

血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂对糖尿病肾病大鼠肾小球内 12-脂氧合酶活性及 P 钙黏蛋白表达的影响

王婉宁 李佳 马福哲 孙韬 孙珉丹 许钟镐

【摘要】 目的 探讨血管紧张素 II (Ang II) 1 型受体拮抗剂 (ARB) 对 2 型糖尿病肾病 (DN) 大鼠肾小球内 12-脂氧合酶 (12-LO) 活性及 P 钙黏蛋白 (P-cadherin) 表达的影响。方法 用 10^{-7} mol/L Ang II 处理足细胞 24 h。采用皮下包埋的微型渗透泵给雄性 SD 大鼠分别持续恒速注入 12-LO 代谢产物 12 羟二十烷四烯酸 [12(S)-HETE, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$] 和 Ang II ($400 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) 1 周和 2 周。使用高脂饮食结合小剂量链脲菌素 (STZ) 诱导 2 型糖尿病模型, 大鼠模型成功后随机分为 2 组: DN 组和 ARB ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 洛沙坦) 组。以规律正常饮食大鼠作为对照组。6 周后处死大鼠, 收集尿、血液, 提取肾脏, 用系列过筛方法分离肾小球。采用 ELISA、RT-PCR 和 Western 印迹法分别检测相关指标。结果 Ang II 的直接刺激可以诱导足细胞及肾小球内 12(S)-HETE 含量增高 ($P < 0.01$)。12(S)-HETE 刺激使大鼠肾小球内 Ang II 含量增高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, DN 组血糖 ($P < 0.01$)、肾质量/体质量 ($P < 0.01$) 和 24 h 尿白蛋白明显增高 ($P < 0.01$), 但洛沙坦治疗后尿白蛋白 ($P < 0.05$)、肾质量/体质量 ($P < 0.05$) 明显低于 DN 组。与对照组比较, DN 组肾小球内 12(S)-HETE 含量明显增高 ($P < 0.01$), P-cadherin mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), 但洛沙坦治疗后肾小球内 12(S)-HETE 含量明显低于 DN 组 ($P < 0.05$), P-cadherin mRNA 和蛋白表达明显高于 DN 组 ($P < 0.05$)。结论 Ang II 通过激活 12-LO 诱导肾小球内 P-cadherin 的表达下调。ARB 通过抑制 12-LO 活性而上调 DN 肾小球内 P-cadherin 表达, 从而延缓 DN 的进展。

【关键词】 血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂; 糖尿病肾病; 脂氧合酶; 血管紧张素 II; 钙黏着糖蛋白类

Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on the 12-lipoxygenase activity and P-cadherin expression in type 2 diabetic rat glomeruli WANG Wan-ning, LI Jia, MA Fu-zhe, SUN Tao, SUN Min-dan, XU Zhong-gao. Department of Nephrology, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China

Corresponding author: XU Zhong-gao, Email: xuzgkidney@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of angiotensin II (Ang II) type 1 receptor blocker (ARB) on 12-lipoxygenase (12-LO) activity and P-cadherin expression in type 2 diabetic rat glomeruli. **Methods** Podocytes were stimulated by 10^{-7} mol/L Ang II for 24 hours. 12(S)-HETE ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Ang II ($400 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) were infused to rats by osmotic mini-pump for 1 week and 2 weeks respectively. Rats fed with high fat diet received low dose streptozotocin (STZ) to make

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.03.010

基金项目: 国家自然科学基金 (81070578, 81270809); 吉林大学科学前沿与交叉学科创新项目 (200903056)

