

IRF9 基因沉默对雨蛙素诱导的大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 细胞凋亡的影响

薛彬华, 余维丽, 王小蝶, 刘 奕

摘要 目的 探讨干扰素调节因子 IRF9 基因沉默对雨蛙素诱导的大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 细胞凋亡的影响, 阐述 IRF9 在急性胰腺炎(AP) 发生发展中的作用。方法 AR42J 细胞培养至对数期, 分为空白对照组、阴性对照组及 IRF9 沉默组。成功转染 siRNA 后应用雨蛙素诱导 AR42J 细胞构建体外急性胰腺炎模型。采用 qRT-PCR 和 Western blot 方法检测 AR42J 细胞中 IRF9 基因、Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 及蛋白的表达水平; 流式细胞术检测 AR42J 细胞凋亡率。结果 ① 雨蛙素诱导 24 h 后, 各组中的 IRF9 基因的 mRNA 及蛋白水平均较雨蛙素诱导前升高, Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 及蛋白的表达水平亦明显升高, 说明发生 AP 时 IRF9 及凋亡相关基因的表达水平均上调。② 与空白对照组相比, 雨蛙素诱导后 IRF9 沉默组 AR42J 细胞的凋亡率有明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 发生 AP 时 IRF9、Caspase 3 及 Caspase 9 的表达水平均上调, 细胞凋亡率增加, IRF9 基因沉默降低了雨蛙素诱导的体外 AP 细胞模型的细胞凋亡。

关键词 IRF9 基因沉默; AR42J 细胞; 雨蛙素; 细胞凋亡

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0508-05

2019-12-26 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085QC49); 安徽医科大学第二附属医院博士科研启动基金(编号: 2014bkj034)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院重症医学科, 合肥 230601

作者简介: 薛彬华, 女, 硕士研究生;

余维丽, 女, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yu-weilial@163.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.005

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是由胰腺的急性炎症所引发的一种疾病,其特点是炎症发生和胰腺坏死及凋亡^[1]。据报道^[2],胰腺腺泡细胞炎症的发生、增殖、凋亡均参与 AP 的发生发展。IRF9 是干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF)中的一员,迄今为止,在哺乳动物中发现了 9 种 IRF: IRF1~9^[3]。越来越多的证据表明 IRF 在转录调控、应激反应、细胞因子信号转导、凋亡和增殖调控及自稳平衡、炎症反应等方面都有着重要的作用^[3-4]。IRF 参与多种疾病的发生发展过程,包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎症性肠病,以及肿瘤发生及心血管疾病等^[3-4,7]。干扰素调节因子 IRF9 在 AP 中的具体机制目前未见文献报道。该课题旨在研究 IRF9 基因沉默对雨蛙素诱导的大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 凋亡的影响,阐释 IRF9 基因在 AP 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 购于上海富衡细胞库。细胞培养基 DMEM + 100 mg/L 青霉素 + 10% 胎牛血清, 1~2 d 传代。Opti-MEM($\times 1$)和 Lipofectamine 2000 均购于美国 LifeTechnology 公司。

slicing up. After HE staining, Nissl staining and uranyl acetate-lead citrate staining, changes of hippocampus were observed. **Results** The MA addiction rat models were successfully prepared. The learning and memory ability in model group was reduced. The rTMS treatment could effectively improve learning and memory treatment of rats with MA addiction. After natural withdrawal, there were relapse behaviors in rats of model group given conditional clue induction. After rTMS treatment, number of effective nasal touching under conditional clue induction was significantly decreased. In hippocampus of MA addiction rat models, number of Nissl bodies and average optical density decreased. The number of synapses in CA3 area reduced. There was fusion in anterior and posterior membranes. The number of synaptosomes reduced. The rTMS treatment could alleviate pathological changes to some extent. **Conclusion** The rTMS treatment can improve memory function and hippocampus tissue damage in MA addiction rats, and inhibit MA relapse behavior under conditional clue induction.

