

## Kindlin-2 RNA 干扰减轻大鼠颈动脉内膜增生

周青, 吴校林, 卞芳, 李宸宇, 朱通建, 胡河

(襄阳市中心医院 湖北文理学院附属医院心血管内科, 湖北省襄阳市 441000)

[关键词] Kindlin-2; RNA 干扰; 内膜增生; 颈动脉

[摘要] **目的** 观察 Kindlin-2 RNA 干扰对球囊损伤的大鼠颈动脉内膜增生的影响。**方法** 构建并制备 Kindlin-2 siRNA 和阴性对照慢病毒载体并感染球囊损伤的大鼠颈动脉, 1 周和 4 周后取损伤的颈动脉, 实时定量 PCR 检测 Kindlin-2 mRNA 的表达, HE 染色评估术后 4 周颈动脉内膜增生情况, 并行免疫荧光或免疫组化检测颈动脉中 Kindlin-2、 $\alpha$ -actin、PCNA 和  $\beta$ 1 整合素的表达, Masson 染色了解颈动脉中胶原纤维合成情况。**结果** Kindlin-2 RNA 干扰能明显降低 1 周时颈动脉中 Kindlin-2 mRNA 的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 并显著抑制 4 周后颈动脉的内膜增生 ( $P < 0.05$ )。与阴性对照组相比, Kindlin-2 siRNA 组术后 4 周颈动脉中 Kindlin-2、 $\alpha$ -actin、PCNA 和  $\beta$ 1 整合素的表达水平均明显降低, 颈动脉内膜和中膜胶原纤维的合成也减少。**结论** Kindlin-2 RNA 干扰可能通过抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移和细胞外基质合成减轻血管内膜增生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Kindlin-2 RNA interference alleviates intimal hyperplasia of rat carotid arteries

ZHOU Qing, WU Xiaolin, BIAN Fang, LI Chenyu, ZHU Tongjian, HU He

(Department of Cardiology, Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441000, Hubei, China)

[KEY WORDS] Kindlin-2; RNA interference; intimal hyperplasia; carotid artery

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of Kindlin-2 RNA interference on intimal hyperplasia in the balloon injured rat carotid arteries. **Methods** Kindlin-2 siRNA and negative control lentiviral vectors were constructed and produced, then balloon injured rat carotid arteries were infected with lentivirus. Carotid arteries were collected at 1 and 4 weeks after operation. The expression level of Kindlin-2 mRNA in the rat carotid arteries was detected by real-time quantitative PCR technique. The degree of intimal hyperplasia 4 weeks after balloon injury was assessed by HE staining. The immunofluorescence and histochemistry were used to detect the protein expression of Kindlin-2,  $\alpha$ -actin, PCNA and  $\beta$ 1-integrin in the carotid arteries. The synthesis of collagen fibers in the carotid arteries was investigated by Masson staining.

**Results** Kindlin-2 RNA interference can significantly reduce the Kindlin-2 mRNA expression level in the rat carotid arteries at 1 week ( $P < 0.05$ ), and significantly inhibited intimal hyperplasia of carotid arteries 4 weeks after balloon injury ( $P < 0.05$ ). Compared with the negative control group, the protein expression levels of Kindlin-2,  $\alpha$ -actin, PCNA and  $\beta$ 1-integrin were significantly decreased in the carotid arteries of the Kindlin-2 group 4 weeks after operation. The synthesis of collagen fibers in the carotid arteries intima and media was also reduced. **Conclusion** Kindlin-2 RNA interference may inhibit vascular smooth muscle cell proliferation, migration and extracellular matrix synthesis to alleviate intimal hyperplasia.

血管内膜增生(intima hyperplasia, IH)是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等心脑血管疾病共同的病理特征<sup>[1-2]</sup>。血管内膜增生发病机制复

杂, 目前认为可能与血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖、迁移及合成大量细胞外基质(extra cellular matrix, ECM), 内皮功能障

[收稿日期] 2018-05-14

[修回日期] 2018-05-27

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81600288)

[作者简介] 周青, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病的机制研究, E-mail 为 jgzhq3000@163.com。通信作者吴校林, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的机制研究, E-mail 为 wxling.23@163.com。

