

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.009

## siRNA 沉默凋亡抑制蛋白基因对支气管哮喘小鼠气道平滑肌增殖的影响

王涛, 韩娜<sup>△</sup>

(河北大学附属医院(北院)肺二科, 河北保定 071000)

**[摘要]** **目的** 探讨 siRNA 沉默凋亡抑制蛋白基因对支气管哮喘小鼠气道平滑肌增殖的影响。**方法** 将 20 只雌性 BALB/c 小鼠分为实验组和对照组, 实验组构建哮喘模型, 取气管和支气管进行细胞培养。对实验组和对照组培养的气道壁平滑肌细胞分别进行分组: 磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(加入 PBS)、错义链对照组(转染错义链)和 siRNA 转染组(转染 siRNA Survivin), 检测气道壁平滑肌细胞中 Survivin 基因、Survivin 蛋白和 caspase-9 蛋白表达, 检测细胞上清液中 IL-6 和人趋化因子(CCL5)水平。**结果** RT-PCR 结果显示, 实验组中 siRNA 转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin RNA 相对表达量均低于 PBS 对照组和错义链对照组, 气道壁平滑肌细胞中 Survivin 蛋白表达量均低于 PBS 对照组和错义链对照组, 而 caspase-9 蛋白表达量则高于 PBS 对照组和错义链对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 实验组中 siRNA 转染组气道壁平滑肌细胞合成分泌 IL-6 和 CCL5 水平均低于 PBS 对照组和错义链对照组; 2~4 d 细胞增殖量均低于 PBS 对照组和错义链对照组; 气道壁平滑肌细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例高于 PBS 对照组和错义链对照组, 而 S/G<sub>2</sub> 期比例则低于 PBS 对照组和错义链对照组, 细胞凋亡率则高于 PBS 对照组和错义链对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** siRNA 特异性沉默 Survivin 基因, 可加速气道壁平滑肌细胞凋亡, 有效抑制细胞异常增殖及分泌功能。

**[关键词]** 支气管哮喘; Survivin; 气道平滑肌细胞; 增殖**[中图分类号]** R562.2+5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)16-2186-04

**Effects of siRNA silencing of inhibitor of apoptosis protein gene on the proliferation of airway smooth muscle in bronchial asthma mice**

Wang Tao, Han Na<sup>△</sup>

(The Second Department of Pulmonary, the Affiliated Hospital (North Hospital) of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of siRNA silencing of inhibitor of apoptosis protein gene on the proliferation of airway smooth muscle in bronchial asthma mice. **Methods** Twenty female BALB/c mice were randomly divided into experimental group and control group. Mice in the experimental group were constructed asthma models. The trachea and bronchi were collected for cell culture. Respectively, the cultured airway smooth muscle cells in the experimental group and the control group were grouped: PBS control group (added to PBS solution), missense chain control group (transfected with missense chain) and siRNA transfection group (transfected with siRNA Survivin). The expressions of Survivin mRNA, Survivin protein and caspase-9 protein in airway smooth muscle cells were detected. The levels of IL-6 and CCL5 in cell supernatant were detected. **Results** RT-PCR results showed that, the relative expression levels of Survivin RNA of airway smooth muscle cells in the siRNA transfection group of the experimental group were lower than the PBS control group and missense chain group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Western blot results showed that, the expressions of Survivin proteins in the siRNA transfection group of the experimental group were lower than the PBS control group and missense chain control group, while the caspase-9 protein were higher. In the experimental group, the synthesis and secretion levels of IL-6 and CCL5 of airway smooth muscle cells in the siRNA transfection group were lower than the PBS control group and missense chain control group, the cell proliferations at 2-4 d in the siRNA transfection group were lower than the PBS control group and missense chain control group, the proportion of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in the siRNA transfection group were higher than the PBS control group and missense chain control group, but the proportion of S/G<sub>2</sub> phase were lower than the PBS control group and missense chain control group, cells apoptosis rates of the siRNA transfection group were lower than the PBS control group and missense chain control group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** siRNA specific silencing Survivin gene could accelerate the airway smooth muscle cell apoptosis, and inhibit cell abnormal proliferation and secretion.

