人肾微血管内皮细胞转分化在移植肾间质纤维化形成中的作用

汪 俊,刘绪忠,韩志坚,陶 俊,鲁 佩,吴 边,王子杰,殷长军,谭若芸*,顾 民* (南京医科大学第—附属医院泌尿外科肾移植中心,江苏 南京 210029)

[摘 要] 目的:探讨人肾微血管内皮细胞-间充质细胞转分化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT) 在移植肾间质纤维化形成中的意义及相关机制。方法:通过对南京医科大学第一附属医院 25 例慢性移植肾失功能(chronic allograft dysfunction, CAD)患者和 25 例正常人血生化指标进行分析,对移植肾组织标本和正常肾组织标本进行糖原(PAS)和马松三色(Masson)染色检查分析,观察两组肾功能、肾小管萎缩、肾小球塌陷及肾间质纤维化程度的差异。用免疫组织化学和间接免疫荧光双重染色方法检测两组肾组织标本中血管内皮细胞标志物 CD34 和肌成纤维细胞标志物 α-平滑肌细胞肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)以及转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)的表达和分布特点。进一步以原代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为体外研究对象,以 TGF-β1(5 ng/ml)作用 0~72 h,采用免疫印迹方法观察细胞中 CD34 和α-SMA 的表达变化。结果:与正常人相比,CAD 患者血清肌酐水平明显升高,PAS 和 Masson 三色染色结果显示CAD 患者移植肾组织中出现明显肾小管萎缩、肾小球塌陷及肾间质纤维化改变;半定量统计分析结果表明两者间存在统计学差异 (P<0.01)。免疫组织化学及间接免疫荧光染色结果表明,与正常组相比,CAD 组中 CD34 阳性表达率降低而α-SMA 及 TGF-β1 阳性表达率显著升高,CAD 组中部分肾小球和间质微血管内皮细胞呈 CD34 和α-SMA 双重染色阳性。体外研究显示,TGF-β1 作用于 HUVECs 细胞后,随着时间延长,CD34 表达逐渐降低而α-SMA 表达逐渐增多,与对照组相比,具有统计学差异(P<0.01)。结论:人肾微血管内皮细胞可能在 TGF-β1 介导下通过发生 EndMT 现象进而在移植肾间质纤维化形成中起重要作用。

[关键词] 肾移植;肾间质纤维化;微血管内皮细胞;TGF-β1

[中图分类号] R699.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)09-1149-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20140901

The role of renal microvascular endothelial-mesenchymal transition in transplant renal interstitial fibrosis formation

Wang Jun, Liu Xuzhong, Han Zhijian, Tao Jun, Lu Pei, Wu Bian, Wang Zijie, Yin Changjun, Tan Ruoyun*, Gu Min* (Kidney Transplantation Center, Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To explore the role and mechanism of human renal microvascular endothelial-mesenchymal transition (EndMT) in transplant renal interstitial fibrosis formation. **Methods**: Based on serum and renal allograft tissue samples from 25 cases of chronic renal allograft dysfunction (CAD) patients and 25 normal renal tissue samples and serum, we observed the changes of renal function and the degree of renal tubular atrophy, renal glomerular collapse and interstitial fibrosis by blood biochemical, periodic acid-schiff staining (PAS) and Mason trichromatic staining assays. Using immunohistochemical and indirect immunofluorescence double staining assays, we also detected the expression and distributions of vascular endothelial cell marker CD34 and myofibroblast marker α-Smooth muscle actin (α-SMA), and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in renal tissue samples of the two groups. Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) set as the object of study and stimulated by TGF-β1(5 ng/ml) respectively for 0~72 h *in vitro*. Western blotting was used to observe the expression of CD34 and α-SMA. **Results**: Compared with the normal group, serum creatinine levels in the CAD group increased significantly. The results of PAS and Masson staining showed that renal tubular atrophy, glomerular collapse and interstitial fibrosis were more apparent in transplanted kidneys of the CAD group. Indirect

