

· 基础研究 ·

## 沉默GCN5或SOX9基因对Thy-1肾炎大鼠肾组织中TGF- $\beta$ 1生成的影响

吴志皎, 张志伟, 刘龙飞, 夏露, 谢梦晓, 罗灿, 邱文, 张婧, 赵聃, 王迎伟\*

南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 研究沉默大鼠肾组织中通用控制核苷酸合成5(general control nonderepressible 5, GCN5)基因、性别决定区Y框蛋白9(SRY related HMG box-9, SOX9)基因对Thy-1肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N)大鼠肾组织内转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)生成的影响。方法: 分别用慢病毒(lentivirus, LV)包装GCN5和SOX9发夹状小干扰RNA(shRNA), 即制备LV-shGCN5和LV-shSOX9重组病毒。然后行大鼠肾动脉灌注术将LV-shGCN5和LV-shSOX9分别导入大鼠肾脏, 再经尾静脉注射兔抗大鼠胸腺细胞抗血清(anti-thymocyte serum, ATS)复制Thy-1N模型。在注射ATS后3 h, 取大鼠肾组织, 用RT-PCR和Western blot检查各组大鼠肾组织中GCN5和SOX9的mRNA及蛋白表达水平, 以验证干扰效果及GCN5、SOX9对TGF- $\beta$ 1产生的影响。结果: 利用肾动脉灌注术将LV-shGCN5或LV-shSOX9重组病毒导入大鼠肾组织后, 不仅能有效沉默相应的靶基因, 而且还能下调TGF- $\beta$ 1的表达。结论: 沉默大鼠肾组织中GCN5或SOX9基因后能显著抑制Thy-1N大鼠肾内TGF- $\beta$ 1的生成。

**[关键词]** Thy-1肾炎(Thy-1N); 通用控制核苷酸合成5(GCN5); 性别决定区Y框蛋白9(SOX9); 转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1); 基因沉默

**[中图分类号]** R692.3**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)03-360-07**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200311

## Effects of GCN5 or SOX9 gene knockdown on TGF- $\beta$ 1 production in the renal tissue of rats with Thy-1 nephritis

WU Zhijiao, ZHANG Zhiwei, LIU Longfei, XIA Lu, XIE Mengxiao, LUO Can, QIU Wen, ZHANG Jing, ZHAO Dan, WANG Yingwei\*

*Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China*

**[Abstract]** **Objective:** This Study aims to study the effect of silencing general control nonderepressible 5 (GCN5) or SRY related HMG box-9(SOX9) gene on TGF- $\beta$ 1 production in the renal tissue of Thy-1 nephritis(Thy-1N) rats. **Methods:** The plasmids of GCN5 and SOX9 shRNA were packaged with lentiviral(LV) to form LV-shGCN5 and LV-shSOX9. Then, the LV-shGCN5 and LV-shSOX9 vectors were separately perfused into rat kidneys by renal artery perfusion, and next, the rat Thy-1N model was replicated by injection of rabbit anti-rat-thymocyte serum(ATS) through rat tail vein. Thereafter, rat renal tissues mentioned-above were taken at 3 h after ATS injection, and mRNA and protein levels of GCN5, SOX9 and TGF- $\beta$ 1 were examined by RT-PCR and Western blot to verify the effects of GCN5 or SOX9 gene interference on TGF- $\beta$ 1 expression in the renal tissues of rats with Thy-1N. **Results:** LV-shGCN5 or LV-shSOX9 vectors could be perfused successfully into rat kidneys through renal artery, and LV-shGCN5 or LV-shSOX9 not only effectively silenced GCN5 or SOX9 gene, but also downregulated TGF- $\beta$ 1 synthesis in the renal tissue of Thy-1N rats. **Conclusion:** Knockdown of GCN5 or SOX9 gene can significantly inhibit renal TGF- $\beta$ 1 production of rats with Thy-1N.

**[Key words]** Thy-1 nephritis(Thy-1N); general control nonderepressible 5(GCN5); SRY related HMG box-9(SOX9); transforming growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1); gene silencing

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03):360-366]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31770934, 81971468)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangyw@njmu.edu.cn

系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是一种人类常见的原发性肾小球疾病,其病理学特征是肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMC)的明显增生和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的异常积聚。随着病程进展,MsPGN病变的肾小球最终可出现纤维化和硬化,患者常因肾功能慢性衰竭而死亡<sup>[1-2]</sup>。近年来,尽管已知该病的发病率高且预后较差,但有关MsPGN的发病机制和致病因素等仍未完全阐明。

