

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00998

核转录因子 κ B 抑制子 α 、 β 和 ϵ 共同稳定下调的 HepG2 细胞系的建立

付 静, 陈 瑶, 任一彬, 钱尤雯, 王红阳*

第二军医大学东方肝胆外科医院国际合作生物信号转导研究所, 上海 200438

[摘要] **目的:** 利用 RNA 干扰的方法, 构建针对人核转录因子 κ B 抑制子 ($I\kappa B$) α 、 β 和 ϵ 的共同干扰载体, 转染人肝细胞癌 HepG2 细胞, 建立稳定、共同下调 $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 的 HepG2 细胞系, 为后续研究奠定基础。**方法:** 构建 3 个针对人 $I\kappa B\alpha$ 基因的干扰载体 pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ (1,2,3), 转染 HepG2 细胞, 在 mRNA 和蛋白水平检测 3 个干扰载体对 $I\kappa B\alpha$ 表达的抑制作用, 筛选出抑制效果最好的干扰载体。以同样的方法构建并筛选出分别针对人 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 基因的最佳干扰载体, 通过酶切连接反应将分别针对 $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 基因的 3 个最佳干扰片段串联连入 pcDNATM6.2-miR 干扰载体中, 构建可同时干扰 $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 的共同干扰载体 pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ - $I\kappa B\beta$ - $I\kappa B\epsilon$ 。将共同干扰载体转染 HepG2 细胞, 通过 G418 筛选, 建立 $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 的表达共同稳定下调的 HepG2 细胞系, 并以蛋白质印迹法检测 $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 的蛋白表达。**结果:** 成功构建共同干扰载体 pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ - $I\kappa B\beta$ - $I\kappa B\epsilon$; Western 印迹结果显示, 与正常及对照载体 pcDNATM6.2-miR-Neg 转染的 HepG2 细胞相比, 在稳定转染 pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ - $I\kappa B\beta$ - $I\kappa B\epsilon$ 的 HepG2 细胞系中, $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 的表达均稳定下调。**结论:** 成功建立了 $I\kappa B\alpha$ 、 $I\kappa B\beta$ 和 $I\kappa B\epsilon$ 共同稳定下调的人肝细胞癌 HepG2 细胞系, 为后续研究奠定了基础。

[关键词] 核转录因子 κ B 抑制子; RNA 干扰; HepG2 细胞; 干扰载体

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-0998-06

Establishment of a stable HepG2 cell line with simultaneous knockdown of nuclear factor-kappaB inhibitors $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$ and $I\kappa B\epsilon$ genes

FU Jing, CHEN Yao, REN Yi-bin, QIAN You-wen, WANG Hong-yang*

International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a human hepatic cancer cell line HepG2 with stable, simultaneous knockdown of three nuclear factor-kappaB inhibitors ($I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$, and $I\kappa B\epsilon$) by RNA interference using pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ - $I\kappa B\beta$ - $I\kappa B\epsilon$ co-targeting $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$, and $I\kappa B\epsilon$ genes, so as to lay a foundation for future study. **Methods:** We designed and constructed three interfering plasmids pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ (1,2,3) targeting human $I\kappa B\alpha$ gene; the three vectors were transfected into HepG2 cells separately and the most effective interfering fragment was identified by RT-PCR and Western blotting analysis. Similarly, we also constructed and selected the most effective interfering vectors targeting $I\kappa B\beta$ and $I\kappa B\epsilon$. Then we chained the three most effective interfering fragments (miR- $I\kappa B\alpha$, miR- $I\kappa B\beta$, and miR- $I\kappa B\epsilon$) into pcDNATM6.2-miR vector to construct pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ - $I\kappa B\beta$ - $I\kappa B\epsilon$ vector, which was used to transfect HepG2 cells and the transfectants were selected by G418. The expression of $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$, and $I\kappa B\epsilon$ in the transfectants was examined by Western blotting analysis. **Results:** We successfully constructed the pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ - $I\kappa B\beta$ - $I\kappa B\epsilon$ vector. Western blotting analysis showed that, compared with the normal HepG2 cells and those transfected with pcDNATM6.2-miR-Neg vector, the protein expression of $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$, and $I\kappa B\epsilon$ was stably down-regulated in cells transfected with pcDNATM6.2-miR- $I\kappa B\alpha$ - $I\kappa B\beta$ - $I\kappa B\epsilon$ vector. **Conclusion:** We have successfully established a HepG2 cell line with simultaneous knockdown of $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$, and $I\kappa B\epsilon$, paving a way for future study.

