

大蒜素对神经母细胞瘤生长的抑制作用

曾纪晓¹, 孙俊杰², 莫家骢^{2*}, 马毅³, 何晓顺³

(1. 广州市儿童医院普通外科, 广东 广州 510120; 2. 中山大学附属第一医院小儿外科, 广东 广州 510080;

3. 中山大学附属第一医院器官移植科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨大蒜素对神经母细胞瘤生长的影响及相关机制。【方法】MTT法测定不同浓度大蒜素对神经母细胞瘤细胞生长的影响;建立裸鼠人神经母细胞瘤皮下移植瘤模型24只($n=8$),随机分为对照组、大蒜素组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和大蒜素组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),观察其对肿瘤生长的影响,荧光定量PCR法测定大蒜素对裸鼠皮下移植瘤VEGF mRNA表达的影响;ELISA法测定裸鼠血浆VEGF浓度;免疫组化法观察肿瘤微血管密度。【结果】不同浓度的大蒜素均能抑制神经母细胞瘤细胞的生长,高浓度的大蒜素能直接杀死肿瘤细胞;大剂量和小剂量大蒜素对裸鼠神经母细胞瘤皮下移植瘤均有抑制作用。对照组、大蒜素组和组的肿瘤体积为(2143 ± 127) mm^3 、(1041 ± 89) mm^3 和(904 ± 65) mm^3 ($P<0.05$);大蒜素能下调神经母细胞瘤VEGF mRNA转录,对照组、大蒜素组和组VEGF mRNA表达量分别为(8.4 ± 0.8)、(6.1 ± 0.7)和(5.1 ± 0.5);大蒜素能够抑制肿瘤细胞VEGF的表达,对照组、大蒜素组和组裸鼠血VEGF浓度分别为(78 ± 10)、(45 ± 8)和(35 ± 7) pg/mL ;大蒜素可以减少神经母细胞瘤的微血管密度。【结论】大蒜素在体内和体外均可抑制神经母细胞瘤细胞的生长,其机制与大蒜素抑制肿瘤细胞增殖和下调神经母细胞瘤VEGF mRNA的转录和蛋白表达有关。

关键词: 大蒜素; 肿瘤; 神经母细胞瘤; 血管内皮生长因子

中图分类号: R73 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)03-0259-05

Inhibition of Allicin on Growth of Neuroblastoma in Vitro and in Vivo

ZENG Ji-xiao¹, SUN Jun-jie², MO Jia-cong^{2*}, MA Yi³, HE Xiao-shun³

(1. Department of General Surgery, Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Pediatric Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

3. Department of Organ Transplantation, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the efficacy and the possible mechanism of neuroblastoma induced by allicin. 【Methods】 MTT assay was used to test the effect of allicin on the growth of human neuroblastoma cell lines SK-N-SH. Twenty four nude mice bearing subcutaneous xenograft human neuroblastoma (NB) were randomly divided into 3 groups; the control group, the allicin group (allicin 1 mg/kg/d) and group (allicin 10 mg/kg/d). The role of allicin on the growth of the tumor was evaluated after 4 weeks, including the tumor volume and weight. The expression of VEGF mRNA was detected by fluorescent quantitation ploymerase chain reaction (FQ-PCR). The serum VEGF concentration was measured by ELISA. The expression of MVD was analyzed with immunocytochemistry. 【Results】 Allicin inhibited the growth of NB in vitro and in vivo. The volume of tumor; the control group (2143 ± 127) mm^3 , allicin group I (1041 ± 89) mm^3 and allicin group II (904 ± 65) mm^3 ($P<0.05$). The expression of VEGF mRNA and serum VEGF concentration was inhibited significantly by allicin. The expression of VEGF mRNA in the control group, the allicin group I and allicin group II was (8.4 ± 0.8), (6.1 ± 0.7), and (5.1 ± 0.5) ($P<0.05$). The serum VEGF concentration in the control group, the allicin group I and allicin group II was (78 ± 10), (45 ± 8) and (35 ± 7) pg/mL ($P<0.05$). Allicin inhibit the expression of MVD of NB ($P<0.05$). 【Conclusion】 Allicin can inhibit the growth of NB in vitro and in vivo, which may be caused by suppression the expression of VEGF and MVD.

