

慢病毒载体转染 293T 细胞,在该细胞中成功包装得到含有 CARM1 shRNA 的慢病毒颗粒,利用其感染 P19 细胞,有效地沉默了 CARM1 的表达。借助 Western blot 法以及实时荧光定量 PCR,我们筛选出有明显干扰效果的 CARM1 shRNA 慢病毒载体,并且验证了 CARM1 shRNA 慢病毒载体的干扰效率及特异性。利用 pLKO.1 shRNA 慢病毒体系,笔者最终成功构建得到稳定敲低 CARM1 表达的小鼠畸胎瘤 P19 细胞系。尽管各个稳定敲低 CARM1 表达的 P19 细胞系在形态上并没有发生明显变化,而且干性维持相关基因的表达也没有显著的改变,但是结合 P19 分化模型,参考 CARM1 在细胞分化过程的研究报道,笔者认为 CARM1 有可能在 P19 细胞命运改变过程中,发挥重要的动态调控功能。

#### 参考文献

- 1 Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function [J]. Molecular cell, 2005, 18(3): 263 - 272
- 2 Ahmad A, Cao X. Plant PRMTs broaden the scope of arginine methylation [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2012, 39(5): 195 - 208
- 3 Chen D. Regulation of transcription by a protein methyltransferase [J]. Science, 1999, 284(5423): 2174 - 2177
- 4 Frankel A. The novel human protein arginine N - methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(5): 3537 - 3543
- 5 McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age [J]. Cell, 2001, 106(1): 5 - 8
- 6 Pal S, Vishwanath SN, Erdjument - Bromage H, et al. Human SWI/ SNF - associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and nega-

- tively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes [J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24(21): 9630 - 9645
- 7 Wu Q. CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation [J]. Stem Cells, 2009, 27(11): 2637 - 2645
- 8 Root DE, Hacohen N, Hahn WC, et al. Genome - scale loss - of - function screening with a lentiviral RNAi library [J]. Nature Methods, 2006, 3(9): 715 - 719
- 9 Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, et al. Arginine N - methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable [J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(13): 4859 - 4869
- 10 Yadav N. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator - associated arginine methyltransferase 1 - deficient mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(11): 6464 - 6468
- 11 Kim J. Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP - regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(24): 25339 - 25344
- 12 Torres - Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, et al. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo [J]. Nature, 2007, 445(7124): 214 - 218
- 13 Moffat J. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high - content screen [J]. Cell, 2006, 124(6): 1283 - 1298
- 14 van der Heyden MA, Defize LH. Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation [J]. Cardiovascular Research, 2003, 58(2): 292 - 302

(收稿日期:2014 - 01 - 17)

(修回日期:2014 - 01 - 21)

## 银杏叶提取物对 1 型糖尿病心肌病大鼠心肌 Bcl - 2、Bax 和 caspase - 3 表达的影响

袁凤菊 卢 璐 刘根林 李 鹏 郑靖宇 杨开颜 李剑敏

**摘 要 目的** 探讨银杏叶提取物(extract of *Ginkgo biloba*, EGB)对 1 型糖尿病心肌病大鼠心肌 Bcl - 2、Bax 和 caspase - 3 表达的影响。**方法** 将 30 只 SD 雄性大鼠随机分成 3 组:正常对照组(Con 组,  $n = 10$ )、糖尿病模型组(DM 组,  $n = 10$ )和银杏叶提取物治疗组(EGB 组,  $n = 10$ )。用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)进行腹腔注射,建立 1 型糖尿病动物模型后用银杏叶提取物注射液腹腔注射建立 EGB 组,其余两组给予相同体积的生理盐水。于 12 周末用超声心动图仪测定左心室舒张末期容积

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170204);浙江省温州市科技局对外合作项目(H20090008)

