

基于内皮细胞的内皮-间质转化筛选肾康丸活性成分

张 妍¹, 张佳幸¹, 熊一凡¹, 鲁 路², 王明清¹, 刘思明³, 肖 炜¹

南方医科大学¹中医药学院, ³药学院, 广东 广州 510515; ²广州中医药大学第一附属医院岭南医学研究所, 广东 广州 510407

摘要:目的 基于 ALK5 靶点, 通过分子对接技术对肾康丸的有效成分进行筛选, 并验证各分子在高糖模型中的作用, 从而筛选出肾康丸影响内皮细胞内皮-间质转化活性的有效成分, 优化组方配伍。方法 对初步筛选的 9 个分子进行活力测定后选定毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、豆甾醇 3 个分子; 通过设置正常细胞组、高糖损伤组、高糖损伤组+毛蕊异黄酮、高糖损伤组+刺芒柄花苷、高糖损伤组+豆甾醇组, 并用实时荧光定量 PCR 检测 3 个分子的 α -SMA, vimentin 的 mRNA 表达水平; 用 Western blot 法检测 SMAD2/3 磷酸化情况。结果 与正常细胞组活力比较, 毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、豆甾醇 3 个分子细胞毒性弱, 与正常细胞组活力比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。其中, 高糖加毛蕊异黄酮组的 α -SMA, vimentin 的 mRNA 水平显著下降 ($P<0.05$), SMAD2/3 磷酸化受到抑制。其他两组差异无统计学意义。结论 高糖对内皮细胞会产生损伤, 可通过黄芪单体毛蕊异黄酮来抑制 α -SMA, vimentin 上调, 抑制 SMAD2/3 参与调节内皮细胞内皮-间质转化从而改善糖尿病肾病。

关键词:内皮细胞; 内皮-间质转化; 肾康丸; 毛蕊异黄酮

Screening active ingredients of Shenkangwan that regulate endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells *in vitro*

ZHANG Cha¹, ZHANG Jiaxing¹, XIONG Yifan¹, LU Lu², WANG Mingqing¹, LIU Siming³, XIAO Wei¹

¹College of Traditional Chinese Medicine, ³School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Lingnan Medical Research Institute, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510407, China

Abstract: Objective To screen the effective components of Shenkangwan that regulate endothelial-mesenchymal transition in endothelial cells for optimizing prescription of Shenkangwan. **Methods** ALK5 was identified as one of the target receptors that regulate endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells using molecular docking technique. Nine molecules were screened as the candidate effective components in Shenkangwan, among which calycosin, ononin and stigmasterol were selected for testing. Glomerular epithelial cells were exposed to high glucose and treated with calycosin, ononin, or stigmasterol, and the cellular expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and vimentin mRNA were detected with real-time fluorescence quantitative PCR. The phosphorylation of SMAD2/3 in the cells was detected using Western blotting. **Results** Calycosin, ononin and stigmasterol did not produce significant cytotoxicity in glomerular epithelial cells ($P>0.05$). The cells exposed to high glucose and calycosin treatment showed significantly decreased mRNA levels of α -SMA and vimentin ($P<0.05$) and inhibited phosphorylation of SMAD2/3. Ononin and stigmasterol did not produce such effects in the cells. **Conclusion** In endothelial cells with high glucose-induced injury, calycosin can inhibit the up-regulation of α -SMA and vimentin and inhibit phosphorylation of SMAD2/3 to regulate endothelial-mesenchymal transition and improve diabetic nephropathy.

Keywords: endothelial cells; endothelial-mesenchymal transition; Shenkangwan; calycosin

糖尿病肾病(DN)已成为全球慢性肾脏病及其导致的终末期肾病的主要构成原因, 发病率呈逐年上升趋势, DN发生机制复杂, 目前其确切的发病机制尚不清楚, 有报道提出可能与高血糖、内皮细胞-间充质转化(EndMT)等因素有关^[1-2]。EndMT特指在一定的生理病理条件下, 内皮细胞会向间充质细胞转变, 其表型和功

收稿日期:2017-07-02

基金项目:国家自然科学基金(81673890);南方医科大学科研启动计划(CX2015N003)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81673890).

