

论著·基础研究

敲减干扰素调节因子 3 对脂多糖刺激 Raw 264.7 细胞核内 Irak1bp1 表达的影响

谈志丽*, 王迎迎*, 钟 欢, 何 玉, 施青青, 杨 雪, 徐国荣, 刘亮明

上海交通大学附属第一人民医院松江分院感染科, 上海 201600

【摘要】目的· 扩增干扰素调节因子 3 (interferon regulator factor 3, IRF3) 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 腺病毒, 并研究该病毒对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激诱导 Raw264.7 细胞核内白介素受体相关激酶 1 结合蛋白 1 (interleukin-1 receptor associated kinase 1 binding protein 1, Irak1bp1) 表达的影响。**方法**· IRF3 shRNA 腺病毒的扩增在人胚肾 293 T (HEK293T) 细胞中进行, 并采用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度。Raw 264.7 细胞随机分为 4 组, 1 组为腺病毒 (-) LPS (-), 2 组为腺病毒 (-) LPS (+), 3 组为腺病毒 (+) LPS (-), 4 组为腺病毒 (+) LPS (+)。细胞 IRF3 基因表达采用 real-time PCR 方法检测; 核内 IRF3 及 Irak1bp1 的表达采用 Western blotting 方法检测。**结果**· 经计算扩增腺病毒滴度为 2.2×10^{11} PFU/mL, 最佳 MOI 为 300。LPS 刺激后 Raw 264.7 细胞内 IRF3 mRNA 较对照组明显增加, 核内 IRF3 蛋白及 Irak1bp1 表达也明显增加; IRF3 shRNA 腺病毒应用后, 细胞对 IRF3 mRNA 的组成性表达及 LPS 刺激诱导的 IRF3 mRNA 和核内蛋白质表达均明显受抑, 但未刺激状态下 IRF3 蛋白核内组成性表达无明显影响; IRF3 shRNA 腺病毒应用对细胞静息及 LPS 刺激诱导的核内 Irak1bp1 表达并无影响。**结论**· IRF3 shRNA 腺病毒能够有效抑制 LPS 刺激诱导的核内 IRF3 的表达, 但并不影响核内 Irak1bp1 的表达。

【关键词】 干扰素调节因子 3; 短发夹 RNA 腺病毒; 白介素受体相关激酶 1 结合蛋白 1 (Irak1bp1); 脂多糖

【DOI】 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.06.001 **【中图分类号】** R575.3 **【文献标志码】** A

Effects of IRF3 knockdown on the nuclear expression of Irak1bp1 protein in LPS-stimulated Raw 264.7 cells

TAN Zhi-li*, WANG Ying-ying*, ZHONG Huan, HE Yu, SHI Qing-qing, YANG Xue, XU Guo-rong, LIU Liang-ming

Department of Infection Diseases, Songjiang Hospital Affiliated to First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201600, China

【Abstract】Objective· To amplify the interferon regulator factor 3 (IRF3) short hairpin RNA (shRNA) virus and investigate the effect of the virus on the nuclear expression of Irak1bp1 protein in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells. **Methods**· Adenovirus was amplified in HEK293T cells and the virus titer was detected by TCID₅₀ assay. The Raw 264.7 cells were randomly divided into four groups including adenovirus (-) LPS (-) group, adenovirus (-) LPS (+) group, adenovirus (+) LPS (-) group and adenovirus (+) LPS (+) group. The expression of intracellular IRF3 mRNA was detected by real-time PCR, and the nuclear expression of IRF3 and Irak1bp1 protein were detected by Western blotting. **Results**· The titer of adenovirus was 2.2×10^{11} PFU/mL and the best MOI was 300. The expression of IRF3 mRNA and nuclear IRF3 protein in LPS-stimulated Raw 264.7 cells were significantly higher than those of the control group. The cellular constitutive expression of IRF3 at mRNA level and the LPS-induced expression of IRF3 were significantly inhibited after transfection of Raw 264.7 cells with adenovirus strains carrying IRF3 shRNA. However, the nuclear constitutive expression of IRF3 protein was not affected by IRF3 shRNA in the unstimulated state. The expression of nuclear Irak1bp1 protein was significantly higher than that of the control group. The nuclear constitutive expression and the LPS-induced expression of Irak1bp1 protein were not affected by IRF3 shRNA. **Conclusion**· Transfection of LPS-stimulated Raw 264.7 cells with adenovirus strains carrying IRF3 shRNA could effectively inhibit the expression of IRF3, but not affect the nuclear expression of Irak1bp1 protein.

