

### 【基础研究】

通信作者:王淑秀(1970-),女,河南济源人,博士,教授,研究方向:帕金森病的发病机制。

through inducing the expressions of ephrinB2 and p-c-Jun, and initiating dopamine neurons apoptosis. Ginsenoside Rg1 may improve the symptoms of PD by decreasing the expressions of ephrinB2, p-c-Jun and restraining dopamine neurons apoptosis.

**Key words:** Parkinson's disease; ginsenoside Rg1; tyrosine hydroxylase; ephrinB2; phosphorylated c-Jun

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经变性疾病,主要临床表现为运动迟缓、僵直、震颤,典型病理学特征是中脑黑质致密区多巴胺能神经元变性及进行性缺失<sup>[1-2]</sup>。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)可选择性地诱导黑质多巴胺能神经元缺失,故 MPTP 诱导的小鼠 PD 模型能较好地反映 PD 的病理过程<sup>[3]</sup>。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是多巴胺生物合成中的限速酶,是脑内多巴胺能神经元的蛋白标志,TH 表达水平的高低能反映多巴胺能神经元的数量<sup>[4]</sup>。促红细胞生成素产生肝细胞(erythropoietin-producing hepatocellular cell line, Eph)受体激酶是细胞表面型受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTK)的一种,其配体为 ephrin。Eph 受体分为 A 型和 B 型,其配体分别为 ephrinA 和 ephrinB<sup>[5]</sup>。在黑质多巴胺能神经环路的形成中, EphB1/ephrinB2 可选择性地抑制多巴胺能神经元生长锥的形成,降低迁移错位神经元的存活率,使黑质-纹状体和纹状体-苍白球多巴胺能神经环路准确形成<sup>[6]</sup>。研究表明,磷酸化 c-Jun(phosphorylated c-Jun, p-c-Jun)与 PD 密切相关<sup>[7]</sup>。目前,对 PD 的治疗多采用左旋多巴等进行对症治疗,但长期使用效果不佳,且无神经保护作用<sup>[1]</sup>。人参皂苷 Rg1 是从人参中提取的主要生物活性成分之一,有神经营养作用,对 MPTP 引起的多巴胺能神经元损伤有保护作用<sup>[8]</sup>。本研究通过观察人参皂苷 Rg1 对 MPTP 诱导的 PD 小鼠脑黑质中 TH、ephrinB2 及 p-c-Jun 表达的影响,探讨人参皂苷 Rg1 对 PD 的预防治疗作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康雄性 C57BL/6J 小鼠 27 只,12 周龄,体质量 22~30 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证编号 SCXK(京)2006-0009],单笼喂养,自由饮食,室温( $25.0 \pm 2.0$ )℃,自然光照。

**1.1.2 主要试剂** MPTP 购自美国 Sigma 公司,人参皂苷 Rg1 购于北京寰宇科技生物科技发展有限公司,链霉亲和素-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品,TH 小鼠抗小鼠单克隆抗体(工作浓度

1:100)为美国 Millipore 公司产品, ephrinB2 兔抗小鼠多克隆抗体(工作浓度 1:100)为美国 SantaCruz 公司产品, p-c-Jun 兔抗小鼠多克隆抗体(工作浓度 1:50)为美国 Cell Signaling 公司产品,反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司,PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及 PD 小鼠模型构建** 将 27 只小鼠随机分为对照组、模型组和人参皂苷 Rg1 组,每组 9 只。注射 MPTP 前,对照组和模型组小鼠腹腔注射生理盐水( $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),人参皂苷 Rg1 组小鼠腹腔注射人参皂苷 Rg1( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),连续 3 d。给药 3 d 后,对照组小鼠继续腹腔注射生理盐水( $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ );模型组和人参皂苷 Rg1 组小鼠腹腔注射 MPTP( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),均在同一天注射 4 次,每次间隔 2 h。注射结束后第 1、5、9、13 天通过爬杆实验检测小鼠的行为变化。

