

引文格式:潘家钰,康刚劲,徐曼华,彭正虹,申苑莎.雌二醇通过激活 SIRT1/P53 通路对人晶状体上皮细胞抗凋亡作用研究[J].眼科新进展,2020,40(5):420-424. doi:10.13389/j.cnki.rao.2020.0097

【实验研究】

雌二醇通过激活 SIRT1/P53 通路对人晶状体上皮细胞抗凋亡作用研究[△]

潘家钰 康刚劲 徐曼华 彭正虹 申苑莎

作者简介:潘家钰,女,1993年12月出生,四川乐山人,硕士。主要研究方向为白内障基础与临床研究。联系电话:18308310310; E-mail: 531671743@qq.com; ORCID:0000-0003-0229-3153
通信作者:康刚劲,女,硕士,教授,硕士研究生导师。主要研究方向为白内障基础与临床研究。联系电话:13808281600; E-mail: 929460414@qq.com; ORCID:0000-0002-0705-9764
收稿日期:2019-09-16
修回日期:2020-01-10
本文编辑:付中静
△基金项目:泸州市科技局基金资助[编号:2015LZCYD-S05(4/12)]
作者单位:646000 四川省泸州市,西南医科大学附属医院眼科

【摘要】 目的 探究雌二醇(*estradiol*, *E*₂)对 *H*₂*O*₂ 诱导的人晶状体上皮细胞(HLE-B₃细胞)氧化损伤的保护作用及抗凋亡机制。**方法** 不同浓度 *H*₂*O*₂ 作用于 HLE-B₃ 细胞,探索最佳浓度。将 HLE-B₃ 细胞随机分成 5 组:空白对照组,模型组(100 μmol · L⁻¹ *H*₂*O*₂),低、中、高浓度 *E*₂ 组(100 μmol · L⁻¹ *H*₂*O*₂ + 0.01 μmol · L⁻¹、0.10 μmol · L⁻¹、1.00 μmol · L⁻¹ *E*₂),观察各组细胞形态变化。采用 CCK-8 和流式细胞学检测细胞的增殖与凋亡,观察不同浓度的 *E*₂ 对 HLE-B₃ 细胞的影响。RT-qPCR 检测沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1) mRNA、P53 mRNA 表达。Western blot 检测 SIRT1、肿瘤抑制蛋白 P53、乙酰化 P53(acetylate P53, Ac-P53)蛋白表达,免疫荧光化学检测 SIRT1 定位及荧光强度。**结果** 100 μmol · L⁻¹ *H*₂*O*₂ 为诱导 HLE-B₃ 细胞氧化应激的最佳浓度。CCK-8 检测结果显示:低、中、高浓度 *E*₂ 组的细胞增殖率均高于模型组(均为 *P* < 0.05)。流式细胞学检测结果显示:模型组细胞凋亡率均高于其他各组,两两比较:空白对照组 < 高浓度 *E*₂ 组 < 中浓度 *E*₂ 组 < 低浓度 *E*₂ 组 < 模型组(均为 *P* < 0.05)。RT-qPCR 及 Western blot 检测结果表明:SIRT1 表达随着 *E*₂ 浓度的升高而增加,高浓度 *E*₂ 组 > 中浓度 *E*₂ 组 > 低浓度 *E*₂ 组 > 模型组 > 空白对照组(均为 *P* < 0.05)。Ac-P53 在空白对照组表达与高浓度 *E*₂ 组差异无统计学意义(*P* > 0.05),其余组间 Ac-P53 表达比较:模型组 > 低浓度 *E*₂ 组 > 中浓度 *E*₂ 组 > 高浓度 *E*₂ 组(均为 *P* < 0.05)。空白对照组中 P53 表达均低于其他各组(均为 *P* < 0.05),其余各组之间两两比较,差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)。共聚焦免疫荧光化学检测结果显示:SIRT1 荧光强度随着 *E*₂ 浓度升高而增强。**结论** *E*₂ 对 HLE-B₃ 细胞的保护作用与 SIRT1/P53 通路相关,在生理浓度范围化学检测内,随着 *E*₂ 浓度的增加,SIRT1 表达增强,抑制 Ac-P53,减少 HLE-B₃ 细胞凋亡。
【关键词】 雌二醇;人晶状体上皮细胞;沉默信息调节因子 1;P53;细胞凋亡
【中图分类号】 R776.1

