

亚硒酸钠对糖尿病肾病大鼠肾脏 *Nephrin* 表达的影响与意义

查火兵, 魏倩萍*

(重庆医科大学 附属第一医院 老年病科, 中国重庆 400016)

摘要: 探讨亚硒酸钠对糖尿病肾病大鼠肾脏 *Nephrin* 表达的影响及二者间的关系, 从而研究亚硒酸钠和 *Nephrin* 在糖尿病肾病中的作用机制. 通过链脲佐菌素法及给予高脂饮食诱导模拟大鼠糖尿病肾病模型, 实验设空白对照组、糖尿病肾病对照组、亚硒酸钠干预组, 亚硒酸钠干预组每日给予亚硒酸钠溶液灌胃, 其它组给予等量生理盐水灌胃. 灌胃 10 周后处死大鼠, 取血、尿标本测相关生化指标. 取肾脏组织戊二醛固定制作切片电镜下观察超微结构改变, 取肾脏组织多聚甲醛固定制石蜡切片光镜下观察病理改变和免疫组化定位蛋白表达. 取肾脏组织 RT-PCR 检测 *Nephrin* 的 mRNA 表达、Western Blotting 检测 *nephrin* 的蛋白表达, 分析各组数据的统计差异. 结果发现亚硒酸钠干预组大鼠基本状况和生化指标较糖尿病肾病对照组明显改善, 光镜和电镜下观察病理改变和超微结构病变较糖尿病肾病对照组明显减轻. 免疫组化 *nephrin* 蛋白表达着色糖尿病肾病对照组较空白对照组减少, 亚硒酸钠干预组较糖尿病肾病对照组着色明显增多. *Nephrin* mRNA 和蛋白表达糖尿病肾病对照组较空白对照组明显降低, 而亚硒酸钠干预组较糖尿病肾病对照组升高, 但低于空白对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$). 亚硒酸钠明显促进肾脏 *Nephrin* 表达, 改善了糖尿病肾病, 表明亚硒酸钠和 *Nephrin* 在防治和延缓糖尿病肾病的发生发展中可能起重要作用.

关键词: 亚硒酸钠; 糖尿病肾病; *Nephrin*

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)06-0526-06

The Influence of Sodium Selenite on *Nephrin* Gene Expression in Kidney of Diabetic Nephropathy Rats and Significance

ZHA Huo-bing, WEI Qian-ping*

(Geriatrics Department, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To investigate the influence of sodium selenite on *Nephrin* gene expression in kidney of diabetic nephropathy rats and the relation between sodium selenite and *Nephrin*, so as to study the role mechanism of sodium selenite and *Nephrin* in diabetic nephropathy. Diabetic nephropathy rat models were established by injecting streptozocin intraperitoneally and feeded high fat diet. Three different groups of the rats were employed: control group, diabetic nephropathy group and selenite-treated group. The selenite-treated group took selenite solution by intragastric administration every day, and other groups took same dose saline by intragastric administration every day. After 10 weeks, rats were killed, blood and urine sample were got ten to took some biochemical indicators. The kidney was cut and made section by glutaral fixation to observe fine structure changes through electron microscope. The kidney was cut and made paraffin section to observe pathological changes with light microscope and to locate *nephrin* protein expression with

收稿日期: 2009-05-02; 修回日期: 2009-06-05

基金项目: 重庆市卫生局课题(07-1-076)

作者简介: 查火兵(1980-), 男, 湖北武穴人, 硕士研究生, 主要从事糖尿病肾病研究, E-mail: yyjkl76421@126.com; * 通讯作者 魏倩萍(1965-), 女, 重庆市人, 重庆医科大学硕士生导师, 博士, 主要从事老年内分泌病研究, Tel: E-mail: wqp68894940@163.com

