

# 替米沙坦对同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子1、核因子 $\kappa$ B表达及细胞黏附的影响

黄茂芝<sup>1</sup>, 徐尚华<sup>1</sup>, 宋欢欢<sup>1</sup>, 许昌声<sup>2</sup>, 谢良地<sup>2</sup>

(1. 福建医科大学附属南平市第一医院心内科, 福建省南平市 353000; 2. 福建高血压研究所, 福建省福州市 350000)

[关键词] 动脉粥样硬化; 替米沙坦; 同型半胱氨酸; 血管细胞黏附分子1; 核因子 $\kappa$ B

[摘要] **目的** 观察替米沙坦对同型半胱氨酸诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子1(VCAM-1)、核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达及与单核细胞黏附的影响。**方法** 胶原酶消化法获取人脐静脉内皮细胞; RT-PCR检测VCAM-1 mRNA的表达; Western blot检测VCAM-1、NF- $\kappa$ B蛋白的表达; ROSE BENGAL染色法检测单核细胞-血管内皮细胞黏附功能。**结果** 与空白对照组相比, 同型半胱氨酸增强了人脐静脉内皮细胞VCAM-1 mRNA、VCAM-1蛋白、NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达水平及与单核细胞黏附能力。替米沙坦(1000 nmol/L组)明显降低了同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞VCAM-1 mRNA、VCAM-1蛋白、NF- $\kappa$ B p65蛋白及与单核细胞的黏附水平( $P < 0.01$ )。与同型半胱氨酸组比, PDTC(NF- $\kappa$ B抑制剂)组NF- $\kappa$ B p65蛋白、VCAM-1 mRNA、VCAM-1蛋白表达水平均明显降低, 内皮细胞与单核细胞的黏附水平也明显降低( $P < 0.01$ )。**结论** 替米沙坦抑制了VCAM-1 mRNA和蛋白的表达及内皮与单核细胞的黏附水平, 其机制可能是通过抑制NF- $\kappa$ B而抑制炎症反应及内皮损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Telmisartan on the Expression of VCAM-1、NF- $\kappa$ B and the Adhesion Induced by Homocysteine in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HUANG Mao-Zhi<sup>1</sup>, XU Shang-Hua<sup>1</sup>, SONG Huan-Huan<sup>1</sup>, XU Chang-Sheng<sup>2</sup>, and XIE Liang-Di<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Affiliated Nanping First Hospital of Fujian Medical University, Naping 350000, China; 2. The Hypertension Institute of Fujian Province, Fuzhou 350004, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Telmisartan; Homocysteine; Vascular Cell Adhesion Molecule -1; Nuclear Factor- $\kappa$ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of telmisartan on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), Nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) induced by homocysteine (Hcy) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the adhesion to monocytes. **Methods** Collagenase was used to isolate the endothelial cell from human umbilical vein. RT-PCR was used to examine the expression of VCAM-1 mRNA. Western blot was used to detect expression of VCAM-1 and NF- $\kappa$ Bp65 protein. ROSE BENGAL staining technique was used to detect Mononuclear cells-endothelial cell adhesion function. **Results** The expression of VCAM-1 mRNA, VCAM-1 protein, NF- $\kappa$ B p65 protein and the adhesion function to monocytes were induced by Hcy in HUVEC compared with the control group ( $P < 0.01$ ). By comparison with the Hcy group, telmisartan (1000 nmol/L) obviously decreased the expression of VCAM-1 mRNA, VCAM-1 protein, NF- $\kappa$ B p65 protein and the level of endothelial cells adhesion to monocytes induced by Hcy in HUVEC ( $P < 0.01$ ). NF- $\kappa$ B inhibitor remarkably antagonized the expression of NF- $\kappa$ B p65 protein, VCAM-1 mRNA and VCAM-1 protein induced by Hcy in HUVEC, and the adhesion function between mononuclear cells and endothelial cells was also decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Telmisartan decreased the higher expression of VCAM-1 mRNA, protein and the level of endothelial adhesion with monocytes induced by Hcy in HUVEC. The mechanism may be through inhibiting the activation of nuclear factor- $\kappa$ B to control inflammation and endothelial injury.

