

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.34.003

干扰素  $\alpha$  通过 IFI16 和 P21 影响人血管内皮细胞凋亡\*龙向淑, 吴强<sup>△</sup>, 宋方, 黄晶, 田茂波, 肖燕

(贵州省人民医院心血管内科, 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的 观察干扰素  $\alpha$ (IFN- $\alpha$ ) 对人血管内皮细胞(VECs)凋亡的影响并了解其部分机制。方法 应用 IFN- $\alpha$  和转染 IFN 诱导蛋白 16 基因(IFI16)的 siRNA 瞬时干预体外培养的 VECs, 以转染非特异性 siRNA 设为对照组, RT-PCR 法检测 IFI16 及 P21 mRNA 表达, Western blot 检测 IFI16 及 P21 蛋白表达, 流式细胞仪 Annexin-V FITC/PI 法检测细胞凋亡情况。结果 与对照组比较, IFN- $\alpha$  组 IFI16 mRNA 和蛋白表达上调( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡增多( $P < 0.05$ ), 伴 P21 mRNA 和蛋白表达增多( $P < 0.05$ ); IFN- $\alpha$  干预后再转染 IFI16 siRNA, IFI16 mRNA 和蛋白表达下调( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡减少( $P < 0.05$ ), P21 mRNA 和蛋白表达减少( $P < 0.05$ )。结论 IFI16 及 P21 参与 IFN- $\alpha$  诱导 VECs 凋亡过程的调控。

**[关键词]** 干扰素  $\alpha$ ; 干扰素诱导蛋白 16; 内皮, 血管; 凋亡

**[中图分类号]** R54; R363

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)34-4759-03

## Interferon alpha induces apoptosis on human vascular endothelial cells via IFI16 and P21\*

Long Xiangshu, Wu Qiang<sup>△</sup>, Song Fang, Huang Jing, Tian Maobo, Xiao Yan

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

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) on apoptosis of human vascular endothelial cells (VECs) and understand its partly mechanism. **Methods** Cultured VECs were treated with IFN- $\alpha$  and interferon inducible protein16 gene(IFI16) siRNA was set transfected in vitro instantaneously. Nonspecific siRNA transfection group was as control group. The expression of IFI16 and P21 mRNA was determined by semiquantitative RT-PCR. IFI16 and P21 proteins were analyzed by Western blot. The cell apoptosis was analyzed by flow cytometry with Annexin-V FITC/PI method. **Results** Compared with control group, in IFN- $\alpha$  induction group, the expressions of IFI16 mRNA and protein were up-regulated( $P < 0.05$ ), the cell apoptosis increased( $P < 0.05$ ), and the expressions of P21 mRNA and protein were up-regulated( $P < 0.05$ ); when transfection IFI16 siRNA after intervention with IFN- $\alpha$ , the expressions of IFI16 mRNA and protein were down-regulated( $P < 0.05$ ), cell apoptosis decreased( $P < 0.05$ ), and the expressions of P21 mRNA and protein were down-regulated( $P < 0.05$ ). **Conclusion** IFI16 and P21 participate in IFN- $\alpha$  regulation of cell apoptosis of VECs in human.

