

不同血管紧张素受体拮抗剂对老年高血压患者血小板活性的影响

李嫣然 王红艳 吴 方

【摘要】 目的:探讨氯沙坦、厄贝沙坦及缬沙坦 3 种血管紧张素受体拮抗剂(ARB)对老年高血压患者血小板活性的影响。 方法:入选年龄 >65 岁、长期服用 ARB 的老年高血压患者 90 例,根据用药情况分成氯沙坦、厄贝沙坦、缬沙坦 3 个治疗组。分别测定各组血小板聚集率(PAR)、血管紧张素 II(Ang II)、环氧化酶-2(COX-2)、血栓素 B_2 (TXB $_2$)水平。比较经不同 ARB 处理的内皮细胞中,由 Ang II 诱导产生的 COX-2 mRNA 及蛋白表达量、TXB $_2$ 水平。 结果:氯沙坦、厄贝沙坦及缬沙坦组 3 组的 PAR 分别为 $12.62\% \pm 0.74\%$ 、 $10.70\% \pm 0.70\%$ 和 $17.17\% \pm 1.44\%$, $P < 0.001$;COX-2 分别为 (81.04 ± 14.19) 、 (75.00 ± 11.14) 、 (145.10 ± 26.52) U/L, $P = 0.012$;TXB $_2$ 为 $(1\ 577.00 \pm 161.90)$ 、 $(1\ 324.00 \pm 121.40)$ 、 $(2\ 025.00 \pm 154.10)$ pg/ml, $P = 0.004$ 。与氯沙坦组相比,厄贝沙坦、缬沙坦组 COX-2 mRNA 及蛋白表达、TXB $_2$ 水平下降更为显著, $P < 0.01$ 。 结论:厄贝沙坦、缬沙坦通过抑制 COX-2/TXB $_2$ 表达,能更有效地抑制老年高血压患者的血小板活性。

【关键词】 老年高血压;血小板活性;环氧化酶-2;氯沙坦;厄贝沙坦;缬沙坦

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.06.019

Impact of different angiotensin receptor blockers on platelet activity in elderly hypertensive patients LI

Yanran, WANG Hongyan, WU Fang. Department of Geriatrics, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

【Abstract】 Objective: To investigate the different inhibitory effects of losartan, irbesartan and valsartan on platelet aggregation in elderly hypertensive patients. **Methods:** According to varied medication history, 90 enrolled hypertensive patients over the age of 65 were divided into losartan ($n = 30$), irbesartan ($n = 30$) and valsartan ($n = 30$) treatment group. Then, platelet aggregation rate (PAR) and plasma levels of angiotension II (Ang II), COX-2 and TXB $_2$ were determined. Human aortic endothelial cells (HAECs) were stimulated by Ang II with or without treatment of losartan, irbesartan and valsartan, and the relative expression of COX-2 and TXB $_2$ was assessed. **Results:** PAR was lower with the treatment of irbesartan and valsartan compared with losartan [$12.62\% \pm 0.74\%$, $10.70\% \pm 0.70\%$ and $17.17\% \pm 1.44\%$], $P < 0.001$ among three groups], associated with more reduced plasma levels of COX-2 [(81.04 ± 14.19) U/L, (75.00 ± 11.14) U/L and (145.10 ± 26.52) U/L, $P = 0.012$ among three groups] and TXB $_2$ [$(1\ 577.00 \pm 161.90)$ pg/ml, $(1\ 324.00 \pm 121.40)$ pg/ml and $(2\ 025.00 \pm 154.10)$ pg/ml, $P = 0.004$ among three groups]. Relative increased expression in HAECs of COX-2 and secretion of TXB $_2$ stimulated by Ang II were more significantly inhibited by irbesartan or valsartan, respectively compared with losartan, $P < 0.01$. **Conclusion:** Irbesartan and valsartan may more

基金项目:上海市科委基金(124119a6800)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院老年病科

通信作者:吴 方, Email: wufangrjh@163.com

effectively decrease platelet activity in elderly hypertensive patients by attenuating the expression of COX-2/TXB₂.

