

雷帕霉素对肾小管上皮细胞生物学行为的影响及其治疗糖尿病肾病分子机制的初步研究

成芳^{1,2}, 涂珍珍¹, 周利利¹, 苏超³, 王德光³, 周海胜¹

摘要 目的 研究雷帕霉素(RAPA)对肾小管上皮细胞生物学行为的影响及其治疗糖尿病肾病分子机制。方法 体外培养肾小管上皮细胞(HK-2),使用转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)处理HK-2细胞,以建立肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转化(EMT)的细胞模型,并联合RAPA处理HK-2细胞,通过Transwell迁移实验和侵袭实验观察HK-2细胞的迁移和侵袭等细胞生物学行为变化;通过RT-PCR、Western blot法观察EMT分子标志物表达的变化;结合前期建立的糖尿病肾病小鼠模型的肾组织及通过腹腔注射RAPA[1 mg/(kg·d)]处理后的模型小鼠肾组织,利用HE染色分析肾组织的病理变化;利用免疫组化检测EMT分子标志物的表达变化。结果 Transwell实验结果表明,TGF- $\beta 1$ 诱导HK-2细胞发生迁移和侵袭能力明显增加;联合应用RAPA后,迁移和侵袭能力明显抑制。RT-PCR、Western blot和免疫组化结果显示TGF- $\beta 1$ 可以促进间质细胞标志分子Vimentin的表达,而上皮标志分子E-cadherin的表达明显降低;联合应用RAPA后可以抑制TGF- $\beta 1$ 诱发的EMT作用。HE染色显示,RAPA治疗后,能显著改善糖尿病肾病小鼠肾小管形态病变。结论 RAPA具有抑制肾小管上皮细胞发生EMT作用。

关键词 雷帕霉素;转化生长因子 $\beta 1$;糖尿病肾病;上皮-肌成纤维细胞转分化

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0001-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.001

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要微血管并发症之一,是终末期肾病的首要原因,伴有动脉粥样硬化疾病和过早死亡的高风险性^[1]。DN以进行性肾脏纤维化为特征,其中,纤维细胞主要来源是肾小管上皮细胞。大量研究^[2]证

实,肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肾小管上皮细胞通过表型改变而转变为成纤维细胞的一个过程,是发生肾间质纤维化的重要机制之一,这些成纤维细胞通过管状基底膜迁移转变成间质。

雷帕霉素(rapamycin, RAPA)目前临床上常用于器官移植后抗排斥反应。RAPA是一种免疫抑制剂,具有高效、低毒等优点,可抑制多种免疫细胞的增殖和活化^[3]。有研究^[4]表明,RAPA可增加基质蛋白的合成,促进基底膜增厚和系膜基质增生、抑制肾小管上皮细胞增殖,可能部分抑制EMT发生等作用,从而有利于减轻蛋白尿和肾间质纤维化。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta 1$)是最重要的促纤维化因子,在大多数上皮细胞和上皮细胞来源的肿瘤细胞中,TGF- $\beta 1$ 能诱导上皮细胞EMT的发生^[2]。该研究拟利用TGF- $\beta 1$ 诱导肾小管上皮细胞发生EMT,并联合使用RAPA在细胞水平观察其对EMT的抑制作用;同时利用糖尿病肾病小鼠模型在动物整体水平对其发病过程中可能发生EMT及RAPA抑制EMT发生过程进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 生物材料 HK-2细胞株由东南大学附属中大医院刘必成教授惠赠。糖尿病肾病小鼠模型肾组织由前期利用db/db小鼠(6~7周)建立的糖尿病肾病小鼠模型^[5]制备,包括:阴性对照组(正常db/db小鼠)、阳性对照组(糖尿病肾病小鼠模型)和RAPA治疗组[糖尿病肾病小鼠腹腔内注射RAPA 1 mg/(kg·d)]等肾组织的蜡块标本。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基购自美国Hyclone公司;DMSO和RAPA购自美国Sigma公司;重组人TGF- $\beta 1$ 购自英国Abcam公司;鼠源抗人E-cadherin抗体、鼠源抗人Vimentin抗体、鼠源抗人 β -actin抗体、Anti-mouse HRP-linked IgG等均购自美国Cell

