

银杏内酯 B 对高糖诱导人晶状体上皮细胞凋亡的影响

王彦红, 兰天野, 陈婷, 刘平, 林丽丽

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30973275)

作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 王彦红, 护师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 林丽丽, 硕士, 主管护师, 研究方向: 白内障。

liuping3958@163.com

收稿日期: 2016-03-09 修回日期: 2016-06-03

Effect of ginkgolide B on high glucose-induced human lens epithelial cell apoptosis

Yan-Hong Wang, Tian-Ye Lan, Ting Chen, Ping Liu, Li-Li Lin

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30973275)

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Li-Li Lin. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liuping3958@163.com

Received: 2016-03-09 Accepted: 2016-06-03

Abstract

• **AIM:** To study the effect of ginkgolide B on high glucose-induced human lens epithelial cell (HLEC) apoptosis.

• **METHODS:** The high glucose-induced HLEC model was established. Different concentrations of ginkgolide B were intervened. Cell viability was assayed by MTT assay, morphology of cell apoptosis was observed by hochest33258 staining. Cell ultrastructural changes were detected by transmission electron microscopy. Expressions of apoptosis-related factors caspases-3 and caspase-9 were tested by colorimetric detection.

• **RESULTS:** High glucose inhibited the activity of HLECs, induced apoptosis reaction of HLECs, caused high expression of apoptosis factors in cells; while ginkgolide B inhibited the decrease of cell viability induced by high glucose, decreased the HLEC apoptosis and reduced the expression of apoptosis factors Caspase-3 and Caspase-9.

• **CONCLUSION:** Ginkgolide B may inhibit the expression of caspases-3 and caspase-9 then effectively inhibited high glucose-induced apoptosis in HLECs.

• **KEYWORDS:** ginkgolide B; high glucose; lens epithelial cells; apoptosis

Citation: Wang YH, Lan TY, Chen T, *et al.* Effect of ginkgolide B on high glucose-induced human lens epithelial cell apoptosis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(7):1242-1244

摘要

目的: 探讨银杏内酯 B 对高糖诱导的人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLECs) 凋亡的影响。

方法: 建立高糖诱导的 HLECs 模型, 用不同浓度的银杏内酯 B 干预, MTT 比色法检测细胞存活率, Hochest33258 染色观察凋亡细胞形态, 透射电镜观察细胞内超微结构变化, 比色法检测凋亡相关因子 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达。

结果: 高浓度葡萄糖可抑制 HLECs 活性, 诱导 HLECs 发生凋亡, 引起细胞内 Caspase-3 及 Caspase-9 表达水平升高; 银杏内酯 B 能明显抑制高糖诱导的 HLECs 活力的下降, 降低细胞凋亡率, 减少高糖所致 HLECs 细胞内 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达。

结论: 银杏内酯 B 可能通过抑制 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达而有效抑制了高糖诱导的 HLECs 凋亡。

关键词: 银杏内酯 B; 高糖; 晶状体上皮细胞; 凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.7.09

引用: 王彦红, 兰天野, 陈婷, 等. 银杏内酯 B 对高糖诱导人晶状体上皮细胞凋亡的影响. *国际眼科杂志* 2016;16(7):1242-1244

0 引言

糖尿病是一种因体内胰岛素分泌不足或相对缺乏而导致的一系列临床综合征。糖尿病慢性并发症严重威胁人类健康, 其中糖尿病性白内障已成为糖尿病并发症中仅次于视网膜病变的第二大眼病^[1]。银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 为银杏叶中的主要成分, 是血小板活化因子和钙通道拮抗剂, 具有减轻栓塞及缺血所致的各类异常炎症反应的作用, 已应用于治疗心血管系统疾病^[2-3]。有研究证实, 银杏内酯 B 可对实验性糖尿病大鼠血管系统发挥保护作用^[4], 在眼部, 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, 从而发挥视神经保护作用^[5], 但是对传代培养的 HLECs 影响的研究很少。本研究通过体外培养 HLECs, 观察银杏内酯 B 干预后高葡萄糖浓度下 HLECs 形态及生长情况的变化, 探讨银杏内酯 B 对 HLECs 凋亡的抑制作用, 为糖尿病性白内障的发病机制及防治提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 HLECs (ATCC 公司), 银杏内酯 B (北京索来宝科技有限公司, 纯度 >99%), 胎牛血清、DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), MTT 试剂盒 (上海伯奥生物制品公司), Hochest33258 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司), Caspase-3、Caspase-9 活性检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 HLECs 培养 HLECs 培养在含链霉素 100 μg/mL、青霉素 100 U/mL 的 DMEM 培养基中, 胎牛血清浓度为

