

血清外泌体 miR-30d-5p 靶向 RHOB 在三氯乙烯药疹样皮炎中的作用

蔡曙阳¹, 王 慧^{2,3}, 张雪松¹, 左绪磊¹, 马金茹¹, 洪依婷¹, 吴奇峰⁴, 朱启星^{1,2,3}

摘要 目的 检测三氯乙烯药疹样皮炎(OMDT)患者血清外泌体中 miR-30d-5p 的表达水平及其与肝功能的相关性,再对 miR-30d-5p 进行生信分析并验证下游靶基因 RHOB。方法 收集 6 例 OMDT 患者和 6 例健康对照者血清样本提取血清外泌体。透射电镜、纳米粒子跟踪分析以及 Western blot 法对外泌体进行鉴定后提取 miRNA,检测其中 miR-30d-5p 表达水平并与肝功能作相关性分析,用 miRWalk 及 miRDB 数据库预测 miR-30d-5p 的靶基因,进行功能聚类和途径富集分析,最后通过双荧光素酶报告基因实验验证靶基因 RHOB。结果 6 例 OMDT 患者在发病高峰期时血清外泌体中 miR-30d-5p 表达水平明显降低($P < 0.05$),并且与肝功能指标丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、 γ -谷氨酰胺基转移酶水平均呈负相关(相关系数分别为: $r_s = -0.943, P = 0.005; r_s = -0.886, P = 0.019; r_s = -0.886, P = 0.019$)。生信分析及双荧光素酶报告基因实验显示 RHOB 是 miR-30d-5p 的直接靶基因。结论 OMDT 患者血清外泌体 miR-30d-5p 表达降低,与肝功能指标呈负相关,并且可能通过靶向 RHOB 参与三氯乙烯所致肝损伤过程。

关键词 三氯乙烯;外泌体;miR-30d-5p;RHOB

中图分类号 R 135.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)05-0718-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.003

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是一种工业上常用的有机溶剂,在 TCE 接触的职业工人中,少部分可出现类似于药疹样皮炎的皮肤大面积表皮坏死和剥脱,临床上称为三氯乙烯药疹样皮炎(occupa-

tional dermatitis medicamentosa-like of trichloroethylene, OMDT)^[1]。除了皮肤损伤外,部分 OMDT 患者还伴有严重的肝功能异常,因此,开展 TCE 引起的肝脏损伤及其机制研究,具有重大的职业卫生意义。

目前,OMDT 通常被认为是一种由 T 淋巴细胞介导的 IV 型变态反应为主的复合免疫反应^[2],早些研究发现多种免疫细胞可以分泌外泌体,如巨噬细胞^[3]、树突状细胞^[4]和 NK 细胞^[5],这些外泌体广泛存在于血液、尿液和唾液等体液中^[6],参与免疫细胞间的通信作用。外泌体中 miR-30d-5p 被发现参与多种免疫反应,如非分型流感嗜血杆菌引起的急性中耳炎^[7]、布氏弧杆菌引起的胃肠炎^[8]等,但是在 TCE 引起的免疫性肝脏损伤中 miR-30d-5p 是否发挥作用还尚不明确。因此,该研究旨在探索 OMDT 患者肝脏损伤机制中 miR-30d-5p 的作用及可能参与的生物信息学过程。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2020 年广东省职业病防治院收治的 OMDT 患者 6 例,所有病例均按照 GBZ 185—2006《职业性三氯乙烯药疹样皮炎诊断标准》进行诊断^[9]。纳入标准:①有明确的 TCE 接触史;②出现以皮疹、发热、肝功能损害和浅表淋巴结肿大等临床表现;③既往身体健康,无药物、食物过敏史。排除标准:①有激素用药史或肝毒性药物使用史;②有肝病家族史;③发病前接触其他明确的职业危害因素。另在安徽医科大学附属医院收集肝功能正常的健康志愿者 6 例,与患者按照年龄(± 3 岁)和性别 1:1 匹配。患者肝功能指标结果由住院病历中的检测报告单获得。本研究经安徽医科大学第一附属医院临床医学研究伦理委员会审核批准(批准号:5101302),所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 血清外泌体提取试剂盒、miRNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司);miRNA 反转录试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];Mix 溶液(瑞士 Roche 公司);HSP-70 抗体、Flotillin-1 抗体、CD9 抗体(英国 Abcam 公司);RIPA 裂解缓冲

2022-12-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82173494,81874259)

作者单位:¹安徽医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生学系,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院皮肤病研究所,合肥 230022

