· 基础研究 ·

缬沙坦抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡

顾建钦　秦历杰

【摘要】**目的**　研究缬沙坦对血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡的影响，并探讨其机制是否与激活腺苷酸活蛋白激酶相关。**方法**　将大鼠胸主动脉平滑肌细胞（A7r5）分为 5 组：①对照（DMSO）组、②血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ，Ang Ⅱ）100 μmol/L 组、③血管紧张素Ⅱ 100 μmol/L ＋缬沙坦（valsartan，Val）10 μmol/L 组、④血管紧张素Ⅱ 100 μmol/L ＋缬沙坦 10 μmol/L＋复合物 C（Compoud C，CompC）1 μmol/L 组、⑤血管紧张素Ⅱ 100 μmol/L＋5-氨基咪哇-4-甲酞胺核糖核普酸（AICAR）100 μmol/L 组，各组细胞予以相应药物处理 24h 后，用分光光度法检测细胞内 Caspase 3 活性；流式细胞术检测细胞凋亡率；蛋白印迹法检测细胞内 AMPK 总蛋白及磷酸化水平的变化；免疫荧光法检测细胞内活性氧（ROS）的含量；WST-1 法检测细胞内总超氧化物歧化酶（SOD）活性；TBA 法检测细胞内丙二醛（MDA）活性。多组定量资料比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-*t*。**结果**　与对照组相比，Ang Ⅱ组细胞凋亡率增加［（45.46 ± 15.40）%和（1.88 ± 3.28）%，*P* = 0.002］，细胞内 ROS 的生成增加［（9.24 ± 0.46）和（1.00 ± 0.00），*P* < 0.01］，Caspase 3 活性增加［（35.03 ± 3.54）和（13.33 ± 1.79），*P* < 0.01］、MDA 活性增加［（4.32 ± 0.73）和（2.05 ± 0.18），*P* < 0.01］，细胞内 AMPK 的磷酸化水平降低，SOD 活性降低［（90.29 ± 14.73）和（136.02 ± 18.82），*P* = 0.001］；与 Ang Ⅱ组相比，Ang Ⅱ＋Val 组和 Ang Ⅱ ＋ AICAR 组细胞凋亡率降低［（24.91 ± 8.46）% 和（45.46 ± 15.40）%，*P* = 0.031］；［（27.90 ± 4.39）%和（45.46 ± 15.40）%，*P* = 0.038］，两组细胞内 ROS 的生成降低［（2.37 ± 0.05）和（9.24 ± 0.46），*P* < 0.01］；［（2.79 ± 0.31）和（9.24 ± 0.46），*P* < 0.01）］，Caspase 3 活性降低［（18.08 ± 2.69）和（35.03 ± 3.54），*P* < 0.01］；［（27.83 ± 3.56）和（35.03 ± 3.54），*P* = 0.002］，MDA 活性降低［（3.25 ± 0.55）和（4.32 ± 0.73），*P* = 0.017］；［（3.46 ± 0.60）和（4.32 ± 0.73），*P* = 0.047］，AMPK 的磷酸化水平增加，SOD 活性增加［（140.71 ± 20.27）和（90.29 ± 14.73），*P* < 0.01］；［（116.73 ± 17.96）和（90.29 ± 14.73），*P* = 0.029］；与 Ang Ⅱ＋Val 组相比，Ang Ⅱ＋Val＋CompC 组细胞凋亡率增加［（43.84 ± 12.00）%和（24.91 ± 8.46）%，*P* = 0.043］，细胞内 ROS 的生成增加［（4.64 ± 0.15）和（2.37 ± 0.05），*P* < 0.01］，Caspase 3 活性增加［（25.64 ± 3.52）和（18.08 ± 2.69），*P* = 0.011］，MDA 活性增加［（5.12 ± 0.92）和（3.25 ± 0.55），*P* < 0.01］，细胞内 AMPK 的磷酸化水平下降，SOD 活性下降［（99.48 ± 16.59）和（90.29 ± 14.73），*P* = 0.002］。**结论**　缬沙坦可以抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡，其机制可能与调节细胞内 AMPK 的磷酸化水平和 ROS、SOD、MDA 的活性相关

