

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01175

siRNA 靶向沉默 *p22phox* 表达对内皮细胞衰老抑制作用的研究

李虹¹, 白小娟², 刘强³, 王宁夫¹

1. 杭州市第一人民医院南京医科大学附属杭州医院, 杭州 310006;
2. 中国医科大学附属第一医院, 沈阳 110001;
3. 浙江大学医学院第二附属医院, 杭州 310009

摘要: 设计特异性 siRNA(Short interference RNA)诱导人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞 NAD(P)H 氧化酶活性亚单位 *p22phox* 基因沉默, 探讨 *p22phox* 基因沉默在血管紧张素 (Ang) 诱导的 ECV-304 衰老中的作用及机理。应用体外转录合成 3 种 siRNA 转染体外培养的 ECV-304, RT-PCR 鉴定对 *p22phox* 基因沉默的效率和特异性, 确立适宜的转染浓度和基因沉默的持续时间; ECV-304 分为空白对照组、Ang 组、siRNA 转染组、Ang + siRNA 转染组, 观察细胞衰老改变及活性氧水平, 分析各组细胞 *p22phox* 的 mRNA 及蛋白表达。结果表明: 3 种 siRNA 中, 一种对 *p22phox* mRNA 表达抑制率达到 83%, 在一定转染浓度范围内, siRNA 诱导的基因沉默效率呈剂量依赖性, 抑制效率高峰期在 24~36 h; 给予 Ang 后, β -gal 染色阳性细胞数显著增加, 出现衰老的特征性改变, 衰老细胞 *p22phox* 的 mRNA 及蛋白表达增加, 伴有一氧化氮(NO)生成减少, 活性氧生成增加, siRNA 诱导 *p22phox* 基因沉默后降低了活性氧水平, 增加 NO 生成, 改善了 Ang 诱导的 ECV-304 细胞的衰老改变。siRNA 干扰技术可成功诱导 NAD(P)H 氧化酶 *p22phox* 基因沉默, 从而减缓 Ang 诱导体外培养的 ECV-304 衰老进程, *p22phox* 是防治衰老有希望的分子靶点。

关键词: 血管紧张素 ; *p22phox*; 内皮细胞; 衰老; siRNA

The study on inhabiting endothelial cell aging by targeted silencing of *p22phox*

LI Hong¹, BAI Xiao-Juan², LIU Qiang³, WANG Ning-Fu¹

1. Department of Cardiology, the Affiliated Hangzhou Hospital, Nanjing Medical University, Hangzhou 310006, China;
2. Clinical Circulatory Section of the First Affiliated Hospital in CMU, Shenyang, 110001, China;
3. The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China

Abstract: The aim of the study was to determine the importance and possible mechanism of NAD (P)H oxidase subunits P (superscript 22phox) involved in human umbilical endothelial cell lines ECV-304 aging by special short interference RNA (siRNA). Three siRNAs targeting *p22phox* were designed and synthesized *in vitro*, which were used to transfect ECV-304 cultured *in vitro* for selecting the most powerful and most suitable transfection concentration and time. The cell line ECV-304 was divided into three groups: control group, angiotensin (Ang) group, siRNA group, and Ang + siRNA

收稿日期: 2007-12-08; 修回日期: 2008-07-14

基金项目: 南京医科大学科技发展基金(编号: 07NMUM075)项目[Supported by Nanjing Medical University (No. 07NMUM075)]

作者简介: 李虹(1977-), 女, 山东沂源人, 博士, 住院医师, 研究方向: 心血管疾病与衰老。Tel: 0571-87065701; E-mail: rainbowheart2003@126.com

