

· 论 著 ·

SIGIRR 过表达对 LPS 诱导的 H292 细胞 NF- $\kappa$ B 活性的影响\*陈旭昕, 吴学玲<sup>#</sup>, 陈华萍, 钱桂生<sup>△</sup>

(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

**摘要:**目的 研究单免疫球蛋白白介素-1 受体相关蛋白(SIGIRR)对内毒素(LPS)诱导的人气道上皮 H292 细胞核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活性影响。方法 将含有 SIGIRR cDNA 全长的真核表达载体瞬时转染 H292 细胞 24 h 后,用 Western blot 的方法检测 SIGIRR 在细胞内的表达水平,同时设立空载体转染组作为对照。另外,于转染 24 h 后给予 LPS 刺激,分别于加入 LPS 后 3、6、12、24 h 收集细胞质、细胞核蛋白和培养上清液,用 Western blot 的方法检测各时间点细胞质和细胞核中 NF- $\kappa$ B 蛋白水平变化,用 ELISA 的方法检测各时间点培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平。结果 在给予 LPS 刺激前,用质粒瞬时转染的方法使 SIGIRR 在 H292 细胞中过表达可以显著抑制 NF- $\kappa$ B 的转录活性,同时抑制 LPS 诱导的细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的产生。结论 过表达 SIGIRR 可减轻 H292 细胞对 LPS 诱导的炎症反应,这可能与 SIGIRR 抑制 LPS-TLR4 信号传导而减少 NF- $\kappa$ B 的活化有关。调控 SIGIRR 的表达有望成为新的治疗急性肺损伤(ALI)等炎症失控性疾病的靶点。

**关键词:**内毒素类;单免疫球蛋白白介素-1 受体相关蛋白;核转录因子- $\kappa$ B

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)08-0732-03

Effect of SIGIRR overexpression on activation of NF- $\kappa$ B induced by LPS in H292 cells\*Chen Xuxin, Wu Xuelling<sup>#</sup>, Chen Huaping, Qian Guisheng<sup>△</sup>

(Research Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of SIGIRR overexpression on the activation of NF- $\kappa$ B induced by LPS in H292 cells. **Methods** The H292 cells were transfected with eukaryotic expression vector containing full length cDNA of SIGIRR. At 24 h after transfection, the protein level of SIGIRR in H292 cells was determined by Western blot. An empty vehicle was used as a control group. Otherwise, LPS was administered into the cell culture medium at 24 h post-transfection. The cytoplasmic extracts, nuclear extracts and culture supernatant were collected at different time points (3, 6, 12, 24 h) after LPS-stimulation. The activity of NF- $\kappa$ B was measured by Western blot. The concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 were detected by ELISA. **Results** Compared with control group, SIGIRR overexpression could significantly inhibit the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B induced by LPS in H292 cells. And, SIGIRR overexpression could decrease the releases of TNF- $\alpha$  and IL-6 stimulated by LPS in H292 cells. **Conclusion** SIGIRR overexpression can attenuate the inflammatory reactions to LPS in H292 cells. The mechanism may be that SIGIRR blocks the TLR4-LPS signal transduction and suppresses the activation of NF- $\kappa$ B. Modulating the expression of SIGIRR may be a novel therapy target for the treatments of ALI and other inflammatory diseases.

**Key words:** endotoxins; single immunoglobulin IL-1 receptor related protein; nuclear transcription factor- $\kappa$ B

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是临床常见的危急重症。由于目前缺乏特异性治疗手段,病死率仍居高不下<sup>[1]</sup>。过往对 ALI/ARDS 的研究多聚焦在肺泡上皮细胞、肺血管内皮细胞以及肺内多种炎症细胞上,而近期研究表明,气道上皮细胞作为第一道接触刺激因素的防御细胞亦参与了 ALI/ARDS 的发病,在该疾病的发生、发展中扮演了重要角色<sup>[2]</sup>。核转录因子- $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)参与多种细胞因子和炎症介质基因的转录调控, NF- $\kappa$ B 过度活化后,必然会启动系列炎性细胞因子的表达和炎症级联反应,介导 ALI 等器官损伤<sup>[3]</sup>。单免疫球蛋白白介素-1 受体相关蛋白(single immunoglobulin IL-1 receptor related protein, SIGIRR)是新近发现的 Toll 样受体/白介素-1 受体(Toll like receptor/Interleukin-1, TLR/IL-1)超家族成员之一,研究表明 SIGIRR 能通过与 TLR/IL-1 及其下游的接头分子相互作用,而抑制 IL-1 和内毒素(lipopolysaccharide, LPS)信号通路<sup>[4]</sup>。本研究以阳离子脂质体为介导,上调 SIGIRR 在人气道上皮细胞系

