

Sigirr 缺失调控 NF- κ B 并参与慢性肾病小鼠发生肾间质纤维化

童子文¹,徐德莘¹,王 喆²,杨 萍¹,涂珍珍¹,臧丹丹³,周海胜^{1,3}

摘要 目的 研究 *Sigirr* 基因缺失小鼠在慢性肾病 (CKD) 并发肾间质纤维化 (RIF) 中的作用和机制。方法 利用 PCR 鉴定正常基因型 (*Sigirr*^{+/+}) 小鼠和 *Sigirr* 基因缺失 (*Sigirr*^{-/-}) 小鼠。含 0.2% 高腺嘌呤饲料喂养小鼠,连续喂养 12 周,以建立慢性肾脏损伤并发 RIF 模型。收集小鼠眼眶静脉血以检测肾功能;利用 HE 染色分析肾脏组织病理变化,通过 Masson 染色观察肾脏纤维化程度,利用 IHC 和 Western blot 检测白细胞介素 (IL)-1 β 、MyD88 和 NF- κ B 等信号分子变化,同时观察转化生长因子 (TGF)- β 1、E-cadherin 和 Vimentin 的表达变化。结果 肾功能检测结果显示高腺嘌呤喂养小鼠的血清肌酐和尿素氮较对照组增加;HE 和 Masson 染色结果显示:与 *Sigirr*^{+/+} 小鼠比较, *Sigirr*^{-/-} 小鼠的肾组织中,炎症细胞浸润和胶原纤维沉积更明显。IHC 和 Western blot 结果显示 IL-1 β 及其下游的 MyD88 表达增加, p-P65 水平显著增加; *Sigirr*^{-/-} 小鼠的肾组织中 IL-1 β 、MyD88、p-P65 等变化较 *Sigirr*^{+/+} 小鼠显著;同时 TGF- β 1 显著增加,且 Vimentin 的表达增加, E-cadherin 的表达明显降低, Western blot 检测 Vimentin、E-cadherin 结果与免疫组化一致,且 α -SMA 也显著升高。结论 高腺嘌呤饮食可以建立 CKD 并发 RIF 小鼠模型。 *Sigirr* 的缺失增加肾间质 IL-1 β 介导 NF- κ B 信号通路的活化,促进 TGF- β 1 表达,有利于上皮-间质细胞转分化相关 RIF 过程。

关键词 *Sigirr* 基因;慢性肾病;肾间质纤维化;IL-1 β ;NF- κ B
中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0724-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.004

单一免疫球蛋白白细胞介素-1 受体相关受体 (single immunoglobulin interleukin-1 related receptor, SIGIRR) 介导的信号通路具有抑制白细胞介素 (interleukin, IL)-1 的活性。前期研究^[1]发现 NF- κ B/SIGIRR 负调控 IL-1 β 诱导的肾小管上皮-成纤维细胞转分化。研究^[2-4]证实在 IL-1 的刺激下, SI-

GIRR 以配体依赖性方式与 IL-1 受体复合物相互作用。肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 发展过程中常见的病理改变^[5],其发病机制是与炎症因子、细胞因子和转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1 等活化相关信号通路有关^[6-7]。目前研究 CKD 并发 RIF 的模型主要是通过单侧输尿管的结扎术诱发的急性肾损伤的大鼠模型^[8]。但其与临床上常见的慢性肾病并发 RIF 的过程具有较大差异性。为探讨 SIGIRR 在 CKD 并发 RIF 中的作用,该研究拟使用 *Sigirr* 基因敲除小鼠 (*Sigirr*^{-/-}) 在高嘌呤饮食诱发肾脏慢性损伤,建立 CKD 并发 RIF 小鼠模型,观察 RIF 的病理特点及 SIGIRR 在 RIF 发生过程中作用和机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 野生型 C57BL/6 (*Sigirr*^{+/+}) 小鼠、*Sigirr*^{-/-} 小鼠购自南京集萃药康股份有限公司,饲养于 SPF 级的动物房,饲养条件为恒温 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度 60%,明暗周期为 12 h/12 h,小鼠体质量 (22 \pm 2) g。所有动物实验均遵循《实验动物护理和使用指南》和安徽医科大学伦理指南 (伦理号: LISC20200007)。鼠源 E-cadherin 抗体、兔源 Vimentin 抗体、兔源 α -SMA 抗体、兔源 P65 抗体、兔源 p-P65 抗体、抗鼠或兔抗体购买于美国 Cell Signaling Technology 公司。鼠源 IL-1 β 抗体、兔源 TGF- β 1 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。鼠源 p-p65 抗体购自上海圣克鲁兹生物技术有限公司。琼脂凝胶糖粉购自于北京擎科生物科技有限公司。免疫组织化学试剂盒、DAB 显色液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。改良 Masson 三色染色液购自北京索莱宝科技有限公司。正常小鼠饲料和含有 0.2% 腺嘌呤的高腺嘌呤饲料均购自于无锡戴茨生物科技有限公司。PCR 试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。用于 PCR 检测小鼠基因组 DNA 的 *Sigirr* 敲除引物: P1: 5'-TTCCAGTAGTCGGTTCTGA-ACTCAG-3', P2: 5'-TGTGGAGGTCAAACCTCTTAGG-3', PCR 扩增产物为 900 bp;用于 PCR 检测野生型

