

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 CD40 表达的影响

涂光辉^{1,2}, 尹凯¹, 周志刚³, 孟军³, 熊紫薇⁴, 涂剑⁴, 罗招阳¹

(南华大学 1. 医学院; 3. 附属第一医院; 4. 药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖南省南县人民医院, 湖南省南县 413200)

[关键词] 氨氯地平; 氧化型低密度脂蛋白; HUVEC 12 内皮细胞; 白细胞分化抗原 40

[摘要] 目的 观察氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC 12)中白细胞分化抗原 CD40 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 实验分为 6 组: 对照组、10.0 μmol/L 氨氯地平单独处理组、ox-LDL 组、0.1、1.0 及 10.0 μmol/L 氨氯地平预先处理细胞 1 h 后加入 50 mg/L ox-LDL 共同孵育 24 h 组。用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CD40 mRNA 的表达, Western blot 检测 CD40 蛋白的表达。结果 随着氨氯地平浓度增加, 细胞 CD40 的 mRNA 和蛋白表达逐渐降低, 当浓度为 10.0 μmol/L 时作用更明显。结论 氨氯地平对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 12 细胞 CD40 的表达具有抑制作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Amlodipine on CD40 Expression in HUVEC 12 Endothelial Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

TU Guang Hui^{1,2}, YIN Kai¹, ZHOU Zhi Gang³, MENG Jun³, XIONG Zi Wei⁴, TU Jian⁴, and LUO Zhao Yang¹

(1. Medical College, 3. the First Affiliated Hospital, 4. Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. People's Hospital of County Nanxian, Nanxian County, Hunan 413200, China)

[KEY WORDS] Amlodipine; Oxidized Low Density Lipoprotein; HUVEC 12 Endothelial Cells; CD40

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of Amlodipine on CD40 expression in HUVEC 12 endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to explore the new antiatherosclerotic role of Amlodipine. **Methods** The experiment groups included 6 groups: control group, 10.0 μmol/L Amlodipine alone treated group, ox-LDL group, and different concentration (0.1, 1.0, 10.0 μmol/L) of Amlodipine pretreated for 1 h and treated with 50 mg/L ox-LDL for 24 h group. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of CD40 and western blot was used to detect the protein expression of CD40. **Results** RT-PCR and western blot showed that with ox-LDL and Amlodipine treatment, both mRNA and protein expression of CD40 were greatly decreased in a concentration dependent manner. **Conclusion** Amlodipine can have a significant effect on down regulating CD40 expression induced by ox-LDL.

白细胞分化抗原 CD40 是一种分子量为 45 ~ 50 kDa 的跨膜糖蛋白, 属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员。文献报道氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、热休克蛋白、血流动力学异常等可以诱导其表达^[1,3], CD40 与其配体(CD40 Ligand, CD40L)在内皮细胞, 尤其是动脉粥样硬化(As)斑块中的内皮细胞过量表达, CD40/CD40L 的相互作用促进入血管细胞释放白细胞介素 1(IL-1)、TNF-α 和基质金

属蛋白酶(MMP)等, 而这些细胞因子与 As 斑块的形成及破裂密切相关。氨氯地平是第三代钙通道阻滞剂, 可以较高密度插入细胞膜多不饱和脂肪酸分子附近, 提供质子给脂质过氧化分子, 阻断过氧化过程^[4]; 并且已有研究报道氨氯地平对部分炎症因子表达具有抑制作用^[5], 但是对其潜在作用机制还不清楚。通过对 ox-LDL 诱导血管内皮细胞炎症因子 CD40 表达以及氨氯地平抑制炎症因子表达作

[收稿日期] 2011-06-20

[基金项目] 湖南省卫生厅科技项目(B2007092, 2007101), 衡阳市科学技术发展项目(2010kj17)

[作者简介] 涂光辉, 副主任医师, 硕士研究生。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。通讯作者罗招阳, 教授, 硕士研究生导师。

