

二甲双胍对 2 型糖尿病模型大鼠肾组织 nephrin 表达的影响

翟丽敏¹, 叶山东¹, 顾俊菲¹, 杨迪¹, 胡闻²

摘要 目的 观察不同剂量二甲双胍(MET)对 2 型糖尿病(T2DM)模型大鼠肾组织 nephrin 表达的影响,了解其对肾小球足细胞的保护作用。方法 高脂饲料喂养结合腹腔注射小剂量链脲佐菌素(STZ)建立 T2DM 大鼠模型,给予不同剂量[150、300、500 mg/(kg·d)]MET 干预治疗(MET1 组、MET2 组、MET3 组),并设立糖尿病模型组(T2DM 组)和正常对照组(NC 组)。8 周后,观察各组大鼠血糖(BG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、尿素氮(BUN)、尿白蛋白和尿 nephrin 排泄的情况以及肾脏组织病理改变和 nephrin 表达的变化。结果 8 周末,MET 三组 BG、HbA1c、尿白蛋白/尿肌酐(UACR)、基底膜厚度(GBMT)和足突融合率(FRFP)明显低于 T2DM 组,高于 NC 组($P < 0.05$);MET2、MET3 组低于 MET1 组($P < 0.05$)。MET 组血 BUN、尿 nephrin/尿肌酐(UNER)低于 T2DM 组($P < 0.05$),MET3 与 MET1 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。MET 组肾组织 nephrin 蛋白和 mRNA 表达较 T2DM 组显著升高($P < 0.05$),但是低于 NC 组

($P < 0.05$);各 MET 组间 nephrin 蛋白表达差异无统计学意义,MET3 组 nephrin mRNA 表达高于 MET1 组($P < 0.05$)。

结论 MET 可减轻 T2DM 模型大鼠肾组织 nephrin 表达的减少和保护足细胞,并有一定的剂量依赖性。

关键词 2 型糖尿病;糖尿病;二甲双胍;nephrin;足细胞

中图分类号 R 977.15;R 587.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1228-05

二甲双胍(metformin,MET)是治疗 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)的一线首选药物,除降糖作用以外,还可通过抑制炎症反应、抗氧化应激和改善胰岛素抵抗和脂质代谢等机制预防和延缓糖尿病肾病的发生和进展^[1],但确切机制尚不清楚。nephrin 是构成肾小球裂孔膜的主要构架分子,其参与足细胞的信号传导并维持足细胞的形态。该实验观察不同剂量 MET 对 T2DM 大鼠肾组织 nephrin 的表达及经尿排泄的影响,旨在探讨不同剂量 MET 对 T2DM 模型大鼠足细胞的保护作用及其与剂量的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 45 只,雄性 2 月

2015-04-29 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M159);安徽高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2011A157)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹内分泌科、²病理科,合肥 230001

作者简介:翟丽敏,女,硕士研究生;

叶山东,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: ysd196406@163.com

Acrp30(100 ng/ml) was selected to add into the cells after culturing for some hours, the morphological changes, migration and autophagy level were quantified by invert microscope, wound-healing assay and Western blot respectively. The total apoptotic rate of added Acrp30 and pretreated with an autophagy inhibitor 3-methyladenine aggravated (MA) groups were analyzed by flow cytometry. **Results** ① Compared with the control group, the viability of 50, 100 ng/ml cultured 72 h and 200 ng/ml cultured 48, 72 h groups were lower($P < 0.05$); ② Compared with the control group, the migration lengths of Acrp30 added group 48, 72 h were decreased ($P < 0.01$); ③ The level of autophagy (autophagy associated protein LC3B-II/LC3B-I) was up-regulated after Acrp30 added group cultured 24, 48 h compared with the control group($P < 0.05$, $P < 0.01$), but the ratio was reduced along with time after 72 h, it had no difference with the control; ④ The apoptotic rate of MCF-7 cells increased after 48 h, 72 h treated with 100 ng/ml Acrp30 and pretreated with MA groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$) compared with the control group. Furthermore, the 72 h apoptotic rate of (Acrp30 + MA) group was increased compared with Acrp30 group ($P < 0.05$).

Conclusion Acrp30 can inhibit the growth and migration of MCF-7 cells and induce the autophagy and apoptosis. Inhibit autophagy can promote the apoptosis which induced by adiponectin in MCF-7 cells.

