

化瘀通络中药不同配伍对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及对肾小球 P-cadherin 表达的影响

霍贝贝¹, 白璐¹, 张肖², 陈志强^{1,2*}, 郭倩¹, 徐晶³

¹河北医科大学; ²河北省中医院, 石家庄 050017; ³河北中医学院, 石家庄 050200

摘要: 为观察化瘀通络中药不同配伍对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用及对肾小球足细胞裂孔膜蛋白 P-cadherin 表达的影响, 将 70 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组和模型组、化瘀通络组、厄贝沙坦组、化瘀组和通络组, 灌胃干预 16 周。检测大鼠的体重、肾重、肾脏指数、24 h 尿蛋白定量, 分别采用实时定量 PCR 和蛋白印迹法检测 P-cadherin 的表达。结果显示, 与模型组比较, 化瘀通络组大鼠的肾脏指数、24 h 尿蛋白定量明显下降 ($P < 0.01$), 体重增加、P-cadherin mRNA 和蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。提示化瘀通络中药可能通过上调 P-cadherin mRNA 和蛋白的表达, 减少尿蛋白, 延缓糖尿病肾病病程进展。

关键词: 糖尿病肾病; 化瘀通络; P-cadherin; 裂孔膜蛋白

中图分类号: R2-031

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.018

Protective Effect of Different Combinations of Chinese Recipe of Stasis-removing-and-Collaterals-dredging on the Kidney of Diabetic Nephropathy Rats and Its Effect on the Expression of P-cadherin in the Glomerular

HUO Bei-bei¹, BAI Lu¹, ZHANG Xiao², CHEN Zhi-qiang^{1,2*}, GUO Qian¹, XU Jing³

¹Hebei Medical University; ²Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China;

³Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

Abstract: To observe the protective effect of different combinations of Chinese recipe of stasis-removing-and-collaterals-dredging on the kidney of diabetic nephropathy (DN) rats and its effect on the expression of slit diaphragm protein P-cadherin in the podocyte, 70 male Sprague Dawley rats were randomly divided into control group, model group, stasis-removing-and-collaterals-dredging group, irbesartan group, stasis-removing group and collaterals-dredging group, and different medicines were intragastrically fed once a day for 16 weeks. Body weight, kidney weight, kidney index and 24 h urinary total protein were tested at the end of week 16. The expression of P-cadherin was detected by Real-time PCR, Western blot, respectively. The results showed that compared with the model group, kidney index, 24 h urinary total protein of stasis-removing-and-collaterals-dredging group were significantly decreased ($P < 0.01$), body weight and the mRNA and protein expression of P-cadherin were significantly increased ($P < 0.01$). It suggested that Chinese medicines of stasis-removing-and-collaterals-dredging may increase the mRNA and protein expression of P-cadherin to reduce urinary protein and delay the progression of DN.

Key words: diabetic nephropathy; stasis removing and collaterals dredging; P-cadherin; slit diaphragm protein

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最严重的并发症之一, 也是终末期肾病的第二大病因。有数据显示, 截至 2013 年我国糖尿病患者达 9840 万, 已成为糖尿病患者人数最多的国家, DN 的

发病率也逐年提高^[1]。DN 发病早期主要表现为肾小球高滤过和肾脏肥大, 随后出现持续微量蛋白尿, 一旦出现明显蛋白尿, 病情将不断进展, 直至发展为肾衰, 严重威胁人们的健康, 因此 DN 的防治极为迫切。近年来, 中医药在改善 DN 临床症状、降低蛋白尿等方面表现出独有优势^[2], 中医学认为“久病入络”, 瘀血是 DN 主要病机, 故化瘀通络中药成为基础用药, 其疗效也得到认可^[3,4], 但其作用机制仍不

收稿日期: 2016-12-21 接受日期: 2017-02-24

基金项目: 国家自然科学基金 (81373804, 81173419)

* 通信作者 Tel: 86-311-69095003; E-mail: chenzhizhiqiang2011@163.com

com

明确。有研究^[5]发现肾小球滤过屏障中足细胞的损伤可能是导致蛋白尿产生的重要因素之一,其上的 P-cadherin 是近期发现的与蛋白尿产生密切相关的裂孔膜蛋白。本实验旨在观察化瘀通络中药不同配伍对大鼠肾小球足细胞 P-cadherin 表达的影响,进一步探索其作用靶点。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