【Key words】 Hypertension in elderly; Platelet activity; Cyclooxygenase-2; Irbesartan; Valsartan; Losartan

大量临床试验显示,肾素-血管紧张素系统(RAS)在高血压的进展和心脑血管事件的发生中起重要作用^[1-2]。血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是RAS主要效应物质^[3],它通过与血管紧张素受体结合引起相应生理效应^[1,4],其中血管紧张素1型受体(AT₁R)具有影响内皮功能和血管重构的功能^[5]。AT₁R拮抗剂(如氯沙坦、厄贝沙坦和缬沙坦)已被广泛应用于老年高血压患者的治疗^[6]。研究发现,AT₁R拮抗剂还有较强的抗血小板功能,老年高血压患者选用AT₁R拮抗剂可能减少心血管事件的发生^[7]。本实验旨在比较服用不同AT₁R拮抗剂的老年高血压患者血小板活性的变化,并通过体外细胞实验探究不同AT₁R拮抗剂对AngⅡ诱导下内皮细胞COX-2、TXB₂表达量的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2011年4月~2014年6月在我院住院治疗的高血压患者共90例,其中男性76例、女性14例,平均年龄(77.59 ± 2.11)岁。排除标准:肝肾功能不全,合并血液系统疾病、急慢性感染,近3个月内有创伤或外科手术史。

根据长期用药情况,分为氯沙坦组($n=30$)、厄贝沙坦组($n=30$)和缬沙坦组($n=30$)。各组患者入院后初始治疗剂量依次为50 mg/d、150 mg/d和80 mg/d。根据血压情况酌情调整剂量或加用小剂量氢氯噻嗪12.5~25 mg/d,目标血压<140/90 mmHg。

1.2 研究方法

1.2.1 测定血小板聚集率(PAR)、血浆AngⅡ、COX-2及TXB₂水平

患者入院后常规空腹采集静脉血2~3 ml,采用低速离心法收集富血小板血浆,加入花生四烯酸(AA)0.5 μmol/L,记录AA诱导的PAR^[8]。采用ELISA法检测血浆AngⅡ、COX-2和TXB₂水平。TXB₂为TXA₂代谢产物,本实验通过检测TXB₂水平代表TXA₂的水平,评价血小板活化程度。

1.2.2 细胞培养

人主动脉内皮细胞(HAEC)置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,在37℃含5% CO₂的恒温细胞培养箱中培养,细胞生长到90%融合时消化传代,以 5×10^5 /孔的密度接种于12孔板,检测mRNA表达,以 1×10^6 /孔的密度接种于6孔板检测蛋白表达。加入AngⅡ(100 nmol/L)以及相同浓度(1 μmol/L)的氯沙坦、厄贝沙坦或缬沙坦后培养。根据预实验结果,分别在表达量最高的时间点测定相应指标:在加药后1 h时检测COX-2 mRNA表达量,2 h检测COX-2蛋白表达量,3 h检测TXB₂水平。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测COX-2 mRNA表达量

收集各组细胞,Trizol法提取细胞总RNA,COX-2引物上游序列为5'-CCCACCCATGT-CAAAACCGA-3',下游序列为5'-CCGGGTACA-ATCGCACTTATACT-3';GAPDH上游序列为5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTTCG-3',下游引物序列为5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'。按Real Master Mix(SYBR Green)说明书配置反应体系。反应条件为94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,40个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。反应在ABI 7000定量荧光仪上进行,应用比较Ct法进行相对定量。

1.2.4 Western blot检测COX-2蛋白表达量

收集各组细胞,使用裂解液裂解细胞,BCA法测定细胞蛋白浓度,将细胞裂解液于100℃,10 min变性,每孔蛋白上样量60 μg。聚丙烯酰胺凝胶电泳条件:80 V,30 min;100 V,1 h。电泳结束后,蛋白经100 V,2 h转至NC膜;5%脱脂奶粉室温封闭2 h;加入一抗(COX-2稀释比为1:500;GAPDH稀释比为1:2000),4℃冰箱孵育过夜;TBST洗3次;加入二抗(稀释比1:5000)室温孵育2 h;洗膜后显影。

1.2.5 统计学分析

采用Graph Pad Prism 5进行统计学分析, t 检

验或 *one-way* ANOVA 方法比较计数资料, *Chi-square* 检验比较计量资料, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 一般临床资料