Key words adiponectin; MCF-7 cell; proliferation; autophagy; apoptosis

龄,由安徽医科大学实验动物中心提供。实验期间,室温控制在 $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度48%,12 h交替照明,大鼠自由进食饮水。

1.1.2 药物和试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);MET(上海施贵宝公司);肌酐、尿素氮试剂盒(南京建成科技公司);三酰甘油(triacylglycerol, TG)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL-C)试剂盒(北京北化康泰公司);白蛋白放射免疫试剂盒(天津市协和公司);尿nephlin ELISA试剂盒(上海艾来萨生物科技有限公司);胰岛素放射免疫试剂盒(北京原子高科公司);TRIzol、PCR试剂盒及引物合成(大连TaKaRa公司)。

1.1.3 主要仪器设备 DS-5型糖化血红蛋白检测仪(英国DREW公司);DFM-96型10管放射免疫计数仪(安徽合肥众成机电公司);DG-3022A型酶联免疫检测仪(江苏南京国营华东电子管厂);ND1000紫外/分光光度仪(美国Nano-Drop公司)。

1.2 方法

1.2.1 T2DM大鼠模型的制备 普通雄性SD大鼠45只随机分成两组:正常对照组(NC组, $n=8$),喂以常规饲料;模型组(DM组, $n=37$),喂以高脂饲料(常规饲料加10%猪油、2%胆固醇)。高脂喂养1个月后,测空腹血糖(fasting peripheral blood glucose, FBG)及血浆胰岛素水平(fasting insulin, FINS),并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-Ir) [$\text{HOMA-Ir} = (\text{FBG} \times \text{FINS}) / 22.5$]。予腹腔内一次性注射STZ 30 mg/kg(溶解于新鲜配制的0.1 mmol/L枸橼酸缓冲液中, pH4.4)。NC组动物注射等量枸橼酸缓冲液。1周后测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L伴胰岛素抵抗为T2DM大鼠成模标准。

1.2.2 动物分组及给药方法 共有32只大鼠造模成功。再随机分成糖尿病模型组(T2DM组, $n=9$), MET治疗组(MET1, $n=8$; MET2, $n=8$; MET3, $n=7$)大鼠,分别每日给予MET [150、300、500 mg/(kg·d)],每日清晨灌胃,高脂饲料,共8周。

1.2.3 标本的留取 干预治疗后8周末,以代谢笼收集12 h尿液,准确计量,混匀后留尿液5 ml,混匀置于 -40°C 冰箱待测尿白蛋白、尿nephlin和尿肌酐。留取尿标本后,各组大鼠在10%的水合氯醛腹腔注射麻醉下行腹主动脉插管留取血标本待测血糖(blood glucose, BG)、糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、

FINS、TG和LDL-C;取出双肾组织经生理盐水反复灌洗去除包膜,右肾部分组织于液氮下保存,留做Real-Time PCR,其余用来观察肾脏病理变化。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 生化指标的检测 尿白蛋白采用放射免疫分析法,尿nephlin采用ELISA法,尿肌酐采用苦味酸比色法,血尿素氮采用尿酶法。酶法检测TG,选择性沉淀法检测LDL-C。尿白蛋白排泄和尿nephlin分别采用其与尿肌酐的比值表示,以排除尿液稀释的影响,简称为尿白蛋白肌酐比[urinary albumin/urine creatinine, UACR]和尿nephlin肌酐比[urinary nephlin/urine creatinine, UNER]。

1.3.2 免疫组化检测肾组织nephlin蛋白表达 石蜡切片脱蜡水化,微波抗原修复,滴加免抗大鼠nephlin(1:200) 4 $^\circ\text{C}$ 过夜, PBS洗,再滴加生物素标记的羊抗兔二抗,室温孵育30 min。二甲胺基偶氮苯显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,中性树胶封固。每张切片取3个视野($\times 400$)拍照,全自动图像分析系统(Image pro plus 6.0)对图像中的阳性反应部位测定累积光密度(integral optical density, IOD)及相应面积,取每张切片阳性物质的相对含量。

1.3.3 电镜处理 透射电镜取1 mm³肾皮质小块,2.5%戊二醛固定,制作超薄切片,超薄切片在10 000倍下采集10个视野,随机测量8处肾小球基底膜厚度(glomerular basement membrane thickness, GBMT)取平均值,测出基底膜上融合足突的总长度/基底膜的总长度为足突融合率(food process fusion ratio, FRFP),镜下观察肾小球足细胞及基底膜变化。

