doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.18.003

STZ 诱导的糖尿病模型小鼠肾脏的上皮 - 间质转分化研究 *

王阜蕾 张妍春 陈媛媛 刘 祁 周 健

(第四军医大学西京医院眼科,全军眼科研究所 陕西 西安 710032)

摘要目的:探讨 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏发生上皮 - 间质转分化(EMT)的情况。方法:将 80 只 C57BL 小鼠随机分为正常对照 组(NC 组)和糖尿病组(DM 组),每组 40 只。DM 组小鼠用 1%STZ(streptozotocin,链脲佐菌素)溶液按 60mg/kg 体质量的剂量进行 腹腔注射,每天 1 次,连续 6 天。NC 组小鼠平行腹腔注射同等体积 0.1mol/L 的柠檬酸钠缓冲液。再将成模小鼠随机分为 A、B 批 次,A 批次用于动态观察生存率、小鼠体质量及随机血糖的监测;B 批次用于在造模后第 4、8、12 周末观察肾组织的病理变化,并 用 Western blot、免疫荧光染色的方法观察肾组织中 EMT 标志蛋白 α-SMA 和 E-cadherin 的表达。结果:STZ 诱导的糖尿病模型小 鼠出现糖尿病典型症状如多饮、多尿等,血糖持续在高水平状态,体质量增长缓慢。在造模后 12 周末,DM 组小鼠较 NC 组小鼠累 积生存率显著降低,两组比较差异具有统计学意义(P<0.001)。在造模后的第 8 周末,DM 组小鼠肾脏出现明显的病理改变,到第 12 周末时,绝大部分肾小管上皮细胞被梭形的肌成纤维细胞取代,肾小球空泡,基底膜增厚。造模后的第 4、8、12 周末时,DM 组 小鼠 E-cadherin 表达量均显著低于 NC 组小鼠 (P=0.004,0.026,0.004); 而在第 8 和 12 周末时,DM 组 α-SMA 表达量显著升高 (P=0.009,0.015)。在第 12 周末,肾组织冰冻切片 E-cadherin 和 α-SMA、免疫荧光染色结果与上述结果一致。结论:STZ 诱导的糖尿 病模型小鼠有较典型的糖尿病临床改变, L肾组织发生了 EMT。

关键词:链脲佐菌素;上皮-间质转分化;肾脏;糖尿病

中图分类号:R-33; R587.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)18-3413-06

A Study on the Epithelial-mesenchymal Transition in the Kidney of Diabetic Mice Model Induced by STZ*

WANG Fu-lei, ZHANG Yan-chun, CHEN Yuan-yuan, LIU Qi, ZHOU Jian

(Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Eye Institute of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China