³安徽医科大学国家教育部皮肤病学重点实验室,合肥 230022

⁴广东省职业病防治院,广州 510000

作者简介:蔡曙阳,男,硕士研究生;

朱启星,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:zqxing@yeah.net

液、PMSF 蛋白酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司);PVDF 膜、Western blot 发光液试剂盒(德国 GE Healthcare 公司);miR-30d-5p mimics、miR-NC mimics、野生和突变 RHOB 质粒、转染试剂(上海吉玛制药技术有限公司);HEK-293T 细胞由安徽医科大学基础医学院赠予;DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、100 U/ml 青霉素(美国 Gibico 公司)。聚合酶链式反应 PCR 仪(瑞士 Roche 公司, Light Cycler 96);纳米颗粒跟踪分析仪(德国 Particle Metrix 公司, PMX-120);透射电子显微镜(美国 Thermo Scientific 公司, Talos L120C G2);Western blot 全自动化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司, Chemiscope 6000 Touch);微孔板发光检测仪(美国 Promega 公司, GloMax96)。

1.3 血清收集与外泌体提取 用含有促凝剂的采血管收集新鲜全血,室温静置 5 min 后以 3 000 r/min 离心 15 min,将上层血清分装置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。取 2 ml 血清样本,按照血清外泌体提取试剂盒说明书进行操作,首先将溶解后的血清用 0.22 μm 过滤器过滤,与缓冲液 XBP 等体积混合,2 000 r/min 离心 1 min,之后加入 3.5 ml 的缓冲液 XWP,12 000 r/min 离心 5 min,最后加入 400 μl 的缓冲液 XE,2 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 溶液重悬收集外泌体。

1.4 外泌体鉴定

1.4.1 透射电子显微镜观察 将收集的外泌体用 200 μl 的 PBS 溶液重悬后滴至洁净封口膜上,然后用镊子夹取一枚载网置于外泌体液滴上,悬浮 10 min,用滤纸缓慢吸干;后转移载网到 2.5% 戊二醛液滴上,悬浮 5 min,用滤纸吸干;最后将载网转移到去离子水液滴上漂洗 10 次,每次 2 min,漂洗完毕后用滤纸吸干,转移载网到 40 g/L 乙酸双氧铀液滴上染色 10 min,滤纸吸干后转移载网到 10 g/L 甲基纤维素液滴上染色 5 min,滤纸吸干液体后室温静置干燥 10 min,放入样品架电镜下观察记录。

1.4.2 纳米颗粒跟踪分析 首先用去离子水清洗机器样本池,然后以聚苯乙烯微球(100 nm)标准品对机器进行校准,再使用 1 \times PBS 溶液清洗机器样本池。准备工作完成后将外泌体样本用 PBS 溶液稀释至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,用注射器注入纳米颗粒跟踪分析仪,每个样本重复测量 3 次,软件会对样本里颗粒的运动特征进行记录,同时加以分析后会得到粒径-浓度分布图数据,可以检测外泌体样品的粒径大

小。

1.4.3 Western blot 法检测外泌体标志蛋白 提取外泌体样品蛋白并定量,然后使用 SDS-PAGE 进行电泳分离,200 mA 转膜 3 h,将 PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h。之后将膜与 HSP-70(1 : 1 000)、Flotillin-1(1 : 1 000)、CD9(1 : 1 000)抗体一起置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第 2 天,将膜在含有 0.05% Tween-20 的 TBST 中洗涤 3 次,每次 10 min,然后与山羊抗兔 IgG 抗体或山羊抗鼠 IgG 抗体(1 : 5 000)一起室温孵育 2 h。将膜在含有 0.05% Tween-20 的 TBST 中洗涤 3 次,每次 10 min,用 ECL 检测试剂盒进行显影。

1.5 外泌体 RNA 提取与 qRT-PCR 检测 使用外泌体 RNA 纯化试剂盒提取血清外泌体中包含 miRNA 的总 RNA,采用加尾法逆转录为 cDNA。于 PCR 仪中进行扩增,扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后以 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 循环 45 次。所得结果使用比较循环阈值($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)法分析,以 miR-16 作为内参基因,计算 miR-30d-5p 的相对表达量,每个样本重复检测 3 次。引物序列:miR-16(F):GC-TAGCAGCACGTAAATATTGGCG; miR-30d-5p(F):TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG;通用引物(R):CGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC。

