

· 论 著 ·

## 胰岛素和丁酸钠对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞组蛋白乙酰化及增殖相关基因和蛋白的影响

傅春江<sup>1</sup>, 何作云<sup>2</sup>, 王旭开<sup>1△</sup>, 杨成明<sup>1</sup>, 王红勇<sup>1</sup>, 方玉强<sup>1</sup>, 石伟彬<sup>1</sup>, 韩愈<sup>1</sup>, 何多芬<sup>1</sup>

(第三军医大学:1. 大坪医院心内科, 重庆 400042; 2. 新桥医院心内科, 重庆 400037)

**摘要:**目的 研究组蛋白乙酰化修饰对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖及表型转换的影响。方法 原代培养自发性高血压大鼠(SHR) VSMCs。免疫印迹检测胰岛素、PD98059、丁酸钠对 VSMCs 组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、组蛋白乙酰化、血小板衍生生长因子(PDGF)和  $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SM actin)的影响。RT-PCR 检测其对 MAPK、PDGF 和  $\alpha$ -SM actin 基因转录的作用。结果 (1)胰岛素促进 HDAC1 的表达, 丁酸钠明显抑制 HDAC1 的表达, PD98059 对 HDAC1 的表达无明显影响; (2)免疫印迹显示胰岛素促进组蛋白 H3 乙酰化, 而 PD98059 抑制胰岛素的这种作用; (3)胰岛素上调 PDGF 的表达, 同时下调  $\alpha$ -SM actin 的表达。该作用可被 PD98059 和丁酸钠阻断。结论 组蛋白乙酰化的改变参与了胰岛素介导 SHR VSMCs 增殖的过程, 且这种过程通过 MAPK 信号传导途径。

**关键词:**胰岛素; 丁酸钠; 组蛋白乙酰化; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖

**中图分类号:** R365.544; R446.61

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2010)02-0173-04

### Effects and mechanisms of insulin and sodium butyrate on histone acetylation and proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats

FU Chun-jiang<sup>1</sup>, HE Zuo-yun<sup>2</sup>, WANG Xu-kai<sup>1△</sup>, et al.

(1. Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To identify the effects of histone acetylation modification on proliferation and phenotype conversion of vascular smooth muscle cells. **Methods** Primary culture of VSMCs from SHR was performed, the effect of insulin, PD98059 and sodium butyrate on VSMC HDAC1, MAPK, PDGF,  $\alpha$ -SM actin and lysine acetylation of histone H3 were measured by immunoblotting, respectively. **Results** (1) Insulin increased, while sodium butyrate decreased HDAC1 expression, PD98059 had no effect on HDAC1 expression. (2) Insulin increased, while PD98059 decreased the acetylation of histone H3 determined by immunoblotting. (3) Insulin up-regulated the expression of PDGF, down-regulated  $\alpha$ -SM actin expression, which was blocked by PD98059 and sodium butyrate. **Conclusion** Histone acetylation is engaged into the insulin-mediated proliferation of VSMCs from SHR, MAPK pathway is involved into this action.

**Key words:** insulin; sodium butyrate; histone acetylation; vascular smooth muscle cell; cell proliferation

我国人群高血压(EH)的患病率呈持续增长趋势,大量研究证实,高血压合并糖尿病及高胰岛素血症的患者,发生心脑血管并发症的风险大大高于单纯高血压患者。研究还证实,胰岛素可促进血管平滑肌细胞(VSMC)中 bFGF、TGF- $\beta$ 、PDGF、Matrix Gla 和 OPN 等细胞增殖及表型相关基因及蛋白高表达,而决定 VSMC 表型的  $\alpha$ -SM 却是低表达,表明胰岛素促进 VSMC 异常增殖的同时还伴有 VSMC 表型改变。那么 VSMC 是通过何种方式引起这些基因表达差异的呢?目前尚缺乏相关研究。既往对胰岛素引起血管平滑肌细胞异常增殖的研究,多从细胞转录因子(如 AP-1 等),应答基因转录、翻译及结构基因本身改变等方面入手。近年来,基因外修饰,特别是组蛋白修饰对基因的表达调控有了重要的进展,提出了“组蛋白密码”的假说:即结构基因表达的开放与关闭与组蛋白修饰-染色质重构有关。胰岛素可以促进 VSMC 增殖,这种作用和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路密切相关,在胰岛素引起 VSMC 增殖的过程中,是否通过了组蛋白修饰,以及 MAPK 是否参与了这种修饰,目前还不清楚,这正是本研究所要探讨

