

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002133

下调 *PKR* 基因对胰腺细胞 AR42J 增殖、凋亡的影响及机制

李 勇, 权 刚, 李孝琼, 肖云峰, 吴妮莎, 徐黎明, 周国俊, 李建水, 冷政伟

(川北医学院附属医院肝胆外科二, 南充 637000)

【摘要】目的:探讨下调 *PKR* 基因对大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 增殖、凋亡的影响及机制。**方法:**利用雨蛙素作用 AR42J 细胞建立急性胰腺炎细胞模型,在细胞模型中通过慢病毒载体下调 *PKR* 基因为实验组,对照病毒转染组为对照组。平板克隆形成和 CCK-8 法检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况,qRT-PCR 及流式细胞术分别检测核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路关键基因表达变化。**结果:**相较于对照组,实验组中 NF- κ B 通路关键基因 NF- κ B、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、iNOS 相对表达量为 0.45 ± 0.08 、 0.26 ± 0.05 、 0.51 ± 0.25 、 0.38 ± 0.04 , 相对表达下降($t=7.64$, $t=16.41$, $t=6.67$, $t=10.15$, 均 $P<0.05$);实验组细胞克隆数为 (275.33 ± 7.02) 个,对照组克隆数为 (36.00 ± 4.00) 个,克隆形成能力明显增强($t=51.29$, $P=0.00$);CCK-8 数据:在 24 h、48 h、72 h,实验组细胞增殖率为 $(25.00 \pm 3.00)\%$ 、 $(50.33 \pm 4.04)\%$ 、 $(62.33 \pm 4.51)\%$, 对照组为 $(12.33 \pm 1.53)\%$ 、 $(17.00 \pm 1.00)\%$ 、 $(24.00 \pm 2.00)\%$, 实验组增殖能力明显增强($t=6.52$, $t=13.87$, $t=13.46$, 均 $P<0.05$)。实验组和对照组中细胞早期凋亡率分别为 $(6.2 \pm 0.6)\%$ 和 $(13.4 \pm 0.9)\%$, 实验组凋亡明显减少($t=11.53$, $P=0.00$);晚期凋亡率分别为 $(4.1 \pm 0.2)\%$ 和 $(12.2 \pm 0.5)\%$, 实验组凋亡明显减少($t=26.05$, $P=0.00$)。**结论:**下调 *PKR* 基因可以抑制 NF- κ B 通路减缓细胞炎症反应,致 AR42J 细胞凋亡减少、增殖能力增强。

【关键词】急性胰腺炎; *PKR*; AR42J 细胞; NF- κ B 通路**【中图分类号】**R576**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-11-15Effect of down-regulating the *PKR* gene on the proliferation and apoptosis of pancreatic AR42J cells and its mechanism

Li Yong, Quan Gang, Li Xiaojiong, Xiao Yunfeng, Wu Nisha,

Xu Liming, Zhou Guojun, Li Jianshui, Leng Zhengwei

(Department of Hepatobiliary Surgery II, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of down-regulating the *PKR* gene on the proliferation and apoptosis of pancreatic AR42J cells and its mechanism. **Methods:** AR42J cells were treated with cerulein to establish an acute pancreatitis model, in which the cells with the down-regulated *PKR* gene mediated by a lentiviral vector were taken as experimental group, and the cells transfected with control virus were taken as control group. The cells were tested for proliferation by cell counting kit (CCK-8) and colony formation assay and for apoptosis by flow cytometry (FCM); the changes in the expression of key genes of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway were measured by both qRT-PCR and FCM. **Results:** Compared with the control group, the experimental group had significantly reduced relative expression of key genes [NF- κ B, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and iNOS] of the NF- κ B pathway (0.45 ± 0.08 , 0.26 ± 0.05 , 0.51 ± 0.25 , and 0.38 ± 0.04 , respectively, $t=7.64$, 16.41 , 6.67 , and 10.15 , respectively, all $P<0.05$); the experimental group had significantly enhanced colony formation ability than the control group (colony count: 275.33 ± 7.02 vs. 36.00 ± 4.00 , $t=51.29$, $P=0.00$); the result of CCK-8 assay showed a significantly enhanced cell proliferation ability in the experimental group compared with the control group, with the cell proliferation rates at 24 h, 48 h, and 72 h as $(25.00 \pm 3.00)\%$, $(50.33 \pm 4.04)\%$, and $(62.33 \pm 4.51)\%$, respectively, for the experimental group versus $(12.33 \pm 1.53)\%$, $(17.00 \pm 1.00)\%$, and $(24.00 \pm 2.00)\%$, respectively, for the control group ($t=6.52$, 13.87 , and 13.46 , respectively, all $P<0.05$). Compared with the control group, the experimental group had significantly reduced values in both early apoptosis rate [$(13.4 \pm 0.9)\%$ vs. $(6.2 \pm 0.6)\%$, $t=11.53$, $P=0.00$]

and late apoptosis rate [$(12.2 \pm 0.5)\%$ vs. $(4.1 \pm 0.2)\%$, $t=26.05$, $P=0.00$]. **Conclusion:** Down-regulating the *PKR* gene can slow down the cellular inflammatory response by suppressing the NF- κ B pathway, leading to reduced apoptosis and enhanced proliferation of AR42J cells.

