

# 氯沙坦对血管紧张素 II 致培养的牛脑微血管内皮细胞损伤的保护作用

刘慧青, 张岫美\*, 魏欣冰

(山东大学 医学院 药理学研究所, 山东 济南 250012)

**摘要:** 目的 观察氯沙坦对血管紧张素 II (Ang II) 致牛脑微血管内皮细胞 (BCMECs) 损伤的保护作用。方法 用分光光度计测定培养的 BCMECs 乳酸脱氢酶 (LDH) 的漏出量, 流式细胞仪测定 BCMECs 细胞间粘附分子-1 (ICAM1) 的表达量, 硝酸还原酶法和放射免疫分析法分别测定 BCMECs 上清液中一氧化氮 (NO) 和内皮素-1 (ET<sub>1</sub>) 的含量。结果 Ang II 呈剂量依赖性增加 BCMECs LDH 漏出、NO 和 ET<sub>1</sub> 释放及 ICAM1 表达, 氯沙坦对此均有明显抑制作用。结论 氯沙坦抑制 Ang II 致体外培养 BCMECs 的损伤。

**关键词:** 脑微血管内皮细胞; 血管紧张素 II; 氯沙坦; AT<sub>1</sub> 受体

中图分类号: R965; R972 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)01 - 0005 - 05

## Protective effect of losartan on bovine cerebral microvessel endothelial cell injury induced by angiotensin II in culture

LIU Hui-qing, ZHANG Xiur-mei, WEI Xin-bing

(Department of Pharmacology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** **Aim** To investigate the protective effects of losartan on bovine cerebral microvessel endothelial cell (BCMEC) injury induced by angiotensin II (Ang II) in culture. **Methods** In this study, cultured bovine cerebral microvessel endothelial cells were used and the lactate dehydrogenase (LDH) leakage from bovine cerebral microvessel endothelial cells were observed. Flow cytometry was used to evaluate intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) expression in bovine cerebral microvessel endothelial cells. Supernatant nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET<sub>1</sub>) contents in bovine cerebral microvessel endothelial cells were measured, by NO assay kit and radioimmunoassay, respectively. **Results** Angiotensin II, in a dose-dependent manner, increased lactate dehydrogenase leakage, NO and ET<sub>1</sub> releases, intercellular adhesion molecule-1 expression of bovine cerebral microvessel endothelial cells. These effects induced by  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  angiotensin II were all significantly inhibited by  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  losartan. **Conclusion** Angiotensin II may be involved in the initiation and progression of cerebrovascular disease by injuring cerebral endothelium directly and causing endothelial dysfunction. Losartan was shown to protect against angiotensin II-induced bovine cerebral microvessel endothelial cells injury by blocking AT<sub>1</sub> receptor, suggesting that losartan may play a role in the prevention and treatment of cerebrovascular diseases.

**Key words:** cerebrovascular endothelial cells; angiotensin II; losartan; AT<sub>1</sub> receptor

脑血管内皮细胞受损是脑血管疾病特别是脑缺血发病的早期病变和基本动因,与脑血管疾病发生

发展密切相关。肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 是机体重要的体液调节系统,在心脑血管疾病的发病机制中起重要作用,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是该系统重要的生物活性肽。氯沙坦 (losartan, LT) 作为一种新型的 AT<sub>1</sub> 受体选择性拮抗剂,临床用于治疗高血压已取得肯

收稿日期: 2002-01-04.

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (Y95C1133).