用的观察,作者提出如下的工作思路:氨氯地平可能在 ox LDL 诱导的血管内皮细胞 CD40 表达中发挥作用。本实验旨在用 ox LDL 刺激人脐静脉内皮细胞,观察 CD40 表达的情况和氨氯地平的影响,进而探讨氨氯地平在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人脐静脉 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,逆转录聚合酶链反应试剂盒为美国 Promega 公司产品;引物由上海生工有限公司合成;小鼠抗人 CD40 单克隆抗体和 Western blot 荧光检测试剂盒为 Santa Cruz Biotechnology (USA) 产品;小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自康成生物科技公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗购自武汉博士德公司;BCA 蛋白定量试剂盒为 Hyclone Pierce 公司产品;RIPA 裂解液购自碧云天生物技术研究所,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞分组

实验分为 6 组:对照组、10.0 μ mol/L 氨氯地平单独处理组、50 mg/L ox LDL 孵育 24 h 组、0.1、1.0 及 10.0 μ mol/L 氨氯地平预先处理细胞 1 h 后加入 50 mg/L ox LDL 共同孵育 24 h 组。

1.3 RT-PCR 检测 CD40 mRNA 的表达

CD40 的引物序列:上游 5'-TGC CAG CCA GGA CAG AAA CT 3',下游 5'-GGG ACC ACA GAC AAC ATC AG 3',PCR 扩增产物长度为 444 bp,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。内参 GAPDH 的产物长度为 697 bp。

1.4 Western blot 检测 CD40、 β -actin 蛋白的表达

收集不同条件处理的 HUVEC 12 内皮细胞,裂解细胞后用 BCA 法进行蛋白质定量。先加 5 \times SDS 混匀,煮沸后再进行电泳,再转移至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭后,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h;显影、定影后进行图像分析。

1.5 统计学处理

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,由 SPSS 12.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 氨氯地平对 ox LDL 诱导的 HUVEC 12 细胞 CD40 mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果发现:氨氯地平处理正常状态的内皮细胞不影响 CD40 mRNA 表达,但氨氯地平预处理可以明显降低 ox LDL 诱导的血管内皮细胞 CD40 mRNA 表达。在 0.1 ~ 10.0 μ mol/L 的范围之内,随氨氯地平浓度增加,CD40 mRNA 的表达逐渐下调,当浓度为 1.0 μ mol/L 时,内皮细胞 CD40 mRNA 表达明显下调,当浓度为 10.0 μ mol/L 时,CD40 mRNA 表达下调至最低(图 1)。

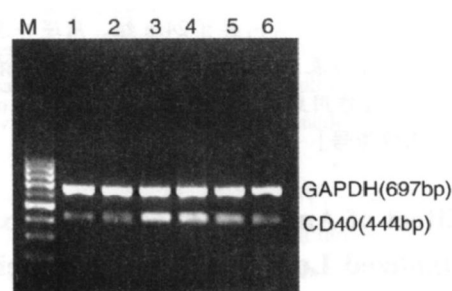


图 1. RT-PCR 检测不同浓度氨氯地平对 HUVEC 12 内皮细胞 CD40 mRNA 表达的影响。1 为空白组,2 为 10.0 μ mol/L 氨氯地平组,3 为 ox LDL 处理组,4 为 ox LDL + 0.1 μ mol/L 氨氯地平组,5 为 ox LDL + 1.0 μ mol/L 氨氯地平组,6 为 ox LDL + 10.0 μ mol/L 氨氯地平组,M 为 DNA marker。

Figure 1. Effect of amlodipine of different concentration on the mRNA CD40 expression in HUVEC 12 Endothelial Cells by RT-PCR detection

表 1. 不同浓度氨氯地平对 HUVEC 12 内皮细胞 CD40 mRNA 表达的影响

Table 1. Effect of amlodipine of different concentration on the mRNA CD40 expression in HUVEC 12 Endothelial Cells

| Group | Relative density(CD40/GAPDH) |
|-------|-----------------------------------|
| 1 | 0.2358 \pm 0.0245 |
| 2 | 0.2496 \pm 0.0239 |
| 3 | 0.7875 \pm 0.0398 ^a |
| 4 | 0.7543 \pm 0.0356 ^a |
| 5 | 0.5484 \pm 0.0295 ^{ab} |
| 6 | 0.3988 \pm 0.0258 ^{ab} |