【关键词】缬沙坦；血管紧张素Ⅱ；血管平滑肌细胞；凋亡；腺苷酸活化蛋白激酶；活性氧；总超氧化物歧化酶；丙二醛

Valsartan inhibits angiotensin Ⅱ-induced vascular smooth muscle cell apoptosis *Gu Jianqin*，*Qin Lijie*
Department of Emergency Medicine，*Henan Provincial People's Hospital*，*Zhengzhou* 450003，*China*
Corresponding author：*Qin Lijie*，*Email*：*qinlijie*1819@163.*com*

【**Abstract**】**Objective**　To investigate the impacts of valsartan on cell apoptosis induced by angiotensin Ⅱ in vascular smooth muscle cells，and discuss whether the mechanism is relevant to AMP-Activated Protein Kinases. **Methods**　Vascular smooth muscle cells（A7r5）were designated to 5 groups：①control（DMSO）group，②Angiotensin Ⅱ（Ang Ⅱ）100 μmol/L group，③Angiotensin Ⅱ 100 μmol/

DOI：10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.08.013
基金项目：河南省科技攻关计划项目（122102310589）
作者单位：450003　郑州，河南省人民医院急诊科
通信作者：秦历杰，Email：qinlijie1819@163.com

L + valsartan 10 μmol/L group, ④Angiotensin Ⅱ 100 μmol/L + valsartan 10 μmol/L + compound C 1 μmol/L group, ⑤ Angiotensin Ⅱ 100 μmol/L + 5-Aminoimidazole-4earboxamide-ribo-nucle-oside (AICAR) 100 μmol/L group, after 24h incubation, the intracellular activity of Caspase 3 was measured by spectrophotometry, the cell apoptosis were enumerated by low cytometry, the intracellular AMP-Activated Protein Kinases (AMPK) phosphorylation and total expression quantity were examined by western blot, the intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured by fluorescent probe DCFH-DA, the intracellular activity of total superoxide dismutase (SOD) was measured by WST-1 method, the intracellular activity of Malondialdehyde (MDA) was measured by TBA method. Two groups were compared by using Student t test. Differences among multiple groups were evaluated by ANOVA. **Results** Compared with control group, the cell apoptosis of Angiotensin Ⅱ group was increased [(45.46 ± 15.40)% *vs.* (1.88 ± 3.28)%, P = 0.002], the synthesis of ROS was increased [(9.24 ± 0.46) *vs.* (1.00 ± 0.00), P < 0.01], the activity of Caspase 3 was increased [(35.03 ± 3.54) *vs.* (13.33 ± 1.79), P < 0.01], the activity of MDA was increased [(4.32 ± 0.73) *vs.* (2.05 ± 0.18), P < 0.01)], the phosphorylation of AMPK was decreased, the activity of SOD was decreased [(90.29 ± 14.73) *vs.* (136.02 ± 18.82), P = 0.001]; compared with Angiotensin Ⅱ group, the cell apoptosis of Angiotensin Ⅱ + valsartan group and Angiotensin Ⅱ + AICAR group were decreased [(24.91 ± 8.46)% *vs.* (45.46 ± 15.40)%, P = 0.031]; [(27.90 ± 4.39)% *vs.* (45.46 ± 15.40)%, P = 0.038], the synthesis of ROS was decreased [(2.37 ± 0.05) *vs.* (9.24 ± 0.46), P < 0.01]; [(2.79 ± 0.31) *vs.* (9.24 ± 0.46), P < 0.01], the activity of Caspase 3 was decreased [(18.08 ± 2.69) *vs.* (35.03 ± 3.54), P < 0.01]; [(27.83 ± 3.56) *vs.* (35.03 ± 3.54), P = 0.002], the activity of MDA were decreased [(3.25 ± 0.55) *vs.* (4.32 ± 0.73), P = 0.017]; [(3.46 ± 0.60) *vs.* (4.32 ± 0.73), P = 0.047], the phosphorylation of AMPK was increased, the activity of SOD was increased [(140.71 ± 20.27) *vs.* (90.29 ± 14.73), P < 0.01]; [(116.73 ± 17.96) *vs.* (90.29 ± 14.73), P = 0.029]; compared with Angiotensin Ⅱ + valsarntan group, the cell apoptosis of Angiotensin Ⅱ + valsartan + compound C group was increased [(43.84 ± 12.00)% *vs.* (24.91 ± 8.46)%, P = 0.043], the synthesis of ROS was increased [(4.64 ± 0.15) *vs.* (2.37 ± 0.05), P < 0.01], the activity of Caspase 3 was increased [(25.64 ± 3.52) *vs.* (18.08 ± 2.69), P = 0.011], the activity of MDA was increased [(5.12 ± 0.92) *vs.* (3.25 ± 0.55), P < 0.01], the phosphorylation of AMPK was decreased, the activity of SOD was decreased [(99.48 ± 16.59) *vs.* (90.29 ± 14.73), P = 0.002)]. **Conclusions** Valsartan could inhibit angiotensin Ⅱ-induced vascular smooth muscle cell apoptosis via activating AMPK, suppressing the synthesis of ROS and the activity of MDA, elevating the activity of SOD.