\* 通讯作者 Tel: 86 - 531 - 8383146, Fax: 86 - 531 - 2942084,

E-mail: zhangxm@sdu.edu.cn

定疗效,对充血性心力衰竭也有明显的治疗作用,但用于治疗脑血管疾病的报道很少。有资料表明,脑动脉硬化、脑梗死患者血浆 Ang II 的含量高于正常人;且 Ang II 与脑循环障碍及脑水肿有关<sup>[1]</sup>。Fornes 等<sup>[2]</sup>研究发现长期服用氯沙坦,能降低有卒中倾向的自发性高血压大鼠(SHR-SP)卒中的发生率及减轻靶器官的损伤。Ito 等<sup>[3]</sup>进一步证实,AT<sub>1</sub>受体拮抗剂在产生降压作用之前可明显改善 SHR-SP 高血压所致的脑水肿,这与其抑制 Ang II 对脑血管内皮的损伤有关。本文用培养的牛脑微血管内皮细胞(bovine cerebral microvessel endothelial cells, BCMECs)首次研究了 Ang II 对 BCMECs 的损伤作用及机制,并观察了氯沙坦对这种损伤的保护作用,以期深入探讨 RAS 在脑血管疾病的发病机制中的作用和影响 RAS 的药物在防治脑血管疾病中的潜在价值。

## 材料与方法

**药品与试剂** 血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)、胶原酶 II 型(collagenase II)为美国 Sigma 公司产品;氯沙坦(losartan, LT)为美国 Merck & CO. INC 公司产品;minimum essential medium(MEM)干粉培养基、胰蛋白酶(trypsin),美国 Gibco 公司产品;新生小牛血清(fetal calf serum, FCS)为杭州四季青生物工程材料有限公司产品;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒,南京建成生物工程研究所产品;内皮素(endothelin, ET)测定放免试剂盒为解放军总医院科技开发中心放免所产品;小鼠抗人细胞间粘附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM1)单克隆抗体(克隆号 84H10), FITC 标记羊抗小鼠 IgG, 兔抗人八因子相关抗原多克隆抗体、FITC 标记羊抗兔 IgG, 美国 ZYMED 公司产品。

**仪器与设备** 水套式二氧化碳孵养箱,美国 Shelton 公司产品;超净工作台,苏州净化设备厂产品;倒置相差显微镜,重庆光学仪器厂产品;GD 272 连续式分光光度计,上海医用分析仪器厂产品;GC 911 放射免疫伽玛计数器,中国科技大学科技开发总公司产品;FACScan 型流式细胞仪,美国 BD 公司产品。

**牛脑微血管内皮细胞的培养及鉴定** 参照 Carson 法和本室已建立的 BCMECs 培养技术<sup>[4]</sup>。当细胞长成致密单层后可加入 0.1% 胰蛋白酶传代培养。将培养的 BCMECs 进行 VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定。细胞计数用台盼蓝排除法,取 3~4 代细

胞,以  $(2 \sim 3) \times 10^5$  细胞/孔种于 24 孔培养板或  $(1 \sim 2) \times 10^4$  细胞/cm<sup>2</sup> 种于 75 mL 培养瓶,孵育 48 h 至亚融合状态后进行实验。

**实验分组** (1) 对照组:培养液中不加任何处理因素;(2) Ang II 组:培养液中加入 Ang II 至终浓度分别为  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 4 个亚组;(3) LT 组:先加入氯沙坦 MEM 培养基,孵育 30 min 后再加入 Ang II MEM 培养基(Ang II 终浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>, LT 终浓度为  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>)。

**BCMECs 上清液中 LDH 含量的测定**  $1 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> Ang II 组孵育 4, 8, 12 和 24 h, 其余各组均孵育 12 h。取上清液 20 μL, 按照说明书处理各试管, GD272 连续分光光度计 440 nm 波长比色, 测定各管吸光度值, 并从标准曲线上查出细胞培养液中 LDH 的单位数。实验重复 4 次。

**BCMECs 上清液中 NO 含量的测定** NO 化学性质活泼, 在体内代谢转化为硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)和亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 而 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 可进一步还原为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>。本法利用硝酸还原酶特异性地将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 还原为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 培养液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量可间接反应 NO 含量。各组 37 °C 孵育 4 h 后取上清液 300 μL, 按照 NO 试剂盒测定上清液中 NO 的含量。实验重复 4 次。