1.3.4 Real-Time PCR检测肾组织nephlin mRNA表达 TRIzol法提取肾组织RNA,取2 μg 总RNA进行逆转录,产物cDNA进行Real-Time PCR。nephlin引物序列上游:5'-CTGAACCTGGACGACATGGAGA-3',下游:5'-AGCCTGGGATAGCTTGGCTTG-3'; β -actin引物序列上游:5'-GCCTTAGCCTGGACCCATAG-3',下游:5'-GACCACCAATCCACACAGA-3'。使用ABI7500型扩增仪,20 μl 反应体系荧光染料法,95 $^\circ\text{C}$ 预变性30 s;95 $^\circ\text{C}$ 变性5 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火34 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸1 min的热循环40次;95 $^\circ\text{C}$ 15 s、60 $^\circ\text{C}$ 1 min及95 $^\circ\text{C}$ 15 s循环1次。内参和目的片段分别同批扩增,每组设置3个复孔,采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法分析Ct值 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示目的基因mRNA表达的拷贝数与 β -actin拷贝数之比。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 方差齐性数据采用单因素方差分析进行组间比较, 采用 SNK 检验进行两两比较, 方差不具有齐性者用 Dunnett's T3 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠一般生化指标比较 8 周末, 各糖尿病组大鼠的血 BG、HbA1c、BUN、UNER、UACR、TG、LDL-C 和 FINS 水平明显高于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 T2DM 组比较, MET 组上述指标明显降低 ($P < 0.05$); MET 组间 BG、HbA1c、BUN、UNER 和 UACR 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠 UNER 和 UACR 比较 与 NC 组比较, 各糖尿病组大鼠 UNER 和 UACR 明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 T2DM 组比较, 各剂量 MET 组 UNER 和 UACR 显著降低 ($P < 0.05$); MET3 组低于 MET1 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 各组大鼠肾组织 nephrin 蛋白表达的变化 免疫组化结果以 nephrin 阳性反应部位 IOD 显示, NC 组肾组织 nephrin 表达最多, 其余各组表达水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MET 各组与

T2DM 组比较, nephrin 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$), 但 MET 三组间 nephrin IOD 差异无统计学意义。见表 2、图 1。

2.4 各组大鼠肾组织 nephrin mRNA 表达的变化

T2DM 组肾组织 nephrin mRNA 表达较 NC 组明显降低 ($P < 0.05$), MET 组肾组织 nephrin mRNA 表达明显高于 T2DM 组, MET3 组肾组织 nephrin mRNA 表达量明显高于 MET1 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.5 各组大鼠肾组织病理变化 电镜下可见: NC 组肾脏结构清晰, GBMT 厚薄均匀, 基本无足突融合; T2DM 组 GBMT 明显增厚, 与 NC 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 足突融合, 结构模糊不清, FRFP 达 80%; MET1 组与 NC 组相比, GBMT 明显增厚 ($P < 0.05$), 足突仍有明显融合, 约 60%; MET2 组 GBMT 较 T2DM 组、MET1 明显减低 ($P < 0.05$), FRFP 约 50%; MET3 组 GBMT 增厚及足突融合均明显改善, 与 T2DM 组及 MET1 组存在差异有统计学意义 ($P < 0.05$), FRFP $< 30\%$ 。见表 2、图 2。

