

HBV 在 HK-2 细胞内的表达及其转分化的影响

徐慧¹, 王义国², 刘长虹², 刘倩², 杜娟³

(1. 山东省医学科学院, 济南大学医学与生命科学学院, 济南 250062;

2. 山东大学附属千佛山医院消化内科, 济南 250014; 3. 山东大学附属千佛山医院中心实验室, 济南 250014)

摘要:目的 研究乙型肝炎病毒(HBV)在人近端肾小管上皮细胞(HK-2)的表达及其转分化的影响。方法 体外培养 HK-2 细胞,分为 HK-2 组、HK-2-PHY106 组(空质粒 PHY106 转染组)、HK-2-PHY106-HBV 组(PHY106-HBV 质粒转染组)。用脂质体 lipofectamineTM2000 转染 HK-2 细胞。用 ELISA 法检测各组细胞培养上清液中 HBsAg 与 HBeAg 的含量。免疫细胞化学染色及 Western blot 印迹检测转染 72 h 后 E-钙黏素(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达。RT-PCR 法检测转染 72 h 后转化生长因子-1(TGF- β 1)的 mRNA。结果 HK-2-PHY106-HBV 组细胞培养上清液中可检测到 HBsAg 和 HBeAg 的高表达;免疫细胞化学染色及 Western blot 印迹检测均显示 HK-2-PHY106-HBV 组 E-cadherin 表达显著下调($P < 0.05$),而 α -SMA 表达与其他两组相比明显上调($P < 0.05$);RT-PCR 显示 HK-2-PHY106-HBV 组 TGF- β 1 的 mRNA 表达上调($P < 0.05$)。结论 HBV 可在 HK-2 细胞内高效复制,并能够导致 HK-2 转分化,其机制可能是通过上调 TGF- β 1 来实现的。

关键词:乙型肝炎病毒;肾小管上皮细胞;转染;细胞表型转化;转化生长因子- β 1

中图分类号: R512.6⁺2 文献标志码: A

Expression of HBV and its effects on the transdifferentiation in HK-2 cells

XU Hui¹, WANG Yi-guo², LIU Chang-hong², LIU Qian², DU Juan³

(1. Shandong Academy of Medical Science, School of Medicine and Life Sciences, Jinan University, Jinan 250062, China;

2. Department of Gastroenterology, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250014, China;

3. Central Laboratory, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of HBV and effects on the transdifferentiation in HK-2 cells. **Methods** HK-2 cells were cultured in vitro and we divided them into the HK-2 group, the HK-2-PHY106-HBV group (HK-2 cells transfected with PHY106-HBV plasmid) and the HK-2-PHY106 group (HK-2 cells transfected with PHY106 control plasmid). HK-2 cells were transfected by lipofectamineTM2000. Supernatant of culture was collected for examining HBsAg and HBeAg by using ELISA; The expression of E-cadherin and α -smooth muscle actin in HK-2 were assayed by immunocytochemistry and Western blot after the cells were transfected for 72 h. TGF- β 1 mRNA was detected by RT-PCR after the cells were transfected for 72 h. **Results** The HBsAg and HBeAg were detected with a higher expression in the HK-2-PHY106-HBV group. The E-cadherin detected by immunocytochemistry and Western blot showed a significantly lower expression in the HK-2-PHY106-HBV group($P < 0.05$). However, the expression of α -SMA in the HK-2-PHY106-HBV group was higher than that of the other two groups($P < 0.05$). Additionally, we also found TGF- β 1 mRNA expression was upregulated in the HK-2-PHY106-HBV group showed by RT-PCR($P < 0.05$). **Conclusion** HBV can be replicated highly efficiently in HK-2 cells and can make HK-2 cells occur transdifferentiation. The mechanism may be by upregulating TGF- β 1 expression.