**1.2.2 组织取材与样本制备** 在最后 1 次注射 MPTP 后第 14 天,将小鼠经  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  水合氯醛麻醉( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛常规灌注固定脑组织后,迅速开颅取脑,  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛  $4^\circ\text{C}$  后固定过夜,置于质量分数 20% 蔗糖沉底后,转入质量分数 30% 蔗糖至沉底,对包含黑质的脑组织进行冠状冰冻连续切片,保存于  $-80^\circ\text{C}$ ,供 SP 免疫组织化学染色;将小鼠快速断头取脑,于冰上分离出中脑黑质部位,分离出的组织于液氮冷存,以备 RT-PCR 用。

**1.2.3 爬杆实验** 将直径为 25 cm 的软木小球固定于长 50 cm、粗 0.8 cm 的木杆顶端,木杆上缠纱布防滑,将小鼠放于小球上,记录小鼠整个爬杆时间<sup>[9]</sup>。

**1.2.4 RT-PCR** 应用 TRIzol 试剂提取小鼠黑质中总 RNA。根据试剂盒说明书进行反转录。PCR 反应循环参数为:  $94^\circ\text{C}$ 、2 min,  $94^\circ\text{C}$ 、30 s,  $55^\circ\text{C}$ 、30 s,  $72^\circ\text{C}$ 、1 min,共 30 个循环,最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物序列:正链为 5'-GCCAAGGTCATCCATGACAAC-3',负链为 5'-AGTG-TAGCCCAAGATGCCCTT-3',PCR 扩增产物长度为 351 bp; TH 引物序列:正链为 5'-GGTATACGC-CACGCTGAAGG-3',负链为 5'-TAGCCACAGTAC-

CGTTCCAGA-3',PCR 扩增产物长度为 90 bp。PCR 产物用 20 g · L<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下摄片,运用 Geen-tools 分析软件对条带进行分析,以目的基因与 GAPDH 的扩增条带积分吸光度值之比值表示目的基因相对表达量。实验重复 3 次。

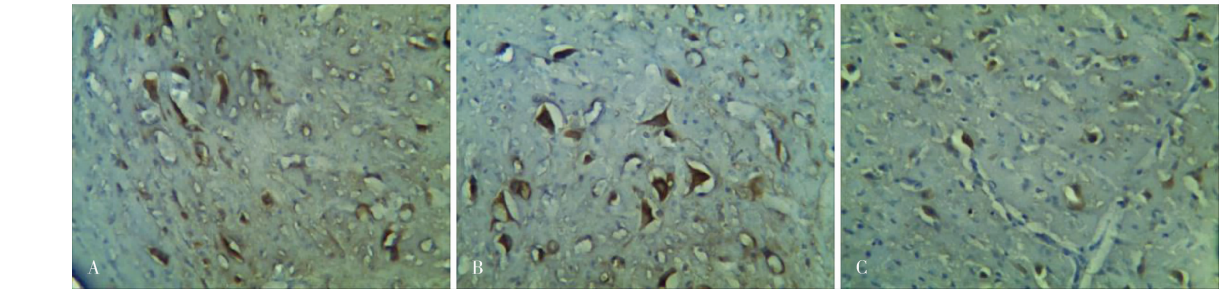
**1.2.5 免疫组织化学** 采用 SP 免疫组织化学染色法检测 3 组小鼠脑黑质中 ephrinB2 及 p-c-Jun 蛋白的表达,染色方法按试剂盒说明书进行。阴性对照以磷酸盐缓冲溶液代替一抗,其余操作相同。每张切片随机选取黑质区的 5 个高倍视野,计数阳性细胞,取其平均值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 3 组小鼠爬杆实验结果比较** 第 1 次腹腔注射 MPTP 后 10 min 模型组小鼠均出现不同程度的震颤、竖毛、转圈、翘尾;第 4 次注射 MPTP 后,模型组小鼠出现步态蹒跚、活动减少、动作变慢等症状;人参皂甙 Rg1 组与模型组比较上述行为学症状明显减轻;对照组未出现上述行为学变化。在不同时间点,模型组小鼠爬杆时间均显著长于对照组和人参皂甙 Rg1 组 ( $P < 0.05$ );人参皂甙 Rg1 组与对照组小鼠爬杆时间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );见表 1。

