

# 17-β 雌二醇对高糖诱导 RPE 细胞保护作用的研究

矫梦瑶,张洋洋,孙旋,孙凯,康旭聪,蒋巍,陈娜

作者单位:(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科  
作者简介:矫梦瑶,女,毕业于哈尔滨医科大学,护师,研究方向:眼底病。  
通讯作者:陈娜,女,毕业于哈尔滨医科大学,主管护师,研究方向:眼底病. jiaomengyao333@163.com  
收稿日期:2017-05-08 修回日期:2017-08-29

## Protective effects of 17β-estradiol on high glucose-induced RPE cells

Meng-Yao Jiao, Yang-Yang Zhang, Xuan Sun, Kai Sun, Xu-Cong Kang, Wei Jiang, Na Chen

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to:Na Chen. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. jiaomengyao333@163.com.  
Received:2017-05-08 Accepted:2017-08-29

### Abstract

• AIM: To discuss the protective effects and possible mechanisms of 17β-estradiol on human retinal pigment epithelial (RPE) cells induced by high glucose.  
• METHODS: RPE cells were cultured and divided into four groups according to randomized controlled method: blank control group: the cells were treated with 5.5mmol/L routine glucose medium for processing; high glucose group: cells were treated with 100mmol/L glucose for 12h; 17β-estradiol low concentration group: after treated with 10 μmol/L 17β-estradiol, cells were treated with 100mmol/L glucose for 12h; 17β-estradiol high concentration group: after treated with 100 μmol/L 17β-estradiol, cells were treated with 100mmol/L glucose for 12h. Cell viability were tested by MTT colorimetric detection. Cells apoptosis were detected by Hoechst33258 staining. Intracellular reactive oxygen species(ROS) level were detected by H<sub>2</sub>DCFDA staining. Expression of CAT, SOD and MDA were tested by colorimetric detection.  
• RESULTS: RPE cell activity decreased with the concentration of glucose increased; 17β-estradiol inhibited high glucose-induced cell viability decrease in RPE cells, decreased the apoptosis rate of RPE cells and intracellular ROS generation; besides, 17β-estradiol significantly increased the expression of CAT, SOD and decreased the expression of MDA in RPE cells.  
• CONCLUSION: The 17β-estradiol effectively inhibited high glucose-induced RPE cells damage, which provide

reliable experimental basis for the treatment of injuries in RPE cells.

• KEYWORDS: 17β-estradiol; human lens epithelial cells; high glucose; protective effect

Citation: Jiao MY, Zhang YY, Sun X, et al. Protective effects of 17β-estradiol on high glucose-induced RPE cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(10):1830-1833

### 摘要

目的:探讨17-β雌二醇对高糖诱导人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞的保护作用 and 可能机制。

方法:RPE细胞传代培养,随机对照法分为四组:空白对照组:5.5mmol/L葡萄糖常规培养基进行处理;高糖组:100mmol/L葡萄糖作用12h;17-β雌二醇低浓度组:10μmol/L 17-β雌二醇孵育24h后,加入100mmol/L葡萄糖作用12h;17-β雌二醇高浓度组:100μmol/L 17-β雌二醇孵育24h后,加入100mmol/L葡萄糖作用12h。MTT比色法检测细胞活力, Hoechst33258染色观察细胞凋亡, H<sub>2</sub>DCFDA染色检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,比色法检测过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的表达。

结果:随着葡萄糖浓度的增加,RPE细胞活性逐渐下降,17-β雌二醇能明显抑制高糖诱导的RPE细胞活力的下降,降低RPE细胞凋亡率,抑制细胞内ROS生成。此外,17-β雌二醇能明显增加RPE细胞内CAT、SOD表达,降低MDA的表达。