【**Key words**】 Valsartan; Angiotensin Ⅱ; Vascular smooth muscle cell; Apoptosis; AMP-Activated Protein Kinases; Reactive oxygen species; Total superoxide dismutase; Malondialdehyde

在动脉粥样硬化晚期，平滑肌细胞的异常凋亡将引起粥样硬化斑块破裂，导致急性冠脉综合征的发生[1]。血管紧张素Ⅱ（angiotensin Ⅱ，Ang Ⅱ）可以通过增加细胞内活性氧的合成诱导血管平滑肌细胞的凋亡[2-3]。而腺苷酸活化蛋白（AMPK）可以抑制血管平滑肌细胞内活性氧的生成[4]，AMPK 活性增加可以降低气道平滑肌细胞的凋亡[5]。缬沙坦是临床常用血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂，具有多种心血管保护作用[6]，但有研究表明，缬沙坦的部分药理作用可能与激活细胞内的 AMPK 相关[7-8]。但是，目前仍不明确缬沙坦能否通过激活 AMPK 抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡。本课题研究了缬沙坦对血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡的影响及其相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

大鼠胸主动脉平滑肌细胞株 A7r5（上海中科院细胞库）；血管紧张素Ⅱ、缬沙坦原粉（大连美仑生物技术有限公司）；Compound C、AICAR（美国 Sigma 公司）；DMEM 高糖培养基（以色列 BI 公司）；优质胎牛血清（兰州百灵生物技术有限公司）；Phospho-AMPKα（Thr172）、AMPKα 抗体（美国 CST 公司）；Caspase 3 活性检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、活性氧检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；总超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒、丙二醛（MDA）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

1.2 细胞培养

大鼠胸主动脉平滑肌细胞株（A7r5）培养在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中，至于 37℃、含 5% CO_2 的培养箱中，3 d 换液一次，细胞长至 80% 时，予以 1∶2 传代处理。实验所用细胞，均为状态良好的对数生长期细胞。

1.3 实验分组

将血管平滑肌细胞分为：①对照（DMSO）组、②Ang Ⅱ组、③Ang Ⅱ + Val 组、④Ang Ⅱ + Val + CompC 组、⑤Ang Ⅱ + AICAR 组，各组细胞予以相应药物处理 24 h，其中③组提前加入 Val 干预 30 min；④组提前加入 Val 和 CompC 干预 30 min；⑤组提前加入 AICAR 干预 30 min。

1.4 Caspase 3 活性检测

各组细胞相应药物处理 24 h 后，消化，离心收集细胞，加入裂解液，冰浴裂解 15 min，离心，将上清液转移至预冷的离心管中。立即用酶标仪（美国 Thermo SCIENTIFIC 公司）检测各组细胞的吸光度值，并用 Bradford 法测定各组细胞的蛋白浓度，最后计算得出各组细胞的 Caspase 3 活性。

1.5 流式细胞术检测细胞的凋亡率

各组细胞相应药物处理 24 h 后，消化，离心收集细胞，用 PBS 洗涤后重悬，取 10 万重悬细胞，离心后加入 195 μLAnnexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞，再依次加入 5 μLAnnexin V-FITC 和 10 μl 碘化丙啶染色液，室温避光孵育 15 min 后上流式细胞仪（美国 Thermo SCIENTIFIC 公司）检测。

1.6 Western blot 检测总蛋白及磷酸化水平

每样品取 30 μg 总蛋白上样，SDS-PAGE 胶电泳，转膜（PVDF 膜 90 V 2 h），5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，相应一抗（1∶1 000 稀释）孵育（4 ℃过夜），TBST 洗膜 4 次，每次 5 min，二抗（1∶2 000 稀释）室温孵育 2 h，TBST 洗膜，同前，将膜置于 ImageQuant LAS4000 机器（美国 GE 公司）中，加入超敏 ECL 化学发光液，进行曝光。

