

IFI16 siRNA 对干扰素 α 诱导的人脑血管外膜成纤维细胞增殖与凋亡的影响

黄晶, 龙向淑, 宋方, 吴强

(贵州省人民医院心内科, 贵州省贵阳市 550002)

[关键词] 干扰素诱导蛋白 16; 干扰素 α ; 血管外膜成纤维细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 探讨干扰素诱导蛋白 16(IFI16) siRNA 对干扰素 α (IFN- α) 诱导的人脑血管外膜成纤维细胞(HBVA)增殖与凋亡的影响。**方法** 在 HBVA 中转染 IFI16 siRNA 48 h 后,用 2×10^6 U/L IFN- α 处理转染 IFI16 siRNA 的细胞 24 h,流式细胞术测定细胞周期及凋亡,real-time PCR 和 Western blot 测定细胞中 IFI16 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 转染 IFI16 siRNA 后,HBVA 中 IFI16 mRNA 和蛋白表达水平下调,同时抑制细胞 G/S 期转换。IFN- α 诱导 HBVA 中 IFI16 mRNA 和蛋白表达上调,抑制细胞 G/S 期转换,促进细胞凋亡。但在转染 IFI16 siRNA 的 HBVA 中 IFN- α 的上述作用受到了抑制。**结论** IFN- α 抑制 HBVA 增殖,促进其凋亡可能与促进 IFI16 表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of IFI16 siRNA on Apoptosis and Proliferation of Interferon- α Induction of Human Brain Vascular Adventitial Fibroblasts

HUANG Jing, LONG Xiang-Shu, SONG Fang, and WU Qiang

(Department of Cardiology, Guizhou People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[KEY WORDS] Interferon-inducible Protein 16; Interferon- α ; Vascular Adventitial Fibroblast; Cell Proliferation; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of interferon-inducible protein 16 (IFI16) siRNA on the proliferation and apoptosis of interferon- α (IFN- α) induction of human brain vascular adventitial fibroblasts (HBVA). **Methods** The siRNA of IFI16 gene was transfected into HBVA in vitro. 48 hours after transfection, the cells were exposed to 2×10^6 U/L IFN- α for 24 h. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The mRNA and protein levels of IFI16 were measured by real-time PCR and Western blot. **Results** After transfection with IFI16 siRNA, the expression of IFI16 mRNA and protein levels was decreased in HBVA, and the cell cycle at G/S transition was promoted. Meanwhile, stimulated with IFN- α up-regulated the expression of IFI16 mRNA and protein levels, and inhibited the cell cycle transition at G/S and promoted cells apoptosis in HBVA. Such effect was restrained by transfection with IFI16 siRNA into HBVA. **Conclusion** IFN- α may inhibit cells proliferation and promote cells apoptosis of HBVA by up-regulating the expression of IFI16.

血管外膜成纤维细胞(vascular adventitial fibroblast, VAF)是动脉管壁细胞成分之一,其增殖、迁移、表型转换和分泌细胞外基质等变化是动脉粥样硬化、高血压、冠状动脉搭桥术后及支架植入术后

再狭窄等血管增殖性疾病主要的病理生理机制之一^[1-2]。干扰素(interferon, IFN)通过表达多种 IFN 诱导蛋白发挥抗增殖、抗病毒、干预细胞生长和分化等作用^[3]。近年研究发现 IFN- α 能抑制 VAF 及

[收稿日期] 2016-01-07

[修回日期] 2016-05-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260030)

[作者简介] 黄晶, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床。龙向淑, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床。宋方, 博士, 主治医师, 研究方向为心肌及血管重构的基础与临床。通讯作者吴强, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病与心力衰竭的基础与临床, E-mail 为 gzgywq@126.com。

