

# RNA干扰介导的I $\kappa$ B蛋白激酶 $\alpha$ 及 $\gamma$ 基因沉默对巨噬细胞分泌细胞因子的影响

陈海龙, 李海龙, 李宏, 刘佳, 贺雪梅

## ■背景资料

自从1998年Fire *et al*首次发现并命名RNAi以来, 该技术已经被广泛应用于多种细胞系中结构蛋白、核转录因子、功能调节及关键蛋白功能多样性等研究领域。

陈海龙, 李海龙, 大连医科大学附属第一医院普外科 辽宁省大连市 116011

李宏, 刘佳, 大连医科大学 辽宁省大连市 116023

贺雪梅, 大连铁路卫生学校 辽宁省大连市 116001

陈海龙, 医学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事胆胰疾病的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30271667

通讯作者: 陈海龙, 116011, 辽宁省大连市中山路222号, 大连医科大学附属第一医院普外科, hailongchen2006@126.com

电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631284

收稿日期: 2007-02-23 修回日期: 2008-11-11

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2008-12-28

## Effect of expression silencing of NF- $\kappa$ B in RAW264.7 macrophages on secretory cytokines in systemic inflammatory response syndrome

Hai-Long Chen, Hai-Long Li, Hong Li, Jia Liu, Xue-Mei He

Hai-Long Chen, Hai-Long Li, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Hong Li, Jia Liu, Department of Gastroenterology, Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China

Xue-Mei He, Dalian Railway Health School, Dalian 1160001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30271667

Correspondence to: Dr. Hai-Long Chen, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. hailongchen2006@126.com

Received: 2007-02-23 Revised: 2008-11-11

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2008-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the potential effect of IKK activation on expression of inflammatory cytokines in macrophage over-activation in systemic inflammatory response syndrome.

**METHODS:** RNAi was used to assess the role of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  and  $\gamma$  in LPS-induced NF- $\kappa$ B activation and expression of downstream cytokines in RAW264.7 macrophages.

**RESULTS:** IKK $\alpha$  and IKK $\gamma$  were markedly down-regulated in macrophages following RNA interference treatment while no obvious changes in IKK $\alpha$  and IKK $\gamma$  expression were noted in control group. After LPS activation, expressions of IKK $\alpha$  and IKK $\gamma$  increased with time. Silenced IKK $\alpha$  and IKK $\gamma$  resulted in down-regulation in such relevant genes as TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-10, and I $\kappa$ B $\alpha$ .

**CONCLUSION:** The current studies demonstrate multiple functions of I $\kappa$ B kinases in activating NF- $\kappa$ B signal pathway and in regulating expressions of inflammatory cytokines induced by LPS in RAW264.7 macrophages. Drugs targeting the IKK $\alpha$  and IKK $\gamma$  interaction may be of clinical significance for inflammation regulation.

**Key Words:** Gene silencing; RNA interference; Nuclear factor- $\kappa$ B; I $\kappa$ B kinases; Lipopolysaccharides; Inducible nitric oxide synthase; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Interleukin-10; Macrophages

Chen HL, Li HL, Li H, Liu J, He XM. Effect of expression silencing of NF- $\kappa$ B in RAW264.7 macrophages on secretory cytokines in systemic inflammatory response syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(36): 4056-4061

## 摘要

**目的:** 探讨I $\kappa$ B蛋白激酶 $\alpha$ 及 $\gamma$ 基因沉默对巨噬细胞分泌的NF- $\kappa$ B依赖性的下游炎症因子表达的影响。

**方法:** 应用RNA干扰技术将I $\kappa$ B蛋白激酶 $\alpha$ 及 $\gamma$ 基因沉默后, 观察RAW264.7小鼠巨噬细胞经LPS刺激后, NF- $\kappa$ B的活化以及多种NF- $\kappa$ B依赖性的下游炎症因子的表达。

**结果:** RNA干扰处理后RAW264.7巨噬细胞中IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因表达出现明显下调, 而对对照组中IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因表达无明显变化。经LPS刺激活化, IKK $\alpha$ 和IKK $\gamma$ 表达随作用时间逐渐增强。IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因沉默后, 可导致TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-10、I $\kappa$ B $\alpha$ 等多种炎症相

## ■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

关基因表达的明显下调。

**结论:** IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 两种蛋白激酶参与NF- $\kappa$ B信号通路的调节, NF- $\kappa$ B信号通路的活化是全身性炎症反应的中心环节。

