

## · 实验研究 ·

## 银杏叶提取物对体外培养的人 Müller 细胞氧化损伤的保护作用

孙艳艳 杨旭 安慧娟 李庆福 鲍玉洲

**【摘要】 背景** 氧化应激是视网膜损伤中重要的病理生理过程,探讨保护视网膜免受氧化应激损伤的方法具有重要的临床意义。研究证实银杏叶提取物具有抗氧化、抗凋亡、抗血栓、抗炎等多种功能,但其对人 Müller 细胞的抗氧化作用研究较少。**目的** 研究银杏叶提取物(EGb)对氧化剂三氧化二砷( $As_2O_3$ )诱导的人 Müller 细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制。**方法** 人 Müller 细胞株用含体积分数 10% 胎牛血清(FBS)、 $2\ \mu\text{mol/L}$  谷氨酰胺和质量分数 1% 青链霉素双抗的 DMEM/F12 培养液进行培养和传代,取对数生长期的 Müller 细胞分为 5 个组,阴性对照组细胞采用常规培养法进行培养,在培养基中加入终质量浓度为  $5\ \text{mg/L}$  的  $As_2O_3$  处理细胞 24 h 以建立细胞氧化损伤模型,然后将  $5$ 、 $10$  和  $20\ \text{mg/L}$  EGb 分别加入模型细胞培养液中作用 24 h,采用 MTT 法检测各组细胞的活力;采用 CM-H2DCFDA 荧光探针法测定各组细胞活性氧簇(ROS)含量;采用逆转录 PCR(RT-PCR)法检测细胞中 caspase-3 mRNA 的相对表达量;采用 Western blot 法分别检测细胞质和细胞核中 Nrf2 蛋白的表达。**结果** Müller 细胞接种至培养瓶后 24 h,倒置显微镜下可见接种细胞贴壁良好,培养 6~7 d 时 Müller 细胞的细胞体积较大,细胞质丰富,呈镶嵌样排列。 $As_2O_3$  处理组部分细胞凋亡,呈卵圆形悬浮在培养液中。MTT 法测定结果表明,阴性对照组细胞活力(A 值)最高, $As_2O_3$  处理组细胞活力最低,而  $As_2O_3+5\ \text{mg/L}$  EGb 组、 $As_2O_3+10\ \text{mg/L}$  EGb 组和  $As_2O_3+20\ \text{mg/L}$  EGb 组 A 值随着 EGb 质量浓度的增加而逐渐增加,各组间总体比较差异有统计学意义( $F=163.57, P=0.00$ )。阴性对照组细胞中 ROS 荧光强度最弱, $As_2O_3$  处理组最强, $As_2O_3+5\ \text{mg/L}$  EGb 组、 $As_2O_3+10\ \text{mg/L}$  EGb 组和  $As_2O_3+20\ \text{mg/L}$  EGb 组细胞中 ROS 荧光强度值随着 EGb 质量浓度的升高而逐渐减弱,各组间细胞中 ROS 荧光强度值的总体比较差异有统计学意义( $F=4\ 013.61, P=0.00$ )。细胞内 caspase-3 mRNA 的相对表达量随 EGb 质量浓度的升高逐渐下降,各组间总体比较差异有统计学意义( $F=2\ 199.72, P=0.00$ )。各组细胞质中 Nrf2 蛋白的表达比较,差异无统计学意义( $F=15.42, P=0.40$ );阴性对照组、 $As_2O_3$  处理组及  $As_2O_3+5\ \text{mg/L}$  EGb 组、 $As_2O_3+10\ \text{mg/L}$  EGb 组和  $As_2O_3+20\ \text{mg/L}$  EGb 组细胞核 Nrf2 蛋白表达量(灰度值)分别为  $100.01\pm0.04$ 、 $46.59\pm0.63$ 、 $54.51\pm0.62$ 、 $59.93\pm0.17$  和  $67.60\pm0.24$ ,总体比较差异有统计学意义( $F=7\ 271.72, P=0.00$ ),其中阴性对照组细胞核 Nrf2 蛋白表达量最低,而  $As_2O_3$  处理组最高,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** EGb 以剂量依赖的方式减轻体外培养的人 Müller 细胞的氧化应激损伤,其机制与抗氧化和抗凋亡作用有关,其减轻 Müller 细胞氧化应激损伤的调控主要发生在细胞核。

**【关键词】** 银杏科;植物提取物/药理;细胞株;Müller 细胞/药物作用;细胞缺氧;氧化应激;细胞生存/药物作用;凋亡/药物作用;人

**Protective effect of extract of ginkgo biloba on oxidative damage of human Müller cells** Sun Yanyan, Yang Xu, An Huijuan, Li Qingfu, Bao Yuzhou. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China  
Corresponding author: Bao Yuzhou, Email: baoyuzhou@126.com

