

· 论 著 ·

雌二醇介导 SIRT1-FOXO3a 对成骨细胞自噬的作用和机制研究

唐烨* 蒋林 蒋成明 王惟达 周乾

长沙市一医院脊柱外科,湖南 长沙 410005

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 12-1788-10

摘要: **目的** 探讨雌激素是否能通过增强 SIRT1 的活性进而对成骨细胞及其通路产生作用。**方法** 17 β -雌二醇(17 β -E2)作用于 hFOB1.19 成骨细胞 24 h,应用荧光自噬检测试剂盒(MDC)检测成骨细胞自噬情况;应用蛋白免疫印迹技术检测自噬相关蛋白 LC3 的表达含量;应用蛋白免疫印迹技术检测 AMPK、磷酸化的 AMPK、SIRT1 蛋白活性的影响;在 17 β -E2 环境中,增强或抑制 SIRT1 的活性,通过电镜、激光共聚焦显微镜、流式细胞仪观察细胞形态和关键蛋白质的改变;应用免疫印迹技术及实时定量 PCR 检测 17 β -E2/SIRT1/AMPK/FOXO3a 对细胞自噬相关蛋白 Bcl-2、Bnip3、mTOR 及凋亡相关蛋白 caspase-3 的影响。**结果** 17 β -E2(10^{-8} mmol/L, 10^{-6} mmol/L)增加成骨细胞的自噬,成骨细胞内 LC3II 蛋白活性增加;随着 17 β -E2 浓度的增加, SIRT1 蛋白表达量增加,且活性增强;17 β -E2 增加磷酸化 AMPK 的水平,且 AMPK 可以增加成骨细胞内 SIRT1 的活性;SIRT1 激动剂 SRT1720 及抑制剂 Ex527 可以干预 17 β -E2/SIRT1 对成骨细胞细胞凋亡的负调节作用;应用激光共聚焦显微镜和透射电镜观察成骨细胞内 17 β -E2/SIRT1 调节 LC3 蛋白,并发现 SRT1720 可增强成骨细胞内的双层膜结构的线粒体自噬小体的数量;介导 SIRT1 蛋白,17 β -E2 可以增加自噬相关蛋白 Bcl-2 和 Bnip3 的表达,减低 mTOR 的活性,增加 FOXO3a 活性。**结论** SIRT1 在 17 β -E2 介导的成骨细胞自噬作用中起到关键作用;17 β -E2 可能通过 AMPK/SIRT1/FOXO3a/mTOR 通路介导成骨细胞自噬。

关键词: 17 β -雌二醇;沉默信息调节因子 1;5'-单磷酸腺苷活化蛋白激酶;FOXO3 基因编码的人类蛋白质;线粒体自噬

The effect and mechanism of estradiol mediated SIRT1-FOXO3a on autophagy in osteoblasts

TANG Ye*, JIANG Lin, JIANG Chengming, WANG Weida, ZHOU Qian

Spine Surgery of Changsha First Hospital, Changsha 410005, China

* Corresponding author; TANG Ye, Email: tangyecs@163.com

Abstract: **Objective** To investigate whether estrogen can enhance the activity of Sirt1 and then have an effect on osteoblasts and their pathways. **Methods** Different concentrations of 17 β -E2 were applied to hFOB 1.19 after 24 hours, the autophagy of osteoblasts was detected by fluorescence autophagy detection kit (MDC); The expression of autophagy related protein LC3 was detected by Western blotting; The effect of AMPK, phosphorylated AMPK and SIRT1 on egg white activity was detected by Western blotting; SIRT1 was enhanced or inhibited in 17 β -E2 environment. The changes of cell morphology and key proteins were observed by electron microscopy, confocal laser microscopy and flow cytometry; The effects of 17 β -E2/SIRT1/AMPK/FOXO3a on autophagy related proteins Bcl-2, BNIP3, mTOR and caspase-3 were detected by immunoblotting and real-time quantitative PCR. **Results** 17 β -E2 (10^{-8} mmol/L, 10^{-6} mmol/L) increased the autophagy of osteoblasts and the activity of lc3ii protein in osteoblasts; With the increase of 17 β -E2 concentration, the expression of SIRT1 protein increased and the activity increased; 17 β -E2 increased the level of phosphorylated AMPK, and AMPK increased the activity of SIRT1 in osteoblasts; SRT1720, SIRT1 agonist, and ex527, an inhibitor of SIRT1 It could interfere with the negative regulation of 17 β -E2/SIRT1 on the apoptosis of osteoblasts; Using laser confocal microscopy and perspective electron microscopy to observe the LC3 protein regulated by 17 β -E2/SIRT1 in osteoblasts, SRT1720 was found It could enhance the autophagy mediated by 17 β -E2, increase the autophagy bodies in cells, and increase the mitochondrial autophagy bodies with double membrane structure; It could mediate SIRT1 protein, 17 β -E2 could increase the expression of autophagy related proteins Bcl-2 and BNIP3, reduce the activity of mTOR and increase the activity of FOXO3a. **Conclusion** SIRT1 plays a key role in 17 β -E2 mediated autophagy of osteoblasts; 17 β -E2 may mediate autophagy of

* 通信作者: 唐烨, Email: tangyecs@163.com

osteoblasts through AMPK/SIRT1/FOXO3a/mTOR pathway.