年龄相关性白内障(age related cataract, ARC)已经成为中老年群体视力损伤的常见疾病,据报道,ARC 的发病与人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLECs)的氧化损伤和细胞凋亡有关。早期已有研究者发现白内障的发病率在不同性别患者中存在着显著差异^[1],一定浓度的雌激素能有效抑制 HLECs 凋亡并发挥其抗氧化功能^[2]。

Sirtuins 是一种高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸家族-依赖性组蛋白去乙酰化酶,而沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)是该家族中的成员之一,它被视为多种生物寿命的“调控因子”^[3]。SIRT1 的上调已被证明对各种眼部疾病,如白内障、视网膜变性、视神经炎和葡萄膜炎,具有重要的保护作用^[4],它主要通过底物组蛋白/非组蛋白的去乙酰化发挥作用^[5]。目前,雌激素作用于 HLECs 的抗凋亡机制尚无定论,其是否通过影响 SIRT1/P53(肿瘤抑制蛋白)通路来实现抗凋亡作用在 HLECs 中的报道尚少。本研究通过 *H*₂*O*₂ 诱导 HLE-B₃ 细胞氧化损伤,探讨生理浓度下雌二醇(*estradiol*, *E*₂)对 HLE-B₃ 细胞的作用机制,为进一步防治 ARC 的发生发展提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HLE-B₃ 细胞系(ATCC, 美国), *E*₂ 粉末、*H*₂*O*₂ 试剂(Sigma, 美国), DMEM 高糖培养基(Hyclone, 美国), 胎牛血清、CCK-8 试剂盒(Dojindo, 中国), AnnexinV FITC/PI 流式细胞检测试剂盒(BD 公司, 美国), RNA 提取试剂盒(Tiangen, 中国), BCA 法蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司), PCR 试剂盒(Qiagen, 德国), SIRT1、P53、乙酰化 P53(acetylate P53, Ac-P53)、GAPDH 抗体(Abcam, 英国)。

1.2 方法

1.2.1 HLE-B₃ 细胞的复苏与培养 将保存于 -80 ℃ 冰箱中的 HLE-B₃ 细胞取出,立即放于 37 ℃ 温水浴中,待完全融化后离心取细胞悬液,置于含体积分数 5% CO₂ 培养箱进行培养,按 1:3 比例进行传代,每 3 d 传代一次。待细胞生长稳定后,计数铺板,根据实验条件加入相应试剂进行实验。

1.2.2 HLE-B₃ 氧化损伤模型中鉴定 *H*₂*O*₂ 最佳浓度 取生长状态良好的 HLE-B₃ 细胞,待其生长至 75% ~ 80%,弃原有培养基,加入胰蛋白酶消化后重悬,进行细胞计数。每孔细胞取 500 × 10³ 个,每组

设置3个复孔,待细胞贴壁,分别加入不同浓度($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) H_2O_2 , CCK-8 试剂盒测量每组细胞增殖率,流式细胞学检测每组细胞凋亡率。

1.2.3 实验分组 将 HLE-B₃ 细胞接种于6孔板中,每孔细胞数量约 500×10^3 个,并随机分成5组,空白对照组:含胎牛血清的 DMEM 改良式培养基培养 HLE-B₃ 细胞;模型组:予以含 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 的培养基作用细胞12 h;低、中、高浓度 E_2 组:分别予以 $0.01\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.00\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2 处理后,再加入含 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 的培养基,放入含体积分数5% CO_2 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养(分组依据参考文献^[6])。

1.2.4 CCK-8 试剂盒检测细胞活力 于96孔板中接种 HLE-B₃ 细胞,每孔 10×10^3 个,根据实验分组条件培养24 h,每组设置3个复孔,每孔加入 CCK-8 试剂 $10\text{ }\mu\text{L}$,作用1.5 h,置于分光光度仪中设置波长为 450 nm ,测定每孔的吸光度(A)值,根据细胞活力 $= A_{\text{处理组}}/A_{\text{样品对照组}}\times 100\%$,计算各组细胞活力。

