

藏药灰兜巴对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的改善作用

杨坤宝^{1,2}, 庞宗然^{1*}, 尹长江^{2*}, 白颖慧¹, 鲁碧楠¹, 于宁³, 韩桂艳³
(1. 中央民族大学药学院, 北京 100081; 2. 承德医学院, 河北 承德 067000; 3. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 探讨藏药灰兜巴对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的改善作用。**方法** 采取高脂高糖饮食喂养和腹腔注射 65 mg/kg 链脲佐菌素法诱导糖尿病肾病大鼠模型。大鼠随机分为对照组、模型组、二甲双胍组、灰兜巴组, 每组 8 只, 灌胃给药 6 周。分别于药物干预前后进行口服葡萄糖耐量实验 (oral glucose tolerance test, OGTT), 收集 24 小时尿液并检测 mAlb 与 Ucr 比值; PASM 观察肾组织病理学改变情况; Western blot 法和免疫荧光法检测足细胞标志蛋白 Nephlin 表达; 透射电子显微镜观察足细胞和肾小球基底膜损伤。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠时间-血糖曲线下面积及 mAlb/Ucr 升高 ($P<0.01$), 足细胞标志蛋白 Nephlin 表达减少 ($P<0.01$), 透射电镜下可见肾小球基底膜明显增厚及广泛足突融合。与模型组比较, 灰兜巴可改善糖尿病肾病大鼠空腹葡萄糖耐量受损, 降低 mAlb/Ucr ($P<0.01$), 上调足细胞标志蛋白 Nephlin 表达 ($P<0.01$), 减少足细胞丢失, 改善足细胞和肾小球基底膜超微结构改变情况。**结论** 益气养阴藏药灰兜巴可减轻糖尿病肾病大鼠足细胞损伤, 降低蛋白尿, 从而发挥肾脏保护作用。
关键词: 灰兜巴; 蛋白尿; 足细胞; 糖尿病肾病
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)09-2299-07
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.010

Ameliorative effects of Tibetan Huidouba on podocyte injury in diabetic nephropathy rats

YANG Kun-bao^{1,2}, PANG Zong-ran^{1*}, YIN Chang-jiang^{2*}, BAI Ying-hui¹, LU Bi-nan¹,
YU Ning³, HAN Gui-yan³
(1. College of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 2. Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 3. The Hospital Affiliated to Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

ABSTRACT: AIM To explore ameliorative effects of Huidouba (HDB), a Tibetan medical agent, on podocyte injury in diabetic nephropathy (DN) rats. **METHODS** Rats were induced into DN models by high fat diet (HFD) feeding and intraperitoneal injection of 65 mg/kg streptozocin (STZ). Rats were randomly divided into control group, model group, metformin group, and HDB group, 8 rats in each group, for 6-week corresponding gavage. Oral glucose tolerance test (OGTT) was conducted before and after drug intervention, and 24-hour urine was collected to detect mAlb and Ucr ratio. Renal histopathology analysis was performed by PASM staining. Nephlin, the biomarker of podocyte, was examined by Western blot and immunofluorescence assay of renal tissue. Podocyte injury and ultrastructural changes of glomerular basement membrane (GBM) were detected by transmission electronic microscope (TEM). **RESULTS** Compared with the control group, the model group shared

收稿日期: 2020-04-16
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81804217); 承德医学院重点课题 (201810); 承德医学院重大项目科研专项 (KY2020006)
作者简介: 杨坤宝 (1983—), 女, 博士生, 副教授, 从事中药、民族药治疗糖尿病及并发症作用机制研究。Tel: 13463655778, E-mail: ykb2002-0216@163.com
*** 通信作者:** 庞宗然 (1966—), 男, 博士, 教授, 从事中药、民族药治疗糖尿病及并发症作用机制研究。Tel: (010) 68935090, E-mail: 675931443@qq.com
尹长江 (1979—), 男, 硕士, 副教授, 从事中药治疗糖尿病及并发症作用机制研究。Tel: 13731443998, E-mail: 13731443998@163.com

more area under glucose-time curve (AUC) and higher mAlb/Ucr level ($P<0.01$), but decreased Nephryn expression ($P<0.01$), obviously increased GBM thickness, and more extensive fusion of foot processes under TEM. Compared with the model group, HDB group shared improvement in the impaired fasting glucose tolerance and mAlb/Ucr reduction in DN rats ($P<0.01$), up-regulation of renal Nephryn expression, and therefore resultant improvement in ultrastructure damage of podocyte and GBM. **CONCLUSION** HDB, a Tibetan tonic for Benefiting Qi and Nourishing Yin, can improve podocyte damage and proteinuria, and thus protect kidney from damage in DN rats.

