

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.06.016

论著 · 实验研究

沉默 PAX2 基因对肾间质纤维化大鼠的影响

李丽¹ 吴玉斌² 徐海生¹ 王长山³

(1. 佳木斯大学附属第一医院儿科, 黑龙江 佳木斯 154002;
2. 中国医科大学附属盛京医院小儿肾内科, 辽宁 沈阳 110004;
3. 佳木斯大学基础医学院生物教研室, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] **目的** 探讨体内沉默 PAX2 基因对肾间质纤维化大鼠肾小管上皮细胞转分化 (EMT) 的影响。
方法 64 只 Wistar 大鼠麻醉后, 单侧输尿管结扎法制作肾间质纤维化大鼠模型, 随机分为阴性对照组和 PAX2 基因沉默组, 每组 32 只。将 200 μ L NC-siRNA-in vivo jetPEITM 混合液转染阴性对照组大鼠, 将 200 μ L PAX2-siRNA-in vivo jetPEITM 混合液转染 PAX2 基因沉默组大鼠, 各组分别于转染后 3、5、7、14 d 分为 4 个亚组, 每组 8 只。留取各组肾组织标本, 应用 Real-Time PCR 及 Western blot 法检测肾皮质 PAX2 mRNA 及其蛋白的沉默情况, 以及 E-钙粘素 (E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) mRNA 和蛋白表达情况。**结果** PAX2 基因沉默组 PAX2 mRNA 和蛋白表达量较阴性对照组均降低 ($P < 0.05$)。随着梗阻时间的延长, 两组 E-cadherin mRNA 和蛋白表达量逐渐下降, α -SMA mRNA 和蛋白表达量逐渐升高; 在转染 14 d 时, PAX2 基因沉默组 E-cadherin mRNA 和蛋白相对表达量明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 而 α -SMA mRNA 和蛋白相对表达量明显低于阴性对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 沉默 PAX2 基因在肾间质纤维化晚期大鼠中可明显抑制肾小管 EMT 进程, 可能对肾间质纤维化有治疗作用。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(6): 551-557]

[关键词] PAX2 基因; 基因沉默; 肾间质纤维化; 大鼠

Influence of PAX2 gene silencing on renal interstitial fibrosis in rats

LI Li, WU Yu-Bin, XU Hai-Sheng, WANG Chang-Shan. Department of Pediatrics, First Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002, China (Wang C-S, Email: wcs0451@163.com)

Abstract: Objective To investigate the influence of silencing PAX2 gene *in vivo* on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in rats with renal interstitial fibrosis. **Methods** A total of 64 Wistar rats were anaesthetized, and unilateral ureteral obstruction (UUO) was performed to establish a rat model of renal interstitial fibrosis. The 64 rats were randomly divided into negative control and PAX2 gene silencing groups ($n=32$ each). The rats in the control group were transfected with 200 μ L NC-siRNA-in vivo jetPEITM solution. Those in the PAX2 gene silencing group were transfected with 200 μ L PAX2-siRNA-in vivo jetPEITM solution. Each group was further divided into 4 subgroups based on the post-transfection time (3, 5, 7 and 14 days after transfection), with 8 rats in each subgroup. Renal tissue samples were harvested in each group. Real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of PAX2 in the renal cortex, as well as the mRNA and protein expression of E-cadherin and α -SMA. **Results** Compared with the control group, the PAX2 gene silencing group showed significantly lower mRNA and protein expression of PAX2 ($P < 0.05$). In the two groups, the mRNA and protein expression levels of E-cadherin were gradually reduced over the time of obstruction, while those of α -SMA gradually increased. At 14 days after transfection, the PAX2 gene silencing group had significantly higher mRNA and protein expression of E-cadherin but lower mRNA and protein expression of α -SMA compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** PAX2 gene silencing can significantly inhibit the process of EMT of renal tubular cells in rats with advanced fibrosis, suggesting that PAX2 gene silencing may have a therapeutic effect on renal interstitial fibrosis. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(6): 551-557]