作者单位:325003 温州医科大学附属第一医院病理科

通讯作者:杨开颜,电子信箱:1220235004@qq.com;李剑敏,电子信箱:wzyxyljmin@163.com

(LVIDV)、左心室收缩末期容积(LVISV)、左心室射血分数(LVEF)和每搏射血量(SV);测定左心室重量指数、血糖和血胰岛素水平;用TUNEL法测定心肌细胞的凋亡指数(AI);用RT-PCR和Western blot法分别检测其Bcl-2、Bax和caspase-3的表达。结果与Con组相比,DM组大鼠LVIDV( $P < 0.01$ )、SV( $P < 0.01$ )、胰岛素含量( $P < 0.01$ )和心肌组织Bcl-2( $P < 0.05$ )的表达都显著降低;而左心室重量指数和血糖浓度( $P < 0.01$ )、心肌组织中Bax( $P < 0.05$ )、caspase-3( $P < 0.05$ )的表达以及Bax/Bcl-2比例均明显升高。当EGB干预治疗后,与DM组相比,大鼠LVIDV( $P < 0.05$ )、SV( $P < 0.05$ )、胰岛素含量( $P < 0.05$ )和心肌组织Bcl-2( $P < 0.05$ )的表达均显著升高;而左心室重量指数( $P < 0.05$ )、血糖浓度( $P < 0.01$ )、心肌组织中Bax( $P < 0.05$ )、caspase-3( $P < 0.05$ )的表达以及Bax/Bcl-2比例( $P < 0.05$ )均明显降低。但是TUNEL染色显示各组大鼠的心肌细胞凋亡率(cardiomyocyte apoptosis index, CAI)没有明显的差异( $P > 0.05$ )。结论银杏叶提取物可以通过增加Bcl-2的表达,降低Bax、caspase-3表达及Bax/Bcl-2比例,减少心肌细胞的凋亡,从而提高了糖尿病心肌病的心肌功能。这也提示EGB通过调节心肌凋亡相关基因的表达,减少细胞的凋亡是其治疗糖尿病心肌病的重要机制之一。

**关键词** 银杏叶提取物 糖尿病心肌病 凋亡

[中图分类号] R587.1 [文献标识码] A

#### Effects of Extract of *Ginkgo Biloba* on Myocardial Bcl-2, Bax and Caspase-3 Expression in Type 1 Diabetic Cardiomyopathy Rats. Yuan

Fengju, Lu Lu, Liu Genlin, et al. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325003, China

**Abstract Objective** To study the effect of extract of *Ginkgo biloba* (EGB) on myocardial Bcl-2, Bax and caspase-3 expression in type 1 diabetic cardiomyopathy rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into three groups: normal control group (Con), diabetic group (DM) and EGB-treated group (EGB), with each group of ten only. Streptozotocin (STZ) was injected intraperitoneally to the animals in later two groups to induce type 1 diabetic rats model and the EGB-treated group rats were injected intraperitoneally with EGB, and the same volume of normal saline was injected to the other groups. At the end of the 12<sup>th</sup> week, we used echocardiography to determine the left ventricular end-diastolic volume (LVIDV), the left ventricular end-systolic volume (LVISV), the left ventricular ejection fraction (LVEF) and the stroke volume (SV). The left ventricle weight index, blood glucose and blood insulin were measured. Myocardial apoptosis was measured by two ways. The one was terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and the other was the expressions of Bcl-2, Bax and caspase-3 of Left ventricular tissue, which were measured by Western blot and RT-PCR respectively. **Results** Compared to Con group, LVIDV ( $P < 0.01$ ), SV ( $P < 0.01$ ), blood insulin ( $P < 0.05$ ) and the Bcl-2 ( $P < 0.05$ ) of ventricular tissue were decreased in diabetic group, while the left ventricle weight index ( $P < 0.01$ ), blood glucose ( $P < 0.01$ ), the Bax ( $P < 0.05$ ), caspase-3 ( $P < 0.05$ ) and Bax/Bcl-2 were increased. After the EGB intervention, compared to DM group, LVIDV ( $P < 0.05$ ), SV ( $P < 0.05$ ), blood insulin ( $P < 0.05$ ) and the Bcl-2 ( $P < 0.05$ ) of ventricular tissue were increased, while the left ventricle weight index ( $P < 0.05$ ), blood glucose ( $P < 0.01$ ), the Bax ( $P < 0.05$ ), caspase-3 ( $P < 0.05$ ) and Bax/Bcl-2 ( $P < 0.05$ ) were decreased, but cardiomyocyte apoptosis index (CAI) showed no significant difference between each group by TUNEL stain ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** EGB may play an important role in improvement cardiac function via increasing the expression of Bcl-2 and decreasing the expression of Bax, caspase-3 and the ratio of Bax/Bcl-2. It suggests that effective regulation of the expression of apoptosis associated genes in myocardial mitochondrial apoptotic pathway and attenuation cardiomyocyte apoptosis may be one of the mechanisms for EGB to treat diabetic cardiomyopathy.

