

◇ 基础医学研究 ◇

## 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

蒋克国<sup>1</sup>, 王德光<sup>1</sup>, 周海胜<sup>2</sup>, 查晓军<sup>2</sup>, 张桂霞<sup>1</sup>, 金福泉<sup>3</sup>, 季爽<sup>4</sup>, 潘海峰<sup>5</sup>, 叶冬青<sup>5</sup>, 郝丽<sup>1</sup>

**摘要** 目的 建立稳定敲低单免疫球蛋白白介素 1 相关受体(SIGIRR)基因的人肾小管上皮细胞株(HKC),并初步研究其功能。方法 针对SIGIRR基因的有效靶点设计shRNA序列,与GV248-GFP-Puro慢病毒载体连接产生重组体(GV248-GFP-Puro-shSIGIRR)。将测序验证正确的重组体与包装质粒(pMDL、pRev、pVSVG)共转染293T细胞进行病毒包装,收集病毒并感染HKC细胞。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blot法分析检测HKC细胞中SIGIRR干涉效率。应用白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )刺激成功敲低SIGIRR的HKC细胞及对照细胞,Western blot法检测其下游核转录因子NF- $\kappa$ B(p65)的磷酸化水平,qRT-PCR分析单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、正常T细胞表达和分泌的活化调节蛋白(RANTES)mRNA水平。结果 成功构建重组慢病毒载体GV248-GFP-Puro-shSIGIRR。qRT-PCR和Western blot法均证实HKC细胞中成功敲低SIGIRR的表达。此外,IL-1 $\beta$ 刺激后,与对照细胞相比,敲低SIGIRR的HKC细胞(HKC/shSIGIRR)的p65磷酸化水平上调,MCP-1和RANTES mRNA表达水平升高。结论 HKC的炎症反应中,SIGIRR蛋白对Toll样受体/白介素1受体(TLR/IL-1R)通路起“刹车”作用。该研究为狼疮性肾炎的治疗提供了新的潜在的靶点。

**关键词** 狼疮性肾炎;人肾小管上皮细胞;SIGIRR;慢病毒载体;NF- $\kappa$ B;趋化因子

中图分类号 R 593.24+2; R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0129-07

### 狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是系统性红

2014-10-23 接收

基金项目:安徽省博士后科学基金(编号:9101019202);中国博士后科学基金(编号:2012M511399);国家自然科学基金(编号:81101524、81372475、81172591)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院肾脏内科,合肥 230601  
<sup>2</sup>安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室、<sup>3</sup>药学院、<sup>4</sup>第一临床学院、<sup>5</sup>公共卫生学院流行病与卫生统计系,合肥 230032

作者简介:蒋克国 男 主治医师 硕士研究生;  
王德光 男 主任医师 副教授 硕士生导师,责任作者,E-mail: wangdeguang@ahmu.edu.cn;  
周海胜 男 副教授 硕士生导师,责任作者,E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn;  
查晓军 男 副教授 硕士生导师,责任作者,E-mail: zhaxiaojunpunc@gmail.com

斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)最常见的并发症之一,而肾脏受累的严重程度对SLE患者死亡率及预期寿命有显著影响<sup>[1-2]</sup>。但LN发病机制尚未完全明确。研究<sup>[3-7]</sup>提示LN的发生和发展与肾小管上皮细胞内Toll样受体/白介素1受体(Toll-like receptor/IL-1 receptor, TLR/IL-1R)信号通路的活化有关,核转录因子NF- $\kappa$ B激活,产生趋化因子[如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、正常T细胞表达和分泌的活化调节蛋白(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor, RANTES)]调节炎症细胞向肾组织浸润和活化。有研究<sup>[8-9]</sup>提示单免疫球蛋白白介素1相关受体(single immunoglobulin IL-1-related receptor, SIGIRR)对TLR/IL-1R信号通路起负调控作用,因此有望成为LN治疗新的潜在的靶点。该研究以人肾小管上皮细胞(human renal tubule epithelial cells, HKC)作为模型,构建针对SIGIRR基因的小发夹状RNA(small hairpin RNA, shRNA)的慢病毒表达载体,包装成病毒感染HKC细胞,建立SIGIRR稳定下调的HKC细胞系(HKC/shSIGIRR),并探讨在TLR/IL-1R信号通路激动剂白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1beta, IL-1 $\beta$ )诱导下,NF- $\kappa$ B(p65)的磷酸化水平和其下游靶基因MCP-1和RANTES趋化因子mRNA水平的表达情况。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株、菌株与载体** HKC细胞购自北京协和细胞资源中心;293T细胞由实验室保存;Top10感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司;GV248-GFP-Puro购自上海吉凯基因化学技术有限公司;pMDL、pRev和pVSVG质粒由实验室保存。

