

## · 实验研究 ·

## 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

王杰 康刚劲 袁雪峰 徐曼华 蒋燕 罗波

646000 泸州,四川医科大学附属第一医院眼科[王杰(现在资阳市第一人民医院眼科)、康刚劲、徐曼华、蒋燕];641300 四川省资阳市,资阳市第一人民医院耳鼻喉科(袁雪峰);646000 泸州,四川医科大学生物化学教研室(罗波)

通信作者:康刚劲,Email:929460414@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.006

**【摘要】** **背景** 人 LECs 表达端粒酶活性,其活性改变与白内障的形成相关。研究证实,雌激素能增加人子宫内腺癌及乳腺癌细胞的端粒酶活性,从而发挥促进增生、抗凋亡作用,但能否增加人 LECs 中的端粒酶活性从而影响其生物学功能,国内外鲜见报道。**目的** 探讨  $\beta$  型雌二醇 ( $\beta$ -E<sub>2</sub>) 是否能增加人 LECs 端粒酶活性及其对人 LECs 增生和凋亡的影响。**方法** 体外培养并传代人 LECs 细胞系,先用  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 分别作用人 LECs 0、6、12、24 和 48 h,采用 RT-PCR 法确定增加人 LECs 中端粒酶逆转录酶 (hTERT) mRNA 表达的最佳时间。将培养的人 LECs 细胞分为 5 个组,空白对照组细胞进行常规培养,溶剂对照组在培养液中添加体积分数 0.1% 乙醇,不同浓度  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组分别在培养液中添加  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub>,继续培养细胞 24 h,采用 RT-PCR 法检测各组人 LECs 中 hTERT mRNA 的相对表达量;采用端粒重复序列扩增 (TRAP)-ELISA 法检测端粒酶活性;采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法检测各组细胞的增值值;采用 Hoechst33258 荧光染色法分析人 LECs 的凋亡情况。**结果**  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度下能够增加人 LECs 中 hTERT mRNA 相对表达量的最佳作用时间为 24 h。 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组人 LECs 中 hTERT mRNA 的相对表达量分别为  $0.477 \pm 0.015$ 、 $0.712 \pm 0.013$  和  $0.914 \pm 0.031$ ,明显高于空白对照组的  $0.428 \pm 0.010$  及溶剂对照组的  $0.426 \pm 0.010$ ,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组端粒酶活性值分别为  $0.711 \pm 0.015$ 、 $0.941 \pm 0.010$  和  $1.249 \pm 0.047$ ,明显高于空白对照组的  $0.535 \pm 0.013$  和溶剂对照组的  $0.543 \pm 0.013$ ,差异均有统计学意义(均  $P = 0.000$ )。 $1 \times 10^{-8}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组细胞的增值值(A 值)明显高于  $1 \times 10^{-7}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组,差异均有统计学意义(均  $P = 0.000$ ),而  $1 \times 10^{-7}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组与空白对照组间细胞中的细胞增值值间差异均无统计学意义( $P = 0.718$ 、 $0.856$ )。 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组的细胞凋亡率均低于空白对照组和溶剂对照组(均  $P = 0.000$ );空白对照组与溶剂对照组间比较差异无统计学意义( $P = 0.777$ )。人 LECs 增值值与 hTERT mRNA 相对表达量及端粒酶活性值间无明显直线相关关系( $r = -0.299$ ,  $P = 0.278$ ;  $r = -0.157$ ,  $P = 0.576$ )。人 LECs 凋亡率与 hTERT mRNA 相对表达量及端粒酶活性值间均呈明显负相关( $r = -0.975$ ,  $P = 0.000$ ;  $r = -0.981$ ,  $P = 0.000$ )。**结论**  $\beta$ -E<sub>2</sub> 能上调人 LECs 中的端粒酶活性,稍高浓度的  $\beta$ -E<sub>2</sub> 可能通过增加人 LECs 的端粒酶活性而抑制细胞凋亡,但无促增生作用。

**【关键词】** 晶状体上皮细胞;雌二醇;端粒酶;年龄相关性,白内障;凋亡;增生;细胞培养;细胞系**基金项目:** 泸州市科技计划项目 [2015LZCYD-S05(4/12)]**The regulation of estradiol on growth dynamics of human LECs affected by increasing telomerase activity**

Wang Jie, Kang Gangjin, Yuan Xuefeng, Xu Manhua, Jiang Yan, Luo Bo

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China (Wang J [Department of Ophthalmology, First People's Hospital of Ziyang City now], Kang GJ, Xu MH, Jiang Y); Department of E. N. T, First People's Hospital of Ziyang City, Ziyang 641300, China (Yuan XF); Department of Biochemistry, Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China (Luo B)