[[]基金项目] 国国家自然科学基金青年基金项目 (81100532); 江苏省"科教兴卫"工程医学重点人才培养资助项目 (RC2011055);江苏省"六大人才高峰"资助项目(2010WSN-56,2011-WS-033);江苏省卫生厅面上项目(H2009907);江苏省"333高层次人才培养工程"项目(2011,2013)

^{*}通信作者(Corresponding author), E-mail:tanruoyun112@vip.sina.com; lancetgu@aliyun.com

immunofluorescence staining and immunohistochemical results showed that the positive stains of CD34 reduced, while the positive expression of α -SMA and TGF- β 1 increased significantly in the CAD group compared with the normal group. Indirect immunofluorescence double staining showed that the double positive stains of CD34 and α -SMA could be found in the parts of glomerular and interstitial microvascular endothelial cells in the CAD group. The results of Western blotting demonstrated that after treatment with TGF- β 1, the expression of CD34 reduced and α -SMA expression increased in an time-dependent mean in HUVECs as compared with the normal group(P < 0.01). **Conclusion**: Human renal microvascular EndMT may be mediated by TGF- β 1 and plays an important role in transplant renal interstitial fibrosis formation.

[Key words] renal transplantation; renal interstitial fibrosis; microvascular endothelial cells; TGF-β1

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09):1149-1156]

虽然近 30 年来大量新型免疫抑制剂的应用,使得肾移植受者短期存活率显著改善,但其长期存活率仍不足 50%[1]。如何提高肾移植术后的远期存活率一直肾移植学界关注的焦点问题。目前已知慢性移植肾失功能(chronic allograft dysfunction,CAD)是影响移植肾长期存活的首要原因,而移植肾间质纤维化作为 CAD 病理组织学主要特征之一,研究显示其是决定移植肾功能的关键因素[1-2]。其病理基础主要为细胞外基质产生过多,并在间质中异常沉积[3]。目前认为引起细胞外基质合成和分泌的关键效应细胞为肌成纤维细胞[3],但迄今为止,肌成纤维细胞的主要来源及激活机制仍未完全阐明[4]。

内皮细胞-间充质细胞转分化(endothelial-mesenchymal transtion, EndMT) 是指内皮细胞丢失其特异性标志物如 CD34 等,而重新获得间充质细胞标志物如 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA),进而转换成有活力的间充质细胞的过程^[5]。这一名词最早出现在胚胎心脏发育中,近来研究证实 EndMT 不仅在胚胎心血管发育、动脉粥样硬化、炎症、高血压、肿瘤转移和多种组织纤维化(如心脏、肺、角膜和肝等)等病理生理过程中起关键作用^[5-10],而且还可作为肌成纤维细胞来源之一在急性肾损伤和多种非移植性纤维性肾病的形成中起重要作用,且研究还指出在不同微环境中引起 EndMT 发生的关键介质也有所不同^[11-13]。但对于 EndMT 是否参与肾移植间质纤维化这一特殊的病理过程,目前国内外尚无相关报道。

为了证实肾微血管 EndMT 在移植肾间质纤维 化形成中的意义,本研究通过观察 25 例 CAD 受者 和 25 例正常人血生化、肾组织结构特征,以及肾组 织中 CD34、α-SMA 以及 TGF-β1 的表达、分布特点, 探究在 CAD 受患者移植肾组织的微血管内皮细胞 中是否存在 EndMT 现象,并阐明其与移植肾间质纤 维化形成之间的关系。并以原代脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)细胞为体外培养对象,以 TGF-β1 作用不同时间后,通过观察细胞中 CD34 和 α-SMA 蛋白表达的变化,进一步阐明肾微血管 EndMT 参与移植肾间质纤维化形成所涉及的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2010 年 1 月~2012 年 12 月南京医科大学第一附属医院 CAD 患者移植肾组织 25 例,年龄 21~60 岁,均为汉族,移植肾切除或者肾穿刺时间为移植术后 6 个月~11 年。另取 25 例正常肾组织标本作为正常对照组,均为汉族;该标本均来源于行肾癌根治术时远离肿瘤组织 5 cm 以上的正常肾脏组织。所有组织标本均采用福尔马林固定 24 h 后脱水制成石蜡块,并制备石蜡切片,每张切片厚 0.3 μm,烘干后避光常温保存,备不同染色实验使用。上述正常人和肾移植受者肾组织标本的收集均通过伦理审批并签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 糖原染色(PAS)和 Masson 三色染色