[KEY WORDS] inhibitor of nuclear factor-kappaB; RNA interference; HepG2 cells; interfering vector

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):998-1003]

核转录因子 κ B (nuclear factor-kappaB, NF- κ B) 广泛存在于各种细胞中, 参与了免疫调节、炎症反

[收稿日期] 2009-08-10 **[接受日期]** 2009-09-11

[基金项目] 上海市自然科学基金(08ZR1405500). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai(08ZR1405500).

[作者简介] 付 静, 研究实习员. E-mail: fujing-724@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.com

应、生长控制、分化、肿瘤发生以及细胞凋亡等过程^[1-3]。在静息状态下, NF- κ B 复合体和核转录因子 κ B 抑制子 I κ B 家族成员结合滞留于细胞质中。经刺激后, I κ B 家族成员发生磷酸化、泛素化和蛋白酶体介导的蛋白降解, 致使 NF- κ B 二聚体与 I κ B 家族成员解离进入细胞核激活下游靶基因表达。核转录因子 κ B 抑制子 I κ B 家族包括 I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ 、I κ B ζ 及 Bcl-3, 有研究者把 p105 (I κ B γ)、p100 (I κ B δ) 这两个蛋白也归为 I κ B 家族成员。其中发挥主要作用的是 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 蛋白^[4-6]。

目前, NF- κ B 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发生发展中的作用仍不十分明了。有些研究表明在肝细胞癌组织中 NF- κ B 表达强度明显高于癌周组织及正常肝组织, 其表达与肝细胞癌的发生、发展呈正相关。但也有些研究表明肝细胞中 NF- κ B 的活化能抑制肝细胞癌的发生, 但它在炎性细胞 (如巨噬细胞) 中的活化却能促进肿瘤的发生与发展^[7]。为进一步探讨 NF- κ B 的活化在肝细胞癌发生、发展中的作用, 本研究采用 RNA 干扰技术, 构建并筛选出可同时干扰 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的共同干扰载体 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ 。将该载体转染人肝细胞癌 HepG2 细胞, 建立 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的表达共同稳定下调的 HepG2 细胞系, 使得 NF- κ B 在该细胞系中持续稳定活化, 为 NF- κ B 的功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 pcDNATM6.2-miR 和 pcDNATM6.2-miR-Neg 载体购自 Invitrogen 公司。宿

主菌 *Escherichia coli* DH5 α 和 HepG2 细胞为德国马普生化所提供, 本室保存。TRIzol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录酶 M-MLV、Taq 酶购自 Promega 公司; 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、琼脂糖 DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; 胰化蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司; 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、胰蛋白酶和胎牛血清购自 Gibco BRL 公司; G418、脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; DNA 及蛋白 Marker 购自 MBI 公司; 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司; 3M 滤纸购自 Whatman 公司; 硝酸纤维素膜购自 S&S 公司; 抗 p65、p50、I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ 一抗和 ECL 化学发光检测系统购自 Santa Cruz 公司; 抗 GAPDH 一抗、抗鼠及抗兔二抗购自康成生物科技有限公司。所需引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 针对人 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的单基因干扰载体的构建及鉴定

1.2.1 设计寡核苷酸插入片段 根据 GenBank 中人 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的基因序列, 设计能产生发夹 RNA 结构的寡核苷酸片段。每个基因选取 3 个干扰靶位点设计插入片段, 详细序列如下 (表 1)。该片段含有两个干扰结构域, 每个结构域长 21 个核苷酸且与目标基因的编码区相对应。这两个结构域能形成反向互补序列并被 19 个核苷酸 (以加粗字母表示) 所分开形成发夹茎环。插入片段可通过合成两条互补的寡核苷酸片段退火形成, 其 5' 和 3' 端分别含有与载体 (图 1) 互补的黏端。