10%,培养箱内 CO₂ 体积分数为 5%,温度为 37℃,细胞接种密度为 5×10⁵/mL,维持细胞生长密度为 80%~90%,每 3~5d 传代 1 次。

1.2.2 实验分组 实验共分 4 组:(1)阴性对照组:以正常培养液培养。(2)氧化损伤组:30mmol/L 葡萄糖溶液作用 12h。(3)银杏内酯 B 组:加入银杏内酯 B 作用 24h 之后,加入 30mmol/L 葡萄糖溶液作用 12h,依银杏内酯 B 浓度不同分为两个亚组(1mol/L 和 10mol/L)。

1.2.3 MTT 比色法检测各组 HLECs 细胞活力 细胞接种于 96 孔板中,接种密度为 1×10⁵/mL,培养 24h 后,向各孔细胞中加入 20μL MTT(5g/L),温育 4h,去除培养液后加入 200μL DMSO 溶液,室温下振荡 10min 后,用酶标仪测定各孔 570nm 的光密度值,细胞活力=(各组细胞光密度值/正常组细胞光密度值)×100%。

1.2.4 透射电子显微镜观察各组 HLECs 超微结构的变化 4℃下用 2.5% 戊二醛溶液固定各组细胞 24h,1% 锇酸后固定,PBS 洗涤细胞 2 次,醋酸铀快染,乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,切片剂切片后用柠檬酸、醋酸铀双重染色,观察细胞内结构改变。

1.2.5 Hoechst33258 染色观察 HLECs 凋亡细胞形态 细胞经相应处理后用 PBS 洗涤细胞 2 次,在 150μL 的 Binding Buffer 中加入 2μL Hoechst 染液,避光、室温反应 5min 后置于荧光显微镜下观察,正常细胞核表现为暗蓝色,凋亡细胞的细胞核为亮蓝色。

1.2.6 比色法检测各组 HLECs 中 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性 收集细胞并用 1g/L 胰酶消化,1200r/min 离心 10min,收集细胞并用 PBS 冲洗 2 次,每份样品加 30μL 细胞裂解液,冰上孵育 20min,10 000r/min 离心 10min,进行 Caspase-3 和 Caspase-9 活性检测,检测方法按 Caspase-3、Caspase-9 活性检测试剂盒进行。
Caspase 活性 = OD_{405nm}/OD_{595nm}。

统计学分析:采用 SPSS 11.5 软件对实验数据进行分析,实验结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,多组间比较用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 银杏内酯 B 对 HLECs 活性的影响 阴性对照组细胞活性为 98.67%±3.44%,葡萄糖干预后细胞活性下降到 32.67%±3.63%,与阴性对照组比较差异具有统计学意义($F = 1.56, P < 0.01$)。用不同浓度银杏内酯 B 处理后,HLECs 活性分别提高到 48.67%±3.32% 和 59.00%±3.57%,与氧化损伤组比较差异具有统计学意义($F = 3.10, 1.72, P < 0.05$,图 1)。