**关键词:** 基因沉默; RNA干扰; 核因子- $\kappa$ B; I $\kappa$ B激酶; 脂多糖; 诱生性一氧化氮合酶; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白介素-10; 巨噬细胞

陈海龙, 李海龙, 李宏, 刘佳, 贺雪梅. RNA干扰介导的I $\kappa$ B蛋白激酶 $\alpha$ 及 $\gamma$ 基因沉默对巨噬细胞分泌细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(36): 4056-4061

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/4056.asp>

## 0 引言

核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)被认为在细胞应对多种胞外刺激过度活化时的信号传递过程中发挥着十分重要的作用<sup>[1]</sup>。静息状态下, NF- $\kappa$ B与抑制蛋白I $\kappa$ B结合, 以无活性的形式存在于胞质内。当细胞受内毒素、肿瘤坏死因子等外界信号刺激后, I $\kappa$ B在蛋白激酶IKK的作用下发生磷酸化降解, NF- $\kappa$ B迅速移位到细胞核, 与特异性 $\kappa$ B序列结合, 诱导TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、化学因子、黏附分子、集落刺激因子、COX-2、诱生性一氧化氮合酶等相关基因转录<sup>[2-3]</sup>, 引发全身炎症反应, 甚至发展成急性肺损伤(acute lung injury, ALI)、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。因此, 通过抑制NF- $\kappa$ B的过度活化进而降低由内毒素或细胞因子引起的炎症病理损害将是十分理想的治疗手段。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是最近发展起来的抑制特定基因产物表达的有效方法<sup>[4-5]</sup>。是一种由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子在mRNA水平上关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程。siRNA(small interfering, RNAs)就是这种短片段双链RNA分子, 其来源于长双链RNA(dsRNA)的酶切降解, 能够以序列同源互补的mRNA为靶目标, 降解特定的mRNA<sup>[6]</sup>, 是目前研究基因调控的重要手段。我们应用RNA干扰技术特异性地将NF- $\kappa$ B信号通路中的IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因沉默, 探究RAW264.7巨噬细胞经LPS刺激后NF- $\kappa$ B的活性及炎症细胞因子表达的变化, 进而为临床上全身炎症反应性疾病的靶向治疗提供实验基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7购于中

国科学院上海细胞所; Silencer siRNA Cocktail Kit(RNase III, Ambion, USA)试剂盒购自美国Ambion公司; RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7细胞用含100 mL/L胎牛血清、0.2% NaHCO<sub>3</sub>和0.3% HEPES的DMEM培养液(Gibco Life Science, USA), 加青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L, 在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>和100%湿度的孵箱中培养至对数生长期。用2.5 g/L胰蛋白酶和0.04% EDTA的无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的PBS混合液消化处理细胞, 重悬细胞于培养液中, 进行细胞计数, 调整细胞密度, 以2 $\times$ 10<sup>8</sup>/L的密度分装到含有培养液(pH7.2)的细胞培养皿中, 混匀, 将细胞悬液均匀铺在培养皿中。本实验中, 以1 $\times$ 10<sup>9</sup>/L的密度将细胞接种于60 mm培养板(NUNC, Denmark)中, 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养24 h。用于RNA干扰和转染的细胞, 先与转染试剂/短链RNA复合物共同作用48 h, 然后给予LPS(10 mg/L)刺激, 于不同时间点收集细胞低温保存。去离子水稀释LPS(serotype 055: B5, Sigma, USA)至储存浓度为0.5 g/L, 分装后存放于-20℃。本实验共分为12组, 每组5个培养皿: Group N<sub>0</sub>: RAW264.7巨噬细胞正常培养组; Group N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>: 给予LPS(10 mg/L)刺激, 作用30 min, 2 h; Group A<sub>0</sub>: 细胞与转染试剂/IKK $\alpha$  siRNA混和物作用48 h; Group A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: 细胞经转染及IKK $\alpha$ 干扰处理后, 给予LPS(10 mg/L)刺激分别作用30 min, 2 h; Group B<sub>0</sub>: 细胞与转染试剂/IKK $\gamma$  siRNA混和物作用48 h; Group B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>: 细胞经转染及IKK $\gamma$ 干扰处理后, 给予LPS(10 mg/L)刺激分别作用30 min, 2 h; Group C<sub>0</sub>: 细胞与转染试剂/IKK $\alpha$  & IKK $\gamma$  siRNA混和物作用48 h; Group C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: 细胞经转染及IKK $\alpha$  & IKK $\gamma$ 同时干扰处理后, 给予LPS (10 mg/L)刺激分别作用30 min, 2 h; 于不同作用时间点收集的样本分装后-80℃保存。

