

## 雌激素抑制内质网应激引起的血管内皮细胞凋亡及机制

王宇<sup>1,2</sup>, 杨欣<sup>1</sup>, 李晓冬<sup>2</sup>, 何小静<sup>2</sup>, 王彦洁<sup>3</sup>

(1.北京大学人民医院妇产科,北京市 100044;2.河北医科大学第二医院妇产科,河北省石家庄市 050000;

3.北京大学第三医院妇产科,北京市 100000)

[关键词] 内质网应激; 细胞凋亡; 雌激素信号通路; 动脉粥样硬化; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] **目的** 通过建立人脐静脉内皮细胞(HUVEC)内质网应激(ERS)的细胞模型,研究雌激素抑制内质网应激引起的凋亡的信号传导机制,以探讨雌激素对心血管的保护机制。**方法** 分别用 10  $\mu\text{mol/L}$  的衣霉素(TM)或 2 mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT)诱导 HUVEC,建立内质网应激细胞模型,提前给予  $10^{-8}$  mol/L 的 17- $\beta$  雌二醇( $E_2$ )预处理 1 h,用 Western blot 检测葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)判断模型是否建立成功,并探索  $E_2$  对内质网应激的作用。检测内质网应激的三条主要信号通路蛋白的变化,上调最显著的为内质网应激最主要的信号通路。Western blot 检测内质网应激凋亡蛋白 C/EBP-同源蛋白(CHOP),Hochest 染色检测细胞凋亡率,探索  $E_2$  对内质网应激凋亡的作用。添加  $E_2$  受体拮抗剂 ICI182780( $ER\alpha$ 、 $ER\beta$  拮抗剂及 GPER 激动剂)和 G15(GPER 拮抗剂)后检测内质网应激最主要通路蛋白表达量的变化,探索雌激素受体在其抑制内质网应激中的作用。添加  $E_2$  受体后信号通路阻断剂,检测雌激素抑制内质网应激的过程中活化其受体后激活的最主要受体后信号通路。**结果** TM/DTT 组 GRP78 的表达量显著上调,内质网应激三条信号通路中蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)信号通路上调最明显,而 TM/DTT+ $E_2$  组上调显著回复。TM/DTT 组 CHOP 的表达量显著上调且细胞凋亡率显著增加,而 TM/DTT+ $E_2$  组上调明显回复,凋亡细胞减少。 $E_2$  有显著抑制 p-PERK/PERK 上调的作用,而  $E_2$  的保护作用可分别被 ICI182780 和 G15 阻断,同时添加 ICI182780 和 G15 时阻断作用最显著。分别添加信号通路阻断剂后, $E_2$  抑制 p-PERK/PERK 上调的作用均减弱,其中以磷脂酰肌醇-3 羟基激酶(PI3K)通路阻断剂的作用最显著。**结论**  $E_2$  可抑制 TM/DTT 诱导的 HUVEC 内质网应激。p-PERK/PERK 通路可能为 TM/DTT 诱导的 HUVEC 内质网应激最主要的信号通路。 $E_2$  可抑制过度内质网应激引起的细胞凋亡。 $E_2$  受体在  $E_2$  抑制内质网应激凋亡的作用中起重要作用。 $E_2$  受体激活包括 PI3K-蛋白激酶 B(PKB/Akt)、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38-丝裂原活化蛋白激酶(p38-MAPK)在内的信号通路快速起到抑制内质网应激的作用,其中 PI3K-Akt 通路可能为最主要的通路。雌激素通过抑制 PERK 信号通路引起的内质网应激凋亡,保护血管内皮细胞,其抑制内质网应激的机制主要为活化的雌激素受体激活 PI3K/Akt 通路。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

## Estrogen Reduces Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in Vascular Endothelial Cells and the Mechanism

WANG Yu<sup>1,2</sup>, YANG Xin<sup>1</sup>, LI Xiao-Dong<sup>2</sup>, HE Xiao-Jing<sup>2</sup>, and WANG Yan-Jie<sup>3</sup>

(1.Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital of Peking University, Beijing 100040; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000; 3.Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100000)

[KEY WORDS] Endoplasmic Reticulum Stress; Cell Apoptosis; Estrogen Signaling; Atherosclerosis; Human Umbilical Vein Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the signaling mechanism of estrogen reducing endoplasmic reticulum stress induced apoptosis, to explore the protective mechanism of the effect on cardiovascular, through establishing the ER stress cell

[收稿日期] 2015-06-08

[修回日期] 2015-08-25

[基金项目] 国家自然科学基金(2101000216)

