

高糖环境下肾小管上皮细胞来源外泌体诱导巨噬细胞向肌成纤维细胞转化

王 东^{1,2}, 吴永贵¹, 齐向明¹

摘要 目的 探讨高糖环境下肾小管上皮细胞来源外泌体诱导巨噬细胞向肌成纤维细胞转化的作用与机制。方法 正常糖(5.5 mmol/L)及高糖(30.0 mmol/L)分别处理人肾小管上皮细胞(HK2)48 h,收集上清液提取并鉴定外泌体;观察人急性单核细胞白血病细胞株(THP-1)巨噬细胞是否吞噬 PKH67 标记的外泌体;通过检测诱导性氮氧化物合酶(iNOS)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、甘露醇受体(CD206)的表达,以确定分化为 M1 和 M2 型巨噬细胞的最佳浓度及时间点;激光共聚焦检测 CD206 与 α -SMA、IV 型胶原(Col-IV)、纤维连接蛋白(FN)的荧光共表达。qRT-PCR 与 ELISA 法测定转化生长因子受体- β 1(TGF- β 1)、白细胞介素(IL)-10、IL-6 水平。Western blot 测定 TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达。结果 上清液离心获取标本后检测到白细胞分化抗原群 63(CD63)和肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101)阳性、内质网分子伴侣蛋白(Calnexin)阴性,确认为外泌体并且纯度较高;THP-1 巨噬细胞能够吞噬各组外泌体;各组外泌体刺激的最佳浓度为 40 mg/L、最佳时间为 96 h。高糖外泌体刺激 24 h 巨噬细胞以 M1 型为主,96 h 则以 M2 型为主。与正常糖组相比,高糖组 M2 型巨噬细胞 CD206、 α -SMA、Col-IV、FN 的荧光表达均增强,TGF- β 1、IL-10 的表达和分泌水平均上调(均 $P < 0.05$),IL-6 的表达和分泌则下调($P < 0.05$),TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达也显著升高(均 $P < 0.05$)。结论 高糖环境下 HK2 分泌的外泌体能够诱导 M2 型巨噬细胞向肌成纤维细胞转化,其机制可能与 TGF- β 1/Smad3 信号通路的激活相关。

关键词 外泌体;巨噬细胞;肌成纤维细胞

中图分类号 R 587.2;R 692.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0847-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.002

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一种严重的糖尿病微血管并发症,肾脏纤维化是 DN 进展为终末期肾病最重要的病理生理变化。研究 DN

纤维化的机制进而阻断甚至扭转肾脏纤维化的发生发展一直是需要努力的重点。研究^[1]表明, DN 是一种炎症性疾病,巨噬细胞的浸润则是 DN 发病机制中的关键步骤。研究^[2]表明,在 DN 中,巨噬细胞发生了向肌成纤维细胞的转化,即巨噬细胞-肌成纤维细胞转化(macrophage-to-myofibroblast transformation, MMT),进而引发肾脏纤维化。而 DN 中的肌成纤维细胞 50% 来源于浸润的巨噬细胞^[3]。然而,MMT 在 DN 中究竟是如何引发的,目前鲜有报道,因而被作为该研究的重点。外泌体是由膜衍生而来的纳米级囊泡,常常是各细胞间交流并传递信息的重要载体。研究^[4]表明,抑制肾小球上皮细胞来源的外泌体可以抑制 DN 纤维化的发生。另有研究^[5]表明,高糖环境下肾小球内皮细胞分泌的外泌体,能够激活系膜细胞,进而引发肾脏纤维化。因此,该研究着眼于外泌体,试图将 MMT 与 DN 纤维化联系起来。在 DN 中肾小管的损伤常常发生较早,而血糖水平的高低与其损伤程度直接相关。因此,该研究将探讨高糖环境下人肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cells, HK2)产生的外泌体能否以及如何促使巨噬细胞向肌成纤维细胞转化,为 DN 纤维化的机制研究提供新的思路,从而为 DN 的治疗奠定新的基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 人 HK2 细胞株由孟晓明教授(安徽医科大学)惠赠,THP-1 细胞株由孙国平教授(安徽医科大学)惠赠,胎牛血清(加拿大 Wisent 公司),青-链霉素双抗溶液、D-葡萄糖和 MINI67-1KT(美国 Sigma 公司),胰蛋白酶和 BCA 蛋白浓度试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),无外泌体血清(美国 System Biosciences 公司),ELISA 试剂盒(上海 Excell Bio 公司),反转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒(南京诺唯赞公司),引物(上海生工公司),CD63 抗体(上海 Bioscience 公司),TSG101 抗体(美国 Abcam 公司),TRIzol 试剂(美国 Life Technology 公司),FITC Mouse Anti-CD206 和 IgG1 Isotype Control

2022-03-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770722)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

² 随州市中心医院肾脏内科,随州 441300

作者简介:王 东,女,硕士研究生;

齐向明,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: qxm119

@126.com

(美国 BD 公司), PE Rabbit Anti-iNOS 和 IgG Isotype Control(北京博奥森公司), 兔抗 CD206、兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、兔抗 Col-IV、兔抗 FN、兔抗 TGF- β 1 抗体、小鼠抗 β -action 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(武汉三鹰公司), Calnexin 抗体、兔抗 Smad3 和兔抗 p-Smad3 抗体(美国 CST 公司), ECL 增强化学发光试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 获取、标记及鉴定外泌体 ① HK2 细胞株用无外泌体的 FBS 培养, 待细胞融合达 70% ~ 80%, 换无血清培养基继续培养 24 h 同步化。将 HK2 分为正常组(5.5 mmol/L)和高糖组(30 mmol/L), 培养 48 h, 分别收集两组上清液, 离心获取沉淀(即外泌体), 以适量 PBS 重悬, -80°C 保存; ② 将获得的外泌体冰上自然解冻, 醋酸双氧铀室温下负染 1 ~ 2 min, PBS 反复冲洗晾干, 电镜观察; ③ 将获得的外泌体依次加入稀释液 C 和 PKH67 后反复离心, 得到 PKH67 标记外泌体, 加入 PBS 重悬, 避光 4°C 保存, 用于后续实验。