2022-11-25 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:82071832)

作者单位:安徽医科大学¹生物化学教研室、²基础医学院、³科研实验中心,合肥 230032

作者简介:童子文,男,硕士研究生;

周海胜,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

Sigirr 的引物: P3: 5'-AGCCTAAATCTGCAATCTCTC-CC-3', P4: 5'-GAAACCTGTGCCCTAATCCATG-3', PCR 扩增产物为 496 bp; 引物均是由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 CKD 并发 RIF 小鼠模型的建立 取 7~8 周龄的 *Sigirr*^{+/+} 小鼠和 *Sigirr*^{-/-} 小鼠各 8 只, 均为雄性小鼠。将小鼠随机进行分组, 包括高腺嘌呤喂养组: 即高腺嘌呤饲料喂养 12 周 (4 只 *Sigirr*^{+/+}、4 只 *Sigirr*^{-/-} 鼠); 正常饲料喂养的对照组: 正常饲料喂养 12 周 (4 只 *Sigirr*^{+/+}、4 只 *Sigirr*^{-/-} 鼠)。12 周后, 异氟烷麻醉小鼠, 眼眶静脉丛采血用于后续生化分析, 处死, 取两肾脏分别固定于 4% 多聚甲醛和放在 -80 °C 冰箱中, 备用。

1.3 各组小鼠肾脏组织病理学检查 小鼠肾脏组织常规脱水包埋、切片, 烤片、脱蜡至水。进行 HE 染色和 Masson 染色, 中性树脂封片, 镜下观察拍照。

1.4 免疫组织化学分析 (immunohistochemistry analysis, IHC) 切片脱蜡至水, 利用柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复, 3% 过氧化氢溶液覆盖组织阻断过氧化物酶, 4 °C 孵育一抗过夜, 孵育增强剂, 孵育二抗, DAB 显色, 苏木精核染, 盐酸酒精分化, 脱水封片, 拍照分析。

1.5 Western blot 实验 取冻存小鼠肾脏组织每组 50 mg, 裂解液提取总蛋白, 配置 10% SDS-PAGE 胶, 每孔蛋白上样 6 μ l, 电泳分离、转膜, 然后 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h, 4 °C 孵育一抗过夜, 洗膜。对应二抗室温孵育 2 h, 洗膜、蛋白条带加 ECL 曝光

显色。用凝胶图像处理系统 (Image J 软件) 得出灰度值。

1.6 小鼠基因型的 PCR 鉴定 剪去一段小鼠鼠尾, 常规提取鼠尾的基因组 DNA 作为模板。扩增结束, 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Sigirr*^{-/-} 小鼠基因型鉴定 提取 *Sigirr*^{-/-} 小鼠和 *Sigirr*^{+/+} 小鼠鼠尾基因组, 分别利用敲除引物和 WT 引物进行 PCR 扩增。结果显示 *Sigirr*^{-/-} 小鼠基因组在 P1-P2 引物扩增后 900 bp 特异条带, 但 P3-P4 引物扩增显示阴性结果; *Sigirr*^{+/+} 小鼠基因组在引物扩增获得 496 bp 的特异性条带, 而 P1-P2 引物扩增未出现条带 (图 1)。因此, 拟建立模型的小鼠为 C57BL/6 品系 *Sigirr*^{-/-} 和 *Sigirr*^{+/+} 纯合小鼠。

2.2 CKD 并发 RIF 小鼠模型的建立及相关指标比较 按照图 2A 的方案, 采用高腺嘌呤饲料和正常饲料喂养 *Sigirr*^{-/-} 小鼠和 *Sigirr*^{+/+} 小鼠, 持续时间为 12 周。观察发现: 高腺嘌呤饲料喂养小鼠的肾脏颜色显示黄白色, 硬度较对照组明显增加; 且肾脏内含大量积液, 液体呈黄褐色浑浊样, 并有明显的肾肿胀伴有颗粒状和肾盂积水现象, 对照组小鼠肾脏肉眼未见异常 (图 2B)。