**Key words** Extract of *Ginkgo biloba*; Diabetes mellitus; Apoptosis

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)的概念由Hambry等<sup>[1]</sup>于1974年首次提出,是由糖尿病所引起的心脏微血管病变以及心肌代谢紊乱所导致的心肌广泛局灶性坏死,而不能用其他心脏病变来解释的一种特异性心肌病。其在病理形态学上具有心肌细胞凋亡、肥大、心肌间质纤维化和炎症的特征,而且早期心功能主要表现为心肌收缩和舒张的障碍<sup>[2,3]</sup>,晚期以收缩功能不全为主,并且容易发生充血性心力衰竭等。目前糖尿病心肌病的发病机制尚未明确,有关DCM的发病机制研究中,氧化应激和糖

尿病心肌病的关系是目前研究的热点之一。众多的研究发现糖尿病心肌组织中线粒体氧自由基(reactive oxygen species, ROS)生成增多,抗氧化能力的减弱,将引起心肌细胞基因表达异常,信号转导改变,激活程序性的心肌细胞的死亡途径(凋亡)的发生<sup>[4,5]</sup>。笔者前期的实验中发现EGB能减轻糖尿病心肌组织ROS的累积所导致的损伤<sup>[6]</sup>,但其分子病理机制有待进一步的证实。银杏叶提取物(extract *Ginkgo biloba*, EGB)是在银杏叶研究的基础之上以银杏叶为原料,采用适当的溶剂所提取的传统中药,其主要成

分是黄酮类和萜类内酯化合物,黄酮类为抗氧化剂,具有清除细胞内的氧自由基和调节 NO 的作用<sup>[7]</sup>。本实验通过用链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导 1 型糖尿病模型,来研究 EGB 对糖尿病心肌病大鼠心肌凋亡途径的影响,旨在阐明 EGB 保护糖尿病心肌病的分子病理机制。

材料与amp;方法

1. 动物:30 只 SD(Sprague-Dawley)雄性大鼠,体质量 180~200g,2 个月鼠龄,清洁级(温州医科大学实验动物中心,实验动物许可证号:X1204139)。

2. 试剂和仪器:链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)和枸橼酸钠分析纯购于美国 Sigma 公司;银杏叶提取物(EGB)购于北京双鹤高科天然药物公司,批号为 100718;Johnson 稳步倍加血糖仪、胰岛素检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;Vivid 7 超声心动图仪,GE Health care;Tunel 试剂盒购于罗氏公司;Western blot 相关蛋白一抗、二抗均购于碧云天生物技术研究所;化学发光试剂盒购于 Biological Industries 公司;RT-PCR 引物合成并订购于上海生工生物工程有限公司;Trizol 购于 Invitrogen 公司;MUVB-20 凝胶成像分析系统,来自美国 Ultralum 公司。

3. 动物模型的建立、分组及处理<sup>[8]</sup>:将 30 只雄性 SD 大鼠,先随机分成正常对照组(Con 组, $n=10$ )和造模组( $n=20$ ),造模组大鼠按笔者前期报道<sup>[8]</sup>的方法在禁食 12h 后腹腔注射 STZ 建立 1 型糖尿病大鼠模型,STZ 注射 72h 后测血糖,13.8mmol/L 以上者为造模成功。造模成功的大鼠再随机分成两组,糖尿病组(DM 组, $n=10$ )和银杏叶提取物治疗组(EGB 组, $n=10$ ),EGB 组按 8mg/(kg·d)腹腔注射 EGB,而 DM 组和 Con 组则给予等体积的生理盐水腹腔注射。所有动物在清洁级条件下自由进食、饮水、饲养,每两周测血葡萄糖 1 次,在实验的第 12 周末用超声心动图仪测左心室功能。各组实验大鼠在禁食 24h 后称重,再行断尾采血法,用 Johnson 稳步倍加血糖仪测定大鼠血糖。断头处死后取全血 2~3ml,用于胰岛素的测定。在冰上迅速取出心脏组织,称取心脏和左心室的重量,再取左心室组织用于制作常规石蜡切片或迅速放于-80℃冰箱冻存备用,用于 Western blot 法及 RT-PCR 等实验。