**BCMECs 上清液中 ET<sub>1</sub> 含量的测定** 各组细胞分别孵育 12, 24 和 36 h, 然后取上清液 100 μL, 按 ET<sub>1</sub> 测定试剂盒所述的均相竞争法和非平衡法处理样品, 利用 GC 911 放射免疫伽玛计数器测定样品中 ET<sub>1</sub> 的含量。实验重复 4 次。

**牛脑微血管内皮细胞 ICAM1 的检测** 各组细胞均孵育 18 h 后, 加入 0.02 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 2 mL 消化细胞, 用含 10% FCS 的 MEM 培养液终止消化, 将细胞吹打成单细胞悬液, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清液, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)清洗, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 70%乙醇 4 °C 固定 10 min, PBS 洗去固定液, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 加入小鼠抗人 ICAM1 单克隆抗体, 室温孵育 2 h, PBS 清洗后加入 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG, 室温避光 50 min, 然后进行流式细胞仪检测, ICAM1 的荧光强度反映牛脑微血管内皮细胞 ICAM1 的表达量。实验重复 3 次。

**统计处理** 各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间分析用 *t* 检验进行统计学处理。

## 结果

### 1 BCMECs 上清液中 LDH 的含量

与对照组比较,不同浓度 Ang II 作用于 BCMECs 12 h 后,除  $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  外,其余各剂量组( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) BCMECs 上清液中 LDH 的含量均明显增加 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),且呈剂量依赖性。LT 组较  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 组,上清液中 LDH 的含量减少了 30% ( $P < 0.05$ ),但依然高于对照组 26% ( $P < 0.05$ )。  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 刺激 BCMECs 4, 8, 12 和 24 h 后上清液中 LDH 的含量分别为 ( $62 \pm 10$ ), ( $72 \pm 7$ ), ( $114 \pm 18$ ) 和 ( $117 \pm 18$ )  $\text{U} \cdot \text{dL}^{-1}$ , 呈明显的时间依赖关系,且各时间点 LDH 的含量较对照组均有显著性增高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ )。结果见表 1 和图 1。

**Table 1 Effect of losartan on lactate dehydrogenase leakage (LDH), nitric oxide (NO) secretion and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) expression in cultured bovine cerebral microvessel endothelial cells (BCMECs) induced by angiotensin II**

Group	LDH/ $\text{U} \cdot \text{dL}^{-1}$ ( $n=4$ )	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ( $n=4$ )	ICAM1/ % ( $n=3$ )
Control	$59 \pm 8$	$14 \pm 4$	$7.0 \pm 2.3$
Ang II $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$60 \pm 4$	$23 \pm 4^*$	$11.0 \pm 1.2$
$1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$81 \pm 8^{**}$	$26 \pm 4^{**}$	$16.2 \pm 1.4^{**}$
$1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$114 \pm 18^{**}$	$34 \pm 6^{**}$	$24 \pm 3^{**}$
$1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$172 \pm 15^{***}$	$47.4 \pm 2.6^{**}$	$41 \pm 13^*$
Ang II $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + LT $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$80 \pm 9^{\#}$	$21 \pm 5^{\#}$	$15.9 \pm 2.9^{\#}$

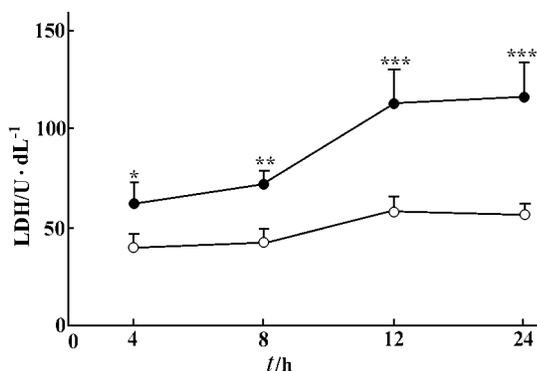
$\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0001$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II group