作者单位: 130021 长春, 吉林大学白求恩第一医院肾病内科

通信作者: 许钟镐, Email: xuzgkidney@yahoo.com.cn

type 2 diabetes and divided into 2 groups: low dose STZ (DN group), low dose STZ + ARB treatment (Losartan group). Rats fed with regular chow were used as control group. All the rats were sacrificed after 6 weeks. Urine, blood, kidney cortical tissue and isolated glomeruli by sieving method were collected at the end of study respectively. ELISA, RT-PCR and Western blotting for related target were performed respectively. **Results** Ang II increased 12(S)-HETE levels in podocytes and glomeruli (all $P < 0.01$). Ang II levels in the glomeruli were significantly increased by 12(S)-HETE stimulation ($P < 0.01$). Blood glucose, kidney/body weight and 24 hour urinary protein were increased in DN group compared with that in control group (all $P < 0.01$). However, urine protein, Kidney/body weight were decreased in Losartan group compared with DN group (all $P < 0.05$). Increment of 12(S)-HETE content and decrement of P-cadherin expression were observed in DN glomeruli compared with that in control group (all $P < 0.01$). These abnormalities were prevented by administration of the losartan (all $P < 0.05$).

Conclusions Ang II can down-regulate glomerular P-cadherin expression via activation of 12-LO. ARB can ameliorate the progression of DN via up-regulation of glomerular P-cadherin through inhibition of 12-LO activation in type 2 DN rats.

【Key words】 Angiotensin II type 1 receptor blockers; Diabetic nephropathies; Lipoygenase; Angiotensin II; Cadherin

糖尿病肾病(DN)蛋白尿的发生、发展与白细胞型 12-脂氧合酶(12-LO)的表达增加密切关系^[1-4]。蛋白尿的形成与足细胞裂孔膜跨膜蛋白的变化有关。已发现的足细胞裂孔膜跨膜蛋白主要由 nephrin 和 P 钙黏蛋白(P-cadherin)组成。现有研究证明, DN 时足细胞 nephrin 表达降低与蛋白尿密切关系^[5-7], 而 P-cadherin 的损伤可导致非 nephrin 或 NEPH1 依赖的蛋白尿^[7]。值得引起注意的是, 近期的研究发现抑制 12-LO 活性可以调控足细胞裂孔膜跨膜蛋白 P-cadherin 的表达而延缓 DN 蛋白尿^[8], 而抑制肾素-血管紧张素系统同样可以有效地延缓 DN 蛋白尿进展。本研究探讨 2 型 DN 时血管紧张素 II (Ang II) 1 型受体拮抗剂 (ARB) 洛沙坦对肾小球内 12-LO 活性及足细胞裂孔膜上的跨膜蛋白 P-cadherin 的影响, 为通过抑制 Ang II -12-LO 作用途径来延缓 DN 蛋白尿提供理论依据。

材料和方法

1. 主要试剂: P-cadherin、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz), 12-LO 代谢产物 12 羟二十烷四烯酸 [12(S)-HETE, 美国 Biomol], Ang II ELISA 试剂盒(美国 Adlitteram Diagnostic), RPMI-1640、抗生素、小牛血清(美国 Gibco), Alzet Model 1002 微型渗透泵(美国 Durect), I 型胶原、 γ -IFN、Ang II、链脲菌素(STZ)(美国 Sigma), 12(S)-HETE ELISA 试剂

盒(美国 Assay Designs), 尿白蛋白 ELISA 试剂盒(美国 Exocell), RNA STAT-60 试剂(美国 Tel-Test), RT-PCR 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTP(德国 Boehringer Mannheim GmbH)。

