

# 银杏叶提取物对高糖诱导的人视网膜色素 上皮细胞凋亡的影响

南娜<sup>1</sup>, 赵萍<sup>1\*</sup>, 张睿<sup>2</sup>

(1. 河北医科大学第四医院, 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第一医院, 石家庄 050031)

**[摘要]** **目的:**观察银杏叶提取物对高糖诱导的人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 细胞凋亡的影响并初步探讨可能机制。**方法:**体外培养 ARPE-19 细胞株,分为正常组(5.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖),高糖组(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖),银杏叶提取物组(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>银杏叶提取物)。噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性;流式细胞术测定细胞凋亡率;采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 B 细胞白血病/淋巴瘤相关抗原-2(Bcl-2), 白血病/淋巴瘤相关抗原相关 X 蛋白(Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 凋亡相关因子(Fas), Fas 受体(FasL) mRNA 和蛋白的表达。Western blot 检测 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)磷酸化及核 JNK 表达变化。**结果:**高糖组吸光度 A 明显低于正常组( $P < 0.05$ ), 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>银杏叶提取物组比高糖组 A 明显升高( $P < 0.05$ );高糖组细胞凋亡率明显高于正常组, 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>银杏叶提取物组比高糖组细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ );与正常组比较,高糖组 Bax 和 Caspase-3, Fas 和 FasL 表达升高( $P < 0.05$ ), 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>银杏叶提取物组能降低 Bax 和 Caspase-3 的表达, 升高 Bcl-2 表达水平, 降低 Fas 和 FasL 表达( $P < 0.05$ );与正常组比较,高糖组 JNK 磷酸化及核 JNK 蛋白水平升高( $P < 0.05$ ), 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>银杏叶提取物降低 JNK 磷酸化及核 JNK 表达( $P < 0.05$ )。**结论:**银杏叶提取物能通过 JNK 通路, 抑制细胞凋亡, 改善糖尿病视网膜病变。

**[关键词]** 银杏叶提取物; 高糖; 糖尿病视网膜病变; 细胞凋亡; JNK 通路

**[中图分类号]** R587; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0168-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180168

## Effect of ginkgo leaves extract on Apoptosis in High Glucose-induced Human Retinal Pigment Epithelial Cells

NAN Na<sup>1</sup>, ZHAO Ping<sup>1\*</sup>, ZHANG Rui<sup>2</sup>

(1. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China;

2. The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of ginkgo leaves extract on the apoptosis in high-glucose-induced human retinal pigment epithelial cells, in order to explore possible mechanisms. **Method:** *In vitro*, ARPE-19 cells was divided into normal control group (5.5 mmol·L<sup>-1</sup> glucose), high-glucose group (30 mmol·L<sup>-1</sup> glucose) and ginkgo leaves extract group (30 mmol·L<sup>-1</sup> glucose + 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> ginkgo leaves extract). MTT assay was used to detect cell viability. Flow cytometry was used to determine the apoptotic rate. Bcl-2, Bax, Caspase-3, Fas and FasL mRNA and protein expressions were measured by Real-time PCR and Western blot. Western blot was used to detect the phosphorylation of JNK and the expression of nuclear JNK. **Result:** A value of the high-glucose group was significantly lower than that of the control group. Those in 12.5,

**[收稿日期]** 20170511(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81400812)

**[第一作者]** 南娜, 主管护师, 从事眼科疾病的临床及护理研究, Tel:13673166180, E-mail: nanan1976@126.com

**[通讯作者]** \* 赵萍, 教授, 博士, 从事眼科疾病的临床研究, Tel:0311-86095438, E-mail: yknanna@sina.com

25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> ginkgo leaves extract groups were significantly higher than those of the high-glucose group ( $P < 0.05$ ). The apoptotic rate of the high-glucose group was significantly higher than that of the control group. Those in 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> ginkgo leaves extract groups were significantly lower than those of the high-glucose group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, expressions of Bax, Caspase-3, Fas and FasL in the high-glucose group were increased. And expressions of Bax, Caspase-3, Fas and FasL were decreased by 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> ginkgo leaves extract ( $P < 0.05$ ). JNK phosphorylation and nuclear JNK protein were increased in the high-glucose group, compared with the control group; and JNK expression was decreased in 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> ginkgo leaves extract groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** ginkgo leaves extract could alleviate diabetic retinopathy and inhibit apoptosis through the JNK pathway.

