

热休克反应负调节小鼠巨噬细胞 IL-18 的表达

王韵^{①②} 李昌麟^① 王兴宇^① 张劲松^① 张宗梁^{①*}

(^①中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ^②第三军医大学细胞生物学教研室, 重庆 400038.

* 联系人, E-mail: immusig@sunm.shcnc.ac.cn)

摘要 热休克反应(HSR)是机体或细胞保护自身免受一系列有害刺激的自我保护性反应,近年来的研究表明它还参与了细胞因子的表达调节. IL-18 是调节免疫反应的一个重要的细胞因子. 研究了小鼠巨噬细胞(RAW264.7)中 HSR 对脂多糖(LPS)诱导的 IL-18 表达的效应,结果表明,HSR 强烈抑制了 LPS 引起的 IL-18 的 mRNA 的转录和蛋白分泌. 进一步对这一下调效应机制的研究表明,在热休克细胞中,介导 IL-18 表达的转录因子 AP-1 与 IL-18 启动子区域(-1120 ~ -1083)的 DNA 序列结合活性明显下降,AP-1 上游激酶 JNK 的磷酸化水平也显著降低. 上述这些研究结果提示,HSR 对 IL-18 表达的下调效应与 JNK/AP-1 信号通路的抑制密切相关.

关键词 热休克反应(HSR) 热休克蛋白 IL-18 JNK/AP-1 巨噬细胞(RAW264.7)

外界环境刺激和细胞病理状态(如热、紫外线、炎症和组织损伤等)都能够诱发细胞应激反应,即热休克反应(heat shock response, HSR)^[1]. HSR 通过热休克因子(heat shock factors, HSFs)的激活引起热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)的产生, HSPs 作为分子伴侣保护细胞免受有害刺激的进一步损伤^[2].

巨噬细胞(RAW264.7)是重要的免疫调节和效应细胞,在天然免疫和获得性免疫中起着重要的桥梁作用. 在革兰氏阴性细菌外膜脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的刺激下,巨噬细胞能够分泌 IL-1, IL-6, IL-12, IL-10, IL-18 和 TNF- α 等多种细胞因子,从而对机体免疫系统产生广泛的调节效应^[3]. 近年来的研究发现,HSR 除了行使分子伴侣的功能外,还参与了对细胞因子的表达调节,能够抑制 LPS 诱导的 TNF- α , IL-12 等促炎症细胞因子的表达^[4,5],上调抑炎症细胞因子 IL-10 的表达^[6],起到抗炎症的作用.

在 RAW264.7 分泌的多种细胞因子中,IL-18 是 1995 年发现的促炎症细胞因子,具有与 IL-12 相似的生物学功能. 它与 IL-12 协同作用可刺激 Th1 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ ,并诱导 Th1 细胞增殖,提高 NK 细胞的细胞毒作用^[7]. 临床上对 IL-18 的研究表明,它与多种由炎症反应失调和细胞免疫过度激活导致的如风湿性关节炎等自身免疫疾病密切相关^[8]. 因此,研究 IL-18 基因表达调节的机制并寻找控制其表达强度的方法具有重要意义.

在 IL-18 基因外显子 1 上游(-1120 ~ -1083)的启动子区域有一个转录因子 AP-1(activator protein-1)结

合位点,LPS 诱导 IL-18 的表达依赖于 AP-1 与该位点的结合^[9]. 已知丝/苏氨酸蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的一个成员 SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase)可通过磷酸化 AP-1 的重要组分 c-Jun,从而激活转录因子 AP-1,提高 AP-1 的 DNA 结合活性,进一步引起一系列相关基因的表达^[10].

本文报道了 HSR 抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 IL-18 的表达,并进一步证明了 HSR 不仅抑制了 AP-1 与 IL-18 启动子上 DNA 序列的结合活性,而且还抑制了 AP-1 上游激酶 JNK 的磷酸化效应. 这些结果提示在 HSR 中 IL-18 的表达下调是由于 JNK/AP-1 信号通路受到抑制引起的.

