

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.19.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220830.1819.021.html\(2022-08-31\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220830.1819.021.html(2022-08-31))

雌二醇降低细胞外组蛋白诱导内皮细胞损伤的作用及机制研究*

杨帆¹,舒林飞¹,袁志舟¹,李涛²,龙永其¹,谌磊^{1△}

(1.湖南省株洲市中心医院泌尿外一科 412007;2.海南医学院

第二附属医院器官移植科,海口 570216)

[摘要] **目的** 研究雌二醇(E2)降低细胞外组蛋白诱导内皮细胞损伤的作用及机制。**方法** 培养人脐静脉内皮细胞株(HUVECs)并进行分组干预,用 200 $\mu\text{g/mL}$ 小牛胸腺组蛋白(CTH)处理 1 h 诱导内皮细胞损伤,CTH 处理前给予 0.1 mmol/L E2、0.1% 二甲基亚砜(DMSO)或 50 $\mu\text{mol/L}$ P79350 预处理 1 h。采用四唑氮化合物(MTS)法检测细胞活力[490 nm 处吸光度(A_{490})值],ELISA 检测培养基中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平,TUNEL 法检测细胞凋亡率,Western blot 检测细胞中活化型 caspase-3(cleaved caspase-3)、磷酸化 p38(p-p38)、磷酸化核因子- κB (p-NF- κB)表达水平。**结果** CTH 组 A_{490} 值、培养基中 SOD 水平均明显低于对照组,培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平、细胞凋亡率、细胞中 cleaved caspase-3、p-p38、p-NF- κB 表达水平均明显高于对照组($P<0.05$);DMSO+E2 组 A_{490} 值、培养基中 SOD 水平均明显高于 DMSO+CTH 组,培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平、细胞凋亡率、细胞中 cleaved caspase-3、p-p38、p-NF- κB 表达水平均明显低于 DMSO+CTH 组($P<0.05$);P79350+E2 组 A_{490} 值、培养基中 SOD 水平均明显低于 DMSO+E2 组,培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平、细胞凋亡率、细胞中 cleaved caspase-3、p-p38、p-NF- κB 表达水平均明显高于 DMSO+E2 组($P<0.05$)。**结论** E2 可能通过抑制 p38/NF- κB 通路介导的炎症反应、氧化应激及细胞凋亡,降低 CTH 诱导的内皮细胞损伤。

[关键词] 雌二醇;细胞外组蛋白;内皮细胞损伤;p38/NF- κB 通路;炎症反应;氧化应激;细胞凋亡

[中图分类号] R459.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)19-3261-07

Effect and mechanism of estradiol on decreasing extracellular histone-induced endothelial cell injury*

YANG Fan¹,SHU Linfei¹,YUAN Zhizhou¹,LI Tao²,LONG Yongqi¹,CHEN Lei^{1△}

(1. The First Department of Urology, Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou, Hunan 412007, China;

2. Department of Organ Transplant, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570216, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect and mechanism of estradiol (E2) on decreasing extracellular histone induced endothelial cell injury. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured to conduct the grouping and intervention. The endothelial cell injury was induced by the treatment of 200 $\mu\text{g/mL}$ calf thymus histone (CTH) for 1 h. Before CTH treatment, 0.1 mmol/L E2, 0.1% DMSO or 50 $\mu\text{mol/L}$ P79350 was pretreated for 1 h. Then the cell viability [absorbance value at 490 nm (A_{490})] was detected by MTS assay, the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in culture medium were detected by ELISA, the apoptosis rate was detected by TUNEL assay, and the expression levels of cleaved caspase-3, phosphorylated p38 (p-p38) and phosphorylated NF- κB (p-NF- κB) in cells were detected by Western blot. **Results** The A_{490} value and SOD level in culture medium in the CTH group were significantly lower than those in the control group, the expression levels IL-1 β , IL-6, TNF- α and MDA in culture medium, the apoptosis rate, the expression levels of cleaved caspase-3, p-p38 and p-NF- κB in cells were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The A_{490} value and SOD level in culture medium in the DMSO+E2 group were higher than those in the DMSO+CTH group, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA in culture medium, the cellular apoptosis rate, the

expression levels of cleaved caspase-3, p-p38 and p-NF- κ B in cells were significantly than those in the DMSO+CTH group ($P<0.05$). The A_{490} value and SOD level in culture medium in P79350+E2 group were lower than those in the DMSO+E2 group, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , MDA in culture medium, the cellular apoptosis rate, the expression levels of cleaved caspase-3, p-p38 and p-NF- κ B in cells were significantly higher than those in the DMSO+E2 group ($P<0.05$). **Conclusion** E2 may reduce the endothelial cellular injury induced by inhibiting p38/NF- κ B pathway mediated inflammatory response, oxidative stress and cellular apoptosis.

