

- Allergy Immunol 2002, 128(2): 77-89.
- (2) 彭毅志, 袁志强, 肖光夏. 早期肠道喂养在降低烧伤后肠黏膜通透性中的作用[J]. 中国医师杂志 2003, 5(11): 1474-1476.
- (3) 熊爱兵, 刘承荣, 李庭富, 等. 加味四君子汤对烫伤大鼠 T 细胞亚群和免疫球蛋白的影响[J]. 中华烧伤杂志 2001, 17(5): 308.
- (4) 游浩元, 詹剑华, 严济, 等. 休克期大面积切痂对严重烫伤大鼠 T 淋巴细胞 CD₂₅ 表达的影响[J]. 实用临床医学 2005, 6(8): 7-9.
- (5) 王存邦, 白海, 蕙瑞, 等. 小剂量 X 线对小鼠细胞免疫功能影响[J]. 中国公共卫生 2010, 26(5): 655-656.
- (6) 项平. 药膳配伍规律研究[J]. 扬州大学烹饪学报 2002(3): 23-27.
- 收稿日期: 2011-03-09 (解学魁编辑 郭薇校对)

【实验研究】

17 β 雌二醇对脂多糖致炎性拮抗作用*张莉莉¹, 解博红², 郭继强², 宋向凤²

摘要: 目的 研究 17 β 雌二醇 (17 β -estradiol, E2) 对核转录因子 (NF- κ B) 转录活性及 Toll 样受体 (TLR4) 表达的影响。方法 采用脂多糖和 17 β 雌二醇同时作用于单核巨噬细胞 RAW264.7, 采用逆转录-聚合酶链反应方法检测细胞表面 TLR4 基因的表达; 用荧光素酶报告基因转染试验观察 NF- κ B 转录活性变化。结果 对照组、LPS 单独刺激组和 17 β 雌二醇预作用组细胞 TLR4 mRNA 的相对表达分别为 (1.23 \pm 0.21)、(1.52 \pm 0.28) 和 (1.11 \pm 0.27), NF- κ B 转录活性的相对值分别为 (126 \pm 32)、(306 \pm 58) 和 (247 \pm 37), LPS 刺激可使细胞 TLR4 mRNA 表达和 NF- κ B 转录活性增强, 而 17 β 雌二醇预作用可明显降低 TLR4 mRNA 的表达和 NF- κ B 转录活性, 组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 17 β 雌二醇能通过调节 TLR4 及转录因子 NF- κ B 的活性呈现一定的抗炎作用。

关键词: 雌激素; 巨噬细胞; 核转录因子 (NF- κ B); Toll 样受体 (TLR4)

中图分类号: R 392.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)02-0187-02

Effects of 17 β -estradiol on expression of NF- κ B and TLR4 in LPS-stimulated RAW264.7 cells ZHANG Li-li, XIE Bo-hong, GUO Ji-qiang, et al. Department of Microbiology, Sanquan College, Xinxiang Medical University (Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of 17 β -estradiol on the expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and Toll-like receptor 4 (TLR4) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells. **Methods** The expression of TLR4 mRNA in RAW264.7 cells was detected with reverse-transcription-PCR (RT-PCR). The activity of transcription factor NF- κ B was detected with method of luciferase reporter. **Results** The relative expression level of TLR4 mRNA was 1.23 \pm 0.21, 1.52 \pm 0.28, and 1.11 \pm 0.27 in the control group, LPS stimulation group, and 17 β -estradiol group, respectively. Meanwhile, the relative value of NF- κ B activity was 126 \pm 32, 306 \pm 58, and 247 \pm 37 in the control group, LPS stimulation group, and 17 β -estradiol group, respectively. 17 β -estradiol could decrease the expression of TLR4 mRNA and the transcription activity of NF- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** 17 β -estradiol has anti-inflammatory effect via regulation of TLR4 expression and NF- κ B transcriptional activity.

