

综述

肾小球内皮细胞-间质转化在糖尿病肾病肾纤维化中的作用

路曼, 刘芳香, 闻悦伽, 周小春, 王俭勤*

(兰州大学第二医院肾脏内科, 兰州 730000)

摘要: 肾纤维化是糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)重要的病理特征。肾小球内皮细胞-间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndoMT)可促进肾纤维化, 在DKD的发生发展中起重要作用, 但其具体机制仍有待研究。本文就EndoMT在DKD肾纤维化中的分子机制以及目前通过抗EndoMT治疗延缓DKD肾纤维化的研究进展作一综述, 以期为DKD的临床治疗提供新的理论依据。

关键词: 糖尿病肾病; 肾纤维化; 内皮细胞-间质转化

Roles of glomerular endothelial-to-mesenchymal transition for renal fibrosis in diabetic kidney disease

LU Man, LIU Fangxiang, WEN Yuejia, ZHOU Xiaochun, WANG Jianqin*

(Department of Nephrology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Renal fibrosis is an important pathological feature of diabetic kidney disease (DKD). In recent years, several studies have shown that glomerular endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) can promote renal fibrosis and play an important role in the development of DKD, but its specific mechanism still needs to be studied. This paper reviews the molecular mechanism of EndoMT in renal fibrosis of DKD and the current research progress on delaying renal fibrosis of DKD by anti-EndoMT therapy, in order to provide a new theoretical basis for the clinical treatment of DKD.

Key Words: diabetic kidney disease; renal fibrosis; endothelial-to-mesenchymal transition

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病的重要微血管并发症之一, 也是终末期肾脏病的主要原因^[1]。DKD的病理变化包括肾小球内皮功能障碍、肾小球基底膜增厚、系膜增生、足细胞功能障碍和肾小管萎缩, 最终导致间质纤维化和肾小球硬化^[2]。肾纤维化是在有害因素如高葡萄糖、创伤、炎症和氧化应激等的长期刺激下, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肾脏组织中过度沉积的病理过程。肾小球内皮细胞-间质转

化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndoMT)可以通过促进肾纤维化而影响DKD的进展。本文将从EndoMT与DKD的关系、EndoMT的调控及EndoMT靶向治疗现状等方面进行阐述。

1 EndoMT概述

EndoMT是内皮细胞失去部分细胞特征并获得间充质细胞某些特征的过程。这一复杂的生物学过程伴随着以下几种变化。(1)细胞表型改变: 内

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 兰州市科技局人才创新创业项目(2021-RC-94); 甘肃省青年基金项目(21JR1RA157); 甘肃省临床医学研究中心项目(21JR7RA436)

第一作者: E-mail: 18328081581@163.com

*通信作者: E-mail: ery_wangjqery@lzu.edu.cn

皮标志物如VE-钙黏蛋白、血管性血友病因子、血小板衍生生长因子和CD31的表达减少,间质标志物如 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、N-钙黏蛋白、成纤维细胞特异性蛋白-1(fibroblast specific protein-1、FSP-1)、I型胶原蛋白的表达增加^[3]; (2)细胞形态改变:由于细胞-细胞连接(接触连接和紧密连接)的蛋白质下调和细胞骨架的重组,细胞间的黏附力消失,使细胞由镶嵌排列的鹅卵石状细胞转变为没有顶端-基底极性的纺锤形细胞^[4]; (3)细胞功能改变:细胞获得强迁移性,并可产生ECM。

EndoMT主要发生在胚胎发育阶段,并首先在胚胎发育的血管和间充质心脏垫(心脏瓣膜的前体)的形成中被描述^[5]。近年来的研究表明,在炎症、氧化应激等病理情况下EndoMT也可被触发,参与动脉粥样硬化^[6]及肿瘤^[4]等疾病的进展过程。不仅如此,EndoMT还与心脏^[7]、视网膜^[8]和肾脏^[9]等器官的纤维化存在密切联系。

