

IRF3 抑制 LPS 诱导肝星状细胞 LX-2 的炎症因子的分泌

刘云洁¹ 程 玮² 李 丽³ 顾 萌³ 徐 涛³

摘要 目的 研究干扰素调节因子 3 (IRF3) 对 LPS 诱导的肝星状细胞中 LX-2 中炎症因子 IL-6 及 TNF- α 分泌的影响。方法 利用脂质体将质粒 pcDNA3-IRF3 瞬时转染到人肝星状细胞 LX-2 中过量表达 IRF3 ,qRT-PCR 和 Western blot 法检测转染效率 ,并检测炎症因子 IL-6 及 TNF- α 的表达。结果 qRT-PCR 和 Western blot 结果显示用 2 μ g/ml 的 LPS 刺激 LX-2 细胞 12 h 后 ,与正常组比较 ,IRF3 的表达量明显降低 ,而诱导产生的炎症因子 TNF- α 及 IL-6 的表达量则明显上升。而 pcDNA3 转入 LX-2 细胞 12 h 后 ,与 pcDNA3 空载体对照组比较 ,pcDNA3 转染组中炎症因子 IL-6 及 TNF- α 表达量在 LX-2 细胞中被显著抑制。结论 在肝星状细胞中 ,IRF3 能够抑制 LPS 诱导的肝星状细胞 LX-2 中炎症因子 IL-6 及 TNF- α 的表达。

关键词 IRF3;TNF- α ;肝星状细胞;LX-2 细胞;炎症因子

中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2019)02 - 0178 - 05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.02.003

肝纤维化是指病理因素所致肝脏内弥漫性细胞外基质 (extracellular matrix ,ECM) 过度沉积的一个慢性肝损伤的病理过程^[1-2]。若缺乏有效的干预手段 ,可最终发展为肝硬化 ,甚至肝癌^[3]。肝纤维化的标志是肝星状细胞活化的过程 ,LX-2 细胞是一种稳定的来源于人的肝星状细胞 ,曾被广泛地用作研究肝纤维化的细胞模型^[4]。通常肝星状细胞的活化过程中伴随炎症因子的升高 ,而炎症反应又是引起纤维化的重要病理因素 ,因此探究炎症因子分泌的调节机制具有潜在的临床意义^[5]。干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3 ,IRF3) 是干扰素

调节因子家族的重要成员 ,是合成 I 型干扰素的关键分子 ,在免疫防御系统中起着举足轻重的作用^[6]。近年来 ,IRF3 在肝脏疾病中屡见报道^[7-8] ,表明 IRF3 是一个调控肝脏疾病的关键分子 ,该研究旨在探究 IRF3 在星状肝细胞中对炎症因子分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系 LX-2 细胞系受赠于 Dr. Scott Friedman (美国纽约西奈山医学院)。LX-2 细胞在采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (105 U/L 青霉素和 100 g/L 培养 ,在含 5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱条件 (37 $^{\circ}$ C) 下孵育。LX-2 细胞贴壁生长 ,胰酶消化后取对数生长期细胞用于实验。

1.2 药品和试剂 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α) (美国 R&D Systems 公司); TRIzol (日本 TaKaRa 公司); BCA 法蛋白浓度定量试剂盒 (武汉生物科技有限公司); 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、脂多糖 (LPS)、DMSO (美国 Sigma 公司); PVDF 膜 (北京 Solarbio 公司); 胎牛血清、DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶 (美国 GBICO 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS)、RIPA 细胞强裂解液、蛋白酶抑制剂 (PMSF) (上海碧云天生物技术有限公司); TRIzol (美国 Invitrogen 公司); qRT-PCR 引物的合成 (上海生工生物工程技术有限公司); 逆转录试剂盒 (美国 MBI Fermentas 公司); 质粒 pcDNA3-IRF3 空载体 pcDNA3 (美国 Addgene 公司); TNF- α 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 核因子抑制蛋白 (κ B inhibitor protein ,I κ B)、p-I κ B、白介素 6 (interleukin-6 ,IL-6) 单克隆抗体 (南京巴傲德公司); p-p65、IRF3 (美国 Cell Signaling Technology 公司); p65、 β -actin 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶标记抗兔和抗鼠 IgG (北京中杉金桥公司); ECL 化学发光试剂盒 (美国 Pierce 公司)。