[Key words] estradiol; extracellular histone; endothelial cell injury; p38/NF- κ B pathway; inflammatory reaction; oxidative stress; apoptosis

脓毒症是临床常见的危重症,其救治难度大、病死率高。脓毒症的主要病理生理特征是全身炎症反应激活,涉及炎症细胞因子的大量释放、氧化应激及细胞凋亡的异常激活等生物学环节,严重者可进展为多器官功能障碍综合征^[1-2]。血管内皮细胞损伤在脓毒症病情发展、多脏器功能损伤中起到重要作用,造成内皮损伤的因素复杂,其中从细胞核小体释放进入细胞外的组蛋白具有细胞毒性。多项临床研究^[3-4]和基础研究^[5]证实,脓毒症患者及动物模型的血清细胞外组蛋白水平升高且与预后相关。采用大剂量组蛋白短时间冲击处理的方式通过激活核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)及 p38 通路可建立内皮细胞损伤模型^[6]。

雌激素是目前已知具有心脑血管保护作用的激素,有临床研究显示血清雌二醇(estradiol, E2)水平不足是脓毒症患者预后不良的危险因素之一^[7],另有动物实验证实补充 E2 可减轻脓毒症动物的脏器损伤^[8]。但 E2 在脓毒症发病过程中的内皮保护作用及机制尚不十分清楚。有研究报道, E2 在神经元损伤及心肌梗大模型中的细胞保护作用与抑制 p38 通路及 NF- κ B 通路有关^[9-10]。基于此,本研究在大剂量组蛋白短时间冲击诱导的内皮细胞损伤模型中探索了 E2 的保护作用,以及 NF- κ B、p38 通路相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 试剂

小牛胸腺组蛋白(calf thymus histone, CTH)、四唑氮化合物(MTS)细胞增殖试剂盒购自武汉艾美捷科技公司, E2、p38 激动剂 P79350(储存液浓度 0.5 mol/L)购自美国 Sigma 公司,白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的 ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,裂解液及 TUNEL 凋亡检测试剂盒购自上海碧云天公

司,活化型 caspase-3(cleaved caspase-3)、p38、磷酸化 p38(p-p38)、NF- κ B、磷酸化 NF- κ B(p-NF- κ B)特异性一抗购自美国 CST 公司。

1.1.3 仪器

细胞培养箱购自美国 Thermo 公司,多功能酶标仪购自美国 Bio-tek 公司,荧光显微镜购自日本 Nikon 公司,凝胶成像仪购自美国 Bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 HUVECs 培养及分组

HUVECs 在含有 10% 胎牛血清的完全培养基中贴壁培养,密度生长至 90% 时用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。传代的 HUVECs 接种在不同规格的培养板,分为对照组、CTH 组、E2 组、二甲基亚砜(DMSO)组、DMSO+CTH 组、DMSO+E2 组、P79350+E2 组,处理方法如下:对照组用不含药物的培养基处理 60 min; CTH 组用含有 200 μ g/mL CTH 的培养基处理 60 min; E2 组先给予含有 0.1 mmol/L E2 的培养基预处理 60 min,而后用含有 200 μ g/mL CTH 的培养基处理 60 min; DMSO 组用含有 0.1% DMSO 的培养基连续处理 2 h; DMSO+CTH 组用含有 0.1% DMSO 的培养基预处理 60 min,而后用含有 200 μ g/mL CTH 的培养基处理 60 min; DMSO+E2 组用含有 0.1% DMSO 和 0.1 mmol/L E2 的培养基预处理 60 min,而后用含有 200 μ g/mL CTH 的培养基处理 60 min; P79350+E2 组用含有 50 μ mol/L P79350 和 0.1 mmol/L E2 的培养基预处理 60 min,而后用含有 200 μ g/mL CTH 的培养基处理 60 min。所有分组均重复 5 次。

1.2.2 细胞活力的检测

HUVECs 接种在 96 孔培养板中, CTH 处理后 15、30、45、60 min 时,采用 MTS 法进行细胞活力检测,在每个培养孔内加入 20 μ L 检测液并继续培养 4 h,而后在酶标仪上检测 490 nm 波长的吸光度(A_{490})值。

