

复方丹参注射液对冠心病患者硝酸酯耐药的影响

王 静¹ 吴时达¹ 陈守春² 闫亚非¹ 吴昌碧¹ 徐俊波¹ 郑 铿¹

摘要 **目的** 探讨复方丹参注射液对冠心病患者硝酸酯耐药的影响及机制。**方法** 将 84 例入选冠心病患者随机分为 3 组: A 组(消心痛组)、B 组(消心痛加复方丹参注射液组)、C 组(消心痛加维生素 C 组), 3 组消心痛用法均为 15 mg, 每天 4 次, 治疗时间均为 10 天。观察临床耐药情况、血压, 分别于治疗前后用彩色多普勒检测肱动脉基础内径值(D0)、加压后肱动脉舒张反应[D1, 即血流介导血管内径扩张(flow-mediated vasodilation, FMD)]和含服硝酸甘油后的血管舒张反应(D2), 并采血检测内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、内皮源型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因 mRNA 表达。内皮依赖性血管舒张功能(endothelial-dependent vasodilation, EDD)以 $(D1 - D0)/D0 \times 100\%$ 表示, 非内皮依赖性血管舒张功能(endothelial-independent vasodilation, EID)以 $(D2 - D0)/D0 \times 100\%$ 表示。**结果** (1) B(28.57%)、C(35.71%) 两组临床耐药的发生率明显低于 A 组(64.28%), B、C 组间差异无显著性。(2) 治疗后 A 组血压回升, 与治疗前比较差异无显著性; C 组虽有回升, 但仍较治疗前低; B 组无明显回升。B、C 组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。(3) 治疗后 A 组 EID 降低, B、C 组 EDD 提高($P < 0.05$), B、C 两组 EDD、EID 高于 A 组($P < 0.05$), B 组 EDD 高于 C 组($P < 0.05$)。(4) 治疗后 B 组 ET-1 mRNA 表达下降, eNOS mRNA 表达升高, C 组 eNOS mRNA 表达也升高, 与治疗前比较差异有显著性, 与 A 组比较差异也有显著性($P < 0.05$), 但 C 组 eNOS mRNA 表达低于 B 组($P < 0.05$)。**结论** 复方丹参注射液能部分阻止硝酸酯耐药的发生, 优于维生素 C, 其机制可能与其调节 eNOS、ET-1 mRNA 表达及保护血管内皮功能等有关。

关键词 复方丹参注射液; 硝酸酯; 耐药; 内皮依赖性血管舒张功能; 非内皮依赖性血管舒张功能; 内皮源型一氧化氮合酶; 内皮素-1

Effect of Compound Salvia Injection on Nitrate Ester Tolerance WANG Jing, WU Shi-da, CHEN Shou-chun, et al *Chengdu Municipal First People's Hospital, Chengdu (610016)*

Objective To investigate the effect and mechanism of Compound Salvia injection (CSI) on nitrate ester tolerance. **Methods** Eighty-four patients with coronary heart disease (CHD) were randomly divided into three groups, Group A treated with isosorbide dinitrate (ISD, 15 mg, 4 times per day) alone, Group B with ISD plus CSI and Group C with ISD plus vitamin C. The therapeutic course for all groups was 10 days. The tolerance to nitrate ester and blood pressure were monitored. Before and after treatment, the color Doppler ultrasonic apparatus was used to detect the baseline value of humeral arterial internal diameters (D0), the humeral arterial dilatatory response under compression [D1, that is, the flow-mediated vasodilation (FMD)] and the vasodilatory response after sucking of nitroglycerin (D2). And the blood levels of endothelin-1 (ET-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA expression were determined. The endothelial-dependent vasodilation (EDD) was expressed by $(D1 - D0)/D0 \times 100\%$, and the endothelial-independent vasodilation (EID) was expressed by $(D2 - D0)/D0 \times 100\%$. **Results** (1) The occurrence rate of nitrate tolerance in Group B and C (28.57% and 35.7%) was lower than that in Group A (64.29%), but insignificant difference was found between the former two. (2) After treatment, blood pressure increased in Group A to the level of pre-treatment, that in Group C also increased but still lower than that of pre-treatment, while insignificant increase was observed in Group B, comparison between Group B and C showed significant difference ($P < 0.05$). (3) After treatment, EID lowered in Group A, EDD increased in Group B and C ($P < 0.05$), EDD and EID in Group B and C were higher than those in Group A ($P < 0.05$), and EDD was higher in Group B than in Group C ($P < 0.05$). (4) After treatment, ET-1 mRNA expression lowered in Group B, eNOS mRNA expression increased in Group B and C,