1.3 主要仪器 NAPCO-6100 型细胞恒温培养箱购自美国 SHELLAB 公司; SWCJ-4F 型单人双面超净工作台购自江苏苏州安泰空气技术有限公司; MLS-3020 型自动高压灭菌锅购自日本 Sanyo 公

2018 - 10 - 10 接收

基金项目: 安徽医科大学博士科研资助项目 (编号: XJ201536); 国家自然科学基金 (编号: 81700522); 安徽省自然科学基金面上项目 (编号: 1808085MH235)

作者单位:¹ 安徽医科大学第三附属医院 (合肥市滨湖医院) 静脉用药调配中心 ,合肥 230061

² 解放军 92752 部队卫生队 ,合肥 231600

³ 安徽医科大学药学院 ,合肥 230032

作者简介: 刘云洁 ,女 ,硕士 ,主管药师;

徐 涛 ,男 ,副教授 ,硕士生导师 ,责任作者 ,E-mail: xutao@ahmu.edu.cn

司;3-16K 型高速冷冻离心机购自美国 Sigma 公司提供;PCR 梯度扩增仪购自德国 Eppendorf 公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 仪购自美国 BioRad 公司;Real-time PCR system 购自美国热电公司。

1.4 Western blot 法检测 LX-2 细胞用冷 RIPA 细胞裂解液加蛋白酶抑制剂 PMSF 冰上裂解,30 min 后收集细胞裂解液,再于高速离心机 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 吸取上清液,用 BCA 法蛋白浓度定量试剂盒测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品在 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h,再电转移到活化的 PVDF 膜上,室温下在 5% 脱脂奶粉中在摇床上封闭 3 h,洗净封闭液后加入一抗,于 4 °C 冰箱中过夜。次日用 TBST 缓冲液洗净一抗,再用含辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,TBST 缓冲液洗净二抗,最后用 ECL 发光剂进行检测,曝光、显影。以 β-actin 作为内参,分别以目的蛋白与 β-actin 光密度比值作为该目的蛋白的相对表达量。

1.5 qRT-PCR 法检测 按 TRIzol 试剂说明书提取得到 LX-2 细胞总 RNA,再立即用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值,重复 3 次,测得该比值稳定于 1.8~2.0。总的 RNA 逆转录得到 cDNA,于 10 μl 体系上 qRT-PCR system 检测目的基因,β-actin 用作内参。实验重复 3 次。qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
IRF3	F: AGAGGCTCGTGATGGTCAAGGTT
	R: AGACTGGGTGGCTGTTGGAATG
IL-6	F: GCCACTCACCTTTCAGAACG
	R: CCGTCGAGGATGTACCGAATT
TNF-α	F: GATCAATCGGCCGACTATC
	R: TCCTCACAGGGCAATGATCC
β-actin	F: GCCAACACAGTGTCTGTGG
	R: CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG

1.6 瞬时转染过表达质粒 pcDNA3-IRF3 LX-2 细胞在无血清的培养基 DMEM 中饥饿 12 h,然后取约 2 × 10⁵ ~ 3 × 10⁵ 个/ml 细胞接种在 6 孔板中,正常培养,次日按照 Lipofectamine™ 2000 说明书方法转入质粒 pcDNA3-IRF3 和空载体 pcDNA3 6 h 后弃去 Optim-MEM,换为正常培养基培养细胞用于实验。用 Western blot 和 qRT-PCR 法检测转染效率。

1.7 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分

析 (ANOVA),两组之间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IRF3 在 LPS 诱导的 LX-2 细胞中表达受到抑制 用 2 μg/ml LPS 刺激 LX-2 细胞不同时间后,如图 1 和图 2 所示,Western blot 和 qRT-PCR 结果表明 IRF3 在 LPS 刺激后 12 h,与正常组比较,蛋白和基因水平上明显受到抑制 (*F* = 18.845 *P* < 0.01; *F* =