Corresponding author: Kang Gangjin, Email: 929460414@qq.com

**[Abstract]** **Background** Human LECs can express telomerase activity, which participates in the formation of

cataract. It is reported that estrogen can increase the expression of telomerase activity in human endometrial cancer and breast cancer cells and play an important role in promoting proliferation and anti-apoptosis, but whether estrogen exerts its role on human LECs is still unclear. **Objective** This study aimed to investigate whether  $\beta$ -estradiol ( $\beta$ -E<sub>2</sub>) can increase the telomerase activity of human LECs and the influence of  $\beta$ -E<sub>2</sub> on proliferation and apoptosis of human LECs. **Method** Human LECs line was cultured and passaged *in vitro*, and  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> was added in the medium for 0, 6, 12, 24 and 48 hours, and reverse transcription PCR was used to determine the optimal time of the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in the cells. Cultured cells were divided into five groups. The cells in the blank control group were cultured in the routine medium. Ethanol of 0.1% was added in the solvent control group, and  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  or  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> was added in the medium in different contents of  $\beta$ -E<sub>2</sub> groups, respectively. The relative expression level of hTERT mRNA in different groups was detected by reverse transcription PCR. Telomere repeat amplification protocol (TRAP)-ELISA was employed to determine the telomerase activity. The proliferative value of the cells was assayed by cell counting kit-8, and the apoptosis rate of the cells was examined by Hoechst33258 staining. **Results** The optimal time of  $\beta$ -E<sub>2</sub> to rise the expression of hTERT mRNA (absorbance) was at 24 hours under the  $1 \times 10^{-6}$  mol/L. The relative expression levels of hTERT mRNA in the cells were  $0.477 \pm 0.015$ ,  $0.712 \pm 0.013$  and  $0.914 \pm 0.031$  in the  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> group, which were significantly higher than  $0.428 \pm 0.010$  in the blank control group and  $0.426 \pm 0.010$  in the solvent control group (all at  $P < 0.05$ ). The telomerase activity values (absorbance) were  $0.711 \pm 0.015$ ,  $0.941 \pm 0.010$  and  $1.249 \pm 0.047$  in the  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> group, which were higher than  $0.535 \pm 0.013$  in the blank control group and  $0.543 \pm 0.013$  in the solvent control group (all at  $P = 0.000$ ). The proliferative values of the cells (absorbance) were significantly raised in the  $1 \times 10^{-8}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> group compared with  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> group (both at  $P = 0.000$ ), and no significant difference was found in the proliferative values between the blank control group and the solvent control group ( $P = 0.718, 0.856$ ). The apoptosis rates of the cells in the  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> group were lower than those in the blank control group and the solvent control group (all at  $P = 0.000$ ), and there was no significant difference between the blank control group and the solvent control group ( $P = 0.777$ ). No obvious correlation was found between the HLECs proliferative values and hTERT mRNA expression levels or telomerase activity values ( $r = -0.299, P = 0.278; r = -0.157, P = 0.576$ ). However, significantly negative correlations were seen between apoptosis rates and hTERT mRNA expression levels or telomerase activity values ( $r = -0.975, P = 0.000; r = -0.981, P = 0.000$ ). **Conclusions**  $\beta$ -E<sub>2</sub> can increase the activity of telomerase in human LECs, and high dose of  $\beta$ -E<sub>2</sub> can inhibit apoptosis, but it does not promote proliferation.

**[Key words]** Epithelial cells; lens; Estradiol; Telomerase; Cataract, age-related; Apoptosis; Proliferation; Cell, cultured; Cell line

**Fund program:** Luzhou Science and Technology Project (2015LZCYD-S05[4/12])

端粒的缩短与大量代谢性、退化性及年龄相关性疾病密切相关<sup>[1]</sup>。端粒酶作为一种逆转录酶,以自身RNA为模板合成新的端粒DNA序列,添加到端粒末端,发挥调节细胞周期与衰老、增生与凋亡的作用<sup>[2]</sup>。雌激素增加端粒酶活性并发挥抗凋亡等作用的研究主要集中在人子宫内膜癌细胞<sup>[3]</sup>、乳腺癌细胞<sup>[4]</sup>等高表达端粒酶活性的细胞中,其对于人LECs的作用国内外均鲜见研究。研究表明,人LECs属于雌激素受体阳性细胞且自身少量表达端粒酶活性<sup>[5-6]</sup>,由此推测雌激素能上调人LECs中端粒酶的活性,抑制人LECs的凋亡,从而控制及延缓年龄相关性白内障的发生和发展。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 标准永生化人LECs系SRA01/04(四川大学分子生物学实验室提供);低糖型DMEM、优

级胎牛血清(fetal bovin serum, FBS)(美国HyClone公司);总RNA提取及RT-PCR试剂盒(成都BioBRK生物技术有限公司);端粒重复序列扩增(telomere repeat amplification protocol, TRAP)-ELISA试剂盒(德国宝灵曼生物有限公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒、 $\beta$ 型雌二醇( $\beta$ -estradiol,  $\beta$ -E<sub>2</sub>)粉末(北京Solarbio公司);Hoechst染色试剂盒(上海Beyotime公司)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞的培养和分组** 用含体积分数15% FBS、质量分数1%双抗的低糖型DMEM完全培养液中培养人LECs SRA01/04,在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育,每2天换液1次,3~4 d传代1次。取对数生长期且达70%~80%融合的细胞接种在培养孔板,按照干预方法的不同进行分组。空白对照组常规培养人

LECs, 溶剂对照组在培养液中添加体积分数 0.1% 乙醇,  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组分别在培养液中添加  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub>。每组设 3 个平行对照组。

**1.2.2 RT-PCR 法检测人 LECs 中人端粒酶逆转录酶 mRNA 的表达** 用  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 分别干预人 LECs 0、6、12、24 和 48 h, 采用 RT-PCR 法检测人 LECs 中人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) mRNA 的相对表达, 以 GAPDH 作为内参。待接种于 6 孔板上的细胞长满瓶底约 70% 时, 按照实验分组予以相应浓度的  $\beta$ -E<sub>2</sub> 干预相应时间后收集各组人 LECs。常规提取总 RNA 并逆转录为 cDNA 后行 PCR。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 54.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环 30 次。引物序列: hTERT 上游引物为 5'-GCTCCAGGCACAACGAAC-3', 下游引物为 5'-CTCGACGACGTACACACTCATC-3'; GAPDH 上游引物为 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', 下游引物为 5'-CCATCACGCCACGCCACAGTTTCC-3'。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳并经 Bio-Rad 凝胶成像系统扫描, 图像输入 Quantity One 软件进行灰度分析, hTERT 吸光度 (A) 值与 GAPDH (A) 值之比即 hTERT mRNA 表达丰度。