碍与损伤,血小板聚集与血栓形成,脂质沉积,炎症反应等多种因素有关<sup>[3-5]</sup>。近期研究发现 Kindlin-2 通过活化整合素参与细胞增殖、迁移、细胞-细胞外基质黏附、细胞骨架重构以及炎症等生理过程<sup>[6]</sup>,提示 Kindlin-2 可能影响血管内膜增生。本文通过观察 Kindlin-2 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生的影响,探讨 Kindlin-2 在血管内膜增生中的作用机制,并为治疗心脑血管疾病提供新的思路。

## 1 实验和方法

### 1.1 材料和试剂

大龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自武汉大学动物实验中心,6~8 月龄,350~400 g,许可证号 SCXK(鄂)2008-0004。小鼠抗  $\alpha$  肌动蛋白( $\alpha$ -actin)、兔抗 Kindlin-2 抗体购自美国 Sigma 公司,兔抗  $\beta$ 1 整合素和兔抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体购自美国 Millipore 公司,Cy3 标记的羊抗兔二抗和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记羊抗小鼠二抗购自美国 Santz Cruz 公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司,Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。实时定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒购自 Fermentas 中国公司。

### 1.2 Kindlin-2 慢病毒载体的构建与制备

根据 GenBank 数据库中大鼠 Kindlin-2 基因序列(NM\_001011915)和 RNAi 原理,构建 3 条 siRNA (small interfering RNA)序列及 1 条阴性对照序列(上海吉凯基因化学技术有限公司),Kindlin-2 siRNA 靶向序列分别为 5'-CAAACAGATAACAG-CACGG-3', 5'-CAGACAGCTCTTACAACCT-3'和 5'-CTGAAGATGCAACATCTGA-3',阴性对照序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTACCGT-3'。选择最有效的一条 Kindlin-2 siRNA 靶序列(第 1 条)合成含有绿色荧光蛋白基因标记的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)并插入到慢病毒载体 GV118 基因组中,然后共转染至 293T 细胞中培养,之后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液并进行浓缩,采用逐孔稀释滴度测定法,测定慢病毒滴度接近  $1 \times 10^{12}$  TU/L。

### 1.3 大鼠颈动脉球囊损伤模型及慢病毒感染

SD 大鼠随机分为假手术组( $n=12$ )、阴性对照组( $n=16$ )和 Kindlin-2 siRNA 组( $n=16$ ),40 mg/kg

戊巴比妥钠腹腔麻醉后,颈部正中切口暴露左颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,颈外静脉给予普通肝素(100 U/kg)抗凝后,用显微血管夹夹闭左颈总动脉近心端和颈内动脉,临时阻断血流。在颈外动脉剪一斜形切口,将 1.25 mm $\times$ 15 mm 球囊从颈外动脉切口逆行插入颈总动脉,充盈球囊后将球囊旋转并来回抽动,重复 3~5 次,以剥脱内膜。退出球囊,将 50  $\mu$ L Kindlin-2 siRNA 慢病毒或阴性对照慢病毒稀释液( $2 \times 10^{11}$  TU/L)注入损伤动脉节段(约 2 cm),局部作用 30 min,结扎颈外动脉,松开血管夹,缝合颈部切口,普通饮食喂养 4 周。假手术组仅分离出左颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉后缝合伤口。

### 1.4 实时定量 PCR 检测 Kindlin-2 mRNA 的表达

于 1 周和 4 周时取球囊损伤和慢病毒感染的左颈总动脉,组织匀浆后使用 Trizol 试剂抽提总 RNA,取总 RNA 3  $\mu$ g 在 20  $\mu$ L 逆转录体系中合成 cDNA,以 4  $\mu$ L cDNA 为模板加入 Kindlin-2 上下游引物和 SYBR 荧光复合物在 20  $\mu$ L 反应体系中进行 PCR 扩增,并连续测定荧光强度,利用 ABI Prism 7900 软件分析得到每个样品的 Ct 值,使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值分析结果。引物序列分别为 Kindlin-2 上游 5'-AGATCTGGCT-TCGCTGTGAT-3',下游 5'-CGGGATTGATGTCAGTT-GTG-3';内参( $\beta$ -actin)上游 5'-CACGATGGAGGG-GCCGGACTCATC-3',下游 5'-TAAAGACCTCTATGC-CAACACAGT-3'。