Key words: allicin; neoplasm; neuroblastoma; vascular endothelial growth factor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3): 259-263]

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 广东省教育厅“千百十工程”人才基金项目(Q02033)

作者简介: 曾纪晓, 博士, 主治医师, E-mail: zengjixiao@hotmail.com; * 通讯作者, 莫家骢, 博士, 博士生导师, 主任医师, E-mail: gdmjc@hotmail.com

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是小儿常见的恶性肿瘤,术前多需化疗,术后应予常规化疗,但化疗过程中小儿对使用的化疗药物反应较大,且有部分患儿对抗肿瘤药物不敏感,甚至呈多药耐药^[1-3]。有必要筛选对神经母细胞瘤有效的其他药物,研究表明大蒜素对胃癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌等均有明显抑制作用^[4-7]。大蒜素对神经母细胞瘤的作用目前未见报道,本研究旨在研究大蒜素对神经母细胞瘤生长的影响,并探讨可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人神经母细胞瘤细胞株 SK-N-SH 由国家重点学科中山大学普通外科实验室传代保种。BALB/C, nu/nu 裸鼠,鼠龄 4 周,体质量 18 ~ 20 g,由中山大学动物实验中心提供,动物合格证号 2004A084。无特殊病原菌(SPF)条件下分笼饲养。大蒜素(上海禾丰制药公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma 公司),小鼠抗人 VEGF ELISA 试剂盒(武汉博士德,中国),CD34 单克隆抗体(Antibody Diagnostical Inc, USA),Trizol RNA 提取试剂盒(Innitrogen, USA),Bio-Rad450 酶标仪(Coulter, USA),流式细胞仪(Coulter, USA),引物和探针由上海博亚生物公司合成。

1.2 细胞培养和 MTT 法测定大蒜素对 NB 细胞株 SK-N-SH 生长的影响

人 NB 细胞 SK-N-SH 常规复苏、传代,高糖 DMEM 培养基和 100 mL/L 胎牛血清,在 37 °C、体积分数 5%CO₂ 条件下培养。倒置相差显微镜下观察细胞生长的情况及大蒜素对细胞形态的影响。取对数生长期细胞,制备单细胞悬液,调整细胞浓度为 5 × 10⁴/mL 接种于 96 孔板,每孔接种 200 μL,培养 24 h 后加入大蒜素,使其终浓度分别为 10、20、40、400、4 000 μg/L,对照组仅加入培养液;96 孔板置于 37 °C,体积分数 5% CO₂ 培养箱内分别培养 24、48、72 h,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL,37 °C 培养 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,检测前轻轻振荡培养板 15 ~ 20 min,使结晶充分溶解,用酶标仪在 450 nm 处测定每孔吸光度(A)值,并用 630 nm 作为参考波长。每次、每一浓度、每时段条件做 6 个平行孔,重复 3 次。

1.3 建立裸鼠人神经母细胞瘤皮下移植瘤模型、实验分组和处理方案

参照文献[8]的方法,每只裸鼠接种 1 × 10⁷ 个细胞,建立该模型 24 只,将成模裸鼠随机分为 3 组(n = 8):空白对照组;大蒜素 组:大蒜素每日按体质量 1 mg/kg;大蒜素 组:大蒜素每日 10 mg/kg。裸鼠成瘤后 1 周开始给药,每 4 d 测定裸鼠质量、皮下移植瘤体积,腹腔内注射给药 4 周后处死裸鼠。完整剥除肿瘤,测定肿瘤体积及重量,肿瘤分为 2 份,于液氮冻存及制备石蜡标本。

