

· 基础研究 ·

硼替佐米通过下调 Smurf1 拮抗大鼠慢性移植肾间质纤维化

周嘉俊, 桂泽平, 顾 民, 谭若芸*

南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:通过观察硼替佐米(bortezomib)对于 smad 泛素化调节因子1(Smurf1)的表达及肾小管上皮细胞-间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响,探讨硼替佐米抗移植肾纤维化的分子机制。方法:构建大鼠移植肾间质纤维化模型,并用硼替佐米进行干预。通过马松三色(Masson)染色观察硼替佐米对各组大鼠移植肾纤维化程度的影响。通过免疫组化检测硼替佐米对于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Smurf1、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)及 α -平滑肌蛋白(α -SMA)表达的影响。以肾小管上皮细胞(HK-2)为对象,以 TNF- α 作为刺激因子,通过 Western blot 检测 Smurf1、E-cadherin 和 α -SMA 的表达变化。通过慢病毒转染的方式敲低 Smurf1 在 HK-2 细胞中的表达,通过 Western blot 检测 TNF- α 刺激后 E-cadherin 和 α -SMA 的表达变化。将细胞分为对照组、TNF- α 组、硼替佐米组及实验组,Western blot 检测 Smurf1、E-cadherin 和 α -SMA 的表达变化。结果:硼替佐米治疗组大鼠移植肾间质纤维化明显且 α -SMA 与 Smurf1 的表达显著低于生理盐水治疗组($P < 0.05$),同时 E-cadherin 的表达显著高于生理盐水治疗组($P < 0.05$)。50 ng/mL TNF- α 刺激 HK-2 细胞 24 h 后 Smurf1 和 α -SMA 的表达明显高于 0 h 组($P < 0.05$),E-cadherin 的表达则明显低于 0 h 组($P < 0.05$)。敲低 Smurf1 的表达后,sh-Smurf1 组细胞在 TNF- α 刺激后的 E-cadherin 表达明显高于 sh-con 组细胞($P < 0.05$),而 α -SMA 则明显降低($P < 0.05$)。硼替佐米干预后,实验组细胞的 E-cadherin 的表达明显高于 TNF- α 组($P < 0.05$), α -SMA 的表达则明显低于 TNF- α 组($P < 0.05$)。结论:硼替佐米可以通过抑制 Smurf1 的表达从而抑制 TNF- α 诱导的肾小管上皮细胞 EMT 现象,进而抑制移植肾间质纤维化。

[关键词] 肾移植;硼替佐米;肾间质纤维化;肾小管上皮细胞

[中图分类号] R692

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)05-636-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20190502

Bortezomib attenuates the renal interstitial fibrosis in rat kidney transplantation via downregulating the expression of Smurf1

Zhou Jiajun, Gui Zeping, Gu Min, Tan Ruoyun*

Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to determine the anti-fibrogenic role of Bortezomib in renal interstitial fibrosis in kidney transplantation and to determine whether Bortezomib can reverse the renal tubular epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulated by Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1). **Methods:** Rat renal transplant model was established and intervened by Bortezomib. To detect the anti-fibrogenic effect of Bortezomib, Masson staining was applied to determine the area of renal interstitial fibrosis. Expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), Smurf1, α -SMA and E-cadherin was evaluated by immunohistochemistry staining. Western blot was used to detect expression of Smurf1, α -SMA and E-cadherin proteins in human renal tubular epithelial cells (HK-2) stimulated by TNF- α . Lentivirus was used to knockdown the expression of Smurf1 to detect the regulatory role of Smurf1 in the EMT induced by TNF- α . HK-2 cells were divided into 4 groups including Control group (cultured with fetal bovine serum), TNF- α group (cultured with TNF- α), Bortezomib group (cultured with Bortezomib) and experimental group (treated with Bortezomib and TNF- α together). Western blot was performed to detect expression of α -SMA, E-cadherin and Smurf1 proteins. **Results:** Compared with Allo+ vehicle group, the area of renal interstitial fibrosis in Allo+Bortezomib group was significantly alleviated ($P < 0.05$). The positive area of Smurf1 and α -SMA was remarkably reduced by treatment of Bortezomib ($P < 0.05$), while the expression of E-cadherin was significantly

[基金项目] 国家自然科学基金(81772681)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: tanruoyun112@vip.sina.com

increased ($P < 0.05$). After treatment of 50 ng/mL TNF- α , the expression of Smurf1 and α -SMA was significantly promoted and E-cadherin was downregulated ($P < 0.05$) in HK-2 cells. Cells of sh-Smurf1 group showed lower expression of α -SMA and higher expression of E-cadherin than sh-con group cells after the treatment of TNF- α ($P < 0.05$). As compared with cells treated with TNF- α , E-cadherin was significantly increased in HK-2 cells after treatment with TNF- α and Bortezomib, and α -SMA was significantly decreased ($P < 0.05$).

