DOI:10.16016/j.1000-5404.201607038

Slit2/Robo1 信号通路蛋白在早期糖尿病肾病肾小球中的表达及临床意义

刘军辉,唐璐瑶,侯世会,官 涛,张 均,黄云剑 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 探讨早期糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)肾小球中 Slit2 和 Robo1 的表达与肾小球内皮细胞增生的关系及临床意义。**方法** 收集符合 Tervaert's 糖尿病肾病病理分型Ⅰ~Ⅱa 期,患者 24 h 尿蛋白 >30 mg 且 <500 mg,肾小球滤过率(estimate glomerular filtration rate, eGFR) >90 mL/(min·1.73 m^2)等纳入标准的 19 例 2 型糖尿病 DN 标本,以及 15 例正常肾组织手术标本,采用 HE 染色、PAS 染色和电镜观察 DN 肾小球组织形态结构的变化,免疫组化检测 Slit2、Robo1 和血管内皮细胞标记物 CD31 在肾小球中的表达,分析 DN 肾小球中 Slit2 和 Robo1 与 CD31 表达的相关性,以及 Slit2、Robo1 和 CD31 的表达与 24 h 尿蛋白以及 eGFR 的相关性。**结果** 早期 DN 存在肾小球肥大、系膜基质轻度增多、基底膜增厚、毛细血管扩张、血管内皮细胞增大和增多等典型早期 DN 病理特征。Slit2 表达于肾小球血管内皮、肾小管上皮和系膜细胞区域;Robo1 表达于肾小球血管内皮、肾小管上皮和足细胞区域。与正常肾组织相比,早期 DN 肾小球中 CD31 的表达水平显著增高。早期 DN 肾小球中 Slit2 和 Robo1 的表达较正常肾组织也显著性增高($P<0.01$)。相关性分析显示,早期 DN 肾小球中 Slit2 和 Robo1 的表达与 CD31 表达呈显著正相关($r=0.73$, $P<0.01$; $r=0.72$, $P<0.01$);早期 DN 肾小球中 Slit2、Robo1 和 CD31 表达与 eGFR 呈显著正相关($r=0.78$, $P<0.01$; $r=0.81$, $P<0.01$; $r=0.57$, $P<0.05$);早期 DN 肾小球中 Slit2、Robo1 和 CD31 表达与 24 h 尿蛋白也呈显著正相关($r=0.46$, $P<0.05$; $r=0.49$, $P<0.05$; $r=0.47$, $P<0.05$)。**结论** Slit2/Robo1 信号通路可能通过参与早期 DN 肾小球内皮细胞增生促进病理性血管生成,从而加速蛋白尿的进展。

[关键词] 糖尿病肾病;肾小球内皮细胞;血管生成;Slit2;Robo1;CD31
[中图法分类号] R363.21;R587.2;R692 [文献标志码] A

Expression and significance of Slit2/Robo1 signaling pathway in glomeruli of early diabetic nephropathy

Liu Junhui, Tang Luyao, Hou Shihui, Guan Tao, Zhang Jun, Huang Yunjian (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of Slit2/Robo1 and its relationship with the proliferation of glomerular endothelial cells in the patients with early diabetic nephropathy (DN), and evaluate the clinical significance of the signal pathway. **Methods** Renal tissues of 19 patients with early DN [at classes Ⅰ~Ⅱa of Tervaert's classification, 24-h urinary albumin excretion between 30 and 500 mg, estimated glomerular filtration rate (eGFR) >90 mL/(min·1.73 m^2)] were collected, and another 15 normal renal tissues were also harvested as control. HE staining, PAS staining and electron microscopy were used to observe the glomerular morphology of the obtained tissues. Immunohistochemical staining was employed to detect the expression of Slit2, Robo1 and CD31 in the glomerular specimens, and then the correlation of the expression of Slit2 and Robo1 with CD31 was analyzed, and the correlation of their expression with 24-h urinary albumin excretion and eGFR was also analyzed. **Results** Pathological observation displayed that typical morphological features of early DN, including glomerular hypertrophy, slightly expanded mesangial matrix, thickened glomerular basement membrane, telangiectasia, and enlarged