immunohistochemistry analysis. The kidney was cut and the expression of *Nephrin* mRNA and nephrin protein through RT-PCR and Western blotting were examined. All data was analyzed by statistics methods. The basic conditions and biochemical indicators of selenite-treated group were better than diabetic nephropathy group, and the same to pathological changes and fine structure changes. Immunohistochemistry analysis manifested that the coloration of diabetic nephropathy group paraffin section diminished comparing to the control group, but the coloration of selenite-treated group paraffin section enhanced comparing to the diabetic nephropathy group. The expression of *Nephrin* mRNA and nephrin protein in diabetic nephropathy group was decreased comparing to the control group, but of which selenite-treated group enhanced comparing to the diabetic nephropathy group, diminishing comparing to the control group yet. All differences were statistically significant ($P < 0.05$). Sodium selenite can enhance the expression of *Nephrin* in kidney of diabetic nephropathy rats, improve diabetic nephropathy, and it is hinted that sodium selenite and *Nephrin* may play important roles in delaying the process of diabetic nephropathy.

Key words : sodium selenite ; diabetic nephropathy ; *Nephrin*

(*Life Science Research*, 2009, 13(6) : 526~531)

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(Diabetes mellitus, DM)最常见、最严重的慢性并发症和主要死亡原因之一,随着糖尿病发病率的逐年提高,糖尿病肾病已成为导致慢性肾功能衰竭的首位病因,如何有效预防和延缓 DN 发生、发展进程,已成为当今医学界重要研究课题。硒作为具有抗氧化应激作用的微量元素,已被证明在糖尿病及其并发症中具有积极的效果^[1,2]。近年研究表明,1998 年由 Tryggvason 等所确定的 nephrin 分子,在肾脏由肾小球足细胞表达。其定位于裂孔膜,对维持裂孔膜的完整性起关键作用。已经证实 nephrin 的分布和表达改变是多种肾小球疾病蛋白尿的发病机制之一,缺乏 nephrin 蛋白可导致裂孔膜结构丧失、大量的蛋白尿及肾功能衰竭^[3]。研究证实在 DN 患者中 *Nephrin* 表达明显降低,其在 DN 中起积极作用^[4]。但 *Nephrin* 在糖尿病肾病发生发展中与亚硒酸钠之间的关系国内外报道甚少。本研究通过观察亚硒酸钠对糖尿病肾病大鼠肾脏 *Nephrin* 表达的影响以及二者间的关系,从而探讨亚硒酸钠与 *Nephrin* 在糖尿病肾病发生发展中作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠,约 180~200 g,购自重庆医科大学实验动物中心。链脲佐菌素购自美国 sigma 公司。亚硒酸钠购自上海生工。血糖仪及血糖试纸为美国强生,稳豪型。总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化。逆转录试剂盒为上海东洋纺公

司(日本)。引物由大连宝生物公司设计与合成。PCR 反应液购自北京天根生化。免疫组化 SABC 试剂盒、nephrin 多克隆抗体及二抗、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司。血、尿肌酐测定试剂盒,尿白蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物公司。低温高速离心机为美国 sigma 公司。PCR 仪为美国 Bio-rad 公司,垂直电泳槽、电转移装置、电泳仪为北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立

选取 35 只大鼠,适应性喂养 1 周,禁食 10 h 后,随机选取 25 只,链脲佐菌素溶于 0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 4.2)中配成 1% 的溶液,以 55 mg/kg 体重一次性腹腔注射,72 h 后尾静脉采血测血糖,以随机血糖浓度 > 16.65 mmol/L 作为糖尿病模型建立标准,共成模 20 只,未成模的剔除。成模大鼠随机分为糖尿病肾病对照(DN 组)和亚硒酸钠干预组(DN-Se 组),每组 10 只。另 10 只大鼠给予等体积的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液腹腔注射,作为正常对照组(N 组),72 h 后尾静脉采血测血糖,该组大鼠 FBG 均处于正常值范围 (FBG < 6.0 mmol/L)。最终成模每组 8 只。

1.2.2 分组

分为 3 组,为空白对照组、糖尿病肾病对照组及亚硒酸钠干预组。1) 空白对照组 (N 组): 普通饲料喂养,每日等量生理盐水灌胃,连续 10 周; 2) 糖尿病肾病对照组 (DN 组): 高脂饲料喂养,每日等量生理盐水灌胃,连续 10 周; 3) 亚

