

• 实验研究 •

慢肾康宁对肾间质纤维化大鼠内质网应激
PERK-ATF4 通路的影响孙升云^{1*} 金鑫¹ 黄少君² 徐梅² 颜显欣² 朱诗平¹ 何玲² 聂玲辉²

(1. 暨南大学附属第一医院, 广东省广州市黄埔大道西 630 号, 510515; 2. 暨南大学医学院)

基金项目: 暨南大学科研培育与创新基金资助项目

* 通讯作者: tsunsy@jnu.edu.cn, (020)38688118

[摘要] **目的** 探讨慢肾康宁对肾间质纤维化大鼠肾脏组织的保护作用及机制。 **方法** 60 只雄性 Wistar 大鼠, 随机选取 7 只为正常组, 其余 53 只采用 2.5% 腺嘌呤悬浮液灌胃建立肾间质纤维化模型, 21 d 后将 50 只造模成功的大鼠随机分为模型组、氯沙坦组[10 mg/(kg·d)]、慢肾康宁低剂量组[7.5 g/(kg·d)]、慢肾康宁中剂量组[15 g/(kg·d)]、慢肾康宁高剂量组[30 g/(kg·d)], 每组 10 只, 分别给予相应药物灌胃, 正常组和模型组以等量蒸馏水灌胃, 连续 30 d。实验结束后, 检测各组大鼠血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、24 小时尿蛋白定量(24hMTP), 估算肾小球滤过率(eGFR), HE 和 Masson 染色观察肾组织病理变化, 免疫组织化学方法检测肾组织内质网应激标志性蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78), TUNEL 法检测肾小管上皮细胞凋亡水平, 实时定量 PCR 测定肾组织 GRP78、转录激活因子 4(ATF4)、CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)mRNA 表达水平。 **结果** 与模型组比较, 氯沙坦组和慢肾康宁各剂量组 Scr、BUN、24hMTP 均显著下降($P < 0.01$), eGFR 上升($P < 0.01$)。病理观察, 模型组可见肾小管上皮细胞凋亡、坏死、脱落, 肾小管扩张、炎性细胞浸润, 肾间质内腺嘌呤代谢产物沉积和胶原纤维增生, 氯沙坦组和慢肾康宁各组较模型组病理变化轻。与模型组比较, 各给药组 GRP78 表达水平及细胞凋亡水平均下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各给药组 GRP78、ATF-4、CHOP mRNA 表达水平较模型组降低($P < 0.05$)。 **结论** 慢肾康宁对肾间质纤维化大鼠肾脏组织内质网应激 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 通路过度表达有很好的抑制作用, 具有肾脏保护作用, 这可能是它减轻肾间质纤维化的重要机制之一。

[关键词] 慢肾康宁; 肾间质纤维化; 内质网应激; 葡萄糖调节蛋白 78; 转录激活因子 4; CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白

Effect of Manshen Kangning Formula on PERK/ATF4 Pathway in Endoplasmic Reticulum Stress in Renal Interstitial Fibrosis Rats
SUN Shengyun¹, JIN Xin¹, HUANG Shaojun², XU Mei², YAN Xianxin², ZHU Shiping¹, HE Ling², NIE linghui²

(1. The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangdong Province 510515; 2. Medical College of Jinan University)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect and mechanism of Manshen Kangning Formula (formula for chronic kidney disease, MKF) on endoplasmic reticulum stress in renal tissue of renal interstitial fibrosis rats. **Methods** Sixty male Wistar rats were selected, seven were randomly set into normal group, and other 53 were given 2.5% adenine to make renal interstitial fibrosis model. After modeling, fifty successful model rats were randomized into model group, losartan group, MKF small-dose group, MKF middle-dose group and MKF large-dose group, with 10 in each. The treatment groups were given losartan suspension [10mg/(kg·d)], small-dose MKF suspension [7.5g/(kg·d)], middle-dose MKF suspension [15g/(kg·d)] and large-dose MKF suspension [30g/(kg·d)] respectively and the same amount of distilled water was given to the normal group and model group intragastrically. The administration lasted for 30 days. The serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), 24-hour urinary protein (24hUP) and estimated glomerular filtration rate (eGFR) were detected. The renal histopathological changes were observed with HE and Masson staining. The glucose-regulated protein 78 (GRP78) was detected with immunohistochemical staining and the apoptotic cells were detected with TUNEL staining. Real Time PCR was used to detect the expression levels of GRP78 mRNA, activating transcription factor 4 (ATF4) mRNA and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) mRNA. **Results** Comparing with the model group, the levels of Scr, BUN and 24hUP were significantly decreased ($P < 0.01$), but the eGFRs were significantly increased in the losartan group and MKF groups ($P < 0.01$). Apoptosis, necrosis and shedding in renal tubular epithelial cells, tubular dilatation, inflammatory cell infiltration, adenine metabolite deposition and collagen fibers in renal interstitial tissue could be seen under the microscope in the model group. Comparing with the model group, the pathological changes were lighter in the losartan group and MKF groups. Comparing with the model group, GRP78 expressions and apoptosis levels were significantly decreased in the losartan group and MKF

