

# 17- $\beta$ -雌二醇对心肌缺氧/复氧 NF- $\kappa$ B 及 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

霍洪亮, 安尚玉, 钟世刚, 曾庆华  
(东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

**摘要** 利用乳鼠原代培养心肌细胞建立缺氧/复氧模型, 采用流式细胞术、Western blot、RT-PCR 及 Elisa 等方法, 研究了 17- $\beta$ -雌二醇对缺氧/复氧诱导的 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响, 分析雌激素在心肌缺氧/复氧损伤中的抗炎作用. 结果表明, 心肌缺氧/复氧使 NF- $\kappa$ B p65 活化, 雌激素对 NF- $\kappa$ B 活化有明显的抑制作用. 雌激素对 NF- $\kappa$ B 途径和对非 NF- $\kappa$ B 途径 ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 和蛋白表达都有抑制作用. 以上结果说明雌激素在心肌缺氧/复氧过程中的抗炎作用是通过多途径实现的.

**关键词** 17- $\beta$ -雌二醇; 心肌细胞; 缺氧/复氧; 核转录因子- $\kappa$ B; 黏附分子

中图分类号 O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)04-0746-05

心肌缺氧/复氧能引起过氧化反应<sup>[1]</sup>, 诱导多种细胞因子产生和释放, 促进黏附因子(CAM)表达, 造成心肌炎性伤害. 实验证明细胞间黏附分子(ICAM-1)和内皮黏附分子(VCAM-1)是引起心肌细胞炎性反应的两种主要因子, 在其基因启动子上均有核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)结合序列. NF- $\kappa$ B 是一个氧敏感因子, 在由心肌缺氧/复氧引起的炎性损伤反应中起着关键作用. 天然雌激素在多种动物炎性模型中都表现出抗氧化<sup>[2]</sup>和抗炎作用<sup>[3~5]</sup>. 17- $\beta$ -雌二醇( $E_2$ )对巨嗜细胞的抗炎作用主要是通过 ER $\alpha$  特异性介导, 激活包括磷脂酰肌醇 3 激酶(PI<sub>3</sub>K)在内的非基因途径, 抑制 NF- $\kappa$ B 家族成员 p65 的核内运输, 阻止其与 DNA 特异序列结合, 影响 CAM 的基因表达, 发挥抗炎作用<sup>[6]</sup>. CAM 的基因表达除受 NF- $\kappa$ B 信号途径调控外, 还受到其它信号路径和第二信使的影响, 如: AP-1 因子、IL-1 $\beta$  刺激、PKC、cAMP 和 Ca<sup>2+</sup><sup>[7~10]</sup>等. 研究显示, 抑制 NF- $\kappa$ B 活化是抗炎的重要环节. 目前, 抑制 NF- $\kappa$ B 的抗炎机制有 3 种解释: 第一种是阿司匹林和磺胺吡啶类药物, 通过抑制 NF- $\kappa$ B 的抑制蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化和降解<sup>[11,12]</sup>, 白藜芦醇等抑制 I $\kappa$ B 激酶(IKK)活性<sup>[13]</sup>, 阻止 NF- $\kappa$ B 活化抗炎; 第二种是糖皮质激素受体(GR)和过氧化物酶受体(PPAR)激活物类, 通过阻断 NF- $\kappa$ B 的基因转录活动抗炎<sup>[14,15]</sup>; 第三种是能够促进 I $\kappa$ B $\alpha$  表达的诱导物抗炎<sup>[16]</sup>. 实验表明,  $E_2$  的抗炎机制与第二种相似, 是通过抑制 NF- $\kappa$ B 核运输, 阻断 CAM 表达信号转导过程. 但是, 雌激素对于心肌非 NF- $\kappa$ B 活化途径诱导的 CAM 表达炎性反应的抑制作用, 尚无明确结论. 研究  $E_2$  对 NF- $\kappa$ B 活化途径和非 NF- $\kappa$ B 活化途径 CAM 表达的影响, 有助于进一步全面了解雌激素在机体中的抗炎作用, 为进一步明确抗炎机制和抗炎治疗提供理论基础和实验依据.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

17- $\beta$ -雌二醇( $E_2$ )、二巯基甲酸吡啶(PDTC)和雌激素抑制剂(IC182780), Sigma 公司; 新生牛血清, 四季青公司; DMEM 高糖培养基, Gibco 公司; 一抗 NF- $\kappa$ B p65 和 Lambin B, Santa cruz 公司; ICAM-1 一抗、二抗羊抗兔 IgG、FITC 标记二抗和 ECL 发光试剂盒, 博士德公司; VCAM-1 一抗, 北京博奥森公司; PVDF 膜, Millipore 公司; 胰蛋白酶, DIFCO 公司; 破膜剂, Caltag 公司; RT-PCR 试剂盒,

收稿日期: 2009-02-26.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30870910)资助.