H292 细胞中的表达,观察 SIGIRR 过表达后对 LPS 诱导的 H292 细胞 NF- $\kappa$ B 活性以及 NF- $\kappa$ B 下游靶基因 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的影响,以期对 ALI/ARDS 的治疗提供更多的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** H292 细胞购自中国科学院上海细胞所, pEGFP-N1 空真核表达载体(ClonTech)由本室保存, SIGIRR-EGFP 真核表达载体由本室成功构建<sup>[5]</sup>。Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 和 Opti-MEM 无血清培养基购自美国 Invitrogen 公司, LPS (Ecoil0111; B4)购自美国 Sigma, 高糖 RPMI1640 培养基和胎牛血清(FBS)均为 Hyclone 公司产品。人 TNF- $\alpha$  和 IL-6 ELISA 试剂盒购自深圳达科为生物技术公司。细胞质和细胞核蛋白提取试剂盒为 ActiveMotif 公司产品。抗人 SIGIRR 抗体、抗 NF- $\kappa$ Bp65 抗体以及 PVDF 膜购自 SantaCruz 公司。抗人 GAPDH 抗体、增强型 ECL 发光试剂盒、蛋白定量 BCA 法试剂盒和细胞总蛋白提取试剂盒均为碧云天生物技术公司产品。

## 1.2 方法

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(306272)。 △ 通讯作者, Tel: (023)68755603; E-mail: gsqxqhospital@yahoo. cn.

# 共同第一作者。

**1.2.1 细胞培养与转染** H292 细胞维持在含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中。转染前 1 d 以 3 × 10<sup>5</sup>/孔接种至 6 孔板中, 待细胞达到 90% 的融合度时, 按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行转染。每孔 SIGIRR-EGFP 真核表达载体质粒 DNA 用量为 4 μg, Lipofectamine™ 2000 用量为 10 μL。以 pEGFP-N1 空真核表达载体替换 SIGIRR-EGFP 作为空转染对照组。转染 6 h 后, 更换为含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基继续培养 24 h, 备用后继实验。

**1.2.2 SIGIRR 蛋白表达的检测** 按上述方法接种转染细胞, 分为两组: SIGIRR-EGFP 转染组和 pEGFP-N1 空转染组, 转染 24 h 后收集细胞。用碧云天细胞总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, 并按蛋白定量 BCA 法试剂盒说明书进行蛋白浓度测定, 样品与 5 × 上样缓冲液混合煮沸变性 5 min, 每个样本上样量为 25 μL, 行常规 Western blot 检测。简述如下: 等量的蛋白行 12% 聚丙烯酰胺电泳 (恒压 90 V, 1.5 h), 切下所需的分离胶, 将同样大小的 PVDF 膜依次用甲醇和电转缓冲液处理后, 按照滤纸、膜、胶、滤纸的顺序依次铺放在半干电转仪的工作台上, 再用电转缓冲液充分润湿滤纸、胶和膜后, 接通电源恒压 17 V, 1 h。转膜结束后, 将 PVDF 膜取出用 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h, 与一抗 4 °C 孵育过夜, 洗膜 3 次后与辣根过氧化物酶标记的二抗 37 °C 孵育 2 h, 同前洗膜 3 次后, 用增强型 ECL 发光试剂盒显影, 并用 GBox-HR 凝胶分析仪扫描图像, 行灰度分析。计算待测条带灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值。

**1.2.3 NF-κB 活性的检测** 同上将 H292 细胞接种于 6 孔板中并按上述方法进行脂质体转染, 共分为两组: SIGIRR-EGFP 转染组和 pEGFP-N1 空转染组。转染 24 h 后, 加入 LPS (终浓度为 1 μg/mL)。分别于加入 LPS 后 3、6、12、24 h 收集细胞, 参照 ActiveMotif 公司说明书, 提取细胞质和细胞核蛋白, 同前处理样本行 Western blot 检测。并用 GBox-HR 凝胶成像系统扫描图像, 行灰度分析, 各组以 NF-κBp65 细胞核灰度值与细胞质灰度值的比值表示 NF-κB 活化水平。