2 EndoMT参与DKD肾纤维化

肾小球内皮细胞是肾脏滤过膜的第一层屏障,与血液中的循环物质直接接触,更容易受到葡萄糖、脂质及炎症因子等的损害。当肾脏受到损伤刺激时,内皮细胞肿胀使毛细血管间隙变小,增加白细胞黏附,促进红细胞折叠,破坏正常血流,可导致血流剪切应力降低并抑制一氧化氮的形成。所有这些变化加上一氧化氮生成减少和血管舒张受损可导致肾血流量减少,启动EndoMT,最终引起肾脏纤维化^[10]。肾脏纤维化是DKD晚期的重要病变,也是DKD进展为终末期肾脏病的关键环节。

现有研究表明,在肾纤维化过程中,大约10%的成纤维细胞可通过肾小球EndoMT产生^[11],积累的成纤维细胞可以诱导ECM的产生,促进肾脏纤维化的进展。 α -SMA和FSP1是成纤维细胞的表面标志物,CD31为内皮细胞的表面标志物,Zeisberg等^[12]对链脲佐菌素构建的DKD小鼠肾脏组织进行免疫荧光双重染色,发现大约40%的FSP-1阳性细胞和50%的 α -SMA阳性细胞同时表达CD31。Srivastava等^[13]的研究发现,在DKD中沉默信号调节因子3蛋白能够通过调节EndoMT进而在

肾纤维化的过程中发挥作用。Lovisa等^[14]的研究发现,敲除肾损伤/纤维化小鼠内皮细胞中的*Twist*和*Snail*基因可以抑制EndoMT过程,改善肾纤维化。这些研究证实,EndoMT可能在DKD肾纤维化的进展中发挥积极作用,是DKD肾纤维化中间质细胞的来源之一。

3 EndoMT参与DKD肾纤维化的分子机制

3.1 介导DKD肾纤维化中EndoMT的信号传导通路

EndoMT发生机制复杂,可以被转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路、Wnt/ β -catenin信号通路和核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路等激活,其中起主导作用的是TGF- β 信号通路。

3.1.1 TGF- β 信号通路

TGF- β 是TGF- β 超家族的成员,是纤维化疾病中的关键促纤维化介质,也是EndoMT的主要调节因子。TGF- β 超家族还包括激活素、抑制素、骨形态发生蛋白以及生长分化因子等,在肾脏炎症、细胞凋亡和增殖中发挥多种生物学功能。

哺乳动物中的TGF- β 有TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3三种亚型,其中TGF- β 1是最常见的亚型,可由所有类型的肾脏细胞产生。正常情况下,TGF- β 信号传导通过各种机制受到正负调节。当肾脏损伤后,TGF- β 调控因子表达急剧失调,可导致TGF- β 表达上调,激活细胞表面的TGF- β I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体,进一步介导磷酸化Smad2/3与Smad4形成异构复合物,转入细胞核,上调EndoMT相关转录因子的表达,如*Snail*、*Slug*、*Twist*、*Zeb1*和*Zeb2*,导致EndoMT过程启动^[15],这个过程也被称为Smad依赖性信号途径。

此外,TGF- β 还可以通过其受体复合物激活Smad非依赖性信号通路。TGF- β 通过激活ERK/MAPK信号通路、PI3K/AKT信号通路和TAK1信号通路磷酸化靶向转录因子或调控翻译过程来促进EndoMT^[16],也可以诱导RhoA GTP酶活化,最终通过Rock/Limk通路引起肌动蛋白细胞骨架重塑,并连续产生肌成纤维细胞^[17](图1)。

