

· 论 著 ·

螺内酯对清蛋白诱导人肾小管上皮细胞转分化的影响^{*}危志强, 秦晓华, 徐承云, 邹宏昌, 徐高四, 占锦峰, 涂卫平[△]

(南昌大学第二附属医院肾内科 330006)

摘要:目的 探讨螺内酯对人清蛋白诱导的人近端肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)发生转分化的影响,以及该过程是否通过转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)/Smads 信号通路发挥作用。方法 体外培养 HK-2 细胞,将其随机分为 7 组:A 组(未加刺激物)、B 组(加入 10^{-7} mol/L 螺内酯)、C 组(加入 5 mg/mL 清蛋白)、D 组(加入 5 mg/mL 清蛋白及 10^{-8} mol/L 螺内酯)、E 组(加入 5 mg/mL 清蛋白及 10^{-7} mol/L 螺内酯)、F 组(加入 5 mg/mL 清蛋白及 10^{-6} mol/L 螺内酯)、G 组(先加 10 μ mol/L TGF- β_1 拮抗剂,30 min 后加入 5 mg/mL 清蛋白)。采用 RT-PCR 检测 TGF- β_1 和整合素连接激酶(ILK)的 mRNA 表达;细胞免疫荧光检测上皮钙黏素(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达;ELISA 法检测纤维连接蛋白(FN)的蛋白水平。结果 C 组 ILK mRNA, α -SMA、FN 蛋白较其他各组表达明显增高($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达明显下降($P<0.05$),而 TGF- β_1 mRNA 表达高于除 G 组以外其余各组($P<0.05$)。与 G 组相比,C 组 TGF- β_1 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$),而 ILK mRNA, α -SMA、FN 蛋白表达明显下降($P<0.05$),E-cadherin 表达明显升高($P<0.05$)。D、E、F 组 TGF- β_1 、ILK mRNA、 α -SMA、FN 蛋白表达逐渐下降,组间两两比较差异有统计学意义($P<0.05$);E-cadherin 的表达逐渐增高($P<0.05$)。结论 一定浓度的清蛋白可以诱导体外培养的 HK-2 细胞发生转分化;螺内酯可抑制人清蛋白诱导 HK-2 细胞转分化作用,且呈剂量依赖性;TGF- β_1 /Smads 信号通路可能是此过程中的重要通路。

关键词:螺内酯;肾小管;上皮细胞;细胞分化;转化生长因子 β

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)18-1799-03

Effects of spironolactone on albumin induced transdifferentiation of human renal tubular epithelial cells^{*}Wei Zhiqiang, Qin Xiaohua, Xu Chengyun, Zou Hongchang, Xu Gaosi, Zhan Jin feng, Tu Weiping[△]

(Nephrology Department, the Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To discuss the effects of spironolactone(SPI) on albumin(Alb) induced transdifferentiation of human kidney proximal renal tubular epithelial cells(HK-2 cells), and whether the process through TGF- β_1 /Smads signaling pathways. **Methods** In vitro HK-2 cells were randomly divided into the following seven groups: group A (without stimulus), group B (10^{-7} mol/L SPI), group C (5 mg/mL Alb), group D (5 mg/mL Alb + 10^{-8} mol/L SPI), group E (5 mg/mL Alb + 10^{-7} mol/L SPI), group F (5 mg/mL Alb + 10^{-6} mol/L SPI), group G (10 μ mol/L TGF- β_1 antagonist) 30 min later adding 5mg/mL Alb). Using RT-PCR to detect TGF- β_1 and ILK mRNA expressions; Immunofluorescence detection in E-cadherin and α -SMA proteins expression; ELISA assay for detection of FN protein levels. **Results** In group C, compared with other groups, ILK mRNA and α -SMA, FN proteins expression were higher than other groups($P<0.05$), but E-cadherin protein express declined obviously($P<0.05$), at the same time, TGF- β_1 mRNA expression was higher than other groups except group G($P<0.05$). Compared with the group G, TGF- β_1 mRNA expression of group C was no obviously difference($P>0.05$), but ILK mRNA and α -SMA, E-cadherin, FN proteins expression were distinctly decreased($P<0.05$). In group D, E, F, TGF- β_1 , ILK mRNA and α -SMA, FN proteins expressions had descended gradually($P<0.05$). Compared with any two of them, these expressions had obviously decreased($P<0.05$). On the contrary, E-cadherin expression was in the opposite direction($P<0.05$). **Conclusion** A certain concentration of albumin can be induced transdifferentiation of HK-2 cells in vitro. Spironolactone inhibits this process in a dose-dependent manner. TGF- β_1 /Smads signaling pathway may be play an important role in this process.

