

雷公藤多甙对实验性系膜增殖性肾炎 蛋白尿及系膜损伤的影响

万毅刚^{1,2} 孙 伟³ 甄彦君¹ 铃木浩一² 唐泽环² 河内裕² 清水不二雄²

摘要 目的 观察雷公藤多甙(multi-glycoside of tripterygium wilfordii Hook. f., GTW)在体内对实验性系膜增殖性肾炎蛋白尿及系膜损伤的影响。方法 运用单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)1-22-3 建立大鼠可逆性抗 Thy1.1 抗体肾炎(简称“抗 Thy1.1 肾炎”)模型,以 GTW 干预,并设立对照组。比较 24h 尿蛋白排泄量(urinary protein excretion, Upo)、肾功能(serum creatinine, SCr; blood urea nitrogen, BUN)、血浆总蛋白(total plasma protein, TP)以及肾小球形态学变化,并检测肾组织中增殖因子(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB; transforming growth factor- β , TGF- β) mRNA 表达水平。结果 GTW 抑制抗 Thy1.1 肾炎模型 Upo 和系膜损伤;抗 Thy1.1 肾炎模型肾组织中增殖因子(PDGF-BB、TGF- β) mRNA 表达水平与正常组比较,分别为其 2.84 倍与 1.64 倍,GTW 使 PDGF-BB mRNA 过高表达水平下调 33.1%,与对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。结论 GTW 可减少系膜增殖性肾炎模型蛋白尿,抑制系膜细胞增殖和细胞外基质沉积;这些作用可能与下调肾组织增殖因子(PDGF-BB) mRNA 的表达有关。

关键词 雷公藤多甙;抗 Thy1.1 抗体肾炎;细胞因子

Preventive Effect of Multi-glycoside of Tripterygium Wilfordii Hook. f. on Proteinuria and Mesangial Injury in Experimental Mesangial Proliferative Glomerulonephritis WAN Yi-gang, SUN Wei, ZHEN Yan-jun, et al
Department of Traditional Chinese Medicine, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing (210008)

Abstract Objective To observe the preventive effect of multi-glycoside of Tripterygium Wilfordii Hook. f. (GYW) on proteinuria and mesentery injury in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis *in vivo*. **Methods** The reversible anti-Thy1.1 antibody glomerulo nephritis model of rats was established with monoclonal antibody 1-22-3 and intervened with GTW, and a control group was set up in the same time. Changes of 24h urinary protein excretion, serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), total plasma protein (TP) and glomerular morphology were observed, and the level of mRNA expression of proliferative factors, including platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and transforming growth factor- β (TGF- β), in renal tissue was determined. **Results** GTW could inhibit proteinuria and mesangial injury in anti-Thy1.1 antibody nephritis model. The PDGF-BB and TGF- β mRNA expression in the anti-Thy1.1 antibody nephritis model rats were increased for 2.84 and 1.64 times respectively to those in the normal control group. GTW could down-regulate the over-expression of PDGF-BB mRNA by 33.1%, it was significantly different to that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** GTW could reduce the proteinuria and inhibit mesangial cells proliferation and extracellular matrix deposition, these effects maybe related to the down-regulating of PDGF-BB mRNA expression.

Key words Multi-glycoside of Tripterygium Wilfordii Hook. f.; anti-Thy1.1 antibody glomerulonephritis; cytokine

基金项目:卫生部笹川医学奖学金资助研究课题(第 26 期);江苏省中医药局科研项目(No. Z-054)

作者单位:1. 南京大学医学院附属鼓楼医院中医科(南京 210008);2. 日本新潟大学研究生院肾脏分子生物学研究所;3. 江苏省中医院肾科

通讯作者:孙 伟, Tel: 025 - 86617141 转 71416, E-mail: sun-wei2003@medmail.com.cn

近年来,雷公藤多甙(multi-glycoside of tripterygium wilfordii Hook. f., GTW)在临床上广泛应用于治疗增殖性肾小球肾炎为主的肾小球疾病^[1,2]。其活性成分雷公藤内酯醇(triptolide)对体外培养的肾小球固有细胞或炎症细胞增殖和凋亡的作用,以及对某些细胞因子的抑制作用已得到较为深入的认识^[3],然而,