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370821);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC 2013jjB10023)
[通信作者] 黄云剑,E-mail:yun81@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160926.0918.005.html

and increased vascular endothelial cells were seen in the DN group. Slit2 was expressed in the vascular endothelial cells, tubule epithelial cells and mesangial cells. Robo1 was expressed in the vascular endothelial cells, tubule epithelial cells and podocyte cells. CD31 was highly expressed in the renal tissues from the DN patients than the non-diabetic control. The expression levels of Slit2 and Robo1 were also strongly expressed in the DN group than the non-diabetic control ($P<0.01$). The Slit2 or Robo1 expression was positively correlated with that of CD31 in the DN ($r=0.73$, $P<0.01$; $r=0.72$, $P<0.01$), and the expression levels of Slit2, Robo1 and CD31 were positively correlated with DN patients' eGFR ($r=0.78$, $P<0.01$; $r=0.81$, $P<0.01$; $r=0.57$, $P<0.05$) and with DN patients' 24-h urinary albumin excretion ($r=0.46$, $P<0.05$; $r=0.49$, $P<0.05$; $r=0.47$, $P<0.05$). **Conclusion** Slit2/Robo1 signaling pathway may promote pathological angiogenesis in early DN by participating in the proliferation of glomerular endothelial cells, and then accelerate the progression of urinary protein.

[**Key words**] diabetic nephropathy; glomerular endothelial cells; angiogenesis; Slit2; Robo1; CD31

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81370821) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jjB10023).
Corresponding author: Huang Yunjian, E-mail: yun81@sina.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病微血管病变的主要并发症之一。早期糖尿病肾病血管病变主要表现为病理性血管新生,而新生血管结构和功能不成熟,表现为内皮通透性增加、血浆蛋白外渗,进而出现系膜基质增多、血管腔狭窄、纤维帽和微动脉的玻璃样变等 DN 特征性的改变。目前,糖尿病肾病肾脏出现异常血管新生的发病机制仍然不完全清楚。已知 DN 肾小球肥大、内皮高通透性、内皮一氧化氮合成酶(eNOS)低表达、尿蛋白增多与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)高表达密切相关[1]。体外实验也证实 VEGF 能促进内皮细胞增生、迁移和内皮成管[2]。动物实验研究显示抗 VEGF 治疗会缓解和改善 DN 病理变化[3],说明抗血管新生可能对早期 DN 治疗有帮助。然而抗 VEGF 治疗也会带来许多不良副作用,如微血管堵塞、高血压和蛋白尿的发生[4],因此需要深入研究高糖条件下血管新生的调控机制,找到治疗 DN 血管新生的新策略。

近年 Slit2/Robo1 信号通路在血管新生的调节作用开始得到广泛关注[5-6]。Slit2 主要表达于血管内皮细胞和平滑肌细胞,相对分子质量约为 200×10^3。Slit2 通过不同的 Robo 受体调节内皮细胞多样的生物学表现[7]。Robo 家族是一类单通道的跨膜受体,在哺乳动物中包括 4 个成员:Robo1、Robo2、Robo3 和 Robo4。Robo1 和 Robo4 均可表达于血管内皮细胞和平滑肌细胞,且更容易与 Slit2 配体结合。研究表明 Slit2/Robo1 信号通路参与糖尿病视网膜血管新生[8],但是否也参与早期 DN 肾脏的血管生成尚少见报道。因此,本研究通过检测正常和早期 DN 肾组织中的 Slit2、Robo1 和血管内皮细胞标记物 CD31 的表达变化,结合相应临床生化检测指标,探讨 Slit2/Robo1 信号通路在早期 DN 肾小球血管新生中的作用及其可能的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2011 年 9 月至 2016 年 1 月本科收治的 2 型糖尿病 DN 患者的临床资料和病理肾活检标本,依据 Mogensen's 糖尿病肾病临床分型[9],结合 2010 年 Tervaert's 糖尿病肾病病理分型标准[10],将糖尿病患者 24 h 尿蛋白 >30 mg 且 <500 mg,肾活检镜下肾小球系膜轻度增生,系膜增生面积小于毛细血管袢腔面积的(相当于 Tervaert's 糖尿病肾病病理分型Ⅱa 期),肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate,eGFR)>90 mL/(min·1.73 m^2),纳入为早期糖尿病肾病患者。共筛选早期 DN 患者 19 例,其中男性 14 例,女性 5 例,年龄(49.9±7.2)岁,发现糖尿病时间平均 4.2 年,有不规则口服降糖药物治疗史。取 15 例肾癌患者癌旁正常组织(对照组),其中男性 9 例,女性 6 例,年龄(48.1±9.3)岁。早期 DN 组及对照组均排除合并其他肾脏疾病。本研究通过本院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 临床及实验数据

临床数据和肾脏病理资料均为患者在我院初次确诊为 DN 时的临床资料和肾活检结果。临床数据包括性别、年龄和发现糖尿病时间;生化检测指标包括糖化血红蛋白(HbA1c)、血尿素氮、血肌酐水平及 24 h 尿蛋白量,估算 eGFR 根据 Kong 等[11]提出的适合中国人群 eGFR 估算公式进行计算。

