

# EGCG 诱导人视网膜色素上皮细胞凋亡作用的研究

邱梅园, 丁芝祥, 靳 荷, 蒋姣姣

引用: 邱梅园, 丁芝祥, 靳荷, 等. EGCG 诱导人视网膜色素上皮细胞凋亡作用的研究. 国际眼科杂志 2022;22(8):1257-1261

基金项目: 桂林市科学研究与技术开发计划项目 (No.20210227-7-6); 中青年教职工科研能力提升项目 (No.2018glmcy068)

作者单位: (541001) 中国广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院眼科

作者简介: 邱梅园, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 眼底病的基础研究。

通讯作者: 邱梅园. 153734451@qq.com

收稿日期: 2021-09-22 修回日期: 2022-07-15

## 摘要

目的: 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 凋亡的影响及其机制。

方法: 体外培养 ARPE-19, 分别采用 0、40、80、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGCG 处理。处理预定时间后分别用 hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡形态学变化; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; 实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blotting 检测细胞凋亡相关因子 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (bcl-2)、BCL2-Associated X 的蛋白质 (Bax)、胱天蛋白酶-3 (caspase-3) 和 p53 的表达。

结果: hoechst 33258 染色结果发现 ARPE-19 随着 EGCG 药物浓度的增加, 凋亡细胞数量逐渐增多, 可见明显的凋亡小体; 流式细胞仪结果显示随着 EGCG 药物浓度的升高, 凋亡率逐渐增高, 40、80、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  凋亡率分别为 4.95%  $\pm$  0.071%、11.75%  $\pm$  0.075% 和 21.25%  $\pm$  0.919% 与对照组 (2.8%  $\pm$  1.556%) 相比有差异 ( $P < 0.01$ ), 呈现出药物浓度依赖性; 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果表明 EGCG 能明显上调凋亡促进因子 Bax、caspase-3 和 p53 的 mRNA 和蛋白表达, 同时下调凋亡抑制因子 bcl-2 的表达, 均呈现浓度依赖性。

结论: EGCG 能明显诱导 ARPE-19 发生凋亡, 其机制与抑制 bcl-2 的表达, 增强 Bax、caspase-3 和 p53 的表达有关。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG); 人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19); 凋亡; B 淋巴细胞瘤-2 基因 (bcl-2); BCL2-Associated X 的蛋白质 (Bax); 胱天蛋白酶-3 (caspase-3); p53

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.8.04

## Study on the apoptosis of human retinal pigment epithelium cells induced by EGCG

Mei-Yuan Qiu, Zhi-Xiang Ding, He Jin, Jiao-Jiao Jiang

Foundation items: The Scientific Research and Technology Development Program in Guilin (No.20210227-7-6); Research

Ability Improvement Project for Young Faculty (No.2018glmcy068) Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Mei-Yuan Qiu. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 153734451@qq.com Received: 2021-09-22 Accepted: 2022-07-15

## Abstract

• AIM: To investigate the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on the apoptosis of human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells and its mechanism.

• METHODS: The ARPE-19 cells were cultured *in vitro* and treated with 0, 40, 80 and 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGCG, respectively. At the proposed time of treatment the morphological changes were detected by hoechst 33258 staining. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis-related factors B lymphocytoma-2 gene (bcl-2), BCL2-Associated X protein (Bax), caspase-3 and p53 were detected by quantitative RT-PCR and Western blotting.

• RESULTS: Hoechst 33258 staining showed that the ARPE-19 cells with the increase of EGCG drug concentration, the number of apoptotic cells gradually increased and the apoptotic bodies were observed. Flow cytometry showed that the apoptosis rate increased gradually with the increase of EGCG drug concentration. The apoptosis rates at 40, 80 and 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were 4.95%  $\pm$  0.071%, 11.75%  $\pm$  0.075% and 21.25%  $\pm$  0.919% respectively, which was significantly different compared with the control group (2.8%  $\pm$  1.556%) ( $P < 0.01$ ), presented with a drug concentration-dependent. The results of quantitative PCR and Western blotting showed that EGCG could significantly up-regulate the expression of apoptosis-promoting factors Bax, caspase-3 and the mRNA and protein expression of p53, and down-regulate the apoptosis-inhibiting factor bcl-2, all of these showed concentration-dependent effects.

