

· 基础研究 ·

质子泵抑制剂通过激活钙调神经磷酸酶诱发血管内皮炎症

张何坚^{1,2}, 柏 蓉³, 鲍丽琴³, 张学会³, 孙鲁宁², 马梦圆^{1,2}, 程紫萍², 陈安九^{2*}, 王永庆^{1,2*}

¹徐州医科大学江苏省新药研究与临床药学重点实验室, 江苏 徐州 221004; ²南京医科大学第一附属医院药学部, 江苏 南京 210029; ³江苏盛泽医院药学部, 江苏 苏州 215228

[摘要] 目的: 研究质子泵抑制剂对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)黏附和炎症水平的潜在影响及相关机制。方法: 以10 μmol/L的兰索拉唑孵育HUVEC不同时间(0、24、48、72、96 h)后, 应用qRT-PCR及Western blot技术检测细胞炎症因子白介素6(interleukin 6, IL-6)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)的蛋白及mRNA表达水平, 同时检测HUVEC中钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)及活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)蛋白水平的变化。此外, 用兰索拉唑及CaN抑制剂FK506单独或联合孵育细胞96 h后, 检测HUVEC中NFAT、IL-6、ICAM-1及VCAM-1蛋白的表达情况。结果: 兰索拉唑可以时间依赖性地增加HUVEC中CaN的表达和NFAT的核转位, 并进一步增加IL-6、ICAM-1及VCAM-1的表达。CaN抑制剂可以很大程度上减轻兰索拉唑诱导这种效应。结论: 兰索拉唑会诱发血管炎症并增加细胞黏附, 其机制可能与CaN的活化有关。

[关键词] 兰索拉唑; 人脐静脉内皮细胞; 钙调神经磷酸酶; 白介素-6; 细胞黏附分子

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)02-173-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20210204

Proton pump inhibitor induce vascular endothelium inflammation by activating calcineurin

ZHANG Hejian^{1,2}, BAI Rong³, BAO Liqin³, ZHANG Xuehui³, SUN Luning², MA Mengyuan^{1,2}, CHENG Ziping², CHEN Anjiu^{2*}, WANG Yongqing^{1,2*}

¹Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004;

²Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ³Department of Pharmacy, Jiangsu Shengze Hospital, Suzhou 215228, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of proton pump inhibitors on adhesion and inflammation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and its potential mechanism. **Methods:** Western blot and qRT-PCR were used to detect the mRNA and protein expression of interleukin-6 (IL-6), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in HUVECs after treating with 10 μmol/L lansoprazole for 0, 24, 48, 72 and 96 h, protein levels of calcineurin (CaN) and nuclear factor of activated T cells (NFAT) were evaluated at the same time. In addition, protein levels of NFAT, IL-6, ICAM-1 and VCAM-1 were evaluated after treating with lansoprazole, CaN inhibitor FK506, and lansoprazole combined FK506 for the further research in mechanism. **Results:** Lansoprazole could time-dependently increase the expression of CaN and nuclear translocation of NFAT, and further increase the expression of IL-6, ICAM-1 and VCAM-1. Calcineurin inhibitor could relieve the NFAT nuclear translocation and vascular inflammation induced by lansoprazole. **Conclusion:** Lansoprazole may induce endothelial cell inflammation and increase cell adhesion by activating CaN.

[Key words] lansoprazole; HUVEC; calcineurin; interleukin-6; cell adhesion molecule

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(02): 173-180]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673515); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20161591); 江苏省“六大人才高峰”项目(2014-YY-001); 江苏省药学会奥赛康医院药学基金(A201615); 苏州市产业技术创新专项(SYSD2016046); 苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2016067)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wyqjsh@163.com; wulynj@163.com

