

COX-2 抑制剂塞来昔布对肝癌小鼠 CD4⁺CD25⁺ 调节 T 细胞的影响*

徐大恒¹, 陈霖¹, 唐承薇¹, 王春晖^{1△}, 孟文彤²

1. 四川大学华西医院 消化内科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 血液内科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂塞来昔布对肝癌小鼠调节 T 细胞(regulatory T, Treg) 的影响。**方法** 昆明种小鼠随机分成正常组及肝癌组, 每组各 20 只。肝癌小鼠和正常小鼠于背部皮下注射肝癌 H22 荷瘤小鼠腹水稀释液或生理盐水 0.2 mL 一次。于次日开始, 每组各取 10 只采用塞来昔布 30 mg/(kg·d)灌胃; 肝癌组另外 10 只予以相同容积的生理盐水灌胃, 作为肝癌对照组。灌胃均为 1 次/d, 共 24 d。正常组另外 10 只不做任何干预, 作为健康对照组。给药 24 d 后处死全部小鼠, 完整取出肿瘤后称取瘤重, HE 染色检测是否成瘤; 采用流式细胞学技术测定小鼠外周血中 Treg 细胞数量变化; 免疫组织化学方法检测肝癌组织中叉头样/翼状螺旋转录因子-3(Foxp3)及 COX-2 的表达情况。**结果** 塞来昔布干预后小鼠瘤重低于肝癌对照组[(0.82±0.30) g vs. (1.41±0.63) g, $P<0.05$]。HE 染色证实所有肿瘤小鼠均已成瘤。肝癌对照组小鼠外周血中 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例高于健康对照组[(4.26±0.89)% vs. (3.01±0.65)% , $P<0.05$] ; 经塞来昔布作用后, 其 Treg 占 CD4⁺T 细胞的比例下降[(3.04±0.74)% vs. (4.26±0.89)% , $P<0.05$]。正常小鼠经塞来昔布作用后, 其外周血 Treg 与健康对照组相比无明显变化。塞来昔布干预后肝癌小鼠肿瘤浸润淋巴细胞中 Foxp3 蛋白阳性细胞低于肝癌对照组[(8.87±3.72)% vs. (30.78±9.26)% , $P<0.05$] , 肿瘤组织中 COX-2 表达水平亦下调[IOD 值(2.90±1.030) vs. (6.63±2.279) , $P<0.01$]。**结论** 肝癌小鼠外周血中 Treg 比例增高; COX-2 抑制剂能明显降低其外周血及肿瘤浸润淋巴细胞中 Treg 的比例。

【关键词】 CD4⁺CD25⁺ 调节 T 细胞 Foxp3 环氧合酶-2 肝癌

Effect of Cyclooxygenase-2 Inhibitor on CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Mouse Hepatocellular Carcinoma XUDa-heng¹, CHEN Lin¹, TANG Cheng-wei¹, WANG Chun-hui^{1△}, MENG Wen-tong². 1. Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: wangch@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of celecoxib on regulatory T cells (Treg) in mouse hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Total of 40 mice was divided into two subgroups, normal animal groups include control and celecoxib group, HCC groups include control and celecoxib group. 30 mg/kg of celecoxib were given daily for 24 days for celecoxib groups. All mice were sacrificed after 24 days treatment and the removed tumor weight were measured. By detecting CD4 and CD25 with flow cytometry, the level of Treg in peripheral blood was determined. The expressions of Forkhead/winged helix transcription factor-3 (Foxp3) protein in the tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in tumor tissue were measured by immunohistochemistry techniques. **Results** The mean weight of tumor in celecoxib group is much lower than that of control group [(0.82±0.30) g vs. (1.41±0.63) g, $P<0.05$]. The percentage of Treg in total CD4⁺T cells isolated from the peripheral blood of HCC animals in control group was higher than that of normal control group [(4.26±0.89)% vs. (3.01±0.65)% , $P<0.05$]. After treatment with celecoxib, the percentage of Treg was decreased [(3.04±0.74)% vs. (4.26±0.89)% , $P<0.05$] and the percentage of Foxp3 positive cell in TILs was also decreased [(8.87±3.72)% vs. (30.78±9.26)% , $P<0.05$]. The tumor tissue COX-2 protein expression in celecoxib group was lower than in that of control group [IOD (2.90±1.030) vs. (6.63±2.279) , $P<0.01$] and the changing of COX-2 in tumor tissue was according to Treg in the peripheral blood. **Conclusion** Treg cells are increased in the peripheral blood of HCC mice and COX-2 inhibitor could decrease the percentage of Treg cell in the peripheral blood or TILs.