• CONCLUSION: EGCG can obviously induce the apoptosis of ARPE-19 cells. The mechanism is related with the inhibition of bcl-2 and increase the expression of Bax, caspase-3 and p53.

• KEYWORDS: epigallocatechin gallate (EGCG); human retinal pigment epithelium cells (ARPE-19); apoptosis; B lymphocytoma-2 gene (bcl-2); BCL2-Associated X protein (Bax); caspase-3; p53

Citation: Qiu MY, Ding ZX, Jin H, et al. Study on the apoptosis of human retinal pigment epithelium cells induced by EGCG. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(8):1257-1261

## 0 引言

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞是视网膜神经细胞和脉络膜之间的单层上皮细胞层,对视网膜的内在平衡至关重要。它构成了视网膜生物屏障,对神经视网膜的光感受器有支持作用,此外也具有运输营养物质及免疫赦免等功能<sup>[1]</sup>。因此,RPE的异常变化会引起其功能紊乱,导致光感受器的退化及视力的丧失,最终导致增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 或年龄相关性黄斑变性等疾病的发生。PVR是视网膜脱离的并发症之一,其主要原因是由于RPE细胞、巨噬细胞和纤维母细胞等的大量增殖,其中RPE细胞的增殖被认为是PVR发生发展最主要的原因,RPE细胞异常增生使其迁移至玻璃体腔和玻璃体视网膜膜交界处,逐渐形成视网膜前膜,进而牵拉视网膜,最终导致视网膜脱离及视力损害。此外,在PVR发展之前,RPE细胞异常增殖及迁移的相关表型也难以回到正常状态。因此,如何控制PVR的发展仍是一个难题。近年来,PVR的研究热点是借助细胞凋亡途径控制RPE细胞的增殖,或施加凋亡诱导剂,使增殖及迁移的细胞发生凋亡,进而遏制PVR的进展。绿茶多酚提取物表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 是绿茶多酚提取物儿茶素 (catechin) 的主要成分,约占儿茶素的80%,具有很强的抗氧化能力。同时,研究表明低浓度EGCG对紫外线等因素引起的RPE细胞凋亡具有抵抗作用。而EGCG单独使用对RPE细胞起到什么作用尚不清楚。本实验应用不同浓度EGCG作用于体外培养的人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19),探讨EGCG对RPE细胞的促/抗凋亡作用,并观察其对凋亡相关因子B淋巴细胞瘤-2基因 (bcl-2)、BCL2-Associated X的蛋白质 (Bax)、胱天蛋白酶-3 (caspase-3) 等因子的 mRNA 及蛋白水平的影响,评价EGCG对PVR早期防治的应用价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** EGCG (中国药品生物制品检定所); ARPE-19株购买于武汉大学细胞库中国典型培养物保藏中心 (武汉); 青链霉素混合液 (100×) (含青霉素 10U/L, 含链霉素 10μg/L) 购自武汉博士德生物公司; DMEM 培养基、小牛血清和胰蛋白酶均购自 GIBCO 公司; 鼠抗 β-actin 单克隆抗体 (上海碧云天); 兔抗 bcl-2、caspase-3、p53 多克隆抗体 (abcam 公司); 兔抗 Bax 多克隆抗体 (abmart)、ECL 试剂盒 (美国伯乐公司)。Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司), 蛋白定量分析试剂盒 (上海碧云天生物有限公司)。流式细胞仪 (美国 BD FACScan); 倒置荧光显微镜 IX-71 (日本 Olympus 公司); 细胞培养箱 (美国 thermo 公司); 冷冻高速离心机 (美国 thermo 公司), 蛋白电泳及转印系统 (美国伯乐公司), 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 EGCG 溶液配制** 将 EGCG 用 PBS 配制成 16mg/mL 的母液, 0.22μm 的滤膜过滤除菌, 用完全培养基稀释成 40、80、160μg/mL 三个浓度。

