

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

新型二氫吡啶類鈣離子通過阻斷劑對血管平滑肌細胞以脂多醣體及
干擾素- γ 誘發發炎的保護作用及其分子調控機制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CN10029

執行期間：100 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

計畫主持人：劉淑芬

計畫參與人員：劉淑芬

執行單位：藥學系

中華民國 101 年 2 月 24 日



前言

心血管疾病中的粥狀動脈硬化 (atherosclerosis) 是一種與血管功能異常相關的慢性發炎性疾病 (Ross, 1999)。在臨床及病理觀察顯示，血中膽固醇過高為動脈硬化的一大危險因子，其會誘發一連串的發炎反應驅使血管壁內皮細胞功能喪失、血壓上升與平滑肌細胞增生等。因為當血中低密度脂蛋白 (LDL) 過多的時候，便會受氧化，被巨噬細胞吞噬而沉積在血管壁上，降低血管的彈性，造成所謂的硬化。在近年的研究報告中也指出，動脈硬化的進程是一連串的發炎反應，當血管受到傷害、血脂堆積的時候，血管表面會表現出 ICAM、VCAM 等附著因子，並且會釋放 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 等發炎媒介物質或化學趨向物質，吸引單核球進入血管壁，並使平滑肌細胞增生等一連串的發炎反應 (Glass & Witztum, 2001; Libby, 2002)。

鈣離子通道阻斷劑如 nifedipine、verapamil 與 diltiazem 可藉由抑制細胞外鈣離子的流入與細胞內鈣離子的釋放鬆弛心肌與平滑肌來治療心血管疾病如心絞痛、高血壓等，此類藥物同時亦具有抗粥狀動脈硬化的性質 (Lüscher et al., 2009)，亦具有抗氧化與冠狀動脈鬆弛的作用 (Yamagishi et al., 2008)。最近鈣離子通道阻斷劑也被期待用於降低內毒素血症的肝組織損傷 (Li et al., 2006)。許多鈣離子通道阻斷劑已經被用於限制心血管衰竭以及延長內毒素性休克的存活時間 (Wu et al., 2004)。有許多的報告指出不同的鈣離子拮抗劑，如 nifedipine 和 verapamil，都可以抑制 LPS 誘發的 TNF- α 表現以及將鈣離子從培養性的 Kupffer cells 中釋放出來 (Lichtman et al., 1996)。另外，也發現到在 LPS 毒性未發生前，用鈣離子通道拮抗劑 (如: diltiazem、nifedipine、verapamil) 預防治療老鼠時，可以減少血清中的 ALT (alanine aminotransferase) 和 iNOS 在肝臟中的表現 (Mustafa & Olson, 1999)。另外，許多研究顯示鈣離子通道阻斷劑在發炎的過程中具有保護作用，在以 LPS 誘發內毒素血症的動物模式中，鈣離子通道阻斷劑可以改善存活率與敗血症相關的代謝異常。此外，鈣離子通道阻斷劑也可調節發炎時發炎細胞激素 (TNF- α , IL-1 α and IL-1 β) 或抗發炎細胞激素 (IL-10) 的釋放 (Sirmagul et al., 2006)。另外，幾項研究顯示鈣離子通道阻斷劑除了影響肌肉細胞也可透過抑制細胞外鈣離子的流入減少各種參與免疫反應的細胞活化如 T 細胞、肥大細胞以及巨噬細胞 (Szabó et al., 1993)。

