

BDNF 基因修饰淋巴细胞培养上清对 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用

黄居科^{1,3}, 唐小卿², 潘渊明⁴, 冯鉴强², 陈培熹², 陈明振³(1. 深圳市宝安区人民医院神经外科, 广东 深圳 518000; 中山大学 2. 基础医学院生理学教研室;
3. 附属第一医院神经外科; 4. 中山医学院麻醉学系, 广东 广州 510080)

摘要: **目的** 研究脑源性神经营养因子基因 (brain-derived neurotrophic factor, *BDNF* gene) 修饰淋巴细胞对 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用。 **方法** MTT 法检测 H_2O_2 和多巴胺 (dopamine, DA) 对 PC12 细胞生长的抑制率, Hoechst 染色和 PI 染色流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 检测 H_2O_2 和 DA 对 PC12 细胞凋亡的诱导作用。 **结果** *BDNF* 基因修饰的大鼠淋巴细胞的培养上清可降低 H_2O_2 和 DA 对 PC12 细胞生长的抑制率并能抑制 H_2O_2 和 DA 诱导 PC12 细胞凋亡。 **结论** *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清对 PC12 细胞氧化应激损伤具有保护作用。

关键词 脑源性神经营养因子; 淋巴细胞; 氧化应激; PC12 细胞

中图分类号 R392.11

文献标识码 A

文章编号 1672-3554(2004)06-0524-06

Protective Effect of Supernatant of Lymphocytes Modified by Brain-derived Neurotrophic Factor Gene on PC12 Cells Damage Induced by Oxidative Stress

HUANG Ju-ke^{1,3}, TANG Xiao-qing², PAN Yuan-ming⁴, FENG Jian-qiang²,
CHEN Pei-xi², CHEN Ming-zhen³

(1. Department of Neurosurgery, Bao'an People's Hospital, Shenzhen 518000, China; 2. Department of Physiology, Preclinical School; 3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital; 4. Faculty of Anesthesia, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect of lymphocytes modified by brain-derived neurotrophic factor gene (*BDNF* gene) on PC12 cells damage induced by oxidative stress. **Methods** The growth inhibitory rate of PC12 cells mediated by H_2O_2 and dopamine (DA) was evaluated by MTT assay. The apoptosis of PC12 cells induced by H_2O_2 and DA was determined by PI stain flow cytometry and Hoechst stain. **Results** The supernatant of lymphocytes modified by *BDNF* gene decreased the growth inhibitory rate and apoptosis rate of PC12 cells induced by H_2O_2 and DA. **Conclusion** The supernatant of rat lymphocytes genetically modified by *BDNF* gene has the protective effect on PC12 cells damage induced by oxidative stress.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; lymphocytes; oxidative stress; PC12 cells

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(6): 524 - 529]

应用保护性蛋白如脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, *BDNF*) 对神经元的存活提供支持是中枢神经系统疾病的基因治疗主

要策略之一^[1]。目前许多体外和体内的实验证实, 神经营养因子家族成员能够有效地阻止多种神经元的死亡^[2]。然而如何将这些多肽因子透过血脑屏

收稿日期 2004-06-20

基金项目 广东省自然科学基金资助项目 (01322)

作者简介 黄居科 (1968 -), 男, 广西平南人, 硕士, 主治医师; 冯鉴强, 教授, 博士生导师, 通讯作者。E-mail: huangjuke@163.com

障运送至受损伤的神经元部位,一直是一个十分困难的问题,因此采用基因修饰的细胞脑内移植成为研究的重点。淋巴细胞是体外基因转移的常用靶细胞,我们将构建好的 *BDNF* 基因重组逆转录病毒转染了大鼠淋巴细胞,发现其在体外高表达和分泌具有生物活性的 *BDNF* 蛋白^[3],本实验将以 H_2O_2 和 DA 损伤 PC12 细胞为神经损伤模型,进一步探讨其体外抗神经细胞损伤的作用,为研究 *BDNF* 基因修饰的淋巴细胞防治神经损伤奠定前期基础。