石蜡切片 PAS(MST-8038,福州迈新公司)染色 简述如下:石蜡切片脱蜡至水,蒸馏水洗,过碘酸酒精液 10 min,自来水冲洗 10 min,Schiff 氏液 10 min,流水冲洗 5 min,用苏木精染核 3 min(细胞核染色过深可用盐酸酒精分化),流水冲洗 5 min,常规脱水、封片。Masson 三色染色(MST-8004,福州迈新公司)简述如下:石蜡切片脱蜡至水,水洗,苏木精液染核 5~10 min, 公 2%冰醋酸水溶液浸洗片刻,1%磷钼酸水溶液分化 3~5 min,不经水洗,直接用苯胺蓝染5 min,以 0.2%冰醋酸水溶液浸洗片刻,常规脱水、封片。以正置显微镜(E600 Epi,Nicon公司,日本)观察,数码相机(Melville公司,美国)记录结果。由 2人

分别单盲下参照 Banff 07 评分标准分析两组肾组织标本中肾小管间质纤维化的程度[14], PAS 染色切片主要用于观察肾小管萎缩程度,而 Masson 三色染色切片主要观察肾间质纤维化程度。评判方法及标准如下:①肾小管萎缩:400 倍光镜下观察 PAS 染色结果,每张切片随机选择 10 个视野,计算肾小管萎缩占肾皮质区域的百分比,每个参数按 0~3 分评定(0=正常,1=轻度受损,2=中度受损,3=重度受损);②肾间质纤维化:400 倍光镜下观察 Masson 三色染色结果,每张切片随机选择 10 个视野,计算间质纤维化占肾皮质区域的百分比,每个参数按 0~3 分评定(0=正常,1=轻度受损,2=中度受损,3=重度受损)。

1.2.2 免疫组织化学染色

石蜡切片用 SP 法免疫组化染色:60℃烤片 20 min, 常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水;置 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH6.0)中煮沸 15~20 min, 自然冷却 20 min 以上,再用冷水冲洗,加快冷却至室温, PBS 冲洗 5 min × 3 次。正常羊血清工作液封闭, 37℃ 10 min, 倾去勿洗,滴加一抗 4℃ 冰箱孵育过夜,PBS 冲洗,5 min × 3 次(用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照);滴加辣根过氧化物酶标记二抗,37℃孵育 30 min,PBS 冲洗,5 min × 3 次;DAB 染色,自来水充分冲洗后,苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。以正置显微镜观察,400 倍光镜下每张切片分别由 2 人单盲下随机选择 10 个视野,数码相机记录结果。运用专业图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 测量视野内目标蛋白阳性染色面积百分比。

1.2.3 间接免疫荧光双重染色

冰冻切片固定后,水洗,山羊血清室温下封闭 30 min,将兔抗人 CD34(1:1 500,Abcan 公司,美国)和鼠抗人 α-SMA(1:1 000,Sigma 公司,美国)混合后 4℃过夜,充分水洗后将 TRITC 标记的山羊抗兔(1:200)和 FITC 标记的山羊抗鼠(1:200)二抗混合后 37℃下避光孵育 2 h,水洗后 DAPI 染核,水洗封片。血管内皮细胞标志物 CD34 用红色荧光标记,肌成纤维细胞标志物 α-SMA 用绿色荧光标记,以 DAPI 染核后即刻在激光共聚焦扫描显微镜(LSM710 CarlZeiss 公司,德国)下观察拍片。

1.2.4 HUVEC 原代细胞分离、培养、鉴定及处理

利用胶原酶IV从新生儿脐静脉上酶消化得到HUVECs,原代以20%FBS培养,运用内皮细胞标记物CD34间接免疫荧光染色对其进行鉴定,培养至第4代。TGF-β1刺激HUVECs 0~72 h后,PBS清洗