### 1.5 HE 染色检测内膜增生

4 周后取剩余大鼠的左颈总动脉,血管标本经 4%多聚甲醛固定、脱水及石蜡包埋,切成厚 4  $\mu$ m 切片。苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,日本尼康显微镜下观察血管横切面新生内膜增生情况并拍照。每份标本非连续切片 5 张,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定血管内膜和中膜面积,并计算内膜和中膜面积比(intima/media, I/M)。

### 1.6 免疫组化或免疫荧光技术检测

取石蜡包埋的血管标本切片,脱蜡至水抗原修复后,加入用 5% BSA 按一定比例稀释好的抗 Kindlin-2 (1 : 250)、 $\alpha$ -actin (1 : 400)、PCNA (1 : 500)、 $\beta$ 1 整合素(1 : 250)抗体覆盖组织,切片平放于湿盒内 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗涤后再分别加入 Cy3、FITC 和 HRP 标记的二抗,避光室温孵育 50 min。免疫组化用二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色后苏木素复染细胞核,脱水封片,免疫荧光使用 4,6-联脒-2-2 苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核后封片,均在日本尼康荧光显微镜下观察并采集图像,采用

Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行数据分析。

### 1.7 Masson 染色检测胶原纤维

石蜡包埋的血管标本切片,脱蜡至水,苏木精染细胞核后用 Masson 复合染色液 5~10 min,醋酸洗涤后用磷钼酸水溶液处理,苯胺蓝染色 5 min,最后中性树脂封片于显微镜下照相。阳性结果为胶原纤维呈蓝色,胞浆、纤维素呈红色,胞核呈蓝黑色。

### 1.8 统计学处理

所有数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。计量数据的比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RNA 干扰对颈动脉中 Kindlin-2 mRNA 表达的影响

与假手术组相比,阴性对照组和 Kindlin-2 siRNA 组颈总动脉中 Kindlin-2 mRNA 水平在 1 周和 4 周时均明显升高( $P < 0.05$ ),1 周和 4 周时 Kindlin-2 siRNA 组 Kindlin-2 mRNA 水平较阴性对照组都显著降低( $P < 0.05$ ),提示大鼠颈动脉慢病毒感染和 Kindlin-2 RNA 干扰有效,且作用能持续到第 4 周(图 1)。

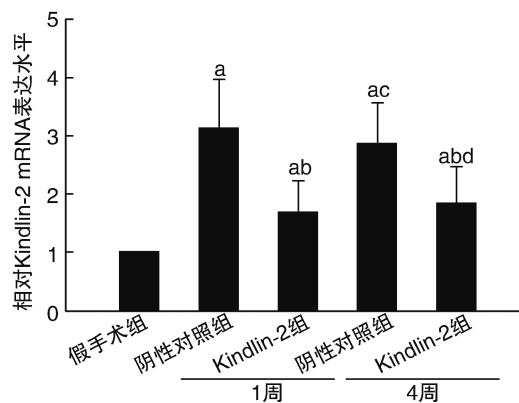


图 1. 颈动脉中 Kindlin-2 mRNA 相对水平比较 a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组相比;b 为  $P < 0.05$ ,与阴性对照组(1 周)相比;c 为  $P < 0.05$ ,与 Kindlin-2 siRNA 组(1 周)相比;d 为  $P < 0.05$ ,与阴性对照组(4 周)相比。

Figure 1. Comparison of relative levels of Kindlin-2 mRNA in carotid arteries

### 2.2 Kindlin-2 RNA 干扰抑制内膜增生

大鼠颈动脉球囊损伤和慢病毒感染 4 周后,通过 HE 染色和图像定量分析得出 Kindlin-2 siRNA 组和阴性对照组颈动脉内膜较假手术组明显增生( $P < 0.05$ ),Kindlin-2 siRNA 组内膜/中膜面积比较阴性对照组显著降低( $P < 0.05$ ),提示 Kindlin-2 siRNA 慢病毒感染能抑制颈动脉内膜增生(图 2)。

