

雌激素抑制淋巴细胞 IL-1 β 和 IL-6 释放并下调 Cx40 及 Cx43 水平

王璐^{1,2}, 王爱^{1,3}, 杨瑞^{1,2}, 张莹莹^{1,2}, 倪欣^{1,2}, 于秀石^{1,2}, 单莉娅^{1,2}, 马克涛^{1,2}

摘要 目的 探讨雌激素(E)对淋巴细胞上连接蛋白40(Cx40)和Cx43表达及白细胞介素1 β (IL-1 β)和IL-6释放的影响。方法 选取Wistar京都(WKY)大鼠6只,采集腹主动脉外周血,分离淋巴细胞进行培养,分为空白组(Ctrl)、刀豆蛋白A(ConA)组和刀豆蛋白A+雌激素(ConA+E)组。应用ELISA检测培养基上清液中IL-1 β 、IL-6的水平;应用免疫荧光技术检测淋巴细胞上Cx40和Cx43的表达和分布情况;应用流式细胞术检测淋巴细胞上Cx40和Cx43表达水平变化;应用Western blot检测淋巴细胞上Cx40和Cx43的蛋白表达。结果 ConA组IL-1 β 和IL-6表达较Ctrl组升高($P < 0.01$),ConA+E组较ConA组降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);免疫荧光结果显示Cx40主要表达在细胞质及细胞核,而Cx43主要表达在细胞膜,ConA组淋巴细胞上Cx40和Cx43蛋白表达较Ctrl组升高($P < 0.01$),ConA+E组较ConA组降低($P < 0.01$);ConA组淋巴细胞上Cx40和Cx43表达水平较Ctrl组升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),ConA+E组较ConA组降低($P < 0.05$);ConA组淋巴细胞上Cx40和Cx43蛋白表达较Ctrl组明显升高($P < 0.01$),ConA+E组较ConA组明显降低($P < 0.01$)。结论 E抑制炎症因子IL-1 β 和IL-6的释放,同时下调淋巴细胞上Cx40和Cx43的表达,提示Cx40和Cx43可能参与E的抑炎作用。

关键词 炎症;淋巴细胞;连接蛋白;雌激素;刀豆蛋白A

中图分类号 R 392

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)08-1189-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.005

炎症反应是常见的一个病理过程,当机体免疫反应状态异常时,可有大量淋巴细胞浸润,造成组织

和细胞损伤而导致炎症,淋巴细胞作为反映机体细胞免疫功能的重要指标在其中发挥着必不可少的作用^[1]。课题组前期研究^[2-3]表明,应用缝隙连接阻断剂(gap junction inhibitory peptide, Gap27)后炎症因子的释放被显著抑制,提示由连接蛋白(connexin, Cx)构成的缝隙连接通道在淋巴细胞介导的炎症反应中发挥了重要作用。有研究^[4-5]表明,缝隙连接通道介导免疫细胞间的电和化学信号交流,参与细胞因子的释放以及炎症反应过程。近年研究^[6-7]显示,雌激素(estrogen, E)除了可以促进和维持女性生殖器官和第二性征的发育以外,也通过调节免疫系统功能,进而抑制炎症反应。因此,该研究假设E抑制炎症反应可能与淋巴细胞间连接蛋白的表达以及炎症因子的释放有关。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

1.1.1 试剂 ConA和E购自美国Sigma公司;APC anti-rat CD4和Per-cp anti-rat CD8a购自美国Biolgend公司;Anti-Connexin 40购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;Anti-Connexin 43抗体购自美国Abcam公司;Cx 40 FITC标记二抗和Cx 43 FITC标记二抗购自北京中杉金桥生物公司;KBM581培养基购自美国Corning公司;大鼠白细胞介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-6 ELISA检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司;淋巴细胞分离液购自天津灏洋科技有限责任公司。

1.1.2 仪器 CO₂恒温培养箱购自上海力申科学仪器有限公司;流式细胞仪购自美国BD公司;LSM510激光共聚焦显微镜购自德国CarlZeiss公司。

1.2 实验动物 实验动物选取12周龄清洁级WKY雄鼠6只,体质量150~300 g,饲养环境的室温控制在22~25℃、湿度50%~60%,购自北京维通利华实验动物有限责任公司,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。