的。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 自发性高血压大鼠(SHR)购自北京阜外医院;胎牛血清和 DMEM 购自 Gibco 公司;PD98059 购自 Promega 公司;羊抗鼠抗体、羊抗兔抗体、兔抗羊抗体购自 Sigma 公司;胰岛素购自德国 Roche 公司,抗 MAPK 抗体、抗  $\alpha$ -SM actin 抗体购自 Sigma 公司;抗 HDAC1 抗体、抗 H3 赖氨酸乙酰化抗体购自 Cellsignaling 公司;抗 PDGF 抗体、抗骨桥蛋白(OPN)抗体购自 Santa 公司; $\beta$ -actin 抗体购自 Abcam 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 VSMC 的分离培养及分组** 采用纯种 4 周龄雄性 SHR,分离主动脉,去除内膜与外膜,用贴块法分离培养 VSMC,经免疫组化鉴定,6~10 代的 VSMC 用于研究。实验分为 6 个组。(1)空白对照组(C 组):不加任何干预;(2)胰岛素组(insulin 组):加入终浓度为  $10^{-7}$  mol/L 胰岛素作用;(3)PD98059 组:加入终浓度为  $10^{-5}$  mol/L PD98059;(4)丁酸钠组(Na 组):加入终浓度为  $10^{-3}$  mol/L 丁酸钠;(5)胰岛素联合

<sup>△</sup> 通讯作者。

PD98059 组(insulin 联合 PD98059 组):PD98059 预处理 30min 后,再加入同样浓度的胰岛素;(6)胰岛素联合丁酸钠组(insulin 联合 Na 组):丁酸钠预处理 30min 后,再加入同样浓度的胰岛素。以上各组胰岛素均作用 24h。

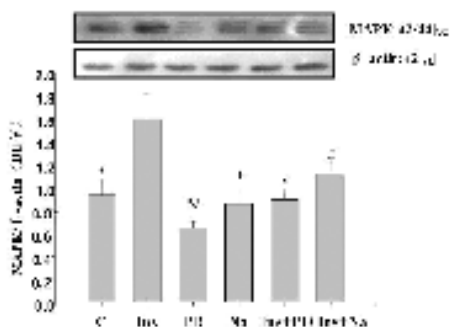
**1.2.2 VSMC 蛋白质提取** 按  $1 \times 10^8$  cells/L 细胞数接种于  $25\text{cm}^2$  培养瓶中,用含 10% 小牛血清 DMEM 培养基培养,贴壁生长后换含 1% 小牛血清 DMEM 培养基静置培养 24h。将静置培养的 VSMC 细胞按组别分别加或不加 PD98059、丁酸钠,孵育 30min 后每孔加或不加胰岛素;孵育 24h 后弃去培养基,冷 PBS 漂洗,0.25% 胰酶消化,4 000r/min,2min,弃上清液,冷 PBS 漂洗,4 000r/min,2min,弃上清液。4℃ 下在细胞沉淀中加入细胞裂解液 (cell lysis buffer  $100\mu\text{L}$  + PMSF  $1\mu\text{L}$ ),4℃ 下 1h 充分裂解。取上清液分装、保存。DU 800 Spectrophotometer 建立蛋白质浓度曲线后测定蛋白质样品浓度。

**1.2.3 免疫印迹** 提取的蛋白质按  $100\mu\text{g}$  上样,9% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,125V,90min 分离蛋白质 125V,125mA,1h 转印至 PVDF 膜。TBST 漂洗 3 次,每次 5min,TBS 配置的 5% 脱脂奶粉封闭 2h。用抗 MAPK、 $\alpha$ -SM actin 和 OPN、HDAC1、PDGF、H3 赖氨酸乙酰化抗体进行检测。