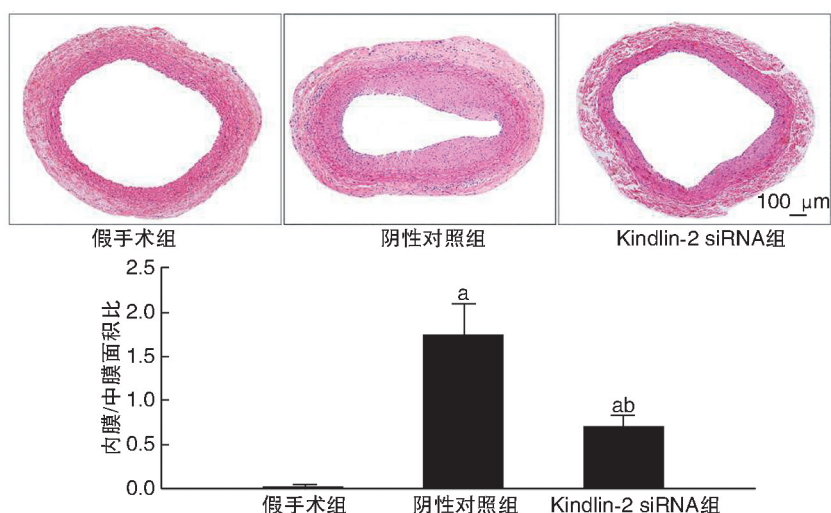


图 2. 大鼠颈动脉内膜增生比较 a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组相比;b 为  $P < 0.05$ ,与阴性对照组相比。

Figure 2. Comparison of carotid intimal hyperplasia in rats

### 2.3 颈动脉中 Kindlin-2 和 $\alpha$ -actin 免疫荧光表达

大鼠颈动脉球囊损伤和慢病毒感染 4 周后通过免疫荧光来检测颈动脉中 Kindlin-2 和  $\alpha$ -actin 蛋白表达水平,进一步评估慢病毒感染和 RNA 干扰的效果,采用 Kindlin-2 和  $\alpha$ -actin/DAPI 荧光强度比进行比较分析,结果显示 Kindlin-2 siRNA 组颈动脉中

Kindlin-2 和  $\alpha$ -actin 蛋白表达水平较阴性对照组明显降低,但较假手术组升高(图 3)。

### 2.4 Kindlin-2 RNA 干扰对 PCNA 和 $\beta 1$ 整合素表达的影响

大鼠颈总动脉中 PCNA 免疫组化染色显示,假手术组可见少量阳性细胞,阴性对照组可见大量阳

性细胞,主要分布在新生的内膜中,Kindlin-2 siRNA慢病毒感染后阳性细胞减少,提示 Kindlin-2 RNA 干扰能抑制细胞增殖。 $\beta 1$  整合素免疫组化染色结果显示 Kindlin-2 siRNA 组颈总动脉内膜和中膜中  $\beta 1$  整合素的表达较阴性对照组明显降低,而 Kindlin-2 siRNA 组和阴性对照组  $\beta 1$  整合素的表达均较假手术组升高(图 4)。

### 2.5 颈动脉 Masson 染色结果

Kindlin-2 siRNA 组和阴性对照组大鼠颈动脉内膜和中膜中胶原纤维较假手术组明显增多,表明结缔组织增多,而 Kindlin-2 siRNA 慢病毒感染后胶原纤维的合成较阴性对照组显著减少,内膜增生减轻(图 5)。

