

RNAi 干扰 *WT1* 和 *Pax2* 表达对逆转肾小管上皮间充质转化的作用

黄彬¹, 姜悦^{1*}, 皮蕾², 滕军旗¹

(1.中山大学附属第一医院检验医学部, 广东广州 510080; 2.广州市妇女儿童医疗中心检验科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】探讨抑制肾小管上皮间充质转化(EMT)过程中胚胎发育关键基因 *WT1* 和 *Pax2* 的表达对 EMT 的逆转作用。【方法】采用 RNAi 技术分别抑制 *WT1* 和 *Pax2*。分别构建 pshRNA-*WT1* 和 pshRNA-*Pax2* 表达载体, 采用脂质体转染技术, 使质粒瞬时转染 NEK52E 细胞后用 10 ng/mL IL-1 α 刺激细胞, 分别提取不同时间点细胞的 RNA 和蛋白质, 采用 RT-PCR 和 Western blot 检测细胞 *WT1*、*Pax2*、*Snail*、上皮细胞标志 *E-cadherin* 和间充质标志 α -SMA 的 mRNA 和蛋白质的表达, 并观察 NRK52E 细胞的形态。【结果】构建的 pshRNA-*WT1* 和 pshRNA-*Pax2* 表达载体可在转染细胞内发挥 RNAi 作用抑制 *WT1* 和 *Pax2* 基因的表达, 抑制率分别为 80.4% 和 82.7%。分别抑制 *WT1* 和 *Pax2* 基因后 EMT 过程受阻, α -SMA 和 *Snail* 的表达显著减少, *E-cadherin* 的表达无显著性变化, 细胞形态未发生明显的成纤维化样改变。【结论】*WT1* 和 *Pax2* 基因是 EMT 中的关键基因, 分别抑制胚胎发育关键基因 *WT1* 和 *Pax2* 均可使 EMT 受阻。阻断 *WT1* 和 *Pax2* 的表达有望中止 EMT 及肾纤维化的发生。

关键词: RNAi; 上皮间充质转化; 肾小管上皮细胞

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)04-0442-07

Reverse Effect on Renal Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition by RNAi Silencing *WT1* and *Pax2* Expression

HUANG Bin¹, JIANG Tang^{1*}, PI Lei², TENG Jun-qi¹

(1. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Laboratory Medicine, The Hospital for Women and Children of Guangzhou, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the reverse effect on renal tubular epithelial to mesenchymal transition by RNA interference (RNAi) silencing the embryonic genes *WT1* and *Pax2* expression. 【Methods】 RNAi was used to inhibit *WT1* and *Pax2*. *WT1* shRNA expression vector pshRNA-*WT1*-452 and pshRNA-*WT1*-283, *Pax2* shRNA expression vector pshRNA-*Pax2*-983 and pshRNA-*Pax2*-302 were constructed. Plasmids were transfected into NEK52E cells with cationic liposome, and then 10 ng/mL IL-1 α was added to stimulate NRK52E cells. RNA and protein were extracted at different time points respectively, and *WT1*, *Pax2*, *Snail*, the epithelial marker *E-cadherin*, the mesenchymal marker α -SMA mRNA and protein were detected using RT-PCR and Western blot analysis; the morphology of cells was observed. 【Result】 pshRNA-*WT1* and pshRNA-*Pax2* specifically and efficiently inhibited *WT1* and *Pax2* expression in NEK52E cells by RNAi, the repression rates were 80.4% and 82.7%, respectively. Repressing *WT1* and *Pax2* using RNAi blocked EMT in NRK52E cells treated with IL-1 α , which was evidenced by suppressed α -SMA, *Snail* expression, restored *E-cadherin* expression, and the normal cell morphology. 【Conclusion】 Our experiments suggest that *WT1* and *Pax2* expression in tubular epithelial cells play an important role in promotion of EMT, and there may be therapeutic value in silencing *WT1* and *Pax2* so as to prevent or to reverse renal fibrosis.

Key words: RNA interference; epithelial to mesenchymal transition; renal tubular epithelial cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4):442-448, 510]

收稿日期: 2010-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(30370661); 广东省自然科学基金(31683)

作者简介: 黄彬, 医学博士, 副主任技师, E-mail: hb906@163.com; * 通信作者: 姜悦, E-mail: jennyj@vip.163.com

