



实验设计基本原则和方法



武汉大学 敖英

发育源性疾病湖北省重点实验室

yingao@whu.edu.cn





讲座提纲

- 一、医学实验设计的基本原则
- 二、医学实验设计的基本要素
- 三、医学实验设计范例





医学研究核心内容

- **Design**
- **Measurement**
- **Evaluation**





医学实验设计

- 实验设计的一般要求：科学性，严密性，合理性，高效性。
- 三原则：随机原则 重复原则 对照原则
- 三要素：处理因素 实验对象 实验效应





随机原则

- 简单随机抽样：抛硬币、抽签查随机数字表及计算器随机法等
- 分层随机法：根据研究对象的特点为分层因素，按照分层因素分层后再进行随机分组
- 系统随机抽样：将所有研究对象按照设计要求的抽样单位依次编号，先随机抽取第一个观察单位，再依次按照一定的间隔抽取其余的观察单位。
- 半随机法：将研究对象奇数和偶数进行分组。





重复原则

一般而言，计量资料的样本数每组不少于5例，以10 – 20例为好。计数资料的样本数则需每组不少于10例，以30例为好。

动物实验每组所需的样本数

动 物	计量资料	计数资料
小(小鼠、大鼠、蛙)	≥ 10	≥ 30
中(兔、豚鼠)	≥ 6	≥ 20
大(犬、猫)	≥ 5	≥ 10





对照原则

- (1) 同期随机对照：研究对象同时间、同地点选择，以随机分配方式分组；可比性强，避免了选择性偏倚，结果更具说服力
- (2) 自身对照：对照与实验在同一受试对象进行。
- (3) 历史性对照：将新的干预性措施的结果与过去的研究比较，是将研究者以往的研究结果或他人的研究结果与本次研究结果作对照。
- (4) 非随机同期对照：研究对象是同时间、同地点，用非随机分配的方法分为试验组和对照组，分组的方法不是随机的；
- (5) 配对对照：将试验组对象按照配对因素与对照组相配对
- (6) 空白对照：对照组不加任何处理因素
- (7) 实验对照：采用的与实验组条件一致的对照措施





常设的对照组

(1) 空白对照(正常对照, 阴性对照)

在不加任何特殊处理条件下所设的对照, 如生理盐水对照、**DMSO**对照等

(2) 实验对照(模型对照)

在某有关实验条件下所设对照, 如疾病模型对照、老年对照等

(3) 自身对照

用同体实验前后对照、左右肢对照等

(4) 相互对照

实验中各实验组之间互为对照

(5) 标准对照(阳性对照)

用已证实有效、公认或已批准上市的药物作为对照





常用的实验分组

(1) 正常对照组 (溶媒对照)

(2) 受试药大剂量对照组

(3) 模型对照组

(4) 受试药小剂量组

(5) 受试药中剂量组

(6) 受试药大剂量组

} 造模

(7) 阳性对照组





- ① **WT**对照
- ② 基因过表达/敲除
- ③ **WT**+造模
- ④ 基因过表达/敲除+造模
- ⑤ **WT**+造模+干预
- ⑥ 基因过表达/敲除+造模+干预





齐同原则

除处理因素外，不同比较组研究对象的其它因素或条件相同，即组间有较好的可比性。齐同是进行比较的前提，没有齐同就没有分析比较的价值。

- * 比较组间除接受的处理因素不同外，其它条件应相同，保证组间的均衡性。
- * 对实验效应的观察方式要相同，包括采用相同的仪器设备、测试手段、观察方法等。





讲座提纲

- 一、医学实验设计的基本原则
- 二、医学实验设计的基本要素
- 三、医学实验设计范例





实验设计的“三个基本要素”

处理因素 实验对象 实验效应





处理因素

根据研究目的由研究者人为施加给受试对象的因素。

1. 处理因素的标准化

有来源、批号、剂型、给药途径、给药剂量等

2. 处理因素的数量、水平与设计

分单/多因素设计、单/多水平设计等。

3. 消除非处理因素干扰

年龄、体重、性别等，注意构成比，要一致





实验动物之间用药量的换算

换算方法：

已知A种动物每kg体重用药量，欲估计B种动物每kg体重用药剂量时，可查表找出折算系数(W)，再按下列公式计算：

$$\text{B种动物的剂量(mg/kg)} = W \times \text{A种动物的剂量(mg/kg)}$$





**表2-4 动物与人的每公斤体重等效剂量
折算系数(W)表**

折算系数 (W)		A种动物或成人						
		小鼠 (20g)	大鼠 (200g)	豚鼠 (400g)	兔 (1.5kg)	猫 (2.0kg)	犬 (12kg)	成人 (60kg)
B 种 动 物 或 成 人	小鼠(20g)	1.0	1.4	1.6	2.7	3.2	4.8	9.01
	大鼠(200g)	0.7	1.0	1.14	1.88	2.3	3.6	6.25
	豚鼠(400g)	0.61	0.87	1.0	1.65	2.05	3.0	5.55
	兔(1.5kg)	0.37	0.52	0.6	1.0	1.23	1.76	3.30
	猫(2kg)	0.30	0.42	0.48	0.81	1.0	1.4	2.70
	犬(12kg)	0.21	0.28	0.34	0.56	0.68	1.0	1.88
	成人(60kg)	0.11	0.16	0.18	0.304	0.371	0.531	1.0





例：某利尿药人口服给药剂量为给药时的剂量为**40 mg/kg**，
试粗略估计大鼠灌胃给药时可以试用的剂量。

解：查表找出人(**60 kg**)与大鼠(**200 g**)的每kg体重等效剂量折算系数(**W**):

$$W = 6.25$$

于是大鼠的适当试用剂量为:

$$6.25 \times 40 \text{ mg/kg} = 250 \text{ mg/kg}$$





表2-4 动物与人的每公斤体重等效剂量
折算系数(W)表

折算系数 (W)		A种动物或成人						
		小鼠 (20g)	大鼠 (200g)	豚鼠 (400g)	兔 (1.5kg)	猫 (2.0kg)	犬 (12kg)	成人 (60kg)
B 种 动 物 或 成 人	小鼠(20g)	1.0	1.4	1.6	2.7	3.2	4.8	9.01
	大鼠(200g)	0.7	1.0	1.14	1.88	2.3	3.6	6.25
	豚鼠(400g)	0.61	0.87	1.0	1.65	2.05	3.0	5.55
	兔(1.5kg)	0.37	0.52	0.6	1.0	1.23	1.76	3.30
	猫(2kg)	0.30	0.42	0.48	0.81	1.0	1.4	2.70
	犬(12kg)	0.21	0.28	0.34	0.56	0.68	1.0	1.88
	成人(60kg)	0.11	0.16	0.18	0.304	0.371	0.531	1.0





实验对象（动物或人）

1. 可在不同水平进行研究

整体动物：正常动物、病理模型、转基因动物等

离体器官：子宫、心脏、小肠等

组织：肛尾肌、血管条等

细胞：肝细胞、心肌细胞等





实验效应 (指标)

计量指标及统计方法

计数指标及统计方法

等级指标及统计方法





计量资料（定量指标）

用定量的方法测定所获得的资料，如血压、血糖、血细胞数等。
常带有度量衡单位，如cm、mg、ml等。

常用统计方法：

(1) t 检验

用于两组均数、前后对比或配对对比差值均数的显著性检验，包括完全随机化设计的两样本均数的 t 检验和配对 t 检验。

(2) 方差分析

用于多组样本均数间差别的显著性检验。





计数资料（定性指标）

将观察单位按某种属性或类别分组计数，得到各组观察单位的个数，如患病与未患病的人数；某人群中 **O**、**A**、**B**、**AB** 各种血型的人数。率（如阳性率、死亡率）是最常用的指标。

常用统计方法：

- (1) 2×2 表的 χ^2 检验
- (2) $2 \times K$ 表的 χ^2 检验





等级资料 (半定量资料)

将观察单位按不同程度分组计数，得到各组观察单位的个数，如疾病痊愈、显效、改善、无效和恶化的人数；组织病变程度为++、++、+、±、-的人数；疼痛缓解为高度、中度、轻度、无效的人数等。其准确性介于计量资料和计数资料之间。

常用统计方法：

等级资料多属于偏态资料，其分析常用非参数统计法，如等级序值法、秩和检验等进行显著性检验。





指标选择注意事项

关联性：所选指标应与研究目的有着本质的密切的联系，能够确切地反映处理因素的效应，可通过查阅文献资料或理论推导来确定指标的有效性，也可通过预备实验或用标准阳性对照来验证其有效性。

特异性：反映某一特定现象，且不与其他现象相混淆。

客观性：易于量化的、经过仪器测量和检验而获得的。

重复性：在相同条件下指标可以重复出现。

灵敏性：根据实验要求相应显示出微小的变化，由实验方法和仪器的灵敏度共同决定。

可行性：既有文献依据，又符合本实验室条件和研究者实际水平。





讲座提纲

- 一、医学实验设计的基本原则
- 二、医学实验设计的基本要素
- 三、医学实验设计范例





Sirt6 敲除通过Notch途径导致足细胞损伤和蛋白尿

- **Nature Communication 2016**
- 一区, 11.329 (2015)
- 研究目的: 证实sirt6敲除通过增加notch的H3K9组蛋白乙酰化水平, 增加其表达, 介导足细胞损伤和肾小球疾病





实验设计

- 现象
 - 整体水平：**Sirt6**在糖尿病肾病和阿霉素肾病的小鼠足细胞中表达下调
 - 人体标本：不同的肾病标本中**sirt6**表达降低
- 现象反证
 - 整体水平：**Sirt6**敲除加重STZ糖尿病小鼠足细胞损伤
 - 细胞水平：**Sirt6**高表达对足细胞有保护作用
- 机制+反证
 - 人体、动物、细胞水平：**Sirt6**通过降低**H3K9**乙酰化水平抑制**Notch**信号通路
 - 细胞水平：抑制**notch**通路，可以减轻**sirt6**敲除所致足细胞损伤
 - 动物、细胞水平：**Sirt6**敲除加重阿霉素肾病小鼠足细胞损伤
 - 整体水平：**Sirt6**过表达减轻肾损伤