**[Key words]** bronchial asthma; Survivin; airway smooth muscle cells; proliferation

支气管哮喘是呼吸科常见的气道慢性炎症性疾病, 病理过程复杂, 研究认为<sup>[1]</sup>, 气道慢性炎症诱发气道重塑是其发病的重要病理基础。气道重塑过程主要涉及慢性炎症所致气道壁

平滑肌细胞大量增殖和细胞外基质沉积, 其中, 平滑肌细胞大量增殖在气道重塑中尤为重要<sup>[2]</sup>, 如何有效抑制平滑肌细胞增殖及表型转化, 有望为支气管哮喘治疗提供新的契机。存活蛋

白(Survivin)是凋亡抑制蛋白家族中抑制凋亡作用最强的蛋白,可通过抑制 caspase 激活而对细胞凋亡起负向调控,在细胞异常增殖及恶性转化中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。已有研究表明<sup>[4]</sup>, Survivin 参与并调控肿瘤细胞异常增殖、凋亡过程。但其在气道平滑肌细胞增殖中的作用鲜有报道。本研究尝试采用小干扰 RNA(siRNA)靶向沉默 Survivin 基因,通过改变 Survivin 基因表达观察其对气道平滑肌细胞生物学行为的影响,以期为支气管哮喘基因靶向治疗提供基础资料。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 标准胎牛血清和鼠抗平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白单克隆抗体均购自美国 Sigma 公司,胰蛋白酶液、DMEM 高糖培养基和 DMEM 培养基均购自 Thermo 公司,Trizol 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 Liposuction 2000 脂质体转染试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司,SP 免疫组织化学试剂盒购自北京欣唐生物科技有限公司,兔抗人 Survivin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗人 GAPDH 单克隆抗体试剂盒和兔抗人 caspase-9 多克隆抗体均购自福州迈新公司,细胞周期试剂盒和凋亡试剂盒均购自美国 Bestbio 公司,小鼠 IL-6 和人趋化因子(CCL5/Rantes)检测试剂盒均购自上海丰寿生物科技有限公司,siRNA Survivin、阳性对照 GAPDH-siRNA、阴性对照错义链均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物及分组** 20 只 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠由河南省实验动物中心提供,体质量 15~18 g,饲养于标准条件下(温度 23℃左右、相对湿度 50%~60%),自由饮水及摄食。利用随机数字表随机分为实验组和对照组,每组 10 只。

**1.2.2 小鼠哮喘模型的构建及处理** 参考文献<sup>[5]</sup>方法构建小鼠哮喘模型,实验组:第 1 天将 10%卵清蛋白和 10%氢氧化铝抗原溶液 0.2 mL 进行腹腔注射致敏,14 d 后进行超声雾化吸入 2.5%卵清蛋白 30 min 左右诱发哮喘,等待小鼠出现咳嗽、呼吸急促、烦躁、发绀等哮喘发作症状,每间隔 1 d 进行 1 次,连续进行 42 d。对照组:第 1 天将生理盐水进行腹腔注射,后续处理与实验组相同,仅将生理盐水替换卵清蛋白。所有小鼠在最后 1 次雾化处理后 1 d 进行颈椎脱臼处死,取气管和支气管进行细胞培养,对右肺中叶进行免疫组织化学染色。利用组织贴块法对小鼠气道壁平滑肌细胞进行培养,取培养第 5 代细胞进行后续实验处理。

