

氨氯地平经核因子 κ B 下调氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞血小板源生长因子 B 的表达

卢琼^{1,2}, 何谨^{1,3}, 周志刚^{1,3}, 孟军^{1,3}, 涂剑⁴, 涂玉林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. 怀化医学高等专科学校, 湖南省怀化市 418000)

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

[摘要] **目的** 观察氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC-12)中血小板源生长因子 B(PDGF-B)和核因子 κ B(NF- κ B)表达的影响,通过氨氯地平对 ox-LDL/NF- κ B/PDGF-B 的影响,进一步探讨氨氯地平相关的作用机制。**方法** 不同浓度氨氯地平(0、0.1、1.0、10.0 μ mol/L)预先处理细胞 0.5 h 后加入 50 mg/L ox-LDL 共同孵育 24 h,RT-PCR 和 Western Blot 检测细胞内 PDGF-B 的表达及 NF- κ B 的蛋白表达;进一步通过 NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)的加入,RT-PCR 和 Western blot 观察其对 PDGF-B 及 NF- κ B 表达的影响。**结果** 随着氨氯地平处理浓度的增加,HUVEC-12 中 PDGF-B 的 mRNA 和蛋白表达,以及 NF- κ B 的蛋白表达均明显下调,NF- κ B 抑制剂 PDTC 既可降低 NF- κ B 的蛋白表达,也可下调 PDGF-B 的表达,作用与 10.0 μ mol/L 氨氯地平组的结果相近。**结论** 氨氯地平可通过 NF- κ B 下调 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 中 PDGF-B 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Amlodipine Down-Regulates Platelet-Derived Growth Factor-B Expression in HUVEC-12 Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein Through Nuclear Factor- κ B

LU Qiong^{1,2}, HE Jin^{1,3}, ZHOU Zhi-Gang^{1,3}, MENG Jun^{1,3}, TU Jian⁴, and TU Yu-Lin¹

(1. Medical School, 3. the First Affiliated Hospital, 4. Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001; 2. Huaihua Medical College, Huaihua, Hunan 418000, China)

[KEY WORDS] Amlodipine; Oxidized Low Density Lipoprotein; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Nuclear Factor- κ B; Platelet-Derived Growth Factor-B

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of Amlodipine on the expression of platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC-12) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), further to explore the related mechanism of Amlodipine through its role on ox-LDL/NF- κ B/PDGF-B. **Methods** After pretreated with different concentration (0, 0.1, 1.0, 10.0 μ mol/L) of Amlodipine for 0.5 h and treated with 50 mg/L ox-LDL for 24 h, the expressions of PDGF-B and NF- κ B protein were respectively detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. Then, Pyrrolidinedithiocarbamic acid, ammonium salt(PDTC), a kind of NF- κ B inhibitor was added, and RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of PDGF-B and NF- κ B. **Results** With the increasing concentration of Amlodipine, the PDGF-B and NF- κ B protein expressions were all down-regulated obviously. PDTC not only down-regulated the NF- κ B protein expression, but also the PDGF-B expression, as effectively as 10.0 μ mol/L Amlodipin group. **Conclusion** Amlodipine can down-regulate the PDGF-B expression in HUVEC-12 induced by ox-LDL through NF- κ B.

氨氯地平(Amlodipine)属第三代钙通道阻滞剂。近年来,其降压以外的多效作用如抗动脉粥样

[收稿日期] 2012-06-01

[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] 卢琼,硕士研究生,实验师,从事动脉粥样硬化的机制研究。通讯作者涂剑,副教授,硕士研究生导师,主要研究心血管药物防治,E-mail为 tujian0734@yahoo.com.cn。通讯作者涂玉林,教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化的机制和防治。

硬化(atherosclerosis, As)作用尤为受到重视。研究资料显示^[1-5],其抗 As 作用可能与改善内皮功能、抗氧化应激、抗炎、抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移等有关,但具体机制尚未阐明。本课题组的前期研究已发现^[6],氨氯地平可下调氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC-12)中血小板源生长因子 B(platelet-derived growth factor-B, PDGF-B) mRNA 的表达。大量研究发现^[7,8],PDGF-B 是 As 形成过程中血管内皮细胞、单核巨噬细胞和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)等之间相互作用的介质,在 As 形成中有重要意义。而氨氯地平如何下调 PDGF-B 表达的机制未见报道。有文献报道^[9,10],在 As 斑块中的内皮细胞、巨噬细胞及 VSMC 中均可检测到核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B),NF- κ B 被激活后可诱导参与调控 As 有关的基因,其中包括 PDGF 等。本实验旨在通过 ox-LDL/NF- κ B/PDGF-B 这一信号传导途径探讨氨氯地平抗 As 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