1 材料与方法

(i) RAW264.7 细胞培养和刺激. 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 在 37℃, 5% CO₂ 的条件下培养在 DMEM 培养基中,添加 10%灭活胎牛血清(FBS, GIBCO, USA),100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素. 热休克的处理为 5% CO₂, 43℃的条件下培养 2 h,随后在 5% CO₂, 37℃进行恢复性培养^[5]. LPS(O55:B5, Sigma, USA)的刺激浓度为 1 μ g/mL^[9],时间为 4 h.

(ii) RT-PCR. 细胞总 RNA 用 TRIzol (GIBCO, USA)抽提. 反转录试剂购自日本 TaKaRa 公司: 20 μ L 反应体系中,含 1 μ g 总 RNA, 20 U AMV 反转录酶. 管家基因 *hpert*(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)作为内源

性对照. 引物序列分别为 *hsp70*: 5'-GAAGGTGCT-GGACAAGTGC-3' 和 5'-GCCAGCAGAGGCCTCT-AATC-3'; *hprt*: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTT-GTTG-3' 和 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'. Taq 酶为 TaKaRa 公司产品, 25 μ L PCR 反应体系中, 含 1 μ L RT 产物, 引物浓度均为 10 pmol/L. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 55 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 60 s; 26 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 反应产物进行 7%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后参照 Bassam 等人^[11]的方法用银染法染色: 10%醋酸固定 30 min, ddH₂O 漂洗 2 ~ 3 min, 银染液(5.89 mmol/L AgNO₃, 0.056% HCHO)中染色 45 min, 再用 ddH₂O 漂洗 1 min, 然后在显色液(0.28 mol/L Na₂CO₃, 0.056% HCHO, 8 μ mol/L Na₂S₂O₃ · 5H₂O)中显影, 最后用 10%醋酸终止显色.

(iii) 免疫印迹分析. 2 $\times$ 10⁶ 个细胞经相应刺激后移去培养液, 用 200 μ L 裂解缓冲液(Pierce, USA)裂解细胞, 将裂解液转移至 Eppendorf 管, 5000 $\times$ g 离心 5 min, 将上清液转移到另一 Eppendorf 管, 用 BCA 法(Pierce, USA)测定蛋白浓度. 将 20 μ g 蛋白与 6 $\times$ SDS 加样缓冲液(187.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 6% SDS, 30%甘油, 150 mmol/L DTT, 0.1%溴酚蓝)混合, 煮沸变性 5 min. 样品以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移法转移到硝酸纤维素膜(S&S, Germany)上. 室温下封闭 3 h 后(封闭缓冲液: 5%脱脂奶粉溶于 TBST: 55 mmol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH7.5), 加入一抗, 羊抗鼠 Hsp70 多克隆抗体, 兔抗磷酸化 SAPK/JNK 抗体, 兔抗 SAPK/JNK 抗体(Santa Cruz Biotech, USA, 1 : 1000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜. 洗去一抗后, 加入相应二抗, 辣根过氧化物酶偶联的抗羊 IgG 二抗, 抗兔 IgG 二抗(Santa Cruz Biotech, USA, 1 : 2000 稀释), 反应 2 h. 随后用敏感的化学发光法显色, X 射线底片曝光.

(iv) *IL-18* 反义 RNA 探针的制备. *IL-18* 和

RPL32 亚克隆 cDNA 由 RT-PCR 获得. PCR 的引物 I (含 *Hind* III 酶切位点)和引物 II (含 *Eco*R I 酶切位点)详见表 1. 扩增片段的长度适合用 5%聚丙烯酰胺分离. PCR 产物经 *Hind* III/*Eco*R I 酶解后, 装入载体 pSP72 (Promega, USA)相应位置, 经测序验证所制备的探针 DNA 序列是正确的. 接着用 *Hind* III 线性化质粒, 在反转录试剂盒(PharMingen, USA)中 T7 RNA 聚合酶指导下, 用 α -[³²P]UTP(Amersham Pharmacia Biotech, USA)标记合成反义 RNA 探针.