由河北医科大学实验动物中心提供清洁级 SD 大鼠 70 只,动物许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。

1.2 药物和试剂

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 美国 Enzo Life Sciences 公司,批号:04081408);中药配方颗粒:丹参(1.8 g/袋,相当于临床使用饮片量 10 g,产品批号:501306T),川芎(1.3 g/袋,相当于临床使用饮片量 6 g,产品批号:412272T),水蛭(1.5 g/袋,相当于临床使用饮片量 3 g,产品批号:408245T),全蝎(1.0 g/袋,相当于临床使用饮片量 3 g,产品批号:412299T),地龙(1.0 g/袋,相当于临床使用饮片量 10 g,产品批号:501153T),均由广东一方制药有限公司惠赠;厄贝沙坦(150 mg/片,赛诺菲制药有限公司,批号:4A293);TRIzol Reagent(Life technologies 公司,批号:66218);FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(北京 TIANGEN 公司,批号:03326);Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(美国 Invitrogen 公司,批号:8213233);引物(上海生工生物工程公司);小鼠单克隆抗体 P-cadherin(Abcam 公司,批号:GR211713-5);BCA 蛋白定量试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司,批号:15060420)。

1.3 实验仪器

稳豪型血糖仪(美国强生公司);稳豪型血糖试纸(强生上海医疗器材有限公司,批号:3685306);Nano Drop 2000C 紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);C1000™ Thermal Cycler PCR 仪(美国 Bio-RAD 公司);Eco 实时定量 PCR 仪(美国 Illumina 公司);Odyssey 红外激光扫描仪(美国 LI-COR 公司)。

2 实验方法

2.1 实验分组与造模

70 只雄性大鼠普通饲料适应性喂养一周,检测血糖和尿蛋白均为阴性。按照随机数字表法随机分

为正常组(C组)8只(给予普通饲料),余为造模组,采用高糖高脂饲料喂养配合 STZ 一次性腹腔注射法制备糖尿病大鼠模型。造模前大鼠禁食不禁水 12 h,用枸橼酸缓冲液(pH4.3)配置 1% 浓度 STZ,以 35 mg/kg 体质量腹腔注射,72 h 后三次尾静脉取血测随机血糖均 ≥ 16.7 mmol/L 者即为模型制备成功,不符合标准者予以剔除。随后将成模的 55 只大鼠分为模型组(M组)、化瘀通络组(Q组)、厄贝沙坦组(I组)、化瘀组(H组)和通络组(T组),各组 11 只。

2.2 给药方法

化瘀通络中药组成:川芎、丹参、地龙、水蛭和全蝎,化瘀组中药为:川芎、丹参,通络组中药为:地龙、水蛭和全蝎。根据临床成人药量和配伍比例,按照动物体表面积法计算大鼠灌胃剂量。川芎用量为每日 1.13 g/kg,丹参为 1.41 g/kg,地龙 0.94 g/kg,水蛭和全蝎均为 0.56 g/kg,厄贝沙坦每日 14.12 mg/kg。日一次,灌胃干预 16 周。

2.3 标本采集

收集第 16 周末的 24 h 总尿量,留取 5 mL 尿液离心(3500 rpm,10 min)取上清液 1 mL,放入-80 °C 保存,用于检测 24 h 尿蛋白定量。10% 水合氯醛 350 mg/kg 麻醉,剖开腹腔快速剥离右肾称重,随即剥离左肾切取肾皮质,立即投入液氮短暂冷冻后转入-80 °C 超低温冰箱,待实时定量 PCR(Real-time PCR)、Western blot 检测。

