

控制血糖对糖尿病大鼠肾 PTEN 表达及纤维化病变的影响*

李 霜, 王圆圆, 文箐颖, 苏 博, 肖 瑛, 石明隽, 郭 兵**

(贵阳医学院 病理生理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 观察控制血糖前后糖尿病(DM)大鼠肾组织第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因(PTEN)表达变化, 探讨 PTEN 与肾小管上皮细胞向间充质细胞的转化(EMT)的关系及控制血糖对 PTEN 表达及肾纤维化病变的影响。方法: SD 大鼠随机分为正常对照组(N)、糖尿病组(DM)、胰岛素治疗组(DMA), 尾静脉注射 STZ 复制 DM 模型, 于成模 13 周起, DMA 组大鼠采用胰岛素个体化治疗, 以血糖控制在 4~7 mmol/L, 尿糖阴性为准, 分别于 16 周和 24 周时处死各组大鼠。生化方法测血糖、血肌酐和 24 h 尿蛋白; 观察肾脏病理改变; 免疫组织化学和 Western blotting 检测各组大鼠肾组织 PTEN、Collagen IV、FN、E-cadherin 和 α -SMA 蛋白的表达; RT-PCR 检测 PTEN mRNA 的表达。结果: 与 N 组相比, 不同时间点 DM 组大鼠血糖、血肌酐、24 h 尿蛋白明显增多($P < 0.05$), 并出现肾组织纤维化改变; 而 DMA 组大鼠血糖、血肌酐、24 h 尿蛋白均显著低于 DM 组($P < 0.05$), 肾纤维化病变明显改善; 不同时间点的 DM 组大鼠肾组织 PTEN 蛋白和 mRNA 的表达均较 N 组明显减少($P < 0.05$), 并伴有 E-cadherin 的表达减少($P < 0.05$), α -SMA 表达增加($P < 0.05$), Collagen IV 和 FN 蛋白的沉积增多($P < 0.05$); 而与 DM 组相比, DMA 组大鼠肾组织 PTEN 蛋白和 mRNA 表达均明显增加($P < 0.05$), 且 E-cadherin 的表达增加($P < 0.05$), α -SMA 表达减少($P < 0.05$), Collagen IV 和 FN 在间质的沉积减少($P < 0.05$)。结论: 控制血糖能上调肾小管上皮细胞 PTEN 的表达, 同时能减少肾小管上皮细胞 EMT 及肾间质 ECM 沉积, 改善肾纤维化病变。

[关键词] 细胞外基质; 纤维化; 糖尿病; 血糖; 肾疾病; 第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因; 大鼠, Sprague-Dawley

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)01-0014-06

Effects of Blood Glucose Control on Expression of PTEN and Fibrotic Lesions in Renal Tissue of Diabetic Rats

LI Shuang, WANG Yuanyuan, WEN Qingying, SU Bo, XIAO Ying, SHI Mingjun, GUO Bing
(Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the influence of blood glucose control on renal PTEN expression and renal fibrosis in diabetic rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into control (N), diabetes mellitus (DM) and insulin-treated DM groups (DMA). DM model was established by tail intravenous injection of streptozotocin (STZ). Since the 13th week of successful modeling, rats in group DMA were given insulin to control blood glucose to the levels of 4~7 mmol/L and make urine glucose negative. The rats were sacrificed in 16 and 24 weeks respectively. Blood glucose (BG), serum creatinine (Scr) and 24 h urine protein (24 h UP) were measured with biochemical methods. The pathological changes of renal tissue were observed. Immunohistochemistry and western blot were employed to assay the expression of PTEN, Collagen IV, FN, E-cadherin, and α -SMA protein in rat renal tissue. In addition, the expression of PTEN mRNA was examined with RT-PCR. **Results:** BG, Scr, and 24 h UP of group DM were significantly higher than those of group N ($P < 0.05$), and renal tissue presented fi-

*[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字[2010]40号); 贵阳市社会发展科技攻关项目(2010 筑科农合同字第 1-社-15 号)

** 通讯作者 E-mail: guobings@126.com

brosis changes in group DM at different time points. BG, Scr, and 24 h UP of group DMA were significantly lower than those of group DM ($P < 0.05$), and renal fibrosis lesions obviously alleviated. The PTEN protein and mRNA levels in group DM were significantly lower than those in group N at different time points, and the expression of E-cadherin was lower and α -SMA, Collagen IV and FN protein were higher than those in group N. The expression of PTEN protein, mRNA and E-cadherin in group DMA were significantly higher than those of group DM ($P < 0.05$), while the expression of α -SMA, Collagen IV and FN protein were lower than those of group DM. **Conclusions:** Blood glucose control can up-regulate the expression of PTEN in renal tubular epithelial cells and delay the process of tubular epithelial-mesenchymal transition (EMT) and alleviate renal fibrosis.

