

文章编号: 1673-3851 (2011) 04-0591-06

SIK1 在巨噬细胞中调控 IL-6 及 IL-12 表达的研究

娄 军¹, 欧阳川², 郑明珠², 姚韵靓², 王 璐², 仇 庆¹, 周秀梅¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; 2. 浙江大学医学院免疫研究所, 杭州 310058)

摘 要: 通过 LPS(lipopolysaccharide)刺激巨噬细胞,发现盐诱导激酶(Salt Inducible Kinase 1, SIK1)基因的表达随着刺激时间呈现一定的变化趋势。提示 SIK1 在免疫系统中可能具有潜在的功能。实验构建了 Sik1 基因过表达的腺病毒载体 Ad-Sik1,通过感染 RAW264.7 细胞过表达 Sik1 基因,采用荧光定量 PCR、ELISA 及 Western Blot 等方法,分别从 mRNA 及蛋白质水平探讨 SIK1 与免疫炎症因子 IL-6(Interleukin-6)及 IL-12(Interleukin-12)之间的关系。实验结果表明:SIK1 能够上调免疫炎症因子 IL-6、IL-12 的表达。这将为免疫调节的研究及一些免疫相关疾病的临床诊断与治疗提供一定的理论依据。

关键词: SIK1; LPS 刺激; IL-6; IL-12

中图分类号: R392 **文献标识码:** A

0 引 言

盐诱导激酶于 1999 年因其被克隆于高盐饮食大鼠的肾上腺而得名^[1]。盐诱导激酶蛋白家族包括三个成员:SIK1、SIK2、SIK3,分别由 3 个不同的基因编码表达。盐诱导激酶是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,因其氨基酸序列与腺苷酸活化激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)异源三聚体的 α 亚基相似,而被归属于 AMPK 家族。但 3 种 SIK 蛋白均不能与 AMPK 的 β 、 γ 亚基形成异源三聚体,故 SIK 蛋白激酶不能直接被 AMP 所活化^[2]。SIK 蛋白家族的二级结构具有共同特征:N 端的激酶结构域、SNH 结构域(SNF1 homolog, SNF1 同源)和 C 端的蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)结构域^[3]。盐诱导激酶家族成员之一 SIK1 的氨基酸序列上含有三个可以被磷酸化的氨基酸位点,分别是 268、475 位的苏氨酸以及 577 位的丝氨酸。当细胞处于静息状态时,SIK1 既存在于细胞核也存在于细胞质。577 位的丝氨酸对 SIK1 从细胞核转移到细胞质是非常重要的。当该位点被突变之后,SIK1 只能存在于细胞核^[4]。577 位的丝氨酸被磷酸化将导致两个重要结果:一是使 SIK1 催化活性降低,二是使其从细胞核转移到细胞质。

目前有关 SIK1 的研究主要包括以下四个方面:(1)SIK1 能够调控 TORC(CREB activity coactivators)家族成员,如 SIK1 可以使 TORC2 的 171 位苏氨酸磷酸化,导致其从细胞核转移到细胞质,不能与 CREB(cAMP-responsive element binding protein)共同作用于 DNA 启动子上的 CRE 位点,从而抑制依赖于 CREB 转录因子的靶基因的转录,同时 SIK1 也是 CREB 下游的一个靶基因,形成了对 CREB 的一种负反馈,SIK1 可以通过调控 CREB 来抑制相关基因的表达,在能量代谢途径中发挥重要作用^[5];(2)SIK1 是一种可以磷酸 II 型 HDACs(Histone deacetylases)家族的蛋白激酶,在骨骼肌细胞中,SIK1 通过磷酸化 HDAC5,使其出核与 MEF2(Myocyte Enhancer Factor 2)分离,正向调控依赖 MEF2 的靶基因表达,提高骨骼肌细胞的存活^[6];(3)胞内钙离子的变化引发 CaMK I(Calmodulin kinases I)磷酸化 SIK1 蛋白 SNH 结构域中的苏氨酸

收稿日期: 2010-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(30800093)

