

杨阳,白海涛,李玲,等. 沉默 *Wnt4* 基因抑制大鼠肾间质纤维化[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2):215-221.

Yang Y, Bai HT, Li L, et al. Silencing *Wnt4* inhibits renal interstitial fibrosis in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2):215-221.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.014

# 沉默 *Wnt4* 基因抑制大鼠肾间质纤维化

杨阳<sup>1</sup>,白海涛<sup>1\*</sup>,李玲<sup>2</sup>,陈美雪<sup>3</sup>

(1. 厦门大学附属第一医院 福建医科大学教学医院儿内科,福建 厦门 361000; 2. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院儿内科,武汉 430014; 3. 莆田市儿童医院儿内科,福建 莆田 351100)

**【摘要】** 目的 探讨沉默 *Wnt4* 基因对肾间质纤维化的影响,为慢性肾病的治疗提供理论依据。方法 128只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阴性对照组和 *Wnt4* 基因沉默组,每组32只。构建 *Wnt4* siRNA慢病毒载体体内转染沉默组的大鼠,于转染后第3、7、10、14天分为四个亚组,每组8只大鼠。通过H&E染色病理检查、RT-PCR技术检测肾间质改变及 $\beta$ -连环蛋白、*Wnt4*、 $\alpha$ -SMA表达情况。结果 H&E染色病理检查结果表明:假手术组四个时间点未见肾间质改变;UUO组、阴性沉默组及沉默组造模后3d出现肾间质水肿、少量肾间质纤维化,10、14d肾间质弥漫性巨噬细胞、淋巴细胞浸润,呈加重趋势;阴性沉默组基因与UUO组相同;沉默组四个时间点均出现不同程度肾间质纤维化,14d肾间质纤维化程度低于阴性沉默组及UUO组( $P < 0.05$ );*Wnt4*基因沉默后UUO组mRNA表达量的相关性分析显示,*Wnt4*与 $\beta$ -catenin mRNA表达量具有显著相关性( $r = 0.886, P < 0.001$ )。*Wnt4*与 $\alpha$ -SMA mRNA表达量具有显著相关性( $r = 0.930, P < 0.001$ )。*Wnt4*基因沉默后沉默组mRNA表达量的相关性分析显示,*Wnt4*与 $\beta$ -catenin mRNA表达量无显著相关性( $r = 0.204, P = 0.263$ )。*Wnt4*与 $\alpha$ -SMA mRNA表达量具有显著相关性( $r = 0.753, P < 0.001$ )。结论 沉默 *Wnt4* 基因在肾间质纤维化大鼠中可明显抑制肾间质纤维化,可能对其有治疗作用。

**【关键词】** *Wnt4* 基因;基因沉默;肾间质纤维化;大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)02-0215-07

## Silencing *Wnt4* inhibits renal interstitial fibrosis in rats

YANG Yang<sup>1</sup>, BAI Haitao<sup>1\*</sup>, LI Ling<sup>2</sup>, CHEN Meixue<sup>3</sup>

(1. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361000, China.

2. Wuhan Children's Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014. 3. Putian Children's Hospital, Putian 351100)

Corresponding author: BAI Haitao. E-mail: baihaitao@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of silencing *Wnt4* on renal interstitial fibrosis (RIF) and provide a theoretical basis for the treatment of chronic kidney disease. **Methods** A total of 128 Sprague-Dawley rats were divided randomly into four groups of 32 rats each: sham operation, model, negative control and *Wnt4* silencing groups. The *Wnt4* siRNA lentiviral vector was transfected into the silencing group *in vivo* and divided into four subgroups of eight rats each, at 3, 7, 10 and 14 days after transfection. Renal interstitial changes and expression of  $\beta$ -catenin, *Wnt4* and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) were examined by pathology using H&E staining and detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** The pathological examination showed no renal interstitial changes at the four time points tested in the sham operation group; renal interstitial edema and a small amount of RIF occurred in the UUO group, negative silencing,

**【基金项目】**福建省卫生厅青年科研课题(2013-2-86);福建省自然科学基金科技项目(2015J01549)。

Funded by Youth Science Research Project of Fujian Provincial Department of Health (2013-2-86), and Science and Technology Project of Fujian Natural Science Foundation (2015J01549).