Key words: PAX2 gene; Gene silencing; Renal interstitial fibrosis; Rats

[收稿日期] 2016-02-14; [接受日期] 2016-03-23

[基金项目] 黑龙江省青年科学基金项目 (QC2012C119); 黑龙江省卫生厅项目 (2012-198); 佳木斯大学科学技术项目-重点项目 (Sz2014-011)。

[作者简介] 李丽, 女, 博士, 副教授。

[通信作者] 王长山, 男, 副教授。

肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 是指由多种原因引起的细胞外基质成分在肾间质过度沉积和肾间质纤维的增生变化; 是各种慢性肾脏疾病发展至终末期肾功能不全的统一通路和重要原因^[1]。单侧输尿管结扎 (unilateral ureteral obstruction, UO) 模型是 RIF 最经典的动物模型^[2]。RIF 的发病机制是复杂的病理过程, 目前认为肾小管上皮细胞转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在该过程中发挥重要作用^[3-4]。E-钙粘素 (E-cadherin) 是肾小管上皮细胞特征性标志^[5], 在 EMT 时首先消失; α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth activator protein, α -SMA) 是公认的肌成纤维细胞标志性蛋白, 是 EMT 的重要标志^[6]。RIF 的发生发展机制尚未完全阐明, 临床上治疗效果不理想, 缺乏治疗方案, 因而阻滞或延缓 RIF 病理过程是阻止肾功能进行性衰竭的关键。

PAX2 (paired box 2) 基因编码核转录因子, 参与了肾脏胚胎发育的基因调控, 肾单位发育成熟后 PAX2 表达即消失。近年来研究发现 PAX2 在肾脏疾病中出现重新表达, 本课题组前期的工作证实 PAX2 重新表达参与了 RIF 过程^[7]。RNA 干扰技术是一种新的基因阻断技术, 广泛应用于哺乳细胞体外研究, 随着研究的深入, 如何把小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 导入动物或是人体内研究却遇到一定困难, jetPEI 纳米颗粒是具有极低的毒性、高重复性的基因载体, 可用于体内蛋白功能的研究、临床前研究、以及 RNA 干扰研究^[8-11]。目前关于 RIF 的 RNA 干扰研究, 仅限于转染体外细胞, 本实验前期已成功筛选出 PAX2-siRNA 用于大鼠体内转染^[10], 有效沉默 PAX2 基因, PAX2 基因沉默是否通过参与 EMT 过程, 延缓肾小管 EMT 进程, 目前体内动物实验尚未见报道, 本实验应用 jetPEI 纳米颗粒介导 PAX2-siRNA 转染 UO 大鼠体内, 明确 PAX2 基因沉默对 RIF 肾小管 EMT 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

4~6 周龄雄性 Wistar 大鼠 64 只, 体重 120~150 g, 购于中国医科大学实验动物中心, 合格证号: SYXK (辽) 2003-0019。PAX2 单克

隆抗体购于美国 Zymed 公司; TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司; Prime ScriptTM RT Reagent Kit 和 Real time quantitative PCR (SYBR Premix Ex TaqTM) 试剂盒购于 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司; PCR 引物经大连宝生物公司合成; E-cadherin 和 α -SMA 单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司; 2'F 修饰的 PAX2-siRNA 和 NC-siRNA (阴性对照) 由上海吉玛公司合成; in vivo-jetPEITM 购于法国 PolyPlus Transfection 公司。

1.2 siRNA 设计合成

首先从 NCBI 数据库中获取大鼠 PAX2 基因编码序列全长 (GeneID: 293992, mRNA: NM_001106361), 由上海吉玛公司合成干扰 PAX2 基因的 PAX2-siRNA 和随机的不靶向任何基因的阴性对照 NC-siRNA, 序列见表 1。

表 1 PAX2-siRNA 和 NC-siRNA 的 siRNA 序列表

siRNA	序列
PAX2-siRNA	sense: 5'-GGAGCGAGUUCUCAGGCAATT-3' Anti-sense: 5'-UUGCCUGAGAACUCGCUCCCA-3'
NC-siRNA	sense: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' Anti-sense: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

