

[文章编号] 1007-3949(2005)13-05-0575-04

• 实验研究 •

## 拉西地平、氨氯地平对人脐静脉内皮细胞间粘附分子 1 表达的影响

刘海宁<sup>1</sup>, 张兴华<sup>2</sup>, 耿庆信<sup>3</sup>

(1. 淄博市中心医院, 山东省淄博市 255036; 2. 山东省立医院, 山东省济南市 250021;

3. 济南市中心医院, 山东省济南市 250013)

[关键词] 药理学; 钙通道阻滞剂抗动脉粥样硬化作用; 逆转录聚合酶链反应; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 人脐静脉内皮细胞; 细胞间粘附分子 1

[摘要] 目的 观察第三代二氢吡啶类钙通道阻滞剂拉西地平、氨氯地平对肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞间粘附分子 1 表达的影响, 以探讨拉西地平、氨氯地平抗动脉粥样硬化机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 以低密度脂蛋白作为载体分别加入不同浓度的拉西地平 ( $5.26 \times 10^{-5}$  mmol/L、 $1.58 \times 10^{-4}$  mmol/L、 $3.16 \times 10^{-4}$  mmol/L) 和氨氯地平 ( $5.26 \times 10^{-6}$  mmol/L、 $1.58 \times 10^{-5}$  mmol/L、 $3.16 \times 10^{-5}$  mmol/L) 共同孵育 45 min, 再加入肿瘤坏死因子  $\alpha$  共同孵育 6 h, 采用流式细胞术和逆转录聚合酶链反应分别测定细胞间粘附分子 1 蛋白和 mRNA 的表达。结果 不同浓度的拉西地平显著抑制细胞间粘附分子 1 的表达, 随浓度增加, 抑制作用逐渐增强; 氨氯地平在低浓度时无明显抑制作用, 但中、高浓度时可明显抑制细胞间粘附分子 1 的表达。流式细胞术和逆转录聚合酶链反应的检测结果基本一致。结论 拉西地平和氨氯地平均能够显著抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的细胞间粘附分子 1 表达, 但拉西地平的抑制作用强于氨氯地平, 可能与其不同的抗氧化活性有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effect of Lacidipine and Amlodipine on Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LIU Hai-Ning, ZHANG Xing-Hua, and GENG Qing-Xin

(Zibo Central Hospital, Zibo 255036, China)

[KEY WORDS] Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ ; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Intercellular Adhesion Molecules-1; Lacidipine; Amlodipine

[ABSTRACT] **Aim** To observe the influence of Lacidipine and Amlodipine on tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC). **Methods** Lacidipine and Amlodipine of different concentrations were incorporated in hUVEC using low density lipoprotein (LDL) as a carrier for 45 minutes respectively. Human recombinant TNF- $\alpha$  was then incubated with hUVEC for 6 hours. The expression of ICAM-1 in protein level and mRNA level was detected by flow cytometric technique and RT-PCR. **Results** Lacidipine, at any concentration, determined a dose-dependent significant decrease of the expression of ICAM-1. Amlodipine determined variable decreases of ICAM-1 at the intermediate and highest concentrations. **Conclusion** According to the results of flow cytometric technique and RT-PCR, Lacidipine and Amlodipine exert different effect on the TNF- $\alpha$  induced expression of ICAM-1 in hUVEC, which may be related with their different lipophilicity and antioxidant activity.

细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 是血管内皮细胞表达的一种重要粘附分子, 与动脉粥样硬化的发生、发展有着密切关系<sup>[1]</sup>。在易发生动脉粥样硬化的部位, 最先被观察到的变化就是单核细胞聚集, ICAM-1 参与了这一过程。各种损伤因素如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumour

necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等均可诱导血管内皮细胞 ICAM-1 表达增加。抑制 ICAM-1 的表达, 就可阻止动脉粥样硬化的形成和发展。近二十多年的研究发现, 第三代的二氢吡啶类钙通道阻滞剂拉西地平和氨氯地平不仅具有良好的降压作用, 还具有显著的抗动脉粥样硬化作用, 能够显著延缓动脉粥样硬化的形成和发展, 对无论是高血压还是正常血压患者均显示出有益的作用, 且与其降压作用无关<sup>[2,3]</sup>。本研究旨在探讨拉西地平和氨氯地平对 TNF- $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, hUVEC) ICAM-1 表达的影响, 以期进一步了解