【Key words】 CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell Forkhead/winged helix transcription factor-3
Cyclooxygenase-2 Hepatocellular carcinoma

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81070294)和四川省青年科技基金(No. 08ZQ026-088)资助

△ 通讯作者, E-mail: wangch@scu.edu.cn

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及死亡率一直居高不下^[1,2]。虽然肝癌的治疗有外科手术、肝动脉栓塞化疗、射频消融治疗、经皮无水乙醇

注射等多种治疗方法,但总体死亡率尚无明显改观,如何进一步提高疗效及寻找新的治疗靶点成为关注的重点。肝癌的发生、发展及转归除了与抑癌基因失活、癌基因激活及生长因子参与外,还与机体免疫系统之间存在着十分密切的联系。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)对维持机体的免疫稳态有重要作用。我们以往的研究发现,肝癌患者外周血 Treg 比例增高^[3],非甾体类抗炎药物(NSAIDs)能抑制肝癌生长^[4]。一般认为,NSAID 药物抑制肿瘤生长主要与其抑制环氧合酶-2(COX-2)有关,但其对肿瘤组织 Treg 是否有影响,目前尚不清楚。本研究从肿瘤免疫调节的角度,探讨了选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布对肝癌小鼠 Treg 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及动物 H22 小鼠肝癌细胞株源自四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室肿瘤研究室。健康昆明种小鼠,清洁级,雄性,4~6 周龄,体质量 18~22 g。由四川大学实验动物中心提供[生产许可证:scxk(川)-10-2006],人类疾病相关多肽研究室饲养,饲养温度控制在 20~22 ℃,湿度控制在 30%~50%,每周更换垫料 2 次,清洗笼具 1 次。

1.1.2 主要试剂及药品 FITC 标记鼠抗人 CD4 抗体(EB11004873 eBioscience,美国),PE 标记鼠抗人 CD25 抗体(EB12025973 eBioscience,美国),叉头样/翼状螺旋转录因子-3(Foxp3)兔抗小鼠单克隆抗体(bs-0269R,envision),COX-2 山羊抗小鼠单克隆抗体(北京博奥森公司),SP-9000 免疫组化染色试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉公司),塞来昔布(北京辉瑞制药有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 昆明种小鼠以数字编码随机分成正常组及肝癌组,每组各 20 只。正常小鼠分为 2 组,即健康对照组(A 组)、塞来昔布组(B 组);肝癌小鼠分为 2 组,即肝癌对照组(C 组)、塞来昔布组(D 组)。每个亚组 10 只小鼠。A 组不加干预措施,B 组和 D 组每只给予塞来昔布 30 mg/kg 灌胃;C 组每只给予相同剂量生理盐水灌胃。所有小鼠均每天灌胃 1 次,共给药 24 d。

1.2.2 小鼠肝癌模型的制备 从-70 ℃冰箱中取出冻存的 H22 小鼠肝癌细胞,于 37 ℃水箱中迅速复苏,用 2 mL 注射器抽取后迅速注入昆明种小

鼠(另取 4 只)腹腔内。取接种 6~8 d 的腹水型肝癌 H22 荷瘤小鼠,颈椎脱臼致死,消毒后剪开并剥去皮肤,用无菌注射器穿过腹壁肌层抽取腹水,用 Hanks 液稀释至 1×10^7 cell/mL。A 组及 B 组正常小鼠背部皮下注射 0.2 mL 生理盐水一次,C、D 组肝癌小鼠每只于背部皮下注射腹水稀释液 0.2 mL 一次。B、C、D 组于次日开始分组给予塞来昔布或生理盐水灌胃。处死后观察肿瘤小鼠瘤体大小,HE 染色检测肿瘤小鼠是否成瘤。

