

核转录因子 NF- κ B 调节人肾小管上皮细胞 SIGIRR 表达机制的研究

蒋克国^{1,2}, 朱莉¹, 赵文曼¹, 石瑞¹, 王德光¹

摘要 目的 探讨人肾小管上皮细胞(HKC)内核转录因子 NF- κ B(NF- κ B)反馈调控单免疫球蛋白白介素1受体相关蛋白(SIGIRR)表达的分子机制。方法 分子克隆法构建 pLNCX2-G418-SIGIRR 过表达载体,经 PT67 细胞包装后感染 HKC 细胞,构建 SIGIRR 过表达细胞和对照细胞。使用 IL-1 β 诱导,Western blot 验证过表达 SIGIRR 可抑制 NF- κ B 活化。使用 NF- κ B 阻断剂和干扰 NF- κ B 活性后,免疫荧光法验证活化的 NF- κ B 可调控 SIGIRR 表达。在线工具预测 SIGIRR 启动子区存在 NF- κ B 结合位点。分子克隆法从人基因组 DNA 内获取含有结合位点的 SIGIRR 启动子序列,连接至荧光素酶载体 pGL3-Luc,构建 pGL3-Luc-SIGIRR,并突变结合位点。使用荧光素酶报告基因实验和染色质免疫沉淀技术(ChIP)共同验证活化的 NF- κ B 可结合在 SIGIRR 启动子区调控 SIGIRR 基因的表达。结果 构建的 pLNCX2-G418-SIGIRR 逆转录病毒载体经酶切、测序验证后对比 SIGIRR 基因编码序列完全一致,重组体和对照载体经病毒包装后转入 HKC 细胞后成功构建 HKC/SIGIRR 实验组和 HKC/Co 对照组细胞系,在 mRNA 和蛋白水平的 SIGIRR 表达差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.001$)。过表达 SIGIRR 细胞组相比对照组细胞可以减少 IL-1 β 诱导的 NF- κ B 的活化($P < 0.001$),抑制 NF- κ B 活化和干扰 NF- κ B 表达后,SIGIRR 的表达出现下调。提取人基因组 DNA 后,分子克隆法获得 SIGIRR 目的启动子序列连接至载体,成功构建 pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶载体并定点突变载体,经酶切和测序验证与目的序列完全一致。通过荧光素酶报告基因实验和 CHIP 实验证实 NF- κ B 可结合 SIGIRR 启动子区域,调控 SIGIRR 表达。结论 HKC 细胞中 SIGIRR 可以影响 NF- κ B 的活化,活化的 NF- κ B 可以结合到 SIGIRR 的启动子区域,调

控 SIGIRR 的基因表达变化,形成一个反馈体系,控制 NF- κ B 的过度活化。

关键词 人肾小管上皮细胞; TLR 样受体; 核转录因子; 单免疫球蛋白白介素1受体相关蛋白

中图分类号 R 692.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0358-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.003

在肾脏疾病中,炎症信号通路持续活化被认为是导致肾功能损害的重要因素,抑制炎症信号通路活化可减少肾脏纤维化发生,延缓慢性肾脏进展^[1],研究^[2-3]表明 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)可以识别炎症,激活下游信号传递,发生相应生物学反应,其中核转录因子 NF- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)被认为是 TLR 诱导反应的主要调控因子。TLR 活化后能及时激活机体的免疫系统抵御和清除病原体,但是过度激活导致抗炎与致炎的失衡,引起机体损伤^[4]。为了保持机体的免疫平衡,体内必然存在 TLR 信号通路的调节剂来维持其活化与抑制间的平衡,保证机体免疫反应的适度 and 稳定^[5]。研究^[6]表明广泛表达在肾小管上皮细胞、消化道和肺等器官组织的单免疫球蛋白白介素1受体相关蛋白(single immunoglobulin interleukin-1-related receptor, SIGIRR),对 TLR 信号通路具有负调控作用,但是哪种机制调控 SIGIRR 的表达,目前尚缺乏研究。该课题组前期研究^[7-8]表明在人肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cells, HKC)内 SIGIRR 可以调控白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 诱导的 NF- κ B 的活化,并且活化的 NF- κ B 反过来又可以影响 SIGIRR 蛋白的表达,但是活化的 NF- κ B 影响 SIGIRR 蛋白表达的具体分子机制未能阐明,为了阐明其分子机制,在 HKC 细胞中通过荧光素酶报告基因实验和染色质免疫沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)验证 NF- κ B 可结合 SIGIRR 的启动序列并调控 SIGIRR 基因水平的表达,为 NF- κ B 调节 SIGIRR 蛋白的表达提供理论依据。

2023-02-17 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2008085MH244);安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金面上孵育计划项目(编号:2020GMFY04);安徽医科大学第二附属医院临床研究培育计划项目(编号:2020LCZD01);安徽医科大学校科学研究基金(编号:2019xkj140)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院肾脏内科,合肥 230601

²安徽医科大学第三附属医院肾脏内科,合肥 230001

作者简介:蒋克国,男,副主任医师,博士研究生;