血管内皮细胞、血管平滑肌细胞增殖,促进 VAF 凋亡^[4-6];IFN- β 能抗增殖及抑制动脉粥样硬化^[7]。干扰素诱导蛋白 16 (interferon-inducible protein 16, IFI16) 是 IFN 诱导蛋白 p200 家族的人源蛋白成员之一,研究发现 IFI16 参与了细胞增殖和凋亡的调控^[8]。近来有研究报道该蛋白家族成员 p204 (鼠源 IFI16) 能促进大鼠 VAF 凋亡^[9],但 IFN- α 对 VAF 增殖与凋亡的影响是否与其诱导 IFI16 表达有关尚未见文献报道。本研究拟观察 IFN- α 对 VAF 增殖与凋亡的影响及 IFI16 表达变化,为研究 IFN 及其诱导蛋白运用于防治心血管疾病提供理论及实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人脑血管外膜成纤维细胞 (human brain vascular adventitial fibroblast, HBVAF) 细胞株 (ScienCell 公司);DMEM 高糖培养基和胎牛血清 (Hyclone 公司);Control siRNA-A、IFI16 siRNA (h)、siRNA transfection medium、siRNA transfection reagent、Control siRNA (FITC-conjugated)-A、IFI16 抗体、 β -actin 抗体、siRNA transfection medium (Santa Cruz 公司);IFN- α (北京三元基因工程有限公司);SDS-PAGE 凝胶试剂盒、细胞周期与凋亡检测试剂盒 (碧云天公司);real-time PCR 荧光染料试剂 (TaKaRa 公司);人 β -actin 引物上游 TGGCACCACACCTTCTACAATG,下游 TCATCTTCTCGCGGTTGGC;人 IFI16 引物上游 GAAGTGCCAGCGTAACTCCTA,下游 TACCTCAAA-CACCCATTAC (上海生工生物公司);逆转录试剂 (Fermentas 公司)。

1.2 HBVAF 的培养

从液氮罐中取出 HBVAF,经 37 $^{\circ}$ C 水浴,再经 10 倍体积 DME 培养液 (含 10% 胎牛血清) 漂洗。1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL 上述培养液吹打重悬细胞,加培养液至 4 mL 后,置于 37 $^{\circ}$ C、含 5%CO₂ 培养箱内。24 h 后更换新培养液。采用复苏后第 3 代生长状态良好的细胞用于实验。

1.3 实验分组

实验分六组:空白对照组 (Negative 组)、非特异性 siRNA 转染组 (control siRNA 组) 和 IFI16 siRNA 组,用 2×10^6 U/L IFN- α 处理各组 24 h,即获 IFN- α + 空白对照组 (IFN- α + Negative 组)、IFN- α + control siRNA 组和 IFN- α + IFI16 siRNA 组。

1.4 real-time PCR 检测 IFI16 mRNA 表达

按 Trizol 法提取总 RNA 后,42 $^{\circ}$ C 60 min,70 $^{\circ}$ C 5 min 合成 cDNA。real-time PCR 采用 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,重复循环 40 次。95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s 进行熔解曲线。计算各组 IFI16 mRNA 的相对表达量。

1.5 Western blot 检测 IFI16 蛋白表达

通过细胞裂解液 (RIPA) 提取细胞蛋白。蛋白定量后加入 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水 5 min 变性。湿法转膜转移蛋白条带至 NC 膜。常温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜,加入一抗工作液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (IFI16 抗体稀释度 1 : 500、 β -actin 抗体稀释度 1 : 5000), TBST 洗膜,37 $^{\circ}$ C 孵育二抗 1 h, TBST 洗膜, ECL 化学发光, X 光胶片显影、定影后对胶片进行扫描。BandScan 4.3 软件计算 IFI16 与 β -actin 吸光度比值。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

按细胞周期与凋亡检测试剂盒说明书进行 DNA 含量分析及凋亡测定。

1.7 统计学分析

所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IFI 16 mRNA 和蛋白的表达变化

与 Negative 组比较,IFI16 siRNA 组中 IFI16 mRNA 和蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$);IFN- α + Negative 组、IFN- α + control siRNA 组和 IFN- α + IFI16 siRNA 组中 IFI16 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$);Negative 组与 control siRNA 组间 IFI16 mRNA 和蛋白表达水平无统计学差异。与 IFN- α + Negative 组比较,IFN- α + IFI16 siRNA 组中 IFI16 mRNA 和蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$);IFN- α + Negative 组与 IFN- α + control siRNA 组间 IFI16 mRNA 和蛋白表达水平无统计学差异 (图 1)。