表 1 针对人 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 基因的干扰片段序列

Tab 1 Interfering sequences targeting human I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ genes

Target gene		Interfering segments(5'-3')
I κ B α miRNA1	anti-sense	TGCTGTAGAGGCTAAGTGTAGACACG TTTTGGCCACTGACTGAC CGTGTCTACTTAGCCTCT
	sense	TGTAGAGGCTAAGTAGACACG GTCAGTCAGTGGCCAAAAC CGTGTCTACACTTAGCCTCTAC
I κ B α miRNA2	anti-sense	GCTGAGCAATTTCTGGCTGGTTGGT GTTTTGGCCACTGACTGAC ACCAACCACAGAAATTGCT
	sense	CTGAGCAATTTCTGTGGTTGGT GTCAGTCAGTGGCCAAAAC ACCAACCAGCCAGAAATTGCTC
I κ B α miRNA3	anti-sense	TGCTGTGAGCTGGTAGGGAGAAATAGCG TTTTGGCCACTGACTGAC GCTATTCTCTACCAGCTCA
	sense	CTGTGAGCTGGTAGAGAATAGCG GTCAGTCAGTGGCCAAAAC GCTATTCTCCCTACCAGCTCAC
I κ B β miRNA1	anti-sense	TGCTGAATCACAGCCAAGTGCAGTGC TTTTGGCCACTGACTGAC GCAGCTGCATGGCTGTGATT
	sense	CTGAATCACAGCCATGCAGTGC GTCAGTCAGTGGCCAAAAC GCAGCTGCAGCTGGCTGTGATT
I κ B β miRNA2	anti-sense	TGCTGAATCCAGGAAGGTTTCATGCT GTCAGTCAGTGGCCAAAAC AGCATGAACCTTCTGGATT
	sense	CTGAATCCAGGAAGGTTTCATGCT GTCAGTCAGTGGCCAAAAC AGCATGAACCTTCTGGATT
I κ B β miRNA3	anti-sense	TGCTGCATCTTTGTGGATAACG GGCAGTTTTGGCCACTGACTGAC TGGCCGTTCCACAAAGATG
	sense	CTGCATCTTTGTGGAAACG GGCAGTCAGTCAGTGGCCAAAAC TGGCCGTTATCCACAAAGATGC
I κ B ϵ miRNA1	anti-sense	TGCTGTGTAAGTGAGTGCTTCCAGCT GTTTTGGCCACTGACTGAC AGCTGGAAACTCACTTACA
	sense	CTGTGTAAGTGAGTTTCCAGCT GTCAGTCAGTGGCCAAAAC AGCTGGAAGCACTCACTTACAC
I κ B ϵ miRNA2	anti-sense	TGCTGATGAAGGGCTGTGTACCATGG TTTTGGCCACTGACTGAC CATGGTGACAGCCCTTCAT
	sense	CTGATGAAGGGCTGTACCATGG GTCAGTCAGTGGCCAAAAC CATGGTGACAGCCCTTCATC
I κ B ϵ miRNA3	anti-sense	TGCTGATCAATGTCAGCTCCATTC CGTTTTGGCCACTGACTGAC CCGGAATGGCTGACATTGAT
	sense	CCTGATCAATGTCAGCCATTCC GGTCAGTCAGTGGCCAAAAC CCGGAATGGAGCTGACATTGATC

