

· 基础研究 ·

他克莫司对肾小管上皮细胞转分化早期 CTGF、VEGF 表达的影响

闵亚丽, 赵冬慧, 于 黔

(贵阳市第一人民医院肾内科 550004)

摘要:目的 探讨不同剂量的他克莫司(FK506)对肾小管上皮细胞(HKC)转分化的作用及其对早期结缔组织生长因子(CTGF)、血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 以体外培养的 HKC 为研究对象,分 4 组:(1)对照组;(2)转化生长因子- β 1(TGF- β 1)(8 ng/mL)组;(3)FK506(10,30,60 ng/mL)组;(4)TGF- β 1(8 ng/mL)加 FK506(10,30,60 ng/mL)组。应用形态学、免疫组化技术和半定量反转录 PCR(RT-PCR)观察 FK506 对 TGF- β 1 诱导的 HKC 转分化的作用及对 α -SMA、CTGF、VEGF 表达的影响。结果 与对照组比较,48 h 后 TGF- β 1 组 HKC 细胞呈现出长梭形外观, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、CTGF、VEGF 的表达明显增多($P < 0.01$),FK506 组 α -SMA、VEGF 及 CTGF 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。TGF- β 1 加 FK506 组比 TGF- β 1 组 α -SMA、VEGF 及 CTGF 随 FK506 的浓度增加表达明显降低($P < 0.05$)。结论 FK506 对 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞转分化早期可能通过下调 VEGF、CTGF 的表达起抑制作用。

关键词:他克莫司;肾小管;细胞转分化;血管内皮生长因子类;结缔组织生长因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.32.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)32-3401-03

Effects of Tacrolimus on transdifferentiation and CTGF, VEGF early expression of human renal tubular epithelial cells

Min Yali, Zhao Donghui, Yu Qian

(Department of Nephrology, First People's Hospital of Guiyang City, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To explore different doses of tacrolimus(FK506) to renal tubular epithelial cells(HKC) transdifferentiation and its early action on connective tissue growth factor(CTGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) expressing change. **Methods** The human kidney cells(HKC) were cultured for 48 hours in different conditions:(1)Serum free as control,(2)Treated with TGF- β 1(8 ng/mL);(3)Treated with FK506 at different concentration(10,30,60 ng/mL);(4)Treated with FK506 at different concentration(10,30,60 ng/mL) plus TGF- β 1(ng/mL). The expression of α -SMA was assessed with RT-PCR, The expression of CTGF, VEGF was assessed with RT-PCR and immunohistochemistry after 48 hours. **Results** Compared with the control group, The expression of CTGF, VEGF and α -SMA mRNA was markedly increased in HCK cultured with TGF- β 1 group($P < 0.05$), which were suppressed significantly in HKC cultured with TGF- β 1 plus FK506 group($P < 0.05$). **Conclusion** The inhibition of FK506 on transdifferentiation of tubular epithelial cells may be related to the down-regulation of VEGF, CTGF.

Key words: tacrolimus; kidney tubules; cell transdifferentiation; vascular endothelial growth factors; connective tissue growth factor

肾间质纤维化是指由多种原因引起的细胞外基质成分在肾间质内过度沉积,是各种慢性肾脏疾病进行性发展的最终通路^[1]。由于肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转化(EMT)在肾间质纤维化变化中的重要性已经为人们认识,所以积极探索有效的预防、抑制甚至逆转 EMT 的发生对治疗肾间质纤维化进展有重要意义^[2]。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)是非常重要的促纤维化因子,结缔组织生长因子(CTGF)是 TGF- β 1 发挥作用的下游效应因子。VEGF 是血管新生的主要促进因子^[3]。大量表达的 VEGF 可加重平滑肌细胞增生及血管壁增厚,促进细胞外基质成分在内皮细胞外堆积,导致肾脏纤维化。FK506 临床主要应用于器官移植排斥反应等的治疗,近年开始用于免疫性肾脏疾病、结缔组织病等的治疗,但 FK506 对肾小管上皮细胞转分化中的作用如何研究甚少。本实验的目的在于观察 FK506 对 TGF- β 1 诱导的体外培养的肾小管上皮细胞转分化的早期影响,并对其可能的作用机制进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 实验细胞 人类肾小管上皮细胞购自中国典型培养物保藏中心。

