

17 β -雌二醇对人晶状体上皮细胞的保护作用与细胞焦亡的相关性研究

陈颖,康刚劲,王妍茜,徐曼华,杨涛

引用:陈颖,康刚劲,王妍茜,等. 17 β -雌二醇对人晶状体上皮细胞的保护作用与细胞焦亡的相关性研究. 国际眼科杂志 2021; 21(10):1680-1685

基金项目:泸州市科技计划项目[No.2015LZCYD-S05(4/12)]
作者单位:(646000)中国四川省泸州市,西南医科大学附属医院眼科
作者简介:陈颖,女,硕士,研究方向:白内障。
通讯作者:康刚劲,女,硕士,教授,研究方向:白内障. 929460414@qq.com
收稿日期:2021-03-26 修回日期:2021-08-26

摘要

目的:探索17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)对人晶状体上皮细胞的保护作用与细胞焦亡的相关性及其机制。

方法:体外培养人晶状体上皮细胞,设立空白对照组、H₂O₂处理组(含100 μ mol/L H₂O₂培养基培养12h)、雌二醇组(分别于含1 \times 10⁻³、1 \times 10⁻²、1 \times 10⁻¹ μ mol/L雌二醇培养基中培养24h后,再加入含100 μ mol/L H₂O₂的培养基处理12h)。扫描电子显微镜观察细胞超微结构;免疫荧光染色法检测Gasdermin D(GSDMD)分布及荧光强度;CCK-8法检测细胞活力;TUNEL法检测细胞焦亡;免疫印迹实验(Western-blot)检测半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(Caspase-1)、GSDMD、NOD样受体蛋白(NLRP3)表达水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测白介素-1 β (IL-1 β)表达。

结果:与空白对照组相比,H₂O₂处理组的细胞活力下降,细胞焦亡率升高,Caspase-1、GSDMD、NLRP3蛋白的表达上调,IL-1 β 分泌增多。而与H₂O₂处理组相比较,雌二醇组细胞焦亡率下降,Caspase-1、GSDMD、NLRP3蛋白的表达下调,IL-1 β 分泌量减少,并随雌激素浓度的递增,而呈递减趋势。

结论:17 β -雌二醇对人晶状体上皮细胞的保护作用具有浓度依赖性,其保护机制与抑制人晶状体上皮细胞焦亡过程相关,并有经典焦亡途径参与。

关键词:白内障;人晶状体上皮细胞;细胞焦亡;雌激素
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.10.03

Study on the relationship between the protective effect of 17 β -estradiol on human lens epithelial cells and cell pyroptosis

Ying Chen, Gang-Jin Kang, Yan-Xi Wang, Man-Hua Xu, Tao Yang

Foundation item: Luzhou Science and Technology Project [No. 2015LZCYD-S05(4/12)]

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

Correspondence to: Gang-Jin Kang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 929460414@qq.com

Received: 2021-03-26 Accepted: 2021-08-26

Abstract

• AIM: To explore the relationship between the protective effect of 17 β -estradiol (E₂) on human lens epithelial cells and pyroptosis.

• METHODS: Human lens epithelial cells were cultured *in vitro* and divided into blank control group, H₂O₂ treatment group, and 17 β -estradiol + H₂O₂ treatment group. Scanning electron microscope to observe the cytological morphology; immunofluorescence technique to detect Gasdermin D (GSDMD) distribution and fluorescence intensity; CCK-8 to detect cell viability; TUNEL to detect cell pyroptosis; Western-blot to detect Cysteinylnaspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), GSDMD, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) protein expression level; ELISA to detect interleukin-1 β (IL-1 β) expression.

• RESULTS: Compared with the control group, the cell viability of the H₂O₂ treatment group was significantly decreased, the expression of Caspase-1, GSDMD, and NLRP3 protein were significantly up-regulated, and the secretion of IL-1 β was significantly increased. Compared with the H₂O₂ treatment group, the expression of Caspase-1, GSDMD, and NLRP3 protein in the 17 β -estradiol + H₂O₂ treatment group were down-regulated, and the secretion of IL-1 β decreased, and it showed a decreasing trend with the increase of estrogen concentration.

• CONCLUSION: 17 β -estradiol has a protective effect on human lens epithelial cells, and its protective mechanism is related to the inhibition of the pyroptosis process of human lens epithelial cells, and the classical pyroptosis pathway is involved.

