

• 研究成果综述 •

# L-精氨酸/一氧化氮抗动脉粥样硬化的作用及机理

杨永宗<sup>①</sup> 杨和平<sup>①</sup> 戴爱国<sup>②</sup> 陈颜芳<sup>③</sup> 易光辉<sup>①</sup> 万腊香<sup>①</sup> 林曙光<sup>③</sup>

(①衡阳医学院分子生物学研究中心,衡阳 421001. ②衡阳医学院附属第一医院. ③广东省心血管病研究所)

**摘要** 内膜损伤是动脉粥样硬化病理过程的重要始动环节。L-精氨酸可改善内皮功能。应用病理学、病理生理学、生物化学、药理学、细胞和分子生物学等手段,从整体、器官、组织、细胞及分子等不同水平探索了L-精氨酸—一氧化氮通路对动脉粥样硬化的防治作用及可能机制。结果发现,L-精氨酸对动脉粥样硬化具有多种作用。首先,它可调节内皮细胞氧化应激状态,如抑制氧自由基的生成。其次,它能拮抗血清低密度脂蛋白氧化修饰。第三,它抑制细胞粘附分子-1的释放。第四,它阻抑粒细胞的粘附和聚集。第五,它通过促进组织型纤维蛋白酶原激活物的释放和抑制纤溶酶原激活物抑制剂的合成及释放来调节凝血/纤溶功能。第六,它通过调节内皮细胞自分泌和/或旁分泌内皮素和血管紧张素Ⅱ,从而调节血管舒缩状态及内皮通透性。第七,L-精氨酸—一氧化氮通路对动脉粥样硬化病变过程中内膜增生、斑块形成和血管闭塞等事件中与细胞增殖和细胞凋亡关系密切的原癌基因和抗癌基因的表达失衡具有调节作用。在抗动脉粥样硬化方面,L-精氨酸的药效优于消心痛和硝苯吡啶。以上研究结果表明,L-精氨酸—一氧化氮通路抗动脉粥样硬化的作用是多环节的、多层次的,L-精氨酸—一氧化氮通路的障碍是动脉粥样硬化病变的重要始动环节,适时调节L-精氨酸—一氧化氮通路将是防治动脉粥样硬化的重要手段。

**关键词** L-精氨酸,一氧化氮,动脉粥样硬化。

动脉粥样硬化病变以内膜斑块形成为主要特征。内膜损伤是内膜病变发生的关键环节。内膜损伤后,使内皮功能紊乱、内膜增生、细胞外基质蓄积和脂质堆积。血管内皮功能紊乱诱导一系列病理生理学变化:如内皮通透性增加<sup>[1~4]</sup>、血管舒张功能障碍、与内膜有关的生长因子和细胞因子异常分泌及调节异常、血小板粘附和聚集、炎细胞粘附和浸润、脂蛋白氧化修饰等。L-精氨酸是一氧化氮的前体,能舒张血管、逆转动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)时血管内皮依赖性松弛功

能障碍<sup>[5~6]</sup>。正常血管并不缺乏L-精氨酸,但在高胆固醇血症等病理情况下可出现一氧化氮(nitric oxide, NO)氧化分解加速,使L-精氨酸耗竭,进而导致NO减少<sup>[9]</sup>。但是血浆中L-精氨酸相对缺乏并非等于血管壁L-精氨酸不足,因此,探讨As病变血管壁L-精氨酸含量的变化是本研究的目的之一。

硝基酯类扩血管药已在临床应用于治疗动脉粥样硬化性心脏病达百余年,直到八十年代才逐步认识其作用机理与NO有关,但硝基酯类扩血管药存在耐药性<sup>[9]</sup>。大量的临床调查表明食用坚果能降低冠心病发病率和死亡率,而坚果的主要抗As成份是L-精氨酸。比较L-精氨酸与硝基酯类扩血管药的抗As作用<sup>[10,11]</sup>,指导临床用药和开发更有效的抗As药物是本研究的主要方向。

高胆固醇血症时,氧自由基生成增多,能加速NO的氧化降解,从而降低NO的活性。NO通过调节血管张力、血压及细胞间的相互作用,以达到调节血管的自身稳定,阻止As的发生发展。而NO系统功能障碍,致NO合成减少或氧化分解加速,促使细胞的粘附、增殖及血管收缩,可进一步加速As的损伤<sup>[12~14]</sup>。探索L-精氨酸保护内皮、舒张血管、抗氧自由基、抗细胞粘附和促进纤溶的机理是本研究的主要问题。

一氧化氮(NO)由NO合成酶(NO synthetase, NOS)催化L-精氨酸生成。NOS存在于多种细胞和组织中,如内皮细胞(endothelial cell, EC)、平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、单核巨噬细胞、神经细胞和血小板等,是体内合成NO的唯一催化酶。迄今已知至少有两种类型的NOS,一种是“原生型”NOS(constitutive NOS, cNOS),主要分布于EC(eNOS)和神经细胞(nNOS),其活性依赖于Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白复合物;另一种是“诱导型”NOS(inducible NOS, iNOS),主要分布于巨噬细胞和中性粒细胞,可被某些细胞因子如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、干扰素-γ(interferon-γ)和内毒素诱导激活。iNOS激活后生成NO的能力比cNOS强得多,且可引起不同的生理和病理生理效应。

