

沉默 CCL19 对结直肠癌增殖、迁移、侵袭和促血管形成的影响

陆 军^{1,2}, 赵敬坤^{1,2}, 陆爱国¹, 冯 浩³, 王蒲雄志¹, 张 卓¹, 宗雅萍¹, 马君俊¹, 刘炳亚², 郑民华¹

上海交通大学 医学院附属瑞金医院 1. 微创外科, 2. 上海市消化外科研究所, 上海 200025; 3. 慕尼黑大学医学院, 德国慕尼黑 80539

[摘要] 目的 研究趋化因子 CCL19 在结直肠肿瘤中的作用。方法 采用 Real-Time PCR 和 Western blotting 技术筛选高表达 CCL19 的细胞株 SW620 细胞作为研究对象,并用 siRNA 沉默 SW620 中的 CCL19 基因。分别采用细胞增殖实验、Transwell 迁移、侵袭实验和小管形成实验来检测 SW620 细胞的增殖、迁移、侵袭和促血管形成能力的变化。结果 Western blotting 和 Real-Time PCR 证实 SW620 中 CCL19 相对其他细胞株高表达。经 siRNA-CCL19 干扰后,SW620 细胞在 48 ~ 120 h 内细胞增殖能力显著上升 ($P < 0.05$),细胞迁移、侵袭能力亦明显上升 ($P < 0.05$),促血管形成能力明显增强。结论 SW620 是相对高表达 CCL19 的细胞株,沉默 CCL19 基因后可以明显促进 SW620 细胞在体外的增殖、迁移、侵袭和促血管形成能力,因此认为 CCL19 在结直肠癌发展中起着抑制作用,并有应用于抗癌药物研究的前景。

[关键词] 趋化因子 CCL19;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭;血管形成

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2014.05.003 **[中图分类号]** R735.35; R735.37 **[文献标志码]** A

Effects of silencing CCL19 on migration, invasion, and proangiopoiesis of colorectal cancer cells

LU Jun^{1,2}, ZHAO Jing-kun^{1,2}, LU Ai-guo¹, FENG Hao³, WANG PU Xiong-zhi¹, ZHANG Zhuo¹, ZONG Ya-ping¹, MA Jun-jun¹, LIU Bing-ya¹, ZHENG Min-hua¹

1. Department of Minimally Invasion Surgery, 2. Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 3. The University of Munich School of Medicine, Munich 80539, Germany

[Abstract] **Objective** To investigate the role of chemokine CCL19 in colorectal carcinoma tissues. **Methods** SW620 Cell line with highest expression level of CCL19 was screened for the study by the Real-Time quantitative PCR and Western blot. CCL19 of SW620 was silenced by siRNA. The changes of proliferation, migration and invasion, and proangiopoiesis abilities of SW620 were detected by the CCK-8, Transwell, and tube formation assay, respectively. **Results** The Western blotting and Real-Time PCR confirmed that the expression of CCL19 in SW620 was higher than that of other cell lines. The proliferation, migration, invasion, and proangiopoiesis abilities of SW620 cells within 48 – 120 h were significantly improved after CCL19 being silenced. **Conclusion** The expression level of CCL19 in SW620 is relatively high. Silencing CCL19 can significantly enhance the proliferation, migration, invasion, and proangiopoiesis abilities of SW620 cells *in vitro*, so it is believed that the CCL19 can inhibit the development of colorectal cancer and is potential to be applied to the research of anticancer drugs.

[Key words] chemokine CCL19; cell proliferation; cell migration; cell invasion; vascularization

[基金项目] 国家自然科学基金(81201625);上海市科委引导项目(124119a0900)(National Natural Science Foundation of China, 81201625; Guidance Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 124119a0900)。

[作者简介] 陆 军(1987—),男,硕士生;电子信箱:13788989913@163.com。

[通信作者] 陆爱国,电子信箱:adams_lu66@yahoo.com.cn。

结直肠癌是全球发病率和病死率最高的肿瘤之一,近年来,其在中国的发病率也呈现逐年上升趋势^[1]。但是,结直肠癌的发病机制尚未完全清楚,因此,研究结直肠癌发生、发展及转移的分子学机制对诊断和治疗有重要的意义。

