

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.010

· 基础研究 ·

## *Rac1b* siRNA 对胃癌 AGS 细胞中血管生成相关分子表达的影响

薛妍, 杨静悦, 斯晓明, 陈衍, 尤向辉, 刘都户, 刘文超(第四军医大学西京医院肿瘤科, 陕西西安 710032)

[摘要] 目的: 研究小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制 *Rac1b* 表达后对胃癌 AGS 细胞血管生成相关分子表达的影响。方法: 体外合成针对 *Rac1b* 基因的 siRNA 序列 (*Rac1b* siRNA), 脂质体法转染 AGS 细胞, RT-PCR 和 Western blotting 观察 *Rac1b* siRNA 对 AGS 细胞 *Rac1b* mRNA 和蛋白水平表达的影响, ELISA 和 Western blotting 检测缺氧条件下转染 *Rac1b* siRNA 后 AGS 细胞培养上清中 VEGF 表达水平以及细胞中血管生成相关分子 P53、VHL 和 HIF-1 $\alpha$  表达水平的变化。结果: 测序证实体外合成的 *Rac1b* siRNA 序列正确。*Rac1b* siRNA 转染 AGS 细胞后, 可在 mRNA 和蛋白水平特异性抑制 *Rac1b* 的表达, 对其同源分子 *Rac1* 的 mRNA 和蛋白表达水平无影响。*Rac1b* siRNA 可显著抑制 AGS 细胞培养上清中 VEGF 的分泌, 这种抑制作用在缺氧情况下更为明显。同时, *Rac1b* siRNA 在缺氧情况下可抑制 AGS 细胞内 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达、上调 p53 和 VHL 蛋白的表达。结论: *Rac1b* siRNA 可抑制胃癌 AGS 细胞中 *Rac1b* 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 可能通过调节血管生成相关分子 HIF-1 $\alpha$ 、P53 及 VHL 的表达抑制缺氧情况下 AGS 细胞 VEGF 的分泌。

[关键词] *Rac1b*; siRNA; 胃肿瘤; 血管生成相关分子

[中图分类号] R730.54; R735.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)04-0414-05

## Effect of *Rac1b* siRNA on expression of angiogenesis-related molecules in gastric cancer AGS cells

XUE Yan, YANG Jing-yue, SI Xiao-ming, CHEN Yan, YOU Xiang-hui, LIU Du-hu, LIU Wen-chao (Department of Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of small interfering RNA (siRNA) targeting *Rac1b* on the expression of angiogenesis-related molecules in gastric cancer AGS cells. **Methods:** siRNA targeting *Rac1b* (*Rac1b* siRNA) was synthesized and transfected into AGS cells by lipofectamine<sup>TM</sup> reagent. The effect of *Rac1b* siRNA on mRNA and protein expressions of *Rac1b* in AGS cells was examined by RT-PCR and Western blotting analysis. ELISA and Western blotting analysis were used to assess VEGF production in the supernatants of transfected AGS cells and the expressions of angiogenesis-related molecules such as P53, VHL and HIF-1 $\alpha$  in AGS cells under hypoxia situation. **Results:** DNA sequencing analysis confirmed that the sequence of *Rac1b* siRNA was correct. Transfection of *Rac1b* siRNA in AGS cells resulted in a specific decrease in *Rac1b* mRNA and protein expressions, while failed to knock down the expression of its homologous molecular *Rac1*. The secretion of VEGF in the supernatant of AGS cells transfected with *Rac1b* siRNA was significantly inhibited, and this inhibition effect was more obvious under hypoxia condition. Meanwhile, *Rac1b* siRNA down-regulated HIF-1 $\alpha$  protein expression and up-regulated the expressions of angiogenesis-related molecules such as P53 and VHL. **Conclusion:** *Rac1b* siRNA can inhibit the mRNA and protein expressions of *Rac1b* in gastric cancer AGS cells; it can also inhibit VEGF production through regulating the expression of angiogenesis-related molecules such as P53, VHL and HIF-1 $\alpha$  under hypoxia condition.