质子泵抑制剂(如兰索拉唑)是一种强效胃酸抑制剂,前药形式的质子泵抑制剂因其良好的脂溶性可以经简单扩散自由通过细胞膜,进入胃壁细胞后在酸性环境中发生质子化,转变为次磺酰胺类活性形式,不可逆地抑制 $H^+/K^+-ATPase$ 的功能,阻止 H^+ 进入胃腔。因而对各种原因引起的胃酸分泌增加都有良好的抑制作用,是临床治疗消化性溃疡、胃食管反流病等酸相关性疾病的一线药物^[1]。然而,随着此类药物临床应用越发广泛,其潜在的不良反应也逐渐显现。有研究指出,长期使用质子泵抑制剂可能增加骨质疏松等疾病的发生风险^[2],还可能增加住院患者的病死率^[3]。近年来,国内外学者逐渐关注质子泵抑制剂潜在的心血管风险。有研究指出,质子泵抑制剂会通过抑制CYP2C19酶的活性而影响氯吡格雷的活化,从而增加此类用药人群的心血管风险^[4]。然而,也有研究报道,质子泵抑制剂的心血管风险可能与药物相互作用无关,因为在没有使用氯吡格雷的正常人群中,长时间使用质子泵抑制剂也会增加心血管事件的发生风险^[5]。Yepuri等^[6]研究结果表明,长期使用质子泵抑制剂会通过抑制溶酶体酸化而加速内皮细胞衰老,而Ghebremariam等^[7]的研究证实,质子泵抑制剂可以显著增加内皮和血清中不对称二甲基精氨酸的含量,从而减弱一氧化氮合酶的血管保护作用。这些结果表明,质子泵抑制剂可能直接作用于血管内皮而影响其正常功能。有研究报道,质子泵抑制剂会增加细胞内游离钙离子浓度^[8],而胞内钙离子稳态长期失衡可能活化钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)并进一步诱导活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)向细胞核内转移,引起组织功能障碍。另有研究报道, CaN活化与血管内皮中白介素6(interleukin 6, IL-6)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)表达增加密切相关,这也是一部分血管毒性物质发挥作用的重要途径^[9]。因此,本研究以内皮细胞中CaN为基础,探究质子泵抑制剂增加心血管风险的可能机制,为临床安全用药提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

兰索拉唑标准品购于中国食品药品检定研究院(纯度:99.6%);DMEM培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(Biological Industries公司,以色列);Trypsin-EDTA消化液(Gibco公司,美国);FK506(APEX-BIO公司,美国);DMSO(Sigma公司,美国);GAPDH抗体、IL-6抗体、HRP标记山羊抗兔IgG、FITC标记驴抗兔IgG、抗荧光淬灭封片剂(武汉塞维尔生物科技有限公司);NFAT抗体、CaN抗体、ICAM-1抗体、VCAM-1抗体、Lamin B1抗体(Abcam公司,英国);PMSF、RIPA裂解液、核蛋白浆蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);PVDF膜(Merck公司,美国);化学发光液(Millipore公司,美国);逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本),内参引物GAPDH,其余引物由生工生物工程有限公司合成,引物序列信息见表1。

表1 qRT-PCR的引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR	
引物名称	引物序列(5'→3')
IL-6-F	CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG
IL-6-R	GGACTTTTGTACTCATCTGCAC
ICAM-1-F	TGCAAGAAGATAGCCAACCAAT
ICAM-1-R	GTACACGGTGAGGAAGGTTTTA
VCAM-1-F	CAGGCTGGAGATAGACTTACTG
VCAM-1-R	CCTCAATGACAGGAGTAAAGGT

CO₂培养箱 HF100(上海力申科学仪器有限公司);涡旋震荡仪(Eppendorf公司,德国);离心机(Eppendorf公司,德国);倒置荧光显微镜 IX73(Olympus公司,日本),荧光显微镜 LSM 5(德国Zeiss公司);电泳仪 PowerPac™ BASIC(Bio-Rad公司,美国);酶标仪(Bio Tek公司,美国);实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems公司,美国);超声破碎仪(Sonics公司,美国);化学发光图像分析系统 Tanon 5200 Multi(上海天能科技有限公司);MilliQ超纯水机(Millipore公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组

HUVEC细胞贴壁生长,正常培养阶段使用含有1%双抗和10%胎牛血清的DMEM培养基进行培养,隔天换液。细胞给药阶段用含有0.1% DMSO、1%双抗和10%胎牛血清的培养基或相应的含药培养基进行培养,每天换液。细胞于37℃、含有5% CO₂的培养箱中培养,当细胞生长至80%汇合时进行传代,传代比例为1:2,取状态良好的对数生长期细胞

进行实验。

第一阶段实验以兰索拉唑 10 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理细胞 0、24、48、72 和 96 h,各处理组细胞间 DMSO 含量、总培养时间保持一致。第二阶段实验分为 Veh 组、LPZ 组、FK506 组、LPZ+FK506 组共 4 组。Veh 组为对照组;LPZ 组中含有 10 $\mu\text{mol/L}$ 兰索拉唑;FK506 组中含有 1 $\mu\text{mol/L}$ FK506;LPZ+FK506 组中含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 FK506 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的兰索拉唑,各组间 DMSO 含量保持一致,共同培养 96 h。

1.2.2 qRT-PCR 法检测各组细胞中 IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达

用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的兰索拉唑孵育细胞 0、24、48、72、96 h 后,用 TRIzol 试剂盒提取各组细胞的总 RNA,调齐浓度后逆转录成 cDNA。以每孔 5 μL SYBR Green、0.2 μL 正向引物、0.2 μL 反向引物、3.6 μL 无酶水和 1 μL 经稀释的 cDNA 配成 10 μL 反应体系。每个样本设置 3 个复孔,上样结束后经 4 $^{\circ}\text{C}$ 2 000 r/min 离心 5 min 以除尽气泡。上机进行 IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 等基因的扩增,以 GAPDH 为内参分析经不同时间药物作用后相关基因 mRNA 表达水平的变化。