利用化學合成方法合成的新型二氫吡啶類 (1,4-dihydropyridine) 鈣離子通道阻斷劑 labedipinedilol-A，透過細胞及動物實驗證實除了具有降低自發性高血壓鼠和 Deoxycorticosterone acetate (DOCA) 誘發高血壓鼠的血壓外，也可藉由干擾細胞生長週期的進行以及抑制 proline-rich tyrosine kinase 2、protein kinase C 和鈣離子相關的 MEK-ERK 路徑來達到抑制血管平滑肌細胞增生的作用 (Liou et al., 2004)。最近的研究也顯示 labedipinedilol-A 可透過減少 ROS 的生成與細胞凋亡來防止 lysophosphatidylcholine 所誘發的血管平滑肌細胞死亡 (Hsu et al., 2011)。但 labedipinedilol-A 是否具有抗發炎的作用以及是否可藉由減少細胞內鈣離子濃度的上升來減少 LPS 所誘發的發炎反應都尚未被研究，為了評估 labedipinedilol-A 的抗發炎活性與作用機轉，擬進行以 LPS 誘發小鼠內毒素血症 (endotoxemic model) 的動物實驗與發炎的細胞實驗作為研究模式，我們預期 labedipinedilol-A 能在發炎反應中扮演抑制的角色，並透過抗發炎的機制來減少粥狀動脈硬化的形成。Lercanidipine 是另一個長效型的二氫吡啶類鈣離子通道阻斷劑，先前的研究



指出lercanidipine 可透過抗氧化的作用來抑制血管平滑肌細胞增生以減少粥狀動脈硬化的形成 (Wu et al., 2009) 。然而，lercanidipine 是否對LPS導致的血管功能障礙 (vascular dysfunction) 具有抗發炎的作用及可能的抗發炎分子調控機制也尚未被詳細報告，故本計畫中個也一併加入並比較2種二氫吡啶類鈣離子通道阻斷劑的抗發炎活性與機轉。

實驗方法

一、一氧化氮測定 (nitric oxide analysis): 將 10^6 個細胞種於 6 孔培養盤中，24 小時後細胞投與不同的藥物及其不同濃度一小時後，再加入 LPS (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/IFN- γ (100 U/ml) 培養 24 小時後，吸取 150 μl 上清液至 96 孔盤中，加入 150 μl 的 Griess Reagent 均勻混合後，測量 540 nm 吸光值。與檢量線比較後即可計算出上清液所含 nitrite 量。

二、測定 IL-1 β 、TNF- α 含量 (ELISA): 將 10^5 個細胞種於 24 孔培養盤中，24 小時後細胞投與不同的藥物及其不同濃度一小時後，再加入 LPS (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/IFN- γ (100 U/ml) 培養 24 小時後，吸取上清液並用 IL-1 β 、TNF- α 的 ELISA kit 測定其含量。

三、西方點墨法 (Western blotting): 蛋白質濃度以 Bio-Rad DC Protein Assay 測量。得知濃度後，以二次蒸餾水稀釋至特定濃度，取稀釋蛋白液約四分之一體積的 sample buffer 加入後，放置於沸水中 5 分鐘，再置於冰上 5 分鐘，短暫離心後即可注入至孔洞中。先以電壓 100 伏特跑 10 分鐘，待蛋白質跑至上下膠界面處後，再將電壓轉至 200 伏特，待 40 分鐘後即關閉電源。將 PVDF membrane 先以甲醇浸泡 2 分鐘，再用二次蒸餾水潤洗後，再浸泡於 transfer buffer 中 15 分鐘備用。將 SDS-PAGE 置於 membrane 上，上下以潤濕的紙墊包夾後，置於 semi-dry transfer 機器上扣好電極和上蓋後，以 20 伏特轉漬 30 分鐘。修剪 membrane 得到特定分子量的 band 後，加入適量 blocking buffer (5 % 脫脂奶粉於 washing buffer) 室溫下搖晃 1 小時以去除非特异性結合，再以稀釋過的一級抗體均勻覆蓋於 band 上 4 $^{\circ}\text{C}$ 作用隔夜。之後吸起一級抗體後，以 washing buffer 洗 5 分鐘六次。在將稀釋後的二級抗體均勻覆蓋於 band 上室溫作用 1 小時，之後再以 washing buffer 洗 5 分鐘六次，即可用 ECL 壓片。