• KEYWORDS: cataract; human lens epithelial cells; pyroptosis; estrogen

Citation: Chen Y, Kang GJ, Wang YX, et al. Study on the relationship between the protective effect of 17 β -estradiol on human lens epithelial cells and cell pyroptosis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(10):1680-1685

0 引言

白内障是目前全世界致盲的最常见疾病^[1],其中年龄相关性白内障的发病率最高。既往多数学者认为白内障的产生是由于晶状体上皮细胞在各种致病因素刺激下,发生过度凋亡,导致晶状体发生一系列病理改变,并表明晶状体上皮细胞的凋亡是除了先天性白内障以外其他类型白内障的病理学基础^[2]。近年来,有学者发现在年龄相关性白内障中还存在着一种不同于细胞凋亡的细胞程序性死亡——细胞焦亡^[3]。当晶状体上皮细胞在氧化应激下,可产生大量活性氧,促使细胞焦亡,诱发白内障。

细胞焦亡是一种伴随炎症反应的细胞程序性死亡^[4]。其途径分为两型,即经典型与非经典型。经典型焦亡途径是通过细胞内模式识别受体接收刺激信号后,借助凋亡相关微粒蛋白(CARD-domain containing adaptor protein, ASC)与半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白水解酶前体(pro-cysteiny aspartate specific proteinase-1, pro-caspase-1)结合,形成炎症复合体,促发细胞焦亡的发生。模式识别受体包括 NLRs 受体(NOD-like receptors)、Toll 样受体(Toll-like receptors)和 PYHIN 蛋白。而目前研究较多也较成熟的通路为核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nod-like receptor protein 3, NLRP3)参与及依赖半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白水解酶(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)介导的经典型焦亡途径。当 NLRP3 接收外界刺激信号后,借 ASC 与 pro-caspase-1 结合,形成 NLRP3 炎症小体^[5]。激活自身蛋白酶后,生成有催化活性的 Caspase-1。Caspase-1 切割 GSDMD(gasderminD),释放 N-端结构域(GSDMD-N)。GSDMD-N 迁移在质膜上形成非特异性孔洞,从而促进细胞渗透裂解。Caspase-1 活化后可以刺激白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)的释放,从而扩大炎症反应^[6]。

雌激素被认为具有保护人晶状体上皮细胞的作用^[7-8],其机制与抗凋亡、抗氧化等相关。而此保护机制是否与抗焦亡相关,目前仍无有关的研究。故本文旨在探究雌激素对人晶状体上皮细胞的保护机制与细胞焦亡的相关性,为局部及全身用药预防年龄相关性白内障的发生、发展提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 材料

人晶状体上皮细胞 HLE-B₃ 细胞系(ATCC, 美国), 17- β 雌二醇(17 β -estradiol, E₂)粉末, H₂O₂ 试剂(Sigma, 美国), 噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)粉, BCA 法蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司), TUNEL 试剂盒(Roche, 英国), CCK-8 检测试剂盒(上海碧云天公司), Caspase-1 抗体(Novus, 美国), GSDMD 抗体(Thermo, 美国), NLRP3 抗体(武汉三鹰, 中国)、GAPDH 抗体(Abcam, 英国), IL-1 β 检测试剂盒(云克隆, 中国), 超净工作台(Thermo, 美国), 恒温培养箱(Thermo, 美国), 共聚焦显微镜(Leica, 德国), 电泳仪(BIORAD, 美国), 紫外分光光度计(HACH, 美国), 胶片分析仪(天能公司, 中国), 扫描电子显微镜(Tescan, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代

将 HLE-B₃ 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、含体积分数为 5% CO₂ 的恒温孵箱培养,隔天换液。待细胞生长至对数期,按 1:3 比例传代,每 3d 传代一次。待细胞经 4 次传代生长稳定后进行后续实验。

1.2.2 MTT 法确定 H₂O₂ 处理浓度及时间

将处于生长对数期的细胞消化混匀后,计数板计数,细胞浓度为每毫升 10 \times 10⁴ 个,按每孔 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔板中。次日弃去 96 孔板中培养基,加入含 0、50、100、200 μ mol/L H₂O₂ 培养基,分别处理 6、12、24h。弃去孔板中的培养基后,加入 200 μ L 培养基、20 μ L 浓度为 5mg/L MTT 溶液。恒温箱中作用 4h 后弃去培养基及 MTT 溶液,加入 150mL DMSO 洗去多余结晶,酶标仪检测光吸收值。

1.2.3 实验分组

根据 MTT 法确定 H₂O₂ 处理浓度为 100 μ mol/L,时间为 12h。随机将细胞依据参考文献[22, 25]分为五组。空白对照组:含胎牛血清的培养基培养 HLE-B₃ 细胞;H₂O₂ 处理组:培养基培养 24h 后,加入含 100 μ mol/L H₂O₂ 的培养基处理 12h;雌二醇 1 组(1 \times 10⁻³ μ mol/L 雌二醇+H₂O₂ 处理组);雌二醇 2 组(1 \times 10⁻² μ mol/L 雌二醇+H₂O₂ 处理组);雌二醇 3 组(1 \times 10⁻¹ μ mol/L 雌二醇+H₂O₂ 处理组)。