**[Key words]** interferon  $\alpha$ ; interferon inducible protein16; endothelial vascular; apoptosis

血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)连续内衬于血管腔表面而构成的血管内皮具有物理屏障作用及内分泌等功能。各种物理、化学及炎症等因素导致血管内皮细胞过度凋亡、增殖减少及功能紊乱是高血压、动脉粥样硬化及血管成形后再狭窄等血管增殖性疾病发生的始动环节, 因此, 抑制 VECs 凋亡并适当促进其增殖对防治上述疾病至关重要。国外研究显示, 干扰素(interferon, IFN)可诱导多种肿瘤细胞凋亡<sup>[1-4]</sup>。国内研究表明, 干扰素  $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )可抑制大鼠血管平滑肌细胞及人 VECs 增殖<sup>[5-6]</sup>, 但 IFN- $\alpha$  对 VECs 凋亡的影响及其机制尚未完全明确。本研究拟观察 IFN- $\alpha$  对人 VECs 凋亡的影响及 IFN 诱导蛋白 16 基因(IFI16)和 P21 表达变化, 初步探讨 IFN- $\alpha$  影响人 VECs 凋亡的部分机制, 为防治上述心血管疾病提供新的依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自中科院。IFN- $\alpha$  购自北京三元基因工程有限公司。Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司。2 $\times$  Taq PCR MasterMix (KT201)、Trizol 总 RNA 提取试剂盒及 DNA Ladder(100 bp) 购自北京天根公司。RT-PCR 试剂盒(DRR047A)购自 TaKa-

Ra 公司。PCR 引物设计及合成由宝生物工程(大连)有限公司完成。引物具体序列如下。IFI16, 上游: 5'-AGG ACC GTT CAT GAC CAG ZAT AG-3', 下游: 5'-TGC GTT CAG CAC CAT CAC TTC-3'(扩增长度 184 bp); GAPDH, 上游: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 下游: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'(扩增长度 452 bp); P21, 上游: 5'-AAG ACC ATG TGG ACC TGT CAC TGT-3', 下游: 5'-GAA GAT CAG CCG GCG TTT-3'(扩增长度 155 bp)。IFI16 siRNA (h); sc-35633、Control siRNA-A(sc-36869)及 IFI16 抗体(sc-8023)购自 Santa Cruz 公司。P21 抗体(ab92675)购自 Abcam 公司。Tubulin 抗体(AT819)及 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(C1063)购自碧云天公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 VECs 培养及实验分组** 实验细胞为复苏后第 2~3 代处于对数生长期的 VECs。实验分 3 组: 转染非特异性 siRNA 设为阴性对照组(对照组), IFN- $\alpha$  诱导加非特异性 siRNA 转染组(IFN 组)和 IFN- $\alpha$  诱导加 IFI16 siRNA 转染组(IFN+siRNA 组)。IFN 组及 IFN+siRNA 组加入 IFN- $\alpha$  干预 6 h 后去除 IFN- $\alpha$ (IFN- $\alpha$  干预终浓度为 2 $\times 10^6$  U/L), 再分别转染非

特异性 siRNA 及 IFI16 siRNA, 对照组未加入 IFN- $\alpha$ , 与上述两组同步转染非特异性 siRNA, 培养 48 h 收集细胞。实验重复 3 次。

**1.2.2 反转录 PCR(RT-PCR)测定 mRNA 表达** Trizol 法提取细胞总 RNA。取总 RNA 1  $\mu$ L 为模板, 逆转录合成 cDNA。再以 cDNA 产物 3  $\mu$ L 为模板, 进行 PCR 反应, 反应体系 25  $\mu$ L, 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 反应结束后取产物 5  $\mu$ L 进行电泳分析, 电泳介质为 2% 琼脂糖凝胶, 电泳结束在 UVP800 型凝胶成像系统下观察 DNA 电泳结果并成像。