### 2 BCMECs 上清液中 NO 的含量

与对照组比较,Ang II 各剂量组上清液中 NO 的含量均显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性。在加入  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 之前先加入 LT 明显减少了 BCMECs 上清液中 NO 的含量 ( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

### 3 BCMECs 上清液中 ET<sub>1</sub> 的含量

与对照组比较, $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 呈剂量依赖性促进 BCMECs 释放 ET<sub>1</sub>,但无明显时间依赖关系,其中  $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 有显著意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。预先给予 LT 的 BCMECs



○—○ Control; ●—● Ang II

Figure 1 Time-dependent induction of LDH release in bovine cerebral microvessel endothelial cells (BCMECs) by  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  angiotensin II (Ang II). Cells were incubated with  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II for 4, 8, 12 and 24 h. Data for four experiments were expressed as  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0001$  vs control

上清液中 ET<sub>1</sub> 的含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。结果见表 2。

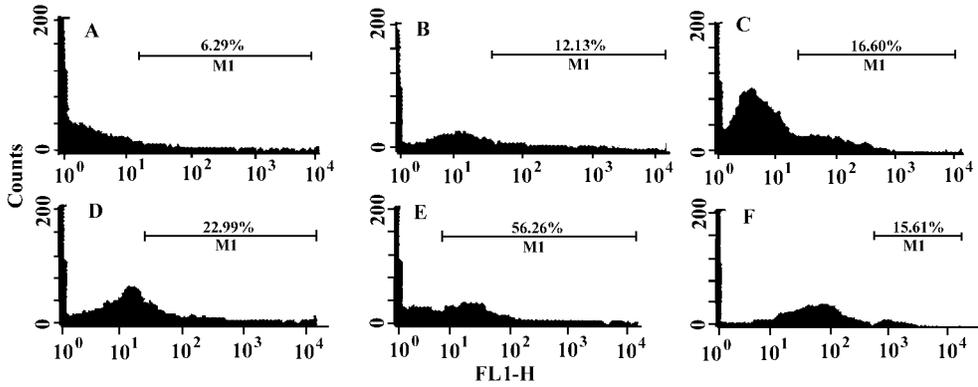
### 4 牛脑微血管内皮细胞 ICAM1 的表达

用流式细胞仪荧光强度检测显示,正常情况下,ICAM1 在 BCMECs 表面呈低表达 ( $7.0 \pm 2.3$  %); Ang II 作用 18 h 后,除  $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  外,其余各剂量均明显促进 BCMECs ICAM1 的表达 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。在加  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II 之前先加入 LT 可显著降低 ICAM1 的表达 ( $P < 0.05$ ),但依然明显高于正常水平 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1 和图 2。

**Table 2 Effect of losartan (LT) on supernatant endothelin-1 contents in cultured bovine cerebral microvessel endothelial cells (BCMECs) induced by angiotensin II**

Group	Endothelin-1/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$		
	12 h	24 h	36 h
Control	$15.9 \pm 2.1$	$16.0 \pm 2.4$	$17.8 \pm 2.0$
Ang II $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$17 \pm 4$	$20 \pm 5$	$21 \pm 4$
$1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$23 \pm 4^*$	$24 \pm 3^{**}$	$23 \pm 4$
$1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$38 \pm 5^{**}$	$40 \pm 4^{**}$	$39 \pm 6^{**}$
Ang II $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + LT $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$18 \pm 3^{\#}$	$20 \pm 3^{\#}$	$24 \pm 4^{\#}$

$n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II group



A: Control BCMECs ; B,C,D,E: BCMECs subjected to Ang II ( $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ; F: BCMECs incubated with  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  losartan for 30 min , and then treated with  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II

Figure 2 Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) in bovine cerebral microvessel endothelial cells (BCMECs) measured by flow cytometry