作者简介: 娄 军(1984-),男,湖北荆州人,硕士研究生,主要从事肿瘤的靶向基因治疗研究。

通讯作者: 周秀梅,电子邮箱:zhouxiumei824@163.com

位点,磷酸化的 SIK1 又可以通过调节 PME-1(phosphatase methylesterase-1)/ PP2A(protein phosphatase 2A)蛋白复合体,进而影响到钠钾泵的功能,参与细胞渗透压平衡^[7]; (4)在 TGF- β (Transforming growth factor- β)信号通路中,SIK1 可以与 Smad7 形成复合体共同下调 TGF- β 的I型受体 ALK5(Activin receptor-like Kinase 5)的活性。SIK1 是 TGF- β 的信号通路中的一个负向调控因子^[8]。此外,SIK1 在细胞周期G2/M期的转化过程中也具有重要作用,还能参与细胞的迁移、分化以及凋亡过程等^[9-10]。

目前还没有关于 SIK1 在免疫系统中的研究报道。探索 SIK1 与免疫炎症因子 IL-6、IL-12 之间的关系,可以进一步了解 SIK1 蛋白的功能,同时也为临床免疫诊断及研究提供更多有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒包装质粒 pAdTrack, pAdEasy 以及对照组病毒为本实验室所有。RAW264.7、HEK293 细胞为本实验室所有。Reverse Transcriptase M-MLV、SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)以及相关限制性内切酶购自 Takara 公司。MAPK (Erk1/2)、Phospho-MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)、Phospho-Jnk1/2(Thr183/Tyr185)、Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)等抗体购自 Cell Signaling Technology。SIK1、 β -actin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。LPS 购自 Sigma 公司,硫羟乙酸盐肉汤购自 BD 公司。Mouse IL-6 ELISA Ready-Set-Go Kit、Mouse IL-12 p70 ELISA Ready-Set-Go Kit 购自 eBioscience。蛋白定量试剂盒 Pierce BCA Protein Assay Kit 购自 Thermo。4~6 周 C57 小鼠购自浙江大学动物中心。所有细胞都在 5% CO₂, 37°C 培养条件下培养,培养液为 10% FBS(Foetal Bovine Serum)的 DMEM (Dulhecco's Modified Eagle's Medium)。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞中 Sik1 基因表达水平的检测

1.2.1.1 小鼠腹腔巨噬细胞 M ϕ (macrophage)的培养

实验前 3 天,向每只小鼠腹腔内注入硫羟乙酸盐肉汤 1 mL。动物处死后收集腹腔巨噬细胞并计数,以 2.5×10^6 个/mL 的细胞密度接种于 24 孔培养板。培养 12 h 后,去除旧的培养液,用 DMEM 培养基冲洗 1~2 次,再加入新鲜的培养液,置于 5% CO₂, 37°C 条件培养。继续培养 24 h 后,用 2 μ g/mL 的 LPS 分别刺激细胞 0、3、6、12、24、48 h。收集刺激后的细胞,按照 Takara 公司的 Trizol 使用说明书、Reverse Transcriptase M-MLV、SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)说明书提取 RNA,反转录成 cDNA,进行荧光定量 PCR 分析 Sik1 基因的 mRNA 表达情况。相关引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

荧光定量 PCR 引物如下: Sik1: 上游: 5'-ACAGGTGCTAGGGATCATGC -3'; 下游: 5'-TGAGGAACCTC-CAGACTGCT-3'; IL-6: 上游: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'; 下游: 5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3'; IL-12: 上游: 5'-AGGTGCGTTCTCGTAGAGA-3'; 下游: 5'-AAAGCCAACCAAGCAGAAGAG-3'; β -actin: 上游: 5'-GTATGGAATCCTGTGGCATC -3'; 下游: 5'-AAGCACTTGCAGTGCACGAT-3'。

1.2.1.2 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 的培养

RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/孔铺于 24 孔培养板,待细胞生长至 60%,用 2 μ g/mL 的 LPS 分别刺激细胞 0、3、6、12、24、48 h,收集不同刺激时间的细胞,提取 RNA,反转录成 cDNA,通过荧光定量 PCR 分析 Sik1 基因的 mRNA 表达情况。

