

高锌对 Caco-2 细胞铁、锌含量及其调控基因 mRNA 表达的影响

张 弋¹, 李正银¹, Li Jing², 秦海宏¹

(1. 第二军医大学海军医学系军队卫生学教研室, 上海 200433; 2. Department of Chemistry & Biochemistry, University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, USA)

[摘要] **目的:**探讨高锌对小肠细胞铁、锌含量和铁、锌调控基因 *DMT1*、*IREG1*、*ZnT1* 及 *hZIP4* mRNA 表达的影响。**方法:**以 Caco-2 细胞为小肠细胞体外模型,以锌浓度分别为 4、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液培养 24 h,用原子吸收分光光度计检测细胞内铁、锌含量,用 RT-PCR 方法检测 *DMT1*、*IREG1*、*ZnT1* 及 *hZIP4* mRNA 表达,以 GAPDH mRNA 水平作为内参照。**结果:**高锌处理 24 h 后 Caco-2 细胞内锌含量升高,培养基锌浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时达到高峰,而细胞内铁含量却随培养基锌浓度升高而降低。细胞内 *DMT1*、*IREG1*、*ZnT1* mRNA 表达均出现上调,*hZIP4* mRNA 表达则发生下调。**结论:**补锌可以提高小肠细胞内锌含量,但会使细胞内铁含量下降。铁和锌在小肠中的吸收可能相互影响。

[关键词] 锌;铁;Caco-2 细胞;*DMT1*;*IREG1*;*ZnT1*;*hZIP4*; 基因表达

[中图分类号] R 151.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0041-05

Effect of high zinc concentrations on contents of iron and zinc and expression of their regulating mRNA in Caco-2 cells

ZHANG Yi¹, LI Zheng-yin¹, LI Jing², QIN Hai-hong¹ (1. Department of Military Hygiene, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Chemistry & Biochemistry, University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effect of high zinc concentrations on contents of iron and zinc and expression of their regulating mRNA in Caco-2 cells. **Methods:** Caco-2 cells were used as model of human small intestinal enterocytes and were treated for 24 h with 4, 50, 100 and 200 $\mu\text{mol/L}$ of zinc. The zinc and iron contents were determined by atom absorption spectrophotography and the expression of *DMT1*, *IREG1*, *ZnT1* and *hZIP4* mRNA were determined by RT-PCR (the level of GAPDH was taken as internal control). **Results:** The zinc content in Caco-2 cells was increased 24 h after treatment with zinc, and reached the peak when exposed to 50 $\mu\text{mol/L}$ zinc. The iron content decreased with the increase of zinc concentration. Zinc supplement increased the expressions of *DMT1*, *IREG1* and *ZnT1* mRNA but decreased the expression of *hZIP4* mRNA. **Conclusion:** It is suggested that zinc supplement can increase the contents of zinc but decrease the contents of iron in Caco-2 cells. There may be interactions between iron and zinc in the intestinal lumen.

[KEY WORDS] zinc; iron; Caco-2 cells; *DMT1*; *IREG1*; *ZnT1*; *hZIP4*; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 41-45]

锌是 300 多种酶保持活性的必要组成部分,并与有丝分裂、DNA 及蛋白质合成、基因表达与激活过程有关^[1]。小肠是膳食锌吸收的主要部位,肠腔中锌水平的提高可以影响铁的吸收以及两者的膳食生物利用率^[2]。以往的研究表明,补锌可使血清铁蛋白和红细胞压积明显下降^[3],其影响机制至今尚不清楚。本实验以 Caco-2 细胞为小肠细胞体外模型,以铁、锌转运体相关基因为切入点,观察了高锌对 Caco-2 细胞铁、锌含量和铁、锌调控基因 *DMT1*、*IREG1*、*ZnT1* 及 *hZIP4* mRNA 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 试剂 高糖型 DMEM 培养基和胰蛋白酶

(Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青公司),培养基双抗(上海生工生物工程公司),RNA 抽提试剂盒(TRIzol Reagent, Gibco BRL 公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),DL2000 DNA marker(TaKaRa 公司)。其余试剂为国产分析纯。

1.1.2 仪器 3510 型原子吸收分光光度计(上海安捷伦科技有限公司),二氧化碳培养箱(FORMA SCIENTIFIC INC-311, USA),Labofuge400R 高速低温离心机(德国 Heraeus 公司),PAC300 电泳仪(美国 BIO-RAD),SX-100 IMAGE SYSTEM(上海四星公司),

[基金项目] 第二军医大学海军医学系创新研究工程基金。Supported by Fund for Innovation Research of Faculty of Navy Medicine of Second Military Medical University.

