之前。补充L-精氨酸后,则增加NO的产生,从而抑制高胆固醇血症所诱导单核细胞的粘附作用^[19]。

内皮产生其他的旁分泌因素可调节单核细胞粘附于内皮。高胆固醇血症加速内皮产生超氧阴离子,这参与动脉粥样硬化多种环节^[21]。高胆固醇喂养家兔1个月时,其主动脉产生的超氧阴离子为正常的3倍。这种超氧阴离子增加在很大程度上是由于内皮黄嘌呤氧化酶活性增强所致^[22]。抗氧化剂可清除超氧阴离子,增加内皮依赖性舒张,减少损伤形成^[23]。氧化型LDL灌注所诱导单核细胞粘附明显地被灌注超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)或肝素诱导内皮细胞释放的SOD所抑制^[24]。L-精氨酸可能作为一种抗氧化剂减少单核细胞粘附,尽管一些研究显示了L-精氨酸缺乏直接的抗氧化特性以及L-精氨酸抗细胞粘附的作用不是通过直接的抗氧化物所介导的,但并不能排除L-精氨酸代谢产物(NO)可能干预超氧阴离子的作用。已有实验表明:内皮剥脱能增加超氧阴离子的产生,NO能降低巨噬细胞氧化LDL的能力,且巨噬细胞对LDL-胆固醇的氧化与NO的产生呈反向关系,NO对LDL氧化的抑制作用可能是通过产生氧自由基的酶(如还原型辅酶Ⅱ氧化酶)途径实现的^[25]。因此NO调节内皮细胞粘附的作用与抗超氧阴离子有关,进而推论L-精氨酸抑制内皮细胞粘附的作用也与抗超氧阴离子有关。

2.3 L-精氨酸抗糖尿病合并肾脏、心脏纤维化的作用机理

糖尿病晚期可合并肾脏和心脏纤维化,其纤维化的机理尚不完全清楚,糖尿病合并肾病或心脏病表现胶原积聚增加,胶原的溶解性下降,葡萄糖介导异常交联^[26]、氧自由基交联^[27]或葡萄糖诱导胶原转录水平明显增加。而L-精氨酸抗糖尿病合并肾脏、心脏纤维化的机理是:①增加胶原的溶解性^[28];②拮抗自由基介导的糖基化异常交联;③由于L-精氨酸与氨基胍的活性相类似,从而阻断脱氧葡萄糖或甲基乙二醛与 Σ -蛋白质的反应,进而降低胶原交联^[28];④精氨酸能激活白介素-1 α ,而白介素-1 α 可促进胶原酶的活性增加,进而增加胶原的分解^[29];⑤精氨酸通过免疫调节作用,

介导巨噬细胞的活性,进而介导胶原清除^[30]。

2.4 L-精氨酸抗高血压的作用机理

前述L-精氨酸除了舒张血管发挥抗高血压的作用以外,还可通过下面机制发挥抗高血压的作用:①抑制肾素的活性^[31];②近年研究报道血管紧张素转换酶抑制剂与其减少血管紧张素Ⅱ无关^[32],而与NO生成有关;③缓激肽和P物质舒血管作用也与NO的生成有关^[33,34];④抑制平滑肌细胞增殖。

3 硝基酯类药对心血管疾病的作用机理

这类药物包括硝酸甘油、硝酸异山梨醇酯、硝酸戊四醇酯、尼可地尔(Nicorandil)等有机硝酸酯类、亚硝酸异戊酯和硝普钠。自从1879年William Murrel首次报道硝酸甘油治疗心绞痛以来,迄今这类药物仍广泛用于治疗心绞痛、高血压和充血性心力衰竭等疾病。然而有关其扩血管作用机理所知甚少,直到80年代才逐步认识其作用机理与NO有关。Shultz^[35]和Katsuki等^[36]于1977年同时发现硝基扩血管药呈剂量依赖性升高平滑肌细胞的cGMP水平。此后,生物化学研究证明这类药物与NO均可激活可溶性GC。现已公认,硝基扩血管药可在体内经代谢而释放外源性NO,通过NO的上述作用而导致血管扩张。因此,硝基扩血管药的扩血管作用并不依赖于血管内皮细胞的存在。