[**Key words**] extracellular matrix; fibrosis; diabetes mellitus; blood glucose; kidney diseases; phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten; rats, Sprague-Dawley

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)严重的并发症,也是导致糖尿病病人终末期肾衰竭的主要病因。在各种细胞因子的作用下,肾小管上皮细胞向间充质细胞的转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)及细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)大量沉积是导致 DN 肾间质纤维化的重要原因^[1]。前期的研究发现, DN 时肾组织第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)的蛋白和 mRNA 表达均减少,可能使转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)过激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (PKB/Akt)信号通路,从而促进了 DN 的发生发展^[2]。然而,在 DN 发生发展过程中 PTEN 的表达变化对肾小管上皮细胞 EMT 的发生和 ECM 沉积的作用尚不甚清楚。本研究通过观察控制血糖前后 PTEN 在 DM 大鼠肾组织中的表达变化,初步探讨 PTEN 与 EMT 的关系及控制血糖对 DN 时肾组织 PTEN 的表达及肾纤维化病变的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体重(180 ± 20)g,由上海西普尔-比凯实验动物有限公司提供[许可证号:Scxy(沪)2003-0002]。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ;Sigma 公司);血糖、血肌酐、尿蛋白检测试剂盒(迈克公司);PTEN、E-cadherin、 α -SMA 多克隆抗体(博奥森公司),FN、Collagen IV 多克隆抗体、

β -actin 单克隆抗体和 DAB 显色剂(博士德公司),免疫组织化学 SP 两步法检测试剂(迈新生物技术开发有限公司);Western 印迹用 PVDF 膜、Whatman 3MM 滤纸(Millipore);超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物研究所);PTEN 和 β -actin 引物(上海生工生物工程技术有限公司);总 RNA 提取试剂盒(TRIZOL 法)、2 倍 Taq PCR MasterMix、Marker1(天根生化科技有限公司);RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)。其它试剂均为市售分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型及分组 32 只 SD 大鼠尾静脉注射溶于 pH 4.5、0.01 mol/L 无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的 STZ 55 mg/kg 复制 DM 大鼠模型,48 h 后测大鼠空腹血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 且尿糖阳性认为造模成功。随机分成糖尿病组(DM 组)和胰岛素治疗组(DMA 组),DMA 组从第 13 周开始皮下注射精蛋白锌胰岛素,实行个体化剂量,以血糖控制在 4~7 mmol/L,尿糖阴性为准,分别饲养至 16 周和 24 周处死动物($n=8$),DM 组动物亦饲养至相应周数后处死($n=8$)。同时,设鼠龄相同的正常对照组(N 组),尾静脉注射 0.01 mol/L 无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5),饲养至相应周数后处死($n=8$)。所有大鼠予标准饲料喂养,自由饮水。

1.2.2 标本收集 大鼠处死前 1 d 用代谢笼收集 24 h 尿,记录尿量,取部分尿液离心后 -20 °C 保存;处死前禁食 6~8 h,麻醉后称重,股动脉穿刺采血,分离血清, -20 °C 保存;开腹取双侧肾脏,去掉包膜及周围脂肪组织,称重后分别用 4% 多聚甲醛固定及 -80 °C 保存。

1.2.3 生化指标测定 氧化酶法测血清葡萄糖

(blood glucose, BG); 苦味酸法测血肌酐 (serum creatinine, Scr); 考马斯亮蓝法测尿蛋白 (urine protein, UP), 均按试剂盒说明书操作。尿蛋白浓度与尿量乘积为 24 h 尿蛋白量。