**1.1.2 抗体及主要试剂** 兔抗SIGIRR抗体购自美国Ori Gene公司;兔抗p-p65抗体和兔抗p65抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;鼠抗GAPDH抗体购自美国Abcam公司;IL-1 $\beta$ 购自美国Pepro Tech公司;Polybrene购自美国Millipore公司;

嘌呤霉素购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; NuPAGE 10% Bis-Tris GEL 1.5 mm × 10 Well、Lipofectamin™ 2000 和 Opti-MEM 培养基购自美国 Life Technologies 公司; DMEM/F12、DMEM/高糖培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; Age I 和 EcoR I 购自美国 New England Biolabs 公司; 质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 购自加拿大 Fermentas 公司; T<sub>4</sub> DNA 连接酶和 SYBR® Premix Ex Taq™ 购自日本 TaKaRa 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

HKC 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养。293T 细胞培养条件为含 10% 胎牛血清 DMEM/高糖培养基培养。37 °C、5.0% CO<sub>2</sub> 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约 80% 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 慢病毒干涉载体构建及包装

SIGIRR 特异性干涉序列选自 Public TRC Portal 网站 (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/gene/search>),从中选取 3 个靶序列,由上海生工生物工程股份有限公司合成 3 对单链 DNA 序列。见表 1。退火处理后连接至 GV248-GFP-Puro 慢病毒载体。见图 1A。将重组体命名为 GV248-GFP-Puro-shSIGIRR-1#、GV248-GFP-Puro-shSIGIRR-2#、GV248-GFP-Puro-shSIGIRR-3#。转化 Top10 大肠杆菌、挑选阳性克隆、提取质粒,由上海生工生物工程股份有限公司测序验证。

取成功构建的重组慢病毒载体及 GV248-GFP-Puro-shScramble(实验室先前构建,序列见表 1) 分别和包装质粒(pMDL、pRev、pVSVG) 共转染 293T 细胞。转染前 2 h 将细胞培养基更换为 Opti-MEM 培养基。转染后混合培养 8 h 后更换含 10% 血清的 DMEM/高糖培养基继续培养。因载体带有绿色荧光蛋白报告基因,24 h 后可观察转染效率。转染后 48、72 h,收集含有病毒的上清液。将收集的上清液 1 500 r/min 离心 5 min,0.45 μm 的滤膜过滤,-80 °C 储存、备用。

### 1.2.3 孔稀释法测定病毒滴度

测定前 1 d 将生长状态良好的 293T 细胞消化稀释至 1.0 × 10<sup>5</sup> /ml,加入 96 孔板,100 μl/孔,每个病毒 10 个孔。感染当日将含有病毒的上清液,在 EP 管中做连续 10 个

表 1 3 对单链及 shScramble DNA 序列

名称	DNA 序列
shSIGIRR-1#	F: 5'-CCGGCCATCCAGAACATCAGCTTCTCTCGAGA GAAGCTGATGTTCTGGATGGTTTTTG-3' R: 5'-AATTCAAAAACCATCCAGAACATCAGCTTCTCT CGAGAGAAGCTGATGTTCTGGATGG-3'
shSIGIRR-2#	F: 5'-CCGGTGACCAGCACTGAAGTCTATGCTCG AGCATAGACTTCAGTGTGCTGATTTTTG-3' R: 5'-AATTCAAAAATGACCAGCACTGAAGTCTATGCTC GAGCATAGACTTCAGTGTGCTGCA-3'
shSIGIRR-3#	F: 5'-CCGGGTTCGTGAATTCATCTAACTCGAG TTTAGGATGAAGTTCACGAACTTTTG-3' R: 5'-AATTCAAAAAGTTCGTGAATTCATCTAACTCG AGTTTAGGATGAAGTTCACGAAC-3'
shScramble	F: 5'-CCGGTACTGCAGCCACATTCCTCTCGAGGAGA ATGTGGCTGCACTTTTTG-3' R: 5'-AATTCAAAAAGTACTGCAGCCACATTCCTCTCG AGGAGAATGTGGCTGCACTAC-3'

10 倍梯度稀释。弃去 96 孔板中原有的培养基,将稀释好的病毒液 100 μl/孔加到细胞孔中,继续培养 24 h 后,每孔加入 100 μl 新鲜培养液。72 h 后观察荧光并计数最大稀释倍数孔中的带有荧光的细胞个数。病毒滴度(TU/ml) = 荧光细胞个数 × 稀释倍数/病毒体积。

### 1.2.4 慢病毒感染 HKC 细胞及稳定筛选

接种状态良好的 HKC 细胞至 6 孔板,密度约 40%,待细胞贴壁后,按照病毒定量结果加入病毒上清液,同时加入 Polybrene 至终浓度为 6 μg/ml。6 h 后更换完全培养基。次日重复感染 1 次,72 h 后荧光显微镜下观察感染情况,加入嘌呤霉素 2 μg/ml 继续筛选培养 2 周,直至单克隆细胞群形成。

