

氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞血小板源性生长因子 B mRNA 表达的影响

何 谨^{1,2}, 孟 军^{1,2}, 周志刚^{1,2}, 周 喜³, 涂 剑³, 涂玉林²

(南华大学 1. 附属第一医院, 2. 心血管病研究所, 3. 药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 氨氯地平; 氧化型低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 血小板源性生长因子 B

[摘要] 目的 观察氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的 HUVEC-12 内皮细胞中血小板源性生长因子 B mRNA 表达的影响, 从一个新的角度探讨氨氯地平的抗动脉粥样硬化作用机制。方法 预实验筛选出氧化型低密度脂蛋白对血小板源性生长因子 B 表达适宜的处理浓度 (50 mg/L) 与时间 (24 h)。实验分为 5 组: 对照组、氧化型低密度脂蛋白组和三个不同剂量 (0.1、1.0 和 10.0 μmol/L) 氨氯地平组, 用 RT-PCR 检测血小板源性生长因子 B mRNA 的表达。结果 以 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白刺激 HUVEC-12 内皮细胞 24 h。随着预处理氨氯地平浓度增加, 细胞血小板源性生长因子 B mRNA 的表达逐渐降低, 并呈现浓度依赖性, 当浓度为 10.0 μmol/L 时作用更明显。结论 氧化型低密度脂蛋白可影响 HUVEC-12 内皮细胞中血小板源性生长因子 B mRNA 的表达, 氨氯地平可下调氧化型低密度脂蛋白诱导的 HUVEC-12 内皮细胞中血小板源性生长因子 B mRNA 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Amlodipine on PDGF-B mRNA Expression in HUVEC-12 Endothelial Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

HE Jin^{1,2}, MENG Jun^{1,2}, ZHOU Zhi-Gang^{1,2}, ZHOU Xi³, TU Jian³, and TU Yu-Lin²

(1. The First Affiliated Hospital, 2. Institute of Cardiovascular Disease, 3. Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Amlodipine; Oxidized Low Density Lipoprotein; Human Umbilical Vascular Endothelial Cells; Platelet-Derived Growth Factor-B

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of amlodipine on platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) mRNA expression in HUVEC-12 endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to explore the new antiatherosclerotic role of amlodipine. **Methods** HUVEC-12 endothelial cells were treated with 50 mg/L ox-LDL for 24 hours through the preexperiment. The experiment groups included 5 groups: control group, ox-LDL group, different concentration (0.1, 1.0 and 10.0 μmol/L) of amlodipine pretreated for 0.5 h and treated with 50 mg/L ox-LDL for 24 h group.

RT-PCR was used to detect the mRNA expression of PDGF-B. **Results** RT-PCR analysis showed that with ox-LDL and amlodipine treatment, the mRNA expression of PDGF-B was greatly decreased in a concentration-dependent manner.

Conclusion Ox-LDL can affect the mRNA expression of PDGF-B in the HUVEC-12 endothelial cells. Amlodipine can down-regulate the mRNA expression of PDGF-B.

Conclusion Ox-LDL can affect the mRNA expression of PDGF-B in the HUVEC-12 endothelial cells. Amlodipine can down-regulate the mRNA expression of PDGF-B.

氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 是动脉粥样硬化 (As) 主要的危险因素之一, 它可以通过多种途径在 As 的起始和进展中起重要作用。其中 ox-LDL 激活内皮细胞, 促使其分泌血小板源性生长因子 B (PDGF-B), 促进血管平滑肌细胞增殖是致 As 的一

个重要环节^[1]。氨氯地平属第三代钙通道阻滞剂 (CCB), 近年来, 其降压以外的多效作用备受关注, 其中抗 As 作用尤为受到重视。大量证据证实, 氨氯地平还具有显著的抗 As 作用^[2,3], 但对其抗 As 作用的具体机制尚未阐明, 该药是否可影响 PDGF-B

[收稿日期] 2011-01-11

[基金项目] 湖南省医药卫生基金 (B2007101) 资助

[作者简介] 何谨, 硕士, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化的机制研究。通讯作者涂剑, 博士, 副教授, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 tujian0734@yahoo.com.cn。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的机制研究。

