

IFN- λ R1 与 TRAF6 的相互作用及对 NF- κ B 与 ISRE 活性的影响

杨 霞 张俊文 黄秉仁 陈 虹

摘 要 **目的** 构建含有信号肽的全长 IFN- λ R1 质粒,研究在配体 IFN- λ 1 存在的情况下 IFN- λ R1 与 TRAF6 的相互作用及对 NF- κ B 与 ISRE 活性的影响。**方法** 利用多次 PCR 将信号肽编码序列引入 IFN- λ R1 序列中,构建表达载体,用免疫荧光及膜蛋白分离实验鉴定 IFN- λ R1 的表达定位。用免疫共沉淀的方法研究 IFN- λ 1 刺激下 IFN- λ R1 与 TRAF6 间的相互作用。用双荧光素酶报告基因实验研究 IFN- λ R1 与 TRAF6 相互作用后对下游 NF- κ B 与 ISRE 活性的影响,采用实时定量 PCR 的方法检测此种作用对 OAS1 与 Mx1 基因表达的影响。**结果** 成功构建了含信号肽的全长 IFN- λ R1 表达载体,细胞内表达的 IFN- λ R1 可正确定位于细胞膜上。细胞共转染 IFN- λ R1 和 TRAF6,在免疫沉淀物中可以检测到两个蛋白同时存在。细胞内共表达的 IFN- λ R1 能够抑制 TRAF6 诱导的 NF- λ B 的激活,而共表达的 TRAF6 可以抑制 IFN- λ R1 下游 ISRE 的活性,并下调 OAS1 与 Mx1 基因的表达。**结论** 证实了在 IFN- λ 1 存在下 IFN- λ R1 与 TRAF6 的相互作用及二者相互作用对各自细胞信号转导通路的影响,为 TRAF6 作为 IFN- λ 受体信号通路中的相互作用蛋白提供了新的实验依据。

关键词 IFN- λ R1 TRAF6 NF- κ B ISRE 相互作用

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Interaction between IFN- λ R1 and TRAF6 Down-regulates the NF- κ B and ISRE Signal Pathway. Yang Xia, Zhang Junwen, Huang Bingren, Chen Hong. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To construct an expression vector for the full length IFN- λ R1 containing a signal peptide in order to investigate the interaction between IFN- λ R1 and TRAF6 under the stimulation of IFN- λ 1, and to observe how the interaction between IFN- λ R1 and TRAF6 influence the activities of NF- κ B and ISRE. **Methods** DNA cloning technique was employed to construct expression vector for the full length IFN- λ R1 containing a signal peptide. Immunofluorescence assay and membrane protein separation were used to confirm the expression of IFN- λ R1. Co-transfection and immunoprecipitation were used to study the interaction between IFN- λ R1 and TRAF6 spurred by IFN- λ 1. Dual Luciferase Reporter Gene Assay was also used to research the NF- κ B and ISRE activities. OAS1 and Mx1 mRNA levels were detected by quantitative real time PCR. **Results** The full-length expression vector of IFN- λ R1 with signal peptide was successfully constructed which can be expressed on the cell membrane correctly. The interaction between IFN- λ R1 and TRAF6 at presence of IFN- λ 1 was confirmed by co-transfection and immunoprecipitation. IFN- λ R1 can repress the activity of NF- κ B induced by TRAF6 overexpression in HEK293T and Hela cells. Whereas, TRAF6 can inhibit IFN- λ R1 downstream signal activity of IFN- λ 1 stimulation and down-regulate the expression of OAS1 and Mx1. **Conclusion** These results provide the further evidences for the IFN- λ R1 interacting with TRAF6, and how this interaction effects on these two signal transduction pathways. They also provide a new experimental proof of TRAF6 as a binding protein in the signal pathway of IFN- λ R1.

