

TFPI 基因转染对血管平滑肌细胞中细胞凋亡抑制蛋白的调控

马丹丹¹, 李辉¹, 傅羽¹, 赵勇², 刘越¹, 尹新华¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001; 2. 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 基因转染; 组织因子途径抑制物; 血管平滑肌细胞; 细胞凋亡抑制蛋白 1; survivin

[摘要] **目的** 研究组织因子途径抑制物(TFPI)基因转染对大鼠血管平滑肌细胞中细胞凋亡抑制蛋白(IAP)表达的影响,探讨 TFPI 诱导细胞凋亡的可能机制。**方法** 将含有人 TFPI 基因的重组腺病毒或含 β -半乳糖苷酶(LacZ)基因的重组腺病毒或 DMEM 在体外分别转染大鼠血管平滑肌细胞,用 ELISA 方法测定转染后细胞中 TFPI 蛋白的表达水平,用 RT-PCR 方法测定基因转染后不同时间点细胞中 c-IAP1 mRNA 的表达,用 Western-blot 方法检测基因转染后不同时间点细胞中 survivin 的表达。**结果** 基因转染后 1 天在血管平滑肌细胞中即可检测到 TFPI 蛋白表达,峰值出现在转染后第 3 天;基因转染后 3 天和 7 天,TFPI 组 c-IAP1 mRNA 的表达与对照组相比明显减少($P < 0.05$);基因转染后 3、5、7 天,TFPI 组 survivin 的表达与对照组相比明显减少($P < 0.05$),且具有明显的时间依赖性。**结论** TFPI 可能通过抑制 IAP 的表达来发挥诱导平滑肌细胞凋亡的作用,从而抑制冠状动脉介入治疗后狭窄发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Regulation on the Expression of Inhibitor of Apoptosis Proteins by TFPI Gene Transfer in Vascular Smooth Muscle Cells

MA Dan-Dan¹, LI Hui¹, FU Yu¹, ZHAO Yong², LIU Yue¹, and YIN Xin-Hua¹

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Gene Transfer; Tissue Factor Pathway Inhibitor; Vascular Smooth Muscle Cell; Inhibitor of Apoptosis Proteins-1; Survivin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene transfer on the expression of inhibitor of apoptosis proteins(IAP) in vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** Human TFPI or LacZ recombinant adenovirus or DMEM was used to infect rat aortic VSMC in vitro respectively. ELISA was used to examine the expression of exogenous TFPI gene. RT-PCR was used to detect the expression of c-IAP1 mRNA and western blot was used to detect the expression of survivin at different time points after gene transfer. **Results** TFPI protein expression was detected in VSMC at 1st day after gene transfer and the peak expression was at the 3rd day. The expression of c-IAP1 mRNA in TFPI group was reduced compared with those in the LacZ and DMEM groups ($P < 0.05$). The expression of survivin in TFPI group was also decreased compared with those in LacZ and DMEM groups ($P < 0.05$) in a time dependent manner. **Conclusions** TFPI might induce VSMC apoptosis through the inhibition on the expression of IAP, and therefore reduce the occurrence of restenosis after percutaneous coronary intervention.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)凋亡减少是导致血管新生内膜增厚和促进

再狭窄发生发展的重要机制,因此诱导 VSMC 凋亡可能是阻止新生内膜增生的重要途径^[1]。组织因

[收稿日期] 2014-12-04

[修回日期] 2015-02-08

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81200143, 81200235),黑龙江省自然科学基金项目(QC2012C015),哈尔滨市科技局优秀学科带头人项目(2012RFXXS008),黑龙江省中医药管理局科技项目(ZHY12-W035)

[作者简介] 马丹丹,硕士研究生,研究方向为冠心病动脉粥样硬化的机制及治疗的研究, E-mail 为 598955071@qq.com。李辉,硕士研究生,研究方向为冠心病动脉粥样硬化的机制及治疗的研究, E-mail 为 929986045@qq.com。傅羽,博士,博士后,副教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病动脉粥样硬化的机制及治疗的研究, E-mail 为 fuyu198010@yahoo.com。