Bold-faced fragment indicating the hairpin loop

1.2.2 针对单基因的干扰载体的构建 首先,将上述设计的单链寡核苷酸片段进行退火。反应体系:正义链 5 μ l(200 μ mol/L),反义链 5 μ l(200 μ mol/L),10 \times 退火缓冲液 2 μ l 和去离子水 8 μ l,终体积为 20 μ l。95 $^{\circ}$ C 孵育 4 min,逐渐冷却至室温。将退火得到的双链插入片段接入干扰载体。反应体系:载体 pcDNATM6.2-miR 2 μ l (5 ng/ μ l),插入片段 4 μ l(10 nmol/L),5 \times 连接缓冲液 4 μ l,T₄ DNA 连接酶 1 μ l,去离子水 9 μ l,终体积为 20 μ l。将该连接体系置于室温 5~30 min。取 5 μ l 连接产物转入 100 μ l 的 DH5 α 感受态细菌,铺在含有 50 μ g/ml 壮观霉素的琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取 5~10 个具有抗性的单克隆,测序鉴定。

1.2.3 干扰效果的检测 参照 LipofectamineTM2000 操作说明将针对单基因的干扰载体 pcDNATM6.2-miR-I κ B α (1,2,3)、pcDNATM6.2-miR-I κ B β (1,2,3)和 pcDNATM6.2-miR-I κ B ϵ (1,2,3)转染到培养状态良好的 HepG2 细胞。同时以 pcDNATM6.2-miR-Neg 载体(其插入片段不针对任何脊椎动物基因)转染的 HepG2 细胞为阴性对照。持续培养细胞 72 h 后提取细胞 RNA 和蛋白质,分别在 mRNA 和蛋白质水平检测各干扰载体对相应基因的干扰效果,每个基因挑选出一个干扰效果最佳的载体。

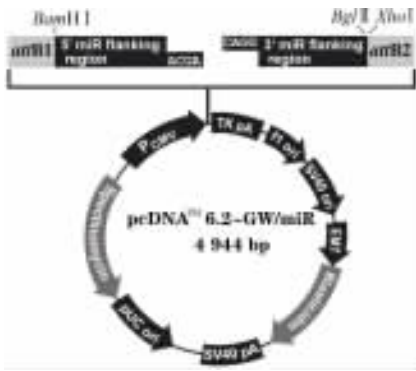


图 1 pcDNATM6.2-miR 载体图谱
Fig 1 Map of pcDNATM6.2-miR vector

1.3 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 共同干扰载体的构建

1.3.1 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β 双干扰载体的构建 取具有最好干扰效果的 pcDNATM6.2-miR-I κ B α 干扰载体,以 BglIII 和 XhoI 进行双酶切。经 1% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收约 5 000 bp 大小的载体片段,作为后续连接的载体骨架。另取挑选出的 pcDNATM6.2-miR-I κ B β 干扰载体以 BamHI 和 XhoI 进行双酶切,

经 2% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收约 60 bp 大小的 miR-I κ B β 插入片段。将上述双酶切得到的 miR-I κ B β 插入片段接入 pcDNATM6.2-miR-I κ B α 载体骨架。取 5 μ l 连接产物转入 100 μ l 的 DH5 α 感受态细菌,铺在含有 50 μ g/ml 壮观霉素的琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取 5~10 个具有抗性的单克隆,测序鉴定,即可得到 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β 双干扰载体。实验流程如图 2 所示。

1.3.2 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ 共同干扰载体的构建 取上述构建得到的 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β 和 pcDNATM6.2-miR-I κ B ϵ 载体按上述方法进行双酶切,将 miR-I κ B ϵ 插入片段接入 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β 骨架载体,通过转化、抗性筛选和测序,得到可同时干扰 I κ B α 、I κ B β 及 I κ B ϵ 的共同干扰载体。

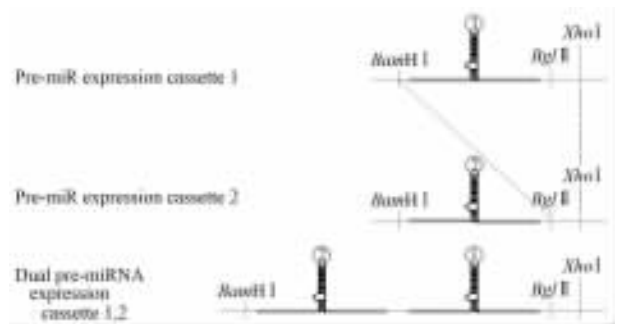


图 2 共同干扰载体构建示意图
Fig 2 Construction of pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ plasmid