3 讨论

长期高血糖是糖尿病肾病的基本原因, 肾小球足细胞功能障碍和结构异常在糖尿病肾小球硬化和蛋白尿的发生中起重要作用。nephrin 是构成肾小

表 1 8 周各组大鼠生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	NC 组 (n=8)	T2DM 组 (n=9)	MET1 组 (n=8)	MET2 组 (n=8)	MET3 组 (n=7)
BG (mmol/L)	4.45 ± 1.07	15.6 ± 1.56 [*]	14.44 ± 0.70 [*]	11.75 ± 0.98 ^{* #△}	10.58 ± 1.03 ^{* #△}
HbA1c (%)	4.13 ± 0.89	12.41 ± 0.61 [*]	11.57 ± 0.38 [*]	8.78 ± 0.32 ^{* #△}	8.24 ± 0.33 ^{* #△}
FINS (mU/L)	17.53 ± 3.42	28.16 ± 4.98 [*]	25.24 ± 3.80 [*]	22.08 ± 2.61 ^{* #}	21.55 ± 2.29 ^{* #}
BUN (mmol/L)	6.91 ± 2.52	18.95 ± 0.98 [*]	13.23 ± 2.20 ^{* #}	11.30 ± 2.02 ^{* #}	10.27 ± 1.15 ^{* #△}
UACR (mg/g)	0.25 ± 0.66	2.86 ± 0.10 [*]	2.39 ± 0.17 ^{* #}	1.80 ± 0.08 ^{* #△}	1.37 ± 0.17 ^{* #△}
UNER (ng/g)	96.49 ± 7.59	678.77 ± 34.27 [*]	400.0 ± 43.90 ^{* #}	371.13 ± 33.42 ^{* #}	320.55 ± 40.20 ^{* #△}
TG (mmol/L)	0.58 ± 0.19	1.80 ± 0.19 [*]	1.38 ± 0.29 ^{* #}	1.19 ± 0.41 ^{* #}	1.01 ± 0.08 ^{* #}
LDL-C (mmol/L)	0.54 ± 0.19	1.46 ± 0.35 [*]	0.97 ± 0.11 ^{* #}	0.96 ± 0.08 ^{* #}	0.94 ± 0.08 ^{* #}

与 NC 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 T2DM 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 MET1 组比较: [△] $P < 0.05$

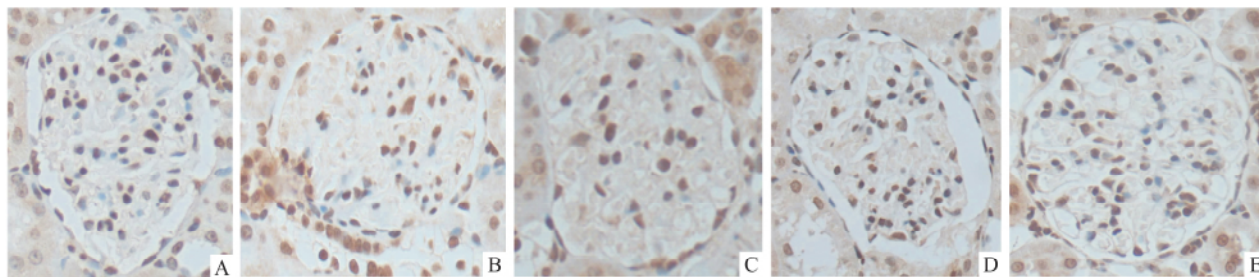


图 1 各组大鼠肾组织 nephrin 蛋白表达 免疫组化 ×400

A: NC 组; B: T2DM 组; C: MET1 组; D: MET2 组; E: MET3 组

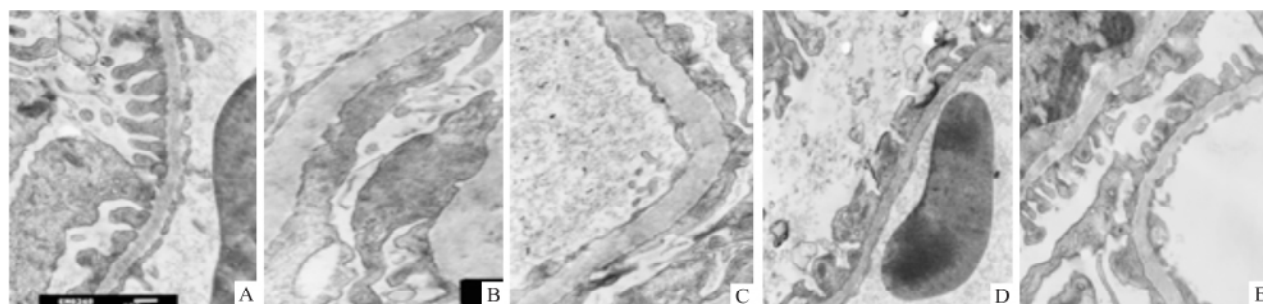


图2 8周末电镜各组大鼠肾脏病理结构改变 $\times 10\,000$
A: NC组; B: T2DM组; C: MET1组; D: MET2组; E: MET3组