**1.2.2 ARPE-19 细胞株培养** 调整密度为每毫升  $5 \times 10^4$  个细胞接种到培养瓶中, 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培

养, 培养基为含 10% 胎牛血清、青霉素 (100U/mL)、链霉素 (100μg/mL) 的 DMEM 培养基。

**1.2.3 hoechst 33258 荧光染色** 取对数生长期的 ARPE-19, 以每孔  $4 \times 10^4$  个细胞种于 6 孔板内, EGCG 干预 48h 后, 将 6 孔板内的培养基吸出, PBS 洗两遍, 4% 的多聚甲醛室温固定 15min, PBS 洗两遍后, 加入用 PBS (1:1 000) 稀释 hoechst 33258, 37℃ 孵育 20min。PBS 洗两遍后, 荧光显微镜下观察拍照, 注意操作时动作轻柔, 以免凋亡细胞被洗掉。

**1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率** EGCG 处理细胞 48h 后, 胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤后离心, 转移到 1.5mL EP 管内, 先将 10× 结合缓冲液用去离子水稀释成 1× 结合缓冲液, 每管加 100μL 稀释好的结合缓冲液, 各加入 5μL Annexin V-FITC 和 PI, 室温避光染色 30min, 再加入 100μL 稀释好的结合缓冲液, 筛网过滤, 流式细胞仪测定细胞凋亡率。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测细胞 Bax 和 caspase-3 及 p53 的 mRNA 表达** EGCG 处理细胞 48h 后收集细胞, 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, ABI7500fast 荧光定量 PCR 仪上机检测, 反应条件: 50℃ 2min, 94℃ 15min; 94℃ 15s, 60℃ 1min (采集荧光), 40 个循环。将 β-actin 设为内参, 正常组设为 1, 以 p53, Bax, caspase-3 的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  反映目的基因 mRNA 相对表达水平。

**1.2.6 Western blot 法检测细胞蛋白表达** 收集 EGCG 处理 48h 后的细胞, PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, 离心取上清, BCA 方法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 胶电泳后, 将蛋白转移至 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h, 加入 bcl-2、Bax、caspase-3 和 p53 的一抗 (1:1000) 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 β-actin 作为内参, 用目的蛋白灰度值/内参灰度值反映蛋白的相对表达水平, 实验重复 3 次。

统计学分析: 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较首先采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 hoechst 33258 荧光染色** hoechst 33258 染色观察是否有凋亡小体的出现, 结果发现随着 EGCG 浓度的升高, 凋亡细胞也逐渐增多, 荧光染色变高亮浓缩, 并可见明显的凋亡小体, 见图 1。

**2.2 流式细胞仪检测不同浓度 EGCG 诱导 ARPE-19 凋亡情况** 不同浓度 EGCG 组间凋亡率比较差异有统计学意义 ( $F = 168.409, P < 0.01$ ), 见表 1。组间的两两比较采用 LSD-t 检验, 80、160μg/mL 组与对照组和 40μg/mL 组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 80μg/mL 组与 160μg/mL 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 40μg/mL 组与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。