2016-09-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81372911)

作者单位:¹安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院²药剂科、³肾脏内科,合肥 230601

作者简介:成芳,女,硕士研究生;

周海胜,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

signaling technology 公司;一抗、二抗稀释液购自日本 TOYOBO 公司;Transwell 嵌套购自美国 Corning 公司;Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit、FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 购自瑞士 Roche 公司;引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司;基质胶 Matrigel 购自美国 BD 公司;DNA marker DL2000 购自大连宝生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和分组 HK-2 细胞使用含 10% 的胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素(P/S) DMEM 培养基,在体积比 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中进行培养,细胞贴壁生长融合达到 90% 时,使用 0.25% 胰酶消化传代培养;实验分为以下 4 组:无血清阴性对照组、阳性对照组(TGF-β1 处理组)、RAPA 组、TGF-β1 联合 RAPA 共同作用组。TGF-β1 浓度根据参考文献^[6-7],拟使用 10 μg/ml 处理 HK-2 细胞;结合文献^[8-9]报道,细胞增殖抑制率接近 50% 的 RAPA 浓度为 400 ng/ml 处理 HK-2 细胞 48 h。

1.2.2 Transwell 迁移实验和侵袭实验 取出 Transwell 嵌套,置于 6 孔板上。分别配制 10% 和 2% 胎牛血清 DMEM 培养基;制备 5 × 10⁵/ml 的细胞悬液;取 200 μl 细胞悬液种植于上室,在下室加入 600 μl 含相应 RAPA 或 TGF-β1 的 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,培养 24 h;取出上室,擦去膜上未穿过的细胞,0.1% 结晶紫染色;在倒置显微镜下取左上、左下、右上、右下及中心 5 个视野,计数穿膜细胞数;比较不同组之间的差异。如进行 Transwell 侵袭实验,拟将 Matrigel(50 mg/L)用不含血清的培养基 1:8 稀释,取 50 μl 均匀涂布于 Transwell 小室膜上,4 °C 晾干,后续实验方法同 Transwell 迁移实验。

1.2.3 RT-PCR 收集已经处理好的细胞,TRIzol 法提取各组细胞总 RNA;一步法进行 RT-PCR,反应体系为:PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μl,2 × 1 Step Buffer 25 μl,正向引物(20 μmol/l) 1 μl,反向引物(20 μmol/l) 1 μl,总 RNA 模板 500 ng,ddH₂O 补足至 50 μl。反应条件是:50 °C 30 min,94 °C 2 min,(94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,72 °C 10 min)35 个循环。将 RT-PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。引物信息见表 1。

1.2.4 Western blot 分析 接种 HK-2 细胞于 12 孔板,待细胞贴壁后,选择最佳药物浓度于最适时间处理、收集细胞,PBS 清洗 3 次,加入适量已在 37 °C 水浴预热 10 min 的细胞裂解液,冰上裂解 20 min,接着用 1 ml 枪头刮下细胞,100 °C 水浴锅中裂解

表 1 引物序列

引物名称	序列	PCR 产物长度(bp)
Vimentin	F:5'-CGCTTCGCCAACTACAT-3' R:5'-AGGGCATCCACTTCACAG-3'	690
E-Cadherin	F:5'-CGCATTGCCACATACA-3' R:5'-CGTTAGCCTCGTTCTCA-3'	502
β-actin	F:5'-TCCTGTGGATCCACGAAACT-3' R:5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'	330

10 min,随后配 10% 分离胶,进行 10% SDS-PAGE 电泳,后采用 340 mA 恒流湿转 1 h,使蛋白转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 40 min 后,分别加入稀释后的一抗 E-cadherin(1:100)、Vimentin(1:1 000)及 β-actin(1:1 000),4 °C 孵育,次日洗膜,用 1:5 000 稀释的二抗孵育,于摇床上摇晃 12 h 后洗膜、暗室曝光、显影、定影。