趋化因子是一类具有吸引白细胞移行至炎症部位的小分子量分泌蛋白,相对分子质量多为 8 000 ~ 10 000,在炎症反应中具有重要作用。随着肿瘤免疫治疗和肿瘤微环境的深入认识,趋化因子和肿瘤的关系越来越被重视。多种趋化因子在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用,其中大多数具有促进作用,如 C-C 族趋化因子配体 2 [chemokine (C-C motif) ligand 2, CCL2]、C-X-C 族趋化因子配体 12 [chemokine (C-X-C motif) ligand 12, CXCL12] 等,可以促进肿瘤的侵袭、转移和血管形成。然而,部分趋化因子却被证实在体内外均起着抑制肿瘤的作用,如 C-X-C 族趋化因子配体 9 [chemokine (C-X-C motif) ligand 9, CXCL9] 和 [chemokine (C-X-C motif) ligand 10, CXCL10] 以及 C-C 族趋化因子配体 19 [chemokine (C-C motif) ligand 19, CCL19] 等^[2,3]。

CCL19 是趋化因子 C-C 族的成员,又名巨噬细胞炎症蛋白 3 β (macrophage inflammatory protein 3-beta, MIP-3 β) 或者 EB 病毒源性分子配体 1 趋化因子 (epstein-barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine, ELC), 其特异性受体 CCR7 是分布于细胞膜表面的 G 蛋白偶联受体^[4]。国内外众多研究^[5-7] 表明, CCL19 能在体内外抑制多种实体肿瘤, 如肺癌、卵巢癌和纤维肉瘤等。然而, CCL19 与结直肠癌的关系却鲜有报道, 因此本课题组选取 CCL19 研究其与结直肠癌之间存在的关系。我们的前期研究^[8] 发现, CCL19 在结肠肿瘤组织中明显低表达, 且以不同浓度的重组人 CCL19 刺激肿瘤细胞后, 细胞增殖、迁移和侵袭等能力明显减弱, 但当 CCR7 被抗体中和后, 该抑癌作用就明显减弱。为了进一步验证 CCL19 的功能, 本研究利用 siRNA 沉默结肠癌细胞 CCL19 基因的方法来验证 CCL19 的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人结直肠癌细胞系 (HCT116、Caco2、LoVo、SW480、SW1116、SW620 和 HT29) 以及人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 由上海消化外科研究所保存传代; 小牛血清 (FBS)、

RPMI1640、Leibovitz's L-15 和 F-12K 培养液 (杭州吉诺生物有限公司); LipofectamineTM 2000、TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司, 美国); siRNA (上海吉玛生物有限公司); 反转录试剂盒 (DBI Bioscience 公司, 美国); 鼠抗人 CCL19 单克隆抗体 (R&D 公司, 美国); CCK-8 试剂盒 (Dojindo 公司, 日本); Transwell 小室 (Corning 公司, 美国); Matrigel 胶 (BD 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HCT116、HT29、Caco2 和 HUVEC 以含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液培养传代; SW480、SW620 和 SW1116 以含 10% FBS 的 L-15 培养液培养传代, LoVo 以含 10% FBS 的 F-12K 培养液传代培养。于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育。

1.2.2 PCR 扩增 CCL19 引物序列: 5'-GTGACCTGCATTAACCTCTTTACTTGC-3' (上游); 5'-TATGGCTCTGGCTCTACTGGTTG-3' (下游)。GAPDH 引物序列: 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3' (上游); 5'-GTAGCCCAGGATGCCCTFGA-3' (下游)。以 TRIzol 试剂抽提细胞总 RNA, 经电泳鉴定完整性, 分光光度计测定 RNA 浓度。反转录试剂盒合成 cDNA, 反应条件为: 25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 min, 4 °C 保存。将 10 μ L Mix、1 μ L RNA、上下游引物各 1 μ L 以及 7 μ L 去离子水混合后行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 68 °C 30 s, 共 34 个循环。PCR 产物均等加入 2% 琼脂糖凝胶孔中, 于 140 V 电压下电泳 40 min, 紫外凝胶成像仪摄片。