(v) 核糖核酸酶切保护法(ribonuclease protection assay, RPA). 6 $\times$ 10⁶ 个细胞经相应刺激后移去培养液, 细胞总 RNA 用 TRIzol 抽提. 将溶解在杂交缓冲液中的探针(3 $\times$ 10⁵ 个 $\cdot$ μ L⁻¹ $\cdot$ min⁻¹) 2 μ L 与 16 μ g 样品 RNA 杂交 12 ~ 16 h, 经 RNase A + T1, 蛋白酶 K 依次处理, 去除单链 RNA 片段和酶蛋白后, 与 mRNA 杂交的保护片段经纯化回收, 以 5%变性聚丙烯酰胺测序, 凝胶电泳分离, X 射线底片曝光.

(vi) 凝胶电泳迁移率变化分析(EMSA). AP-1 野生型寡核苷酸探针(野生型): 5'-CTTCCTATGTGT-CACTTCCTG-3'; AP-1 突变型寡核苷酸探针(突变型): 5'-CTTCCTATGTGAGTCTTCCTG-3')由上海生工生物工程公司合成. 探针以 γ -[³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech, USA)和 T4-多聚核苷酸激酶(Promega, USA)末端标记. 参照 Zhang 等人^[12]的方法抽提核蛋白. 核蛋白-DNA 结合反应条件如下: 20 μ L 体系中含 5 μ g 核蛋白, 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5%甘油, 1 mmol/L DTT 和 1 μ g poly (dI-dC, 非特异性竞争物), 混匀后, 在冰上反应 30 min. 然后加入标记探针(1 $\times$ 10⁴ 个 $\cdot$ μ L⁻¹ $\cdot$ min⁻¹) 2 μ L 置室温反应 20 min. 核蛋白-DNA 复合物以 6%聚丙烯酰胺凝胶(含 50 mmol/L Tris, 0.38 mol/L 甘氨酸和 2 mmol/L EDTA)分离, 干胶后在-70 $^{\circ}$ C 加增感屏进行放射自显影. 竞争和超迁移(super shift)实验在进行

表 1 合成反义 RNA 核酸探针中使用的 PCR 引物

亚克隆	序列	引物	长度/bp
<i>IL-18</i>	123 ~ 339	5'-CAGAAGCTTCGCCTCAAACCTTCCAAAT-3' <i>Hind</i> III	217
		5'-AGAATTCTGTCAACGAAGAGAACTTGG-3' <i>Eco</i> R I	
		5'-CAGAAGCTTAGTTCATCCGGCACC-3' <i>Hind</i> III	
<i>RPL32</i>	106 ~ 225	5'-AGAATTCCAATGTTGGGCATCAAG-3' <i>Eco</i> R I	120

探针-DNA 结合前, 加入 50 倍于标记探针量的正常和突变竞争 DNA 或 2 μg 抗体, c-Jun, c-Fos (Santa Cruz Biotech, USA)至相应反应管, 置冰上反应 30 min.

(vii) ELISA. HSR 前后的 RAW264.7 细胞经 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 24 h, 收集上清液, 然后用 ELISA 试剂盒(MBL, Japan)检测上清液中 IL-18 分泌情况.

2 结果

2.1 HSR 对 Hsp70 表达的影响

HSR 的一个重要特征是诱导 HSPs 的产生^[1,2]. 用 43℃热处理 RAW264.7 细胞 2 h, 对正常细胞和热处理细胞用台盼蓝染色, 观察到存活细胞均大于 95%. 然后在不同的恢复时间检测 Hsp70 的 mRNA 和蛋白质表达动力学. 半定量 RT-PCR 的结果表明, *hsp70* 的 mRNA 水平在热休克后 6 h 时达到最大值, 在 24 h 后回复到热休克前的水平(图 1(a)). 内源性对照的看家基因 *hprt* 在热休克前后及不同恢复时间基本没有变化.

接着用 Western blot 对 Hsp70 蛋白的合成进行测定, 经 3 次以上的重复实验, Hsp70 表达在热休克后随恢复时间的延长逐渐上升, 到 6 h 时达到最高值, 在 24 h 时又降低至热休克前的水平(图 1(b)). 这些结果与 RT-PCR 检测到的 mRNA 结果是一致的, 表明我们成功地诱导了 RAW264.7 细胞的 HSR.