Key words: spironolactone; kidney tubules; epithelial cells; cell differentiation; transforming growth factor beta

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)进展为终末期肾衰竭的共同病理途经。肾小管上皮细胞(HK-2)转分化可介导细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过量沉积,被视为 RIF 发生、发展的重要机制。研究表明,蛋白尿是导致 RIF 的独立危险因素。大量清蛋白在体外可诱导 HK-2 发生转分化^[1]。近年来一些研究已证实螺内酯具有抑制肌成纤维细胞转分化、减少蛋白尿、抑制 ECM 堆积等作用。有实验表明螺内酯可抑制高糖诱导的 HK-2 细胞发生转分化^[2],但对清蛋白诱导的 HK-2 发生转分化是否

有影响,目前尚无报道。本实验通过使用人清蛋白刺激肾小管上皮细胞,并使用不同浓度螺内酯进行干预,检测转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)、整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)mRNA、上皮钙黏素(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)蛋白水平等表达情况,以探讨螺内酯对清蛋白诱导的 HK-2 细胞发生转分化的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 HK-2 细胞由中山大学第一附属医院

^{*} 基金项目:江西省卫生厅科技计划(20121077)。[△] 通讯作者;Tel: (0791)86291976;E-mail: tuweiping6102@sina.com。

余学清教授惠赠;胎牛血清(FBS)、TRJzol DMEM/F12 培养基为美国 Gibco 公司产品;人纯化清蛋白为北京 Solarbio 公司产品;螺内酯为美国 Sigma 产品;单克隆小鼠抗人 TGF-β₁ 中和抗体为 R&D 公司产品;ELISA 试剂盒为上海森雄公司产品;兔抗人 E-cadherin 抗体、兔抗人 α-SMA 蛋白抗体、FIFC 标记羊抗兔二抗为上海博奥森公司产品;RevertAidTM 逆转录试剂盒为美国 Invitrogen Life Technologies 公司产品;5%二氧化碳培养箱为 Thermo Forma 公司产品;倒置显微镜为日本 Nikon 公司产品;PCR 扩增仪为美国 BIOCAD 公司产品;核酸、微量蛋白测定仪、凝胶成像和化学发光图像分析系统为美国 BIOCAD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 HK-2 细胞培养于规格为 25 cm² 的培养瓶,以 10%胎牛血清、含 2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM/F12(1:1)培养基进行培养,培养条件为 37℃、5%CO₂。倒置显微镜下观察细胞长至融合度为 70%~80%时,用无血清的 DMEM/F12 培养基同步 24 h 后,随机分为 7 组,即 A 组未加刺激物,B 组加入 10⁻⁷ mol/L 螺内酯,C 组加入 5 mg/mL 清蛋白,D 组加入 5 mg/mL 清蛋白及 10⁻⁸ mol/L 螺内酯,E 组加入 5 mg/mL 清蛋白及 10⁻⁷ mol/L 螺内酯,F 组加入 5 mg/mL 清蛋白及 10⁻⁶ mol/L 螺内酯,G 组先加 10 μmol/L TGF-β₁ 拮抗剂,30 min 后加入 5 mg/mL 清蛋白。实验重复 3 次。

