

[文章编号] 1000-4718(2019)06-1010-06

黄芪注射液联合葛根素注射液对 2 型糖尿病小鼠心肌的保护作用及其机制*

王庆霞¹, 陈会刚², 孙晶¹, 石玉珍³, 王殿文^{3△}

(¹山东大学第二医院药学部药品调剂科, 山东 济南 250000; ²诸城市妇幼保健院病理产科, 山东 诸城 262200; ³山东大学第二医院临床实验室, 山东 济南 250000)

[摘要] 目的: 探讨黄芪注射液联合葛根素注射液对 2 型糖尿病小鼠心脏的保护作用及其机制。方法: 将造模成功的 2 型糖尿病 KKAy 小鼠随机分为模型组和治疗组(黄芪注射液联合葛根素注射液腹腔注射), 同周龄雄性 KKAy 小鼠作为正常对照组, 并于 21、24 和 28 周龄时分别处死小鼠。HE 染色观察心肌组织形态变化; TUNEL 染色法检测心肌细胞凋亡; real-time PCR 检测小鼠心脏组织中葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 和 p53 上调凋亡调控因子 (PUMA) mRNA 的表达; Western blot 检测小鼠心脏组织中 GRP78、CHOP、PU-MA、caspase-3、cleaved caspase-3、caspase-9、cleaved caspase-9、多腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 和 cleaved PARP 蛋白的表达。结果: 模型组小鼠心肌细胞发生肥大, 可见到部分细胞出现肌浆溶解和坏死, 治疗组小鼠病变减轻; 与对照组比较, 模型组小鼠心肌细胞凋亡数显著增加 ($P < 0.01$), 治疗组小鼠心肌细胞凋亡数较模型组显著降低 ($P < 0.05$); 模型组小鼠 21、24 和 28 周龄心肌组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA mRNA 和蛋白水平, 以及 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 cleaved PARP 蛋白表达水平与正常对照组比较显著增加 ($P < 0.01$); 治疗组小鼠心肌组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA mRNA 和蛋白水平以及 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 cleaved PARP 蛋白表达水平均显著低于模型组 ($P < 0.01$)。结论: 黄芪注射液联合葛根素注射液对 2 型糖尿病小鼠心肌具有保护作用, 其机制可能与抑制内质网应激和 caspase 通路的活化, 从而抑制细胞凋亡有关。

[关键词] 黄芪注射液; 葛根素注射液; 糖尿病心肌病; 内质网应激; 细胞凋亡

[中图分类号] R363.2; R587.2 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.008

Protective effect of Huangqi injection combined with puerarin injection on myocardium of type 2 diabetes mice

WANG Qing-xia¹, CHEN Hui-gang², SUN Jing¹, SHI Yu-zhen³, WANG Dian-wen³

(¹Department of Pharmaceutical Dispensing, Second Hospital of Shandong University, Jinan 250000, China; ²Department of Pathology and Obstetrics, Zhucheng Maternal and Child Health Care Hospital, Zhucheng 262200, China; ³Clinical Laboratory, Second Hospital of Shandong University, Jinan 250000, China. E-mail: 775641644@qq.com)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the effect of Huangqi injection combined with puerarin injection on the myocardium of the mice with type 2 diabetes. METHODS: Diabetic KKAy mice were randomly divided into model group and treatment group (Huangqi injection combined with puerarin injection). The male KKAy mice of the same age were used as control group. All mice were sacrificed at 21, 24 and 28 weeks. Morphological changes of the myocardium were observed by HE staining. Apoptosis of the cardiomyocytes was measured by TUNEL staining. The mRNA levels of glucose-regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP) and p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) were detected by real-time PCR, and the protein levels of GRP78, CHOP, PUMA, caspase-3, cleaved caspase-3, caspase-9, cleaved caspase-9, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and cleaved PARP were determined by Western blot. RESULTS: Cardiomyocyte hypertrophy, partly dissolved sarcoplasm and necrosis were observed in model group, and these lesion were alleviated in treatment group. Obvious increased apoptosis in model group and significantly decreased apoptosis of cardiomyocytes in treatment group was observed ($P < 0.05$). At 21, 24 and 28 weeks, the mRNA and protein levels of GRP78, CHOP and PUMA and the protein levels of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and cleaved PARP in model

[收稿日期] 2018-09-11 [修回日期] 2018-12-26

* [基金项目] 山东省卫生科技发展支持计划项目 (No. 201501145)

△通讯作者 Tel: 0531-85875490; E-mail: 775641644@qq.com

group were increased significantly as compared with control group ($P < 0.01$), and these in treated group were decreased compared with model group. **CONCLUSION:** Huangqi injection combined with puerarin injection has cardioprotective effects on type 2 diabetes mice and its mechanism of the action was implemented via inhibiting the activation of endoplasmic reticulum stress and caspase pathway, thus resulting in suppressed apoptosis.