ABSTRACT Objective: To investigate the incidence of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the kidney of streptozotocin induced diabetic mice. Methods: Eighty C57BL mice were randomly divided into normal control group (NC group) and diabetic group (DM group). Forty mice in DM group were injected intraperitoneally with 1% STZ (streptozotocin) at the dose of 60 mg/kg body weight once a day, for six consecutive days. The other forty mice in NC mice were injected with 0.1 mol/L sodium citrate buffer at the same time and at the same volume with the mouse in DM group. Then the mice in two groups were randomly divided into batch A and batch B. Mice in batch A were used for monitoring the survival rate, body weight and random blood glucose dynamically. Mice in batch B were applied for histopathological changes study, Western blot assay and immunofluorescence staining to observe the changes of proteins α -SMA and E-cadherin in renal tissues at the ends of the 4th, 8th, and 12th week after the DM model was established. **Results:** Mice in DM group showed typical symptoms of diabetes, such as polydipsia and polyuria, high levels of blood glucose, slow growth of body weight, comparing with the mice in NC group. By the twelve-week observation, the survival rate of mice in DM group was significantly lower than that in NC group (P<0.001). At the end of the 8th week, obvious histopathological changes were showed in the kidney of DM group. By the end of the 12th week, further damages increased, for instance, the vast majority of renal tubular epithelial cells were changed into spindle shaped fibroblasts, vacuoles were showed in glomerulus, and glomerular basement membrane were thicken. Western blot detection showed that in DM group E-cadherin expressions were significantly lower than that in NC group (P=0.004, 0.026, 0.004) at the ends of the 4th, 8th, and 12th week, while α -SMA expressions increased significantly (P=0.009, 0.015) at the ends of the 8th and 12th week. Immunofluorescence staining showed that the expressions of E-cadherin and α -SMA in the frozen sections of kidney tissues in DM group at the 12th week were consistent with the results of those in Western blot assay. Conclusion: STZ induced diabetic mice had typical clinical changes of diabetes mellitus, including EMT in renal tissues.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81370998);陕西省科技统筹创新工程项目(2012KTCQ03-03) 作者简介:王阜蕾(1984-),男,硕士研究生,主治医师,研究方向:白内障发病机理及药物防治研究, 电话:15209221215,E-mail: wangzeyu2014@126.com
△ 通讯作者:周健,女,主任医师、教授、博士研究生导师,研究方向:白内障的基础及临床研究, E-mail: zhoujian@fmmu.edu.cn
(收稿日期:2017-03-12 接受日期:2017-03-31) Key words: Streptozotocin; Epithelial-mesenchymal transition; Kidney; Diabetes mellitus Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.1 Document code: A Article ID: 1673-6273(2017)18-3413-06

前言

随着人们生活水平的提高及饮食结构的改变,糖尿病的患病率逐年上升,2010年我国糖尿病患病率达11.6%^[1],已成为世界糖尿病第一大国。糖尿病是一组遗传和环境因素相互作用引起糖、蛋白、脂肪和水电解质等一系列代谢紊乱的临床综合征,如果不进行及时正规治疗,可引起多种慢性并发症。糖尿病肾病(Diabetic nephropath,DN)是糖尿病患者最常见和最严重的并发症之一,是终末期肾功能衰竭的主要原因^[2],并且DN的3年生存率仅为53%,是糖尿病患者致死的最主要原因。

糖尿病肾病的发病机制还不完全清楚,有研究报道肾间质 纤维化是几乎所有的慢性肾脏疾病 (Chronic kidney disease, CKD)发展到终末期的共同通路,其主要表现为细胞间质的增 多,引起肾小管的损伤^[3]。肾小管的上皮细胞发生了 EMT,转变 成间质细胞^[4]。因此,EMT 是肾小管间质纤维化发生、发展的始 动因素之一^[5]。但在 DN 的实验研究中,大多数动物模型不能重 现人类糖尿病晚期重要脏器损伤的结构特征^[6],链脲霉素诱导 的 C57BL/6J 小鼠能够展现类似于人类 DN 的病理改变,包括 肾小球膜扩张、肾小球膜炎、肾小球性硬化、肾小管间质纤维 化等^[7,8],其中肾小管间质纤维化是人类 DN 预后的主要影响 因素^[9]。

在本研究中,我们采用链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导建立糖尿病小鼠模型,动态观察其肾脏的变化,记录小鼠的 生存情况,旨在评价该糖尿病模型在研究糖尿病并发症中的应 用价值。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

实验动物:6-8 周龄雄性 C57BL 小鼠 80 只,清洁级,体质 量(20± 2)g,由第四军医大学实验动物中心提供。实验动物的使 用遵循中国国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

主要试剂和抗体:链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)(Sigma, 美国)、柠檬酸钠(天津红岩,中国)、戊巴比妥钠(杭州四季青,中 国)、苏木素染液(珠海贝索,中国)、伊红染液(珠海贝索,中国)、 RIPA 裂解液(碧云天生物技术公司,中国)、BCA 蛋白定量试剂 盒(Thermo,美国)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技 术公司,中国)、5×蛋白上样缓冲液(西安壮志生物科技公司,中 国)、10-180kDa 预染蛋白 Marker(Thermo,美国)、ECL 化学发光 底物试剂(Thermo,美国)、Triton-X 100 (Invitrogen,美国)、驴血 清(Hyclone,美国)、DAPI(Invitrogen,美国)。兔抗鼠 E-cadherin 单克隆抗体(CST 公司,美国)、兔抗鼠 a-SMA 单克隆抗体(abcam 公司,英国)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(Invitrogen 公 司,美国)、兔抗鼠β-actin 单克隆抗体(世纪维康,中国)。