硒酸钠干预组 (DN-Se): 高脂饲料喂养, 每日以亚硒酸钠 $1 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 连续 10 周普通饲料采用重庆医科大学实验动物中心专用饲料, 高脂饲料按下列配方由动物中心配制. 按 10 kg 计: 玉米粉 2 400 g, 次粉 1 300 g, 小麦麸 700 g, 大豆粕 1 000 g, 鱼粉 1 200 g, 猪油 2 000 g, 啤酒酵母 400 g, 骨粉 200 g, 鸡蛋 700 g, 食盐 100 g. 各组大鼠分笼喂养, 实验期间自由进食、进水, 自然照明, 室温 $20\sim 28^\circ\text{C}$, 均不给予胰岛素和降糖药.

1.2.3 标本的选取

喂养 10 周后, 尾静脉采血测血糖. 用代谢笼准确收集 24 h 尿量, 新鲜尿样以 $3\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 15 min, 去沉渣后 -20°C 保存备用. 配制新鲜 10% 水合氯醛溶液, 按 $4 \text{ mL}/\text{kg}$ 剂量腹腔注射. 打开腹腔, 从腹主动脉迅速取鲜血约 $3\sim 5 \text{ mL}$, 自行凝固后离心取上清, -20°C 保存备用. 迅速取双肾, 去除肾包膜, 用冷生理盐水灌洗, 同时观察肾脏大小、颜色、质地, 称双肾重量. 切取双肾外周皮质组织置于冻存管投入液氮冻存备用. 迅速切取小块肾脏组织置于戊二醛中固定, 制切片作扫描电镜观察. 切取肾脏组织置于多聚甲醛溶液固定, 制作石蜡切片.

1.2.4 一般项目的检测

观察每组大鼠的毛色、体型、饮食饮水、精神状态, 用强生血糖仪测尾部静脉血糖. 测尿白蛋白用溴甲酚绿比色法, 测定血肌酐用除蛋白法.

1.2.5 电镜切片的制备和观察

肾组织用 4% 戊二醛前固定, 2% 锇酸 (pH 7.4) 后固定 (4°C), 乙醇丙酮梯度脱水, EDPON-816 环氧树脂包埋, LKBm 型切片超薄片, 铀一铅双重染色, 扫描电镜观察肾超微结构变化.

1.2.6 HE 染色光镜观察病理改变和免疫组化分析

将多聚甲醛固定的组织块脱水石蜡包埋, 切片烤干后制成玻片标本. HE 染色后显微镜下观察, 成像系统拍照 ($\times 400$), 观察病理改变. 取石蜡切片按常规免疫组化 SP 法操作, DAB 显色剂显色. 显微镜下观察, 显微镜成像系统拍照. 棕黄色颗粒为蛋白表达着色.

1.2.7 RT-PCR 法检测 *Nephrin* mRNA 表达

采用 TRizol 按试剂盒说明书提取总 RNA, 酶标仪测浓度, 取一定量总 RNA 按试剂盒说明操作逆转录成 cDNA. 引物由大连宝生物公司合成, 为 PAGE 级, 上游 $5'-\text{TCCTGAAGACACAGACGACACAG}-3'$ 下游 $5'-\text{CATTGGAGAGCACCAGAA}$

$\text{GAC}-3'$, 产物长度 110 bp. RT-PCR 按 PCR 反应液说明书按 $25 \mu\text{L}$ 体系和常规反应条件试反应, 调整退火温度达到最佳状态. 反应结束后将 PCR 产物电泳, 电泳后琼脂糖凝胶用成像系统扫描留存图像. 图像经 Quantity one 软件分析, 比较各组的灰度比值.