[收稿日期] 2011-10-10

[基金项目] 福建省科技厅基金项目[(2007)3129]

[作者简介] 黄茂芝, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 maozhihuang@163.com。通讯作者徐尚华, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 xshanghua@medmail.com.cn。

近年来,血管紧张素 II 受体阻滞剂(ARB)大量应用于动脉粥样硬化(As)的临床治疗,其临床作用除很强的降压作用外,目前研究表明在抑制炎症反应、改善内皮功能和稳定斑块方面也成为 ARB 类抗 As 的研究重点。替米沙坦是一种新型的 ARB 类药物,脂溶性强,组织穿透性好,与 AT<sub>1</sub>R 亲和力高且持续时间长,除降压作用外,还能有效改善胰岛素抵抗、调节糖脂代谢紊乱、延缓动脉粥样斑块形成及心血管事件的发生<sup>[1-4]</sup>。目前对替米沙坦在抗 As,保护心血管中作用的报道主要是围绕其能改善内皮功能、抗氧化应激、抗炎、稳定斑块等作用。研究表明,血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)是启动动脉硬化早期炎症反应和介导单核细胞迁移和渗透的关键步骤<sup>[5]</sup>。炎症转录因子核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是调节炎症因子 VCAM-1、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)等基因转录的关键因子之一,且研究证实组织中 NF- $\kappa$ B 的激活明显增强<sup>[6]</sup>。同型半胱氨酸(Hcy)是心脑血管并发症的重要危险因素。研究表明,As 患者血清 Hcy 水平明显高于正常人,且与病情的严重程度呈正相关。本研究拟通过观察替米沙坦对 Hcy 诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)表达 VCAM-1、NF- $\kappa$ B 及单核细胞和内皮细胞黏附水平的影响,为替米沙坦抗 As 特别是高 Hcy 并发 As 的治疗提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本的采集

实验所用脐带来自于福建省妇幼保健院及福建医科大学附属第一医院住院育龄健康产妇剖腹产后的新鲜胎儿脐带(孕妇自愿提供),M199 培养液中 4℃ 保存,2 h 内进行分离培养。

### 1.2 试剂

Hcy 溶液、ROSE BNGGAL 染料、PDTC 干粉(NF- $\kappa$ B 抑制剂)(Sigma 公司);替米沙坦药物原粉(Boehringer Ingelheim 公司);M199 培养粉、Trizol 试剂、琼脂糖(Invitrogen 公司);I 型胶原酶、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司);RT-PCR 试剂盒、PCRmix、PCRMark(Fermentas 公司);引物合成(上海博尚生物技术有限公司);硝酸纤维素膜(Milipore 公司);Western blot 印迹化学发光试剂、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、抗  $\beta$ -actin、NF- $\kappa$ B 一抗(Santa Cruz 公司);VCAM-1 一抗(Abcam 公司);其它常用试剂为分析纯。

### 1.3 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定

无菌条件下,取健康产妇剖腹产后新鲜的胎儿脐带 15~20 cm,用 PBS 冲洗数遍至洗净残血后,以 0.1% 的 I 型胶原酶 37℃ 消化 20 min 后收集消化液,1 kr/min 离心 10 min,弃上清。加入含 15% 胎牛血清的 M199 完全培养液,放入 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内中 37℃ 培养。24 h 后换液,待细胞生长达铺满瓶底 80%~90%,以 0.25% 胰蛋白酶消化及传代,在倒置显微镜下观察细胞的形态,选择生长状态良好的第 2~3 代细胞用于实验。采用形态学和免疫细胞化学染色检测兔抗人 VIII 因子的表达对内皮细胞进行鉴定。