2. 细胞实验: 条件永生性小鼠足细胞培养方法参考文献[9]。将液氮中冻存的足细胞迅速取出, 于 37℃ 水浴中摇晃, 使之在 1 min 内迅速溶解, 以减少细胞复苏过程中的损伤。在超净台上, 将细胞移入 5 ml 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中, 1200 r/min 离心 5 min, 倾去含 DMSO 的上清。加入含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液 5 ml, 轻柔吹打至细胞呈单个, 将其移入培养瓶。加入 50 U/ml γ -IFN, 放入 33℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 天更换 1 次培养液。待细胞长满 70% ~ 80% 时将细胞培养瓶中的培养液倾去, 用 PBS 轻柔洗涤细胞两次, 弃掉洗涤液, 加入 0.25% 胰蛋白酶 2 ml, 轻轻摇动培养瓶, 使胰蛋白酶均匀覆盖细胞表面。置 37℃ 培养箱中消化 2 ~ 5 min, 直至在倒置显微镜下细胞回缩变圆, 甚至有些细胞从瓶底脱落, 立即用 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液终止消化, 用吸管反复吹打瓶壁上的细胞。将含细胞的培养液移入离心管中, 1200 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入含 10% FBS, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液 5 ml, 轻柔吹打至细胞呈单个, 视细胞密度以 1:2 或 1:3 分瓶培养。将传代的足细胞移入不含 γ -IFN 的培养液中, 于 37℃、5% CO₂

培养箱中,待其分化 10~14 d,细胞生长至亚融合状态时,更换为无血清培养液使细胞同步化 48 h。根据前期的剂量和时间依赖性预实验结果,最终用 Ang II (10^{-7} mol/L)处理足细胞 24 h,然后收集的细胞和上清液保管在 -70°C 冰箱。

3. 动物实验: (1) 雄性 SD 大鼠 16 只,体质量 180~200 g,适应性喂养 1 周后随机分为对照组($n=8$,输注乙醇胺)和 12(S)-HETE 组($n=8$,输注 12(S)-HETE $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,乙醇胺溶剂)。两组大鼠均在无菌条件下用如下的外科手术方法植入微量渗透泵 1 枚:用乙醚轻度麻醉大鼠,然后俯卧于无菌操作台上,在大鼠背部切开 1 厘米横向切口,用止血钳进行纵向钝性分离皮下组织后纵向植入渗透泵,缝合切口。微型渗透泵持续恒速注射 12(S)-HETE 或溶剂(对照组)7 d,之后处死大鼠,提取肾小球冻存于 -70°C 备用。(2) 雄性 SD 大鼠 16 只,体质量 180~200 g,适应性喂养 1 周后随机分为对照组($n=8$,输注乙醇胺)和 Ang II 组($n=8$,输注 Ang II $400\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,乙醇胺溶剂)。微量渗透泵植入方法如上述。微型渗透泵持续恒速注射 Ang II 或溶剂(对照组)14 d,之后处死大鼠,提取肾小球冻存于 -70°C 备用。(3) 雄性 SD 大鼠 35 只,体质量 180~200 g,适应性喂养 1 周后随机分为对照组($n=10$)、糖尿病肾病组(DN, $n=12$)和 ARB 组($n=13$):2 型糖尿病模型的制备参考文献[10-11],喂食按配方配制的高脂肪颗粒饲料,5 个星期后,给予低剂量 STZ (35 mg/kg);对照组喂食普通饲料,自由饮水。STZ 注射 48 h 后大鼠尾静脉采血测血糖,以血糖浓度 $>16.7\text{ mmol/L}$ 确定为模型成功,未达到标准的大鼠被排除实验。糖尿病模型诱导成功后分为两组: DN 组($n=12$)和 ARB 组($n=13$,给予洛沙坦, $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 溶于蒸馏水灌胃)。对照组和 DN 组大鼠给予等量蒸馏水灌胃。根据前期的预实验结果制定了用药剂量和实验时间。6 周后处死大鼠,测血糖、称重,乙醚麻醉小鼠,心脏取血,取出右肾称重,于实验结束前留取 24 h 尿测 24 h 尿白蛋白量,采用系列过筛方法分离肾小球,在 -70°C 保存。

4. RT-PCR: 用 RNA STAT-60 试剂一步法提取细胞的总 RNA。用 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA。P-cadherin 引物正义链 5'-AACTTCACCGG