**1.2.4 培养上清液中 TNF-α 和 IL-6 含量检测** 同上将 H292 细胞接种于 6 孔板中并按上述方法进行脂质体转染, 共分为两组: SIGIRR-EGFP 转染组和 pEGFP-N1 空转染组。转染 24 h 后, 加入 LPS (终浓度为 1 μg/mL)。分别于加入 LPS 后 3、6、12、24 h 收集细胞培养上清液, 用 TNF-α 和 IL-6 ELISA 试剂盒检测 TNF-α 和 IL-6 浓度, 具体操作参照说明书进行。每个样本设置 3 个复孔, 检测结果取平均值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。计量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-q 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

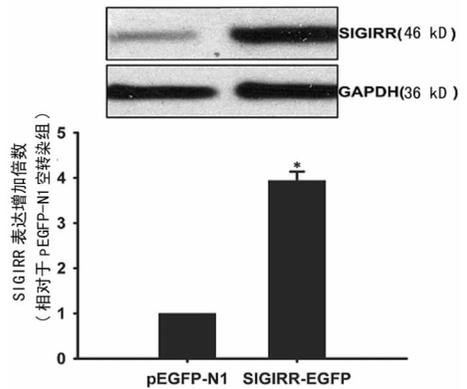
**2 结 果**

**2.1 SIGIRR 蛋白表达** 将重组质粒 SIGIRR-EGFP 转染人呼吸道上皮 H292 细胞株 24 h 后, 提取细胞总蛋白行 Western blot 检测, 并以转染空载体 pEGFP-N1 作对照, 可见 SIGIRR-EGFP 转染组的 H292 细胞过表达 SIGIRR, 两组灰度值比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

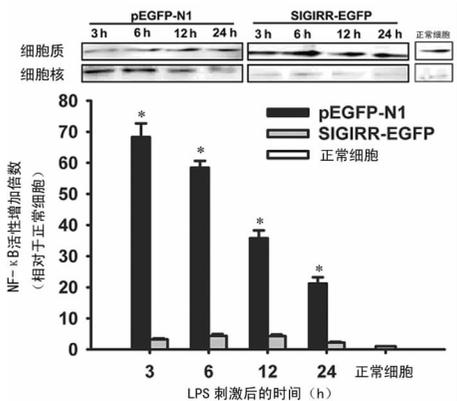
**2.2 NF-κB 活性检测** pEGFP-N1 空转染组在 LPS 刺激后 NF-κB 活性显著高于正常细胞, 而转染 SIGIRR-EGFP 重组质粒的细胞其 NF-κB 活性在各时间点均显著低于 PEGFP-N1 空转染组 ( $P < 0.05$ ), 与正常 H292 细胞相比 NF-κB 活性略有升高, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。

**2.3 TNF-α、IL-6 含量检测** 两组细胞培养上清液中 TNF-α

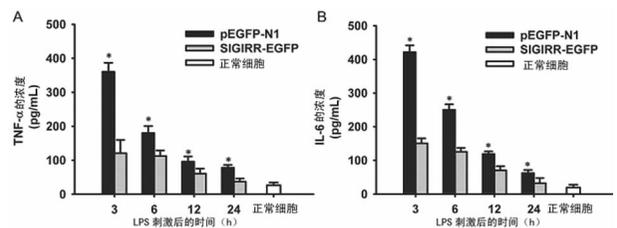
和 IL-6 含量比较见图 3。在 LPS 刺激后的各个时间点以内, PEGFP-N1 空转染组 TNF-α 和 IL-6 水平显著高于正常细胞, 而重组质粒 SIGIRR-EGFP 转染细胞即过表达 SIGIRR 的 H292 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的水平显著低于 PEGFP-N1 空转染组 ( $P < 0.05$ ), 且在 24 h 时间点时已接近正常细胞水平。