### 1.2.5 细胞总 RNA 提取、逆转录和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测

使用 UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定其浓度和光密度(optical density, OD) OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值,并且采用 1% 普通琼脂糖凝胶电泳对 RNA 质量进行快速分析。取 1 000 ng 总 RNA,使用 RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 对 RNA 进行反转录成总 cDNA,并稀释 20 倍作为 qRT-PCR 检测模板。利用 SYBR® Premix Ex Taq™ 进行 qRT-PCR 检测,引物序列见表 2。反应体系为 20 μl,每组样品设置 3 个重复;扩增程序:95 °C 预变性 2 min、94 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。

### 1.2.6 细胞总蛋白提取和 Western blot 法检测

收集细胞总蛋白前,PBS 清洗 2 次,加入 Western blot 细胞裂解液在冰上裂解 30 min,100 °C 水浴 10 min,

表2 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列
SIGIRR	F: 5'-CTCCCCGTCTGAAGACCAG-3' R: 5'-CCCCAATTCCCAATGGAAGC-3'
$\beta$ -actin	F: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3' R: 5'-AAAGGGTGTAAACGCAACTAA-3'
MCP-1	F: 5'-AGCCACCTTCATTGCCCAAAG-3' R: 5'-CTCCTTGGCCACAATGGTCT-3'
RANTES	F: 5'-CCAGCAGTCGTCTTTGTAC-3' R: 5'-CTCTGGTTGGCACACACTT-3'

制备细胞总蛋白样品。采用 NuPAGE 10% Bis-Tris GEL 1.5 mm × 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 °C 摇床上孵育过夜。次日将 TBST 洗脱后的 PVDF 膜条带再置于按要求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 线片曝光显示结果,灰度扫描分析软件计算各区带密度值。

**1.2.7 IL-1 $\beta$  诱导实验** 将 HKC、HKC/shScramble (GV248-GFP-Puro-shScramble 感染的 HKC 细胞)、HKC/shSIGIRR(已证明稳定敲低 SIGIRR 的 HKC 细胞) 细胞接种至 12 孔板培养,分为 2 组,一组在对数生长期加入终浓度为 10 ng/ml 的 IL-1 $\beta$ ,另一组正常培养 24 h 后分别收集细胞总 RNA、总蛋白用于实验研究。该实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 成功构建 GV248-GFP-Puro-shSIGIRR 慢病毒载体** 经双酶切的 GV248-GFP-Puro 与退火后的 shRNA 连接后产生 3 个重组慢病毒载体。转化 Top10 大肠杆菌,长出克隆后提取质粒,由上海生物工程股份有限公司测序证实插入序列正确,说

明成功构建载体。见图 1。

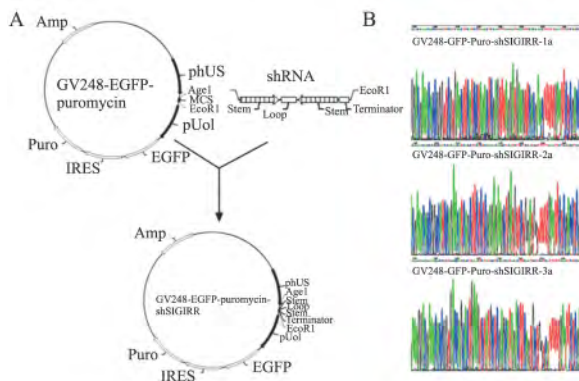


图1 载体构建示意图与阳性克隆测序鉴定  
A: 重组载体构建示意图; B: 测序图

**2.2 慢病毒包装和滴度测定并成功高效感染 HKC 细胞** 构建的重组慢病毒载体和 GV248-GFP-Puro-shScramble 分别和包装质粒共转染 293T 细胞 24 h 后荧光显微镜下观察均可见大量荧光,提示转染成功。见图 2。采用孔稀释法测定慢病毒滴度为(4 × 10<sup>7</sup> ~ 6 × 10<sup>7</sup>) TU/ml。将收集的慢病毒连续 2 次感染 HKC 细胞后,72 h 后荧光显微镜观察显示 80% 以上 HKC 细胞表达荧光蛋白,提示成功感染。见图 3。

**2.3 HKC 细胞中 SIGIRR 干扰效果检测** 提取经嘌呤霉素筛选 2 周后的 HKC/shScramble、HKC/shSIGIRR-1#(GV248-GFP-Puro-shSIGIRR-1#感染的 HKC 细胞)、HKC/shSIGIRR-2#(GV248-GFP-Puro-shSIGIRR-2#感染的 HKC 细胞)、HKC/shSIGIRR-3#(GV248-GFP-Puro-shSIGIRR-3#感染的 HKC 细胞) 与 HKC 的总 RNA 和总蛋白。qRT-PCR 和 Western blot 法分析结果提示 HKC/shSIGIRR-2#与 HKC/shSIGIRR-3#中的 SIGIRR 表达均受到干扰,后者更加明显。在 mRNA 和蛋白水平上,与 HKC/shScramble 相比 HKC/shSIGIRR-3#敲低 SIGIRR 表达 >70% (*t* = 6.289, *P* < 0.01; *t* = 5.562, *P* < 0.01)。见图 4。因此成功获得稳定敲低 SIGIRR 基因的 HKC 细胞