1.3 转染液配制

siRNA 与 in vivo jetPEITM 混合液的配制严格按照操作说明进行, 详见参考文献^[10]。即: (1) 将 80 μ g siRNA 粉末 (NC-siRNA 或 PAX2-siRNA) 离心后加入 5% 葡萄糖溶液 100 μ L, 充分混合; (2) 取 8 μ L in vivo-jetPEITM 加入 5% 葡萄糖溶液 92 μ L, 充分混合; 将 (1) 溶液立刻加入到 (2) 溶液中, 共 200 μ L, 室温孵育 15 min。

1.4 制作 UO 动物模型及体内转染

64 只 Wistar 大鼠用水合氯醛麻醉后, 沿左耻骨上切开, 在左肾下方找到并分离出输尿管, 将输尿管上、下结扎两处, 从中间进行剪断^[7]。随机分为阴性对照组和 PAX2 基因沉默组, 每组 32 只。将 200 μ L NC-siRNA-in vivo jetPEITM 混合液分成 4 份 (每份 50 μ L), 在每只阴性对照组大鼠肾脏上、下极和肾脏两侧缘的中央分别进行肾脏被膜下注射, 分层缝合后关闭腹腔; 将 200 μ L PAX2-siRNA-in vivo jetPEITM 混合液分成 4 份 (每份 50 μ L) 给每只 PAX2 基因沉默组大鼠进行注射,

注射部位同阴性对照组。再将两组大鼠按转染后3、5、7、14 d分为4个亚组，每亚组8只大鼠。

1.5 标本采集

各组大鼠分别于转染后3、5、7、14 d进行水合氯醛麻醉，脊椎脱臼法处死大鼠。消毒、留取左侧梗阻肾，行盐水反复冲洗，将脂肪剥去，滤纸充分吸干，分离出皮质和髓质，放于液氮罐内，移至-80℃冰箱，待行Real-Time PCR和Western blot检测。

1.6 Real-Time PCR检测PAX2、E-cadherin和α-SMA mRNA表达

取两组转染后3、5、7、14 d大鼠肾皮质100 mg，TRIzol试剂提取总RNA，经37℃ 15 min，85℃ 5 s，逆转录合成cDNA，以此为模板用相应引物经PCR方法进行扩增。各基因引物序列见表2。

表2 各基因的引物序列表

引物	序列	片段长度 (bp)
PAX2-F	5'-CGGTGAGAAGAGGAAACGAG-3'	246
PAX2-R	5'-GCTTGGAAGACATCG GGATA-3'	
E-cadherin-F	5'-TGCTCCTACTGTTTCTACG-3'	111
E-cadherin-R	5'-CTTCTCCACCTCCCTCTT-3'	
α-SMA-F	5'-AGCCAGTCGCCATCAGGAAC-3'	90
α-SMA-R	5'-CCGGAGCCATTGTCACACAC-3'	
GAPDH-F	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	143
GAPDH-R	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	

扩增条件为：95℃预变性10 s；95℃变性5 s，60℃退火34 s，共40个循环。融解曲线条件（ABI7500机器自行设定）：95℃ 15 s，60℃ 1 min，95℃ 15 s。以前期实验中CT值最大的样品为标准样品，用EAZY Dilution依次稀释成4个梯度，与所有样品同时进行扩增。利用ABI 7500 Real-Time PCR system（美国应用生物系统公司），根据标准曲线自动进行分析，同时显示实验结果，用ΔΔCT法进行计算。

1.7 Western blot检测PAX2、E-cadherin和α-SMA蛋白表达

取两组转染后3、5、7、14 d大鼠肾皮质100 mg，加入裂解液500 μL研磨，离心10 min，取上清，测各样品中蛋白含量；取50 μg蛋白进

行聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至PVDF膜；脱脂奶粉行封闭，在4℃过夜；加PAX2（1:1000）、α-SMA（1:1000）和E-cadherin（1:1000）以及内参β-actin（1:1000）37℃ 2 h；TBST洗膜3次，每次10 min；加HRP标记的羊抗兔IgG（1:5000，美国Santa Cruz提供），37℃ 2 h，洗膜；DAB显色液铺于膜上，避光放置，约3 min后可出现蛋白显色带，将膜上条带扫描存入电脑，应用Quantity One-4.4.0分析软件，分析每条带的灰度值，结果用β-actin校正。

