

刘超英,董 骏,高 洪,等. 泛素基因沉默对 TLR4/NF- κ B 信号通路中关键分子表达的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(8):37-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.008

泛素基因沉默对 TLR4/NF- κ B 信号通路中关键分子表达的影响

刘超英,董 骏,高 洪,严玉霖,富国文,单春兰

(云南农业大学动物科学技术学院,云南昆明 650201)

摘要:为了探讨泛素(ubiquitin,简称 Ub)对 TLR4/NF- κ B 信号通路中关键分子表达的影响,通过脂质体将短发夹 RNA(shRNA)质粒转染猪小肠上皮细胞,使其泛素基因沉默,于转染后 6、12、24、48 h 收集细胞及其上清。应用荧光定量 PCR 检测细胞内 TLR4/NF- κ B 信号通路中关键分子 TLR4、NF- κ B、MyD88、I κ B- α 的 mRNA 表达水平,应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 NF- κ B、I κ B- α 及炎症因子 TNF- α 、IL-1 含量的变化。结果显示,shRNA 质粒有效地抑制了泛素基因的表达,转染 shRNA 质粒后,TLR4/NF- κ B 信号通路中 TLR4、NF- κ B、MyD88 和 I κ B- α 的 mRNA 表达量及 NF- κ B、I κ B- α 、TNF- α 和 IL-1 含量均普遍呈下降的趋势,说明泛素在炎症因子的释放中起着至关重要的作用,泛素基因的沉默能够抑制该通路的活化。

关键词:泛素;基因沉默;信号通路;炎症因子

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)08-0037-04

泛素-蛋白酶体途径是一种广泛存在于真核细胞中的非常重要的、依赖于腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的蛋白质降解途径,可以从多个环节参与调控 NF- κ B 信号通路^[1-3]。泛素(ubiquitin,简称 Ub)作为该途径的重要组成部分,可以降解 TLR4/NF- κ B 信号通路中的 I κ B,使 NF- κ B 游离到细胞核内参与炎症因子的合成,从而诱发炎症反应^[4-6]。当该途径受到抑制时,会导致活性 NF- κ B 的产生量减少,抗凋亡蛋白的水平随之降低,使细胞出现凋亡^[7]。

短发夹 RNA(short hairpin RNAs,简称 shRNAs)是能够形成发夹结构的非编码小 RNA 分子,因其具有特殊的茎环结构,在哺乳动物细胞中可以长期甚至稳定地发挥 RNA 干扰作用,而不引起非特异性反应。因此,目前 shRNA 介导的 RNA 干扰技术已经成为研究哺乳动物细胞内外基因功能强有力的工具^[8-10]。为了研究泛素基因对 TLR4/NF- κ B 信号通路的作用,本研究利用 shRNA 干扰技术对猪小肠上皮细胞的泛素基因进行沉默,并对 TLR4/NF- κ B 信号通路中关键分子的表达情况进行检测,不仅可以为基因沉默的相关研究提供理论依据,还可以为从蛋白降解角度寻找治疗炎症类疾病的新思路奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2017-11-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260594,31660704);云南省高校科技创新团队支持计划(编号:云教科[2011]14号);云南生猪产业技术体系建设专项经费(编号:云财农[2009]171号)。

作者简介:刘超英(1992—),女,河南安阳人,博士研究生,主要从事分子病理学研究。E-mail:1107946950@qq.com。

通信作者:高 洪,博士,教授,从事动物病理学方向的研究。
E-mail:gaohongping@163.com。

猪小肠上皮细胞(IPEC-J2),购自广州吉尼欧生物有限公司;焦碳酸二乙酯(DEPC)、2×Easy Taq PCR Super Mix,购自北京百泰克生物有限公司;Lipofectamine 3000 转染试剂,购自 Lifetechnologies 公司;胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶溶液[0.25% 胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)],购自 Gibico 公司;DMEM 高糖培养基,购自 Hyclone 公司。本试验于云南农业大学动物医学院动物病理实验室完成。