[作者简介] 王宇,硕士研究生,医师,E-mail 为 1213315208@qq.com。李晓冬,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为妇科内分泌。通讯作者杨欣,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为妇产科学,E-mail 为 xinyang\_2003@sina.com。

model in human umbilical vein endothelial cell. **Methods** To establish ERS cell model, HUVECs were incubated in 10  $\mu\text{mol/L}$  tunicamycin (TM) or 2 mmol/L dithiothreitol (DTT) with or without  $10^{-8}$  mol/L 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) pretreatment. Tested glucose regulated protein (GRP78) to determine whether the model was successfully established and explored the impact of  $E_2$  in ERS. The changes of three major signaling pathway proteins of ERS were detected by Western blot, and the most significant increase is the most important signal pathway of ERS. To explore the impact of  $E_2$  in apoptosis induced by ERS, the apoptosis protein C/EBP-homologous protein (CHOP) was analyzed by Western blot and the apoptosis rate of cells was tested by Hoechst staining. To explore the role of estrogen receptor in its suppression of ERS, we added ICI182780 (ER $\alpha$ , ER $\beta$  antagonist and GPER agonist) and G15 (GPER antagonist) before adding  $E_2$ , and analyzed the expression of the main signal pass of ERS by western blot. Added the inhibitors of  $E_2$  receptor signaling, to explore the main post-receptor signaling pathway. **Results** The expression of GRP78 was significantly increased in TM/DTT group, and the protein kinase R-like ER kinase (PERK) was the most significant increase one among the three signaling pathways of ERS. In the presence of  $E_2$ , the regulations replied. The expression of CHOP and the apoptosis rate of cells were significantly increased in TM/DTT group, and regulations replied when added  $E_2$ . The inhibition of  $E_2$  to the up-regulation of p-PERK/PERK was inhibited by ICI182780 and G15 respectively, the blocking is the most obvious while adding both. The effect of  $E_2$  reduced p-PERK/PERK were weakened when added the inhibitors of  $E_2$  receptor signaling respectively, and the weakness was the most obvious when added the signaling inhibitor of Akt. Among them, the effect of PI3K-Akt inhibitor was the most significant. **Conclusions**  $E_2$  can protect human endothelial cells from ERS induced by TM and DTT. p-PERK/PERK pathway may be the most important signal path of ERS.  $E_2$  plays a role in inhibiting HUVEC apoptosis induced by over ERS. The receptors of  $E_2$  play an important role when  $E_2$  inhibited apoptosis induced by over ERS. The activated  $E_2$  receptor can activate rapid estrogen receptor signaling pathways include PI3K-Akt, ERK1/2, JNK and p38-MAPK to inhibit ERS, and PI3K-Akt pathway may be the most important one.  $E_2$  possibly prevent vascular endothelial cells by inhibition of apoptosis induced by ERS, and the mechanism of inhibiting ERS was mainly through the activated  $E_2$  receptors activating PI3K-Akt pathway.

雌激素对绝经前妇女的心血管系统有保护作用,在窗口期开始激素补充治疗,能降低心血管疾病的发生<sup>[1-2]</sup>,其心血管效应主要是通过作用于血管内皮实现的<sup>[3]</sup>。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是诱发心血管疾病的主要病理基础。血管内皮细胞凋亡是As的一个重要机制<sup>[4]</sup>,过度的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)及其引起的内皮细胞凋亡在As的早期发挥了重要的作用<sup>[5-6]</sup>。本研究用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)内质网应激模型,探讨17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -estradiol,  $E_2$ )对内质网应激的影响及内质网应激主要信号通路的激活情况,添加 $E_2$ 受体拮抗剂和信号通路阻断剂,探讨 $E_2$ 抑制内质网应激的信号通路,以期明确其抑制血管内皮细胞凋亡、防止As的机制,指导绝经后妇女合理应用激素补充治疗,使她们从中获得最大利益。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

HUVEC株EA.hy926源于北京大学人民医院中心实验室,EA.hy926是将原代培养的HUVEC与抗硫鸟嘌呤的A549克隆株融合构建的HUVEC株。

$E_2$ 、ICI182780和Hoechst33342及信号通路阻断剂LY294002、SB203580、SP600125、U0126购自美国Sigma-Aldrich公司。衣霉素(tunicamycin, TM)和G15从美国Tocris Bioscience公司获得。二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)购自美国Amresco公司。DMEM培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素和胰蛋白酶均购自美国Gibco公司。抗p-PERK、PERK抗体购自CST公司,抗p-IRE1 $\alpha$ 、IRE1 $\alpha$ 及ATF6抗体购自Abcam公司。抗CHOP、抗GRP78抗体来自美国Santa Cruz公司,内参 $\beta$ -actin抗体和蛋白质Marker购自美国Proteintech公司,其它提取蛋白试剂购于中国Beyotime、Applygen和ZSGB-BIO公司。

### 1.2 细胞培养及处理

选用含10%胎牛血清的DMEM培养基,常规加入100 mg/L青链霉素置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub>条件下培养细胞。内皮细胞接种于6孔板中,每2天更换一次培养基,当生长融合至70%~80%时,取生长状态良好的细胞更换为含1%胎牛血清的DMEM饥饿24 h使细胞生长同步化。

