

文章编号:1000-5404(2012)07-0597-05

论著

## 胆汁酸 G-蛋白偶联受体通过 p38 MAPK 通路诱导巨噬细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和 IL-6 的转录

张闻宇<sup>1,2</sup>, 黄文栋<sup>2</sup>, 娄桂予<sup>2,3</sup> (450003 郑州, 河南省郑州人民医院内分泌科<sup>1</sup>; 91010 杜尔特, 美国 City of Hope 医学中心 Beckman 研究所<sup>2</sup>; 400038 重庆, 第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室<sup>3</sup>)

**[摘要]** 目的 观察胆汁酸 G-蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor for bile acids, TGR5)被齐墩果酸(oleanolic acid, OA)激活后对 RAW264. 7 细胞白细胞介素-1(interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)转录的影响及其机制的探讨。方法 通过实时荧光定量(Real-time)PCR 法检测 OA 作用不同时间 RAW264. 7 细胞和原代枯否细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达;并进一步分析在 RAW264. 7 细胞中加入 3 种不同信号通路的抑制剂对上述 3 种炎症因子 mRNA 表达的影响。OA 作用 RAW264. 7 细胞和原代枯否细胞不同时间后, Western blot 分析 p38 MAPK 的磷酸化水平。结果 OA 刺激 RAW264. 7 细胞 6、12、24 h 后, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达明显升高。OA 作用于分离的原代枯否细胞 3 h 和 6 h 后, 也可观察到相同的结果。p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可以明显地抑制 OA 诱导的 RAW264. 7 细胞内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达, 但 PKA 和 NF- $\kappa$ B 的抑制剂无此作用。RAW264. 7 细胞和原代枯否细胞经 OA 刺激后, p38 MAPK 磷酸化水平明显增强。结论 TGR5 可能通过活化 p38 MAPK 磷酸化诱导炎症细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达, 提示 TGR5 在无其他刺激因素作用下, 具有诱导炎症因子表达的作用。

**[关键词]** 胆汁酸 G-蛋白偶联受体; 齐墩果酸; RAW264. 7 细胞株; 枯否细胞; 促炎因子

**[中图分类号]** R392. 11; R392. 3; R363. 21

**[文献标志码]** A

## TGR5 induces IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ and IL-6 mRNA transcription by p38 MAPK pathway in mouse macrophages

Zhang Wenyu<sup>1,2</sup>, Huang Wendong<sup>2</sup>, Lou Guiyu<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>Department of Endocrinology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan Province, 450003, <sup>3</sup>Department of Biochemistry Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; <sup>2</sup>Backman Research Institution, City of Hope, Duarte, 91010, USA)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of plasma membrane-bound G protein-coupled receptor for bile acids (TGR5) activation by oleanolic acid (OA) on the expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in mouse macrophages. **Methods** Real-time PCR was used to detect the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 at mRNA level after rat macrophage RAW264. 7 cells and Kupffer cells were incubated with OA in different time periods. And the expression of these inflammatory factors were further analyzed by the same method when RAW264. 7 cells were stimulated by inhibitors of 3 different signal pathway plus OA. The phosphorylation level of p38 MAPK was measured by Western blotting. **Results** Treatment of RAW264. 7 cells with OA resulted in a robust increase in IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  transcripts at 6, 12 and 24 h compared with untreated control cells. Similarly, an up-regulation of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  expression was also observed in isolated Kupffer cells at 3 and 6 h. Pre-treatment of RAW 264. 7 cells with a p38 MAPK inhibitor SB203580 markedly reduced the OA-induced increase of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  transcription, but not for PKA or NF- $\kappa$ B inhibitors. p38 phosphorylation was increased by OA treatment in both RAW 264. 7 cells and Kupffer cells. **Conclusion** TGR5 activation induces IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  expression through p38 MAPK activation, indicating that TGR5 possesses pro-inflammatory properties when without any other stimulus.