1.2.2 激光共聚焦 ① 标记的外泌体与 THP-1 巨噬细胞共培养 24 h, 将细胞固定、破膜、封闭、染核, 激光共聚焦显微镜观察 THP-1 巨噬细胞能否吞噬外泌体; ② 将外泌体刺激的 THP-1 巨噬细胞接种孔板中, 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗, 5% 驴血清封闭 2 h, 分别加入抗 CD206、抗 α -SMA、抗 Col-IV、抗 FN 一抗(1:200), 4°C 孵育过夜, PBS 洗 3 次后, 加入 FITC、PE 标记的二抗(1:200)室温孵育 2 h, DAPI 染细胞核, 封片后采集图像。

1.2.3 流式细胞术 各组 THP-1 巨噬细胞取样加入流式管, 4°C 下 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液后 PBS 重悬, 加入受体阻断抗体, 室温放置 20 min 后洗涤。 4°C 下 1 000 r/min 离心 10 min, 加 PBS 重悬, 分别加入同型 IgG、FITC-CD206、PE-iNOS, 室温孵育 30 min。 避光洗涤离心, 弃上清液再次加入 PBS 重悬, 流式细胞仪检测。

1.2.4 Western blot 实验 处理后的细胞经冰上裂解, 提取总蛋白, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白上样, 经凝胶电泳、恒流转膜后, 脱脂牛奶封闭 2 h, 抗 α -SMA、抗 CD206、抗 iNOS、抗 Col-IV、抗 FN、抗 TGF- β 1、抗 Smad3、抗 p-Smad3 一抗孵育过夜, TBST 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 孵育 45 min, 洗膜, ECL 显色, 曝光显影定影后, 以 β -actin 为内参, 计算各蛋白的相对表达量。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 将 THP-1 巨噬细胞分为空白组、正常糖外泌体刺激组和高糖外泌体刺激组, 收集处理后的细胞, 用 TRIzol、三氯甲烷、异丙醇提取细胞总 RNA, 根据试剂盒操作说明将 RNA 反转录成 cDNA, SYBR Green 法进行反应, 检测 TGF- β 1、IL-6、IL-10 的 mRNA 表达。引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相对表达量。

表 1 引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
TGF- β 1	CCCTGGACACCAACTATTGC	GCAGAAGTTGGCATGCTAGC
IL-6	CGGGAACGAAAGAGAAGCTC	ACAACAACAATCTGAGGTGC
IL-10	GCTGTCATCGATTCTTCCC	TCAAACCTACTCATGGCTTGT
β -actin	GCGAGAAGATGACCCAGATC	GGATAGCACAGCCTGGATAG

1.2.6 ELISA 实验 收集处理后各组培养上清液, 用试剂盒检测样品在特定波长处的吸光度, 依照标准曲线计算上清液中 TGF- β 1、IL-6、IL-10 浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据进行比较采用单因素方差分析, LSD- t 检验组间差异显著性, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HK2 来源外泌体鉴定 从正常糖组、高糖组 HK2 细胞的培养上清液中提取到的囊泡, 在电镜下观察, 可见典型双层膜结构, 且直径分布于 30 ~ 100 nm 之间。将各组囊泡的重悬液采用 Western blot 进行检测, 结果提示外泌体的标志蛋白 CD63 和 TSG101 有着阳性表达, 而内质网分子伴侣蛋白 Calnexin 却未见表达, 表明所获取的外泌体纯度较高。见图 1。

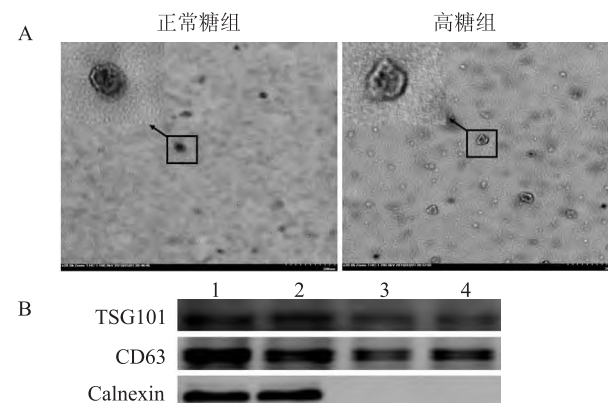


图 1 外泌体电镜下形态及标志蛋白的表达

A: 外泌体经醋酸铀负染 $\times 20\,000$; B: 外泌体标志蛋白的表达; 1: 正常糖组细胞; 2: 高糖组细胞; 3: 正常糖外泌体; 4: 高糖外泌体

2.2 THP-1 巨噬细胞与外泌体共培养 ① DAPI 染核,PKH67 标记外泌体,用激光共聚焦显微镜观察 THP-1 巨噬细胞中是否有 PKH67 的绿色荧光表达,结果提示外泌体能够被 THP-1 巨噬细胞所吞噬,见图 2。② 通过 Western blot 检测细胞 α -SMA 蛋白表达,得出各组外泌体的最佳刺激浓度为 40 mg/L、最佳刺激时间为 96 h,见图 3。③ 通过流式细胞术检测 iNOS 和 CD206,提示高糖外泌体刺激后,