[**KEY WORDS**] Huangqi injection; Puerarin injection; Diabetic cardiomyopathy; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis

糖尿病心脏病,包括冠状动脉粥样硬化、心肌病、微血管病变和植物神经功能紊乱所致的心率失常,是糖尿病患者致死的主要因素^[1]。研究表明,糖尿病伴随心肌病与2型糖尿病患者发生心力衰竭密切相关,是2型糖尿病患者死亡率升高的原因之一^[2]。目前,糖尿病尤其是2型糖尿病发病率逐渐增高,且疗效仍不理想,因此需深入认识糖尿病发病机制,寻找新型2型糖尿病的治疗药物。我国传统医学对糖尿病引起的心脏病变也有一定认识:《诸病源候论》中即有“消渴重,心中疼”的记载;《医砭》中亦有“心火太盛津液耗涸,在上…甚则消及肺脏,在中…甚则消及脾脏,在下…甚则消及肾藏,在外…甚则消及筋骨,四藏皆消,则心自焚而死矣……”的论述。现代中医根据糖尿病心肌病的临床表现将其归属于“消渴”、“胸痹”、“心痛”、“惊悸”和“怔忡”等范畴,其中,“消渴”为本,其病机多为气阴两虚,目前已有许多中药组方成功开发并应用于临床消渴病的治疗,取得良好效果^[3],黄芪和葛根作为益气养阴的常见药对,用于消渴病的治疗亦能取得一定疗效。研究表明黄芪注射液联合葛根素注射液对2型糖尿病动物 KKAY 小鼠肾脏过强的内质网应激反应有良好的抑制作用^[4],但其机制尚不清楚。研究发现2型糖尿病小鼠心肌组织中存在高活性内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[5-7],提示2型糖尿病伴随的病理学改变如心肌肥厚和纤维化与ERS的激活密切相关。研究表明,ERS通过调控内质网钙平衡以及葡萄糖代谢参与糖尿病心肌病的发生和发展^[8],但ERS信号通路激活与糖尿病心肌病发生的因果关系及意义仍不清楚。本项工作联合黄芪注射液和葛根素注射液治疗2型糖尿病小鼠,探讨其对2型糖尿病小鼠心脏病发生发展过程中内质网应激通路和caspase通路的激活情况,进一步分析其与内质网应激及细胞凋亡的关系,为临床糖尿病心脏病相关新药的研发与应用提供参考资料。

材 料 和 方 法

1 材料与试剂

1.1 实验动物 SPF级KKAY小鼠,雄性,8~10周龄,体重22~25g,购自中国医学科学院实验动物研

究所[合格证号:KYLL-2017(GJ)A-0028],适应性饲养7d,自由饮水和进食。高脂饲料(10%猪油+20%蔗糖+2.5%胆固醇+0.5%胆酸钠+67%基础饲料)购自北京科澳协力饲料有限公司,普通饲料购自中国医学科学院动物中心。

1.2 主要试剂 葛根素注射液(批号:1009056,成都地奥九泓制药厂);黄芪注射液(批号:1404163,湖南五洲通药业有限责任公司);无水乙醇和二甲苯购自国药试剂;HE染液购自索莱宝公司;TRIzol购自Invitrogen;反转录试剂盒购自Promega;power sybr-green购自ABI;引物设计应用Primer5软件设计并交由宝生物工程(大连)有限公司合成;抗葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78,GRP78)、C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)和p53调凋亡调控因子(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)抗体购自Abcam;抗caspase-3、cleaved caspase-3、caspase-9、cleaved caspase-9抗体购自Novus;抗多腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]和cleaved PARP抗体购自Cell Signaling Technology;反转录试剂盒和Real-time PCR试剂盒购自TaKaRa;BCA蛋白浓度检测试剂盒购自Thermo;其它试剂为国产分析纯。