[Key words] *Rac1b*; siRNA; gastric tumor; angiogenesis-related molecule

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 414-418]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30770823); 陕西省自然科学基金资助项目(No. 2007C222)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30770823), and the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2007C222)

[作者简介] 薛妍(1973-), 女, 河北省平山县人, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤血管生成研究。E-mail: xueyan@fmmu.edu.cn

[通信作者] 刘文超(LIU Wen-chao, corresponding author), E-mail: fmmuxueyan@hotmail.com

Rac1 是小 G 蛋白 Rho 家族的主要成员之一,在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用。Rac1b 是 Rac1 的一个变异剪接体,功能类似于一个快速循环的 GTP 酶,游离于 GTP 结合和解离状态之间<sup>[1]</sup>。既往的研究<sup>[2-4]</sup>表明,在结直肠癌和乳腺癌中,Rac1b 蛋白表达水平增高;同时也表明,Rac1b 的 mRNA 表达水平在一些消化道肿瘤中升高。由此推测,Rac1b 可能同大多数 Rho 家族分子一样,在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用。

基于这一推测,本研究检测胃癌细胞 AGS 内 Rac1b 的表达水平,应用 RNA 干扰技术抑制 Rac1b 的表达,观察其对血管生成相关分子 VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、p53 和 VHL 表达水平的影响。以此探讨 Rac1b 是否可能通过影响血管生成相关分子的表达来激活缺氧诱导的肿瘤血管生成,*Rac1b* siRNA 是否有可能成为治疗肿瘤血管生成的一种新型方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

兔抗人 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体、ECL 试剂盒购自 Santa Cruz 公司,鼠抗人 p53、VHL 单克隆抗体购自 Neomarkers 公司,鼠抗人肌动蛋白单克隆抗体购自 Sigma 公司,辣根酶标记山羊抗小鼠/兔购自北京中山生物技术有限公司。TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒购自 Gibco 公司,RT-PCR 试剂盒购自 MBI 公司,Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 细胞培养

人胃癌细胞 AGS、KATO III、MKN-45、MKN-28 及永生化的胃黏膜上皮细胞 GES 为本研究室保存,在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的完全培养液 DMEM 中贴壁生长,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,用 0.25% 的胰酶和 1% EDTA 消化传代。缺氧条件培养参照文献<sup>[5]</sup>,将细胞置于 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 及 94% N<sub>2</sub> 的密闭培养装置内培养。

### 1.3 构建 mU6pro/Rac1b-siRNA 真核表达质粒

mU6pro siRNA 真核表达载体由美国 Michigan 大学的 Turner 教授惠赠,其质粒特性参照文献<sup>[6]</sup>。根据 *Rac1b* 的 cDNA 编码序列,设计了编码人 *Rac1b* siRNA 的互补寡核苷酸链(靶向位点为核苷酸 239 ~ 258),序列如下:5'-TTTGGAGTTATATCCTTAC-CGACACGGTAAGGATATAACCTCCTTTTT-3'; 3'-CTCCAATATAGGAATGGCTGTGCCATTCCTATATTGGA GGAAAAGATC-5'。退火、应用 *Bbs* I 和 *Xba* I 双酶切 mU6pro 载体,连接、转化,再与真核表达载体 pCEFL-GST-neo 共转染。接种细胞,在 37 °C、5%

CO<sub>2</sub> 孵箱中培养细胞至 70% ~ 90% 融合。应用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 按照操作说明进行转染。共转染时 siRNA 表达载体质粒(mU6pro/Rac1-siRNA,无新霉素抗性筛选标签)和 pCEFL-GST-neo 真核表达载体(有新霉素抗性筛选标签)所用质量比为 10:1,应用 800  $\mu$ g/ml G418 筛选 12 d。挑选单细胞克隆、扩大培养。