Key words: 17 β -E2; SIRT1; AMPK; FOXO 3a; mitochondrial autophagy

绝经后女性出现骨质疏松症是因为绝经之后女性卵巢功能减退进而导致雌激素水平降低,从而引起体内成骨细胞和破骨细胞数量失衡,进而产生骨形成与骨吸收失衡^[1],造成绝经后女性骨量减少、骨质强度降低。雌激素的减少被认为是造成绝经后骨质疏松症的关键因素之一^[2]。研究雌激素对成骨细胞的作用通路及相关基因,有利于进一步探讨绝经后骨质疏松症发生的机制,并且可以引导该疾病治疗做出更好预测方法、诊断方法和防治措施。

沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 可通过抑制氧化应激诱导的损伤来纠正绝经后骨质疏松症的表现^[3]。有研究^[4]表明,17 β -雌二醇 (17 β -E2) 能够促进乳腺癌细胞的自噬,还可通过自噬抑制人脐静脉的衰老^[5]。但 17 β -E2 是否能够通过 AMPK/SIRT1 途径引起成骨细胞自噬并起到保护作用的机制还需要进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材料和分组

实验细胞分组:空白对照组和 10⁻⁶ mmol/L、10⁻⁷ mmol/L、10⁻⁸ mmol/L 17 β -E2 组。另外,根据实验分组加入激活剂或抑制剂:激活剂 SRT1720 (1 μ mol/L) 或抑制剂 Ex527 (400 nmol/L) 加入细胞预处理 2 h 后,加入 10⁻⁶ mmol/L 17 β -E2,然后将细胞培养 24 h,用 PBS 冲洗后备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞自噬免疫荧光染色 (荧光抗体标记): hFOB1.19 细胞调整细胞密度,接种于六孔板中,待细胞贴壁后,加入相应的干预处理,具体步骤如下:①免疫荧光:细胞固定;通透;封闭;一抗孵育;二抗孵育;染核;观察。②细胞自噬检测 MDC 法:贴壁细胞在 24 孔板内爬片至所需要的密度,加入处理因素培养 24 h;MDC 染色工作液配制;在所需的孔板内加入 100 μ L 的 MDC 染色工作液,室温避光染色 20 ~ 40 min,弃去染色液,以 1 $\times$ Wash Buffer 覆盖细胞爬片,观察细胞,计数,拍照;与 EB 双染色。

1.2.2 实时定量 PCR 技术检测成骨细胞中相关蛋白 mRNA 的表达:①细胞干预:按照各组实验目的处理细胞,然后测量各组成骨细胞表达的 SIRT1 mRNA、Beclin-1 mRNA、BCL-2 mRNA、FOXO 3a mRNA、caspase 3 mRNA 的含量表达;②细胞收集:

上述处理后的细胞,弃除细胞的培养液。将需要暂时保存的样本冻存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中,备用提取 RNA;③细胞 RNA 的提取;④RNA 纯度的测定;⑤实时定量 PCR 的检测。

1.2.3 蛋白免疫印迹技术检测成骨细胞中 SIRT1 等相关蛋白的含量:在 TBST 内清洗,10 min/次,共需洗 3 次。在避光条件下按照 1:1 的比例混合 A 和 B 两种发光液,均匀的滴加在条带上,然后开始荧光检测,将整理好的图像用 Image J 软件分析,明确灰度值以及半定量分析目标蛋白质,数据统计并记录形态、数目情况,拍摄照片。

1.2.4 流式细胞仪检测:采用 AV/PI 双重染色的 FCM 分析细胞凋亡,成骨细胞用膜联蛋白 V-FITC 试剂盒处理,用于膜联蛋白 V-FITC/PI 双重染色。流式细胞仪 (BD FACS Aria IIu) 用于分析成骨细胞凋亡细胞,并且以低流速和最少 1 $\times$ 10⁵ 细胞。

1.2.5 透射电镜:细胞取材;固定;脱水;包埋;固化;切片;3% 乙酸铀酰和柠檬酸铅双重染色;使用日立 HE-800 型透射电子显微镜进行观察和拍摄。

1.3 统计分析

所有数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差 (SD)。方差检验的均质性检验通过 Leven 检验进行。通过单向方差分析 (ANOVA) 和最低显着性差异 (LSD) 检验确定特定组之间的差异。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。借助于 SPSS22.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 17 β -E2 在体外细胞实验中增强成骨细胞自噬和 SIRT1 活性

2.1.1 17 β -E2 对成骨细胞内 LC3II 蛋白活性的作用:用不同浓度的 17 β -E2 作用成骨细胞 24 h 或 10⁻⁶ mmol/L 浓度作用不同时间,应用蛋白印记技术观察自噬相关蛋白 LC3 表达的变化。17 β -E2 引起成骨细胞自噬改变,具有浓度依赖性和时间依赖性 (图 1)。检测 LC3 蛋白表达及 LC3II/LC3I 比值,与对照组相比,作用相同时间中 10⁻⁶ mmol/L 浓度组及相同浓度作用 24 h 组的结果差异最明显,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.1.2 MDC 检测 17 β -E2 对成骨细胞自噬的影响:不同条件下的 17 β -E2 作用于成骨细胞 24 h,用细胞自噬检测试剂盒检测成骨细胞自噬强度的变化,用

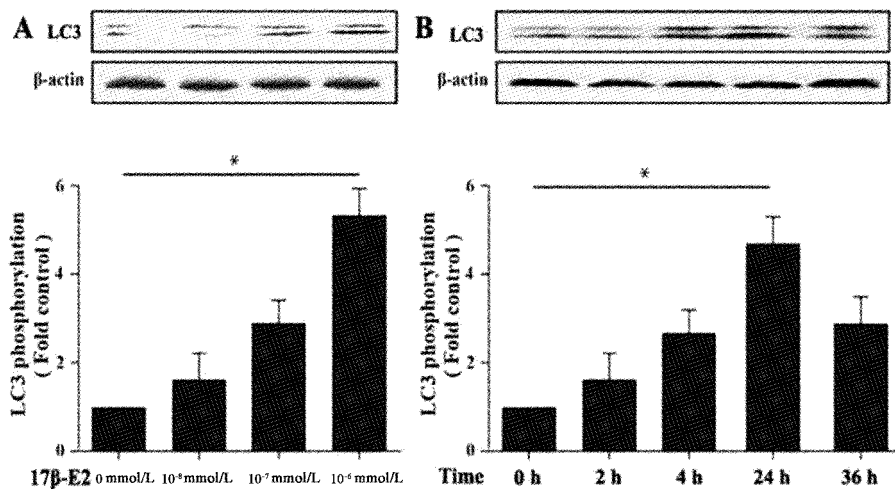


图1 17β-E2对成骨细胞内LC3II蛋白活性的作用

A:浓度依赖性;B:时间依赖性。注:* $P<0.05$ 。

Fig.1 The effect of 17β-E2 on LC3II protein activity in osteoblasts

A:concentration dependent; B:time-dependent.