### 1.3 构建内质网应激模型,并探索雌激素对内质网应激的作用

用10  $\mu\text{mol/L}$ 衣霉素(TM)或2 mmol/L的二硫苏糖醇(DTT)诱导HUVEC构建内质网应激模型。

将 HUVEC 细胞分为 3 组,即:空白对照组, TM/DTT 组, TM/DTT+E<sub>2</sub> 组(提前给予 10<sup>-8</sup> mol/L 的 E<sub>2</sub> 预处理 1 h 后,用 TM/DTT 处理)。处理好细胞后用 Western blot 检测内质网应激的标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein, GRP78) 的表达。

各组细胞处理结束后,提取总蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度,根据目的蛋白分子量大小配置 10%~15%不连续 SDS-PAGE 分离胶。每孔依次上样总蛋白样品 50 μg,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸纤维素膜转膜,含 5%(重量/体积)脱脂奶粉封闭,一抗杂交孵育过夜,洗膜后二抗室温孵育 2 h, ECL 超敏发光液化学发光,使用 ImageJ 软件 V1.43 灰度分析。

#### 1.4 探索内质网应激最主要的信号通路,验证雌激素对内质网应激的作用

按上述分组进行干预后,用 Western blot 检测内质网应激三条主要的信号通路蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK)、转录激活因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 和需肌醇酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, IRE1) 蛋白水平的变化,其中上调最明显的即为内质网应激最主要的信号通路。

#### 1.5 雌激素对人脐静脉内皮细胞内质网应激凋亡的作用

1.5.1 Western blot 检测人脐静脉内皮细胞内质网应激凋亡相关蛋白的表达 按上述分组进行干预后,用 Western blot 检测内质网应激凋亡相关蛋白 C/EBP-同源蛋白 (C/EBP-homologous protein, CHOP) 的表达。

1.5.2 Hoechst 染色检测细胞的凋亡率 行染色的细胞接种密度较前有所不同,铺皿时密度为 30%,余条件同前,饥饿 24 h 后,按上述分组进行干预。按以下步骤染色:将干预好的细胞取出, PBS 冲洗 2 遍,每次 30 s; 4%多聚甲醛固定 5 min, 后用 PBS 冲洗 2 遍,每次 30 s; 在避光条件下,取 Hoechst33342 染色贮存液 2 μL, 用培养基稀释至 10 mL。加入细胞培养皿后,置于 37℃ 温箱避光孵育 10 min。后用 PBS 冲洗 2 遍,每次 30 s; 镜下拍照,曝光 6.99 s。

#### 1.6 添加特异性的雌激素受体拮抗剂,探索雌激素受体的作用

添加 10<sup>-7</sup> mol/L 的 E<sub>2</sub> 受体拮抗剂 ICI182780 (ERα、ERβ 拮抗剂及 GPER 激动剂) 和 G15 (GPER 拮抗剂) 后将 HUVEC 分为 6 组,即:空白对照组;

TM/DTT 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> + ICI182780 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> + G15 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> + ICI182780 + G15 组,提前给予 E<sub>2</sub> 受体拮抗剂预处理 1 h 后用 E<sub>2</sub> 预处理 1 h,再用 TM/DTT 处理。Western blot 检测内质网应激信号通路蛋白 p-PERK/PERK 的表达。

#### 1.7 添加信号通路阻断剂后,探索雌激素受体后的信号通路

添加 10<sup>-7</sup> mol/L E<sub>2</sub> 受体后信号通路阻断剂:磷脂酰肌醇-3 羟基激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 阻断剂 LY294002、p38-丝裂原活化蛋白激酶 (p38-mitogen activated protein kinase, p38-MAPK) 阻断剂 SB203580、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK) 阻断剂 SP600125、细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2) 阻断剂 U0126 后将 HUVEC 分为 7 组,即:空白对照组; TM/DTT 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> + LY294002 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> + SB203580 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> + SP600125 组; TM/DTT + E<sub>2</sub> + U0126 组。提前加入信号阻断剂预处理 1 h 后,用 E<sub>2</sub> 预处理 1 h,再用 TM/DTT 处理。Western blot 检测 p-PERK/PERK 表达量的变化,明确雌激素抑制内质网应激最主要的受体后信号通路。

#### 1.8 统计学方法

所有实验均重复 3 遍以上,采用 GraphPad Prism 4.0 统计软件进行数据分析及统计图制作,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,进一步两两比较采用 Student Newman-Keuls 方法进行分析, *P* < 0.05 认为有统计学差异。