1.2.5 流式细胞学检测细胞凋亡率 将 HLE-B₃ 细胞接种于6孔板中,每孔调整细胞个数约 10×10^6 个,重悬细胞,将细胞悬液移至离心管内, $1500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,弃上清液,加入 Loading buffer 悬浮细胞,调整每组细胞数为 200×10^3 个,按照 AnnexinV FITC/PI 流式细胞检测试剂盒说明书进行检测。

1.2.6 RT-qPCR 检测各组 SIRT1 mRNA、P53 mRNA 表达 用 Trizol 裂解液裂解细胞后,按照 RNA 试剂盒提取细胞总 RNA,于 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴箱中变性5 min,将 RNA 逆转录为 cDNA,选取 GAPDH 基因为内参基因进行 RT-qPCR 检测。SIRT1 上游引物:TAGA-CACGCTGGAACAGGTTG,下游引物:GGTTTCAT-GATAGCAAGCGG;P53 上游引物:GCGCACAGAG-GAAGAGAATCT,下游引物:TATGGCGGGAGG-

TAGACTGAC。扩增条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 2 min, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 10 s,40个循环。记录每组目的基因和内参基因的 CT 值,相对表达定量(relative quantity, RQ) $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,结果以 RQ 统计。

1.2.7 Western blot 检测 SIRT1、P53、Ac-P53 蛋白的表达 RIPA 裂解液裂解细胞,置于低温离心机中, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清。用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量检测,每组加入 $40\text{ }\mu\text{g}$ 总蛋白进行电泳,转膜,封闭液室温孵育1 h;充分洗涤后加入一抗稀释液 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜后磷酸盐缓冲液(PBS)洗膜,加入二抗稀释液,室温孵育30 min,PBS 洗涤。结果用 AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标条带的灰度值/GAPDH 灰度值(灰度比)。

1.2.8 共聚焦免疫荧光染色 于超净台中将细胞悬液转移至盖玻片上,培养6 h,PBS 洗涤3次,每次5 min; $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定30 min,加入 SIRT1 一抗于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,再用 PBS 洗涤3次;待干后加入二抗室温孵育50 min,PBS 洗涤,加入抗荧光淬灭剂,封片,共聚焦荧光显微镜观察。

1.3 统计学处理 用 SPSS 19.0 统计学软件分析数据,多组样本均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验,数据结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 光学显微镜下观察 HLE-B₃ 细胞形态 HLE-B₃ 培养24 h后,显微镜下观察各组细胞形态。空白对照组(图1A)细胞贴壁生长,呈长梭形、不规则椭圆形。模型组(图1B)较空白对照组细胞密度降低,且可见部分细胞出现形态改变,胞体拉长变形,边界不清。低、中、高浓度 E_2 组细胞的密度(图1C、图1D、图1E)均高于模型组,且随 E_2 浓度梯度增加,HLE-B₃ 细胞生长状态呈上升趋势。

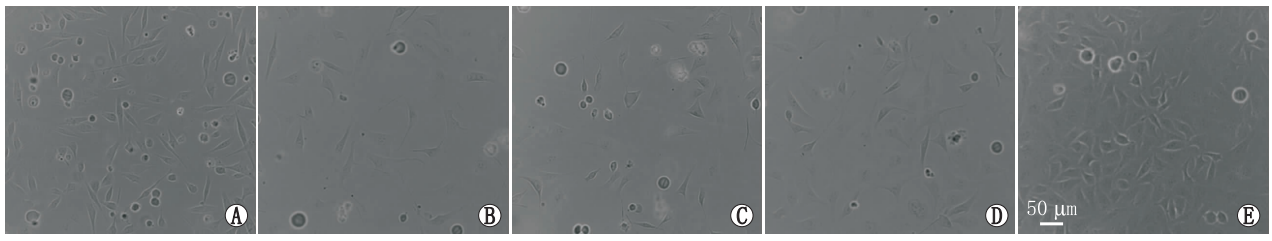


图1 光学显微镜观察各组 HLE-B₃ 细胞形态的变化 A:空白对照组;B:模型组;C:低浓度 E_2 组;D:中浓度 E_2 组;E:高浓度 E_2 组

2.2 E_2 对 HLE-B₃ 细胞生长活力的影响 模型组的细胞增殖率(63.61%)较空白对照组(100.0%)明显降低($P<0.05$)。低浓度 E_2 组(75.78%)、中浓度 E_2 组(82.30%)、高浓度 E_2 组(98.40%)的细胞增殖率均高于模型组(均为 $P<0.05$)。低浓度 E_2 组 $<$ 中浓度 E_2 组 $<$ 高浓度 E_2 组(均为 $P<0.05$)。