1.3 主要试剂

人 Slit2、Robo1 和 CD31 兔多克隆抗体均购自 Proteintech 公司,PV-6000 免疫组化试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,

HE 染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,PAS 染色试剂盒购自索莱宝科技有限公司。

1.4 肾组织 HE 染色、PAS 染色和电镜拍照

4 μm 肾组织石蜡切片进行 HE 染色和 PAS 染色,实验步骤依据试剂盒说明书进行。进行透射电镜样品制备的肾组织,2.5% 戊二醛固定后交电镜室进行后续固定、漂洗、脱水、包埋、固化、超薄切片及铀-铅双重染色,最后 JEM-1400 Plus 透射电镜观察并拍照。

1.5 免疫组化学检测 Slit2、Robo1 和 CD31 的表达

免疫组化依据试剂盒说明书进行操作,二抗由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。阴性对照以 PBS 代替一抗,其他操作步骤同前。切片染色成功后在光学显微镜下观察并拍照,每张切片随机选取 5 个高倍镜视野(×400)的肾小球,使用 Image-Pro Plus 6.0 彩色图像分析处理系统对 Slit2、Robo1 和 CD31 在肾小球中的表达(不包括肾小球囊壁)用累积光密度值(IOD)进行半定量分析,取平均值反映样本指标的表达量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 t 检验或秩和检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例的临床特点

对照组和早期 DN 组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。早期 DN 组患者发现糖尿病最短 1 年,最长 14 年,平均 4.2 年。早期 DN 组糖化血红蛋白和 24 h 尿蛋白均显著性高于对照组($P<0.05$);尿素氮两组差异无统计学意义($P>0.05$);早期 DN 组血肌酐略低于正常对照组,而 eGFR 略高于对照组,差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2.2 光镜和电镜观察早期 DN 患者肾小球形态结构的变化

HE 染色结果显示早期 DN 肾小球肥大,肾小球毛细血管扩张;PAS 染色结果显示早期 DN 组肾小球肥大,肾小球系膜轻度增生;透射电镜检测结果显示早期 DN 组肾小球基底膜增厚,内皮细胞增大以及数量相对增多(图 1,表 2)。

表 1 两组临床及实验数据比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	糖化血红蛋白(%)	尿蛋白(mg/24 h)	尿素氮(mmol/L)	血肌酐(μmol/L)	eGFR[mL/(min·1.73 m^2)]
对照组	15	48.1±9.3	5.34±0.42	17.94±5.48	5.33±1.40	70.69±8.91	100.08±12.36
早期 DN 组	19	49.9±7.2	7.53±0.89[a]	236.27±92.63[a]	5.31±1.32	62.32±10.83	108.03±10.89