THP-1 巨噬细胞会分化为 M1 和 M2 型。与刺激 48 h 比较,刺激 24 h 时 M1 型巨噬细胞比例明显居高;与刺激 84 h 比较,刺激 96 h 时 M2 型巨噬细胞比例则明显居高,THP-1 巨噬细胞经高糖外泌体刺激 24 h 以 M1 型巨噬细胞为主,刺激 96 h 则以 M2 型巨噬细胞为主,见图 4。④ Western blot 显示不同刺激时间下 iNOS 和 CD206 的蛋白表达,见图 5。

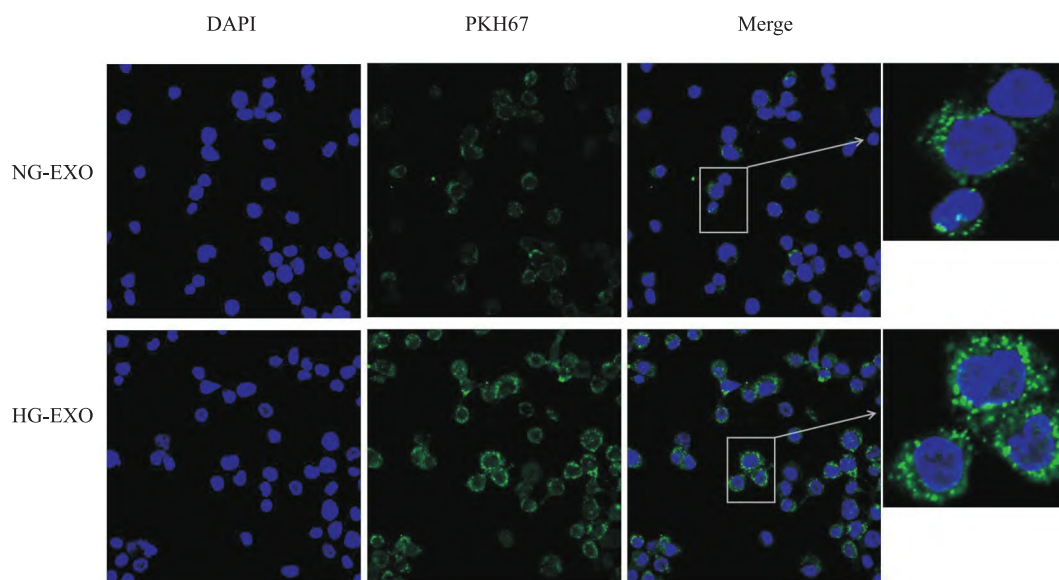


图2 THP-1 巨噬细胞吞噬外泌体 ×400

