

[文章编号] 1007-3949(2000)-02-0147-04

• 实验研究 •

氯沙坦和依那普利对左旋硝基精氨酸诱导的高血压大鼠纤溶功能的影响

田洪森, 丁文惠, 彭旭, 王晓红, 唐朝枢

(北京医科大学第一医院心内科, 北京 100034)

[主题词] 氯沙坦/药理学; 依那普利/药理学; 高血压; 模型, 心血管; 大鼠; 纤溶酶原激活物, 组织型; 纤溶酶原激活物抑制剂-1

[摘要] 为探讨肾素-血管紧张素系统在纤溶功能紊乱中的意义; 用腹腔注射左旋硝基精氨酸诱导大鼠高血压, 导致纤溶功能紊乱, 从第 2 周开始分别给血管紧张素Ⅱ的 1 型受体阻滞剂氯沙坦和血管紧张素转换酶抑制剂依那普利干预, 于第 5 周末应用发色底物法测定各组大鼠组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂-1 的血浆活性, 并观察氯沙坦和依那普利干预的影响。结果发现, 与对照组相比, 高血压大鼠血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1 活性增强 50%, 组织型纤溶酶原激活物活性减低 34%, 纤溶酶原激活物抑制剂-1 与组织型纤溶酶原激活物的比值升高 127%, 差异均有显著性 ($P < 0.01$)。氯沙坦或依那普利干预均可使上述指标得到显著改善 ($P < 0.01$)。离体血管孵育时高血压大鼠血管释放纤溶酶原激活物抑制剂-1 的能力比对照组明显增强 ($P < 0.01$); 氯沙坦或依那普利干预使其生成纤溶酶原激活物抑制剂-1 的基础水平及不同浓度凝血酶诱导的过度释放分别减少 19%~46% 和 25%~50% ($P < 0.01$), 两种干预间差异无显著性; 给 10.0 kIU/L 凝血酶刺激时, 高血压大鼠离体血管组织型纤溶酶原激活物的生成较对照组下降 32% ($P < 0.05$), 氯沙坦和依那普利干预均未能改善这种下降趋势。结果表明, 氯沙坦或依那普利干预可抑制高血压大鼠血管纤溶酶原激活物抑制剂-1 的过度生成, 但对组织型纤溶酶原激活物无影响。提示肾素-血管紧张素系统对纤溶系统的调节主要是通过调节纤溶酶原激活物抑制剂-1 的生成, 并经血管紧张素Ⅱ介导。

[中图分类号] R972

[文献标识码] A

Effect of Losartan and Enalapril on Fibrinolytic Function of L-N-Nitro-Arginine-induced Hypertensive Rats

TIAN Hong-Sen, DING Wen-Hui, PENG Xu, WANG Xiao-Hong, and TANG Chao-Shu

(Department of Cardiology, the First Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China)

MeSH Losartan/pharmacology; Enalapril/pharmacology; Hypertension; Models, Cardiovascular; Rat; Plasminogen Activators, Tissue; Plasminogen Activator Inhibitor-1

ABSTRACT **Aim** To investigate the role of renin-angiotensin system (RAS) in the cause of fibrinolytic dysfunction.

Methods 28 male Wistar rats were randomly divided into four groups: L-NNA group: Wistar rats were administered by intraperitoneal injection of L-NNA (15 mg/kg everyday) to induce hypertensive model for 5 weeks; Losartan group and Enalapril group: the hypertensive model were induced as L-NNA group, and treated with losartan (10 mg/kg everyday) or enalapril (10 mg/kg everyday) by gavage from second to fifth week; 4) Control group: treated with normal saline and tap water instead of L-NNA and losartan or enalapril in the same procedure. The activity changes of PAI-1 and tPA both in plasma and in isolated vessels incubation were measured by spectrophotometric assay.

