

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-01-0018-05

# 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

宋方, 田茂波, 黄晶, 龙向淑, 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 p204; 血管外膜成纤维细胞; 细胞凋亡; 细胞增殖; 细胞迁移

[摘要] **目的** 观察干扰素诱导蛋白 p204 表达抑制后对大鼠血管外膜成纤维细胞(VAF)凋亡、增殖与迁移的影响及其部分机制。**方法** 应用 Ifi204 小干扰 RNA(siRNA)转染 VAF 使 Ifi204 基因沉默(Ifi204-siRNA 组),以非特异性 siRNA 转染作为其转染阴性对照组(Con-siRNA 组)和未经处理的 VAF 作为未干预阴性对照组(Neg 组)。用 MTT 法检测 VAF 细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡,细胞划痕法和 Transwell 法测定细胞迁移情况,应用实时荧光 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 p204、p53 及 p21 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 与 Con-siRNA 组和(或)Neg 组相比,Ifi204-siRNA 组的 p204、p53 及 p21 的 mRNA 和蛋白表达减少( $P < 0.05$ ),细胞凋亡率下降( $P < 0.05$ ),细胞增殖及迁移速度提高( $P < 0.05$ )。**结论** 抑制 p204 表达可减少大鼠 VAF 细胞凋亡,促进其增殖与迁移,其机制可能部分与抑制 p53 及 p21 表达有关。

[中图分类号] R322.1

[文献标识码] A

## Inhibition of p204 Expression Promotes Rat Vascular Adventitia Fibroblasts Growth and Migration

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

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

[KEY WORDS] Interferon-inducible Protein p204; Vascular Adventitial Fibroblasts; Apoptosis; Proliferation; Migration

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of interferon-inducible protein 204 (p204) on the apoptosis, proliferation and migration of vascular adventitial fibroblast cells (VAF) in rat. **Methods** The specific small interference RNA (siRNA) of p204 gene (Ifi204) were transfected into VAF in vitro instantaneously. VAF were divided into three groups, Ifi204 siRNA transfection group (Ifi204-siRNA), control siRNA transfection group (Con-siRNA), untreated VAF as a negative intervention control group (Neg). Then the cell vitality to reflect cell proliferation was analyzed by MTT method, cell apoptosis was analyzed by flow cytometry, cell migration by scratch assay and transwell chamber. The mRNA and protein levels of p204, p53 and p21 were measured by real-time qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results** After transfection of the Ifi204 siRNA, the mRNA and protein expression levels of p204, p53 and p21 were decreased in the VAF, and the cell apoptosis was inhibited, the cell proliferation and migration were promoted. **Conclusion** Inhibition of p204 expression can promote VAF cell growth and migration, which may be related to the inhibition of p53 and p21 expression.

血管外膜成纤维细胞(vascular adventitial fibroblast, VAF)与动脉粥样硬化、高血压、血管介入治疗及冠状动脉搭桥术后狭窄等血管增殖性疾病的发生、发展密切相关<sup>[1-2]</sup>。鼠 p204 属于干扰素诱导

蛋白 200 家族(the interferon-inducible protein 200 family, p200)成员,其能通过多种机制发挥抗增殖作用<sup>[3]</sup>。前期研究发现 p204 在大鼠主动脉血管外膜存在丰富的表达<sup>[4]</sup>,干扰素  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )可诱导

[收稿日期] 2015-02-14

[修回日期] 2015-07-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81260030)

[作者简介] 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,E-mail 为 songfangheart@126.com。田茂波,硕士,医师。通讯作者吴强,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,主要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。