large-dose group ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the expressions of GRP78 mRNA, ATF-4 mRNA and CHOP mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Endoplasmic reticulum stress is related to the occurrence and development of renal interstitial fibrosis. MKF can attenuate renal interstitial fibrosis and protect kidney function, which may be relevant to regulating the over expression of PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway.

Keywords Manshen Kangning Formula(formula for chronic kidney disease); renal interstitial fibrosis; endoplasmic reticulum stress; glucose-regulated protein 78; activating transcription factor 4; CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein

肾小球硬化和肾间质纤维化是各种慢性肾脏病(CKD)发展到终末期的共同途径^[1-2]。其中肾间质纤维化在慢性进程中作用更大,阻止肾间质纤维化的进展对防治CKD有重大意义。过强或者持续时间过久的内质网应激(ERS)可引起细胞凋亡^[3]。肾小管细胞过度凋亡可引起肾小管细胞减少,肾小管萎缩和肾间质纤维化^[4]。ERS可诱导肾小球足细胞的结构及功能障碍,直接导致肾小球硬化及急性肾衰竭^[5],目前认为,PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP通路在此过程中起重要作用。本实验选择腺嘌呤诱导的肾间质纤维化大鼠模型,探讨慢肾康宁对肾间质纤维化大鼠ERS的抵抗作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 动物

由南方医科大学动物中心购进60只雄性SPF级Wistar大鼠,体重160~180g,许可证号:SCXK(粤)2011-0015。

1.2 药物

氯沙坦钾片(100mg/片,批号:09220),由杭州默沙东制药有限公司生产。腺嘌呤(批号:MC1025B0510J),由加拿大BBI公司生产。慢肾康宁(黄芪30g、党参15g、茯苓15g、淫羊藿20g、山萸肉9g、麦冬12g、生地黄12g、丹参10g、海螵蛸15g、大黄9g)均采用三九免煎配方颗粒,用蒸馏水调整至合适浓度。

1.3 试剂与仪器

葡萄糖调节蛋白(GRP78)、转录激活因子4(ATF-4)、CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、内参Actin引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。Trizol试剂盒(批号:5596-026)由美国Invitrogen公司生产。逆转录反应试剂和PCR反应试剂(SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit)由天根生化科技有限公司生产。9600PCR扩增仪(美国PE公司)、Chrono4全自动荧光定量PCR仪(美国MJ Research公司)。

1.4 动物模型的建立及分组

采用随机数字表法选取7只大鼠为正常组,其

余53只为造模组。造模组给予2.5%腺嘌呤悬浮液,按250mg/(kg·d)的剂量灌胃21天,正常组用等量蒸馏水灌胃。21天后采用目内眦取血,检测血清肌酐(SCr)、尿素氮(BUN),证实腺嘌呤诱导大鼠肾间质纤维化模型成功后(死亡3只),采用随机数字表法分为模型组、氯沙坦组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组10只。治疗过程中死亡8只,其中模型组2只,氯沙坦组4只,低剂量组和中剂量组各1只。

1.5 给药方法

氯沙坦组给予氯沙坦钾片10mg/(kg·d)大鼠灌胃,慢肾康宁根据临床用量配成相应浓度:给药参照人鼠换算公式:大鼠的用药量(mg/kg)=临床常用量(mg/kg)×大鼠等效面积系数(6.25),中剂量15g/(kg·d),低剂量7.5g/(kg·d),高剂量30g/(kg·d),连续灌胃30天,正常组、模型组予以等量蒸馏水灌胃。

1.6 检测指标

1.6.1 生化指标检测 给药30天后采集各组大鼠24小时尿液标本,腹主动脉抽血1.5ml,离心取血清送暨南大学附属第一医院检验中心,测定SCr、BUN、24小时尿蛋白量(24hMTP)及肾小球滤过率(eGFR)。

