氰酸盐诱导氧化应激促进肾小管 上皮细胞上皮—间充质转化

田宽^{1,2} 袁德智³ 胡玲^{1,2} 张滔^{1,2,4} 周鹏^{1,2} 郭星娴^{1,2} 陈益^{1,2} 郭小宇^{1,2} 李林颖^{1,2} 李静^{1,2} 冉建华^{1,2*} (¹重庆医科大学解剖教研室神经科学研究中心, 重庆 400016; ²重庆医科大学组织胚胎教研室 组织细胞工程与干细胞研究室, 重庆 400016; ³重庆医科大学第二附属医院神经内科, 重庆 400016; ⁴重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120)

摘要 该研究探讨氰酸盐(cyanate)诱导肾小管上皮细胞氧化应激损伤和促进肾纤维化的作 用。氰酸盐作用HK-2肾小管上皮细胞后,CCK8法检测其对细胞活力的影响;倒置显微镜观察细 胞形态的改变;DCFH-DA法检测细胞ROS水平;细胞免疫荧光和Western blot分别检测E-cadherin、 Fibronectin、α-SMA的表达;Western blot检测TGF-β的表达水平。结果显示,2 mmol/L氰酸盐明显 下调HK-2细胞的活力(P<0.05),细胞形态变为长梭形。氰酸盐作用24 h后,HK-2细胞内ROS水平 呈浓度依赖性升高。免疫荧光和Western blot结果均显示,氰酸盐作用24 h后,HK-2的Fibronectin、 α-SMA表达升高,E-cadherin表达下降;TGF-β的表达水平随氰酸盐浓度升高而上调(P<0.05)。以上 结果表明,氰酸盐诱导肾小管上皮细胞产生过量ROS,上调TGF-β水平促进细胞上皮–间充质细胞 转化(epithelia-mesenchymal transition, EMT)。

关键词 氰酸盐; HK-2细胞; 氧化应激; 上皮--间充质细胞转化

Cyanate Induces Oxidative Stress and Epithelia-Mesenchymal Transition on Renal Tubular Epithelial Cells

Tian Kuan^{1,2}, Yuan Dezhi³, Hu Ling^{1,2}, Zhang Tao^{1,2,4}, Zhou Peng^{1,2}, Guo Xingxian^{1,2}, Chen Yi^{1,2}, Guo Xiaoyu^{1,2}, Li Linying^{1,2}, Li Jing^{1,2}, Ran Jianhua^{1,2*}

(¹Center of Neuroscience Research, Department of Anatomy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Department of Histology and Stem Cell Research, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ³Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ⁴Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China)

Abstract The study was to explore the pathologic role of cyanate inducing oxidative stress and epithelia-mesenchymal transition (EMT) on renal tubular epithelial cells. After treating with cyanate on different concentrations, the viability of HK-2 cells was measured by CCK8 assay. The morphologic changes were observed with the inverted microscope. DCFH-DA assay was utilized to detect ROS level. The distributions of E-cadherin, Fibronectin, α -SMA were detected by immunofluorescence assay, and the expression levels of E-cadherin,

收稿日期: 2018-11-01 接受日期: 2018-12-29

*Corresponding author. Tel: +86-15086814824, E-mail: 1315038024@qq.com

国家自然科学基金(批准号: 81770738)、重庆市科技计划项目(批准号: cstc2015jcyjA10036)和重庆医科大学大学生项目(批准号: CXSY201802、CXSY201810)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 15086814824, E-mail: 1315038024@qq.com

Received: November 1, 2018 Accepted: December 29, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81770738), the Project of Science and Technology of Chongqing (Grant No.cstc2015jcyjA10036), the Project of College Students in Chongqing Medical University (Grant No.CXSY201802, CXSY201810)

网络出版时间: 2019-02-21 14:53:36 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190221.1453.018.html

Fibronectin, α -SMA, TGF- β were detected by Western blot. After treating with 2 mmol/L cyanate for 24 h, the viability of HK-2 cells was significantly decreased (P < 0.05), with morphologic changes as long-spindled cell. ROS levels were greatly increased on a dose dependent manner. Western blot and Immunofluorescence results showed the expression levels of Fibronectin and α -SMA were significance increased. However, the expression of E-cadherin was significantly decreased. The expression level of TGF- β was increased after treating with cyanate in a does dependent manner (P < 0.05). Cyanate could directly generate excess ROS, which induce the expression of TGF- β increased to promote epithelia-mesenchymal transition.