1.2.3 标本留取 所有小鼠于末次给药(第 24 d)后次日颈椎脱臼致死,用 EDTA-K2 抗凝剂采血管收集小鼠静脉血,置于冰盒中保存,取 100 μ L 当天行流式细胞学检测。肿瘤小鼠除留取静脉血外,完整取出肿瘤组织并称取瘤重,用多聚甲醛固定,用于病理检测及免疫组化。

肿瘤生长抑制率(%)=(对照组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重 \times 100%

1.2.4 流式细胞术检测 所有小鼠外周血 CD4、CD25 取 100 μ L 加 EDTA 的抗凝血,加入待测抗体,混匀后室温避光孵育 20 min。每管各加红细胞裂解液 1 mL,室温避光溶血 10 min。1 500 r/min 离心 3 min,弃上清。加 1 mL PBS 缓冲液洗涤,1 500 r/min 离心 3 min,弃上清。加 0.5 mL PBS 缓冲液重悬细胞,混匀上流式细胞仪检测(P07900102, BD 公司)。CD4⁺CD25⁺T 细胞即为 Treg,即流式细胞仪分出两个均为阳性的为 Treg。

1.2.5 免疫组化检测 肿瘤小鼠 Foxp3 及 COX-2 表达 石蜡切片常规脱蜡至水,采用枸橼酸缓冲液(0.01 mol/L,pH6.0)高压锅抗原热修复,加 3% H₂O₂ 室温避光孵育 30 min,PBS 缓冲液洗 5 min \times 3 次。Foxp3 检测采用 Envision 二步法,即加入一抗(1:1 000)孵育后,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次,滴加 Envision 二抗,37 ℃孵育 30 min,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次。COX-2 的检测采用 SP 法。用 10%正常非免疫羊血清 37 ℃孵育 30 min,滴加一抗(COX-2 1:400)4 ℃冰箱中过夜,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次。滴加二抗工作液,37 ℃孵育 60 min,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37 ℃孵育 60 min,PBS 缓冲液清洗 5 min \times 3 次。DAB 显色、苏木素复染,脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。每只小鼠取 1 张切片观察。

阳性结果判断:在高倍镜视野下随机观察 5 个视野,Foxp3 阳性染色以细胞核染成棕黄色为主,计

数肿瘤组织中 Foxp3 阳性细胞数及淋巴细胞数, 计算 Foxp3 阳性细胞 (Treg) 占淋巴细胞比例 (%); COX-2 阳性染色以细胞浆及细胞膜染成棕黄色为主, 采用 IPP 软件测积分光密度 (IOD) 值。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠瘤重及一般情况比较

所有接种小鼠处死后检视均有成瘤, 肿瘤呈圆形或椭圆形, 切片经 HE 染色后病理证实为肿瘤组织。D 组小鼠瘤重低于 C 组 [(0.82 ± 0.30) g vs. (1.41 ± 0.63) g, $P < 0.05$], 肿瘤生长抑制率为 41.8%; C、D 两组小鼠均 100% 存活。两组小鼠饮

食、活动较好及大便性状均正常, 毛色光泽。

2.2 各组小鼠外周血中 Treg/CD4⁺T 细胞的比例变化

如图 1 及附表所示, 与 A 组比较, B 组正常小鼠给予塞来昔布后, 其外周血 Treg 占 CD4⁺T 细胞的百分比略降低, 但二者差异无统计学意义 ($P >$

附表 塞来昔布对小鼠外周血 Treg 的影响

Table Effect of celecoxib on Treg in mouse peripheral blood

Group	<i>n</i>	Treg/CD4 ⁺ T (%)
A	10	3.01 ± 0.65
B	10	2.97 ± 0.46
C	10	4.26 ± 0.86*
D	10	3.04 ± 0.74#