通讯作者: 王宁夫(1954-), 男, 河北人, 博士, 教授, 研究方向: 心血管疾病介入治疗。Tel: 0571-87065701; E-mail: wangningfu@hotmail.com

group. Cell aging was identified by β -gal stain. Reactive oxygen species (ROS) and NO level in cells and medium were measured. RT-PCR and Western blot were used to analyze mRNA and protein expression of NAD(P)H oxidase subunit p22phox. Among the 3 siRNAs, siRNA-1 was the most powerful on gene silence with 50 nmol/L transfection concentration at 24 h and 36 h. The number of positive cells stained by β -gal were increased in ECV-304 stimulated with Ang, and p22phox mRNA and protein expression were increased in aging ECV-304 stimulated with Ang, which had lower NO and higher ROS. Compared with Ang group, ROS level was decreased and NO level was increased in Ang + siRNA group with decreased aging level. The result of the present study suggested that siRNA could induce NAD(P)H oxidase subunit p22phox gene silence, Ang could induce ECV-304 aging cultured *in vitro*, and the possible pathway of endothelial cell aging is that Ang upregulates p22phox expression, and then enhances the cell ROS level.

Keywords: angiotensin; endothelial cell; aging; p22phox; short interference RNA

衰老是心血管疾病的主要危险因素之一^[1]。全球老龄化社会的到来, 防衰抗衰研究成为降低心血管病发病率死亡率的重要手段^[2]。大量研究证实内皮细胞生物学改变是人类衰老和疾病的基础^[3]。血管壁内皮细胞存在活性氧(ROS)系统, NAD(P)H氧化酶是内皮细胞ROS产生的主要来源^[4], p22phox是NAD(P)H氧化酶必需的活性亚单位, 此酶由血管紧张素II(AngII)激活^[5], 并认为与高血压病、缺血性心脏病等血管重构有关^[6], 目前尚缺乏NAD(P)H氧化酶与内皮细胞衰老的相关性研究。RNA干扰是一种快速有效的基因沉默技术, 是基因功能研究的有利手段。本研究旨在观察体外转录合成的siRNA (short interference RNA)是否可诱导人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 的NAD(P)H氧化酶活性亚单位p22phox基因沉默, p22phox基因沉默对Ang 诱导的ECV-304衰老的干预作用, 从而验证p22phox与内皮细胞衰老的相关性及可能的机理。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 (美国 ATCC)贴壁生长于含 10% 胎牛血清 (Hyclone, USA) 的 RPMI1640 培养液(Gibco, USA)中。细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 和完全饱和湿度条件下培养, 2~3 d 换液以维持良好生长状态。收获细胞用 0.125% 的胰酶消化, 4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心收集。

1.2 siRNA 设计、合成及筛选

1.2.1 siRNA 设计和合成

根据 GenBank 人类 p22phox 基因 (编号 NM_

000101.1) 已知序列, 按Mittal和Elbashir等^[6-8] siRNA 设计原则, 选择潜在的 siRNA 靶位点, 将潜在序列在NCBI refseq-mrna database中进行BLAST同源序列比对, 排除和其他编码序列同源性高可能引起非特异性干扰的序列。最终选取 3 种 siRNA (siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3), 合成其对应的 cDNA 序列 (Invitrogen 公司), 经体外转录合成相应的双链 siRNA (SilencerTM siRNA Construction Kit, Ambion Inc, USA)。合成的 siRNA 序列见表 1。

1.2.2 siRNA 的转染及筛选

ECV-304 接种于 6 孔培养板, 细胞融合达 60% 时, 进行转染, 转染前 2 h 更换无血清无双抗 1640 培养液。用无血清无双抗 1640 培养液稀释 siRNA 和转染试剂 lipofectamineTM 2000 (Invitrogen, USA), 将稀释液混合, 形成 siRNA-转染试剂复合物, 将其加入细胞中, siRNA 终浓度为 50 nmol/L。转染后 24 h 收获细胞, RT-PCR 检测 p22phox mRNA 表达的改变; 针对抑制作用最强的 siRNA-1 确立阴性对照。

1.2.3 siRNA 抑制效率随时间浓度的改变及特异性检测

以不同终浓度的 siRNA-1(10 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L)转染细胞, 转染 12 h、24 h、36 h、48 h 收集细胞, RT-PCR 检测目的基因表达, 确立转染的适宜浓度及随时间的变化趋势。确立合适的浓度及时间后, 细胞分组如下: 1 组: 空白对照组, 不加因素, 与其余各组同时无血清孵育; 2 组: 仅加入 siRNA, 不加入转染试剂; 3 组: 仅加入转染试剂, 不加 siRNA; 4 组: 阴性对照 siRNA 加转染试剂组; 5 组: siRNA 加转染试剂组, 转染 24 h 后, 收集细胞检测目的基因表达以确立 siRNA 抑制效应的特异性。

