

# 雌激素缺乏对心肌衰老、凋亡和心功能的影响

严 翼 张 浩 杨志健 苗登顺 张定国

**摘 要** **目的** 通过手术去除双侧卵巢建立更年期小鼠模型探讨雌激素缺乏对心脏衰老、凋亡和心功能的影响,并讨论相关机制。**方法** 取 8 周龄雌性 C57/BL6 小鼠 20 只,按随机数字表法分为去卵巢组 (OVX group) 和假手术对照组 (control group) (每组各 10 只)。去卵巢组通过手术去除双侧卵巢建立更年期模型。术后 6 个月行心脏超声 (以下简称心超) 检测评估心功能,心肌组织取材进行组织学检测和衰老、凋亡等相关指标检测。**结果** 与对照组比较,OVX 组小鼠心肌纤维化和心/体重比均明显升高。二维心超结果显示 OVX 组小鼠较对照组小鼠室间隔厚度、舒张期左心室内径和容量显著增高。与对照组比较,OVX 组小鼠  $\beta$ -gal 阳性细胞率明显增加,P16、P19 表达显著上调,而 SIRT1、Bmi-1 等抗衰老指标显著降低。与对照组比较,OVX 组小鼠凋亡指标 Bax、caspase-3 等表达显著增加,抗凋亡指标 Bcl-2 表达明显降低。与对照组比较,OVX 组小鼠抗氧化指标 SOD1、SOD2 表达均显著下降。**结论** 雌激素缺乏能够促进心肌纤维化、导致心肌细胞衰老和凋亡,其主要机制可能与降低 SIRT1 和 Bmi-1 的表达促进氧化应激等多种因素相关。

**关键词** 雌激素 心脏 衰老 凋亡

**中图分类号** R541.3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.026

**Research of Estrogen Deficiency on Myocardial Aging, Apoptosis and Cardiac Function.** Yan Yi, Zhang Hao, Yang Zhijian, et al. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu 210029, China

**Abstract** **Objective** To investigate the effects and mechanism of estrogen on heart aging, apoptosis and cardiac function by establishing the menopause model through removing bilateral ovaries. **Methods** A total of 20 eight-weeks-old female C57/BL6 mice were randomly divided into ovariectomized group (OVX group) and sham operated group (control group) ( $n=10$ ). Bilateral ovaries were removed to establish the menopause model. Six months later, cardiac function was assessed by echocardiography, and the myocardial tissue was collected to testing the aging and apoptosis indicators. **Results** Compared with the control group, OVX group showed a definite increase in myocardial fibrosis and heart/body weight ratio. Echocardiography showed that IVS, EDV and LVIDd were higher than those in the control group. In OVX group, the beta-gal positive cell rate and the expression of P16, P19 were increased significantly, while SIRT1, Bmi-1 and other anti-aging indicators reduced profoundly, when compared with those in control group. At the same time, the expression of Bax, caspase-3 in OVX group increased significantly, whereas the expression of anti-apoptotic index Bcl-2 reduced markedly, when compared with those in control group. Furthermore, the expression of the antioxidant index SOD1 and SOD2 in OVX group decreased notably when compared with control group. **Conclusion** Lack of estrogen can promote ventricular wall hypertrophy, increase myocardial fibrosis, accelerate the cell aging and apoptosis, which may be related to decreasing the expression of SIRT1 and Bmi-1, promoting the oxidative stress.

**Key words** Estrogen; Heart; Aging; Apoptosis

衰老指在正常状况下,随年龄的增加,自身组织结构逐步发生退行性变化,机体器官的机能减退,内环境自稳能力减弱、对内外环境损伤因素的抵抗力降低,趋向死亡的自然现象<sup>[1]</sup>。随着衰老的进展,一系列疾病如心脑血管疾病、糖尿病、骨质疏松、神经退行性疾病的发生率和病死率呈上升趋势,衰老被认为是这些疾病的独立危险因素<sup>[2]</sup>。而

雌激素被认为是女性的“保护伞”。女性进入绝经期后,卵巢功能衰退导致体内雌激素水平迅速降低,促进衰老进程发展,引起心血管疾病的发生<sup>[3]</sup>。本实验主要通过对小鼠去卵巢手术,模拟雌激素缺乏模型,探讨雌激素缺乏后对心血管系统衰老、凋亡和心功能的影响。