动脉粥样硬化的发生和发展与细胞增殖凋亡密切相关,其细胞增殖和细胞凋亡受包括 NOS 在内的一些因子和原癌基因表达产物的复杂调节,NOS 和这些基因的时相性和位相性的变化是 As 发生、发展和逆转研究的主要突破口<sup>[15~21]</sup>。

### 1 高脂血症时血浆中和粥样硬化动脉壁中 L-精氨酸的相对不足

正常血管壁并不缺乏 L-精氨酸,但高脂血症时是否出现血浆 L-精氨酸相对不足和动脉粥样硬化血管壁 L-精氨酸缺乏,这是关系到 L-精氨酸有否疗效的重要问题<sup>[9]</sup>。为此,我们建立了测定家兔主动脉壁 L-精氨酸水平的新方法<sup>[22]</sup>。传统的测定方法步骤较多,容易出现测定样品 L-精氨酸的损失和误差。我们采用的 Pic-Tag™ 氨基酸分析法具有简便、快速和较为准确等优点。采用这种新方法我们发现给家兔饲以高胆固醇饲料三个月可使家兔主动脉壁出现 L-精氨酸不足( $P < 0.01$ );补充 L-精氨酸能使家兔主动脉壁 L-精氨酸含量增加( $P < 0.01$ ),并且能使家兔血清 NO 水平增加( $P < 0.01$ )<sup>[9]</sup>。这些结果说明了高脂血症时血浆中和动脉粥样硬化血管壁 L-精氨酸的相对不足,补充 L-精氨酸可增加血管壁 L-精氨酸的含量<sup>[23]</sup>。发现粥样硬化动脉壁 L-精氨酸的相对不足是本研究的创新点。

### 2 L-精氨酸抗动脉粥样硬化的疗效观察

冠状动脉粥样硬化性心脏病是危害人类健康的严重疾病。冠状动脉内膜斑块使管腔变窄导致冠状动脉

供血不足,引起临床症状。L-精氨酸可降低血胆固醇进而使斑块内胆固醇含量减少,阻止斑块进展,甚至可使斑块面积缩小。我们的研究结果显示家兔额外补充 L-精氨酸可缩小冠状动脉斑块面积和降低斑块内胆固醇含量<sup>[10,11]</sup>;L-精氨酸还可降低高胆固醇血症<sup>[5]</sup>和冠心病心绞痛患者<sup>[14]</sup>的血清胆固醇,改善心肌缺血症状。

#### 2.1 L-精氨酸对家兔主动脉和冠状动脉粥样硬化斑块面积以及斑块内胆固醇含量的影响

已经发现,给动物补充 L-精氨酸可改善血管的内皮依赖性舒张,减轻 As 的病变程度,L-精氨酸可抑制粒细胞粘附、抑制血小板的粘附和聚集及抑制 SMC 的增殖。L-精氨酸可通过多种环节发挥抗 As 的作用。L-精氨酸对主动脉和冠状 As 斑块面积的防治作用呈量效关系。随剂量增大而表面出作用增强<sup>[10]</sup>。预防性应用 L-精氨酸可阻止高胆固醇血症家兔主动脉壁胆固醇含量的增高,而治疗性应用也具有明显的降低动脉壁胆固醇含量的作用。这一作用也呈量效关系。而且,L-精氨酸降低管壁胆固醇和血管斑块面积的作用优于临床上常用量的硝苯吡啶及消心痛<sup>[10,11]</sup>。因此 L-精氨酸是一种优于硝苯吡啶和消心痛的抗动脉粥样硬化药。

#### 2.2 L-精氨酸对冠心病心绞痛和高脂血症患者的临床疗效观察

为观察 L-精氨酸的临床疗效,于 1996 年 4~12 月应用 L-精氨酸片进行了抗心绞痛临床疗效及安全性观察<sup>[14]</sup>。结果发现 L-精氨酸具有扩张血管、降低血压、减少心肌耗氧量和减轻心肌缺血程度的作用(表 1)。

表 1. 治疗前后两组患者心率、血压及其他指标的变化( $\bar{x} \pm s$ )。

指 标	L-精氨酸组(n=38)			安慰剂组(n=30)		
	治疗前	治疗后	差 值	治疗前	治疗后	差 值
心率(次/min)	86±15	78±10 <sup>b</sup>	10±10 <sup>c</sup>	85±17	83±10	3±8
收缩压(kPa)	19.1±2.8	16.7±1.2 <sup>b</sup>	2.8±1.8 <sup>c</sup>	19.1±2.6	18.7±1.2	0.41.6
舒张压(kPa)	10.9±1.8	10.4±1.6 <sup>a</sup>	0.6±1.2 <sup>c</sup>	10.8±2.6	10.4±1.2	0.41.1
RPP(kPa·次/min)	1 640±386	1 300±296 <sup>b</sup>	376±310 <sup>c</sup>	1 621±379	1 551±326	84±236
NST	3.5±1.6	2.2±1.5 <sup>b</sup>	1.4±1.6 <sup>c</sup>	3.4±1.6	3.2±1.8	0.3±1.5
ST段(mm)	3.2±2.0	1.8±1.7 <sup>b</sup>	1.5±1.8 <sup>c</sup>	3.4±2.2	3.3±2.9	0.2±1.6