结论:17-β雌二醇能有效抑制高糖对RPE细胞的损伤,从而为用于治疗视网膜相关疾病提供可靠的实验依据。

关键词:17-β雌二醇;人视网膜色素上皮细胞;高糖;保护作用

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.10.06

引用:矫梦瑶,张洋洋,孙旋,等. 17-β雌二醇对高糖诱导RPE细胞保护作用的研究. 国际眼科杂志 2017;17(10):1830-1833

### 0 引言

糖尿病是一种引起人体全身组织代谢异常的常见内分泌系统疾病,在眼部可引起代谢性白内障、虹膜新生血管、糖尿病视网膜病变、视网膜新生血管等。糖尿病视网膜病变是导致糖尿病患者视力下降甚至盲的最常见病因之一<sup>[1]</sup>。长期的高血糖状态导致细胞黏附分子活化、抗氧化酶损伤、微血栓形成,引起视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的生物学特性变化。RPE细胞很容易受到血糖波动的影响发生结构和功能的改变。本研究将通过体外建立RPE细胞高糖损伤模型,探索

17-β雌二醇对 RPE 细胞的保护作用 and 作用机制,为实现雌激素防治糖尿病视网膜病变提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 17-β雌二醇(Sigma 公司),RPE 细胞(ATCC 公司),DMEM 培养基(Sigma 公司),胎牛血清(Sigma 公司),MTT 试剂盒(Sigma 公司),Hoechst33258 试剂盒(碧云天公司),H<sub>2</sub>DCFDA(碧云天公司),过氧化氢酶(catalase,CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** RPE 细胞培养在 100μg/mL 链霉素和 100U/mL 青霉素的 DMEM 培养基中,内含 100mL/L 胎牛血清,培养基 pH 值为 6.9,培养箱温度为 37℃,每 2~4d 传代一次。

**1.2.2 细胞分组** 取对数生长期细胞,待细胞贴壁生长后移除培养液更换高糖处理,先以浓度为 0、50、100、200mmol/L 葡萄糖溶液筛选,根据实验结果,选用 100mmol/L 葡萄糖溶液为高糖组,实验共分 4 组。空白对照组:细胞用葡萄糖浓度为 5.5mmol/L 的葡萄糖常规 DMEM 培养基进行处理;高糖组:100mmol/L 葡萄糖作用 12h;17-β雌二醇低浓度组:10μmol/L 17-β雌二醇孵育 24h 后,加入 100mmol/L 葡萄糖作用 12h;17-β雌二醇高浓度组:100μmol/L 17-β雌二醇孵育 24h 后,加入 100mmol/L 葡萄糖作用 12h。

**1.2.3 MTT 检测细胞活力** 细胞接种于 96 孔板(细胞密度  $5 \times 10^4$ /L,每孔 120μL),培养 24h 使细胞同步化,向各孔细胞中加入 20μL MTT(5g/L),培养 4h 后弃去培养液,加入 150μL DMSO 溶液,微量振荡器室温下振荡 10min 后用酶标仪测定 492nm 的光密度值。RPE 细胞的存活率=(实验组 OD-空白组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD)×100%。

**1.2.4 Hoechst 染色观察细胞凋亡** 用 PBS 洗涤 2 次,在 150μL 缓冲液中加入 2μL Hoechst 染液,避光、室温反应 5min 后置于荧光显微镜下观察,放大倍数为 400 倍。活细胞呈均匀淡蓝色荧光,凋亡细胞的细胞核内染色质浓缩,荧光显微镜下可见浓染致密的颗粒状荧光,呈亮蓝色荧光。每组 5 张不同的图片上各随机选取 5 个视野计数,细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

**1.2.5 细胞内活性氧的检测** 利用氧敏感荧光探针 H<sub>2</sub>DCFDA 检测活性氧(reactive oxygen species,ROS)。RPE 细胞接种于 96 孔板内,用含 10μmol/L 的 H<sub>2</sub>DCFDA 探针的培养液在 37℃ 细胞培养箱内孵育 20min,平衡盐溶液冲洗 2 次后置于荧光显微镜下检测细胞内荧光强度,每组 5 张不同的图片上各随机选取 5 个视野计数。

**1.2.6 氧化应激指标检测** 收集细胞并用 1g/L 胰酶消化,加入 PBS 制成细胞悬液,1200r/min 离心 10min 弃上清,收集细胞并用 PBS 冲洗 2 次,加入 30μL 细胞裂解液后冰上孵育 20min,3000r/min 离心 10min,按试剂盒说明书,使用 721D 分光光度计测定细胞内 CAT、SOD 和 MDA 含量。