1.2.5 HE 染色 选取肾组织切片,脱蜡,依次浸泡于二甲苯(I)(II)中各 15 min、二甲苯:无水乙醇(1:1)中 2 min、95% 乙醇(I)(II)中各 5 min、80% 乙醇中 5 min、蒸馏水中 5 min,然后苏木精液染色 5 min,流水稍洗 1~3 s,1% 盐酸乙醇 1~3 s,稍水洗 10~30 s,促蓝液返蓝 30 s,流水冲洗 15 min,蒸馏水冲洗 2 s,80% 乙醇稍洗 2 s,95% 乙醇 I、II 中各浸泡 5 min,二甲苯 I、II、III 中各浸泡 5 min,中性树胶封固。

1.2.6 免疫组化 标志标本,常规脱蜡至水,高压抗原修复,封闭内源性过氧化物酶,滴加一抗工作液[E-cadherin(1:50)、Vimentin(1:500)]4 °C 孵育过夜;分别加入相应的二抗,37 °C 孵育 40 min,后用链霉卵白素工作液 37 °C 孵育 30 min,DAB 显色,自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片,在高倍镜下摄片观察。

1.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较用 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素的方差分析。

2 结果

2.1 RAPA 和 TGF-β1 对 HK-2 细胞侵袭力的影响 为在细胞水平验证 HK-2 细胞在 TGF-β1 作用下诱发 EMT 而引起细胞侵袭能力的变化,使用 10 μg/ml TGF-β1 处理 HK-2 细胞 48 h。Transwell 侵袭实验结果显示阴性对照组 HK-2 细胞穿透 Matrigel 基质膜的细胞数为(96.15 ± 21.37),提示 HK-2 具有一定的侵袭能力;经 TGF-β1 处理的 HK-2 细胞,穿透 Matrigel 基质膜的细胞数(234.17 ± 31.24),与

阴性对照组比较明显增加 ($P < 0.01$); 同时为观察 RAPA 对 HK-2 发生的 EMT 抑制作用, 使用 400 ng/ml RAPA 处理 HK-2 细胞, 结果显示 RAPA 组和 RAPA 联合 TGF- β 1 组 HK-2 细胞分别与 TGF- β 1 处理组比较穿透数目均明显减少 ($P < 0.01$), 分别为 (35.28 ± 9.11) 和 (45.19 ± 7.23) ; 4 组间 $F = 180.3$, 可见 RAPA 可以显著降低 HK-2 细胞的穿膜数。见图 1。