1.2.3 Western blot 法检测蛋白表达

细胞经不同药物处理后,用 RIPA 裂解液和核浆蛋白提取试剂盒(使用前 2 min 内加入蛋白酶抑制剂)分别提取细胞总蛋白、核蛋白和浆蛋白。提取的蛋白用细胞破碎仪超声 3~5 次,每次 5 s,随后离心取上清。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,调齐浓度后加入 5 \times 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min,变性后的蛋白样本立即使用或保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。使用 SDS-PAGE 按照每孔 35 μg 的上样量进行电泳,待蛋白分离后停止电泳。用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,室温条件下用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 90 min,经 TBST 漂洗后放入相应的一抗中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用 TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 10 min。室温条件下在摇床上孵育二抗约 1 h,结束后仍用 TBST 缓冲液漂洗 3 次,最后使用 Tanon 显色系统进行显影。以 GAPDH 为内参,用 Image J 软件对 Western blot 条带进行半定量分析,各给药组目的蛋白的表达用对照组进行标准化。

1.2.4 免疫荧光

细胞经不同药物处理后,在室温条件下固定 15 min,结束后用 Triton 破膜 15 min,弃去 Triton,用山羊血清室温封闭 1 h,结束封闭后加入一抗过夜,次日加入荧光二抗室温孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次后用

DAPI 染液对细胞核进行染色,3 min 后用 PBS 洗净残余 DAPI 染液,以 488 nm 为激发波长在荧光显微镜下进行观察。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,所有数据均使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,多组间的比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每项实验均独立重复 3 次,使用 Graph-Pad Prism 5 软件进行作图。

2 结果

2.1 兰索拉唑能时间依赖性激活 CaN,并促进 NFAT 向核内转移

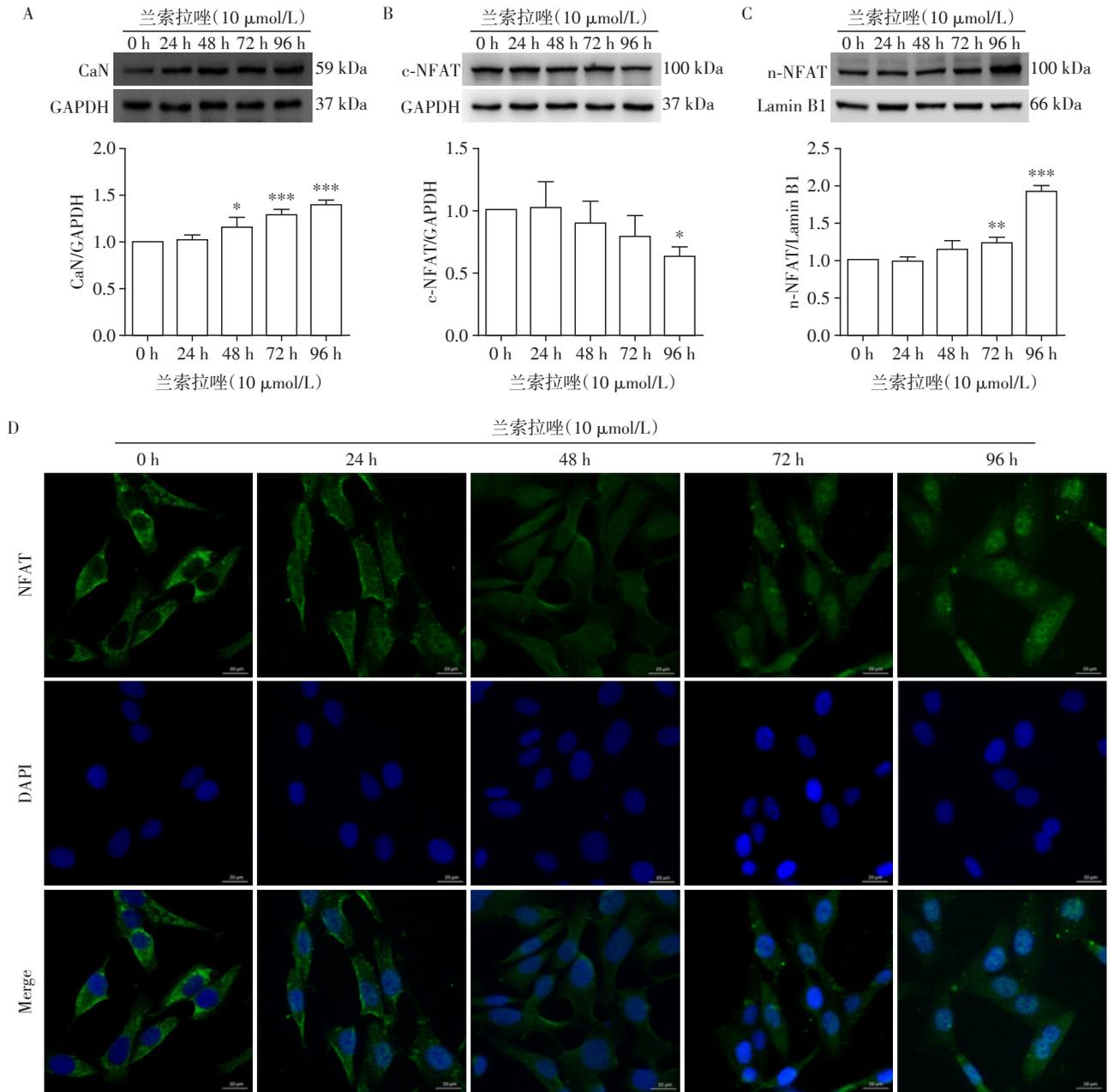
为了研究兰索拉唑长期作用对 HUVEC 中 CaN 表达的影响,分别用兰索拉唑处理细胞 24、48、72、96 h 后,应用 Western blot 技术进行检测。结果如图 1A 所示,兰索拉唑可以时间依赖性地上调细胞中 CaN 蛋白的表达。此外,本研究进一步探索了细胞中 NFAT 的表达情况。结果如图 1B、C 所示,兰索拉唑能减少细胞浆中 NFAT 的表达,并能时间依赖性上调细胞核中 NFAT 蛋白的表达,免疫荧光结果(图 1D)与 Western blot 结果一致,共同说明兰索拉唑长期反复刺激会诱导细胞浆中的 NFAT 向细胞核内转移。