1 为空白组,2 为 10.0 μ mol/L 氨氯地平组,3 为 ox LDL 处理组,4 为 ox LDL + 0.1 μ mol/L 氨氯地平组,5 为 ox LDL + 1.0 μ mol/L 氨氯地平组,6 为 ox LDL + 10.0 μ mol/L 氨氯地平组,M 为 DNA marker。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 ox LDL 组比较; $n = 3$

2.2 氨氯地平对 ox LDL 诱导的 HUVEC 42 细胞 CD40 蛋白质表达的影响

Western blot 检测结果显示,氨氯地平处理正常状态的内皮细胞不影响 CD40 蛋白的表达,但氨氯地平预处理可以明显降低 ox LDL 诱导的血管内皮细胞 CD40 蛋白的表达,在 0.1~10.0 μmol/L 的范围之内,随氨氯地平浓度增加,CD40 蛋白的表达逐渐下调,当浓度为 1.0 μmol/L 时,内皮细胞 CD40 蛋白表达明显下调,当浓度为 10.0 μmol/L 时,CD40 蛋白表达下调至最低(图 2)。

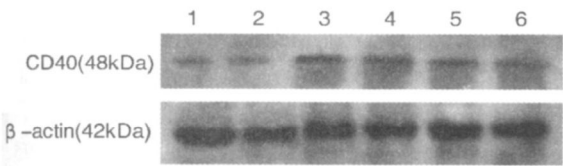


图 2. Western blot 检测不同浓度氨氯地平对 HUVEC-12 内皮细胞 CD40 蛋白表达的影响。1 为空白组,2 为 10.0 μmol/L 氨氯地平组,3 为 ox LDL 处理组,4 为 ox LDL + 0.1 μmol/L 氨氯地平组,5 为 ox LDL + 1.0 μmol/L 氨氯地平组,6 为 ox LDL + 10.0 μmol/L 氨氯地平组。

Figure 2. Effect of amlodipine of different concentration on the mRNA CD40 expression in HUVEC 42 endothelial cells by western blot detection

表 2. 不同浓度氨氯地平对 HUVEC 42 内皮细胞 CD40 蛋白表达的影响

Table 2. Effect of amlodipine of different concentration on the mRNA CD40 expression in HUVEC 42 endothelial cells

| Group | Relative density(CD40/ β-actin) |
|-------|----------------------------------|
| 1 | 0.3654 ±0.0312 |
| 2 | 0.3898 ±0.0296 |
| 3 | 0.9012 ±0.0398 ^a |
| 4 | 0.84456 ±0.0254 ^a |
| 5 | 0.6513 ±0.0333 ^{ab} |
| 6 | 0.4235 ±0.0247 ^{ab} |

1 为空白组,2 为 10.0 μmol/L 氨氯地平组,3 为 ox LDL 处理组,4 为 ox LDL + 0.1 μmol/L 氨氯地平组,5 为 ox LDL + 1.0 μmol/L 氨氯地平组,6 为 ox LDL + 10.0 μmol/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; n=3)。

3 讨 论

研究已证实^[6],ox LDL 是致 As 的关键因素,其通过内皮细胞内脂质过氧化损伤、泡沫细胞形成等

在血管功能改变中发挥重要作用。

CD40 是一种 I 型跨膜糖蛋白,在多种细胞(如单核/巨噬细胞、内皮细胞等)表面表达。研究者发现^[6,7],CD40/CD40L 交联不但能够促使单核细胞激活释放白细胞介素 1(IL 1)、白细胞介素 2(IL 2) 以及肿瘤坏死因子(TNF),而且能够抑制单核细胞凋亡,作用机理可能与直接通过 CD40 信号途径激活细胞内抗凋亡基因和抑制凋亡基因表达有关。本实验观察到 CD40 蛋白在正常状态 HUVEC 42 细胞中少量表达,ox LDL 孵育 HUVEC 42 细胞后 CD40 出现高表达,表明在促 As 因素作用下内皮细胞会上调 CD40 这一重要的炎性介质,也提示 As 与炎症反应间存在着一定的联系。近期由于人们发现 CD40/CD40L 大量表达在 As 斑块的肩部(此区域被认为是 As 斑块破裂最敏感的区域)以及在急性冠脉综合征患者血清中出现可溶性 CD40L 的明显升高^[8,9],CD40/CD40L 与 As 易损斑块之间的关系引起了研究者更多的关注。