王德光,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wangdeguang@ahmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌株与载体 HKC 细胞、PT67 细胞和 293T 细胞为安徽医科大学基础医学院生物化学实验室保存。HKC/shp65 和 HKC/shSc 细胞系为安徽医科大学基础医学院生物化学实验室先前构建。Top10 感受态菌株购自北京天根生化科技有限公司。人 SIGIRR cDNA 由厦门大学韩家淮院士赠送。GV248-GFP-Puro-shSc、GV248-GFP-Puro-shp65、pLNCX2-G418 和 pGL3-basic 质粒为安徽医科大学基础医学院生物化学实验室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 兔抗 SIGIRR 抗体购自美国 OriGene 公司,鼠抗 p-P65 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,鼠抗 Lamin B1 抗体和鼠抗 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司。IL-1 β 购自美国 Peprotech 公司, Polybrene 购自美国 Millipore 公司, G418 和 LipofectamineTM3000 购自美国 Life technologies 公司。DMEM/F12、DMEM/高糖培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。RevertAidTM First Stand cDNA Synthesis Kit 购自加拿大 Fermentas 公司。NF- κ B 抑制剂 BAY-117082 和细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。Wizard[®] 基因组 DNA 试剂盒 A112 和荧光素酶检测系统 E1500 购自美国 Promega 公司。Bgl II、Xho I、KpnI、Dpn I、Pyrobest DNA Polymerase、Prime STAR[®] HS DNA Polymerase 和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 购自大连宝生物工程有限公司。SimpleChIP[®] Enzymatic Chromatin IP Kit (Agarose Beads) #9002 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。水平电泳槽和垂直电泳槽购自北京六一仪器厂。CO₂ 细胞组织培养箱购自日本三洋电机公司。荧光倒置显微镜购自意大利 Optika 公司。荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司(ABI)。Glo-Max[®] 20/20 发光检测仪购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HKC 细胞培养条件为含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 293T、PT67 细胞培养条件为含 10% 胎牛血清 DMEM/高糖培养基。所有细胞均在 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中培养, 当细胞在对数生长期, 状态良好并且密度达到 80% 左右时, 使用 0.25% 的胰蛋白酶消化后, 进行

传代、冻存或其他实验。

1.2.2 SIGIRR 过表达 HKC 细胞系构建 设计含有 Bgl II、Xho I 酶切位点的引物, F: 5'-CCGCTC GAGATGCCAGGTGTCTGTG-3', R: 5'-GGAAGATCT CTACATATCATCCTTGGACACCA-3', PCR 扩增 SIGIRR cDNA 经 Bgl II、Xho I 双酶切、纯化回收后连接至逆转录病毒载体 pLNCX2-G418, 形成重组体转入感受态细胞 Top10, 挑取阳性克隆扩增后制备质粒, 经 Bgl II、Xho I 酶切验证后并测序, 提示正确后命名为: pLNCX2-G418-SIGIRR。LipofectamineTM3000 脂质法分别将适量的空载体 pLNCX2-G418 与重组体 pLNCX2-G418-SIGIRR 转染 PT67 细胞培养 8 h 后更换含 10% 血清的 DMEM/高糖培养基继续培养, 收集上清液 1 500 r/min 离心 5 min, 0.45 μ m 的滤膜过滤, 加入至状态良好的 HKC 细胞, 同时加入 Polybrene 至终浓度为 6 μ g/ml。6 h 后更换完全培养基, 后加入含有 G418 至终浓度 600 μ g/ml 的培养基继续培养, 直至单克隆细胞群形成, 经实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和 Western blot 验证 SIGIRR 过表达 HKC 实验组细胞系和对照组细胞系构建成功, 命名为: HKC/SIGIRR 和 HKC/Co。

1.2.3 NF- κ B 与 SIGIRR 启动子区结合在线预测 通过 <http://www.ensembl.org/index.html> 查找 SIGIRR 第 1 个外显子位置, 随后在 <http://genome.ucsc.edu/> 获得 SIGIRR 的启动子基因的 DNA 序列, 最后于 <http://bip.weizmann.ac.il/> 网站预测查找 NF- κ B 的结合位点, 所得信息用于实验。

1.2.4 pGL3-Luc-SIGIRR 启动子载体构建和结合位点突变 使用 Wizard[®] 基因组 DNA 纯化试剂盒 A1120 从 293T 细胞中按照操作说明提取人基因组 DNA。两步法扩增目的片段, 首先使用完全匹配引物, F: 5'-AGCCCACCCCACCCCACACTCCTCTC-3', R: 5'-CGCCCACTTTCCTCCCTTCCCCCAGC-3', Prime STAR[®] HS DNA Polymerase 扩增 SIGIRR 启动子序列, 经凝胶电泳切胶回收后的 DNA 为模板, 使用含有 KpnI/XhoI 酶切位点引物, F: 5'-CGGGGTACCCA AGGGCTACGTCAACCAC-3', R: 5'-CCGCTCGAGGA CAAGCAGCGCCCCGG-3', 所得产物经电泳、切胶回收、KpnI/XhoI 双酶切, 切胶回收后连接到 pGL3-Basic 载体形成重组体, 转入 Top10 感受态菌株, 扩增, 提取质粒, 酶切验证和测序验证后命名为: pGL3-

