

小鼠TRAF6基因shRNA真核表达载体的构建与表达

陈 锋, 何生松, 邱荣元, 庞 然, 许娟娟, 董继华

■背景资料

内毒素及其诱导的细胞因子网络平衡失常以及过度炎症反应是肝脏损伤的主要病理机制。TRAF6作为介导NF- κ B信号转导的一个关键衔接蛋白, 在内毒素信号转导通路和天然免疫信号通路中起重要作用, 如果能减少TRAF6合成, 就可以减少炎症因子的释放, 既能一定程度上有效阻断内毒素炎症反应, 减轻肝脏损伤, 又不干扰机体防御细菌感染的正常功能。RNAi技术能高效、特异地抑制细胞内源或外源性靶基因的表达, 已应用于基因功能、肿瘤等的研究。

陈锋, 何生松, 邱荣元, 庞然, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430022

许娟娟, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

董继华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室 湖北省武汉市 430022

陈锋, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科在读博士, 主要从事病毒性肝炎及肝衰竭的病因机制研究。

作者贡献分布: 何生松与陈锋对此文所作贡献均等; 此课题设计由陈锋与何生松完成; 研究过程由陈锋、邱荣元、庞然及许娟娟操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由董继华与何生松提供; 数据分析及本论文写作由陈锋完成; 何生松修改校正。

通讯作者: 何生松, 教授, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科。

shengshe168@yahoo.com.cn

电话: 027-85726132

收稿日期: 2009-03-04 修回日期: 2009-04-15

接受日期: 2009-04-27 在线出版日期: 2009-05-18

Construction and expression of mouse TRAF6-shRNA eukaryotic expressing plasmid

Feng Chen, Sheng-Song He, Rong-Yuan Qiu, Ran Pang, Juan-Juan Xu, Ji-Hua Dong

Feng Chen, Sheng-Song He, Rong-Yuan Qiu, Ran Pang, Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Juan-Juan Xu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Ji-Hua Dong, Central Laboratory, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Sheng-Song He, Department of Infectious, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. shengshe168@yahoo.com.cn

Received: 2009-03-04 Revised: 2009-04-15

Accepted: 2009-04-27 Published online: 2009-05-18

Abstract

AIM: To construct and select TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) short hairpin RNA (shRNA) expressing plasmid that can inhibit TRAF6 mRNA expression in Raw 264.7 cells.

METHODS: Four pairs of oligos for hairpin RNA targeting mouse TRAF6 gene were chemically synthesized. The annealed oligos were inserted into the down stream of U6 promoter of

linearized pGCsi-U6/GFP/Hygro vector to construct RNA interference (RNAi) plasmid (pGCsi-TRAF6 shRNA) respectively. To get most effective and optimal dosage siRNA, the four vectors were transfected into Raw 264.7 cells with different ratios between plasmid (g) and TransFectin (L) (1 : 2, 2 : 5, 1 : 3 and 1 : 4), and the expression of fluorescence and efficiency of transfection were detected by fluorescence microscopy.

RESULTS: The recombinant plasmids pGCsi-TRAF6 shRNA1, 2, 3, 4 were successfully constructed and the inserted sequence was confirmed by DNA sequencing. Fluorescence microscopy showed that the transfection efficiencies were $13.7\% \pm 1.2\%$, $24.5\% \pm 2.1\%$, $19.3\% \pm 1.7\%$ and $16.3\% \pm 2.8\%$ at ratios of 1 : 2, 2 : 5, 1 : 3 and 1 : 4, respectively, between plasmid (g) and TransFectin. The ratio of 2 : 5 was considered as the optimal one.

CONCLUSION: The siRNA plasmid targeting mouse TRAF6 gene is successfully developed and can be applied to study the function of TRAF6 on inflammatory reaction during acute hepatic failure (AHF).