荧光显微镜观察结果。结果中 10⁻⁶ mmol/L 组荧光强度明显高于对照组,具有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

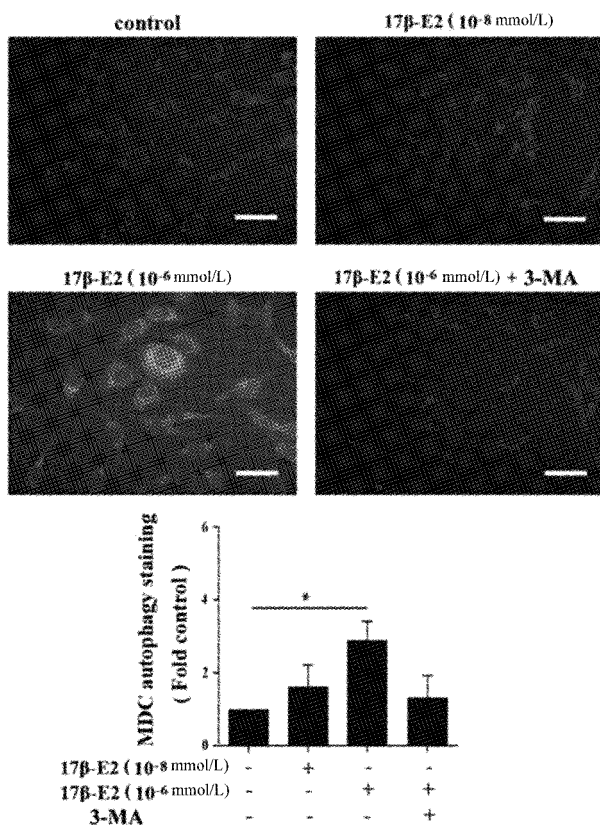


图2 MDC检测17β-E2对成骨细胞自噬的影响

注:* $P<0.05$ 。

Fig.2 The effect of 17β-E2 on autophagy of osteoblasts detected by MDC

2.2 17β-E2增强成骨细胞内SIRT1活性

不同浓度的 17β-E2 处理成骨细胞后提取 SIRT1 蛋白,结果用蛋白印迹法检测。随着 17β-E2 浓度的增加,SIRT1 蛋白表达含量增加,其中 10⁻⁶ mmol/L 组的含量明显高于对照组,结果具有统计学意义($P<0.05$)。实时定量 PCR 检测 SIRT1 mRNA 的含量,其中 10⁻⁶ mmol/L 组含量明显高于对照组($P<0.05$)。见图 3。

2.3 17β-E2通过激活AMPK并促进成骨细胞中SIRT1活性

在体外细胞实验中,将不同浓度的 17β-E2 应用于成骨细胞,并检测细胞中 p-AMPK 和 t-AMPK 的蛋白质含量。结果表明:与相对比例相比,10⁻⁶ mmol/L 17β-E2 可以明显增加 p-AMPK 的活性,而不增加总 AMPK 的含量,具有统计学意义($P<0.05$),见图 4 A。

用 Ex229(AMPK 激活剂,10 nmol/L),化合物 C (Compound C,10 μmol/L,AMPK 抑制剂)预处理成骨细胞,并添加 10⁻⁶ mmol/L 17β-E2 培养细胞。检测 SIRT1 蛋白的含量,结果表明相对于对照组,Ex229 可以明显增加 SIRT1 的含量,而化合物 C 可明显抑制 SIRT1 的表达(图 4B)。统计分析具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 激活SIRT1增强17β-E2诱导的成骨细胞自噬水平

2.4.1 Fitc-LC3 B 激光共聚焦显微镜观察 17β-E2/SIRT1 对成骨细胞自噬的影响:在体外细胞实验

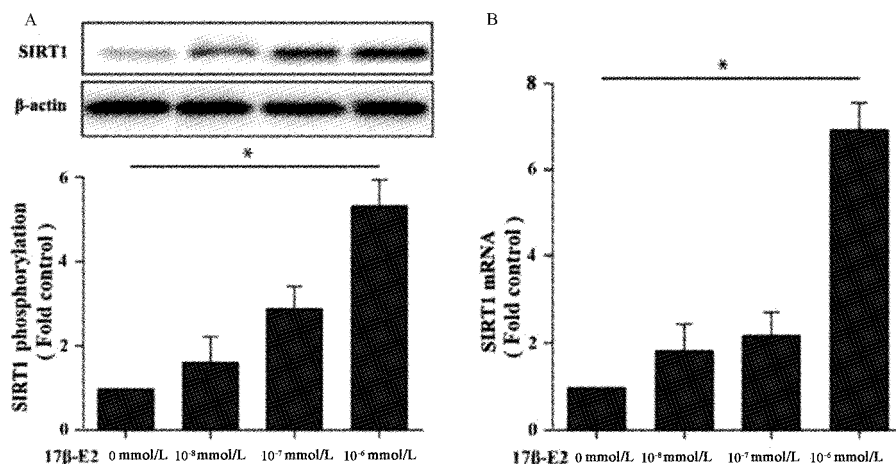


图3 17β-E2对成骨细胞内SIRT1基因表达和蛋白活性的作用

A: 蛋白印迹法检测; B: 实时定量PCR检测SIRT1 mRNA的含量。注: * $P < 0.05$ 。

Fig.3 The effects of 17β-E2 on SIRT1 gene expression and protein activity in osteoblasts

A: Western blot method; B: real time quantitative PCR to detect SIRT1 mRNA content.

