

2型糖尿病肾病大鼠模型的建立及肾病早期尿蛋白组分析

洪侃^{1,2}, 郝志明^{3*}, 刘志华¹, 卞坤娟², 黄玉政⁴, 徐明⁴

(¹苏州大学附属第一医院心内科, 江苏 苏州 215006; ²南京医科大学附属无锡人民医院内分泌科, ³心内科, 江苏 无锡 214023; ⁴江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏 无锡 214064)

[摘要] 目的: 探寻高糖高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导致2型糖尿病大鼠糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)早期尿液小分子差异多肽。方法: ①40只4周龄SD大鼠随机分为糖尿病模型组(A组)30只和对照组(B组)10只, A组应用高糖高脂饮食6周联合STZ注射(以注射时计为0), 诱导致2型糖尿病大鼠模型, B组普通饮食; ②-6、-2、2、12周末收集各组大鼠24h尿液, 尾静脉取血检测血糖; -2、2、12周末收集血样本和肾脏标本。尿液测24h白蛋白排泄率, 血样本测胰岛素、胆固醇、甘油三酯等指标; ③将大鼠尿液分为4组: A1组(-2周末时A组尿液, 10个标本)、A2组(12周末时A组尿液, 10个标本)、B1组(-2周末时B组尿液, 10个标本)、B2组(12周末时B组尿液, 10个标本)。采用弱阳离子磁珠联合基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术对各组尿液样本进行尿液多肽谱的采集, 应用ClinProTools软件进行生物学比较分析。结果: ①高糖高脂饮食6周联合25 mg/kg STZ腹腔注射诱导2型糖尿病大鼠模型, 成模率87%, 成模大鼠具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特点; 12周时出现DN相应的形态及功能改变, 2型糖尿病大鼠DN成模率67%, 死亡率20%; ②弱阳离子磁珠联合MALDI-TOF-MS技术检测4组大鼠尿液, ClinProTools软件分析后发现A2组和B2组间多肽谱比较有7个多肽峰差异具有统计学意义, 在A2组高表达有4个, 低表达有3个。结论: ①利用高糖高脂饮食6周联合STZ成功诱导DN大鼠模型; ②弱阳离子磁珠联合MALDI-TOF-MS技术, 能获得2型糖尿病大鼠DN早期和正常对照大鼠尿液多肽谱, 并有效地鉴定出差异常蛋白峰。

[关键词] 2型糖尿病肾病; 动物模型; 大鼠; 肾脏病理; 磁珠分离; 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱; 尿液多肽

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-698-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130530

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)最主要的原因, 约占全部ESRD病例的44%^[1], 严重影响患者的生存质量。按照目前DN的诊断标准, 早期诊断仍存在问题。基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年发展较快的一项蛋白质组学技术。本研究主要利用弱阳离子(weak cation exchange, WCX)磁珠联合MALDI-TOF-MS技术, 通过ClinProTools软件探寻高糖高脂饮食6周联合小剂量链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导致2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)肾病大鼠和健康对照大鼠尿液中差异表达的小分子多肽峰谱, 旨在蛋白质分子水平探索更灵敏更特异的标志物, 早期发现DN。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验采用江苏省血吸虫病防治研究所提供的清洁级4周龄雄性SD大鼠, 体重180~220 g, 饲养环境SPF级。饮用自来水, 动物房温度控制在25℃左右, 12h交替照明模拟正常昼夜生理节律。并按实验动物使用的3R原则给予人道关怀^[2]。

1.1.2 仪器和试剂

STZ、戊巴比妥钠(美国Sigma公司), 稳步型血糖试纸、稳步型血糖仪(美国强生公司), MB-WCX磁珠试剂盒(223983)、Autoflex™ MALDI-TOF-MS、ClinPro Tools软件、Flex Analysis软件(美国Bruker Daltonics公司), ¹²⁵I-胰岛素放射免疫分析(中国原子能科学研究院同位素研究所), 尿微量白蛋白测定试剂盒(免疫比浊法, 上海太阳生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金项目(09NJ-MUZ51)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yuzm@wuxiph.com