肾功能检测结果显示两组小鼠血清尿素氮和肌

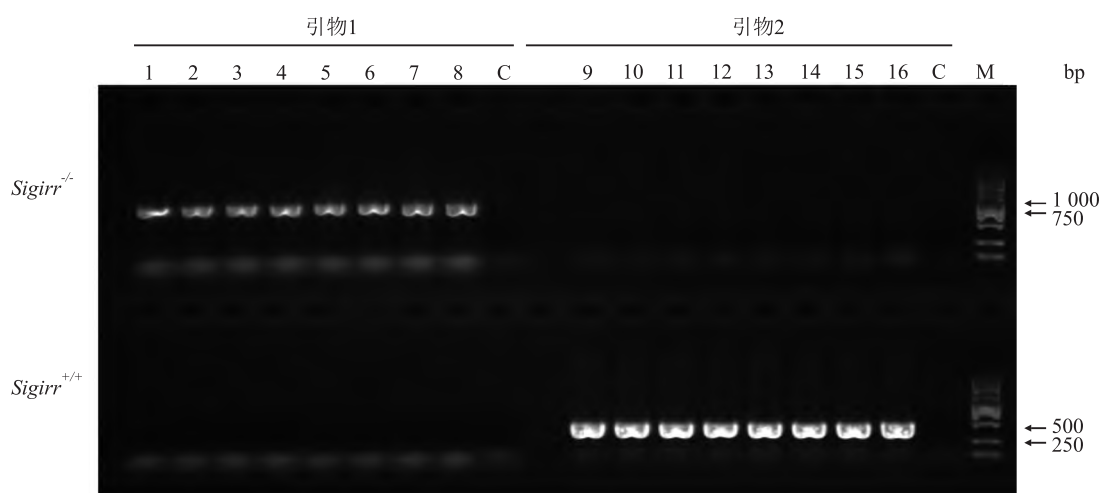


图 1 PCR 鉴定小鼠鼠尾基因组 DNA 的 *Sigirr* 基因

敲除引物用于 PCR 鉴定 *Sigirr* 基因敲除的小鼠基因型; WT 引物用于检测正常基因型的小鼠基因组; 1~8 泳道: 8 只 *Sigirr* 基因缺失小鼠鼠尾基因组 DNA 的 PCR 扩增结果; 9~16 泳道: 8 只正常基因型小鼠鼠尾基因组 DNA 的 PCR 扩增结果; C: 空白对照组; M: DNA Marker

酞比较差异有统计学意义 ($F = 92.10, P < 0.001; F = 16.5, P < 0.001$)。与高嘌呤喂养 $Sigirr^{+/+}$ 组小鼠比较,高嘌呤喂养组 $Sigirr^{-/-}$ 小鼠血清尿素氮水平升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与正常饲料喂养组 $Sigirr^{+/+}$ 小鼠和 $Sigirr^{-/-}$ 小鼠比较,高嘌呤喂养组 $Sigirr^{+/+}$ 小鼠和 $Sigirr^{-/-}$ 小鼠的血清尿素氮(均 $P < 0.001$)和肌酐($P < 0.05, P < 0.01$)水平升高,差异有统计学意义(图 2C、D)。

HE 染色显示对照组的小鼠肾组织形态及结构

正常,在高嘌呤喂养组小鼠肾脏中观察到肾小管扩张和大量炎性细胞浸润且出现肾小球硬化等形式的肾损伤,且 $Sigirr^{-/-}$ 小鼠肾脏组织中,炎性细胞浸润、小球充血等病理变化较对照组更明显(图 2E)。

Masson 染色结果显示:高嘌呤饲料喂养组出现蓝色沉积;与对照组肾脏组织比较,高嘌呤饲料喂养组小鼠肾脏中胶原沉积显著增加,且 $Sigirr^{-/-}$ 小鼠肾组织的胶原沉积较 $Sigirr^{+/+}$ 小鼠更严重(图 2E)。