联系人简介: 曾庆华, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事分子细胞生理学研究. E-mail: zengqh707@nenu.edu.cn

Takara 公司.

二氧化碳培养箱, 三洋公司; 培养板 Costar 公司; 倒置相差显微镜, Olympus 公司; 酶标仪, Bio-RAD Model 680 及电泳凝胶成像系统, Bio-RAD 公司; TC-96/T 基因扩增仪, 杭州博日公司; 低温高速离心机, Sigma 公司; 电泳仪和电泳槽, 北京六一公司.

## 1.2 实验过程

1.2.1 心肌细胞分离培养 取出生 2 d 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(雌雄不限), 由吉林大学基础医学部实验动物中心提供. 用 75% 酒精消毒, 无菌取出心脏, 于 4 °C 预冷, 用 D-Hanks 缓冲液多次冲洗. 剪成 0.5 ~ 1 mm<sup>3</sup> 碎块, 加入 4 mL 0.25% 胰酶消化液, 于 37 °C 温浴 5 min, 轻轻反复吹打, 使松弛的细胞从组织块中脱落. 将细胞悬液吸入离心管中, 加入含有质量分数为 15% 的新生牛血清的 DMEM 培养基终止胰酶反应. 重复上述消化过程 8 ~ 10 次(弃去首次收集的细胞悬液). 收集消化后的细胞悬液用 100 目滤网过滤, 离心 6 min (1200 r/min), 弃去上清液, 加入含 15% 血清的 DMEM 培养液将细胞沉淀混悬, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 1 h; 差速贴壁收集心肌细胞上清悬液, 按  $2 \times 10^5$  Cell/mL 转种于无菌培养板上. 建立实验模型.

1.2.2 心肌细胞缺氧/复氧模型制备 将培养 72 h 的心肌细胞更换为无氧(5% CO<sub>2</sub>; 95% N<sub>2</sub> 饱和 30 min) 培养液, 放入缺氧装置内(5% CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>, 37 °C), 在 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 4 h, 达到缺氧时间后, 更换复氧液, 再进行有氧培养(5% CO<sub>2</sub>, 95% 空气, 37 °C) 4 h. 完成缺氧/复氧损伤. 实验共分 6 组, 即正常对照组(Control)、缺氧/复氧组(H/R)、缺氧/复氧 + E<sub>2</sub> 组(H/R + E<sub>2</sub>)、缺氧/复氧 + PDTC 组(H/R + PDTC)、缺氧/复氧 + E<sub>2</sub> + ICI 组(H/R + E<sub>2</sub> + ICI) 和缺氧/复氧 + E<sub>2</sub> + PDTC 组(H/R + E<sub>2</sub> + PDTC). 实验组 E<sub>2</sub> (5  $\mu$ mol/L)、ICI (5  $\mu$ mol/L) 和 PDTC (25  $\mu$ mol/L) 于缺氧/复氧前加入.

1.2.3 流式细胞仪检测 用 FCM 法检测 NF- $\kappa$ B p65 水平. 取生长心肌细胞, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 以含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 1200 r/min 离心 6 min, 弃上清液, 加 100  $\mu$ L A 液(固定剂), 孵育 15 min, 加 100  $\mu$ L B 液(破膜剂), 孵育 5 min; 加 NF- $\kappa$ B p65 一抗(兔抗大鼠) 100  $\mu$ L, 振荡重悬, 孵育 15 min. 加 FITC 标记的山羊抗兔荧光 IgG 抗体 50  $\mu$ L, 暗处室温孵育 15 min, 用 PBS 洗涤. 用 200  $\mu$ L PBS 重悬, 测试. 用 FITC-IgG 作阴性对照. 检测结果为胞浆内 NF- $\kappa$ B p65 表达的百分比(未激活).