1.2.4 免疫荧光染色检测 GSDMD 蛋白的分布及荧光强度

将处理后的细胞进行消化、离心,细胞悬液滴加至盖玻片上培养约 6h, PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 30min,加入 GSDMD 一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤后予以二抗室温孵育 50min。滴加 DAPI 染液,室温孵育 5min 后洗涤 3 次。滴加适量的抗荧光淬灭剂,盖玻片封片,荧光显微镜下观察。

1.2.5 CCK-8 检测各组细胞活力

取出细胞,胰蛋白酶消化,配制成浓度为每毫升 1 \times 10⁵ 个的细胞悬液,按 10000 个细胞/孔接种于 96 孔板,每孔加 100 μ L,置于培养箱中培养,根据实验分组处理。每个浓度的样本设五个复孔。所有孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液,培养箱中孵育 2h。酶标仪测定 450nm 光密度值(optical density, OD)。细胞存活率=实验组 OD 值/对照组 OD 值 \times 100%。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞焦亡

待细胞爬片后, PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 30min,按 TUNEL 试剂盒说明书操作,DAPI 染液染色,室温避光孵育 5min,洗涤 3 次。滴有抗荧光淬灭剂的盖玻片封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.7 Western-blot 法检测 GSDMD 和 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白浓度

用 PBS 缓冲液润洗贴壁细胞 3 次,加入细胞总蛋白提取试剂使细胞完全裂解。收集上清液,使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。确定每个样品总蛋白上样量均为 40 μ g。电泳、转膜。将转好的膜加入封闭液室温封闭 1h,一抗稀释液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤干净后,二抗稀释液室温孵育 30min。PBS 洗涤后曝光、显影。由 Alpha Ease FC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.2.8 ELISA 法检测 IL-1 β 含量

将细胞悬液,按 1000 个细胞/孔接种于 96 孔板,每孔加 100 μ L。待贴壁后根据分组加入含不同浓度雌二醇培养基,空白对照组更换为含胎牛血清的培养基,再次培养 24h 后。H₂O₂ 处理组及各雌二醇组加入含 100 μ mol/L H₂O₂ 培养基处理 12h。每组设置 3 个复孔。经冰冻溶解、低温离心后收集上清液。包被、封闭、显色后,加入终止液,最后分光光度计各孔 OD 值,设置波长为 450nm。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计学软件分析数据,数据结果用均数 \pm 标准差表示,多组样本均数间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

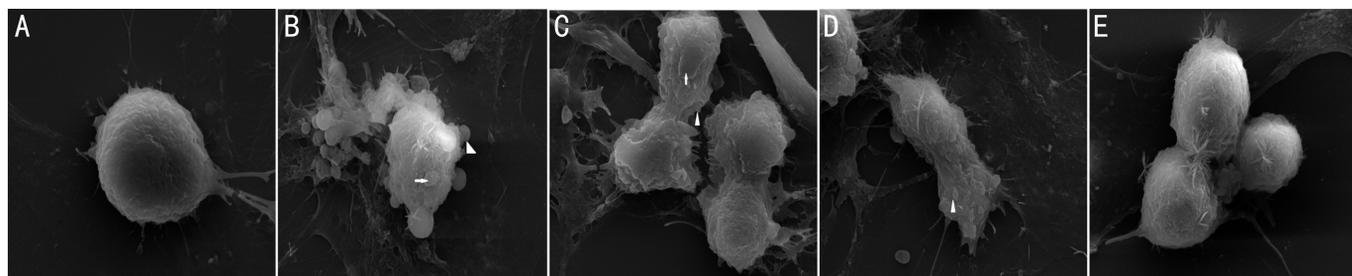


图1 扫描电子显微镜下观察各组 HLE-B₃ 细胞形态变化 A:空白对照组;B:H₂O₂ 处理组;C:雌二醇1组;D:雌二醇2组;E:雌二醇3组;箭头:孔隙,三角形:囊泡。