Key words: Hepatitis B virus; Tubular epithelial cell; Transfection; Phenotypic transformation; Transforming growth factor- β 1

乙型肝炎病毒相关性肾炎(HBV associated glomerulonephritis, HBV-GN)是HBV感染引起的常见肝外损害之一^[1],发展至晚期会引起肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)。RIF是多种慢性肾脏疾病发展到终末期肾功能衰竭的共同病理途径,以成纤维细胞大量增生和细胞外基质过度积聚为特征。肾小管上皮细胞间充质细胞转分化(tubular epithelial-to-mesenchymal transition, TEMT)在肾小管间质纤维化过程中起重要作用,转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是公认的致纤维化因子。HBV感染肾小管上皮细胞能否引起TEMT及其机制目前研究较少,本实验用C基因型重组全长乙型肝炎病毒转染至人近端肾小管上皮细胞(the human proximal tubular epithelial cell line, HK-2),研究乙型肝炎病毒对HK-2的表型转化作用及其机制,为乙型肝炎病毒相关性肾炎的发病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 C基因型重组乙型肝炎病毒(PHY106-CHBV,由中国人民解放军军医进修学院成军教授惠赠);HK-2为人近端肾小管上皮细胞株(山东大学医学院生化实验室保存);质粒提取试剂盒、脂质体转染试剂 lipofectamineTM2000均购自美国Invitrogen公司;DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;兔抗人 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、兔抗人E-钙黏素蛋白(E-cadherin)购自英国Abcam公司;生物素标记羊抗兔IgG、DAB试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;逆转录试剂盒、PVDF膜购自加拿大Ferments公司;ECL显影试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;TE2000-U荧光倒置显微镜为日本Nikon公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人近端肾小管上皮细胞培养使用DMEM/F12培养基,加10%新生牛血清、青霉素、链霉素。在37℃、5%CO₂的条件下培养瓶内常规培养,细胞贴壁生长,EDTA-0.25%胰酶消化,每2~3天传代1次。

1.2.2 PHY106-CHBV的提取与鉴定 取2 μ L PHY106-CHBV转化感受态细菌DH5 α ,在具有Amp抗性培养板中37℃温箱培育过夜。挑取单克隆加入20 mL具有Amp抗性的LB培养基中37℃温箱培育过夜,SDS-碱裂法中提质粒,采用Hind III

和Nsi I双酶切质粒,琼脂糖电泳鉴别片段大小,并由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.3 实验分组 上述常规培养的HK-2细胞设为HK-2组,转染了空质粒PHY106的HK-2细胞设为HK-2-PHY106组,转染了空质粒与C基因型重组乙型肝炎病毒复合物(PHY106-CHBV DNA)的HK-2细胞设为HK-2-PHY106-HBV组。

1.2.4 转染HK-2细胞 取对数生长期的HK-2细胞,以 $1 \times 10^6/\text{mm}^2$ 传代于24孔板中,在37℃、5%条件下贴壁培养至80%~90%融合。分别取相应质粒0.8 μ g加入50 μ L opti-MEM中轻轻混匀。取脂质体2 μ L稀释于50 μ L opti-MEM中,轻轻混匀,室温放置5 min。将上述稀释的脂质体加入稀释的质粒DNA中混匀,室温放置小于20 min,将孔板内细胞培养基丢弃,加入400 μ L DMEM/F12。HK-2组再加100 μ L DMEM/F12, HK-2-PHY106组加100 μ L脂质体-PHY106复合物, HK-2-PHY106-HBV组加100 μ L脂质体-PHY106-cHBV DNA复合物,6 h后换完全培养基继续培养。

1.2.5 HK-2细胞转染后HBsAg与HBeAg的检测

于转染后24、48、72 h收集各组细胞培养上清液,进行HBsAg与HBeAg的定量检测。

1.2.6 免疫细胞化学 预先在24孔板里放置直径为10 mm的盖玻片,待细胞爬片后按实验分组处理细胞,每组3个复孔。取出细胞爬片,经4%多聚甲醛固定,0.5% TritonX-100室温孵育30 min,3% H₂O₂室温孵育20 min,去除内源性过氧化物酶,正常兔血清室温封闭15 min,吸取多余液体,分别加入兔抗人 α -SMA(1:100)、E-cadherin(1:100)多克隆抗体、PBS(PBS代替一抗,作阴性对照)4℃孵育过夜,次日加入生物素化二抗(即用型),37℃孵育30 min,滴加SP,37℃孵育20 min,滴加DAB孵育8 min,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片。LIMPS显微镜观察图像,胞浆呈棕黄色说明 α -SMA阳性,包膜呈棕黄色说明E-cadherin阳性,摄片,Image Pro Plus6.0软件分析平均光密度,进行相对定量分析。

1.2.7 Western blot检测 冰上加裂解液裂解细胞,离心取上清,BCA法测蛋白浓度,加样缓冲液变性蛋白,蛋白上样50 μ g,经SDS-PAGE垂直凝胶电泳后电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜,5%脱脂奶粉37℃摇床封闭2 h,用特异性抗体进行孵育,一抗浓度如下: α -SMA(1:500)、E-cadherin(1:500)和GAPDH(1:3 000),4℃过夜,经TBST冲洗10 min \times 3次后加入辣根过