Key words methamphetamine; addiction; low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation; relapse

1.2 试剂 IRF9 的 siRNA 序列及一对阴性对照序列购于上海吉玛制药技术有限公司; DEME/H 培养基、RIPA 裂解液、TRIzol 试剂、ECL 荧光剂(显影剂)、BCA 蛋白浓度试剂盒购于合肥塞维尔生物科技有限公司。PVDF 膜购于美国 Millipore 公司,雨蛙素粉末购于北京索莱宝科技有限公司。

1.3 IRF9-siRNA 转染胰腺 AR42J 细胞 将培养至对数期的 AR42J 细胞接种至 6 孔板,待细胞密度达到 90%,用 PBS 洗 2 次,每孔加入 1 500 μ l Opti-MEM。将细胞分组为空白对照组、阴性对照组和 IRF9 沉默组。使用 Lipofectamine 2000 进行 si-RNA 转染,24 h 后使用雨蛙素诱导。

1.4 qRT-PCR 检测各组 AR42J 细胞中 IRF9 及凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 水平 取转染成功的细胞,按照 TRIzol 试剂操作说明书提取细胞中总 RNA。后逆转录成 cDNA 备用,流程参照逆转录试剂盒说明书。IRF9 基因上游引物序列: 5'-CTGCTCACCTTCATCTACAACG-3'; 下游引物序列: 5'-ACTAGGATGCCCCCTCTCAA-3'; Caspase 3 正义引物: 5'-GCGGTATTGAGACAGACAGTGAAC-3', 反义引物: 5'-GCGGTAGAGTAAGCATACAG-GAAGTC-3' 及 Caspase 9 正义引物: 5'-GGGCTCAG-CACACGCATTGG-3', 反义引物: 5'-TTCTTAGCAGT-CAGGTCGTTCTTCAC-3'; GAPDH 基因上游引物序列: 5'-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3', 下游引物序列: 5'-TGTCATATTTGGCAGGTTT-3'。采用荧光定量 PCR 扩增仪按照以下条件进行荧光定量 PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、20 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C、1 s, 60 $^{\circ}$ C、15 s, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 反应结束后以 GAPDH 基因作为内参照,计算 IRF9、Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 相对表达量。

1.5 Western blot 法检测各组 AR42J 细胞中 IRF9 及凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 蛋白的表达水平 Western blot 法检测各组细胞中的 IRF9、Caspase 3 及 Caspase 9 蛋白的表达情况。取转染成功的 AR42J 细胞, PBS 清洗细胞后,提取各组细胞的总蛋白,用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转至 PVDF 膜,按顺序孵育一抗,二抗,用 ECL 化学发光底物显影检测蛋白。最后用 Image-Proplus 图像处理系统分析并计算 Western blot 灰度值。

1.6 流式细胞仪检测各组 AR42J 细胞凋亡情况 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测: 取转染成功后的 AR42J 细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞后,按凋亡试剂盒说明书染色,用 CytoFLEX 流式细胞仪检

测各组凋亡率,用 CytExpert 分析软件分析实验结果。

1.7 统计学处理 用 SPSS 16.0 软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 t 检验; 多组数据之间相互比较用方差分析。所有实验至少要重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 结果 雨蛙素诱导前与空白对照组比较,沉默组的 IRF9 基因的 mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义($F = 58.762, P < 0.05$),Caspase 3 及 Caspase 9 基因的 mRNA 表达水平亦降低,差异有统计学意义($F = 5.987, F = 5.894, P < 0.05$); 而阴性对照组的 IRF9、Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 表达水平无明显差异。雨蛙素诱导 24 h 后,各组中的 IRF9 基因的 mRNA 水平均较雨蛙素诱导前升高($F = 28.250, P < 0.05$); 凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 的表达水平亦较诱导前升高($F = 6.370, F = 6.979, P < 0.05$)。见图 1~3。