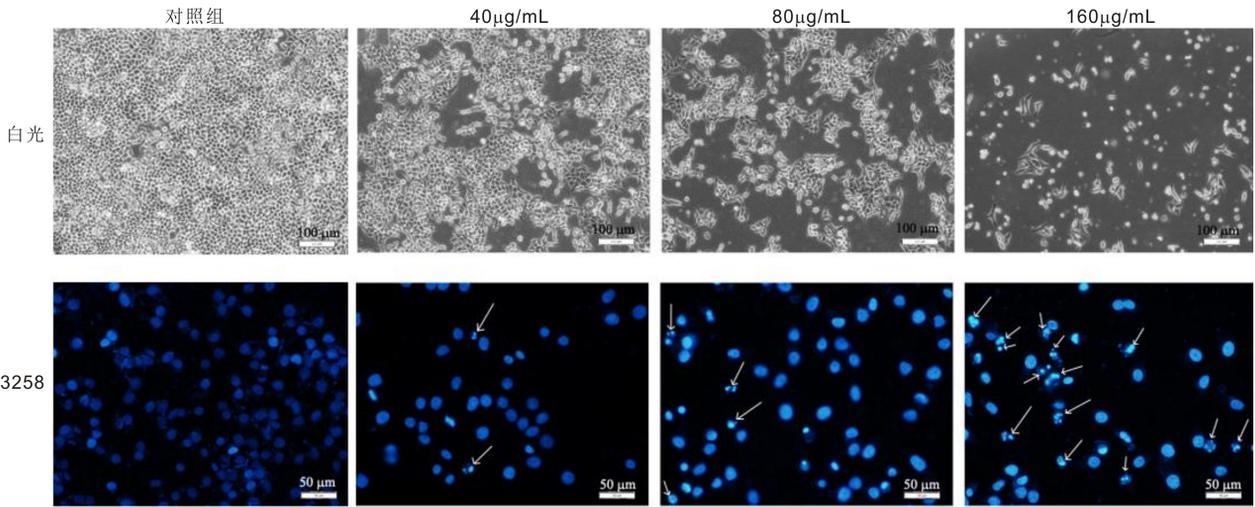


图1 hoechst 33258 荧光染色分析不同浓度 EGCG 诱导 ARPE-19 内的凋亡小体 箭头所示凋亡小体。

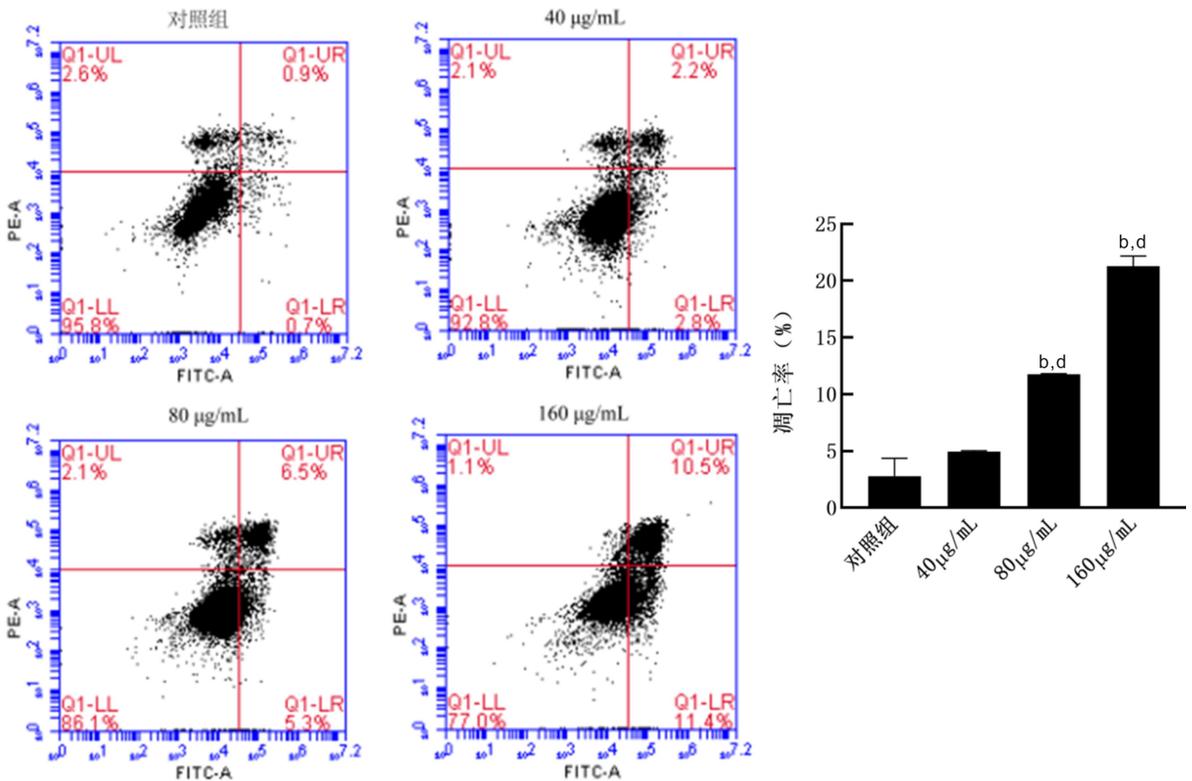


图2 流式细胞仪检测不同浓度 EGCG 诱导 ARPE-19 凋亡情况 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 40 μg/mL。