a:$P<0.05$,与对照组比较

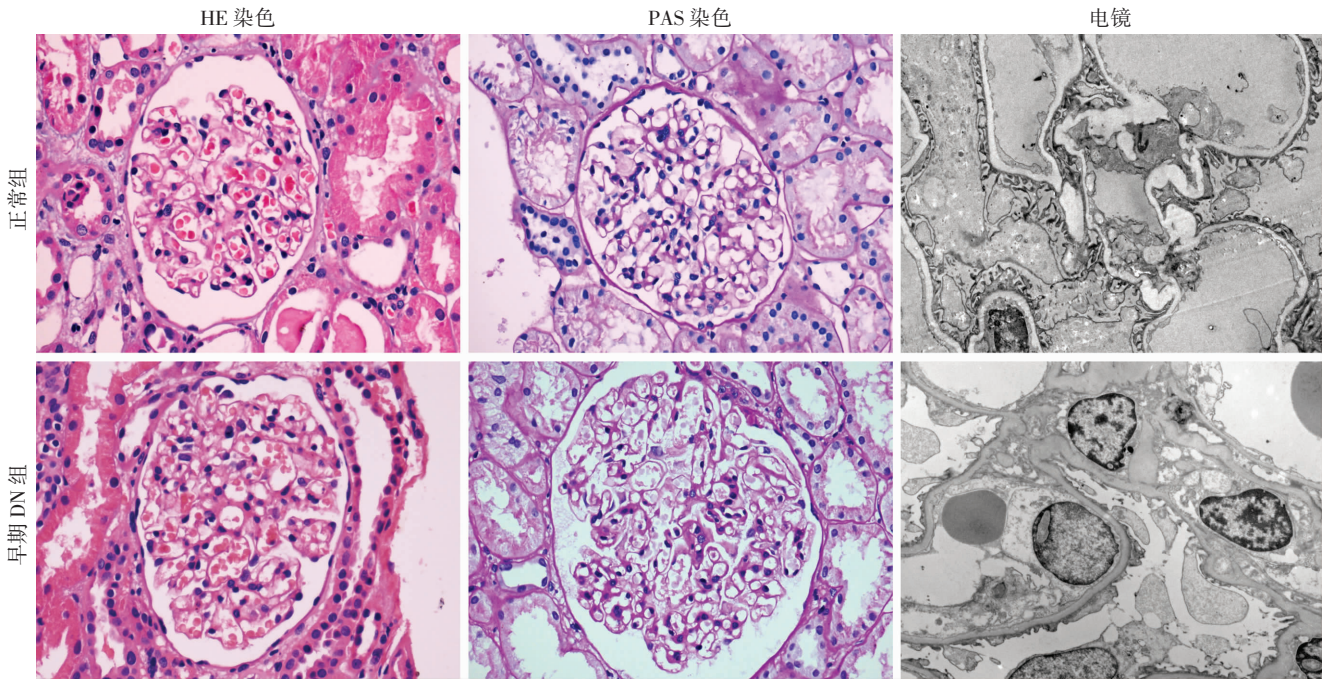


图 1 两组肾小球组织形态学变化 (HE×400,PAS×400,×8 000)

表 2　两组肾小球形态结构的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肾小球直径(μm)	肾小球系膜增生指数评分	肾小球基底膜厚度(nm)	肾小球单个血管腔内皮细胞个数
对照组	15	198.93 ±25.16	0.37 ±0.10	323.45 ±44.63	0.93 ±0.11
早期 DN 组	19	288.35 ±33.18[a]	2.85 ±0.92[a]	508.16 ±45.09[a]	1.95 ±0.24[a]

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.3　2 组肾小球组织中 Slit2、Robo1 和 CD31 的表达

免疫组化结果显示,Slit2 表达于肾小球血管内皮、肾小管上皮和系膜细胞区域;Robo1 受体表达于肾小球血管内皮、肾小管上皮和足细胞区域;CD31 表达于肾小球血管内皮。与正常组相比,早期 DN 组肾小球中 Slit2、Robo1 和 CD31 的表达都显著性增高($P<0.01$,图 2,表 3)。

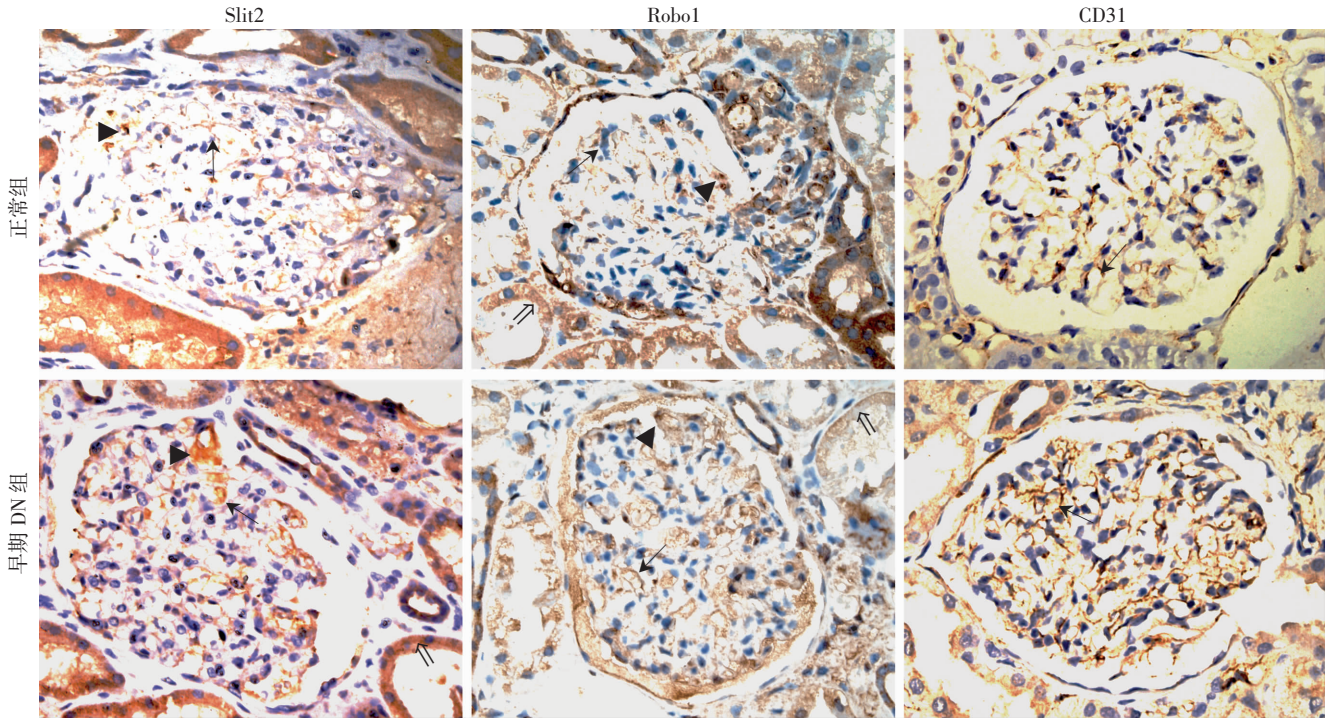
表 3　半定量分析两组肾小球中 Slit2、Robo1 和 CD31 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Slit2	Robo1	CD31
对照组	15	6 853.02 ±1 535.97	6 665.84 ±1 799.75	17 942.57 ±2 257.39
早期 DN 组	19	20 169.25 ±3 302.96[a]	17 985.63 ±2 325.46[a]	46 088.12 ±5 399.36[a]