**[Key words]** TGR5; oleanolic acid; RAW264. 7 cells; Kupffer cells; inflammatory factors

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600299). Corresponding author. Lou Guiyu, Tel: 86-23-68752944, E-mail: louguiyu@hotmail.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30600299)

**[通信作者]** 娄桂予, 电话: (023)68752944, E-mail: louguiyu@hotmail.com

胆汁酸 G-蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor for bile acids, TGR5) 是胆酸的 G 蛋白偶联膜受体, 可差异性表达于各种组织<sup>[1-3]</sup>。石胆酸、脱氧胆酸等疏水性胆酸是其天然配体。TGR5 被活化后, 主要在糖代谢和能量代谢及维持胆汁酸代谢平衡中发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。也有研究发现, TGR5 表达于肝脏的枯否细胞 (肝脏中表达致炎因子的主要细胞) 等巨噬细胞<sup>[7]</sup>; 而且兔外周血分离的巨噬细胞和外源性表达 TGR5 的单核细胞系 THP-1 能抑制内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达<sup>[1]</sup>。这些研究提示, TGR5 可能在炎症和机体免疫中扮演者重要角色。近期的一项体内研究也表明, TGR5 的活化减轻了由 LPS 诱导的肝脏炎症, 进一步证实其在炎症中的作用<sup>[8]</sup>。然而, 在无任何刺激因素作用下, TGR5 在细胞因子表达中的生理作用仍不清楚。齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 是已被证实的 TGR5 的活化剂<sup>[1]</sup>, 本研究旨在观察 TGR5 被 OA 活化后, 对巨噬细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达的影响, 并进一步分析 TGR5 激活后引起炎症因子表达变化的信号传导通路, 以明确其在炎症过程中的生理作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

p38 MAPK 抑制剂 SB203580、PKA 抑制剂 H89 和 NF- $\kappa$ B 抑制剂 BMS-345541 购自 Calbiochem 公司, 小鼠单克隆磷酸化 p38 抗体购自 Cell Signalling 公司, Oleanolic acid 购自 Sigma 公司, RAW264.7 购自 ATCC, 逆转录和 Real-time 扩增系统分别购自 Invitrogen 和 Applied Biosystems 公司, DME 和胎牛血清 (去内毒素) 购自 Gibco 公司, C57BL/6 小鼠来自于美国 City of Hope 医学中心实验动物房。

### 1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养及分组 RAW264.7 用含 10% 胎牛血清的 DMEM (高糖) 培养基, 于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。待细胞长至 80% 融合时, 接种至 6 孔板, 密度为  $0.7 \times 10^6$ /孔, 24 h 后更换为含 0.2% BSA 的 DMEM, 培养 24 h 后, 再做相应处理。①OA 作用不同时间的处理: 对照组加入与实验组等体积的 DMSO, 实验组加入 10  $\mu$ mol/L OA, 与细胞孵育 6、12、24 h。②不同剂量 OA 的处理: 对照组加入与实验组等体积的 DMSO, 实验组 1 加入 10  $\mu$ mol/L OA, 实验组 2 加入 20  $\mu$ mol/L OA, 和细胞共孵育 24 h。③信号通路抑制剂的处理: 对照组加入与实验组等体积的 DMSO, 实验组中分别加入抑制剂 H89 (10  $\mu$ mol/L), SB203580 (10  $\mu$ mol/L), BMS-345541 (1  $\mu$ mol/L) 与细胞孵育 30 min, 然后用 OA (10  $\mu$ mol/L) 刺激 24 h。

1.2.2 原代枯否细胞的分离、培养及处理 4~5 月龄 C57BL/6 小鼠, 经胶原酶 IV 原位灌注肝脏后, 摘除肝脏, 得到肝脏匀浆。然后, 用二部 Percoll 密度梯度离心法分离肝脏枯否细胞<sup>[9]</sup>。分离的枯否细胞以  $1 \times 10^6$  的密度接种于 6 孔板内, 培养

于含 10% 胎牛血清 (无内毒素) 的 DMEM 培养液中, 接种 30 min 后, 换液, 继续培养 24 h。之后更换为含 0.2% BSA 的 DMEM, 培养 24 h。OA 作用不同时间的处理: 对照组加入与实验组等体积的 DMSO, 实验组加入 10  $\mu$ mol/L OA, 与细胞孵育 3、6、12 h。