1.7 免疫荧光法检测细胞内活性氧的含量

各组细胞相应药物处理 24 h 后，去除 6 孔板中的培养基，每孔加入 1 mL 浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA。置于培养箱中 30 min。用不含血清的培养基清洗细胞三次。然后用荧光显微镜（日本 OLYMPUS 公司）观察各组细胞内荧光强弱，拍照，用软件 ImageJ 1.44p 分析荧光值。

1.8 细胞内总超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）活性检测

各组细胞相应药物处理 24 h 后，消化，离心收集细胞，加入裂解液，冰浴裂解 15 min，离心，将上清液转移至预冷的离心管中。按照试剂盒说明书步骤，用 WST-1 法检测 SOD 活性，用 TBA 法检测 MDA 活性。并用 BCA 法测定各组细胞的蛋白浓度，最后计算得出各组细胞内的 SOD、MDA 活性。

1.9 统计学方法

用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。数据均采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组定量资料比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用最小有意义差异法（LSD-t 法），以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缬沙坦抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡

如图 1 所示，与对照组相比，Ang Ⅱ处理血管平滑肌细胞 24 h 后显著增加细胞内的 Caspase 3 的活性（$P < 0.01$）和细胞的凋亡率（$P = 0.002$）。缬沙坦、AICAR（AMPK 激活剂）均可显著抑制血管平滑肌细胞内 Caspase 3 活性（$P < 0.01$；$P = 0.002$）和细胞凋亡率的增加（$P = 0.031$；$P = 0.038$）。但是 CompC（AMPK 抑制剂）却可以减弱缬沙坦对细胞内 Caspase 3 的活性（$P = 0.011$）和细胞凋亡率的影响（$P = 0.043$）。

2.2 缬沙坦增加血管平滑肌细胞内 AMPK 的磷酸化水平

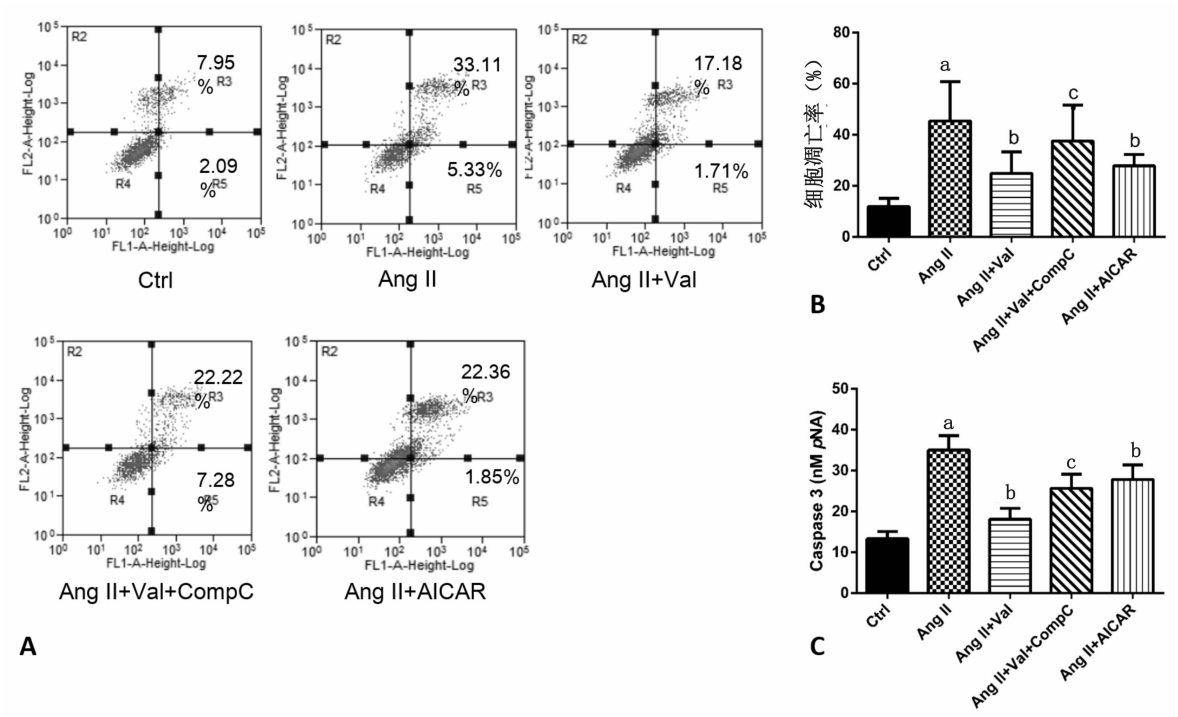
如图 2A 所示，缬沙坦处理血管平滑肌细胞 24 h 后可以剂量依赖性增加细胞内 AMPK 的磷酸化水平。如图 2B 所示，Ang Ⅱ处理血管平滑肌细胞 24 h 后可以降低细胞内 AMPK 的磷酸化水平，缬沙坦、AICAR（AMPK 激活剂）均可显著抑制平滑肌细胞内 AMPK 磷酸化水平的降低。CompC（AMPK 抑制剂）显著抑制缬沙坦增加细胞内 AMPK 的磷酸化表达。