表 1 siRNA 及 PCR 引物设计
Table 1 siRNA and PCR primer design

名称 Name	序列 Sequence
siRNA-1	正义链 (Sense strand) siRNA: GAAGGGCUCCACCAUGGAGTT 反义链 (Antisense strand) siRNA: UCCAUGGUGGAGCCCUUCTT
siRNA-2	正义链 (Sense strand) siRNA: GAGGAAGAAGGGCUCCACCTT 反义链 (Antisense strand) siRNA: GGUGGAGCCCUUCUUCUUCTT
siRNA-3	正义链 (Sense strand) siRNA: UUACUAUGUUCGGGCCGUCTT 反义链 (Antisense strand) siRNA: GACGGCCCGAACAUAGUAATT
NAD(P)H 氧化酶 <i>p22phox</i>	上游 Upstream 5'- GTTTGTGTGCCTGCTGGAGT-3'
NAD(P)H oxidase subunit <i>p22phox</i>	下游 Downstream 5'- TGGGCGGCTGCTTGATGGT-3'
<i>GAPDH</i>	上游 Upstream 5'-GCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT-3'
	下游 Downstream 5'-TACCGAAGTTGTCATGGATGACCT-3'

1.2.4 RT-RCR

Trizol 试剂(Gibco)提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 量和纯度, 所用 RNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.0 之间。用 AMV 逆转录酶(TaKaRa 公司)将 RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应, 反应体系为: RT 产物 2 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, $MgCl_2$ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 上下游引物各 0.5 mol/L, *Taq* 酶 1.25 U, 用 ddH₂O 补至 20 μ L。用 Primer premir5.0 和 Oligo6.0 软件设计 PCR 特异性引物(表 1)。*p22phox* 扩增条件为: 95 预变性 10 min; 94 1 min, 62 1 min, 72 1 min, 循环 35 次; 72 延伸 10 min。*GAPDH* 复性温度为 60 , 其余扩增条件同 *p22phox*。扩增产物长度 *p22phox* 为 317 bp, *GAPDH* 为 464 bp。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像分析系统分析, *GAPDH* 吸光度作为内对照。

1.3 Ang 刺激细胞

1.3.1 细胞分组

ECV-304 接种于 6 孔培养板,融合达 60%进行如下分组。1 组: 空白对照组, 无刺激因素与其余各组同时无血清孵育; 2 组: Ang 刺激组, 细胞无血清同步 6 h 后, 加入终浓度为 10^{-6} mol/L 的 Ang (Sigma, USA),持续刺激 48 h, 第 12 h、24 h 各补充 Ang 一次; 3 组: siRNA 转染组, siRNA 终浓度为 100 nmol/L; 4 组: Ang 刺激加 siRNA 转染组, siRNA(终浓度为 100 nmol/L)转染后 6 h, 加入终浓度为 10^{-6} mol/L 的 Ang ,持续刺激 48 h, 第 12 h、24 h 各补充 Ang 一次。

1.3.2 细胞衰老程度鉴定

β -gal是一种可鉴定衰老细胞的生物学标志物,

依据Dirnri和Serrano提出的方法[9,10], PBS(pH 7.2)洗细胞一次, PBS配置的 0.5%的戊二醛固定 5 min, PBS洗两次; 在新配置的 1 mg/mL的X-gal染液(150 mmol/L Nacl, 2 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$, 5 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$, 40 mmol/L柠檬酸, 12 mmol/L磷酸钠, pH 6.0)中染色, 37 无CO₂孵育 12~16 h, 显微镜下计数胞浆中有兰色沉淀的细胞百分数。