2.2 各组 HLECs 超微结构的变化 阴性对照组 HLECs 形态完整,核膜连续,核仁呈椭圆形(图 2A);30mmol/L 葡萄糖诱导的 HLECs 膜膜不清晰,细胞明显膨胀,胞内线粒体出现空泡及变性,细胞核亦膨胀明显(图 2B);不同浓度的银杏内酯 B 处理后,HLECs 超微结构损害程度依次减轻,逐渐可看到细胞内细胞器结构,尤其是高剂量组作用明显(图 2C~D)。

2.3 银杏内酯 B 对高糖诱导 HLECs 凋亡的影响 Hoechst33258 核染色法显示,阴性对照组未见明显凋亡染色的细胞核;氧化损伤组凋亡细胞明显增多,细胞核荧光较强,呈致密浓染;给予不同浓度的银杏内酯 B 作用后凋

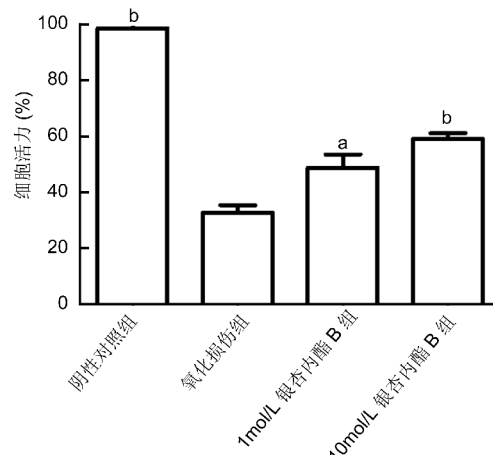


图 1 MTT 法检测银杏内酯 B 对高糖诱导的 HLECs 活力的影响 ^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 氧化损伤组。

亡细胞减少,与氧化损伤组比较差异具有统计学意义($F = 1.25, 8.71, P < 0.05$),且细胞核形态改善,荧光强度逐渐减弱(图 3,4)。

2.4 银杏内酯 B 对高糖诱导 HLECs 凋亡相关蛋白表达的影响 由表 1 可知,HLECs 经葡萄糖处理后,Caspase-3 和 Caspase-9 的表达明显增加,与阴性对照组比较差异具有显著统计学意义($F = 2.17, 1.66, P < 0.01$)。给予不同浓度银杏内酯 B 处理后,Caspase-3 和 Caspase-9 表达量下降,与氧化损伤组比较差异具有统计学意义($F = 2.54, 1.73, P < 0.05$)。

3 讨论

抗氧化剂银杏内酯 B 是一种天然抗氧化剂,在保护心肌、抗休克、改善脑缺血-再灌注、急性胰腺炎的救治方面发挥重要作用。国内外大量研究已经证实银杏内酯 B 能减轻细胞凋亡与损伤,清除自由基、抗脂质过氧化,从而发挥对组织的保护作用^[6-7]。李爽乐等^[8]曾经报道过银杏叶提取物通过增加 Bcl-2 蛋白表达,减少 Bcl-2/Bax 表达,阻止氧化损伤所致的 SD 大鼠晶状体上皮细胞凋亡。但是关于银杏内酯 B 对 HLECs 氧化损伤的保护作用鲜有报道。高糖是糖尿病性白内障患者晶状体混浊的主要诱发因素。研究证实,高糖环境促使机体处于氧化应激状态,机体的抗氧化防御系统被严重削弱,晶状体受到氧化剂的攻击,致使晶状体蛋白质发生氧化损伤,最终发生晶状体混浊^[9]。本实验中,细胞活力检测结果显示高糖处理的 HLECs 活力明显降低,凋亡染色证实高糖明显增加了 HLECs 凋亡数量;电镜观察细胞超微结构显示,经高糖处理的细胞,其结构损伤明显,但是经过银杏内酯 B 预处理的细胞,其活力得到不同程度的改善,凋亡细胞数量减少,细胞形态逐渐改善,说明该药物在一定程度上能够抑制高糖诱导的细胞损伤,而且对细胞的保护作用呈剂量依赖性。

