

# NE 激活 Nrf2/HO-1 信号通路 调节人子宫内膜上皮细胞的氧化应激

杨雪<sup>1,3\*</sup>, 马瑞欣<sup>1,4\*</sup>, 李佳鑫<sup>1</sup>, 孔雪瑞<sup>1</sup>, 李军平<sup>1</sup>, 罗彦<sup>1,2</sup>

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.004

**摘要** 目的 明确去甲肾上腺素(NE)是否能通过核因子E2相关因子2(Nrf2)和血红素加氧酶-1(HO-1)调控培养的人子宫内膜上皮细胞(hEECs)的氧化应激状态。方法 培养hEECs,通过逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)检测 $\alpha$ 和 $\beta$ 肾上腺素能受体在hEECs的表达;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)实验确定NE处理对细胞活性的影响,根据结果将细胞分为处理组和对照组,选择合适浓度进行处理;通过Western blot实验,检测闭锁蛋白(Occludin),闭锁小带蛋白-1(ZO-1),凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),抗氧化应激蛋白Nrf2、HO-1的表达,流式细胞术检测NE处理后细胞凋亡的情况;酶联免疫吸附试验试剂盒(ELISA)检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的水平。结果 在hEECs上检测到 $\alpha 1 a$ 、 $\alpha 1 b$ 、 $\alpha 2 a$ 、 $\alpha 2 b$ 、 $\alpha 2 c$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 肾上腺素能受体的表达。NE处理后,在低浓度(5、10  $\mu\text{mol/L}$ )不明显影响细胞活力,而15、20  $\mu\text{mol/L}$  NE处理细胞6 h或24 h均明显增加细胞活性。紧密连接蛋白ZO-1和Occludin在15  $\mu\text{mol/L}$  24 h处理组显著升高。ZO-1在6 h处理组下降,15  $\mu\text{mol/L}$ 处理显著下降,同时Occludin在6 h处理组升高。NE处理后与对照相比,细胞凋亡率升高,15  $\mu\text{mol/L}$  NE处理细胞6 h凋亡率显著升高,处理24 h后细胞凋亡率有所下降,凋亡相关蛋白Bcl-2/Bax > 1。NE处理后,上调Nrf2及HO-1,细胞培养基上清液中的MDA水平没有明显升高,同时SOD水平明显上调。结论 NE处理细胞后可通过激活Nrf2/HO-1信号,上调SOD,发挥抗氧化应激、抗凋亡的作用。

**关键词** 去甲肾上腺素;Nrf2;HO-1;人子宫内膜上皮细胞;ZO-1;Occludin;Bax;Bcl-2

**中图分类号** R 339.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0767-07

2023-12-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760265);宁夏自然科学基金(编号:2023AAC03218)

作者单位:<sup>1</sup>宁夏医科大学基础医学院,银川 750000

<sup>2</sup>肇庆医学高等专科学校基础医学院,肇庆 526000

<sup>3</sup>宁夏医科大学附属吴忠市人民医院眼科,吴忠 751100

<sup>4</sup>中南大学湘雅医院老年医学科,长沙 410000

作者简介:杨雪,女,硕士研究生;

罗彦,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wyxsh@hotmail.com

\* 对本文具有同等贡献

应激会引起机体产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致氧化还原失衡,进而引起炎症及其他细胞功能紊乱,而很多女性生殖系统疾病均和氧化应激有关,例如子宫内膜异位症,多发性流产等<sup>[1]</sup>。去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)是重要的应激激素,其水平在应激时明显升高,在猪的发炎的子宫内膜,NE可通过特定的 $\alpha$ 及 $\beta$ 肾上腺素能受体亚型调控炎性介质前列腺素E2的合成<sup>[2]</sup>,或参与子宫收缩性的调控<sup>[3]</sup>,但NE如何影响正常人子宫内膜上皮细胞(human endometrial epithelial cells, hEECs)内的氧化应激情况还不清楚。对于氧化应激,核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是重要的抗氧化应激通路,细胞内炎症发生,ROS增加,都可促使Nrf2核转录增加,上调HO-1,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及其他抗氧化酶。有研究<sup>[4]</sup>表明NE可明显上调棕色脂肪细胞中的HO-1的表达。该研究旨在探究在NE是否能够激活Nrf2/HO-1信号调控正常hEECs的氧化应激反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** 正常hEECs购自北京北纳创联生物技术研究院。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 10%胎牛血清购自美国Clark Bioscience公司(cat. no. FB 35015);100 U/ml青霉素和100  $\mu\text{g/ml}$ 链霉素购自北京索莱宝科技有限公司(cat. no. T 1350);培养基为DMEM/F12购自上海达特希尔生物科技有限公司;总RNA提取试剂盒、一步法逆转录试剂盒购自北京天根生化科技有限公司(cat. #DP419, cat. KR118-02);Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司(cat. no. BB-4101-100 T);Cyt-oFLEX流式细胞仪购自美国Beckman公司;BCA全

