

Kruppel 样因子 4 对内毒素所致 IL-6 基因表达的调控及机制研究*

冯衍生** 刘梅冬** 刘 瑛 刘俊文 陈广文 张华莉*** 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理生理学系, 长沙 410078)

摘要 探讨 Kruppel 样因子 4(KLF4)对内毒素所致白介素(IL-6)的基因表达以及释放的影响, 并对其调控机制做了初步研究. 使用 RT-PCR 和 Western blot 检测 KLF4 mRNA 和蛋白质的表达. 采用 KLF4 过表达的 RAW264.7 巨噬细胞株或反义寡核苷酸技术抑制内源性 KLF4 的表达, 用 RT-PCR 和 ELISA 检测内毒素(LPS)刺激后 IL-6 mRNA 和蛋白质的表达. 采用荧光素酶报告基因检测 RAW264.7 细胞中 KLF4 过表达对 IL-6 基因启动子报告基因转录活性的影响. 使用 EMSA 法检测细胞中 KLF4 与 IL-6 基因启动子区 KLF4 元件的结合. 结果表明: LPS 可以诱导 RAW264.7 巨噬细胞 KLF4 的表达以及 IL-6 蛋白表达. KLF4 过表达明显抑制 IL-6 的 mRNA 和蛋白质的表达, 而 KLF4 缺失使这种作用消失. 荧光素酶报告基因的结果显示, KLF4 可以抑制 LPS 所致的 IL-6 基因启动子的转录活性. EMSA 显示 KLF4 不能与 IL-6 启动子区的 KLF4 结合元件直接结合. 结果表明, LPS 可以促进 RAW264.7 小鼠巨噬细胞 KLF4 的表达和 IL-6 的释放. KLF4 能抑制 LPS 诱导的 IL-6 表达和释放, 其机制是抑制 IL-6 启动子的转录活性, 但 KLF4 的抑制作用不是通过直接与 IL-6 基因的启动子区相结合而实现的.

关键词 Kruppel 样因子 4(KLF4), 内毒素(LPS), 白介素 6(IL-6), 炎症

学科分类号 R363

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00168

Sp/Kruppel 样因子(KLFs)是一个锌指样转录因子家族, 这个家族目前至少已被发现 20 多个成员, 如 Sp1-4、KLF1-7 等^[1]. Sp/Kruppel 样因子参与调控细胞增殖、分化、胚胎发育等重要生命过程, 并与肿瘤等多种疾病有关. 近年来的研究表明, 某些 KLFs 家族成员在炎症反应的基因表达调控中起了重要作用. 如 Sp1 和 Sp3 在内毒素(LPS)刺激后激活, 能促进抗炎介质 IL-10 的表达^[2]. KLF6 在急性损伤中能快速诱导, 并且直接激活胶原蛋白 $\alpha 1$ 、TGF- β 、iNOS 的转录表达^[3]. KLF2/肺 KLF 在 IL-1 β 刺激的人脐静脉内皮细胞中表达下调, 高表达的 KLF2 能够抑制 IL-1 β 诱导的 VCAM-1、E-选择素的表达以及 T 细胞的滚动和黏附从而抑制炎症反应^[4~6]. 以上研究表明, KLFs 家族的许多成员在炎症中起着重要的作用.

Kruppel 样因子 4(Kruppel-like factor 4 or Gut Kruppel-like factor, KLF4/GKLF)是 Sp/Kruppel 样锌指转录因子家族的成员之一. KLF4 具有促进表皮增殖分化, 抑制结肠癌、膀胱癌等恶性肿瘤发生等多种功能^[7, 8]. 最近本室采用 cDNA 微阵列检测