大鼠Thy-1肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N),又名抗胸腺细胞血清性肾炎(anti-thymocyte serum nephritis, ATSN)是一种研究人类MsPGN的动物模型<sup>[3-4]</sup>。Thy-1N模型的原理是,将兔抗大鼠胸腺细胞血清(anti-thymocyte serum, ATS)通过静脉注射至大鼠体内,其中的抗体能与GMC表面的Thy-1抗原结合,形成免疫复合物,随后该复合物能迅速激活补体的经典途径,产生C5b-9复合物导致GMC损伤。已发现Thy-1N的病变具有补体依赖性,特别是对不引起GMC溶破的C5b-9[即亚溶解C5b-9(sublytic C5b-9)]有依赖性。sublytic C5b-9体外刺激大鼠GMC后可诱导其凋亡<sup>[5-7]</sup>、增生<sup>[8]</sup>或合成过量的促炎性因子<sup>[9-10]</sup>。

本课题组以往研究已显示,受sublytic C5b-9刺激的大鼠GMC,其不仅合成促增生因子,如转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)升高明显<sup>[9]</sup>,而且肾组织中的通用控制核苷酸合成5(general control nonderepressible 5, GCN5)和性别决定区Y框蛋白9(SRY related HMG box-9, SOX9)的表达也十分显著,但GCN5和SOX9的升高是否能影响TGF- $\beta$ 1的生成,目前并不清楚。

有文献报道,GCN5是一种组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HAT),属于一个转录辅激活因子,其主要功能不仅在于能使组蛋白上的赖氨酸发生乙酰化,而且还能发挥辅助转录因子的作用,可促进靶基因的表达<sup>[11-12]</sup>。此外,SOX9属于一个锌指样结构的转录因子,它既能与靶基因启动子的相应部位结合,又可与转录辅激活因子作用,进而能增强基因的转录与表达<sup>[13-14]</sup>。TGF- $\beta$ 1是一种细胞因子,其在细胞周期进展和促纤维化中有促进效应<sup>[9, 15]</sup>。本课题组的前期研究已发现,大鼠Thy-1N发病后,肾组织中GCN5、SOX9和TGF- $\beta$ 1的表达水平均明显上调,且三者的表达时相比较接近(即GCN5和SOX9基本同步,并稍早于TGF- $\beta$ 1的升高)。此外,他人体外实验也显示,在GMC中沉默

GCN5或SOX9基因后,sublytic C5b-9刺激GMC诱导TGF- $\beta$ 1的生成明显减少。因此,本实验拟对体外结果进行体内验证,探讨沉默大鼠肾组织中GCN5或SOX9基因后,对Thy-1N大鼠肾内TGF- $\beta$ 1产生的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性SD大鼠(160~200 g)购自南京医科大学实验动物中心。多克隆兔抗大鼠胸腺细胞血清(anti-thymocyte serum, ATS, 含Thy-1抗体)由本室制备。补体来自10例正常人(志愿者)血清(normal serum, NS)。逆转录试剂盒(ReverTra Ace- $\alpha$ <sup>TM</sup>) (TOYOKA公司, 日本);小鼠抗大鼠GCN5抗体(OmnimAbs公司, 美国)和SOX9抗体(Santa Cruz公司, 美国),小鼠抗大鼠TGF- $\beta$ 1抗体(南京巴傲得生物科技公司);大鼠GMC细胞株(HBZY-1)(武汉大学中国典型培养物保藏中心)。本研究经南京医科大学实验动物伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组慢病毒(lentivirus, LV)的构建

将shGCN5、shSOX9及对照shCTR的干扰序列交由上海吉凯公司构建相应的重组慢病毒(LV-shRNA)。相关序列如下:shGCN5, 5'-GCCGAAATGCATCCTGCAAAT-3'; shSOX9, 5'-GTGGATGTCAAAGCAACAGGC-3'; shCTR, 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。

#### 1.2.2 LV-shRNA感染大鼠GMC的实验

将大鼠GMC接种于含4 mL DMEM完全培养基(含10%胎牛血清)的细胞培养皿中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养<sup>[5-10]</sup>。在GMC生长至80%~90%融合时,用DMEM完全培养液重悬细胞,使细胞浓度为 $5 \times 10^4$ 个/mL,以100  $\mu$ L/孔加入96孔板(5个复孔)培养12 h。用梯度稀释法使每孔LV-shCTR滴度分别为 $1 \times 10^7$  TU/mL、 $1 \times 10^6$  TU/mL。弃去培养液,重新加入完全培养液培养60 h(本课题组研究显示, LV载体感染GMC 60 h效率最高)。记录荧光细胞数,确定最佳病毒滴度。LV-shGCN5、LV-shSOX9感染大鼠GMC的方法同上。

#### 1.2.3 大鼠肾动脉灌注LV-shRNA的实验

取正常雄性SD大鼠30只,随机分为5组(每组6只),为NS组、Thy-1N组、LV-shCTR+Thy-1N组、LV-shSOX9+Thy-1N组和LV-shGCN5+Thy-1N组。每只大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(每100 g体重0.3 mL),

