

## 研究论文

# pEGFP-N1-IRF3a重组质粒通过调节STAT1的活化诱导非小细胞肺癌细胞的凋亡

易亮<sup>1</sup> 吴艳萍<sup>2</sup> 韩倩<sup>2</sup> 杨云梅<sup>1\*</sup><sup>1</sup>浙江大学医学院附属第一医院老年医学科, 杭州 310003; <sup>2</sup>北京大学第一医院老年内科, 北京 100034

**摘要** 干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)在固有免疫激活的过程中发挥重要作用, 其中IRF3a是由IRF3可变剪接形成的一个亚型, 目前几乎没有研究报道该蛋白对肿瘤细胞凋亡的影响。在该研究中, 首先通过qRT-PCR检测*IRF3a*基因在肺癌组织以及癌旁组织中的表达水平; 然后通过PCR从人外周血细胞中获取*IRF3a*基因, 与质粒pEGFP-N1成功构建重组质粒pEGFP-N1-IRF3a。重组质粒转染非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞A549、H1299后, 细胞凋亡比例明显升高, cleaved caspase8、cleaved caspase3水平也显著升高。此外, 过表达IRF3a能激活STAT1, 以p-STAT1抑制剂Nifuroxazide抑制STAT1的活性能显著抑制IRF3a诱导的细胞凋亡。因此, 该研究成功构建了pEGFP-N1-IRF3a重组质粒, 并进一步证明了IRF3a通过激活STAT1诱导NSCLC细胞的凋亡。

**关键词** 干扰素调节因子3a; 质粒构建; 非小细胞肺癌细胞凋亡

## Recombinant pEGFP-N1-IRF3a Plasmid Induces the Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Regulating the Activity of STAT1

YI Liang<sup>1</sup>, WU Yanping<sup>2</sup>, HAN Qian<sup>2</sup>, YANG Yunmei<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Geriatric Medicine, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China;<sup>2</sup>Department of Geriatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

**Abstract** IRF3 (interferon regulatory factor 3) plays the significant roles in regulating innate immune activity. IRF3a (interferon regulatory factor 3 isoform 3) is the translated production of IRF3 transcript variant 3 under the control of alternative splicing. However, seldom researches whether IRF3a has effect on the apoptosis of cancer cells been performed. In this research, the level of *IRF3a* gene expression was firstly tested in the lung cancer tissues and the adjacent tissues by qRT-PCR. *IRF3a* gene was obtained from human peripheral blood mononuclear cells by PCR and cloned into pEGFP-N1 plasmid, then the recombinant pEGFP-N1-IRF3a plasmid was successfully constructed. The apoptotic cells dramatically increased and the level of cleaved caspase3, cleaved caspase8 strikingly elevated followed recombinant pEGFP-N1-IRF3a plasmid transfected into A549 and H1299 cells. Moreover, IRF3a overexpression could promote the activity of STAT1 and the apoptotic cells decreased obviously following the pretreatment of STAT1 inhibitor Nifuroxazide. Therefore, recombinant pEGFP-N1-IRF3a plasmid was

收稿日期: 2019-09-18 接受日期: 2019-12-26

\*通讯作者。Tel: 13957189199, E-mail: 1194070@zju.edu.cn

Received: September 18, 2019 Accepted: December 26, 2019

\*Corresponding author. Tel: +86-13957189199, E-mail: 1194070@zju.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5192>

successfully constructed in this research and it further revealed that IRF3a promoted the apoptosis of NSCLC A549 and H1299 cells by activating the phosphorylation of STAT1.

**Keywords** IRF3a; plasmid construction; non-small cell lung cancer cell apoptosis

干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)广泛表达于各种组织细胞中, 包括免疫细胞以及肿瘤细胞, 对于固有免疫的调节发挥重要作用<sup>[1]</sup>。近期研究报道, IRF3通过依赖/不依赖干扰素的方式调节抗肿瘤和促肿瘤的作用<sup>[2-3]</sup>。IRF3a是IRF3可变剪接形成的一个亚型, 与IRF3的结构相比, N末端有一个独特的氨基酸序列。该蛋白在脑组织以及HeLa细胞中普遍存在<sup>[4]</sup>。有研究报道, 在病毒感染或者肿瘤进展中, IRF3/IRF3a的比例会影响宿主的免疫力, 这可能是由于IRF3a抑制IRF3激活所致的<sup>[4]</sup>。然而, IRF3a在肺癌组织中的表达情况以及该蛋白对肺癌凋亡的影响仍不清楚。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Lipofectamine 3000、TRIzol RNA分离试剂、PCR Master Mix购自美国Invitrogen公司; 凋亡试剂盒Annexin V-FITC/PI购自北京全式金生物科技公司; p-STAT1抑制剂Nifuroxazide购自美国Selleck公司; 质粒pEGFP-N1、抗兔源性、鼠源性二抗购自美国Santa Cruz公司; 鼠抗人caspase-3单克隆抗体购自美国Biolegend公司; 兔抗人caspase-8单抗购自美国ABclonal公司; 兔抗人p-STAT1(S727)单抗、兔抗人STAT1单抗、兔抗GFP单抗购自英国Abcam公司。