4 周龄 SD 雄性大鼠, 体重 180~220 g, 普通饲料适应性喂养 1 周后, 随机分为糖尿病模型组(A 组) 30 只和对照组(B 组) 10 只。分别采用研究所提供的颗粒型高糖高脂饲料(含 20%蔗糖、10%猪油、2.5%胆固醇、1.0%胆酸盐、66.5%常规饲料)^[3]和颗粒型普通饲料(含 23%蛋白、4.7%脂肪、0.24%钠盐)喂养。

1.2.2 糖尿病肾病大鼠模型的制备

A 组大鼠高糖高脂饲料喂养 6 周, 禁食 16 h 后, 一次性右下腹后 1/3 处腹腔注射由枸橼酸钠溶液(0.1 mol/L, pH4.5, 高压灭菌)配制的 STZ 25 mg/kg 诱导 T2DM 模型, B 组同时给予等量的溶剂。72 h 后尾静脉采血。糖尿病判断标准^[3]: 空腹血糖大于正常大鼠血糖均值 ± 3 个标准差, 本研究确定该值 > 16.7 mmol/L 为胰岛素敏感性降低, 符合此标准的大鼠确定为 T2DM 大鼠。成模 26 只, 3 只随机血糖 < 16.7 mmol/L, 造模失败, 1 只死亡, 糖尿病大鼠成模率 87%, 死亡率 3%。

1.2.3 体重、血糖检测

注射 STZ 的时间计为 0, 注射前 6 周(-6 周)、注射前 2 周(-2 周)、注射后 2 周(2 周)、注射后 6 周(6 周)周末称大鼠体重, 同时尾静脉取血检测血糖。

1.2.4 尿液、血样及肾脏样本采集

-2、2、12 周周末用代谢笼收集 24 h 尿, 自由饮水。采集尿液后将尿管置于冰上, 以 4℃ 3 000 r/min 离心 5 min, 将分离的上清尿标本分装于 EP 管中, 于-80℃冰箱冻结保存待用。从采集尿液到样本冻存在 30 min 之内完成。所有样本统一测定前, 将冻存尿液样本置于室温中融化, 避免反复冻融。

-2、2、12 周周末在 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉下从心脏采取血标本后处死 A、B 组大鼠各 2 只, 随后取肾做病理检测。解剖大鼠, 分离左侧肾脏, 做纵切, 组织标本用 10%中性缓冲甲醛固定, 石蜡包埋, 切成 3 μ m 厚的切片, 行 HE 染色, 用普通光学显微镜检查。

1.2.5 血样本和尿微量白蛋白测定

空腹甘油三酯、胆固醇由自动生化分析仪测定。空腹胰岛素采用双抗体放射免疫分析法。尿微量白蛋白测定用酶免洗试剂盒一步法。

1.2.6 尿液 WCX 磁珠处理

进行 WCX 磁珠联合 MALDI-TOF-MS 测定的尿样为 4 组: A1 组(-2 周末时 A 组尿液, 10 个标本)、A2 组(12 周末时 A 组尿液, 10 个标本)、B1 组(-2 周末时 B 组尿液, 10 个标本)、B2 组(12 周末时 B 组尿液, 10 个标本)。从-80℃冰箱中取出尿标本,

4℃ 10 000 g 离心 3 min, 置于冰上备用。

从 4℃冰箱取出磁珠试剂盒, 磁珠悬浮液完全混匀。加入磁珠至样品管与尿标本上清液混匀, 室温静置 5 min。磁珠贴壁 1 min, 吸去清澈的悬浮液体, 枪头避免接触到磁珠而吸走磁珠。样品处理完毕后, 可以直接质谱分析或冻存-20℃于 24 h 内分析。取 1 μ l 混合液, 点在 Anchorchip 靶标准品位置, 室温干燥后。将 Anchorchip 靶放入质谱仪, 选择方法 LP-Clinprot。

