

原发性高血压患者血小板聚集性与 L-精氨酸转运功能的改变

王军 徐洪涛^① 姚兴海^② 余静 姜志胜^② 唐朝枢^②

(解放军北京医学高等专科学校生理学教研室, 北京 100071)

Changes of Aggregation and L-Arginine Transport of Platelet in Patients with Essential Hypertension

WANG Jun, XU Hong-Tao, YAO Xing-Hai, YU Jing, JIANG Zhi-Sheng and TANG Chao-Shu

(Department of Physiology, Beijing Military Medical College, Beijing 100071, China)

ABSTRACT

Aim To study the changes of volume, function and characteristics of L-arginine (L-Arg) transport of platelet (Pt) in patients with essential hypertension (EH).

Methods Nitric oxide (NO) production by platelets was assayed by measuring the accumulation of nitrite in the incubation medium using Greiss reaction according Green' method. Transport of ³H-L-Arg was determined essentially as described by William. Influx of ³H-L-Arg was determined by measuring cell-associated radioactivity after an appropriate period of incubation with ³H-L-Arg.

Results In EH patients, the quantity and volume of Pt has no obvious difference with the normal. The maximum platelet aggregation ratio (PAR) was much higher than that in normal ($P < 0.05$) and PAR was correlated with NO production. The production of NO and the ability of L-Arg transport in EH was respectively lower than that in normal ($P < 0.01$). Maximum transport velocity (V_{max}) in EH was only 79% of normal ($P < 0.01$). While the Michael constant (K_m) showed no significant difference between the

two groups.

Conclusion Above results indicate that there exists a functional and L-Arg transport disturbance in EH. It appears that the improvement of NO production and L-Arg transport in treatment of hypertension may be potentially important.

KEY WORDS Essential hypertension; Platelet; Aggregation; L-arginine; Transport

摘要 为探讨高血压病患者血小板功能的改变及其可能的机制, 本文观察了 23 名原发性高血压患者和 14 名健康成年人血小板体积、数量、聚集性和一氧化氮产生量及 L-精氨酸转运特征。结果发现, 原发性高血压患者血小板数目、体积无明显改变, 而最大聚集率较对照组高 1.3 倍 ($P < 0.05$), 在二磷酸腺苷刺激下一氧化氮产生量较对照组低 71% ($P < 0.01$), 且血小板最大聚集率与一氧化氮产生量之间成明显负相关 ($r = -0.63$)。原发性高血压患者血小板 L-精氨酸转运能力明显降低, 其最大转运速率仅为对照组的 79% ($P < 0.01$), 但两组间米氏常数无明显差异。结果提示, 原发性高血压患者血小板聚集功能增强可能与一氧化氮生成减少及 L-精氨酸转运功能降低有关。

关键词 原发性高血压; 血小板; 聚集性; L-精氨酸; 转运

高血压是导致心脑血管病的主要危险因素。近年来的研究表明, 血小板在血栓形成、动脉粥样硬化及高血压发病过程中起着重要的作用, 其功能的改变关系到疾病的发生、发展和转归^[1]。本文观察了 23 例原发性高血压患者血小板的体积、数量、聚集性、一氧化氮产生量及 L-精氨酸转运功能的改变, 以探讨血小板功能改变与高血压发病的关系。

本文为世川医学奖学金同学会科研启动基金资助项目

①海军总医院心内科, 北京 100037

②北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100081

1 材料和方法

1.1 研究对象

随机选择符合 WHO 诊断标准的原发性高血压患者 23 例(排除其他心肺疾患),其中男性 14 例,女性 9 例,平均年龄 56.2 ± 6.4 岁,平均动脉压(mean artery pressure, MAP)为 123.7 ± 13.2 mmHg,按 WHO 标准分期,Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 20 例,受试者于实验前两周停用药物。对照组为经体检健康者 14 例,其中男性 8 例,女性 6 例,平均年龄为 52.6 ± 5.5 岁,MAP 为 95.8 ± 6.8 mmHg。

1.2 富血小板血浆制备

晨起从肘正中静脉抽血,加入 3.8% 枸橼酸钠抗凝(血与抗凝剂体积比为 9:1),3 000 r/min 离心 15 min,制备富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP),用 Hepes 液将血小板数调整在 $(200 \sim 250) \times 10^9/L$ 。

1.3 血小板聚集性的测定

参照文献[2],血小板功能测定应用上海通用医用仪器公司 TYXN-91 多功能智能血液聚集仪。采用比浊法,取 200 μL PRP 于血小板聚集测定管中,在血小板聚集仪上加入 1 $\mu mol/L$ 致聚剂二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)钠盐(Sigma 公司),测定血小板最大聚集率(platelet aggregation, PAR)。