GGACTAGAG-3', 反义链 5'-GTCAAACACCAGCAGGGAGT-3', 扩增产物长度 194 bp; GAPDH 引物正义链 5'-GACAAGATGGTGAAGGTCGG-3', 反义链 5'-CATGGACTGTGGTCATGAGC-3', 扩增产物长度 538 bp。取 $10\text{ }\mu\text{l}$ cDNA 产物进行 PCR 扩增,反应体积为 $50\text{ }\mu\text{l}$,用 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ dNTP、 1.25 U Taq 聚合物、 2 mmol/L MgCl_2 、上游和下游引物各 50 pmol ,反应条件: 95°C 预变性 3 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min,共循环 35 次,最后 72°C 延伸 7 min。将各个 PCR 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)中电泳,于紫外线下拍照,将胶片上反应条带在图像分析仪中扫描进行半定量。

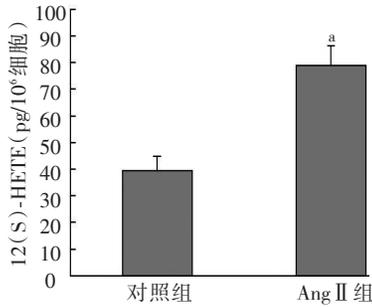
5. Western 印迹: 取出冰冻肾小球,加入组织蛋白裂解液,超声碎裂后提取蛋白,测定蛋白浓度。取 $50\text{ }\mu\text{g}$ 样本蛋白,加样本处理液,煮沸 5 min, 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。半干板转移槽转移至 PVDF 膜上,丽春红染液染色观察蛋白转移情况。5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 分别加 P-cadherin (1:1000) 及 β -actin (1:3000) 抗体进行杂交。 4°C 过夜, TBST 洗膜 $3\times 10\text{ min}$, 加二抗 (1:2000) 进行杂交,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 $3\times 10\text{ min}$, ECL 发光剂显色并曝光成像。利用图像分析系统扫描确定 X 线片上条带的相对吸光度值。

6. ELISA 分析: 严格按试剂盒说明书操作。根据制备的标准曲线计算样本浓度,然后用测量出样本浓度除样本总蛋白浓度,计算出样本每单位蛋白中 12(S)-HETE 及 Ang II 的含量。

7. 统计学处理: 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,两组以上比较采用方差分析检验。采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

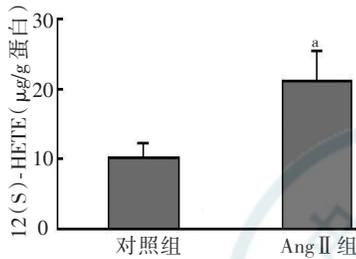
结 果

1. Ang II 对足细胞和肾小球内 12(S)-HETE 含量的影响: 用 Ang II 直接刺激足细胞 24 h 后,细胞培养上清液中 12(S)-HETE 含量显著高于对照组 ($P < 0.01$), 见图 1。利用皮下包埋的微型渗透泵给大鼠输注 Ang II 14 d 后, Ang II 组肾小球内 12(S)-HETE 含量显著高于对照组 ($P < 0.01$), 见图 2。



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

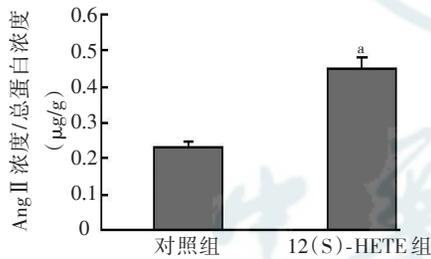
图1 Ang II 对足细胞分泌 12(S)-HETE 水平的影响(ELISA)



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

图2 Ang II 对大鼠肾小球内 12(S)-HETE 含量的影响(ELISA)

2. 12(S)-HETE 对大鼠肾小球内 Ang II 含量的影响: 12(S)-HETE 组大鼠肾小球内 Ang II 含量显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 3。



