

网络出版时间: 2021-7-28 15:20 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1037.065.html>

LncRNA H19 对大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 细胞凋亡的影响

王小蝶, 余维丽, 王福贵, 孙 昀

摘要 目的 研究长链非编码 RNA(LncRNA) H19 对雨蛙素刺激的大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 细胞凋亡的影响。方法

在体外通过用雨蛙素刺激 AR42J 细胞建立 AP 模型, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测沉默以及过表达 H19 后凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 和蛋白表达水平; 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率。结果 H19 沉默后, 凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 和蛋白水平下降, 细胞凋亡率也相对减少 ($P < 0.05$); 而过表达 H19 后, Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 和蛋白水平增加, 细胞凋亡率也是升高的 ($P < 0.05$)。结论 沉默 LncRNA H19 可减少雨蛙素诱导的胰腺腺泡细胞凋亡, 提示其可能成为治疗急性胰腺炎的潜在有效靶点。

关键词 LncRNA H19; AR42J 细胞; 急性胰腺炎; 细胞凋亡
中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1273-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.020

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是胰腺的炎症性疾病,严重时可引起全身炎症反应综合征,可导致单个或多个器官功能障碍,甚至死亡^[1]。AP的特征是蛋白酶异常激活、实质损伤、胰腺自身消化、胰腺腺泡细胞凋亡和坏死以及强烈的炎症反应。目前 AP 的治疗方法有液体复苏、营养支持等,尚无针对性药物治疗^[2]。而长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是由 200 多个核苷酸组成,参与调节了许多细胞过程,如细胞凋亡、增殖、自噬等。许多研究^[3]已发现 LncRNAs 参与了多种生物学和病理过程。LncRNA H19 是位于染色体 11P15.5 上的母系表达印记基因转录而来,并在某些疾病中发现了 H19 的上调,例如肝癌^[4]、食管癌^[5]、动脉粥样硬化^[6]、骨关节炎^[7]等。然而, LncRNA H19 是否可以通过调节胰腺腺泡细胞凋亡从

而参与 AP 的发生发展尚不清楚。该研究拟探讨 LncRNA H19 在大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 细胞凋亡中的作用机制,以期 AP 的发病机制以及临床诊疗提供理论依据和思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料 大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 购于上海富衡细胞库。LncRNA H19 的 siRNA (si-H19), siRNA 对照 (si-NC), 空载质粒对照 (pEX-3) 以及过表达 H19 (pEX-3-H19) 序列均购于上海吉玛制药有限公司。Lipofectamine 2000 购于美国 Life Technology 公司; Opti-MEM (x1) 培养基购于美国 Gibco 公司。雨蛙素粉末购于北京索莱宝科技有限公司; qRT-PCR 试剂盒购于日本 Takara 公司。Caspase 3、Caspase 9 以及 β -Actin 抗体均购于武汉三鹰生物技术有限公司。Annexin-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购于上海七海复泰生物科技有限公司。

1.2 细胞培养与转染 AR42J 细胞使用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,置于 37°C、5% CO₂ 恒温培养箱中,每 2~3 d 传代 1 次。取对数生长期细胞接种至 6 孔板,待细胞长至 60%~80% 汇合度后,根据 Lip2000 说明书进行转染,转染成功后用雨蛙素 (100 nmol/L) 刺激 24 h,处理好的细胞进行后续实验。实验分为 6 组记为:空白对照组(不做任何处理的 AR42J 细胞)、雨蛙素组、si-NC + 雨蛙素组、si-H19 + 雨蛙素组、pEX-3 + 雨蛙素组、pEX-3-H19 + 雨蛙素组。

1.3 qRT-PCR 检测各组细胞中 H19 及凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的蛋白的 mRNA 水平

取处理好的各组细胞,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。按照表 1 所示引物序列采用荧光定量 PCR 扩增仪按照以下条件进行荧光定量 PCR 反应:95°C、30s, 95°C、5s, 60°C、20s, 共 40 个循环;95°C、1s, 60°C、15s, 95°C、5s, 反应结束后以 GAPDH 基因作为内参照,计算 H19、Caspase3 及 Caspase9 的 mRNA 相对表达量。见表 1。

2021-03-25 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A183);安徽医科大学第二附属医院临床研究培育计划项目(编号: 2020LCZD08)

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:王小蝶,女,硕士研究生;