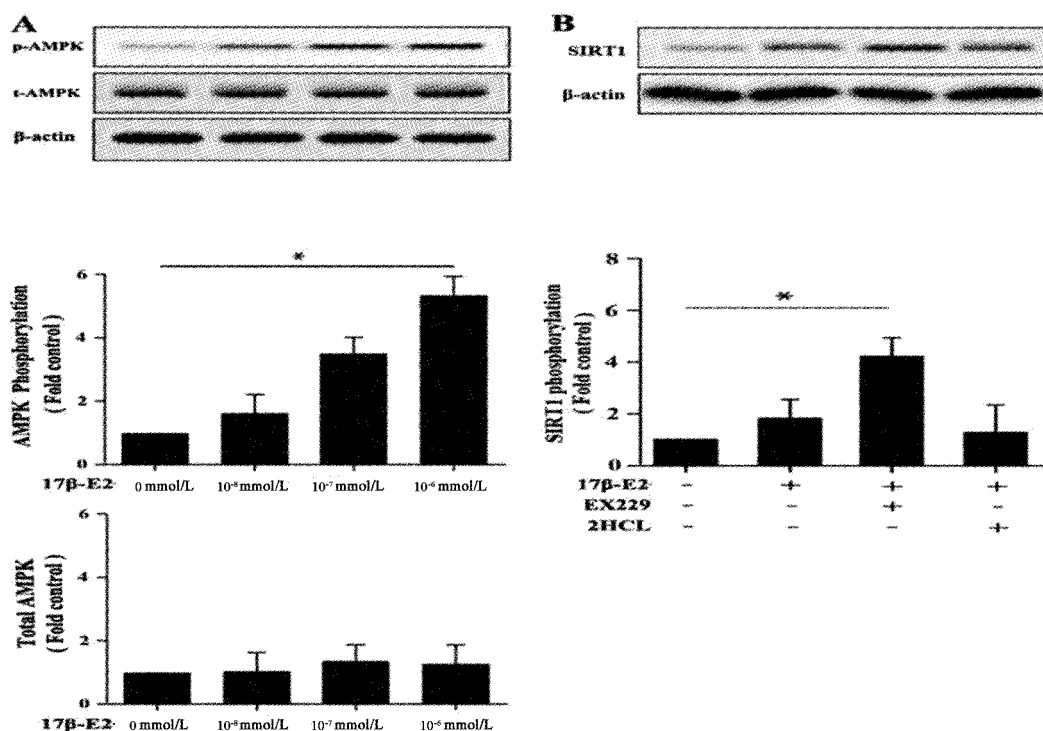


图4 17β-E2/SIRT1对细胞内AMPK蛋白活性的影响。

注: * $P < 0.05$ 。

Fig.4 The effect of 17β-E2/SIRT1 on the activity of AMPK protein

中,用SRT1720(SIRT1激活剂)或Ex527(SIRT1抑制剂)预处理细胞2 h,并添加了10⁻⁶ mmol/L 17β-E2作用24 h,来观察SIRT1活性的增强和减弱对17β-E2中成骨细胞自噬的影响。本研究用免疫荧光抗体标记自噬相关蛋白LC3B蛋白(绿),DAPI染色剂染细胞核(蓝),并用激光共聚焦显微镜观察细

胞自噬(图5 A)。与空白对照组相比,10⁻⁶ mmol/L 17β-E2可以增强自噬相关蛋白LC3的表达,而SRT1720可以强化17β-E2此作用($P < 0.05$)。

2.4.2 流式细胞仪检测17β-E2/SIRT1对成骨细胞凋亡的影响:为了检测用17β-E2/SIRT1对成骨细胞凋亡的影响,本研究采用17β-E2、SRT1720及