1.2.4 Western blot 检测 收集心肌细胞, 加入细胞裂解液, 冰浴 15 min. 于 4 °C, 1500 r/min 离心 5 min. 弃上清液, 细胞裂解液重悬细胞, 吹打细胞悬液 10 次. 于 4 °C 离心 1 min (10000 r/min), 上清液即为胞质蛋白, 下层为核蛋白. 用细胞核蛋白抽提液重悬细胞, 吹打悬液 10 次, 轻轻振荡 30 min. 于 4 °C 离心 15 min (20000 r/min). 留取上清液(含核蛋白), 用 CBG 法进行蛋白定量. 用梯度 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白. 沉积胶约 40 min (80 mV), 分离胶约 90 min (130 mV). 根据蛋白分子量标准切割凝胶并将胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h. 一抗 NF- $\kappa$ B p65 (体积比 1:500) 于 4 °C 过夜, 二抗山羊抗兔 (体积比 1:2000) 于 37 °C 孵育 60 min. ECL 检测试剂盒曝光, 计算机扫描. 应用 Quantity One 对蛋白条带进行灰度分析.

1.2.5 RT-PCR 检测 提取心肌细胞总 RNA. GAPDH (磷酸甘油醛脱氢酶) 引物: 上游为 5'-ATTGCTCTCAATGACAACCTT-3', 下游为 5'-GAACTTTATTGATGGTATTCG-3', 退火温度为 50 °C. ICAM-1 引物: 上游为 5'-TATCGGGATGGTGAAGTCT-3', 下游为 5'-GGCGTAATAGGTGTAATG-3', 长度为 203 bp, 退火温度为 53 °C. VCAM-1 引物: 上游为 5'-CGGTCATGGTCAAGTGTTC-3', 下游为 5'-GAGATC-CAGGGGAGATGTCA-3', 长度为 570 bp, 退火温度为 58 °C. 进行逆转录反应, 30 个循环扩增. 将 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳, 用凝胶成像分析仪扫描, 应用 Band scan 5.0 软件测定电泳条带的光密度值(Optical density, OD), 目的基因 mRNA 的相对表达量以目的片段与相应 GAPDH 的 OD 比值表示.

1.2.6 Elisa 检测 心肌细胞于无血清 DMEM 培养基中培养 20 h, 用 1% 多聚甲醛固定 20 min, PBS/T 冲洗; 0.1% Triton 作用 15 min; 用含 2% BSA 的 PBS/T 封闭 30 min; 冲洗, 加入兔抗大鼠一抗于 37 °C 孵育 1 h, 用 PBS/T 冲洗; 羊抗兔二抗孵育 1 h, 冲洗; 用 100  $\mu$ L TMB 显色剂显色; 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应; 读取酶标仪 450 nm 处的吸光值.

1.2.7 统计学方法 以 Sigma Stat 3.5 软件进行统计学处理,应用 *t*-Test 或 one-way ANOVA 分析,结果以 Mean  $\pm$  SD 表示,  $p < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 E<sub>2</sub> 对心肌 NF- $\kappa$ B 的抑制作用

以对照组胞浆内 NF- $\kappa$ B 的水平为标准,采用流式细胞仪对各组心肌细胞胞浆内 NF- $\kappa$ B p65 的水平进行分析,结果表明,缺氧/复氧损伤导致胞浆内 NF- $\kappa$ B 的水平明显降低,差异显著. E<sub>2</sub> 干预组胞浆内 NF- $\kappa$ B 的水平与损伤组相比升高显著. 施加雌激素抑制剂处理,胞浆内 NF- $\kappa$ B 的水平明显降低,与对照组相比差异显著. Western blot 法检测各组细胞核中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平,结果显示,对照组 NF- $\kappa$ B 蛋白表达量降低,损伤组 NF- $\kappa$ B 蛋白明显增加. E<sub>2</sub> 干预组 NF- $\kappa$ B 蛋白减少,雌激素抑制剂组 NF- $\kappa$ B 与损伤组无明显差异(图 1),结果表明, E<sub>2</sub> 在心肌缺氧/复氧损伤过程中抑制 NF- $\kappa$ B 入核,这与流式细胞仪检测结果一致。