1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组间比较采用t检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后各时间点两组PAX2 mRNA的沉默效果

Real-Time PCR检测转染后不同时间点PAX2 mRNA的表达，通过所得出的扩增曲线，利用标准曲线算出CT值，结果各时间点PAX2基因沉默组与阴性对照组比较PAX2 mRNA的表达量明显下降 ($P < 0.05$)，见表3和图1。

表3 转染后不同时间点两组PAX2 mRNA相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	3 d	5 d	7 d	14 d
阴性对照组	1.58 ± 0.21	1.76 ± 0.35	3.05 ± 0.25	4.09 ± 0.42
PAX2基因沉默组	1.15 ± 0.24	1.21 ± 0.33	1.76 ± 0.20	1.99 ± 0.33
t值	3.8500	3.2523	11.2492	11.1418
P值	0.0018	0.0058	0.0001	0.0001

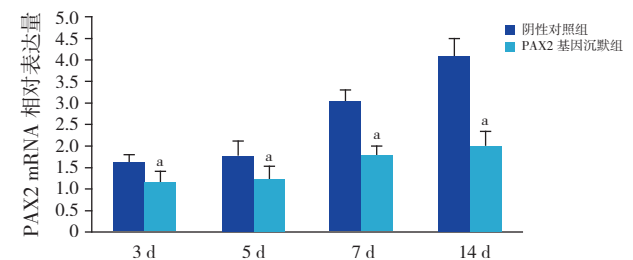


图1 Real-Time PCR法检测转染后不同时间点两组PAX2 mRNA相对表达量比较 (n=8) a示与阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 转染后各时间点两组 PAX2 蛋白的沉默效果

Western blot 检测转染后不同时间点两组 PAX2 蛋白的表达, 结果显示各条泳道都在 43 kD 及 46 kD 处出现条带, 说明 β -actin 及 PAX2 蛋白

为特异性条带。各时间点 PAX2 基因沉默组 PAX2 蛋白表达量与阴性对照组相比明显降低 ($P < 0.05$), 表明 PAX2-siRNA-in vivo jetPEI™ 复合物转染后各时间点 PAX2 蛋白的表达均受抑制, 见表 4 和图 2。

表 4 转染后不同时间点两组 PAX2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	3 d	5 d	7 d	14 d
阴性对照组	0.071 ± 0.008	0.190 ± 0.034	0.308 ± 0.053	0.437 ± 0.051
PAX2 基因沉默组	0.026 ± 0.005	0.051 ± 0.005	0.160 ± 0.025	0.198 ± 0.029
<i>t</i> 值	13.2778	11.4586	7.1050	11.6303
<i>P</i> 值	0.0001	0.0001	<0.001	0.0001

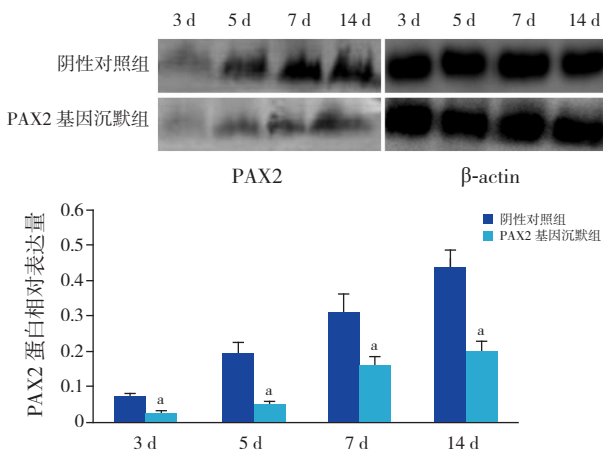


图 2 Western blot 法检测转染后不同时间点两组 PAX2 蛋白相对表达量比较 上图为电泳条带图; 下图为统计图 ($n=8$), a 示与阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 PAX2 基因沉默后两组大鼠各时间点 E-cadherin mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	3 d	5 d	7 d	14 d
阴性对照组	0.655 ± 0.023	0.559 ± 0.043	0.365 ± 0.031	0.268 ± 0.016
PAX2 基因沉默组	0.607 ± 0.074	0.572 ± 0.059	0.409 ± 0.068	0.387 ± 0.036
<i>t</i> 值	1.7555	-0.5050	-1.6905	-8.4926
<i>P</i> 值	0.1010	0.6214	0.1130	0.0001

