

## 绿原酸抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 人肾小管上皮细胞系 HK-2 纤维化因子表达

孙梦奎, 李守林\*

(深圳市儿童医院 泌尿外科, 广东 深圳 518038)

**摘要:**目的 探讨绿原酸对 TGF- $\beta$ 1 诱导的人肾小管上皮 HK-2 细胞表达纤维化因子的变化及其分子机制。方法 体外培养 HK-2 细胞。用 CCK-8 法检测细胞增殖;用免疫细胞荧光法检测 collagen I、collagen III 的表达;RT-qPCR 检测纤维化相关基因 mRNA 的表达;用 Western blot 检测 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的表达。结果 在不同时间节点(0、12、24、36、72 h)各浓度(0、20、40、80  $\mu$ g/mL)CGA 组细胞增殖无显著差异。与对照组相比,TGF- $\beta$ 1 处理组 collagen I、collagen III、 $\alpha$ -SMA、vimentin、TGF- $\beta$ 1、snail 及 slug 的表达比对照组明显增加( $P < 0.05$ ),但 E-cadherin 的表达降低( $P < 0.05$ )。CGA 能够显著降低 TGF- $\beta$ 1 对上述分子表达的影响。同时,与 TGF- $\beta$ 1 处理组相比,CGA 能够降低 HK-2 细胞 TLR4、p-I $\kappa$ B $\alpha$  及 p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达( $P < 0.05$ )。结论 CGA 能够抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的人肾小管上皮 HK-2 细胞表达纤维化因子的增加,其分子机制与调节 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**关键词:** 绿原酸;人肾小管上皮细胞;纤维化因子;TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号:R34 文献标志码:A

## Chlrogenic acid inhibits TGF- $\beta$ 1-induced fibrotic factors expression of human renal tubular epithelial cell line HK-2

SUN Meng-kui, LI Shou-lin\*

(Department of Urology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of Chlrogenic acid (CGA) on TGF- $\beta$ 1 induced the change of human renal tubular epithelial HK-2 cell fibrotic factors change and the underlying mechanism. **Methods** HK-2 cells were cultured *in vitro*. CCK-8 assay was conducted to detect cell proliferation. Immunofluorescence assay was used to detect the expression of collagen I and collagen III. RT-qPCR was used to detect mRNA expression of HK-2 cell fibrosis related genes. Western blot assay was carried out to detect protein expression of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. **Results** The proliferation rate of cells in different CGA treated groups at different time points showed no differences. The expression of collagen I, collagen III,  $\alpha$ -SMA, vimentin, TGF- $\beta$ 1, snail and slug increased while E-cadherin decreased in TGF- $\beta$ 1 group ( $P < 0.05$ ). CGA reversed these expression changes induced by TGF- $\beta$ 1. Further, CGA inhibited TGF- $\beta$ 1 induced TLR4, p-I $\kappa$ B $\alpha$  and p-NF- $\kappa$ B expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Chlrogenic acid can inhibit TGF- $\beta$ 1 induced increase of fibrotic factors expression in human renal tubular epithelial HK-2 cell through suppressing activation of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words:** chlrogenic acid; human renal tubular epithelial cell; fibrotic factor; TLR4/NF- $\kappa$ B signal pathway

收稿日期:2021-01-11 修回日期:2021-08-24

基金项目:深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201612013);深圳市重点专科(2020-2024)(SZXK035)