Luc-SIGIRR(wt) ,并进行除菌处理后备用。

设计引物对 NF- κ B 与 SIGIRR 预测结合位点序列突变,预测结合位点 1(PBR1) 5'-AGGAATCCCC-3'(-842 ~ -852) 突变为: 5'-AGGAATCTAT-3', 突变位点 1 引物 F: 5'-CCATGTGGGGCCGAGGAATCTATTGTATGTTTCAGGGCTGTG-3', 突变位点 1 引物 R: 5'-CACAGCCCTGAACATACAATAGATTCCTGCGGCCCCACATGG-3', 所得新重组体命名为 pGL3-Luc-SIGIRR-mutation 1(mt1) 。预测结合位点 2(PBR2) 5'-GGAATCCCCATCC-3'(-1472 ~ -1486) 突变为: 5'-GGAATCTATATCC-3', 突变位点 2 引物 F: 5'-GCAGGTTTGGAACTCTATATCCCCCAAGAATGCCCTCTGAACTCC-3', 突变位点 2 引物 R: 5'-GGAGTTCAGAGGGCATTCTTGGGGATATAGAGTTCCAAACCTGC-3', 所得新重组体命名为 pGL3-Luc-SIGIRR-mutation 2(mt2) 。以 pGL3-Luc-SIGIRR-mutation 1 为模板, 再次使用构建突变载体 pGL3-Luc-SIGIRR-mutation 2 的引物构建两个结合位点同时突变的载体, 所得新重组体命名为 pGL3-Luc-SIGIRR-mutation 3(mt3) 。

1.2.5 细胞总 RNA 提取、逆转录和 qRT-PCR 检测

根据柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒提取实验细胞总 RNA, 测定其浓度和 D_{260}/D_{280} 比值, 使用 RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 对 RNA 进行反转录成总 cDNA 备用。利用 SYBR® Premix Ex Taq™ 进行 qRT-PCR 检测, 反应体系为 20 μ l, 每组样品设置 3 个重复, 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。目标基因 SIGIRR 引物 F: 5'-CTCCC-CGTCTGAAGACCAG-3', R: 5'-CCCAATTCCCAAT-GGAAGC-3'。

1.2.6 细胞总蛋白、核蛋白提取及 Western blot 实验

收集细胞总蛋白前, PBS 清洗 2 次, 加入细胞裂解液在冰上裂解 30 min, 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 制备细胞总蛋白样品。细胞核蛋白提取按照抽提试剂盒说明操作。Western blot 采用 NuPAGE 10% Bis-Tris GEL 1.5 mm \times 10 Well 分离胶电泳分离细胞总蛋白, 湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜后, 将其置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中, 室温摇床上封闭 45 min。根据目标蛋白不同分子量大小切取 PVDF 膜条带置于按要求稀释的一抗中, 4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜。次日将 TBST 洗脱后的 PVDF 膜条带再置于稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗中, 室温孵育 5 h 后, TBST 洗脱, 暗室中超敏 X 胶片曝光显示结果,

灰度扫描分析软件计算各区带密度值。

1.2.7 细胞免疫荧光分析

PBS 洗涤处理后的细胞 4% 多聚甲醛室温固定, 含 0.1% TritonX-100 的 PBS 室温透化 10 min, 含 3% 马血清封闭液室温下封闭 30 min, 弃封闭液, 加稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤, 加二抗室温避光孵育再次洗涤后, 加入 DAPI 染核洗涤后, 加入少量 PBS, 荧光显微镜下观察。

1.2.8 荧光素酶报告基因实验

将对数生长期的 293T 细胞, 接种于 12 孔板, 密度达到 50%, 次日按照 Lipofectamine™ 3000 说明, 分别将 pGL3-Basic(对照)、wt、mt1、mt2、mt3 转入。12 h 后传上述各组细胞至 96 孔板, 调整每孔细胞数约 1×10^4 个, 每组细胞设 4 个复孔, 按照实验设计加入药物和(或) 转入载体 GV248-GFP-Puro-shSc 或 GV248-GFP-Puro-shp65, 24 h 后收集样品。按照荧光素酶检测系统 E1500 操作说明进行检测, 在 GloMax® 20/20 发光检测仪荧光素酶测量仪(Promega) 读取数据, 分析结果。

1.2.9 染色体免疫共沉淀实验

采用 CHIP 方法验证 NF- κ B 结合于 SIGIRR 启动子区, 调控 SIGIRR 的表达, 根据 SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Agarose Beads) #9002 试剂盒说明书操作, 简要过程如下: 甲醛使 HKC 细胞体内蛋白与 DNA 交联、核染色质的分离。微球核酸酶消化染色质、超声破碎核膜, 凝胶电泳分析染色质酶切情况和测量 DNA 浓度, 根据试剂盒说明和 DNA 浓度配制染色质免疫沉淀, 反应结束后漂洗染色质, 从抗体/蛋白 G 微球上洗脱并解交联, 再经用离心柱纯化, 获得的 DNA 样本, 使用相应引物, 结合位点 1(PBR1) 引物, F: 5'-GAGGGGTGCTGTGAGAAGGCTGTG-3', R: 5'-AAGCCTGAGAGCCCCACAAAGAC-3'; 结合位点 2(PBR2) 引物, F: 5'-CCTCAAGGCTACGTCAACCACAG-3', R: 5'-GGTCAGGGGTCAGGAGTTCAGAGG-3', 对照(NBR) 引物, F: 5'-ACCCCTCCCTGATCTCTCCTGTCTG-3', R: 5'-CGGCACTCACGGGACCAGGTACTC-3', qRT-PCR 扩增后获得结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建 pLNCX2-G418-SIGIRR 逆转录病毒载体和 SIGIRR 过表达 HKC 细胞系