### 1.2 细胞培养

肺腺癌细胞株A549、人支气管上皮细胞株16HBE14o(American Type Culture Collection, 美国)用含有10%胎牛血清(Corning, 美国)的高糖DMEM(Corning, 美国)培养; H1299(American Type Culture Collection, 美国)用含10%胎牛血清(Corning, 美国)的RPMI 1640(Corning, 美国)培养, 3种细胞都置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C孵箱培养。

### 1.3 实时定量PCR和普通PCR

用Trizol提取肺癌标本、癌旁标本以及外周血细胞的RNA, 并将2 μg RNA在20 μL体系中反转录成cDNA。(1)IRF3a基因通过使用SYBR试剂进行实时定量PCR, 并且用ABI7500进行检测。基因的相对表达量以GAPDH mRNA作为参照, 通过2<sup>-ΔΔCt</sup>

计算。(2)普通PCR的扩增根据PCR Master Mix的说明书操作, 然后将PCR产物在1%凝胶上进行电泳, 将目的条带切胶纯化提取对应的DNA片段。引物如下, IRF3a引物1(用于普通PCR) forward: 5'-gcc gga tcc gct gac tg-3', reverse: 5'-tgg agg cac acc atg agg a-3'; IRF3a引物2(含内切酶序列, 用于普通PCR) forward: 5'-act gtc tcg agg tga tgg tgg ggc gca ag-3', reverse: 5'-act gta ccg gtg tg ctc tcc cca ggg ccc t g-3'; IRF3a引物3(用于实时定量PCR) forward: 5'-ccc gac ctt cca tcg tag-3', reverse: 5'-gcc cac tag gag tcc ttt c-3'。

### 1.4 质粒构建

首先从外周血细胞中获取IRF3a的cDNA, 以引物1进行第一次PCR, 切胶纯化获得IRF3a产物1, 以产物1为模板在引物2的作用下完成第二次PCR, 获得含有内切酶序列的IRF3a产物(产物2), 产物2、空载质粒pEGFP-N1分别与限制性内切酶Xho I和Age I(Thermo Scientific, 美国)孵育1.5 h, 后将孵育的产物2、空载质粒pEGFP-N1以及T4连接酶混合1.5 h, 然后以热休克90 s的方式将上述混合物转化到感受态大肠杆菌中, 转化的细菌以含有30 μg/mL卡那霉素的LB培养基(Invitrogen, 美国)培养。最后, 随机选择存活的菌落以IRF3a引物1进行PCR进行重组质粒的鉴定。

### 1.5 质粒的转染

待细胞长到80%~90%时, 分别将重组质粒pEGFP-N1-IRF3a、空载质粒pEGFP-N1与Lipofectamine 3000孵育5 min, 然后分别加入A549、H1299细胞中, 6 h后换液, 48 h后通过荧光显微镜以及Western blot检测转染效率。

### 1.6 细胞蛋白的提取

弃去细胞上清, 用冷PBS洗细胞3遍, 然后加入细胞裂解液(RIPA:PMSF=100:1) 200 μL, 静置10 min后用细胞刮将细胞刮下, 收集细胞裂解液于4 °C, 15 000 r/min离心15 min, 取上清5 μL用BCA试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 美国)测蛋白浓度, 其余蛋白加入5×上样缓冲液后100 °C煮5 min, -20 °C保存用于Western blot。

### 1.7 Western blot

每孔上样20 μg蛋白量, 先恒压80 V电泳30 min,

然后恒压120 V电泳60 min; 电泳结束, 用含20%甲醇的电转液进行电转(恒流200 mA, 2 h); 电转完后用5%的封闭液封闭1 h; TBST洗3遍后一抗4 °C孵育过夜; TBST洗3遍后二抗常温孵育1 h, 最后显像。