**2.3 实时荧光定量 PCR 检测不同浓度 EGCG 凋亡相关因子的 mRNA 表达** 不同浓度 EGCG 处理 ARPE-19 后,能够显著上调 p53, Bax 和 caspase-3 mRNA 的表达。不同浓度 EGCG 各组间 Bax, caspase-3, p53 的 mRNA 表达比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 两两比较结果见表 1, 图 3。

**2.4 Western blot 检测不同浓度 EGCG 凋亡相关蛋白的表达** EGCG 作用 ARPE-19 48h 后, Western blot 检测 bcl-2, Bax, caspase-3 和 p53 的蛋白表达情况, 随着剂量的增加, EGCG 可明显抑制 bcl-2 的蛋白表达, 而显著增强 Bax, caspase-3 和 p53 的蛋白表达, 见图 4。不同浓度 EGCG 各组间 bcl-2, Bax, caspase-3 和 p53 的蛋白表达比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 两两比较结果见表 1。

### 3 讨论

PVR 是孔源性视网膜脱离最严重的并发症之一, 易造成视网膜结构的变形以及视网膜复位手术的失败, 严重

的可以导致视功能丧失或失明<sup>[2]</sup>。RPE 细胞是 PVR 发生发展中公认的最重要的细胞成分, RPE 是视网膜 10 层结构的最外层, 构成了视网膜的外屏障。正常情况下, RPE 细胞是静止的, 但是若在受损伤的情况下可发生增殖和迁移, 是 PVR 恶化的原因之一, 因此早期抑制 RPE 细胞的增殖成为近年来 PVR 防治研究的主流趋势和热点。目前, 临床上尚没有疗效确切的药物用于 PVR 的治疗, 各种抗增殖、抗代谢的药物因毒性大、副作用多等问题限制了其进一步的临床应用<sup>[3-4]</sup>, 目前这类药物尚处于实验研究阶段<sup>[5]</sup>, 因此, 寻求新的治疗 PVR 的途径提上日程, 成为当前研究的热点。EGCG 是绿茶多酚提取物儿茶素的主要成分, 约占儿茶素的 80%, 具有特殊的立体化学结构<sup>[6]</sup>。大量研究表明茶多酚具有很强的抗氧化能力, 一直作为天然的食品抗氧化添加剂, 具有抗氧化、抗肿瘤<sup>[7-8]</sup>、清除氧自由基等多种生物活性作用, 有良好的应

表1 各组凋亡率和各因子 mRNA 及蛋白表达比较

分组	凋亡率(%)	mRNA				蛋白		
		Bax	caspase-3	p53	bcl-2	Bax	caspase-3	p53
对照组	2.8±1.556	1	1	1	1	1	1	1
40μg/mL	4.95±0.071	1.3±0.083 <sup>a</sup>	1.952±0.111 <sup>b</sup>	1.048±0.145	0.774±0.002 <sup>b</sup>	7.290±0.082 <sup>b</sup>	1.685±0.001 <sup>b</sup>	0.936±0.006
80μg/mL	11.75±0.075 <sup>b,d</sup>	2.476±0.277 <sup>b,d</sup>	2.213±0.228 <sup>b</sup>	2.217±0.189 <sup>b,d</sup>	0.739±0.003 <sup>b,d</sup>	9.166±0.099 <sup>b,d</sup>	2.677±0.007 <sup>b,d</sup>	1.334±0.007 <sup>b,d</sup>
160μg/mL	21.25±0.919 <sup>b,d,f</sup>	6.17±0.053 <sup>b,d,f</sup>	8.69±0.345 <sup>b,d,f</sup>	4.318±0.131 <sup>b,d,f</sup>	0.305±0.023 <sup>b,d,f</sup>	9.912±0.057 <sup>b,d,f</sup>	4.183±0.013 <sup>b,d,f</sup>	1.506±0.020 <sup>b,d,f</sup>
F	168.409	681.519	749.520	238.454	1221.219	6621.871	68475.992	1253.798
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 40μg/mL 组; <sup>f</sup>P<0.01 vs 80μg/mL 组。