**【作者简介】**杨阳(1984—),女,硕士,从事肾间质纤维化研究。Email: r4d8v3@163.com

**【通信作者】**白海涛(1967—),女,教授,从事小儿肾疾病研究。Email: baihaitao@163.com

and silencing groups at 3, 10 and 14 days after modeling. The number of diffuse macrophages and infiltration of lymphocytes were increased. The negative silencing group showed similar alterations at the UUO group. The silencing group showed different degrees of RIF at the four time points tested. *Wnt4* expression was significantly correlated with the expression of  $\beta$ -catenin mRNA ( $r=0.886, P < 0.001$ ). There was a significant correlation between the mRNA expressions of *Wnt4* and  $\alpha$ -SMA ( $r=0.930, P < 0.001$ ). Correlation analysis of mRNA expression in the silencing group after *Wnt4* silencing showed that there was no significant correlation between the mRNA expressions of *Wnt4* and  $\beta$ -catenin ( $r=0.204, P=0.263$ ). There was a significant correlation between the mRNA expressions of *Wnt4* and  $\alpha$ -SMA ( $r=0.753, P < 0.001$ ).

**Conclusion** Silencing *Wnt4* can significantly inhibit RIF in rats, and may have therapeutic effects.

**【Keywords】** *Wnt4* gene; gene silencing; chronic kidney disease, CKD; rats

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是慢性肾病的病理生理基础。RIF 是由于各种原因使间质炎症细胞浸润、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)不断积聚从而导致肾功能减退的动态过程。而肾小管上皮-间充质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)作为肾小管间质纤维化的主要细胞学行为,近年来已被广为接受和研究,但其确切分子机制尚未完全阐明。*Wnt*/ $\beta$ -catenin 信号通路被越来越多证实与纤维化疾病的发生密切相关,包括特发性肺纤维化、肝纤维化等。*Wnt* 基因家族目前已有 19 种基因,16 种在成年小鼠肾有不同程度表达。其中 *Wnt4* 基因在肾的发育中发挥着至关重要的作用,在胚胎肾中, *Wnt4* 主要诱导肾小管间质细胞向上皮细胞转化,诱导肾小管的形成。*Wnt4* 基因沉默是否通过参与 EMT 过程,延缓肾间质纤维化,目前相关体内动物实验尚未见报道。本研究通过构建 *Wnt4*-siRNA 载体分别转染 UUO 大鼠体内,拟在探讨 *Wnt4* 基因沉默后对  $\beta$ -catenin 表达的影响,以及与肾间质纤维化的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 128 只,7 周龄,体重约 180 ~ 220 g,由厦门大学实验动物中心提供【SCXK(京)2012-0001】,实验在厦门大学实验动物中心进行【SYXK(闽)2013-0006】。SD 大鼠常规饲养,自由摄食、饮水,光照黑暗交替 12/12 h,建模前 12 h 禁食。所有操作均符合实验动物伦理学要求。

#### 1.1.2 试剂与仪器

慢病毒载体系统(载体编号:GV115)、293T 细胞、大肠埃希菌菌株 DH5 $\alpha$ 、PCR 用试剂 primer (R&F)购自上海吉凯基因化学技术有限公司。兔抗

大鼠  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体购自英国 Abcam,兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体购自杭州贤至生物科技公司。山羊抗兔二抗购自美国 Earthox。兔抗大鼠 *Wnt4* 多克隆抗体、兔抗大鼠  $\beta$ -catenin 单克隆抗体、兔抗大鼠 vimentin 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。兔 IgG 两步法免疫组化试剂盒即用型购自武汉博士德。Taq polymerase、TRIzol 试剂、cDNA 合成试剂盒和 RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa。引物由上海英俊生物技术有限公司设计及合成。DME0 购自 Gibco 公司,胰酶购自上海化学试剂公司, Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。oligo dT 购自上海生工, PVDF 膜购自美国 PALL, BCA 蛋白质定量试剂盒购自北京天根生化, DAB 显色盒购自福州迈新生物技术公司, X 光胶片购自美国 Kodak, ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *Wnt4* siRNA 慢病毒载体的构建

选取 NRK-52E 大鼠肾细胞培养,收集生长状态良好的细胞,采用 RT-PCR 检测目的基因的表达,筛选出表达丰度较高的细胞类别,用做后期的慢病毒的内筛内验。根据目的基因序列及 siRNA 设计原则,分别设计四个 *Wnt4* 基因的干扰靶点。构建病毒载体框架。(见表 1)。

通过 T4DNA 连接酶将双酶切(酶切位点为 AgeI, EcoRI)线性化的载体和 DNA 片段在适当的 buffer 中进行连接反应,制备双链 DNA oligo,连接与转化慢病毒载体(pGCSIL-GFP 载体)与 *Wnt4* shRNA 序列。挑取转化子重悬于 10  $\mu$ L LB 溶液,混匀取 1  $\mu$ L 作为模板;使用相应引物:*Wnt4* 上游上游引物 CCATGATTCCTTCATATTTGC;下游引物 GTAATACGGTTATCCACGCG。进行菌落 PCR 鉴定实验。PCR 阳性重组子鉴定后,送公司测序。包装 *Wnt4* siRNA 慢病毒,转染 293T 细胞。