Keywords cyanate; HK-2; oxidative stress; epithelia-mesenchymal transition

肾纤维化是在多种致病因素刺激下,通过多条 信号通路和相应的细胞因子激活成纤维细胞、促 进肾脏细胞外基质集聚、增加胶原蛋白合成并减 少降解等机制,逐渐导致肾间质纤维化、肾小球硬 化等组织改变和肾功能损伤的病理过程,是各种肾 脏疾病进展到终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)的共同病理途径^[1]。由于肾脏纤维化的病理 生理机制极为复杂,涉及到炎症反应、氧化应激、 免疫损伤等多个环节,这些病理环节互为因果、相 辅相成,共同促进肾脏纤维化的发生发展。研究肾 纤维化的病理机制、寻找关键的作用靶点有助于开 发药物阻断肾纤维化的进程。

近年来,高浓度尿素在体内的病理作用被人们 逐渐认识,其通过诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生与慢性肾病伴发的动脉粥样硬化^[2]、胰岛 素抵抗的发生密切有关[3]; 高浓度尿素可诱导小鼠体 内外肾内髓细胞ROS大量产生,造成蛋白质、脂质及 DNA损伤,促进慢性肾病患者肾功能逐渐恶化^[3-4],提 示尿素促发的氧化应激是其发挥病理作用的共同机 制。众所周知, 氰酸盐(cyanate)是尿素非酶促反应 的水解产物,在慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者体内浓度较高^[5]。Cyanate通过氨甲酰化 (carbamylation)改变蛋白质的构象或干扰蛋白质的 相互作用,促发炎症反应,参与了类风湿性关节炎、 溃疡性结肠炎、银屑病等免疫性疾病的病理过程[6-8]。 与此同时, cyanate修饰的氨甲酰化血红蛋白、白蛋 白、脂蛋白等是引发CKD伴发动脉粥样硬化的重要 病理机制^[9]; 氨甲酰化白蛋白可影响系膜细胞的代 谢促进胶原沉积而致肾小球硬化[10]。除此以外,近 期有研究指出, cyanate自身可直接通过氧化应激导 致血管内皮功能紊乱,从而导致动脉粥样硬化^[11]。 本课题组也证实了PKCβ/P66Shc信号通路是氰酸盐 诱导脐静脉内皮细胞内ROS产生和氧化应激的重要 途径^[12]。由此可见, 尿素可能是通过cyanate直接引 发氧化应激损伤; 而氧化应激本身也是促进肾纤维 化的重要病理机制^[13]。因此, 本研究采用氰酸盐负 荷肾小管上皮细胞, 探讨cyanate能否诱导肾小管上 皮细胞氧化应激的发生以及是否促进肾小管上皮细 胞上皮-间充质转化, 为肾纤维化的机制研究提供新 的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肾小管上皮细胞(HK-2)购自上海中乔新舟生 物科技有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自Lonsera公司; DMEM培养基购自HyClone公 司; 氰酸盐购自Sigma公司; 胰蛋白酶消化液、青/链 霉素溶液、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂 盒、ROS测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限 公司; PVDF膜、ECL化学发光试剂盒购自Millipore 公司; CCK8试剂盒购自Dojindo公司; E-cadherin、 α-SMA抗体购自GeneTex公司; Fibronectin、TGF-β 抗体购自Bioss公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HK-2常规复苏后,用含10% FBS 和1%青/链霉素的DMEM培养液,于37℃、含5% CO₂的恒温培养箱内培养。6 h后首次换液,此后每1~2天 换液1次。待细胞生长汇合到80%左右时,用0.25%胰蛋白酶于37℃消化2 min;显微镜下观察细胞皱缩变圆后加入新培养液终止消化,以800 r/min离心5 min,弃去上清液,加入新培养液,混匀,进行常规传代处理后按上述条件继续孵育,以备用于后续实验。