\* 通信作者 (corresponding author): ettylishoulin@163.com

肾脏纤维化(renal fibrosis)包括肾小球硬化、肾小管萎缩、肾间质纤维化及细胞外基质异常分布等,是各类肾脏疾病、损伤进展到终末期时的主要病理改变之一。探索如何延缓甚至逆转肾脏纤维化从而更好的保护肾脏功能一直是研究的热点。绿原酸(chlorogenic acid, CGA)是由咖啡酸和奎宁酸聚合所形成的酯酸,是植物经有氧呼吸过程产生的苯丙素类化合物。有报道称其能够有效的缓解肺<sup>[1]</sup>、肝脏<sup>[2]</sup>等器官的纤维化。但是,其对肾脏纤维化是否有影响却暂无相关报道。肾脏纤维化的一个显著特点就是肾小管上皮细胞表达胶原纤维蛋白 I 和 III 增加。本研究拟探索 CGA 对人肾小管上皮 HK-2 细胞表达纤维化因子的影响及其潜在分子机制,为临床上治疗肾脏纤维化提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肾小管上皮细胞系 HK-2(ATCC 公司);细胞培养基 DMEM/F-12(Hyclone 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);绿原酸(Sigma-Aldrich 公司);重组人 TGF- $\beta$ 1(PeproTech 公司);TRIzol 试剂(Invitrogen 公司);RNA 反转录试剂盒(TaKaRa 公司);目的基因上下游引物(上海生工生物工程技术有限公司);TLR4(Toll-like receptor 4/nuclear factor  $\kappa$ B)、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B 及 GAPDH 抗体(Abcam 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及分组:于含 10%胎牛血清、青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 IU/mL 的 DMEM/F-12 培养基中培养人肾小管上皮 HK-2 细胞,培养条件为 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞孵育箱中。CGA 对 HK-2 细胞增殖的影响中,细胞分组为 0、20、40、80  $\mu$ g/mL 的 CGA 分别处理细胞 0、12、24、36、72 h,共 20 组。后续实验分组:对照组(磷酸盐缓冲液处理 48 h),TGF- $\beta$ 1 组(5 ng/mL 人重组 TGF- $\beta$ 1 处理 48 h)。CGA 组(20、40、80  $\mu$ g/mL 的 CGA 处理 48 h)。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖:将处于对数增殖期的 HK-2 细胞混悬液以  $2 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L。静置 24 h 待细胞贴壁后,用 100  $\mu$ L 的细胞培养基 DMEM/F-12 与 10  $\mu$ L 的

CCK-8 试剂混匀,加入各孔之中并与细胞孵育 1 h,在激发波长设为 450 nm 的酶标仪下测定各孔吸光度值(absorbance value, A)。

1.2.3 Real-time PCR 检测 mRNA 表达:收集各组 HK-2 细胞,添加 Trizol 细胞裂解液 1 mL 提取总 RAN。用分光光度计检测 RNA 吸光度值。波长在 260 nm 的吸光值/280 nm 的吸光度值( $A_{260}/A_{280}$ )位于 1.8~2.1 为合格样本,可用于后续实验。根据 RNA 反转录试剂盒说明书,用 20  $\mu$ L 反应体系进行反转录,获得模板 cDNA。采用 20  $\mu$ L 反应体系以上述 cDNA 为模板进行扩增。其中 cDNA 为 4  $\mu$ L,上、下游引物分别为 1  $\mu$ L,SYBR 混合物 10  $\mu$ L,超纯水 4  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s,70  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共计 30 个循环。以 GAPDH 为内参,2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算 mRNA 的相对表达量。上下游目的基因引物。Collagen I 上游序列 5'-GCCAAGACGAAGACATCCCA-3',下游序列 5'-CACCATCATTTCCACGAGCA-3';collagen III 上游序列 5'-GAGCTGGCTACTTCTCGCTC-3',下游序列 5'-CCTTGACCATTAGGAGGGCG-3';E-cadherin 上游序列 5'-GGGGTCTGTCATGGAAGGTG-3',下游序列 5'-CAAAATCCAAGCCCGTGGTG-3'; $\alpha$ -SMA 上游序列 5'-AAAGCAAGTCCTCCAGCGTT-3',下游序列 5'-TTAGTCCCCGGGATAGGCAA-3';vimentin 上游序列 5'-CCGCACATTCGAGCAAAGAC-3',下游序列 5'-AAGCGCACCTTGTCGATGTA-3';TGF- $\beta$ 1 上游序列 5'-ATGGTGGAAACCCACAACGA-3',下游序列 5'-ATGACACAGAGATCCGCAGTC-3';snail 上游序列 5'-CGAGTGGTTCTTCTGCGCTA-3',下游序列 5'-GGGCTGCTGGAAGGTAAACT-3';slug 上游序列 5'-ACGCCTCCAAAAAGCCAAAC-3',下游序列 5'-ACTC ACTCGCCCCAAAGATG-3';GAPDH 上游序列 5'-TTGCAACCGGGAAGGAAATG-3',下游序列 5'-TGGAATTTGCCATGGGTGGA-3'。

1.2.4 免疫荧光检测细胞胶原纤维的表达:将处于对数增殖期的 HK-2 细胞混悬液以  $2 \times 10^4$  个/mL 接种于 6 孔板爬片。4%多聚甲醛固定 10 min,0.5%的 Triton X-100 透膜 10 min,向玻片滴加山羊血清封闭 30 min,然后滴加一抗孵育过夜。Collagen I 和 collagen III 的浓度均为 1:50。向玻片上滴加荧光二抗,湿盒中避光孵育 1 h。滴加