表 1 *Wnt4* 基因 shRNA 序列  
Table 1 *Wnt4* shRNA sequences

序号 (No.)	序列 Sequences
<i>Wnt4</i> -RNAi(1)-a	ccggcgCACTAAAGGAGAAGTTTGAActcgagTCAAACCTTCTCCTTTAGTGcgtttttg
<i>Wnt4</i> -RNAi(1)-b	aattcaaaaacgCACTAAAGGAGAAGTTTGAActcgagTCAAACCTTCTCCTTTAGTGcg
<i>Wnt4</i> -RNAi(2)-a	ccggacACATGCGGGTGGAGTGCAActcgagTTGCACTCCACCCGCATGTgtttttg
<i>Wnt4</i> -RNAi(2)-b	aattcaaaaacACATGCGGGTGGAGTGCAActcgagTTGCACTCCACCCGCATGTgt
<i>Wnt4</i> -RNAi(3)-a	ccggcgGAAGAGGAAACGTGCGGAGActcgagTCTCGCACGTTTCTCTTCTCggtttttg
<i>Wnt4</i> -RNAi(3)-b	aattcaaaaaccGAAGAGGAAACGTGCGGAGActcgagTCTCGCACGTTTCTCTTCTCggt
<i>Wnt4</i> -RNAi(4)-a	ccggtaCGGATGAGGACCTGTTGTAActcgagTACACCAGGTCCTCATCCGtatttttg
<i>Wnt4</i> -RNAi(4)-b	aattcaaaaataCGGATGAGGACCTGTTGTAActcgagTACACCAGGTCCTCATCCGta
GV115-NC-1	CCGGTTCCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAAATTTTTG
GV115-NC-1	AATTCAAAAATTCCTCCGAACGTGTCACGTTTCTTTGAAACGTGACACGTTCCGAGAA

1.2.2 动物模型制作

180 ~ 220 g 的雄性 SD 大鼠称重后以 1% 的戊巴比妥钠注射麻醉后,固定于动物台,备皮后医用酒精及安尔碘常规消毒,行左侧耻骨上切口(约 2 ~ 3 cm),逐层打开腹腔,推开肠管避开肝,沿左肾下极寻找左输尿管,游离,用 5-0 号丝线上下结扎两处,然后从中剪断输尿管以防逆行性感染,分层缝合切口并安尔碘消毒;假手术组仅游离左侧输尿管,并不结扎,其余步骤同单侧输尿管结扎(unilateral ureteral obstruction, UO)模型组。

1.2.3 动物分组及体内转染

实验设 128 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:根据手术及给药处理方式的不同,依次为①假手术组(单侧输尿管分离不接扎组,  $n = 32$ );②模型组(UO 组,单侧输尿管结扎组,  $n = 32$ );③阴性组(单侧输尿管结扎+阴性慢病毒液沉默组,  $n = 32$ );④沉默组(单侧输尿管结扎+*Wnt4* 慢病毒液沉默组,  $n = 32$ )。于术后第 3、7、10、14 天每组各处死 8 只动物,留取肾标本。其中阴性组在 UO 模型组的基础上用微量进样器于肾被膜(单侧肾转染)下注射阴性对照的重组慢病毒液 10  $\mu$ L(含病毒颗粒  $1 \times 10^7$  ifu),沉默组在 UO 组的基础上采用微量进样器于肾被膜下注射特异的 *Wnt4* siRNA 慢病毒液 10  $\mu$ L。四组大鼠自由取食并饮水。分别于术后 3、7、10、14 d 牺牲各组 8 只大鼠,取肾组织。

1.2.4 冰冻切片制作、标本采集

注射慢病毒液的梗阻侧肾组织必须保持新鲜,勿固定,立即制作冰冻切片。*Wnt4* siRNA 慢病毒浓缩液肾内转染 3 d 后牺牲大鼠,立即取梗阻侧肾,勿固定,用干净冻存管装好。将组织块置于金属组织托上面,组织块在 -15 $^{\circ}$ C ~ -20 $^{\circ}$ C 环境中冰硬,切片

厚度为 4 ~ 5  $\mu$ m。切片置于荧光显微镜下观察绿色荧光在肾的分布,了解不同剂量组的感染效率。

各组大鼠分别于造模后 3、7、10、14 d 牺牲大鼠,并取左侧肾,冠状面切开组织,取一部分肾组织(小米粒大小,约 1 mm<sup>3</sup>)置于 2.5% 戊二醛中固定,待做电镜。一部分置于 4% 中性甲醛中固定,石蜡包埋,待做 H&E 染色、Masson 染色及免疫组化。一部分剥离表面脂肪后分离肾皮质和髓质,包入无菌锡纸中置液氮罐内,再转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱,待做 RT-PCR。