1.2.3 培养基中炎症反应和氧化应激反应指标的检测

HUVECs 接种在 12 孔培养板中, CTH 处理后 60 min 分别收集培养基和细胞,采用南京建成生物工程研究所的 ELISA 试剂盒检测培养基中 IL-1 β 、IL-6、

TNF- α 、MDA、SOD 水平,采用 BCA 法检测细胞中的蛋白水平,计算每毫克细胞蛋白中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、SOD 水平。

1.2.4 细胞凋亡率的检测

HUVECs 接种在 24 孔培养板中,CTH 处理后 60 min 收集细胞并用 4%多聚甲醛固定,采用 TUNEL 法检测细胞凋亡,按照试剂盒说明书进行 TUNEL 染色和 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色,在显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞及 DAPI 阳性细胞并计数,计算细胞凋亡率=TUNEL 阳性细胞数/DAPI 阳性细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 细胞中蛋白表达水平的检测

HUVECs 接种在 12 孔培养板中,CTH 处理后 60 min 收集细胞并加入上海碧云天公司的裂解液提取细胞蛋白,与上样缓冲液混合、煮沸变性后进行 Western blot 检测,将样品加入聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳、电转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 cleaved caspase-3、p38、p-p38、NF- κ B、p-NF- κ B 及 β -actin 特异性一抗过夜,次日孵育辣根过氧化物酶二抗 1 h 并在凝胶成像仪中采用电化学发光(ECL)法显影得到蛋白条带,按照蛋白条带的灰度值计算 cleaved caspase-3/ β -actin、p-p38/p38、p-NF- κ B/NF- κ B 水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计软件录入数据并进行统计分

析,实验数据均为计量资料且经正态性检验符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 E2 对 CTH 诱导 HUVECs 活力降低的影响

CTH 处理后 15、30、45、60 min,CTH 组的 A_{490} 值均明显低于对照组($P<0.05$),E2 组的 A_{490} 值均明显高于 CTH 组($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组 HUVECs 活力 A_{490} 值比较($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	15 min	30 min	45 min	60 min
对照组	0.71 $\pm$ 0.09	0.85 $\pm$ 0.12	0.97 $\pm$ 0.11	1.19 $\pm$ 0.18
CTH 组	0.44 $\pm$ 0.06 ^a	0.59 $\pm$ 0.05 ^a	0.71 $\pm$ 0.07 ^a	0.82 $\pm$ 0.10 ^a
E2 组	0.65 $\pm$ 0.05 ^b	0.71 $\pm$ 0.07 ^b	0.86 $\pm$ 0.10 ^b	1.04 $\pm$ 0.14 ^b
F	21.232	18.849	11.382	9.384
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 CTH 组比较。

2.2 E2 对 CTH 诱导 HUVECs 中炎症反应和氧化应激反应激活的影响

CTH 处理后 60 min,CTH 组细胞培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平均明显高于对照组,SOD 水平明显低于对照组($P<0.05$);E2 组细胞培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平均明显低于 CTH 组,SOD 水平明显高于 CTH 组($P<0.05$),见表 2。

表 2 3 组 HUVECs 培养基中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 及 SOD 水平比较($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	IL-1 β (ng/mg)	IL-6(pg/mg)	TNF- α (ng/mg)	MDA(nmol/mg)	SOD(mU/mg)
对照组	0.93 $\pm$ 0.11	93.11 $\pm$ 13.24	1.42 $\pm$ 0.22	0.65 $\pm$ 0.09	16.68 $\pm$ 3.25
CTH 组	2.51 $\pm$ 0.34 ^a	303.48 $\pm$ 41.59 ^a	4.58 $\pm$ 0.71 ^a	1.88 $\pm$ 0.24 ^a	8.37 $\pm$ 1.09 ^a
E2 组	1.46 $\pm$ 0.16 ^b	168.52 $\pm$ 22.59 ^b	2.55 $\pm$ 0.31 ^b	0.94 $\pm$ 0.13 ^b	13.01 $\pm$ 2.26 ^b
F	54.823	71.382	63.852	45.823	2.784
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 CTH 组比较。

2.3 E2 对 CTH 诱导 HUVECs 中细胞凋亡激活的影响

CTH 处理后 60 min,CTH 组的细胞凋亡率及细胞中 cleaved caspase-3 表达水平均明显高于对照组($P<0.05$);E2 组的细胞凋亡率及细胞中 cleaved caspase-3 表达水平均明显低于 CTH 组($P<0.05$),见图 1。

