

# 硝酸甘油耐受机制研究进展

聂盛丹<sup>1</sup>综述, 胡长平<sup>2</sup>, 李元建<sup>2</sup>审校

(1. 厦门市第一医院, 福建省厦门市 361000; 2. 中南大学药学院, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 药理学; 硝酸甘油耐受机制; 综述; 硝酸甘油; 心绞痛

[摘要] 硝酸甘油是治疗心绞痛的经典药物, 其舒张血管作用是通过释放一氧化氮所介导。长期反复应用硝酸甘油引起耐受导致疗效减弱, 故限制了硝酸甘油的临床应用。硝酸甘油耐受机制尚未完全阐明, 涉及多种代谢酶活性、内源性活性物质水平以及受体活性变化。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

硝酸甘油是治疗心绞痛的经典药物, 通过舒张血管, 降低前后负荷, 扩张冠状动脉, 减少心肌耗氧而发挥作用。最初认为其直接作用于血管平滑肌细胞而产生舒血管效应, 直至 1977 年才认识其舒张血管作用是通过释放一氧化氮(nitric oxide, NO)所介导<sup>[1]</sup>。NO 直接激活鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)或促进前列腺素 I<sub>2</sub>(prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>)释放间接活化腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC), 使组织中第二信使环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)和环磷酸鸟苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)生成增加, cGMP 和 cAMP 分别激活 cGMP 依赖性激酶 iv(cGMP-dependent protein kinase, cGK-I)和 cAMP 依赖性激酶 iv(cAMP-dependent protein kinase, cAK-I), cGK 和 cAK 使血管扩张性磷酸蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)磷酸化调节细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度而产生舒血管作用。但长期反复应用硝酸甘油引起耐受导致疗效减弱, 故限制了硝酸甘油的临床应用。硝酸甘油耐受机制尚未完全阐明, 涉及多种代谢酶活性、内源性活性物质水平以及受体活性变化。

## 1 血容量扩张

在急性心肌梗死或慢性心功能不全的冠心病患者和健康志愿者, 静脉给予硝酸甘油时血细胞比积降低, 推测静脉输注硝酸甘油期间血浆容量扩张能部分抵消其扩张血管作用, 可能是其耐受形成的原因之一。硝酸甘油耐受时增加血容量可能与水钠潴留和体液由细胞内向细胞外转移增加有关, 涉及肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活以及血管紧张素 II 的分泌增加<sup>[2]</sup>。但随后的研究认为血容量扩张不是硝酸甘油耐受的主要原因, 因为硝酸甘油出现耐受后, 血细胞比积继续下降并持续数天; ④在离体血管硝酸甘油也可诱导耐受; ④氢氯噻嗪治疗并不能有效防止其耐受发生<sup>[5]</sup>。

## 2 缩血管反应增强

研究证明, 持续使用硝酸甘油后缩血管反应增强, 这种改变与缩血管物质的效应增强有关, 涉及交感神经系统、肾素-血管紧张素系统及局部活性物质(如内皮素 1)分泌变化。硝酸甘油扩张血管降低血压时可引起交感神经反射性兴奋, 其耐受形成可能与交感神经系统兴奋性持续增加有关, 耐受出现后停用硝酸甘油可降低病人的运动耐量, 引发反跳性的心肌缺血; 硝酸酯类耐受后血浆中儿茶酚胺、精氨酸血管加压素浓度升高; NO 对交感中枢抑制作用减弱。已知内源性 NO 通过减弱脑干中枢神经兴奋性或抑制神经节后神经传递使交感缩血管作用减弱, 脑室内给予一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸(N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine, L-NNA)后交感活性则显著增强<sup>[3]</sup>。