Caspase-3 和 Caspase-9 是细胞凋亡通路的重要启动者和参与者^[10]。我们的研究结果显示,30mmol/L 葡萄糖作用 HLECs 后,两种凋亡因子的表达量均明显上升,而予以银杏内酯 B 处理后,Caspase-3 和 Caspase-9 表达减少,其下降趋势与银杏内酯 B 的剂量呈正相关,表明银杏内酯 B 确实能抑制 HLECs 的凋亡,并且抗凋亡作用主要是通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 激活实现的。

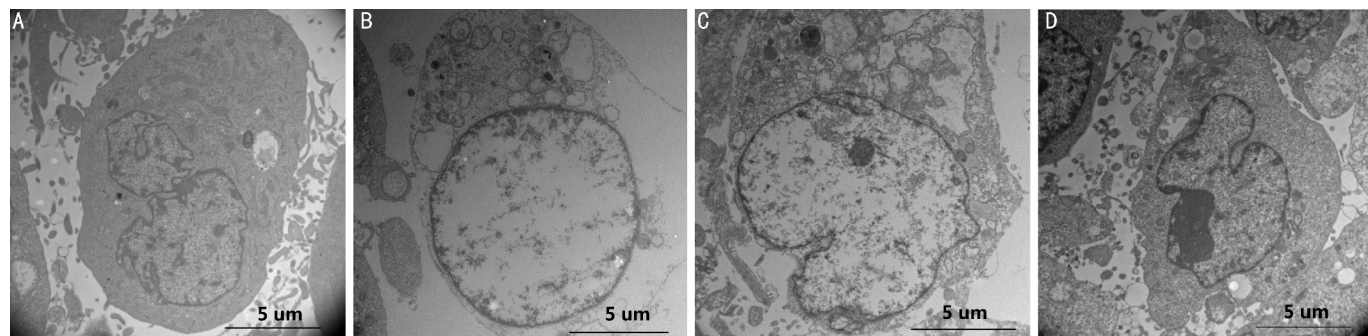


图2 透射电镜观察各组 HLECs 超微结构改变 A: 阴性对照组; B: 氧化损伤组; C: 1mol/L 银杏内酯 B 组; D: 10mol/L 银杏内酯 B 组。

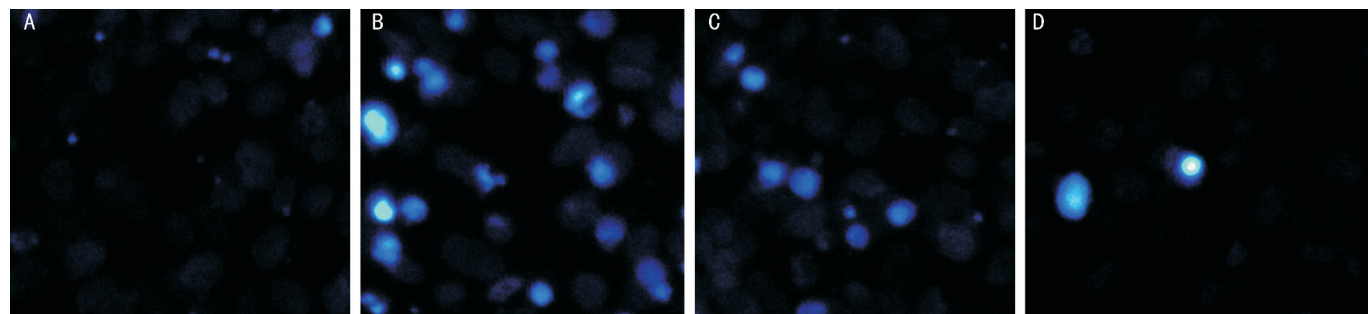


图3 银杏内酯 B 对氧化损伤致 HLECs 凋亡的抑制作用 ($\times 200$) A: 阴性对照组; B: 氧化损伤组; C: 1mol/L 银杏内酯 B 组; D: 10mol/L 银杏内酯 B 组。