统计学分析:采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行处理,结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并行 Student's *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

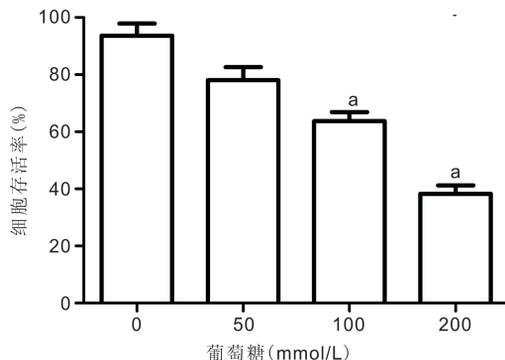


图 1 不同浓度梯度葡萄糖对 RPE 细胞存活率的影响(<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 0mmol/L 葡萄糖组)。

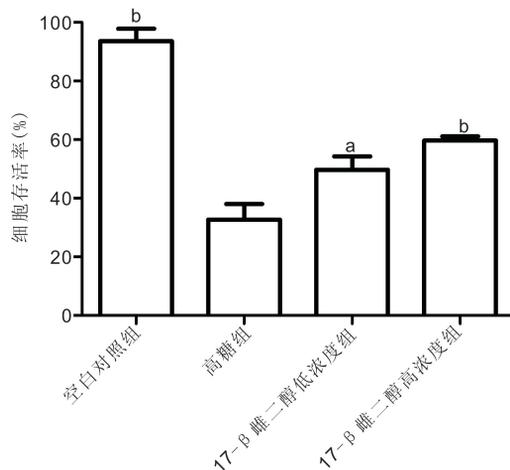


图 2 17-β雌二醇对 RPE 细胞活力的影响(<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 高糖组)。

## 2 结果

**2.1 不同浓度梯度葡萄糖对 RPE 细胞的影响** 通过用 MTT 法进行不同浓度梯度葡萄糖对 RPE 细胞活性分析,我们发现随着葡萄糖浓度的增加,RPE 细胞活性逐渐下降,当葡萄糖浓度为 100mmol/L 时 RPE 细胞活性为  $63.66\% \pm 3.43\%$ ,与空白对照组比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 1),所以我们选择该浓度建立 REP 高糖模型。

**2.2 17-β雌二醇对 RPE 细胞活性的影响** 通过用 MTT 法进行 17-β雌二醇对 RPE 细胞活性分析,我们发现高糖组 RPE 细胞经 100mmol/L 葡萄糖处理后,细胞活性明显下降,用不同浓度 17-β雌二醇处理后,RPE 细胞活性分别提高到  $49.67\% \pm 3.72\%$  和  $59.67\% \pm 3.24\%$ ,与高糖组比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2)。

**2.3 17-β雌二醇对高糖致 RPE 细胞凋亡的抑制作用** Hoechst33258 核染色法显示,空白对照组 RPE 细胞未见明显凋亡( $1.03\% \pm 1.22\%$ ),细胞核均呈现淡蓝色低荧光,高糖组凋亡细胞明显增多( $42.25\% \pm 3.14\%$ ),凋亡的 RPE 细胞核呈致密浓染的亮蓝色,高糖组 RPE 细胞凋亡率与空白对照组比较差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ );给予不同浓度的 17-β雌二醇作用后凋亡细胞逐渐减少,荧光强度逐渐减弱,其凋亡率逐渐下降,17-β雌二醇低、高浓度组的细胞凋亡率与高糖组比较,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3、4)。

表1 17-β 雌二醇对 RPE 细胞内 CAT 和 SOD 与 MDA 含量的影响

组别	CAT(U/mg)	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)	$\bar{x} \pm s$
空白对照组	61.11±3.63	82.44±3.52	57.09±3.44	
高糖组	34.25±3.45 <sup>a</sup>	46.73±3.58 <sup>a</sup>	103.08±3.63 <sup>a</sup>	
17-β 雌二醇低剂量组	41.28±2.63 <sup>c</sup>	59.63±3.04 <sup>c</sup>	86.84±3.14 <sup>c</sup>	
17-β 雌二醇高剂量组	44.05±2.73 <sup>c</sup>	63.13±2.74 <sup>c</sup>	70.03±2.78 <sup>c</sup>	

