

第 V 结构域缺失型 β_2 -GPI 对糖尿病大鼠

尿蛋白排泄的影响*

周赛君 王洁 孟振兴 陈思思 于德民 于佩**

天津医科大学代谢病医院糖尿病肾病血液透析科 (天津 300070)

【摘要】目的：探讨第 V 结构域缺失型 β_2 糖蛋白 I (DI-IV) 对糖尿病大鼠 24h 尿蛋白排泄以及血管内皮生长因子 (VEGF) - 一氧化氮 (NO) 轴的影响。方法：将大鼠高脂喂养 8 周后尾静脉注射 STZ (30mg•kg⁻¹) 进行糖尿病造模, 造模成功 1 周后将大鼠随机分为对照组、 β_2 糖蛋白 I (β_2 -GPI) 组以及 DI-IV 组, 每周分别于尾静脉注射人血清白蛋白 (HSA)、 β_2 -GPI、DI-IV 各 200mg•kg⁻¹, 持续 4 周。于干预前后取血, 测定血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、血甘油三酯 (TG)、总胆固醇酯 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、24h 尿蛋白等。采用 Western blot 检测肾脏 VEGF、内皮源性一氧化氮合酶 (eNOS) 的表达及 eNOS 磷酸化。结果：与干预前相比, 对照组、 β_2 -GPI 组 TG、TC、LDL-C、HDL-C、Scr 无明显变化 (P 均 >0.05), 而血糖、24h 尿蛋白排泄升高 (P 均 <0.05); 干预后 DI-IV 组血 TC、LDL-C、24h 尿蛋白排泄均减少 (P 均 <0.05)。与对照相比, DI-IV 组肾脏 VEGF-A 表达减少 ($P<0.05$), eNOS 的磷酸化表达增加 ($P<0.05$)。结论：DI-IV 可能通过改善糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴功能以及降脂作用, 减轻糖尿病 SD 大鼠 24h 尿蛋白的排泄。

【关键词】第 V 结构域缺失型 β_2 糖蛋白 I; 糖尿病肾病; VEGF-NO 轴; 尿蛋白

【中图分类号】R965;R587.2;R587.1

【文献标志码】A

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2013.02.004

Effect of Domain V Deletion of β_2 -Glycoprotein I on Urine Protein Excretion of Diabetic SD Rats

Zhou Sai-jun, Wang jie, Meng Zhen-xing, Chen Si-si, Yu De-min, Yu Pei.
Key Lab of Hormones and Development, Ministry of Health; Department of hemodialysis of Diabetic Nephrology, The Metabolic Disease Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

【Abstract】Objective: To investigate effect of domain V deletion of β_2 -glycoprotein I (DI-IV) on 24-hour urinary protein excretion, VEGF-NO axis, and possible mechanisms in diabetic rats. Methods: Diabetic model was established with the use of SD rats, treated with intravenous injection of STZ (30mg/kg) after a high fat diet for eight weeks. One week after successful modeling, the rats were randomly assigned to control group, β_2 glycoprotein I (β_2 -GPI) group and DI-IV group, treated with intravenous injection of human serum albumin (HSA), β_2 -GPI or DI-IV with a dose of 200mg/kg every week, for four weeks, respectively. Blood samples were taken before and after the intervention, and serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), serum triglyceride (TG), total cholesterol ester (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and 24-hour urinary protein were analyzed. Western blot was used to analyze the expression of VEGF and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and the phosphorylation of eNOS of rats' kidneys. Results: After intervention,

*基金项目:国家自然科学基金项目 (30971393, 81070645); 天津市自然科学基金项目 (10JCYBJC12000); 天津市卫生局科技基金重点项目及一般项目 (09KZ01, 09KZ89); 天津医科大学科技基金资助项目 (2009ky25)

**通信作者:于佩 E-mail: wby1998@hotmail.com

TG, TC, HDL-C, Scr and LDL-C had no significant difference ($p > 0.05$) while blood glucose and 24-hour urinary protein excretion increased ($p < 0.05$) in control group and β_2 -GPI group; TC, LDL-C, 24-hour urinary protein excretion decreased ($p < 0.05$) in DI-IV group. VEGF-A expression in kidneys decreased more and phosphorylation of eNOS increased more in DI-IV group than in control group ($p < 0.05$).