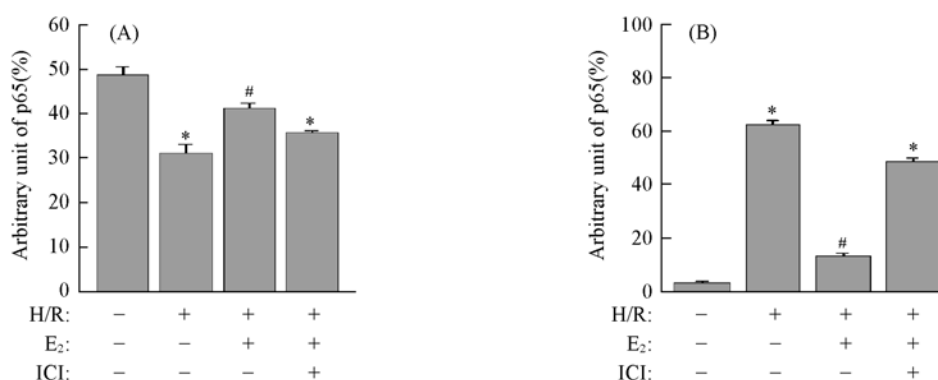


Fig.1 NF- $\kappa$ B nuclear translocation during hypoxia/reoxygenation in cardiac myocytes

(A) Flow Cytometry method(in cytoplasm); (B) Western blot method(in nuclear).

\*  $p < 0.05$  vs. control,  $n = 3$ ; #  $p < 0.05$  vs. H/R,  $n = 3$ .

### 2.2 E<sub>2</sub> 对心肌 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达的影响

NF- $\kappa$ B 有 ICAM-1 和 VCAM-1 基因启动子结合序列,活化入核能诱导黏附因子表达,引起心肌细胞炎性损伤. 从 RT-PCR 结果[图 2(A)]可知,缺氧/复氧导致心肌两种黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 水平显著升高. E<sub>2</sub> 干预组中, ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 水平显著降低. 施加雌激素受体阻断剂后, ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 水平再次升高. 但略低于缺氧/复氧组. 说明 E<sub>2</sub> 对心肌缺氧/复氧 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达有明显的抑制作用. 这种抑制作用是通过受体途径和非受体途径实现的. 采用 Elisa 法检测各组胞浆中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白的表达[图 2(B)和(C)],并与 ICAM-1 和

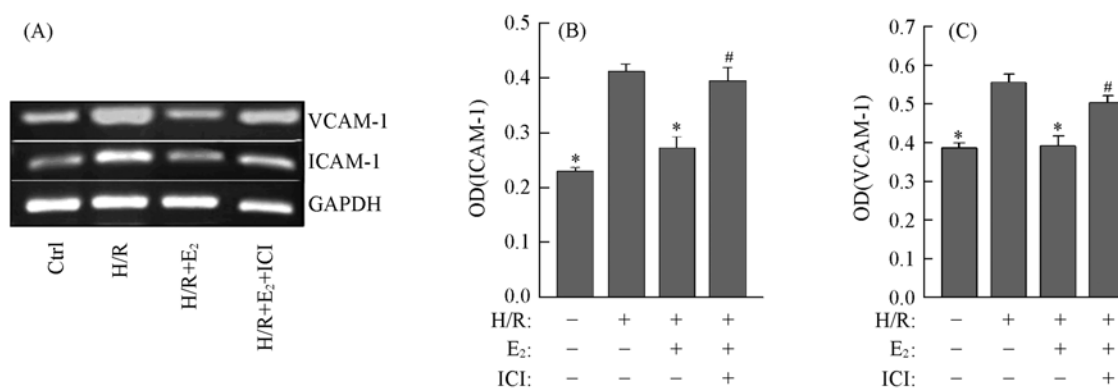


Fig.2 Effect of 17- $\beta$ -Estradiol on the expressions of mRNA(A) and proteins of ICAM-1(B) and VCAM-1(C) during hypoxia/reoxygenation in cardiac myocytes

\*  $p < 0.05$  vs. H/R,  $n = 3$ ; #  $p < 0.05$  vs. H/R + E<sub>2</sub>,  $n = 3$ .

VCAM-1 mRNA 水平比较, 实验结果具有一致性. 在心肌缺氧/复氧过程中,  $E_2$  可以通过抑制黏附因子的表达, 减少心肌炎性反应, 对心肌细胞起到保护作用.

### 2.3 $E_2$ 通过 NF- $\kappa$ B 影响 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达

NF- $\kappa$ B 发生核转移与 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达存在依赖关系. 由实验可知, 细胞缺氧/复氧损伤后, 胞核中 NF- $\kappa$ B 量显著增加 (图 1). ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达量也明显增加 (图 2),  $E_2$  干预后, 核中 NF- $\kappa$ B 与 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达量明显下降. 施加雌激素抑制剂后, NF- $\kappa$ B 与 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达又明显增加. 说明 NF- $\kappa$ B 活化与 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达有直接关系.  $E_2$  的抗炎作用是部分通过抑制 NF- $\kappa$ B 活化和入核, 调控黏附因子的表达实现的 (图 3).