硝酸甘油耐受时表现为肾素-血管紧张素系统激活, 如家兔持续使用硝酸甘油 72 h 后, 其舒血管作用显著下降, 血浆肾素活性、血管紧张素 II 水平及血管紧张素 II 受体 mRNA 显著增加, 预先应用血管紧张素 II 转化酶抑制剂或血管紧张素 II 受体阻断剂能有效防止耐受形成<sup>[3,4]</sup>。在体家兔连续给予大剂量硝酸甘油诱导耐受, 显著增加血管紧张素 II、血栓素和 5-羟色胺的缩血管作用<sup>[5]</sup>。临床研究发现, 慢性冠心病患者连续静脉滴注硝酸甘油, 外源性血管紧张素 II 和苯肾上腺素降低前臂血流量作用显著增强, 而预先应用血管紧张素 II 转化酶抑制剂卡托普利, 可取消这种对缩血管物质的高敏感性<sup>[5]</sup>。这种高收缩反应涉及蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)途径, 因为能被 PKC 抑制剂 calphostin C 或 N-benzoyl-staurosporine 所阻断<sup>[5]</sup>。

内皮素 1 是参与硝酸甘油耐受的另因素, 支持证据有: 硝酸甘油耐受后血管组织中可见密集的内皮素 1 样和巨大内皮素 1 样免疫沉淀, 其水平增高可能与血管紧张素 II 及氧化应激有关, 因为血管紧张素 II 及氧化应激均可促使内皮及平滑肌细胞分泌内皮素 1; ④内皮素 1 除直接收缩血管外还正反馈调节血管紧张素 II 的生成与释放; ④内皮素 1 孵育主动脉环后, 对血管紧张素 II、苯肾上腺素、5-羟色胺、KCl 的收缩敏感性显著增高, 其机制也与 PKC 活性增高有关; 硝酸甘油耐受大鼠预先给予内皮素 1 受体阻断剂波森坦能

[收稿日期] 2004-11-29 [修回日期] 2005-09-19

[作者简介] 聂盛丹, 硕士, E-mail 为 nie\_shengdan@yahoo.com.cn。  
胡长平, 博士, 副教授。通讯作者李元建, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管药理研究, E-mail 为 yuan\_jianli@yahoo.com。

恢复硝酸甘油的舒血管作用<sup>[3]</sup>。

### 3 舒血管物质减少

硝酸甘油的舒血管和降压效应及耐受形成与降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 有关<sup>[6,7]</sup>。大鼠静脉注射硝酸甘油,在血压下降的同时伴有血浆 NO 和 CGRP 升高,预先给予大剂量辣椒素耗竭 CGRP 后显著减弱硝酸甘油降压效应及升高血浆 CGRP 作用;硝酸甘油孵育离体大鼠主动脉, CGRP 显著增加,选择性 CGRP 受体拮抗剂 CGRP8-37 可削弱硝酸甘油的扩张大鼠主动脉作用。在体大鼠连续给予大剂量硝酸甘油诱导耐受后,其降压作用消失,同时显著降低硝酸甘油升高血浆 CGRP 与 NO 浓度效应;硝酸甘油停用 4 或 8 天后,能部分或完全恢复其降压和促 CGRP 释放作用<sup>[6]</sup>。硝酸甘油耐受形成后,巯基供体 N-乙酰半胱氨酸及含巯基的血管紧张素 iv 转化酶抑制剂卡托普利能逆转硝酸甘油的舒血管、降压及促 CGRP 释放作用<sup>[6]</sup>。硝酸甘油产生耐受后不影响外源性 CGRP 的舒血管作用<sup>[6]</sup>,提示硝酸甘油耐受并非影响 CGRP 受体。

研究发现硝酸甘油及其活性代谢产物 NO 通过活化前列环素合酶使 PGI<sub>2</sub> 合成增加,前列环素合酶抑制剂能抑制硝酸甘油舒张血管效应<sup>[8]</sup>,故推测硝酸甘油及其活性代谢产物 NO 的部分舒血管作用由 PGI<sub>2</sub> 介导。在大鼠和家兔,硝酸甘油发生耐受的同时 PGI<sub>2</sub> 的主要代谢产物 6-酮-PGF<sub>1α</sub> 显著减少,提示前列环素合酶活性下降。硝酸甘油抑制前列环素合酶的机制可能是其诱导血管组织中过氧化硝基产物增多<sup>[8]</sup>,使前列环素合酶酪氨酸硝基化而抑制活性<sup>[9]</sup>。