### 1.4 半定量 RT-PCR 检测人胃癌细胞中 *Rac1b* mRNA 的表达

应用 TRIzol 抽提总 RNA,根据 *Rac1b* 编码区基因序列,应用 Primer 5 软件设计引物,其中上游序列为 GCAAAGACAAGCCGATT,下游序列为 TCTTCTTCACGGGAGGC,循环参数为 94 °C 40 s、54 °C 30 s、72 °C 30 s,扩增产物长度为 348 bp。内参对照为  $\beta_2$ -microglobulin( $\beta_2$ -mg),上游引物为 CTATCCAGCGTACTCCAA,下游引物为 AAGT-CAACTTCAATGTCGG,循环参数为 94 °C 30 s、54 °C 30 s、72 °C 30 s,扩增产物长度为 118 bp。预实验结果表明, $\beta_2$ -microglobulin 在循环 26 次后即进入平台期,Rac1 在循环 30 次后进入平台期,因此分别选用 26 次及 30 次作为两者的循环次数。用 UVP 凝胶图像分析仪进行图像分析。

### 1.5 Western blotting 法检测 HIF-1 $\alpha$ 的表达水平

收获对数生长期的细胞,用 50 ~ 100  $\mu$ l 三去污裂解液(含 1% NP-40、50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L PMSF 和 1 mg/L 抑肽酶)重悬细胞并反复吹打 3 ~ 5 min;混匀后于 4 °C 温育 20 min,12 000  $\times g$  离心 20 min,取上清作为细胞总蛋白质,分装后储于 -70 °C 备用。取 50 ~ 100  $\mu$ g 的蛋白质样品与等体积的 2  $\times$  SDS 上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L 二硫苏糖醇、4% SDS、0.2% 溴酚蓝、20% 甘油)混合,于 100 °C 变性 5 min,加载于 8% 或 12% 不连续聚丙烯酰胺凝胶样品孔中;以恒压 60 V(浓缩胶)/120 V(分离胶)电泳至溴酚蓝抵达凝胶底边,取出凝胶用电转仪转移 1 ~ 3 h,8% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 °C 温育过夜,二抗室温温育 2 h,ECL 显色观察结果。

### 1.6 ELISA 法检测 VEGF 的表达水平

在 35 mm 的培养板中,每孔接种 2  $\times$  10<sup>5</sup> 个细胞,设 3 个复孔,在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 中培养 24 h,然后换无血清 RPMI 1640 培养基,继续培养 24 h。在 0 和 12 h 分别将其中 2 孔细胞置于 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 及 94% N<sub>2</sub> 的密闭培养装置内培养,另外 1 孔细胞继续在常氧情况下培养。收集并计数细胞,应用 VEGF ELISA 试剂盒检测条件培养基内

VEGF 含量,将标本(100  $\mu$ L/L)加入相应孔中后,37  $^{\circ}$ C 孵箱温育 90 min,洗板 4 次;加入生物素化抗体工作液(100  $\mu$ L/孔),37  $^{\circ}$ C 孵箱温育 60 min,洗板 4 次;加入酶结合工作液(100  $\mu$ L/孔),37  $^{\circ}$ C 孵箱温育 30 min,洗板 4 次;加入底物显色剂 100  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C 避光温育 10~15 min,加入终止液 100  $\mu$ L/孔,混匀后即刻测量  $D_{450}$  值。根据标准曲线计算每  $1 \times 10^5$  细胞中的 VEGF 量(ng)。

1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS11.5 软件,组间差异采用  $t$  检验, $P < 0.05$  时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Rac1b* 在胃癌细胞中高表达

以 RT-PCR 比较了永生化人胃黏膜上皮细胞(GES)和 4 种胃癌细胞(AGS、KATO III、MKN-45 和 MKN-28)中 *Rac1b* mRNA 表达水平。结果(图 1)表明,*Rac1b* mRNA 在几种胃癌细胞中均高表达,其中 AGS 细胞中 *Rac1b* mRNA 表达最高,所以后续实验选择 AGS 细胞进行 *Rac1b* siRNA 转染。

