

### 【基础研究】

通信作者:王 峰(1977-),男,河南新乡人,博士,副教授,研究方向:神经疾病机制研究;E-mail:wfeng100@126.com

糖尿病是最为常见的严重代谢紊乱性疾病<sup>[1]</sup>,其周围神经系统和中枢神经系统并发症会引起机体一系列结构和功能损害<sup>[2-3]</sup>。糖尿病肾病是糖尿病最为常见的血管并发症之一,细胞凋亡参与了糖尿病肾病的发生<sup>[4]</sup>。近年发现,银杏叶提取物(extract of ginkgo biloba, EGb)有抑制肾小管上皮细胞凋亡的作用<sup>[5]</sup>。EGb 的主要活性成分为黄酮苷和银杏内酯。黄酮苷已被证实具有清除自由基、抗脂质过氧化等作用<sup>[6]</sup>。本实验通过建立糖尿病大鼠模型,利用免疫组织化学方法和 Western blot 法检测糖尿病大鼠肾皮质中 Bcl-2 和 Bax 表达,进而探讨 EGb 对糖尿病大鼠的治疗作用。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂和仪器** 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司),鱼精蛋白锌胰岛素(徐州万邦生化制药有限公司),EGb(桂林思特新有限公司),SP-9000 Histostain<sup>TM</sup>-Plus Kits(北京中杉金桥生物技术有限公司),兔抗鼠 Bcl-2 和 Bax 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),放射免疫沉淀(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、双辛丁酸法(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)。HM340E 石蜡切片机(Microm International GmbH, 德国);OLYPMILUS 显微镜(日本)。

**1.2 动物分组及处理** 8 周龄雄性 Wistar 大鼠 50 只(由新乡医学院实验动物中心提供),体质量( $200.0 \pm 20.0$ )g。随机选取 40 只大鼠,禁食 24 h,按  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射 STZ(pH 为 4.4 的柠檬酸缓冲液配制),第 4 天尾部采血,以 One Touch II 测每只大鼠的空腹血糖。血糖  $> 15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  为造模成功。将糖尿病大鼠随机分为糖尿病模型组、胰岛素治疗组( $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  胰岛素皮下注射)、EGb 低剂量治疗组( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  EGb 灌胃给药)、EGb 高剂量治疗组( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  EGb 灌胃给药),每组 10 只。其余 10 只大鼠灌胃蒸馏水作为正常对照组。胰岛素和 EGb 每天给药 1 次。3 个月后处死大鼠,取肾皮质放入  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛固定,进行免疫组织化学染色。

**1.3 免疫组织化学抗生物素-生物素-过氧化物酶复合法(avidin-biotin-pxoxidase complex method, ABC)检测肾皮质 Bcl-2 和 Bax 表达** 石蜡切片

常规脱蜡,微波处理进行抗原修复,去离子水孵育 15 min 消除内源性氧化物酶活性,以正常山羊血清封闭非特异性反应位点;一抗用兔抗鼠 Bcl-2 和 Bax 蛋白(工作浓度为  $1:2\,000$ ),置  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜;滴加生物素标记的二抗(山羊抗兔 IgG), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;空白对照用磷酸盐缓冲液代替一抗,二氨基联苯胺显色,苏木精复染。常规脱水、透明、封片,光镜下观察并拍照。Bcl-2 和 Bax 阳性均表现为定位于细胞膜和细胞质内棕黄色或棕褐色细小颗粒。每张免疫组织化学染色切片随机选取 5 个 400 倍视野,每个视野使用免疫组织化学 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测其积分光密度,并取其平均值,以积分光密度值反映 Bcl-2、Bax 阳性细胞数。