1.2.8 Western Blotting 检测蛋白表达

用 RIPA 裂解液法提取总蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度. 取 $70 \mu\text{g}$ 蛋白加入 $1\times\text{SDS}$ 上样缓冲液定容至 $70 \mu\text{L}$, 取 $50 \mu\text{L}$ 等量等体积上样, SDS-PAGE 电泳分离蛋白. 按 Marker 指示范围切取目的蛋白所在胶块, 按目的蛋白相对分子质量估算电转移时间 (约 1 h). 转移后用奶粉配制封闭液摇床封闭 1.5 h, 洗膜后孵合一抗冰箱 4°C 过夜, 次日再洗膜孵合二抗 2 h, 洗膜后置于配制的 DAB 显色液中显色, 约 5 min 后终止显色, 观察条带, 数码相机照相留存图片并通过软件 Quantity one 分析图像, 取灰度比值.

1.3 统计学处理

用 SPSS 软件分析, 实验所得数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s, n=8$) 表示, 正态分布、方差齐性组间比较用 ANOVA 和 t 检验比较, 方差不齐用 t' 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义. 非正态分布、方差不齐用秩和检验.

2 结果

2.1 大鼠的肾重与体重比值、血糖值、血肌酐、尿 24 h 白蛋白

大鼠成模分组后, 分别给予普通饲料、高脂饲料喂养, 空白对照组大鼠毛色洁白, 体重稳定增加, 而糖尿病肾病对照组及亚硒酸钠干预组大鼠毛色暗淡, 呈暗黄色, 排尿明显增多, 体重明显下降, 精神稍差. 以下血糖及血肌酐、尿 24 h 白蛋白均系成模 10 周时所采标本测定. 由表 1 可知, 亚硒酸钠干预组血清肌酐、尿 24 h 白蛋白均较糖尿病肾病对照组明显降低, 差异有统计学意义. 而血糖、肾重与体重比值亚硒酸钠干预组及糖尿病肾病对照组均较空白对照组升高, 但亚硒酸钠干预组与糖尿病肾病对照组间无明显差异.

2.2 各组大鼠模型病理学改变及免疫组化定位蛋白表达

如图 1 所示, 空白对照组 (A1) 肾脏组织结构清晰, 形态学正常. 糖尿病肾病对照组 (B1)

相较空白对照组,肾小球大小不一,基底膜增厚,肾小球内可见粉红色均质状类椭圆形结节状改变.亚硒酸钠干预组(C1)上述病变明显减轻.免疫组化空白对照组(A2)nephrin 有较强表达.

糖尿病肾病对照组(B2)nephrin 较空白对照组表达减少.亚硒酸钠干预组(C2)nephrin 较糖尿病肾病对照组明显增强,但比空白对照组表达少.

表 1 大鼠肾重与体重比值、血糖、血清肌酐、尿 24 h 白蛋白($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Kindey / body weight, serum glucose, serum creatinine, 24 hours urinary albumin of rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

Index	N	DN	DN-Se
Kindey/body weight/(%) [▲]	0.81 ± 0.086	1.26 ± 0.318*	1.16 ± 0.093*ns
Serum glucose/(mmol·L ⁻¹) [△]	6.375 ± 1.008	28.600 ± 4.451*	30.663 ± 3.524*ns
Serum creatinine/(μmol·L ⁻¹) [△]	54.999 ± 24.414	217.151 ± 71.816*	217.151 ± 71.816*#
24 hours urinary albumin/(mg·(24 h) ⁻¹) [△]	22.631 ± 3.195	107.184 ± 57.318*	107.184 ± 57.318*#

Notes : * : $P < 0.05$ vs N ; # : $P < 0.05$ vs DN ; ns $P > 0.05$ vs DN ; [△] : equal variances not assumed t-test ; [▲] : wilcoxon rank sum test ; N : control group ; DN : diabetic nephropathy group ; DN-Se : selenite intervention group.

