

# 氨氯地平下调内皮细胞源性 PDGF-B 表达 抑制平滑肌细胞增殖和迁移

何 谨<sup>1</sup>, 孟 军<sup>1</sup>, 白 洁<sup>1</sup>, 涂 剑<sup>2</sup>, 许选选<sup>3</sup>, 王 佐<sup>3</sup>, 涂玉林<sup>3</sup>

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

[关键词] 氨氯地平; 人脐静脉内皮细胞; 血小板源性生长因子 B; 人脐动脉平滑肌细胞; 细胞增殖和迁移

[摘要] **目的** 观察人脐静脉内皮细胞 12 (HUVEC-12) 受氧化型低密度脂蛋白刺激及氨氯地平作用后, 血小板源生长因子 B (PDGF-B) 的内源性表达改变对人脐动脉平滑肌细胞 (HUASMC) 增殖和迁移的影响。**方法** 酶联免疫吸附法检测不同浓度氨氯地平预孵育对氧化型低密度脂蛋白诱导的 HUVEC-12 细胞培养上清液中 PDGF-B 蛋白的表达。选择 10.0  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平 and 20  $\mu\text{mol/L}$  PDGF-B 抗体分别预孵育 HUASMC 30 min, 然后与 PDGF-B 上清液共同孵育 24 h, 噻唑蓝法检测不同细胞增殖能力的变化, Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力的改变。**结果** 氨氯地平可下调氧化型低密度脂蛋白诱导的 HUVEC-12 细胞培养上清液中 PDGF-B 的蛋白表达, 并能使预孵育 HUASMC 组细胞的增殖和迁移能力明显降低。**结论** 氨氯地平下调内皮细胞源性 PDGF-B 的表达可抑制 HUASMC 的增殖和迁移。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Amolodipine Inhibits the Cell Proliferation and Migration of HUASMC by Down-regulating Platelet-derived Growth Factor-B Expression Derived from HUVEC-12 Cells

HE Jin<sup>1</sup>, MENG Jun<sup>1</sup>, BAI Jie<sup>1</sup>, TU Jian<sup>2</sup>, XU Xuan-Xuan<sup>3</sup>, WANG Zuo<sup>3</sup>, and TU Yu-Lin<sup>3</sup>

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

[KEY WORDS] Amolodipine; Human Umbilical Vein Endothelial Cell-12; Platelet-derived Growth Factor-B; Human Umbilical Arterial Smooth Muscle Cells; Cell Proliferation and Migration

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) expression derived from human umbilical vein endothelial cell-12 (HUVEC-12) on the cell migration of human umbilical arterial smooth muscle cells (HUASMC). **Methods** HUVEC-12 cells were pretreated with different concentrations of amlodipine (0, 0.1, 1.0, 10.0  $\mu\text{mol/L}$ ) for 30 min and then incubated with 50 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) for 24 h. PDGF-B protein expression was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the culture medium. HUASMC were pretreated with 10.0  $\mu\text{mol/L}$  amlodipine or 20  $\mu\text{mol/L}$  PDGF-B antibody for 30 min respectively and then incubated with PDGF-B supernatant fluid for 24 h, the cell proliferation was determined by thiazolyl blue (MTT) and the migration was determined by Transwell migration experiment. **Results** Amlodipine could down-regulate the PDGF-B protein expression in HUVEC-12 cells induced by ox-LDL. The cell proliferation and migration were both significantly decreased in the amlodipine pretreated group, the same as PDGF-B antibody pretreated group. **Conclusion** Amlodipine inhibits HUASMC proliferation and migration by down-regulating endothelial cell-derived PDGF-B expression.