作者单位: 1. 四川省成都市第一人民医院(成都 610016); 2. 成都地奥制药集团

通讯作者: 王 静, Tel: 028-86676164, E-mail: chenshch@mail.sc.cninfo.net

with significant difference as compared with those before treatment and those in Group A ($P < 0.05$), and eNOS mRNA expression in Group C was lower than that in Group B ($P < 0.05$). **Conclusion** CSI could partially prevent the occurrence of tolerance to nitrate ester, with the effect better than vitamin C, the mechanism might be related with its regulation on eNOS, ET-1 mRNA expression and protection on vascular endothelial function.

Key words Compound Salvia injection; nitrate ester; drug tolerance; endothelial-dependent vasodilation; endothelial-independent vasodilation; endothelial nitric oxide synthase; endothelin-1

硝酸酯类药物用于心血管疾病的治疗已有一百多年的历史,目前仍是治疗冠心病心肌缺血、充血性心力衰竭等的主要药物之一。但硝酸酯类耐药性的发生会导致其临床疗效减弱或消失。故对硝酸酯耐药性的评价及如何阻止或减轻硝酸酯耐药具有重要的临床意义。本研究采用肱动脉血管超声结合临床症状、血压变化对冠心病患者硝酸酯耐药性进行评价,观察复方丹参注射液对硝酸酯耐药性的影响并探讨其机制。

资料与方法

1 研究对象 研究对象为 2001 年 7 月—2003 年 2 月成都市第一人民医院心内科住院的冠心病患者 84 例,全部符合国际心脏病学会协会(ISFC)及世界卫生组织(WHO)临床命名标准化联合专题组对缺血性心脏病的命名和诊断标准^[1],其中有 41 例行冠脉造影。排除急性心肌梗死、心绞痛持续发作。冠脉造影证实须经经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)及支架植入者、严重心力衰竭、血压 $>160/100$ mmHg 或 $<90/60$ mmHg、合并糖尿病、严重脑肝肾器质性疾病者。女性均为绝经后。所有入选者先进入 4 天导入期,予消心痛 15 mg,每日 4 次,若能耐受者进入试验。纳入者按随机数字表法随机分成 3 组,每组 28 例。治疗前 3 天停用阿司匹林、硝酸酯类药物。3 组患者性别构成、年龄、血压、血糖、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肌酐等资料比较差异均无显著性($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组受试者一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	A 组	B 组	C 组
例数	28	28	28
年龄(岁)	64.2±14.5	62.4±15.2	65.6±14.1
性别(男/女)	13/15	16/12	13/15
收缩压(mmHg)	124.30±13.87	125.00±10.84	126.42±14.39
舒张压(mmHg)	76.13±9.54	73.81±8.83	75.26±8.53
TC(mmol/L)	4.76±0.91	4.64±0.85	4.70±0.98
TG(mmol/L)	1.51±0.38	1.49±0.35	1.47±0.37
HDL-C(mmol/L)	1.37±0.35	1.39±0.40	1.41±0.42
LDL-C(mmol/L)	2.82±0.63	2.90±0.59	2.89±0.65
血糖(mmol/L)	5.54±0.62	5.46±0.74	5.38±0.81
肌酐(μmol/L)	97.75±17.51	100.83±13.95	95.85±15.25