1.2.2 CCK8法检测细胞活力 将对数期HK-2接种 于96孔板并在细胞培养箱中37 ℃孵育24 h, 根据El-Gamal等^[11]的研究结果, 将氰酸盐实验组浓度分别设 置为0、0.25、0.5、1、2 mmol/L, 对照组(0 mmol/L 组)加入等体积的培养基,每组设置5个复孔;各孔加入10 μL CCK8试剂后于培养箱中37 ℃孵育2 h,采 用酶标仪测定450 nm处的吸光度(D)值,根据公式计 算细胞活力。

1.2.3 细胞形态观察 先计数细胞接种在6孔板里, 每孔2×10⁵/孔,放置在37 ℃、5% CO₂的细胞培养箱 中。观察细胞贴壁后弃去旧培养液,先用PBS液冲 洗3次,加入无血清培养基后放入细胞培养箱。12 h 后分别加入不同浓度(0、0.5、1、2 mmol/L)的氰酸盐, 再37 ℃恒温孵育24 h。在倒置显微镜之下观察细胞 形态学的变化并拍照。

1.2.4 DCFH-DA法检测HK-2内ROS的水平 以 1 mmol/L的氰酸盐负荷HK-2细胞24 h,按照说明书 操作。弃去培养液,加入浓度为10 µmol/L DCFH-DA的培养基,每孔加入稀释后的DCFH-DA 1 mL, 37 ℃避光孵育30 min,每3~5 min轻摇孔板1次,随后 用PBS液洗涤3次,在荧光显微镜下观察荧光强度。

1.2.5 细胞免疫荧光技术检测E-cadherin、α-SMA和 Fibronectin的荧光表达情况 1 mol/L氰酸盐负荷 细胞24 h后, PBS清洗3次,每次5 min; 采用4%多聚 甲醛室温固定15 min; PBS液清洗3次,每次5 min; 随 后于室温下封闭30 min(封闭缓冲液:4%山羊血清、 0.2% Triton X-100的PBS液); 再以稀释的一抗(1:200, 对照组用PBS代替)于4 ℃孵育过夜。次日PBS液洗 涤3次,每次5 min; 滴加稀释的荧光二抗(1:150),室 温下避光孵育1 h, PBS液洗涤干净, DAPI染核5 min, PBS液充分洗涤后封片,荧光显微镜下观察。

1.2.6 Western blot检测E-cadherin、α-SMA、

Fibronectin和TGF-β蛋白质水平 培养的HK-2加 入1 mmol/L氰酸盐作用24 h后收集细胞。细胞裂解 液冰上裂解30 min, 4 ℃、12 000 r/min离心15 min, 收集上清液为细胞总蛋白,采用BCA法检测蛋白质 浓度。选取10% SDS-PAGE分离蛋白质,随后电转 至PVDF膜,于室温下5% BSA封闭2 h,分别加入一 抗(均为1:1 000, 4 ℃孵育12~24 h;次日TBST洗膜3 次,每次10 min)和二抗(均为1:10 000, 37 ℃孵育1 h), TBST常温洗膜3次,每次10 min。ECL液显色, Image Lab Tool仪器曝光。Image Lab Tool分析软件对目的 条带进行灰度值分析。

1.2.7 统计学分析 采用SPSS 20.0软件完成统计分析。计量资料以均数±标准差(x±s)表示,采用独立 样本t检验比较两样本均数, P<0.05表示差异具有显 著统计学意义, P<0.01表示差异具有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度氰酸盐对HK-2活力的影响

采用CCK8法检测不同浓度氰酸盐(0、0.25、0.5、 1、2 mmol/L)负荷HK-2细胞24 h后对细胞活力的影 响。结果显示,低浓度氰酸盐(0.25、0.5、1 mmol/L) 负荷导致细胞活力水平略有下降,但无显著差异;当 氰酸盐的浓度达到2 mmol/L时,细胞活力水平下降 至56%左右,具有显著性差异(P<0.05,图1)。

2.2 不同浓度氰酸盐对HK-2细胞形态的影响

不同浓度氰酸盐(0、0.5、1、2 mmol/L)负荷 HK-2细胞24 h后,倒置显微镜观察活体细胞的生长



不同剂量氰酸盐作用24h后HK-2的活力。*P<0.05,对照组相比。

Cell viability of HK-2 after cyanate treatment for 24 h. *P < 0.05 compared with control group.

