

沉默干扰素诱导蛋白16对人主动脉外膜成纤维细胞凋亡的影响*

肖燕¹, 吴强^{2**}

(1. 贵州医科大学内科学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院人民医院 心内科, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 探讨沉默干扰素诱导蛋白16 (IFI16) 表达对人主动脉外膜成纤维细胞 (HAAFs) 凋亡的影响及其部分机制。方法: 应用 IFI16 小干扰 RNA (siRNA)、Control siRNA 转染 HAAFs 分别 IFI16 基因沉默组 (IFI16-siRNA 组)、阴性对照组 (Control-siRNA 组), 未经干预的 HAAFs 作为空白组; 用流式细胞仪检测凋亡, 应用 Western blot 检测 IFI16、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2)、磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 蛋白表达。结果: 与 Control-siRNA 组或空白组相比, IFI16-siRNA 组的细胞凋亡率下降, 伴随着 IFI16 蛋白表达减少, p-ERK1/2 水平增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 沉默 IFI16 表达可减少 HAAFs 细胞凋亡, 其机制可能部分与 ERK 信号通路有关。

[关键词] 干扰素诱导蛋白; 血管外膜成纤维细胞; 凋亡

[中图分类号] R541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)05-0507-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.05.003

Reducing Effect of IFI16 Expression on Human Aortic Adventitial Fibroblasts Apoptosis

XIAO Yan¹, WU Qiang²

(1. Department of Internal Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Cardiology, Guizhou Province People's Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550002, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of silencing interferon-inducible protein 16 (IFI16) expression on the apoptosis of human aortic adventitial fibroblasts (HAAFs). **Methods:** The specific small interference RNAs (siRNAs) of IFI16 and Control siRNA were transected into HAAFs in IFI16-siRNA group, negative control group and untreated blank group. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The protein levels of IFI16, extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK1/2) were measured by Western Blot. **Results:** The protein expression levels of IFI16 were decreased in the HAAFs, the cell apoptosis was downregulated, the protein expression levels of p-ERK1/2 were increased, differences were statistic significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Inhibition of IFI16 expression can downregulate HAAFs cell apoptosis, which may be related to the ERK signaling pathway.

[Key words] interferon-inducible protein; human aortic adventitial fibroblasts; apoptosis

血管外膜成纤维细胞 (vascular adventitial fibroblast, VAF) 增殖和凋亡的失衡是血管重构的细

胞学基础^[1-2]。血管重构是高血压等血管增殖性疾病的主要病理生理特点^[1-2]。人干扰素诱导蛋

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81260030); 贵州省科学技术厅 - 贵州省人民医院科技联合基金项目 [黔科合 LH 字 (2015) 7159 号]

** 通信作者 E-mail: gzywq@126.com

网络出版时间: 2016-05-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160513.2037.020.html>

白 16 (interferon-inducible protein 16, IFI16) 是由 p200 家族中人源蛋白基因 IFI16 编码, 在细胞生长中起着负性调控作用, 对细胞的凋亡起促进作用^[3]。本课题组前期研究发现 IFI16 在人脑血管外膜成纤维细胞 (human brain vascular adventitial fibroblasts, HBVAFs) 存在基础表达, 通过下调 IFI16 表达能促进 HBVAFs 增殖, 提示 HBVAFs 增殖的调控可能部分与 IFI16 表达有关^[4]。但 IFI16 对 HAAF 凋亡的影响尚未见报道。本研究进一步通过 IFI16 小干扰 RNA (siRNA) 转染使 IFI16 基因沉默从而抑制 IFI16 表达, 观察其对 HAAF 凋亡的影响, 探讨其可能的机制, 为治疗血管疾病提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

原代 HAAF (6120)、成纤维细胞培养基 (2301)、胎牛血清 (0010)、成纤维细胞生长因子 (2352)、青霉素/链霉素溶液 (0503) 购自 Sciencell 公司; X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent 购自 Roche 公司; IFI16 siRNA (sc-35633)、Control siRNA (sc-37007)、Control siRNA (FITC-conjugated) (sc-36869) 及 IFI16 抗体 (sc-8023) 购自 Santa Cruz 公司; 细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 抗体 (ab17942) 和磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体 (ab47339) 购自 Abcam 公司; GAPDH 抗体 (sc-25778) 购自北京中杉金桥; Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (559763) 购自 BD 生物科学。