1.3 方法

2019-04-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660271);石河子大学国际合作项目(编号:GJHZ201603);兵团中青年科技创新领军人才计划(编号:2016BC006)

作者单位:新疆石河子大学医学院¹ 新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室、² 生理学教研室,石河子 832000

³昌吉回族自治州人民医院,昌吉 831100

作者简介:王璐,女,硕士研究生;

马克涛,男,教授,博士,责任作者, E-mail: maketao@hot-mail.com;

单莉娅,女,讲师,硕士,责任作者, E-mail: sly119@foxmail.com

1.3.1 细胞培养与分组 大鼠称重、麻醉,采集腹主动脉血 3 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,剩余血细胞根据密度梯度离心法分离淋巴细胞,于细胞间超净台无菌操作将分离的白色云雾状淋巴细胞层吸出,细胞洗涤液洗涤 2 次,红细胞裂解液裂解 1 次,1 800 r/min 离心 6 min,弃上清液,沉淀加入 10% 胎牛血清的 KBM581 进行培养。分为三组:空白组(Ctrl)、ConA 组(10 μg/ml ConA 干预 48 h)和 ConA + E 组(1 μg/ml E 预孵育 24 h 后加入 10 μg/ml ConA 共孵育 48 h)。

1.3.2 ELISA 检测培养基中 IL-1β 和 IL-6 水平 取出已干预好的细胞,1 800 r/min 离心 6 min,取上清液,应用 ELISA 技术检测 IL-1β 和 IL-6 水平,操作步骤按照试剂盒说明书。

1.3.3 流式细胞术检测淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达水平 取出已干预好的细胞,1 800 r/min 离心 6 min,弃上清液,PBS 重悬细胞,设置阴性对照管和同型对照管,按照说明书分别加入相应流式表面抗体 APC-CD4 和 percp-CD8a,充分混匀后室温避光孵育 30 min,洗涤后 1 800 r/min 离心 6 min,弃上清液;固定破膜后分别孵育 Cx40 和 Cx43 一抗及二抗,37 °C 孵育 30 min;洗涤后加入 PBS 重悬细胞,上机进行流式检测。

1.3.4 免疫荧光技术检测淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达及分布情况 取出已干预好的细胞,1 800 r/min 离心 6 min,弃上清液,PBS 漂洗 3 次,固定破膜,BSA 37 °C 封闭 30 min,一抗于湿盒内 37 °C 孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次,二抗于湿盒内 37 °C 孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,滴加 PI,湿盒内室温避光染色 20 s,PBS 漂洗 3 次,封片。激光扫描共聚焦显微镜观察。

1.3.5 Western blot 检测淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的蛋白表达 取出已干预好的细胞,1 800 r/min 离心 6 min,沉淀采用 BCA 法测定蛋白浓度后,取蛋白样品加入适量的上样缓冲液,置于沸水中使蛋白变性,于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,电泳完毕后将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 2 h,分别加入 Cx40、Cx43 及 NADPH 一抗 4 °C 过夜,洗膜后再加入二抗室温孵育 2 h,再次洗膜后与发光试剂反应,置于 X 线胶片暗盒中曝光、显影。应用 ImageJ2x 分析软件检测并分析条带的灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两样

本均数 *t* 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养基中 IL-1β 及 IL-6 的水平 ELISA 检测结果显示,ConA 组与 Ctrl 组相比,培养基中 IL-1β 和 IL-6 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$); ConA + E 组与 ConA 组相比,培养基中 IL-1β 和 IL-6 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$, $n = 6$),见表 1。

表 1 培养基中 IL-1β 及 IL-6 的水平($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	IL-1β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
Ctrl	53.02 ± 1.42	34.96 ± 0.24
ConA	111.80 ± 1.55**	40.75 ± 0.47**
ConA + E	55.75 ± 0.32##	37.91 ± 0.88#

与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$; 与 ConA 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达及分布差异