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

图3 12(S)-HETE 对大鼠肾小球内 Ang II 含量的影响(ELISA)

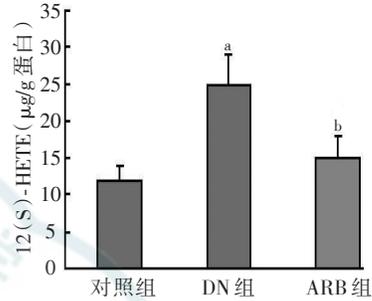
3. 各组大鼠的一般情况: DN 组大鼠血糖、肾质量/体质量和 24 h 尿白蛋白量显著高于对照组 (均 $P < 0.01$), 而洛沙坦治疗后尿白蛋白 ($P < 0.05$)、肾质量/体质量 ($P < 0.05$) 显著低于 DN 组, 见表 1。

4. 洛沙坦对 DN 大鼠肾小球内 12(S)-HETE 含量的影响: DN 组大鼠肾小球内 12(S)-HETE 含量显著高于对照组 ($P < 0.01$), 但洛沙坦治疗后肾小球内 12(S)-HETE 含量显著低于 DN 组 ($P < 0.05$), 见图 4。

表 1 各组大鼠各指标变化情况($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	DN 组	ARB 组
血糖 (mmol/L)	5.56±0.27	18.30±0.53 ^a	18.39±0.64 ^a
肾质量/体质量(mg/g)	3.12±0.26	4.88±0.36 ^a	3.61±0.28 ^b
尿白蛋白量(mg/d)	0.31±0.03	1.51±0.14 ^a	0.74±0.06 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 DN 组比较,^b $P < 0.05$



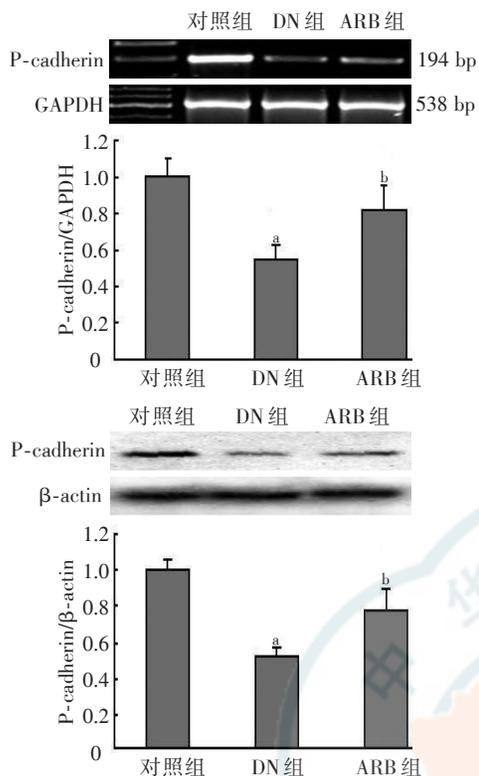
注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 DN 组比较,^b $P < 0.05$

图4 各组大鼠肾小球内 12(S)-HETE 含量变化(ELISA)

5. 洛沙坦对 DN 大鼠肾小球内 P-cadherin 表达的影响: DN 组大鼠肾小球内 P-cadherin mRNA 和蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.01$), 而洛沙坦能够增加 DN 大鼠肾小球内 P-cadherin mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$), 见图 5。