选择分子量采集范围 1 000~12 000, 先采用高激光能量轰一下结晶点, 再用低于高激光能量 10%~20%的能量采集图谱。同一标准品多点采集, 累加 5~10 个结晶点数据, 得到累加后的标准品图谱, 平均分子量偏差小于 100 ppm。

1.2.7 MALDI-TOF-MS 检测

Autoflex control 具体参数设置如下: 选择方法 LP_Clinprot, 靶 MTP-Anchorchip 800/384, N₂ 激光源, 激光能量在 60%左右, 正离子线性模式和自动采集数据的模式, 检测相对分子量范围为 1 000~12 000。质谱数据采集后, 应用 FlexAnalysis 对图谱进行基线的平滑、衰减、标峰及用 Excel 表格进行数据输出。

1.3 统计学方法

质谱数据通过 ClinProTools 软件中 *t* 检验进行比较分析, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。其余指标采用 SPSS17.0 统计软件, 计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较用 *t* 检验(非正态分布者采用秩和检验), $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A、B 组大鼠临床表现

糖尿病模型成立以后 A 组大鼠皆出现多饮多食多尿, 毛色晦暗, 逐渐出现消瘦; B 组大鼠无明显改变(表 1)。

2.2 A、B 组大鼠血糖及血胰岛素结果

高糖高脂饲养 4 周, 即注射 STZ 前 2 周(-2 周), A 组空腹血糖值与 B 组无明显差异 ($P > 0.05$); 血

表 1 A、B 组大鼠不同时间体重水平比较

时间(周)	(g, $\bar{x} \pm s$)		
	A 组	B 组	<i>P</i> 值
-6	205.00 \pm 10.46 (<i>n</i> =30)	207.00 \pm 9.62 (<i>n</i> =10)	0.215
-2	233.00 \pm 11.16 (<i>n</i> =30)	215.00 \pm 10.28 (<i>n</i> =10)	0.041
2	222.00 \pm 13.32 (<i>n</i> =26)	241.00 \pm 12.55 (<i>n</i> =10)	0.035
12	176.00 \pm 14.04 (<i>n</i> =20)	244.00 \pm 12.50 (<i>n</i> =10)	0.002

浆胰岛素值较 B 组显著增加 ($P < 0.001$); 注射 STZ 后 2 周, A 组空腹血糖值明显高于 B 组 ($P < 0.001$), 达到糖尿病标准。其血浆胰岛素值虽有所下降但仍高于 B 组且差异有显著性意义 ($P < 0.001$, 表 2)。

2.3 A、B 组大鼠不同时期血甘油三酯、胆固醇和尿

微量白蛋白比较结果

12 周时 A 组大鼠血甘油三酯、胆固醇水平增高明显(表 3), 出现 DN 特点, 尿微量白蛋白增多 ($\geq 5 \text{ mg/d}$ 确认为 DN 成模), 见表 4; 此时大鼠成模 20 只, 4 只死亡, 2 只尿微量白蛋白增多不明显, T2DM 大鼠 DN 成模率 67%, 死亡率 20%。

表 2 A、B 组大鼠不同时间尾静脉血糖和血胰岛素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间(周)	血糖 (mmol/L)			胰岛素 (mIU/L)		
	A 组	B 组	P 值	A 组	B 组	P 值
-6	6.44±0.46 (n=30)	6.35±0.25 (n=10)	0.334	-	-	-
-2	6.51±0.51 (n=30)	6.46±0.39 (n=10)	0.258	31.93±4.98 (n=30)	15.43±0.66 (n=10)	< 0.001
2	22.84±4.25 (n=26)	6.61±0.33 (n=10)	< 0.001	26.35±5.10 (n=26)	16.49±0.72 (n=10)	< 0.001
12	21.93±4.36 (n=20)	6.55±0.28 (n=10)	< 0.001	13.77±0.42 (n=20)	17.26±0.58 (n=10)	0.011