1.6.2 肾组织形态学观察 大鼠处死后,取肾脏组织块4℃生理盐水冲洗,放入4%甲醛固定液中固定,制作石蜡切片,HE染色观察组织病理变化,采用Masson染色观察肾组织纤维化改变。免疫组织化学采用常规SABC法,显微镜下观察肾脏GRP78表达情况,阳性反应物为棕黄色颗粒。每组大鼠随机选取5张切片,每张切片在高背景下取5个视野,显微镜下观察,计算机图像分析软件(imagepro plus 5.0)计数分析。

1.6.3 TUNEL检测细胞凋亡水平 石蜡切片常规脱蜡脱水,按照TUNEL试剂盒(批号:KGA7022)说明书操作,显微镜下观察肾脏细胞凋亡情况。细胞核呈棕色颗粒为阳性细胞。每组大鼠随机选取5张切片,每张切片在高背景下取5个视

野,计算机图像分析软件计数分析。

1.6.4 荧光定量 RT-PCR 检测 大鼠处死后,取肾脏组织 4℃ 生理盐水冲洗,组织总 RNA 的提取按照 Trizol 说明书进行。配置逆转录体系:10×RT mix 2 μl,超纯 dNTP 2 μl,Oligo dT₁₅ 2 μl,Quant Reverse 1 μl,RNase Free dH₂O(13-x) μl,Total RNA x 配置成 20 μl 的反应体系。充分混匀后然后放入 PCR 仪,37℃,60 min,进行逆转录合成 cDNA,以此为模板进行荧光定量 PCR。根据基因库设计引物序列如下:Actin: F-TGTTGCCCTAGACTTCGAGCA, R-GGACCCAGGAAGGAAGGCT,产物大小 155bp;GRP78: F-AACCCAGATGAGGCTGTAGCA, R-ACATCAAGCAGAACCAGGTCA,产物大小 91bp;CHOP: F-CCAGCAGAGGTCACAAGCAC, R-CGCACTGACCACTCTGTTTC,产物大小 126bp;ATF4: F-GCATCTGTATGAGCCCTGAGTCC, R-CCACGAGGAACACCTGGAGAAG,产物大小 103bp。PCR 扩增条件:95℃ 1 min,94℃ 15 s,57℃ 5 s(GRP78 56℃),68℃ 30 s,40 个循环。以 RNase Free dH₂O 代替 cDNA 为阴性对照组。2^{-ΔΔCT} 法计算组间倍数。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 肾间质纤维化模型建立的评价

表 1 示,造模 21 天后,模型组大鼠 SCr、BUN、24hMTP、eGFR 较正常组均显著升高($P < 0.05$ 或

$P < 0.01$)。说明模型建立成功。

2.2 各组大鼠 SCr、BUN、24hMTP、eGFR 比较

表 2 示,模型组 SCr、BUN 和 24hMTP 与正常组比较明显升高($P < 0.01$),eGFR 显著降低($P < 0.01$)。各治疗组与模型组比较,SCr、BUN 和 24hMTP 水平显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),eGFR 上升($P < 0.01$)。与氯沙坦组比较,低、中剂量组 SCr、BUN 和 24hMTP 水平显著下降($P < 0.05$),eGFR 上升($P < 0.05$),高剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠肾组织病理变化

形态:肉眼观察肾组织,正常组呈蚕豆样,红褐色,质地坚实,体积无肿大,有光泽。模型组和各治疗组大鼠的肾脏体积均有不同程度的增大,模型组尤甚,外观呈“大白肾”,表面可见大量白色颗粒分布,质地坚实。

HE 染色:显微镜下观察,正常组大鼠的肾脏结构正常。模型组可见大量的肾小管上皮细胞凋亡、坏死、脱落,肾小管扩张、炎性细胞浸润,有不同程度的萎缩、坏死。肾小管以及肾间质内有大量棕黄色的腺嘌呤代谢产物沉积。氯沙坦组和慢肾康宁各组较模型组病理变化轻,肾小管萎缩和扩张好转,上皮细胞相对完整,炎症细胞浸润较少,肾小球及小管中棕黄色颗粒减少。见图 1。

Masson 染色:模型组肾间质可见大量蓝染胶原纤维增生,肾小球病变不明显。氯沙坦组和慢肾康宁各组较模型组病理变化轻,肾小管萎缩和扩张好转,胶原纤维增生相对减少。见图 2。