RPP:收缩压与心率乘积;NST:非应激试验。a: $P < 0.05$ , b: $P < 0.01$ ,与治疗前相比较; c:  $P < 0.01$ ,与安慰剂组相比较。

口服 L-精氨酸片明显缓解冠心病心绞痛发作,改善心肌缺血、降低心肌耗氧量及降低总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和低密度脂蛋

白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC),并未见明显不良反应。因此,L-精氨酸片作为一种新型的冠心病心绞痛治疗药物,值得在临床上推广应用。

在观察 L-精氨酸片抗冠心病心绞痛临床疗效及安全性的基础上,我们又进行了 L-精氨酸片抗冠心病高脂血症的临床疗效观察。用 L-精氨酸治疗冠心病高脂血症前后患者血脂、脂蛋白和载脂蛋白的测定结果见表 2。与治疗前相比较,可见用 L-精氨酸治疗后患者血清 TC、TG、LDLC 和脂蛋白(a)明显降低( $P < 0.01$ ),高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)升高( $P < 0.05$ ),但载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 无明显变化。患者血清丙二醛明显降低( $P < 0.01$ ),而 SOD 活性明显升高( $P < 0.01$ );患者血浆精氨酸浓度明显增加( $P < 0.01$ )。治疗前后患者血液流变学各项指标也有变化。与治疗前相比较,用 L-精氨酸治疗后患者 BSV 低切变, Hc、ESR 方程 K 值、AIRBC 和 PSV 明显降低( $P < 0.05$ ),但 BSV 高切变,纤维蛋白原和红细胞电泳等无明显变化( $P > 0.05$ )(表 2)。

表 2. 用 L-精氨酸治疗一个月前后冠心病高脂血症患者血脂、血浆 L-精氨酸和血液流变学的变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$ )

指 标	用药前	用药后
总胆固醇 <sup>①</sup>	7.5 ± 1.0	4.7 ± 0.9 <sup>b</sup>
甘油三酯 <sup>①</sup>	2.2 ± 0.9	1.5 ± 0.3 <sup>b</sup>
LDLC <sup>①</sup>	5.9 ± 1.8	3.2 ± 1.1 <sup>b</sup>
HDLC <sup>①</sup>	1.1 ± 0.3	1.8 ± 0.6 <sup>a</sup>
脂蛋白(a) <sup>②</sup>	0.48 ± 0.13	0.17 ± 0.06 <sup>b</sup>
载脂蛋白 AI <sup>②</sup>	1.16 ± 0.18	1.50 ± 0.48
载脂蛋白 B <sup>②</sup>	1.25 ± 0.31	1.06 ± 0.15
丙二醛(μmol/L)	7.1 ± 1.5	4.3 ± 0.6 <sup>b</sup>
SOD(kU/L)	67 ± 33	103 ± 34 <sup>b</sup>
L-精氨酸 <sup>①</sup>	1.0 ± 0.4	4.6 ± 4.0 <sup>b</sup>
BSVLS(20/s)	8.1 ± 1.7	7.1 ± 1.1 <sup>a</sup>
红细胞压积(%)	48 ± 8	36 ± 4 <sup>b</sup>
血沉(mm/h)	40 ± 20	29 ± 13 <sup>b</sup>
血沉方程 K 值	125 ± 45	80 ± 31 <sup>b</sup>
红细胞聚集指数	4.1 ± 1.3	3.5 ± 0.8 <sup>b</sup>
血浆比粘度	1.82 ± 0.15	1.62 ± 0.20
纤维蛋白原 <sup>②</sup>	2.8 ± 0.7	2.4 ± 0.6
红细胞电泳率(s)	16.9 ± 0.9	16.9 ± 0.8

LDLC:低密度脂蛋白胆固醇; HDLC:高密度脂蛋白胆固醇; SOD:超氧化物歧化酶活性; BSVLS:全血比粘度低切变。①计量单位为 mmol/L; ②计量单位为 g/L。a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ ,与用药前相比较。

### 3 L-精氨酸抗动脉粥样硬化血管内膜损伤的机理

血管内膜损伤可反映在血管内皮通透性增加,内皮依赖性血管舒张功能障碍,血管内皮一炎细胞粘附作用增强,血小板粘附于内皮并聚集,凝血与纤溶间的平衡失调,脂质过氧化及氧化型低密度脂蛋白增加并在血管内皮下堆积,血管平滑肌细胞增殖以及新生内膜形成,与细胞增殖和凋亡密切相关的基因表达失衡,等等。L-精氨酸—NO 通路能否对以上血管内膜损伤具有一定的调节作用,为此我们进行了下列研究。