【Key words】 interferon regulator factor 3; short hairpin RNA; interleukin-1 receptor associated kinase 1 binding protein 1 (Irak1bp1); lipopolysaccharide (LPS)

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可识别巨噬细胞表面 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 并激活 MyD88 依赖及非依赖性信号通路, 参与多种免疫损伤性

疾病的发生与发展^[1-3]。近期有研究^[4-5]显示 2 条信号通路之间存在相互作用, MyD88 依赖信号通路激活能够抑制 MyD88 非依赖信号通路分子干扰素调节因子 3 (interferon

【基金项目】 国家自然科学基金 (81770612, 81070357, 30660066); 上海市松江区科技攻关项目 (16SJGG57) (National Natural Science Foundation of China, 81770612, 81070357, 30660066; Songjiang District Science and Technology Research Project of Shanghai, 16SJGG57)。

【作者简介】 谈志丽 (1990—), 女, 硕士生; 电子信箱: lwfdtzi895@live.com。王迎迎 (1981—), 女, 主治医师, 硕士; 电子信箱: ying1981428@sina.com.cn。
* 为共同第一作者。

【通信作者】 刘亮明, 电子信箱: liuliangming@hotmail.com。



regulator factor 3, IRF3) 及其下游干扰素的表达。IRF3 是干扰素调节因子家族成员, IRF3 活化后进入细胞核内可诱导 I 型干扰素 (如 IFN- β) 的转录表达, 发挥固有抗病毒及抗菌免疫^[6]。也有研究^[7]显示 IRF3 的激活对 MyD88 依赖信号通路中的炎症因子释放有促进作用, 但是相关机制并不明确。我们前期采用干扰腺病毒对 IRF3 进行敲减的实验研究^[8-9]也证实 IRF3 对 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的分泌具有促进作用, 但是其促分泌作用并不是通过影响 NF- κ B p65 入核来实现的。白介素受体相关激酶 1 结合蛋白 1 (interleukin-1 receptor associated kinase 1 binding protein 1, Irak1bp1) 是近年发现的一种 NF- κ B 正向调节蛋白, Irak1bp1 被 Irak1 蛋白磷酸化激活后依靠其结构中的核定位信号转位至细胞核, 在核内结合 NF- κ B p65 亚基进而增强其转录激活的能力^[10-11]。结合以上研究, 我们推测 IRF3 可能通过促进 Irak1bp1 入核, 进而增强 p65 的转录活性, 促进炎症因子的表达与分泌。为验证以上推测, 我们在本研究中再次利用前期实验使用的干扰腺病毒, 对 IRF3 进行基因敲减实验, 研究 IRF3 对小鼠腹腔巨噬细胞 (Raw 264.7 细胞) Irak1bp1 表达及分泌的影响, 以阐明 IRF3 对巨噬细胞炎症信号通路的影响, 为将来探讨 IRF3 在免疫炎症损伤性疾病中的效应奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与耗材

Raw 264.7 细胞及 HEK293T 细胞 (中国科学院上海细胞库), DMEM 培养液和 1640 培养液 (上海吉诺公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司), 脂多糖 (美国 Sigma 公司), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), PCR 相关试剂 (日本 Takara 公司), Irak1bp1 兔多克隆抗体 (美国 Abcam 公司), IRF3 及 LaminB1 兔单克隆抗体 (美国 Cell Signaling 公司), Western blotting 相关试剂 (上海碧云天公司)。

IRF3 shRNA 绿色荧光蛋白 (GFP) 表达腺病毒 (由本课题组自行构建), 针对基因位点 1219–1239: 5'-GGTTGTTCTACATGTCTTAA-3'。该干扰腺病毒采用了 pAdeno-U6-CMV-EGFP 质粒携带, 并经与腺病毒骨架质粒 pBHGlox E1E3 重组包装构建^[1-2]。