约 10 min 大鼠进入全麻状态。之后,消毒腹部皮肤,切开腹腔找到腹主动脉,将稀释好的 LV-shRNA 悬液(终浓度  $5 \times 10^7$  TU/mL)经腹主动脉的肾动脉开口下端迅速灌注(体积为 200  $\mu$ L),时间约为 5 s,灌注完毕后且将明胶海绵放在灌注开口处,后再分层缝合,并消毒创口。具体方法见文献描述<sup>[5-10]</sup>。

#### 1.2.4 大鼠 Thy-1N 模型的复制

在肾动脉灌注 LV-shSOX9 或 LV-shGCN5 后第 4 天,大鼠尾静脉注射 ATS 或 NS(剂量为每 100 g 体重 1 mL),注射 3 h 后取鼠肾皮质,小部分用 OCT 包埋留作冰冻切片,其余大部分置于  $-70$   $^{\circ}$ C 保存,之后提取 RNA 和蛋白行 RT-PCR 和 Western blot 检查。

#### 1.2.5 LV-shRNA 灌注效果的检查

大鼠行肾动脉灌注 LV-shRNA 后 4 d,取其重要器官,如心、肝、脾、肺和肾,送南京医科大学实验动物中心用小动物活体可见光三维成像系统(Perkin Elmer 公司,美国)进行检查。同时取肾组织样本制作冰冻切片,然后置荧光显微镜下观察 GFP 荧光以确定 LV-shRNA 在肾脏中的侵染情况。上述实验均设正常未处理的大鼠器官作为对照进行同步检查。

#### 1.2.6 RT-PCR 检查 GCN5、SOX9 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的丰度

先用 TRIzol 法提取大鼠肾皮质中的总 RNA,取 500 ng(500 ng/10  $\mu$ L)总 RNA 逆转录成 cDNA,再用 RT-PCR 检测 3 种基因的 mRNA 丰度,RT-PCR 的引物序列为:GCN5 上游 5'-CCCAGCACTCCCATCTTC-3',下游 5'-GTCTTATGCTTCGGGTCAAA-3'(扩增产物长度 446 bp);SOX9 上游 5'-GCACATCAAGACGGAGCA-3',下游 5'-GGTGAAGGTGGAGTAGAGCC-3'(扩增产物长度 217 bp);TGF- $\beta$ 1 上游 5'-CCGCAACAACGCAATC-3',下游 5'-GAGCACTGAAGCGAAAGC-3'(扩增产物长度 320 bp);GAPDH 上游 5'-GCACTGAGGAACCCGCCTAT-3',下游 5'-ACCGCCTGTTCCGTTTCAGA-3'(扩增产物长度 496 bp)。相应的测定方法参见文献<sup>[5-10]</sup>。

#### 1.2.7 Western blot 测定 GCN5、SOX9 和 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达

取各组大鼠肾组织标本,研磨后离心 12 000 g 30 min,取上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上。加入相应的一抗过夜,TBST 漂洗 3 次,再加入标记 HRP 的二抗,室温 1 h 后用 ECL 化学发光法检测。

#### 1.2.8 光学显微镜检查

取各组大鼠注射 ATS 7 d 后的肾组织,分别进

行石蜡包埋、切片及 HE 染色。切片用光学显微镜观察并计数肾小球内的细胞数。每组切片 1 张,每张切片计数 20 个肾小球。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 及 GraphPad Prism 6 软件进行数据处理。所有实验均独立重复 3 次。所得数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差不齐时采用秩变换检验(rank transformations test)。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 LV-shGCN5、LV-shSOX9 和 LV-shCTR 重组病毒的构建及其感染 GMC 剂量的确定

由于本课题组前期研究已构建了 shGCN5、shSOX9 和 shCTR 表达质粒,所以本研究开展之前先将其序列交由吉凯公司进行 LV 包装,得到 LV-shSOX9、LV-shGCN5 和 LV-shCTR 重组病毒。之后采用  $1 \times 10^7$  TU/mL 和  $1 \times 10^6$  TU/mL 两种 LV 载体滴度进行了 GMC 的感染实验。结果显示,两种滴度的 LV-shCTR 均能感染 GMC 细胞,且感染效率可达 90% 左右(图 1),但比较而言, $1 \times 10^7$  TU/mL 滴度的荧光强度更高。因此,在后续的大鼠肾动脉灌注实验中, LV-shRNA 的灌注剂量为  $1 \times 10^7$  TU/mL。