HUVEC-12 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 NF- κ B 一抗、RIPA 裂解液购自碧云天生物技术研究所,兔抗 β -actin 一抗购自北京博奥森生物技术有限公司,兔抗 PDGF-B、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 细胞分组

为检测不同浓度氨氯地平对 HUVEC-12 PDGF-B 和 NF- κ B 蛋白表达的影响,将实验分为对照组和不同浓度(0、0.1、1.0 和 10.0 μ mol/L)氨氯地平组(分别用 0、0.1、1.0、10.0 μ mol/L 氨氯地平预先处理细胞 0.5 h 后加入 50 mg/L ox-LDL 共同孵育 24 h)。为观察 NF- κ B 抑制剂 PDTC 对 PDGF-B 和 NF- κ B 表达的影响,将实验分 6 组:①对照组:培养基孵育 24 h;②ox-LDL 组:50 mg/L ox-LDL 孵育 24 h;③ox-LDL + PDTC 组:20 μ mol/L PDTC 预孵育细胞 30 min 后加 50 mg/L ox-LDL 共孵育 24 h;④PDTC 组:20 μ mol/L PDTC 孵育 24 h;⑤ox-LDL + 氨氯地平组:10.0 μ mol/L 氨氯地平预孵育细胞 30 min 后加 50 mg/L ox-LDL 共孵育 24 h;⑥氨氯地平组:10.0 μ mol/L 氨氯地平孵育 24 h。

1.3 RT-PCR 检测 PDGF-B mRNA 的表达

PDGF-B 引物为上游 5'-ATCGCCGAGT GCAAGACGCG-3',下游 5'-AAGCACCATTGGCCGTC- CGA-3',PCR 产物长度为 586 bp,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。内参 GAPDH 引物序列为上游 5'-TGATGACATCAAGAAGGTG- GTGAAG-3',下游 5'-TCCTTGGAGGCCA TGTGGC- CAT-3',产物长度为 240 bp,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 0.5 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。

1.4 Western Blot 检测 PDGF-B、NF- κ B 的蛋白表达

收集各组细胞,按 1:50 比例添加苯甲基磺酰氟(PMSF)于 RIPA 裂解液,裂解细胞,经 BCA 法蛋白定量,上样缓冲液调各组蛋白量一致,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 ~ 10 min 使蛋白变性。电泳、转膜至 PDVF 膜上,预染蛋白 Marker 确定蛋白分子量标准。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h;洗膜后激发荧光,显示于 X 光片,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 SPSS12.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氨氯地平对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 中 PDGF-B 表达的影响

RT-PCR(结果见前期研究^[6])和 Western Blot 检测结果均显示,随着氨氯地平浓度增加,细胞 PDGF-B mRNA 和蛋白的表达均逐渐减少,且呈现浓度依赖性,当浓度为 10.0 μ mol/L 时作用更明显(图 1 和表 1)。

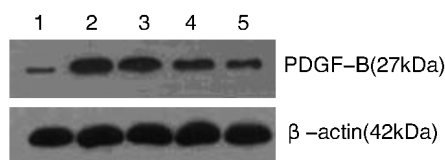


图 1. Western Blot 检测不同浓度氨氯地平对 HUVEC-12 中 PDGF-B 蛋白表达的影响 1 为对照组,2 为 0 μ mol/L 氨氯地平组(ox-LDL 组),3 ~ 5 依次为 0.1、1.0 和 10.0 μ mol/L 氨氯地平组。

Figure 1. Effect of different concentration of Amlidipine on the PDGF-B protein expression in HUVEC-12 detected by Western Blot

2.2 氨氯地平对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 细胞 NF-κB 表达的影响

随着氨氯地平浓度增加,细胞 NF-κB 蛋白的表达逐渐减少,并呈现浓度依赖性,当氨氯地平浓度为 10.0 μmol/L 时作用更明显(图 2 和表 1)。

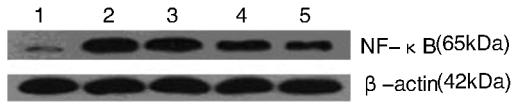


图 2. Western Blot 检测不同浓度氨氯地平对 HUVEC-12 中 NF-κB 蛋白表达的影响 1 为对照组,2 为 0 μmol/L 氨氯地平组(ox-LDL 组),3~5 依次为 0、1、1.0 和 10.0 μmol/L 氨氯地平组。

Figure 2. Effect of different concentration of Amlodipine on the NF-κB protein expression in HUVEC-12 detected by Western Blot

表 1. 不同浓度氨氯地平对 HUVEC-12 中 PDGF-B 和 NF-κB 蛋白表达的影响 (n = 3)

Table 1. Effect of different concentration of Amlidipine on the PDGF-B and NF-κB protein expression in HUVEC-12