根据实验设计

将 SIGIRR cDNA 连接至 pLNCX2-G418 形成重组体 (图 1A) 转化 Top10 感受态细胞后, 克隆扩增, 菌液 PCR (图 1B)、质粒双酶切 (图 1C) 和测序 (图 1D) 表明插入片段序列正确, 提示成功构建 pLNCX2-G418-SIGIRR 逆转录病毒载体。空载体 pLNCX2-G418 与重组体 pLNCX2-G418-SIGIRR 逆转录病毒分别经 PT67 细胞包装后感染 HKC, G418 筛选后, 形成单克隆细胞群, 提取细胞总 RNA 和总蛋白, qRT-PCR (图 1E) 和 Western blot (图 1F) 分析 HKC/SIGIRR 组和 HKC/Co 组, SIGIRR 表达在 mRNA 和蛋白水平的表达差异有统计学意义 ($F = 3.687$, $F = 1.458$), 提示成功构建 SIGIRR 过表达 HKC 的实验组细胞系和对

照组细胞系。

2.2 SIGIRR 影响 NF- κ B 的激活 Western blot 分析 IL-1 β 诱导的 HKC/SIGIRR 组和 HKC/Co 组细胞的核蛋白, 显示过表达 SIGIRR 可减少 NF- κ B (p65) 的磷酸化 (图 2A), 差异有统计学意义 ($F = 15.82$)。免疫荧光分析经 IL-1 β 诱导的 HKC 组细胞加或不加 BAY-117082 处理后的 SIGIRR 蛋白表达, 结果显示加入 BAY-117082 处理组细胞 SIGIRR 表达下降 (图 2B)。在加入 IL-1 β 诱导的 HKC/shp65 组细胞和 HKC/shSc 对照细胞中免疫荧光检测得到同样的结果 (图 2C)。研究表明 SIGIRR 和 NF- κ B 存在调节和反馈调节通路。

