

降糖益肾方对高胰岛素诱导的人肾小球系膜细胞增殖及 IRS-1、PI-3K 蛋白表达的影响

吴勇军¹ 喻 嵘² 成细华³ 吴 慧² 伍参荣³ 魏冠德² 张 琴²

摘要 目的 观察降糖益肾方对高胰岛素诱导的人肾小球系膜细胞(human glomerular mesangial cells, HMCs)增殖及其胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI-3K)蛋白表达的影响。**方法** 将 HMCs 分为正常空白对照组(空白组)、高胰岛素模型组、抑制剂组、中药组。首先预实验确定胰岛素、抑制剂和降糖益肾方用药浓度。各组分别加入不同培养液,空白组予 RPMI1640 培养液,其余 3 组均予含 100 nmol/L 胰岛素的培养液,培养 24 h,同时抑制剂组、中药组分别予 80 $\mu\text{mol/L}$ LY294002、125 mg/L 降糖益肾方干预,继续培养 48 h。采用 MTT 法及流式细胞技术检测 HMC 增殖,采用免疫组化和 Western blot 技术检测 IRS-1、PI-3K 蛋白表达。**结果** 在高胰岛素诱导下,中药组和抑制剂组 HMC 增殖均显著降低,IRS-1、PI-3K 蛋白表达水平下调($P < 0.01$);与抑制剂组比较,中药组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达水平下调稍弱($P < 0.05$)。**结论** 降糖益肾方具有降低高胰岛素诱导的 HMC 增殖的作用,其机制可能与干预胰岛素信号通路有关。

关键词 降糖益肾方;肾小球系膜细胞;胰岛素受体底物-1;磷脂酰肌醇-3-激酶

Effect of Jiangang Yishen Recipe on High Insulin Induced Cell Proliferation of Human Glomerular Mesangial Cells and the Expression of Insulin Receptor Substrate 1 and Phosphatidylinositol-3-kinase WU Yong-jun¹, YU Rong², CHENG Xi-hua³, WU Hui², WU Can-rong³, WEI Guan-de², and ZHANG Qin² 1 College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208), China; 2 Key Laboratory of Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208), China; 3 Key Laboratory of Cell Biology and Molecular Technology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208), China

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Jiangtang Yishen Recipe (JTYSR) on high insulin induced cell proliferation of human glomerular mesangial cells (HMCs) and the expression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K). **Methods** HMCs were divided into 4 groups, i.e., the negative control group, the high insulin model group, the JTYSR group, and the LY294002 group. The concentration of insulin, JTYSR, and LY294002 was respectively confirmed by pre-experiment. Different culture solution was respectively added for different groups. RPMI1640 culture solution was added for HMCs in the negative control group, while HMCs in the rest 3 groups were cultured by 100 nmol/L insulin for 24 h. Meanwhile, HMCs from the JTYSR group and the LY294002 group were exposed to 125 mg/L JTYSR and 80 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 respectively for further 48 h. The proliferation of HMCs was detected by MTT and flow cytometry. The protein expression of IRS-1 and PI-3K in HMC was detected by immunohistochemical assay and Western blot. **Results** The proliferation of HMCs induced by high in-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81011120382; No. 81102593; No. 81273753); 湖南省自然科学基金资助项目(No. 12JJ2048); 湖南省自然科学基金省市联合基金项目(No. 12JJ9031); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(No. 2010-170); 湖南省普通高等学校科学研究项目(No. 11C0964)

作者单位:1. 湖南中医药大学药学院(长沙 410208); 2. 湖南中医药大学中医内科学重点实验室(长沙 410208); 3. 湖南中医药大学细胞生物学与分子技术重点实验室(长沙 410208)

通讯作者:喻 嵘, Tel: 0731-88458219, E-mail: yuron@hotmail.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 05. 0597

ulin could be significantly lowered, and the protein expression of IRS-1 and PI-3K could be down-regulated in the JTYSR group and the LY294002 group ($P < 0.01$). Compared with the LY294002 group, the protein expression of IRS-1 and PI-3K could be slightly down-regulated in the JTYSR group ($P < 0.05$). Conclusion JTYSR could lower high insulin induced proliferation of HMCs, and its mechanism might be related to insulin signaling pathway.