3.1 硝基酯类扩血管作用与NO的释放有关

硝基扩血管药在体内释放NO的调节,目前尚有争论。一般认为,有机硝酸酯类药 $[R'-(O-NO_2)_n]$ 和亚硝酸酯类药以其亲脂性而进入血管平滑肌细胞后,在谷胱甘肽-S-转移酶的催化下降解为亚硝酸异戊酯 $[R'-(CO-NO=O)]$,脱下来的一个 NO_2 与巯基反应首先形成不稳定的中间体S-亚硝基硫醇(S-Nitrosothiol, R-S-NO),后者迅速分解为二硫化物并自发性地释放NO。这类药物在血液中的代谢需要血浆蛋白(尤其是白蛋白)、血红蛋白和巯基的参与,即血红蛋白中的 Fe^{2+} 被氧化为 Fe^{3+} ,而巯基与降解脱下的 NO_2 生成S-亚硝基硫醇。此外,硝普钠在无需酶的条件下就可在体内自发性地释放NO而激活GC^[37]。硝基酯类虽然有扩血管作用,但几乎所有制剂均产生耐药。

3.2 硝酸酯耐药的可能机理

3.2.1 药效动力学变化 曾认为,由于吸收、分布和排泄等药效动力学变化,引起血中磷酸酯水平下降是硝酸酯制剂随时间而出现药效下降的机理。但最近研究表明服用二硝酸异山梨醇酯后,血浆该药水平在第2天比第1天更高,因而认为血中药浓度的持续高水平实际上才是这些病人对硝酸酯耐药的原因。

3.2.2 体内还原型巯基或P450的消耗 硝酸酯类药物只有在体内提供巯基的条件下,才能经代谢生成不稳定的中间体R-S-NO,后者迅速释放NO而激活可溶性鸟苷酸环化酶,此酶促使环一磷酸鸟苷(cGMP)的形成,cGMP可通过多种机理降低细胞钙并促使收缩蛋白对钙的敏感性降低,进而引起血管扩张。如果长期或大量应用此类药物,势必消耗体内大量巯基,因而不利于这类药物在体内代谢生成R-S-NO。一些临床研究资料表明,对硝酸甘油已产生耐受性的病人静注或口服大剂量巯基生成药N-乙酰半胱氨酸后,其耐受性得以消除^[38,39]。但另一些资料表明,N-乙酰半胱氨酸不能消除硝酸甘油或硝酸异山梨醇酯所致的耐受性^[40]。这说明体内游离巯基的减少不是这类药物产生耐受性的唯一原因。由于细胞色素P450在释放NO的不同氧化过程中起作用,因而有人提出,“细胞色素P450耗竭”可用来解释硝酸盐产生耐药机制,但这一假说还未在体内得到证实。

3.2.3 可溶性GC活性的降低和GC脱敏 硝酸酯类药物在体内转化NO的过程中,使血红蛋白中的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,巯基转变为二硫键。导致可溶性GC活性降低,而使这类药物的扩血管效应减弱。研究资料表明^[41],这类药物发生耐受性时伴有可溶性GC活性的降低。然而,直接释放NO的硝普钠亦可明显降低GC的活性,且补充巯基生成剂不能完全恢复GC的活性,提示这类药物耐受性的产生至少部分是直接抑制GC所致。当用极高浓度的硝酸甘油在体外诱导耐药时,可发现可溶性GC的脱敏,以致使GMP生成不足。

3.2.4 神经内分泌缩血管机制的激活 慢性充血性心力衰竭病人可出现舒张功能发生改变^[42],故有人认为,内皮细胞功能障碍可能是硝酸酯耐药的一个重要原因。但硝酸甘油被认为是一种外源性血管舒张因子,在缺乏正常内皮细胞时仍然有效,以内皮功能障碍来解释硝酸酯耐药并不可靠。有报道,充血性心力衰竭产生耐药时血中儿茶酚胺和肾素活性增高^[43],但也报道在输注硝酸甘油24小时,对产生和未产生耐药的充血性心力衰竭患者用药前、后血浆肾素、肾上腺素和去甲肾上腺素进行测定,结果未显示任何差异。因而,有人认为神经内分泌机理在硝酸酯类耐药中的作用值得怀疑。

3.2.5 NO受体的亲和性降低 若长期使用硝酸酯类药物,则因提高体内外源性NO水平而使NO受体的数目减少(向下调节),进而减弱NO对其受体的激动作用,从而产生耐受性。此外,耐受性的产生亦可能与NO受体(可溶性GC)中血红蛋白基团的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 、