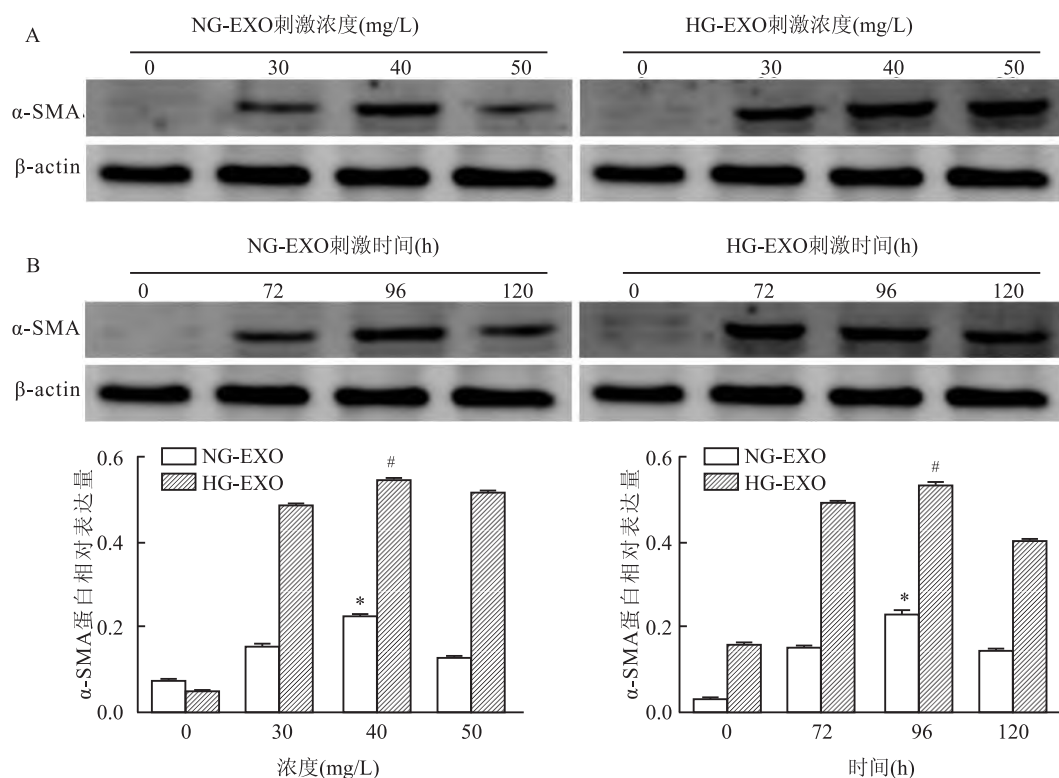


图3 外泌体刺激的最佳浓度和时间

NG-EXO:正常糖外泌体刺激;HG-EXO:高糖外泌体刺激;与空白组比较,* $P < 0.05$;与 NG-EXO 组比较,# $P < 0.05$

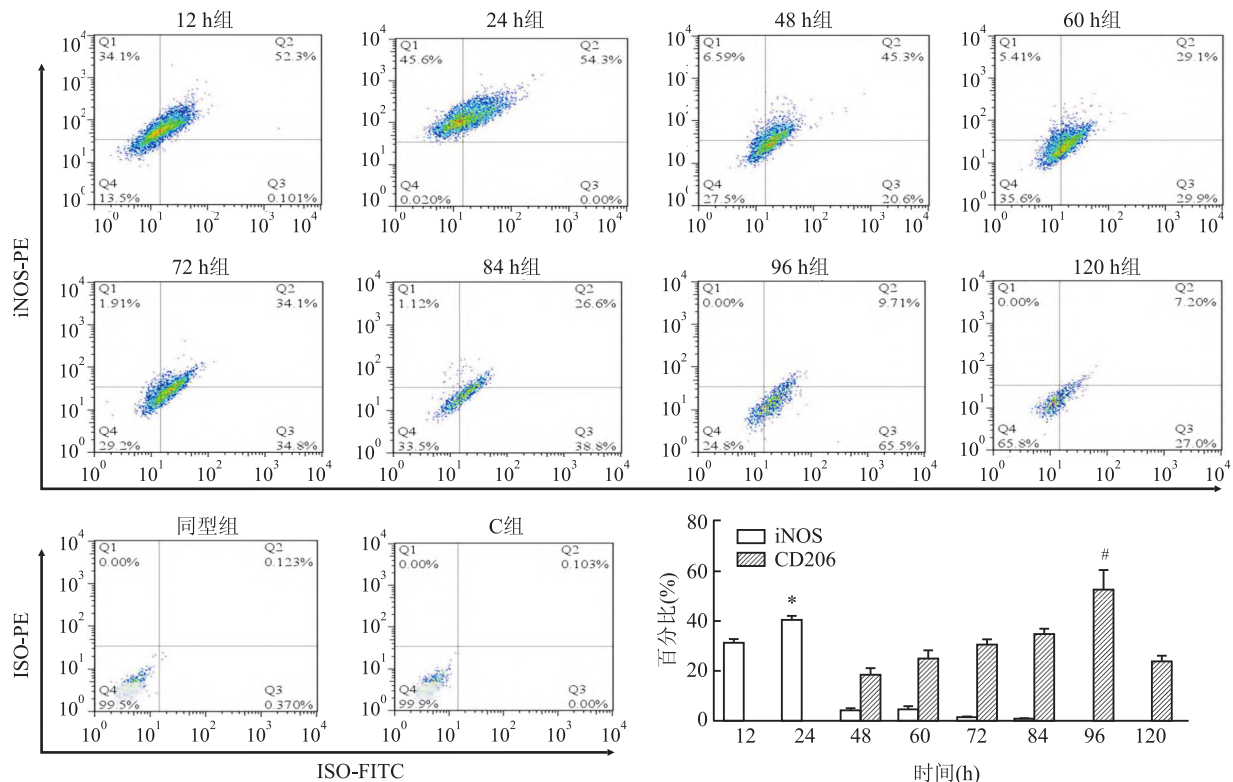


图4 iNOS 阳性细胞百分比和 CD206 阳性细胞百分比随着外泌体刺激时长而改变

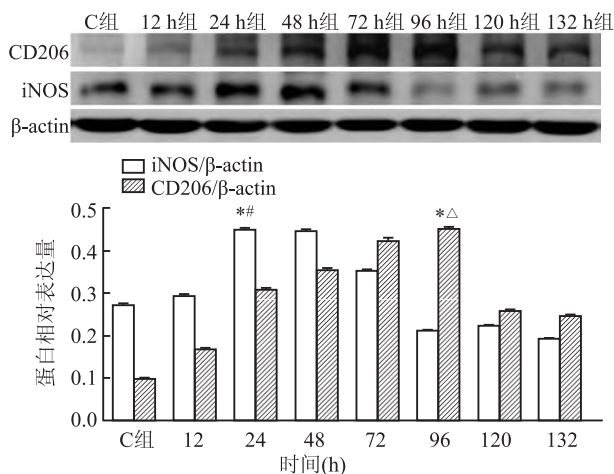
与 12 h 组比较: * $P < 0.05$; 与 84 h 组比较: # $P < 0.05$ 

