

RNA 干扰介导的核转录因子-κB 抑制蛋白激酶 α 和 γ 基因沉默对核转录因子-κB 信号通路调节作用的影响

陈海龙 李海龙 张桂信 李宏 刘佳 贺雪梅

【摘要】 目的 观察 RNA 干扰介导的核转录因子-κB 抑制蛋白(IκB)激酶(IKK)α 和 γ 基因沉默对核转录因子-κB(NF-κB)信号通路的调节作用,进一步阐明其基因调控机制。方法 设计 IKKα 及 IKKγ 靶向的小分子干扰 RNA(siRNA),合成互补的寡核苷酸链,转染到 RAW264.7 小鼠巨噬细胞。观察经脂多糖(LPS)刺激后 NF-κB 的活化、IKKα 及 IKKγ 基因表达的变化、NF-κB p65 及 p50 核移位的变化以及前体蛋白 NF-κB p105 的表达情况。结果 IKKα 及 IKKγ 基因沉默后,可导致 IKKα 及 IKKγ 基因表达出现明显下调,同时 NF-κB p65 及 p50 的核移位受到抑制,胞质、胞核中 NF-κB p65、p50 及 p105 的表达显著下调,而且能抑制 NF-κB p65、p50 及 p105 蛋白的核移位。结论 IKKα 及 IKKγ 两种蛋白激酶参与 NF-κB 信号通路的调节,不仅能分别在抑制蛋白的泛肽化、组蛋白磷酸化等环节发挥作用,而且还能够通过相互之间的协同作用,弥补其中某种蛋白受到过度抑制时所引起的炎症信号通路的功能障碍。

【关键词】 基因沉默; RNA 干扰; 核转录因子-κB; 核转录因子-κB 抑制蛋白激酶; 脂多糖; 巨噬细胞

Influence of inhibitory κB protein kinase α and γ genes silencing induced by RNA interference on nuclear factor-κB signal pathway CHEN Hai-long *, LI Hai-long, ZHANG Gui-xin, LI Hong, LIU Jia, HE Xue-mei. * Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning, China

【Abstract】 Objective To investigate the role of inhibitory κB (IκB) protein kinase (IKK) α and γ genes silencing induced by RNA interference (RNAi) in modulation of nuclear factor-κB (NF-κB) signal pathway, to elucidate further the regulatory mechanism of NF-κB gene. Methods IKKα and IKKγ targeting small interference RNA (siRNA) were designed to synthesize complementary oligonucleotide chains, then it was transfected into mouse macrophage cell line RAW264.7. The transfected cells were treated with lipopolysaccharide (LPS, 10 μg/ml), then the expression of IKKα and IKKγ genes, the nuclear translocation changes in NF-κB p65 and p50 proteins, and the expression of precursor protein NF-κB p105 were detected at selected time points. Results It was shown that RNAi targeting IKKα and IKKγ could down-regulate the expression of IKKα and IKKγ genes, and at the same time, down-regulate the expression of NF-κB p65, p50 and p105 proteins both in cytoplasm and nucleus, and inhibit the nuclear translocation of NF-κB p65, p50 and p105 proteins. Conclusion These findings provide evidence for the involvement of the two protein kinases IKKα and IKKγ in the modulation of NF-κB signal pathway, not only they can inhibit the ubiquitin of protein and histone phosphorylation respectively, but also can redeem the functional impairment of the inflammation signal pathway induced by over inhibition of some proteins, through synergistic action of the two kinases.

【Key words】 gene silencing; RNA interference; nuclear factor-κB; inhibitory κB kinase; lipopolysaccharide; macrophage

核转录因子-κB(NF-κB)参与多种基因尤其是炎症与免疫相关基因的表达与调控^[1],其中 p50 与 RelA (p65)两亚基形成的异二聚体为最常见的形式。静息状态下,NF-κB 二聚体与其抑制蛋白(IκBs)结合,以无活性的形式存在于胞质内。当细胞受到

