

引文格式:张盼盼,董琪,华英彬,徐海峰.贝伐单抗对人视网膜色素上皮细胞形态、凋亡率及凋亡相关因子表达的影响[J].眼科新进展,2018,38(4):314-318. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0074

【实验研究】

贝伐单抗对人视网膜色素上皮细胞形态、凋亡率及凋亡相关因子表达的影响[△]

张盼盼 董琪 华英彬 徐海峰

作者简介:张盼盼,女,1990年7月出生,山东人,在读硕士研究生。研究方向:眼底病。联系电话:15053253240;E-mail:gongqm1216@163.com;ORCID:0000-0003-0557-1171

About ZHANG Pan-Pan: Female, born in July, 1990. Postgraduate student. Tel: 15053253240; E-mail: gongqm1216 @ 163. com; ORCID: 0000-0003-0557-1171

收稿日期:2017-08-23

修回日期:2017-09-28

本文编辑:董建军

△基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2014HM029)

作者单位:250022 山东省济南市,济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院 山东省眼科研究所 青岛眼科医院(张盼盼);266071 山东省青岛市,山东省眼科研究所 青岛眼科医院(董琪,华英彬,徐海峰)

通讯作者:徐海峰,E-mail:chxhf@126.com;ORCID:0000-0002-7300-5043

Received date: Aug 23, 2017

Accepted date: Sep 28, 2017

Foundation item: Shandong Provincial Natural Science Foundation (No: ZR2014HM029)

From the University of Jinan, School of Medicine and Life Science, Shandong Eye Institute, Qingdao Eye Hospital (ZHANG Pan-Pan), Jinan 250022, Shandong Province, China; Qingdao Eye Hospital, Shandong Eye Institute (DONG Qi, HUA Ying-Bin, XU Hai-Feng), Qingdao 266071, Shandong Province, China

Responsible author: XU Hai-Feng, E-mail: chxhf @ 126. com; ORCID: 0000-0002-7300-5043

Effects of bevacizumab on morphology and apoptosis of human retinal pigment epithelial cells as well as the expression of apoptosis-related factors

ZHANG Pan-Pan, DONG Qi, HUA Ying-Bin, XU Hai-Feng

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of bevacizumab on cell morphology, apoptosis rate and apoptosis-related factors in human retinal pigment epithelium-cells. **Methods** Human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) were cultured in DMEM/F12 medium containing 0.25 g · L⁻¹ bevacizumab and divided into 1-week dosing group and 2-week dosing group according to the different incubation time, respectively. Meanwhile, the control group was set up. Then, the cell morphology and apoptosis of each group were observed by light microscope and flow cytometry, accordingly. The expression levels of apoptosis-promoting genes P53, TP53INP1, Bax and apoptosis-inducible gene Bcl-2 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Light microscopic observation revealed that the cells in the 1-week control group and the 2-week control group showed typical epithelial cell morphology, and were in stone-like, single-layer adherent-like growth. Compared with the control group, part of the cell morphology after bevacizumab treatment changed slightly, and the cells became rounded, the cell body was elongated and the boundary was poor. The apoptotic rates of the 1-week control group, 1-week dosing group, 2-week control group and 2-week dosing group were (5.57 ± 1.46)%, (6.39 ± 1.25)%, (6.88 ± 1.10)% and (13.34 ± 1.94)%, respectively, and there was no significant difference in the apoptotic rate between 1-week control group, 1-week dosing group and 2-week control group (both *P* > 0.05), but the apoptotic rate of the 2-week dosing group was significantly higher than that of the 2-week control group, the 1-week dosing group and 1-week control group, and the differences were statistically significant (all *P* < 0.01). RT-PCR and Western blot results showed that compared with the 1-week control group, the expression of P53, TP53INP1 and Bax mRNA was up-regulated in 1-week dosing group, but the expression of Bcl-2 mRNA was down-regulated, and the differences were statistically significant (all *P* < 0.05). The expression levels of P53, TP53INP1 and Bax mRNA in 2-week dosing group were higher than those in 2-week control group and 1-week dosing group, while Bcl-2 mRNA expression was down-regulated, and the differences were statistically significant (all *P* < 0.05). There was no significant difference in the expression of the above factors in 1-week control group and 2-week control group (all *P* > 0.05). The protein expressions of above factors were similar to their mRNA expression. **Conclusion** Bevacizumab can alter the morphology of ARPE-19 cells, increase the apoptotic rate and up-regulate the expression of apoptosis-promoting factors, but down-regulate the expression of apoptosis-suppression factors in ARPE-19 cells, which may be the reason for the loss of RPE layer in the macula after anti-VEGF therapy.

