

· 基础研究 ·

干扰素- α 对人血管成纤维细胞迁移的影响

吴 强*, 黄 晶, 宋 方, 龙向淑

(贵州省人民医院心内科, 贵阳 550002)

【摘要】目的 探讨干扰素- α (IFN- α) 对人脑血管外膜成纤维细胞 (VAFs) 迁移的影响及机制。**方法** 培养人脑VAFs, 用终浓度为2000kU/L的IFN- α 刺激24h (IFN- α 组), 用细胞划线法与Transwell法检测细胞迁移能力变化, 用Real-time PCR法和蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法分别检测细胞中干扰素诱导蛋白16在mRNA和蛋白表达水平的变化。以空白组为对照。**结果** 与空白组比较, IFN- α 组VAFs的干扰素诱导蛋白16的mRNA和蛋白表达水平上调, 细胞迁移受限。**结论** IFN- α 可抑制VAFs迁移, 该效应可能与促进干扰素诱导蛋白16表达有关。

【关键词】 干扰素 α ; 成纤维细胞; 迁移; 干扰素诱导蛋白

【中图分类号】 R363

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00057

Interferon- α suppresses migration of human brain vascular adventitial fibroblasts *in vitro*

WU Qiang*, HUANG Jing, SONG Fang, LONG Xiangshu

(Department of Cardiology, Guizhou Provincial Peoples' Hospital, Guiyang 550002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of interferon- α (IFN- α) on the migration of human brain vascular adventitial fibroblasts (VAFs). **Methods** VAFs were cultured in presence or absence of 2000 kU/L IFN- α for 24h. VAFs migration was investigated by cell scratch assay and counted by Transwell chamber test. The mRNA and protein expression of interferon-inducible protein 16 were detected by semiquantitative RT-PCR and Western blotting. **Results** IFN- α treatment resulted in a reduce in cell migration and enhanced expression of interferon-inducible protein 16 at mRNA and protein levels in VAFs. **Conclusion** IFN- α may inhibit the migration capacity of VAFs via up-regulating the expression of interferon-inducible protein 16.

【Key words】 interferon alfa; fibroblasts; migration; interferon-inducible protein

This work was supported by the Governor Special Project for Excellent Talents in Science, Technology and Education of Guizhou Province (2009-30), the Special Project of Science and Technology Facility for High-grade Talents of Guizhou Province (TZJF-2010-098), and the National Natural Science Foundation of China (No.81260030).

血管外膜成纤维细胞 (vascular adventitial fibroblasts, VAFs) 是动脉管壁成分细胞之一, 近年研究发现VAFs的增殖、表型转化、迁移及分泌细胞外基质等变化参与了血管增殖性疾病的病理改变, 在血管重构过程中起着重要的作用^[1-3]。干扰素 (interferon, IFN) 是一组具有抗病毒、抗增殖、影响细胞生长和分化等作用的细胞因子, 通过诱导表达多种IFN诱导蛋白发挥其生物学效应^[4]。本文应用IFN- α 刺激人脑VAFs, 检测其迁移和IFN诱导蛋白16 (interferon-inducible protein, IFI16) 表达的变化,

旨在探讨IFN- α 对VAFs迁移的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人脑VAFs细胞株购自ScienCell公司; IFN- α 购自北京三元基因工程有限公司; 逆转录试剂盒购自Fermentas公司; 人IFI16引物 (上游: gaagtccagcgtaactccta, 下游: tacctcaaaccacccattcac, 80bp) 和人 β -actin引物 (上游: tggcaccacaccttctacaatg, 下游: tcattctctcgcggttggc, 103bp) 购自上海生工生

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-01-06

基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金资助项目 (黔省专合字 2009-30); 贵州省高层次人才科研条件特助经费项目 (TZJF-2010-098); 国家自然科学基金资助项目 (No.81260030)

通讯作者: 吴 强, Tel: 0851-5937194, E-mail: waqqa@yahoo.com.cn

物工程公司; Real-time PCR荧光染料试剂盒购自TakaRa公司; Transwell小室购自Corning公司。

1.2 VAFs的培养

将冻存的VAFs复苏后移入15ml离心管, 加入10倍体积的10%胎牛血清DMEM培养基, 1000r/min离心5min, 弃上清, 加入1ml培养基重悬细胞, 移至培养瓶中, 再加培养基至4ml, 置于5%CO₂培养箱37℃孵育, 24h后更换培养基。取复苏后第3~4代生长状态良好的细胞用于实验。