【Key words】 acute pancreatitis; *PKR*; AR42J cell; NF- κ B pathway

作者介绍: 李 勇, Email: 182318962@qq.com,

研究方向: 肝胆胰脾的基础与临床研究。

通信作者: 冷政伟, Email: lengzhengwei@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81402444); 四川省科技厅资助项目 (编号: 2017JY0170, 2018JY0489)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190510.1501.030.html>

(2019-05-13)

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种以胰腺局部炎症和全身炎症反应为特征的急性炎症性疾病。轻症急性胰腺炎病程呈自限性,预后较好,重症急性胰腺炎临床病情凶险,病死率高^[1-2]。近年来研究发现细胞炎症改变在 AP 的发生发展过程中发挥关键作用。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路通过调节炎症因子、诱导酶、趋化因子等,在免疫、炎症、凋亡中发挥重要作用^[3]。在肿瘤研究中发现双链 RNA 依赖性蛋白激酶(double-stranded RNA-dependent kinase, PKR)能够激活 NF- κ B 信号通路导致炎症因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)释放导致细胞炎症损伤,且 PKR 高表达可直接导致细胞死亡^[4]。但是,PKR 是否通过介导 NF- κ B 信号通路活性导致胰腺腺泡细胞损伤研究较少。因此,本课题通过雨蛙素作用大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 建立 AP 细胞模型^[5],研究 PKR 是否通过介导 NF- κ B 信号通路影响 AR42J 细胞增殖、凋亡,并探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与细胞培养

大鼠胰腺腺泡细胞 AR42J 购自美国模式培养物集存库,使用含 10%胎牛血清(Hyclone 公司)的 MEN 培养基(Hyclone 公司),培养于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。取对数生长期细胞,含 100 nmol/L 雨蛙素(Sigma 公司)的培养基处理细胞进行后续研究。

1.2 CCK-8 法检测细胞增殖

分别取实验组和对照组细胞消化后以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,培养 72 h 后加 CCK-8 试剂并于 450 nm 波长处读取吸光度(absorbance, A)值,分别绘制生长曲线,计算细胞增殖率(%)=(A_{实验组}/A_{对照组}-1)×100%。

1.3 细胞半数抑制率

取 5×10^3 细胞/孔接种于 96 孔板中,使用含雨蛙素(10、30、50、70 nmol/L)培养基培养细胞 24 h 后加 10 μ L CCK-8 试剂并在 450 nm 波长处读取 A 值,绘制生长曲线,生长抑制率(%)=(1-A_{实验组}/A_{对照组})×100%,根据结果细胞经 IC₅₀ 雨蛙素浓度处理后,为模型进行后续研究。

1.4 平板克隆形成实验

参考课题组发表相关文章,检测细胞增殖能力差异^[6]。取 500 个细胞,用 6 mL 完全培养基悬浮后,培养于 6 孔板中,7 d 后 75%乙醇固定,结晶紫染色后照相获取数据并计数克隆数量进行后续统计。

1.5 慢病毒载体下调细胞中 PKR 基因

以感染复数为 30(感染复数=病毒活性单位/细胞数)的比例转染经雨蛙素处理后的 AR42J 细胞,转染时间为 6 h。转染方法参考课题组前期文章,被绿色荧光蛋白标记的慢病毒载体购自上海吉凯基因公司,转染 shPKR 慢病毒设为实验组;转染对照病毒设为对照组;根据慢病毒操作手册及预实验结果,收集 2 组细胞培养于上述 MEN 培养基中 2 d 后提取 mRNA,5 d 后提取蛋白质进行后续研究。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

采用 Annexin V-APC/PI 凋亡试剂盒检测(联科生物),消化离心收集 5×10^5 个细胞,细胞悬浮于 500 μ L 封闭液中,加入 5 μ L Annexin V-APC 及 10 μ L PI,室温下(15 °C~25 °C)避光孵育 5 min,上流式细胞仪(BD FACSVerse)行数据分析。