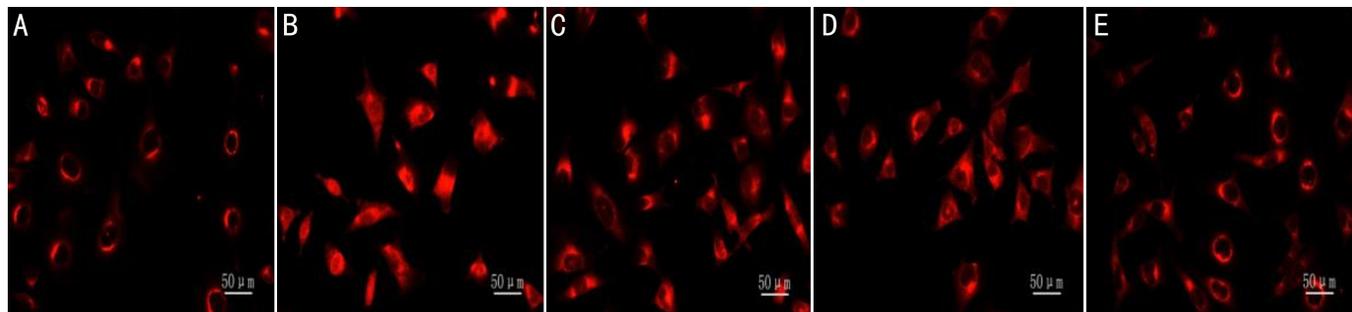


图2 免疫荧光染色检测各组 HLE-B₃ 细胞荧光强度 A:空白对照组;B:H₂O₂ 处理组;C:雌二醇1组;D:雌二醇2组;E:雌二醇3组。

2 结果

2.1 扫描电子显微镜下观察各组 HLE-B₃ 细胞形态变化

情况 在扫描电子显微镜下观察到空白对照组与雌二醇3组中细胞形态呈圆形,边界清楚(图1)。而在 H₂O₂ 处理组、雌二醇1组、雌二醇2组中可见明显细胞形态不规则。在 H₂O₂ 处理组、雌二醇1组中出现细胞形态稍肿胀、“囊泡”及“孔隙”形成。而在雌二醇2组中细胞肿胀不明显,但仍有“囊泡”及“孔隙”形成。

2.2 免疫荧光染色检测雌二醇对 GSDMD 免疫荧光的影响

共聚焦显微镜下观察雌二醇对 HLE-B₃ 细胞中 GSDMD 免疫荧光的影响。当特异性抗体与细胞膜上的 GSDMD 相结合后,在共聚焦显微镜下可观察到红色荧光(图2)。各组荧光强度情况比较差异有统计学意义($F=38.656, P<0.001$,表1)。H₂O₂ 处理组中荧光强度高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 H₂O₂ 处理组相比较,各雌二醇组中免疫荧光强度比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。各雌二醇组中两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且在一定浓度范围内,荧光强度随雌二醇浓度递增而呈减弱趋势。

2.3 CCK-8 法检测雌二醇对 HLE-B₃ 细胞活力的影响

各组细胞存活率比较差异有统计学意义($F=81.275, P<0.001$,表1)。H₂O₂ 处理组细胞活力较对照组降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H₂O₂ 处理组相比,各雌二醇组细胞活力升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各雌二醇组中两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且在一定雌二醇浓度范围内,细胞存活率随雌二醇浓度递增而呈递增趋势。

2.4 雌二醇对细胞焦亡率的影响

TUNEL 法经检测细胞发生 DNA 的断裂情况从而检测各组 HLE-B₃ 细胞的焦亡情况(图3)。各组细胞焦亡情况比较差异有统计学意义($F=455.585, P<0.001$,表1)。H₂O₂ 处理组细胞焦亡率高于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 H₂O₂ 处

理组相比较,各雌二醇组中细胞焦亡率降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各雌二醇组中两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且在一定雌二醇浓度范围内,细胞焦亡率随雌二醇浓度递增而呈递减趋势。

2.5 Western-blot 法检测 NLRP3 和 GSDMD 和 Caspase-1 蛋白表达情况

2.5.1 Western-blot 法检测雌二醇对 NLRP3 蛋白表达的影响

各组 NLRP3 蛋白表达(灰度比)比较差异有统计学意义($F=60.866, P<0.001$,表1)。H₂O₂ 处理组 NLRP3 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H₂O₂ 处理相比,各雌二醇组中 NLRP3 蛋白表达比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。在雌二醇组中 NLRP3 蛋白表达两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),并在一定雌二醇浓度范围内, NLRP3 蛋白随雌二醇浓度递增而呈递减趋势,见图4。

2.5.2 Western-blot 法检测雌二醇对 GSDMD 蛋白表达的影响

各组 GSDMD 蛋白表达(灰度比)比较差异有统计学意义($F=63.886, P<0.001$,表1)。H₂O₂ 处理组 GSDMD 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H₂O₂ 处理相比,各雌二醇组中 GSDMD 蛋白表达比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。在雌二醇组中 GSDMD 蛋白两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),并在一定雌二醇浓度范围内, GSDMD 蛋白随雌二醇浓度递增而呈递减趋势,见图5。