外界信号刺激后,IκB 在 IκB 激酶(IKK)的作用下发生磷酸化降解,NF-κB 迅速移位到细胞核内,与靶基因上特异性 κB 序列结合,诱导肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-1(IL-1)、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)等相关基因转录,引发全身炎症反应,甚至发展成急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能障碍综合征(MODS)^[2-3]。在此过程中,通过抑制 NF-κB 过度活化进而降低由内毒素或细胞因子引起的炎症损害将是十分理想的治疗手段。RNA 干扰(RNAi)是最近发展起来的抑制特定基因产物表达的有效方法^[4-5],是一种由双链

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.002

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划项目(90709005)

作者单位:116011 辽宁,大连医科大学附属第一医院普外科(陈海龙、李海龙、张桂信);大连医科大学细胞生物学教研室(李宏、刘佳);大连铁路卫生学校生理教研室(贺雪梅)

Email:hailongchen2007@hotmail.com

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。小分子干扰 RNA (siRNA)就是这种短片断 dsRNA 分子,其来源于 dsRNA 的酶切降解,而这种短片断 RNA 长度约为 21~23 bp,能够以序列同源互补的 mRNA 为靶目标,降解特定的 mRNA^[6],是目前研究基因调控的重要手段。在本实验中,应用 RNAi 技术特异性地将 NF- κ B 信号通路中的 IKK α 及 IKK γ 基因沉默,探究 RAW264.7 巨噬细胞经脂多糖(LPS)刺激后 NF- κ B 的活性以及 NF- κ B p50、p65、p105 的核移位和蛋白表达的变化,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 材料与方 法

1.1 细胞培养及分组:小鼠单核/巨噬细胞系 RAW264.7 购于中国科学院上海细胞所。用含体积分数 10%胎牛血清(FBS)加青霉素 100 kU/L、链霉素 100 mg/L 的 DMEM 培养液(Gibco Life Science, 美国),在孵箱中传代培养,以 1×10^6 /L 的密度将细胞接种于 60 mm 培养板(NUNC, 丹麦)中, 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养 24 h。用于 RNAi 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。实验共分 12 组,每组 5 个培养皿:RAW264.7 巨噬细胞正常培养组(N0 组);细胞与转染试剂/IKK α siRNA 混和物作用 48 h 组(A0 组);细胞与转染试剂/IKK γ siRNA 混和物作用 48 h 组(B0 组);细胞与转染试剂/IKK α 和 IKK γ siRNA 混和物作用 48 h 组(C0 组);4 组在干扰处理后给予 LPS(10 mg/L)刺激,分别作用 30 min(相应为 N1、A1、B1、C1 组)和 2 h(相应为 N2、A2、B2、C2 组)。于各时间点收集细胞样本,-80 °C 保存待测。

1.2 RAW264.7 巨噬细胞核蛋白的提取:试剂配置参照文献[7]方法进行。倒去细胞培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,收集细胞,4 °C 离心 5 min 后弃上清液,加入 200 μ l 冷缓冲液 A,冰浴 10 min,振荡 10 s,混匀,离心 10 s,上清液即为胞质提取物,分装后-80 °C 保存。沉淀中加入 20 μ l 冷缓冲液 B,冰浴 20 min,4 °C 离心 2 min,弃沉淀,上清液即为核提取物,分装后-80 °C 保存。

1.3 siRNA 的设计与制备过程:设计 5'端具有 T7 启动子对应序列的 DNA 模板,经过单独的转录反应合成 dsRNA。siRNA 的制备过程严格按照 Silencer™ siRNA Cocktail 试剂盒(Ambion, 美国)操作说明进行。

1.4 siPORT 脂质体转染方法转染细胞:转染过程严格按照 siPORT 脂质体转染试剂盒(Ambion, 美国)操作。转染前 24 h 将细胞接种于培养板内正常培养(DMEM, 10%FBS),直至达到 70%汇片,4 μ l siPORT 脂质体转染+不含血清的 DMEM 培养液,体系总体积为 15 μ l;5 μ l siRNA (25 nmol/L)+不含血清的 DMEM 培养液,体系总体积为 185 μ l。将 siRNA 加到 siPORT 脂质体转染中,混匀,室温作用 20 min。先加新鲜 DMEM 培养液 800 μ 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 5 ml 新鲜正常培养液(DMEM, 10%FBS),转染 48 h 后检测干扰效果。