## 材料与方法

1. 实验动物:本实验使用体重约 25g 的 8 周龄雌性 C57/BL6 小鼠,均由南京医科大学 SPF 级实验动物中心饲养。实验动物许可证号为 SYXK(苏)2016-

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院(严翼、张浩、杨志健、张定国);南京医科大学(苗登顺)

通讯作者:张定国,电子信箱:zhdg0223@126.com

0016。动物中心相对湿度 50% ~ 70% ,光照 12h 昼夜循环,室内平均温度 20℃。全程自由饮水、摄食,单笼颗粒型饲料喂养。

2. 去卵巢动物模型建立:2% 水合氯醛 40mg/kg (体重)腹腔注射麻醉,消毒皮肤。自腰椎背部正中线向下做纵行切口约 0.5cm,可见两侧肾脏下淡粉红色的卵巢及相连子宫角,在子宫角上结扎后切断子宫角,摘除卵巢,缝合皮肤。假手术对照组仅开腹,但不切断子宫角及切除卵巢。术后常规饲养,自由摄食和饮水。

3. 心脏功能检测:术后 6 个月,小鼠用 2% 水合氯醛 40mg/kg 剂量麻醉,胸部脱毛,通过高频超声图像系统检测左室舒张末期容量 (EDV)、左心室收缩末期容量 (ESV)、左心室舒张末内径 (LVIDd)、左心室收缩期内径 (LVIDs)、室间隔收缩末期厚度 (IVSd) 以及室间隔舒张末期厚度 (IVSs),并计算左心室短轴缩短率 (LVFS)、左心室射血分数 (LVEF),计算公式为  $LVEF = (EDV - ESV) / EDV \times 100\%$ ,  $LVFS = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100\%$ 。每个参数测量 3 次并且记录平均值。术后 6 个月,分别称量每只小鼠的体重。随后处死小鼠,并称量心脏重量,计算心重比,公式为心重比 = 心脏重量/体重。

4. Masson 染色和总胶原 (T - Col) 染色:取小鼠

心脏固定,常规制成石蜡切片。经脱蜡、水化后,分别采用 Masson 染色和苦味酸直红染液,漂洗后苏木素复染,脱水封片后于显微镜下观察和图像采集。

5. 免疫组织化学染色:心脏标本常规脱蜡、水化、羊血清封闭后,加一抗稀释液,放于 4℃ 冰箱内孵育过夜。摇洗后依次加入二抗、生物素 - 辣根过氧化物酶试剂、DAB 显色液,将切片置苏木素染色液中复染后封片,置于显微镜下观察和图像采集。

6. 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测和实时荧光定量 PCR (Real - time PCR):将小鼠心脏组织提蛋白,行蛋白电泳后,依次经转膜、封闭、一抗孵育过夜、漂洗、二抗孵育后显影。将小鼠心脏组织提取 RNA,反转录得到 cDNA,加入不同引物体系进行检测。

7. 统计学方法:用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,所有实验所采集到的数据都用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验,均为双侧检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. 雌激素缺乏对小鼠心脏结构的影响:采用 Masson 染色和总胶原染色观察心肌纤维化和胶原聚集,结果显示与假手术对照组比较,OVX 组心肌纤维化和胶原聚集明显 (图 1 A 和 B)。RT - PCR 检测表