表 1 造模后正常组与模型组大鼠 SCr、BUN、24hMTP 及 eGFR 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	24hMTP(mg/d)	eGFR(ml/min)
正常组	7	25.00±1.87	7.11±0.97	113.09±28.53	98.64±4.69
模型组	50	309.73±1.97**	52.39±17.72*	517.30±47.80**	7.05±2.73**

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 各组大鼠 SCr、BUN、24hMTP、eGFR 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	24hMTP(mg/d)	eGFR(ml/min)
正常组	7	34.83±4.12	6.10±1.01	115.00±5.71	98.20±9.99
模型组	8	340.00±22.99*	23.74±2.51*	675.86±74.58*	19.30±2.48*
氯沙坦组	6	174.67±11.00*▲▲	14.83±2.08*▲▲	303.37±52.80*▲▲	51.17±3.54*▲▲
低剂量组	9	266.11±14.78*▲▲△	18.90±2.14*▲▲△	493.76±37.04*▲▲△	27.18±5.98*▲▲△
中剂量组	9	234.75±13.59*▲▲△	18.78±0.88*▲▲△	438.84±34.69*▲▲△	32.61±5.75*▲▲△
高剂量组	10	176.80±18.60*▲▲	14.53±2.25*▲▲	323.81±41.83*▲▲	49.96±10.95*▲▲

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与氯沙坦组比较,△ $P < 0.05$

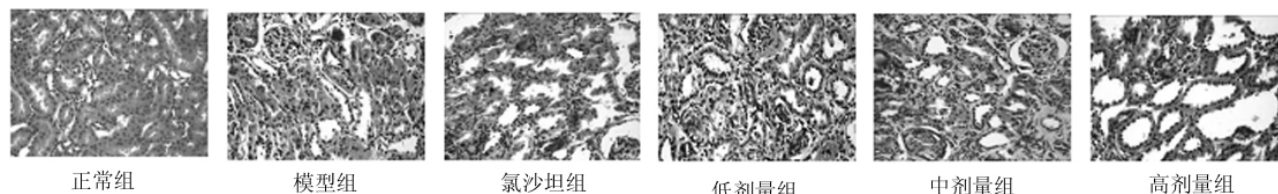


图 1 各组大鼠肾组织病理变化(HE 染色×200)

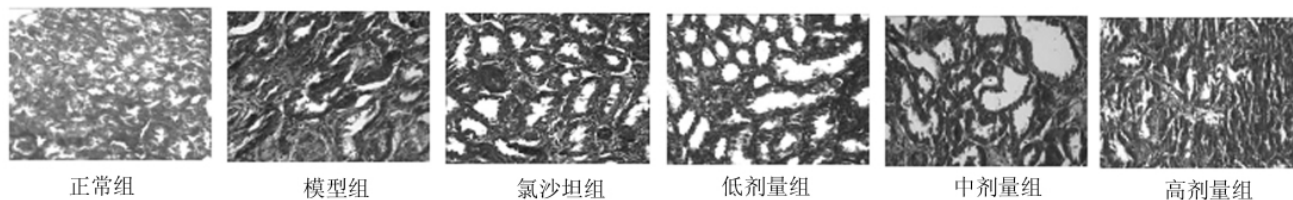


图 2 各组大鼠肾组织病理变化(Masson 染色×200)

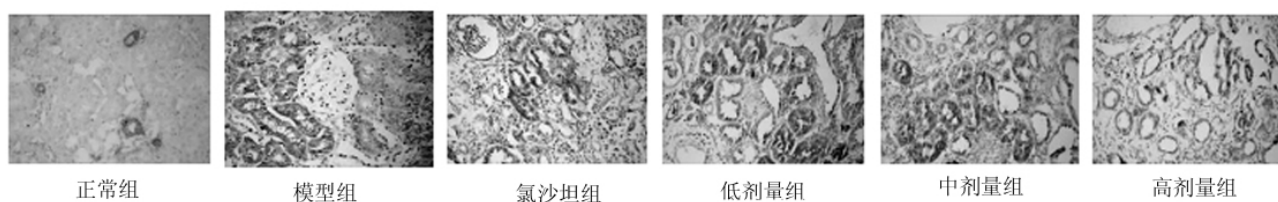


图 3 各组大鼠肾组织中 GRP78 的表达(×200)