在糖尿病动物模型和DKD患者中,高血糖及晚期糖基化产物(advanced glycation end products,

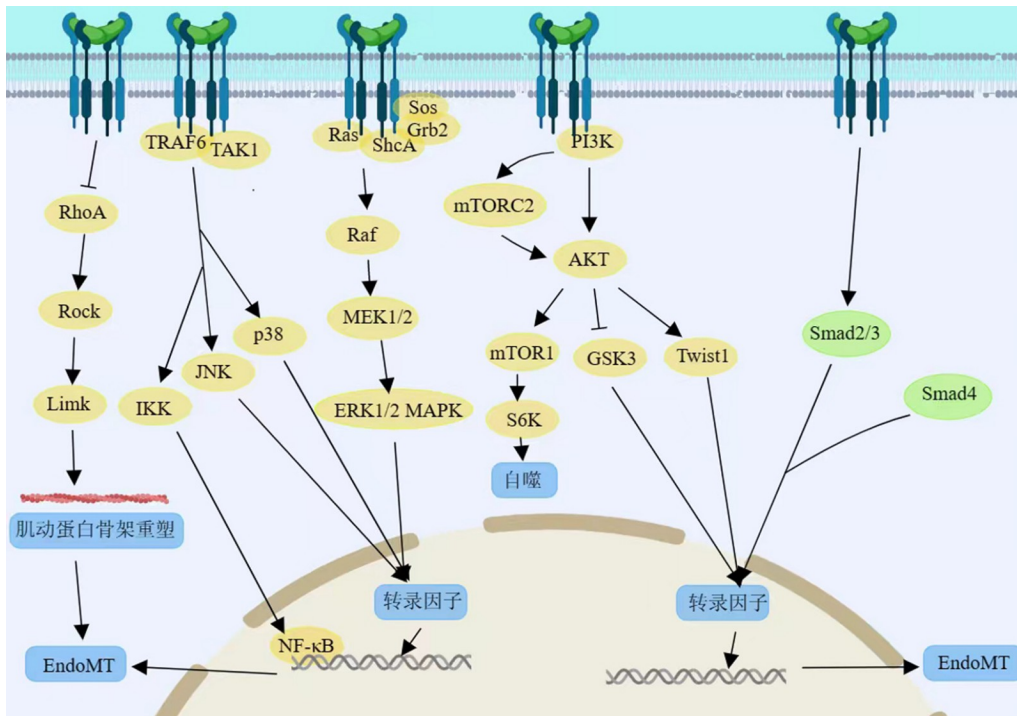


图1 TGF-β信号通路简图

AGEs)、血管紧张素Ⅱ等介质均可刺激TGF-β1分泌, TGF-β1通过Smad2/3信号传导激活经典途径导致ECM沉积和肾小球基底膜厚度增加^[18], 进而导致肾脏纤维化和炎症。

3.1.2 Wnt/β-catenin信号通路

Wnt/β-catenin途径是典型的Wnt途径。在正常成人肾组织中, Wnt/β-catenin信号通路的表达水平较低。但当肾脏组织受损时, Wnt/β-catenin通路被激活, Wnt蛋白与由Frizzled和LRP5/6组成的受体复合物结合, 并将APC/Axin/GSK3/CK1胞内降解复合体募集到细胞膜上, 从而避免了受体降解复合体对β-catenin的磷酸化和降解。随后, 细胞质中积累的游离β-catenin转位到细胞核, 调节Wnt靶基因的表达, 促进EndoMT^[19]。

3.1.3 NF-κB信号通路

经典的NF-κB信号通路可由肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等刺激物激活, 这些刺激物可以激活特定的受体使TAK1磷酸化, 进一步激活含NF-κB必需调节蛋白的κB抑制因子激酶(inhibitor of κB kinase, IKK)复合物, 进而诱导核因子抑制蛋白-α

的磷酸化和降解, 使NF-κB异二聚体RelA/p50瞬易位到细胞核并驱动靶基因的转录^[20], 从而诱导EndoMT发生, 促进肾脏纤维化^[21]。

3.2 DKD相关致病因素参与EndoMT

炎症、氧化应激、AGEs、表观遗传学及细胞自噬等是DKD的致病因素, 现发现这些致病因素也可以通过TGF-β、Wnt/β-catenin、NF-κB等信号通路调控EndoMT, 参与DKD肾纤维化过程。

