

雷帕霉素联合坎地沙坦治疗 2 型糖尿病肾病的疗效观察

苏超,王德光,张桂霞,王瑞峰,袁亮,张晶晶,王雪荣,何衡杰,刘桂凌,郝丽

摘要 目的 观察 mTOR 抑制剂(雷帕霉素)联合血管紧张素 II 受体阻滞剂(坎地沙坦)对糖尿病肾病的作用。方法 24 只 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠随机均等分为糖尿病组(D 组)、雷帕霉素治疗组(R 组)、坎地沙坦治疗组(C 组)、雷帕霉素+坎地沙坦治疗组(R+C 组);同时 6 只 db/+ 小鼠作为阴性对照组(ND 组)。治疗 16 周后,观察各组小鼠体重、血糖、血肌酐水平、尿白蛋白排泄率及肾组织病理指标的差异。结果 与 D 组比较,雷帕霉素、坎地沙坦及两者联合治疗均可显著延缓 db/db 小鼠体重增长,差异有统计学意义($P < 0.01$)。治疗 16 周后,R 组、C 组 24 h 尿白蛋白排泄率、血肌酐水平均低于 D 组,R+C 组低于 R 组和 C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 ND 组比较,糖尿病各组肾小球体积、系膜区基质显著增加,雷帕霉素、坎地沙坦及两者联合治疗均可显著延缓肾小球体积增大及系膜基质增加;与 R 组、C 组比较,R+C 组肾小球体积及系膜区基质占肾小球面积百分比均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。电镜结果显示 D 组肾小球基底膜出现弥漫性或节段性增厚,雷

帕霉素、坎地沙坦及两者联合治疗均可显著延缓肾小球基底膜增厚。结论 雷帕霉素联合坎地沙坦可进一步降低尿蛋白排泄率及血肌酐水平,延缓肾小球体积增大及系膜区基质沉积;在减轻糖尿病肾损害、延缓糖尿病肾病进展方面具有协同作用。

关键词 2 型糖尿病;糖尿病肾病;雷帕霉素;坎地沙坦;哺乳动物雷帕霉素靶子

中图分类号 R 587.24;R 737.25;R 972.41;R 544.12;R 743.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)06-0792-05

哺乳动物雷帕霉素靶分子(mammalian target of rapamycin, mTOR)是胰岛素样信号通路的关键分子,其过度活化与 2 型糖尿病及糖尿病肾病多个发病环节密切相关。mTOR 在细胞内由两种不同的复合体形式组成:mTOR 复合物 1(mTOR complex 1, mTORC1)和 mTOR 复合物 2(mTOR complex 2, mTORC2)。mTORC1 接受营养及能量信号的控制,对雷帕霉素敏感^[1]。近年来研究^[2-3]显示雷帕霉素对糖尿病肾病有一定的治疗作用,雷帕霉素为 mTOR 通道的抑制剂,坎地沙坦为血管紧张素 II 受体阻滞剂,而血管紧张素 II 可以激活 mTOR 通道^[4],因此两种药物联用理论上可以起到双重抑制 mTOR 通道活化从而达到治疗糖尿病肾病的目的。

2015-03-17 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金重点项目(编号:KJ2010A168)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院肾脏内科,合肥 230601

作者简介:苏超,男,硕士研究生;