#### 3.1 L-精氨酸能降低血管内皮通透性

动脉粥样硬化过程中内皮功能失衡导致血管舒张功能的损害<sup>[1,2]</sup>和内皮细胞粘附性增加<sup>[12]</sup>。八十年代初我们曾发现静脉注射高脂血清后 3 h 就使主动脉组织耗氧量显著增加,这提示高脂血清对动脉壁的代谢有影响<sup>[1]</sup>。为了解高脂血清对动脉内膜的作用,我们测定了一次静脉注射高脂血清后 1~5 小时家兔主动脉内膜通透性的变化,发现通透性增高的过程具有两个特点:一是出现快,第 1 小时即见升高,第 2、3 h 达到顶点;二是暂时性,第 5 h 即恢复正常水平。提示一次静脉注射高脂血清后早期出现的内膜通透性增高,可能是内皮功能性变化的一种反映<sup>[2]</sup>。为探索降低动脉内膜通透性防治动脉粥样硬化的想法提供了一定的依据。为了更好的评价内膜通透性的变化,我们建立了恒压银染法技术,用这种方法研究了 L-精氨酸对血管内皮通透性的影响<sup>[4]</sup>。

结果发现正常家兔主动脉内皮表面光滑、银染线描出内皮细胞的轮廓,银线细小、均匀且连续,有些微状弯曲。内皮细胞呈长梭形或椭圆形,相互连接,并沿血流方向排列。喂养胆固醇 4 周时,可见银染线增宽,呈双银染线现象。8 周时除 4 周的改变外,还出现银染线不连续,细胞结合部位孔洞增大,说明内皮通透性增加。而加喂 L-精氨酸的家兔,内皮银染线连续沿着血流方向排列,银线较细小,细胞结合部位未见明显孔洞,说明血管内皮通透性恢复正常。

#### 3.2 L-精氨酸能改善血管内皮依赖性舒张功能

高脂血症损伤内皮依赖性松弛是其引起动脉粥样硬化的重要原因之一。血管内皮细胞通过分泌强有力的血管舒张因子如 NO 和血管收缩因子如内皮素调节血管张力,维持血管舒张与血管收缩之间的平衡。内皮损伤和内皮功能不良时,内皮细胞产生和分泌的 NO 减少,导致血管舒张功能障碍,血管痉挛。

在用雄性新西兰白兔研究 L-精氨酸对高脂血症和

内皮剥脱时血管内皮依赖性舒张功能的影响时发现,家兔喂养 2%胆固醇和內皮剥脱 30 天出现动脉內皮依赖性舒张功能受损,2%胆固醇+2%L-精氨酸喂养 30 天均能有效地抑制高胆固醇所致的血管內皮依赖性舒张功能的降低<sup>[8,24]</sup>。冠心病患者的冠状动脉常发生异常收缩、痉挛和心肌缺血,这往往与內皮依赖性舒张功能障碍有关,补充 L-精氨酸明显改善冠心病心绞痛<sup>[14]</sup>和高脂血症的症状<sup>[5]</sup>。

### 3.3 L-精氨酸能降低血管內皮细胞的粘附性

高脂血症继发血管內皮细胞功能障碍被认为是 As 的早期形成机制,內皮功能障碍表现之一就是粘附分子的诱导与表达致 EC 表面异常增高的粘附性。我们曾观察到新西兰白兔喂 2%胆固醇饮食两周后,NO 基础释放显著减少,白细胞对冠状动脉內皮细胞粘附性显著增加,而给予 L-精氨酸可逆转这一反应。为进一步探讨 L-精氨酸对血管內皮—细胞粘附的作用,用 OLDL 处理培养的猪主动脉內皮细胞,以 Ficol L-Hapaque 分离液密度梯度离心分离人外周血单核细胞,观察 L-精氨酸对內皮细胞—单核细胞粘附率的影响;采用反转录—多聚酶链反应技术,检测氧化型低密度脂蛋白和 L-精氨酸对內皮细胞血管粘附分子-1 表达的影响。我们首先报道了 L-精氨酸具有剂量和时间依赖性地抑制氧化型低密度脂蛋白的促內皮细胞—单核细胞粘附作用。氧化型低密度脂蛋白处理內皮细胞能明显增加內皮细胞血管细胞粘附分子-1 的表达,而 L-精氨酸能阻抑氧化型低密度脂蛋白的此种作用。这提示 L-精氨酸可能通过抑制血管细胞粘附分子-1 表达来阻抑氧化型低密度脂蛋白的促內皮细胞—单核细胞粘附作用<sup>[12]</sup>。