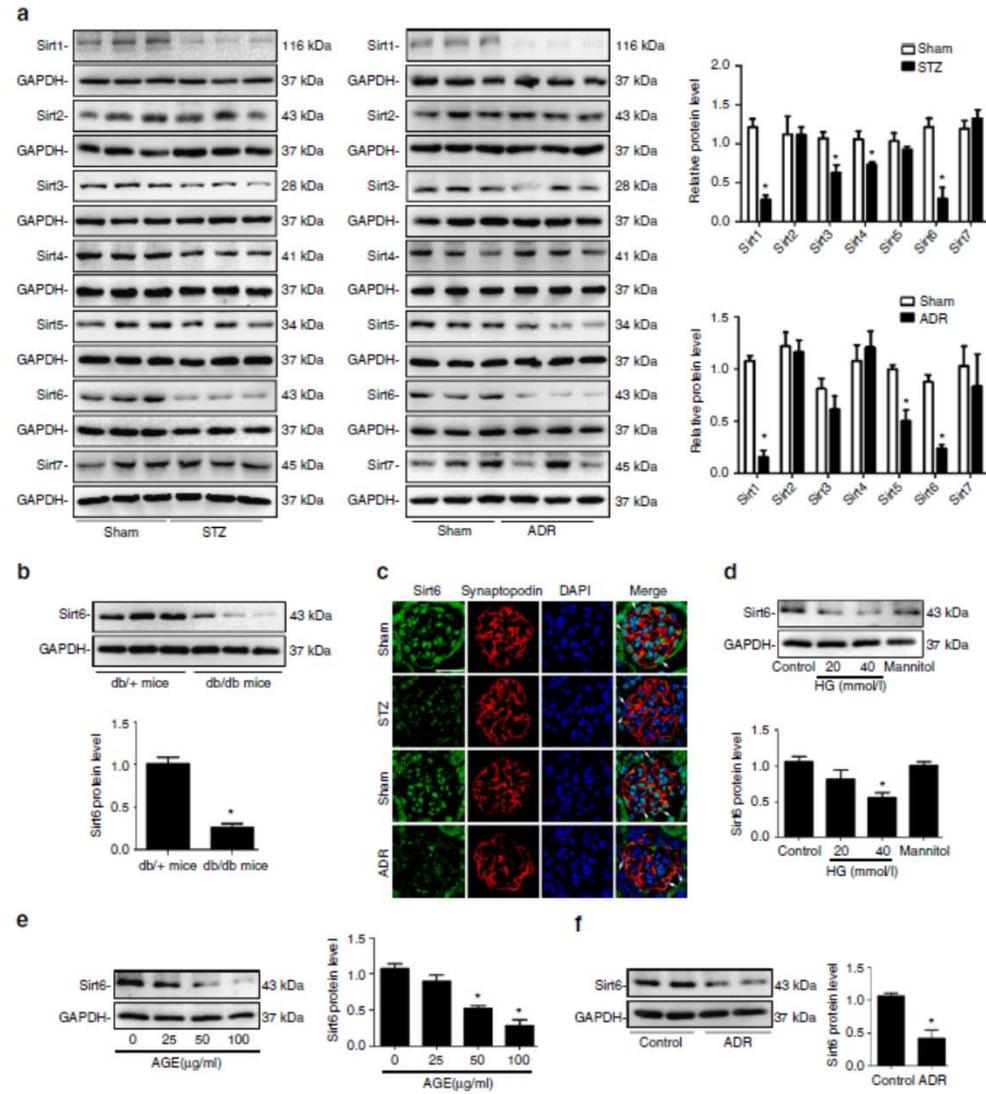




整体水平：Sirt6在糖尿病肾病和阿霉素肾病的小鼠足细胞中表达下调

- 动物模型：空白组小鼠、STZ诱导的糖尿病小鼠（1型糖尿病模型）、阿霉素诱导的肾病（模拟人FSGS）、db/db mice（2型糖尿病模型）
- 细胞：人足细胞系：空白、高糖处理、AGE处理、ADR处理
- 指标：肾脏组织中sirt各亚型的表达（WB）、肾脏足细胞中sirt6的表达（sirt6和synaptopodin的双染）、足细胞中sirt6的表达（WB）
- 结果：糖尿病小鼠肾脏Sirt1,3,4,6表达降低，阿霉素肾病小鼠肾脏Sirt1,5,6表达降低，Sirt4表达有升高趋势。db/db mice中Sirt6表达降低。造模小鼠肾脏足细胞中sirt6表达下降；人足细胞系中sirt6表达下降
- 结论：足细胞Sirt6表达降低与多种肾病发生有关

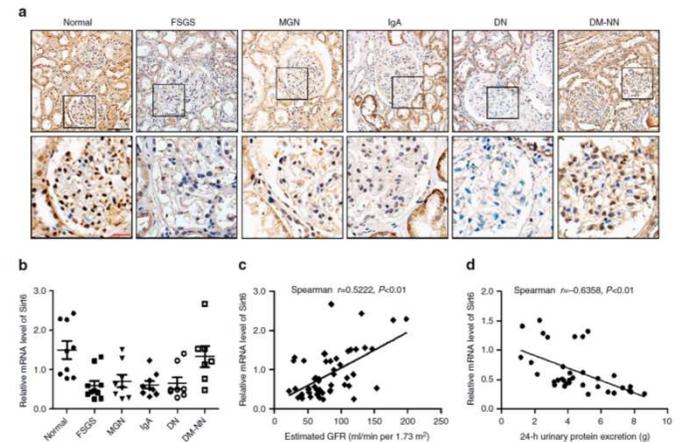






人肾病标本中sirt6表达降低

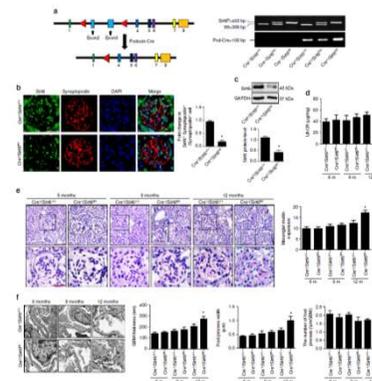
- 标本：正常人或无肾病的糖尿病患者（7例）、糖尿病肾病（8例）、FSGS（10例）、膜性肾病（8例）、IgA肾病（9例）
- 指标：sirt6免疫组化、PCR
- 结果：肾脏sirt6水平与肾小球滤过率正相关，与蛋白尿负相关
- 结论：肾脏sirt6水平降低可能参与介导人肾小球疾病的发生





整体水平：Sirt6敲除加重糖尿病小鼠足细胞损伤

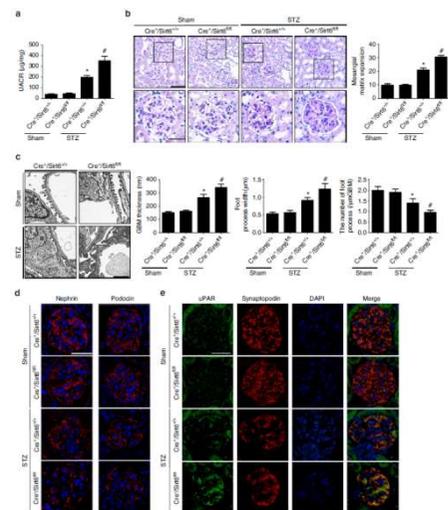
- Podocin-Cre mice与Sirt6^{fl/fl} 交配产生Podocin-Cre Sirt6^{fl/fl} 小鼠（Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠）
- 分组：野生型小鼠、Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠
- 指标：肾脏sirt6基因和蛋白表达；9月龄、12月龄肾功能、形态学、其他亚型去乙酰化酶（sirtuin）的表达
- 结果：Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠建立成功（肾脏sirt6基因和蛋白表达降低）；Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠12月龄出现轻微蛋白尿、系膜基质增生和足细胞基底膜增厚；其他亚型去乙酰化酶（sirtuin）的表达无异常。
- 结论：12月龄之前，Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠无异常病理改变。





复制STZ糖尿病模型

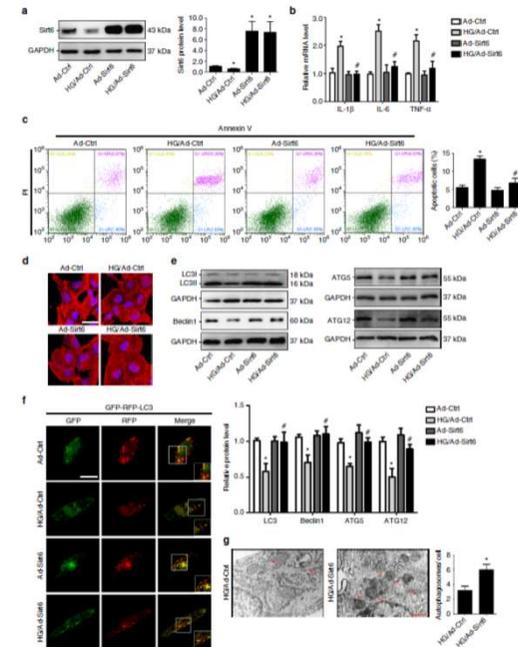
- 分组：野生型小鼠对照组、野生型小鼠STZ糖尿病模型组、**Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}**小鼠对照组、**Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}**小鼠STZ糖尿病模型组
- 指标：尿蛋白、**HE**、足细胞标志基因的表达、**uPAR**表达（免疫荧光）
- 结果：与野生型小鼠STZ糖尿病模型组比较，**Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}**小鼠STZ糖尿病模型组尿蛋白增加，足细胞标志基因表达降低，**uPAR**表达上调
- 结论：**sirt6**敲除可以加重糖尿病的足细胞损伤





细胞水平：Sirt6对足细胞有保护作用

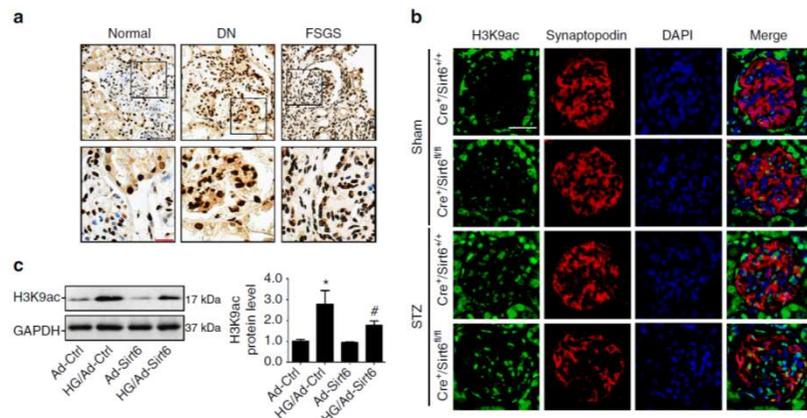
- 分组：人足细胞系：WT组、高表达Sirt6组、WT+高糖组、高表达Sirt6+高糖组
- 指标：炎性介质的基因表达 (PCR)、足细胞凋亡、自噬 (免疫荧光, WB)
- 足细胞肌动蛋白表达 (免疫荧光)、uPAR表达 (免疫荧光)
- 结果：高表达Sirt6组炎性介质表达降低、足细胞凋亡减少、自噬增强、足细胞肌动蛋白表达增强