Conclusion: DI-IV could relieve 24-hour urine protein excretion of diabetic SD rats. Possible mechanisms are to improve VEGF-NO axis function and lipid-lowering effect in diabetic rat kidneys.

[Key words] domain V deletion of β_2 -glycoprotein I; diabetic nephropathy; VEGF-NO axis; urinary protein

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一, 已成为导致终末期肾衰竭的首要原因^[1]。近年来研究表明糖尿病肾脏 VEGF-NO 轴解耦联是 DN 重要发病机制之一^[2]。并且研究发现内皮源性一氧化氮合酶 (eNOS) (内皮细胞产生 NO 的关键酶) 在糖尿病肾脏的磷酸化活性显著降低^[3]。这提示糖尿病肾脏血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路受损。恢复糖尿病肾脏 VEGF 信号通路, 提高 eNOS 的活性对糖尿病肾病的发生发展可能具有重要意义。

β_2 糖蛋白 I (β_2 -GPI) 是抗磷脂综合征等自身免疫性疾病的主要自身抗原, 能调节血脂代谢, 并具有促凝和抗凝的双重功能^[4]。最新研究发现, β_2 -GPI 在糖尿病血管并发症中具有重要的作用^[5]。 β_2 -GPI 由 5 个结构域和 4 个 N-端连接的糖基化位点, 形成延长的“鱼钩样”三维结构。 β_2 -GPI 的前四个结构域相似。第 V 结构域含一个保守的阳性电荷区 cys281-cys288, 是与磷脂结合的主要位点^[4]。研究表明, 第 V 结构域缺失型 β_2 -GPI (DI-IV) 可调节人脐静脉血管内皮细胞、视网膜-脉络膜血管内皮细胞 RF/6A 细胞系 VEGF 系统的功能, 对血管内皮细胞具有保护作用^[6]。提示 DI-IV 亦可能对糖尿病肾小球血管内皮细胞 VEGF 信号通路具有一定的调控作用, 从而降低蛋白尿。本研究探讨 DI-IV 对糖尿病大鼠尿蛋白排泄的影响以及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 36 只, 8 周龄。购自天津市放射研究所, 体重 180~200g。实验期间自由进食、饮水, 每笼 6~7 只, 自然昼夜光线, 室内通风良好, 室温 18~22℃, 相对湿度

40%~70%。

1.1.2 主要试剂 DI-IV、人 β_2 -GPI 由澳大利亚新南威尔士大学圣乔治医院感染免疫实验室惠赠。链脲佐菌素 (STZ) 购自 Sigma 公司, 兔抗鼠 VEGF-A 多克隆抗体, 兔抗鼠 eNOS 多克隆抗体, 兔抗鼠 eNOS (ser1177) 磷酸化多克隆抗体, 购自美国 Bioworld Technology。

1.1.3 实验动物分组 健康雄性 SD 大鼠 36 只给予高糖高脂饮食 (高脂配方为 79% 基础饲料、1% 胆固醇、10% 猪油、10% 蛋黄粉) 持续喂养 8 周后, 于尾静脉注射 STZ ($30\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 1 周后以随机血糖 $\geq 16.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为糖尿病模型制备成功。随后将大鼠随机分为 3 组, 每组 12 只, 即糖尿病对照组 (A 组), β_2 -GPI 组 (B 组), DI-IV 组 (C 组), 分别于尾静脉注射人血浆蛋白 (HSA)、 β_2 -GPI、DI-IV 各每周 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 持续注射 4 周。