結果與討論

為了了解 labedipinedilol-A 與 lercanidipine 在粥狀動脈硬化-血管發炎方面的藥理作用，我們先對 2 種鈣離子通道阻斷劑進行初步篩選實驗，以 MTT 試驗發現 2 種鈣離子通道阻斷劑即使濃度使用到 10 μM ，也不會造成細胞死亡，意即以下的實驗劑量不會造成細胞毒性而增加其抗發炎作用 (Figure 1)。以不同濃度的 nifedipine、labedipinedilol-A 與 lercanidipine (1、10 μM) 分別投予至大鼠胸主動脈血管平滑肌細胞的細胞培養液中，同時也給予 LPS (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/ IFN- γ (100 U/ml) 刺激 24 小時發現 iNOS protein 與 iNOS mRNA 的表現可在 LPS 組中被誘發出來，而 labedipinedilol-A 與 lercanidipine 對 LPS /IFN- γ 所誘發的 iNOS protein 與 iNOS mRNA (Figure 2) 具有不同程度的抑制作用。另外，lercanidipine 的抗發炎作用較偏向同時抑制 TNF- α 以及 IL-1 β ; labedipinedilol-A 則是在 TNF- α 抑制有較強的作用 (Figure 3)。總結來說，從我們的結果可知，eugenolol 及 glyceryl-isoeugenol 的抗 iNOS、TNF- α 以及 IL-1 β 表現作用可能是經由阻斷



MAPKs (Figure 4)及 Akt/I κ B α 磷酸化 (Figure 5) 表現來抑制下游 NF- κ B 等轉錄因子的表現與活化而來 (Figure 6)。

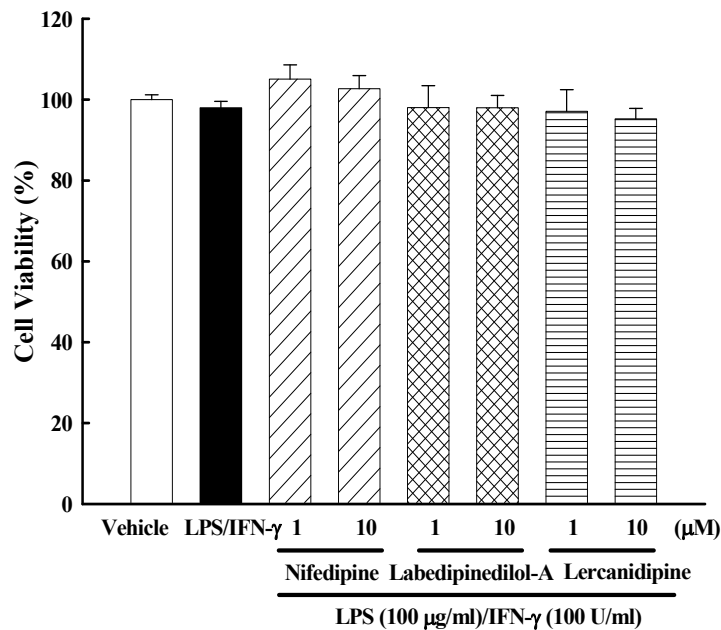


Fig. 1. Effects of nifedipine, labedipinedilol-A or lercanidipine on cell viability of RASMCs. Cells were treated for 24 h with 100 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml interferon (IFN)- γ in the absence or presence of indicated concentrations of three CCBs. Cell viability was measured by an MTT assay. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments, with triplicate determinations in each experiment.