**【Abstract】 Background** Oxidative stress is a pathophysiological process of retina, so it is very important to explore a protective way against retinal oxidative stress. Studies determined that extract of ginkgo biloba (EGb) has antioxidant, anti-apoptosis, anti-thrombosis and anti-inflammatory effects, however, the effect of EGb on human Müller cells in oxidative stress is still below understood. **Objective** This study was to investigate the protection of EGb against oxidative stress of human retinal Müller cells induced by  $As_2O_3$  *in vitro*. **Methods** Human retinal Müller

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.008

作者单位:450008 郑州,河南中医学院基础医学院(孙艳艳、李庆福);450052 郑州大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室(杨旭、安慧娟);450003 郑州,河南省眼科研究所 河南省立眼科医院(鲍玉洲)

通信作者:鲍玉洲, Email: baoyuzhou@126.com

cell line was cultured in DMEM/F12 with 10% fetal bovine serum (FBS), 2  $\mu\text{mol/L}$  glutamine and 1% antibiotics.  $\text{As}_2\text{O}_3$  solution at the final concentration 5 mg/L was added in the medium for 24 hours to establish oxidative models, and then the EGb with the final concentrations of 5, 10 and 20 mg/L was used to cell models for 24 hours, respectively. Cell viability was detected by MTT assay, and reactive oxygen species (ROS) levels in the cells were detected with CM-H2DCFDA fluorescent probe. The relative expression levels of caspase-3 mRNA in cytoplasm and cell nuclei were assayed by reverse-transcription PCR (RT-PCR), and the expressions of Nrf2 protein were quantitatively detected by Western blot. **Results** Müller cells adhered well 24 hours after cultured. At 6–7 days after culture, Müller cell body was large with abundant cytoplasm and mosaic-like arrangement. However, floating cells were seen after  $\text{As}_2\text{O}_3$  treatment. Cell viability (absorbance) was significantly different among the normal culture group,  $\text{As}_2\text{O}_3$ -treated group,  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb group,  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb group and  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb group, with the strongest viability in the normal culture group and the weakest viability in the  $\text{As}_2\text{O}_3$ -treated groups ( $F=163.57, P=0.00$ ). The fluorescence intensity of ROS was the weakest in the normal culture group and the strongest in the  $\text{As}_2\text{O}_3$ -treated group and was gradually weakened with the increase of EGb doses, showing a remarkable difference among the groups ( $F=4013.61, P=0.00$ ). The relative expression level of caspase-3 mRNA in the cells was gradually reduced with the increase of EGb doses, with a statistically significant difference among the groups ( $F=2199.72, P=0.00$ ). In addition, no considerable difference was seen in the expression level of Nrf2 protein (grey scale) in cytoplasm among the groups ( $F=15.42, P=0.40$ ); while in the nuclei, the expression levels of Nrf2 protein were  $100.01\pm0.04, 46.59\pm0.63, 54.51\pm0.62, 59.93\pm0.17$  and  $67.60\pm0.24$  in the normal culture group,  $\text{As}_2\text{O}_3$ -treated group and  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb group,  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb group,  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb group respectively, with a significant difference among them ( $F=7271.72, P=0.00$ ). **Conclusions** EGb can protect human retinal Müller cells against  $\text{As}_2\text{O}_3$ -induced damage in a dose-dependant manner by antioxidant and antiapoptotic effects *in vitro*, and the activities occur primarily in cell nucleus.

**[Key words]** Ginkgo biloba; Plant extracts/pharmacology; Cell line; Müller cells/drug effects; Cell hypoxia; Oxidative stress; Cell survival/drug effects; Apoptosis/drug effects; Humans

Müller细胞是视网膜神经胶质细胞,该细胞位于视网膜内核层的内中间区,细胞体可以向视网膜的内外侧发出遍布内界膜到外界膜的整个视网膜层的细长突起,包绕视网膜细胞中的视锥和视杆细胞、双极细胞以及视网膜神经节细胞的大部分神经元,且 Müller 细胞特化的足板附着于视网膜的毛细血管壁,参与血-视网膜屏障的构成。正常情况下, Müller 细胞线粒体内参与电子传递的氧气中有 0.1% ~ 5.0% 会转变为过氧化物,发挥供能、杀菌、清除毒素的作用并影响体内各种基因的转录和表达,参与机体各种重要生命活动的调节。因此, Müller 细胞损伤与视网膜疾病的发生密切相关。银杏叶提取物(extract of ginkgo biloba, EGb)是从银杏叶中提取的一类天然化合物,其有效成分主要是黄酮和银杏内酯<sup>[1-2]</sup>,具有抗氧化、抗凋亡、抗血栓、抗炎等多种功能<sup>[3]</sup>。但迄今关于 EGb 对视网膜氧化应激过程中的抗氧化作用研究较少。本研究拟探讨 EGb 对 Müller 细胞氧化应激损伤的保护作用,为视网膜损伤的修复治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人 Müller 细胞株(郑州博兴公司)。DMEM/F12