王德光,男,博士,副教授,责任作者,E-mail:wangdeguang@vip.163.com

P1 (GSTP1) of cervical cancer SiHa cells. **Methods** MTS assay was used to study the effect of different concentrations of Xanthatin on the growth of SiHa cell lines. Morphological changes on SiHa cells were observed with fluorescence microscope. The effect of Xanthatin on apoptosis of SiHa cells was analyzed by flow cytometry. In addition, changes of GSTP1 expression and activity were determined by immunohistochemistry and colorimetric method, and changes of p-JNK expression were determined by Western blot. **Results** Xanthatin (0 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the proliferation on SiHa cells in a time and dose-dependent manner. The morphological changes observed in Xanthatin-treated cells included cell shrinkage, roundup and even some apoptotic bodies existed. After Xanthatin treatment for 24 h in SiHa cells, the apoptotic ratios were 5.02%, 9.62%, 18.5%, 26.4% and 37.5% with concentrations of Xanthatin at 0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$. Compared with the control, apoptosis rate increased obviously. SiHa cells exposed to increasing concentrations of Xanthatin led to the expression and activity of GSTP1 down-regulated and the expression of p-JNK. **Conclusion** These results demonstrate that Xanthatin exerts anti-tumor effects on SiHa cells through its anti-proliferative and pro-apoptotic roles. The molecular mechanism for pro-apoptotic effect may be related to its down-regulated effects on GSTP1 and up-regulated effects in c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway.

Key words Xanthatin; SiHa cells; proliferation; apoptosis

该研究选择 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠,观察雷帕霉素联合坎地沙坦对糖尿病肾病的治疗效应。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 离心机 (Biofuge22R, 德国 Heraeus Instruments 公司);全自动生化分析仪 (美国雅培制药有限公司);罗氏微量血糖 (surper-check 型, 德国罗氏诊断有限公司);电镜 (JEM-1230 型, 日本电子株式会社事务所);超薄切片机 (LKB-NOVA 型, 瑞典 LKB 公司);雷帕霉素、坎地沙坦 (美国 LC 公司)

1.2 实验动物 清洁健康的 6~7 周龄 db/db 小鼠,由南京动物模式研究所提供,分笼饲养 (每笼 4 只)于 SPF 级实验室,室温保持在约 21℃,通风良好。实验期间小鼠自由饮水 (高压灭菌)、饮食,饲料购自南京动物模式研究所后勤部。

1.3 糖尿病模型及实验分组 24 只 6~7 周龄 db/db 小鼠适应性喂养 1 周后测尾静脉血糖、尿糖,db/db 小鼠血糖均 >16.7 mmol/L、尿糖 3+~4+,提示糖尿病模型成功。随机将 db/db 小鼠分为 4 组,每组 6 只;同时 6 只 db/+ 小鼠作为阴性对照组,共干预治疗 16 周。具体如下:db/+ 小鼠,阴性治疗组 (ND 组);阳性对照组 (D 组),生理盐水腹腔注射;雷帕霉素治疗组 (R 组),腹腔内注射雷帕霉素 1 mg/d;坎地沙坦治疗组 (C 组),坎地沙坦 4 mg/(kg·d)溶于饮水中;雷帕霉素 + 坎地沙坦治疗组 (R + C 组),腹腔内注射雷帕霉素 1 mg/(kg·d),坎地沙坦 4 mg/(kg·d)溶于饮水中。

1.4 标本采集 每周测量小鼠体重,每 2 周测小鼠血糖,在第 16 周末将小鼠采血处死,留取血清及肾组织标本。一部分肾组织予 4% 福尔马林固定后切片行 HE 染色和 2.5% 戊二醛固定后行电镜观察,其余肾组织标本分装后置于 -80℃ 冰箱冻存。

1.5 24 h 尿白蛋白排泄率及血清肌酐测定 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测 24 h 尿蛋白,采用全自动生化分析仪检测血肌酐。

1.6 系膜区基质及肾小球体积的测定及计算方法 从肾组织 HE 染色切片中随机选取 10 个正切的肾小球,用 SPI 图像分析软件测量并计算系膜区面积;然后石蜡切片在 400 倍光学显微镜下,测量 20~40 个横跨血管极和尿极的肾小球平均面积。肾小球体积 = $\beta/\kappa \times$ 肾小球平均面积。 β (形状系数) = 1.38, κ (体积分布系数) = 1.1。