1.4 血小板 NO₂ 的测定

参照文献[3],将 PRP 血小板数调整到 $5 \times 10^5/L$,取 1 mL 于试管内再加入 50 μL ADP,37℃ 孵育 5 min,30 min 后加入等量 Greiss 试剂(1% 对氨基苯磺胺,0.1% N-(1-萘基)-乙二胺,5% 磷酸),室温放置 10 min,应用酶标仪在 550 nm 波长下测样品的吸光度。

1.5 血小板 L-精氨酸转运测定

参照文献[4],按体积比 1:10 取 PRP 于不含 Ca-Cl₂ 和葡萄糖的 Hepes 液中,4℃、2 350 r/min 离心 10 min,弃去上清,重复洗脱一次。用含 CaCl₂ 和葡萄糖的 Hepes 液将血小板数调整至 $5 \times 10^5/L$ 。取 50 μL 分别加入不同浓度(5、10、20、40、80、100、200 $\mu mol/L$)的 ³H-L-精氨酸溶液中(比活性为 2 290 Tbq/mol,购自 NEN/Dupont Co.),37℃ 孵育 1 min,加入 100 μL 终止液(270 mmol/L Formaldehyde, 16 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl)。经 millipore 过 450 nm 微孔滤膜抽滤,用 4 mL Hepes 液洗 3 次,滤膜吹干加入闪烁液,在液体闪烁计数器上测 ³H-L-精氨酸放射活性,同时设立不加样本的非特异平行对照管,L-精氨酸的转运为总摄入量与非特异结合之差。以 pmol/ 10^5 Pt 表示。

1.6 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组资料用非配对组间 t 检验。

2 结果

2.1 原发性高血压患者血小板聚集性的改变

如附表(Table)所示,原发性高血压患者血小板计数与对照组相近,血小板体积亦无明显改变(P 均 > 0.05)。在 ADP 刺激下原发性高血压患者血小板最大聚集率明显高于对照组($P < 0.05$)。

Table. The aggregation, NO₂ production and L-arginine transport of platelets ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	PAR (%)	L-Arg Transport		
			NO ₂ (mmol/ 10^5 Pt)	Vmax (nmol/ 10^5 Pt/min)	Km (nmol/L)
Control	14	61.5 ± 7.6	5.93 ± 1.53	11.94 ± 0.79	12.13 ± 0.40
Hypertension	23	80.6 ± 8.8^a	1.68 ± 0.50^b	9.51 ± 0.78^b	11.82 ± 1.13

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 血小板聚集功能与血压及病程之间的关系

原发性高血压患者血小板最大聚集率同血压水平无明显相关关系($r = 0.34$, $P > 0.05$),与病程长短的相关性亦较差($r = 0.41$, $P > 0.05$)。

2.3 血小板聚集功能与一氧化氮产生量之间

的关系

原发性高血压患者血小板在 ADP 刺激下 NO₂ 生成量较对照组明显降低($P < 0.01$)。血小板最大聚集率与 NO 产生量呈负相关($r = -0.63$, $P < 0.05$)。

2.4 原发性高血压患者血小板³H-L-精氨酸转运动力学特征

原发性高血压患者及对照组 L-精氨酸转运的浓度曲线见图 1(Figure 1)。血小板对 ^3H -L-精氨酸转运呈高亲和载体转运方式,在不同浓度点 EH 患者血小板的转运率均比对照组明显降低($P < 0.01$)。Eadie-Hofstee Plot 分析发现, EH 患者血小板对 L-精氨酸的最大转运速率(V_{\max})为对照组的 79%($P < 0.05$),而 ^3H -L-精氨酸转运的米氏常数值(K_m)无明显差异($P > 0.05$)(图 2, Figure 2)。

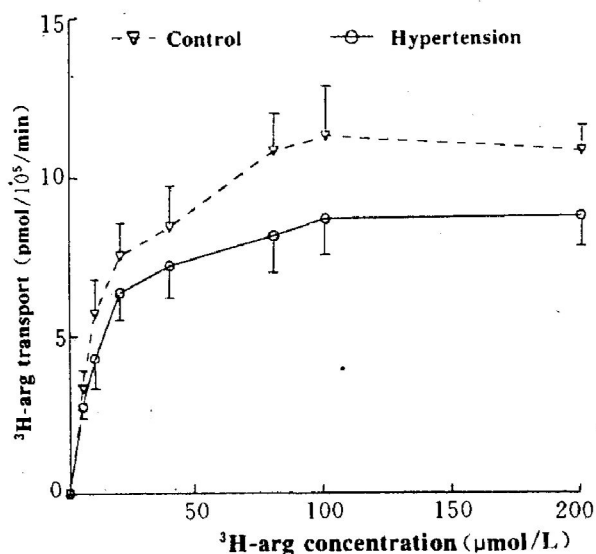


Figure 1. Kinetics of ^3H -L-Arginine transport by platelet.