2.5.3 Western-blot 法检测雌二醇对 Caspase-1 蛋白表达的影响

各组 Caspase-1 蛋白表达(灰度比)比较差异有统计学意义($F=10.918, P=0.001$,表1)。H₂O₂ 处理组 Caspase-1 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);与 H₂O₂ 处理相比,各雌二醇组中 Caspase-1 蛋白表达比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。雌二醇各组中 Caspase-1 蛋白两两比较,雌二醇2组与雌二醇3组比较差异无统计学意义($P=0.35$),雌二醇1组与雌二醇2组

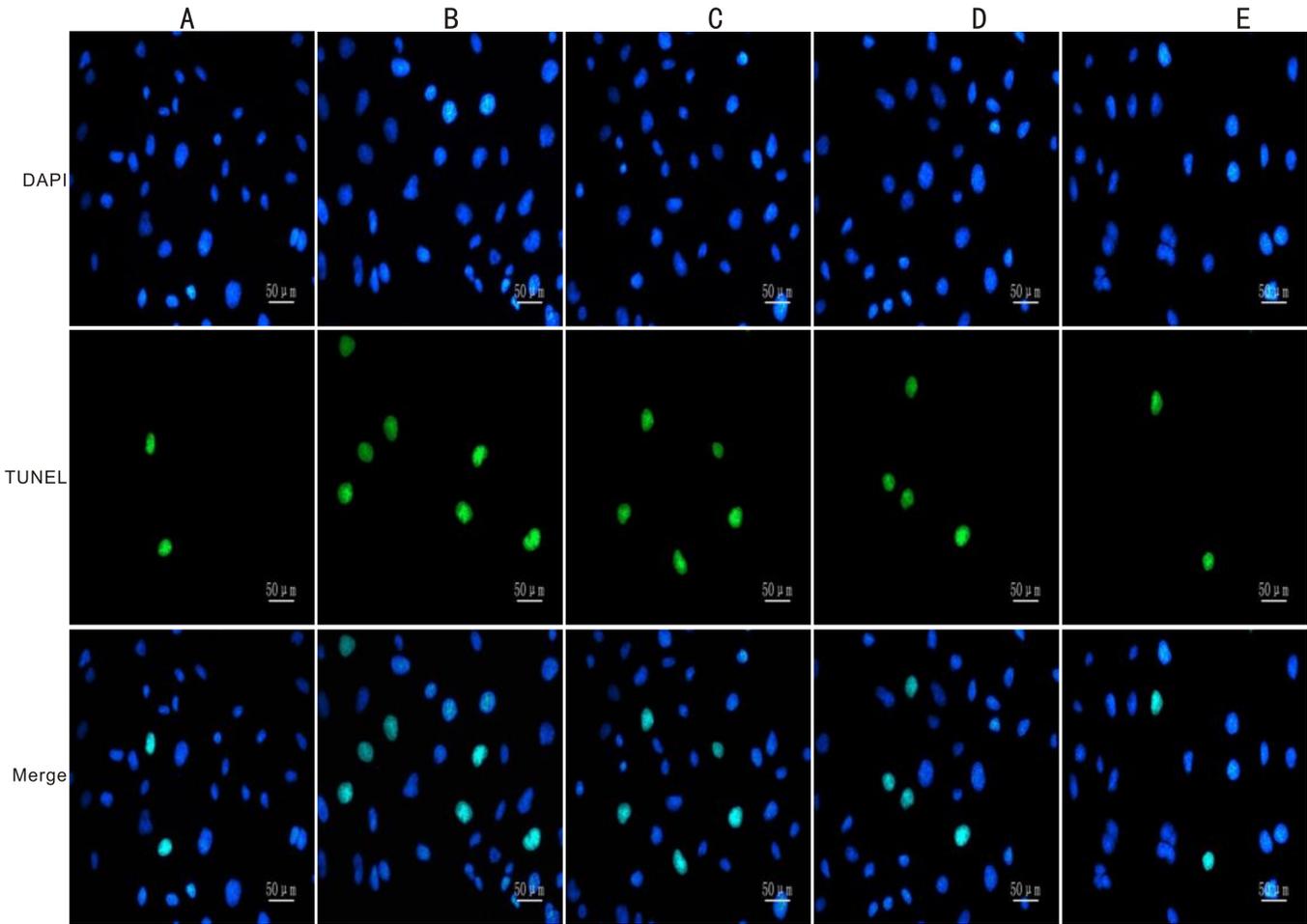


图3 TUNEL法检测各组HLE-B₃细胞焦亡情况 A:空白对照组;B:H₂O₂处理组;C:雌二醇1组;D:雌二醇2组;E:雌二醇3组。

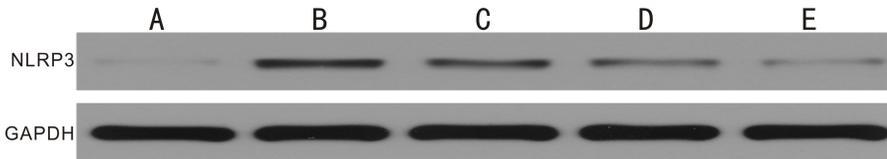


图4 Western-blot法检测雌二醇对NLRP3蛋白表达的影响 A:空白对照组;B:H₂O₂处理组;C:雌二醇1组;D:雌二醇2组;E:雌二醇3组。

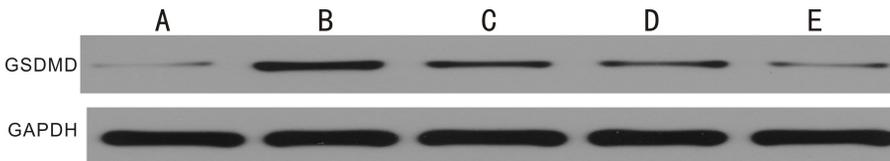


图5 Western-blot法检测雌二醇对GSDMD蛋白表达的影响 A:空白对照组;B:H₂O₂处理组;C:雌二醇1组;D:雌二醇2组;E:雌二醇3组。

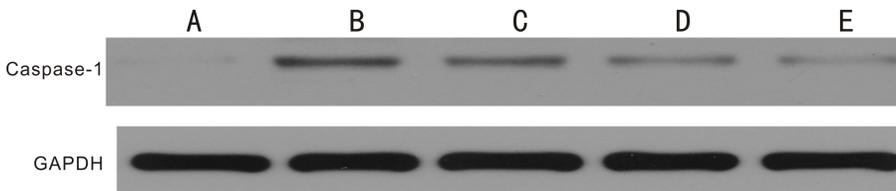


图6 Western-blot法检测雌二醇对Caspase-1蛋白表达的影响 A:空白对照组;B:H₂O₂处理组;C:雌二醇1组;D:雌二醇2组;E:雌二醇3组。

比较差异无统计学意义($P=0.27$),而雌二醇1组与雌二醇3组比较差异有统计学意义($P=0.03$),见图6。

2.6 ELISA法检测雌二醇对IL-1 β 分泌量的影响 各组IL-1 β 分泌量比较,差异有统计学意义($F=100.632, P<0.001$,表1)。H₂O₂处理组IL-1 β 分泌量高于对照组,差