1.2.4 肾组织病理检查 多聚甲醛固定肾组织, 制成 3 μm 厚的石蜡切片, 行 HE 及 PAS 染色, 光镜观察肾组织形态结构变化。

1.2.5 免疫组织化学染色 采用 SP 两步法检测 FN、Collagen IV 在各组大鼠肾组织的分布和表达。石蜡切片脱蜡水化, 经微波热修复抗原及 5% BSA 封闭后, 分别加入 FN (1:50)、Collagen IV (1:50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入生物素化二抗, 室温下孵育 30 min, 滴加 SP 试剂, DAB 显色, 苏木素复染。PBS 代替一抗, 作阴性对照; FN、Collagen IV 阳性计数方法参考以往的报道, 计数 10 个视野 (400 倍), 取均值^[3]。

1.2.6 Western 印迹检测 取 80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的各组大鼠肾皮质, 每组 100 mg, 分别加入组织蛋白提取液后匀浆、离心、取上清, 用 BCA 试剂盒 (碧云天) 测定各组蛋白质浓度, 按所测得浓度计算每泳道所需体积, 加入加样缓冲液煮沸 10 min。经 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 再转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 PTEN、E-cadherin、 α -SMA 或 β -actin 一抗, 工作浓度分别为 1:300、1:300、1:200 和 1:300, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第 2 天, TBST 洗膜后, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗 (浓度均为 1:8 000) 室温孵育 1 h, 加 ECL 荧光显色液, 暗室胶片曝光。胶片于凝胶成像系统 (Chmio Dox, Bio-Rad) 扫描, Quantity one 软件分析各条带的面积和灰度值, 两者乘积为积分灰度值, 每个样本重复操作 3 次。以 β -actin 蛋白条带作为内参, 结果用目标蛋白/ β -actin 值表示。

1.2.7 RT-PCR 检测肾组织 PTEN mRNA 的表达

TRIzol 法提取大鼠肾皮质的总 RNA, 核酸蛋白仪测 RNA 的浓度和纯度 (A260 nm/A280 nm 值均在 1.8~2.0), 取 4 μg 肾组织, 总 RNA 按 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 说明进行逆转录, 合成 cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以 cDNA 为模板进行 PTEN 和 β -actin (作为内参) 共同扩增。PCR 所需引物序列如下: PTEN: 上游 5'-CGACGGGAAGACAAGACAAGTTCAT-3', 下游 5'-GCTAGCCTCTGGATTTGACG-3', 产物 385 bp; β -actin: 上游 5'-GAAATCGTGCCTGACATTAG-3', 下游 5'-CTAGAAGCATTGCGCGGTGA-3', 产物

490 bp。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 进入循环: 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 62 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 30 个循环后, 再 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。反应产物做 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Bio-Rad 凝胶成像系统扫描, 应用 Quantity one 软件将各 PTEN 条带的光密度值与 β -actin 条带光密度值的比值作为 PTEN 相对表达水平参数, 进行半定量分析。

1.2.8 统计学分析 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 软件, 组间比较采用方差齐性检验, 作单因素方差分析。相关性分析采用 Bivariate Correlations 计算 Pearson 相关系数, $P < 0.05$ 时表示有统计学意义。

2 结果

2.1 生物化学指标测定结果

如表 1 所示 DM 组各时点的 BG、Scr、24 h 尿蛋白较正常对照组明显升高 ($P < 0.05$), DMA 组上述各指标比相应时点 DM 组明显降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠的血糖、血肌酐浓度和 24 h 尿蛋白量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 1 Levels of BG, Scr, and 24 h UP in each group

周数	组别	BG (mmol/L)	Scr ($\mu\text{mol/L}$)	24 h UP (mg)
16	N	8.04 \pm 0.32	73.46 \pm 12.68	6.65 \pm 1.24
	DM	27.15 \pm 1.20 ⁽¹⁾	118.07 \pm 11.88 ⁽¹⁾	26.38 \pm 18.34 ⁽¹⁾
	DMA	6.85 \pm 3.48 ⁽²⁾	88.00 \pm 15.64 ⁽²⁾	7.33 \pm 2.88 ⁽²⁾
24	N	7.95 \pm 1.09	89.72 \pm 8.13	3.76 \pm 1.19
	DM	23.33 \pm 2.63 ⁽¹⁾	116.37 \pm 38.28 ⁽¹⁾	49.35 \pm 31.86 ⁽¹⁾
	DMA	8.41 \pm 0.74 ⁽²⁾	85.46 \pm 14.63 ⁽²⁾	6.25 \pm 1.80 ⁽²⁾