[收稿日期] 2012-07-20

[基金项目] 湖南省卫生厅科技项目 (B2007101) 和博士启动基金 (B2011XQD44) 资助

[作者简介] 何谨, 硕士, 主管技师, 研究方向为病理生理及心电生理。孟军, 硕士, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的机制和防治, E-mail 为 mongoesmeng@sina.com。通讯作者涂剑, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病药物防治, E-mail 为 tujian0734@yahoo.com.cn。

氨氯地平(amlodipine)是第3代新型长效1,4-二氢吡啶类钙拮抗剂。最新的基础与临床研究结果显示,它具有良好的抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用,能防止新的血管损伤形成,延缓As的发展过程<sup>[1-5]</sup>。虽然已有许多文献报道了氨氯地平对血管的保护作用,包括可抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖与迁移等<sup>[6]</sup>,但对其潜在作用机制仍不完全清楚。

血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)对于间充质细胞起源的如VSMC而言,是一种重要的促细胞分裂剂,可通过与组织局部的特异性受体结合,能刺激多种细胞分裂和增殖<sup>[7]</sup>。目前已知的PDGF家族成员至少有4个,其中PDGF-B主要在内皮细胞中表达,与心血管疾病的发生发展关系最为密切。有研究指出,PDGF-B对As的发生发展意义重大<sup>[8]</sup>,尤其在VSMC的过度增殖中的作用及其机制备受关注。氨氯地平是否通过调节PDGF-B的表达影响VSMC的增殖和迁移?

因此,本实验旨在观察通过氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导或氨氯地平干预,观察其对PDGF-B表达及细胞增殖和迁移的影响,以进一步明确氨氯地平抗As的作用及其机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞及主要试剂

人脐静脉内皮细胞12(human umbilical vein endothelial cell-12, HUVEC-12)和人脐动脉平滑肌细胞(human umbilical arterial smooth muscle cell, HUA-SMC)均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;兔抗人PDGF-B单克隆抗体和人PDGF-B酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 ELISA 检测 HUVEC-12 细胞培养上清液中 PDGF-B 的蛋白表达

细胞分5组:对照组、ox-LDL组、氨氯地平(0.1, 1.0, 10.0  $\mu\text{mol/L}$ )预先加入细胞0.5 h后再加入50 mg/L ox-LDL共同孵育24 h组,收集各组细胞培养上清液(此含有内皮细胞源性PDGF-B的上清液用于后面平滑肌细胞的增殖和迁移实验)。ELISA实验严格按说明书操作:稀释抗体,反应孔中各加0.1 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日,弃去孔内溶液,洗涤后加各样品,置37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。洗涤后于各反应孔

中加入新鲜稀释的酶标抗体0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗涤后加入临时配制的四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, TMB)底物溶液0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 约30 min,加入2 mol/L硫酸0.05 mL终止反应。450 nm处,以空白对照孔调零测各孔光密度(optical density, OD)值。

### 1.3 噻唑蓝法检测 HUASMC 细胞增殖能力

细胞分6组:对照组、PDGF-B组、PDGF-B+氨氯地平组、PDGF-B+PDGF-B抗体组、PDGF-B抗体单独处理组、氨氯地平单独处理组;均匀接种到96孔培养板,培养24 h后每孔加5 g/L噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT)10  $\mu\text{L}$ ,培养箱继续培养4 h后,吸弃上清液,再加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(每孔150  $\mu\text{L}$ ),充分振荡10 min,置酶标仪于波长490 nm处测OD值。

### 1.4 Transwell 迁移实验

Transwell在24孔板中浸泡1 h,每孔加入100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液;上室加入HUASMC,下室分别加入PDGF-B上清液、PDGF-B上清液+氨氯地平、PDGF-B上清液+PDGF-B抗体,培养箱中孵育20~24 h;取上室,酒精棉球擦掉上室膜上未迁移的细胞,95%酒精固定10 min,苏木素染色,随机选择3个连续显微镜视野(100 $\times$ )计数迁移到上室膜下的细胞,取平均数。

### 1.5 统计学处理

统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用方差分析及 $t$ 检验,通过SPSS 12.0统计软件完成, $P < 0.05$ 说明差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 氨氯地平对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 细胞培养上清液中 PDGF-B 蛋白表达的影响

结果显示,ox-LDL明显上调HUVEC-12细胞培养上清液中PDGF-B的蛋白表达;随着氨氯地平浓度增加,PDGF-B的蛋白表达逐渐减少,呈剂量依赖性,尤以10.0  $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组作用最显著(图1)。结合相关文献<sup>[1,2]</sup>,进而选择10.0  $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平处理细胞。