1.7 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

Trizol 法提取总 RNA 并逆转录为 cDNA,采用 SYBR Green 法检测相关基因 mRNA 表达,95 °C 预温处理 10 min,95 °C 变性 10 min 为一个扩增周期,40 个周期扩增后 60 °C 作用 10 s 退火,72 °C 作用 10 s 延伸。GAPDH 作为内参,mRNA 相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 表示。引物序列如下:PKR,正义链:5'-GAGGGCGACGAGATTTTAGGG-3',反义链:5'-CTGGCCA-TTTTCTCTCCCCG-3';IL-6,正义链:5'-TGCCCTCTTGGGA-CTGAT-3',反义链:5'-CTGGCTTTGCTCTTCTTGTTAT-3';TNF- α ,正义链:5'-CCACGCTCTTCTGTCTACTG-3',反义链:5'-GCTACGGGCTTGTCACCTC-3';COX-2,正义链:5'-ATGA-CTTCCCTGGGTTTGCT-3',反义链:5'-GTCCCCATTGTGG-TATCTG-3';NF- κ B,正义链:5'-TGTCCATGCAGCTTCGG-CGG-3',反义链:5'-GGCCGGGGTTTCAGTTGGTCC-3';iNOS,正义链:5'-GACCAAACTGTGTGCCTGGA-3',反义链:5'-TA-CTCTGAGGGCTGACACAAGG-3';GAPDH,正义链:5'-CTC-AACTACATGGTCTACATGTTCCA-3',反义链:5'-CTTCCCA-TCTCAGCCTTGACT-3'。

1.8 流式细胞术检测蛋白质表达

3×10^5 细胞使用 BD 穿膜液在室温下固定 30 min,然后分别与 NF- κ B p65(1/100,美国 CST#8242)、IL-6(1/100,美国 PeproTech#500-p73)、TNF- α (1/100,美国 PeproTech#500-p72)、iNOS(美国 Abcam# ab15323)一抗在 4 °C 避光下孵育 30 min;冷 PBS 洗涤后与 APC 标记的二抗(1:100,美国 eBioscience#A-10931)在 37 °C 下孵育 30 min;不添加一抗,直接与 1:100 二抗孵育设定为同型对照。冷 PBS 洗涤后细胞悬浮于 500 μ L PBS 中,上机检测。平均荧光强度比值与蛋白质表达量成正比,平均荧光强度比值=样本平均荧光强度/对应同型对照样本平均荧光强度。

1.9 激光共聚焦检测蛋白质定位

细胞爬片后 PBS 漂洗 1 次,4%多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 漂洗 1 次后使用 0.5% Triton-100 室温下作用

10 min 以通透细胞,加 5%山羊血清 4 ℃作用 1 h 后加入适量 1:400 NF- κ B 抗体后放入湿盒 4 ℃避光过夜,PBS 漂洗 3 次,加入 APC 标记 1:200 相应二抗,37 ℃避光孵育 30 min,PBS 漂洗 1 次后加入 DAPI 室温下作用 10 min 后使用激光共聚焦仪器检测。

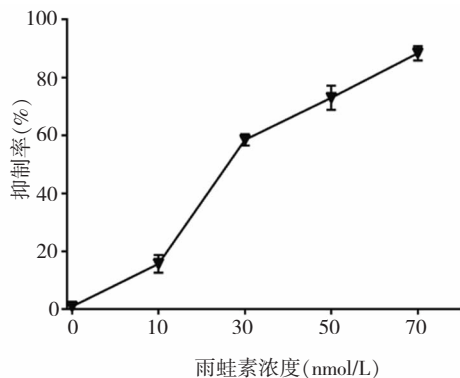
1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行分析。正态分布计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

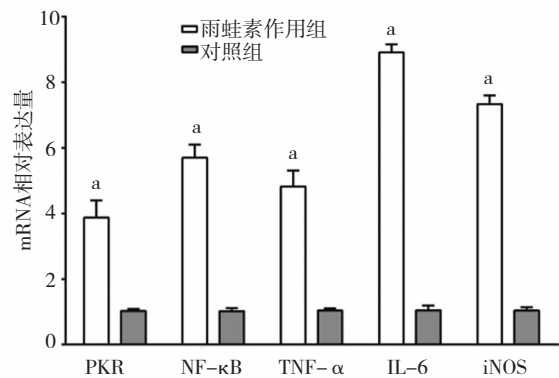
2 结果

2.1 雨蛙素作用 AR42J 细胞对相关基因表达影响

CCK-8 法检测数据后绘制生长曲线(图 1A),经 SPSS 计算半数抑制率(IC_{50})时雨蛙素浓度(25.4 nmol/L)组进行后续研究。而后 qRT-PCR 数据也显示(图 1B),与非处理组相比,雨蛙素作用组中 PKR、NF- κ B 及其介导的炎症通路关键基因 TNF- α 、IL-6、iNOS 的 mRNA 相对表达量分别为 3.87 ± 0.53 、 5.70 ± 0.40 、 4.82 ± 0.48 、 8.91 ± 0.26 、 7.34 ± 0.26 ,表达量明显升高(均 $P<0.05$)。