HUVECs, 去 PBS 加 0.1~1.0 ml 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂抽提总蛋白,按 BCA 蛋白质定量试剂盒(北京博凌科为公司)操作说明,测定蛋白浓度。1.2.5 免疫蛋白印迹

将准备好的蛋白和预染蛋白 Marker 分别上样,变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白至 Mark 条带分开。按 Bio-Rad 蛋白转移装置说明组装滤纸凝胶纤维素夹层,30 mA 恒流 4℃条件下,蛋白质转移到 PVDF 膜。膜在 5%脱脂奶粉溶液中室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合。然后加入一抗 4℃过夜,再加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。化学发光法检测,膜与化学发光底物孵育,经 X线片曝光显影。GIS1000 分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化。目的蛋白的灰度值除以内参的灰度值以校正误差,所得结果代表目的蛋白相对含量。

1.3 统计学方法

数据均采用均数 ± 标准差(\bar{x} ± s)表示,应用 SPSS 21.0 统计软件分析,两组间比较用组间 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P \le 0.05$ 认为 差异有统计学意义。每组实验独立重复 3 次或以上。

2 结 果

2.1 两组一般临床特点及血生化结果

CAD 组均经过移植肾切除(10 例)或者穿刺活检(15 例)病理确诊,平均年龄为(48.9 ± 6.2)岁,移植术后时间平均为(55.6 ± 8.1)个月,血肌酐平均值为(339.1 ± 22.5) μ mol/L。正常人(正常组)平均年龄为(39.8 ± 4.7)岁,血肌酐平均值为(97.7 ± 10.3) μ mol/L,CAD 组的血肌酐值与正常组相比差异有统计学意义(P < 0.05,表 1)。

2.2 两组肾组织结构特征

PAS 和 Masson 三色染色结果表明(图 1):正常 组肾脏组织中肾小球形态正常,肾小管排列规则清 晰,小管基底膜清晰完整,肾间质区域比较少。而 CAD 组肾组织中部分肾小球出现节段或球性硬化,肾小管出现明显萎缩,基底膜增厚,肾间质区域明显

表 1 正常人和 CAD 患者的临床特点

Table 1 Demographic data and clinical characteristics of patients

指标	正常组(n=25)	CAD组(n=25)	P值
年龄(岁)	39.8 ± 4.7	49.8 ± 6.2	>0.05
性别(男/女)	16/99	19/9	>0.05
血肌酐值(µmol/L)	97.7 ± 10.3	339.1 ± 22.5	< 0.01

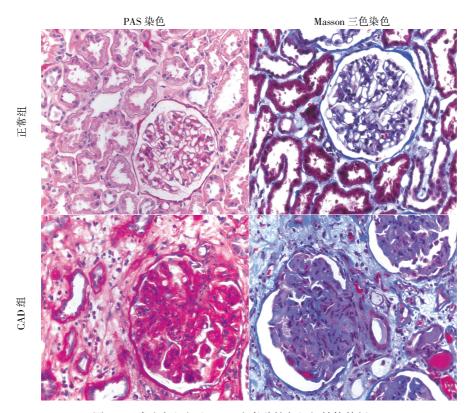


图 1 正常人肾组织和 CAD 患者移植肾组织结构特征(×400)

Figure 1 Morphological changes in kidney tissue of each group (x400)

增加,间质纤维化明显加重。

2.3 两组肾组织中肾小管间质纤维化程度

采用 Banff 07 移植肾活检诊断评分标准 [14],进一步评判两组肾组织标本中肾小管间质纤维化的程度,结果证实 CAD 组肾小管萎缩程度显著高于正常组 [(1.8 ± 0.81) 分 vs(0.3 ± 0.20)分,P<0.05];而 Masson 三色染色结果也表明,CAD 组肾间质纤维化的评分显著高于正常组 [(2.1 ± 0.78) 分 vs(0.2 ± 0.16)],两组之间均具有统计学差异(P<0.05)。