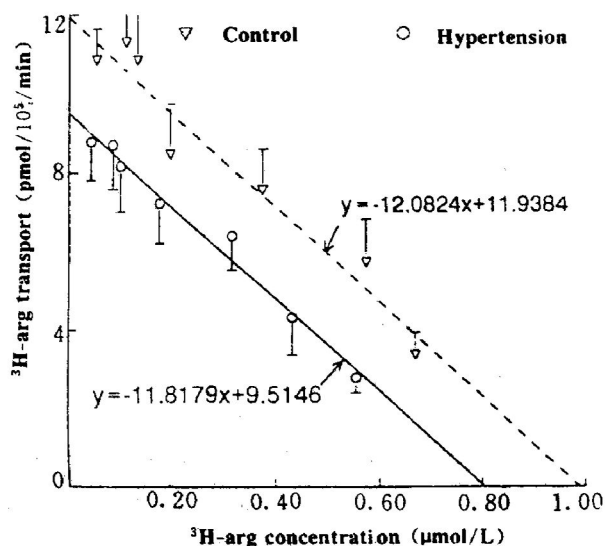


Figure 2. Eadie-Hofstee plot of arginine transport vs arginine concentration in patients of hypertension and normotensive.

3 讨论

关于高血压病患者血小板功能的研究国内外已有较多报道。多数学者认为高血压时血液在血管内呈湍流状态,细胞与细胞之间、细胞与血管壁之间相互碰撞,使血小板膜受损,引起 ADP 释放,从而使血小板粘附与聚集功能大为增强。另外,高血压时血小板细胞浆游离 Ca^{2+} 异常可能与血小板功能亢进有关^[5]。血小板聚集性增加、血栓形成是高血压与动脉粥样硬化的重要诱因^[6]。已有实验证实,血小板可以生成 NO, NO 通过激活鸟苷酸环化酶,使细胞浆内 Ca^{2+} 浓度下降,从而抑制血小板的粘附与聚集。本组资料发现, EH 患者血小板的聚集功能明显高于对照组,同近年来的报道一致,并发现 EH 患者血小板的聚集功能与高血压的程度及病程长短无密切相关,而与 NO 产生量有较明显的负相关关系,提示高血压时血小板聚集功能的改变可能与 NO 有关。细胞外 L-精氨酸通过高亲和性非 Na^+ 依赖性 Y^+ 蛋白氨基酸载体转运到细胞内^[7],与分子氧在血小板内一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)作用下生成 NO。可见, NO 生成有 NOS 和 L-精氨酸转运两个限速环节。已有实验证实高血压时血小板 NOS 的表达和活性降低。而高血压时血小板 NO 生成减少是否也与 L-精氨酸转运有关未见报道。本工作观察了血小板 L-精氨酸转运的浓度饱和曲线,随着精氨酸浓度的升高,精氨酸转运速率升高,但当精氨酸浓度达到一定程度(100 $\mu\text{mol/L}$)后,转运速率则不再随浓度的升高而升高。高血压时血小板精氨酸转运能力明显低于正常人,其 V_{\max} 较正常人低 21%($P < 0.05$), K_m 无明显改变。提示高血压时血小板 NO 生成减少不仅与 NOS 活性降低有关,可能还受精氨酸转运功能减退的影响。

由本文结果可见,高血压时血小板聚集功能的增强可能与 L-精氨酸转运功能的降低及 NO 生成减少有关。提示在治疗高血压时,除积极降压外,还需考虑抑制血小板活性的药物和促进血小板 L-精氨酸转运的药物联合应用,对防治动脉粥样硬化及减少并发症可能有更好的

疗效。

参考文献

- 1 Islism F, Barefoe D, Ebanks M, et al. The role of platelet in essential hypertension. *Blood Press*, 1995, **4**: 199
- 2 董尔丹, 石山. 阿斯匹林与维拉米并用对血小板聚集与血栓形成的影响. *中国药理学报*, 1990, **6**(6): 375~378.
- 3 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrite, nitrate and ^{15}N in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **125**: 131
- 4 Drurante W, Liao L. Differential regulation of L-Arg transport and inducible NOS in cultured vascular smooth

muscle cells. *Am J Physiol*, 1995, **268**: H1158

- 5 Zicha J, Kunes J, Devynck MA. Platelet Calcium handling is different in rats with salt-dependent and spontaneous forms of genetic hypertension. *Am J Hypertens*, 1996, **9**: 812
- 6 欧和生, 曾建平, 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**: 327
- 7 Rodamski MW, Palmer RM, Moncada S. Characterization of the Larginine: nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1990, **87**: 5183

(此文 1998-07-06 收到, 1998-10-24 修回)

(此文编辑: 文玉珊)