1.2.2 Sik1 过表达病毒载体的构建及病毒的包装纯化

1.2.2.1 建构 Sik1 过表达病毒载体

取小鼠淋巴结,提取 RNA 反转录成 cDNA,进行 PCR 获取 Sik1 基因。Sik1 基因 PCR 引物如下:上游: 5'-ATTGGTACCACCATGGTGATCATGTCGGAGTTCAG-3'; 下游: 5'-ATAGCGGCCGCTCACTG-TACCAGGACGAATGTCCCCCG-3'。Sik1 基因 PCR 回收产物及载体 pAdTrack 采用 Kpn I、Not I 双酶切,构建 pAdTrack-Sik1 质粒。将构建好的 pAdTrack-Sik1 用 Pme I 酶切过夜,乙醇沉淀回收后转化到含有 pAdEasy 质粒的 BJ5183 感受态中,同源重组构建病毒包装质粒 pAdEasy-Sik1。将 pAdEasy-Sik1 用 Pac I 酶切回收后转染到 HEK293 中包装成含有 Sik1 基因的腺病毒 Ad-Sik1。所构建的质粒均经过上海生工生物工程技术有限公司测序验证。

1.2.2.2 病毒扩增、纯化以及滴度测定

HEK293细胞接种于10 cm培养皿,待细胞生长至80%,分别加入Ad-Sik1病毒及对照病毒,3~4 d细胞全部病变后收集细胞。CsCl密度梯度离心纯化病毒之后,接种HEK293细胞于96孔培养板。待细胞生长至60%~70%,感染经梯度稀释的纯化病毒,本实验病毒稀释范围为 $10^7 \sim 10^{12}$ 倍。5% CO₂, 37℃培养5 d开始观察记录空斑,至第10 d止,采用TCID₅₀(tissue culture infective dose)法计算病毒滴度^[11]。

1.2.3 流式细胞术检测 Ad-Sik1 病毒感染细胞的效率

RAW264.7细胞 1×10^6 个/孔铺于6孔培养板,待细胞生长至60%,换成含5% FBS的DMEM培养基,加入200 MOI(multiplicity of infection)的对照组及Ad-Sik1病毒。5% CO₂, 37℃培养24 h后,去除培养基,用PBS洗1~2次,换成含10% FBS的DMEM培养基。继续培养12 h后,加入胰酶消化细胞,3 000 r/min离心5 min收集细胞,用PBS重悬,各取部分用于流式细胞术检测病毒感染细胞的效率。剩余细胞再次离心,加入DMEM培养基重悬,细胞计数后用于以下实验。

1.2.4 定量PCR及ELISA分析Sik1过表达后IL-6及IL-12的变化

将上述对照组及Ad-Sik1病毒感染后的细胞铺于12孔培养板。待细胞生长至80%,移去旧的培养基,每孔加入1 mL的新鲜DMEM培养基,分别用2 μg/mL的LPS刺激细胞0、3、6、12、24 h,收集不同刺激时间的细胞培养液及细胞。收集的细胞培养液,按照Mouse IL-6 ELISA Ready-Set-Go Kit、Mouse IL-12 ELISA Ready-Set-Go Kit说明书分析其中IL-6及IL-12的蛋白含量。收集的细胞按每孔1 mL加入Trizol,提取RNA,反转录成cDNA,进行半定量及荧光定量PCR检测Sik1、IL-6及IL-12的mRNA表达水平。

1.2.5 Western Blot 检测相关信号通路蛋白的变化

将上述对照组及Ad-Sik1病毒感染后的细胞铺于12孔培养板。待细胞生长至80%,移去旧的培养基,加入1 mL的无血清DMEM培养基。继续培养12 h后,分别用2 μg/mL的LPS刺激细胞0、15、30、60 min,收集不同刺激时间的细胞,加入蛋白裂解液冰上裂解30 min。通过BCA法进行蛋白定量,以每管50 μg蛋白样品分装于1.5 mL的EP管中,加入5×SDS蛋白上样缓冲液,煮沸10 min, -80℃保存备用。配制10%的SDS-PAGE凝胶电泳板,每孔加入50 μg蛋白样品进行电泳,硝酸纤维素膜(PVDF)转移、封闭后,再分别用抗SIK1、β-actin、p-Erk1/2、Erk1/2、p-Jnk1/2、p-P38的抗体作为一抗,用相应的荧光二抗进行杂交,最后用红外线成像系统(Odyssey)检测PVDF膜上二抗的荧光信号。