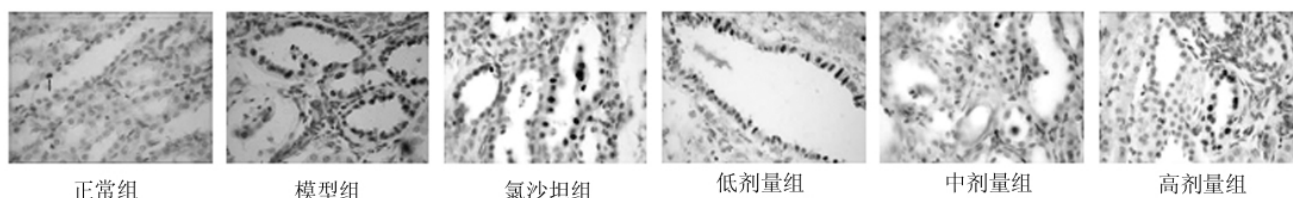


图 4 各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡表达(TUNEL 染色×400)

表 3 各组大鼠肾组织 GRP78 蛋白表达、细胞凋亡指数及 GRP78、ATF-4、CHOP mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	GRP78 光密度	凋亡指数	GRP78 mRNA	ATF-4 mRNA	CHOP mRNA
正常组	7	0.03±0.02	5.59±1.71	1	1	1
模型组	8	40.14±4.60*	40.14±4.60*	7.77±0.91*	6.32±0.43*	6.04±0.24*
氯沙坦组	6	11.76±1.50*▲▲	11.76±1.50*▲▲	4.18±0.66*▲	3.09±0.53*▲	2.68±0.32*▲
低剂量组	9	25.32±1.77*▲△	25.32±1.77*▲△	5.46±0.62*▲△	5.15±0.07*▲△	5.45±0.81*▲△
中剂量组	9	23.13±0.77*▲△	23.13±0.77*▲△	5.03±0.66*▲△	5.07±0.16*▲△	5.07±0.34*▲△
高剂量组	10	14.37±0.90*▲▲	14.37±0.90*▲▲	3.82±0.66*▲	3.51±0.26*▲	2.66±0.31*▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与氯沙坦组比较,△ $P<0.05$

2.4 各组大鼠肾组织 GRP78 表达和分布比较

GRP78 蛋白主要表达于肾小管,肾小球中有少量表达。正常组大鼠肾组织 GRP78 表达较弱。模型组表达最强,慢肾康宁随着剂量的增加表达渐减,氯沙坦组与高剂量组表达较弱,见图 3、表 3。

2.5 各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡比较

正常组肾组织细胞凋亡不明显。模型组有大量的肾小管上皮细胞凋亡,氯沙坦组和高剂量组凋亡较轻,慢肾康宁各组随着剂量的增加凋亡程度逐渐减轻($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图 4、表 3。

2.6 各组大鼠肾组织 GRP78、ATF-4、CHOP mRNA 表达比较

表 3 示,与正常组比较,各组 GRP78、ATF-4、CHOP mRNA 表达差异有统计学意义($P<0.05$);各给药组与模型组比较,GRP78、ATF-4、CHOP mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$);低、中剂量组与氯沙坦组比较,GRP78、ATF-4、CHOP mRNA 表达上升,差异有统计学意义($P<0.05$);氯沙坦组与高剂量组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

近年来,CKD 的发病率呈递增趋势,我国对近 5 万名 18 岁以上成年人进行 CKD 流行病学调查显示,成年人群中 CKD 的患病率为 10.8%,估计现有成年 CKD 患者 1.2 亿,而知晓率仅为 12.5%^[6]。因此对 CKD 早期进行干预治疗,延缓肾功能损伤的进展具有重要的意义。细胞过度凋亡是导致肾间质纤维化的重要原因之一,其机制尚不明确^[7]。常见凋亡通路分别是:线粒体通路,死亡受体通路和内质网通路。内质网通路是新近研究发现的凋亡途径,其核心内容是 ERS。内质网主要的生理功能是负责正确折叠蛋白质的合成转运、信号肽识别和糖基化修饰,Ca²⁺ 的贮存和调节,信号转导等。大量的分子伴侣在内质网中辅助蛋白质前体完成折叠。在分子途径稳态下,分子伴侣 GRP78 与 3 个蛋白(PERK、ATF6、IRE-1)结合,使 3 个蛋白处于无活性状态,内质网才能释放成熟的蛋白质。当缺氧、Ca²⁺ 稳态失衡、能量缺乏或蛋白质突变等内质网内环境发生变化时,未成熟蛋白质就会在内质网中堆积,这一过程即为 ERS。研究证实,ERS 是一种信号反应通路系统,属细胞自我保护机制的一部分^[8]。若严重或长时间的 ERS 损伤内质网的功能,GRP78 从 3 种跨膜蛋白上解离,解离后的蛋白被激活,启动由 ERS 介导的凋亡信号通路,激活下游的凋亡信号分子(CHOP、JNK、caspase12 和 Bcl-2 家族)^[9],进而引起细胞的代谢和凋亡。