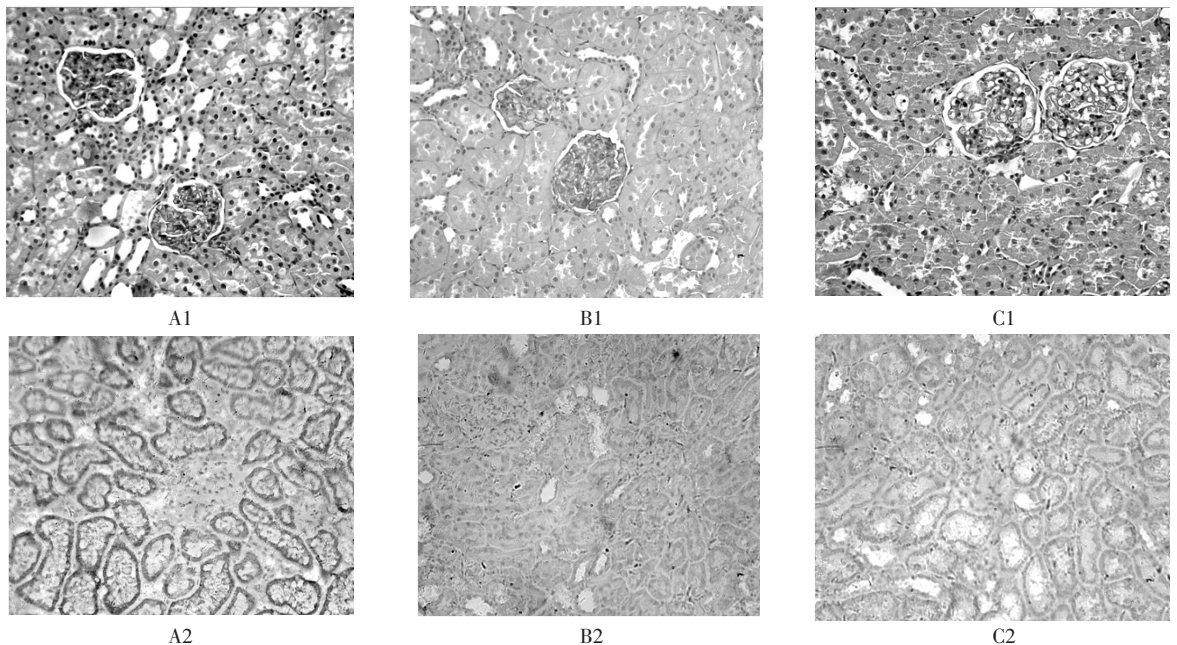


图 1 HE 染色光镜($\times 400$)下病理改变和免疫组化定位 nephrin 蛋白表达图片

A1、A2: 空白对照组; B1、B2: 糖尿病肾病对照组; C1、C2: 亚硒酸钠干预组.

Fig.1 HE stain with light microscope($\times 400$) and immunohistochemistry analysis location

A1, A2 : N ; B1, B2 : DN ; C1, C2 : DN-Se.

2.3 肾脏组织电镜下的超微结构改变

如图 2 所示,扫描电镜观察显示空白对照组大鼠肾小球血管祥结构清晰,内皮细胞、基底膜及足细胞等结构均正常;糖尿病肾病对照组大鼠肾小球基底膜节段性增厚,增厚处基底膜的 3 层细微结构不清楚,呈均质状,部分足细胞足突融合;而亚硒酸钠干预组上述改变明显轻于糖尿病肾病对照组.

2.4 Nephrin mRNA 表达差异分析

由表 2 可知,大鼠肾脏 Nephrin mRNA 表达通过 RT-PCR 检测.糖尿病肾病对照组 Nephrin

mRNA 表达低于空白对照组,而亚硒酸钠干预组 Nephrin mRNA 表达高于糖尿病肾病对照组,但低于空白对照组($P < 0.05$).

2.5 nephrin 蛋白表达差异分析(43 kD)

用 Quantity One 软件分别扫描 nephrin 蛋白条带及内参蛋白条带(β -actin),取(灰度 \times 面积)数值,按公式 nephrin/内参计算灰度比值,分析各组灰度比值统计学差异性.表 2 可见,糖尿病肾病对照组灰度比值低于空白对照组,而亚硒酸钠干预组灰度比值明显高于糖尿病肾病对照组,但仍低于空白对照组,差异有显著性($P < 0.05$).