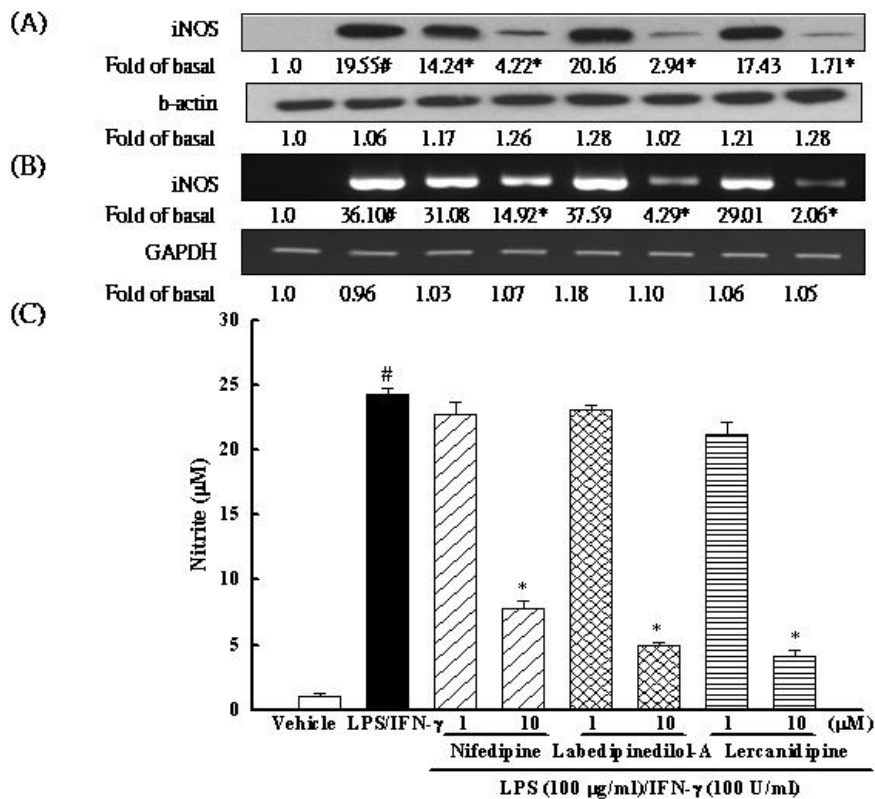
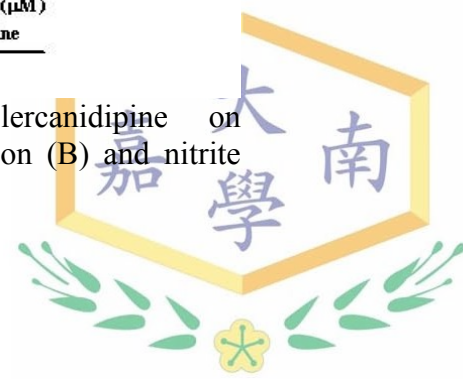


Fig. 2. Effects of nifedipine, labedipinedilol-A or lercanidipine on LPS/IFN- γ -stimulated iNOS protein (A), iNOS mRNA expression (B) and nitrite



production (C) in RASMCs. Cells were pretreated with 1 and 10 μM of three CCBs for 1 h followed by incubation with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml interferon (IFN)- γ for 24 h. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments, with triplicate determinations in each experiment. # $p < 0.05$ compared with the vehicle; * $p < 0.05$ compared with LPS/IFN- γ alone.