* $P < 0.05$, vs. Group A; # $P < 0.05$, vs. Group C. A: Healthy mouse; B: Healthy mouse treated with celecoxib; C: HCC mouse; D: HCC mouse treated with celecoxib

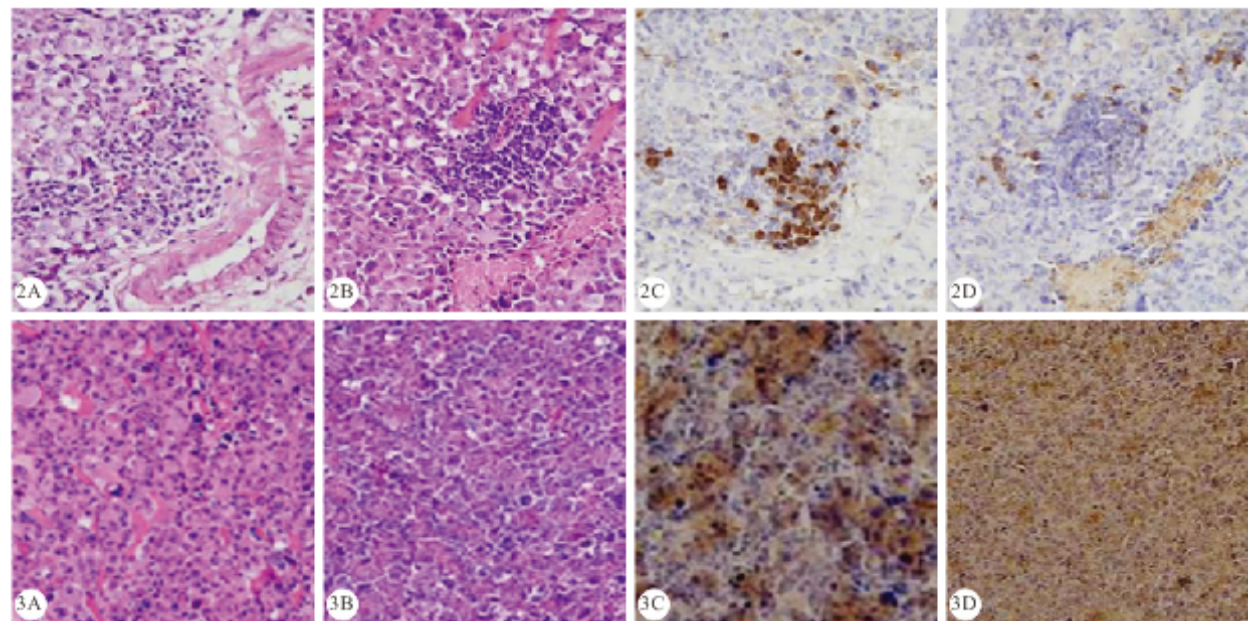
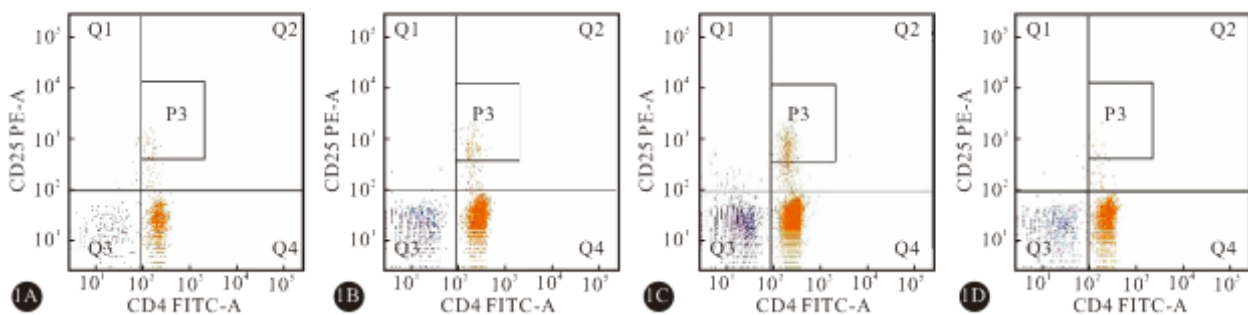