[收稿日期] 2004-12-29

[修回日期] 2005-09-15

[作者简介] 刘海宁, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向为冠心病的发生机制及防治。张兴华, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的发生机制及冠心病的介入治疗。耿庆信, 博士研究生, 副主任医师, 副教授, 主要研究方向为冠心病的发生机制及冠心病的介入治疗。

其抗动脉粥样硬化作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 人脐静脉内皮细胞株-H8 培养

人脐静脉内皮细胞株(hUVEC)-H8 由山东大学医学院细胞生物学教研室提供。细胞复苏成功后,用含 20% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基进行传代培养。待细胞汇合后即可进行试验。

### 1.2 药物干预

将 TNF- $\alpha$  (Sigma 公司) 加到培养的 hUVEC-H8 中(终浓度为 2  $\mu$ g/L), 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 6 h 诱导 ICAM-1 表达。将拉西地平(哈尔滨制药集团提供)和氨氯地平(辉瑞制药集团提供)原料药分别溶解于乙腈中,拉西地平溶液浓度为 12 g/L,氨氯地平溶液浓度为 11 g/L。取拉西地平和氨氯地平溶液各 20 mL、60 mL、120 mL,分别加入到 1 mL 的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) (购自中国医学科学院基础所, 1.1 kg/L) 中;然后再分别取含有拉西地平、氨氯地平溶液的 LDL 各 200  $\mu$ L,加到培养的内皮细胞中(含 20% FBS 的 DMEM 培养基 2 mL),加入到内皮细胞中拉西地平的终浓度依次为 5.26  $\times 10^5$  mmol/L、1.58  $\times 10^4$  mmol/L 和 3.16  $\times 10^4$  mmol/L;加入到内皮细胞中氨氯地平终浓度依次为 5.26  $\times 10^6$  mmol/L、1.58  $\times 10^5$  mmol/L 和 3.16  $\times 10^5$  mmol/L。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 45 min;再分别加入 TNF- $\alpha$  (终浓度为 2  $\mu$ g/L), 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 6 h。

### 1.3 流式细胞术

用 25% 胰蛋白酶消化细胞,倒置相差显微镜下观察到细胞收缩/裂隙后,加入培养液终止消化,反复吹打细胞使之成为单个细胞悬液,移入离心管中,1 500 r/min 离心 3~5 min,再加入 PBS 液清洗 2 遍;1 500 r/min~2 000 r/min 离心 10 min,每管中加入 2~3 滴多聚甲醛固定。上机检测前调节细胞浓度为 10<sup>10</sup>/L。取 100  $\mu$ L 细胞悬液加入 10  $\mu$ L FITC 标记的鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体,室温避光孵育 30 min,用 PBS 洗涤一次,上机检测其平均荧光强度,每个观察值检测 3 次。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应

逆转录聚合酶链反应试剂盒由 Invitrogen 公司提供。采用异硫氢酸呱—酚—氯仿一步提取法提取总 RNA,用分光光度计测 A<sub>260</sub>和 A<sub>280</sub>,比值 > 1.8。逆转录反应:于 DEPC 水处理的 0.5 mL eppendorf 管中加入的反应体系为总 RNA 1  $\mu$ L、MMLV 1  $\mu$ L、逆转录反应体系 7  $\mu$ L、下游引物 P<sub>2</sub> 1  $\mu$ L、补去 Rnase 水至 20

$\mu$ L。快速离心混匀,37  $^{\circ}$ C 放置 1 h,95  $^{\circ}$ C、10 min 灭活 MMLV,快速离心使蒸汽沉于管底。聚合酶链反应是在上述 20  $\mu$ L 产物的 eppendorf 管中加入聚合酶链反应体系 19  $\mu$ L、上游引物 P<sub>1</sub> 1  $\mu$ L、去离子水 58  $\mu$ L、TaqDNA 聚合物 2  $\mu$ L(1 k/L)。循环条件为 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min  $\rightarrow$  57  $^{\circ}$ C 退火 1 min  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 35 次,末次延长 7 min。聚合酶链反应产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳: ICAM-1 458 bp,  $\beta$ -actin 520 bp, PCR Marker 由 Invitrogen 公司提供,紫外灯下照片。ICAM-1 引物根据文献由上海生物工程公司合成。 $\beta$ -actin 引物根据国际互连网从 cDNA 文库检索到原始序列设计,由上海生物工程公司合成。 $\beta$ -actin: P<sub>1</sub> 为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', P<sub>2</sub> 为 5'-CTC AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'; ICAM-1: P<sub>1</sub> 为 5'-CAC AAG CCA CGC CTC CCT GAA CCT A-3', P<sub>2</sub> 为 5'-TGT GGG CCT TTG TGT TTT GAT GCT A-3'。