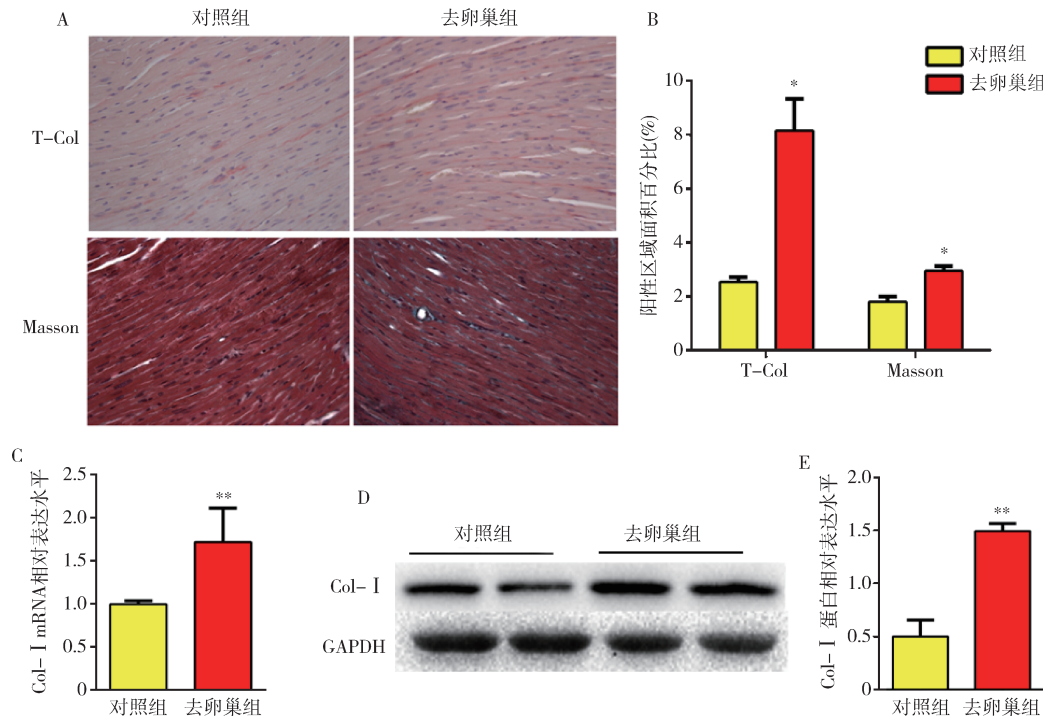


图 1 雌激素缺乏加速心肌纤维化和胶原聚集

A. 总胶原染色、Masson 染色显微图像 (×400);B. 总胶原染色、Masson 染色阳性面积统计图 (总胶原:对照组 2.541 ± 0.090,OVX 组 8.156 ± 0.592;Masson:对照组 1.807 ± 0.099;OVX 组 2.951 ± 0.090);C. I 型胶原 mRNA 表达水平统计图;D. I 型胶原蛋白表达水平;E. I 型胶原蛋白相对表达量统计图;与对照组比较,\*  $P = 0.000$ ,\*\*  $P < 0.01$

明,OVX 组 I 型胶原(Col - I)mRNA 水平较对照组显著增加(图 1C)。此外,Western blot 法检测结果证实,OVX 组 I 型胶原的蛋白表达水平也明显增加(图 1D 和 E)。

2. 雌激素缺乏对心功能的影响:手术后 6 个月,二维心超检测表明,与对照组比较,OVX 组室间隔厚度、舒张期左室内径和容量显著增高(表 1,图 2)。同时,与对照组比较,OVX 组心比重增加(OVX 组  $5.834 \pm 0.307 \text{ mg/g}$ , 对照组  $4.511 \pm 0.265 \text{ mg/g}$ ,

表 1 两组之间心功能比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 项目                    | 对照组                | 去卵巢组                    |
|-----------------------|--------------------|-------------------------|
| IVSd (mm)             | $0.694 \pm 0.046$  | $0.761 \pm 0.064^{**}$  |
| IVSs (mm)             | $1.064 \pm 0.075$  | $1.141 \pm 0.087^{*}$   |
| LVIDd (mm)            | $3.343 \pm 0.258$  | $3.613 \pm 0.365^{*}$   |
| LVIDs (mm)            | $2.276 \pm 0.368$  | $2.510 \pm 0.408$       |
| LVEF (%)              | $61.304 \pm 8.805$ | $59.167 \pm 7.303$      |
| LVFS (%)              | $32.313 \pm 6.139$ | $30.886 \pm 4.835$      |
| EDV ( $\mu\text{l}$ ) | $45.935 \pm 8.560$ | $55.727 \pm 13.630^{*}$ |
| ESV ( $\mu\text{l}$ ) | $18.394 \pm 7.256$ | $23.512 \pm 9.595$      |