1 材料和方法

1.1 细胞和细胞培养

PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株由我校实验动物中心引入,培养于含体积分数为 10% 马血清、体积分数 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,于 37℃、体积分数 5% CO_2 条件下培养。选取对数生长期细胞实验。

1.2 试剂和质粒

甲氮甲唑蓝 [4, 5-dimethylthiazol-2-yl] -2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、碘化丙啉 (propidium iodide, PI)、RNase A、Hoechst 33258、多巴胺购自 Sigma 公司(美国),RPMI-1640 培养基、马血清、胎牛血清购自 GibcoBRL 公司(美国), H_2O_2 (分析纯)购自广州化学试剂厂。*BDNF* 基因重组逆转录病毒 (LXSN-*BDNF*) 由本室构建。

1.3 动物与仪器

SD 大鼠 (220 ~ 250 g, 雌雄不拘) 由我校实验动物中心提供。流式细胞仪为美国 Beckmancoulter 公司产品,ELITE,激光波长 488 nm,功率 15 mW。酶联免疫仪美国 Bio-TEK 公司产品 (Ex800)。倒置荧光显微镜日本 Olympus 公司产品 (X70)

1.4 *BDNF* 基因重组逆转录病毒感染淋巴细胞^[3]

取 SD 大鼠颈椎脱臼处死后,无菌取脾脏于 200 目金属网筛上研压,用 RPMI-1640 培养基冲洗,收集网下的细胞悬液,并用尖咀吸管吹打使成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min (TD5 型离心机,离心半径为 12 cm),去上清,加入 7 g/L 的 NH_4Cl 裂解红细胞,离心,去上清,RPMI-1640 培养基洗 2 次后,用含体积分数 10% 小牛血清、20 U/mL IL-2 和 5 $\mu g/mL$ PHA 的 RPMI-1640 培养基含配成所需浓度于 37℃、体积分数 5% CO_2 中培养 24 h,然后按以

下进行 pLXSN-*BDNF* 感染淋巴细胞:淋巴细胞用含体积分数 10% 小牛血清、20 U/mL IL-2 和 5 $\mu g/mL$ PHA 的 RPMI-1640 培养基培养 2 d,收集细胞,按 2×10^6 cells/mL 加入病毒上清,并加入 8 $\mu g/mL$ polybrene,于 37℃、体积分数 5% CO_2 中培养 2.5 h 后,加上上述培养基使 polybrene 稀释至 2 $\mu g/mL$,继续培养。24 h 后换液,重复感染。如此重复病毒感染连续 3 d。

1.5 流式细胞仪 (FCM) 检测 *BDNF* 蛋白的表达

收集淋巴细胞,调整浓度为 1×10^7 cells/mL,用 100 μL 固定试剂 (IC fixation Buffer, eBioscience 公司产品) 固定 1 h。加入破膜试剂 (Permeabilization Buffer, eBioscience 公司产品) 500 μL ,离心去上清后再加入 300 μL 破膜试剂,10 min 后离心去上清。加入 50 μL 按 1 : 100 用破膜剂稀释的一抗 (空白对照管不加一抗),室温 (18 ~ 25℃) 孵育 30 min。500 μL PBS 洗两次后,加入按 1 : 200 用体积分数 0.5% 小牛血清/PBS 稀释的二抗 100 μL ,室温 (18 ~ 25℃) 孵育 30 min,用 500 μL PBS 洗两次上机检测。计数 10 000 个细胞,记录标本的阳性细胞的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

1.6 MTT 法测定 PC12 细胞生长抑制率

淋巴细胞经病毒连续感染 3 d 后,换不含 IL-2 和 PHA 的完全培养基继续培养 1 d,收集淋巴细胞培养上清。PC12 细胞按 4 000 cells/hole 接种至 96 孔板过夜后,换成 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清和/或不同浓度的 H_2O_2 及 DA。37℃、体积分数 5% CO_2 中培养 24 h 后,每孔加 5 mg/mL MTT 20 μL ,再培养 4 h,倾去培养液,加 DMSO 100 μL /孔,待甲紫完全溶解后,用酶联免疫仪在波长 570 nm 处读取吸光度 (A) 值,按公式计算细胞抑制率 (inhibitor rate, IR): $IR = (1 - \text{试验孔 A 均值} / \text{对照孔 A 均值}) \times 100\%$ 。重复 3 次。