2.2 兰索拉唑诱导血管炎症,增加 HUVEC 黏附分子表达

为了研究兰索拉唑对 HUVEC 黏附分子和炎症因子表达的影响,分别用兰索拉唑处理细胞 24、48、72、96 h 后,用 Western blot 和 qRT-PCR 技术进行检测。结果显示,兰索拉唑可以增加 HUVEC 中 IL-6 蛋白的表达,且在 96 h 时最为明显(图 2A、B)。兰索拉唑还可以时间依赖性增加 ICAM-1 蛋白的表达(图 2A、C),而对于 VCAM-1,虽然未呈现时间依赖性,给药 48、72、96 h 后蛋白表达也出现显著上调(图 2A、D)。此外 qRT-PCR 结果显示,兰索拉唑能时间依赖性增加 ICAM-1 mRNA 的表达(图 3B),而对于 IL-6 及 VCAM-1 mRNA 的表达水平,虽然未出现统计学差异,但随着给药时间的增加也出现了上调趋势(图 3A、C)。这些结果共同说明长时间的兰索拉唑刺激可能诱发血管内皮炎症,并增加内皮细胞黏附。

2.3 CaN 抑制剂能缓解兰索拉唑诱导的血管损伤

为了进一步验证 CaN 活化在兰索拉唑诱导的血管炎症中发挥的作用。本研究使用 CaN 抑制剂 FK506(1 $\mu\text{mol/L}$)单独或联合兰索拉唑共同孵育细



A: Western blot 检测细胞内 CaN 蛋白表达; B: Western blot 检测细胞质中 NFAT 蛋白表达; C: Western blot 检测细胞核中 NFAT 蛋白表达; D: 激光共聚焦显微镜下观察细胞中 NFAT 表达情况($\times 400$)。与 0 h 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图1 各组 HUVEC 中 CaN 和 NFAT 的表达量

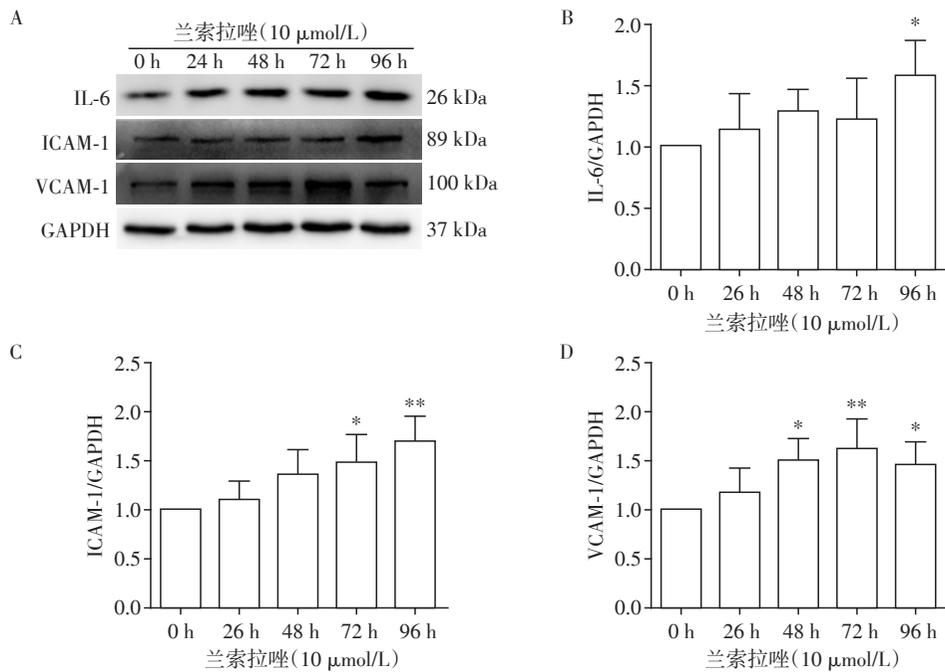
Figure 1 Expression of CaN and NFAT of HUVECs in each group