[ **Key words** ] ginkgo leaves extract; high glucose; diabetic retinopathy; cell apoptosis; JNK

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见的微血管并发症,也是糖尿病患者致盲的主要原因<sup>[1-2]</sup>,糖尿病视网膜病变的发病机制尚未明确,但大量研究认为凋亡、炎症、氧化等参与了其发生发展病变过程<sup>[3-4]</sup>。目前尚无一种疗效理想的治疗方法用于糖尿病视网膜病变的防治,临床上常用的是激光光凝治疗,但会引起外周和夜间视力减退、中央凹烧灼和黄斑水肿等严重的副作用;玻璃体切除属于创伤性治疗方法,存在一定手术风险。药物防治中,西药治疗除控制血糖外,常用阿司匹林、莫西赛利等药物改善视网膜的血流状态,但西药机制单一特点,导致了疗效尚不令人满意。中医药治疗糖尿病视网膜病变具有独特的优势,能够提高视力、改善眼底出血等多种症状,并改善微循环、抑制自由基、凋亡等多方面延缓病变发生发展,近年来,中医药治疗糖尿病视网膜病变取得了一定的进展<sup>[5]</sup>,有文献报道银杏叶提取物治疗糖尿病视网膜病变疗效确切,可以减轻患者视网膜及玻璃体内的纤维组织增生等<sup>[6]</sup>,但其机制尚未阐明。本实验通过观察银杏叶提取物对糖尿病视网膜病变后细胞凋亡的作用,并初步探讨其可能作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 细胞株由 ATCC 公司提供(批号 RL-2302)。

**1.2 药物及试剂** 银杏叶提取物注射液(台湾济生化学制药厂股份有限公司,规格 5 mL 含 17.5 mg 银杏叶提取物,批号 H4002);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 79402);Trans Script™ One-Step RT-PCR Super Mix(大连宝生物有限公司,批号 RR047A);蛋白定量分析试剂盒(美国 Pierce 公司,批号 23225);B 细胞白血病/淋巴瘤相关抗原 2(Bcl-2,批号 ab59348),白血病/淋巴瘤相关抗原相关 X 蛋白(Bax,批号 ab53154),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

(Caspase-3,批号 ab2302),凋亡相关因子(Fas,批号 ab82419),Fas 受体(FasL,批号 ab15285),c-Jun 氨基末端激酶(JNK,批号 ab179461),磷酸化 JNK(p-JNK,批号 ab124956),β-肌动蛋白(β-actin,批号 0b8227)均购自美国 Abcam 公司。

**1.3 仪器** 7300 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),Gel Doc XR<sup>+</sup> 型凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司),Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

## 2 方法

**2.1 银杏叶提取物溶液配制** 参照文献[7]将市售银杏叶提取物注射液(3 500 mg·L<sup>-1</sup>)用无血清的 DMEM 培养基稀释至目标浓度。

**2.2 细胞培养** ARPE-19 细胞株,调整密度为  $5 \times 10^4$  个/mL 的细胞接种到培养瓶中,在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养,培养基为 10% 胎牛血清,青霉素(100 U·mL<sup>-1</sup>),链霉素(100 U·mL<sup>-1</sup>)的低糖 DMEM 培养基。取对数生长期的 ARPE-19 细胞用于实验,分为正常组(5.5 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖),高糖组(30 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖),银杏叶提取物组(30 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖 + 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 银杏叶提取物)。作用 48 h 后,收集细胞。

**2.3 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力** 药物作用 ARPE-19 细胞 48 h 后,每孔加入 MTT 液 10 μL 孵育 4 h,弃去上清液,加入二甲基亚砜(DMSO)溶液 100 μL,充分振荡 10 min,选用 570 nm 波长的酶标仪测定各孔的吸光度 A。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