氨氯地平(Amlodipine) 属第三代长效 1,4-二氢吡啶类钙通道阻滞剂,具有高度血管选择性,与细胞膜钙通道复合物具有高度特异的亲和性结合位点,明显扩张外周动脉,并能扩张冠状动脉,增加冠状动脉流量,在降压同时可控制心肌缺血,改善心绞痛发生。近期研究显示氨氯地平除了上述作用外还具有显著的抗 As 作用^[10,11],而这种作用并不依赖于对血压的调控。Trion 等^[12]观察了氨氯地平对 apoE^{-/-}小鼠的抗 As 作用,结果显示氨氯地平在未降低血压的情况下,明显抑制 apoE^{-/-}小鼠 As 病变的进展,并能消退已形成的斑块。在体外实验中,研究者观察到氨氯地平抑制了 THP 1 细胞与人脐静脉内皮细胞的黏附^[13]。本实验用氨氯地平预处理细胞后再加入 50 mg/L ox LDL 共同孵育 24 h,RT-PCR 与 Western blot 检测均观察到,随着氨氯地平浓度增加,细胞 CD40 的表达逐渐减少,并呈现浓度依赖性,当浓度为 10.0 μmol/L 时作用更明显。

这说明,药物氨氯地平预处理,可下调 ox LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞中 CD40 的表达,减轻内皮细胞损伤。

[参考文献]

[1] Li D, Liu L, Chen H, et al. LOX 4, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(5): 816-821.
[2] Pido-Lopez J, Whittall T, Wang Y, et al. Stimulation of

- cell surface CCR5 and CD40 molecules by their ligands or by HSP70 up regulates APOBEC3G expression in CD4 (+) T cells and dendritic cells [J]. J Immunol, 2007, 178(3): 1 671 679.
- [3] Stokes KY, Calahan L, Hamric CM, et al. CD40/CD40L contributes to hypercholesterolemia induced microvascular inflammation [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(3): H689 697.
- [4] 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.
- [5] Jukema JW, van der Hoorn JW. Amlodipine and atorvastatin in atherosclerosis: a review of the potential of combination therapy[J]. Expert Opin Pharmacother, 2004, 5(2): 459 468.
- [6] Chen J, Mehta JL. Interaction of oxidized low density lipoprotein and the renin angiotensin system in coronary artery disease[J]. Curr Hypertens Rep, 2006, 8(2): 139 143.
- [7] Danese S, Fiocchi C. Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease [J]. Crit Rev Immunol, 2005, 25(2): 103 - 121.
- [8] 邓翔, 沈元琼, 游咏, 等. 脂联素抑制晚期糖基化终末产物诱导的 HUVEC 细胞 CD (40) 高表达 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(17): 2 612 615.
- [9] 严金川, 丁澍, 梁仪, 等. CD (40) -CD (40) L 相互作用对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(20): 2 496 499.
- [10] 周志刚, 涂剑, 王北冰, 等. 氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞亲环素 A 表达的影响 [J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2008, 16 (11): 865 - 868.
- [11] 涂剑, 周志刚, 王北冰, 等. 氨氯地平对平滑肌细胞泡沫化过程中亲环素 A 表达和胆固醇蓄积的影响 [J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2009, 17(3): 177 180.
- [12] Trion A, de Maat M, Jukema W, et al. Anti atherosclerotic effect of amlodipine, alone and in combination with atorvastatin, in APOE* 3 Leiden/hCRP transgenic mice [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006, 47(1): 89 95.
- [13] Yu T, Morita I, Shimokado K, et al. Amlodipine modulates THP-1 cell adhesion to vascular endothelium via inhibition of protein kinase C signal transduction [J]. Hypertension, 2003, 42(3): 329 334.
- (此文编辑 李小玲)