图5 iNOS、CD206 蛋白表达量随着外泌体刺激时长而变化

与空白组(C组)比较: * $P < 0.05$; 与 48 h 组比较: # $P < 0.05$; 与 72 h 组比较: Δ $P < 0.05$

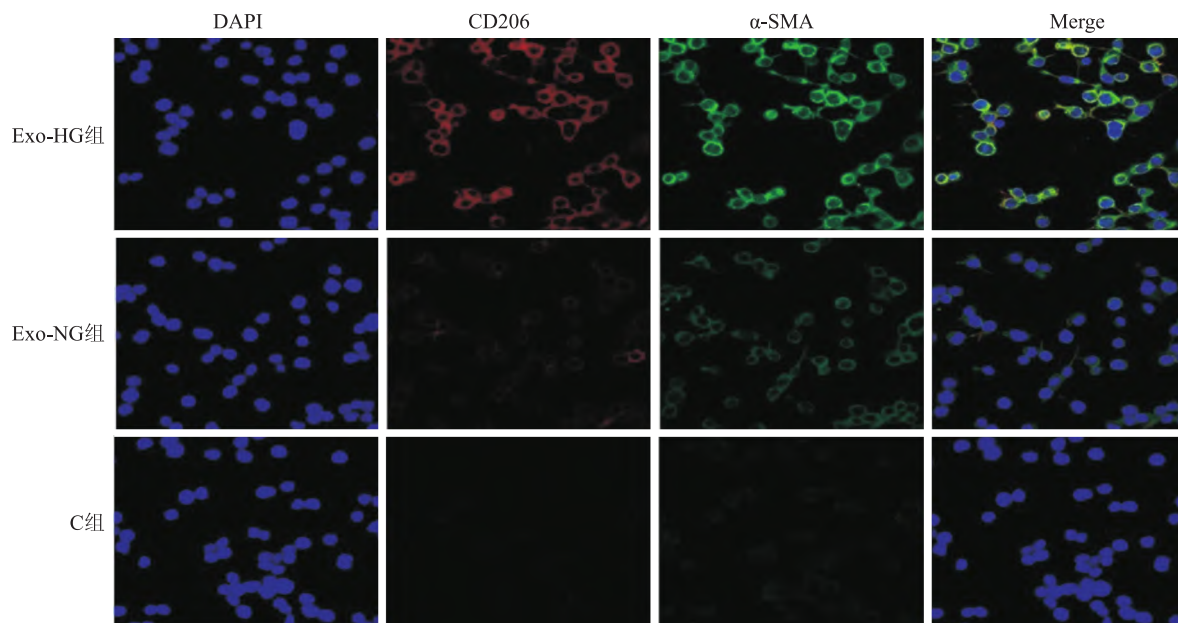
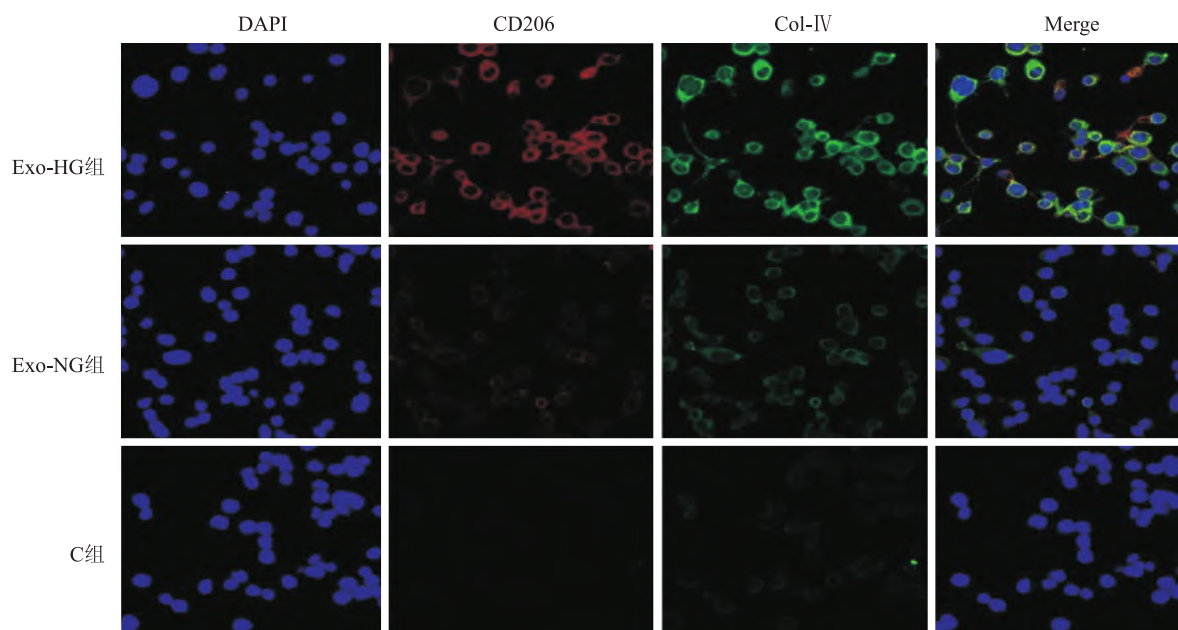
2.3 THP-1 巨噬细胞经外泌体刺激后的分泌功能改变 分别用正常糖组外泌体(EXO-NG)和高糖组外泌体(EXO-HG)刺激 THP-1 巨噬细胞。① 激光共聚焦结果显示:与正常组(C组)相比,高糖组 THP-1 巨噬细胞 CD206 和 α -SMA、Col-IV、FN 共表达的荧光强度显著增强。见图 6~8。② Western

blot 结果显示:高糖组 THP-1 巨噬细胞中 α -SMA、Col-IV 和 FN 蛋白表达量均显著增加($F = 1340.34$, $P < 0.05$; $F = 173.81$, $P < 0.05$; $F = 303.14$, $P < 0.05$)。见图 9。③ qRT-PCR 结果显示:与正常组相比,高糖组 THP-1 巨噬细胞 TGF- β 1、IL-10 的 mRNA 表达水平明显上调($F = 582.39$, $P < 0.05$; $F = 463.48$, $P < 0.05$; $F = 333.45$, $P < 0.05$), IL-6 的 mRNA 表达水平则明显下调($P < 0.05$)。④ ELISA 结果显示:与正常组相比,高糖组 THP-1 巨噬细胞上清液中 TGF- β 1、IL-10 分泌量明显上调($F = 361.71$, $P < 0.05$; $F = 50.69$, $P < 0.05$),而 IL-6 分泌量则明显下调($F = 49.33$, $P < 0.05$)。见图 10。