2.3 $Sigirr$ 基因缺失对 IL-1 β 活化 MyD88/NF- κ B

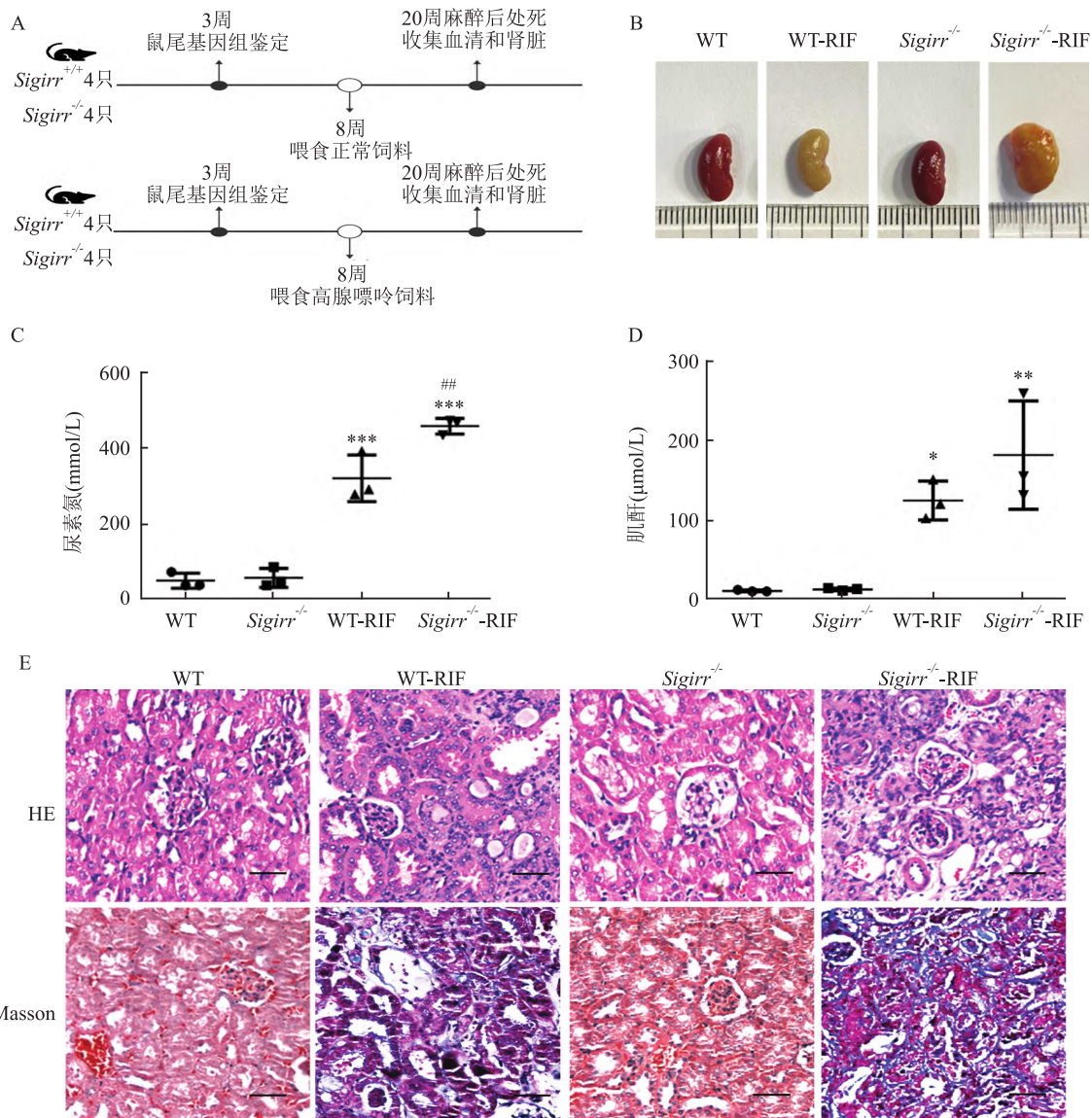


图 2 CKD 并发 RIF 小鼠模型建立

WT: $Sigirr^{+/+}$ 组小鼠; WT-RIF: $Sigirr^{+/+}$ 小鼠的 CKD-RIF 模型组; $Sigirr^{-/-}$ 组: $Sigirr$ 基因敲除小鼠; $Sigirr^{-/-}$ -RIF 组: $Sigirr^{-/-}$ 小鼠的 CKD-RIF 模型组; A: 建立 CKD 并发 RIF 模型方案; B: 正常和模型小鼠肾脏大体形态图; C: 正常和模型小鼠血清尿素氮值比较; D: 正常和模型小鼠血清肌酐值比较; E: 各组小鼠肾组织切片 HE 染色和 Masson 染色 $\times 40$; 与对应对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 WT-RIF 比较: ### $P < 0.01$