作者简介:张 妍,在读硕士研究生,E-mail: 635278374@qq.com

通信作者:肖 炜,医学博士,研究员,E-mail: xw76888@126.com

能都会发生改变, 其中最早发生改变的便是内皮细胞受到遏制, 细胞的紧密连接受到破坏, 上皮细胞失去粘附能力, 逐渐从底膜上脱落; 从而使 α -SMA, vimentin 等间充质细胞表型重新表达^[3-4]。内皮细胞作为一种干细胞, 广泛应用于 DN 及各种糖尿病并发症的研究, 近年来越来越多的研究显示 EndMT 在内皮细胞纤维化中起着重要的作用^[5-6], 而肾脏内皮细胞纤维化是 DN 的主要病理特征, EndMT 可促进 DN 肾脏纤维化的进展。内皮细胞在促成纤维刺激下如 TGF- β 、高糖等可获得成纤维细胞样表型同时, 其内皮细胞表型逐渐消失, 形成纤维化细胞。越来越多的研究显示 EndMT 在 DN 早期间质纤维化进程中发挥重要作用, 有研究表明 EndMT 确实存在

于DN并促进DN纤维化的进展^[7]。肾康丸是我们研制的治疗DN的中药制剂并获得国家专利(专利号:ZL 200610036515.2)的经验复方,目前肾康丸的作用主要是改善肾内血流动力学,增加肾小球滤过率及有效肾血流量的作用,并能减少尿蛋白的排泄,并具有降血脂、血黏度的作用,可在一定程度上改善DN临床症状,延缓DN的进展^[8-9],已广泛应用于DN的临床治疗。我们前期实验发现肾康丸可能是通过阻断内皮细胞EndMT途径发挥效果,但是有效成分不清楚。经文献检索发现,从内皮细胞EndMT的角度出发筛选肾康丸的有效成分的研究尚未见报道,因此,本研究着眼于筛选疗效稳定、毒性小的中药有效成分应用于临床,探讨肾康丸中对阻断EndMT有显著效果的有效药物成分,以便更好地发挥肾康丸治疗DN的优势,并为其后续成分优化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 靶点的筛选和肾康丸成分

通过分子对接技术,基于物理力学原理的能量打分函数对分子对接的模式进行打分^[10]。筛查到8个与受体结合度好的内皮细胞EndMT的靶点,分别为ALK5、AT1R、Calcineurin、GRK2、integrin、P38、Rhoa、Tak1。其中ALK5是TGF-β1型受体的一种,转化生长因子-β(TGF-β)参与肾脏调控的各个环节,活化的TGF-β使ALK5磷酸化而激活,激活的ALK5可以磷酸化其下游的信号分子-受体活化的Smad2和Smad3,从而启动细胞内级联反应,促进肾纤维化的发生和发展^[11-12],因此从ALK5靶点出发探讨肾脏病变进展,从而研究保护肾功能的机制具有重要意义。本实验基于ALK5靶点,并从中科院中药与化学成分数据库以及台湾中药数据库中搜集肾康丸的药物化学成分,将肾康丸中的有效成分与ALK5进行对接,筛选出9个对接度好的有效成分,对接结果如表1所示。

1.2 药品与试剂

毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、豆甾醇(成都曼斯特生物科技有限公司),纯度都为98%。胰蛋白酶(美国Gibco),DMEM培养液(美国Gibco),新生牛血清(美国Gibco),葡萄糖(广州威佳科技公司),CCK8试剂盒(日本同仁公司),trizol(takara瑞真生物公司),荧光染料SYBR Green、qPCR试剂盒(广州威佳科技公司),ALK5(英国abcam),smad2/3(英国abcam)。

1.3 内皮细胞的培养

将肾小球内皮细胞(GECs)接种于25 cm²的培养皿中,加入含10%胎牛血清的低糖型DMEM-F12培养基,置于含5% CO₂的37℃培养箱中培养,细胞传至第3代供实验使用。