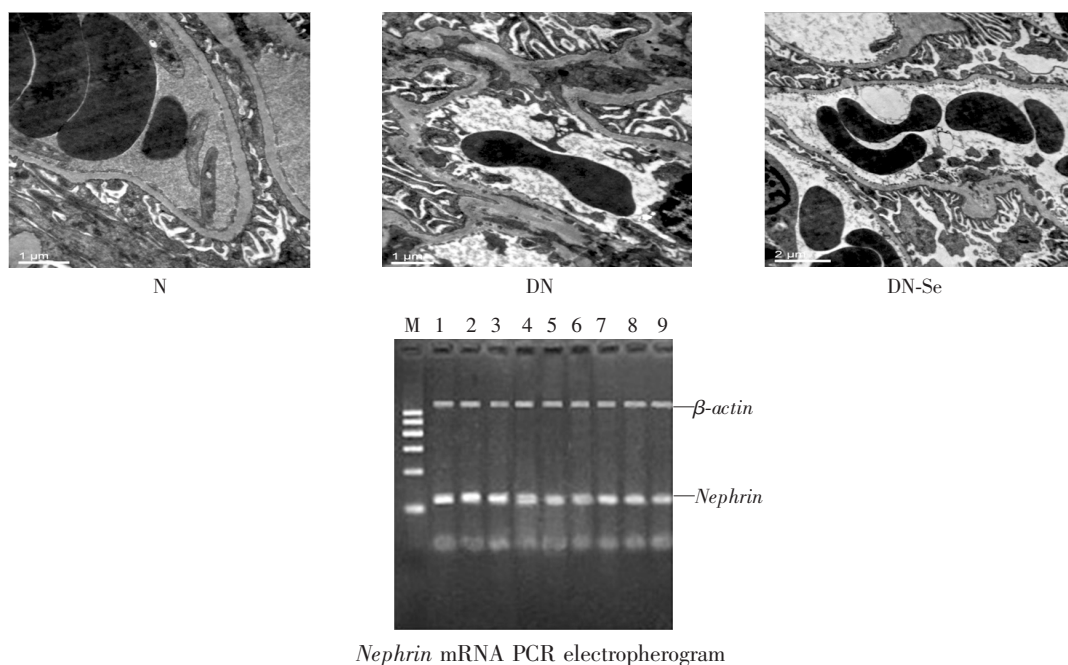


图2 肾脏组织扫描电镜图片和 *Nephrin* mRNA PCR 电泳图

Fig.2 Kindey electron microscope scanogram and *Nephrin* mRNA PCR electropherogram

M : Marker (600 , 500 , 400 , 300 , 200 , 100 bp)

1 , 2 , 3 : Group N ; 4 , 5 , 6 : Group DN ; 7 , 8 , 9 : Group DN-Se.

表2 各组大鼠肾脏 *Nephrin* mRNA 表达、蛋白表达($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 The expression of *nephrin* mRNA and *Nephrin* protein in the kindey of rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Index	N	DM	DM-Se
RT-PCR gray scale ^Δ	1.65 ± 0.14	1.28 ± 0.07*	1.40 ± 0.07**
Protein gray scale ^Δ	1.77 ± 0.34	0.85 ± 0.15*	1.32 ± 0.27**

Notes : * $P < 0.05$ vs N ; # $P < 0.05$ vs DM ; ^Δ : equal variances not assumed t -test ; N : control group ; DN : diabetic nephropathy group ; DN-Se : selenite intervention group.

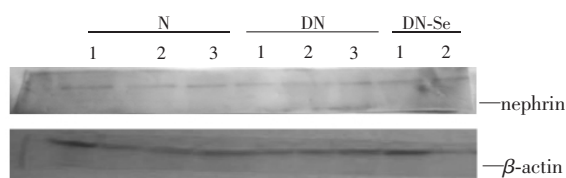


图3 *nephrin* Western blotting 蛋白表达图

Fig.3 *nephrin* Western blotting protein expression

3 讨论

硒是机体必需的微量元素之一,是谷胱甘肽过氧化物酶必需的结构成分,谷胱甘肽过氧化物酶的主要功能是清除体内过氧化物,维持膜系统的完整性. 研究显示^[5-7]给糖尿病鼠补充硒不仅可预防氧化应激,而且也可防止肾脏损伤,同时能改善葡萄糖内环境和增强外周组织胰岛素的敏感性. 有研究用低硒饮食诱导大鼠氧化应激,证明硒缺乏可使 TGF- β 1 表达增加,下调 GSH-Px 和过氧化物酶基因的表达,导致白蛋白尿和肾小

球硬化. 这些都提示在糖尿病肾病早期补充硒有延缓疾病发展的作用. 但硒具体作用的信号途径及相关因子不甚清楚.