a: $P<0.01$,与对照组比较

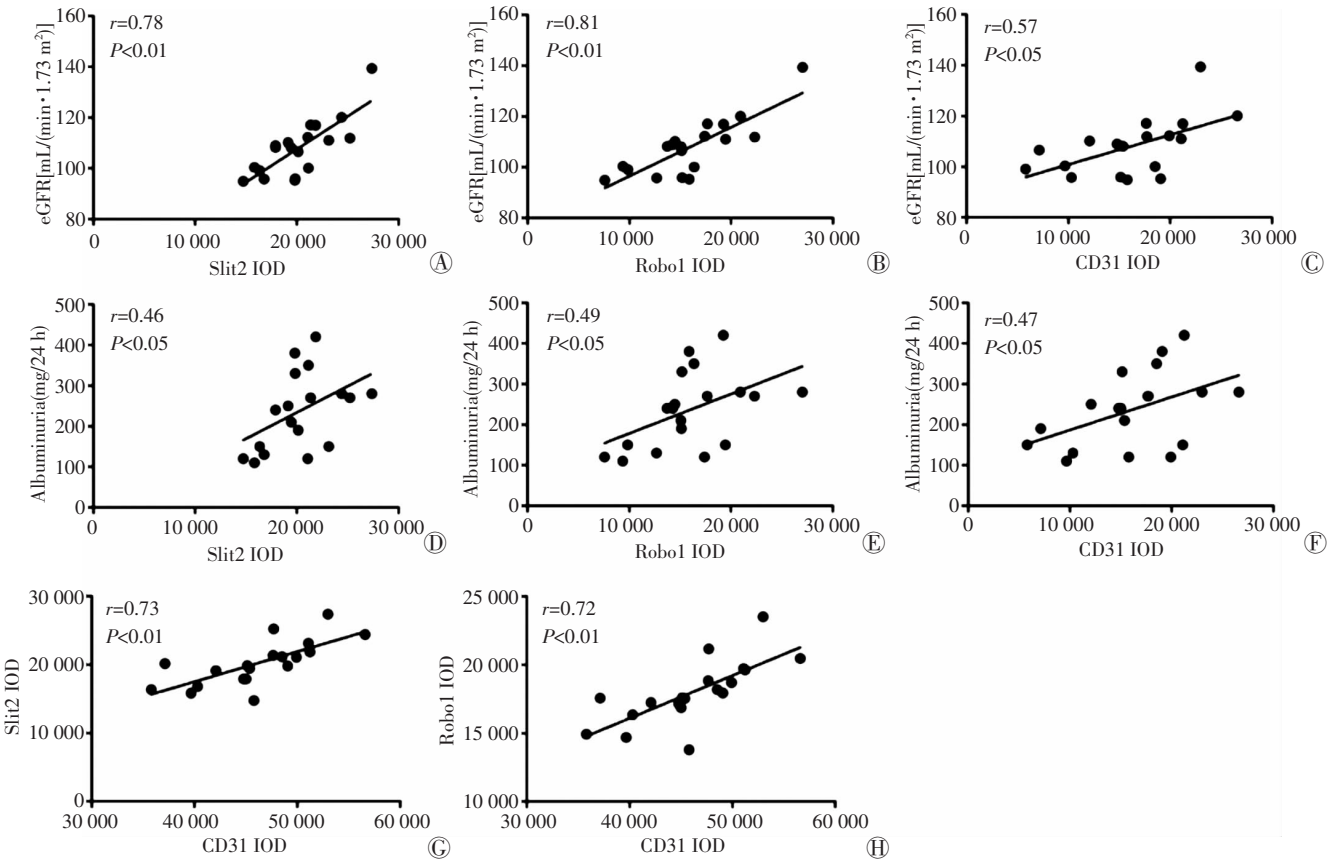
2.4　早期 DN 组肾小球 Slit2/Robo1 表达、CD31 表达、24 h 尿蛋白以及 eGFR 的相关性分析