### 4 氧化应激损伤

大量研究表明,硝酸甘油增加氧自由基生成也是硝酸甘油耐受的重要机制。细胞培养实验发现,硝酸甘油孵育内皮细胞或平滑肌细胞 24 h,活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加,硝酸甘油升高内皮细胞中 cGMP 作用减弱,而抗氧化剂维生素 C 可显著抑制硝酸甘油引起的 ROS 生成,并恢复硝酸甘油升高内皮细胞中 cGMP 的作用<sup>[10]</sup>。在在体家兔,硝酸甘油诱导耐受的同时,血管组织中超氧阴离子产物及 NADH 活性增加,而超氧化物歧化酶活性及表达下降,外源性超氧化物歧化酶孵育耐受血管组织可恢复硝酸甘油及乙酰胆碱的舒血管作用,超氧化物歧化酶抑制剂可模拟家兔离体血管耐受<sup>[3,11]</sup>。在体大鼠实验证明,雷米普利、氯沙坦预处理 6 周可阻止硝酸甘油耐受形成,并减少血管组织中的超氧阴离子,其作用依赖于血管内皮存在,提示在内皮细胞硝酸酯类诱导的氧化应激、增加氧自由基的产生而降低 NO 的效应。在人体抗氧化剂维生素 E、维生素 C、叶酸也能防止硝酸甘油耐受形成,并提高细胞内 cGMP 水平。目前,关于硝酸甘油耐受时血管组织超氧阴离子增多机制仍不清楚,可能与 NOS、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸、黄嘌呤氧化还原酶介导硝酸甘油的促氧自由基生成有关<sup>[3,11]</sup>。

硝酸甘油刺激血管释放超氧阴离子与 NO 反应生成过

氧亚硝基化合物,不仅减弱了硝酸甘油舒血管作用,并能引起氧化应激反应诱发内皮损伤<sup>[5]</sup>。在体动物实验发现,硝酸甘油和乙酰胆碱可产生交叉耐受<sup>[12,13]</sup>。最近发现冠心病患者持续使用硝酸甘油贴皮剂,乙酰胆碱导致的冠状动脉前降支收缩增强<sup>[5,14]</sup>;健康志愿者持续应用硝酸甘油后,硝酸甘油及外源性乙酰胆碱舒张前臂动脉的作用显著减弱,同时 N-单甲基精氨酸 (N-monomethyl-L-arginine, L-NMMA) 诱导的血管收缩作用显著减弱,低剂量 L-NMMA 反而引起异常的舒血管作用,而硝普钠的舒血管反应无改变,叶酸能防止耐受发生的同时恢复乙酰胆碱舒张血管作用,推测硝酸甘油产生耐受的同时伴有内皮损伤与 NOS 功能失调<sup>[15]</sup>,硝酸甘油耐受时的 NOS 功能失调可能与 NOS 底物四氢生物喋呤和 L-精氨酸耗竭有关。研究证明,补充四氢生物喋呤可逆转耐受大鼠硝酸甘油降压作用,恢复 NOS 活性,减轻硝酸甘油所致内皮损伤<sup>[16]</sup>。NOS 抑制剂 L-NNA 显著降低耐受大鼠血管组织中超氧阴离子水平,可能是耐受大鼠血管组织 NOS 脱偶联增加超氧阴离子产生<sup>[17]</sup>。在缺乏底物 L-精氨酸或辅因子四氢生物喋呤的情况下, NOS 的催化活性出现失偶联,不能催化 L-精氨酸的两个电子氧化而形成 NO,相反使分子氧接受单个电子而生成超氧阴离子自由基<sup>[18]</sup>。体外实验证明补充 L-精氨酸可阻止 NOS 脱偶联和耐受形成<sup>[3]</sup>。

### 5 一氧化氮/环磷酸鸟苷信号系统异常

磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 在平滑肌细胞中主要有四种亚型,其中 PDE 1A1 特异性降解 cGMP, PDE 1A1 活性增加可导致 cGMP 降解加快。研究发现耐受大鼠血管组织中钙依赖性 PDE 1A1 活性及其 mRNA 水平和蛋白水平显著增加,非选择性 PDE 抑制剂 Zaprinast 和选择性 PDE1 抑制剂长春西汀能有效逆转硝酸甘油耐受<sup>[14,19]</sup>。PDE 1A1 含量及活性增加导致细胞内 cGMP 降解加快,细胞内钙增加,使血管对硝酸甘油及其它血管舒张因子的舒张反应下降,而对缩血管物质敏感性增加<sup>[19]</sup>。细胞培养实验表明,血管紧张素 II 孵育主动脉平滑肌细胞,细胞内钙浓度和 PDE 1A1 活性显著增加,并可取消心房钠肽升高 cGMP 的作用,长春西汀可取消血管紧张素 II 的作用<sup>[19]</sup>。这些结果表明 PDE 1A1 活性增高是硝酸甘油耐受形成的机制之一。