Key Words: Tumour necrosis factor receptor-associated factor 6; RNA interference; Eukaryotic expression vector; Short hairpin RNA

Chen F, He SS, Qiu RY, Pang R, Xu JJ, Dong JH. Construction and expression of mouse TRAF6-shRNA eukaryotic expressing plasmid. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(14): 1406-1411

摘要

目的: 构建并筛选肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)短发夹RNA(shRNA)表达质粒。

方法: 针对小鼠TRAF6 mRNA设计4条理论上最佳的siRNA序列, 经退火成互补双链, 将相应双链DNA插入pGCsi-U6/GFP/Hygro质粒中, 构建重组表达质粒pGCsi-TRAF6-shRNA1, 2, 3, 4, 并以不同比例DNA质粒/脂质体转染重组质粒(1 : 2、2 : 5、1 : 3和1 : 4)至RAW 264.7细胞中, 观察转染效果。

■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科

结果: 靶向TRAF6 mRNA的4个shRNA重组质粒载体pGCsi-TRAF6 shRNA1, 2, 3, 4, 经测序分析, shRNA编码序列与设计的片段完全一致, 证实载体构建成功. 应用荧光显微镜分析转染效率显示, DNA(g)/脂质体转染重组质粒(L)按1:2、2:5、1:3和1:4比例转染细胞的效率分别为13.7%±1.2%、24.5%±2.1%、19.3%±1.7%、16.3%±2.8%, 以2:5为最佳比例. 只加了脂质体未加质粒(试剂对照)的细胞无荧光表达.

结论: TRAF6靶向RNA干扰重组表达质粒构建成功, 为进一步研究阻断TRAF6表达对急性肝衰竭过度炎症反应的基因治疗奠定基础.

关键词: 肿瘤坏死因子受体相关因子6; RNA干扰; 重组表达质粒; 短发卡RNA

陈锋, 何生松, 邱荣元, 庞然, 许娟娟, 董继华. 小鼠TRAF6基因shRNA真核表达载体的构建与表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(14): 1406-1411
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1406.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子受体相关因子(tumour necrosis factor -receptor-associated factor-6, TRAF6)家族成员是一类多功能衔接蛋白, 他们交织于一系列信号传导分子和效应器的网络中, 最终引起NF- κ B和JNK的活化, 由此影响细胞的生存与死亡. 肠源性内毒素血症可导致过度的炎症反应及肝坏死, 是各种原因导致肝功能衰竭发生的唯一的共同物质基础^[1-2]. 在细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活的信号NF- κ B通路中, TRAF6作为调节内毒素胞内信号转导的关键因子, 是近年来颇受关注的细胞质内的多功能信号接头分子. 现已证明TRAF6可介导多条信号通路(TNF- α 、IL-1和RANKL通路), 最终激活转录因子NF- κ B、AP-1、PKB/Akt等, 在介导病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)引起的天然和获得性免疫及炎症反应的信号转导中发挥重要作用, 因此可尝试通过拮抗或抑制TRAF6的表达和功能来逆转或减慢内毒素炎症反应的发展.

RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术具有高效性、特异性和快速性, 已被广泛应用基因的表达调控和功能研究中. 裸小干扰RNA(short interfering RNA, siRNA)转染率低, 抑制时间短. 有研究表明短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)对靶基因的抑制效果优

于siRNA^[3]. 本研究针对小鼠TRAF6基因设计4条干扰序列, 构建以U6启动子控制下的TRAF6 shRNA重组表达载体, 并在RAW264.7细胞中成功表达, 为进一步研究TRAF6在LPS信号转导通路及其与机体炎症反应中的关系奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 RAW264.7细胞由华中科技大学同济医学院附属协和医院中心实验室董继华主任惠赠; 真核表达载体pGCsi/GFP/Hygro购自北京毅新乐业科技有限公司; T4连接酶购自NEB公司; 质粒中量抽提试剂盒购自Omega公司; TRIzol购自美国Invitrogen公司; 逆转录试剂盒、限制性内切酶(*Bam*H I、*Hind*III)及胶回收试剂盒、DNA Marker DL2000购自日本TaKaRa公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司; 脂质体TransFectin购自美国Bio-rad公司.