### 1.8 凋亡细胞检测

采用Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒进行流式细胞术检测, 重组质粒转染细胞后, 收集细胞离心, PBS洗2遍, 按照说明书分别加入Annexin V-FITC和PI, 避光15 min, 然后上机检测。

### 1.9 统计学分析

3次独立重复实验。并采用SPSS 20.0软件进行统计分析, 结果用均数±标准误( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两组间比较采用 $t$ 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *IRF3a*基因在非小细胞肺癌组织中的表达水平

在8个非小细胞肺癌患者中, 其中5个肺癌标本中*IRF3a* mRNA的水平都高于对应的癌旁组织(图1)。

### 2.2 重组质粒pEGFP-N1-IRF3a的构建

通过PCR检测发现, *IRF3a*在A549、H1299细胞

的表达水平极低(图2), 因此, 我们通过构建重组质粒, 在细胞中过表达*IRF3a*对其凋亡进行研究。

首先通过*IRF3a*引物1进行PCR获得了长为1 223 bp的产物1(图3A), 然后以产物1、引物2进行第二次PCR获得了含有内切酶序列长为1 203 bp的产物2(图3B), 并将该产物进行DNA测序, 其序列与基因组中NM\_001197123.1是一致的(图3C), 在限制性内切酶剪切后, 我们获得了产物2片段以及空载质粒片段(图4)。

经转化后, 大肠杆菌被选择性地生长在LB培养基上(图5A), 随机地选择8个菌落进行PCR, 有4个含有*IRF3a*基因片段(图5B), 并通过DNA测序验证。因此, 重组质粒pEGFP-N1-IRF3a构建成功。

### 2.3 重组质粒在NSCLC细胞的表达

重组质粒pEGFP-N1-IRF3a转染A549、H1299细胞48 h后, 通过荧光显微镜观察转染效率(图6A)。通过Western blot检测到, *IRF3a*在重组质粒转染后表达水平显著升高(图6B)。

### 2.4 *IRF3a*促进NSCLC细胞的凋亡

重组质粒pEGFP-N1-IRF3a转染A549、H1299细

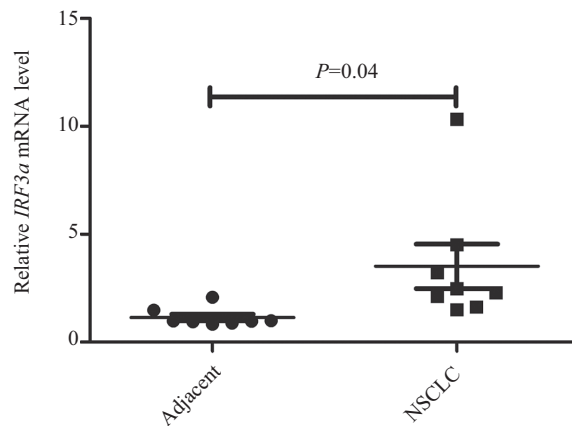


图1 荧光定量PCR检测剪接体*IRF3a* mRNA在肺癌及其癌旁组织中的表达水平

Fig.1 *IRF3a* mRNA expression examined by quantitative PCR in the NSCLC tissues and the adjacent tissues