采用 FITC 染料标记二抗和 PI 标记细胞核的双重免疫荧光来显示 Cx40 和 Cx43 在淋巴细胞上的表达和分布情况。绿色荧光代表 Cx40 和 Cx43 在淋巴细胞上的表达和分布情况,而红色荧光则对应为染色的细胞核。结果表明,Cx40 主要表达在细胞质及细胞核,而 Cx43 主要表达在细胞膜,与 Ctrl 组相比,ConA 组 Cx40 和 Cx43 在淋巴细胞上表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$),给予 E 干预后 Cx40 和 Cx43 的表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

2.3 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 表达水平的变化 流式细胞术检测结果显示,ConA 组淋巴细胞 Cx40 和 Cx43 阳性表达率高于 Ctrl 组大鼠,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); ConA + E 组淋巴细胞 Cx40 和 Cx43 阳性表达率低于 ConA 组大鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$, $n = 3$),见图 2。

2.4 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的蛋白表达 Western blot 检测结果显示,ConA 组淋巴细胞上 Cx40 蛋白表达水平高于 Ctrl 组,差异有统计学意义($P < 0.01$); ConA + E 组淋巴细胞上 Cx40 蛋白表达水平低于 ConA 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。ConA 组淋巴细胞上 Cx43 蛋白表达水平明显高于 Ctrl 组,差异有统计学意义($P < 0.01$); ConA + E 组淋巴细胞上 Cx43 蛋白表达水平明显低于 ConA 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