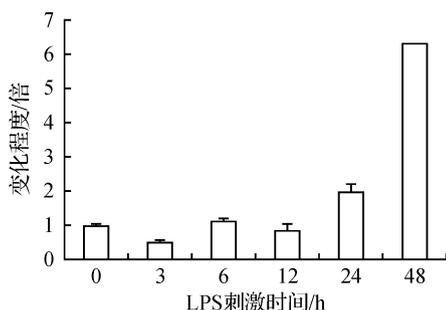
1.2.6 统计学处理

统计学软件采用Excel 2007,所有定量实验均重复3次,各组数据以“均值±标准差”表示。组间比较用*t*检测, $P < 0.05$ 代表差异显著, $P < 0.01$ 代表差异极显著。

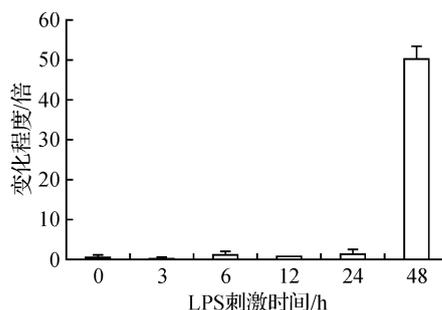
2 结果

2.1 LPS刺激Mφ及RAW264.7细胞不同时间时Sik1 mRNA表达情况

通过荧光定量PCR,以LPS刺激对照组0 h时目的基因mRNA相对β-actin的光密度比值为1,其他时间段样品均与0 h样品相比。结果表明在巨噬细胞系RAW264.7(见图1a)及腹腔巨噬细胞(见图1b)中,Sik1的mRNA变化趋势基本一致,在LPS刺激0~24 h无明显变化,在24~48 h有显著的升高。其中,在小鼠腹腔巨噬细胞中,Sik1的mRNA在48 h较0 h升高了50倍左右(见图1b)。



(a) Sik1在RAW264.7细胞中的mRNA表达情况



(b) Sik1在腹腔巨噬细胞中的mRNA表达情况

图1 Sik1在巨噬细胞中mRNA的表达情况

2.2 流式细胞术及半定量 PCR 检测 Sik1 过表达效率

由于所构建的病毒质粒含有 GFP 基因,通过流式细胞术检测病毒感染细胞后的绿色荧光信号。结果表明,以未感染病毒的细胞的荧光信号为参考(见图 2(a)),对照组病毒感染 RAW264.7 细胞的效率达到 92.88%(见图 2(b)),Ad-Sik1 组病毒感染效率达到 93.46%(见图 2(c))。半定量 PCR 结果也表明所构建的 Ad-Sik1 病毒能够使 Sik1 基因在 RAW264.7 细胞中高效过表达(见图 2(d))。