子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)是血浆中新发现的一种抗凝蛋白,通过形成 TFPI/FXa/FVIIa/组织因子(tissue factor, TF)抑制 FXa 和 TF/FVIIa 复合物,调节 TF 的活性,发挥抗凝、抗血栓的作用^[2]。我们前期体外实验表明,TFPI 能够明显抑制 VSMC 迁移^[3],并通过激活线粒体通路和抑制 JAK-2/STAT-3 通路来诱导体外培养的 VSMC 发生凋亡^[4,5],从而抑制新生内膜的形成,但是关于 TFPI 诱导 VSMC 发生凋亡的其他机制尚不十分明确。

近年来研究发现细胞凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族成为凋亡调节因素中的热点之一,其中 c-IAP1(cellular IAP-1)和 survivin 是 IAP 家族中的主要成员,可抑制 caspase-3 和 caspase-7 以阻断细胞凋亡。本研究在前期工作基础上,应用重组腺病毒载体将 TFPI 基因转染至体外培养大鼠 VSMC 中,观察基因转染后 3 天、5 天和 7 天 TFPI 对细胞凋亡抑制蛋白家族中 c-IAP1 和 survivin 表达的影响,从而进一步发现 TFPI 诱导 VSMC 凋亡的可能机制,为 TFPI 防治动脉粥样硬化疾病及冠脉介入术后再狭窄等疾病提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

低糖 DMEM 培养基(Hyclone); 优级胎牛血清(Hyclone); 人组织因子途径抑制物 ELISA 试剂盒(American Diagnostica Inc. 公司); Trizol (Invitrogen); 逆转录试剂盒(Promega); Taq 酶(Fermentas); 兔抗鼠 survivin 多克隆抗体(Cell Signaling Technologies); 小鼠 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz); HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司); 携带 TFPI 基因的重组腺病毒载体(Ad-TFPI, 滴度 5×10^7 pfu/mL)和携带 LacZ 基因的重组腺病毒载体(Ad-LacZ, 滴度 5×10^7 pfu/mL)均由哈尔滨医科大学附属第一医院尹新华教授构建。

1.2 大鼠主动脉血管平滑肌细胞培养

采用贴块法培养原代大鼠血管平滑肌细胞。选取体重约 170 g Wister 雄性大鼠,无菌操作取出胸主动脉并剥除血管外膜,然后纵行剪开血管,小心刮除血管内膜后将血管剪成体积约 1mm^3 组织块,将其贴附于培养瓶底面,然后将培养瓶翻转 180° 使培养瓶底面朝上,同时在培养瓶对侧加入含 20% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液,放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中静置培养 3~4 h,之后轻轻翻转培养瓶使

培养液缓慢淹没组织块,继续静置培养。当原代培养平滑肌细胞生长至铺满瓶壁 $2/3$ 以上时即可进行传代,取第 3~5 代 VSMC 用于实验。

1.3 外源基因转染至体外培养大鼠血管平滑肌细胞

当 VSMC 生长至占底面积 70%~80% 时弃掉培养液,更换为无血清低糖 DMEM 培养 24 h 使 VSMC 同步化,分别转染感染指数(multiplicity of infection, MOI)为 100 的 Ad-TFPI、Ad-LacZ 或低糖 DMEM,置于 37°C 培养箱中每 15 min 摇晃 1 次,吸附 2 h 后用 PBS 洗 3 次,加入含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液继续培养。

1.4 TFPI 蛋白表达的检测

基因转染后 1、3、5 和 7 天,分别取各组培养液上清,用人组织因子途径抑制物蛋白 ELISA 检测试剂盒测定 TFPI 蛋白的表达。具体方法按照说明书进行操作^[5]。