Key words IFN- λ R1; TRAF6; NF- κ B; ISRE; Interaction

干扰素- λ (interferon- λ , IFN- λ) 是 2003 年由 Sheppard 等^[1]和 Kotenko 等^[2]共同发现,属于 III 型干扰素,包括: IFN- λ 1、IFN- λ 2 和 IFN- λ 3,又称白细

胞素 (interleukin, IL)-29、IL-28A 和 IL-28B。IFN- λ 的受体由特有的配基结合亚基 IFN- λ R1 (又称 IL28RA) 和辅助亚基 IL-10R2 组成。与 I 型干扰素相似, IFN- λ 与其受体结合,通过激活 JAK 酪氨酸激酶-信号转导和转录激活子 (janus family tyrosine kinase-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 信号通路,发挥抗病毒、抗肿瘤细胞增殖和免疫调节的生物学功能^[3]。此外,是否还有

作者单位: 100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者: 陈虹, 电子信箱: hchen@public.bta.net.cn

其他蛋白参与 IFN - λ 与其特异受体 IFN - λR1 的相互作用及信号转导,并进而影响 IFN - λ1 的生物学活性值得探讨。在前期研究中,本课题组采用生物信息学方法发现 IFN - λR1 的膜内区有结合肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor associated factors, TRAF6)的结构域,用分子生物学方法对 IFN - λR1 膜内区与 TRAF6 的相互作用进行了验证,并初步观察了两者的相互作用的生物学活性^[4]。为了进一步研究细胞在 IFN - λ1 的刺激下,IFN - λR1 与 TRAF6 相互作用的生物学活性,本研究在前期工作的基础上构建了含有信号肽的全长 IFN - λR1 的表达载体,用共转染免疫沉淀和荧光素酶报告基因等方法获得了一些结果,为认识 TRAF6 作为 IFN - λR1 的新的相互作用蛋白在 IFN - λ 的信号转导通路中的作用提供了新的依据。

材料与方法

1 材料:人宫颈癌细胞株 Hela、人胚肾细胞株 HEK293T、DH5α 感受态细菌由本室保存。表达质粒 pCMV - Myc、pEGFP - N1、pFlag - CMV2、报告基因质粒 pGL - NF - κB - luc、pISRE - TA - luciferase、pRL - SV40 由本室保存, pFlag - TRAF6 由本室构建, pEF - BOSpuro - IL28RA 由 Dr. Jean

Christophe Renauld 馈赠。VigoFect 转染试剂购自维格拉斯生物技术有限公司(北京),Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。蛋白酶抑制剂混合片购自 Roche 公司。热启动高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶 Bgl II 与 Kpn I 购自宝生物工程(大连)有限公司。SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂购自 TaKaRa 公司。RNA 反转录试剂盒购自 Promega 公司。Protein A/G 购自 GE 公司。Digitonin 试剂、Flag、β - actin 抗体购自 Sigma 公司,EGFR、Myc 抗体购自 Santa Cruz 公司。HRP/FITC 标记的二抗购自中杉金桥生物公司。引物均由上海生工合成。

2. IFN - λR1 全长表达质粒的构建:从美国国立生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information)上获取 IFN - λR1 的全长 cDNA 序列,设计引物,引物序列见表 1。以 pEF - BOSpuro - IL28RA 为模板,经过 3 轮 PCR 扩增将信号肽编码序列引入 IFN - λR1cDNA 序列的 5'端。具体步骤如下:以 FP1 和 RP1 进行第 1 轮扩增,FP2 和 RP1 进行第 2 轮扩增,FP3 和 RP1、FP4 和 RP2 分别作为第 3 轮的扩增引物,每轮扩增的产物为下一轮 PCR 的模板;反应条件均为 98℃ 预变性 10s,98℃ 变性 10s,68℃ 延伸 90s,共 35 个循环,68℃ 最后延伸 5min。然后将两个第 3 轮 PCR 产物片段进行内切酶 Bgl II 与 Kpn I 消化,分别克隆至 pCMV - Myc 和 pEGFP - N1 载体的 Bgl II 与 Kpn I 位点上,转化 DH5α 感受态细菌,对重组质粒 DNA 进行双酶切鉴定及 DNA 测序。构建正确的质粒分别命名为 pMyc - IFN - λR1 和 pEGFP - IFN - λR1。

表 1 引物序列表

引物名称	引物序列(5'→3',下划线标记为酶切位点)	重组载体名称
FP1	CCTGCTCCTGTGCCTGCTGCAGGCCG/CTCCAGGGAGGCCCC	pMyc - IFN - λR1
FP2	TATGGCGGGGCCCCGAGCGCTGGGGCCCC/CCTGCTCCTGTGCCTGC	
FP3	GA AGATCTC/TATGGCGGGGCCCCGAG	
RP1	GC GGTACCTCACCTGGCCATGTAATGC	
FP4	GA AGATCTCGCCACC/ATGGCGGGGCCCCGAG	pEGFP - IFN - λR1
RP2	GC GGTACCGTCCTGGCCATGTAATGC	