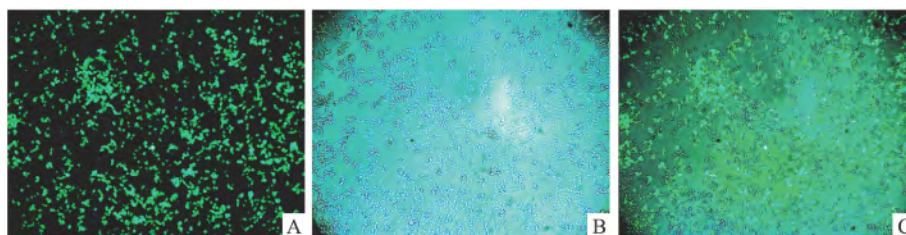


图2 重组慢病毒和包装质粒共转染 293T 细胞 24 h × 100  
A: 荧光; B: 白光; C: 叠加

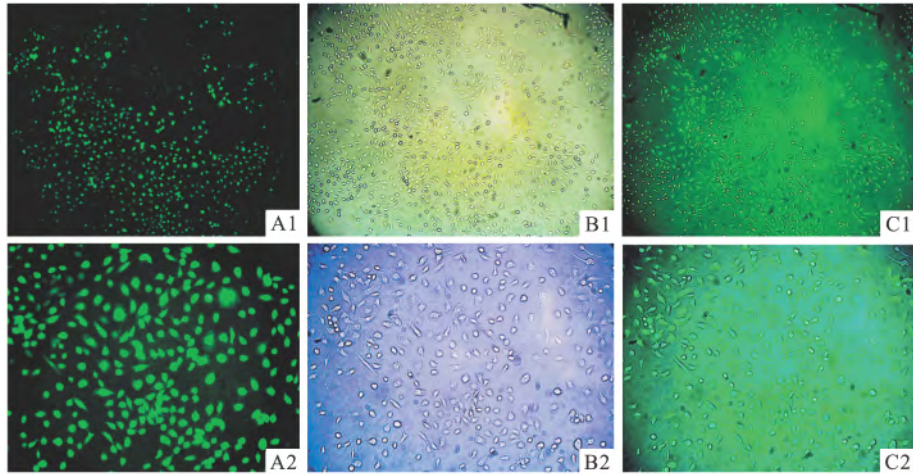


图3 慢病毒感染 HKC 细胞 72 h  
A: 荧光; B: 白光; C: 叠加; 1: ×100; 2: ×200

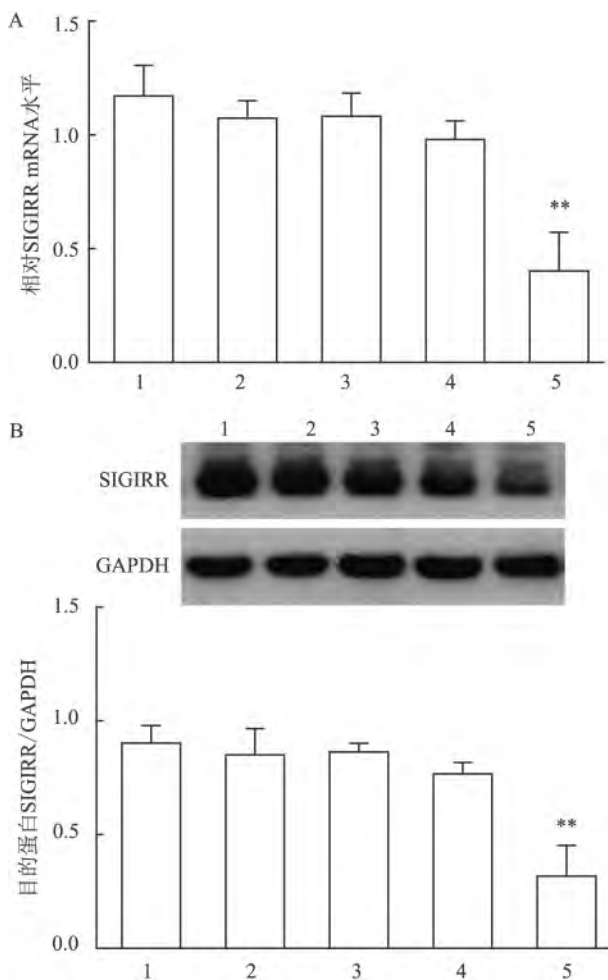


图4 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HKC 细胞中 SIGIRR 的干涉效果

A: qRT-PCR 分析干涉效果; B: Western blot 法分析干涉效果与灰度分析统计; 1: HKC; 2: HKC/shScramble; 3: HKC/shSIGIRR-1#; 4: HKC/shSIGIRR-2#; 5: HKC/shSIGIRR-3#; 与 HKC/shScramble 比较: \*\*  $P < 0.01$