**2.2 3 组小鼠脑黑质中 TH mRNA 的表达** 见图 1。模型组小鼠黑质中 TH mRNA 的表达水平 ( $0.55 \pm 0.05$ ) 显著低于对照组 ( $0.67 \pm 0.05$ ) 和人参皂甙 Rg1 组 ( $0.65 \pm 0.04$ ),差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );人参皂甙 Rg1 组与对照组小鼠黑质中 TH mRNA 的表达水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



A:对照组;B:模型组;C:人参皂苷 Rg1 组。

图 2 3 组小鼠脑黑质中 ephrinB2 蛋白的表达 (SP, ×200)

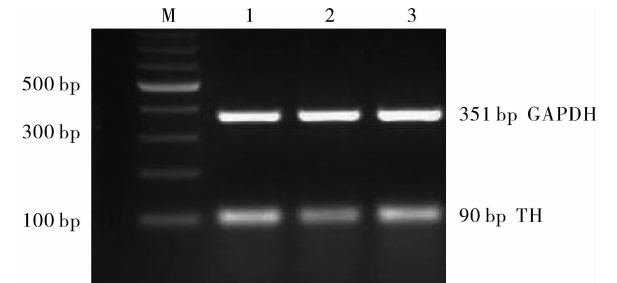
Fig.2 Expression of ephrinB2 protein in substantia nigra of mice in the three groups (SP, ×200)

**2.3.2 3 组小鼠脑黑质中 p-c-Jun 蛋白的表达** p-c-Jun 阳性染色可见于细胞核和细胞质,呈棕黄色。对照组小鼠脑黑质中 p-c-Jun 少量表达于细胞核;模型组小鼠黑质中可见大量细胞核呈阳性染色的

表 1 3 组小鼠爬杆时间比较  
Tab.1 Comparison of the climbing pole time of mice among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	爬杆时间/min			
		第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 13 天
对照组	9	4.45 ± 0.21	4.33 ± 0.15	4.36 ± 0.20	4.46 ± 0.35
模型组	9	7.23 ± 0.15 <sup>a</sup>	7.35 ± 0.28 <sup>a</sup>	7.59 ± 0.31 <sup>a</sup>	7.65 ± 0.25 <sup>a</sup>
人参皂苷 Rg1 组	9	4.92 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.12 ± 0.16 <sup>b</sup>	4.87 ± 0.17 <sup>b</sup>	5.12 ± 0.23 <sup>b</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。



M:marker;1:对照组;2:模型组;3:人参皂苷 Rg1 组。

图 1 3 组小鼠脑黑质中 TH mRNA 的表达

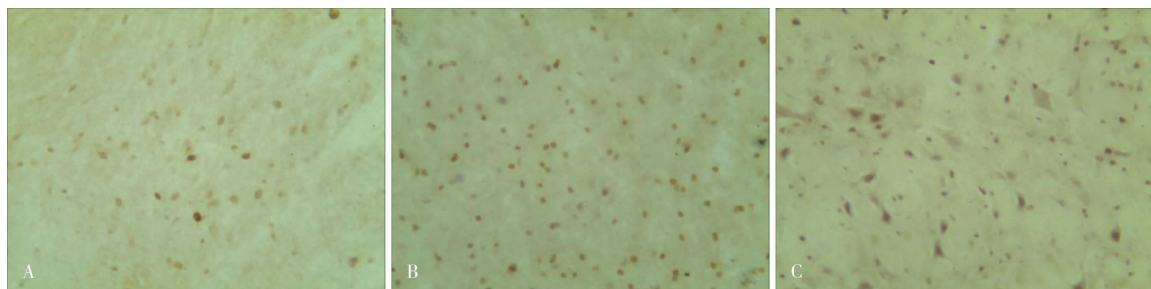
Fig.1 Expression of TH mRNA in substantia nigra of mice in the three groups