\*:  $P < 0.05$ , 与 pEGFP-N1 空转染组比较。  
图 1 Western blot 检测 H292 细胞中 SIGIRR 的蛋白表达



\*:  $P < 0.05$ , 与 SIGIRR-EGFP 转染组比较。  
图 2 SIGIRR 对 LPS 诱导的 NF-κB 转录活性的影响



\*:  $P < 0.05$ , 与 SIGIRR-EGFP 转染组比较。  
图 3 SIGIRR 对 H292 细胞培养上清液中 TNF-α (A) 和 IL-6 (B) 含量的影响

**3 讨 论**

TLRs 是固有免疫系统中的主要病原模式受体之一, TLRs 通路的激活在全身性炎症反应和天然防御免疫中起着重要作用<sup>[6]</sup>。但是过度的 TLR 应答会引发抗炎与致炎间的失衡导致机体损伤。当病原相关分子与 TLRs 结合, 髓样分化 p88 (myeloid differentiation p88, MyD88) 通过其 Toll-白介素受体 (TIR) 同源结构域与 TLRs 的相应结构域相互作用, 随后 MyD88 通过其死亡结构域募集具有相同死亡结构域的 IL-1 受体相关激酶 (IL-1R-associated kinase, IRAK), 导致 IRAK 自身磷酸化, 自身磷酸化的 IRAK 与 TNF 受体相关因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6) 形成复合物, 进而导致

TRAF6 寡聚化。寡聚化后,再与转移生长因子  $\beta$  激酶 1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1, TAK1)、TAK1 结合蛋白 1 (TAK1-binding protein 1, TAB1) 及 TAK1 结合蛋白 2 (TAK1-binding protein 2, TAB2) 相互作用, TAK1 磷酸化, I $\kappa$ B 激酶 (IKK) 和 c-JUNN 末端激酶 (JNK) 激活, 使 NF- $\kappa$ B 和转录因子 (activator protein-1, AP-1) 活化, 产生前炎症细胞因子, 导致炎症级联反应发生, 最终导致组织器官受损<sup>[7]</sup>。而肺脏由于是全身血液过滤器, 又富含巨噬细胞, 因此肺脏往往是最先受累的器官, 临床表现为 ARDS。

为避免有害和不适宜的炎症反应, 机体尚有相应的 TLRs 信号通路负调控成分来维持 TLRs 信号通路活化与抑制间的平衡, 保证机体免疫反应的适度 and 稳定<sup>[8]</sup>。有研究发现, SIGIRR 在 IL-1 或 LPS 的作用下, 能以配体依赖的方式分别与 IL-1R 或 TLR4 受体复合物 (MyD88、IL-1R、TLR4、TRAF6 及 IRAK) 短暂结合而抑制 IL-1 与 LPS 信号传导, 进而减少 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[9]</sup>。因此, 本研究假设在 LPS 刺激气道上皮 H292 细胞前, 先以脂质体作为介导, 用 SIGIRR-EGFP 重组质粒转染细胞, 增强 SIGIRR 在 H292 细胞中的表达应该可以减少 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 的活化。NF- $\kappa$ B 未被激活时与 I $\kappa$ B- $\alpha$  形成一个复合物, 分布在细胞质中。在炎症细胞因子、生长因子、趋化因子以及 LPS 等的刺激下, I $\kappa$ B- $\alpha$  的 Ser32 和 Ser36 位点被磷酸化, 随后被泛素-蛋白酶体途径降解。NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B- $\alpha$  解聚后, 其核定位序列被暴露, 从而易位到细胞核内促进 NF- $\kappa$ B 依赖的基因转录<sup>[3]</sup>。本研究用 SIGIRR-EGFP 重组质粒转染 H292 细胞 24 h, 增强 SIGIRR 在细胞内的表达后再给予 LPS 刺激, 同时以 pEGFP-N1 空载体转染 H292 细胞为对照。Western blot 检测结果显示, 与 pEGFP-N1 空转染组比较, 各时间点转染 SIGIRR-EGFP 重组质粒的细胞其 NF- $\kappa$ B 核易位显著减少, 即转染 SIGIRR-EGFP 重组质粒的细胞其 NF- $\kappa$ B 活性在各时间点均显著低于 pEGFP-N1 空转染组。这一结果证实了前面本研究提出的假设。