2.4 两组肾组织中 CD34 和 α-SMA 的表达及分布

免疫组化染色结果表明(图 2):在正常组肾脏组织中,肾小球和肾周微血管中 CD34 表达丰富,而 α -SMA 仅少量表达;相反,在 CAD 组肾组织中, CD34 表达明显下降,仅呈微量表达,而 α -SMA 表达则显著升高。进一步以半定量统计分析方法计算两组肾组织标本中 CD34 和 α -SMA 蛋白的阳性染色面积,结果显示:正常组 CD34 阳性表达率显著高于CAD 组 [(31.44 ± 3.21)% vs (6.82 ± 3.52)%,P < 0.05)];而 CAD 组 α -SMA 阳性表达率则较正常组明显增多[(36.76 ± 4.74)% vs (8.87 ± 3.67)%,P < 0.05](图 3)。借助间接免疫荧光双重染色方法,进一步观察了正常组和 CAD 组肾组织中血管内皮细

胞特异性标志物(CD34)和肌成纤维细胞特异性标志物(α-SMA)的表达和分布特点,结果发现(图 4):在正常肾组织微血管内皮细胞中 CD34 染色呈阳性(红色荧光),而α-SMA 染色呈阴性。相反,在 CAD组患者肾组织微血管内皮细胞中 CD34 阳性染色明显下降,而肾组织中α-SMA 阳性染色明显增加呈强阳性(绿色荧光);并且发现在肾小球和间质中部分微血管内皮细胞呈α-SMA 和 CD34 双重染色阳性(黄色荧光)。

2.5 两组肾组织中 TGF-β1 表达的变化

免疫组化染色结果表明(图 5A):在正常组肾脏组织中,TGF-β1 仅少量表达;而在 CAD 组肾组织中TGF-β1 表达则显著升高。进一步以半定量统计分析方法计算两组肾组织标本中 TGF-β1 的阳性面积百分比,结果显示:CAD 组肾组织中 TGF-β1 的表达量(15.36 ± 0.32)%明显高于正常组肾组织(5.73 ± 0.86)%,P<0.01,图 5B。

2.6 TGF- β 1 处理后对 HUVECs 细胞中 CD34 和 α -SMA 表达的影响

原代 HUVECs 经过鉴定后(图 6),培养传代至第 4 代,以 5 ng/ml TGF-β1 刺激 HUVECs 0~72 h后,提取蛋白进行免疫蛋白印迹试验,结果显示(图

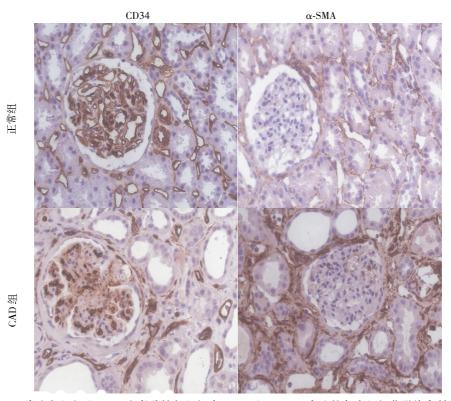


图 2 正常人肾组织和 CAD 患者移植肾组织中 CD34 和 α-SMA 表达的免疫组织化学染色结果(×400)

Figure 2 $\,$ Immunchistochemical detection the infiltration of CD34 and $\,$ α -SMA in kidney tissue(×400)

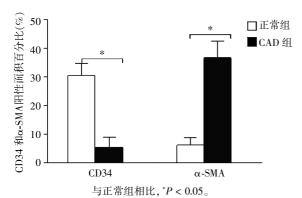


图 3 正常人肾组织和 CAD 患者移植肾组织中 CD34 和 α-SMA 阳性表达率的半定量统计分析结果

Figure 3 Positive area percentage of CD34 and $\alpha\text{-SMA}$ in kidney tissue of each group