胞 96 h, 并使用 Western blot 检测蛋白表达水平的变化。结果如图 4A 所示, FK506 对兰索拉唑诱导的 CaN 表达升高有显著的抑制作用。图 4B~D 显示, 与 Veh 组相比, LPZ 组 NFAT 的核转位显著增加, 而 FK506 组 NFAT 的核转位情况无显著变化, LPZ+FK506 组 NFAT 的核转位情况虽然也有升高, 但是与 LPZ 组相比升高幅度显著降低。此外, 与 Veh 组相比, LPZ 组 IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白表达量显著增加, 而 FK506 组与 LPZ+FK506 组 IL-6、ICAM-1

和 VCAM-1 的蛋白表达量无显著变化(图 5), 说明兰索拉唑诱导的血管炎症及黏附增加与 CaN 的激活密切相关。

3 讨论

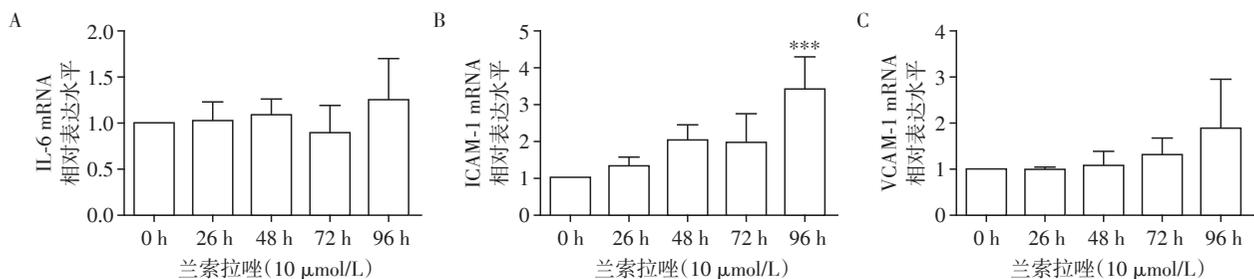
质子泵抑制剂广泛用于治疗酸相关性疾病, 临床使用量逐年增加, 但在发挥强效抑酸作用的同时, 其潜在的不良反应也逐渐引起人们的重视^[10]。在心血管领域, 质子泵抑制的潜在作用一直存在争



A: Western blot 电泳图; B: 半定量分析各组细胞中 IL-6 蛋白表达水平; C: 半定量分析各组细胞中 ICAM-1 蛋白表达水平; D: 半定量分析各组细胞中 VCAM-1 蛋白表达水平。与 0 h 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图2 Western blot 检测各组 IL-6、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达

Figure 2 Expression of IL-6, ICAM-1 and VCAM-1 proteins in each group detected by Western blot



A: qRT-PCR 检测各组细胞中 IL-6 的表达; B: qRT-PCR 检测各组细胞中 ICAM-1 的表达; C: qRT-PCR 检测各组细胞中 VCAM-1 的表达。与 0 h 组相比, *** $P < 0.001$, $n=3$ 。

