doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.002

## 多囊肾病小型猪肾脏组织中增殖和凋亡的改变\*

连晓英 白雪源 赵 静 张英杰 曹 静 王媛媛

(解放军总医院肾病科,肾脏疾病国家重点实验室,国家慢性肾病临床医学研究中心北京100853)

摘要 目的:观察 ADPKD 小型猪肾脏组织中细胞增殖和凋亡的改变。方法:使用 PKD1 基因敲除的小型猪模型,用 Western blot 和免疫组化方法检测肾脏组织中细胞增殖指标 PCNA;增殖相关的 mTOR 信号通路分子(phospho-mTOR、phospho-p7086、phospho-4EBP1)和 ERK 信号通路分子(phospho-PKA、phospho-MEK、phospho-ERK)的表达水平以及内皮细胞粘附分子 CD31 以及凋 亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase 3 的表达变化。结果:在 ADPKD 小型猪肾脏组织中,增殖指标 PCNA 表达显著升高。mTOR 信号 通路分子 phospho-mTOR、phospho-p7086、phospho-4EBP1 水平明显升高,ERK 信号通路分子中 phospho-PKA、phospho-MEK、phospho-ERK 水平明显升高。CD31 表达明显升高,Bax/Bcl-2 的比值以及 caspase 3 的表达水平显著升高。结论:本研究显示在 ADPKD 小型猪肾脏组织中,细胞增殖和凋亡信号通路明显激活。

关键词:常染色体显性多囊肾病;增殖;凋亡;小型猪

中图分类号:R-33;R692 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)11-2007-05

# Changes of Proliferation and Apoptosis in the Kidney of Mini-Pigs with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease\*

LIAN Xiao-ying, BAI Xue-yuan<sup>4</sup>, ZHAO Jing, ZHANG Ying-jie, CAO Jing, WANG Yuan-yuan

(Department of Nephrology, State Key Laboratory of Kidney Diseases, National Clinical Research Center for Kidney Diseases, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

**ABSTRACT Objective:** To observe proliferation and apoptosis of the cell in the kidney of Mini-Pigs with ADPKD. **Methods:** We observed the protein expression changes of cell proliferation marker PCNA, proliferation-related mTOR signal pathway key molecules (phospho-pTOR, phospho-p70S6, phospho-4EBP1), ERK signal pathway key molecules (phospho-PKA, phospho-MEK, phospho-ERK), endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), Bax, Bcl-2 and caspase 3 in the kidney tissues of PKD1 deletion mini-pig model by West-ern blot and Immunohistochemical staining. **Results:** The results showed that the level of PCNA was markedly up-regulated. The molecules in mTOR signal pathway (phospho-mTOR, phospho-p70S6, phospho-4EBP1), ERK signal pathway (phospho-PKA, phospho-4EBP1), ERK signal pathway (phospho-PKA, phospho-4EBP1), ERK, phospho-4EBP1), ERK markedly increased in ADPKD mini-pig kidney tissues. In addition, the Bax/Bcl-2ratio and the caspase3 were increased significantly. **Conclusion:** The research shown that the signal pathway of proliferation and apoptosis was activated in ADPKD mini-pig kidney tissues.

Key words: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease; Proliferation; Apoptosis; Mini-pig Chinese Library Classification(CLC): R-33; R692 Document code: A Article ID: 1673-6273(2017)11-2007-05

## 前言

常染色体显性多囊肾病(autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD)是最常见的单基因遗传病之一,其发病机 制目前未完全明确也无特异性的防治手段<sup>[13]</sup>。ADPKD 由 PKD1 或 PKD2 基因突变所致,分别占 85 %和 15 %<sup>4]</sup>。在啮齿 类多囊肾动物模型和细胞中,多囊肾的囊肿衬里上皮细胞存在 增殖和凋亡信号通路异常<sup>[56]</sup>,引起囊泡衬里上皮细胞异常增殖 和囊液过度分泌,促进囊泡的形成。因此,国内外许多研究把干 预囊肿上皮细胞增殖和凋亡作为治疗多囊肾病的重点<sup>[78]</sup>。另 外,囊肿周围新生血管形成也参与囊肿衬里上皮细胞的过度增 殖,其中,内皮细胞粘附分子 (endothelial cell adhesion molecule-1,CD31)的表达增加起重要作用。