KEYWORDS Jiangtang Yishen Recipe; glomerular mesangial cell; insulin receptor substrate 1; phosphatidylinositol-3-kinase

肾小球系膜细胞的增殖在糖尿病肾病发生发展过程中处于十分重要的地位^[1],既往研究表明降糖益肾方对糖尿病及肾病并发症具有一定的防治作用^[2]。本研究采用细胞培养的方法,观察降糖益肾方对高胰岛素诱导的人肾小球系膜细胞(human glomerular mesangial cell, HMC)增殖以及其胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI-3K)表达的影响,结果报道如下。

材料与方法

1 细胞株 HMC 细胞株由武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供,复苏、培养、传代,取第 3~10 代实验。

2 药物 降糖益肾方以左归丸化裁,由熟地 12 g、黄芪 18 g、山茱萸 12 g、菟丝子 6 g、牛膝 9 g、黄连 6 g、丹参 9 g、玉米须 12 g、益母草 9 g 组成,饮片购自湖南中医药大学附属第一医院药房,经鉴定为正品后,经三蒸水煎煮 2 次,搅拌均匀后静置过滤,浓缩制备成生药浓度为 1 g/mL 的药液,2 500 r/min 离心 5 min,除杂质取上清液,灭菌后 4 ℃ 储存备用;胰岛素注射液(400 IU/10 mL,江苏万邦生化医药公司,批号: A20090002);青霉素 G(160 万 IU,华北制药厂,批号: 090102);链霉素(100 万 IU,华北制药厂,批号: 081101)。

3 试剂及仪器 RPMI-1640(批号: 1313945)、新生牛血清(NBCS,批号: 6313495)均购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶(美国 Difeo 公司,批号: 236940);牛血清白蛋白(杭州四季青生物工程公司,批号: M080916);PI-3K 抑制剂(LY294002,美国 MCE 公司,批号: S1737);免疫组化用兔抗大鼠 TGF- β_1 一抗、HGF 一抗及即用型 SACB 试剂盒均购自武汉博士德生物公司;细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,批号: P0028;蛋白 Marker 购自杭州宝科生物科技有限公司,批号: SM1811。细胞培养瓶、细胞培养板(96 孔

和 24 孔)、盖玻片均购自武汉亚法生物工程公司;CO₂ 培养箱:SL-2300 型,美国 ShellLab 公司;遥控酶标仪:SUNRIES 型,奥地利 Tecan 公司;倒置显微镜:CK2 型,日本 Olympus 公司;流式细胞仪:FACSCalibur 型,美国 BD 公司;电泳和转膜装置:SubCell,美国 Bio-Rad 公司;高速离心机:LG-10A 型,北京京立离心机有限公司。

4 胰岛素、LY294002、降糖益肾方用药浓度确定

4.1 胰岛素浓度的确定 培养的 HMC 分为空白组,胰岛素 10、25、50、100、200 nmol/L 组,空白组加入培养液(含 10% NBCS 的 RPMI1640 培养液加 100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素,用 7.5% NaHCO₃ 液调 pH 值至 7.2~7.4);其余组分别加入含不同浓度胰岛素注射液的培养液(胰岛素 10、25、50、100、200 nmol/L),每组设 8 个复孔。培养 24 h 后,MTT 法检测胰岛素对 HMC 增殖的抑制作用及与 HMC MCs 共培养的最佳时间。结果显示,随着胰岛素浓度的升高,光密度 OD 值越大,胰岛素浓度达 100 nmol/L 时 OD 值达最大值,200 nmol/L 胰岛素 OD 值反而下降,因而实验用胰岛素浓度选为 100 nmol/L,此时细胞增殖最强。胰岛素浓度为 100 nmol/L 时,结果显示,随着胰岛素与 HMC 共培养时间的延长,OD 值增大,24 h 达平台期,因此胰岛素与 HMC 共培养时间选为 24 h。