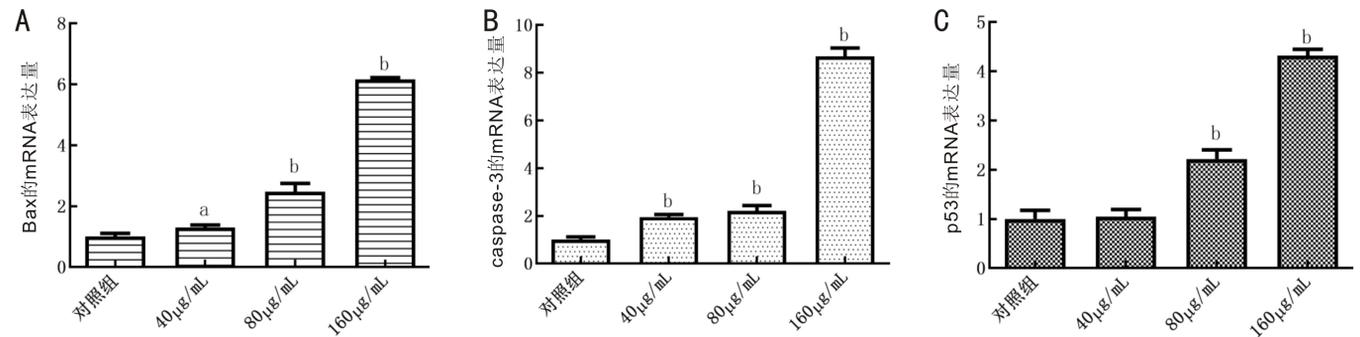


图3 实时荧光定量 PCR 分析不同浓度 EGCG 凋亡相关因子的 mRNA 表达 A: Bax; B: caspase-3; C: p53; <sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组。