2.4 指标检测与方法

2.4.1 大鼠一般情况

密切观察大鼠的精神状态、皮毛色泽、爪甲颜色、摄食饮水量等变化。

2.4.2 大鼠肾重、体重和肾脏指数

根据测得的肾重和 16 周末空腹体重,计算肾脏指数:右肾重/体重。

2.4.3 24 h 尿蛋白定量

采用终点法检测尿蛋白浓度,乘以 24 小时总尿量,计算 24 h 尿蛋白定量(24 h urinary total protein, 24 h UTP)。

2.4.4 采用 Real-time PCR 法检测肾皮质中 P-cadherin mRNA 的表达

取-80 °C 冻存的肾皮质 100 mg 加入 1 mL TRIzol 冰上匀浆,提取 RNA 溶解液。紫外分光光度计测量其浓度和纯度,电泳检测其完整性。调整 RNA 浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,将其反转录成 cDNA。引物序列:P-

cadherin: 上游 5'-AGCGTGGTCTCCGAGTCCTA-3', 下游 5'-TCCAGCCAATGCCTCTTTCT-3', 产物长度 117 bp。 β -actin: 上游 5'-ACCCGCGAGTACAACCT-TCT-3', 下游 5'-TTCAGGGTCAGGATGCCTCT-3', 产物长度 266 bp。反应体系为: 上下游引物和 cDNA 各 1 μ L, DEPC 水 2 μ L, SYBR Green qPCR SuperMix 5 μ L, 每种样品做 3 个复孔。采用两步法进行扩增, 经预变性(95 $^{\circ}$ C 10 min)、变性(95 $^{\circ}$ C 10 s)、退火和延伸(60 $^{\circ}$ C 30 s), 40 个循环后读取 Cq 值。数据分析时采用 $\Delta\Delta Cq$ 法, 相对表达量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 。

2.4.5 采用 Western blot 检测肾皮质中 P-cadherin 蛋白的表达

取冻存的肾皮质 100 mg 加入 1 mL RIPA 裂解液和 4 μ L 蛋白酶抑制剂后匀浆管研磨至无肉眼可见颗粒, 4 $^{\circ}$ C 离心取上清液, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定蛋白浓度, 加上样缓冲液和 RIPA 裂解液将浓度统一调至 5 μ g/ μ L, 100 $^{\circ}$ C 干浴变性 5 分钟。灌制聚丙烯酰胺凝胶, 上样 50 μ g, 依次经电泳、电转, 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗(稀释浓度 1:200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后避光加荧光二抗(稀释浓度 1:10000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 将 PVDF 膜放入红外激光扫描仪, 读取分析荧光条带灰度值, 以目的蛋白灰度值/内参灰度值表示蛋白表达相对含量。

表 1 各组大鼠的体重、肾重、肾脏指数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of body weight, kidney weight and kidney index of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	样本量 Number	体重 Body weight(g)	肾重 Kidney weight(g)	肾脏指数 Kidney index(mg/g)
正常组 Control	8	557.13 \pm 70.34	1.54 \pm 0.23	2.76 \pm 0.26
模型组 Model	7	248.43 \pm 32.16 **	1.67 \pm 0.08	6.80 \pm 0.90 **
化瘀通络组 Stasis-removing-and-collaterals-dredging	8	339.38 \pm 56.59 **##	1.71 \pm 0.17	5.16 \pm 0.90 **##
厄贝沙坦组 Irbesartan	8	251.50 \pm 40.24 **	1.55 \pm 0.19	6.22 \pm 0.65 **
化瘀组 Stasis-removing	8	292.17 \pm 55.52 **	1.75 \pm 0.36	6.04 \pm 0.98 **
通络组 Collaterals-dredging	7	258.86 \pm 21.53 **	1.63 \pm 0.24	6.38 \pm 1.29 **

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$; Compared with model, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

3.3 各组大鼠第 16 周末 24 h UTP

与 C 组比较, 各造模组大鼠 24 h UTP 上升($P < 0.01$); 与 M 组比较, 各治疗组大鼠 24 h UTP 均下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 I 组比较, Q 组下降($P < 0.05$); 与 Q 组比较, H 组和 T 组上升($P < 0.05$)。表明各治疗组药物均可减少蛋白尿, 化瘀通络中药效果显著。结果见表 2。

3.4 各组大鼠肾皮质 P-cadherin mRNA 的表达比较

与 C 组比较, M 组 P-cadherin mRNA 表达显著

2.5 统计学处理

应用 SPSS21.0 统计软件进行分析, 数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 如果各样本具有正态性和方差齐性, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-q 检验; 方差不齐, 则采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠一般情况