1.5 TFPI 对 c-IAP1 mRNA 表达的影响

采用 RT-PCR 方法。将 VSMC 接种于 6 孔板(每孔约 5×10^5 个细胞),待细胞长至 70%~80% 贴壁时,用无血清的 DMEM 培养液饥饿 24 h,按 1.3 中的方法进行基因转染。基因转染后 3 天和 7 天,提取细胞总 RNA,行 RT-PCR 扩增。采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA,加 4 mL 25 mmol/L MgCl_2 、2 μL $10 \times \text{Buffer}$ 、2 μL dNTP(Mix)、0.5 μL RNasin、0.7 μL AMV 酶、1 μL Oligo(dT)引物,加水补足至 20 μL 体系,按下列条件行逆转录反应: 42°C 50 min, 95°C 5 min, 5°C 5 min。反应结束后取逆转录产物 1 μg 用于 PCR 扩增目的基因,PCR 反应条件:dNTP 1.6 μL , $10 \times \text{Buffer}$ 2 μL , Taq 酶 0.1 μL , 上游引物 0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , 补水至 20 μL , 按下列条件行 PCR 反应:c-IAP1: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s, 共 30 个循环; 72°C 10 min; β -actin: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 60 s, 共 30 个循环; 72°C 5 min。取 5 μL PCR 产物上样于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析,100 mV, 25 min。凝胶图像处理系统摄片保存。c-IAP1 基因引物序列如下:上游引物:5'- TGGCTACT-TCAGTGGCTCCT -3', 下游引物:5'- GCAAAGCAG-GCCACTCTATC -3'; β -actin 基因引物序列如下:上游引物:5'- GGCTACAGCTTACCACCAC -3', 下游引物:5'- GCTTGCTGATCCACATCTG C -3'。

1.6 TFPI 对 survivin 蛋白表达的影响

采用 Western blot 法。在基因转染后 1、3、5 和 7 天分别收集各组细胞,用预冷的 RIPA 裂解液裂解

细胞提取蛋白,用 BCA 法测定蛋白的浓度。根据不同指标各组分别取 10 μ g 或 80 μ g 等量蛋白样品与上样缓冲液混匀后煮沸 5 min,于 10% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温振荡封闭 2 h,TBST 洗膜后分别加入兔抗鼠 survivin 多克隆抗体(1:500 稀释)和小鼠 β -actin 单克隆抗体(1:1000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜后再分别加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG(1:5000 稀释)和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(1:5000 稀释),于 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 2 h;洗膜后采用 ECL 法显影。用 GIS 软件对胶片进行扫描及条带灰度分析。

1.7 统计学分析

所有实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用重复测量方差分析法对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞中外源 TFPI 蛋白的表达

基因转染后 1、3、5 和 7 天 TFPI 组均可检测到 TFPI 蛋白表达(表 1),其峰值出现在转染后 3 天,

说明外源 TFPI 基因已被成功转染至大鼠 VSMC 中并已经有效表达。

表 1. 血管平滑肌细胞中外源 TFPI 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \mu$ g/L)

分 组	1 天	3 天	5 天	7 天
Ad-TFPI	11.09 \pm 0.67	13.75 \pm 0.81	11.86 \pm 0.73	10.82 \pm 0.94
Ad-LacZ	—	—	—	—
DMEM	—	—	—	—

—表示未检测到。

2.2 TFPI 对血管平滑肌细胞中 c-IAP1 mRNA 表达的抑制作用

基因转染后 3 天和 7 天分别提取各组细胞 RNA,检测 TFPI 对 c-IAP1 mRNA 表达的影响,结果显示:基因转染后 3 天和 7 天,TFPI 组 c-IAP1 mRNA 的表达较 LacZ 组和 DMEM 组相比显著减少($P < 0.05$;图 1),而 LacZ 组和 DMEM 组相比无明显差异($P > 0.05$),表明 TFPI 可能通过抑制 c-IAP1 mRNA 的表达来诱导 VSMC 凋亡。