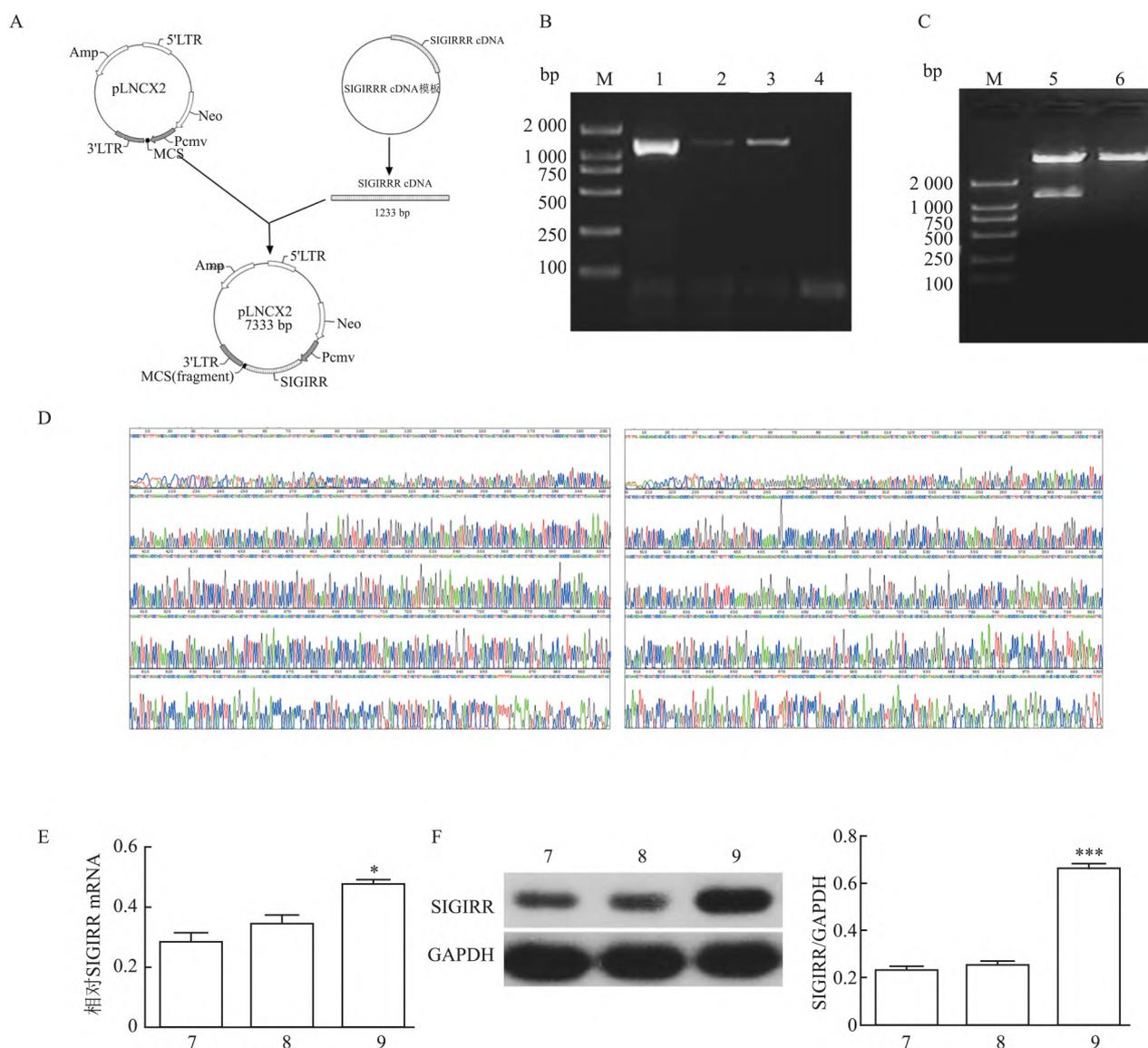


图 1 构建 pLNCX2-G418-SIGIRR 载体和 HKC/SIGIRR 细胞系

A: pLNCX2-G418-SIGIRR 载体构建示意图; B: 菌液 PCR 验证; C: 双酶切鉴定; D: 重组体测序图; E: qRT-PCR 分析 SIGIRR mRNA 表达; F: Western blot 分析 SIGIRR 蛋白表达; 1: 阳性对照组; 2~3: 重组体组; 4: 对照组; 5: 重组体双酶切组; 6: 空载体双酶切组; 7: HKC 组; 8: HKC/Co 组; 9: HKC/SIGIRR 组; 与 HKC 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

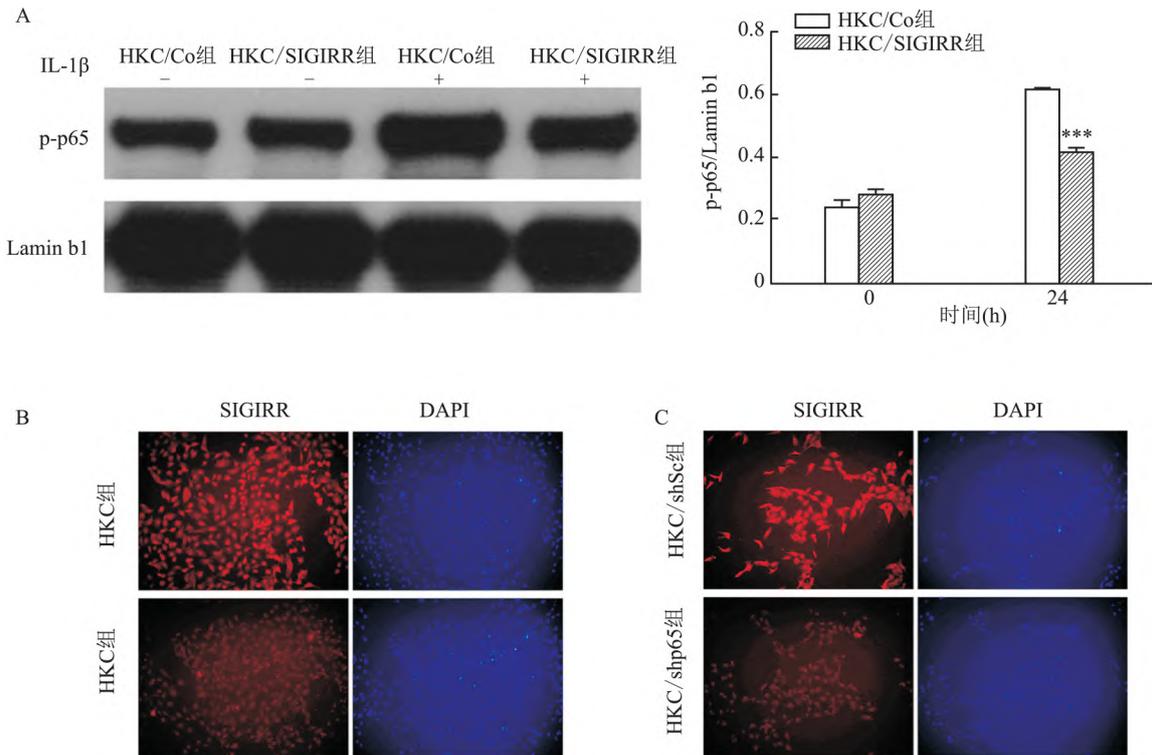


图2 NF-κB 与 SIGIRR 互为调节

A: Western blot 分析 IL-1β 处理或未处理的 HKC/Co 组和 HKC/SIGIRR 组细胞内 p-p65 和 Lamin b1 表达; B: 免疫荧光法分析 BAY 11-7082 处理或未处理 HKC 细胞后 SIGIRR 表达 ×100; C: 免疫荧光法分析 IL-1β 处理的 HKC/shp65 组和 HKC/shSc 组细胞内 SIGIRR 表达 ×100; 与 HKC/Co 组比较: *** $P < 0.001$

2.3 构建 pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶载体及突变载体 经在线分析显示 SIGIRR 的第 1 个外显子位置为: Chromosome 11: 417 397 ~ 417 325 在第 1 个外显子位置的上游 DNA 序列中, -342 ~ -352 和 -1 472 ~ -1 456 存在距离第 1 个外显子最近的 2 个 NF-κB 结合位点, 分别命名为 PBR1 和 PBR2, NBR 为 NF-κB 距离 PBR2 上游 900 bp 和下一结合位点下游 900 bp 之间无结合序列(图 3 A)。构建 pGL3-Luc-SIGIRR 重组体双酶切验证(图 3B), 测序验证后与目的 DNA 比对完全正确, 提示成功构建 pGL3-Luc-SIGIRR(wt) 荧光素酶载体, 随后设计定点突变(图 3A、C), 使 NF-κB 不能结合于 SIGIRR 启动子区, 所获得 3 个突变株经双酶切(图 3D)及测序验证(图 3E), 提示成功构建 pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶突变载体(mt1、mt2、mt3)。