Conclusion: Bortezomib attenuates the renal interstitial fibrosis in kidney transplantation via downregulating the expression of Smurf1.

[Key words] kidney transplantation; bortezomib; renal tubular interstitial fibrosis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 636-642]

目前,肾移植仍然是终末期肾病最有效的治疗方式^[1]。由于新型免疫抑制的发展,T细胞介导的急性排异的发生率已显著降低^[2-3]。然而,移植肾的长期存活率仍然不尽如人意。慢性移植肾功能丧失(chronic renal allograft dysfunction, CAD)是影响移植肾长期存活的主要原因,其主要病理特征之一即为慢性移植肾间质纤维化^[4]。移植肾间质纤维化的病理成因主要是由于过多的细胞外基质在间质小管周边的异常沉积,继而瘢痕组织代替正常组织,导致移植肾功能的丧失。活化的肌成纤维细胞是分泌与合成细胞外基质的关键细胞。既往研究表明,肾小管细胞可通过上皮细胞-间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)转换为肌成纤维细胞继而成为间质基质的重要来源^[5]。本课题组既往的研究表明,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可以诱导肾小管上皮细胞(HK-2)产生EMT现象,进而促进移植肾纤维化^[6]。在乳腺癌、慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)中,smad 泛素化调节因子1(Smurf1)均在转化生长因子- β (TGF- β)诱导的EMT中具有重要作用^[7-8]。但是,Smurf1在TNF- α 诱导的EMT过程中的作用却未见报道。

硼替佐米(bortezomib)作为一种广谱的蛋白酶体抑制剂,对血液系统疾病如多发性骨髓瘤和轻链淀粉样变性有着良好的治疗作用。有研究表明,硼替佐米可以预防肝脏、皮肤和心脏的纤维化^[9-11]。但是硼替佐米对于移植肾间质纤维化的作用却未见报道。本研究构建了慢性移植肾间质纤维化的动物模型并且以HK-2为研究对象,探讨了Smurf1在移植肾间质纤维化中的作用及机制。在此基础上,进一步探讨了硼替佐米对移植肾间质纤维化的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

健康SPF级Lewis大鼠40只,雄性,180~200 g,

2月龄;健康SPF级F344大鼠20只,雄性,180~200 g, 2月龄(北京维通利华公司)。在饲养期间,室内相对湿度48%,室温(19 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,大鼠自由饮水摄食。

HK-2细胞系(南京凯基生物),来源于人近端肾小管上皮细胞。人重组TNF- α (Peprotech公司,美国),硼替佐米(PS-341, Selleck公司,美国),抗Smurf抗体(Santa Cruz公司,美国),抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(Abcam公司,美国),抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(BD公司,美国)。二抗均购于北京中杉金桥公司。细胞培养相关试剂购于南京凯基生物公司。大鼠肌酐检测试剂盒购于南京建成生物试剂公司。Smurf1敲低慢病毒购于上海吉凯基因有限公司。高渗枸橼酸盐腺嘌呤溶液(HC-A)购于上海长征医院。

科凌显微手术台(镇江科凌显微仪器厂),Bio-Rad电泳仪(Bio-Rad公司,美国),Nikon显微镜(尼康公司,日本)。显微剪刀、显微镊子、组织剪、组织镊、持针器、显微持针器(上海医疗器械集团有限公司),10-0显微缝线(宁波灵桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及移植肾间质纤维化模型构建

随机将大鼠分成4组,其中2个对照组(Con组)为Lewis大鼠之间同系移植,同时给予生理盐水与硼替佐米治疗,Con+vehicle组为生理盐水治疗组,Con+Bortezomib组为硼替佐米治疗组。2个实验组(Allo组)为Lewis大鼠作为受体,F344大鼠作为供体,Allo+vehicle组为生理盐水治疗组,Allo+Bortezomib组为硼替佐米治疗组。

大鼠慢性移植肾纤维化模型构建手术方法同贾其磊等^[12]。硼替佐米自手术第1天起从尾静脉注射,剂量为0.2 mg/kg,每3 d 1次。大鼠移植14 d后从原位进入腹腔,结扎右肾动静脉后切除右侧肾脏。