### 3.4 L-精氨酸对 tPA 和 PAI 的影响

血小板聚集、血栓形成是 As 性病变晚期常见事件。正常情况下,EC 即可分泌纤维蛋白酶原抑制物及一些凝血因子促进凝血,又可分泌纤溶酶原激活物抑制凝血,在防止血栓形成、维持凝血与纤溶的关系方面起重要作用。EC 还可通过释放 NO 和 PG<sub>12</sub>抑制血小板活化和聚集。As 时 EC 损伤,致上述凝血与纤溶平衡失调,易引起血栓形成。此外,EC 损伤后其合成与分泌 NO 减少,导致血小板聚集和血管收缩。血小板激活和聚集又可引起生长因子的释放,继而导致 SMC 的增殖。我们用酶联免疫分析法检测猪主动脉內皮细胞培养液中 tPA 抗原、tPA 活性和 PAI 活性,并观察了 LDL 和 L-精氨酸对 tPA 和 PAI 的影响,我们首先报道了 LDL 能明显降低 tPA 抗原含量,同时伴有 tPA 活性的降低和 PAI 活性增高;而 L-精氨酸能保护血管內皮细胞,增加其 tPA 合成,并能部分地拮抗 LDL 降低 tPA

合成的作用,可能对抑制血小板粘附聚集等方面起重要作用<sup>[25]</sup>。

### 3.5 L-精氨酸对脂蛋白代谢和脂质过氧化的影响

氧化修饰 LDL (OLDL)及 mm-LDL 均可使单核细胞牢固的粘附于內皮,继而迁移到內皮下转变为巨噬细胞,通过清道夫受体大量摄取 OLDL,使大量胆固醇在细胞內堆积,导致泡沫细胞的形成。

用雄性新西兰白兔观察 L-精氨酸对高脂血症时血浆脂蛋白、血清一氧化氮、脂过氧化物和超氧化物歧化酶的影响。我们首先报道了 2%L-精氨酸治疗 90 天,能有效地抑制高胆固醇所致的血清脂质过氧化物的升高,提高高脂血症家兔血清超氧化物歧化酶活性,促进血管內皮细胞一氧化氮的释放,L-精氨酸能明显地抑制 LDL 的氧化修饰作用<sup>[13]</sup>。口服 L-精氨酸对高脂血症患者具有抗脂质过氧化等作用<sup>[5]</sup>。

### 3.6 L-精氨酸促进 cNOS 表达和 NO 合成增加

用脂多糖诱导 NO 合成酶活性增加,可以减轻其对 LDL 的氧化,这种抑制效应可被阻断 NO 合成的 N<sup>G</sup>-甲基—精氨酸(NMMA)所逆转,说明 NO 的合成是脂多糖激活的巨噬细胞抑制 LDL 胆固醇氧化的原因。用脂质过氧化物硫代巴比妥反应物质表示的 LDL 氧化程度与其抑制 NO 活性相关。在猪冠状动脉左前降支的实验中,OLDL 组,以 OLDL 灌流 40 min;OLDL+精氨酸组,以 L-精氨酸( $3 \times 10^{-1}$  mol/L)预灌流 10 min,然后以 OLDL (300 mg/L)灌流 40 min;对照组,以单纯 Krebs's 液灌。OLDL 组 MDA 水平显著高于对照组及 OLDL+L-精氨酸组,经 cNOS 定量 PCR 显示,L-精氨酸组与 OLDL 组相比,前者 cNOS mRNA 水平大约比后者高 3 倍,而 GAPDH mRNA 水平相对稳定<sup>[7]</sup>。提示 OLDL 可抑制 cNOS mRNA 的表达,而应用 L-精氨酸可对抗这一作用,OLDL 可抑制一氧化氮的活性与合成。

一氧化氮可以在细胞內或细胞外作用等多个水平发挥其抑制氧化修饰的效应,如作用于细胞內含有血红素或 Fe-S 活性中心的鸟苷酸环化酶、脂多糖加氧酶与无机铁形成稳定的化合物、或与蛋白质形成相对稳定的亚硝基硫基化合物等,这都将引起细胞內或间质氧化水平的改变而调整细胞內活性氧化的产生。NO 还可与 LO· 及 LOO· 反应生成分子量不同的多种有机过氧亚硝基化合物,从而终止脂质过氧化的链式扩增反应。吸入 NO 可逆转缺氧性肺血管收缩反应<sup>[6,26]</sup>。对 30 例冠心病高脂血症患者和 15 例正常人测定其血浆 L-精氨酸、血清硝酸根、亚硝酸根浓度和 LDL 的迁移率的变化。发现冠心病高脂血症患者血浆 L-精氨酸浓度降低,

血清硝酸根浓长变化不明显<sup>[9]</sup>, LDL 的迁移率的增加;说明冠心高脂血症患者血浆 L-精氨酸相不足, NO 的产物——亚硝酸根可促进 LDL 的氧化, 导致冠心病高脂血症患者 LDL 的迁移率的增加(表 3)。

表 3. 冠心病高脂血症患者血浆 L-精氨酸、硝酸盐类及低密度脂蛋白相对电泳迁移率变化( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	例 数	血浆 L-精氨酸	血清硝酸盐类	LDL 相对电泳迁移率
健康对照者	16	113±8	30±9	1.94±0.13
冠心病患者	30	89±5 <sup>a</sup>	38±10 <sup>a</sup>	1.55±0.21 <sup>a</sup>