1.4 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 共同稳定下调细胞系的建立及鉴定 选取共同干扰载体 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ ,转染生长状态良好的 HepG2 细胞。转染 48 h 后,换成含有 400 μ g/ml G418 的选择性培养基,筛选培养 20 d,在显微镜下挑选单克隆,获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆并扩增培养。取 pcDNATM6.2-miR-Neg 载体转染细胞并建立稳定细胞系,作为后续实验的阴性对照。以 Western 印迹检测正常 HepG2 细胞、pcDNATM6.2-miR-Neg 转染组和 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ 转染组中相关蛋白的表达情况。

1.5 Western 印迹结果的分析 将 Western 印迹结果通过 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件系统进行定量分析,计算单位 D 值和条带面积,将各实验组的总 D 值与对照组比较,得到相对百分数。

1.6 统计学处理 全部数据采用统计学软件

SPSS 11.0 进行统计学处理, 各组间数据比较采用 t 检验法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒抽提及测序结果 抽提得到针对单基因的 pcDNATM6.2-miR-I κ B α (1, 2, 3)、pcDNATM6.2-miR-I κ B β (1, 2, 3) 和 pcDNATM6.2-miR-I κ B ϵ (1, 2, 3) 干扰载体(图 3)。经测序鉴定该 9 个干扰载体中均含有正确的插入片段。

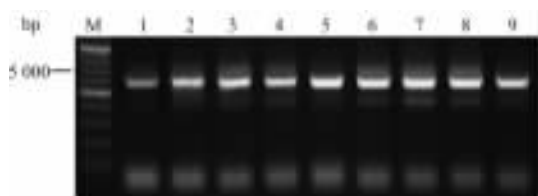


图 3 质粒抽提结果

Fig 3 Results of plasmid extracting

M: Marker; 1-3: pcDNATM6.2-miR-I κ B α (1, 2, 3); 4-6: pcDNATM6.2-miR-I κ B β (1, 2, 3); 7-9: pcDNATM6.2-miR-I κ B ϵ (1, 2, 3)

2.2 干扰结果的检测

2.2.1 mRNA 水平 取上述 9 种针对单基因的干扰载体及 pcDNATM6.2-miR-Neg 对照载体转染 HepG2 细胞 72 h 后, 提取细胞 mRNA, RT-PCR 结果显示在针对每个基因的 3 个干扰载体中均有 1~2 个载体具有较好的干扰效果, 目的基因 mRNA 水平下调 80% 以上(图 4)。

2.2.2 蛋白质水平 将针对单基因的干扰载体及 pcDNATM6.2-miR-Neg 对照载体转染 HepG2 细胞

72 h 后, 提取细胞总蛋白, 通过 Western 印迹检测 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的蛋白表达变化, 结果表明在针对每个基因的 3 个干扰载体中均有 1~2 个载体具有较好的干扰效果, 蛋白表达量下调 80% 以上, 与 mRNA 水平干扰结果一致。Western 印迹定量结果(图 5)亦显示转染干扰载体组与对照组相比目的基因的蛋白表达量明显下调, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图 5)。分别选取具有最佳干扰效果的 pcDNATM6.2-miR-I κ B α (3)、pcDNATM6.2-miR-I κ B β (1) 和 pcDNATM6.2-miR-I κ B ϵ (3) 构建三基因共同干扰载体 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ , 并建立 HepG2 稳定细胞系。

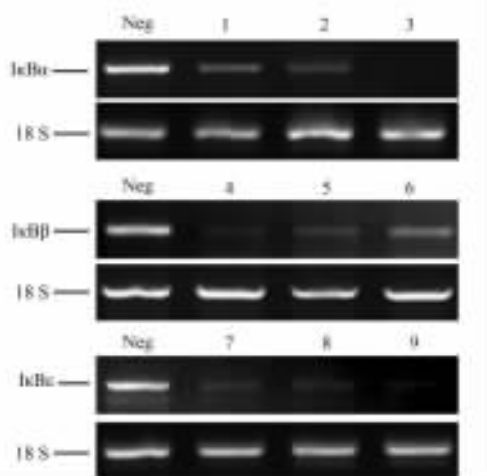


图 4 干扰载体 mRNA 水平对目的基因表达的抑制作用

Fig 4 Inhibited expression of I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ mRNA in HepG2 cells transfected with interfering plasmids