### 1.4 细胞分组

取 2~3 代细胞接种于 6 孔培养板,待细胞铺满 80%~90%,换用优化培养基孵育 24 h 使细胞同步化后,分组如下:①空白对照组:不加干预因素;②Hcy 组:不同作用浓度的 Hcy( $10^{-6}$  mol/L~ $10^{-3}$  mol/L)与细胞共同培养 24 h;③Hcy + 替米沙坦组:用不同作用浓度的替米沙坦(10、100 及 1000 nmol/L)分别与细胞培养 1 h,而后加入  $10^{-4}$  mol/L Hcy(根据②实验结果选取最佳浓度)与细胞共孵育 24 h;④Hcy + 替米沙坦 + PDTC 组: $10^{-5}$  mol/L PDTC(NF- $\kappa$ B 抑制剂)与细胞孵育 1 h 后加入  $10^{-4}$  mol/L Hcy 和 1000 nmol/L 替米沙坦(根据③实验结果选取最佳浓度)再与细胞共孵育 24 h。实验重复 3 次,每次每组设 3 复孔。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测 VCAM-1 mRNA 表达

收集上述各组细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞 RNA 1  $\mu$ g 据试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,再取逆转录产物 1  $\mu$ L 进行 PCR 扩增。VCAM-1 上游 5'-TTCCTAGCGTGTACCCCTGACC-3',下游 5'-CAGAAAGAGGCTGTAGCTCCCCGT-3',扩增片段 390 bp,95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,33 个循环;GAPDH 上游 5'-ACCACAGTCCATGC-CATCAC-3',下游 5'-TCCACCACCTGTTGCCTGTA-3',扩增片段 454 bp,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环。上述反应后,取 5  $\mu$ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,UVP 凝胶图像分析系统摄图,并分析各组目的基因及 GAPDH 基因的 OD 值,以两者的比值代表各基因的表达量。

### 1.6 免疫印迹法检测 NF- $\kappa$ B 和 VCAM-1 蛋白表达

各孔按蛋白提取试剂盒说明书加入细胞裂解缓冲液,于冰上裂解细胞,进行蛋白定量,按实验分组用微量加样器加 40  $\mu$ g 于凝胶的加样孔中,经电泳、转膜、封闭,加入一抗 4℃ 过夜,TBS 缓冲液洗膜 10 min  $\times$  3 次,加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔

IgG 37℃ 孵育 1 h, 发光剂 ECL 盒显色反应。用凝胶图像分析所得电泳图的平均光密度。

### 1.7 ROSE BENGAL 染色法检测单核细胞-血管内皮黏附功能

将 HUVEC 传代接种于 96 孔培养板 ( $1 \times 10^5$  个/孔), 培养过夜, 按上述分组进行药物干预 (12 孔/组)。继续培养 24 h, HUVEC 中加入 HL-60 细胞 ( $3 \times 10^9$  个/L) 100  $\mu$ L, 放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h, 用 PBS 洗去未黏附细胞, 倒置显微镜观察, 加入 0.25% 虎红, 100  $\mu$ L/孔, 室温作用 10 min, 洗去游离虎红, 加 PBS-乙醇 (1:1) 200  $\mu$ L/孔, 室温作用 1 h 后, 酶标仪 570 nm 测 OD 值, 用 OD 值大小表示黏附量<sup>[7,8]</sup>。

### 1.8 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件包统计, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hcy 对内皮细胞 VCAM-1 mRNA 表达的影响

$10^{-5} \sim 10^{-3}$  mol/L Hcy 促进 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达, 与空白对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ; 图 1 和表 1)。

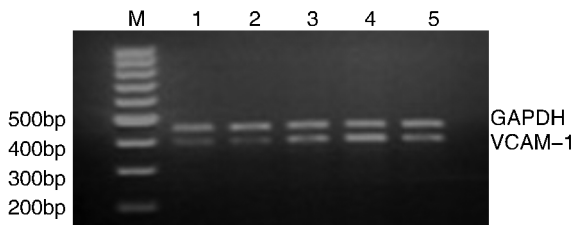


图 1. Hcy 对 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为空白对照组, 2 为 Hcy  $10^{-6}$  mol/L 组, 3 为 Hcy  $10^{-5}$  mol/L 组, 4 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组, 5 为 Hcy  $10^{-3}$  mol/L 组。