2.2 细胞周期的改变

与 Negative 组比较,IFI16 siRNA 组 G0/G1 期细胞数减少,S 期细胞数增多 ($P < 0.05$);IFN- α + Negative 组、IFN- α + control siRNA 组和 IFN- α + IFI16 siRNA 组 G0/G1 期细胞数增多,S 期细胞数减少 ($P < 0.05$);Negative 组与 control siRNA 组间差异无统计学意义。与 IFN- α + Negative 组比较,IFN- α + IFI16

siRNA 组 G0/G1 期细胞数减少, S 期细胞数增多 ($P < 0.05$); IFN- α + Negative 组与 IFN- α + control siRNA 组间差异无统计学意义 (图 2)。

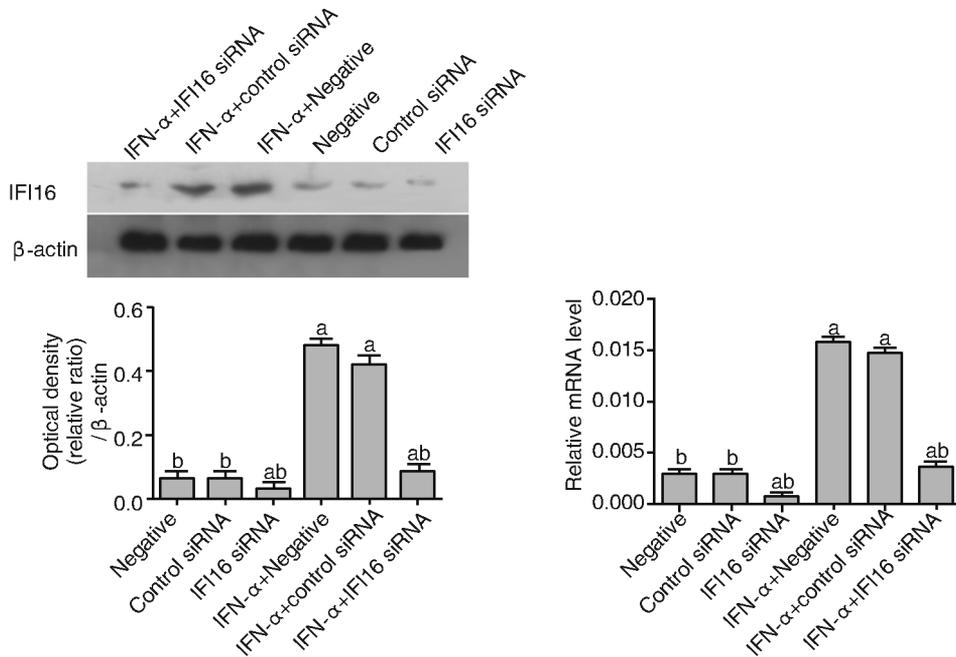


图 1. 干预后 IFI16 mRNA 和蛋白在 HBVAF 中的表达 a 为 $P < 0.05$, 与 Negative 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 IFN- α +Negative 组比较。
Figure 1. Effect of intervention factors on the expression of IFI16 mRNA and protein in HBVAF