孙 昀,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: sunyun15@163.com

表1 H19、Caspase3、Caspase9 以及 GAPDH 的 qRT-PCR 的引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
H19	正义引物: TCTCCGAGACACCGATCACTGC
	反义引物: GCACAGGATGAAGCCAGACAAGG
Caspase3	正义引物: GCGGTATTGAGACAGACAGTGGAAAC
	反义引物: GCGGTAGAGTAAGCATAACAGGAAGTC
Caspase9	正义引物: GGGCTCAGCACACGCATTGG
	反义引物: TTCTTAGCAGTCAGGTCGTTCTTCAC
GAPDH	正义引物: ATGACTCTACCCACGGCAAG
	反义引物: GATCTCGCTCCTGGAAGATG

1.4 Western blot 法检测各组细胞中凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的蛋白的表达水平 取处理好的各组细胞,加入 RIPA 裂解液,提取总蛋白,用 BCA 试剂盒进行定量。然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。用 5% 脱脂牛奶在摇床上室温封闭 2 h 后 TBST 洗 3 × 10 min。用相应的一抗在 4℃ 条件下孵育过夜。再用 TBST 洗 3 × 10 min,用相对应二抗在室温摇床下孵育膜 1 h,用 TBST 洗涤 10 min × 3 次后,用 ECL 化学发光底物显影检测蛋白。最后用 Image-J 图像处理系统分析并以 β-Actin 作为内参照计算 Western blot 灰度值。

1.5 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况 取处理好的各组细胞,加入适量胰酶消化(不含 EDTA)轻轻吹打细胞后 500 r/min 离心 5 min 弃上清液,用 1 ml PBS 重悬细胞,500 r/min 离心 5 min,收集细胞。加入 400 μl Binding Buffer 重悬细胞,再每组加入 5 μl Annexin V-FITC,混匀后室温避光孵育 15 min。最后加入 10 μl PI 染色液冰浴避光 5 min。在 30 min 内进行 CytoFLEX 流式细胞仪检测,用 CytExpert 分析软件分析实验结果。

1.6 统计学处理 用 SPSS17.0 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 沉默及过表达 H19 后各组中 H19、Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 表达水平 与空白对照组相比,雨蛙素组中的 H19、Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 表达水平增高(*F* = 9.097、25.58、58.10, *P* 均 < 0.05);雨蛙素组、si-NC + 雨蛙素组、pEX-3 + 雨蛙素组中的 H19、Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 表达水平差异无统计学意义;而与 si-NC + 雨蛙素组相比,si-H19 + 雨蛙素组中的 H19、Caspase 3 及 Caspase

9 水平下降(*F* = 21.11、50.71、125.3, *P* 均 < 0.05);反之,与 pEX-3 + 雨蛙素组相比,pEX-3-H19 + 雨蛙素组中的 H19、Caspase 3 及 Caspase 9 水平升高(*F* = 49.51、60.12、45.21, *P* 均 < 0.05),见图 1。即说明 H19 沉默后,凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 水平下降,而过表达 H19 后,凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 水平上升。

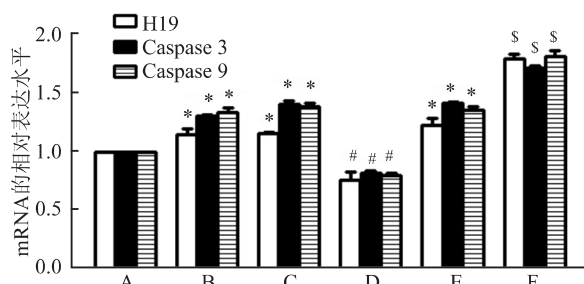


图1 qRT-PCR 检测 AR42J 细胞中的 H19、Caspase 3 以及 Caspase 9 的 mRNA 表达

A: 空白对照组; B: 雨蛙素组; C: si-NC + 雨蛙素组; D: si-H19 + 雨蛙素组; E: pEX-3 + 雨蛙素组; F: pEX-3-H19 + 雨蛙素组; 与空白对照组比较: * *P* < 0.05; 与 si-NC + 雨蛙素组比较: # *P* < 0.05; 与 pEX-3 + 雨蛙素组比较: § *P* < 0.05