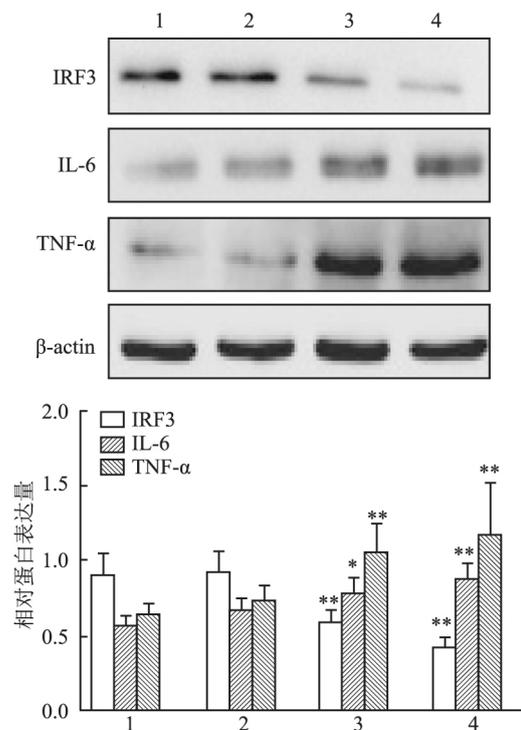


图 1 IRF3 在 LPS 诱导的 LX-2 细胞中的蛋白表达

1: 正常组;2: LPS 刺激 6 h 组;3: LPS 刺激 12 h 组;4: LPS 刺激 24 h 组;与正常组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

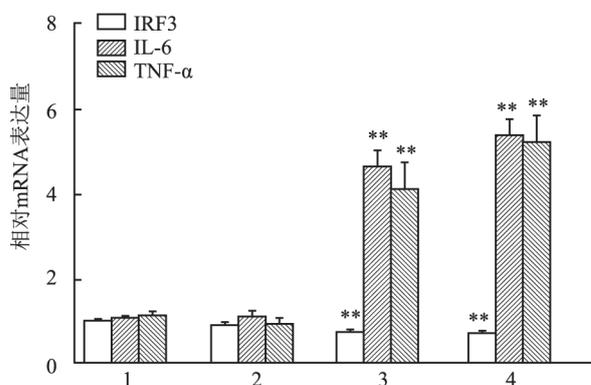


图 2 IRF3 在 LPS 诱导的 LX-2 细胞中的 mRNA 表达

1: 正常组;2: LPS 刺激 6 h 组;3: LPS 刺激 12 h 组;4: LPS 刺激 24 h 组;与正常组比较: ** *P* < 0.01

27.922 $P < 0.01$), 差异有统计学意义。炎症因子 TNF- α 在 LPS 刺激 12 h 后, 蛋白和基因表达量则明显上调 ($F = 176.32, P < 0.01$; $F = 184.21, P < 0.01$); IL-6 在 LPS 刺激 12 h 后, 蛋白和基因表达量也明显上升, 差异有统计学意义 ($F = 69.998, P < 0.01$; $F = 177.01, P < 0.01$)。

2.2 IRF3 抑制炎症因子的释放 根据上述结果, 选择用 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激 LX-2 细胞 12 h 用于实验。如图 3、4、5 所示, Western blot、qRT-PCR 及 ELISA 结果显示, 与正常组比较, IRF3 在 LPS 刺激下 12 h 后表达显著下调; 而转染 pcDNA3-IRF3 后, 与 pcDNA3 空载体对照组和正常组相比, IRF3 蛋白和基因表达量都显著增加 ($F = 21.303, P < 0.01$; $F = 18.358, P < 0.01$), 说明转染效果较好。而炎症因子 TNF- α 的蛋白和基因表达量与 pcDNA3 空载体对