1.2.2 RT-PCR 检测 TGF-β₁ 和 ILK 的 mRNA 表达 分别收集各组细胞,提取总 RNA,均按 TRIzol 说明书进行。提取物用微量蛋白/核酸测定仪测定 RNA 纯度和浓度。取总 RNA 5 μL 作逆转录操作,按 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作,总反应体积为 25 μL。聚合酶链反应引物序列如下,GAPDH:正义链 5'-AGT CCA CTG GCG TCT TCA C-3',反义链 5'-GCT TGA CAA AGT GGT CGT TGA-3';TGF-β₁: 正义链 5'-ACC GCA ACA ACG CAA TCT ATG-3',反义链 5'-ATT CCG TCT CCT TGG TTC AGC-3';ILK: 正义链 5'-GCA CTC AAT AGC CGT AGT G-3',反义链 5'-CCT ACT TGT CCT CAT CTT C-3'。反应条件为:预变性 95℃ 4 min,扩增 94℃ 30 s,退火 30 s,72℃ 1 min。退火温度及循环数分别为 ILK 55℃,35 个循环;TGF-β₁ 54℃,35 个循环,最后一个循环后 72℃ 延伸 5 min。取各检测物 PCR 产物 8 μL,1.2%的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统成像,用图像分析处理系统进行灰度扫描分析 DNA 条带含量,以所得积分吸光度与内参照 GAPDH 积分吸光度的比值作为半定量值进行分析。

1.2.3 免疫荧光检测 E-cadherin、α-SMA 蛋白的表达 HK-2 细胞接种于 6 孔板备置细胞玻片,各组培养 24 h 后,4%多聚甲醛室温固定 20 min。参照试剂盒说明书,滴加 E-cadherin 单抗、α-SMA 蛋白单抗(1:100)4℃ 过夜,滴加 FITC 标记二抗孵育 40 min,中性树胶封片。在荧光显微镜下观察,随机取 3 个视野观察,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析 E-cadherin、α-SMA 积分光密度(IOD)值。

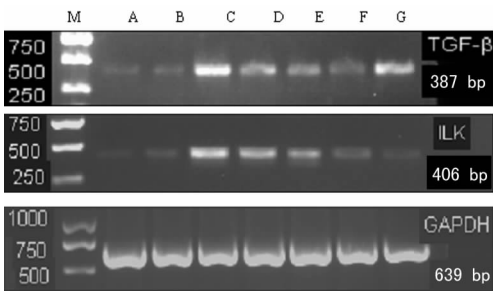
1.2.4 ELISA 检测 FN 蛋白的水平 根据试剂盒说明书对标准品和细胞培养上清液进行检测。在酶标仪 450 nm 处,以空白对照孔调零,测取吸光度 A 值,以 A₄₅₀ 值对 FN 标准品 (ng/mL)在 Excel 上作标准曲线,根据表本的 A 值求出 FN 含量(ng/mL)。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 统计分析软件进行处理,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差 LSD-*t* 检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结 果

2.1 细胞 TGF-β₁ 和 ILK 的 mRNA 表达结果 A、B 组 HK-2 细胞 TGF-β₁ 和 ILK 的 mRNA 均有微量表达;C 组 TGF-β₁ mRNA 表达水平高于除 G 组以外其余各组 ($P < 0.05$),ILK mRNA 表达水平较其他各组均明显增高 ($P < 0.05$);D、E、F 组 HK-2 细胞 TGF-β₁ 和 ILK 的 mRNA 表达逐渐下降,两组间比较差异统计学意义 ($P < 0.05$);与 C 组比较,G 组 HK-2 细胞 TGF-β₁ mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 ILK mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。



M: DNA-Mark; A~G: A~G 组。

图 1 各组 HK-2 细胞 TGF-β₁ 和 ILK 的 mRNA 的表达

表 1 各组细胞 TGF-β₁ 和 ILK 的 mRNA 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β ₁	ILK
A 组	0.391±0.015	0.387±0.023
B 组	0.385±0.018	0.380±0.030
C 组	0.921±0.044	0.662±0.027
D 组	0.771±0.017	0.588±0.024
E 组	0.590±0.020	0.473±0.017
F 组	0.414±0.034	0.407±0.013
G 组	0.911±0.037	0.384±0.016

