

苯磺酸左旋氨氯地平对 2 型糖尿病合并高血压患者血小板聚集及 MMP-9/MMP-2 表达的影响

李 瑾, 付 莉, 劳国娟*, 杨 川, 任 萌, 严 励
(中山大学孙逸仙纪念医院内分泌科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】观察苯磺酸左旋氨氯地平对 2 型糖尿病合并高血压患者血小板聚集率(PAG)的影响,并探讨其血小板抑制作用是否通过改变血小板释放 MMP-9 和 MMP-2 的途径实现。【方法】体外测定 32 例 2 型糖尿病合并高血压患者的血小板经苯磺酸左旋氨氯地平处理前后聚集率的变化,同时用 ELISA 法测定 MMP-9 和 MMP-2 表达的变化。【结果】经苯磺酸左旋氨氯地平处理后,2 型糖尿病合并高血压患者血小板的聚集率从 $(47.77 \pm 11.92)\%$ 下降至 $(40.78 \pm 13.97)\%$, $P < 0.05$,抑制率为 $(13.50 \pm 25.23)\%$;MMP-2 的表达从 $(22.27 \pm 17.52)\text{ng/mL}$ 下降到 $(19.85 \pm 17.09)\text{ng/mL}$,MMP-9 的表达从 $(61.12 \pm 30.95)\text{ng/mL}$ 下降到 $(59.92 \pm 32.78)\text{ng/mL}$, $P > 0.05$ 。【结论】苯磺酸左旋氨氯地平可抑制 2 型糖尿病合并高血压患者血小板聚集,其抑制作用不是通过改变血小板释放 MMP-9 和 MMP-2 的途径实现。

关键词: 苯磺酸左旋氨氯地平;糖尿病;高血压;血小板聚集率;基质金属蛋白酶

中图分类号: R58 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)02-0270-04

Effects of Levamlodipine on Platelet Aggregation and Expression of MMP-9/MMP-2 in Patients with Type 2 Diabetes and Hypertension

LI Jin, FU Li, LAO Guo-juan*, YANG Chuan, REN Meng, YAN Li

(Department of Endocrinology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To study the effects of levamlodipine on the platelet aggregation and expression of MMP-9/MMP-2 in the patients with type 2 diabetes and hypertension. 【Methods】32 patients with type 2 diabetes and hypertension were recruited. Platelet aggregation (platelet aggregation maximal, PAG_M) was determined by the blood coagulation instrument TYXN-91A. The concentrations of MMP-9, MMP-2 in platelet were measured by ELISA. 【Results】 PAG_M of patients with T2DM and hypertension were reduced after using levamlodipine (before $(47.77 \pm 11.92)\%$ vs after $(40.78 \pm 13.97)\%$, $P < 0.05$), platelet inhibition rate was $(13.50 \pm 25.23)\%$, while there was no statistically differences that MMP-9, MMP-2 releasing after using levamlodipine. 【Conclusion】Levamlodipine can inhibit platelet aggregation in patients with type 2 diabetes and hypertension. Levamlodipine has no effect on expression of MMP-9 and MMP-2.

Key words: levamlodipine; diabetes; hypertension; platelet aggregation; matrix metalloproteinase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(2):270-273]

2型糖尿病患者体内血小板处于高度活化状态,聚集、黏附、释放等功能增强,可启动血栓形成过程,容易导致血栓形成。高血压患者由于血压的升高,血液的湍流状态与血流切应力发生改变,血管内皮损伤导致血小板活化,继发血栓形成,进一

步促进心脑血管并发症的发生发展。钙离子拮抗剂除降压作用以外,具有改善血小板功能、抗血小板聚集的作用,但其作用机理尚未完全阐明。在血小板活化的众多因子中,基质金属蛋白酶近年来引起人们的重视。血小板中存在基质金属蛋白酶

收稿日期:2013-12-20

基金项目:广东省社会发展领域科技计划项目(2009B030801150)

作者简介:李瑾,硕士研究生,研究方向:糖尿病慢性并发症,E-mail:persistence25@163.com; *通信作者:劳国娟,硕士,主治医师,研究方向:糖尿病慢性并发症,E-mail:laoguojuan@139.com