1.2 实验方法

1.2.1 IRF3 shRNA 腺病毒扩增 腺病毒扩增方法参照文献^[13]并加以改进, 简述如下: 采用含 5% FBS 的 DMEM 细胞培养基 [95% DMEM 培养液 + 5% FBS + 青链霉素

混合液 (100 U/mL)] 培养 293T 细胞于 100 mm 培养皿中, 至单层细胞 80% ~ 90% 融合时加入病毒原液 (滴度 1×10^{10} PFU/mL) 10 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养; 每日观察细胞至病变特征形成 (葡萄串状、球形), 荧光显微镜下观察细胞至病毒感染 95% 以上; 收集细胞及上清, 4 $^{\circ}$ C, 560 \times g 离心 10 min 后取沉淀; 取 1 mL 无血清培养基重悬沉淀, -20 $^{\circ}$ C 及 37 $^{\circ}$ C 快速冻融重悬细胞 3 次, 使细胞破碎释放出病毒, 离心机离心 10 min 收集上清。各取 10 μ L 上清感染 40 皿 (100 mm) HEK293T 细胞, 至细胞病变后收集所有细胞及上清; 进一步离心取沉淀、无血清培养基重悬并快速冻融反复 3 次后高速离心; 采用 Millipore 0.45 μ m 过滤器对收集的上清加以过滤, 分装后冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 IRF3 shRNA 腺病毒滴度检测 病毒滴度检测采用 TCID₅₀ 法。流程如下: 293T 细胞调整浓度至 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔细胞培养板 (每孔细胞数 1×10^4 个)。在离心管中采用含 2% FBS 的 DMEM 细胞培养液将收集的病毒作连续 10 倍的稀释 (10^{-5} ~ 10^{-14}), 将稀释好的病毒接种到 96 孔细胞培养板中; 每一稀释度接种一纵排共 8 孔, 每孔接种 100 μ L, 设两纵排正常对照组, 逐日观察并记录阳性结果 (细胞病变特征形成) 至正常对照组细胞脱落, 观察 5 ~ 7 d。采用 Reed-Muench 两氏法计算, 具体公式如下。

$\lg(\text{TCID}_{50}) = \text{距离比例} \times \text{稀释度对数之间的差} + \text{高于 50\% 病变率的稀释度的对数}$

$\text{距离比例} = (\text{高于 50\% 病变率的百分数} - 50\%) / (\text{高于 50\% 病变率的百分数} - \text{低于 50\% 病变率的百分数})$

1.2.3 Raw 264.7 细胞培养与分组处理 Raw 264.7 细胞培养采用含 10% FBS 的 1640 细胞培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞活力采用台盼蓝染色 (细胞活力达 98%, 用于下一步实验)。细胞接种于 6 孔板中, 每孔细胞数 2×10^5 个。培养 24 h, 待细胞稳定贴壁后, 将细胞随机分成 4 组: 1 组为腺病毒 (-) LPS (-), 2 组为腺病毒 (-) LPS (+), 3 组为腺病毒 (+) LPS (-), 4 组为腺病毒 (+) LPS (+)。干扰腺病毒采用最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值感染, 其余组加入同等体积的 PBS。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 2 h 后弃上清, 换成含 5% FBS 的培养液, 继续培养 46 h。弃去上清, 纯 1640 培养液 500 μ L 分别加入每孔细胞中, LPS 刺激组予以终浓度 20 μ g/mL 的 LPS 刺激^[14], 正常对照组加入同等体积的 $1 \times$ PBS。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 6 h 后收集细胞用于后续实验, 实验重复进行 6 次。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 细胞总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂说明书进行, 得到的 RNA 溶液, 经质量检测合格后

按照反转录试剂盒说明书进行第一链 cDNA 的合成。引物的设计与合成由上海生工生物技术有限公司完成。目的基因和内参引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 反应体系 (20 μ L) 为: 10 μ L SYBR Premix Ex Taq (TliRNaseH Plus) (2 \times), 0.4 μ L PCR Forward Primer (10 μ mol/L), 0.4 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol/L), 0.4 μ L ROX Reference Dye II (50 \times), 2 μ L DNA 模板, 6.8 μ L dH₂O。两步法进行扩增。第一步: 95 $^{\circ}$ C, 30 s, 1 个循环; 第二步: 95 $^{\circ}$ C, 5 s, 60 $^{\circ}$ C, 34 s, 40 个循环。内参为 *GAPDH*, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法对数据进行分析。

表 1 基因扩增引物序列和产物长度
Tab 1 Primer sequences and product length of gene amplification

