

五种钙通道阻滞剂抑制小鼠腹腔巨噬细胞释放过氧化氢¹

陈蔚如, 杨永新, 李迪民, 张欣怡², 郑慧琴, 陈 坚²

(新疆医学院药理教研室, ²药物分析教研室, 乌鲁木齐830054, 中国)

R 965.2

Inhibition of 5 calcium channel blockers on H₂O₂ release from mouse peritoneal macrophages

CHEN Wei-Ru, YANG Yong-Xin, LI Di-Min, ZHANG Xin-Yi², ZHENG Hui-Qin, CHEN Jian²
(Department of Pharmacology, ²Department of Pharmaceutical analysis, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT After the peritoneal macrophages from mice were incubated with different concentrations of calcium channel blockers for 3 h at 37°C, the macrophages were stimulated with opsonized zymosan for 1.5 h at 37°C. The released H₂O₂ was measured by fluorescence assay. The results showed that verapamil (Ver), nifedipine (Nif), nicardipine (Nic), nimodipine (Nim), and nitrendipine (Nit) reduced the H₂O₂ release significantly in a dose-dependent manner. The IC₅₀ values (μmol·L⁻¹) were 30, 50, 49, 63, and 92 for Nic, Nif, Nim, Nit, and Ver, respectively. There was slight inhibition of dihydropyridine (Bay k 8644) 10 μmol·L⁻¹ on H₂O₂ release. When Bay k 8644 at above concentration combined with Ver, Nim, and Nit 25 μmol·L⁻¹, respectively, the inhibitions of Ver, Nim, and Nit on H₂O₂ release were increased 32%—40%. Above results showed that on the inhibition of H₂O₂ release, the effects of dihydropyridines calcium channel blockers were greater than that of Ver, and the effects of Nic and Nif were greater than those of Nim and Nit. The acting site of Bay k 8644 at high concentration (10 μmol·L⁻¹ and over) was probably different from that of typical calcium channel blockers Nim, Nit, and Ver in macrophages.

KEY WORDS nicardipine; nifedipine; nimodipine; nitrendipine; verapamil; dihydropyridines; hydrogen peroxide; macrophages; zymosan; drug combinations

Received 1991-01-21

Accepted 1992-12-22

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 3870891.

摘要 用调理的酵母聚糖刺激小鼠腹腔巨噬细胞, 发现5种钙通道阻滞剂以浓度依赖的方式抑制 H₂O₂ 的释放。IC₅₀ (μmol·L⁻¹) 分别是: Nic 30; Nif 50; Nim 49; Nit 63; Ver 92。Bay k 8644 10 μmol·L⁻¹ 分别和 Ver、Nim、Nit 25 μmol·L⁻¹ 合用时, 可明显增强后3药对 H₂O₂ 释放的抑制作用, 提示高浓度的 Bay k 8644 在巨噬细胞的作用点不同于 Nim、Nit 和 Ver。

关键词 尼卡地平; 硝苯地平; 尼莫地平; 尼群地平; 维拉帕米; 双氢吡啶; 过氧化氢; 巨噬细胞; 酵母聚糖; 合并用药

钙通道阻滞剂

H₂O₂ 是一种重要的氧自由基, 氧自由基与炎症的发生、发展及组织细胞的损害有密切关系⁽¹⁻³⁾。我们已经证明钙通道阻滞剂维拉帕米 (verapamil, Ver), 硝苯地平 (nifedipine, Nif) 和尼卡地平 (nicardipine, Nic) 具有抗炎作用⁽⁴⁾。观察药物对氧自由基产生和释放的影响, 是探讨药物抗炎机制的重要方面。本文观察5种钙通道阻滞剂 Nic、Nif、Ver、尼莫地平 (nimodipine, Nim)、尼群地平 (nitrendipine, Nit) 及钙通道激动剂双氢吡啶 (dihydropyridine, Bay k 8644, Bay) 对小鼠腹腔巨噬细胞释放 H₂O₂ 的影响。

MATERIALS AND METHODS

小鼠 C57BL/6小鼠, 鼠龄9—10 wk, ♀♂兼用, 由新疆医学院动物室提供。

药品和试剂 Nic (河北张家口东风制药厂), Nif (新疆制药厂), Nit (河北石家庄新华制药厂), Nim (山东新华药厂), Bay (德国 Bayer 药厂), 上述药物以 30% ETOH 溶解后, 以培养液稀释至所需浓度, ETOH 终浓度 < 3%。Ver 针剂 (Orion 厂), H₂O₂ (AR, 上海桃浦化工厂), 含量用 uv 分光光度仪标定。莨菪亭 (scopolantin, RUKA, Switzerland) 于磷酸缓

冲液中(PBS, pH 7.4), 37°C水浴24 h至完全溶解, 分装, -20°C避光贮存. 酵母聚糖(zymosan, Sigma)经同种小鼠血清调理, -20°C贮存备用. 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HPO, 中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂), RPMI 1640培养基(GABC, USA). Krebs-Ringer phosphate buffer with glucose (KRPG)组成(mmol·L⁻¹): NaCl 120, KCl 4.8, CaCl₂ 0.54, MgSO₄ 1.2, glucose 5.5, sodium phosphate buffer 15.6, pH 7.4.