1.3.3 细胞培养液及细胞 NO、ROS 测定

硝酸还原酶法(NO 试剂盒, 南京建成生物工程研究所)测定 NO, 细胞用生理盐水制备成 $10^6/\mu$ L 匀浆, 超声破碎后检测, 细胞培养液直接检测。双氢乙酞乙酸二氯荧光黄(DCFH-DA, Invitrogen 公司)可被细胞内活性氧氧化为二氯荧光黄(DCF) 发出绿色荧光, 用 DCFH-DA 作为探针(终浓度为 10 μ mol/L), 流式细胞仪检测细胞内 DCF 的平均荧光强度, 可相对定量细胞内活性氧水平, 离心收集细胞, PBS 洗 2 次, 新鲜培养液重悬, 加 DCFH-DA, 37 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测, 激发光 488 nm, 650 nm 滤光片收集。

1.3.4 RT-PCR 及 Western-blot

RT-PCR 检测 *p22phox* mRNA, 表达方法同上。RIPA Buffer 裂解液提取总蛋白, 考马斯亮兰法测蛋白含量, 调整蛋白浓度, 煮沸变性 5 min, 12%SDS-PAGE 电泳后半干转印仪转膜, 5%脱脂奶粉的 TBST(0.05%的 Tween-20)封闭 1 h, 1 : 300 稀释的一抗(*p22phox* 多克隆抗体购自美国 Santa cruz, AT₁R、AT₂R 多克隆抗体购自武汉博士德)4 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1.5 h, 洗膜后化学发光法显色, β -actin 为内对照。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件进行统计处理, 各项观察指标以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组资料用 ANOVA, LSD 法进行组间比较, 分析评价 siRNA 抑制的时效量效关系, $P<0.05$ 为差异有显著性, $P<0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 siRNA 的筛选

2.1.1 3 种 siRNA 对 *p22phox* 的 mRNA 表达抑制效果

siRNA(50 nmol/L) 转染后 24 h, siRNA-1 对 *p22phox* 抑制作用最强, 抑制率为 $(82\pm 4)\%$; siRNA-2 仅表现为轻度抑制, 与对照组无显著差异; siRNA-3 抑制率为 $(63\pm 6)\%$, 与对照组有显著差异(图 1)。

2.1.2 siRNA-1 对 *p22phox* 的 mRNA 表达抑制的时效关系

10 nmol/L siRNA 组抑制率 $(57\pm 9)\%$; 50 nmol/L siRNA 组抑制率为 $(85\pm 8)\%$, 100 nmol/L siRNA 组抑制率为 $(89\pm 11)\%$, 50 nmol/L 与 100 nmol/L siRNA 两组抑制作用无显著差别。3 个剂量组与对照组比较均有显著差异; siRNA 抑制效应在 12 h 已经出现, 24 h 及 36 h 达到高峰, 48 h 开始下降, 但与对照组仍有显著差异(图 2)。

2.1.3 siRNA-1 对 *p22phox* 的 mRNA 表达抑制的特异性

2、3、4 组与 1 组空白对照比较均未显示差异, 5 组与其余各组比较均有显著差异, 说明抑制效应是由序列特异性 siRNA 转染介导的(图 3)。根据以上 3

种 siRNA 抑制效果、量效时效关系、抑制特异性的检测, 最终选取抑制效率最高的 siRNA-1, 干扰浓度为 50 nmol/L。

2.2 细胞衰老程度

β -gal 染色显示, 空白对照组及 siRNA 转染组细胞几乎不表达 β -gal; Ang 组 β -gal 阳性的细胞数较空白组明显增加, $(72\pm 13)\%$ 细胞染色阳性 ($P=0.000$); Ang 加 siRNA 转染组 β -gal 阳性细胞数较 Ang 组降低, 为 $(49\pm 17)\%$ ($P=0.002$)。说明 Ang 可诱导 ECV-304 细胞衰老, 从 mRNA 水平沉默 *p22phox* 表达在一定程度上抑制了 Ang 诱导的细胞衰老。