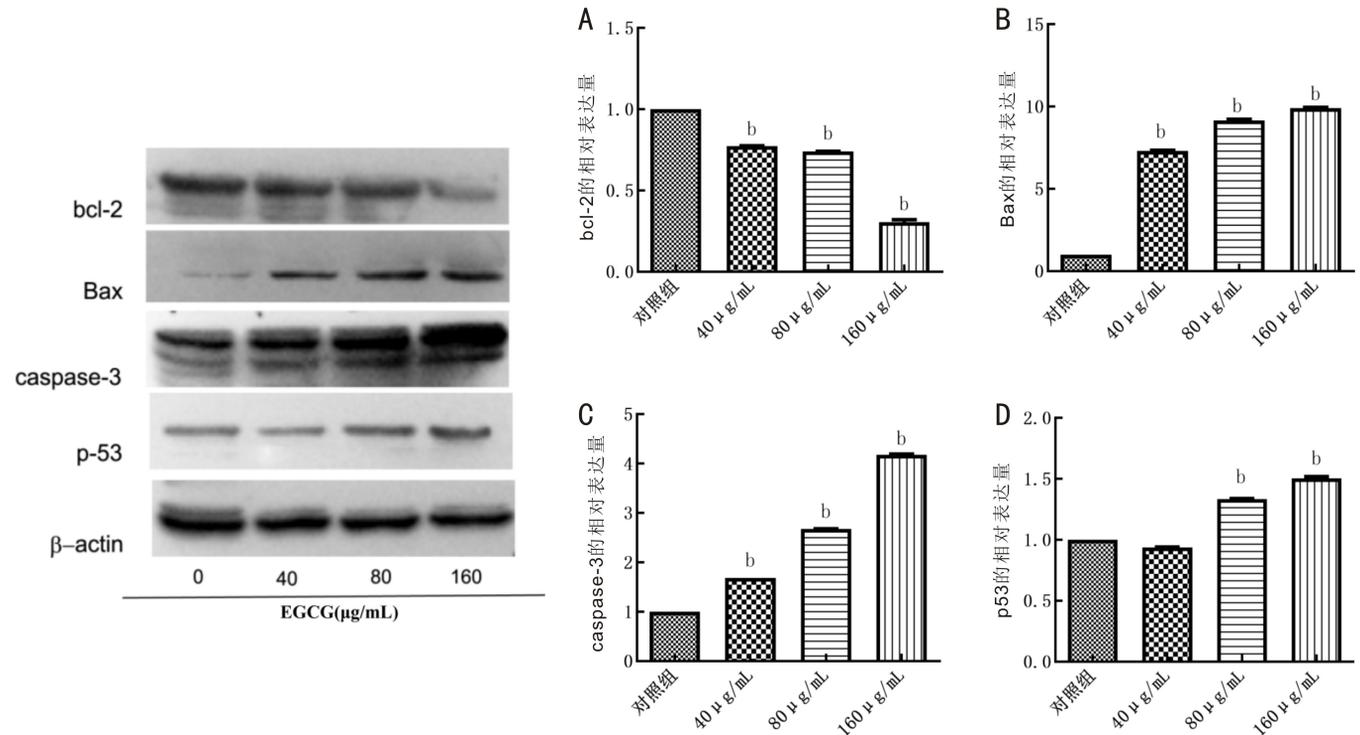


图4 Western blot 检测不同浓度 EGCG 凋亡相关因子蛋白表达 A: bcl-2; B: Bax; C: caspase-3; D: p53. <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组。

用前景<sup>[9]</sup>。诱导 RPE 细胞凋亡能够很好的抑制细胞的增殖及转移<sup>[10]</sup>,Cao 等<sup>[11]</sup>利用 50μmol/L(约 23μg/mL)浓度的 EGCG 作用于受到紫外线处理的 RPE 细胞,结果表明该浓度的 EGCG 对紫外线引起的 RPE 细胞凋亡具有保护作用,该实验中仅用了一个浓度。但其他浓度或更高浓度的 EGCG 单独使用对 RPE 细胞是否具有不同的作用尚不清楚。本文利用 40、80、160μg/mL 的 EGCG 单独作用于体外培养的 ARPE-19<sup>[12]</sup>,检测了细胞凋亡相关的指标,目的是全面了解 EGCG 对 ARPE-19 的作用。

EGCG 作用 ARPE-19 48h,普通显微镜下观察发现随着药物浓度的增高,ARPE-19 数量逐渐减少,并且变圆,乃至细胞从培养皿上脱落下来,为了证实细胞是坏死还是凋亡,我们利用 hoechst 33258 进行染色,发现使用的 160μg/mL 的 EGCG 能诱导 ARPE-19 的凋亡小体出现,说明 160μg/mL 的 EGCG 能够诱导 ARPE-19 发生凋亡,流式细胞仪进一步分析表明,160μg/mL EGCG 能够诱导 21%左右的 ARPE-19 发生凋亡。细胞凋亡的发生,往往伴随着促凋亡因子表达的增多以及抑制凋亡因子表达的

减少<sup>[13-15]</sup>。caspase-3、Bax 和 p53 是属于促凋亡细胞因子,当凋亡发生时,常常伴随着这些因子表达的升高<sup>[16-18]</sup>。Bcl-2 细胞因子是属于 bcl-2 家族的一员,与细胞凋亡密切相关,是一种非常重要的抑制凋亡的细胞因子<sup>[16, 19]</sup>。本研究发现,80 和 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EGCG 干预 ARPE-19 后,也伴随着 caspase-3、Bax、p53 和 Bcl-2 的表达改变。实时荧光定量 PCR 及 Western blot 实验结果显示,随着 EGCG 浓度的增高,促凋亡因子 caspase-3、Bax 和 p53 的表达增多,而抑制凋亡因子 bcl-2 的表达减少,这说明 80 和 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EGCG 在诱导 ARPE-19 发生凋亡的同时,上调 caspase-3、Bax 和 p53 的表达,下调 bcl-2 的表达,EGCG 诱导 ARPE-19 凋亡的机制与 caspase-3、Bax、p53 和 bcl-2 等细胞因子的表达改变有关。

上述结果表明 80 和 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EGCG 具有促进 ARPE-19 凋亡作用,有望用于抑制因 RPE 细胞异常增殖引起的 PVR 病变。但仍然有诸多问题需要进一步研究。比如,该浓度 EGCG 对其他细胞,尤其是视网膜内的其他细胞是否具有促凋亡作用。如果 EGCG 对其他细胞也具有促凋亡作用,其应用就受到极大的限制。需要进一步检测恰当的浓度,使得该浓度 EGCG 只引起 RPE 细胞凋亡,而对其他细胞没有影响,这样才具有临床应用价值。由于 EGCG 是一种多靶点的抑制剂,其对 RPE 细胞的作用机制及靶点还远未完全阐明,这些细胞因子之间的上下游关系以及相互联系如何尚需进行更深入的研究。