3.2.1 炎症

高血糖会导致细胞损伤, 从而触发细胞内炎症介质的释放。现已发现多种炎症介质在EndoMT中发挥作用。TNF-α是一种主要由巨噬细胞分泌的细胞因子, 是慢性炎症的重要介质, 在DKD中分泌增加, 并与肾脏结局有关。TNF-α通过激活MAPK和NF-κB下游级联信号和转录因子, 促进细胞因子的产生和肾脏内黏附分子的表达, 触发EndoMT, 最终导致肾小球硬化症和肾小管间质纤维化的发展^[22]。NF-κB转录因子的活化和核易位是炎症介导的EndoMT的关键步骤^[23]。炎症因子IL-1β可以通过激活TAK1复合物而激活经典NF-κB途径^[20]。炎症因子IL-6水平升高可能与肾纤维化有关。现有研究表明, IL-6信号传导主要通过两种主

要途径完成, IL-6的抗炎活性是由经典信号介导的, 而促炎特性是由反式信号通路介导的^[24]。当肾脏受到损伤时, 经典的IL-6通路抗炎作用消失, IL-6可以通过反式信号通路发挥作用, 与体液中的可溶性白介素-6受体(soluble IL-6 receptor, sIL-6R)结合形成IL-6/sIL-6R复合物, 激活膜gp130, 导致随后的JAK/STAT3磷酸化, 激活EndoMT过程, 促进肾脏纤维化。Chen等^[25]的研究阻断了小鼠肾纤维化模型中的IL-6反式信号传导, 发现肾纤维化和炎症反应显著降低。

3.2.2 氧化应激

高血糖导致的活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加是DKD发病机制的核心^[26]。由ROS过度产生介导的高氧化应激水平也是炎症的另一个标志。ROS在血液中循环, 可直接与血管内壁的内皮细胞直接作用, 增加内皮细胞内的氧化应激过程, 促进细胞转化。Montorfano等^[27]证明了氧化应激可直接参与EndoMT过程, 这种效应依赖ALK5的表达, 并由依赖Smad3、p38和NF- κ B激活的TGF- β 分泌介导^[23]。最近的一项研究表明, 氧化应激也可通过激活TGF- β /RhoA/Rac1/MRTF轴在EndoMT后期发挥作用^[28]。TGF- β 2能够诱导G-肌动蛋白-心肌蛋白相关转录因子(myocardin related transcription factor, MRTF)的上调、激活和细胞核积聚, 被激活的MRTF参与了肌动蛋白细胞骨架的形成及其收缩能力的调节。这些调控是肌成纤维细胞转分化的特征, 与细胞伸长和细胞运动增强有关, 因此加速了EndoMT的后期阶段, 促进了纤维化的发展。

3.2.3 AGEs

糖尿病患者的持续高血糖状态可导致AGEs在体内蓄积, 从而促进糖尿病并发症的发生。AGEs可通过RAGE/ERK/MAPK信号通路、蛋白激酶B信号级联及TGF- β 信号通路诱导EndoMT^[29]。

3.2.4 表观遗传学

高血糖诱导的NF- κ B信号传导增加、核因子红细胞-2相关因子表达下降、ROS产生增加、TGF- β 传导信号增加及EndoMT, 可能导致下游蛋白质和脂质的糖基化修饰以及AGEs的产生, 最终导致与代谢记忆相关的持久、不可逆的改变^[30]。这种代谢记忆在糖尿病并发症的发展中起关键作