LDL: 低密度脂蛋白。a:  $P < 0.05$ , 与健康对照者比较。

### 4 动脉内膜损伤后血管壁细胞增殖和细胞凋亡与原癌基因表达的关系

原生型 NOS(constitutive NOS, cNOS)和诱导型 NOS(iNOS)均为 NADPH 依赖性的二氧化酶,能催化 L-精氨酸生成 NO 和瓜氨酸。cNOS 依赖于  $Ca^{2+}$ /钙调蛋白(CaM),引起 NO 短期释放,不受糖皮质激素的影响,分布于血管内皮;而 iNOS 则不依赖于  $Ca^{2+}$ /CaM,受内毒素及某些细胞因子诱导,引起长时间 NO 释放,分布于巨噬细胞、粒细胞、平滑肌细胞和内皮细胞。我们在动脉粥样硬化研究中发现 cNOS 和 iNOS 调节血管壁平滑肌细胞的动态平衡。

#### 4.1 大鼠动脉内膜损伤后血管壁细胞增殖和细胞凋亡与 NOS、ET-1 和原癌基因表达的关系

大鼠内皮剥脱 30 分钟和 120 分钟时,内膜面有大量的血小板粘附,未见 SMC 增殖,cNOS、c-sis mRNA 表达很低,c-fos、c-jun、c-myc 和内皮素-1(ET-1)表达增加。1 天时血小板粘附增加,偶见 SMC 的迁移和增殖,c-sis 基因表达水平增加,ET-1 表达达高峰,c-fos、c-jun、c-myc 表达水平下降,cNOS 表达似乎检测不到。5 天时 SMC 增殖旺盛,10 天和 15 天出现明显的增生灶,c-sis 基因表达 5 天迅速上升,15 天达高峰,20 天和 25 天逐渐下降到基础水平;ET-1 表达随时间延长表达逐渐下降;5 天和 10 天 c-fos、c-jun 和 c-myc 基因表达升高,之后逐渐下降到基础水平,cNOS 表达随时间延长而逐渐升高。因此,c-fos、c-jun、c-myc 出现双相表达<sup>[16]</sup>,而其第二次高表达与 c-sis mRNA 和 cNOS mRNA 表达增加呈基本一致趋势。内膜损伤早期内皮素过量表达,cNOS 表达不足,ET/NO 平衡体系受到损害,从而血管内皮功能受损,促发动脉硬化的链式反应<sup>[21]</sup>,补充 L-精氨酸可促进原生型一氧化氮合成酶基因的表

达,一氧化氮释放增加,改善内皮舒张功能<sup>[2]</sup>,抑制原癌基因的过度表达,从而抑制内皮的增生。

#### 4.2 家兔动脉内膜损伤后血和壁细胞增殖和细胞凋亡与 NOS 和原癌基因表达的关系

在高胆固醇饲料加内皮剥脱造成的实验性兔主 As 上观察到,术后一周 c-myc mRNA 水平较高,hsp70 mRNA 呈低水平,内膜只有灶性增生;2~4 周 c-myc 表达降低,hsp70 表达增加,内膜呈明显弥漫性增厚;6 周时平滑肌细胞源性泡沫细胞明显增多,此时 c-myc 表达恢复正常,而 hsp70 仍保持高水平。发现了 c-myc 基因转录升高和恢复的过程均发生在 hsp70 基因转录变化之前,c-myc 基因产物可能激活 hsp70 mRNA 的转录,而 hsp70 在 As 的 SMC 增殖过程中起重要作用<sup>[27]</sup>。在动脉粥样硬化表层和深层 c-sis 和 c-myc mRNA 表达水平不同<sup>[17,19]</sup>,同时 As 斑块内有 P53 基因表达的异常<sup>[18]</sup>。

采用 TUNEL 标记法,观察用主动脉经球囊导管损伤后 0、8 h、24 h、3 天和 5 天对血管中膜平滑肌细胞和外周细胞凋亡的变化。提取血管组织总 RNA,采用反转录-多聚酶链反应测定 iNOS 基因表达。结果表明,血管损伤后 8 小时可见中膜平滑肌细胞凋亡增加,24 小时达高峰,3 天和 5 天仍维持在较高水平,外膜细胞凋亡无明显改变,而 iNOS 基因在 8 h 明显增加,在 24 h 最高,与细胞凋亡存在平衡关系<sup>[21]</sup>,细胞凋亡存在“双相反应”,第一次细胞凋亡高峰在血管损伤后 24 h,第二次高峰则在 8 至 14 天。第一次高峰与 iNOS 表达有关,第二次高峰与 cNOS 表达有关,第一次高峰细胞凋亡主要发生在中膜平滑肌细胞,第二次高峰主要发生在内膜平滑肌细胞(表 4)。