⁽¹⁾ 与各时间点正常对照组相比, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与各时间点糖尿病组相比, $P < 0.05$

2.2 肾组织病理变化

HE 及 PAS 染色可见正常大鼠肾小管结构清晰, 肾小管上皮细胞排列整齐, 基底膜完整, 间质中未见炎性细胞浸润。DM 组大鼠肾小管腔扩张明显, 肾小管上皮细胞变性, 甚至萎缩、脱落。肾小管基底膜不规则增厚, 间质出现炎性细胞浸润, 肾小管间质 PAS 染色阳性物质增多。DMA 组大鼠肾脏病变有不同程度的改善, 肾小管间质 PAS 染色阳性物质明显减少, 炎症细胞浸润减轻, 肾小管间质纤维化病变减少, 见图 1。

2.3 免疫组织化学结果

免疫组织化学染色检测 FN 和 Collagen IV 的表达。正常大鼠肾组织 FN 在肾小管基底膜呈少量线性分布, 而在糖尿病大鼠可见 FN 的表达明显增多 ($P < 0.05$), 肾小球也可见阳性染色, 而治疗组

大鼠 FN 的表达显著减少;正常大鼠肾组织 Collagen IV 阳性染色主要存在于细胞间质,而在糖尿病大鼠

其阳性染色明显增多,可见小管基底膜强阳性染色,治疗组 Collagen IV 的表达显著减少,见图 2。

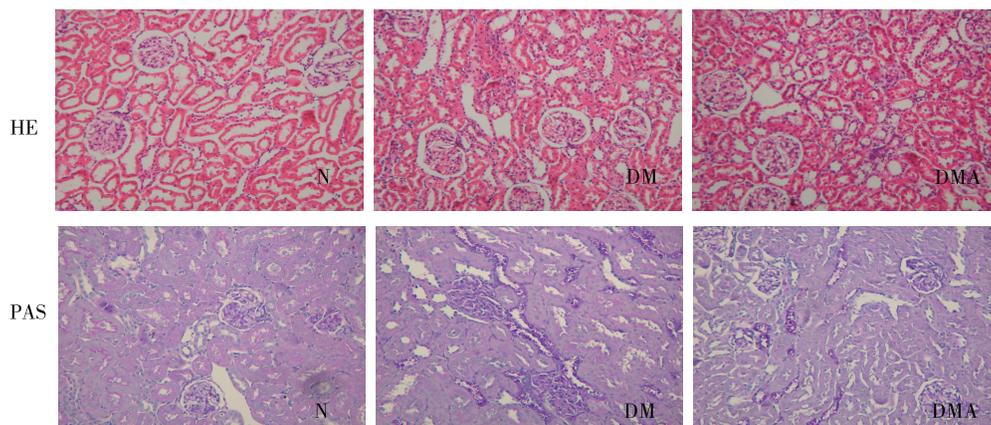
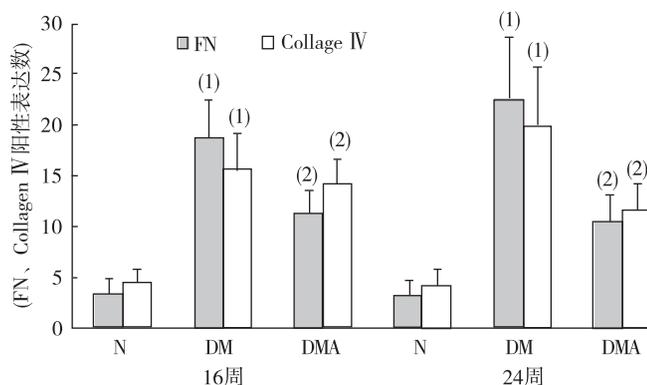
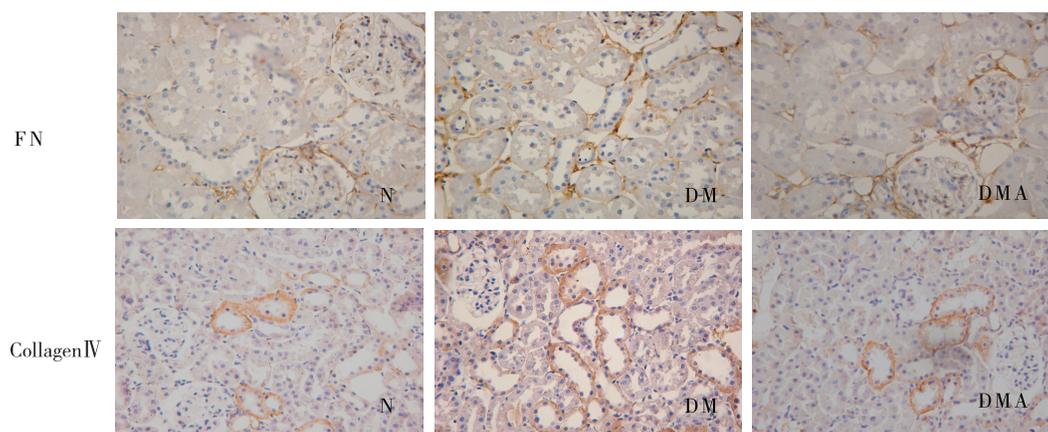


