

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00955

通络方剂对糖尿病大鼠肾小球足细胞的保护作用

孙亮亮¹, 李文桐², 王 华³, 邹俊杰¹, 石勇铨¹, 刘志民^{1*}

1. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003
2. 上海警备区第一干休所, 上海 200040
3. 广州军区武汉总医院心内科, 武汉 430070

[摘要] **目的** 观察通络方剂对糖尿病大鼠肾小球足细胞的保护作用, 探讨糖尿病肾病足细胞损伤的可能机制。**方法** 通过腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg)制作糖尿病大鼠模型, 将成模大鼠随机分为糖尿病组(DM组, 12只)、糖尿病 TLR 干预组(DM+TLR组, 12只), 另设正常对照组(CON组, 8只)。DM+TLR组大鼠予以 TLR[0.4 g/(kg·d)]灌胃, DM组和 CON组每日均在同一时间予同体积蒸馏水一次性灌胃。干预12周后测定各组大鼠24h尿蛋白定量; 取大鼠肾皮质, 采用电子显微镜观察肾小球足细胞超微结构; 采用体视学方法计数足细胞、计算足细胞相对密度; 采用蛋白质印迹分析法检测足细胞 nephrin 蛋白的表达; 测定血浆和肾皮质中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量。**结果** 与 CON组比较, DM组和 DM+TLR组大鼠肾质量/体质量比值、血糖和24h尿蛋白升高(P 均 <0.01); 12周时 DM组大鼠肾小球基底膜增厚、足细胞足突融合、微绒毛化, 足细胞计数减少($P<0.01$)、足细胞相对密度降低($P<0.01$)且 nephrin 表达减少($P<0.01$)。DM+TLR组足突形态接近正常, 基底膜增厚, 但较 DM组减轻, 足细胞计数、足细胞相对密度和 nephrin 表达量均高于 DM组(P 均 <0.01)。与 CON组比较, DM组和 DM+TLR组大鼠在观察终点血浆和肾皮质 SOD、GSH-Px 活性均降低($P<0.01, P<0.05$), MDA 含量则升高($P<0.01, P<0.05$); 与 DM组相比较, DM+TLR组血浆和肾皮质 SOD、GSH-Px 活性增加(P 均 <0.01), MDA 含量降低($P<0.01, P<0.05$)。**结论** TLR可以改善糖尿病大鼠肾小球的足细胞损伤, 可能与其抗氧化应激作用有关。

[关键词] 糖尿病肾病; 通络方剂; 足细胞; 氧化应激; nephrin

[中图分类号] R 587.24 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-0955-05

Effects of *Tongluo* recipe on injury of glomerular visceral epithelial cells in streptozotocin-induced diabetic rats

SUN Liang-liang¹, LI Wen-tong², WANG Hua³, ZOU Jun-jie¹, SHI Yong-quan¹, LIU Zhi-min^{1*}

1. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. The First Sanatorium for Retired Cadre, Garrison Command of Shanghai, Shanghai 200040, China
3. Department of Cardiology, Wuhan General Hospital, PLA Guangzhou Military Area Command, Wuhan 430070, Hubei, China

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effects and the possible mechanisms of *Tongluo* recipe (TLR) on podocyte injury in streptozotocin-induced diabetic rats. **Methods** Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg) dissolved in citrate buffer. The diabetic model rats were randomly divided into two groups ($n=12$): diabetic mellitus (DM) group and DM+TLR group. Rats in the DM+TLR group received 0.4 g/(kg·d) TLR throughout the experiment. Rats in the DM group and CON group ($n=8$) were given celiac perfusion of distilled water once at the same time and dose. After 12-week treatment, 24 h urinary protein of rats was determined; the cellular ultrastructures of podocytes were observed by transmission electronic microscope; the number and the density of podocytes in glomerulus were measured by stereological dissector/fractionator methods; the expression of nephrin in renal cortical tissue was detected by Western blotting analysis; the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA) were measured in the plasma and renal cortical tissue. **Results** Compared with CON group, DM group and DM+TLR group had significantly increased ratio of kidney mass to body mass, blood glucose, and 24-h proteinuria (all $P<0.01$); at the 12th week, the glomerular basement membrane in DM group became conspicuously thick, foot process fusion and microvilli of

[收稿日期] 2011-07-17 **[接受日期]** 2011-08-30

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划, 2005CB523304). Supported by the National Program on Key Basic Research (“973” Projects, 2005CB523304).