1.2 方法

1.2.1 小鼠TRAF6基因shRNA序列的设计: 以GenBank已公布的小鼠TRAF6 mRNA序列(NM009424)为参考序列, 用美国Invitrogen公司的在线设计软件BLOCK-iTTM RNAi Designer (<http://www.invitrogen.com/rnai>)筛选目标干扰序列, 使用BLAST将潜在的序列和相应的基因组数据库进行比较, 排除那些和其他编码序列/EST同源的序列, 筛选出4条理论上最佳的siRNA序列. LOOP结构选用了TCAAGAG, 末端以polyT作为RNA聚合酶III终止信号, 两端设计有*Bam*H I和*Hind* III酶切位点, 长度均为59个碱基(表1). shRNA寡核苷酸序列由北京毅新乐业科技有限公司合成.

1.2.2 单链DNA片段的退火连接: 将10D合成的DNA Oligo用去离子水溶解, 浓度为3 g/L. 各取正义链和反义链Oligo溶液1 μ L加48 μ L退火缓冲液, 在PCR仪上按照如下程序进行退火处理: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min, 75 $^{\circ}$ C 5 min, 70 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C保存. 将退火处理后产物稀释100倍, 用于连接反应.

1.2.3 酶切和连接反应: 载体pGCsi/GFP/Hygro经*Bam*H I和*Hind* III双酶切, 37 $^{\circ}$ C酶切5 h, 琼脂糖电泳, 使用胶回收试剂盒回收, 电泳检测估算浓度, 稀释浓度至50 mg/L. 将退火片段与经酶切后的载体按摩尔比3:1混合进行连接反应, 置22 $^{\circ}$ C连接4 h.

1.2.4 重组质粒的转化、筛选和鉴定: 各取3 μ L

■ 相关报道

近年研究表明TRAF6不仅是LPS信号转导的关键调控分子, 还在TLR/IL-1R介导炎症反应和天然免疫信号通路中起重要作用, TRAF6降解可显著抑制树突状细胞产生炎症因子. 2008年Yang *et al*研究发现TRAF6缺失的肥大细胞IL-6、CCL-9、IL-13合成障碍并且细胞表面的Fc ϵ R I型聚集障碍, NF- κ B p65合成减少, 从而抑制炎症反应.

■创新盘点

本研究以LPS信号通路中的TRAF6为靶点,构建针对小鼠TRAF6的shRNA真核表达载体,并转染RAW264.7细胞,为进一步研究TRAF6基因在急性肝衰竭中的作用机制以及探索急性肝衰竭的基因治疗奠定基础。

表1 针对小鼠TRAF6基因设计合成的shRNA序列

	起始位置		shRNA序列 ¹⁾
shRNA1	900-920	正义链	5'-GATCGGCCAACGTCCTTTCCAGAAGTTCAGAGACTTCTGGAAGGACGTTGGCTTTTA-3'
		反义链	5'-AGCTTAAAAGCCAACGTCCTTTCCAGAAGTCTCTTGAACCTTCTGGAAGGACGTTGGCG-3'
shRNA2	1303-1323	正义链	5'-GATCGGACCCAAATTATGAGGAACTCAAGAGGTTTCCTCATAATTTGGGTCCTTTTA-3'
		反义链	5'-AGCTTAAAAGGACCCAAATTATGAGGAACTCTTGAGTTTCCTCATAATTTGGGTCGCG-3'
shRNA3	2324-2344	正义链	5'-GATCGCTGCAGCTCAATCGTTAATCAAGAGATTAACGATTGAGCTGCAGCTTTTA-3'
		反义链	5'-AGCTTAAAAGCTGCAGCTCAATCGTTAATCTCTTGAATTAACGATTGAGCTGCAGCG-3'
shRNA4	3285-3305	正义链	5'-GATCGCTGCTGTGTATTTGTTAATGTCAAGAGCATTAAACAAATACACAGCAGCTTTTA-3'
		反义链	5'-AGCTTAAAAGCTGCTGTGTATTTGTTAATGCTCTTGACATTAACAAATACACAGCAGCG-3'