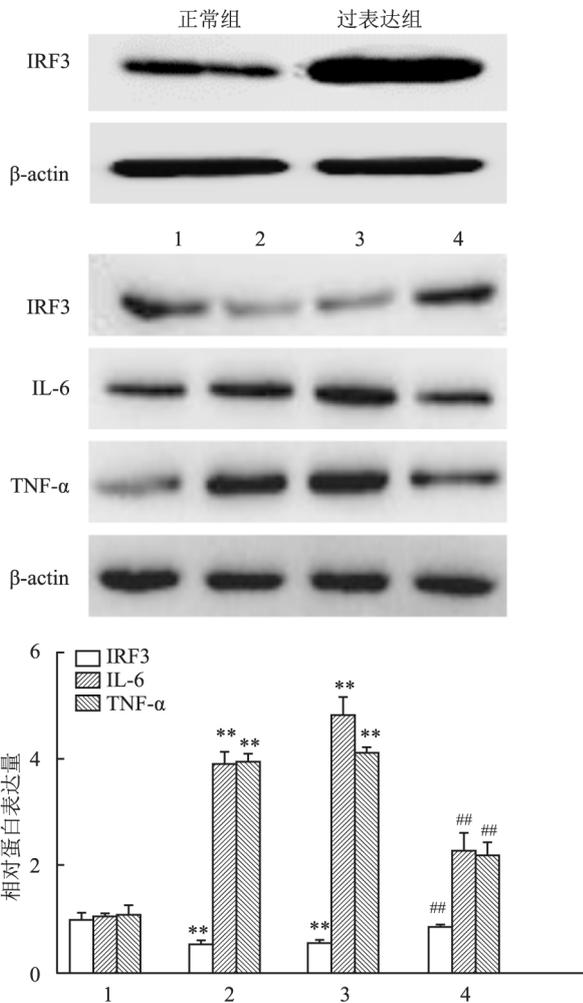


图3 过表达 IRF3 后 IL-6 及 TNF- α 的蛋白表达

1: 正常组; 2: LPS 刺激组; 3: LPS 刺激组 + 转染空质粒 pcDNA3 对照组; 4: LPS 刺激组 + 转染质粒 pcDNA3-IRF3 组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 pcDNA3 空载体对照组比较: ## $P < 0.01$

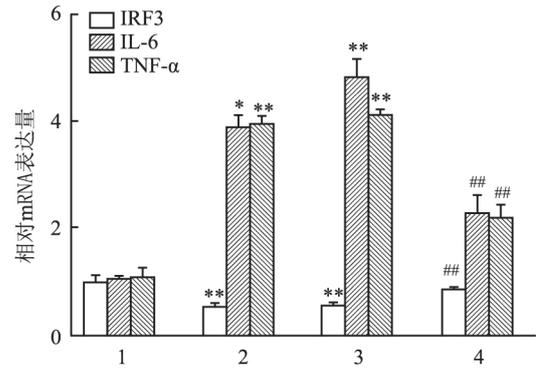


图4 过表达 IRF3 后 IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 表达

1: 正常组; 2: LPS 刺激组; 3: LPS 刺激组 + 转染空质粒 pcDNA3 对照组; 4: LPS 刺激组 + 转染质粒 pcDNA3-IRF3 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 pcDNA3 空载体对照组比较: ## $P < 0.01$

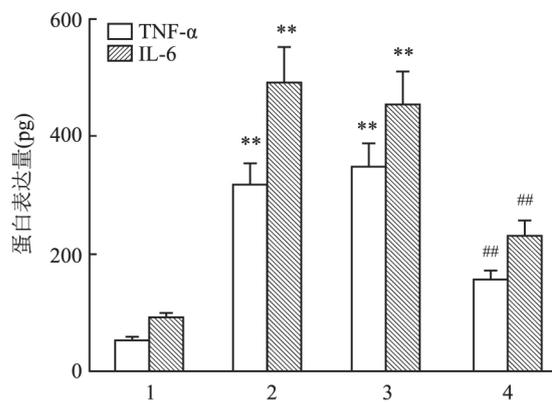


图5 ELISA 检测过表达 IRF3 后细胞分泌的 IL-6 及 TNF- α 蛋白表达

1: 正常组; 2: LPS 刺激组; 3: LPS 刺激组 + 转染空质粒 pcDNA3 对照组; 4: LPS 刺激组 + 转染质粒 pcDNA3-IRF3 组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 pcDNA3 空载体对照组比较: ## $P < 0.01$