4. 测定左心室功能:于实验的第 12 周末测定左心室功能相关指标,先将大鼠用水合氯醛麻醉,再用超声心动图仪测定左心室功能,分别测量左心室舒张末期容积(LVIDV)、左心室收缩末期容积(LVISV),计算左心室射血分数(LVEF,%)=(LVIDV-LVISV)/LVIDV×100%和每搏射血量(SV)=LVIDV-LVISV。

5. 测定血糖和胰岛素:测定过程参照笔者前期试验<sup>[8]</sup>:于实验的第 12 周末,采用断尾采血法后用 Johnson 稳步倍加血糖仪测定大鼠血糖。断头处死大鼠后,取 3ml 全血,用放免法测定血胰岛素水平。实验过程按照测定试剂盒的说明书。

6. 测量左心室重量指数以及用 TUNEL 法检测左心室心肌细胞凋亡:操作过程参照笔者前期试验<sup>[8]</sup>,测量大鼠体重然后处死大鼠,取出心脏,分离左心室,并测量心脏和左心室的重量,计算左心室重量指数(LVWI)=左心室的重量/体重。取出心室组织,用 10% 甲醛固定,从低浓度到高浓度乙醇脱水,石蜡包埋后,制作切片,厚度 5μm。每 5 张取 1 张,每个标本均取 6 张切片,脱蜡 2 次,再浓度梯度乙醇至水。TUNEL 染色过程严格按试剂盒说明书操作。

7. RT-PCR 法检测心肌细胞中 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的 mRNA 表达:取适量心肌组织(约 100mg),按照 Trizol 说明书提取心肌组织总 RNA。取 1μg 的量进行 RT-PCR 反应。PCR 反转录反应按照试剂盒进行,PCR 扩增条件为:94℃,5min;接着进行 35 个循环:变性 94℃,30s;退火 56℃,30s 和延伸 72℃,60s,最后 72℃,10min。产物进行电泳跑胶,1.5% 琼脂糖,100mA,30min。电泳后拍照,再用凝胶成像系统对扩增产物进行扫描,最后用 β-actin(内参)密度作为参考定量标准,数值以两者之积分吸光度的比值来表示。所用 RT-PCR 扩增引物见表 1。

表 1 PCR 产物长度大小及引物序列

| 基因        | 引物(5'→3')                        | 大小(bp) |
|-----------|----------------------------------|--------|
| Bcl-2     | Sense:CTGGTGGACAACATCGCTCTG      | 228    |
|           | Antisense:GGTCTGCTGACCTCACTTGTG  |        |
| Bax       | Sense:CGGAATTGGAGATGAACTGG       | 366    |
|           | Antisense:GTGAGCGAGCGGTGAGGAC    |        |
| caspase-3 | Sense:GAAGCGAATCAATGGACTCTG      | 595    |
|           | Antisense:GCACAAAGCGACTGGATGAA   |        |
| β-actin   | Sense:CATCTCTTGCTCGAAGTCCA       | 318    |
|           | Antisense:ATCATGTTTGAGACCTTCAACA |        |

8. Western blot 法检测心肌细胞中 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的蛋白表达:从-80℃冰箱取出心肌组织,快速研磨后进行裂解,按照 BCA 试剂盒方法测定蛋白质浓度后,进行定容定量,再经过 SDS-PAGE 电泳、转膜、洗膜、抗体孵育等方法,曝光后用凝胶成像系统扫描 X 线片,得到净光密度值,分析结果。所用抗体浓度为:一抗 Bcl-2 1:250、Bax 1:400、caspase-3 1:600,二抗 1:5000。

9. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间的比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠心功能结果:与 Con 组相比,DM 组大鼠的 LVIDV、SV 均显著减少( $P < 0.01$ )。与 DM 组大鼠相比,EGB 组大鼠 LVIDV、SV 均显著增高( $P < 0.05$ )。然而各组大鼠的 LVISV 和 LVEF 却未见显著差异( $P > 0.05$ ),详见表 2。