图1 氢酸盐对HK-2细胞活力的影响

Fig.1 Effects of cyanate on HK-2 viability

情况。正常培养的HK-2细胞呈椭圆形贴壁生长,细胞排列均匀、紧密呈铺路石样分布; 0.5 mmol/L氰酸盐组细胞形态和数量无明显改变;随氰酸盐浓度的逐渐增加, HK-2细胞数量相应减少、细胞间隙增宽且不规则, 1 mmol/L的氰酸盐导致个别细胞表面突起呈三角形; 当氰酸盐的浓度达到2 mmol/L时,细胞数量明显减少, 皱缩细胞增多, 大部分细胞表面突起伸长呈梭形。结果提示, 氰酸盐能直接引起HK-2 细胞数量和形态的改变, 且呈剂量依赖性(图2)。

2.3 不同浓度氰酸盐诱导HK-2内ROS的产生

荧光探针DCFH-DA自由穿过细胞膜进入细胞, 经酯酶水解生成的DCFH被细胞内ROS氧化生成发 绿色荧光的DCF,以此判定细胞内ROS的水平。不 同浓度(0、0.5、1、2 mmol/L)氰酸盐负荷HK-2细胞 24 h后荧光显微镜下观察,正常组的细胞镜下未见 绿色荧光,0.5 mmol/L氰酸盐作用的细胞中仅见微 弱的绿色荧光;1 mmol/L氰酸盐组细胞内绿色荧光 开始增强,2 mmol/L氰酸盐组所有细胞胞质内均有 耀眼的绿色荧光。统计分析结果显示,随氰酸盐浓 度的增强,HK-2细胞内ROS水平逐渐升高,1 mmol/L 氰酸盐(P<0.05)和2 mmol/L氰酸盐组的ROS水平具 有显著差异(P<0.01),证实了氰酸盐可诱导HK-2内 ROS产生且早于细胞形态和活力的改变(图3)。

2.4 不同浓度氰酸盐负荷对HK-2细胞标志物表达情况的影响

采用1 mmol/L氰酸盐负荷HK-2细胞24 h后,显 微镜观察HK-2细胞中钙黏附蛋白E-cadherin、纤维 连接蛋白Fibronectin、α平滑肌肌动蛋白α-SMA的 表达情况, E-cadherin和α-SMA在细胞质中呈红色 荧光, Fibronectin呈绿色荧光,所有胞核被DAPI染 成蓝色荧光。正常组细胞中Fibronectin、α-SMA未 见荧光信号, E-cadherin绿色荧光信号强烈,均匀分 布于细胞质中;氰酸盐组细胞中E-cadherin绿色荧 光信号明显降低,而细胞质中Fibronectin、α-SMA 的荧光信号显著增强,提示氰酸盐可直接引起HK-2 细胞中上皮细胞标志物表达下降而间质细胞标志 物上调(图4)。

2.5 不同浓度氰酸盐负荷对HK-2细胞标志物及 TGF-β表达水平的影响

不同浓度(0、0.5、1、2 mmol/L)氰酸盐负荷



图2 倒置显微镜观察氰酸盐处理24 h后HK-2细胞形态变化 Fig.2 The morphological changes of HK-2 cells after cyanate treatment for 24 h



A: 不同氰酸盐浓度作用HK-2持续24 h后DCFH-DA染色的荧光表现; B: DCFH-DA染色的定量分析; *P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较。 A: HK-2 cells treated with increasing concentrations of cyanate for 24 h with DCFH-DA staining; B: quantity analysis of intensity of the DCFH-DA staining; *P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图3 不同浓度氰酸盐诱导HK-2后ROS产生 Fig.3 ROS production in HK-2 induced by different concentrations



图4 氰酸盐诱导HK-2中α-SMA、E-cadherin、Fibronectin蛋白质表达的影响 Fig.4 Effects of cyanate on levels of α-SMA, E-cadherin, Fibronectin proteins in HK-2