Figure 1. Effect of homocysteine on VCAM-1 mRNA expression in HUVEC

表 1. Hcy 对 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Effect of homocysteine on mRNA expression in HUVEC

分 组	VCAM-1 mRNA
空白对照组	0.172 ± 0.064
Hcy $10^{-6}$ mol/L 组	0.176 ± 0.037
Hcy $10^{-5}$ mol/L 组	0.781 ± 0.17 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L 组	1.152 ± 0.13 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-3}$ mol/L 组	0.527 ± 0.182 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

### 2.2 替米沙坦对 Hcy 诱导的内皮细胞 VCAM-1 mRNA 表达的影响

与 Hcy 组相比, 替米沙坦 (100 和 1000 nmol/L) 明显降低了内皮细胞 VCAM-1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ; 图 2 和表 2)。

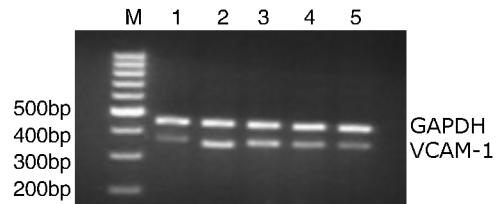


图 2. 替米沙坦对 Hcy 诱导的 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为空白对照组, 2 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L, 3 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 10 nmol/L 组, 4 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 100 nmol/L 组, 5 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L 组。

Figure 2. Effect of telmisartan on VCAM-1 mRNA expression induced by homocysteine in HUVEC

表 2. 替米沙坦 Hcy 诱导的 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 2. Effect of telmisartan on mRNA expression induced by homocysteine in HUVEC

分 组	VCAM-1 mRNA
空白对照组	0.166 ± 0.047
Hcy $10^{-4}$ mol/L 组	0.939 ± 0.18 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 10 nmol/L 组	0.726 ± 0.121 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 100 nmol/L 组	0.516 ± 0.129 <sup>ab</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L 组	0.234 ± 0.109 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较, b 为  $P < 0.01$ , 与 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组比较。

### 2.3 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞 VCAM-1 mRNA 表达的影响

与 Hcy 组相比, 替米沙坦和 PDTC 干预明显降低 Hcy 诱导 VCAM-1 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 而后二者之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ; 图 3 和表 3)。

表 3. 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的 HUVEC VCAM-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 3. Effect of telmisartan and PDTC on VCAM-1 mRNA expression induced by homocysteine in HUVEC

分 组	VCAM-1 mRNA
空白对照组	0.097 ± 0.018
Hcy $10^{-4}$ mol/L 组	0.785 ± 0.11 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L 组	0.295 ± 0.098 <sup>ab</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L + PDTC $10^{-5}$ mol/L 组	0.201 ± 0.094 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较, b 为  $P < 0.01$ , 与 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组比较。

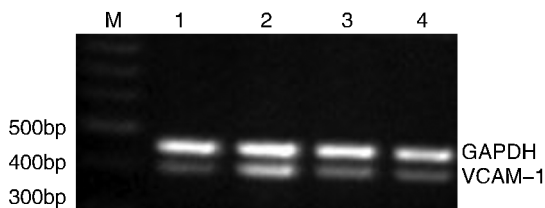


图 3. 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导 VCAM-1 mRNA 表达的影响 M 为 Marker,1 为空白对照组,2 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组,3 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L 组,4 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L + PDTC  $10^{-5}$  mol/L 组。

Figure 3. Effect of telmisartan and PDTC on VCAM-1 mRNA expression induced by homocysteine in HUVEC

### 2.4 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,  $10^{-4}$  mol/L Hcy 明显增加了内皮细胞 VCAM-1 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ )。与 Hcy 组相比, 替米沙坦和 PDTC 干预都明显降低了 Hcy 诱导的内皮细胞 VCAM-1 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ ), 而后二者之间比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ ; 图 4 和表 4)。