**1.2.3 TRAP-ELISA 法检测端粒酶活性** 收集各实验组人 LECs 后, 按 TRAP-ELISA 试剂盒说明书制备端粒酶提取液。取部分提取液在 94 °C 条件下灭活 10 min 作为阴性对照。在微量离心管中依次加入端粒酶测定混合液 25  $\mu$ l、提取液 5  $\mu$ l、无菌 DEPC 水 20  $\mu$ l, 按说明书进行扩增反应。将 5  $\mu$ l PCR 产物与 20  $\mu$ l 变性液混匀, 室温放置 20 min, 加入杂交液 225  $\mu$ l, 混匀。取 100  $\mu$ l 加入包被于亲和素的微孔板中, 37 °C、300 r/min 摇床上孵育 2 h。冲洗后加入过氧化物酶标记的地高辛抗体 100  $\mu$ l, 37 °C、300 r/min 摇床上孵育 30 min, 冲洗后加入 100  $\mu$ l 四甲基联苯胺, 37 °C、300 r/min 摇床上显色 20 min 后加入终止液 100  $\mu$ l。30 min 内在 ELISA 酶标仪上测波长为 450 nm 和 690 nm 处的 A 值, 以二者的差值代表细胞端粒酶活性。每组设 3 个复孔。

**1.2.4 CCK-8 法检测人 LECs 的增值** 按实验分组处理接种于 96 孔板中的人 LECs 后, 吸尽培养液, 新鲜培养液洗涤细胞 2 次, 加入 100  $\mu$ l 不含  $\beta$ -E<sub>2</sub> 的培养液, 然后每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液继续孵育细胞 2.5 h, 酶标仪上测定 450 nm 处各孔增值 (A)。每组设 3 个复孔。

**1.2.5 Hoechst33258 荧光染色检测人 LECs 的凋亡率** 体积分数 70% 乙醇浸泡盖玻片 5 min, 晾干后置于 6 孔板底部。接种人 LECs 2 ml 于 6 孔板中进行培养, 至

人 LECs 覆盖盖玻片约 70% 后按实验分组处理各孔细胞。吸尽培养液, 加入 0.5 ml 固定液固定细胞 10 min, 弃固定液, PBS 清洗后加入 0.5 ml Hoechst33258 染色液, 染色 5 min。PBS 清洗后滴 1 滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 倒置荧光显微镜下观察并照相, 用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件计算凋亡细胞所占百分比。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件 (IBM SPSS statistics) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验和组间均数 Levene 多样本方差齐性检验, 符合正态分布且方差齐, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用均衡分组单因素多水平实验设计, 各组间检测指标的总差异比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。双变量间的关系分析采用 Pearson 线性相关分析, 对相关系数进行假设检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 培养的人 LECs 的形态学表现

光学显微镜下观察人 LECs 的形态及生长状态显示, LECs 大小均匀, 细胞质透亮, 细胞核居中, 清晰可见, 细胞增生活跃 (图 1)。

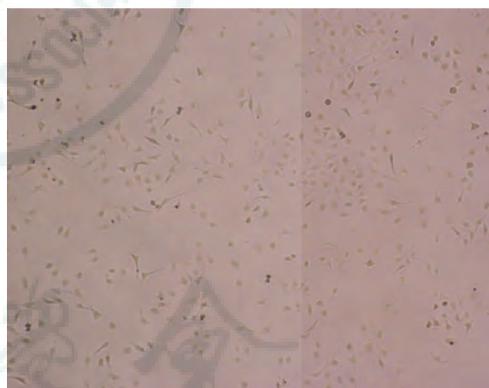
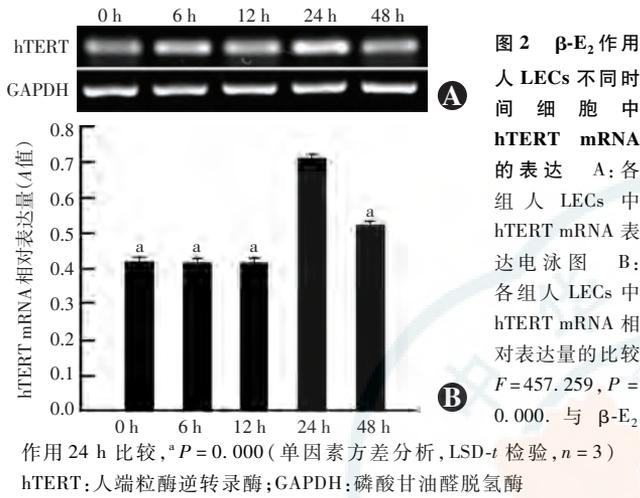


图 1 光学显微镜下观察培养的人 LECs ( $\times 100$ ) LECs 大小均匀, 细胞质透亮, 细胞核居中, 细胞增生活跃

### 2.2 $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用不同时间人 LECs 中 hTERT mRNA 的相对表达

内参 GAPDH 及 hTERT 的电泳条带与在 GenBank 中查找到的序列扩增长度一致, 为特异性扩增片段。 $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用人 LECs 0、6、12 h hTERT mRNA 的表达条带强度接近,  $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用 24 h 表达条带明显增强,  $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用 48 h 表达条带减弱。 $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用人 LECs 0、6、12、24 和 48 h hTERT mRNA 相对表达量 (A 值) 分别为  $0.424 \pm 0.010$ 、 $0.420 \pm 0.010$ 、 $0.420 \pm 0.010$ 、 $0.712 \pm 0.010$  和  $0.524 \pm 0.112$ , 各时间点总体比较差异有统计学意义。