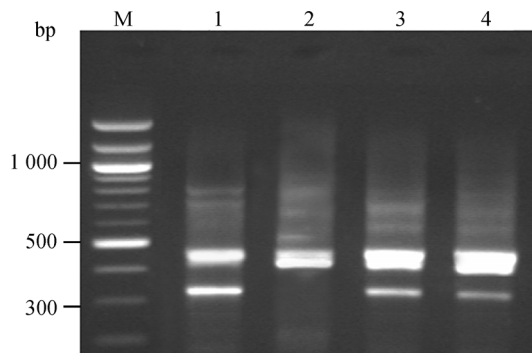


图 1 3 种 siRNA 对 *p22phox* 的 mRNA 表达抑制作用的电泳图

M: DL100 DNA marker; 1: 空白对照组; 2: siRNA-1; 3: siRNA-2; 4: siRNA-3。

Fig. 1 Three siRNAs silence effects on the mRNA expression of *p22phox*

M: DL100 DNA marker; 1: The blank control group; 2: The siRNA-1 group; 3: The siRNA-2 group; 4: The siRNA-3 group.

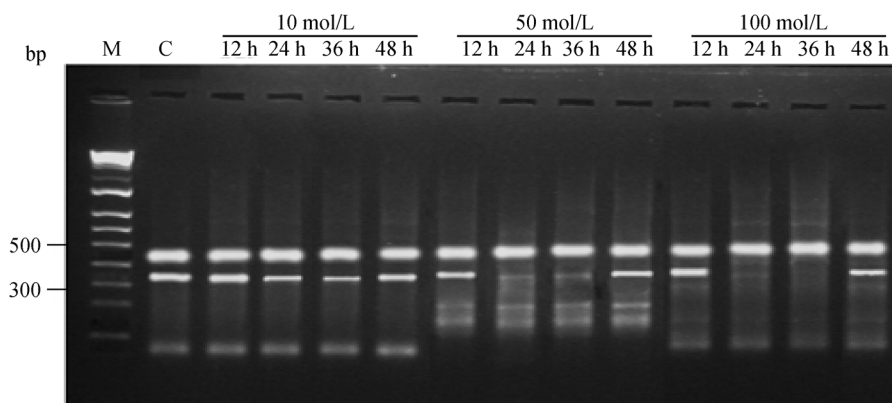


图 2 不同浓度及时间 siRNA-1 对 *p22phox* 的 mRNA 表达抑制作用的电泳图

M: DL100 DNA marker; C: 空白对照组。

Fig. 2 siRNA-1 silence effect on the mRNA expression of *p22phox* at different concentrations and different phages

M: DL100 DNA marker; C: Blank control.

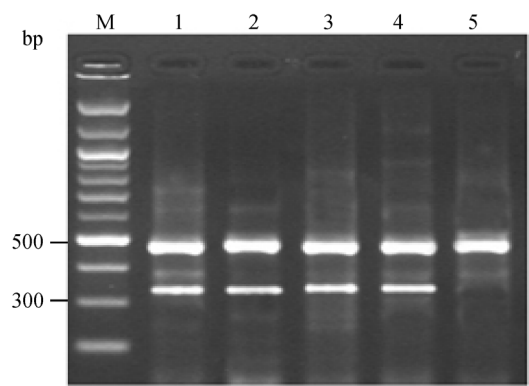


图 3 siRNA-1 的特异性检测
1: 空白对照组; 2: 仅加 siRNA 组; 3: 仅加转染试剂组; 4: 阴性对照 siRNA 加转染试剂组; 5: siRNA 加转染试剂组。
Fig. 3 The specialty detection of siRNA-1
1: The bland control group; 2: The siRNA added group; 3: The transfection agent added group; 4: The negative siRNA and tansfection agent added group; 5: siRNA and transfection agent added group; M: DNA marker DL-100(100 bp)

2.3 细胞培养液及细胞 NO、ROS 水平

与其余 3 组比较, Ang 组细胞内 ROS 含量显著增高, NO 水平显著降低, 说明 Ang 诱导后衰老的

ECV-304 产生 ROS 增多, NO 减少, 沉默 *p22phox* 的基因表达可明显抑制 Ang 刺激介导的 ROS 增多和 NO 的下降; siRNA 转染组 ROS、NO 含量与空白组无显著差异, 但有下降趋势(表 2)。