1.2 试验方法

1.2.1 猪小肠上皮细胞的培养 于 37℃ 水浴,使 IPEC-J2 尽量在 1 min 内完全融化,于 4 000 r/min 离心 5 min,加入 1 mL DMEM 培养液将底部细胞吹打均匀后,注入含有 6 mL DMEM 培养液和 10% 胎牛血清的细胞培养瓶内,轻缓摇晃使细胞均匀分布,然后置于 37℃、5% CO₂ 的温箱内培养。

1.2.2 shRNA 质粒的设计及构建 根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站中的猪泛素基因的核苷酸序列,设计针对猪泛素基因保守区的 shRNA 序列 UBC-sus-263(5'-GAGAACGTCAAGGCGAAGATC-3'),并设计阴性对照 UBC-shNC(5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGT-3'),质粒载体为 U6/GFP/Neo,带绿色荧光标记,由上海吉玛制药公司合成。将质粒 DNA 溶液于 -20℃ 保存,对应的甘油菌液于 -80℃ 保存。

1.2.3 泛素基因沉默 在六孔板中培养 IPEC-J2 细胞,当汇合度达到 80% 左右时将培养液换为 2 mL 无血清、无抗生素的 DMEM 培养基,开始转染。转染分为空白细胞对照组、shRNA 质粒转染组和空白质粒转染组,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,分别在培养 6、12、24、48 h 时收集细胞及其上清。

1.2.4 引物设计 本试验选用 β -actin 作为内参基因,在 NCBI 网站中查找公开发表的 β -actin、TLR4、NF- κ B、MyD88 和 I κ B- α 基因序列,遵循实时荧光定量 PCR(Real-Time

PCR) 的引物设计原则,利用 Primer 6.0 软件设计引物,并由 深圳华大基因股份有限公司合成,引物序列如表 1 所示。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	T_m (℃)	产物长度 (bp)
β -actin(GenBank 登录号:AY550069.1)	F:GATGAGATTGGCATGGCTTT;R:CACCTTCACCGTTCAGTTT	55	122
TLR4(GenBank 登录号:AB232527)	F:CCCTCTTTCATCTCTGCCTTC;R:GGGACACCACGACAATAACCT	61	114
NF- κ B(GenBank 登录号:EU399817)	F:CGGGGACTACGACCTGAATG;R:CAAAGATGGGGTGAGAGAGGA	59	107
I κ B- α (GenBank 登录号:NM_001005150.1)	F:TCCACTTGGCGGTGATCA;R:ATCACAGCCAGCTTCCAGAAG	57	65
MyD88(GenBank 登录号:XM_005669362.1)	F:TGCGTCTGCTCCATTGCT;R:TCACATTCTTGCTTTGC	54	95

注: T_m 为增色效应达到最大值的 1/2 时的温度,即 DNA 的熔解温度(或熔点)。

1.2.5 Real-Time PCR 提取细胞总 RNA,然后按照反转录说明书于冰上配制反应液,反转录结束后按下列组分配制荧光定量 PCR 反应液:12.5 μ L SYBR Premix Ex Taq II (Tli RnaseH Plus) (2 \times),各 0.7 μ L PCR 上下游引物 (10 μ mol/L),2.0 μ L 模板,9.1 μ L dH₂O,将上述反应液加入 0.2 mL 八联排管中混匀,离心,在 Bio-Rad Real-Time PCR 仪上进行反应,反应程序设置如下:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s, T_m 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;溶解曲线 55 $^{\circ}$ C 30 s,81 个循环。结束后保存数据,并计算各指标的 mRNA 相对表达量。

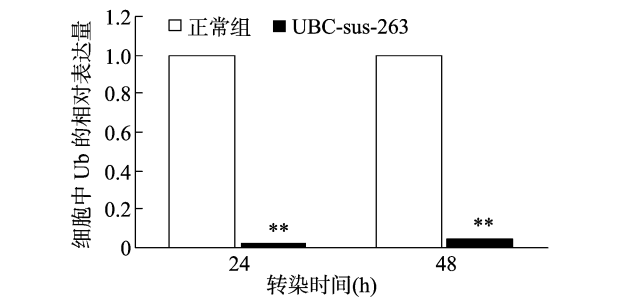
1.2.6 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 采集不同时期各处理组的细胞培养上清液,用 ELISA 试剂盒检测 I κ B- α 、NF- κ B 及炎性因子 IL-1、TNF- α 的含量。