1.7 Hoechst 染色检测 PC12 细胞凋亡

将 PC12 细胞接种于 6 孔板内的盖玻片上,加入 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清和/或 H_2O_2 (100 $\mu mol/L$) 和 DA (100 $\mu mol/L$),作用 24 h 后,加入新鲜配制的 40 g/L 多聚甲醛于 4℃ 固定细胞 10 min,加 5 mg/L Hoechst 33258 染色液染色 10 min, PBS 液洗后,用封片液 (20 mmol/L 柠檬酸, 50 mmol/L 磷酸氢二钠, 体积分数 50% 甘油, pH 5.5) 封片后荧光显微镜观察、摄片。正常细胞核出现弥漫均匀的低强度荧光; 细胞核如呈浓染致密的固缩

形态或颗粒状荧光, 记为凋亡的细胞。

1.8 PI 染色流式细胞仪 (FCM) 检测 PC12 细胞凋亡

取对数生长期 PC12 细胞, 加入 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清和/或不同浓度的 H_2O_2 和 DA, 作用 24 h 后, 收集各组细胞, PBS 洗 2 遍, 用体积分数 70 % 乙醇 4 °C 固定过夜。PBS 洗 1 遍, 加 PI 荧光染液 (5 mg/L PI, 20 mg/L RNaseA) 于 4 °C 冰箱中放置 45 min, 300 目尼龙网过滤, 上流式细胞仪检测。计算 10 000 个细胞, 以亚 G_1 峰细胞为凋亡细胞, 计算凋亡率。

1.9 统计学处理

全部数据经 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 one-way ANOVA。

2 结 果

2.1 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞 *BDNF* 蛋白表达明显

流式细胞仪检测细胞 *BDNF* 蛋白表达, 结果显示正常淋巴细胞有微量的 *BDNF* 表达, *BDNF* 基因修饰淋巴细胞 *BDNF* 蛋白的表达明显增加, *BDNF* 蛋白的 MFI 值由 1.11 增至 6.45 ($P < 0.01$)。

2.2 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞培养上清对 H_2O_2 和 DA 抑制 PC12 细胞生长的影响

2.2.1 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞培养上清减弱 H_2O_2 对 PC12 细胞生长的抑制作用 采用 MTT 法检测细胞的增殖状况, 以了解 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清对 H_2O_2 抑制 PC12 细胞生长的影响。10 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对 PC12 细胞的生长具有明显的抑制作用, 加入 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清后, 可明显减弱 10 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对 PC12 细胞生长的抑制作用, 而加入正常淋巴细胞的培养上清并不影响 H_2O_2 对 PC12 细胞生长的抑制作用 (图 1a)。

2.2.2 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞培养上清减弱 DA 对 PC12 细胞生长的抑制作用 50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ DA 对 PC12 细胞的生长具有明显的抑制作用, 加入 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清后, 可明显减弱 50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ DA 对 PC12 细胞生长的抑制作用, 而加入正常淋巴细胞的培养上清并不影响 H_2O_2 对 PC12 细胞生长的抑制作用 (图 1b)。