图 1 16 周正常对照组、糖尿病组和胰岛素治疗组大鼠肾组织形态(HE 和 PAS 染色, $\times 200$)
Fig.1 Tissue morphology of kidney tissues of each group in 16 weeks (HE and PAS staining)



注: ⁽¹⁾ 与各时间点正常对照组相比, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与各时间点糖尿病组相比, $P < 0.05$

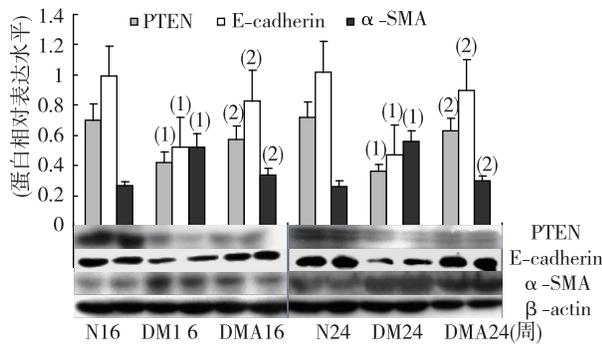
图 2 免疫组织化学显示各组大鼠肾组织 FN 和 Collagen IV 蛋白表达 ($\times 400$)

Fig.2 The levels of FN and Collagen IV in kidney tissues of each group showed by immunohistochemistry staining

2.4 Western 印迹结果

正常对照组中 PTEN 和 E-cadherin 高表达,而 α -SMA 仅有少量表达。DM 组大鼠 PTEN、E-cadherin 蛋白表达较正常对照组显著下调 ($P <$

0.05), 而 α -SMA 蛋白表达显著高于正常组 ($P < 0.05$)。DMA 组 PTEN、E-cadherin 蛋白表达较 DM 组大鼠明显增多 ($P < 0.05$), α -SMA 蛋白表达较 DM 组大鼠有所减少 ($P < 0.05$), 见图 3。



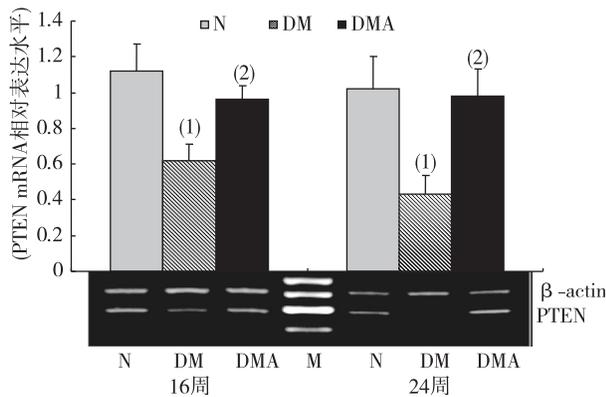
注: (1) 与各时间点正常对照组相比, $P < 0.05$;
(2) 与各时间点糖尿病组相比, $P < 0.05$

图3 Western blot 显示各组大鼠肾皮质 PTEN、E-cadherin 和 α -SMA 蛋白表达水平

Fig. 3 The levels of PTEN, E-cadherin and α -SMA protein in kidney tissues of each group showed by western blot