了内毒素休克小鼠肺组织基因表达谱的变化,发现 KLF4 基因在注射内毒素 2 h 的小鼠肺组织中表达上调. 注射内毒素 20 h 后, KLF4 基因的表达水平进一步升高^[9]. 研究发现, KLF4 在 IFN- γ 、LPS 或 TNF- α 处理的巨噬细胞中表达上调, KLF4 通过与 iNOS (inducible nitric-oxide synthase) 启动子区的 KLF4 结合元件结合以及与 NF- κ B 家族成员 p65 的相互作用共同诱导 iNOS 的表达, 从而发挥其促炎功能^[10]. 最近研究还表明, KLF4 可以调节血管内皮细胞的炎症反应, 并且在凝血过程中起重要作用^[11]. 我室最近的研究工作也显示, KLF4 可以促进早期炎症介质 IL-10 和晚期炎症介质 HMGB-1 的表达^[12, 13]. 作为一种在炎症中发挥重要作用的转录因子, KLF4 是否可以调控其他炎症介质的表达,

* 国家自然科学基金资助项目(30571746), 国家自然科学基金青年基金资助项目(30400169)和国家自然科学基金重点项目(30330280).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0731-2355022, E-mail: huali.zhang@hsc.utah.edu

收稿日期: 2009-03-20, 接受日期: 2009-06-29

目前并不清楚.

本研究采用 KLF4 过表达的 RAW264.7 巨噬细胞株^[12, 13]或 KLF4 反义寡核苷酸抑制内源性 KLF4 的表达, 发现 KLF4 过表达明显抑制 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 表达和白介素(IL-6)蛋白的释放, 而 KLF4 的缺失使 LPS 诱导 IL-6 蛋白的释放明显增加. 进一步发现, KLF4 可以抑制 LPS 所致的 IL-6 基因启动子的转录活性, 但是 KLF4 不是通过直接与 IL-6 基因的启动子区相结合而发挥其抑制作用.

1 材料与方法

1.1 细胞培养及 LPS 处理

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株购自中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养在 5% CO₂ 培养箱. 12~20 h 后加入 LPS(购自 Sigma 公司), 在不同时间点收集细胞标本及上清标本.

1.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

细胞总 RNA 的提取按 Gibco BRL 公司的相应试剂盒说明书进行. cDNA 第一链合成程序为: 42℃ 1 h, 95℃ 5 min, 4℃ 10 min. 根据 KLF4 的核苷酸序列设计特异性引物, 引物为: 5' AAC-GATGATGCACTTGCAGA 3' 和 5' GGAAATTG-GGGTAGGAAGGA 3' (上海英骏公司合成). PCR 反应所用程序: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 30 s, 56℃~58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 根据不同引物进行若干个循环, 最后于 72℃ 再延伸 10 min. 取 5~8 μl PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测. 溴乙锭染色后于紫外透射仪拍照.

1.3 酶联免疫吸附实验(ELISA)

IL-6 ELISA 试剂盒购自武汉博士德公司, 按试剂盒说明书检测 LPS 处理后 IL-6 蛋白的释放.

1.4 IL-6 基因启动子的荧光素酶报告基因质粒 pGL₃-IL-6(-1327~+10) 的构建

根据小鼠 IL-6 基因的启动子区序列(-1327~+10)设计引物: 5' CTGGGTACCGGATCCTGAGAGTGTTT 3' 和 5' GCAAGCTTGGAAGCTTCAT-AGCGGTTTCT 3' (上海英骏公司合成). 以小鼠基因组 DNA 为模板, 采用 Pyrobest DNA 聚合酶进行 PCR, 扩增产物经凝胶 DNA 回收试剂盒纯化. 用 *Kpn* I 和 *Hind* III 限制性内切酶将纯化的产物克隆至 pGL3 载体中.