下划线为酶切位点 Bgl II 或 Kpn I ,斜线隔开前面顺序为每次 PCR 后在 5'端增加的核苷酸序列

3. 细胞免疫荧光实验:HeLa 细胞在含 10% 胎牛血清(FBS)的高糖 DMEM 培养基中于 37℃ 和 5% CO₂ 的孵育箱中培养。转染前 24h 用胰酶将 HeLa 细胞消化成单细胞并接种于 6 孔板的盖玻片上,待其生长至接合度为 80% ~ 90% 时,用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂按说明书进行转染操作。转染 pEGFP - IFN - λR1 质粒的细胞 24h 后经 4% 多聚甲醛固定后直接用 DAPI 复染细胞核后封片。转染 pMyc - IFN - λR1 质粒的细胞经 4% 多聚甲醛固定后用 1:200 稀释的 Myc 抗体 37℃ 孵育 1h,PBS 洗,加入 1:200 稀释的 FITC 标记的第 2 抗体 37℃ 孵育 1h,PBS 洗,DAPI 复染细胞核后封片,荧光显微镜观察 IFN - λR1 在细胞中的表达定位。

4. 细胞膜、胞质蛋白分离^[5]:转染前 24h 将 HEK293T 接种于 6 孔板中,按 VigoFect 转染试剂按说明书转染 pMyc - IFN - λR1 质粒。24h 后消化离心收集细胞,加入含毛地黄皂

苷(digitonin)的细胞裂解液(0.005% digitonin,90mmol/L KAc,25mmol/L Hepes, pH 7.4,25mmol/L MgCl₂,1mmol/L EGTA,0.2mmol/L CaCl₂,12mmol/L 谷氨酸和蛋白酶抑制剂混合片溶液),冰上放置 15min,12000 × g 低温离心 10min,上清即为可溶性胞质蛋白;向沉淀加入高盐溶液(300mmol/L NaCl)和 1% NP - 40,冰上放置 15min,12000 × g 低温离心 15min,上清即为不可溶性膜蛋白。分离的膜蛋白和胞质蛋白用抗 Myc 抗体进行 Western blot 法检测。

5. 免疫共沉淀及 Western blot 法:HEK293T 细胞共转染 pMyc - IFN - λR1 与 pFlag - TRAF6 质粒,24h 后更换为 3% FBS 的高糖 DMEM 培养基,饥饿培养 2 ~ 4h,给以 IFN - λ1 (200ng/ml)刺激,分别于 0、3、5、15min 和 0、6、12、24h 收集细胞。加入细胞裂解液(50mmol/L Tris - HCl,pH 7.4,150mmol/L NaCl,1% NP - 40,1mmol/L EDTA,0.25% 去氧胆酸钠,蛋

白酶抑制剂混合片溶液), 冰上裂解 15min, 离心收集上清, BCA 法测定总蛋白浓度, 按总蛋白量一致的原则, 每份样品留出 10% 作为内参(input), 其余加入 1 μ g Flag 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 然后加入 40 μ l 50% 的 proteinA/G, 4 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 低速离心去上清, 加入 1ml 细胞裂解液低温洗去未结合蛋白, 加入 2 $\times$ SDS 蛋白电泳加样缓冲液, SDS-PAGE 蛋白电泳分离, 印迹到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 用 Myc、Flag、 β -actin 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, HRP 标记的第 2 抗体于室温孵育 1.5h, 洗膜后, 加入 ECL 化学发光液用 X 线片显影。

6. 双荧光素酶报告基因检测: 取对数生长期的细胞接种于 24 孔板中, 待细胞结合度为 80%~90% 时进行转染, 分为 3 组: a. pMyc-IFN- λ R1 + pFlag-CMV2; b. pCMV-Myc + pFlag-TRAF6; c. pMyc-IFN- λ R1 + pFlag-TRAF6, 均与报告基因质粒共转染, 每组 4 孔, 24h 后更换为 3% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 以 200ng/ml 的 IFN- λ 1 给予 0h 和 20h 的刺激, 然后弃去培养基, PBS 洗, 按 Promega 公司双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作, 用 TD-20 仪器分别读取 *F* 值(萤火虫荧光素酶活性)和 *R* 值(海肾荧光素酶活性), 计算比值 $T = F/R$ 。