2.3 E_2 对 HLE-B₃ 细胞的抗凋亡作用 流式细胞学检测各组细胞的凋亡率,空白对照组的 HLE-B₃ 凋亡率($3.86\pm 0.04\%$)低于模型组细胞凋亡率($15.64\pm 1.18\%$) ($P<0.05$)。低、中、高浓度 E_2 组细胞凋亡率依次为($9.79\pm 0.25\%$)、($8.88\pm 0.14\%$)、($6.00\pm 0.47\%$)。细胞凋亡率比较显示,模型组 $>$ 低浓

度 E_2 组 > 中浓度 E_2 组 > 高浓度 E_2 组 > 空白对照组 (均为 $P < 0.05$)。

2.4 E_2 对 HLE-B₃ 细胞 SIRT1 mRNA、P53 mRNA 表达的影响 RT-qPCR 检测各组 HLE-B₃ 细胞中 SIRT1、P53 mRNA 的表达, 模型组细胞中 SIRT1 mRNA (RQ) (2.24 ± 0.05) 表达较空白对照组 (1.01 ± 0.02) 明显升高 ($P < 0.05$), SIRT1 mRNA 表达水平模型组 (2.24 ± 0.05) < 低浓度 E_2 组 (2.58 ± 0.11) < 中浓度 E_2 组 (3.7 ± 0.13) < 高浓度 E_2 组 (3.88 ± 0.12) (均为 $P < 0.05$)。空白对照组 P53 mRNA (RQ) (1.02 ± 0.04) 表达明显低于其他各组 (均为 $P < 0.05$), 模型组 (1.73 ± 0.1)、低浓度 E_2 组 (1.82 ± 0.16)、中浓度 E_2 组 (1.76 ± 0.12)、高浓度 E_2 组 (1.74 ± 0.14) 组间 P53 mRNA 表达水平两两比较差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$)。

2.5 Western blot 检测细胞中 SIRT1、P53、Ac-P53 蛋白表达

2.5.1 Western blot 检测 E_2 对 HLE-B₃ 细胞中 SIRT1 蛋白表达的影响 SIRT1 蛋白表达 (灰度比) 在空白对照组 (0.040) 中呈现弱阳性, SIRT1 蛋白表达组间比较: 空白对照组 < 模型组 (0.138) < 低浓度 E_2 组 (0.250) < 中浓度 E_2 组 (0.486) < 高浓度 E_2 组 (0.712) (均为 $P < 0.05$)。

2.5.2 Western blot 检测 Ac-P53 蛋白表达 Ac-P53 (灰度比) 空白对照组 (0.071) 表达与高浓度 E_2 组 (0.070) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Ac-P53 表达比较: 模型组 (0.564) > 低浓度 E_2 组 (0.317) > 中浓度 E_2 组 (0.129) > 高浓度 E_2 组 (均为 $P < 0.05$)。

2.5.3 Western blot 检测 E_2 对 HLE-B₃ 细胞中 P53 蛋白表达的影响 P53 (灰度比) 在空白对照组 (0.394) 表达低于模型组 (0.705) 和其他各组 (均为

$P < 0.05$), 组间 P53 表达两两比较结果显示, 模型组与各浓度 E_2 组 (低浓度 E_2 组灰度比 0.718, 中浓度 E_2 组灰度比 0.710, 高浓度 E_2 组灰度比 0.705) 差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$)。见图 2。