炎症反应是机体活组织对各种致炎因素的一种

正常防御反应,同时伴有大量淋巴细胞浸润,这方面变化产生的实质是机体与炎症因子进行抗争的反映^[8]。炎症因子主要由免疫细胞释放,在炎症反应

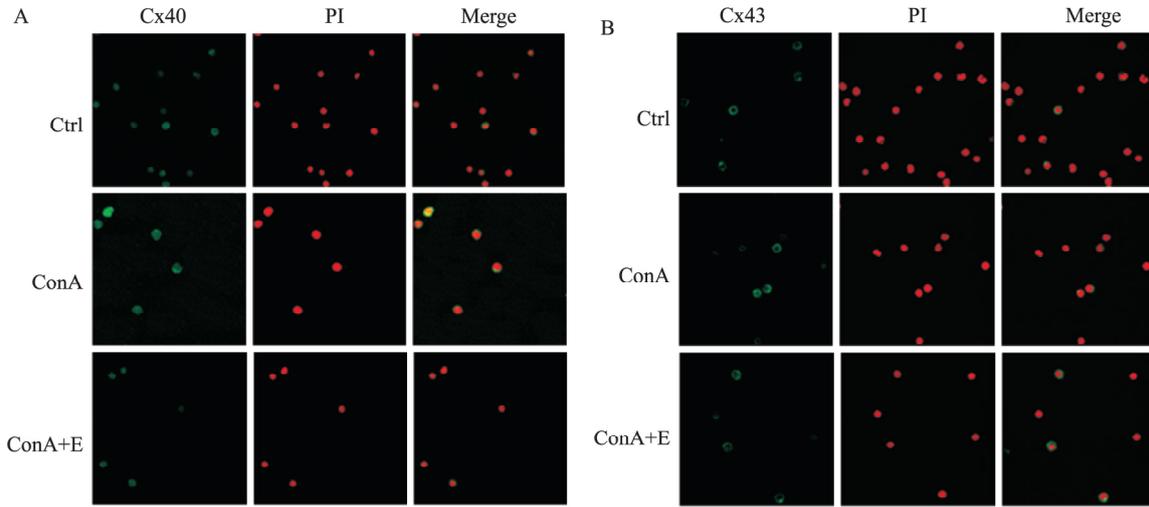


图1 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达及定位 ×630

A: Cx40 的表达及定位; B: Cx43 的表达及定位

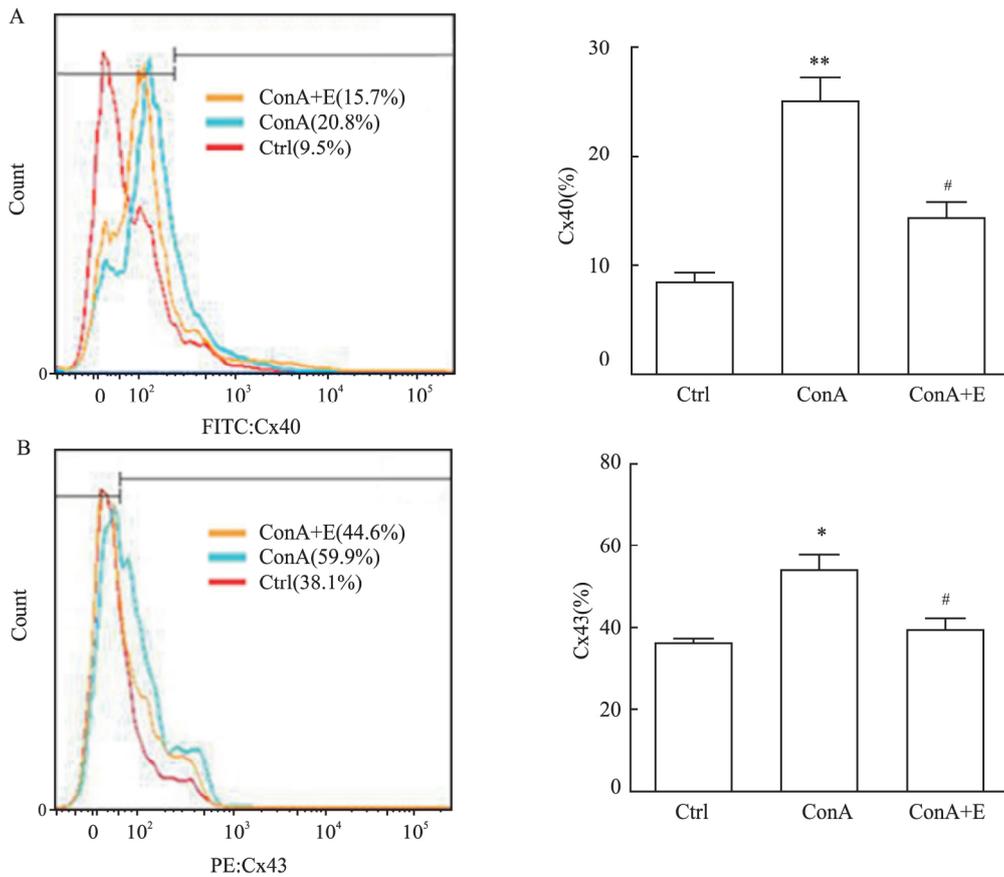


图2 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达水平

A: 淋巴细胞上 Cx40 阳性表达及统计结果; B: 淋巴细胞上 Cx43 阳性表达及统计结果; 与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ConA 组比较: # $P < 0.05$

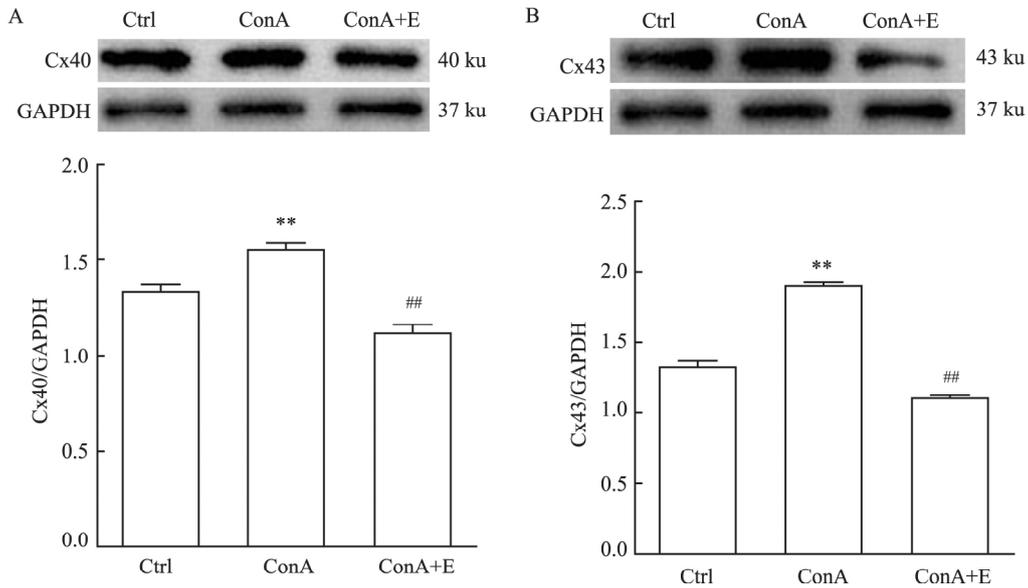


图3 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的蛋白表达

A: Cx40 的蛋白表达; B: Cx43 的蛋白表达; 与 Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$; 与 ConA 组比较: ## $P < 0.01$