照组比较, 则明显受到抑制 ($F = 24.255, P < 0.01$; $F = 188.028, P < 0.01$), 另一炎症指标因子 IL-6 在蛋白和基因水平上也表现出相同的趋势 ($F = 54.689, P < 0.01$; $F = 107.817, P < 0.01$), 差异具有统计学意义。这表明在 LPS 诱导的 LX-2 细胞中 IRF3 抑制炎症因子的释放。

2.3 IRF3 对 NF- κ B 信号通路的影响 Western blot 方法表明, LX-2 细胞在 LPS 刺激后 12 h 后, 与正常组比较, p-p65 及 p-I κ B α 表达量明显升高, 提示 NF- κ B 信号通路激活。而与 pcDNA3 空载体对照组比较, 过表达 IRF3 后, p-I κ B α 及 p-p65 蛋白表达量显著下调 ($F = 131.045, P < 0.01$; $F = 122.267, P < 0.01$), 而非磷酸化的 I κ B α 和 p65 蛋白水平未见显著改变 ($F = 1.317, P > 0.05$; $F = 0.043, P > 0.05$),

表明 IRF3 抑制 NF- κ B 信号通路的激活。见图 6。

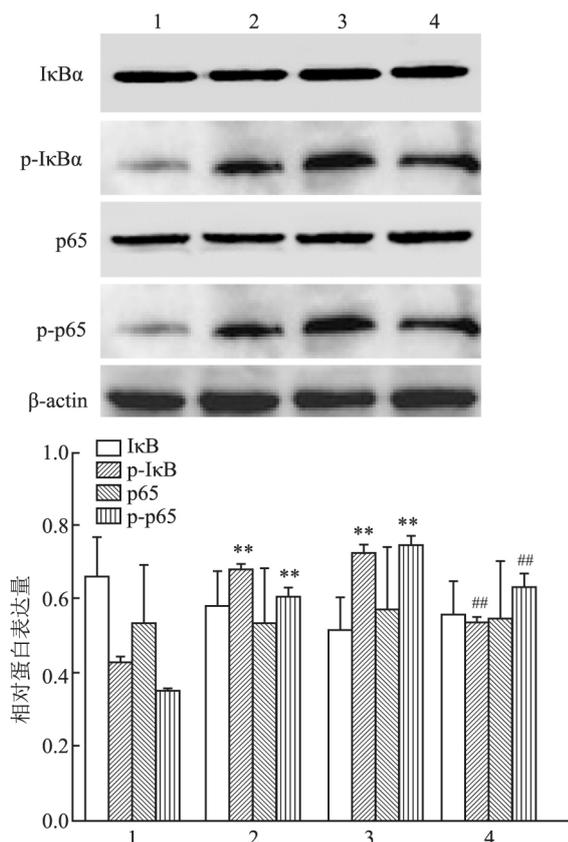


图 6 IRF3 对 NF- κ B 信号通路的影响

1: 正常组; 2: LPS 刺激组; 3: LPS 刺激组 + 转染空质粒 pcDNA3 对照组; 4: LPS 刺激组 + 转染质粒 pcDNA3-IRF3 对照组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 pcDNA3 空载体对照组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

在哺乳动物中, 目前已知的干扰素转录因子家族共包含 9 个成员, 分别命名为 IRF1 ~ 9, 其中 IRF3 广泛表达于个体各种组织及细胞中, 在合成 I 型干扰素及其诱导基因的生化过程中起着关键作用^[6]。IRF3 除了在免疫系统中起着重要的调节作用外, 近年来研究^[9]报道, IRF3 在脂质代谢、急性肝损伤、肿瘤等也起着显著的调节作用。本实验中重点研究了 IRF3 在星状细胞中对炎症因子分泌的影响。