¹⁾ 序列结构为: **BamH** II + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + **Hind** III。

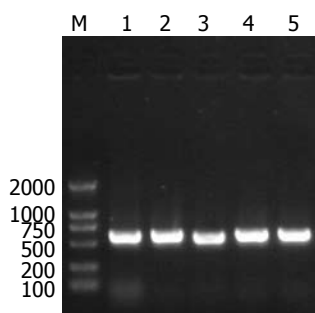


图1 菌液PCR效果

图1 M: Marker(DL2000); 1: pGCsi-TRAF6 shRNA1; 2: pGCsi-TRAF6 shRNA2; 3: 空载体; 4: pGCsi-TRAF6 shRNA3; 5: pGCsi-TRAF6 shRNA4。

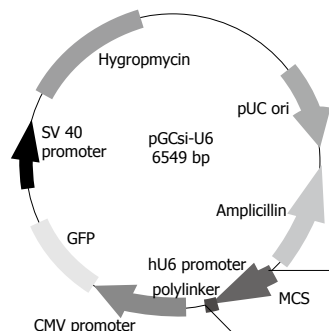


图2 质粒pGCsi

质粒载体图。多克隆位点(MCS)如下: 5'-Mlu I-Sam II-Hind III-Xba I-Sa I I-Pst I-BamH I-U6Promoter-EcoR I-Sal I-Xba I-Dra III-3'。

产物接种到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中进行转化,涂布于氨苄青霉素抗性的LB平板上,37℃恒温箱培养过夜。每个培养皿各挑取3个单克隆菌落接种于LB培养液(含氨苄青霉素终浓度为50 mg/L),37℃恒温摇床培养过夜,使用载体多克隆位点两端的引物进行PCR扩增检测阳性菌落,扩增条件为:95℃ 10 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,35个循环后,4℃中止反应。取PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。将PCR鉴定正确的TRAF6 shRNA载体用中提试剂盒中量提取质粒后,送北京华大基因研究中心测序,测序正确的质粒分别命名为pGCsi-TRAF6-shRNA1,2,3,4。将鉴定证实的细菌扩增培养,摇至对数生长期,每0.7 mL过夜培养细菌加0.3 mL甘油,-70℃冰箱保存。