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

$P < 0.01$ ), 心室明显肥厚。但两组之间射血分数和左心室短轴率比较,差异无统计学意义(表 1)。

3. 雌激素对小鼠心肌凋亡的影响:为明确雌激素缺乏是否影响心肌细胞的凋亡,采用免疫组织化学染色方法观察 caspase - 3 阳性细胞百分率。与对照组比较,OVX 组 caspase - 3 阳性细胞百分率显著增加(图 3A 和 B)。同时,分别运用 RT - PCR 和 Western blot 法检测 Bcl - 2、Bax、caspase - 3、TNF -  $\alpha$  等凋亡相关因子 mRNA 水平和蛋白表达量的改变。OVX 组 caspase - 3 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加与免疫组化结果一致。同时,OVX 组抗凋亡指标 Bcl - 2 显著减少,而 Bax、TNF -  $\alpha$  等促凋亡指标显著增加(图 3C ~ E)。

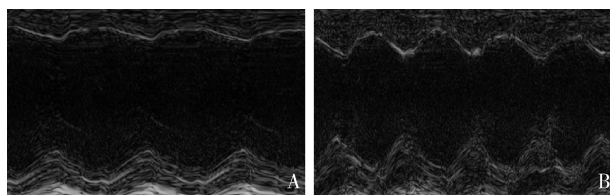


图 2 具有代表性的二维超声

A. 对照组; B. 去卵巢组

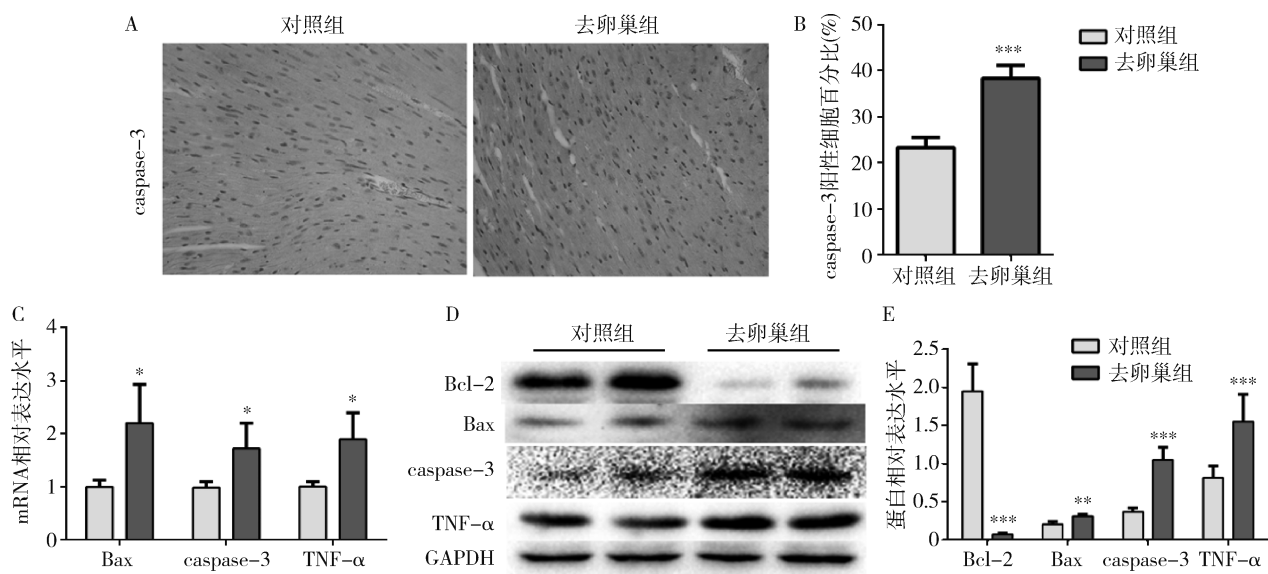


图 3 雌激素缺乏增加心肌的凋亡

A. caspase - 3 免疫组织化学染色显微图像 ( $\times 400$ ); B. caspase - 3 免疫组织化学染色阳性细胞率统计图(对照组  $23.27\% \pm 1.142\%$ , OVX 组  $38.41\% \pm 1.382\%$ ); C. 凋亡相关 mRNA 表达水平统计图; D. 凋亡相关蛋白表达水平; E. 凋亡相关蛋白相对表达量统计图;与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P = 0.000$