[作者简介] 孙亮亮, 博士, 主治医师, 讲师. E-mail: sun_liang@yahoo.com.cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885377, E-mail: zmliu_cz@hotmail.com

podocytes were observed, and nephrin expression, podocyte number and podocyte density in the glomerulus were all significantly decreased ($P < 0.01$). The morphology of the foot process was almost normal in DM + TLR group, with the basement membrane thickened, but was slighter than that in the DM group; and nephrin expression, podocyte number and podocyte density in DM + TLR group were significantly higher than those in the DM group ($P < 0.01$). Compared with CON group, DM group and DM + TLR group had significantly increased MDA content, and significantly decreased SOD and GSH-Px activities in the plasma and renal cortical tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with DM group, DM + TLR group had significantly increased SOD and GSH-Px activities and significantly decreased MDA content in plasma and renal cortical tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** TLR can ameliorate podocyte injury probably through depleting free radical production and increasing activities of antioxidant.

[Key words] diabetic nephropathies; *Tongluo* recipe; podocyte; oxidative stress; nephrin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9): 955-959]

足细胞(podocyte)即肾小球脏层上皮细胞,是一种终末分化细胞。在许多肾脏疾病中足细胞损伤主要表现为肾小球足细胞数量减少、足突融合、足突裂孔膜蛋白丢失^[1-2]。早期糖尿病肾病通常表现为微量白蛋白尿,近来有研究表明,足细胞损伤在糖尿病肾病蛋白尿发生过程中是关键因素,但其损伤机制和病理生理基础尚未完全阐明^[3-4]。氧化应激在糖尿病慢性并发症的发生、发展过程中发挥重要作用,实验性糖尿病大鼠肾脏组织中存在广泛的氧化应激和代谢紊乱,这是导致肾小球固有细胞形态和功能异常的重要因素^[5-6]。通络方剂(*Tongluo* recipe, TLR)是根据中医络病学理论研制而成的复方制剂,由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、土鳖虫和赤芍等药物组成^[7]。大量的临床研究表明,TLR对心、脑、肾脏微血管有保护作用,在脑缺血再灌注造成的氧化应激损伤模型中可以减轻脂质过氧化反应,具有抗氧化作用^[8-10]。然而,TLR是否对糖尿病肾小球足细胞具有抗氧化的保护作用,目前尚无相关报道。本研究应用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病大鼠模型,观察TLR对糖尿病大鼠肾皮质氧化应激水平及超微结构的影响,对糖尿病肾病的发病机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 STZ购自美国Sigma公司,TLR由石家庄以岭药业股份有限公司提供。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。兔抗鼠WT-1抗体、羊抗鼠nephrin抗体购自美国Santa Cruz公司;HRP标记二抗IgG购自武汉博士德生物工程有限公司。

罗氏优越型血糖仪(瑞士罗氏公司),日立H-600透射电子显微镜(日本日立公司),DU-640型分

光光度计(美国Beckman公司)。

1.2 模型建立 雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量(180±20)g,购自第二军医大学实验动物中心[实验动物生产许可证号:SYXK(沪)2007-0003]。大鼠适应性饲养7d,给予STZ 60 mg/kg单次腹腔注射(临用前以pH 4.2的0.1 mol/L柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液新鲜配制),72 h后尾静脉采血并测定随机血糖,7 d后复测随机血糖,以2次随机血糖≥16.7 mmol/L确定为糖尿病造模成功。正常对照大鼠予以等体积溶剂(柠檬酸缓冲液)腹腔注射。

1.3 动物分组及处理 造模成功的24只糖尿病大鼠随机分为糖尿病未干预组(DM组,12只)、糖尿病TLR干预组(DM+TLR组,12只),另设正常对照组(CON组,8只)。DM+TLR组大鼠予TLR[0.4 g/(kg·d)溶于蒸馏水]灌胃,CON组、DM组均在每日同一时间以同等剂量蒸馏水一次性灌胃。处死前1 d代谢笼留取24 h尿标本,送第二军医大学长征医院实验诊断科测定24 h尿蛋白定量。