用, 而代谢记忆的存在使人们相信表观遗传学因素可能在其中发挥了作用。

表观遗传学是指基于非基因序列改变导致基因表达水平发生变化, 包括DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA的调控, 在调节基因转录和翻译方面起重要作用, 并且与EndoMT过程有关。当机体受到环境和病理状态(如饮食、运动、毒素、氧化应激、炎症和代谢变化)刺激时, 表观遗传修饰可以通过直接影响靶基因来改变疾病表型。在TGF- β 1诱导的肾纤维化模型中, TGF- β 1上调诱导的Ras蛋白样激活剂1抗体启动子DNA的过度甲基化, 导致该Ras-GTP抑制因子的表达减少, Ras-GTP信号传导增加, 成纤维细胞活化增加和纤维化^[31]。组蛋白修饰包括磷酸化、泛素化、甲基化和乙酰化。迄今为止, 只发现组蛋白赖氨酸甲基化和乙酰化与EndoMT相关^[32,33]。DNA甲基化可以与组蛋白修饰相互作用, 而组蛋白修饰又会受到非编码RNA的调控^[34]。一旦由高糖刺激或其他糖尿病致病因子触发, 表观遗传变化的这些复杂相互作用可以持续激活DKD中的促炎和纤维化基因。因此, 逆转表观遗传学变化不仅可以控制血糖, 也可以消除高血糖引起的代谢记忆, 延缓糖尿病并发症的发生。

3.2.5 细胞自噬

自噬是一种修复性的、维持生命的过程, 通过该过程, 细胞质组分被包裹在双膜囊泡中, 并在与溶酶体融合时降解。当肾脏细胞暴露于缺氧、氧化应激等应激条件时, 自噬是肾上皮细胞(包括足细胞、近端肾小管、系膜细胞和内皮细胞)的重要保护机制。而在高血糖等营养或能量过剩的状态下, 自噬机制下调可导致DKD的发展和进展^[35]。目前, 自噬在EndoMT中的确切作用机制尚未明确, 但已有研究表明, 敲除自噬相关基因7可促进EndoMT, 并通过激活TGF- β 及其受体上调纤维化的关键基因^[36]。Gui等^[21]的研究发现, 敲除内皮细胞自噬相关基因16L, 可减少NF- κ B降解, 导致炎性细胞因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)的产生, 并进一步促进EndoMT。Ke等^[37]发现, 丝氨酸蛋白酶抑制剂可通过PI3K/AKT/mTOR信号通路激活自噬, 改善了缺氧刺激的细胞损伤和EndoMT。上述研究表明, 自噬可抑制EndoMT过程, 而内皮自噬

缺陷起着致病作用, 可诱导EndoMT和组织纤维化。

3.2.6 其他

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)家族是一组结构相同的多功能信号分子, 可调节人类发育、生理和病理过程, 包括血管生成、伤口愈合、胚胎发育以及通过旁分泌或内分泌系统的新陈代谢。FGF通过调节多种信号通路来执行这些功能, 包括ERK/MAPK、PI3K/AKT、STAT和NF- κ B通路^[38]。Lin等^[39]的研究结果显示, FGF1不仅可以缓解肾脏炎症反应, 还可以使TGF- β 蛋白及其下游的纤维化介质表达明显降低, 发挥抗纤维化的作用, 延缓DKD的进展。Lin等^[40]的研究表明, FGF21可以通过激活AKT负向调节TGF- β /p53/Smad信号通路在DKD中发挥抗纤维化的作用。Correia等^[41]的研究表明, FGF2可通过miR-20a调节ALK5、TGF- β R2和Smad锚定蛋白的表达来控制内皮TGF- β 1信号传导。FGF2信号传导的抑制及TGF- β 1的激活, 可上调受体复合物水平、激活Smad2/3, 从而降低miR-20a水平, 增加内皮细胞对TGF- β 1的反应性, 最终导致EndoMT。

4 针对EndoMT的靶向治疗

在DKD患者中, EndoMT是肾纤维化的关键组成部分, 受到多个信号通路的调控, 其分子机制极为复杂, 至今尚未完全阐明, 因此探究EndoMT发生机制对于DKD患者抗纤维化靶向治疗药物的开发具有重要意义, 可能是未来DKD治疗的新方向。