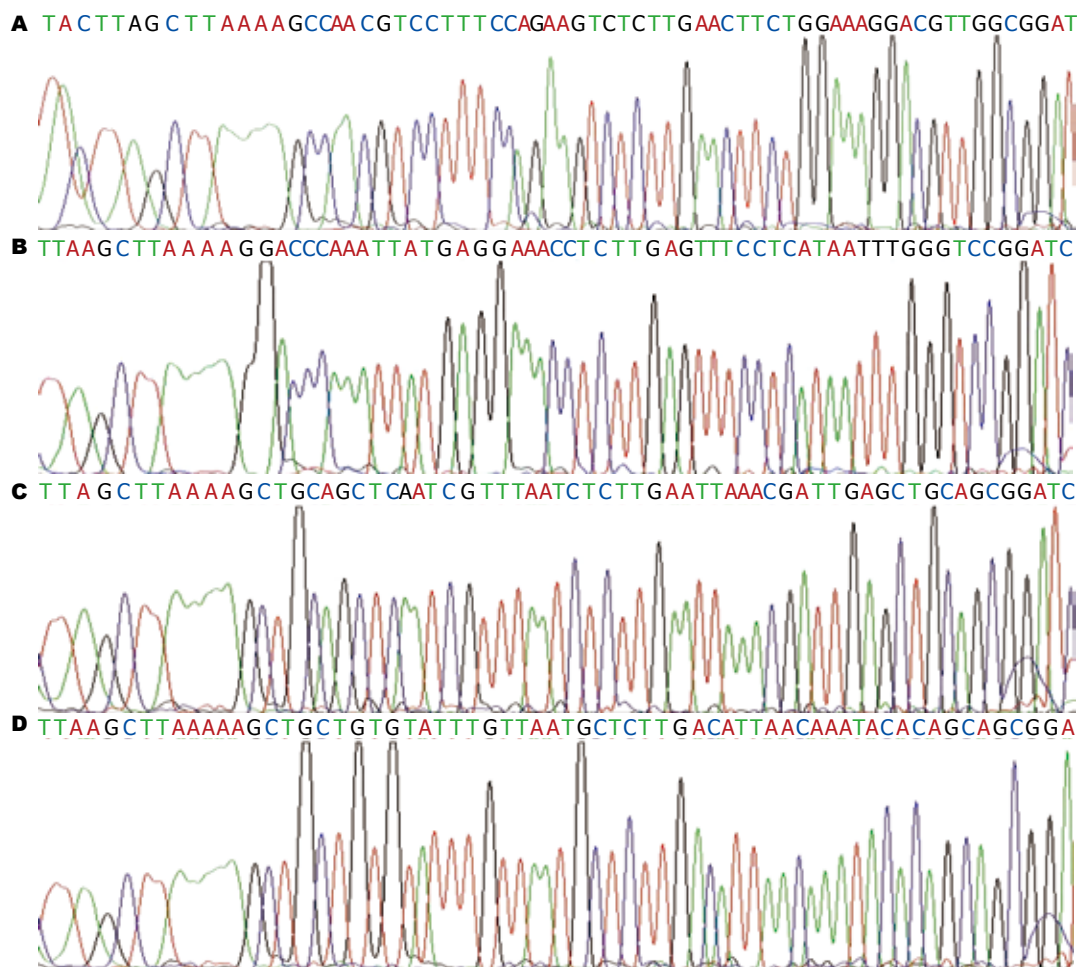
1.2.5 转染用质粒DNA的制备、定量:用去内毒素质粒中量提取试剂盒,分别提取几种pGCsi-TRAF6shRNA重组质粒(按说明书操作),用紫外分光光度计检测DNA溶液 A_{260} 为0.1-1.0, $A_{260}/A_{280}>1.8$,用该质粒转染细胞。

1.2.6 细胞培养及转染条件优化:用高糖DMEM培养基(含100 mL/L胎牛血清,100 kU/L的青霉素/链霉素)在50 mL/L CO₂,37℃,饱和湿度的条件下培养RAW264.7细胞。转染前1 d,胰酶消化细胞并计数,将细胞接种于96孔培养板,密度为

1×10^5 /孔,当细胞汇合度约70%-90%时,即可进行转染。分别用25 μ L无血清培养基稀释DNA和TransFectin,将DNA(g)/TransFectin(L)按1:2、2:5、1:3和1:4比例混合,室温孵育20 min后,将50 μ L混合物加入到含血清培养基的细胞中,转染4 h后更换培养基,第2天重复转染1次。在第2次转染48 h后在荧光显微镜下计数表达荧光的细胞数,确定转染效率。每个孔做5个复孔,计算平均值。转染效率 = 表达荧光的细胞数/计数的细胞总数 $\times 100\%$ 。选取最佳剂量进行转染。实验分为空白对照组(A组)、空白质粒转染组(B组)和重组质粒转染组(C组),每组均设5个复孔。转染后72 h加入100 mg/L潮霉素筛选,经3 wk后形成阳性克隆,扩增培养备用。