1.2.2 大鼠血清肌酐检测

大鼠移植后2、4、8、12、16周处死后取血,分离血清。按南京建成生物试剂公司提供的试剂盒说

明书检测大鼠肌酐。

1.2.3 马松三色(Masson)染色

应用Masson染色检测移植肾纤维化程度。Masson染色方法同赵春春等^[6]。由2位病理科医生使用正置显微镜(Nikon 1600 L)在单盲状态下对移植肾纤维化程度进行分析。

1.2.4 免疫组织化学染色

免疫组织化学染色方法同赵春春等^[6]。每个切片随机选取5个带有肾小球的视野,应用图像分析软件(Image Pro Plus)计算各目标蛋白阳性染色面积占视野面积的百分比。

1.2.5 HK-2细胞培养及处理

取正常生长的HK-2细胞,培养于含10%胎牛血清(FBS)、1%双抗的DMEM/F12培养基。于每个6孔板中加入 1×10^5 个细胞,每孔中细胞生长至80%时,撤去带血清培养基。加入无血清培养基,饥饿12 h后,加入50 ng/mL TNF- α 分别处理0、6、12、24、48 h。其中TNF- α 处理0 h作为对照组。24 h后收集细胞提取细胞总蛋白。

取正常生长的HK-2细胞,于每个6孔板中加入 1×10^5 个细胞,每孔中细胞生长至80%时,撤去带血清培养基。加入无血清DMEM/F12培养基,饥饿12 h后,将细胞分为4组:①对照组:加入不完全培养液2 mL;②硼替佐米组:加入含30 nmol/L硼替佐米的培养液2 mL;③TNF- α 组:加入含50 ng/mL TNF- α 的培养液2 mL;④实验组:加入30 nmol/L硼替佐米和50 ng/mL TNF- α 的培养液2 mL。4组细胞分别在上述条件下培养24 h后,收集细胞提取细胞总蛋白。

1.2.6 构建Smurf1低表达HK-2细胞系

sh-Smurf1是具有敲低效率的慢病毒,sh-con为空载病毒。取正常生长的HK-2细胞,于每个6孔板中加入 1×10^5 个细胞。待细胞完全贴壁后,每个孔加入 1.5×10^6 个sh-Smurf1或sh-con病毒。感染8 h后更换新鲜DMEM/F12(10%FBS、1%双抗)培养基。感染48 h后观察绿色荧光强度,并通过嘌呤霉素进行阳性细胞筛选2~3 d。随后富集细胞进行培养,提取蛋白后检测Smurf1的表达。

1.2.7 Western blot

将各组蛋白分别上样,电泳后转膜至聚偏二氟乙烯膜上。将膜置于50 g/L的脱脂奶粉溶液中封闭2 h,加入一抗(E-cadherin、Smurf1、 α -SMA、GAPDH抗体稀释1:1 000)于4℃孵育过夜。TBST缓冲液充分洗膜后,加入相对应的二抗(稀释1:1 000)孵育1.5 h。TBST缓冲液洗膜3遍,每次15 min,曝光。采

用Image Pro Plus分析条带信号强度。以每组内参信号强度作为基准,计算各组蛋白相对表达量。

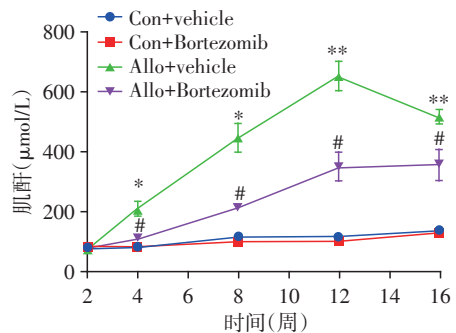
1.3 统计学方法

应用SPSS 22.0软件进行统计处理,计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析及两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义,每组实验重复3次或以上。

2 结果

2.1 各组大鼠血清肌酐比较

大鼠肾移植后14 d切除对侧肾脏,Con+vehicle组和Con+Bortezomib组大鼠肌酐始终稳定在一个较低的水平。Allo+vehicle组大鼠与Con+vehicle组大鼠肌酐相比明显升高,在4、8、12、16周时均有统计学差异($P < 0.05$,图1)。硼替佐米干预后,Allo+Bortezomib组大鼠肌酐较Allo+vehicle组大鼠显著降低,在4、8、12、16周时差异均具有统计学意义($P < 0.05$,图1)。