1.2 试剂 他克莫司由安斯泰来公司惠赠;DMEM/F12 购自

美国 Gibico 公司;0.25%胰蛋白酶购自 Thermo 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、胎牛血清(FBS)购自北京中山公司;人重组 TGF- β 1 购自 Peprotech 公司;兔抗人 CTGF 多克隆抗体,兔抗人 VEGF 多克隆抗体购自山海天呈公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;RT-PCR 逆转录试剂盒购自 Formentas 公司;CTGF、VEGF 及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)引物合成(上海生工)。

1.3 方法

1.3.1 HCK 细胞形态学观察 HKC 细胞培养于 DMEM/F12,5% FBS、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中孵育,细胞传代采用 0.25%胰蛋白酶消化。将细胞按照 1×10^6 C 个/孔接种于孔板中,细胞生长至 70%~80%,换用无血清培养基同步化 24 h。以未处理的 HKC 为对照组,以 TGF- β 1(8 ng/mL)单独处理 48 h 的 HKC 为 TGF- β 1 组,以不同浓度 FK506 单独处理细胞 48 h 为 FK506(10,30,60 ng/mL)组,以 8 ng/mL TGF- β 1 加不同浓度的 FK506 共同处理细胞 48 h 为 TGF- β 1 加 FK50(10,30,60 ng/mL)组。然后每 4 小时在倒置显微镜下观察 1 次细胞形态。48 h 后拍照,收集爬片及细胞分别进行以下实验,所有实

验重复 3 次。

1.3.2 细胞免疫组化方法测定各组 HKC 细胞 CTGF 及 VEGF 蛋白的表达 获得细胞爬片后,以冷 PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定 20 min 后吸干,加入 PBS 水化。0.1% Tritonx-100 室温 30 min,0.3% H₂O₂ 室温 20 min 封闭内源性过氧化物酶,5%山羊血清室温 30 min,封闭非特异性抗原,分别加兔抗人 CTGF 及 VEGF 多克隆抗体(1:200,1:150)4℃过夜。再分别与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗 37℃孵育 40 min,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明、树脂封片;用 PBS 替代一抗做空白对照,显微镜下观察并照相。

1.3.3 RT-PCR 测定细胞 mRNA 水平的表达 按 TRizol 说明书提取细胞中的总 RNA,紫外分光光度计对 RNA 定量,用 Oligo(dT)引物进行样品 RNA(200 ng)的反转录,得到 cDNA。 α -SMA 上游 5'-GCT CAC GGA GGC ACC CCT GAA-3'下游 5'-CTG ATA GGA CAT TGT TAG CAT-3'。CTGF 上游 5'-CGG CTT ACC GAC TGG AAG AC-3'下游 5'-CGT CGG TAC ATA CTC CAC AG-3'。VEGF 上游 5'-ACC ATG AAC TTT CTG CTG TC-3'下游 5'-TCA CCG CCT CGG CTT GTC AC-3'。GAPDH 上游 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3'下游 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3' (上海生工)。Real-Time PCR 反应体系为:10×PCR 缓冲液 2.5 μ L;MgCl₂ 溶液 3 μ L;dNTP 混合液 3 μ L;Taq 聚合酶 3 μ L;20 μ mol/L 的 PCR 特异性上游引物 0.5 μ L;20 μ mol/L 的 PCR 特异性下游引物 0.5 μ L;cDNA 2 μ L;加水至总体积为 25 μ L。反应体系置于 Real-Time PCR 仪上。分别反应条件:(1)94℃变性 3 min;35 个 PCR 循环:94℃变性 30 s;58℃退火 30 s;72℃延伸 60 s。(2)95℃变性 1 min;45 个 PCR 循环:95℃变性 10 s;60℃退火 1 s;72℃延伸 10 s。(3)94℃变性 3 min;35 个 PCR 循环:94℃变性 30 s;58℃退火 30 s;72℃延伸 45 s。(4)94℃变性 3 min;35 个 PCR 循环:94℃变性 30 s;58℃退火 30 s;72℃延伸 45 s。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶 100 V 50 min,结果用凝胶成像系统及分析软件进行电泳条带分析, α -SMA 基因的浓度除以 GAPDH 基因的浓度,即为 α -SMA 基因校正后的相对含量。CTGF 基因的浓度除以 GAPDH 基因的浓度,即为 CTGF 基因校正后的相对含量。VEGF 基因的浓度除以 GAPDH 基因的浓度,即为 VEGF 基因校正后的相对含量。