1.2.3 Real-Time PCR 引物及 cDNA 合成过程同上。取 1 μ L cDNA 混合上下游引物及 SYBR Green PCR Master Mix 在 Real-Time PCR 仪中进行反应。反应条件: 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 68 °C 30 s, 共 40 个循环。以 2^{- Δ Ct} 表示计算结果 (Δ Ct 为同一样本中目的基因与内参基因 Ct 值之差)。

1.2.4 Western blotting 收集 6 孔板内培养细胞, 每孔加入 90 μ L 细胞裂解液。经超声裂解后置冰上 30 min, 16 000 $\times g$ 离心 15 min, 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 上样量为 50 μ g, 加入上样缓冲液后煮沸 10 min 变性。细胞培养上清液蛋白提取则通过 Millipore 超滤离心管浓缩细胞上清液后获得。电泳 (积层胶 80 V, 分离胶 120 V), 转膜 (200 mA, 3 h), 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 一抗 1:1 500 稀释, 室温孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:10 000 稀释) 后室温避光孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 用红外荧光扫描仪扫膜。

1.2.5 细胞转染 将 SW620 细胞均匀铺于 6 孔板中,待细胞密度达到 50% 后,以 Lipofectamine™ 2000 作为转染介质,将 siRNA 转染进入细胞。将转染目的基因非同源性 siRNA 片段后的 SW620 细胞作为阴性对照,将只加入 Lipofectamine™ 2000 的 SW620 细胞作为空白对照。

1.2.6 siRNA 筛选 si-CCL19 #1: 5'-UCUGAGUGGCACCAUGAUTTAUCAUUGGUGCCACUCAGATT-3'; si-CCL19 #2: 5'-CCUGGGUAGAACGCAUCAUTTAUGAUGCGUUCUACCCAGGTT-3'; si-CCL19 #3: 5'-GGUACAUUGGAGGAACUUTTAAGUUCUCCACGAUGUACCTT-3'。转染 24 h 后抽取总 RNA,转染 72 h 后抽取细胞总蛋白和细胞培养上清液蛋白。

1.2.7 细胞增殖实验 设 siRNA 干扰组、阴性对照组和空白对照组,每组为 6 个平行孔,并将对应处理后的细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,分别于 0、24、48、72、96 和 120 h 时加入 10 μ L CCK-8 溶液,并于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育 2 h,全光谱微孔板分光光度计测 450 nm 处的吸光度 D 值, D 值的大小代表细胞增殖能力的强弱。

1.2.8 Transwell 细胞迁移和侵袭实验 将 Transwell 小室分成 3 组:siRNA 干扰组、阴性对照组和空白对照组,每组设 3 个复孔(侵袭实验需另用 1:7 稀释的 Matrigel 胶以 50 μ L/孔铺于小室聚碳酸酯膜内表面)。分别向每组上室加入 150 μ L 密度为 5×10^5 个/mL 对应处理的 SW620 细胞悬液,下室加入含 20% FBS 的 L-15 培养液,孵育 48 h 后取出小室,棉签擦去上室细胞,甲醇固定 15 min,1% 结晶紫染色 25 min,PBS 清洗。100 倍光镜下计数穿过碳酸酯膜的细胞数,并以穿膜细胞的相对数目计算肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。取 5 个随机视野内的细胞数,并取平均值进行统计处理。

1.2.9 小管形成实验 将 Matrigel 胶以 50 μ L/孔均匀铺于 96 孔板中,分为 3 组,每组设 3 个复孔。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温箱中凝固 30 min 后每孔加入 3×10^4 个 HUVEC。此外,第 1 组加入 siRNA 干扰组的 SW620 细胞培养液 100 μ L,第 2 组加入阴性对照组的 SW620 细胞培养液 100 μ L,第 3 组加入空白对照组的 SW620 细胞培养液 100 μ L。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温箱中孵育 10 h 后 100 倍光学显微镜下每孔取 5 个随机视野拍照。