培养基(美国 Hyclone 公司);质量分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液(北京博奥拓科技有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司); $\text{As}_2\text{O}_3$  注射液(国药准字 H20030347,黑龙江哈尔滨医大药业有限公司);青霉素钠(国药准字 H21021677,本溪辽宁科泰生物基因制药股份有限公司);硫酸链霉素(国药准字 H13020649,山西太原药业有限公司);谷氨酰胺(上海化学试剂公司);EGb 注射液(国药准字 H42022870,上海禾融医药公司);逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)反应试剂盒(日本宝生物工程(中国)有限公司);caspase-3 引物(上海赛百盛生物科技股份有限公司合成);MTT、细胞质和细胞核蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物科技公司);活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(南京建成生物技术公司);小鼠抗人核因子相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)单克隆抗体(bs-1074R, 1:500)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(bs-0296G, 1:3000)(北京博奥森生物技术有限公司)。细胞培养皿、吸管(美国 Corning 公司);CO<sub>2</sub>细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 人 Müller 细胞的培养** 用含体积分数 10% FBS、2  $\mu\text{mol/L}$  谷氨酰胺和质量分数 1% 青链霉素双抗的 DMEM/F12 培养基作为生长培养基,将 Müller 细胞接种到 75  $\text{cm}^2$  培养瓶内,细胞密度为  $5 \times 10^5/\text{瓶}$ ,置于含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内培养,温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ 。待细胞长成单层后,用质量分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化细胞,按 1:2 或 1:3 分瓶传代。

**1.2.2 实验分组及方法** 实验分为 5 个组,每组 6 瓶细胞,细胞以  $5 \times 10^5/75 \text{ cm}^2$  的密度在培养瓶中进行培养,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理组细胞培养基内 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 终质量浓度为 5  $\text{mg/L}$ ,在加入 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 后 24 h 开始实验;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+5  $\text{mg/L}$  EGb 组先在细胞培养基中加入 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,置于 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 4 h,再加入终质量浓度为 5  $\text{mg/L}$  的 EGb,继续培养 24 h 后开始实验;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+10  $\text{mg/L}$  EGb 组培养液中同法添加 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 10  $\text{mg/L}$  EGb,继续培养 24 h;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+20  $\text{mg/L}$  EGb 组培养液中同法添加 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 20  $\text{mg/L}$  EGb,继续培养 24 h;阴性对照组细胞在常规培养液中培养,在相应时间点内仅往该组细胞培养液内加入同等剂量的 DME/F12 培养液,不添加 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 EGb。

**1.2.3 MMT 法测定细胞存活率** 参照文献[4]的方法进行细胞存活率的检测。细胞以  $5 \times 10^4/\text{孔}$  的密度接种至 96 孔板中,待细胞长满后,根据分组分别加入 5  $\text{mg/L}$  As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 5  $\text{mg/L}$ 、10  $\text{mg/L}$ 、20  $\text{mg/L}$  EGb,培养 24 h。首先吸去培养板内液体,用 37  $^{\circ}\text{C}$  PBS 漂洗 2 次,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  用生长培养液配制的 0.5  $\text{g/L}$  MTT 溶液,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下避光培养 4 h,弃上清,加入 150  $\mu\text{l}$  二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),轻轻振荡 10 min,使结晶颗粒充分溶解,以调零孔校正调零点,每个 96 孔培养板设 3 个调零孔,每组设 6 个复孔。用 490 nm 波长酶标仪测定吸光度(A)值。细胞存活率(%)=(实验组  $A_{490}$ -调零组  $A_{490}$ )/(对照组  $A_{490}$ -调零组  $A_{490}$ ) $\times 100\%$ ,实验重复 3 次,取其平均值。

**1.2.4 流式细胞仪测定细胞中 ROS 的表达** 各组细胞培养 24 h,弃培养液,加入 1 倍 PBS 洗涤 2 次,加入 1 ml 终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的荧光染料二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)的无血清培养液,于 37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀使探针和细胞充分接触。用无血清培养基洗涤细胞 3 次,充分除去未进入细胞内的 DCFH-DA。细胞刮板刮取细胞后,用 400  $\mu\text{l}$  PBS 吹打使细胞悬浮后上机,流式细胞仪激发波长设定为 488 nm,测定 ROS 的荧光强度。