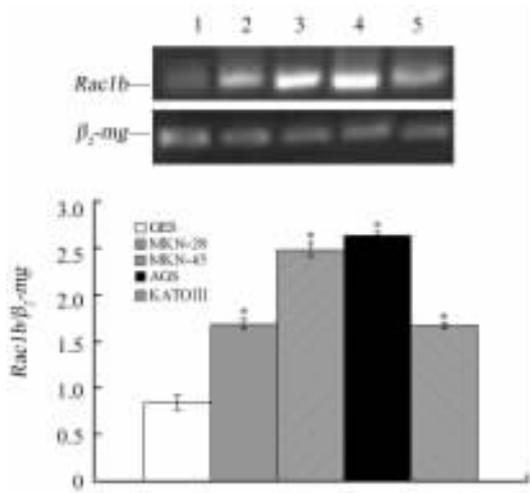


图 1 *Rac1b* mRNA 在胃癌细胞株中高表达  
Fig.1 *Rac1b* mRNA was highly expressed in human gastric cancer cell lines

1:GES cells;2:MKN-28 cells;3:MKN-45 cells; 4:AGS cells;5:KATO III cells; \*  $P < 0.05$  vs GES cell

2.2 *Rac1b* siRNA 真核表达载体的鉴定

在计算机辅助下设计了 *Rac1b* siRNA 作用的靶点,并合成其相应的 cDNA 序列,退火后重组入 mU6pro 载体;测序证实重组片段序列正确后,应用 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切 mU6pro 空载体和 mU6pro/*Rac1b*-siRNA 重组质粒,空载体酶切释放的片段为

1.1 kb,而重组质粒释放片段约 400 bp,证明 *Rac1b* siRNA 真核表达载体构建成功(图 2)。

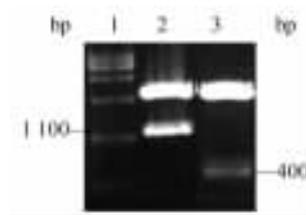


图 2 *Rac1b* siRNA 表达载体的鉴定

Fig.2 Identification of *Rac1b* siRNA expression vectors

1:Marker; 2: mU6pro; 3: *Rac1b* siRNA

2.3 AGS/*Rac1b*-siRNA 细胞中 *Rac1b* siRNA 的抑制效果

由图 3 显示,*Rac1b* siRNA 在 mRNA 水平可明显抑制 *Rac1b* 的表达,且这种抑制作用的特异性较好,对其同源分子 *Rac1* mRNA 表达无明显影响。

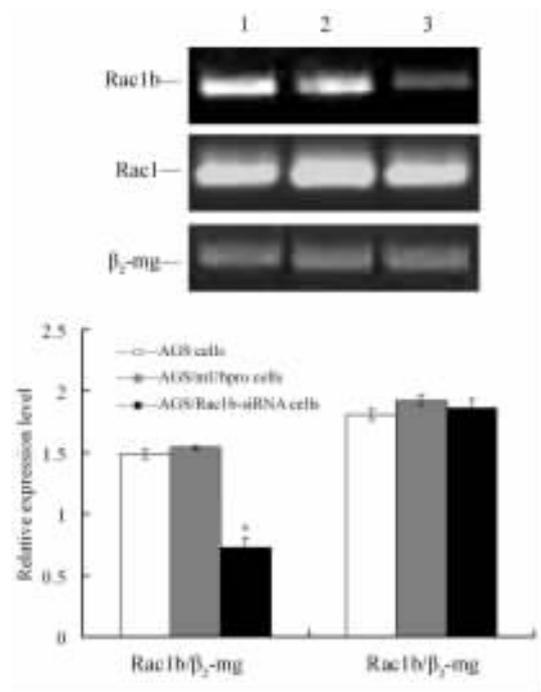


图 3 *Rac1b* siRNA 抑制 AGS 细胞中 *Rac1b* mRNA 的表达

Fig.3 *Rac1b* siRNA transfection inhibited *Rac1b* mRNA expression in AGS cells

1: Control; 2: mU6pro; 3: *Rac1b* siRNA; \*  $P < 0.05$  vs AGS cells

2.4 *Rac1b* siRNA 对缺氧诱导的血管生成相关分子表达的影响

为了观察 *Rac1b* siRNA 对缺氧诱导的血管生成相关因子表达水平的影响,实验检测了不同缺氧时间(0~24 h) AGS/*Rac1b* siRNA 转染细胞培养上清