1.2.3 Real-time PCR 检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 水平的表达 TRI 试剂提取细胞总 RNA。取 2  $\mu$ g 总 RNA 根据 SuperScript First-Strand Synthesis System 的操作步骤说明合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 加入特异性的引物和 2  $\times$  SYB Green 使用 Applied Biosystems 7300 Real-time PCR 仪对其 mRNA 进行扩增。扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, PCR 仪内扩增 40 个循环。使用的引物序列如下: M36b4 上游 5'-GCCCTGCACTCTCGCTTTCT-3', 下游 5'-CAACTGGGCACCGAGGCAACAGTTG-3'; TNF- $\alpha$  上游 5'-CGCCCTTCCAGAACTCCAGGCG-3', 下游 5'-TGCTACGACGTGGGCTACAG-3'; IL-1 $\beta$  上游 5'-CCTGAAGTCAACTGTGAAATGCC-3', 下游 5'-CAGCTTCTCCACAGGCACAATGAG-3'。结果分析: 以管家基因 M36b4 作为内参基因, 计算各组细胞中相应基因的  $\Delta\Delta$ Ct 值。 $\Delta\Delta$ Ct = (Ct 目的基因 - Ct 管家基因), 以目的基因的量 ( $2 - \Delta\Delta$ Ct) 为定量结果进行统计学分析。

1.2.4 Western blot 检测 p38 MAPK 磷酸化表达 在 RAW264.7 细胞或枯否细胞培养基中加入 10  $\mu$ mol/L OA 分别作用 15、30、40 min 和 1 h, 提取各时相总蛋白, 进行蛋白定量。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白, 电印迹转移法将凝胶内的蛋白转至硝酸纤维素膜。5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 1:1 000 (p38 MAPK) 稀释, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的二抗 (稀释度 1:1 000), 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBS 洗膜后, 加 ECL 化学发光试剂, 压片曝光。

### 1.3 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Graphpad Prism5 统计分析软件, 各组均数的比较行单因素方差分析。

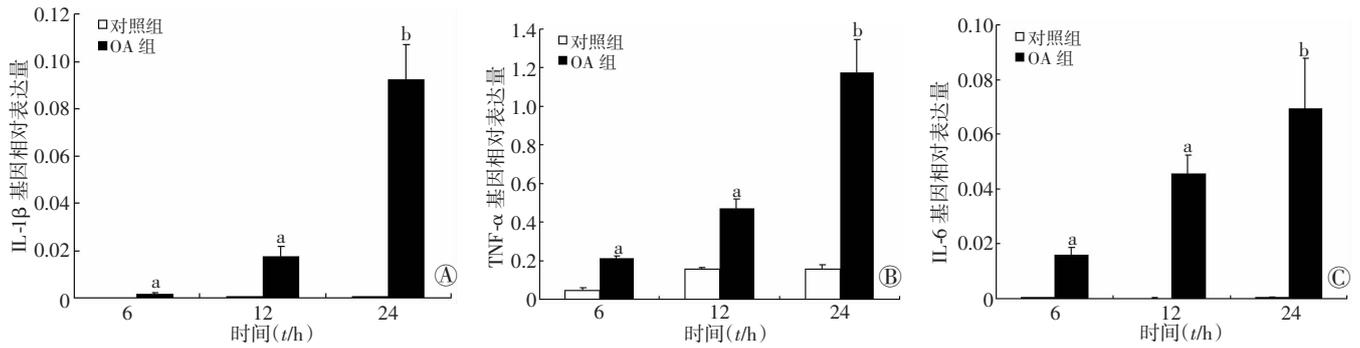
## 2 结果

### 2.1 OA 作用不同时间对 RAW264.7 细胞和枯否细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 表达的诱导

Real-time PCR 的结果表明, OA (10  $\mu$ mol/L) 处理 RAW264.7 细胞后的 6、12 和 24 h, IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达较对照组均显著增高 (图 1)。在 OA 刺激 24 h 时, IL-1 $\beta$ 、IL-6 的转录被诱导增加了 100 倍以上, TNF- $\alpha$  的表达增强了 10 倍以上。与 RAW264.7 细胞结果相似, OA (10  $\mu$ mol/L) 刺激枯否细胞 3 h 后也可诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达 (图 2)。