1.2.5 H&E 染色病理检测  $\beta$ -catenin、*Wnt4*、*E-cadherin* 和  $\alpha$ -SMA 的表达

按常规方法进行 H&E 染色,光镜下观察四组大鼠肾组织结构病理及肾间质纤维化的改变。按说明书采用兔 IgG 两步法免疫组化法染色,结果以出现棕黄色颗粒为阳性表达。

1.2.6 RT-PCR 检测  $\beta$ -catenin、*Wnt4*、*E-cadherin* 和  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达

取各组转染后 3、7、10、14 d 大鼠肾皮质 100 mg,采用 Trizol 试剂提取大鼠肾皮质 RNA 并逆转录成 cDNA。经 37 $^{\circ}$ C, 15 min, 85 $^{\circ}$ C 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。设计  $\alpha$ -SMA、 $\beta$ -catenin、*Wnt4* 引物,以 GAPDH 作为内参,以目的基因拷贝数/GAPDH 拷贝数作为目的基因的相对表达量。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,58 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,共 45 个循环。融解曲线条件:95 $^{\circ}$ C 5 s,65 $^{\circ}$ C 1 min。

1.3 统计学分析

数据分析采用 SPSS 20.0 软件,实验数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间比较采用完全随机设计方差分析,相关性分析采用 Spearman 分析,检验水准  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠肾间质病理 H&E 染色结果

H&E 染色结果表明:假手术组四个时间点未见肾间质改变;UUO 组、阴性沉默组及沉默组造模后 3 d 出现肾间质水肿、少量肾间质纤维化,10、14 d 肾间质弥漫性巨噬细胞、淋巴细胞浸润,呈加重趋势;阴性沉默组基因与 UUO 组相同;沉默组四个时间点

均出现不同程度肾间质纤维化,14 d 肾间质纤维化程度低于阴性沉默组及 UUO 组( $P < 0.05$ )(图 1)。

### 2.2 *Wnt4* 基因沉默后 *Wnt4* mRNA 相对表达量

假手术组 *Wnt4* mRNA 表达量在四个时间点无明显变化;UUO 组及阴性组 *Wnt4* mRNA 表达量随着阻断时间延长增加,与同一时间点的假手术组相比明显增多( $P < 0.05$ ),第 10、14 天明显低于同一时间点的 UUO 组及阴性沉默组( $P < 0.05$ )(图 2)。

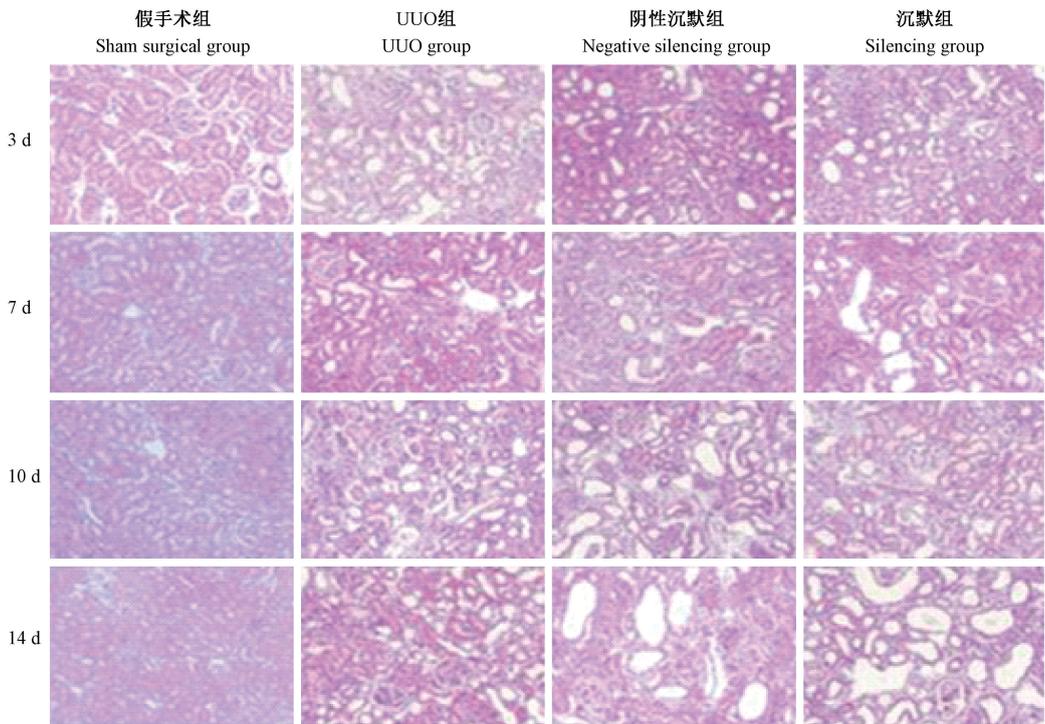


图 1 *Wnt4* 基因沉默后不同时间各组大鼠肾间质 H&E 染色结果( $\times 200$ )