上皮细胞在特定的病理状态下可通过上皮细胞-肌成纤维细胞间的逆向分化,即上皮间充质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)^[1-2]成为具有多向分化功能的间充质细胞。大量的研究资料和本课题组前期实验均表明,在肾间质纤维化中存在肾小管上皮细胞转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MF)的现象。肾纤维化中, MF可来源于:①肾间质成纤维细胞;②血管平滑肌细胞;③肾小管上皮细胞。其中肾小管上皮细胞经 EMT 转化是 MF 的主要来源,肾小管上皮细胞失去上皮细胞的表型,获得新的间充质细胞的特点,如 E-钙粘素(E-cadherin)的表达减少、新表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)^[1-5]。除集合管,正常肾小管上皮细胞是由胚胎期后肾间充质细胞经间充质上皮转化(mesenchymal to epithelial transition, MET)而来^[6]。因此,实际上 EMT 是胚胎发育过程中 MET 的逆向分化过程。大量研究证实 EMT 在肾脏疾病的发展过程中起重要作用,并与疾病的严重程度相关,在肾纤维化中 EMT 发挥了关键作用^[1-5]。EMT 被很多生长因子、细胞因子、激素和细胞外信号调节,如 TGF- β 1、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、血管紧张素 II(angiotensin II, AngII) 和上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等^[2-7]。研究表明 IL-1 α 能使体外培养的肾小管上皮细胞 NRK52E 发生 EMT,抗 TGF- β 1 抗体能终止这种作用的发生^[7]。IL-1 是一种炎性因子,有广泛的生物学效应,作用于机体多个系统,参与免疫调节,介导炎症反应和致纤维化等。在人类和动物肾小球肾炎中,IL-1 的表达明显上调。把 IL-1 注入大鼠体内,在肾脏局部可见大量白细胞浸润,并继之以广泛的纤维化^[8]。本课题组前期研究成功建立了 EMT 动物模型(5/6 肾切除致大鼠肾衰)和 EMT 细胞模型(IL-1 α 刺激培养的 NRK52E 细胞)。在所建立的 EMT 模型中,我们观察到肾小管上皮细胞重新表达 Wilm's 肿瘤基因(Wilm's tumor 1, *WT1*)和 *Pax2* 基因(paired box gene 2, *Pax2*),提示 *WT1* 和 *Pax2* 在 EMT 过程中重新表达并参与了 EMT 过程。*WT1* 和 *Pax2* 是胚胎发育的关键基因,出生后表达关闭^[9-10]。为了进一步研究 *WT1* 和 *Pax2* 在 EMT 中重新表达的意义和作用,本文拟采用 RNAi 技术使 EMT 中重新表达的 *WT1* 和 *Pax2* 沉默,研究 *WT1* 和 *Pax2* 被沉默后细胞发生的变化,探讨逆转 EMT 的策略,为临床治疗肾纤维化指出

一条可能的新途径。

1 材料与方法

1.1 细胞株、细菌和质粒

肾近曲小管上皮细胞系 NRK52E 由中山大学附属第一医院肾病实验室提供,pGenesil-1 质粒由重庆医科大学张鹏辉博士惠赠,大肠埃希菌 *DH5 α* 由本室保存。

1.2 主要试剂与仪器

内切酶 *Bam* HI、*Hind* III 和 *Sal* I 购自 Roche 公司(瑞士),DNA 纯化试剂盒购自上海生物工程有限公司,去内毒素质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司(荷兰),shRNA DNA 片段由武汉晶赛生物工程技术有限公司合成。Lipofectamine 2000 和 TRIzol 购自 Invitrogen 公司(美国),DMEM/F12 培养基购自 GIBCO 公司(美国),重组大鼠 IL-1 α 购自 Cytolab 公司(美国),RT-PCR 试剂购自 MBI Fermentas 公司(美国),兔抗 E-cadherin 单克隆抗体、兔抗 β -actin 多克隆抗体、兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司(美国),兔抗 α -SMA 多克隆抗体、兔抗 Snail 多克隆抗体购自 Abcam 公司(英国),兔抗 *Pax2* 多克隆抗体、FITC 标记羊抗兔 IgG 二抗购自 Covance 公司(美国),兔抗 *WT1* 多克隆抗体购自 Calbiochem 公司(德国)。Axioplan 全自动显微镜购自 Zeiss 公司(德国),SHK-99-11 恒温摇床购自北京北方工业公司,Fluor ChemTM 8900 凝胶成像分析仪购自 Alfa Innotech 公司(美国),mini-PROTEIN II 垂直电泳仪购自 Bio-Rad 公司(美国),9700 扩增仪购自 ABI 公司(美国),CK40 倒置显微镜购自 Olympus 公司(日本)。

1.3 pshRNA-*WT1*、pshRNA-*Pax2*、阴性对照和阳性对照表达质粒的构建

根据 shRNA 的设计原则^[11-12]、载体 pGenesil-1 的酶切位点以及 GenBank 中 *WT1* 和 *Pax2* 的编码序列(NM_031534)和(XM_239083),合成针对 *WT1* 编码区 452 ~ 473 bp 和 283 ~ 302 bp 为靶向的 DNA 片段和针对 *Pax2* 编码区 983 ~ 1002 bp 和 302 ~ 323 bp 为靶向的 DNA 片段,茎环结构(Loop)为 9 个与靶基因不互补的非同源碱基(TTCAAGACG),末端终止信号为 TTTTTT。在合成 DNA 片段的末端设计上 *Bam* HI 和 *Hind* III 酶切