Sirt6通过降低H3K9抑制Notch信号通路

- Sirt6是特异性H3K9去乙酰化酶
- 人体标本：正常组、DN、FSGS病人肾脏活检标本
- 动物：野生型小鼠对照组、野生型小鼠STZ糖尿病模型组、Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠对照组、Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠STZ糖尿病模型组
- 细胞：WT组、高表达Sirt6组、WT+高糖组、高表达Sirt6+高糖组
WT、WT+高糖组、WT+DAPT、WT+高糖组+DAPT
- 指标：H3K9ac水平（免疫组化、免疫荧光、WB）
- 结果：病人肾脏标本H3K9乙酰化水平降低，sirt6敲除鼠足细胞H3K9水平升高(免疫荧光双染)、高表达Sirt6组足细胞H3K9水平降低



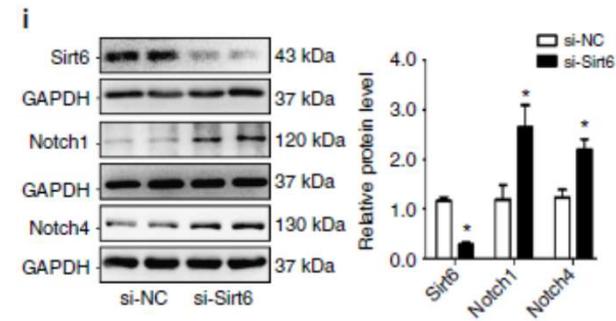
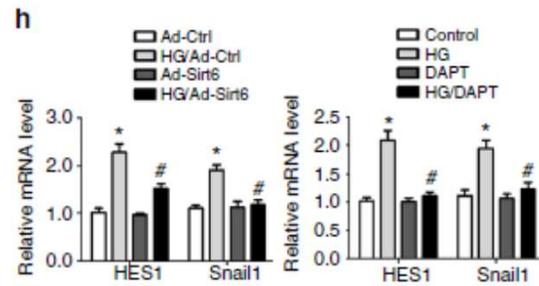
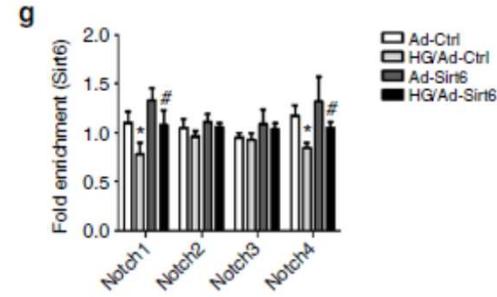
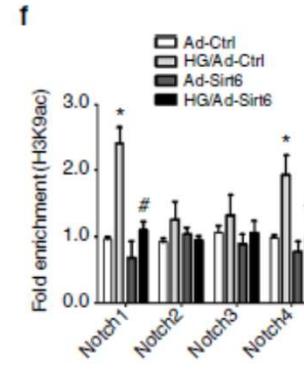
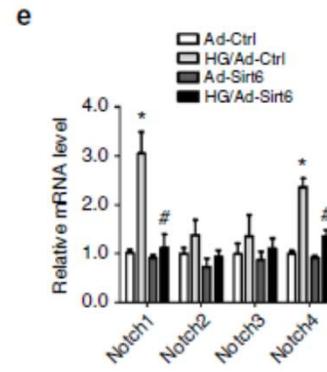
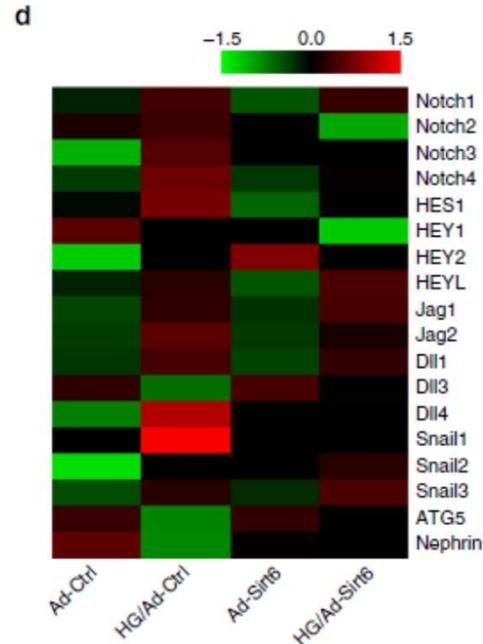


- 动物：野生型小鼠对照组、野生型小鼠STZ糖尿病模型组、**Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}**小鼠对照组、**Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}**小鼠STZ糖尿病模型组
- 细胞分组：WT组、高表达Sirt6组、WT+高糖组、高表达Sirt6+高糖组
- WT、WT+高糖组、WT+DAPT、WT+高糖组+DAPT (notch信号抑制剂)
- 指标：notch表达 (基因芯片、PCR)、启动子区H3K9乙酰化水平 (ChiP)、notch下游分子HES1、snail1表达(PCR)、sirt6与notch启动区的结合 (ChiP)
- 结果：细胞水平，高糖导致足细胞系notch1、4表达上调，Sirt6可抑制notch1、4的表达上调作用；高糖导致足细胞notch1、4启动子区H3K9乙酰化水平升高，Sirt6可抑制该作用；Sirt6可以与notch1、4启动子区结合，高糖环境下，该结合作用减弱。高糖诱导notch下游靶基因的表达，Sirt6可以抑制该作用。DAPT明显抑制足细胞系notch下游靶基因的表达。

动物水平，糖尿病小鼠足细胞notch1、4表达上调；notch下游靶基因的表达上调，Sirt6敲除的小鼠上调作用更明显。

- 结论：Sirt6通过降低H3K9抑制Notch信号通路



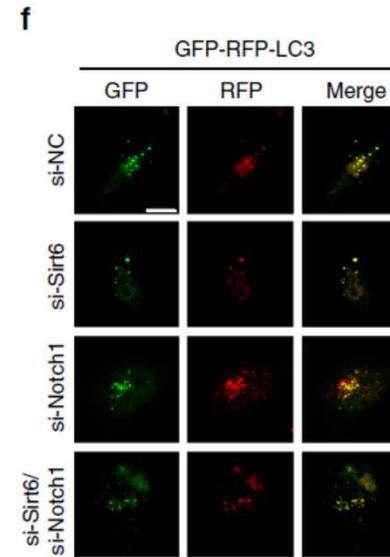
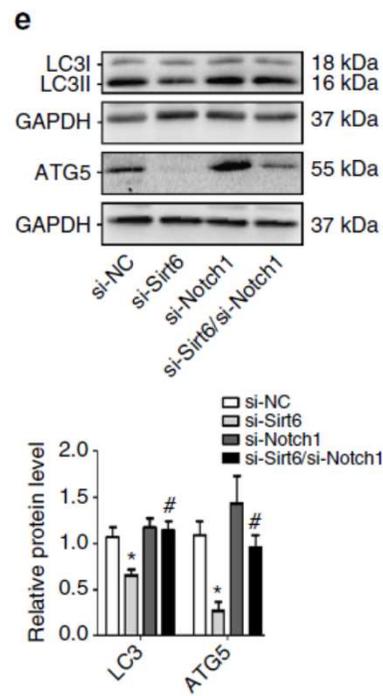
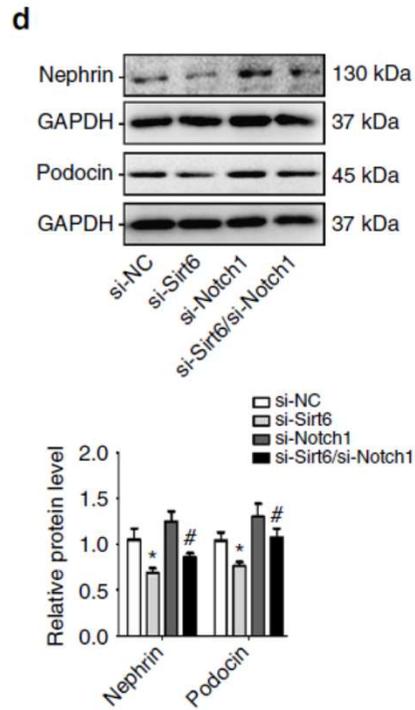
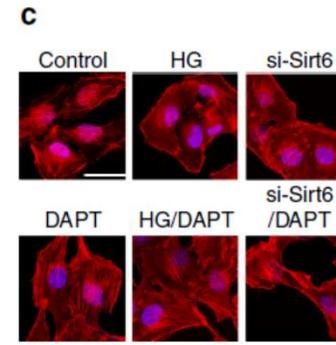
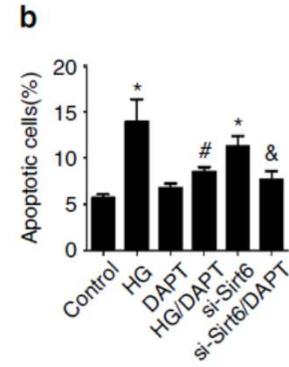
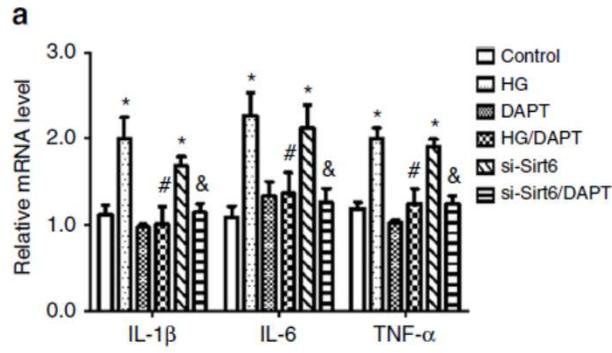




细胞水平：抑制notch减轻sirt6敲除所致足细胞损伤

- 分组：WT、高糖、DAPT、高糖+DAPT、敲除sirt6、敲除sirt6+DAPT
- WT、敲除sirt6、敲除Notch1、sirt6与Notch1双敲
- 指标：炎症因子的表达（PCR）、细胞凋亡、nephrin, podocin表达（WB）、细胞自噬、自噬基因（WB）、自噬流
- 结果：抑制notch通路减少由sirt6敲除引起的炎症因子的表达和细胞凋亡，减轻肌动蛋白的重排，恢复nephrin, podocin表达。Notch1敲除恢复sirt6敲除引起的足细胞自噬，升高自噬基因的表达和自噬流。