[Key words] age-related macular degeneration; bevacizumab; human retinal pigment epithelial cells; cell apoptosis rate; apoptosis factors

【摘要】 目的 探讨贝伐单抗对人视网膜色素上皮细胞形态、凋亡率及凋亡相关因子表达的影响。方法 用含浓度为0.25 g · L⁻¹贝伐单抗的DMEM/F12培养液培养人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19),根据培养时间的不同分为1周加药组、2周加药组,同时设立1周对照组和2周对照组;用光镜观察各组细胞形态;采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况;用实时荧光定量PCR和Western blot检测凋亡促进基因P53、TP53INP1、Bax以及凋亡抑制基因Bcl-2的mRNA和相应蛋白的表达情况。结果 光镜下观察发现1周对照组和2周对照组的细胞呈典型上皮细胞形态,细胞形态呈铺路石样,单层贴壁样生长。贝伐单抗处理

不同时间后,显微镜下观察发现,1周加药组和2周加药组的部分细胞形态略有改变,出现变圆的细胞,胞体拉长,边界欠清。1周对照组、1周加药组、2周对照组、2周加药组的细胞凋亡率分别为 $(5.57 \pm 1.46)\%$ 、 $(6.39 \pm 1.25)\%$ 、 $(6.88 \pm 1.10)\%$ 、 $(13.34 \pm 1.94)\%$,1周加药组、1周对照组和2周对照组间细胞凋亡率差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$);2周加药组的细胞凋亡率均高于1周对照组、2周对照组和1周加药组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。与1周对照组相比,1周加药组的凋亡促进因子P53、TP53INP1、Bax mRNA的表达均升高,而凋亡抑制因子Bcl-2 mRNA的表达则降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);2周加药组P53、TP53INP1、Bax mRNA的表达均高于2周对照组和1周加药组,而Bcl-2 mRNA的表达则降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);1周对照组和2周对照组相比,各因子的表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。各因子蛋白的表达情况与mRNA类似。**结论** 贝伐单抗能改变ARPE-19细胞的形态,上调ARPE-19细胞的凋亡率和凋亡促进因子的表达,下调凋亡抑制因子的表达,可能是抗VEGF治疗后黄斑部视网膜色素上皮层缺失的原因之一。