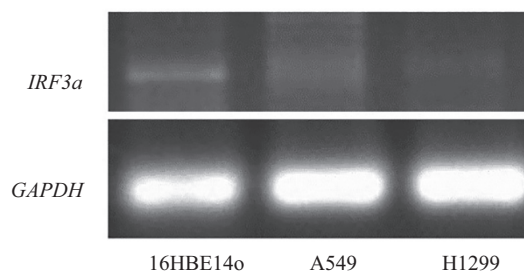
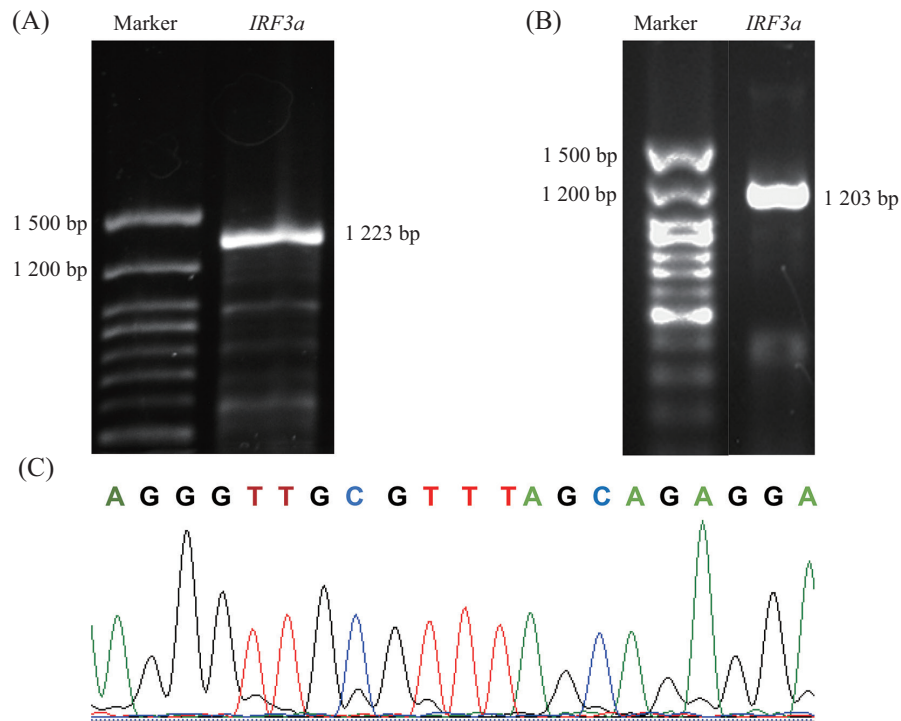


图2 PCR检测*IRF3a*基因在16HBE14o、A549、H1299细胞系的表达水平

Fig.2 The expression level of *IRF3a* gene detected by PCR in 16HBE14o, A549 and H1299 cell lines

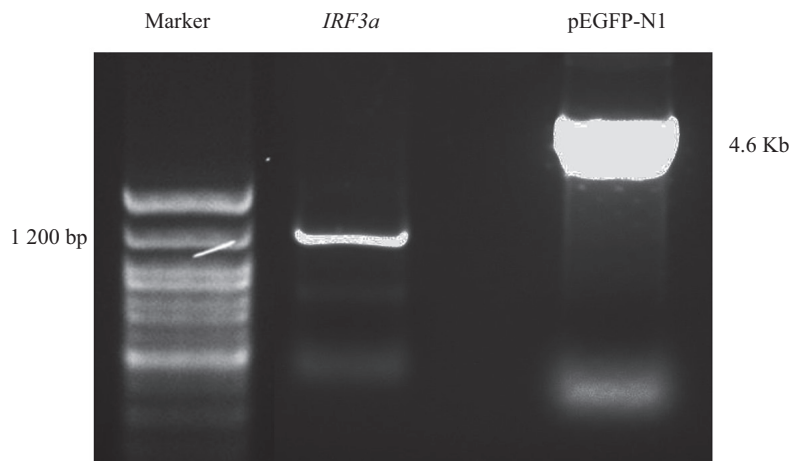


A: 以 *IRF3a* 引物1行PCR获得的产物1; B: 含有内切酶序列的 *IRF3a* PCR产物2; C: 产物2测序的部分序列。

A: the PCR product 1 obtained with the primer 1 of *IRF3a*; B: the PCR product 2 of *IRF3a* with restriction endonuclease sequence; C: partial sequence of product 2 sequencing.

图3 *IRF3a* 基因PCR产物的获取与鉴定

Fig.3 The gene *IRF3a* PCR product was obtained and identified



限制性内切酶剪切后显示的 *IRF3a* 产物2片段、空载质粒 p-EGFP-N1 片段。

The product 2 of *IRF3a* fragment and vector p-EGFP-N1 plasmid fragment showed after the digestion of restriction endonuclease.