1.4 CCK8法检测各分子的细胞活力情况

将内皮细胞接种于96孔培养板,细胞密度约为5×10³,加入含10%胎牛血清的低糖型DMEM-F12培养基至100 μL/孔,设置9个药物分子组,每个分子组设置5个不同药物浓度,并设立5个复孔,以及空白孔。培养72 h后分别在每孔加入CCK8溶液(10 μL/孔)后放入培养箱继续培养1 h,然后在酶联免疫检测仪A_{570 nm}处测量各孔的吸光值。

1.5 细胞分组设置

CCK8结果得出了3个活力较好的分子,分别是毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、豆甾醇。继而进一步将细胞分为正常细胞组、高糖损伤组、高糖损伤组+毛蕊异黄酮、高糖损伤组+刺芒柄花苷以及高糖损伤组+豆甾醇组。高糖损伤组中的细胞加入浓度为30 mmol/L的高葡萄糖培养液进行培养(称质量1.8 g的葡萄糖并用10 mL的PBS充分溶解,混匀溶解后就是1 mol/L的葡萄糖溶液。随后再使用滤过器过滤溶液,可放冰箱保存。每次实验取24.4 μL的1 mol/L的葡萄糖溶液加到1 mL的低糖DMEM培养基之中,这就是浓度为30 mmol/L的高葡萄糖培养液的配置过程)。

1.6 RT-qPCR法检测α-SMA, vimentin的mRNA表达

细胞计数,取1×10⁶~1×10⁷细胞加入1 mL Trizol试剂,剧烈震荡1 min,再加入适量氯仿(氯仿和trizol比例为5:1),离心后取上清再加入异丙醇,混匀后再次离心并弃废液,最后加入DEPC水,紫外分光光度仪检测抽提总RNA的质量和浓度,测A_{260 nm}/A_{280 nm}比值在1.6~1.9,并计算RNA含量。按试剂盒说明书逆转录为cDNA,-4℃保存。α-SMA引物:上游引物:5'-CGCGACTTTGC AGAGATGTCC-3',下游引物:5'-CCATCCCCTGAA GAGTTCTCC-3'(扩增长度为95 bp)。Vimentin引物:上游引物为5'-CGCCAGATGCGTGAAATGG-3',下游引物为5'-ACCAGAGGGAGTGAATCCAGA-3'(扩增长度为278 bp)。PCR反应体系(SYBRGreen 10 μL,上游引物0.5 μL,下游引物0.5 μL,cDNA1 μL,ddH₂O 8 μL),将配制好的PCR反应溶液置于RT-PCR仪上进行PCR扩增反应。

1.7 Western blot法检测SMAD2/3磷酸化情况

收集已处理好的各试验组的细胞样品,离心收集细胞沉淀于1.5 mL离心管中,PBS洗涤2次,加入100 μL细胞裂解液,用移液枪反复吹打,冰上孵育30 min,4℃,12 000 r/min离心15 min后,取上清液,再加入5×蛋白缓冲稀释剂于变性仪上变性,变形后-20℃保存,待用。BCA法测定蛋白样品浓度,每个样品上样量为15 μL,分离胶质量分数为10%,浓缩胶质量分数为6%,蛋白行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转移至聚偏二氟

乙烯(PVDF)膜,将PVDF膜于5%脱脂奶粉4℃封闭2 h,加入SMAD2/3抗体(1:800,v/v)4℃过夜,TBST洗涤3次,加入羊抗鼠二抗(1:2000,v/v)37℃摇床孵育2 h,再用TBS洗涤3次,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照,用Quantity One 4.4.0定量分析系统对胶片扫描并进行相对浓度测定。

1.8 统计学方法

以上实验均重复3次,所有数据采用均数±标准误表示,运用统计学软件SPSS17.0对所有数据进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 认为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾康丸成分的分子对接结果

肾康丸应用于临床治疗DN及其并发症已经多年,药效显著。但是其具体有效成分却尚未明确。前期证明TGF-beta/smad信号可能是关键靶点^[13],所以选取ALK-5为对接靶点。基于中科院中药与化学成分数据库以及台湾中药数据库,筛选了365个关于肾康丸药物成分的分子,其中杜仲110个;黄芪84个;金樱子6个;山楂61个;玉米须28个;益母草12个;鱼腥草64个。用chemdraw进行3D建模,能量优化,预备对接。最终完成了肾康丸365个分子与ALK5的对接,筛选出9个结合度较好的分子(表1)。