在 cGK-I 基因敲除小鼠,硝基化合物的舒血管作用消失,提示 cGK 活性或表达改变可能导致硝基化合物舒血管作用减弱。最近研究表明 P-VASP 含量改变与内皮功能及氧化应激密切相关<sup>[20]</sup>。大鼠和家兔连续使用硝酸甘油诱导耐受,血管组织的 cGK-I 及 VASP 表达无改变,但 VASP 活性显著下降<sup>[21]</sup>。在冠心病患者体内也得到同样的结果<sup>[22]</sup>。家兔体内给予维生素 C 有效恢复硝酸甘油的舒血管作用,同时使 P-VASP 水平恢复<sup>[23]</sup>。许多实验证明,过氧化亚硝基及超氧阴离子使巯基氧化而抑制 sGC 活性,当巯基缺乏时,硝酸甘油氧化 sGC 的活性位点使其活性下降<sup>[24]</sup>。家兔和大鼠给予高剂量硝酸甘油和硝酸酯类化合物 ISDN 后,血管组织的 cGK-I 表达减少。

## 6 硝酸甘油生物转化异常

耐受血管组织中硝酸甘油化合物转化显著减弱,可能涉及还原型巯基耗竭。最近报道长期应用硝酸酯类不伴有组织中巯基的耗竭。推测可能是细胞内增多的超氧阴离子使蛋白结合型巯基氧化引起 NOS 及膜蛋白酶功能下降,而导致硝酸酯类的生物转化受抑。大量实验表明,氧化还原反应改变或过氧化硝基生成增加均抑制 P<sub>450</sub> 及谷胱甘肽-S 转移酶活性<sup>[25,26]</sup>,这些酶的抑制剂亦可显著加重硝酸甘油耐受<sup>[27]</sup>。

最近报道,线粒体醛脱氢酶在硝酸甘油的生物转化过程中起重要作用,该酶消耗巯基特异性催化硝酸甘油转化为 1,2-二硝酸甘油和亚硝酸盐。体内外实验发现线粒体醛脱氢酶抑制剂可取消硝酸甘油的舒血管作用,并阻止硝酸甘油转化生成 1,2-二硝酸甘油,体外高浓度硝酸甘油孵育血管组织可显著降低线粒体醛脱氢酶活性,并抑制 1,2-二硝酸甘油的生成。在体大鼠连续给予大剂量硝酸甘油诱导耐受后硝酸甘油舒血管作用显著减弱的同时硝酸甘油生物转化活性产物 1,2-二硝酸甘油减少,心脏和血管组织线粒体线粒体醛脱氢酶活性下降 50%,其机制涉及线粒体内自由基生成增加<sup>[13]</sup>。这些研究提示硝酸甘油耐受可能与线粒体醛脱氢酶功能缺失有关。