Key words: estrogen; macrophage; NF- κ B; TLR4

雌激素是女性生殖系统生长发育所必需的一类固醇激素, 主要包括雌酮、雌二醇和雌三醇, 其中以雌二醇的生理功能最强。一般认为雌激素可作为体液免疫的增强子^[1], 参与细胞的生长、分化、免疫应答和炎症反应等, 影响自身免疫性疾病的发生与发展, 但是具体的作用机制还未完全阐明。本课题前期观察到 17 β 雌二醇能以剂量依赖的方式影响 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的功能^[2-3], 本研究进一步探讨了 17 β 雌二醇 (17 β -estradiol, E2) 对单核巨噬细胞 Toll 样受体 (TLR4) 表达的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 (本实验中心保存); 脂质体、报告基因检测试剂 (碧云天生物技术公司); RP-

MI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); 核转录因子 (NF- κ B)-Luc 质粒 (美国国立卫生研究院栾好江博士惠赠); 17 β 雌二醇、脂多糖 (美国 Sigma 公司)。莫洛尼鼠白血病病毒 (M-MLV) 逆转录酶、pGL3-Basic、pGL3-Control、Trizol 试剂 (TaKaRa 公司); T196 普通 PCR 仪 (德国 Biometra 公司); 荧光分析仪 (德国 Biometra 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞接种于含有体积比为 10% 灭活胎牛血清的新鲜 RPMI 培养液中, 内含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes) 缓冲液、谷氨酰胺, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 2~3 d 传代 1 次, 调整细胞密度不超过 5 \times 10⁵ /mL。

1.2.2 17 β 雌二醇刺激 将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞分装于 24 孔培养板中, 数量为 1 \times 10⁵ /孔, 用于 TLR4 mRNA 表达检测; 2 \times 10⁵ /孔, 用于 NF- κ B 转录活性检测。实验分组为: 无刺激对照组; 脂多糖 (终浓度为 1 μ g/mL) 刺激组; 脂多糖 + 17 β 雌二醇 (终浓度为 10⁻⁹ mol/L) 刺激组; 每组

* 基金项目: 河南省教育厅立项课题 (200510472009)

作者单位: 1. 新乡医学院三全学院微生物学教研室, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院免疫学教研室

作者简介: 张莉莉 (1984 年-), 女, 河南睢县人, 助教, 学士, 研究方向: 神经内分泌免疫。

通讯作者: 宋向凤, E-mail: xfsong@xxmu.edu.cn

设 3 个复孔。在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中继续培养 48 h, 收获细胞, 分别进行各项检测。

1.2.3 TLR4 mRNA 表达检测 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 用于逆转录, 逆转录按照 M-MLV 逆转录酶试剂说明书操作。采用逆转录-聚合酶链反应技术检测 TLR4 mRNA 的表达。引物序列如下: TLR4: 上游 5'-ACCTG-GCTGGTTTACAGTC-3', 下游 5'-CTGCCAGAGACATTG-CAGAA-3', 产物 201 bp; 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 上游 5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3', 下游 5'-CACATT-GGGGGTAGGAACAC-3', 产物 201 bp。引物由 Introvigen 公司合成。PCR 反应条件为: 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次, 最后再 72 °C 延伸 5 min。实验重复 3 次。取扩增产物 10 μL 电泳并在紫外灯下观察。

1.2.4 NF-κB 转录活性检测 采用荧光素酶报告基因转染试验检测 NF-κB 的转录活性。按照 Tfx™-50 脂质体试剂说明书进行操作, 将荧光素酶报告基因质粒 NF-κB-Luc、阴性对照 pGL3-Basic 和阳性对照 pGL3-Control 各转染 RAW264.7 细胞, 转染 36 h 后, 各转染组加入 LPS 和/或 17β 雌二醇。转染 42 h 后收集细胞, 转入 1.5 mL EP 管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 每管加入 200 μL 报告基因细胞裂解液, 振荡 30 s, 置室温 5 min, 12 000 r/min 离心 30 s, 取 20 μL 上清液加入 100 μL 荧光素混合液, 立即用荧光分析仪检测荧光光量值。

1.3 统计分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 17β 雌二醇对 TLR4 mRNA 表达影响(图 1) 结果如图 1 所示, 对照组、脂多糖单独刺激组和 17β 雌二醇预作用组细胞 TLR4 mRNA 的相对表达分别为 (1.23 ± 0.21)、(1.52 ± 0.28) 和 (1.11 ± 0.27)。脂多糖刺激可使细胞表达 TLR4 mRNA 增强, 而 17β 雌二醇预作用可明显降低 TLR4 mRNA 的表达, 组间比较具有统计学意义(两两比较 $t = 3.978$, $P = 5.463$, 均 $P < 0.05$)。