【关键词】 年龄相关性黄斑变性;贝伐单抗;人视网膜色素上皮细胞;细胞凋亡率;凋亡因子

【中图分类号】 R774

目前玻璃体内注射抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体是年龄相关性黄斑变性(age-related degeneration, AMD)的一线治疗方法^[1-3]。尽管玻璃体内持续注射抗VEGF能够长期保持视觉功能,但近来研究发现,长期抗VEGF治疗可以加快AMD患者黄斑部地图状萎缩的进展^[4-7],其机制尚不清楚。在病理结构上,黄斑部萎缩最早和最明显的病变是视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)萎缩,研究表明,凋亡相关因子的协调表达对维持人RPE细胞形态和功能起重要作用^[8],本研究分析贝伐单抗对人视网膜色素上皮细胞-19(ARPE-19)细胞的形态、凋亡率以及凋亡相关因子表达的影响,进而探讨抗VEGF治疗后RPE萎缩的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 ARPE-19细胞(购自美国ATCC公司, CRL-2302), DMEM/F-12培养基(美国Invitrogen公司),胎牛血清(美国Gibco公司),胰蛋白酶(美国Sigma公司),注射用青霉素钠(哈尔滨哈药集团制药总厂),注射用硫酸链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司),贝伐单抗(瑞士罗氏公司),Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(日本TaKaRa公司),Real Master Mix(SYBR Green)试剂盒(北京天根生化科技有限公司),Bax抗体、Bcl-2抗体、TP53INP1抗体(兔抗人抗体,美国Abcam公司),Acetyl-P53抗体(兔抗人抗体,美国CST公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 在37℃、含体积分数5% CO₂的孵育箱中进行细胞培养,选用含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基,其中加入 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素培养ARPE-19细胞,细胞接种于6孔板中,将胎牛血清浓度调整为体积分数2%并加入终浓度为 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贝伐单抗(参照玻璃体内注射时的终浓度;每次用量 $1.25 \times 10^{-3} \text{ g}$,玻璃体容积 $4.5 \times 10^{-3} \text{ L}$,浓度为 $0.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),根据贝伐单抗处理时间的不同分为1周加药组、2周加药组,同时分别设立对照组为1周对照组、2周对照组。

1.2.2 光镜下观察细胞形态学变化 贝伐单抗处理后,分别培养至1周、2周后,在光学显微镜下观察各实验组的细胞形态变化。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 各实验组细胞经贝伐单抗处理相应时间,加入胰蛋白酶消化后, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min, PBS重悬后进行细胞计数,每组取 10^6 个细胞,用PBS洗2遍, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上清,参照凋亡试剂盒说明书加入相应试剂,避光染色30 min,立即于FACSCalibur流式细胞仪中在波长为488 nm激光下检测细胞的凋亡情况。绘制流式细胞图,左下象限为正常细胞($\text{AnV}^- \text{PI}^-$),右下象限为早期凋亡细胞($\text{AnV}^+ \text{PI}^-$),左上象限为损伤细胞($\text{AnV}^- \text{PI}^+$),右上象限为晚期凋亡细胞($\text{AnV}^+ \text{PI}^+$)。计算各组细胞凋亡率,实验重复3次。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测P53、TP53INP1、Bax和Bcl-2 mRNA的表达 收集各时间点的细胞,总RNA提取试剂盒提取各组细胞mRNA,并在紫外分光光度计上测量各组的260 nm和280 nm吸光度值,确定各组细胞RNA的浓度及纯度。根据反转录试剂盒说明书对提取的P53、TP53INP1、Bax和Bcl-2的mRNA进行反转录。采用ABI 7500实时荧光定量PCR系统,按Real Master Mix(SYBR Green)试剂盒说明书加入试剂进行PCR反应。反应条件:95℃预变性10 s,95℃变性15 s,60℃退火60 s,共45个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct代表循环阈值)表示目的基因的表达量。以GAPDH为内参,引物由青岛德罗海达生物技术有限公司设计并合成,目的基因及内参基因引物序列见表1。实验独立重复3次,取平均值。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

基因	引物序列
GAPDH	F:5'-ATGCTGGCGCTGAGTACGT-3'
	R:5'-AGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'
P53	F:5'-CCTGAGGTTGGCTCTGACTGTA-3'
	R:5'-CACGCACCTCAAAGCTGTTTC-3'
TP53INP1	F:5'-CCTGAGGTTGGCTCTGACTGTA-3'
	R:5'-CACGCACCTCAAAGCTGTTTC-3'
Bax	F:5'-GGGTGTCGCCCTTTTCTACT-3'
	R:5'-CCCAACCACCTGGCTCTTG-3'
Bcl-2	F:5'-ACGGTGGTGGAGGAGACTCTT-3'
	R:5'-GCCGGTTCAGGTACTCAGTCAT-3'