1.2.7 数据处理 本试验中的所有数据均用 SPSS 16.0 进行统计分析,试验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用单因素方差分析比较各组均值的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 转染 shRNA 质粒后 IPEC-J2 细胞中泛素基因的表达情况

根据 24、48 h 的反应循环数 (C_T 值),计算 shRNA 质粒转染 IPEC-J2 细胞后 Ub 基因的 mRNA 相对表达量。如图 1 所示,UBC-sus-263 的 shRNA 质粒对泛素基因的沉默效果较好,在 2 个时间点中,其表达量均仅为空白细胞组的 2%,表现出极显著差异 ($P < 0.01$)。



**表示与正常组相比差异极显著 ($P < 0.01$)
图1 shRNA 质粒转染 IPEC-J2 后细胞中 Ub 基因的 mRNA 的表达情况

2.2 IPEC-J2 细胞中 TLR4、NF- κ B、I κ B- α 及 MyD88 的 mRNA 表达量

由图 2-A 可以看出,shRNA 质粒转染 IPEC-J2 后,细胞内的 TLR4 表达量明显降低,相较于对照组显示出极显著差异,在 24 h 时降至最低值。而空白质粒组转染后细胞内的

TLR4 表达量较空白细胞组略微升高,6 h 时差异极显著,24 h 时差异显著,其他时间点差异不明显。由图 2-B 可以看出,shRNA 质粒表达载体转染 IPEC-J2 后,细胞内的 NF- κ B 表达量明显降低,相较于对照组表现出极显著差异,在 12 h 时降至最低值。而空白质粒组转染后细胞内的 NF- κ B 表达量较空白细胞组升高,在 6 h 时与对照组相比差异显著,12、48 h 与空白对照组相比表现出极显著差异。由图 2-C 可以看出,shRNA 质粒转染 IPEC-J2 后,细胞内的 I κ B- α 表达量明显降低,相较于对照组表现出极显著差异,在 24 h 时降至最低值。而空白质粒组转染后细胞内的 I κ B- α 表达量较空白细胞组呈上升趋势,12、24 h 时与空白对照组差异显著,48 h 时差异极显著。由图 2-D 可以看出,shRNA 质粒转染 IPEC-J2 后,细胞内的 MyD88 表达量明显降低,相较于对照组显示出极显著差异,在 48 h 时降至最低值。而空白质粒组在 6、48 h 时细胞内的 MyD88 表达量较空白细胞组略微升高,而 12、24 h 时的表达量略微降低,与空白对照组间差异不显著。

2.3 IPEC-J2 细胞中细胞因子的 ELISA 检测结果

由图 3-A 可以看出,在各时间点,shRNA 质粒转染组细胞中的 NF- κ B 含量明显低于空白细胞组、空白质粒转染组,6 h 时与空白组间差异极显著,其余时间均显示出显著差异。由图 3-B 可以看出,在转染 12~48 h,shRNA 质粒转染组细胞中的 I κ B- α 含量明显低于空白细胞组、空白质粒转染组,并在 12、48 h 时与空白对照间显示出显著差异,24 h 时差异极显著。由图 3-C 可以看出,在各时间点,shRNA 质粒转染组细胞中的 TNF- α 含量明显低于空白细胞组、空白质粒转染组,并在 6、24、48 h 时与空白对照组间显示出极显著差异,12 h 时差异显著。由图 3-D 可以看出,在各时间点,shRNA 质粒转染组细胞中的 IL-1 含量明显低于空白细胞组、空白质粒转染组,并在 24、48 h 时与对照组显示出极显著差异,在 6、12 h 时与空白对照组间差异显著。