2.3 缬沙坦抑制血管紧张素Ⅱ增加血管平滑肌细胞内活性氧的合成

用免疫荧光法检测细胞内的活性氧（ROS）含量。将各组细胞内荧光强度与对照组细胞内的荧光强度的比值，作为各组细胞内的相对活性氧含量。如图 3 所示，与对照组相比，Ang Ⅱ处理血管平滑肌细胞 24h 后显著增加细胞内的活性氧含量（$P < 0.01$）。缬沙坦、AICAR（AMPK 激活剂）均可显著抑制平滑肌细胞内活性氧的合成（$P < 0.01$；$P < 0.01$）。但是 CompC（AMPK 抑制剂）却可以减弱缬沙坦的抗活性氧合成能力（$P < 0.01$）。

2.4　缬沙坦抑制血管紧张素Ⅱ对血管平滑肌细胞内总超氧化物歧化酶和丙二醛活性的影响

与对照组相比，Ang Ⅱ处理血管平滑肌细胞 24h 后显著降低细胞内的 SOD 活性（$P=0.001$），增加细胞内的 MDA 的活性（$P<0.01$）。缬沙坦、AICAR（AMPK 激活剂）均可显著抑制平滑肌细胞内 SOD 活性的降低（$P<0.01$；$P=0.029$）和 MDA 活性的增加（$P=0.017$；$P=0.047$）。CompC（AMPK 抑制剂）可以减弱缬沙坦对细胞内 SOD（$P=0.002$）和 MDA 活性的影响（$P<0.01$）。见图 4。



与对照组相比，$^{a}P<0.01$，与 Ang Ⅱ组相比，$^{b}P<0.05$，$^{b}P<0.01$，与 Ang Ⅱ + Val 组相比，$^{c}P<0.05$

图 1　血管紧张素Ⅱ、缬沙坦对血管平滑肌细胞内 Caspase 3 活性和细胞凋亡率的影响

Fig 1　Effect of angiotensin Ⅱ and valsartan on activity of Caspase 3 in vascular smooth muscle cells and the cell apoptosis

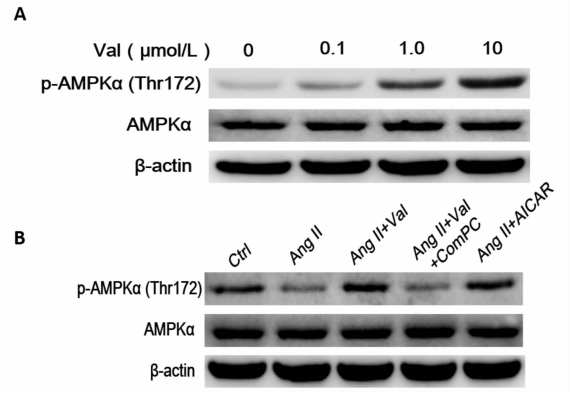
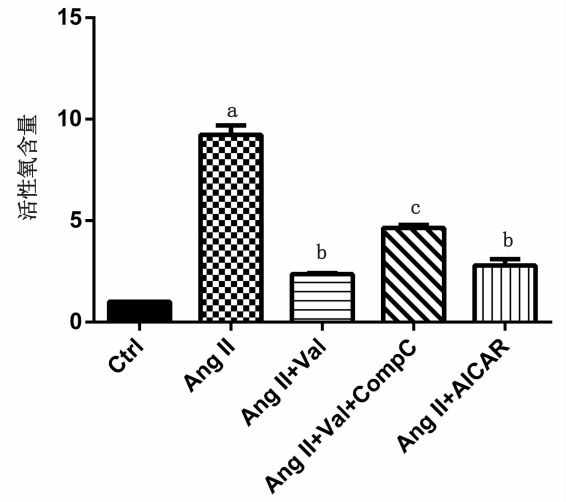