目前多是使用啮齿类多囊肾动物模型,其与人类多囊肾病 在囊肿形成机理上有细微的差别。猪在解剖学、生理学等方面 与人类有高度的相似性,可以更好地模拟人类疾病的发生过 程<sup>[9,10]</sup>,是研究人类疾病理想的大动物模型。我们前期通过锌指 核酶(ZFN)技术敲除小型猪 PKD1 基因,建立了常染色体显性 多囊肾病小型猪模型<sup>[11]</sup>,本研究主要探讨了慢性 ADPKD 模型 肾脏组织中增殖、CD31 和凋亡的表达变化,以期为治疗 ADP-

<sup>\*</sup> 基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFA0101002);国家自然科学基金项目(81570659);海南省社会发展科技专项资金项目(SF201341) 作者简介:连晓英(1988-),硕士研究生,主要研究方向:多囊肾发病机制和治疗,电话:15313864873,E-mail: 15313864873@163.com △ 通讯作者:白雪源,教授,研究员,博士生导师,主要研究方向:多囊肾,E-mail: xueyuan\_bai@163.com

KD 提供更多的理论依据。

## 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

随机挑选 5-6 月龄的通过锌指核酶(ZFN)技术敲除 PKD1 基因的小型猪6头作为多囊肾模型组(PKD),选取相同月龄相 同品系的野生型小型猪6头作为正常对照组(CON)。饲养条件 为:室温 19~29 ℃,湿度 40~70 %,同等进食。喂养 18 个月,按 规定日期麻醉后取血、尿标本,然后处死动物,制备肾脏组织标 本。 PCNA, phospho-mTOR, phospho-p70S6, phospho-4E-BP1, phospho-PKA, phospho-MEK, phospho-ERK1/2 多克隆抗体购 自 Cell Signaling Technology 公司。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 生化分析 在预定的时间,从所有小型猪收集外周血和 尿标本,离心 3000 r/min × 10 min,使用前储存在 -80 ℃。用比 色法检测尿素氮(BUN)与肌酐(Cr)。

1.2.2 肾脏组织病理分析(PAS 染色) 小型猪肾脏组织固定于 4%的多聚甲醛中,石蜡包埋切片,切片厚3µm。切片常规脱 蜡,于1%过碘酸氧化 20 min,水洗,甩干。入 Schiff 液 30 min, 浸入温水, 20-25 min, 水洗。苏木素染核 2-3 min, 水洗。1%盐酸 乙醇分化数秒,水洗。氨水返蓝数秒。流水冲洗。梯度乙醇脱水, 二甲苯脱水,树胶封片。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blot) 检测用 RIPA 裂解液裂解 小型猪肾脏组织。4 ℃离心 12000 r/min× 30 min,取上清。用 BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,变性蛋白。取 50-100 μg蛋白上样,在6%-12%SDS-PAGE(聚丙烯酰胺)凝胶电泳 分离蛋白。所得产物转移至 NC 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加人一抗兔抗人 PCNA, phospho-mTOR, phospho-P70S6, phospho-4EBP1, phospho-PKA, phospho-MEK, phospho-ERK,

CD31,Bcl-2,Bax,caspase 3 多克隆抗体(1:1000)过夜。用 TBST 洗膜 10 min× 3 次, 然后加入二抗为辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:1000),室温孵育1h,用TBST 液洗膜10 min×3次,电 化学发光(electrochemiluminescence, ECL)显影。最后,用 ImageJ (Bio-Rad Laboratories)分析条带灰度值,计算目的蛋白和 内参β-actin 条带灰度值比值。