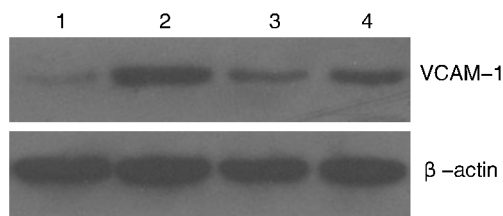


图 4. 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达的影响 1 为空白对照组,2 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组,3 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L 组,4 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L + PDTC  $10^{-5}$  mol/L 组。

Figure 4. Effect of telmisartan and PDTC on VCAM-1 protein expression induced by homocysteine in HUVEC

表 4. 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 4. Effect of telmisartan and PDTC on VCAM-1 protein expression induced by homocysteine in HUVEC

分 组	VCAM-1 蛋白
空白对照组	0.085 ± 0.022
Hcy $10^{-4}$ mol/L 组	0.781 ± 0.115 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L 组	0.186 ± 0.076 <sup>b</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L TIM 1000 nmol/L + PDTC $10^{-5}$ mol/L 组	0.275 ± 0.12 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较, b 为  $P < 0.01$ , 与 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组比较。

### 2.5 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,  $10^{-4}$  mol/L Hcy 明显增加了内皮细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ )。与 Hcy 组相比, 替米沙坦和 PDTC 干预都明显降低了 Hcy 诱导的内皮细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ ), 与替米沙坦组比较, PDTC 组对 Hcy 诱导的内皮细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的降低作用有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 图 5 和表 5)。

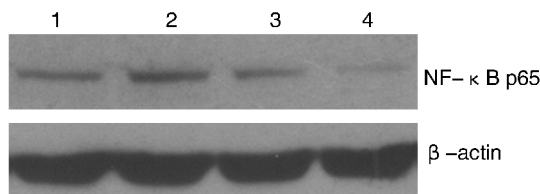


图 5. 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响 1 为空白对照组,2 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组,3 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L 组,4 为 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L + PDTC  $10^{-5}$  mol/L 组。

Figure 5. Effect of telmisartan and PDTC on NF- $\kappa$ B p65 expression induced by homocysteine in HUVEC

表 5. 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 5. Effect of telmisartan and PDTC on NF- $\kappa$ B p65 expression induced by homocysteine in HUVEC

分 组	NF- $\kappa$ B p65 蛋白
空白对照组	0.103 ± 0.017
Hcy $10^{-4}$ mol/L 组	0.187 ± 0.044 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L 组	0.089 ± 0.012 <sup>b</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L + PDTC $10^{-5}$ mol/L 组	0.045 ± 0.007 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较, b 为  $P < 0.01$ , 与 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组比较。

### 2.6 替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞与单核细胞黏附水平的影响

倒置显微镜下, 空白对照组只有少量 HL-60 细胞与内皮细胞黏附, 呈散状分布; Hcy 组可见大量 HL-60 细胞与内皮细胞黏附聚集, 成团成块; 替米沙坦组与 Hcy 组比较黏附细胞团块明显减少; PDTC 组较 Hcy 组也明显减少, 但减少程度不如替米沙坦组 (表 6 和图 6)。

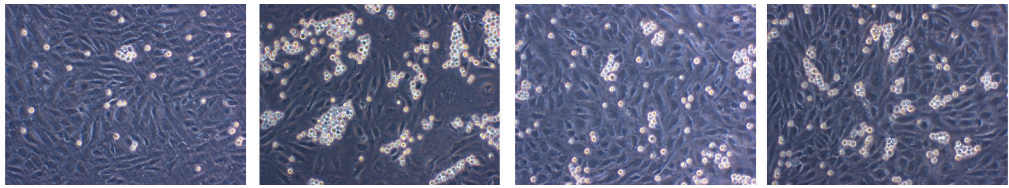


图 6. 倒置显微镜下观察替米沙坦、PDTC 对 Hcy 诱导的内皮细胞与单核细胞黏附水平的影响 从左到右依次为空白对照组、Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组、Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L 组和 Hcy  $10^{-4}$  mol/L + TIM 1000 nmol/L + PDTC  $10^{-5}$  mol/L 组。

Figure 6. Observing the effects of telmisartan and PDTC on the adhesion between endothelial cells and monocytes induced by homocysteine under inverted microscope