1.3 实验分组

空白组: 加入10%胎牛血清的DMEM培养基培养24h; IFN-α处理组: 加入含IFN-α终浓度为2000kU/L的10%胎牛血清的DMEM培养基培养24h。

1.4 Real-time PCR法检测IFI16的mRNA表达

取对数生长期细胞, 按Trizol法提取总RNA, 测定RNA浓度和A_{260nm}/A_{280nm}值, 按RT-PCR两步法试剂盒说明操作逆转录合成cDNA (42℃ × 60min, 70℃ × 5 min)。按照荧光PCR试剂盒说明操作进行PCR扩增。Real-time PCR采用Step One Plus™系统, 条件: 95℃ 30s预变性, 95℃ 5s, 60℃ 34s, 重复循环40次。溶解曲线分析95℃ 15s, 60℃ 1min, 95℃ 15s。根据ΔCt和2^{-ΔCt}计算各组IFI16 mRNA的相对表达量。实验重复3次。

1.5 Western 免疫印迹法检测蛋白表达

按细胞裂解液说明书提取细胞蛋白, 用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 置沸水煮5min变性; 10%分离胶电泳, 电压80V, 进入浓缩胶后改为120V。湿电转膜, 电流200mA, 转膜时间1h; 5%脱脂奶粉室温封闭1h; TBST洗膜3次, 每次10min; 一抗4℃ (IFI16抗体和β-actin抗体稀释度分别为1:500和1:5000) 过夜孵育; TBST洗膜3次, 每次10min; 37℃孵育二抗1h; TBST洗膜3次, 每次10min; 加入ECL反应印迹。用扫描仪扫描曝光胶片, BandsScan4.3软件进行总灰度分析。以β-actin为内对照测定各组IFI16蛋白的相对含量。实验重复3次。

1.6 细胞划线法观察细胞迁移

在孔内细胞汇合度 > 90%时, 垂直于孔背面的横线划痕标记, 分别于空白组和IFN-α组对应的各孔内加入不含和含IFN-α终浓度为2000kU/L的5%血清DMEM培养基1ml, 置于5%CO₂培养箱, 于37℃孵育24h后随机选取视野拍照。

1.7 Transwell小室法定量迁移细胞

取对数生长期细胞, 消化、计数后, 用0.1%胎牛血清DMEM培养基重悬细胞至1×10⁵个/mL。在每个小室中加入100μl细胞悬液, 在24孔板下室内加入含10%胎牛血清的DMEM培养基800μl (空白组); 另于上、下室内加入终浓度为2000kU/L的IFN-α (IFN-α组)。将24孔板置于5%CO₂培养箱, 于37℃孵育24h后弃孔内培养液, 上室用PBS液洗涤3遍, 将小室置于4%多聚甲醛中固定20min, 自然晾干。将小室置于0.1%结晶紫中染色20min后, 用灭菌水洗涤3遍。再度置干后, 显微镜下随机选取4个视野 (400×), 计数迁移细胞。

1.8 统计学处理

计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较应用 SPSS 11.5 统计软件进行t检验。以P < 0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IFI16的mRNA与蛋白表达的变化

与空白组比较, IFN-α组IFI16的mRNA与蛋白表达上调 (P < 0.05; 图1, 表1)。

2.2 VAFs迁移的变化

细胞划线法发现, 低血清培养24h后IFN-α组的细胞迁移范围低于空白组 (图2A, B, C, D)。Transwell小室迁移细胞计数结果显示, IFN-α组的迁移细胞数低于空白组 (P < 0.05; 表1, 图2E, F, G, H)。