1.4 统计学处理 用 SPSS 12.0 软件对结果中的数据进行处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态的观察 对照组及 FK506 各浓度组 HKC 细胞

生长 6 d 后,形成融合的单层上皮细胞,呈椭圆形的铺路石样的形态学特征。加 TGF- β 1 培养 48 h 后细胞呈现成纤维细胞样梭形外观,且细胞生长排列紊乱,细胞发生了转分化。同时加入不同剂量的 FK506 和 TGF- β 1 共同作用组,观察到部分细胞形态维持正常的细胞形态,仍存在部分发生形态改变的细胞,似成纤维细胞样。

2.2 FK506 对 α -SMA mRNA 表达的影响 对照组少量表达 α -SMA mRNA,不同浓度 FK506 作用 48 h 后,较对照组 α -SMA mRNA 表达量变化差异无统计学意义($P > 0.05$),TGF- β 1 干预 48 h 后,较对照组 α -SMA mRNA 表达量显著上升($P < 0.05$),FK506 可以减少 TGF- β 1 诱导的 α -SMA mRNA 表达,且随着 FK506 剂量的增加抑制作用逐渐增强,并呈剂量依赖性($P < 0.05$),见图 1、表 1。

2.3 FK506 对 CTGF 及 VEGF 表达的影响

2.3.1 细胞免疫组化 SP 法检测 CTGF 及 VEGF 表达的变化

将每张片在 $\times 100$ 高倍镜下,顺时针盲法计算 15 个高倍视野中,阳性细胞百分率=总阳性细胞数/总细胞数,每组实验重复 3 次。对照组和 FK506 各浓度组 CTGF 阳性细胞占总 HKC 细胞的面积比值均很低(3.21%~4.13%),各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),TGF- β 1 组见大量细胞质中呈棕黄色,为 CTGF 表达阳性,阳性细胞占总 HKC 细胞的面积比值是 15.42%,与对照组和 FK506 各浓度组差异有统计学意义($P < 0.05$),与 TGF- β 1 组比较,加入 FK506 (10、30、60 ng/mL)共同作用 48 h 后,CTGF 阳性细胞占总 HKC 细胞的面积比值分别为 11.83%、9.25%、6.54%,呈剂量依赖性($P < 0.05$)。见封 3 图 2。对照组 VEGF 阳性细胞占总 HKC 细胞的面积比值 7.54%,FK506 各浓度组(7.2%~7.6%)与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),TGF- β 1 组见大量细胞质中呈棕黄色,为 VEGF 表达阳性,阳性细胞占总 HKC 细胞的面积比值是 23.07%,与对照组和 FK506 各浓度组差异有统计学意义($P < 0.01$),与 TGF- β 1 组比较,TGF- β 1 加 FK506 (10、30、60 ng/mL)组作用 48 h 后,VEGF 阳性细胞占总 HKC 细胞的面积比值分别为 17.28%、14.25%、10.21%,呈剂量依赖性($P < 0.05$)。见封 3 图 3。