VAF 中 p204 表达增加,同时抑制了 VAF 的增殖<sup>[5]</sup>,提示 IFN-α 抑制 VAF 增殖的作用可能部分与 p204 表达有关。目前关于抑制 p204 表达对 VAF 生长、迁移等生物学功能的影响尚未见文献报道,本研究进一步通过 Ifi204 (p204 mRNA) 小干扰 RNA (siRNA) 转染使 Ifi204 基因沉默从而抑制 p204 表达,观察其对 VAF 凋亡、增殖与迁移的影响,探讨其可能的机制,为治疗血管狭窄性疾病提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级 SD 大鼠购自贵州医科大学实验动物中心;DMEM 高糖型细胞培养液、胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购自 Hyclone 公司;PCR 扩增引物由上海生工合成 (表 1);FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (KR106) 购自天根公司;iTaq Universal SYBR Green Supermix (#172-5120) 购自 Bio-Rad 公司;X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent 购自 Roche 公司;Ifi204-siRNA (sc-40700)、Control-siRNA (sc-36869) 及 p204 抗体 (sc-13367) 购自 Santa Cruz 公司;细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21<sup>WAF</sup> (p21) 抗体 (ab92675) 购自 Abcam 公司;抑癌因子 p53 抗体购自 GeneTex;GAPDH 抗体、噻唑蓝 (MTT) 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (C0009) 及 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (C1062) 购自碧云天;Transwell 小室购自 Corning 公司。

表 1. PCR 引物及 siRNA 序列

Table 1. The sequences of PCR primers and siRNA

基因名称	引物序列	片段大小 (bp)
Ifi204 siRNA	F:5'-AGGCAACCAAAGUAGUGUTG-3'	-
	R:5'-ACACUAACAUUGGUUGCCUAG-3'	
p204	F:5'-TCATGGTCCCAAACAAGTGA-3'	200
	R:5'-ACCCATTGCACCCAAAATAA-3'	
p21	F:5'-CTGTCTTGCACCTCTGGTGTCTGA-3'	121
	R:5'-CCAATCTCGCTTGGAGTGA-3'	
p53	F:5'-GCTGAGTATCTGGACGACAGG-3'	253
	R:5'-AGCGTGATGGAAGGATG-3'	
GAPDH	F:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	452
	R:5'-TCCACCACCTGTTGCTGTGA-3'	

1.2 大鼠 VAF 的培养和分組

大鼠 VAF 的培养、纯化及鉴定按文献<sup>[5-6]</sup>报道的方法,取 4~6 代细胞用于实验。实验细胞分为 3 组,即 Ifi204 特异性 siRNA 转染使 Ifi204 基因沉默组 (Ifi204-siRNA 组)、非特异性 siRNA 转染作为其

转染阴性对照组 (Con-siRNA 组),未经处理的 VAF 作为未干预阴性对照组 (Neg 组)。

1.3 siRNA 转染

取对数生长期细胞接种于 6 孔板中,8 × 10<sup>4</sup>/孔,用不含双抗的 10% DMEM 培养液培养,观察待细胞达 30%~50% 时进行 siRNA 转染。按 X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent 说明书操作,添加 siRNA 转染复合物干预 6 h 后,换正常含双抗的 10% DMEM 培养液分别于 48 h 及 72 h 后收集细胞,使用荧光素共轭的 Control-siRNA 检测转染效率在 70%~90% 之间。每组每时间点 3~6 复孔,实验重复 3 次。

1.4 Real-time qRT-PCR 法检测 mRNA 表达

按 TRNzol 总 RNA 提取试剂盒说明操作提取总 RNA,取 1 μg 按 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明逆转录合成 cDNA。取 2 μL 产物进行 PCR 循环,按 Bio-Rad 公司 iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix 试剂盒说明配制 20 μL PCR 反应体系,PCR 反应条件为:起始模板预变性 (95℃ 10 min),PCR 循环模板变性 (95℃ 15 s) + 延长 (60℃ 1 min) 循环 40 次,溶解曲线 65℃ 到 95℃、每 5 s 增加 0.5℃。以 GAPDH 为内参照,2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各组 p204、p21 及 p53 mRNA 的相对表达量。

1.5 Western blot 检测蛋白表达

提取细胞总蛋白,每孔上样 80 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿法转膜转移蛋白条带至 PVDF 膜。将膜置 Western 封闭液中室温下封闭 1 h;加入 p204 一抗工作液,室温下孵育 15 min 后置 4℃ 冰箱过夜;TBST 洗膜,室温下孵育稀释的二抗 1 h;TBST 洗膜,ECL 化学发光,显影定影。蛋白膜应用 Western 一抗二抗去除液处理后,同法封闭、孵育 p53、p21 及 GAPDH 内参一抗及二抗。胶片扫描,ImageJ 软件分析 p204、p53 及 p21 与内参条带的吸光度值之比。