信号通路的影响 利用 IHC 检测模型小鼠肾脏组织中 IL-1 β 的表达水平。结果显示:CKD-RIF 模型小鼠肾脏组织中,IL-1 β 表达水平较对照组肾脏组织显著增加;且 *Sigirr* 基因缺失时,IL-1 β 的增加更明显(图 3A)。进一步利用 IHC 检测其下游信号分子 MyD88 和磷酸化 P65 (p-P65) 的变化。结果发现,伴随 CKD-RIF 小鼠的肾组织中的 IL-1 β 表达升高,与对照组比较,MyD88、p-P65 的均明显增加;特别是与 CKD-RIF 模型的 *Sigirr*^{+/+} 小鼠的肾组织比较,CKD-RIF 的 *Sigirr*^{-/-} 小鼠肾组织增加较更明显。同时用新鲜肾组织,提取总蛋白进行 Western blot 分析,结果显示(图 3B、C):*Sigirr*^{-/-} 和 *Sigirr*^{+/+} 的 CKD-RIF 小鼠的肾组织比对应的非模型组小鼠肾

组织中 IL-1 β 表达水平均明显增加,且 *Sigirr*⁻ 缺失的 CKD-RIF 小鼠较 *Sigirr*^{+/+} 组显著增加 ($P < 0.001$);MyD88、p-P65 变化与 IHC 的结果一致,且差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.4 TGF- β 1 介导的肾间质上皮-肌成纤维细胞转化 (epithelial-myofibroblast transition, EMT) 促进 CKD-RIF 的发生 利用 IHC 检测各组模型小鼠的肾组织中的 TGF- β 1、E-cadherin、Vimentin 等表达水平。结果显示:与对照组的小鼠肾脏组织比较,发生 RIF 小鼠的肾组织中的 TGF- β 1 表达水平明显升高(图 4A);RIF 小鼠肾组织中,E-cadherin 表达降低同时 Vimentin 增加,且 *Sigirr*^{-/-} 小鼠肾脏中 E-cadherin 的减少和 Vimentin 的增加比 *Sigirr*^{+/+} 小