图4 限制性内切酶消化产物的生成

Fig.4 The double restriction endonuclease digestive product was produced

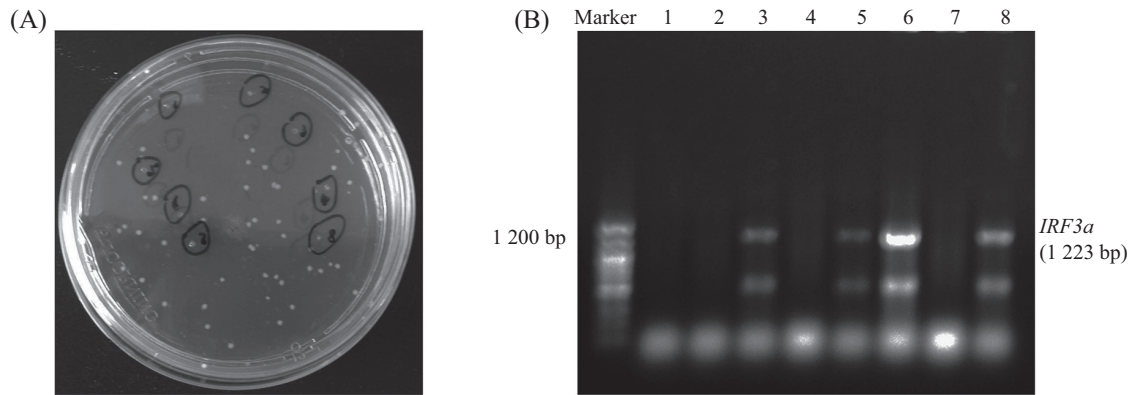
胞后, 凋亡细胞比例明显升高(图7A和图7B)。此外, cleaved caspase3、casapse8水平显著增高(图7C)。

## 2.5 STAT1的活化参与 *IRF3a* 诱导的 NSCLC 细胞凋亡

重组质粒转染 A549、H1299 细胞后, 发现 STAT1

的磷酸化水平明显升高(图8A)。在质粒转染细胞24 h 前, 用 p-STAT1 抑制剂 Nifuroxazide (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 A549、H1299 细胞, 然后进行重组质粒的转染, 发现 Nifuroxazide 处理组的凋亡细胞明显下降(图 8B)。



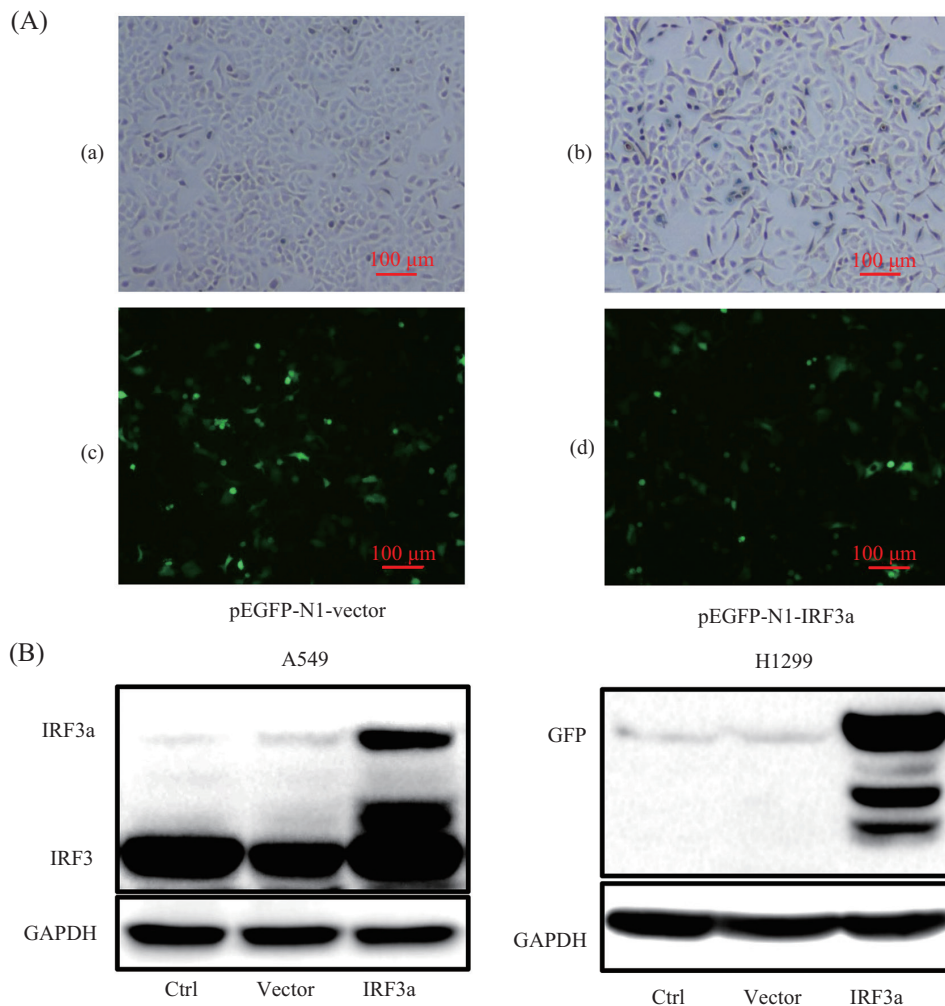


A: 质粒转化后培养的菌落; B: 随机筛选1~8号菌落, 以*IRF3a*引物1进行PCR验证。

A: the bacterial colony after plasmid transformation; B: PCR was performed with the primer 1 of *IRF3a* followed the number 1-8 colony randomly selected.