1.6 MTT 检测细胞增殖活力

收集对数生长期细胞,按约 4000 个细胞/孔接种于 96 孔板,细胞孵育过夜后,每组分别设 6 或 8 个复孔,设置调零孔 2 个,各组干预方法同前,继续培养 48 h 及 72 h 后收集细胞。按文献<sup>[5]</sup>的方法在 Bio-tek Elx800UV 型酶标仪测 A<sub>490 nm</sub> 处吸光值。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡和坏死

按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (C1062) 说明书操作收集、重悬及染色细胞后进行流式细胞仪检测。

### 1.8 细胞划痕法观察细胞迁移距离

在6孔板背后均匀画出6条横穿过孔的线条,待孔内各组细胞汇合度达90%后,用划线工具垂直于孔背面横线划痕。吸弃孔内液体,并用PBS清洗2遍,加入低血清培养液。显微镜下拍照后,放入细胞培养箱培养24 h后取样、拍照、计算迁移距离。迁移距离=划痕0 h后划痕宽度-划痕24 h后划痕宽度,以像素(pixel)作为长度单位。

### 1.9 Transwell 小室定量迁移细胞

取各组对数生长期细胞,用无血清DMEM培养液重悬细胞至 $1 \times 10^6$ 个/L。每个小室(上室)中加入100  $\mu$ L上述细胞悬液,在24孔板内(下室)加入含5% FBS的DMEM培养液600  $\mu$ L,培养8 h后吸弃孔内培养液,上室用PBS液洗涤3遍后,将小室置于4%多聚甲醛中固定20 min,自然晾干后再将小室置于0.1%结晶紫中染色20 min,之后用PBS液洗涤5遍。晾干后,显微镜下随机选取4个视野,观察细胞并计数。

### 1.10 统计学处理

应用SPSS19.0统计软件对各组数据进行正态

性及方差齐性检验,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 抑制 p204 表达对 VAF 凋亡、增殖及迁移的影响

与Neg组和Con-siRNA组比较,Ifi204-siRNA组的细胞凋亡率减少( $P < 0.05$ )(图1及表2)。干预后各组细胞继续培养48 h,与Con-siRNA组比较,Ifi204-siRNA组的MTT吸光度降低( $P < 0.05$ );培养72 h,与Neg组和Con-siRNA组比较,Ifi204-siRNA组的MTT吸光度均降低( $P < 0.05$ ;表2)。细胞划痕24 h后计算迁移距离,与Neg组和Con-siRNA组比较,Ifi204-siRNA组的迁移距离延长( $P < 0.05$ );通过Transwell小室计算迁移细胞数量,与Con-siRNA组比较,Ifi204-siRNA组的迁移细胞数量增加( $P < 0.05$ ;图2及表2)。以上各指标在Neg组和Con-siRNA组间无统计学差异。

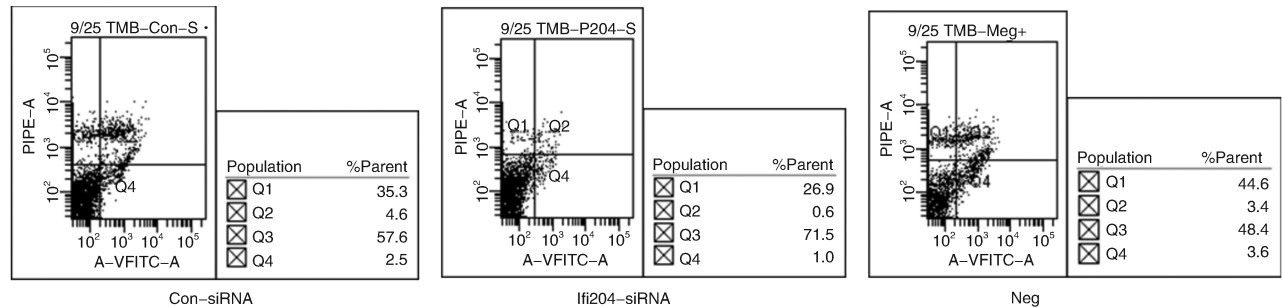


图 1. p204 表达抑制对 VAF 凋亡的影响  
Figure 1. Effect of inhibition of p204 expression on apoptosis of VAF