1.4 肾皮质取材和电镜观察 干预12周后,予10%水合氯醛3 ml/kg腹腔注射,迅速分离双肾,取肾皮质,2.5%戊二醛固定后,1%锇酸固定,环氧树脂Epon812浸润和包埋,LKB-I型超薄切片机切片,3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,日立H-600透射电子显微镜下观察肾小球足细胞超微结构。剩余肾皮质组织待测生化指标。

1.5 足细胞计数方法 肾皮质经石蜡包埋后2 μm连续切片,每隔10张切片取一对毗邻的切片,每个肾小球取4对切片行免疫酶法标记足细胞核蛋白WT-1,每张片子随机观察5个肾小球。运用体视框/分合法^[11](disector/fractionator)原理,结合Image-Pro plus 6.0图像分析软件测量平均肾小球体积(mean glomerular volume, mGV),计数每肾小球足细胞数量(podocyte number per glomerulus,

PN), 计算足细胞相对密度。足细胞密度以每足细胞肾小球体积 (glomerular volume per podocyte, GV/P) 表示。

1.6 足细胞标志蛋白 nephrin 检测及抗氧化指标检测 肾皮质组织以冷 0.9% 氯化钠溶液冲洗后准确称取质量, 制成 10% 匀浆, $956 \times g$ 离心 10 min, 取上清液, 严格按照试剂盒说明操作, 测定蛋白含量, 采用蛋白质印迹分析法检测 nephrin 蛋白的表达。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性, 二硫代二硝基苯甲酸 (DTNB) 法定量测定 GSH-Px 活性, 硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定脂质过氧化产物 MDA 含量。采腹主动脉血, 抗凝摇匀, $1\ 300 \times g$ 离心 10 min, 取上清液置 -20°C 保存, 血浆用于 SOD、GSH-Px 和 MDA 检测。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件包进行统计分

析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 大鼠一般状况 成模大鼠出现典型的多饮、多尿、多食、体质量减轻等糖尿病症状, 精神萎靡, 毛色暗淡, 无光泽, 易脱落。经 TLR 干预后, 糖尿病大鼠反应灵敏, 毛发光泽度有所增加。CON 组大鼠饮食、饮水、尿量正常, 毛发光亮, 体质量自然增加。

2.2 各组大鼠的肾质量/体质重比值、血糖和 24 h 尿蛋白 与 CON 组相比, DM 组和 DM+TLR 组大鼠肾质量/体质重比值、血糖和 24 h 尿蛋白定量均升高 (P 均 < 0.01)。与 DM 组比较, DM+TLR 组大鼠肾质量/体质重比值减小 ($P < 0.01$), 24 h 尿蛋白定量减少 ($P < 0.01$), 血糖差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 各组大鼠肾质量/体质重比值、血糖、24 h 尿蛋白比较

Tab 1 Comparison of kidney mass/body mass, plasma glucose and 24 h urinary protein in each group

Group	<i>n</i>	Kidney mass/body mass ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Plasma glucose $c_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	24 h urinary protein <i>m/mg</i>
CON	8	2.9 ± 0.7	5.7 ± 0.5	20.1 ± 4.5
DM	12	$4.9 \pm 0.4^{**}$	$28.81 \pm 5.6^{**}$	$116 \pm 25.9^{**}$
DM+TLR	12	$4.1 \pm 0.4^{**\Delta\Delta}$	$26.96 \pm 2.0^{**}$	$78.8 \pm 11.9^{**\Delta\Delta}$

($\bar{x} \pm s$)

CON: Control; DM: Diabetic mellitus; TLR: *Tongluo* recipe. $^{**} P < 0.01$ vs CON group; $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ vs DM group

2.3 各组大鼠肾小球足细胞超微结构 CON 组大鼠肾小球足细胞形态正常, 细胞核内染色质明显, 核仁清楚, 线粒体嵴呈平行排列, 粗面内质网丰富, 表面有核糖体附着; 足突排列整齐、均匀, 由内皮细胞、肾小球基底膜 (GBM)、足突组成的肾小球滤过屏障三层结构清晰、整齐, 基底膜厚度均匀一致 (图 1A、1B、1C)。