关于 *Nephrin* 与糖尿病肾病的关系, *nephrin* 作为肾小球的滤过屏障分为 3 层,其中与清蛋白滤出增多最密切相关的是外层的足细胞及足突之间的裂隙隔膜(slit diaphragm, SD). 研究发现在糖尿病肾病早期就出现了 *nephrin* 和 *podocin* 表达的下调,并伴随着肾小球足细胞数目的减少,足突宽度的增加,随着疾病的进展更加严重. *nephrin* 和 *podocin* 的表达下调所致的足细胞的损害不仅和蛋白尿的程度有关,也与肾小球硬化症的进展和肾功能的损害有关^[8]. 目前许多研究探讨了在糖尿病肾病病程中 *nephrin* 与蛋白尿之间的关系. 而从这个角度干预 *nephrin* 的表达改善蛋白尿, *nephrin* 作为药物干预糖尿病肾病的治疗靶点值得探讨^[9]. 研究通过雌激素 17 β -雌二醇作用于糖尿病肾病,发现保护足细胞而改善了肾

脏病变是其作用途径之一^[10]。而对 nephrin 表达的调节将影响足细胞的结构和功能,进而改善糖尿病肾病。

本文检测的是在硒干预下肾脏组织 *Nephrin* 的表达变化,检测结果表明,糖尿病肾病对照组 *Nephrin* 表达水平较空白对照组明显降低。研究表明,在糖尿病肾病的起始阶段,肥大的肾小球和 nephrin 的低表达和蛋白尿密切相关^[11]。糖尿病肾病对照组大鼠出现了大量的蛋白尿,肾小球结构破坏,和 nephrin 的低表达密切相关。研究发现,在糖尿病肾病,骨形态发生蛋白-7(BMP-7) 通路活性降低,伴随着足细胞分化标记分子 WT1,突触孔蛋白(synaptopodin)和 nephrin 表达的减少,而结缔组织生长因子(CTGF)在肾小球表达显著增加。CTGF 的过表达和糖尿病肾病的足细胞分化标记分子减少有关^[12]。这可能是糖尿病肾病中 *Nephrin* 表达减少的分子机制之一,有待进一步探讨。

亚硒酸钠干预组肾脏病变较糖尿病肾病对照组减轻而 *Nephrin* 的表达明显增加。霉酚酸酯^[13] 被用于治疗改善糖尿病肾病病变。霉酚酸酯的治疗显著地增长了 nephrin 和 podocin 在肾小球的表达。霉酚酸酯能减少尿蛋白的排泄,其作用机制和部分上调了在糖尿病鼠肾小球的 nephrin 和 podocin 表达有关。亚硒酸钠可以通过上调肾小球 nephrin 的表达而减少蛋白尿,改善糖尿病肾病。蛋白激酶 C- α (PKC- α)途径是重要的细胞内信号途径,PKC- α 的激活调节了 nephrin 的表达和血管小球白蛋白的通透性^[14],进而促进了糖尿病肾病的发展。而增长的糖化血红蛋白和 *Nephrin*、VEGF 的异常表达有关,从而促进了蛋白尿和肾小球硬化的发展。增长的糖化血红蛋白是激活 PKC- α 途径的刺激因素^[15]。PKC- α 途径可能是 *Nephrin* 重要调节途径,而硒对细胞内信号途径 PKC- α 通路有抑制作用,这可能是亚硒酸钠调节 *Nephrin* 的途径之一^[16]。本研究在硒干预下延缓了肾脏病变,代谢紊乱、氧化应激症状有所改善,蛋白尿明显减少,而组织病理学和超微结构观察足细胞结构与数目得到改善,减少了肾小球内足细胞的足突增生,降低了肾脏损害。