A. 雨蛙素作用后 AR42J 细胞生长曲线



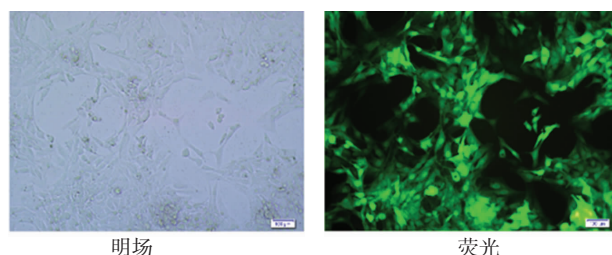
a: $P<0.05$, 实验重复 3 次

B. 雨蛙素对 PKR、NF- κ B 通路激活的影响

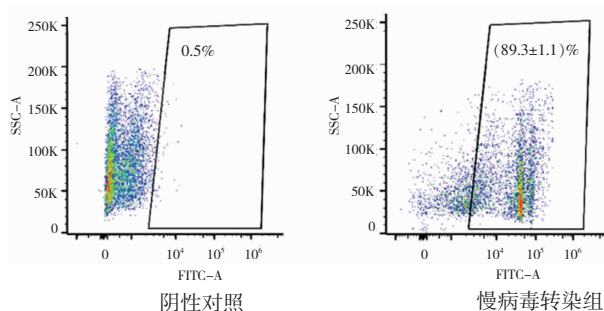
图 1 雨蛙素对细胞生长曲线及 PKR、NF- κ B 相关基因表达影响

2.2 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 慢病毒转染效率

将 25.4 nmol/L 雨蛙素作用 AR42J 细胞 24 h 后,转染 shPKR 慢病毒载体组为实验组,转染对照病毒组为对照组。首先采用激光共聚焦观察转染效率(慢病毒带绿色荧光蛋白)较高(图 2A);然后采用流式细胞术检测绿色荧光蛋白表达阳性率约为 $(88.8 \pm 1.1)\%$ (图 2B);qRT-PCR 数据显示,实验组、对照组 PKR mRNA 相对表达量分别为 0.41 ± 0.10 、 0.99 ± 0.12 ($t=6.67$, $P=0.00$);FCM 数据显示 2 组蛋白质相对表达量为 1.32 ± 0.07 、 5.87 ± 0.26 ,均具有统计学差异 ($t=29.72$, $P=0.00$),提示转染效率较高,能够满足后续研究需要。



A. 激光共聚焦观察慢病毒转染后绿色荧光蛋白表达



B. 流式细胞术检测细胞阳性率

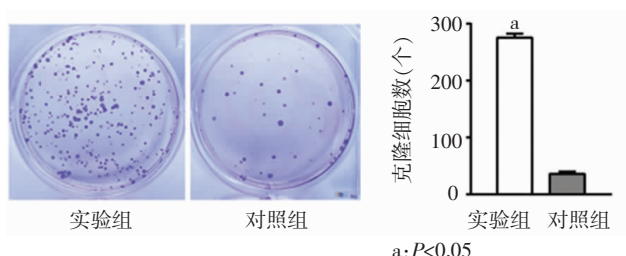
图 2 慢病毒转染效率测定

2.3 PKR 下调对细胞增殖能力的影响

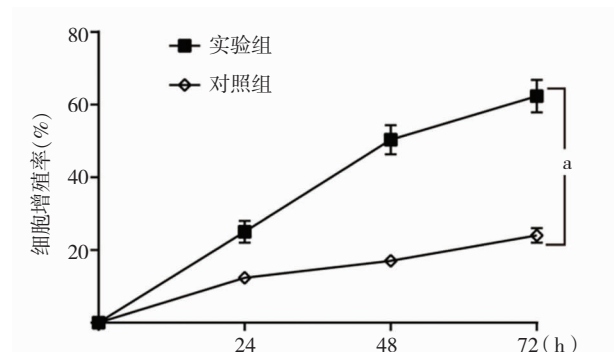
平板克隆形成实验结果显示(图 3A),实验组和对照组细胞克隆数量分别为 (275.33 ± 7.02) 个和 (36.00 ± 4.00) 个,2 组有明显差异 ($t=51.29$, $P=0.00$)。与平板克隆形成实验结果相吻合,CCK-8 实验结果显示(图 3B),下调 PKR 基因 24 h、48 h、72 h 后,实验组细胞增殖率为 $(25.00 \pm 3.00)\%$ 、 $(50.33 \pm 4.04)\%$ 、 $(62.33 \pm 4.51)\%$,对照组为 $(12.33 \pm 1.53)\%$ 、 $(17.00 \pm 1.00)\%$ 、 $(24.00 \pm 2.00)\%$,实验组增殖能力明显增强 ($t=6.52$, $t=13.87$, $t=13.46$, 均 $P<0.05$)。以上数据提示,PKR 下调后可逆转雨蛙素对细胞增殖能力的抑制作用。