#### 4.3 猪动脉内膜损伤后血管壁细胞增殖和细胞凋亡与 NOS 和原癌基因表达的关系

在复制贵州小香猪猪动脉粥样硬化模型的基础上,用球囊导管扩张其猪动脉 1 天时,SMC 开始迁移和增殖,增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达增加,SMC 内 c-fos、c-myc 蛋白表达增加,cNOS mRNA 表达增加,未见程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)阳性细胞;8 天时 PCNA 蛋白表达明显增加,出现 PCD 阳性细胞,c-fos、c-myc 蛋白表达回落,cNOS mRNA 表达下降,iNOS mRNA 表达增加;14 天时 PCNA 蛋白表达持续高水平;30 天时 PCNA、c-fos、c-myc 蛋白表达回落,cNOS mRNA 表达回落,PCD 阳性细胞减少,P53 蛋白表达在 1 天、8 天时表达低,14 天和 30 天其蛋白表达高;bc2 在 1 天和 8 天蛋白表达高,而在 14 天和 30 天时其蛋白表达水平低<sup>[15,16]</sup>。c-fos 和 c-myc 蛋白表达第一

次高峰与 iNOS mRNA 表达相一致, c-fos 和 c-myc 第二次蛋白高表达与 cNOS mRNA 表达相一致。

表 4. 球囊导管损伤后家兔腹主动脉内膜和中膜的细胞凋亡指数及一氧化氮合成酶基因表达的动态变化

时 间	细胞凋亡指数		iNOS (cpm)	cNOS (cpm)	a-actin (cpm)
	中 膜	内 膜			
即刻	6±3	—	60±49	20±6	1 630±158
8 h	15±6 <sup>a</sup>	—	925±108 <sup>a</sup>	23±8	1 518±144
24 h	50±18 <sup>ab</sup>	—	1 520±212 <sup>ab</sup>	27±5	1 703±169
3 天	32±12 <sup>a</sup>	4±1	1 380±163 <sup>a</sup>	76±12	1 690±201
5 天	20±9 <sup>ac</sup>	7±3 <sup>e</sup>	1 118±147 <sup>ac</sup>	169±25 <sup>e</sup>	1 580±180
8 天	7±3	14±5 <sup>f</sup>	634±77	381±53 <sup>f</sup>	1 674±137
14 天	4±2	17±4 <sup>f</sup>	30±4	639±78 <sup>f</sup>	1 674±153
25 天	—	5±3	25±3	248±25	1 598±160

iNOS: 诱导型一氧化氮合成酶基因; cNOS: 原形型一氧化氮合成酶基因; actin: 肌动蛋白; cpm: 每分钟计数。

a:  $P < 0.01$ , 与即刻比较; b:  $P < 0.01$ , 与 8 h 比较; c:  $P < 0.05$ , 与 24 h 比较; e:  $P < 0.05$ , f:  $P < 0.01$ ; 与 3 天比较。“—”示没有检测。

#### 4.4 成人冠状动脉左前降支粥样硬化斑块中细胞增殖和细胞凋亡与 NOS 和原癌基因表达的关系

对 65 例成人冠状动脉左前支粥样硬化进行 HE 染色及免疫组化, 结果显示: 脂纹期斑块中可见 SMC 内 PCNA 阳性细胞, PCD 阳性细胞少见; PCNA 阳性细胞中有 c-fos、c-myc 蛋白表达, PCD 阳性细胞中有 P53 蛋白表达, bcL-2 主要分布于中膜 SMC。纤维斑块期纤维帽含大量 SMC, 其细胞中 PCNA 和 PCD 阳性细胞均增多, PCNA 阳性细胞中 c-fos、c-myc 蛋白表达高; PCD 阳性细胞有 P53 蛋白表达, 并可检测到 c-fos、c-myc 蛋白表达; bcL-2 主要分布于中膜 SMC。粥样硬化斑块纤维帽中 SMC 减少, 偶见 PCD 和 PCNA 阳性细胞, PCD 阳性细胞多于 PCNA 阳性细胞, c-fos、c-myc、P53 难以检测到, 中膜 SMC 检测到 bcL-2 阳性细胞。复合病变期纤维帽中 SMC 极少, 几乎检测不到 PCNA 和 PCD 阳性细胞, 亦检测不到 c-fos、c-myc、P53、bcL-2 的蛋白表达, 但仍可在中膜 SMC 检测 bcL-2 阳性细胞。iNOS mRNA 表达见于内膜的泡沫细胞和内皮细胞, cNOS mRNA 表达见于内皮细胞。纤维帽中 SMC 增殖(指 PCNA 阳性细胞)旺盛时, PCD 检出率高; 纤维帽 SMC 中 PCNA 阳性细胞少时, PCD 检出率低, 这时于维持斑块稳定性极为重要, 斑块中 SMC 趋于增殖, 则取决于即刻早期基因和相关基因的重调。根据斑块 SMC 上述特点, 选择 SMC 抑制剂时要特别慎重, 尤其对于纤维