2.4 E2 对 CTH 诱导 HUVECs 中 p38/NF- κ B 通路激活的影响

CTH 处理后 60 min,CTH 组细胞中 p-p38、p-NF- κ B 表达水平均明显高于对照组($P<0.05$);E2 组细胞中 p-p38、p-NF- κ B 表达水平均明显低于 CTH 组($P<0.05$),见图 2。

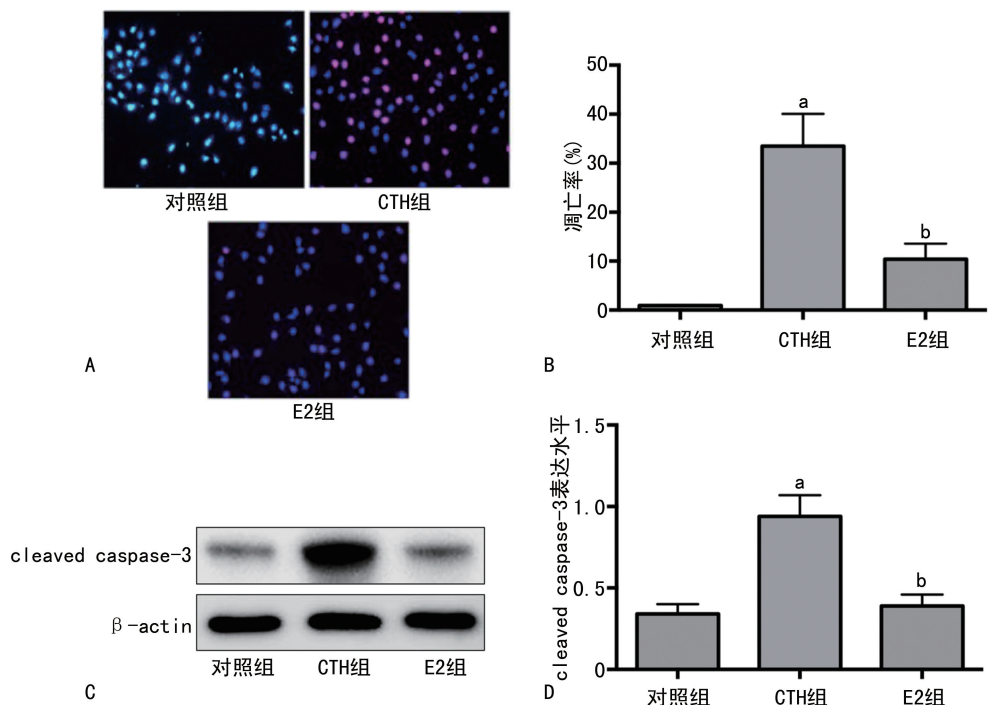
2.5 p38 激动剂对 E2 改善 CTH 诱导 HUVECs 中

p38/NF- κ B 通路激活的影响

CTH 处理后 60 min,DMSO+CTH 组细胞中 p-p38、p-NF- κ B 表达水平均高于 DMSO 组($P<0.05$);DMSO+E2 组细胞中 p-p38、p-NF- κ B 表达水平均明显低于 DMSO+CTH 组($P<0.05$);P79350+E2 组细胞中 p-p38、p-NF- κ B 表达水平均明显高于 DMSO+E2 组($P<0.05$),见图 3。

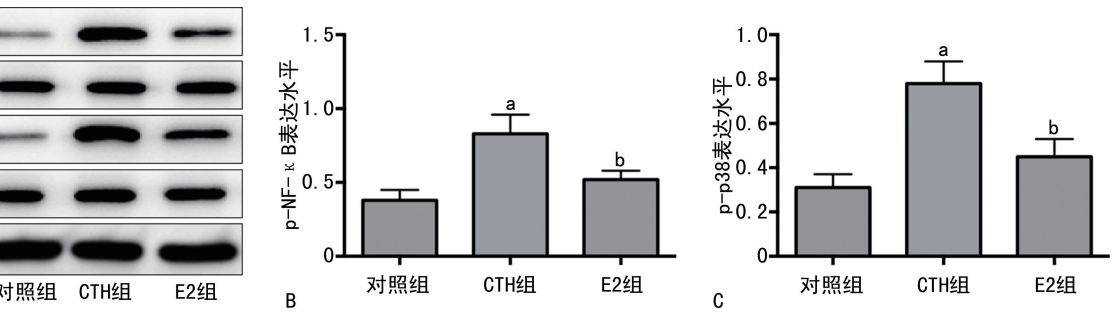
2.6 p38 激动剂对 E2 改善 CTH 诱导 HUVECs 活力降低的影响