1.2 主要仪器

多功能酶标仪(Biotek,美国)、电泳仪、电泳槽、转膜槽 (Bio-Rad,美国)、凝胶成像系统(Bio-Rad,美国);倒置显微镜 (Olympus IXT0,日本);激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000 公司,日本)、石蜡切片机(Leica,德国)、冰冻切片机(Leica,德国)、 便携式血糖仪(罗氏,美国)、血糖试纸(罗氏,美国)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 按随机数表法将 6-8 周龄雄性 C57BL 小鼠 80 只分为糖尿病模型组(DM 组) 40 只和对照组(NC 组) 40 只;在糖尿病造模后,再将成功建立糖尿病模型的 40 只小 鼠和对照组 40 只小鼠随机分为 A、B 批次,A 批次糖尿病模型 组(DM 组) 20 只和对照组(NC 组)20 只,用于动态观察生存率、 小鼠体质量及随机血糖的监测;B 批次糖尿病模型组 (DM 组) 20 只和对照组(NC 组)20 只,用于在不同时间点取动物组织做 病理、组化等研究。

1.3.2 糖尿病模型小鼠建立 实验动物经过适应性饲养1周, 开始造模。在首次腹腔注射 STZ 前禁食 12 h,用 0.1 mol/L 柠檬 酸 / 柠檬酸钠缓冲液(pH 4.4)将 STZ(streptozotocin,链脲佐菌 素)配制成 5 mg/mL 的溶液,按 60 mg/kg 体质量的剂量进行腹 腔注射,每天 1 次,连续 6 天,注射后予常规饮食,保证充足的 饮水与环境干燥清洁。正常对照组小鼠平行腹腔注射同等体积 0.1 mol/L 的柠檬酸钠缓冲液(pH 4.4)。STZ 溶液配制及腹腔注 射过程均在避光条件下快速进行。在连续腹腔注射 STZ 结束 后 1 周,经尾静脉采血并测定模型组小鼠的随机血糖,当血糖 值≥ 16.5 mmol/L 者为糖尿病小鼠,纳入后续实验。

1.3.3 存活、体质量增长及随机血糖的观察 在开始造模前(0周)和造模后第4、8和12周末,分别记录各组小鼠的存活数量,并计算生存率。在开始造模前(0周)和造模后第1周、2周、4周、8周和12周称量各组小鼠体质量、采小鼠尾静脉血测随机血糖值。

1.3.4 **肾组织病理学观察** 在开始造模前(0周)和造模后的第 4、8、12周末,分别从每组中取3只小鼠,腹腔注射1%戊巴比 妥钠(30~50 mg/kg)进行麻醉后,用4%多聚甲醛做心脏灌注, 取出肾脏,并将左侧1/2肾脏置于4%多聚甲醛磷酸缓冲液中 固定2-4小时,经过酒精梯度脱水,用石蜡包埋,制备3μm石 蜡切片,经HE染色,于光学显微镜下观察并拍照记录各组小 鼠肾组织的变化。

1.3.5 **肾组织切片的免疫荧光染色** 在造模后第 12 周末,从 各组中随机分别取出 3 只小鼠,按照上述方法获得肾脏组织, 用含 20%蔗糖 PBS 溶液浸泡 3 h 后,再经过 30%蔗糖 PBS 溶 液浸泡,在4℃过夜。用 OCT 包埋标本,制备 6-8 μm 的冰冻切 片,放入储片盒存于 -20℃冰箱。