2.2 沉默及过表达 H19 后各组中 Caspase 3 及 Caspase 9 的蛋白表达水平 与空白对照组相比,雨蛙素组中的 Caspase 3 及 Caspase 9 蛋白水平增高(*F* = 5.182、37, *P* 均 < 0.05);雨蛙素组、si-NC 组 + 雨蛙素组、pEX-3 + 雨蛙素组中的 Caspase 3 及 Caspase 9 蛋白水平差异无统计学意义;而与 si-NC 组 + 雨蛙素组相比,si-H19 + 雨蛙素组中的 Caspase 3 及 Caspase 9 蛋白水平下降(*F* = 11.17、34.13, *P* 均 < 0.05);反之,与 pEX-3 + 雨蛙素组相比,pEX-3-H19 + 雨蛙素组中的 Caspase 3 及 Caspase 9 蛋白水平升高(*F* = 11.02、42.02, *P* 均 < 0.05),见图 2。即说明 H19 沉默后,凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的蛋白水平下降,而过表达 H19 后,凋亡相关基因 Caspase 3 及 Caspase 9 的蛋白水平上升。

2.3 沉默及过表达 H19 后各组中细胞的凋亡率 与空白对照组相比,雨蛙素组的细胞凋亡率增高(*F* = 23.68, *P* < 0.05);雨蛙素组、si-NC 组 + 雨蛙素组、pEX-3 + 雨蛙素组中的细胞凋亡率差异无统计学意义;而与 si-NC 组 + 雨蛙素组相比,si-H19 + 雨蛙素组的细胞凋亡率下降(*F* = 49.84, *P* < 0.05);反之,与 pEX-3 + 雨蛙素组相比,pEX-3-H19 + 雨蛙素组的细胞凋亡率升高(*F* = 108, *P* < 0.05)。见图 3。即说明 H19 沉默后,细胞凋亡率下降,而过表达

H19 后 细胞的凋亡率明显上升。

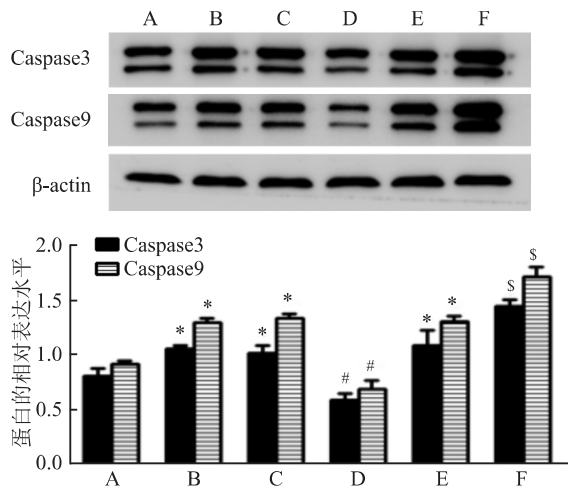


图2 Western blot 法检测各组中 AR42J 细胞中 Caspase3、Caspase9 的蛋白表达水平

A: 空白对照组; B: 雨蛙素组; C: si-NC + 雨蛙素组; D: si-H19 + 雨蛙素组; E: pEX-3 + 雨蛙素组; F: pEX-3-H19 + 雨蛙素组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 si-NC + 雨蛙素组比较: # $P < 0.05$; 与 pEX-3 + 雨蛙素组比较: ^S $P < 0.05$

3 讨论

有证据^[8]表明, LncRNAs 参与了 AP 的发生和发展。然而, LncRNA H19 在 AP 中的潜在机制尚不清楚。

LncRNAs 已被证明是基因表达的主要调节因

子, 在包括癌症在内的各种生物功能和疾病过程中起着关键作用。LncRNA H19 是一种印记的母系表达的转录物, 是少数特征明确的 LncRNA 之一。H19 的异常表达与多种疾病有关, 且 H19 在炎症相关疾病中的表达水平通常较高^[3]。Wang et al^[9] 实验发现, 在类风湿性关节炎患者的滑膜组织中检测到 H19 的高表达, 而磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K) 可调控 H19 的水平抑制滑膜细胞的增殖及凋亡。而在乳腺癌中, H19 的下调还可抑制参与细胞周期调节的 p53 的表达^[10]。在精原细胞的缺氧复氧模型中, H19 在细胞复氧后显著增加, 沉默了 H19 后, 小鼠的精原细胞的凋亡水平明显增加^[11]。也有研究^[12]发现, H19 在缺血再灌注的心肌细胞中上调, 且敲除 H19 可增加细胞活力, 减少细胞凋亡, 减少炎症细胞因子(白介素-1β、肿瘤坏死因子和白介素-6), 抑制氧化应激。另一项实验^[6]表明, LncRNA H19 作为 miR-148b 的上游, 可调节 WNT/β-连环蛋白信号通路, 以促进氧化低密度脂蛋白刺激的血管平滑肌细胞的增殖并抑制其凋亡。半胱氨酸蛋白水解酶(Caspase) 能够启动和维持细胞凋亡, 而其家族成员 Caspase 3 是最重要的凋亡蛋白酶之一, 通常位于哺乳动物细胞凋亡通路下游, 其表达量直接反映细胞凋亡程度。Caspase 3 可被 Caspase 9 直接激活, 通过其自身介导的信号传导途径导致细胞发生