DAPI 避光孵育 5 min, 然后在荧光显微镜下观察并采集图像, 红色荧光为阳性表达。每张切片随机取 5 个视野, 采用 Image Pro Plus 6.0 图像处理分析软件计算高倍镜视野下荧光密度值。

**1.2.5 Western blot 检测目的蛋白表达:** 添加 RIPA 裂解 HK-2 细胞并提取总蛋白, 使用 BCA 法进行蛋白定量。制备 SDS/PAGE 凝胶, 各孔加入 20  $\mu\text{L}$  蛋白样。电泳分离蛋白, 电转蛋白至硝酸纤维素膜。5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入抗体 TLR4 (1:1 000)、p-I $\kappa$ B $\alpha$  (1:1 000)、I $\kappa$ B $\alpha$  (1:1 000)、p-NF- $\kappa$ B (1:1 000)、NF- $\kappa$ B (1:1 000) 及 GAPDH (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 5 min/次。添加二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 5 min/次。采用 ECL 化学发光和曝光显影。以 GAPDH 为内参。

### 1.3 统计学分析

数据处理采用 SPSS 22.0 软件, 所有实验均设 4 个复孔重复 4 次并采集数据, 正态分布计量

资料以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 多组样本比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 student-*t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的绿原酸 (CGA) 对 HK-2 细胞增殖的影响

各浓度 (0、20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 绿原酸组细胞增殖之间无显著差异 (表 1)。

### 2.2 CGA 对 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HK-2 细胞表达纤维化相关基因及蛋白的影响

与对照组相比, TGF- $\beta$ 1 组 collagen I、collagen III、 $\alpha$ -SMA、vimentin、TGF- $\beta$ 1、snail 及 slug 表达增加, 而 E-cadherin 表达降低 ( $P<0.01$ )。与 TGF- $\beta$ 1 组相比, 不同浓度的 CGA 能够降低 collagen I、collagen III、 $\alpha$ -SMA、vimentin、TGF- $\beta$ 1、snail 及 slug 表达, 而增加 E-cadherin 表达 ( $P<0.01$ ) (图 1~2, 表 2~4)。

表 1 CGA 对 HK-2 细胞增殖的影响

Table 1 Effect of chlorogenic acid on proliferation of HK-2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

time/hour	A value			
	CGA (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CGA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CGA (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	CGA (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
0	0.43 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.05
12	0.54 $\pm$ 0.06	0.53 $\pm$ 0.02	0.53 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.05
24	0.64 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.04
36	0.96 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.07
48	1.37 $\pm$ 0.08	1.38 $\pm$ 0.06	1.39 $\pm$ 0.07	1.42 $\pm$ 0.09
60	1.67 $\pm$ 0.05	1.69 $\pm$ 0.08	1.64 $\pm$ 0.05	1.62 $\pm$ 0.09
72	1.72 $\pm$ 0.05	1.74 $\pm$ 0.07	1.76 $\pm$ 0.08	1.73 $\pm$ 0.05

表 2 CGA 对 HK-2 细胞 collagen I、collagen III、E-cadherin 及  $\alpha$ -SMA mRNA 表达的影响

Table 2 Effect of chlorogenic acid on collagen I, collagen III, E-cadherin and  $\alpha$ -SMA expression of HK-2 cells in mRNA level ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

group	relative mRNA expression level			
	collagen I	collagen III	E-cadherin	$\alpha$ -SMA
control	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.907
TGF- $\beta$ 1	1.70 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>	1.81 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>	0.52 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	1.91 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>
TGF- $\beta$ 1 + CGA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1.61 $\pm$ 0.05	1.64 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>	0.66 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	1.68 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>
TGF- $\beta$ 1 + CGA (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1.46 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	1.52 $\pm$ 0.12 <sup>#</sup>	0.74 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	1.53 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>
TGF- $\beta$ 1 + CGA (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1.23 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	1.32 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.87 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>	1.32 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>

<sup>\*</sup> $P<0.05$  compared with control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with TGF- $\beta$ 1 group.