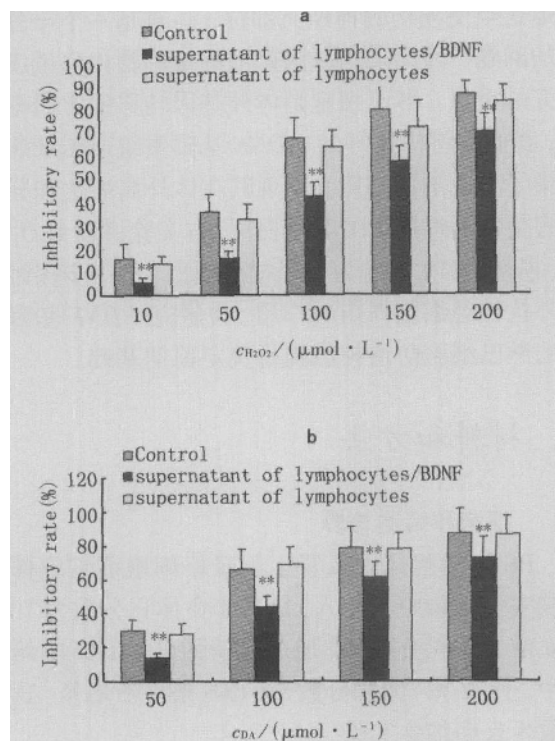


图 1 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清对 PC12 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of supernatant of lymphocytes genetically modified by *BDNF* gene on PC12 cell growth ($n = 3$)

a: H_2O_2 ; b: DA; Between groups, $F = 6.48$, $P = 0.008$; compared with control, $** P < 0.01$

2.3 Hoechst 染色检测 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞培养上清对 H_2O_2 和 DA 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

经 Hoechst 33258 染色, 荧光显微镜下观察细胞内 DNA 的形态, 结果发现, 正常 PC12 细胞染色质分布均匀, 为弥漫均匀的低强度荧光 (图 2A); 经 H_2O_2 和 DA 处理 24 h 后, PC12 细胞有大量的细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的凋亡细胞, 且有少量凋亡小体 (图 2B、E); 合并应用 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清可明显降低出现细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的细胞数, 大部分细胞染色质呈弥漫均匀低强度荧光 (图 2C、F); 合并应用正常淋巴细胞的培养上清, 对 H_2O_2 和 DA 造成的这种细胞损伤无明显影响 (图 2D、G)。

2.4 FCM 检测 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞培养上清对 H_2O_2 和 DA 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

2.4.1 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞培养上清抑制 H_2O_2 诱导 PC12 细胞凋亡 采用 FCM 检测 PC12 细胞凋亡情况, 以明确 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培