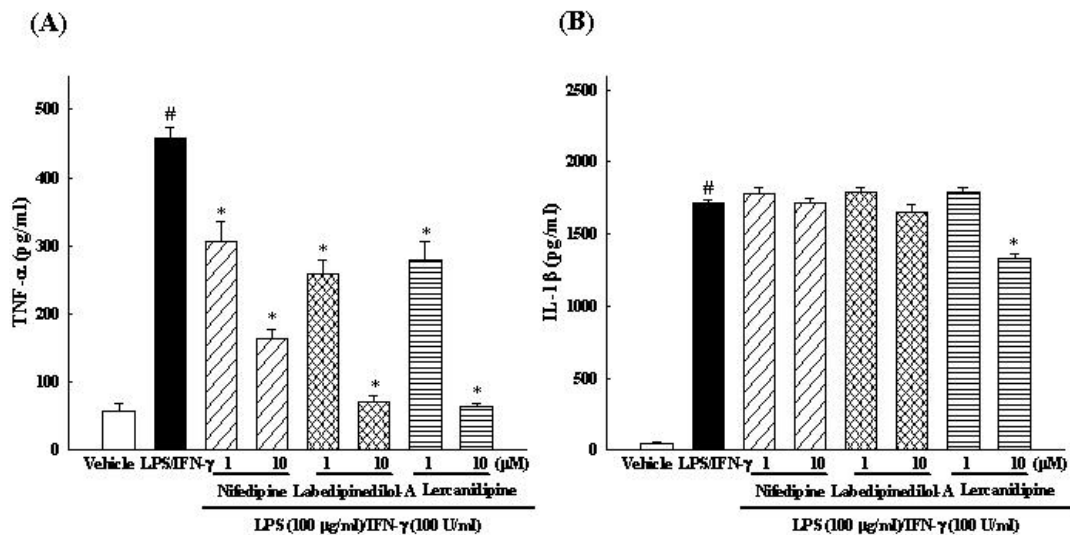


Fig. 3. Effects of nifedipine, labedipinedilol-A or lercanidipine on LPS/IFN- γ -stimulated TNF- α (A) and IL-1 β (B) production. Cells were pretreated with 1 and 10 μM of three CCBs for 1 h followed by incubation with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml interferon (IFN)- γ for 12 h. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments, with triplicate determinations in each experiment. # $p < 0.01$ compared with the vehicle; * $p < 0.05$ compared with LPS/IFN- γ alone.

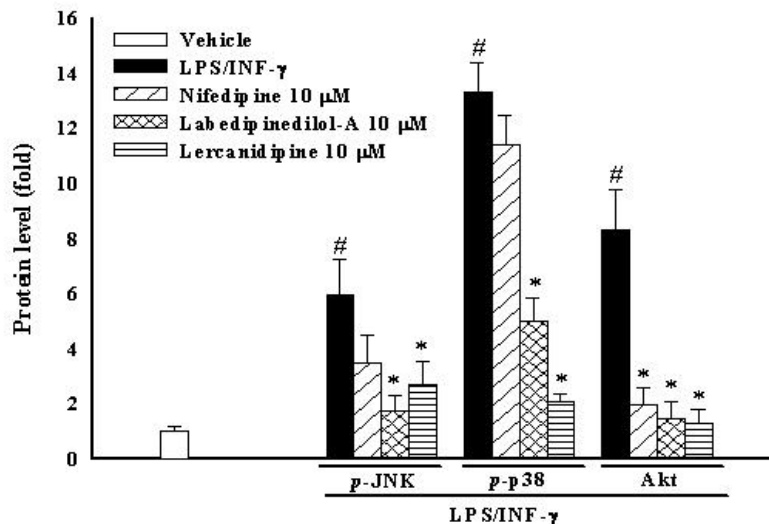


Fig. 4. Effects of nifedipine, labedipinedilol-A or lercanidipine on LPS/IFN- γ -stimulated phosphorylation of MAPKs and Akt. Cells were pretreated with or without three CCBs for 1 h and then treated in the absence or presence of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml interferon (IFN)- γ for 30 min. The total MAPK levels were used as internal controls. Similar results are obtained from three independent experiments.