位点,在 *Hind* III 酶切位点前加上 *Sal* I 酶切位点,用 BLAST 检索设计的 DNA 片段序列的特异性,同时设计针对 *GAPDH* 序列的 shRNA 作为阳性对照,与 *WT1* 和 *Pax2* 基因无同源性的 *HK* 序列为阴性对照。所用 shRNA 序列见表 1。

表 1 本研究所用的 shRNA 序列
Table 1 shRNA used in this study

Target gene	Target sequence	Plasmid name
<i>WT1</i>	5'-AAGGATACAGCACGGTCACCTT-3'	pshRNA-WT1-452
	5'-GCCTTCACCTTGCACCTTCT-3'	pshRNA-WT1-283
<i>Pax2</i>	5'-TGTGTCAGGCACACAGACG-3'	pshRNA-Pax2-983
	5'-AACGCCCAAAGTGGTGACAA-3'	pshRNA-Pax2-302
<i>GAPDH</i> (Positive control)	5'-GTGGATATTGTTGCCATCA-3'	pGAPDH
Negative control	5'-GACTTCATAAGGCCGATGC-3'	pHK

将合成的 DNA 单链退火、克隆到线性化的 pGenesil-1,然后转化大肠埃希菌 *DH5 α* ,筛选重组质粒,并将筛选的重组质粒送往上海申友生物技术有限公司进行序列分析,以证实目的 DNA 片段已经克隆到 pGenesil-1 载体。

1.4 NRK52E 细胞的复苏

从液氮罐中取出细胞冻存管,迅速投入 37℃ 水浴中,至融化。低速离心 10 min。去上清,加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 1 mL,吹打混匀后转移至培养瓶内,加入适量培养基置于 37℃、5%(体积分数)CO₂ 细胞培养箱内培养。

1.5 细胞转染

采用 Lipofectamine 2000 瞬时转染质粒,按照试剂盒说明书进行操作。NRK52E 细胞随机分为下列各组:①空白对照组:用无血清的 DMEM/F12 培养基培养;②单纯 IL-1 α 刺激组:用含 10 ng/mL IL-1 α 的无血清 DMEM/F12 培养基培养;③空载体组:转染 pGenesil-1 质粒;④实验组:分别转染 pshRNA-WT1-452、pshRNA-WT1-283、pshRNA-Pax2-983 和 pshRNA-Pax2-302 质粒;⑤阳性对照组:转染 pGAPDH 质粒;⑥阴性对照组:转染 pHK 质粒。转染质粒 24 h 后,换用无血清的 DMEM/F12 培养基同步化 24 h,然后加入终浓度为 10 ng/mL 的 IL-1 α 培养。

1.6 RT-PCR

收集各组细胞,按照 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,然后按照 Revert Aid™ First Strand

cDNA Synthesis Kit 说明书进行逆转录。大鼠 *WT1*、*Pax2*、 α -*SMA*、*Snail*、*E-cadherin* 及 β -*actin* 基因序列通过 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/fulltext.html>) 获得,引物设计采用 PRIMER 5.0 软件,所设计引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表 2。

表 2 PCR 扩增所用的引物序列及产物大小
Table 2 PCR primers used in this study and amplification products length

Gene	Primer(5'-3')	Products length (bp)
<i>WT1</i>	P1 CCA CCC CAC TCC TTC ATC AAA	731
	P2 AAG AGT TGG GGC CAC TCC AGA TA	
<i>Pax2</i>	P1 TCG GAC CCT GAC TAA TGG C	310
	P2 TCC TTT CCT GTC TGG CAA CT	
α - <i>SMA</i>	P1 AGC TAT GAG CTG CCT GAC G	412
	P2 AGA AGC ATT TGC GGT GGA	
<i>E-cadherin</i>	P1 GCA GTT CTG CCA GAG AAA CC	315
	P2 AAT CCT GCT TCC AGG GAG AT	
<i>Snail</i>	P1 GCTGCCAATGCTCATCTGGGACTCT	300
	P2 TTGAAGGGCTTTTCGAGCCTGGAGAT	
β - <i>actin</i>	P1 GCC CAT CTA TGA GGG TTA C	570
	P2 CTG GAA GGT GGA CAG TGA G	