的表达,目前尚无报道。本研究旨在用 ox-LDL 刺激 HUVEC-12 内皮细胞,观察氨氯地平对 PDGF-B 表达的影响,进而探讨氨氯地平在其中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要试剂

HUVEC-12 内皮细胞购自中国科学院上海研究所细胞库,原料药氨氯地平粉剂由扬子江药业惠赠,总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒为美国 Promega 公司产品;引物由上海生工有限公司合成;2 × Taq PCR Master Mix 和 100 bp DNA Ladder 购自吉诺生物公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞分组

不同浓度 ox-LDL (0、25、50 及 100 mg/L) 与 HUVEC-12 内皮细胞共同孵育 24 h,筛选出 ox-LDL 对 PDGF-B 表达适宜的处理浓度 (50 mg/L),再以 50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC-12 内皮细胞不同时间 (0、3、6、12 及 24 h) 筛选出适宜的处理时间 (24 h)。实验分为 5 个实验组:对照组、ox-LDL 组、0.1、1.0 及 10.0 μmol/L 氨氯地平预先处理细胞 30 min 后加入 50 mg/L ox-LDL 共同孵育 24 h 组。

1.3 RT-PCR 检测 PDGF-B mRNA 的表达

PDGF-B 的引物序列:上游 5'-ATC GCC GAG TGC AAG ACG CG-3',下游 5'-AAG CAC CAT TGG CCG TCC GA-3',PCR 扩增产物长度为 586 bp。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,72℃ 终延伸 5 min。内参 GAPDH 产物长度为 240 bp。

1.4 统计学方法

所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 ox-LDL 对 HUVEC-12 内皮细胞 PDGF-B mRNA 表达的影响

随 ox-LDL 浓度增加 PDGF-B mRNA 的表达先上调后下降,当浓度为 50 mg/L 时,表达水平达峰值;但当浓度为 100 mg/L 时,表达下降(图 1)。因此,选择 ox-LDL 的处理浓度为 50 mg/L。

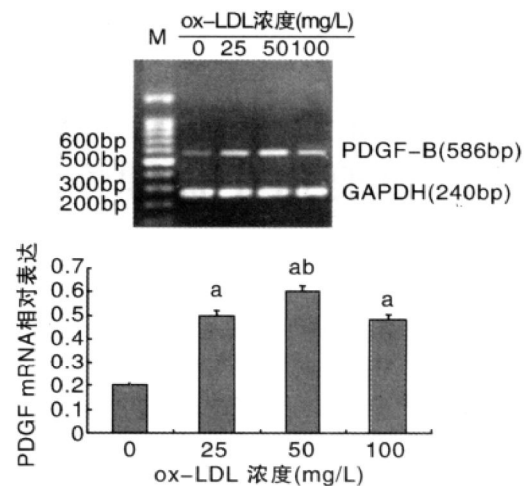


图 1. RT-PCR 检测不同浓度 ox-LDL 对 HUVEC-12 内皮细胞 PDGF-B mRNA 表达的影响 ($n=3$) M 为 100 bp marker。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 25 mg/L 组和 100 mg/L 组比较。

Figure 1. Effect of different concentrations of ox-LDL on PDGF-B mRNA expression in HUVEC-12 endothelial cells by RT-PCR detection

2.2 ox-LDL 处理 HUVEC-12 内皮细胞不同时间对 PDGF-B mRNA 表达的影响

PDGF-B mRNA 的表达随着 ox-LDL 处理时间的延长逐渐增加,在 24 h 时的表达最高(图 2)。因此,选择 ox-LDL 的处理时间为 24 h。

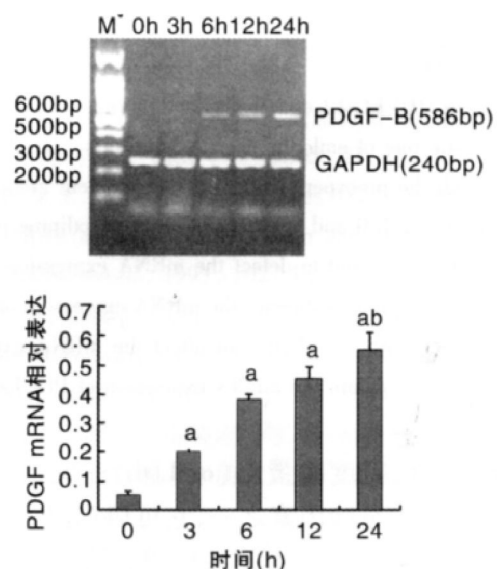


图 2. RT-PCR 检测 ox-LDL 处理 HUVEC-12 细胞不同时间后 PDGF-B mRNA 表达的变化 ($n=3$) M 为 100 bp marker。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 3、6 及 12 h 组比较。