A: Western blot分别检测不同氰酸盐浓度作用HK-2持续24 h后α-SMA、Fibronectin、E-cadherin的表达; B: 不同氰酸盐浓度作用后α-SMA条带的半定量分析; C: 不同氰酸盐浓度作用后Fibronectin条带的半定量分析; D: 不同氰酸盐浓度作用后E-cadherin条带的半定量分析; E: Western blot分别检测不同氰酸盐浓度作用HK-2持续24 h后TGF-β表达; F: 不同氰酸盐浓度作用后TGF-β条带的半定量分析。*P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较。

A: HK-2 cells treated with increasing concentrations of cyanate for 24 h measured by Western blot; B: semi-quantitative analysis of α -SMA at different concentrations; C: semi-quantitative analysis of Fibronectin at different concentrations; D: semi-quantitative analysis of E-cadherin at different concentrations; E: HK-2 cells treated with increasing concentrations of cyanate for 24 h measured by Western blot; F: semi-quantitative analysis of TGF- β at different concentrations. *P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图5 不同浓度氰酸盐诱导HK-2产生EMT标志物及TGF-β

Fig.5 The marks of EMT and TGF-β production in HK-2 induced by different concentrations

HK-2细胞24 h后提取细胞质中的蛋白, Western blot 检测HK-2细胞中E-cadherin、Fibronectin、α-SMA和 TGF-β的表达水平改变(图5)。结果显示, 0.5 mmol/L 氰酸盐负荷即可引起HK-2细胞中上皮细胞标志 物E-cadherin的表达水平下降(P<0.05),表达水平 不受氰酸盐浓度的影响。与此同时,Fibronectin和 α-SMA的表达水平从0.5 mmol/L氰酸盐开始随负荷 浓度增加而表达水平增强,Fibronectin表达水平增 加在1 mmol/L氰酸盐浓度时具有显著统计学差异 (P<0.05),在2 mmol/L氰酸盐浓度时具有极显著统 计学差异(P<0.01);α-SMA表达增加在2 mmol/L氰 酸盐浓度时具有显著统计学差异(P<0.05),与荧光 标志物的表达趋势一致,提示氰酸盐对HK-2细胞标 志物表达的影响早于ROS的产生和形态学的改变 (图5)。TGF-β的表达水平随着氰酸盐浓度时具有显 著统计学差异(P<0.05),2 mmol/L氰酸盐浓度时具有显

3 讨论

本研究证实了尿素水解产物氰酸盐可直接引起HK-2肾小管上皮细胞内ROS大量产生、细胞活性下降及形态的改变。同时发现,细胞内TGF-β的表达水平随氰酸盐浓度的增加而升高,上皮细胞标志物E-cadherin的表达下调而间充质细胞标志物Fibronectin和α-SMA的表达增加,提示氰酸盐可引起肾小管上皮细胞氧化应激损伤、具有促进细胞向间质型细胞转化、参与肾小管纤维化的病理作用。

1972年, Johnson等^[14]发现, 慢性肾病患者体内 尿素浓度达到50 mmol/L也可很好地耐受, 因此认为 尿素是低毒素物质, 并被临床广泛接受。然而后期 的临床观察发现, 每天透析患者的生存率比低频透 析患者提高2~3倍, 而尿素水平是两组间唯一具有显 著性差异的血清学指标^[15], 使得更多学者开始关注 尿素的病理作用。随后的研究发现, 高浓度尿素可 促进肾内髓细胞^[4]、3T3-L1脂肪细胞^[3]、HEK293细 胞^[16]中氧化应激的发生, 与细胞DNA损伤、胰岛素 抵抗等CKD并发症的发生密切相关。

肾纤维化是多细胞因子介导、多信号通路转导、多因素驱动的慢性肾脏疾病进展至终末期肾衰竭的渐进性病理过程^[1]。肾纤维化导致肾功能不可逆的损伤,反之,肾功能的损伤又促进肾纤维化的发生发展;而尿素为蛋白质终末代谢产物,因肾功能下降蓄积在体内导致ROS大量产生,可能也参与了促进肾纤维化进展的过程。尽管有研究证实,尿素水解产物——氰酸盐通过氨甲酰化修饰白蛋白影响系