Figure 1 Pathological changes of renal interstitium of the rats in different groups at different time points after *Wnt4* silencing(HE staining, $\times 200$ )

### 2.3 *Wnt4* 基因沉默后 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量

假手术组  $\beta$ -catenin mRNA 的表达量在四个时间点无明显变化;UUO 组、阴性组及沉默组  $\beta$ -catenin mRNA 的表达量随着梗阻时间延长增加,明显高于同一时间点的正常组( $P < 0.05$ ),且三组间表达量无统计学差异。(见图 3)

### 2.4 *Wnt4* 基因沉默后 $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量

假手术组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量在四个时间点无明显差别;UUO 组及阴性组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量随着梗阻时间延长增加,明显高于同一时间点的假手术组( $P < 0.05$ )。沉默组的  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量随着梗阻时间延长减少,第 10、14 天时与同一时间点的 UUO 组及阴性沉默组相比明显减少( $P < 0.05$ ),但仍

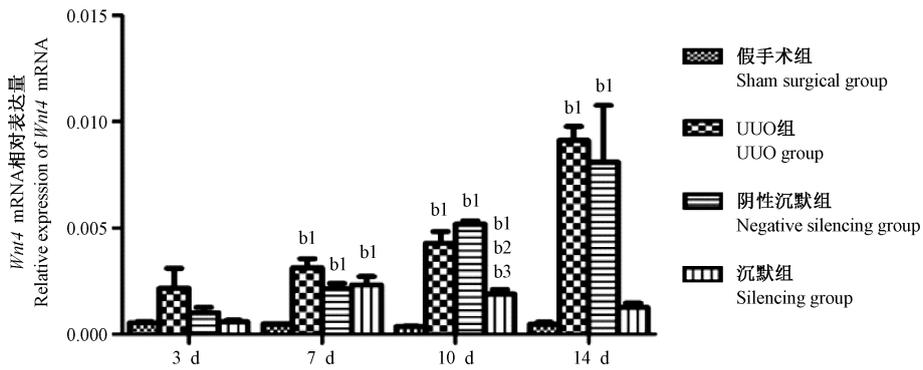
明显高于同一时间点的假手术组(图 4)。

### 2.5 *Wnt4* 基因沉默后波形蛋白(vimentin) mRNA 相对表达量

假手术组的 vimentin mRNA 表达量在四个时间点无明显差异;UUO 组及阴性沉默组 vimentin mRNA 表达量随着梗阻时间延长增加,明显高于同一时间点的假手术组( $P < 0.05$ )。沉默组 vimentin mRNA 表达量随着梗阻时间延长增加,第 14 天时表达量减少,明显低于同一时间点的 UUO 组及阴性沉默组( $P < 0.05$ ),但较同一时间点的假手术组表达量仍高( $P < 0.05$ )(见图 5)。

### 2.6 *Wnt4* 基因沉默后 *Wnt4* 与 $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -SMA 相关性分析

*Wnt4* 基因沉默后 UUO 组 mRNA 表达量的相关



注: b1 表示 UUO 组、阴性沉默组与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; b2, b3 表示沉默组与 UUO 组、阴性沉默组比较,  $P < 0.05$ 。(下同)

图 2 *Wnt4* 基因沉默后肾组织中 *Wnt4* mRNA 相对表达量

Note. b1: The UUO and the negative silencing groups were compared with the sham operation group, respectively,  $P < 0.05$ . b2 and b3: The silencing group compared with the UUO and negative silencing groups,  $P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Relative expression of *Wnt4* mRNA in the renal tissues after *Wnt4* silencing

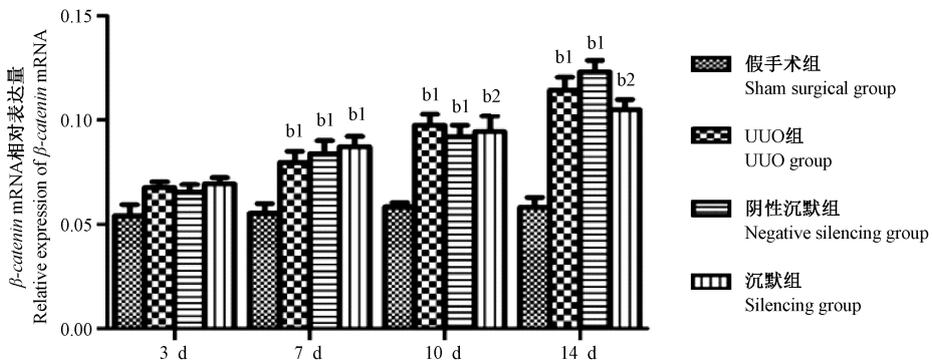


图 3 *Wnt4* 基因沉默后  $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量

Figure 3 Relative expression of  $\beta$ -catenin mRNA in the renal tissues after *Wnt4* gene silencing