1.2.4 免疫组织化学法检测 (Immunohistochemistry) 小型猪 肾组织于 10%的中性甲醛液固定 24 h 后常规脱水透明,石蜡 包埋,连续切片,片厚3µm。切片脱蜡入水,于4℃枸橼酸钾液 微波修复 10-15 min, 室温晾 30 min, PBS 浸泡 5 min× 3 次。入 3%H2O2室温孵育 30 min, 消除内源性过氧化物酶活性,PBS 浸泡 2-3 min× 3 次。山羊血清室温封闭 20 min,加稀释过的一 抗,4℃过夜。PBS 浸泡 5 min× 3次,滴加 4℃生物素标记的二 抗工作液,室温孵育 40 min。入 PBS 浸泡 5 min× 3 次,加 4 ℃ 辣根酶标记的链酶卵白素,室温孵育40min。PBS浸泡5min× 3次,DAB 溶液显色,苏木精复染,脱水,透明,封片。结果以胞 质或者胞核内棕黄色颗粒为阳性。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,两组间数据以均 数±标准差表示,采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 两组小型猪肾功能的而比较

同等条件喂养小型猪18个月后,与正常对照组相比,PKD 组血肌酐(Scr)和尿蛋白 / 尿肌酐比值(P/C)水平均显著升高 (P<0.05),尿素氮(BUN)水平虽然升高,但是没有统计学差异 (P>0.05)(见表1)。

表1 两组小型猪血、尿生化检测结果(x±s)

Paramaters	CON	PKD
BUN (mmol/L)	5.73± 1.26	6.07± 0.90
SCr(µmol/L)	102.53± 14.37	149.73± 10.43*
P/C(mg/mmol)	8.01± 0.20	20.16± 3.86*

Note: CON: control group; PKD: ADPKD group.BUN: blood urea nitrogen; SCr: serum creatinine; P/C: urine protein/urine creatinine. Compared with the control group, \*P<0.05 vs CON.

#### 2.2 两组小型猪肾脏组织形态的比较

PAS 染色结果显示:与正常对照组相比,PKD 组肾小管明 显扩张(见图1)。



图 1 两组小型猪肾脏组织 PAS 染色结果 Fig.1 PAS staining results of Mini-pig kidney tissues between two groups Note: expresses expansive kidney tubules

CON

## 2.3 两组小型猪肾组织中 PCNA 的表达变化

增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) 存在于细胞核内,是反映细胞增殖状态的指标。我们用 Western blot 和免疫组化方法检测了两组小型猪肾脏组织中 PCNA 蛋白质表达水平。Western blot 结果显示:在 PKD 小型猪肾组 织中,PCNA 表达水平较对照组显著升高(P<0.05),免疫组化染 色结果显示 PKD 小型猪肾小管囊肿衬里上皮细胞核 PCNA 着 色为棕色的细胞数量较对照组明显增加。表明 ADPKD 小型猪 肾脏组织囊肿衬里上皮细胞增殖显著(图 2)。



Fig.2 Change of PCNA expression in the kidney tissue of mini-pig between two groups.

Protein expression data are presented as the mean± SD. \*P<0.05 vs CON.

## 2.4 两组小型猪肾组织中 mTOR 信号通路的表达变化

mTOR(mammalian target of rapamycin, 雷帕霉素哺乳靶蛋白)是调控细胞生长与增殖的一个关键性蛋白激酶。mTOR下游信号通路分子包括 p70S6K 和 4E-BP1, 可促进细胞增殖。我们用 Western blot 和免疫组化的方法检测了两组小型猪肾脏组织中的 phospho-mTOR、phospho-P70S6、phospho-4EBP1 (激活

型)蛋白质的表达水平。Western blot 结果显示 PKD 组 phospho-mTOR、phospho-P70S6、phospho-4EBP1(激活型)水平明显 增高(p<0.05);免疫组化染色结果显示 PKD 小型猪肾小管囊肿 衬里上皮细胞 phospho-mTOR 着色为棕色的细胞数量较对照 组明显增加。表明在 ADPKD 小型猪肾小管囊肿衬里上皮细胞 中 mTOR 信号通路明显激活(图 3)。



Fig.3 Comparison of the changes of mTOR signal pathway moleculars expression in Mini-pig kidney tissues between two groups. Note: Protein expression data are presented as the mean± SD. \*P<0.05 vs CON.