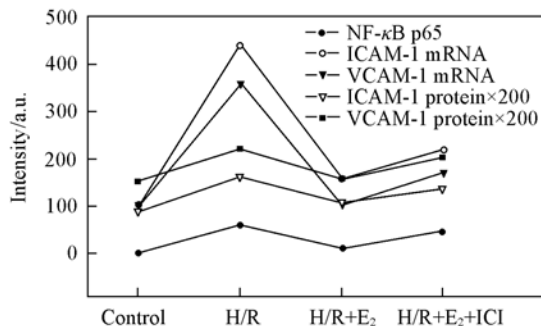


Fig. 3 Effect of 17- $\beta$ -Estradiol on CAM mRNA and CAM protein expression by NF- $\kappa$ B signal pathway after hypoxia-reoxygenation in cardiac myocytes

### 2.4 $E_2$ 对非 NF- $\kappa$ B 途径 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白的影响

在心肌缺氧/复氧损伤中,  $E_2$  能抑制 NF- $\kappa$ B 诱导的 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达, 并存在相关性. NF- $\kappa$ B 抑制剂 (PDTC) 处理组 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达程度较缺氧/复氧组都有明显减少 (图 4). 但是, 与对照组相比还有较高的表达水平. 说明诱导 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达的因素除 NF- $\kappa$ B 外, 还有其它诱导因子存在. 因此, 本实验结论与 Kacimi 等<sup>[17]</sup> 认为 CAM 的表达至少需要两种以上核转录因子诱导是一致的, NF- $\kappa$ B 只是诱导 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达核转录因子之一. 进一步施加  $E_2$  处理后, ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达水平在 PDTC 处理的基础上均有一定程度降低, 说明  $E_2$  对非 NF- $\kappa$ B 途径 (如 ER/PI3k/Akt<sup>[18]</sup> 和 ER/Src/Shc/ERK<sup>[19]</sup>) 诱导 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达仍有抑制作用.  $E_2$  对心肌缺氧/复氧损伤 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的抑制作用是通过多种信号途径实现的.

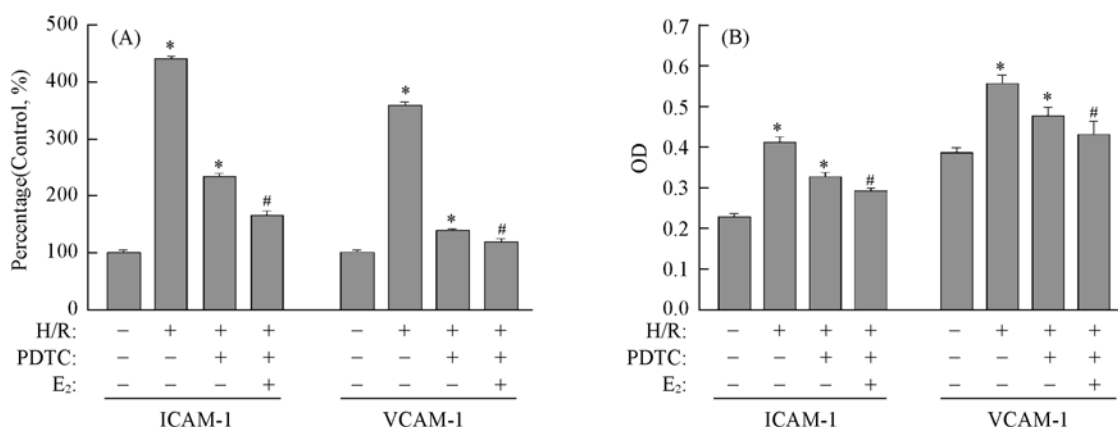


Fig. 4 Effect of 17- $\beta$ -Estradiol on CAM mRNA and CAM protein expression by NF- $\kappa$ B-dependent and NF- $\kappa$ B-independent signal pathway

(A) RT-PCR method; (B) Elisa method. \*  $p < 0.05$  vs. control,  $n = 3$ ; #  $p < 0.05$  vs. H/R + PDTC,  $n = 3$ .