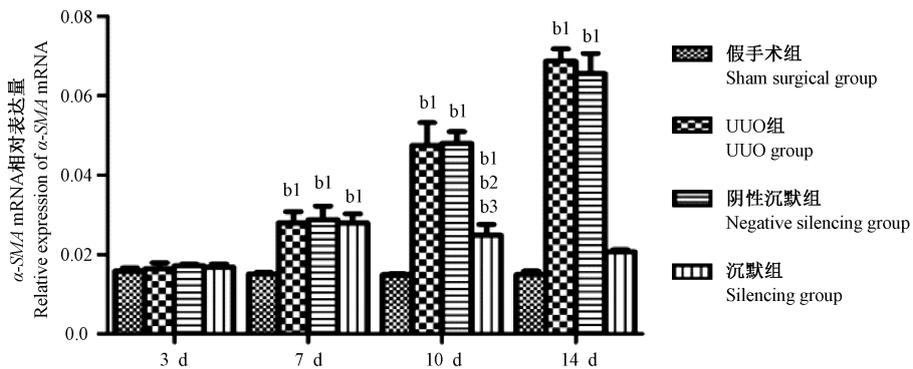


图 4 *Wnt4* 基因沉默后  $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量

Figure 4 Relative expression of  $\alpha$ -SMA mRNA in the renal tissues after *Wnt4* silencing

性分析显示, *Wnt4* 与  $\beta$ -catenin mRNA 表达量具有显著相关性 ( $r = 0.886, P < 0.001$ ) (图 6A)。 *Wnt4* 与  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量具有显著相关性 ( $r = 0.930, P < 0.001$ ) (图 6B)。 *Wnt4* 基因沉默后沉默组 mRNA

表达量的相关性分析显示, *Wnt4* 与  $\beta$ -catenin mRNA 表达量无显著相关性 ( $r = 0.204, P = 0.263$ ) (图 6C)。 *Wnt4* 与  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量具有显著相关性 ( $r = 0.753, P < 0.001$ ) (见图 6D)。

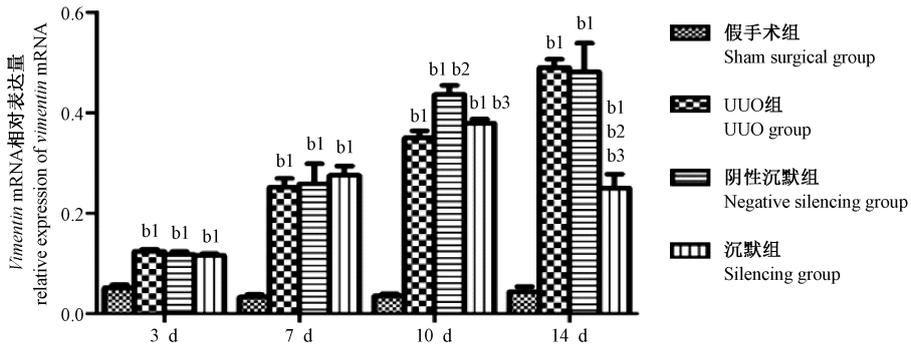
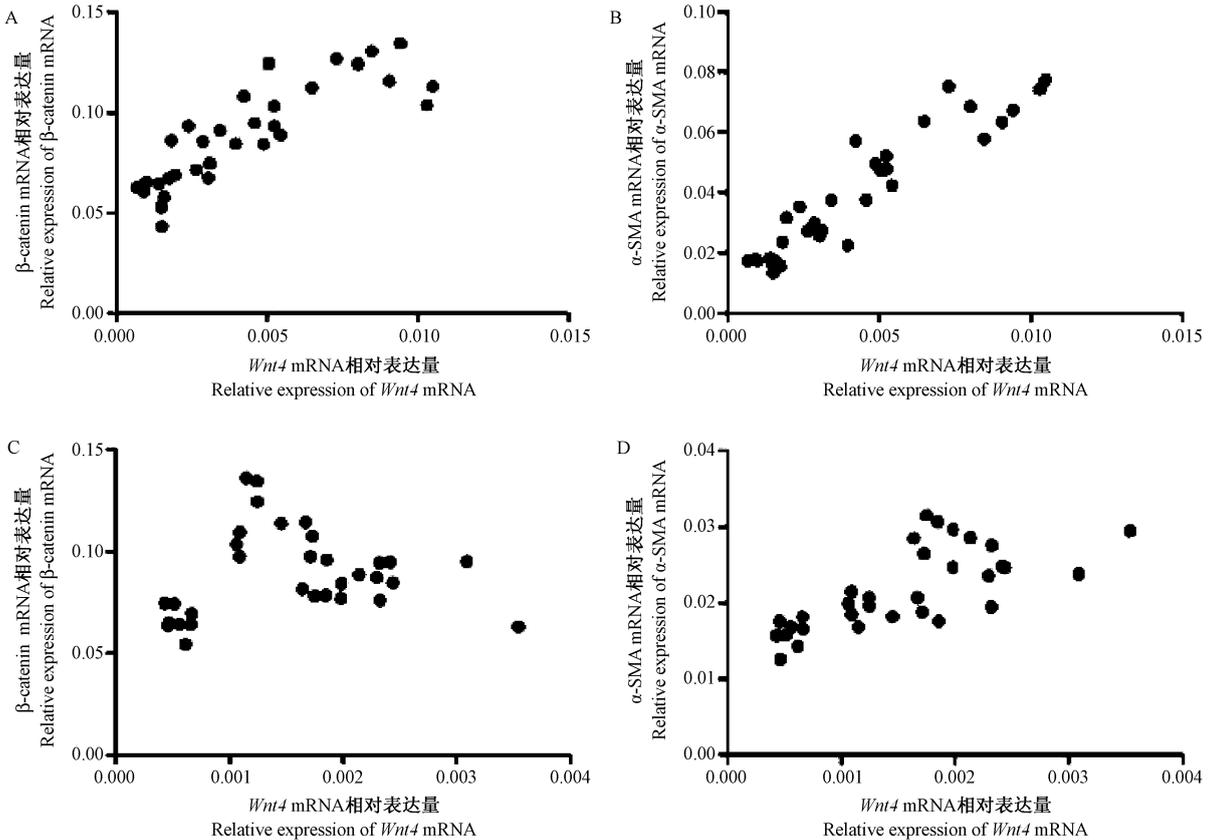