相关性分析结果(图 3)显示,早期 DN 组肾小球中 Slit2 和 Robo1 的表达与血管内皮细胞标记物 CD31 表达呈正相关($r=0.73$,$P<0.01$;$r=0.72$,$P<0.01$),提示 Slit2/Robo1 信号通路可能参与了早期 DN 肾小球血管内皮细胞增生;早期 DN 组肾小球中 Slit2、Robo1 和 CD31 表达与 eGFR 呈正相关($r=0.78$,$P<0.01$;$r=0.81$,$P<0.01$;$r=0.57$,$P<0.05$),提示 Slit2 和 Robo1 表达增高发生在早期 DN 高 eGFR 时期,CD31 表达增高反映血管内皮细胞增生并可能促进血管新生从而增加 eGFR;早期 DN 肾小球中 Slit2、Robo1 和 CD31 表达与 24 h 尿蛋白也呈正相关($r=0.46$,$P<0.05$;$r=0.49$,$P<0.05$;$r=0.47$,$P<0.05$),提示 Slit2/Robo1 信号通路可能通过参与血管内皮增生促进病理性血管生成,从而促进蛋白尿的进展。



单箭头示内皮细胞区域,双箭头示肾小管上皮区域,Slit2 图中短箭头示系膜细胞区域,Robo1 图中短箭头示足细胞区域

图 2　两组肾小球组织中 Slit2、Robo1 和 CD31 的表达　(×400)



A~C:分别表示 Slit2、Robo1 和 CD31 在早期 DN 组肾小球中的表达与 DN 患者 eGFR 的相关性;D~F:分别表示 Slit2、Robo1 和 CD31 在早期 DN 组肾小球中的表达与 DN 患者 24 h 尿蛋白的相关性;G~H:分别表示 Slit2 和 Robo1 在早期 DN 组肾小球中的表达与 CD31 表达的相关性

图 3 两组肾小球 Slit2/Robo1 表达、CD31 表达、24 h 尿蛋白以及 eGFR 相关性分析

3 讨论

通常早期 DN 的定义是指 Mogensen 等[9] 1983 年发布的 DN 分期的第 3 期,又称“持续微量白蛋白尿期”,即尿蛋白排泄率为 15~300 μg/min,此期 eGFR 仍然超过正常水平,患者血压可轻度升高。Mogensen 将 24 h 尿蛋白定量 >0.5 g 的患者分到第 4 期,即显性糖尿病肾病期(overt diabetic nephropathy)。由于该分期是针对 1 型糖尿病肾病所作分期,部分标准并不完全适合 2 型糖尿病肾病的情况,存在诸多不足。以尿蛋白为主要标准进行分期可能会导致一些已经出现 eGFR 降低、尿蛋白不高的 2 型糖尿病肾病患者分入早期糖尿病肾病,从而影响患者的治疗和对预后的判断。尽管这样,2014 年我国糖尿病肾病防治指南中 2 型糖尿病肾病临床分期[12] 仍然是参照 Mogensen 的分期,并未提出准确的定义。随着近年肾活检技术的开展和进步,2010 年 2 月美国肾脏病杂志发表了糖尿病肾病病理的 Tervaert[10] 分型标准,为 DN 的临床诊断和研究提供了标准化的依据,该分型方案优点是对 1 和 2 型DN 均适用,而且建立了量化的标准,如Ⅰ期 DN 肾小球基底膜厚度男性(年龄≥9 岁)>430 nm,女性(年龄≥9 岁)>395 nm;Ⅱa 期轻度系膜基质增生 >25% 观察的系膜区等量化标准。但该分型仅提出病理分级标准,未提及临床表现和尿蛋白水平。为此,我们结合上述二个经典分期标准,将 Tervaert 分型Ⅱa 期和 24 h 尿蛋白 >30 mg 且 <500 mg,同时 eGFR >90 mL/(min·1.73 m^2),并排除有其他肾脏疾病的糖尿病患者纳为早期 DN 患者。纳入标准包括部分 Mogensen 4 期(24 h 尿蛋白 <500 mg)患者和 Tervaert 分型Ⅱa 期以下患者,既包括 Mogensen 以尿蛋白分级原则也体现了 Tervaert 分型对早期 DN 的分级原则。入组的 19 例早期 DN 患者,年龄(49.9±7.2)岁,2 组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。发现糖尿病时间平均 4.2 年。早期 DN 组的糖化血红蛋白显著性高于对照组,说明患者血糖水平控制不佳。早期 DN 组血肌酐略低于对照组,而 eGFR 略高于对照组,差异均无统计学意义