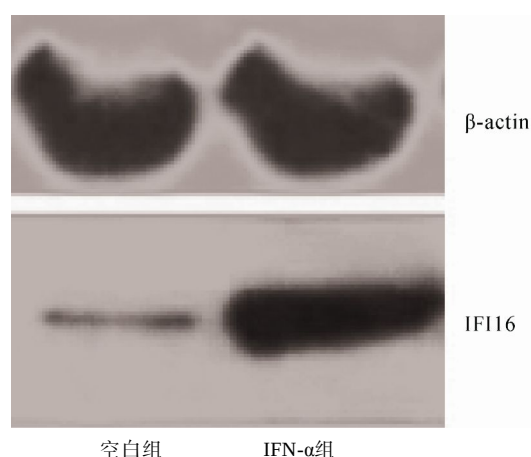


图1 空白组和IFN-α组的IFI16蛋白表达的变化

Figure 1 The expression of IFI16 protein in blank control group and IFN-α group

3 讨论

血管壁是由内、中及外膜组成, 相应地其细胞成分分别为血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及VAFs。长期以来关于动脉粥样硬化、高血压、血管

表1 空白组和IFN-α组的IFI16的mRNA与蛋白表达、细胞迁移数的变化

Table 1 Expression of IFI16 and migration of VAFs in blank control group and IFN-α group ($\bar{x} \pm s$)

组别	VAFs迁移数(个/视野, $n = 4$)	IFI16的mRNA表达($n = 3$)	IFI16的蛋白表达($n = 3$)
空白组	143.0 ± 7.4	3.04 ± 0.20	0.064 ± 0.003
IFN-α组	49.2 ± 3.4*	16.13 ± 0.62*	0.478 ± 0.018*

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$

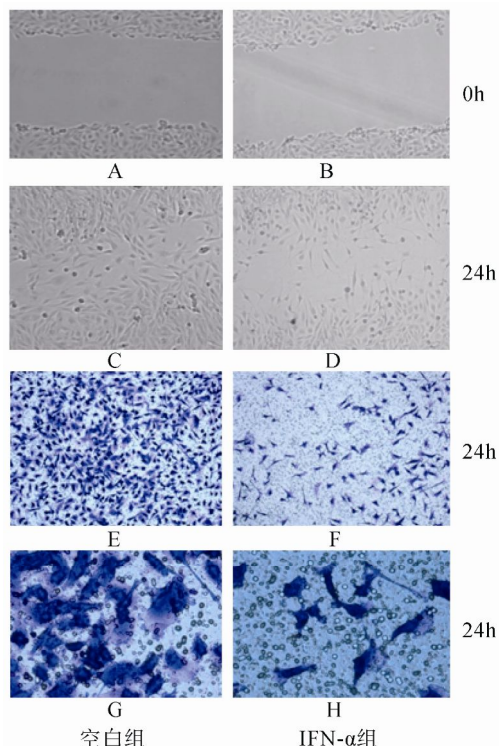


图2 空白组和IFN-α组VAFs迁移范围的变化

Figure 2 VAFs migration capability of blank control group and IFN-α group *in vitro* (crystal violet)

A: 空白组; B: IFN-α组加入IFN-A即刻; C: 空白组24h; D: IFN-α组加入IFN-α23h; E: 空白组24h结晶紫染色 ($\times 100$); F: IFN-α组24h结晶紫染色 ($\times 100$); G: 空白组24h结晶紫染色 ($\times 400$); H: IFN-α组24h结晶紫染色 ($\times 400$)

介入治疗后再狭窄等血管增殖性疾病的研究主要集中于前二者, 而VAFs被认为仅具有支持和营养功能。近年来越来越多的证据^[1-3]显示, VAFs增殖、表型转变为肌成纤维细胞, 并向内膜迁移与分泌胶原纤维等生物学行为异常也是血管重构发生、发展的重要病理生理机制之一。

IFN是机体在病毒及其他IFN诱导剂刺激下, 由单核细胞、淋巴细胞及体细胞所产生的一类具有抗增殖、抗病毒、调节细胞分化和免疫应答等多种生物活性的糖蛋白, 根据其信号转导受体复合物的不同以及序列同源性, 被分为 I 型 (包括 IFN-α、IFN-β、IFN-δ及IFN-τ等)^[5]、II 型 (IFN-γ)^[6]及 III 型 (IFN-λ)^[7]。近年来, 针对IFN对血管重构的影响已取得了一些有趣的证据。局部转染过表达IFN-β能够显著下调球囊损伤动脉后的血管平滑肌细胞增殖和血管新生内膜形成^[8]; 然而, 转