**1.3 统计学方法** 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间采用 *t* 检验,两组以上的比较采用 ANOVA 法进行统计分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 胰岛素和丁酸钠对 MAPK 的影响** 经胰岛素刺激后,VSMC 的 MAPK 表达明显增加,这与前面实验结果一致,而用丁酸钠和 PD98059 预处理后,胰岛素促进 MAPK 的表达作用明显减弱 ( $P < 0.05$ ),在未给予胰岛素干预情况下,PD98059 对 VSMC MAPK 的表达亦有降低作用 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。



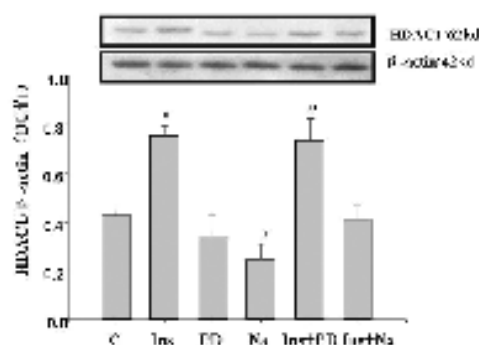
\*: 与胰岛素组比较,  $P < 0.05$ ; #: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; Ins: 胰岛素,  $10^{-7}\text{M}$ ; PD: MAPK 抑制剂 PD98059,  $10^{-5}\text{M}$ ; Na: HDAC 抑制剂丁酸钠,  $10^{-3}\text{M}$ ;  $n=7$ 。

**图 1 胰岛素和丁酸钠对 MAPK 的影响**

**2.2 胰岛素和丁酸钠对 HDAC1 的影响** 用胰岛素作用于 VSMC,结果显示胰岛素可上调 HDAC1 的表达,说明胰岛素对组蛋白乙酰化/去乙酰化产生了影响。这种作用可被丁酸钠所阻断,但 PD98059 对胰岛素作用后的 HDAC1 无明显影响,说明胰岛素促进 HDAC1 表达并没有通过 MAPK 途径,而丁酸钠组 HDAC1 的表达最低,提示丁酸钠对生理情况下 SHR VSMC HDAC1 蛋白质的表达即有抑制作用 (图 2)。

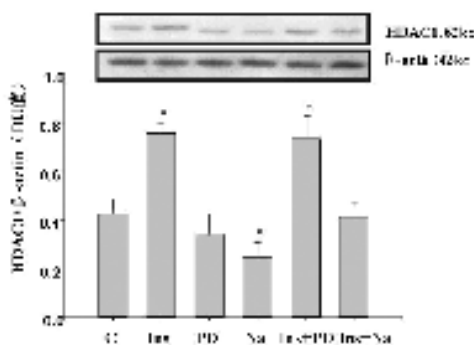
**2.3 胰岛素和丁酸钠对 H3 赖氨酸乙酰化的影响** 经胰岛素作用后,SHR VSMC H3 乙酰化赖氨酸 (Lys9) 的表达较正常对照组升高 ( $P < 0.05$ ),而 PD98059 可使正常对照组 H3 乙酰化赖氨酸的表达减弱,同时抑制胰岛素对 H3 乙酰化赖氨酸的

上调作用,说明胰岛素促进 H3 赖氨酸乙酰化的作用通过 MAPK 途径。丁酸钠可使 SHR VSMC H3 乙酰化赖氨酸的表达明显升高,提示丁酸钠可明显促进 VSMC H3 的乙酰化 (图 3)。



\*: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; Ins: 胰岛素,  $10^{-7}\text{M}$ ; PD: MAPK 抑制剂 PD98059,  $10^{-5}\text{M}$ ; Na: HDAC 抑制剂丁酸钠,  $10^{-3}\text{M}$ ;  $n=5$ 。