临床常见的一些新型降糖药也具有抑制EndoMT、改善肾脏纤维化的作用。二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP-4)抑制剂西他列汀抑制DPP-4降低胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1) 7-36(活性形式)的脱颗粒并促进GLP-1受体信号传导。GLP-1受体激动剂利拉鲁肽可以直接激活GLP-1受体信号传导。在内皮细胞中, 激活的GLP-1受体可以上调骨形态发生蛋白受体2, 抑制TGF- β 1/Smad3信号传导, 导致EndoMT相关转录因子*Snail*的表达减少, 从而改善肾纤维化^[42]。此外, DPP-4可以与整合素 β 1形成复合物, 导致其磷酸化, 然后通过TGF- β 2/Smad3信号通路

促进EndoMT。DPP-4-整合素 β 1的协同作用也可以通过增强内皮生长因子受体1的表达促进EndoMT^[43]。DPP-4水平受miR-29的调控, 发生DKD时, miR-29受抑制导致DPP-4水平升高, 而利格列汀可以通过提高miR-29水平来抑制肾脏纤维化^[44]。

除此之外, 一些针对TGF- β 靶向治疗的临床前研究也为抗肾脏纤维化的治疗带来了新希望。Kurat等^[45]的研究表明, 新型酪氨酸蛋白激酶受体抑制剂CH5451098可以通过阻断TGF- β 信号通路来改善肾功能。Liu等^[46]的研究使用了一种由非抑制性纤溶酶原激活物抑制剂1受体和阳离子脂质体中的siRNA组成的新型纳米颗粒系统, 该系统可以靶向递送TGF- β 1基因特异性siRNA到肾小球, 有效地抑制肾小球TGF- β 1表达, 从而发挥抗肾脏纤维化的作用。这种治疗方式仅特异性作用于肾小球, 可以避免治疗过程中对其他器官的影响, 是未来治疗人类肾小球纤维化疾病的极具潜力的方法。

近年来, 中药在抗肾纤维化方面的作用也有所研究。芦丁是一种具有抗自由基、抗脂质过氧化、抗血小板活化因子以及抗炎等功效的中药。有研究发现, 芦丁可以通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路恢复自噬, 抑制EndoMT的发展, 从而阻止和延缓肾纤维化进展^[47]。其他中药也被证实有抗纤维化作用, 但多在肺部和心血管疾病方面, 抗肾纤维化的相关证据较少。

5 总结与展望

EndoMT在DKD肾纤维化的过程中起着重要作用, DKD相关致病因素如炎症、氧化应激、AGEs、表观遗传学及细胞自噬等可以通过TGF- β 、Wnt/ β -catenin等信号通路来激活EndoMT过程, 从而促进肾纤维化, 针对EndoMT机制的研究为肾纤维化的治疗提供了潜在的靶点。以上综述表明, 靶向EndoMT的干预和药物治疗能够在一定程度上延缓和减轻肾纤维化, 但这些研究大多数停留在细胞及动物实验阶段, 相关临床实验数据较少, 缺乏证据支持这些药物在人体内的抗纤维化作用及其在临床上的应用。且肾脏纤维化程度的传统评估方法为肾脏活检, 频繁的肾脏活检会带

给患者极大的负担,这也为临床试验的进行增加了难度。目前,需要新的、可靠的评估肾脏纤维化的生物标志物以及大量的临床实验数据进一步验证靶向EndoMT的药物在治疗肾纤维化中的有效性及安全性。

DKD会进展为终末期肾脏病,目前的治疗只会延缓但不能停止或逆转这一过程。TGF- β 可以诱导EndoMT发生,是DKD肾纤维化的关键驱动因素,在心脏、血管、视网膜和所有肾组织中均有表达。理论上来说,TGF- β 信号通路靶向治疗具有很大的应用前景,不仅可以延缓DKD患者肾脏纤维化进程,还可以降低糖尿病患者视网膜病变和心血管疾病等并发症的发生以改善预后。但各个器官在细胞组成方面存在显著差异,维持内环境稳态涉及器官的特异性信号网络。因此,特异性抗纤维化策略不太可能在所有关键器官中产生一致的保护作用,可能需要器官特异性治疗才能达到临床受益最大化。

