

IFN- γ 干扰素对大鼠血管平滑肌细胞增殖及增殖细胞核抗原表达的影响

丁 钢¹, 祝之明, 祝善俊, 杨永健, 钟 健, 王海燕, 张卓奇², 黄永麟²

(第三军医大学大坪医院高血压中心实验室, 重庆 400042;

1. 哈尔滨 211 医院心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150080; 2. 哈尔滨医科大学第一临床医院心内科)

[主题词] IFN- γ 干扰素; 血管平滑肌细胞; 增殖细胞核抗原

[摘 要] 为观察 IFN- γ 干扰素对血管平滑肌细胞增殖的影响及探讨其作用机制, 培养大鼠主动脉血管平滑肌细胞, 以 IFN- γ 干扰素 (500 ku/L) 刺激血管平滑肌细胞 24 h 后, 通过氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法及 Western 杂交印迹法观察 IFN- γ 干扰素作用 24 h 对大鼠血管平滑肌细胞 DNA 合成及增殖细胞核抗原表达的影响。结果发现 IFN- γ 干扰素明显抑制 10% 胎牛血清刺激血管平滑肌细胞引起的增殖细胞核抗原表达增多及氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入增高 ($P < 0.01$), 表明 IFN- γ 干扰素具有较强的抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖的作用。

[中图分类号] R361

[文献标识码] A

Effects of IFN- γ on VSMC Proliferation and Its Expression of PCNA Protein in Rat

DING Gang¹, ZHU Zhi-Ming, ZHU Shan-Jun, YANG Yong-Jian, ZONG Jian, WANG Hai-Yan, ZHANG Zuo-Qi², and HUANG Yong-Lin²

(Hypertension Center of Daping Hospital, Chongqing 400042, China; 1. Postdoctor of Daping Hospital, the Cardiovascular Department of 211 Hospital in Harbin at Present, 150080; 2. The First Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China)

[MeSH] Interferon γ ; Vascular Smooth Muscle Cell; Proliferating Cell Nuclear Antigen

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of interferon γ (IFN- γ) on rat vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and its expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Methods** The changes of tritium-labelled thymidine (³H-TdR) incorporation into rat VSMC and PCNA expression (Western blotting) were observed after 24 h stimulation with IFN- γ .

Results IFN- γ (500 ku/L) markedly suppressed serum-stimulated ³H-TdR incorporation into VSMC from $7\,865 \pm 1\,054$ cpm/well in the serum group to $4\,914 \pm 1\,078$ cpm/well in the co-cultured group with serum and IFN- γ ($P < 0.01$), and decreased PCNA expression from 167.62 ± 8.03 in serum group to 120.65 ± 10.2 (Western blotting, absorbance) in the co-cultured group ($P < 0.01$). **Conclusions** The results suggested that IFN- γ inhibit PCNA expression and DNA synthesis of rat VSMC, and suppress VSMC proliferation.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖为血管再狭窄形成的关键环节^[1]。IFN- γ 干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 系一种具有抑制细胞增殖活性的细胞因子, 已有研究显示干扰素抑制 VSMC、成纤维细胞、内皮细胞、淋巴母细胞及 T 淋巴细胞等多种细胞增殖^[2,3], 但关于 IFN- γ 对 VSMC 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达和 DNA 合成的影响尚少有报道。为此, 我们培养大鼠 VSMC, 以氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷 (tritium-labelled thymidine, ³H-TdR) 掺入和蛋白印迹杂交 (Western blot hybridization, Western blotting) 技术观察 IFN- γ 对

DNA 合成和 PCNA 表达的影响, 以进一步证实 IFN- γ 的抗 VSMC 增殖作用, 并为其作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -actin) 单克隆抗体、波形蛋白单克隆抗体、PCNA 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记二抗、链霉素亲生物素—过氧化物酶标免疫组织化学试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。化学发光试剂盒购自 NEN-WTM Life Science 公司。³H-TdR 购自北京原子能研究所。IFN- γ 试剂购自英国 Peprotech 公司。

1.2 血管平滑肌细胞培养及鉴定

取 6~8 周 200~250 g Wistar-Kyoto 大鼠 22 只, 无菌条件下分离出动脉, 剥去外膜, 棉签擦除内皮, 贴块法培养于含 10% 胎牛血清的 M199 培养液中,

[收稿日期] 2002-06-03 [修回日期] 2002-09-12

[作者简介] 丁钢, 第三军医大学大坪医院高血压内分泌科博士后, 现在哈尔滨 211 医院心内科工作, 从事冠心病临床及科研工作, 发表论著 20 余篇。祝之明, 第三军医大学大坪医院高血压内分泌科主任, 教授, 博士生导师。祝善俊, 第三军医大学新桥医院心内科, 教授, 博士生导师。

细胞呈岛状贴壁生长,待呈融合状态时,以 0.01% 胰蛋白酶消化传代。VSMC 鉴定:用 α -actin 抗体和波形蛋白抗体进行免疫细胞化学染色, α -actin 染色阳性、波形蛋白染色阴性为 VSMC^[4]。