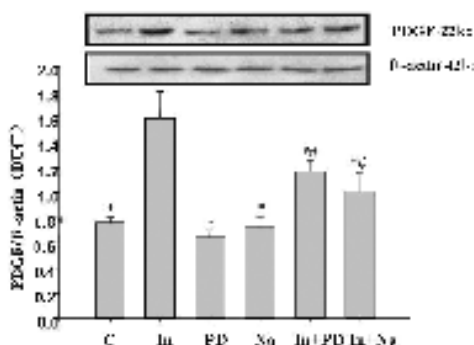
**图 2 胰岛素和丁酸钠对 HDAC1 的影响**



\*: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; Ins: 胰岛素,  $10^{-7}\text{M}$ ; PD: MAPK 抑制剂 PD98059,  $10^{-5}\text{M}$ ; Na: HDAC 抑制剂丁酸钠,  $10^{-3}\text{M}$ ;  $n=6$ 。

**图 3 胰岛素和丁酸钠对 H3 乙酰化赖氨酸的影响**

**2.4 胰岛素和丁酸钠对 PDGF 的影响** 免疫印迹结果显示胰岛素组 PDGF 的表达明显高于其他组 ( $P < 0.05$ ),PD98059 及丁酸钠预处理后,与胰岛素组比较这种作用受到明显的抑制 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

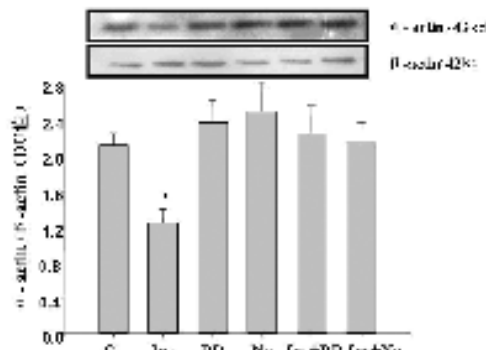


\*: 与胰岛素组比较,  $P < 0.05$ ; #: 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; Ins: 胰岛素,  $10^{-7}\text{M}$ ; PD: MAPK 抑制剂 PD98059,  $10^{-5}\text{M}$ ; Na: HDAC 抑制剂丁酸钠,  $10^{-3}\text{M}$ ;  $n=4$ 。

**图 4 胰岛素和丁酸钠对 PDGF 的影响**

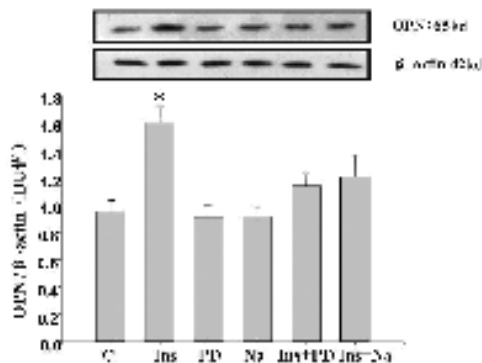
**2.5 胰岛素和丁酸钠对  $\alpha$ -SM actin 的影响** 免疫印迹结果显示胰岛素组  $\alpha$ -SM actin 的表达明显低于其他组 ( $P < 0.05$ ),PD98059 及丁酸钠预处理后,这种作用受到明显的抑制与胰岛素组比较 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

**2.6 胰岛素和丁酸钠对 OPN 的影响** 免疫印迹结果显示胰岛素作用后 OPN 的表达较空白对照组明显增强 ( $P < 0.05$ )，PD98059 及丁酸钠预处理后，OPN 的表达明显减弱，与胰岛素组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。



\* : 与空白对照组比较  $P < 0.05$ ; Ins: 胰岛素,  $10^{-7}$  M; PD: MAPK 抑制剂 PD98059,  $10^{-5}$  M; Na: HDAC 抑制剂丁酸钠,  $10^{-3}$  M;  $n = 5$ 。

图 5 胰岛素和丁酸钠对  $\alpha$ -SM actin 的影响



\* : 与空白对照组比较,  $P < 0.05$ ; Ins: 胰岛素,  $10^{-7}$  M; PD: MAPK 抑制剂 PD98059,  $10^{-5}$  M; Na: HDAC 抑制剂丁酸钠,  $10^{-3}$  M;  $n = 4$ 。