### 2.2 内皮细胞源性 PDGF-B 的表达改变对平滑肌细胞增殖的影响

MTT检测结果显示,与对照组相比,PDGF-B组细胞OD值明显增加,表明细胞增殖明显;而单独加PDGF-B抗体和氨氯地平处理组与对照组相比,OD值变化不明显;与PDGF-B组相比,氨氯地平

PDGF-B 抗体预孵育组, OD 值均明显降低, 说明细胞增殖能力明显被抑制(表 1)。

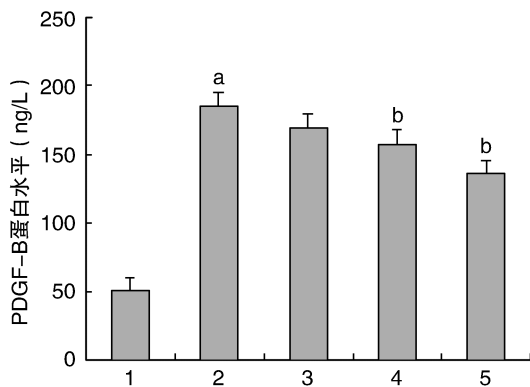


图 1. ELISA 检测不同浓度氨氯地平对 HUVEC-12 内皮细胞培养上清液中 PDGF-B 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + 0.1  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平组, 4 为 ox-LDL + 1.0  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平组, 5 为 ox-LDL + 10.0  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较;  $n = 3$ 。

Figure 1. PDGF-B protein expression was detected by ELISA in the culture medium

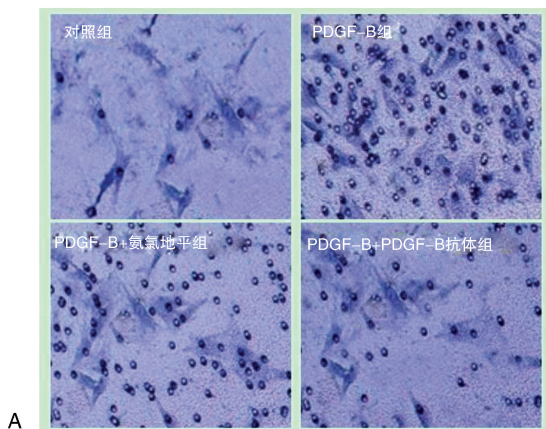


表 1. 各组细胞对人脐动脉平滑肌细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1. Effect of every group cells on the cell proliferation of HUASMC ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分 组	OD 值
对照组	0.3324 $\pm$ 0.0230
PDGF-B 组	0.8612 $\pm$ 0.0330 <sup>a</sup>
PDGF-B + 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组	0.6275 $\pm$ 0.0280 <sup>b</sup>
PDGF-B + PDGF-B 抗体组	0.4583 $\pm$ 0.0360 <sup>b</sup>
PDGF-B 抗体组	0.3245 $\pm$ 0.0250
10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组	0.3728 $\pm$ 0.0290

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 PDGF-B 组比较。

### 2.3 内皮细胞源性 PDGF-B 的表达改变对平滑肌细胞迁移的影响

Transwell 迁移实验结果发现: 与对照组相比, PDGF-B 上清液对平滑肌细胞迁移有明显的促进作用 ( $P < 0.05; n = 3$ ; 图 2); 与 PDGF-B 组比较, PDGF-B + 氨氯地平组和 PDGF-B + PDGF-B 抗体组细胞迁移数均明显减少 ( $P < 0.05; n = 3$ ; 图 2), 表明细胞迁移能力明显被抑制。