2.4 细胞 *p22phox* 蛋白和 mRNA 表达

RT-PCR 显示, 与空白组比较, *p22phox* 蛋白及 mRNA 表达在 Ang 组显著增高, 在 siRNA 转染组显著减低, Ang 加 siRNA 转染组 *p22phox* 的 mRNA 表达显著下降, 蛋白表达与空白组无差异, 但显著低于 Ang 组(图 4)。

3 讨论

自 1998 年 RNA 干扰技术(RNAi)问世^[4], RNAi 已经成为研究基因功能和信号通路的不可或缺的工具, 是一种可快速高效获得基因功能缺失的有效方式。RNAi 是涉及多种蛋白的复杂过程, 简言之, 双链 RNA 进入细胞后经 Dicer 酶作用生成长度为 21~23 nt 的双链 siRNA(short interference RNA), 内源性

表 2 细胞培养液及细胞 NO、ROS 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Levels of angiotensin II and reactive oxygen (ROS) in ECV-304 and cell culture medium ($\bar{x} \pm s$)

分组 Group	培养液 NO(mmol/L) NO level in Cell cultured medium	细胞 NO(μ mol/g 蛋白) NO level in ECV-304	细胞 ROS ROS level in ECV-304
空白对照组 Bland control	6.1 \pm 1.5	59.1 \pm 9.8	183.0 \pm 42.3
siRNA 转染组 siRNA transfection group	5.9 \pm 1.5	58.2 \pm 10.7	165.0 \pm 57.1
Ang 组 Ang group	1.2 \pm 0.7**###	15.1 \pm 5.0**###	452.3 \pm 47.0**###
Ang 加 siRNA 转染组 Ang and siRNA transfection group	3.5 \pm 0.5*#	42.0 \pm 6.2*#	349.2 \pm 41.1**###

注: 与空白组比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与 siRNA 转染组比较, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$; 与 Ang 组比较, : $P<0.05$, : $P<0.01$ 。
Notes: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the blank group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs the siRNA transfection group; : $P<0.05$, : $P<0.01$ vs the Ang group.

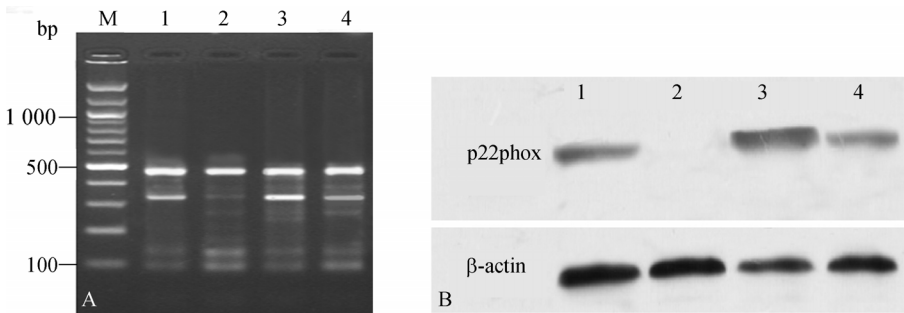


图 4 各组细胞 *p22phox* 的 mRNA(A)及蛋白表达(B)
1: 空白对照组; 2: siRNA 转染组; 3: Ang 刺激组; 4: Ang 加 siRNA 转染组。

Fig. 4 The mRNA(A) and protein expression(B) of four groups
1: The blank control group; 2: The Ang stimulated group; 3: The siRNA transfected group; 4: The Ang stimulated and siRNA transfected group; M: DNA marker DL-100(100 bp).

生成或体外合成引入细胞的siRNA与蛋白结合生成RNA诱导沉默复合物(RISC),特异性识别结合与其互补的mRNA,并以酶切方式将其降解。因此RNAi是通过诱导mRNA序列特异性降解引起转录后基因沉默,一般认为, RNAi适用于所有的物种。大量研究证实,体外合成的siRNA在低等生物和高等生物的细胞中均能发挥强大的特异性基因抑制功能^[12,13],对非靶基因的表达无影响,是一种高效特异性抑制基因表达的新途径^[14]。