Figure 2. Effect of different time of ox-LDL treatment on PDGF-B mRNA expression in HUVEC-12 endothelial cells by RT-PCR detection

2.3 氨氯地平对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 内皮细胞 PDGF-B mRNA 表达的影响

随着氨氯地平浓度增加, HUVEC-12 内皮细胞 PDGF-B mRNA 的表达逐渐减少, 并呈现浓度依赖性, 当浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时作用更明显(图 3)。

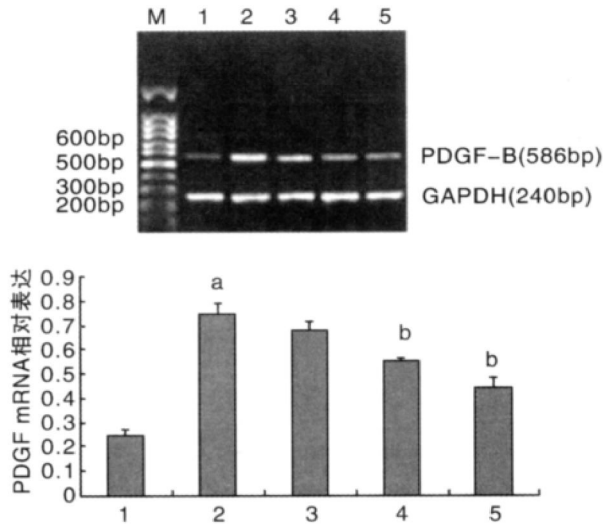


图 3. RT-PCR 检测不同浓度氨氯地平对 HUVEC-12 内皮细胞 PDGF-B mRNA 表达的影响 ($n=3$) M 为 100 bp marker。1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组, 4 为 ox-LDL + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平, 5 为 ox-LDL + 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 3. Effect of different concentrations of amlodipine on PDGF-B mRNA expression in HUVEC-12 endothelial cells by RT-PCR detection

3 讨论

As 的发病机制至今尚未完全阐明。在诸多危险因素中, ox-LDL 是启动 As 发生的重要环节, 通过多种途径在 As 的起始和进展中起重要作用。PDGF 是一种重要的促细胞分裂剂, 通过组织局部的特异性受体发挥作用, 可以刺激多种细胞分裂和增殖^[4]。大量研究发现, PDGF-B 与心血管疾病的发生发展关系非常密切。PDGF-B 是 As 形成过程中血管内皮细胞、血小板、单核巨噬细胞和血管平滑肌细胞 (VSMC) 之间相互作用的介质, 在 As 形成中有重要意义^[5-8]。本研究采用 ox-LDL 与 HUVEC-12 内皮细胞共同孵育, 结果发现, 随着 ox-LDL 浓度的升高, 处理时间的延长, PDGF-B mRNA 表达呈现上升趋势。说明 ox-LDL 可通过促进 PDGF-B 的表达, 促进 PDGF-B 的作用, 促进细胞分裂与增殖, 导致内皮