2.3 免疫组织化学结果

**2.3.1 3 组小鼠脑黑质中 ephrinB2 蛋白的表达** ephrinB2 阳性染色主要见于细胞膜和细胞质,呈棕褐色。对照组小鼠 ephrinB2 阳性细胞散在分布于黑质区;模型组小鼠黑质区有大量的 ephrinB2 阳性细胞,染色较深;人参皂甙 Rg1 组小鼠黑质区 ephrinB2 阳性细胞数较模型组减少(图 2)。模型组小鼠脑黑质中 ephrinB2 阳性细胞数 ( $13.80 \pm 2.39$ ) 显著高于对照组 ( $10.20 \pm 2.38$ ) 和人参皂甙 Rg1 组 ( $10.92 \pm 2.70$ ),差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );人参皂甙 Rg1 组与对照组小鼠脑黑质中 ephrinB2 阳性细胞数比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

( $15.60 \pm 2.08$ ), 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。人参皂苷 Rg1 组与对照组小鼠脑黑质

中 p-c-Jun 阳性细胞数比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



A: 对照组; B: 模型组; C: 人参皂苷 Rg1 组。

图 3 3 组小鼠脑黑质中 p-c-Jun 蛋白的表达 (SP,  $\times 200$ )

Fig. 3 Expression of p-c-Jun protein in substantia nigra of mice in the three groups (SP,  $\times 200$ )

### 3 讨论

人参皂苷 Rg1 具有抗神经细胞凋亡、抗氧化、抗衰老、增强记忆力等作用<sup>[8,10-11]</sup>。近年来, 人参皂苷 Rg1 的神经营养和神经保护作用受到人们的重视, 尤其是其对多巴胺能神经毒性及 1-甲基-4 苯基-吡啶离子 (1-methyl-4-phenyl pyridine, MPP<sup>+</sup>) 性诱导的多巴胺能神经元损伤的保护作用备受关注<sup>[10-11]</sup>。人参皂苷 Rg1 可保护大鼠大脑皮质神经元, 防止细胞凋亡发生<sup>[12]</sup>。用多巴胺诱导经人参皂苷 Rg1 预处理 24 h 的 PC12 细胞凋亡时, 其细胞凋亡率、caspase-3 活性以及氧化亚氮代谢产物 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 水平均显著下降, 高浓度的人参皂苷 Rg1 对多巴胺诱导的 PC12 细胞凋亡有较好的保护作用<sup>[13]</sup>。当 6-羟基多巴胺诱导黑质纹状体损伤时, 人参皂苷 Rg1 对多巴胺能神经元具有神经保护作用<sup>[10]</sup>。人参皂苷 Rg1 还可保护黑质神经元免受鱼藤酮的神经毒性作用, 其作用机制可能是抑制线粒体凋亡信号转导通路<sup>[14]</sup>。TH 是黑质多巴胺能神经元的特异性标志<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, 模型组小鼠黑质中 TH mRNA 表达水平显著低于对照组和人参皂苷 Rg1 组, 提示 MPTP 诱导了多巴胺能神经元变性坏死或凋亡, 而人参皂苷 Rg1 有助于变性的多巴胺能神经元恢复或保护多巴胺能神经元免于凋亡。在不同时间点, 模型组小鼠爬杆时间均显著长于对照组和人参皂苷 Rg1 组, 提示人参皂苷 Rg1 保护的多巴胺能神经元具有生物活性。

EphrinB2 能调控炎症性疼痛和神经性疼痛, 当神经受到损伤时, ephrinB2 表达水平升高<sup>[5]</sup>。EphrinB2 能抑制体外培养的中脑黑质多巴胺能神经元的轴突生长<sup>[15]</sup>。本研究发现 ephrinB2 在正常小鼠和 PD 小鼠中脑黑质均有不同程度的表达, PD 组小鼠黑质中 ephrinB2 表达水平明显高于对照组, 可能由于 MPTP 神经毒性导致大量的多巴胺能神经元变性坏死, 局部