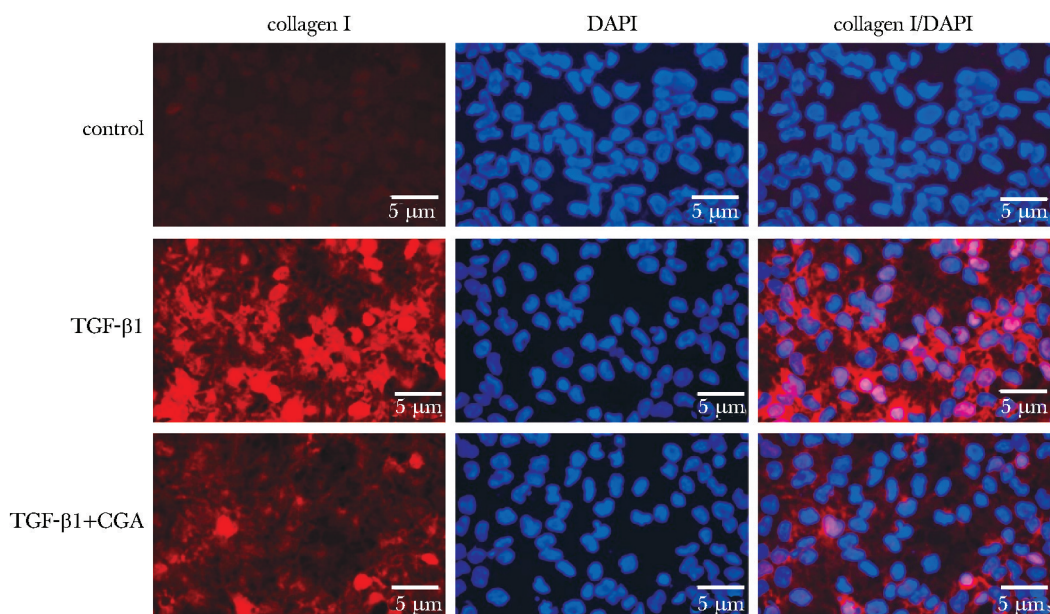


图 1 CGA 对 HK-2 细胞 collagen I 表达的影响

Fig 1 Effect of chlorogenic acid on collagen I expression of HK-2 cells

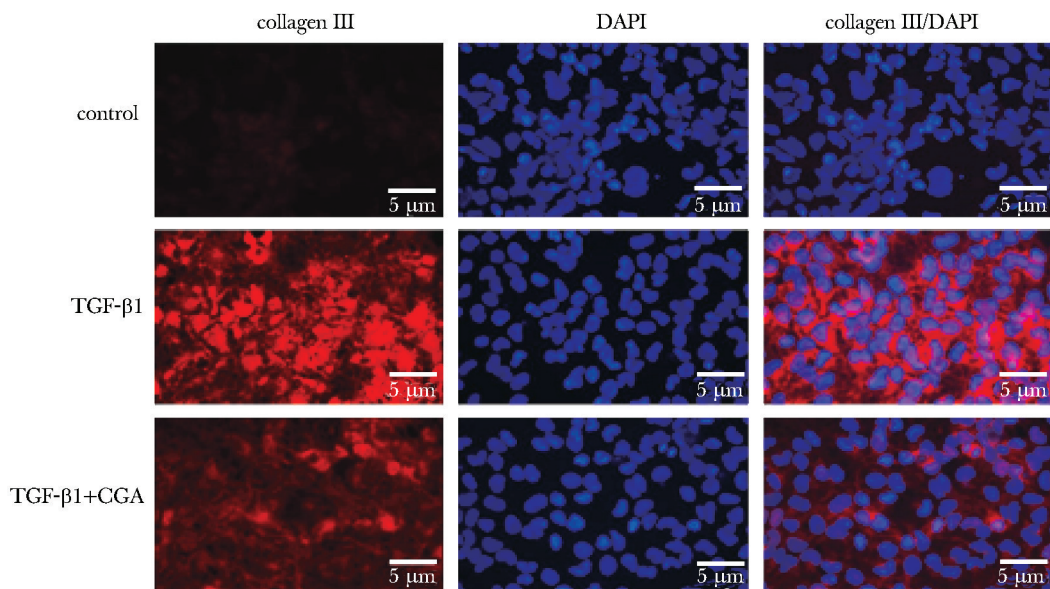


图 2 CGA 对 HK-2 细胞 collagen III 表达的影响

Fig 2 Effect of chlorogenic acid on collagen III expression of HK-2 cells

### 2.3 CGA 对 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比, TGF- $\beta$ 1 组 TLR4、p-I $\kappa$ B $\alpha$  及 p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达量增加 ( $P < 0.01$ )。与 TGF- $\beta$ 1 组相比, 绿原酸 (80  $\mu$ g/mL) 组的 HK-2 细胞 TLR4、p-I $\kappa$ B $\alpha$  及 p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ) (图 3, 表 5)。