DM 组大鼠发病 12 周时肾小球足细胞核内染色质边集, 胞质内空泡形成明显, 可见自噬小体、凋亡小体形成, 线粒体肿胀、基质呈空泡状、线粒体嵴消失, 粗面内质网腔有不同程度的扩张、出现脱颗粒表现; 足突增宽、融合并有微绒毛化改变, 肾小球基底膜均匀增厚, 肾小球系膜区增宽 (图 1D、1E、1F)。

DM+TLR 组大鼠足细胞形态接近正常, 胞质内空泡形成明显减少, 线粒体嵴变短, 部分排列紊乱, 局部粗面内质网腔轻微扩张; 足突部分微绒毛化, 肾小球基底膜节段性增厚, 但较 DM 组明显减轻 (图 1G、1H、1I)。

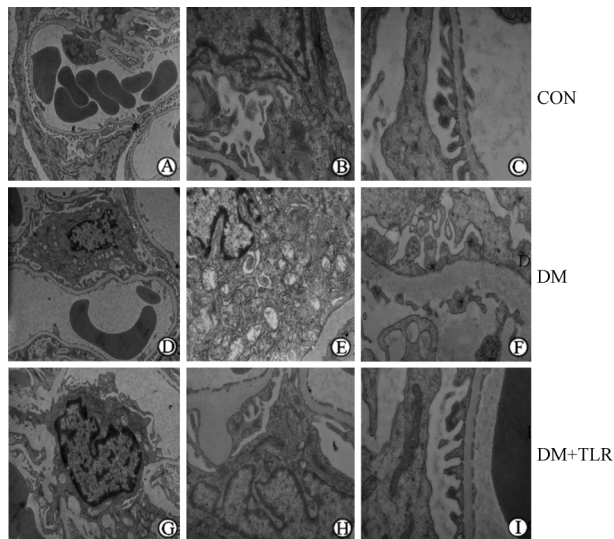


图 1 各组大鼠肾小球的超微结构

Fig 1 The glomerular ultrastructure of each group

CON: Control; DM: Diabetic mellitus; TLR: *Tongluo* recipe. A, D, G: Nucleolus of podocytes; B, E, H: Mitochondria and dictyosome; C, F, I: Glomerular basement membrane. Original magnification: $\times 4\ 800$ (A); $\times 6\ 500$ (D); $\times 8\ 400$ (G); $\times 15\ 000$ (B, E, H); $\times 20\ 000$ (C, F, I)

2.4 各组大鼠足细胞损伤指标 肾小球免疫组化染色(图 2)显示 WT-1 蛋白呈棕色核染(未经苏木素复染)。与 CON 组比较,DM 组和 DM+TLR 组在观察终点 mGV 增大($P<0.01, P<0.05$)、PN 减少($P<0.01, P<0.05$)、GV/P 升高($P<0.01, P<0.05$)。与 DM 组比较,DM+TLR 组 mGV 减小、PN 增加、GV/P降低(P 均 <0.01),见表 2。DM 组大鼠肾皮质足突标志蛋白 nephrin 与 CON 组比较表达减少($P<0.01$);DM+TLR 组 nephrin 蛋白条相对表达量与 CON 组相比差异无统计学意义,但 nephrin 表达量高于 DM 组($P<0.01$,图 3)。

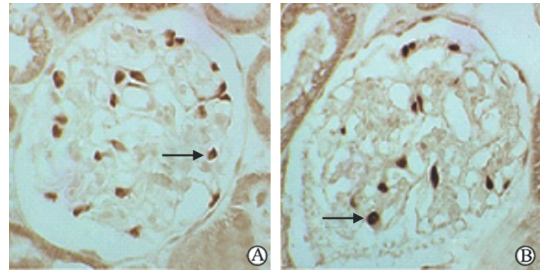


图 2 肾小球免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemistry of glomeruli

A: Control(CON) group; B: Diabetic mellitus (DM) group. Arrows indicate podocytes' nucleus stained brown with WT-1 marker (without hematoxylin staining). Original magnification: $\times 1000$

表 2 各组大鼠肾小球足细胞计数

Tab 2 Number and density of podocytes in glomerulus of each group

Group	n	mGV($\mu\text{m}^3 \cdot 10^{-6}$)	PN	GV/P(μm^3)
CON	8	1.32 \pm 0.1	555 \pm 10	2379 \pm 191
DM	12	1.50 \pm 0.06**	403 \pm 26**	3019 \pm 571**
DM+TLR	12	1.47 \pm 0.4* $\Delta\Delta$	515 \pm 19* $\Delta\Delta$	2863 \pm 125* $\Delta\Delta$