Neg: pcDNATM6.2-miR-Neg; 1-3: pcDNATM6.2-miR-I κ B α (1, 2, 3); 4-6: pcDNATM6.2-miR-I κ B β (1, 2, 3); 7-9: pcDNATM6.2-miR-I κ B ϵ (1, 2, 3)

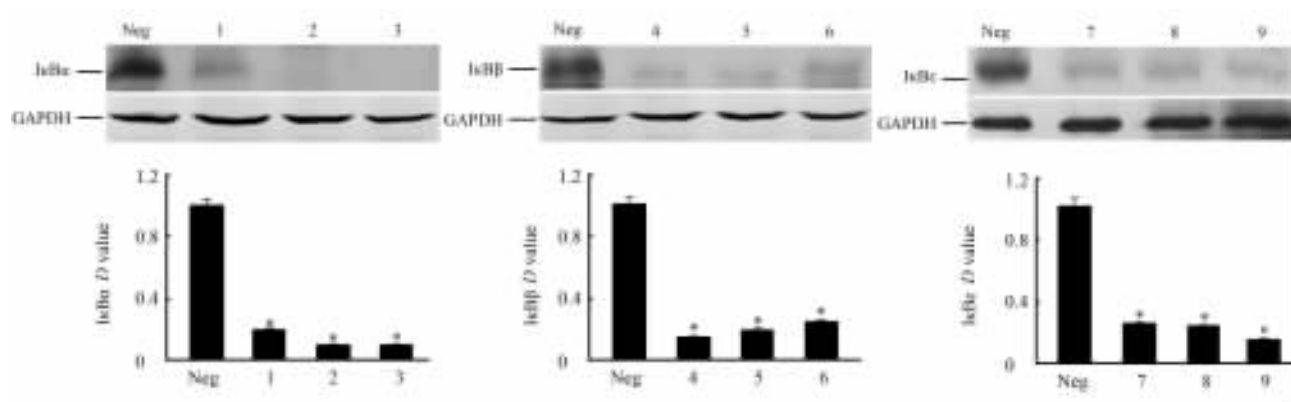


图 5 干扰载体在蛋白水平对目的基因表达的抑制作用

Fig 5 Expression of I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ in HepG2 cells transfected with interfering plasmids

Neg: pcDNATM6.2-miR-Neg; 1-3: pcDNATM6.2-miR-I κ B α (1, 2, 3); 4-6: pcDNATM6.2-miR-I κ B β (1, 2, 3); 7-9: pcDNATM6.2-miR-I κ B ϵ (1, 2, 3).

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

2.3 共同稳定下调 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的 HepG2 细胞系的建立 蛋白质印迹结果和定量分析(图 6)显示,与正常 HepG2 细胞及 pcDNATM6.2-miR-Neg 稳定转染组相比,在稳定转染 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ 的细胞中,I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 蛋白表达均明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但

内源 p65、p50 和 GAPDH 均未见明显改变,这表明该共同稳定下调细胞系可有效、特异性抑制蛋白 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的表达,为后续实验奠定了基础。正常 HepG2 细胞株及 pcDNATM6.2-miR-Neg 稳定转染组中各蛋白表达未见明显差异,定量结果无统计学意义。