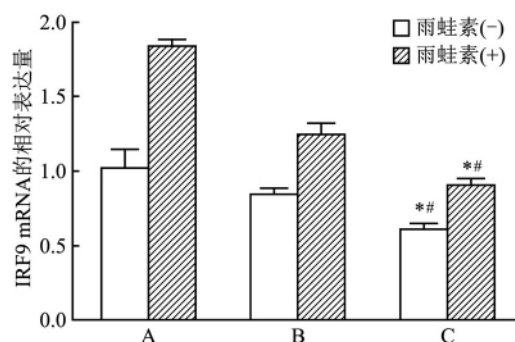


图1 雨蛙素(100 nmol/L)诱导及 IRF9 基因沉默的 AR42J 细胞 IRF9 的 mRNA 表达的影响

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

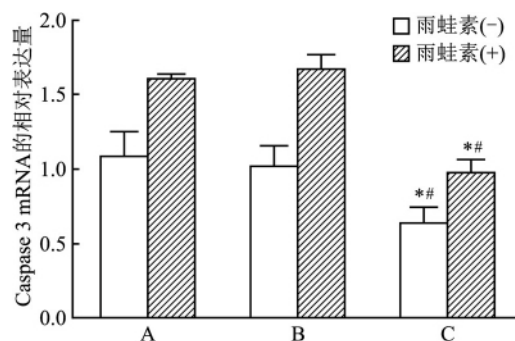


图2 雨蛙素(100 nmol/L)诱导及 IRF9 基因沉默的 AR42J 细胞 Caspase 3 的 mRNA 表达的影响

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

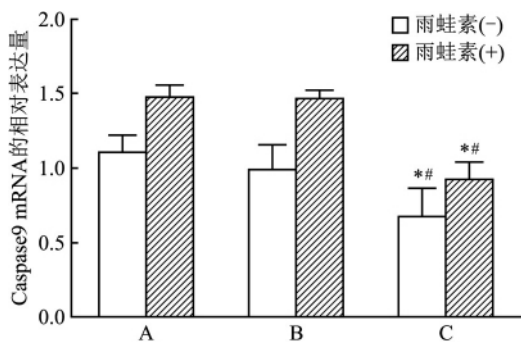


图3 雨蛙素(100 nmol/L)诱导及IRF9基因沉默的AR42J细胞Caspase 9的mRNA表达的影响

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

2.2 Western blot 结果 ① 雨蛙素诱导前, 阴性对照组 AR42J 细胞内的 IRF9 蛋白的表达与空白对照组比较无明显变化。IRF9 沉默组 AR42J 细胞内 IRF9 蛋白的表达是降低的, 差异有统计学意义 ($F = 10.712, P < 0.05$), 说明 IRF9 基因沉默成功, 见图 4, 5。② 雨蛙素诱导 24 h 后, 各组中的 IRF9 基因的蛋白水平均较雨蛙素诱导前升高 ($F = 5.915, P <$

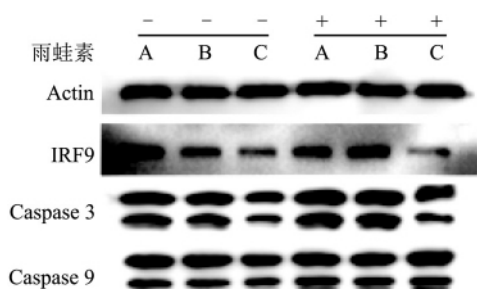


图4 Western blot 法检测雨蛙素(100 nmol/L)诱导及IRF9沉默的AR42J细胞IRF9、Caspase 3、Caspase 9蛋白的表达水平

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组

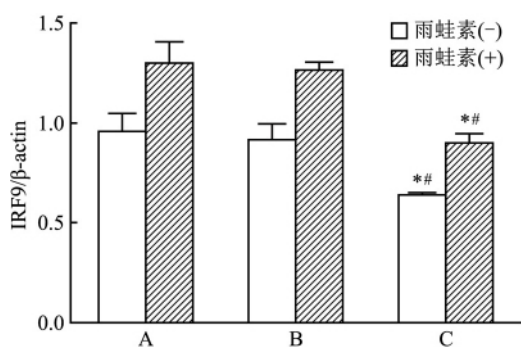


图5 雨蛙素(100 nmol/L)诱导及IRF9基因沉默的AR42J细胞IRF9蛋白表达的影响

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

0.05), 见图 5。凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的蛋白的表达水平较诱导前升高 ($F = 4.315, F = 4.924, P < 0.05$), 见图 6, 7。