1.4 荧光定量 PCR 检测裸鼠皮下移植瘤 VEGF mRNA 表达

引物和探针:VEGF F: 5'-GCCAGGCCACGGC TTAT-3', VEGF R: 5'-TGAGTTGAGGTTGGCCTGT TC-3', GAPDH F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3', GAPDH R: 5'-GAAGATGGTGTGATGGATTTC-3', VEGFC Probe: 5' FAM-AAGCAAAGATCTGGA GGAGCAGT-TAMARA-3', GAPDH Probe: 5' FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'。逆转录反应条件:93 °C 3 min 预变性,93 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 45 s,共 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。反应后取 8 μL PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳。阳性定量模板(GAPDH)按倍比稀释而成。扩增反应条件为:93 °C 2 min,93 °C 30 s,60 °C 1 min,共 40 个循环。

1.5 ELISA 法测定裸鼠血浆 VEGF 浓度

采用右眼球摘除法处死裸鼠,无菌 EP 管收集血液标本,一般为 1.5 ~ 1.8 mL,常温下静置 30 min,4 000 r/min 离心 5 min,收集上清放 -70 °C 超低温冰箱保存待测,按 ELISA 试剂盒操作流程测定血浆 VEGF 浓度。

1.6 免疫组化法测定裸鼠皮下移植瘤微血管密度

采用 CD34 二步免疫组化法(SP 法),按试剂说明书操作。先于 100 倍光镜寻找肿瘤中心微血管密度最高的 3 个区域,后在 400 倍镜下计算肿瘤微血管数目的均值。计数包括黄染的内皮细胞,与邻近微血管肿瘤细胞之间有明显分离的内皮细胞团,但将管腔 > 8 个红细胞面积的血管排除在外。微血管密度(MVD)为平均微血管数目/0.216,本过程按盲法操作。

1.7 统计学方法

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验和方差分析。采用 SPSS 11.0 软件包,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 倒置相差显微镜下 SK-N-SH 细胞形态观察

正常生长的 SK-N-SH 细胞呈梭形或多角形, 有较长的突起, 呈单层贴壁, 生长迅速, 代谢旺盛, 48 h 须换液一次, 3 ~ 4 d 传代 1 次。对照组细胞大小、形态不规则, 但差异不大, 折光性好, 边缘清晰, 内含丰富颗粒。药物处理组 12 h 后细胞大小、形态和贴壁能力较对照组有明显差别: 低浓度大蒜素组(10、20 $\mu\text{g/L}$)作用后, 细胞形态变化不大, 贴壁尚可; 较高浓度大蒜素组(40 $\mu\text{g/L}$)作用后, 细胞明显皱缩, 突起少见, 细胞间隙增大, 细胞内颗粒颜色加深, 折光性增强, 大量细胞呈片状脱落, 培养液中有多量细胞漂浮, 细胞生长明显减缓。处理 24 h 后上述变化更加明显。高浓度大蒜素组(400、4 000 $\mu\text{g/L}$)作用 12 h 后, 绝大部分肿瘤细胞死亡(图 1A、B)。

2.2 大蒜素对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞生长的影响

MTT 法结果显示不同浓度的大蒜素对人神经母细胞均有抑制作用, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 高浓度的大蒜素可直接杀死神经母细胞(表 1)。

2.3 裸鼠皮下移植瘤成瘤率及大蒜素的影响

24 只裸鼠全部成瘤, 成瘤率 100%。SK-N-SH 细胞接种后 1 周左右成瘤。各组裸鼠实验期间, 精神、反应和饮食正常, 实验结束时, 24 只裸鼠均存活, 无裸鼠死亡退出实验, 对照组裸鼠肿瘤表面有明显出血和坏死, 血管丰富。与对照组比较, 不同剂量的大蒜素能明显抑制皮下移植瘤的生长, 肿瘤的重量和体积差异有统计学意义($P < 0.05$); 小剂量组与大剂量组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$; 表 2, 图 2)。