表 2. p204 表达沉默对 VAF 凋亡、增殖和迁移的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Effect of inhibition of p204 expression on apoptosis, proliferation and migration of VAF( $\bar{x} \pm s$ )					
分 组	凋亡( $n=3$ )	MTT 吸光度 (48 h) ( $n=6$ )	MTT 吸光度 (72 h) ( $n=6$ )	迁移距离 ( $n=4$ )	迁移细胞数量 ( $n=4$ )
Neg 组	6.57% $\pm$ 0.75%	0.63 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.07	75.50 $\pm$ 7.85	153.75 $\pm$ 9.40
Con-siRNA 组	6.77% $\pm$ 0.67%	0.61 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0.06	74.75 $\pm$ 8.46	151.75 $\pm$ 7.41
Ifi204-siRNA 组	1.87% $\pm$ 0.23% <sup>ab</sup>	0.66 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.28 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	89.50 $\pm$ 9.47 <sup>ab</sup>	169.25 $\pm$ 15.86 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 Neg 组比较; b 为  $P < 0.05$ , Con-siRNA 组比较。

### 2.2 抑制 p204 表达后 p53 及 p21 mRNA 与蛋白表达的变化

实时荧光 qRT-PCR 结果显示,与 Neg 组和 Con-siRNA 组比较,Ifi204-siRNA 组 Ifi204、p53 及 p21 的

mRNA 表达量均减少( $P < 0.05$ ;表3)。Western blot 结果亦显示,与 Neg 组和 Con-siRNA 组比较,Ifi204-siRNA 组 p204 蛋白表达下调( $P < 0.05$ ),伴随着 p53 及 p21 蛋白表达量减少( $P < 0.05$ )(图3)。