表2 大鼠超声心动图左心室功能测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别    | n | LVIDV (ml)        | LVISV (ml)     | LVEF(%)          | SV (ml)           |
|-------|---|-------------------|----------------|------------------|-------------------|
| Con 组 | 8 | 0.790 ± 0.0961    | 0.201 ± 0.0948 | 75.095 ± 10.0767 | 0.589 ± 0.0788    |
| DM 组  | 8 | 0.619 ± 0.0743 *  | 0.212 ± 0.0742 | 66.261 ± 9.4878  | 0.405 ± 0.0444 *  |
| EGB 组 | 8 | 0.725 ± 0.0922 *# | 0.216 ± 0.0537 | 70.108 ± 5.9551  | 0.504 ± 0.0737 *# |

与 Con 组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 DM 组比较, #  $P < 0.05$

2. 各组大鼠左心室重量指数、血糖及血胰岛素水平结果:与 Con 组相比,DM 组大鼠血胰岛素水平显著降低( $P < 0.01$ ),而左心室重量指数( $P < 0.01$ )、血糖( $P < 0.01$ )均显著增高;与 DM 组相比,EGB 组大鼠血胰岛素水平( $P < 0.05$ )显著增高,而左心室重量指数( $P < 0.05$ )和血糖( $P < 0.01$ )均显著降低,详见表3。

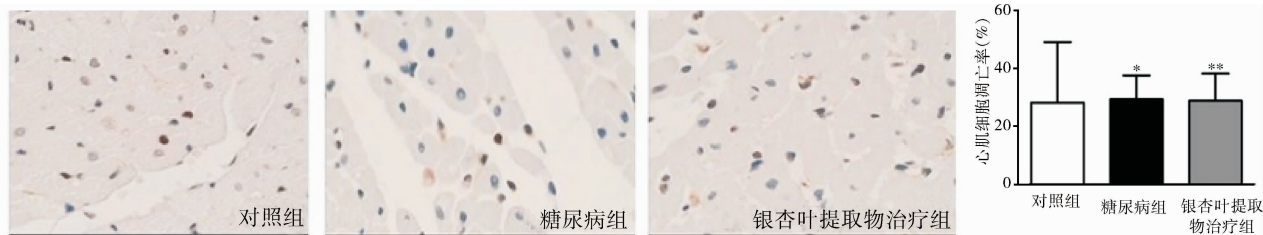
3. TUNEL 法检测左心室心肌细胞凋亡结果:经过 TUNEL 染色后,结果显示,凋亡细胞的细胞核固缩,细胞核呈棕黄色。每张切片任意选取心肌区域5个视野,均为非重叠的400倍高倍镜视野,计数心肌细胞凋亡数和心肌细胞总数,心肌细胞凋亡率(car-

diomyocyte apoptosis index, CAI) (%) = 心肌细胞凋亡数/心肌细胞总数 × 100%,计数并且计算后,比较每组实验大鼠的左心室心肌细胞凋亡率,发现没有明显的差异,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图1。

表3 左心室重量指数、血糖及血胰岛素水平结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别    | n | 左心室重量指数<br>(mg/g)    | 血糖<br>(mmol/L) | 血胰岛素<br>(mIU/L)       |
|-------|---|----------------------|----------------|-----------------------|
| Con 组 | 8 | 1.55 ± 0.17          | 5.46 ± 0.98    | 21.45 ± 2.70          |
| DM 组  | 8 | 2.20 ± 0.33 *        | 26.45 ± 3.17 * | 13.98 ± 2.33 *        |
| EGB 组 | 8 | 1.88 ± 0.30 $\Delta$ | 17.89 ± 2.93 # | 16.93 ± 1.27 $\Delta$ |

与 Con 组相比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 DM 组比较, #  $P < 0.01$ ,  $\Delta P < 0.05$