#### 参考文献

- 1 马洪梅,孙凤海,贾健. 视网膜色素上皮细胞的生理功能及其参与的病变. 国际眼科杂志 2015;15(7):1184-1186
- 2 彭燕一,蒋姣姣. PDGF- $\alpha$  受体反义寡核苷酸对增殖性玻璃体视网膜病变的影响. 实用医学杂志 2014;30(4):518-522
- 3 Thompson JT. Negative results matter; why can't we improve the treatment of proliferative vitreoretinopathy? *Ophthalmology* 2017; 124(6):753-754
- 4 Ghasemi Falavarjani K, Modarres M. Proliferative vitreoretinopathy and antivasular endothelial growth factor treatment. *Eye* 2014; 28(12): 1525-1526
- 5 Chiquet C, Rouberol F. Proliferative vitreoretinopathy: curative treatment. *J Fr Ophtalmol* 2014;37(8):653-659
- 6 Zhou XL, Liang LW, Zhao Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates angiotensin II-induced oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells through the activation of Nrf2/

- caspase-3 signaling. *J Vasc Res* 2017;54(5):299-308
- 7 Moradzadeh M, Hosseini A, Erfanian S, et al. Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/AKT and Telomerase. *Pharmacol Rep* 2017;69(5):924-928
- 8 Kwak TW, Park SB, Kim HJ, et al. Anticancer activities of epigallocatechin-3-gallate against cholangiocarcinoma cells. *Onco Targets Ther* 2016;10:137-144
- 9 葛建,林芳,李明揆,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)生物活性研究进展. 安徽农业大学学报 2011;38(2):156-163
- 10 Bhattacharya S, Ray RM, Chaum E, et al. Inhibition of Mdm2 sensitizes human retinal pigment epithelial cells to apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3368-3380
- 11 Cao G, Chen M, Song Q, et al. EGCG protects against UVB-induced apoptosis via oxidative stress and the JNK<sub>1/c</sub>-Jun pathway in ARPE19 cells. *Mol Med Rep* 2012;5(1):54-59
- 12 邱梅园,丁芝祥,廖妙云,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对视网膜色素上皮细胞增殖及相关因子表达的影响. 眼科新进展 2018; 38(7):638-642
- 13 Zhao TF, Fu YX, Sun H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia. *IUBMB Life* 2018;70(1):60-70
- 14 Venkatesan RS, Sadiq AMM. Effect of morin-5'-sulfonic acid sodium salt on the expression of apoptosis related proteins caspase 3, Bax and Bcl 2 due to the mercury induced oxidative stress in albino rats. *Biomed Pharmacother* 2017;85:202-208
- 15 Li H, Lv B, Kong L, et al. Noval mediates resistance of rat pheochromocytoma cells to hypoxia-induced apoptosis via the Bax/Bcl-2/caspase-3 pathway. *Int J Mol Med* 2017;40(4):1125-1133
- 16 Pratheeshkumar P, Kuttan G. Oleonic acid induces Apoptosis by modulating p53, Bax, Bcl-2 and caspase-3 gene expression and regulates the activation of transcription factors and cytokine profile in B16F. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2011;30(1):21-31
- 17 Zeng JW, Chen SQ, Li N, et al. Sasanquasaponin from *Camellia oleifera* Abel. induces apoptosis via Bcl-2, Bax and caspase-3 activation in HepG2 cells. *Mol Med Rep* 2015;12(2):1997-2002
- 18 Dolka I, Król M, Sapieryński R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: an immunohistochemical and prognostic study. *Res Vet Sci* 2016;105:124-133
- 19 Zheng XL, Sun HX, Liu XL, et al. Astilbic acid induced COLO 205 cell apoptosis by regulating Bcl-2 and Bax expression and activating caspase-3. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(8):1090-1095