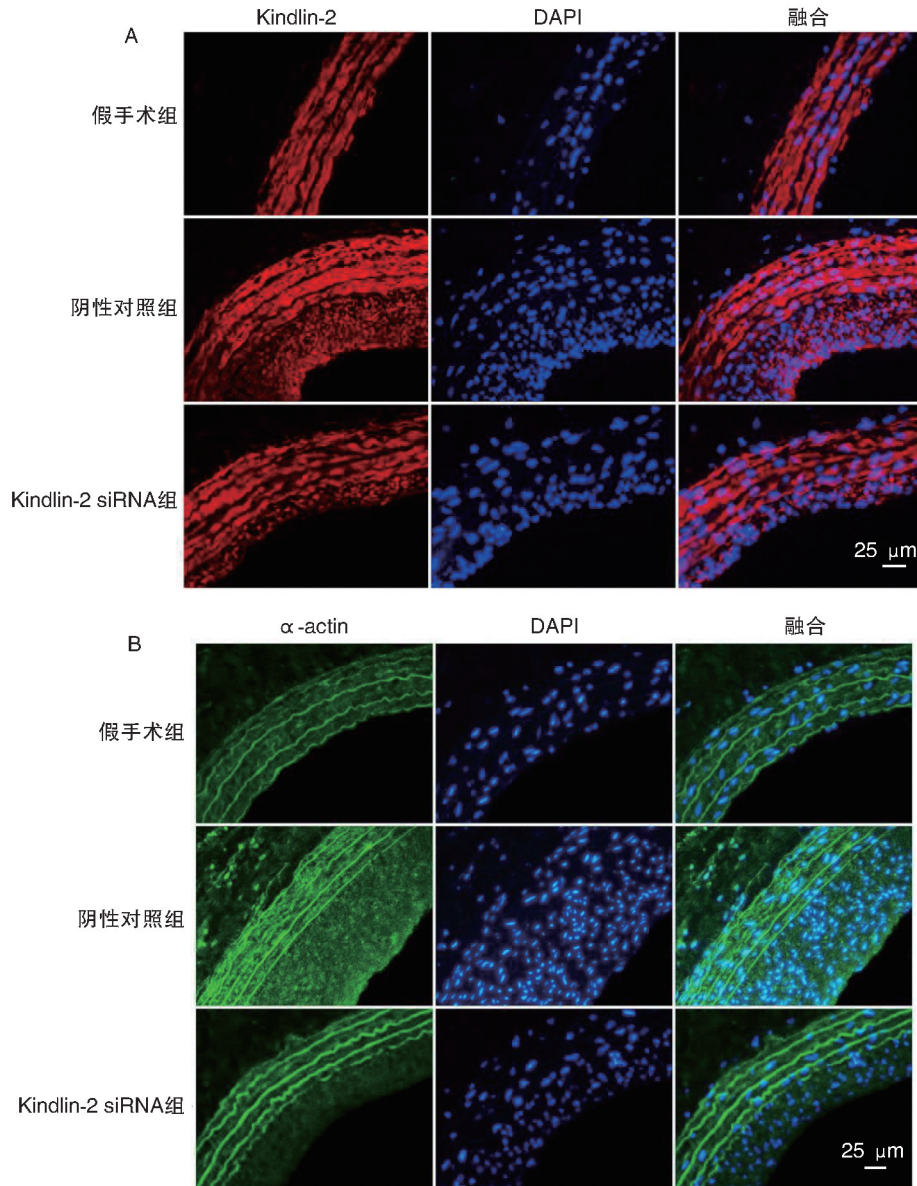


图 3. 颈动脉中 Kindlin-2 和  $\alpha$ -actin 蛋白表达 A 为颈动脉中 Kindlin-2 红色荧光表达,B 为颈动脉中  $\alpha$ -actin 绿色荧光表达。

Figure 3. The expression of Kindlin-2 and  $\alpha$ -actin protein in carotid arteries

### 3 讨论

VSMC 异常增殖、中膜向内膜迁移、细胞外基质沉积是血管内膜增生的重要基础,也是影响动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的主要原因<sup>[1-4]</sup>。尽

管随着抗增殖药物、药物洗脱支架的广泛使用,一定程度上减少了再狭窄的发生,但引起的内皮化延迟、支架内血栓等并发症已成为临床上比较棘手的问题<sup>[1,7-8]</sup>。目前,如何防治血管内膜增生和再狭窄是心血管疾病领域研究的热点问题。RNA 干扰诱