1.7 电镜标本制作及基底膜厚度 (basement mem-

brane thickness, GBM) 的测定 将切好的片子 (片厚为 70 nm) 水洗处理后在透射电镜下进行观察,根据等距离曲线移动原则对每个样本的一个肾小球拍照 15 张。随机设置测试系统,选择测试线与 GBM 足细胞侧相交的点作 GBM 的垂直线,与内皮细胞相交处的距离为 GBM 截面宽度,进而计算出 GBM 调和平均厚度。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件包进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;治疗前后的比较采用配对资料 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA);组间比较采用 q 检验,方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 Tamhane 法。

2 结果

2.1 一般情况变化 非糖尿病的 db/+ 小鼠体型适中,反应灵敏,毛发稠密而有光泽;2 型糖尿病模型 db/db 小鼠体型肥胖,毛发稍显枯黄,活动较迟钝。治疗前 db/+ 小鼠体重显著低于 D 组、R 组、C 组和 R + C 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.001$),但糖尿病小鼠各组之间差异无统计学意义。治疗 16 周后 db/+ 小鼠体重显著低于 D 组、R 组、C 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);R + C 组体重与 db/+ 小鼠比较差异无统计学意义。C 组、R 组、R + C 组与 D 组比较,体重显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。R + C 组体重显著低于 R 组和 C 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组治疗前后血糖情况 治疗前非糖尿病 db/+ 小鼠血糖显著低于糖尿病各组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。治疗 16 周后各组血糖较治疗前无显著变化,在糖尿病各组之间差异无统计学意义。见表 1。

表 1 治疗前后体重、血糖、尿白蛋白排泄率及血肌酐变化 ($n \bar{x} \pm s$)

组别	n	时间 (周)	体重 (g)	血糖 (mmol/L)	24 h 尿蛋白 (μ g)	血肌酐 (μ mol/L)
ND	6	1	25.2 \pm 1.7	6.0 \pm 1.1	54.3 \pm 9.7	-
	6	16	28.9 \pm 2.7	6.1 \pm 0.8 ^{ΔΔ}	57.7 \pm 11.7 ^{ΔΔ}	50.3 \pm 7.7 ^{ΔΔ}
D	6	1	40.6 \pm 2.4 ^{**}	28.2 \pm 2.7 ^{**}	481.3 \pm 14.1 ^{**}	-
	5	16	44.9 \pm 2.3	29.8 \pm 2.8	585.0 \pm 40.6 ^{##}	87.4 \pm 6.5 ^{##}
R	6	1	38.6 \pm 3.0 ^{**}	25.4 \pm 2.2 ^{**}	484.7 \pm 26.5 ^{**}	-
	5	16	36.0 \pm 3.5	24.5 \pm 2.5	375.0 \pm 55.1 ^{ΔΔ##}	80.0 \pm 10.5 ^{##}
C	6	1	38.0 \pm 2.9 ^{**}	27.5 \pm 2.0 ^{**}	475.7 \pm 26.0 ^{**}	-
	6	16	36.2 \pm 2.6	27.2 \pm 1.9	415.0 \pm 16.1 ^{ΔΔ##}	70.5 \pm 4.0 ^{##}
R+C	6	1	38.3 \pm 2.1 ^{**}	25.9 \pm 2.8 ^{**}	475.3 \pm 15.1 ^{**}	-
	5	16	34.1 \pm 2.6	25.1 \pm 1.8	324.1 \pm 39.5 ^{ΔΔ##}	63.0 \pm 4.2 ^{ΔΔ}

与 ND 组治疗前比较: ^{**} $P < 0.01$; 与同一组治疗前比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 D 组治疗 16 周后比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 与 R + C 组治疗 16 周后比较: ^Δ $P < 0.05$