4.2 LY294002 浓度确定 培养的 HMC 分为空白组,LY294002 100、80、50、20 μ mol/L 组,空白组加入培养液(同前),其余组分别加入含不同浓度胰岛素信号通路抑制剂 LY294002 的培养液(LY294002 100、80、50、20 μ mol/L),每组设 5 个复孔。培养 24 h 后,MTT 法检测 LY294002 对 HMC 增殖的抑制作用。结果显示,LY294002 浓度为 20、50、80 μ mol/L 时,对 HMC 增殖均有显著抑制作用,其中浓度为 80 μ mol/L 时对 HMC 抑制率为 43.7%,因而实验确定 LY294002 浓度为 80 μ mol/L。

4.3 降糖益肾方用药浓度确定 培养的 HMC

分为空白组、降糖益肾方 500、250、125、65、50 及 25 mg/L 组,空白组加入培养液(同前),其余组分别加入含不同浓度降糖益肾方的培养液(降糖益肾方 500、250、125、65、50 及 25 mg/L),每组设 10 个复孔。培养 24 h 后,MTT 法检测降糖益肾方对 HMC 毒性增殖。结果显示,降糖益肾方浓度为 25、50、65、125 mg/L 时,对 HMC 增殖均有显著抑制作用,其中浓度为 125 mg/L 时,对 HMC 抑制率为 41.2%,因而实验确定降糖益肾方浓度为 125 mg/L。

5 分组及干预方法 HMC 按 1×10^5 /mL 的密度接种于 24 孔平底培养板盖玻片上,200 μ L/孔,倒置显微镜下观察,放入 CO₂ 孵箱中继续进行爬片培养,待细胞适当扩增(24 h)后,吸弃旧培养液,加入 200 μ L 新培养液,分为正常组(空白组)、模型组(胰岛素诱导组)、抑制剂组(LY294002)及中药组(降糖益肾方),每组设 5 个复孔。模型组、抑制剂组、中药组每孔加培养液稀释的 100 nmol/L 胰岛素注射液 20 μ L,正常组加 20 μ L 培养液。培养 24 h 后,吸弃旧培养液,加入 200 μ L 新培养液,同时抑制剂组每孔加培养液稀释的 80 μ mol/L LY294002 液 20 μ L,中药组每孔加培养液稀释的 125 mg/L 降糖益肾方液 20 μ L,正常组和模型组加 20 μ L 培养液,继续培养 48 h。

6 HMC 增殖及 IRS1、PI-3K 蛋白表达观察 收集各组细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,重悬于结合缓冲液中,采用碘化丙啶 PI 双染色法,以流式细胞仪检测,CellQuest 软件分析细胞周期和细胞凋亡;Western blot 技术检测 IRS1、PI-3K 蛋白质表达:以 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,测定蛋白含量后,取 20 μ g 蛋白样品,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,湿转法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜,1.2% BSA 封闭后,加入一抗,室温 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,再加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,用 ESL 发光检测;同时采用免疫细胞化学染色技术(SABC 法)检测各组细胞 IRS1、PI-3K 蛋白表达。

7 统计学方法 数据结果采用 SPSS 16.0 软

件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料符合正态性、方差齐性采用方差分析,组间比较采用 *q* 检验,不符合正态性、方差不齐采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 HMC 增殖结果比较(表 1,图 1) 与正常组比较,模型组 G1 期细胞显著减少,G2 + S 期细胞显著增加,HMC 凋亡率显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,抑制剂组、中药组给药后 G1 期细胞显著减少,G2 + S 期细胞显著增多,HMC 凋亡率显著升高($P < 0.01$);与抑制剂组比较,中药组 HMC 凋亡率降低($P < 0.05$)。

表 1 各组 HMC 增殖结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预浓度	<i>n</i>	凋亡率	G1 期	G2 + S 期
正常	—	5	23.51 \pm 1.21 *	71.3 \pm 3.2 *	28.7 \pm 2.0 *
模型	—	5	1.75 \pm 0.09	50.5 \pm 2.4	49.5 \pm 2.2
抑制剂	80 nmol/mL	5	69.81 \pm 4.12 *	21.2 \pm 3.1 *	78.8 \pm 7.8 *
中药	125 mg/L	5	52.32 \pm 4.28 * [△]	22.4 \pm 2.4 *	77.6 \pm 6.4 *