## 参 考 文 献

- [1] LI Ying (李莹), WANG Yi (王毅), QU Hai-Bin (瞿海斌), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2008, 29(3): 515—518
- [2] CHEN Zhan-Guo (陈战国), ZHAO Hai-Xia (赵海霞), WEI Jun-Fa (魏俊发), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2009, 30(1): 82—89

- [ 3 ] Bebo B. F. , Jr Fyfe-Johnson A. , Adlard K. , *et al.* . J. Immunol. [J] , 2001 , **166**(3) : 2080—2089
- [ 4 ] Dubal D. B. , Zhu H. , Yu J. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J] , 2001 , **98**(4) : 1952—1957
- [ 5 ] Ito. A. , Bebo B. F. J. , Matejuk A. , *et al.* . J. Immunol. [J] , 2001 , **167**(1) : 529—542
- [ 6 ] Serena G. , Clara M. , Adriana M. , *et al.* . Molecular and Cellular Biology. [J] , 2005 , **25**(8) : 2957—2968
- [ 7 ] Dean N. M. , McKay R. , Condon T. P. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 1994 , **269**(23) : 16416—16424
- [ 8 ] Bouillon M. , Fortier M. A. , Boulianne R. , *et al.* . J. Cancer[J] , 1992 , **50**(2) : 281—288
- [ 9 ] Pober J. S. , Slowik M. R. , De Luca L. G. , *et al.* . J. Immunol. [J] , 1993 , **150**(11) : 5114—5123
- [ 10 ] Renkonen R. , Mennander A. , Ustinov J. , *et al.* . Int. Immunol. [J] , 1990 , **2**(8) : 719—724
- [ 11 ] Wahl. C. , Liptay S. , Adler G. , *et al.* . J. Clin. Investig. [J] , 1998 , **101**(5) : 1163—1174
- [ 12 ] Yamamoto Y. , Yin M. J. , Lin K. M. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J] , 1999 , **274**(38) : 27307—27314
- [ 13 ] Yin M. J. , Yamamoto Y. , Gaynor R. B. . Nature[J] , 1998 , **396** : 77—80
- [ 14 ] Nissen R. M. , Yamamoto K. R. . Genes Dev. [J] , 2000 , **14**(18) : 2314—2329
- [ 15 ] Ricote M. , Li A. C. , Willson T. M. , *et al.* . Nature[J] , 1998 , **391**(1) : 79—82
- [ 16 ] Auphan N. , DiDonato J. , Rosette C. , *et al.* . Science[J] , 1995 , **270**(5234) : 286—290
- [ 17 ] Kacimi R. , Joel K. S. , Koudssi F. . Circ. Res. [J] , 1998 , **82**(5) : 576—586
- [ 18 ] Patten R. D. , Pourati I. , Aronovitz M. J. , *et al.* . Circ. Res. [J] , 2004 , **95**(7) : 692—699
- [ 19 ] Kousteni S. , Bellido T. , Plotkin L. I. , *et al.* . Cell[J] , 2001 , **104**(5) : 719—730

## Effect of 17- $\beta$ -Estradiol on Hypoxia-reoxygenation-induced NF- $\kappa$ B Activity, ICAM-1 and VCAM-1 Expression in Cardiac Myocytes

HUO Hong-Liang, AN Shang-Yu, ZHONG Shi-Gang, ZENG Qing-Hua \*

(School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

**Abstract** Transcription factor(NF)- $\kappa$ B plays an important role during hypoxia-reoxygenation in cardiac myocytes. In previous studies, it has been proved that NF- $\kappa$ B can bind to the specific sequences located in the promoters of ICAM-1 and VCAM-1, mediate the expression of tow adhesion molecules, and cause the cell inflammatory response and apoptosis. In order to analyze the anti-inflammation function of 17- $\beta$ -estradiol during hypoxia-reoxygenation, we established the hypoxia-reoxygenation model in cardiac myocytes which were isolated from neonatal rat. And then, we detected the effect of 17- $\beta$ -estradiol on activation of NF- $\kappa$ B p65 and studied the estrogen on how to adjust the level of ICAM-1 and VCAM-1 by Flow Cytometry, Western Blot, RT-PCR and Elisa technology. The results show that the NF- $\kappa$ B pathway is activated during hypoxia-reoxygenation, and 17- $\beta$ -estradiol inhibits this activation significantly. 17- $\beta$ -Estradiol also inhibits the expression of ICAM-1 and VCAM-1 by both NF- $\kappa$ B-dependent and NF- $\kappa$ B-independent pathway. Taken together, all results suggested that anti-inflammatory effect of 17- $\beta$ -estradiol during myocardial hypoxia-reoxygenation is achieved through multichannels.

**Keywords** 17- $\beta$ -Estradiol; Cardiac myocytes; Hypoxia-reoxygenation; NF- $\kappa$ B; Adhesion molecule

(Ed. : H, J, Z)