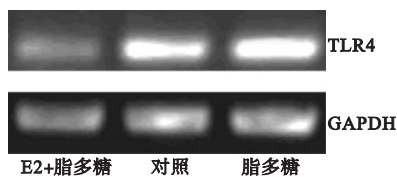


图 1 17β 雌二醇对 RAW264.7 细胞 TLR4 的影响

2.2 17β 雌二醇对 NF-κB 转录活性影响 对照组、脂多糖单独刺激组和 17β 雌二醇预作用组细胞 NF-κB 转录活性的相对值分别为 (126 ± 32)、(306 ± 58) 和 (247 ± 37)。LPS 刺激可使细胞 NF-κB 转录活性增强, 而 17β 雌二醇预作用可明显降低 NF-κB 转录活性, 组间比较具有统计学意义(两两比较 $t = 4.939$, $P = 12.496$, 均 $P < 0.05$)。

3 讨论

许多研究和临床观察发现, 进入青春期以后的女性比男性对抗原刺激具有更强的免疫应答, 性激素受体在多种免疫器官和免疫细胞上均有表达⁽⁴⁾, 这提示性激素对免疫功能有着重要的调节作用, 但确切的机制尚不清楚。前期研究显示,

雌激素能抑制 T 淋巴细胞的增殖, 但促进 B 淋巴细胞产生抗体⁽²⁻³⁾。

单核巨噬细胞是体内重要的吞噬细胞和抗原提呈细胞, 它通过表面的模式识别受体去识别病原相关分子模式, 引起细胞内信号转导, 最终导致细胞活化并分泌一些细胞因子以影响免疫功能。Toll 样受体是单核巨噬细胞表面重要的模式识别受体, 在机体固有免疫对病原体的识别方面发挥着非常重要的作用, 但关于雌激素对单核巨噬细胞的 Toll 样受体的影响报道极少, 结果还存在很大争议⁽⁵⁻⁷⁾。本研究探讨 17β 雌二醇对 LPS 刺激下的单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞 TLR4 表达的影响。结果显示, 脂多糖的刺激使细胞表面 TLR4 mRNA 表达增强, 但预先用 17β 雌二醇作用后, 则 TLR4 mRNA 表达明显降低, 这提示雌激素能降低 LPS 引起的炎症反应, 从而对机体有一定的保护作用。

NF-κB 是一种重要的细胞核转录因子, NF-κB 活化后可以调控的靶基因包括免疫相关受体、细胞因子、炎症因子、黏附分子、急性期蛋白等⁽⁸⁾, 在调控免疫细胞的激活、淋巴细胞的发育、细胞凋亡、肿瘤形成、病毒复制、炎症反应⁽⁹⁾ 及多种自身免疫性疾病方面发挥重要作用。本研究结果显示, 17β 雌二醇能明显降低 LPS 刺激下的 NF-κB 转录因子的活性, 减轻许多炎症性靶基因的表达。

本研究结果提示, 17β 雌二醇能明显降低 LPS 诱导下的 TLR4 的表达, 并通过 NF-κB 信号途径降低单核巨噬细胞对细菌感染的敏感性。

志谢 此研究在新乡医学院免疫学研究中心完成, 感谢王辉教授给予的指导和帮助

参考文献

- Cutolo M, Brizzolara R, Atzeni F, et al. The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1193(1): 36-42.
- 宋向凤, 孙翔, 王辉. 雌孕激素对 T 淋巴细胞生长的调节作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2005, 21(2): 249-253.
- 宋向凤, 牛志国, 郭继强, 等. 17-β 雌二醇对人 B 淋巴细胞系 IM-9 细胞的调节作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2009, 25(3): 274-275, 279.
- Shim GJ, Gherman D, Kim HJ, et al. Differential expression of estrogen receptors in human secondary lymphoid tissues [J]. *Pathol*, 2006, 208(3): 408-414.
- Calippe B, Douin-Echinard V, Delpy L, et al. 17β-estradiol promotes TLR4-triggered proinflammatory mediator production through direct estrogen receptor alpha signaling in macrophages *in vivo* [J]. *J Immunol* 2010, 185(2): 1169-1176.
- Vegeto E, Ghisletti S, Meda C, et al. Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17β-estradiol in macrophage cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, 91(1-2): 59-66.
- Paimela T, Ryhänen T, Mannermaa E, et al. The effect of 17β-estradiol on IL-6 secretion and NF-κB DNA-binding activity in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Immunol Lett* 2007, 110(2): 139-144.
- Lopez-Guerra M, Colomer D. NF-κB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia, [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(3): 275-288.
- 罗炳德, 吕阳, 谭非, 等. 青蒿琥酯对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞保护作用 [J]. *中国公共卫生* 2008, 24(1): 54-55.

收稿日期: 2010-10-19

(孔繁学编辑 郭薇校对)