( $F = 457.259, P = 0.000$ ), 其中  $\beta\text{-E}_2$  作用 24 h 时 hTERT mRNA 的相对表达最高, 与其余各组比较差异均有统计学意义(均  $P = 0.000$ );  $\beta\text{-E}_2$  作用 6 h 和 12 h 组与空白对照组比较差异均无统计学意义( $P = 0.641, 0.601$ )(图 2)。

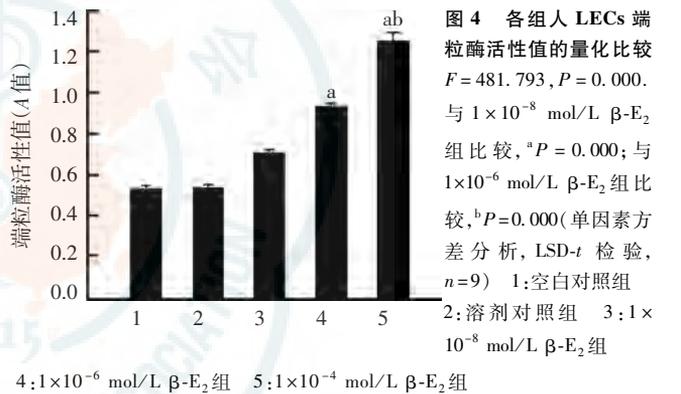
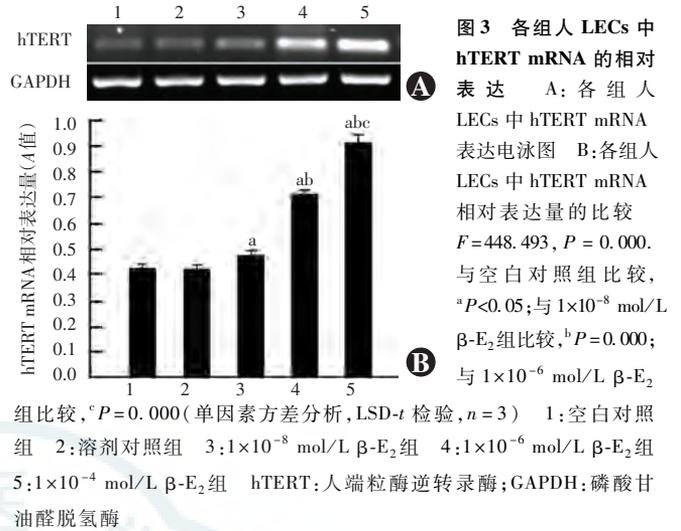


### 2.3 不同组间人 LECs 中 hTERT mRNA 相对表达量的比较

空白对照组、溶剂对照组细胞中 hTERT mRNA 表达条带强度接近,  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 组人 LECs 中 hTERT mRNA 表达条带逐渐增强。空白对照组、溶剂对照组及  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-4}$  mol/L hTERT mRNA 的相对表达量(A 值)分别为  $0.428 \pm 0.010$ 、 $0.426 \pm 0.010$ 、 $0.477 \pm 0.015$ 、 $0.712 \pm 0.013$  和  $0.914 \pm 0.031$ , 组间总体比较差异有统计学意义( $F = 448.493, P = 0.000$ ), 其中空白对照组与溶剂对照组中 hTERT mRNA 相对表达量的差异无统计学意义( $P = 0.885$ )。  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta\text{-E}_2$  组中 hTERT mRNA 的相对表达逐渐增高, 两两比较差异均有统计学意义(均  $P = 0.000$ )(图 3)。

### 2.4 各组人 LECs 中的端粒酶活性

正常人 LECs 中可检测到端粒酶活性(A 值), 空白对照组、溶剂对照组及  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta\text{-E}_2$  组细胞中 A 值的总体比较差异有统计学意义( $F = 481.793, P = 0.000$ ), 其中空白对照组和溶剂对照组端粒酶活性分别为  $0.535 \pm 0.013$  和  $0.543 \pm 0.013$ , 差异无统计学意义( $P = 0.693$ )。  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta\text{-E}_2$  组的端粒酶活性逐渐增高, 分别为  $0.711 \pm 0.015$ 、 $0.941 \pm 0.010$  和  $1.249 \pm 0.047$ , 差异均有统计学意义(均  $P = 0.000$ )。 各组人 LECs 端粒酶活性表达趋势与 hTERT mRNA 相对表达一致(图 4)。



### 2.5 各组人 LECs 的增生情况

空白对照组、溶剂对照组及  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta\text{-E}_2$  组人 LECs 增生值(A)总体比较差异有统计学意义( $F = 187.685, P = 0.000$ )。  $1 \times 10^{-8}$  mol/L  $\beta\text{-E}_2$  组人 LECs 增生值明显高于空白对照组, 差异有统计学意义( $P = 0.000$ ); 溶剂对照组、 $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta\text{-E}_2$  组和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta\text{-E}_2$  组与空白对照组比较差异均无统计学意义( $P = 0.823, 0.718, 0.856$ )(表 1)。

