

# 银杏叶提取物对体外培养翼状胬肉成纤维细胞增殖的抑制作用

朱 晶,吴超琼,陈 丹

作者单位:(430022)中国湖北省武汉市第一医院眼科  
作者简介:朱晶,女,硕士,研究方向:眼表及角膜病。  
通讯作者:吴超琼,女,主治医师,研究方向:青光眼及眼表疾病。  
wucq73@126.com  
收稿日期:2012-02-13 修回日期:2012-06-04

## Ginkgo biloba extract inhibits the proliferation of human pterygium fibroblasts *in vitro*

Jing Zhu, Chao-Qiong Wu, Dan Chen

Department of Ophthalmology, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Chao-Qiong Wu, Department of Ophthalmology, the First Hospital of Wuhan, Wuhan 430022, Hubei Province, China. wucq73@126.com

Received: 2012-02-13 Accepted: 2012-06-04

### Abstract

• AIM: To investigate the effects of ginkgo biloba extract (GBE) with different concentration on the proliferation of human pterygium fibroblasts cells (HPFs).

• METHODS: The HPFs were incubated with GBE at concentration of 12.5mg/L, 25.0mg/L, 50.0mg/L, 100.0mg/L for 24-72 hours, the effects of GBE on the proliferation of HPFs were evaluated by MTT assay. Flow cytometry (FCM) was used to examine the cell cycle distribution and apoptosis of HPFs exposed to different concentrations of GBE for 48 hours.

• RESULTS: The proliferation of HPFs was not significantly inhibited incubated with 12.5mg/L GBE for 24 hours through MTT assay ( $P > 0.05$ ). Other groups could significantly inhibit HPFs proliferation in a dose- and time-dependent manner, and there were significant differences between each of the two groups ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry examination suggested the cell percentage in the  $G_0/G_1$  phase increased while that of the S phase decreased exposed to different concentrations of GBE for 48 hours, the rate of apoptosis of HPFs respectively reached 4.37%, 8.14%, 11.09%, 15.18%, and there were significant differences between the two groups ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: GBE can significantly inhibit HPFs proliferation and induce its apoptosis with dose- and time-dependent manner.

• KEYWORDS: pterygium; fibroblasts cells; proliferation; inhibition

Citation: Zhu J, Wu CQ, Chen D. Ginkgo biloba extract inhibits the proliferation of human pterygium fibroblasts *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(7):1245-1247

### 摘要

目的: 研究不同浓度的银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 对体外培养人翼状胬肉成纤维细胞 (human pterygium fibroblasts, HPFs) 增殖和凋亡的影响。

方法: 用噻唑蓝比色法 (MTT) 检测不同浓度 (12.5, 25.0, 50.0, 100.0mg/L) GBE 在不同作用时间 (24, 48, 72h) 对体外培养的 HPFs 增殖的影响。用流式细胞仪检测 HPFs 的细胞周期及凋亡率。

结果: MTT 结果显示, GBE 浓度为 12.5mg/L 组作用 24h 后对 HPFs 的增殖无明显抑制作用 ( $P > 0.05$ ), 其余各时间段各组均可见明显抑制 HPFs 的增殖, 且各组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 流式细胞仪检测发现 GBE 作用 48h 后  $G_0/G_1$  期细胞比例增加, S 期细胞比例下降, 计算不同浓度 GBE 作用下凋亡率分别为 4.37%, 8.14%, 11.09%, 15.18%, 组间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

结论: GBE 对 HPFs 的增殖有明显抑制作用, 并与用药剂量和持续时间有关。

关键词: 翼状胬肉; 成纤维细胞; 增殖; 抑制

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.07.06

引用: 朱晶, 吴超琼, 陈丹. 银杏叶提取物对体外培养翼状胬肉成纤维细胞增殖的抑制作用. 国际眼科杂志 2012;12(7):1245-1247

### 0 引言

翼状胬肉是一种常见的眼表疾患, 具体发病原因尚不清楚, 可能与紫外线照射、气候、风尘、烟雾等因素有关, 目前仍以手术治疗为主, 但传统手术方式术后复发率较高。银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 是银杏科植物银杏叶的提取物<sup>[1]</sup>, 随着其药理作用研究的日益深入而被广泛用于临床, 但 GBE 对于人翼状胬肉成纤维细胞 (human pterygium fibroblasts, HPFs) 的作用尚未见研究报道。本研究通过 GBE 作用于体外培养的翼状胬肉成纤维细胞, 观察 GBE 对其增殖和凋亡的影响, 寻找有效抑制成纤维细胞增殖和避免不良反应的新方法。

### 1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养液、二甲基偶氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO)、SABC 免疫组织化学试剂盒 (小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体, 羊抗鼠 IgG), 均为武汉博士德公司产品; 2.5g/L 胰蛋白酶、碘化丙啶、Rnase, 均为 Sigma 公司产品; 胎牛血清 (Gibco 公司); 银杏叶提取物 (GBE, 德国威玛舒培博士药厂); 流式细胞仪 (Gibco 公司)。

表1 不同作用时间各浓度组 GBE 对 HPFs 增殖的影响

GBE 浓度 (mg/L)	$A_{490}$ 值			IR (%)			$\bar{x} \pm s$
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
0	0.436±0.018	0.412±0.042	0.387±0.012	-	-	-	
12.5	0.403±0.012	0.362±0.009 <sup>a</sup>	0.311±0.004 <sup>a</sup>	3.8	10.1	18.2	
25.0	0.372±0.008 <sup>a</sup>	0.298±0.007 <sup>a,c</sup>	0.233±0.010 <sup>a,c</sup>	10.5	21.3	37.6	
50.0	0.322±0.008 <sup>a,e</sup>	0.246±0.003 <sup>a,e</sup>	0.137±0.004 <sup>a,e</sup>	25.4	41.7	53.4	
100.0	0.238±0.011 <sup>a,g</sup>	0.196±0.004 <sup>a,g</sup>	0.108±0.005 <sup>a,g</sup>	33.3	58.2	72.3	
<i>F</i>	92.34	98.92	106.47				
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01				