细胞损伤。这一结果与文献 [9] 报告一致。

氨氯地平是第三代新型长效 1,4-二氢吡啶类 CCB。其抗 As 作用可能与改善内皮功能、抗氧化应激、抗炎、抑制 VSMC 增殖与迁移及表型改变等有关^[10-15]。但其抗 As 作用的确切机制尚未阐明, 该药是否可影响 PDGF-B 的表达, 目前尚无报道。本研究用氨氯地平预处理细胞后再加入 ox-LDL 共同孵育, RT-PCR 检测结果发现, 随着氨氯地平浓度增加, PDGF-B mRNA 的表达逐渐减少, 并呈现浓度依赖性, 当浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时作用更明显。说明氨氯地平预处理可下调 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 内皮细胞中 PDGF-B mRNA 的表达, 通过抑制细胞分裂与增殖, 减轻内皮细胞损伤。有文献 [16] 报道, 选用蛋白激酶 C (PKC) 的抑制剂 (Calphostin C) 预处理细胞, 能明显抑制 TNF- α 对 PDGF-B mRNA 及蛋白的诱导作用, 还能阻断 TNF- α 诱导的核转录因子 κB (NF- κB) 等核转位及与 PDGF-B 启动子相应的 DNA 序列结合活性。提示 PKC 信号转导途径参与 PDGF-B 诱导过程, PKC 通过激活转录因子 NF- κB 介导 TNF- α 诱导的 PDGF-B 表达增加。另有研究证明, 分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 在 PDGF-B 表达的信号转导中也起着重要作用^[17]。进一步的实验, 我们将研究氨氯地平通过影响何种信号途径, 下调 PDGF-B 的表达。

综上所述, 我们认为 ox-LDL 可影响 HUVEC-12 内皮细胞 PDGF-B mRNA 的表达, 氨氯地平可下调 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 内皮细胞 PDGF-B mRNA 的表达。

【参考文献】

- [1] 齐晓云, 杨关林, 赏楠, 等. 比较不同中药方剂对兔动脉内膜损伤后血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(3): 535-537.
- [2] 李璇, 陈良, 张梅, 等. 氨氯地平对兔动脉粥样硬化及炎症因子妊娠相关血浆蛋白 A 作用的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(6): 444-448.
- [3] Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, et al. Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(2): 768-774.
- [3] Hoch R V, Soriano P. Roles of PDGF in animal development [J]. Development, 2003, 130: 4 679-684.
- [4] Tanaga K, Bujo H, Zhu Y, et al. LRP1B attenuates the migration of smooth muscle cells by reducing membrane localization of urokinase and PDGF receptors [J]. Arterio-

- scler Thromb Vasc Biol, 2004, 24: 1 422-428.
- [5] Tallquist M, Kazaluaskas A. PDGF signalling in cells and mice [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15: 205-213.
- [6] Brown XQ, Bartolak-Suki E, Williams C, et al. Effect of substrate stiffness and PDGF on the behavior of vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis [J]. J Cell Physiol, 2010, 225 (1): 115-122.
- [7] 林萍, 杨关林, 周鑫. 益气活血汤抑制实验兔 PDGF 表达和血管平滑肌细胞表型转变的研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11 (7): 200-202.
- [8] Zhang JH, Zhou L, Yin HC, et al. Effect of oxidized-LDL on NF- κ B nuclear translocation in aortic smooth muscle cells originated from rats of different ages [J]. Chin Med Sci J, 2005, 20 (2): 112-115.
- [9] Toba H, Nakagawa Y, Miki S, et al. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the n (g)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine [J]. Hypertens Res, 2005, 28 (8): 689-700.
- [10] Yoshii T, Iwai M, Li Z, et al. Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions [J]. Hypertens Res, 2006, 29 (6): 457-466.
- [11] Batova S, DeWever J, Godfraind T, et al. The calcium channel blocker amlodipine promotes the unclamping of eNOS from caveolin in endothelial cells [J]. Cardiovasc Res, 2006, 71 (3): 478-485.
- [12] Toba H, Shimizu T, Miki S, et al. Calcium channel blockers reduce angiotensin II induced superoxide generation and inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells [J]. Hypertens Res, 2006, 29 (2): 105-116.
- [13] Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, et al. Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286 (2): 768-774.
- [14] Ziesche R, Petkov V, Lambers C, et al. The calcium channel blocker amlodipine exerts its antiproliferative action via p21 (Waf1/Cip1) gene activation [J]. FASEB J, 2004, 18 (13): 1 516-523.
- [15] Kalthoff H, Roeder C, Humburg I, et al. Modulation of platelet-derived growth factor A- and B-chain/c-sis mRNA by tumor necrosis factor and other agents in adenocarcinoma cells [J]. Oncogene, 1991, 6 (6): 1 015-021.
- [16] Wang L, Gong F, Dong X, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nuclear orphan receptor Nur77 [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 341 (1-2): 159-166.

(此文编辑 文玉珊)