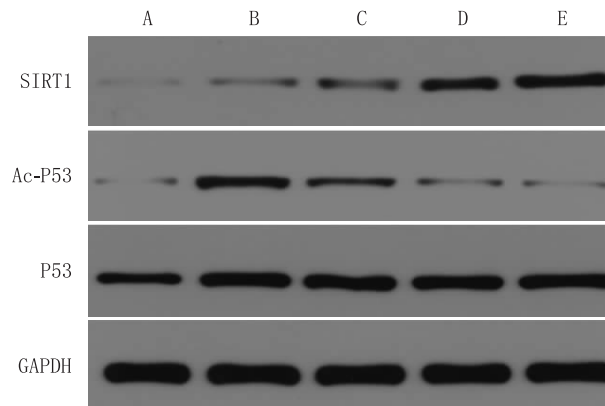


图 2 Western blot 检测各组 HLE-B₃ 细胞 SIRT1、Ac-P53、P53 蛋白表达情况 A: 空白对照组; B: 模型组; C: 低浓度 E_2 组; D: 中浓度 E_2 组; E: 高浓度 E_2 组

2.6 免疫荧光染色检测 SIRT1 表达与定位 共聚焦显微镜下观察 E_2 对 HLE-B₃ 细胞中 SIRT1 免疫荧光的影响, 特异性抗体与 SIRT1 结合后, 在荧光显微镜下观察可呈现绿色荧光 (见图 3), 荧光染色着染细胞核, SIRT1 分布于 HLE-B₃ 细胞的细胞核上, 空白对照组 (429.30 ± 80.66) 荧光强度较模型组 (1776.53 ± 285.48) 弱 ($P < 0.05$); 组间两两比较, 模型组 < 低浓度 E_2 组 (2541.10 ± 489.43) < 中浓度 E_2 组 (3400.25 ± 645.86) < 高浓度 E_2 组 (8442.82 ± 1059.35) (均为 $P < 0.05$)。

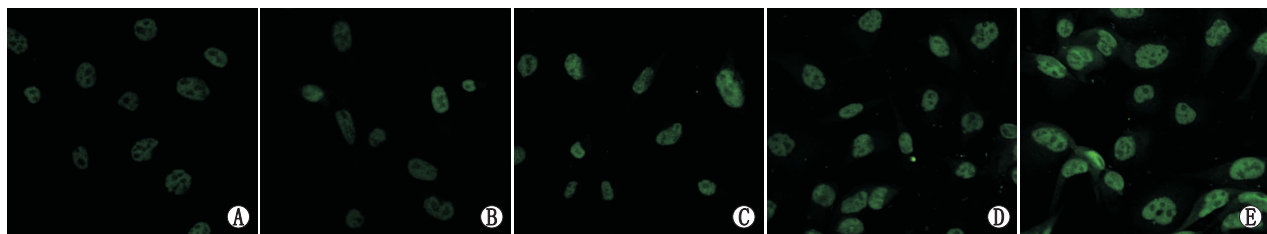


图 3 免疫荧光检测各组 HLE-B₃ 细胞 SIRT1 表达 ($\times 600$) A: 空白对照组; B: 模型组; C: 低浓度 E_2 组; D: 中浓度 E_2 组; E: 高浓度 E_2 组

3 讨论

据预测, 至 2050 年发达国家和发展中国家 65 岁及以上人口比例将会持续上升, 随着预期寿命的增加, 衰老的慢性疾病将会越来越普遍^[7]。目前白内障仍是全球首位致盲性眼病, 也是中老年群体视力损伤的常见疾病。ARC 是白内障中最常见的类型, 它易引起致盲与视觉功能障碍, 其中 HLECs 在

维持晶状体透明中起重要作用。本研究予以不同浓度的 H_2O_2 作用于 HLE-B₃ 细胞模拟 HLECs 氧化损伤, CCK-8 和流式细胞学检测选出 H_2O_2 体外造模最佳浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 作用时间为 12 h。Wang 等^[8]用不同浓度 H_2O_2 作用于 LECs 24 h, 浓度在 $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时 HLE-B₃ 细胞活力轻微下降, 浓度高于 $75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细胞存活率急剧下降, 与本研究 H_2O_2 最佳浓度不一致, 这可能与不同检测方法和