各组患者的年龄、性别、血压、血脂、血糖、血小板计数、肝肾功能以及糖尿病、冠心病的患病人数

表 1 各组患者 PAR、Ang II、COX-2 及 TXB₂ 水平比较

指标	氯沙坦组	厄贝沙坦组	缬沙坦组	3 组间 <i>P</i> 值
PAR (%)	17.17 ± 1.44	12.62 ± 0.74	10.70 ± 0.70	<0.001
Ang II (ng/ml)	1.53 ± 0.12	1.61 ± 0.22	1.48 ± 0.13	0.855
COX-2 (U/L)	145.10 ± 26.52	81.04 ± 14.19 ⁽¹⁾	75.00 ± 11.14 ⁽¹⁾	0.012
TXB ₂ (pg/ml)	2 025.00 ± 154.10	1 577.00 ± 161.90 ⁽¹⁾	1 324.00 ± 121.40 ⁽²⁾	0.004

注:与氯沙坦组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$; ⁽²⁾ $P < 0.01$

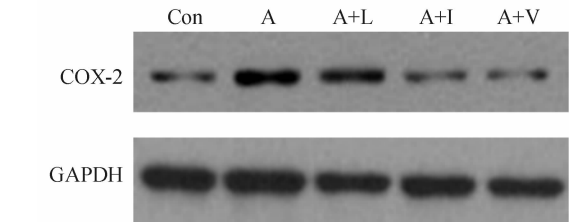
2.3 不同 AT₁R 拮抗剂对 COX-2、TXB₂ 表达量的影响

与厄贝沙坦、缬沙坦共孵育后, Ang II 诱导的内皮细胞 COX-2 mRNA 及蛋白表达受到了比氯沙坦更显著地抑制, 但在厄贝沙坦与缬沙坦两组之间, COX-2 mRNA 及蛋白表达的抑制作用无显著差异; 细胞培养上清中的 TXB₂ 水平在厄贝沙坦、缬沙坦干预后明显低于氯沙坦组, 见表 2、图 1。

表 2 不同 AT₁R 拮抗剂对 Ang II 诱导下内皮细胞中 COX-2、TXB₂ 表达量的影响

组别	COX-2 mRNA 表达量 ($\times 10^3$)	TXB ₂ 表达量 (pg/ml)
对照组	0.929 ± 0.033	74.342 ± 1.755
Ang II 组	7.727 ± 0.263	190.701 ± 6.597
氯沙坦组	5.554 ± 0.235 ⁽²⁾	155.245 ± 3.024 ⁽¹⁾
厄贝沙坦组	4.117 ± 0.255 ⁽²⁾⁽³⁾	103.434 ± 2.920 ⁽²⁾⁽⁴⁾
缬沙坦组	3.221 ± 0.532 ⁽²⁾⁽³⁾	101.728 ± 8.815 ⁽²⁾⁽³⁾

注:与 Ang II 组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.001$; 与氯沙坦组相比, ⁽³⁾ $P < 0.01$, ⁽⁴⁾ $P < 0.001$



注:Con 为对照组, A 为 Ang II 组, A + L 为 Ang II + 氯沙坦组, A + I 为 Ang II + 厄贝沙坦组, A + V 为 Ang II + 缬沙坦组

图 1 氯沙坦、厄贝沙坦和缬沙坦对于 Ang II 诱导的 COX-2 蛋白表达量的影响

等基本特征无统计学差异。

2.2 各组患者 PAR 和 Ang II、COX-2、TXB₂ 水平

厄贝沙坦、缬沙坦组 PAR、COX-2、TXB₂ 水平明显低于氯沙坦组, 但厄贝沙坦、缬沙坦两组间上述指标均无差异; 3 组间的血浆 Ang II 水平无统计学差异, 见表 1。

3 讨论

研究发现, 高血压患者可能存在体内血小板活性升高。活化的血小板黏附、聚集并释放促凝物质, 参与机体血栓形成。研究证实, 机体内血小板活性与 TXA₂ 及 COX-2 水平密切相关^[9]。Wing 等^[10]发现, 老年高血压患者心脑血管事件风险明显高于正常人, 可能与体内 COX-2、TXA₂ 水平、PAR 升高以及 Ang II 有关。

本研究发现, 厄贝沙坦、缬沙坦组患者的 PAR 及 COX-2、TXB₂ 的水平明显低于氯沙坦组。Senchenkova 等^[11]发现, AT₁R 缺陷鼠中 Ang II 对 COX-2、TXA₂ 及 PAR 的促进作用受到明显抑制, 提示 AT₁R 拮抗剂有抗血小板的作用, 并可能降低血栓事件风险^[1,12]。然而, 不同的 AT₁R 拮抗剂对血栓形成的影响程度可能也不同^[13]。Li 等^[14]发现, 厄贝沙坦和缬沙坦有抗动脉血栓作用。