**1.2.3 小鼠气道壁平滑肌细胞分组及处理** 对实验组和对照组培养的气道壁平滑肌细胞分别进行分组:磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(加入 PBS)、错义链对照组(转染错义链)和 siRNA 转染组(转染 siRNA Survivin),根据 Survivin 基因序列及 siRNA 设计原则,确定最佳的 siRNA Survivin 序列:GCA TTC GTC CGG TTG CGC T。将等量的  $1 \times 10^6$  气道壁平滑肌细胞加入到 6 孔培养板中,放置到 37℃恒温箱中培养,待细胞生长达到 70%~80%融合时,将培养基换成不含血清 DMEM 行过夜培养。次日进行转染,严格按照试剂说明书进行操作,让 siRNA 最终浓度保持在 30 nmol/L,混匀后,放置在 37℃恒温箱培养,46 h 后开始下面的使用。

**1.2.4 利用逆转录 PCR(RT-PCR)检测气道壁平滑肌细胞中 Survivin mRNA 表达** 利用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒对细胞中总 RNA 进行提取,利用逆转录试剂盒进行逆转录为 cDNA。以获得的 cDNA 为模板进行 PCR, Survivin 引物序列为,

上游:5'-ACG GGG GAG AGA CGC AGT CC-3',下游:5'-GAC CGA GAC CGG GAC CTG GA-3',以 GAPDH 作为内参,PCR 反应条件:94℃预变性 10 min,94℃变性 20 s,55℃退火 15 s,72℃延伸 30 s,连续进行 36 个循环。对获得的 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,利用 Multi Gauge V3.1 软件对获得的电泳图像进行分析获得 Survivin mRNA 相对表达量。

**1.2.5 利用蛋白免疫印迹法(Western blot)对气道壁平滑肌细胞中 Survivin 和 caspase-9 蛋白表达量** 提取培养气道壁平滑肌细胞中总蛋白,于 4℃下 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液,保存于-20℃冰箱。利用 BCA 蛋白定量试剂盒对获得的蛋白浓度进行检测,取 50  $\mu$ g 蛋白进行十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并电转至硝酸纤维素膜上,用 5%脱脂奶粉进行封闭 120 min,分别将一抗 Survivin(1:1 000)、caspase-9(1:500)及内参加入后,4℃过夜,将二抗加入,利用双色红外荧光扫描系统对结果进行检测,计算蛋白相对量。

**1.2.6 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 IL-6 和 CCL5 水平** 取处理后 48 h 的气道壁平滑肌细胞上清液,利用 ELISA 法对 IL-6 和 CCL5 水平进行检测。

**1.2.7 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法对细胞增殖情况进行检测** 取对数期生长的气道壁平滑肌细胞,将 200  $\mu$ L 约含 5 000 个细胞接种于培养板,分别在培养 2、3 和 4 d 后终止培养,每次终止培养前 4 h,将 20  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液加入后,培养 4 h,将培养基去除后,继续往各孔加入 200  $\mu$ L DM-SO,振荡至结晶溶解,利用全自动酶标仪对各孔进行检测。

**1.2.8 采用流式细胞仪对细胞凋亡情况及细胞周期进行检测** 取对数期生长的气道壁平滑肌细胞,消化后收集细胞,用 4℃预冷 PBS 冲洗 3 次,利用结合缓冲液 1 mL 重新悬浮细胞(浓度  $1 \times 10^6$ ),取细胞悬液 100  $\mu$ L 计入流式管中,并加入 20  $\mu$ g/mL 碘化丙啶(PI)10  $\mu$ L,避光条件下放置 20 min,利用流式细胞仪(购自美国 Beckman Coulter 公司)对细胞凋亡情况进行检测。另取消化后细胞,用预冷的 70%乙醇固定过夜后,离心,收集细胞,用 PBS 洗涤 3 次,以 100  $\mu$ g/mL 加入 RNase A,于 37℃恒温箱孵育 25 min,加入 PI 500  $\mu$ L 于 4℃下避光 25 min,利用流式细胞仪对细胞周期进行检测。