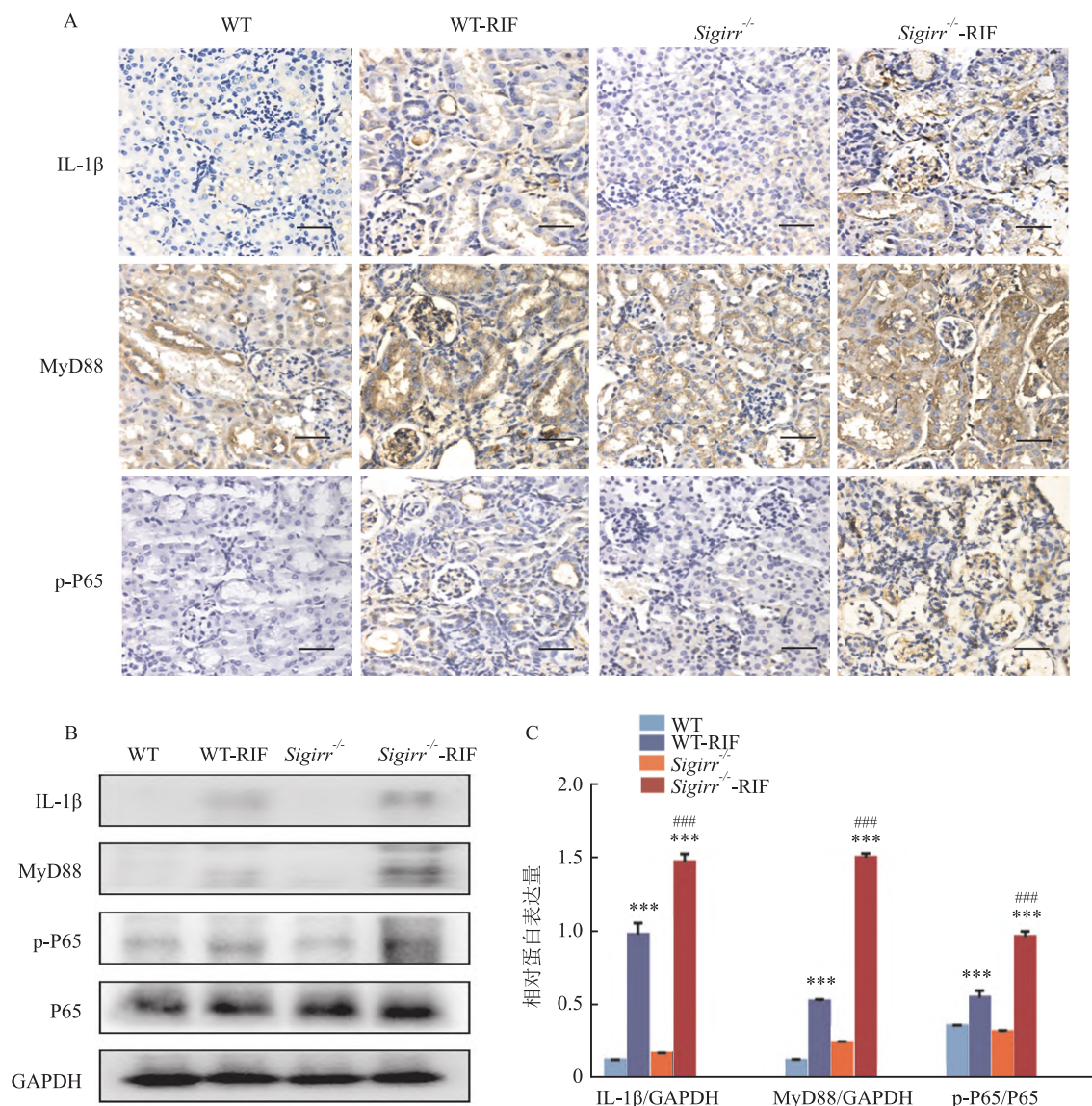


图 3 IHC、Western blot 检测模型小鼠的肾组织 IL-1 β 、MyD88、p-P65 变化

A: IHC 检测小鼠肾组织 IL-1 β 、MyD88 和 p-P65 蛋白水平表达 $\times 40$; B、C: Western blot 检测小鼠肾组织 IL-1 β 、MyD88 和 p-P65 蛋白灰度分析及相对表达水平;与对应对照组比较:*** $P < 0.001$;与 WT-RIF 比较:### $P < 0.001$

鼠更为明显(图 4B)。同时利用分离获取的新鲜肾组织,提取总蛋白进行免疫印迹分析,结果显示(图 4C);*Sigirr*^{-/-} 和 *Sigirr*^{+/+} 的 CKD-RIF 小鼠的肾组织比对应的非模型组小鼠肾组织中 α -SMA 表达水平明显增加,且 *Sigirr*^{-/-} 的 CKD-RIF 小鼠较 *Sigirr*^{+/+} 的 CKD-RIF 小鼠显著增加 ($P < 0.01, P < 0.001$);E-cadherin、Vimentin 变化与 IHC 的结果一致,且差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。

3 讨论

炎症反应可以诱发 CKD 发生 RIF。CKD 并发 RIF 在病理上表现为 EMT 且伴随肾间质炎症细胞

浸润^[9]。目前在研究 RIF 的模型大多数是采用单侧输尿管结扎的大鼠模型,与临床上 RIF 的病因和发病机制方面存在较大差异。采用腺嘌呤饲料喂养小鼠引起肾脏慢性损伤在探讨 CKD-RIF 机制具有一定的优势。本研究使用 0.2% 腺嘌呤饲料喂养小鼠 12 周后,发现肾脏显示为黄白色,且肾组织内含大量黄褐色浑浊样积液,有明显的肾肿胀伴有颗粒状和肾盂积水现象。其原因可能是小鼠体内形成了溶解度较低的 2,8-二羟基嘌呤,导致肾损伤肾积水^[10]。更重要的是肾功能检测高嘌呤喂养组小鼠血清尿素氮和肌酐高于对照组小鼠。HE 染色显示高嘌呤饮食组小鼠肾脏组织粒细胞进入肾小管管