1.6 细胞培养与双荧光素酶报告基因实验验证

将 HEK-293T 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中常规培养。使用购买的 RHOB 质粒与 miR-30d-5p(miR-NC)模拟物进行实验。取对数生长期的 HEK-293T 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板上,根据说明书进行操作,分别将配套的转染试剂与 miR-NC 模拟物、miR-30d-5p 模拟物、野生型 RHOB 质粒、突变型 RHOB 质粒等共同加入细胞,随机分为 4 组:野生型 + miR-30d-5p 组(共转染野生型质粒和 miR-30d-5p 模拟物)、野生型 + miR-NC 组(共转染野生型质粒和 miR-NC 模拟物)、突变型 + miR-30d-5p 组(共转染突变型质粒和 miR-30d-5p 模拟物)、突变型 + miR-NC 组(共转染突变型质粒和 miR-NC 模拟物),6 h 后弃去换成新的培养基,再过 12 h 左右完成转染过程,此时检测各组中萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性。

1.7 生物信息学分析 采用功能聚类(gene ontology, GO)数据库对基因产物的属性进行分析,它包含三大类:生物学过程(biological process, BP);细胞组分(cellular component, CC);分子功能(molecular

function, MF)。在 Gene Ontology 中输入 miR-30d-5p, 并选择物种为人类, 检索后得到富集结果。途径富集 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 是分析基因功能、联系基因组信息和功能信息的数据库。在本研究中, 使用 KEGG 数据库中的代谢通路数据库进行检索分析, 探索 miR-30d-5p 的靶基因可能与哪些通路相关。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件和 Graphpad Prism 8 软件进行统计分析, 非正态分布数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 采用非参数检验, 配对样本比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验, 独立样本组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 相关性分析采用秩相关 (Spearman 相关), 正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间均数两两比较采用最小显著性差异法 (LSD), 检验水准 α 取 0.05 (双侧)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本情况 12 例研究对象均无激素用药史或肝毒性药物使用史, 无肝病家族史, 6 例 OMDT 患者中男性 4 例 (66.7%), 女性 2 例 (33.3%), 均有明确的 TCE 接触史, 与 6 例健康志愿者按性别和年龄与患者 1:1 进行配对。以 $M(P_{25}, P_{75})$ 计, 可知: OMDT 患者年龄为 20.0 (17.5 ~ 23.8) 岁; 健康志愿者年龄为 23 (19.8 ~ 24.5) 岁, 经秩和检验两组年龄差异无统计学意义 ($Z = 0.194, P > 0.05$)。

2.2 血清外泌体的鉴定 电镜观察外泌体呈圆形、椭圆形, 具有双层脂质包膜结构, Western blot 法检测发现外泌体特征性膜蛋白 CD9、Flotollin-1 和 HSP70 表达阳性, 纳米颗粒跟踪分析仪检测外泌体粒径约 200 nm, 均符合外泌体的特征, 见图 1。

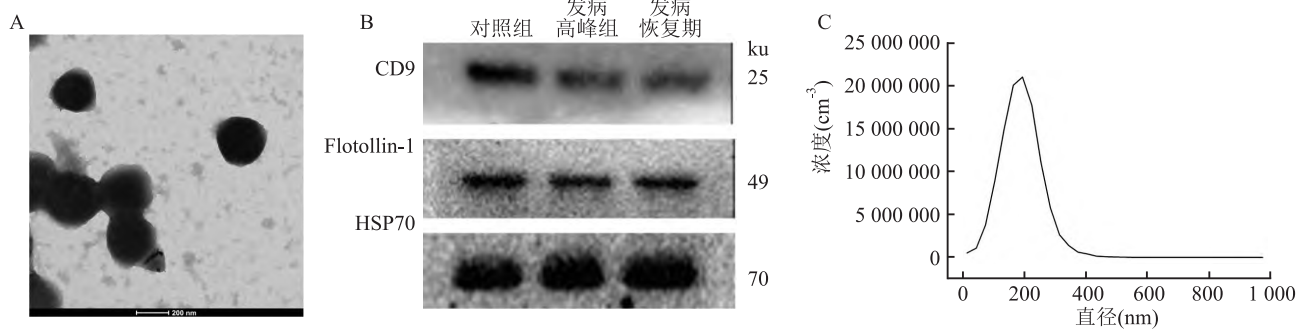


图 1 血清外泌体鉴定

A: 血清外泌体的透射电镜观察; B: Western blot 法检测外泌体特征性膜蛋白; C: 纳米颗粒跟踪分析观察

2.3 血清外泌体中 miR-30d-5p 基因表达水平的改变 qRT-PCR 结果显示, 对照组、发病高峰期组和发病恢复期组血清外泌体中 miR-30d-5p 相对表达水平分别为: 0.90 (0.58, 2.12), 0.14 (0.01, 0.55), 0.93 (0.73, 1.29)。发病高峰期组血清外泌体中 miR-30d-5p 表达水平明显低于其他两组, 差异有统计学意义 ($H = 6.398, P = 0.034$), 见图 2。