### 1.4 Western blot 检测肾皮质 Bcl-2 和 Bax 表达

常规方法提取肾皮质组织总蛋白,行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,质量分数 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  封闭过夜,分别加入兔抗大鼠 Bcl-2 和 Bax 一抗。将玻璃皿放在摇床上,室温下轻摇孵育 1 h。加入二抗室温轻摇 45 min,然后将膜在 TBS-Tween 中漂洗 3 次,每次室温轻摇 5 min。用 ECL 试剂盒曝光,显影,定影后观察结果。Gelpro32 软件分析各组目的蛋白和内参平均光密度比值。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠肾皮质免疫组织化学染色** 结果见图 1 和图 2。Bax 染色结果显示,正常对照组大鼠肾皮质可见散在淡黄色颗粒阳性细胞;糖尿病模型组大鼠的肾皮质 Bax 黄色颗粒细胞数目明显增多;与糖尿病模型组比较,胰岛素治疗组大鼠肾皮质 Bax 黄色颗粒细胞数目减少很明显,EGb 低剂量治疗组大鼠肾皮质 Bax 阳性细胞数减少不明显,EGb 高剂量治疗组大鼠肾皮质 Bax 淡黄色颗粒细胞数目明显减少。Bcl-2 染色结果显示,正常对照组大鼠肾皮质可见散在棕色颗粒阳性细胞;糖尿病模型组大鼠肾皮质 Bcl-2 黄色颗粒细胞数目明显减少;EGb 低、高剂量治疗组大鼠肾皮质 Bcl-2 黄色颗粒细胞数目明显增多。

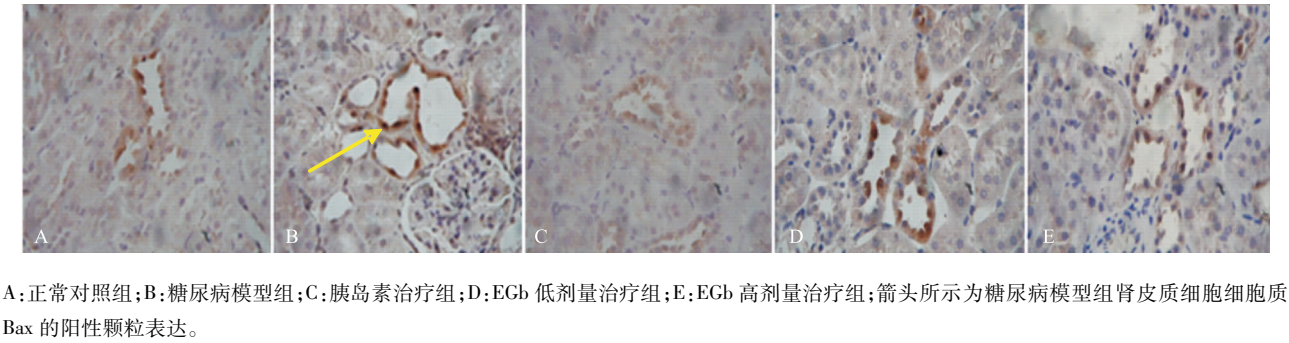


图 1 各组大鼠肾皮质细胞细胞质中 Bax 的表达 (ABC, ×400)

Fig. 1 Expression of Bax in renal cortex cells of rats in each group(ABC, ×400)

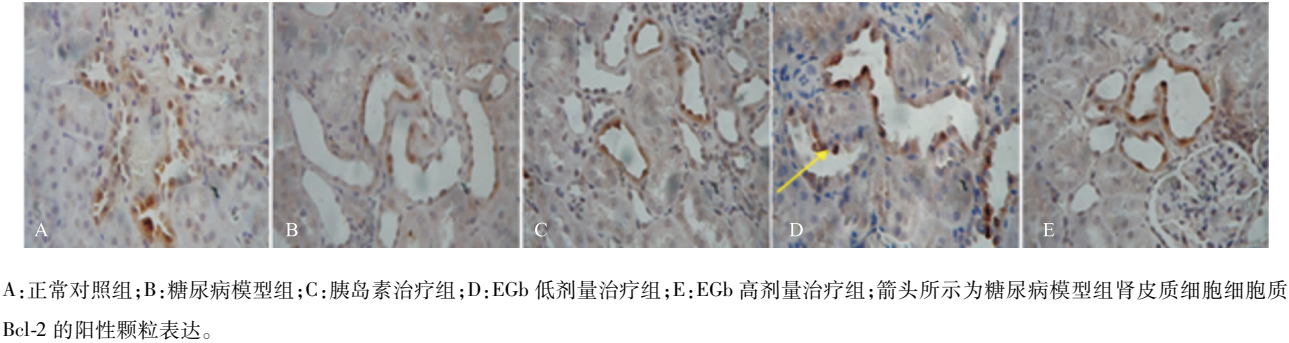


图 2 各组大鼠肾皮质细胞细胞质中 Bcl-2 的表达 (ABC, ×400)

Fig. 2 Expression of Bcl-2 in renal cortex cells of rats in each group(ABC, ×400)