1.2.5 Western blot 测定 Acetyl-P53、TP53INP1、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 不同时间点收集细胞,提取各组细胞总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,按每个样本 50 μg 总蛋白上样,行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压设置为 80 V,跑约 30 min,调整电压为 120 V,约 90 min 后待溴酚蓝跑到板底时,停止电泳;在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下,100 mA 电转膜 3 h,50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 Bax、Bcl-2 一抗(均为 1 : 2000)、Acetyl-P53 一抗(1 : 500)、TP53INP1 一抗(1 : 300)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第 2 天洗膜后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔 IgG,1 : 3000)室温孵育 1 h。免疫反应结束后化学发光试剂发光,暗室曝光显影。Gel-Del 凝胶成像系统照相,应用 Image J 图像分析软件进行统计学分析。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验对所得的实验数据进行统计学分析,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 贝伐单抗处理后各组 ARPE-19 细胞的形态变化 光镜下观察发现,1 周对照组和 2 周对照组的细胞呈典型上皮细胞形态,细胞形态呈铺路石样,单层贴壁样生长。贝伐单抗处理不同时间后,显微镜下观察,1 周加药组和 2 周加药组的部分细胞形态略有改变,出现变圆的细胞,胞体拉长,边界欠清(图 1)。

2.2 各组 ARPE-19 细胞凋亡率 流式细胞仪检测结果显示,1 周对照组、1 周加药组、2 周对照组、2 周加药组的细胞凋亡率分别为 $(5.57 \pm 1.46)\%$ 、 $(6.39 \pm 1.25)\%$ 、 $(6.88 \pm 1.10)\%$ 、 $(13.34 \pm 1.94)\%$,1 周加药组、1 周对照组和 2 周对照组间细胞凋亡率差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$);2 周加药组的细胞凋亡率均高于 1 周对照组、2 周对照组和 1 周加药组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),见图 2。

图 1 贝伐单抗处理后各组 ARPE-19 细胞的形态变化

图 2 流式细胞仪检测各组的细胞凋亡率

2.3 实时荧光定量 PCR 检测各组 P53、TP53INP1、Bax、Bcl-2 mRNA 的表达 实时荧光定量 PCR 检测结果显示:与 1 周对照组相比,1 周加药组的凋亡促进因子 P53、TP53INP1、Bax mRNA 的表达均升高,而凋亡抑制因子 Bcl-2 mRNA 的表达则降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);2 周加药组 P53、TP53INP1、Bax mRNA 的表达均高于 2 周对照组和 1 周加药组,而 Bcl-2 mRNA 的表达则降低,差异均

有统计学意义(均为 $P < 0.05$);1 周对照组和 2 周对照组相比,各因子的表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),见表 2。

2.4 Western blot 检测各组 Acetyl-P53、TP53INP1、Bax、Bcl-2 蛋白的表达 与 1 周对照组相比,1 周加药组的凋亡促进因子 P53、TP53INP1、Bax 蛋白的表达均升高,而凋亡抑制因子 Bcl-2 蛋白的表达则降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);2 周加药

组 Acetyl-P53、TP53INP1、Bax 蛋白的表达均高于 2 周对照组和 1 周加药组,而 Bcl-2 蛋白的表达则降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);1 周对照

组和 2 周对照组相比,各因子的表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),见表 3 和图 3。

表 2 各组相关凋亡因子 mRNA 表达

组别	P53	TP53INP1	Bax	Bcl-2
1 周对照组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.10
1 周加药组	1.20 ± 0.03 ^a	1.21 ± 0.09 ^a	1.26 ± 0.07 ^a	0.63 ± 0.03 ^a
2 周对照组	0.93 ± 0.09 ^b	1.00 ± 0.03 ^b	1.02 ± 0.00 ^b	1.06 ± 0.08 ^b
2 周加药组	1.57 ± 0.05 ^{cd}	1.89 ± 0.08 ^{cd}	1.41 ± 0.02 ^{cd}	0.40 ± 0.05 ^{cd}