(Matrix metalloproteinase, MMP), 其中 MMP-2 和 MMP-9 与血小板的功能关系密切^[1]。MMP-2 促进血小板聚集, 而 MMP-9 起抑制作用^[2]。在调控血小板聚集中, MMP-9/MMP-2 可能起了重要的作用。本文选取了 2012 年 1 月至 2013 年 3 月住院或门诊的 2 型糖尿病合并高血压患者 32 例, 体外分析左旋氨氯地平处理前后血小板聚集率和 MMP-2/MMP-9 表达的变化, 旨在探讨左旋氨氯地平是否通过改变 MMP-2/MMP-9 表达参与了其抗血小板聚集的过程。

1 材料与方 法

1.1 临床资料

符合 1999 年 WHO 制定的诊断标准的 2 型糖尿病及高血压患者 32 例, 女 19 例, 男 13 例。所有入选者均无冠心病、肝肾疾病、脑血管病、肿瘤及血液系统疾病。所有受试者采血前 6 个月内均未服用过阿司匹林、潘生丁等可能影响血小板功能的药物。6 个月内降糖、降压方案无改变, 未服用过钙离子拮抗剂。

1.2 试 剂

左旋氨氯地平(施慧达)原药由施慧达药业集团(吉林)有限公司提供。TYXN-91A 型多功能智能血液凝集仪(上海通用技术研究所)和 LG-PABER 型血小板聚集凝血因子分析仪(北京中勤世帝科学仪器有限公司)由我院血液科提供。枸橼酸葡萄糖液(ACD)(1:9)抗凝管购自广州阳普医疗科技股份有限公司。MMP-2/MMP-9 测定的 ELISA 试剂盒购自上海 ExcellBio Inc 公司。

1.3 方 法

1.3.1 测定受试者一般生化指标 测定所有受试者以下生化指标:①体质指数(BMI);②腰臀比(WHR);③脂(CHOL、TG、HDL-C、LDL-C)、肝功能(ALT)、肾功能(Cr、UAER)、由本院检验科常规检测;④糖基化血红蛋白(HbA1c)、空腹及餐后 2h 静脉血浆葡萄糖(FBG、PBG)由本院糖尿病中心检测。

1.3.2 测定受试者血小板聚集率及 MMP-2、MMP-9 受试者空腹 8~10 h, 第 2 天采集静脉血 8 mL, 置于枸橼酸葡萄糖液(ACD)(1:9)抗凝管中, 血与抗凝液的体积比为 9:1, 1 000 r/min ($r = 11.5$ cm) 离心 10 min, 取上层富含血小板血浆

(platelet-rich plasma, PRP)置于 1.5 mL EP 管中备用, 将剩余的血再次离心, 3 000 r/min ($r = 11.5$ cm)离心 10 min, 取上层贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。用 PPP 在血液凝集仪上调零, 以 PRP 为血小板供体。留取 32 名受试者的 PRP, 分成两份, 每份 300 μ L, 分别加入左旋氨氯地平(20 μ mol/L)(用药后组)和蒸馏水(用药前组)各 10 μ L, 再分别加入 ADP(5 μ mol/L), 诱导聚集。用比浊法测定血小板聚集性, 记录 5 min 内的血小板最大聚集率(PAG_M), 计算血小板聚集抑制率(%): (用药前组 PAG_M-用药后组 PAG_M)/用药前组 PAG_M × 100%。反应后的 PRP 以 1 200 r/min ($r = 11.5$ cm)离心 5 min, 取上清, 按 ELISA 试剂盒说明书测定 MMP-2 和 MMP-9 含量。

1.4 统计学方法

计量资料以均数 ± 标准差表示, 组间比较采用配对 *t* 检验, 以 SPSS17.0 统计软件处理各统计值结果。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 受试者一般临床特征

本研究入选 32 名患者, 其性别、年龄、BMI、腰臀比(WHR)、FBG、PBG、HbA1c、血脂(CHOL、TG、LDL-C、HDL-C)、肝功能(ALT)、肾功能(Cr、UAER)见表 1。

表 1 入选者病例资料

Table 1 Baseline characteristics of the study population

Item	Results ($n = 32$)
Gender (M/F)	13/19
Age /years	58.91 ± 12.56
BMI /(kg/m^2)	24.87 ± 2.29
WHR	0.97 ± 0.09
FBG/(mmol/L)	6.68 ± 1.28
PBG/(mmol/L)	15.54 ± 5.51
HbA1c/%	7.92 ± 2.21
CHOL /(mmol/L)	4.70 ± 1.18
TG /(mmol/L)	1.78 ± 1.04
HDL-C/ (mmol/L)	1.08 ± 0.26
LDL-C/ (mmol/L)	2.82 ± 0.86
ALT/(U/L)	22.06 ± 16.07
Cr/ ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	106.53 ± 29.52
UAER/ ($\mu\text{g}/\text{min}$)	17.3(4.45, 89.05)