2 方法

2.1 2型糖尿病动物 KKAY 小鼠模型的建立 用高脂饲料和普通饲料喂养KKAY小鼠,饲养温度为22~25℃,相对湿度控制在50%~60%之间;每日12h光照维持,昼夜循环,自由进食、饮水。实验鼠的处理遵循国家科学技术委员会1988年颁布的《实验动物管理条例》,并得到我校动物管理委员会的批准。待12周龄时,将随机血糖 ≥ 13.9 mmol/L的KKAY小鼠视为糖尿病模型建立成功^[9]。

2.2 实验动物分组及给药 实验分为对照(control)组、模型(model)组和治疗(treatment)组,将造模成功的KKAY小鼠(12周龄)随机分为模型组和治疗组,具体分组情况如下:对照组(18只):给予普通饲料饲喂;模型组(18只):KKAY小鼠给予高脂饲料饲喂,12周龄起每日给予与治疗组相同剂量的生理盐水(4.3 mL/kg),腹腔注射;治疗组18只:KKAY小鼠给予高脂饲料,每日腹腔注射黄芪注射液(3.0

mL/kg) 和葛根素注射液(1.3 mL/kg), 2种药物先后注射。以上各组动物均为单笼饲养, 均自由饮食, 饮水, 每日换垫料, 分别于21、24和28周龄各处死6只。

2.3 采集心肌组织样品 分别于21周龄、24周龄和28周龄时分批处死各组小鼠, 用剪刀打开小鼠胸腔, 将心脏剪下, 以冰生理盐水冲洗残留血液, 去除大血管, 快速切留心尖组织, 保存于液氮罐中备用。

2.4 HE染色法观察心肌的形态变化 经4%多聚甲醛固定的心脏组织常规石蜡切片, 进行HE染色, 光学显微镜下观察心肌组织病理学变化。

2.5 TUNEL染色法检测心肌细胞凋亡 24周龄处死的小鼠心脏组织经4%甲醛固定、脱水、包埋制备石蜡切片(10 μm)。按照TUNEL试剂盒检测心肌细胞凋亡, 于光学显微镜下观察并拍照, 以细胞核呈棕

褐色为阳性细胞, 随机取5个视野, 分别记录每个视野中阳性细胞数及细胞总数, 计算每个视野的凋亡指数, 凋亡指数(%) = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%, 求平均值。

2.6 Real-time PCR 采集的心肌组织按照TRIzol试剂说明书提取总RNA, 分光光度计测定其吸光度(A)值。按照RT-PCR试剂盒说明书合成cDNA, 反应条件为: 42 °C 1 h; 70 °C 5 min; 4 °C 放置10 min后置于-80 °C保存。取2 ng cDNA进行real-time PCR反应, 引物见表1, 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 20 s; 58 °C 30 s; 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 10 min。IQ5™ Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad)进行real-time PCR数据分析, 结果经内参照β-actin校正, 各基因相对含量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

表1 Real-time PCR引物

Table 1. The primer of real-time PCR

Name	Forward primer(5' -3')	Reverse primer(5' -3')
GRP78	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
CHOP	AGCTGGAAGCCTGCTATGAGGA	AGCTAGGGACCCAGGGTCAA
PUMA	ACCTCAACGCGCAGTACGA	GGGAGGAGTCCCATGAAGAGA
β-actin	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

2.7 Western blot 采集的心肌组织50 μg, 加入300 μL RIPA裂解液, 超声破碎, 15 000 ×g, 4 °C离心10 min, 按照BCA试剂盒说明书测定总蛋白浓度。每个样本取30 μg进行SDS-PAGE, 将蛋白转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 分别孵育I抗(GRP78, CHOP, PUMA, caspase-3, cleaved caspase-3, caspase-9, cleaved caspase-9, PARP, cleaved PARP和β-actin), 4 °C过夜。洗膜、孵育II抗(室温1 h)。ECL显影后扫描, 蛋白相对表达量经内参照β-actin校正后经ImageJ软件分析。

3 统计学处理

应用SPSS 17.0软件对实验结果进行统计学分

析, 结果用均数 ± 标准差(mean ± SD)表示, 多组间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 HE染色观察心肌形态变化