p204、p53 及 p21 的 mRNA 和蛋白表达在 Neg 组和 Con-siRNA 组间差异无统计学意义。

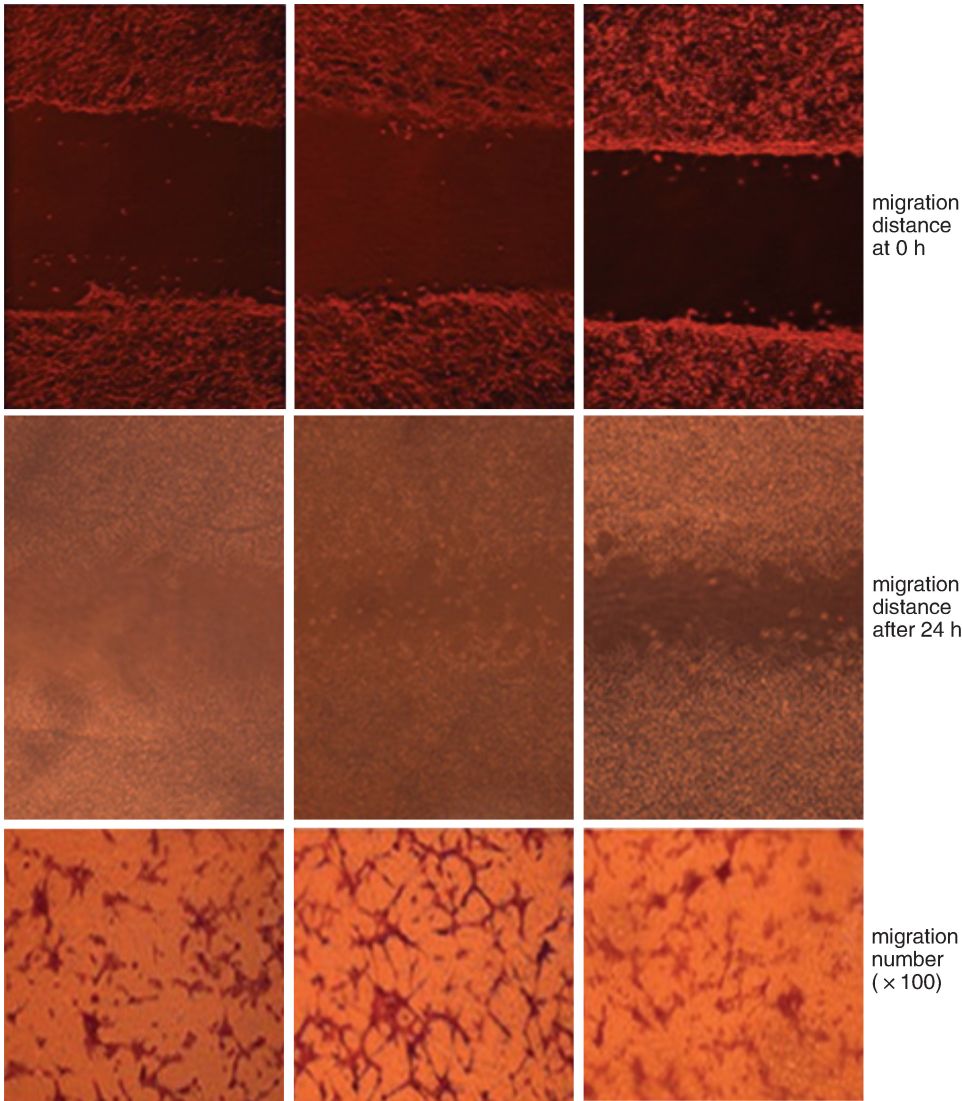


图 2. 干预因素对 VAF 迁移数量和距离的影响 从左到右依次为 Con-siRNA 组、Ifi204-siRNA 组和 Neg 组。  
Figure 2. Effect of inhibition of p204 expression on migration distance and number of VAF

表 3. Ifi204 表达沉默对 p53 及 p21 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3. Effect of decreased expression of p204 on mRNA expression of p53 and p21( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	Ifi204 mRNA	p53 mRNA	p21 mRNA
Neg 组	2. 06 $\pm$ 0. 09	2. 10 $\pm$ 0. 06	2. 11 $\pm$ 0. 08
Con-siRNA 组	2. 05 $\pm$ 0. 08	2. 08 $\pm$ 0. 05	2. 05 $\pm$ 0. 06
Ifi204-siRNA 组	1. 06 $\pm$ 0. 05 <sup>ab</sup>	1. 02 $\pm$ 0. 06 <sup>ab</sup>	1. 01 $\pm$ 0. 05 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0. 05$ , 与 Neg 组比较; b 为  $P < 0. 05$ , Con-siRNA 组比较。

3 讨 论

血管重构是血管增殖性疾病的主要病理生理机制, 既往认为 VAF 在血管重构过程中作为“旁观

者”, 仅起着支持与营养的作用。但近年来, 越来越多的研究证明 VAF 的增殖、迁移与分泌细胞外基质等在血管重构过程中起着重要的作用<sup>[1-2]</sup>。将 VAF 作为治疗靶点, 有效地抑制其增殖、迁移对防治血管增殖性疾病有重要意义。

p21 (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>) 通过抑制细胞周期蛋白/细胞周期依赖性激酶 (cyclin/CDK) 复合物活性, 使细胞周期进程受阻, 抑制细胞生长<sup>[7]</sup>。p53 及 Rb 是重要的抑癌因子, p21 启动子上有 p53 的结合位点, p53 在转录水平使 p21 表达增加; p21 可以抑制 cdk4 或者细胞周期蛋白 D 激酶活性, 而后两种蛋白的激活可以导致 Rb 蛋白的磷酸化 (pRb), 使 Rb 蛋白从蛋白复合物 pRb/E2F/DP-1 中释放出来, 从而激活 E2F 相关基因表达促进细胞增殖<sup>[8]</sup>, 显然, 增加 p21

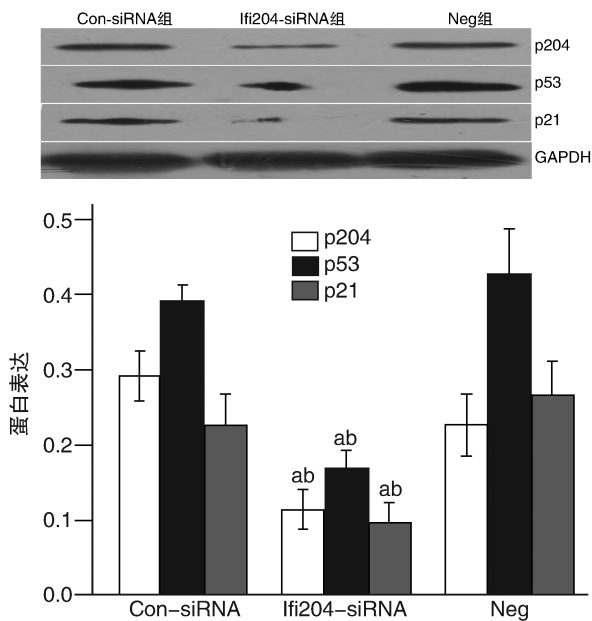


图 3. p204 表达沉默对 p53 及 p21 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
a 为  $P < 0.05$ , 与 Neg 组比较; b 为  $P < 0.05$ , Con-siRNA 组比较。  
Figure 3. Effect of decreased expression of p204 on protein expression of p53 and p21( $\bar{x} \pm s$ )