该药物在体内对系膜增殖性肾小球肾炎的分子药理机制尚未见报道。日本新潟(Niigata)大学肾病研究所研制的单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)1-22-3 肾炎(又称抗 Thy1.1 抗体肾炎)模型是研究以系膜病变为主体的增殖性肾小球肾炎发病机制的重要工具^[4]。我们建立大鼠可逆性抗 Thy1.1 抗体肾炎(简称抗 Thy1.1 肾炎)模型,通过免疫荧光(immunofluorescence, IF)、逆转录 PCR(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)等方法,观察雷公藤多甙对该模型蛋白尿、系膜损伤及其相关增殖因子血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)、转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)的影响,试图说明该药物治疗增殖性肾小球肾炎的部分分子药理学机制。

材料与方法

1 试剂与药物 主要试剂包括:mAb 1-22-3(日本新潟大学肾病研究所研制);TRIZOL(GIBCO BRL, MD, USA);逆转录试剂盒(Superscript Preamplification System; GIBCO BRL);小鼠抗人单克隆抗体 α -smooth muscle actin (Sigma, USA);大鼠抗兔单克隆抗体 collagen type I (Chemicon, USA);山羊抗小鼠单克隆抗体 IgG2a、豚鼠抗兔单克隆抗体 IgG (Southern Biotechnology Associates, USA)。GTW 购于中国浙江得恩德制药有限公司(药物批号:0211114)。将 15 mg GTW 溶解于 1ml 蒸馏水中,配制成 GTW 溶液(15g/L)。

2 实验动物与分组 8 周龄、体重 200g 左右 Wistar 雌性大鼠 19 只,购于日本チヤ-ルス-リバ-株式会社,在日本新潟大学医学部实验动物中心喂养。所有大鼠均喂以标准饮食,并自由饮水。实验前 3 天,将 19 只大鼠随机分为 3 组:(1)正常组 5 只;(2)抗 Thy1.1 肾炎加蒸馏水干预组(对照组)7 只;(3)抗 Thy1.1 肾炎加 GTW 干预组(GTW 组)7 只。实验前各组大鼠体重和尿蛋白差异无显著性。GTW 组于造模前 3 天开始灌胃给药[Wistar 大鼠的有效剂量为 75 mg/(kg·d)],对照组同时以蒸馏水 1 ml 灌胃,每日 1 次。正常组不予任何干预,自由喂养。

3 抗 Thy1.1 肾炎模型建立 实验前,临时将 15 mg mAb 1-22-3 溶解于 15 ml 生理盐水中,配制成抗体溶液(1 g/L)。用乙醚分别麻醉对照组及 GTW 组大鼠,每只大鼠经尾静脉注射 mAb 1-22-3 溶液 0.5 ml。注射抗体后,各组大鼠出现不同程度的蛋白尿,约 0.5 h 开始出现抗 Thy1.1 肾炎典型系膜病变。

4 检测项目及方法

4.1 生化指标测定 造模前、造模后第 1、3、5、7 天,分别将各组大鼠放入金属代谢笼,收集 24 h 尿液,以 Bradford 法测定尿蛋白。根据尿量计算 24 h 尿蛋白排泄量(urinary protein excretion, Upro)。造模后第 7 天,在乙醚麻醉状态下解剖大鼠胸腔,经心脏采血 5 ml,测定血清肌酐(SCr)、血清尿素氮(BUN)、血浆总蛋白(TP)等(由日本新潟大学医学部附属医院医学检验部检测)。

4.2 肾组织 PAS 染色 解剖大鼠腹腔,自肾门处分离两侧肾脏,取右肾部分组织,经脱水、石蜡包埋等预处理,进行 Periodic Acid Schiff (PAS)染色(由日本江东微生物研究所处理)。每张切片随机选取 30 个肾小球,按文献^[5]方法进行系膜细胞(mesangial cell, MC)和细胞外基质(extracellular matrix, EMC)半定量积分。

4.3 免疫荧光 取右肾肾极组织,进行 3 μ m 冷冻切片(CRYOTOME, ThermoBioAnalysis, Tokyo, Japan),以间接免疫荧光法检测肾小球 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原(collagen type I)表达。实验中所用一抗分别为小鼠抗人单克隆抗体 α -SMA (anti- α -SMA; IgG2a)、大鼠抗兔单克隆抗体 collagen type I (anti-collagen type I; IgG)。二抗分别为 FITC 标记的山羊抗小鼠单克隆抗体 IgG2a、豚鼠抗兔单克隆抗体 IgG。向冷冻切片所载标本内依次滴加一抗和 FITC 标记的二抗,其间,以磷酸盐缓冲液(PBS)洗片,经 37℃ 分别孵育 30 min,甘油封片。每张切片随机选取 30 个肾小球,分别按文献^[5]方法进行 α -SMA、collagen type I、细胞外基质(matrix)荧光染色(IF)半定量积分。