细胞培养条件相关。

已有研究者调查发现,月经初潮年龄越早、绝经年龄越大、绝经后使用雌激素替代疗法的人群,白内障发病的风险会越低^[9]。目前,研究雌激素对HLECs的保护作用主要通过抗氧化损伤和减少细胞凋亡来实现。Skiljic等^[10]通过雌激素作用体外培养HLECs验证了雌激素通过非基因组机制介导抗氧化应激作用。Ganatra等^[11]研究表明,雌激素可抑制山羊LECs骨架蛋白的解聚和细胞凋亡。王杰等^[12]用不同浓度的E₂作用体外培养的HLECs,表明E₂通过上调HLECs中的端粒酶活性而抑制细胞凋亡。Roy等^[13]研究表明,雌激素具有双相效应,不同浓度的雌激素对HLECs的作用不尽相同,国内外对其作用机制也尚无定论。本研究参照文献[6]将E₂浓度组设置为生理状态下的浓度梯度(0.01 μmol·L⁻¹、0.10 μmol·L⁻¹、1.00 μmol·L⁻¹),探讨不同浓度E₂对HLECs保护作用及其作用机制。

SIRT1是依赖性组蛋白去乙酰化酶,也是Sir-tuins家族中的成员之一,有助于调节多种生物的寿命。SIRT1具有去乙酰化酶的作用,可以调节许多转录因子,如P53,叉头形蛋白O,转录因子E₂F₁,核因子κB,过氧化物酶体增殖物受体辅助激活因子1,成肌分化抗原等^[14]。有研究表明在癌细胞中,SIRT1过表达可以阻断细胞的凋亡和衰老,并促进细胞增殖和血管的生成^[15],体外培养乳腺癌细胞发现E₂通过雌激素受体α转录复合物直接影响促进SIRT1表达^[16]。眼部组织中,SIRT1定位于角膜、晶状体、虹膜、睫状体和视网膜在内的组织细胞的细胞核、细胞质中^[4],氧化应激条件下,视网膜色素上皮细胞中也存在SIRT1表达增加及其抗氧化作用^[17]。本研究通过共聚焦免疫荧光化学检测发现SIRT1多定位于HLEC细胞核上,且随着E₂浓度的增加,SIRT1蛋白表达逐渐增加。P53是一种触发细胞凋亡的蛋白质,泛素化、磷酸化和乙酰化是P53的翻译后修饰,它对P53的稳定性及活性有重要的影响^[18]。乙酰化的P53促进细胞凋亡,它已被证明是SIRT1的下游靶点^[19]。本研究发现,随着E₂浓度增加,SIRT1表达增加,Ac-P53减少,表明E₂在某种程度上促进了SIRT1表达,其发挥去乙酰化作用,抑制P53乙酰化,阻止P53依赖性的凋亡通路,使细胞免于凋亡,并且在一定范围内随着E₂浓度的增加,抗凋亡作用越显著,与王杰等^[12]研究结果一致。Agaoglu等^[20]发现,在ARC患者晶状体前囊膜及血液中SIRT1的表达较正常人明显增加。Xu等^[21]在糖尿病性白内障大鼠的前囊膜中发现SIRT1表达较正常大鼠增加,与本研究SIRT1在模型组中表达高于空白对照组的结果相一致,表明SIRT1的表达水平在白内障的发展中起着至关重要的作用。另外,本研究结果中P53表达在模型组、低、中、高浓度E₂组间比较无显著差异,原因可能与其翻译后修饰的功能性P53相关,SIRT1使P53去乙酰化后抑制了细胞凋亡程

序,降低了细胞凋亡。E₂对HLECs的保护作用可通过多种途径实现,其他途径的存在可能影响本研究结果的分析,这也是本研究的不足之处,后期仍需进一步完善实验以排除相关干扰因素的影响。

综上所述,本研究证明了生理浓度下E₂对HLE-B₃细胞的作用为抗凋亡作用,并进一步探讨了E₂可能通过SIRT1/P53通路保护HLECs免于凋亡。但在HLECs中E₂影响SIRT1/P53通路可能存在更多的作用靶点与调控机制,目前尚未完全清楚,仍需进一步探索。