4. 雌激素缺乏对心肌衰老的影响:为明确雌激素缺乏是否促进心肌细胞衰老,采用免疫组织化学染色方法观察  $\beta$  - gal 阳性细胞百分率,采用 Western blot 法检测衰老相关 p16、p19、Bmi - 1 和 SIRT1 的表达情

况。结果显示,与对照组比较,OVX 组  $\beta$  - gal 阳性细胞数明显增加(图 4A 和图 4B)。与之相一致的是, p16、p19 表达上升,而 Bmi - 1 和 SIRT1 表达降低(图 4C 和图 4D)。

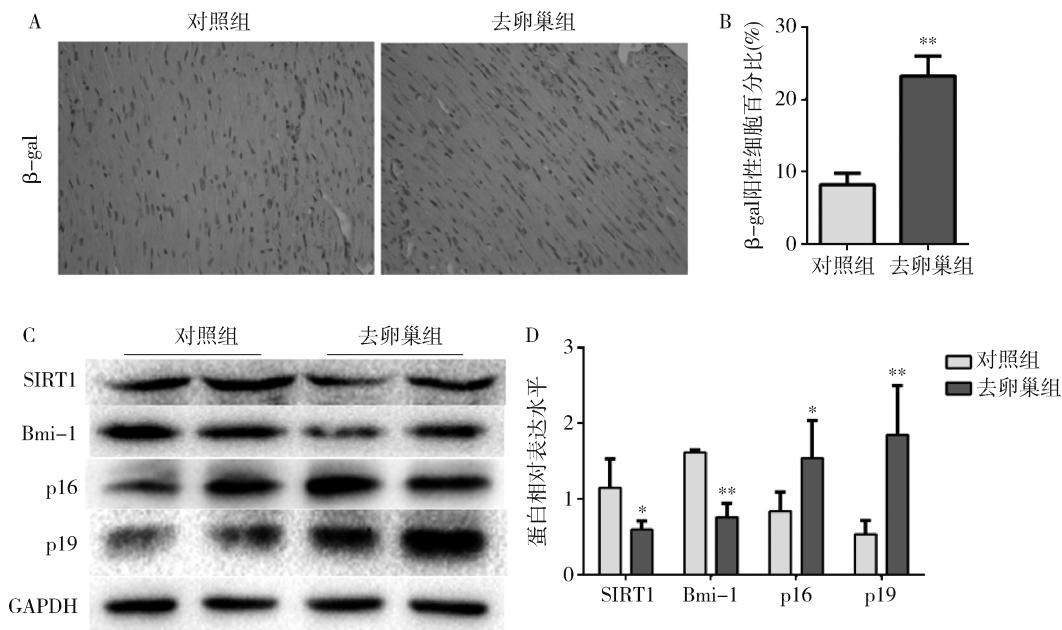


图4 雌激素缺乏加速心机的衰老

A. β - gal 免疫组织化学染色显微图像 (×400); B. β - gal 免疫组织化学染色阳性细胞率统计图 (对照组 8.157 ± 0.799, OVX 组 23.230 ± 1.373); C. 衰老相关蛋白表达水平; D. 衰老相关蛋白相对表达量统计图; 与对照组比较, \* P < 0.05, \*\* P = 0.000

5. 雌激素缺乏对心肌抗氧化能力的影响: 雌激素缺乏是否增加了氧化应激, 导致心肌细胞抗氧化能力减弱, 加速细胞衰老和损伤。分别用 RT - PCR 和 Western blot 法检测了抗氧化应激相关指标 SOD1、

SOD2 的表达。结果显示与对照组比较, OVX 组 SOD1 和 SOD2 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 (图 5)。