氧化物酶标记的二抗(1:5 000),37°摇床孵育 1 h, TBST 冲洗 10 min × 3 次, ECL 显影曝光, Bio-Rad 凝胶成像系统进行图像采集, ImageJ 软件分析各阳性条带的平均光密度值, 设内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 计算各目标蛋白的相对表达量。

1.2.8 RT-PCR 检测 TGF- β 1 的 mRNA 将细胞种在 6 孔板里, 按实验分组处理细胞, 转染 72h 后用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 核酸蛋白仪测 RNA 浓度和纯度, 反转录合成该 DNA。以 β -actin 做内参照, 进行半定量聚合酶链反应。TGF- β 1 的引物序列为: 5'-TCCACCTGCAAGACTATCGAC-3', 5'-GAGG-TATCGCCAGGAATTGTT-3'; β -actin 的引物序列为: 5'-AGTTGCGTTACACCTTTC-3', 5'-CCTTCACCG-TTCCAGTTT-3'。二者的退火温度均为 57 °C, 循环次数均为 30 次。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Bio-Rad 凝胶成像系统扫描, ImageJ 软件分析各条带积分吸光度值, TGF- β 1 mRNA 的相对量用 TGF- β 1/ β -actin 的平均光密度值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验比较各组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHY106-CHBV 质粒的鉴定结果 酶切鉴定使用 HindIII 和 Nsi I 两种限制性内切酶, Nsi I 位于 HBV 基因组 2 464 bp 位置, 载体上无此限制酶, 所以酶切得到 920、5 400 bp 两条片段的克隆(图 1)。

表 1 各组上清液 HBsAg(ng/mL)与 HBeAg (PEI U/mL)表达情况($n=5$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	HBsAg 定量	HBeAg 定量	HBsAg 定量	HBeAg 定量	HBsAg 定量	HBeAg 定量
HK-2 组	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.17 ± 0.03
HK-2-PHY106 组	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.03
HK-2-HPY106-HBV 组	0.16 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.51 ± 0.03*	1.02 ± 0.04*	2.62 ± 0.02*	1.93 ± 0.06*

注: HBsAg 定量生物参考区间 0 ~ 0.2 ng/mL, HBeAg 定量 0 ~ 0.5 PEI U/mL; * $P < 0.05$ vs HK-2 组。

2.3 HK-2 细胞形态的改变 倒置相差显微镜下 HK-2 组和 HK-2-PHY106 组细胞呈单层圆形贴壁生长, 铺满后细胞融合呈鹅卵石状。HK-2-PHY106-HBV 组细胞形态发生改变, 变为细长的梭形细胞。见图 2。

2.4 免疫细胞化学结果 E-cadherin 在 HK-2 组和 HK-2-PHY106 组中表达明显高于 HK-2-HPY106-HBV 组 ($P < 0.05$); 而 α -SMA 在 HK-2-HPY106-

基因测序结果 PHY106 真核表达载体上的 C 基因型 HBV 的序列正确。

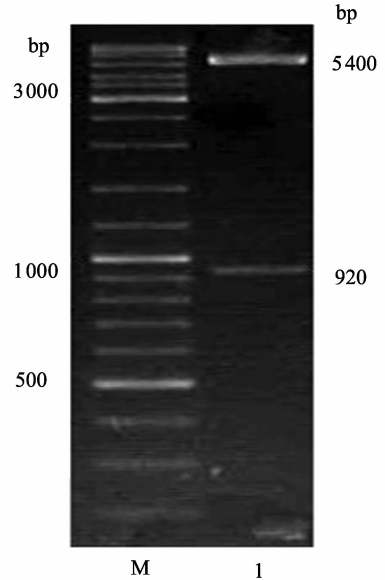


图 1 重组质粒 PHY106-CHBV 双酶切后电泳结果 M: 1 kb DNA 分子量标准; 1: Hind III 和 Nsi I 双酶切后重组质粒电泳结果。

Fig. 1 The electrophoresis results of recombinant plasmid PHY106-CHBV after restriction enzyme digestion. M: 1 kb DNA ladder marker; 1: The electrophoresis results of recombinant plasmid after Hind III and Nsi I double restriction enzyme digestion.