2 治疗方法 3 组患者均予冠心病常规治疗,但硝酸酯类药物均采用消心痛,用法为 15 mg,每天 4 次。B 组在此基础上加复方丹参注射液(由四川宜宾五粮液集团宜宾制药有限公司提供,组成:丹参、降香,每毫升含原生药材 1.1 g)40 ml 溶解在生理盐水 100 ml 中静脉滴注,每天 1 次;C 组予维生素 C 3 g 加入生理盐水 100 ml 中静脉滴注,每天 1 次。

3 观察指标

3.1 一般情况及临床耐药的观察 治疗前采血检测血脂、血糖、尿酸、肌酐、尿素氮等。分别于治疗前、治疗第 5 天、治疗第 10 天结束时监测患者血压,观察收缩压的变化情况。观察患者服药后有无静息状态下心绞痛继续发作或发作已停止又重新发作或心绞痛加重(按 CCSC 心绞痛分级标准)的情况,若有上述情况视为临床耐药,计算各组耐药发生率。

3.2 血管舒张功能的检测 血管舒张功能测定参照 Celermajer 等^[2]方法,应用美国惠普 2000 型彩色多普勒超声诊断系统,7.0 MHz 线阵探头。患者取仰卧位,右上臂外展 15°,探测右臂肘上 2~10 cm 处肱动脉的纵切面,获得清晰图像后固定探头位置,测量舒张末期内径,取 3 个心动周期的平均值。每位受试者测定右肱动脉内径基础值(D0)后进行反应性充血试验:将血压计袖带置于靶动脉远端充气加压至 280 mmHg,4 min 后放气,放气后 60~90 s 内测右肱动脉内径 D1(即血流介导血管内径扩张,flow-mediated vasodilation, FMD),内皮依赖性血管舒张功能(endothelial-dependent vasodilation, EDD)以 D1 较 D0 增加的百分数表示。休息 15 min 再含化硝酸甘油 0.5 mg,4 min 后测右肱动脉内径值 D2。血管非内皮依赖性舒张功能(endothelial-independent vasodilation, EID)以 D2 较 D0 增加的百分数表示。

3.3 外周血内皮素-1(ET-1)、内皮源型一氧化氮合酶(eNOS)基因表达的检测

3.3.1 全血总 RNA 抽提 分别采集患者治疗前后空腹外周静脉血各 2 ml(EDTA 抗凝)。每份标本各取新鲜血 1.5 ml,采用 Qiagen 公司全血 RNA 抽提

试剂盒进行总 RNA 提取(详细方法见试剂盒操作说明)。抽提所得总 RNA 分别溶于 30 μ l 纯水中,置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

3.3.2 引物设计 根据 Genebank 中 ET-1、eNOS 基因序列资料,选取保守区域设计引物(上海基康生物技术有限公司合成)。其中 ET-1 基因扩增产物大小约为 500 bp,eNOS 基因扩增产物大小约为 400 bp,内对照 β -actin 基因扩增产物大小约为 600 bp。目的基因扩增引物序列如下:

ET-1: Pe_1: 5'-GATTATTTGCTCATGATTT-3';Pe_2:5'-TCACCAATGTGCTCGGTTG-3'
eNOS: Pn_1: 5'-TAGCCAAAGTCACCATCGT-3';Pn_2:5'-GAGCCATACAGGATTGTCTG-3'

3.3.3 逆转录 每例标本各取总 RNA 5 μ l,分别以 PCR 下游引物(Pe_2、Pn_2 或 β -actin 下游引物)为特异性引物进行逆转录(逆转录反应采用 Qiagen 公司逆转录试剂盒进行,具体操作按说明进行),反应产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3.3.4 PCR 反应 每份标本各取逆转录反应产物 5 μ l 为模板,分别进行 PCR 反应,每次反应均设 β -actin 内对照,反应体系如下:

逆转录产物	5 μ l
PCR 上游引物(10 pmol/ μ l)	1 μ l
PCR 下游引物(10 pmol/ μ l)	1 μ l
4 $\times$ dNTP(2.5 mmol/次)	4 μ l
10 $\times$ PCR buffer(含 MgCl ₂)	5 μ l
Vent DNA polymerase(1 u/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	33 μ l
	50 μ l

反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

3.3.5 产物分析 取 PCR 产物 5 μ l 加样于 1.5% 的琼脂糖凝胶中,80 V 电压电泳 30 min。置凝胶成像系统上测定各目的条带灰度值。各目的条带均以 β -actin 扩增产物为内参照,计算待测目的基因产物与 β -actin 的灰度扫描比值,以此作为待测目的基因的

表达值。

4 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料比较用方差分析。统计分析采用 SPSS 10.0 统计软件进行。

结 果

1 3 组患者临床耐药的发生情况比较 A 组耐药发生率为 64.28% (18/28 例),B 组为 28.57% (8/28 例),C 组为 35.71% (10/28 例),B、C 组较 A 组低 ($P < 0.05$),B、C 组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2 3 组 SBP 变化情况比较 见表 2。3 组治疗前收缩压比较差异无显著性,治疗 5 天后血压均较治疗前下降,但 B、C 组较 A 组降低更明显 ($P < 0.05$)。至第 10 天时,A 组血压回升,与治疗前比较差异无显著性;C 组虽有回升,但仍较治疗前低 ($P < 0.05$);B 组无明显回升。B、C 组间差异有显著性。

表 2 3 组患者治疗前后收缩压变化情况 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	收缩压		
		治疗前	治疗第 5 天	治疗第 10 天
A	28	124.33 $\pm$ 13.87	113.80 $\pm$ 9.99 *	122.67 $\pm$ 15.94
B	28	125.00 $\pm$ 10.84	102.64 $\pm$ 11.59 * Δ	104.51 $\pm$ 12.59 * Δ
C	28	126.42 $\pm$ 14.39	104.25 $\pm$ 12.90 * Δ	113.20 $\pm$ 14.59 * Δ $\blacktriangle$

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$;与 A 组同期比较, Δ $P < 0.05$;与 B 组同期比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$

3 3 组治疗前后肱动脉内径测量结果比较 见表 3。治疗前 D0、D1、EDD、D2、EID 3 组之间比较差异无显著性;治疗后 A 组 EID 降低,B、C 组 EDD 提高 ($P < 0.05$),B、C 两组 EDD、EID 高于 A 组 ($P < 0.05$),B 组 EDD 高于 C 组 ($P < 0.05$)。

4 3 组治疗前后 ET-1 mRNA、eNOS mRNA 表达变化 见表 4。3 组治疗前 ET-1mRNA、eNOS mRNA 表达比较差异无显著性;治疗 10 天后,B 组 ET-1mRNA 表达下降,eNOS mRNA 表达升高,C 组 eNOS mRNA 表达也升高,与治疗前比较差异有显著性,与 A 组比较差异也有显著性 ($P < 0.05$),但 C 组 eNOSmRNA 表达低于 B 组 ($P < 0.05$)。

表 3 3 组治疗前后肱动脉内径变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	D0(mm)	D1(mm)	EDD (%)	D2(mm)	EID (%)
A	28	治疗前	4.19 $\pm$ 0.76	4.62 $\pm$ 0.81	10.30 $\pm$ 3.20	4.91 $\pm$ 0.65	17.2 $\pm$ 5.3
		治疗后	4.11 $\pm$ 0.92	4.50 $\pm$ 0.82	9.49 $\pm$ 3.10	4.52 $\pm$ 0.81	10.1 $\pm$ 4.4 *
B	28	治疗前	4.10 $\pm$ 0.82	4.48 $\pm$ 0.90	9.40 $\pm$ 4.50	4.88 $\pm$ 0.73	19.1 $\pm$ 7.8
		治疗后	4.11 $\pm$ 0.85	4.79 $\pm$ 0.98	16.64 $\pm$ 4.05 * Δ	4.75 $\pm$ 0.84	15.5 $\pm$ 6.1 Δ
C	28	治疗前	4.26 $\pm$ 0.90	4.70 $\pm$ 0.74	9.70 $\pm$ 4.10	5.04 $\pm$ 0.81	18.3 $\pm$ 7.2
		治疗后	4.14 $\pm$ 0.79	4.68 $\pm$ 0.87	12.94 $\pm$ 4.28 * Δ $\blacktriangle$	4.76 $\pm$ 0.78	14.9 $\pm$ 0.78 Δ