1.5 KLF4 反义寡核苷酸的转染

KLF4 反义寡核苷酸的序列为 5' agactcgcca-

gggtggctgcctcatt 3' (上海英骏公司合成). 用 0.25 ml 不含血清的 DMEM 培养基分别溶解 20 μg 反义寡核苷酸和 15 μl Lipofectamine 2000(购自 Invitrogen 公司). 5 min 后, 将反义寡核苷酸与 Lipofectamine 2000 混匀. 细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 遍后, 加入 1.5 ml 无血清 DMEM 培养基, 然后加入上述重组质粒或寡核苷酸与脂质体的混合物, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 6 h 后再加入 2 ml 含 20%小牛血清的 DMEM 培养基, 于 24 h 后收集细胞, 进行后续实验.

1.6 凝胶电泳迁移率分析(EMSA)

将细胞传代贴壁 24 h, 细胞生长到融合率达到 70%~80%时, 按我室常规方法提取细胞核蛋白^[12, 13], Bradford 法测定蛋白质浓度后置-70℃ 保存备用. 以上步骤均在 4℃ 进行操作. 将寡核苷酸探针变性退火成双链(程序为: 94℃ 5min, 逐渐恢复至室温), 12% PAGE 胶检验退火效果, 稀释分装, -20℃ 保存备用. 按 Pierce 公司 EMSA 试剂盒操作程序进行.

1.7 荧光素酶报告基因分析

将真核表达质粒、荧光素酶报告基因质粒和 pRL-TK 载体共同转染细胞. 转染 36 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 400 μl PLB 细胞裂解液裂解细胞, 将 24 孔板置于 25℃ 孵育 20 min. 分出 40 μl 的细胞裂解液, 并将其和 100 μl 的荧光素酶检测试剂 II (LAR II) 混合, 立即用荧光发光计测量萤火虫荧光素酶的活性. 然后, 在荧光发光计试管中加入 100 μl 的 Stop&GloTM 试剂, 以猝灭萤火虫荧光素酶反应, 同时激活海肾荧光素酶反应, 并立即测量海肾荧光素酶的活性(双荧光素酶报告基因试剂盒购自 Promega 公司).

1.8 免疫印迹分析(Western blot)

细胞用 预冷 PBS 洗 3 次, 加入 80~100 μl 2×SDS 裂解液裂解细胞, 将裂解液超声 10~15 s, 10 000 g 离心 5 min, 取上清液, 用 Bradford 法测定蛋白质浓度. 样品经 12% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶分离后, 电转移法转移到硝酸纤维素膜上. 室温下封闭 4 h 后, 加入一抗(1:1 000 稀释, KLF 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, GAPDH 抗体购自 Sigma 公司), 4℃ 过夜. 洗膜液洗去一抗后, 加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:1 000 稀释, 二抗购自 Boster Biological Technology 公司), 孵育 2 h. 洗膜液洗去二抗后 DAB 显色. 光密度扫描定量分析.

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 两组间比较用 t 检验. 以 $P < 0.05$ 判断为有统计学意义.

2 结 果

2.1 LPS 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 KLF4 mRNA 和蛋白质表达的影响

采用 750 $\mu\text{g/L}$ LPS 处理 RAW264.7 巨噬细胞, 不同时间点收集细胞 RNA 和总蛋白, 用 RT-PCR 和 Western blot 检测 KLF4 的 mRNA 和蛋白质水平. 结果显示: KLF4 mRNA 在 LPS 刺激后 2 h 升高, 4 h 达到高峰(图 1a). KLF4 蛋白在 LPS 刺激后 2 h 明显升高, 12 h 达到高峰, 24 h 仍有所升高(图 1b).