脂多糖 LPS 是革兰阴性细菌的细胞壁组成成分, 是革兰阴性菌致病的主要因素, 可以引起机体一系列的炎症反应^[10], 在本实验中用浓度为 2 μ g/ml 的 LPS 诱导激活 LX-2 细胞。

研究^[11]表明, NF- κ B 是细胞内重要的核转录因子, 其参与多种基因的表达和调控, 介导调节炎症反应。当细胞处于静息状态时, NF- κ B 二聚体通过非共价键的形式与其抑制蛋白 I κ B 结合而分散在细胞

质内, 包括内质网应激在内的许多因素可激活 NF- κ B, 激活后的 NF- κ B 进入细胞核, 与 DNA 模块上的特异蛋白结合, 诱导特异 mRNA 的产生, 最后转录、产生和释放各种细胞因子。本实验用 LPS 诱导激活细胞, 再通过瞬时转染质粒 pcDNA3-IRF3 过量表达 IRF3, 观测其对 NF- κ B 信号通路的影响, 结果显示 NF- κ B 信号通路中的关键蛋白 p-p65 及 p-I κ B α 表达量与 pcDNA3 空载体对照组相比明显减少, 而 p65 和 p-I κ B 表达量未见改变, 提示 IRF3 可能是通过抑制 NF- κ B 从而减少炎症因子的释放。IRF3 在 LPS 诱导的星状细胞中能够抑制炎症因子的分泌, 说明 IRF3 可能参与了肝脏炎症和纤维化的病理过程, 但由于肝纤维化发生发展的病理因素复杂, IRF3 在纤维化中扮演的角色需要进一步的探究。

参考文献

- [1] Koller T, Kollerova J, Huorka M, et al. Noninvasive scoring algorithm to identify significant liver fibrosis among treatment-naive chronic hepatitis C patients [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014, 26(10): 1108 - 15.
- [2] Fuchs B C, Hoshida Y, Fujii T, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2014, 59(4): 1577 - 90.
- [3] 付 晓, 张学荣, 廖 明 等. 以 iTRAQ 技术分析大鼠肝纤维化发展成肝癌过程中肝组织差异表达的蛋白质 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(12): 1873 - 82.
- [4] Zhu Y, Ni T, Deng W, et al. Effects of NLRP6 on the proliferation and activation of human hepatic stellate cells [J]. Exp Cell Res, 2018: [Epub ahead of print].
- [5] 王爱秀. TWEAK/Fn14 通过激活 NF- κ B/STAT3 信号通路诱导肝星状细胞分泌促炎症因子 [D]. 南京: 南京大学, 2017.
- [6] Liu L M, Tu W J, Zhu T, et al. IRF3 is an important molecule in the U1/UT system and mediates immune inflammatory injury in acute liver failure [J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49027 - 41.
- [7] Qiao J T, Cui C, Qing L, et al. Activation of the STING-IRF3 pathway promotes hepatocyte inflammation, apoptosis and induces metabolic disorders in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Metabolism 2017, 81: 13 - 24.
- [8] Loi P, Yuan Q, Torres D, et al. Interferon regulatory factor 3 deficiency leads to interleukin-17-mediated liver ischemia-reperfusion injury [J]. Hepatology 2013, 57(1): 351 - 61.
- [9] Zhao G N, Jiang D S, Li H. Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease [J]. BBA-biomembranes 2015, 1852(2): 365 - 78.
- [10] 张晓音, 吴 旻, 李雨萌 等. 脂多糖的效应及其机理研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(12): 133 - 6.
- [11] 孙雪芳, 王洪新, 梁灵君 等. 黄芪多糖通过 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制脂多糖诱导的大鼠心肌细胞肥大 [J]. 中国药理学通报 2013, 29(2): 208 - 12.