2.4 PKR 下调对细胞凋亡的影响

FCM 数据显示(图 4),实验组和对照组中细胞早期凋亡率分别为 $(6.2 \pm 0.6)\%$ 和 $(13.4 \pm 0.9)\%$,差异有统计学意义 ($t=11.53$, $P=0.00$);晚期凋亡率分别为 $(4.1 \pm 0.2)\%$ 和 $(12.2 \pm 0.5)\%$,差异有统计学意义 ($t=26.05$, $P=0.000$)。提示 PKR 下调后可逆转雨蛙素导致的细胞凋亡。

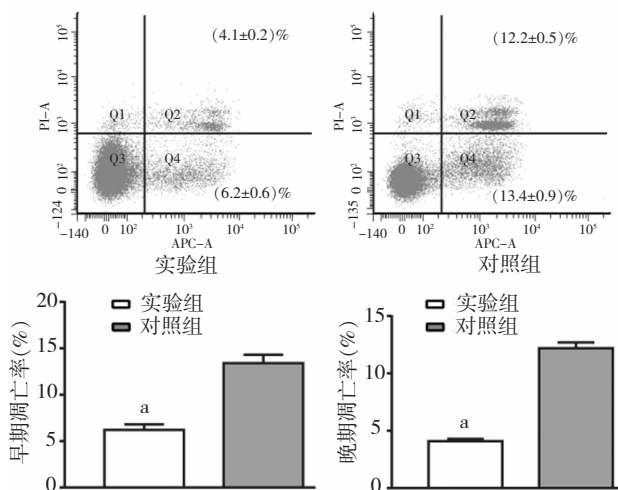


A. 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力变化

a: $P<0.05$, 实验重复 3 次

B. CCK-8 观察细胞增殖能力变化

图 3 PKR 下调对细胞克隆形成及增殖能力的影响



流式细胞术检测细胞凋亡实验显示,实验组中 PKR 下调后,细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率均明显下降; a: $P<0.05$, 实验重复 3 次

图 4 PKR 下调对细胞凋亡的影响

2.5 PKR 下调对细胞中 NF- κ B 介导的炎症通路关键基因表达的影响

为进一步研究 PKR 下调对 AR42J 细胞增殖及凋亡影响的分子机制,通过 qRT-PCR 及 FCM 分别检测了 NF- κ B 介导的炎症通路关键基因。qRT-PCR 数据显示(图 5A),实验组和对照组 NF- κ B 及 TNF- α 、IL-6、iNOS 的 mRNA 相对表达量分别为 0.45 ± 0.08 、 0.26 ± 0.05 、 0.51 ± 0.25 、 0.38 ± 0.04 和 1.02 ± 0.1 、 1.04 ± 0.07 、 1.05 ± 0.14 、 1.03 ± 0.10 ($t=7.64$, $t=16.41$, $t=6.67$, $t=10.15$, 均 $P<0.05$)。通过 FCM 检测细胞中蛋

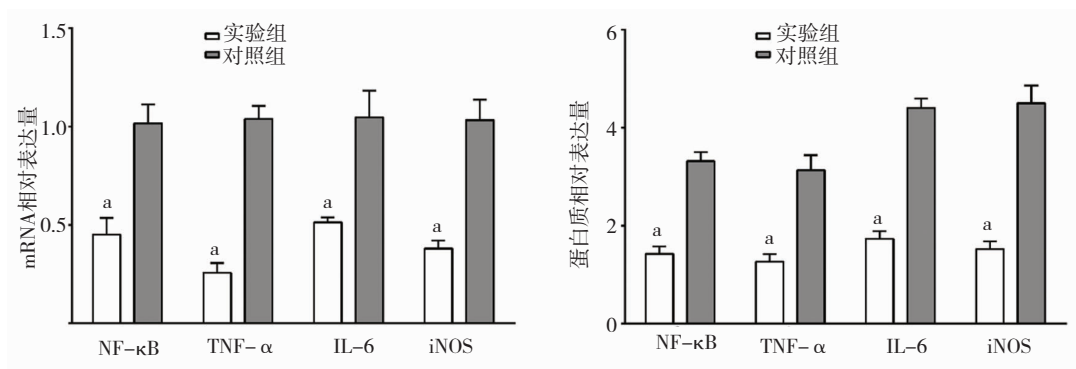
白质的表达,发现实验组、对照组中上述基因蛋白质相对表达量分别为 1.42 ± 0.15 、 1.27 ± 0.15 、 1.73 ± 0.15 、 1.52 ± 0.16 和 3.32 ± 0.19 、 3.13 ± 0.31 、 4.4 ± 0.2 、 4.5 ± 0.36 ($t=13.63$, $t=9.47$, $t=18.35$, $t=13.07$, 均 $P<0.05$) (图 5A)。激光共聚焦显示 NF- κ B 蛋白由主要表达于核内转移表达于细胞质中(图 5B)。以上数据显示,PKR 下调可导致 AR42J 细胞中 NF- κ B 介导的炎症通路受到明显抑制。