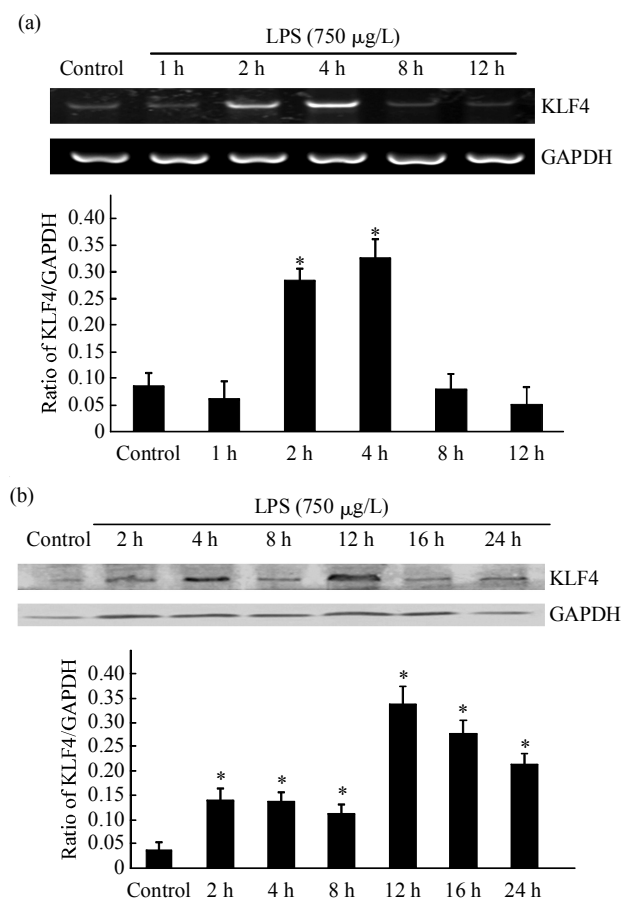


Fig. 1 Expression of KLF4 in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages

RAW264.7 macrophages were stimulated with LPS (750 $\mu\text{g/L}$) for various periods of time. (a) mRNA levels of KLF4 in various periods of time were determined by RT-PCR. (b) Protein levels of KLF4 in various periods of time were determined by Western blot. *: Statistically significant versus control group, $P < 0.05$, $n \geq 3$.

2.2 LPS 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 IL-6 蛋白释放的影响

采用 750 $\mu\text{g/L}$ LPS 处理 RAW264.7 巨噬细胞,

收集不同时间点的细胞培养上清, 采用 ELISA 方法检测 IL-6 蛋白的释放. 结果显示: LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞后, IL-6 蛋白的释放明显增加(图 2).

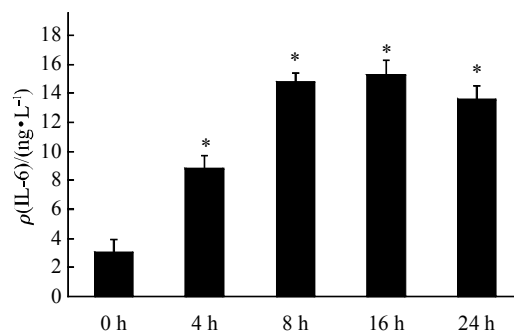


Fig. 2 Release of IL-6 in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages

RAW264.7 macrophages were stimulated with LPS (750 $\mu\text{g/L}$) for 0 h, 4 h, 8 h and 16 h. Protein levels of IL-6 in various periods of time were determined by ELISA. *: Statistically significant versus control group, $P < 0.05$, $n \geq 3$.

2.3 KLF4 过表达对 IL-6 mRNA 表达和 IL-6 蛋白释放的影响

采用我室建立的稳定高表达 KLF4 蛋白的 RAW264.7 巨噬细胞株, 用 750 $\mu\text{g/L}$ LPS 处理不同时间后, 收集细胞总蛋白或细胞培养上清, 检测 IL-6 mRNA 和 IL-6 蛋白的水平. 结果显示: LPS 刺激之后, 转空载体细胞的 IL-6 mRNA 表达明显升高, 并在 4 h 时达到高峰, KLF4 过表达明显抑制了 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 的表达(图 3), KLF4