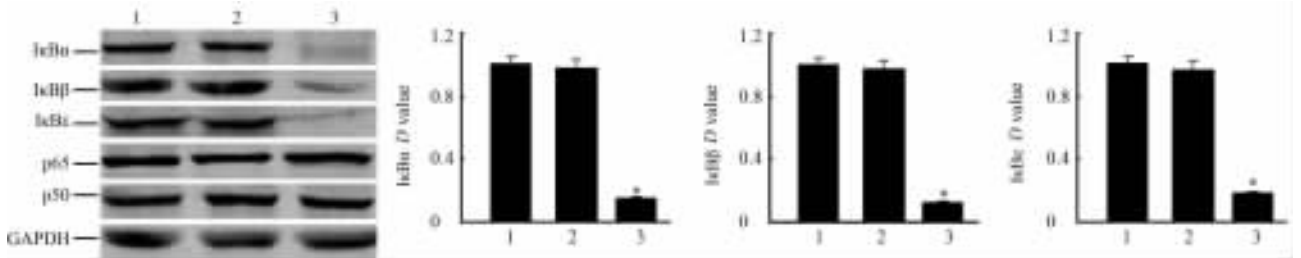


图 6 共同稳定下调 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 的 HepG2 细胞系的鉴定

Fig 6 Identification of HepG2 cells transfected with pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ

1: Normal HepG2 cells; 2: Transfected by pcDNATM6.2-miR-Neg; 3: Transfected by pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ . * $P < 0.05$ vs normal HepG2 cells; $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

转录因子 NF- κ B 是信号转导途径中关键性的转录因子, κ B 位点存在于多种细胞和病毒的基因组中,因而 NF- κ B 能够调控众多基因转录及其信号通路,与许多疾病相关。在过去的 20 年里,关于 NF- κ B 通路的调节机制及其如何在生理病理状态中发挥功能,已取得了许多研究结果。目前已普遍认为 NF- κ B 的激活与急性炎症和细胞存活机制相关,诸多恶性肿瘤中 NF- κ B 亦呈持续性活化^[8]。由于诸多炎症反应因子、细胞因子、化学因子、蛋白酶和凋亡抑制子均参与了 NF- κ B 的激活,因而 NF- κ B 活化通路可能联系着肿瘤的发生和发展^[7]。该假设在小鼠炎症相关的肝癌和大肠癌中均得到了证实^[9]。

在静息状态下,NF- κ B 复合体和抑制性蛋白 I κ B 家族成员(主要为 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ)结合滞留于细胞质中,在一定刺激作用下,NF- κ B 二聚体与 I κ B 家族成员解离进入细胞核激活靶基因。I κ B 蛋白的共同特点是存在多个紧密相邻的由 33 个氨基酸组成的重复序列,称为锚蛋白基序。I κ B 蛋白的主要功能是覆盖 NF- κ B 复合体的核定位信号,阻止 NF- κ B 转移入细胞核;在细胞核阻碍 NF- κ B 与 DNA 的结合;解离 NF- κ B 与 DNA 的复合物^[10-11],并通过其 N 端及 C 端的出核序列促使 NF- κ B 出核^[12]。目前认为 NF- κ B 与 I κ B 形成复合体穿梭于胞核胞质且处于动态平衡,I κ B 抑制蛋白和 NF- κ B

解离才是激活 NF- κ B 转录的关键,I κ B 降解后释放出的游离 NF- κ B 才可与核内 DNA 结合并激活转录。

肝细胞癌(简称肝癌)是一种常见的恶性肿瘤,其发病机制目前仍不完全清楚。现认为,多基因、多阶段的癌基因或抑癌基因变异构成肝癌发生发展的分子基础。目前有研究证实,NF- κ B 信号转导途径参与了肝脏免疫炎症反应相关基因、肝炎病毒相关基因、原癌基因和抑癌基因的转录表达^[9]。NF- κ B 在肝癌组织中的异常激活,可抑制细胞凋亡,促进肝细胞存活,与肝癌的发生发展密切相关^[13-14]。但亦有结果表明肝细胞中 NF- κ B 的活化能抑制肝癌的发生^[7]。