讨论

12-LO 是一种不饱和脂肪酸的氧合酶, 它以花生四烯酸为基质生成相应的氢化二十碳四烯酸 12(S)-HETE。目前已证实 12-LO 及其代谢产物 12(S)-HETE 主要通过氧化应激和炎症反应参与 DN 的发生发展^[1-4]。而肾素-血管紧张素系统的激活在 DN 的发生、发展过程中亦起着至关重要的作用。Ang II 与肾小球滤过屏障正常结构破坏和(或)功能损伤有着十分密切的关系。众所周知, Ang II 通过与 Ang II 1 型受体结合发挥作用, 导致血管收缩, 引起蛋白尿、肾小球硬化, 最终导致肾衰竭, 而使用 ARB 能有效地减轻肾病尿蛋白的漏出, 延缓病情的发展。众多实验研究均证实 1 型和 2 型 DN 时肾小球内 Ang II 的含量均增加, Ang II 通过压力依赖性和非压力依赖性过程引起蛋白尿^[12-13]。研究发现用 Ang II 刺激肾小球细胞可以激活 12-LO 活性^[3-4, 14], 而 ARB 可降低肾



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与DN组比较,^b $P < 0.05$

图5 各组大鼠肾小球内P-cadherin表达变化 (RT-PCR和Western印迹)

组织12-LO活性并延缓蛋白尿的进展^[15]。然而, DN时通过抑制Ang II-12-LO作用途径延缓蛋白尿的机制还不十分清楚。

有研究证实,P-cadherin在高糖刺激的足细胞和早期DN肾小球内的表达降低^[7]。最近,Xu等^[15]利用已公认的高脂饮食结合小剂量STZ诱导的2型糖尿病动物模型,证实了抑制12-LO可以延缓2型糖尿病大鼠蛋白尿的进展,其主要机制是12-LO通过调节P-cadherin的表达而影响DN蛋白尿的进展。近期的研究已证实12(S)-HETE的直接刺激可以诱导大鼠肾小球内P-cadherin蛋白表达降低^[8],且Ang II可激活12-LO活性^[3-4,14],因此我们假设DN时用ARB阻断Ang II的作用可以上调P-cadherin蛋白表达,从而降低蛋白尿。我们采用洛沙坦来处理DN大鼠,并观察蛋白尿、肾小球内12(S)-HETE含量及P-cadherin蛋白表达,结果发现,DN组血糖、肾质量/体质量和24 h尿白蛋白量显著高于对照组,但洛沙坦治疗后尿白蛋白、肾质量/体质量显著低于DN组,由此证明洛沙坦治疗DN有效;而与对照组比较,DN组肾小球内12(S)-HETE含量增高,P-cadherin蛋白表达降低,

此结果间接地证实12(S)-HETE的刺激诱导P-cadherin蛋白表达下调的可能性。然而,用洛沙坦治疗后肾小球内12(S)-HETE含量显著低于DN组,肾小球内P-cadherin蛋白表达显著高于DN组。这些结果提示用洛沙坦阻断Ang II的作用能够抑制12-LO活性,从而提高P-cadherin表达而延缓DN蛋白尿进展。

有研究表明,足细胞裂孔膜上的跨膜蛋白P-cadherin的损伤可能导致蛋白尿^[7]。近期的研究证实Ang II直接刺激可以诱导肾小球内P-cadherin的表达降低,12-LO通过调节P-cadherin的表达而影响DN蛋白尿的进展^[8]。本研究结果提示,利用洛沙坦抑制12-LO活性,可以阻止DN肾小球内P-cadherin的损伤。为了阐明Ang II对足细胞及肾小球内12-LO活性的直接作用,本研究不仅采用Ang II直接刺激足细胞,而且利用微型渗透泵给大鼠持续恒速注入Ang II,观察足细胞及肾小球内12-LO的代谢产物12(S)-HETE含量,结果证实,与对照组比较,Ang II的直接刺激可以诱导足细胞及肾小球内12(S)-HETE含量增高,从而证明了Ang II可以直接激活足细胞及肾小球内12-LO活性的假设,为Ang II通过激活12-LO活性诱导DN肾小球内P-cadherin的表达下调的结论提供了理论依据。值得引起注意的是,本研究发现采用微型渗透泵持续恒速注入12(S)-HETE刺激的大鼠肾小球内Ang II含量明显增高,从而为利用ARB来阻止12-LO与Ang II之间的相互协同作用提供线索。