图 6 胰岛素和丁酸钠对 OPN 的影响

### 3 讨论

丁酸钠是 HDAC 抑制剂,通过抑制 HDACs 的活性,引起组蛋白超乙酰化。国内外大量研究证实丁酸钠对许多种细胞的异常增殖能够起到抑制作用,并且丁酸钠已经应用于肿瘤的临床研究。但是关于丁酸钠对高胰岛素血症时 VSMC 的异常增殖作用研究得较少。本研究发现,在丁酸钠预处理后,胰岛素促进 VSMC 增殖的作用受到明显抑制,说明组蛋白的超乙酰化同样对 VSMC 异常增殖具有抑制作用。在丁酸钠处理后,结果显示 H3 组蛋白赖氨酸乙酰化与其他组相比明显增强,这和国外的相关研究结果一致。同时本研究发现,在使用胰岛素刺激后,H3 组蛋白赖氨酸表达亦增强,为什么都是组蛋白赖氨酸乙酰化增强而胰岛素的作用表现促进细胞增殖,而丁酸钠的作用是抑制细胞增殖呢? 组蛋白乙酰化可以中和组蛋白所带正电荷,从而减弱核小体中碱性氨基酸与 DNA 的静电吸引力,降低其与带负电荷 DNA 链的亲合性,降低相邻核小体之间的聚集,使 DNA 与组蛋白空间位阻增大,两者间的相互作用减弱,DNA 易于解聚,染色质呈转录活性结构,因此有利于转录因子与 DNA 模板相结合,增加转录因子的进入进而激活基因转录<sup>[1]</sup>。本研究也发现细胞增殖相关基因 PDGF 在胰岛素的作用下表达明显升高,同时伴随 H3 赖氨酸乙酰化增强,说明 H3 赖氨酸乙酰化使得 PDGF 基因活化。关于细胞

增殖相关因子 PDGF 是目前研究得比较多的,大量的研究证实 PDGF 促进 VSMC 的增殖,这种现象在肿瘤细胞也得到证实,胰岛素促进 VSMC 增殖和很多癌基因的激活相关,癌基因激活后又可通过增殖相关因子的激活从而使细胞增殖。因此,丁酸钠可能对 VSMC 的增殖存在抑制作用。丁酸钠抑制细胞增殖的原因在于其使组蛋白超乙酰化,有研究证实组蛋白乙酰化促进细胞增殖,但组蛋白的超乙酰化反而抑制细胞增殖,研究发现丁酸钠可以下调增殖相关细胞核抗原(PCNA)、视网膜母细胞瘤敏感蛋白 p130(pRb)、细胞分裂控制蛋白 2 同系物(cdc2)、细胞周期素(cyclin)B1、细胞分裂控制蛋白 20 同系物(p55cdc)、HMG1、2 以及其他细胞增殖相关基因的表达,上调 cyclin D1、p21WAF1、p141NK4B/p15INK5B、丛集蛋白等增殖抑制基因的表达。同时丁酸钠还对应激相关蛋白如热休克蛋白(HSP)、细胞色素 P450,血管功能调节蛋白存在影响<sup>[2]</sup>。丁酸钠还对 GST-P1 在核上的定位存在影响,同时下调应激氧化蛋白<sup>[3]</sup>,从而抑制 VSMC 的增殖。因此,丁酸钠抑制细胞增殖和两方面因素有关:(1)组蛋白的超乙酰化抑制了增殖相关基因的转录;(2)组蛋白的这种超乙酰化促进抗癌基因及增殖抑制基因的转录活性,且这种作用具有肿瘤相关基因特异性,其具体机制目前不清。使用丁酸钠处理后,组蛋白的超乙酰化对 MAPK 也起到抑制作用,MAPK 作为细胞信号转导通路在 VSMC 增殖过程中扮演着重要的角色<sup>[4]</sup>,胰岛素促进 VSMC 增殖其中的重要一条通路就是 MAPK 途径已经得到较广泛地认同。