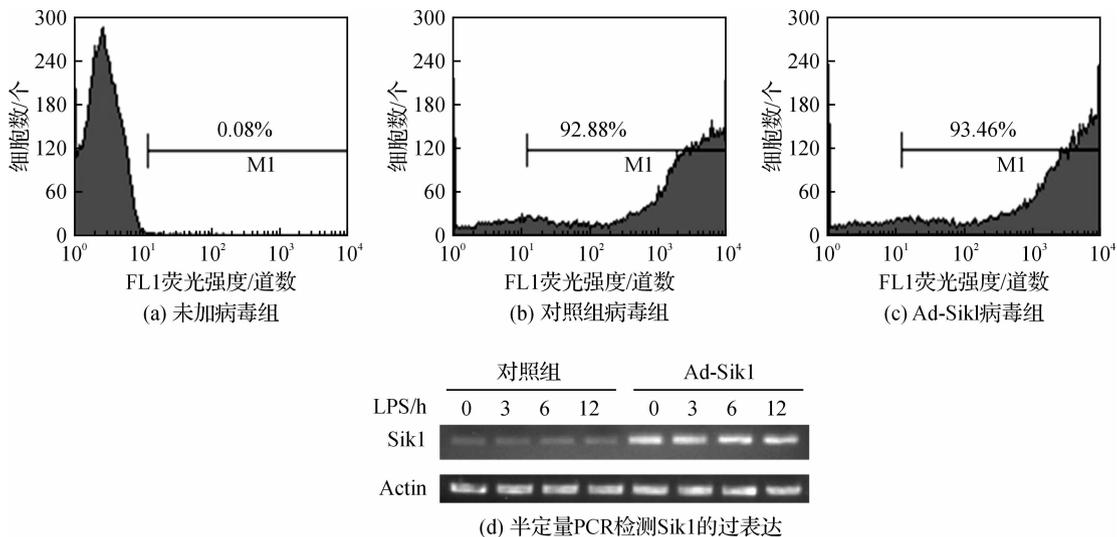


图2 流式细胞术及半定量 PCR 检测 Sik1 基因过表达效率

2.3 Sik1 基因过表达后 IL-6 及 IL-12 的变化

通过荧光定量 PCR,结果表明,在 Sik1 基因过表达的情况下,IL-6(见图 3(a))、IL-12(见图 3(b))的 mRNA 表达水平在 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的不同时间较对照组均有显著升高。通过 ELISA 分析 LPS 刺激 RAW264.7 细胞不同时间的细胞上清,发现在 Sik1 基因过表达的情况下,细胞上清中 IL-6 的蛋白含量较对照组在 LPS 刺激 12、24 h 均有明显的增加(见图 3(c)),IL-12 的蛋白含量较对照组在 LPS 刺激 24 h 也有明显的增加(见图 3(d))。