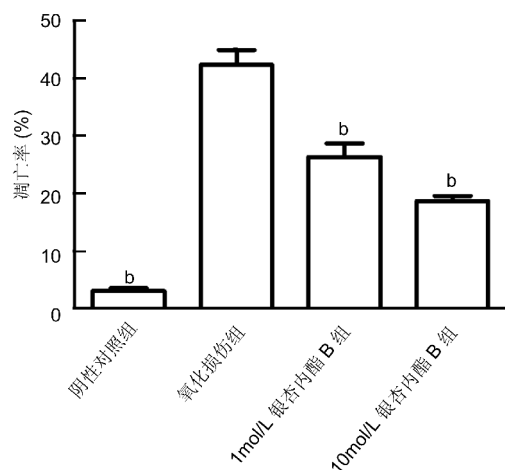


图4 银杏内酯 B 对氧化损伤致 HLECs 凋亡抑制率的影响 ^b $P < 0.01$ vs 氧化损伤组。

表1 银杏内酯 B 对高糖致 HLECs 损伤 Caspase-3 和 Caspase-9 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, U/mL$)

组别	Caspase-3	Caspase-9
阴性对照组	77.86 \pm 3.45	105.54 \pm 4.23
氧化损伤组	137.65 \pm 3.48 ^b	148.42 \pm 3.53 ^b
1mol/L 银杏内酯 B 组	110.34 \pm 2.63	128.40 \pm 4.17
10mol/L 银杏内酯 B 组	93.29 \pm 3.73 ^a	107.73 \pm 3.21 ^a

注: ^a $P < 0.05$ vs 氧化损伤组; ^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组。

综上所述,银杏内酯 B 对高糖诱导的 HLECs 凋亡具有一定的抑制作用,抑制效应与药物浓度有关,从而可能减少 HLECs 细胞凋亡及由此引起的病理损害。本研究结

果提示了银杏内酯 B 在白内障防治方面的运用潜力,为氧化应激相关晶状体疾病的防治提供新的实验证据。

参考文献

- 1 Chu CJ, Johnston RL, Buscombe C, et al. Risk factors and incidence of macular edema after cataract surgery: a database study of 81984 Eyes. *Ophthalmology* 2016;123(2):316-323
- 2 Zhang C, Tian X, Luo Y, et al. Ginkgolide B attenuates ethanol-induced neurotoxicity through regulating NADPH oxidases. *Toxicology* 2011;287(1-3):124-130
- 3 Yang ZZ, Li J, Li SX, et al. Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats. *J Ethnopharmacol* 2011;136(1):117-122
- 4 闵志雪,包鹏举,崔凤娟,等. 银杏内酯 B 对实验性糖尿病血管病变的保护作用. *医学理论与实践* 2012;25(21):2616-2618
- 5 王振宇,莫晓芬,蒋旭花,等. 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. *生理学报* 2012;64(4):417-424
- 6 Nagahora N, Ito Y, Nagasawa T. Dietary Chinese quince polyphenols suppress generation of α -dicarbonyl compounds in diabetic KK-A(y) mice. *J Agric Food Chem* 2013;61(27):6629-6635
- 7 Ji RL, Xia SH, Di Y, et al. Mechanism and dose-effect of Ginkgolide B on severe acute pancreatitis of rats. *World J Gastroenterol* 2011;17(17):2241-2247
- 8 李爽乐,罗清礼,李正时,等. 银杏叶提取物对 H_2O_2 诱导的晶状体上皮细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响. *国际眼科杂志* 2006;6(4):786-788
- 9 Samanta A, Kumar P, Machhua S, et al. Incidence of cystoid macular oedema in diabetic patients after phacoemulsification and free radical link to its pathogenesis. *Br J Ophthalmol* 2014;98(9):1266-1272
- 10 Li X, Qi Z, Zhao L, et al. Astaxanthin reduces type 2 diabetic associated cognitive decline in rats via activation of PI3K/Akt and attenuation of oxidative stress. *Mol Med Rep* 2016;13(1):973-979