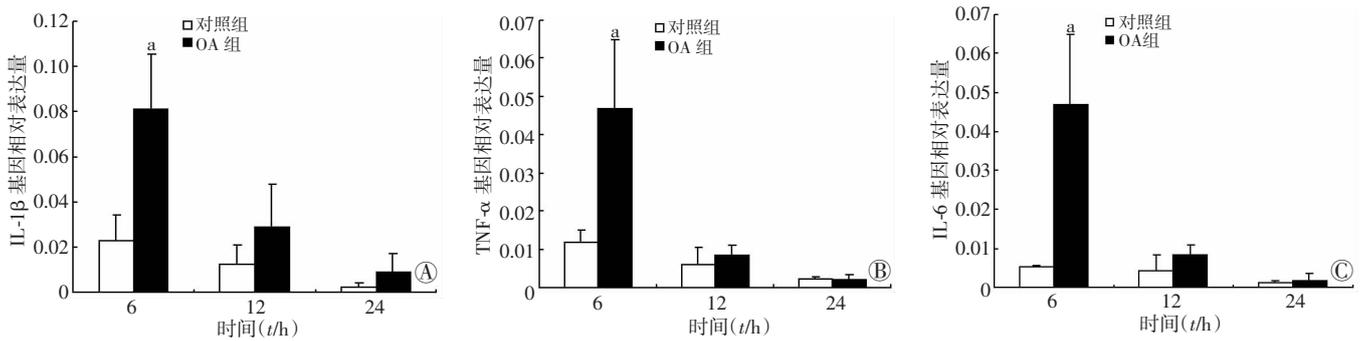
### 2.2 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 抑制 OA 诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 的表达

Real-time 结果表明用 PKA 的抑制剂 H89 或 NF- $\kappa$ B 的抑制剂 BMS-345541 预处理 RAW264.7 细胞后, 不抑制 OA 诱导的炎症因子的表达 (图 3、4)。p38 特异性的抑制剂 SB203580 预处理 RAW264.7 后, 几乎完全抑制了 OA 刺激的炎症因子的生成 (图 5)。



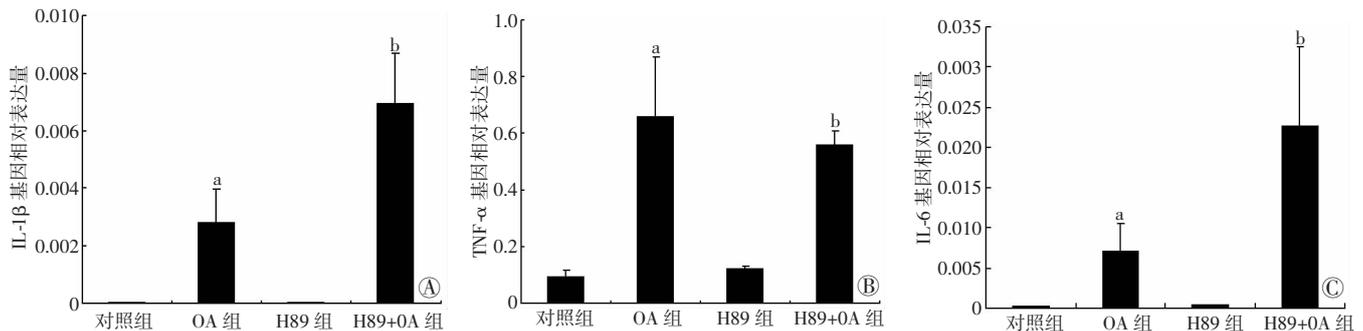
a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较 A: IL-1 $\beta$ ; B: TNF- $\alpha$ ; C: IL-6

图1 Real-time PCR 检测 OA 作用不同时间 RAW264.7 细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达