($P>0.05$),早期 DN 组患者尿蛋白水平(236.27 ± 92.63) mg/24 h, < 300 μg/min,说明入组患者符合 Mogensen 糖尿病肾病早期临床分型。

Tervaert 分型方案也增加了血管损伤分级,如动脉血管玻璃样变,无计 0 分,一个动脉玻璃样变计 1 分,超过 1 个计 2 分;内膜增厚,无计 0 分,内膜增厚未超过膜厚度计 1 分,超过计 2 分。该血管分级评分对判断慢性 DN 患者的预后和蛋白尿发生的程度很有帮助,但未提出早期 DN 血管损伤更详细的分级标准,因此,需要更深入研究早期 DN 血管损伤的病理特点和发生机制。本研究采用 HE 染色、PAS 染色和透射电镜观察发现早期 DN 肾小球相对肥大、系膜基质轻度增生、基底膜增厚、毛细血管扩张、血管内皮细胞体积增大和数目增多,这些结果与动物和人早期 DN 肾小球病理改变基本一致[13-14]。同时,CD31 染色结果显示早期 DN 组 CD31 的表达也明显高于对照组,这意味着早期 DN 肾脏存在血管内皮增生,而内皮增生是血管生成的一个关键环节,这意味着早期 DN 可能存在血管新生[15]。早期 DN 新生血管结构和功能不成熟,存在肾小球内皮高通透性,进而出现持续微量白蛋白尿、系膜基质增多、动脉玻璃样变等 DN 特征性改变[16]。DN 血管新生与 VEGF 的活性和表达增高有关[1],但 VEGF 增多的刺激因素多,因此,寻找高糖血管损伤病变的启动因素仍然需要更多的研究。

我们前期研究[17]了 ROBO4/ARF6 信号通路蛋白在人糖尿病肾病肾小球中的表达变化,发现 DN 肾小球内皮细胞存在低表达 Robo4,提示内皮细胞高通透性和微量白蛋白尿的发生与 Robo4 表达下降有关。Robo4 是 Robo 家族中具有血管稳定作用的跨膜蛋白,配体 Slit2 通过 Robo4 信号途径可抑制内皮增殖、迁移和成管等血管新生作用,而经 Robo1 途径与 Robo4 途径作用刚好相反。因此,需要进一步观察 Robo1 和上游配体 Slit2 的表达变化,以便全面了解 Slit2/Robo 系统在 DN 的作用。已经发现 Slit2/Robo1 信号通路参与了不同的生理和病理条件下的血管新生。如 Sli2/Robo1 信号通路活化参与了心脏管型形成[18]、视网膜血管新生[19]、病理性肿瘤血管生成[20]和糖尿病视网膜血管新生[8]等。但该信号通路是否参与了早期 DN 病理性血管新生仍不清楚,本研究免疫组化结果显示,Slit2 表达于肾小球血管内皮、肾小管上皮和系膜细胞区域;Robo1 受体表达于肾小球血管内皮、肾小管上皮和足细胞区域,提示 Slit2/Robo1 信号通路蛋白可能广泛参与肾脏细胞的信号调控。早期 DN 组中 Slit2 与 Robo1 的表达显著性高于对照组,相关分析显示 Slit2 与 Robo1 的表达与 CD31 表达成显著正相关,说明 Slit2/Robo1 信号通路在早期 DN 肾小球中被激活,有可能参与了病理性血管内皮增生和血管新生。

近年研究认为早期 DN 出现微量蛋白尿与异常血管新生有关联[21],因此我们分析了早期 DN 组中 CD31 的表达与 24 h 尿蛋白的相关性,结果发现 CD31 与 24 h 尿蛋白正相关,意味着血管内皮增生可能促进了蛋白尿的进展。分析 Slit2 和 Robo1 表达与 24 h 尿蛋白的相关性发现其也与尿蛋白呈正相关,由此推测 Slit2/Robo1 信号通路可能通过促进早期 DN 肾小球血管内皮增生从而促进血管新生并加速蛋白尿的进展。结合我们前期研究 Robo4 在 DN 表达的结果,我们认为早期 DN 可能存在高表达的 Slit2、高表达的 Robo1 和低表达的 Robo4,Robo1-Robo4 平衡失衡,Robo4 负反馈机制缺失,由此产生由 Slit2/Robo1 途径活化参与的血管新生和肾小球高通透性等病理生理结果,但这仅仅是推测,需要进一步体外实验研究证实。