图 1 流式细胞分析塞来昔布对各种小鼠外周血 Treg 比例的影响

图 2 塞来昔布对小鼠肝癌组织中浸润淋巴细胞 Foxp3 表达的影响

(A, B: HE; C, D: Envision)。×200

图 3 塞来昔布对小鼠肝癌组织 COX-2 表达的影响 (A, B: HE; C, D: SP)。×200

Fig 1 Peripheral blood Treg ratio in each group detected by flow cytometry (Q1: CD25⁺ cell; Q2: CD4⁺CD25⁺ cell; Q3: CD4⁻CD25⁻ cell; Q4: CD4⁺ cell; P3: CD4⁺CD25^{high} Treg)

Fig 2 Effect of celecoxib on Foxp3 protein expression in mouse HCC (A, B: HE; C, D: Envision)。×200

Fig 3 Effect of celecoxib on COX-2 protein expression in mouse HCC (A, B: HE; C, D: SP)。×200

1A: Healthy mouse; 1B: Healthy mouse treated with celecoxib; 1C, 2A, 2C, 3A, 3C: HCC mouse; 1D, 2B, 2D, 3B, 3D: HCC mouse treated with celecoxib

0.05)。C 组小鼠外周血中 Treg 占 CD4⁺ T 细胞的比例高于 A 组 ($P < 0.05$)。经塞来昔布作用后, D 组肝癌小鼠外周血 Treg 占 CD4⁺ T 细胞的百分比与 C 组相比降低 ($P < 0.05$)。

2.3 肿瘤组织浸润淋巴细胞中 Foxp3 阳性细胞比例

如图 2 所示, 小鼠肝癌组织中可见较多淋巴细胞浸润, 其中部分细胞 Foxp3 核染色阳性, 说明这些肿瘤浸润淋巴细胞中存在一定比例的 Treg 细胞。C 组肿瘤组织浸润淋巴细胞中 Treg 的比例低于 D 组 [$(8.87 \pm 3.720)\%$ vs. $(30.78 \pm 9.26)\%$, $P < 0.05$]。

2.4 肿瘤组织 COX-2 表达

如图 3 所示, 小鼠肝癌组织中有较高水平的 COX-2 蛋白表达, 其部位主要位于胞浆。经 COX-2 抑制剂作用后, COX-2 表达水平明显降低。图像分析结果显示, C 组及 D 组 COX-2 的 IOD 值分别为 6.63 ± 2.279 、 2.90 ± 1.030 ($P < 0.01$)。

3 讨论

近 20 余年来, 大量的流行病学和实验证据表明非甾体抗炎药(包括选择性及非选择性 COX-2 抑制剂)能够抑制结直肠癌、胃癌、胰腺癌、非小细胞型肺癌、前列腺癌、肝癌等多种肿瘤的生长。环氧化酶是前列腺素(PGE₂)合成的限速酶, 包括 COX-1 与 COX-2 两种亚型, 它们可以将花生四烯酸催化转变成前列腺素。已有大量实验证明, COX-2 在多种恶性肿瘤中呈现高表达, COX-2 抑制剂能通过 COX-2 及非 COX-2 途径抑制肿瘤生长。我们以往的研究证实, 选择性 COX-2 抑制剂能明显抑制人肝癌裸鼠移植瘤的生长^[5]。本研究也证实, 塞来昔布能明显抑制小鼠肝癌生长。肿瘤组织 COX-2 的高水平表达不仅与血管生成增加、侵袭与转移密切相关^[6-9], 还与肿瘤免疫逃避相关。有研究证实, COX-2 的下游产物 PGE₂ 能通过下调 p40 亚单位抑制人单核细胞 IL-12 及 IL-23 的表达^[10], 诱导巨噬细胞产生 IL-10^[11]。Stolina 等^[12]发现, 使用 COX-2 抑制剂能够明显起到抗肿瘤作用, 包括抑制肿瘤生长及延长生存期, 其机制可能与恢复 IL-10/IL-12 的平衡有关。因此, COX-2 可能是通过增加 IL-10, 减少 IL-12 的分泌来抑制树突状细胞, 进而使肿瘤细胞完成免疫逃避。除上述机制外, 近年来的研究还发现, COX-2 可以影响 Treg 参与肿瘤免疫调节。