#### 2.2 大鼠肾动脉灌注 LV-shRNA 的鉴定

##### 2.2.1 小动物器官可见光三维成像观察

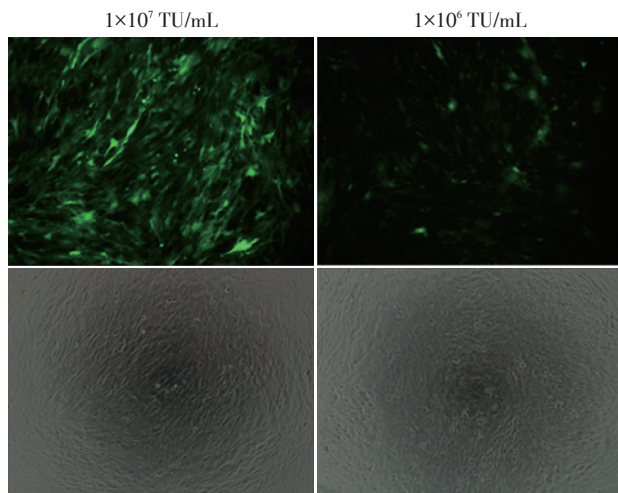
为了验证肾动脉灌注术能够将带有 GFP 荧光的 LV-shRNA 重组病毒(以 LV-shCTR 为例)成功导入大鼠肾组织,用剂量为  $1 \times 10^7$  TU 的 LV-shCTR 灌入大鼠肾动脉,第 4 天时取大鼠主要脏器(心、肝、脾、肺和肾)进行小动物成像检查,同时进行正常大鼠相同器官的检查。结果发现, LV-shCTR 灌注大鼠后,其肾的荧光强度明显强于其他脏器(图 2A、B)。另外,正常大鼠的对应器官荧光均呈阴性。表明利用肾动脉灌注术的确能将 LV-shRNA 导入大鼠的肾组织。

##### 2.2.2 冰冻切片检查

同上时间取肾组织进行冰冻切片,灌注了 LV-shCTR 的大鼠荧光显微镜检查显示,其肾小球和肾小管部位可见 GFP 荧光(图 2C),正常肾组织无荧光呈现。表明该 LV-shCTR 确实可侵染大鼠的肾组织细胞。

#### 2.3 沉默 GCN5、SOX9 基因的效果鉴定及其对 Thy-1N 大鼠肾组织中 TGF- $\beta$ 1 生成的影响

利用肾动脉灌注术分别向大鼠肾组织中注入



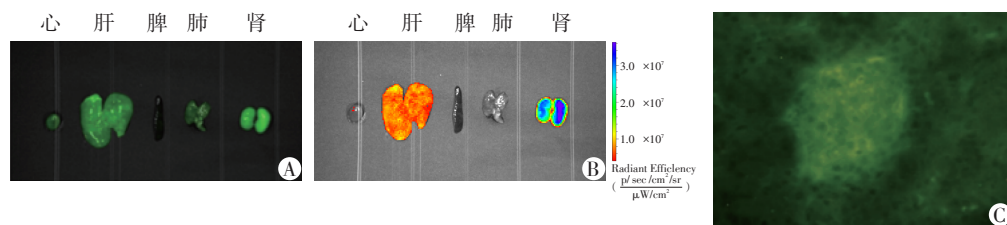
两种滴度( $1 \times 10^7$  TU/mL和 $1 \times 10^6$  TU/mL)的LV-shCTR处理GMC 60 h,细胞呈现出较强的荧光,感染效率约90%( $\times 100$ )。

图1 荧光显微镜检查LV-shCTR重组病毒感染大鼠GMC的情况

Figure 1 Detection of rat GMC infected by recombinant virus LV-shCTR under fluorescence microscopy

LV-shGCN5、LV-shSOX9和LV-shCTR,在灌注第4天,再给大鼠尾静脉注射ATS,即诱导Thy-1N模型。在Thy-1N大鼠发病后3 h取肾皮质,先检查肾组织中GCN5和SOX9的mRNA与蛋白表达情况。RT-PCR(图3)和Western blot(图4)结果显示,Thy-1N组和LV-shCTR+Thy-1N组,其肾组织中GCN5和SOX9的mRNA和蛋白水平均显著升高,但在LV-shGCN5+Thy-1N和LV-shSOX9+Thy-1N处理组(即沉默了GCN5或SOX9基因的Thy-1N大鼠),其肾组织中GCN5和SOX9的mRNA和蛋白表达均明显减少。表明肾内灌注LV-shGCN5和LV-shSOX9确实可有效沉默肾组织GCN5和SOX9基因的表达。

为了研究沉默GCN5和SOX9对Thy-1N大鼠TGF- $\beta$ 1表达的影响。我们又用RT-PCR与Western blot检查了各组大鼠肾组织中TGF- $\beta$ 1 mRNA(图3)及蛋白(图4)的水平。实验发现,Thy-1N组和LV-shCTR+Thy-1N组大鼠肾组织中TGF- $\beta$ 1基因的表达



A:小动物器官可见光三维成像显示,肾脏荧光明显强于心、肝、脾、肺;B:为荧光数值图例;C:肾组织冰冻切片检查证实,其肾小球和肾小管部位均出现了GFP荧光( $\times 400$ )。

图2 LV-shCTR质粒灌注大鼠器官的成像和肾组织冰冻切片的检查

Figure 2 Imaging of rat organs perfused by LV-shCTR plasmids and examination of frozen sections of rat renal tissue