2.2 上清液 HBsAg 与 HBeAg 的检测结果 HK-2-PHY106-HBV 组上清液中可检测到 HBsAg 与 HBeAg 的表达, 为阳性; HK-2 组和 HK-2-PHY106 组则未检测到, 为阴性。其中 72 h 表达量最高(表 1), 以后的实验以 72 h 转染细胞做相关检测。

HBV 组中表达明显高于 HK-2 组和 HK-2-PHY106 组 ($P < 0.05$)。各组细胞的平均光密度见图 2。

2.5 Western blot 结果 Western blot 结果显示, E-cadherin 在 HK-2 组和 HK-2-PHY106 组中表达明显高于 HK-2-PHY106-HBV 组 ($P < 0.05$); 而 α -SMA 在 HK-2-PHY106-HBV 组中表达明显高于 HK-2 组和 HK-2-PHY106 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

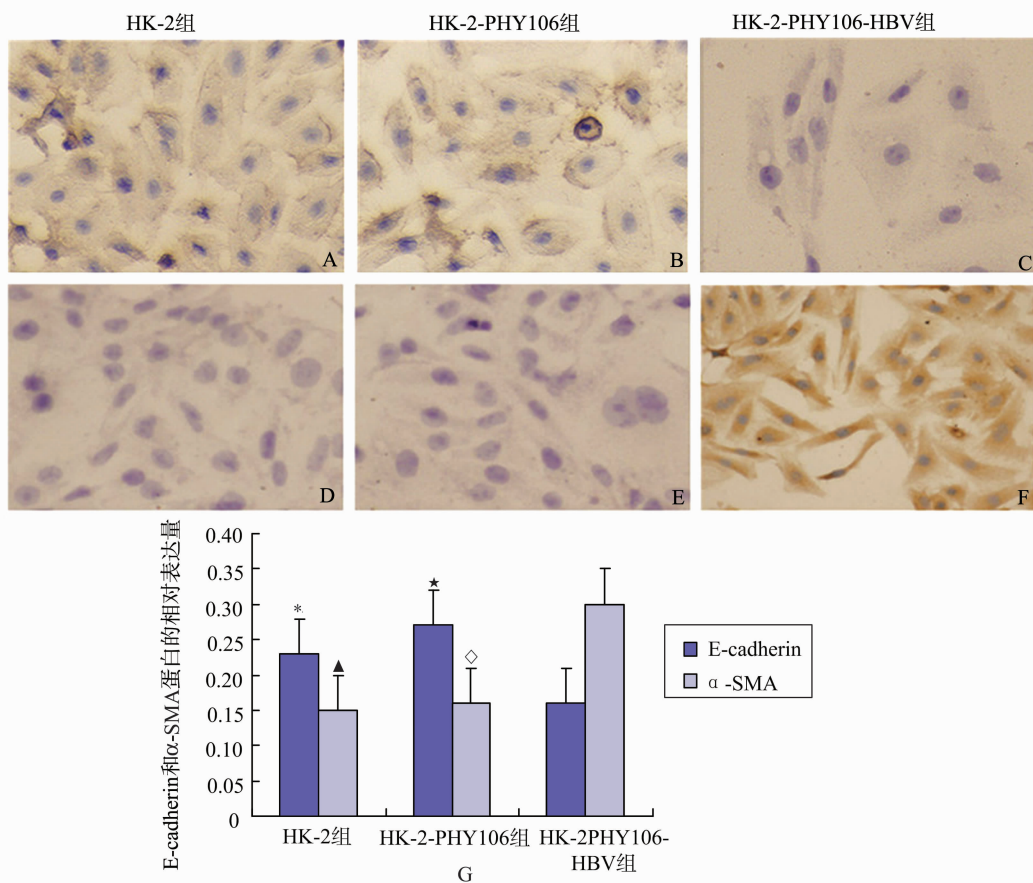


图2 免疫细胞化学检测的HBV对HK-2细胞E-cadherin和α-SMA表达的影响

A-C: E-cadherin表达情况(×200); D-F: α-SMA表达情况(×200); G: E-cadherin和α-SMA在各组的平均光密度数据统计图。**P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组, ^▲*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组; **P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组, ^◇*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组。

Fig. 2 The effect of HBV to HK-2 cells on the expressions of E-cadherin and α-SMA by immunocytochemistry

A-C: The expression of E-cadherin (×200); D-F: The expression of α-SMA (×200); G: The statistical data of average optical density of E-cadherin and α-SMA in different groups. **P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group, ^▲*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group; **P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group, ^◇*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group.