7. 实时定量 PCR 分析: 将 HEK293T 细胞接种于 6 孔板中进行转染, 除上述分组外增加空载体 pCMV-Myc + pFlag-CMV2 组, 24h 后更换为 3% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 以 200ng/ml 的 IFN- λ 1 给予 0h 和 20h 刺激, 收集细胞, Trizol 法提取总 RNA。参照 Promega 公司反转录试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA。参照 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒说明书, 以 GAPDH 为内参检测 OAS1、Mx1 基因的表达。引物如下: OAS1: 5'-AGATCAATGAGCCCTGCATAAACCC-3' 和 5'-ATTGACAGTCTGTAAACATCATC-3', Mx1: 5'-GTGGAACCTCGTCTCGAGTCTGGTA-3' 和 5'-AGATCCAGGACCAGCTGAGCCTGT-3', GAPDH: 5'-TGAGTACGTCGTGGAGTCCA-3' 和 5'-TAGACTCCACGACATACTCA-3'。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 数值用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组独立样本的 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 细胞内重组表达的 IFN- λ R1 可以定位于细胞膜: 为了研究细胞在 IFN- λ 1 刺激下, IFN- λ R1 与 TRAF6 是否存在相互作用, 首先将 IFN- λ R1 的信号肽编码序列通过多次 PCR 引入 IFN- λ R1 cDNA 的 5' 端, 获得带有信号肽的全长 IFN- λ R1 编码序列, 分别克隆至带有 Myc 标签的表达载体 pCMV-Myc 和带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达载体 pEGFP-N1 中, 获得重组质粒 pMyc-IFN- λ R1 和 pEGFP-IFN- λ R1。DNA 序列分析结果显示, 重组质粒中全长 IFN- λ R1 的编码序列正确, IFN-

- λ R1 与标签蛋白的融合位点读码框架正确。细胞免疫荧光检测显示, 转染含有信号肽的全长 IFN- λ R1 表达质粒后, 表达的 IFN- λ R1 主要分布于细胞膜表面 (图 1A)。将转染 pMyc-IFN- λ R1 的 293T 细胞进行细胞膜蛋白和细胞质蛋白的分离, Western blot 法检测结果显示只有在不溶性的细胞膜成分中可以检测到 IFN- λ R1 表达蛋白, 进一步证实了重组质粒中的信号肽可以引导 IFN- λ R1 正确表达定位于细胞膜上 (图 1B)。

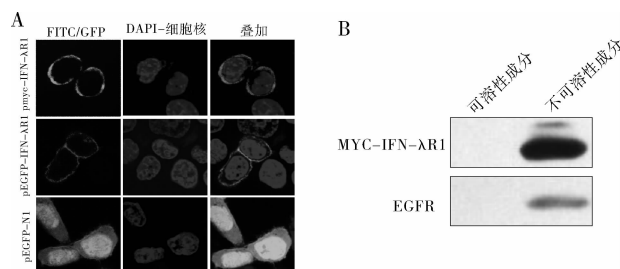


图 1 细胞内表达的 IFN- λ R1 可以正确定位于细胞膜

A. 荧光显微镜观察 IFN- λ R1 在细胞内的分布 (第 1 行为 pMyc-IFN- λ R1, 第 2 行为 pEGFP-IFN- λ R1, 第 3 行为 pEGFP-N1) (10 $\times$ 60); B. 细胞蛋白分离后 Western blot 法检测 Myc-IFN- λ R1 蛋白的表达, 表皮生长因子受体 (EGFR) 为膜受体蛋白的阳性对照