帽中 SMC 数少的斑块, 在这种情况下可能采用 SMC 促进剂, 以增加纤维成分分泌, 增强斑块的稳定性<sup>[16]</sup>。

#### 参考文献

- 1 杨永宗, 涂玉林. 动脉粥样硬化家兔主动脉耗氧量的变化. 中华心血管病杂志, 1980, 8: 312~314.
- 2 杨永宗, 王瑞瑜. 一次静脉注射高脂血清对家兔主动脉内膜通透性的影响. 中华心血管病杂志, 1982, 10(3): 216~218.
- 3 杨永宗, 冯大明, 金海燕. 利血平抑制动脉粥样硬化的实验研究. 中华心血管病杂志, 1983, 11(4): 33~34.
- 4 冯大明, 方玉荣, 杨永宗. 恒压银染法制备家兔主动脉扫描电镜样品. 中华病理学杂志, 1985, 11(1): 33~34.
- 5 谭小进, 戴爱国, 文芳, 等. L-精氨酸对冠心病高脂血症患者血脂、脂过氧化物及血液流变学的影响. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(1): 41~44.
- 6 戴爱国, 张珍祥, 牛汝楫, 等. 急性缺氧大鼠血浆、呼出气一氧化氮含量的变化吸入一氧化氮对缺氧性肺血管收缩反应的影响. 中国病理生理杂志, 1997, 5(1): 20~24.
- 7 焦鸿丽, 刘易林, 万腊香, 等. L-精氨酸对猪冠状动脉内皮功能的影响及其可能机制. 基础医学与临床, 1997, 17(4):
- 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 孙文清, 谭小进, 戴爱国, 等. 冠心病高脂血症患者 L-精

氨酸、硝酸根、亚硝酸根和 tPA、PAI 水平的变化. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(4):

10 焦鸿丽,刘易林,万腊香,等. L-精氨酸对高脂血症家兔主动脉和冠状动脉粥样硬化斑块面积的影响. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(3): 199~204.

11 焦鸿丽,刘易林,万腊香,等. 盐酸-L-精氨酸对高脂血症家兔主动脉和冠状动脉壁胆固醇含量的影响. 中国药理学通报, 1997, 待发表

12 林曙光,陈颜芳,伍淑英,等. L-精氨酸抑制内皮细胞粘附分子-1 表达与氧化型低密度脂蛋白促单核细胞粘附作用下降有关. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4(3): 176~180.

13 杨永宗,陈颜芳,刘易林,等. L-精氨酸对高脂血症家兔血浆脂蛋白、一氧化氮和脂过氧化物的影响. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3(3): 206~211.

14 戴爱国,范咏梅,杨和平,等. L-精氨酸治疗冠心病心绞痛. 新药与临床, 1997, 16(10).

15 易光辉,韦立新,盖鲁粤,等. 球囊损伤后猪粥样硬化髂动脉原癌蛋白表达的时相. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(1): 27~31.

16 杨和平,杨永宗. 动脉硬化平滑肌细胞增殖和凋亡的基因表达调节. 高技术通讯, 1997, 7(8).

17 杨和平,张敏,杨永宗,等. 动脉粥样硬化斑块内泡沫细胞 c-sis 和 c-myc 基因表达的研究. 中国病理生理杂志, 1992, 8: 622~624.

18 杨和平,傅爱华,姚阿卿,等. 动脉粥样硬化病变内 P53 基因的实验研究. 中华医学杂志, 1993, 73(11): 674~676.

19 杨和平,张敏,刘革修,等. 动脉硬化斑块和斑块旁中膜 c-sis, c-myc 基因推测和细胞表型的比较研究. 中华病理学杂志, 1992, 21(6): 349~350.

20 陈颜芳,陈鲁原,林曙光. 大鼠主动脉内皮损伤后原生型一氧化氮合成酶和内皮素-1 基因表达的改变. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4(3): 190~193.

21 陈颜芳,林曙光,余细勇,等. 家兔腹主动脉球囊导管损伤后血管平滑肌细胞凋亡和一氧化氮合成酶基因表达. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(2): 130~133.

22 王佐,刘易林,姜志胜. 一种测定家兔主动脉壁 L-精氨酸水平的新方法. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4(1): 72~74.

23 焦鸿丽,雷小勇,杨和平. 高胆固醇血症家兔主动脉壁 L-精氨酸含量的变化. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(3): 226.

24 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.

25 欧和生,彭建平,杨和平,等. L-精氨酸和 LDL 对血管内皮细胞合成 t-PA 和 PAI 的影响. 中国应用生理学杂志, 1996, 12(4): 327~331.

26 戴爱国,张珍祥,牛汝楫,等. 缺氧对肺动脉内皮细胞一氧化氮合成酶活性及基因表达的影响. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18(3): 164~166.

27 杨和平,黄生宁,杨鸿,等. SHR 和 WKY 大动脉 hsp70 mRNA 水平的比较研究. 实验生物学报, 1995, 28(1): 31~35.

(1997-07-28 收到, 1997-09-03 修回)

### 名词术语的汉英对照及缩写(V)

纤维白蛋白	albuminofibrin
纤维蛋白	fibrin
纤维蛋白原	fibrinogen
纤维蛋白酶	fibrin ferment
纤维蛋白酶	thrombase
纤维蛋白降解	fibrin degradation
纤维蛋白溶解	fibrinolysis
纤维蛋白降解物	fibrin degradation product, FDP