1.5 RNA 的提取及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR):常规 TRIzol 法提取各标本总 RNA,紫外分光光度仪测定浓度,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完好性。IKK α 上游引物:5'-GCAGACCGTGAACATCCTCT-3',下游引物:5'-TCCAGGACAGTGAACGAGTG-3',扩增产物大小:202 bp;IKK γ 上游引物:5'-GGTGGAGAGACTGAGCTTGG-3',下游引物:5'-CTAAAGCTTGCCGATCCTTG-3',扩增产物大小:203 bp;内参照 β -肌动蛋白(β -actin)上游引物:5'-GCATGGAGTCCTGTGGCAT-3',下游引物:5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGG-3',扩增产物大小:324 bp。反转录体系 20 μ l,含样品 RNA 3 μ l,按照 TaKaRa RNA PCR 试剂盒提供说明书进行操作,反应条件为 55 °C 30 min,99 °C 5 min,5 °C 5 min;PCR 反应体系 15 μ l,包含反转录液 2.4 μ l。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 45 s,58 °C 45 s,72 °C 45 s,循环 35 次;72 °C 延伸 7 min,4 °C 恒定。取出扩增产物直接加入 3 μ l 6 倍溴酚蓝载样缓冲液混匀,琼脂糖凝胶电泳,在紫外透射仪下数码成像。

1.6 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)分析:参照文献[8]方法进行,用紫外分光光度仪测定各蛋白样品的浓度。以每孔 120 μ g 的蛋白含量点样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上后,分别与 1:1 000 稀释度的兔抗小鼠 p65、p50、p105 多克隆抗体(Santa Cruz, 美国)和 1:3 000 稀释度的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体(Dako, 丹麦)孵育。应用增强化学发光法(ECL)显色拍片。同一蛋白样品按照相同蛋白上样量以及上样顺序经 SDS-PAGE 分离后用考马斯亮蓝染色作为内参照。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 2-巯基乙醇, 2% SDS, 1 mmol/L Tris-HCl pH 6.8)至 55 °C, 然后将膜放入其中, 55 °C 水浴箱内, 间歇振荡 30 min, 随后用含 5% 牛奶的 TBS-T 封闭液封闭过夜, 再重复上述的杂交操作步骤。

2 结果

2.1 RNAi 后 RAW264.7 巨噬细胞内 IKKα 和 IKKγ 的基因表达(图 1); RT-PCR 结果显示, RAW264.7 巨噬细胞中 IKKα 及 IKKγ 基因表达明显下调, 未给予 RNAi 处理的对照组中 IKKα 及 IKKγ 基因表达无明显变化。将 IKKα 基因沉默后能相应引起 IKKγ 代偿性表达增强, 反之亦然。经 LPS 刺激活化后, RAW264.7 巨噬细胞中 IKKα 和 IKKγ 表达随作用时间的延长逐渐增强。当对目的基因 IKKα 及 IKKγ 进行 RNAi 后, 能显著降低二者的表达水平, 且以 siIKK(α 和 γ)组最为明显。

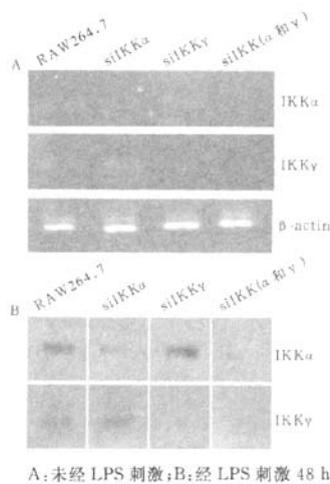


图 1 RT-PCR 检测 RNAi 后 RAW264.7 巨噬细胞内 IKKα 和 IKKγ 的基因表达

2.2 RNAi 后 RAW264.7 巨噬细胞内 NF-κB p65 及 p50 核移位的变化(图 2): Western blotting 结果显示: 给予 LPS 刺激后, N1 组和 N2 组核内 NF-κB p65/p50 表达显著增强, 并于 2 h 增强最明显; 而胞质内则出现相应时间点表达降低。应用针对 IKKα 及 IKKγ 的 siRNA 进行干扰处理后, 能显著抑制核内 NF-κB p65/p50 的表达, 并以 siIKK(α 和 γ)组作用最为突出; 同时胞质内 NF-κB p65/p50 蛋白表达量也出现明显降低。进一步实验表明, IKKα 及 IKKγ 发生基因沉默后, 同样能对由 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞胞质中 IκBα 的转录和合成起到下调作用。