### 3 讨论

肾脏纤维化是所有慢性肾病或损伤如慢性肾小球肾炎、糖尿病肾病等发展至终末期肾病的共同病理改变。截至目前, 肾脏纤维化的机制尚未完全明了。寻找有效的抗肾脏纤维化手段是目前的研究热点。

表3 CGA对HK-2细胞vimentin、TGF-β1、snail及slug mRNA表达的影响

Table 3 Effect of chlorogenic acid on vimentin, TGF-β1, snail and slug mRNA expression of HK-2 cells in mRNA level ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

group	vimentin	TGF-β1	snail	slug
control	1.00±0.03	1.00±0.06	1.00±0.09	1.00±0.03
TGF-β1	1.76±0.05 <sup>*</sup>	1.83±0.05 <sup>*</sup>	1.74±0.07 <sup>*</sup>	1.98±0.13 <sup>*</sup>
TGF-β1 + CGA (20 μg/mL)	1.63±0.12	1.59±0.05 <sup>#</sup>	1.61±0.08	1.64±0.11 <sup>#</sup>
TGF-β1 + CGA (40 μg/mL)	1.42±0.03 <sup>#</sup>	1.47±0.07 <sup>#</sup>	1.49±0.12 <sup>#</sup>	1.52±0.15 <sup>#</sup>
TGF-β1 + CGA (80 μg/mL)	1.18±0.06 <sup>#</sup>	1.12±0.06 <sup>#</sup>	1.23±0.02 <sup>#</sup>	1.28±0.13 <sup>#</sup>

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  compared with control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  compared with TGF-β1 group.

表4 CGA对HK-2细胞collagen I和collagen III表达的影响

Table 4 Effect of chlorogenic acid on collagen I and collagen III expression of HK-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

group	A value	
	collagen I	collagen III
control	0.23±0.02	0.16±0.01
TGF-β1	2.13±0.31 <sup>*</sup>	1.93±0.27 <sup>*</sup>
TGF-β1 + CGA (80 μg/mL)	1.17±0.19 <sup>#</sup>	0.95±0.14 <sup>#</sup>

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  compared with control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  compared with TGF-β1 group.

CGA广泛分布于各类植物中,多项研究表明,CGA具有抗氧化<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>的功能。除此之外,研究表明CGA能够有效的抑制肝脏纤维化,其具体机制与调节TGF-β1/Smad7信号通路<sup>[2]</sup>、抑制TLR4/MyD88/NF-κB信号通路均有关系<sup>[5]</sup>。但是,CGA是否能够抑制肾小管纤维化却并无报道。

TGF-β1诱导HK-2细胞分泌纤维化因子是常用的肾脏纤维化细胞模型<sup>[6]</sup>。Collagen I和collagen III是肾间质重要的细胞基质成分,随着肾脏纤维化

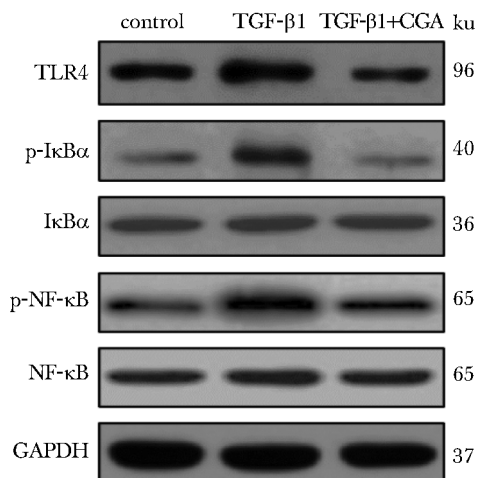


图3 CGA对TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of chlorogenic acid on expression of TLR4/NF-κB signal pathway related protein

的进展,含量会显著增加<sup>[7]</sup>。细胞外基质出现异常积聚是肾脏纤维化特征性的表现之一,部分源自于肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞的合成和分泌<sup>[8]</sup>。本研究发现,TGF-β1预处理后的人肾小管上皮HK-2细胞collagen I和collagen III表达增加,