KEY WORDS: Huidouba (HDB); podocyte; proteinuria; diabetic nephropathy (DN)

2017年底,国际糖尿病联盟公布了第八版全球糖尿病地图。全球糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)成人患者(20~79岁)到2017年已达到4.25亿,预计到2045年,糖尿病患者可能达到6.42亿。其中我国患病人口最多,高达1.144亿^[1]。而糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)作为糖尿病最常见微血管并发症,目前已成为导致终末期肾病(End-stage renal disease, ESRD)的最主要原因之一^[2]。北大医院最新统计结果显示,我国DN已经超过了肾小球肾炎相关慢性肾脏病,成为ESRD的首要病因,估计患病人数已达2400万^[3]。目前临床治疗糖尿病肾病多以控制血糖、血压为主,但并不能完全阻止其进展。因此,深入研究糖尿病肾病发病机制并寻找新的天然药物,对于减缓该疾病发生发展具有重要意义。

藏药灰兜巴又名灰菟巴、闭口袋,为地蛛科地蛛属卡氏地蛛(*Atypus karschi* Doenitz)在老茶树根部所筑的巢穴,具有益气健脾、滋补肾阴之功效,在四川峨眉山地区被世代相传,用于糖尿病及其并发症的治疗^[4]。本实验研究发现,灰兜巴可改善糖尿病肾病大鼠肾组织病理学及足细胞超微结构改变,减少足细胞丢失,降低蛋白尿。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性SD大鼠32只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0011,5周龄,体质量120~140 g。饲养环境恒温22~24℃,相对湿度50%~60%,12 h/12 h昼夜更替,本实验经承德医学院实验动物伦理委员会许可(实验动物伦理审查批号201712-007)。

1.2 药物与试剂 灰兜巴产于四川省峨眉山市双福镇,6月中下旬采摘,晒制,经吉林农业大学李欣教授鉴定为正品,二甲双胍(1,1-二甲基双胍盐酸盐含有量98.8%,批号H20103205)由石家庄市普力制药有限公司馈赠;链脲佐菌素(streptozo-

tocin, STZ)(货号S0130)购自美国Sigma公司;尿微量白蛋白(mAlb)测定试剂盒(货号E038-1-1)、尿肌酐(Ucr)测定试剂盒(货号C011-1-1)购自南京建成生物工程研究所;PASM染色试剂盒(货号G1059)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;β-actin鼠单克隆抗体(货号AF0003)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型,50X,货号P1045)、预染蛋白质分子量标准(19-117kD,货号P0066)、RIPA裂解液(强,货号P0013B)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,货号P0010)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号P0012A)、BeyoECL Plus(超敏ECL化学发光试剂盒)(货号P0018)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X)(货号P0015)、PVDF膜(0.45 μm, 26.5 cm×3.75 m,货号IPVH00010)均购自碧云天生物技术有限公司;Nephryn(B-12)小鼠单克隆抗体(货号sc-377246)购自美国圣克鲁斯生物技术有限公司;山羊抗小鼠IGG(H&L)二抗(CY3标记,货号GB21301)、DAPI染色试剂(货号G1012)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;50%葡萄糖(武汉市福星生物药业有限公司,国药准字H42022230)。

1.3 仪器 高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);BK200全自动生化分析仪(山东博科生物产业有限公司);ES自动组织脱水机(美国Thermo公司);Histocentre 3组织包埋机(美国Thermo公司);RM 2125轮转式切片机(德国Leica公司),TK-218型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司);MDF-U4086超低温冰箱(日本三洋公司);Eclipse Ti-SR倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);DS-Ri1-U3数码显微成像系统(日本Nikon公司);SDS-PAGE电泳仪(北京六一厂);转膜仪(北京六一厂);Tanon-5200化学发光凝胶成像系统(天能科技有限公司);HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);强生稳豪倍易型血糖仪[强生(中国)医疗器材有限公司]。