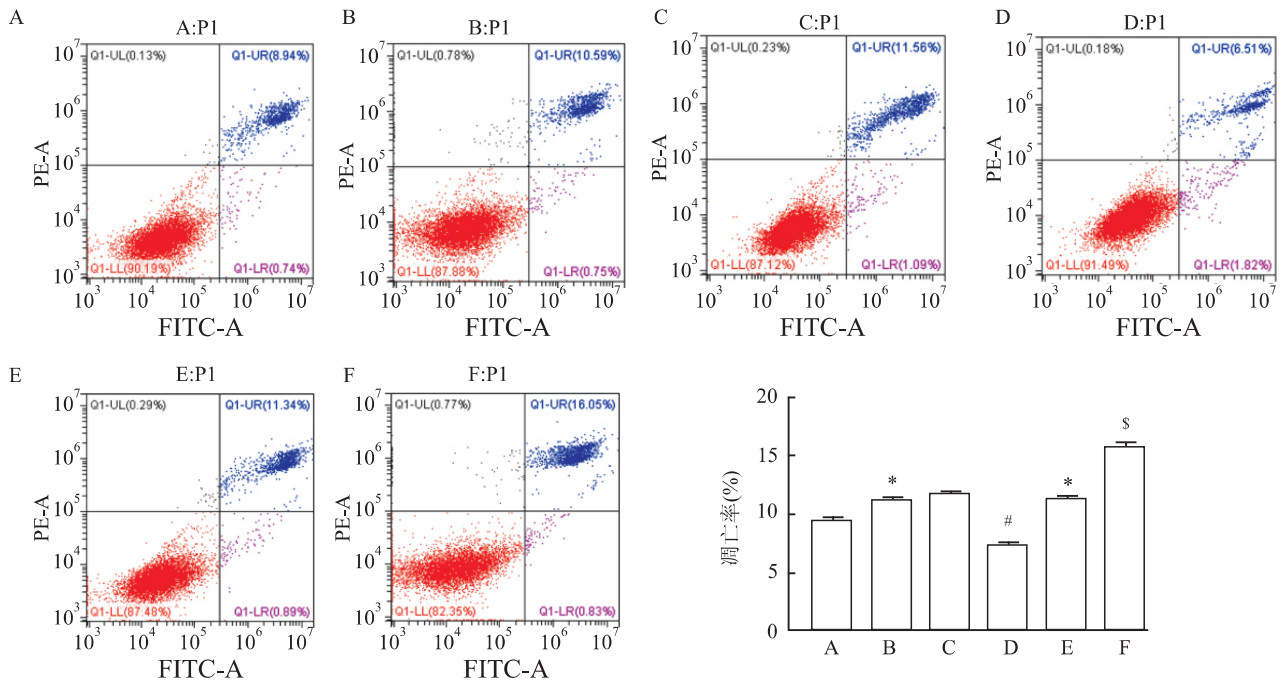


图3 流式细胞术检测沉默及过表达 H19 后各组中细胞的凋亡率

A: 空白对照组; B: 雨蛙素组; C: si-NC + 雨蛙素组; D: si-H19 + 雨蛙素组; E: pEX-3 + 雨蛙素组; F: pEX-3-H19 + 雨蛙素组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 si-NC + 雨蛙素组比较: # $P < 0.05$; 与 pEX-3 + 雨蛙素组比较: ^S $P < 0.05$

凋亡^[13]。本研究用雨蛙素刺激在体外建立 AP 模型与空白对照组相比,在雨蛙素刺激 24 h 后发现了 H19 的表达增高。本实验通过细胞转染成功获得 H19 沉默的 AR42J 细胞株,而沉默 H19 后, Caspase 3 及 Caspase 9 的表达水平下降, AR42J 细胞凋亡水平下降,而过表达 H19 后, AR42J 细胞凋亡水平上升。本研究说明 H19 可能参与并调控胰腺腺泡细胞的凋亡,这与上述文献一致。