1.2 标本收集与处理

各组大鼠于糖尿病造模后 1 周及干预后 4 周, 分别取血, 采用葡萄糖氧化酶法测定血糖, 全自动生化分析仪 (日立 7070) 测定血 TG、LDL-C、Scr、BUN。收集 24 h 尿液用于放免比浊法测定尿蛋白, 检测 24 h 尿蛋白定量。

1.3 Western blot 检测肾脏 VEGF、eNOS 的表达

各组大鼠于干预后 4 周处死, 取肾组织, 加入 $60\mu\text{L}$ RIPA 裂解液, 裂解液在使用前数分钟加入 PMSF 使其终浓度为 $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 玻璃匀浆器匀浆至充分裂解, 14000g 离心 5min, 取上清, 蛋白质定量试剂盒 BCA 法测蛋白浓度。用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完毕后转膜, 将转好的聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 按照 Maker 位置修剪, 室温下, 脱脂奶粉封闭 1h, 加入 1:1000 稀释的一抗, 4°C 孵育过夜, Tris-盐酸缓

冲液 + Tween 20 (TBST) 洗膜 3 次, 加入 1 : 3000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗, 室温孵育 1h, TBST 洗膜 3 次, DAB 显色, 凝胶成像系统记录实验结果。用 Band Scan 图像分析软件分析条带密度, 内参为 β -actin, 计算各目的条带的相对光密度。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 11.5 统计软件做数据分析。所有资料均进行正态性检验, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 组间采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 干预前大鼠体重及生化指标

3 组大鼠在干预前体重、随机血糖、血 TG、TC、HDL-C、LDL-C、Scr、BUN、24h 尿蛋白均无明显差异 (表 1)。

2.2 干预后大鼠体重及生化指标

3 组大鼠干预 4 周后, 各组血糖、Scr、BUN、TG、HDL-C 无明显差异 ($P > 0.05$); β_2 -GPI 组血 TC、LDL-C 较对照组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而 DI-IV 组血 TC、LDL-C、24h 尿蛋白排泄均减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

与干预前相比, 对照组 TG、LDL-C、Scr、HDL-C 均无明显变化 (P 均 > 0.05), β_2 -GPI 组 LDL-C、TC 有降低趋势, 但无统计学差异 (P 均 > 0.05); 而对照组、 β_2 -GPI 组血糖、24h 尿蛋白排泄升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); DI-IV 组, 干预后血 TG、LDL-C、24h 尿蛋白排泄均减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 3 组大鼠体重、血 BUN 均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 2)。

2.3 大鼠肾 VEGF、eNOS 以及磷酸化 eNOS 的表达

各组大鼠肾 Western blot 检测: DI-IV 组 VEGF 表达较对照组、 β_2 -GPI 组均减少 ($P < 0.01$), 而磷酸化 eNOS (p-eNOS) 表达增加 ($P < 0.05$); 3 组大鼠肾脏 eNOS 表达无明显差异 ($P > 0.05$) (图 1)。