2 方法

2.1 药物制备 灰兜巴水提物制备, 根据当地用药方式, 总结灰兜巴制备工艺参数^[4], 并结合预实验研究结果, 委托承德颈复康药业集团有限公司加工制备。取灰兜巴 10 kg, 分别加入药材量 10、9、9 倍量的水, 药材浸泡 2 h, 沸腾回流 (100 ℃) 提取 3 次, 2 h/次; 收集提取液, 70 ℃ 减压浓缩至适当的相对密度 (1.02), 放至室温, 加入乙醇至乙醇浓度为 80%, 4 ℃ 醇沉 12 h, 过 100 目筛, 收集水提醇沉部分, 真空减压干燥得灰兜巴水提醇沉物, 本次灰兜巴生药提取率为 2.54%。冰上配置 1% STZ (10 mg STZ 溶于 1 mL 柠檬酸柠檬酸钠缓冲液) 后用锡纸包裹, 并在 15 min 内使用。

2.2 糖尿病肾病模型制备 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机选取 8 只进入对照组并饲以 SPF 级大鼠维持饲料 (定义为 0 周), 其余大鼠以高脂高糖饲料 (66.5% 大小鼠维持饲料 + 10% 猪油 + 20% 蔗糖 + 2.5% 胆固醇 + 1% 胆酸钠) 喂养, 6 周后禁食不禁水 4 h, 一次性腹腔注射 1% STZ (65 mg/kg), 对照组注射等体积溶媒。注射 1 周后禁食不禁水 12 h, 进行口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT), 50% 葡萄糖备用, 用于低血糖昏迷灌胃抢救。以空腹血糖 (Fasting blood glucose, FBG) ≥ 11.1 mmol/L^[5-7], OGTT 实验 AUC 升高 2 倍, 视为造模成功。采用随机数字表法将造模成功大鼠分为模型组 ($n=8$), 二甲双胍组 ($n=8$), 灰兜巴组 ($n=8$)。

2.3 给药 课题组前期糖尿病肾病大鼠动物预实验结合灰兜巴当地用药量设计灰兜巴水提物冻干粉高、中、低剂量组, 其中以高剂量组 (180 mg/kg) 效果最为明显, 确定灰兜巴组给药剂量 (180 mg/kg)。参考魏伟主编第 4 版《药理实验方法学》, 按种属间体表面积换算大鼠二甲双胍等效剂量为 45 mg/kg。用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 混悬灰兜巴水提醇沉物冻干粉和二甲双胍粉末, 按 1 mL/100 g 灌胃给药。对照组和模型组每天于固定时间灌胃等体积 0.5% CMC-Na, 灌胃 6 d, 休息 1 d, 如此连续干预 6 周。

2.4 给药前后 OGTT 实验 分别于药物干预前 (第 7 周) 和药物干预后 (第 13 周) 进行 OGTT 实验。禁食不禁水 12 h, 50% 葡萄糖溶液 (2 g/kg) 灌胃, 并于 0、30、60、90、120 min, 用强生稳豪血糖仪测尾尖血糖。根据近似梯形面积

计算 $AUC(\text{mmol/L} \cdot \text{h}) = [(\text{BG}_0 + \text{BG}_{30}) \times 0.5/2] + [(\text{BG}_{30} + \text{BG}_{60}) \times 0.5/2] + [(\text{BG}_{60} + \text{BG}_{90}) \times 0.5/2] + [(\text{BG}_{90} + \text{BG}_{120}) \times 0.5/2]$ (BG 分别代表糖负荷后各时间点的血糖值)。

2.5 全自动生化分析仪检测药物干预前后尿液 mAlb/Ucr 分别于药物干预前后用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 期间自由饮食。取 1 mL 尿液于 1.5 mL 离心管中, 4 ℃ 下 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 全自动生化分析仪检测 mAlb、Ucr, 并计算二者比值。实验结束时, 腹腔注射氯胺酮 (10 mg/100 g) 麻醉大鼠, 脱颈椎法处死大鼠, 剖腹取出肾脏, 一侧用于组织病理学及超微结构观察, 另一侧切小块后 -80 ℃ 保存。