**1.2.3 蛋白印迹法(Western blot)测定蛋白表达** 收集分组干预培养于 6 孔板中的 VECs 至 5 mL EP 管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸尽培养液, PBS 漂洗细胞 3 次并转移至 1.5 mL 的 EP 管中, 2 000 r/min 离心 5 min, 去除 PBS, 予细胞裂解液裂解细胞, 高速冷冻(4  $^{\circ}$ C)离心 5 min, 取适量上清液另置于预冷、无菌的 EP 管中, 采用 BCA 法行蛋白定量。向 0.2 mL EP 管中加入 80  $\mu$ g 蛋白样品, 取十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液适量加入管中, 沸水(100  $^{\circ}$ C)中煮沸 3 min。以 8% SDS-PAGE 为电泳介质, 恒压 80~100 V 分离蛋白, 4  $^{\circ}$ C 恒流 250 mA $\times$ 90 min 转移蛋白至 PVDF 膜上。转印蛋白后的 PVDF 膜置入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 2 h, 去除封闭液, 加入按 1:500 稀释的一抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 吸尽 TBST, 加入按 1:5 000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记), 摇床孵育 2 h(常温), 收集二抗, TBST 摇床漂洗 3 次。将 PVDF 膜蛋白面朝上置于保鲜膜上, 取 ECL 化学发光试剂 A 和 B 按 1:1 避光混合, 1 min 后将混合液均匀滴加至膜上, 约 1 min 后去尽残液, 保鲜膜固定 PVDF 膜。X 光胶片曝光、显影及定影后扫描, 用图像软件根据信号强弱对条带进行灰度分析。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集培养于 6 孔板中的各组细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 漂洗 2 次, 按 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒说明书操作, 置流式细胞仪测定每个样本中细胞凋亡的百分比。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析处理, 计量数据用  $\bar{x}\pm s$  表示, LSD 法组间两两比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 干预因素对 IFI16 mRNA 及蛋白表达的影响** 与对照组比较, IFN- $\alpha$  干预后 IFI16 mRNA 及蛋白表达增多( $P<0.05$ ), IFN- $\alpha$  干预后再转染 IFI16 siRNA, IFI16 mRNA 和蛋白表达减少( $P<0.05$ ); 与 IFN 组比较, IFN+siRNA 组 IFI16 mRNA 和蛋白表达下调( $P<0.05$ ), 见图 1、表 1。

**2.2 干预因素对 P21 mRNA 及蛋白表达的影响** 与对照组比较, IFN- $\alpha$  干预后 P21 mRNA 及蛋白表达增多( $P<0.05$ ),

IFN- $\alpha$  干预后再转染 IFI16 siRNA, P21 mRNA 及蛋白表达减少( $P<0.05$ ); 与 IFN 组比较, IFN+siRNA 组 P21 mRNA 及蛋白表达下调( $P<0.05$ ), 见图 2、表 1。