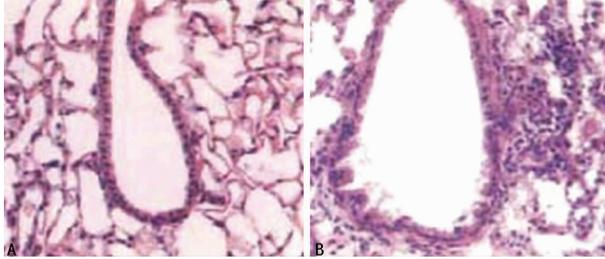
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,每组实验重复进行 3 次。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠哮喘模型构建鉴定** 对照组小鼠在模型构建过程中均未出现饮食、行为、呼吸节律异常,实验组小鼠在模型构建过程中出现了活动减少、呼吸节律不齐、急促、烦躁不安、四肢震颤、呛咳等表现,严重的甚至出现点头呼吸及口鼻紫绀。肺组织免疫组织化学显示,对照组小鼠气道上皮完整,未出现平滑肌增厚、炎性细胞浸润等现象;实验组小鼠气道上皮细胞出现破坏、炎性细胞浸润及平滑肌增厚等现象,提示构建小鼠哮喘模型成功,见图 1。

**2.2 不同处理组 Survivin 基因表达和 caspase-9 蛋白表达** RT-PCR 结果显示,实验组中 PBS 对照组和错义链对照组小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin RNA 相对表达量均高于对照组中 PBS 对照组和 siRNA 转染组,差异均有统计学意义( $P <$

0.05), 实验组中 siRNA 转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin RNA 相对表达量均低于 PBS 对照组和错义链对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示, 实验组中 PBS 对照组和错义链对照组小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin 蛋白表达量均高于对照组中 PBS 对照组和 siRNA 转染组, 而 caspase-9 蛋白表达量则低于对照组中 PBS 对照组和 siRNA 转染组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 实验组中 siRNA 转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin 蛋白表达量均低于 PBS 对照组和错义链对照组, 而 caspase-9 蛋白表达量则高于 PBS 对照组和错义链对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1、图 1~3。



A: 对照组; B: 实验组。

图 1 免疫组织化学检测小鼠哮喘模型肺组织病理改变 (HE,  $\times 200$ )

表 1 不同处理组 Survivin 基因表达和 caspase-9 蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Survivin RNA	Survivin 蛋白	caspase-9 蛋白
实验组			
PBS 对照组	0.934 ± 0.104 <sup>c</sup>	0.752 ± 0.135 <sup>c</sup>	0.219 ± 0.059 <sup>c</sup>
错义链对照组	0.939 ± 0.115 <sup>c</sup>	0.715 ± 0.127 <sup>c</sup>	0.227 ± 0.064 <sup>c</sup>
siRNA 转染组	0.513 ± 0.097 <sup>ab</sup>	0.441 ± 0.103 <sup>ab</sup>	0.462 ± 0.072 <sup>ab</sup>
对照组			
PBS 对照组	0.521 ± 0.083	0.402 ± 0.097	0.451 ± 0.076
错义链对照组	0.532 ± 0.092	0.396 ± 0.091	0.438 ± 0.071
siRNA 转染组	0.517 ± 0.075	0.381 ± 0.085	0.424 ± 0.069

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 PBS 对照组相比; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与错义链对照组相比; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组相比。

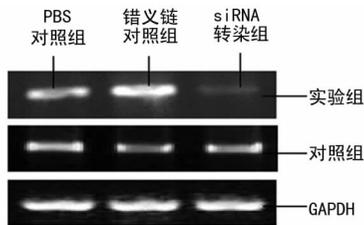


图 1 RT-PCR 检测实验组和对照组中 Survivin 基因表达

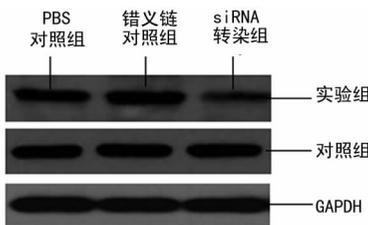


图 2 Western blot 检测实验组和对照组中 Survivin 蛋白表达

2.3 不同处理组对气道壁平滑肌细胞合成分泌 IL-6 和 CCL5 水平的影响 实验组中 PBS 对照组、错义链对照组和 siRNA 转染组气道壁平滑肌细胞合成分泌 IL-6 和 CCL5 水平均高于对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 实验组中 siRNA 转染组气道壁平滑肌细胞合成分泌 IL-6 和 CCL5 水平均低于 PBS 对照组和错义链对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