3 讨论

近年来研究表明, VEGF 尤其是 VEGF-A 是维

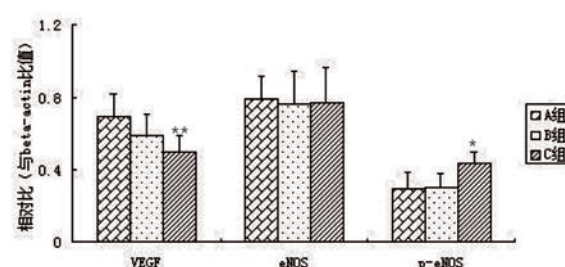


图1 大鼠肾脏 VEGF-A、eNOS、p-eNOS 的表达

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

持正常肾脏结构和功能重要因素, 却成为糖尿病肾脏的损伤因子^[7]。VEGF 作为促血管新生的核心因子, 在肾脏的生长、成熟、维持血管的完整性等方面起重要作用。研究发现, 糖尿病大鼠肾脏 VEGF 的表达明显升高, 且升高程度与糖尿病肾病进展成正相关^[2]。1 型和 2 型糖尿病患者肾脏均发现 VEGF-A 水平增加, 且与肾小球肥大、尿蛋白增加、肾小球高滤过相关; 短期内通过抗 VEGF 治疗可以降低蛋白尿和肾脏肥大^[2,9]。本研究结果表明, 糖尿病大鼠 VEGF 的水平与尿蛋白排泄成正相关。因此, VEGF 作为非糖尿病状态下肾脏的保护因子, 在糖尿病状态下却可能成为糖尿病肾病的损伤因子。2006 年, Nakagawa 等^[3]首次提出糖尿病肾脏内 VEGF-NO 轴解耦联是 DN 重要发病机制之一。随后研究发现, 利用 STZ 诱导的野生型小鼠糖尿病肾病仅出现早期糖尿病肾损害的病理变化, 即肾小球肥大、系膜增生和基底膜增厚; 而 eNOS 敲除小鼠在 STZ 诱导产生糖尿病后会出现严重的肾损害。并且这些病变与糖尿病肾病患者肾病变极其相似: 不仅会发生早期特征, 还出现糖尿病肾病的晚期特点, 如系膜血管裂解、K-W 结节形成、肾小球内胶原的沉积、血管损害、肾小球硬化、肾间质纤维化等病理改变, 同时还具有高血压、大量蛋白尿以及进行性肾衰竭, 并同时伴随着肾脏 VEGF 表达明显升高^[10]。因此, eNOS 敲除的糖尿病大鼠模型不仅证实了 VEGF-NO 轴解耦联是糖尿病肾病重要的致病机制, 而且证实了 eNOS 在维持 VEGF-NO 轴正常的功能中起着关键的作用。

研究发现糖尿病大鼠模型内皮细胞 eNOS 表达与正常鼠无明显变化, 但其活性明显下降, NO 释放明显减少。并且, 经胰岛素治疗后, 肾脏内皮细胞 eNOS 活性可明显恢复, NO 释放量明显增加^[12]。

可见，eNOS 活性下降是 VEGF-NO 轴解偶联的关键环节。本研究结果显示 DI-IV 干预组 eNOS 磷酸化表达显著增加，且 VEGF-A 的表达相应下降，提示 DI-IV 对糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴解偶联的机制有改善作用。本研究亦定量检测了干预前后大鼠 24h 尿蛋白的排泄，结果 DI-IV 可显著改善糖尿病大鼠尿蛋白，DI-IV 对糖尿病大鼠尿蛋白的改善作用的靶点可能是糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴。DI-IV 可能经提高 eNOS 活性，发挥抗糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 轴解偶联的机制。

本研究结果亦表明，DI-IV 对糖尿病大鼠的血脂如 TC、LDL-C 具有明显的改善作用，并且这种作用明显强于 β_2 -GPI。DI-IV 的这种降脂作用，

可能亦是其改善尿蛋白的重要机制之一。但是其确切的降脂机制尚待进一步研究。

3 组大鼠经干预后血 BUN 水平均升高，而 SCr 水平均未明显升高，提示 DI-IV 无肾毒性作用。血 BUN 升高可能由于尾静脉注射蛋白制剂后，蛋白质在体内代谢所致。

综上所述，DI-IV 对糖尿病大鼠肾脏 VEGF-NO 的功能具有保护作用。DI-IV 对糖尿病大鼠尿蛋白的改善作用的机制可能为：一方面经提高糖尿病大鼠肾脏 eNOS 的磷酸化活性，发挥抗 VEGF-NO 轴解偶联的作用；另一方面，经改善糖尿病大鼠血脂水平，发挥降脂作用；因此，DI-IV 对糖尿病蛋白尿具有潜在的治疗作用。

表 1 干预前3组体重及生化指标测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重/g	血糖/mm \cdot L $^{-1}$	TC/mm \cdot L $^{-1}$	TC/mm \cdot L $^{-1}$
A组	12	422.67 \pm 3.5	20.13 \pm 4.62	22.88 \pm 2.62	15.68 \pm 1.41
B组	12	422.67 \pm 5.5	19.88 \pm 3.69	23.16 \pm 3.61	15.94 \pm 2.16
C组	12	427.33 \pm 8.5	19.95 \pm 3.15	21.99 \pm 2.94	16.01 \pm 2.07