## 2 结果

#### 2.1 TM/DTT 诱导 HUVEC 内质网应激,而雌激素可抑制内质网应激的发生

为构建人脐静脉内质网应激模型,并探索雌激素对内质网应激的作用,我们用 TM/DTT 诱导内质网应激,并给予 E<sub>2</sub> 预处理后检测其对内质网应激的作用,结果分析显示,与空白对照组相比 TM/DTT 组蛋白 GRP78 的表达量显著上调,而在 10<sup>-8</sup> mol/L 的 E<sub>2</sub> 预处理后其上调明显受到抑制 (图 1)。

#### 2.2 PERK 通路是内质网应激最主要的信号通路,而雌激素可显著抑制其蛋白上调

内质网应激有三条主要的信号通路,分别为 PERK、IRE1、ATF6,为探索 TM/DTT 诱导的内质网



应激最主要的信号通路,用 Western blot 检测内质网应激信号通路在蛋白水平的变化,结果显示 TM/DTT 诱导 HUVEC 内质网应激时三条内质网应激通

路均有激活,其中以 p-PERK/PERK 通路蛋白上调最显著。而  $10^{-8}$  mol/L 的  $E_2$  可显著抑制三条信号通路蛋白的上调(图 2)。

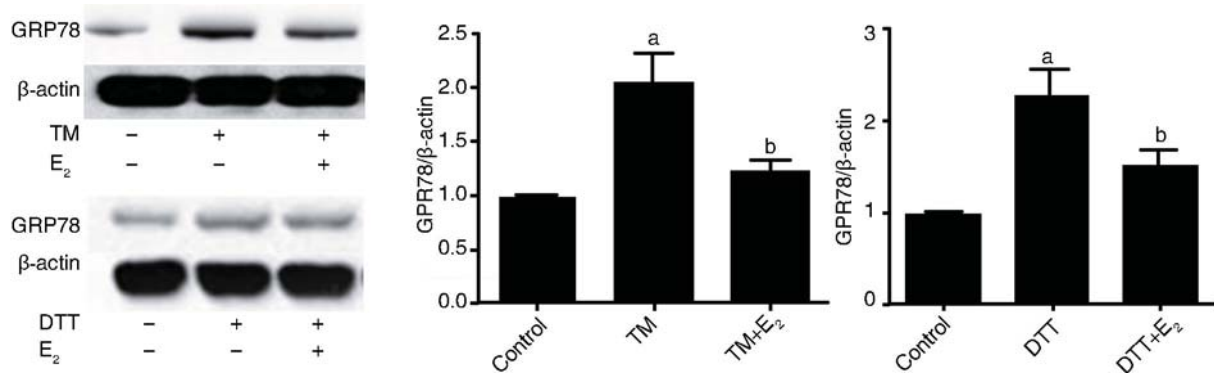


图 1. Western blot 检测雌激素抑制内质网应激时 GRP78 的表达 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 TM/DTT 组比较。TM:10  $\mu$ mol/L 的衣霉素处理 10 h;DTT:2 mmol/L 的二硫苏糖醇处理 8 h; $E_2$ : $10^{-8}$  mol/L 17 $\beta$ -雌二醇。