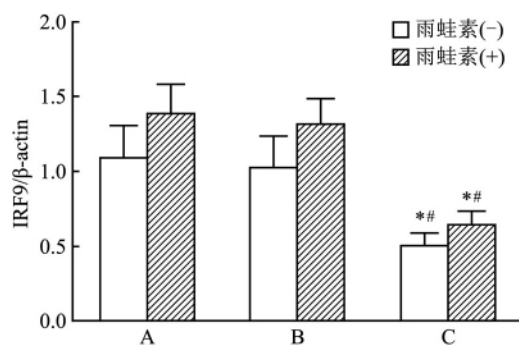


图6 雨蛙素(100 nmol/L)诱导及IRF9基因沉默的AR42J细胞Caspase 3蛋白表达的影响

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

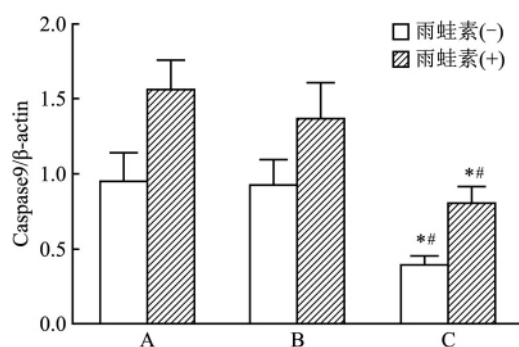


图7 雨蛙素(100 nmol/L)诱导及IRF9沉默的AR42J细胞Caspase 9蛋白表达的影响

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

2.3 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测的结果

雨蛙素诱导前, 空白对照组 (CON) 凋亡率是: 10.955 ± 1.386 , IRF9-NC-siRNA 组 (NC) 凋亡率是: 9.453 ± 0.991 , IRF9-siRNA 组凋亡率是 7.755 ± 0.823 , IRF9 沉默组 AR42J 细胞的凋亡率是降低的, 差异有统计学意义 ($F = 157.772, P < 0.05$)。雨蛙素诱导 24 h 后, 对照组 (CON +) 凋亡率是: 19.255 ± 1.362 , IRF9-NC-siRNA (NC +) 组凋亡率是: 17.570 ± 1.600 ; IRF9-siRNA 组凋亡率是 15.708 ± 3.074 , 雨蛙素诱导 24 h 后 IRF9 沉默组 R42J 细胞的凋亡率亦是下降的, 差异有统计学意义 ($F = 63.217, P < 0.05$)。与空白对照组和阴性对照组比较, IRF9-siRNA 转染 24 h 后的 AR42J 细胞的凋亡率是降低的。