1.2.2 RAW264.7巨噬细胞核蛋白的提取: 参照文献[7]方法进行。倒去细胞培养液, 用PBS洗两次, 用刮板将细胞刮下, 收集于适当体积离心管, 4℃离心5 min, 使细胞沉淀。弃上清, 加入200  $\mu$ L冷缓冲液A(10 mmol/L HEPES-KOH pH7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L dithiothreitol, 0.5 mmol/L PMSF, 5 mg/L leupeptin, 5 mg/L aprotinin, 10 mg/L soybean trypsin inhibitor and 1 mg/L of pepstatin), 冰浴10 min, 振荡10 s, 混匀。离心10 s, 上清即为胞

### ■ 相关报道

研究普遍认为, TNF- $\alpha$ 不仅为一类炎症效应因子, 具有促炎作用; 同时还是巨噬细胞活化的炎症诱导因子, 在炎症的“级联瀑布”过程发挥着至关重要的作用。

## ■应用要点

本研究进一步明确了蛋白激酶IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 对NF- $\kappa$ B信号通路活化和相关炎症细胞因子表达调节的分子机制。

表 1 TNF- $\alpha$ 、IL-10、iNOS、IKK $\alpha$ 、IKK $\gamma$ 及内对照 $\beta$ -actin引物序列

检测项目	上游引物	下游引物	扩增片段(bp)
TNF- $\alpha$	5'-GCGACGTGGAAGTGGCAGAAG-3'	5'-GGTACAACCCATCGGCTGGCA-3'	372
IL-10	5'-GCTATGCTGCCTGCTCTTAC-3'	5'-CTGGGGCATCACTTCTACC-3'	274
iNOS	5'-CTGCAGGTCTTTGACGCTCGG-3'	5'-GTGGAACACAGGGGTGATGCT-3'	741
IKK $\alpha$	5'-GCAGACCGTGAACATCCTCT-3'	5'-TCCAGGACAGTGAACGAGTG-3'	202
IKK $\gamma$	5'-GGTGGAGAGACTGAGCTTGG-3'	5'-CTAAGCTTGCCGATCCTTG-3'	203
$\beta$ -actin	5'-GCATGGAGTCCTGTGGCAT-3'	5'-CTAGAAGCATTTCGGTGG-3'	324

浆提取物,分装后-70℃保存。沉淀中加入20  $\mu$ L冷缓冲液B(20 mol/L HEPES-KOH pH7.9, 25% glycerol, 420 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L dithiothreitol, 0.5 mmol/L PMSF, 5 mg/L leupeptin, 5 mg/L aprotinin, 10 mg/L soybean trypsin inhibitor and 1 mg/L of pepstatin),冰浴20 min。4℃离心2 min,弃沉淀。上清即为核提取物,分装后-80℃保存。

1.2.3 siRNA的设计与制备过程: siRNA的制备过程严格按照Ambion公司Silencer siRNA Cocktail Kit(RNase III, Ambion, USA)试剂盒操作说明进行。简言之,设计5'端具有T7启动子对应序列的DNA模板,经单独的转录反应合成dsRNA。携带T7启动子序列的IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 的上游引物分别为: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG GCA GAC CGT GAA CAT CCT CT-3', 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG GGT GGA GAG ACT GAG CTT GG-3'; 下游引物为: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG TCC AGG ACA GTG AAC GAG TG-3', 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG CTA AAG CTT GCC GAT CCT TG-3'。

1.2.4 siPORT Lipid方法转染细胞: 转染过程严格按照Ambion公司siPORT Lipid(Ambion, USA)试剂盒操作。简言之,转染前24 h将细胞接种于培养板内正常培养(DMEM, 100 mL/L FBS),直至达到70%汇片,4  $\mu$ L of siPORT Lipid+DMEM reduced serum medium,总体积15  $\mu$ L体系; 5  $\mu$ L of siRNA(25 nmol/L)+DMEM reduced serum medium,总体积185  $\mu$ L体系。将稀释好的siRNA加入稀释好的siPORT Lipid中,轻轻混匀,室温作用20 min。先加入新鲜DMEM培养液800  $\mu$ L至培养孔中,将转染试剂/siRNA混合物加入孔内,正常培养条件下,孵育4 h。每孔加入5 mL新鲜正常培养液(DMEM, 100 mL/L FBS),转染48 h后检测干扰效果。