表 6. ROSE BENGAL 染色法检测内皮细胞与单核细胞的黏附水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 6. ROSE BENGAL staining method was used to measure adhesion between endothelial cells and monocytes

分 组	OD 值
空白对照组	0.244 ± 0.092
Hcy $10^{-4}$ mol/L 组	0.573 ± 0.075 <sup>a</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L 组	0.296 ± 0.111 <sup>b</sup>
Hcy $10^{-4}$ mol/L + TIM 1000 nmol/L + PDTC $10^{-5}$ mol/L 组	0.339 ± 0.022 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较, b 为  $P < 0.01$ , 与 Hcy  $10^{-4}$  mol/L 组比较。

### 3 讨 论

Hcy 是蛋氨酸循环的代谢产物, 血浆 Hcy 水平升高参与了 As 的发病机制, 被认为是心脑血管疾病的独立危险因素<sup>[9,10]</sup>, 本研究发现 Hcy 呈浓度依赖性促进了体外培养的 HUVEC VCAM-1 mRNA 的表达, 也增加了内皮细胞和单核细胞的黏附水平。VCAM-1 是免疫球蛋白家族成员之一, As 早期其促使单核细胞向内皮黏附, 进展期则促进单核细胞迁移入内皮下层转化为巨噬细胞摄取脂质转化为泡沫细胞, 在 As 整个炎症反应过程中均起着重要的作用。Koga 等<sup>[11]</sup>用 Hcy (0 ~ 100 mol/L) 处理人主动脉内皮细胞 (HAEC) 20 h 后明显地提高了 VCAM-1 的表达水平并增加了 HAEC 和 U937 细胞的黏附水平。还有学者报道 Hcy 处理 HAEC 后使 VCAM-1 的表达水平增加了 5 倍以上<sup>[12]</sup>。以上研究结果均表明 Hcy 可通过促进内皮细胞 VCAM-1 的表达及增加内皮细胞与单核细胞的黏附作用参与了 As 的加速形成过程。

近年来, 替米沙坦大量应用于心脑血管 As 疾病的临床治疗, 且其抗炎、抗氧化、保护内皮等作用成为研究重点<sup>[13,14]</sup>。国内有研究<sup>[15,16]</sup>证实了替米沙坦改善血管内皮细胞的形态、功能从而预防 As 和心

血管疾病的效果。本研究中, 替米沙坦可明显地降低 Hcy 诱导的 HUVEC VCAM-1 的表达水平。这与 Cianchetti 等<sup>[17]</sup>研究结果相符合。由此表明替米沙坦可通过降低内皮细胞 VCAM-1 的表达来改善 Hcy 所致的内皮细胞炎性损伤, 起到抗 As 的作用。

其次, 本研究还观察到: 替米沙坦在抑制 Hcy 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达的同时也明显地抑制了内皮细胞 NF- $\kappa$ B 的表达。NF- $\kappa$ B 以同源或异源二聚体的形式存在于胞浆, 以 p50/p65 异源二聚体最为常见, 其中 p65 蛋白含有 C 末端转录激活域, 是 NF- $\kappa$ B 对靶基因发挥转录调节作用的关键亚基。本研究选择 NF- $\kappa$ B p65 亚基作为靶基因, 观察到替米沙坦和 NF- $\kappa$ B 阻断剂 PDTC 均明显地抑制了 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达。这与前期研究结果阿托伐他汀通过抑制晚期糖基化终末产物诱导人内皮细胞 NF- $\kappa$ B 介导的炎症细胞因子表达, 进而抑制血管内膜炎性反应相吻合<sup>[18]</sup>。Nakano 等<sup>[19]</sup>的研究指出替米沙坦可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 的转录来抑制炎症因子的表达。还有研究表明替米沙坦可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号途径来负性调控炎症基因的转录<sup>[20]</sup>。Carluccio 等<sup>[21]</sup>研究结果显示, Hcy 可通过 NF- $\kappa$ B 介导的氧自由基诱导 HUVEC 的 VCAM-1 产生。由此表明替米沙坦有可能是通过抑制了 NF- $\kappa$ B 的激活来抑制同型半胱氨酸 (Hcy) 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达, 发挥抗炎和保护内皮的作用。