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$;与 A 组治疗后比较, Δ $P < 0.05$;与 B 组治疗后比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$

表 4 3 组治疗前后 ET-1mRNA,eNOS mRNA
基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	ET-1 mRNA	eNOS mRNA
A	28	治疗前	1.27 ± 0.65	0.35 ± 0.09
		治疗后	1.42 ± 0.57	0.30 ± 0.12
B	28	治疗前	1.31 ± 0.51	0.37 ± 0.10
		治疗后	1.03 ± 0.46 * △	0.56 ± 0.21 * △
C	28	治疗前	1.24 ± 0.55	0.34 ± 0.13
		治疗后	1.15 ± 0.57	0.45 ± 0.18 * △▲

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$;与 A 组治疗后比较,△ $P < 0.05$;与 B 组治疗后比较,▲ $P < 0.05$

讨 论

关于硝酸酯耐药的评价有多种方法,冠状动脉造影是冠心病患者硝酸酯类耐药性最直观的评价方法^[3],但其方法要求设备和技术条件较高,难以推广。临床也有认为在硝酸酯类代谢转化过程中环磷酸鸟苷(cGMP)为硝酸酯发挥生物学效应的中心环节,临床硝酸酯耐药与细胞内血小板 cGMP 生成减少相平衡,并提出血小板 cGMP 可作为硝酸酯类药效和耐药的监测指标^[4],但因目前对催化硝酸酯代谢生物转化形成 NO 的多步酶促反应尚不清楚。最近 Cohen 研究组提出 NO 的扩血管作用并非依赖 cGMP,而是直接激活血管平滑肌细胞的钙激活钾通道 K_{Ca} ,故 cGMP 评价硝酸酯耐药的作用有待进一步确定。目前临床常用无创性评价方法如观察冠心病患者血压的变化、临床症状和静息或运动试验心电图 ST 段及运动耐量等是否有改善来评价硝酸酯耐药,但这些方法易受其他因素的影响或有一定的局限性。研究报道肱动脉与冠状动脉对硝酸甘油的扩血管反应性相似,庄汉屏等^[5]证实冠心病患者肱动脉对硝酸酯类扩血管反应能在一定程度上反映硝酸酯类抗心肌缺血的疗效。本课题采用 Parker(消心痛 15 mg,每天 4 次)的方法,结合临床药效、SBP 的变化和肱动脉 EID 来评价耐药。结果三者较一致地反应了耐药的发生,与文献报道一致^[5-7]。

检索 1966—2000 年 Medline 硝酸酯耐药相关文章,关于硝酸酯耐药机制研究最多的为超氧化物诱导的 NO 失活^[8]。而且大部分有关阻止 NO 失活的研究均涉及维生素 C,初步支持维生素 C 在减弱硝酸酯耐药方面发挥的作用。近年 Watanabe 等为探讨维生素 C、维生素 E 等抗氧化剂对预防硝酸酯耐药的作用做了大量的工作,得出了肯定的结论^[9]。本课题也证实维生素 C 可部分阻止硝酸酯耐药的产生,但其作用不及复方丹参注射液。复方丹参注射液可能通过下列途径阻止硝酸酯耐药。