1.2.5 RNA的提取及RT-PCR: 常规TRIzol法(Life Technology, USA)提取各标本的总RNA, CRAY-

50(Varian Inc, Australia)紫外分光光度仪对其浓度加以测定,10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完好性。反转录体系20  $\mu$ L,包含样品RNA 3  $\mu$ L,依照TaKaRa RNA LA PCR Kit试剂盒提供说明书进行操作,反应条件为: 55℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min; PCR反应体系15  $\mu$ L,包含反转录液2.4  $\mu$ L。PCR反应条件为94℃预变性5 min; 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s, 循环35次; 72℃延伸7 min, 4℃恒定。取出扩增产物直接加入3  $\mu$ L 6倍溴酚蓝载样缓冲液混匀,性10 g/L琼脂糖凝胶电泳,在紫外透射仪下数码成像。TNF- $\alpha$ 、IL-10、iNOS、IKK $\alpha$ 、IKK $\gamma$ 及内对照 $\beta$ -actin引物序列见表1。

1.2.6 Western印迹分析: 参照文献[8]方法进行。用紫外分光光度仪(Cary 50, Varian Inc, Australia)测定各蛋白样品的浓度。煮沸变性后,以每孔120  $\mu$ g的蛋白含量点样,经100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。通过电转仪将凝胶上蛋白样品移至PVDF膜(Amersham, UK)上,分别与1:1000稀释度的兔抗小鼠TNF- $\alpha$ 、IL-10、iNOS多克隆抗体(Santa Cruz, CA, USA)和1:3000稀释度的辣根酶标记山羊抗兔抗体(Dako, Denmark)孵育。应用增强的化学放射发光法(ECL, Roche, Diagnostics Corporation, Indianapolis, In USA)标记结合信号,通过荧光自显影感光在Kodak XAY胶片上。同一蛋白样品按照相同蛋白上样量及上样顺序经SDS-PAGE电泳分离后用考马斯亮蓝染色作为内对照。本实验中PVDF膜至少重复使用2次,方法如下: 首先预热洗脱液(100 mmol/L 2-Mercaptoethanol, 20 g/L SDS, 1 mol/L Tris-HCl pH6.8)至55℃,然后将膜放入其中,55℃水浴箱内,间歇震荡30 min,随后封闭(5% milk powder in TBS-T)过夜,再重复上述的杂交操作步骤。

统计学处理 所有数据以mean $\pm$ SD表示,采用SPSS11.5统计分析软件进行处理,组间比较采用方差分析和t检验, $P<0.05$ 为具有统计学意义。



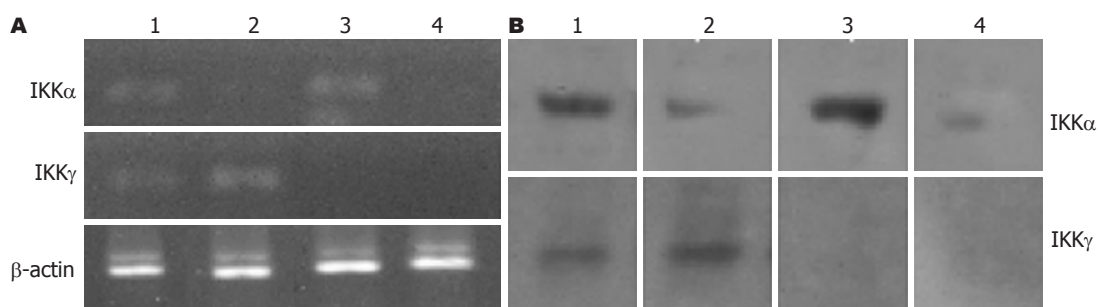


图 1 RAW264.7巨噬细胞中IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因表达. 1: RAW264.7 cells; 2: si-IKK $\alpha$ ; 3: si-IKK $\gamma$ ; 4: si-IKK( $\alpha$ & $\gamma$ ).

#### 同行评价

本文主要探究RAW264.7巨噬细胞经LPS刺激后NF- $\kappa$ B的活性及炎症细胞因子表达的变化,进而为临床上全身炎症反应性疾病的靶向治疗提供实验基础.