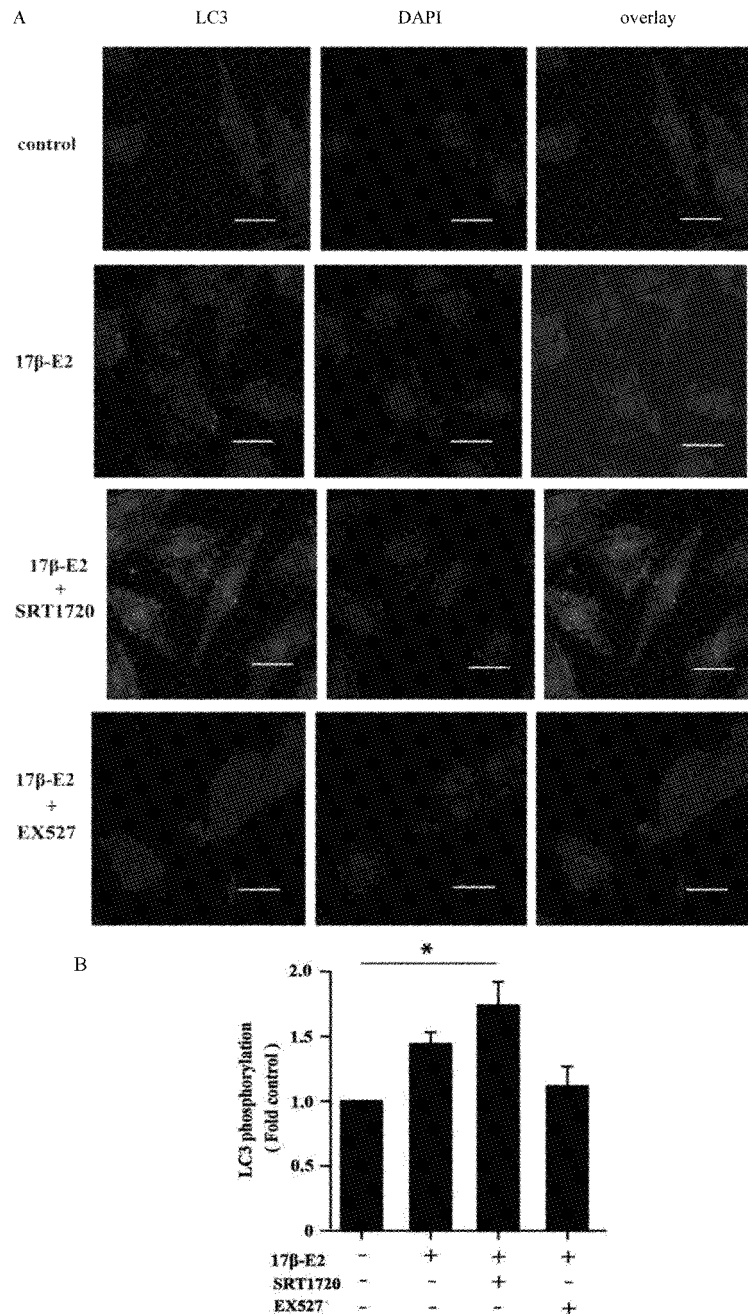


图 5 Fitc-LC3B 激光共聚焦显微镜观察 17β-E2/SIRT1 对成骨细胞自噬的影响

A: 激光共聚焦显微镜观察细胞自噬; B: 自噬相关蛋白 LC3 的表达。注: * $P < 0.05$ 。

Fig.5 Effect of 17β-E2/SIRT1 on autophagy of osteoblasts observed by Fitc-LC3B laser confocal microscope

A: Observation of autophagy by laser confocal microscopy; B: Expression of autophagy related protein LC3.

EX527 分别处理细胞,通过 V-FITC/PI 双重染色检测凋亡率。结果显示(图 6),17β-E2 组可降低细胞凋亡率,而 SRT1720 明显增强此作用($P < 0.05$)。

2.4.3 电镜观察细胞内 17β-E2/SIRT1 对细胞内线粒体自噬影响:进一步使用电子显微镜观察细胞的微观自噬状态(图 7),17β-E2 可以增加细胞内自噬的线粒体小体数量,而 SRT1720 更加明显的增加了

细胞内自噬的线粒体小体数量,但 Ex527 可以抑制此结果。结果表明,激活成骨细胞内 SIRT1,可以增强细胞内线粒体自噬水平。

2.5 17β-E2 介导的成骨细胞中 SIRT1-FOXO3a-mTOR 通路诱导成骨细胞自噬

在体外细胞实验中,添加 10^{-6} mmol/L 17β-E2,并添加 SRT1720 或 Ex527 以观察激活或抑制 SIRT1

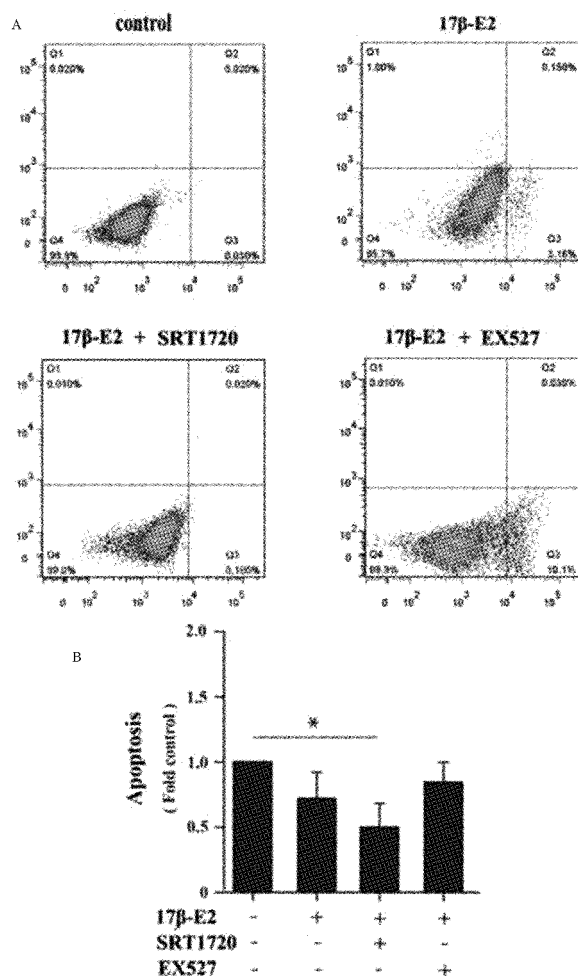


图6 流式细胞仪检测 17β-E2/SIRT1 对成骨细胞凋亡的影响

A: V-FITC/PI 双重染色检测凋亡率; B: 17β-E2 组降低细胞凋亡率, SRT1720 增强细胞凋亡率。注: * $P < 0.05$ 。

Fig. 6 The effect of 17β-E2/SIRT1 on osteoblast apoptosis was detected by flow cytometry

A: The apoptosis rate was detected by V-FITC/PI double staining; B: 17β-E2 group decreased the apoptosis rate, SRT1720 increased the apoptosis rate.