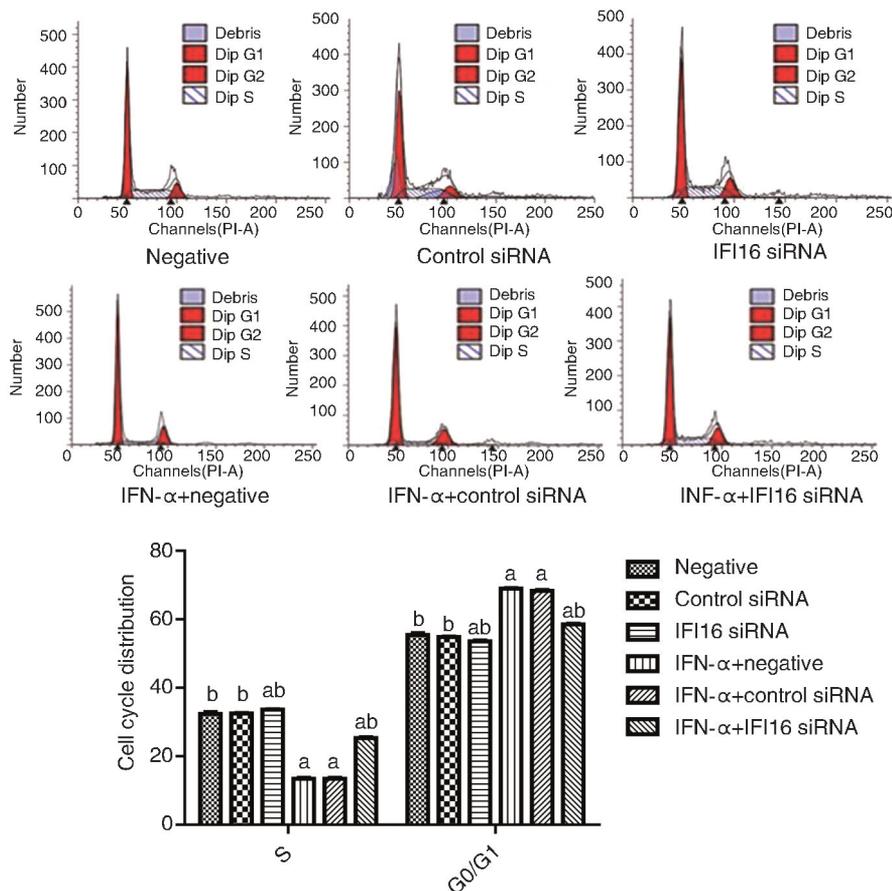


图 2. 干预后对 HBVAF 细胞周期的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 Negative 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 IFN- α +Negative 组比较。
Figure 2. Effect of intervention factors on cell cycle of HBVAF

2.3 细胞凋亡情况比较

凋亡细胞数在 IFI16 siRNA 组、Negative 组与 control siRNA 组间差异无统计学意义。与 Negative 组比较, IFN- α +Negative 组、IFN- α +control siRNA 组和 IFN- α +IFI16 siRNA 组凋亡细胞数增多 ($P <$

0.05)。与 IFN- α +Negative 组比较, IFN- α +IFI16 siRNA 组凋亡细胞数减少 ($P <$ 0.05); IFN- α +Negative 组与 IFN- α +control siRNA 组间凋亡细胞数差异无统计学意义(图 3)。