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 0mg/L 组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 12.5mg/L 组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs 25.0mg/L 组; <sup>g</sup>*P*<0.05 vs 50.0mg/L 组。

表2 FCM 检测各浓度组 GBE 作用 48h 对 HPFs 细胞周期的影响及凋亡率

GBE 剂量 (mg/L)	细胞周期			凋亡率 (%)	$\bar{x} \pm s$
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$		
0	49.82±1.25	27.76±1.68	20.62±1.05	1.43	
12.5	52.34±2.11	25.21±2.28	18.06±1.77	4.37 <sup>a</sup>	
25.0	59.18±2.76	19.17±1.87	13.33±1.49	8.14 <sup>a</sup>	
50.0	64.02±2.72	15.75±0.98	9.97±1.04	11.09 <sup>a</sup>	
100.0	73.55±2.69	8.32±0.46	3.08±0.51	15.18 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 0mg/L 组。

## 1.2 方法

**1.2.1 HPFs 的培养** 取材于武汉市第一医院眼科手术切除的新鲜翼状胬肉组织,采用组织块培养技术,建立翼状胬肉成纤维细胞株,传代细胞接种于含 200g/L 小牛血清的 DMEM 培养基中,将培养瓶置于 50mL/L CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养箱内,待原代细胞基本长满瓶底时用 2.5g/L 胰蛋白酶消化,按 1:2 传代培养,取生长良好的第 4 代细胞用于实验。制备细胞爬片,HE 染色并以波形蛋白抗体经免疫组织化学鉴定。

**1.2.2 GBE 对 HPFs 增殖的影响** 将消化好的第 4 代 HPFs 按 4×10<sup>4</sup>/mL 转移到 96 孔板内,每孔 200μL,共设 6 组,每组设复孔 4 组,培养 24h 待细胞贴壁后弃原液加药。分别加入 12.5, 25.0, 50.0, 100.0mg/L GBE 200μL,同时设空白对照组和阴性对照组,分别继续培养 24, 48, 72h 后,各孔加 MTT 20μL,孵育 4h,弃原液,加入 120μL DMSO,室温下振荡 10min 后用酶标仪检测 490nm 处吸光度值( $A_{490}$ )。细胞抑制率(Inhibitory Rate, IR) = 1 - (实验组平均 A 值/阴性对照组平均 A 值) × 100%。

**1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率** 取第 4 代生长良好的 HPFs 细胞,弃原液, PBS 洗涤 2 次,分别加入含 GBE 的培养液,使其最终浓度分别为 12.5, 25.0, 50.0, 100.0mg/L,继续培养 48h,用 2.5g/L 胰蛋白酶消化,离心收集细胞,弃上清,用 PBS 洗涤 3 次,加入 700mL/L 冷乙醇 2mL 混匀,置于 4℃ 冰箱固定 24h, 1 000r/min 离心 5min,弃乙醇,用 PBS 洗涤 3 次,调整细胞浓度为 4.0×10<sup>5</sup>/mL,取 1mL PBS 细胞悬液加入 Rnase 300μL, 37℃ 孵育 30min,加入碘化丙锭 300μL,混匀,4℃ 避光染色 1h, 300 目尼龙网筛过滤,流式细胞仪(激光波长 488nm)检测 DNA 含量的细胞分布。实验结果经计算机 CellQuest 软件分析处理得出细胞凋亡率。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用完全随机多水平单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间均数比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 翼状胬肉成纤维细胞免疫组织化学鉴定** 体外培养的人翼状胬肉细胞波形蛋白染色表达阳性,位于胞浆,形态规则,呈现与成纤维细胞长轴方向一致的棕黄色束状或网状结构;空白对照组无棕黄色颗粒出现。HE 染色可见细胞呈梭形,胞浆均匀,淡红色,有胞质突起,核蓝染,椭圆形,染色质均匀。

**2.2 GBE 对 HPFs 增殖的抑制作用** GBE 作用 24h,浓度为 12.5mg/L 组对 HPFs 的增殖无明显抑制作用(*P*>0.05),其余各时间段各组均可见明显抑制 HPFs 的增殖,且各组间比较差异有统计学意义(*F* = 92.34, 98.92, 106.47, *P*<0.01),且随 GBE 浓度升高抑制强度增加(*P*<0.05),随作用时间延长抑制强度增加(*P*<0.05)。体外培养 24~72h 其吸光度( $A_{490}$ )随着时间的推移逐渐减小,差异有统计学意义(*P*<0.05,表 1)。

**2.3 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率** 低于  $G_1$  期的细胞为凋亡细胞,其占细胞总数的比例为凋亡率。作用 48h 后,随着 GBE 浓度增加, $G_0/G_1$  期细胞比例逐渐增加,S 期细胞比例明显减少,说明细胞阻滞于  $G_0/G_1$  期,进入 DNA 合成期的细胞减少,各 GBE 组 HPFs 凋亡率分别为 4.37%, 8.14%, 11.09%, 15.18%,与对照组比较均存在显著性差异(*P*<0.05,表 2)。

## 3 讨论

翼状胬肉是局部球结膜纤维血管组织增生侵犯角膜的一种眼表疾病,它不仅可引起眼部刺激症状,影响美观,还可不同程度地影响视力<sup>[2]</sup>。其发病机制不明,临床治疗