## 2.5 两组小型猪肾组织中 ERK 信号通路的表达变化

ERK 是调节细胞增殖的的另一个关键蛋白激酶。p-ERK 表示 ERK 的活化状态。我们用 western blot 和免疫组化的方法 检测了两组小型猪肾脏组织 ERK 信号通路中 phospho-PKA、 phospho-MEK、phospho-ERK 蛋白质表达水平。结果显示在 ADPKD 小型猪肾脏组织中,phospho-PKA、phospho -MEK、 phospho-ERK 的水平显著升高;免疫组化染色结果显示 PKD 小型猪肾小管囊肿衬里上皮细胞胞浆 phospho-ERK 着色为棕 色的细胞数量较对照组明显增加。表明在 ADPKD 小型猪肾小管上皮细胞中 ERK 信号通路被激活(图 4)。

## 2.6 两组小型猪肾组织中 CD31 表达变化

内皮细胞粘附分子 (endothelial cell adhesion molecule, CD31)表达于内皮表面,参与血管生成。我们用 Western blot 方 法检测了两组小型猪肾脏组织 CD31 蛋白质表达水平。结果显 示与对照组相比,ADPKD 的小型猪肾组织中 CD31 的表达水 平显著升高(图 5)。





Fig.4 Comparison of the changes of ERK signal pathway moleculars expression in Mini-pig kidney tissues between two groups. Protein expression data are presented as the mean± SD. \*P<0.05 vs CON.



tissues between two groups.

Note: Protein expression data are presented as the mean± SD. \*P<0.05 vs CON.

## 2.7 两组小型猪肾组织中凋亡相关蛋白的表达变化

我们用 Western blot 方法检测了两组小型猪肾脏组织凋亡 相关蛋白 Bax、Bcl-2、caspase 3 表达水平。Western blot 结果显 示在 ADPKD 小型猪肾组织中,Bax/Bcl-2 的比值升高,caspase 3 的表达水平显著升高;免疫组化染色结果显示 PKD 小型猪 肾小管囊肿衬里上皮细胞胞浆 Bax 着色为棕色的细胞数量较 对照组明显增加。(图 6)。

## 3 讨论

我们的研究结果显示:ADPKD 小型猪模型组的肾功能指标肌酐、尿蛋白/肌酐明显升高;PAS 染色结果显示 ADPKD 小型猪肾小管出现明显的扩张。这些实验结果表明该模型为较理想的 ADPKD 动物模型。

研究表明,在 ADPKD 组织和 PKD1 突变的细胞中上皮细胞异常增殖<sup>60</sup>。PCNA 是细胞增殖的指标,我们用 Western blot 和免疫组化以方法检测了 ADPKD 小型猪肾脏中 PCNA 的表达水平,结果显示,在 ADPKD 小型猪肾小管囊肿衬里上皮细胞中 PCNA 的表达水平明显升高,表明在 ADPKD 小型猪肾脏 中存在明显的增殖。

近年研究发现,在 PKD 动物模型中发现一些信号通路失 调[12-16],可以作为潜在的治疗靶点。在这些失调的信号通路中, 其中包括控制细胞生长和增殖的 mTOR (mammalian target of rapamycin, 雷帕霉素哺乳靶蛋白)信号通路的激活<sup>[17,18]</sup>。mTOR 是调控细胞生长与增殖的一个关键性蛋白激酶。mTOR 下游信 号通路分子包括 p70S6 和 4E-BP119,可促进细胞增殖。目前在 啮齿类动物模型中已经发现 mTOR 抑制剂能够延缓多囊肾囊 泡的进展<sup>11</sup>,但是在临床实验中疗效较差,需要进一步深入研 究。我们的研究结果显示: ADPKD 小型猪肾脏组织中 phospho-mTOR、phospho-p70S6、phospho-4EBP1的水平明显升高。 此外,我们用 Western blot 方法检测了小型猪肾脏组织中的 phospho-PKA, phospho-MEK, phospho-ERK 表达变化,结果显 示:与之前的研究结果一致<sup>201</sup>,ADPKD小型猪肾脏组织中的 phospho-PKA, phospho-ERK, phospho-MEK 水平明显升高。表 明在 ADPKD 小型猪肾脏中, mTOR 和 ERK 增殖信号通路被 激活。





研究表明囊肿周围新生血管形成参与囊肿上皮细胞的过度增殖<sup>[21]</sup>,在 ADPKD 的进展中发挥作用,其中内皮细胞粘附分子 CD31 的表达起重要作用。我们用 Western blot 方法检测了小型猪肾脏组织 CD31 的表达水平,结果显示 ADPKD 小型猪肾脏组织中 CD31 表达水平明显升高。