2 结果

2.1 重组质粒pGCsi-U6/GFP/Hygro-shRNA的鉴定 根据蓝白斑筛选出白色克隆株摇菌扩增后,将菌液进行PCR验证,插入59 nt寡核苷酸的1、2、3、4表达载体的扩增产物在550 bp处,验证中的阴性质粒为500 bp,两者相差50 bp左右,其电泳结果与实验预计的结果完全符合(图1-2)。将PCR鉴定正确的重组载体用中提试剂盒中量提取质粒后,测序证实插入的4个shRNA片段碱基序列与设计序列完全相符,重组质粒构建成



■应用要点

本研究利用带有绿色荧光蛋白的质粒构建靶向TRAF6基因的shRNA表达载体, 利用RNA干扰技术抑制TRAF6 mRNA表达, 为进一步体内和体外实验, 探索TRAF6基因的作用机制和急性肝衰竭过度炎症反应的基因治疗提供了方法和途径。

图3 重组质粒DNA测序图谱. A: pGCsi-TRAF6shRNA1; B: pGCsi-TRAF6shRNA2; C: pGCsi-TRAF6shRNA3; D: pGCsi-TRAF6shRNA4.

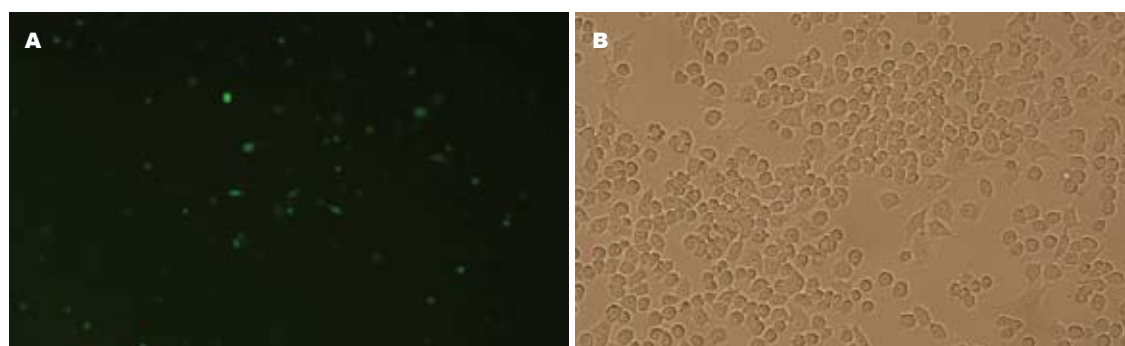


图4 荧光显微镜及光镜观察RAW264.7细胞($\times 200$). A: pGCsi-TRAF6-shRNA 1, 2, 3, 4及空载体瞬时转染; B: 试剂对照.

功(图3).

2.2 细胞转染效率测定 编码shRNA的带绿色荧光蛋白的重组载体转染入RAW 264.7细胞后, 在绿色荧光激光波长下细胞应显示为绿色(图4). 应用荧光显微镜分析转染效率显示, DNA(g)/TransFectin(L)按1:2、2:5、1:3和1:4比例转染细胞的效率分别为 $13.7\% \pm 1.2\%$ 、 $24.5\% \pm 2.1\%$ 、 $19.3\% \pm 1.7\%$ 、 $16.3\% \pm 2.8\%$, 以2:5为

最佳比例. 只加了脂质体未加质粒(试剂对照)的细胞无荧光表达(图4).

3 讨论

由病毒性肝炎、酗酒、药物等多种原因所致的肝功能衰竭是临床常见危重症, 迄今缺乏有效的治疗方法. LPS是革兰氏阴性杆菌生长时释放或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖成分, 是常

同行评价

本文研究思路清晰,技术路线明确,方法可靠,为今后进一步探索急性肝衰竭的发生机制及基因治疗提供了实验基础,有一定的学术及应用价值。

见的炎症反应激活因子。目前国内外大多数学者认为,内毒素及其诱导细胞因子网络平衡失常以及过度炎症反应是肝损伤的主要病理机制,是各种原因导致肝功能衰竭的共同物质基础^[4]。肝衰竭时产生大量损害肝细胞的细胞因子,同时也产生一定的保护因子,但损害因子占主导地位,有效抑制损害因子对提高肝衰竭患者的生存率有积极作用。