2.4 在基因水平上验证 NF-κB 调控 SIGIRR 表达 pGL3-Luc-SIGIRR 载体或突变载体转染 293T 细胞后, 予以 IL-1β 诱导处理, 经荧光素酶仪器测定, 相比 pGL3-Luc-SIGIRR 对 PBR1 位点突变后可以减少荧光素酶活性, 而对 PBR2 突变、PBR2 和 PBR1

同时突变后荧光素酶活性下降更明显($F = 4.214$ 、 1.176 、 3.890) (图 4A)。pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶载体转染 293T 细胞后经 IL-1β 处理后再加入 BAY11-7082 或 DMSO, 经荧光素酶活性检测显示, 加入 BAY11-7082 组相比对照组活性下降($F = 1.067$) (图 4B)。pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶载体转染 293T 细胞与 GV248-GFP-Puro-shSc(shSc) 或 GV248-GFP-Puro-shp65(shp65) 共转染细胞并加入 IL-1β 诱导处理, 经荧光素酶活性检测显示, shp65 实验组相比 shSc 对照组活性下降($F = 4.929$) (图 4C)。该实验提示 NF-κB 可结合在 SIGIRR 启动子区域调控 SIGIRR 基因水平上表达。

野生型 HKC 细胞大量培养后, 加入 IL-1β 诱导处理后再经 BAY11-7082 或 DMSO 处理后, 经 CHIP 实验后, qRT-PCR 分析结果显示 NF-κB(p65) 可以结合至 SIGIRR 启动子区, 且 PBR2 结合量大于 PBR1($F = 1.686$ 、 1.372) (图 4D)。在稳定干涉 p65 表达的 HKC 细胞中得到同样结果($F = 1.078$ 、 2.344) (图 4E)。结果显示, NF-κB(p65) 活化后可结合于 SIGIRR 启动子区并调控 SIGIRR 的表达, 形

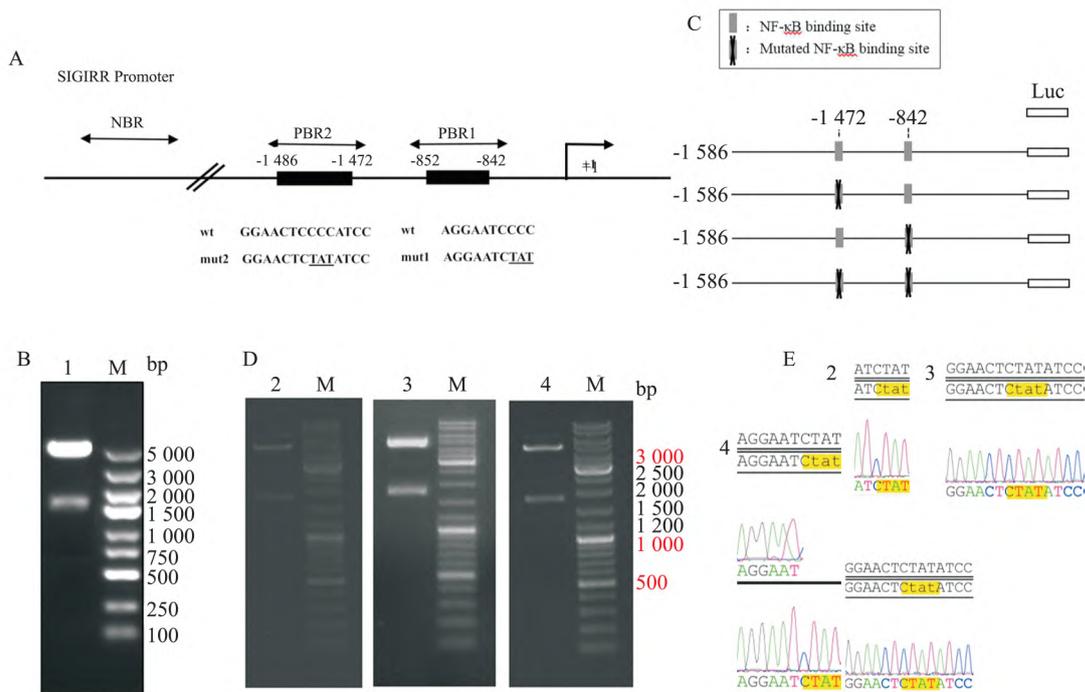


图3 pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶载体及突变载体

A: 在线预测结合位点和突变示意图; B: pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶载体双酶切鉴定; C: pGL3-Luc-SIGIRR 荧光素酶载体突变示意图; D: 突变载体双酶切验证; E: 突变载体测序验证; 1: wt 组; 2: mut1 组; 3: mut2 组; 4: mut3 组