2.6 肾脏组织 PASM 染色 4 ℃ 预冷生理盐水冲洗肾脏组织后投入 10% 福尔马林中性固定液固定 48 h, 经充分流水冲洗, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋。常规病理切片, 厚度约 4 μm , 脱蜡至水, 高碘酸染色, 乌洛托品储备液孵育染色, 显色以肾小球毛细血管基膜呈黑色为准, 硫代硫酸钠处理, 复染伊红, 脱水封片, 光镜下观察肾脏组织病理学改变。

2.7 Western blot 肾组织匀浆液, 4 ℃ 下 7 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加 PBS 溶液重复清洗 2~3 次至组织无血色, 按说明加入 RIPA 裂解液 (150~250 μL /20 mg), 4 ℃ 下 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 按 BCA 蛋白质定量试剂盒操作测定蛋白浓度。经煮蛋白、电泳、转膜、封闭, 用 TBST 溶液稀释一抗, 4 ℃ 孵育过夜。TBST 溶液洗膜后, 加入与一抗对应来源的二抗室温慢摇孵育 2 h, 再用 TBST 溶液洗膜, ECL 发光液进行显色, 化学发光凝胶成像系统曝光。以 β -actin 为内参分析 Nephrin 蛋白相对表达量。

2.8 免疫荧光分析 肾组织石蜡切片约 4 μm 厚, 脱蜡至水, 用 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH=8.0) 于微波炉内进行抗原修复, 自发荧光淬灭, 3% BSA 封闭。按说明书加入 Nephrin 一抗 (1:100), 4 ℃ 孵育过夜。再加入与一抗相应种属的二抗, 即山羊抗小鼠 IGG (H&L) 二抗 (CY3 标记), 抗荧光淬灭封片剂封片, 于尼康倒置荧光显微镜下采集图像。

2.9 透射电镜观察肾脏超微结构 肾脏组织修成 1 mm³ 小块; 3.1% 戊二醛于 4 ℃ 冰箱内固定 2 h, 1% 锇酸后固定 1 h, 常规电镜样品包埋; 半薄切片, 光镜下定位选区; 超薄切片, 片厚 60 nm, 醋

酸双氧铈及柠檬酸铅双重染色，透射电子显微镜观察肾脏超微结构改变。校准后，选至少 30 个点测量肾小球基底膜内层到外层的垂直距离，计算平均肾小球基底膜厚度（thickness of glomerular basement membrane，TGBM）。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行分析。分析前进行数据正态性分布和方差同质性检验，方差齐则采用单因素方差分析；方差不齐或非正态，采用秩和检验；对 OGTT 重复测量设计资料采用多因素方差分析；并采用 LSD 法对多个样本均数进行两两比较。实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 药物干预前后 OGTT 分析 药物干预前，与对照组比较，模型组、二甲双胍组和灰兜巴组大鼠 AUC 升高 ($P < 0.01$)；二甲双胍组和灰兜巴组 AUC 与模型组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。药物干预后，灰兜巴和二甲双胍均可改善糖尿病肾病大鼠空腹葡萄糖耐量受损情况，二甲双胍组、灰兜巴组 AUC 低于模型组 ($P < 0.01$)。见图 1。

3.2 给药前后 mAlb/Ucr 比较 药物干预前，与对照组比较，模型组大鼠尿液 mAlb/Ucr 升高 ($P < 0.01$)；二甲双胍组和灰兜巴组 mAlb/Ucr 与模型组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。药物干预后，二甲双胍组和灰兜巴组 mAlb/Ucr 低于模型组 ($P < 0.01$)，且灰兜巴组 mAlb/Ucr 低于二甲双胍组 ($P < 0.01$)，见图 2。

3.3 PASM 染色观察肾组织病理改变 肾组织石蜡切片经 PASM 染色后，肾小球基底膜 IV 胶原镀银呈黑色。模型组可见明显肾小球管丛系膜扩张伴基底膜增生。灰兜巴和二甲双胍可明显减轻肾小球病理改变（图 3）。

3.4 肾组织 Nephryn 蛋白表达 Western blot 结果显示，与对照组比较，模型组足细胞标志蛋白 Nephryn 表达下降 ($P < 0.01$)，灰兜巴和二甲双胍可减轻模型大鼠足细胞 Nephryn 下降情况 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，且灰兜巴组 Nephryn 蛋白表达高于二甲双胍组 ($P < 0.01$)，见图 4。