与Con+vehicle组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与Allo+vehicle组比较,# $P < 0.05$ 。

图1 各组大鼠血清肌酐数值

Figure 1 Serum creatinine of rats in different groups

2.2 各组大鼠肾间质纤维化程度比较

大鼠肾移植术后16周,Masson染色显示:与Con+vehicle组相比,Allo+vehicle组大鼠移植肾出现明显的肾间质纤维化,纤维化面积达到(70.00 \pm 5.12)%,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图2)。硼替佐米治疗后,与Allo+vehicle组相比,Allo+Bortezomib组大鼠移植肾间质纤维化面积显著降低(40.00 \pm 3.14)%,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图2)。

2.3 各组大鼠肾脏组织中TNF- α 、E-cadherin、 α -SMA、Smurf1的表达及分布

Allo+vehicle组大鼠肾脏组织中的TNF- α 阳性染色面积较Con+vehicle组大鼠明显升高($P < 0.01$,

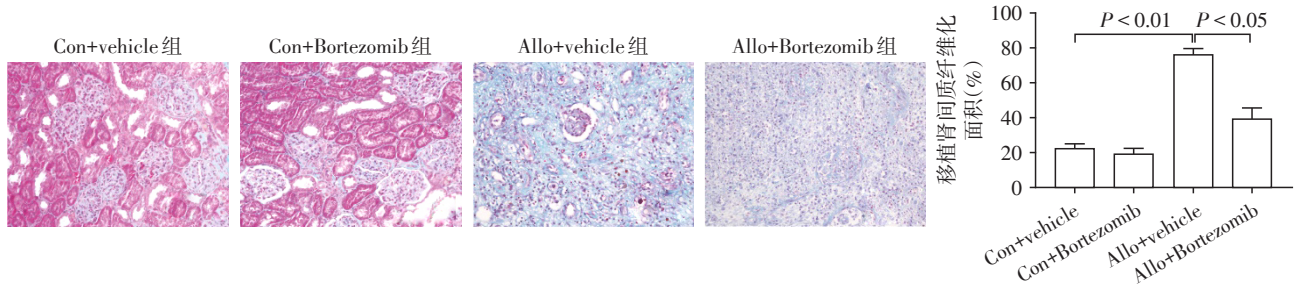


图2 各组大鼠移植肾间质纤维化面积($\times 200$)

Figure 2 Areas of renal interstitial fibrosis in graft kidney of rats in each group ($\times 200$)

图3)。免疫组化显示TNF- α 主要表达于肾间质与肾小管上皮细胞。硼替佐米干预后,与Allo+vehicle组相比,Allo+Bortezomib大鼠移植肾中的TNF- α 表达明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

Allo+vehicle组大鼠肾脏组织中的E-cadherin阳性染色面积较Con+vehicle组大鼠明显降低($P < 0.01$,图4)。免疫组化显示E-cadherin主要表达于肾小管。硼替佐米干预后,与Allo+vehicle组相比,Allo+Bortezomib组移植肾中E-cadherin的表达明显增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

Allo+vehicle组大鼠肾脏组织中 α -SMA的阳性染色面积较Con+vehicle组大鼠明显升高($P < 0.01$,图5)。免疫组化显示 α -SMA主要表达于肾小管上皮细胞和肾间质,肾小球也有少量表达。硼替佐米

干预后,与Allo+vehicle组相比,Allo+Bortezomib组大鼠移植肾中 α -SMA的表达明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图5)。

Allo+vehicle组大鼠肾脏组织中Smurf1的阳性染色面积较Con+vehicle组大鼠相比明显升高($P < 0.01$,图6)。免疫组化显示Smurf1主要表达于肾小管上皮细胞。硼替佐米治疗后,与Allo+vehicle组相比,Allo+Bortezomib组大鼠移植肾中Smurf1的表达明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图6)。

2.4 TNF- α 对于HK-2细胞E-cadherin、 α -SMA、Smurf1表达的影响

TNF- α 处理0 h时,HK-2细胞中E-cadherin表达较高,随着处理时间的增加E-cadherin的表达逐渐降低(图7)。与0 h组相比,24 h、48 h组E-cadherin

