

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0209-03

•临床研究•

急性冠状动脉综合征患者血小板一氧化氮合酶活性及表达改变

姚康¹, 刘亚平², 徐标³

(1. 东南大学附属中大医院心内科, 江苏省南京市 210009;

2. 常州市第一人民医院心内科, 江苏省常州市 213003; 3. 南京市鼓楼医院心内科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 内科学; 冠心病血小板一氧化氮合酶变化; 同位素色谱法; 急性冠状动脉综合征; 一氧化氮合酶; 血小板; 血栓形成

[摘要] 观察急性冠状动脉综合征患者血小板一氧化氮合酶活性及表达改变情况。急性冠状动脉综合征患者 32 例, 以健康成人 22 例作对照, 取外周静脉血后, 利用凝胶色谱柱法收集血小板, 用同位素两步色谱法测定一氧化氮合酶活性; 蛋白免疫印迹增强化学发光法检测内皮型一氧化氮合酶表达水平。结果发现, 基础状态下血小板一氧化氮合酶活性正常人为 $956.0 \pm 48.2 \text{ pmol}/10^8$ 血小板, 急性冠状动脉综合征患者为 $525.5 \pm 60.8 \text{ pmol}/10^8$ 血小板, 明显低于正常人 ($P < 0.01$), 组胺刺激后血小板一氧化氮合酶活性仍低于正常对照组 ($P < 0.01$); 与正常人相比, 急性冠状动脉综合征患者血小板内皮型一氧化氮合酶表达无明显改变。结果提示, 急性冠状动脉综合征患者血小板一氧化氮合酶活性降低, 一氧化氮释放减少可能是其血小板活化的机制之一。由于血小板粘附, 聚集白色血栓形成是急性冠状动脉综合征早期事件, 这对我们认识冠心病发病机理、开发临床新药提供新的思路。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Changes of Platelets Nitric Oxide Synthase Activity and Expression in Patients with Acute Coronary Syndromes

YAO Kang¹, LIU Ya-Ping², and XU Biao³

(1. Department of Cardiology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009; 2. Department of Cardiology, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213003; 3. Department of Cardiology, Gulou Hospital, Nanjing 210009; China)

[KEY WORDS] Acute Coronary Syndrome; Nitric Oxide Synthase; Platelet; Thrombosis; Nitric Oxide; Western Blotting

[ABSTRACT] **Aim** To observe the activity and expression of platelets nitric oxide synthase (NOS) in patients with acute coronary syndrome (ACS). **Methods** Peripheral venous blood was collected from both normals and ACS patients. Sepharose CL-2B gel column were used to isolate platelets. Nitric oxide synthase (NOS) activity in platelets was assessed by measuring the conversion of ^3H -L-arginine to ^3H -L-citrulline and determined in the absence or presence of histamine or L-NAME; The levels of endothelial NOS (eNOS) expression were measured by western blotting. **Results** Platelet NOS activity was significantly decreased in ACS patients compared with normal subjects ($P < 0.01$); it was still lower after histamine stimulation ($P < 0.01$); There were no significant change of eNOS expression between ACS patients and normal subjects. **Conclusions** Platelets NOS activity of ACS patients reduced. Since platelet aggregation and thrombus formation are implicated in unstable angina and myocardial infarction, impaired platelet NOS activity and thus decreased NO production may contribute to development of ACS.

急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 是一组以冠状动脉粥样硬化斑块破裂、出血和血栓形成为基本病理生理特点, 以急性心肌缺血或坏死为共同特征的临床综合征。主要包括不稳定型心绞痛、急性心肌梗死。其中血小板粘附、活化、聚集和血栓形成是其发病的中心环节^[1]。由一氧化氮

合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化产生的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 在抑制血小板粘附聚集、维持血流稳定上起着重要作用。现已证实人血小板内含有 NOS (主要是内皮型 NOS, 即 eNOS), 能利用左旋精氨酸合成 NO, NO 通过增加细胞内 cGMP, 从而抑制血小板的粘附与聚集作用^[2]。而 ACS 时血小板有一系列功能异常, 聚集粘附作用增强, 这些异常是否与血小板 NOS 系统改变有关及其分子机制, 目前研究甚少。本文通过观察 ACS 患者血小板 NOS 活性和表达变化, 从而探讨其在 ACS 发病学上的意义。

[收稿日期] 2003-08-20 [修回日期] 2003-12-30

[作者简介] 姚康, 硕士, 住院医师, 讲师, 主要从事血管内皮功能以及一氧化氮合酶活性调节方面的研究。刘亚平, 硕士, 主治医师, 主要从事血管内皮功能以及一氧化氮合酶活性调节方面的研究。徐标, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 国务院政府特殊津贴获得者, 主要从事心血管介入治疗以及血管内皮功能研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 ACS 患者 32 例,男 24 例,女 8 例,年龄 61.4 ± 9.7 岁。其中急性心肌梗死 18 例,典型不稳定型心绞痛 14 例;22 名体检正常者为对照组,男 16 例,女 6 例,年龄 57.3 ± 11.6 岁。入选要求:健康成人,无吸烟嗜好,抽血前 10 天未服用任何药物;④ ACS 患者血压正常,抽血前未服用非甾体类消炎药、硝酸酯类药,未用过肝素。以下情况在剔除之列:合并糖尿病、脑卒中、严重肾功能不全、感染、严重高热。符合要求者来院后立即抽血。