表 2 左旋氨氯地平对 2 型糖尿病合并高血压患者 PAGM 及 MMP-9 和 MMP-2 表达的影响

Table 2 The effects of levamlodipine on the platelet aggregation and expression of MMP-9/MMP-2 in patients with type 2 diabetes and hypertension

Levamlodipine treated	PAGM /%	MMP-9 / (ng/mL)	MMP-2 / (ng/mL)	MMP-9/MMP-2
Before	47.77 ± 11.92	61.12 ± 30.59	22.27 ± 17.52	4.77 ± 3.35
After	40.78 ± 13.97 ¹⁾	59.52 ± 32.78 ²⁾	19.85 ± 17.09 ²⁾	5.35 ± 4.69 ²⁾

1) $P < 0.05$, vs Before; 2) $P > 0.05$, vs Before.

2.2 左旋氨氯地平对 2 型糖尿病合并高血压患者血小板聚集功能及 MMP 的影响

予以左旋氨氯地平处理后,结果显示(表 2),与对照组相比,2 型糖尿病合并高血压患者的血小板最大聚集率明显下降,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),左旋氨氯地平的血小板聚集抑制率为(13.50 ± 25.23)%。予以左旋氨氯地平处理后,MMP-9、MMP-2 和 MMP-9/MMP-2 比值的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

糖尿病合并冠心病、脑卒中、周围血管疾病的发生率为非糖尿病人群的 2.5 倍^[3],心脑血管病变是糖尿病致死的主要原因。目前越来越多的循证医学^[4-5]及基础医学的研究发现,单纯的血糖控制不一定能够显著地降低心血管事件。在糖尿病患者中,血小板的功能有明显的紊乱。高血糖可以通过很多因素导致血小板功能紊乱^[6-8],如:高血糖可以导致患者氧化应激增加,也可以激活各种炎症因子,这些因子可以活化血小板的聚集。另外,高血糖还可能直接作用血小板,导致血小板表面的 GPIIb/IIIa 表达增加^[8],从而使血小板的粘附和聚集增强,启动血栓形成过程,容易导致血栓形成,增加心血管事件的发生率。高血压患者由于血压的升高,血液的湍流状态与血流切应力发生改变,血管内皮损伤导致血小板活化,继发血栓形成,进一步促进心脑血管并发症的发生发展。

钙离子拮抗剂是一种作用非常广泛的药物,具有抗炎、抗平滑肌细胞迁移和增殖、抗内皮细胞损伤、升高血清 HDL-C 水平和降低主动脉和肝脏组织以及红细胞膜的胆固醇含量、改善血小板的功能和抗血小板聚集等作用,对动脉粥样硬化中的许多机理产生影响^[9]。本研究体外分析苯磺酸

左旋氨氯地平处理前后血小板聚集率变化,结果表明:与用药前组相比,左旋氨氯地平处理后血小板聚集率降低,抑制率为(13.50 ± 25.23)%($P < 0.05$)。既往研究表明,氨氯地平能够通过控制血压从而改善高血压环境下对血小板活化的诱导:高血压时存在着湍流和切应力改变等血流动力学紊乱,使血小板膜与红细胞膜受损,引起二磷酸腺苷(ADP)释放,ADP 与血小板膜特异性受体结合后,促进 Ca^{2+} 的释放,血小板胞浆内 Ca^{2+} 增加;能激活轻链蛋白激酶,使肌球蛋白磷酸化,形成肌球蛋白复合物,血小板发生活化。但其降低血压的程度与其对血小板的抑制作用并无相关,而主要通过影响血小板内的 Ca^{2+} 发挥作用^[10]。血小板内的钙离子参与血小板活化的各个环节,包括:血小板形态的改变、分泌及聚集。由于血小板内缺乏电压依赖型的 L 型钙离子通道,受体激动型的钙离子通道被阻滞, Ca^{2+} 向细胞内流动减少,细胞内 Ca^{2+} 水平降低,从而抑制由肾上腺素、ADP、胶原、花生四烯酸等诱导的血小板聚集和释放反应,减少血栓素 A2(TX A2)合成,血小板活性被抑制^[11]。在本实验中,纳入者均为糖尿病合并高血压患者,其血液中的血小板在所述的病理环境下处于激活状态,经过体外左旋氨氯地平孵育后,能够抑制 Ca^{2+} 向血小板内流动,降低血小板内 Ca^{2+} 水平,从而抑制了 ADP 诱导的血小板聚集和释放反应。另一方面,氨氯地平还能通过改善内皮细胞功能抑制血小板活化^[12]。本研究为体外实验,有一定的局限性,但实验结果证明,苯磺酸左旋氨氯地平能够降低糖尿病合并高血压患者的血小板聚集率。