的发生和发展过程中起关键作用^[9]。其中, IL-1 β 和 IL-6 能够促进淋巴细胞的增殖与分化, 促进免疫炎症反应。同时, 淋巴细胞在免疫反应中也发挥核心作用, 其活化、增殖及炎症因子的释放等细胞行为是免疫反应的基础和关键事件^[10]。另外, ConA 具有强力的促有丝分裂作用, 能够较好的促进淋巴细胞转化, 刺激淋巴细胞分泌炎症因子^[11]。本研究结果表明, 通过 ELISA 检测炎症因子表达水平, 使用 ConA 激活淋巴细胞后, 淋巴细胞释放 IL-1 β 和 IL-6 增多, 给予雌激素干预后, IL-1 β 和 IL-6 的浓度明显降低, 提示体外炎症模型制备成功, 并且 E 能够减少 ConA 刺激下炎症因子的分泌。

由 Cx 构成的缝隙连接通道作为细胞间进行物质交换和信息通讯的一种特殊膜通道结构, 直接介导细胞间的电和化学信号交流, 在细胞增殖分化以及机体新陈代谢中发挥重要作用。Vliagoftis et al^[5] 发现 Cx43 在外周血嗜酸性粒细胞上表达, 不仅定位于细胞质内, 而且存在于质膜上。本研究结果证实了淋巴细胞上表达有 Cx40 和 Cx43, 且 Cx40 主要表达在细胞质及细胞核, 而 Cx43 主要表达在细胞膜。此外, 研究^[12] 显示由 Cx40 和 Cx43 构成的缝隙连接通道参与免疫系统细胞间细胞通讯及免疫炎症应答。当免疫细胞受到炎症因子的刺激时, 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 表达可显著上调。本研究结果中也表明由 ConA 激活的淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达升高, 提示 Cx40 和 Cx43 可能参与了炎症反应。近年来研究^[13] 显示, E 可以抑制炎症反应, 对多种

脏器具有一定的保护作用。已有研究^[14] 表明, E 对多种组织细胞中 Cx43 的表达、分布、空间构象及功能状态等具有调节作用, 且具有调节缝隙连接的功能。本研究结果显示, 在 ConA 刺激下淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达上调, 给予 E 干预后, 淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达下降, 提示 E 的抗炎作用可能与下调淋巴细胞上的连接蛋白有关, 但它是如何通过下调淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 从而发挥抗炎作用的机制仍不十分清楚, 后续需要进一步探讨。

综上所述, 本研究结果证实淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达在 ConA 刺激下显著上调, 炎症因子水平升高, 给予 E 进行干预后, Cx40 和 Cx43 的表达下降, 炎症因子水平降低, 表明 E 能够抑制促炎因子 IL-1 β 和 IL-6 的释放, 同时下调淋巴细胞上 Cx40 和 Cx43 的表达, 从而改善炎症反应。这一研究对了解 Cx 参与淋巴细胞炎症反应具有一定的意义, 也为阐明 E 的抗炎机制及其临床治疗提供更多依据。

参考文献

- [1] Schiffrin E L. Inflammation, immunity and development of essential hypertension [J]. J Hypertens, 2014, 32(2): 228 - 9.
- [2] 张海超, 潘立君, 张亮等. T 淋巴细胞及连接蛋白 43 在自发性高血压和正常血压大鼠肾脏的表达差异 [J]. 中华高血压杂志, 2016, 24(5): 451 - 6.
- [3] 王爱, 张海超, 张亮等. 自发性高血压大鼠外周血 CD4⁺ / CD8⁺ T 淋巴细胞比率增加且连接蛋白 40(Cx40) 和炎症因子水平升高 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(2): 145 - 8, 152.