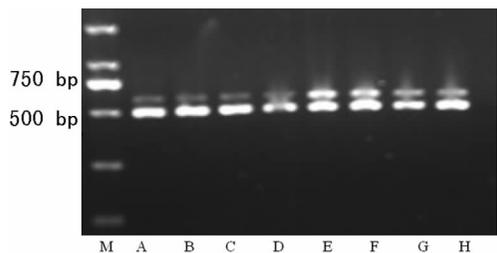
2.3.2 RT-PCR 定量检测 对照组少量 CTGF mRNA 的表达,TGF- β 1 干预 48 h 后,较对照组 CTGF mRNA 表达量显著上升($P < 0.05$),FK506 各浓度组作用 48 h 后,较对照组 CTGF mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),但 TGF- β 1 加 FK506 (10、30、60 ng/mL)组作用 48 h 后可减少 TGF- β 1 诱导的 CTGF mRNA 表达,且随着 FK506 剂量的增加抑制作用逐渐增强,并呈剂量依赖性($P < 0.05$),见图 4、表 1。

表 1 FK506 对各组细胞 α -SMA mRNA、CTGF mRNA 及 VEGF mRNA 含量的变化($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

组别	α -SMA mRNA	CTGF mRNA	VEGF mRNA
对照组	0.187±0.037	0.543±0.001	0.495±0.734
FK506 10 ng/mL 组	0.178±0.033	0.512±0.011	0.485±0.070
FK506 30 ng/mL 组	0.180±0.041	0.489±0.002	0.535±0.021
FK506 60 ng/mL 组	0.175±0.037	0.468±0.095	0.491±1.027
TGF- β 1 组	1.199±0.200 [#]	1.877±0.047 [#]	1.555±0.043 [#]
TGF- β 1+FK506 10 ng/mL 组	0.666±0.063 Δ	0.702±0.045 Δ	0.936±1.002 Δ
TGF- β 1+FK506 30 ng/mL 组	0.465±0.114 Δ	0.672±0.017 Δ	0.688±2.021 Δ
TGF- β 1+FK506 60 ng/mL 组	0.317±0.023 Δ	0.606±0.022 Δ	0.442±1.030 Δ

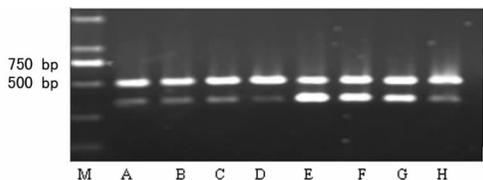
Δ : $P < 0.05$,与 TGF- β 1 组比较;[#]: $P < 0.01$,与对照组比较。

对照组有基础量 VEGF mRNA 的表达, TGF- β 1 干预 48 h 后, 对照组 VEGF mRNA 表达量明显上升 ($P < 0.05$), 不同浓度 FK506 作用 48 h 后, 较对照组 VEGF mRNA 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 TGF- β 1 加 FK506 (10、30、60 ng/mL) 组作用后可减少 TGF- β 1 诱导的 VEGF mRNA 表达, 且随着 FK506 剂量的增加抑制作用逐渐增强, 并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$), 见图 5、表 1。



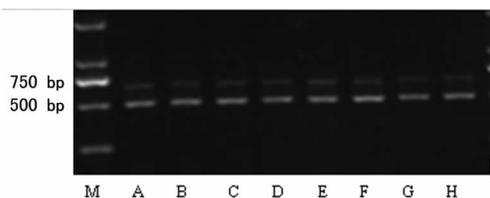
M: Marker; A: 对照组; B: FK506 10 ng/mL 组; C: FK506 30 ng/mL 组; D: FK506 60 ng/mL 组; E: TGF- β 1 组; F: TGF- β 1 加 FK506 10 ng/mL 组; G: TGF- β 1 加 FK506 30 ng/mL 组; H: TGF- β 1 加 FK506 60 ng/mL 组。

图 1 RT-PCR 测定不同组 α -SMA 及内对照 GAPDH 的 mRNA 表达



M: Marker; A: 对照组; B: FK506 10 ng/mL 组; C: FK506 30 ng/mL 组; D: FK506 60 ng/mL 组; E: TGF- β 1 组; F: TGF- β 1 加 FK506 10 ng/mL 组; G: TGF- β 1 加 FK506 30 ng/mL 组; H: TGF- β 1 加 FK506 60 ng/mL 组。