分 组	PDGF-B 蛋白	NF-κB 蛋白
对照组	21.8% ± 1.4%	15.8% ± 1.2%
0 μmol/L 氨氯地平组	68.9% ± 4.2% ^a	72.1% ± 5.6% ^a
0.1 μmol/L 氨氯地平组	60.2% ± 3.1%	68.6% ± 2.3%
1.0 μmol/L 氨氯地平组	48.1% ± 2.5% ^b	49.5% ± 2.1% ^b
10.0 μmol/L 氨氯地平组	35.6% ± 1.3% ^b	34.6% ± 1.6% ^b

a 为 P < 0.05, 与对照组比较; b 为 P < 0.05, 与 0 μmol/L 氨氯地平组比较。

2.3 NF-κB 抑制剂 PDTC 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 中 PDGF-B 和 NF-κB 表达的影响

PDTC 单独处理组和氨氯地平单独处理组与对照组相比,PDGF-B 的 mRNA 和 NF-κB 的蛋白表达差异无显著性;而用 PDTC 或氨氯地平预孵育后再加 ox-LDL,则明显下调 PDGF-B 的 mRNA 和 NF-κB 的蛋白表达(图 3、图 4 和表 2)。

表 2. PDTC 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 中 PDGF-B mRNA 和 NF-κB 蛋白表达的影响 (n = 3)

Table 2. Effect of PDTC on the PDGF-B mRNA and NF-κB protein expression in HUVEC-12

分 组	PDGF-B mRNA	NF-κB 蛋白
对照组	18.9% ± 0.5%	12.1% ± 0.4%
ox-LDL 组	69.8% ± 4.5% ^a	70.2% ± 2.5% ^a
ox-LDL + PDTC 组	50.6% ± 2.2% ^b	38.9% ± 2.2% ^b
PDTC 组	21.1% ± 1.9%	14.6% ± 1.1%
ox-LDL + 氨氯地平组	48.4% ± 3.1% ^b	48.7% ± 1.9% ^b
氨氯地平组	20.3% ± 0.9%	16.2% ± 1.0%

a 为 P < 0.05, 与对照组比较; b 为 P < 0.05, 与 ox-LDL 组比较。

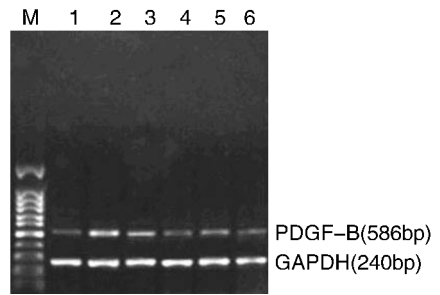


图 3. RT-PCR 检测 PDTC 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 中 PDGF-B mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + PDTC 组, 4 为 PDTC 组, 5 为 ox-LDL + 氨氯地平组, 6 为氨氯地平组。

Figure 3. Effect of PDTC on the PDGF-B mRNA expression in HUVEC-12 detected by RT-PCR

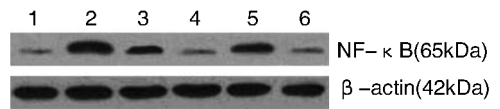


图 4. Western Blot 检测 PDTC 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 中 NF-κB 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + PDTC 组, 4 为 PDTC 组, 5 为 ox-LDL + 氨氯地平组, 6 为氨氯地平组。

Figure 4. Effect of PDTC on the NF-κB protein expression in HUVEC-12 detected by Western Blot

3 讨 论

氨氯地平抗 As 作用的确切机制尚未阐明,可能与改善内皮功能、抗氧化应激、抗炎、抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移及表型改变等有关^[1-5]。在本实验中,我们通过 RT-PCR 和 Western Blot 检测均观察到,随着氨氯地平浓度增加,细胞 PDGF-B 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 HUVEC 中 PDGF-B 的表达,减轻内皮细胞损伤。

有文献报道,在 As 斑块中的内皮细胞、巨噬细胞及 VSMC 中均可检测到 NF-κB 的激活,当 NF-κB 激活后可诱导参与调控与 As 有关的基因,其中包括 PDGF 等^[9,10]。NF-κB 激活后,首先刺激内皮细胞过度表达黏附分子、炎症递质等,炎症递质可进一步促进 VSMC 的迁移和增殖,促进 As 斑块的发展。Lawrence 等^[11]在 2001 年报道了 NF-κB 的抗炎机制: NF-κB 激活与炎症细胞激活和炎症介质的增加密切相关,还与炎症的消退和抗炎因子表达密切相关,说明 NF-κB 在 As 炎症消退过程中起着调节作

用。另外,利用 LDL 受体缺乏鼠的实验发现^[12],抑制 LDL 受体缺乏鼠巨噬细胞 NF- κ B 的激活,可加重 As 的病变,表现为病损面积增大,损伤加重,坏死增加,病变早期较多巨噬细胞聚集等,证实了 NF- κ B 可能通过影响炎症-抗炎平衡而调控 As 的发展。氨氯地平是否通过 NF- κ B 途径下调 ox-LDL 诱导的内皮细胞源性 PDGF-B 的表达呢?