1.2 材料和试剂

Sepharose CL-2B 和蛋白 A-Sepharose CL4B 凝胶 (Pharmacia Biotech, Sweden); ^3H -L-精氨酸、Dowex 50WX 4-400(H⁺型)、L-NAME、组胺、PMSF 和亮氨酸抑制肽 (Sigma 公司);western 印迹试剂盒 (ECLTM, Amersham Life Science UK);兔抗人 eNOS 多克隆抗体和羊抗兔 HRP-IgG (Santa Cruz, Germany);血小板分离柱 (英国 St. Thomas Hospital 提供)。

1.3 纯化血小板悬液制备^[1]

健康成人及 ACS 患者抽取肘正中静脉血 30 mL, 3.8% 枸橼酸钠抗凝,置塑料离心管中,1 200 r/min 离心 8 min,收集上层血清,得到富血小板血浆 (PRP);加入已反复洗涤平衡过的 Sepharose CL2B 色谱柱中过柱,充分洗脱,收集含血小板的乳白色部分,即得到纯化的血小板悬液。调整血小板计数到 $1 \times 10^{11}/\text{L}$,备用。

1.4 一氧化氮合酶活性测定^[2]

根据 NOS 可使 ^3H -L-精氨酸生成 ^3H -L-瓜氨酸和 NO 原理,利用同位素两步色谱法测定 ^3H -L-精氨酸产量反映 NOS 活性。每 1 mL 血小板悬液加入 0.9 μCi 的 ^3H -L-精氨酸,样品分为对照组、组胺组和 L-NAME 组,37℃ 孵育 15 min,在相应试管中分别加入组胺 (终浓度 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、L-NAME (终浓度 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$),37℃ 孵育 30 min 后,加入终止反应液 1 mL,4℃、3 000 r/min 离心 20 min;弃上清后加入 1 mL 0.3 mol/L HClO_4 , -20℃ 冻融三次,破碎血小板,静置,上清经 Dowex 50WX 4-400 色谱柱充分交换,静置,收集流出液,加入闪烁液后行 ^3H -L-瓜氨酸放射活性测定。血小板 NOS 活性以 ^3H -L-瓜氨酸生成量表示,单位 pmol/ 10^8 血小板。

1.5 免疫沉淀法纯化血小板内皮型一氧化氮合酶蛋白

取纯化的血小板悬液,4℃、3 000 r/min 离心 20

min,弃上清,加入预冷至 0℃ 血小板裂解液 (含 1% SDS、0.5% 曲拉通 X-100、PMSF 1 mmol/L、亮氨酸抑制肽 2 mg/L) 0.8 mL 中,冰上振荡 30 min,8 000 r/min 离心 60 min,加入预先结合有 eNOS 抗体的蛋白 A-Sepharose CL4B 凝胶,4℃ 结合 2 h。反复洗涤三次后吸干所有液体,加入 50 μL 1×SDS 凝胶上样缓冲液,95℃、5 min,小心吸取上清。

1.6 蛋白免疫印迹

各取蛋白样品 10~15 μL 上样,行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用半干电转移法,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉 4℃ 过夜封阻;第二天分别与一抗 (兔抗人 eNOS 多克隆抗体,1:1000 稀释)、二抗 (羊抗兔 HRP-IgG,1:1000 稀释) 孵育,反复洗膜后滴加 ECL 显色液,暗室中胶片曝光。胶片蛋白条带进行光密度扫描分析。

1.7 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 Dunnett *t* 检验分析 (Prism 3.0 统计软件),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板一氧化氮合酶活性

急性冠状动脉综合征 (ACS) 患者血小板 NOS 活性明显低于正常人 ($P < 0.01$),组胺刺激后血小板 NOS 活性仍低 ($P < 0.01$),二者均可被 NOS 阻断剂 L-NAME 所阻断 (表 1, Table 1)。

表 1. 急性冠状动脉综合征患者及健康成人血小板一氧化氮合酶活性

Table 1. Platelets NOS activity in ACS patients and normal subjects ($\bar{x} \pm s$, pmol/ 10^8 platelets)

	<i>n</i>	对照组	组胺刺激组	L-NAME 组
正常人	22	956 $\pm$ 48	1 355 $\pm$ 82	273 $\pm$ 27 ^b
ACS 患者	32	527 $\pm$ 61	697 $\pm$ 59 ^{ab}	306 $\pm$ 26 ^b

a: $P < 0.01$, 与正常人比较; b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 血小板内皮型一氧化氮合酶蛋白表达