7): 在对照组细胞中, HUVECs 特异性标志物 CD34 表达丰富,而间质细胞标志物 α -SMA 几乎不表达。而给予 TGF- β 1 处理后,随着时间的增加, CD34 表达逐渐减少,而 α -SMA 则开始表达且表达丰度以时间依赖性的方式显著增加(P < 0.01, n = 3)。

3 讨论

目前已知 CAD 是影响移植肾长期存活的首要 因素^[2],而移植肾间质纤维化形成等作为影响移植 肾功能的决定性因素,有研究显示其在移植后1年 的发生率高达 50%,2 年时达 70%, 而 10 年则接近 100%[15]。目前已知移植肾间质纤维化的病理组织学 基础为肾间质活化的肌成纤维细胞聚集而致细胞外 间质产生过多并在间质异常沉积[3,16]。尽管目前有较 多研究涉及移植肾间质纤维化形成机制, 但关于肌 成纤维细胞的主要来源及激活机制仍未完全阐明。 本研究首先在 CAD 患者纤维化移植肾组织中发现 在部分肾微血管内皮细胞中出现血管内皮细胞特异 性标志物 CD34 表达明显降低,而间质细胞特异性 标志物 α-SMA 及致纤维化细胞因子 TGF-β1 表达 显著升高。其次,在体外研究中也证实 TGF-β1 可诱 导原代 HUVEC CD34 表达的降低和 α-SMA 表达的 升高。因此,提示在 CAD 患者纤维化移植肾组织中, TGF-β1 可能通过诱导肾微血管内皮细胞向间充质 细胞表型的转化,进而促进移植肾间质纤维化的形 成。

近来有学者研究证实 EndMT 可在急性肾损伤和多种纤维性肾病中起重要作用[12-13,17],但对于EndMT 是否参与移植肾间质纤维化这一特殊的病理过程,目前国内外尚无相关报道。为了验证在移植肾间质纤维化形成过程中是否发生了肾微血管EndMT 现象,本研究首先观察了 25 例 CAD 患者和25 例正常人肾功能及其肾组织标本的 PAS 和Mas-

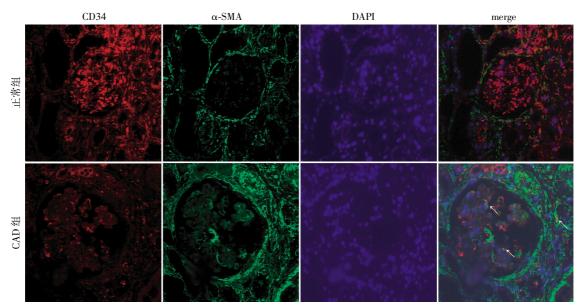
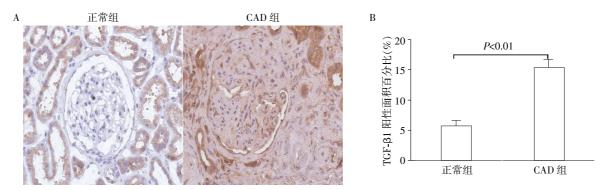
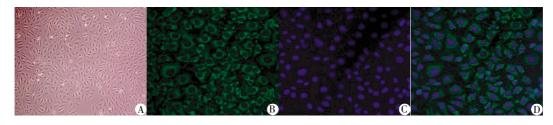


图 4 正常人肾组织和 CAD 患者移植肾组织中 CD34 和 α-SMA 表达的间接免疫荧光双重染色结果(×400) Figure 4 Immunofluorescence of the signal of CD34 and α-SMA in kidney fissue of each group (×400)



A:正常人肾组织和 CAD 患者移植肾组织中 TGF-β1 表达的免疫组织化学染色结果(\times 400); B:正常人肾组织和 CAD 患者移植肾组织中 TGF-β1 表达的半定量统计分析结果。

图 5 正常人和 CAD 患者肾组织中 TGF-β1 表达的免疫组织化学染色结果 Figure 5 The expression of TGF-β1 in kidney tissne of each group