注:与 1 周对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$;与 2 周对照组相比,^c $P < 0.05$;与 1 周加药组相比,^d $P < 0.05$

表 3 各组相关凋亡因子蛋白表达

组别	Acetyl-P53	TP53INP1	Bax	Bcl-2
1 周对照组	1.00 ± 0.01	1.02 ± 0.01	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.00
1 周加药组	2.35 ± 0.04 ^a	3.63 ± 0.03 ^a	1.30 ± 0.07 ^a	0.87 ± 0.05 ^a
2 周对照组	1.03 ± 0.05 ^b	1.06 ± 0.02 ^b	1.05 ± 0.04 ^b	0.94 ± 0.00 ^b
2 周加药组	3.03 ± 0.08 ^{cd}	5.38 ± 0.06 ^{cd}	1.64 ± 0.09 ^{cd}	0.33 ± 0.04 ^{cd}

注:与 1 周对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$;与 2 周对照组相比,^c $P < 0.05$;与 1 周加药组相比,^d $P < 0.05$

图3 Western blot 检测各组 Acetyl-P53、TP53INP1、Bax、Bcl-2 的蛋白表达

3 讨论

抗 VEGF 治疗是目前治疗湿性 AMD 的首选治疗方法,但随着治疗以及随访时间的延长,临床发生黄斑部进行性萎缩的几率不断增加,且黄斑部萎缩的发生与抗 VEGF 治疗有明显的相关性^[9-11]。黄斑部的变性常伴有 RPE 层的缺失及变性^[12-13],RPE 是眼底一层重要的细胞结构,其分泌的许多细胞因子对维持眼内微环境具有重要作用,因此,本研究以 ARPE-19 细胞的凋亡率及凋亡相关因子为检测指标,探讨长期抗 VEGF 治疗是否通过影响 RPE 细胞的凋亡而参与黄斑部萎缩的发生。

长期抗 VEGF 治疗可以加速黄斑部地图状萎缩的进展,Dunaief 等^[14]发现在干性 AMD 中黄斑部地图状萎缩的边缘存在 RPE 细胞的凋亡,因此,我们采用流式细胞仪检测贝伐单抗处理后 ARPE-19 细胞的凋亡率,发现贝伐单抗处理后细胞凋亡率升高且呈时间依赖性,因此我们推测长期抗 VEGF 引发的 RPE 细胞的凋亡可能是黄斑部地图状萎缩的原因之一。

尽管抗 VEGF 治疗可能会诱导 RPE 细胞凋亡,促进黄斑部地图状萎缩的发生,但目前抗 VEGF 治疗湿性 AMD 的作用尚无其他方法可以替代,因此探讨 RPE 凋亡发生的机制以及寻找可靠的保护措施具有重要意义。