活性对 17β-E2 环境中成骨细胞自噬的影响。用 SRT1720 或 Ex527 预处理 2 h, 然后用 10^{-6} mmol/L 17β-E2 处理 24 h。检测 LC3 mRNA 的含量, 结果发现与对照组相比, 17β-E2 增加了 LC3 mRNA 的含量, 而 SRT1720 增强了此结果(图 8 A, $P < 0.05$); 与空白对照组相比, 17β-E2 增加了 FOXO3a mRNA、SIRT1 mRNA 的表达和自噬相关基因 Beclin-1 mRNA 的表达(图 8B ~ 图 8D), 而 SRT1720 增强了此结果($P < 0.05$); 然而 17β-E2 减少了凋亡相关蛋白 caspase3 mRNA 的表达含量, 而 SRT1720 可以显著下调此结果(图 8E, $P < 0.05$)。进一步检测成骨

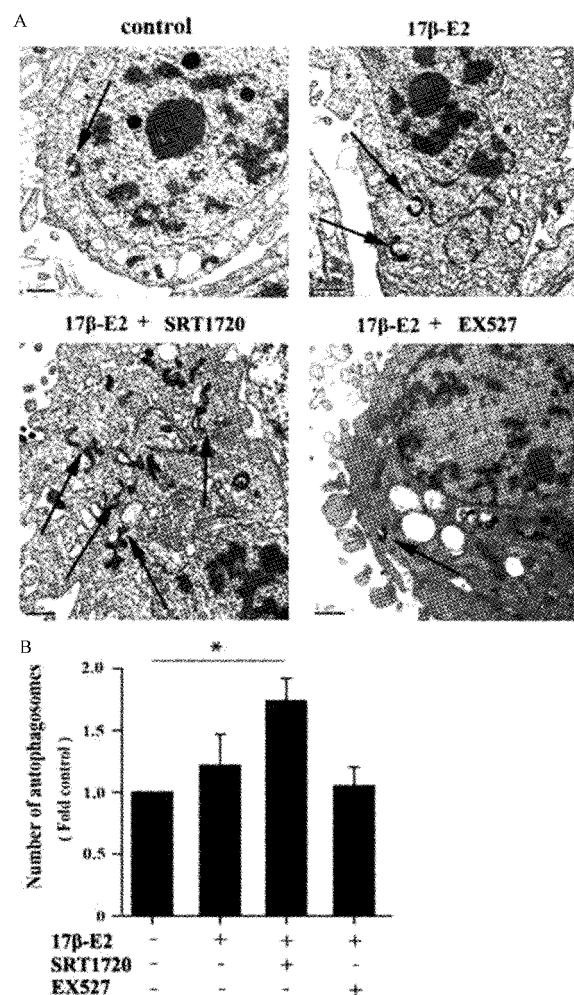


图7 电镜观察细胞内 17β-E2/SIRT1 对细胞内线粒体自噬影响

A: 电子显微镜观察细胞的微观自噬状态; B: SRT1720 增加细胞内自噬小体数量, Ex527 抑制其数量。注: * $P < 0.05$ 。

Fig. 7 Electron microscope observation of the effect of 17β-E2 / SIRT1 on intracellular mitochondrial autophagy

A: Microscopic autophagy of cells observed by electron microscope; B: SRT1720 increased the number of autophagy bodies in cells, Ex527 inhibited the number of autophagy bodies.

细胞自噬相关蛋白 mTOR、BCL-2、Bnip3、LC3II 及 Beclin-1 蛋白活性, 发现细胞内 17β-E2/SIRT1 明显增强了 BCL-2、Bnip3、LC3II 及 Beclin-1 蛋白的活性, 但降低 p-mTOR 的含量(图 9, $P < 0.05$)。

3 讨论

体外细胞实验结果发现, 不同浓度、不同时间的 17β-E2 作用于成骨细胞, 引起成骨细胞不同程度的自噬, 自噬相关蛋白 LC3 增加, 其中 10^{-6} M 17β-E2 作用 24 h 引起的细胞自噬具有统计学意义。并且雌二醇引起的成骨细胞自噬是剂量和时间依赖的。

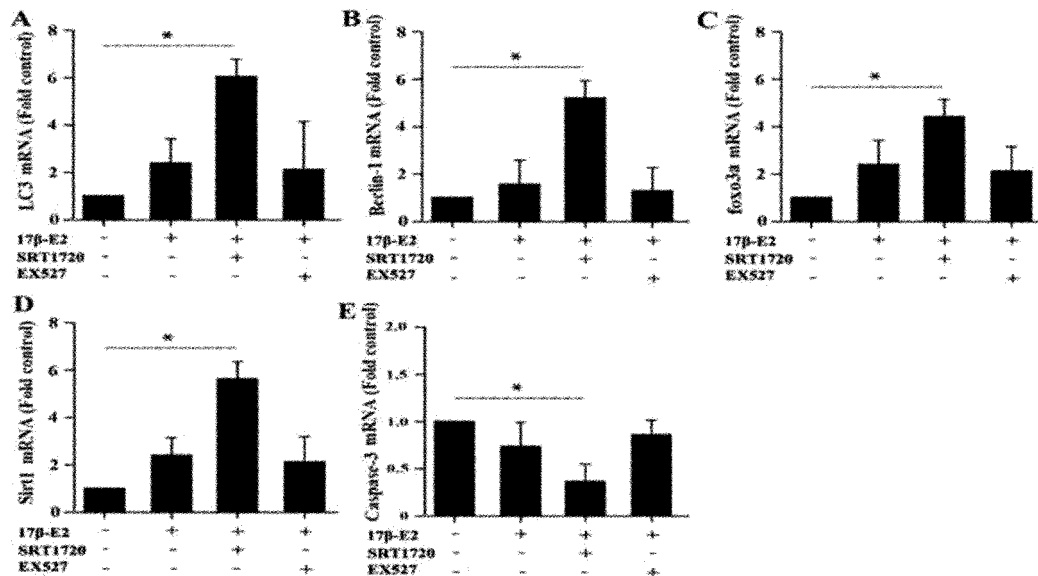


图8 17β-E2/SIRT1对细胞内FOXO3a、BCL2、caspase3和Bnip3基因表达的影响

A:LC3 mRNA;B:Beclin-1 mRNA;C:FOXO3a mRNA;D:SIRT1 mRNA;E:caspase3 mRNA。注: * $P < 0.05$ 。

Fig.8 The effect of 17β-E2/SIRT1 on the expression of FOXO3a, BCL2, Caspase3 and BNIP3 in cells

A:LC3 mRNA; B: Beclin-1 mRNA; C: FOXO3a mRNA; D: SIRT1 mRNA; E: Caspase3 mRNA.