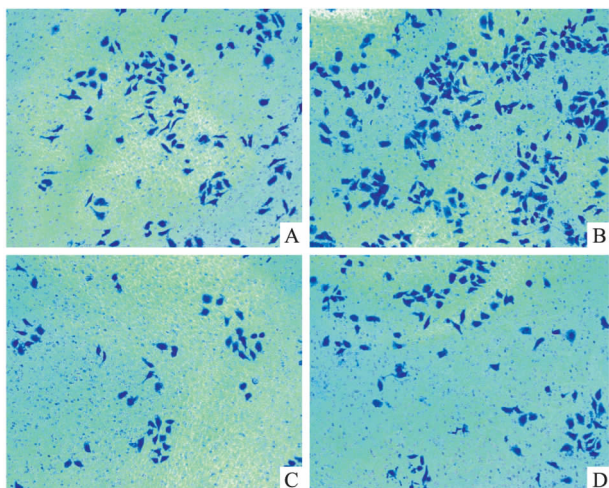


图1 RAPA 和 TGF- β 1 对 HK-2 细胞侵袭力的影响

A: 无血清阴性对照组; B: 阳性对照组 (TGF- β 1 处理组); C: RAPA 组; D: RAPA 联合 TGF- β 1 组

2.2 RAPA 和 TGF- β 1 对 HK-2 细胞迁移能力的影响 为研究 HK-2 细胞在 TGF- β 1 诱发 EMT 而引起细胞迁移能力的变化, 使用 10 μ g/ml TGF- β 1 处理 HK-2 细胞 48 h。阴性对照组 HK-2 细胞穿透基质膜的细胞数为 (178.04 ± 35.16) 提示 HK-2 具有一定的迁移能力; 经 TGF- β 1 处理的 HK-2 细胞, 穿透的细胞数 (525.21 ± 29.07) , 与阴性对照组比较明显增加 ($P < 0.01$); 为观察 RAPA 对 HK-2 发生的 EMT 抑制作用, 使用 400 ng/ml RAPA 处理 HK-2 细胞, RAPA 组和 RAPA 联合 TGF- β 1 组 HK-2 细胞分别与 TGF- β 1 组比较穿透数目均明显减少 ($P < 0.01$), 分别为 (71.11 ± 11.29) 和 (95.31 ± 17.05) ; 4 组间 $F = 288.9$, 可见 RAPA 可以显著降低 HK-2 细胞的穿膜数。见图 2。

2.3 RAPA 和 TGF- β 1 对 HK-2 细胞 Vimentin 和 E-cadherin 表达水平的影响 为进一步研究 RAPA 抑制 HK-2 细胞发生 EMT 的分子机制, 在 mRNA 水平和蛋白质水平分别检测了上皮细胞标志分子 E-cadherin 及间质细胞标志分子 Vimentin 的表达。

RT-PCR 结果显示: 与对照组比较, TGF- β 1 可以促进 Vimentin 的表达, 抑制 E-cadherin 的表达; 而 RAPA 组及 RAPA 联合 TGF- β 1 组 Vimentin 的表达较 TGF- β 1 处理组均明显降低; RAPA 组及 RAPA 联合 TGF- β 1 处理组细胞的 E-cadherin 表达较 TGF- β 1 处理组均明显增加 ($P < 0.05$) (图 3)。Western blot 结果与 mRNA 结果一致 (图 4)。由此可见, RAPA 可以逆转 TGF- β 1 引起 HK-2 细胞发生 EMT 的效应。