**1.2.5 RT-PCR 法测定 caspase-3 mRNA 的表达** 按

照 1.2.2 的方法培养细胞和分组,加入 EGb 进行干预并继续培养后 24 h,用胰蛋白酶-EDTA 消化细胞,37  $^{\circ}\text{C}$  下用无菌生理盐水漂洗细胞 3 次,离心半径 3.5 cm,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,每支离心管内加入 1 ml Trizol,充分混匀后按操作说明提取总 RNA,RT-PCR 一步法检测细胞中 caspase-3 mRNA 的表达水平,用灰度值测定法计算 caspase-3 mRNA 的相对表达量。根据 NCBI 中人 caspase-3 和 GAPDH 的 RNA 序列设计引物,人 caspase-3 上游引物:5'-TGGAACAAATGGACCTGTTGA-3',下游引物:5'-TAATAACCAGGTGCTGTG GACT-3';GAPDH 上游引物:5'-GGACCTGACCTGCC GTCTA-3',下游引物:5'-TAGCCCAGGATGCCCTTG AG-3'。RT-PCR 反应体系包括 2 倍混合液 12.5  $\mu\text{l}$ ,上下游引物各 1.0  $\mu\text{l}$ ,模板总 RNA 1.0  $\mu\text{l}$ ,用无 RNA 酶去离子水补足至 25.0  $\mu\text{l}$ ,混匀后离心并上机扩增。反应条件:50  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min,94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 35 个循环。实验重复 3 次,取其平均值。

## 1.2.6 Western blot 法测定 Nrf2 蛋白质的表达水平

细胞培养及分组方法同 1.2.2。在加入 EGb 进行干预并继续孵育后 24 h,弃培养液,用 PBS 洗涤 2 次,用细胞刮刮取并收集细胞;用 PBS 漂洗 3 次,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞后按试剂盒操作说明,分别提取细胞核和细胞质蛋白质进行测定。以小鼠抗人 Nrf2 单克隆抗体作为一抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体作为二抗,小鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体为一抗作为内参,二抗同前。以灰度值作为评判指标,实验重复 3 次,取其平均值。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,采用 Origin 7.0 软件制作统计图表。本研究中各测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实均符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间样本均数经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组五水平实验设计,阴性对照组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理组及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+5  $\text{mg/L}$  EGb 组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+10  $\text{mg/L}$  EGb 组和 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+20  $\text{mg/L}$  EGb 组间各检测指标的总差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。采用双尾检验法,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞形态和增生活力

Müller 细胞复苏后贴壁良好,细胞体饱满并伸出短小伪足。细胞换液并生长 2~3 d 后进入分裂旺盛期,细胞增多并增大,呈现长梭形、三角形等,细胞突起



明显。培养 5 d 时细胞生长进入对数期,胞体呈现狭长梭形,细胞质丰富。培养 6~7 d 时,Müller 细胞的细胞体积较大,细胞质丰富,呈镶嵌样排列。5 mg/L  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理后部分细胞凋亡,呈卵圆形悬浮到培养液中。MTT 法测定结果表明,阴性对照组细胞活力( $A$  值)最高, $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组细胞活力最低,而  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb 组、 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb 组和  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb 组细胞活力随着 EGb 质量浓度的增加而逐渐增加,各组间总体比较差异有统计学意义( $F = 163.57$ ,  $P = 0.00$ );与  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组比较, $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb 组、 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb 组和  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb 组细胞活力逐渐增强,其  $A$  值增加,差异均有统计学意义( $t = -5.347$ 、 $-9.152$ 、 $-14.638$ , 均  $P < 0.001$ ) (表 1, 图 1)。

表 1 各组人 Müller 细胞存活率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

| 组别                                      | 样本量 | 人 Müller 细胞存活率         |
|-----------------------------------------|-----|------------------------|
| 阴性对照组                                   | 6   | $0.509 \pm 0.015$      |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ 处理组             | 6   | $0.332 \pm 0.007^a$    |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ + 5 mg/L EGb 组  | 6   | $0.354 \pm 0.008^{ab}$ |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ + 10 mg/L EGb 组 | 6   | $0.383 \pm 0.040^{ab}$ |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ + 20 mg/L EGb 组 | 6   | $0.445 \pm 0.011^{ab}$ |
| $F$                                     |     | 163.57                 |
| $P$                                     |     | 0.00                   |

注:与阴性对照组比较, $^a P < 0.05$ ;与  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组比较, $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验)  $\text{As}_2\text{O}_3$ :三氧化二砷;EGb:银杏叶提取物

## 2.2 各组细胞中 ROS 含量的变化

用流式细胞仪对各组细胞内 ROS 荧光强度的测定结果显示,阴性对照组细胞内 ROS 荧光最弱, $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组最强, $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb 组、 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb 组和  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb 组细胞内荧光强度强于阴性对照组,但弱于  $\text{As}_2\text{O}_3$  组。各组间细胞中 ROS

荧光强度值的总体比较差异有统计学意义( $F = 4\,013.61$ ,  $P = 0.00$ ),其中  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组、 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb 组、 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb 组和  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb 组细胞中 ROS 荧光强度值均明显高于阴性对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb 组、 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb 组和  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb 组细胞中 ROS 荧光强度值均明显低于  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ) (表 2, 图 2)。