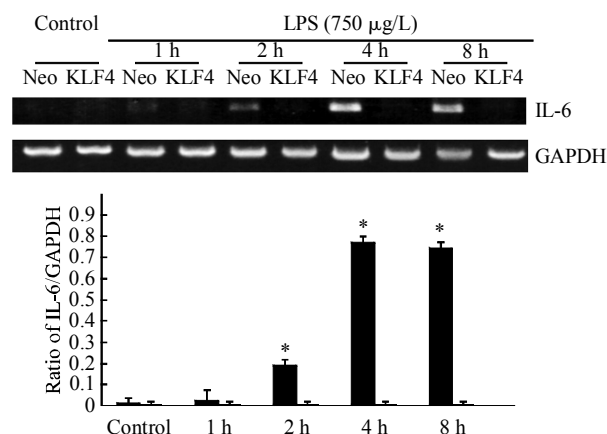


Fig. 3 Effect of KLF4-overexpression on LPS-induced IL-6 expression in RAW264.7 macrophages

KLF4-overexpressed or vector control RAW264.7 macrophages were incubated with or without LPS (750 $\mu\text{g/L}$) for 0h, 1 h, 2 h, 4 h and 8 h. mRNA levels of IL-6 were determined by RT-PCR. Neo: The vector control group; KLF4: KLF4 overexpression group. *: Statistically significant versus the vector control group, $P < 0.05$, $n \geq 3$. ■: Neo; □: KLF4.

过表达明显抑制了 LPS 诱导的 IL-6 蛋白的释放(图 4).

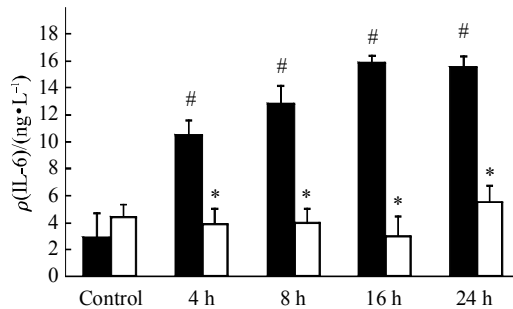


Fig. 4 Effect of KLF4-overexpression on LPS-induced IL-6 release in RAW264.7 macrophages

KLF4-overexpressed or vector control RAW264.7 macrophages were incubated with or without LPS (750 μ g/L) for 0 h, 4 h, 8 h, 16 h and 24 h. IL-6 in the culture medium was determined by ELISA. Neo: The vector control group; KLF4: KLF4 overexpression group; 0 h, 4 h, 8 h, 16 h and 24 h: Cells stimulated with LPS for 0 h, 4 h, 8 h, 16 h and 24 h respectively. #: Statistically significant versus the vector control group. *: Statistically significant versus the vector control group with the stimulation of LPS, $P < 0.05$, $n \geq 3$. ■: Neo; □: KLF4.

2.4 KLF4 缺失对 IL-6 蛋白释放的影响

瞬时转染 KLF4 反义寡核苷酸 48 h 后有效抑制了内源性 KLF4 mRNA 和蛋白质的表达(图 5a, 5b). 内源性 KLF4 被抑制后, LPS(750 μ g/L)诱导的 IL-6 蛋白释放较对照组明显升高(图 5c).

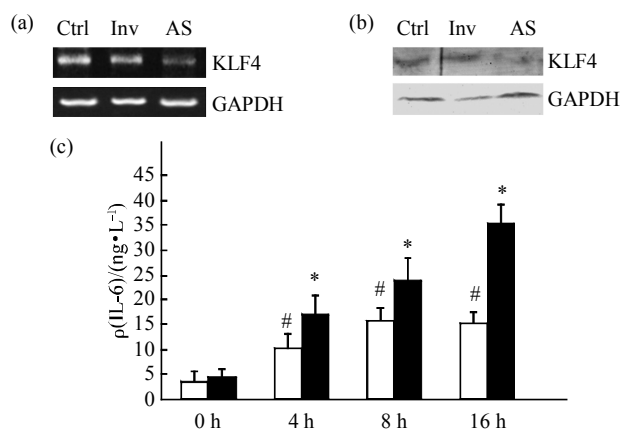


Fig. 5 Effect of KLF4-deficiency on LPS-induced IL-6 expression in RAW264.7 macrophages