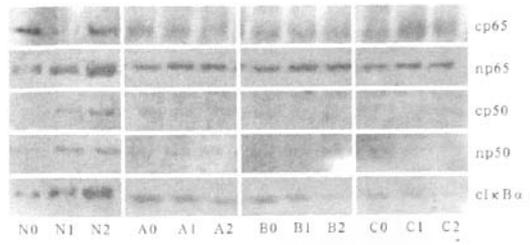


图 2 Western blotting 检测各组 RNAi 后 RAW264.7 巨噬细胞内 NF-κB p65 和 p50 在细胞质(c)和细胞核(n)内的表达

2.3 RNAi 后 RAW264.7 巨噬细胞内前体蛋白 p105 的表达; LPS 能活化巨噬细胞并使其合成大量 p105 蛋白, 与时间呈正相关。IKKα 及 IKKγ 的基因沉默后, 不但能显著下调胞质、胞核中 p105 表达量, 而且能抑制 p105 蛋白的核移位, 以 siIKK(α 和 γ)组最为明显(图 3)。

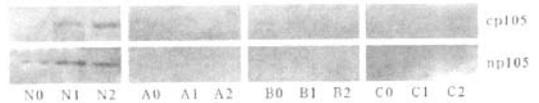


图 3 Western blotting 检测各组 RNAi 后 RAW264.7 巨噬细胞内前体蛋白 p105 在细胞质(c)和细胞核(n)内的表达

3 讨论

自从 1998 年 Fire 等首次发现并命名 RNAi 以来, 该技术已经被广泛应用于多种细胞系中结构蛋白、NF-κB 功能调节及关键蛋白功能多样性等研究领域^[9-10]。本实验中采用 RNAi 方法及用量, 经证实具有无明显细胞毒性、高效性的特性, 并能稳定保持目的基因沉默效果约 5~7 d, 有利于对 RAW264.7 巨噬细胞中 NF-κB 炎症信号转导通路的分子生物学机制进行较为深入的研究。

在本实验中, 经 RT-PCR 和 Western blotting 检测, 转染到 RAW264.7 巨噬细胞内的 IKKα 及 IKKγ 表达显著降低, 证明本研究中所用 RNAi 方法针对目的基因的沉默作用是有效和可靠的。正常细胞给予 LPS 刺激能诱导 IKKα 及 IKKγ 表达, 并随作用时间延长而增强; 但如预先将 IKKα 及 IKKγ 基因沉默再给予 LPS 刺激时, 则仅出现转录水平的低表达。本实验中还发现, 如将 IKKα 基因沉默后, 会引起 IKKγ 的代偿性表达增强, 反之亦然。该结果首次证实, IKKα、IKKγ 在调节巨噬细胞 NF-κB 炎症信号通路活化的过程中存在明显的相互协同作用, 以弥补两者中任意一种蛋白活性受到过度抑制时所引起的炎症信号通路持续转导的功能障碍。