**表 1 各组人 LECs 的增生值比较( $\bar{x} \pm s, A$  值)**

组别	样本量	人 LECs 的增生值
空白对照组	9	$0.6047 \pm 0.0152$
溶剂对照组	9	$0.6077 \pm 0.0166$
$1 \times 10^{-8}$ mol/L $\beta\text{-E}_2$ 组	9	$0.8881 \pm 0.0203^a$
$1 \times 10^{-6}$ mol/L $\beta\text{-E}_2$ 组	9	$0.6009 \pm 0.0103$
$1 \times 10^{-4}$ mol/L $\beta\text{-E}_2$ 组	9	$0.6072 \pm 0.0162$
$F$		187.685
$P$		0.000

注: 与空白对照组比较,  $^a P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验) LECs: 晶状体上皮细胞

### 2.6 各组人 LECs 的凋亡率

正常人 LECs 呈均匀蓝色, 凋亡细胞呈碎块状致密浓染(图 5)。各组间人 LECs 凋亡率的总体比较差异有统计学意义 ( $F = 140.092, P = 0.000$ ),  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组随着  $\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度的下降细胞凋亡率逐渐降低, 分别为 ( $8.21 \pm 0.31$ )%、( $5.29 \pm 0.37$ )% 和 ( $3.25 \pm 0.29$ )%, 均明显低于空白对照组的 ( $9.68 \pm 0.64$ )% 和溶剂对照组的 ( $9.78 \pm 0.40$ )%, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 空白对照组与溶剂对照组间细胞凋亡率的差异无统计学意义 ( $P = 0.777$ )。

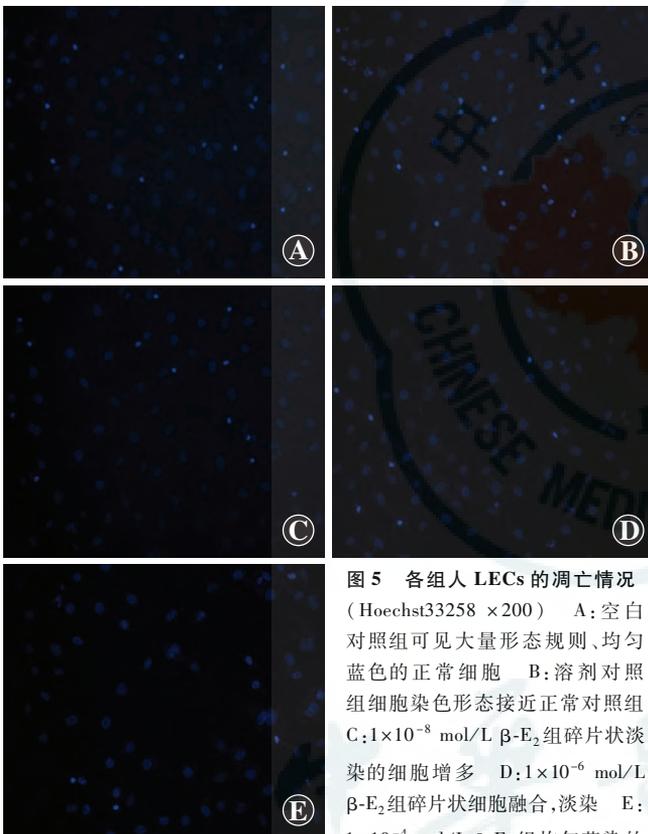


图 5 各组人 LECs 的凋亡情况 (Hoechst33258  $\times 200$ ) A: 空白对照组可见大量形态规则、均匀蓝色的正常细胞 B: 溶剂对照组细胞染色形态接近正常对照组 C:  $1 \times 10^{-8}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组碎片状淡染的细胞增多 D:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组碎片状细胞融合, 淡染 E:  $1 \times 10^{-4}$  mol/L  $\beta$ -E<sub>2</sub> 组均匀蓝染的

细胞明显减少, 淡染细胞增加

### 2.7 人 LECs 增殖值、凋亡率与 hTERT mRNA 及端粒酶活性的关系

不同浓度  $\beta$ -E<sub>2</sub> 作用后人 LECs 的增生活性 ( $0.662 \pm 0.118$ ) 与 hTERT mRNA 相对表达量 ( $0.591 \pm 0.200$ ) 及端粒酶活性 ( $0.796 \pm 0.281$ ) 的增加均无明显相关 ( $r = -0.299, P = 0.278$ ;  $r = -0.157, P = 0.576$ ), 但细胞的凋亡率 ( $7.240 \pm 2.680$ ) 与 hTERT mRNA 相对表达量及端粒酶活性值均呈负相关 ( $r = -0.975, P = 0.000$ ;  $r = -0.981, P = 0.000$ ) (图 6, 7)。

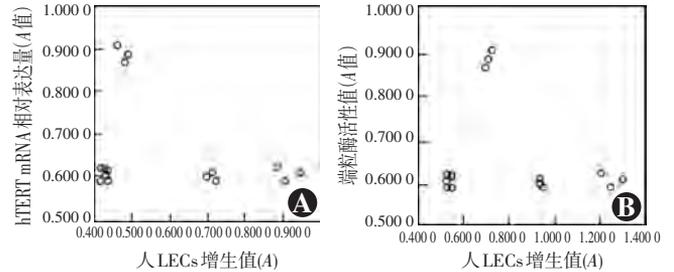


图 6 人 LECs 增殖与 hTERT mRNA 表达和端粒酶活性的关系 A: 人 LECs 增殖值与 hTERT mRNA 相对表达量的散点图 二者间无明显相关性 ( $r = -0.299, P = 0.278$ ) (Pearson 线性相关分析,  $n = 15$ ) B: 人 LECs 增殖值与端粒酶活性值间无明显相关性 ( $r = -0.157, P = 0.576$ ) (Pearson 线性相关分析,  $n = 15$ ) hTERT: 人端粒酶逆转录酶; LECs: 晶状体上皮细胞