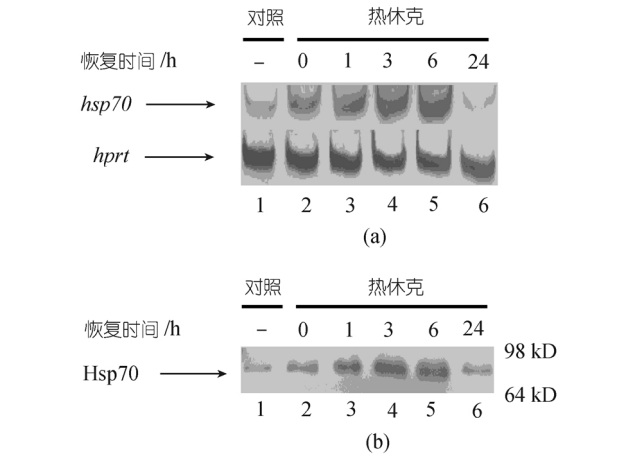


图 1 体外 43℃热处理 2 h 后不同恢复时间小鼠 RAW264.7 的 Hsp70 表达动力学
(a) *hsp70* 和 *hprt*(看家基因)的 mRNA 水平. 1 示正常对照组, 2~6 示细胞经热休克 2 h 后在 37℃培养 0, 1, 3, 6, 24 h 的结果. (b) Hsp70 蛋白质水平. 1 示正常对照组, 2~6 示细胞经热休克 2 h 后在 37℃培养 0, 1, 3, 6, 24 h 的结果

2.2 HSR 对 IL-18 mRNA 表达的影响

为了探索 43℃热休克处理对 RAW264.7 细胞

IL-18 表达的影响, 在上述已经建立的 HSR 系统中, 应用 RPA 检测了热休克处理前后 IL-18 mRNA 的表达变化. 3 次以上的重复实验结果表明, 热休克处理显著抑制了 LPS 诱导的 IL-18 mRNA 表达(图 2).

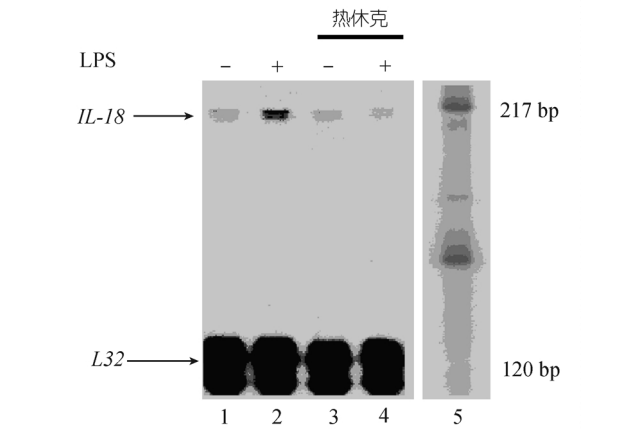


图 2 HSR 对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 IL-18 表达的影响
1 示正常对照组, 2 示 LPS 处理组, 3 和 4 分别示 HSR 后未添加和添加 LPS 处理相同时间组, 5 示探针分子量, L32 为看家基因. HSR: 43℃培养细胞 2 h 后在 37℃进行恢复性培养 4 h. LPS 刺激浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 时间为 4 h

2.3 HSR 对 IL-18 蛋白表达的影响

为了检查 HSR 对 IL-18 分泌的影响, 应用敏感的 ELISA 技术对 LPS 诱导的 IL-18 蛋白质的分泌进行测定. 结果表明, LPS 刺激上调了 RAW264.7 细胞 IL-18 的分泌, 然而 43℃热休克处理抑制了这种上调效应(图 3). 这一结果与上述 mRNA 结果一致, 进一步证明 HSR 对巨噬细胞 IL-18 表达的抑制效应.

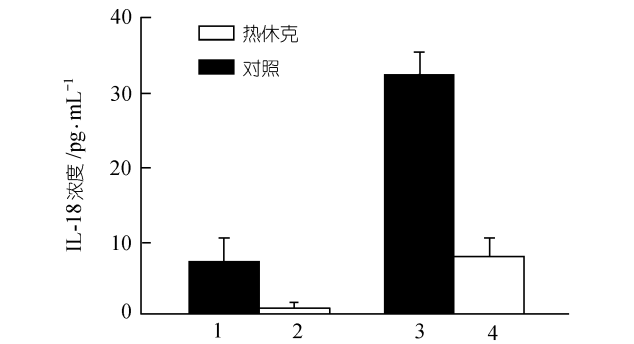


图 3 HSR 对 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 IL-18 蛋白表达的影响
1 示正常对照组, 2 和 4 分别示 HSR 后未添加和添加 LPS 处理相同时间组, 3 示 LPS 处理组. HSR: 43℃培养细胞 2 h 后在 37℃进行恢复性培养 4 h. LPS 刺激浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 时间为 24 h