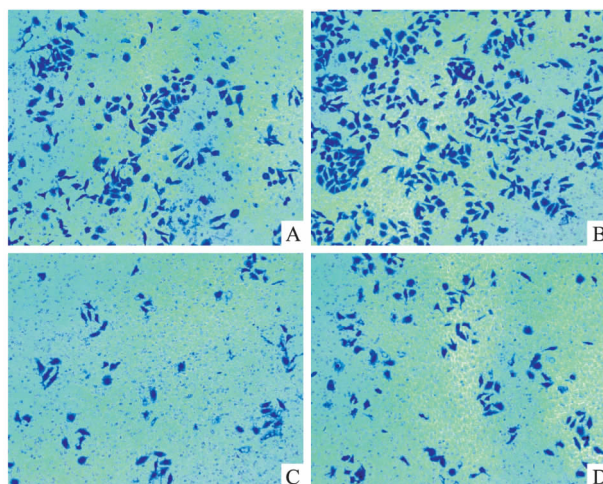


图2 RAPA 和 TGF- β 1 对 HK-2 细胞迁移力的影响

A: 无血清阴性对照组; B: 阳性对照组 (TGF- β 1 处理组); C: RAPA 组; D: RAPA 联合 TGF- β 1 组

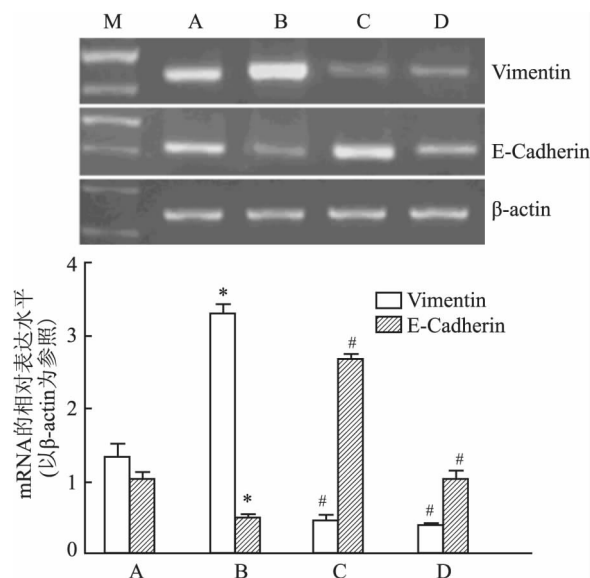


图3 RT-PCR 检测 HK-2 细胞中 Vimentin 和 E-cadherin 表达

M: DNA marker DL2000; A: 无血清阴性对照组; B: 阳性对照组 (TGF- β 1 处理组); C: RAPA 组; D: RAPA 联合 TGF- β 1 组; 与无血清阴性对照组比较: * $P < 0.05$; 与阳性对照组 (TGF- β 1 处理组) 比较: # $P < 0.05$

2.4 HE 染色结果 为观察保存的糖尿病肾病小鼠的肾组织标本的结构和形态,选取前期保存的肾组织标本进行 HE 染色。结果显示(图 5):正常小鼠肾小管结构清晰,基底膜正常,细胞极性存在,胞质丰富,未见颗粒状变性和空泡性变性;糖尿病肾病小鼠的肾小管结构不清,基底膜增厚,细胞坏死脱落,胞质呈颗粒状变性及泡状变性,局部可见胆红素沉积;RAPA 处理后,肾小管结构有肾小管结构基本保存,部分肾小管基底膜轻度增厚,部分细胞坏死脱落,细胞胞质部分呈颗粒状变性及泡状变性。提示前期留存的肾组织标本保持原有形态和结构。

2.5 免疫组化检测动物模型肾组织中目的蛋白的表达 为进一步分析糖尿病肾病发生过程中是否发生 EMT 及 RAPA 治疗后的抑制作用,利用免疫组织化学方法检测 E-cadherin 和 Vimentin 表达变化。结果显示,正常肾组织中 E-cadherin 高表达,主要集中于小管上皮细胞的细胞膜及细胞相互接触的间隙中,但随着糖尿病肾病发展过程中,其表达水平明显降低;与正常肾组织相比,在糖尿病肾病的组织中,Vimentin 表达明显增加;在经过 RAPA 治疗后表达降低。见图 6。

3 讨论

雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)是近年来显示的一类进化上非常保守的蛋白激酶家族,哺乳动物 TOR 基因产物只有哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)这一种蛋白,即 RAPA 在体内的直接作用靶点^[10],可以刺激蛋白质翻译、核糖体合成和抑制细胞自我吞噬。RAPA 是一种有效的 mTOR 特异性抑制剂,其进入细胞后,结合在免疫亲和蛋白 FKBP12 上,形成 RAPA-FKBP12 复合物,抑制 mTOR 活性,进而抑制细胞周期的进展,阻断细胞的增殖,发挥免疫抑制作用。国外已将其应用于以肾移植为主的各类器官移植,近年来国内也开始应用于肾移植^[11]。

EMT 是肾小管上皮细胞在各种损伤因素作用下,通过表型改变转变为成纤维细胞,进而通过管状基底膜迁移转变成间质。EMT 发生过程主要有上皮细胞失去黏附特性,重新表达 α -平滑肌肌动蛋白和肌动蛋白重组,肾小管基底膜的破坏,细胞迁移力和侵袭力的增强。E-cadherin 是细胞间黏附蛋白,可维持上皮细胞结构的完整性,其表达水平降低是发