**2.4 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率** 收集细胞, PBS 洗涤后离心,固定于 70% 乙醇,采用 Annexin V-FITC/PI 双染法测定细胞凋亡率。

**2.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测细胞 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Fas, FasL mRNA 表达** 收集细胞, PBS 洗涤,加入 trizol 试剂,提取总 RNA,鉴定

RNA 纯度和浓度,按 RNA 试剂盒要求依次加入试剂,将总 RNA 逆转录成 cDNA,后按荧光定量扩增试剂盒要求依次加入引物和反应试剂,ABI 荧光定量 PCR 仪上机检测,反应条件:94 ℃ 5min, 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。将  $\beta$ -actin 设为内参,正常组设为 1,以 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Fas, FasL  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  反映目的基因 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列 (5'-3')	长度 /bp
Bcl-2	上游 TGTGTGGAGACGCTCAACC	98
	下游 TGGATCCAGGTGTCAGGT	
Bax	上游 GATGCGTCCACCAAGAAGC	272
	下游 AAGTCCAATGTCCAGCCCAT	
Caspase-3	上游 ACTGGACTGTGGCATTGAGAC	185
	下游 TTGTCCGCATACTGTTTCAGC	
Fas	上游 CCTCTACCTCTGTTCTTACG	73
	下游 GATGTCAGTCACTTGGGCATT	
FasL	上游 GCCTGTGTCTCCTTGTGATGT	145
	下游 TCCAAAGATGATGCTGTGTG	
$\beta$ -actin	上游 GGTCAATCCATTGGCAA	105
	下游 GAGTTGAAGGTAGTTTCGTGGA	

**2.6 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测细胞 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Fas, FasL 蛋白表达及 JNK, p-JNK, 核 JNK 蛋白表达** 收集细胞, PBS 洗涤, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, 或用核蛋白提取试剂盒提取核蛋白, 取上清, BCA 方法测定蛋白浓度, 变性后转移至 PVDF 膜, 脱脂奶粉室温封闭, 加入 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Fas, FasL 及 JNK, p-JNK 的一抗 (1:1 000) 孵育过夜, 加入稀释合适浓度的二抗, 室温孵育反应后洗膜, 胶片发光显影后定影扫描。以  $\beta$ -actin 作为内参, 以目的蛋白灰度值/内参灰度值反映蛋白的相对表达水平。

**2.7 统计学处理** 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 13.0 统计软件采用单因素方差分析结合 Dunnett 检验进行分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞活性的影响** 与正常组比较, 高糖组细胞 A 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 银杏叶提取物孵育后, 与高糖组相比, 12.5, 25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  银杏叶提取物组 A 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 表明银杏叶提取物能促进 ARPE-19 细胞活性。见表 2。

**3.2 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞凋亡率的影响** 与正常组比较, 高糖组细胞凋亡率明显高于正常组 ( $P < 0.05$ ), 12.5, 25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  银杏叶提取物组比高糖组细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ ), 表明银杏

表 2 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of ginkgo leaves extract on cell viability in ARPE-19 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{570}$
正常	-	0.85 ± 0.10
高糖	-	0.37 ± 0.03 <sup>1)</sup>
银杏叶提取物	12.5	0.50 ± 0.05 <sup>1,2)</sup>
	25	0.69 ± 0.09 <sup>1,2,3)</sup>
	50	0.75 ± 0.09 <sup>1,2,3)</sup>
	100	0.82 ± 0.07 <sup>2,3,4)</sup>