1.2 方法

1.2.1 人主动脉成纤维细胞 (HAAF) 的培养和分组 HAAF 的培养按 HAAF 说明书的方法进行培养, 取 3~5 代细胞用于实验。实验细胞分为 3 组, 为 IFI16 基因沉默组 (IFI16-siRNA 组) 和阴性对照组 (Control-siRNA 组) 以及未经干预的 HAAF 组 (空白组)。

1.2.2 siRNA 转染 在六孔板中转染, 取生长状态好的 HAAF, 以 1.5×10^5 个/孔铺板, 用不含双抗的成纤维完全培养基培养, 第 2 天待细胞密度达 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, 换不含双抗的成纤维完全培养基继续培养, 使用 Control siRNA (FITC-

conjugated) 检测转染效率, 大约在 80%~90% 之间。每组 3 复孔, 实验重复 3 次。

1.2.3 IFI16、ERK1/2 与 p-ERK1/2 蛋白测定 按细胞裂解液 (RIPA) 说明书提取细胞蛋白。应用 Protein A280 检测蛋白浓度。加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 100 °C 加热 5 min 变性。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。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜, 加入一抗工作液 (IFI16 抗体、ERK1/2 抗体、p-ERK1/2 抗体、GAPDH 稀释度分别为 1:200、1:1 000、1:1 000、1:500), 置 4 °C 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。ImageJ 软件分析 IFI16 与内参条带、p-ERK1/2 与 ERK1/2 的吸光度值之比。

1.2.4 HAAF 的凋亡 按 Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I 说明书操作, 用流式细胞仪检测 HAAF 的凋亡情况, 采用细胞凋亡分布图, Q2 象限代表晚期凋亡及坏死细胞, Q3 象限代表早期凋亡细胞, 凋亡细胞比例 (%) = Q2 + Q3。Q1 象限是坏死细胞, Q4 象限是正常细胞。采用 FlowJo 软件进行分析。

1.3 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, 计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HAAF 凋亡率

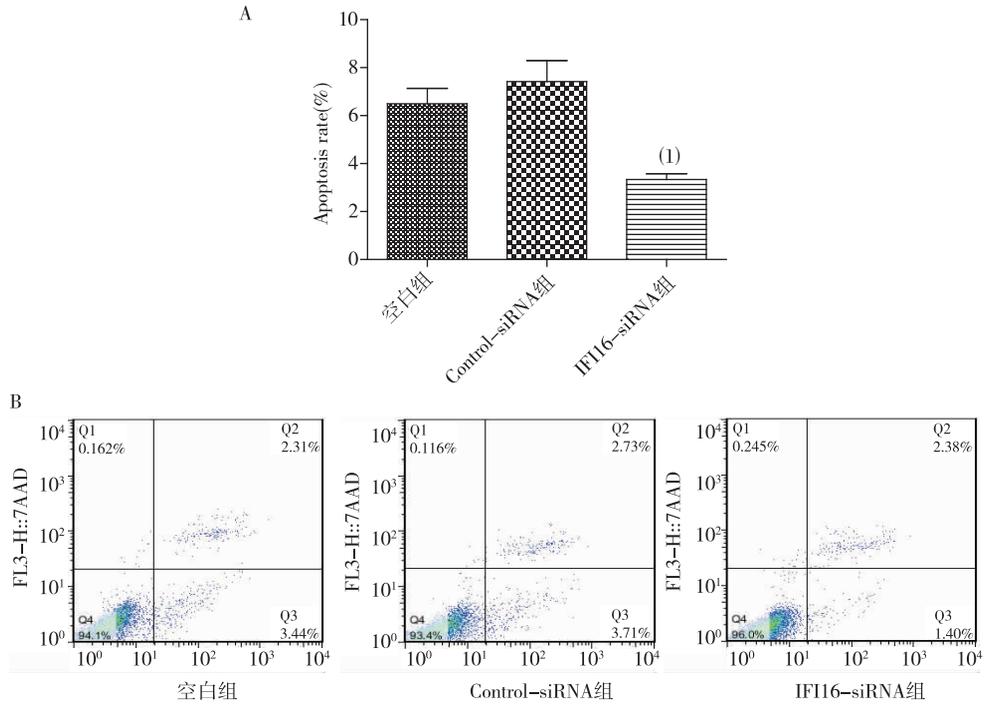
细胞凋亡包括早期凋亡和晚期凋亡。与 Control-siRNA 组和空白组比较, IFI16-siRNA 组的细胞凋亡率减少 ($P < 0.05$), 见图 1。以上各指标在 Control-siRNA 组和空白组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 IFI16、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达