图1 TUNEL 法检测分析左心室心肌细胞凋亡结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

与对照组比较, \*  $P > 0.05$ ; 与糖尿病组比较, \*\*  $P > 0.05$

4. 各组大鼠左心室心肌组织 RT-PCR 的结果:与对照组相比,DM 组大鼠左心室心肌组织 Bcl-2 的表达明显降低( $P < 0.01$ ),而 Bax ( $P < 0.01$ )、caspase-3 ( $P < 0.01$ )的表达以及 Bax/Bcl-2 比例( $P < 0.01$ )明显升高( $P < 0.01$ );与 DM 组相比,EGB 组大鼠左心室心肌组织 Bcl-2 的表达明显升高( $P < 0.01$ ),而 Bax ( $P < 0.01$ )、caspase-3 ( $P < 0.05$ )的表达以及 Bax/Bcl-2 比例( $P < 0.01$ )明显降低,详见图2。

5. 各组大鼠左心室心肌组织 Western blot 法的结果:与对照组相比,DM 组大鼠左心室心肌组织中的 Bcl-2 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),而 Bax、caspase-3 蛋白的表达以及 Bax/Bcl-2 比例明显升高( $P < 0.05$ )。与 DM 组相比,EGB 组大鼠左心室心肌组织中的 Bcl-2 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ),而 Bax、caspase-3 蛋白的表达以及 Bax/Bcl-2 比例明显降低( $P < 0.05$ ),详见图3。

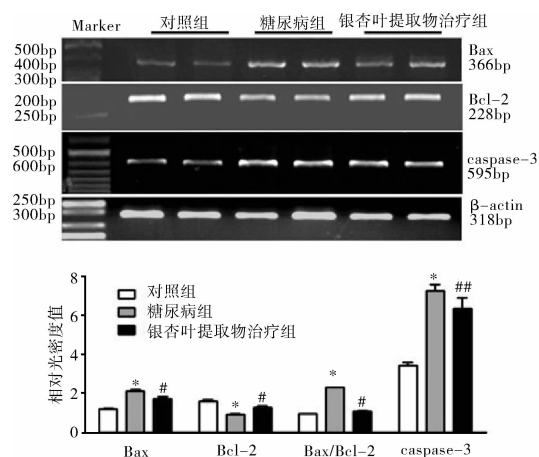


图2 各组大鼠左心室心肌组织 RT-PCR

分析结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

与对照组相比较, \*  $P < 0.01$ ; 与糖尿病组比较, #  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.05$

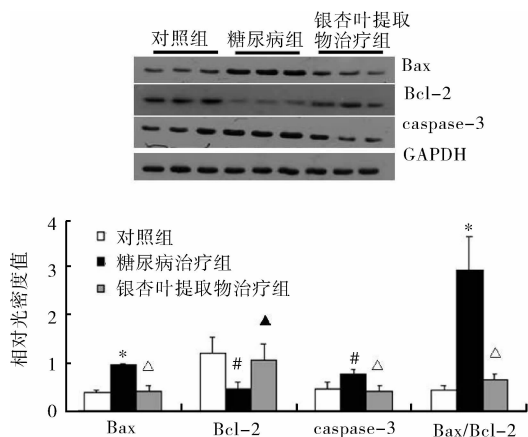


图 3 各组大鼠左心室心肌组织 Western blot 法

结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

与对照组相比较, \*  $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$ ; 与糖尿病组比较, Δ  $P < 0.01$ , ▲  $P < 0.05$

## 讨 论

细胞的凋亡途径主要涉及内源性途径和外源性途径两种。其中内源性途径是源于线粒体起始,外源性途径则是源于死亡受体起始。线粒体起始的内源性途径与氧化应激关系密切。众多的研究结果表明,糖尿病高血糖导致机体氧化应激增多是促使糖尿病心肌细胞凋亡的主要原因之一<sup>[9]</sup>。而线粒体是心肌能量代谢的关键细胞器,占心肌细胞体积的 45%。因此,线粒体起始的内源性凋亡途径在糖尿病心肌病的发病机制研究中备受关注。

本实验通过用 STZ 诱导大鼠 1 型糖尿病心肌病模型,于 12 周末发现糖尿病大鼠血糖、左心室重量指数明显升高,而血胰岛素水平、LVIDV、SV 都明显降低。提示了 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠在 12 周已经出现了心肌细胞的肥大及左心室收缩舒张的功能障碍。这与糖尿病心肌病在早期,心功能主要表现为心肌收缩和舒张的障碍相吻合<sup>[10,11]</sup>。有研究表明,左心室的收缩舒张功能障碍与心肌细胞的凋亡有关。在实验中笔者检测到的凋亡相关基因及其蛋白的高表达也证实了心肌细胞凋亡在糖尿病心肌病中的存在,但是在笔者的 TUNEL 实验中,虽然发现糖尿病大鼠的心肌细胞存在凋亡,与正常组和银杏叶治疗组比较有增多的趋势,但统计各组间比较并没有明显的区别。此结果与之前的研究的结果不符,其原因有待进一步探索<sup>[12,13]</sup>。