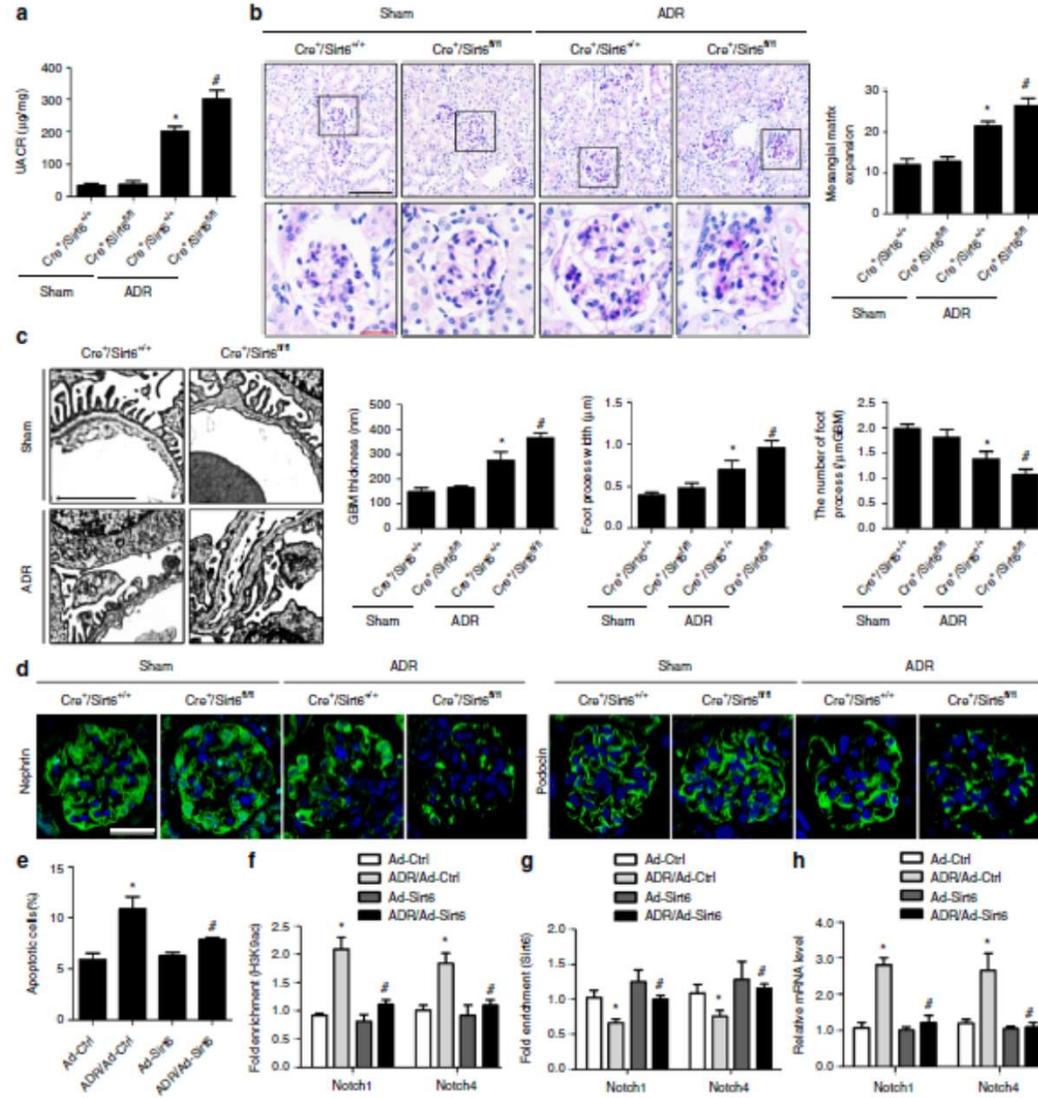




Sirt6敲除加重阿霉素肾病小鼠足细胞损伤

- 分组：
 - 动物：WT、WT+ADR模型组、Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠对照组、Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}小鼠ADR模型组
 - 细胞：WT、ADR处理、sirt6高表达、sirt6高表达+ADR处理
- 指标：
 - 动物：尿蛋白、肾小球硬化情况（PAS）、足细胞损伤：基底膜厚度、足突个数、足突厚度（电镜）、nephrin, podocin表达（免疫荧光）、
 - 细胞：足细胞凋亡、notch1、4启动子区H3K9乙酰化水平（ChiP）、sirt6与notch1、4启动子区的结合（ChiP）、notch1、4表达（PCR）
- 结果：
 - 动物：与WT+ADR模型组比较，Cre⁺/Sirt6^{fl/fl}ADR模型组小鼠尿蛋白含量增加、出现肾小球硬化和足细胞损伤、nephrin, podocin表达降低，
 - 细胞：ADR引起足细胞凋亡，sirt6高表达减轻足细胞凋亡。ADR增加足细胞notch1、4启动子区H3K9乙酰化水平，升高notch1、4的基因表达，sirt6逆转上述作用；ADR降低sirt6与足细胞notch1、4启动子区的结合，sirt6高表达逆转上述作用。



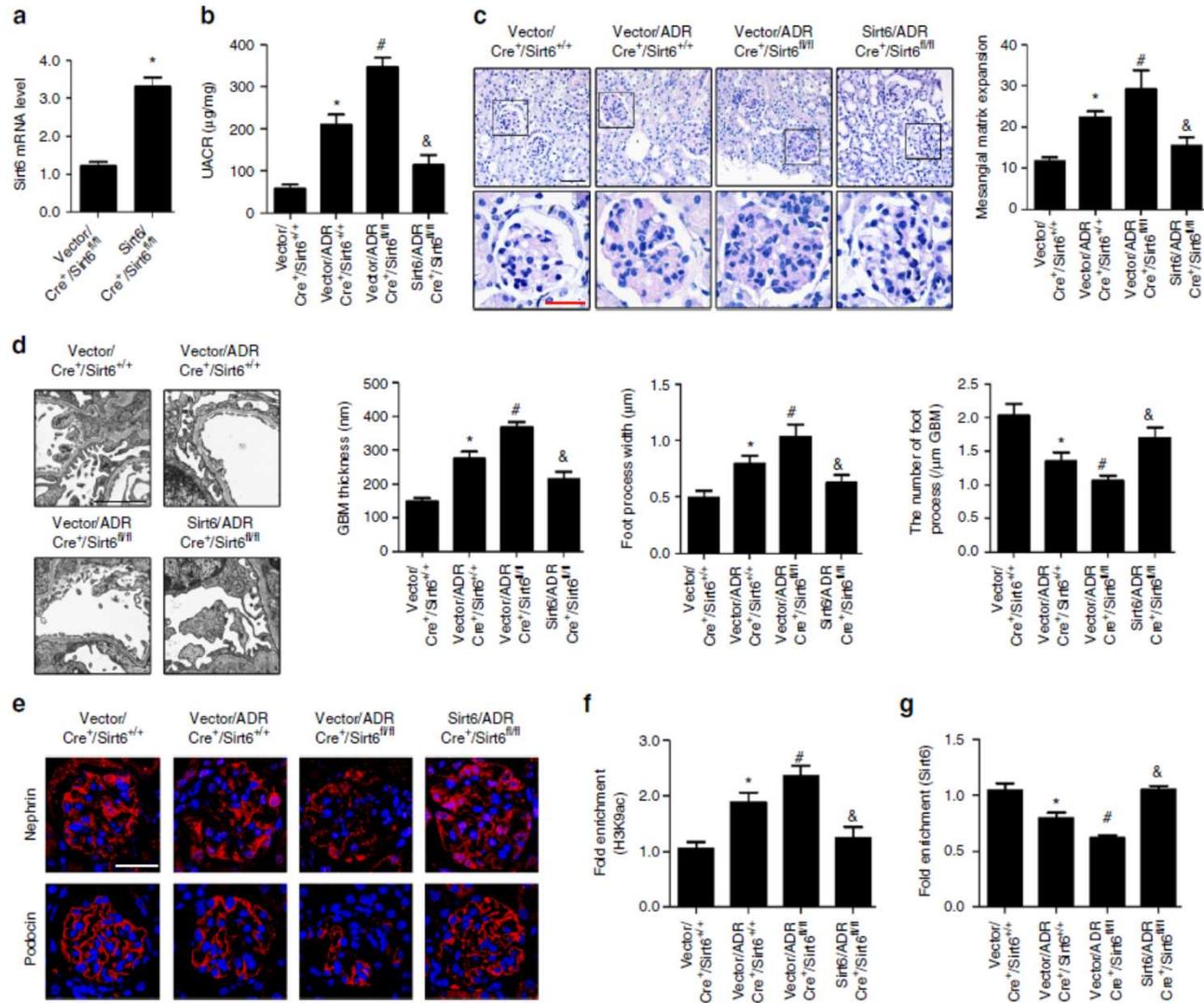




整体水平：外源性给予Sirt6过可以减轻肾损伤

- 外源性给予含有sirt6的慢病毒载体
- 分组：WT、WT+ADR、Cre+/Sirt6^{fl/fl}+ADR、Cre+/Sirt6^{fl/fl}+ADR+sirt6
- 指标：尿蛋白、基质增生（PAS染色）、足细胞损伤（电镜）、nephrin, podocin表达（免疫荧光）、自噬蛋白的表达（免疫组化）、notch1启动子区H3K9乙酰化水平（chip）、Notch1, Notch4表达
- 结果：外源性给予sirt6减轻蛋白尿，减少基质增生和足细胞损伤，恢复nephrin, podocin表达，增加自噬蛋白的表达，减少notch1启动子区H3K9乙酰化水平，降低Notch1, Notch4表达。