组别	HDL-C/mm \cdot L $^{-1}$	LDL-C/mm \cdot L $^{-1}$ /L	Ser μ mol \cdot L $^{-1}$	BUN/mm \cdot L $^{-1}$	尿蛋白/mg \cdot 24 h $^{-1}$
A组	2.57 \pm 0.65	9.19 \pm 0.81	36.07 \pm 3.97	9.08 \pm 1.62	28.67 \pm 5.72
B组	2.69 \pm 0.84	9.27 \pm 1.07	32.78 \pm 5.12	8.99 \pm 1.94	27.35 \pm 7.04
C组	2.77 \pm 0.49	9.21 \pm 1.91	35.21 \pm 4.68	9.13 \pm 1.85	29.17 \pm 6.65

表 2 干预后3组体重及生化指标测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重/g	血糖/mm \cdot L $^{-1}$	TG/mm \cdot L $^{-1}$	TC/mm \cdot L $^{-1}$
A组	9	452.18 \pm 4.7 ^{##}	28.36 \pm 3.72 [#]	23.61 \pm 2.673	16.49 \pm 2.97
B组	10	468.37 \pm 6.5 ^{##}	26.18 \pm 4.87 [#]	24.52 \pm 4.17	13.94 \pm 3.74
C组	9	471.19 \pm 6.4 ^{##}	26.15 \pm 5.17 [#]	22.79 \pm 3.64	9.01 \pm 2.15 ^{**}

组别	HDL-C/mm \cdot L $^{-1}$	LDL-C/mm \cdot L $^{-1}$	Ser/ μ mol \cdot L $^{-1}$	BUN/mm \cdot L $^{-1}$	尿蛋白/mg \cdot 24 h $^{-1}$
A组	2.64 \pm 1.02	9.98 \pm 1.42	39.07 \pm 4.18	12.08 \pm 3.22 [#]	49.67 \pm 8.98 ^{##}
B组	2.14 \pm 0.99	8.27 \pm 0.96	40.72 \pm 5.18	13.13 \pm 3.09 [#]	47.95 \pm 10.09 ^{##}
C组	1.9 8 \pm 0.67	5.21 \pm 2.18 ^{**}	38.14 \pm 5.72	12.13 \pm 2.98 [#]	31.25 \pm 7.42 ^{**}

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与干预前相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

【参考文献】

[1] Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, et al. Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database [J] . Am J Kidney Dis, 2012, 59(1): 75-83.

[2] Mironidou-Tzouveleki M, Tsartsalis S, Tomos C. Vascular

endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of diabetic nephropathy of type 1 diabetes mellitus [J] . Curr Drug Targets, 2011, 12(1): 107-114.

[3] Nakagawa T, Sato W, Sautin YY, et al. Uncoupling of vascular endothelial growth factor with nitric oxide as a mechanism for diabetic vasculopathy [J] . J Am Soc Nephrol, 2006, 17(3): 736-745.

(下转第36页)