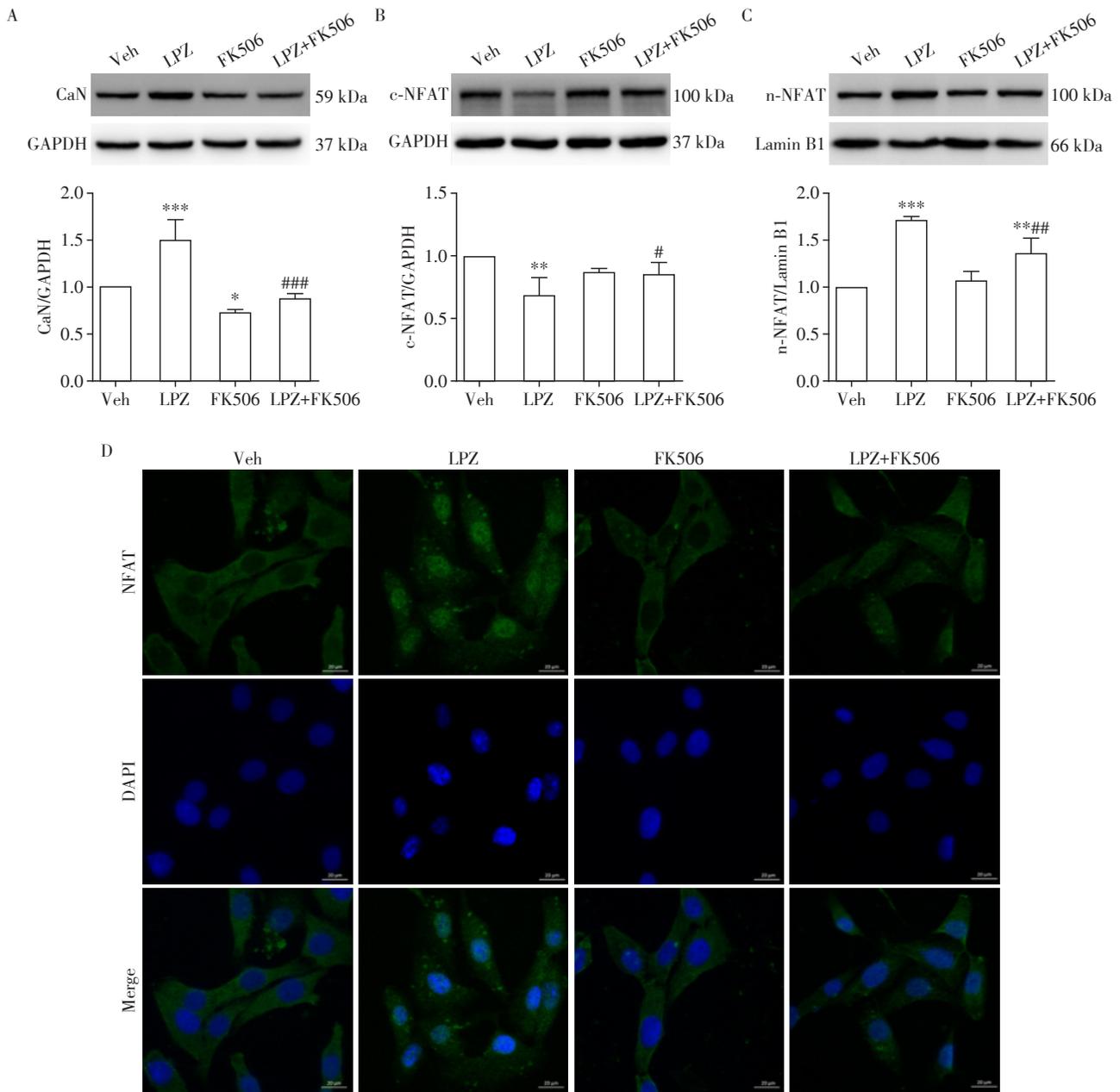
图3 qRT-PCR 检测各组 IL-6、ICAM-1、VCAM-1 mRNA

Figure 3 mRNA of IL-6, ICAM-1, VCAM-1 in each group detected by qRT-PCR

议。Lin 等^[11]指出, 兰索拉唑可以通过抑制 Akt/GSK3 β / β -catenin 信号通路的激活而缓解高血压诱导的心脏重构。而 Sehested 等^[12]的研究发现, 长期使用质子泵抑制剂会使缺血性脑卒中的风险增加 13%, 使急性心肌梗死的风险增加 31%。Sun 等^[5]一项包含 17 项 RCT 的 meta 分析表明, 质子泵抑制剂可能增加患者心血管事件的发生风险, 且在长期用药人群中风险会进一步增加。

心血管疾病是威胁人类生活的严重疾病之一, 因心血管疾病死亡的人数占每年全球疾病死亡总人数的 30% 以上。而血管内皮炎症引起的内皮功能障碍是各种心血管疾病(动脉粥样斑块形成、心肌梗死等)发生发展的关键步骤^[13]。正常情况下,

炎症因子 IL-6 和黏附分子 ICAM-1 及 VCAM-1 在血管组织中表达量较低, 而发生内皮炎症时, 表达量会显著升高^[14]。Yu 等^[9]的研究结果表明, 在 TNF- α 诱导的内皮炎症中, CaN 的激活发挥了关键作用, 抑制 CaN 可以显著减弱 TNF- α 诱导的 NFAT 核转位, 并降低 IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 的表达量。CaN 是一种钙调蛋白/钙离子依赖性的蛋白磷酸酶, 在血管内皮中表达较为丰富。CaN 对胞内钙离子变化有较高的敏感性, 胞内钙离子升高会显著增加 CaN 的表达并进一步诱导 NFAT 向细胞核内转移^[11]。Schilling 等^[8]的研究结果表明, 质子泵抑制剂急性给药会减少内质网钙容量, 并能显著增加心肌细胞中舒张期游离钙离子浓度, 而长期使用质子泵抑制剂对