Figure 1. Estrogen can inhibit the expression of GRP78 in ERS by Western blot

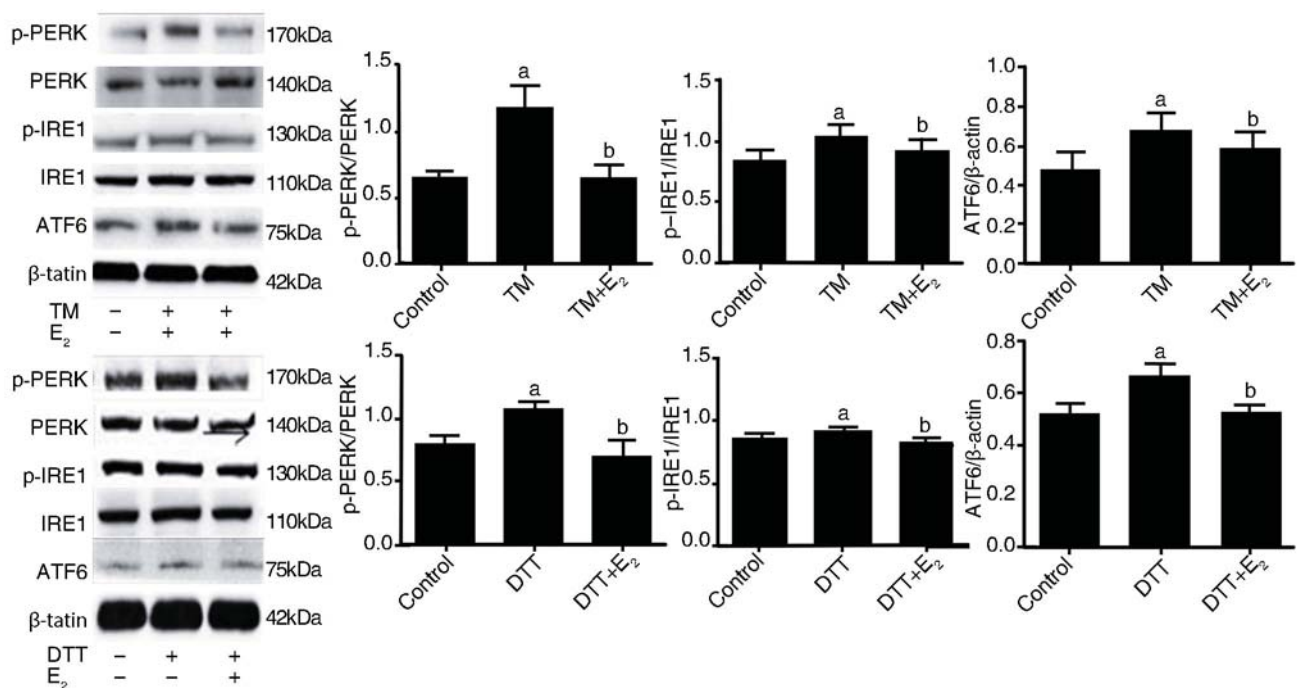


图 2. Western blot 检测内质网应激信号通路在蛋白水平的变化及雌激素的干预作用 a 为  $P<0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 TM/DTT 组比较( $n\geq 3$ )。TM/DTT:10  $\mu$ mol/L 的 TM 或 2 mmol/L 的 DTT 处理 6 h; $E_2$ : $10^{-8}$  mol/L 17 $\beta$ -雌二醇。

Figure 2. Effect of estrogen and the change of endoplasmic reticulum stress signaling pathway in protein level by Western blot

### 2.3 雌激素可抑制过度内质网应激引起的凋亡

过度的内质网应激引起细胞凋亡,为探索  $E_2$  对细胞凋亡的作用,我们对凋亡标志蛋白 CHOP 进行 Western blot 检测,分析蛋白 CHOP 的表达量变化,结果显示过度的内质网应激诱导凋亡,而  $E_2$  抑制凋亡的发生(图 3)。用 Hoechst 染色检测细胞形态学变化,发现 TM/DTT 组同一高倍视野凋亡细胞数目

显高于空白对照组, TM/DTT+E<sub>2</sub> 组凋亡细胞数目少于 TM/DTT 组(图 4)。

### 2.4 雌激素受体在其抑制内质网应激引起的凋亡中的作用

我们通过添加  $E_2$  受体拮抗剂,探索  $E_2$  受体在其抑制内质网应激中的作用,Western blot 检测结果显示, $10^{-8}$  mol/L 的  $E_2$  有显著抑制 p-PERK/PERK

上调的作用,而  $E_2$  的保护作用可分别被 ICI182780 和 G15 阻断,同时添加 ICI182780 和 G15 时阻断作

用最显著。但 ICI182780 和 G15 本身对 p-PERK/PERK 无显著的改变(图 5)。

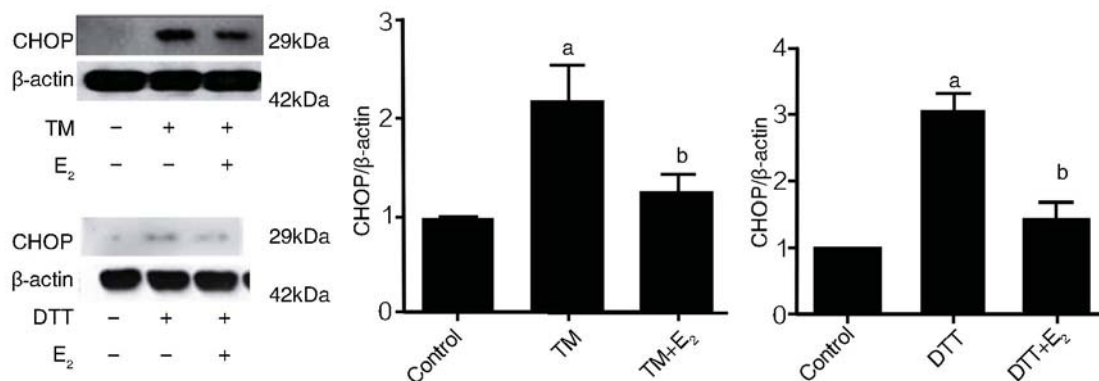


图 3. 雌激素可显著抑制内质网应激凋亡时 CHOP 的表达( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 TM/DTT 组比较。TM:10  $\mu\text{mol/L}$  的衣霉素处理 10 h;DTT:2 mmol/L 的二硫苏糖醇处理 8 h; $E_2$ : $10^{-8}$  mol/L 17 $\beta$ -雌二醇。