注:<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs 空白对照组;<sup>c</sup>  $P < 0.05$  vs 高糖组。

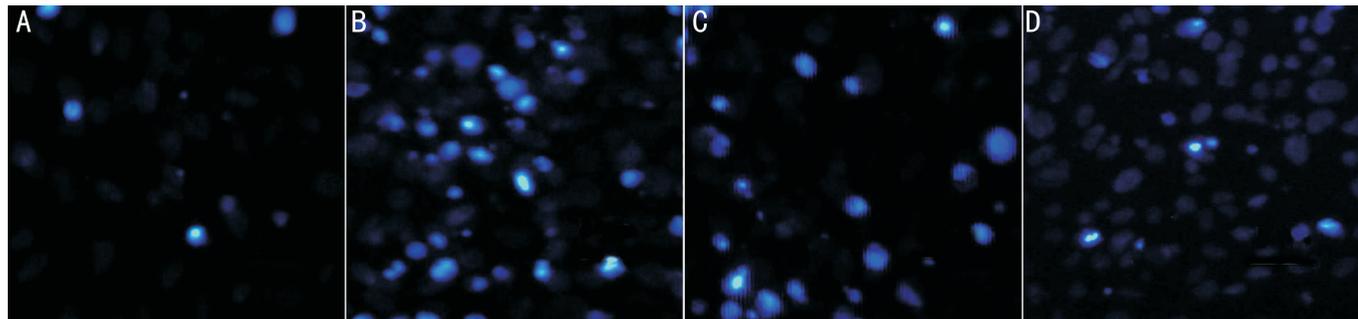


图3 Hoechst33258 核染色法观察 17-β 雌二醇对高糖致 RPE 细胞凋亡的抑制作用(×300) A:空白对照组;B:高糖组;C:17-β 雌二醇低浓度组;D:17-β 雌二醇高浓度组。

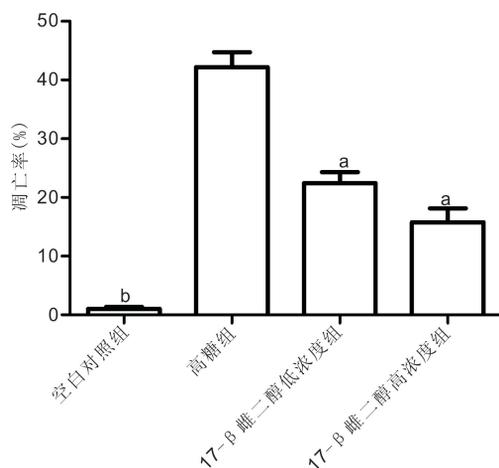


图4 17-β 雌二醇对高糖诱导 RPE 细胞凋亡的抑制作用(<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs 高糖组)。

2.4 H<sub>2</sub>DCFDA 荧光探针检测各组 RPE 细胞内 ROS 变化 采用 H<sub>2</sub>DCFDA 荧光探针检测细胞内 ROS 变化情况,正常细胞胞核呈黑绿色低荧光,氧化损伤细胞核呈亮绿色高荧光。高糖组与空白对照组相比,DCF 荧光信号明显增强,不同浓度 17-β 雌二醇干预后,荧光信号强度逐渐减弱(图5)。

2.5 17-β 雌二醇对 RPE 细胞内 CAT 和 SOD 与 MDA 含量的影响 从表1中可以观察到,高糖组 RPE 细胞中 CAT 和 SOD 含量与空白对照组比较明显下降,MDA 含量明显升高,与空白对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );给予 17-β 雌二醇后,CAT 和 SOD 含量逐渐升高,MDA 含量有下降的趋势,17-β 雌二醇低、高剂量组与高糖组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