均明显上调,但在LV-shGCN5+Thy-1N或LV-sh-SOX9+Thy-1N处理的大鼠肾中,TGF- $\beta$ 1的表达水平则明显下降。提示沉默大鼠肾内GCN5或SOX9基因后,TGF- $\beta$ 1基因的表达受到了明显抑制。

#### 2.4 沉默GCN5、SOX9基因后对Thy-1N大鼠肾细胞增生的影响

分组处理大鼠后7 d,取各组大鼠肾皮质进行切片。光镜检查证实,沉默了肾内GCN5或SOX9基因的大鼠,其肾小球内的细胞数明显低于Thy-1N组和LV-shCTR+Thy-1N组(图5)。提示,沉默肾组织中的GCN5和SOX9基因后确可抑制Thy-1N大鼠肾小球内细胞的增生。

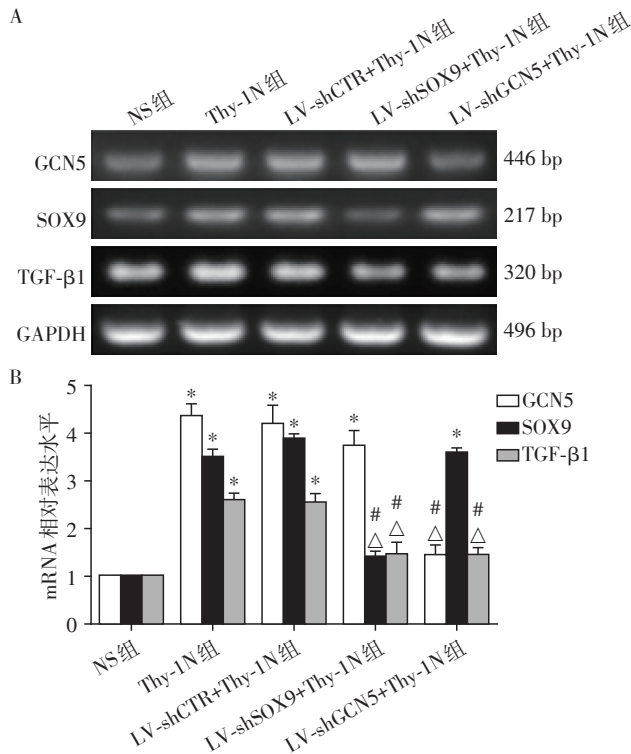
### 3 讨论

MsPGN的病变特征是GMC的异常增生和ECM的大量积聚,最终可发展为肾小球纤维化和硬化。

已有资料显示,MsPGN在我国原发性肾小球肾炎病例中占有较高的比例,约占原发肾病综合征的30%<sup>[1-2]</sup>。虽然现在已知MsPGN的发病与免疫异常有关,但其确切的发病机制、致病因素及调控机制等尚不清楚。因此,深入研究其机制,既可为开发MsPGN治疗药物提供帮助,也可为指导临床诊治等提供参考。

大鼠Thy-1N模型是研究MsPGN的常用动物模型<sup>[16]</sup>。该模型肾小球的病理改变与人MsPGN极为相似。多年来,本课题组的研究已发现,Thy-1N大鼠GMC的病变具有sublytic C5b-9的依赖性(即Thy-1N大鼠发病早期,其GMC表面可见sublytic C5b-9的沉积,但此时细胞形态完整)。体外用sublytic C5b-9刺激培养GMC后,能引起细胞产生凋亡或增生等多种反应<sup>[4-10]</sup>。

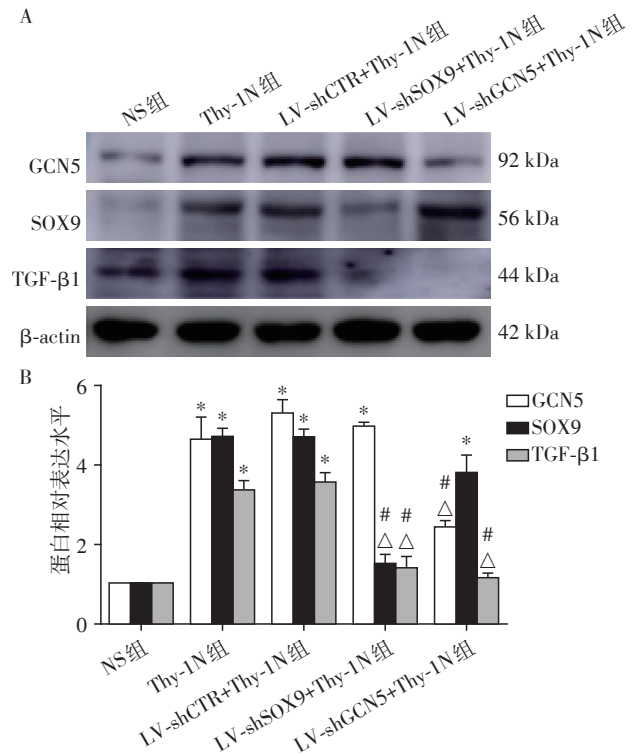
sublytic C5b-9诱导GMC增生的机制,本课题组的体外研究已证实,受sublytic C5b-9刺激的GMC可