2.4 THP-1 巨噬细胞经外泌体刺激后通路蛋白的表达 Western blot 结果显示,与正常组相比,高糖组 THP-1 巨噬细胞 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达均明显升高($F = 994.23$, $P < 0.05$; $F = 259.96$, $P < 0.05$)。见图 11。

3 讨论

肌成纤维细胞、纤维细胞和免疫细胞等被认为与 DN 的发展密切相关,其稳态失调可导致进行性纤维化和活肾单位的损失。肾脏巨噬细胞浸润是

图6 CD206 和 α -SMA 共表达 $\times 400$ 图7 CD206 和 Col-IV 共表达 $\times 400$

人类慢性肾病的共同特征,浸润程度与损伤严重程度相关。募集到受损肾脏后巨噬细胞主要分为2种不同的亚型:经典激活(M1)和选择性激活(M2)。M1型能释放IL-1、IL-6和TNF- α ,被认为有促炎作用,而M2型表达精氨酸酶、甘露糖受体和IL-10,具有抗炎功能^[6]。越来越多研究^[6-7]提示,在肾脏纤维化进展中发挥关键作用的是M2型巨噬细胞而非M1型。先前的研究^[8]表明,高糖环境下HK2来源的外泌体能在早期活化巨噬细胞,使其分化为M1

型,进而引发炎症因子释放增加。而在该实验中,随着高糖外泌体刺激时间的延长,THP-1巨噬细胞CD206的荧光表达强度也逐渐增强。CD206即甘露糖受体(mannose receptor, MR)是高度可信的M2型巨噬细胞标志物,提示THP-1巨噬细胞在高糖外泌体长时间作用下可极化为M2型巨噬细胞。M2型巨噬细胞常被视为促纤维化型,在肾脏的纤维化中发挥着重要作用^[6]。但M2型巨噬细胞诱导肾脏修复和再生的机制仍存在争议。