3 讨论

AP 为最常见的外科急腹症之一,以胰腺局部炎症和全身炎症反应为主要临床表现,其中重症急性胰腺炎常伴有胰腺及周围组织坏死,临床病情凶险,病死率高^[1]。近年来研究发现,细胞炎症改变在 AP 的发生发展过程中发挥关键作用,炎症反应及胰腺实质细胞死亡是导致疾病进展的主要原因。同时诸多通路和基因调控参与调控了胰腺细胞损伤、死亡过程,如 Fu 等^[7]发现 miR-29/TNFRSF1A 通路介导了胰腺细胞的凋亡;JNK/Egr-1 通路及 p38 MAPK 介导的细胞损伤通路参与了胰腺细胞损伤进程^[8]。Xie 等^[9]也发现 TNIP2 高表达可以抑制 NF- κ B 信号通路活性,从而保护胰腺细胞 AR42J 功能。其中核转录因子 κ B 通路在胰腺细胞损伤、细胞死亡过程中发挥关键作用^[9-10]。

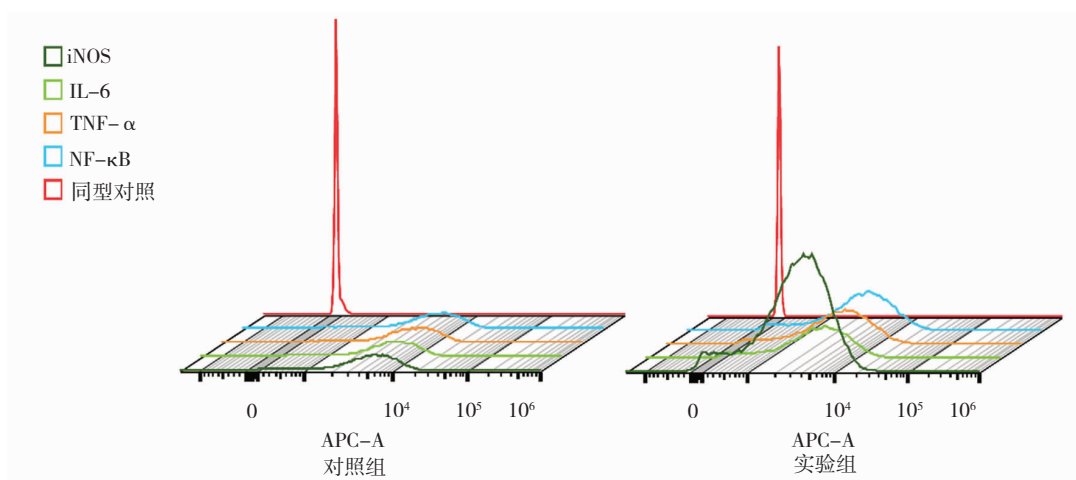
NF- κ B 非激活状态下主要定位于细胞质中,受激活因子激活后 NF- κ B 进入核内,激活下游的炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-6、iNOS、IL-8 等,导致细胞损伤及 AP 进展^[11-12]。在肿瘤研究中发现双链 RNA 依赖性蛋白激酶 PKA 对 NF- κ B 通路信号转录和转导过程中发挥调控作用,且 PKR 高表达可以导致细胞死亡,而细胞死亡是导致 AP 及进展的最关键因素之一。但 PKR 是否通过介导 NF- κ B/炎症反应信号通路活性导致胰腺腺泡细胞损伤研究较少,故开展本研究以明确 PKR 在 AP 进展过程中的具体作用及分子机制。

首先通过雨蛙素作用大鼠胰腺腺泡 AR42J 细胞建立 AP 的细胞损伤研究模型^[5,13-14],AR42J 为小鼠胰腺腺泡细胞,被大量应用为研究急性胰腺炎的细胞模型。如 Fu 等^[15]在 AR42J 细胞中研究 miR-22 在胰腺细胞凋亡中的作用和机制;雨蛙素也是最常用于诱导 AP 细胞模型的药物^[3]。本研究发现 PKR、NF- κ B 及其介导的炎症通路关键基因 TNF- α 、IL-6、iNOS 均高表达,提示 PKR 很可能通过介导 NF- κ B/