表 2 各组 Müller 细胞 ROS 荧光强度的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

| 组别                                      | 样本量 | 荧光强度                    |
|-----------------------------------------|-----|-------------------------|
| 阴性对照组                                   | 6   | $5.886 \pm 0.377$       |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ 处理组             | 6   | $67.655 \pm 0.893^a$    |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ + 5 mg/L EGb 组  | 6   | $36.513 \pm 0.506^{ab}$ |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ + 10 mg/L EGb 组 | 6   | $26.730 \pm 0.298^{ab}$ |
| $\text{As}_2\text{O}_3$ + 20 mg/L EGb 组 | 6   | $22.700 \pm 0.814^{ab}$ |
| $F$                                     |     | 4\,013.61               |
| $P$                                     |     | 0.00                    |

注:与阴性对照组比较, $^a P < 0.05$ ;与  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组比较, $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验) ROS:活性氧簇; $\text{As}_2\text{O}_3$ :三氧化二砷;EGb:银杏叶提取物

## 2.3 各组细胞中 caspase-3 mRNA 的相对表达量

比较各组 Caspase-3 mRNA RT-PCR 扩增产物电泳条带相对灰度值发现  $\text{As}_2\text{O}_3$  组细胞中 caspase-3 mRNA 的相对表达量最高,阴性对照组细胞中 caspase-3 mRNA 的相对表达量最低,各 EGb 处理组 caspase-3 mRNA 表达量随 EGb 质量浓度的增加逐渐下降,各组间总体比较差异有统计学意义( $F = 2\,199.72$ ,  $P = 0.00$ ),其中  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L 组、 $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L 组和  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb 组细胞中 caspase-3 mRNA 的相对

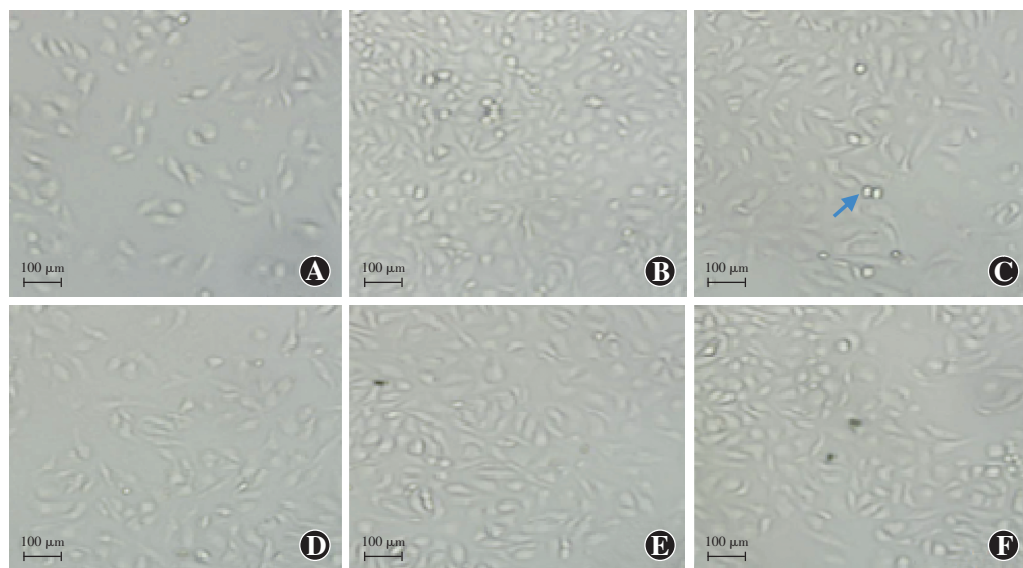


图 1 各组 Müller 细胞的生长情况 (标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) A: 正常 Müller 细胞接种后 24 h 贴壁 B: 正常细胞培养至第 5 天生长成单层 C:  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理细胞后 4 h 细胞明显少于正常的单层细胞,可见部分卵圆形的凋亡细胞 (箭头) D:  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb 组卵圆形凋亡细胞较  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组少 E:  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 10 mg/L EGb 组正常细胞量较  $\text{As}_2\text{O}_3$  处理组与  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 5 mg/L EGb 组多 F:  $\text{As}_2\text{O}_3$  + 20 mg/L EGb 组正常细胞量最多