Results Significant fibrinolytic dysfunction was found in the L-NNA rats, and this dysfunction was markedly improved by the treatment with losartan or enalapril; Compared with the control group, the ability of PAI-1 release in isolated vessels of L-NNA rats was significantly increased ($P < 0.01$). In the losartan- and enalapril-treated group, the baseline levels and thrombin-induced release of PAI-1 in isolated vessels were reduced by 19%-46% and 25%-50% respectively ($P < 0.05$), and there is no statistical difference between the two treatment groups. When induced by 10.0 kIU/L thrombin, the tPA release in isolated vessels of L-NNA rats were 32% lower than that of controls ($P < 0.05$), and this decline was not improved by the treatment with losartan and enalapril.

Conclusions The regulation of RAS on fibrinolysis system is to accelerate the release of PAI-1, which is mediated by Angiotensin II.

[作者简介] 田洪森, 男, 1967 年 2 月出生, 硕士研究生; 丁文惠, 女, 1954 年 4 月出生, 主任医师, 硕士研究生导师; 唐朝枢, 男, 1945 年 9 月出生, 病理生理学教授, 博士研究生导师。

高血压、动脉粥样硬化和心肌梗死等心血管疾病常并存凝血-纤溶系统功能紊乱,而凝血-纤溶系统功能紊乱又严重影响了这些疾病的发生、发展及预后^[1]。近年来认为肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在纤溶系统的调节中起关键性作用^[2],但肾素-血管紧张素系统调节纤溶系统的机制目前尚未完全阐明。本研究在一氧化氮合酶抑制剂左旋硝基精氨酸(L-N-Nitro-Arginine, L-NNA)诱导的大鼠高血压模型上,分别给血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$)的1型受体阻滞剂氯沙坦(losartan)和血管紧张素转换酶抑制剂依那普利干预,研究氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血管生成组织型纤溶酶原激活物(tissue type plasminogen activator, tPA)及其抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)的影响,以探讨RAS在纤溶功能紊乱中的发病学意义。

1 材料与方法

1.1 材料

左旋硝基精氨酸(L-NNA)和凝血酶购自美国Sigma公司,氯沙坦和依那普利由默沙东公司提供,PAI-1和tPA活性测定试剂盒由上海医科大学分子遗传室提供。

1.2 高血压模型制备^[3]

将28只体重150~170 g雄性Wistar大鼠随机分为4组。L-NNA组:每日给L-NNA 15 mg/kg,分两次腹腔注射,连续5周,以此方法来制备高血压模型;于第2周起给自来水2 mL灌胃,每日1次,连续4周。④氯沙坦组:高血压模型制备同L-NNA组所述;于第2周起每日给氯沙坦10 mg/kg灌胃,连续4周。④依那普利组:高血压模型制备同L-NNA组所述,于第2周起每日给依那普利10 mg/kg灌胃,连续4周。对照组:给1 mL生理盐水腹腔注射,每日2次,连续5周,于第2周起给自来水2 mL灌胃,每日1次,连续4周。

1.3 血压、心率及心指数测定

于第5周末,应用RBP-1型大鼠血压计(中日友好医学院研究所研制)测定各组大鼠尾动脉压及心率,测定时间定于8:00~9:00。以心脏重量(mg)/体重(g)比值表示心指数。

1.4 离体血管孵育^[4]

应用戊巴比妥钠40~60 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠,动脉放血处死,摘取胸、腹主动脉,剪成2 mm薄片,称重并分成4份,分别置于不含或含0.5、2.0和

10.0 kIU/L等不同浓度凝血酶的1 mL 1640培养基中,95% O_2 -5% CO_2 饱和、37℃震荡孵育4 h,收集上清液,测定血管释放的tPA和PAI-1活性。

1.5 血浆和血管孵育液中纤溶酶原激活物抑制剂-1和组织型纤溶酶原激活物活性测定

第5周末经大鼠腹主动脉抽取血样1.8 mL加入含0.2 mL 0.13 mmol/L的枸橼酸钠抗凝管中,迅速低温离心分离血浆,分装后置-70℃冰箱冻存,测定PAI-1活性的血浆标本须加等体积酸化液酸化后冻存;用于测定tPA活性的血管孵育液亦须进行酸化。用发色底物法测定PAI-1和tPA活性,按试剂盒说明制备标准曲线,将待测标本稀释后加入平底酶标板,然后按说明加入发色底物、纤溶酶原和加速剂,37℃水浴180 min后终止反应,应用BIO-RAD型酶标仪在405 nm波长下测定各孔的吸光度值,根据标准曲线的回归方程计算PAI-1和tPA活性。