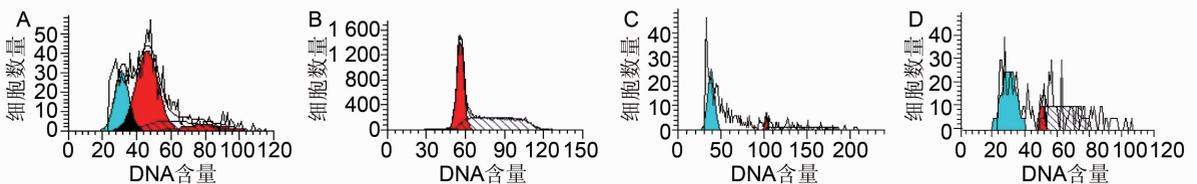
注:与模型组比较,* $P < 0.01$;与抑制剂组比较,[△] $P < 0.05$

2 Western blot 技术检测各组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达结果比较(表 2,图 2) 与正常组比较,模型组 IRS-1、PI3K 的蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。与模型组比较,中药组和抑制剂组 IRS-1、PI-3K 的蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$);而与抑制剂组比较,中药组下调 IRS-1、PI-3K 蛋白表达水平的作用稍弱($P < 0.01$)。

表 2 Western blot 技术检测各组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

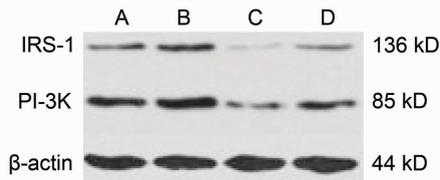
组别	干预浓度	<i>n</i>	IRS-1/ β -actin	PI3K/ β -actin
正常	—	5	0.262 \pm 0.021 *	0.437 \pm 0.034 *
模型	—	5	0.349 \pm 0.027	0.567 \pm 0.040
抑制剂	80 nmol/mL	5	0.085 \pm 0.011 **	0.185 \pm 0.017 **
中药	125 mg/L	5	0.203 \pm 0.019 ** [△]	0.364 \pm 0.032 ** [△]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与抑制剂组比较,[△] $P < 0.01$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为抑制剂组;D 为中药组;蓝色区域为凋亡峰;红色区域为 G0/G1 峰

图 1 各组 HMC 增殖结果



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为抑制剂组;D 为中药组

图 2 Western blot 技术检测各组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达结果

3 SABC 法检测各组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达结果比较(表 3,图 3) 与正常组比较,模型组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。与模型组比较,中药组和抑制剂组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$);与抑制剂组比较,中药组 IRS-1、PI-3K 的蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。

表 3 SABC 法检测各组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预浓度	n	IRS-1	PI3K
正常	—	5	0.125 ± 0.008 *	0.138 ± 0.005 *
模型	—	5	0.201 ± 0.004	0.215 ± 0.017
抑制剂	80 nmol/mL	5	0.072 ± 0.012 **	0.093 ± 0.007 **
中药	125 mg/L	5	0.113 ± 0.019 **△	0.141 ± 0.007 **△

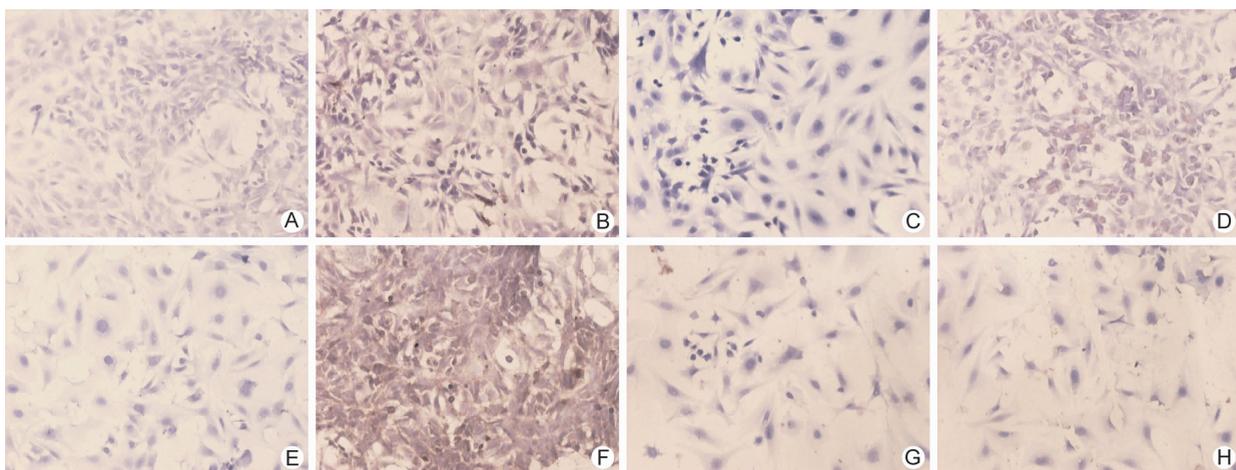
注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与抑制剂组比较, △ $P < 0.05$