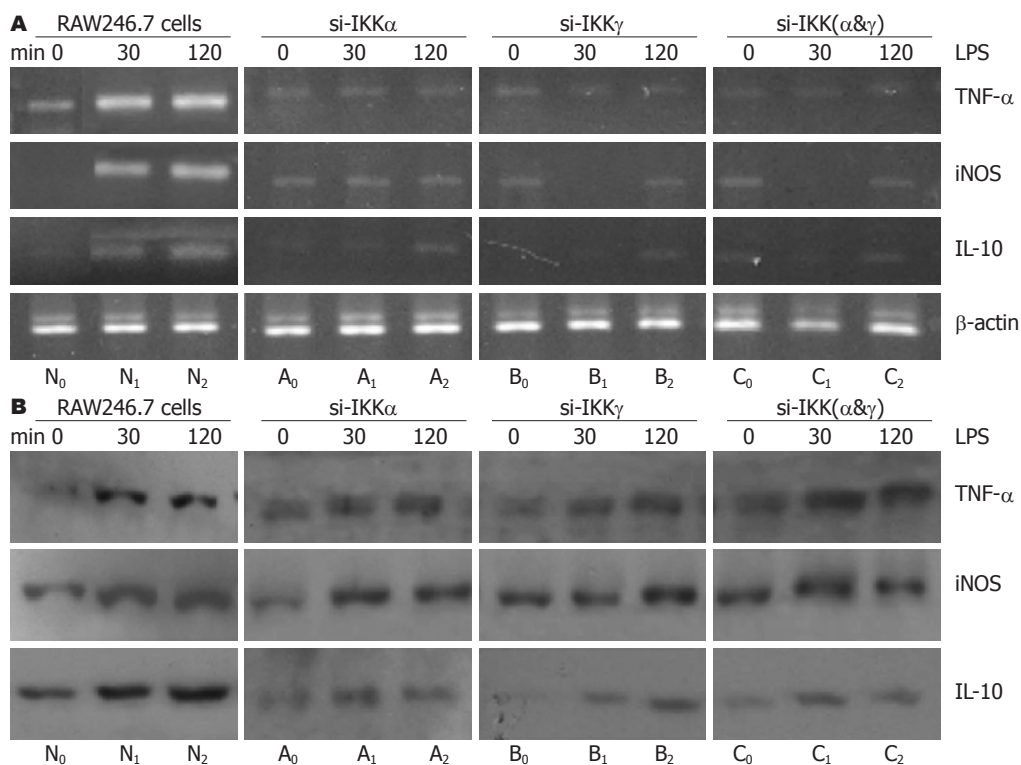


图 2 RAW264.7巨噬细胞中TNF- $\alpha$ 、iNOS和IL-10的表达. A: RT-PCR; B: Western blot.

## 2 结果

**2.1 RNA干扰后RAW264.7巨噬细胞内蛋白激酶IKK $\alpha$ 及 $\gamma$ 基因的表达** 以脂质体为转染载体,将针对靶基因的小片段RNA导入细胞并培养48 h后, RT-PCR结果显示RAW264.7巨噬细胞中IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因表达出现明显下调,而未给予RNA干扰处理的对照组中IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因表达无明显变化(图1). 经LPS刺激活化后, RAW264.7巨噬细胞中IKK $\alpha$ 和IKK $\gamma$ 表达随作用时间逐渐增强. 当对目的基因IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 进行RNA干扰后,能显著降低二者的表达水平,且以si-IKK( $\alpha$ & $\gamma$ )组最为明显.

**2.2 RNA干扰后RAW264.7巨噬细胞内NF- $\kappa$ B依赖性的下游因子TNF- $\alpha$ 、iNOS及IL-10表达的变化** 应用RT-PCR及Western蛋白印记分析的方法

对RNA干扰后的RAW264.7巨噬细胞内NF- $\kappa$ B依赖性的下游因子TNF- $\alpha$ 、iNOS及IL-10表达的检测结果显示: 正常状态下, RAW264.7巨噬细胞仅生成少量的TNF- $\alpha$ ,以维持细胞正常生理功能的需要. 给予LPS刺激后, TNF- $\alpha$ 的转录及蛋白表达均显著增强. 然而针对目的基因IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 进行基因沉默后,于30 min和2 h时间点检测到TNF- $\alpha$ : 在蛋白水平仅受到部分地抑制;而转录水平却出现明显降低(图2). iNOS在正常RAW264.7巨噬细胞中无表达,当给予LPS(10 mg/L)刺激后,可诱导其高表达并与刺激持续的时间呈正相关. IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因沉默后,能明显减弱巨噬细胞对LPS刺激引起的iNOS高表达状态,且在si-IKK $\gamma$ 处理组及si-IKK( $\alpha$ & $\gamma$ )处理组中30 min时间点,此种现象更为突出. LPS能够