[作者简介] 张 弋,硕士生,讲师。E-mail: zhangyi_april@sina.com

PTC-100™ PCR 仪(美国 MJ. Research Inc.)。

1.2 小肠细胞体外模型制备 Caco-2 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。用含有 10%小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下常规培养。根据实验需要,按 1×10⁵个细胞/孔接种于六孔板中,继续培养 13 d 至细胞完全融合。

1.3 补锌对 Caco-2 细胞内铁、锌含量的影响 含 10%小牛血清的普通 DMEM 培养液锌浓度经复旦大学分析测试中心测定为 4 μmol/L,加入不同量硫酸锌并经原子吸收分光光度计测定使培养液锌浓度分别为 50、100、200 μmol/L。细胞培养 13 d 经镜下观察达到完全融合后,吸去培养基,PBS 冲洗 2 次,分别加入普通培养基和锌浓度为 50、100、200 μmol/L 的培养基,每组 6 孔,继续培养 24 h 后,吸去全部培养基,PBS 快速冲洗 2 次,10 mmol/L EDTA 冲洗 1 次,PBS 冲洗 1 次,加入纯硝酸 6 ml 消化过夜。用原子吸收分光光度计测定铁、锌含量。

1.4 高锌对 Caco-2 细胞 DMT1、IREG1、hZIP4、ZnT1 mRNA 表达的影响

1.4.1 RNA 的抽提 取培养 13 d 并达到完全融合的细胞,吸去培养基,PBS 冲洗 2 次,分别加入普

通培养基和锌浓度为 50、100、200 μmol/L 的培养基,每组 6 孔,继续培养 24 h 后,弃尽培养基,按试剂盒说明抽提总 RNA。

1.4.2 cDNA 的合成 逆转录体系包括:2 μl 总 mRNA,4 μl Mg²⁺,1 μl RNA 酶抑制剂,1 μl AMV 逆转录酶,1 μl 随机引物,45℃ 反应 60 min,99℃ 5 min 迅速灭活逆转录酶,然后迅速冰浴冷却。

1.4.3 PCR 扩增 在 0.5 ml PCR 薄壁管内加逆转录产物 1 μl,10×PCR buffer 5 μl, MgCl₂ 3 μl, dNTP 0.5 μl, Taq DNA 聚合酶 0.5 μl,上、下游引物(引物序列见表 1)各 1 μl,补充无酶水至总体积 50 μl,反应液表面加矿物油 15 μl 覆盖。PCR 采用热启动法,即先于 99℃ 变性 8 min,降至 80℃ 时再加入 Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件为:94℃ 1 min, GAPDH、ZnT1 52℃ (DMT1 65℃, hZIP4 60℃, IREG1 55℃)退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 扩增 30 循环,最后 72℃ 延伸 10 min。RT-PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, SX-IMAGE 凝胶成像系统进行密度扫描后,以灰度表示电泳带的强度,以对应的 GAPDH 密度为对照,对扩增产物进行半定量分析。