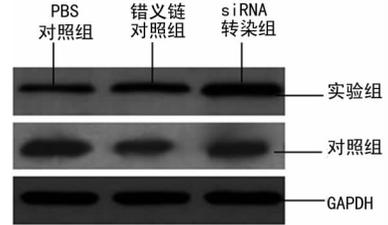


图 3 Western blot 检测实验组和对照组中 caspase-9 蛋白表达

表 2 不同处理组对气道壁平滑肌细胞合成分泌 IL-6 和 CCL5 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	IL-6	CCL5
实验组		
PBS 对照组	539.7 ± 26.8 <sup>c</sup>	337.4 ± 27.2 <sup>c</sup>
错义链对照组	522.8 ± 19.7 <sup>c</sup>	318.6 ± 21.5 <sup>c</sup>
siRNA 转染组	369.8 ± 43.9 <sup>abc</sup>	262.5 ± 35.7 <sup>abc</sup>
对照组		
PBS 对照组	207.8 ± 23.5	142.5 ± 18.9
错义链对照组	196.5 ± 20.4	139.6 ± 17.1
siRNA 转染组	184.7 ± 16.9	135.9 ± 15.8

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 PBS 对照组相比; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与错义链对照组相比; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组相比。

2.4 不同处理组对气道壁平滑肌细胞增殖的影响 实验组中 PBS 对照组、错义链对照组和 siRNA 转染组 2~4 d 细胞增殖量均高于对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 实验组中 siRNA 转染组 2~4 d 细胞增殖量均低于 PBS 对照组和错义链对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 不同处理组对气道壁平滑肌细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	2 d	3 d	4 d
实验组			
PBS 对照组	0.79 ± 0.13 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.67 ± 0.12 <sup>c</sup>
错义链对照组	0.77 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.38 ± 0.13 <sup>c</sup>	1.63 ± 0.10 <sup>c</sup>
siRNA 转染组	0.59 ± 0.09 <sup>abc</sup>	1.04 ± 0.18 <sup>abc</sup>	1.41 ± 0.11 <sup>abc</sup>
对照组			
PBS 对照组	0.36 ± 0.11	0.81 ± 0.19	1.17 ± 0.24
错义链对照组	0.34 ± 0.09	0.79 ± 0.17	1.14 ± 0.20
siRNA 转染组	0.31 ± 0.08	0.76 ± 0.15	1.16 ± 0.21

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 PBS 对照组相比; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与错义链对照组相比; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组相比。

2.5 不同处理组对气道壁平滑肌细胞周期及细胞凋亡的影响 实验组中 PBS 对照组和错义链对照组气道壁平滑肌 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

期比例显著低于对照组,而 S/G<sub>2</sub> 期比例则高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),实验组中 siRNA 转染组气道壁平滑肌细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例高于 PBS 对照组和错义链对照组,而 S/G<sub>2</sub> 期比例则低于 PBS 对照组和错义链对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );实验组中 PBS 对照组和错义链对照组细胞凋亡率均低于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),实验组中 siRNA 转染组细胞凋亡率则高于 PBS 对照组和错义链对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 4。