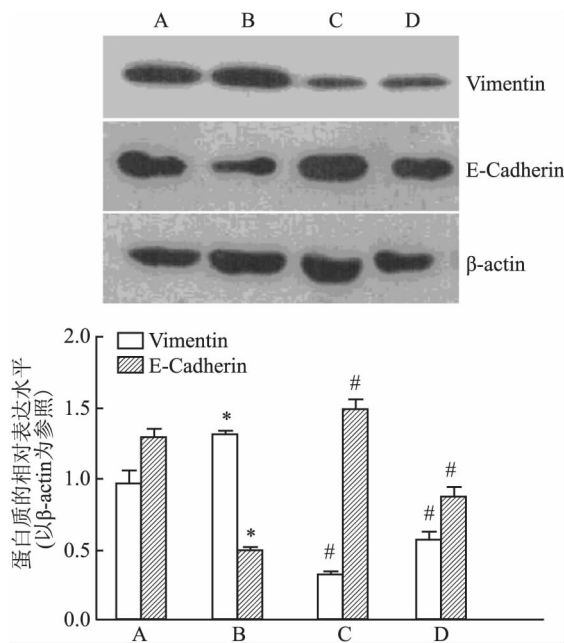


图 4 Western blot 检测 HK-2 细胞中 Vimentin 和 E-cadherin 表达
M: DNA marker DL2000; A: 无血清阴性对照组; B: 阳性对照组 (TGF- β 1 处理组); C: RAPA 组; D: RAPA 联合 TGF- β 1 组; 与无血清阴性对照组比较: * $P < 0.05$; 与阳性对照组 (TGF- β 1 处理组) 比较: # $P < 0.05$