基因名称	引物类型	引物序列 (5'→3')	产物长度 /bp
<i>IRF3</i>	Sense Primer	ACGCACAGATGGCTGACTTT	102
	Antisense Primer	TCCTCTTCCAGGTTGACAGG	
<i>Irak1bp1</i>	Sense Primer	AACTCAGGTGGGCTGATGAC	109
	Antisense Primer	AGGGGTTTCAGGTCCTGCATT	
<i>GAPDH</i>	Sense Primer	GACATGCCGCCTGGAGAAAC	124
	Antisense Primer	GTCCACCACCTGTTGCTGTAG	

1.2.5 Western blotting 细胞浆核蛋白提取按照碧云天细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明书进行。BCA 法检测蛋白浓度后, 将蛋白配平、变性分装后冻存于 -70 $^{\circ}$ C。取 30 μ g 核蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳, 蛋白转移至 NC 膜; 室温下牛奶封闭 2 h, 4 $^{\circ}$ C 兔抗鼠一抗 (1:1 000) 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗, 室温反应 1 h。漂洗 3 次后, 置于显色液中显色, 通过伯乐分子成像系统成像并观察, 并采用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.3 统计学方法

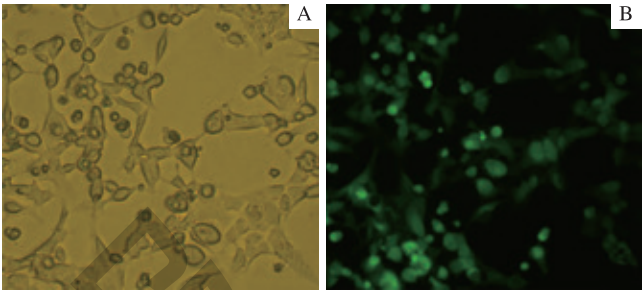
所有实验重复操作 6 次。实验数据的处理和分析采用 SPSS 16.0 软件, 数据分析采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HEK293T 细胞扩增 IRF3 shRNA 腺病毒

正常培养的 HEK293T 细胞形态规则, 呈现多角形。待单层 HEK293T 细胞达到 80% 融合时加入 10 μ L

病毒原液, 48 h 后 1/2 的细胞变为圆球形 (图 1A), 倒置荧光显微镜下可见 HEK293T 细胞内表达的 GFP (图 1B); 72 h 后 90% 以上的细胞变为圆球形, 且有较多细胞脱落。



注: A. 腺病毒感染 48 h 后 HEK293T 光镜下表现 ($\times 200$); B. 细胞感染腺病毒后荧光显微镜下表现 ($\times 200$)。
图 1 HEK293T 细胞感染腺病毒后镜下表现图
Fig 1 Microscopic performance of adenovirus amplification in HEK293T cells

2.2 IRF3 shRNA 腺病毒滴度检测

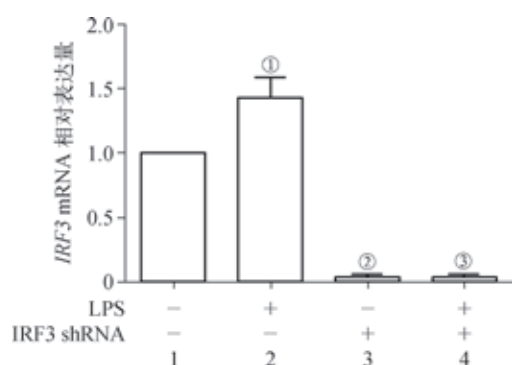
TCID50 法检测腺病毒滴度, 倒置荧光显微镜下正常对照组、 10^{-13} 及 10^{-14} 稀释度 8 个复孔中均未出现 GFP, 10^{-5} 稀释度 8 个复孔中均出现 GFP。重复实验后得到各稀释度具体感染情况, 根据 Reed-Muench 两氏法公式计算得出扩增的腺病毒滴度为 3.16×10^{11} TCID50/mL (2.2×10^{11} PFU/mL)。

2.3 IRF3 shRNA 腺病毒感染最佳 MOI 值测定

IRF3 shRNA 腺病毒分别以 MOI 值为 0、50、100、300 和 500 感染 Raw 264.7 细胞, 分析得出 IRF3 shRNA 腺病毒感染 Raw 264.7 细胞的最佳 MOI 值为 300。