小胶质细胞和星形胶质细胞反应性增生, 且 ephrinB2 在这些细胞中高表达有关<sup>[16]</sup>, 也可能由于黑质多巴胺能神经元变性坏死, 引起局部反应性炎症, 模型组小鼠 ephrinB2 表达增多以减轻炎症性疼痛。人参皂苷 Rg1 组 ephrinB2 的表达水平较模型组明显降低, 可能由于人参皂苷 Rg1 具有抗神经细胞凋亡、抗炎等作用<sup>[7]</sup>, 减轻了 MPP<sup>+</sup> 诱导的炎症反应及炎性疼痛, 故黑质区 ephrinB2 的表达水平显著减低。

c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是促分裂原活化蛋白激酶家族 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 成员之一, 能被多种刺激因子如神经毒物、环境因素、凋亡因子等激活<sup>[17]</sup>。活化的 JNK 反过来磷酸化其底物, 包括 c-Jun、活化转录因子 2 (activating transcription factor 2, ATF2)、转录因子 Ets-like protein 1 (Elk-1)、p53, 导致神经兴奋性中毒或神经元死亡<sup>[17]</sup>。Saporito 等<sup>[18]</sup> 认为 MPTP 引起的神经元凋亡是经 JNK 信号传导途径实现的。MPTP/MPP<sup>+</sup> 能磷酸化 JNK 的特异性活化底物 c-Jun, 并且使其表达升高, 继而发生细胞凋亡。有研究表明 MPTP 能诱导小鼠脑组织中 c-Jun 磷酸化, 且其磷酸化发生于黑质多巴胺能神经元<sup>[7,19]</sup>。本实验结果显示, 模型组小鼠黑质中 p-c-Jun 阳性表达的细胞明显增多; 人参皂苷 Rg1 预处理后, 小鼠中脑黑质中 p-c-Jun 阳性细胞减少, 提示人参皂苷 Rg1 可能减轻了 MPTP 诱导的 c-Jun 磷酸化, 阻止 p-c-Jun 发生核移位而避免 JNK 信号通路受干扰, 从而保护多巴胺能神经元。

综上所述, MPTP 可能通过促进小鼠中脑黑质区 p-c-Jun、ephrinB2 的表达导致 PD 发生, 人参皂苷 Rg1 可能通过保护多巴胺能神经元, 降低 p-c-Jun、ephrinB2 的表达来改善 PD 症状。

### 参考文献:

[1] Chambers J W, Pachori A, Howard S, et al. Small molecule C-Jun-



N-terminal kinase inhibitors protect dopaminergic neurons in a model of Parkinson's disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2011, 2 (4):198-206.

[2] 赵营,翟德胜,崔泰震,等. SLC6A3 基因多态性与帕金森病关联性研究 Meta 分析 [J]. *新乡医学院学报*, 2013, 30 (6):438-444.

[3] Smeyne R J, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 134 (1):57-66.

[4] Kamal M A. Editorial: status of tyrosine hydroxylase in the healthy and Parkinson's brain [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11 (4):336-339.

[5] Zhao J, Yuan G, Cendan C M, et al. Nociceptor-expressed ephrinB2 regulates inflammatory and neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2010, 6 (1):77-90.

[6] Pasquale E B. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6 (6):462-475.

[7] Hunot S, Vila M, Teismann P, et al. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (2):665-670.

[8] Chen X C, Zhou Y C, Chen Y, et al. Ginsenoside Rg1 reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26 (1):56-62.

[9] Matsuura K, Kabuto H, Makino H, et al. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion [J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 73 (1):45-48.

[10] Xu L, Chen W F, Wong M S. Ginsenoside Rg1 protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease through the IGF-1 receptor signaling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158 (3):738-748.