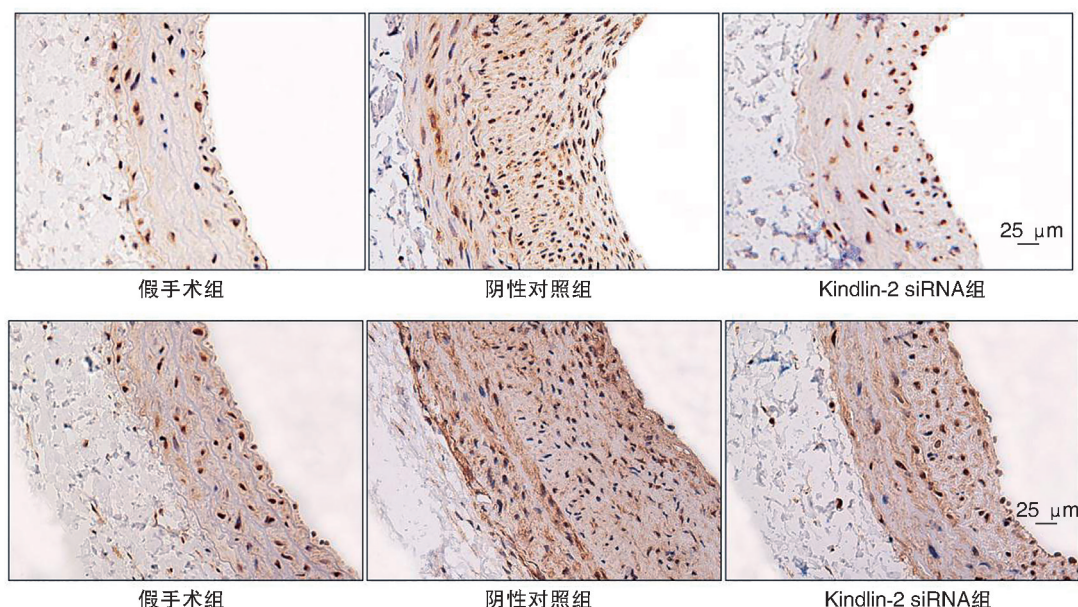


图 4. 大鼠颈动脉中 PCNA(上图)和  $\beta 1$  整合素(下图)的表达

Figure 4. The expression of PCNA(above) and  $\beta 1$  integrin(below) protein in rat carotid arteries

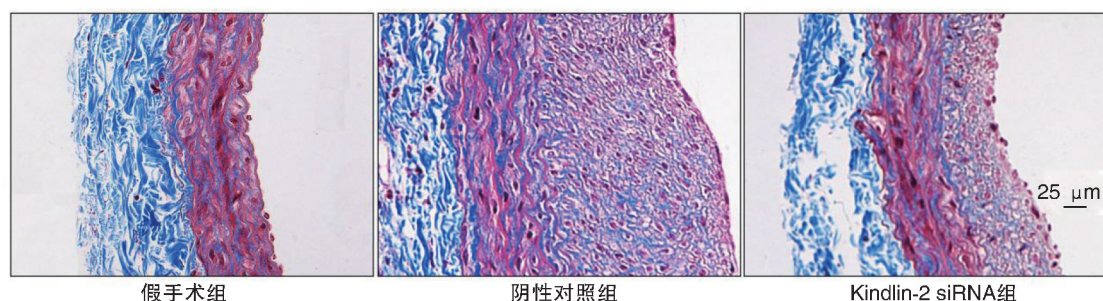


图 5. 大鼠颈动脉中胶原纤维的表达

Figure 5. The expression of collagen fibers in rat carotid arteries

导的基因沉默具有低毒性、特异性、高效性等特点,作为基因治疗方法引起了许多研究者的兴趣<sup>[9]</sup>。我们根据 RNA 干扰原理,构建了 Kindlin-2 siRNA 慢病毒载体并感染球囊损伤大鼠颈动脉,结果显示能显著抑制颈动脉内膜增生。

Kindlin-2 是近期发现的黏着斑蛋白,属于 Kindlin 家族的一个成员,含有一个典型的 FERM 结构域(four-point-one, ezrin, radixin, moesin),它通过 FERM 结构域与整合素  $\beta$  亚基胞内段相互作用,在细胞增殖、迁移、分化、细胞-细胞外基质黏附、细胞骨架重构以及整合素介导的双向信号传导中都具有重要的作用<sup>[10-12]</sup>。目前对于 Kindlin-2 的生理功能还知之甚少,之前的研究发现 Kindlin-2 基因敲除的小鼠和斑马鱼心脏发育严重异常并具有胚胎致死性,提示 Kindlin-2 在机体发育中有重要作

用<sup>[11-12]</sup>。在细胞水平,Kindlin-2 基因敲除能明显降低胚胎干细胞黏附于层黏蛋白和纤维连接蛋白的能力<sup>[11]</sup>。而且 Kindlin-2 也能够调节足细胞-基质黏附和基质沉积<sup>[13]</sup>。本文通过 Kindlin-2 siRNA 慢病毒感染大鼠颈动脉,实时定量 PCR 检测颈动脉中 Kindlin-2 mRNA 水平,免疫荧光检测颈动脉中 Kindlin-2 蛋白的表达,结果显示慢病毒感染有效并能通过 Kindlin-2 siRNA 降低颈动脉中 Kindlin-2 mRNA 和蛋白的表达。我们进一步研究发现 Kindlin-2 siRNA 能显著抑制大鼠颈动脉内膜增生。为了阐明 Kindlin-2 RNA 干扰影响内膜增生的作用机制,我们检测了颈动脉中  $\alpha$ -actin、 $\beta 1$  整合素及胶原纤维的表达,结果表明 Kindlin-2 RNA 干扰能明显降低颈动脉中  $\alpha$ -actin、 $\beta 1$  整合素和胶原纤维的表达。