异有统计学意义($P<0.05$)。与H₂O₂处理组相比较,各雌二醇组中IL-1 β 分泌量降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。雌二醇组中两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且在一定雌二醇浓度范围内,随着雌二醇浓度递增,而IL-1 β 浓度呈递减趋势。

表1 各组相关指标检测结果

| 组别 | 免疫荧光强度 | 细胞存活率 (%) | 细胞焦亡率 (%) | NLRP3 蛋白 表达 | GSDMD 蛋白 表达 | Caspase-1 蛋白 表达 | IL-1 β (pg/mL) |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| 空白对照组 | 2876.04 \pm 482.55 | 100.00 \pm 3.45 | 5.29 \pm 0.31 | 0.04 \pm 0.01 | 0.07 \pm 0.02 | 0.04 \pm 0.01 | 23.73 \pm 2.92 |
| H ₂ O ₂ 处理组 | 12690.75 \pm 1909.90 | 65.70 \pm 3.24 | 15.82 \pm 0.37 | 0.44 \pm 0.01 | 0.68 \pm 0.02 | 0.4 \pm 0.01 | 109.83 \pm 11.01 |
| 雌二醇 1 组 | 8575.40 \pm 1214.91 | 70.24 \pm 2.27 | 12.50 \pm 0.29 | 0.29 \pm 0.05 | 0.47 \pm 0.06 | 0.25 \pm 0.08 | 75.08 \pm 4.89 |
| 雌二醇 2 组 | 5166.13 \pm 803.86 | 76.72 \pm 3.33 | 10.52 \pm 0.29 | 0.17 \pm 0.05 | 0.34 \pm 0.06 | 0.18 \pm 0.08 | 54.08 \pm 2.75 |
| 雌二醇 3 组 | 3900.35 \pm 474.86 | 83.18 \pm 4.05 | 8.64 \pm 0.34 | 0.08 \pm 0.01 | 0.24 \pm 0.07 | 0.1 \pm 0.04 | 36.25 \pm 3.34 |
| <i>F</i> | 38.656 | 81.275 | 455.585 | 60.866 | 63.886 | 10.918 | 100.632 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.001 | <0.001 |