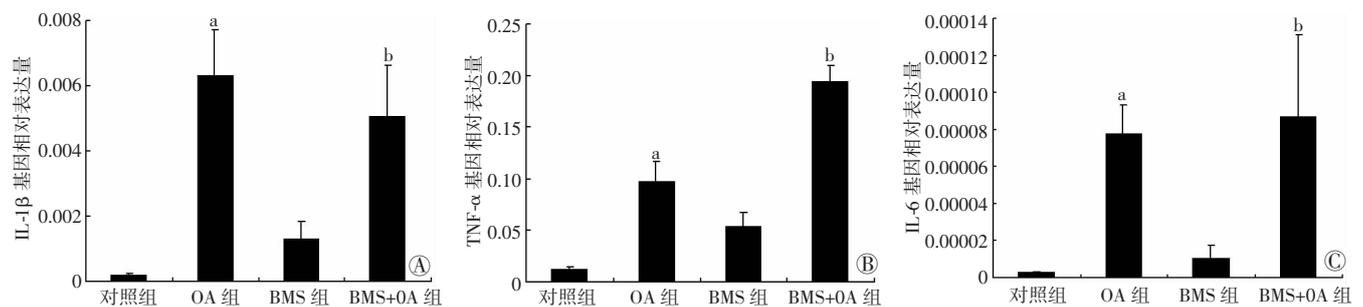
a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较 A: IL-1 $\beta$ ; B: TNF- $\alpha$ ; C: IL-6

图2 Real-time PCR 检测 OA 作用不同时间桔否细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达



a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 H89 组比较 A: IL-1 $\beta$ ; B: TNF- $\alpha$ ; C: IL-6

图3 Real-time PCR 检测在 RAW264.7 细胞中 H89 对 OA 诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响



a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 BMS 组比较 A: IL-1 $\beta$ ; B: TNF- $\alpha$ ; C: IL-6

图4 Real-time PCR 检测在 RAW264.7 细胞中 BMS-345541 对 OA 诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响

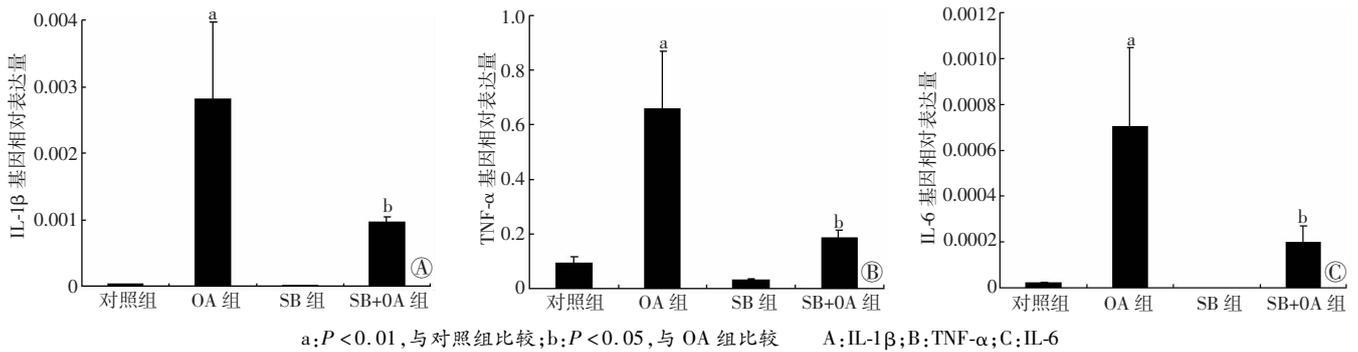
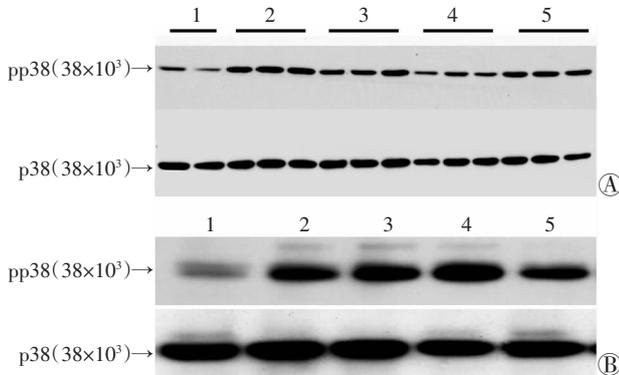