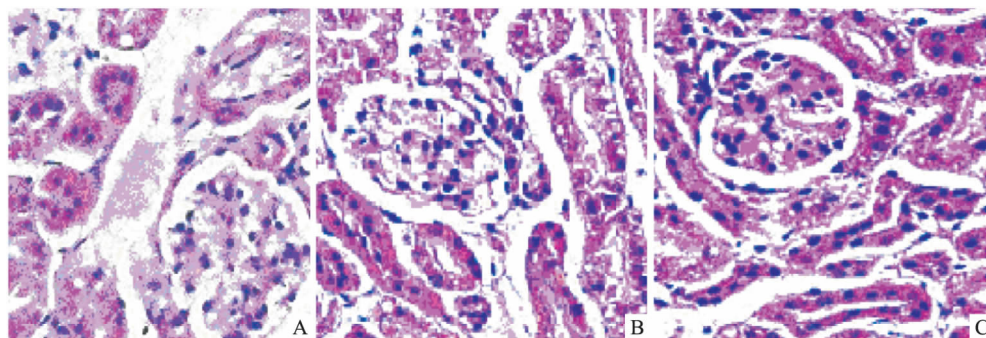


图 5 HE 染色结果 SP \times 200
A: 阴性对照组 (正常 db/db 小鼠); B: 阳性对照组 (糖尿病肾病组); C: RAPA 治疗组

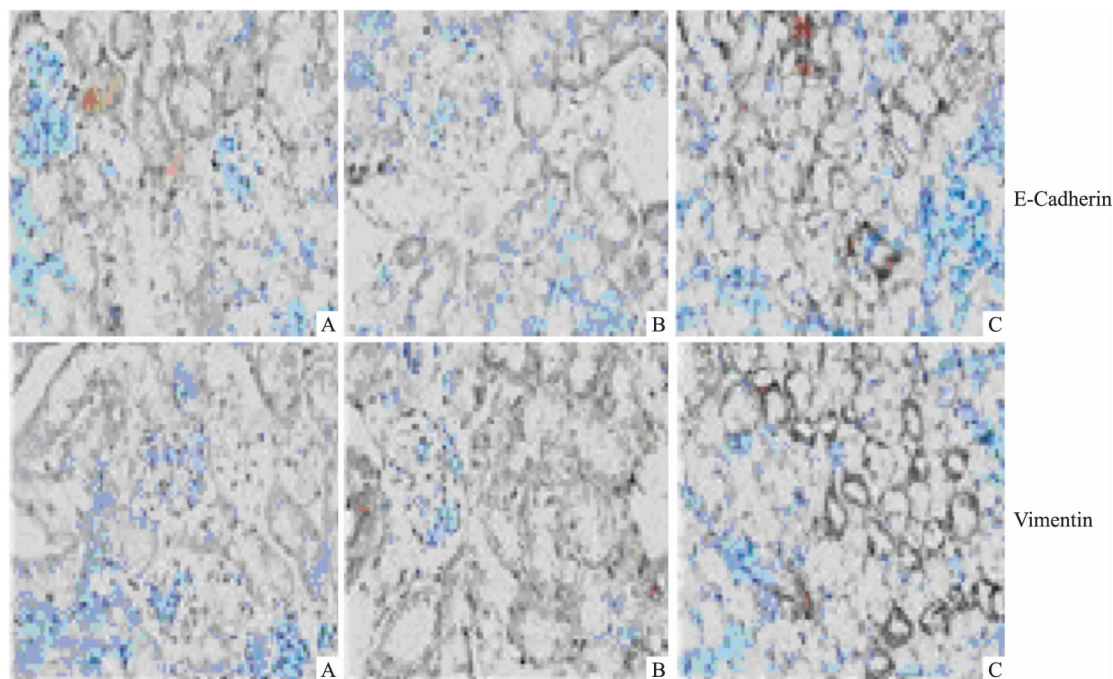


图6 免疫组化检测目的蛋白的表达 SP×400

A:阴性对照组(正常 db/db 小鼠);B:阳性对照组(糖尿病肾病组);C:RAPA 治疗组

生 EMT 关键标志分子,同时伴随间质细胞标志分子如 Vimentin、N-cadherin 等表达增加^[10]。为研究 RAPA 对肾小管上皮细胞在糖尿病肾病发病过程中可能发生 EMT 的抑制作用,利用 TGF- β 1 诱导了 HK-2 细胞发生的 EMT 结果显示 HK-2 细胞在 TGF- β 1 作用下,其迁移能力和侵袭能力较对照组明显增加;mRNA 水平和蛋白质水平分析证实:TGF- β 1 作用下, HK-2 细胞的 E-cadherin 表达显著降低, Vimentin 表达明显增加,提示成功建立了 EMT 的细胞模型;而 RAPA 能显著抑制 HK-2 的迁移和侵袭能力,并能逆转 E-cadherin 和 Vimentin 表达。利用前期的糖尿病肾病小鼠模型的肾组织,进行 HE 染色观察,表明这些模型肾小球和肾小管的变化符合糖尿病肾病的形态特征。RAPA 治疗后肾小球和肾小管的病变较对照组明显减轻。免疫组化结果显示糖尿病肾病小鼠肾组织中 Vimentin 的表达明显增加, E-cadherin 表达明显降低,提示糖尿病肾病在发病过程中,肾小管上皮细胞可能发生 EMT,此过程可能与肾小管的纤维化有关。而 RAPA 恢复肾小管上皮细胞中 E-cadherin 的表达,抑制 Vimentin 的表达。这可能是 RAPA 具有抑制肾小管上皮细胞发生 EMT。

尽管在慢性肾功能衰竭中,肾小管上皮细胞转分化作为肾脏纤维化的机制已被广泛接受和认可,

然而体内肾小管上皮细胞 EMT 是否存在这一问题仍存在争议,还没有确凿的依据论证 EMT 是体内肾脏纤维化的发生过程。本研究中 TGF- β 1 诱导肾小管上皮细胞发生 EMT,而 RAPA 干扰了 TGF- β 1 诱导的 EMT 的发生与发展。然而在临床上应用 RAPA 治疗糖尿病肾病,还需进一步深入研究肾小管上皮细胞发生 EMT 的分子机制。