进一步用细胞自噬检测试剂盒(MDC法)检测成骨细胞自噬,并用荧光显微镜观察细胞自噬荧光强度的变化。结果发现随着17β-E2浓度的增加,细胞中荧光斑点的强度及数量增强,细胞自噬增强,而自噬抑制剂3-MA可以抑制成骨细胞自噬。表明刺激引起的成骨细胞自噬依赖mTOR通路。

研究发现17β-E2可正向调节SIRT1^[6],抑制p53乙酰化,触发活性氧(ROS)产生,激活p-mTOR,产生自噬,并发挥SIRT1的保护作用。为进一步探讨SIRT1在17β-E2介导的成骨细胞自噬中的作用,本研究使用SIRT1720来增加SIRT1的活性,并使用EX527来抑制SIRT1的活性。结果发现与17β-E2组相比,SIRT1720增强了细胞的免疫荧光亮点数量,并且这种增强可以被EX527抑制,表明SIRT1可增强17β-E2介导的成骨细胞自噬。用透射电镜观察细胞微观形态发现17β-E2可增加成骨细胞中自噬小体的数量,并增加双层膜结构的线粒体自噬的数量,并且SIRT1720增加了细胞中17β-E2诱导的线粒体自噬,表明SIRT1增强了雌二醇引起的成骨细胞线粒体自噬水平。

笔者进一步探究SIRT1对成骨细胞凋亡的影响,结果表明SIRT1的激活减少了17β-E2环境中的成骨细胞凋亡。SIRT1可增加自噬相关蛋白LC3II和自噬相关基因Beclin-1的表达水平,并降低了caspase-3 mRNA的表达水平,表明SIRT1增加了成

骨细胞的自噬并降低了其凋亡。细胞自噬相关蛋白mTOR复合物1(mTORC1)在自噬中的抑制功能已得到充分确立^[7]。mTOR是细胞生长、细胞代谢和细胞存活的基本调节剂,并且是AMPK的下游靶标。研究表明,对于某些因素,例如压力、ERα可以激活AMPK磷酸化水平以抑制mTORC1活性并增加自噬水平^[8]。既往研究^[9]中,植物雌激素白藜芦醇可以影响AMPK的活性,进而对植物生理功能产生影响。最近研究^[8]表明在动物中17β-E2介导的ERα-AMPK-mTOR通路抑制mTOR活性并增加自噬活性,表明雌激素可能对AMPK磷酸化具有补偿作用。

有研究^[9]表明雌激素可通过防止SIRT1依赖的AMPK途径阻止神经元死亡,从而预防缺血性卒中。雌激素可正向调节AMPK发挥作用,AMPK在骨性关节炎中起保护作用^[10]。本研究结果表明17β-E2通过激活磷酸化的AMPK活化SIRT1。既往研究^[11]表明AMPK的激活增加了NAD⁺的水平,从而诱导SIRT1的激活。SIRT1是一种脱乙酰基酶,可调节细胞应激的代谢活性,其激活可促进其下游靶标(包括PGC-1α,FOXO1和FOXO3a)的脱乙酰基作用,调节机制导致线粒体能量代谢的激活。FOXO3a的活性与年龄相关,在调节细胞存活中起到关键作用,FOXO3a的活性也受到沉默调节蛋白的脱乙酰基作用的调节,FOXO3a通过乙酰化参与