网络出版时间: 2019-1-11 14:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.004.html>

甘氨酸转运体 1 抑制剂 M22 对 癫痫小鼠认知障碍的改善作用研究

林力峰 梁 维 刘 洲 冼文川 钟望涛

摘要 目的 研究甘氨酸转运体 1 (GlyT1) 抑制剂 M22 对戊四氮 (PTZ) 诱导的癫痫小鼠认知功能障碍的改善作用。方法 按照体质量随机将筛选的 50 只 C57BL/6 小鼠分为 3 组: 空白对照组 (Control, $n = 10$), 模型组 (Model, $n = 20$), M22 组 (M22, $n = 20$)。空白对照组腹腔注射等量的生理盐水, 模型组和 M22 组小鼠腹腔注射 PTZ (30 mg/kg) 制备慢性点燃癫痫模型, 连续腹腔注射 PTZ 2 周时间, 并同时通过灌胃给予 M22 组小鼠 40 mg/(kg·d) 的 M22。2 周后采用 Morris 水迷宫实验对其学习记忆功能进行评价, 然后将小鼠处死, 对其海马进行 HE 染色, 并测定小鼠大脑皮层的凋亡相关蛋白, 对其神经元细胞的凋亡情况进行评价。结果 Morris 水迷宫实验结果显示癫痫发作导致了小鼠认知功能障碍, 而 M22 对其认知障碍具有改善作用; HE 染色结果显

示模型组小鼠神经元明显发生凋亡, 而 M22 具有保护作用。凋亡相关蛋白测定显示 M22 对于癫痫导致的神经元凋亡具有显著的保护作用。结论 甘氨酸转运体 1 抑制剂 M22 能够显著提高癫痫小鼠的学习、记忆能力, 抑制神经元细胞凋亡, 为癫痫或者难治性癫痫患者提供新的选择。

关键词 癫痫; 认知功能障碍; M22

中图分类号 R 332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0182-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.004

癫痫是由于脑部神经元高度同步化异常放电而引起的慢性、反复发作的短暂性大脑兴奋-抑制功能失调综合征。其主要的临床特性是发作性、重复性、刻板性与短暂性^[1-3]; 有文献^[4]报道 30% ~ 40% 的癫痫患者均伴有不同程度的认知障碍。目前的抗癫痫药物均不能明显改善癫痫患者的认知功能损伤与多动障碍, 有些药物甚至能够加重患者的认知损伤, 并且加重多动障碍的发生^[5-6]。

甘氨酸作为脑内最为重要的兴奋性神经递质,

2018-08-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81400986); 湛江市非资助科技计划项目 (编号: 2017B01019)

作者单位: 广东医科大学附属第一医院神经内科 湛江 524001

作者简介: 林力峰, 女, 大学本科;

钟望涛, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: pediatty@163.com

IRF3 suppress the secretion of inflammatory cytokines in the hepatic stellate cell induced by LPS

Liu Yunjie¹, Cheng Wei², Li Li³, et al

(¹Pharmacy Intravenous Admixture Service, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Binhu Hospital, Hefei 230061; ²PLA 92752 Troops Health Team, Hefei 231600;

³School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of IRF3 on the secretion of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in hepatic stellate cells induced by LPS. **Methods** Transient transfection of plasmid pcDNA3-IRF3 into LX-2 of human hepatic stellate cells by liposome was used to detect the transfection efficiency, and the expression of inflammatory factor IL-6 and TNF- α was detected by Western blot and qRT-PCR. **Results** The results of qRT-PCR and Western blot showed that the expression of TNF- α and IL-6 in LX-2 cells stimulated with 2 μ g/ml LPS for 12 h was significantly lower than that in normal control group, while the expression of TNF- α and IL-6 increased significantly. However, after pcDNA3 was transfected into LX-2 cells for 12 h, the expression levels of inflammatory factors IL-6 and TNF- α in pcDNA3 transfected group were significantly inhibited in LX-2 cells compared with the control group. **Conclusion** IRF3 can inhibit the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in LX-2 induced by LPS.

Key words IRF3; TNF- α ; hepatic stellate cells; LX-2 cells; inflammatory factor