图5 Real-time PCR 检测在 RAW264.7 细胞中 SB203580 对 OA 诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响

### 2.3 OA 增强巨噬细胞 p38 MAPK 的磷酸化水平

RAW264.7 细胞和枯否细胞经 OA (10  $\mu$ mol/L) 分别刺激 15、30、45 min 和 1 h, 提取各组总蛋白, Western blot 检测 p38 MAPK 磷酸化水平。结果表明, 与对照组比较, OA 作用的不同时间段内, p38 MAPK 磷酸化水平均增强 (图 6)。这提示 OA 能活化巨噬细胞内的 p38 信号传导途径。



A: RAW264.7 细胞; B: 枯否细胞 1-5: OA 作用 0、15、30、40、60 min  
图 6 Western blot 检测 OA 作用不同时间 RAW264.7 细胞和枯否细胞中 p38 的磷酸化水平

### 3 讨论

已证实 TGR5 活化后可以在体内外抑制 LPS 诱导的炎症因子的表达<sup>[1]</sup>。本研究表明 TGR5 被 OA 激活后, 在无 LPS 的刺激下, 可上调巨噬细胞 L-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  转录水平的表达, 从而表明 TGR5 对炎症因子的表达具有双重调节作用。

TGR5 活化后, 激活 Gs-蛋白, 进而升高细胞内 cAMP 的浓度, 激活下游的 PKA 蛋白激酶, 从而抑制 LPS 诱导的炎症因子的表达, 这一 TGR5 下游信号传导通路已被证实<sup>[1]</sup>。而 NF- $\kappa$ B 是被公认的在 LPS 诱导的炎症因子生成中发挥重要作用的转录因子<sup>[10-12]</sup>。因此, 我们首先探讨 PKA 和 NF- $\kappa$ B 是否参与了炎症因子的生成。PKA 和 NF- $\kappa$ B 这两种抑制剂不能阻止

TGR5 对 L-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达的上调作用, 表明 PKA 和 NF- $\kappa$ B 这两条信号途径不参与 TGR5 诱导的炎症因子的转录。从而提示 TGR5 诱导的 L-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  转录, 与 TGR5 抑制 LPS 诱导炎症因子表达的信号通路有所不同。

MAPK 是介导细胞外信号引起细胞核反应的极其重要的信号系统, 已证明在哺乳动物中存在 4 个 MAPK 成员, 即 ERK、JNK/SAPK、p38 和 ERK5/BMK1 等 MAPK 亚族, 其中 p38 MAPK 通路主要对炎性细胞因子和多种类型的细胞应激信号进行转导, 大量研究表明阻断 p38 级联能减轻炎症反应<sup>[13-14]</sup>。我们的实验结果也证实, p38 的特异性抑制剂几乎完全抑制了 TGR5 诱导的 L-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达, 提示 p38 是引起该反应的重要激酶。而且用 OA 激活 RAW264.7 和枯否细胞膜上的 TGR5, 可以检测到 p38 的磷酸化水平在所观察的时间段内均有明显升高, 也说明 TGR5 活化后, 确实可以激活 p38 MAPK 的信号传导途径。研究表明, p38 MAPK 被激活后, 可活化转录激活因子 (transcription factor, ATF) 家族、CREB 等转录因子<sup>[15-16]</sup>。而在 L-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的基因上游调控区域内包含有这些转录因子的结合位点<sup>[17-19]</sup>。因此我们推测, TGR5 活化后, 可以通过激活 p38 MAPK, 进而激活其下游某个或某些转录因子, 促进其结合于 L-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的基因上游调控区域, 从而诱导了这 3 种炎症因子的表达。

G 蛋白偶联受体对于炎症因子的双重作用也见于其他受体。比如  $\beta_2$  雄激素受体 ( $\beta_2$  adrenergic receptor,  $\beta_2$  AR)。在 LPS 存在的条件下,  $\beta_2$  AR 可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活性而抑制炎症因子的表达。然而,  $\beta_2$  AR 本身可以升高巨噬细胞内炎症因子的表达, 该作用是通过 MAPK 信号通路实现的, 而不依赖与 NF- $\kappa$ B 途径<sup>[20]</sup>。