1.6 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用方差分析及组间 q 检验作统计学处理。

2 结果

2.1 氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血压的影响

氯沙坦和依那普利对大鼠血压的影响如表1(Table 1)所示。与对照组动物相比,L-NNA大鼠血压升高47% ($P < 0.01$),心率减慢12% ($P < 0.01$),心肌肥大,心指数增加25% ($P < 0.01$);氯沙坦和依那普利干预明显改善动物的高血压,与L-NNA组比较,血压分别降低18%和19% ($P < 0.01$),心率分别增快7%和8% ($P < 0.01$),心指数分别降低13%和16% ($P < 0.01$)。

表1. 氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血压、心率和心指数的影响。

Table 1. Effect of losartan and enalapril on heart rate, blood pressure and heart index of L-NNA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$).

Groups	Blood pressure (mm Hg)	Heart rate (beats/min)	Heart index
Control	112 \pm 7	396 \pm 16	3.14 \pm 0.13
L-NNA	165 \pm 9 ^a	348 \pm 20 ^a	3.94 \pm 0.21 ^a
Losartan	136 \pm 6 ^b	371 \pm 15 ^c	3.42 \pm 0.17 ^b
Enalapril	133 \pm 7 ^b	377 \pm 16 ^c	3.32 \pm 0.15 ^b

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, compared with L-NNA group.

2.2 氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血浆纤溶酶

原激活物抑制剂-1 和组织型纤溶酶原激活物活性的影响

氯沙坦和依那普利对大鼠血浆纤溶功能的影响如表 2 (Table 2) 所示。与对照组相比, L-NNA 大鼠血浆 PAF-1 活性增加 50% ($P < 0.01$), tPA 活性减低 34% ($P < 0.01$), PAF-1 与 tPA 的比值升高 127% ($P < 0.01$); 氯沙坦和依那普利干预均可明显改善 L-NNA 大鼠的纤溶功能, 与 L-NNA 组相比, PAF-1 活性分别减低 23% 和 25% ($P < 0.01$), tPA 活性分别增加 22% 和 29% ($P < 0.01$), PAF-1/tPA 比值分别降低 37% 和 40% ($P < 0.01$)。

表 2. 氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1 和组织型纤溶酶原激活物活性的影响。

Table 2. Effect of losartan and enalapril on plasma PAF-1 and tPA activity of L-NNA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$).

Groups	PAF-1 activity (kAU/L)	tPA activity (kIU/L)	Ratio of PAF-1 and tPA
Control	5.83 \pm 1.02	1.20 \pm 0.16	4.87 \pm 0.52
L-NNA	8.72 \pm 1.38 ^a	0.79 \pm 0.12 ^a	11.06 \pm 1.32 ^a
Losartan	6.71 \pm 1.22 ^b	0.96 \pm 0.13 ^c	6.96 \pm 1.06 ^b
Enalapril	6.58 \pm 1.18 ^b	1.02 \pm 0.14 ^c	6.65 \pm 0.90 ^b

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, compared with L-NNA group.

表 3. 氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血管生成纤溶酶原激活物抑制剂-1 的影响。

Table 3. Effect of losartan and enalapril on PAF-1 release in isolated vessels of L-NNA rats ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	Concentration of thrombin (kIU/L)			
		0	0.5	2.0	10.0
Control	7	1.03 \pm 0.19	1.31 \pm 0.33	2.10 \pm 0.55	1.62 \pm 0.46
L-NNA	7	1.55 \pm 0.25 ^a	2.96 \pm 0.75 ^a	4.85 \pm 1.21 ^a	3.92 \pm 1.10 ^a
Losartan	7	1.26 \pm 0.20 ^b	2.04 \pm 0.55 ^c	3.02 \pm 0.76 ^c	2.12 \pm 0.61 ^c
Enalapril	7	1.17 \pm 0.34 ^b	1.85 \pm 0.51 ^c	2.87 \pm 0.66 ^c	1.96 \pm 0.49 ^c

Vessels are incubated in conditional medium with absence of thrombin, 0.5, 2.0 or 10.0 kIU/L thrombin for 4 hours; a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, compared with L-NNA group.