A: Western blot检测细胞内CaN蛋白表达;B:Western blot检测细胞质中NFAT蛋白表达;C:Western blot检测细胞核中NFAT蛋白表达;D:激光共聚焦显微镜下观察细胞中NFAT表达情况(×400)。与Veh组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与LPZ组相比,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$,### $P < 0.001$, $n=3$ 。

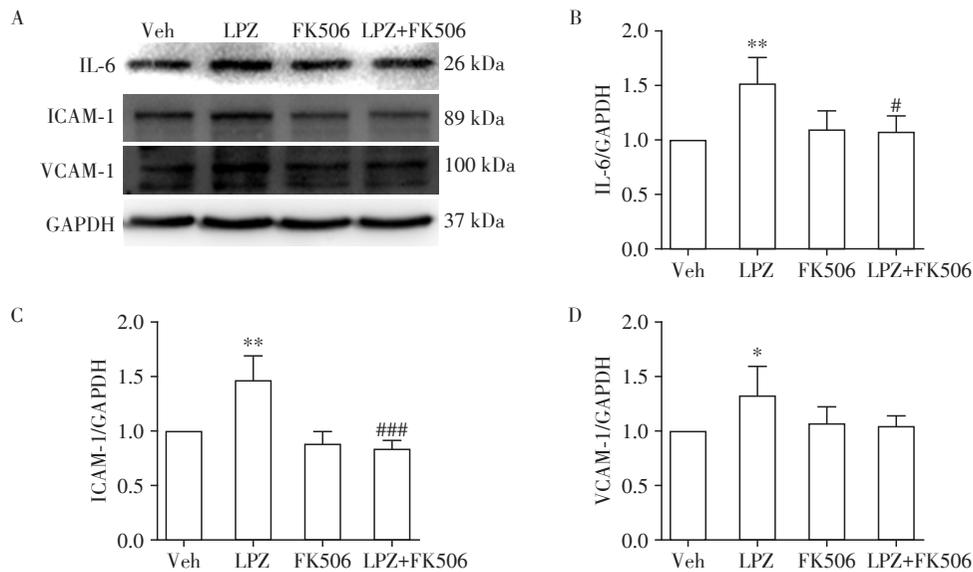
图4 FK506对兰索拉唑诱导的HUVEC中CaN和NFAT表达的影响

Figure 4 The effects of FK506 on expression of CaN and NFAT induced by lansoprazole in HUVECs

血管内皮细胞中CaN的影响,尚未见报道。

在本研究中,用兰索拉唑孵育HUVEC不同时间后发现,兰索拉唑能时间依赖性地增加CaN的表达,并显著增加NFAT的核转位。此外,兰索拉唑还能显著增加HUVEC中IL-6、ICAM-1及VCAM-1的表达,提示兰索拉唑长时间作用能激活CaN并进一步诱发血管内皮炎症。为了进一步验证兰索拉唑诱导的血管炎症与CaN激活的相关性,本研究将

CaN抑制剂FK506单独或联合兰索拉唑共同作用于细胞96 h。结果显示,1 $\mu\text{mol/L}$ 的FK506单独作用于HUVEC 96 h后对NFAT的核转位没用影响,也不会增加IL-6、ICAM-1和VCAM-1蛋白的表达,但是它能显著减弱由兰索拉唑诱导的NFAT核转位,并能很大程度上抑制由兰索拉唑诱导的IL-6、ICAM-1和VCAM-1表达增加,这些结果进一步证实了兰索拉唑诱导的血管内皮炎症和细胞黏附增加与CaN



A: Western blot电泳图; B: 半定量分析各组细胞中IL-6蛋白表达水平; C: 半定量分析各组细胞中ICAM-1蛋白表达水平; D: 半定量分析各组细胞中VCAM-1蛋白表达水平。与Veh组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与LPZ组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, $n=3$ 。

图5 FK506对兰索拉唑诱导的HUVEC中IL-6、ICAM-1、VCAM-1表达的影响

Figure 5 The effects of FK506 on the expression of IL-6, ICAM-1 and VCAM-1 induced by lansoprazole in HUVECs

的活化有较大相关性。

虽然质子泵抑制剂在发挥抑酸作用时需要先被活化,但考虑到体循环及血管内皮细胞内的pH不足以使质子泵抑制剂发生质子化,因此本研究采用兰索拉唑的原型药物进行实验符合药物在体内的实际情况。以往在研究兰索拉唑心血管效应时较少关注该药物对心肌细胞或血管内皮细胞的长期影响^[8,11],而心血管不良事件往往发生在长期使用质子泵抑制剂的患者中^[12]。本研究通过比较不同时间的兰索拉唑对HUVEC的作用,探讨质子泵抑制剂产生心血管效应的潜在规律,为临床质子泵抑制剂的安全使用提供参考。