2.5 PT-PCR 结果

PTEN mRNA 的表达同其蛋白表达趋势一致, DM16 周组 PTEN mRNA 水平较正常对照组显著降低 ($P < 0.05$), DM 24 周组 PTEN mRNA 表达较 N 组进一步减少 ($P < 0.05$); DMA 组 PTEN mRNA 水平则显著高于同时点 DM 组 ($P < 0.05$), 见图 4。



注: (1) 与各时间点正常对照组相比, $P < 0.05$;
(2) 与各时间点糖尿病组相比, $P < 0.05$

图4 PTEN mRNA 在正常对照组、糖尿病组和胰岛素治疗组大鼠肾组织中的表达

Fig. 4 The expression of PTEN mRNA in kidney tissues of each group

3 讨论

本实验采用 STZ 复制糖尿病动物模型, 尾静脉注射 STZ 48 h 后, 大鼠血糖显著升高且尿糖阳

性, 而且在整个实验中血糖一直维持在高水平, 并出现多饮、多食、多尿的症状, 提示大鼠糖尿病模型复制成功。同时 BG、Scr、24 h UP 明显增多且肾脏发生病理学改变, 表明大鼠已发生了 DN。

TGF- β_1 是目前公认的致纤维化因子, 其引起的 EMT 是导致肾间质纤维化的重要原因^[4]。研究发现, 在脏器纤维化过程中, TGF- β_1 可以通过激活 PI3K-PKB/Akt 通路来发挥其致纤维化的作用。TGF- β_1 可以激活受体 ALT1/5, 随即与 PI3Kp85 调节亚基形成复合物并且激活其 p110 催化亚基, 磷酸化磷酸肌醇 4,5 二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂) 成为磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP₃), PIP₃ 使 PKB 转位到质膜内侧, 被磷脂酰肌醇依赖的激酶 (phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1) 激活, 继而磷酸化多种蛋白, 发挥其促纤维化作用^[5,6]。张勇等^[7] 的体外研究发现, 人肾小管上皮细胞 (human renal tubular epithelial cells, HKC) 经 TGF- β_1 刺激 48 h 后 α -SMA 表达显著升高, 加入 PI3K 特异性抑制剂后, 能显著抑制 TGF- β_1 诱导的 α -SMA 表达, 表明 PI3K/Akt 信号通路可能介导了 TGF- β_1 诱发的肾小管 EMT 过程; 也有研究表明, TGF- β_1 激活 PI3K-PKB/Akt 通路参与了肾间质 ECM 的沉积^[8]; 以上研究都提示了 PI3K-PKB/Akt 通路的激活在 DN 的发生发展中有致纤维化作用。

PTEN 是一种具有双重特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 其表达产物具有脂性磷酸酯酶和蛋白性磷酸酯酶活性。正常组织中 PTEN 的高表达及其活性的存在, 提示了 PTEN 参与了多种生理和病理过程。PI3K 是一种脂质激酶, 是促进细胞增殖的重要调节因子, PTEN 通过其脂质磷酸酶活性引起 PIP₃ 脱磷酸化反应生成 PIP₂, 从而抑制其活性并阻断了 PI3K 信号传导通路及其下游的生物学效应^[9]。有研究表明, PTEN 蛋白可以抑制 TGF- β_1 激活 PI3K-PKB/Akt 通路产生的致纤维化效应^[10]。既往的研究也发现糖尿病大鼠肾组织 PTEN 蛋白和 mRNA 表达均明显下降, 且 PTEN 表达与 p-Akt1 (Ser473) 表达呈显著负相关, 提示糖尿病大鼠肾组织 p-Akt1 (Ser473) 表达增多不仅是由 TGF- β_1 激活 PI3K-PKB/Akt 通路造成的, 还可能是 PTEN 的表达减少导致对该通路的抑制作用减弱, 从而导致了 DN 的发生发展^[2]。本研究结果显示 DM 组大鼠肾组织的 PTEN 随着病程进展蛋白和转录水平的表达均明显减少; 同时, 反映肾间质纤维化情况的