图 2　血管紧张素Ⅱ、缬沙坦对血管平滑肌细胞内 AMPK 的磷酸化和总蛋白水平的影响

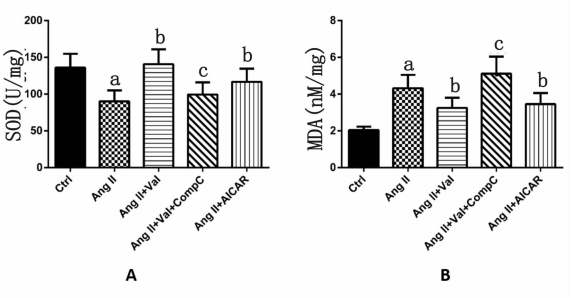
Fig 2　A　Dose-effect relationship of valsartan on AMPK phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells. B　Effect of angiotensin Ⅱ and valsartan on AMPK phosphorylation and expression in vascular smooth muscle cells.



与对照组相比，$^{a}P<0.01$；与 Ang Ⅱ组相比，$^{b}P<0.01$；与 Ang Ⅱ + Val 组相比，$^{c}P<0.01$

图 3　血管紧张素Ⅱ、缬沙坦对血管平滑肌细胞内活性氧合成的影响

Fig 3　Effect of angiotensin Ⅱ and valsartan on synthesis of ROS in vascular smooth muscle cells



与对照组相比，$^{a}P < 0.01$，与 Ang Ⅱ组相比，$^{b}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$；与 Ang Ⅱ + Val 组相比，$^{c}P < 0.01$。

图 4 血管紧张素Ⅱ、缬沙坦对血管平滑肌细胞内 SOD、MDA 活性的影响。

Fig 4 Effect of angiotensin Ⅱ and valsartan on activity of SOD and MDA in vascular smooth muscle cells

3 讨论

动脉粥样硬化是引起慢性缺血性心血管病的重要病理改变。血管平滑肌细胞的异常增殖、迁移和凋亡，在动脉粥样硬化的形成和发展中具有重要作用。研究表明，我国急性心梗患者发病率正逐年上升[9]，冠心病患者发生急性心梗后，血液内血管紧张素Ⅱ（Ang Ⅱ）的浓度明显升高[10-11]，而高浓度的 Ang Ⅱ可以通过增加细胞内活性氧（ROS）的合成诱导血管平滑肌细胞的凋亡[2-3]，平滑肌细胞的异常凋亡又将引起粥样硬化斑块破裂，导致急性冠脉综合征的发生[1]，从而形成恶性循环，影响冠心病患者的预后。因此抑制血管平滑肌细胞的异常凋亡对改善急性冠脉综合征患者的预后具有重要意义。

本研究发现，血管紧张素Ⅱ可以降低细胞内总超氧化物歧化酶（SOD）的活性、增加丙二醛（MDA）的活性和活性氧的生成，并增加细胞内 Caspase 3 的活性，从而促进细胞的凋亡。

研究表明，活化的 AMPK 可以降低细胞内活性氧的合成，发挥细胞保护作用[4,12]。本研究用 AICAR（AMPK 激活剂）预处理血管平滑肌细胞可以显著抑制血管紧张素Ⅱ对细胞内 SOD、MDA、Caspase 3 活性和活性氧合成的影响，这提示活化的 AMPK 可以通过降低活性氧的合成抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡。