1.3 统计学方法

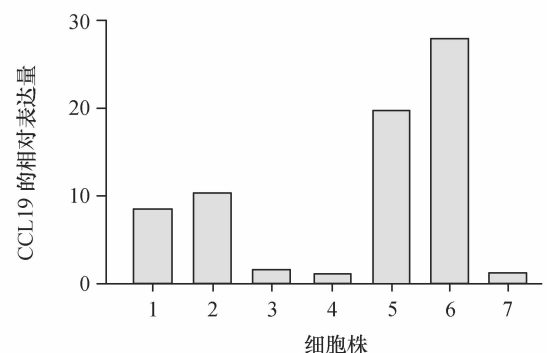
采用 SAS 9.3 软件进行统计学分析,计量资料以

$\bar{x} \pm s$ 表示。CCK-8 细胞增殖实验、Transwell 迁移和侵袭实验穿膜细胞数目的比较均采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用 Bonferroni's Multiple Comparison Test 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌细胞株 CCL19 筛选

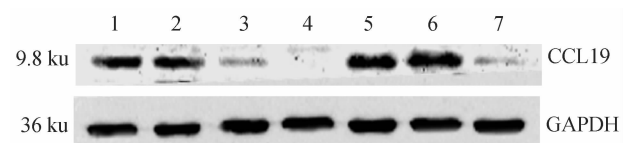
Real-Time PCR 和 Western blotting 显示:细胞株 SW620、SW1116 和 HCT116 相对高表达 CCL19,其中又以 SW620 表达最高(图 1、2)。而我们的前期实验又证实 SW620 是受体 CCR7 表达最高的细胞,因此选取生长状态较好且转染效率较高的 SW620 细胞株作为本研究的实验对象。



注: 1. HCT116; 2. SW480; 3. LoVo; 4. Caco2; 5. SW1116; 6. SW620; 7. HT29。

图 1 Real-Time PCR 检测各细胞株 CCL19 的表达量

Fig 1 Expression levels of CCL19 in cell lines detected by Real-Time PCR



注: 1. HCT116; 2. SW480; 3. LoVo; 4. Caco2; 5. SW1116; 6. SW620; 7. HT29。

图 2 细胞株 Western blotting 筛查 CCL19 的表达量

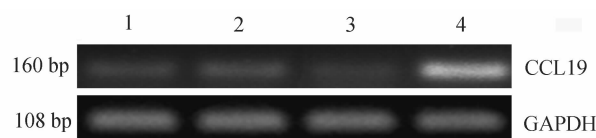
Fig 2 Expression levels of CCL19 in cell lines screened by Western blotting

2.2 siRNA 序列干扰效率筛选

分别用 3 种 siRNA 转染 SW620 细胞后,Real-Time PCR 验证结果显示 si-CCL19 #3 的干扰效率较其他两种更高(图 3)。因此,选取 si-CCL19 #3 作为我们实验用 siRNA。3 组细胞蛋白和细胞上清液蛋白的 Western blotting 显示:经过 siRNA 干扰后,CCL19 的表达量较其他两组明显减少,而阴性对照组和空白对照组之间差异不明显(图 4)。

2.3 细胞增殖实验

沉默 CCL19 后,SW620 细胞增殖能力在 48 ~ 120 h 时较阴性对照组和空白对照组出现显著增强,差异有统计学意义($P < 0.01$),而阴性对照组与空白对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1、图 5)。



注: 1. si-CCL19 #1; 2. si-CCL19 #2; 3. si-CCL19 #3; 4. 阴性对照。

图 3 Real-Time PCR 检测 3 种 siRNA 的干扰效率

Fig 3 The interfere efficiency of three siRNA detected by Real-Time PCR

表 1 细胞增殖实验各时间点的吸光度值($n = 6$)

Tab 1 The absorbance values of the proliferation assay at each time point ($n = 6$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
空白对照组	0.23 ± 0.012	0.31 ± 0.019	0.64 ± 0.096^{①}	1.06 ± 0.120^{②}	2.33 ± 0.166^{②}	2.84 ± 0.118^{②}
阴性对照组	0.23 ± 0.011	0.30 ± 0.016	0.63 ± 0.112^{①}	1.01 ± 0.128^{②}	2.31 ± 0.190^{②}	2.74 ± 0.190^{②}
SiRNA 干扰组	0.23 ± 0.010	0.32 ± 0.020	0.81 ± 0.090	1.40 ± 0.103	3.18 ± 0.179	3.80 ± 0.230