**2.2 各组大鼠肾皮质 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数的比较** 结果见表 1。与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠肾皮质 Bcl-2 阳性细胞计数减少 ( $P < 0.01$ )、Bax 阳性细胞数增加 ( $P < 0.01$ );而与糖尿病模型组比较,胰岛素治疗组、EGb 低剂量和高剂量治疗组大鼠肾皮质 Bcl-2 阳性细胞数增加 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ),EGb 低剂量治疗组大鼠肾皮质 Bax 阳性细胞数减少不明显 ( $P > 0.05$ ),胰岛素治疗组、EGb 高剂量治疗组大鼠肾皮质 Bax 阳性细胞数减少 ( $P < 0.05$ )。

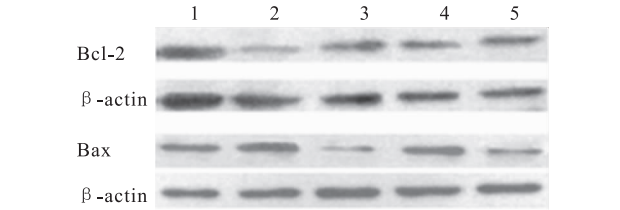
表 1 各组大鼠肾皮质 Bcl-2 和 Bax 阳性细胞数的比较  
Tab.1 Comparison of the number of Bcl-2 and Bax positive cell in renal cortex of rats among the groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	Bcl-2	Bax
正常对照组	10	17.50 ± 1.97	15.00 ± 4.40
糖尿病模型组	10	9.60 ± 3.21 <sup>a</sup>	18.50 ± 4.39 <sup>a</sup>
胰岛素治疗组	10	18.30 ± 2.45 <sup>b</sup>	7.75 ± 3.86 <sup>b</sup>
EGb 低剂量治疗组	10	12.40 ± 2.05 <sup>c</sup>	19.00 ± 2.58
EGb 高剂量治疗组	10	15.30 ± 2.15 <sup>b</sup>	15.00 ± 5.15 <sup>c</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与糖尿病模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

**2.3 Western blot 检测肾皮质 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达** 结果见图 3 和表 2。胰岛素治疗组、EGb 低剂量治疗组和 EGb 高剂量治疗组 Bcl-2 蛋白表达高于糖尿病模型组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。EGb 低剂量

治疗组与糖尿病模型组 Bax 蛋白表达比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而胰岛素治疗组、EGb 高剂量治疗组 Bax 蛋白表达显著低于糖尿病模型组 ( $P < 0.05$ )。



1: 正常对照组;2:糖尿病模型组;3:胰岛素治疗组;4:EGb 低剂量治疗组;5:EGb 高剂量治疗组。

图 3 各组大鼠肾皮质 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达  
Fig. 3 Expression of Bcl-2 and Bax protein in renal cortex of rats in each group

表 2 各组大鼠肾皮质 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的比较  
Tab.2 Comparison of Bcl-2 and Bax protein expression in renal cortex of rats among the groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	Bcl-2	Bax
正常对照组	10	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
糖尿病模型组	10	49.10 ± 10.32 <sup>a</sup>	113.70 ± 13.16 <sup>a</sup>
胰岛素治疗组	10	86.70 ± 15.31 <sup>b</sup>	64.60 ± 13.27 <sup>b</sup>
EGb 低剂量治疗组	10	69.90 ± 19.09 <sup>c</sup>	100.70 ± 16.07
EGb 高剂量治疗组	10	79.90 ± 8.71 <sup>b</sup>	82.80 ± 4.71 <sup>c</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与糖尿病模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

糖尿病肾病的早期改变为肾皮质肥大、肾小球及肾小管基底膜增厚,逐渐导致肾小球硬化,最终发生肾衰竭。Ortiz 等<sup>[7]</sup>发现大鼠肾小管上皮细胞在高血糖状态下,抗凋亡基因 Bcl-2 表达降低,而促凋亡基因 Bax 表达增加,从而使细胞凋亡的数目增加。

EGb 是从银杏叶中提取的活性物质,主要活性化学成分为黄酮类及萜类。药理学研究表明,EGb 中黄酮类成分具有清除自由基、抗氧化、降血脂、改善血流动力学等药理作用,银杏内酯类成分具有抑制血小板活化因子及炎症分泌物的作用<sup>[8-9]</sup>。还有研究发现,EGb 能够降低血糖水平,改善胰岛素抵抗,有效防治糖尿病并发症<sup>[10]</sup>。