表 4 不同处理组对气道壁平滑肌细胞周期及细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	细胞周期		细胞凋亡率
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S/G <sub>2</sub> 期	
实验组			
PBS 对照组	51.8 ± 5.7 <sup>c</sup>	47.2 ± 4.3 <sup>c</sup>	3.6 ± 1.3 <sup>c</sup>
错义链对照组	50.9 ± 5.3 <sup>c</sup>	45.9 ± 3.9 <sup>c</sup>	3.3 ± 1.1 <sup>c</sup>
siRNA 转染组	62.2 ± 7.2 <sup>ab</sup>	33.8 ± 4.1 <sup>ab</sup>	9.4 ± 1.7 <sup>ab</sup>
对照组			
PBS 对照组	67.8 ± 6.9	38.7 ± 6.2	8.1 ± 1.2
错义链对照组	65.7 ± 7.3	35.9 ± 5.7	8.4 ± 1.4
siRNA 转染组	63.4 ± 6.5	34.6 ± 5.5	8.9 ± 1.5

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 PBS 对照组相比;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与错义链对照组相比;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与对照组相比。

### 3 讨 论

支气管哮喘作为一种气道炎症、重塑、高反应性的慢性进展性疾病,气道壁平滑肌细胞在气道重塑过程中发挥重要作用,不仅体现在细胞本身大量增殖及肥大,而且出现表现改变,分泌细胞因子的能力增加,而细胞因子又会促进气道壁平滑肌细胞增殖及分泌<sup>[5-6]</sup>。Survivin 作为一种凋亡抑制蛋白,可结合细胞周期调控因子 CDK4,激活 CDK2/cyclin E,并使 Rb 发生磷酸化,加入细胞由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期,同时,还可使 CDK4 结合复合物中释放出 p21WAF1/CIP1,通过与 caspase 作用而对 Fas 介导的细胞凋亡进行抑制,从而加速细胞的恶性转化及异常增殖<sup>[7]</sup>。本研究有选择性的利用 RNA 干扰引起 Survivin 基因沉默,观察其对小鼠支气管哮喘模型气道壁平滑肌细胞增殖、凋亡及分泌功能的影响。

本研究参考有关文献<sup>[5]</sup>进行支气管哮喘小鼠模型构建,结果显示,构建的模型可反应支气管哮喘实际病理过程。本研究 RT-PCR 结果显示,实验组中 PBS 对照组和错义链对照组小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin RNA 相对表达量均高于对照组中 PBS 对照组和 siRNA 转染组( $P < 0.05$ ),说明在支气管哮喘模型小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin 基因呈高表达,从而抑制细胞凋亡而加速细胞增殖过程<sup>[8]</sup>,同时,实验组中 siRNA 转染组小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin RNA 相对表达量均低于 PBS 对照组和错义链对照组( $P < 0.05$ ),说明在对 Survivin 基因有效抑制后,小鼠气道壁平滑肌细胞中 Survivin 基因呈低表达,进一步提示 Survivin 与气道壁平滑肌细胞异常增殖有关。Western blot 结果进一步说明,Survivin 蛋白在支气管哮喘小鼠气道壁平滑肌细胞中呈高表达,而其发挥生理作用可能通过与 caspase-9 蛋白相互作用而使细胞发生异常增殖<sup>[9]</sup>。

IL-6 是重要的炎症因子,其水平升高可促使 Th 向 Th2 分化,而 Th2 功能亢进,则会加速支气管哮喘病程进展<sup>[10]</sup>,CCL5 则是 Th1 相关趋化因子,对嗜酸性粒细胞具有正向趋化作用,而嗜酸性粒细胞浸润及数量与支气管哮喘发作及病情严重程度关系密切<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,实验组中 PBS 对照组、错义链对照组和 siRNA 转染组气道壁平滑肌细胞合成分泌 IL-6 和 CCL5 水平均高于对照组( $P < 0.05$ ),实验组中 siRNA 转染组气道壁平滑肌细胞合成分泌 IL-6 和 CCL5 水平均低于 PBS 对照组和错义链对照组( $P < 0.05$ ),说明支气管哮喘小鼠模型中 IL-6 和 CCL5 水平增加,这可能与气道壁平滑肌细胞大量合成分泌 IL-6 和 CCL5 有关<sup>[12]</sup>,而抑制 Survivin 基因则可减少两者的分泌,结合本研究结果,实验组中 siRNA 转染组 2~4 d 细胞增殖量均低于 BS 液对照组和错义链对照组( $P < 0.05$ ),说明抑制 Survivin 基因可减少气道壁平滑肌细胞,从而减少了 IL-6 和 CCL5 分泌。