糖尿病导致心肌细胞凋亡的机制比较复杂,主要涉及许多的基因调控,其中 Bcl-2 家族和 caspase 家族相关基因是参与其中比较重要的基因。目前比较

确定的 Bcl-2 家族,主要是通过线粒体的信号转导通路来调控细胞凋亡的。Bcl-2 家族有多种成员,对于细胞凋亡的功能各不相同,有的参与促进细胞凋亡,而有的则参与抗细胞凋亡的作用,抗凋亡主要的有 Bcl-2 和 Bcl-XL 基因而促凋亡重要的是 Bax 基因。二者的定位不同,Bcl-2 基因表达的蛋白主要位于线粒体外膜上,而 Bax 基因表达的蛋白则主要分布在胞质中。当接收到相应刺激后开始诱导凋亡,Bax 会从胞质中转移到线粒体和核膜上,同时形成 Bax/Bcl-2 的同源二聚体,抗凋亡基因 Bcl-2 可以让 Bax 蛋白失活。但是如果 Bax 表达过多时则会发挥其促凋亡的作用,使得凋亡得以发生,而当 Bcl-2 表达增加时则可减少或抑制细胞凋亡的发生。由此可知,Bax/Bcl-2 的比例增高还是降低,是决定细胞线粒体凋亡的信号转导的重要因素<sup>[14]</sup>。

caspase 是公认的凋亡转导过程中必不可少的基因,在 caspase 级联反应中,caspase-3 则被认为是细胞凋亡过程中的终末剪切酶,是细胞凋亡的有力执行者,当 caspase-3 被激活后,细胞凋亡则不可避免的发生<sup>[15]</sup>。本研究用 Western blot 法和 RT-PCR 对线粒体凋亡相关的基因及其蛋白进行检测,发现糖尿病大鼠左心室心肌组织 Bcl-2 的表达减少,而 Bax 和 caspases-3 的表达增加。这些基因及其蛋白表达的改变,间接证实了心肌细胞凋亡在糖尿病心肌病中的存在。其结果也与相关的研究<sup>[16-18]</sup>相符。但之所以各实验组动物心肌细胞的 TUNEL 检测没有差异,笔者考虑到糖尿病是一种慢性代谢性疾病,凋亡的发生主要靠有效的刺激持续存在并且达到一定的“阈值”,直到激活凋亡相关的 caspase 的级联反应,细胞凋亡一旦发生,周围的组织和细胞将迅速地吞噬凋亡小体并且将其降解,使之消失,这种过程要远远地比凋亡后的降解“慢”。由此笔者认为,在类似糖尿病心肌病中的心肌细胞“慢性”凋亡过程中,可以通过类似 Western blot 法和 RT-PCR 等相关技术,来检测和组织凋亡相关的基因及其蛋白的表达,以此推测凋亡的发生。但是,用 TUNEL 法等虽然可以观测到细胞的凋亡,但是很难检测到有很多凋亡细胞的存在。这也恰好能解释我们实验 TUNEL 法的测定结果。

银杏叶提取物(EGB)的有效成分是黄酮类和萜类内酯化合物,其中黄酮类是有效清除自由基的主要成分。EGB 干预治疗后则使糖尿病大鼠血糖、左心室重量指数明显降低,血胰岛素水平、LVIDV、SV 明显升高,提示 EGB 在降低血糖,提高血胰岛素水平

的同时可改善糖尿病大鼠的左心室的收缩舒张功能。再进一步检测心肌细胞凋亡相关基因及其蛋白,发现 Bax 和 caspase - 3 的表达比糖尿病组大鼠的明显减少,而 Bcl - 2 的表达增加,提示 EGB 对糖尿病心肌病的改善作用的可能途径是通过改变糖尿病大鼠心肌细胞的上述凋亡相关基因的表达、降低心肌细胞的凋亡来发生的。