3 讨论

随着我国人口的老齡化,年龄相关性白内障已成为严重影响人民生活水平的疾病之一。然而,目前白内障尚无有效的预防措施,其主要且有效的治疗方式仍然是手术。手术治疗所需的费用、耗材,以及患者需承担的痛苦及手术风险等都成为需要被重视和解决的问题。因此,明确年龄相关性白内障的发病机制,进一步探求防治方法已成为一项刻不容缓的工作。

在1992年,Zychlinsky等^[9]发现巨噬细胞经福氏志贺氏杆菌诱导可发生一种异于凋亡和坏死的细胞程序性死亡。直到2001年正式将这种由Caspase-1介导的细胞死亡方式命名为“Pyroptosis”,即:细胞焦亡^[10]。目前已在多种疾病中被发现存在细胞焦亡,比如细菌病毒感染、非酒精性脂肪性肝炎、肿瘤、慢性阻塞性肺疾病等。Jin等^[3]研究发现在年龄相关性白内障的发生中也存在细胞焦亡。

细胞焦亡及凋亡均属于细胞程序性死亡。曾经有研究以玻璃体腔内注射淀粉样 β 蛋白(A β)后的大鼠为模型,发现其视网膜色素上皮细胞可同时发生凋亡和焦亡^[11]。两者的相同之处在于:均可发生DNA断裂、细胞核皱缩,形成“囊泡”^[12]。不同之处在于,凋亡不发生质膜的破裂,而在焦亡过程中,由于GSDMD-N形成的非特异性孔洞,可导致细胞渗透裂解^[13]。本实验中,经H₂O₂处理的人晶状体上皮细胞,在扫描电子显微镜观察可见细胞形态稍肿胀以及“囊泡”“空隙”形成,并且细胞活力下降、焦亡率升高。而经一定浓度雌二醇诱导后,细胞肿胀程度及“囊泡”“空隙”形成较改善,细胞活力升高、焦亡率下降,并随雌二醇浓度改变而改变。说明一定浓度的雌二醇对维持晶状体上皮细胞的正常形态及活力有一定作用并且具有浓度依赖性。

细胞焦亡的途径分为由Caspase-1介导的经典途径以及由Caspase-4、5、11介导的非经典途径^[14]。细胞焦亡经典途径通过形成炎性小体,生成有催化活性的Caspase-1, Caspase-1可切割GSDMD,促发焦亡的发生,同时可促发炎症因子的释放从而扩大炎症反应。Caspase-1是一种炎性Caspase,且Duprez等^[15]认为Caspase-1不参与细胞凋亡。Sun等^[16]研究发现白内障患者晶状体上皮细胞中Caspase-1前体及Caspase-1蛋白表达高于正常对照组。本研究亦发现H₂O₂可促使HLE-B₃细胞中Caspase-1蛋白及IL-1 β 表达上调,并且一定浓度雌二醇可下调Caspase-1蛋白的表达及IL-1 β 的分泌,并且在此浓度范围内,Caspase-1蛋白表达及IL-1 β 分泌可随雌二醇浓度的递增而递减。

NLRP3是核苷酸结合寡聚化结构域样受体(NLR)家

族的一员,与ASC及Caspase-1前体组装后所得的复合体被称为NLRP3炎性小体,可促发Caspase-1的激活。Zou等^[17]认为抑制NLRP3可明显减轻H₂O₂诱导的人晶状体上皮细胞氧化应激损伤。本研究发现HLE-B₃经H₂O₂诱导后,可促进NLRP3蛋白表达上调;而雌二醇在一定浓度范围内可下调NLRP3蛋白的表达,且在该范围内,其表达可随雌二醇浓度的升高而降低。

Gasdermin蛋白家族由GSDMA、GSDMB、GSDMC、GSDMD、GSDME(DFNA5)和DFNB59组成^[18],而GSDMD在NLRP3炎症小体引发的细胞焦亡途径起着重要的作用^[19]。Wang等^[20]以短波长蓝光照射大鼠,经12wk后,所有实验组大鼠均出现不同程度的晶状体混浊,并且发现实验组大鼠晶状体上皮细胞中GSDMD、Caspase-1蛋白及mRNA的表达均较对照组上调,认为细胞焦亡在白内障的发生中起关键作用。本研究经荧光免疫染色实验发现GSDMD位于人晶状体上皮细胞膜上,H₂O₂可上调GSDMD蛋白的表达,而雌二醇在一定浓度范围内可抑制GSDMD蛋白的表达,并且此抑制作用随雌二醇浓度的增加而增强。