2.4 OMDT 患者治疗前后肝功能指标水平的改变

肝功能检查结果显示, 6 例患者入院时发病高峰期天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、 γ -谷氨酰胺基转移酶 (γ -glutamyl transferase, GGT) 明显升高, 与出院时发病恢复期比较差异有统计学意义 ($Z = -2.201, P = 0.028; Z = -2.201, P = 0.028; Z = -2.201, P = 0.028$), 见图 3。

2.5 OMDT 患者发病高峰期时肝功能指标与 miR-30d-5p 表达水平的相关性分析

通过相关性分析发现, 患者发病高峰期时血清外泌体 miR-30d-5p 相对表达量与 AST、ALT、GGT 水平均呈负相关, 见表 1。

表 1 OMDT 患者血清外泌体 miR-30d-5p 表达水平与肝功能指标的相关性分析

肝功能指标	r_s 值	P 值
AST	-0.943	0.005
ALT	-0.886	0.019
GGT	-0.886	0.019

2.6 OMDT 患者血清 miR-30d-5p 表达水平的生物信息学分析

在 miRWalk 数据库中筛选出了 535 个 miR-30d-5p 的候选靶基因, 在 miRBD 数据库中筛选出了 736 个 miR-30d-5p 的候选靶基因, 两个数据库的交集显示了 46 个候选靶基因, 采用 GO 分析

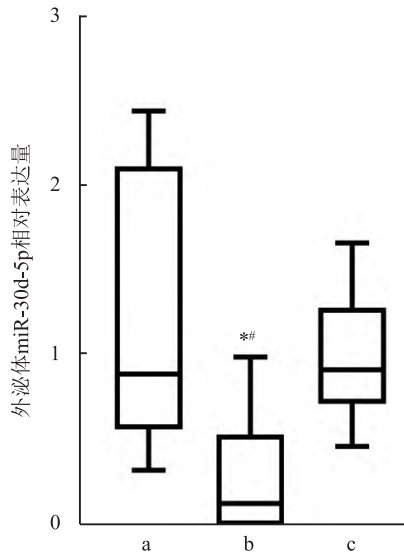


图2 患者各组血清外泌体 miR-30d-5p 表达水平

a: 对照组; b: 发病高峰期; c: 发病恢复期; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与发病恢复期比较: # $P < 0.05$

和 KEGG 分析对这些候选靶基因结果进行进一步研究。GO 分析从生物学过程、细胞组分和分子功能三个方面对结果进行描述,发现 miR-30d-5p 主要参与钙调素结合与钙调蛋白依赖性蛋白激酶的激活等 73 个分子功能,异三聚体 G 蛋白与转运囊泡膜等 81 个细胞组分以及血管形态学重构与肽基丝氨酸磷酸化等 172 个生物学过程,图 4 中展示的是相关性较为密切的前 10 个结果。KEGG 分析表明大多数候选靶基因在胆碱能突触、破骨细胞分化、Apelin 信号通路、Wnt 信号通路和 Oxytocin 信号通路等途径中富集,图 4 中展示的是相关性较为密切显著的前 30 个条目。上述结果说明 miR-30d-5p 广泛参与机体免疫反应的生理病理学过程。

2.7 miR-30d-5p 靶向调控 RHOB 基因 为进一步明确 miR-30-5p 发挥生物学功能的可能机制,在上述生信分析结果中选取 RHOB 基因进行下一步研究。利用 psiCHECK2 质粒作为骨架,将预测的