本研究发现,丁酸钠明显抑制 MAPK 蛋白的表达。这可能是丁酸钠抑制胰岛素促 VSMC 增殖的一个重要机制。在本研究中发现一个有趣的现象,胰岛素虽然促进 H3 组蛋白乙酰化,但对 HDAC1 的作用却是增强的。HDAC1 是组蛋白去乙酰化酶之一,可以使组蛋白去乙酰化,从理论上讲,HDAC1 的增强应该使组蛋白去乙酰化增强,乙酰化减弱,但本研究的结果却显示胰岛素促进 HDAC1 的表达。作者分析这可能和两方面因素有关:(1)组蛋白的去乙酰化是 HDAC 家族共同作用的结果,每一种 HDAC 对结合在 DNA 上的组蛋白靶点是不同的,胰岛素可能对不同的 HDAC 具有不同的作用;(2)胰岛素促进了 H3 组蛋白的乙酰化,是否在 VSMC 内存在着一种反馈平衡机制,使得 HDAC1 的活性反而增强呢? 以上只是推测,具体机制有待进一步探讨。在阻断 MAPK 后并不能抑制胰岛素促进 HDAC1 的作用,说明胰岛素促进 HDAC1 的表达没有通过 MAPK 途径。因为细胞信号转导通路有很多种,如蛋白激酶 A(PKA),蛋白激酶 C(PKC)和磷脂酰肌醇-3(羟基)激酶(PI3K)-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)通路等。胰岛素的这种作用有可能通过了其他途径。

本研究还证实,PD98059 可以阻断胰岛素促进 H3 的乙酰化作用,说明在 VSMC 中,胰岛素对 H3 的乙酰化作用是通过 MAPK 信号通路的。在 H3 乙酰化减弱的同时伴随 VSMC 增殖的抑制,说明 H3 乙酰化对 VSMC 的增殖具有重要意义。H3 乙酰化增加的同时细胞也发生了表型的转化,在 VSMC 中  $\alpha$ -SM actin 作为收缩型的标志,而 OPN 和基质蛋白作为合成型的标志。研究发现 VSMC 增殖的同时往往伴随这些蛋白的变化,因此,一部分研究者也把  $\alpha$ -SM actin 和 OPN 含量的变化作为细胞增殖的一个指标。VSMC 的主要特点是在成熟的血管组织中并非是其终末分化状态,因此在某种条件下其表型可以被调节。VSMC 去分化状态和表型的改变被认为是在动脉

粥样硬化和新生内膜过度增殖过程中血管壁重构的重要方面。分化状态的 VSMC 呈纺锤形,增殖和收缩能力均很低;而去分化状态的 VSMC 呈菱形或上皮细胞样,具有较高的增殖能力和迁移能力,其蛋白水解活性也增加,而细胞支架和收缩蛋白含量降低,并且对凋亡诱导刺激的敏感性增加<sup>[5]</sup>。

胰岛素可促使 PDGF 上调,PD98059 和丁酸钠均可阻断胰岛素对 VSMC 的这种作用,说明组蛋白的超乙酰化通过某种途径抑制了 PDGF 的表达,组蛋白的乙酰化/去乙酰化改变在胰岛素促 VSMC 增殖的过程中起着重要的调控作用。