采用 50 μ L PCR 反应体系,94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s(β -*actin*、*WT1*、*E-cadherin*、*Snail*)或 60℃ 退火 30 s(*Pax2*、 α -*SMA*),72℃ 延伸 45 s,35 个循环,然后 72℃ 延伸 10 min。取 4 μ L PCR 产物在含有 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 10 g/L 琼脂糖凝胶中以 85 V 恒压电泳 30 min,用凝胶成像分析仪成像并半定量分析 DNA 带的含量,以所测得样品的积分吸光度与内参照 β -*actin* 积分吸光度的比值代表半定量值。

1.7 Western blot 分析

按 TRIzol 试剂盒说明书提取蛋白质,并在微量蛋白/核酸测定仪上测定总蛋白浓度,然后进行 SDS-PAGE 电泳、转移电泳和免疫印迹杂交。用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS 封闭液封闭 NC 膜, TBST 洗膜后用 50 g/L BSA 稀释的一抗(α -*SMA* 多克隆抗体 1:400、*E-cadherin* 单克隆抗体 1:600、*WT1* 多克隆抗体 1:800、*Pax2* 多克隆抗体 1:800、*Snail* 多克隆抗体 1:800、 β -*actin* 多克隆抗体 1:500、*GAPDH* 多克隆抗体 1:500) 分别与膜孵育,4℃ 摇床过夜。洗膜后加入 HP 标记的抗兔 IgG 二抗(1:1 000),室温孵育 1 h,洗膜后将 NC 膜置于发光液

中 1 min,取出膜甩去多余液体,将膜置于两张干净的透明薄膜之间,对着 X-线胶片曝光 30 s ~ 10 min。自动洗片机洗片后用凝胶成像分析仪成像,并扫描分析蛋白质带的含量,用与 β -actin 的比值作为半定量结果。

1.8 统计学处理

全部数据用 SPSS 11.0 统计软件进行处理。资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,经 Levene 检验之后,得知方差齐性,两组间均数比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的电泳鉴定

pGenesil-1 质粒的多克隆位点 (MCS) 如下: -*Hind* III-shRNA-*Bam* HI-U6 promotor-*Eco* RI-*Sal* I-*Xba* I-*Dra* III-。在插入的目的基因片段里,设计了一个 *Sal* I 的酶切位点,插入在质粒 pGenesil-1 的 *Bam* HI 和 *Hind* III 之间,如若插入正确,就能被 *Sal* I 酶切出一条约 400 bp 的 DNA 小带。经酶切鉴定分析,重组质粒 pshRNA-WT1-452、pshRNA-WT1-283、pshRNA-Pax2-983、pshRNA-Pax2-302、pHK 和 pGAPDH 符合设计要求 (见图 1)。

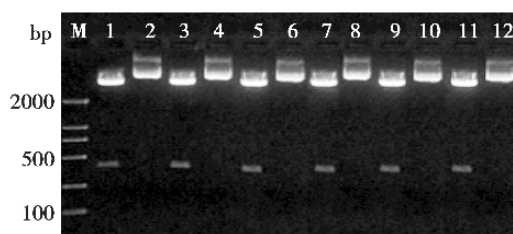


图 1 重组质粒 DNA 酶切鉴定图

Fig.1 Restriction pattern of the recombinant plasmid

M: DNA marker; 1: pHK + *Sal* I; 2: pHK; 3: pGAPDH + *Sal* I; 4: pGAPDH; 5: pshRNA-WT1-452 + *Sal* I; 6: pshRNA-WT1-452; 7: pshRNA-WT1-283 + *Sal* I; 8: pshRNA-WT1-283; 9: pshRNA-Pax2-983 + *Sal* I; 10: pshRNA-Pax2-983; 11: pshRNA-Pax2-302 + *Sal* I; 12: pshRNA-Pax2-302

2.2 重组质粒插入基因序列测定

将筛选的克隆送上海申友生物技术有限公司进行测序,结果显示与设计的 DNA 序列完全一致,进一步证实重组质粒 pshRNA-WT1-452、pshRNA-WT1-283、pshRNA-Pax2-983、pshRNA-Pax2-302、pHK 和 pGAPDH 构建成功。

2.3 转染 pshRNA-WT1 质粒后 NRK52E 细胞 *WT1* 基因的表达改变

RT-PCR 和 Western blot 结果显示, NRK52E 细胞分别转染 pshRNA-WT1-452 和 pshRNA-WT1-283 质粒后再给予 IL-1 α 刺激, *WT1* mRNA 和蛋白质的表达与单纯 IL-1 α 刺激组相比均明显减弱 ($P < 0.05$)。转染 pshRNA-WT1-452 的细胞 *WT1* mRNA 和蛋白质减弱的程度比转染 pshRNA-WT1-283 的细胞弱,两者的基因沉默效率分别为 60.5% 和 80.4%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。空白对照组无 *WT1* 的表达,阴性对照组、阳性对照组和空载体组 *WT1* 的表达同单纯的 IL-1 α 刺激组,差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 2)。