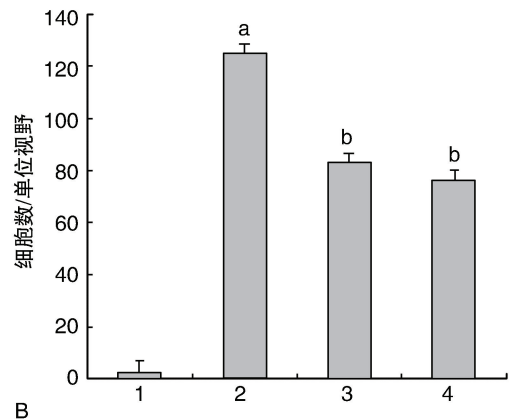


图 2. 各组平滑肌细胞迁移情况的检测 A 为 Transwell 迁移实验图 (100 $\times$ ); B 为统计图。1 为对照组, 2 为 PDGF-B 组, 3 为 PDGF-B + 氨氯地平组, 4 为 PDGF-B + PDGF-B 抗体组。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 PDGF-B 组比较;  $n = 3$ 。

Figure 2. The detection of smooth muscle cell migration in each group

## 3 讨 论

氨氯地平具有良好的抗 As 作用, 可能与改善内皮功能<sup>[9]</sup>、抗氧化应激<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移<sup>[6]</sup>等有关, 但具体机制尚未阐明。在本课题组的前期研究中已发现<sup>[1]</sup>: ox-LDL 可上调 HUVEC-12 细胞中 PDGF-B mRNA 的表达, 氨氯地平预处理细胞后再加入 ox-LDL 共同孵育, 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, 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。本实验中进一步通过 ELISA 检测, 获得了一致的结果——随着氨氯地平浓度增加, HUVEC-12 细胞培养上清液中 PDGF-B 的蛋白表达逐渐减少, 尤以 10.0  $\mu\text{mol/L}$  氨氯地平组作用最显著。提示氨氯地平可能通过下调 PDGF-B 的表达发挥抗 As 作用。

之前已经提到, PDGF-B 是 PDGF 家族成员之一, 由二硫键连接的同源或异源二聚体即 PDGF-BB

组成,分子量为 28 ~ 35 kDa,是一种与心血管疾病的发生发展关系密切的促细胞分裂剂,可刺激 VSMC 等细胞的分裂增生,通过刺激胶原合成和胶原酶的活化作用调节胞外基质的更新,最终促进 DNA 合成和细胞裂解、增殖<sup>[12]</sup>。此外,PDGF-B 也是引导平滑肌细胞迁移的主要趋化分子,能诱导平滑肌细胞从血管中膜迁移至内膜,并聚集在由坏死的泡沫细胞组成的脂池周围,产生胶原纤维和弹力纤维,组成纤维帽,包绕脂池,形成典型的粥样硬化斑块<sup>[13]</sup>。氨氯地平抑制 VSMC 的增殖与迁移,是否是作用于 PDGF-B 的结果? 在本实验中得到了证实:内皮细胞源性 PDGF-B 促进人脐动脉平滑肌细胞的增殖与迁移能被氨氯地平抑制,效应与 PDGF-B 抗体一致。提示氨氯地平可通过下调 PDGF-B 的表达来抑制 VSMC 的增殖和迁移,从而发挥抗 As 作用,这将为进一步证明氨氯地平具有良好的抗 As 作用提供实验依据。

已有研究发现,PDGF 可诱导鼠<sup>[14]</sup>、兔<sup>[15]</sup>等哺乳动物 VSMC 的增殖,但其具体信号转导机制还不甚清楚。其中可能的信号转导途径涉及磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidyl inositol-3-kinase,PI3K)、Ras、磷脂酶激活、Ca<sup>2+</sup> 离子等多种途径<sup>[16-20]</sup>。在与 Ca<sup>2+</sup> 离子相关作用中<sup>[20]</sup>,PDGF-B 可以促进 VSMC 的细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流和内 Ca<sup>2+</sup> 释放增加。因此,作为钙拮抗剂之一的氨氯地平既可直接阻滞 Ca<sup>2+</sup> 内流,还可能通过下调 PDGF-B 的表达间接阻滞 Ca<sup>2+</sup> 内流,最终都将抑制 VSMC 的增殖。当然,确切机制还有待后续实验进一步证实。

#### [参考文献]

[1] 何 谨, 孟 军, 周 志 刚, 等. 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[J]. 中 国 动 脉 硬 化 杂 志, 2011, 19(5): 395-398.