2.4 IRF3 shRNA 腺病毒对 Raw 264.7 细胞 IRF3 mRNA 表达的影响

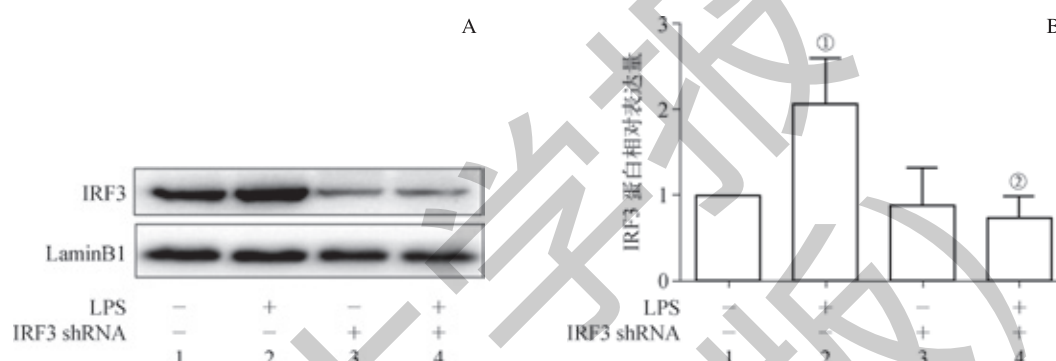
各组细胞 IRF3 mRNA 相对表达量如图 2 所示, 1 组为 1.00 ± 0.00 , 2 组为 1.43 ± 0.15 , 3 组为 0.03 ± 0.01 , 4 组为 0.03 ± 0.02 。经统计学分析, Raw 264.7 细胞 IRF3 mRNA 的相对表达水平 2 组与 1 组相比升高 ($P=0.010$), 3 组较 1 组降低 ($P=0.000$), 4 组较 2 组降低 ($P=0.000$), 3 组与 4 组相比差异无统计学意义 ($P=1.000$)。shRNA 敲减 IRF3 后, IRF3 表达降低, LPS 刺激也不能提升 IRF3 表达。对照 shRNA 本身并不影响 IRF3 mRNA 的表达^[15], 可以认为 IRF3 shRNA 能够抑制 LPS 刺激诱导及静息状态下 Raw 264.7 细胞 IRF3 mRNA 的表达。



注: ① $P=0.010$, ② $P=0.000$, 与1组比较; ③ $P=0.000$, 与2组比较。

图2 干扰腺病毒处理的LPS刺激细胞IRF3 mRNA相对表达情况

Fig 2 Expression of IRF3 mRNA in LPS-stimulated cells treated with interference adenovirus



注: A. 蛋白条带; B. IRF3 蛋白相对表达水平。① $P=0.008$, 与1组比较; ② $P=0.002$, 与2组比较。

图3 干扰腺病毒处理的LPS刺激细胞核内IRF3蛋白相对表达情况

Fig 3 Expression of nuclear IRF3 protein in LPS-stimulated cells treated with interference adenovirus

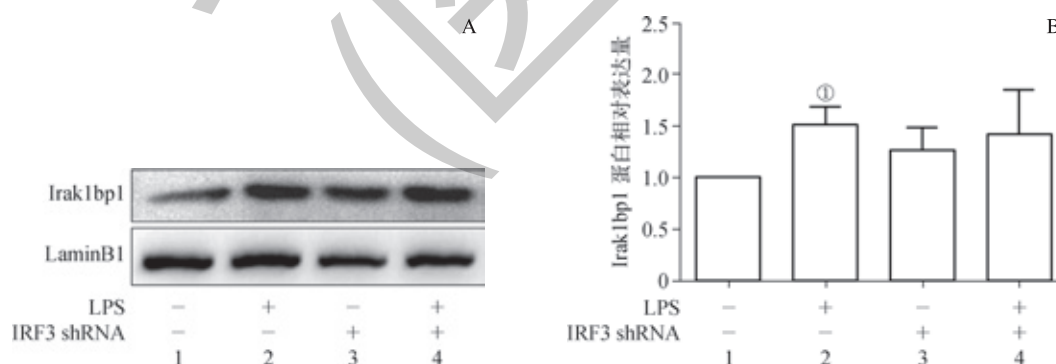
2.6 IRF3 shRNA 腺病毒对核内 Irak1bp1 蛋白表达的影响

Raw 264.7 细胞核内 Irak1bp1 蛋白表达水平 2 组较 1 组显著上调 [(1.52 ± 0.17) vs (1.00 ± 0.00), $P=0.007$], 3 组与 1 组 [(1.26 ± 0.23) vs (1.00 ± 0.00), $P=0.337$], 4 组与 2