总之, 替米沙坦可通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性进而抑制炎症反应和内皮损伤发挥抗 As 作用, 具体机制还需进一步深入研究, 希望其在高同型半胱氨酸血症并发 As 中的治疗发挥更多更好的作用。

#### [参考文献]

- [1] Watanabe M, Inukai K, Sumita T, et al. Effects of telmisartan on insulin resistance in Japanese type 2 diabetic patients[J]. Int Med, 2010, 49: 1 843-847.
- [2] Sugimoto K, Qi NR, Kazdova L, et al. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects a-

- gainst weight gain and hepatic steatosis[J]. *Hypertension*, 2006, 47: 1 003-009.
- [3] Younis F, Stern N, Limor R, et al. Telmisartan ameliorates hyperglycemia and metabolic profile in nonobese Cohen-Rosenthal diabetic hypertensive rats via peroxisome proliferator activator receptor-gamma activation[J]. *Metabolism*, 2010, 59: 1 200-209.
- [4] Maejima Y, Okada H, Haraguchi G, et al. Telmisartan, a unique ARB, improves left ventricular remodeling of infarcted heart by activating PPAR gamma [J]. *Lab Invest*, 2011, 91: 6 932-944.
- [5] Kim HK, Choi YW, Lee EN, et al. 5-Hydroxymethylfurfural from black garlic extract prevents TNFalpha-induced monocytic cell adhesion to HUVECs by suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression, reactive oxygen species generation and NF-kappaB activation[J]. *Phytother Res*, 2011, 7. doi: 10.1002/ptr.3351.
- [6] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion[J]. *Clin Invest*, 1996, 7: 1 715-722.
- [7] Ma Y, Sun JN, Xu QP, et al. 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid inhibits adhesion of polymorphonuclear leukocyte to TNF-alpha-induced endothelial cells in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 246-250.
- [8] Ding M, Zhao GR, Yuan YJ, et al. Aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* regulates adhesion molecule expression of tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cells by blocking activation of nuclear factor kappaB [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 45: 516-524.
- [9] Guba SC, Fink LM, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia-an emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease[J]. *Am J Clin Pathol*, 1996, 106: 709-722.
- [10] Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 1997, 337: 230-236.
- [11] Koga T, Claycombe K, Meydani M. Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 161: 365-374.
- [12] Silverman MD, Tumuluri RJ, Davis M. Homocysteine up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 expression in cultured human aortic endothelial cells and enhances monocyte adhesion [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 587-592.
- [13] Nagai N, Oike Y, Noda K, et al. Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 2 925-931.
- [14] Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, et al. Changes in urinary albumin excretion, inflammatory and oxidative stress markers in ADPKD patients with hypertension[J]. *Am J Med Sci*, 2012, 343(1): 46-51.
- [15] 吴仕平, 陈明. 替米沙坦联合阿托伐他汀对糖尿病大鼠内皮细胞形态、功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(6): 542-547.
- [16] 龚丽娅, 蓝光明, 黄秋霞. 替米沙坦改善代谢综合征患者血管内皮功能[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(4): 431-434.
- [17] Cianchetti S, Del Fiorentino A, Colognato R, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of telmisartan in cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 198: 22-28.
- [18] 徐尚华, 王科峰, 许昌声, 等. 阿托伐他汀对晚期糖基化终末产物诱导的人内皮细胞单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 表达影响及其机制的实验研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 19(6): 512-517.
- [19] Nakano A, Hattori Y, Aoki C, et al. Telmisartan inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation independently of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. *Hypertens Res*, 2009, 32: 765-769.
- [20] Fouad AA, Jresat I. Protective effect of telmisartan against cadmium-induced nephrotoxicity in mice[J]. *Life Sci*, 2011, 89: 29-35.
- [21] Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, et al. Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of mediterranean diet polyphenolic antioxidants [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 4: H2 344-354.

(此文编辑 李小玲)