3 讨论

在 TLR4/NF- κ B 信号通路中,泛素扮演着重要的角色,研究认为,很多泛素化抑制因子可以作为治疗许多疾病的新靶点^[11-14]。Marfella 等的研究表明,通过免疫组织化学方法和酶联免疫分析的方法,应用罗格列酮抑制泛素-蛋白酶体途径,可以通过减少 I κ B(转录核因子 κ B 抑制子)的降解,从而抑制与 NF- κ B 相关的炎症过程^[15]。目前,针对泛素蛋白酶体系统的生物学靶点已经在蛋白酶体抑制剂与 E1(泛素活

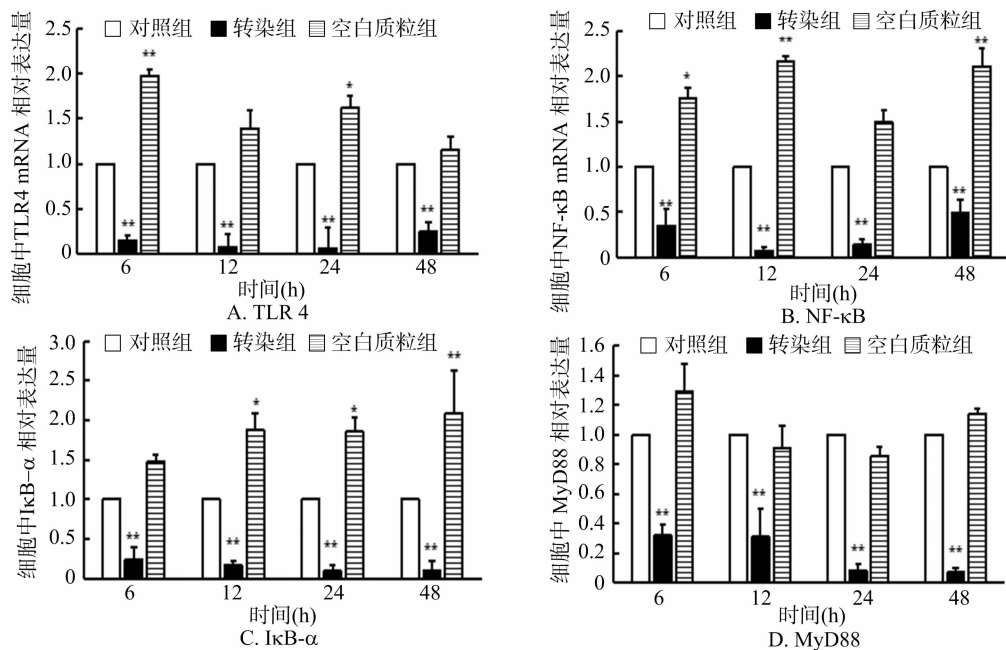


图2 转染 shRNA 质粒后细胞 IPEC-J2 中 TLR4、NF-κB、IκB-α 和 MyD88 mRNA 的表达情况

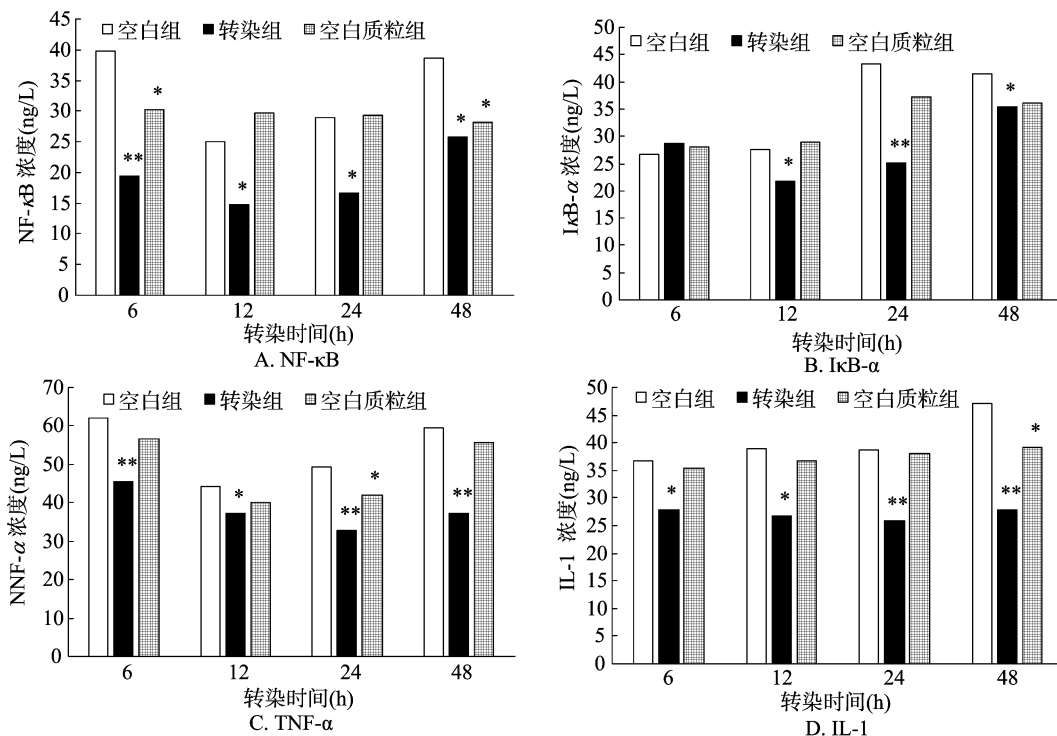


图3 转染 shRNA 质粒后不同时间点 IPEC-J2 细胞中 NF-κB、IκB-α、TNF-α 和 IL-1 的含量

化酶)、E2(泛素结合酶)、E3(泛素连接酶)方面得到扩展。在大多数肿瘤细胞中,泛素分子都呈高表达状态^[16]。Choongseob 等通过降低泛素 *UBB* 基因的表达量而成功抑制了体内、外肿瘤细胞的生长,其机制是通过促进细胞凋亡及调节 NF-κB 分子通路实现的^[17-18]。因此可见,泛素化是调节 NF-κB 活化的一种重要机制。

在本试验中,通过构建 shRNA 质粒对泛素基因进行沉默,下调或终止其表达,可以达到抑制泛素蛋白合成的目的,

研究转染该质粒后对猪小肠上皮细胞中 TLR4/NF-κB 信号通路的作用。结果显示,细胞内 TLR4 的 mRNA 表达量比空白对照组和空白质粒转染组低,随着转染时间增加,表达量逐渐降低,并在 24 h 时降至最低值;NF-κB 的 mRNA 表达量也明显低于空白细胞组和空白质粒转染组,在 12 h 时降至最低值后逐渐升高,但仍低于空白细胞组中的 NF-κB 含量;IκB-α、MyD88 的 mRNA 表达量也都低于同组的空白细胞组和空白质粒转染组,并且随着转染时间的增加,mRNA 的表达

量逐渐降低,均在 24 h 时出现最小值。试验结果表明,泛素基因沉默以及泛素的表达量下调,对 TLR4/NF- κ B 信号通路起到了抑制作用,各下游分子的表达量均出现降低,其抑制作用很可能是通过抑制泛素化降解 I κ B 而实现的。

参考文献:

- [1] Corn J E, Vucic D. Ubiquitin in inflammation; the right linkage makes all the difference[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21(4): 297–300.
- [2] Akutsu M, Dikic I, Bremm A. Ubiquitin chain diversity at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(5): 875–880.
- [3] Grice G L, Nathan J A. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(18): 3497–3506.
- [4] Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms[J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 2004, 1695(1/2/3): 55–72.
- [5] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling[J]. *Science*, 2007, 315(589): 201–205.
- [6] Popovic D, Vucic D, Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(11): 1242–1253.
- [7] 成 军. 现代细胞自噬分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 276.
- [8] Moore C B, Guthrie E H, Huang M T H, et al. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 629: 141–158.
- [9] Staskiewicz L, Thorburn J, Morgan M J. Inhibiting autophagy by shRNA knockdown: cautions and recommendations[J]. *Autophagy*, 2013, 9(10): 1449–1450.