从 -20 ℃冰箱取出肾组织切片,置于室温 15 min,用 PBS (pH7.2)漂洗 3 次,在肾组织表面滴加封闭液(3 %BSA300 mg+1 %triton100 µL +1XPBS10 mL),置于湿盒在室温下孵育 3 h。用 PBS 洗切片 3 次,在室温下分别滴加一抗:兔抗鼠 E-cadherin (1:200)和兔抗鼠 a-SMA(1:100),孵育 1 h 后再放于在 4 ℃冰箱 过夜;用 PBS 洗切片,在室温下避光孵育荧光二抗(HRP 标记 的山羊抗兔 IgG 抗体 1:200)3 h,经 PBS 漂洗,室温下用 DAPI (1:500) 孵育 15 min 标记细胞核,再用 50 %甘油封片。

在激光共聚焦显微镜下观察,用相同的拍摄参数采集图像。用图像分析软件 (Image-pro plus)进行平均荧光强度分析 (IOD/Area)。以上实验均独立重复 3 次以上。

1.3.6 Western blot 检测肾组织中蛋白表达变化 在成模后第 4、8和12周末,用上述方法处死小鼠,取肾组织约100mg,加 入 RIPA 组织蛋白裂解液,提取肾组织的总蛋白,并以 BCA 法 测定蛋白含量。经95℃水浴变性后,从各样本中分别取30µg 蛋白样品,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,通过湿转法将蛋 白转移至硝酸纤维素膜上,用丽春红染色显示蛋白条带及标准 分子量蛋白条带,按标准分子量的位置及目标蛋白分子量将硝 酸纤维素膜分段剪开;用1×TBST 溶液洗膜3次,用5%脱脂 奶粉封闭非特异性抗原 2 h 后,再经过 1× TBST 溶液洗膜,分 别加入兔抗鼠 E-cadherin(1:800)和 a-SMA(1:800)单克隆抗体, 兔抗鼠 β-actin(1:400)单克隆抗体作为内对照,在4℃孵育过 夜;次日,用1×TBST溶液洗膜后,加入HRP标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:2000),在室温孵育 2 h;经 1× TBST 溶液洗膜后,在 避光条件下加入适量 ECL 化学发光底物,用 Bio-rad 凝胶发光 系统曝光显影,将显影条带进行扫描。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 数据分析软件对实验数据进行统计学分析,计量数据以均数±标准差(x±s)表示,两组间比较采用独立 样本的 t 检验,生存率采用 Log Rank (Mantel-Cox)分析。P<0.05 为差异有统计学意义。以上实验均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 糖尿病小鼠的一般情况、生存率、体重增长、随机血糖的变化

2.1.1 一般状况 实验观察期间,NC 组小鼠一般状态良好,饮 食正常,昼夜活动规律,运动活跃,反应灵敏,毛发有光泽,饮 食、饮水正常、尿量正常;DM 组小鼠精神较差,活动明显减少, 毛发枯黄无光泽,出现多饮、多食、多尿等表现。

2.1.2 生存率 如表 1 和图 1 所示,在 12 周的观察期内,NC 组全部小鼠到达观察终点,累积生存率 100 %;DM 组共死亡 11 只,累积生存率 68.3 %。Log Rank (Mantel-Cox)分析显示,两组累积生存率比较差异具有统计学意义(P<0.001)。

2.1.3 体质量增长的变化 如表 2 所示,在造模前,两组小鼠

体质量基本相同,无明显差异。造模成功后的1w、2w、4w、8w、12w,DM组小鼠体重均明显低于NC组,差异具有统计学意义(均为P=0.000)。

2.1.4 糖尿病小鼠随机血糖变化 如表 3 所示,在造模前,各 组小鼠随机血糖水平无明显差异。造模成功后 1 w、2 w、4 w、8 w、12 w, DM 组小鼠血糖均明显高于 NC 组小鼠,差异具有统 计学意义(均为 P=0.000)。