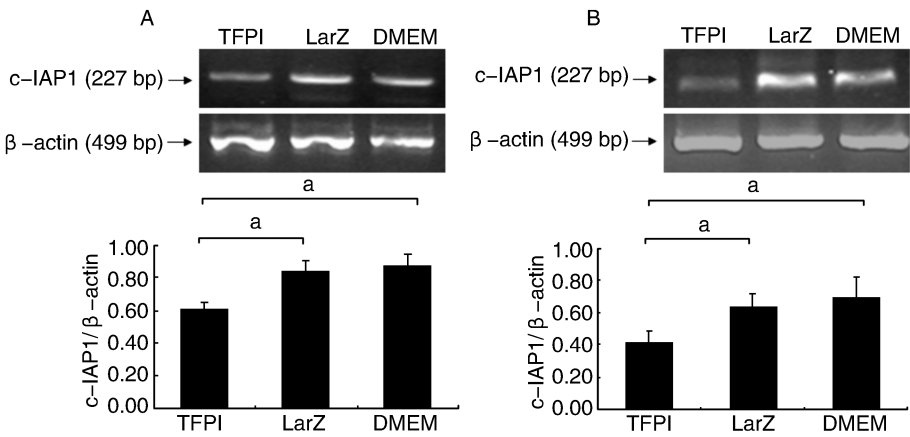


图 1. 基因转染后各时间点 TFPI 对 c-IAP1 mRNA 表达的影响
A 为基因转染后 3 天,B 为基因转染后 7 天;a 为 $P < 0.05$,两组之间比较。

Figure 1. The effect of TFPI on the expression of c-IAP1mRNA at each time point after gene transfer

2.3 TFPI 对血管平滑肌细胞中 survivin 蛋白表达的抑制作用

基因转染后 1、3、5、7 天分别收集各组细胞提取蛋白,检测 TFPI 对 survivin 蛋白表达的影响,结果显示:基因转染后 3、5 和 7 天,TFPI 组 survivin 蛋白的表达较 LacZ 组和 DMEM 组比较显著减少($P < 0.05$;图 2),而 LacZ 组和 DMEM 组比较差异无显著

性($P > 0.05$),表明 TFPI 可能通过抑制 survivin 蛋白的表达来诱导 VSMC 发生凋亡,这可能是 TFPI 诱导 VSMC 凋亡的机制之一。

另外,基因转染后 1、3、5 和 7 天 TFPI 组 survivin 蛋白的表达逐渐减少,呈现明显的时间依赖性(图 3)。

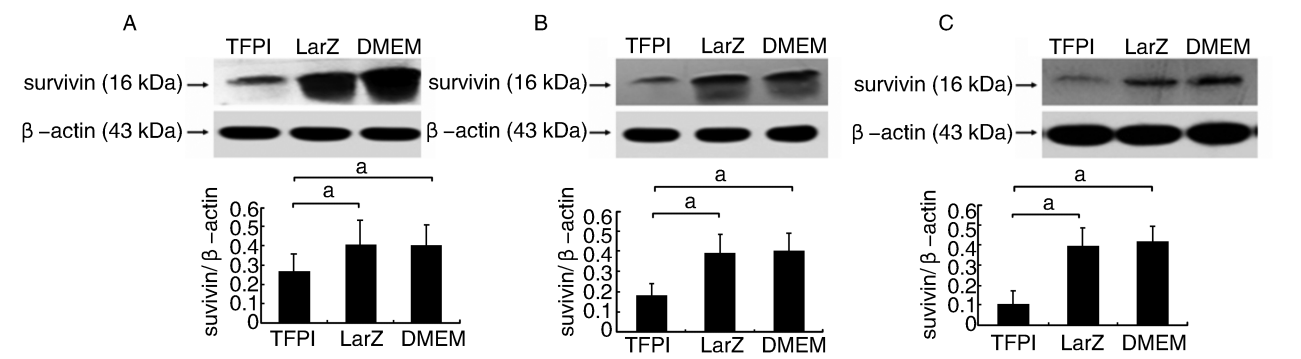


图 2. 基因转染后各时间点 TFPI 对 survivin 表达的影响 A 为基因转染后 3 天,B 为基因转染后 5 天,C 为基因转染后 7 天。a 为 $P < 0.05$,两组之间比较。

Figure 2. The effect of TFPI on the expression of survivin at each time point after gene transfer

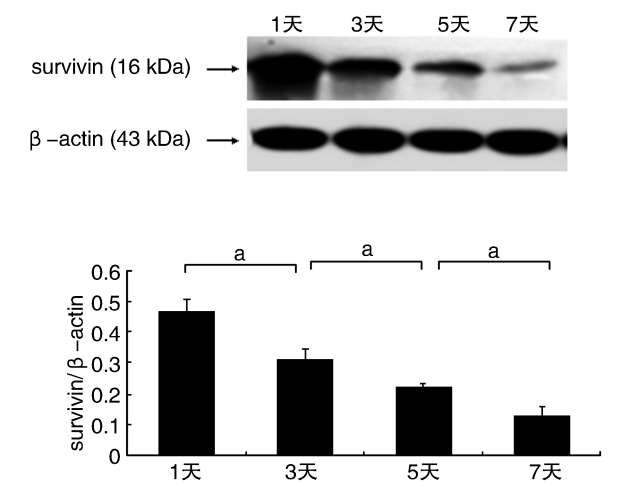


图 3. TFPI 组基因转染后不同时间点 survivin 的表达 a 为 $P < 0.05$,两组之间比较。

Figure 3. The expression of survivin at different time point after TFPI gene transfer