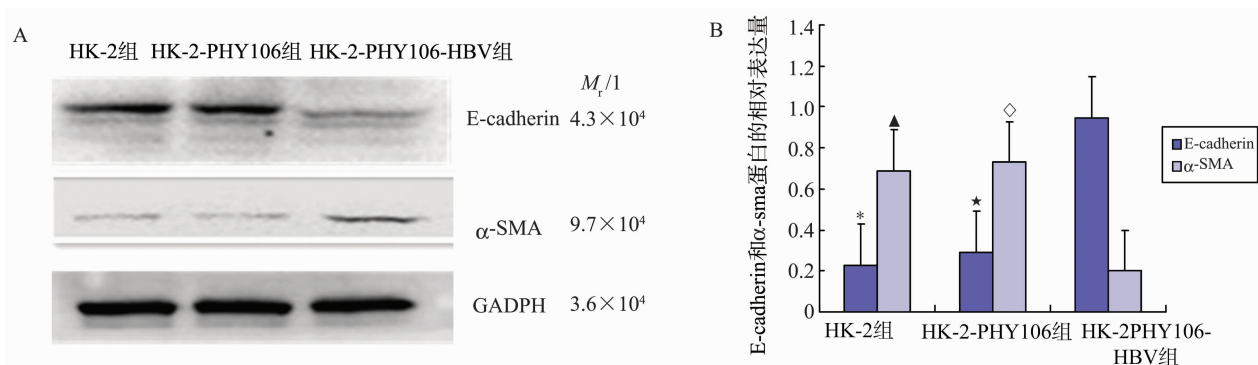


图3 Western blot检测HBV对HK-2细胞E-cadherin和α-SMA表达的影响

A: E-cadherin和α-SMA表达情况; B: E-cadherin和α-SMA在各组的平均光密度数据统计图。**P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组, ^▲*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组; **P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组, ^◇*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV组。

Fig. 3 The effect of HBV to HK-2 cells on the expression of E-cadherin and α-SMA by Western blot

A: The expression of E-cadherin and α-SMA; B: The statistical data of average optical density of E-cadherin and α-SMA in different groups. **P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group, ^▲*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group; **P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group, ^◇*P* < 0.05 vs HK-2-PHY106-HBV group.

2.6 RT-PCR检测TGF-β1的mRNA的表达 RT-PCR结果显示, TGF-β1的mRNA在HK-2-PHY106-

HBV组中的表达明显高于HK-2组和HK-2-PHY106组(*P* < 0.05)。见图4。

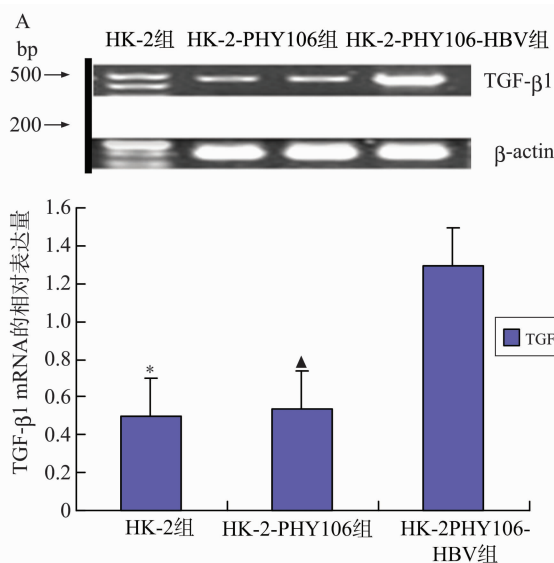


图4 HBV 对各组 HK-2 细胞 TGF-β1 mRNA 表达的影响
A: TGF-β1 mRNA 表达情况; B: TGF-β1 mRNA 的平均光密度数据统计图。* $P < 0.05$ vs HK-2-PHY106-HBV 组, $\blacktriangle P < 0.05$ vs HK-2-PHY106-HBV 组。

Fig. 4 The effect of HBV to HK-2 cells on the expresion of TGF-β1 mRNA

A: The expression of TGF-β1 mRNA; B: The statistical data of average optical density of TGF-β1 mRNA.