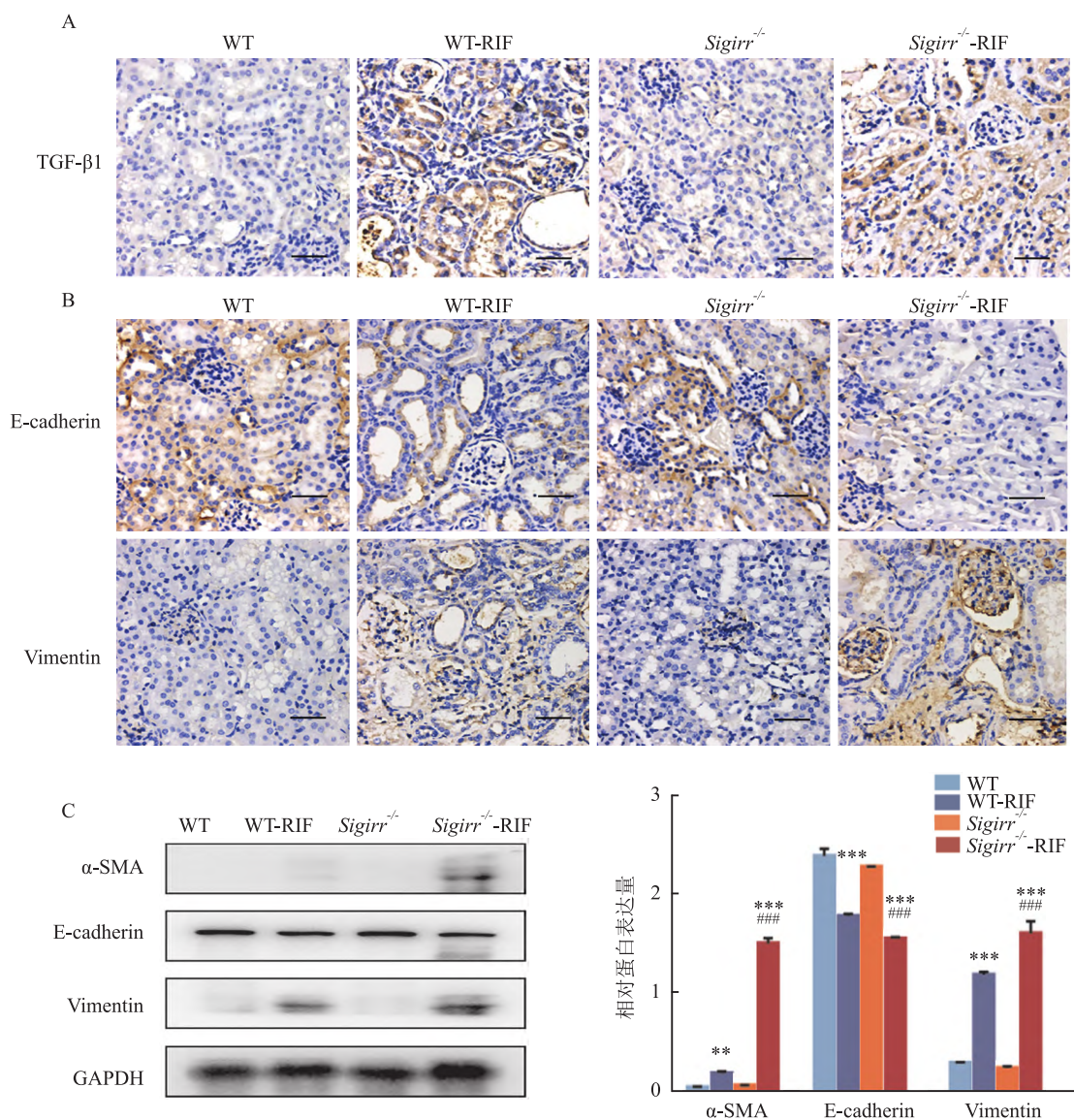


图 4 各组小鼠肾组织 TGF- β 1、E-cadherin、Vimentin 等表达

A: IHC 检测肾脏组织 TGF- β 1 的表达 $\times 40$; B: IHC 检测肾脏组织 E-cadherin、Vimentin 表达 $\times 40$; C: Western blot 检测小鼠肾组织 α -SMA、E-cadherin、Vimentin 蛋白灰度分析及相对表达水平;与对应对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 WT-RIF 比较: #### $P < 0.001$

腔、肾小管萎缩且出现肾小球硬化。因此,利用腺嘌呤饲料喂养小鼠成功建立了慢性肾脏损伤的小鼠模型。

持续慢性肾脏损伤容易诱发 RIF,主要病理变化是细胞外基质聚集在肾间质和肾小管周围,导致肾脏的纤维化和硬化^[8]。本研究 Masson 染色的结果显示:肾间质中出现大量蓝色条索状沉淀,提示 CKD 并发 RIF 造模成功。在对肾脏组织进行 IHC 和 Western blot 分析,显示上皮细胞的标记分子 E-cadherin 表达显著降低,而成纤维细胞标记分子 Vimentin 和肌成纤维标记分子 α -SMA 表达增加。证实腺嘌呤诱发慢性肾脏损伤导致 RIF 与 EMT 的发生有关。

IL-1 β 是一种常见的促炎症、促纤维化的细胞因子,在 CKD 及其并发的 RIF 过程中发挥重要作用。IL-1 β 通过结合 IL-1 受体,依赖 MyD88 进而激活 NF- κ B 信号通路,增加 TGF- β 1 的表达^[2,8,11]。TGF- β 1 是 EMT 的重要诱导分子,促进 RIF 的发生和发展。通过检测肾脏组织中 IL-1 β 、MyD88、p-P65 和 TGF- β 1,结果发现高嘌呤喂养组小鼠肾脏组织,IL-1 β 、MyD88 和 TGF- β 1 等分子均显示较高表达水平,而且与 P65 的活化状态保持一致性。因此腺嘌呤饮食诱发 CKD-RIF 的机制是依赖于 IL-1 β 激活 NF- κ B/TGF- β 1 信号通路,促进 RIF。