与 Control-siRNA 组和空白组比较, IFI16-siRNA 组 IFI16 蛋白表达下调 ($P < 0.05$), 同时 p-ERK1/2 蛋白表达量增加 ($P < 0.05$), 见图 2。以上指标在 Control-siRNA 组和空白组间差异无统计学意义。

3 讨论

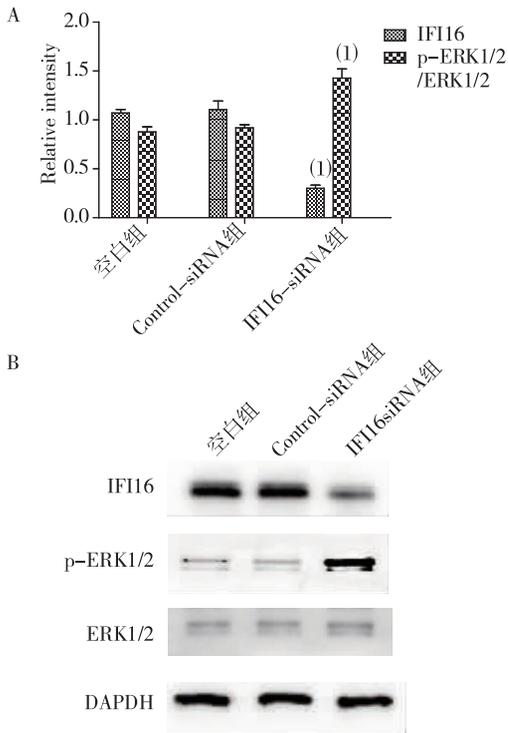
VAF 是血管外膜的主要细胞, 在血管重构中



注:A 为细胞凋亡统计结果,⁽¹⁾与 Control-siRNA 组及空白组比较, $P < 0.05$;B 为细胞凋亡分布情况,Q2 象限代表晚期凋亡及坏死细胞,Q3 象限代表早期凋亡细胞,凋亡细胞比例 (%) = Q2 + Q3;Q1 象限是坏死细胞,Q4 象限是正常细胞

图 1 沉默 IFI16 表达对 HAAFs 凋亡的影响

Fig. 1 Effect of inhibition of IFI16 expression on apoptosis of HAAFs



注:A 为统计结果,B 为蛋白电泳结果。⁽¹⁾与 Control-siRNA 组及空白组比较, $P < 0.05$

图 2 IFI16、p-ERK1/2 及 ERK1/2 蛋白的表达

Fig. 2 Protein expression of IFI16, p-ERK1/2 and ERK1/2

扮演者重要角色,有效地抑制 VAF 的增殖、迁移以及表型转化等对防治血管增殖性疾病有重要意义^[1]。

IFI16 在多种上皮细胞,消化道,泌尿生殖道如卵巢、前列腺、乳腺和乳管表达,并发挥着调节细胞增殖、凋亡、衰老以及细胞分化等广泛的生物学功能^[5]。在骨肉瘤和软组织肉瘤细胞过表达 IFI16 能抑制细胞增殖^[6]。在前列腺癌细胞核过表达 IFI16 表达能抑制肿瘤增殖,而异位表达 IFI16 于细胞质则促进癌细胞衰老^[7]。在乳腺癌细胞中缺失或减少的 IFI16 水平是导致肿瘤抑制因子 p53 活性降低,p53 介导的凋亡失调,促使肿瘤发生的原因之一^[8]。在衰老的前列腺上皮细胞和老年人成纤维细胞 IFI16 表达增加,且在衰老的成纤维细胞沉默 IFI16 后细胞表现出增殖能力^[7-8]。本研究结果表明,在 HAAFs 中沉默 IFI16 能抑制细胞凋亡。