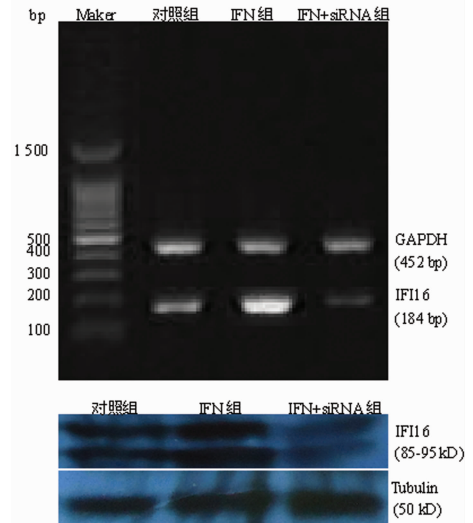


图 1 干预因素对 VECs IFI16 mRNA 和蛋白表达的影响

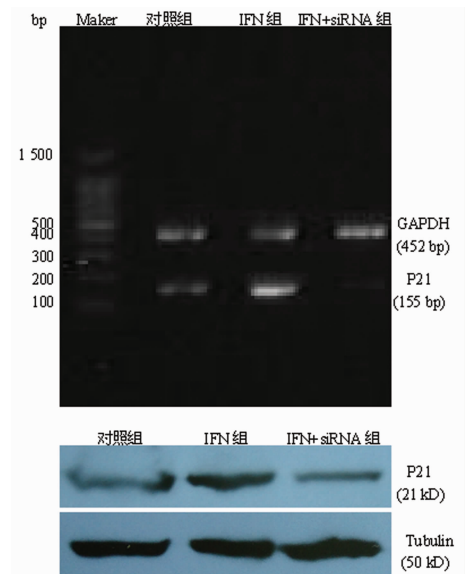


图 2 干预因素对 VECs P21 mRNA 和蛋白表达的影响

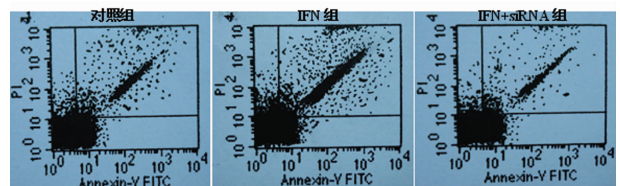


图 3 干预因素对 VECs 凋亡的影响

表 1 干预因素对相关指标的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	IFI16 mRNA	IFI16 蛋白	P21 mRNA	P21 蛋白	细胞凋亡率(%)
对照组	0.97 $\pm$ 0.08	1.25 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.06	10.27 $\pm$ 2.09
IFN 组	1.89 $\pm$ 0.05*	1.92 $\pm$ 0.08*	1.37 $\pm$ 0.09*	0.81 $\pm$ 0.04*	23.26 $\pm$ 1.39*
IFN+siRNA 组	0.23 $\pm$ 0.06* $\Delta$	0.31 $\pm$ 0.04* $\Delta$	0.11 $\pm$ 0.05* $\Delta$	0.19 $\pm$ 0.07* $\Delta$	5.04 $\pm$ 1.51* $\Delta$

\*:  $P<0.05$ , 与对照组比较;  $\Delta$ :  $P<0.05$ , 与 IFN 组比较。

**2.3 干预因素对 VECs 凋亡的影响** 与对照组比较,IFN 组 VECs 凋亡增多( $P<0.05$ ),IFN+siRNA 组 VECs 凋亡减少( $P<0.05$ );与 IFN 组比较,IFN+siRNA 组 VECs 凋亡减少( $P<0.05$ ),见图 3、表 1。

### 3 讨 论

VEC 构成的血管内皮是分布于全身各组织的代谢十分活跃的一个内分泌器官,具有调节血管平滑肌细胞增殖、迁移、表型转化及基质分泌等生物学功能,是血液与组织之间的物理屏障。物理损伤、化学刺激、炎症反应等因素可引起内皮细胞凋亡、脱落,导致血管内皮损伤、内分泌功能障碍及内皮细胞增殖活性改变,是血管增殖性疾病发生、发展过程中重要的病理基础。如何维持血管内皮完整性并使其内分泌功能正常化是血管增殖性疾病防治领域有待攻克难题。

IFN 是一组具有免疫调节、抗病毒及影响细胞增殖和凋亡等作用的细胞因子家族<sup>[7-8]</sup>。IFN 通过影响细胞基因表达、跨膜信号传递、蛋白激酶激活及蛋白磷酸化等而促进细胞凋亡<sup>[2-3,8]</sup>。IFI16 是 IFN 诱导蛋白 200 家族的人类蛋白成员之一。众多研究表明,IFI16 具有抗肿瘤、抗病毒、调节免疫、抑制 VECs 增殖、迁移及新生血管形成和调控血管内皮炎症反应等作用<sup>[9-14]</sup>。近期研究显示,IFN- $\alpha$  可促进 IFI16 表达并抑制 VECs 增殖<sup>[6]</sup>,但 IFN- $\alpha$  对 VECs 凋亡有何影响? 本研究结果显示,IFN- $\alpha$  干预后 IFI16 mRNA 和蛋白表达上调,导致 VECs 凋亡增加,进一步证实 IFI16 表达存在转录和翻译水平的 IFN- $\alpha$  诱导性,提示 IFN- $\alpha$  可诱导 IFI16 表达而促进 VECs 凋亡。P21 作为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin dependent kinase inhibitors,CDKI)的 CIP 家族成员之一,具有抑制细胞增殖、调控细胞终末分化和衰老等作用。P21 是 P53 调节转录的靶基因,P53 与其启动子上的 P53 结合位点结合而调节靶基因表达,P21 表达除受 P53 调节外,非 P53 依赖信号通路如信号转导子及转录激活子(signal transducer and activator of transcription,STAT)及 P200 家族成员 P202 等亦可调节其表达<sup>[5]</sup>。P53 能促进细胞凋亡相关分子,如 Apaf-1、Bax、Noxa 和 PUMA 等的表达,增强细胞对凋亡刺激的敏感性而导致细胞凋亡<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,单独 IFN- $\alpha$  干预后,IFI16 mRNA 和蛋白上调,VEC 凋亡增多,伴 P21 mRNA 和蛋白表达上调;IFN- $\alpha$  干预后再转染 IFI16 siRNA,IFI16 mRNA 和蛋白表达下调,细胞凋亡减少,P21 mRNA 和蛋白表达亦减少,证实 IFI16 siRNA 在转录和翻译水平对 IFI16 表达的抑制作用,提示 IFI16 和 P21 表达变化呈一致性趋势,在 IFN- $\alpha$  促进 VECs 凋亡过程中,P21 可能作为 IFI16 的下游蛋白而发挥其作用。