注: ① $P < 0.05$, ② $P < 0.001$ 与 SiRNA 干扰组比较。

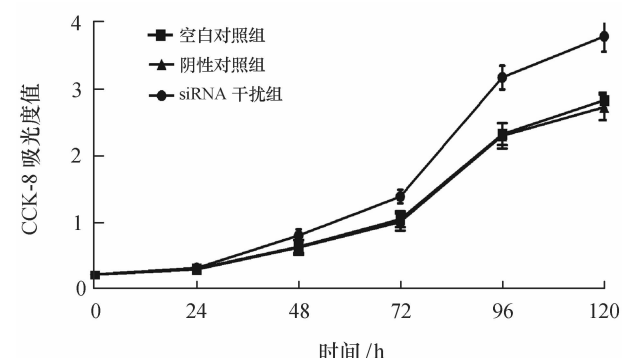
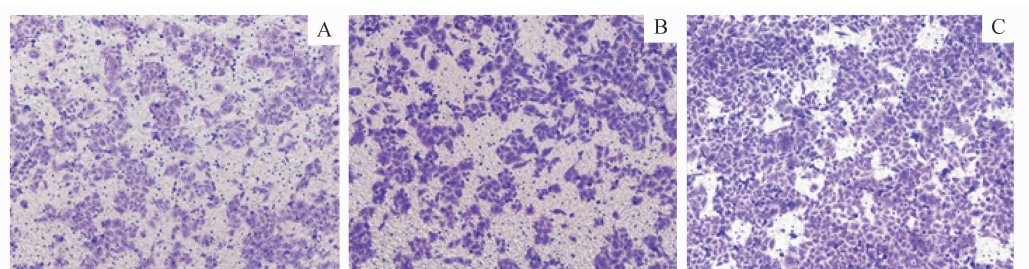


图 5 SW620 细胞增殖曲线($n = 6$)

Fig 5 Proliferation curves of SW620 cells ($n = 6$)

2.4 Transwell 细胞迁移实验

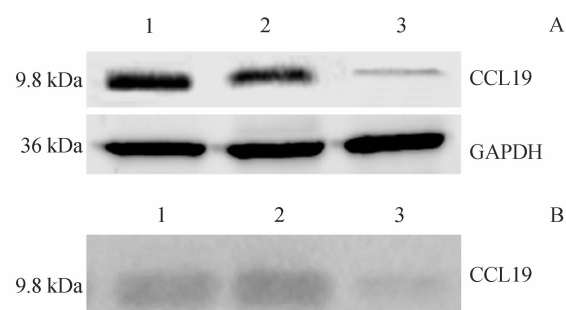
Transwell 细胞迁移实验结果显示 siRNA 组的穿膜细胞数较对照组明显增多(图 6)。空白对照组、阴性对照组和 siRNA 干扰组的穿膜细胞数分别为(351.04 ± 49.22)、(320.04 ± 46.12)和($1018.03 \pm$



注: A. 空白对照组; B. 阴性对照组; C. siRNA 干扰组。

图 6 Transwell 细胞迁移实验结果 $\times 100$

Fig 6 The results of Transwell cell migration assay $\times 100$



注: A. CCL19 在细胞内的干扰效果; B. CCL19 在细胞培养上清液中的干扰效果; 1. 空白对照组; 2. 阴性对照组; 3. siRNA 干扰组。

图 4 Western blotting 检测各组 CCL19 蛋白的表达差异

Fig 4 The differences of expressions of CCL19 of each group detected by Western blotting

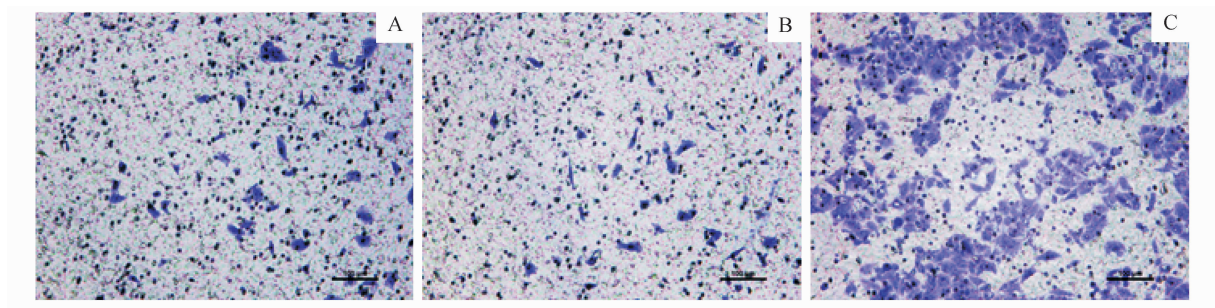
107.61) 个, siRNA 干扰组的迁移细胞数明显多于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$),但两对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 细胞侵袭实验