ERK1/2 由相对分子量分别为 44 kD 和 42 kD 的 ERK1 和 ERK2 组成,能被各种刺激因子磷酸化而激活,并通过与转录因子作用,发挥调节细胞增殖、凋亡及分化等生物学功能。激活的 ERK1/2 能磷酸化转录因子 c-myc 和 Sp1,增强转录因子 c-myc 和 Sp1 与人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)启动子特异性结合,增

加转录活性,抑制细胞凋亡^[9-10]。在肿瘤细胞中,IFI16 蛋白能通过 c-myc 的介导抑制 hTERT 的转录^[11]。在正常人细胞中抑制内源性的 IFI16 表达能增加 hTERT 的转录^[11]。细胞凋亡受抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白的调控,其中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 具有抗凋亡作用,Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 Associated X protein, Bax)和 Bcl-2 相关凋亡促进因子(Bcl-2 associated death promoter, Bad)具有促凋亡作用,而细胞中 Bcl-2/Bax 的比值决定细胞是否凋亡。ERK1/2 能磷酸化 Bad 蛋白,从而抑制 Bcl-2/Bax 异二聚体中的 Bax 游离,导致 Bax 同二聚体的形成减少,抑制细胞凋亡^[12]。本研究显示,抑制 IFI16 的表达,伴随着 p-ERK1/2 蛋白的上调,HAAFs 细胞凋亡的减少。

综上所述,通过 IFI16 小干扰 RNA (siRNA) 技术,能抑制 IFI16 蛋白表达,下调 HAAFs 细胞的凋亡,伴随着 p-ERK1/2 蛋白表达量增多,提示 IFI16 能调控 HAAFs 细胞的凋亡,其机制可能部分与 ERK1/2 信号通路有关,但 IFI16 是否通过 ERK1/2/c-myc/hTERT 以及 ERK1/2/Bad/Bax 信号通路调节 HAAFs 细胞凋亡,仍需进一步研究。

4 参考文献

- [1] 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(7):663-665.
- [2] Tieu BC, Ju X, Lee C, et al. Aortic adventitial fibroblasts participate in angiotensin-induced vascular wall inflammation and remodeling [J]. J Vasc Res, 2011(3):261-272.
- [3] Mazibrada J, De Andrea M, Rittà M, et al. In vivo growth inhibition of head and neck Squamous cell carcinoma by the Interferon-inducible gene IFI16 [J]. Cancer Lett, 2010(1):33-43.
- [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(29):952-955.
- [5] Liao JC, Lam R, Brazda V, et al. Interferon-inducible protein 16; insight into the interaction with tumor suppressor p53 [J]. Structure, 2011(3):418-29.
- [6] Zhang Y, Howell RD, Alfonso DT, et al. IFI16 inhibits tumorigenicity and cell proliferation of bone and cartilage tumor cells [J]. Front Biosci, 2007(12):4855-4463.
- [7] Xin H, Curry J, Johnstone RW, et al. Role of IFI16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence [J]. Oncogene, 2003(31):4831-4840.
- [8] Xin D, Larissa P, Sudhakar V, et al. IFI16 Induction by Glucose Restriction in Human Fibroblasts Contributes to Autophagy through Activation of the ATM/AMPK/p53 Pathway [J]. PLoS One, 2011(5):e19532.
- [9] Dasgupta P, Sengupta SB. Role of diallyl disulfide-mediated cleavage of c-Myc and Sp-1 in the regulation of telomerase activity in human lymphoma cell line U937 [J]. Nutrition, 2015 (7-8):1031-1037.
- [10] Zhao Q, Assimopoulou AN, Klauck SM. Inhibition of c-MYC with involvement of ERK/JNK/MAPK and AKT pathways as a novel mechanism for shikonin and its derivatives in killing leukemia cells [J]. Oncotarget, 2015 (36):38934-38951.
- [11] Song LL, Ponomareva L, Shen H, et al. Interferon-inducible IFI16, a negative regulator of cell growth, down-regulates expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene [J]. PLoS One, 2010(1):e8569.
- [12] Quoyer J, Longuet C, Broca C, et al. GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells [J]. J Biol Chem, 2010(3):1989-2002.

(2016-02-25 收稿, 2016-04-28 修回)
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 赵毅