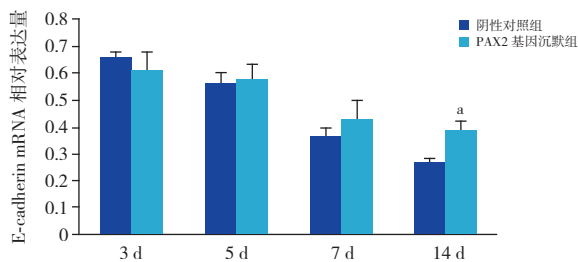


图 3 Real-Time PCR 法检测 PAX2 基因沉默后两组大鼠各时间点 E-cadherin mRNA 相对表达量比较 ($n=8$) a 示与阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 PAX2 基因沉默后 E-cadherin mRNA 表达

Real-Time PCR 检测各组 E-cadherin mRNA 的表达, 溶解曲线的溶解温度一致, 提示产物是特异的; 通过扩增曲线与标准曲线所得的 CT 值, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。阴性对照组和 PAX2 基因沉默组在转染后 3、5、7 d, E-cadherin mRNA 相对表达量逐渐减少, 且两组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在转染后 14 d 时, PAX2 基因沉默组 E-cadherin mRNA 的相对表达量与阴性对照组相比明显升高 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

2.4 PAX2 沉默后 E-cadherin 蛋白的表达

Western blot 结果显示, 各组 β -actin 条带的亮度相似, 而 E-cadherin 条带的亮度不相同, 在转染后 3、5、7 d, 阴性对照组和 PAX2 基因沉默组 E-cadherin/ β -actin 蛋白相对表达量逐渐下降, 且两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在转染后 14 d 时, PAX2 基因沉默组 E-cadherin/ β -actin 蛋白表达量增加, 与同期阴性对照组相比明显升高 ($P < 0.05$)。见表 6 和图 4~5。

表6 PAX2 基因沉默后两组大鼠不同时间点 E-cadherin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	3 d	5 d	7 d	14 d
阴性对照组	0.494 ± 0.060	0.370 ± 0.021	0.258 ± 0.028	0.115 ± 0.008
PAX2 基因沉默组	0.475 ± 0.064	0.390 ± 0.053	0.258 ± 0.019	0.272 ± 0.031
<i>t</i> 值	0.6248	0.9755	0.0449	-14.0509
<i>P</i> 值	0.5424	0.3459	0.9648	0.0001

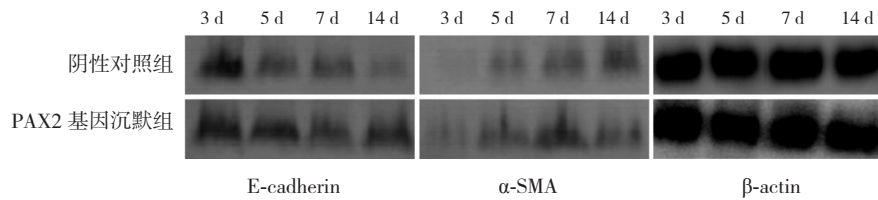


图4 Western blot 法检测 PAX2 基因沉默后两组大鼠各时间点 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白相对表达量电泳图

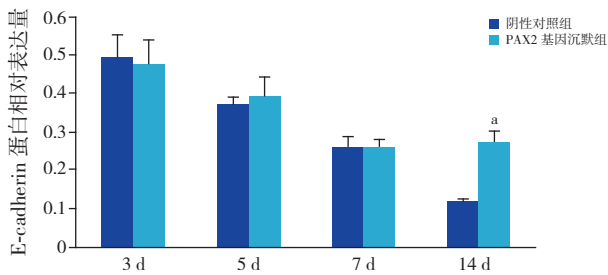


图5 Western blot 法检测 PAX2 基因沉默后两组大鼠不同时间点 E-cadherin 蛋白相对表达量比较 ($n=8$)
a 示与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