3 讨论

冠状动脉内介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)目前已经成为治疗冠心病尤其是急性心肌梗死最有效的手段之一,PCI技术的完善和操作人员经验的积累使得PCI成功率不断提高,但仍存在术后再狭窄问题,严重影响了PCI的远期疗效。以往认为动脉粥样硬化可能是再狭窄的主要发生机制,但目前研究发现再狭窄的发生也可能是血管局部损伤之后过度修复的结果。VSMC凋亡和增殖是维持血管壁细胞相对稳定的一对基本因素,也就是说细胞凋亡可以抵消外界因素所导致的细胞增生,而PCI后发生再狭窄可能是由于这种平衡失调,即增生大于凋亡所致。因此,诱导VSMC发生凋亡可能是有效阻止新生内膜增厚的重要途径。

TFPI是血浆内一个包含三个Kunitz型结构域

的内源性抗凝蛋白,通过FXa结合于第二个Kunitz结构域而FVIIa结合于第一个Kunitz结构域形成TFPI/FXa/FVIIa/TF四位体复合物从而抑制TF/FVIIa的活性,发挥抗凝血的作用。我们在前期工作中已经构建了携带TFPI基因的重组腺病毒载体,并将其转染至体外培养的VSMC中,证明当MOI为100时其在VSMC中的转染效率可高达95%^[3]。我们课题组和国内外的研究均显示在体内实验中外源rTFPI蛋白和TFPI基因转染均可显著抑制动脉内膜剥脱后血栓形成^[6-7],并通过体外实验证明TFPI可能通过抑制VSMC迁移和增殖来抑制血管损伤后局部新生内膜增生^[3,8,9]。同时本课题组首次发现TFPI可能通过激活cyt C通路和抑制JAK-2/STAT-3通路磷酸化来诱导VSMC凋亡,但是否存在其他诱导凋亡的机制尚不明确。

细胞凋亡是体内防止细胞过度增殖的正常生理过程,而细胞凋亡的调控是机体维持正常细胞更新和增殖的关键因素。细胞凋亡受到多种因子的精细调控,细胞内固有的IAP家族在抑制细胞凋亡过程中起重要作用^[10]。IAP位于细胞内部,是一种重要的凋亡因子,其过量表达被认为是引起凋亡抵抗的重要机制之一。人类细胞内的IAP家族成员共有8种:c-IAP1、c-IAP2、NAIP、survivin、XIAP、Bruce、ILP-2和Livin^[11]。目前对c-IAP1的研究多集中在肿瘤细胞凋亡的调控。在前期工作中,我们发现基因转染后的3、5和7天TFPI组大鼠VSMC凋亡率明显升高,本研究中我们的结果显示:基因转染后3天和7天,TFPI组IAP1 mRNA的表达较LacZ组和DMEM组相比显著减少,表明TFPI可能通过抑制c-IAP1 mRNA的表达来诱导VSMC发生凋亡。

Survivin(生存素)是新近发现的一种凋亡抑制基因,也是IAP家族中一个结构独特的新成员^[12]。

survivin 是仅含有一个 BIR 结构域的最小的 IAP,是目前发现的最强的凋亡抑制基因,它广泛地表达于人类胚胎发育组织、造血干细胞、分泌期子宫内膜、早期绒毛以及多种肿瘤组织中,因此与细胞分裂和增殖等功能密切相关,逐渐成为研究的热点之一。目前有关 survivin 在 VSMC 凋亡中作用的研究较少,本研究在前期诱导细胞凋亡的基础上,将 TFPI 基因转染至体外培养的 VSMC 中,结果发现:基因转染后 3、5 和 7 天,TFPI 组 survivin 蛋白的表达较 LacZ 组和 DMEM 组相比显著减少,表明 TFPI 可能通过抑制 survivin 蛋白的表达来诱导 VSMC 凋亡,并且 TFPI 组 survivin 蛋白的表达随凋亡增多逐渐较少,具有明显的时间依赖性,这可能是其诱导细胞凋亡的机制之一,目前此方面尚无相关报道。