本研究发现胰岛素促使  $\alpha$ -SM actin 下调的同时使 OPN 上调,且这种作用能够被 PD98059 和丁酸钠阻断,因此,一方面说明胰岛素的这种作用通过了 MAPK 通路,另一方面说明结构基因的外修饰即组蛋白的乙酰化/去乙酰化改变影响了这些蛋白质的表达。从机制上推测,组蛋白的超乙酰化抑制了某些增殖及表型转化相关基因,使得 VSMC 的增殖受到抑制,从而升高  $\alpha$ -SM actin 和下调 OPN。据此,作者认为,胰岛素是否通过这样一个途径而引起 VSMC 增殖的呢?即胰岛素 $\rightarrow$ MAPK 细胞信号转导系统 $\rightarrow$ 组蛋白乙酰化改变 $\rightarrow$ 相关增殖基因(如 PDGF)活化 $\rightarrow$ 细胞增殖和表型转化。但其中许多具体环节尚待进一步研究。在临床上,冠脉内支架植入术已被广泛地应用于冠心病的治疗,在支架植入后,如何预防再狭窄是保持支架作用长期稳定性的关键,雷帕霉素细胞内的作用靶点是雷帕霉素靶蛋白(mTOR),其通常情况下被 Akt 磷酸化。雷帕霉素可以抑制 mTOR 下游的活化,包括 JNK 活化以及诱导凋亡<sup>[6]</sup>,从而抑制 VSMC 的增殖,达到防止再狭窄的目的。目前,雷帕霉素涂层支架已经应用于临床治疗并被认可,丁酸钠作为人体内生理存在的成分,是否可以作为预防再狭窄的药物?值得进

一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Kozarides T. Histone acetylases and dactylases in cell proliferation[J]. *Curr Opin Genet Dev*,1999,9:40.
  - [2] Ranganna K, Yusefipour Z, Yatsu FM, et al. Gene expression profile of butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Mol Cell Biochem*,2003,254(1-2):21.
  - [3] Ranganna K, Mathew OP, Yatsu FM, et al. Involvement of glutathione/glutathione S-transferase antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *FEBS*,2007,274(22):5962.
  - [4] Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, et al. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation[J]. *J Clin Invest*,2008,118(8):2747.
  - [5] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. *Physiol Rev*,2004,84(3):767.
  - [6] Huang S, Shu L, Dilling MB, et al. Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21(Cip1)[J]. *Mol Cell*,2003,11(6):1491.
- (收稿日期:2009-07-23 修回日期:2009-08-28)
- 
- (上接第 172 页)
- and coronary artery disease[J]. *Eur Respir J*,1999,14:179.
- [2] 张希龙,童茂容,夏锡容,等. 鼾症老年人睡眠呼吸暂停症与心血管疾病的相关性[J]. *中华老年心脑血管杂志*,2001,3(3):150.
  - [3] Kraiczi H, Caidahl K, Samuelsson A, et al. Impairment of vascular endothelial function and left ventricular filling: association with the severity of apnea - induced hypoxemia during sleep[J]. *Chest*,2001,119:1085.
  - [4] Leung RST, Bradley TD. Sleep apnea and cardiovascular disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2001,164:2147.
  - [5] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease[J]. *Am J Cardiol*,1983,51:606.
  - [6] 王广发. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的临床表现[J]. *中华结核和呼吸杂志*,2003,26(5):262.
  - [7] Goodfriend T L, Calhoun DA. Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy[J]. *Hypertension*,2004,43(3):518.
  - [8] Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease[J]. *JAMA*,2003,290(14):1906.
  - [9] Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, et al. Aldosterone excretion among subjects with resistant hypertension and symptoms of sleep apnea[J]. *Chest*,2004,125(1):112.
  - [10] Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. Seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure[J]. *Hypertension*,2003,42(6):1206.
  - [11] Mooe T, Rabben T, Wiklund U, et al. Sleep disordered breathing in men with coronary artery disease[J]. *Chest*,1996,109(3):659.
  - [12] Koehler U, Schafer H. Is obstructive sleep apnea(OSA) a risk factor for myocardial infarction and cardiac arrhythmias in patients with coronary heart disease(CHD) [J]. *Sleep*,1996,19(4):283.
  - [13] Phillips BG, Narkiewicz K, Pesek CA, et al. Effects of obstructive sleep apnea endothelin-1 and blood pressure[J]. *J Hypertens*,1999,17(1):61.
  - [14] Punjabi NM, Sorkin JD, Katzell LI, et al. Sleep disordered breathing and insulin resistance in middle aged and overweight men[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2002,165(5):677.
  - [15] Javaheri S. Central sleep apnea hypopnea syndrome in heart failure: prevalence, impact and treatment[J]. *Sleep*,1996,19(Suppl 10):S229.
- (收稿日期:2009-07-23 修回日期:2009-08-28)