2.3 各组治疗前后尿白蛋白排泄率及血肌酐变化

治疗前 db/+ 小鼠 24 h 尿白蛋白排泄率显著低于 D 组、R 组、C 组和 R + C 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 但糖尿病小鼠各组之间差异无统计学意义。治疗 16 周后, D 组小鼠 24 h 尿白蛋白排泄率较治疗前明显增加, R 组、C 组和 R + C 组较治疗前显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); R 组、C 组和 R + C 组 24 h 尿白蛋白排泄率低于 D 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); R + C 组 24 h 尿蛋白排泄率低于 R 组和 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗 16 周后, db/+ 小鼠血肌酐水平为显著低于 D 组、R 组和 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); R + C 组血肌酐水平与 db/+ 小鼠比较, 差异无统计学意义。C 组、R + C 组与 D 组比较, 血肌酐水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。R + C 组血肌酐水平显著低于 R 组和 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.4 治疗后肾小球体积变化 治疗 16 周后, D 组肾小球体积显著高于 ND 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。R + C 组肾小球体积显著低于 D 组、R 组和 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 db/+ 小鼠比较差异无统计学意义。见图 1、2。

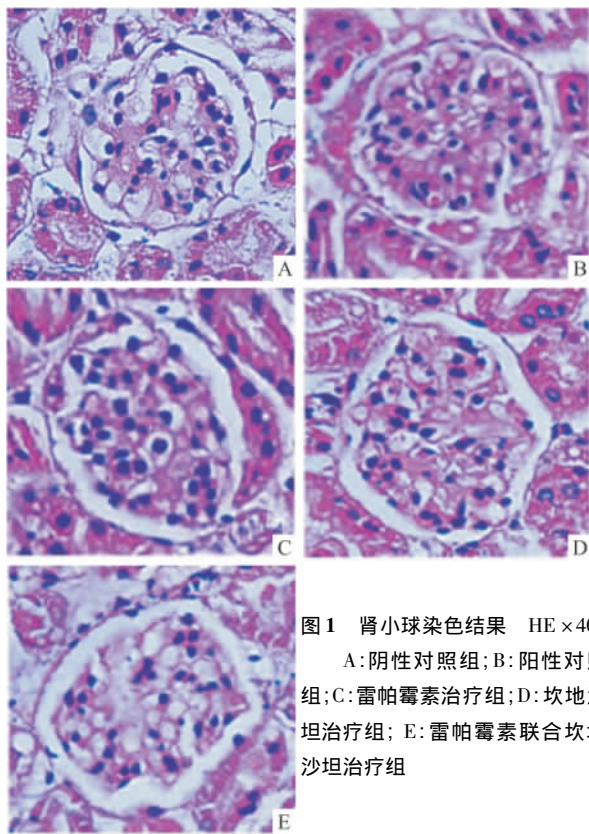


图1 肾小球染色结果 HE × 400
A: 阴性对照组; B: 阳性对照组; C: 雷帕霉素治疗组; D: 坎地沙坦治疗组; E: 雷帕霉素联合坎地沙坦治疗组

2.5 治疗后系膜区基质占肾小球面积百分比 治

疗 16 周后, D 组系膜区基质占肾小球面积百分比显著高于 ND 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。R + C 组系膜区基质占肾小球面积的比例显著低于 D 组、R 组和 C 组, 差异有统计学意义。见图 3。