蛋白提取试剂盒、凯基 BCA 蛋白含量检测试剂盒购自南京凯基生物发展有限公司 (cat. no. KGP 250, cat. no. KGPBCA); 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、SOD 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所 (cat. no. A00 3-1-1, cat. no. A001-3-2); 小鼠抗 Nrf2 抗体购自美国 Santa cruz 公司 (cat. no. sc-365949, 1:800); 兔抗 HO-1 抗体、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体、兔抗 B 细胞淋巴瘤-2 蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体购自美国 Proteintech 公司 (cat. no. 10701-1-AP, 1:3 000, cat. no. 50500-2-1 g, 1:3 000, cat. no. 12789-1-AP, 1:2 000), 兔抗 闭锁蛋白 (Occludin) 抗体购自美国 Abcam 公司 (cat. no. ab 216327, 1:1 000), 兔抗 闭合小带蛋白-1 (Zonula Occludens-1, ZO1) 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司 (cat. no. bs1329R, 1:500), 过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗和兔抗  $\beta$ -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司 (cat. no. ZB 2301, 1:5 000, cat. no. ZB 2305, 1:5 000, cat. no. TA 09, 1:1 000)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 hEECs 细胞用含 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM/F 12 培养基常规培养。待细胞生长至 80% ~ 90% 融合度时进行传代, 第 2 ~ 15 代细胞用于后续实验。

1.2.2 RT-PCR 实验检测肾上腺素能受体的表达 常规培养 hEECs 细胞至细胞融合至 90% ~ 100% 时, 提取细胞 RNA, 逆转录之后, 在 98  $^{\circ}$ C 初始变性 30 s 后, 进行了 35 个 PCR 循环 (98  $^{\circ}$ C 持续 10 s, 51  $^{\circ}$ C 持续 30 s, 72  $^{\circ}$ C 持续 2 min), 然后在 72  $^{\circ}$ C 最后延伸 2 min。在用 Gelred 染色的 2% 琼脂糖凝胶上, 由负极向正极 100 V, 32 min 电泳后观察 PCR 产物, 并使用 700 bp DNA Ladder 作为 DNA 标记, 在化学发光凝胶成像系统中观察结果。引物序列<sup>[5]</sup>见表 1。

1.2.3 CCK-8 检测实验 常规培养 hEECs, 待细胞贴壁生长至对数生长期后, 消化细胞计数并接种于 96 孔板内 (5  $\times$  10<sup>3</sup> 个/孔) 继续培养至贴壁后, 弃去旧的培养基后, 加入含有终浓度为 0、5、10、15、20  $\mu$ mol/L 的 NE 的完全培养基分别培养细胞 6、24 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值 (OD), 运用 CCK-8 法检测 NE 对细胞活性的影响。细胞增殖活性以细胞存活率表示, 细胞存活率 (%) = (OD<sub>实验组</sub> - OD<sub>空白组</sub>) / (OD<sub>对照组</sub> - OD<sub>空白组</sub>)  $\times$  100%。