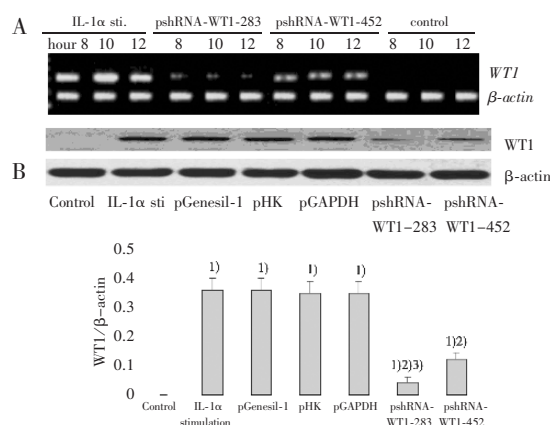


图 2 转染 pshRNA-WT1 质粒后 *WT1* 基因的表达改变

Fig.2 pshRNA-WT1-mediated repression of *WT1* in cultured NRK52E cells

A: RT-PCR; B: Western blot, after cells were transfected with plasmid for 48 h; 1) $P < 0.05$ versus control; 2) $P < 0.05$ versus IL-1 α stimulation group; 3) $P < 0.05$ versus pshRNA-WT1-452

2.4 转染 pshRNA-WT1 后 NRK52E 细胞相关基因的表达改变

RT-PCR 和 Western blot 结果显示,转染 pshRNA-WT1-283 质粒后再给予 IL-1 α 刺激, NRK52E 细胞少量表达 α -SMA 和 Snail,其 α -SMA 和 Snail 的表达量与单纯 IL-1 α 刺激组相比明显减少 ($P < 0.05$),空白对照组不表达 α -SMA 和 Snail。RT-PCR 和 Western blot 结果显示, pshRNA-WT1-283 质粒转染组 E-cadherin 的表达量随 IL-1 α 刺激时间的延长无统计学意义 ($P > 0.05$),与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而与单纯 IL-1 α 刺激组相比则明显增多 ($P < 0.05$; 图 3)。

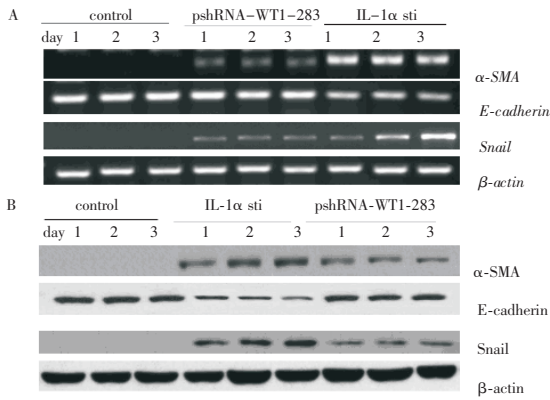


图 3 转染 pshRNA-WT1-283 质粒后 NRK52E 细胞 α -SMA、Snail 和 E-cadherin 的表达改变

Fig.3 Expression of α -SMA, Snail and E-cadherin after NRK52E cells were transfected with pshRNA-WT1-283

A: RT-PCR; B: Western blot

2.5 转染 pshRNA-Pax2 质粒后 NRK52E 细胞 Pax2 基因表达的改变

RT-PCR 和 Western blot 结果显示, NRK52E 细胞分别转染 pshRNA-Pax2-983 和 pshRNA-Pax2-302 质粒后再给予 IL-1 α 刺激, Pax2 mRNA 和蛋白质的表达与单纯 IL-1 α 刺激组相比均明显减弱 ($P < 0.05$)。转染 pshRNA-Pax2-983 的细胞 Pax2 mRNA 和蛋白质减弱的程度比转染 pshRNA-Pax2-302 的细胞强, 两者的基因沉默效率分别为 82.7% 和 65.6%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

NRK52E 细胞分别转染 pshRNA-Pax2-983 和 pshRNA-Pax2-302 质粒后再给予 IL-1 α 刺激, 未检测到 WTI mRNA 和蛋白质的表达。空白对照组无 Pax2 和 WTI 表达, 阴性对照组、阳性对照组和空载体组 Pax2 的表达同单纯的 IL-1 α 刺激组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 4)。

2.6 转染 pshRNA-Pax2 后 NRK52E 细胞相关基因的表达改变

RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 转染 pshRNA-Pax2-983 质粒后, NRK52E 细胞少量表达 α -SMA 和 Snail, 其 α -SMA 和 Snail 的表达量与单纯 IL-1 α 刺激组相比明显减少 ($P < 0.05$), 而空白对照组不表达 α -SMA 和 Snail。RT-PCR 和 Western blot 结果显示, pshRNA-Pax2-983 质粒转染组 E-cadherin 的表达量随 IL-1 α 刺激时间的延长无统计学意义 ($P > 0.05$), 与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而与单纯 IL-1 α 刺激