本研究结果显示,实验组中 siRNA 转染组 2~4 d 细胞增殖量均低于 PBS 对照组和错义链对照组( $P < 0.05$ ),实验组中 siRNA 转染组气道壁平滑肌细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例高于 PBS 对照组和错义链对照组,而 S/G<sub>2</sub> 期比例则低于 PBS 对照组和错义链对照组( $P < 0.05$ ),实验组中 siRNA 转染组细胞凋亡率则高于 PBS 对照组和错义链对照组( $P < 0.05$ ),说明抑制 Survivin 基因表达可有效抑制哮喘模型小鼠气道壁平滑肌细胞异常增殖,并加速细胞凋亡的发生,提示 Survivin 介导的细胞凋亡通路在气道壁平滑肌细胞异常增殖中发挥重要作用,特异性的对 Survivin 基因进行抑制可加速气道壁平滑肌细胞凋亡,从而阻止支气管哮喘发生的病理基础产生<sup>[13]</sup>。

综上所述,siRNA 技术可特异性引起 Survivin 基因沉默,降低其在支气管哮喘模型小鼠气道壁平滑肌细胞中的表达,可加速气道壁平滑肌细胞凋亡发生,有效抑制细胞异常增殖及分泌功能,有望为进一步开展体内实验研究提供新的线索,并为支气管哮喘的基因治疗提供新的靶位。

### 参考文献

- [1] Miller M, Rosenthal P, Beppu A, et al. ORMDL3 transgenic mice have increased airway remodeling and airway responsiveness characteristic of asthma[J]. J Immunol, 2014, 192(8): 3475-3487.
- [2] Perry MM, Durham AL, Austin PJ, et al. BET bromodomains regulate transforming growth factor-β-induced proliferation and cytokine release in asthmatic airway smooth muscle[J]. J Biol Chem, 2015, 290(14): 9111-9121.
- [3] Khan S, Bennit HF, Wall NR. The emerging role of exosomes in survivin secretion[J]. Histol Histopathol, 2015, 30(1): 43-50.
- [4] Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: a molecular biomarker in cancer[J]. Indian J Med Res, 2015, 141(4): 389-397.
- [5] Chen Y, Wang Y, Fu Z. T lymphocyte antigen 4-modified dendritic cell therapy for asthmatic mice guided by the CCR7 chemokine receptor[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(9): 15304-15319.

融合表达时都缺乏信号识别序列,过表达无明显组织毒性,它的合成和转运到细胞膜有可能绕过大肠埃希菌易位子复合体<sup>[8]</sup>。Mistic 有紧凑的 4 个  $\alpha$  螺旋结构,不同于其他膜蛋白,这 4 个螺旋结构并不形成疏水跨膜部分,它的表面富有极性和带电残基,有特殊的表面亲水性质,是这种表面极性而不是疏水性促使它与细胞膜结合紧密,对膜蛋白在大肠埃希菌中的表达起到强大的促进作用,并增加其溶解性<sup>[12]</sup>。

去饱和酶均是多次跨膜的固有膜蛋白,他们的过量表达即进行相关研究的第一步,也是最大的瓶颈之一。本文利用遗传工具成熟的大肠埃希菌表达系统,结合与 Mistic 的融合表达,成功过量表达了  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶,实现分子生物学意义上的过量表达。此研究结果为进一步对跨膜型脂肪酸去饱和酶的结构和功能研究奠定基础,为改造出一个高活性的  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶的研究奠定基础。在原核宿主中重组高效表达  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶,作用于 18~20 碳的脂肪酸底物,有效将  $\omega$ -6 脂肪酸转变为  $\omega$ -3 脂肪酸,具有重要的医学和营养学价值。