3.5 肾组织足细胞 Nephryn 荧光检测 为验证 Nephryn 蛋白表达结果，进行肾组织石蜡切片免疫荧光检测，观察肾小球足细胞丢失情况。免疫荧光检测结果显示，模型组大鼠肾小球足细胞标志蛋白 Nephryn (CY3 标记) 表达明显减少。灰兜巴和二

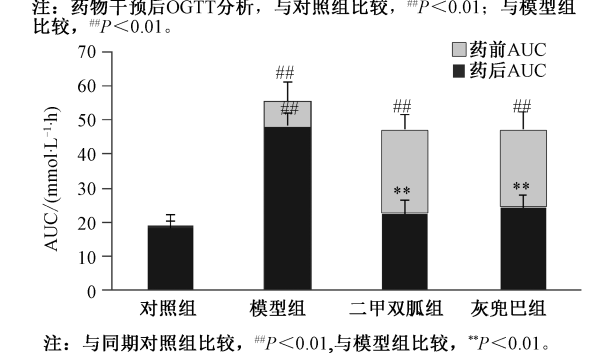
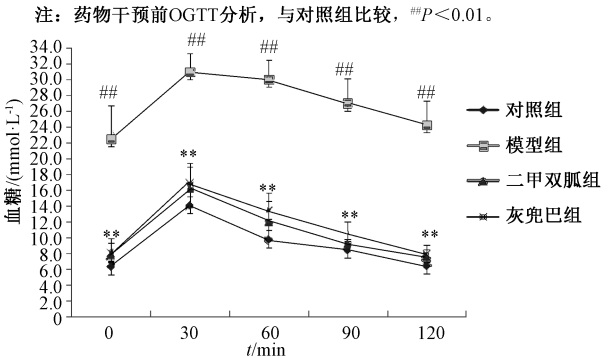
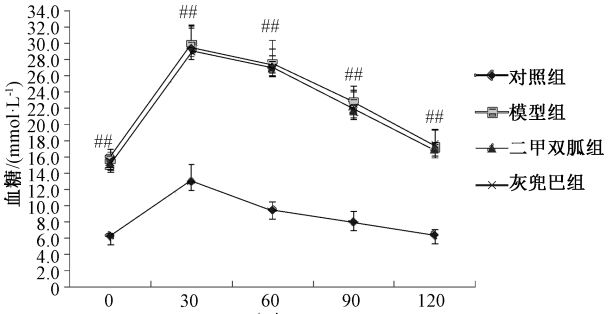


图 1 药物干预前后 OGTT 分析及 AUC 比较 (n=8)
Fig. 1 OGTT analysis and AUC comparison before and after medication (n=8)

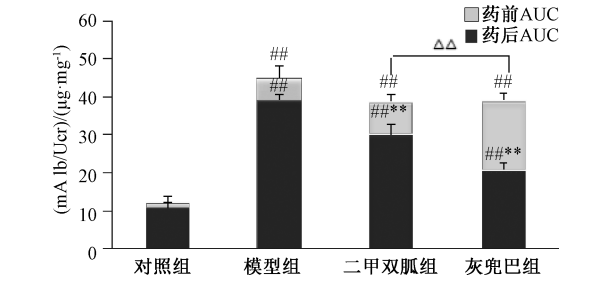


图 2 给药前后 mAlb/Ucr 比较 (n=8)
Fig. 2 Comparison of mAlb/Ucr before and after medication (n=8)