图5 重组质粒的鉴定

Fig.5 The identification of the recombinant plasmid

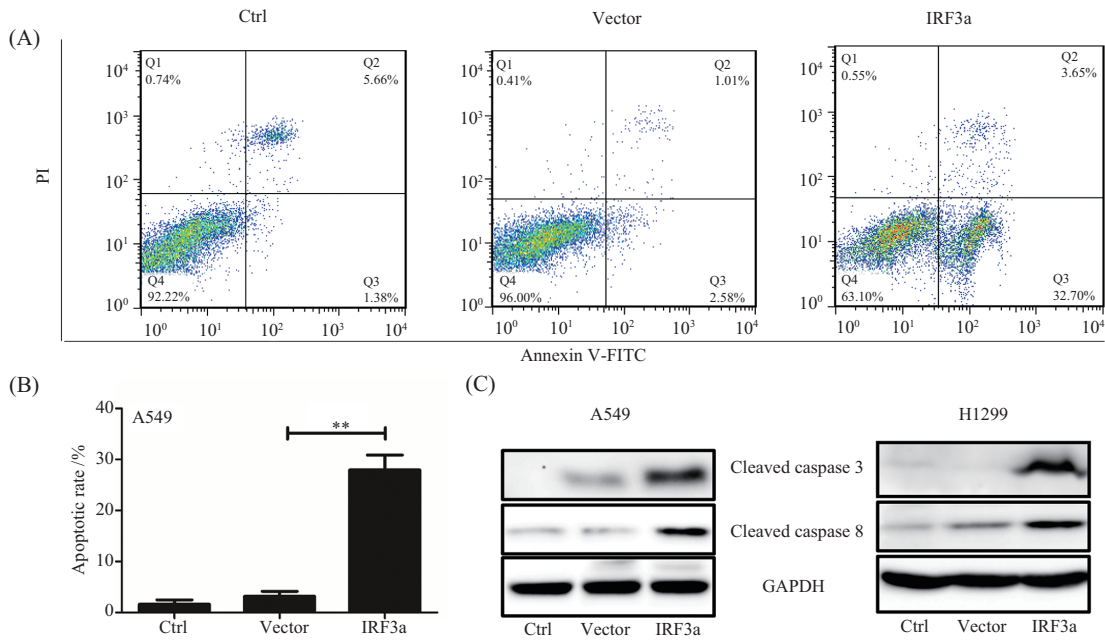


A: 荧光显微镜下显示重组质粒pEGFP-N1-IRF3a的表达情况(a、b表示白光视野; c、d表示荧光视野); B: Western blot检测重组质粒融合表达水平(ctrl代表空白对照)。

A: the fluorescence microscope showed the expression of recombinant plasmid pEGFP-N1-IRF3a (a,b show the white light scope; c,d show the fluorescence scope); B: the expression of the recombinant plasmid was detected by Western blot (ctrl represents the empty control).