表 1 RT-PCR 所用引物序列

Tab 1 Sequences of primers used in RT-PCR

Gene	Product length(bp)	Primers	Location	Sequence
DMT1	391	Forward	786-805	5'-AAC CCA GCC AGA GCC AGG TA-3'
		Reverse	1 157-1 176	5'-CCC CCT TTG TAG ATG TCC AC-3'
IREG1	447	Forward	245-267	5'-TCA GCG AGA GCA GCA GCA GCG AT-3'
		Reverse	669-691	5'-GAG AAC CCA TCC ATG GTA CAT GG-3'
ZnT1	322	Forward	4-23	5'-ATG GGG GCT CTG GTG AAC GC-3'
		Reverse	306-325	5'-CCT GGT CGG GAC CCT GCT CG-3'
hZIP4	325	Forward	1 711-1 730	5'-GGC TAC TGC CCT ATA TGA TC-3'
		Reverse	2 017-2 035	5'-AGA GTG CTA CGT AAG GAA C-3'
GAPDH	195	Forward	386-403	5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3'
		Reverse	561-580	5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计分析软件进行样本均数的方差分析。

2 结 果

2.1 补锌对 Caco-2 细胞内铁、锌含量的影响 补锌 24 h 后,Caco-2 细胞内铁含量随培养基锌浓度增加而降低,50 μmol/L 组虽有下降,但与对照相比无显著差异($P=0.096$),而 100 μmol/L 组和 200 μmol/L 组分别较对照组下降了 20.8%和 35.6%,均与对照组有显著差异($P<0.05$)。以 50 μmol/L 锌培养 Caco-2 细胞 24 h 后,细胞内锌含量较对照组

高 89.7%,与对照组比差异非常显著($P<0.01$)。随着培养基锌浓度的继续升高细胞内锌含量逐渐下降,当培养基锌浓度达到 200 μmol/L 时,细胞内锌含量与对照组无显著差异($P=0.085$)。见图 1。

2.2 高锌对 Caco-2 细胞 DMT1、IREG1、hZIP4、ZnT1 mRNA 表达的影响 图 2 显示,DMT1 mRNA 和 IREG1 mRNA、ZnT1 mRNA 表达都随培养基锌浓度升高而增高,50、100 和 200 μmol/L 组与对照组相比差异均非常显著($P<0.01$)。hZIP4 mRNA 表达随培养基锌浓度升高而降低,50 μmol/L 组与对照组相比无显著差异($P=0.069$),100 和

200 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比差异均非常显著($P<0.01$)。

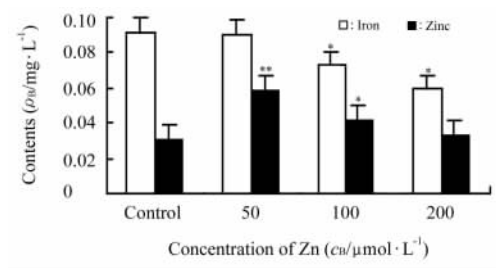


图 1 不同锌浓度培养 24 h 后 Caco-2 细胞内铁、锌含量

Fig 1 Iron and zinc contents in Caco-2 cells 24 h after zinc supplement

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; $n=6$, $\bar{x} \pm s$

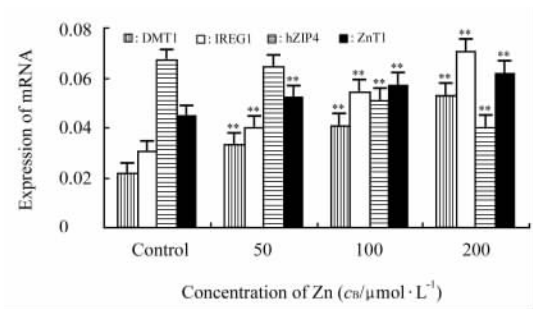


图 2 不同高锌水平培养 24 h 后 Caco-2 细胞中 DMT1、IREG1、hZIP4 ZnT1 mRNA 表达量的比较

Fig 2 Comparison of expression of DMT1, IREG1, hZIP4, ZnT1 mRNA in Caco-2 cells after exposed to different high zinc concentrations for 24 h