各周龄对照组小鼠心肌细胞排列致密、整齐, 心肌细胞结构完整、清晰, 细胞核呈卵圆形, 大小一致; 随周龄增加, 模型组小鼠心脏组织病变逐渐加重; 与同周龄模型组相比, 治疗组小鼠心肌组织病变减轻, 可见轻度肌浆溶解。以24周为例, 见图1。

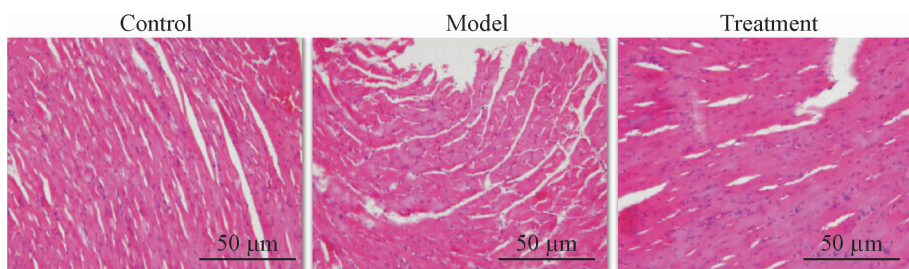


Figure 1. Morphological changes of myocardial tissue were observed using HE staining.

图1 24周龄各组小鼠心肌组织形态学观察

2 TUNEL 染色观察小鼠心肌细胞凋亡

TUNEL 染色结果显示,对照组小鼠心肌细胞排列有序,细胞核圆而大,核仁清晰,TUNEL 阳性细胞少;与对照组比较,模型组小鼠 TUNEL 阳性细胞数

目显著增多($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组小鼠心肌细胞 TUNEL 阳性细胞数目显著减少($P < 0.01$),见图 2。

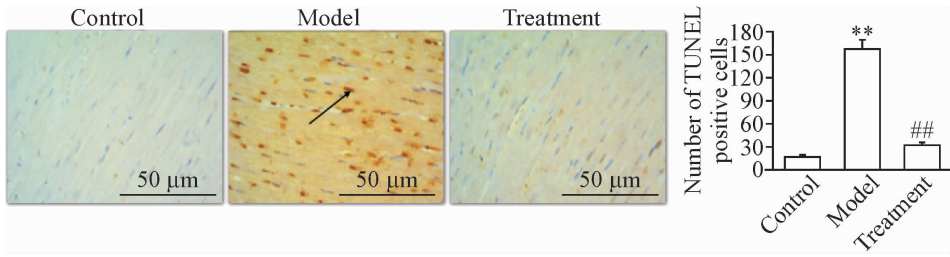


Figure 2. Myocardial apoptosis in type 2 diabetic mice was observed by TUNEL staining. Mean \pm SD. $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 2 TUNEL 染色观察 2 型糖尿病小鼠心肌细胞凋亡

3 各组小鼠心脏组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA 的 mRNA 表达水平

Real-time PCR 结果显示:21 周、24 周和 28 周时,模型组小鼠心肌组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA

mRNA 表达水平显著高于对照组($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组小鼠心肌组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$),但仍高于对照组,差异不显著,见图 3。

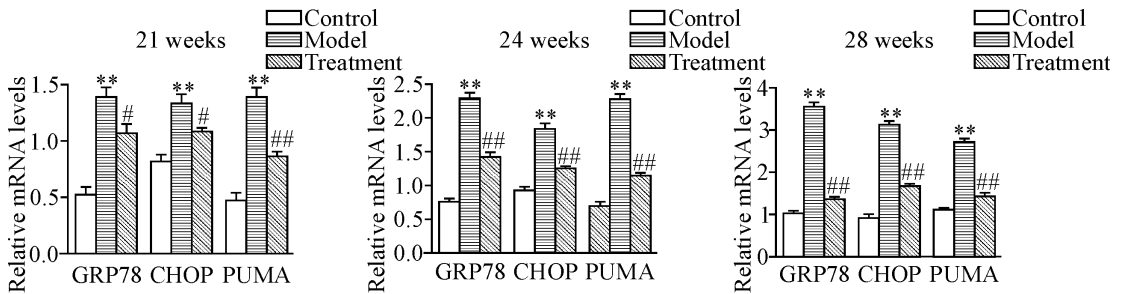


Figure 3. The expression of GRP18, CHOP and PUMA mRNA in each groups were detected by real-time PCR. Mean \pm SD. $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group.