(a) mRNA levels of KLF4 were determined by RT-PCR. (b) Protein levels of KLF4 were determined by Western blot. (c) The macrophages were stimulated with LPS(750 μ g/L) for 0 h, 4 h, 8 h and 16 h. IL-6 in various periods of time were determined by ELISA. Ctrl: RAW264.7 macrophages were treated only with lipofectamine; Inv: RAW264.7 macrophages were transiently transfected with random oligonucleotide of KLF4; AS: RAW264.7 macrophages were transiently transfected with morpholino antisense oligonucleotide of KLF4. #: Statistically significant versus the group without the stimulation of LPS; *: Statistically significant versus the ctrl group with the stimulation of LPS, $P < 0.05$, $n \geq 3$. □: Control; ■: AS.

2.5 KLF4 对 IL-6 基因启动子转录活性的影响

采用荧光素酶报告基因检测 RAW264.7 细胞中 KLF4 过表达对 IL-6 基因启动子报告基因转录活性的影响. 结果发现: LPS 处理后 IL-6 基因启动子在 KLF4 过表达细胞内的转录活性明显低于转空载体细胞(图 6).

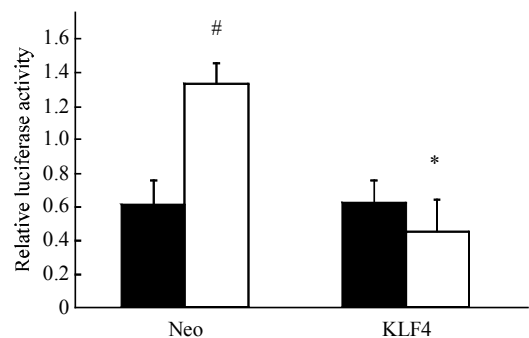


Fig. 6 Luciferase reporter gene assays showing the transcription activity of KLF4 to IL-6 promoter in RAW264.7 macrophages

Neo: the vector control group; KLF4: KLF4 overexpression group. #: Statistically significant versus the vector control group (Neo), *: Statistically significant versus the relevant group with the stimulation of LPS, $P < 0.05$, $n \geq 3$. ■: Control; □: LPS.

2.6 EMSA 检测细胞中 KLF4 与 IL-6 基因启动子区 KLF4 元件的结合

采用 TESS or MATCH™ 软件分析 IL-6 基因的启动子区, 显示 IL-6 启动子区-311~-298 bp 含有

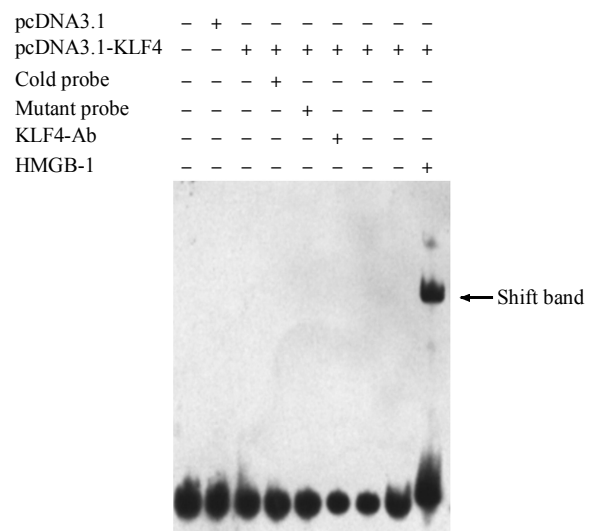


Fig. 7 EMSA showing the DNA binding activity of KLF4 to the KLF binding element of IL-6 promoter in RAW264.7 macrophages

pcDNA3.1: Nuclear extract from the vector control group; pcDNA3.1-KLF4: Nuclear extract from KLF4 overexpression group; Cold probe: Competition with cold probe; Mutant probe: Competition with mutant cold probe; KLF4 Ab: Supershift by KLF4 antibody; HMGB1: The KLF binding element of HMGB1(Positive control).