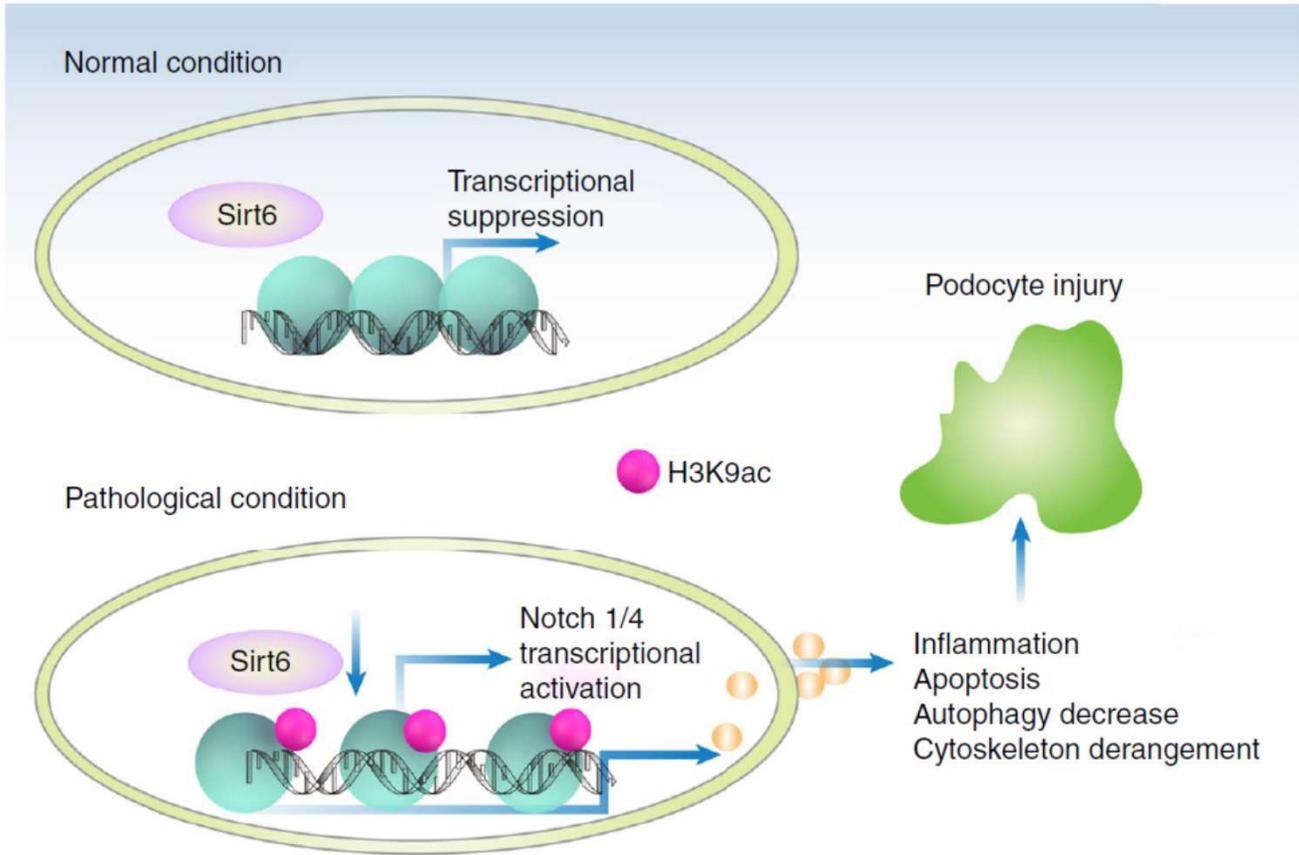






Statistics. Data are expressed as means \pm SE. Student's *t*-test was employed for comparisons between two groups; one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-test for multiple comparisons was used for groups of three or more. All tests were two-tailed, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.







例2

FSGS是由肾小球增生造成的足细胞应激所致的适应性改变

- **J Am Soc Nephrol, 2017**
- 一区, 8.996
- 研究目的: 应用podocin promoter-AA-4E-BP1转基因大鼠 (足细胞不能发生代偿性肥大), 证实肾小球非足细胞增生, 超过足细胞足突的覆盖范围, 是导致FSGS死亡机制之一。





实验设计---整体实验、人体数据比较

- 观察转基因鼠出生后7月自发性发生FSGS
- 转基因鼠单肾切除，观察术后3月（FSGS早期）肾脏形态功能及与足细胞的关系
- 术后干预（低热量、抑制mTORC1、抑制RAS）对FSGS形成的影响
- 分析FSGS发生的病理因素和干预因素
- 观察不同处理因素肾小球增生情况
- 观察不同处理因素足细胞数量、基因表达情况
- 与人FSGS数据库比较相似性



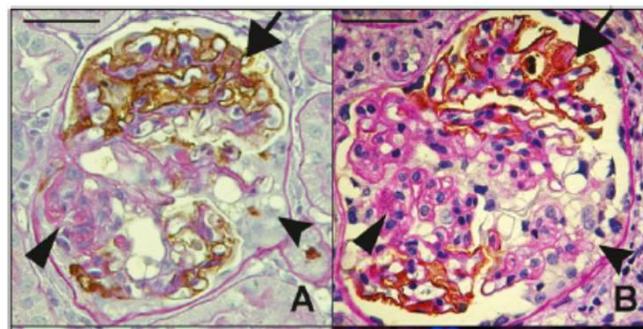


整体水平：转基因大鼠出生后7月自发性出现成熟的FSGS

- 动物：7个月（300g）转基因大鼠、Fischer344对照组大鼠
- 指标：肾小球PAS染色、足细胞阳性染色（positive Glepp1染色）、尿蛋白
- 结果

转基因组FSGS面积占整个肾小球面积的16%；硬化部位没有足细胞染色（图）；蛋白尿增加（未给数据，文字表述）

对照组：无蛋白尿、FSGS（引用文献）



podocin-AA-4E-BP1 transgenic (TG) Fischer344 rat: 正常情况下，生长因子或营养可以活化mTORC1。而此过表达鼠足细胞mTORC1不能活化，下游基因不能转录。在单肾摘除后，剩余肾脏足细胞不能满足肾小球其他细胞超滤过和肥厚的需要，12周后出现FSGS。





整体水平：转基因小鼠FSGS的发生发展

- 动物：转基因大鼠
- 造模：100g转基因大鼠单肾切除，切除3周后检测指标
- 分组：转基因鼠假手术组、转基因鼠单肾切除组（未切除动物肾脏形态学正常，引用文献）
- 指标：肾重、体重、肾功能、肾小球黏连比例、尿pocodin/肌酐比值
- 结果

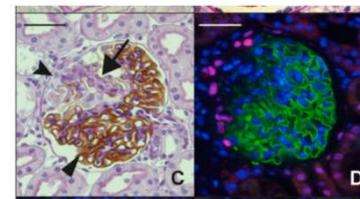
单肾切除3周肾重增加，尿蛋白/肌酐比值增加，黏连面积增加，肾小球增大，出现部分FSGS，足细胞体积不变。FSGS部位足细胞密度减少，部分毛细血管网裸露，无足细胞覆盖。PEC侵入缺乏足细胞的部位

- 结论：单肾切除导致肾小球代偿性肥大，转基因鼠足细胞不能发生适应性增加，导致部分毛细血管网裸露，出现蛋白尿和PEC的入侵，导致部分FSGS

Table 1. Phenotypic Analysis

Groups	Body Weight, g	Kidney Weight, g	Urine Protein/Creatinine Ratio	Serum Creatinine, mg%	Adhesions, %	Urine Podocin mRNA/Creat Ratio, units/g Creatinine	
TG.1K.ALD (FSGS)	202±7	1.8±0.2	7.3±1.6	1.4±0.1	5.6±2.6	3.1±2.1	
TG.2K.ALD	202±15	1.1±0.2 ^a	2.4±0.5 ^a	1.1±0.2	0.0 ^a	0.7±0.3	

Group	Glomerular Volume, ×10 ⁶ μm ³	Podocyte No. per Tuft, n	Podocyte Nuc Density, per 10 ⁶ μm	Podocyte Volume, ×10 ³ μm ³	Glepp1 Area, %	Glepp1+ve Glom Vol, ×10 ³ μm ³	Glepp1-ve Glom Vol, ×10 ³ μm ³
TG.1K.ALD (FSGS)	1.2±0.1	145±15	120±11	2.7±0.2	32.6±2.7	379±80	817±105
TG.2K.ALD	0.8±0.2 ^a	142±31	178±38 ^a	2.7±0.5	46.7±1.5 ^a	393±46	429±78 ^a

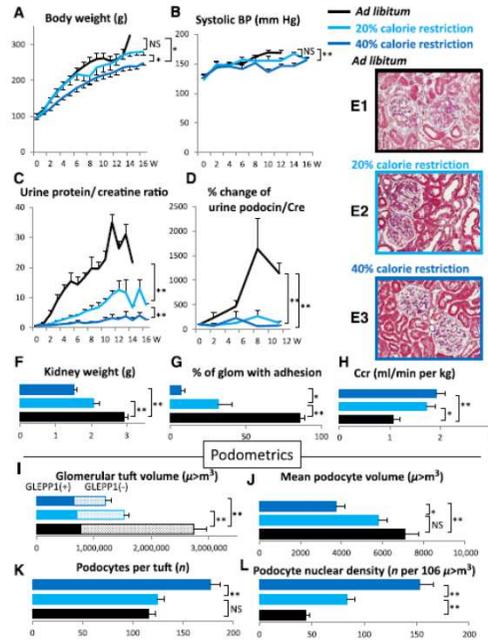




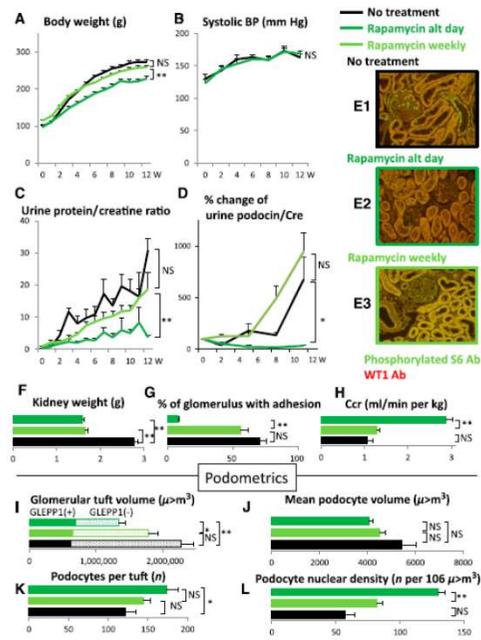
整体水平：减慢肾小球生长可以防止FSGS的发生

- 科学问题：减慢肾小球生长或抑制 RAA 是否可以防止 FSGS 的发生？
动物：转基因大鼠，术后12周处死
- 分组：转基因动物单肾切除+正常饮食
转基因动物单肾切除+ 饲料中减少热量20%
转基因动物单肾切除+ 饲料中减少热量40%
转基因动物单肾切除+雷帕霉素（mTORC1激酶抑制剂）隔天一次
转基因动物单肾切除+雷帕霉素（mTORC1激酶抑制剂）一周一次
转基因动物单肾切除+ACEI
- 指标：体重、肾重增长率、肾小球体积、足细胞脱落（尿podoci基因表达/肌酐比值）、足细胞数量（WT1免疫荧光）、足细胞密度（Glepp1免疫组化）、足细胞体积、尿蛋白/肌酐比值、肌酐清除率、收缩压
- 结果：干预组体重（ACEI不降体重）、肾重增长率降低，肾小球体积减小，足细胞脱落减少、足细胞核密度增加、细胞体积增加、肾小球中GLEPP-体积减少。肾小球与囊腔黏连减少，肌酐清除率增加，收缩压降低（雷帕霉素不降血压）
- 结论：由营养或mTORC1活化引起的肾小球增生被逆转,或阻断ang II后可以防止FSGS的发生