表 3 A、B 组不同时间血甘油三酯及胆固醇水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间(周)	甘油三酯(mmol/L)			胆固醇(mmol/L)		
	A 组	B 组	P 值	A 组	B 组	P 值
-2	0.75±0.16 (n=30)	0.69±0.23 (n=10)	0.063	1.89±0.28 (n=30)	1.86±0.28 (n=10)	0.654
2	1.11±0.17 (n=26)	0.71±0.17 (n=10)	0.024	2.49±0.32 (n=26)	1.82±0.14 (n=10)	0.041
12	1.49±0.27 (n=20)	0.79±0.29 (n=10)	< 0.001	2.98±0.46 (n=20)	1.92±0.34 (n=10)	0.032

表 4 A、B 组大鼠不同时间尿微量白蛋白水平比较 ($\text{mg/d}, \bar{x} \pm s$)

时间(周)	A 组	B 组	P 值
-2	1.85±0.56 (n=30)	1.79±0.68 (n=10)	0.431
2	2.11±0.34 (n=26)	1.89±0.52 (n=10)	0.065
12	7.19±0.83 (n=20)	2.23±0.46 (n=10)	0.013

2.4 肾脏病理切片

A 组 12 周大鼠肾脏可见系膜细胞增生, 肾小球基底膜增厚, 肾小球出现结节型和弥漫型病变; 对应的同期 B 组大鼠肾脏组织结构清晰, 系膜细胞无增生, 基底膜光滑、均质(图 1)。

2.5 质谱结果分析

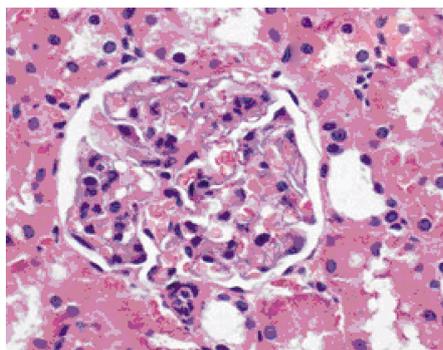
利用 ClinProTools 软件自动采集数据并进行基线和均一化处理及分子量校正, 对 A1 组与 A2 组, A1 组

与 B1 组, A2 组与 B2 组尿液质谱图谱进行两两比较分析, 发现 A1、A2 和 B1 组间无明显差异($P > 0.05$)。

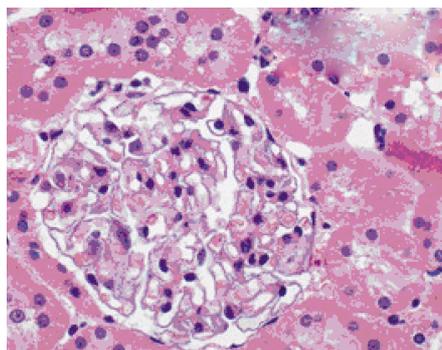
A2 组和 B2 组间多肽谱比较, 进行统计分析后显示有 7 个差异多肽峰具有统计学意义, 在 A2 组高表达有 4 个, 低表达有 3 个。DN 大鼠的尿液与对照大鼠的尿液比较, 质荷比为 4 850.67、6 182.77、3 334.63、1 783.24 的小分子多肽峰增多; 同时质荷比为 2 027.77、3 061.92、4 096.17 的多肽峰减少(表 5)。

3 讨论

人类糖尿病以 T2DM 占多数, 因此建立理想实用的 T2DM 动物模型对其发病机制及其慢性并发症的研究具有重要意义。本研究先以高糖高脂饲料喂养大鼠, 引起大鼠外周胰岛素抵抗, 为了克服胰岛素



A 组



B 组

图 1 12 周 A、B 组大鼠肾脏病理切片(HE, ×400)

表 5 A2 组与 B2 组间差异峰的峰度比较

多肽峰	A2 组	B2 组	$(\bar{x} \pm s)$ P 值
4 850.67	136.06±31.27	27.33±9.12	< 0.001
6 182.77	59.31±10.54	19.76±5.24	< 0.001
3 334.63	81.16±18.02	30.92±14.83	0.034
1 783.24	98.06±27.15	54.31±28.65	0.042
2 027.77	48.91±20.24	73.03±23.91	0.031
3 061.92	9.67±6.3	13.49±5.50	0.048
4 096.17	37.43±13.71	65.87±26.78	0.040