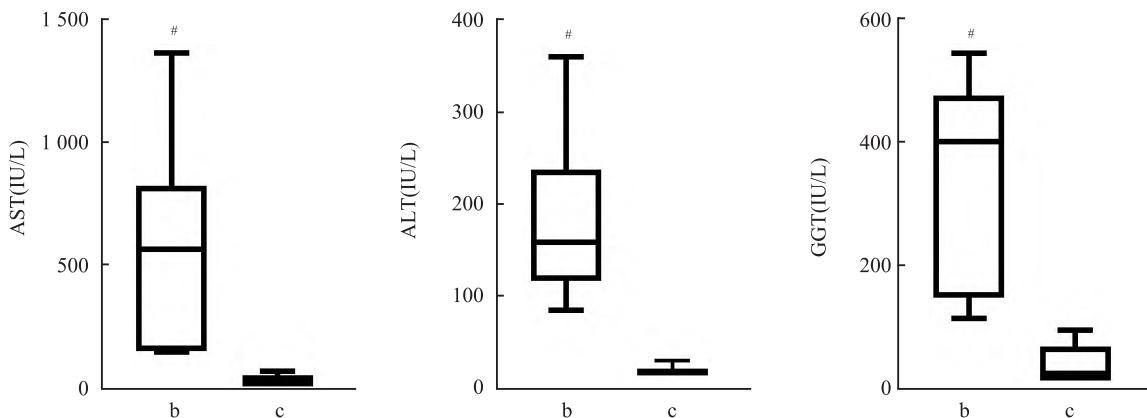


图3 OMDT 患者肝功能指标水平

b: 发病高峰期; c: 发病恢复期; 与发病恢复期比较: # $P < 0.05$

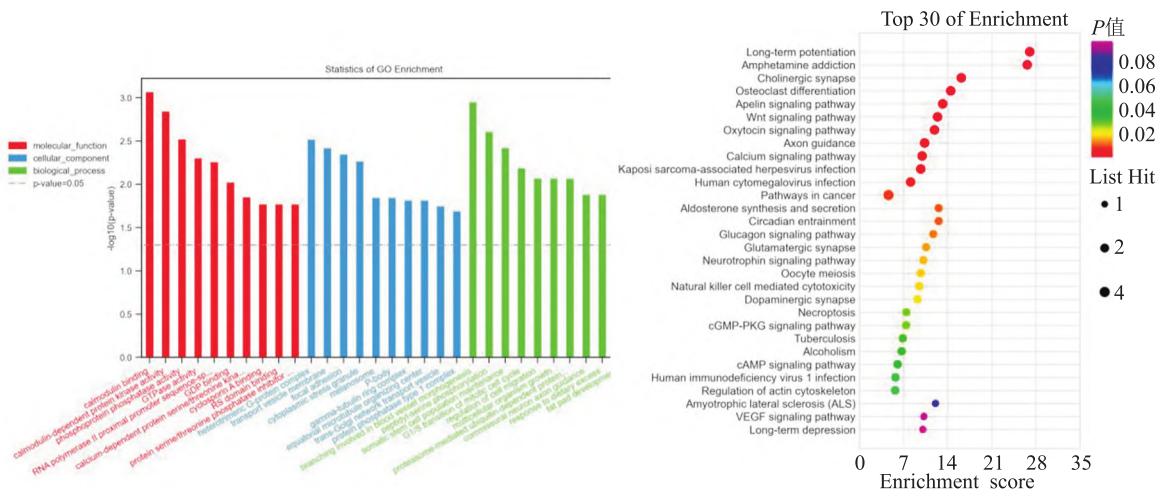


图4 功能聚类分析和生物通路分析

miR-30d-5p 与 RHOB 结合部位序列及其突变体序列剪切并插入到萤火虫荧光素酶基因下游,分别构建野生和突变的 RHOB 表达载体,与 miR-30d-5p 模拟物或 miR-NC 模拟物同时转染入 293T 细胞进行双荧光素酶活性检测实验。结果显示:转染 miR-30d-5p 模拟物可显著下调带有 RHOB 野生 3'-UTR 序列的报告基因荧光素酶活性,而靶基因序列突变后的荧光素酶活性不受影响,转染 miR-NC 模拟物后不影响野生和突变组的报告基因荧光素酶活性,差异有统计学意义 ($F = 11.458, P = 0.003$),见图 5。以上结果证明 miR-30d-5p 模拟物可特异性靶向结合 RHOB 的 3'-UTR 序列,从而调控 RHOB 的表达水平。预测结合位点序列:RHOB 3' UTR:... AUGGUGAGCUUAUGAUGUUUACA...; miR-30d-5p 3'UTR:GAAGGUCAGCCCUACAAAUGU。