缬沙坦是临床常用的血管紧张素Ⅱ 1 型受体（AT1-R）拮抗剂之一，可以竞争性抑制 Ang Ⅱ与 AT1-R 的结合，从而发挥降压、改善动脉粥样硬化形成的作用。尽管目前普遍认为缬沙坦的药理作用与拮抗 AT1-R 相关，但是仍有研究表明缬沙坦的部分药理作用并不依赖于拮抗 AT1-R[13]。另外 Ha 等[14]研究表明，缬沙坦可以通过激活腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）抑制 THP-1 细胞内组织因子的表达，且该作用不依赖于拮抗 AT1-R。基于上述认识，本研究发现，缬沙坦可以剂量依赖性增加血管平滑肌细胞内 AMPK 的磷酸化水平，并可以抑制 Ang Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡，其机制可能与激活 AMPK 相关。但是 Tea 等[15]研究表明，使用缬沙坦处理自发性高血压模型大鼠 2 周，可以增加大鼠血液内 Ang Ⅱ的水平，而增加的 Ang Ⅱ可以通过与 AT2-R 结合，从而导致大鼠主动脉壁内平滑肌细胞的凋亡增加。因此，笔者推断冠心病患者发生急性心梗后，因血液内 Ang Ⅱ的浓度明显升高[10-11]，短期内应用缬沙坦可以降低血管壁内平滑肌细胞的凋亡，但若长期使用缬沙坦可能会反馈性增加血液内 Ang Ⅱ的水平，从而导致血管平滑肌细胞的凋亡增加，但该假设仍需进一步研究验证。

尽管本研究并未排除缬沙坦通过拮抗 AT1-R 发挥的药理作用，但仍可以从既得结果中得出结论，缬沙坦可以通过激活 AMPK 抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞凋亡，部分解释了缬沙坦在发挥降压作用的同时抑制动脉粥样硬化发生发展，改善急性冠脉综合征患者预后的可能机制。

参 考 文 献

[1] Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis [J]. Nat Med, 2006, 12 (9): 1075-1080. DOI: 10.1038/nm1459.

[2] Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Rios FJ, et al. Angiotensin Ⅱ and vascular injury [J]. Curr Hypertens Rep, 2014, 16 (6): 431. DOI: 10.1007/s11906-014-0431-2.

[3] Redondo S, Ruiz E, Padilla E, et al. Role of TGF-beta1 in vascular smooth muscle cell apoptosis induced by angiotensin Ⅱ [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 556 (1-3): 36-44. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.10.060.

[4] Pei X, Li X, Chen H, et al. Thymoquinone Inhibits Angiotensin Ⅱ-Induced Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Through the AMPK/PPARgamma/PGC-1alpha Pathway [J]. DNA Cell Biol, , 2016, 35 (8): 426-433. DOI: 10.1089/dna.2016.3262.

[5] 朱述阳. 脂联素对气道平滑肌凋亡的作用及对 AMPK 活性的影响 [J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30 (16): 969-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2010.016.003.

[6] 赵鹏. 缬沙坦对心力衰竭大鼠心肌中解聚素-金属蛋白酶的干预作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 10 (22): 1100-1104. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2013.10.007.

[7] Shinshi Y, Higashiura K, Yoshida D, et al. Angiotensin Ⅱ inhibits glucose uptake of skeletal muscle via the adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway [J]. J Am Soc Hypertens, 2007, 1 (4): 251-255. DOI: 10.1016/j.jash.2007.04.007

[8] Yoshida D, Higashiura K, Shinshi Y, et al. Effects of angiotensin Ⅱ receptor blockade on glucose metabolism via AMP-activated protein kinase in insulin-resistant hypertensive rats [J]. J Am Soc Hypertens, 2009, 3 (1): 3-8. DOI: 10.1016/

j. jash. 2008. 08. 002.
[9] 中国医师协会急诊医师分会、中华医学会心血管病学分会、中华医学会检验医学分会. 急性冠脉综合征急诊快速诊疗指南 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25 (4): 397-404. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2016. 04. 002.
[10] Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis [J]. Hypertension, 2001, 37 (4): 1047-1052. DOI: 10. 1161/01. HYP. 37. 4. 1047.
[11] 熊力. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统与急性心肌梗死短期预后关系的研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2014, 1: 92-94. DOI: 10. 3969/j. 1674-4055. 2014. 01. 28.
[12] Barbosa VA, Luciano TF, Marques SO, et al. Acute exercise induce endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via Akt and AMP-activated protein kinase in aorta of rats: Role of reactive oxygen species [J]. Int J Cardiol, 2013, 167 (6): 2983-2988. DOI: 10. 1016/j. ijcard. 2012. 08. 050.
[13] Iwashita M, Sakoda H, Kushiyama A, et al. Valsartan, independently of AT1 receptor or PPARgamma, suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302 (3): 286-296. DOI: 10. 1152/ajpendo. 00324. 2011.
[14] Ha YM, Park EJ, Kang YJ, et al. Valsartan independent of AT (1) receptor inhibits tissue factor, TLR-2 and -4 expression by regulation of Egr-1 through activation of AMPK in diabetic conditions [J]. J Cell Mol Med, 2014, 18 (10): 2031-2043. DOI: 10. 1111/jcmm. 12354.
[15] Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, et al. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin Ⅱ type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo [J]. Hypertension, 2000, 35 (5): 1069-1073. DOI: 10. 1161/01. HYP. 35. 5. 1069.