Bcl-2 基因家族是一类新的癌基因家族,通过广泛抑制各种刺激诱导的细胞凋亡,延长细胞活力而发挥作用<sup>[11-12]</sup>。该家族包含抗凋亡 Bcl-2、Bcl-XL 和促凋亡 Bax 的成员。其中 Bax 和 Bcl-2 分别可以以同源二聚体形式存在,它们之间也可以形成异源二聚体,并使之失活。Bcl-2 与 Bax 表达水平的平衡是决定细胞存活的重要因素,Bax 同源二聚体形成可诱导凋亡;随着 Bcl-2 蛋白表达量上升,越来越多的 Bax 二聚体分开,与 Bcl-2 形成比 Bax-Bax 更稳定的 Bax-Bcl-2 异源二聚体,从而中和了 Bax-Bax 诱导凋亡的作用,即细胞内 Bax 与 Bcl-2 比例的失调导致了细胞凋亡的发生<sup>[13-14]</sup>。

本研究免疫组织化学染色结果显示,糖尿病模型组大鼠肾皮质 Bcl-2 阳性细胞计数明显下降、Bax 阳性细胞数明显增加;而 EGb (50、100 mg · kg<sup>-1</sup>) 治疗组大鼠肾皮质 Bcl-2 表达明显上升,EGb 低剂量治疗组大鼠肾皮质 Bax 表达下降不明显,EGb 高剂量治疗组大鼠肾皮质 Bax 表达明显下降。Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达也获得了相同的结果。以上结果说明 EGb 能通过升高糖尿病大鼠肾皮质 Bcl-2 的表达和抑制其 Bax 的表达来起到治疗糖尿病损伤的作用。

目前,国内在 EGb 对糖尿病治疗方面的研究相对较少,本研究通过探究 EGb 对糖尿病大鼠肾皮质 Bcl-2 和 Bax 表达的影响,以便为临床治疗提供更加可靠的依据。

### 参考文献:

- [1] Albert K G, Zimmet P Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation [J]. *Diabet Med*, 1998, 15 (7): 539-553.
- [2] McCall A L. The impact of diabetes on the CNS [J]. *Diabetes*, 1992, 41 (5): 557-570.
- [3] Biessels G J, Kapessa A C, Bravenboer B, et al. Cerebral function in diabetes mellitus [J]. *Diabetologia*, 1994, 37 (7): 643-650.
- [4] Soldatos G, Cooper M E. Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82 (Suppl 1): S75-S79.
- [5] Wang Y, Pei D S, Ji H X, et al. Protective effect of a standardized Ginkgo extract (gintonin) on renal ischemia/reperfusion injury via suppressing the activation of JNK signal pathway [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15 (11): 923-931.
- [6] Seif E N, El-fattah A A. Lipid peroxide, phospholipids glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia, effect of ginkgo biloba extract [J]. *Pharmacol Res*, 1995, 32 (5): 273-278.
- [7] Ortiz A, Ziyadeh F N, Neilson G E. Expression of apoptosis regulatory genes in renal proximal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys [J]. *J Invest Med*, 1997, 45: 50-56.
- [8] Eckert A. Mitochondrial effects of Ginkgo biloba extract [J]. *Int Psychogeriatr*, 2012, 24 (1): s18-s20.
- [9] Lim S, Yoon J W, Kang S M, et al. EGb761, a Ginkgo biloba extract, is effective against atherosclerosis *in vitro*, and in a rat model of type 2 diabetes [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (6): e20301.
- [10] Lu Q, Yin X X, Wang J Y, et al. Effects of Ginkgo biloba on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28 (6): 818-828.
- [11] 吴俭, 金国强, 杨利丽, 等. 复方丹参注射液对感染性休克大鼠脑损伤时一氧化氮、B-细胞淋巴瘤-2 蛋白及 S100 的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29 (10): 758-760.
- [12] 陶红芳, 方建林, 刘元生, 等. 紫杉醇下调死亡结构域沉默子表达促进白血病细胞凋亡新机制研究 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29 (11): 862-865.
- [13] 王颢, 夏娜梅, 李明芳, 等. 白花蛇舌草对人 B 淋巴细胞瘤 Ramos 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *新乡医学院学报*, 2015, 32 (4): 295-298.
- [14] 周俊, 何湘珍, 肖启国. 金樱子通过增加 Bcl-2/Bax 表达比抑制大鼠糖尿病性白内障晶状体上皮细胞的凋亡 [J]. *眼科新进展*, 2014, 34 (4): 314-318.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)