诱导巨噬细胞合成大量IL-10, 但IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因沉默后, IL-10基因的转录及蛋白表达亦受到显著抑制, 以si-IKK( $\alpha$ & $\gamma$ )处理组最明显. 并且, 经转染目的基因siRNA处理的细胞再给予LPS刺激时, 即使延长作用时间亦不能诱导IL-10蛋白表达增强(图2).

### 3 讨论

自从1998年Fire *et al*首次发现并命名RNAi以来, 该技术已经被广泛应用于多种细胞系中结构蛋白、核转录因子、功能调节及关键蛋白功能多样性等研究领域<sup>[9-10]</sup>. 本实验中, 经针对IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 的siRNA分别转染到RAW264.7巨噬细胞内, 经RT-PCR和免疫印迹检测, 转染细胞的IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 的表达显著降低, 证明本研究中所使用的RNA干扰的方法针对目的基因的沉默作用是有效可靠的. 正常细胞给予LPS刺激能诱导IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 的表达, 并且随作用时间的延长而增强; 但如果预先将IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因沉默再给予LPS刺激时, 则仅出现转录水平的低表达. 正常生理状态下, NF- $\kappa$ B蛋白二聚体主要以失活的形式存在于细胞质中, 其核定位信号区域被抑制蛋白I $\kappa$ Bs遮蔽. 当各种细胞外刺激因素与膜表面受体结合后, 炎症信号传入细胞内, 进而启动一系列炎症相关的连锁反应, NF- $\kappa$ B蛋白二聚体被激活并发生核易位进入细胞核, 与多种炎症效应基因启动子区域的特定 $\kappa$ B序列结合, 加速多种细胞因子和炎症介质的转录<sup>[11]</sup>.

研究已经证明, 经LPS刺激活化后, 巨噬细胞内能通过NF- $\kappa$ B信号通路启动大量炎症细胞因子及炎症介质, 如: TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-10等的合成和释放<sup>[3]</sup>. 因此设想, 如果将NF- $\kappa$ B信号通路上的两个关键酶IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 进行基因沉默, 就极有可能使多种炎症效应基因的转录和释放发生一系列的变化. 为验证上述假设, 首先应用LPS刺激RAW264.7巨噬细胞使其过度活化, 随之检测到炎症因子TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-10的大量表达, 且与作用时间呈正相关性. Aupperle *et al*<sup>[12]</sup>的研究亦证实TNF- $\alpha$ 、IL-10等刺激因子可以活化蛋白激酶IKK家族, 后者能促使抑制蛋白I $\kappa$ B $\alpha$ 发生磷酸化降解, 进而促进NF- $\kappa$ B二聚体核易位. 研究普遍认为, TNF- $\alpha$ 不仅为一类炎症效应因子, 具有促炎作用; 同时还是巨噬细胞活化的炎症诱导因子, 在炎症的“级联瀑布”过程发挥着至关重要的作用<sup>[13]</sup>. iNOS是NO合成的关键酶, 主要存在于过度活化的炎症细胞中, 经其催化生

成的NO作用持久、不易被机体代谢降解, 参与机体不同器官的损害过程<sup>[14]</sup>. IL-10是一种内源性的抗炎因子, 能抑制机体内炎症细胞的过度活化状态, 在炎症的负反馈调节中扮演着重要角色<sup>[15]</sup>. 另据报道, 将IKK $\alpha$ 和IKK- $\beta$ 的基因敲除后, 会引起I $\kappa$ B $\alpha$ 、IL-10等多种NF- $\kappa$ B依赖的炎症因子表达改变<sup>[16]</sup>.