** $P<0.01$ vs control group; $n=6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨 论

锌是人体必需的微量元素之一,由于锌与许多细胞功能有关,其在细胞内的浓度受到了严密的调控^[4]。锌的重要功能使锌缺乏与多种机能紊乱相关,胎儿发育早期缺锌可能导致中枢神经系统发育畸形^[5],儿童缺锌可引起生长发育迟缓、食欲减退、机体免疫功能下降^[6]。但体内锌蓄积同样会产生细胞毒性作用,高锌可以通过抑制细胞能量产生而引起神经元的死亡^[7],锌过度蓄积是脑出血、癫痫、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化等发生的重要原因^[8,9]。小肠是膳食锌吸收的主要部位,而以往的研究发现锌和铁在小肠吸收过程中存在着相互竞争关系^[10],补锌后小肠细胞中铁和锌含量的变化可以清楚地反应出肠腔中两者的竞争状况。

本实验发现当培养基锌浓度在 50 $\mu\text{mol/L}$ 以下时,细胞内铁含量变化不明显,但随着培养基锌浓度继续升高,细胞内铁含量明显下降,提示过量锌可以使细胞内铁含量下降。而补锌后细胞内锌含量明显高于对照组,当培养基锌浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时达到峰值,但随着培养基锌浓度继续升高,细胞内锌含量逐渐下降,当培养基锌浓度达到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内锌含量又降到与对照组相当的水平,提示在一定范围内补锌可以提高小肠细胞内锌的含量。

近年来,锌、铁转运体的不断发现对我们了解小肠的锌、铁吸收及转运机制有很大帮助。DMT1 是迄今为止所克隆的第一个哺乳动物跨膜铁转运体,1997 年 7 月和 8 月,分别由美国哈佛医学院 Gunshin 研究小组及由哈佛医学院等机构联合组建的 Fleming 研究小组报道并鉴定得到了促进铁摄取的新 mRNA,即 DMT1^[11,12]。DMT1 广泛分布于机体各组织,其中在小肠和十二指肠的表达最高^[11]。其最主要的功能为对二价金属离子的摄取和转运,在二价金属离子中,DMT1 优先摄取铁,但其是否参与小肠锌转运还不清楚。本实验发现当 Caco-2 细胞暴露于高锌环境 24 h 后,细胞中 DMT1 mRNA 表达显著上调,50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 组分别比对照组上调了 32.1%、78.5%和 133.8%,均有非常显著性差异($P<0.01$),这与高铁对小肠细胞 DMT1 mRNA 表达作用正好相反^[13]。该结果提示,补锌后小肠细胞对铁的摄取是增加的,这与 Yamaji 等^[2]的实验结果一致,因此,我们推测 DMT1 在小肠细胞锌内稳态方面可能有一定的调节作用,但其作用是类似 ZIP,即促进小肠细胞对锌的摄取,还是类似 ZnT1,即促进细胞的锌外流,降低细胞内锌浓度,还有待深入探讨。

IREG1 在人体组织广泛表达,在网状内皮系统、十二指肠及孕期子宫高度表达。在亚细胞水平,IREG1 主要定位在十二指肠上皮细胞的基底膜上和网状内皮系统细胞的胞质区室中^[14]。在十二指肠,IREG1 只在其绒毛成熟的有吸收能力的上皮细胞基底膜上表达,其主要功能是将铁从细胞中释放出来。组织细胞中 IREG1 过度表达可以导致细胞内铁缺失,机体缺铁可以上调 IREG1 在十二指肠的表达,反之,当体内储铁增加时其表达下调。本研究发现 IREG1 mRNA 表达会随培养基锌浓度升高而显著增高,50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 组分别比对照组增高 53.5%、88.8%和 145.1% ($P<0.01$),表明补锌后细胞内铁外流明显增加。这就解释了为什么补锌后小肠细胞内铁含量会下降;虽然补锌后细胞对铁的摄取增加,但由于铁外流同样增加且大于摄入,