本研究我们进一步检测了抗 VEGF 药物贝伐单抗共培养后 ARPE-19 细胞的凋亡相关基因的表达情况。P53 是调控细胞凋亡、损伤修复、细胞衰老的重要细胞因子^[15-16],肿瘤抑制蛋白 P53 翻译后修饰的一种重要形式是乙酰化,乙酰化不仅可以增强 P53 的稳定性,还可以提高 P53 的转录活性^[17-18]。TP53INP1 是 P53 的靶基因,可编码两种蛋白质 TP53INP1 α 和 TP53INP1 β ,这种同系物的合成在细胞应激期间增加 P53 介导的转录激活,进而诱导 P53 介导的细胞凋亡^[19-22]。本研究发现,未经贝伐单抗处理的细胞,即 1 周对照组和 2 周对照组 P53 和 TP53INP1 的 mRNA 和 Acetyl-P53 和 TP53INP1 蛋白表达的差异无统计学意义,因此可以排除因培养时间不同对各实验组的影响。1 周加药组和 2 周加药组 P53、TP53INP1 的 mRNA 和 Acetyl-P53、TP53INP1 的蛋白表达分别高于 1 周对照组和 2 周对照组,且 2 周加药组的表达明显高于 1 周加药组,差异有统计学意义。由此可见,贝伐单抗可使 P53 和 TP53INP1 的 mRNA 以及 Acetyl-P53 和 TP53INP1 蛋白的表达水平提高,并且呈时间依赖性;肿瘤抑制因子 P53 通过调节促凋亡蛋白 Bax 的转录激活和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达来诱导凋亡^[23-25]。作为癌基因衍生的抗细胞凋亡蛋白,Bcl-2 在细胞凋亡过程中发挥抑制作用,而 Bax 是 Bcl-2 同源的凋亡蛋白,通过与 Bcl-2 竞争来促进细胞死亡。已知 Bcl-2/Bax 的比率降低可促进 Bax 介导的细胞凋亡^[26-27]。因此,本研究观察了贝伐单抗处理不同时间后 RPE 细胞中 Bax 和

Bcl-2 的表达, 研究结果发现, 经贝伐单抗处理后, 细胞凋亡促进因子 Bax 的 mRNA 和蛋白表达显著升高, 细胞凋亡抑制因子 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达显著降低, 且呈时间依赖性, Bcl-2/Bax 的比值较前显著下调。以上结果表明, 抗 VEGF 治疗可能通过上调促凋亡基因, 降低凋亡抑制基因的表达来诱导 RPE 细胞的凋亡, 加重黄斑部地图状萎缩的发生。

综上所述, 临床浓度的贝伐单抗可诱导 RPE 细胞的凋亡, 从而促进或加重黄斑部地图状萎缩的发生, 因此需要探讨最佳的给药频率, 以争取在维持疗效的同时降低其副作用; 同时, 探索具有针对性的保护措施具有重要意义。