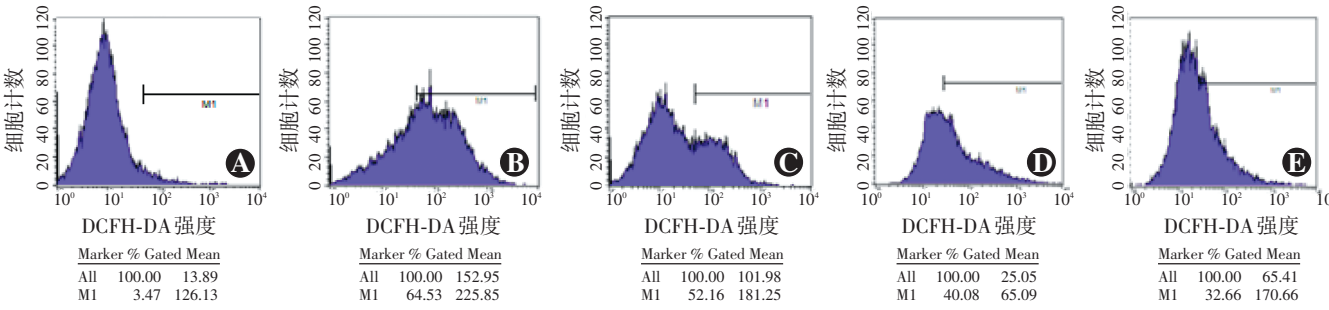


图2 EGb对Müller细胞ROS荧光强度的影响峰值图 A:阴性对照组主峰为正常细胞的ROS荧光强度吸收峰 B:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组可见ROS荧光强度吸收峰较阴性对照组右移 C:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+5 mg/L EGb组可见ROS荧光强度吸收峰较阴性对照组右移 D:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+10 mg/L EGb组ROS荧光强度吸收峰较阴性对照组右移,但较As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组左移 E:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+20 mg/L EGb组ROS荧光强度吸收峰较阴性对照组右移,但较As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组左移 DCFH-DA:二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯

表达量均明显低于As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )(图3,表3)。

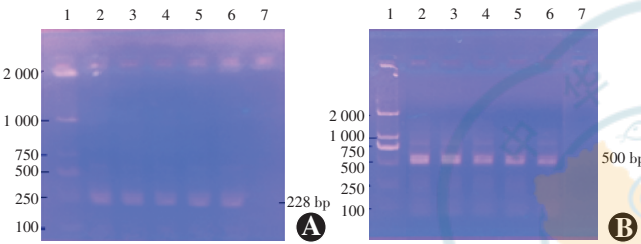


图3 RT-PCR法检测各组Müller细胞中caspase-3 mRNA的表达 A:各组Müller细胞中caspase-3 mRNA的表达电泳图 B:各组Müller细胞中GAPDH mRNA的表达电泳图 1:分子标志物 2:阴性对照组 3:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组 4:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+5 mg/L EGb组 5:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+10 mg/L EGb组 6:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+20 mg/L EGb组 7:空白对照组

| 表3 各组Müller细胞中caspase-3 mRNA的相对表达量的比较( $\bar{x}\pm s$ )                                                                                                                     |     |                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------|
| 组别                                                                                                                                                                          | 样本量 | caspase-3 mRNA 表达量        |
| 阴性对照组                                                                                                                                                                       | 3   | 1.999±0.402               |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 处理组                                                                                                                                          | 3   | 3.836±1.899 <sup>a</sup>  |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +5 mg/ml EGb组                                                                                                                                | 3   | 3.110±1.021 <sup>ab</sup> |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +10 mg/ml EGb组                                                                                                                               | 3   | 2.954±0.935 <sup>ab</sup> |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +20 mg/ml EGb组                                                                                                                               | 3   | 2.848±1.293 <sup>ab</sup> |
| F                                                                                                                                                                           |     | 2 199.72                  |
| P                                                                                                                                                                           |     | 0.00                      |
| 注:与阴性对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ;与As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 处理组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- <i>t</i> 检验) As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :三氧化二砷;EGb:银杏叶提取物 |     |                           |

2.3 各组细胞中Nrf2蛋白的表达量

Western blot检测显示,各组细胞质中Nrf2蛋白的表达无明显差异,而细胞核内Nrf2蛋白表达印迹明显不同,其中As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组细胞核内Nrf2蛋白印迹最弱,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+5 mg/L EGb组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+10 mg/L EGb组和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+20 mg/L EGb组细胞核内Nrf2蛋白印迹则随着EGb剂量的增加而逐渐增强(图4)。各组之间细胞质中Nrf2蛋白表达量(灰度值)的总体比较差异无

统计学意义( $F=15.42, P=0.40$ );而各组间细胞核中Nrf2蛋白的表达水平总体比较差异有统计学意义( $F=7 271.72, P<0.00$ ),其中随着EGb质量浓度的增加,细胞核中Nrf2蛋白的表达水平逐渐升高,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+5 mg/L EGb组、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+10 mg/L EGb组和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+20 mg/L EGb组细胞核中Nrf2蛋白表达的灰度值均明显高于As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )(图4,表4)。