C 组大鼠精神状态良好, 活动灵活, 皮毛润泽, 爪甲颜色正常, 摄食饮水尿量无异常, 体重平稳增加。余组则精神逐渐萎靡, 毛色晦暗, 爪甲淤青, 多饮多食多尿, 体重较前减轻, 部分大鼠出现白内障, M 组尤甚, 各治疗组不同程度缓解。M 组死亡 4 只, Q 组、I 组、H 组各死亡 3 只, T 组死亡 3 只, 剔除 1 只。

3.2 各组大鼠第 16 周末肾重、体重、肾脏指数

各组大鼠肾重间无统计学差异($P > 0.05$)。与 C 组相比, 各造模组体重显著降低, 肾脏指数明显升高($P < 0.01$), 差异有统计学意义; 与 M 组比较, Q 组体重升高, 肾脏指数降低($P < 0.01$), I 组、H 组和 T 组则无统计学差异($P > 0.05$)。表明化瘀通络中药可以增加大鼠体重和肾脏指数, 对肾重影响不显著。结果见表 1。

下调($P < 0.01$); 与 M 组比较, Q 组和 I 组 P-cadherin mRNA 表达明显上调($P < 0.01$), H 组和 T 组则无明显上调($P > 0.05$); 与 I 组比较, Q 组表达量无差异($P > 0.05$), H 组和 T 组表达量下调($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 Q 组相比, H 组和 T 组表达量下调($P < 0.01$), 且该两组间无统计学差异($P > 0.05$)。表明化瘀通络中药能够上调 DN 大鼠肾小球 P-cadherin mRNA 的表达, 效果优于化瘀组和通络组。结果见表 2。

表 2 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量和 P-cadherin mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of 24 h urinary total protein and mRNA expression of P-cadherin of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	24 h 尿蛋白定量 24 hUTP(mg/24 h)	P-cadherin mRNA 相对表达量 mRNA expression of P-cadherin
正常组 Control	9.21 ± 0.56	1.009 ± 0.149
模型组 Model	46.98 ± 6.64 * *	0.498 ± 0.086 * *
化癥通络组 Stasis-removing-and-collaterals-dredging	30.12 ± 5.66 * * * # Δ	0.826 ± 0.133 #
厄贝沙坦组 Irbesartan	34.89 ± 3.58 * * #	0.804 ± 0.105 #
化癥组 Stasis-removing	37.21 ± 3.96 * * # □	0.521 ± 0.084 Δ Δ □ □
通络组 Collaterals-dredging	36.82 ± 4.16 * * # □	0.559 ± 0.093 Δ □ □

注:与正常组比较, * * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$; 与厄贝沙坦组比较, Δ $P < 0.05$, Δ Δ $P < 0.01$; 与化癥通络组比较, □ $P < 0.05$, □ □ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * * $P < 0.01$; compare with model, # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$; compared with Irbesartan, Δ $P < 0.05$, Δ Δ $P < 0.01$; compared with Stasis-removing-and-collaterals-dredging, □ $P < 0.05$, □ □ $P < 0.01$.

3.5 各组大鼠肾皮质 P-cadherin 蛋白表达的 Western blot 结果

与 C 组比较, M 组 P-cadherin 表达量显著下调 ($P < 0.01$); 与 M 组比较, Q 组和 I 组 P-cadherin 表达显著上调 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 且该两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), H 组和 T 组无明显上调 ($P > 0.05$); 与 I 组比较, Q 组表达量无统计学差异 ($P > 0.05$), H 组和 T 组表达量下调 ($P < 0.05$); 与 Q 组比较, H 组和 T 组表达量下调 ($P < 0.01$), 该两组间无统计学差异 ($P > 0.05$)。表明化癥通络中药能够上调 DN 大鼠肾小球 P-cadherin 蛋白的表达, 效果优于化癥组和通络组。结果见图 1 和图 2。

4 讨论

蛋白尿是 DN 的主要临床表现, 肾小球滤过屏障受损是导致蛋白尿的主要原因。足细胞是一种终末化细胞, 附着在肾小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 外侧, 同 GBM、毛细血管内皮细