表 4. 氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血管生成组织型纤溶酶原激活物的影响。

Table 4. Effect of losartan and enalapril on tPA release in isolated vessels of L-NNA rats ($\bar{x} \pm s$, $\times 10$ IU/L).

Groups	n	Concentration of thrombin (kIU/L)			
		0	0.5	2.0	10.0
Control	7	8.2 \pm 1.3	8.8 \pm 1.5	12.1 \pm 2.6	17.8 \pm 3.2
L-NNA	7	6.8 \pm 1.4	7.0 \pm 1.3	9.0 \pm 2.2	12.1 \pm 2.7 ^a
Losartan	7	7.2 \pm 1.4	7.6 \pm 1.2	9.8 \pm 2.1	13.8 \pm 2.6
Enalapril	7	7.7 \pm 1.2	7.8 \pm 1.3	10.3 \pm 1.8	14.3 \pm 2.7

Vessels are incubated in conditional medium with absence of thrombin, 0.5, 2.0 or 10.0 kIU/L thrombin for 4 hours. a: $P < 0.05$, compared with control group.

2.3 氯沙坦和依那普利对高血压大鼠血管生成纤溶酶原激活物抑制剂-1 和组织型纤溶酶原激活物的影响

左旋硝基精氨酸(L-NNA) 大鼠血管孵育液 PAF-1 活性的基础水平较对照组高 51% ($P < 0.01$); 给 0.5、2.0、10.0 kIU/L 等不同浓度凝血酶刺激时, L-NNA 大鼠血管孵育液的 PAF-1 活性分别比对照组高 126%、131% 和 142% ($P < 0.01$); 氯沙坦和依那普利干预可抑制 L-NNA 大鼠血管过度生成 PAF-1, 与 L-NNA 组相比, 氯沙坦干预使 L-NNA 大鼠血管孵育

液 PAF-1 的基础水平及不同浓度凝血酶刺激诱导的过度生成, 分别减低 19%、31%、38% 和 46% ($P < 0.01$), 而依那普利干预则使其分别减低 25%、38%、41% 和 50% ($P < 0.01$)。依那普利和氯沙坦两种干预之间无显著性差异(表 3, Table 3)。

2.4 氯沙坦和依那普利对左旋硝基精氨酸大鼠血管生成组织型纤溶酶原激活物的影响

左旋硝基精氨酸(L-NNA) 大鼠血管孵育液 tPA 活性的基础水平较对照组低 17%, 与对照组相比, 给 0.5、2.0 和 10.0 kIU/L 凝血酶刺激时 tPA 活性减

低, 分别比对照组低 20% ($P > 0.05$)、25% ($P > 0.05$) 和 32% ($P < 0.05$); 与 L-NNA 组比较, 氯沙坦和依那普利干预组的血管孵育液 tPA 活性虽略有升高, 但差异无显著性(表 4, Table 4)。