CTH 处理后 15、30、45、60 min,DMSO+CTH 组的 A_{490} 值均明显低于 DMSO 组($P<0.05$),DMSO+E2 组的 A_{490} 值均明显高于 DMSO+CTH 组($P<0.05$),P79350+E2 组的 A_{490} 值均明显低于 DMSO+E2 组($P<0.05$),见表 3。



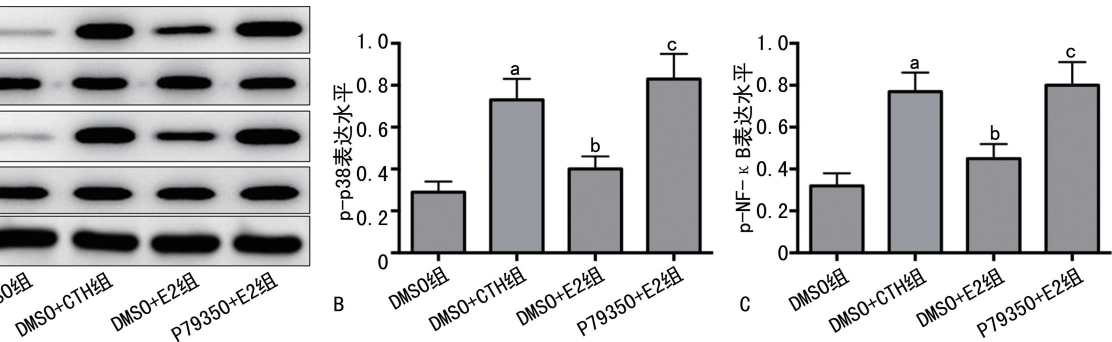
A:细胞凋亡的 TUNEL 染色;B:细胞凋亡率柱状图;C:cleaved caspase-3 蛋白条带;D:cleaved caspase-3 表达水平柱状图。^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 CTH 组比较。

图1 3 组 HUVECs 凋亡的比较



A:p38/NF-κB 通路相关蛋白的蛋白条带;B:p-NF-κB 表达水平柱状图;C:p-p38 表达水平柱状图;^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 CTH 组比较。

图2 3 组 HUVECs 中 p38/NF-κB 通路相关蛋白的比较



A:p38/NF-κB 通路相关蛋白的蛋白条带;B:p-p38 表达水平柱状图;C:p-NF-κB 表达水平柱状图;^a: $P<0.05$,与 DMSO 组比较;^b: $P<0.05$,与 DMSO+CTH 组比较;^c: $P<0.05$,与 DMSO+E2 组比较。

图3 4 组 HUVECs 中 p38/NF-κB 通路相关蛋白的比较

2.7 p38 激动剂对 E2 改善 CTH 诱导 HUVECs 中炎症反应和氧化应激反应激活的影响

CTH 处理后 60 min,DMSO+CTH 组细胞培养基中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA 水平均明显高于 DMSO 组,SOD 水平明显低于 DMSO 组($P<0.05$);

DMSO+E2 组细胞培养基中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA 水平均明显低于 DMSO+CTH 组,SOD 水平明显高于 DMSO+CTH 组($P<0.05$);P79350+E2 组细胞培养基中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA 水平均明显高于 DMSO+E2 组,SOD 水平明显低于 DMSO+

E2 组($P<0.05$),见表4。

2.8 p38 激动剂对 E2 改善 CTH 诱导 HUVECs 中细胞凋亡激活的影响

CTH 处理后 60 min,DMSO+CTH 组的细胞凋亡率及细胞中 cleaved caspase-3 表达水平均明显高于

DMSO 组($P<0.05$);DMSO+E2 组的细胞凋亡率及细胞中 cleaved caspase-3 表达水平均明显低于 DMSO+CTH 组($P<0.05$);P79350+E2 组的细胞凋亡率及细胞中 cleaved caspase-3 表达水平均明显高于 DMSO+E2 组($P<0.05$),见图4。

表 3 4 组 HUVECs 活力 A₄₉₀ 值比较($n=5,\bar{x}\pm s$)