活性氧学说是较为公认的衰老假说。活性氧是调节血管张力和结构的重要信号分子,在维持血管稳态、介导血管损伤中起关键性作用^[15]。有研究证实,人内乳动脉和大鼠冠状动脉ROS产量很低却同衰老密切相关^[16,17]。NAD(P)H氧化酶是内皮细胞ROS的主要来源^[18],此酶可由Ang 激活^[19], p22phox是NAD(P)H氧化酶活性必需的亚单位。同样已有大量研究显示衰老机体血管局部Ang 升高,ACEI处理可逆转血管的衰老改变^[20],提示随增龄血管局部增高的Ang 可能诱导了内皮细胞衰老。但目前尚无研究证实p22phox与内皮细胞衰老的相关性,也无siRNA诱导p22phox基因沉默的报道。由此,本研究首先针对p22phox基因体外转录合成siRNA,脂质体转染后证实其特异性抑制p22phox mRNA表达;经分析干扰效果的时效量效关系证实:高浓度的siRNA(100 nmol/L)与较低浓度的siRNA(50 nmol/L)比较并未显示更高的抑制效率,可能原因考虑为:(1)

siRNA干扰效率并不呈现剂量依赖性,文献报道也证实小剂量siRNA即可引起高效能的基因表达抑制,可用“随机降解PCR”的放大模型解释,即细胞内存在RdRP(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), RdRP通过siRNA引导链识别并结合mRNA,生成一种双链RNA的Dicer酶底物,以产生更多的siRNA,从而形成siRNA的自身PCR;(2)高浓度的siRNA及转染试剂反而增加细胞毒性。干扰现象存在一定的时间性,本实验中干扰效率高峰期存在于24~36 h,48 h即开始下降。有报道RNAi效应可在不同的细胞间长距离传递维持,在某些生物如线虫中可传递给子代,此种效应可能由miRNA介导,体外转录合成后导入细胞中的siRNA似乎无长时间干扰效应。

本研究中3种 siRNA 均符合 siRNA 设计的基本原则,但 siRNA-1 显示了最佳的抑制作用。可能的解释为:结合 p22phox 的 mRNA 二级结构进行分析(图5),与 siRNA-1 比较, siRNA-2 与靶目标结合部位二级结构过少,结合的稳定性较差,而 siRNA-3 与靶目标结合部位二级结构过多,导致其结合能力较低。

我们进一步验证了Ang 刺激可诱导 ECV-304 衰老,衰老的 ECV-304 p22phox 蛋白及 mRNA 水平明显上调,伴随ROS产量增高及NO减少(内皮功能障碍表现); siRNA 转染特异性抑制 p22phox 表达可显著降低ROS的生成,证明内皮细胞 NAD(P)H 氧化酶是 ROS 产生的主要来源, p22phox 表达抑制后给予 Ang