表5 CGA对TLR4/NF-κB信号通路相关蛋白表达的影响

Table 5 The effect of chlorogenic acid on expression of TLR4/NF-κB signal pathway related protein ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

group	protein expression level				
	TLR4	p-IκBα	IκBα	p-NF-κB	NF-κB
control	0.45±0.02	0.23±0.03	0.34±0.04	0.30±0.01	0.38±0.05
TGF-β1	0.73±0.04 <sup>*</sup>	0.42±0.01 <sup>*</sup>	0.36±0.05	0.52±0.04 <sup>*</sup>	0.41±0.03
TGF-β1 + CGA (80 μg/mL)	0.52±0.03 <sup>#</sup>	0.24±0.01 <sup>#</sup>	0.37±0.03	0.37±0.03 <sup>#</sup>	0.40±0.04

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  compared with control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  compared with TGF-β1 group.

绿原酸处理 HK-2 细胞,能够降低 collagen I 和 collagen III 的表达,减少细胞外基质的产生,抑制肾脏纤维化。

研究表明,肾脏纤维化时肾小管细胞能够向间质细胞分化,转变为成纤维细胞,成为细胞外基质的一个重要来源<sup>[9]</sup>。上皮细胞向间质细胞转化表现为细胞黏附分子 E-cadherin 表达降低, $\alpha$ -SMA 表达增加,细胞骨架发生变化,vimentin 表达增加,snail、slug 表达增加<sup>[10-11]</sup>。本研究中,CGA 能够有效的抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HK-2 细胞上皮间质化,从而抑制肾小管上皮纤维化。

有研究证实 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路参与肾脏纤

维化<sup>[12]</sup>。脐带来源的间充质干细胞的条件培养基能够抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,从而保护大鼠部分输尿管梗阻导致的肾小管上皮的纤维化<sup>[13]</sup>。所以抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路,能够有效的保护肾小管上皮细胞,减少细胞纤维化。同时,大量研究表明,CGA 能够有效的抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活<sup>[5]</sup>。本研究证实,CGA 能有效的抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路。

综上所述,CGA 能够有效的抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的人肾小管上皮 HK-2 细胞分泌纤维化因子,其分子机制与抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路激活有关。

## 参考文献:

- [1] Wang YC, Dong J, Nie J, *et al.* Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by chlorogenic acid through endoplasmic reticulum stress inhibition[J]. *Apoptosis*, 2017, 22:1147-1156.
- [2] Yang F, Luo L, Zhu ZD, *et al.* Chlorogenic acid inhibits liver fibrosis by blocking the miR-21-Regulated TGF- $\beta$ 1/Smad7 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 929. doi: 10.3389/fphar.2017.00929.
- [3] Liang N, Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions [J]. *Nutrients*, 2015, 8:16. doi: 10.3390/nu8010016.
- [4] Liu YJ, Zhou CY, Qiu CH, *et al.* Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL60 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8:1106-1110.
- [5] Shi H, Dong L, Jiang J, *et al.* Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway[J]. *Toxicology*, 2013, 303:107-114.
- [6] Sun Z, Ma Y, Chen F, *et al.* miR-133b and miR-199b knockdown attenuate TGF- $\beta$ 1-induced epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SIRT1 in diabetic nephropathy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 837:96-104.
- [7] 楚非, 邹万忠, 孙锁柱, 等. 大鼠肾小管间质纤维化中肾小管上皮细胞表型转化的研究[J]. *中华肾脏病杂志*, 2003, 19:10-14.
- [8] Strutz F, Muller GA Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21: 3368-3370.
- [9] Sun YB, Qu X, Caruana G, *et al.* The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis[J]. *Differentiation*, 2016, 92:102-107.
- [10] Grande MT, Sanchez-Laorden B, Lopez-Blau C, *et al.* Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease[J]. *Nat Med*, 2015, 21:989-997.
- [11] 方复, 毛华辉, 卢国春, 等. IL-8 在胃癌组织上皮间质转化过程中表达增强 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39:1444-1448.
- [12] Sierra-Mondragon E, Molina-Jijon E, Namorado-Tonix C, *et al.* All-trans retinoic acid ameliorates inflammatory response mediated by TLR4/NF- $\kappa$ B during initiation of diabetic nephropathy [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 60: 47-60.
- [13] Liu B, Ding F, Hu D, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium attenuates renal fibrosis by reducing inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition via the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9:7. doi: 10.1186/s13287-017-0760-6.