一个潜在的 KLF4 结合元件. 采用 EMSA 检测细胞中 KLF4 与 IL-6 基因启动子区-311~-298 bp 的结合情况, 结果发现: KLF4 过表达细胞的核蛋白与 IL-6 基因启动子区-311~-298 bp 没有结合(图 7).

3 讨 论

IL-6 是一种具有多种功能的细胞因子. 在 IL-1 β 、TNF- α 和 LPS 的刺激下机体可以产生 IL-6. IL-6 在免疫反应、炎症、细胞分化、凝血以及肿瘤等的发生发展中有重要作用. 在损伤、创伤、应激和感染等因素所致的炎症反应中 IL-6 表达明显升高. IL-6 在炎症中可以诱导机体产生 C-反应蛋白以及纤维蛋白原等, 并且可以促进血栓形成^[2]. 机体内增高的 IL-6 可以通过与 IL-6 受体结合引起炎症性疾病的发生, 如类风湿关节炎, Crohn's 病等^[3]. 在类风湿关节炎中 IL-6 可以刺激 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等分泌炎症介质, 并且可以促进 B 淋巴细胞的成熟分化, 增加 IL-1 β 和 TNF- α 的效应. 在炎症反应中 IL-6 对其他炎症细胞, 如中性粒细胞、单核巨噬细胞等有趋化作用^[4]. 这些都说明 IL-6 在炎症反应中有重要作用.

KLF4 是一个有着多种功能的核转录因子. 在细胞的增殖分化, 肿瘤的发生发展以及炎症的发生发展中都有重要作用. 本室最近的研究表明, KLF4 可以直接调控早期炎症 IL-10 和晚期炎症介质 HMGB-1 的表达. 本研究中采用稳定转染 KLF4 的细胞株和反义寡核苷酸技术, 证明 KLF4 可以抑制 IL-6 mRNA 的表达和 IL-6 蛋白的释放, 荧光素酶报告基因显示 KLF4 过表达显著抑制 IL-6 基因启动子的转录活性. 作为转录因子, KLF4 主要通过下游基因启动子区的 GC 盒、CACCC 盒和基础转录元件等三种结合元件相结合, 从而直接调控基因的表达. 本室已发现, KLF4 与小鼠 IL-10 基因启动子区-235~-212 bp 的 KLF4 结合元件相结合而调控 IL-10 的表达. KLF4 能够与小鼠 HMGB1 基因启动子区-734~-705 bp 以及-1 322~-1 293 bp 的 KLF4 结合元件相结合促进 HMGB-1 的表达. 我们通过生物信息学分析发现, IL-6 启动子区有一个潜在的 KLF4 结合元件, 进一步采用 EMSA 检测 KLF4 与 IL-6 基因启动子区 KLF4 结合元件的结合, 发现 KLF4 不能和 IL-6 启动子区 KLF4 结合元