株—HKC/shSIGIRR-3#命名为 HKC/shSIGIRR,用于下一步的细胞实验分析。

**2.4 IL-1 $\beta$  诱导 HKC/shSIGIRR 后核转录因子 NF- $\kappa$ B (p65) 的磷酸化与 MCP-1 和 RANTES 趋化因子 mRNA 的变化** Western blot 法分析经 IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) 诱导和未诱导的 HKC、HKC/shScramble 和 HKC/shSIGIRR 的各组细胞 p65 磷酸化水平改变情况。结果显示敲低 SIGIRR 基因,其下游基因 p65 的磷酸化水平较 HKC/shScramble 明显升高 ( $t = 2.941$   $P < 0.05$ )。提示在 HKC 细胞中,敲低 SIGIRR 解除了 SIGIRR 对 TLR/IL-1R 信号通路的抑制,导致 NF- $\kappa$ B 过度激活。见图 5。NF- $\kappa$ B 信号的激活会通过增强下游趋化因子的表达从而参与 LN 的发生和发展。因此,需进一步分析敲低 SIGIRR 是否会影响 NF- $\kappa$ B 下游靶基因 (MCP-1、RANTES) 的表达。收集经 IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) 诱导和未诱导的 HKC、HKC/shScramble 和 HKC/shSIGIRR 的总 RNA,经 qRT-PCR 分析显示:与 HKC/shScramble 相比,敲低 SIGIRR 的 HKC 细胞中 MCP-1 和 RANTES 的 mRNA 表达水平均明显升高 ( $t = 3.189$   $P < 0.05$ ;  $t = 2.838$   $P < 0.05$ ) 见图 6。

### 3 讨论

TLR/IL-1R 信号通路在炎症反应和天然防御免疫中起着重要作用,当 TLR/IL-1R 与 IL-1 及某些 TLR 激动剂 (如脂多糖、IL-1 $\beta$  等) 配体结合后,TLR/IL-1R 信号即被触发,其通过 MyD88 依赖通路或 MyD88 非依赖通路激活 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 可参与 MCP-1 和 RANTES 等多种趋化因子的表达,募集炎症细胞聚集发生炎症反应,但 TLR/IL-1R 信号通路的过度

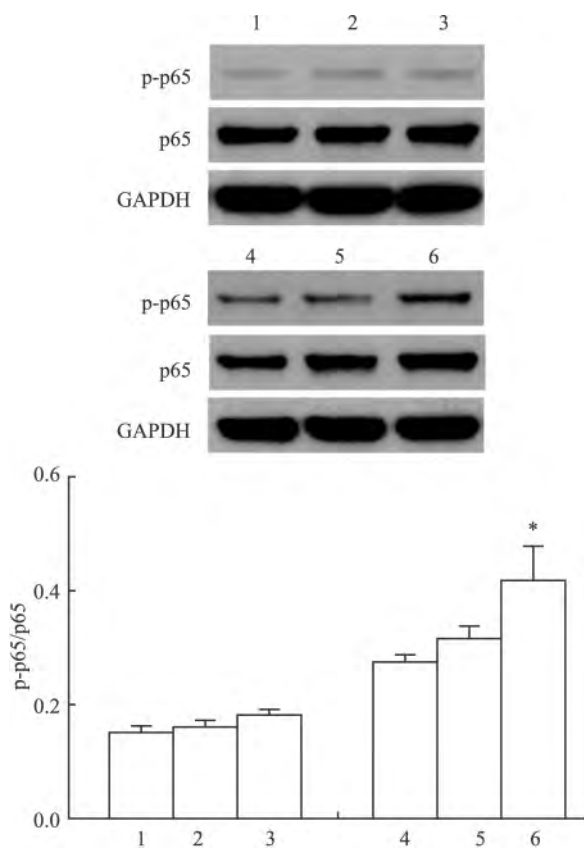


图5 Western blot 法检测 IL-1 $\beta$  诱导和未诱导细胞 24 h 后 p-p65、p65、GAPDH 表达

1、4: HKC; 2、5: HKC/shScramble; 3、6: HKC/shSIGIRR; 1~3: 未加 IL-1 $\beta$  处理; 4~5: 加 IL-1 $\beta$  处理; 与加 IL-1 $\beta$  处理 HKC/shScramble 比较: \*  $P < 0.05$