与对照组比较,ACS 患者 eNOS 蛋白表达无明显改变 (图 1, Figure 1)。

3 讨论

急性冠状动脉综合征 (ACS) 是严重的冠状动脉事件,严重威胁人类健康。研究表明冠状动脉粥样硬化斑块破裂、糜烂进而血栓形成和血管收缩是其

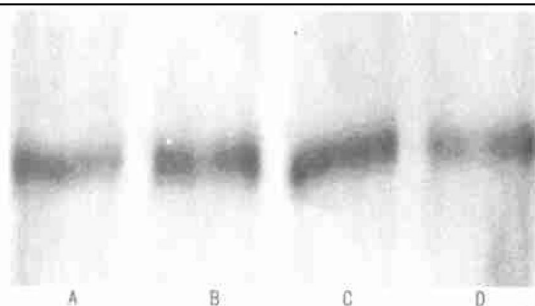


图 1. 蛋白免疫印迹检测内皮型一氧化氮合酶蛋白表达水平
A 和 B 为正常对照组; C 和 D 为急性冠状动脉综合征组。

Figure 1. The expression of eNOS in platelets detected by western blotting

发病的中心环节; 其中血循环中血小板发生活化并介导的白色血栓形成在急性冠状动脉综合征发病过程中起着重要作用。斑块破裂后内皮下胶原暴露, 血小板粘附、活化和聚集过程中释放的 ADP、5-羟色胺、血栓素 A_2 等对血小板持续激活形成正反馈效应^[3]。抗血小板药物—肠溶阿司匹林可显著降低冠心病心血管事件死亡率, 这也从临床上进一步证实了血小板在冠状动脉事件中的作用。一氧化氮由 NOS 作用于底物产生, 它是重要的生物信使分子和效应分子。在心血管系统, 一氧化氮除调节血压和血管张力, 抑制平滑肌细胞增殖外, 还有抗血小板粘附聚集作用^[4]。内皮功能障碍, 一氧化氮合成释放减少与高血压、冠心病、糖尿病血管并发症等密切相关。体内许多细胞有一氧化氮合成通路, 如血管内皮细胞、平滑肌细胞、神经细胞等。1990 年 Radomski 等^[5]首次报道血小板存在 L-arginine/一氧化氮通路, 能合成释放一氧化氮; 随后多项研究证实血小板能够表达 eNOS 和 iNOS^[6,7]。它的主要功能是: 当血小板活化、粘附、聚集时合成释放一氧化氮, 以负反馈形式抑制血小板的活化, 从而抑制血小板血栓形成。这其间的精确平衡调节是维持血小板正常功能, 维持正常血流稳定的重要环节^[6]。急性冠状动脉综合征时血小板功能异常, Freedman 等^[8]用微电极法直接测量急性冠状动脉综合征患者血小板一氧化氮释

放, 发现其血小板一氧化氮释放低于正常人。而关于一氧化氮释放受损的分子机制研究甚少, 可能包括催化一氧化氮合成反应的限速酶 NOS 活性及表达改变等。

本研究利用凝胶过滤柱法制备纯化血小板悬液, 去除血浆中的一些活化因子, 用同位素两步色谱法检测 NOS 活性, 发现急性冠状动脉综合征患者血小板 NOS 活性明显低于正常人 ($P < 0.01$); 用 NOS 激动剂组胺刺激后仍低于正常人 ($P < 0.01$) 的基础状态。蛋白免疫杂交分析显示, 急性冠状动脉综合征患者血小板 eNOS 表达并无明显改变。这表明急性冠状动脉综合征时一氧化氮释放减少主要与 eNOS 活性下降有关, 而不是通过降低 eNOS 表达来实现的。有关急性冠状动脉综合征时 eNOS 活性下调可能有更为复杂的分子机制, 尚需进一步研究。由于血小板粘附、聚集和白色血栓形成是不稳定型心绞痛、急性心肌梗死的主要病理基础, 本研究结果对深入认识急性冠状动脉综合征发病机理、寻找新的干预措施、设计开发临床新药都有一定意义。

[参考文献]

- [1] Timmons S, Harrison JK, Moncada S. Separation of human platelets from plasma proteins in clotting factor (B γ WV) by a combined albumin gradient-gel filtration method using HEPES buffer. *Thromb Res*, 1978, **12**: 297-301
- [2] 张新波, 黄海繁, 张灵芝. 一氧化氮合酶活性的测定及其应用. *北京医科大学学报*, 1994, **26** (增刊): 173-174
- [3] Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*, 2000, **83**: 361-344
- [4] Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *J Clin Invest*, 1991, **21**: 361-374
- [5] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 5 193-197
- [6] Mehta JL, Chen LY, Kone, BC. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med*, 1995, **125**: 370-371
- [7] Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovas Pharmacol*, 1996, **27**: 154-158
- [8] Freedman JE, Ting B, Hankin B. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation*, 1998, **98**: 1 481-486

(此文编辑 文玉珊)