Figure 3. The estrogen can significantly inhibit the expression of CHOP in apoptosis induced by ERS( $n=3$ )

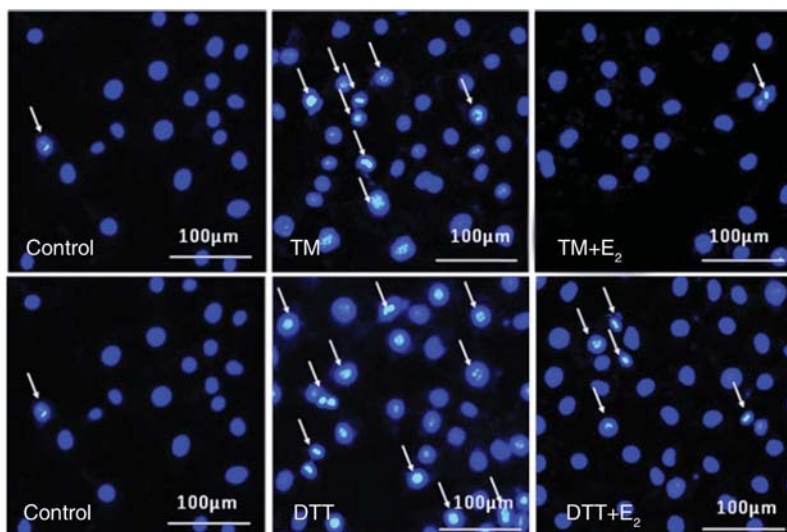


图 4. 雌激素可抑制过度内质网应激引起的凋亡( $n=3$ ) 白色箭头所指处为凋亡细胞被亮染的细胞核。Control:对照组;TM/DTT:10  $\mu\text{mol/L}$  衣霉素或 2 mmol/L 二硫苏糖醇处理 12 h 组;TM/DTT+E<sub>2</sub>: $10^{-8}$  mol/L 雌激素预处理 1 h 后,加入 10  $\mu\text{mol/L}$  衣霉素或 2 mmol/L 二硫苏糖醇再处理 12 h。

Figure 4. The excessive endoplasmic reticulum stress may induce the apoptosis while the estrogen could inhibit the occurrence of apoptosis( $n=3$ )

## 2.5 PI3K-Akt 通路可能是雌激素抑制内质网应激最主要的受体后信号通路

为探索最主要的雌激素受体后信号通路,我们分别添加信号通路阻断剂,用 Western blot 检测 p-PERK/PERK 的变化,结果显示  $10^{-8}$  mol/L 的  $E_2$  可明显抑制 p-PERK/PERK 的表达, $E_2$  的这一作用可分别被 LY294002、SB203580、SP600125 及 U0126 显著阻断,其中 LY294002 的阻断效果最显著,但 LY294002 本身对 p-PERK/PERK 无明显的作用(图 6)。

## 3 讨论

As 是诱发心血管疾病的主要病理基础,而在 As 的亚临床阶段已存在内皮细胞功能障碍<sup>[7]</sup>。血管内皮细胞的过度凋亡是 As 发生的一个始动因素。既往研究表明雌激素可保护心血管系统,防止 As 的发生,但其具体机制尚不清楚。我们提出假设:雌激素可能通过抑制内质网应激引起的血管内皮细胞凋亡起到保护心血管系统,防止 As 的作用,并进一步探索雌激素抑制内质网应激的机制。