图6 重组质粒在NSCLC细胞中的表达。

Fig.6 The expression of the recombinant plasmid in the NSCLC cells

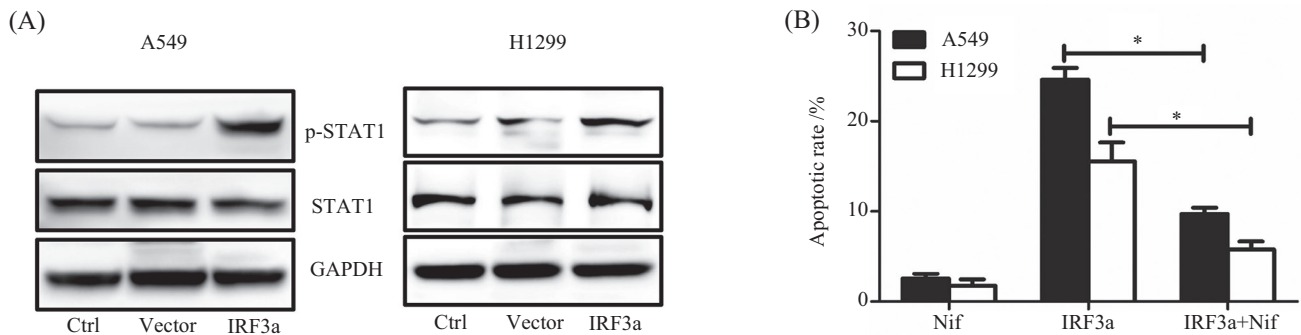


A: 重组质粒pEGFP-N1-IRF3a转染A549细胞后, 流式细胞术检测凋亡细胞的比例; B: 柱状图显示A549细胞凋亡比例(\*\* $P < 0.01$ ); C: Western blot检测A549、H1299细胞中cleaved caspase3、cleaved caspase8水平。

A: the apoptotic cells were detected by flow cytometry followed the transfection of recombinant plasmid pEGFP-N1-IRF3a to A549 cells; B: the histogram shows the apoptotic cells of A549 cell line (\*\* $P < 0.01$ ); C: the expression of cleaved caspase3, cleaved caspase8 in A549 and H1299 cells were detected by Western blot.

图7 IRF3a促进NSCLC细胞的凋亡

Fig.7 IRF3a promotes the apoptosis of NSCLC cells



重组质粒pEGFP-N1-IRF3a转染后, A: Western blot检测A549、H1299细胞中STAT1磷酸化水平; B: p-STAT1抑制剂Nifuroxazide预处理后, 流式细胞术检测过表达IRF3a后凋亡细胞的比例。(Nif: Nifuroxazide, \* $P < 0.05$ ).

After the transfection of recombinant plasmid pEGFP-N1-IRF3a, A: the phosphorylation level of STAT1 (p-STAT1) in A549 and H1299 cells were detected by Western blot; B: the apoptotic cells were detected by flow cytometry after the pretreatment with p-STAT1 inhibitor Nifuroxazide (Nif: Nifuroxazide, \* $P < 0.05$ ).

图8 STAT1的活化参与IRF3a诱导的NSCLC细胞凋亡

Fig.8 The activated STAT1 involves in IRF3-induced-apoptosis in the NSCLC cells

### 3 讨论

可变剪接通过转录的可塑性使单个转录本转变成多个转录本, 进而翻译产生多种蛋白。在人类, 几乎95%的外显子基因都会通过一系列的调节因子被可变剪接<sup>[5]</sup>。目前认为, 可变剪接是增强真核生物功能复杂性的重要因素, 可变剪接异常往往与肿瘤

的进展和预后相关<sup>[6]</sup>。有研究显示, 肿瘤细胞能够破坏可变剪接的正常过程, 产生促进肿瘤细胞增殖以及迁移的剪接体<sup>[7]</sup>。此外, 调控元素的突变或调节蛋白的异常表达都会不同程度地导致可变剪接的异常, 进而影响肿瘤的发生和预后<sup>[8]</sup>。

通常情况下, *IRF3*在一系列调节元素的作用下

通过剪切外显子2、3、6或多个外显子一并剪切,能够产生6种剪接蛋白,包括IRF3a、IRF3b、IRF3c、IRF3d、IRF3e和IRF3f<sup>[9]</sup>。IRF3a作为*IRF3*的可变剪接产物之一,是由*IRF3*基因外显子2被剪切后其余外显子拼接而成的蛋白<sup>[10]</sup>。在以往的研究中对于*IRF3a*在肺癌中的作用鲜有研究。在本研究中,我们首先收集了8例肺癌标本及其癌旁组织,通过实时定量PCR分析发现,*IRF3a*基因在肺癌组织中的表达高于癌旁组织,这与我们既往发现IRF3在肺癌组织中的高表达是一致的。但我们的标本量相对较少,对于其临床意义的研究还需进一步扩大样本数量。

在本研究中,我们从<https://www.genecards.org/>网站中获知*IRF3a*在外周血细胞中表达水平相对较高。由于*IRF3*具有多个剪接体转录本,并且各个剪接体之间多个外显子序列相似度极高<sup>[9]</sup>,这为引物的设计增加了很大难度,我们通过比对避开相似序列,以软件Primer Premier 5、Oligo 6为工具成功地设计出了*IRF3a*的引物1,最后通过PCR技术成功获取了*IRF3a*的mRNA。因为蛋白IRF3a是IRF3的剪接体,目前尚无IRF3a的特异性抗体,我们选择anti-IRF3抗体(ab50772, Abcam),是因为该抗体的抗氨基酸序列与蛋白IRF3a是一致的。因此,该抗体同样可以与蛋白IRF3a结合。