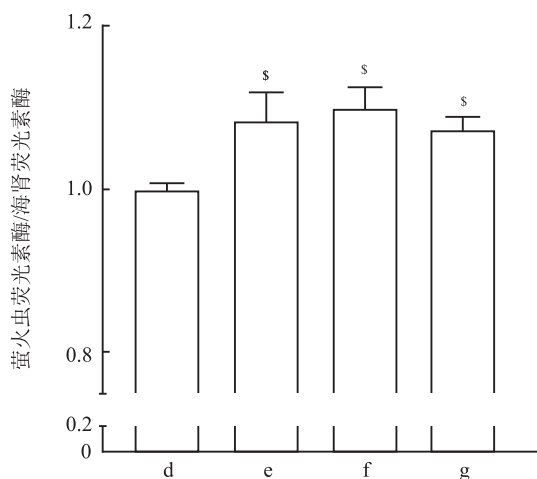


图 5 双荧光素酶报告基因

d: miR-30d-5p 模拟物 + 野生型 ROHB 质粒; e: miR-30d-5p 模拟物 + 突变型 ROHB 质粒; f: miR-NC 模拟物 + 野生型 ROHB 质粒; g: miR-NC 模拟物 + 突变型 ROHB 质粒; 与 miR-30d-5p 模拟物 + 野生型 ROHB 质粒比较; ^s $P < 0.05$

3 讨论

职业人群暴露 TCE 主要通过呼吸道和皮肤进入机体发挥毒性作用,影响多种脏器,其中以肝脏最为多见,可继发肝炎等多种疾病,严重影响患者预后。本研究 6 例患者在发病高峰期肝功能指标异常升高,存在明显的肝脏损伤。目前 OMDT 的肝损伤发病机制并未完全阐明,有待进一步研究。

一项研究^[10]显示 TCE 暴露工人的外周血血清 miR-150-5p 等 miRNA 分子表达水平有明显改变,另一项研究^[11]显示血清外泌体 miR-21-5p 和 miR-

339-5p 表达水平与职业性三氯乙烯超敏反应综合征相关,外泌体 miR-21 和 miR-690 也被发现加重了 TCE 介导的免疫炎症反应^[12]。因此,血清外泌体包裹的 miRNA 作为一种稳定的功能分子,无论是作为临床治疗的靶点,还是作为早期预测或诊断的生物标志物,在 OMDT 的临床研究都具有广阔的前景。先前的研究^[13]表明,miR-30d-5p 可以通过参与 T 细胞与 B 细胞的激活调控机体的免疫反应,并且与非酒精性脂肪性肝等多种肝脏疾病的发生发展有关,结合一项关于 TCE 暴露人群 miRNA 的芯片研究^[14],其中 miR-30 家族有明显差异表达,因此本研究选择了 miR-30d-5p 进行深入探讨。

本研究收集了 OMDT 患者的血清后提取外泌体,并对其进行鉴定。目前普遍认为外泌体的直径在 30 ~ 150 nm 之间,微囊泡的直径一般在 100 ~ 1 000 nm 之间,本研究结果中显示其直径约为 200 nm,属于粒径偏小的一部分,参考相关文献后依然选择外泌体对其进行描述^[15]。电镜结果显示其呈圆形、椭圆形,具有双层脂质包膜结构,Western blot 结果显示其表面的特殊蛋白 CD9、Flotollin-1 和 HSP70 表达呈阳性,与文献报道的结果一致^[16],为后续研究奠定了基础。qRT-PCR 结果显示,OMDT 患者发病高峰期时血清外泌体的 miR-30d-5p 水平明显降低,并且与 AST、ALT 和 GGT 指标呈现负相关,推测血清外泌体 miR-30d-5p 可能参与了 OMDT 患者的肝脏损伤的过程。

对 miR-30d-5p 进行靶基因的预测及生物学信息分析结果显示,miRWalk 及 miRBD 数据库共预测到 46 个 miR-30d-5p 的可能靶点,其中 RHOB 是一种小的 GTP 酶,属于 GTPase 信号分子家族,是细胞分裂、膜泡运输、伤口愈合或免疫监视等多种细胞和生理过程中的关键介质,同时还被发现参与非酒精性脂肪肝病、肝纤维化等多种肝脏损伤^[17],这与 GO 分析结果高度相似。KEGG 结果显示了 RHOB 可能参与的信号通路,其中包括 cAMP、Wnt、calcium 在内的大多数都与免疫性肝病密切相关。miR-30d-5p 与 RHOB 的靶向关系在多个网站被预测到(<http://www.targetscan.org>、<http://genome.ucsc.edu>),双荧光素酶报告基因结果显示,miR-30d-5p 模拟物可特异性靶向结合 RHOB 的 3'-UTR 序列,说明 miR-30d-5p 可以负向调控 RHOB 的表达,本研究虽然未能检测 OMDT 患者肝脏的 RHOB 表达水平,但是在课题组正在进行的 TCE 致敏小鼠模型研究基础上发现致敏阳性鼠的肝脏组织中 RHOB 基因表达水