抵抗,使血糖维持在正常范围,机体代偿性分泌更多的胰岛素,此时再给予小剂量(25 mg/kg)的 STZ 使 β 细胞受损,胰岛素分泌相对减少,引起高血糖。该模型的建立过程类似于人 T2DM 的进程,可用来研究 T2DM 的发病机制。本研究中糖尿病模型成模率 87%,T2DM 大鼠 DN 成模率 67%,死亡率 20%。成模大鼠血糖明显增高,注射 STZ 后 2 周,A 组空腹血糖值明显高于 B 组($P < 0.01$),“三多一少”症状明显,符合 T2DM 临床表现;同时具有高血脂表现,注射 STZ 后 2 周,A 组空腹甘油三酯及胆固醇水平明显高于 B 组并随时间延长(12 周)进一步加重($P < 0.05$);高糖高脂饲养 4 周,即注射 STZ 之前 2 周,A 组空腹血糖值与 B 组无明显差异时血浆胰岛素值已显著增加($P < 0.01$),有胰岛素抵抗现象;注射 STZ 后 2 周时,其血浆胰岛素值虽有所下降,但仍高于 B 组且差异有统计学意义($P < 0.01$)。然后依其自然病情发展出现 DN 的相应形态及功能改变。Mogensen 标准把 DN 改变分为 5 期^[4],Ⅲ期在临床上表现为持续蛋白尿;组织病理学上早期表现为肾小球系膜基质增宽及毛细血管基底膜增厚。本研究中 T2DM 大鼠发病过程及特征与患者的临床过程和代谢特征基本类似,符合 T2DM 的典型特点。

MALDI-TOF-MS 技术是近年发展较快的一项蛋白质组学技术,它的基本原理是样品分子离子化后,根据不同离子间的质荷比(m/z)差异来分离并确定分子量。牛俊等^[5]采用快速高分离度液相色谱-质谱技术(RRLC-MS)检测经格列美脲治疗的 T2DM 大鼠尿液中代谢物的变化。提示该技术可作为寻找肾脏疾病尿液潜在标志物的有效手段。磁珠是近年发展起来并在生物医学领域广泛应用的一种新型多功能试剂,为免疫磁性微球技术的一种,其可捕获分子量在 15 000 以下的蛋白及肽段。WCX 磁珠表面带有羧基,在 pH7.0 的环境中带正电,可特异性吸附带有负电荷的蛋白质,具有快速、高纯度和高收率等优

点^[6]。Fiedler 等^[7]通过研究尿液收集、储存等方法的不同对磁珠富集尿液中蛋白/多肽的影响,建立了磁珠分离尿液蛋白的标准化流程,规范从样本采集、处理以及存储的各个环节,最大程度上避免人为因素对标本中蛋白含量的影响。表明此方法可靠性强,可重复性高。

尿液中的蛋白 30%来源于循环中的血浆,70%由泌尿系统局部产生^[8],其中最主要的是肾脏。这些蛋白蕴含着丰富的生物学信息,因此尿液是寻找 DN 早期诊断标志物的理想体液样品之一,且具有采集方便、便于重复采样等优点。在国内,动物尿蛋白组学在 DN 领域的研究少见。

本研究结果提示,A 组尿液多肽谱出峰多集中在 7 000 m/z 以下。在 T2DM 大鼠成模 12 周,出现 DN 病理改变时,A2 组和对照 B2 组尿液多肽谱比较发现有 7 个多肽峰差异有统计学意义($P < 0.05$),其中质荷比 4 850.67、6 182.77、3 334.63、1 783.24 的多肽峰在 DN 组表达上调,在尿液中增多;同时,质荷比为 4 096.17、2 027.77、3 061.92 的多肽峰,在尿液中减少。说明在 T2DM 大鼠出现 DN 病理改变时尿液蛋白质谱也有变化,不仅有多肽增加,也有减少。提示尿液蛋白质谱可以作为提示 DN 病变的信号,为下一步研究提供依据。尤其是质荷比 4 850.67 的多肽峰差异明显(136.06 ± 31.27 vs 27.33 ± 9.12),值得研究。