- [19] Marik PE, Zaloga GP. Immunonutrition in critically ill patients: a systematic review and analysis of the literature [J] . Intensive Care Med , 2008, 34(11): 1980–1990.
- [20] Romeo J, Nova E, Wärnberg J, et al. Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and synbiotics in different life–stages [J] . Nutr Hosp, 2010, 25(3): 341–349.
- [21] Sturtzel B, Mikulits C, Gisinger C, et al. Use of fiber instead of laxative treatment in a geriatric hospital to improve the wellbeing of seniors [J] . J Nutr Health Aging, 2009, 13(2): 136–139.
- [22] Salvatore S, Hauser B, Vandenplas Y. Chronic enteropathy and feeding [J] . Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 2007, 59(1): 115–126.
- [23] Rayes N, Seehofer D, Theruvath T, et al. Effect of enteral nutrition and synbiotics on bacterial infection rates after pylorus–preserving pancreatoduodenectomy: a randomized, double–blind trial [J] . Ann Surg, 2007, 246(1): 36–41.
- [24] Oláh A, Belágyi T, Pótl L, et al. Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study [J] . Hepatogastroenterology, 2007, 54(74): 590–594.
- [25] 陈强谱, 邢月利, 欧琨, 等. 早期肠内营养对胃肠癌患者术后T淋巴细胞亚群的影响 [J] . 癌症, 2001, 20(3): 294–297.
- [26] 陈强谱. 临床肠内营养 [M] . 北京: 人民卫生出版社, 1998: 180–190.
- [27] 傅廷亮, 郑步峰. 肠内营养与肠黏膜屏障的保护 [J] . 山东医药, 2008, 48(31): 105.
- [28] 陈强谱, 黄桀. 手术、创伤后的早期肠内营养 [J] . 山东医药, 2008, 48(31): 104.
- [29] 黎介寿. 临床营养支持的发展趋势 [J] . 肠外与肠内营养, 2010, 17(1): 1–4.
- [30] B' Weimann A. Immunonutrition in patients after multiple trauma [J] . Br J Nutr, 2002, 87(Suppl): 133–134.
- [31] Mccowen KC, Bistrian BR. Immunonutrition problematic or problem solving [J] . Am J Clin Nutr, 2003, 77 (4): 764–770.
- [32] Bertolini G, Iapichino G, Radrizzani D, et al. Early enteral immunonutrition in patients with severe sepsis: results of an interim analysis of a randomized multicentre clinical trial [J] . Intensive Care Med, 2003, 29(6): 834–840.
- [33] Fujitani K, Tsujinaka T, Fujita J, et al. Prospective randomized trial of preoperative enteral immunonutrition followed by elective total gastrectomy for gastric cancer [J] . Br J Surg, 2012, 99(5): 621–629.
- [34] Zhang Y, Gu Y, Guo T, et al. Perioperative immunonutrition for gastrointestinal cancer: a systematic review of randomized controlled trials [J] . Surg Oncol, 2012, 21(2): e87–e95.
- [35] Mizock BA. Immunonutrition and critical illness: an update [J] . Nutrition, 2010, 26(7–8): 701–707.

(上接第17页)

- [4] Advani A, Gilbert RE. The endothelium in diabetic nephropathy [J] . Semin Nephro, 2012, 32(2): 199–207.
- [5] Passam FH, Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, et al. Molecular pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: the role of oxidative post–translational modification of beta 2glycoprotein I [J] . J Thromb Haemost, 2011, 9 (Suppl. 1): 275–282.
- [6] Yu P, Passam FH, Yu DM, et al. Beta2–glycoprotein I inhibits vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor–induced angiogenesis through its amino terminal domain [J] . J Thromb Haemost, 2008, 6(7): 1215–1223.
- [7] Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, Krilis SA. New insights into the biology and pathobiology of beta2–glycoprotein I [J] . Curr Rheumatol Rep, 2011, 13(1): 90–95.
- [8] Fruchart JC, Sacks FM, Hermans MP, et al. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in dyslipidaemic patient [J] . Diab Vasc Dis Res, 2008, 5(4): 319–335.
- [9] Flyvbjerg A, Dagnaes–Hansen F, De Vriese AS, et al. Amelioration of long–term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody [J] . Diabetes, 2002, 51(10): 3090–3094.
- [10] Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy [J] . J Am Soc Nephrol, 2007, 18(2): 539–550.
- [11] San Martín R, Valladares D, Roa H, et al. Do adenosine receptors offer new therapeutic options for diabetic nephropathy [J] . Curr Vasc Pharmacol, 2009, 7(4): 450–459.
- [12] Tufro A, Veron D. VEGF and podocytes in diabetic nephropathy [J] . Semin Nephrol, 2012, 32(4): 385–393.