总之,Ang II通过激活12-LO诱导DN肾小球内P-cadherin的表达下调。因此,利用ARB来抑制12-LO活性,从而上调DN肾小球内P-cadherin的表达对延缓DN蛋白尿的进展具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Yuan H, Lanting L, Xu ZG, et al. Effects of cholesterol-tagged small interfering RNAs targeting 12/15-lipoxygenase on parameters of diabetic nephropathy in a mouse model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295: F605-F617.
- [2] Kang SW, Natarajan R, Shahed A, et al. Role of 12-lipoxygenase in the stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase and collagen alpha5 (IV) in experimental diabetic nephropathy and in glucose-stimulated podocytes. *J*

- Am Soc Nephrol, 2003, 14: 3178-3187.
- [3] Reddy MA, Adler SG, Kim YS, et al. Interaction of MAPK and 12 - lipoxygenase pathways in growth and matrix protein expression in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283: F985-F994.
- [4] Kim YS, Xu ZG, Reddy MA, et al. Novel interactions between TGF- β 1 actions and the 12/15 - lipoxygenase pathway in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 352-362.
- [5] Doublrier S, Salvidio G, Lupia E, et al. Nephron expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycosylated albumin and angiotensin II. *Diabetes*, 2003, 52: 1023-1030.
- [6] Liu G, Kaw B, Kurfi J, et al. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*, 2003, 112: 209-221.
- [7] Xu ZG, Ryu DR, Yoo TH, et al. P-Cadherin is decreased in diabetic glomeruli and in glucose-stimulated podocytes in vivo and in vitro studies. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20: 524-531.
- [8] Guo QY, Miao LN, Xu ZG, et al. Role of 12-lipoxygenase in decreasing P - cadherin and increasing angiotensin II type 1 receptor expression according to glomerular sizes in type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300: E708-E716.
- [9] Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res*, 1997, 236: 248-258.
- [10] Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 2002, 106: 987-992.
- [11] Danda RS, Habiba NM, Rincon - Choles H, et al. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes. *Kidney Int*, 2005, 68: 2562-2571.
- [12] Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, et al. Renin - angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*, 2003, 86: S64-S70.
- [13] Hoffmann S, Podlich D, Hahnel B, et al. Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 1475-1487.
- [14] Kim YS, Reddy MA, Lanting L, et al. Differential behavior of mesangial cells derived from 12/15 - lipoxygenase knockout mice relative to control mice. *Kidney Int*, 2003, 64: 1702-1714.
- [15] Xu ZG, Lanting L, Vaziri ND, et al. Upregulation of angiotensin II type 1 receptor, inflammatory mediators and enzymes of arachidonate metabolism in obese Zucker rat kidney: reversal by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Circulation*, 2005, 111: 1962-1969.

(收稿日期:2012-10-28)

(本文编辑:杨克魁)

· 读者·作者·编者 ·

本刊对如何鉴定重复发表论文的声明

近年来,学术论文主要研究内容重复发表的现象越来越多。这里说的重复发表指的是将同一研究的课题的结果总结成多篇论文,先后投寄到多个杂志发表的现象。在我们日常的来稿中,有一部分论文属于这种情况。国外学者将这种稿件成为“腊肠切片”(salami slicing),而国内学者将这类论文叫做“变相重复发表”。实际上这也是属于一稿多投的一种。本刊结合国内外学者及专家的意见,将“重复发表”稿件定义为(1)作者单位相同,或大部分作者相同,包括第一作者相同或者不同、作者排名顺序相同或者不同;(2)主要的研究方法相同;(3)半数以上内容(包括资料或讨论部分)相同;(4)结论类似。

本刊对上述这类论文均作退稿处理。在此提醒作者,如您所投的稿件与以前刊出的文章可能被认为是重复发表时要加以说明,以便本编辑部正确判断和处理。

本刊编辑部