对于IRF3a在肿瘤细胞中的功能,既往研究都未涉及。本研究发现,该剪接体可能通过外源性凋亡通路促进肿瘤细胞的凋亡。这可能与IRF3的机制类似,主要涉及以下3个方面:(1)通过与TRAIL的启动子结合,激活外源性凋亡通路<sup>[11]</sup>;(2)激活肿瘤细胞自身的固有免疫,进而促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[12]</sup>;(3)维甲酸诱导基因I(retinoic acid-inducible gene I, *RIG-I*)诱导IRF3介导的凋亡,最终激活caspase9和caspase 3<sup>[13]</sup>。本研究进一步发现,STAT1的活化参与IRF3a诱导的肺癌细胞凋亡。STAT1的活化是干扰素信号通路中的重要环节,在细胞的炎症、免疫反应中发挥重要作用,它具有抗肿瘤以及促肿瘤的双重作用:一方面,它可以上调caspases、Bcl-2、Bcl-XL、p27、p21<sup>WAF</sup>表达,促进肿瘤细胞的凋亡;另一方面,激活的STAT1能促进细胞因子,如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, inos)等的表达,从而促进肿瘤的形成<sup>[14-15]</sup>。我们以前的研究发现,IRF3也能调节STAT1的激活,因此,在非小细胞肺癌中可变剪接体IRF3a的功能与

IRF3有相似的部分。但对于IRF3a更加完善的作用机制,还需更进一步探究。这将为揭示IRF3及其剪接体在肺癌细胞中的作用提供更加深入的认识。

## 参考文献 (References)

- [1] CHATTOPADHYAY S, SEN G C. RIG-I-like receptor-induced IRF3 mediated pathway of apoptosis (RIPA): a new antiviral pathway [J]. Protein Cell, 2017, 8(3): 165-8.
- [2] ROMIEU-MOURE R, SOLIS M, NARDIN A, et al. Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages [J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10576-85.
- [3] PALCHETTI S, STARACE D, DE CESARIS P, et al. Transfected poly(I:C) activates different dsRNA receptors, leading to apoptosis or immunoadjuvant response in androgen-independent prostate cancer cells [J]. J Biol Chem, 2015, 290(9): 5470-83.
- [4] KARPOVA A Y, HOWLEY P M, et al. Dual utilization of an acceptor/donor splice site governs the alternative splicing of the IRF-3 gene [J]. Gene Dev, 2000, 14(22): 2813-8.
- [5] DE MIGUEL F J, SHARMA R D, PAJARES M J, et al. Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer [J]. Cancer Res, 2014, 74(4): 1105-15.
- [6] PAN Q, SHAI O, LEE L J, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. Nat Genet, 2008, 40(12): 1413-5.
- [7] URBANSKI L M, LECLAIR N, ANCZUKOW O. Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018, 9(4): e1476.
- [8] CLIMENTE-GONZALEZ H, PORTA-PARDO E, GODZIK A, et al. The functional impact of alternative splicing in cancer [J]. Cell Rep, 2017, 20(9): 2215-26.
- [9] LI Y, HU X, SONG Y, et al. Identification of novel alternative splicing variants of interferon regulatory factor 3 [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1809(3): 166-75.
- [10] CLEMENT J F, BIBEAU-POIRIER A, GRAVEL S P, et al. Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association [J]. J Virol, 2008, 82(8): 3984-96.
- [11] KIRSHNER J R, KARPOVA A Y, KOPS M, et al. Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target [J]. J Virol, 2005, 79(14): 9320-4.
- [12] YI L, SUN D, HAN Q, et al. Interferon regulatory factor 3 mediates Poly(I:C)-induced innate immune response and apoptosis in nonsmall cell lung cancer [J]. Int J Oncol, 2018, 52(5): 1623-32.
- [13] CHATTOPADHYAY S, SEN G C. dsRNA-activation of TLR3 and RLR signaling: gene induction-dependent and independent effects [J]. J Interferon Cytokine Res, 2014, 34(6): 427-36.
- [14] VERHOEVEN Y, TILBORGH S, JACOBS J, et al. The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer [J]. Semin Caner Biol, 2019, 60: 41-56.
- [15] LI H, XING L, ZHAO N, et al. Furosin induced apoptosis by the regulation of STAT1/STAT2 and UBA7/UBE2L6 genes in HepG2 cells [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): pii: E1629.