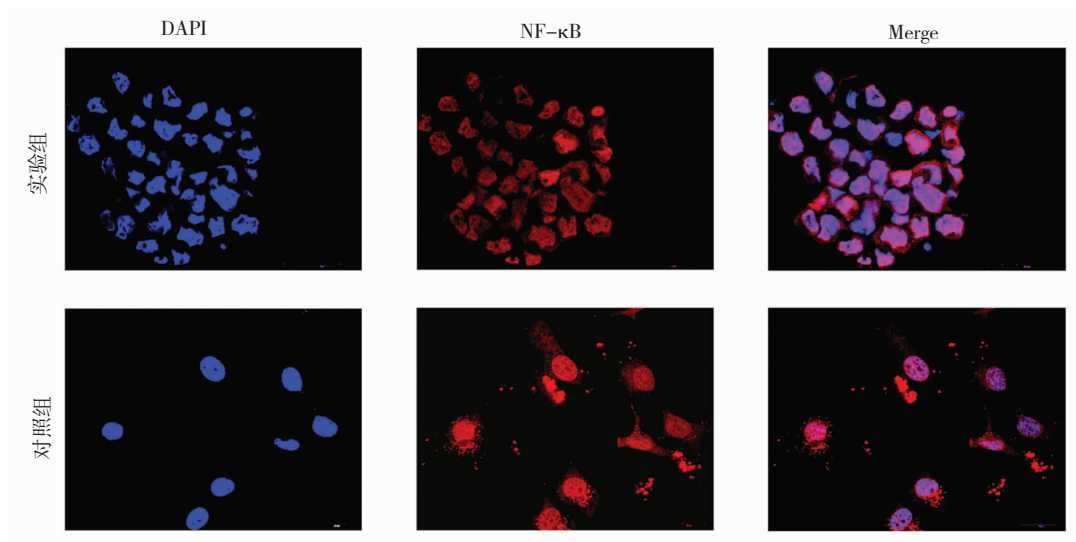


a: $P < 0.05$, 实验重复 3 次

A. qRT-PCR 检测细胞中 NF-κB 通路 mRNA 表达变化



B. 流式细胞术检测细胞中 NF-κB 通路蛋白质表达变化



C. 激光共聚焦检测 NF-κB 蛋白表达位置变化 (Bar=30 μm)

图 5 PKR 下调对细胞中 NF-κB 介导的炎症通路关键基因表达的影响

炎症通路导致细胞损伤及死亡。研究报道 TNF-α 在急性胰腺炎相关的细胞凋亡及炎症反应过程中发挥重要作用^[16]。IL-6 已经被证实高表达于 AP 实

验模型和患者体内,且其表达水平高低与 AP 的严重程度成正相关^[17],阻断 IL-6 表达可以减轻小鼠胰腺炎的严重程度。彭艳等^[18]研究也证实胰腺炎患者

TNF- α 、IL-6 降低,能够降低 BISAP 评分,并且能改善 SAP 患者的症状和转归。Pérez 等^[3]研究也证明 IL-6 在急性胰腺炎老鼠体内高表达,随着 PGC-1 α 基因下调,NF- κ B p65 蛋白在核内表达聚集导致 NF- κ B 通路激活,证明在 AP 中 NF- κ B 激活可以直接上调 IL-6 表达,最终导致严重炎症反应和胰腺损伤。本研究在建立的细胞损伤模型中下调 PKR 基因,发现下调 PKR 能够导致细胞增殖及克隆形成能力增加,流式细胞术发现细胞凋亡明显减少。

为了进一步探讨下调 PKR 导致细胞凋亡减少、增殖及克隆形成能力增加的分子机制,采用 qRT-PCR 检测其介导的炎症通路关键基因 TNF- α 、IL-6、iNOS 的 mRNA 表达,流式细胞术检测了 NF- κ B 蛋白质的表达,且通过激光共聚焦检测了 NF- κ B 表达位置的变化,以反映 NF- κ B 信号通路激活的情况。传统的 Western blot 检测蛋白质技术操作流程相对简单,对实验设备要求不高,所需细胞数为 $(1\sim 2) \times 10^6$ 个细胞/样本,完成实验时间 2~3 d。本研究所采用的流式细胞术检测蛋白质技术具有检测精度高、时间短(3 h 内)、所需细胞数少(1×10^5 个细胞/2 样本),其检测结果可靠性并不亚于 Western blot 技术^[19-20]。