### 1.5 统计学处理

结果以均数  $\pm$  标准差表示,数据处理采用方差分析和 *q* 检验, *P* < 0.05 为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞检测结果

肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 诱导 hUVEC ICAM-1 表达的平均荧光强度为 129.81  $\pm$  5.77。不同浓度拉西地平与 hUVEC 孵育后,均显著抑制 ICAM-1 表达,且随浓度增加,抑制作用逐渐增强 (*F* = 38.06, *P* < 0.01)。而氨氯地平在低浓度时对 ICAM-1 表达并无明显抑制作用(*q* = 2.44, *P* < 0.05),仅在中、高浓度时显著抑制 ICAM-1 的表达,且随浓度增加,抑制作用逐渐增强 (*F* = 17.86, *P* < 0.01),见表 1(Table 1)。

表 1. 不同浓度的拉西地平和氨氯地平对细胞间粘附分子 1 表达的影响

Table 1. Effects of different dose of Lacidipine and Amlodipine on ICAM-1 expression

处理因素	平均荧光强度
肿瘤坏死因子 $\alpha$	129.81 $\pm$ 5.77
拉西地平 (mmol/L)	
5.26 $\times 10^5$	108.77 $\pm$ 6.31 <sup>a</sup>
1.58 $\times 10^4$	81.50 $\pm$ 4.65 <sup>a</sup>
3.16 $\times 10^4$	65.54 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup>
氨氯地平 (mmol/L)	
5.26 $\times 10^6$	117.32 $\pm$ 5.86
1.58 $\times 10^5$	101.52 $\pm$ 4.40 <sup>a</sup>
3.16 $\times 10^5$	79.96 $\pm$ 3.98 <sup>a</sup>

a: *P* < 0.01, 与肿瘤坏死因子  $\alpha$  组比较。

## 2.2 拉西地平 and 氨氯地平对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的内皮细胞间粘附分子 1 mRNA 表达的影响

不同浓度拉西地平均可明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 hUVEC ICAM-1 mRNA 的表达, 随浓度增加, 抑制作用明显增强。氨氯地平在低浓度 (20  $\mu$ L) 时无明显抑制作用, 但随浓度增加, 抑制作用明显增强。图像分析 ICAM-1/ $\beta$ -actin 的光密度比值, TNF- $\alpha$  组为 0.78, 拉西地平组 (5.26  $\times 10^{-5}$  mmol/L、1.58  $\times 10^{-4}$  mmol/L、3.16  $\times 10^{-4}$  mmol/L) 依次为 0.42、0.34 及 0.20 (图 1, Figure 1), 氨氯地平组 (5.26  $\times 10^{-6}$  mmol/L、1.58  $\times 10^{-5}$  mmol/L、3.16  $\times 10^{-5}$  mmol/L) 依次为 0.77、0.56 及 0.41 (图 2, Figure 2)。两组比较, 拉西地平组抑制作用明显强于氨氯地平组 (图 3, Figure 3)。

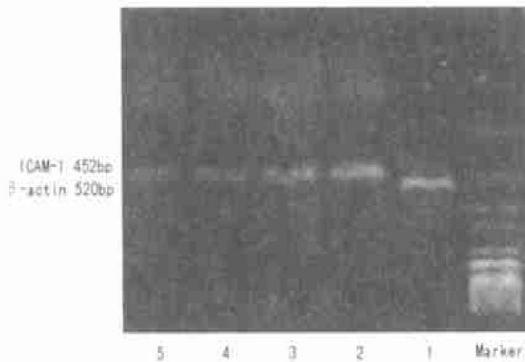


图 1. 不同浓度拉西地平对肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞间粘附分子 1 mRNA 表达的影响 1 为  $\beta$ -actin, 2 为肿瘤坏死因子  $\alpha$ , 3 为  $5.26 \times 10^{-5}$  mmol/L 拉西地平, 4 为  $1.58 \times 10^{-4}$  mmol/L 拉西地平, 5 为  $3.16 \times 10^{-4}$  mmol/L 拉西地平。