参考文献

- [1] ROSENFELD PJ, BROWN DM, HEIER JS, BOYER DS, KAISER PK, CHUNG CY, *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (14): 1419-1431.
- [2] BROWN DM, KAISER PK, MICHELS M, SOUBRANE G, HEIER JS, KIM RY, *et al.* Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age related macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (14): 1432-1444.
- [3] MARTIN DF, MAGUIRE MG, FINE SL, YING GS, JAFFE GJ, GRUNWALD JE, *et al.* Ranibizumab and Bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119 (7): 1388-1398.
- [4] GRUNWALD JE, DANIEL E, HUANG J, YING GS, MAGUIRE MG, TOTH CA, *et al.* Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121 (1): 150-161.
- [5] GRUNWALD JE, PISTILLI M, YING GS, MAGUIRE MG, DANIEL E, MARTIN DF, *et al.* Growth of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials [J]. *Ophthalmology*, 2015, 122 (4): 809-816.
- [6] CHAKRAVARTHY U, HARDING SP, ROGERS CA, DOWNES SM, LOTERY AJ, CULLIFORD LA, *et al.* Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2013, 382 (9900): 1258-1267.
- [7] LOIS N, MCBAIN V, ABDELKADER E, SCOTT N, KUMARI R. Retinal pigment epithelial atrophy in patients with exudative age-related macular degeneration under going anti-vascular endothelial growth factor therapy [J]. *Retina*, 2013, 33 (1): 13-22.
- [8] AREND N, WERTHEIMER C, LAUBICHLER P, WOLF A, KAMPIK A, KERNT M. Idebenone prevents oxidative stress, cell death and senescence of retinal pigment epithelium cells by stabilizing Bax/Bcl-2 ratio [J]. *Ophthalmologica*, 2015, 234 (2): 73-82.
- [9] YING GS, KIM BJ, MAGUIRE MG, HUANG J, DANIEL E, JAFFE GJ, *et al.* Sustained visual acuity loss in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132 (8): 915-921.
- [10] LI X, XU G, WANG Y, XU X, LIU X, TANG S, *et al.* Safety and efficacy of conbercept in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121 (9): 1740-1747.
- [11] DANIEL E, SHAFFER J, YING GS, GRUNWALD JE, MARTIN DF, JAFFE GJ, *et al.* Outcomes in eyes with retinal angio-
- matous proliferation in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123 (3): 609-616.
- [12] MUNK MR, CEKLC L, EBNETER A, HUF W, WOLF S, ZINKERNAGEL MS, *et al.* Macular atrophy in patients with long-term anti-VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Acta Ophthalmol*, 2016, 94 (8): e757-e764.
- [13] HWANG JC, DEL PRIORE LV, FREUND KB, CHANG S, IRANMANESH R. Development of subretinal fibrosis after anti-vegf treatment in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2011, 42 (1): 6-11.
- [14] DUNAIEF JL, DENTCHEV T, YING GS, MILAM AH. The role of apoptosis in age-related macular degeneration [J]. *Arch Ophthalmol*, 2002, 120 (11): 1435-1442.
- [15] SHARMA G, RANA NK, SINGH P, DUBEY P, PANDEY DS, KOCH B. p53 dependent apoptosis and cell cycle delay induced by heteroleptic complexes in human cervical cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 218-231.
- [16] SETOGUCHI K, TESLAA T, KOEHLER CM, TEITELL MA. P53 regulates rapid apoptosis in human pluripotent stem cells [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428 (7): 1465-1475.
- [17] RYU HW, SHIN DH, LEE DH, CHOI J, HAN G, LEE KY, *et al.* HDAC6 deacetylates p53 at lysines 381/382 and differentially coordinates p53-induced apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2017, 391: 162-171.
- [18] AI G, DACHINENI R, KUMAR DR, MARIMUTHU S, ALFONSO LF, BHAT GJ, *et al.* Aspirin acetylates wild type and mutant p53 in colon cancer cells; identification of aspirin acetylated sites on recombinant p53 [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37 (5): 6007-6016.
- [19] SEILLIER M, PEUGET S, GAYET O, GAUTHIER C, N' GUESAN P, MONTE M, *et al.* TP53INP1, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LC3-interacting region (LIR) and promotes autophagy-dependent cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19 (9): 1525-1535.
- [20] OKAMURA S, ARAKAWA H, TANAKA T, NAKANISHI H, NG CC, TAYA Y, *et al.* p53 DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2001, 8 (1): 85-94.
- [21] WEI Q, LI YX, LIU M, LI X, TANG H. MiR-17-5p Targets TP53INP1 and regulates cell proliferation and apoptosis of cervical cancer cells [J]. *Iubmb Life*, 2012, 64 (8): 697-704.
- [22] TOMASINI R, SAMIR AA, CARRIER A, ISNARDON D, CECCHINELLI B, SODDU S, *et al.* TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (39): 37722-37729.
- [23] LEU J, DUMONT P, HAFEY M, MURPHY ME, GEORGE DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6 (5): 443-450.
- [24] MIHARA M, ERSTER S, ZAIKA A, PETRENKO O, CHITTENDEN T, PANCOSKA P, *et al.* P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria [J]. *Mol Cell*, 2003, 11 (3): 577-590.
- [25] VOUSDEN KH, LU X. Live or let die; the cell's response to p53 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (8): 594-604.
- [26] SAVORY J, RAO JK, HUANG Y, LETADA PR, HERMAN MM. Age-related hippocampal changes in Bcl-2: Bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis associated with aluminum-induced neurodegeneration; increased susceptibility with aging [J]. *Neurotoxicology*, 1999, 20 (5): 805-817.
- [27] ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 281 (5381): 1322-1326.