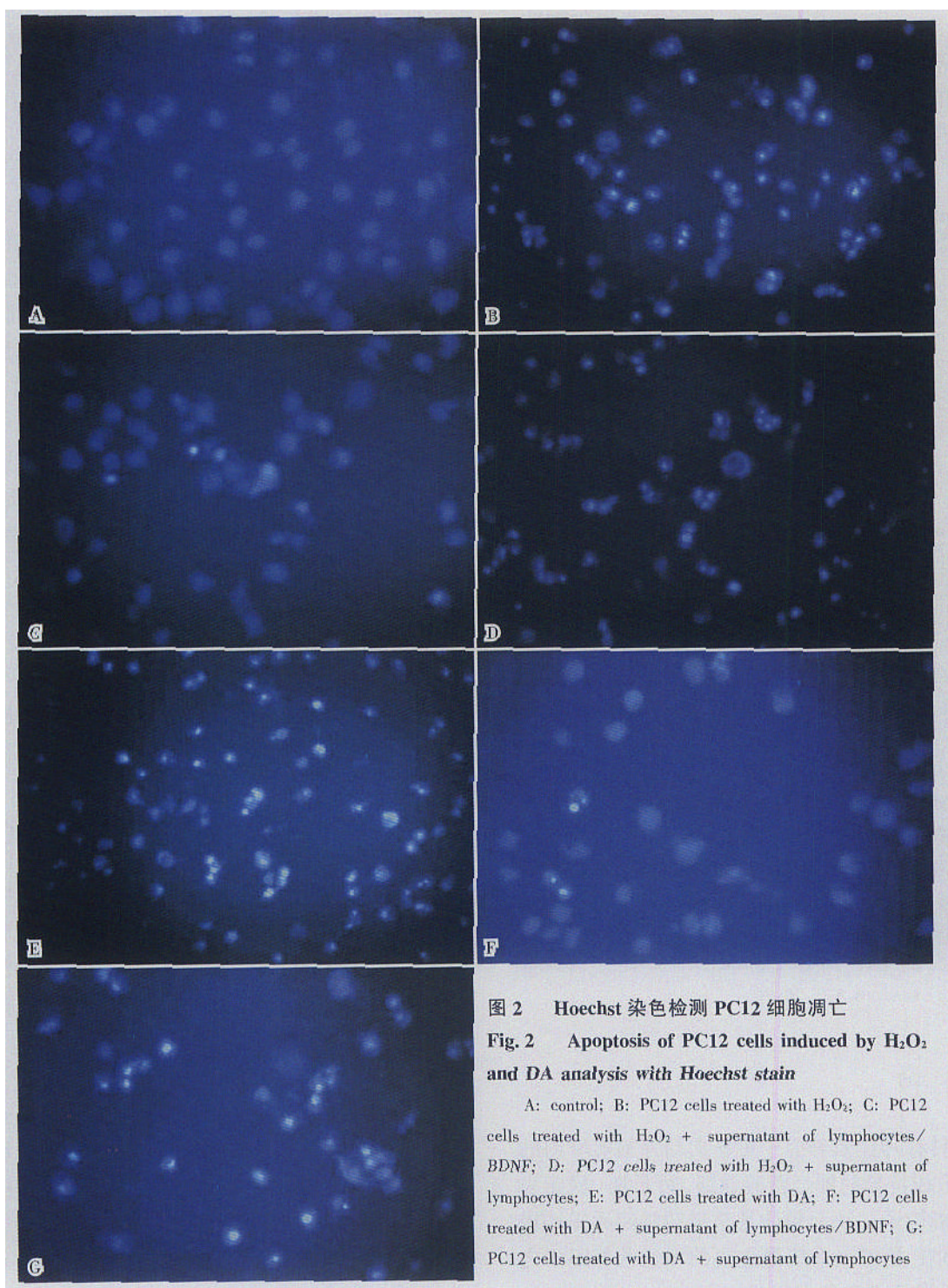


图2 Hoechst 染色检测 PC12 细胞凋亡

Fig. 2 Apoptosis of PC12 cells induced by H_2O_2 and DA analysis with Hoechst stain

A: control; B: PC12 cells treated with H_2O_2 ; C: PC12 cells treated with H_2O_2 + supernatant of lymphocytes/*BDNF*; D: PC12 cells treated with H_2O_2 + supernatant of lymphocytes; E: PC12 cells treated with DA; F: PC12 cells treated with DA + supernatant of lymphocytes/*BDNF*; G: PC12 cells treated with DA + supernatant of lymphocytes

养上清对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞凋亡的影响。PC12 细胞的自然凋亡率为 3.9%。50、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 后, PC12 细胞的凋亡率分别为 36.9%、84.6%, 合并应用 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清后, H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡率分别下降到 21.3%、73.7% ($P < 0.01$); 正常淋巴细胞的培养上清并不影响 H_2O_2 对 PC12 细胞的凋亡诱导作用,

合并应用后, H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡率分别为 34.5%、81.9% ($P > 0.05$) 图 3a)。

2.4.2 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞培养上清抑制 DA 诱导 PC12 细胞凋亡 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DA 作用 24 h 后, PC12 细胞的凋亡率分别为 56.3%、74.8%, 合并应用 *BDNF* 基因修饰淋巴细胞的培养上清后, DA 诱导的 PC12 细胞凋亡率分别

下降到39.7%、56.9% ($P < 0.01$) ;正常淋巴细胞的培养上清并不影响 DA 对 PC12 细胞的凋亡诱导作用,合并应用后,DA 诱导的 PC12 细胞凋亡率分别为 54.7%、71.7% ($P > 0.05$) 图 3b)。