2.4 HSR 抑制了 AP-1 的 DNA 结合活性

已有报道指出, 转录因子 AP-1 参与调节 IL-18 的表达^[9]. 为了解 43℃ HSR 引起的 IL-18 表达的抑制是否与 AP-1 的活性有关, 我们运用 EMSA 技术对细胞核中 AP-1 蛋白与 IL-18 启动子上(−1120 ~ −1083)的一段 DNA 序列的结合能力进行了测定. 如图 4 所示, 正常 RAW264.7 中, LPS 处理 1 h 引起了转录因子 AP-1 与 DNA 显著结合(图 4 中的 3), 而在热休克处理后的 RAW264.7 中, 这种 DNA 结合被明显抑制(图 4 中的 9).

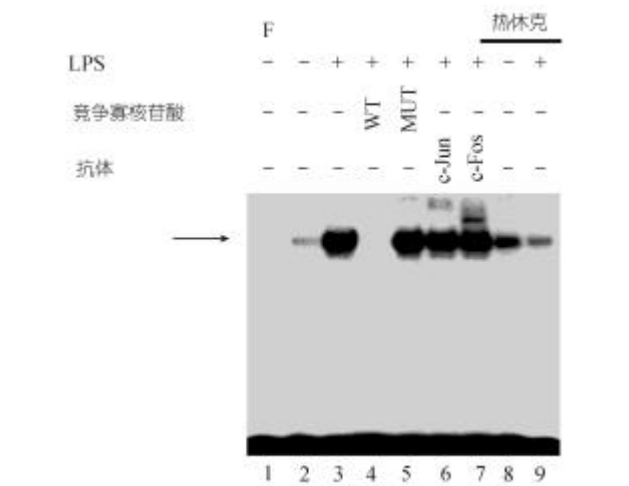


图 4 HSR 抑制了 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 转录因子 AP-1 的 DNA 结合活性

1 示自由探针(F, free probe), 2 示正常对照组, 3~7 示 LPS 处理组, 4 和 5 示竞争实验中分别加入了野生型寡核苷酸(WT)和突变型寡核苷酸(MUT), 6 和 7 示超迁移实验中分别加入了抗 c-Jun 和抗 c-Fos 抗体, 8 和 9 分别示 HSR 后未添加和添加 LPS 处理相同时间组. HSR: 43℃ 培养细胞 2 h 后在 37℃ 进行恢复性培养 4 h. LPS 刺激浓度为 1 μg/mL, 时间为 1 h

为了验证转录因子 AP-1 结合的特异性, 我们做了竞争实验. 50 倍于标记探针量的非标记正常寡核苷酸可竞争抑制 AP-1 和 DNA 的结合, 而突变寡核苷酸则不能介导此效应(图 4 中的 4 和 5). 表明图 4 中的结合是 AP-1 与 DNA 探针的特异性结合. 应用 c-Fos 和 c-Jun 蛋白的特异性抗体进行了超迁移实验, 加入 c-Fos 和 c-Jun 蛋白的特异性抗体的泳道出现了滞后带(图 4 中的 6 和 7), 表明本实验中转录因子 AP-1 是由 c-Fos 和 c-Jun 两种亚基组成的.

2.5 HSR 对 LPS 诱导的 JNK 磷酸化的影响

如前所述, AP-1 的活性由上游激酶 JNK 调节. 为了探索 AP-1 活性的抑制是否与其上游信号的阻遏相

关, 我们用 Western blot 技术对 HSR 中 LPS 刺激的 JNK 的磷酸化水平效应做了进一步分析. 如图 5 所示, 细胞总 JNK 水平在各种处理前后基本不变, 而 HSR 显著抑制 LPS 引起的 JNK 磷酸化这一效应(图 5 中的 2 和 4).