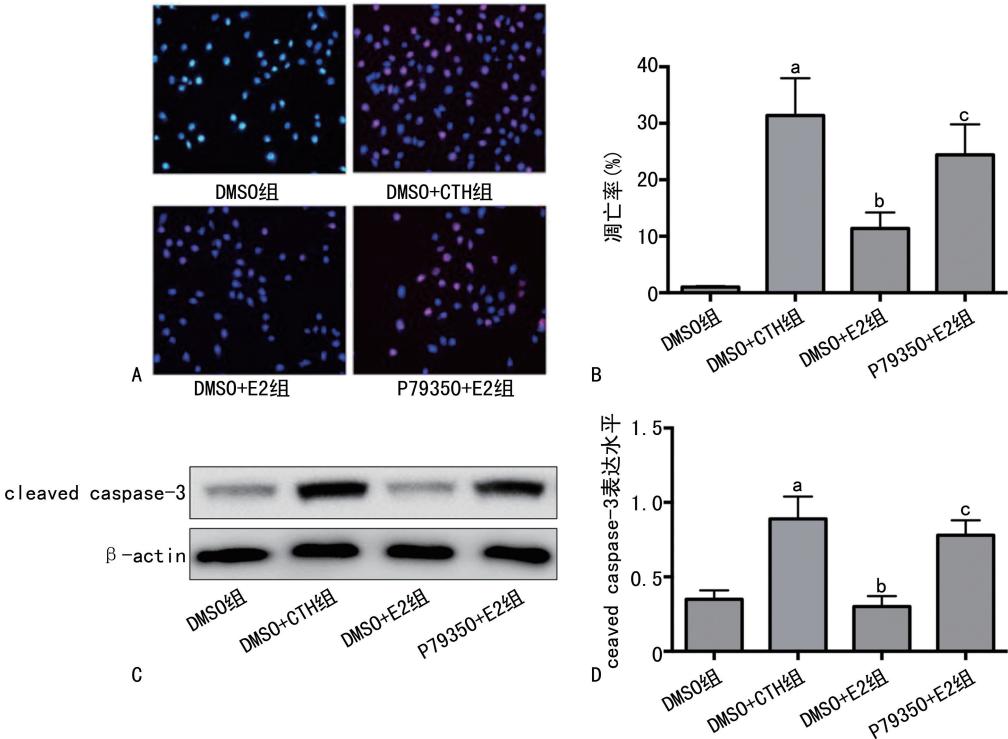
组别	15 min	30 min	45 min	60 min
DMSO 组	0.69±0.08	0.82±0.12	0.93±0.10	1.13±0.13
DMSO+CTH 组	0.42±0.05 ^a	0.56±0.05 ^a	0.70±0.06 ^a	0.79±0.08 ^a
DMSO+E2 组	0.58±0.04 ^b	0.68±0.07 ^b	0.83±0.06 ^b	0.99±0.12 ^b
P79350+E2 组	0.40±0.04 ^c	0.59±0.06 ^c	0.72±0.05 ^c	0.82±0.06 ^c
<i>F</i>	31.851	29.823	16.844	21.855
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与 DMSO 组比较;^b: $P<0.05$,与 DMSO+CTH 组比较;^c: $P<0.05$,与 DMSO+E2 组比较。

表 4 4 组 HUVECs 培养基中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA 及 SOD 水平比较($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	IL-1β(ng/mg)	IL-6(pg/mg)	TNF-α(ng/mg)	MDA(nmol/mg)	SOD(mU/mg)
DMSO 组	1.02±0.13	96.71±11.95	1.35±0.24	0.62±0.10	17.14±3.41
DMSO+CTH 组	2.77±0.31 ^a	319.24±46.24 ^a	4.71±0.69 ^a	1.95±0.21 ^a	8.62±1.02 ^a
DMSO+E2 组	1.59±0.14 ^b	149.54±21.73 ^b	2.71±0.35 ^b	1.03±0.12 ^b	12.83±2.15 ^b
P79350+E2 组	2.51±0.28 ^c	284.59±33.57 ^c	4.45±0.52 ^c	1.83±0.14 ^c	9.94±1.21 ^c
<i>F</i>	64.852	81.832	77.384	72.832	29.585
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与 DMSO 组比较;^b: $P<0.05$,与 DMSO+CTH 组比较;^c: $P<0.05$,与 DMSO+E2 组比较。