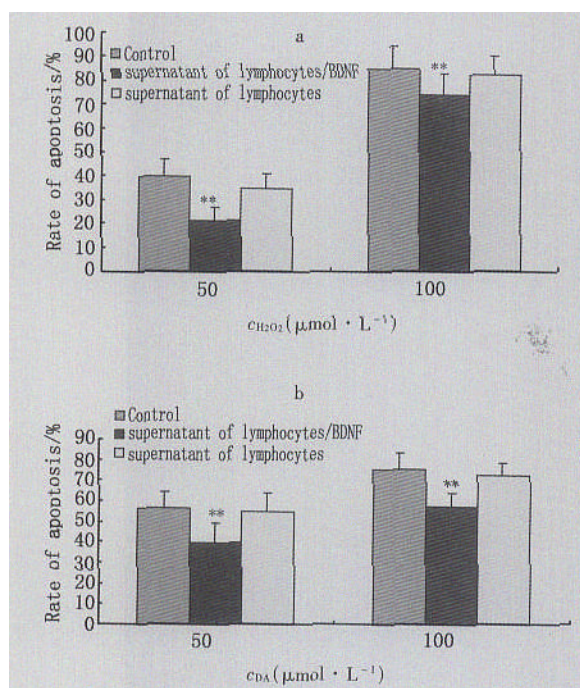


图 3 FCM 检测 BDNF 基因修饰淋巴细胞的培养上清对 PC12 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of supernatant of lymphocytes genetically modified by BDNF gene on the apoptosis of PC12 cell analysis with FCM ($n = 3$)

a: H_2O_2 ; b: DA; Between groups, $F = 8.48$, $P = 0.000$; Compared with control, ** $P < 0.01$

3 讨 论

基因转移神经营养因子可靶向治疗脑实质内的位点,并形成特异的神经营养通路,可长期、稳定表达神经营养因子,从而预防甚至逆转神经元损伤或变性。BDNF 是神经系统最主要的神经营养因子之一,具有很强的刺激和促进神经细胞生长、分化,防止损伤后的细胞凋亡,促进损伤细胞修复的作用^[2]。

Andsberg 等^[4]发现在兔大脑中动脉栓塞前 4~5 周,通过腺相关病毒预先将 BDNF 基因转移到兔的纹状体内,可适度减缓脑卒中时神经元的死亡。Tobias 等^[5]将 BDNF 基因修饰的原代培养的成纤维细胞移植于受损的脊髓束后,可刺激发芽,拯救丢失和萎缩的运动红核神经元,并能使之再生。最近 Lawrence

等^[6]将 BDNF 基因修饰的施沃恩细胞移植于营养不良的视网膜上,取得令人满意得疗效。以上研究表明通过 BDNF 基因转移来治疗神经系统疾病具有较好的应用前景。

我们尝试将 BDNF 基因导入淋巴细胞,期望利用其在神经系统疾病状态下易通过血脑屏障,且可在损伤部位聚集的特性^[7],通过静脉注射移植入脑,实现 BDNF 基因的非损伤性脑内转移。Kramer 等^[8]曾通过逆转录病毒将 NGF 基因导入淋巴细胞而透过血脑屏障,提示将 BDNF 基因导入淋巴细胞,实现 BDNF 基因的非损伤性脑内转移是可行的。

氧化应激能诱导神经细胞凋亡,是造成中枢损伤后继发性病理损害的主要机制之一^[9]。在中枢神经系统继发性损害过程中,由于损伤组织缺血、缺氧等继发病理改变,造成组织内氧自由基产生增加,清除能力下降,导致氧自由基聚集。大量的实验证明氧化应激能引起多巴胺能神经元凋亡^[10],在帕金森病患者的脑内,活性氧一个重要的来源就是多巴胺,这种神经递质通过自氧化或酶代谢而生成自由基^[11]。越来越多的实验证实多巴胺不仅可作为一种神经递质,而且还可作为一种神经毒参与神经退行性病变^[12]。

我们前段工作表明 BDNF 基因修饰的淋巴细胞能高表达和分泌具有生物活性的 BDNF 蛋白^[3]。它是否具有抗神经细胞氧化应激损伤的作用呢?本研究以 H_2O_2 和 DA 损伤 PC12 细胞为氧化应激损伤神经细胞模型,探讨了其对氧化应激损伤神经细胞的保护作用。结果显示,BDNF 基因修饰淋巴细胞的培养上清不仅可明显减弱 H_2O_2 和 DA 对 PC12 细胞生长的抑制作用,还可显著抑制 H_2O_2 和 DA 诱导 PC12 细胞凋亡,表明 BDNF 基因修饰的淋巴细胞的培养上清对神经细胞具有拮抗氧化应激损伤的作用,这为进一步探讨 BDNF 基因修饰淋巴细胞非损伤性脑内转移而进行 CNS 损伤的基因治疗提供了有意义的实验依据。