(上接第 28 页)

- [36] 喻凤莲, 周成明, 邓 锐. 水稻籽实及其根系土壤中镉含量的相关性研究——以几个金土地工程土地整理区为例[J]. *四川地质学报*, 2012, 32(4): 468–471.
- [37] Fang Y, Sun X Y, Yang W J, et al. Concentrations and health risks of lead, cadmium, arsenic, and mercury in rice and edible mushrooms in China[J]. *Food Chemistry*, 2014, 147: 147–151.
- [38] 易亚科, 周志波, 陈光辉. 土壤酸碱度对水稻生长及稻米镉含量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(3): 428–436.
- [39] 刘佳凤, 田娜娜, 赵玉杰, 等. 基于 Cubist 多元混合回归的稻米富集 Cd 模型构建研究[J]. *农业环境科学学报*, 2018, 37(6): 1059–1065.
- [40] 胡召华, 靳 磊, 朱捍华. 石灰降低稻米镉含量的效果及其影响因素[J]. *湖南农业科学*, 2017(8): 20–23.
- [41] 范 健, 廖启林, 许宏铭, 等. 稻米与小麦吸收土壤重金属的基本特征[J]. *地质学刊*, 2016, 40(4): 701–709.
- [42] 陈子扬, 孙孝龙. 土壤中有有机质与重金属关系的研究进展[J]. *环境与发展*, 2017, 29(8): 141–142.

- [10] Golzio M, Escoffre J M, Teissié J. shRNA-mediated gene knockdown in skeletal muscle[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 798: 491–501.
- [11] 方 帅, 赵 博. 泛素化及相关疾病研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2017, 44(5): 377–384.
- [12] 兰秋艳, 高 媛, 李衍常, 等. 泛素、泛素链和蛋白质泛素化研究进展[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(1): 14–30.
- [13] Kimura Y, Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis[J]. *Journal of Biochemistry*, 2010, 147(6): 793–798.
- [14] Verhelst K, Verstrepen L, Carpentier I, et al. Linear ubiquitination in NF- κ B signaling and inflammation; what we do understand and what we do not[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 82(9): 1057–1065.
- [15] Marfella R, D'Amico M, di Filippo C, et al. Increased activity of the ubiquitin-proteasome system in patients with symptomatic carotid disease is associated with enhanced inflammation and may destabilize the atherosclerotic plaque; effects of rosiglitazone treatment[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 47(12): 2444–2455.
- [16] Ishibashi Y, Hanyu N, Suzuki Y, et al. Quantitative analysis of free ubiquitin and multi-ubiquitin chain in colorectal cancer[J]. *Cancer Letters*, 2004, 211(1): 111–117.
- [17] Choongseob O, Soonyong P, Eun K L, et al. Downregulation of ubiquitin level via knockdown of polyubiquitin gene *Ubb* as potential cancer therapeutic intervention[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2623.
- [18] Nicassio F, Corrado N, Vissers J H, et al. Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability[J]. *Current Biology*, 2007, 17(22): 1972–1977.
- [43] 陈 浩, 吉力力·阿不都外力, 刘 文, 等. 博尔塔拉河沿岸土壤重金属含量特征与有机质、pH 值的关系[J]. *水土保持研究*, 2016, 23(5): 210–213.
- [44] 何腾兵, 董玲玲, 刘元生, 等. 贵阳市乌当区不同母质发育的土壤理化性质和重金属含量差异研究[J]. *水土保持学报*, 2006, 20(6): 157–162.
- [45] 林大松, 徐应明, 孙国红, 等. 土壤 pH、有机质和含水氧化物对镉、铅竞争吸附的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 510–515.
- [46] Eriksson J E. A field study on factors influencing Cd levels in soils and in grain of oats and winter wheat[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 1990, 53(1/2): 69–81.
- [47] 郭毅轩, 赵秀兰. 颗粒有机质对水稻镉吸收及转运的影响[J]. *环境科学*, 2018, 39(11): 5180–5188.
- [48] 余贵芬, 蒋 新, 孙 磊, 等. 有机质对土壤镉有效性的影响研究综述[J]. *生态学报*, 2002, 22(5): 682–688.
- [49] 王秀梅, 安 毅, 秦 莉, 等. 对比施用生物炭和肥料对土壤有效镉及酶活性的影响[J]. *环境化学*, 2018, 37(1): 67–74.