中 VEGF 的含量。结果(图 4A)显示, *Rac1b* siRNA 转染 AGS 细胞后,可明显抑制 AGS 细胞培养上清中 VEGF 的分泌量,这种抑制作用在缺氧情况下更为明显,最大的抑制效应在 24 h。在缺氧情况下, VEGF 的表达主要受转录因子 HIF-1 $\alpha$  的调节。实验应用 Western blotting 法检测了 HIF-1 $\alpha$  的表达水平。结果(图 4B)表明, *Rac1b* siRNA 转染后明显抑制了 AGS 细胞内 HIF-1 $\alpha$  的表达水平。肿瘤抑癌基因 *p53* 和 *VHL* 可以抑制血管生成<sup>[7-8]</sup>, *VHL* 和 *p53* 可通过泛素-蛋白酶体通路降解 HIF-1 $\alpha$ , 从而抑制 HIF-1 $\alpha$  刺激的转录<sup>[8-9]</sup>。因此,在多种肿瘤中, VEGF 的表达受 *p53* 和 *VHL* 的负性调控。为了证实 *p53* 和 *VHL* 是否参与了 *Rac1b* 介导的肿瘤血管生成,本实验检测了 *p53* 和 *VHL* 的表达水平。结果(图 4B)显示, AGS 细胞转染 *Rac1b* siRNA 后, *p53* 和 *VHL* 的表达水平明显上调,这种作用在缺氧情况下更为明显。结果表明, *Rac1b* 可能通过 *p53* 和 *VHL* 来调控 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达。当然,也不能排除其他可能如 *Rac1b* 可以直接调控 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达和功能。

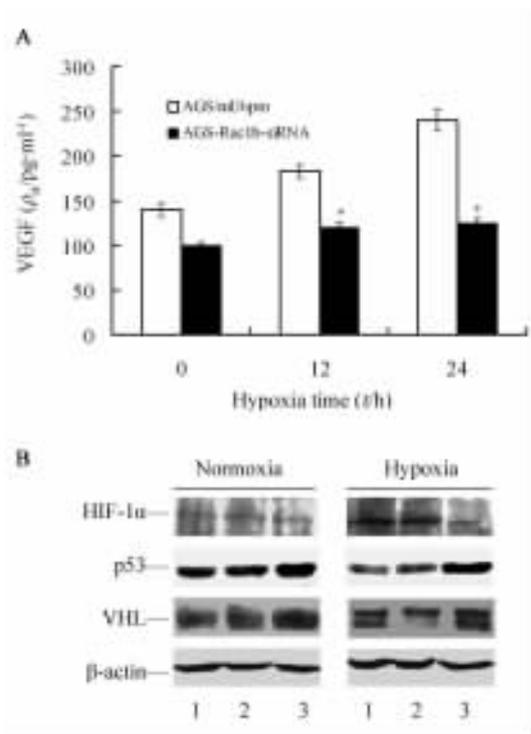


图4 *Rac1b* siRNA 对 AGS 细胞中血管生成相关分子表达的影响

Fig. 4 Effect of *Rac1b* siRNA on expression of angiogenesis-related molecules in AGS cells

A: VEGF; B: Angiogenesis-related molecules; 1: Control; 2: mU6pro; 3: *Rac1b*-siRNA

### 3 讨论

以往研究<sup>[1]</sup>表明, *Rac1b* 是 *Rac1* 的一个变异剪接体,它在 *Rac1* 编码子 75 ~ 76 之间插入了额外的 57 个核苷酸,编码 19 个氨基酸,形成了一个新的、功能尚不完全明确的外显子 3b。 *Rac1b* 最早是从皮肤和胃肠道的上皮组织中鉴定分离的,随后研究发现,与相应的正常组织相比, *Rac1b* 在不同恶性阶段的结直肠癌肿瘤中表达水平均升高<sup>[2]</sup>。因此,插入的 19 个氨基酸有可能是 *rac1b* 的一个功能结合位点,这个位点可能参与引发肠道肿瘤的信号通路。另外的研究<sup>[3]</sup>也表明, *Rac1b* 就像一个快速循环的 GTP 酶,循环于 GTP 结合和解离状态之间,在乳腺癌恶变的不同期间表达水平均升高。然而,目前有关 *Rac1b* 和肿瘤血管生成之间的研究还非常少。