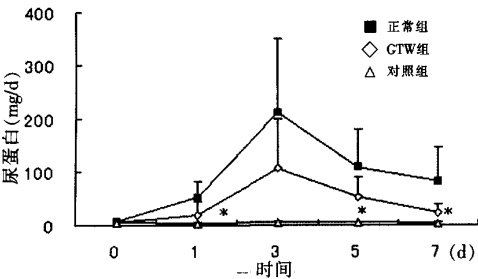
4.4 RT-PCR 检测肾组织 PDGF-BB、TGF- β mRNA 表达 取各组大鼠左肾,游离肾皮质,采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法抽提总 RNA,以分光光度法测 RNA 含量与纯度。取总 RNA 5 μ g,按逆转录试剂盒说明逆转录 cDNA。PDGF-BB、TGF- β 、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物由美国 Invitrogen 公司东京分社合成。PDGF-BB:引物 1(sense)序列为 5'-GAA GCC AGT CTT CAA GAA GGC CAC-3',引物 2(antisense)序列为 5'-AAC GGT CAC CCG AGT TTG AGG TGT-3',扩增产物长度 148 bp^[6];TGF- β :引物 1(sense)序列为 5'-GCC TCC GCA TCC CAC CTT TG-3',引物 2(antisense)序列为 5'-GCG GGT GAC TTC TTT GGC GT-3',扩增产物长度 396 bp^[7];GAPDH 监控 RNA 上样量,引物 1(sense)序列为 5'-CTC TAG CCA CGG CAA GTT CAA-3',引物 2(antisense)序列

为 5'-GGA TGA CCT TGC CCA CAG C-3', 扩增产物长度 516 bp^[7]。PDGF-BB 扩增条件为 95℃ 预热 9 min, 然后 95℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min。TGF-β、GAPDH 扩增条件: 退火温度均为 60℃, 其余过程同 PDGF-BB。PDGF-BB 循环 33 轮, TGF-β 循环 36 轮, GAPDH 循环 26 轮, 循环终末 72℃ 10 min 终止反应 (PC-800 programmable temperature control system, Astec, Fukuoka, Japan)。取 PCR 产物 5 μl, 加入溴酚蓝指示剂 (0.5 mg/L) 1 μl, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光摄影系统 (UVP systems, Bioimaging, Upland, CA, USA) 拍照, 再以 LabWorks 软件 (Densitograph, ATTO, Tokyo, Japan) 进行光密度 (IOD) 扫描。结果分别与 GAPDH 对照, 数值以两者光密度比值表示。三者 PCR 扩增反应分别重复 3 次。

5 统计学处理 实验数据采用 StatView 统计软件 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) 处理。各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间差异采用单因素方差分析, 组间均数比较采用 *t* 检验。

结 果

1 各组大鼠 24 h 尿蛋白排泄量变化 见图 1。正常组、GTW 组大鼠在造模后第 1 天检测出尿蛋白, 造模后第 3 天达到高峰, 以后尿蛋白水平逐渐下降, 至第 7 天时, 尿蛋白仍维持在较高水平。两组 24 h 尿蛋白排泄量变化趋势基本一致, 但 GTW 组尿蛋白水平低于对照组, 分别在造模后第 1、5、7 天时, 两组差异有显著性 ($P_{\text{day1}} = 0.044, P_{\text{day5}} = 0.013, P_{\text{day7}} = 0.036$)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

图 1 各组大鼠 24h 尿蛋白的动态变化

2 各组大鼠血液生化指标变化 见表 1。对照组大鼠在造模后第 7 天出现肾功能改变。GTW 组 BUN 水平低于对照组, 两组差异有显著性 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血液生化指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	TP(g/L)
正常	5	27.40±4.84	9.36±0.54	0.68±0.02
对照	7	25.76±2.77	11.31±1.37*	0.65±0.03
GTW	7	26.65±4.84	7.80±0.54 [△]	0.64±0.02