在本实验中,我们发现,氨氯地平可同时下调 ox-LDL 诱导的 HUVEC-12 中 NF- κ B 的表达。加入 NF- κ B 抑制剂 PDTC 可明显下调细胞 PDGF-B 及 NF- κ B 的表达,结果与 10.0 μ mol/L 氨氯地平的作用相近。有文献表明^[13],在培养的 HUVEC 系 EA-hy926 细胞中转染 siRNA,靶向性抑制 NF- κ B p65,48 h 后检测也发现,内皮细胞内 NF- κ B 核酸及蛋白表达量均明显减少,同时其迁移能力明显下降,抑制率可达 64.5%。提示通过 RNA 干扰技术 (RNAi) 可以特异性抑制内皮细胞内重要的转录因子 NF- κ B p65。而 NF- κ B 信号通路被切断后,受其调控的促血管生成因子相关基因的转录与翻译即被终止,内皮细胞的增殖、迁移能力下降,从而抑制血管生成过程。另有研究 ox-LDL 对 HUVEC 表达分化抗原 CD40 中 NF- κ B 的作用,以进一步探讨卡托普利可能的抗 As 作用时^[14],发现预先加入卡托普利、PDTC, HUVEC 中 CD40 的表达低于 ox-LDL 组 ($P < 0.05$),卡托普利组内皮细胞 CD40 的表达值低于卡托普利 + PDTC 组和卡托普利 + NAME 组,说明 ox-LDL 通过 NF- κ B 途径激活了 CD40 的表达,卡托普利通过一氧化氮 (NO) 途径及 NF- κ B 的转录使 ox-LDL 引起的内皮细胞 CD40 的表达下降,从而具有抗 As 作用。

综上所述,从本实验获得的结果,我们认为,药物氨氯地平预处理,可通过 NF- κ B 途径下调 PDGF-B 的表达,减轻内皮细胞损伤,从而发挥抗 As 作用。进一步的研究中,我们将进行体内实验,从整体动物实验水平验证氨氯地平通过 NF- κ B 途径影响 PDGF-B 的表达改变的相关机制。

[参考文献]

[1] Fukao K, Shimada K, Hiki M, et al. Effects of calcium channel blockers on glucose tolerance, inflammatory state, and circulating progenitor cells in non-diabetic patients with essential hypertension: a comparative study between Azelnidipine and amlodipine on glucose

tolerance and endothelial function—a crossover trial (AGENT) [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10: 79.

- [2] Hansel B, Girerd X, Bonnefont-Rousselot D, et al. Blood pressure-lowering response to amlodipine as a determinant of the antioxidative activity of small, dense HDL3 [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2011, 11(5): 317-325.
- [3] 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.
- [4] Salehi I, Mohammadi M, Mirzaei F, et al. Amlodipine attenuates oxidative stress in the heart and blood of high-cholesterol diet rabbits [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2012, 23(1): 18-22.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Boucher P, Gotthardt M, Li WP, et al. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis [J]. *Science*, 2003, 300: 329-332.
- [8] Mottaqhi A, Salehi E, Sezavar H, et al. The in vitro oxidized LDL and PHA on proliferation and gene expression of regulatory T cells in patients with atherosclerosis [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2012, 11(3): 217-223.
- [9] 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.
- [10] Xu S, Liu Y, Le K, et al. Tanshinone II-A inhibits oxidized LDL-induced LOX-1 expression in macrophages by reducing intracellular superoxide radical generation and NF- κ B activation [J]. *Transl Res*, 2012, 160(2): 114-124.
- [11] Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, et al. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation [J]. *Nat Med*, 2001, 7(12): 1291-1297.
- [12] Qiu Y, Tanaka T, Nawata H, et al. Dihydrotestosterone inhibits lectin-like oxidized-LDL receptor-1 expression in aortic endothelial cells via a NF- κ B/AP-1-mediated mechanism [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(7): 3405-415.
- [13] 刘 木 彪, 何 援 利, 钟 洁. NF- κ B p65 siRNA 抑 制 人 脐 静 脉 内 皮 细 胞 迁 移 的 研 究 [J]. *细 胞 与 分 子 免 疫 学 杂 志*, 2009, 25(5): 428-430.
- [14] Huang Z, Meng S, Wang L, et al. Suppression of oxLDL-induced MMP-9 and EMT expression by berberine via inhibition of NF- κ B activation in human THP-1 macrophages [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012, 295(1): 78-86.

(此文编辑 许雪梅)