质谱结果表明,运用 WCX 磁珠联合 MALDI-TOF-MS 技术较灵敏、简便,并能有效监测 T2DM 大鼠尿液多肽动态表达情况,获得的质谱图包括了多肽峰的数目、大小、含量等全面信息,可以较容易地发现某一组图谱与其他图谱的差异性,并能了解某一差异峰在各组间的峰度变化情况,对于早期 DN 的诊断、病因探求提供相关信息,具有重要意义。

[参考文献]

[1] Toshio D, Akira M, Takeshi M, et al. The current clinical problems for early phase of diabetic nephropathy and approach for pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 82(suppl 1):21-24

[2] 贺争鸣,李冠民,邢瑞昌. 3R 理论的形成、发展及在生命科学中的应用[J]. 实验动物科学与管理, 2000, 17(3):43

[3] 郭啸华,刘志红,李恒,等. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(5):290-294

[4] Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E, et al. The

Biomed, 2012, 25(7):9543-9552

[5] Li Y, Weber E, Liu F, et al. The optimization of an 8-channel transceiver volume array for small animal MRI at 9.4T[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2011, 2011: 2833-2836

[6] 姚楠, 张健, 黄德建, 等. 磁共振成像技术评价考布他汀 A4 磷酸酯对大鼠移植性肝脏肿瘤的治疗作用[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(6):558-562

[7] Wang H, Chen F, Ni Y, et al. Hypericin as a marker for determination of tissue viability after intratumoral ethanol injection in a murine liver tumor model[J]. Acad Radiol, 2008, 15(1):107-113

[8] Ni Y, Adzamlı K, Miao Y, et al. MRI contrast enhancement of necrosis by MP-2269 and gadophrin-2 in a rat [J]. Invest Radiol, 2001, 36(2):97-103

[9] Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(3):789-794

[10] Harmer PW, McGeachie JM, Davies MJ, et al. Evans blue dye as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability[J]. J Anat, 2002, 200 (Pt1):69-79

[11] Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(1): 3710-3714

[12] Ni Y, Bormans G, Chen F, et al. Necrosis avid contrast agents: functional similarity versus structural diversity [J]. Invest Radiol, 2005, 40(8):526-535

[13] Wang H, Miranda Cona M, Chen F, et al. Comparison between nonspecific and necrosis-avid gadolinium contrast agents in vascular disrupting agent-induced necrosis of rodent tumors at 3.0T[J]. Invest Radiol, 2011, 46(9):531-538

[14] MarChal G, Ni Y, Herijgers P, et al. Paramagnetic metalloporphyrins: infarct avid contrast agents for diagnosis of acute myocardial infarction by MRI[J]. Eur Radio, 1996, 6(1):2-8

[15] Ni Y, Cresens E, Adriaens P, et al. Necrosis-avid contrast agents; introducing nonporphyrin species[J]. Acad Radiol, 2002, 9(1):98-101

[收稿日期] 2012-12-10

(上接第 701 页)

stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 1983, 32 (2):64-78

[5] 牛俊, 皮子凤, 越皓, 等. 格列美脲治疗的 2 型糖尿病大鼠的尿液代谢组学研究[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(10):2169-2172

[6] Zhang X, Leung SM, Morris CR, et al. Evaluation of a novel, integrated approach using functionalized magnetic beads, bench-top MALDI-TOF-MS with prestructured sample supports, and pattern recognition software for profiling potential biomarkers in human plasma[J]. J Biomol Tech, 2004, 15(3):167-75

[7] Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, et al. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2007, 53 (3):421-428

[8] Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots[J]. Proteomics, 2004, 4(4):1159-1174

[收稿日期] 2012-12-14