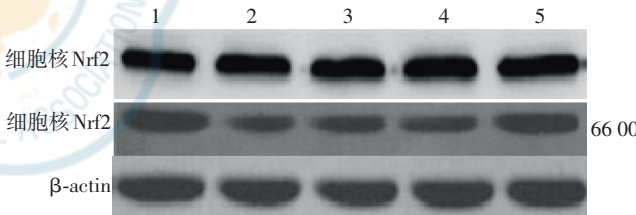


图4 Western blot法检测各组Müller细胞中Nrf2蛋白的表达 1:阴性对照组 2:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理组 3:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+5 mg/L EGb组 4:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+10 mg/L EGb组 5:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>+20 mg/L EGb组

| 表4 各组Müller细胞中Nrf2表达灰度值的比较( $\bar{x}\pm s$ )                                                                                                                                              |     |             |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------|-------------------------|
| 组别                                                                                                                                                                                        | 样本量 | 不同部位Nrf2灰度值 |                         |
|                                                                                                                                                                                           |     | 细胞质         | 细胞核                     |
| 阴性对照组                                                                                                                                                                                     | 3   | 5.02±0.27   | 5.00±0.04               |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 处理组                                                                                                                                                        | 3   | 4.99±0.27   | 2.32±0.63 <sup>a</sup>  |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +5 mg/L EGb组                                                                                                                                               | 3   | 4.98±0.44   | 2.72±0.62 <sup>ab</sup> |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +10 mg/L EGb组                                                                                                                                              | 3   | 5.02±0.56   | 2.99±0.17 <sup>ab</sup> |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> +20 mg/L EGb组                                                                                                                                              | 3   | 4.99±0.01   | 3.38±0.24 <sup>ab</sup> |
| F                                                                                                                                                                                         |     | 15.42       | 7 271.72                |
| P                                                                                                                                                                                         |     | 0.40        | 0.00                    |
| 注:与阴性对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ;与As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 处理组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- <i>t</i> 检验) Nrf2:核因子相关因子2;As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :三氧化二砷;EGb:银杏叶提取物 |     |             |                         |

3 讨论

自发现银杏叶中的银杏黄酮和银杏内酯等物质具有防治心脑血管和神经系统疾病的功能以来,对银杏

叶内有效成分的研究逐渐成为热点<sup>[1]</sup>。EGb 是银杏内酯和银杏黄酮组成的混合物质的总称,EGb 中的黄酮类化合物具有清除超氧阴离子( $O_2\cdot^-$ )、羟自由基( $OH\cdot$ )、一氧化氮(nitric oxide, NO)、脂质过氧化自由基等功能<sup>[5]</sup>。Ou 等<sup>[6]</sup>研究证实,黄酮多酚抗氧化功能主要是为细胞内线粒体氧化呼吸链提供电子,从而抑制氧自由基反应和脂质过氧化,进而阻碍丙二醛等毒性物质的生成。同时 EGb 还参与自由基反应酶活性的调节,减缓氧自由基和脂质过氧化对细胞的损伤。EGb 在体内可激活腺苷酸蛋白激酶系统,抑制血管内氧化型低密度脂蛋白的生成,降低 ROS 对血管内皮细胞的氧化应激损伤<sup>[6-7]</sup>。王振宇等<sup>[8]</sup>研究证实,EGb 可抑制 RGCs 的 caspase-3 活性,降低 RGCs 凋亡的风险。最新研究表明,EGb 对糖尿病视网膜病变、视网膜动脉硬化、慢性青光眼等均有一定疗效<sup>[9-10]</sup>,但其作用机制尚不清楚。本研究依据相关文献<sup>[11]</sup>及我们的预实验结果,选定 5 mg/L、10 mg/L 和 20 mg/L 3 个质量浓度进行实验,证明 EGb 能保护体外培养的人 Müller 细胞免受  $As_2O_3$  诱导的氧化应激损伤。

机体内 ROS 主要包括单线态氧( $O_2^1$ )和  $H_2O_2$  等,生理情况下,活性氧自由基的产生和清除处于动态平衡,任何原因导致 ROS 产生过多和/或抗氧化体系清除障碍均可引起机体氧化/抗氧化体系失衡,使机体组织细胞受到氧化损伤,处于氧化应激状态<sup>[12]</sup>。研究证实,Nrf2/ARE 通路是重要的内源性抗氧化应激通路<sup>[13]</sup>,ROS 是激活该通路的重要介质之一。Caspases 是介导细胞凋亡的调节基因家族,是细胞凋亡的启动者和执行者,其中 caspase-3 是该家族级联反应中最关键的凋亡执行蛋白酶,也是细胞凋亡最终的效应蛋白<sup>[14-15]</sup>。本研究中用流式细胞仪对处于氧化应激状态的 Müller 细胞中 ROS 进行检测,发现随着 EGb 质量浓度的增加,细胞中 ROS 含量逐渐降低,即细胞质 Nrf2 蛋白表达减弱,而细胞核中 Nrf2 蛋白的表达却逐渐增强,因此认为 EGb 可能通过多重的细胞信号途径对氧化应激状态的 Müller 细胞发挥保护作用。