1.3 实验细胞分组

实验用第 7~15 代 VSMC,等细胞铺满平皿 80% 后,用无血清的 M199 培养基继续培养 48 h 使 VSMC 处于静止状态,然后分为 4 组,每组 8~10 皿:

对照组(Control):仅用 M199 培养基,培养细胞 24 h。 $\text{IFN-}\gamma$ 组:加入 $\text{IFN-}\gamma$ (500 ku/L),孵育细胞 24 h。(血清刺激组(Serum):加入 10% 胎牛血清,孵育细胞 24 h。血清(Serum) + $\text{IFN-}\gamma$ 组:10% 胎牛血清中加入 $\text{IFN-}\gamma$ (500 ku/L),孵育细胞 24 h。

1.4 免疫组织化学染色

4% 多聚甲醛固定细胞 24 h,SP 法染色,二氨基联苯胺显色, α -actin 单克隆抗体、波形蛋白单克隆抗体的工作浓度均为 1:200。

1.5 氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入

悬浮各组 VSMC,调整细胞密度至 $10^7 \sim 10^9$ 个/L,接种于 24 孔培养板(每孔 1 mL),每组 6 孔。每孔加入 100 μ L 的 $^3\text{H-TdR}$ (终浓度为 3.7×10^{10} Bq/L), 37°C 、95% 空气 + 5% CO_2 条件下孵育 24 h。各孔 VSMC 经洗涤、悬浮、滤纸收集、破碎后,以液体闪烁计数器测定放射性强度,以每孔每分钟计数(count per minute, cpm)即 cpm/孔表示 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量,以此反应细胞 DNA 合成速率。实验重复 6 次。

1.6 增殖细胞核抗原蛋白印迹杂交

以含苯甲基磺酰氟的细胞裂解缓冲液收集各组培养皿的 VSMC 为一个样本,冰浴超声粉碎, 4°C 12 000 g 离心,分光光度仪测定蛋白浓度,分装贮存于 -70°C 待用。配制聚丙烯酰胺凝胶,蛋白变性,每孔加样 80 μ g,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,PCNA 抗体(1:2000)孵育 3~4 h,二抗(1:1000)孵育 1~2 h,暗室 NEN 发光试剂中 X 光片曝光,显影和定影。凝胶扫描成像系统分析,蛋白表达量用吸光度(absorbance, A)表示。每个样本重复做 3 次后取平均值,实验共重复 3 次。

1.7 统计学分析

所测数据用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以校正 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞的鉴定

免疫细胞化学染色,平均每个视野下 95% 的细

胞胞浆内 α -actin 染色呈黄色,为阳性着色;小于 5% 的细胞波形蛋白染色阳性,证明培养的细胞为 VSMC。

2.2 血管平滑肌细胞氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入及增殖细胞核抗原蛋白表达变化

增殖细胞核抗原 Western blotting 结果出现了特异结合带,分子质量 36 kDa。血清组 $^3\text{H-TdR}$ 掺入及 PCNA 蛋白表达明显高于血清 + $\text{IFN-}\gamma$ 组,两组 $^3\text{H-TdR}$ 掺入分别为 $7\,865 \pm 1\,054$ 和 $4\,914 \pm 1\,078$ cpm/孔,PCNA A 值分别为 167.62 ± 8.03 和 120.65 ± 10.2 ,经统计学处理后均有显著性差异($P < 0.01$)。与对照组比较,单纯 $\text{IFN-}\gamma$ 对大鼠 VSMC 的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入无明显影响,但 $\text{IFN-}\gamma$ 可抑制 PCNA 表达,其 A 值由 74.54 ± 13.28 降至 56.80 ± 4.42 ($P < 0.05$) (表 1, Table 1; 图 1, Figure 1)。

表 1. γ -干扰素对大鼠血管平滑肌细胞氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入和增殖细胞核抗原表达的影响。

Table 1. Effects of $\text{IFN-}\gamma$ on $^3\text{H-TdR}$ incorporation and PCNA expression of rat VSMC ($\bar{x} \pm s$).

Groups	$^3\text{H-TdR}$ (cpm/well)	PCNA (A)
Control	$3\,950 \pm 786$	74.54 ± 13.28
$\text{IFN-}\gamma$	$4\,059 \pm 574^c$	56.80 ± 4.42^{ac}
Serum	$7\,865 \pm 1\,054^b$	167.62 ± 8.03^b
Serum + $\text{IFN-}\gamma$	$4\,914 \pm 1\,078^c$	120.65 ± 10.20^{bc}

$^3\text{H-TdR}$: $n = 6$; PCNA: $n = 3$; a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.01$, compared with serum group.