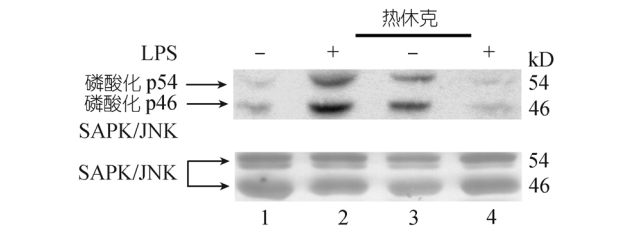


图 5 HSR 抑制了 LPS 诱导的小鼠 RAW264.7 JNK 的磷酸化 1 示正常对照组, 2 示 LPS 处理组, 3 和 4 分别示 HSR 后未添加和添加 LPS 处理相同时间组. HSR: 43℃ 培养细胞 2 h 后在 37℃ 进行恢复性培养 4 h. LPS 刺激浓度为 1 μg/mL, 时间为 30 min

3 讨论

细胞 HSR 是所有机体或细胞在进化过程中所保留下来的自我保护性反应. 细胞应激的一个重要生理和生化作用是诱导 HSPs 的产生^[1,2,13]. HSPs 也称应激蛋白, 存在于所有的真核细胞和原核细胞中, 是高度保守的蛋白质分子家族, 它们具有重要的生理和细胞保护功能. HSPs 按其分子量大小和同源程度可分为 Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 和小分子 HSPs 等 6 个家族^[13]. 目前, 对 Hsp70 与细胞免疫应答之间的关系受到越来越多的关注^[3~5,14].

本文研讨了 43℃ 条件下 Hsp70 的表达动力学, 建立了小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 的 HSR 系统. 利用这一体系, 探索了 RAW264.7 细胞 IL-18 的表达变化, 并报道了 HSR 对 LPS 诱导的 IL-18 表达的下调效应.

小鼠 IL-18 是一个分子量为 18.3 kD 的分子, 热灭活的丙酸菌(*Propionibacterium acnes*)和细菌 LPS 都可诱导 IL-18 的表达^[15]. 新近的研究显示, IL-18 是巨噬细胞对 LPS 和其他微生物产物反应后所分泌的一个重要的细胞因子, 具有诱导 Th1 细胞和 NK 细胞产生 IFN-γ 的功能, 因此也称为 IFN-γ 诱导因子(IGIF). IL-18 与 IL-12 协同作用, 可显著增强 IFN-γ 的产生, 参与机体抵御胞内微生物的感染. IL-18 单独作用可诱导 Th2 细胞的细胞因子产生以及过敏性炎症反应^[16]. 过量表达 IL-18 会引起严重炎症失调. 因此, 加强对 IL-18 的表达调节的研究在控制炎症反应、维持免疫系统功能的平衡上具有重要意义.

如前所述, 已有实验室证明了 AP-1 是参与 IL-18

表达调节的重要的转录因子^[9]. AP-1 的转录活性又受到 JNK 激酶的调节. 在细胞受体的触发条件下, JNK 激酶受上游信号分子介导的磷酸化而激活, 活化的 JNK 激酶可进一步磷酸化其下游底物 c-Jun 分子, 从而激活含有 c-Jun 蛋白的转录因子 AP-1 和 AP-1 转位到细胞核, 与 DNA 序列上的相应位点结合, 启动下游基因的转录. 近来有报道指出, 在人淋巴瘤细胞 U937 和 PEER 中 Hsp70 的产生可抑制 JNK 的磷酸化^[17]. 这使得我们去推测 HSR 对 IL-18 的抑制效应与 JNK/AP-1 信号通路之间的相关性.

本实验在发现 IL-18 表达受抑制的基础上, 进一步检查了小鼠 RAW264.7 细胞 HSR 中 JNK 的磷酸化水平和 AP-1 的 DNA 结合活性. 3 次重复实验的结果显示, HSR 抑制了 JNK 的磷酸化和 AP-1 的 DNA 结合活性(图 4). 这表明 HSR 引起的 IL-18 表达的抑制可能与 JNK/AP-1 信号通路的阻遏有关.