图 3 Real-time PCR 检测各组小鼠目的基因 mRNA 表达

4 各组小鼠心脏组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA 蛋白的表达情况

Western blot 结果显示:21 周、24 周和 28 周时,模型组小鼠心肌组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA 蛋白表达水平显著高于对照组($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组小鼠心肌组织中 GRP78、CHOP 和 PUMA 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$),见图 4。

5 联合治疗对 2 型糖尿病小鼠心肌组织凋亡相关通路的影响

Western blot 结果显示,与对照组组比较,模型组小鼠心肌组织中 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 cleaved PARP 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),而 caspase-3、caspase-9 和 PARP 蛋白表达水平无明显变化;与模型组比较,治疗组小鼠心肌组织中 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 和 cleaved PARP 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),见图 5。

讨 论

高糖诱导的心肌细胞凋亡是导致糖尿病心肌损伤的重要原因。心肌细胞凋亡增多引起心肌细胞数量的相对减少也是糖尿病心肌损伤发生的重要原因之一^[10]。本研究结果显示黄芪注射液联合葛根素注射液治疗能缓减 2 型糖尿病小鼠心肌损伤病情,表明黄芪注射液联合葛根素注射液联具有心肌保护功能;进一步观察到治疗组小鼠心肌组织中凋亡的细胞明显减少,提示黄芪注射液联合葛根素注射液发挥心肌保护功能至少部分通过抑制 2 型糖尿病小鼠心肌细胞凋亡而实现。

ERS 在糖尿病心脏病变的发生发展过程中起着重要的作用^[11],GRP78、CHOP 和 PUMA 共同调控 ERS 介导细胞凋亡过程^[12-14]。GRP78 是 ERS 发生的标志物^[15],其通过促进蛋白质的正确折叠、协助跨膜转运至内质网腔、降低细胞对 Tc 细胞的敏感性,抑

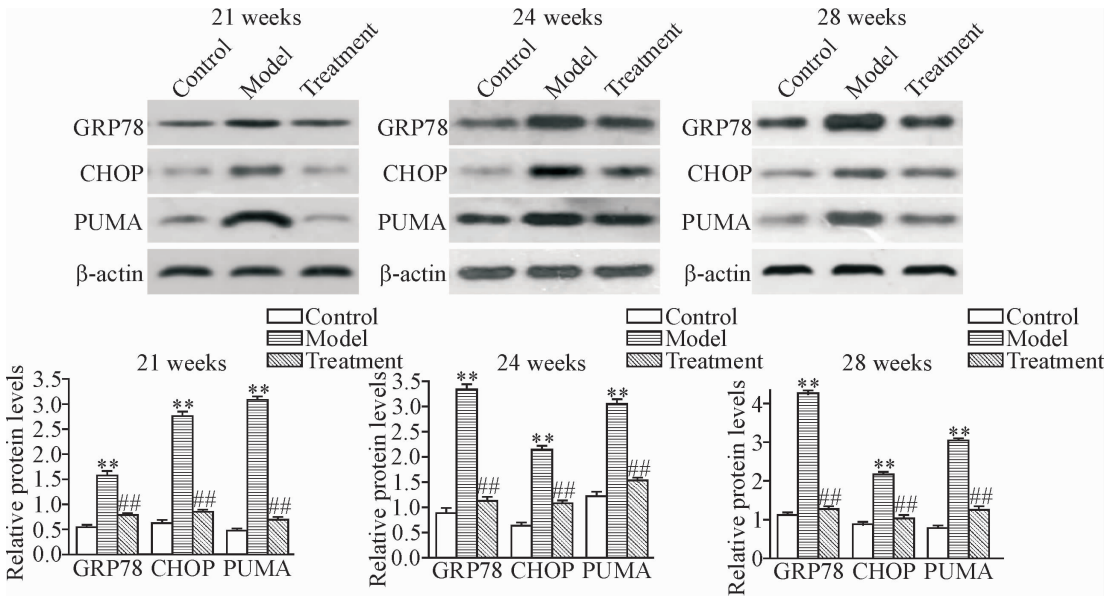


Figure 4. Expression of GRP78, CHOP and PUMA proteins in each group were measured by Western blot. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 4 Western blot 检测各组小鼠心肌组织中目的蛋白表达