肿瘤抑癌基因 *p53* 和 *VHL* 的缺失会诱发血管生成。比如, *p53* 缺失可能会诱导血管生成分子 VEGF 表达水平升高,而 *p53* 高表达可明显抑制内源性 VEGF 的转录和表达<sup>[10]</sup>。同样, *VHL* 缺失可诱导肿瘤高度血管化、促进肿瘤转移<sup>[11]</sup>。 *p53* 和 *VHL* 还可以通过泛素-蛋白酶体通路促进 HIF-1 $\alpha$  的降解抑制 HIF-1 $\alpha$  诱导的 VEGF 的转录和表达<sup>[7-9]</sup>。本研究表明,在常氧和缺氧下, *Rac1b* siRNA 转染 AGS 细胞后可明显抑制 AGS 细胞培养上清中 VEGF 的分泌量,其可能的机制是通过抑制 HIF-1 $\alpha$ 、上调 *p53* 和 *VHL* 的表达水平来调控 VEGF 的表达和功能。

本实验结果与其他有关 *Rac1b* 的研究结果一致,均认为 *Rac1b* 可能在肿瘤的发生、发展及血管生成中发挥着重要作用。实验结果表明 *Rac1b* siRNA 会影响缺氧情况下血管生成相关分子的表达,可能会影响肿瘤血管生成。 siRNAs 是长度为 21-23 个核苷酸的寡核苷酸,体外应用可以在哺乳细胞产生特异性的基因沉默效应<sup>[12-13]</sup>。目前的研究<sup>[14-15]</sup>已经表明,在裸鼠体内应用 siRNA 可以有效抑制基因表达。这些均表明 siRNA 可作为未来基因治疗的一种有效手段。已经有研究表明, *Rac1b* 可能参与了肿瘤的恶性进程,因此 *Rac1b* siRNA 可能会成为 *Rac1b* 相关肿瘤的一种有效治疗手段。

### [参考文献]

- [1] Singh A, Karnoub AE, Palmby TR, Lengyel E, Sondek J, Der CJ. *Rac1b*, a tumor associated, constitutively active *Rac1* splice variant, promotes cellular transformation [J]. *Oncogene*, 2004, 23( 58 ): 9369-9380.

- [ 2 ] Matos P, Jordan P. Increased Rac1b expression sustains colorectal tumor cell survival [ J ]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6( 7 ): 1178-1184.
- [ 3 ] Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, et al. Rac1 in human breast cancer: Overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b [ J ]. *Oncogene*, 2000, 19( 26 ): 3013-3020.
- [ 4 ] 潘阳林, 毕 锋, 刘 娜, 杜静平, 蒋海萍, 薛 妍, 等. Rac 亚家族在胃肠道肿瘤细胞系中的表达及活性 [ J ]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 5( 25 ): 441-444.
- [ 5 ] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects [ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93( 4 ): 266-276.
- [ 6 ] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99( 9 ): 6047-6052.
- [ 7 ] Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: A new role for the guardian of the genome [ J ]. *J Mol Med*, 2007, 85( 11 ): 1175-1186.
- [ 8 ] Jones MK, Szabó IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS. von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1 $\alpha$ : New targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis [ J ]. *FASEB J*, 2002, 16( 2 ): 264-266.
- [ 9 ] Schmid T, Zhou J, Brtine B. HIF-1 and p53: Communication of transcription factors under hypoxia [ J ]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8( 4 ): 423-431.
- [ 10 ] Oh SY, Kwon HC, Kim SH, Jang JS, Kim MC, Kim KH, et al. Clinicopathologic significance of HIF-1 $\alpha$ , p53, and VEGF expression and preoperative serum VEGF level in gastric cancer [ J ]. *BMC Cancer*, 2008, 1( 8 ): 123.
- [ 11 ] Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Masson D, Zerrouki S, Jouan F, Collet N, et al. Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma [ J ]. *Br J Cancer*, 2009, 101( 8 ): 1417-1424.
- [ 12 ] Wouters BG, Brown JM. Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the hypoxic fraction in determining tumor response to fractionated radiotherapy [ J ]. *Radiat Res*, 1997, 147( 5 ): 541-550.
- [ 13 ] 高福莲, 朱晓燕, 王 峰, 吴景兰, 张钦宪. siRNA 对 SGC7901/VCR 细胞 mdrl 基因沉默效果的影响因素分析 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33( 3 ): 151-155.
- [ 14 ] Kamlah F, Eul BG, Li S, Lang N, Marsh LM, Seeger W, et al. Intravenous injection of siRNA directed against hypoxia-inducible factors prolongs survival in a Lewis lung carcinoma cancer model [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16( 3 ): 195-205.
- [ 15 ] Jonson AL, Rogers LM, Ramakrishnan S, Downs LS. Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer [ J ]. *Gynecol Oncol*, 2008, 111( 2 ): 356-364.
- [ 收稿日期 ] 2010-05-12 [ 修回日期 ] 2010-06-18  
[ 本文编辑 ] 王 莹