A:细胞凋亡的 TUNEL 染色;B:细胞凋亡率柱状图;C:ceaved caspase-3 的蛋白条带;D:cleaved caspase-3 表达水平柱状图;^a: $P<0.05$,与 DMSO 组比较;^b: $P<0.05$,与 DMSO+CTH 组比较;^c: $P<0.05$,与 DMSO+E2 组比较。

图 4 4 组 HUVECs 凋亡的比较

3 讨 论

组蛋白是一种在细胞核内与 DNA 互相结合形成核小体的核蛋白,在不同病理因素刺激下组蛋白异常释放进入细胞外并产生细胞毒性。近些年,多项脓毒症相关的研究证实细胞外组蛋白的产生与疾病病情及预后相关^[3-4],但相关的分子机制及防治手段尚不清楚。在脓毒症发生、发展的过程中,血管内皮细胞损伤与病情加重及全身多个脏器功能损伤有关,细胞外组蛋白的细胞毒性作用可能是脓毒症病程中引起内皮损伤的关键因素^[11]。有多项细胞研究通过大剂量组蛋白短时间冲击处理,即 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTH 处理 1 h 的方式诱导血管内皮细胞发生损伤^[6,12]。

本研究采用 0.1 mmol/L E2 预处理 HUVECs, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CTH 处理 15、30、45、60 min 后细胞的 A_{490} 值明显降低,与既往研究中 CTH 诱导内皮细胞损伤的实验结果吻合^[6,12]。脓毒症发病过程中炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡的过度激活是与多器官功能障碍、内皮细胞损伤直接相关的因素^[13-14]。本研究在 CTH 诱导 HUVECs 损伤模型中检测到培养基中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及氧化应激产物 MDA 水平均升高,抗氧化酶 SOD 水平降低,同时细胞凋亡率及细胞中凋亡基因 cleaved caspase-3 表达水平升高,与脓毒症发病过程中炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡激活的特点吻合^[13-14]。以此为基础,本研究将继续在 CTH 诱导 HUVECs 损伤模型中以炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡为切入点研究相关的分子机制及防治手段。

E2 是具有心血管保护作用的性激素,在多种病理因素引起内皮细胞损伤的模型中发挥保护作用,对内皮细胞在病理状态下的炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡均具有抑制作用^[15-16]。本研究在 CTH 诱导 HUVECs 损伤前进行 E2 预处理,E2 预处理后给予 CTH 15、30、45、60 min 时细胞的 A_{490} 值均明显增加,表明 E2 对 CTH 诱导 HUVECs 损伤具有改善作用。进一步分析炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡可知:E2 预处理后 CTH 诱导 HUVECs 损伤模型中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 的生成,凋亡率及 cleaved caspase-3 表达水平均降低,SOD 水平升高,表明 E2 在改善 CTH 诱导 HUVECs 损伤时发挥了抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用,与既往研究中有关 E2 生物学特性的报道一致^[15-16],也与本研究已经观察到 E2 减轻 CTH 诱导 HUVECs 损伤的作用吻合。

根据国内曹清等^[6]研究中细胞实验结果,CTH 诱导 HUVECs 损伤与激活 NF- κB 和 p38 通路有关。p38 属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族,发生磷

酸化后生成有活性的 p-p38,后者能够引起下游 NF- κB 发生磷酸化并参与炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡的调控^[17]。已有多项研究证实,E2 的心脑血管保护作用与抑制 p38 及 NF- κB 的磷酸化有关^[9-10,18],本研究在 CTH 诱导 HUVECs 损伤的模型中检测到 p-p38 及 p-NF- κB 的表达水平增加,符合 NF- κB 和 p38 激活的特点;E2 预处理后,p-p38 及 p-NF- κB 的表达水平降低,表明 E2 在 CTH 诱导 HUVECs 损伤模型中抑制 NF- κB 和 p38 的激活。进一步通过使用 p38 激动剂 P79350 与 E2 联合预处理的方式验证 p38/NF- κB 通路在 E2 减轻 CTH 诱导 HUVECs 损伤中的作用,加用 p38 激动剂后,E2 预处理减轻细胞损伤、炎症反应、氧化应激反应及细胞凋亡的作用被削弱,表明 E2 改善 CTH 诱导 HUVECs 损伤的作用部分与抑制 p38/NF- κB 通路有关。