图 4 RT-PCR 测定不同组 CTGF 及内对照 GAPDH 的 mRNA 表达



M: Marker; A: 对照组; B: FK506 10 ng/mL 组; C: FK506 30 ng/mL 组; D: FK506 60 ng/mL 组; E: TGF- β 1 组; F: TGF- β 1 加 FK506 10 ng/mL 组; G: TGF- β 1 加 FK506 30 ng/mL 组; H: TGF- β 1 加 FK506 60 ng/mL 组。

图 5 RT-PCR 测定不同组 VEGF 及内对照 GAPDH 的 mRNA 表达

3 讨 论

大量研究已证实, 在肾脏中 TGF- β 1 可以活化成纤维细胞、促进小管上皮细胞转分化、刺激 ECM 合成, 使肾小管上皮细胞表型发生改变, 失去表达细胞角蛋白, 钙粘蛋白等上皮细胞标记抗原, 开始表达肌成纤维细胞标志物如 α -SMA^[4-5]。本实验使用 TGF- β 1 作为直接的刺激因子, 对 HKC 作用 48 h 后, 细胞拉长、肥大呈现成纤维细胞样梭形外观, 且细胞生长排列紊乱。CTGF 是 TGF- β 1 发挥致纤维化作用的下游效应因

子, TGF- β 1 可通过 I 型转化生长因子 β 受体 (T β RI)/ 激活素受体样激酶 5 (ALK-5) 依赖 Smad2 信号途径促进 CTGF 的表达。CTGF 是 TGF- β 1 的正反馈因子, 放大 TGF- β 1 的作用, 而不影响其抗炎和免疫调节的作用, 是一个更加理想的抗纤维化靶点^[6-7]。

VEGF 是维持血管内皮细胞生存、再生及其功能的重要因子^[8]。在生理状态下, 肾脏有基础量的 VEGF 的表达, 对维持肾血管结构及正常生理功能是必需的^[9]。大量表达的 VEGF 可介导肾小球系膜细胞和肾小球足突细胞产生细胞外基质而参与肾小球硬化的发生^[10-11], 增加肾小球滤过屏障的通透性、使多种炎症因子渗出和分泌, 加剧炎症反应^[12], 促进肾脏纤维化。在近来的研究中, TGF- β 1 与 VEGF 关系的研究也取得了显著进展。TGF- β 1 可能通过蛋白激酶 C 途径上调近端小管上皮细胞 VEGF 的表达, 增加单核细胞的趋化作用加重平滑肌细胞增生及血管壁增厚, 管腔狭窄及闭塞等引起肾血流量减少, 使毛细血管袢及周周毛细血管数量增加, 毛细血管通透性增加, 促进细胞外基质成分在内皮细胞外堆积, 促进炎细胞在间质的浸润, 导致肾脏纤维化^[13]。Kang 等^[14]在 5/6 肾切除大鼠慢性肾衰模型中观察到早期 VEGF 明显增加, 随后随着肾小球 VEGF 表达下降, 肾小球毛细血管损伤越重, 肾小球硬化程度也越重。最近有研究报道 VEGF 可促进糖尿病小鼠肾小球新生血管生成, VEGF 表达上调与糖尿病肾脏病变密切相关^[15]。

本实验观察到, TGF- β 1 作用 48 h 后 CTGF 及 VEGF 表达明显增加, 说明早期 CTGF、VEGF 加重了 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞转分化。TGF- β 1 及 FK506 共同作用 48 h 检测到 CTGF、VEGF mRNA 均明显下调, 说明在 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞转分化的早期 FK506 下调 CTGF、VEGF 表达, 抑制了肾间质纤维化的进展, 且呈剂量依赖性。随着 TGF- β 1 作用时间的延长, 在慢性肾功能损伤的后期 CTGF 及 VEGF 的变化, 及 FK506 对其的作用, 在今后的实验中会进一步探讨。