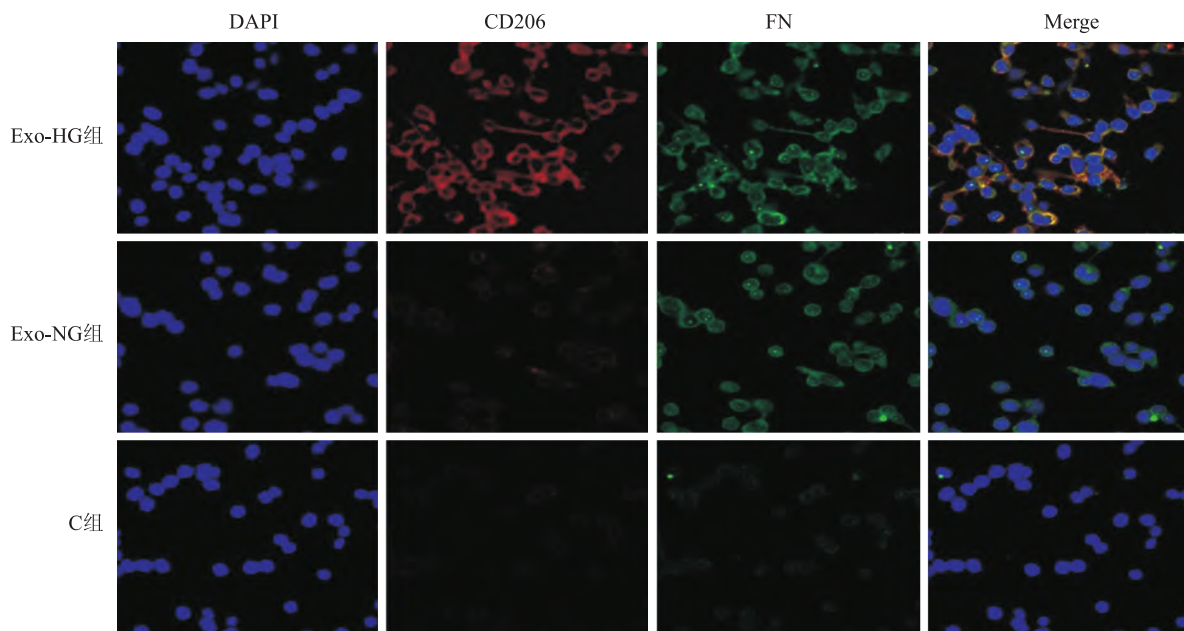


图8 CD206和FN共表达 ×400

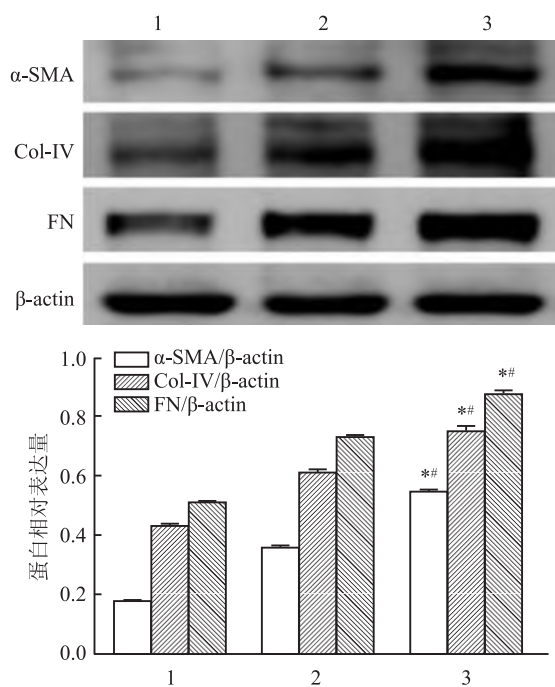


图9 高糖外泌体刺激对α-SMA、Col-IV、FN蛋白表达的影响

1:空白组;2:正常糖外泌体刺激组;3:高糖外泌体刺激组;与空白组比较: * $P < 0.05$;与正常糖外泌体刺激组比较: # $P < 0.05$

研究^[2-3]证实,巨噬细胞是通过向肌成纤维细胞转化而引发肾脏纤维化的发生。近期研究^[3]表明 MMT 的转化细胞同时表达 M2 型巨噬细胞的标记蛋白 CD206,提示 M2 型巨噬细胞是发生转化的主要细胞。上述所得的 M2 型巨噬细胞是否发生了向肌成纤维细胞的转化。肌成纤维细胞是一种多起

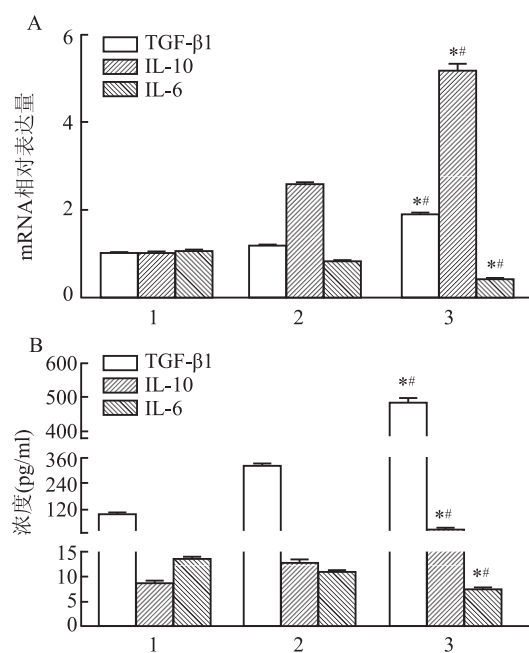


图10 高糖外泌体刺激对TGF-β1、IL-10、IL-6表达的影响

A:qRT-PCR;B:ELISA;1:空白组;2:正常糖外泌体刺激组;3:高糖外泌体刺激组;与空白组比较: * $P < 0.05$;与正常糖外泌体刺激组比较: # $P < 0.05$

源的异质性细胞,是组织纤维化过程中产生过量细胞外基质 (ECM) 的主要来源细胞,它们表达 α-SMA,分泌胶原蛋白 (Col-I) 和 FN 等 ECM 促进组织纤维化^[9]。α-SMA 是广泛认可的纤维化标志物,在 DN 的肾脏纤维化中有显著的表达^[10]。Col-IV 和 FN 则是肌成纤维细胞分泌的经典细胞外基质^[5]。

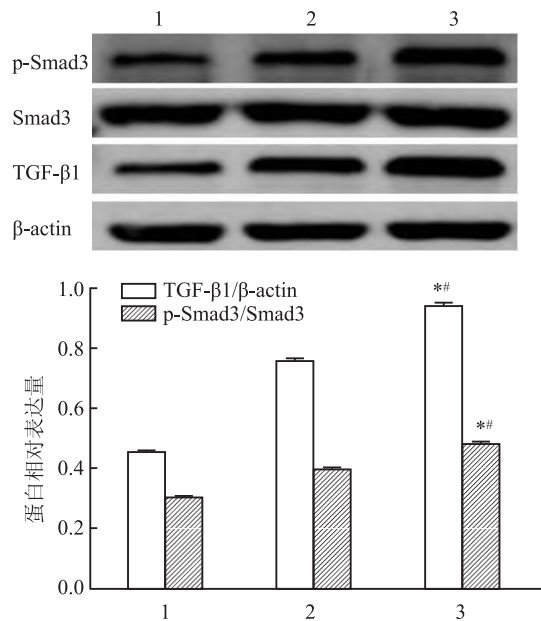


图 11 各组细胞 TGF-β1/Smad3 信号通路蛋白表达变化

1:空白组细胞;2:正常糖外泌体刺激组细胞;3:高糖外泌体刺激组细胞;与空白组比较: * $P < 0.05$; 与正常糖外泌体刺激组比较: # $P < 0.05$

该研究表明,经高糖外泌体作用后极化为 M2 型的巨噬细胞,其 α -SMA、Col-IV 和 FN 蛋白表达显著增加,证实了 MMT 的发生。提示外泌体可作为 MMT 与 DN 间的枢纽,为后续研究 DN 纤维化的阻断甚至逆转打下基础。

为初步探究该研究中外泌体在 DN 中诱发 MMT 的具体机制,该研究检测了由巨噬细胞转化而来的肌成纤维细胞中 TGF-β1/Smad3 通路蛋白的表达。TGF-β1 是纤维化疾病的中枢调节因子,是 DN 肾脏纤维化的关键调节器^[11]。研究^[12]表明,高糖刺激巨噬细胞产生的外泌体可促使肾脏纤维化的发生,其机制可能与 TGF-β1/Smad3 通路相关。Smad3 是 TGF-β1 信号经典的下游通路之一, TGF-β1/Smad3 通过直接调控细胞外基质的产生和释放来促使纤维化的发生^[13]。该研究向肌成纤维细胞转化后的巨噬细胞表达大量的 TGF-β1,其 p-Smad3/Smad3 蛋白表达也明显升高。提示 DN 中 MMT 的发生可能与 TGF-β1/Smad3 通路的激活相关。同时该实验检测了其炎症因子的分泌,结果显示 IL-10 分泌量增加而 IL-6 降低。IL-10 的代偿性表达提示机体发挥着抗炎作用,而 IL-6 则是经典的促炎因子,其分泌量增加常常引发炎症细胞浸润的增多^[14]。研究^[15]表明 TGF-β1 信号不仅能促进肾脏