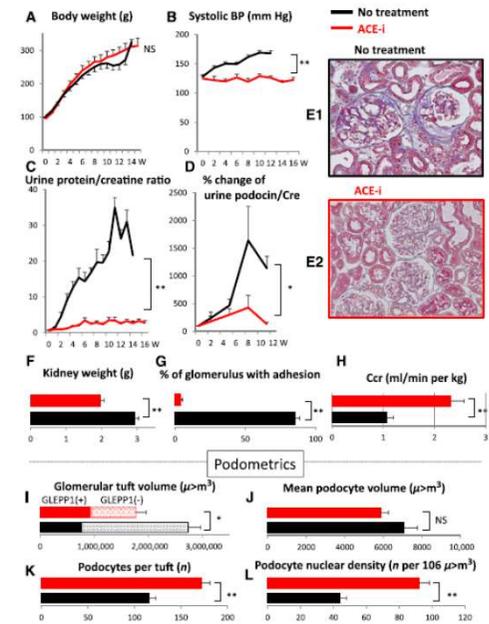




饲料中减少热量



雷帕霉素



ACEI





整体水平：治疗时间窗

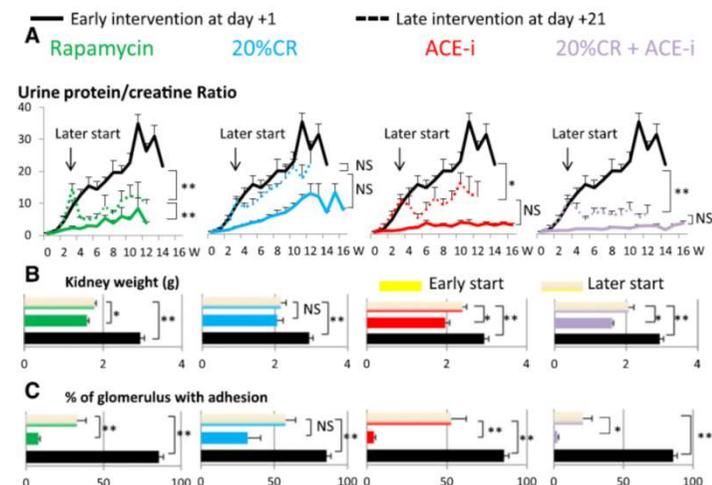
- 动物：单肾切除的转基因小鼠
- 分组（术后1天或3周开始干预）

罗帕霉素：手术组、手术后1天干预组、手术后3周干预组

低热量：手术组、手术后1天干预组、手术后3周干预组

ACEI:手术组、手术后1天干预组、手术后3周干预组

- 指标：尿蛋白/肌酐比值，肾重，肾小球黏连比例
- 结果：手术后早期干预效果更好；罗帕霉素、ACEI手术后三周后干预有效





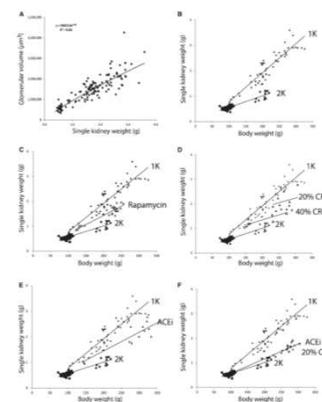
整体水平：肾小球体积-肾重-体重相关性分析

指标：肾小球体积-肾重

肾重-体重：两肾、单肾、单肾+干预因素（罗帕霉素、低热量、ACEI）

结果：肾小球体积与肾重正相关；肾重与体重正相关，但单肾与体重关系曲线的斜率更大，说明体重的增加对单肾肾小球增生的影响更大。干预因素能降低肾重-体重曲线的斜率

结论：体重增加更易造成单肾模型中肾小球增生；干预因素可以改善该现象





整体实验：细胞周期

- 科学问题：本模型中FSGS的形成是否由肾小球的增生（非足细胞的生长周期加快）引起？
- 分组：野生鼠双肾组、野生鼠单肾组、过表达鼠双肾组、过表达鼠单肾组、过表达鼠单肾+低热量饮食组、过表达鼠单肾+雷帕霉素组、过表达鼠单肾+ACEI组
- 指标：Ki67免疫荧光、不同区域Ki67阳性染色细胞核计数
- 结果：野生鼠单肾组Ki67阳性细胞数增加，主要分布在肾小球内、周边、脏层上皮细胞、间质、肾小管，与WT1阳性染色不重叠。干预因素降低Ki67阳性细胞数。
- 结论：非足细胞增生是形成FSGS的必要条件

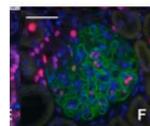


Table 3. Ki67 Cell Cycle Analysis

Group	Ki67-Positive Nuclei per Field				
	Intraglomerular	Podocyte	PEC	Periglomerular/Interstitial	Tubular
TG1K.ALD (FSGS)	10.3±1.7*	0.01±0.1	2.8±0.7*	8.2±2.2*	4.0±1.1*
TG2K.ALD	6.4±0.9*	0.1±0.1	0.9±0.4	3.2±0.5	2.0±0.4
TG1K.CRD	1.9±1.2	0.0±0.0	0.6±0.3	1.7±0.9	0.7±0.4
TG1K.ALD.Rapa	2.0±1.2	0.0±0.0	0.4±0.2	2.3±0.8	1.1±0.7
TG1K.ALD.ACEI	2.8±0.6	0.0±0.0	0.7±0.3	2.7±1.0	1.3±0.5
WT.2K.ALD	4.5±1.0*	0.0±0.0	0.7±0.4	3.2±0.8	2.5±0.9
WT.1K.ALD	6.7±1.0*	0.0±0.0	0.6±0.3	2.6±0.2	2.8±1.1





整体实验：与FSGS相关的基因表达谱

- 目的：明确FSGS有关的早期事件
- 动物：术后3周动物
- 分组：野生鼠双肾组、野生鼠单肾组、过表达鼠双肾组、过表达鼠单肾组、过表达鼠单肾+低热量饮食组、过表达鼠单肾+雷帕霉素组、过表达鼠单肾+ACEI组
- 指标：基因表达谱
- 结果：差异基因主要为细胞周期相关基因；过表达鼠单肾和野生鼠单肾组表达量最高，各干预组表达量最低，过表达和野生鼠双肾组表达量居中。

- 结论：佐证上述结果，细胞增生是FSGS发生的必要条件

PA Rank Order	Categories	Diseases or Functions Annotation	P Value	Molecules	Molecule Number
1	Cell cycle, cellular assembly, and organization, DNA replication, recombination, and repair	Regulation of	7.4E-25	ATRX/AURK1BUB1/CCNA2/CCNB1/CCNB2/CCNA4/CENPE/CENPF/ECT2/KLBP/AMMEX/PT1/AFDC/MTFB/INSTR/LATS1/LMNA/NCAPD/NCAPG/NCAPG2/NOCB/NL/NUP2/NUSAP1/PXK1/PTTG1/SGO1/STAG1/STAG2/TOP2A/TPX2/ZWINT	34
2	Cell cycle	Arrest in mitosis	1.6E-17	AURKB/BUB1/BUB1B/CDCC2/CDK1/CENPE/CENPF/CSNK1A1/DOXA2/KIF14/KIF18A/KIF18B/KIF201A/MPS2/NOCB/NL/NUP2/POW1/PXK1/PURA/BAGCAP1/SGO1/TPX2/ZWINT	23
3	Cell cycle	Mitosis	1.9E-17	AURKB/BCL2/BMP2/BUB1/BUB1B/CCNA2/CCNB1/CCNA4/CDCC3/CDCC5/CDK1/CENPE/CENPF/CENPF/CLASP/CSNK1A1/ECT2/EGAP/EPN1/ETV5/FRS3/KOMF/SGO2/SB/SLMO1/STK11/STK18A/KIF18B/KIF201A/KIF11/KIF13/LATS1/LATS2/MPS2/NOCB/NL/NUP2/NUSAP1/POGZ/POU5F1/PRK2/PPP1R1A/PHF1/PTTG1/PURA/BAGCAP1/SGO1/SIC1/SAH1/SP1/TNC/TOP2A/TPX2/TIMP3/WRHAP/ZWINT	57
4	Cell cycle	M phase	1.1E-16	AURKB/BCL2/BUB1B/CCNB1/CDAP/CDCA4/CDCC3/CDK1/CENPE/DMPL/ECT2/EPN1/AMMEX/PT1/AFDC/NOCB/NL/KIF14/KIF18A/LATS1/LATS2/LMNA/MTFB/NCAPD/NOCB/NUP2/NUSAP1/PHF1/PTTG1/SAH1/TPX2/BAGCAP1/INK4/STAG1/TOP2A/TPX2	37





FSGS早期足细胞表达情况

- 科学问题：足细胞的肥大是不是FSGS发生的必要条件？
- 动物：手术后3周的动物
- 分组：同前
- 指标：单个肾小球中足细胞数量、足细胞密度、标志基因nephrin,podocin,WT1表达
- 结果：转基因单肾组单个肾小球中足细胞数量并未减少，但足细胞密度降低，nephrin表达降低
- 结论：足细胞被稀释

Group	Podometric Parameters			Glomerular Transcript Values Expressed as % Compared with WT.2K.ALD				
	Podocyte Number per Glom	Podocyte Nuclear Density	Glepp1 Area Density	WT1	Podocin	Nephrin	Ptpro (Glepp1)	Podocin/Nephrin Ratio
TG.1K.ALD	106.6±10.7	49.9±4.7 ^a	69.6±5.8 ^a	60.3±13.1 ^a	67.6±11.1 ^b	50.8±9.4 ^a	51.6±8.1 ^a	132.7±3.2 ^a
TG.2K.ALD	104.5±23.0	74.0±15.9	99.8±3.1	107.1±17.8	99.5±16.0	93.0±14.5	121.5±16.4	106.5±4.0
TG.1K.CRD	107.4±15.7	87.9±12.0	95.5±4.8	101.1±18.5	83.6±14.9	87.9±15.4	91.4±12.2	94.8±8.9
TG.1K.ALD.Rapa	92.9±13.8	102.7±6.4	94.5±2.7	30.4±10.1 ^a	33.1±9.0 ^a	24.3±8.9 ^a	34.5±11.9 ^a	140.9±18.5 ^a
TG.1K.ALD.ACEi	96.1±12.2	76.6±13.8	89.4±3.1	68.3±13.4 ^b	66.4±14.5 ^b	62.4±12.1 ^a	63.9±13.4 ^a	105.4±7.0
WT.1K.ALD	95.8±14.0	113±31.2	99.9±2.4	88.7±4.5	94.9±5.3	86.9±6.7	77.9±9.6	108.9±3.5
WT.2K.ALD	100±14.0	100±30.2	100±3.4	100±11.7	100±5.7	100±13.0	100±8.0	100±8.5





大鼠和人FSGS基因表达情况比较

- 问题：人FSGS早期事件是不是和大鼠相似？
- 方法：将Nephroseq database数据库中FSGS早期人类肾脏标本基因组学与大鼠比较。
- 步骤：转基因单肾组正常饮食组与低热量饮食组比较，有800个基因表达由显著差异（相差1.5倍以上），其中615个可以被Nephroseq database识别。这615个基因中，376个显著升高，239个降低。然后将这两大组基因放到肾小球疾病数据库中进行相关性分析。
- 结果：二者高度正相关。





Statistical Analyses

For rat studies shown in Figures 2–5 all results are presented as mean \pm SEM. For all other studies, data are shown as the mean \pm 1 SD. Means of variables in two or more independent groups were compared by the unpaired *t* test and ANOVA with Bonferroni correction.