参考文献

- [1] MIECHELL P, CUMMING R G, ATTEBO K, PANCHAPAKESAN J. Prevalence of cataract in Australia: the Blue Mountains eye study[J]. *Ophthalmology*, 1997, 104(4): 581-588.
- [2] WORZALA K, HILLER R, SPERDUTO R D, MUTALIK K, MURABITO J M, MOSKOWITZ M, et al. Postmenopausal estrogen use, type of menopause, and lens opacities: the Framingham studies[J]. *Arch Intern Med*, 2001, 161(11): 1448-1454.
- [3] KANG H, OKA S, LEE D Y, PARK J, APONTE A M, JUNG Y S, et al. Sirt1 carboxyl-domain is an ATP-repressible domain that is transferable to other proteins[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 155-160.
- [4] MIMURA T, KAJI Y, NOMA H, FUNATSU H, OKAMOTO S. The role of sirt1 in ocular aging[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116(1): 17-26.
- [5] LI Y, XU S, LI J, ZHENG L, FENG M, WANG X, et al. Sirt1 facilitates hepatocellular carcinoma metastasis by promoting PGC-1α-mediated mitochondrial biogenesis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29255-29274.
- [6] CELOJEVIC D, PETERSEN A, KARLSSON J O, BEHNDIG A, ZETTERBERG M. Effects of 17β-estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells[J]. *Mol Vis*, 2011, 17(1): 1987-1996.
- [7] GANGULI M, BEER J C, ZMUDA J M, RYAN C M, SULLIVAN K J, CHANG C H, et al. Aging, diabetes, obesity, and cognitive decline: a population-based study[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2020, [Epub ahead of print].
- [8] WANG X, SIMPKINS J W, DYKENS J A, CAMMARATA P R. Oxidative damage to human lens epithelial cells in culture: estrogen protection of mitochondrial potential, ATP, and cell viability[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(5): 2067-2075.
- [9] YOUNAN C, MITCHELL P, CUMMING R G, PANCHAPAKESAN J, ROCHTCHINA E, HALE S A M. Hormone replacement therapy, reproductive factors, and the incidence of cataract and cataract surgery: the Blue Mountains Eye Study[J]. *Am J Epidemiol*, 2002, 155(11): 997-1006.
- [10] SKILJIC D, PETERSEN A, KARLSSON J O, BEHNDIG A, NILSSON S, ZETTERBERG M. Effects of 17β-estradiol on activity, gene and protein expression of superoxide dismutases in primary cultured human lens epithelial cells[J]. *Curr Eye Res*, 2018, 43(5): 639-646.
- [11] GANATRA D A, JOHAR K S, PARMAR T J, PATEL A R, RAJ-KUMAR S, ARORA A I, et al. Estrogen mediated protection of cytoskeleton against oxidative stress[J]. *Indian J Med Res*, 2013, 137(1): 117-124.
- [12] 王杰, 康刚劲, 袁雪峰, 徐曼华, 蒋燕, 罗波. 雌二醇通过增加端粒酶活性影响人LECs生长动力学的实验研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(3): 219-225.
- [13] WANG J, KANG G J, YUAN X F, XU M H, JIANG Y, LUO B. The regulation of estradiol on growth dynamics of human LECs affected by increasing telomerase activity[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(3): 219-225.
- [14] ROY S, SAHA S, GUPTA P, UKIL A, DAS P K. Crosstalk of PD-1 signaling with the sirt1/foxo-1 axis during the progression of visceral leishmaniasis[J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(9): 1-12.
- [15] LIAO Z, ZHANG J, WANG J, YAN T, XU F, WU B, et al. The anti-nephritic activity of a polysaccharide from okra via