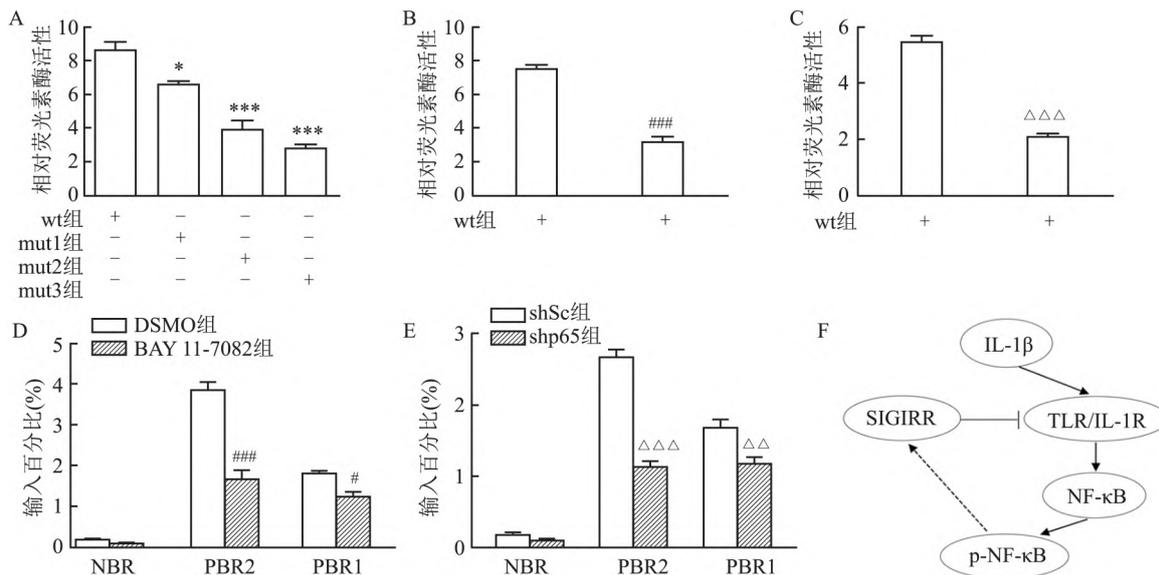


图4 荧光素酶报告基因和 CHIP 实验

A、B、C: 荧光素酶报告基因分析; D、E: qRT-PCR 分析 CHIP 结果; F: NF-κB 反馈调控 SIGIRR 通路示意图; 与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 DMSO 组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; 与共转 shSc 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

成一个反馈系统(图4F)。

3 讨论

肾脏在病理状态下可以产生各种炎症因子,这

些因子又可通过旁分泌和自分泌方式使炎症效应不断扩大,引起炎症级联反应,持续的炎症并导致进行性肾小管萎缩和肾功能恶化,最终导致肾小球硬化及肾小管间质纤维化引起终末期肾病,TLR 信号通

路参与该肾脏病变的过程^[9]。TLR 激活后激活下一步信号传导,诱发特定的转录反应,其中转录因子 NF- κ B 被认为是 TLR 诱导反应的主要调控因子。在该研究中也显示经过细胞因子 IL-1 β 诱导处理的 HKC 后,NF- κ B 可明显激活。

肾脏内各种组织细胞和经血液循环浸入的血液免疫细胞均存在 NF- κ B 的转录调控,在肾疾病的发病中许多的因素诱导 NF- κ B 活化,参与调控炎症介质及细胞因子的产生^[10]。虽然快速诱导 NF- κ B 在宿主对病原体的反应中至关重要,但关闭可能具有破坏性的基因表达的能力也同样重要。研究^[1,11]表明当抑制 NF- κ B 信号通路的激活,可以抑制肾小管上皮细胞成纤维细胞的生成,发挥抗纤维化作用保护肾功能。因此,为了保持机体的免疫平衡,体内必然存在天然的调节剂保证机体免疫反应的适度和稳定,研究^[7-8]表明 SIGIRR 可以调控 NF- κ B 的激活从而控制炎症反应。该研究结果显示在 HKC 细胞内过表达 SIGIRR 后,可明显抑制 NF- κ B 的活化,进一步得到同样的结果。

SIGIRR 早年被发现和命名,脊椎动物之间的 SIGIRR 表达高度保守,SIGIRR 的表达具有组织特异性,主要表达在上皮样组分的组织器官^[6]。SIGIRR 的表达同样存在细胞特异性,主要表达在肾脏组织中的肾小管上皮细胞,并且 SIGIRR 在某些疾病中出现表达上调、下降或动态变化^[12-13],但是何种机制调控 SIGIRR 的表达,目前研究尚未完全阐明,研究^[14]已经表明 SIGIRR 的表达出现差异可能与转录因子 SP1 调节相关。该研究通过数据分析和细胞学上验证,在 HKC 细胞中,NF- κ B 可调控 SIGIRR 基因表达,为 SIGIRR 的表达调控找到新的位点。

该研究表明 SIGIRR 可以影响 NF- κ B 的激活,活化的 NF- κ B 可以结合到 SIGIRR 的启动子区域,调控 SIGIRR 基因的表达变化,结合既往课题组研究^[7-8]蛋白水平上的变化,提示 NF- κ B-SIGIRR 之间形成一个反馈体系,控制 NF- κ B 的过度活化,防止炎症的过度,使机体达到平衡状态,避免持续处于致炎状态。