已有大量的流行病学研究及临床试验证实雌激素对人晶状体上皮细胞具有保护作用^[7-8,21-22]。有研究表明雌激素对晶状体上皮细胞保护作用主要是通过非基因组机制,与受体无关^[23]。本研究组也曾发现雌二醇可通过上调端粒酶活性而抗人晶状体细胞凋亡,且可通过激活SIRT1/P53通路抗凋亡发挥对人晶状体上皮细胞的保护作用^[24]。但目前尚无研究证实雌激素对人晶状体上皮细胞的保护作用是否与抗焦亡相关。本实验结果显示,H₂O₂可诱导人晶状体细胞的焦亡,而这种作用可被雌激素所抑制。并且这种抑制作用在一定范围内随雌激素浓度的递增而递增。由此我们认为在年龄相关性白内障的发生中可能同时存在细胞凋亡及细胞焦亡的相互作用,并且雌激素对晶状体上皮细胞的保护作用不仅可通过抗氧化、抗凋亡等途径,可能还有抗焦亡过程的参与。

综上所述,本研究证明了17 β -雌二醇对人晶状体上皮细胞的保护作用具有浓度依赖性,且其保护机制与抑制晶状体上皮细胞焦亡过程相关,并有经典焦亡途径参与。为雌激素对人晶状体上皮细胞的保护作用机制提供新的研究方向,但雌激素的作用靶点及焦亡过程通路还需进一步探索。

参考文献

- Liu YC, Wilkins M, Kim T, et al. Cataracts. *Lancet* 2017; 390 (10094):600-612
- Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis

appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 1995;130(1):169-181

3 Jin X, Jin H, Shi Y, et al. Pyroptosis, a novel mechanism implicated in cataracts. *Mol Med Rep* 2018;18(2):2277-2285

4 Chen X, He WT, Hu LC, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res* 2016;26(9):1007-1020

5 Labbé K, Saleh M. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ* 2008;15(9):1339-1349

6 Duprez L, Wirawan E, Berghe TV, et al. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* 2009;11(13):1050-1062

7 Younan C. Hormone replacement therapy, reproductive factors, and the incidence of cataract and cataract surgery: the blue mountains eye study. *Am J Epidemiol* 2002;155(11):997-1006

8 王杰,康刚劲,袁雪峰,等.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. *中华实验眼科杂志* 2016;34(10):219-225

9 Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992;358(6382):167-169

10 de Vasconcelos NM, Van Opdenbosch N, Van Gorp H, et al. Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death Differ* 2019;26(1):146-161

11 Gao J, Cui JZ, To E, et al. Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye. *J Neuroinflammation* 2018;15(1):15

12 Tsuchiya K. Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications. *Microbiol Immunol* 2020;64(4):252-269

13 Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21(11):678-695

14 Nagata S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu Rev Immunol* 2018;36:489-517

15 Duprez L, Wirawan E, Berghe TV, et al. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* 2009;11(13):1050-1062

16 Sun Y, Rong XF, Li D, et al. Down-regulation of CRTAC1 attenuates UVB-induced pyroptosis in HLECs through inhibiting ROS production. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;532(1):159-165

17 Zou YY, Cui BJ, Liang P, et al. Inhibition of NLRP3 protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by NF- κ B signaling. *Ophthalmic Res* 2020;63(2):174-181

18 Kesavardhana S, Malireddi RKS, Kanneganti TD. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annu Rev Immunol* 2020;38:567-595

19 方源. Gasdermin D-N 端片段在细胞焦亡时寡聚并迁移上细胞质膜. 厦门大学 2017

20 Wang YM, Zhang M, Sun Y, et al. Role of short-wavelength blue light in the formation of cataracts and the expression of caspase-1, caspase-11, Gasdermin D in rat lens epithelial cells: insights into a novel pathogenic mechanism of cataracts. *BMC Ophthalmol* 2020;20(1):1-11

21 Celojovic D, Petersen A, Karlsson JO, et al. Effects of 17 β -estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells. *Mol Vis* 2011;17:1987-1996

22 Zetterberg M. Age-related eye disease and gender. *Maturitas* 2016;83:19-26

23 Škiljić D, Nilsson S, Petersen A, et al. Oestradiol levels and superoxide dismutase activity in age-related cataract: a case-control study. *BMC Ophthalmol* 2016;16(1):1-5

24 潘家钰,康刚劲,徐曼华,等.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. *眼科新进展* 2020;40(5):420-424