Transwell 细胞侵袭实验结果表明 siRNA 干扰组侵袭进入下室的细胞数明显多于两对照组(图 7)。空白对照组、阴性对照组和 siRNA 干扰组的侵袭细胞数分别为(28.40 ± 6.80)、(22.60 ± 8.14)和(102.00 ± 16.09)个, siRNA 干扰组明显多于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$),但两对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 小管形成实验

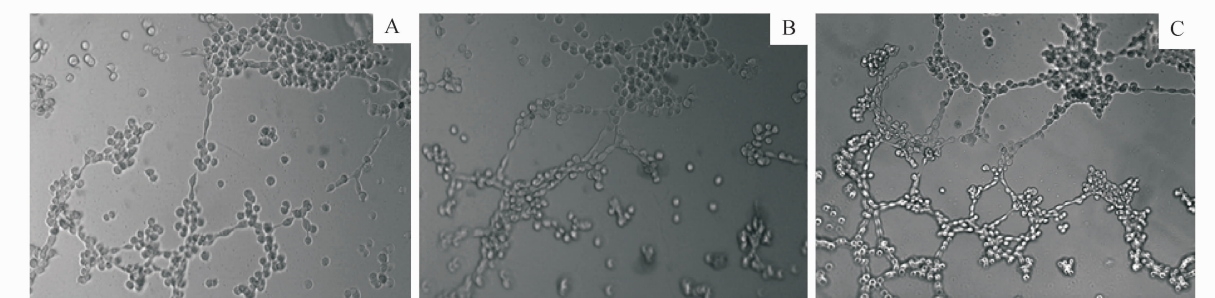
经 3 种不同方式处理 HUVEC 细胞 10 h 后,结果显示空白对照组和阴性对照组仅有少量小管形成,而 siRNA 干扰组却形成了大量网状结构的小管(图 8)。



注: A. 空白对照组; B. 阴性对照组; C. siRNA 干扰组。

图 7 细胞侵袭实验结果 $\times 100$

Fig 7 The results of cell invasion assay $\times 100$



注: A. 空白对照组; B. 阴性对照组; C. siRNA 干扰组。

图 8 3 种不同方式处理 HUVEC 细胞 10 h 后形成的小管 $\times 100$

Fig 8 Tubes formed after HUVEC cells being treated by three different methods for 10 h $\times 100$

3 讨论

CCL19 在多种实体肿瘤中均起着抑癌作用,但 CCL19 在结直肠癌发生和发展中的作用却鲜有报道。因此,本研究以趋化因子 CCL19 为研究对象,利用体外细胞实验研究 CCL19 与结直肠癌之间的关系。

根据国内外大量文献^[2,9]报道,一些趋化因子可在体外抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭以及促血管形成能力。因此,本课题组尝试探究趋化因子 CCL19 是否也在体外可对结直肠癌细胞产生以上几方面功能的抑制。我们的前期研究^[8]表明,重组人 CCL19 刺激结直肠肿瘤细胞后,细胞增殖、迁移、侵袭及促血管形成等能力明显受到抑制。而在本研究中,我们利用 siRNA 有效沉默 SW620 细胞中的 CCL19,结果显著促进了该细胞增殖、迁移、侵袭及促血管形成的能力,两者共同说明了 CCL19 在体外确有抑制肿瘤的作用。在细胞增殖实验中,细胞培养 48 h 内的增殖缓慢且 3 组间差异不显著,可能是 Lipofectamine™ 2000 的细胞毒性所致。而 48 h 后,siRNA 干扰细胞增殖作用较阴性对照组和空白对照