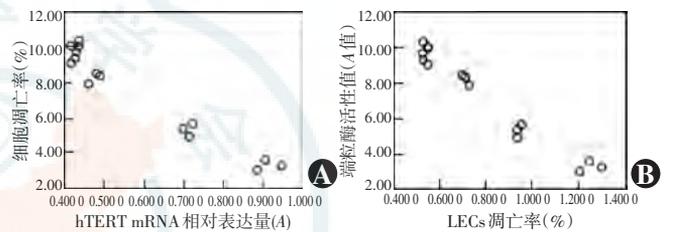


图 7 LECs 凋亡率与 hTERT mRNA 及端粒酶活性之间关系的散点图 A: hTERT mRNA 相对表达量与 LECs 凋亡率间呈明显负相关 ( $r = -0.975, P = 0.000$ ) (Pearson 线性相关分析,  $n = 15$ ) B: LECs 凋亡率与端粒酶活性值间呈明显负相关 ( $r = -0.981, P = 0.000$ ) (Pearson 线性相关分析,  $n = 15$ ) LECs: 晶状体上皮细胞; hTERT: 人端粒酶逆转录酶

### 3 讨论

年龄相关性白内障已成为全球人口老龄化所面临的严重问题之一<sup>[7]</sup>, 手术是目前最有效的治疗方法, 但存在着手术风险、有相关并发症、手术率较低以及因手术产生的医疗费用高等社会问题<sup>[8]</sup>, 因此, 寻求新的白内障防治方法仍然具有重要意义。

人 LECs 过度凋亡是除先天性白内障以外各型白内障形成的共同细胞学基础, 正常人 LECs 几乎无凋亡细胞<sup>[9]</sup>。在各种诱因, 包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、钙离子及紫外线等诱发自内障的过程中, 人 LECs 凋亡均先于晶状体混浊的发生<sup>[10]</sup>, 因此抑制人 LECs 凋亡成为控制白内障发生和发展的重要环节之一。端粒酶活性干预凋亡过程, 而凋亡途径参与端粒酶活性的调节。Xiang 等<sup>[11]</sup>将 hTERT mRNA 导入兔 LECs 中以增加端粒酶活性, 结果显示 LECs 的凋亡率下降。高度增生的组织或器官中细胞在分化为终末表型时其端粒酶活性的丧失与年龄相关性疾病的发生密切相关<sup>[12]</sup>。徐国兴等<sup>[13]</sup>发现年龄相关性白内障组 LECs 中端粒酶活性明显低于正常组, 提出 LECs 中端粒酶活性降低导致年龄相关性白内障的发生, 上调端粒酶活性而维持端粒

的正常长度则可防止人 LECs 的凋亡,从而防止年龄相关性白内障的发生及发展。近年来基因治疗显示出独特的优越性,但其安全性及导致严重并发症发生的风险依然存在<sup>[14]</sup>,通过基因手段转染 hTERT 来诱导端粒酶的活性仍然需要大量的研究工作。目前国外已有探索药物增加端粒酶活性的成功范例,N-乙酰肌肽滴眼液便可通过增加细胞中的端粒酶活性,显著降低在缺乏有效抗氧化保护作用的人 LECs 中由氧化应激所导致的端粒缩短而防止人 LECs 的凋亡,延缓白内障的发生和发展<sup>[15-16]</sup>。

雌激素来源广,易获取,目前已有大量应用于临床的雌激素制剂。雌激素能上调人子宫内腺癌细胞、人乳腺癌细胞、人外周血单核细胞及骨髓间充质干细胞中 hTERT 基因的表达及增加端粒酶活性,降低凋亡细胞比例<sup>[2-3,17-18]</sup>。雌激素增加端粒酶活性的这种作用不仅存在于雌激素受体阳性的高表达端粒酶活性的肿瘤细胞中,还存在于仅少量表达端粒酶活性的细胞中,如人外周血单核细胞。Li 等<sup>[19]</sup>提到端粒酶是雌激素在雌激素依赖性细胞生长与衰老的下游作用靶点,进一步研究证实雌激素与 hTERT 之间确实存在着交互作用<sup>[20]</sup>。人 LECs 中存在端粒酶活性且表达雌激素受体,推测雌激素也能上调人 LECs 中的端粒酶活性,从而降低细胞凋亡率。

端粒酶由人端粒酶 RNA、人端粒酶蛋白 1 和 hTERT 3 个主要部分组成,hTERT 基因的表达水平决定端粒酶活性的高低<sup>[21]</sup>。本研究中观察不同浓度  $\beta$ -E<sub>2</sub> 干预体外培养的人 LECs 后细胞中 hTERT mRNA 的相对表达和端粒酶活性值,发现正常人 LECs 中可少量表达 hTERT mRNA 及有低的端粒酶活性, $\beta$ -E<sub>2</sub> 可增加人 LECs 中的 hTERT mRNA 的表达及端粒酶活性,其作用具有浓度依赖性,且端粒酶活性表达趋势与 hTERT mRNA 的相对表达一致。 $\beta$ -E<sub>2</sub> 干预组与空白对照组及溶剂对照组相比细胞凋亡率均降低,随着  $\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度的增加其凋亡率也随之下降低,此外人 LECs 凋亡率与 hTERT mRNA 的表达量及端粒酶活性均呈负相关,说明  $\beta$ -E<sub>2</sub> 发挥抗人 LECs 凋亡的作用与端粒酶活性的增加有关。Celojevic 等<sup>[22]</sup>提出生理浓度 ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-8}$  mol/L) 的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 对体外培养的人 LECs 有促增生作用,而药理浓度 ( $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-2}$  mol/L) 下则表现为诱导细胞凋亡的作用,推测不同浓度  $\beta$ -E<sub>2</sub> 的作用通路可能不一致。本研究与 Celojevic 等<sup>[22]</sup>的部分研究结果一致, $\beta$ -E<sub>2</sub> 仅在低浓度 ( $1 \times 10^{-8}$  mol/L) 组表现出促人 LECs 增生的作用,在稍高浓度 ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 及高浓度 ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L) 下无明显促增生作用,人