肾素-血管紧张素抑制剂通过转录因子KLF4影响足细胞表遗传并改善蛋白尿

- 杂志：**Kidney International**；2015
- 分区及IF：一区，**8.563**
- 研究目的：证实**ARB**通过上调**KLF4**，促进**nephrin**去甲基化，上调**nephrin**表达，维持足细胞功能





实验设计

- 整体水平：ARB通过上调KLF4表达降低nephrin启动子区DNA甲基化
- 整体水平反证：敲除KLF4能抑制ARB对肾脏的保护作用
- 细胞水平：angII通过抑制KLF4表达来诱导nephrin启动子甲基化
- 人肾脏疾病中KLF4和nephrin表达降低，nephrin启动子区甲基化水平升高

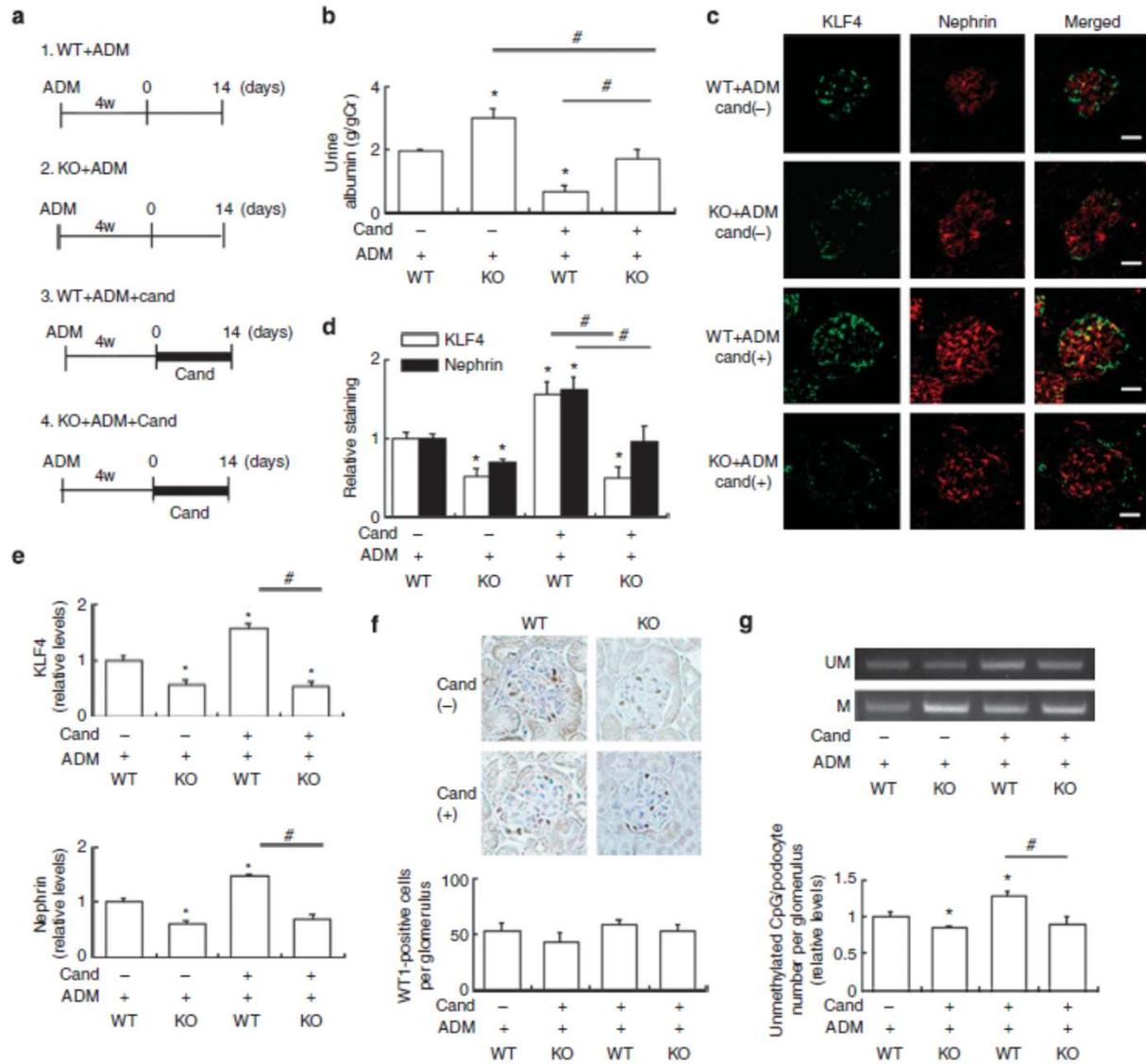




整体水平：ARB通过上调KLF4表达降低nephrin启动子区DNA甲基化

- 动物：WT小鼠
- 分组：空白、阿霉素模型、坎地沙坦、阿霉素+厄贝沙坦、阿霉素+卡托普利
- 指标：尿白蛋白、肾脏ang II水平、肾脏KLF4、nephrin、podocin表达（免疫荧光、WB、PCR）、WT1阳性染色（免疫组化）、nephrin启动子区甲基化水平（MSP）
- 结果：ADM模型中，肾脏ang II水平上调，尿蛋白含量增加；肾脏KLF4、nephrin、podocin表达降低，足细胞数量减少，nephrin启动子区甲基化水平升高。ARB或ACEI可以逆转上述现象。



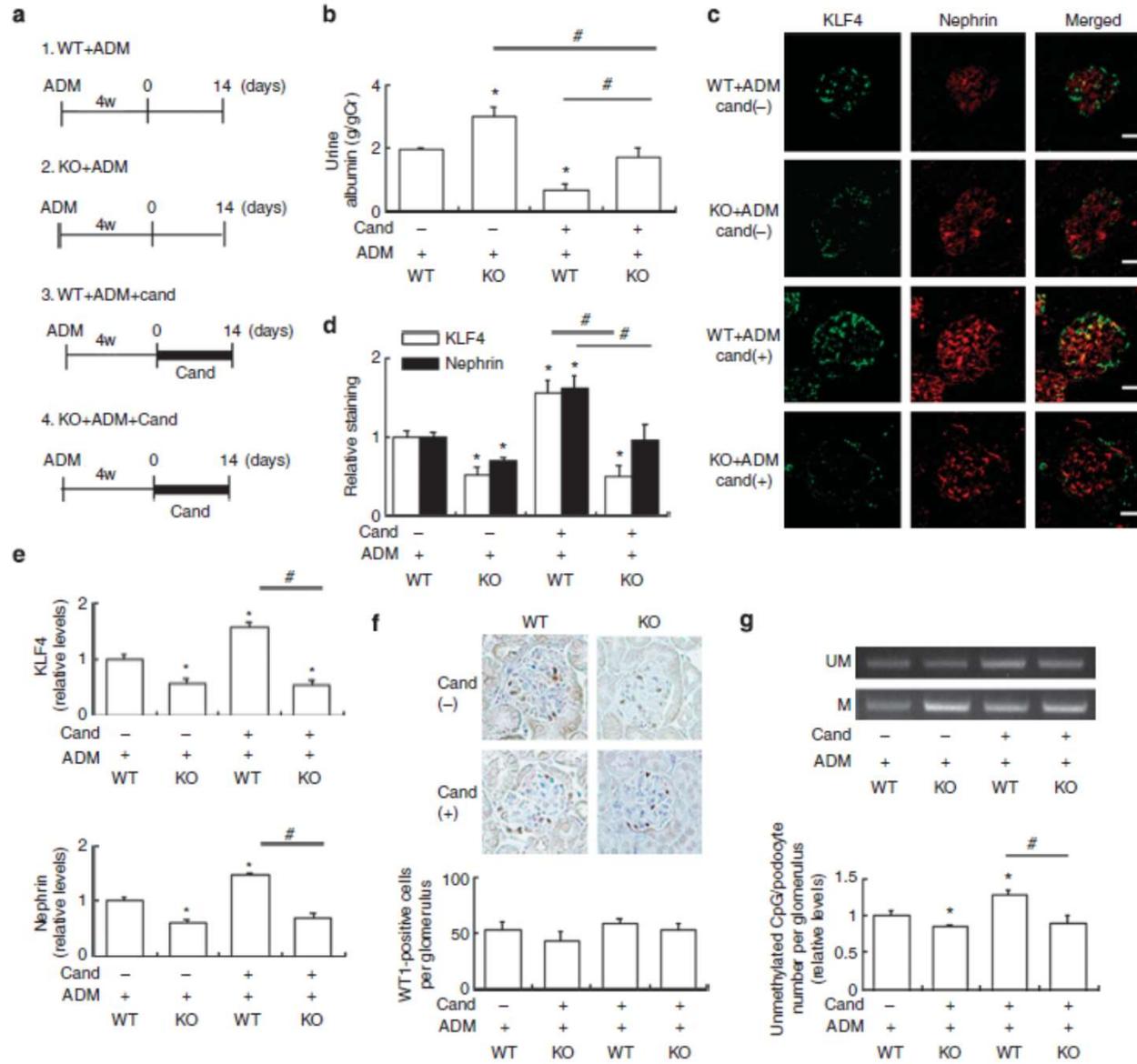




整体水平：敲除KLF4能抑制ARB对肾脏的保护作用

- 建立了足细胞特异性KLF4敲除小鼠
- 分组：WT+ADM, KO+ADM, WT+ADM+cand, KO+ADM+cand
- 指标：尿白蛋白，肾脏KLF4、nephrin表达（免疫荧光、PCR（激光分离肾小球））、足细胞数量（WT1阳性染色，免疫组化）、nephrin启动子甲基化水平
- 结果：KLF4敲除造模小鼠尿蛋白显著高于野生型造模小鼠，ARB处理显著降低野生型和敲除小鼠尿蛋白，但对敲除小鼠的改善作用没有野生型明显。ARB并不增加敲除鼠KLF4表达，对nephrin的升高作用也很小。KLF4敲除对足细胞数量没有明显改变。KLF4敲除升高nephrin启动子区甲基化水平，ARB不能明显改善该作用。
- 结论：敲除KLF4能抑制ARB对肾脏的保护作用