膜细胞代谢、促进胶原沉积而致肾小球硬化[10],但 目前缺乏高浓度尿素对肾小管作用和肾间质纤维化 的研究。同时,越来越多的证据显示,氰酸盐直接作 用于线粒体产生ROS可能是其导致血管内皮细胞损 伤的重要病理机制[11-12],因此,探讨氰酸盐对肾小管 的病理作用有助于人们认识各种病因引起肾损伤后 肾纤维化发展的机制。本研究采用不同浓度的氰酸 盐作用HK-2细胞24 h后发现, 2 mmol/L氰酸盐可显 著影响细胞的活力和形态, 尤其是细胞突起增加出 现三角形和长梭形的形态改变,证实了氰酸盐直接 的病理作用。DCFH-DA法观察到HK-2细胞内绿色 荧光呈剂量依赖性增加,在1 mmol/L氰酸盐作用下 具有显著性差异,提示其引起ROS的产生早于细胞 形态和活性的改变,这一结果不仅与前面的高浓度 尿素引起ROS大量产生的结果相符,同时提示ROS 产生可能是导致肾纤维化的早期病理改变。

研究证实, ROS的产生和氧化应激本身也是促 进上皮--间充质转化的重要病理机制[13,17]。因此、氰 酸盐作用于HK-2细胞是否会引起相应的标志物改 变是值得探讨的问题。在上皮--间充质转化过程中, 常见的分子标记物的表达改变可反映这一动态变 化过程,即肾小管上皮细胞常见标志物上皮型钙黏 附蛋白(E-cadherin)表达下调,而细胞间充质蛋白标 志物如纤连蛋白(fibronectin, FN)和α-平滑肌肌动蛋 白(α-smooth muscle actin, α-SMA)则表达相应增加。 本研究根据ROS产生的结果,采用还未引起细胞形 态改变的1 mmol/L氰酸盐作用于HK-2细胞24 h, 观 察早期细胞标志物的变化情况。细胞免疫荧光结果 显示,1 mmol/L氰酸盐导致细胞胞质内FN、α-SMA 荧光信号明显增强, E-cadherin明显减弱。免疫印迹 结果显示, 0.5 mmol/L氰酸盐即可引起E-cadherin表 达下调到较低水平, 而氰酸盐呈剂量依赖性引起FN 和α-SMA表达升高,分别在1 mmol/L和2 mmol/L具 有显著性差异,形态学结果与分子表达水平一致,提 示结果的可靠性。

目前的研究表明,转化生长因子-β(TGF-β)是 导致EMT的重要细胞因子,其在正常肾组织中表达 较弱,在多种肾脏疾病中尤其是肾纤维化中高度表 达^[18]。TGF-β活化可刺激ECM产生,上调FN的表达; TGF-β信号通路通过Smad2和Smad3的磷酸化导致 E-cadherin的减少和间质生物标志物的增加,促进肾 小管上皮细胞的纤维表型和破坏细胞极性^[19-20]。本 研究采用免疫印记检测了TGF-β的表达水平,其随 氰酸盐浓度的增加而表达上调,这一表达趋势与上 皮细胞标志物的减少和间充质细胞标志物的增加一 致,提示TGF-β是导致HK-2细胞上皮-间充质转化的 重要分子。既往研究表明,ROS与TGF-β在各种病 理过程中关系密切。大鼠脑星形胶质细胞中ROS的 产生可上调TGF-β的表达水平^[21];TGF-β持续表达可 诱导肺上皮细胞线粒体中ROS水平上调^[22]。本研究 中,1 mmol/L氰酸盐作用HK-2细胞24 h后,尽管观察 到ROS和TGF-β的水平均出现上调,但尚无法确定 二者的因果关系,还需要进一步的研究探讨氰酸盐 引起肾小管上皮细胞上皮-间充质转化的具体机制。

参考文献 (References)