图 5 *Wnt4* 基因沉默后波形蛋白 (*vimentin*) mRNA 相对表达量

Figure 5 Relative expression of *vimentin* mRNA after *Wnt4* silencing



注:A、B,UUO 组; C、D,沉默组。

图 6 *Wnt4* 基因沉默后 *Wnt4* 与  $\beta$ -catenin、 $\alpha$ -SMA 相关性分析

Note:A、B,UUO group. C、D,Silencing group.

Figure 6 Correlation between the expressions of *Wnt4* and  $\beta$ -catenin and  $\alpha$ -SMA after *Wnt4* gene silencing

### 3 讨论

肾间质纤维化是临床慢性肾病治疗和肾移植管理的关键,但至今 RIF 的发病机制还不甚明了,对抗肾间质纤维化的治疗,尚无有效的方案。本研究前期实验证明 *Wnt*/ $\beta$ -catenin 信号通路在肾间质纤维化中起到重要作用,信号通路阻断可减少肾间质纤维化发生。*Wnt* 信号传导通路分为经典 *Wnt*/ $\beta$ -

catenin 信号通路及非经典信号转导通路,后者包括 *Wnt*/ $\text{Ca}^{2+}$  通路和细胞极性通路<sup>[1]</sup>,当肾损伤时,*Wnt4* 基因大量表达,与跨膜结合并形成复合物,抑制细胞内 GSK-3 $\beta$  表达水平,阻止  $\beta$ -连环蛋白磷酸化及降解,导致细胞内  $\beta$ -连环蛋白大量聚集,进入细胞核中与转录因子 LEF/TCF 结合,激活下游与 EMT 密切相关的靶基因,包括 *Snail*, *Twist* 和锌指蛋白(zinc finger E-box binding protein, ZEB),三者

均可在抑制上皮细胞钙粘蛋白的同时激活间充质基因,包括 N-钙粘蛋白、波形蛋白和粘连蛋白<sup>[2-3]</sup>。在肾发育的不同阶段,多种 *Wnt* 蛋白在肾不同部位均有不同程度的表达。国内外大量的基因敲除模型及体外研究证实, WNT 蛋白介导的信号通路在肾的发育过程中必不可少,在肾发育的早期, *Wnt4* 主要表达腹侧间充质帽 (CM) 中,介导间充质-上皮转分化,是唯一在肾前体细胞表达并表现出在肾发育过程中有重要作用的 *Wnt* 基因<sup>[4]</sup>。关于 *Wnt4* 诱导 MET 发生的机制,2011 年, Tanigawa 等<sup>[5]</sup> 用重组 WNT 蛋白作为大鼠后肾间充质的祖细胞,研究发现 WNT4 蛋白能够诱导肾小管的形成。2013 年,李里等<sup>[6]</sup> 应用脂质体介导将重组质粒 pEGFP-PAX2 转入体外培养的大鼠肾小管上皮细胞,发现 PAX2 转染至肾小管上皮细胞后激活了 *Wnt4* 通路, PAX2 在体外诱导正常肾小管上皮细胞间充质转分化可能是通过 *Wnt*/ $\beta$ -catenin 通路完成。综上所述, *Wnt4* 基因和  $\beta$ -catenin 基因及其编码的蛋白在 *Wnt*/ $\beta$ -catenin 信号通路对 EMT 的调控中发挥重要作用。