参考文献

- [1] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 糖尿病肾脏疾病临床诊疗中国指南. 中华肾脏病杂志, 2021, 37(3): 255-304
- [2] Thomas MC. Targeting the pathobiology of diabetic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2021, 28(4): 282-289
- [3] Hong L, Du X, Li W, et al. EndMT: a promising and controversial field. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(7): 493-500
- [4] Ciszewski WM, Wawro ME, Sacewicz-Hofman I, et al. Cytoskeleton Reorganization in EndMT—the role in cancer and fibrotic diseases. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11607
- [5] Nakajima Y, Yamagishi T, Hokari S, et al. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)- β and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat Rec*, 2000, 258(2): 119-127
- [6] Zhang X, Ren Z, Jiang Z. EndMT-derived mesenchymal stem cells: a new therapeutic target to atherosclerosis treatment. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(4): 755-765
- [7] Zhang L, He J, Wang J, et al. Knockout RAGE alleviates cardiac fibrosis through repressing endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) mediated by autophagy. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 470
- [8] Shu DY, Butcher E, Saint-Geniez M. EMT and EndMT: emerging roles in age-related macular degeneration. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4271
- [9] Yang Z, He LJ, Sun SR. Role of endothelial cells in renal fibrosis. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 145-163
- [10] Basile DP, Collett JA, Yoder MC. Endothelial colony-forming cells and pro-angiogenic cells: clarifying definitions and their potential role in mitigating acute kidney injury. *Acta Physiol*, 2018, 222(2): e12914
- [11] LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*, 2013, 19(8): 1047-1053
- [12] Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(12): 2282-2287
- [13] Srivastava SP, Li J, Takagaki Y, et al. Endothelial SIRT3 regulates myofibroblast metabolic shifts in diabetic kidneys. *iScience*, 2021, 24(5): 102390
- [14] Lovisa S, Fletcher-Sananikone E, Sugimoto H, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition compromises vascular integrity to induce Myc-mediated metabolic reprogramming in kidney fibrosis. *Sci Signal*, 2020, 13(635): eaaz2597
- [15] Ma J, van der Zon G, Sanchez-Duffhues G, et al. TGF- β -mediated endothelial to mesenchymal transition (EndMT) and the functional assessment of EndMT effectors using CRISPR/Cas9 Gene Editing. *J Vis Exp*, 2021(168): doi: 10.3791/62198
- [16] Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(2): a022129
- [17] Park CH, Yoo TH. TGF- β inhibitors for therapeutic management of kidney fibrosis. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(12): 1485
- [18] Dou L, Jourde-Chiche N. Endothelial toxicity of high glucose and its by-products in diabetic kidney disease. *Toxins*, 2019, 11(10): 578
- [19] Hu L, Ding M, He W. Emerging therapeutic strategies for attenuating tubular EMT and kidney fibrosis by targeting Wnt/ β -Catenin signaling. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 830340
- [20] Yu H, Lin L, Zhang Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Sig Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209
- [21] Gui Z, Suo C, Wang Z, et al. Impaired ATG16L-dependent autophagy promotes renal interstitial fibrosis in chronic renal graft dysfunction through inducing EndMT by NF- κ B signal pathway. *Front Immunol*, 2021, 12: 650424
- [22] Lampropoulou IT, Stangou M, Sarafidis P, et al. TNF- α pathway and T-cell immunity are activated early during the development of diabetic nephropathy in type II