血小板活性增强在血栓性疾病的发生和发展过程中起着十分重要的作用,抑制血小板活化功能对于预防糖尿病合并高血压患者动脉硬化具有重要意义。在血小板活化的众多因子中,基质金属蛋白酶近年来引起人们的重视。血小板中存在

MMP,其中MMP-2和MMP-9与血小板的功能关系密切^[1]。MMP-2促进血小板聚集,而MMP-9起抑制作用^[2]。最近研究发现卡乐地平具有抑制MMP-2/MMP-9活性的作用^[13]。但在本研究中并没有观察到MMP-9/MMP-2表达的变化,提示苯磺酸左旋氨氯地平对2型糖尿病合并高血压患者的抗血小板聚集作用并不是通过改变血小板释放MMP-9和MMP-2的途径实现的。Chou^[14]等研究显示氨氯地平可通过减少胶原及凝血酶引起的血小板释放血栓素从而抑制血小板聚集,同时发现氧化血红蛋白(NO的清除剂)及L-NAME(NOS抑制剂)可消除氨氯地平的这一作用,因此推测苯磺酸左旋氨氯地平抑制血小板聚集的机制是通过NO途径和抑制血小板释放血栓素来实现的。

综上所述,本研究显示,苯磺酸左旋氨氯地平能够降低糖尿病合并高血压患者的血小板聚集率,为降低糖尿病合并高血压患者的大血管病变风险提供了理论依据。同时证明其抗血小板聚集的作用并不是通过改变血小板释放MMP-9和MMP-2的途径实现的。

参考文献

- [1] Kazes I, Elalamy I, Sraer JD, et al. Platelet release of trimolecular complex components MT1-MMP/TIMP2/MMP2: involvement in MMP2 activation and platelet aggregation[J]. *Blood*, 2000, 96(9): 3064-3069.
- [2] Santos-Martinez MJ, Medina C, Jurasz P, et al. Role of metalloproteinases in platelet function[J]. *Thromb Res*, 2008, 121(4): 535-542.
- [3] Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies [J]. *Lancet*, 2010, 375 (9733): 2215-2222.
- [4] Mancia G. Effects of intensive blood pressure control in the management of patients with type 2 diabetes mellitus in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial[J]. *Circulation*, 2010, 122(8): 847-849.
- [5] Duckworth W, Abraira C, Moritz T, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(2): 129-139.
- [6] Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. Thrombotic risk factors: basic pathophysiology [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(2 Suppl): S3-S9.
- [7] Farhan S, Hochtl T, Kautzky-Willer A, et al. Antithrombotic therapy in patients with coronary artery disease and with type 2 diabetes mellitus [J]. *Wien Med Wochenschr*, 2010, 160(1-2): 30-38.
- [8] De Luca G, Gibson C M, Bellandi F, et al. Impact of distal embolization on myocardial perfusion and survival among patients undergoing primary angioplasty with glycoprotein IIb-IIIa inhibitors: insights from the EGYPT cooperation [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2010, 30(1): 23-28.
- [9] Alcocer L, Bendersky M, Acosta J, et al. Use of calcium channel blockers in cardiovascular risk reduction: issues in Latin America [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2010, 10(3): 143-154.
- [10] Nadar S, Blann AD, Lip GY. Platelet morphology and plasma indices of platelet activation in essential hypertension: effects of amlodipine-based antihypertensive therapy [J]. *Ann Med*, 2004, 36(7): 552-557.
- [11] Belcher PR, Drake-Holland AJ, Noble MI. The antiplatelet drug target in atherosclerotic diseases [J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2006, 6(1): 43-55.
- [12] Schiffrin EL, Pu Q, Park JB. Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients [J]. *Am J Hypertens*, 2002, 15(2 Pt 1): 105-110.
- [13] Yeh JL, Hsu JH, Liang JC, et al. Lercanidipine and labedipinedilol: A attenuate lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells through inhibition of HMGB1 release and MMP-2, 9 activities [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 226(2): 364-372.
- [14] Chou TC, Li CY, Yen MH, et al. Antiplatelet effect of amlodipine: a possible mechanism through a nitric oxide-mediated process [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(10): 1657-1663.

(编辑 孙慧兰)