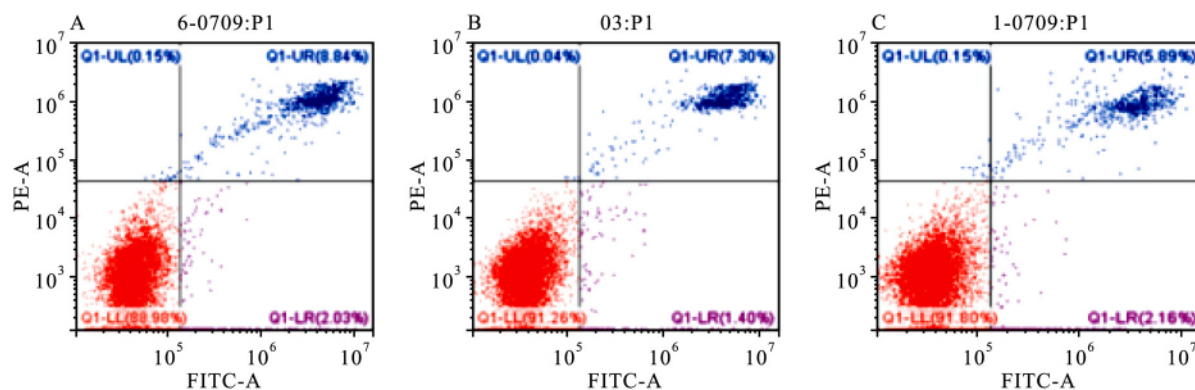


图8 雨蛙素诱导前各组 AR42J 细胞凋亡率比较

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组

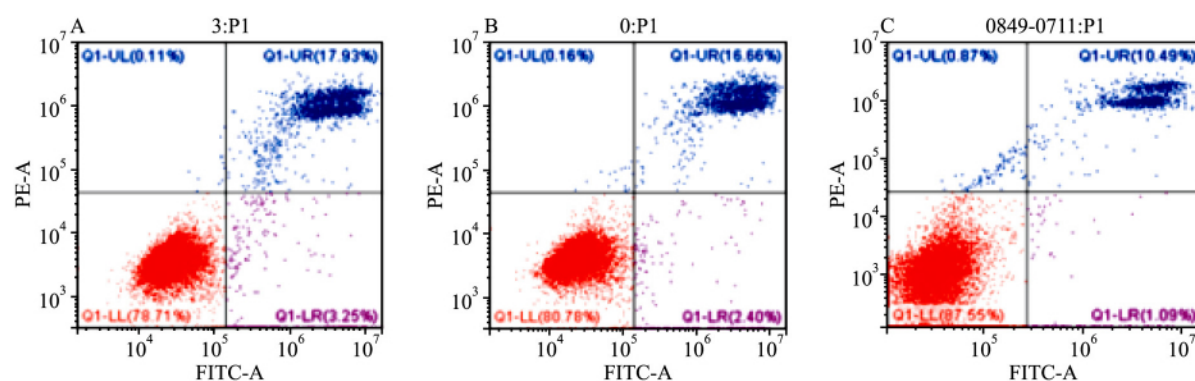


图9 雨蛙素(100 nmol/L)诱导后各组 AR42J 细胞凋亡率比较

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组

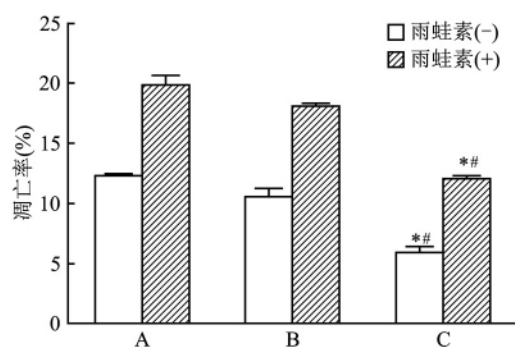


图10 雨蛙素(100 nmol/L)诱导前及诱导后

各组 AR42J 细胞凋亡率

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: IRF9 沉默组; 与空白对照组

比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

AP 是一种临床上常见的危重症,由多种病因引起的胰酶激活,继以胰腺局部炎症反应为主要特征,病情较重者可发生全身炎症反应综合征并可有器官功能障碍、代谢性酸中毒、休克等严重后果,其病死率较高,预后较差^[8]。当胰腺炎发生时,胰腺腺

泡细胞受到损伤,细胞坏死的数量增加,细胞内各种酶和细胞器被释放,并伴有急性炎症,导致急性重症胰腺炎^[9]。此外,AP 的病理特征涉及腺泡细胞凋亡和炎症反应等方面。凋亡是细胞正常的生理过程,包括细胞核形态学改变和相关基因表达,从而引起细胞程序性死亡。Caspase 3 是白细胞介素-1 β 转化酶家族成员,是凋亡的执行人,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的通路。在各种刺激因子作用下,死亡受体或细胞内死亡信号被激活,Caspase 3 被上游的 Caspase 9 激活,同时 Caspase 7 也被激活,形成凋亡复合体,促使细胞凋亡。本研究采用 RNA 干扰技术沉默 IRF9 基因,随后应用雨蛙素诱导建立体外 AP 模型,通过 qRT-PCR 及 Western Blot 技术检测 IRF9、凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 及蛋白的表达水平,流式细胞术检测各组 AR42J 细胞凋亡情况。本研究结果表明:与空白对照组比较,沉默组 IRF9 基因的 mRNA 及蛋白水平均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);阴性对照组 IRF9 基因的 mRNA 及蛋白水平无明显差异,说明 IRF9 基因沉默成功。雨蛙素诱导 24 h 后,各组中的 IRF9