综上所述,临床相关浓度的兰索拉唑可能诱导血管内皮炎症,并增加内皮细胞黏附,且这一作用与内皮细胞中CaN的活化密切相关。本研究表明CaN可作为预防质子泵抑制剂相关心血管不良反应的潜在靶点,值得进行更加全面和深入的研究,这对于促进质子泵抑制剂在临床的安全合理使用具有重要意义。

[参考文献]

[1] ISSHI K, MATSUHASHI N, JOH T, et al. Proton pump inhibitor monotherapy is effective to attenuate dyspepsia symptoms associated with gastroesophageal reflux disease: a multicenter prospective observational study [J]. J Gastroenterol, 2019, 54(6): 492-500

[2] POLY T N, ISLAM M M, YANG H C, et al. Proton pump

inhibitors and risk of hip fracture: a meta-analysis of observational studies [J]. Osteoporos Int, 2019, 30(1): 103-114

[3] PAPPAS M, JOLLY S, VIJAN S. Defining appropriate use of proton-pump inhibitors among medical inpatients [J]. J Gen Intern Med, 2016, 31(4): 364-371

[4] KIM M S, SONG H J, LEE J, et al. Effectiveness and safety of clopidogrel Co-administered with statins and proton pump inhibitors: A Korean National Health Insurance Database Study [J]. Clin Pharmacol Ther, 2019, 106(1): 182-194

[5] SUN S, CUI Z, ZHOU M, et al. Proton pump inhibitor monotherapy and the risk of cardiovascular events in patients with gastro-esophageal reflux disease: a meta-analysis [J]. Neurogastroenterol Motil, 2017, 29(2): e12926

[6] YEPURI G, SUKHOVERSHIN R, NAZARI-SHAFTI T Z, et al. Proton pump inhibitors accelerate endothelial senescence [J]. Circ Res, 2016, 118(12): e36-42

[7] GHEBREMARIAM Y T, LEPENDU P, LEE J C, et al. Unexpected effect of proton pump inhibitors: elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine [J]. Circulation, 2013, 128(8): 845-853

[8] SCHILLINGER W, TEUCHER N, SOSSALLA S, et al. Negative inotropy of the gastric proton pump inhibitor pantoprazole in myocardium from humans and rabbits: evaluation of mechanisms [J]. Circulation, 2007, 116(1): 57-66

[9] YU B X, YUAN J N, ZHANG F R, et al. Inhibition of

Orai1-mediated Ca²⁺ entry limits endothelial cell inflammation by suppressing calcineurin-NFATc4 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(2):1864-1870

[10] 董洁,邢娟,路国涛,等. 肠内营养对质子泵抑制剂导致的胃肠道不良反应的保护作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1):77-83

[11] LIN H, LI Y, ZHU H, et al. Lansoprazole alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure in mice by blocking the activation of beta-catenin [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(1):101-113

[12] SEHESTED T S G, GERDS T A, FOSBOL E L, et al. Long-term use of proton pump inhibitors, dose-response relationship and associated risk of ischemic stroke and myocardial infarction [J]. *J Intern Med*, 2018, 283(3):268-281

[13] 周明,黄君文,陈婷,等. Tenascin-X蛋白及CD34在动脉粥样斑块形成过程中的表达及相关性的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(2):181-186

[14] CHEN X, LIN J, HU T, et al. Galectin-3 exacerbates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing inflammation via integrin beta1-RhoA-JNK signaling activation [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):10990-11000

[收稿日期] 2019-10-27

(上接第159页)

178-194

[7] ISHIKURA Y, YABUTA Y, OHTA H, et al. *In vitro* derivation and propagation of spermatogonial stem cell activity from mouse pluripotent stem cells [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(10):2789-2804

[8] SATO T, KATAGIRI K, KOJIMA K, et al. *In vitro* spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0130171

[9] YUAN Y, LI L, CHENG Q, et al. *In vitro* testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3):244-255

[10] QI L, LIU Z X, WANG J, et al. Systematic analysis of the phosphoproteome and kinase-substrate networks in the mouse testis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(12):3626-3638

[11] LI Y, CHENG Y W, ZHUT Y et al. The protein phosphorylation landscape of mouse spermatids during spermiogenesis [J]. *Proteomics*, 2019, 19(11):e1900055

[12] HANDEL M A, EPPIG J J, SCHIMENTI J C. Applying “gold standards” to in-vitro-derived germ cells [J]. *Cell*, 2014, 157(6):1257-1261

[收稿日期] 2020-12-28