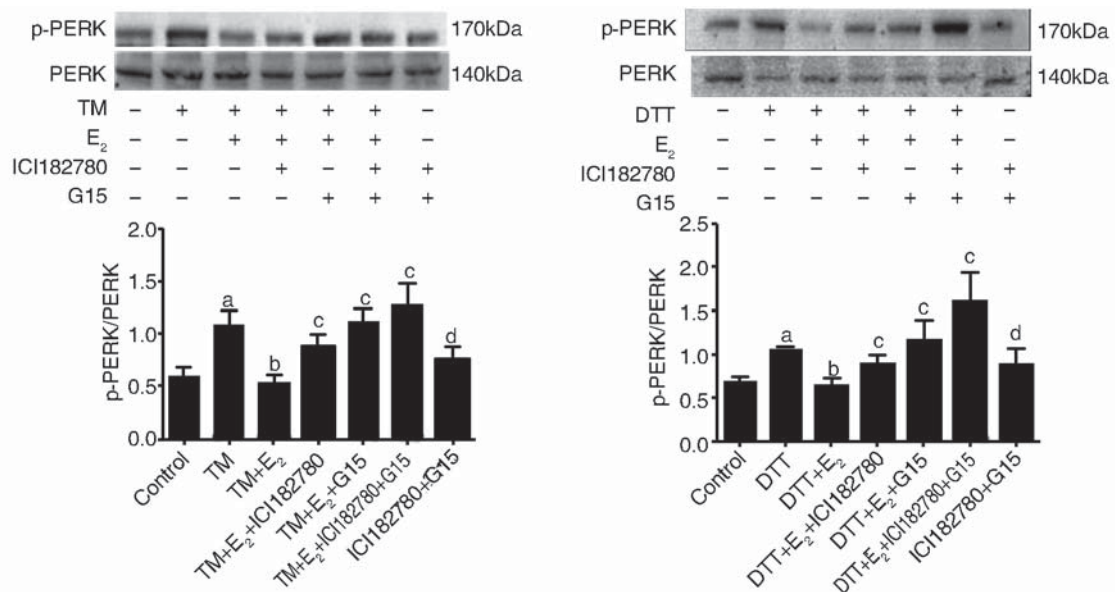


图 5. Western blot 检测雌激素受体在其抑制内质网应激引起的凋亡中的作用 a 为  $P<0.05$ , 与空白对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 TM/DTT 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 TM/DTT+E<sub>2</sub> 组比较; d 为  $P<0.05$ , 与 TM/DTT+E<sub>2</sub>+ICI182780+G15 组比较。

Figure 5. Effect of estrogen receptor in the inhibition of apoptosis induced by the endoplasmic reticulum stress by Western blot

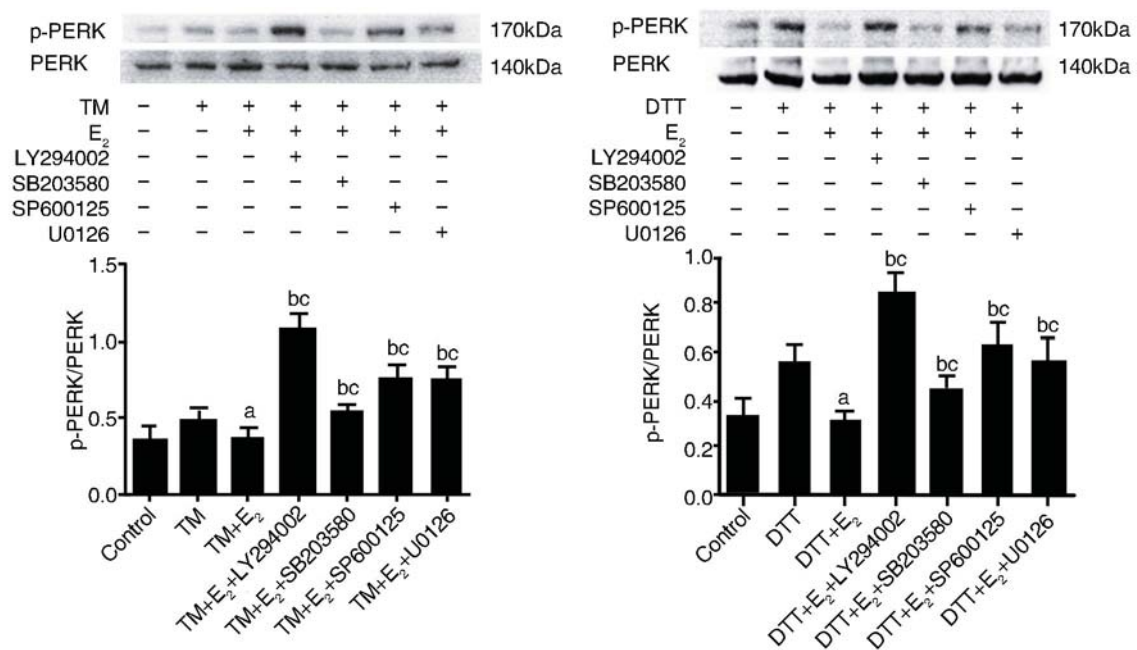


图 6. LY294002 阻断雌激素的作用最显著 a 为  $P<0.05$ , 与 TM/DTT 组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 TM/DTT+E<sub>2</sub> 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 TM/DTT+E<sub>2</sub>+LY294002 组比较。

Figure 6. LY294002 has the most significant blocking effect to the action of estrogen

在内质网稳态的情况下, PERK、ATF6、IRE1 与分子伴侣 GRP78 相结合, 形成稳定的复合物, 处于无活性状态。而当内质网稳态被打乱时, PERK、ATF6 和 IRE1 与 GRP78 解离, 启动内质网应激的三条主要信号转导通路<sup>[8-9]</sup>, 内质网应激标志蛋白 GRP78 及内质网应激凋亡相关蛋白 CHOP 上

调<sup>[10]</sup>。本研究成功用 TM/DTT 诱导了内质网应激模型, 内质网应激三条主要通路都有激活, 而 PERK 通路上调最显著。过度的内质网应激引起细胞凋亡, 既往临床和实验研究均表明雌激素有血管保护作用<sup>[11-12]</sup>。本研究显示 E<sub>2</sub> 可能通过抑制内质网应激及其引起的内皮细胞凋亡保护心血管系统。