表 1 不同浓度大蒜素作用 SK-N-SH 细胞不同时间后的 A 值

Table 1 Absorbance of cell lines SK-N-SH treated by Allicin of various concentrations in different times

($\bar{x} \pm s, n=6$)			
Group	24 h	48 h	72 h
0 $\mu\text{g/L}$	0.51 \pm 0.12	0.72 \pm 0.17	0.68 \pm 0.09
10 $\mu\text{g/L}$	0.43 \pm 0.08	0.52 \pm 0.11	0.45 \pm 0.03
20 $\mu\text{g/L}$	0.40 \pm 0.10	0.42 \pm 0.13	0.37 \pm 0.17
40 $\mu\text{g/L}$	0.33 \pm 0.09 ¹⁾	0.30 \pm 0.11 ¹⁾	0.29 \pm 0.05 ¹⁾
400 $\mu\text{g/L}$	0.14 \pm 0.05 ¹⁾	0.07 \pm 0.02 ¹⁾	0.04 \pm 0.03 ¹⁾
4000 $\mu\text{g/L}$	0.02 \pm 0.01 ¹⁾	0.02 \pm 0.00 ¹⁾	0.01 \pm 0.01 ¹⁾

ANOVA among all groups, $P < 0.05$; 1) Compared with control group, $P < 0.01$

2.4 大蒜素对裸鼠人神经母细胞瘤 VEGF mRNA 转录和翻译的影响

与对照组比较, 不同剂量的大蒜素均明显抑制肿瘤 VEGF mRNA 的转录, 抑制肿瘤 VEGF 的分泌($P < 0.05$), 不同浓度组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。

2.5 大蒜素对裸鼠人神经母细胞瘤皮下移植瘤 MVD 的影响

与对照组比较, 不同剂量的大蒜素均明显减少神经母细胞瘤 MVD($P < 0.05$), 且不同浓度组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨 论

神经母细胞瘤(NB)为小儿最常见的颅外实体肿瘤, 其恶性程度高, 早期即可发生多部位、多系统转移, 手术切除率低^[1]。NB 对常规放射和化学治疗不甚敏感, 患儿的预后不理想, 其发病率和病死率居儿童肿瘤前列, 严重威胁广大儿童的生命健康^[1]。有必要寻求一种新的、安全有效的 NB 治

表 2 大蒜素对裸鼠人神经母细胞瘤皮下移植瘤的影响

Table 2 Influence of Allicin on tumor of nude mice bearing subcutaneous xenograft human neuroblastoma

($\bar{x} \pm s, n=8$)					
Group	Mass/g	Volume/ mm^3	VEGF mRNA/ $\lg(\text{copy/mL})$	VEGF/($\mu\text{g/mL}$)	MVD
Control group	2.14 \pm 0.39	2143 \pm 127	8.4 \pm 0.8	78 \pm 10	18.2 \pm 2.0
Allicin group	1.67 \pm 0.27	1041 \pm 89	6.1 \pm 0.7	45 \pm 8	13.6 \pm 2.6
Allicin group	1.14 \pm 0.16 ¹⁾	904 \pm 65 ¹⁾	5.1 \pm 0.5	35 \pm 7	11.0 \pm 1.1 ¹⁾

ANOVA among all groups, $P < 0.05$; 1) Compared with allicin group I, $P < 0.05$

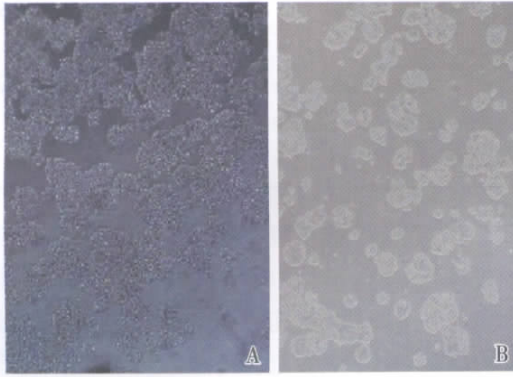


图 1 人神经母细胞瘤细胞株 SK-N-SH 形态

Fig.1 Morphology of human NB cell lines SK-N-SH

A: Control group, $\times 100$; B: Treated with alliin 40 $\mu\text{g/L}$ in 48 h, $\times 100$