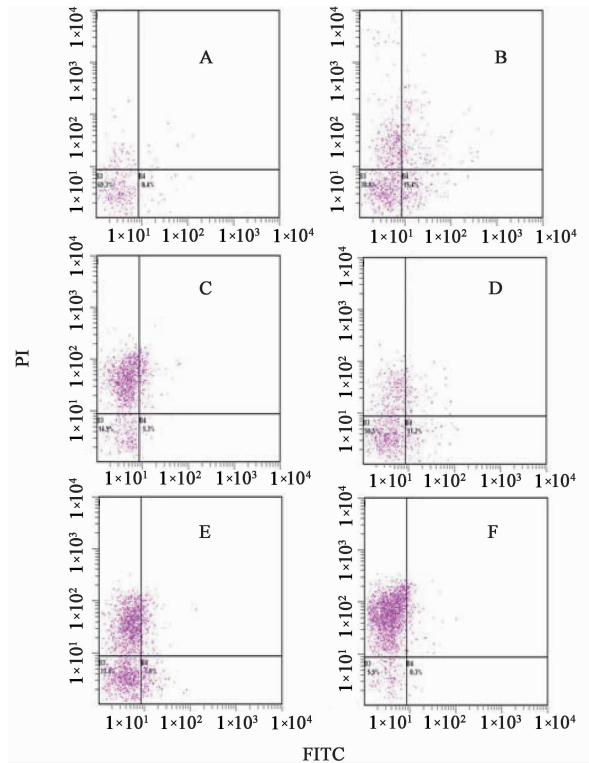
注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与高糖组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 12.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ;与 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 ~ 7 同)。

叶提取物能抑制 ARPE-19 细胞凋亡。见表 3, 图 1。

表 3 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of ginkgo leaves extract on apoptotic rate in ARPE-19 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
正常	-	3.83 ± 0.50
高糖	-	16.23 ± 2.15 <sup>1)</sup>
银杏叶提取物	12.5	11.93 ± 1.11 <sup>1,2)</sup>
	25	9.23 ± 0.17 <sup>1,2,3)</sup>
	50	7.50 ± 1.05 <sup>1,2,3)</sup>
	100	6.47 ± 0.45 <sup>1,2,3,4)</sup>



A. 正常组; B. 高糖组; C ~ F. 银杏叶提取物不同质量浓度组 (12.5, 25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (图 2 ~ 4 同)

图 1 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞凋亡率的影响

Fig. 1 Effect of ginkgo leaves extract on apoptotic rate in ARPE-19 cells

**3.3 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA 和蛋白表达的影响** 与正常组比较,高糖组细胞 Bax, Caspase-3 mRNA 和蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 与高糖组相比, 12.5 mg·L<sup>-1</sup> 银杏叶

提取物组 Bax, Caspase-3 蛋白表达和 Bax mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ), 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 银杏叶提取物组 Bax, Caspase-3 表达均降低, Bcl-2 表达均升高 ( $P < 0.05$ )。见表 4, 5, 图 2。

表 4 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of ginkgo leaves extract on Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA expression in ARPE-19 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	Bcl-2	Bax	Caspase-3
正常	-	1.03 ± 0.15	1.07 ± 0.12	1.07 ± 0.12
高糖	-	1.37 ± 0.25	5.67 ± 0.72 <sup>1)</sup>	4.37 ± 0.55 <sup>1)</sup>
银杏叶提取物	12.5	1.57 ± 0.29	3.53 ± 0.35 <sup>1,2)</sup>	3.50 ± 0.35 <sup>1,2)</sup>
	25	2.07 ± 0.25 <sup>1)</sup>	3.03 ± 0.32 <sup>1,2)</sup>	2.90 ± 0.26 <sup>1,2,3)</sup>
	50	3.07 ± 0.50 <sup>1,2,3,4)</sup>	2.13 ± 0.25 <sup>1,2,3,4)</sup>	2.23 ± 0.15 <sup>1,2,3,4)</sup>
	100	4.1 ± 0.72 <sup>1,2,3,4,5)</sup>	1.13 ± 0.06 <sup>2,3,4,5)</sup>	1.17 ± 0.12 <sup>2,3,4,5)</sup>