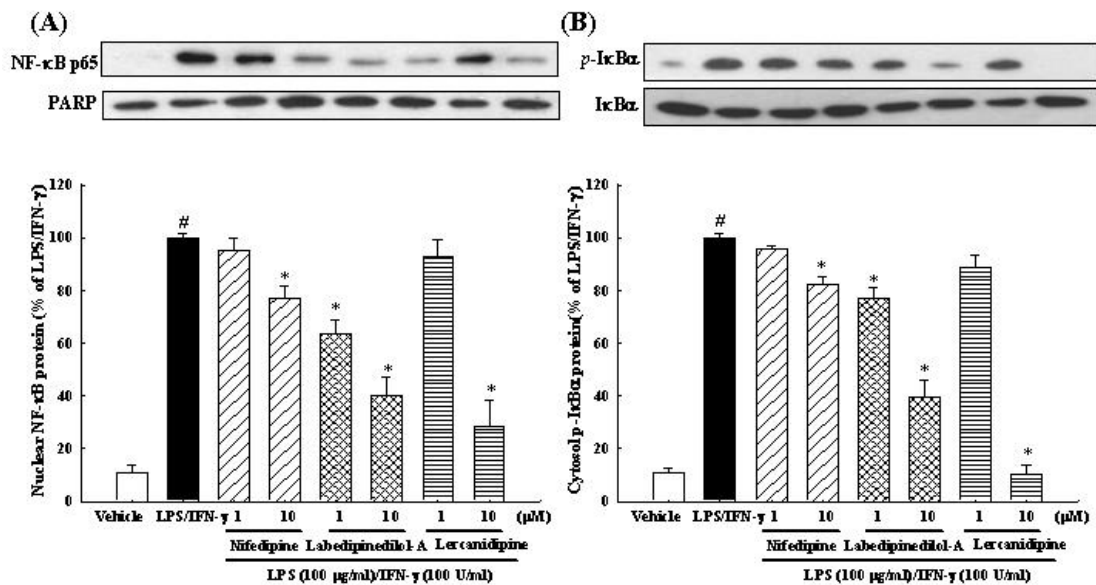


Fig. 5. Effects of nifedipine, labedipinedilol-A or lercanidipine on LPS/IFN- γ -stimulated nuclear factor (NF)- κ B protein level, phosphorylated inhibitory factor- κ B (I κ B)- α protein level and I κ B- α expression in RASMCs. Cells were pretreated with or without three CCBs for 1 h and then treated in the absence or presence of 100 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml interferon (IFN)- γ for 30 min. The nuclear fractions were used to analyze the protein content of NF- κ B protein, and the cytosolic fractions were used to analyze the protein content of I κ B- α and phosphorylated I κ B- α protein by Western blotting. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments, with triplicate determinations in each experiment. [#] $p < 0.01$ compared with the vehicle ; * $p < 0.05$ compared with LPS/IFN- γ alone.

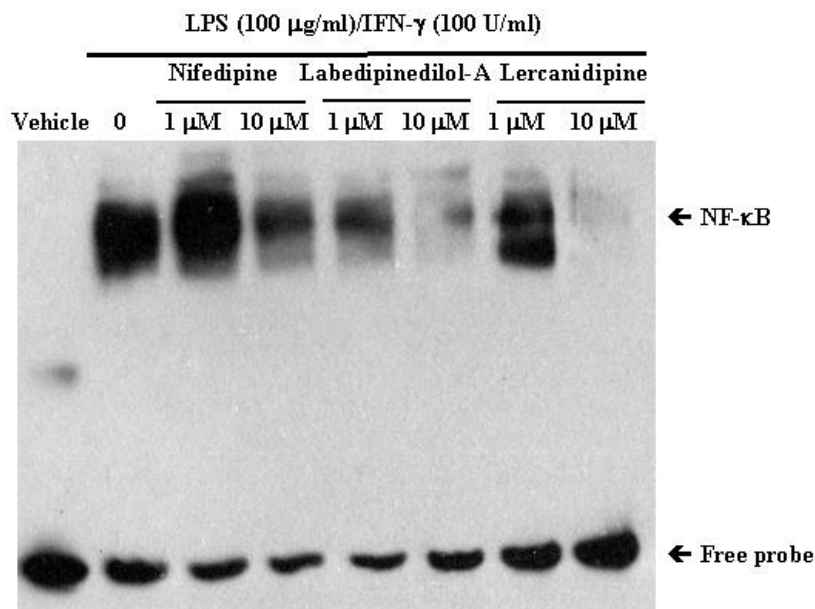
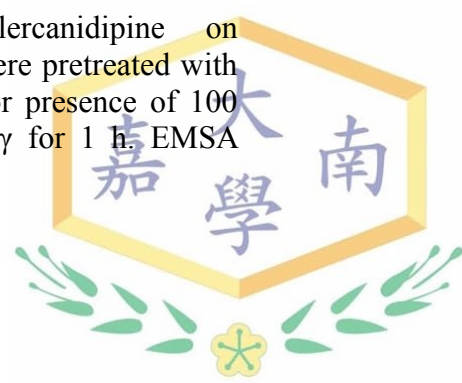