* $P < 0.05$ vs HK-2-PHY106-HBV group, $\blacktriangle P < 0.05$ vs HK-2-PHY106-HBV group.

3 讨论

HBV 感染机体不仅可引起肝脏结构和功能的改变,还可出现多种肝外脏器的损伤,且以乙型肝炎相关性肾炎 (HBV-GN) 最受关注^[1],其发病机制尚未完全明确,主要包括免疫复合沉积损伤、自身免疫损伤和乙型肝炎病毒通过激活相关信号传导通路直接导致肾脏损伤^[2]。本课题前期工作用含 HBV-DNA 的质粒转染人肾小球系膜细胞,证实了 HBV 可在人肾小球系膜细胞中复制并表达相应抗原,并使系膜细胞发生凋亡^[3]。本实验用含 HBV-DNA 的质粒转染 HK-2 细胞,研究是否会引起肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化。

TEMT 在肾小管间质纤维化过程中起重要作用,它是指肾小管上皮细胞 (renal tubular epithelial cell, RTEC) 在各种病理损伤下失去原有上皮细胞表型,转分化为肌成纤维细胞^[4-6] (myofibroblast, MyoF),分泌大量 I 型、III 型、IV 型胶原和纤维连结蛋白,使细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积,并合成金属蛋白酶抑制物-1 (TIMP-1) 抑制 ECM 的降解,从而促进纤维化的进程。正常肾脏中几乎无 MyoF, MyoF 主要来源于成纤维细胞的分化,血管周围平滑肌细胞的迁移或局部增殖以及肾

小管上皮细胞的转分化^[4]。α-SMA 是真核细胞的一种细胞骨架蛋白,参与构成微丝结构,是 MyoF 的特异性蛋白^[5],正常肾脏 α-SMA 的表达仅见于血管中层^[6]。研究发现,α-SMA 在肾脏局部表达的高低可间接反映肌成纤维细胞的数量^[7-8],因此 α-SMA 被普遍作为检测肾脏固有细胞向 MyoF 转分化的一项指标。E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 作为上皮细胞间特异性的一种黏附联结分子,是上皮细胞的标志蛋白,它能保持细胞骨架结构的正常,并参与上皮细胞极性的形成,对于维持上皮细胞结构的完整性有重要意义^[9]。E-cadherin 表达下调会使细胞失去上皮细胞极性。钟雯等^[10] 研究结果显示:在正常人肾组织中起细胞间连接作用的 E-cadherin 表达丰富,但从 2 期糖尿病患者中 E-cadherin 的表达即开始下降,而 α-SMA 则开始表达,并随临床分期的增加而上升。本实验用含 HBV-DNA 的质粒转染 HK-2 细胞,72 h 后检测到上清液中 HBsAg 与 HBeAg 的高表达,证实了 HBV 可在 HK-2 中高效复制并表达相应抗原。转染 72 h 后用相差显微镜观察,发现细胞形态由上皮细胞样的鹅卵石形变为成纤维细胞样的细长梭形,说明了 HK-2 在细胞形态上发生了转变。用免疫细胞化学和蛋白印迹两种方法检测 α-SMA 和 E-cadherin 的表达,结果 MyoF 标志物 α-SMA 表达明显上调 ($P < 0.05$),而上皮细胞标志物 E-cadherin 表达显著下调 ($P < 0.05$),从而在蛋白组学上证实了 HBV 感染人肾小管上皮细胞后可引起 HK-2 细胞向肌成纤维细胞转分化。

目前关于 TEMT 的分子机制尚未完全明确,已有研究表明有多种细胞因子及其信号传导通路参与调节肾小管上皮细胞转分化,研究较多、作用较明确的细胞因子主要有 TGF-β1、肝细胞生长因子、白介素-1 和骨形态形成蛋白-7^[11-12]。在这些诱导因子中 TGF-β 是目前公认的最主要的肾脏促纤维化因子,启动并调节 TEMT 全过程^[13],在肾间质纤维化过程中起重要作用。

TGF-β 的受体,包括 I 型受体和 II 型受体,它们由两条不同的具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的肽链构成异二聚体。TGF-β 与 I 型受体结合后,II 型受体再结合上去并使 I 型受体磷酸化,进而磷酸化与 TGF-β 特异作用的下游信号蛋白,从而激活细胞内的信号传导。TGF-β1 的表达主要见于受损的肾小管上皮细胞,且表达量与肾间质纤维化程度呈正相关。有研究显示,慢性乙型肝炎患者血清中 TGF-β1 水平升高,提示感染乙型肝炎病毒后,人体 TGF-β1 水平发生变化,可能是肾小管上皮细胞损