ECM 主要成分 FN 和 Collagen IV 较正常组表达显著增多,并且伴有肾小管上皮细胞表型标志物 E-cadherin 的显著减少而间质细胞标志物 α -SMA 的表达。提示在 DN 的纤维化病变过程中 PTEN 的表达减少,促进了 TGF- β_1 过激活 PI3K-PKB/Akt 通路,诱导了肾小管 EMT 的发生和肾间质 ECM 的沉积,使 DN 的病变加重。这与前期的研究结果相一致^[2]。本实验进一步观察了胰岛素治疗 DM 大鼠后肾组织 PTEN 的表达变化和肾脏的纤维化病变情况。结果表明,控制血糖后,PTEN 在转录和蛋白水平的表达均上调,而 FN 和 Collagen IV 表达显著降低,同时 α -SMA 的表达显著减少,而 E-cadherin 的表达增加,肾脏的纤维化病变减轻。提示控制血糖能上调肾小管上皮细胞 PTEN 的表达,抑制 TGF- β_1 激活 PI3K-PKB/Akt 通路产生的致纤维化效应,延缓和减轻了肾小管上皮细胞的 EMT 及肾间质 ECM 的沉积,改善肾纤维化病变。

4 参考文献

- [1] Truong LD, Sheikh-Hand, Chakraborty S, et al. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy[J]. *Kidney International*, 1996(50):200-207.
- [2] 王圆圆,刘瑞霞,郭兵,等. 大鼠肾组织 PETN 表达下调在糖尿病肾病发展中的作用[J]. *生理学报*, 2011(4): 325-332.
- [3] 肖瑛,石明隽,郭兵,等. 丹芪合剂对 DM 大鼠肾小管 BMP-7 及其受体表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2009(10): 2495-2497.
- [4] 黄彬,姜悦. 肾纤维化中上皮间充质转化的最新研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2006(3): 264-265.
- [5] Russo RC, Garcia CC, Barcelos LS, et al. Phosphoinositide3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice[J]. *J Leukoc Biol*, 2011(2): 269-282.
- [6] Balasis ME, Forinash KD, Chen YA, et al. Combination of farnesyltransferase and Akt inhibitors is synergistic in breast cancer cells and causes significant breast tumor regression in ErbB2 transgenic mice[J]. *Clin Cancer Res*, 2011(9): 2852-2862.
- [7] 张勇,张璟. 磷脂酰肌醇 3 激酶/Akt 通路参与 TGF- β_1 诱导人肾小管上皮细胞间质转分化过程[J]. *医学研究生学报*, 2006(4): 319-322.
- [8] Martínez-Salgado C, Fuentes-Calvo I, García-Cenador B, et al. Involvement of H- and N-Ras isoforms in transforming growth factor-beta1-induced proliferation and collagen and fibronectin synthesis[J]. *Exp Cell Res*, 2006(11): 2093-2106.
- [9] Paul W, Sum it J, Ganesh V. Intracellular signaling mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of γ -tocotrienol in neoplastic mammary epithelial cells[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005(7): 803-810.
- [10] Kattla JJ, Carew RM, Heljic M, et al. Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF- β_1 driven epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008(295): F215-F225.
- (2011-12-31 收稿, 2012-01-12 修回)
编辑:张丽君
- (上接第 13 页)
- [23] Zhang JF, He ML, Fu WM, et al. Primate-specific microRNA-637 inhibits tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by disrupting signal transducer and activator of transcription 3 signaling[J]. *Hepatology*, 2011(6): 2137-2148.
- [24] Han ZB, Chen HY, Fan JW, et al. Up-regulation of microRNA-155 promotes cancer cell invasion and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma following liver transplantation[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011(10):1076.
- [25] Lin J, Huang S, Wu S, et al. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2011(11):1641-1647.
- [26] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection[J]. *Science*, 1996(5289):998-1001.
- [27] Xi Y, Nakajima G, Gavin E, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples[J]. *RNA*, 2007(10):1668-1674.
- [28] Siebolts U, Varnholt H, Drebbler U, et al. Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR[J]. *J Clin Pathol*, 2009(1):84-88.
- [29] Gao P, Wong CC, Tung EK, et al. Deregulation of microRNA expression occurs early and accumulates in early stages of HBV-associated multistep hepatocarcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2011(6):1177-1184.
- [30] Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009(3-4):369-378.
- (2011-12-16 收稿, 2011-12-30 修回)
编辑:张丽君