- diabetes mellitus. *Clin Immunol*, 2020, 215: 108423
- [23] Pérez L, Muñoz-Durango N, Riedel CA, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 33: 41-54
- [24] Li Y, Zhao J, Yin Y, et al. The role of IL-6 in fibrotic diseases: molecular and cellular mechanisms. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(14): 5405-5414
- [25] Chen W, Yuan H, Cao W, et al. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation. *Theranostics*, 2019, 9(14): 3980-3991
- [26] Samsu N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 1497449
- [27] Montorfano I, Becerra A, Cerro R, et al. Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway. *Lab Invest*, 2014, 94(10): 1068-1082
- [28] Sobierajska K, Wawro ME, Niewiarowska J. Oxidative stress enhances the TGF- β 2-RhoA-MRTF-A/B axis in cells entering endothelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2062
- [29] He W, Zhang J, Gan T, et al. Advanced glycation end products induce endothelial-to-mesenchymal transition via downregulating sirt 1 and upregulating TGF- β in human endothelial cells. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 1-12
- [30] Yao Y, Song Q, Hu C, et al. Endothelial cell metabolic memory causes cardiovascular dysfunction in diabetes. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(1): 196-211
- [31] Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*, 2010, 16(5): 544-550
- [32] Sun J, Wang Y, Cui W, et al. Role of epigenetic histone modifications in diabetic kidney disease involving renal fibrosis. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 1-11
- [33] Hulshoff MS, Xu X, Krenning G, et al. Epigenetic regulation of endothelial-to-mesenchymal transition in chronic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(9): 1986-1996
- [34] Kato M, Natarajan R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(6): 327-345
- [35] Koch EAT, Nakhoul R, Nakhoul F, et al. Autophagy in diabetic nephropathy: a review. *Int Urol Nephrol*, 2020, 52(9): 1705-1712
- [36] Singh KK, Lovren F, Pan Y, et al. The essential autophagy gene ATG7 modulates organ fibrosis via regulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 2015, 290(5): 2547-2559
- [37] Ke X, Chen X, Yan L, et al. Vaspin contributes to autophagy and endothelial-to-mesenchymal transition via PI3K-AKT-mTOR pathway. *Acta Histochemica*, 2022, 124(4): 151881
- [38] Farooq M, Khan AW, Kim MS, et al. The role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in tissue repair and regeneration. *Cells*, 2021, 10(11): 3242
- [39] Lin Q, Chen O, Wise Jr JP, et al. FGF1 Δ HBS delays the progression of diabetic nephropathy in late-stage type 2 diabetes mouse model by alleviating renal inflammation, fibrosis, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2022, 1868(8): 166414
- [40] Lin S, Yu L, Ni Y, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates diabetes-induced renal fibrosis by negatively regulating TGF- β -p53-Smad2/3-mediated epithelial-to-mesenchymal transition via activation of AKT. *Diabetes Metab J*, 2020, 44(1): 158-172
- [41] Correia ACP, Moonen JRAJ, Brinker MGL, et al. FGF-2 inhibits endothelial-mesenchymal transition through microRNA-20a-mediated repression of canonical TGF- β Signaling. *J Cell Sci*, 2015: 569-579
- [42] Xu J, Wang J, Cheng Y, et al. Glucagon-like peptide-1 mediates the protective effect of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor on renal fibrosis via reducing the phenotypic conversion of renal microvascular cells in monocrotaline-treated rats. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1-14
- [43] Gupta S, Sen U. More than just an enzyme: Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) and its association with diabetic kidney remodelling. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104391
- [44] Radbakhsh S, Sathyapalan T, Banach M, et al. Incretins and microRNAs: interactions and physiological relevance. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104662
- [45] Kurata A, Tachibana Y, Takahashi T, et al. Novel AXL-specific inhibitor ameliorates kidney dysfunction through the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition of renal tubular cells. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0232055
- [46] Liu X, Zhang J, Tang A, et al. A novel peptide ligand-coated nano-siRNA-lipoplex technology for kidney targeted gene therapy. *Am J Transl Res*, 2022, 14(10): 7362-7377
- [47] Dong R, Zhang X, Liu Y, et al. Rutin alleviates EndMT by restoring autophagy through inhibiting HDAC1 via PI3K/AKT/mTOR pathway in diabetic kidney disease. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154700