伤的机制之一^[14-15]。张勇等^[16]研究证实,体外培养的肾小管上皮细胞经 TGF- β 1 刺激 48 h 后细胞形态明显拉长, α -SMA 表达明显上调。TGF- β 1 也被证实参与高糖诱导的 TEMT 现象^[17],但是否介导乙型肝炎病毒相关性肾炎发生 TEMT,目前研究较少。TGF- β 1 介导的 TEMT 信号传导途径包括 smad、P38MAPK、PI3k/Akt、RhoA/ROCK 途径等^[18]。各种信号传导途径之间又存在相互影响。本实验用 RT-PCR 法检测到转染 72 h 后 HK-2 细胞中的 TGF- β 1 的 mRNA 表达明显上调,可能是 HBV 感染细胞后引起的细胞损伤,使细胞分泌 TGF- β 1 增多,细胞外液增多的 TGF- β 1 又作用于 HK-2 细胞,引起 HK-2 转分化。至于 TGF- β 1 是通过何种信号通路介导 TEMT 需要进一步研究。

综上所述,本实验已证实 HBV 可在 HK-2 细胞中高效复制并表达 HBsAg 与 HBeAg,并且通过在蛋白水平检测 α -SMA 和 E-cadherin 的表达,证实 HBV 可引起 HK-2 细胞发生表型转化,通过检测 TGF- β 1 的 mRNA 水平证实其转分化的机制有可能是通过上调 TGF- β 1 来实现的。

参考文献:

- [1] Mason A. Role of viral replication in extrahepatic syndromes related to hepatitis B virus infection[J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2006, 52(1):53-66.
- [2] 洪森, 王义国, 刘长虹, 等. HBV 在人肾小管上皮细胞内的表达及其对其凋亡的影响[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 50(1):34-38.
- [3] 洪森, 王义国. 乙型肝炎病毒相关性肾炎的发病机制[J]. *中国医药指南*, 2011, 9(2):39-41.
- [4] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(4):1465-1475.
- [5] Alexopoulos E, Gionanlis L, Papayianni E, et al. Predictors of outcome in idiopathic rapidly progressive glomerulonephritis (IRPGN)[J]. *BMC Nephrol*, 2006, 7:16.
- [6] Quinlan J M, Yu W Y, Hornsey M A, et al. In vitro culture of embryonic mouse intestinal epithelium: Cell differentiation and introduction of reporter genes[J]. *BMC Dev Biol*, 2006, 6:24.
- [7] Sommer M, Gerth J, Stein G, et al. Transdifferentiation of endothelial and renal tubular epithelial cells into myofibroblast-like cells under in vitro conditions: A morphological analysis[J]. *Cells Tissues Organs*, 2005, 180(4):204-214.
- [8] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2):213-217.
- [9] Durvasula R V, Shankland S J. Podocyte injury and targeting therapy: an update [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(1):1-7.
- [10] 钟雯, 曾姣娥, 李又空, 等. 糖尿病肾病中肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化的意义[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(11):1929-1932.
- [11] Iwano M, Plieth D, Danoff T M, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(3):341-350.
- [12] Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, et al. TGF- β 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2) [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(2):579-592.
- [13] Roberts A B, Tian F, Byfield S D, et al. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(1-2):19-27.
- [14] 宋新文, 邓存良, 盛云建, 等. 慢性乙型肝炎患者血清转化生长因子 β 1、肝细胞生长因子的检测及临床意义[J]. *临床荟萃*, 2007, 22(14):1001-1002.
- [15] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(9):1465-1475.
- [16] 张勇, 张璟. 磷脂酰肌醇 3 激酶/Akt 通路参与 TGF- β 1 诱导的人肾小管上皮细胞间质转分化过程[J]. *医学研究生学报*, 2011, 19(4):319-322.
- [17] 张飞飞, 谭若云, 熊明霞, 等. 高糖通过转化生长因子 B-Smad 信号传递途径诱导肾小管上皮细胞转分化[J]. *中华肾脏病杂志*, 2008, 24(3):174-178.
- [18] 金新力. TGF- β 1 诱导 TEMT 信号通路的研究进展[J]. *国际移植与血液净化杂志*, 2008, (6):5, 32-35.

(编辑:张彩凤)