### 讨论

血管内皮细胞具有重要的代谢和内分泌功能,其损伤及功能改变参与心脑血管疾病的发生发展。内皮细胞有异质性,不同种属或同一种属不同器官间均存在差别<sup>[5]</sup>,因此根据不同研究目的选择相应的血管内皮细胞十分重要。

脑微血管内皮细胞是血脑屏障的重要组成部分,测定内皮细胞 LDH 释放是较常用来反映细胞损伤程度的指标。Audus 等<sup>[6]</sup>证实体外培养的牛脑微血管内皮细胞存在 AT<sub>1</sub> 和 AT<sub>2</sub> 受体,且 Ang II 在血脑屏障摄取转运都由 AT<sub>1</sub> 受体介导。本实验结果表明,较高浓度的 Ang II 可明显促进 BCMECs 释放 LDH,且随着时间的延长损伤作用逐渐加重。高效能的 AT<sub>1</sub> 受体选择性拮抗剂氯沙坦可显著拮抗 Ang II 所致的 BCMECs 损伤。

正常情况下,脑微血管内皮细胞持续释放 NO,对脑血流的调节有重要作用。脑缺血过程中产生的 NO 具有双重作用<sup>[8,9]</sup>。早期因 eNOS 激活产生的 NO 可扩张脑血管,增加缺血区脑血流,保护脑组织。而由 iNOS 及 nNOS 激活产生的 NO 却呈现神经毒性作用。脑缺血时 NO 介导兴奋性氨基酸的神经毒性作用,大量产生的 NO 可与超氧自由基反应生成强氧化剂过氧亚硝基 (ONOO<sup>-</sup>),ONOO<sup>-</sup> 能直接氧化膜脂质、DNA 以及蛋白质,产生广泛的细胞损伤作用。此外,NO 的生成需要消耗 O<sub>2</sub>,脑缺血时可导致进一步缺氧,抑制线粒体呼吸,加重细胞损伤。虽然 Ang II 对内皮细胞释放 NO 的影响尚有争议,但目前大部分实验证实<sup>[7,13]</sup>,Ang II 促进内皮细胞释放 NO。

本实验结果与此一致,Ang II 呈剂量依赖性的刺激 BCMECs 释放 NO,氯沙坦可拮抗此效应。关于 Ang II 刺激 NO 生成的机制,可能是 Ang II 激活 AT<sub>1</sub> 受体,使细胞内钙离子增加,进而激活 NOS 催化 L-Arg 生成 NO<sup>[7]</sup>。Ang II 通过激活 eNOS 或 iNOS 促进 BCMECs 释放 NO 及其分子生物学机制尚需深入研究。

ET<sub>1</sub> 是迄今发现的最强的缩血管物质,ET<sub>1</sub> 强烈的缩血管效应,可导致脑血管痉挛、脑缺血、脑梗死等,与脑血管疾病密切相关。Ziv<sup>[10]</sup>报道,急性脑梗死患者血浆 ET<sub>1</sub> 含量显著高于对照组,且在发病 24 h 达对照组 4 倍。ET<sub>1</sub> 的增高可引起侧支血管收缩,使病灶局部血流量进一步减少,加重梗死区脑组织缺血及神经元损伤。本实验结果显示,Ang II 可以促进培养的 BCMECs 分泌 ET<sub>1</sub>,经氯沙坦预处理后 ET<sub>1</sub> 的分泌量明显减少。

ICAM1 为白细胞 CD11/CD18 系统的配体,表达量增加可介导白细胞的活化及与血管壁的紧密黏附,为白细胞的进一步跨内皮游出提供条件<sup>[11]</sup>。在脑动脉粥样硬化、脑缺血及缺血再灌注损伤等脑血管疾病的病理过程中发挥重要作用。本实验结果表明 ICAM1 在培养的 BCMECs 呈低表达,较高浓度 Ang II 可诱导 BCMECs 表达 ICAM1,预先加入氯沙坦,内皮细胞 ICAM1 的表达可明显降低。这与 Ito 等<sup>[3]</sup>的实验结果一致。Ang II 促进 BCMECs 表达 ICAM1 的机制尚不清楚,可能与 Ang II 活化 AT<sub>1</sub> 受体后激活细胞膜上的 NADH/NADPH 氧化酶产生超氧阴离子,具有信号传递功能的超氧阴离子活化转