2.2 糖尿病小鼠的肾组织病理学改变

在造模后的第4周末,在光学显微镜下观察各组小鼠肾组 织石蜡切片的 HE 染色,结果显示:肾小管上皮细胞、纤维细胞 的胞浆呈粉红色,上皮细胞的细胞核呈蓝紫色,上皮细胞,细胞 形态均一,排列规则,上皮细胞之间呈鹅卵石样连接紧密,均未 发现明显差异。在第8周末,NC 组小鼠肾组织结构未见异常,

Table 1 The Survival of diabetic mice

Time point	NC Group	DM Group
4w	100%(n=20)	90%(n=18)
8w	100%(n=20)	70%(n=14)
12w	100%(n=20)	45%(n=9)

Note: 4w, 8w, 12w: at the end of the 4th, 8th, and 12th week n: the number of the samples at each time point.





表 2 糖尿病小鼠体质量的变化(g, x±s)

Table 2 Changes of the body weight of diabetic mice $(g, \bar{x}\pm s)$					
	NC Group	DM Group	Р		
0w	19.54 ± 0.49 (n=20)	19.65± 0.62(n=20)			
1w	27.47± 0.81(n=20)	22.19± 1.26(n=20)*	0.000		
2w	27.80± 0.78(n=20)	23.23± 1.05(n=20)*	0.000		
4w	28.22± 0.98(n=20)	24.12± 0.92(n=18)*	0.000		
8w	29.21± 0.99(n=20)	25.24± 1.04(n=14)*	0.000		
12w	30.47± 1.18(n=20)	25.44± 0.91(n=9)*	0.000		

Note: 0w: before treatment, 1w, 2w, 4w, 8w, 12w: at the end of the 4th, 8th, and 12th week

n: the number of the samples at each time point, *: the significant difference between the two groups at the same time point, P<0.05.

表3 糖尿病小鼠随机血糖的变化 (mmol/L, x±s)

Table 3 Changes of the random blood glucose of diabetic mice $(mmol/I) \propto$	+ ~

	NC Group	DM Group	Р	
0w	5.67± 0.30(n=20)	5.64± 0.40(n=20)		
1 w	5.36± 0.60(n=20)	22.98± 2.81(n=20)*	0.000	
2w	5.65± 0.36(n=20)	24.44± 2.84(n=20)*	0.000	
4w	5.48± 0.48(n=20)	24.33± 2.57(n=18)*	0.000	
8w	5.34± 0.49(n=20)	25.56± 2.82(n=14)*	0.000	
12w	5.43± 0.54(n=20)	25.29± 2.33(n=9)*	0.000	

Note: 0w: before treatment, 1w, 2w, 4w, 8w, 12w: at the end of the 4th, 8th, and 12th week. n: the number of the samples at each time point. * : the significant difference between the two groups at the same time point, P<0.05.

• . the significant difference between the two groups at the same time point, P<0.05

而 DM 组部分肾小管上皮细胞呈梭形肌成纤维细胞, 胞质疏松,出现细胞核深染,肾小球出现断裂和空泡。在第 12 周末, NC 组小鼠仍无异常变化, DM 组小鼠的肾损害程度却进一步加重,绝大部分肾小管上皮细胞被梭形的肌成纤维细胞取代, 肾小球空泡,基底膜增厚(图 2)。



图 2 光学显微镜下糖尿病小鼠肾脏的组织学改变(HE 染色× 200) Fig. 2 Histological changes of kidney in diabetic mice under light microscope (HE staining × 200)

2.3 糖尿病小鼠的肾组织中 EMT 标志蛋白的表达变化

用 Western blot 检测小鼠肾脏组织中 EMT 标志蛋白 α-SMA 和 E-cadherin 的表达的变化,结果显示:NC 组小鼠肾 组织中 α-SMA、E-cadherin 均有一定量表达;造模后第 4 周末 时,NC 组、DM 组 α-SMA 蛋白表达量组间无统计学差异(P=0. 176);到第 8 和 12 周末时,DM 组α-SMA 表达量较 NC 组小鼠 显著升高,差异具有统计学意义(P=0.009,0.015)。DM 组小鼠在 造模后第 4、8、12 周末时 E-cadherin 表达量均较 NC 组小鼠显

著降低,具有统计学差异(P=0.004,0.026,0.004)(图 3)。



at the same time point, P<0.05.