慢肾康宁是临床应用多年的治疗 CKD 3~4 期的经验方,由党参、黄芪、茯苓、淫羊藿、山茱萸、麦冬、生地黄、丹参、大黄等组成,具有健脾益肾、利湿祛浊等功效。临床研究证实,该方可有效降低 CKD 3~4 期 SCr、BUN、胱抑素(cys-c),提高 eGFR,同时可减轻蛋白尿,改善患者腰膝酸软、倦怠乏力、食少纳差等症状^[10]。我们以往的实验研究表明,慢肾康宁通过上调血管内皮生长因子(VEGF),降低血小板反应蛋白 1(TSP-1)、转化生长因子-β₁(TGF-β₁),下调促细胞凋亡蛋白(Bax),增高肾组织中水通道蛋白 2(AQP-2)的表达水平,减少了肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化^[11-12]。以往实验研究证实,慢肾康宁可以通过减少肾小管细胞凋亡来缓解肾间质纤维化,推测慢肾康宁可能减轻 ERS,减少细胞凋亡,保护肾功能。

本实验研究结果显示,慢肾康宁各剂量组与模型组比较,SCr、BUN、24hMTP 均有所降低,eGFR

上升,说明大鼠肾功能有所恢复,其中高剂量组与氯沙坦组疗效最好。GRP78 在模型组中大量表达,说明 ERS 在腺嘌呤诱导的大鼠肾间质纤维化模型中存在,同时高剂量组可有效降低 GRP78 蛋白表达。TUNEL 检测细胞凋亡中可见肾小管细胞凋亡的数量也逐渐减少,其中氯沙坦组和高剂量组下降明显。慢肾康宁还能降低 GRP78、ATF4 和 CHOP mRNA 表达水平,氯沙坦组和高剂量组疗效最好。因此可以推测慢肾康宁可能通过 PERK-eIF2α-ATF4-CHOP 通路减少 ERS 的发生而起到肾脏保护作用。说明在腺嘌呤诱导的肾间质纤维化大鼠模型中 ERS 参与了肾间质纤维化的发生发展,而慢肾康宁可以减轻 ERS,减少细胞凋亡的发生,维持机体内环境的稳定,保护肾组织,从而延缓肾功能恶化的进展。

参考文献

- [1] el Nahas AM. Pathways to renal fibrosis[J]. *Exp Nephrol*, 1995, 3(2): 71-75.
- [2] 祖金池, 崔娜, 段斐. 特发性肺纤维化中的信号转导通路[J]. *医学研究与教育*, 2009, 26(2): 79-81.
- [3] Iwano M, Neilson EG. Mechanism of tubulointerstitial fibrosis [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004, 13(3): 279-284.
- [4] Hughes J. Apoptosis in tubulointerstitial renal disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(Suppl 6): 55-57.
- [5] 刘宝琴, 王华芹. 内质网应激与未折叠蛋白反应的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 6(11): 869-872.
- [6] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815-822.
- [7] 刘光辉. 内质网应激在糖尿病大鼠肾损害中的作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2010: 34-35.
- [8] Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress[J]. *Trends Microbiol*, 2005, 13(4): 159-163.
- [9] 张红, 李学旺. 内质网应激在糖尿病肾病中的作用和机制[J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27(2): 135-138.
- [10] 孙升云, 金玲, 冯伟峰, 等. 氯沙坦与中药肾衰方合用对慢性肾衰患者肾功能的保护作用[J]. *暨南大学学报(自然科学和医学版)*, 2009, 30(2): 195-197.
- [11] 申贝贝. 肾衰方对肾间质纤维化大鼠肾组织 VEGF、SP-1 表达的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2010: 36-37.
- [12] 崔娟. 肾衰方对肾间质纤维化大鼠 TGF-β₁、Bax 蛋白、AQP-2 影响的实验研究[D]. 广州: 暨南大学, 2010: 41-42.

(收稿日期: 2012-04-25; 修回日期: 2012-08-15)

[编辑: 洪 涛]