讨 论

现代研究表明,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)及其所致的β细胞分泌障碍是2型糖尿病及其并发症发病过程中的两个主要环节^[3]。在“胰岛素抵抗—糖尿病—糖尿病肾病”这一病理生理过程中,细胞

胰岛素信号传导的异常(靶细胞胰岛素受体及受体后的功能缺失),可导致 IR,出现高胰岛素血症,形成糖脂代谢紊乱及炎症因子、细胞因子等的产生^[4]。现代研究表明 HMC 内存在胰岛素受体底物(insulin receptor substrate 1, IRS),是连接胰岛素/胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGF)信号转导途径上下游的信号分子^[5],胰岛素/IGF 信号途径能够通过 PI-3K 途径激活下游相关蛋白激酶,可促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[6-10]。高水平胰岛素可通过胰岛素信号途径促进系膜细胞增殖,增强系膜细胞分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM),促进 ECM 积聚^[11,12],从而在糖尿病肾病发生发展过程中处于十分重要的地位。

降糖益肾方为本课题组临床治疗糖尿病肾病有效方,以左归丸加减化裁,由熟地、黄芪、山茱萸、菟丝子、黄连、丹参、牛膝、玉米须、益母草 9 味药组成,方中重用熟地滋阴养肾为主药,以填真阴;山茱萸、菟丝子、牛膝补益肝肾,强健腰膝;黄芪益气健脾;黄连清热解毒;丹参、益母草活血化瘀;玉米须清热利湿,利尿消肿;诸药合用,共奏滋阴益气,活血解毒,利尿消肿之功效。课题组前期研究表明,降糖益肾方具有显著降低 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠空腹血糖、血清胰岛素水平,同时能够显著降低糖尿病小鼠血清尿素氮、肌酐和尿微量白蛋白、β₂-微球蛋白含量,明显改善肾脏血流动力学异常,降低肾小球内高压及高滤过状态。电镜下 MKR 鼠肾小球毛细血管基底膜节段性增厚,足突节段性融合,系膜细胞及基质明显增生,可见散在电子高密度沉积物,而降糖益肾方具有改善足细胞形态结构及肾小球系膜细胞与基质增生的病理损害。显著降低血



注:A、E 为正常组;B、F 为模型组;C、G 为抑制剂组;D、H 为中药组;A-D 为 IRS-1 蛋白表达;E-H 为 PI-3K 蛋白表达

图 3 各组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达结果 (SABC, ×400)

清视黄醇结合蛋白 4 (retinol binding protein-4, RBP-4) 和纤溶酶原激活物抑制剂 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 水平, 显著改善肾脏基质金属蛋白酶 MMP-2 蛋白表达, 抑制系膜细胞增殖及细胞外基质积聚的作用^[13-15]。