平明显升高,提示 RHOB 有望成为 OMDT 的治疗靶点之一。

综上所述,OMDT 患者血清外泌体 miR-30d-5p 表达水平降低,与肝脏损伤程度呈负相关,并且本研究确定了 miR-30d-5p 与 RHOB 基因的靶向调控关系,为深入研究 OMDT 患者肝损伤的具体调控机制提供了指导方向,但本研究实验中并未对 miR-30d-5p 的表达进行干预,因此还需要进一步研究以获得确定性的结论。

参考文献

- [1] Lin D, Wang D, Li P, et al. Dynamic analysis of peripheral blood TCR beta-chain CDR3 repertoire in occupational medicamentosa-like dermatitis due to trichloroethylene[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 9971.
- [2] 邓丽丹, 邓立华, 林大枫, 等. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎患者外周血 T 和 B 淋巴细胞分析[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2020, 38(10): 731-5.
- [3] Li Z, Suo B, Long G, et al. Exosomal miRNA-16-5p derived from M1 macrophages enhances T cell-dependent immune response by regulating PD-L1 in gastric cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 572689.
- [4] Van Coillie S, Wiernicki B, Xu J, et al. Molecular and cellular functions of CTLA-4[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1248: 7-32.
- [5] Han D, Wang K, Zhang T, et al. Natural killer cell-derived exosome-entrapped paclitaxel can enhance its anti-tumor effect[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(10): 5703-13.
- [6] Zhu Q, Cheng L, Deng C, et al. The genetic source tracking of human urinary exosomes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(43): e2108876118.
- [7] Val S, Krueger A, Poley M, et al. Nontypeable haemophilus influenzae lysates increase heterogeneous nuclear ribonucleoprotein secretion and exosome release in human middle-ear epithelial cells [J]. FASEB J, 2018, 32(4): 1855-67.
- [8] Zur B J, Backes C, Golz G, et al. MicroRNA response of primary human macrophages to arcobacter butzleri infection[J]. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2016, 6(2): 99-108.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎诊断标准[S]. 中华人民共和国卫生部国家职业卫生标准 GBZ 185-2006, 2006.
- [10] Lee K M, Bassig B A, Zhang L, et al. Association between occupational exposure to trichloroethylene and serum levels of microRNAs: a cross-sectional molecular epidemiology study in China[J]. Int Arch Occup Environ Health, 2019, 92(8): 1077-85.
- [11] Liu W, Zheng J, Ren X, et al. Correction to: serum levels of miR-21-5p and miR-339-5p associate with occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome[J]. J Occup Med Toxicol, 2021, 16(1): 31.
- [12] Banerjee N, Wang H, Wang G, et al. Differential expression of miRNAs in trichloroethene-mediated inflammatory/autoimmune response and its modulation by sulforaphane: delineating the role of miRNA-21 and miRNA-690 [J]. Front Immunol, 2022, 13: 868539.
- [13] Eroglu F, Dokur M, Ulu Y. MicroRNA profile in immune response of alveolar and cystic echinococcosis patients[J]. Parasite Immunol, 2021, 43(7): e12817.
- [14] Lee K M, Bassig B A, Zhang L, et al. Association between occupational exposure to trichloroethylene and serum levels of microRNAs: a cross-sectional molecular epidemiology study in China[J]. Int Arch Occup Environ Health, 2019, 92(8): 1077-85.
- [15] Toh W S, Lai R C, Zhang B, et al. MSC exosome works through a protein-based mechanism of action[J]. Biochem Soc Trans, 2018, 46(4): 843-53.
- [16] Whiteside T L. The emerging role of plasma exosomes in diagnosis, prognosis and therapies of patients with cancer[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2018, 22(1A): 38-40.
- [17] 黄燕飞, 王爱华, 王喜全, 等. Rho 激酶及其抑制剂与神经系统疾病[J]. 宁夏医学杂志, 2019, 41(7): 668-72.