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, [△] $P < 0.01$

3 各组大鼠肾组织 PAS 染色和免疫荧光染色结果 见表 2、图 2。对照组、GTW 组大鼠在造模后第 7 天的肾小球病理改变包括 MC 增殖、ECM 沉积; 系膜区增宽, 呈弥漫性或团状分布 (PAS 染色); α-SMA、collagen type I 荧光染色增强 (IF)。经 GTW 干预后, 肾小球内具有增殖特征的 MC 细胞数和 ECM 所占面积明显减少 (PAS 染色), α-SMA、collagen type I 荧光染色 (IF) 所反映出的系膜增殖性病变更明显改善。两组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肾小球形态学变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞形态学积分			总细胞数 (/肾小球)
		matrix	α-SMA	collagen type I	
正常	5	0.27±0.06	0.40±0.04	0.48±0.04	59.86±2.59
对照	7	2.79±0.24*	2.48±0.46*	1.96±0.25*	87.20±2.18*
GTW	7	1.16±0.09 [△]	1.79±0.28 [△]	1.51±0.43 [△]	68.62±5.76 [△]

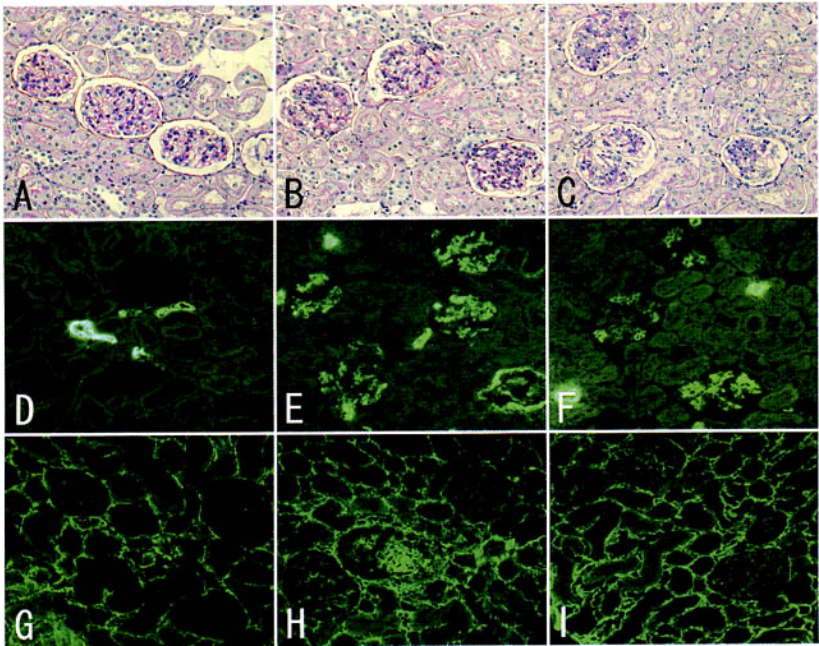
注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与对照组比较, [△] $P < 0.05$

4 各组大鼠肾组织 PDGF-BB、TGF-β mRNA 表达 见图 3。正常组 PDGF-BB mRNA 呈微量表达。对照组表达明显上调, 其表达量为正常组的 2.84 倍。GTW 组表达量较对照组下调 33.1%, 两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。正常组有 TGF-β mRNA 表达。对照组表达稍上调, 其表达量为正常组的 1.64 倍, GTW 组较对照组下调 10.4%, 两者差异无显著性。

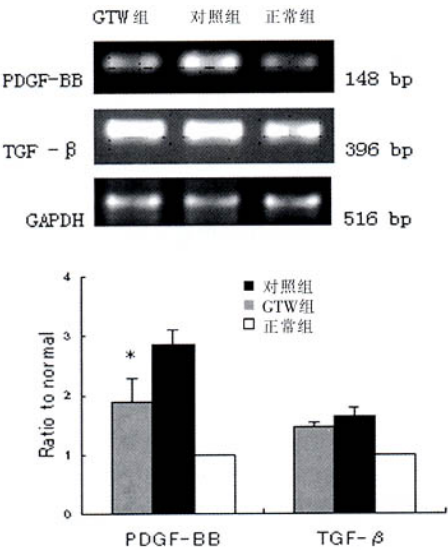
讨 论

据报道^[8], 以系膜病变为主体的系膜增殖性肾小球肾炎 (MsPGN) 是我国发病率较高的肾病之一。位于肾小球毛细血管壁近旁的系膜组织 (包括 MC 和 ECM) 可调节肾小球血流动力学, 影响血管壁的通透性。MC 增殖和 ECM 沉积对肾小球肾炎进展有一定影响, 但上述系膜增殖性病变与蛋白尿的因果关系一直存在争议^[9]。mAb 1-22-3 可识别 MC 表面 Thy1.1 分子, 与之结合后导致严重的速发性系膜病变, 包括“系膜融解 (mesangiolysis)、补体依赖性炎症细胞浸润、一过性 MC 增殖和 ECM 沉积”等^[10]。单次注射该抗体所引发的大鼠可逆性抗 Thy1.1 肾炎模型肾脏病理生理学特征基本类似于人类 MsPGN 早期病变。因此, 该模型是研究人类 MsPGN 发病机制和药理机制的重要工具。