2.5 IRF3 shRNA 腺病毒对核内 IRF3 蛋白表达的影响

Raw 264.7 细胞核内 IRF3 蛋白表达水平 2 组较 1 组显著上调 [(2.06 ± 0.52) vs (1.00 ± 0.00), $P=0.008$], 4 组较 2 组显著下调 [(0.73 ± 0.26) vs (2.06 ± 0.52), $P=0.002$], 而 3 组与 1 组差异无统计学意义 [(0.87 ± 0.45) vs (1.00 ± 0.00), $P=0.675$] (图 3)。这提示 LPS 刺激可诱导 Raw 264.7 细胞核内 IRF3 蛋白表达升高, 而 IRF3 shRNA 腺病毒的应用可抑制上述 LPS 的刺激效应。另外, IRF3 shRNA 腺病毒对 Raw 264.7 细胞核内 IRF3 蛋白的组成性表达无抑制性影响。

组 [(1.42 ± 0.43) vs (1.52 ± 0.17), $P=1.000$] 相比差异无统计学意义 (图 4)。这提示 LPS 刺激可诱导 Raw 264.7 细胞核内 Irak1bp1 蛋白表达升高, IRF3 shRNA 腺病毒的应用并不影响 LPS 刺激诱导及静息状态下核内 Irak1bp1 的表达。



注: A. 蛋白条带; B. Irak1bp1 相对表达水平。① $P=0.007$, 与1组比较。

图4 干扰腺病毒处理的LPS刺激细胞核内Irak1bp1蛋白相对表达情况

Fig 4 Expression of nuclear Irak1bp1 protein in LPS-stimulated cells treated with interference adenovirus

3 讨论

LPS 可激活巨噬细胞表面 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor

4, TLR4) 并通过 MyD88 依赖及非依赖信号通路发挥免疫应答作用^[1-3], 其中 MyD88 非依赖性信号通路依赖 TRIF 信号激活 IRF3, 诱导生成 I 型干扰素, 在固有抗病原体免疫中具有

重要作用^[2]。本项目是在我们前期^[16]利用IRF3腺病毒敲减实验研究的基础上进行的,我们期望通过对巨噬细胞IRF3的敲减实验,探讨该分子对重要的炎症信号通路分子Irak1bp1表达的影响。在本次实验中,我们发现LPS刺激6h后,Raw 264.7细胞IRF3 mRNA的表达较对照组明显增加,这提示LPS能够激活MyD88非依赖性信号通路并促进IRF3基因的转录。IRF3已被证实是干扰素调节因子家族成员,静息情况下它主要存在于细胞浆中;在受到刺激时,IRF3二聚体化并进入核内,诱导靶基因的转录表达^[6,15]。本实验中也发现,LPS刺激后核内IRF3蛋白明显增加,提示LPS除了能够促进IRF3基因的转录,还能够促使其入核活化。

有研究显示IRF3蛋白的表达能够影响MyD88依赖通路中炎症因子的释放。Siegfried等^[7]发现,LPS刺激后,IRF3基因敲除的巨噬细胞对TNF- α 的分泌明显减少。我们前期研究也发现,IRF3对于TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子具有促分泌作用,但是其促分泌的作用机制并不清楚^[8-9]。

近期发现Irak1bp1能够正向调节NF- κ B的活性^[17]。Irak1bp1是Irak1结合蛋白,Irak1是NF- κ B炎症通路的正性调控分子^[18],可磷酸化激活Irak1bp1并促使其入核^[10]。核内Irak1bp1结合NF- κ B p65亚基及核受体协同刺激因子MED1,形成p65/MED1/Irak1bp1复合体^[17],进而增

强NF- κ B p65亚基的转录激活能力^[10-11]。因而,我们推测IRF3可能影响Irak1bp1入核,进而影响NF- κ B p65的转录激活能力。为此,本实验采用IRF3基因沉默实验,研究IRF3对小鼠巨噬细胞Irak1bp1表达及分泌的影响。