RPE 细胞的氧化损伤和凋亡与糖尿病视网膜病变的发生密切相关<sup>[2]</sup>。17-β 雌二醇具有很强的抗氧化能力,可以有效地清除自由基,抑制人体多个组织、器官的细胞凋亡,对心血管系统、内分泌系统、生殖系统和神经系统均

发挥保护作用<sup>[3]</sup>。已有研究证实,17-β 雌二醇通过上调 PI3K/Akt 蛋白的表达,抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的血管内皮细胞损伤,发挥抗高糖和抗细胞凋亡作用<sup>[4]</sup>。RPE 细胞位于视网膜神经上皮层与 Bruch 膜/脉络膜复合体之间,构成视网膜的外屏障,对于维持视网膜正常生理代谢发挥重要作用。其结构和功能异常可以导致多种视网膜疾病的发生,如中心性浆液性脉络膜视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、先天性视网膜营养不良、视网膜色素变性等<sup>[5]</sup>。由于人 RPE 细胞在眼部的特殊位置,导致其特别容易受到氧自由基的攻击。

大量研究证实,累积性氧化损伤是导致糖尿病视网膜病变发生的一个重要原因。RPE 细胞对氧化应激较为敏感,高糖刺激 PRE 细胞导致细胞抗氧化能力下降,同时产生大量自由基和 ROS,细胞内氧化代谢产物堆积导致细胞毒性损伤,过多的自由基将直接通过损伤线粒体造成 PRE 凋亡<sup>[6-7]</sup>。我们模拟体内环境中 RPE 的氧化应激状态,利用 100mmol/L 葡萄糖建立细胞高糖模型,观察 17-β 雌二醇对该细胞的保护作用。细胞活力检测结果显示 100mmol/L 葡萄糖处理的 RPE 细胞活力明显降低,17-β 雌二醇能够抑制高糖诱导的细胞损伤,其保护作用呈剂量依赖性;Hoechst33258 核染色凋亡结果显示,高糖作用下 RPE 细胞凋亡率明显增加,细胞内 ROS 表达也增高,表明高糖造成了一定程度的氧化应激损伤;17-β 雌二醇有效抑制了高糖诱导的凋亡反应的发生,同时也降低了细胞内 ROS 的生成。

雌激素是维持机体正常生理状态的重要的甾体类激素,17-β 雌二醇为雌激素重要组成部分。天然雌激素主要由卵巢分泌,在眼部的葡萄膜和视网膜组织中也有明显分布<sup>[8-9]</sup>。其主要作用是维持机体激素水平稳定,此外 17-β 雌二醇还可以降低炎症反应程度、调控 VEGF 抑制新生血管生成、改善组织缺血再灌注的损伤<sup>[10-11]</sup>。既往有研究从不同角度探讨了 17-β 雌二醇对视网膜组织和细胞的保护作用。Giddabasappa 等<sup>[12]</sup>通过体外建立 ARPE-19 细胞高糖模型,观察发现 17-β 雌二醇通过上调