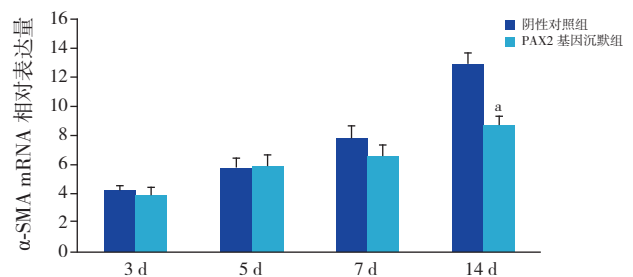


图6 Real-Time PCR 法检测 PAX2 基因沉默后两组大鼠不同时间点 α -SMA mRNA 相对表达量比较 ($n=8$)
a 示与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

2.5 PAX2 基因沉默后 α -SMA mRNA 表达

Real-Time PCR 法检测 α -SMA mRNA 的表达, 两组在转染后 3、5、7 d 时 α -SMA mRNA 表达均呈上升趋势, 且 PAX2 基因沉默组与同期阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); 在转染后 14 d 时, PAX2 基因沉默组 α -SMA mRNA 相对表达量较同期阴性对照组明显减少 ($P<0.05$)。见表 7 和图 4、6。

表7 PAX2 基因沉默后两组大鼠不同时间点 α -SMA mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	3 d	5 d	7 d	14 d
阴性对照组	4.2 ± 0.4	5.8 ± 0.9	7.7 ± 0.6	12.9 ± 0.7
PAX2 基因沉默组	3.8 ± 0.7	5.9 ± 0.7	7.0 ± 0.8	8.6 ± 0.7
<i>t</i> 值	1.3300	-0.2452	2.1097	11.8340
<i>P</i> 值	0.2048	0.8099	0.0534	0.0001

2.6 PAX2 基因沉默后 α -SMA 蛋白的表达

Western blot 检测 α -SMA 蛋白的表达, 两组在转染后 3、5、7 d, α -SMA/ β -actin 蛋白相对表达量均呈上升趋势, 且 PAX2 基因沉默组与阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); 在转染 14 d 时, PAX2 基因沉默组 α -SMA 蛋白相对表达量较同期阴性对照组明显减少 ($P<0.05$)。见表 8 和图 4、7。

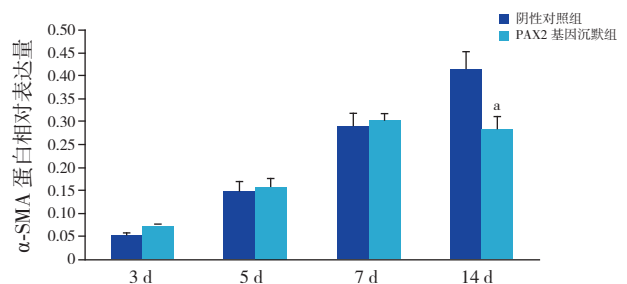


图7 Western blot 法检测 PAX2 基因沉默后两组大鼠不同时间点 α -SMA 蛋白相对表达量比较 ($n=8$) a 示与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

表 8 PAX2 基因沉默后两组大鼠不同时间点 α -SMA 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	3 d	5 d	7 d	14 d
阴性对照组	0.052 \pm 0.006	0.146 \pm 0.024	0.287 \pm 0.031	0.413 \pm 0.038
PAX2 基因沉默组	0.058 \pm 0.006	0.158 \pm 0.017	0.301 \pm 0.018	0.284 \pm 0.026
<i>t</i> 值	-1.8767	-1.1516	-1.0670	7.8819
<i>P</i> 值	0.0816	0.2688	0.3040	0.0001