TRAF6作为介导NF- κ B信号转导的一个关键衔接蛋白,在TLR/IL-1R信号转导通路中的发挥重要调节作用。Lomaga *et al*^[5]发现TRAF6缺失小鼠NF- κ B和诱导型NO合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的活性明显降低,并且IL-1和IL-18信号传导障碍,机体对LPS低反应。他们还发现TRAF6缺失的成纤维细胞能完全阻止LPS诱导的c-Jun氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)活化。Loniewski *et al*^[6]也发现TRAF6基因沉默可显著降低LPS诱导的JNK和I- κ B磷酸化。这说明,与MyD88和IRAK不同,TRAF6只有一种形式能传递LPS和IL-1信号。Yang *et al*^[7]研究发现TRAF6缺失的肥大细胞IL-6、CCL-9、IL-13合成障碍并且细胞表面的Fc ϵ R I型聚集障碍,从而抑制炎症反应以及肥大细胞脱颗粒释放活性介质。Machado *et al*^[8]研究证实脂氧素介导的TRAF6降解可显著抑制树突状细胞产生炎症因子。Imai *et al*^[9]发现TRAF6缺失小鼠能明显降低对TLR4介导的急性肺损伤的敏感性,并且他们还认为TLR4-TRIF-TRAF6-NF- κ B信号通路在急性肺损伤中起关键作用。可见,TRAF6作为一种重要的NF- κ B调节因素,不仅是LPS信号转导的关键调控分子,还在TLR/IL-1R介导炎症反应和天然免疫信号通路中起重要作用,从LPS导致炎症反应的多条途径看,有效阻断TRAF6,可减少炎症因子的释放,既能一定程度上有效阻断内毒素炎症反应,又不干扰机体防御细菌感染的正常功能。

RNAi技术作为生命科学领域中的一个重大发现,已成为基因功能研究的最重要的方法之一,逐渐被广泛应用到生命科学中^[10]。RNAi是利用双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)在细胞内Dicer内切酶的识别、结合、酶切下,产生有活性的长度为21-23 nt的siRNA,介导与具有同源序列的靶mRNA特异性降解,高效、特异性阻断目的基因表达^[11]。有效的基因沉默需要设计和筛选特异、高效的靶基因RNAi序列,以及通过有效方法将序列导入目的细胞^[12]。将siRNAs

转入细胞是RNAi实验成功的关键技术之一。常规方法有:脂质体转染、电穿孔法、微注射法。电穿孔法和微注射法操作较复杂,并且细胞死亡率较高,需要较昂贵的设备,虽然脂质体转染试剂介导的转染,操作简单,但对于不同细胞转染效率不一,本课题转染细胞株效率不高,需进行潮霉素筛选,工作量加大^[13]。近年来越来越多的研究应用腺病毒和慢病毒作为载体,但腺病毒的免疫效应需进一步改善,而以慢病毒为载体,目的片段被整合到基因组当中,这是否造成肿瘤的发生需要进一步研究^[14]。

质粒pGCsi/GFP/Hygro含有人U6 RNA聚合酶III启动子,位于其下游的shRNA在质粒进入宿主细胞后,形成dsRNA,进而形成siRNA,引发RNA干扰。而且该载体中含有可供筛选的氨苄青霉素耐药基因,利于阳性重组子的克隆筛选。在本实验中所构建的载体含有GFP基因,在细胞内表达绿色荧光蛋白,可以方便通过荧光显微镜或流式细胞仪检测确定载体转染效率。我们根据GenBank报道中的小鼠TRAF6基因核苷酸序列,设计出4条阻断TRAF6基因表达的RNAi序列,并成功将其克隆至载体中,重组体被整合到宿主细胞基因组后,由于RNAi效应可以实现传代^[15],通过抗性辅助筛选单克隆细胞,为下一步检测其对TRAF6 mRNA和TRAF6蛋白的抑制效率,判断TRAF6在LPS信号转导及炎症反应中的作用,探索TRAF6是否是一个对机体影响相对较少,又能控制内毒素炎症反应发展成失控性炎症反应的关键靶点奠定基础,进而对以TRAF6为靶点的减轻急性肝衰竭过度炎症反应的基因治疗提供实验基础。