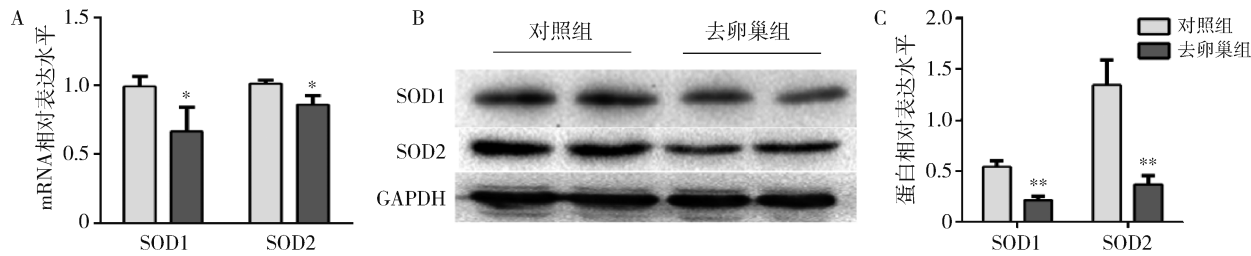


图5 雌激素缺乏后心肌抗氧化应激能力减弱

A. 抗氧化应激 SOD1、SOD2mRNA 表达水平统计图; B. 抗氧化应激 SOD1、SOD2 蛋白表达水平; C. 抗氧化应激 SOD1、SOD2 蛋白相对表达量统计图; 与对照组比较, \* P < 0.05, \*\* P = 0.000

讨 论

更年期的开始标志着女性机体衰老进程加速的开始<sup>[4]</sup>。雌激素的缺乏会降低血管弹性, 引起脂代谢紊乱, 增加心血管疾病如动脉粥样硬化、脑卒中、冠心病、心力衰竭等发生的风险。既往研究表明雌激素通过与雌激素受体 (ER) 结合进而激活目的基因表达, 达到延缓衰老的目的<sup>[5]</sup>。在心血管系统中, 雌激素可通过经典核 ER 亚型和膜 G 蛋白偶联雌激素受体 (GPER) 等受体途径介导的基因和非基因信号调节通路、靶向心血管系统发挥保护作用<sup>[6, 7]</sup>。近年来

Mahmoodzadeh 等<sup>[8]</sup>的研究表明, 雌激素可通过调节细胞外基质蛋白的表达, 抑制心室重塑及左室扩张。雌激素可抑制雌性大鼠成纤维细胞的增殖和 I 型、III 型胶原蛋白的基因表达。本研究采用 Masson 染色和总胶原染色证实雌激素缺乏会引起心肌胶原的聚集和心肌纤维化程度的增加, 而且 RT - PCR 和 Western blot 法检测结果进一步从 mRNA 和蛋白表达水平证实, OVX 组心肌胶原水平较对照组显著增加。既往研究显示, 心肌胶原增加会导致心功能的改变, 本研究中, 采用二维心脏超声检查了小鼠心功能相关指

标。结果表明,OVX 小鼠 6 个月后舒张功能较假手术组显著减退,但左心室射血分数没有明显改变。本研究提示,雌激素缺乏后主要导致心脏舒张功能减退为主,对收缩功能影响不大。

雌激素的缺乏会导致机体活性氧自由基的生成增加从而增加内源性氧化损伤,诱导线粒体功能改变,加快细胞凋亡进程,加速机体衰老<sup>[9]</sup>。本研究结果证实,雌激素缺乏会降低小鼠心脏 SOD1、SOD2 等抗氧化酶的表达。笔者推测,正是这些抗氧化酶的减少,从而导致 OVX 小鼠心肌细胞的损伤,从而促进心肌细胞的衰老和凋亡。

Bmi-1 基因是聚梳蛋白复合体 Polycomb 家族成员之一,Bmi-1 基因能够通过转录抑制 p16Ink4a/p19Arf 信号通路,防止细胞衰老,维持机体干细胞和红细胞自我更新能力<sup>[10, 11]</sup>。此外,Bmi-1 还能够通过维持线粒体功能和维持氧化还原平衡,防止 DNA 损伤,延缓衰老<sup>[12]</sup>。本实验室先前的研究表明雌激素缺乏会降低 Bmi-1 的表达、增加氧化应激水平从而导致骨量流失<sup>[13]</sup>。哺乳动物沉默调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1) 与细胞衰老、基因沉默、基因组稳定性以及能量代谢等密切相关<sup>[14]</sup>。SIRT1 的激活能够减轻机体氧化应激的损伤和线粒体功能障碍<sup>[15]</sup>。既往研究表明 SIRT1 和糖尿病、阿尔茨海默病、心血管病等多种疾病的病理机制相关<sup>[16-19]</sup>。雌激素可以通过多种途径上调 SIRT1 从而延缓机体衰老。本研究进一步证实雌激素缺乏会降低 SIRT1 和 Bmi-1 的表达,增加心肌细胞的氧化应激水平从而加速心肌细胞的衰老。