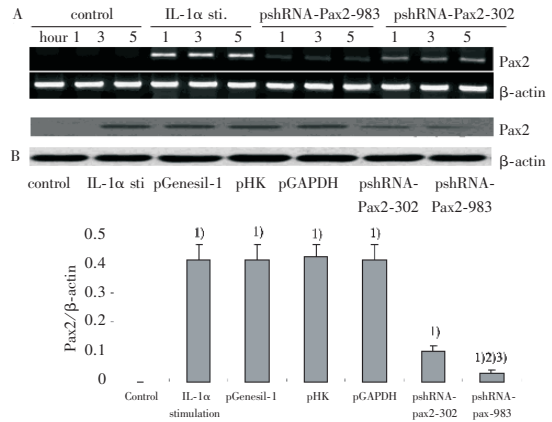


图 4 转染 pshRNA-Pax2 质粒后 Pax2 基因的表达改变

Fig.4 pshRNA-Pax2-mediated repression of Pax2 in cultured NRK52E cells

A: RT-PCR; B: Western blot, after cells were transfected with plasmid for 36 h; 1) $P < 0.05$ versus control; 2) $P < 0.05$ versus IL-1 α stimulation group; 3) $P < 0.05$ versus pshRNA-Pax2-302

组相比则明显增多 ($P < 0.05$; 图 5)。

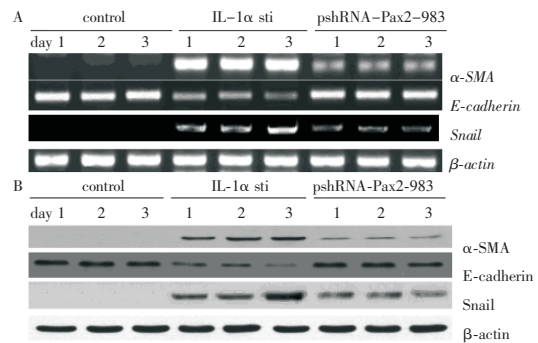


图 5 转染 pshRNA-Pax2-983 质粒后 NRK52E 细胞 α -SMA、Snail 和 E-cadherin 的表达改变

Fig.5 Expression of α -SMA, Snail and E-cadherin after NRK52E cells were transfected with pshRNA-Pax2-983

A: RT-PCR; B: Western blot

2.7 转染 pshRNA-WT1 或 pshRNA-Pax2 后 NRK52E 细胞形态的改变

光镜下观察发现转染 pshRNA-WT1-283 或 pshRNA-Pax2-983 质粒后再给予 IL-1 α 刺激, NRK52E 细胞形态仍呈多边鹅卵石样, 未发生明显的成纤维化样改变(图 6)。

3 讨论

在肾脏发育过程中, 胚胎期肾小管上皮细胞是由间充质细胞分化而来。在胚胎发育晚期, 间充

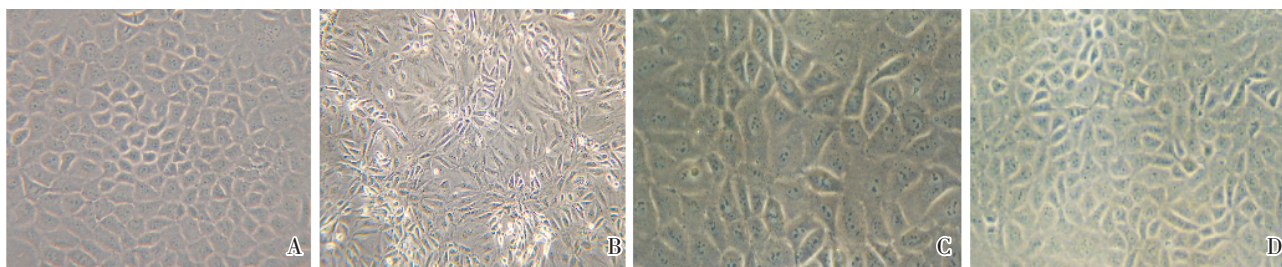


图6 培养3 d的NRK52E细胞的形态

Fig.6 Morphology of NRK52E cells

A: serum-free medium alone; B: IL-1 α (10 ng/mL) stimulated; C: transfected with pshRNA-WT1-283; D: transfected with pshRNA-Pax2-983; $\times 200$