我们的既往研究发现 Wistar 大鼠在注射 mAb 1-22-3 后立即出现蛋白尿, 造模后 3~5 天达蛋白尿高峰, 以后蛋白尿水平逐渐下降, 至 14 天时, 尿蛋白基本恢复正常。肾组织学早期病变以系膜融解为中心, 伴随中性粒细胞为主的炎症细胞浸润, 造模后 4~6 天, 几乎所有的肾小球均表现出 MC 增殖和 ECM 沉积, 伴随单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞为主的炎症细胞



注:A、D、G:正常组;B、E、H:对照组;C、F、I:GTW 组
图 2 各组大鼠肾小球细胞形态学特征、 α -SMA、I 型胶原的变化(ABC 为 PAS 染色,余为 IF 染色 $\times 200$)



注:与对照组比较, * $P < 0.05$

图 3 各组大鼠肾组织 PDGF-BB 和 TGF- β mRNA 的表达

浸润^[10]。因此,我们选择注射 mAb 1-22-3 后第 7 天的模型为研究对象。此时相的模型既有系膜增殖、肾小球炎症细胞浸润,又有明显的蛋白尿,这两点非常类似

于人类 MsPGN 早期发病过程。目前,对于 MsPGN 系膜病变与蛋白尿的关系尚无深入研究。我们试图通过第 7 天时相的抗 Thy1.1 肾炎模型,观察系膜病变与蛋白尿的关系,并且试图说明 GTW 治疗蛋白尿的机制。

我们发现 mAb 1-22-3 诱发的可逆性抗 Thy1.1 肾炎模型在造模后第 7 天时,出现明显的 MC 增殖和 ECM 沉积(PAS 染色),同时,蛋白尿还维持在较高水平;经 GTW 干预后,不仅蛋白尿降低,而且肾小球内 MC 细胞数和 ECM 所占面积明显减少(PAS 染色)。正常的 MC 不表达 α -SMA。当 MC 处于增殖状态,出现细胞表型转化,具备平滑肌细胞和成纤维细胞的性质时就表达 α -SMA。因此, α -SMA 荧光染色阳性细胞可作为 MC 增殖的标志^[5]。胶原是肾小球 ECM 主要成分之一。collagen type I 的表达可以反映肾小球内 ECM 沉积的程度^[5]。我们发现抗 Thy1.1 肾炎模型 MC 增殖和胶原沉积随时间的推延而愈发明显;GTW 可以改善 α -SMA、collagen type I 荧光染色所反映出的系膜增殖性病变。我们的结论至少说明抗 Thy1.1 肾炎蛋白尿、系膜增殖性病变之间有一定联系;GTW 抑制系膜增殖,同时也抑制蛋白尿。

据报道^[6,11],多克隆抗体 ATS 诱导的大鼠抗

Thy1.1 肾炎系膜组织 PDGF-BB mRNA 和蛋白表达均增加;PDGF-BB 中和抗体可抑制相同模型 MC 增殖。这些研究说明 PDGF-BB 与抗 Thy1.1 肾炎系膜增殖性病变有关,PDGF-BB 以 MC 自分泌形式促进其增殖。我们发现 mAb 1-22-3 诱发的可逆性抗 Thy1.1 肾炎模型肾组织 PDGF-BB mRNA 表达水平上调,并且与 PAS 染色、 α -SMA、collagen type I 荧光染色所反映出的系膜增殖性病变相一致;而 GTW 可使该模型肾组织 PDGF-BB mRNA 过度表达水平下调,并且改善系膜增殖性病变和蛋白尿。