2. IFN- λ 1 对 IFN- λ R1 与 TRAF6 的相互作用的影响: IFN- λ R1 与 TRAF6 共转染 293T 细胞后, 用 IFN- λ 1 刺激, 在不同时间点收取并裂解细胞, 使用 TRAF6 的标签蛋白 Flag 的抗体进行免疫沉淀, 检测沉淀复合物中 IFN- λ R1 的标签蛋白 Myc。结果显示, 细胞内过表达的 IFN- λ R1 与 TRAF6 可以相互作用, 给予 IFN- λ 1 刺激后, 在 15min 内, 随着刺激时间的延长, IFN- λ R1 与 TRAF6 的相互作用呈现逐渐减弱的趋势 (图 2A)。而在持续长时间作用时, 免疫沉淀复合物中仍可以检测到 IFN- λ R1 与 TRAF6 的相互作用 (图 2B)。

3. IFN- λ R1 抑制 TRAF6 诱导 NF- κ B 的激活: 核转录因子- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 是 TRAF6 信号通路中的信号分子。双荧光素酶报告基因实验显示, HEK293T 和 HeLa 细胞单独转染 pFlag-TRAF6 质粒时, TRAF6 可以诱导 NF- κ B 报告基因的活性, 在 HEK293T 细胞则更为明显。单独转 pMyc-IFN- λ R1 时, 在两株细胞中 NF- κ B 报告基因的活性都很低。细胞共转染 pMyc-IFN- λ R1 与 pFlag-

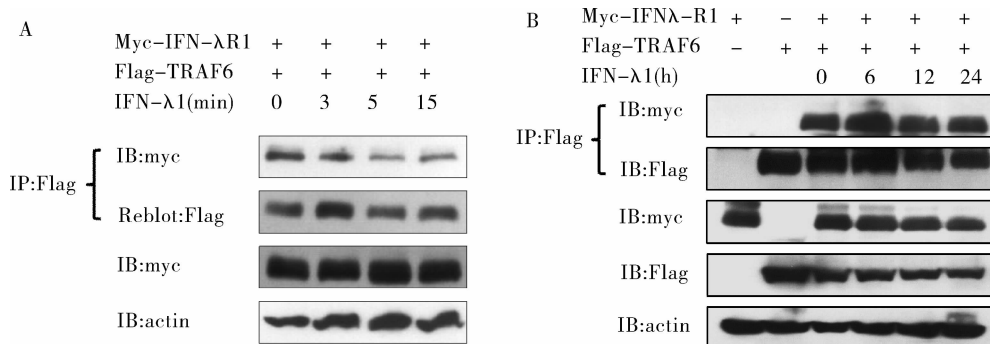


图2 IFN-λ1对IFN-λR1与TRAF6的相互作用的影响

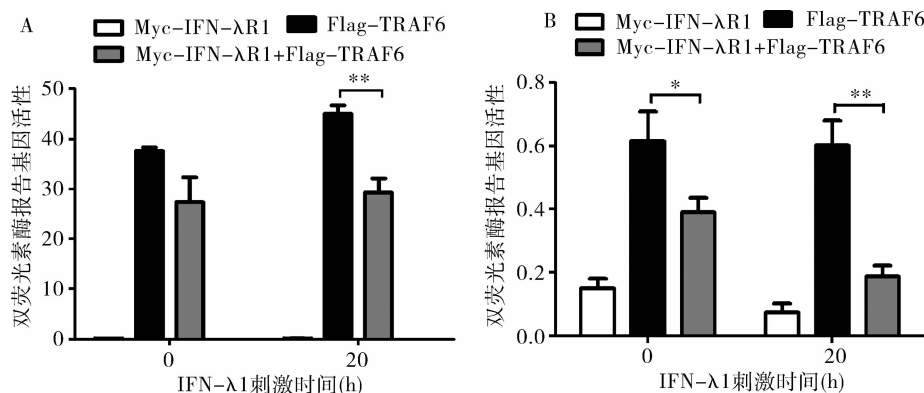


图3 IFN-λR1抑制NF-κB的激活

A. 双荧光素酶报告基因检测 293T 细胞中 NF-κB 的活性; B. 双荧光素酶报告基因检测 HeLa 细胞中 NF-κB 的活性; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

TRAF6 质粒,与单独转染 TRAF6 相比,两株细胞中 NF-κB 报告基因的活性均有降低。进一步观察 IFN-λ1 刺激的影响,结果显示,HEK293T 细胞给予 IFN-λ1 刺激后,TRAF6 诱导的 NF-κB 报告基因的活性被共表达的 IFN-λR1 所抑制,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。在 HeLa 细胞中,无论是否给予 IFN-λ1 刺激,共转染 IFN-λR1 都能显著抑制 TRAF6 诱导的 NF-κB 报告基因的激活 [$P < 0.05$ (IFN-λ1 0h), $P < 0.01$ (IFN-λ1 20h)] (图3)。