参考文献

[1] Wang M, Xu H, Chong Lee Shin O L, et al. Compound alpha-ke-

- to acid tablet supplementation alleviates chronic kidney disease progression *via* inhibition of the NF- κ B and MAPK pathways [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 122.
- [2] Anwar M A, Shah M, Kim J, et al. Recent clinical trends in toll-like receptor targeting therapeutics [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(3): 1053-90.
- [3] Carmody R J, Chen Y H. Nuclear factor- κ B: activation and regulation during toll-like receptor signaling [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(1): 31-41.
- [4] Zhang Y, Liu J, Wang C, et al. Toll-Like receptors gene polymorphisms in autoimmune disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 672346.
- [5] Liew F Y, Xu D, Brint E K, et al. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(6): 446-58.
- [6] Thomassen E, Renshaw B R, Sims J E. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily [J]. *Cytokine*, 1999, 11(6): 389-99.
- [7] Jiang K, Zhang Y, He F, et al. A negative feedback loop involving NF- κ B/TIR8 regulates IL-1 β -induced epithelial-myofibroblast transdifferentiation in human tubular cells [J]. *J Cell Commun Signal*, 2021, 15(3): 393-403.
- [8] 蒋克国,王德光,周海胜,等. 稳定敲低 SIGIRR 的人肾小管上皮细胞的构建及其初步功能的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015(2): 129-34, 135.
- [9] Andrade-Oliveira V, Foresto-Neto O, Watanabe I K M, et al. Inflammation in renal diseases: new and old players [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1192.
- [10] Tamada S, Asai T, Kuwabara N, et al. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: the role of nuclear factor κ B activation in the development of renal fibrosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(1): 17-21.
- [11] Liu X, Zhang X, Cai X, et al. Effects of curcumin on high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells through the TLR4-NF- κ B signaling pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 929-40.
- [12] Kadota C, Ishihara S, Aziz M M, et al. Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in intestinal epithelial cells during inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 162(2): 348-61.
- [13] Mantione M E, Sana I, Vilia M G, et al. SIGIRR downregulation and interleukin-1 signaling intrinsic to renal cell carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 894413.
- [14] Ueno-Shuto K, Kato K, Tasaki Y, et al. Lipopolysaccharide decreases single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related molecule (SIGIRR) expression by suppressing specificity protein 1 (Sp1) *via* the toll-like receptor 4 (TLR4)-p38 pathway in monocytes and neutrophils [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(26): 18097-109.

Regulation of SIGIRR expression mechanism in human renal tubular epithelial cells by nuclear transcription factor NF- κ B

Jiang Keguo^{1,2} Zhu Li¹ Zhao Wenman¹ Shi Rui¹ Wang Deguang¹

(¹Dept of Nephrology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Nephrology, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the molecular mechanisms underlying the feedback regulation of single immunoglobulin interleukin-1 related receptor (SIGIRR) expression by the nuclear factor kappa- κ B (NF- κ B) in human renal tubular epithelial cells (HKC). **Methods** The pLNCX2-G418-SIGIRR overexpression vector was constructed by molecular cloning, and the SIGIRR overexpression cells and control cells were constructed by infecting HKC cells after packaging with PT67 cells. Using IL-1 β induction, Western blot verified that overexpression of SIGIRR inhibited NF- κ B activation. After using NF- κ B blocker and interfering with NF- κ B activity, immunofluorescence assay verified that activated NF- κ B regulated SIGIRR expression. Online tools predicted the presence of NF- κ B binding sites in the SIGIRR promoter region. The SIGIRR promoter sequence containing the binding site was obtained from within human genomic DNA by molecular cloning, ligated to the luciferase vector pGL3-Luc, constructed pGL3-Luc-SIGIRR, and mutated the binding site. The luciferase reporter gene assay and chromatin immunoprecipitation technique (ChIP) were used to jointly verify that activated NF- κ B could bind to the SIGIRR promoter region to regulate SIGIRR gene expression. **Results** The results showed that the constructed pLNCX2-G418-SIGIRR retroviral vector was verified by enzymatic digestion and sequencing to be identical to the coding sequence of the SIGIRR gene for comparison, the recombinant and control vectors were transferred into HKC cells after viral packaging, and the HKC/SIGIRR experimental and HKC/Co control cell lines were successfully constructed at the mRNA and protein levels of SIGIRR expression differences were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Overexpression of SIGIRR cell groups reduced IL-1 β -induced NF- κ B activation compared to control cells ($P < 0.001$). SIGIRR expression was downregulated after inhibition of NF- κ B activation and interference with NF- κ B expression. After extracting human genomic DNA, the SIGIRR target promoter sequence was obtained by molecular cloning method and linked to the vector, and the pGL3-Luc-SIGIRR luciferase vector was successfully constructed and targeted to mutate the vector, which was verified to be identical to the target sequence by digestion and sequencing. The luciferase reporter gene assay and CHIP assay confirmed that NF- κ B could bind to SIGIRR promoter region and regulate SIGIRR expression. **Conclusion** It has been verified that SIGIRR can influence the activation of NF- κ B in HKC cells, and activated NF- κ B can bind to the promoter region of SIGIRR and regulate the gene expression changes of SIGIRR, forming a feedback system to control the over-activation of NF- κ B.

Key words human renal tubular epithelial cells; Toll-like receptor; nuclear transcription factor; single immunoglobulin interleukin-1 receptor-related protein