3 讨论

血管内皮是体内最大的内分泌器官, 可分泌多种活性物质, 调节血管的舒张功能, 维持凝血-纤溶系统的稳态^[1]。血管内皮功能损伤参与高血压、动脉粥样硬化的发病过程。用 L-NNA 可复制出严重高血压和高血压性心肌梗大^[3], 并可降低纤溶活性^[5]。目前大量临床和实验资料证实, 心血管组织局部肾素-血管紧张素系统的过度激活不仅是高血压发病的重要环节, 而且肾素-血管紧张素系统在纤溶平衡的调节中亦起着关键性作用^[2]。给健康志愿者静脉注射生理剂量的血管紧张素 I 即可引起血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1 活性明显升高^[6]; 而血管紧张素转化酶抑制剂治疗在改善急性心肌梗死和高血压患者预后的同时, 也使其纤溶功能紊乱得到改善^[7]; 最近文献[8]报道, 氯沙坦可使心衰患者的血浆纤溶酶原激活物抑制剂-1 活性降低 48%、纤溶酶原激活物抑制剂-1 抗原含量下降 38%, 其效果优于依那普利。本实验结果表明, 氯沙坦和依那普利干预可改善 L-NNA 大鼠的纤溶活性; L-NNA 大鼠离体血管生成纤溶酶原激活物抑制剂-1 的基础水平及对凝血酶刺激的反应性均明显增强, 生成组织型纤溶酶原激活物的能力减弱, 而氯沙坦和依那普利干预均可抑制 L-NNA 大鼠血管纤溶酶原激活物抑制剂-1 的过度生成, 但对组织型纤溶酶原激活物生成无影响。

氯沙坦和依那普利改善纤溶功能可能主要是通过抑制肾素-血管紧张素系统活性, 减少纤溶酶原激活物抑制剂-1 合成。已有研究证实, 血管紧张素 I 可诱导内皮细胞和血管平滑肌细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1 的表达增加, 但对组织型纤溶酶原激活物的表达无影响, 而氯沙坦可清除其诱导作用^[9]。另外氯沙坦和依那普利还有增加一氧化氮和缓激肽的合成、清除氧自由基和抗氧化损伤, 以及保护内皮

功能等作用, 可能是其改善纤溶功能的另一途径^[10]。本实验结果显示氯沙坦和依那普利干预可抑制 L-NNA 大鼠血管纤溶酶原激活物抑制剂-1 的生成, 但对组织型纤溶酶原激活物的生成无影响, 且二者干预效果相近, 可以推测, 肾素-血管紧张素系统对纤溶系统的调节主要是通过调节纤溶酶原激活物抑制剂-1 的生成, 而且是经血管紧张素 I 介导的。

参考文献

- [1] Vaughan DE. Fibrinolytic balance, the renin-angiotensin system and atherosclerotic disease[J]. *Eur Heart J*, 1998, **19** (Suppl G): G 9 - 12
- [2] Vaughan DE. The renin-angiotensin system and fibrinolysis[J]. *Am J Cardiol*, 1997, **79** (5A): 12- 16
- [3] Charpie JR, Charpie PM, Goud C, et al. Quinapril prevents hypertension and enhanced vascular reactivity in nitroarginine-treated rats [J]. *Blood Pressure*, 1997, **6**(2): 117- 124
- [4] 欧和生, 唐朝枢. 血管的器官培养方法及应用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (3): 279- 281
- [5] Korbut R, Warner TD, Gryglewski RJ, et al. The effect of nitric oxide synthase inhibition on plasma fibrinolytic system in septic shock in rats[J]. *Br J Pharmacol*, 1994, **112** (1): 289- 291
- [6] Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, et al. Stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo by infusion of angiotensin I : evidence of potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function[J]. *Circulation*, 1993, **87** (6): 1 969- 973
- [7] Vaughan DE, Rowleau J-L, Ridker PM, et al. Effect of ramipril on plasma fibrinolytic balance in patients with acute anterior myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1997, **96** (2): 442- 447
- [8] Goodfield NE, Newby DE, Ludlam CA, et al. Effect of acute angiotensin I type 1 receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition on plasma fibrinolytic parameters in patients with heart failure [J]. *Circulation*, 1999, **99** (23): 2 983- 985
- [9] Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, et al. Angiotensin I increase plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibition in cultured rat aortic endothelial cells [J]. *Thromb Haemost*, 1997, **77** (6): 1 189- 195
- [10] Wilmsink HW, Banga JD, Hijmering M, et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin I type 1 receptor antagonism on postprandial endothelial function [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **34** (1): 140- 145

(此文 1999- 11- 29 收到, 2000- 02- 08 修回)

(此文编辑 胡必利)