Treg 是 T 细胞成员之一, 免疫无能性和免疫

抑制是 Treg 细胞的两大功能特征。Treg 可通过细胞之间接触、也可通过分泌 IL-10 和 TGF- β 等细胞因子抑制局部免疫反应诱导免疫耐受。Treg 不仅与自身免疫疾病相关, 还参与肿瘤免疫耐受。研究表明, 肿瘤患者外周血中 Treg 比例与正常人群相比明显增高, 这种现象也同样在动物实验中得到证实。本研究通过建立肝癌小鼠模型, 分析其外周血标本 Treg 发现, 肝癌小鼠外周血 CD4⁺ CD25^{high} T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例均高于正常小鼠, 说明 Treg 细胞参与了肝癌的免疫调节。除肿瘤患者外周血中 Treg 增加外, 一些研究还发现肿瘤浸润淋巴细胞中 Treg 水平也增高^[13-15], 这些 Treg 抑制了反应性 T 细胞的增殖及功能。这说明肿瘤微环境中可能存在一个免疫抑制网络, 而 Treg 在其中发挥了重要作用, 并且肿瘤浸润淋巴细胞中 Treg 比例增加在肿瘤免疫耐受中可能更为重要。本研究采用 Foxp3 作为 Treg 特异性分子标志检测了肿瘤浸润淋巴细胞中 Treg 比例, 发现肝癌小鼠肿瘤浸润淋巴细胞中有较高比例的 Foxp3 阳性细胞。Foxp3 对于 Treg 细胞的功能极为重要, 在其它细胞中很少有表达, 被看作是 Treg 细胞的特异性标志。由于 Treg 具有负向调节机体抗肿瘤免疫应答作用, 减少 Treg 细胞或抑制其功能将有助于控制肿瘤的发生、发展。动物实验也证实, 用 anti-CD25 抗体去除 Treg 细胞有助于抗肿瘤治疗^[16,17]。本研究发现, 肝癌小鼠肿瘤组织中 COX-2 高表达的同时, Treg 占肿瘤浸润淋巴细胞比例亦增高, 这可能与 COX-2 催化产物 PGE₂ 参与有关。有研究表明, PGE₂ 不仅能增加 Treg 细胞的免疫抑制功能, 而且能够诱导 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞转变成具有免疫抑制作用的表型^[18]。本研究发现, 塞来昔布抑制小鼠肝癌生长的同时, 不仅其外周血中 Treg 细胞数减少, 肿瘤浸润淋巴细胞中 Foxp3 阳性细胞也明显减少。说明 COX-2 抑制剂能通过免疫调节作用抑制肿瘤生长。

总之, 本研究表明 COX-2 抑制剂塞来昔布能有效抑制小鼠肝癌生长; 下调荷瘤小鼠外周血及肿瘤浸润淋巴细胞中 Treg 的比例, 说明 COX-2 抑制剂抑制肿瘤生长可能与其下调 Treg 水平及参与肿瘤免疫调节有关。COX-2 抑制剂是通过何种信号传导机制调节 Treg 水平尚不清楚, 还有待以后进一步研究。