参考文献

- 1 韩德五. 肠源性内毒素血症所致“继发性肝损伤”的临床依据. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1055-1058
- 2 韩德五. 肝功能衰竭发病机制的研究-肠源性内毒素血症假说. 中华肝脏病杂志 1995; 3: 134
- 3 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 4 Belladonna ML, Vacca C, Volpi C, Giampietri A, Fioretti MC, Puccetti P, Grohmann U, Campanile F. IL-23 neutralization protects mice from Gram-negative endotoxemic shock. *Cytokine* 2006; 34: 161-169
- 5 Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999; 13: 1015-1024
- 6 Loniewski KJ, Patial S, Parameswaran N. Sensitivity

- of TLR4- and -7-induced NF kappa B1 p105-TPL2-ERK pathway to TNF-receptor-associated-factor-6 revealed by RNAi in mouse macrophages. *Mol Immunol* 2007; 44: 3715-3723
- 7 Yang YJ, Chen W, Carrigan SO, Chen WM, Roth K, Akiyama T, Inoue J, Marshall JS, Berman JN, Lin TJ. TRAF6 specifically contributes to FcepsilonRI-mediated cytokine production but not mast cell degranulation. *J Biol Chem* 2008; 283: 32110-32118
- 8 Machado FS, Esper L, Dias A, Madan R, Gu Y, Hildeman D, Serhan CN, Karp CL, Aliberti J. Native and aspirin-triggered lipoxins control innate immunity by inducing proteasomal degradation of TRAF6. *J Exp Med* 2008; 205: 1077-1086
- 9 Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, Ermolaeva M, Veldhuizen R, Leung YH, Wang H, Liu H, Sun Y, Pasparakis M, Kopf M, Mech C, Bavari S, Peiris JS, Slutsky AS, Akira S, Hultqvist M, Holmdahl R, Nicholls J, Jiang C, Binder CJ, Penninger JM. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* 2008; 133: 235-249
- 10 韩明阳, 吴爱国, 郭爱林, 李鹏, 纪术峰, 刘铮. HER-2 基因靶向RNA干扰重组表达载体的构建及序列分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3284-3288
- 11 Tian X, Zhang P, Zamek-Gliszczyński MJ, Brouwer KL. Knocking down transport: applications of RNA interference in the study of drug transport proteins. *Drug Metab Rev* 2005; 37: 705-723
- 12 Ohnishi Y, Tokunaga K, Hohjoh H. Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 516-521
- 13 芦军, 赵金满, 孟艳, 余永红. COL1A1-shRNA表达质粒构建及抑制COL1A1表达的有效序列的筛选. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1622-1627
- 14 Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 326-330
- 15 宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明. TRF2小干扰RNA载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1044-1047

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2009-07-23/26在南宁市召开第二十一次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为功能性胃肠病、炎症性肠病和消化内镜新技术临床应用演示)新技术新理论继续教育学习班. 学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等. 参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分.

1 征稿内容

功能性胃肠病、炎症性肠病中西医结合基础与临床治疗研究; 幽门螺杆菌相关疾病的中西医结合基础与治疗研究; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化系统肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编. 稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2009-06-30.

3 联系方式

袁海锋, 朱永苹, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号广西中医学院瑞康医院, 电话: 0771-2188107; 13597004049; 13077766271, 传真: 0771-2411156, rkxhmk@sina.com或czs.xiaohua@163.com