的表达能抑制该进程。

研究已证实 p204 通过与多种细胞因子或转录因子结合并反应,广泛参与调节细胞增殖和分化、衰老和凋亡,在自身免疫反应、抗病毒及抗癌等领域发挥着重要的作用<sup>[3,9]</sup>。p204 过表达具有抑制细胞生长的功能,可以延缓细胞周期 G1/S 及 G2/M 转换<sup>[10-11]</sup>。一方面,p204 蛋白的 200 X 结构中含有 MF/LHATVAT/S 模序,该模序介导和 53BP1 (p53 结合蛋白 1) 的结合从而激活 p53 来抑制肿瘤细胞增殖与迁移<sup>[10,12]</sup>;另一方面,p204 蛋白的 200 X 还含有 LXCXE 模序,该模序是与 Rb 蛋白结合的特征序列,p204 蛋白可以通过其与 Rb 蛋白结合,从而抑制细胞增殖<sup>[10]</sup>。激活 p53 或表达高水平的 p21,可引起细胞凋亡<sup>[8]</sup>。p21 的表达除受 p53 转录调节外,也存在非 p53 依赖信号通路,p204 是否直接参与调控 p21 还未见研究报道。本研究结果显示,通过特异性 siRNA 抑制 p204 表达可促进大鼠 VAF 增殖与迁移,抑制细胞凋亡,同时伴随 p53 及 p21 表达减少,提示 p204 具有促凋亡、抗增殖及迁移作用,其机制可能部分与调控 p53 及 p21 表达有关。至于是

否直接通过 p204 激活 Rb 或通过 p21 间接激活 Rb 参与以上进程还有待进一步研究明确。

[参考文献]

[1] Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia [J]. J Pathol, 2000, 190: 300-309.

[2] 邱菊辉, 王贵学, 罗向东. 肌成纤维细胞与血管内再狭窄[J]. 中华心血管病杂志, 2009, 37: 663-665.

[3] Luan Y, Lengyel P, Liu CJ. p204, a p200 family protein, as a multifunctional regulator of cell proliferation and differentiation [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19: 357-369.

[4] 宋方, 吴强, 龙向淑, 等. 干扰素诱导蛋白 p204 在大鼠血管壁成分细胞的表达研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(12): 1 097-102.

[5] 宋方, 吴强, 谭洪文, 等. IFN $\alpha$  通过 p204 抑制大鼠主动脉外膜成纤维细胞增殖[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(12): 1 431-436.

[6] 宋方, 吴强, 陆德琴, 等. 一套系统培养鼠主动脉血管壁细胞简单可靠的方法[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19: 361-366.

[7] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(6): 400-414.

[8] Johnstone RW, Wei W, Greenway A, et al. Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16 [J]. Oncogene, 2000, 19(52): 6 033-042.

[9] 宋方, 吴强. 干扰素诱导蛋白 p204 调节心肌分化的机制及应用前景[J]. 中国细胞生物学报, 2011, 33: 59-64.

[10] Hertel L, Rolle S, De Andrea M, et al. The retinoblastoma protein is an essential mediator that links the interferon-inducible 204 gene to cell-cycle regulation[J]. Oncogene, 2000, 19(32): 3 598-608.

[11] Asefa B, Dermott JM, Kaldis P, et al. p205, a potential tumor suppressor, inhibits cell proliferation via multiple pathways of cell cycle regulation[J]. FEBS Lett, 2006, 580(5): 1 205-214.

[12] Ding Y, Wen Y, Spohn B, et al. Proapoptotic and antitumor activities of adenovirus-mediated p202 gene transfer [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(10): 3 290-297.

(此文编辑 许雪梅)