质细胞慢慢失去其作为间充质细胞的表型,并逐步获得上皮细胞的形态和功能学特征,完成MET的表型转化^[6]。组织学理论认为,上皮细胞是成熟的终末功能细胞,一经发育成熟便不能进一步分化。但近年来的研究表明,在某些疾病如恶性肿瘤、肾脏慢性损伤的发生和发展过程中,存在EMT转化现象:上皮细胞在特定的病理状态下,通过EMT转化成为具有多向分化功能的间充质细胞。EMT现象被认为是组织胚胎学界的一场革命。目前发现,EMT可能涉及细胞的迁徙、损伤修复、疾病的迁延等一系列细胞病理和生理功能,在疾病的发展过程中起重要作用,并与疾病的严重程度相关^[1-5]。因此研究疾病状态下EMT的发生机制及其逆转策略具有十分重要的意义。

胚胎肾发育过程中,一系列基因参与了MET转化过程。这一过程涉及了一系列参与、影响肾小管上皮细胞发育基因的开启和关闭,其中研究得较为清楚的基因有*WT1*和*Pax2*^[13-15]。组织胚胎学研究证实,它们在控制胚胎肾小管上皮细胞分化、发育中起关键作用,出生后便一直处于关闭状态。*WT1*和*Pax2*的表达时间、部位、数量的消涨与肾脏发育过程中MET转化存在密切的关系。*WT1*和*Pax2*在肾脏发育早期便表达升高,随着肾小管上皮细胞的发育成熟,*WT1*和*Pax2*的表达逐渐下降至消失。正常的成年肾近曲小管细胞核内不表达*WT1*和*Pax2*。研究发现,*WT1*或*Pax2*基因敲除小鼠的胚胎肾不能发育;*WT1*或*Pax2*基因突变均引起肾肿瘤的发生或者肾脏畸形发育^[13-15]。

本课题组前期研究发现:在胚胎成熟后,上皮细胞内控制间充质细胞表型的基因信息并非完全消失而只是暂时关闭。在肾胚胎发育时*WT1*和*Pax2*表达,肾脏发育成熟后表达几近消失,*WT1*和*Pax2*基因呈关闭—开放—关闭的模式。在本课题

组建立的5/6肾切除致大鼠肾衰的EMT动物模型和IL-1 α 刺激NRK52E的EMT细胞模型中,*WT1*和*Pax2*重新一过性表达,其重新表达可能与肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞逆向分化有关^[9-10]。

为了深入研究*WT1*和*Pax2*基因在EMT转化中重新表达的意义和作用,本研究采用RNAi干扰EMT过程中重新表达的*WT1*和*Pax2*基因,试图阐明EMT的可能机制,探讨中止肾小管上皮细胞逆向分化的策略,为最终阻止慢性肾功能衰竭、肾纤维化及治疗慢性肾纤维化提供实验室依据。

本实验应用转录载体pGenesil-1构建了靶向*WT1*和*Pax2*的质粒载体pshRNA-WT1和pshRNA-Pax2,转染NRK52E细胞后通过RT-PCR和Western blot检测相关基因和蛋白的表达来观察基因沉默的效果。研究结果显示pshRNA-WT1和pshRNA-Pax2能特异性地抑制*WT1*和*Pax2*的表达,抑制率分别为80.4%和82.7%。使*WT1*和*Pax2*基因沉默后,发生EMT转化的NRK52E细胞 α -SMA和Snail的表达减少,E-cadherin的表达恢复,细胞未发生明显的成纤维化样改变。实验结果提示*WT1*和*Pax2*是EMT的关键基因,阻断*WT1*和*Pax2*的重新表达有望中止EMT转化及肾脏纤维化的发生。

目前在其他器官的研究中发现了类似的研究结果。Nick Hastie等的研究发现,在心脏的发育过程中,来源于心外膜的血管祖细胞的增生需要*WT1*的表达,*WT1*通过转录调节Snail和E-cadherin来抑制上皮细胞表型的产生,敲除*WT1*后间充质祖细胞减少^[16]。另有研究表明,敲除WT1+KTS同源异构体的小鼠,其神经祖细胞的增生能力降低,提示维持祖细胞的未分化状态需要*WT1*的表达^[17]。本文的研究结果表明,在肾小管上皮细胞发生EMT转化的过程中,*WT1*重新表达,

抑制 *WT1* 的表达后,EMT 过程受阻,提示对于肾脏细胞的未分化状态需要 *WT1* 的表达。

肾结核病人的肾脏呈弥漫性纤维化,Murer 等人发现肾结核病人肾小管 *Pax2* 大量表达,*Pax2* 的大量表达可能与其肾纤维化相关^[18]。很多研究表明,在肾脏发育过程中 *Pax2* 位于 *WT1* 上游。体外研究表明,*Pax2* 结合并转录激活 *WT1* 的启动子^[13-15]。因此,我们推测在 EMT 过程中,*Pax2* 可能通过转录激活 *WT1* 发挥作用。本实验发现,转染 pshRNA-*Pax2* 后未检测到 *WT1* 的表达,而转染 pshRNA-*WT1* 对 *Pax2* 的表达无影响,表明抑制 *Pax2* 基因表达的同时也抑制了 *WT1* 的表达。且实验发现 IL-1 α 刺激 NEK52E 细胞后 1~5 h,NEK52E 细胞表达 *Pax2* 基因;刺激后 8~12 h,NEK52E 细胞表达 *WT1* 基因,*Pax2* 的表达先于 *WT1* 的表达,提示在 EMT 过程中 *Pax2* 基因位于 *WT1* 基因上游。