3 讨论

UUO 模型制作简单, 有较好的重复性和较高的成功率, 是诱导 RIF 最经典的公认模型, 虽然许多学者通过体内外实验对 RIF 进行了大量的研究, 但其具体发病机制尚未明了, 对抗纤维化的治疗, 尚无有效的方案。因此, 研究 RIF 的发病机制、干预 RIF 的进程、寻找合理的治疗方法是当前肾脏病界的研究热点。

PAX2 基因是发育调控基因家族成员之一, 所编码的蛋白作为核转录因子及信号分子参与胚胎的发育调控, 具有促进细胞增殖及分化的功能, 成熟肾单位其表达消失。有研究表明 PAX2 在病理肾中出现胚胎期的回归表达, 再表达部位主要位于肾小管, 其可能诱导肾小管 EMT, 进而参与肾脏的损伤过程, 致 RIF^[12-13]。PAX2 质粒转染 NRK52E 后导致 NRK52E 表型纤维化, 说明 PAX2 在体外可以介导 RIF^[14]。本课题组的前期研究证明, 在 UUO 大鼠模型肾组织中出现 PAX2 再表达, PAX2 蛋白表达量与 RIF 程度呈正相关^[7]。

本次实验应用 RNA 干扰技术, 通过体内转染, 沉默 PAX2 基因表达, 目前细胞转染是研究基因功能、表达与调控、蛋白功能和疾病生物治疗中最基本的实验技术。基因治疗的载体可以分为病毒性与非病毒性载体。病毒载体具有潜在毒性, 制备复杂、生产困难、相对来说, 非病毒载体无传染性、易于构建、稳定性好、安全性较高、使用方法简单易行。目前大多数研究利用体外细胞进行转染, 体内研究较少。阳离子聚合物多聚乙酰胺^[15] (polyethylenimine, PEI) 是公认的体内外有效的传递基因^[16-18] 和 RNA 干扰技术中用于转运非病毒的载体^[19], 转染率较高, 已被用于多种器官。JetPEI 转染试剂是基因的体内外转染试剂, 该试剂是阳离子化的大分子 PEI 衍生物, 其与外源基因结合形成颗粒状, 与细胞表面的蛋白多糖结合,

通过细胞内吞作用进入细胞。PEI- 复合物具有质子海绵的特性, 吸收溶酶体的 H⁺, 保护 DNA 免受核酸酶的降解, 特点是转染效率高, 重复性好, 极低的细胞毒性, 方法简便, 省时省力。本课题组前期已将 in vivo jetPEI 体内转染试剂与 siRNA 复合物成功转染至大鼠肾被膜下, 明显减轻肾脏纤维化^[10], 但 PAX2 基因沉默是否影响 EMT 进程, 目前国内外未见报道。

本研究成功制作 UUO 大鼠 RIF 模型, 并通过转染试剂成功将 PAX2-siRNA 片段导入 UUO 大鼠体内, 同时应用 Real-Time PCR 及 Western blot 进行检测, 结果显示各时间点 PAX2 基因沉默组与阴性对照组比较, PAX2 mRNA 和蛋白表达量明显降低, 提示 PAX2 基因被沉默。

目前认为, EMT 是 RIF 的重要发病机制之一^[20-21], 本实验选择 E-cadherin 和 α -SMA 两种细胞表型特异性标志物作为判断肾小管 EMT 的指标。本研究 Real-Time PCR 结果表明, 随着梗阻时间的延长, 两组 E-cadherin mRNA 表达量逐渐下降, α -SMA mRNA 表达量逐渐升高; 且两组各指标在转染 3、5、7 d 差异无统计学意义, 在转染 14 d 时, PAX2 基因沉默组 E-cadherin mRNA 表达量明显高于阴性对照组, α -SMA mRNA 表达量明显低于阴性对照组。Western blot 检测 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白结果与 Real-Time PCR 结果一致。说明 PAX2 基因沉默在纤维化早期对 EMT 过程无影响, 在纤维化晚期可明显抑制肾小管 EMT 的过程, 延缓 RIF 的进程。