肝脏枯否细胞是炎症因子如 L-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$

的主要来源细胞。有研究报道胆酸可以诱导肝脏的炎症反应<sup>[21]</sup>,根据本实验的结果,我们推测,作为胆酸的内源性G蛋白受体,TGR5有可能介导了胆酸诱导的炎症因子的生成,从而参与了肝脏的相关功能。在肝脏中,TGR5的具体生理作用尚需进一步研究。

综上所述,本研究证实了在无任何刺激下,TGR5可诱导炎症因子L-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 的生成,该机制可能与TGR5激活的p38 MAPK通路有关。TGR5有可能介导了胆酸诱导的炎症因子L-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 的生成,从而参与肝脏的炎症反应。

### 参考文献:

- [1] Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, *et al.* A G protein-coupled receptor responsive to bile acids [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(11): 9435 - 9440.
- [2] Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, *et al.* The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells [J]. *Hepatology*, 2007, 45(3): 695 - 704.
- [3] Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, *et al.* Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation [J]. *Biochem J*, 2006, 398(3): 423 - 430.
- [4] Watanabe M, Houten S M, Matakai C, *et al.* Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation [J]. *Nature*, 2006, 439(7075): 484 - 489.
- [5] Thomas C, Gioiello A, Noriega L, *et al.* TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(3): 167 - 177.
- [6] Maruyama T, Tanaka K, Suzuki J, *et al.* Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice [J]. *J Endocrinol*, 2006, 191(1): 197 - 205.
- [7] Keitel V, Donner M, Winandy S, *et al.* Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(1): 78 - 84.
- [8] Wang Y D, Chen W D, Yu D, *et al.* The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 54(4): 1421 - 1432.
- [9] Fail P A, Anderson S A. Monitoring endocrine function in males: using intra-atrial cannulas to monitor plasma hormonal dynamics in toxicology experiments [M]//Costa L G, Hodgson E, Lawrence D A, *et al.* *Current Protocols Toxicology*. New York: John Wiley & Sons, 2002, Chapter 16: Unit16.5.
- [10] Hall A J, Vos H L, Bertina R M. Lipopolysaccharide induction of tissue factor in THP-1 cells involves Jun protein phosphorylation and nuclear factor kappaB nuclear translocation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 376 - 383.
- [11] Baldwin A S Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights [J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 649 - 683.
- [12] 杨筱祎,李力. NF- $\kappa$ B 在小鼠感染性早产发生中作用的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(2): 164 - 166.
- [13] Chen S R, Xu X Z, Wang Y H, *et al.* Icariin derivative inhibits inflammation through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(8): 1307 - 1313.
- [14] 倪志宇,丛斌,董玫,等. 八肽胆囊收缩素通过 p38MAPK 通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-1 $\beta$  表达 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(7): 971 - 975.
- [15] Deak M, Clifton A D, Lucocq L M, *et al.* Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB [J]. *EMBO J*, 1998, 17(15): 4426 - 4441.
- [16] Morton S, Davis R J, Cohen P. Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2 [J]. *FEBS Lett*, 2004, 572(1/3): 177 - 183.
- [17] Sano M, Fukuda K, Sato T, *et al.* ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts [J]. *Circ Res*, 2001, 89(8): 661 - 669.
- [18] Altmayr F, Jusek G, Holzmann B. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide causes repression of tumor necrosis factor-alpha transcription and suppression of ATF-2 promoter recruitment in Toll-like receptor-stimulated dendritic cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(6): 3525 - 3531.
- [19] Hershko D D, Robb B W, Luo G J, *et al.* Sodium arsenite downregulates transcriptional activity of AP-1 and CRE binding proteins in IL-1 beta-treated Caco-2 cells by increasing the expression of the transcriptional repressor CREMalpha [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(3): 627 - 640.
- [20] Tan K S, Nackley A G, Satterfield K, *et al.* Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(2): 251 - 260.
- [21] Miyake J H, Wang S L, Davis R A. Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 21805 - 21808.

(收稿:2011-11-13;修回:2011-12-19)

(编辑 汪勤俭)