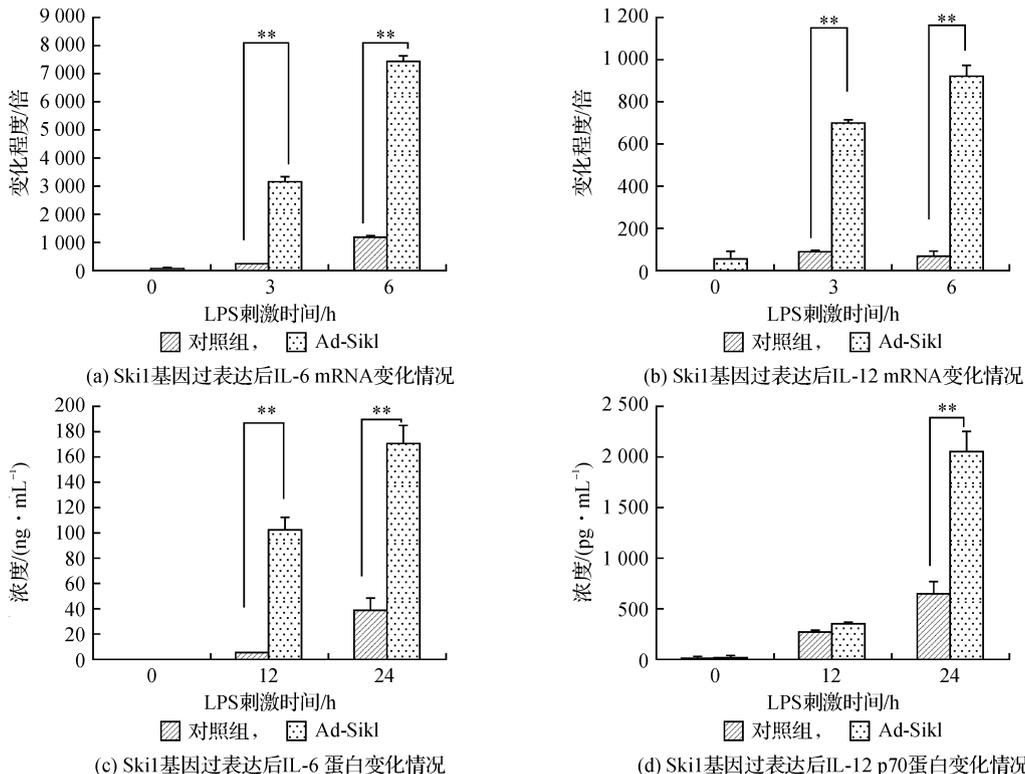


图3 Sik1 过表达后 IL-6 及 IL-12 的变化情况

注:“**”代表 $P < 0.01$

2.4 Western Blot 检测相关信号通路蛋白的变化结果

Western Blot 实验结果表明 SIK1 基因在 RAW264.7 细胞中过表达成功(见图4)。MAPK(mitogen activated protein kinase)信号通路中的相关蛋白 ERK1/2、JNK1/2、P38 的磷酸化水平在 LPS 刺激 0~60 min 的过程中有明显的变化,在 LPS 刺激 30 min 时其磷酸化水平最高。过表达 SIK1 基因之后,MAPK 信号通路中的相关蛋白 ERK1/2、JNK1/2、P38 的磷酸化水平较对照组在 30 min 均有一定程度的上升,相关内参 β -Actin 及 ERK1/2 总蛋白显示各样品中蛋白总量基本一致(见图4)。

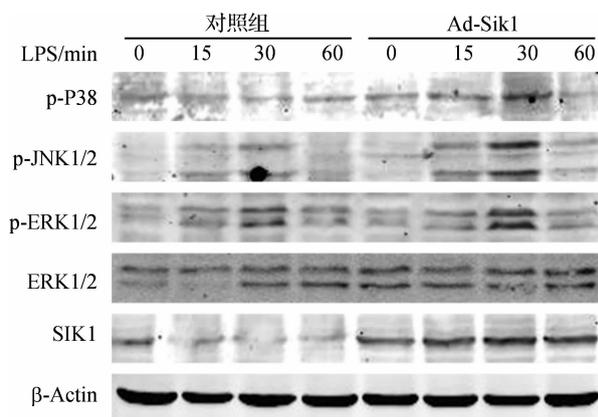


图4 Western Blot 检测相关信号通路蛋白磷酸化变化情况

3 讨论

细菌脂多糖 LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的成分,能够被 TLR4 所识别。LPS 能够与 LBP(LPS binding protein)及受体蛋白 CD14 分子形成复合物,当 TLR4 与该复合物结合时,能激活下游的多条信号途径,如 MAPK、NF- κ B 途径等,进而将信号传递至核内^[12]。MAPK 家族是一组重要的丝/苏氨酸蛋白激酶,通过调节下游底物的磷酸化水平来激活细胞内的多种转录因子。部分被激活的转录因子能够作用于多种免疫炎症因子如 IL-6、IL-12 等基因启动子序列上的重要位点,调节免疫应答^[13]。

实验结果表明,SIK1 基因的过表达能够通过增强 LPS-TLR4 诱导的 MAPK 家族的 ERK、JNK、p38 三条信号途径,促进免疫炎症因子 IL-6、IL-12 的表达。其具体机制可能是 SIK1 通过调控 HDACs 来实现这一过程。已有研究表明,HDACs 可以与多种转录相关蛋白形成复合体,共同作用于 DNA 转录调控区^[14]。HDACs 在免疫炎症因子及抗炎因子的基因表达调控中发挥重要的作用。如 HDAC1、2 能够调控 IL-4, HDAC5 调控 IL-8, HDAC7、9 调控 IL-2, HDAC6、11 调控 IL-10 等^[15-16]。HDACs 家族根据其结构特征可以被分为四大类 I、II、III、IV 型,其中 SIK1 主要能够作用于 II 型的 HDACs(包括 II a 型的 HDAC4、5、7、9 及 II b 型的 HDAC6、10)。研究表明,与 II 型 HDACs 形成复合物的分子有很多,如 MAPK2/3、Erk1/2、I κ Ba、CREB2、MEF2 等^[17],这些都是 LPS-TLR4 诱导信号通路中的重要分子。II 型的 HDACs 与其家族其它成员之间也可以形成复合体共同作用于 MAPK 及 NF- κ B 信号通路^[18]。SIK1 可能参与 II 型 HDACs 与 MAPKs 家族及 HDACs 家族成员之间的作用来实现对转录因子的调控,进而影响免疫炎症因子的表达。SIK1 基因在免疫系统中的潜在作用及其具体作用机制还有待继续探索研究,如 SIK1 在 LPS 刺激 48 h 时,其表达量较 LPS 刺激 0~24 h 增加了几十倍,SIK1 基因在 LPS-TLR4 诱导的其他信号途径中是否也具有重要的作用等。这些结果将为免疫炎症因子表达调控的研究提供一定的参考价值。