激活可造成机体免疫损伤<sup>[4-8]</sup>。为避免该现象的发生,体内尚存有相应负调控成分以保证机体免疫反应的适度 and 稳定,广泛表达在肾小管上皮细胞、消化道和肺等器官组织的 SIGIRR 便是其中之一。人 SIGIRR 定位于 11 p15.5,虽然 SIGIRR 属于 TLR/IL-1R 超家族中的 IL-1R 亚族,然而在功能上,不能介导 TLR/IL-1R 的炎症信号转导,相反还可能抑制 TLR/IL-1R 信号的下传,起到“刹车”作用,但其作用机制目前尚不明确<sup>[8]</sup>。

Lech et al<sup>[10]</sup>发现,敲除 SIGIRR 基因的 B6lpr/lpr 鼠表现为狼疮自身抗原诱导的树突细胞激活增加及 B 细胞增殖、多种自身抗体产生增多、肾小球单核细胞浸润增多及组织损伤加重。在碳氢化合物诱导的狼疮模型中,SIGIRR 敲除小鼠血清自身抗体、尿蛋白量及 LN 活动指数均明显升高<sup>[11]</sup>。另一方面,学者<sup>[12-13]</sup>在肿瘤细胞系 A549、H292 等细胞中发现过度表达 SIGIRR,也能够抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,减少 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子的分泌,这说明

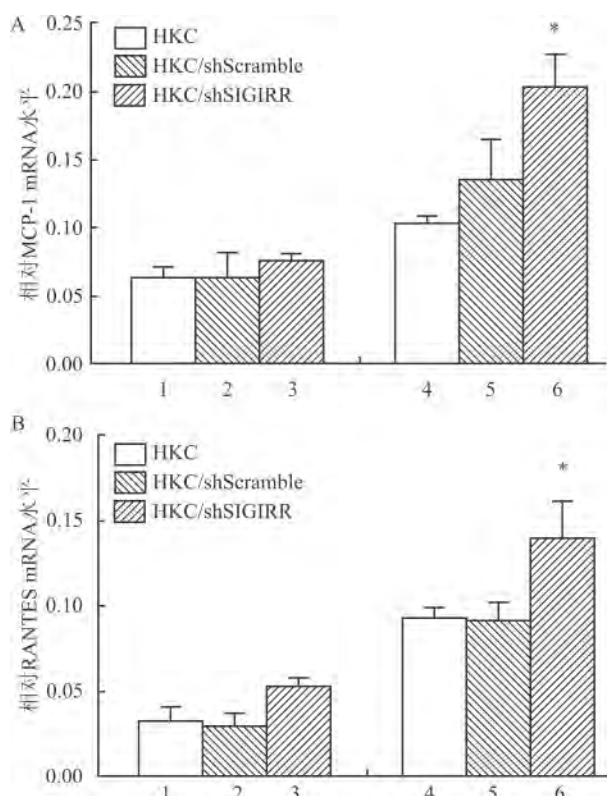


图6 qRT-PCR 检测 IL-1 $\beta$  诱导和未诱导各组细胞 24 h 后 MCP-1 和 RANTES mRNA 水平

A: 相对 MCP-1 mRNA 水平; B: 相对 RANTES mRNA 水平; 1~3: 未加 IL-1 $\beta$  处理; 4~6: 加 IL-1 $\beta$  处理; 与加 IL-1 $\beta$  处理 HKC/shScramble 比较: \*  $P < 0.05$

SIGIRR 可以阻断肿瘤细胞中 TLR/IL-1R-NF- $\kappa$ B 信号通路的激活从而缓解癌症中过度的炎症反应。提示 SIGIRR 在炎症反应的发生和发展中扮演着重要的角色,但是在肾小管上皮细胞的炎症反应中,SIGIRR 蛋白对 TLR/IL-1R 通路是否起到抑制作用,国内尚未见报道。

特异性强、效率高的 RNA 干扰技术,提供了一个逆向研究 SIGIRR 基因在自身免疫性疾病分子病因中作用的方法,而设计和构建敲低靶基因的 shRNA 表达慢病毒载体是实验的核心技术<sup>[14-15]</sup>。该研究成功构建的重组慢病毒干扰载体,经过实验证明能够有效干涉 HKC 细胞中 SIGIRR 的表达,经过嘌呤霉素筛选后构建成稳定敲低 SIGIRR 的 HKC 细胞。本研究显示对 SIGIRR 敲低后,在 IL-1 $\beta$  诱导下 NF- $\kappa$ B (p65) 的磷酸化水平和趋化因子 MCP-1 和 RANTES mRNA 表达增加,阐述了 SIGIRR 能够在 HKC 细胞的炎症反应中对 TLR/IL-1R 通路起到“刹车”作用。该研究为进一步探索 SIGIRR 在 TLR/IL-1R 通路或者其他信号传导通路中的功能研究奠定