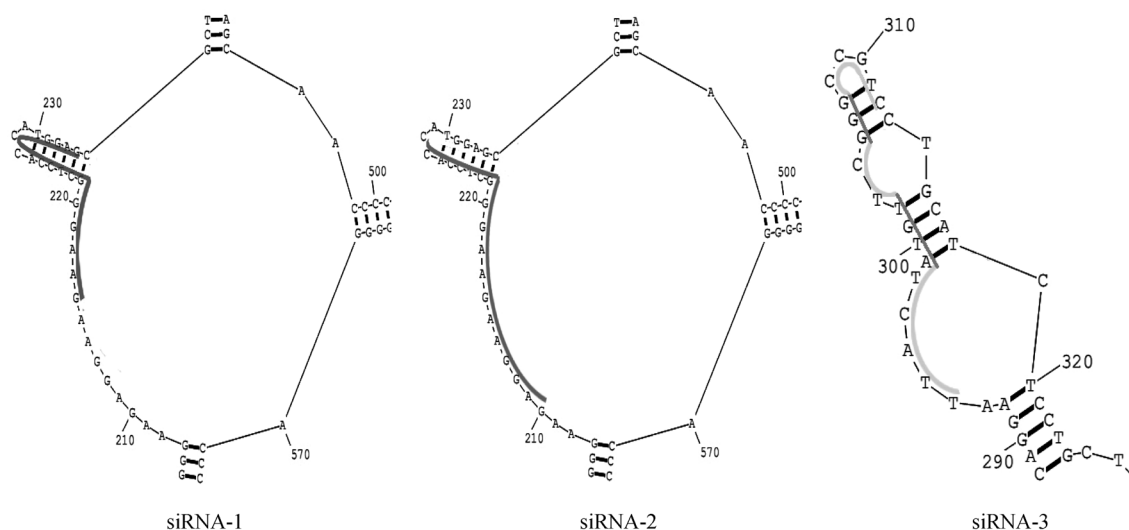


图5 3种 siRNA 与 p22phox 的 mRNA 二级结构结合部位示意图

红、黄、绿颜色线分别代表3种 siRNA,黑色线代表 p22phox 的 mRNA 二级结构。

Fig. 5 Target gene sequence of three kinds of siRNA combined to p22phox

Red line is siRNA-1, green line is siRNA-2, yellow line is siRNA-3, black line is p22phox mRNA secondary structure prediction.

刺激, ROS 产量增高不显著, NO 生成增加, 内皮功能改善, Ang 诱导的 ECV-304 衰老被明显抑制, 可初步证明 Ang 诱导 ECV-304 衰老的重要途径之一是上调 *p22phox* 表达从而生成过多的 ROS。Ang 加 siRNA 转染组 ROS 与空白组无差异, 可能由正常状态下 ROS 产量较低所致; *p22phox* 蛋白水平与空白组也未表现差异, 与 mRNA 下降水平不平行, 可能说明细胞内存在翻译后的蛋白调控机制。但是 *p22phox* 表达的改变究竟通过何种细胞内信号通路影响 ROS 及 NO 表达, siRNA-1 抑制 *p22phox* 基因的表达最终影响 ECV-304 细胞衰老的具体分子机制仍未阐明, 需要进一步的研究论证。

综上所述, 本研究显示体外合成的 siRNA 经脂质体转染 ECV-304 后可特异性抑制 NAD(P)H 氧化酶 *p22phox* 表达; *p22phox* 是衰老防治很有希望的分子靶点, siRNA 干扰技术在内皮衰老研究及防治中可能有广泛的前景。

参考文献(References):

- [1] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*, 2003, 107(1): 139–146. [\[DOI\]](#)
- [2] LI Hong, BAI Xiao-Juan, CHEN Xiang-Mei. Progress in the research of vascular aging mechanism and detecting index. *Natl Med J China*, 2005, 85(3): 212–215. 李虹, 白小涓, 陈香美. 血管衰老机理及检测指标的研究进展. *中华医学杂志*, 2005, 85(3): 212–215.
- [3] Challah M, Nadaud S, Philippe M. Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *Am J Physiol*, 1997, 273(4 Pt 2): 1941–1948.
- [4] Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD (P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries regulation by angiotensin II. *Circ Res*, 2002, 90(11): 1205–1213. [\[DOI\]](#)
- [5] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD (P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 2000, 86(5): 494–501.
- [6] Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorovova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3): 326–330. [\[DOI\]](#)
- [7] Mittal V. Improving the efficiency of RNA inference in mammals. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(5): 355–365. [\[DOI\]](#)
- [8] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188–200. [\[DOI\]](#)
- [9] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9363–9367. [\[DOI\]](#)
- [10] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16. *Cell*, 1997, 88(5): 593–602. [\[DOI\]](#)
- [11] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811. [\[DOI\]](#)
- [12] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature*, 2001, 411(6836): 494–498. [\[DOI\]](#)
- [13] Hiscott A, McLellan DS. Graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation: the role of monoclonal antibodies in prevention and treatment. *Br J Biomed Sci*, 2000, 57(2): 163–169.
- [14] Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17): 9742–9747. [\[DOI\]](#)
- [15] Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res*, 2001, 89(3): 224–236. [\[DOI\]](#)
- [16] Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Maqill FG, Berq GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation*, 2000, 101(18): 2206–2212.
- [17] Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res*, 2002, 90(11): 1159–1166. [\[DOI\]](#)
- [18] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 2000, 86(5): 494–501.
- [19] Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*, 2001, 37(2 Part 2): 529–534.
- [20] Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. *Ink4a/Arf* expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 2004, 114(9): 1299–1307.