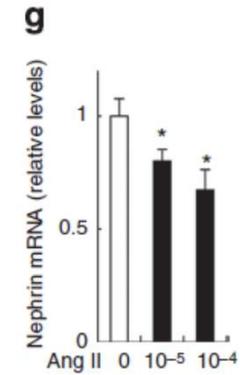
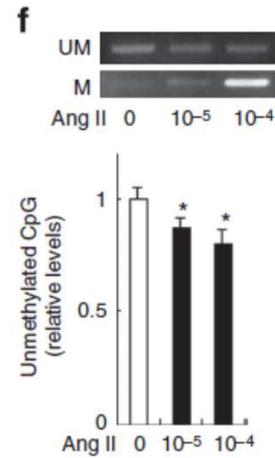
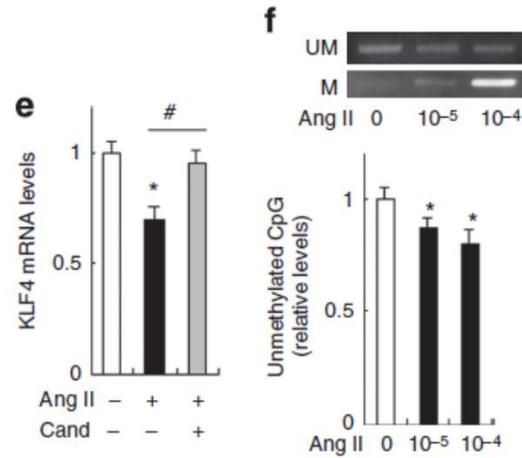
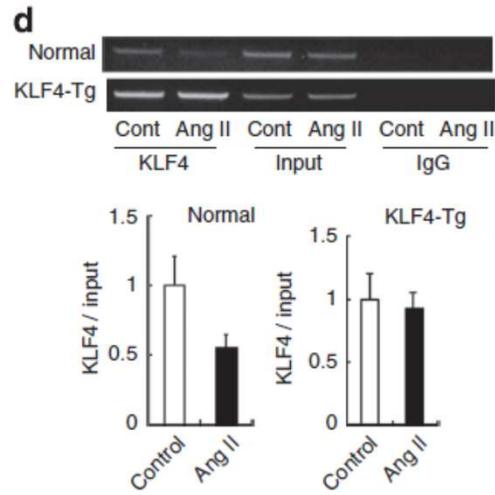
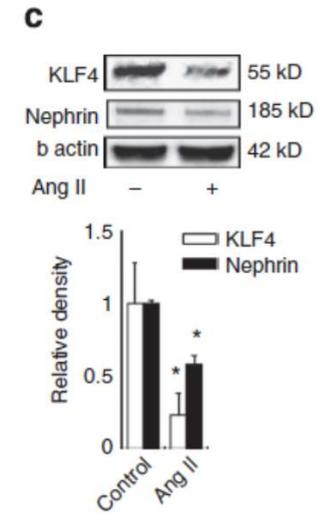
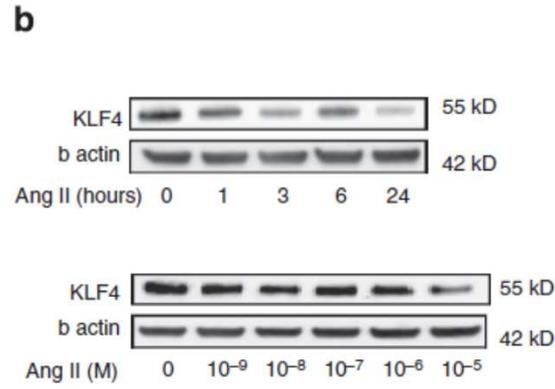
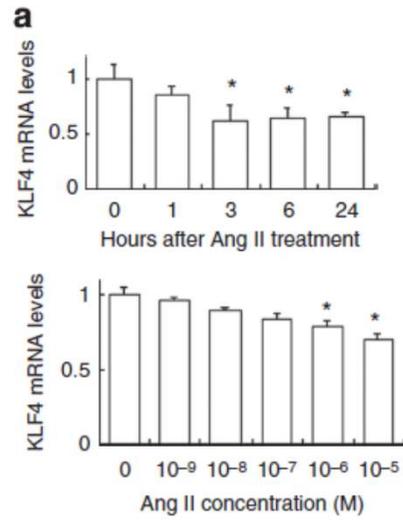




细胞水平：angII通过抑制KLF4表达诱导nephrin启动子甲基化

- 细胞：人足细胞系
- 处理：angII处理细胞（不同时间/不同剂量）
- 空白、angII、angII+坎地沙坦
- 指标：KLF4、nephrin表达（WB,PCR）、KLF4与nephrin启动子区的结合（chip）、nephrin启动子甲基化水平（chip）、DNMT1与nephrin启动子的结合（chip）、
- 结果：angII抑制KLF4和nephrin基因转录，KLF4与nephrin启动子区的结合减少。ARB能逆转angII所致的KLF4表达降低。angII升高nephrin启动子甲基化水平，降低其表达，抑制DNMT1与nephrin启动子的结合







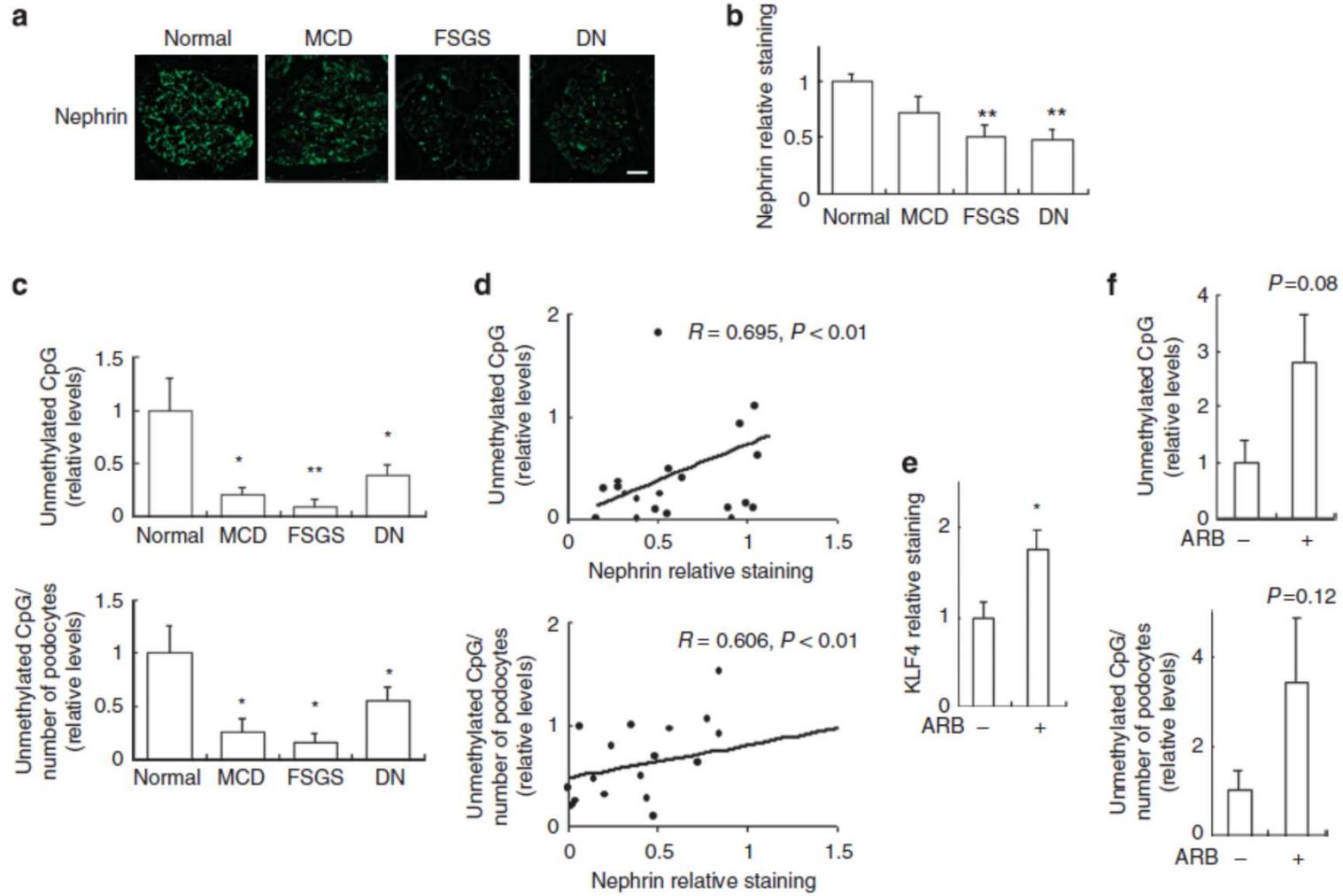
人肾脏疾病中KLF4和nephrin表达降低，nephrin启动子区甲基化水平升高

- 人体标本：对照（8例）、微小病变型肾病（9例）、FSGS（8例）、糖尿病肾病（8例）

所有病人服用ARB

- 指标：nephrin表达（免疫荧光）、nephrin启动子区甲基化水平、二者的相关性、单个足细胞中nephrin表达和启动子区甲基化水平；
- 结果：病人标本中nephrin表达降低，nephrin启动子区非甲基化水平降低、二者正相关。ARB升高病人KLF4表达，nephrin启动子区非甲基化水平升高







Statistics

Results were expressed as the mean \pm s.e.m. Statistical comparisons were made by ANOVA followed by Scheffe's *post-hoc* test between more than two groups, and by a two-tailed Student's *t*-test between two groups. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.





Thank You