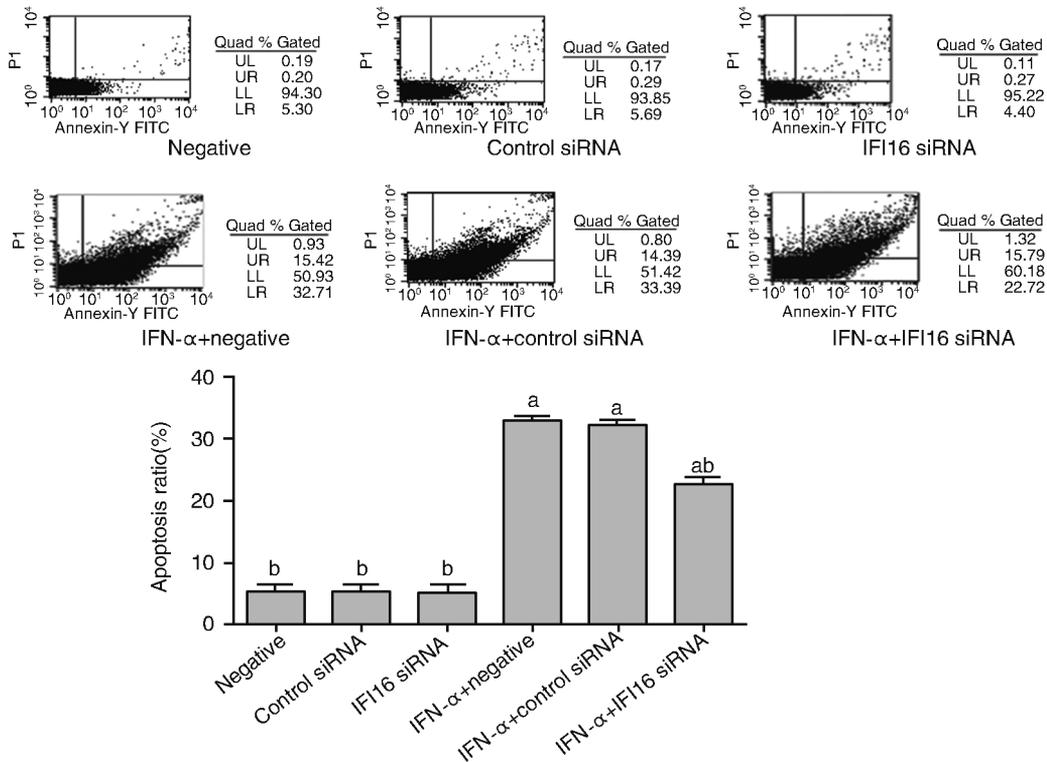


图 3. 干预后对 HBVAF 细胞凋亡的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 Negative 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 IFN- α +Negative 组比较。

Figure 3. Effect of intervention factors on apoptosis of HBVAF

3 讨论

血管壁内、中、外膜分别由血管内皮细胞、血管平滑肌细胞与 VAF 组成。长期以来均将前两者视为血管增殖性疾病病理改变的关键作用靶点, VAF 仅具有营养与支持的作用^[1]。然而随着研究的深入,发现在血管损伤后, VAF 增殖活性大于平滑肌细胞; VAF 获得 α 平滑肌肌动蛋白特征后转化为肌成纤维细胞, 并具备了平滑肌细胞的特点; 增强了 VAF 与肌成纤维细胞合成细胞外基质的能力。分泌合成的细胞外基质不但促进 VAF、平滑肌细胞增殖, 而且还促进血管内胶原蛋白纤维化诱导晚期血管狭窄^[10-11]。因此 VAF 各种功能的异常在血管重构过程中同样起着关键的作用, 故促进 VAF 凋亡并抑制其增殖对防治血管增殖性疾病至关重要。

IFN 是一组具有多种生物学效应(如抗增殖、调节免疫应答、抗病毒等)的活性细胞因子家族, 并被

分为 I 型(IFN- α 、 β 、 τ 等)、II 型(IFN- γ)和 III 型(IFN- λ)。体外实验显示 IFN- α 能抑制血管壁细胞增殖^[5-7]。在体实验发现动脉球囊损伤后通过在损伤局部转染过表达 IFN- β 或肠外给予 IFN- γ 能抑制新生内膜的形成以及血管平滑肌细胞增殖^[12-13]。提示在血管增殖性疾病的治疗过程中运用 IFN 是可行的。本研究结果也同样显示 IFN- α 能抑制 HBVAF 增殖以及促进其凋亡。

IFI16 蛋白在人体多种细胞(如上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞、单核/巨噬细胞、部分肿瘤细胞等)胞核与胞质中存在表达^[14]。本研究发现, IFI16 蛋白在 HBVAF 中存在基础表达。IFI16 蛋白氨基端有参与蛋白与蛋白相互作用的 PYD 结构域与核定位序列(nuclear localization sequence, NLS), 二者通过与凋亡、炎症反应信号通路相关蛋白之间的相互结合参与细胞增殖、凋亡、分化及炎症反应调控等过程^[14]。体外实验发现 IFI16 能抑制血管内皮细