表 5 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of ginkgo leaves extract on Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein expression in ARPE-19 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Caspase-3/β-actin
正常	-	1.09 ± 0.17	0.33 ± 0.05	0.25 ± 0.06
高糖	-	1.16 ± 0.47	1.14 ± 0.21 <sup>1)</sup>	1.27 ± 0.12 <sup>1)</sup>
银杏叶提取物	12.5	1.36 ± 0.06	0.75 ± 0.11 <sup>1,2)</sup>	0.90 ± 0.13 <sup>1,2)</sup>
	25	1.52 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.73 ± 0.18 <sup>1,2)</sup>	0.74 ± 0.10 <sup>1,2,3)</sup>
	50	1.58 ± 0.10 <sup>1,2)</sup>	0.46 ± 0.07 <sup>2,3,4)</sup>	0.54 ± 0.06 <sup>1,2,3,4)</sup>
	100	1.70 ± 0.10 <sup>1,2)</sup>	0.40 ± 0.05 <sup>2,3,4)</sup>	0.38 ± 0.05 <sup>1,2,3,4,5)</sup>

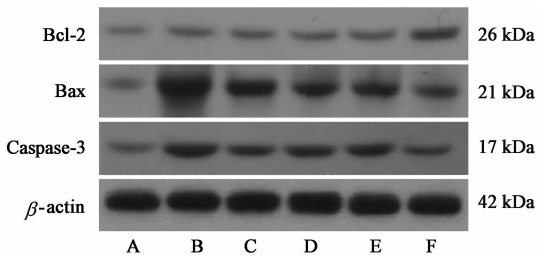


图 2 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of ginkgo leaves extract on Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein expression in ARPE-19 cells

**3.4 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 Fas, FasL mRNA 和蛋白表达的影响** 与正常组比较,高糖组 Fas, FasL mRNA 和蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 与高糖组相比, 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 银杏叶提取物组 Fas, FasL mRNA 和蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$ )。见表 6, 图 3。

**3.5 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 JNK 通路的影响** 与正常组比较,高糖组细胞 p-JNK, 核 JNK 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 与高糖组相比, 12.5, 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 银杏叶提取物组 p-JNK, 核 JNK 蛋白

表 6 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 Fas, FasL 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of ginkgo leaves extract on Fas, FasL expression in ARPE-19 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	mRNA		蛋白	
		Fas	FasL	Fas/β-actin	FasL/β-actin
正常	-	1.10 ± 0.14	1.17 ± 0.21	0.21 ± 0.02	0.12 ± 0.02
高糖	-	5.20 ± 0.61 <sup>1)</sup>	4.63 ± 0.71 <sup>1)</sup>	0.71 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.64 ± 0.06 <sup>1)</sup>
银杏叶提取物	12.5	3.57 ± 0.40 <sup>1,2)</sup>	3.43 ± 0.35 <sup>1,2)</sup>	0.54 ± 0.09 <sup>1,2)</sup>	0.48 ± 0.09 <sup>1,2)</sup>
	25	2.13 ± 0.23 <sup>1,2,3)</sup>	2.90 ± 0.35 <sup>1,2)</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>1,2,3)</sup>	0.29 ± 0.03 <sup>1,2,3)</sup>
	50	1.80 ± 0.20 <sup>1,2,3)</sup>	2.33 ± 0.23 <sup>1,2,3)</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>1,2,3)</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>1,2,3)</sup>
	100	1.10 ± 0.10 <sup>2,3,4,5)</sup>	1.43 ± 0.15 <sup>2,3,4,5)</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>2,3,4)</sup>	0.15 ± 0.03 <sup>2,3,4,5)</sup>