总之,糖尿病心肌病的发生与心肌细胞的凋亡关系密切。其中凋亡的发生可通过糖尿病高血糖导致 ROS 累积增多,致使心肌细胞线粒体 Bax/Bcl - 2 的比例升高达到一定的“阈值”后激发 caspase 级联反应而实现的。EGB 改善糖尿病心肌病的功能,可通过线粒体 Bax/Bcl - 2/caspase - 3 途径减少心肌细胞的凋亡而发挥作用,提示通过有效调节心肌凋亡相关的基因是 EGB 治疗糖尿病心肌病的重要机制之一。

#### 参考文献

- Hamby RT, Zoneraich S, Shennan L, *et al.* Diabetic cardiomyopathy [J]. JAMA, 1974, 229(13): 1749 - 1754
- Fischer M, Baessler A, Hense HW, *et al.* Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic - based survey of a population sample [J]. Eur Heart J, 2003, 24(4): 320 - 328
- 郑国营, 吴铿. 糖尿病心肌病舒张功能不全的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(9): 1647 - 1649
- 杨跃进, 王红, 宋光远. 糖尿病心肌病 [J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(10): 794 - 796
- Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission [J]. Biochim Biophys Acta. 2012, 1817(10): 1833 - 1838
- 李旭升, 陈国荣, 李剑敏, 等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠心肌损伤的防护作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21(2): 176 - 178
- 李海龙, 李红. 银杏叶提取物的神经保护机制的研究进展 [J]. 中医药导报, 2007, 13(7): 111 - 112
- 刘根林, 袁凤菊, 陆慈深, 等. 银杏叶提取物对 I 型糖尿病心肌病大鼠心肌 TGF -  $\beta$ 1 和 collagen 表达及间质纤维化的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(11): 2017 - 2023
- Bhattacharya S, Manna P. D - saccharic acid 1,4 - lactone protects diabetic rat kidney by ameliorating hyperglycemia - mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via NF -  $\kappa$ B and PKC signaling [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 267(1): 16 - 29
- Fischer M, Baessler A, Hense HW, *et al.* Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic - based survey of a population sample [J]. Eur Heart J, 2003, 24(4): 320 - 328
- 高嵩, 危春英. 糖尿病心肌病发病机制及对心功能影响的研究进展 [J]. 江西医药, 2012, 47(5): 434 - 437
- 黄鑫, 李宾公, 郑泽琪, 等. 神经调节蛋白 - 1 对糖尿病心肌病大鼠心肌重构的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(11): 1532 - 1536
- Björklund T, Palojoki E, Saraste A, *et al.* Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodelling after myocardial infarction in experimental diabetes. [J]. Diabetologia, 2004, 47(2): 325 - 330
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life - or - death switch [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647 - 656
- 徐利芬, 陈佳. 糖尿病心肌病与心肌细胞凋亡的研究进展 [J]. 中华老年医学杂志, 2010, 29(1): 82 - 84
- 曹颖. 老年 2 型糖尿病并发急性心肌梗死的临床特点 [J]. 武警医学, 2012, 4: 312
- Ghosh S, Qi D, An D, *et al.* Brief episode of STZ - induced hyperglycemia produces cardiac abnormalities in rats fed a diet rich in n - 6 PUFA [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(21): 2518 - 2527
- 刘欣, 赵秀兰. 糖尿病大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达研究 [J]. 中国心血管杂志, 2005, 10(1): 4 - 7

(收稿日期: 2014 - 04 - 19)

(修回日期: 2014 - 04 - 28)

## CT 导航结合内镜行颅颌面部金属弹丸取出术 37 例临床分析

邢乐君 张海钟 陈 鹏 席 庆 朱 凯 段 瑶 贾婷婷 郭小龙 穆 然

**摘 要 目的** 探讨 CT 导航结合电子内镜取出颌面部及颅底金属弹丸的手术方法及临床疗效。**方法** 近 4 年笔者所在科室收治的颌面部火器伤患者共 37 例, 在 CT 导航结合电子内镜下行颅底及颌面部金属弹丸取出术, 对其临床资料进行分析并总

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271004)

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院口腔颌面外科

通讯作者: 张海钟, 电子信箱: zhanghz301@aliyun.com.cn