实验结果表明, 蛋白激酶IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 在I $\kappa$ B $\alpha$ 、IL-10、iNOS基因转录和表达方面具有重要的调节作用. 预先对巨噬细胞中IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 的基因进行RNA干扰处理后, 再给予LPS刺激细胞时, TNF- $\alpha$ 在mRNA水平的抑制效果明显; 而在蛋白水平受到了部分的抑制. 结果提示可能的原因: 一方面IKK $\alpha$ 和IKK $\gamma$ 能够介导TNF- $\alpha$ 的转录合成; 另一方面, 除转录因子NF- $\kappa$ B外, 可能有其他调节因子对其转录后水平发挥了一定程度的调节作用. 在研究IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 基因沉默的影响时发现, iNOS在si-IKK $\gamma$ 及si-IKK( $\alpha$ & $\gamma$ )处理组的表达被显著抑制, 说明蛋白激酶IKK $\gamma$ 可能对iNOS基因转录具有更为直接的调节作用. 另外, 预先将IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 的基因沉默后再给予LPS刺激, 巨噬细胞中IL-10处于较低表达水平, 即使延长刺激时间亦无明显改变. 鉴于本实验结果, 可以推断蛋白激酶IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 对炎症反应过程中巨噬细胞合成释放一些抗炎因子和炎症的负反馈调节方面具有重要的作用, 二者功能上的持续表达对于IL-10的合成量及发挥抗炎作用时维持稳定的功能状态都是不可或缺的. 新近研究报道, IL-10还能通过抑制I $\kappa$ B激酶的活性、削弱NF- $\kappa$ B与DNA特定定位点的结合能力等环节进一步实现对NF- $\kappa$ B通路的调控<sup>[17]</sup>.

本研究进一步明确了蛋白激酶IKK $\alpha$ 及IKK $\gamma$ 对NF- $\kappa$ B信号通路活化和相关炎症细胞因子表达调节的分子机制.

### 4 参考文献

- 1 Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716
- 2 Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
- 3 Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 3-9
- 4 Lee KY, D'Acquisto F, Hayden MS, Shim JH, Ghosh S. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation. *Science* 2005; 308: 114-118
- 5 Yang D, Buchholz F, Huang Z, Goga A, Chen CY,

- Brodsky FM, Bishop JM. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9942-9947
- 6 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101: 25-33
- 7 Li HL, Chen HL, Li H, Zhang KL, Chen XY, Wang XW, Kong QY, Liu J. Regulatory effects of emodin on NF- $\kappa$ B activation and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Int J Mol Med* 2005; 16: 41-47
- 8 Li H, Sun Y, Kong QY, Zhang KL, Wang XW, Chen XY, Wang Q, Liu J. Combination of nucleic acid and protein isolation with tissue array construction: using defined histologic regions in single frozen tissue blocks for multiple research purposes. *Int J Mol Med* 2003; 12: 299-304
- 9 Heinonen JE, Smith CI, Nore BF. Silencing of Bruton's tyrosine kinase (Btk) using short interfering RNA duplexes (siRNA). *FEBS Lett* 2002; 527: 274-278
- 10 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 435-438
- 11 Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 64-73
- 12 Aupperle KR, Bennett BL, Boyle DL, Tak PP, Manning AM, Firestein GS. NF- $\kappa$ B regulation by I  $\kappa$ B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 1999; 163: 427-433
- 13 Chang JH, Ryang YS, Morio T, Lee SK, Chang EJ. *Trichomonas vaginalis* inhibits proinflammatory cytokine production in macrophages by suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cells* 2004; 18: 177-185
- 14 Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179
- 15 Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270: 9558-9563
- 16 Kellum JA, Song M, Venkataraman R. Hemoadsorption removes tumor necrosis factor, interleukin-6, and interleukin-10, reduces nuclear factor- $\kappa$ B DNA binding, and improves short-term survival in lethal endotoxemia. *Crit Care Med* 2004; 32: 801-805
- 17 Zimmerman MA, Reznikov LL, Raeburn CD, Selzman CH. Interleukin-10 attenuates the response to vascular injury. *J Surg Res* 2004; 121: 206-213

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A:  $\cdots$ ; B:  $\cdots$ ; C:  $\cdots$ ; D:  $\cdots$ ; E:  $\cdots$ ; F:  $\cdots$ ; G:  $\cdots$ . 曲线图可按  $\bullet$ 、 $\circ$ 、 $\blacksquare$ 、 $\square$ 、 $\blacktriangle$ 、 $\triangle$  顺序使用标准的符号. 统计学显著性用:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$  ( $P>0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则  $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第 3 套为  $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ .  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如  $P<0.01$ ,  $t=4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、 $\pm$ 、 $-$  应上下对齐. “空白” 表示无此项或未测, “ $-$ ” 代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小  $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-28)