参 考 文 献

- CA Cancer J Clin,2011;61(2):69-90.
- 2 吴孟超. 肝癌外科治疗的近期进展. 中国普外基础与临床杂志,2006;13(2):125-128.
 - 3 廖娟,王春晖,李肖等. 经导管肝动脉化疗栓塞术对原发性肝癌患者细胞免疫及调节 T 细胞的影响. 肝脏,2011;16(3):198-201.
 - 4 Hossain MA, Kim DH, Jang JY, *et al.* Aspirin induces apoptosis *in vitro* and inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells in a nude mouse xenograft model. In J Oncol,2012;40(4):1298-1304.
 - 5 刘纯伦,唐承薇,周旭春. 奥曲肽联合罗非昔布增强对肝癌生长的抑制作用. 中华内科杂志,2003;42(5):313-315.
 - 6 Morita Y, Hata K, Nakanishi M, *et al.* Cyclooxygenase-2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol,2012;41(3):885-892.
 - 7 Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Ullah MF, *et al.* Celecoxib and GABA cooperatively prevent the progression of pancreatic cancer in vitro and in xenograft models of stress-free and stress-exposed mice. PLoS One,2012;7(8):e43376.
 - 8 Liu H, Yang Y, Xiao J, *et al.* COX-2-mediated regulation of VEGF-C in association with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung cancer. Anat Rec (Hoboken),2010;293(11):1838-1846.
 - 9 Almhanna K, El-Rayes B, Sethi S, *et al.* Association between COX-2 expression and effectiveness of COX-2 inhibitors in a phase II trial in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma. Anticancer Res,2012;32(8):3559-3563.
 - 10 Kalim KW, Groettrup M. Prostaglandin E₂ inhibits IL-23 and IL-12 production by human monocytes through down-regulation of their common p40 subunit. Mol Immunol,2013;53(3):274-282.
 - 11 Patel S, Vetale S, Teli P, *et al.* IL-10 production in non-small cell lung carcinoma patients is regulated by ERK, P38 and COX-2. J Cell Mol Med,2012;16(3):531-144.
 - 12 Stolina M, Sharma S, Lin Y, *et al.* Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. J Immunol,2000;164(1):361-370.
 - 13 Maruyama T, Kono K, Mizukami Y, *et al.* Distribution of Th17 cells and FoxP3 (+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. Cancer Sci,2010;101(9):1947-1954.
 - 14 Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, *et al.* Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. J Immunother,2010;33(4):435-441.
 - 15 Yan M, Jene N, Byrne D, *et al.* Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers. Breast Cancer Res,2011;13(2):R47.
 - 16 Morita R, Hirohashi Y, Sato N. Depletion of Tregs *in vivo*: a promising approach to enhance antitumor immunity without autoimmunity. Immunotherapy,2012;4(11):1103-1105.
 - 17 Ramos RN, Oliveira CE, Gasparoto TH, *et al.* CD25⁺ T cell depletion impairs murine squamous cell carcinoma development via modulation of antitumor immune responses. Carcinogenesis,2012;33(4):902-929.
 - 18 Baratelli F, Lin Y, Zhu L, *et al.* Prostaglandin E₂ induces foxp3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cell. J Immunol,2005;175(3):1483-1490.

(2012-12-12 收稿,2013-04-10 修回)

编辑 吕熙

(上接第 535 页)

- 12 Dlugosová K, Mitasíková M, Bernátová I, *et al.* Reduced connexin-43 expression in the aorta of prehypertensive rats. Physiol Res,2008;57(Suppl 2):S23-S29.
- 13 Li WE, Nagy JI. Connexin43 phosphorylation state and intercellular communication in cultured astrocytes following hypoxia and protein phosphatase inhibition. Eur J Neurosci,2000;12(7):2644-2650.
- 14 Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, *et al.* Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 alpha gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. Int Heart J,2007;48(4):533-546.
- 15 Aoki A, Ogawa T, Sumino H, *et al.* Long-term effects of telmisartan on blood pressure, the renin-angiotensin-aldosterone system, and lipids in hypertensive patients. Heart Vessels,2010;25(3):195-202.
- 16 Ichikawa S, Takayama Y. Long-term effects of olmesartan, an Ang II receptor antagonist, on blood pressure and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive patients. Hypertens Res,2001;24(6):641-646.

(2012-12-26 收稿,2013-04-22 修回)

编辑 余琳