A: RT-PCR 电泳条带; B: 半定量统计图。RT-PCR 显示, Thy-1N 组和 LV-shCTR+Thy-1N 组肾组织中 GCN5、SOX9 和 TGF-β1 mRNA 水平均明显上调, 但 LV-shGCN5+Thy-1N 组和 LV-shSOX9+Thy-1N 组肾组织中 GCN5、SOX9 和 TGF-β1 的 mRNA 水平均明显下降。与 NS 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LV-shCTR+Thy-1N 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与 Thy-1N 组比较, # $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图3 沉默 GCN5 或 SOX9 基因的效果及其对 Thy-1N 大鼠 TGF-β1 基因转录的影响

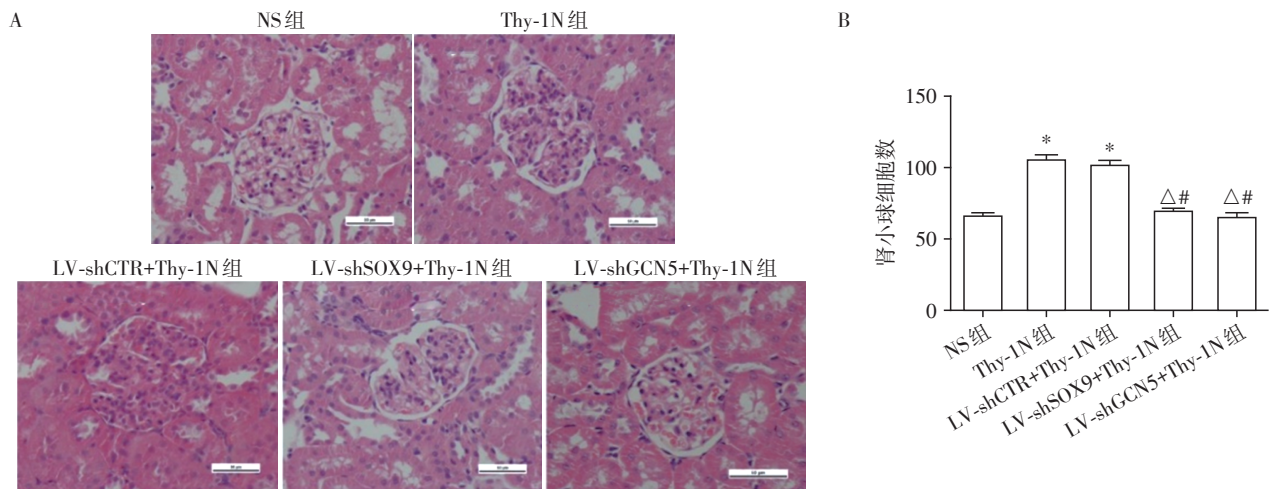
Figure 3 Effect of silencing GCN5 or SOX9 gene and its influence on TGF-β1 mRNA transcription in Thy-1N rats



A: Western blot 电泳条带; B: 半定量统计图。Western blot 实验发现, Thy-1N 组和 LV-shCTR+Thy-1N 组肾组织中 GCN5、SOX9 和 TGF-β1 蛋白的表达均显著增多, 但 LV-shGCN5+Thy-1N 组和 LV-shSOX9+Thy-1N 组肾组织中 GCN5、SOX9 和 TGF-β1 的蛋白表达则明显减少。与 NS 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LV-shCTR+Thy-1N 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与 Thy-1N 组比较, # $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图4 沉默 GCN5 或 SOX9 基因的效果及其对 Thy-1N 大鼠 TGF-β1 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of silencing GCN5 or SOX9 gene and its influence on TGF-β1 protein expression in Thy-1N rats



A: HE 染色光镜照片; B: 肾小球细胞数统计图。与 NS 组相比, Thy-1N 组和 LV-shCTR+Thy-1N 组肾小球内细胞数可见显著增加, 而 LV-shGCN5+Thy-1N 组和 LV-shSOX9+Thy-1N 组肾小球内细胞数则明显低于前述两组。与 NS 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LV-shCTR+Thy-1N 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与 Thy-1N 组比较, # $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图5 沉默大鼠肾组织 GCN5 或 SOX9 基因后对 Thy-1N 大鼠肾小球细胞增生的影响

Figure 5 Effect of silencing GCN5 or SOX9 gene on proliferation of glomerular cells in Thy-1N rats