4. TRAF6 抑制 IFN-λR1 对 ISRE 的激活:IFN-λ 与其受体结合,通过 JAK-STAT 信号通路诱导 STATs 磷酸化,形成干扰素刺激因子 3 (IFN stimulated gene factor 3, ISGF3) 复合物,ISGF3 进入细胞核与干扰素刺激应答元件 (IFN stimulated response element, ISRE) 结合启动转录,使得大量抗病毒基因表达,例如,2',5'-寡腺苷酸合成酶 (2',5'-oligoadenylate synthetase, OAS1),抗黏液病毒蛋白 (MxA 也称 Mx1) 等。为了研究 TRAF6 与 IFN-λR1 相互作用对 IFN-λ 信号通路的影响,首先检测了 ISRE 双荧光素酶

报告基因的活性。如图 4 中 A、B 所示,在 HEK293T 和 HeLa 细胞中,单独转染 pMyc-IFN-λR1 后,给予 IFN-λ1 刺激,均能诱导 ISRE 报告基因的活性增加,单独转染 pFlag-TRAF6,ISRE 报告基因的活性很低,且不受 IFN-λ1 的影响。pMyc-IFN-λR1 与 pFlag-TRAF6 共转染时,两株细胞中 ISRE 报告基因的活性与单独转染 IFN-λR1 相比,均显著降低 (HEK293T 细胞,由 17.97 倍降低至 4.68 倍, $P < 0.001$; HeLa 细胞,由 25.43 倍降低为 1.28 倍, $P < 0.001$)。给予 IFN-λ1 刺激仍不能诱导 ISRE 报告基因的激活,在两株细胞中,ISRE 报告基因的活性均显著低于单独转染 IFN-λR1 组 ($P < 0.001$)。

进一步采用实时定量 PCR 检测了 HEK293T 细胞中 OAS1 和 Mx1 基因的表达,结果显示,各实验组及空质粒对照组中,OAS1 和 Mx1 基因表达水平都很低,给予 IFN-λ1 刺激后,单独转染 pMyc-IFN-λR1 组中 OAS1 和 Mx1 基因的表达明显增加,OAS1 增加 136.95 倍,Mx1 增加 6.31 倍。pMyc-IFN-λR1 与 pFlag-TRAF6 共转染组,过表达的 TRAF6 可