综上所述,本研究通过一系列细胞实验证实 E2 具有改善 CTH 诱导内皮细胞损伤的作用,这一改善作用与抑制 p38/NF- κB 通路介导的炎症反应、氧化应激及细胞凋亡有关。以上结果为今后深入认识细胞外组蛋白诱导内皮细胞损伤的分子机制及防治手段提供了依据,E2 可能作为细胞外组蛋白诱导内皮细胞损伤的防治药物,p38/NF- κB 通路则有望成为研究细胞外组蛋白诱导内皮细胞损伤分子机制的靶点。

参考文献

- [1] CANORA J, MORENO G, MARCO J, et al. Admittances characteristics by sepsis in the Spanish internal medicine services between 2005 and 2015: mortality pattern[J]. Postgrad Med, 2020, 132(3): 296-300.
- [2] CARABALLO C, JAIMES F. Organ dysfunction in sepsis: an ominous trajectory from infection to death[J]. Yale J Biol Med, 2019, 92(4): 629-640.
- [3] TIAN Y, RUSSO R M, LI Y, et al. Serum citrullinated histone H3 concentrations differentiate patients with septic versus non-septic shock and correlate with disease severity[J]. Infection, 2021, 49(1): 83-93.
- [4] ITO T, TOTOKI T, YOKOYAMA Y, et al. Serum histone H3 levels and platelet counts are potential markers for coagulopathy with high risk of death in septic patients: a single-center observational study[J]. J Intensive Care, 2019,

- 26(7):63.
- [5] DOULIAS T, QUICKERT S, WEIS S, et al. Low-dose hydrocortisone prolongs survival in a lethal sepsis model in adrenalectomized rats [J]. *J Surg Res*, 2018, 227:72-80.
- [6] 曹清, 莫茜, 陶悦, 等. 脓毒症胞外组蛋白对血管内皮细胞毒性作用机制的研究[J]. *中国小儿急救医学*, 2016, 23(8):516-521.
- [7] TSANG G, INSEL M B, WEIS J M, et al. Bio-available estradiol concentrations are elevated and predict mortality in septic patients: a prospective cohort study [J]. *Crit Care*, 2016, 20(1):335.
- [8] EL-LAKANY M A, FOUDA M A, EL-GOWELLI H M, et al. Ovariectomy provokes inflammatory and cardiovascular effects of endotoxemia in rats: dissimilar benefits of hormonal supplements [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 393:114928.
- [9] 刁爱芹, 潘爱萍, 王卉, 等. 17 β -雌二醇对机械牵拉诱导心肌细胞 integrin β 1/FAK/p38MAPK 信号转导的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(10):1357-1360, 1408.
- [10] 杜天平, 孟祖东. 17 β 雌二醇对异丙酚诱导发育期大鼠海马神经细胞凋亡时 p38MAPK 信号传导通路的作用机制[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(2):128-133.
- [11] ITO T, KAKUUCHI M, MARUYAMA I. Endotheliopathy in septic conditions: mechanistic insight into intravascular coagulation [J]. *Crit Care*, 2021, 25(1):95.
- [12] IBÁÑEZ-CABELLOS J S, AGUADO C, PÉREZ-CREMADES D, et al. Extracellular histones activate autophagy and apoptosis via mTOR signaling in human endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(10):3234-3246.
- [13] ALMALKI W H. The sepsis induced defective aggravation of immune cells: a translational science underling chemico-biological interactions from altered bioenergetics and/or cellular metabolism to organ dysfunction [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(6):2337-2344.
- [14] PRAUCHNER C A. Oxidative stress in sepsis: pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy [J]. *Burns*, 2017, 43(3):471-485.
- [15] SONG S, WU S, WANG Y, et al. 17 β -estradiol inhibits human umbilical vascular endothelial cell senescence by regulating autophagy via p53 [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 114:57-66.
- [16] XIANG X, HUANG J, SONG S, et al. 17 β -estradiol inhibits H₂O₂-induced senescence in HUVEC cells through upregulating SIRT3 expression and promoting autophagy [J]. *Biogerontology*, 2020, 21(5):549-557.
- [17] 谭晶, 王林林, 崔晓光, 等. p38 siRNA 抑制 NF- κ B 激活经典通路减轻大鼠肺微血管内皮细胞缺氧复氧损伤 [J]. *中华器官移植杂志*, 2018, 39(2):104-108.
- [18] JIANG X, CHEN Z, YU X, et al. Lipopolysaccharide-induced depression is associated with estrogen receptor- α /SIRT1/NF- κ B signaling pathway in old female mice [J]. *Neurochem Int*, 2021, 148:105097.

(收稿日期:2021-12-22 修回日期:2022-06-15)