[11] 石冲, 张宇新, 张作风. 磷酸化 ERK1/2 对 MPTP 帕金森病小鼠黑质 iNOS 表达的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29

(1):60-63.

[12] Li J Q, Zhang X G, Zhang J T. Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons [J]. *Acta Pharm Sinica*, 1997, 32 (6):406-410.

[13] Chen X C, Zhu Y G, Wang X Z, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamine-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22 (8):673-678.

[14] Leung K W, Yung K K, Mak N K, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 in primary nigral neurons against rotenone toxicity [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52 (3):827-835.

[15] Yue Y, Widmer D A, Halladay A K, et al. Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrinB2 [J]. *J Neurosci*, 1999, 19 (6):2090-2101.

[16] Goldshmit Y, McLenachan S, Tumley A. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS [J]. *Brain Res Rev*, 2006, 52 (2):327-345.

[17] Pan J, Qian J, Zhang Y, et al. Small peptide inhibitor of JNKs protects against MPTP-induced nigral dopaminergic injury via inhibiting the JNK-signaling pathway [J]. *Lab Invest*, 2010, 90 (2):156-167.

[18] Saporito M S, Brown E M, Miller M S, et al. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigro-striatal dopaminergic neurons in vivo [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288 (2):421-427.

[19] Xia G, Harding T, Weller M, et al. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (18):10433-10438.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)

( 上接第 780 页)

贯穿了整个 DN 病程并最终演变成终末期肾病。积聚在肾间质的细胞外基质成分复杂,既包括正常肾间质已有的基质蛋白成分( Collagen I、Ⅲ、Ⅶ、纤连蛋白和腱蛋白等)的增多,还包括正常时仅存在于肾小管基膜的基质蛋白( Collagen IV 和纤连蛋白等)的沉积<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,12 周模型组大鼠 HE 染色可见明显的病理变化, Collagen I、Collagen Ⅲ 免疫组织化学结果显示模型组肾组织胶原含量明显高于对照组,这是 DN 的直接证据。超微结构亦可见模型组随病程肾小球毛细血管基底膜弥漫性增厚,足突融合,间质内大量胶原微纤维成束出现。因此,本研究提示在早期 DM 中就出现肾脏的纤维化改变。

综上所述,1 型 DM 大鼠在持续高血糖状态下,心肌和肾组织同期出现纤维化的病理改变,并且二者基本同步,在作为靶器官受损方面二者具有共性,可以推断二者的发病机制可能相似,因此心肾保护必须建立整体化思维,从而为临床 DM 并发症的早期防治开辟思路。

参考文献:

[1] 安荣,孔维,丁延平. 糖心乐对糖尿病心脏病大鼠血糖及心肌酶的影响 [J]. *新乡医学院学报*, 2012, 29 (9):656-658.

[2] 张海燕. 心肌胶原网络重构的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2003, 24 (5):359-362.

[3] Peart J N, Headrick J P. Sustained cardioprotection: exploring unconventional modalities [J]. *Vascul Pharmacol*, 2008, 49 (2/3):63-70.

[4] 王海强,黄耀,添赵黎,等. 等张应力对深筋膜 I、Ⅲ型胶原影响的实验研究 [J]. *中国临床康复*, 2002, 6 (2):208-209.

[5] 张召才,杨其珍,陈灏珠. 心肌纤维化的研究进展 [J]. *临床心血管病杂志*, 2004, 20 (1):58-60.

[6] 郭淑香,孙冬梅,薛瑞凤. 应用背向散射积分技术评价糖尿病大鼠心肌纤维化 [J]. *现代医学*, 2009, 37 (4):261-266.

[7] 孙红霞,杨世杰. 依那普利抗肾丙肾上腺素诱导的心肌纤维化作用及机制 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25 (8):1060-1064.

[8] Lea J P, Nicholas S B. Diabetes mellitus and hypertension: key risk factors for kidney disease [J]. *J Natl Med Assoc*, 2002, 94 (suppl 8):7S-15S.

( 本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)