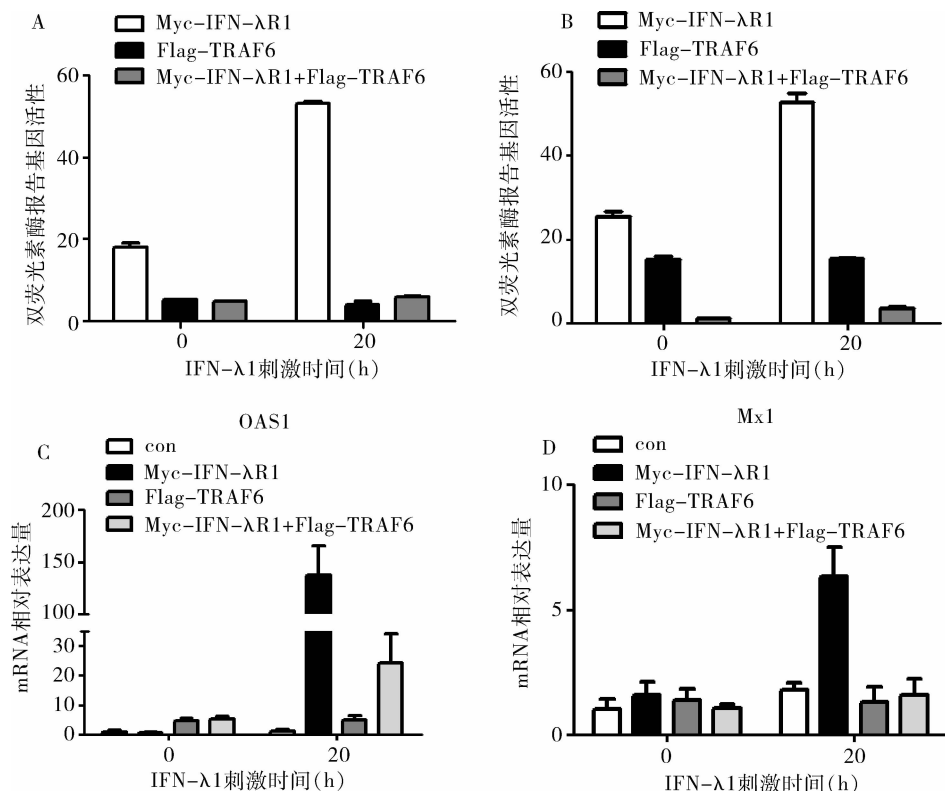


图 4 TRAF6 抑制 IFN-λR1 对 ISRE 的激活

A. 双荧光素酶报告基因检测 293T 细胞中 ISRE 的活性; B. 双荧光素酶报告基因检测 HeLa 细胞中 ISRE 的活性; C. real-time PCR 检测 293T 细胞中 OAS1 亚基的表达; D. real-time PCR 检测 293T 细胞中 Mx1 的表达

以抑制 IFN-λ1 刺激后引起的 OAS1 和 Mx1 基因表达的增加, OAS1 表达下调至 24.09 倍, Mx1 下调至 1.57 倍 ($P < 0.001$) (图 4C 和 D), 表明 TRAF6 与 IFN-λR1 的相互作用可以抑制 IFN-λ1 与 IFN-λR1 结合后引起信号转导通路的活化。

讨 论

Ⅲ型干扰素 IFN-λ 的受体是由 IFN-λR1 与 IL-10R2 组成的异二聚体型细胞膜受体, 其中 IFN-λR1 是配基结合的特异亚基, 对 IFN-λ 受体信号转导通路其决定作用。IFN-λ 与膜受体结合后引起受体二聚化, 激活 Janus kinases, Jak1 和 Tyk2, 进而激活转录因子 STAT1 和 STAT2^[6, 7]。在一些细胞中还会激活 STAT3、STAT4、STAT5。活化后的 STAT1 和 STAT2 以异源二聚体形式招募 IRF-9 (也被称为 ISGF3γ or p48) 形成三聚体的转录因子复合物 ISGF3。ISGF3 通过结合到 ISGs 的干扰素刺激响应元件 ISRE 来调节抗病毒基因表达, 主要包括 OAS1、Mx1 等^[8]。其中, OAS1 可催化一种特殊的核糖核酸内切酶 (RNase L) 形成来降解病毒 RNA, Mx1 属于 GTP 酶类, 它通过削弱细胞内病毒的运输从而抑制病毒的复

制, 发挥抑制病毒增殖的作用。

TRAF6 是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 相关因子家族的成员之一, 是能够同时转导 TNFR (肿瘤坏死因子受体) 超家族和 IL-1R/TLR (interleukin-1 receptor/Toll like receptor) 超家族信号的关键媒介^[9, 10]。TRAF6 作为重要的接头分子, 可以通过 NF-κB 调节 TNF-α、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12 等促炎性因子的表达, 参与调节机体的先天性和获得性免疫、对于细胞增殖、生存与凋亡都具有重要的作用^[11, 12]。

IFN-λR1 与 TRAF6 相互作用是笔者所在课题组^[4]首先报道的。本研究成功构建了含信号肽的全长 IFN-λR1 表达质粒, 细胞内表达的 IFN-λR1 可以定位于细胞膜上, 为研究在 IFN-λ1 刺激下 IFN-λR1 与 TRAF6 的相互作用提供了保证。通过含标签的 IFN-λR1 与 TRAF6 蛋白间的免疫共沉淀实验进一步验证了 IFN-λR1 与 TRAF6 的相互作用, 且这种相互作用在 IFN-λ1 的刺激下可以较长时间持续。为了观察 IFN-λR1 与 TRAF6 相互作用对细胞信号转导通路的影响, 本研究采用双荧光素酶报告基因和