显著上调GCN5、SOX9和TGF- $\beta$ 1基因的表达。进一步实验表明,GCN5及SOX9的升高均可促进GMC合成TGF- $\beta$ 1。提示由sublytic C5b-9刺激GMC诱导上调的GCN5或SOX9能提高TGF- $\beta$ 1的生成。由于体外实验影响因素比较单一,加上体外结果需在体内给予验证,故本研究在体内检查了沉默大鼠肾内GCN5或SOX9基因对Thy-1N大鼠肾组织TGF- $\beta$ 1产生的影响。

已知LV是最常用的病毒载体之一,通常可用于各种目的基因的递送。鉴于LV不仅能包装shRNA表达质粒,而且还容易感染组织细胞,并能有效持久地表达目的基因<sup>[17-18]</sup>。因此,在实验开展之初,我们将shGCN5、shSOX9和shCTR序列交由公司,制备LV-shGCN5、LV-shSOX9和LV-shCTR重组病毒,之后进行了感染GMC的验证。结果发现,LV-shGCN5和LV-shSOX9既能成功感染GMC,又能有效沉默GCN5和SOX9基因。

为了让LV-shGCN5和LV-shSOX9更好地导入大鼠肾组织,采用了本课题组一直延用的大鼠肾动脉灌注术将此重组病毒导入肾组织<sup>[5-10]</sup>。灌注效果显示,导入LV-shRNA后,肾脏的荧光强度显著高于其他器官。随后复制大鼠Thy-1N,检查其肾组织内GCN5和SOX9的表达,证实LV-shGCN5+Thy-1N组和LV-shSOX9+Thy-1N组的GCN5和SOX9基因表达显著下调。提示导入LV-shGCN5和LV-shSOX9能抑制相应基因的表达。

本课题组的体外实验已经发现,用sublytic C5b-9刺激GMC后3 h,GCN5、SOX9和TGF- $\beta$ 1均明显上调,且事先沉默GMC中的GCN5和SOX9基因后再行sublytic C5b-9刺激,其胞内TGF- $\beta$ 1的生成又明显下降(数据尚未发表)。鉴于大鼠Thy-1N发病后,TGF- $\beta$ 1的升高较为显著,为了从体内评估沉默肾内GCN5和SOX9基因对Thy-1N大鼠肾组织中TGF- $\beta$ 1产生的影响,随后检查了各组大鼠TGF- $\beta$ 1基因表达的变化。结果显示,沉默肾组织中的GCN5或SOX9基因后,其肾内TGF- $\beta$ 1基因的表达明显下调,这一现象与其他体外实验结果一致。提示在Thy-1N大鼠病变的过程中,GCN5、SOX9表达的上调能影响TGF- $\beta$ 1的生成。

前已述及,GCN5属于一个兼有HAT活性的转录辅激活因子<sup>[11-12]</sup>,而SOX9则是一个转录因子,为SOX家族成员<sup>[13-14]</sup>。有文献报告,当转录因子与靶基因的启动子结合后,其转录辅激活因子可与转录因子结合形成复合物,共同调节靶基因的转录<sup>[11,14]</sup>。本

课题组已发现,用sublytic C5b-9刺激GMC后3 h,其GCN5、SOX9的表达水平均明显升高,且GCN5与SOX9能发生结合,共同调控TGF- $\beta$ 1基因的转录。本研究证实,Thy-1N大鼠发病3 h时肾组织中的GCN5、SOX9及TGF- $\beta$ 1均显著上调,但GCN5、SOX9升高较为明显,且沉默大鼠肾组织中GCN5或SOX9基因后确能下调TGF- $\beta$ 1的表达。故认为,GCN5和SOX9分子属于TGF- $\beta$ 1的上游基因。值得一提的是,由于他人体外实验已发现,TGF- $\beta$ 1受sublytic C5b-9刺激后3 h升高,6 h更加显著,故今后将仔细检查Thy-1N大鼠发病不同时间点前述指标的表达水平(mRNA和蛋白),或许有利于发现差异。

本研究着重观察了沉默大鼠肾组织中GCN5和SOX9基因对Thy-1N大鼠肾细胞生成TGF- $\beta$ 1的影响,由于TGF- $\beta$ 1已被证实有促进细胞增生和组织纤维化的作用<sup>[15]</sup>,故本研究在Thy-1N大鼠发病后7 d(细胞增生的高峰期),检查各组大鼠肾小球内细胞数的变化。结果证实,沉默了肾内GCN5或SOX9基因后,肾小球内细胞数明显低于Thy-1N模型鼠或未沉默GCN5、SOX9基因的对照鼠(即LV-shCTR+Thy-1N组)。提示沉默大鼠肾组织中GCN5、SOX9基因后,不仅可下调TGF- $\beta$ 1的生成,而且还能减轻其肾小球细胞的增生程度。