## 7 结语

硝酸甘油耐受现象最初的研究主要集中于硝酸甘油的生物转化和脱硝基过程的异常,认为是由于巯基耗竭所致。随后发现硝酸甘油耐受涉及 sGC 活性降低、PDE 活性增高、交感神经系统与肾素-血管紧张素系统激活、内皮受损、线粒体醛脱氢酶活性降低以及超氧阴离子生成等因素。最近将硝酸甘油引起的上述多种生物化学改变归因于其诱导氧化应激<sup>[2]</sup>。然而其确切机制尚待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, **27** (4): 313-319
- [2] Gori T, Parker JD. Nitrate tolerance: a unifying hypothesis. *Circulation*, 2002, **106** (19): 2 510-513
- [3] Gori T, Parker JD. The puzzle of nitrate tolerance: pieces smaller than we thought? *Circulation*, 2002, **106** (18): 2 404-408
- [4] Thadani U. Prevention of nitrate tolerance with angiotensin II receptor type 1 blocker in patients with stable angina: yet another failed strategy to prevent tolerance. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2004, **18** (5): 339-342
- [5] Warnholtz A, Tsilimingas N, Wendt M, Munzel T. Mechanisms underlying nitrate-induced endothelial dysfunction: insight from experimental and clinical studies. *Heart Fail Rev*, 2002, **7** (4): 335-345
- [6] Li YJ, Du YH. CGRP-mediated cardiovascular effect of nitroglycerin. *Med Hypotheses*, 2003, **60** (5): 693-698
- [7] Booth BP, Tabrizi Fard MA, Fung H. Calcitonin gene-related peptide-dependent vascular relaxation of rat aorta. An additional mechanism for nitroglycerin. *Biochem Pharmacol*, 2000, **59** (12): 1 603-609
- [8] Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, et al. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **42** (10): 1 826-834
- [9] Zou MH, Shi C, Cohen RA. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H (2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes*, 2002, **51** (1): 198-203
- [10] About-Mohamed G, Johnson JA, Jin L, El-Remessy AB, Do K, Kaesemeyer WH, et al. Roles of superoxide, peroxynitrite, and protein kinase C in the development of tolerance to nitroglycerin. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, **308** (1): 289-299
- [11] Otto A, Fontaine D, Fontaine J, Berkenboom G. Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, **46** (2): 177-184
- [12] Kusama N, Kajikuri J, Watanabe Y, Suzuki Y, Katsuya H, Itoh T. Characteristics of attenuated endothelium-dependent relaxation seen in rabbit intrapulmonary vein following chronic nitroglycerine administration. *Br J Pharmacol*, 2005, **145** (2): 193-202
- [13] Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, et al. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*, 2004, **113** (3): 482-489
- [14] Parker JD, Gori T. Tolerance to the Organic Nitrates: New Ideas, New Mechanisms, Continued Mystery. *Circulation*, 2001, **104** (19): 2 263-265
- [15] Gori T, Burstein JM, Ahmed S, Miner SE, A-Hesayen A, Kelly S, et al. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation*, 2001, **104** (10): 1 119-123
- [16] Gruhn N, Aldershvile J, Boesgaard S. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in nitroglycerin-tolerant rats. *Eur J Pharmacol*, 2001, **416** (3): 245-249
- [17] Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, et al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res*, 2000, **86** (1): E7-E12
- [18] 姜德建, 李元建. 非对称性二甲基精氨酸——新的心血管疾病危险因子和药物防治靶点. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 379-382
- [19] Kim D, Rybalkin SD, Pi X, Wang Y, Zhang C, Munzel T, et al. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. *Circulation*, 2001, **104** (19): 2 338-343
- [20] Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res*, 2000, **87** (11): 999-1 005
- [21] Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, et al. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation*, 2001, **103** (17): 2 188-194
- [22] Massberg S, Saubier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, et al. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med*, 1999, **189** (8): 1 255-264
- [23] Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, et al. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys) function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*, 2002, **105** (10): 1 170-175
- [24] Artz JD, Schmidt B, McCracken JL, Marletta MA. Effects of nitroglycerin on soluble guanylate cyclase: implications for nitrate tolerance. *J Biol Chem*, 2002, **277** (21): 18 253-256
- [25] Daiber A, Herold S, Schoneich C, Nangaladze D, Peterson JA, Ullrich V. Nitration and inactivation of cytochrome P450BM-3 by peroxynitrite. Stopped-flow measurements prove ferryl intermediates. *Eur J Biochem*, 2000, **267** (23): 6 729-739
- [26] Wong PS, Eiserich JP, Reddy S, Lopez CL, Cross CE, van der Vliet A. Inactivation of glutathione S-transferases by nitric oxide-derived oxidants: exploring a role for tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys*, 2001, **394** (2): 216-228
- [27] Ratz JD, McGuire JJ, Anderson DJ, Bennett BM. Effects of the flavoprotein inhibitor, diphenyleneiodonium sulfate, on ex vivo organic nitrate tolerance in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, **293** (2): 569-577

(此文编辑 文玉珊)