1 对基因表达的影响 用 cDNA 基因芯片技术

检测硝酸甘油(NTG)治疗后大鼠主动脉基因表达,结果证实血管硝酸酯耐药伴随着基因表达的改变,其中一些与报道的硝酸酯耐药的多因素复合机制有关^[10]。本实验观察到复方丹参注射液能上调 eNOS mRNA 表达,下调 ET-1 mRNA 表达,而 eNOS 为 NO 合成的唯一限速酶,NO 和 ET-1 分别是最重要的血管舒张和收缩因子,推测复方丹参注射液通过调节 eNOS mRNA、ET-1 mRNA 表达而阻止或减轻硝酸酯耐药。但也有不同报告,Wang EQ 用 Western 杂交法检测 NTG 治疗后 eNOS mRNA 表达,结果血管耐药不会导致 eNOS(+ / +)鼠 eNOS 蛋白表达的改变,在 eNOS(- / -)鼠和 eNOS(+ / +)鼠同样引起硝酸酯耐药,认为在硝酸酯耐药的发展中 eNOS 不起决定性作用^[11]。关于 eNOS 在硝酸酯耐药的发展中的作用有待进一步深入研究。

2 对血管内皮功能的影响 硝酸酯是一种原药,进入血管平滑肌细胞(VSMCs)内与浆膜部位或经细胞外途径经历一系列的脱硝基代谢过程最终转化为一氧化氮(NO),即硝酸酯源 NO(nitrate/NO,即外源途径 NO)而起作用,此 NO 具有全身性作用,对血液动力学的效应容易产生耐药。而正常血管内皮细胞因子源 NO(EDRF/NO,即内源途径 NO)通过 NOS 催化 L-精氨酸转化成脱氨酸而形成,作用局限,对循环影响短暂,未证明有耐药性。但实验证明血管内皮功能与硝酸酯耐药发生有密切关系。Shakya 以培养的牛主动脉内皮细胞(BAECs)研究 NTG 对 NOS 形成 NO 活性的影响,结果 NTG 刺激 NOS 活性增加近 40%,与乙酰胆碱相当。实验显示短期 NTG 治疗刺激内皮 NOS 活性,增加细胞摄取 L-精氨酸产生 NO,而长时间应用 NTG 则作用相反,NTG 耐药部分依赖 NOS 的活性作用^[12]。持续应用 NTG 治疗引起 NOS 功能障碍^[13],而且内皮功能状况对硝酸酯耐药的逆转至关重要。Gruhn 等比较内皮裸露和内皮完整的血管对 NTG 的反应,结果内皮裸露与否不会影响硝酸酯耐药发展的程度,但是显著改变那些旨在阻止耐药发展的干预手段的效果:在内皮完整的血管,超氧化物歧化酶(SOD)和 Ang II 受体阻断剂能明显阻止耐药的发展,而对内皮裸露的血管则无此作用^[14]。Berkenboom 发现长期应用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)可阻止硝酸酯耐药,但当抑制了 eNOS 或除去血管内皮时,则该保护作用消失,认为 ACEI 通过内皮依赖机制——主要经 β_2 激肽受体增加 NO 有效性而阻止硝酸甘油耐药^[15]。复方丹参注射液能上调 eNOS mRNA 表达,下调 ET-1mRNA 表达,改善血管内皮依赖舒张功能(EDD),保

护血管内皮功能。故复方丹参注射液通过保护改善血管内皮功能阻止硝酸酯耐药。

硝酸酯耐药的产生与血管组织中的超氧阴离子含量显著增加有关^[16], 氧阴离子是一种经典的 NO 灭活物, 两者能迅速反应并生成过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-), 从而使 NO 迅速失活。复方丹参注射液之主要成分为丹参, 丹参的有效成分丹参素、丹参酮是良好的自由基清除剂, 不论对黄嘌呤氧化酶-黄嘌呤系统产生的氧自由基还是 PMA 刺激白细胞产生氧自由基均有明显的清除作用, 可显著抑制 Fe^{2+} -半胱氨酸引起的大鼠心、脑、肝等组织中线粒体的脂质过氧化, 从而减少氧自由基、脂质过氧化物的形成, 减少氧化型低密度脂蛋白 (OX-LDL)。复方丹参注射液的抗氧化作用也是其阻止硝酸酯耐药的机制之一。