2.2 细胞免疫荧光检测细胞 E-cadherin、α-SMA 蛋白的表达 各组 HK-2 细胞 E-cadherin 和 α-SMA 蛋白均有微量表达;C 组 HK-2 细胞 α-SMA 蛋白表达较其他各组明显增高 ($P < 0.05$),而 E-cadherin 表达则明显下降 ($P < 0.05$);D、E、F 组 HK-2 细胞 α-SMA 蛋白的表达逐渐下降,E-cadherin 蛋白的表达逐渐增高,且组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 C 组比较,G 组 HK-2 细胞 E-cadherin 表达明显升高 ($P < 0.05$),而 α-SMA 蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞 E-cadherin、α-SMA 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	α-SMA	E-cadherin
A 组	0.371±0.012	1.076±0.055
B 组	0.366±0.015	1.069±0.036
C 组	0.943±0.050	0.549±0.008
D 组	0.796±0.015	0.631±0.023
E 组	0.613±0.019	0.722±0.006
F 组	0.422±0.025	0.965±0.039
G 组	0.709±0.033	0.896±0.017

2.3 ELISA 法检测上清液 FN 蛋白的水平 C 组细胞上清液

中 FN 蛋白的水平显著高于其他各组($P<0.05$);D、E、F 组上清液中 FN 蛋白的水平逐渐降低,组间两两比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与 C 组比较,G 组上清液中 FN 蛋白的水平明显降低($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组细胞上清液中 FN 蛋白的水平($\bar{x}\pm s$,pg/mL)	
组别	FN
A 组	194.04±50.62
B 组	205.89±53.77
C 组	849.57±124.3
D 组	671.81±100.57
E 组	550.79±72.03
F 组	375.63±84.29
G 组	583.32±107.45

3 讨 论

肾小管上皮细胞转分化发展为 RIF,主要经历了 4 个关键的阶段:(1)上皮细胞间黏附因子(如 E-cadherin)的丢失;(2)间质细胞标记物 α -SMA 及中间丝波形蛋白表达的增加;(3)细胞骨架重塑及表型的转变致肾小管基底膜的破坏;(4)细胞迁移侵袭能力增强致间质纤维化的发展^[3]。大量研究表明,TGF- β_1 是诱导肾小管上皮细胞 EMT 的主要介质,在介导 EMT 中发挥着至关重要的作用^[4],且此作用依赖 Smads 信号通路^[5]。ILK 是一种位于细胞内主要调节细胞黏附、细胞形态以及细胞外基质沉积的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,很多临床表现为蛋白尿的肾脏病模型的研究发现 ILK 是蛋白尿发生的关键性介质之一^[6-7]。TGF- β_1 可促进 ILK 表达^[8]。研究表明,ILK 作为 TGF- β_1 /Smads 信号通路的下游因子参与了 EMT 的 4 个关键步骤^[9]。E-cadherin 是肾小管上皮细胞转分化过程中的重要的标记蛋白之一^[10],其表达的下调被视为是肾小管上皮细胞发生 EMT 的第一步,是肾间质纤维化的始动环节^[11-12]。实验表明,ILK 表达的增加使 E-cadherin 表达下调,并上调 α -SMA 及 FN 的表达^[13]。

本研究观察提示清蛋白诱导组的 TGF- β_1 、ILK mRNA、 α -SMA、FN 蛋白的表达较其他组均明显上调,而 E-cadherin 表达较其他组明显下调。说明大量清蛋白在体外诱导 HK-2 细胞发生 EMT。此结果与文献报道^[1]有相似。另外,在螺内酯干预组中,随着螺内酯浓度的加大,TGF- β_1 、ILK mRNA、 α -SMA 蛋白、FN 蛋白的表达均有所下调,E-cadherin 表达上调。螺内酯可一定程度的抑制清蛋白诱导的 HK-2 细胞发生 EMT,而且呈一定的剂量依赖性。与此同时实验发现,TGF- β 拮抗剂组较清蛋白诱导组的 ILK mRNA 表达明显下调,而 E-cadherin、 α -SMA 蛋白、FN 蛋白的有所下调,TGF- β_1 表达无明显差异。此结果与 Bianchi S 等研究报道相似^[14]。作者认为此过程可能有 TGF- β_1 /Smads 信号通路参与,并可能为主要通路。