Fig. 6. Effects of nifedipine, labedipinedilol-A or lercanidipine on LPS/IFN- γ -stimulated DNA binding activity in RASMCs. Cells were pretreated with or without three CCBs for 1 h and then treated in the absence or presence of 100 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS) and 100 U/ml interferon (IFN)- γ for 1 h. EMSA



experiments of NF- κ B DNA-binding activity were carried out using the LightShift Chemiluminescent EMSA kit from Pierce Biotechnology. The position of the DNA-protein complex (NF- κ B) and the free oligonucleotide are indicated.

參考文獻

- Glass CK and Witztum JL. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-516.
- Hsu JH, Wu JR, Liou SF, Chen HM, Dai ZK, Chen IJ, Yeh JL. (2011) Labeledipinedilol-A prevents lysophosphatidylcholine-induced vascular smooth muscle cell death through reducing reactive oxygen species production and anti-apoptosis. *Atherosclerosis* 217(2):379-86.
- Li G, Qi XP, Wu XY, Liu FK, Xu Z, Chen C, Yang XD, Sun Z, Li JS. (2006) Verapamil modulates LPS-induced cytokine production via inhibition of NF-kappa B activation in the liver. *Inflamm Res* 55(3):108-113.
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
- Lichtman SN, Wang J, Zhang C, Lemasters JJ. (1996) Endocytosis and Ca^{2+} are required for endotoxin-stimulated TNF-alpha release by rat Kupffer cells. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):G920-8.
- Liou SF, Yeh JL, Liang JC, Chiu CC, Lin YT, Chen IJ. (2004) Inhibition of mitogen-mediated proliferation of rat vascular smooth muscle cells by labeledipinedilol-A through PKC and ERK 1/2 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 44(5):539-551.
- Lüscher TF, Pieper M, Tendera M, Vrolix M, Rutsch W, van den Branden F, Gil R, Bischoff KO, Haude M, Fischer D, Meinertz T, Münzel T. (2009) A randomized placebo-controlled study on the effect of nifedipine on coronary endothelial function and plaque formation in patients with coronary artery disease: the ENCORE II study. *Eur Heart J* 30 (13):1590-1597.
- Mustafa SB, Olson MS. (1999) Effects of calcium channel antagonists on LPS-induced hepatic iNOS expression. *Am J Physiol* 277(2 Pt 1):G351-60.
- Ross R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2):115-126.
- Sirmagul B, Kilic FS, Tunc O, Yildirim E, Erol K. (2006) Effects of verapamil and nifedipine on different parameters in lipopolysaccharide-induced septic shock. *Heart Vessels* 21(3):162-168.
- Szabó C, Mitchell JA, Gross SS, Thiemermann C, Vane JR. (1993) Nifedipine inhibits the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther* 265(2):674-80.
- Wu SC, Liu CP, Chiang HT, Lin SL. (2004) Prospective and randomized study of the antihypertensive effect and tolerability of three antihypertensive agents, losartan, amlodipine, and lisinopril, in hypertensive patients. *Heart Vessels* 19(1):13-8.
- Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T. (2008) Role of oxidative stress in the development of vascular injury and its therapeutic intervention by nifedipine. *Curr Med Chem* 15(2):172-177.