胞^[5]、VAF^[15]增殖。在体实验证实对出生 7 周的裸鼠分别注射稳定表达 IFI16 基因以及不表达该基因的头颈部鳞状细胞癌细胞后,IFI16 组肿瘤内新生血管的合成减少,肿瘤组织也明显小于阴性对照组^[16]。但尚未明了 IFI16 在 VAF 凋亡过程中所扮演的角色。本研究结果发现,单纯下调 IFI16 的表达对 HBVAF 凋亡无明显影响,但能促进细胞 G/S 期转换。当 IFN- α 诱导 IFI16 表达增加后,更多的细胞停滞在 G0/G1 期,凋亡细胞数亦有所增加。然而通过 IFI16 siRNA 沉默表达 IFI16 后,IFN- α 的上述作用受到了抑制。推测 IFI16 可能是参与 IFN- α 促进 VAF 凋亡,抑制其增殖的机制之一。

综上所述,IFN- α 能促进 IFI16 表达,诱导 VAF 凋亡、抑制其增殖,但 IFI16 siRNA 沉默 IFI16 表达后可抑制 IFN- α 诱导的 VAF 凋亡,促进其增殖,推测 IFI16 可能参与了 IFN- α 对 VAF 凋亡、增殖的调控。从而为 IFN 及其诱导蛋白应用于血管增殖性疾病提供更多的理论依据。

[参考文献]

- [1] Chiang HY, Korshunov VA, Serour A, et al. Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (7): 1 074-079.
- [2] Tieu BC, Ju X, Lee C, et al. Aortic adventitial fibroblasts participate in angiotensin-induced vascular wall inflammation and remodeling[J]. *J Vase Res*, 2011, 48 (3): 261-272.
- [3] Motylewska E, Lawnicka H, Kowalewicz-KulbatM, et al. Interferon alpha and rapamycin inhibit the growth of carcinoma and medullary thyroid cancer in vitro[J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66 (4): 624-629.
- [4] 黄晶,宋方,龙向淑,等. α 干扰素对人脑血管成纤维细胞增殖、凋亡与迁移的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2013, 12 (29): 952-955.
- [5] 龙向淑,吴强,宋方. 干扰素诱导蛋白 16 对血管内皮细胞增殖的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21 (1): 29-33.
- [6] 龙向淑,吴强,宋方,等. Ras 信号途径参与干扰素- α 抑制大鼠平滑肌细胞增殖[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34 (7): 882-885.
- [7] Bekisz J, Baron S, Balinsky C, et al. Antiproliferative properties of type I and type II interferon[J]. *Pharmaceuticals*, 2010, 3 (4): 994-1 015.
- [8] Zhao H, Gonzalezgugel E, Cheng L, et al. The roles of interferon-inducible p200 family members IFI16 and p204 in innate immune responses, cell differentiation and proliferation[J]. *Genes Dis*, 2015, 2 (1): 46-56.
- [9] 宋方,田茂波,黄晶,等. 抑制干扰素诱导蛋白 p204 表达促进大鼠血管外膜成纤维细胞生长与迁移[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(1): 18-22.
- [10] Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant [J]. *Circ Res*, 2001, 89 (2): 1 111-121.
- [11] Stenmark KR, Davie N, Frid M, et al. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21 (1): 134-145.
- [12] Castronuovo JJ Jr, Guss SB, Mysh D, et al. Cytokine therapy for arterial restenosis: inhibition of neointimal hyperplasia by gamma-interferon [J]. *Cardiovasc Surg*, 1995, 3 (5): 463-468.
- [13] Stephan D, San H, Yang ZY, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia by gene transfer of beta-interferon[J]. *Mol Med*, 1997, 3 (9): 593-599.
- [14] Veeranki S, Choubey D. Interferon-inducible p200-family protein IFI16, an innate immune sensor for cytosolic and nuclear double-stranded DNA: Regulation of subcellular localization[J]. *Mol Immunol*, 2012, 49 (4): 567-571.
- [15] 黄晶,宋方,龙向淑,等. 干扰素诱导蛋白 16 对人脑血管外膜成纤维细胞增殖与迁移的影响及其机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29 (4): 584-589.
- [16] Mazibrada J, De Andrea M, Ritth M, et al. In vivo growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma by the interferon-inducible gene IFI16 [J]. *Cancer Lett*, 2010, 287 (1): 33-43.

(此文编辑 文玉珊)