1.2.4 流式细胞术实验检测 NE 处理后细胞凋亡率 常规培养 hEECs, 待细胞贴壁生长至融合度为

表 1 PCR 引物信息

基因	序列 (5'-3')	bp
$\alpha$ 1 a	F: ATGCTCCAGCCAAGAGTTCA	20
	R: TCCAAGAAGAGCTGGCCTTC	20
$\alpha$ 1 b	F: CTGTGCGCCATCTCCATCGATCGCTAC	27
	R: ATGAAGAAGGGTAGCCAGCACAAAGATGAA	29
$\alpha$ 1 d	F: CTATTCATCGTGAACCTGG	20
	R: TCGGTGATACCGCAGAAGCG	20
$\alpha$ 2	F: CTCTTCTGCTGTCTCTGCG	20
	R: GGTTGACTCGATGGCCTGT	20
$\alpha$ 2 a	F: CTCTTCTGCTGTCTCTGCG	20
	R: GGTTGACTCGATGGCCTGT	20
$\alpha$ 2 b	F: CCTGGCCTCCAGCATCGGAT	20
	R: ATGACCACAGCCAGCAGCAA	20
$\alpha$ 2 c	F: GTGGTGATCGCCGTGCTGAC	20
	R: CGTTTTCGGTAGTCGGGGAC	20
$\beta$ 1	F: CTAATTCCTCTGTGTG	17
	R: GATTGTGCTTCATTGCTATT	20
$\beta$ 2	F: CTTGAGGGTAATAAACTTAG	20
	R: GAGGAACTGAACTGTA	16
$\beta$ 3	F: GCTTGGGTTGCTCAAATG	18
	R: GGAAGGTAGAGTTGTGG	18

80% ~ 90% 时, 消化细胞, 并按照 1 传 5 进行细胞传代至 6 cm 的培养皿, 将细胞分为对照组, 6 h 5  $\mu$ mol/L 处理组, 6 h 15  $\mu$ mol/L 处理组, 24 h 5  $\mu$ mol/L 处理组及 24 h 15  $\mu$ mol/L 处理组, 待细胞贴壁生长至融合度为 60% ~ 70% 时, 分别加入终浓度为 5 和 15  $\mu$ mol/L 的 NE 继续培养 24 h; 待细胞贴壁生长至融合度为 70% ~ 80% 时, 分别加入终浓度为 5 和 15  $\mu$ mol/L 的 NE 继续培养 6 h。按照流式细胞检测试剂盒操作步骤进行后续实验, 并在流式细胞仪上进行检测分析。

1.2.5 Western blot 实验 培养及处理细胞后, 收集细胞培养基并在 4  $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 5 min 后, 分装上清培养基并放入 -80  $^{\circ}$ C 保存。PBS 清洗细胞 2 次后, 按照一个直径 6 cm 的培养皿加入 0.5 ml 0.25% 的胰酶消化细胞, 离心后 PBS 清洗重悬, 再离心后加入适量裂解液提取细胞全蛋白, 操作流程按照 BCA 全蛋白提取试剂盒进行。根据试剂盒进行蛋白定量后, 总上样蛋白 40  $\mu$ g 通过 5% 浓缩胶, 10% 分离胶进行电泳, 转膜, 封闭后, 分别进行 1 抗孵育: 小鼠抗 Nrf2, 兔抗 HO-1, Bax, Bcl-2, Occludin, 兔抗  $\beta$  肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 分别 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗室温孵育 1 h。

1.2.6 检测细胞培养基上清液中 SOD 和 MDA 含量 常规培养及处理细胞后, 收集细胞培养基上清液, 1 000 r/min、5 min 离心, 取上清液 -80  $^{\circ}$ C 保存

备用。MDA、SOD 测定分别根据试剂盒说明书进行。

**1.3 统计学处理** 通过 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, Nrf2、HO-1、ZO-1、Occludin、Bcl-2/Bax 表达结果以内参基因  $\beta$ -actin 作为参照,多组间比较采用单因素方差分析方法或双因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肾上腺素能受体在培养的 hEECs 上的表达

RT-PCR 检测肾上腺素能受体亚型在培养的 hEECs 上的表达,如图 1 所示,在 hEECs 上,检测到  $\alpha 1$  a、 $\alpha 1$  b、 $\alpha 2$  a、 $\alpha 2$  b、 $\alpha 2$  c、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$  肾上腺素能受体的表达。