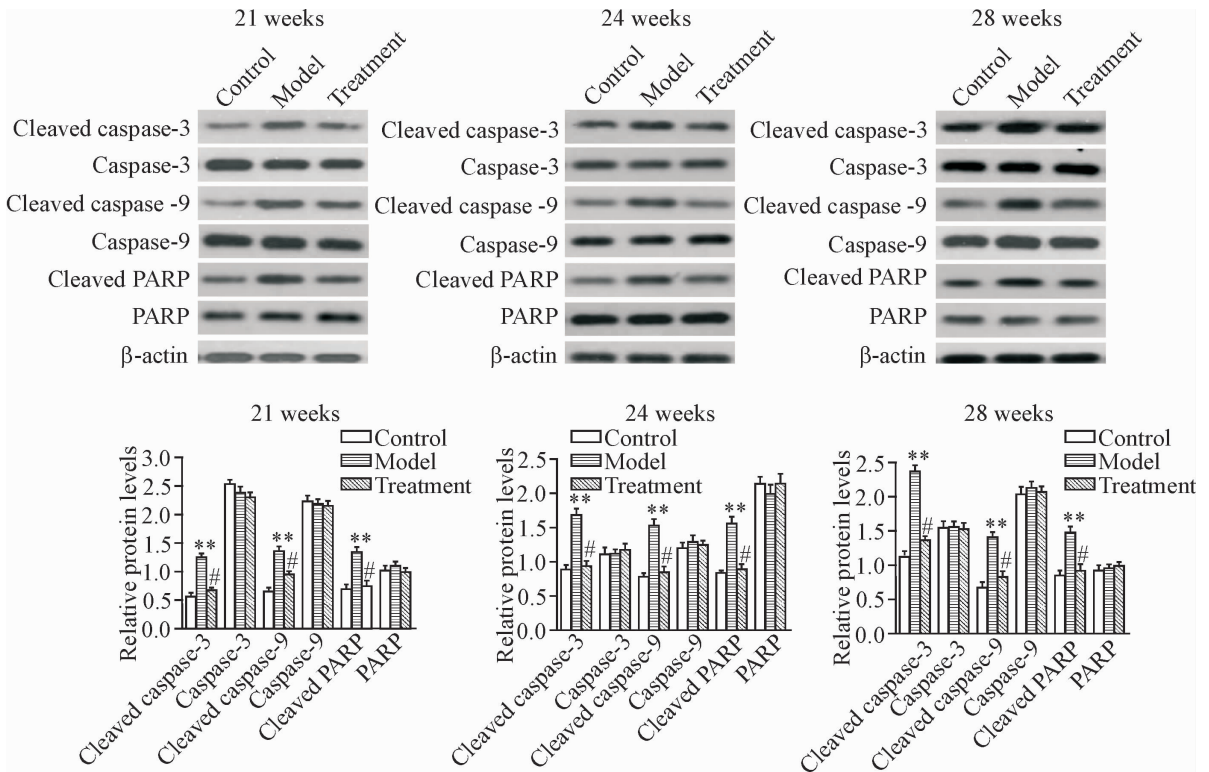


Figure 5. Effects of combination therapy on apoptosis-related protein expression in myocardium of type 2 diabetic mice. Mean \pm SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 5 联合治疗对 2 型糖尿病小鼠心肌组织凋亡相关通路的影响

制细胞凋亡^[16-17]。ERS 发生后通过激活 PERK 和 ATF4 信号通路诱导 CHOP 表达,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,促进促凋亡蛋白 Bid 和 PUMA 的表达,从而激活细胞线粒体凋亡途径^[18]。PUMA 在 p53 诱导的细胞凋亡中发挥重要作用^[19],研究证实 PUMA

蛋白通过翻译后修饰而易于与 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白结合,进而被蛋白酶体降解而抑制细胞凋亡^[20]。本研究结果显示模型组 GRP78、CHOP 和 PUMA mRNA 表达水平显著高于对照组,表明模型组发生了 ERS;治疗组 GRP78、CHOP 和 PUMA 表达的减少表