## · 科技动态 ·

### 雌二醇通过 let-7a 和 miR-125b 的协调调节而抑制人巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B 的激活

miRNA 在动物及人类中广泛存在,并且与发育、分化、凋亡、脂肪代谢、病毒感染和癌症等多种重要生物学过程有联系。虽然在不同的时空发育阶段 miRNA 的表达量不同,但是多种 miRNA 在同一个细胞中的表达使得细胞处在一种内在的 miRNA 环境中,这个环境控制着成千上万的编码基因的 mRNA 水平,使得各种蛋白的表达处在一个适度水平。

$\kappa$ B-Ras2 是 2000 年发现的一种能够增强 I $\kappa$ B $\alpha$  和磷酸化 I $\kappa$ B( p I $\kappa$ B $\alpha$  )稳定性,从而抑制 LPS-TLR4-NF $\kappa$ B 通路产生致炎因子的一种蛋白。美国达特茅斯医学院生理学教研室的 Patricia A Pioli 和她的研究小组发现,在人的巨噬细胞中,let-7a 和 miR-125b 能够协同调节  $\kappa$ B-Ras2 的表达,从而抑制 NF $\kappa$ B 通路的激活。这一工作证明了 miRNA 在 NF $\kappa$ B 通路中的重要作用。首先,作者通过 ELISA 实验和实时定量 PCR 技术确定了雌二醇能够抑制人巨噬细胞 TNF- $\alpha$  的分泌及其 mRNA 的表达。然后,作者通过 P65( NF $\kappa$ B 的一个亚基 )的核蛋白抽提实验及蛋白质印迹技术检测 IKK $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\kappa$ B-Ras2 表达变化,发现在雌二醇刺激的人巨噬细胞中,P65 在核内表达减少,I $\kappa$ B $\alpha$ 、p I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\kappa$ B-Ras2 表达升高,IKK $\beta$  表达没有变化,说明了雌二醇刺激的人巨噬细胞 TNF- $\alpha$  表达降低是由于核内 P65 减少,而 P65 入核减少是由于 I $\kappa$ B $\alpha$ 、p I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\kappa$ B-Ras2 表达升高,并且这一过程不依赖于 IKK $\beta$ 。最后,作者用荧光素酶检测技术( luciferase assay )和瞬时转染 miRNAs 前体实验( transient transfection of premiRNAs )确定  $\kappa$ B-Ras2 是 let-7a, mir-125b 的靶标。

总之,该研究表明:由雌二醇刺激的人巨噬细胞中,let-7a 表达升高而 miR-125b 表达降低,其中,miR-125b 能够增强  $\kappa$ B-Ras2 的产生,let-7a 则抑制  $\kappa$ B-Ras2 的产生,它们的协同作用抑制了 NF $\kappa$ B 通路的激活。miRNA 与多种生物学过程相关,全面而深入地剖析 miRNA 的发生、作用机制和功能,将会揭示这些生物过程乃至一些疑难疾病的分子基础。

[ 赵雁 摘译,田野莘 审阅. Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA. *J Immunol*, 2010, 184( 9 ): 5029-5037. ]