图 2 裸鼠人神经母细胞瘤皮下移植瘤

Fig.2 Nude mice bearing subcutaneous xenograft human neuroblastoma

(from left to right: alliin group II, alliin group I and control group)

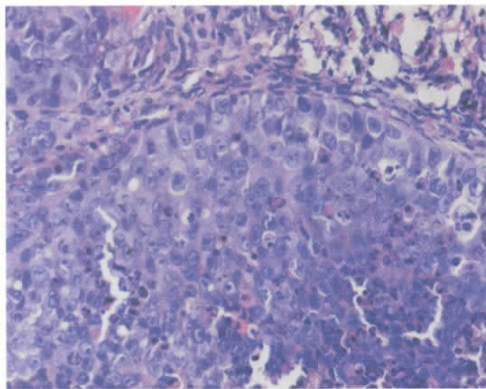


图 3 裸鼠皮下移植瘤 HE 染色

Fig.3 Subcutaneous xenograft human neuroblastoma of nude mice (HE, $\times 200$)

疗药物,以期改善 NB 的治疗效果和预后。目前关于大蒜素和 NB 关系的研究尚未见报道,我们选取

大蒜素为研究药物,采用体外细胞培养和裸鼠实验的方法,观察大蒜素对 SK-N-SH 细胞生长的影响,并探讨其在细胞、蛋白、基因等多个水平上可能的作用机制,以期为 NB 的防治做一有益的探索。

大蒜素为大蒜鳞茎中提取的特有的含硫化合物,近年国内外的流行病学调查和实验表明,大蒜素对多种恶性肿瘤有抑制作用^[5-8]。本实验证实,不同浓度的大蒜素对神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞形态和细胞增殖有明显影响,10 $\mu\text{g/L}$ 大蒜素即可抑制 SK-N-SH 细胞增殖,并且这种抑制作用,随药物浓度的增加而加强,400 $\mu\text{g/L}$ 以上大蒜素作用 48 h 可直接杀死肿瘤细胞。

在进一步的裸鼠实验中我们发现,不同剂量的大蒜素均能抑制裸鼠人神经母细胞瘤皮下移植瘤的生长,大蒜素处理后的裸鼠皮下移植瘤的体积和质量明显小于对照组,呈剂量-效应关系。肿瘤的生长必须依赖血管形成,在缺乏血管新生的条件下肿瘤仅能生长 2 ~ 3 mm。VEGF 是目前所知作用最强的促血管生长因子,诱导内皮细胞有丝分裂,增加血管通透性,抑制肿瘤细胞的凋亡,并能通过诱导巨噬细胞释放血管生长因子,间接促进血管生成。VEGF 对肿瘤的生长、浸润和转移均发挥重要的调节作用,与肿瘤的临床分期呈正相关关系^[9]。实验证实 NB 皮下移植瘤中 VEGF 呈高表达^[10],NB 患者肿瘤组织的 VEGF mRNA 亦呈高表达,肿瘤组织表达 VEGF 的高低与肿瘤分级有关^[11]。本实验中我们运用荧光定量 PCR 和 ELISA 的方法,定量检测裸鼠皮下 NB 的 VEGF mRNA 的转录量和血清 VEGF 的浓度,证实运用大蒜素后能够下调 NB 的转录和翻译,从而抑制 NB 生长。