组明显增强,说明 CCL19 具有抑制细胞增殖的作用。Transwell 细胞迁移、侵袭实验证实沉默 CCL19 后,肿瘤细胞迁移、侵袭能力明显增强,说明 CCL19 在体外具有抑制肿瘤细胞迁移、侵袭的作用,其可能在结直肠癌的发生和发展中起着抑制增殖和转移的作用。最后,本研究以沉默 CCL19 的 SW620 细胞培养液处理 HUVEC 细胞后发现小管形成能力明显增强,说明沉默 CCL19 后 SW620 细胞在培养过程中可能有更多的促血管生成因子分泌,这表明 CCL19 很可能起着抑制肿瘤血管形成的作用。综上所述,CCL19 可能在结肠癌的发生、发展及转移过程中均起着抑制作用。

CCL19 多途径抑制结直肠癌细胞的分子机制尚不全清楚,根据相关报道,趋化因子可与细胞表面受体作用,之后启动一系列的信号通路,从而影响细胞增殖、迁移、侵袭及促血管形成相关的蛋白^[7,10]。根据我们前期实验结果,重组人 CCL19 在体外具有抑癌作用,而当 CCR7 失活后,此抑癌作用明显减弱。再结合本研究结果,证实 CCL19 的抑癌作用是通过 CCL19/CCR7 生物轴实现的。国内外大量动物实验研究^[5,6]表明,CCL19 在多种实体肿瘤中发挥着抑癌作用。因此,我们下一阶段的主要研究任务是通过

动物实验探究 CCL19 是否在体内也起着抑制结直肠癌的作用。

[参考文献]

- [1] Center MM, Jamal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(6): 1688–1694.
- [2] Antonicelli F, Lorin J, Kurdykowski S, et al. CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasiveness *in vitro* and *in vivo*[J]. Br J Dermatol, 2011, 164(4): 720–728.
- [3] Polimeno M, Napolitano M, Costantini S, et al. Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma[J]. BJU Int, 2013, 112(5): 686–696.
- [4] Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, Rodríguez-Fernández JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells[J]. J Immunol, 2006, 176(9): 5153–5159.
- [5] Zhang Q, Sun L, Yin L, et al. CCL19/CCR7 upregulates heparanase via specificity protein-1 (Sp1) to promote invasion of cell in lung cancer[J]. Tumour Biol, 2013, 34(5): 2703–2708.
- [6] Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, et al. Activated local immunity by CC chemokine ligand 19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer[J]. Stem Cells, 2010, 28(1): 164–173.
- [7] Westermann J, Nguyen-Hoai T, Baldenhofer G, et al. CCL19 (ELC) as an adjuvant for DNA vaccination: induction of a TH1-type T-cell response and enhancement of antitumor immunity[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(6): 523–532.
- [8] Lu J, Zhao J, Feng H, et al. Antitumor Efficacy of CC Motif Chemokine Ligand 19 in Colorectal Cancer[J]. Dig Dis Sci, 2014. [Epub ahead of print]
- [9] Wang W, Huang P, Zhang L, et al. Antitumor efficacy of C-X-C motif chemokine ligand 14 in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Sci, 2013, 104(11): 1523–1531.
- [10] Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T (reg) cells[J]. Nature, 2011, 475(7355): 226–230.

[收稿日期] 2013-11-22

[本文编辑] 朱宝渊

(上接第 577 页)

- [5] Mihailovic-Stanojevic N, Jovovic D, Miloradovic Z, et al. Reduced progression of adriamycin nephropathy in spontaneously hypertensive rats treated by losartan[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(4): 1142–1150.
- [6] Nagashima A, Okuda S, Tamaki K, et al. Influence of a high salt diet on glomerular injury and the preventive effects of amiloride in adriamycin nephropathy[J]. Nephron, 1995, 71(1): 87–94.
- [7] 周桥, 卢颖, 仲芳, 等. 蛋白酶体抑制剂硼替佐米对阿霉素肾病大鼠肾脏的保护作用[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2011, 31(2): 158–164.
- [8] Pang M, Kothapally J, Mao H, et al. Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297: 996–1005.
- [9] Marumo T, Hishikawa K, Yoshikawa M, et al. Histone deacetylase modulates the proinflammatory and -fibrotic changes in tubulointerstitial injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(1): 133–141.

[收稿日期] 2014-01-11

[本文编辑] 王淑平