因此,细胞内铁含量降低。

hZIP4 是 ZIP 家族中的一员。由于 ZIP 的功能主要是调节锌的摄取,因而是目前国际上锌内稳态研究的热点之一。在人类 ZIP 家族中,已经鉴定出的 ZIP 蛋白共有 14 种,*hZIP1* 和 *hZIP2* 作为锌转入体在 K562 细胞中表达^[15], *hZIP4* 主要定位于小肠细胞顶膜,其主要作用是控制膳食锌摄取,在维持体内锌稳态中发挥重要作用^[16]。现已证实,人类遗传性锌缺乏疾病肠源性肢端皮炎(AE)均与患者体内 *hZIP4* 改变有关^[17]。*hZIP5* 是 ZIP 家族中的最新成员,其序列与 *hZIP4* 的相似,在小肠细胞中的作用也可能与 *hZIP4* 重叠,在机体锌水平的控制中担当重要角色^[18]。本实验观察了高锌水平对小肠细胞 *hZIP4* mRNA 表达的影响,发现随培养基锌浓度升高 *hZIP4* mRNA 表达逐渐降低,50 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比无显著差异($P=0.069$),而 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比分别减少了 24.7% 和 40.4%($P<0.01$),该结果提示 *hZIP4* 的表达受细胞外锌水平的调节,高锌时细胞对锌的摄取减少,这可以避免细胞内锌浓度过高而产生毒性,因此, *hZIP4* 在维持小肠细胞锌内稳态方面可能具有重要作用。

ZnT1 是 *ZnT* 家族中最先被发现的锌转运体,1995 年由 Palmiter 和 Findley 首次报道并命名^[19]。现已有研究报道的 *ZnT* 家族成员有 8 个,其功能、组织或细胞定位各有特点,但也有一定的重叠。最新发现的 *ZnT8* 只定位于胰岛素分泌颗粒,其主要功能是为胰岛 B 细胞中胰岛素的成熟和存储过程提供锌^[20]。*ZnT1* 分布广泛,它在十二指肠和空肠高度表达而在回肠和结肠没有表达,其在肠细胞定位于基底膜,提示其主要功能可能是将过量的锌从肠细胞转运至血中^[21]。以往的动物实验发现,高锌饲料可使大鼠肠 *ZnT1* mRNA 表达比适锌饲喂组高,而缺锌饲料却不会降低 *ZnT1* mRNA 表达^[21]。锌对 *ZnT1* 表达的调控可能通过启动子上的一个金属反应元件进行^[22]。这种调控机制可以减少锌在细胞内蓄积,防止出现锌过量所致的细胞毒性。我们在实验中发现 *ZnT1* mRNA 表达随培养基锌浓度升高而逐渐增高,50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比均差异显著($P<0.01$),分别提高了 17.5%、28% 和 38.6%。该结果提示,高锌状态下小肠细胞 *ZnT1* 表达上调,锌外流增加,这反映了机体适应锌水平变化的反馈防御机制,该反馈调节对小肠细胞维持其锌内稳态具有重要意义。

本研究发现,一定范围内补锌后细胞内锌含量增加。而高锌状态下 *hZIP4* 表达下调,锌摄取减

少;*ZnT1* 表达上调,锌外排增加,两者作用均使细胞内锌含量下降,与前面的实验结果不符。我们推测,高锌状态下除了 *hZIP4* 和 *ZnT1* 对细胞锌水平进行调控外,可能还有其他锌转运体在调节过程中发挥作用,但具体还有哪些锌转运体参与了锌内稳态的调节,它们的作用机制又是如何等问题尚待今后进一步研究。

[参考文献]