H₂O₂测定⁽⁹⁾ 小鼠断头放血处死, 用冰冷的D-Hank's液(pH 7.2)灌洗腹腔, 收集细胞, 以2×10⁶细胞分样, 110×g离心10 min, 弃上清液, 加入10%的小牛血清RPMI 1640培养液(pH 7.4) 1 ml及不同浓度的药物, 5% CO₂培养箱37°C培养3 h. Trypan blue排斥试验表明, 细胞活度达98%. 弃培养液, KRPG洗2遍, 以洗去未贴壁细胞, 巨噬细胞纯度达90±3%. 每管再加入2 ml反应液, 即1 ml KRPG内含scopolantin 10 nmol, HPO 20 μg, zymosan 50 μg, 37°C培养1.5 h, 110×g离心5 min, 取上清液测荧光强度. 激发波长380 nm, 发射波长460 nm, 以不含细胞的空白管荧光强度为100%, 计算各实验管的相对荧光强度, 以在上述同样反应条件下制备的H₂O₂标准曲线的直线回归方程 $Y=90.2-51.3X$ ($r=-0.9913$)计算H₂O₂的释放量.

仪器 岛津 RF-540荧光分光光度仪.

RESULTS

Zymosan 刺激 H₂O₂的释放 用 zymosan 50 μg·ml⁻¹刺激巨噬细胞, 于不同时间测定H₂O₂的释放量, 结果随刺激时间的延长, H₂O₂的释放量(nmol·L⁻¹/10⁶ cells)增加. 在5和30 min时H₂O₂的释放很少, 分别为0.58±0.07 ($n=5$)和0.64±0.07 ($n=3$), 而在1.5 h和2 h, H₂O₂的释放明显增多, 为1.96±0.55 ($n=4$)和3.57±0.92 ($n=4$). 正式实验的刺激时间为1.5 h.

药物对 H₂O₂释放的影响 5种钙拮抗剂均浓度依赖地抑制H₂O₂的释放, 其中Nic和Nif在10或2.5 μmol·L⁻¹即可产生显著抑制作用, 而Nim、Nit和Ver在25或50 μmol·L⁻¹还不能产生显著作用. Bay 10 μmol·L⁻¹产生轻度抑制H₂O₂释放的作用, 当其10 μmol·L⁻¹和Nim、Nit、Ver 25 μmol·L⁻¹合用时, 则使后3药的抑制作用明显增强, 使抑制率增加32-40%, 而和Nif或Nic 25或10 μmol·L⁻¹合用时, 无明显增强抑制的作用(Tab 1).

Tab 1. Effects of 5 calcium channel blockers and Bay k 8644 on opsonized zymosan induced release of H₂O₂ from mouse peritoneal macrophages. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control. † $P > 0.05$, †† $P < 0.05$, ††† $P < 0.01$ vs single calcium channel blocker at 10 or 25 μmol·L⁻¹. Number of mice in parentheses.

μmol·L ⁻¹	Hydrogen peroxide, nmol·L ⁻¹ /(10 ⁶ cells·h)				
	Nicardipine	Nifedipine	Nimodipine	Nitrendipine	Verapamil
Blank control	0.28±0.05 (15)				
Control	1.54±0.59 (28)	2.63±0.61 (5)	1.07±0.37 (4)	0.83±0.19 (10)	1.14±0.27 (5)
2.5	1.22±0.16* (6)	1.82±0.50** (7)	1.03±0.36* (7)	0.93±0.22* (13)	1.08±0.34* (5)
10	1.01±0.38*** (22)				
25	0.91±0.21** (7)	1.66±0.37*** (7)	0.92±0.26* (7)	0.73±0.18* (13)	1.07±0.35* (7)
50	0.49±0.11*** (7)	1.28±0.24*** (7)	0.45±0.05** (7)	0.47±0.23*** (13)	0.92±0.30* (7)
100	0.23±0.01*** (11)	0.75±0.17*** (7)	0.36±0.02*** (7)	0.28±0.03*** (7)	0.48±0.19*** (7)
IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	30	50	49	63	92
Bay k 8644 10 + Calcium channel blockers					
+25		1.48±0.33***†† (7)	0.50±0.11***††† (7)	0.46±0.12***††† (6)	0.62±0.25***†† (5)
+10	0.89±0.33** (7)				
Bay k 8644 10	1.35±0.34* (12)				