甲双胍组可明显减轻足细胞 Nephryn 下降情况(图 5)。

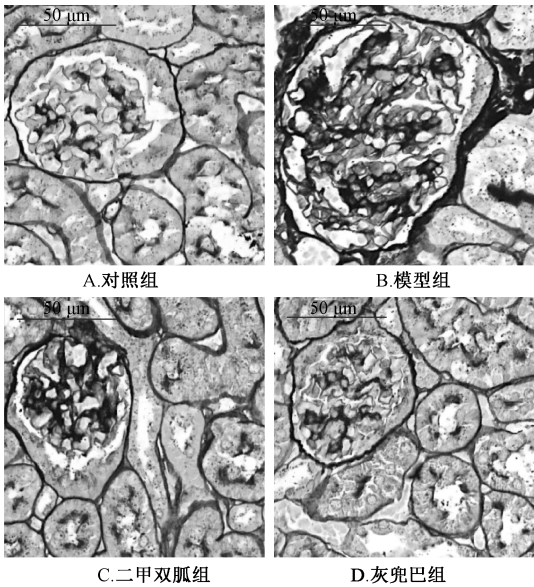
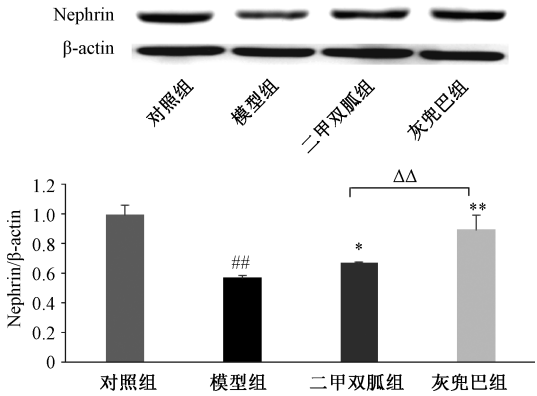


图 3 PASM 染色观察肾小球组织病理改变 (×400)

Fig. 3 Pathological changes examined by PASM staining (×400)



注：与对照组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；灰兔巴组与二甲双胍组比较，^{△△} $P<0.01$ 。

图 4 肾组织 Nephlin 蛋白表达 (n=3)

Fig. 4 Protein expression of Nephlin in kidney (n=3)

3.6 透射电镜观察肾小球超微结构 利用透射电子显微镜观察足细胞和肾小球基底膜超微结构改变情况，进一步验证足细胞标志蛋白 Nephlin 表达结

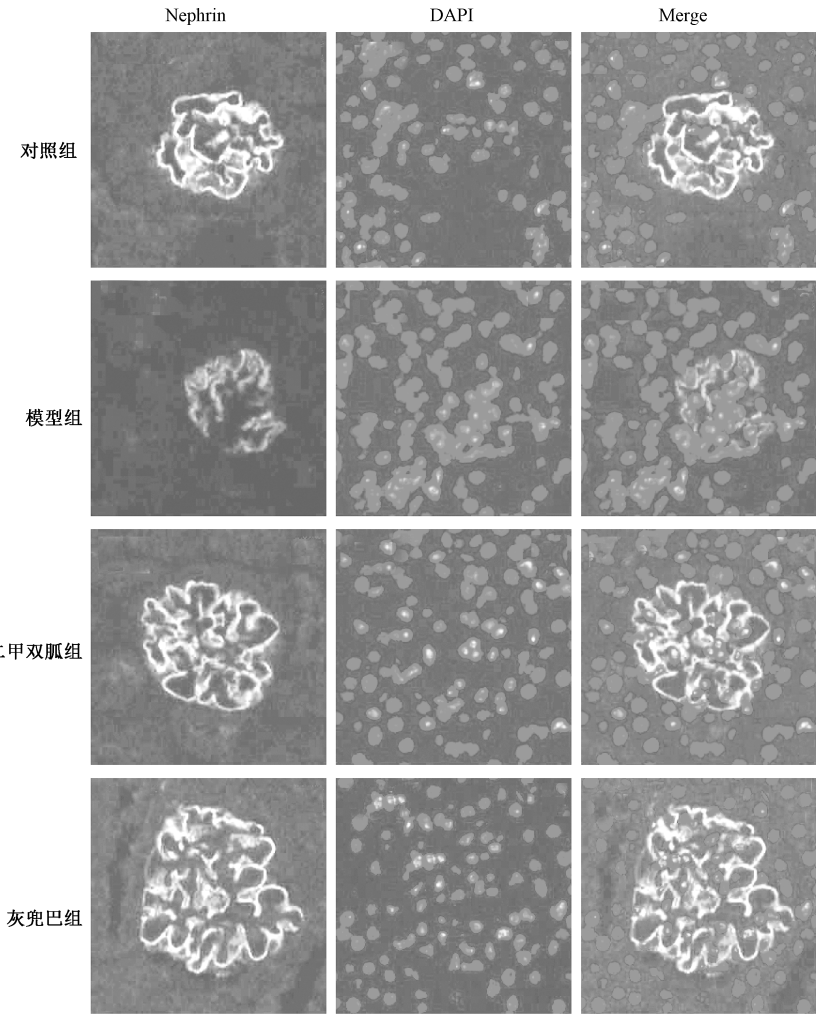
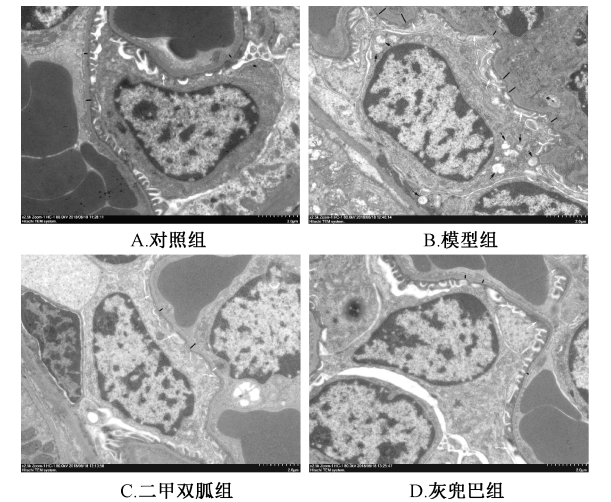