肿瘤的生长、转移和新生血管的数量有密切关系,NB 中 VEGF 和 MVD 均呈高表达^[12],VEGF 与肿瘤内 MVD 呈正相关关系^[9]。有学者认为 MVD 是评价肿瘤组织内血管生成状态以及判断患者预后的金标准^[13]。本实验运用 CD34 单克隆抗体及盲法计算裸鼠皮下移植瘤标本的 MVD,结果提示大蒜素可以降低人神经母细胞瘤移植瘤的 MVD,显示出具有抗肿瘤血管生成的作用。该结果与肿瘤 VEGF mRNA 的定量分析和外周血 VEGF 浓度测定结果一致。

上述研究表明,大蒜素对神经母细胞瘤有明显的抑制作用,作用靶点为抑制肿瘤 VEGF 的表

达,为我们治疗 NB 提供了一个新的可能,但要想使其真正应用于临床并使 NB 患儿受益,还需要开展更广泛更深入的研究。

参考文献:

- [1] 檀卫平, 见须英雄, 马渊理. 神经母细胞瘤 60 例预后因素分析 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003, 24(1): 92-96.
- [2] 郑磊, 孙晓非, 甄子俊, 等. 神经母细胞瘤患者血清神经元特异性烯醇化酶水平变化的临床意义——附 50 例报告 [J]. 新医学, 2008, 39(10): 644-646.
- [3] 朱明亮, 朱云发. 颅鼻沟通嗅神经母细胞瘤 1 例及文献复习 [J]. 中华神经医学杂志, 2003, 2(3): 229-230.
- [4] Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, et al. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(1): 41-47.
- [5] Gunadharin DN, Arunkumar A, Krishnamoorthy G, et al. Antiproliferative effect of diallyl disulfide (DADS) on prostate cancer cell line LNCaP [J]. *Cell Biochem Funct*, 2006, 24(5): 407-412.
- [6] Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, et al. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(6): 891-897.

- [7] Wen J, Zhang Y, Chen X, et al. Enhancement of diallyl disulfide-induced apoptosis by inhibitors of MAPKs in human HepG2 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(2): 323-331.
- [8] 曾纪晓, 何晓顺, 马毅. 雷帕霉素对人肝癌裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(12): 1522-1524.
- [9] 白守民, 刘宜敏, 薛卫平, 等. 鼻咽癌组织中 VEGF 表达及 MVD 的临床意义 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(3S): 69-70.
- [10] Kaneko S, Ishibashi M, Kaneko M. Vascular endothelial growth factor expression is closely related to irinotecan-mediated inhibition of tumor growth and angiogenesis in neuroblastoma xenografts [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(6): 1209-1217.
- [11] Langer I, Vertongen P, Perret J, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastomas [J]. *Med Pediatr Oncol*, 2000, 34(6): 386-393.
- [12] 邹勇根, 孙俊杰, 莫家骢. 化疗对小儿神经母细胞瘤的 VEGF 表达的影响 [J]. 中华小儿外科杂志, 2005, 26(10): 523-525.
- [13] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.

(编辑 张恩健)

(上接第 258 页 from page 258)

- Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones: implications for the development of experimental intimal thickening [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(6): 815-820.
- [5] 聂如琼, 王景峰, 滕虹, 等. 曲尼司特对动脉损伤后血管外膜重塑及细胞增殖的作用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2008, 29(1): 20-24.
- [6] Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers [J]. *Circ Res*, 2001, 89(12): 1147-1154.
- [7] Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone [J]. *Endocrinology*, 1994, 134(1): 277-286.
- [8] Fischer JW, Steitz SA, Johnson PY, et al. Decorin

promotes aortic smooth muscle cell calcification and colocalizes to calcified regions in human atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(12): 2391-2396.

- [9] Moreno M, Muñoz R, Aroca F, et al. Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway [J]. *EMBO J*, 2005, 24(7): 1397-1405.
- [10] Chen XD, Fisher LW, Robey PG, et al. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation [J]. *FASEB J*, 2004, 18(9): 948-958.
- [11] Kuroda M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, et al. Glucocorticoid regulation of proteoglycan synthesis in mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(3): 780-789.

(编辑 张恩健)