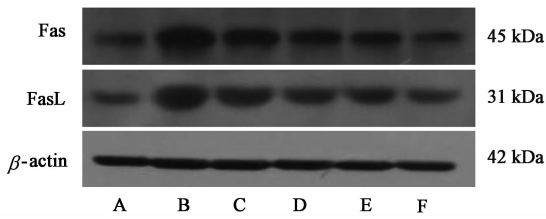


图 3 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 Fas, FasL 表达的影响

Fig. 3 Effect of ginkgo leaves extract on Fas, FasL expression in ARPE-19 cells

表 7 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 JNK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of ginkgo leaves extract on JNK protein expression in ARPE-19 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p-JNK/ $\beta$ -actin	核 JNK/ $\beta$ -actin	JNK/ $\beta$ -actin
正常	-	0.23 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.04
高糖	-	0.90 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	1.00 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	0.60 $\pm$ 0.13
银杏叶提取物	12.5	0.67 $\pm$ 0.06 <sup>1,2)</sup>	0.74 $\pm$ 0.13 <sup>1,2)</sup>	0.60 $\pm$ 0.06
	25	0.43 $\pm$ 0.06 <sup>1,2,3)</sup>	0.66 $\pm$ 0.09 <sup>1,2,3)</sup>	0.55 $\pm$ 0.06
	50	0.40 $\pm$ 0.10 <sup>1,2,3)</sup>	0.41 $\pm$ 0.08 <sup>1,2,3,4)</sup>	0.56 $\pm$ 0.09
	100	0.27 $\pm$ 0.06 <sup>2,3,4,5)</sup>	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>2,3,4)</sup>	0.64 $\pm$ 0.08

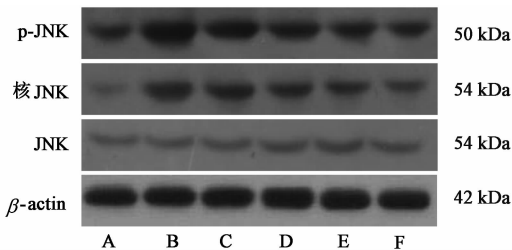


图 4 银杏叶提取物对 ARPE-19 细胞 JNK 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of ginkgo leaves extract on JNK protein expression in ARPE-19 cells

近期有临床专家将银杏叶提取物用于治疗糖尿病视网膜病变,取得了可喜的成果<sup>[13]</sup>。笔者用高糖诱导人视网膜色素上皮细胞建立糖尿病视网膜病变损伤模型,观察到银杏叶提取物能够促进 ARPE-19 细胞活性,保护人视网膜色素上皮细胞。

研究发现,糖尿病患者视网膜存在微血管内皮细胞和周细胞的凋亡,并且有研究认为糖尿病所致的视网膜神经细胞凋亡的损伤要远远早于微血管病变的发生<sup>[14-15]</sup>。本实验观察到,高糖诱导的 ARPE-19 细胞中细胞凋亡率异常升高,表明高糖持续刺激下,细胞凋亡参与了人视网膜色素上皮细胞的发生发展。

随着技术的发展,人们对细胞凋亡有了深入的认识。细胞凋亡存在线粒体通路、死亡受体通路、内质网通路等,各通路互相联系互相作用共同调节细胞凋亡,介导细胞凋亡的信号通路主要有 Wnt 通路

表达均降低 ( $P < 0.05$ ),总 JNK 蛋白表达无差异。见表 7,图 4。

#### 4 讨论

银杏叶提取物来源于银杏科银杏属银杏的干燥叶,临床上被开发用于防治心脑血管和神经系统疾病<sup>[8-9]</sup>,其发挥作用的主要是其有效成分银杏黄酮苷和银杏内酯。现代药理研究表明,银杏叶提取物具有扩张血管、抗氧化、保护神经细胞等作用<sup>[10-12]</sup>,

和 JNK 通路<sup>[16]</sup>。银杏叶提取物是否通过抑制细胞凋亡发挥其保护人视网膜色素上皮细胞的作用,且其通过哪种信号通路,是本实验研究的重要内容。