[2] 涂 剑, 徐 丽 梅, 刘 世 远, 等. 氨 氯 地 平 对 ox-LDL 诱 导 的 人 脐 静 脉 内 皮 细 胞 MCP-1 mRNA 表 达 的 影 响[J]. 南 华 大 学 学 报 · 医 学 版, 2009, 37(1): 10-13.

[3] Nussberger J, Aubert JF, Bouzourene K, et al. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine[J]. Hypertension, 2008, 51(5): 1 306-311.

[4] Derosa G, Maffioli P. Effects of amlodipine plus atorvastatin association in hypertensive hypercholesterolemic patients[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2010, 8(6): 835-843.

[5] Kojima T, Miyauchi K, Yokoyama T, et al. Azelnidipine and amlodipine anti-coronary atherosclerosis trial in hypertensive patients undergoing coronary intervention by serial volumetric intravascular ultrasound analysis in Juntendo University (ALPS-J)[J]. Circ J, 2011, 75(5): 1 071-079.

[6] Ohba T, Watanabe H, Murakami M, et al. Amlodipine inhibits cell proliferation via PKD1-related pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(2): 376-381.

[7] Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development[J]. Development, 2003, 130(20): 4 679-684.

[8] Chen J, Xu L, Chen S, et al. Transcriptional regulation of platelet-derived growth factor-B chain by thrombin in endothelial cells: involvement of Egr-1 and CREB-binding protein[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 366(1-2): 81-87.

[9] Toma L, Stancu CS, Sanda GM, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms of amlodipine action to improve endothelial cell dysfunction induced by irreversibly glycated LDL[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(1): 202-207.

[10] Koh KK, Han SH, Ahn JY, et al. Amlodipine improves endothelial function and metabolic parameters in patients with hypertension[J]. Int J Cardiol, 2009, 133(1): 23-31.

[11] 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.

[12] Ong ET, Hwang TL, Huang YL, et al. Vitisin B, a resveratrol tetramer, inhibits migration through inhibition of PDGF signaling and enhancement of cell adhesiveness in cultured vascular smooth muscle cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 256(2): 198-208.

[13] Hollborn M, Wiedemann P, Bringmann A, et al. Chemotactic and cytotoxic effects of minocycline on human retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(5): 2 721-729.

[14] Mehrhof FB, Schmidt-Ullrich R, Dietz R, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation: role of NF-kappa B revisited[J]. Circ Res, 2005, 96(9): 958-964.

[15] Jun JI, Fang WH, Xia HE, et al. An antisense oligonucleotide targeting against PDGF-β mRNA inhibits proliferation of smooth muscle cells in injured rabbit arteries after denudation[J]. China Journal of Modern Medicine, 2008, 18(22): 3 233-236.

[16] Werth C, Stuhlmann D, Cat B, et al. Stromal resistance of fibroblasts against oxidative damage: involvement of tumor cell-secreted platelet derived growth factor (PDGF) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activation[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(2): 404-410.

[17] Nakata S, Fujita N, Kitagawa Y, et al. Regulation of platelet-derived growth factor receptor activation by afadin through SHP-2: implications for cellular morphology[J]. J Biol Chem, 2007, 282(52): 37 815-825.

[18] Sandilands E, Cans C, Fincham VJ, et al. RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane[J]. Dev Cell, 2004, 7(6): 855-869.

[19] Deng DX, Spin JM, Tsalenko A, et al. Molecular signatures determining coronary artery and saphenous vein smooth muscle cell phenotypes: distinct responses to stimuli[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(5): 1 058-065.

[20] Kojima N, Hori M, Murata T, et al. Different profiles of Ca<sup>2+</sup> responses to endothelin-1 and PDGF in liver myofibroblasts during the process of cell differentiation[J]. Br J Pharmacol, 2007, 151(6): 816-827.