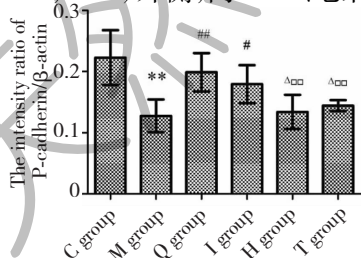


图 1 各组大鼠肾皮质蛋白表达量

Fig. 1 The expression of P-cadherin in renal cortex of rats

注:与正常组比较, * * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$; 与厄贝沙坦组比较, Δ $P < 0.05$; 与化癥通络组比较, □ $P < 0.01$

Note: * * $P < 0.01$ vs C group; # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$ vs M group; Δ $P < 0.05$ vs I group; □ □ $P < 0.01$ vs Q group

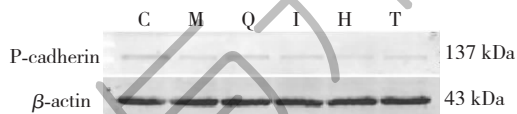


图 2 各组大鼠肾皮质 P-cadherin 蛋白表达 western blot 结果图

Fig. 2 The expression of P-cadherin of rats' renal cortex in each group by western blot

胞共同构成肾小球的滤过屏障, 在肾小球滤过作用中扮演重要角色。两个相邻足细胞之间的裂隙称为裂孔, 其表面覆盖一层拉链状结构的裂孔膜 (slit Diaphragm, SD), 由多种 SD 蛋白 (如 Nephrin、P-cadherin、NEPH1 等) 组成, 在滤过功能中起到蛋白分子筛和电荷屏障的作用, 成为近年来 DN 蛋白尿发病机制研究的重点之一。研究发现, 足细胞 SD 结构蛋白表达减少, 足细胞失去原有表型的形态和功能^[6], 细胞体积代偿性肥大, 严重者可从 GBM 上脱离甚至凋亡, 致使足细胞数目绝对减少, 肾小球滤过屏障结构完整性遭到破坏, 进而损害肾小球的滤过功能, 导致蛋白尿发生。而蛋白尿又会逐步加重足细胞的损伤, 随着足细胞数目不断减少, GBM 进一步裸露, 构成恶性循环^[7]。研究证实, 多种有害刺激 (如高糖环境、阿霉素、TGF-β 等) 可以改变足细胞原有表型蛋白, 从而引发各种肾小球相关疾病, 包括: 糖尿病肾病、微小病理性肾病等^[8-10]。本实验建立 DN 大鼠模型, 检测足细胞 SD 结构蛋白之一即 P-cadherin 的表达变化, 探索其与蛋白尿发生的联系。

P-cadherin 属于钙粘附因子超家族, 也是 SD 蛋白的重要成员。TASSIN 首次发现它存在于足细胞, 并证明其表达于 SD, 随后 Reiser 等^[11] 研究 P-cadherin 有粘附连接作用, 提出它是 SD 的核心蛋白, 它

表达的异常可能引起蛋白尿。P-cadherin 是继 Nephlin 等之后的又一种 SD 跨膜蛋白,在 DN 尿蛋白的发生发展进程中的重要性类似 Nephlin。Guo 等^[12]实验研究上调 P-cadherin 的表达,可降低蛋白尿和肾小球肥大程度。Liu 等^[13]采用静脉注射 P-cadherin 抗体的动物模型,证实破坏 P-cadherin 可导致非 Nephlin 和 NEPH1 依赖性蛋白尿。本实验结果显示各中药组均能降低蛋白尿,化瘀通络中药组效果最佳,且可明显提高 P-cadherin 的表达,提示化瘀中药联合通络中药可能具有协同作用,减少蛋白尿产生。