综上所述,本研究结果表明,OVX 小鼠后由于雌激素缺乏,从而导致抗氧化酶作用减低,促进心肌细胞胶原沉积,心肌细胞衰老和凋亡增加,心肌功能减退。

#### 参考文献

- Poulouse N, Raju R. Aging and injury: alterations in cellular energetics and organ function[J]. *Aging Dis*, 2014,5(2):101-108
- Florencio GL, Goncalves AK, Canario AC, *et al*. Aging: a reflection about physical activity and oxidative stress in women[J]. *Acta Med Portuguesa*, 2011,24(Suppl 4):983-988
- Sitruk-Ware R. Estrogen, hormonal therapy and Aging[J]. *Bulletin de l'academie nationale de medecine*, 2015,199(2-3):355-361
- Schoenaker DA, Jackson CA, Rowlands JV, *et al*. Socioeconomic position, lifestyle factors and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents[J]. *Int J Epidemiol*, 2014,43(5):1542-1562
- Burns KA, Korach KS. Estrogen receptors and human disease: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2012,86(10):1491-1504
- Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function[J]. *Vascular Pharmacol*, 2011,55(1-3):17-25
- Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014,389(1-2):71-83
- Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, *et al*. 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts[J]. *Cardiovas Res*, 2010,85(4):719-728
- Gupte AA, Pownall HJ, Hamilton DJ. Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function[J]. *J Diabetes Res*, 2015,2015:916585
- Mas-Bargues C, Vina-Almunia J, Ingles M, *et al*. Role of p16 (INK4a) and BMI-1 in oxidative stress-induced premature senescence in human dental pulp stem cells[J]. *Redox Biol*, 2017,12:690-698
- Kim AR, Olsen JL, England SJ, *et al*. Bmi-1 regulates extensive erythroid self-renewal[J]. *Stem Cell reports*, 2015,4(6):995-1003
- Griffith J, Andrade D, Mehta M, *et al*. Silencing BMI1 radiosensitizes human breast cancer cells by inducing DNA damage and autophagy[J]. *Oncol Rep*, 2017,37(4):2382-2390
- Li J, Wang Q, Yang R, *et al*. BMI-1 mediates estrogen-deficiency-induced bone loss by inhibiting reactive oxygen species accumulation and T cell activation[J]. *J Bone Mineral Res*, 2017,32(5):962-973
- Lv L, Shen Z, Zhang J, *et al*. Clinicopathological significance of SIRT1 expression in colorectal adenocarcinoma[J]. *Med Oncol*, 2014,31(6):965
- Cheng Y, Di S, Fan C, *et al*. SIRT1 activation by pterostilbene attenuates the skeletal muscle oxidative stress injury and mitochondrial dysfunction induced by ischemia reperfusion injury[J]. *Apoptosis*, 2016,21(8):905-916
- Aditya R, Kiran AR, Varma DS, *et al*. A review on sirtuins in diabetes[J]. *Curr Pharmaceut Design*, 2017,23(16):2299-2307
- Li H, Wang R. Blocking SIRT1 inhibits cell proliferation and promotes aging through the PI3K/AKT pathway[J]. *Life Sci*, 2017,190:84-90
- Ma L, Li Y. SIRT1: role in cardiovascular biology[J]. *Int J Chem*, 2015,440:8-15
- Maiese K. SIRT1 and stem cells: in the forefront with cardiovascular disease, neurodegeneration and cancer[J]. *World J Stem Cells*, 2015,7(2):235-42

(收稿日期:2018-01-06)

(修回日期:2018-01-19)