参考文献:

- [1] Berry M, Barrett L, Seymour L, et al. Gene therapy for central nervous system repair [J]. Curr Opin Mol Ther, 2001, 3(4): 338-9.
- [2] 洪新如, 陈新民, 卢晓欣. 不同时间脑室注射脑源性神经营养因子治疗新生大鼠缺血缺血性脑损伤效果的比较[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 204-7.
- [3] 唐小卿, 冯鉴强, 周继斌, 等. BDNF 基因逆转录表达

载体的构建和在淋巴细胞中的表达[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2003, 24(5): 421-4, 428.

- [4] Andsberg G, Kokaia Z, Klein R L, *et al.* Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2002, 9(2): 187-204.
- [5] Tobias C A, Shumsky J S, Shibata M, *et al.* Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues autotized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration[J]. *Exp Neurol*, 2003, 184(1): 97-113.
- [6] Lawrence J M, Keegan D J, Muir E M, *et al.* Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(1): 267-74.
- [7] Hirschberg D L, Moalem G, He J, *et al.* Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma [J]. *J Neuroimmunol*, 1998, 89(1): 88-6.
- [8] Kramer R Y, Zhang J, Gehrmann R, *et al.* Gene transfer through the blood-nerve barrier: nerve growth factor engineered neuritogenic T lymphocytes attenuate experimental autoimmune neuritis [J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 1162-6.
- [9] He Y, Thong P S, Lee T, *et al.* Dopaminergic cell death precedes iron elevation in MPTP-injected monkeys [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(5): 540-7.
- [10] Lee H J, Kim S H, Kim K W, *et al.* Antiapoptotic role of NF-B in the auto-oxidized dopamine-induced apoptosis of PC12 cells [J]. *J Neurochem*, 2001, 76(2): 602-9.
- [11] Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(Suppl 3): S26-36.
- [12] Shinkai T, Zhang L, Mathias S A *et al.* Dopamine induces apoptosis in cultured rat striatal neurons; possible mechanism of D2-dopamine receptor neuron loss during aging [J]. *J Neurosci Res*, 1997, 47(4): 393-9.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 523 页 from page 523)

- transplantation in rats with the use of microsurgical techniques: a new method[J]. *Surgery*, 1968, 63(6): 956-61.
- [3] Sillber S J. *Microsurgery*[M]. Baltimore: Williams & Wilkin CO, 1979. 59-60.
- [4] 罗少军, 颜大胜, 郝新光. 不阻断腹主动脉下腔静脉的大鼠原位肾脏移植术[J]. *中华显微外科杂志*, 1989, 12(2): 37-9.
- [5] Baker H J. *The Laboratory Rat. Volume II. Research Applications*[M]. New York: Academic Press, 1980. 212-6.
- [6] Yao Y S, Antus B, Liu S Y, *et al.* Influence of sex hormones, androgen antagonists on chronic renal rejection in intact male rats[J]. *Nephro Dial Trans*, 2000, 15(9): A245.
- [7] Liu S Y, Lutz J, Antus B, *et al.* Recipient age and weight affect chronic renal allograft rejection in rats[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(8): 1742-9.
- [8] Balazs Antus, Yao Y S, Liu S Y, *et al.* Contribution of androgens to chronic allograft nephropathy is mediated by dihydrotestosterone[J]. *Kidney Int*, 2001, 60(10): 1955-63.
- [9] Wang M, Yao Y S, Liu S Y, *et al.* Recipient age affects chronic allograft nephropathy in rats [J]. *Transplant Proc*, 2001, 33(7-8): 3341.
- [10] Balazs Antus, Yao Y S, Song E W, *et al.* Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy [J]. *Transpl Int*, 2002, 15(9-10): 494-501.
- [11] Song E W, Zou H Q, Yao Y S, *et al.* Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(2): 676-85.

(编辑 张敏瑞)