**2.2 NE 处理对 hEECs 活力的影响** 随着培养时间的延长,hEECs 正常增殖(图 2A)。与对照组比较 5、10  $\mu\text{mol/L}$  NE 处理细胞对细胞增殖活性的影响差异无统计学意义。15、20  $\mu\text{mol/L}$  NE 处理 hEECs 细胞 6、24 h 后,细胞增殖活性显著增加(图 2B)。

**2.3 NE 处理对 hEECs 上紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的影响** Western blot 结果显示,不同浓度 NE 处理细胞不同时间后影响 ZO-1 和

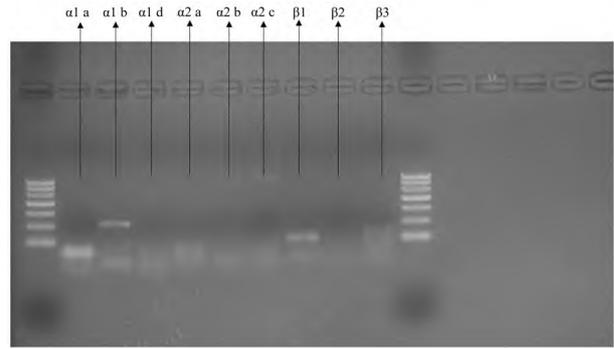


图 1 hEECs 上肾上腺素能受体的表达

Occludin 的表达(图 3A),半定量分析显示,紧密连接蛋白 ZO-1 在 6 h 处理组下降,15  $\mu\text{mol/L}$  NE 处理后显著下降(图 3B 和表 2),Occludin 在 6 h 处理组升高,但差异无统计学意义(图 3C 和表 2)。而 NE 15  $\mu\text{mol/L}$  处理细胞 24 h 后显著上调 ZO-1 和 Occludin (图 3B、3C 和表 2)。

**2.4 NE 处理对 hEECs 细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达的影响** 不同浓度 NE 分别处理 hEECs 6 h 和 24 h 后可以看到与对照组相比,细胞凋亡率是升高的,其中 15  $\mu\text{mol/L}$  处理 6 h 组与对照相比差异有统计学意义。检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 的表达,结果显示蛋白相对表达量 Bcl-2/Bax 大于