($\bar{x}\pm s$)

CON: Control; DM: Diabetic mellitus; TLR: *Tongluo* recipe; mGV: Mean glomerular volume; PN: Podocyte number per glomerulus; GV/P: Glomerular volume per podocyte. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CON group; $\Delta\Delta$ $P<0.01$ vs DM group

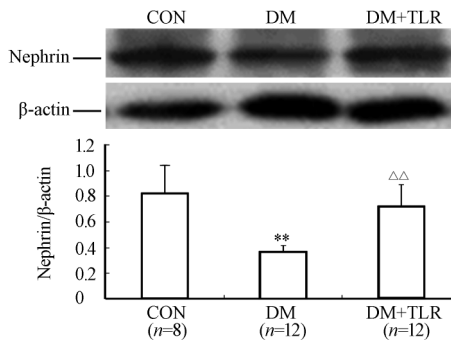


图 3 干预 12 周后肾皮质足突标志蛋白 nephrin 的表达

Fig 3 Nephrin expression in glomerulus in each group after 12 weeks

CON: Control; DM: Diabetic mellitus; TLR: *Tongluo* recipe. ** $P<0.01$ vs CON group; $\Delta\Delta$ $P<0.01$ vs DM group. $\bar{x}\pm s$

2.5 各组大鼠血浆和肾皮质组织氧化应激指标 与CON 组比较,DM 组和 DM+TLR 组在观察终点血浆和肾皮质组织内 SOD 活性、GSH-Px 活性均降低($P<0.01, P<0.05$),MDA 含量则升高($P<0.01, P<0.05$)。与 DM 组比较,DM+TLR 组血浆和肾皮质组织内 SOD 活性、GSH-Px 活性增加(P 均 <0.01),MDA 含量降低($P<0.01, P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

大量研究表明,氧化应激在糖尿病慢性并发症中

发挥重要作用,其与高血糖引起的多元醇途径、糖基化终末产物、蛋白激酶 C、己糖胺代谢途径等诸多通路异常密切相关^[12-13]。因此,高血糖诱导活性氧自由基和脂质过氧化产物生成增加可能是糖尿病慢性并发症发生、发展的共同基础,抗氧化治疗可能在糖尿病相关微血管并发症防治中发挥作用^[14]。TLR 是以络病气络学说为指导研制出的中药复方制剂,全方具有扩张血管、抗凝、降低血浓度、改善微循环的作用。吴以岭等^[7]认为,由高糖引起的活性氧自由基增加及抗氧化酶活性的改变均可对气络造成损伤,中医络病学说与糖尿病微血管并发症在发病机制上具有相同的病理生理基础。我们课题组前期的研究表明,TLR 可通过减少自由基产生、减轻脂质过氧化反应发挥抗氧化损伤作用,改善肾脏微血管血液流变学,有肾脏保护作用^[10]。

肾小球脏层上皮细胞即足细胞是维持肾小球滤过屏障结构和功能正常的主要细胞之一。大量形态学研究证实,许多肾小球疾病可见足细胞结构异常,包括足突增宽、融合、消失以及足细胞减少^[1-2,15]。足细胞是终末分化细胞,无增殖、再分化能力;基因突变、免疫因素、血流动力学异常、高糖、高脂及氧化应激均能导致足细胞异常、凋亡和数量减少,这可能是糖尿病肾病发生、发展的病理生理基础^[16-17]。

表 3 各组大鼠血浆及肾皮质组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量

Tab 3 Activities of SOD and GSH-Px and levels of MDA in plasma and renal cortical tissue of each group

Group	n	Plasma			Renal cortical tissue		
		SOD	GSH-Px	MDA	SOD	GSH-Px	MDA
		$z_B/(U \cdot ml^{-1})$	$z_B/(U \cdot ml^{-1})$	$c_B/(\mu mol \cdot L^{-1})$	$(U \cdot mg^{-1})$	$(U \cdot mg^{-1})$	$m_B/(\mu mol \cdot mg^{-1})$
CON	8	187.15±11.05	322.11±19.30	4.88±0.75	31.82±4.23	47.25±16.2	2.85±0.89
DM	12	89.44±24.21**	214.33±21.31**	9.22±1.14**	9.12±2.13**	19.22±6.29**	6.21±1.36**
DM+TLR	12	143.27±19.70* $\Delta\Delta$	285.73±33.38* $\Delta\Delta$	6.25±0.96* $\Delta\Delta$	22.08±3.66* $\Delta\Delta$	35.30±4.56* $\Delta\Delta$	4.86±0.97* Δ