表1 肾康丸药物成分分子对接筛选结果

Tab.1 Molecular docking screening results of drug composition in *Shenkangwan*

Monomer	Pubchem number	lipid-water partition coefficient	Molecular formula	Vina
Hyperoside	5281643	0.4	C21H20O12	-9.5—8.0
5-Dicaffeoylquinic acid	5280633	-0.4	C16H18O9	-10.3—8.2
Calycosin	5280448	2.4	C15H12O5	-8.9—8.0
Calycosin-7-glucoside	5318267	0.6	C22H22O10	-9.6—8.5
β -sitosterol	222284	9.3	C29H50O	-10.0—8.2
Ononin	71551772	1	C22H22O9	-9.5—8.2
Quercitrin	5280459	0.9	C21H20O11	-9.4—8.2
Isoquercitrin	5484006	0.4	C21H20O12	-8.9—7.9
Stigmasterol	91692579	8.6	C29H48O	-10.7—8.6

2.2 CCK8检测各组细胞细胞活力

将分子对接初步筛选出来的9个分子进行cck8细胞活力测试,设立5个不同浓度组,各组细胞活力值如表2所示,细胞活力值在72 h后只有毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、豆甾醇3个分子在任何浓度范围内都无明显降

低($P>0.05$);而其他6个分子组的A值在72 h后,各不同浓度组范围内有明显降低($P<0.05$)。这说明其他6组分子在一定浓度范围内均有细胞毒性,细胞活力下降,由此排除其他6组分子,选择毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷和豆甾醇进行mRNA水平的验证(表2)。

表2 CCK8法检测各分子组的细胞活力值

Tab.2 Results of CCK8 assay for assessing viability of cells treated with the candidate effective gradients of *Shenkangwan* (Mean±SD)

Monomer	0.1 μ m	0.3 μ m	1 μ m	3 μ m	10 μ m
Hyperoside	100±17.21	121.36±21.36	67.31±16.55	58.28±2.05*	57.24±15.47*
5-Dicaffeoylquinic acid	100±4.64	91.05±5.05	96.58±9.50	53.22±6.14*	40.74±2.91*
Calycosin	100±10.68	99.46±11.80 [#]	97.03±13.23 [#]	107.07±7.98 [#]	100.19±18.5 [#]
Calycosin-7-glucoside	100±2.35	60.50±6.07*	51.26±12.49*	51.95±3.48*	35.16±4.50*
β -sitosterol	100±20.11	102.27±14.46	56.88±3.14*	50.40±15.92*	39.30±6.63*
Ononin	100±7.58	98.93±2.65 [#]	101.02±26.25 [#]	111.48±14.67 [#]	115.08±17.93 [#]
Quercitrin	100±17.54	96.77±20.96	48.13±9.19*	28.13±13.11*	46.81±6.00*
Isoquercitrin	100±15.46	38.24±18.07*	18.49±5.16*	11.18±7.55*	12.43±1.57*
Stigmasterol	100±2.32	103.3±5.50 [#]	104.49±13.87 [#]	94.75±11.66 [#]	108.33±20.64 [#]

* $P>0.05$, * $P<0.05$ vs 0.1 μ m group.

2.3 三个分子组 α -SMA和vimentin的mRNA表达

与正常细胞对照组比较,高糖损伤组的 α -SMA和vimentin的mRNA表达显著升高($P<0.05$);与高糖损伤组比较,高糖损伤组+毛蕊异黄酮组 α -SMA和vimentin

的mRNA表达显著下降($P<0.05$);而高糖损伤组+刺芒柄花苷和高糖损伤组+豆甾醇组 α -SMA和vimentin的mRNA表达无明显变化($P>0.05$)。各组 α -SMA和vimentin的mRNA表达见表3。

表3 各组细胞中 α -SMA和vimentin的mRNA表达

Tab.3 Expression of α -SMA and vimentin mRNA in each group of cells (Mean \pm SD)

Group	α -SMA	Vimentin
Control	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
High glucose	3.87 \pm 0.64*	4.80 \pm 0.35*
high glucose+Calycosin	1.35 \pm 0.15 Δ	2.06 \pm 0.28 Δ
high glucose+Ononin	3.66 \pm 0.58	4.58 \pm 0.71
high glucose+Stigmasterol	3.84 \pm 0.33	4.73 \pm 0.68

* $P<0.05$ vs Control; $\Delta P<0.05$ vs High glucose.