TGF- β 是与 ECM 沉积密切相关的生长因子^[12]。据报道^[13],TGF- β_1 中和抗体可抑制抗 Thy1.1 肾炎模型 ECM 沉积;运用 liposome 法将反义核苷酸 ODN 转染至 TGF- β_1 mRNA 同样可抑制 TGF- β_1 蛋白表达和 ECM 沉积。因此,调控 TGF- β 核酸或蛋白的表达可以抑制 ECM 沉积。对于 mAb 1-22-3 诱发的可逆性抗 Thy1.1 肾炎模型,在造模后第 7 天时,肾组织 TGF- β mRNA 表达水平明显高于正常大鼠;经 GTW 干预后,TGF- β mRNA 表达水平无显著变化。然而,肾小球 PAS 染色和 I 型胶原荧光染色结果显示,GTW 可改善 ECM 沉积。这一结果似乎有矛盾。我们推测,GTW 可能不是单纯通过“调控 TGF- β mRNA 表达”这一经典途径来影响 ECM 代谢。

综上所述,在抗 Thy1.1 肾炎模型中,蛋白尿、系膜增殖性病变、增殖因子之间有一定联系;GTW 在体内从核酸水平上影响增殖因子(PDGF-BB) mRNA 的表达,从而抑制抗 Thy1.1 肾炎蛋白尿及系膜增殖。抗 Thy1.1 肾炎肾组织病理生理学特征不仅表现为“系膜增殖性改变、增殖因子表达增强”,还包括“单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞等炎症细胞浸润”等免疫损伤。GTW 作为免疫抑制药物对细胞免疫的作用已得到广泛的认可。我们推测 GTW 治疗系膜增殖性肾小球肾炎的分子药理机制不仅与其影响肾组织增殖因子表达有关,而且,可能对该模型的免疫损伤有保护作用。mAb 1-22-3 诱发的可逆性抗 Thy1.1 肾炎模型在造模后第 7 天时,虽然出现明显的系膜增殖性病变和蛋白尿,但是,该模型只是模拟了人类 MsPGN 早期病变过程,不能完全反映 MsPGN 肾小球硬化的病理特征,GTW 在体内对 MsPGN 肾小球硬化的影响尚待进一步研究。

(致谢:感谢日本笹川纪念保健协力财团和日中医学协会的资金支持,感谢日本新潟大学研究生院肾脏分子生物学研究所全体老师的帮助)

万方数据

参 考 文 献

- 1 Wan YG, Gu LB, Shimizu F. Mechanism of protective effects of effective components in *Tripterygium wilfordii* hook. f. on glomerulonephritis (Article in Japanese). *J Clin Exp Med* 2003;207(4):285—288.
- 2 戎 戈,胡伟新,刘志红,等.系膜增殖性肾小球肾炎的新疗法:雷公藤多甙新治疗方案的疗效观察.肾脏病与透析肾移植杂志 1998;7(5):409—414.
Rong S, Hu WX, Liu ZH, et al. A new regime of *Tripterygium wilfordii* hook. f. in treating primary mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Nephrol Dial Transplantation* 1998;7(5):409—414.
- 3 Qiu D, Kao PN. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f. *Drugs R D* 2003;4(1):1—18.
- 4 Shimizu F, Kawachi H, Orikasa M. Role of mesangial cell damage in progressive renal disease. *Kidney Blood Press Res* 1999;22(1—2):5—12.
- 5 Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984;26(2):137—143.
- 6 Iida H, Seifert R, Alpers CE, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor are induced in mesangial proliferative nephritis in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(15):6560—6564.
- 7 Tsuji T, Okada F, Yamaguchi K, et al. Molecular cloning of the large subunit of transforming growth factor type β masking protein and expression of the mRNA in various rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(22):8835—8839.
- 8 Li LS. An overview of nephrology in China. *Chin Med J (Engl)* 1989;102(7):488—495.
- 9 Kawachi H, Oite T, Shimizu F. Quantitative study of mesangial injury with proteinuria induced by monoclonal antibody 1-22-3. *Clin Exp Immunol* 1993;92(2):342—346.
- 10 Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, et al. Epitope-specific induction of mesangial lesion with proteinuria by a MoAb against mesangial cell surface antigen. *Clin Exp Immunol* 1992;88(3):399—404.
- 11 Johnson RJ, Raines E, Floege J, et al. Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rat by antibody to platelet derived growth factor. *J Exp Med* 1992;175(5):1413—1416.
- 12 Floege J, Johnson RJ, Gordon K, et al. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int* 1991;40(3):477—488.
- 13 Nakayama M, Okuda S, Tamaki K, et al. Roles of TGF- β and latent TGF- β -binding protein in glomerulosclerosis induced by two consecutive injections of monoclonal antibody 1-22-3 in rats. *Nephron* 1997;76(1):82—89.

(收稿:2004-03-09 修回:2005-02-10)