为明确 NF- κ B 的活化在肝癌发生发展中的作用,曾有研究者尝试利用 RNA 干扰的方法下调 I κ B α 的表达以激活 NF- κ B。但由于 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 三者和功能上可相互代偿,单独下调一种蛋白,无法很好地实现 NF- κ B 的活化。本研究为解决这一问题,设计并构建了可同时有效干扰 3 种主要 I κ B 蛋白的共同干扰载体 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ ,将其转染 HepG2 细胞,通过筛选建立稳定转染的 HepG2 细胞系。结果表明稳定转染 pcDNATM6.2-miR-I κ B α -I κ B β -I κ B ϵ 后,HepG2 细胞中 I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ 蛋白表达均明显受抑制,为 NF- κ B 在肝癌中功能的研究提供了很好的细胞模型,也为实现利用一个载体同时干扰多个基因提供了一种有效

的方法。

[参考文献]

- [1] Karin M, Florian R G. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression[J]. Nat Immunol, 2005, 5: 749-759.
- [2] Pratt M A, Tibbo E, Robertson S J, Jansson D, Hurst K, Perez-Iratxeta C, et al. The canonical NF- κ B pathway is required for formation of luminal mammary neoplasias and is activated in the mammary progenitor population[J]. Oncogene, 2009, 28: 2710-2722.
- [3] Gallardo-Perez J C, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Daniel A, Rodriguez-Enriquez S, Aviles A, et al. NF- κ B is required for the development of tumor spheroids[J]. J Cell Biochem, 2009, 108: 169-180.
- [4] Solt L A, May M J. The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling[J]. Immunol Res, 2008, 42: 3-18.
- [5] Palmer S, Chen Y H. Bcl-3, a multifaceted modulator of NF- κ B-mediated gene transcription[J]. Immunol Res, 2008, 42: 210-218.
- [6] Vinay T, Ricardo G C, Masahito I, Verma I M. Distinct roles of I κ B proteins in regulating constitutive NF- κ B activity[J]. Nat Cell Biol, 2005, 7: 921-923.
- [7] Greten F R, Eckmann L, Greten T F, Park J M, Li Z W, Egan L J, et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer[J]. Cell, 2004, 118: 285-296.
- [8] Karin M, Cao Y, Greten F R, Li Z W. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit[J]. Nature Rev Cancer, 2002, 2: 301-310.
- [9] Pikarsky E, Porat R M, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF- κ B functions as a tumor promoter in inflammation-associated cancer[J]. Nature, 2004, 431: 461-466.
- [10] Birbach A, Gold P, Binder B R, Hofer E, Martin R, Schmid J A. Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 10842-10851.
- [11] Huang T T, Miyamoto S. Postrepression activation of NF- κ B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I κ B α [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21: 4737-4747.
- [12] Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 45225-45235.
- [13] 姚登福, 苏小琴. 核因子- κ B异常激活与肝炎病毒感染关系的研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 23: 1862-1864.
- [14] Wang T, Wang Y, Wu M C, Guan X Y, Yin Z F. Activating mechanism of transcription factor NF- κ B regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 356-360.

[本文编辑] 邓晓群

· 书 讯 ·

《传染病护理学》(第2版)已出版

本书由石宏、石雪松、江智霞主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-838-1,16开,定价:29.00元。

本书自2005年第1版出版发行以来,已十多次重印。2009年2月第2版改版后,至同年10月,已第3次印刷。最后一次印刷时内容更新了甲型H1N1流感、手足口病、艾滋病、人禽流感、传染性非典型肺炎,以及卫生部新发布的关于前述几种疾病的防治指南文件。

本书的其他内容涉及传染病护理学的基本概念和理论、工作原则和方法,传染病防治法规定的传染病(含新列入的)的病原学、流行病学、临床特征、诊治措施、护理诊断和方法,以及相关的健康教育知识。与第1版相比较,变更的内容有传染病隔离、医院获得性感染及传染性非典型肺炎防治管理办法等,并对新发传染病如传染性非典型肺炎、禽流感、手足口病、甲型H1N1流感等内容进行了完善和补充。

本书适合临床护理专业本、专科以及成人教育等不同层次学生学习使用,也可作为临床护理工作自学提高时的学习参考书。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595 65493093

<http://www.smmup.cn>