正常生理状态下, NF-κB 蛋白二聚体与 IκB 以

无活性的复合物形式存在于细胞质中,其核定位信号区域被 I κ B 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,通过一个或多个信号转导途径激活一系列激酶,使 I κ B N 端两个特异性位点丝氨酸磷酸化,随后赖氨酸残基发生泛素化,最后在 26S 蛋白酶体作用下,I κ B 降解,NF- κ B 蛋白二聚体与 I κ B 解离,NF- κ B 被激活并迅速发生核移位从细胞质进入细胞核,与多种炎症效应基因启动子区域的特定 κ B 位点发生特异性结合,调控相应的基因表达。在此过程中,IKK 是最关键的激酶。IKK 包括 IKK α 、IKK β 和 IKK γ ,IKK α 、IKK β 为催化亚单位,IKK γ 为调节亚单位。NF- κ B p65/p50 同源二聚体是 NF- κ B 发挥主要功能的典型代表,也是 NF- κ B 所有形式中最重要的一种。NF- κ B p105 是 I κ B 家族中的重要一员^[11-12]。本实验结果显示,LPS 是 RAW264.7 巨噬细胞活化的强烈刺激物,能引起 NF- κ B 活性过度增强及发生显著核移位;如预先将 IKK α 或 IKK γ (尤其在二者同时干扰的处理组中)基因沉默后,能显著抑制 NF- κ B p65/p50 的合成及过度活化状态,表明 LPS 能刺激活化巨噬细胞,促进 I κ B α 表达,加速 NF- κ B p65/p50 发生核移位。同时将目的基因干扰沉默后,I κ B α 再合成出现延迟现象,且以 siIKK(α 和 γ)同时干扰组最为明显。此结果再次证实,在 LPS 刺激巨噬细胞诱导 I κ B α 表达增强的过程中,IKK α 及 IKK γ 活化功能状态的维持具有十分重要的作用。

有研究表明,前体蛋白 p105 进入细胞核后能与 NF- κ B p50 竞争性地结合 RelA,并形成无活性的二聚体,从而减轻 NF- κ B 炎症信号通路的过度活化状态及多种炎症相关细胞因子的过度表达^[13-14]。由本实验中有关前体蛋白 p105 的检测结果可知:巨噬细胞经 LPS 刺激后,前体蛋白 p105 出现胞质表达减少并向细胞核内聚集;如预先将 IKK α 及 IKK γ 的基因沉默,然后再给予 LPS 刺激,则胞质及核内前体蛋白 p105 表达均明显降低(以二者同时干扰组效果最强)。这充分说明,在 RAW264.7 巨噬细胞过度活化过程中,前体蛋白 p105 的合成及核内聚集是通过 IKK 依赖的途径实现的。

IKK α 及 IKK γ 对 NF- κ 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,不仅各自具有不同的功能特性及作用靶点,同时还存在彼此间的协同作用,并能通过此种方式,相互代偿以弥补单一蛋白功能活性受抑制时所产生的后续影响。本研究

不仅丰富了 IKK 家族在 NF- κ B 炎症转导信号和炎症因子表达方面的调节机制及作用形式,而且为临床治疗多种炎症性疾病,寻找更为适合的药物作用靶点提供了新的实验佐证。

参考文献

- [1] Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 1996, 87(1):13-20.
- [2] Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 2001, 107(1):7-11.
- [3] 王谦,宋勇,施毅. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对失血性休克诱导急性肺损伤小鼠器官组织核转录因子- κ B 活化的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(5):295-298.
- [4] Lee KY, D'Acquisto F, Hayden MS, et al. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation. *Science*, 2005, 308(5718):114-118.
- [5] Yang D, Buchholz F, Huang Z, et al. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15):9942-9947.
- [6] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101(1):25-33.
- [7] Li HL, Chen HL, Li H, et al. Regulatory effects of emodin on NF-kappaB activation and inflammatory cytokine expression in RAW264.7 macrophages. *Int J Mol Med*, 2005, 16(1):41-47.
- [8] Li H, Sun Y, Kong QY, et al. 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(3):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(1-3):274-278.
- [10] Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 2002, 418(6896):435-438.
- [11] Schmitz ML, Bacher S, Kracht M. I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(3):186-190.
- [12] Driessler F, Venstrom K, Sabat R, et al. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol*, 2004, 135(1):64-73.
- [13] Kim CS, Kawada T, Kim BS, et al. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal*, 2003, 15(3):299-306.
- [14] Orián A, Whiteside S, Israel A, et al. Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105, reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem*, 1995, 270(37):21707-21714.

(收稿日期:2008-12-12)

修回日期:2009-02-20)

(本文编辑:李银平)