综上所述, FK506 可以抑制 TGF- β 1 介导的肾小管上皮细胞致纤维化作用, 其作用可能为下调转分化早期 CTGF 及 VEGF 的表达, 保护肾组织血管床, 维持肾小管上皮细胞正常的功能, 为 FK506 临床上早期应用于慢性肾纤维化的防治提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure [J]. *Int Med*, 2004, 43(1): 9-7.
- [2] Liu YH. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 1-5.
- [3] Cox CM, D' Agostino SL, Miller MK, et al. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo [J]. *Dev Biol*, 2006, 296(1): 177-189.
- [4] Schmierer B, Hill CS. TGF beta-SMAD (下转第 3407 页)

- signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(3): 119-128.
- [4] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(4): 1126-1132.
- [5] 吴莺, 张允历, 王文兵, 等. 不同地区幽门螺杆菌 *cagA* 基因羧基端可变区及其蛋白 EPIYA 基序的研究[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(27): 746-749.
- [6] Chen YC, Wang Y, Li JY, et al. *H. pylori* stimulates proliferation of gastric cancer cells through activating mitogen-activated protein kinase cascade[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(37): 5972-5977.
- [7] Tanaka H, Yoshida M, Azuma T. The role of *CagA* in *H. pylori* infection[J]. *Nihon Rinsho*, 2009, 67(12): 2245-2249.
- [8] Murata-Kamiya N. Pathophysiological functions of the *CagA* oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori* [J]. *Microbes Infect*, 2011, 13(10): 799-807.
- [9] Yamaoka Y, Osato MS, Sepulveda AR, et al. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries[J]. *Epidemiol Infect*, 2000, 124(1): 91-96.
- [10] Nardone G, Rocco A, Vaira D et al. Expression of COX-2, mPGE-synthase1, MDR-1(P-gp), and Bcl-xL: a molecular pathway of *H. pylori*-related gastric carcinogenesis [J]. *J Pathol*, 2004, 202(3): 305-312.
- [11] Yang GF, Deng CS, Xiong YY, et al. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobacter pylori cagA*(+) infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 491-496.
- [12] Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5996-6007.
- [13] Campeau E, Gobeil S. RNA interference in mammals: behind the screen[J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(4): 215-226.
- [14] Yang J, Sun M, Zhang A, et al. Adenovirus-mediated siRNA targeting Bcl-xL inhibits proliferation, reduces invasion and enhances radiosensitivity of human colorectal cancer cells[J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9: 117.
- [15] Mu P, Nagahara S, Makita N, et al. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(12): 2978-2990.
- (收稿日期: 2012-03-19 修回日期: 2012-08-02)
-
- (上接第 3403 页)
- signal transduction: molecular specificity and functional flexibility[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12): 970-982.
- [5] Bottinger EP, Bitzer M. TGF2beta signaling in renal disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(2): 2600-2610.
- [6] Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2010, 114(3): 83-92.
- [7] Chen XM, Qi W, Pollock CA. CTGF and chronic kidney fibrosis[M]. *Front Biosci: Schol Ed*, 2009: 132-141.
- [8] Kang DH, Kanellis J, Hugo C, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3): 806-816.
- [9] Maharaj AS, Saint-Geniez M, Maldonado AE, et al. Vascular endothelial growth factor localization in the adult [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(2): 639-648.
- [10] Wang L, Kwak JH, Kim SI, et al. Transforming growth factor-beta1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via 3-p38alpha mitogen-activated protein kinase and p38delta mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(32): 33213-33219.
- [11] Chen S, Kasama Y, Lee JS, et al. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen production by transforming growth factor-1 in mouse podocytes [J]. *Diabetes*, 2004, 53(11): 2939-2949.
- [12] Kim NH, Oh JH, Se JA, et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2005, 67(1): 167-171.
- [13] Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, et al. PDGF(BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF(BB), and PDGF(AB)[J]. *J Surg Res*, 2002, 107(2): 203-209.
- [14] Kang DH, Joly AH, Oh SW, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model(I): Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin211[J]. *Am Soc Nephrol*, 2001, 12(7): 1434-1447.
- [15] 田河林, 韦立顺, 许忠新, 等. 糖尿病小鼠肾小球微血管密度与 VEGF 表达的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(2): 358-361.
- (收稿日期: 2012-04-07 修回日期: 2012-08-13)