Figure 1. Expression of ICAM-1 mRNA by RT-PCR in Lacidipine groups

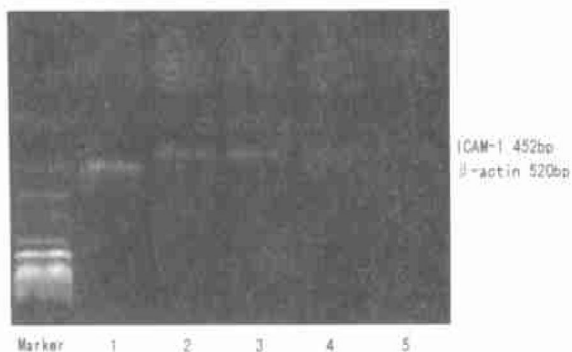


图 2. 不同浓度氨氯地平对肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞间粘附分子 1 mRNA 表达的影响 1 为  $\beta$ -actin, 2 为肿瘤坏死因子  $\alpha$ , 3 为  $5.26 \times 10^{-6}$  mmol/L 氨氯地平, 4 为  $1.58 \times 10^{-5}$  mmol/L 氨氯地平, 5 为  $3.16 \times 10^{-5}$  mmol/L 氨氯地平。

Figure 2. Expression of ICAM-1 mRNA by RT-PCR in Am- lodipine groups

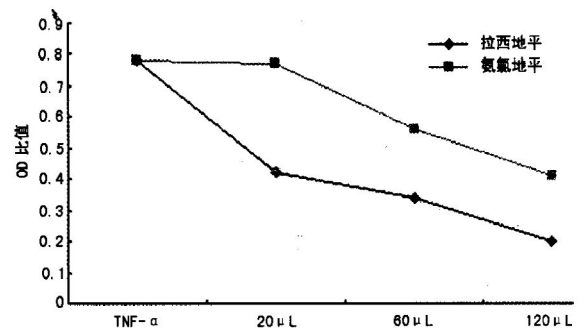


图 3. 不同浓度拉西地平 and 氨氯地平对肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞间粘附分子 1 mRNA 表达的不同影响

Figure 3. Comparison of ICAM-1 mRNA expression by RT-PCR between the two groups

## 3 讨论

第三代二氢吡啶类钙通道阻滞剂拉西地平、氨氯地平一直作为降压药物应用于临床, 但近几年临床研究发现, 该类物质还具有显著的抗动脉粥样硬化作用, 能够显著减缓冠状动脉、颈动脉和主动脉粥样硬化损伤进展, 减少动脉粥样硬化斑块数量<sup>[2,3]</sup>, 但机制尚不十分清楚。拉西地平、氨氯地平能否抑制 ICAM-1 表达以及抑制作用是否相同, 目前国内尚无报道。本研究结果表明, 拉西地平、氨氯地平对 TNF- $\alpha$  诱导的 hUVEC ICAM-1 表达均具有显著的抑制作用。本研究应用流式细胞技术和逆转录聚合酶链反应技术分别从 ICAM-1 的蛋白表达水平和 mRNA 表达水平进行检测, 结果是一致的。但拉西地平 and 氨氯地平的抑制作用并不完全相同。拉西地平在低浓度 ( $5.26 \times 10^{-5}$  mmol/L) 时即能够显著抑制 ICAM-1 的表达, 随浓度增加, 抑制作用逐渐增强; 而氨氯地平在低浓度 ( $5.26 \times 10^{-6}$  mmol/L) 时对 ICAM-1 的表达并无明显的抑制作用, 但在中、高浓度 ( $1.58 \times 10^{-5}$  mmol/L、 $3.16 \times 10^{-5}$  mmol/L) 时可明显抑制 ICAM-1 的表达。说明拉西地平较氨氯地平有更强的抑制作用。