- 1 Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. Nat Rev Nephrol 2016; 12(6): 325-38.
- 2 D'Apolito M, Du X, Pisanelli D, Pettoello-Mantovani M, Campanozzi A, Giacco F, *et al.* Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. Atherosclerosis 2015; 239(2): 393-400.
- 3 D'Apolito M, Du X, Zong H, Catucci A, Maiuri L, Trivisano T, et al. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. J Clin Invest 2010; 120(1): 203-13.
- 4 Zhang Z, Dmitrieva NI, Park, JH, Levine RL, Burg, MB. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and *in vivo*, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(25): 9491-6.
- 5 Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. Nat Med 2007; 13(10): 1176-84.
- 6 Pruijn, GJM. Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Front Immunol 2015; 6: 192.
- Frasca L, Palazzo R, Chimenti MS, Alivernini S, Tolusso B, Bui
 L, *et al.* Anti-LL37 antibodies are present in psoriatic arthritis
 (PsA) patients: New biomarkers in PsA. Front Immunol 2018; 9: 1936.
- 8 Delanghe S, Delanghe JR, Speeckaert R, Van Biesen W, Speeckaert MM. Mechanisms and consequences of carbamoylation. Nat Rev Nephrol 2017; 13(9): 580-593.
- 9 Schreier SM, Steinkellner H, Jirovetz L, Hermann M, Exner M, Gmeiner BM, *et al.* S-carbamoylation impairs the oxidant scavenging activity of cysteine: its possible impact on increased LDL modification in uraemia. Biochimie 2011; 93(4): 772-7.
- 10 Shaykh M, Pegoraro AA, Mo W, Arruda JA, Dunea G, Singh

AK. Carbamylated proteins activate glomerular mesangial cells and stimulate collagen deposition. J Lab Clin Med 1999; 133(3): 302-8.

- 11 El-Gamal D, Rao SP, Holzer M, Hallstrom S, Haybaeck J, Gauster M, *et al.* The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction. Kidney Int 2014; 86(5): 923-31.
- 12 樊春华,田宽,何菲,胡玲,郭佩,陈益,等. 氰酸盐诱导人 脐静脉内皮细胞氧化应激损伤. 中国细胞生物学学报(Fan Chunhua, Tian Kuan, He Fei, Hu Ling, Guo Pei, Chen Yi, *et al.* Cyanate induces oxidative stress injury in human umbilical vein endothelial cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2017; 39(12): 1550-5.
- 13 Jha JC, Banal C, Chow BS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, *et al.* Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. Antioxid Redox Signal 2016; 25(12): 657-84.
- 14 Johnson WJ, Hagge WW, Wagoner RD, Dinapoli RP, Rosevear JW. Effects of urea loading in patients with far-advanced renal failure. Mayo Clin Proc 1972; 47(1): 21-9.
- 15 Kjellstrand CM, Buoncristiani U, Ting G, Traeger J, Piccoli GB, Sibai-Galland R, *et al.* Short daily haemodialysis: survival in 415 patients treated for 1006 patient-years. Nephrol Dial Transplant 2008; 23(10): 3283-9.
- 16 Topanurak S, Ferraris JD, Li J, Izumi Y, Williams CK, Gucek M, et al. High NaCl- and urea-induced posttranslational modifications that increase glycerophosphocholine by inhibiting GDPD5 phosphodiesterase. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110(18): 7482-7.
- 17 Park SA, Kim MJ, Park SY, Kim JS, Lee SJ, Woo HA, et al. EW-7197 inhibits hepatic, renal, and pulmonary fibrosis by blocking TGF-beta/Smad and ROS signaling. Cell Mol Life Sci 2015; 72(10): 2023-39.
- 18 Galichon P, HertigA. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside? Fibrogenesis Tissue Repair 2011; 4: 11.
- 19 Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, *et al.* Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. J Biol Chem 2011; 286(34): 29848-60.
- 20 Yoshida K, Matsuzaki K. Differential regulation of TGF-beta/ Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. Front Physiol 2012; 3: 53.
- 21 Chen MF, Zeng F, Qi L, Zu XB, Wang J, Liu LF, et al. Transforming growth factorbeta1 induces epithelialmesenchymal transition and increased expression of matrix metalloproteinase16 via miR200b downregulation in bladder cancer cells. Mol Med Rep 2014; 10(3): 1549-54.
- 22 Liu D, Liu Y, Xia Z, Dong H, Yi Z. Reactive oxygen species modulator 1 regulates oxidative stress and induces renal and pulmonary fibrosis in a unilateral ureteral obstruction rat model and in HK2 cells. Mol Med Rep 2017; 16(4): 4855-62.