表2 8周各组大鼠 GBMT、FRFP、nephrin mRNA 及蛋白的表达比较($\bar{x} \pm s$)

项目	NC($n=8$)	T2DM($n=9$)	MET1($n=8$)	MET2($n=8$)	MET3($n=7$)
GBMT(nm)	106.00 ± 10.23	$266.58 \pm 21.68^*$	$200.53 \pm 20.36^{* \#}$	$150.98 \pm 17.25^{* \# \Delta}$	$145.94 \pm 16.10^{* \# \Delta}$
FRFP	0.04 ± 0.03	$0.80 \pm 0.08^*$	$0.62 \pm 0.07^{* \#}$	$0.49 \pm 0.04^{* \# \Delta}$	$0.26 \pm 0.10^{* \# \Delta}$
nephrin IOD	56.21 ± 3.24	$17.82 \pm 2.40^*$	$32.94 \pm 4.79^{* \#}$	$36.40 \pm 2.80^{* \#}$	$36.11 \pm 5.90^{* \#}$
nephrin mRNA	2.55 ± 0.12	$0.90 \pm 0.11^*$	$1.13 \pm 0.11^{* \#}$	$1.20 \pm 0.13^{* \#}$	$2.31 \pm 0.04^{* \# \Delta}$

与 NC 组比较: $^* P < 0.05$; 与 T2DM 组比较: $^{\#} P < 0.05$; 与 MET1 组比较: $^{\Delta} P < 0.05$

球足细胞裂孔膜的主要构架分子之一, nephrin 表达及生成减少可引起裂孔膜分子的组成发生改变, 足突间的分子连接减少或中断, 导致足突形态改变和产生蛋白尿。nephrin 在肾组织表达下调, 尚使细胞内外 CD2AP 的信号传递发生障碍, 足细胞结构进一步破坏, 同时足细胞与基底膜相互作用减弱, 甚至从基底膜剥离, 滤过膜的完整性遭到破坏导致蛋白尿, 形成恶性循环。高血糖可通过多种途径影响肾小球足细胞 nephrin 的表达和生成^[2-4]。

MET 属双胍类药物, 现已被各国指南推荐为治疗 T2DM 的首选口服抗糖尿病药物^[1], 近年有研究^[5-6]显示其对糖尿病肾脏损害尚存在一定的肾脏保护。本实验结果显示: 8 周末各剂量 MET 组尿白蛋白排泄和 GBMT 均低于 T2DM 组, 且 MET2、MET3 组低于 MET1 组。电镜显示 MET 组(尤其是 MET3 组)肾小球足突融合明显减轻, 证实 MET 在改善糖尿病大鼠血糖控制的同时对肾脏, 包括足细胞, 可提供保护作用并存在一定剂量依赖性, 与文献^[7]报告相似。进一步观察显示: 糖尿病模型大鼠组肾组织 nephrin 蛋白表达明显降低, MET 干预治疗后可明显减轻肾组织 nephrin 表达的减少和降低尿 nephrin 的排泄, MET3 组效果优于 MET1 组, 提示 MET 可通过调节 T2DM 大鼠 nephrin 蛋白和 mRNA 的表达水平来发挥对肾小球足细胞的保护作用。另外 MET1 组与 T2DM 组比较, BG、HbA1c 并未明显改善, 但同一时间点, 尿白蛋白排泄显著降低, 肾脏病理指标

(GBMT 和足突融合率) 均明显降低且伴有肾组织 nephrin 表达减少的改善和尿 nephrin 排泄的减少, 提示 MET 对肾小球足细胞的保护可能不完全依赖于其降糖作用。MET 减轻肾组织 nephrin 表达的减少和保护足细胞的机制尚不十分明确, 可能与其减轻氧化应激和抑制炎症反应有关。Wu et al^[8]应用 250 mg/kg 的 MET 治疗糖尿病 SD 大鼠 8 周, 发现 MET 可能通过抑制肾脏组织糖基化终末产物的形成和氧化应激反应上调足细胞 nephrin 蛋白的表达。研究^[9]证实 MET 可以通过激活腺苷酸活化蛋白激酶并抑制 NADPH 氧化酶和糖基化终末产物的生成, 降低体外培养的足细胞中活性氧自由基(ROS)含量, 上调糖尿病大鼠肾脏组织 nephrin 表达。研究^[10-11]显示 MET 可通过增加足细胞超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和过氧化氢酶活性, 部分阻断 ROS 的生成来源。Louro et al^[12]分别报告 MET 可降低 T2DM Goto-Kakizaki(GK)鼠血白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β 1 水平, 改善了肾功能, 减轻肾小球纤维化和肾脏炎症参数, 同时肾脏足细胞融合和间质纤维化也有所改善。