已有研究表明在 PKD 中凋亡调节异常能够引起囊泡的发 生和正常肾单位的缺失是相关的。在 PKD 的各种动物模型中 已经观察到小管上皮细胞的凋亡增加<sup>[22]</sup>。同正常对照组相比, 在两周的杂合子和纯合子大鼠肾脏中,TUNEL 阳性的凋亡细 胞是增加的。在一些 PKD 的动物模型中已经发现抑制凋亡能 够阻碍肾脏囊泡的进展。我们的研究结果显示:在 ADPKD 小 型猪肾组织中,Bax/Bcl-2 的比值升高,caspase 3 的表达水平显 著升高,细胞凋亡明显增加。

本研究结果表明在 ADPKD 小型猪肾脏中,增殖相关的 mTOR 和 ERK 信号通路明显被激活,CD31 的表达水平明显升 高,凋亡相关蛋白表达显著升高。本研究为今后开发靶向增殖 信号通路分子的抑制剂和凋亡诱导药物以便用于治疗多囊肾 病奠定了基础。

#### 参考文献(References)

- Takiar V, Caplan MJ. Polycystic kidney disease: pathogenesis and potential therapies [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812 (10): 1337-1343
- [2] Wuthrich RP, Mei C. Pharmacological management of polycystic kidney disease[J]. Expert Opin Pharmacother, 2014, 15(8): 1085-1095
- [3] Rangan GK, Tchan MC, Tong A, et al. Recent advances in autosomal-dominant polycystic kidney disease [J]. Intern Med J, 2016, 46 (8): 883-892
- [4] Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease [J]. Annu Rev Med,

2009, 60: 321-337

- [5] Saigusa T, Bell PD Molecular pathways and therapies in autosomaldominant polycystic kidney disease[J]. Physiology (Bethesda), 2015, 30(3): 195-207
- [6] Paul BM, Vanden Heuvel GB. Kidney: polycystic kidney disease [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2014, 3(6): 465-487
- [7] Ravichandran K, Zafar I, Ozkok A, et al. An mTOR kinase inhibitor slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(1): 45-53
- [8] Yuajit C, Muanprasat C, Gallagher AR, et al. Steviol retards renal cyst growth through reduction of CFTR expression and inhibition of epithelial cell proliferation in a mouse model of polycystic kidney disease[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 88(3): 412-421
- [9] Groenen MA, Archibald AL, Uenishi H, et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution [J]. Nature, 2012, 491(7424): 393-398
- [10] Swindle MM, Makin A, Herron AJ, et al. Swine as models in biomedical research and toxicology testing [J]. Vet Pathol, 2012, 49 (2): 344-356
- [11] He J, Li Q, Fang S, et al. PKD1 mono-allelic knockout is sufficient to trigger renal cystogenesis in a mini-pig model[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(4): 361-369
- [12] Devuyst O, Torres VE Osmoregulation, vasopressin, and cAMP signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013, 22(4): 459-470
- [13] Pinto CS, Raman A, Reif GA, et al. Phosphodiesterase Isoform Regulation of Cell Proliferation and Fluid Secretion in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(4):
   1124-1134 (下转第 2045 页)

matography and adsorption of plasma proteins [J]. J Chromatogr A, 1998, 816(1): 89-96