NF- $\kappa$ B 是已被证实参与炎症反应并且介导多种炎症细胞因子激活的转录因子之一, 是多种信号传导途径的汇聚点, 在调控炎症反应的基因表达方面起关键性作用<sup>[10-12]</sup>。TNF- $\alpha$  是 NF- $\kappa$ B 非常重要的下游靶基因, 在炎症反应中具有始动和关键的促炎免疫作用, 可进一步触发其他炎症介质的释放, 如 IL-6; TNF- $\alpha$  还可以激活诱导型一氧化氮合酶, 导致过氧化亚硝酸阴离子形成而损伤肺泡上皮细胞和肺微血管内皮细胞<sup>[13]</sup>。IL-6 可促进炎症急性期反应, 诱导 B 细胞生长、分化并产生免疫球蛋白, 形成免疫复合物, 同时还能刺激肺微血管表达黏附分子, 促进中性粒细胞聚集, 加重肺损伤<sup>[14]</sup>。本研究通过 ELISA 法检测了 LPS 刺激后 H292 细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平, 结果发现重组质粒 SIGIRR-EGFP 转染细胞即过表达 SIGIRR 的 H292 细胞释放 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平显著低于 PEGFP-N1 空转染组, 这一现象应该归因于 SIGIRR 过表达对 NF- $\kappa$ B 活化的抑制。

以往研究一直认为气道上皮细胞并非 ALI/ARDS 发病中的参与细胞, 但是近年研究表明, 气道上皮细胞是最先接触刺激因素的防御细胞, 可作为局部和全身炎症的炎症启动子以及活跃的炎症介质产生者在 ALI/ARDS 的发病中起着重要作用<sup>[15]</sup>。因此抑制气道上皮细胞对 LPS、细菌代谢物等炎症刺激物的炎症反应将会减少气道上皮细胞对炎症的始动和促进作用。本实验通过质粒转染的方法上调负调控因子 SIGIRR 的表达, 抑制了气道上皮 H292 细胞对 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 活化和炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放。虽然 SIGIRR 的确切

作用尚需进一步体内实验来验证, 但是目前的研究结果为治疗 ALI/ARDS 等其他炎症失控性疾病提供了新的思路和理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的诊断与治疗[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(4): 371-373.
- [2] Wang X, Adler KB, Erjefalt J, et al. Airway epithelia dysfunction in the development of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. Expert Rev Resp Med, 2007, 1(1): 149-156.
- [3] Abraham E. NF- $\kappa$ B activation[J]. Crit Care Med, 2000, 28(4 Suppl): S100-104.
- [4] Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling[J]. Nat Immunol, 2003, 4(9): 920-927.
- [5] 张椿, 钱桂生, 赵云峰, 等. SIGIRR-EGFP 真核表达载体构建及在 H292 细胞中的亚细胞定位研究[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(1): 64-67.
- [6] Lissauer ME, Johnson SB, Bochicchio GV, et al. Differential expression of Toll-like receptor genes: sepsis compared with sterile inflammation 1 day before sepsis diagnosis[J]. Shock, 2009, 31(3): 238-244.
- [7] Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis[J]. Immunobiology, 2008, 212(9/10): 715-722.
- [8] Liew FY, Xu D, Brint EK, et al. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(6): 446-458.
- [9] Qin JZ, Qian YC, Yao JH, et al. SIGIRR Inhibits Interleukin-1 Receptor and Toll-like receptor4-mediated Signaling through Different Mechanisms[J]. J Bio Chem, 2005, 280(26): 25233-25241.
- [10] Mizgerd JP, Lupa MM, Hjoberg J, et al. Roles for early response cytokines during Escherichia coli pneumonia revealed by mice with combined deficiencies of all signaling receptors for TNF and IL-1[J]. Am J Physiol, 2004, 286(6): L1302-1310.
- [11] Jones MR, Simms BT, Lupa MM, et al. Lung NF- $\kappa$ B activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia[J]. J Immunol, 2005, 175(11): 7530-7535.
- [12] Lee JS, Frevert CW, Matute-Bello G, et al. TLR4 pathway mediates the inflammatory response but not bacterial elimination in E. coli pneumonia[J]. Am J Physiol, 2005, 289(5): L731-738.
- [14] Knepler JL, Taher LN, Gupta MP, et al. Peroxynitrite causes endothelial cell monolayer barrier dysfunction[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(3): C1064-1075.
- [15] Norman JG, Fink GW, Messina J, et al. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis [J]. Surgery, 1996, 120(3): 515-521.