PAX2 是人类肾发育必不可少的转录因子, 其基因突变和再表达与 RIF 紧密联系, 但有关 PAX2 确切的功能作用, 尤其是在后天性肾脏疾病中的表达方面研究还不足, 是需要进一步探讨和研究的方面, 而且 PAX2 上游调控分子及下游靶基因还未完全明确, PAX2 是否参与 RIF 信号传导通路, 仍需进一步研究, 因此, 依靠目前日益先进的组

织细胞培养、遗传、分子生物学技术就这些方面深入研究, 终将揭示 PAX2 在肾脏疾病中的作用与地位, 为肾脏疾病预防与治疗带来新的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Hewitson TD. Fibrosis in the kidney: is a problem shared a problem halved?[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(Suppl 1): S14.
- [2] Picard N, Baum O, Vogetseder A, et al. Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat[J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(1): 141-155.
- [3] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2): 212-222.
- [4] Kim MK, Maeng YI, Sung WJ, et al. The differential expression of TGF- β 1, ILK and wnt signaling inducing epithelial to mesenchymal transition in human renal fibrogenesis: an immunohistochemical study[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(9): 1747-1758.
- [5] Xiong H, Hong J, Du W, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(8): 5819-5832.
- [6] Satish L, Gallo PH, Baratz ME, et al. Reversal of TGF- β 1 stimulation of α -smooth muscle actin and extracellular matrix components by cyclic AMP in Dupuytren's-derived fibroblasts[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2011, 12: 113.
- [7] Li L, Wu Y, Zhang W. PAX2 re-expression in renal tubular epithelial cells and correlation with renal interstitial fibrosis of rats with obstructive nephropathy[J]. *Ren Fail*, 2010, 32(5): 603-611.
- [8] André ND, Silva VA, Ariza CB, et al. In vivo knockdown of CXCR4 using jetPEI/CXCR4 shRNA nanoparticles inhibits the pulmonary metastatic potential of B16 F10 melanoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(6): 8320-8326.
- [9] Liu H, Wang Y, Wang M, et al. Fluorinated poly(propyleneimine) dendrimers as gene vectors[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(20): 5407-5413.
- [10] Li L, Wu Y, Wang C, et al. Inhibition of PAX2 gene expression by siRNA (polyethylenimine) in experimental model of obstructive nephropathy[J]. *Ren Fail*, 2012, 34(10): 1288-1296.
- [11] Lee TY, Chang CI, Lee D, et al. RNA interference-mediated simultaneous silencing of four genes using cross-shaped RNA[J]. *Mol Cells*, 2013, 35(4): 320-326.
- [12] Sharma R, Sanchez-Ferraz O, Bouchard M. Pax genes in renal development, disease and regeneration[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 44: 97-106.
- [13] Zhou TB. Signaling pathways of PAX2 and its role in renal interstitial fibrosis and glomerulosclerosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2012, 32(6): 298-303.
- [14] Li L, Wu Y, Yang Y. Paired box 2 induces epithelial-mesenchymal transition in normal renal tubular epithelial cells of rats[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5): 1549-1554.
- [15] Yan X, Zhang Y, Zhang H, et al. Amphiphilic polyethylenimine (PEI) as highly efficient non-viral gene carrier[J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12(12): 1975-1982.
- [16] Liang W, Gong H, Yin D, et al. High-molecular-weight polyethyleneimine conjuncted pluronic for gene transfer agents[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2011, 59(9): 1094-1101.
- [17] Liu C, Liu F, Feng L, et al. The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(10): 2547-2564.
- [18] Huang X, Hartley AV, Yin Y, et al. AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications[J]. *J Virol Methods*, 2013, 193(2): 270-277.
- [19] Shao W, Paul A, Abbasi S, et al. A novel polyethyleneimine-coated adeno-associated virus-like particle formulation for efficient siRNA delivery in breast cancer therapy: preparation and in vitro analysis[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 1575-1586.
- [20] Thakur S, Viswanadhapalli S, Kopp JB, et al. Activation of AMP-activated protein kinase prevents TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and myofibroblast activation [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(8): 2168-2180.
- [21] Winbanks CE, Darby IA, Kelyneck KJ, et al. Explanting is an ex vivo model of renal epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 212819.

(本文编辑: 万静)