实时定量 PCR 实验,在两株细胞内分别针对两个蛋白重要的信号分子进行研究,结果显示,细胞共转染 IFN- λ R1 与 TRAF6,IFN- λ R1 可以抑制 TRAF6 诱导的 NF- κ B 的激活,TRAF6 可以抑制 IFN- λ 1 结合 IFN- λ R1 后对 IRSE 的激活并进而抑制下游 OAS1、Mx1 基因的表达。上述结果为 TRAF6 作为 IFN- λ 受体信号通路中新的相互作用蛋白提供了新的实验依据。至于 IFN- λ R1 与 TRAF6 相互作用影响 NF- κ B 和 IFN 应答通路的分子机制,以及这种对细胞信号通路的影响如何介入 IFN- λ 抗病毒、抗肿瘤细胞增殖和调节免疫的生物学活性需要深入研究。

参考文献

- 1 Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 63-68
- 2 Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 69-77
- 3 Ank N, West H, Bartholdy C, *et al.* Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo[J]. *J Virol*, 2006, 80(9): 4501-4509
- 4 Xie YF, Cui YB, Hui XW, *et al.* Interaction of IFNlambdaR1 with

- TRAF6 regulates NF- κ B activation and IFNlambdaR1 stability [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(11): 3371-3379
- 5 Denti S, Sirri A, Cheli A, *et al.* RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 13027-13034
 - 6 Uze G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family[J]. *Biochimie*, 2007, 89(6-7): 729-734
 - 7 Novak AJ, Grote DM, Ziesmer SC, *et al.* A role for IFN-lambda1 in multiple myeloma B cell growth[J]. *Leukemia*, 2008, 22(12): 2240-2246
 - 8 Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30(8): 555-564
 - 9 Zhang W, He T, Wang Q, *et al.* IL-1 receptor-associated kinase-2 genetic variant rs708035 increases NF- κ B activity through promoting TRAF6 ubiquitination[J]. *J Biol Chem*, 2014
 - 10 Wang X, Ha T, Zou J, *et al.* MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6[J]. *Cardiovasc Res*, 2014
 - 11 Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, *et al.* TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF- κ B and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5674
 - 12 Liu H, Tamashiro S, Baritaki S, *et al.* TRAF6 activation in multiple myeloma: a potential therapeutic target[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2012, 12(3): 155-163 (收稿日期: 2014-04-11)
(修回日期: 2014-04-25)

Mus81 对人乳腺癌 SKBR3 增殖、侵袭和迁移的影响

吴云路 钱颖 吕娟 严秋月 董学君

摘要 目的 研究 Mus81 过表达对人乳腺癌 SKBR3 增殖、侵袭和迁移能力的影响。方法 从相应甘油菌中抽提 Mus81 过表达质粒和阴性对照质粒,通过 Lipofectamine[®] 2000 脂质体转染人乳腺癌 SKBR3 细胞。分别利用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 Mus81 过表达效果,CKK-8 增殖实验检测过表达前后细胞增殖能力变化,Transwell 侵袭实验检测过表达前后细胞侵袭能力变化,Transwell 迁移实验和细胞划痕实验检测过表达前后细胞迁移能力变化。结果 RT-PCR 和 Western blot 法表明 Mus81 基因过表达效果良好。Mus81 过表达后,增殖实验结果显示实验组细胞增殖速度明显低于对照组 ($P < 0.05$)。Transwell 侵袭实验显示,实验组细胞每高倍视野平均穿膜个数低于对照组 ($P < 0.05$)。Transwell 迁移实验显示,实验组细胞每高倍视野平均穿膜个数同对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。细胞划痕实验结果显示,实验组划痕愈合率同对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Mus81 过表达抑制了人乳腺癌 SKBR3 细胞的增殖,降低了细胞的侵袭能力,但对 SKBR3 细胞迁移能力没有明显影响。

关键词 Mus81 乳腺癌 增殖 侵袭 迁移

[中图分类号] R737 [文献标识码] A

基金项目:浙江省重点科技创新团队(2012R10048-09);浙江省医药卫生平台重点基金资助项目(2013ZDA024)

作者单位:325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(吴云路、钱颖、严秋月、董学君);312000 浙江省绍兴市人民医院、浙江大学绍兴医院临床检验中心(吕娟、董学君)

通讯作者:董学君,电子信箱:dxj9666@163.com