SIGIRR 作为 IL-1 β 的负性调控分子,能与 IL-1 受体和其他信号分子如 MyD88 相互作用,从而抑制 IL-1 β /IL-1 受体介导 NF- κ B 信号通路的活化^[12-13]。为进行体内研究 SIGIRR 在 CKD-RIF 发生中作用,利用 *Sigirr* 基因敲除小鼠,通过喂养腺嘌呤饲料建立 CKD-RIF 模型。与 *Sigirr*^{+/+} 的模型小鼠比较,肾功能、肾脏的大体形态、组织结构、Masson 染色等表型变化,*Sigirr*^{-/-} 肾脏损伤更为严重,纤维化程度更明显;同时 IHC 和 Western blot 分析证实:CKD-RIF 的 *Sigirr*^{-/-} 小鼠肾脏组织中 Vimentin、 α -SMA 表达均较 *Sigirr*^{+/+} 肾组织显著增加,E-cadherin 的表达显著减少。因此,*Sigirr* 缺失加剧肾脏慢性损伤,促进 RIF。蛋白质水平检测结果发现:CKD-RIF 的 *Sigirr*^{-/-} 小鼠肾脏组织中 IL-1 β 、MyD88、p-P65 比 CKD-RIF 的 *Sigirr*^{+/+} 的模型小鼠肾脏组织明显增加。因此,*Sigirr* 基因缺失加剧 RIF 的发生发展,这是与增强 IL-1 β /NF- κ B/TGF- β 1 信号通路的活性有关。

综上所述,利用高嘌呤饲料较长时间喂养小鼠,可以建立 CKD 并发 RIF 的小鼠模型,在此模型中,主要是通过 IL-1 β 活化 NF- κ B/TGF- β 1 信号通路,使肾间质发生 EMT;SIGIRR 作为 IL-1 β 的负性调控分子,*Sigirr* 基因的缺失有利于活化 IL-1 β /NF- κ B/TGF- β 1 信号通路,促进 RIF 的发生发展。

参考文献

- [1] Jiang K,Zhang Y,He F,et al. A negative feedback loop involving NF-kappaB/TIR8 regulates IL-1beta-induced epithelial- myofibroblast transdifferentiation in human tubular cells[J]. J Cell Commun Signal,2021,15(3):393-403.
- [2] Bajo M,Patel R R,Hedges D M,et al. Role of MyD88 in IL-1beta and ethanol modulation of GABAergic transmission in the central amygdala[J]. Brain Sci,2019,9(12):361.
- [3] Tian F,Lu Q,Lei J,et al. Negative effects of SIGIRR on TRAF6 ubiquitination in acute lung injury *in vitro*[J]. J Immunol Res,2020,2020:5097920.
- [4] Al-Kuhlani M,Lambert G,Pal S,et al. Immune response against chlamydia trachomatis *via* toll-like receptors is negatively regulated by SIGIRR[J]. PLoS One,2020,15(3):e230718.
- [5] Xu H,Wu T,Huang L. Therapeutic and delivery strategies of phytoconstituents for renal fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev,2021,177:113911.
- [6] Xie Y,Lan F,Zhao J,et al. Hirudin improves renal interstitial fibrosis by reducing renal tubule injury and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) mice[J]. Int Immunopharmacol,2020,81:106249.
- [7] Humphreys B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. Annu Rev Physiol,2018,80:309-26.
- [8] Liao Y,Tan R Z,Li J C,et al. Isoliquiritigenin attenuates UUO-induced renal inflammation and fibrosis by Inhibiting Mincle/Syk/NF-Kappa B signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther,2020,14:1455-68.
- [9] Ammirati A L. Chronic kidney disease[J]. Rev Assoc Med Bras,2020,66(Suppl 1):s3-9.
- [10] Diwan V,Brown L,Gobe G C. Adenine-induced chronic kidney disease in rats[J]. Nephrology (Carlton),2018,23(1):5-11.
- [11] Isaka Y. Targeting TGF-beta signaling in kidney fibrosis[J]. Int J Mol Sci,2018,19(9):2532.
- [12] Fawley J,Cuna A,Menden H L,et al. Single-immunoglobulin interleukin-1-related receptor regulates vulnerability to TLR4-mediated necrotizing enterocolitis in a mouse model[J]. Pediatr Res,2018,83(1):164-74.
- [13] Liu J,Chen Y,Liu D,et al. Ectopic expression of SIGIRR in the colon ameliorates colitis in mice by downregulating TLR4/NF-kappaB overactivation[J]. Immunol Lett,2017,183:52-61.

***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}

(¹*Dept of Biochemistry*, ²*School of Basic Medical Science*, ³*Center 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