- [8] 范彩彩,陈智华,高宇航,等. 纤维蛋白原的 5 种提取方法比较研究
  [J]. 中国农学通报, 2014, 30(29): 22-26
  Fan Cai-cai, Chen Zhi-hua, Gao Yu-hang, et al. Comparative Study of Five Kinds of Extraction Methods of Fibrinogen[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(29): 22-26
- [9] 黄璠,梁小明,杨笃才,等. 外用人纤维蛋白原的分离纯化 [J]. 临床 医药实践, 2015, 24(12): 923-925
   Huang Pan, Liang Xiao-ming, Yang Du-cai, et al. Isolation and Purification of Fibrinogen from External Use [J]. Proceeding of Clinical Medicine, 2015, 24(12): 923-925
- [10] 喇文军, 王妍, 周靖, 等. 一步柱层析纯化血浆分离多种血液制品 组分[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(2): 194-198
  La Wen-jun, Wang Yan, Zhou Jing, et al. Column chromatography separation step plasma components more blood products [J]. Chinese Journal of Bilogicals, 2015, 28(2): 194-198
- [11] Foster P R, Griffin B D, Bienek C, et al. Distribution of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent over ion-exchange chromatography used in the preparation of concentrates of fibrinogen and factor VIII[J]. Vox Sang, 2004, 86(2): 92-99
- [12] Linsley C, Wu B, Tawil B. The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(11-12): 1416-1423
- [13] Sheng L, Luo M, Sun X, et al. Serum fibrinogen is an independent prognostic factor in operable nonsmall cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2013, 133(11): 2720-2725

#### (上接第 2011 页)

- [14] Mekahli D, Parys JB, Bultynck G, et al. Polycystins and cellular Ca<sup>2+</sup> signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(15): 2697-2712
- [15] Pinto CS, Raman A, Reif GA, et al. Phosphodiesterase Isoform Regulation of Cell Proliferation and Fluid Secretion in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(4): 1124-1134
- [16] Rehman G, Shehzad A, Khan AL, et al. Role of AMP-activated protein kinase in cancer therapy[J]. Arch Pharm (Weinheim), 2014, 347 (7): 457-468
- [17] Pema M, Drusian L, Chiaravalli M, et al. mTORC1-mediated inhibition of polycystin-1 expression drives renal cyst formation in tuberous sclerosis complex[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10786
- [18] de Stephanis L, Bonon A, Varani K, et al. Double inhibition of cAMP and mTOR signalling may potentiate the reduction of cell growth in

- [14] Wang H, Gao J, Bai M, et al. The pretreatment platelet and plasma fibrinogen level correlate with tumor progression and metastasis in patients with pancreatic cancer[J]. Platelets, 2014, 25(5): 382-387
- [15] 加莎热特·杰力勒, 白靖平. 跟腱愈合过程中的力学生物学 [J]. 中 国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(42): 8352-8357 Jiasharete · Jielile, Bai Jing-ping. Biomechanics during Achilles tendon healing [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(42): 8352-8357
- [16] Muthard R W, Welsh J D, Brass L F, et al. Fibrin, γ' -Fibrinogen, and Transclot Pressure Gradient Control Hemostatic Clot Growth During Human Blood Flow Over a Collagen/Tissue Factor Wound[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2015, 35 (3): 645-654
- [17] Ndrepepa G, Braun S, King L, et al. Relation of fibrinogen level with cardiovascular events in patients with coronary artery disease [J]. The American journal of cardiology, 2013, 111(6): 804-810
- [18] Wu W, Okamoto O, Kato A, et al. Functional peptide of dermatopontin produces fibrinogen fibrils and modifies its biological activity[J]. Journal of dermatological science, 2014, 76(1): 34-43
- [19] Mousavi Hosseini K, Nasiri S, Heidari M. Separation of Albumin from the Human Plasma by Ethanol and Low Temperature[J]. ZUMS Journal, 2013, 21(85): 74-84
- [20] Wang J, Wang H, Wang Y, et al. Alternate layer-by-layer assembly of graphene oxide nanosheets and fibrinogen nanofibers on a silicon substrate for a biomimetic three-dimensional hydroxyapatite scaffold [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(42): 7360-7368

ADPKD cells[J]. Clin Exp Nephrol, 2016

- [19] Distefano G, Boca M, Rowe I, et al. Polycystin-1 regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent phosphorylation of tuberin to control cell size through mTOR and its downstream effectors S6K and 4EBP1[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(9): 2359-2371
- [20] Baba M, Furihata M, Hong SB, et al. Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kid neys [J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(2): 140-154
- [21] Huang JL, Woolf AS, Long DA. Angiogenesis and autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Pediatr Nephrol, 2013, 28 (9): 1749-1755
- [22] Couillard M, Guillaume R, Tanji N, et al. c-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is independent of FasL/Fas interaction[J]. Cancer Res, 2002, 62(8): 2210-2214