数据显示伴随着 PKR 下调导致细胞凋亡减少、增殖及克隆形成能力增加的同时,细胞中 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、iNOS 表达均明显下降,NF- κ B 表达主要由细胞核内迁移到细胞质中,提示 NF- κ B 通路受到抑制。综上所述,本研究提示下调 PKR 能够抑制 NF- κ B 信号通路介导的 TNF- α 、IL-6、iNOS 炎症因子的释放,减轻细胞损伤、增强细胞克隆增殖能力。

参 考 文 献

- [1] Buxbaum J,Quezada M,Chong B,et al. The pancreatitis activity scoring system predicts clinical outcomes in acute pancreatitis: findings from a prospective cohort study[J]. *Am J Gastroenterol*,2018,113(5): 755-764.
- [2] 王 强,杜 涛,丁 雄. 早期进食与标准时机进食治疗急性胰腺炎效果的系统评价[J]. *重庆医科大学学报*,2016,41(3):292-297.
- [3] Pérez S,Rius-Pérez S,Finamor I,et al. Obesity causes Pgc-1 α deficiency in the pancreas leading to marked Il-6 up-regulation via NF- κ B in acute pancreatitis[J]. *J Pathol*,2019,247(1):48-59.
- [4] Gil J,Alcami J,Esteban M. Activation of NF- κ B by the dsRNA-dependent protein kinase,PKR involves the I κ B kinase complex[J]. *Oncogene*,2000,19(11):1369-1378.
- [5] Cai Y,Shen Y,Xu G,et al. TRAM1 protects AR42J cells from caerulein-induced acute pancreatitis through ER stress-apoptosis pathway[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*,2016,52(5):530-536.
- [6] Leng Z,Xia Q,Chen J,et al. Lgr5+CD44+EpCAM+ strictly defines cancer stem cells in human colorectal cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,46(2):860-872.
- [7] Fu Q,Qin T,Chen L,et al. miR-29a up-regulation in AR42J cells contributes to apoptosis via targeting TNFRSF1A gene[J]. *World J Gastroenterol*,2016,22(20):4881-4890.
- [8] Sandoval J,Pereda J,Perez S,et al. Epigenetic regulation of early- and late-response genes in acute pancreatitis[J]. *J Immunol*,2016,197(10):4137-4150.
- [9] Xie H,Yang M,Zhang B,et al. Protective role of TNIP2 in myocardial injury induced by acute pancreatitis and its mechanism[J]. *Med Sci Monit*,2017,23:5650-5656.
- [10] Liu Y,Chen XD,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.
- [11] Ghosh S,Hayden MS. Celebrating 25 years of NF- κ B research[J]. *Immunol Rev*,2012,246(1):5-13.
- [12] Jakkampudi A,Jangala R,Reddy BR,et al. NF- κ B in acute pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential[J]. *Pancreatology*,2016,16(4):477-488.
- [13] 张雪良,徐子琴,熊建华. spautin-1 对雨蛙素诱导的急性胰腺炎 AR42J 细胞凋亡及自噬的影响[J]. *中华胰腺病杂志*,2018,18(4): 247-250.
- [14] 张 旭,付 强,秦 涛,等. 长链非编码 RNA RGD1566401 在大鼠急性胰腺炎中对外分泌细胞凋亡的作用[J]. *中华实验外科杂志*,2018,35(1):100-102.
- [15] Fu Q,Liu CJ,Zhang X,et al. Glucocorticoid receptor regulates expression of microRNA -22 and downstream signaling pathway in apoptosis of pancreatic acinar cells[J]. *World J Gastroenterol*,2018,24(45):5120-5130.
- [16] Shi C,Hou C,Zhu X,et al. SRT1720 ameliorates sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis in rats by suppressing NF- κ B signalling[J]. *Biomed Pharmacother*,2018,108:50-57.
- [17] Chao KC,Chao KF,Chuang CC,et al. Blockade of interleukin 6 accelerates acinar cell apoptosis and attenuates experimental acute pancreatitis in vivo[J]. *Br J Surg*,2006,93(3):332-338.
- [18] 彭 艳,王学虎,周发春,等. 大黄灌肠对重症急性胰腺炎患者血清高迁移率族蛋白 B1/PCT、IL-6、TNF- α 的影响[J]. *重庆医科大学学报*,2017,42(9):1166-1170.
- [19] Bardet V,Tamburini J,Ifrah N,et al. Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry[J]. *Haematologica*,2006,91(6):757-764.
- [20] Grafone T,Palmisano M,Nicci C,et al. Monitoring of FLT3 phosphorylation status and its response to drugs by flow cytometry in AML blast cells[J]. *Hematol Oncol*,2008,26(3):159-166.

(责任编辑:冉明会)