(收稿日期: 2017-03-29)
(本文编辑: 何小军)

利奈唑胺和万古霉素体外血脑屏障透过试验对比研究

楼屹　蒋思懿　陈树大　李媛媛　陈涛　秦光明　陈金亮　施小燕

脑组织结构复杂且具有特异性, 特别是血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的存在使得许多药物难以进入脑组织发挥作用。确定一种药物能否治疗颅内感染, 是否具有较好的 BBB 透过率是很重要的。2004 年美国传染病学会 (IDSA) 脑膜炎治疗指南推荐[1], 万古霉素作为术后治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 颅内感染的抗菌药物, 但其在 BBB 中透过率仅为 18% 左右[2]。因此, 万古霉素在颅内能否达到有效治疗浓度是有争议的。而利奈唑胺作为新型抗菌药物, 对 MRSA 等革兰阳性菌同样具有较强抗菌活性, 而且在脑脊液中浓度较高, 对利奈唑胺渗透进入革兰阳性菌感染及神经外科术后患者脑脊液的研究发现其 BBB 透过率达 70% 左右[3-4]。但这些研究多局限于体内研究, 由于危重感染者病情的复杂性及术后 BBB 破坏等一些病理生理改变必然会影响药物在体内分布, 因此, 体内研究所得到药物透过 BBB 参数变异常常很大, 而且目前对利奈唑胺治疗颅内感染多局限于个案报道, 没有临床数据对万古霉素和利奈唑胺治疗颅内感染疗效比较。故建立良好的体外 BBB 模型以排除各种干扰因素, 首先进行万古霉素和利奈唑胺体外 BBB 透过率比较, 有益于为临床药物疗效评价提供试验依据。

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2017. 08. 014
基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y13H090008)
作者单位: 315010 宁波, 宁波市中医院重症医学科 (楼屹); 310009 杭州, 浙江大学医学院附属第二医院脑重症医学科 (施小燕、陈树大、李媛媛、陈涛), 检验科 (秦光明), 药剂科 (陈金亮); 浙江省义乌, 浙江大学医学院附属第四医院重症医学科 (蒋思懿)
通信作者: 施小燕, Email: xys0571@ hotmail. com

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

HUVEC, C6 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; RPMI1640 培养基 (Gibco); 胎牛血清 (Hyclone); 福司可林 (美仑生物); Ro20-1724 (Abcam); 液相相关试剂 (甲醇, 甲酸, 乙腈, 乙酸铵等) (Thermos Fisher Scientific); 利奈唑胺 (辉瑞制药有限公司), 万古霉素 (美国礼来公司)。

1.2 仪器

细胞培养箱 (Thermos); MillicellR ERS-2 (Millipore); Agilent 1200 型液相色谱系统 (Agilent Technologies); Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (15 cm × 0.4 cm, 5 μm) (Agilent Technologies); 电子分析天平- AT-261 型 (Mettler); 台式高速离心机 (Eppendorf); pH 计- pHs-25 型 (上海精科雷磁仪器厂); 超声机- HS10260D 型 (BENCHTOP)。

1.3 试剂配制

两种药物标准储备液: 准确称取一定含量的两种药物标准品于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解、定容, 得到 1 mg/mL 的标准储备液, 置于 4 ℃冰箱中保存。临用前用水配成 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6 mg/mL 系列浓度的标准溶液。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 HUVEC, C6 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基中, 37℃, 5% CO_2 饱和湿度下培养, 0.25% 胰酶消化, 取对数生长期细胞用于实验。