临床上  $As_2O_3$  可用于抗肿瘤治疗,但对正常细胞有危害作用,因此常用于抗细胞凋亡的研究<sup>[16-19]</sup>。 $As_2O_3$  是氧化剂,对培养的 Müller 细胞具有致氧化损伤的作用,因其稳定且不易分解,故本研究中利用其诱导体外培养的人 Müller 细胞来制备氧化应激损伤细胞模型。本研究中结果证实, $As_2O_3$  刺激 Müller 细胞时,EGb 能够下调 caspase-3 的表达,调节氧化应激状态下细胞中 Nrf2 蛋白的表达,进一步证明 EGb 对  $As_2O_3$  诱导的 Müller 细胞氧化应激损伤的保护作用是多靶点的,

涉及不同的信号传导机制,但其具体的作用通路及作用机制仍有待进一步研究证实。

## 参考文献

- [1] Hitznerberger G. The effect of ginkgo biloba special extract (EGb 761, Tebfortan) [J]. Wien Med Wochenschr, 1992, 142 (17): 371-379.
- [2] Christen Y, Maixent JM. What is Ginkgo biloba extract EGb 761? An overview-from molecular biology to clinical medicine [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2002, 48 (6): 601-611.
- [3] Gertz HJ, Kiefer M. Review about Ginkgo biloba special extract GBE761 (ginkgo) [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10 (3): 261-264.
- [4] 郭敬,柯敏,文小凤. 高糖对体外培养的视网膜 Müller 细胞活性的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30 (9): 791-794. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.09.006.
- [5] Yan FL, Zheng Y, Zhao FD. Effects of ginkgo biloba extract EGb761 on expression of RAGE and LRP-1 in cerebral microvascular endothelial cells under chronic hypoxia and hypoglycemia [J]. Acta Neuro Pathol, 2008, 116 (5): 529-535. doi:10.1007/s00401-008-0435-6.
- [6] Ou HC, Lee WJ, Lee IT, et al. Ginkgo biloba extract attenuates oxLDL-induced oxidative functional damages in endothelial cells [J]. J Appl Physiol, 2009, 106 (5): 1674-1685. doi:10.1152/jappphysiol.91415.2008.
- [7] Ou HC, Hsieh YL, Yang NC, et al. Ginkgo biloba extract attenuates ox LDL-induced endothelial dysfunction via an AMPK-dependent mechanism [J]. J Appl Physiol, 2013, 114 (2): 274-285. doi:10.1152/jappphysiol.00367.2012.
- [8] 王振宇,莫晓芬,蒋旭花. 银杏内酯 B 通过抑制视网膜神经节细胞凋亡促进其轴突生长 [J]. 生理学报, 2012, 64 (4): 417-424. doi:10.13294/j.aps.2012.04.005.
- [9] 马金力,朱成义. 舒血宁注射液治疗单纯性糖尿病视网膜病变的临床效果 [J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2012, 14 (5): 312-316. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2012.05.014.
- [10] 刘伟,李红. 银杏叶提取物的药理作用及其在眼科疾病的临床研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2008, 8 (8): 1647-1649.
- [11] 王登科,张海宇,孙征,等. 银杏叶提取物对大鼠脑出血后早期血肿周围神经元凋亡的作用 [J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33 (6): 537-539. doi:10.3969/j.issn.1674-6309.2011.06.011.
- [12] Nguyen T, Sherratt PJ, Piekett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element [J]. Annual Rev Pharmacol Toxicol, 2003, 43: 233-260. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229.
- [13] Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents [J]. Methods Mol Biol, 2010, 647: 37-74. doi:10.1007/978-1-60761-738-9\_3.
- [14] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [J]. Science, 1997, 275 (5303): 1129-1132. doi:10.1126/science.275.5303.1129.
- [15] Yamamoto T, Nishioka K. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma [J]. J Invest Dermatol, 2004, 122 (1): 44-50. doi:10.1046/j.0022-202X.2003.22121.x.
- [16] 孟永,黄丽琴,郑健樑,等. 三氧化二砷诱导的视网膜母细胞瘤 SO-Rb50 细胞自噬的研究 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30 (12): 1060-1064. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.12.002.
- [17] 张少波,周仲楼,孙敏. 三氧化二砷对表皮生长因子诱导的视网膜色素上皮细胞增生和迁移的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30 (6): 520-524. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.06.009.
- [18] 李伟军,张晓梅,王彬杰. 三氧化二砷对兔视网膜色素上皮细胞 DNA 损伤的研究 [J]. 眼科研究, 2010, 28 (2): 130-133. doi:10.3969/j.issn.1003-0808.2010.02.008.
- [19] 张红,刘平,于辉. 三氧化二砷诱导人晶状体上皮细胞凋亡的机制研究 [J]. 中华眼科杂志, 2008, 44 (10): 916-920.

(收稿日期:2015-04-15)

(本文编辑:尹卫靖)