图 5 肾组织 Nephlin 免疫荧光检测 (×200)

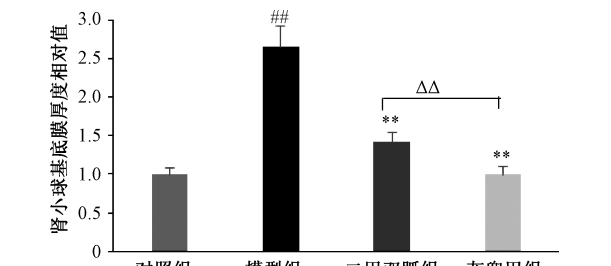
Fig. 5 Expression of Nephlin by immunofluorescence assay (×200)

果。对照组肾小球基底膜清晰，足细胞形态完整；模型组肾小球基底膜不规则增厚，足突广泛融合，足细胞可见明显线粒体嵴断裂或空泡化；灰兜巴和二甲双胍可明显改善肾小球基底膜增厚和足细胞足突融合情况（图6）。TGBM 测量结果进一步为上述观察提供佐证，与对照组比较，模型组 TGBM 增厚（ $P<0.01$ ）；灰兜巴组和二甲双胍组可改善 TGBM 增厚情况，灰兜巴组 TGBM 低于模型组和二甲双胍组（ $P<0.01$ ），见图7。



注：——标示肾小球基底膜内层到外层的垂直距离，即肾小球基底膜厚度（TGBM）；■标示足突融合；↑标示线粒体嵴消失、空泡化。

图6 电镜观察肾小球超微结构改变（ $\times 12\,500$ ）
Fig. 6 Ultrastructure changes under TEM（ $\times 12\,500$ ）



注：与对照组比较，## $P<0.01$ ，与模型组比较，** $P<0.01$ ；灰兜巴组与二甲双胍组比较， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图7 肾小球平均基底膜厚度（ $n=3$ ）
Fig. 7 Mean thickness of glomerular basement membrane（ $n=3$ ）

4 讨论

现有研究报道多采用尾尖采血测空腹血糖或随机血糖作为成功造模判定标准^[8-9]，但课题组预实验发现造模后大鼠血糖不稳定，存在造模成功，但检测时可能因发生低血糖反应，而未被检测出高血糖的情况；或造模不成功，存在一过性高血糖而被

判定为造模成功的情况，因此单独以此为标准判定成模与否缺乏严谨性。本研究将空腹血糖检测结果与 OGTT 分析结果结合起来，以空腹血糖大于 11.1 mmol/L，且 OGTT 时间-血糖曲线下面积升高 2 倍，作为造模成功判定标准。实验结束时，灰兜巴组 AUC 仍高于对照组，说明灰兜巴组大鼠仍存在 2 h 葡萄糖耐量受损的情况。

有研究表明，在糖尿病肾病早期即出现不同程度足细胞损伤，因此，足细胞损伤在该疾病发病中的重要作用倍受关注^[10-11]。足细胞即肾小球脏层上皮细胞，附着于肾小球基底膜外侧，参与构成肾小球滤过膜的最后一道屏障。Nephrin 为足细胞裂孔隔膜的主要成分，在糖尿病肾病患者中其表达明显下降，且下降程度与蛋白尿的进展呈正相关^[12]。检测尿液 mAlb/Ucr 发现，糖尿病肾病大鼠发生大量蛋白尿（ $>30\,\mu\text{g}/\text{mg}$ ），课题组通过 Western blot 法和免疫荧光法检测进一步发现，大鼠肾小球 Nephrin 表达明显减少，提示存在足细胞丢失，而灰兜巴可明显减轻糖尿病肾病大鼠肾小球足细胞丢失情况，透射电镜观察结果与此相互印证。