以各药浓度和抑制百分率得到的回归方程计算 IC_{50} (Tab 1). 由 IC_{50} 可以看出, 二氢吡啶类药物的作用均比 Ver 强, 而在二氢吡啶类钙拮抗剂中以 Nic 和 Nif 的作用较强, 但巨噬细胞对 Nif 的作用更敏感.

DISCUSSION

H_2O_2 及其衍生物在炎症反应及导致的组织损伤方面起重要作用. 钙通道阻滞剂抑制 H_2O_2 的产生和释放, 这是它们发挥抗炎和组织保护的重要机制.

吞噬细胞呼吸爆发产生超氧化物的过程和 Ca^{2+} 有密切关系⁽⁶⁻⁸⁾. 本实验中, 5种钙拮抗剂均能抑制 H_2O_2 的释放, 提示, 抑制 Ca^{2+} 动员可能是它们的共同基础.

Bay 是一个钙通道激动剂, 但在高浓度时产生 Ca 拮抗作用而抑制细胞功能⁽⁹⁾. 在本实验条件下, Bay $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有较弱的促进 H_2O_2 释放的作用, 而在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则产生显著抑制 H_2O_2 的释放 (资料未显示). Tab 1 显示, Bay 在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 已开始产生较弱的抑制作用, 其抑制率与 Nim、Nit $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的作用接近, 并强于 Ver $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的作用, 说明高浓度的 Bay 有钙拮抗剂的性质.

在结构上, Bay 属二氢吡啶类化合物⁽¹⁰⁾. 在本实验中, Bay 与 Nim、Nit、Ver 合用时, 明显增强 H_2O_2 释放的抑制作用, 这一现象揭示, 高浓度的 Bay 在巨噬细胞的作用点不仅与结构不同的 Ver 不同, 而且与同属二氢吡啶类的 Nim、Nit 也不同, 故合用后可产生协同效应. 但是 Bay 与结构类似的 Nic、Nif 合用时, 仅产生弱的增强 H_2O_2 释放的抑制作用, 推测高浓度 Bay 的作用点和 Nic、Nif 可能相同, 故合用后不能产生协同作用.

本文结果表明, 5种钙通道阻滞剂能够抑制巨噬细胞释放 H_2O_2 , 这是它们抗炎或组织保

护的机制之一. 巨噬细胞释放 H_2O_2 的过程, 对二氢吡啶类钙拮抗剂的抑制作用较 Ver 敏感. 高浓度的 Bay 具有钙拮抗剂的性质, 其在巨噬细胞的作用点与典型的钙通道阻滞剂 Nim、Nit 和 Ver 均不同.

ACKNOWLEDGMENTS 中国医学科学院药物研究所张均田教授赠送 Bay k 8644.

REFERENCES

- 1 Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107: 397-418.
- 2 Johnson KJ, Ward PA. Role of oxygen metabolites in immune complex injury of lung. *J Immunol* 1981; 126: 2365-9.
- 3 Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-26.
- 4 Chen WR, Yang YX, Zheng HQ, A SY, Liu F. Anti-inflammatory effects of verapamil, nifedipine and nicardipine. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11: 281-5.
- 5 Zheng YW, Ma DL, Chen MZ. Effects of luteolin on H_2O_2 release of peritoneal macrophages in rats. *Chin Pharmacol Bull* 1990; 6: 56-8.
- 6 Rossi F. The O_2^- -forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim Biophys Acta* 1986; 853: 65-89.
- 7 Hallett MB, Campbell AK. Direct measurement of intracellular free Ca^{2+} in rat peritoneal macrophages: correlation with oxygen-radical production. *Immunology* 1983; 50: 487-95.
- 8 Meshulam T, Diamond RD, Lyman CA, Wysong DR, Melnick DA. Temporal association of calcium mobilization, inositol triphosphate generation, and superoxide anion release by human neutrophils activated by serum opsonized and nonopsonized particulate stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 150: 532-9.
- 9 Fontaine J, Lebrun P. Pharmacological analysis of the effects of Bay k 8644 and organic calcium antagonists on the mouse isolated distal colon. *Br J Pharmacol* 1988; 94: 1198-206.
- 10 Schramm M, Thomas G, Towart R, Franckowiak G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. *Nature* 1983; 303: 535-7.