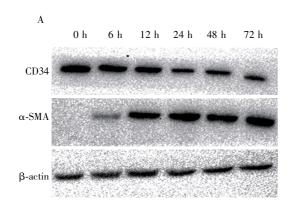


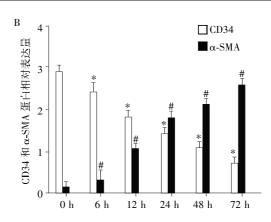
A:光镜下 HUVEC 细胞形态(×200);B:HUVEC 细胞 CD34 表达结果(×400);C:HUVEC 细胞 DAPI 染核(×400);D:merge 结果(×400)。 图 6 原代 HUVECs 光镜及免疫荧光鉴定(×400)

 $Figure~6~~Appraisal~of~original~HUVECs~by~light~microscope~and~immunofluorescence (\times 400)$

son 三色染色结果,结果证实两组人群无论是在肾功能水平还是肾组织间质纤维化程度之间均存在明显统计学差异。本研究进一步观察了两组肾组织标本中 CD34 和 α-SMA 的表达及分布特点,结果发现在 CAD 组肾组织标本的肾小球及肾微血管中,血管内皮细胞特异性标志物CD34 表达显著降低,而肌

成纤维细胞标志物α-SMA 的表达明显升高,进一步借助间接免疫荧光双重染色方法,还观察到肾小球和间质中部分微血管内皮细胞呈 α-SMA 和 CD34 双重染色。因此,上述研究结果提示在 CAD 患者移植肾间质纤维化中存在肾微血管 EndMT 现象,且其发生与移植肾间质纤维化的形成密切相关。





A:TGF-β1 处理对 HUVECs 中 CD34 和 α-SMA 蛋白表达影响的免疫蛋白印迹结果; B:TGF-β1 处理对 HUVECs 中 CD34 和 α-SMA 蛋白表达影响的半定量统计分析结果(CD34 蛋白: 与 0 h 对照组相比, *P < 0.05, n = 3; α-SMA 蛋白: 与 0 h 对照组相比, *P < 0.05, n = 3)。

图 7 TGF-β1 处理对 HUVECs 中 CD34 和α-SMA 蛋白表达的影响

Figure 7 The expression of CD34 and α -SMA in HUVECs after TGF- β 1 induced

目前已知 TGF-B1 是作用最强的致肾间质纤维 化的细胞因子之一, 在正常肾脏组织中仅有微量 TGF-β1 表达,且主要位于肾小管和肾小球。研究表 明,在肾小球肾炎、糖尿病等模型中,都有 TGF-β1 过量表达, 而 TGF-β1 的过度表达可引起各种组织 不可逆性纤维化发生[12,18-19]。近年来有研究发现 TGF-β1 与 CAD 的发生有密切关联^[20]。本研究通过 免疫组化染色方法观察了 CAD 组和正常组肾组织 标本中 TGF-β1 的表达情况,结果证实了在 CAD 组 肾组织中 TGF-β1 的表达显著升高。为了明确 TGFβ1 表达与肾微血管 EndMT 现象发生之间是否相 关,用酶消化法从新生儿脐带上提取原代 HUVEC, 并进行体外培养, 传代至第 5 代后, 以TGF-β1(5 ng/ ml)作用 0~72 h,收集细胞进行免疫蛋白印迹试验, 结果显示 TGF-β1 刺激可引起 HUVEC 特异性标志 物 CD34 表达以时间依赖性方式逐渐减少,而间质 细胞标志物 α-SMA 表达则逐渐增加。故上述研究结 果表明 TGF-β1 可通过诱导人肾微血管内皮细胞发 生 EndMT 现象,进而在移植肾间质纤维化中起作用。