IRF3 shRNA腺病毒由本实验室自行设计和构建^[14]。本实验采用HEK293T细胞扩增该干扰腺病毒,并以最佳病毒滴度感染Raw 264.7细胞。结果显示IRF3 shRNA腺病毒感染后,LPS刺激诱导的IRF3 mRNA及非刺激状态下细胞对IRF3 mRNA的组成性表达均下调,而且IRF3 shRNA腺病毒可显著抑制LPS刺激诱导的核内IRF3蛋白的表达,但不影响未刺激状态下细胞核内组成性IRF3蛋白的水平(可能静息情况下IRF3的核转位受到抑制)。这提示,我们所构建及扩增的干扰腺病毒能有效地使IRF3基因表达沉默,并抑制LPS刺激诱导的IRF3核转位。

本实验也发现LPS刺激6h后核内Irak1bp1蛋白表达显著增加,提示LPS能够诱导Irak1bp1表达并促使其入核,发挥促炎作用。但是IRF3 shRNA腺病毒的应用并不影响LPS刺激诱导及静息状态下核内Irak1bp1的表达,提示IRF3并不是通过促进Irak1bp1入核增强NF- κ B p65亚基转录活性来促进炎症因子释放的。因此,IRF3促进炎症分泌的作用机制仍需进一步研究。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Cover MW, Leung TH, Gaston JE, et al. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation[J]. Science, 2005, 309(5742): 1854-1857.
- [2] Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5): 7711-7730.
- [3] Crispe IN. The liver as a lymphoid organ[J]. Annu Rev Immunol, 2008, 27(27): 147-163.
- [4] Siednienko J, Gajanayake T, Fitzgerald KA, et al. Absence of MyD88 results in enhanced TLR3-dependent phosphorylation of IRF3 and increased IFN- β and RANTES production[J]. J Immunol, 2011, 186(4): 2514-2522.
- [5] An H, Hou J, Zhou J, et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1[J]. Nat Immunol, 2008, 9(5): 542-550.
- [6] Tarassishin L, Bauman A, Suh HS, et al. Anti-viral and anti-inflammatory mechanisms of the innate immune transcription factor interferon regulatory factor 3: relevance to human CNS diseases[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2013, 8(1): 132-144.
- [7] Siegfried A, Berchtold S, Manncke B, et al. IFIT2 is an effector protein of type I IFN-mediated amplification of lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α secretion and LPS-induced endotoxin shock[J]. J Immunol, 2013, 191(7): 3913-3921.
- [8] 朱彤, 徐文娟, 谈志丽, 等. IRF3基因干扰对LPS刺激原代枯否细胞早期细胞因子分泌动态变化的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(4): 470-475.
- [9] 朱彤, 徐文娟, 谈志丽, 等. 在LPS刺激的枯否细胞中敲减干扰素调节因子3(IRF3)表达可影响多条信号转导通路[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, (8): 587-594.
- [10] Luo Y, Kwon HJ, Montano S, et al. Phosphorylation of SIMPL modulates RelA-associated NF- κ B-dependent transcription[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(3): C1013-C1023.
- [11] Kwon HJ, Breese EH, Vig-Varga E, et al. Tumor necrosis factor α induction of NF- κ B requires the novel coactivator SIMPL[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(21): 9317-9326.
- [12] 徐文娟, 朱彤, 谈志丽, 等. IRF3 shRNA腺病毒包装及其对RAW264.7细胞IRF3表达的抑制效应[J]. 免疫学杂志, 2016, 10: 857-864.
- [13] 曹洁玮, 李小鹰. HEK293T细胞扩增重组腺病毒研究[J]. 军医进修学院学报, 2009, 30(6): 860-862.
- [14] Liu LM, Liang DY, Ye CG, et al. The U1/UT system mediates upregulation of proinflammatory cytokines through p38 MAPK and NF- κ B pathways in LPS-stimulated Kupffer cells[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121383.
- [15] Chen H, Jiang Z. The essential adaptors of innate immune signaling[J]. Protein Cell, 2013, 4(1): 27-39.
- [16] Liu LM, Tu WJ, Zhu T, et al. IRF3 is an important molecule in the U1/UT system and mediates immune inflammatory injury in acute liver failure[J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49027-49041.
- [17] Zhao W, Breese E, Bowers A, et al. SIMPL enhancement of tumor necrosis factor- α dependent p65-MED1 complex formation is required for mammalian hematopoietic stem and progenitor cell function[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61123.
- [18] Li XH, Gong JP, Shi YJ, et al. In vitro expression of CD14 protein and its gene in Kupffer cells induced by lipopolysaccharide[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 2(4): 571-575.

[收稿日期] 2018-01-27

[本文编辑] 邵碧云