基因的 mRNA 及蛋白水平均较雨蛙素诱导前升高; 凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 及蛋白的表达水平亦升高, 说明 AP 发生时 IRF9 及凋亡相关基因表达水平均上调, IRF9 基因沉默后凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 及蛋白的表达水平被抑制; 与空白对照组及阴性对照组相比, 雨蛙素诱导后 IRF9 沉默组 AR42J 细胞的凋亡率有明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些结果表明在 AP 发生时 IRF9 基因上调, 凋亡相关基因表达水平升高, 促进了细胞凋亡, 而 IRF9 基因沉默能够降低凋亡相关基因的表达, 降低细胞的凋亡率。本研究提示 IRF9 可能是 AP 诊断和治疗的一个靶标, 可能为今后 AP 的诊断和治疗提供了理论指导和实验依据。

参考文献

- [1] Liu Y, Chen X D, Yu J, et al. Deletion of XIAP reduces the severity of acute pancreatitis via regulation of cell death and nuclear factor- κ B activity [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2685.
- [2] Xu P, Lou X L, Chen C, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation on apoptosis in rats with acute pancreatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(12): 3516–23.
- [3] Matta B, Song S, Li D, et al. Interferon regulatory factor signaling in autoimmune disease [J]. *Cytokine*, 2017, 98: 15–26.
- [4] Marsili G, Perrotti E, Remoli A L, et al. IFN regulatory factors and antiviral innate immunity: how viruses can get better [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2016, 36(7): 414–32.
- [5] Abrams S I, Netherby C S, Twum D Y, et al. Relevance of interferon regulatory factor-8 expression in myeloid-tumor interactions [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2016, 36(7): 442–53.
- [6] Chen Y J, Li J, Lu N, et al. Interferon regulatory factors: a key to tumour immunity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 1–5.
- [7] Zhang Y, Li H. Reprogramming Interferon Regulatory factor signaling in cardiometabolic diseases [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32(3): 210–23.
- [8] Group of Pancreas Surgery, Chinese Society of Surgery, Chinese Medical Association. Guidelines for the management of acute pancreatitis [J]. *J Clin Hepatol*, 2015, 31(1): 17–20.
- [9] Sandler M, Maertin S, John D, et al. Cathepsin B activity initiates apoptosis via digestive protease activation in pancreatic acinar cells and experimental pancreatitis [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(28): 14717–31.

Effect of IRF9 gene silencing on apoptosis of cerulein induced exocrine pancreas AR42J cells

Xue Binhua, Yu Weili, Wang Xiaodie, et al

(Dept of Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effect of interferon regulatory factor IRF9 gene silencing on apoptosis of cerulein induced exocrine pancreas AR42J cells and elucidate the role of IRF9 gene in the development of acute pancreatitis. **Methods** The AR42J cells at logarithmic growth stage were divided into blank control group, negative control group and IRF9 silencing group. After successful transfection of siRNA, the model of acute pancreatitis *in vitro* was constructed by cerulean treatment. The mRNA and protein expression levels of IRF9 gene, Caspase 3 and Caspase 9 in AR42J cells were detected by qRT-PCR and Western blot. The apoptosis rate of AR42J cells in each group was detected by Annexin V-FITC/PI double staining assay. **Results** ① The mRNA and protein levels of IRF9 gene in each group increased after cerulean treated 24 hours, and the mRNA and protein levels of Caspase 3 and Caspase 9 also significantly increased, indicating that the expression levels of IRF9 and apoptosis-related genes were up-regulated when acute pancreatitis occurred. ② Compared with the blank control group, the apoptosis rate of AR42J cells in IRF9 silencing group significantly reduced after cerulean treatment ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression levels of IRF9, Caspase 3 and Caspase 9 were up-regulated and the apoptosis rate increased when acute pancreatitis occurred. The silencing of IRF9 gene reduced the apoptosis of cerulean induced acute pancreatitis *in vitro*.

Key words IRF9 gene silencing; AR42J cells; cerulean; apoptosis