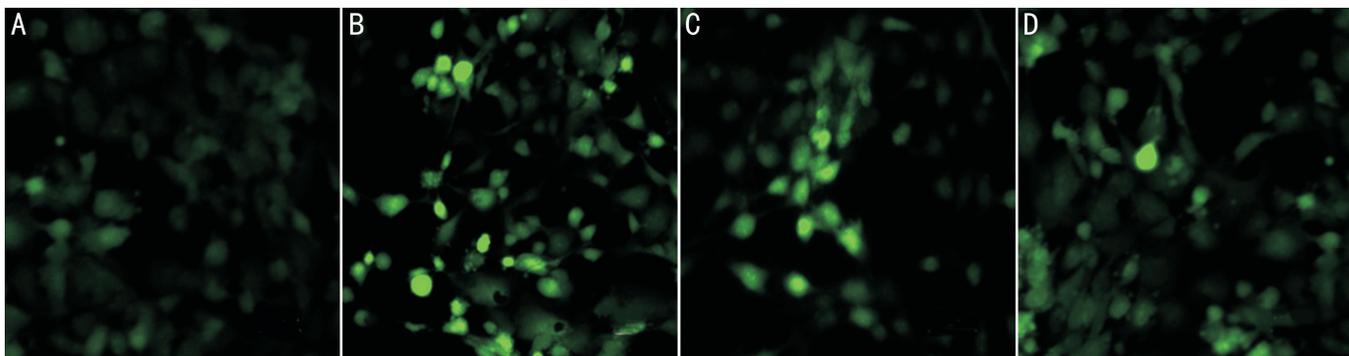


图5 17-β 雌二醇对 RPE 细胞内 ROS 含量变化的影响( $\times 300$ ) A:空白对照组;B:高糖组;C:17-β 雌二醇低浓度组;D:17-β 雌二醇高浓度组。

雌激素受体  $\beta$  的表达降低 RPE 细胞内 ROS 的生成,并避免线粒体去极化反应的发生,进而抑制 RPE 细胞凋亡。

氧化应激损伤导致机体抗氧化防御能力下降,引起视网膜组织发生氧化应激反应,抗氧化酶活力也随之下降。我们的研究结果显示,100mmol/L 葡萄糖作用于 RPE 细胞后,CAT 和 SOD 的表达量均明显下降,MDA 的表达量升高,予以 17-β 雌二醇处理后,CAT 和 SOD 的表达量逐渐升高,MDA 的表达量逐渐下降,提示 17-β 雌二醇可能通过增强抗氧化相关因子的表达发挥细胞保护作用。

综上所述,17-β 雌二醇对 RPE 细胞的高糖损伤具有一定程度的保护作用,为临床有效防治糖尿病视网膜病变提供依据,具有广阔的应用前景。

#### 参考文献

- 1 Shao J, Yao Y. Transthyretin represses neovascularization in diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2016;22:1188-1197
- 2 Senthilkumari S, Sharmila R, Chidambaranathan G, et al. Epalrestat, an Aldose Reductase Inhibitor Prevents Glucose-Induced Toxicity in Human Retinal Pigment Epithelial Cells *In Vitro*. *J Ocul Pharmacol Ther* 2017;33(1):34-41
- 3 杨静,黎洁,卢长喜,等. 17β-雌二醇抗心肌细胞氧化应激损伤的 Nrf-2/HO-1 信号通路的分子机制. *华西药理学杂志* 2013;28(5):467-470

- 4 王朝霞,赵焯,范春雨,等. 17β-雌二醇对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致血管内皮损伤的保护作用及机制的研究. *中西医结合心脑血管病杂志* 2015;13(14):1616-1618

- 5 司俊康,郭俊国,郭大东,等. 黄芪多糖对过氧化氢诱导人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用. *眼科新进展* 2015;35(1):18-20

- 6 Farnoodian M, Halbach C, Slinger C, et al. High glucose promotes the migration of retinal pigment epithelial cells through increased oxidative stress and PEDF expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016;311(3):C418-436

- 7 Oh JR, Han JW, Kim YK, et al. The effects of anti-vascular endothelial growth factor agents on human retinal pigment epithelial cells under high glucose conditions. *Int J Ophthalmol* 2017;10(2):203-210

- 8 范海燕,倪卫杰,施彩虹. 17β-雌二醇对高氧诱导的大鼠视网膜细胞凋亡的保护作用. *国际眼科杂志* 2009;9(3):447-449

- 9 王朝霞,赵焯,范春雨,等. 17β-雌二醇对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致血管内皮损伤的保护作用及机制的研究. *中西医结合心脑血管病杂志* 2015;13(14):1617-1619

- 10 Brown CM, Suzuki S, Jelks KA, et al. Estradiol is a potent protective, restorative, and trophic factor after brain injury. *Semin Reprod Med* 2009;27(3):240-249

- 11 Soliman M. Protective Effects of Estradiol on Myocardial Contractile Function Following Hemorrhagic Shock and Resuscitation in Rats. *Chin Med J* 2015;128(17):2360-2364

- 12 Giddabasappa A, Bauler M, Yepuru M, et al. 17-β estradiol protects ARPE-19 cells from oxidative stress through estrogen receptor-β. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(10):5278-5287