总之, 硝酸酯耐药是通过多种机制而发生, 复方丹参注射液通过不同途径、不同机制阻止其发生。

参 考 文 献

- 1 贝政平, 主编. 内科疾病诊断标准. 北京: 科学出版社, 2001: 50—52.
Bei ZP, editor. Standard for diagnostics of internal diseases. Beijing: Science Press, 2001: 50—52.
- 2 Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch WM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340 (8828): 1111—1115.
- 3 Kubo T, Urabe Y, Suzuki S, et al. Dissociation of vascular tolerance and plasma norepinephrine adjustment during long-term nitrate therapy in human coronary arteries. *Int Med* 1999; 38(10): 773—779.
- 4 Watanabe H, Kakihana M, Ohtsuka S, et al. Platelet cyclic GMP, a potentially useful indicator to evaluate the effects of nitroglycerin and nitrate tolerance. *Circul* 1993; 88(1): 29—36.
- 5 庄汉屏, 余国龙, 廖锦堂, 等. 肱动脉血管超声运动实验对冠心病硝酸酯类耐药性评价. *中华心血管病杂志* 1998; 26(5): 371—373.
Zhuang HP, Yu GL, Liao JT, et al. Evaluation of nitrate tolerance in patients with coronary heart disease by vascular ultrasonography and treadmill exercise. *Chin J Cardiol* 1998; 26(5): 371—373.
- 6 Parker JO, Farrell KB, Lahey KA, et al. Effect of interval between doses on the development of tolerance to isosorbide dinitrate. *N Engl J Med* 1987; 316(23): 1440—1444.
- 7 Yu GL, Zhuang HP, Wang ZH, et al. Evaluation of nitrate tolerance in patients with coronary heart disease by vascular ultrasonography and treadmill exercise. *Int J Cardiol* 1999; 15; 69(2): 133—137.
- 8 Daniel TA, Nawarskas JJ. Vitamin C in the prevention of nitrate tolerance. *Ann Pharmacother* 2003; 34 (10): 1193—1197.
- 9 Watanabe H, Kakihalna M, Ohtsuka S, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of ascorbate on the preventive effect of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *Circul* 1998; 97: 886—891.
- 10 Wang EQ, Lee WI, Brazeau D, et al. cDNA microarray analysis of vascular gene expression after nitric oxide donor infusions in rats: implications for nitrate tolerance mechanisms. *AAPS Pharm Sci* 2002; 4(2): E10.
- 11 Wang EQ, Lee WI, Fung HL. Lack of critical involvement of endothelial nitric oxide synthase in vascular nitrate tolerance in mice. *Br J Pharmacol* 2002; 135(2): 299—302.
- 12 Shakya U, Chen YH, Wang XH, et al. Effect of metallothionein on tolerance of nitroglycerin in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21(1): 87—90.
- 13 Gori T, Burstein JM, Ahmed S, et al. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human *in vivo* study. *Circul* 2001; 104(10): 1119—1123.
- 14 Gruhn N, Boesgaard S, Andersen C, et al. Nitroglycerin tolerance: different mechanisms in vascular segments with or without intact endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40(2): 201—209.
- 15 Berkenboom G, Fontaine D, Unger P, et al. Absence of nitrate tolerance after long-term treatment with ramipril: an endothelium-dependent mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34 (4): 547—553.
- 16 Mihm MJ, Coyle CM, Jing L, et al. Vascular peroxynitrite formation during organic nitrate tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291(1): 194—198.

(收稿: 2004-01-14 修回: 2004-06-15)