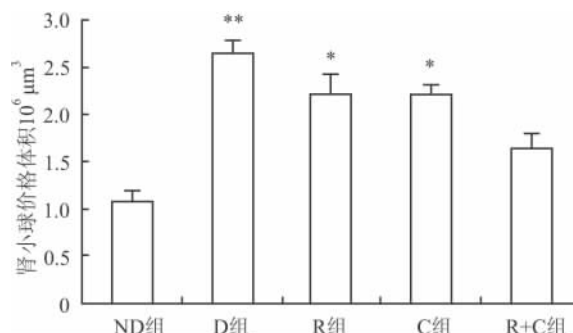


图2 各组肾小球体积的比较

与 R + C 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

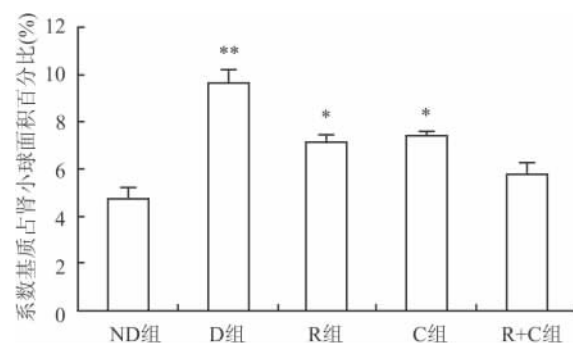


图3 系膜区基质占肾小球面积百分比

与 R + C 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.6 治疗后肾小球 GBM 厚度的变化 16 周后 db/+ 小鼠足细胞体积没有增大, 足突紧贴毛细血管基膜, 足突之间可见裂隙; 基底膜厚度正常。D 组足细胞形态明显改变, 肾小球上皮细胞足突广泛融合, 部分融合成板片状, 融合部分足突裂隙消失, 基底膜厚度明显增加; R 组足突细胞部分融合, 基底膜出现节段性增厚, 但与 D 组相比较, 基底膜厚度明显减少。C 组基底膜厚度变化和 R 组相似, 较 ND 组增厚而较 D 组减轻; R + C 组足突细胞融合较 R 组和 C 组较少, 基底膜厚度较 R 组和 C 组均减少。见图 4。

3 讨论

雷帕霉素是一种新型的免疫抑制剂, 目前较多地应用于肾脏移植和肿瘤的治疗^[5]。mTOR 信号通路的激活与糖尿病肾病的发生发展密切相关, 研究^[6]表明雷帕霉素能够通过抑制 mTOR 通道的活

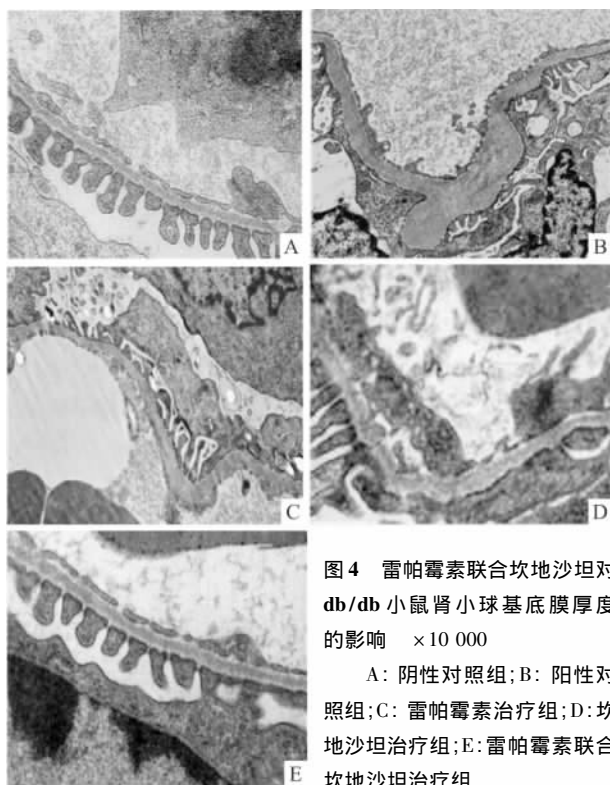


图4 雷帕霉素联合坎地沙坦对 db/db 小鼠肾小球基底膜厚度的影响 $\times 10\ 000$

A: 阴性对照组; B: 阳性对照组; C: 雷帕霉素治疗组; D: 坎地沙坦治疗组; E: 雷帕霉素联合坎地沙坦治疗组

化抑制糖尿病肾病肾小球肥大、基底膜增厚,减少蛋白尿的排泄,延缓肾功能的进一步恶化。坎地沙坦为血管紧张素 II 受体阻滞剂,通过抑制肾素-血管紧张素系统的激活,引起肾小球血流动力学变化,减轻肾小球内高灌注、高滤过、高压状态,避免造成肾脏损伤,近而产生一系列的肾脏保护的作用,为临床上常用的治疗糖尿病肾病的有效药物。血管紧张素 II 为 mTOR 通道的活化剂,因此坎地沙坦可以抑制 mTOR 通道的活化,而两种药物的联合应用理论上可以双重阻断 mTOR 通道的活化,减轻和延缓糖尿病肾病的发展。目前为止,尚无雷帕霉素和坎地沙坦联合用药治疗 2 型糖尿病和糖尿病肾病的报道。