本研究观察银杏叶提取物对线粒体通路 Bcl-2, Bax, Caspase-3 基因变化,死亡受体通路 Fas 和 FasL 的变化来研究其抑制凋亡的作用。Bcl-2, Bax 同属 bcl-2 基因家族成员,细胞损伤后 Bcl-2 构象改变,促进线粒体释放细胞色素 C,从而激活 Caspase-3 级联反应,最终诱发细胞凋亡。Fas 能够结合到死亡受体 FasL,致使 FasL 过度表达,促进细胞凋亡,造成组织、器官的损伤<sup>[10]</sup>。本研究结果显示高糖组 Bcl-2 表达有升高趋势,而 Bax, Caspase-3 和 Fas/FasL 表达异常升高,表明高糖刺激使人视网膜色素上皮细胞 Bcl-2 构象发生变化,进而引起级联反应,诱导了 ARPE-19 细胞凋亡的发生。笔者观察到银杏叶提取物干预后,能够升高 Bcl-2 表达,降低 Bax, Caspase-3 和 Fas/FasL,表明银杏叶提取物能够从两个途径抑制糖尿病视网膜病变细胞凋亡,一个途径是阻止 Bcl-2 构象改变,抑制细胞色素 C 释放,抑制 Caspase-3 引起的一系列反应;另一个途径是直接作用于 Fas 受体,抑制凋亡的发生。笔者进一步观察到了核 JNK 和 JNK 磷酸化水平降低,提示了银杏叶提取物可抑制 JNK 磷酸化,阻止 JNK 入核,从而抑制了 JNK 通路激活,最终抑制了人视网膜色素上皮细胞凋亡。

综上所述,银杏叶提取物能够抑制 JNK 磷酸化,抑制 JNK 进入细胞核,导致 Bcl-2/Bax/Caspase-3 途径和 Fas/FasL 途径受阻,抑制细胞凋亡,共同发挥其保护人视网膜色素上皮细胞的作用。但本实验中仅观察了 JNK 通路,并未对 WNT 通路进行研究,其详细机制仍需进一步的研究。

[参考文献]

[1] 王宏涛,王超,朱慧明,等. 芪黄明目胶囊对糖尿病小鼠视网膜保护作用及对 VEGF 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(22):3481-3485.

[2] De Moraes G, Layton C J. Therapeutic targeting of diabetic retinal neuropathy as a strategy in preventing diabetic retinopathy[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2016, 44(9):838-852.

[3] Mrugacz M, Bryl A, Bossowski A. Neuroretinal apoptosis as a vascular dysfunction in diabetic patients [J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(8):826-830.

[4] Murugesan N, Üstunkaya T, Feener E P. Thrombosis and hemorrhage in diabetic retinopathy: a perspective from an inflammatory standpoint [J]. Semin Thromb Hemost, 2015, 41(6):659-664.

[5] 杜倩,田秋霞,付莉萍,等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠视网膜病变的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2016,32(7): 1323-1326.

[6] 朱成义,伊琼,马金力,等. 银杏叶提取物对糖尿病视网膜病变的临床疗效评价[J]. 国际眼科杂志, 2016,16(2): 361-364.

[7] 王俞方,彭辉灿,燕建军,等. 银杏叶提取物在高糖环境下对人视网膜微血管内皮细胞的作用及可能机制[J]. 眼科新进展,2013,33(9):822-825.

[8] 秦劭晨,陈捷,黑赏艳,等. 银杏叶提取物治疗急性脑梗死随机对照试验的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,21(12):190-195.

[9] 李淑琴,朱嘉宝,武宇洲. 银杏叶提取物防治心脑血管疾病的研究进展[J]. 中国新药杂志,2016,25(1): 76-81.

[10] 白钰,吕全胜,马晓丽. 银杏叶提取物对 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2016,32(10): 1495-1498.

[11] 于广娜. 银杏叶提取物注射液联合多奈呱齐治疗血管性痴呆的疗效及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(20):210-213.

[12] Yallapragada P R, Velaga M K. Effect of Ginkgo biloba extract on lead-induced oxidative stress in different regions of rat brain[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2015, 34(2): 161-173.

[13] 江蕊,郑永征,任秉仪,等. 银杏叶提取物对糖尿病视网膜病变神经保护的影响[J]. 国际眼科杂志, 2015,15(8):1327-1331.

[14] Barber A J, Gardner T W, Abcouwer S F. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011,52(2):1156-1163.

[15] Durham J T, Herman I M. Microvascular modifications in diabetic retinopathy [J]. Curr Diab Rep, 2011, 11(4):253-264.

[16] 李晓婷. 细胞凋亡相关的信号通路[J]. 四川解剖学杂志, 2016,21(1):25-27.

[责任编辑 邹晓翠]