Role of serum exosomal miR-30d-5p targeting RHOB in occupational medicamentosa-like dermatitis due to trichloroethylene

Cai Shuyang¹, Wang Hui^{2,3}, Zhang Xuesong¹, Zuo Xulei¹, Ma Jinru¹, Hong Yiting¹, Wu Qifeng⁴, Zhu Qixing^{1,2,3}

(¹Dept of Occupational Hygiene and Environmental Hygiene, School of Public Health,

Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Dermatology, the First Affiliated Hospital of

Anhui Medical University, Hefei 230022; ³Key Laboratory of Dermatology, Ministry of Education,

the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

⁴Guangdong Province Hospital for Occupational Disease Prevention and Treatment, Guangzhou 510000)

Abstract Objective To detect the expression of serum exosomal miR-30d-5p in occupational dermatitis medicamentosa-like of trichloroethylene(OMDT) patients and its correlation with liver function, then perform bioinformatics analysis and verify the target gene. **Methods** Serum exosomes were extracted from 6 OMDT patients and 6

(下转第 730 页)

***Sigirr* deletion upregulates NF- κ B and is involved in the development of renal interstitial fibrosis in mice with chronic kidney disease**

Tong Ziwen¹, Xu Deping¹, Wang Zhe², Yang Ping¹, Tu Zhenzhen¹, Zang Dandan³, Zhou Haisheng^{1,3}

(¹Dept of Biochemistry, ²School of Basic Medical Science, ³Center for Scientific Research, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role and mechanism of *Sigirr* deletion in chronic kidney disease complicated with renal interstitial fibrosis (CKD-RIF) in mice. **Methods** polymerase chain reaction (PCR) was used for identification of gene types of mice. Mice were continuously fed with the foods containing 0.2% adenine for 12 weeks to establish the CKD-RIF models. Then, serum was collected to detect levels of creatinine and nitrogen when mice were killed. H&E staining was used to analyze the pathological changes of kidney tissues. Masson staining was used to observe the degree of renal fibrosis. Immunohistochemistry was used to detect the changes of the interest proteins, such as IL-1 β , MyD88, activated NF- κ B, TGF- β 1, E-cadherin and Vimentin. **Results** Serum creatinines and urea nitrogens of mice fed with high adenine (CKD-RIF groups) significantly increased, compared with those of the control groups. H&E and Masson staining results showed that there were more infiltrated inflammatory cells and more critical collagen fiber deposition in the renal tissues of the *Sigirr*^{-/-} mice with CKD-RIF. Western blot and Immunohistochemical analysis showed that the expression of IL-1 β and its downstream MyD88 increased, and the level of phosphorylated NF- κ B (p-P65) significantly increased in the renal tissues of CKD-RIF mice compared with the controls. And upregulation of these proteins in renal tissues of *Sigirr*^{-/-} mice with CKD-RIF was more obvious than that of the CKD-RIF *Sigirr*^{+/+} mice. TGF- β 1, as a key cytokine involved in renal interstitial fibrosis, significantly increased, followed by the increase of vimentin, as well as the decrease of E-cadherin. The results of vimentin and cadherin E detected by Western blot were consistent with those of immunohistochemistry, and α -SMA also increased significantly. **Conclusion** Adenine diet successfully induces CKD-RIF mice models. *Sigirr* deletion is beneficial to activation of the IL-1 β mediating NF- κ B signal pathway, which promotes TGF- β 1 expression in the renal interstitiums to induce renal interstitial fibrosis.

Key words *Sigirr* deletion; chronic kidney disease; renal interstitial fibrosis; IL-1 β ; NF- κ B

(上接第 723 页)

healthy controls, and miRNA was extracted from exosomes which were identified by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and western blotting. The expression of serum exosomal miR-30d-5p was detected by real-time fluorescence quantitative PCR, then the correlation with liver function was analyzed. The target genes of miR-30d-5p were predicted by the miRWalk and miRBD databases. Gene ontology analysis and KEGG pathways analysis were performed. Finally, RHOB was verified by Dual-luciferase reporter assay. **Results** The expression of serum exosomal miR-30d-5p significantly decreased in 6 OMDT patients at the peak of the disease ($P < 0.05$), and it was negatively correlated with the level of AST, ALT and GGT (correlation coefficient: $r_s = -0.943, P = 0.005$; $r_s = -0.886, P = 0.019$; $r_s = -0.886, P = 0.019$). Bioinformatics analysis and dual-luciferase reporter assay showed that RHOB was the target gene of miR-30d-5p. **Conclusion** The expression of serum exosomal miR-30d-5p decreases in OMDT patients, which is negatively correlated with the level of liver function, and the target gene RHOB may be involved in the process of liver injury induced by trichloroethylene.

Key words trichloroethylene; exosomes; miR-30d-5p; RHOB