纤维化,并且能通过抑制炎症而发挥对肾脏的保护作用。

参考文献

- [1] Tesch G H. Macrophages and diabetic nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2010, 30(3): 290-301.
- [2] Meng X M, Wang S, Huang X R, et al. Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(12): e2495.
- [3] Wang Y Y, Jiang H, Pan J, et al. Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(7): 2053-67.
- [4] Wu X M, Gao Y B, Xu L P, et al. Tongxinluo inhibits renal fibrosis in diabetic nephropathy: involvement of the suppression of intercellular transfer of TGF-β1-containing exosomes from GECs to GMCs [J]. Am J Chin Med, 2017, 45(5): 1075-92.
- [5] Wu X M, Gao Y B, Cui F Q, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells activate mesangial cells to promote renal fibrosis [J]. Biol Open, 2016, 5(4): 484-91.
- [6] Guiteras R, Flaquer M, Cruzado J M. Macrophage in chronic kidney disease [J]. Clin Kidney J, 2016, 9(6): 765-71.
- [7] Saito H, Tanaka T, Tanaka S, et al. Persistent expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and M2 macrophage markers and chronic fibrosis after acute kidney injury [J]. Physiol Rep, 2018, 6(10): e13707.
- [8] 王东, 徐兴欣, 范哲, 等. 高糖环境下肾小管上皮细胞来源外泌体诱导巨噬细胞激活的作用与机制 [J]. 中华肾脏病杂志, 2018, 34(9): 681-8.
- [9] Sun Y B, Qu X, Caruana G, et al. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis [J]. Differentiation, 2016, 92(3): 102-7.
- [10] Kim D J, Kang J M, Park S H, et al. Diabetes aggravates post-ischaemic renal fibrosis through persistent activation of TGF-β1 and Shh signalling [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16782.
- [11] Gewin L S. TGF-β and diabetic nephropathy: lessons learned over the past 20 years [J]. Am J Med Sci, 2020, 359(2): 70-2.
- [12] 黄小抗, 朱启金, 吴永贵. 高糖刺激的巨噬细胞源外泌体对小鼠肾组织中 TGF-β1/Smad3 通路的影响作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 1-6.
- [13] Wang W, Koka V, Lan H Y. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases [J]. Nephrology (Carlton), 2005, 10(1): 48-56.
- [14] Zhang C, Li Y, Wu Y, et al. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration [J]. J Biol Chem, 2013, 288(3): 1489-99.
- [15] Sureshbabu A, Muhsin S A, Choi M E. TGF-beta signaling in the kidney: profibrotic and protective effects [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 310(7): 596-606.

Exosomes from high glucose-treated renal tubular epithelial cells induce macrophage-to-myofibroblast transformation

Wang Dong^{1,2}, Wu Yonggui¹, Qi Xiangming¹

(¹Dept of Nephropathy, The First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Nephropathy, Hubei Suizhou Center Hospital, Suizhou 441300)

Abstract **Objective** To investigate the role and mechanism of macrophage-to-myofibroblast transition (MMT) induced by exosomes from high glucose-treated renal tubular epithelial cells. **Methods** Human renal tubular epithelial cells (HK2) were divided into glucose control group (5.5 mmol/L D-glucose) and high glucose group (30.0 mmol/L D-glucose) and cultured for 48 hours. The supernatant was collected by ultracentrifugation and identified by transmission electron microscopy and Western blot. PKH67 labelled exosomes were used to stimulate THP-1 macrophages. Laser scanning confocal microscopy was used to observe the phagocytosis process. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), α -SMA and CD206 was detected by flow cytometry and Western blot to determine the best concentration and time point. Laser scanning confocal microscopy was used to detect the fluorescence co-expression of rabbit polyclonal to mannose receptor (CD206), α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type-IV (Col-IV) and fibronectin (FN). The expression of tumor growth factor-beta 1 (TGF- β 1), interleukin (IL)-6, IL-10 was separately detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of TGF- β 1, mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3), phosphorylated-smad 3 (p-Smad3) in THP-1 macrophages was detected by Western blot. **Results** The expression of cluster of differentiation 63 (CD63) and tumor susceptibility gene 101 protein (TSG101) was positive, while the Calnexin protein was negative in the supernatant, confirming that the specimen was exosomes with high purity. THP-1 macrophages could internalize each group of exosomes. 40 mg/L exosomes for 96 hours were the best experimental condition. After being stimulated by high-glucose-exosomes, the percentage of M1 macrophages would climax in 24 hours, and the rate of M2 macrophages would climax in 96 hours. Immunofluorescence staining showed that exosomes released by HG-treated HK2 induced CD206, α -SMA, Col-IV and FN accumulation in cultured THP-1 macrophages. Compared with normal-glucose-exosomes, high-glucose-exosomes increased the expression of TGF- β 1, IL-10 in M2 macrophages and decreased the expression of IL-6 (all $P < 0.05$). Moreover, TGF- β 1 and p-Smad3 proteins expression also increased significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** Exosomes secreted by renal tubular epithelial cells in high glucose environment can induce M2 macrophages transdifferentiate into myofibroblasts, and its mechanism may be related to activation of TGF- β 1/Smad3 signal pathway.

Key words exosomes; macrophage; myofibroblast