整合素属于跨膜糖蛋白,由  $\alpha$ 、 $\beta$  两个亚基组

成,是连接细胞内信号传导和细胞外基质环境的纽带,Kindlin-2 可以与整合素  $\beta$  亚基胞内段结合介导整合素双向信号转导<sup>[14-15]</sup>。 $\alpha$ -actin 是 VSMC 的标志之一,可以反映 VSMC 的增殖和合成能力<sup>[16]</sup>。胶原是构成正常血管壁和新生内膜细胞外基质的主要成分之一,主要由 VSMC 合成并且是整合素的配体<sup>[17]</sup>。根据我们的实验结果得出 Kindlin-2 RNA 干扰可能通过抑制整合素的活性和表达,减弱整合素胞外段和细胞外配体结合,影响细胞骨架重组、细胞形成黏着斑和伪足等生理过程,进而抑制 VSMC 增殖、迁移和细胞外基质合成并减轻血管内膜增生。但具体的作用机制及信号转导通路还有待进一步研究。本研究通过 Kindlin-2 RNA 干扰有效的抑制了球囊损伤的大鼠颈动脉内膜增生,这为临床上治疗动脉粥样硬化和再狭窄提供了一个重要的作用靶点和新的治疗思路。

#### [参考文献]

- [1] Curcio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy[J]. *Circ J*, 2011, 75(6): 1287-1296.
- [2] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, 214(1): 33-50.
- [3] Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, et al. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression[J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22(6): 399-411.
- [4] Subbotin VM. Excessive intimal hyperplasia in human coronary arteries before intimal lipid depositions is the initiation of coronary atherosclerosis and constitutes a therapeutic target[J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(10): 1578-1595.
- [5] 徐健,冯丰,刘闰兰,等.转染 OPN-002-siRNA 对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生和 OPN、TGF- $\beta$ 1、PCNA 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(11): 1107-1112.
- [6] Lai-Cheong JE, Parsons M, McGrath JA. The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(5): 595-603.
- [7] Lee SY, Hong MK, Jang Y. Formation and transformation of neointima after drug-eluting stent implantation: insights from optical coherence tomographic studies [J]. *Korean Circ J*, 2017, 47(6): 823-832.
- [8] 许振业,柳景华,王韶屏,等.经皮冠状动脉介入治疗对内皮功能影响的研究进展[J]. *心肺血管病杂志*, 2016, 7(35): 584-587.
- [9] Qiu Y, Lam JK, Leung SW, et al. Delivery of RNAi therapeutics to the airways-from bench to bedside [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): pii: E1249.
- [10] Bledzka K, Bialkowska K, Sossey-Alaoui K, et al. Kindlin-2 directly binds actin and regulates integrin outside-in signaling[J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(1): 97-108.
- [11] Montanez E, Ussar S, Schifferer M, et al. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(10): 1325-1330.
- [12] Pluskota E, Dowling JJ, Gordon N, et al. The integrin co-activator kindlin-2 plays a critical role in angiogenesis in mice and zebrafish [J]. *Blood*, 2011, 117(18): 4978-4987.
- [13] Qu H, Tu Y, Shi X, et al. Kindlin-2 regulates podocyte adhesion and fibronectin matrix deposition through interactions with phosphoinositides and integrins[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 6): 879-891.
- [14] Cheah M, Andrews MR. Integrin activation: implications for axon regeneration[J]. *Cells*, 2018, 7(3). pii: E20.
- [15] Malinin NL, Pluskota E, Byzova TV. Integrin signaling in vascular function[J]. *Curr Opin Hematol*, 2012, 19(3): 206-211.
- [16] Li P, Zhu N, Yi B, et al. MicroRNA-663 regulates human vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular neointimal formation [J]. *Circ Res*, 2013, 113(10): 1117-1127.
- [17] Petersen JW, Douglas JY. Tenascin-X, collagen, and Ehlers-Danlos syndrome: tenascin-X gene defects can protect against adverse cardiovascular events[J]. *Med Hypotheses*, 2013, 81(3): 443-447.

(此文编辑 许雪梅)