参考文献

- [1] Shao N, Kuang H Y, Wang N, et al. Relationship between oxidant/antioxidant markers and severity of microalbuminuria in the early stage of nephropathy in type 2 diabetic patients[J]. J Diabetes Res, 2013, 2013(5):232404.
- [2] Fuxe J, Karlsson M C I. TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(5-6):455-61.
- [3] Gallon L, Traitanon O, Yu Y, et al. Differential effects of calcineurin and mammalian target of rapamycin inhibitors on alloreactive Th1, Th17, and regulatory T cells [J]. Transplantation, 2015, 99(9):1774-84.
- [4] Lieberthal W, Fuhro R, Andry C, et al. Rapamycin delays but does not prevent recovery from acute renal failure: role of acquired tubular resistance[J]. Transplantation, 2006, 82(1):17-22.
- [5] 苏超,王德光,张桂霞,等.雷帕霉素联合坎地沙坦治疗 2 型糖尿病肾病的疗效观察[J].安徽医科大学学报, 2015, 50(6):792-6.

- [6] Park J T , Kato M , Yuan H , et al. FOG2 protein down-regulation by transforming growth factor- β 1-induced microRNA-200b/c leads to Akt kinase activation and glomerular mesangial hypertrophy related to diabetic nephropathy [J]. *J Biol Chem* 2013 , 288 (31) : 22469-80.
- [7] Deshpande S D , Putta S , Wang M , et al. Transforming growth factor- β 1-induced cross talk between p53 and a microRNA in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes* , 2013 , 62 (9) : 3151 - 62.
- [8] 常 蓓. 炎症环境中雷帕霉素对骨重塑的影响 [D]. 长春: 吉林大学 2015.
- [9] 李 强. 雷帕霉素对脑缺血再灌注后线粒体损伤的影响 [D]. 上海: 上海交通大学 2014.
- [10] Chiang C K , Sheu M L , Lin Y W. Honokiol ameliorates renal fibrosis by inhibiting extracellular matrix and pro-inflammatory factors *in vivo* and *in vitro* [J]. *Br J Pharmacol* 2011 , 163 (3) : 586 - 97.
- [11] 校丽芳 , 严玉澄. 雷帕霉素及其相关分子靶点在糖尿病肾病发病机制中的研究进展 [J]. *上海医学* , 2009 , 32 (3) : 260 - 2.

On rapamycin regulating biological behaviours of renal tubular epithelial cells and its potential mechanisms related to treatment for diabetic nephropathy

Cheng Fang^{1,2} , Tu Zhenzhen¹ , Zhou Lili¹ , et al

¹*Dept of Biochemistry and Molecular Biology Anhui Medical University Hefei 230032;*

²*Dept of Pharmacy , Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601)*

Abstract Objective To investigate biological behaviors of renal tubular epithelial cells treated by rapamycin (RAPA) and its molecular mechanisms related to treatment for diabetic nephropathy (DN). **Methods** Human renal tubular epithelial cells (HK-2) were cultured in complete medium with TGF- β 1 and (or) RAPA. Transwell migration assay or transwell invasion assay , respectively , was performed to observe HK-2 cells treated by TGF- β 1 and (or) RAPA. RT-PCR and Western blot were used to detect expression of E-cadherin and vimentin in HK-2 cells; meanwhile , the mice models with diabetic nephropathy were established and treated by RAPA. HE staining was used to observe pathological changes in these tissues. Immunohistochemical analysis was performed to detect expression of E-cadherin and vimentin in the kidney tissues. **Results** The transwell assays showed the abilities of migration and invasion of HK-2 cells treated by TGF- β 1 significantly increased , compared to the controls. However , the HK-2 cells treated by RAPA showed weaker migration and invasion abilities. RT-PCR , Western blot and immunohistochemistry assay illustrated that E-cadherin expression decreased and vimentin expression increased in HK-2 cells treated by TGF- β 1. However , after the combination use of RAPA , EMT was inhibited , which was induced by TGF- β 1. HE staining revealed that RAPA ameliorated the histological tissue damage in the kidney tissues from the DN mice. **Conclusion** RAPA can reverse epithelial-myofibroblast transdifferentiation of renal tubular epithelial cells.

Key words rapamycin ; transforming growth factor β 1 ; diabetic nephropathy ; epithelial-myofibroblast transdifferentiation