总之,本研究证实在 CAD 患者移植肾间质纤维 化组织中存在肾微血管 EndMT 现象,同时还证实 TGF-β1 高表达诱导血管内皮细胞发生 EndMT。因 此,本研究结果提示肾微血管内皮细胞可能通过 TGF-β1 的介导发生表型的转分化而成为肌成纤维 细胞,进而在移植肾间质纤维化形成中起重要作用。 但对于 TGF-β1 在人肾微血管 EndMT 形成中的调 控机制仍有待进一步研究,同时其他致纤维化因子 如结缔组织生长因子、肿瘤坏死因子、成纤维生长因 子-2、单核细胞趋化因子-1 及碱性成纤维细胞生长 因子等是否也在人肾微血管 EndMT 形成中起作用 也需进一步研究^[21-24]。深入研究移植肾微血管内皮细胞 EndMT 形成的调控机制,不仅有利于从分子生物学水平深入理解移植肾间质纤维化的形成,而且为将来预防移植肾间质纤维化形成提供新线索。

[参考文献]

- [1] Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy [J]. Nat Rev Nephrol, 2009, 5 (9): 513-519
- [2] Mas VR, Archer KJ, Scian M, et al. Molecular pathways involved in loss of graft function in kidney transplant recipients[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10 (3):269-284
- [3] Strutz F. Pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in chronic allograft dysfunction [J]. Clin Transplant, 2009, 23(Suppl 21):26-32
- [4] Cornaire E, Dubois-Xu YC, Rondeau E, et al. Interstitial fibrosis in renal grafts: On the way to a better detection [J]. Nephrol Ther, 2010, 6(6): 494-498
- [5] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis
 [J]. Nat Med, 2007, 13(8):952-961
- [6] Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts [J]. Cancer Res, 2007, 67 (21):10123-10128
- [7] Hashimoto N,Phan SH,Imaizumi K,et al. En dothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43 (2): 161-172
- [8] Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, et al. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium [J]. Mol Vi, 2008, 14 (3):

2272-2281

- [9] Kitao A, Sato Y, Sawada-Kitamura S, et al. Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factorbeta1/Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension [J]. Ame J Pathol, 2009, 175(2):616-626
- [10] Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression [J]. Br J Cancer, 2008, 99(9):1375–1379
- [11] Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. JASN, 2008, 19(12):2282–2287
- [12] Barnes JL, Glass WF. Renal interstitial fibrosis; a critical evaluation of the origin of myofibroblasts [J]. Contri Nephrol, 2011, 169(1); 73-93
- [13] Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300(3): F721–33
- [14] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions[J]. Am J Transplant, 2008, 8(4):753-760
- [15] Waanders F, Rienstra H, Boer MW, et al. Spironolactone ameliorates transplant vasculopathy in renal chronic transplant dysfunction in rats [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(5): F1072-1079
- [16] Carrillo LM, Arciniegas E, Rojas H, et al. Immunolocalization of endocan during the endothelial-mesenchymal

- transition process[J]. EJH,2011,55(2):e13
- [17] Li J, Bertram JF. Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis [J]. Nephrology, 2010, 15(5):507-512
- [18] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. JASN, 2010, 21(2):212-222
- [19] van Meeteren LA, ten Dijke P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta [J]. Cell Tissue Research, 2012,347(1):177-186
- [20] Li Z, Jimenez SA. Protein kinase Cdelta and c-Abl kinase are required for transforming growth factor beta induction of endothelial-mesenchymal transition *in vitro*[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(8):2473–2483
- [21] Lee JG, Ko MK, Kay EP. Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1beta-induced FGF-2 in corneal endothelial cells[J]. Exp Eye Res, 2012, 95(1):35–39
- [22] Fleenor BS, Marshall KD, Rippe C, et al. Replicative aging induces endothelial to mesenchymal transition in human aortic endothelial cells:potential role of inflammation [J]. J Vasc Res, 2012, 49(1):59-64
- [23] Li Z, Feng L, Wang CM, et al. Deletion of RBP-J in adult mice leads to the onset of aortic valve degenerative diseases[J]. Mol Bio Rep, 2012, 39(4):3837-3845
- [24] Balachandran K, Alford PW, Wylie-Sears J, et al. Cyclic strain induces dual-mode endothelial-mesenchymal transformation of the cardiac valve[J]. Proc Nat Acad Sci US-A, 2011, 108(50):19943-19948

「收稿日期] 2014-04-07