螺内酯是醛固酮非选择性拮抗剂,与其在细胞质膜的盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor,MR)的水平上发生直接的拮抗作用,具有利尿、降低血压等作用。在临床研究中发现,给予 CKD 患者服用 8 周螺内酯后,可以显著降低其蛋白尿的水平^[14];部分研究证实小剂量螺内酯联合 ACEI 尚可以有效减少 CKD 的尿蛋白排泄^[15]。动物实验表明,醛固酮选择性拮抗剂也能显著降低糖尿病大鼠肾脏组织 MR mRNA 的表

达,从而减少蛋白尿^[16];Taira 等^[17]报告螺内酯在单肾切除的糖尿病大鼠中,可降低肾组织 TGF- β_1 ,减缓小管间质纤维化。笔者认为本实验从细胞分子水平上,进一步阐述了螺内酯对清蛋白导致肾脏损害的保护作用。但其具体作用机制有待进一步研究。

综上所述,清蛋白可上调 TGF- β_1 、ILK mRNA 和 α -SMA、FN 蛋白,而下调 E-cadherin 蛋白表达,螺内酯则反之,提示一定浓度的人清蛋白可以诱导体外培养的 HK-2 细胞发生 EMT,螺内酯可一定程度的抑制此过程。另外本实验提示:螺内酯抑制清蛋白诱导的 HK-2 发生 EMT 呈一定的剂量依赖性,而且与 TGF- β_1 /Smads 信号通路有关。但其具体的作用机制仍不明确。本实验提示螺内酯对肾脏疾病具有保护效应,为寻找缓解肾脏疾病进展的新策略有一定意义。

参考文献:

[1] Zhao J, Alfonso TS, Paul M, et al. Albumin-stimulated TGF- β_1 in renal tubular cells is associated with activation of MAP kinase[J]. Int Urol Nephrol, 2007, 39(4): 1265-1271.

[2] 刘抗寒,周巧玲,敖翔,等. 醛固酮及其拮抗剂螺内酯对高糖刺激下肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 中南大学学报:医学版, 2010, 35(3): 222-229.

[3] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1): 1-12.

[4] Hills CE, Squires PE. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2010, 31(1): 68-74.

[5] 李瑾,王宁宁,谭若云,等. Smad 信号传递途径调节肾小管上皮细胞转分化实验[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2005, 14(3): 230-234.

[6] Li Y, Kang YS, Dai C, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria[J]. Am J Pathol, 2008, 172(2): 299-308.

[7] Li Y, Tan X, Dai C, et al. Inhibition of integrin-linked-kinase attenuates renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(9): 1907-1918.

[8] Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease; the case for TGF- β as the major mediator[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15 Suppl 1: S55-57.

[9] Monica F, Rossella T, Monica C, et al. TGF-beta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture[J]. Int J Exp Pathol, 2006, 87(3): 197-208.

[10] Chea SW, Lee KB. TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Yonsei Med J, 2009, 50(1): 105-111.

[11] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics[J]. Kidney Int, 2006, 69(2): 213-217.

[12] Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis[J]. J Mol(下转第 1804 页)

3 讨 论

干化学法尿隐血检测因其操作简便、快速、获得数据多等优点极大提高了实验室尿液分析的工作效率^[8-9]。其原理是利用尿液中红细胞内或红细胞破坏后释放出来的血红蛋白的过氧化物酶样活性,在氧化茴香素或过氧化氢烯枯存在的情况下,催化邻甲联苯胺脱氢,从而发生颜色的改变^[10]。临床工作中可能造成干化学法尿隐血检测假阳性的原因有以下几点:(1)尿液中存在游离的血红蛋白或肌红蛋白;(2)尿路感染,尿中出现一些细菌或真菌的代谢产物;(3)化学污染,如次氯酸盐等;(4)尿液中存在热不稳定过氧化物酶;(5)试纸条过期、污染、保存不当、操作不正确等^[11-13];(6)尿液标本保存不当或放置时间过长。可能造成干化学法尿隐血检测假阳性的原因主要是尿液中的维生素 C 含量过高。在实验设计中,排除可能造成干化学法尿隐血检测阳性而镜检阴性的病理性干扰因素,确保镜检的结果能真实准确地反映患者的健康情况。收集尿液标本时做到及时妥当,保证标本不被污染。操作中确保试纸条的质量、操作的正确性,同时检测尿液中维生素 C 的含量,排除尿液维生素 C 阳性标本。在以上前提下,通过同时对标本进行干化学法尿隐血检测和镜检,分析二者结果的相符性,从而判断干化学法尿隐血检测的可靠性。