本实验还显示, 受到 Ang II 刺激的内皮细胞 COX-2 mRNA 及蛋白表达量、细胞培养上清中 TXB₂ 水平均明显升高, 加入 AT₁R 拮抗剂(氯沙坦、厄贝沙坦或缬沙坦)后, 上述效应受到明显抑制, 其中厄贝沙坦、缬沙坦所受的抑制作用比氯沙坦更为显著, 但厄贝沙坦、缬沙坦两药之间并无显著差异。

本研究的研究对象尚未排除可能影响血小板活性的其它因素。今后的研究将扩大样本量、延长观察时间进一步验证厄贝沙坦及缬沙坦的抗栓作用, 以期老年高血压的药物选择提供实验和理论依据。

参 考 文 献

- [1] Kaminska M, Mogielnicki A, Stankiewicz A, et al. Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats [J]. J physiol pharmacol, 2005, 56(4): 571-585.
- [2] Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation [J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(7): 367-374.
- [3] Tocci G, Castello L, Volpe M. A review of angiotensin receptor blocker-based therapies at all levels of cardiovascular risk [J]. Eur Cardiol, 2011, 7: 254-256.
- [4] Pellegrin M, Mazzolai L. Angiotensin ii as an inducer of atherosclerosis: Evidence from mouse studies [J]. J Clin Exp Cardiol, 2013, 1: 1-3.
- [5] Duprez DA. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review [J]. J Hypertens, 2006, 24(6): 983-991.
- [6] Balkrishnan R, Phatak H, Gleim G, et al. Assessment of the use of angiotensin receptor blockers in major European markets among paediatric population for treating essential hypertension [J]. J Hum Hypertens 2009; 23: 420-425.
- [7] Chrysant SG, Chrysant GS. The pleiotropic effects of angiotensin receptor blockers [J]. J Clin Hypertens (Greenwich), 2006, 8(4): 261-268.
- [8] Xu ZH, Jiao JR, Yang R, et al. Aspirin resistance: clinical significance and genetic polymorphism [J]. J Int Med Res, 2012, 40(1): 282-292.
- [9] Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2 [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998, 38: 97-120.
- [10] Wing LM, Reid CM, Ryan P, et al. A comparison of outcomes with angiotensin-converting-enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly [J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 583-592.
- [11] Senchenkova EY, Russell J, Almeida-Paula LD, et al. Angiotensin II-mediated microvascular thrombosis [J]. Hypertension, 2010, 56(6): 1089-1095.
- [12] Dielis AW, Smid M, Spronk HM, et al. The prothrombotic paradox of hypertension: role of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems [J]. Hypertension, 2005, 46(6): 1236-1242.
- [13] Koh KK, Han SH, Chung WJ, et al. Comparison of effects of losartan, irbesartan, and candesartan on flow-mediated brachial artery dilation and on inflammatory and thrombolytic markers in patients with systemic hypertension [J]. Am J Cardiol, 2004, 93(11): 1432-1435, A10.
- [14] Li P, Fukuhara M, Diz DI, et al. Novel angiotensin II AT(1) receptor antagonist irbesartan prevents thromboxane A(2)-induced vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 292(1): 238-246.

(收稿: 2014-10-01 修回: 2014-10-24)

(本文编辑: 孙 雯)

《国际心血管病杂志》2015 年征订启事

《国际心血管病杂志》(原名: 国外医学·心血管疾病分册) 是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、卫生系列高级职称评审核心期刊和华东地区优秀期刊。《国际心血管病杂志》设综述、基础研究、临床研究栏目。办刊宗旨为: 执行党和国家的卫生工作政策, 贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针, 及时反映国内外心血管领域临床、科研、防治工作的重大进展, 促进国内外心血管领域学术交流, 服务于心血管专业的中高级临床、教学和科研工作者。

《国际心血管病杂志》为双月刊, 逢单月 25 日出版, 大 16 开本, 全国各地邮局订购, 邮发代号 4-188。

定价 9.00 元, 全年 54.00 元。编辑部常年接受个人邮购, 免收邮费。

地址: 200031, 上海市建国西路 602 号《国际心血管病杂志》编辑部

电话: 021-33262055

Email: xin_xg@aliyun.com.cn