#### [参考文献]

- [1] ZHOU Q, YANG X, WANG M F, et al. Changes in the diagnosis of glomerular diseases in East China: a 15-year renal biopsy study[J]. *Ren Fail*, 2018, 40(1): 657-664
- [2] JIN M, YIN Z, WEI K, et al. Metanephric mesenchyme-derived Foxd1 + mesangial precursor cells alleviate mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(4): 553-561
- [3] GENG W J, WEI R B, LIU S W, et al. Shenhua tablet inhibits mesangial cell proliferation in rats with chronic anti-Thy-1 nephritis[J]. *Biol Res*, 2016, 49: 17
- [4] WANG Y, HE Q, QIN H, et al. The complement C5b-9 complexes induced injury of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis by increasing nitric oxide synthesis[J]. *Life Sci*, 2006, 79(2): 182-192
- [5] 虞天一, 赵晨卉, 何风霞, 等. Sublytic C5b-9刺激上调KLF4促进肾小球系膜细胞生成IL-23的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(10): 1331-1336
- [6] LIU L, QIU W, WANG H, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce apoptosis of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis through role of interferon regulatory factor-1-dependent caspase 8 activation[J]. *J Biol Chem*,

- 2012, 287(20):16410-16423
- [7] ZHU G, QIU W, LI Y, et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell apoptosis through the cascade pathway of MEKK2-p38 MAPK-IRF-1-TRADD-Caspase 8 in rat Thy-1 nephritis [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1104-1118
- [8] QIU W, ZHANG Y, LIU X M, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce proliferative changes of glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through TRAF6-mediated PI3K-dependent Akt1 activation [J]. *J Pathol*, 2012, 226(4):619-632
- [9] ZHANG J, LI Y, SHAN K, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-beta 1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBP beta acetylation [J]. *FASEB J*, 2014, 28(3):1511-1525
- [10] ZHANG J, XIE M, XIA L, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-23 and IL-36a production by glomerular mesangial cells via PCAF-mediated KLF4 acetylation in rat Thy-1 nephritis [J]. *J Immunol*, 2018, 201(11):3184-3198
- [11] WU Y, MA S, XIA Y, et al. Loss of GCN5 leads to increased neuronal apoptosis by upregulating E2F1- and Egr-1-dependent BH3-only protein Bim [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1):e2570
- [12] ZHAO C H, LI Y T, QIU W, et al. C5a induces A549 cell proliferation of non-small cell lung cancer via GDF15 gene activation mediated by GCN5-dependent KLF5 acetylation [J]. *Oncogene*, 2018, 37(35):4821-4837
- [13] XIAO S, LI Y, PAN Q, et al. MiR-34c/SOX9 axis regulates the chemoresistance of ovarian cancer cell to cisplatin-based chemotherapy [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3):2940-2953
- [14] YAN S, SHAN X, CHEN K, et al. LINC00052/miR-101-3p axis inhibits cell proliferation and metastasis by targeting SOX9 in hepatocellular carcinoma [J]. *Gene*, 2018, 679:138-149
- [15] WANG Q, GU X F, WANG J F. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces mouse precartilaginous stem cell differentiation through TGF-beta1 - CK1epsilon - beta-catenin signalling [J]. *Int J Exp Pathol*, 2018, 99(3): 113-120
- [16] BAI J, GENG W, MEI Y, et al. Effect of huaier on the proliferation of mesangial cells in anti-Thy-1 nephritis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6):2441-2452
- [17] 朱贤慧, 张蕾, 杜紫薇, 等. 大鼠神经元型一氧化氮合酶基因慢病毒载体的构建及功能测定 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6):841-845
- [18] LI Y Q, LIU Y S, YING X W, et al. Lentivirus-mediated disintegrin and metalloproteinase 17 RNA interference reversed the acquired resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma cells *in vitro* [J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34(1):196-205
- [收稿日期] 2019-07-15

(上接第321页)

- N Engl J Med*, 2020 [2020-02-21]. DOI: 10.1056/NEJMoa2001191
- [25] MAIR-JENKINS J, SAAVEDRA-CAMPOS M, BAILLIE J K, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis [J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(1):80-90
- [26] DU L, HE Y, ZHOU Y, et al. The spike protein of SARS-CoV: a target for vaccine and therapeutic development [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(3):226-236
- [27] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J/OL]. *Nature*, 2020 [2020-02-21]. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7
- [28] 中国新闻网. 新冠肺炎康复者血浆能否成“救命良药”? [EB/OL]. (2020-02-14) [2020-02-21]. <http://www.chinanews.com/m/gn/2020/02-14/9091096.shtml>
- [29] YAN R H, ZHANG Y Y, LI Y N, et al. Structure of dimeric full-length human ACE2 in complex with B<sup>o</sup>AT1 [J/OL]. *BioRxiv*, 2020 [2020-02-21]. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.951848>
- [30] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J/OL]. *Science*, 2020 [2020-02-21]. DOI: 10.1126/science.abb2507
- [收稿日期] 2020-02-21