本实验在体外证明高胰岛素培养可诱导 HMC 增殖, 而胰岛素信号通路的激活参与了高胰岛素培养的 HMC 增殖。实验研究显示, 高胰岛素诱导的模型组 HMC 增殖活性增强; 而胰岛素信号通路抑制剂 LY294002 与降糖益肾方均能显著降低胰岛素诱导的 HMC 增殖, 两药物作用后所诱导的 HMC 凋亡可能是将细胞阻断在细胞周期的 S + G2 期。进一步研究表明, 与胰岛素共培养的 HMC 内, IRS-1、PI-3K 的蛋白表达均增强; 而胰岛素共培养的 HMC 中, 给予 PI-3K 的抑制剂 LY294002 后, IRS-1、PI-3K 蛋白表达降低, 说明胰岛素可通过 PI-3K 来传导增殖信号。而中药组 IRS-1、PI-3K 蛋白表达降低的程度稍弱于 LY294002, 表明中药组抑制高胰岛素诱导的 IRS-1、PI-3K 蛋白表达的作用弱于 PI-3K 抑制剂 LY294002。笔者认为, 胰岛素可通过 PI-3K 途径激活细胞增殖信号途径, 可能是 HMC 增殖的重要分子机制^[6,7]。增殖的 HMC 和堆积的系膜基质将导致肾小球的肥大, 可进一步导致肾小球纤维化。

本课题组前期研究已表明滋阴益气、解毒活血立法的中药复方降糖益肾方可通过调控胰岛素信号通路, 改善 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠的肾损伤^[16], 本实验证实该中药复方通过调控胰岛素信号通路, 改善高胰岛素培养的人肾小球系膜细胞的增殖, 在糖尿病肾病肾小球损伤过程中发挥了保护作用。由于本研究工作尚初步开展, 对调控胰岛素信号相关通路从而影响糖尿病肾小球纤维化的作用与机制还有待进一步深入。

参 考 文 献

[1] 杨桢华, 陆晓华, 廖蕴华. 系膜细胞与糖尿病肾病及其微血管病理改变的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(22): 3730-3732.

[2] 艾碧琛, 肖漫江, 喻嵘, 等. 降糖益肾方对 MKR 鼠 2 型糖尿病肾病早期的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(3): 29-33.

[3] Rittz E, Stefanski A. Diabetic nephropathy in type II diabetes[J]. Am J Kidney Dis, 1996, 27(2): 167-194.

[4] Sarafidis PA, Ruilope LM. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications[J]. Am J Nephrol, 2006, 26(3): 232-244.

[5] Thirone AC, Huang C, Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport[J]. Trends Endocrinol Metab, 2006, 17(2): 72-78.

[6] Lee MP, Sweeney G. Insulin increases gelatinase activity in rat glomerular mesangial cells via ERK- and PI-3 kinase-dependent signaling[J]. Diabetes Obstet Metab, 2006, 8(3): 281-288.

[7] Yano N, Suzuki D, Endoh M, et al. *In vitro* silencing of the insulin receptor attenuates cellular accumulation of fibronectin in renal mesangial cells[J]. Cell Commun Signal, 2012, 10(1): 29-35.

[8] Shibata T, Tamura M, Kabashima N, et al. Fluvastatin attenuates IGF-1-induced ERK1/2 activation and cell proliferation by mevalonic acid depletion in human mesangial cells[J]. Life Sci, 2009, 84(21-22): 725-731.

[9] Hirsch E, Costa C, Cirraolo E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling[J]. Endocrinology, 2007, 194(3): 243-256.

[10] 吴欣宇, 张荔群, 吴进, 等. 磷脂酰肌醇-3-激酶与胰岛素抵抗[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(21): 4160-4162.

[11] 杜晓刚, 甘华. 高水平胰岛素对大鼠系膜细胞 NF- κ B 活化及细胞外基质合成的影响[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(2): 165-168.

[12] 袁芳, 刘伏友, 段绍斌, 等. 胰岛素对大鼠肾系膜细胞增殖及损伤和 PAI-1 合成的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(9): 225-226.

[13] 成细华, 喻嵘, 明霞, 等. 左归降糖益肾方对高脂饮食 2 型糖尿病 MKR 小鼠糖脂代谢及炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 105-108.

[14] 艾碧琛, 肖漫江, 喻嵘, 等. 降糖益肾方对 MKR 鼠 2 型糖尿病肾病早期的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(3): 29-33.

[15] 明霞, 艾碧琛, 喻嵘, 等. 降糖益肾方对高脂饲养的 MKR 鼠糖代谢、肾功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(5): 26-29.

[16] 吴慧, 喻嵘, 成细华, 等. 降糖益肾方干预胰岛素信号通路改善转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠肾损伤的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(11): 9-11, 29.

(收稿:2013-06-30 修回:2014-01-24)