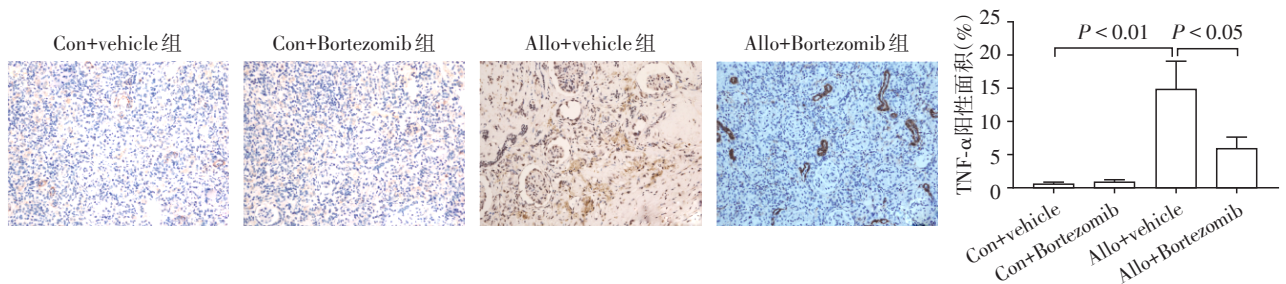


图3 各组大鼠移植肾中TNF- α 的表达($\times 200$)

Figure 3 The expression of TNF- α in graft kidney of rats in each group ($\times 200$)

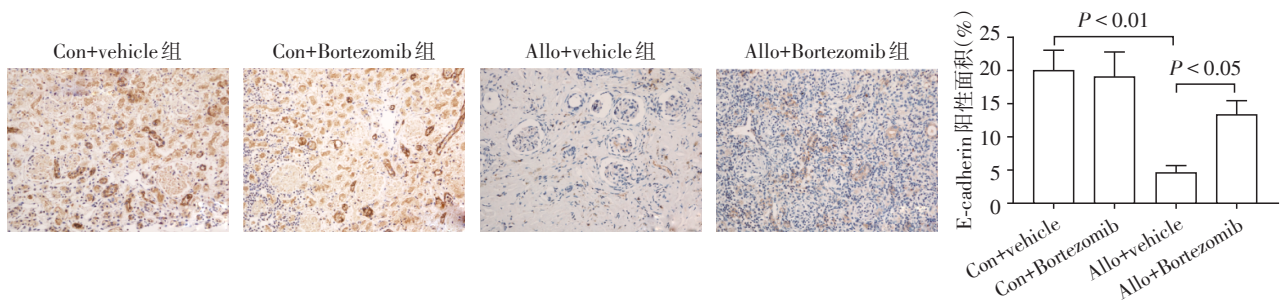


图4 各组大鼠移植肾中E-cadherin的表达($\times 200$)

Figure 4 The expression of E-cadherin in graft kidney of rats in each group ($\times 200$)

的表达显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

TNF- α 处理0 h时, HK-2细胞中 α -SMA、Smurf1表达较低,随着处理时间的增加 α -SMA、Smurf1的表达逐渐升高(图7)。与0 h组相比,24 h、48 h组 α -SMA的表达显著增高,24 h组Smurf1的表达显著增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 敲低 Smurf1 后 TNF- α 对于 HK2 细胞 E-cadherin、 α -SMA 表达的影响

sh-Smurf1 组 Smurf1 的表达较 sh-con 组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图8)。TNF- α 刺激后,sh-con 组 α -SMA 的蛋白表达量较未被刺激的 sh-con 细胞明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图8)。TNF- α 刺激后,sh-Smurf1 组细胞 α -SMA 的表达量较 sh-con 组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图8)。TNF- α 刺激后,sh-con 组 E-cad-

herin 的蛋白表达量较未被刺激的 sh-con 细胞明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图8)。TNF- α 刺激后,sh-Smurf1 组细胞 E-cadherin 的表达量较 sh-con 组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图8)。

2.6 TNF- α 和(或)硼替佐米对于 HK2 细胞中 E-cadherin、 α -SMA、Smurf1 表达的影响

与对照组相比,TNF- α 处理后 TNF- α 组 HK-2 细胞的 Smurf1、 α -SMA 表达明显增高,E-cadherin 的表达则明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图9)。同时加入 TNF- α 与硼替佐米的实验组,Smurf1、 α -SMA 的表达则较 TNF- α 组明显降低,E-cadherin 的表达则较 TNF- α 组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图9)。硼替佐米组细胞中 Smurf1、E-cadherin、 α -SMA 的表达较对照组无统计学差异($P > 0.05$)。