### 参考文献

[1] Bu XF,Zhang J,Jia LJ,et al. Effect of human interferon- $\lambda$ 1 recombinant adenovirus on a gastric cancer orthotopic transplantation model[J]. *Exp Ther Med*,2014,8(4):1115-1122.

[2] Takano S,Ishikawa E,Matsuda M,et al. Interferon- $\beta$  inhibits glioma angiogenesis through down regulation of vascular endothelial growth factor and up regulation of interferon inducible protein 10[J]. *Int J Oncol*,2014,45(5):

1837-1846.

- [3] Asmana Ningrum R. Human interferon alpha-2b; a therapeutic protein for cancer treatment[J]. *Scientifica (Cairo)*,2014;970315.
- [4] Zhao J,Wang M,Li Z,et al. Interferon- $\alpha$  suppresses invasion and enhances cisplatin-mediated apoptosis and autophagy in human osteosarcoma cells[J]. *Oncol Lett*,2014,7(3):827-833.
- [5] 龙向淑,吴强,宋方. 干扰素诱导蛋白 p204 表达变化对大鼠血管平滑肌细胞增殖及 p21 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*,2012,28(2):249-252.
- [6] 龙向淑,吴强,宋方. 干扰素诱导蛋白 16 对血管内皮细胞增殖的影响[J]. *中华高血压杂志*,2013,21(1):29-33.
- [7] Cho H,Kelsall BL. The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis, and inflammation[J]. *Immunol Rev*,2014,260(1):145-167.
- [8] Bekisz J,Baron S,Balinsky C,et al. Antiproliferative properties of type I and type II interferon[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*,2010,3(4):994-1015.
- [9] Raffaella R,Gioia D,De Andrea M,et al. The interferon-inducible IFI16 gene inhibits tube morphogenesis and proliferation of primary, but not HPV16 E6/E7-immortalized human endothelial cells[J]. *Exp Cell Res*,2004,293(2):331-345.
- [10] Kerur N,Veetil MV,Sharma-Walia N,et al. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection[J]. *Cell Host Microbe*,2011,9(5):363-375.
- [11] Gugliesi F,Bawadekar M,De Andrea M,et al. Nuclear DNA sensor IFI16 as circulating protein in autoimmune diseases is a signal of damage that impairs endothelial cells through high-affinity membrane binding[J]. *PLoS One*,2013,8(5):e63045.
- [12] Caposio P,Gugliesi F,Zannetti C,et al. A novel role of the interferon-inducible protein IFI16 as inducer of proinflammatory molecules in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*,2007,282(46):33515-33529.
- [13] Veeranki S,Duan X,Panchanathan R,et al. IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type- I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes[J]. *PLoS One*,2011,6(10):e27040.
- [14] Veeranki S,Choubey D. The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human cytomegalovirus replication[J]. *Mol Immunol*,2012,49(4):567-571.
- [15] Wawryk-Gawda E,Chylińska-Wrzos P,Lis-Sochocka M,et al. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells[J]. *Protoplasma*,2014,251(3):525-533.