- modulation of AMPK-SIRT1-PGC-1 α signaling axis mediated anti-oxidative in type 2 diabetes model mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 140 (1) : 568-576.
- [15] SASAKI Y, IKEDA Y, MIYAUCHI T, UCHIKADO Y, AKASAKI Y, OHISHI M. Estrogen-sirt1 axis plays a pivotal role in protecting arteries against menopause-induced senescence and atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2019, 26 (1) : 1-13.
- [16] LIARTE S, ALONSO ROMERO J L, NICOLAS F J. Sirt1 and estrogen signaling cooperation for breast cancer onset and progression [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9 (1) : 552-561.
- [17] WU Z, LAUER T W, SICK A, HACKETT S F, CAMPOCHIARO P A. Oxidative stress modulates complement factor H expression in retinal pigmented epithelial cells by acetylation of FOXO3 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (31) : 22414-22425.
- [18] BROOKS C L, GU W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation; the molecular basis for p53 regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15 (2) : 164-171.
- [19] XU Y H, SONG Q Q, LI C, HU Y T, SONG B B, YE J M, *et al.* Bouchardatine suppresses rectal cancer in mice by disrupting its metabolic pathways via activating the SIRT1-PGC-1 α -UCP2 axis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854 (1) : 328-337.
- [20] AGAOGLU N B, VAROL N, YILDIZ S H, KARAOSMANOGLU C, DUMAN R, OZDEMIR ERDOGAN M, *et al.* Relationship between SIRT1 gene expression level and disease in age-related cataract cases [J]. *Turk J Med Sci*, 2019, 49 (4) : 1068-1072.
- [21] XU K, WU S, LI Z, LOU H, YAO J, SUN H, SUN Y, DAI Y. Expression of sirt1 and p53 in rat lens epithelial cells in experimentally induced DM [J]. *Curr Eye Res*, 2018, 43 (4) : 493-498.

Anti-apoptotic effect of estradiol on human lens epithelial cells via SIRT1/P53 pathway

PAN Jiayu, KANG Gangjin, XU Manhua, PENG Zhenghong, SHEN Yuansha

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: KANG Gangjin, E-mail: 929460414@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the protective and anti-apoptotic mechanisms of estradiol (E_2) on H_2O_2 -induced oxidative damage in human lens epithelial cells (HLE-B3 cells). **Methods** HLE-B3 cells were treated with different concentrations of H_2O_2 , and the optimal concentration was selected. HLE-B3 cells were randomly divided into 5 groups: normal control group, model group ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$), low, medium and high concentration of E_2 group ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2 + 0.01, 0.10$ and $1.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} E_2$), to observe the morphological changes of cells in each group. The cell proliferation and apoptosis were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) and flow cytometry, to observe the effect of different concentrations of E_2 on HLE-B3 cells. The expression of silent information regulator 1 (SIRT1) mRNA and P53 mRNA were detected by RT-qPCR. Protein expression of SIRT1, tumor suppressor protein P53 and acetylate P53 (Ac-P53) were detected by Western blot. The distribution and fluorescence intensity of SIRT1 were detected by immunofluorescence chemistry. **Results** $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$ was the optimal concentration to induce oxidative stress in HLE-B3 cells. CCK-8 detection results showed: The proliferation rates of low, medium and high concentrations of estradiol groups were higher than that in model group (all $P < 0.05$). Flow cytometry test showed that the apoptosis rate in the model group was higher than that in other group: normal control group < high concentration of E_2 group < medium concentration of E_2 group < low concentration of E_2 group < model group (all $P < 0.05$). RT-qPCR and Western blot test showed that the expression of SIRT1 increased with the rising of E_2 concentration; high concentration of E_2 group > medium concentration of E_2 group > low concentration of E_2 group > model group > normal control group (all $P < 0.05$). The expression of Ac-P53 in normal control group was higher than that in high concentration of E_2 group, and no statistical difference was found ($P > 0.05$); model group > low concentration of E_2 group > medium concentration of E_2 group > high concentration of E_2 group (all $P < 0.05$). The expression of P53 in normal control group was lower than that in other group (all $P < 0.05$), and no statistical difference was found by pairwise comparison among other groups (all $P > 0.05$). Confocal immunofluorescence chemistry showed that the fluorescence intensity of SIRT1 increased with rising of estradiol concentration. **Conclusion** E_2 plays protective effect on HLE-B3 cells via SIRT1/P53 pathway, to inhibit Ac-P53 and decrease HLE-B3 cell apoptosis; the expression of SIRT1 increases with rising of E_2 concentration in the physiological concentration range.

[Key words] estradiol; human lens epithelial cells; silent information regulator 1; P53; cell apoptosis