综上所述, H19 在 AP 的发展过程中高表达,沉默了 H19 后可下调 Caspase 3 及 Caspase 9 的表达,减少雨蛙素刺激引起的细胞凋亡,进而对大鼠胰腺腺泡细胞起到保护作用。本研究初步探讨了 LncRNA H19 在调节胰腺腺泡细胞凋亡的分子机制的认识,未来可深入研究 H19 的上游或下游靶基因,进一步探讨 H19 参与腺泡细胞凋亡的具体作用机制,以期为 AP 的临床诊疗提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Manohar M, Verma A K, Venkateshaiah S U, et al. Pathogenic mechanisms of pancreatitis[J]. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2017, 8(1): 10-25.
- [2] Saluja A, Dudeja V, Dawra R, et al. Early intra-acinar events in pathogenesis of pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1979-93.
- [3] Zhou Q, Liu Z Z, Wu H, et al. LncRNA H19 promotes cell proliferation, migration, and angiogenesis of glioma by regulating Wnt5a/ β -Catenin pathway *via* targeting miR-342 [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020.
- [4] Gamaev L, Mizrahi L, Friehmann T, et al. The pro-oncogenic effect of the lncRNA H19 in the development of chronic inflammation-mediated hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2021, 40(1): 127-39.
- [5] Chen M J, Deng J, Chen C, et al. LncRNA H19 promotes epithelial mesenchymal transition and metastasis of esophageal cancer *via* STAT3/EZH2 axis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 113: 27-36.
- [6] Zhong X, Ma X, Zhang L, et al. MIAT promotes proliferation and hinders apoptosis by modulating miR-481b/STAT3 axis in ox-LDL-induced atherosclerosis cell models [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1078-85.
- [7] Zhou L, Wan Y, Cheng Q, et al. The expression and diagnostic value of LncRNA H19 in the blood of patients with osteoarthritis [J]. *Iran J Public Health*, 2020, 49(8): 1494-501.
- [8] 孙磊, 万莎莎, 王超君, 等. 长链非编码 RNA B3GALT5-AS1 靶向 miR-361-3p 调节大鼠胰腺腺泡细胞增殖及凋亡的分子机制 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(11): 1951-9.
- [9] Wang B, Suen C W, Ma H, et al. The roles of H19 in regulating inflammation and aging [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 579687.
- [10] Wang J, Zhao H, Fan Z, et al. Long noncoding RNA H19 promotes neuroinflammation in ischemic stroke by driving histone deacetylase 1-dependent M1 microglial polarization [J]. *Stroke*, 2017, 48(8): 2211-21.
- [11] 卓栋, 宁金卓, 张经纬, 等. LncRNA H19/miR-203a/PTEN 轴在小鼠 GC-1 细胞缺血再灌注损伤中的作用及影响机制 [J]. *中华男科学杂志*, 2020, 26(6): 499-504.
- [12] Luo H, Wang J, Liu D, et al. The lncRNA H19/miR-675 axis regulates myocardial ischemic and reperfusion injury by targeting PPAR α [J]. *Mol Immunol*, 2018, 105(1): 46-54.
- [13] Liu H, Zhou Y, Tang L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase 9/caspase 3 signalling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2445-54.

Effects of long non-coding RNA H19 on apoptosis of cerulein induced exocrine pancreas AR42J cells

Wang Xiaodie, Yu Weili, Wang Fugui, et al

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

Abstract Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (LncRNA) H19 on the apoptosis of rat pancreatic acinar cells AR42J induced by caerulein. **Methods** An AP model *in vitro* was established by stimulating with caerulein. The mRNA and protein expression levels of Caspase 3 and Caspase 9 were detected by qRT-PCR and Western blot after H19 silencing and overexpression. The apoptosis rate of AR42J cells in each group was detected by Annexin V-FITC/PI assay. **Results** After H19 silencing, the mRNA and protein levels of Caspase 3 and Caspase 9 significantly decreased, and the apoptosis rate was also relatively reduced ($P < 0.05$). After H19 overexpression, the mRNA and protein levels of Caspase 3 and Caspase 9 significantly increased, and the apoptosis rate also significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The silencing of LncRNA H19 can significantly reduce the apoptosis of cerulein-induced pancreatic acinar cells, suggesting that it may be a potential effective target for the treatment of acute pancreatitis.

Key words LncRNA H19; AR42J cells; acute pancreatitis; apoptosis