明 ERS 反应程度减轻;Western blot 结果显示,模型组小鼠心肌组织中 GRP78、CHOP、PUMA、cleaved PARP 蛋白水平显著增高,进一步证实 ERS 通路被激活;同时 caspase 通路也被激活(cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白水平显著增加),表明 2 型糖尿病小鼠心肌细胞凋亡相关通路被激活,心肌细胞凋亡增多;而给予黄芪注射液联合葛根素注射液治疗后,小鼠心肌组织中的 caspase 通路和 PARP 通路被抑制,几乎恢复到基础水平,与对照组比较无明显差异,说明黄芪注射液联合葛根素注射液能抑制 2 型糖尿病小鼠心肌细胞凋亡。

本研究结果证实在 2 型糖尿病心脏病变过程中,发生了心肌细胞的病变、细胞凋亡及 ERS,其凋亡相关通路 caspase 和 PARP 通路被激活。黄芪注射液与葛根素注射液联用可以通过抑制 ERS 和 caspase 通路的激活、减少心肌细胞的凋亡,从而减缓 2 型糖尿病心脏病变。

[参 考 文 献]

- [1] 谢中全. 糖尿病心脏病及其防治进展[J]. 中国医药指南, 2009, 7(2):15-16.
- [2] 丁文龙, 潘大彬. 内质网应激在糖尿病心肌病发病机制中的作用[J]. 承德医学院学报, 2016, 33(4):336-339.
- [3] 戴卫波, 梅全喜, 李乐愚. 中药组方治疗糖尿病药理作用研究进展[J]. 世界中医药, 2016, 11(6):1122-1125.
- [4] 张 达, 李姝玉, 王岩飞, 等. 黄芪与葛根素联用对 KKAy 小鼠肾脏内质网应激相关 PERK 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(1):166-169.
- [5] 刘 玥, 齐 新, 魏丽萍. 中药及复方对糖尿病心肌病病理变化及发病机制影响的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3):823-826.
- [6] 朱月红, 戴启明. 糖尿病心肌病的内质网病变机制及干预[J]. 心血管病学进展, 2015, 36(6):738-742.
- [7] 赵榆华, 雷 婷, 唐杏彤, 等. 糖尿病小鼠心肌病的 NADPH 氧化酶介导内质网应激机制研究及 DPI 的改善作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(14):1142-1145.
- [8] Oe H, Nakamura K, Kihara H, et al. Comparison of effects of sitagliptin and voglibose on left ventricular diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes: results of the 3D trial[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14(1):83.
- [9] 王 谦, 贾德贤, 娄金丽, 等. 2 型糖尿病动物模型 KKAy 小鼠肝、肾的病变[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(4):241-243.
- [10] Gurusamy N, Lekli I, Mukherjee S, et al. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(1):103-112.
- [11] Hamilton MJ, Snapper SB, Blumberg RS. Update on biologic pathways in inflammatory bowel disease and their therapeutic relevance[J]. J Gastroenterol, 2012, 47(1):1-8.
- [12] 周彦明, 杨甲梅, 殷正丰, 等. 内质网应激诱导的细胞凋亡与小鼠肝脏缺血再灌注损伤的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(8):870-872.
- [13] 陈 鹏, 杨成明, 曾春雨, 等. 心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织内质网应激相关凋亡途径的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6):1069-1074.
- [14] Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, et al. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(2):438-447.
- [15] Qian Y, Tiffany-astiglion IE. Lead-induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system [J]. Neurochem Res, 2003, 28(1):153-162.
- [16] Yang Y, Tumer RS, Gaut JR. The chaperone Bip/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion [J]. J Biol Chem, 1998, 273(40):25552-25555.
- [17] Lebeau P, Platko K, Al-Hashimi AA, et al. Loss-of-function PCSK9 mutants evade the unfolded protein response sensor, GRP78, and fail to induce endoplasmic reticulum stress when retained[J]. J Biol Chem, 2018, 293(19):7329-7343.
- [18] Demirtas L, Guclu A, Erdur FM, et al. Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus [J]. Indian J Med Res, 2016, 144(4):515-524.
- [19] 莫小恒, 李 军, 张克君, 等. PUMA 基因对胰腺癌细胞 BxPC-3 的促凋亡作用及其可能机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(4):353-357.
- [20] Wang H, Pei W, Luan Q, et al. A feasibility study on gene therapy of pancreatic carcinoma with Ad-PUMA[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(9):712-719.

(责任编辑:林白霜,余小慧)