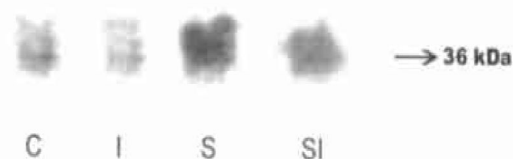


图 1. γ -干扰素对大鼠血管平滑肌细胞增殖细胞核抗原表达的影响(Western blotting)。

Figure 1. Effect of $\text{IFN-}\gamma$ on PCNA expression of rat VSMC (Western blotting). C: control; I: $\text{IFN-}\gamma$; S: serum; SI: serum + $\text{IFN-}\gamma$.

3 讨论

血管再狭窄的关键性发病机制是 VSMC 增殖,寻找可行的抗 VSMC 增殖因子是目前研究的热点。 $\text{IFN-}\gamma$ 具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等作用, $\text{IFN-}\gamma$ (500~1 000 ku/L) 还具有抗细胞增殖的作用^[5],但关于 $\text{IFN-}\gamma$ 对 VSMC PCNA 表达的影响还少有报道。

本文以 IFN- γ 刺激大鼠 VSMC, 观察其对³H-TdR 掺入及 PCNA 表达的影响。结果发现 IFN- γ 对血清刺激引起的³H-TdR 掺入增高和 PCNA 表达均有明显的抑制作用, 单独应用 IFN- γ 孵育 VSMC, 即可抑制 PCNA 表达。PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 所依赖的辅助蛋白, 在 DNA 合成中起重要作用, 是细胞增殖的重要指标, PCNA 表达具有细胞周期依赖性, 在 G₁ 后期开始表达, 于 S 期表达最明显^[6]。本文发现 IFN- γ 可明显抑制大鼠 VSMC 表达 PCNA, 抑制³H-TdR 掺入, 结果提示 IFN- γ 限制 VSMC 由 G₁ 期进入 S 期, 抑制 VSMC 增殖。据文献报道, 干扰素还上调细胞周期负控蛋白(如 p21、p15、p19)^[7], 抑制 cyclin/CDK 活性, 抑制细胞周期素 A 和 D₃ 的表达^[8], 所有这些都为 IFN- γ 用于防治血管再狭窄提供了依据。

[参考文献]

- [1] Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Progress in Cardiovascular Disease*, 1997, **40**: 107-116
- [2] Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M, et al. Interferon γ induces AT₂ receptor expression in fibroblasts by Jak/STAT pathway and interferon regulatory factor 1. *Circ Res*, 2000, **86** (2): 233-240
- [3] Sato M, Ohsaki Y, Tobise K. Transforming growth factor-beta 1 proliferated vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 1995, **8** (2): 160-166
- [4] Sallì O, Schurch W, Seemayer T, et al. Myofibroblasts from diverse pathologic setting are heterogeneous in their content filament proteins. *Lab Invest*, 1989, **60**: 275-285
- [5] Hu W, Verschraegen CF, Wu WG, et al. Activity of ALRT 1550, a new retinoid, with interferon gamma on ovarian cancer cell lines. *Int J Gynecol Cancer*, 2002, **12** (2): 202-207
- [6] Assy N, Minuk G Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol*, 1997, **26** (4): 945-952
- [7] Matsoka M, Kenzaburo T, Shigetaka A. Interferon alpha-induced G₁ phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors p19Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages. *Oncogene*, 1998, **16**: 2 075-086
- [8] Sibinga NE, Perrella MA, Endege WO, et al. Interferon gamma mediated inhibition of cyclin A gene transcription is independent of individual cis-acting elements in the cyclin A promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274** (17): 12 139-146

(此文编辑 曾学清)

•消息•

“高品位, 低价格” 《医学综述》是您最佳选择 邮发代号: 6- 106

国内首家•大型•综述•特色•半月刊•只收成本费
注重品位•注重质量•注重科学•注重信息•注重实用

《医学综述》是卫生部主管的国家级期刊。具有力是雄厚而庞大的编委会阵容, 自 1994 年创刊以来, 得到了广大读(作)者的热心支持, 深受数百万读者的喜爱, 更为众多作者荣升高级职称而庆幸。为了更快、更广泛地介绍世界医学前沿最新进展信息, 本刊于 2003 年由月刊改为半月刊, 全年 24 期。大 16 开, 封皮以进口铜版纸彩色印刷, 内文纸为 80 g 双胶。国内外公开发行, 全国各邮局(所)均可订阅。

主要栏目: 分子生物学、遗传学、免疫学、流行病学、影像学、兼症医学及传统分类的心血管、呼吸、消化、内分泌、神经精神及肿瘤、血液病等系统。是医学院校、科研院所, 硕士、博士研究生和临床医务工作者发表学术见解和学术研究成果及探讨医学进展的极佳园地。创建理论综述版和临床实践版。

《医学综述》欢迎您。相信您的选择一用低价格, 获得高品位。只收成本费, 邮发代号: 6- 106

联系地址: 天津医科大学第二医院《医学综述》(300211)

咨询电话: 022- 86316418 010- 69514263 E-mail: yxzs@btamail.net.cn