造模后第 12 周末时,肾组织冰冻切片免疫荧光染色结果 显示:NC 组肾小管上皮细胞中 α-SMA 荧光强度较低,DM 组 α-SMA 免疫荧光染色的荧光强度明显增强 (图 4);NC 组肾小 管上皮细胞中 E-cadherin 荧光强度较高,而 DM 组 E-cadherin 免疫荧光染色的荧光强度明显减弱(图 5)。

3 讨论

肾间质纤维化是导致慢性肾功能衰竭的病理学基础,肾间





图 4 糖尿病小鼠造模后第 12 周末时肾组织中 α-SMA 免疫荧光染色 Fig. 4 Immunofluorescence staining of α-SMA in the renal tissues of diabetic mice at the end of the 12th week red: staining of α-SMA, blue: staining of nucleus, bar=10 μm

质纤维化的程度是决定慢性肾脏病预后转归的重要因素¹⁰,但 肾间质纤维化的发病机制目前并不十分清楚。研究显示肾小管 间质细胞的活化、炎症细胞浸润、血管活性物质导致纤维化细 胞因子过度表达等在肾间质纤维化的发生和发展过程中可能 发挥着重要的作用^[11]。近年来,研究显示肾小管上皮细胞发生 EMT 转变为间质细胞是肾小管间质纤维化发生的始动因素 之一^[12]。

上皮间质转分化(EMT)是上皮细胞在刺激因素下向间充 质细胞转分化的一种适应性改变,是一种以上皮细胞极性的丧 失和间充质细胞特性的获得为主要特征、同时伴随细胞形态和 相关基因表达改变的细胞变化过程^[13],并且在刺激因素去除后 这种细胞变化仍保持稳定,从而使组织或器官发生纤维化^[14]。 正常的上皮细胞和间充质细胞在表型、功能上存在显著的差 异,因而表达的特征性蛋白不同^[15,16]。研究证实上皮细胞发生 EMT 是多种器官纤维化疾病的共同病理基础^[17]。在糖尿病性肾 病时,肾小管上皮细胞丢失原有细胞的表型,向间质细胞形态 转变^[18],肾间质发生纤维化。Strutz 等最早报道了上皮 - 间质转 分化(EMT)存在于肾纤维化中^[3,4]。肾纤维化的主要特征为间质 纤维化的标志物 α-SMA 的出现及表达增高^[19]。E-cadherin 是一 类细胞粘附分子,在细胞分化的早期发挥着重要作用,E-cadherin 的减少或者缺失是上皮细胞发生 EMT 最重要的指标^[20]。

国外相关文献报道使用 STZ 可以模拟糖尿病肾病的早期 病变,包括相关血液生化检测指标和病理结构的损伤等^[21]。在 本研究中,STZ 诱导的糖尿病小鼠出现典型的糖尿病临床表 现,如精神较差,活动明显减少,毛发枯黄无光泽,出现多饮、多 食、多尿等症状,血糖也较正常小鼠明显升高,并且体质量的增 长明显减缓,生存率显著降低。在我们的研究中,STZ 诱导后第

Fig. 5 Immunofluorescence staining of E-cadherin in the renal tissues of diabetic mice at the end of the 12th week

ᅀ

green: staining of α -SMA, blue: staining of nucleus, bar=10 μ m

8 周时,小鼠肾小球出现断裂和空泡,提示肾脏组织的病理损 伤已经发生。此外,小鼠肾小管中部分上皮细胞由正常形态变 成梭形,这种现象在 12 周时更为显著,提示由上皮细胞向肌成 纤维细胞进行分化,肾小管上皮细胞发生了 EMT。为了明确肾 小管上皮细胞 EMT 的发生,我们检测了 STZ 诱导糖尿病小鼠 肾脏组织中相关的标记分子 α-SMA 和 E-cadherin 的表达,结 果小鼠间质标志物 α-SMA 表达上升,而上皮标志物 E-cadherin 表达降低。有文献报道,在体外培养肾小管上皮细胞,高糖可促 进 α-SMA 的表达,降低 E-cadherin 的表达水平^[2034],这与我们 的体内实验结果是相符的,也在分子层面上验证了糖尿病小鼠 肾脏中 EMT 的发生。