CON; Control; DM; Diabetic mellitus; TLR; *Tongluo* recipe; SOD; Superoxide dismutase; GSH-Px; Glutathione peroxidase; MDA; Mardialdehyde. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs DM group

本研究发现,糖尿病大鼠成模 12 周后,出现持续高血糖状态,体质量减轻,尿蛋白增多;同时,肾小球足细胞数量明显减少,且足突相关分子 nephrin 表达显著下调;血浆和肾皮质组织内抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性降低,而脂质过氧化产物 MDA 含量增高,提示糖尿病早期肾小球足细胞损伤、高血糖导致糖尿病大鼠肾脏组织抗氧化能力下降。TLR 干预后大鼠 24 h 尿蛋白减少,足细胞的丢失减少,超微形态学的损伤减轻,足突标志 nephrin 表达增多,说明 TLR 对糖尿病大鼠肾小球足细胞具有一定的保护作用;同时,TLR 使糖尿病大鼠肾皮质 MDA 产生减少,SOD 活力损失减轻,提示 TLR 对糖尿病肾小球足细胞的保护作用可能是通过抗氧化应激实现的,可能是其减少糖尿病大鼠蛋白尿的病理生理基础。

[参考文献]

[1] Wiggins J. Podocytes and glomerular function with aging[J]. *Semin Nephrol*, 2009, 29: 587-593.

[2] Thomas M C. Pathogenesis and progression of proteinuria[J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 170: 48-56.

[3] Diez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A. Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder[J]. *Am J Kidney Dis*, 2011 Jun 28. [Epub ahead of print]

[4] Stieger N, Worthmann K, Schiffer M. The role of metabolic and haemodynamic factors in podocyte injury in diabetes[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27: 207-215.

[5] Kashiwara N, Haruna Y, Kondeti V K, Kanwar Y S. Oxidative stress in diabetic nephropathy[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 4256-4269.

[6] Singh D K, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire[J]. *Nat Rev Endocrinol*,

2011, 7: 176-184.

[7] 吴以岭. 络病学基础与临床研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2005: 9-11.

[8] 刘明, 邹俊杰, 石勇铨, 孙亮亮, 曲卫, 张春阳, 等. 通络方剂对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡作用的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 808.

Liu M, Zou J J, Shi Y Q, Sun L L, Qu W, Zhang C Y, et al. Effect of *Tongluo* recipe on apoptosis of cardiomyocytes of diabetic rats[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2007, 28: 808.

[9] 丁素菊, 黎佳思. 通心络对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的抗氧化作用[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2006, 31: 552-555.

[10] 张春阳, 邹俊杰, 石勇铨, 曲卫, 孙亮亮, 刘志民. 通络方剂对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 940-943.

Zhang C Y, Zou J J, Shi Y Q, Qu W, Sun L L, Liu Z M. Effect of *Tongluo* recipe on oxidative stress in kidneys of diabetic rats[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 940-943.

[11] White K E, Bilous R W. Estimation of podocyte number: a comparison of methods[J]. *Kidney Int*, 2004, 66: 663-667.

[12] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. *Diabetes*, 2005, 54: 1615-1625.

[13] Niedowicz D M, Daleke D L. The role of oxidative stress in diabetic complications[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2005, 43: 289-330.

[14] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications[J]. *Cir Res*, 2010, 107: 1058-1070.

[15] Schöenberger E, Ehrlich J H, Haller H, Schiffer M. The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 18-24.

[16] Price P M. A role for novel cell-cycle proteins in podocyte biology[J]. *Kidney Int*, 2010, 77: 660-661.

[17] Weil E J, Lemley K V, Yee B, Lovato T, Richardson M, Myers B D, et al. Podocyte detachment in type 2 diabetic nephropathy[J]. *Am J Nephrol*, 2011, 33(Suppl 1): 21-24.

[本文编辑] 商素芳