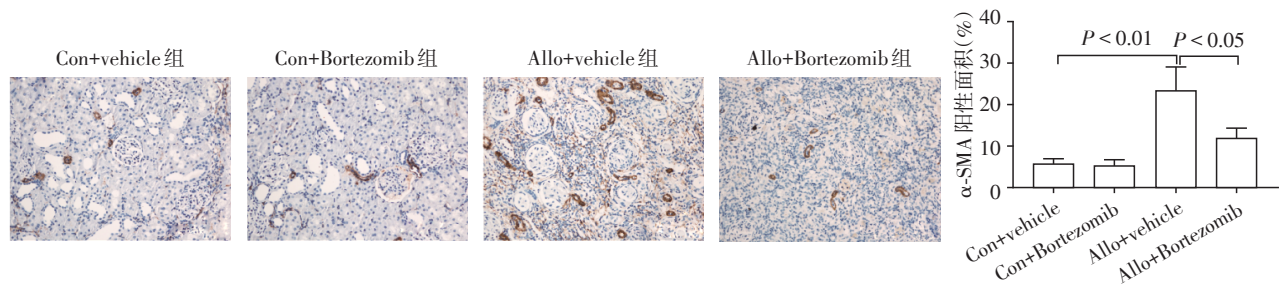


图5 各组大鼠移植肾中 α -SMA 的表达($\times 200$)

Figure 5 The expression of α -SMA in graft kidney of rats in each group($\times 200$)

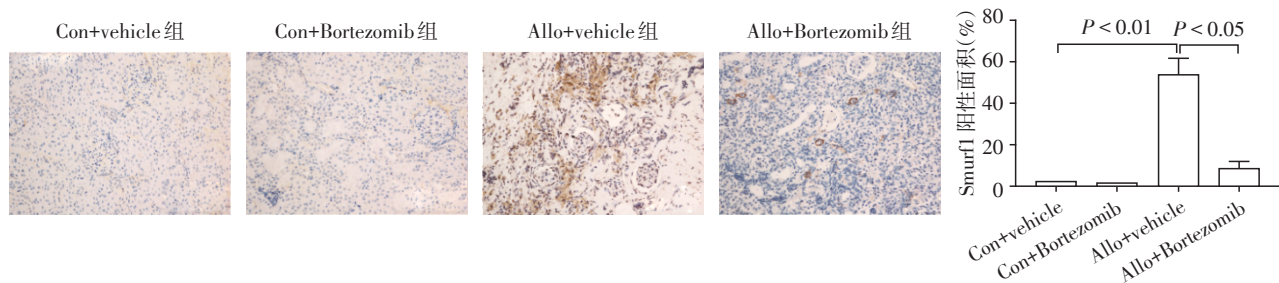


图6 各组大鼠移植肾中 Smurf1 的表达($\times 200$)

Figure 6 The expression of Smurf1 in graft kidney of rats in each group($\times 200$)

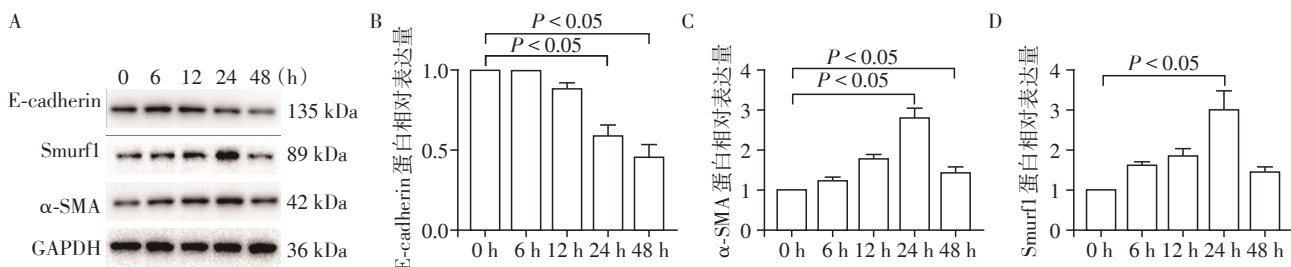


图7 TNF- α 刺激不同时间对 HK-2 细胞 E-cadherin、 α -SMA、Smurf1 表达的影响

Figure 7 The effect of TNF- α on expression of E-cadherin, α -SMA, Smurf1 in HK-2 cells at different times