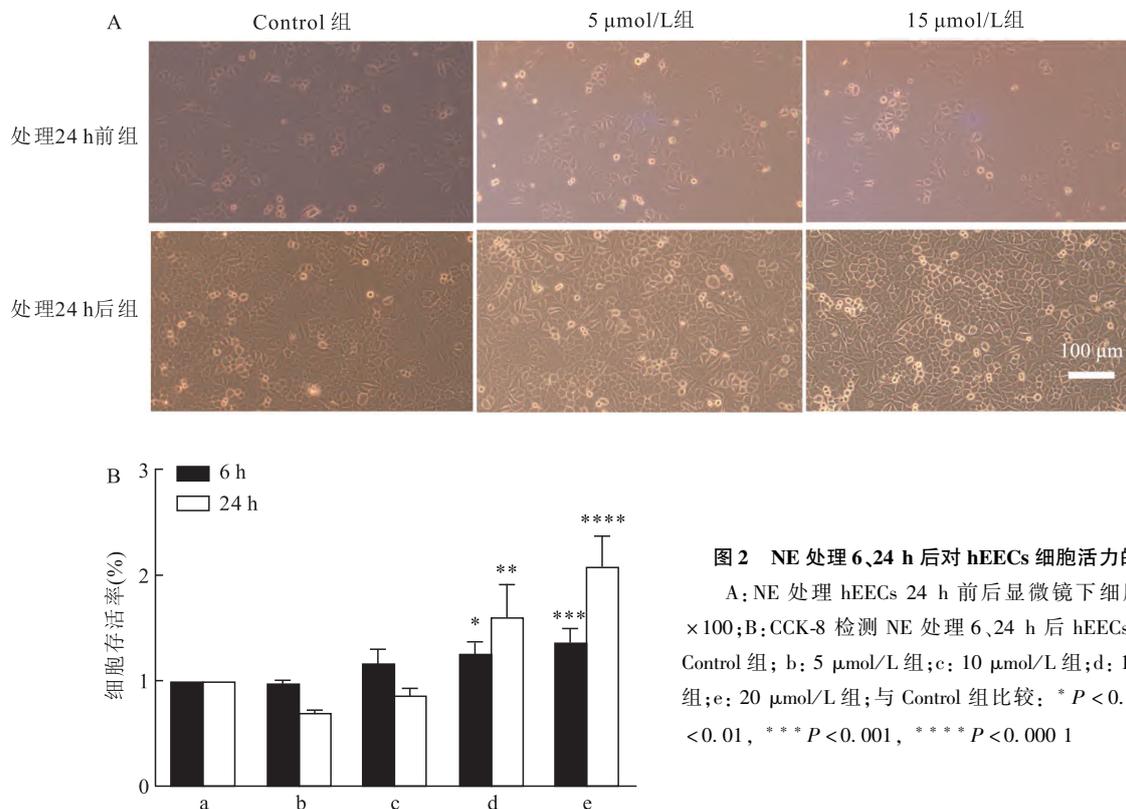


图 2 NE 处理 6、24 h 后对 hEECs 细胞活力的影响

A: NE 处理 hEECs 24 h 前后显微镜下细胞对比图  $\times 100$ ; B: CCK-8 检测 NE 处理 6、24 h 后 hEECs 活性; a: Control 组; b: 5  $\mu\text{mol/L}$  组; c: 10  $\mu\text{mol/L}$  组; d: 15  $\mu\text{mol/L}$  组; e: 20  $\mu\text{mol/L}$  组;与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

表2 不同浓度 NE 处理人子宫内膜上皮细胞不同时间后的相关因子表达 (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	重复次数	6 h		24 h		F 值	P 值
		5 $\mu\text{mol/L}$	15 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	15 $\mu\text{mol/L}$		
Nrf2	5	1.250 $\pm$ 0.082	1.196 $\pm$ 0.126	1.415 $\pm$ 0.160 *	1.564 $\pm$ 0.149 **	5.594	<0.01
HO-1	7	1.649 $\pm$ 0.101	2.332 $\pm$ 0.170 **	2.767 $\pm$ 0.483 ***	2.278 $\pm$ 0.394 *	6.840	<0.01
Occludin	5	1.081 $\pm$ 0.026	1.342 $\pm$ 0.096	1.162 $\pm$ 0.254	2.124 $\pm$ 0.207 ****	8.086	<0.01
ZO-1	9	0.855 $\pm$ 0.072	0.782 $\pm$ 0.033 *	1.171 $\pm$ 0.072	1.454 $\pm$ 0.071 ****	22.170	<0.01
Bel-2/Bax	10	1.432 $\pm$ 0.084 **	1.405 $\pm$ 0.123 **	1.299 $\pm$ 0.100 *	1.331 $\pm$ 0.119 *	5.895	<0.01
MDA	5	0.191 $\pm$ 0.011	0.202 $\pm$ 0.009	0.202 $\pm$ 0.010	0.192 $\pm$ 0.012	0.094	>0.05
SOD	8	6.647 $\pm$ 0.222	7.545 $\pm$ 0.176	9.092 $\pm$ 0.718 **	8.176 $\pm$ 0.675 *	6.153	<0.01