本研究显示,在 843 例泌尿外科住院患者和 403 名体检人员的尿液标本中,干化学法尿隐血检测结果为士、十时,两种方法检测结果的相符率远低于干化学法尿隐血检测结果为阴性、++、+++时两种方法检测结果的相符率。843 例泌尿外科住院患者和 403 名体检人员的尿液标本中两种方法检测阳性的相符率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),这表明干化学法尿隐血检测在泌尿外科住院患者及体检人员中的可靠性是稳定的。

在不同疾病患者中,观察到两种方法检测阳性的相符率高低不一,且以结石患者为最低,推测可能是由于结石患者干化学法尿隐血检测结果为士、+的检出率最高,导致两种方法检测阳性的相符率最低。

综上所述,干化学法尿隐血检测可靠性欠佳,所以仍无法替代镜检,只能作为过筛检测。当干化学法尿隐血检测结果异常时,应结合镜检报告结果进行综合判断。

参考文献:

- [1] 孙丽杰,吴开颜.干化学法检测尿隐血与镜检尿红细胞的相关性探讨[J].基层医学论坛,2011,15(13):444-445.
- [2] 祁琳,朱雪明,单卫明.尿中念珠菌对尿液分析仪分析隐血项的影响[J].苏州大学学报:医学版,2003,23(3):291-292.
- [3] 王桂兰,李倩男,李智.对加热煮沸法排除干化学法尿液隐血假阳性的初探[J].现代检验医学杂志,2002,17(2):8-9.
- [4] 刘玉华.尿液干化学分析的常见影响因素[J].现代诊断与治疗,2006,17(2):116-116.
- [5] 卜桂平.尿液红细胞和白细胞干化学试带法检测假阳性结果分析及对策[J].中国现代药物应用,2010,12(24):65-66.
- [6] 梁艳冰,许元文,唐皓.伴急性肾衰竭横纹肌溶解综合征临床分析[J].热带医学杂志,2008,8(9):915-916.
- [7] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:293-297.
- [8] 徐耀忠,王惠民,王跃国. Clinitek200 型全自动尿液分析仪性能评价[J].南通医学院学报,2002,22(2):226-227.
- [9] 李伟,张红艳.尿液分析与沉渣镜检中红细胞的比较[J].重庆医学,2008,37(9):1020.
- [10] 罗春丽.临床检验基础[M].3版.北京:人民卫生出版社,2010:119.
- [11] 刘彩琼.3种方法检测尿红细胞的比较[J].云南医药,2008,29(2):194-195.
- [12] 张丽梅,徐韞健,廖伟娇,等.尿液红细胞检测和隐血试验的临床应用及影响因素[J].实用医学杂志,2010,26(12):2223-2224.
- [13] 梁秀兰,贺淑霞.5种方法检测尿隐血结果分析[J].宁夏医学杂志,2008,30(4):370-371.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-02-22)

(上接第 1801 页)

Med,2004,82(3):175-181.

- [13] Kaartinen V,Haataja L,Nagy A,et al. TGF β 3-induced activation of RhoA/Rho-kinase pathway is necessary but not sufficient for epithelial-mesenchymal transdifferentiation:Implications for palatogenesis[J]. Int J Mol Med,2002,9(6):563-570.
- [14] Bianchi S,Bigazzi R,Campese VM. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD:an uncontrolled pilot study[J]. Am J Kidney Dis,2005,4(6):45-51.
- [15] Chrysostomou A,Becker G. Spironolactone in addition to ACE inhibition to reduce proteinuria in patients with

chronic renal disease[J]. N Engl J Med,2001,345(12):925-926.

- [16] Guo C,Martinez-Vasquez D,Gonzalo P,et al. Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes-mellitus[J]. Endocrinology,2006,147(11):5363-5373.
- [17] Taira M,Toba H,Murakami M,et al. Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats[J]. Eur J Pharmacol,2008,589(1/3):264-271.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-03-02)