本研究显示雷帕霉素可降低 2 型糖尿病模型小鼠体重。肥胖是 2 型糖尿病的起始环节,肥胖可以引起胰岛素抵抗,同时胰岛素抵抗和肥胖又是糖尿病肾病的独立危险因素。因此,减轻体重可能是雷帕霉素延缓 2 型糖尿病模型肾脏病进展的机制之一。王德光等^[7]发现雷帕霉素可改善 2 型糖尿病小鼠模型(KKAy 小鼠)胰岛素抵抗、减轻体重;肥胖大鼠空腹状态下肾脏的 p-mTOR 和 S6K1 活性明显高于非肥胖大鼠^[8],Laplanche^[9]在肥胖 2 型糖尿病模型 KKAy 和 db/db 小鼠 S6K1 活性明显升高。Inoki

et al^[5]发现敲除 mTOR 效应分子 S6K1 基因的小鼠体重明显轻于同周龄野生型小鼠,即使在高糖饮食下也不出现肥胖,表明 mTOR 信号通路活化在 2 型糖尿病模型肥胖过程中起重要作用。本实验结果也提示雷帕霉素可能是通过抑制 mTOR 下游通路活化减轻 2 型糖尿病小鼠体重。

雷帕霉素是否能够降低 2 型糖尿病小鼠血糖,目前存在较大的争议。研究^[9]表明一些生长因子和氨基酸可以通过激活 mTOR 通路引起胰岛素抵抗从而引起血糖升高,雷帕霉素通过抑制这一通道起到降低血糖、减轻糖尿病肾病进展的作用。王德光等^[7]在雷帕霉素治疗另外一种 2 型糖尿病模型-KKAy 小鼠研究中发现,雷帕霉素可改善胰岛素抵抗,降低血糖,但本研究及研究^[5]却显示雷帕霉素治疗对 2 型糖尿病模型-db/db 小鼠血糖无影响。报道^[10]显示雷帕霉素可引起血糖升高,但这是否与长时间、大剂量应用雷帕霉素而干扰了 mTORC2 通路有关,待进一步研究。

尿白蛋白排泄率增高及肾功能损害是糖尿病肾病的重要临床表现。本研究显示雷帕霉素可显著减少 db/db 小鼠模型尿白蛋白排泄率,降低血肌酐水平,与 KKAy 小鼠上的研究结果相同;在本研究中亦显示雷帕霉素和 ARB 类药物坎地沙坦具有协同作用,两者联合能进一步降低尿白蛋白排泄及血肌酐水平。

Sakaguchi et al^[11]发现,雷帕霉素可减轻糖尿病肾病小鼠的肾脏肥大;而 Lock et al^[12]发现,应用雷帕霉素阻断 mTOR 后,尽管可以延缓糖尿病肾病的发展,但肾小球肥大并没有被改善。本研究不仅表明雷帕霉素可减轻 db/db 糖尿病小鼠早期肾小球体积增大,还显示可减轻糖尿病肾病后期系膜区基质沉积和基底膜增厚,且和坎地沙坦联合具有协同作用,与研究^[11]结果一致。

参考文献

- [1] Estacio R O, Schrier R W. Diabetic nephropathy: pathogenesis, diagnosis and prevention of progression [J]. Adv Intern Med, 2001, 46:359-408.
- [2] Kim D H, Sarbassov D D, Ali S M, et al. mTOR interacts with rapamycin to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery [J]. Cell, 2002, 110(2):163-75.
- [3] Inoki K, Corradetti M N, Guan K L. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease [J]. Nat Genet, 2005, 37(1):19-24.
- [4] Rai P, Lederman R, Haque S, et al. Renin-angiotensin system modulates mTOR pathway through AT2R in HIVAN [J]. Exp Mol