#### 参考文献

- [1] 华晓敏,陈俏俏,潘庆杰. Fat-1 基因及其功能的研究进展[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2012(1):41-47.
- [2] 杨慧婷,王洪梅,方永志,等. Fat-1 转基因动物研究进展[J]. 生物技术通报,2012(12):8-12.
- [3] 元冬娟,吴萍,熊继红,等. 蓖麻和线虫的两种不同结构脂肪酸去饱和酶的原核表达[J]. 生物技术通报,2008(S1):393-396.
- [4] Xu Y, Kong J, Kong W. Improved membrane protein expression in lactococcus lactis by fusion to mistic[J]. Microbiology,2013(159):1002-1009.
- [5] Lee KA, Lee SS, Kim SY, et al. Mistic-fused expression of algal rhodopsins in Escherichia coli and its photochemical

properties[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(9):1694-1703.

- [6] Gong Z, Kessans SA, Song L, et al. Recombinant expression, purification, and biophysical characterization of the transmembrane and membrane proximal domains of HIV-1 gp41[J]. Protein Sci, 2014, 23(11):1607-1618.
- [7] Kefala G, Kwiatkowski W, Esquivies L, et al. Application of mistic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from escherichia coli[J]. J Struct Funct Genomics, 2007, 8(4):167-172.
- [8] Roosild TP, Greenwald J, Vega M, et al. NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression[J]. Science, 2005, 307(5713):1317-1321.
- [9] Deniaud A, Bernaudat F, Frelet-Barrand A, et al. Expression of a chloroplast ATP/ADP transporter in E. coli membranes: behind the Mistic strategy[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1808(8):2059-2066.
- [10] Marino J, Bordag N, Keller S, et al. Mistic's membrane association and its assistance in overexpression of a human GPCR are independent processes[J]. Protein Sci, 2015, 24(1):38-48.
- [11] 周峰,黄非,白林含. 盐藻 PDS 基因的同源克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学报, 2015, 55(2):149-155.
- [12] Broecker J, Fiedler S, Gimpl K, et al. Polar interactions trump hydrophobicity in stabilizing the self-inserting membrane protein Mistic[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(39):13761-13768.

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-02-16)

(上接第 2189 页)

- [6] Palmer DJ, Huang RC, Craig JM, et al. Nutritional influences on epigenetic programming: asthma, allergy, and obesity[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2014, 34(4):825-837.
- [7] Wang HQ, Jin JJ, Wang J. Matrine induces mitochondrial apoptosis in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells via suppression of  $\beta$ -catenin/survivin signaling[J]. Oncol Rep, 2015, 33(5):2561-2566.
- [8] Aboulaiwi WA, Muntean BS, Ratnam S, et al. Survivin-induced abnormal ploidy contributes to cystic kidney and aneurysm formation[J]. Circulation, 2014, 129(6):660-672.
- [9] Marques I, Teixeira AL, Ferreira M, et al. Influence of survivin (BIRC5) and caspase-9 (CASP9) functional polymorphisms in renal cell carcinoma development: a study in a southern European population[J]. Mol Biol Rep,

2013, 40(8):4819-4826.

- [10] Mayer A, Debusson D, Denanglaire S, et al. Antigen presenting cell-derived IL-6 restricts Th2-cell differentiation[J]. Eur J Immunol, 2014, 44(11):3252-3262.
- [11] Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, et al. Asthma phenotypes in Japanese adults—their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes[J]. Allergol Int, 2013, 62(1):113-121.
- [12] Wu D, Tan W, Zhang Q, et al. Effects of ozone exposure mediated by BEAS-2B cells on T cells activation: a possible link between environment and asthma[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2014, 32(1):25-33.
- [13] Wells RE, Garb J, Fitzgerald J, et al. Factors associated with emergency department visits in asthma exacerbation[J]. South Med J, 2015, 108(5):276-280.

(收稿日期:2015-11-18 修回日期:2016-02-26)