基础。为 SIGIRR 作为生物制剂进行干预治疗 LN 带来了一线曙光。

### 参考文献

- [1] Mok C C , Kwok R C , Yip P S . Effect of renal disease on the standardized mortality ratio and life expectancy of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum* , 2013 , 65 ( 8 ) : 2154 - 60 .
- [2] Hsieh C , Chang A , Brandt D , et al . Predicting outcomes of lupus nephritis with tubulointerstitial inflammation and scarring [J]. *Arthritis Care Res ( Hoboken )* , 2011 , 63 ( 6 ) : 865 - 74 .
- [3] Yougbaré I , Boire G , Roy M , et al . NCS 613 exhibits anti-inflammatory effects on PBMCs from lupus patients by inhibiting p38 MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways while reducing proinflammatory cytokine production [J]. *Can J Physiol Pharmacol* , 2013 , 91 ( 5 ) : 353 - 61 .
- [4] Kalergis A M , Iruretagoyena M I , Barrientos M J , et al . Modulation of nuclear factor- $\kappa$ B activity can influence the susceptibility to systemic lupus erythematosus [J]. *Immunology* , 2009 , 128 ( 1 suppl ) : e306 - 14 .
- [5] Tsuboi N , Yoshikai Y , Matsuo S , et al . Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells [J]. *J Immunol* , 2002 , 169 ( 4 ) : 2026 - 33 .
- [6] Kuroiwa T , Schlingens R , Illei G G , et al . Distinct T cell/renal tubular epithelial cell interactions define differential chemokine production: implications for tubulointerstitial injury in chronic glomerulonephritides [J]. *J Immunol* , 2000 , 164 ( 6 ) : 3323 - 9 .
- [7] Van Kooten C , van der Linde X , Woltman A M , et al . Synergistic effect of interleukin-1 and CD40L on the activation of human renal tubular epithelial cells [J]. *Kidney Int* , 1999 , 56 ( 1 ) : 41 - 51 .
- [8] Garlanda C , Riva F , Veliz T , et al . Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8 , an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family [J]. *Cancer Res* , 2007 , 67 ( 13 ) : 6017 - 21 .
- [9] Wang C , Feng C C , Pan H F , et al . Therapeutic potential of SIGIRR in systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatol Int* , 2013 , 33 ( 8 ) : 1917 - 21 .
- [10] Lech M , Kulkarni O P , Pfeiffer S , et al . Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens [J]. *J Exp Med* , 2008 , 205 ( 8 ) : 1879 - 88 .
- [11] Lech M , Skuginna V , Kulkarni O P , et al . Lack of SIGIRR/TIR8 aggravates hydrocarbon oil-induced lupus nephritis [J]. *J Pathol* , 2010 , 220 ( 5 ) : 596 - 607 .
- [12] 黄 勋 , 梁晓华 , 田 丰 , 等 . SIGIRR 对 HMGB1 诱导的 A549 细胞炎症反应的影响 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志* , 2011 , 10 ( 6 ) : 577 - 80 .
- [13] 吴学玲 , 张 椿 , 赵云峰 , 等 . SIGIRR 对 LPS 诱导的 H292 细胞 TLR4 表达的影响 [J]. *西部医学* , 2009 , 21 ( 4 ) : 530 - 2 .
- [14] Morris K V , Rossi J J . Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy [J]. *Gene Ther* , 2006 , 13 ( 6 ) : 553 - 8 .
- [15] Brummelkamp T R , Bernards R , Agami R . A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Science* , 2002 , 296 ( 5567 ) : 550 - 3 .

## Construction of SIGIRR stable knockdown human renal tubular epithelial cells and exploration of its function

Jiang Keguo<sup>1</sup> , Wang Deguang<sup>1</sup> , Zhou Haisheng<sup>2</sup> , et al

(<sup>1</sup>Dept of Nephrology , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601; <sup>2</sup>Dept of Biochemistry and Molecular Biology , School of Basic Medicine Basical , Anhui Medical University , Hefei 230032)

**Abstract Objective** To establish single immunoglobulin IL-1-related receptor ( SIGIRR ) stable knockdown human renal tubular epithelial cells ( HKC ) and explore its function. **Methods** Designed the effective targeted shRNA sequences for the SIGIRR gene , and then connected with the GV248-GFP-Puro to produce recombinant lentiviral vector ( GV248-GFP-Puro-shSIGIRR ) . The corrected recombinants , identified by sequenced , were transfected into 293T cells with packaging plasmids ( pMDL , pRev , pVSVG ) for virus packaging. HKC cells were then infected by packaged viruses. Quantitative real-time PCR( qRT-PCR) and Western blot were used to detect the interference efficiency of SIGIRR in HKC cells. SIGIRR stable knockdown HKC cells ( HKC/shSIGIRR ) and the control cells were induced by IL-1 $\beta$  , then the downstream nuclear transcription factor , the phosphorylated NF- $\kappa$ B ( p65 ) were detected by Western blot. The mRNA expression levels of chemokine monocyte chemoattractant protein 1 ( MCP-1 ) and regulated upon activation normal T cell expressed and secreted factor ( RANTES ) were analyzed by qRT-PCR.