- [1] McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes[J]. J Nutr, 2000,130:1437S-1446S.
- [2] Yamaji S, Tennant J, Tandy S, et al. Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells[J]. FEBS Lett, 2001,507:137-141.
- [3] Yadrick MK, Kenney MA, Winterfeldt EA. Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron in adult females[J]. Am J Clin Nutr,1989,49:145-150.
- [4] Mathews WR, Wang F, Eide DJ, et al. Drosophila fear of intimacy encodes a ZRT/IRT-like protein(ZIP)family zinc transporter functionally related to mammalian ZIP proteins[J]. J Biol Chem, 2005, 280:787-795.
- [5] 王福倌,赵法伋,郭俊生. 锌缺乏对小鼠脑发育及功能影响的实验研究[J]. 第二军医大学学报,2000,21:38-41.
- [6] Wellingshausen N, Kirchner H, Rink L. The immunobiology of zinc[J]. Immunol Today,1997, 18: 519-521.
- [7] Dineley KE, Votyakova TV, Reynolds IJ. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration[J]. J Neurochem, 2003,85:563-570.
- [8] Koh JY. Zinc and disease of the brain[J]. Mol Neurobiol, 2001, 24:99-106.
- [9] Uchida Y, Gomi F, Masumizu T, et al. Growth inhibitory factor prevents neurite extension and the death of cortical neurons caused by high oxygen exposure through hydroxyl radical scavenging[J]. J Biol Chem, 2002, 277:32353-32359.
- [10] Donangelo CM, Woodhouse LR, King SM, et al. Supplemental zinc lowers measures of iron status in young women with low iron reserves[J]. J Nutr, 2002, 132:1860-1864.
- [11] Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter[J]. Nature,1997,388:482-488.
- [12] Fleming MD, Andrews NC. Mammalian iron transport: an unexpected link between metal homeostasis and host defense[J]. J Lab Clin Med,1998,132:464-468.
- [13] Martini LA, Tchack L, Wood RJ. Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells[J]. J Nutr, 2002,132: 693-696.
- [14] Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism[J]. J Biol Chem, 2000, 275:19906-19912.
- [15] Kim B, Wang F, Dufner-Bettie J, et al. Zn^{2+} -stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 4523-

4530.

[16] Ford D. Intestinal and placental zinc transport pathways[J]. Proc Nutr Soc, 2004, 63:21-29.

[17] Dufner-Bettie J, Wang F, Kuo Y, et al. The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice[J]. J Biol Chem, 2003, 278; 33474-33481.

[18] Wang F, Kim B, Petris MJ, et al. The mammalian ZIP5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 51433-51441.

[19] Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc[J]. EMBO J,1995, 14:639-649.

[20] Chimienti F, Devergnas S, Favier A, et al. Identification and cloning of a β -cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules[J]. Diabetes, 2004, 53: 2330-2337.

[21] McMahon RJ, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT1 by dietary zinc[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998, 95; 4841-4846.

[22] McMahon RJ, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters[J]. J Nutr,1998,128;667-670.

[收稿日期] 2005-06-09

[修回日期] 2005-11-25

[本文编辑] 尹 茶

Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism

An H, Xu H, Zhang M, Zhou J, Feng T, Qian C, Qi R, Cao X (Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433,China)

[ABSTRACT] Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) plays important roles in negatively regulating the activation of immune cells primarily via the phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) pathway by catalyzing the PI-3K product PtdIns-3,4,5P3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) into PtdIns-3,4P2. However, the role of SHIP1 in Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated lipopolysaccharide (LPS) response remains unclear. Here we demonstrate that SHIP1 negatively regulates LPS-induced inflammatory response via both phosphatase activity-dependent and -independent mechanisms in macrophages. SHIP1 becomes tyrosine phosphorylated and up-regulated upon LPS stimulation in RAW264.7 macrophages. SHIP1-specific RNA-interfering and SHIP1 overexpression experiments demonstrate that SHIP1 inhibits LPS-induced tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) production by negatively regulating the LPS-induced combination between TLR4 and myeloid differentiation factor 88 (MyD88); activation of Ras (p21^{ras} protein), PI-3K, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), p38, and c-Jun NH2-terminal kinase (JNK); and degradation of IkappaB-alpha. SHIP1 also significantly inhibits LPS-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in TLR4-reconstituted COS7 cells. Although SHIP1-mediated inhibition of PI-3K is dependent on its phosphatase activity, phosphatase activity-disrupted mutant SHIP1 remains inhibitory to LPS-induced TNF-alpha production. Neither disrupting phosphatase activity nor using the PI-3K pathway inhibitor LY294002 or wortmannin could significantly block SHIP1-mediated inhibition of LPS-induced ERK1/2, p38, and JNK activation and TNF-alpha production, demonstrating that SHIP1 inhibits LPS-induced activation of MAPKs and cytokine production primarily by a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism.

[Blood, 2005,105: 4685-4692]