录因子 NF- $\kappa$ B, 继而启动黏附分子的转录有关<sup>[12]</sup>。

本研究结果提示, 氯沙坦通过阻断 AT<sub>1</sub> 受体, 抑制了 Ang II 促进 BCMECs 释放 LDH, NO, ET<sub>1</sub> 及表达 ICAM1 的作用, 从而起到保护脑微血管内皮细胞, 防治脑血管病的作用。进一步深入研究氯沙坦保护脑血管内皮细胞的作用及机制, 对认识脑血管疾病的发生发展, 寻找防治脑血管疾病的药物有重要意义。

## References :

- [ 1 ] Zhu W, Yu BR. Serial observation of plasma endothelin, RAS and calcitonin gene-related peptide with cerebral infarction [ J ]. *Acta Univ Med Tongji* ( 同济医科大学学报 ), 1997, **26**(3) :195 - 198 .
- [ 2 ] Fornes P, Richer C, Vacher E, *et al.* Losartans protective effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats persist durably after treatment withdrawal [ J ]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, **22**(2) :305 - 313 .
- [ 3 ] Ito H, Take mori K, Kawai J, *et al.* AT<sub>1</sub> receptor antagonist prevents brain edema without lowering blood pressure [ J ]. *Acta Neurochir ( Suppl )*, 2000, **76**:141 - 145 .
- [ 4 ] Zhang XM, Wei XB, Sun XH, *et al.* Damage of bovine cerebral microvessel endothelial cells by hydrogen peroxide and the protection with drugs in culture [ J ]. *Acta Univ Med Shandong* ( 山东医科大学学报 ), 1999, **37**(1) :82 - 84 .
- [ 5 ] Page C, Rose M, Yacoub M, *et al.* Antigenic heterogeneity of vascular endothelium [ J ]. *Am J Pathol*, 1992, **14**(3) :673 - 683 .
- [ 6 ] Rose JM, Audus KL. AT<sub>1</sub> receptors mediate angiotensin II uptake and transport by bovine brain microvessel endothelial cells in primary culture [ J ]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, **33**(1) :30 - 35 .
- [ 7 ] Pueyo ME, Arnal JF, Rami H, *et al.* Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells [ J ]. *Am J Physiol*, 1998, **274**(1 Pt 1) : C214 - 220 .
- [ 8 ] Numagami Y, Zubrow AB, Mishra OP, *et al.* Lipid free radical generation and brain cell membrane alteration following nitric oxide synthase inhibition during cerebral hypoxia in the newborn piglet [ J ]. *J Neurochem*, 1997, **755**(1 - 2) :1542 - 1547 .
- [ 9 ] Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite : a product from the reaction of nitric oxide with superoxide [ J ]. *Am J Physiol*, 1995, **268**(5 Pt 1) :L699 - L722 .
- [ 10 ] Ziv I, Fleminger G, Djaldetti R, *et al.* Increased plasma endothelin-1 in acute ischemia [ J ]. *Stroke*, 1992, **23**(7) : 1014 - 1016 .
- [ 11 ] Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, *et al.* Binding of the integrin Mac-1 ( CD11b/CD18 ) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM1 ( CD54 ) and its regulation by glycosylation [ J ]. *Cell*, 1991, **65**(6) :961 - 971 .
- [ 12 ] Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, *et al.* Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor kappa B activation induced by intracellular oxidative stress [ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**(3) :645 - 651 .
- [ 13 ] Saito S, Hirata Y, Emori T, *et al.* Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT<sub>1</sub> receptors [ J ]. *Hypertens Res*, 1996, **19**(3) :201 - 206 .