- Pathol 2014 ,96(3):431-7.
- [5] Inoki K ,Mori H ,Wang J ,et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice[J]. *J Clin invest* 2011 ,121(6):2181-96.
- [6] Kim J H ,Kim N G ,Kwak H J ,et al. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway [J]. *Oncogene* 2000 ,19(39):4549-52.
- [7] 王德光 ,李学旺 ,李航等. 雷帕霉素对 KKAy 小鼠体重及胰岛素抵抗的影响[J]. *中国糖尿病杂志* ,2007 ,15(2):109-11.
- [8] Guertin D A ,Stevens D M ,Saitoh M ,et al. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice[J]. *Cancer Cell* 2009 ,15(2):148-59.
- [9] Laplante M ,Sabatini D M. mTOR signaling at a glance[J]. *J Cell Sci* 2009 ,122(Pt 20):3589-94.
- [10] Johnston O ,Rose C L ,Webster A C ,et al. Sirolimus is associated with new-onset diabetes in kidney transplant recipients[J]. *J Am Soc Nephrol* 2008 ,19(7):1411-8.
- [11] Sakaguchi M ,Isono M ,Isshiki K ,et al. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ,340(1):296-301.
- [12] Lock H R ,Sacks S H ,Robson M G ,et al. Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix production [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* ,2007 ,292(1):F76-81.

The combination of rapamycin and candesartan produces a renoprotective effect on diabetic nephropathy in db/db mice

Su Chao ,Wang Deguang ,Zhang Guixia , et al

(*Dept of Nephrology ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230601*)

Abstract Objective To observe whether the combination of mTOR inhibitor (rapamycin) and angiotensin II receptor blocker (candesartan) can protect diabetic nephropathy better. **Methods** Twenty four db/db mice were randomly divided into 4 groups ,as follows: db/db mice without intervention (group D) ,db/db mice with administration of rapamycin (group R) ,db/db mice with administration of candesartan (group C) ,and db/db mice with administration of the combination of rapamycin and candesartan (group R + C). Six age-matched nondiabetic db/+ mice served as controls (group ND). After a follow-up of 16 weeks ,the biochemical indicators including body weight ,blood glucose ,serum creatinine levels were observed. The difference of urinary protein excretion rates and renal pathological indicators of each group were also observed. **Results** Compared with the group D ,the group R ,group C ,and group D + C therapy could significantly delay the db / db mice weight gain ,and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). After 16 weeks of treatment ,24 h urinary protein excretion rate and serum creatinine in the group R and group C ,were lower than in group D;24 h urinary protein excretion rate and serum creatinine in the group R + C were lower than in the R group and C group and the difference was statistically significant. Compared with the ND group ,glomerular volume and the matrix of mesangial area were significantly increased in diabetic groups; Rapamycin ,candesartan ,and the combination therapy could significantly delay the glomerular volume gain and mesangial matrix accumulation; compared with R group or C group ,the glomerular volume and the percentage of mesangial matrix in total glomerular area were significantly lower in R + C group and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Electron microscopy results also showed that the glomerular basement membrane was diffusely or segmentally thickened in group D ,and the rapamycin ,candesartan and the combination therapy could significantly decrease the thickness of the glomerular basement membrane. **Conclusion** The combination of rapamycin and candesartan can further reduce the rate of urinary protein excretion and serum creatinine levels ,delay glomerular volume gain and mesangial matrix deposition. The combination of rapamycin and candesartan have a synergistic effect on reducing the diabetic kidney damage and delaying the progress of diabetic nephropathy.

Key words diabetes; diabetic nephropathy; rapamycin; candesartan; mTOR