细胞间粘附分子 1 (ICAM-1) 的表达等主要依赖于对氧化还原敏感的核转录因子  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ )。在 ICAM-1 基因的启动子上含有 NF- $\kappa\text{B}$  的结合位点<sup>[4]</sup>。研究已证实, 细胞内产生的各种过氧化产物均可作为细胞内的下游信使激活 NF- $\kappa\text{B}$ , 促进 ICAM-1 的表达。拉西地平 and 氨氯地平均具有很高的亲脂性和抗氧化活性, 通过质子捐赠和共振稳定机制, 将其质子捐赠给脂质过氧化物分子, 阻止过氧化产物的生成; 而拉西地平 and 氨氯地平分子中剩下的未配对的电子则被很好地稳定在吡啶环的共

振结构中<sup>[5]</sup>。通过本研究,我们可以推断正是由于拉西地平和氨氯地平这种亲脂性和抗氧化活性,通过抑制细胞内过氧化产物的生成以及 NF- $\kappa$ B 的激活,抑制了 ICAM-1 的表达。

在本研究中,拉西地平加入到培养细胞中的最终浓度均分别为  $5.26 \times 10^5$  mmol/L、 $1.58 \times 10^4$  mmol/L 和  $3.16 \times 10^4$  mmol/L。考虑到氨氯地平的细胞毒性作用,加入到培养细胞中的最终浓度要低于拉西地平,分别为  $5.26 \times 10^6$  mmol/L、 $1.58 \times 10^5$  mmol/L、 $3.16 \times 10^5$  mmol/L。两者浓度相差 10 倍,但我们认为这两种钙通道阻滞剂对 ICAM-1 抑制作用的不同并不是由它们浓度的不同造成的。Cominacini 等<sup>[6]</sup>应用本研究所采用的剂量用高性能液相色谱法检测 LDL 携带拉西地平和氨氯地平到细胞内浓度,结果却发现氨氯地平在细胞内的浓度反而要明显高于拉西地平。故我们认为拉西地平比氨氯地平有着更强的抗氧化活性。最近,Cominacini 等<sup>[7]</sup>为了证实拉西地平的这种抗氧化特性是否仅为拉西地平分子所特有,对拉西地平、氨氯地平、尼莫地平、硝苯地平等不同的二氢吡啶类钙通道阻滞剂进行了比较,结果发现拉西地平能显著降低氧化型 LDL 诱导的细胞内过氧化产物的产生,其抑制作用要显著强于其他二氢吡啶类钙通道阻滞剂,因此认为拉西地平分子具有独特的抗氧化特性,这是由其独特的分子结构所

决定的。

通过本研究我们认为,拉西地平和氨氯地平均能够显著抑制粘附分子 ICAM-1 的表达,但两者的抑制作用并不相同,这主要是由该类药物内在的抗氧化活性所决定的,从而进一步揭示了第三代二氢吡啶类钙通道阻滞剂的抗动脉粥样硬化作用机制。

#### [参考文献]

- [1] 张新超. 细胞粘附分子在动脉粥样硬化发生发展中的作用. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (2): 179-184
- [2] Miller M, Byington R, Humminghake D, Pitt B, Furberg CD. Sex bias and underutilization of lipid-lowering therapy in patients with coronary artery disease at Academic Medical Centers in the United States and Canada: Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial (PREVENT) Investigators. *Arch Intern Med*, 2000, 160 (3): 343-347
- [3] Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancia G, Dal Palu C. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation*, 2002, 106 (19): 2422-2427
- [4] 胡榕, 吴可贵. 核因子  $\kappa$ B 在心血管疾病中的作用的研究现状. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (5): 604-606
- [5] Preston Mason R. Mechanisms of atherosclerotic plaque stabilization for a lipophilic calcium antagonist amlodipine. *Am J Cardiol*, 2001, 88 (Suppl): 2M-6M
- [6] Cominacini L, Fratta Pasini A, Pastorino AM, Garbin U, Davoli A, Righi A. Comparative effects of different dihydropyridines on the expression of adhesion molecules induced by TNF- $\alpha$  on endothelial cells. *J Hypertens*, 1999, 17: 1837-841
- [7] Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Pastorino AM, Davoli A, Nava C. Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302 (4): 679-684

(此文编辑 文玉珊)