- [4] Takeuchi H, Suzumura A. Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 189.
- [5] Vliagoftis H, Ebeling C, Illaraza R, et al. Connexin 43 expression on peripheral blood eosinophils: role of gap junctions in transendothelial migration [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 803257.
- [6] Wang N, Sun L Y, Zhang S C, et al. MicroRNA-23a participates in estrogen deficiency induced gap junction remodeling of rats by targeting GJA1 [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(4): 390–403.
- [7] Tarhouni K, Guihot A L, Vessieres E, et al. Estrogens are needed for the improvement in endothelium-mediated dilation induced by a chronic increase in blood flow in rat mesenteric arteries [J]. *Vascular Pharmacol*, 2015, 80: 35–42.
- [8] Glass A M, Snyder E G, Taffet S M. Connexins and pannexins in the immune system and lymphatic organs [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(15): 2899–910.
- [9] Deng Y Q, Zhao H, Ma A L, et al. Selected cytokines serve as potential biomarkers for predicting liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis B patients with normal to mildly elevated aminotransferases [J]. *Medicine*, 2015, 94(45): e2003.
- [10] Yu H T, Park S, Shin E C, et al. T cell senescence and cardiovascular diseases [J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(3): 257–63.
- [11] Wang T, Men R, Hu M, et al. Protective effects of Punica granatum (pomegranate) peel extract on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 213–20.
- [12] Ni X, Wang A, Zhang L, et al. Up-regulation of gap junction in peripheral blood T lymphocytes contributes to the inflammatory response in essential hypertension [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184773.
- [13] Guo J M, Shu H, Wang L, et al. SIRT1-dependent AMPK pathway in the protection of estrogen against ischemic brain injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017, 23(4): 360–9.
- [14] Ren J, Wang X H, Wang G C, et al. 17 β estradiol regulation of connexin 43-based gap junction and mechanosensitivity through classical estrogen receptor pathway in osteocyte-like MLO-Y4 cells [J]. *Bone*, 2013, 53(2): 587–96.

Estrogen inhibits the release of IL-1 β and IL-6 and down-regulates the expression of Cx40 and Cx43 on lymphocytes

Wang Lu^{1,2}, Wang Ai^{1,3}, Yang Rui^{1,2}, et al

(¹Ministry-of-Education Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic High-Incidence Diseases,

²Dept of Physiology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000;

³Changji Hui Autonomous Prefecture People's Hospital, Changji 831100)

Abstract Objective To investigate the effects of estrogen (E) on the expression of connexin 40 (Cx40) and Cx43 on lymphocytes and the release of interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6). **Methods** Peripheral blood lymphocytes of the WKY rats were isolated and cultured from abdominal aorta, then divided into Control group, ConA group, and ConA + E group. The level of IL-1 β and IL-6 were detected by ELISA. Immunofluorescence technique was used to detect the expression and location of Cx40 and Cx43 on lymphocytes; flow cytometry was used to detect the expression of Cx40 and Cx43 on lymphocytes; expression of Cx40 and Cx43 on lymphocytes was detected by Western blot. **Results** The level of IL-1 β and IL-6 was higher in ConA group than Control group ($P < 0.01$), lower in ConA + E group than ConA group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Immunofluorescence results showed that Cx40 was mainly expressed in cytoplasm and nucleus of lymphocytes, while Cx43 was mainly expressed on the membrane of lymphocytes. The expression of Cx40 and Cx43 on lymphocytes was significantly higher in ConA group than Control group ($P < 0.01$), and lower in ConA + E group than ConA group ($P < 0.01$). The expression of Cx40 and Cx43 on lymphocytes was higher in ConA group than Control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and lower in ConA + E group than ConA group ($P < 0.05$). The protein expression of Cx40 and Cx43 on lymphocytes was significantly higher in ConA group than Control group ($P < 0.01$), significantly lower in ConA + E group than ConA group ($P < 0.01$). **Conclusion** Estrogen inhibits the release of IL-1 β and IL-6 from lymphocytes and down-regulates the expression of Cx40 and Cx43 on lymphocytes, suggesting that Cx40 and Cx43 on lymphocytes may be involved in the anti-inflammatory effect of E.

Key words inflammation; lymphocytes; connexin; estrogen; concanavalin A