通过对中医药治疗 DN 的相关文献进行 Meta 分析^[14],证明了其在临床上的确切疗效。本课题组基于久病瘀血阻于肾络的病机^[15,16],采用化瘀通络之法,中药全方组配伍川芎、丹参、水蛭、地龙、全蝎,临床及前期实验均有较显著的疗效。本实验通过化瘀通络组、化瘀组、通络组的效应对比,筛选不同中药的靶向性差异。结果表明化瘀通络中药可以上调 P-cadherin 的表达,降低蛋白尿,与之比较,化瘀中药和通络中药则效果不显著。提示化瘀中药和通络中药协同合作,改善蛋白尿疗效较佳,可能是与调节 P-cadherin 的表达,维持足细胞表面蛋白稳定性有关。

参考文献

- 1 Collaborators GMAC. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2015, 385: 117-171.
- 2 Zhao ZJ (赵宗江), Wang YC (王颖超), Du L (杜磊), et al. Influence of Jianpi Yishen Huayu Tongluo Fang on oxidative stress in rats with diabetic nephropath. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2013, 36: 161-165.
- 3 Zhang T (张婷), Gao YB (高彦彬), Yi WM (易文明). Wenshen Jianpi and Tongluo Methods in treating clinical-stage nephropathy. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21: 200-203.
- 4 Fang J (方敬), Chen ZQ (陈志强), Guo Q (郭倩), et al. Regulatory effect of Chinese drugs for stasia removing and collateral dredging on the expressions of podocin and CD2AP in podocyte slit diaphragm of diabetic nephropathy rats. *Chin J Integr Tradit Western Med* (中国中西医结合杂志), 2016, 36: 835-841.
- 5 Su J (苏军), Sui GQ (隋桂琴), Sun LN (孙丽娜), et al.

- Diabetic nephropathy podocyte injury and protection of traditional Chinese Medicine. *Chin J Integr Tradit Western Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2013, 14(2): 183-186.
- 6 Zhang J (章俊), Hua J (华洁), Ma YQ (马亚琼), et al. Effect of salidroside on mouse podocytes epithelial-mesenchymal transition induced by advanced oxidation protein products. *Chin J Integr Tradit Western Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2013, 14: 305-308.
- 7 White KE, Bilous RW. Structural alterations to the podocyte are related to proteinuria in type 2 diabetic patients. *Nephrol Dialysis Transplant*, 2004, 19: 1437-1440.
- 8 Kang YS, Li Y, Dai C, et al. Inhibition of integrin-linked kinase blocks podocyte epithelial-mesenchymal transition and ameliorates proteinuria. *Kidney Int*, 2010, 78: 363-373.
- 9 Samejima K, Nakatani K, Suzuki D, et al. Clinical significance of Fibroblast-Specific protein-1 expression on podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract*, 2012, 120(1): c1-c7.
- 10 Hanamura K, Tojo A, Fujita T. Urinary and glomerular podocytes in patients with chronic kidney diseases. *Clin Exp Nephrol*, 2014, 18: 95-103.
- 11 Reiser J, Kriz W, Kretzler M, et al. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(1): 1-8.
- 12 Guo QY, Miao LN, Li B, et al. Role of 12-lipoxygenase in decreasing P-cadherin and increasing angiotensin II type 1 receptor expression according to glomerular size in type 2 diabetic rats. *AJP; Endocrinol Metabol*, 2011, 300: E708-E716.
- 13 Liu G, Kaw B, Kurfis J, et al. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*, 2003, 112: 209-221.
- 14 Zhu HH (朱海慧), Ye XF (叶学锋), Xie CG (谢春光), et al. Qingreyiqitongluo decoction on proteinuria in diabetic nephropathy rats. *J Emerg Tradit Chin Med* (中国中医急症), 2014, 23: 201-205.
- 15 Xu J (徐晶), Ma EW (马二卫), Bai L (白璐), et al. Effect of Chinese herbs for stasis removing and collaterals dredging upon Angiotensin-converting Enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas Axis in the renal cortex of diabetic nephropathy rats. *Chin J Integr Tradit Western Med* (中国中西医结合杂志), 2014, 34: 714-721.
- 16 Li LL (李黎莉), Chen ZQ (陈志强), Wang YH (王月华), et al. Effect of Chinese material medica of qibenefiting, yin nourishing, stasis removing, and collaterals dredging and their dissembled recipes on nephrin of diabetes mellitus middle rats. *Chin J Integr Tradit Western Med* (中国中西医结合杂志), 2012, 32: 960-964.