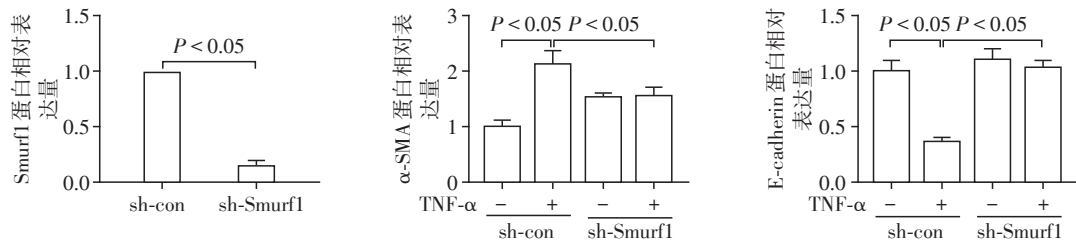
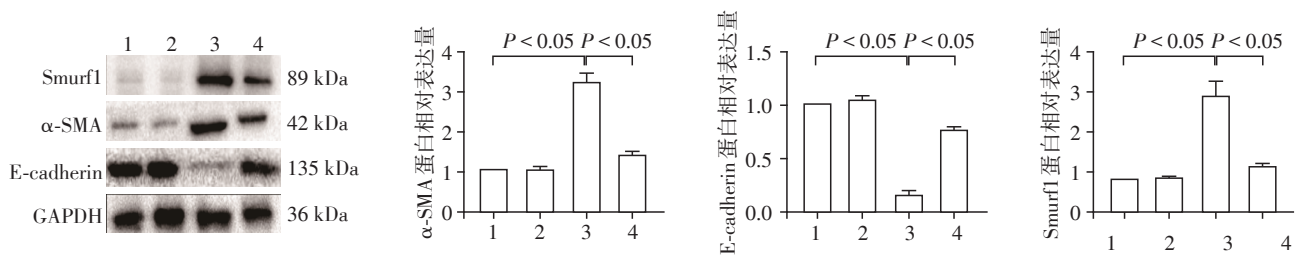


图8 敲低Smurf1后TNF-α对于HK-2细胞E-cadherin、α-SMA表达的影响

Figure 8 The effect of TNF-α on expression of E-cadherin, α-SMA in sh-Smurf1 cells



1:对照组;2:硼替佐米组;3:TNF-α组;4:实验组。

图9 TNF-α和(或)硼替佐米对于HK-2细胞中E-cadherin、α-SMA、Smurf1表达的影响

Figure 9 The effect of TNF-α and (or) Bortezomib on expression of E-cadherin, α-SMA, Smurf1 in HK-2 cells

3 讨论

近几十年来,由于手术和器官保存技术的进步以及免疫抑制剂方案的改善,肾移植术后的短期存活率有了较大提高,但是移植肾远期预后仍不甚理想。肾间质纤维化,主要表现为过多细胞外基质在肾间质沉积,而合成细胞外基质的关键细胞为肌成纤维细胞^[13]。研究表明,肾小管上皮细胞可以向肌成纤维细胞转化,是肾脏纤维化的重要机制^[14]。但EMT的机制仍不明确。硼替佐米在肾移植领域作为一种免疫抑制剂,近年来已经被广泛应用。有研究证明,硼替佐米可以预防肝、肾、皮肤组织纤维化的进程,但其在移植肾间质纤维化的确切作用及机制却鲜有报道。

Smurf1是泛素蛋白酶体途径中的一种E3泛素连接酶,研究证实其可在多种病理生理过程中如肿瘤转移、骨组织修复、实体器官纤维化中起重要作用^[7,15-16]。既往研究表明Smurf1参与了乳腺癌和慢性肾脏疾病中的EMT过程,但其在移植肾小管上皮细胞EMT过程中是否具有调控作用仍不清楚。本研究构建了移植肾纤维化模型。在体内实验中发现,TNF-α与Smurf1在发生纤维化的移植肾间质中明显高表达。同时,大鼠移植肾小管细胞发生EMT。因此,在体外实验中以HK-2为研究对象,TNF-α刺激诱导EMT后发现Smurf1的确随着TNF-α