为探索雌激素受体在  $E_2$  抑制内质网应激中的作用,我们添加  $E_2$  受体拮抗剂,结果显示单独添加 ICI182780 或 G15 都可减弱  $E_2$  对内质网应激的保护作用,而两者同时添加时作用最明显。这表明雌激素抑制内质网应激的过程中雌激素受体  $ER\alpha$ 、 $ER\beta$  及 GPER 均被激活并起到重要作用。雌激素受体主要有:  $ER\alpha$ 、 $ER\beta$  及 GPER,前两者是经典核受体,而 GPER 是位于内质网上的膜受体,可调节快速雌激素信号通路<sup>[13]</sup>,并广泛表达于心血管系统。

快速雌激素信号通路对雌激素保护血管损伤至关重要<sup>[12]</sup>,包括 PI3K-Akt、MAPK 通路等。MAPK 家族成员对细胞的生存有重要作用,包括 ERK1/2、JNK 和 p38-MAPK<sup>[14]</sup>。已在心血管系统发现  $E_2$  可激活 MAPK 和 PI3K-Akt 信号级联<sup>[15]</sup>。血管内皮细胞培养发现  $E_2$  可以通过快速激活 PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路保护缺血再灌注损伤<sup>[16]</sup>。且 PI3K-Akt、p38-MAPK 级联可通过抑制 GRP78 的降解来维护内质网的稳态,抑制内质网应激,是调节细胞凋亡的关键途径<sup>[17-18]</sup>。我们提出假设:  $E_2$  快速激活 PI3K-Akt 和 MAPK 级联抑制内质网应激,保护血管内皮细胞。为进一步探索  $E_2$  抑制内质网应激的受体后信号通路,我们添加 PI3K-Akt、MAPK 的阻断剂,发现分别添加后  $E_2$  抑制内质网应激的作用均明显减弱,其中以 LY294002 作用最显著,而 LY294002 本身对内质网应激无显著作用。表明  $E_2$  可通过激活包括 PI3K/Akt、ERK1/2、JNK 和 p38-MAPK 在内的通路抑制内质网应激,而 PI3K-Akt 通路为最主要的通路。

综上所述,本研究发现  $E_2$  主要通过与其受体结合后激活 PI3K-Akt 通路,抑制内质网应激引起的凋亡,保护血管内皮细胞,以防止 As。

#### [参考文献]

- [1] Yang XP, Reckelhoff JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011, 20(2): 133-138.
- [2] Rossi P, Frances Y, Kingwell BA, et al. Gender differences in artery wall biomechanical properties throughout life [J]. *J Hypertens*, 2011, 29(6): 1023-1033.
- [3] Xing D, Nozell S, Chen YF, et al. Estrogen and mechanisms of vascular protection[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(3): 289-295.
- [4] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 900-917.
- [5] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102.
- [6] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 396-399.
- [7] Choi BJ, Prasad A, Gulati R, et al. Coronary endothelial dysfunction in patients with early coronary artery disease is associated with the increase in intravascular lipid core plaque[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(27): 2047-2054.
- [8] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [9] Stone S, Lin W. The unfolded protein response in multiple sclerosis[J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 264.
- [10] Galan M, Kassan M, Kadowitz PJ, et al. Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(6): 1063-1075.
- [11] Xing D, Nozell S, Chen YF, et al. Estrogen and mechanisms of vascular protection[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(3): 289-295.
- [12] Bernelot MSJ, Schnitzler GR, Nickerson M, et al. Rapid estrogen receptor signaling is essential for the protective effects of estrogen against vascular injury[J]. *Circulation*, 2012, 126(16): 1993-2004.
- [13] Tang H, Zhang Q, Yang L, et al. Reprint of "GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection" [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 389(1-2): 92-98.
- [14] Darling NJ, Cook SJ. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(10): 2150-163.
- [15] Ribeiro JR, Freiman RN. Estrogen signaling crosstalk: Implications for endocrine resistance in ovarian cancer [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 143: 160-173.
- [16] Ueda K, Karas RH. Emerging evidence of the importance of rapid, non-nuclear estrogen receptor signaling in the cardiovascular system [J]. *Steroids*, 2013, 78(6): 589-596.
- [17] Wu QL, Shen T, Shao LL, et al. Ischemic postconditioning mediates cardioprotection via PI3K/GSK-3 $\beta$ /cAMP-dependent signaling pathway in ischemic rat myocardium [J]. *Shock*, 2012, 38(2): 165-169.
- [18] Feaver RE, Hastings NE, Pryor A, et al. GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-dependent mechanism in endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(8): 1534-1541.

(此文编辑 许雪梅)