2.4 毛蕊异黄酮对Smad信号通路影响

与正常细胞组比较,高糖损伤组的ALK5信号通路以及smad2/3磷酸化的蛋白表达量都高于正常组细胞;而在给予毛蕊异黄酮后,与高糖损伤组细胞相比,高糖

损伤组+毛蕊异黄酮组的ALK5信号通路蛋白表达会明显下降,同时smad2/3磷酸化受到抑制。这表明毛蕊异黄酮可以阻断Smad信号,侧面反应了毛蕊异黄酮可以抑制ALK5活性(图1)。

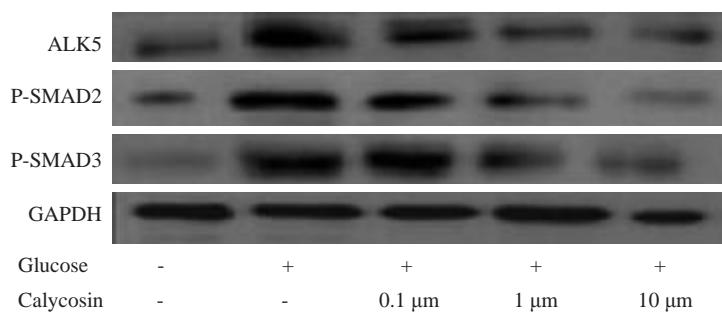


图1 高糖损伤组+毛蕊异黄酮中P-smad2/3蛋白表达
Fig.1 Expression of P-smad2/3 protein in cells with high glucose exposure and calycosin treatment.

3 讨论

随着人们生活水平的逐渐提高及生活方式的转变,糖尿病肾病日益成为危害人类健康的重大疾病之一,并且DN是导致终末期肾病的主要原因之一,患病率逐年上升^[14-15]。DN的特点为肾小球肥大、肾小管间质纤维化、进展性蛋白尿及肾衰竭等等。而DN的具体发生机制尚不完全清楚,近年来研究表明许多因素涉及DN的发生机制,包括蛋白尿、遗传、肾脏血流动力学异常、高血糖、高血压等^[16]。

有研究最先在胚胎期的心脏瓣膜中发现和提出了EndMT的存在,并在主动脉和肺动脉的流动过程中也起到了关键作用。近年来越来越多的实验证明,EndMT参加了心、肾、肺等多个器官的纤维化过程,推

进了疾病的发生发展^[17-19]。肾脏纤维化是引发DN的主要原因之一,而近年来,有研究提出EndMT与肾脏纤维化进展方面关系密切^[20]。糖尿病肾病是糖尿病局部表现在肾脏纤维化不断发生发展过程中的相关疾病,EndMT病变在进展性肾脏疾病中的重要性日渐受到重视。EndMT可由多种因素诱导产生,其中TGF- β 是关键的通路之一^[21],较多研究^[22]显示,TGF- β 可诱导内皮细胞发生EndMT。此外,高糖状态下也可引发EndMT,可能是高糖环境可直接激活TGF- β 下游Smad通路,引起EndMT的发生^[23]。同样,ALK5是TGF β 1的一个重要受体,也是DN发展过程中一个重要靶点,通过ALK5信号途径活化了Smad2/3从而来抑制内皮细胞EndMT的形成和增长^[24],对肾脏生成的成熟阶段起到促进作

用。近期研究表明,EndMT参与了包括心脏、肾脏、肝脏在内的许多器官的纤维化过程,并且存在于DN病理状态中,越来越多的控制EndMT的细胞外和细胞内分子,可用于开发肾脏纤维化治疗^[25-26]。而本实验旨在研究EndMT在肾脏疾病中的作用的最新进展,尤其应重视糖尿病肾病中EndMT的发展变化,将抑制EndMT用作DN的潜在研究机制和药物治疗的新切入点。