本研究成功制作 UUO 大鼠 RIF 模型,并通过慢病毒转染成功将 *Wnt4*-siRNA 片段导入 UUO 大鼠体内,同时应用 Real-Time PCR 进行检测,结果显示各时间点 *Wnt4* 基因沉默组与阴性对照组比较, *Wnt4* mRNA 和蛋白表达量明显降低,提示 *Wnt4* 基因被沉默。在 UUO 模型中, *Wnt4* 基因随着梗阻时间延长表达量增加明显,与转分化指标  $\alpha$ -SMA 的表达量呈显著正相关 ( $r=0.930, P<0.01$ ),纤维化指标波形蛋白梗阻后表达量增加,且肾病理提示肾间质胶原纤维堆积,纤维化形成,证实 *Wnt4* 基因被大量激活后,参与肾小管上皮间质转分化过程,促进肾间质纤维化形成。 $\beta$ -连环蛋白在梗阻后第 7 天表达量明显增多,明显高于同期的假手术组,且 *Wnt4* 与  $\beta$ -catenin 的 mRNA 相对表达量呈显著正相关 ( $r=0.886, P<0.001$ ),说明 *Wnt4* 沉默后,主要通过 *Wnt4*/ $\beta$ -catenin 信号通路传导信号,诱导肾小管上皮间质转分化的发生。沉默组的  $\beta$ -catenin mRNA 的表达量随着梗阻时间的延长表达量增加,与同一时间点的 UUO 组及阴性组无统计学差异。且相关性分析结果显示 *Wnt4* 与  $\beta$ -catenin 无显著相关性 ( $r=0.204, P=0.263$ ),提示 *Wnt4* 基因沉默后,可能会

代偿性地激活其他信号通路,导致  $\beta$ -catenin 的表达量上调。在转染 10 d 时,靶基因沉默组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量明显低于阴性对照组。说明 *Wnt4* 基因沉默在纤维化进程中对 EMT 有影响,在纤维化进程中可明显抑制肾小管 EMT 的过程,延缓 RIF 的进程。本研究显示在 UUO 模型中  $\beta$ -连环蛋白在梗阻后第 7 天表达量明显增多,明显高于同期的正常组,且 *Wnt4* 与  $\beta$ -catenin 的 mRNA 相对表达量呈显著正相关 ( $r=0.886, P<0.001$ ),说明 *Wnt4* 基因激活后,主要通过 *Wnt4*/ $\beta$ -catenin 信号通路传导信号,诱导肾小管上皮间质转分化的发生。

*Wnt* 信号转导的研究还处于探索阶段,有许多问题尚不清楚。本研究通过沉默 *Wnt*/ $\beta$ -catenin 信号通路中的 *Wnt4* 基因,观察了肾间质纤维化的改变,发现沉默 *Wnt4* 基因后肾间质纤维化减少。肾间质纤维化是由多因素导致、多基因参与、多步骤形成的复杂病理生理过程。选择合适的药物和有效的治疗手段对于慢性肾病患者至关重要。综上所述,本研究为慢性肾病的药物研发及治疗靶点提供了一定的理论依据。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Tan RJ, Zhou D, Zhou L, et al. *Wnt*/ $\beta$ -catenin signaling and kidney fibrosis [J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2014, 4(1):84-90.
- [2] Kothari AN, Mi Z, Zapf M, et al. Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition [J]. *Clin Transl Med*, 2014, 3(35):1-14.
- [3] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3):178-196.
- [4] Halt K, Vainio S. Coordination of kidney organogenesis by *Wnt* signaling [J]. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29(4):737-744.
- [5] Tanigawa S, Wang H, Yang Y. *Wnt4* induces nephronic tubules in metanephric mesenchyme by a non-canonical mechanism [J]. *Dev Biol*, 2012, 352(1):58-69.
- [6] 李里, 南晓娟, 吴玉斌. *Wnt4* 基因沉默对 pax2 诱导肾小管上皮细胞间充质转分化的影响 [J]. *吉林大学学报*, 2013, 39(4):720-725.  
Li L, Nan XJ, Wu YB. Effects of *Wnt4* gene silencing on Pax2 induced renal tubular epithelial mesenchymal transdifferentiation [J]. *J Jilin Univ*, 2013, 39(4):720-725.