更有趣的是，在透射电镜观察中发现模型组大鼠存在明显的线粒体嵴消失或空泡化。而新近研究表明，线粒体动力学在 2 型糖尿病及其血管并发症中起着至关重要的作用，线粒体动力学失衡可致线粒体功能障碍，ATP 合成减少，线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）减少，线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP）丢失，最终以线粒体凋亡通路致足细胞凋亡，加速糖尿病肾病的发生发展^[13-14]。强烈提示高糖环境所诱发的足细胞线粒体动力学失衡是否为导致足细胞凋亡、丢失的始动因素？这将为下一步从源头上挖掘灰兜巴发挥糖尿病肾病保护作用机制提供有价值线索。

此外，该实验结果表明，灰兜巴降糖效果虽然不如二甲双胍疗效显著，但其对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用明显优于二甲双胍。中医理论认为，糖尿病肾病属于“消渴病-下消”范畴，消渴失治或治之不当，则致气阴两虚，脾肾两虚，日久则致气血阴阳俱虚，肾络瘀结、浊毒内停。临床治疗早期糖尿病肾病以益气养阴疗效较好^[15]，该实验结果将进一步为临床应用益气养阴藏药灰兜巴治疗糖尿病肾病提供可靠实验依据。

参考文献：

[1] Unnikrishnan R, Pradeepa R, Joshi S R, et al. Type 2

diabetes: demystifying the global epidemic[J]. *Diabetes*, 2017, 66 (6): 1432-1442.

[2] Marathe P H, Gao H X, Close K L. American diabetes association standards of medical care in diabetes 2017 [J]. *J Diabetes*, 2017, 9(4): 320-324.

[3] Zhang L, Long J, Jiang W, *et al.* Trends in chronic kidney disease in China[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9): 905-906.

[4] 杨坤宝, 庞宗然. 藏药灰兜巴治疗糖尿病的研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(8): 1682-1685.

[5] Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review) [J]. *Acta Physiol Hung*, 2014, 101(4): 408-420.

[6] Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, *et al.* RAGE-aptamer blocks the development and progression of experimental diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2017, 66(6): 1683-1695.

[7] Tesch G H, Allen T J. Rodent models of streptozotocin induced diabetic nephropathy [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2007, 12 (3): 261-266.

[8] Wang H Q, Wang S S, Chiufai K, *et al.* Umbelliferone ameliorates renal function in diabetic nephropathy rats through regulating inflammation and TLR/NF-κB pathway [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5): 346-354.

[9] Lyu G F, Qiu Z K, Ye H B, *et al.* The protective effect and MoA of *Panax notoginseng* saponins combined with aminoguanidine on kidney in diabetic nephropathy rats[J]. *Rec Nat Prod*, 2018, 12(6): 602-610.

[10] Toffoli B, Zennaro C, Winkler C, *et al.* Hemicentin 1 influences podocyte dynamic changes in glomerular diseases[J]. *Am J Physiol Renal*, 2018, 314: F1154-F1165.

[11] Müller-Deile J, Schröder P, Beverly-Staggs L, *et al.* Overexpression of preeclampsia induced microRNA-26a-5p leads to proteinuria in zebrafish[J]. *Sci Rep*. 2018, 8(1): 3621.

[12] Ma Y, Yang Q, Zhong Z, *et al.* Role of c-Abl and nephrin in podocyte cytoskeletal remodeling induced by angiotensin II [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 185.

[13] Rovira-Liopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, *et al.* Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications[J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 637-645.

[14] Szabo A, Sumegi K, Fekete K, *et al.* Activation of mitochondrial fusion provides a new treatment for mitochondria-related diseases[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 150: 86-96.

[15] 张 婷, 高彦彬. 益气养阴活血通络法治疗糖尿病肾病的临床研究[J]. *世界中医药*, 2015, 10(10): 1509-1511.