染IFN-γ受体α亚单位的可溶性突变体以抑制内源性IFN-γ的作用, 可抑制血管球囊损伤后的血管平滑肌细胞增殖和血管内皮修复, 提示IFN-γ具有促进增殖性血管重构的作用^[9]。这些看似矛盾的实验结果可能与不同的IFN所触发的信号转导通路间的差异有关, 这也反映了IFN功能的多样性。本研究结果显示, 在无相关病理因素刺激下, 离体培养的VAFs亦存在一定的迁移活性, 而IFN-α可抑制VAFs迁移范围, 下调迁移细胞数量。

IFI16是IFN诱导蛋白200家族的人类同源成员之一, 通过与转录因子Rb和p53等下游目标蛋白的结合, 介导IFN发挥相应的生物学效应^[10-12]。有研究发现IFI16具有抑制血管内皮细胞增殖、迁移及新生血管形成的作用^[13], 参与对血管内皮炎症反应的调控^[14], 但尚未明了IFI16在VAFs迁移过程中所扮演的角色。本研究结果显示, IFN-α组IFI16的mRNA与蛋白表达明显高于空白组, 表明IFN-α可诱导VAFs的IFI16过表达, IFI16可能参与了IFN-α对VAFs迁移的调控。当然这个结论尚需要进一步进行基因转染过表达IFI16和 (或) 沉默其表达以确认, 从而为IFN及其诱导蛋白应用于血管增殖性疾病的干预提供理论依据。

【参考文献】

- [1] An SJ, Boyd R, Zhu M, *et al*. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts[J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(4): 702-709.
- [2] Chiang HY, Korshunov VA, Serour A, *et al*. Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(7): 1074-1079.
- [3] 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, 48(3): 261-272.
- [4] Wessely R. Interference by interferons: Janus faces in vascular proliferative diseases[J]. Cardiovasc Res, 2005, 66(3): 433-443.
- [5] Pitha PM, Kunzi MS. Type I interferon: the ever unfolding story[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2007,

- 316: 41-70.
- [6] van Boxel-Dezaire AH, Stark GR. Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2007, 316: 119-154.
- [7] Ank N, West H, Bartholdy C, *et al.* Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections *in vivo*[J]. J Virol, 2006, 80(9): 4501-4509.
- [8] Stephan D, San H, Yang ZY, *et al.* Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia by gene transfer of beta-interferon[J]. Mol Med, 1997, 3(9): 593-599.
- [9] Kusaba K, Kai H, Koga M, *et al.* Inhibition of intrinsic interferon-gamma function prevents neointima formation after balloon injury[J]. Hypertension, 2007, 49(4): 909-915.
- [10] Asefa B, Klarmann KD, Copeland NG, *et al.* The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation[J]. Blood Cells Mol Dis, 2004, 32(1): 155-167.
- [11] Liao JC, Lam R, Brazda V, *et al.* Interferon-inducible protein 16: insight into the interaction with tumor suppressor p53[J]. Structure, 2011, 19(3): 418-429.
- [12] Kondo Y, Nagai K, Nakahata S, *et al.* Overexpression of the DNA sensor proteins, absent in melanoma 2 and interferon-inducible 16, contributes to tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma with p53 inactivation[J]. Cancer Sci, 2012, 103(4): 782-790.
- [13] 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.
- [14] 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.
- (编辑: 周宇红)

· 消 息 ·

《中华老年多器官疾病杂志》征稿、征订启事

《中华老年多器官疾病杂志》是由中国人民解放军总医院主管、解放军总医院老年心血管病研究所和中国科技出版传媒股份有限公司主办的医学期刊,创办于2002年,月刊。本刊是国内外唯一的一本反映老年多器官疾病的期刊,主要交流老年心血管疾病,尤其是老年心血管疾病合并其他疾病,老年两个以上器管疾病及其他老年多发疾病的诊治经验与发病机制的研究成果。开设的栏目有述评、综述、临床研究、基础研究等。

本刊热忱欢迎从事心脏病学及其相关领域的专家学者踊跃投稿并订阅杂志,我们真诚期待您的关注和参与。

地址: 100853 北京市复兴路28号,解放军总医院老年心血管病研究所

电话: 010-66936756

传真: 010-66936756

电子邮箱: zhldnqg@mode301.cn

在线投稿: <http://www.mode301.cn/ch/author/login.aspx>