硫基转变为二硫键、使受体对这类药物的亲和力降低有关。

参考文献

- 1 Sudhir K, MacGregor JS, Amidon TM, et al. Differential contribution of nitric oxide to regulation of vascular tone in coronary conductance and resistance arteries. Intravascular ultrasound studies. *Am Heart J*, 1994, **127**(4 pt 1): 858~865.
- 2 Hopkins WE, Waggoner AD. Right and left ventricular area and function determined by two dimensional echocardiography in adults with the Eisenmenger syndrome from a variety of congenital anomalies. *Am J Cardiol*, 1993, **72**(1): 90~94.
- 3 Palmer RMJ, Ashton DS. *Nature*, 1988, **33**: 664.
- 4 Moncada S, et al. *Pharmacol Rev*, 1991, **43**: 109.
- 5 Murd F, et al. *Jpn J Pharmacol*, 1992, **58**(Suppl 2): 150.
- 6 Ignarro LJ. *Circ Res*, 1989, **65**: 1.
- 7 杨和平, 杨爱莲, 王小平, 等. L-精氨酸抗家兔动脉粥样硬化内皮损伤. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3**(1): 40~44.
- 8 杨爱莲, 唐显庆, 王小平, 等. L-精氨酸能改善血管内皮依赖性舒张和抗动脉粥样硬化损伤. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3**(1): 36~39.
- 9 Ahlner, et al. *Pharmacol Rev*, 1991, **43**: 351.
- 10 Chen PY, Sanders PW. *J Clin Invest*, 1991, **88**(5): 1590.
- 11 Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. 1. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, 1984, **4**(4): 323~340.
- 12 Masuda J, Ross R. Atherogenesis during cow lervel hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**(2): 178~187.
- 13 de Grijter M, et al. *Metabolism*, 1991, **40**: 1119.
- 14 Territo MC, Berliner JA, Almada L, et al. β -Very low density lipoprotein pretreatment of endothelial monolayers increases monocyte adhesion. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**(6): 824~828.
- 15 Endemana G, et al. *Am J Pathol*, 1989, **126**: 1.
- 16 Berliner JA, et al. *J Clin Invest*, 1990, **85**: 1260.
- 17 Cushing SD, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 5134.
- 18 Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. *Science* 1991, **251**: 788.
- 19 Tsao P, et al. *Circulation*, 1994, **89**: 2176.
- 20 Bath PMW, Hassall DG, Gladwin AM, et al. Nitric oxide and prostacyclin divergence of inhibitory effects in monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 254~260.
- 21 Cooke JP, et al. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1168.
- 22 Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. *J Clin Invest* 1993, **91**: 2546.
- 23 Rubanyi GM, Vanhoutte PM. *Am J Physiol*, 1986, **250**: H815~H821.
- 24 Lehr HA, et al. *Arterioscler Thromb* 1992, **12**: 824.
- 25 Clancy RM, Lesczynska-Piziak J, Abramson SB. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1116.
- 26 Browlee M, Cerami A, Vlassara 1988, H. *N. Engl J Med*, 1988, **318**: 1315.
- 27 Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. *J Biol Chem*, 1986, **261**: 4889.
- 28 Khaidar A, et al. *Circulation*, 1994, **90**: 479.
- 29 Dinarello CA, et al. *J Clin Invest*, 1977, **1**: 734.
- 30 Reynolds JV, et al. *Surgery*, 1988, **104**: 142.
- 31 Hu L, et al. *Hypertension*, 1994, **23**(2): 185.
- 32 Higashi Y, et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, **80**(7): 2198.
- 33 Lin W, et al. *Pharmacol Rev*, 1995, **47**(1): 25.
- 34 Kobari M, et al. *Brain Res Bull*, 1993, **31**(5): 443.
- 35 Shultz KD, et al. *Nature*, 1977, **265**: 750-1.
- 36 Katsuki S, et al. *J Cyclic Nucleotide Res*, 1977, **3**: 23.
- 37 Martin W, et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985, **232**: 708.
- 38 May DC, et al. *N Engl J Med*, 1987, **317**: 805.
- 39 Horowitz JD, et al. *Circulation*, 1988, **77**: 787.
- 40 Parker JO, et al. *Circulation*, 1987, **76**: 572.
- 41 Romanin C, Kukovestz WR. *J Mol Cell Cardiol*, 1989, **21**: 41.
- 42 Margolies KB, et al. *Circulation*, 1990, **82**: 2226.
- 43 Racker M, et al. *N Engl J Med*, 1987, **317**: 799.

(1995-12-11收到, 1996-04-11修回)