LECs 的增值与 hTERT mRNA 的相对表达量及端粒酶活性之间无明显相关关系。本研究推测  $\beta$ -E<sub>2</sub> 低浓度下的促细胞增生作用可能是雌激素的非端粒依赖途径机制。本研究中存在  $\beta$ -E<sub>2</sub> 设置的浓度梯度组较少的问题,在进一步研究中需增加  $\beta$ -E<sub>2</sub> 的浓度组,以验证是否出现如 Pietranera 等<sup>[23]</sup>所提出的药物浓度下  $\beta$ -E<sub>2</sub> 表现出轻微的促细胞凋亡的现象。随着  $\beta$ -E<sub>2</sub> 及端粒酶作用机制研究的不断深入,通过  $\beta$ -E<sub>2</sub> 调控端粒酶活性将有望成为年龄相关性白内障的有效防治手段之一。

## 参考文献

- [1] Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases [J]. FEBS, 2013, 280(14): 3180-3193. DOI: 10.1111/febs.12326.
- [2] Cong Y, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres [J]. Cell Res, 2008, 18(7): 725-732. DOI: 10.1038/cr.2008.74.
- [3] Zhou C, Stepkowski TA, Dickens HK, et al. Estrogen induction of telomerase activity through regulation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) dependent pathway in human endometrial cancer cells [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(2): 1-10 [2015-12-20]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.005730>. DOI: 10.1371/journal.pone.005730.
- [4] dos Santos LG, da Silva BB. The effect of raloxifene on telomerase expression in breast carcinoma samples from postmenopausal women [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011, 159(1): 165-167. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2011.06.020.
- [5] Flynn JM, Dimitrijevic SD, Younes M, et al. Role of wild-type estrogen receptor-beta in mitochondrial cytoprotection of cultured normal male and female human lens epithelial cells [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 295(3): 637-647. DOI: 10.1152/ajpendo.90407.2008.
- [6] Colitz CM, Barden CA, Lu P, et al. Expression and characterization of the catalytic subunit of telomerase in normal and cataractous canine lens epithelial cells [J]. Mol Vis, 2006, 12(9): 1067-1076.
- [7] Qin Y, Zhao J, Min X, et al. MicroRNA-125b inhibits lens epithelial cell apoptosis by targeting p53 in age-related cataract [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(12 Pt A): 2439-2447. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.10.002.
- [8] Carifi G, Miller MH, Pitsas C, et al. Complications and outcomes of phacoemulsification cataract surgery complicated by anterior capsule tear [J]. Am J Ophthalmol, 2015, 159(3): 463-469. DOI: 10.1016/j.ajo.2014.11.027.
- [9] 葛坚, 赵家良, 黎晓新, 等. 眼科学 [M]. 2 版. 人民卫生出版社, 2010: 208-209.
- [10] Ji Y, Cai L, Zheng T, et al. The mechanism of UVB irradiation induced-apoptosis in cataract [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 401(1-2): 87-95. DOI: 10.1007/s11010-014-2294-x.
- [11] Xiang H, Wang J, Mao YW, et al. hTERT can function with rabbit telomerase RNA: regulation of gene expression and attenuation of apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(3): 503-510. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3834.
- [12] Saeed H, Iqtadar M. Stem cell function and maintenance-ends that matter: role of telomeres and telomerase [J]. J Biosci, 2013, 38(3): 641-649.
- [13] 徐国兴, 武莉莉, 郑学栋, 等. 端粒酶在年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中的表达及意义 [J]. 眼科研究, 2005, 23(6): 593-595. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.06.010. Xu GX, Wu LL, Zheng XD, et al. Expression and significance of the telomerase activity in human age-related cataract lens epithelial cells [J]. Chin Ophthal Res, 2005, 23(6): 593-595. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.06.010.
- [14] Cheever TR, Berkley D, Braun S, et al. Perspectives on best practices for gene therapy programs [J]. Hum Gene Ther, 2015, 26(3): 127-133.

DOI:10. 1089/hum. 2014. 147.

[15] Babizhayev MA, Yegorov YE. Telomere attrition in lens epithelial cells—a target for N-acetylcarnosine therapy [J]. Front Biosci ( Landmark Ed), 2010, 15 : 934–956.

[16] Babizhayev MA, Yegorov YE. Biomarkers of oxidative stress and cataract. Novel drug delivery therapeutic strategies targeting telomere reduction and the expression of telomerase activity in the lens epithelial cells with N-acetylcarnosine lubricant eye drops; anti-cataract which helps to prevent and treat cataracts in the eyes of dogs and other animals [J]. Curr Drug Deliv, 2014, 11 (1) : 24–61.

[17] Benko AL, Olsen NJ, Kovacs WJ. Estrogen and telomerase in human peripheral blood mononuclear cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 364 (1–2) : 83–88. DOI:10. 1016/j. mce. 2012. 08. 012.