肾康丸是我们研制的治疗DN的中药制剂并获得国家专利的经验复方,我们应用肾康丸治疗糖尿病肾病十几年余,经反复临床验证,疗效十分确切,能显著减少蛋白尿,稳定降低血肌酐和尿素氮等毒素物质,保护肾功能,有效地延缓DN的进展,是治疗DN的有效药物^[27]。本研究以此为基础通过肾康丸的相关药物作为研究对象,以药物中对应的上市药物小分子为参照,将肾康丸的各个中药成分进行分子对接,综合评价对接和实验结果,研究初步筛选发现了9个对高糖控制较好的药物分子,我们对9个分子组进行活力实验研究,验证得到毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、豆甾醇3个分子的细胞活性跟正常组无显著差异。这是以往关于肾康丸的相关实验所不具有的新的切入点,可以相对便捷有效的对肾康丸的药物组成进行一个初步筛选,从而发现药物中对治疗DN有效的分子成分。

进一步研究毛蕊异黄酮、刺芒柄花苷、豆甾醇3个药物分子,通过药物性验证,从而得到在高糖干预下抑制EndMT疗效最佳的分子。在EndMT发展过程中,静态内皮细胞从平整的内皮层脱落、获得了间充质表型变化。这个所谓间充质表型变化具有下列特征:失去内皮细胞连接、获得侵润性特征、获得间质标志如α-SMA,本研究发现在高糖组α-SMAMRNA水平明显升高,这提示了EndMT的发生。同样,α-SMA是由转化生长因子β(TGF-β)刺激产生,作为内皮细胞EndMT发生过程中的标志基因之一^[28],对肾小球纤维化会产生明显的作用,通过检测α-SMA在细胞中的表达可明确细胞的损伤程度并间接反映出肾脏纤维化的程度。vimentin来源于成纤维细胞、内皮细胞和白细胞等中胚层细胞,vimentin表达是组织细胞向上皮、内皮细胞间质转化的标志^[29],也能在一定程度上反应参与了肾脏纤维化过程。本实验结果显示,与高糖损伤组比较,高糖损伤组+毛蕊异黄酮组可以抑制α-SMA和vimentin的mRNA的表达,这提示在体外实验中,毛蕊异黄酮对高糖有一定的降低作用,并且可能会抑制EndMT促肾脏纤维化的进程。肾脏纤维化的形成涉及转化生长因子-β、TGF-β与其受体结合后激活受体型Smad(R-mad)即Smad2、3,并且TGF-β介导参与EndMT分子机制和DN疾病过程^[30]。我们研究发现毛蕊异黄酮可以阻断Smad2/3信号,进一步提示我们毛蕊异黄酮有可能阻断EndMT进

程。本实验研究旨在将肾康丸中的药物分子与存在于肾脏中的EndMT联系起来,从而得出何种药物分子对抑制肾脏EndMT有良好的作用,这对于治疗DN有着重大的参考价值。

综上所述,基于内皮细胞EndMT在DN病理状态中的发展作用,用肾康丸的药物分子基础筛选出有效抑制EndMT的分子毛蕊异黄酮,为治疗DN提供新的理论依据和切入点。

参考文献:

- Wu M, Tang RN, Liu H, et al. Cinacalcet attenuates the renal endothelial-to-mesenchymal transition in rats with adenine-induced renal failure[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(1): 145-7.
- Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases[J]. J Clin Med, 2016, 5(4): 78.
- Li JH, Qu XL, Bertram JF. Endothelial- Myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in Streptozotocin- induced diabetic mice[J]. Am J Pathol, 2009, 175(4): 1380-8.
- Jackson AO, Zhang JJ, Jiang ZS, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases[J]. Trends Cardiovasc Med, 2017, 27(6): 383-93.
- Lawson J, Elliott J, Wheeler-Jones C, et al. Renal fibrosis in feline chronic kidney disease: Known mediators and mechanisms of injury [J]. Vet J, 2015, 203(1): 18-26.
- Chen XY, Lv RJ, Zhang W, et al. Inhibition of myocyte- specific enhancer factor 2A improved diabetic cardiac fibrosis partially by regulating endothelial- to- mesenchymal transition [J]. Oncotarget, 2016, 7(21): 31053-66.
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(9): 493-503.
- 肖炜,蔡红兵,李欣.肾康丸对糖尿病大鼠肾脏病理的影响[J].光明中医,2008,23(9): 1258-60.
- 肖炜,魏连波,马云,等.肾康丸对糖尿病大鼠肾脏保护作用的实验研究[J].中国中药杂志,2006,31(12): 1006-9.
- 林桂源,姚华聪,郑细娜,等.基于分子对接技术的常用降糖中药有效成分虚拟筛选[J].中国实验方剂学杂志,2015,35(15): 202-6.
- Seystahl K, Tritschler I, Szabo E, et al. Differential regulation of tgf- beta-induced, alk- 5-mediated vegf release by smad2/3 versus smad1/5/8 signaling in glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2014, 16(2): 254-65.
- Zhang J, Tian XJ, Xing J. Signal transduction pathways of EMT induced by TGF-beta, SHH, and WNT and their crosstalks[J]. J Clin Med, 2016, 5(4): 14.
- 肖炜,马云.肾康丸对糖尿病肾病大鼠TGF-β1/Smad信号通路的影响[J].第三军医大学学报,2008,42(16): 1564-7.
- Noubiap JJ, Naidoo J, Kengne AP. Diabetic nephropathy in Africa: A systematic review[J]. World J Diabetes, 2015, 6(5): 759-73.
- Wan Q, Xu YY, Dong ED. Diabetic nephropathy research in China: Data analysis and review from the National Natural Science Foundation of China[J]. J Diabetes, 2015, 7(3): 307-14.
- Fernández Fernández B, Elewa U, Sánchez-Niño MD, et al. 2012

- update on diabetic kidney disease: the expanding spectrum, novel pathogenic insights and recent clinical trials [J]. Minerva Med, 2012, 103(4): 219-34.
- [17] Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, et al. Endothelial-to-Mesenchymal transition in pulmonary hypertension[J]. Circulation, 2015, 131(11): 1006-18.
- [18] Widyantoro B, Emoto N, Nakayama K, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial- to- mesenchymal transition [J]. Circulation, 2010, 121(22): 2407-18.
- [19] Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2282-7.
- [20] Cruz- Solbes AS, Youker K. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and endothelial to mesenchymal transition(EndMT): role and implications in kidney fibrosis [J]. Results Probl Cell Differ, 2017, 60(5): 345-72.
- [21] 史可欣, 梅焕平. 转化生长因子-β调控内皮间充质转化的研究进展 [J]. 山西医药杂志, 2017(05): 522-6.
- [22] Ji Y, Dou YN, Zhao QW, et al. Paeoniflorin suppresses TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6): 794-804.
- [23] Che SK, Hung CC, Hsu HH, et al. Resveratrol ameliorates early diabetic nephropathy associated with augmented TGF- β /smad and ERK1/2 signaling in streptozotocin- induced diabetic rats [J]. Chem Biol Interact, 2015, 190(1): 45-53.
- [24] Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor-beta 2 promotes Snail- mediated endothelial- mesenchymal transition through convergence of Smad- dependent and Smad- independent signalling[J]. Biochem J, 2011, 437(3): 515-20.
- [25] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial- to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(8): 952-61.
- [26] Srivastava SP, Koya D, Kanasaki K. MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT [J]. Biomed Res Int, 2013, 47(8): 125469.
- [27] 龙海波, 张辉, 钟娟, 等. 肾康丸对早期糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(7): 1268-72.
- [28] van Meeteren LA, Ten D P. regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 177.
- [29] Hertig A, Anglicheau D, Verine J, et al. Early epithelial phenotypic changes predict graft fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(8): 1584-91.
- [30] Manetti M, Romano E, Rosa I, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis[J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(5): 924-34.

(编辑:孙昌朋)