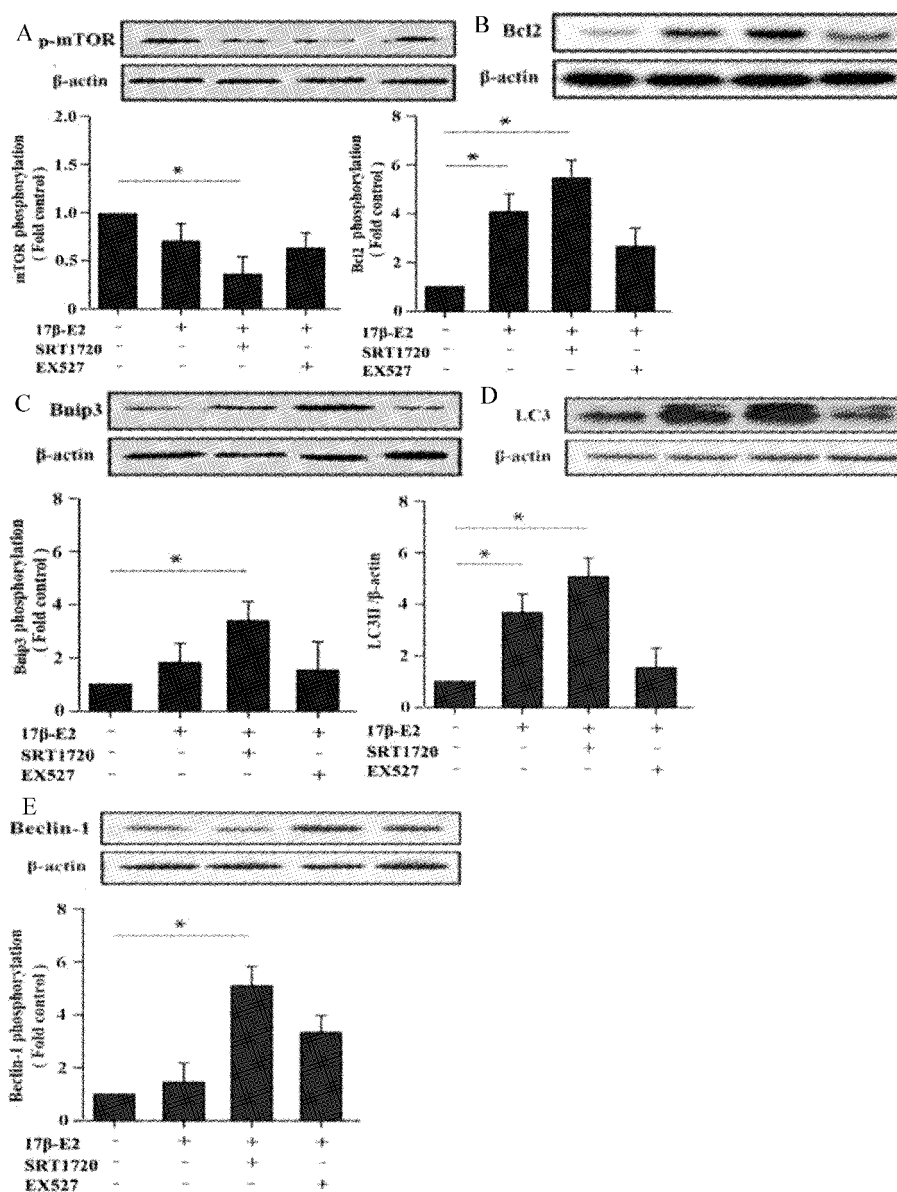


图9 17β-E2/SIRT1 对细胞内 mTOR、BCL-2、Bnip3、LC3、Beclin-1 蛋白活性的影响

A:mTOR; B:Bcl-2; C:Bnip3; D:LC3; E:Beclin-1。

注: * $P < 0.05$ 。

Fig.9 The effects of 17β-E2/SIRT1 on the activities of mTOR, Bcl-2, BNIP3, LC3 and beclin-1 protein in cells A:mTOR; B:Bcl-2; C:Bnip3; D:LC3; E:Beclin-1.

细胞的稳态调节^[12],而 FOXO3a 通过促进 FOXO3a 的表达诱导线粒体自噬^[13]。AMPK 通过激活 SIRT1 来调节 FOXO3a 转录活性^[14]。本研究通过蛋白印记技术检测 SIRT1720 明显上调了 17β-E2 中 FOXO3a 的活性,并明显上调自噬相关基因 Beclin-1, Bnip3 和 BCL-2 的蛋白含量及活性,促进了线粒体自噬,减少了细胞的凋亡,起到了保护作用。

综上所述, SIRT1 在 17β-E2 介导的成骨细胞自噬作用中起到关键作用, 17β-E2 可能通过 AMPK/

SIRT1/FOXO3a/mTOR 通路介导成骨细胞自噬。

【参 考 文 献】

- [1] Wei Q, Liang X, Peng Y, et al. 17β-estradiol ameliorates oxidative stress and blue light-emitting diode-induced retinal degeneration by decreasing apoptosis and enhancing autophagy [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 2715-2730.
- [2] Levin VA, Jiang X, Kagan R. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era [J]. Osteoporos Int, 2018, 29(5): 1049-1055.
- [3] Rada P, Pardo V, Mobasher MA, et al. SIRT1 controls acetaminophen hepatotoxicity by modulating inflammation and

- oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28 (13): 1187-1208.
- [4] Cook KL, Clarke R. Estrogen receptor - α signaling and localization regulates autophagy and unfolded protein response activation in ER+ breast cancer[J]. *Receptors Clin Investig*, 2014, 1(6):e316.
- [5] Ruan Y, Wu S, Zhang L, et al. Retarding the senescence of human vascular endothelial cells induced by hydrogen peroxide: effects of 17 β -estradiol (E2) mediated mitochondria protection [J]. *Biogerontology*, 2014, 15(4):367-375.
- [6] Khan M, Shah SA, Kim MO. 17 β -Estradiol via SIRT1/Acetyl-p53/NF-kB Signaling Pathway Rescued Postnatal Rat Brain Against Acute Ethanol Intoxication[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (4):3067-3078.
- [7] Zhu Z, Yang C, Iyaswamy A, et al. Balancing mTOR signaling and autophagy in the treatment of parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3):728.
- [8] Ge Y, Zhou S, Li Y, et al. Estrogen prevents articular cartilage destruction in a mouse model of AMPK deficiency via ERK-mTOR pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(14):336.
- [9] Li Z, Han X. Resveratrol alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage: possible involvement of the AMPK/SIRT1/autophagy signaling pathway[J]. *Biol Chem*, 2018, 399 (11):1339-1350.
- [10] Zhou S, Lu W, Chen L, et al. AMPK deficiency in chondrocytes accelerated the progression of instability-induced and ageing-associated osteoarthritis in adult mice[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7:43245.
- [11] Tian L, Cao W, Yue R, et al. Pretreatment with Tilianin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/ reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(4):352-360.
- [12] Xia XY, Yu YJ, Ye F, et al. MicroRNA - 506-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis in ovarian cancer cell via targeting SIRT1/AKT/FOXO3a signaling pathway [J]. *Neoplasma*, 2020:190517N441.
- [13] Lin WT, Nithiyanantham S, Hsieh DJ, et al. Bioactive peptides attenuate cardiac apoptosis in spontaneously hypertensive rat hearts through activation of autophagy and mitochondrial biogenesis pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2020; 10.1002/tox.2291.
- [14] Liu Z, Zhang M, Zhou T, et al. Exendin-4 promotes the vascular smooth muscle cell re-differentiation through AMPK/SIRT1/FOXO3a signaling pathways [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 276: 58-66.

(收稿日期: 2020-04-13; 修回日期: 2020-05-25)