总之,本实验证实 Slit2/Robo1 信号通路在早期 DN 肾小球中被激活,Slit2 和 Robo1 表达与肾小球血管内皮标记物 CD31 的表达显著正相关,与 24 h 尿蛋白和 eGFR 正相关,这些结果提示该信号通路可能参与了早期 DN 肾小球血管内皮增生并促进血管新生,阻断 Slit2/Robo1 信号通路有可能成为治疗早期 DN 病理性血管新生的新策略。

参考文献:

[1] Nakagawa T, Sato W, Kosugi T, *et al*. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2013, 2013: 184539. DOI: 10.1155/2013/184539

[2] Sun T, Cao H, Xu L, *et al*. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 mediates VEGF-induced proliferation, migration and tube formation of retinal endothelial cells[J]. Curr Eye Res, 2011, 36(4): 341-349. DOI: 10.3109/02713683.2010.545498

[3] 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. DOI: 10.2174/138945011793591581

[4] Machado F G, Kuriki P S, Fujihara C K, *et al*. Chronic VEGF blockade worsens glomerular injury in the remnant kidney model[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39580. DOI: 10.1371/journal.pone.0039580

[5] Li S, Huang L, Sun Y, *et al*. Slit2 Promotes Angiogenic Activity *via* the Robo1-VEGFR2-ERK1/2 Pathway in Both *In Vivo* and *In Vitro* Studies[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(9): 5210-5217. DOI: 10.1167/iovs-14-16184

[6] 张明慧, 周希瑗. 腺病毒介导 slit2 基因转染人视网膜色素上皮细胞对 RF/6A 细胞迁移及管腔形成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015(16): 1619-1623. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411197

[7] Yang Y C, Chen P N, Wang S Y, *et al*. The differential roles of Slit2-exon 15 splicing variants in angiogenesis and HUVEC permeability[J]. Angiogenesis, 2015, 18(3): 301-312. DOI: 10.1007/s10456-015-9467-4

[8] Zhou W, Yu W, Xie W, *et al*. The role of SLIT-ROBO signaling in proliferative diabetic retinopathy and retinal pigment epithelial cells[J]. Mol Vis, 2011, 17: 1526-1536.

[9] Mogensen C E, Christensen C K, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 1983, 32 Suppl 2: 64-78. DOI: 10.2337/diab.32.2.S64

[10] Tervaert T W, Mooyaart A L, Amann K, *et al*. Pathologic classification of diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(4): 556-563. DOI: 10.1681/ASN.2010010010

[11] Kong X, Ma Y, Chen J, *et al*. Evaluation of the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation for estimating glomerular filtration rate in the Chinese population[J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28(3): 641-651. DOI: 10.1093/ndt/gfs491

[12] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 糖尿病肾病防治专家共识(2014 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(11): 792-801. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2014.11.004

[13] Dessapt-Baradez C, Woolf A S, White K E, *et al*. Targeted glomerular angiopoietin-1 therapy for early diabetic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(1): 33-42. DOI: 10.1681/ASN.2012121218

[14] Najafian B, Alpers C E, Fogo A B. Pathology of human diabetic nephropathy[J]. Contrib Nephrol, 2011, 170: 36-47. DOI: 10.1159/000324942

[15] Tian S, Tang J, Liu H, *et al*. Propyl gallate plays a nephroprotective role in early stage of diabetic nephropathy associated with suppression of glomerular endothelial cell proliferation and angiogenesis[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 209567. DOI: 10.1155/2012/209567

[16] Nakagawa T, Kosugi T, Haneda M, *et al*. Abnormal angiogenesis in diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2009, 58(7): 1471-1478. DOI: 10.2337/db09-0119

[17] 官涛, 郑科, 刘军辉, 等. ROBO4/ARF6 信号通路在糖尿病肾病患者肾小球组织的表达及意义[J]. 解放军医学杂志, 2016(04): 267-272. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2016.04

[18] Fish J E, Wythe J D, Xiao T, *et al*. A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish[J]. Development, 2011, 138(7): 1409-1419. DOI: 10.1242/dev.060046

[19] Rama N, Dubrac A, Mathivet T, *et al*. Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization[J]. Nat Med, 2015, 21(5): 483-491. DOI: 10.1038/nm.3849

[20] Ao J Y, Chai Z T, Zhang Y Y, *et al*. Robo1 promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma through the Rho family of guanosine triphosphatases´signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2015, 36(11): 8413-8424. DOI: 10.1007/s13277-015-3601-1

[21] Zhang B H, Wang W, Wang H, *et al*. Promoting effects of the adipokine, apelin, on diabetic nephropathy[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60457. DOI: 10.1371/journal.pone.0060457

(**收稿**:2016-07-05;**修回**:2016-09-21)

(编辑 龙 亮)