[18] Cha Y, Kwon SJ, Seol W, et al. Estrogen receptor- $\alpha$  mediates the effects of estradiol on telomerase activity in human mesenchymal stem cells [J]. Mol Cells, 2008, 26 (5) : 454–458.

[19] Li H, Simpson ER, Liu JP. Oestrogen, telomerase, ovarian ageing and cancer [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37 (1) : 78–82. DOI: 10. 1111/j. 1440-1681. 2009. 05238. x.

[20] Gopalakrishnan S, Cheung NK, Yip BW, et al. Medaka fish exhibits longevity gender gap, a natural drop in estrogen and telomere shortening during aging: a unique model for studying sex-dependent longevity [J/OL]. Front Zool, 2013, 10 (1) : 78 [2016–01–05]. http://frontiersinzoology. biomedcentral. com/articles/10. 1186/1742-9994-10-78. DOI: 10. 1186/1742-9994-10-78.

[21] Zhou J, Ding D, Wang M, et al. Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression [J]. BMB Rep, 2014, 47 (1) : 8–14.

[22] Celojovic D, Petersen A, Karlsson JO, et al. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells [J]. Mol Vis, 2011, 17 (7) : 1987–1996.

[23] Pietranera L, Brocca ME, Roig P, et al. Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 146 : 15–25. DOI:10. 1016/j. jsmb. 2014. 04. 001.

(收稿日期:2016-01-30)

(本文编辑:尹卫靖)

· 病例报告 ·

息肉样脉络膜病变转化及治疗一例

戴荣平

100730 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院眼科

通信作者:戴荣平, Email:derricka@sina. com

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 03. 007

患者,男,50岁,2013年8月因双眼视力下降1个月余就诊于北京协和医院眼科。眼科检查:视力右眼为0.3,左眼0.6,双眼眼前节正常,眼底均可见类圆形黄白色病灶。右眼FFA显示黄斑区斑驳状高荧光,晚期轻度增强,无明显渗漏;ICGA显示黄斑区点片状高荧光,未见息肉样高荧光,FFA、ICGA均显示从视盘颞侧附近发出异常脉络膜动脉伸向黄斑中心,在黄斑区形成分支血管网。OCT显示右眼RPE隆起,下方可见中高反射信号,未见明显指状突起,视网膜神经上皮可见下少许积液(图1)。初步诊断为右眼息肉样脉络膜病变(polypoid choroid vsculopathy, PCV),右眼玻璃体腔雷珠单抗注射液0.5mg注射,注射方案为3+PRN(pro re nata,需要时)。首次玻璃体腔注射后视网膜下液完全吸收,但RPE脱离及其下方中高反射信号无变化。连续注射3次后患眼视力提高至0.5,RPE脱离及其下方病变仍无变化。

随访第9个月右眼视力0.4,视网膜下液再次出现,下方可见视网膜下液及RPE脱离。再次给予0.5mg雷珠单抗玻璃体腔注射。注射后1个月患眼视网膜下液减少,给予雷珠单抗0.5mg第5次注射。随访第11个月患眼视力0.4,黄斑中心凹颞侧出现橘红色病灶,下方可见视网膜前出血。OCT显示患眼颞侧RPE脱离范围增大,呈圆顶状,边缘可见指状突起,视网膜下液增多。FFA显示患眼黄斑区斑驳状高荧光,晚期轻度增强,中心凹颞侧RPE脱离区呈半月状、均匀一

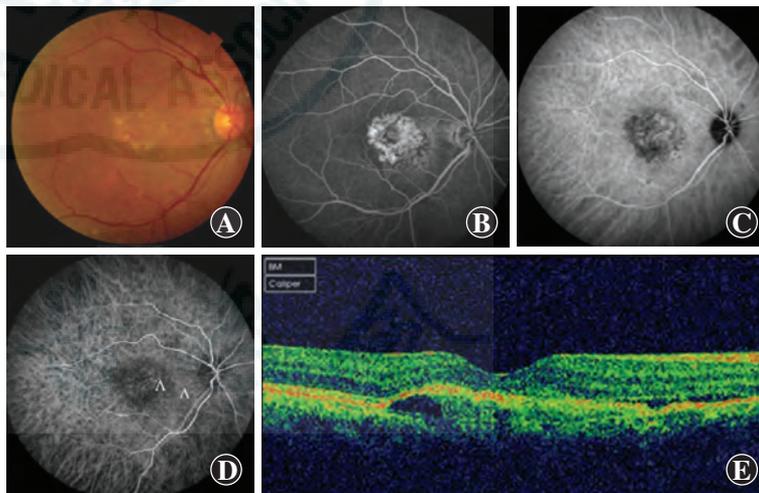


图1 抗VEGF治疗前患者眼底图像 A:彩色眼底照相显示右眼黄斑区类圆形黄白色病灶 B:FFA显示右眼黄斑区斑驳状高荧光 C:ICGA显示右眼黄斑区点片状高荧光 D:ICGA显示造影早期异常脉络膜动脉(白箭头),末端可见分支血管网 E:OCT显示RPE隆起、其下的中高反射信号及视网膜神经上皮下的液性暗区

致的高荧光。ICGA显示患眼黄斑区点片状高荧光,中心凹颞侧及下方息肉样高荧光,RPE脱离区域呈现低荧光。FFA、ICGA显示异常脉络膜动脉以及分支血管网无变化,但分支血管网末端出现息肉样膨大(图2)。临床诊断为右眼PCV,建议行光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)联合雷珠单抗眼内注射治疗,但患者拒绝治疗。