转录因子 Snail 是锌指结合蛋白,在 EMT 转化过程中发挥重要作用。Snail 通过与 E-cadherin 和其他基因启动子特异的 DNA 序列 (E-box) 结合,从而抑制这些基因的表达^[19]。E-cadherin 是上皮细胞间连接的主要分子。本研究发现,在 IL-1 α 刺激 NEK52E 细胞发生 EMT 的过程中,E-cadherin 表达下调,而 α -SMA 和 Snail 获得重新表达,抑制 *WT1* 和 *Pax2* 基因后 E-cadherin 表达恢复, α -SMA 和 Snail 的表达显著减少。实验结果提示,在 EMT 过程中,*Pax2* 基因位于 *WT1* 基因上游,*Pax2* 重新表达后激活 *WT1* 基因的表达,然后转录激活 Snail,Snail 通过与 E-cadherin 启动子的 E-box 结合,抑制 E-cadherin 的表达,细胞发生表型改变。采用 RNAi 分别使 *WT1* 和 *Pax2* 基因沉默后,EMT 过程受阻, α -SMA 和 Snail 的表达显著减少,E-cadherin 的表达无显著性变化,细胞形态未发生明显的成纤维化样改变。因此,*WT1* 和 *Pax2* 基因是 EMT 中的关键基因,分别抑制胚胎基因 *WT1* 和 *Pax2* 均可使 EMT 受阻,这为阻断肾纤维化的发生指出了一条可能的新途径。当然,*WT1* 和 *Pax2* 基因参与 EMT 过程的确切机制尚需深入研究。

参考文献:

[1] Rastaldi MP. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for the development of renal tubulointerstitial fibrosis[J]. J Nephrol, 2006, 19(4):

407-412.

- [2] Li MX, Liu BC. Epithelial to mesenchymal transition in the progression of tubulointerstitial fibrosis[J]. Chin Med J, 2007, 120(21): 1925-1930.
- [3] Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A. Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis[J]. Transplant Rev, 2008, 22(1): 1-5.
- [4] Butt MJ, Tarantal AF, Jimenez DF, et al. Collecting duct epithelial-mesenchymal transition in fetal urinary tract obstruction[J]. Kidney Int, 2007, 72(8): 936-944.
- [5] Ghersi G. Roles of molecules involved in epithelial/mesenchymal transition during angiogenesis [J]. Front Biosci, 2008, 13(1): 2335-2355.
- [6] Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia; induction, nephrogenesis, and cell differentiation [J]. Physiol Rev, 1999, 79(4): 1157-1191.
- [7] Fan JM, Huang XR, Ng YY, et al. Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor β -dependent mechanism in vitro [J]. Am J Kidney Dis, 2001, 37(4): 820-831.
- [8] Margetts PJ, Kolb M, Yu L, et al. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum [J]. Am J Pathol, 2002, 160(6): 2285-2294.
- [9] 姜悦,袁飞,刘云启,等. Wilms 瘤 1 基因在肾小管上皮细胞转分化中的表达及作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21(8): 448-452.
- [10] 姜悦,皮蕾,袁飞,等. 胚胎分化/发育基因 Pax2 与 WT1 的序列启动在肾小管上皮细胞逆向分化中的意义[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(9): 1775-1781.
- [11] Cheng TL, Chang WT. Construction of simple and efficient DNA vector-based short hairpin RNA expression systems for specific gene silencing in mammalian cells [J]. Methods Mol Biol, 2007, 408: 223-241.
- [12] Lai SR, Andrews LG, Tollefsbol TO. RNA interference using a plasmid construct expressing short-hairpin RNA [J]. Methods Mol Biol, 2007, 405(1): 31-37.
- [13] Discenza MT, He S, Lee TH, et al. WT1 is a modifier of the Pax2 mutant phenotype: cooperation and interaction between WT1 and Pax2 [J]. Oncogene, 2003, 22(50): 8145-8155.
- [14] Hosono S, Luo X, Hyink DP, et al. WT1 expression induces features of renal epithelial differentiation in mesenchymal fibroblasts[J]. Oncogene, 1999, 18(2):

(下转第 510 页 to page 510)