参考文献:

- [1] Wang Z, Takemori H, Halder S K, et al. Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal[J]. FEBS Lett, 1999, 453(1): 135-139.
- [2] Okamoto M, Takemori H, Katoh Y, et al. Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2004, 15(1): 21-26.
- [3] Katoh Y, Takemori H, Horike N, et al. Salt-inducible kinase (SIK) isoforms; their involvement in steroidogenesis and adipogenesis[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004, 217(1): 109-112.
- [4] Katoh Y, Takemori H, Min L, et al. Salt-inducible kinase-1 represses cAMP response element-binding protein activity both in the nucleus and in the cytoplasm[J]. Eur J Biochem, 2004, 271(21): 4307-4319.
- [5] Lin X, Takemori H, Katoh Y, et al. Salt inducible kinase is involved in the ACTH/cAMP dependent protein kinase signaling in Y1 mouse adrenocortical tumor cells[J]. Mol Endocrinol, 2001, 15(8): 1264-1276.
- [6] Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, et al. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes [J]. Nat Med, 2007, 13(5): 597-603.
- [7] Sjöström M, Karin S, Kristina E, et al. SIK1 is part of a cell sodium-sensing network that regulates active sodium trans-

- port through a calcium dependent process[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(43): 16922-16927.
- [8] Marcin K, Peter L, Michael V, et al. TGF- β induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling [J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(4): 655-662.
- [9] Stephenson A, Huang G Y, Nguyen N T, et al. Snf1lk encodes a protein kinase that may function in cell cycle regulation [J]. *Genomics*, 2004, 83(6): 1105-1115.
- [10] Cheng H, Liu P, Wang Z C, et al. SIK1 couples LKB1 to p53-dependent anoikis and suppresses metastasis[J]. *Sci Signal*, 2009, 2(80): ra35.
- [11] Lin H T, Tsai H Y, Liu C P, et al. Comparability of bovine virus titers obtained by TCID₅₀/mL and FAID₅₀/mL[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 165(1): 121-124.
- [12] Wang D, Lou J, Ou Y, et al. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(31): 13806-13811.
- [13] Ndlovu N, Van Lint C, Van Wesemael K, et al. Hyperactivated NF- κ B and AP-1 transcription factors, promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(20): 5488-5504.
- [14] Khan A, Tomasi T. Histone deacetylase regulation of immune gene expression in tumor cells[J]. *Immunol Res*, 2008, 40(2): 164-178.
- [15] Villagra A, Sotomayor E M, Seto E. Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation[J]. *Oncogene*, 2010, 29(2): 157-173.
- [16] Villagra A, Cheng F, Wang H W, et al. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(1): 92-100.
- [17] Martin M, Kettmann R, Dequiedt F. Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators[J]. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5450-5467.
- [18] Slevogt H, Schmeck B, Jonat C, et al. *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF- κ B activation and histone deacetylase activity reduction[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5): 818-826.

Regulation of IL-6 and IL-12 Expression by SIK1 Protein in Macrophages

LOU Jun¹, OU Yang-chuan², ZHENG Ming-zhu², YAO Yur-liang², WANG Luo², QIU Qing¹, ZHOU Xiu-mei¹

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,

Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Institute of Immunology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: SIK1 is upregulated by LPS (lipopolysaccharide) stimulation with different time in macrophages. It suggests that SIK1 plays a potential role in immune system. The experiment overexpresses SIK1 in RAW264.7 using virus vectors, and checks its effect on inflammatory cytokine expression by Real Time Quantity PCR, ELISA and Western Blot assay in mRNA and protein level. Results show that the overexpression of SIK1 can enhance the expression of immune inflammatory cytokines including IL-6 and IL-12. To some extent, It will provide certain theoretical basis for the study of immune regulation and related disease in clinical diagnosis and treatment.

Key words: SIK1; LPS stimulation; IL-6; IL-12

(责任编辑: 许惠儿)