综上所述,亚硒酸钠在糖尿病肾病早期起积极干预作用,可能和抗氧化应激、增加外周组织对胰岛素的敏感性、促进肾脏 *Nephrin* 表达有关。

Nephrin 表达水平增加又进一步改善了足细胞结

构和降低了蛋白尿水平,减轻了肾脏损害,从而改善了肾脏功能。表明亚硒酸钠和 *Nephrin* 在延缓和防治糖尿病肾病的发生发展中可能起重要作用。

参考文献(References):

- [1] OZDEMIR S, AYAZ M, CAN B, *et al.* Effect of selenite treatment on ultrastructural changes in experimental diabetic rat bones[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2005, 107(2): 167-179.
- [2] CAN B, ULUSU N N, KILINC K, *et al.* Selenium treatment protects diabetes-induced biochemical and ultrastructural alterations in liver tissue[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2005, 105(1-3): 135-150.
- [3] GERTH V E, ZHOU X, VIZE P D. nephrin expression and three-dimensional morphogenesis of the *Xenopus* pronephric glomus[J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(3): 1131-1139.
- [4] TOYODA M, SUZUKI D, UMEZONO T, *et al.* Expression of human *Nephrin* mRNA in diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(2): 380-385.
- [5] BONNEFONT-ROUSSELOT D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications[J]. *Treat Endocrinol*, 2004, 3(1): 41-52.
- [6] ERBAYRAKTAR Z, YILMAZ O, ARTMANN A T, *et al.* Effects of selenium supplementation on antioxidant defense and glucose homeostasis in experimental diabetes mellitus[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2007, 118(3): 217-226.
- [7] HWANG D, SEO S, KIM Y, *et al.* Selenium acts as an insulin-like molecule for the down-regulation of diabetic symptoms via endoplasmic reticulum stress and insulin signalling proteins in diabetes-induced non-obese diabetic mice[J]. *Biosci*, 2007, 32(4): 723-735.
- [8] CHEN L P, ZHOU Q L, PENG W S, *et al.* Changes of podocyte ultrastructure and expression of podocyte-associated molecules in rats with diabetic nephropathy[J]. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, 2007, 32(4): 620-625.
- [9] BENIGNI A, GAGLIARDINI E, TOMASONI S, *et al.* Selective impairment of gene expression and assembly of *Nephrin* in human diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(6): 2193-2200.
- [10] CATANUTO P, DOUBLIER S, LUPA E, *et al.* 17 beta-estradiol and tamoxifen upregulate estrogen receptor beta expression and control podocyte signaling pathways in a model of type 2 diabetes[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(11): 1194-201.
- [11] ZHANG Z, ZHANG Y, NING G, *et al.* Combination therapy with ATI blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(41): 15896-15901.
- [12] TURK T, LEEUWIS J W, GRAY J, *et al.* BMP signaling and podocyte markers are decreased in human diabetic nephropathy in association with CTGF overexpression[J]. *Histochem Cytochem*, 2009, 10: 1369.
- [13] WU Y, DONG J, YUAN L, *et al.* nephrin and podocin loss is prevented by mycophenolate mofetil in early experimental diabetic nephropathy[J]. *Cytokine*, 2008, 44(1): 85-91.
- [14] MENNE J, MEIER M, PARK J K, *et al.* *Nephrin* loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling *in vivo*[J]. *Kidney Int*, 2006, 70(8): 1456-1462.
- [15] COHEN M P, CHEN S, ZIYADEH F N, *et al.* Evidence linking glycated albumin to altered glomerular *Nephrin* and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(4): 1554-1561.
- [16] GOPEE N V, JOHNSON V J, SHARMA R P, *et al.* Sodium selenite-induced apoptosis in murine B-lymphoma cells is associated with inhibition of protein kinase C-delta, nuclear factor kappaB, and inhibitor of apoptosis protein[J]. *Toxicol Sci*, 2004, 78(2): 204-214.