件相结合. 这说明 KLF4 调控 IL-6 基因表达的机制与调控 IL-10 和 HMGB1 基因的机制有所不同. KLF4 并不是通过与 IL-6 启动子区 KLF4 的结合位点直接相结合来调控 IL-6 的表达, 其机制是抑制 IL-6 启动子的转录活性. KLF4 有可能通过调控其他转录因子而调控 IL-6 的表达和释放, 比如调控 IL-6 的重要转录因子 NF-IL6 和 NF- κ B 等; KLF4 也有可能通过其调控的炎症介质如 IL-1、IL-10 等来影响 IL-6 的释放, 这些机制有待进一步研究. 深入研究 KLF4 对 IL-6 表达释放的调控作用对于阐明 KLF4 在炎症中的调节作用具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Bieker J. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem*, 2001, **276** (37): 34355~34358
- 2 Baeuerle P A, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1994, **12**: 141~179
- 3 Tone M, Powell M J, Tone Y, *et al.* IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol*, 2000, **165**(1): 286~291
- 4 Luo Q, Ma X, Wah S M, *et al.* Activation and repression of interleukin-12 p40 transcription by erythroid Kruppel-like factor in macrophages. *J Biol Chem*, 2004, **279**(18): 18451~18456
- 5 SenBanerjee S, Lin Z, Atkins G B, *et al.* KLF2 is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med*, 2004, **199**(10): 1305~1315
- 6 Wu J, Lingrel J B. Kruppel-like factor 2, a novel immediate-early transcriptional factor, regulates IL-2 expression in T lymphocyte activation. *J Immunol*, 2005, **175**(17): 3060~3066
- 7 Sikora J P. The role of cytokines and reactive oxygen species in the pathogenesis of sepsis. *Pol Merkur Lekarski*, 2000, **7**(43): 47~50
- 8 Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998, **16**(4): 225~260
- 9 David LB, Eric G L, Shon L, *et al.* Recent advances in understanding NF-[kappa]B regulation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2002, **8**(3): 201~212
- 10 Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 2008, **132**(3): 344~362
- 11 Cuschieri J, Maier R V. Mitogen-activated protein kinases(MAPK). *Crit Care Med*, 2005, **33**(12): s417~s419
- 12 Liu J W, Zhang H L, Liu Y, *et al.* KLF4 regulates the expression of interleukin-10 in RAW264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **362**(3): 575~581
- 13 Liu J W, Liu Y, Zhang H L, *et al.* KLF4 promotes the expression, translocation and release of HMGB1 in RAW264.7 macrophages in response to LPS. *Shock*, 2008, **30**(3): 260~266

Role of Kruppel-like Factor 4 in Regulating The Expression of IL-6 Induced by LPS*

FENG Yan-Sheng**, LIU Mei-Dong**, LIU Ying, LIU Jun-Wen,
CHEN Guang-Wen, ZHANG Hua-Li***, XIAO Xian-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to explore the role of Kruppel-like factor 4 (KLF4) in regulating the expression of IL-6 induced by lipopolysaccharide (LPS). mRNA and protein levels of KLF4 in various periods were determined by RT-PCR and Western blot. A full-length cDNA or antisense oligonucleotides of KLF4 was transfected into RAW264.7 macrophages. The expression and release of IL-6 were analyzed by RT-PCR and ELISA. The transcription and DNA binding activities of KLF4 to the IL-6 promoter were detected by the luciferase reporter and EMSA. The results showed that treatment of RAW264.7 macrophages with LPS resulted in increase in KLF4 and IL-6 protein levels; KLF4 overexpression decreased the expression and release of IL-6, while KLF4 inhibition increased the expression of IL-6. The results from luciferase reporter gene assay demonstrated that KLF4 could inhibit the transcriptional activity of IL-6 gene. The results from EMSA demonstrated that KLF4 could not bind to the KLF4 binding sites on the promoter of IL-6 gene. These data suggested that LPS can stimulated the expression of KLF4 and release of IL-6 in RAW264.7 macrophages; KLF4 can inhibited the release of IL-6 in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages; KLF4 can inhibited the transcription activity of IL-6 promoter in RAW264.7 macrophages; this effect of KLF4 is not through binding the IL-6 promoter directly.

Key words Kruppel-like factor 4(KLF4), lipopolysaccharide (LPS), IL-6, inflammation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00168

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30571746), The National Natural Science Foundation for Youth of China (30400169) and The Major National Natural Science Foundation of China (30330280).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-2355022, E-mail: huali.zhang@hsc.utah.edu

Received: March 20, 2009 Accepted: June 29, 2009