目前,EMT 在糖尿病肾病发生发展中的作用已经引起许 多研究者的关注,通过调控 EMT 的发生发展,使细胞从间质表 型过渡到上皮表型,则有可能部分或完全逆转肾纤维化的病理 进展,并显著提高糖尿病的预后。因此,进一步深入研究 EMT 与糖尿病肾病的关系及其潜在机制可能为糖尿病肾病的治疗 开拓新的思路。

参考文献(References)

- X u Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959
- [2] Collins A J, Foley R N, Chavers B, et al. US Renal Data System 2013 Annual Data Report[J]. Am J Kidney Dis, 2014, 63(1 Suppl): A7
- [3] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 212-222
- [4] Strutz F, Okada H, Lo C W, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1[J]. J Cell Biol, 1995, 130(2): 393-405
- [5] Yamashita S, Maeshima A, Nojima Y. Involvement of renal progenitor

tubular cells in epithelial-to-mesenchymal transition in fibrotic rat kidneys[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(7): 2044-2051

- [6] Brosius F R, Alpers C E. New targets for treatment of diabetic nephropathy: what we have learned from animal models[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013, 22(1): 17-25
- [7] Zhao H J, Wang S, Cheng H, et al. Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(10): 2664-2669
- [8] Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(2): 539-550
- [9] Gilbert R E, Cox A, Wu L L, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition [J]. Diabetes, 1998, 47(3): 414-422
- [10] Eddy A A, Neilson E G. Chronic kidney disease progression[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(11): 2964-2966
- [11] Farris A B, Colvin R B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation.[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012, 21(3): 289-300
- [12] Pontrelli P, Conserva F, Papale M, et al. Lysine 63 ubiquitination is involved in the progression of tubular damage in diabetic nephropathy [J]. FASEB J, 2017, 31(1): 308-319
- [13] Mathias R A, Simpson R J. Towards understanding epithelialmesenchymal transition: a proteomics perspective [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794(9): 1325-1331
- [14] Cannito S, Novo E, di Bonzo L V, et al. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(12): 1383-1430

- [15] Zeisberg M, Neilson E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429-1437
- [16] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009,139(5): 871-890
- [17] Choi S S, Diehl A M. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver[J]. Hepatology, 2009, 50(6): 2007-2013
- [18] Kumaria A, Tolias C M, Burnstock G. ATP signalling in epilepsy[J]. Purinergic Signal, 2008, 4(4): 339-346
- [19] Onder T T, Gupta P B, Mani S A, et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways [J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3645-3654
- [20] Liu Y N, Liu Y, Lee H J, et al. Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(23): 7096-7108
- [21] Kaur N, Kishore L, Singh R. Therapeutic effect of Linum usitatissimum L. in STZ-nicotinamide induced diabetic nephropathy via inhibition of AGE's and oxidative stress [J]. J Food Sci Technol, 2017, 54(2): 408-421
- [22] Peng H, Li Y, Wang C, et al. ROCK1 Induces Endothelialto-Mesenchymal Transition in Glomeruli to Aggravate Albuminuria in Diabetic Nephropathy[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20304
- [23] Chitra P S, Swathi T, Sahay R, et al. Growth Hormone Induces Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein in Podocytes: Implications for Podocyte Depletion and Proteinuria [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(9): 1947-1956
- [24] Bertinat R, Silva P, Mann E, et al. In vivo sodium tungstate treatment prevents E-cadherin loss induced by diabetic serum in HK-2 cell line [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(10): 2437-2446