# 丙戊酸钠联合全反式维甲酸促进子宫颈癌细胞衰老的发生

尤青叶<sup>1</sup>, 冯定庆<sup>2</sup>, 凌 斌<sup>1,3</sup>, 张红丽<sup>1</sup>, 李 兵<sup>1</sup>, 伍娇娇<sup>1</sup>, 赵婷婷<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究丙戊酸钠(VPA)联合全反式维甲酸(ATRA)诱导子宫颈癌细胞衰老作用,并探讨其分子机制。方法

实验分为对照组、VPA组、ATRA组、VPA+ATRA组,采用3 mmol/L VPA、1 μmol/L ATRA单独或联合作用于人子宫颈癌HeLa及SiHa细胞,对照组仅加溶媒;采用CellTiter 96® AQueous法检测细胞增殖;β-半乳糖苷酶化学染色法检测细胞衰老;Q-PCR和Western blot法分别检测衰老相关基因P16、P63、hTERT的mRNA和蛋白表达变化。结果 VPA对HeLa及SiHa细胞均有生长抑制作用,与ATRA联合抑制效果明显优于单独用药( $P < 0.05$ );β-半乳糖苷酶染色显示,VPA+ATRA组衰老细胞比例显著增加,与对照组及VPA组、ATRA组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );Q-PCR和Western blot法结果显示,VPA单独和联合ATRA可上调P16、P63的表达,降低hTERT的表达,且联合用药优于单独用药及对照组( $P < 0.05$ )。结论 VPA联合ATRA可抑制子宫颈癌细胞增殖,上调P16和P63的表达,下调hTERT的表达,可能是其诱导细胞衰老的分子机制。

**关键词** 子宫颈癌;丙戊酸;维甲酸;细胞衰老

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0135-05

近年来子宫颈癌的发病率有明显上升和年轻化趋势,发病率以每年2%~3%的速度增长<sup>[1]</sup>。早期

子宫颈癌患者可采用手术治疗,而晚期患者主要以铂类化疗为主,但毒副作用大,患者易对其产生耐药性,患者生存率大大降低<sup>[2-3]</sup>。丙戊酸钠(valproate acid,VPA)是一种传统的抗癫痫药物,同时也是一种组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)抑制剂,高效、安全、低毒、可口服的特点使其极具临床前景。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid,ATRA)是维生素A的生物活性代谢产物,与其受体结合,具有促进上皮细胞分化成熟的作用,已作为一种诱导分化剂用于临床肿瘤的治疗。研究<sup>[4-5]</sup>证实VPA联合ATRA可使子宫颈癌细胞发生细胞周期阻滞,并诱导细胞分化,但细胞凋亡增加不明显。该研究进一步分析VPA联合ATRA的抗子宫颈癌作用,观察其对细胞衰老的影响并探讨其可能的分子机制,为寻求新的子宫颈癌治疗方法提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** VPA购自杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司,用PBS稀释成600 mmol/L的储存液,-20℃保存;ATRA购自美国Sigma公司,用DMSO稀释成833 mmol/L的储存液,-20℃保存;CellTiter 96® AQueous购自美国Promega公司;TRIzol购自美国Invitrogen公司;PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;P16、P63、hTERT抗体购自英国Abcam公司;相应蛋白的辣根酶标记二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DMEM培养基购自美国GIBCO公司;新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;ECL-增强化学发光检测试剂购自瑞士罗氏公司;BIORAD化

2014-11-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81372777、81372779、81072127)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院<sup>1</sup> 妇产科、<sup>2</sup> 分子医学重点实验室,合肥 230001

<sup>3</sup> 卫生部中日友好医院妇产科,北京 100086

作者简介:尤青叶,女,硕士研究生;

凌 斌,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:lingbin.ling@gmail.com

**Results** The results showed that the recombinant lentiviral vector GV248-GFP-Puro-shSIGIRR was successfully constructed. qRT-PCR and Western blot confirmed that SIGIRR was knockdown in HKC cells. Moreover, the results also showed that compared with the control cells, the phosphorylated NF-κB (p65) and the mRNA levels of MCP-1 and RANTES were significantly increased in HKC/shSIGIRR cells by being stimulated with IL-1β. **Conclusion** The results suggest that SIGIRR acts as a “brake” of inflammatory reaction in Toll-like receptor/IL-1 receptor (TLR/IL-1R) pathway in HKC cells. The study may provide a potential new target for the treatment of Lupus nephritis.

**Key words** lupus nephritis; human renal tubular epithelial cells; SIGRR; lentiviral vector; NF-κB; chemokine