综上所述, 本实验结果初步显示 MET 可对 T2DM 模型大鼠肾小球足细胞提供一定的保护作用且有一定的剂量依赖性, 部分可能与其减轻足细胞 nephrin 蛋白和 mRNA 表达减少, 降低尿 nephrin 的排泄有关, 确定的机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2012, 122(6): 253–70.
- [2] Pyram R, Kansara A, Banerji M A, et al. Chronic kidney disease and diabetes [J]. *Maturitas*, 2012, 71(2): 94–103.
- [3] Tufro A, Veron D. VEGF and podocytes in diabetic nephropathy [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(4): 385–93.
- [4] Ristola M, Lehtonen S. Functions of the podocyte proteins nephrin and Neph3 and the transcriptional regulation of their genes [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2014, 126(5): 315–28.
- [5] Nasri H, Baradaran A, Ardalan M R, et al. Bright renoprotective properties of metformin: beyond blood glucose regulatory effects [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2013, 7(6): 423–8.
- [6] Alhaider A A, Korashy H M, Sayed-Ahmed M M, et al. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 192(3): 233–42.
- [7] Kim J, Shon E, Kim C S, et al. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 210821.
- [8] Wu D, Wen W, Qi C L, et al. Ameliorative effect of berberine on renal damage in rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(8–9): 712–8.
- [9] Tzeng T F, Liou S S, Chang C J, et al. The ethanol extract of zingiber zerumbet attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 340645.
- [10] Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, et al. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(2): 268–73.
- [11] Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, et al. Beneficial effects of metformin and irbesartan on advanced glycation end products (AGEs)-RAGE-induced proximal tubular cell injury [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 65(3): 297–302.
- [12] Louro T M, Matafome P N, Nunes E C, et al. Insulin and metformin may prevent renal injury in young type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 653(1–3): 89–94.

Effects of metformin on expression of renal tissue nephrin in type 2 diabetes mellitus rats

Zhai Limin, Ye Shandong, Gu Junfei, et al

(Dept of Endocrinology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the effects of different doses of metformin (MET) on the expression of renal tissue nephrin protein and mRNA in type 2 diabetes mellitus (T2DM) model rats and understand its protective effect on glomerular podocytes. **Methods** The model rats of T2DM were established by being fed with high fat-diet and intraperitoneal injection of low dose of streptozotocin (STZ). Diabetic rats were divided into different dose metformin groups (group MET1 group MET2 and group MET3, 150, 300, 500 mg/(kg·d), respectively), T2DM model group (T2DM group) and normal control group (NC group) were also set up. After 8 weeks, blood glucose (BG), glycated hemoglobin (HbA1c), urinary albumin/urine creatinine (UACR), urinary nephrin excretion, renal tissue pathological changes and nephrin expression were detected. **Results** The levels of BG, HbA1c, UACR, glomerular basement membrane thickness (GBMT) and food process fusion ratio (FRFP) in MET groups were significantly lower than those of T2DM group, while higher than those of NC group ($P < 0.05$), and those above in MET2, MET3 were lower significantly compared with MET1 group ($P < 0.05$); the levels of blood BUN and urinary nephrin/urine creatinine (UNER) in MET groups were lower than those of T2DM group ($P < 0.05$), there was statistically significant difference between MET3 and MET1 group ($P < 0.05$); the expression of renal tissue nephrin protein and mRNA in MET groups were significantly increased compared with that of T2DM group ($P < 0.05$), but lower than that of NC group ($P < 0.05$); the expression of nephrin protein had no statistically significant difference among MET groups, while the expression of nephrin mRNA in MET3 group was higher than that of MET1 group ($P < 0.05$). **Conclusion** MET can alleviate the down-regulation of renal tissue nephrin expression and provide some protection against glomerular podocyte damage in T2DM rats with a dose-dependent manner.

Key words type 2 diabetes mellitus; diabetes; metformin; nephrin; podocyte