IAP 家族成员可以通过抑制特定的 caspases 活性来抑制细胞凋亡的发生。c-IAP1 通过 BIR2 与活化 caspase-3/7 结合,经泛素介导 caspase-3/7 蛋白酶体降解,从而抑制细胞的凋亡^[12]。Survivin 抑制细胞凋亡的机制可能存在多种途径,首先 survivin 通过抑制 cyt C 从线粒体释放来阻断 caspase 的活化,从而在上游即阻断凋亡信号的传导;其次,IAP 家族成员均具有 BIR 功能区,直接抑制下游效应 caspase 的活化,如 caspase-3 和 caspase-7。我们在前期工作中发现基因转染后 3、5、7 天,TFPI 组 cleaved-caspase-3 和 cleaved-caspase-9 的表达水平与对照组相比显著升高,这与 c-IAP1 和 survivin 被抑制的趋势是一致的。因此我们推测 TFPI 是否通过抑制 IAP 表达→抑制 cyt C 从线粒体释放→抑制 caspase-3 和 caspase-9 活化→诱导 VSMC 凋亡呢?还是直接导致 cyt C 释放激活线粒体通路呢?这仍需要在今后的实验中被证实。

机体对细胞凋亡的调控是极其复杂的,由于 IAP 是重要的细胞凋亡调控蛋白,并且与其他细胞内凋亡信号通路有着复杂的关系,因此研究其在 VSMC 凋亡中的作用将为揭示与 VSMC 凋亡相关的血管内膜形成、动脉粥样硬化和再狭窄等疾病的病理机制提供重要的理论依据。本研究发现了 TFPI 基因转染诱导 VSMC 凋亡的新机制,将为相关疾病基因水平的治疗提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] Karper JC, Ewing MM, Jukema JW, et al. Future potential biomarkers for postinterventional restenosis and accelerated atherosclerosis [J]. *Biomark Med*, 2012, 6 (1): 53-66.
- [2] Ellery PE, Adams MJ. Tissue factor pathway inhibitor: then and now [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40(8): 881-886.
- [3] 傅羽,尹新华,张一娜,等. 组织因子途径抑制物基因转移对血管平滑肌细胞迁移的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(2): 111-114.
- [4] 傅羽,张改改,曹滢,等. 组织因子途径抑制物基因转移对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2009, 37(6): 542-547.
- [5] 傅羽,王世鹏,胡晶,等. 腺病毒介导 TFPI 基因转染诱导血管平滑肌细胞凋亡机制的探讨 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2013, 47(1): 19-23.
- [6] Zhao Y, Fu Y, Hu J, et al. The effect of tissue factor pathway inhibitor on the expression of monocyte chemotactic protein-3 and IκB-α stimulated by tumour necrosis factor-α in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2013, 106(1): 4-11.
- [7] Yin X, Fu Y, Yutani C, et al. HVJ-AVE liposome-mediated tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene transfer with recombinant TFPI (rTFPI) irrigation attenuates restenosis in atherosclerotic arteries [J]. *International Journal of Cardiology*, 2009, 135(2): 245-248.
- [8] Sato Y, Kataoka H, Asada Y, et al. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor in aortic smooth muscle cells inhibits migration induced by tissue factor/factor VIIa complex [J]. *Thromb Res*, 1999, 94(6): 401-406.
- [9] Zaman FS, Mast AE, Hall CL. Evaluating surface bound rTFPI through an in vitro model of vessel wall injury [J]. *Thromb Res*, 2011, 127(2): 149-153.
- [10] Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 545: 35-65.
- [11] Jaquith JB. Targeting the inhibitor of Apoptosis Protein BIR3 binding domains [J]. *Pharm Pat Anal*, 2014, 3 (3): 297-312.
- [12] Choi YE, Butterworth M, Malladi S, et al. The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspases-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(19): 12 772-782.

(此文编辑 李小玲)