刺激时间的延长而表达增高。敲低Smurf1的表达后,TNF-α诱导的EMT现象受到明显抑制。证实Smurf1在TNF-α诱导的EMT中起着重要的调控作用。

硼替佐米是一种临床用于治疗多发性骨髓瘤的蛋白酶体抑制剂。在肾移植领域,硼替佐米作为一种可诱导浆细胞凋亡从而治疗抗体介导的排异反应的药物而被广泛应用^[17]。既往有动物实验研究表明,硼替佐米可以显著改善肝脏、皮肤、慢性肾脏疾病中器官的纤维化。但硼替佐米对于移植肾的纤维化的作用仍未见报道。本研究在构建移植肾间质纤维化模型后,采用硼替佐米进行干预,发现硼替佐米可以显著改善移植肾间质纤维化,并且验证了我们体外实验的结果。硼替佐米在临床上的应用主要受其药物不良反应限制,包括粒细胞减少、感染、严重的皮肤湿疹等。在本研究中,将正常人体安全的硼替佐米剂量转换为大鼠的剂量,在体内研究中显示出了良好的抗移植肾纤维化作用,并且未见明显的不良反应。这显示出硼替佐米在临床治疗移植肾间质纤维化中的可行性。

总之,本研究在体内体外实验中证实了Smurf1可以调控TNF-α诱导的肾小管上皮细胞EMT现象。并且硼替佐米可以通过降低Smurf1与TNF-α的表达抑制TNF-α诱导的肾小管上皮细胞EMT,从而抑制移植肾间质纤维化。但硼替佐米对于Smurf1

是否存在直接作用仍有待继续研究。本研究发现了硼替佐米的抗移植肾间质纤维化作用,为临床移植肾间质纤维化的预防与治疗提供了新的思路。同时,Smurf1作为一个调控靶点,也为临床CAD的防治提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Chapman JR. What are the key challenges we face in kidney transplantation today? [J]. *Transplant Res*, 2013, 2 (Suppl 1):456-461
- [2] Colaneri J. An overview of transplant immunosuppression-history, principles, and current practices in kidney transplantation[J]. *Nephrol Nurs J*, 2014, 41(6):549-560
- [3] Cooper JE, Wiseman AC. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation[J]. *Clin Nephrol*, 2010, 73(5):333-343
- [4] Heemann U, Lutz J. Pathophysiology and treatment options of chronic renal allograft damage[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(10):2438-2446
- [5] Ryoo IG, Ha H, Kwak MK. Inhibitory role of the KEAP1-NRF2 pathway in TGFbeta1-stimulated renal epithelial transition to fibroblastic cells: a modulatory effect on SMAD signaling[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):932-965
- [6] Zhao C, Xu Z, Wang Z, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in epithelial-to-mesenchymal transition in transplanted kidney cells in recipients with chronic allograft dysfunction[J]. *Gene*, 2018, 642(4):483-490
- [7] Wei R, Guo J, Li M, et al. Smurf1 controls S phase progression and tumorigenesis through Wee1 degradation [J]. *FEBS Lett*, 2017, 591(8):1150-1158
- [8] Yu L, Liu X, Cui K, et al. SND1 acts downstream of TGF-beta1 and upstream of smurf1 to promote breast cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(7):1275-1286
- [9] Wang W, Luo J, Sheng W, et al. Proteomic profiling of radiation-induced skin fibrosis in rats: targeting the ubiquitin-proteasome system[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2016, 95(2):751-760
- [10] Saeki I, Terai S, Fujisawa K, et al. Bortezomib induces tumor-specific cell death and growth inhibition in hepatocellular carcinoma and improves liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(6):738-750
- [11] Koca SS, Ozgen M, Dagli F, et al. Proteasome inhibition prevents development of experimental dermal fibrosis [J]. *Inflammation*, 2012, 35(3):810-817
- [12] 贾其磊, 尚攀峰, 侯子珍, 等. 大鼠肾移植慢性排斥反应模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(3):18-21
- [13] Vadivel N, Tullius SG, Chandraker A. Chronic allograft nephropathy[J]. *Semin Nephrol*, 2007, 27(4):414-429
- [14] 谭若芸, 王晓华, 苏卫芳, 等. Smurf2在梗阻性肾病小鼠肾小管上皮细胞转分化形成中的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(11):1566-1572
- [15] Shimazu J, Wei J, Karsenty G. Smurf1 inhibits osteoblast differentiation, bone formation, and glucose homeostasis through serine 148[J]. *Cell Rep*, 2016, 15(1):27-35
- [16] Gong W, Chen Z, Zou Y, et al. CKIP-1 affects the polyubiquitination of Nrf2 and Keap1 via mediating Smurf1 to resist HG-induced renal fibrosis in GMCs and diabetic mice kidneys [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 115(12):338-350
- [17] Requião - Moura LR, de Sandes - Freitas TV, Marcelo - Gomes G, et al. Bortezomib in kidney transplant: current use and perspectives [J]. *Curr Drug Metab*, 2017, 18(12):1136-1146

[收稿日期] 2019-02-13