研究表明, 大部分炎性基因的表达都依赖于 NF- κ B 信号通路, 如 IL-12 等细胞因子的表达取决于 NF- κ B 的激活^[18,19]. 我们和其他实验室的研究都已证明 I κ B α /NF- κ B 信号通路在 HSR 抑制促炎症因子的表达中扮演了重要角色^[4,20]. 有文献认为^[21]IL-18 的表达也与 NF- κ B 信号有关, 这对 HSR 下调 IL-18 的表达提供了另一可能的机制, 即通过 NF- κ B 信号通路进行调节.

HSR 的分子生物学是当代生物科学研究领域中的热点之一^[22]. 过度炎症反应对机体是有害的, 甚至会导致机体的死亡. 当机体遭受有害刺激时, 应激反应的抗炎症效应作为一种有效的自我保护机制起着重要作用. 我们应用小鼠 RAW264.7 巨噬细胞观察了 HSR 对 IL-18 表达的影响, 并且证明了转录因子 AP-1 活性的抑制与 IL-18 mRNA 的表达和 IL-18 的分泌抑制密切相关. 这一研究不仅为热应激通过调节细胞因子表达起到抗炎症效应提供了新的依据, 也为临床上寻找控制促炎症细胞因子表达的方法提供了理论依据和思路.

致谢 本工作作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999054201)和中国科学院上海生命科学院创新工程基金资助项目.

参 考 文 献

1 Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55: 1151~1191
2 Morimoto R I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 1993: 259(5100): 1409~1410
3 Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S. Cellular and Molecular

Immunology. 4nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 236~289
4 Snyder Y M, Guthrie L, Evans G F, et al. Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages. *J Leukocyte Biol*, 1992, 51(2): 181~187
5 Li C L, Wang X Y, Zhang J S, et al. Heat shock inhibits IL-12 p40 expression through NF- κ B signaling pathway in macrophages. *Cytokine*, 2001, 16(4): 153~159
6 Wang X Y, Zou Y Y, Wang Y, et al. Differential regulation of interleukin-12 and interleukin-10 by heat shock response in murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(5): 1041~1044
7 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 423~474
8 Gracie J A, Forsey R J, Chan W L, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 1999, 104(10): 1393~1401
9 Kim Y M, Im J Y, Han S H, et al. IFN-gamma up-regulates IL-18 gene expression via IFN consensus sequence-binding protein and activator protein-1 elements in macrophages. *J Immunol*, 2000, 165(6): 3198~3205
10 Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 2000, 103(2): 239~252
11 Bassam B J, Anolles G C, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, 196(1): 80~83
12 Zhang J S, Feng W G, Li C L, et al. NF- κ B regulates the LPS-induced expression of interleukin 12 p40 in murine peritoneal macrophages: roles of PKC, PKA, ERK, p38MAPK, and proteasome. *Cellular Immun*, 2000, 204(1): 38~45
13 Jolly C, Morimoto R I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *L Natl Cancer Inst*, 2000, 92(19): 1564~1572
14 Wong H R, Finder J D, Wasserloos K, et al. Expression of iNOS in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells is inhibited by the heat shock response. *Am J Physiol*, 1995, 269(6): L843~845
15 Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the liver of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun*, 1995, 63(10): 3966~3972
16 Wild J S, Sigounas A, Sur N, et al. IFN- γ -inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Immunol*, 2000, 164(5): 2701~2710
17 Gabai V L, Meriin A B, Mosser D D, et al. Hsp70 prevents activation of stress kinase. *J Biol Chem*, 1997(29), 272: 18033~18037
18 Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 225~260
19 张劲松, 王兴宇, 单佑安, 等. 转录因子 NF- κ B 的研究进展. *科学通报*, 2002, 47(5): 323 ~329
20 Yoo C G, Lee S, Lee C T, et al. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol*, 2000, 164(10): 5416~5423
21 Suk K, Kim S Y, Kim H. Regulation of IL-18 production by IFN γ and PGE₂ in mouse microglial cells: involvement of NF- κ B pathway in the regulatory processes. *Immuno Lett*, 2001, 77(2): 79~85
22 Grover A. Molecular biology of stress responses. *Cell Stress & Chaperones*, 2002, 7(1): 1~5

(2002-09-04 收稿, 2003-01-07 收修改稿)