与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

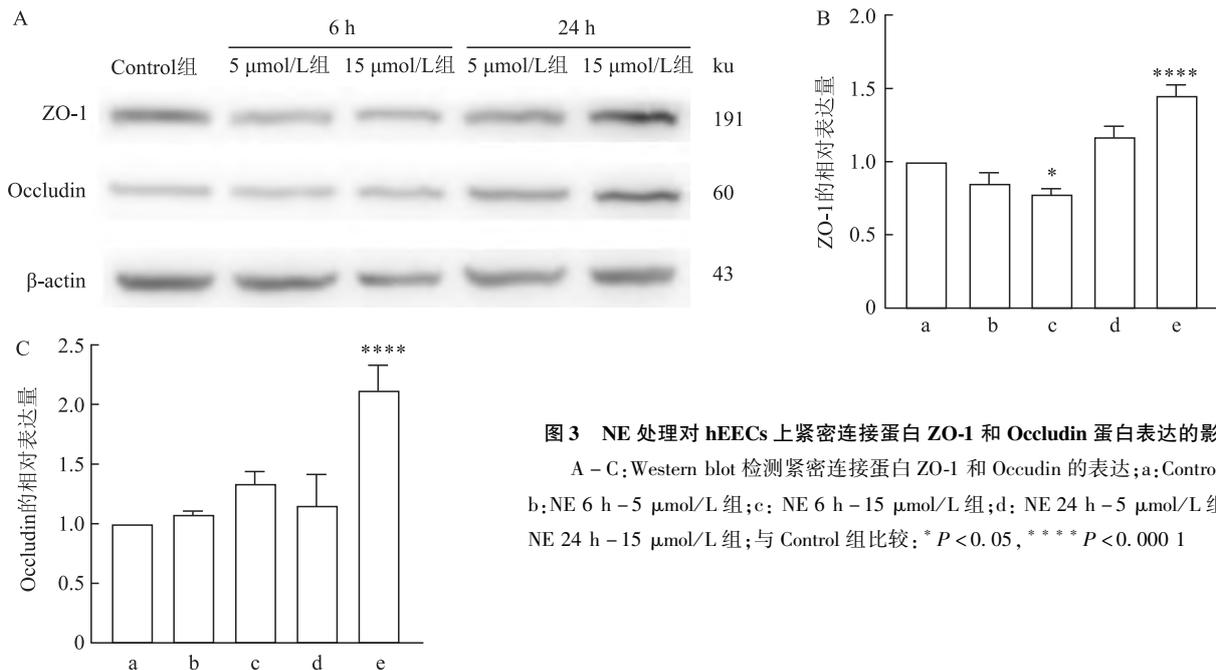


图3 NE 处理对 hEECs 上紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的影响

A - C: Western blot 检测紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达; a: Control 组; b: NE 6 h - 5  $\mu\text{mol/L}$  组; c: NE 6 h - 15  $\mu\text{mol/L}$  组; d: NE 24 h - 5  $\mu\text{mol/L}$  组; e: NE 24 h - 15  $\mu\text{mol/L}$  组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

1, 提示细胞的抗凋亡作用较强(图4和表2)。

**2.5 NE 处理对 hEECs 上 HO-1、Nrf2 蛋白表达的影响** NE 处理 hEECs 细胞后, 上调 Nrf2 和 HO-1 的表达, 在 24 h 处理组, HO-1 和 Nrf2 的上调差异均有统计学意义, 在 6 h - 15  $\mu\text{mol/L}$  处理组, HO-1 的上调差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图5和表2)

**2.6 NE 处理 hEECs 后对 MDA、SOD 的影响** 为检测 NE 处理后对细胞氧化应激的影响, 收集并检测了细胞培养上清液中 MDA 和 SOD 的水平, 结果显示, NE 处理 6 h 后 SOD 即开始升高, 处理 24 h 后 SOD 水平显著上调, 同时, MDA 的水平没有明显改变(图6和表2)。

### 3 讨论

NE 通过肾上腺素能受体发挥作用, 实验中检测到肾上腺素能受体亚型  $\alpha1$  a、 $\alpha1$  b、 $\alpha2$  a、 $\alpha2$  b、 $\alpha2$  c、 $\beta1$ 、 $\beta3$  在 hEECs 的表达, 而人子宫肌层的  $\beta3$

肾上腺素能受体及大鼠子宫上的  $\alpha2$  肾上腺素能受体亚型参与了调控子宫收缩<sup>[6-7]</sup>, 大鼠子宫上  $\beta$  肾上腺素能受体还介导了氧化应激的调控<sup>[8]</sup>, 可见肾上腺素能受体在子宫功能的调控中发挥着重要的作用。CCK-8 实验的结果显示了不同浓度 NE 处理对培养的 hEECs 活性的影响, 5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  NE 处理细胞 6 h 和 24 h 对细胞活性的促进或抑制不明显, 而 15  $\mu\text{mol/L}$  和 20  $\mu\text{mol/L}$  NE 处理细胞后明显促进细胞增殖, 同时, 检测了细胞紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达, 发现高浓度 (15  $\mu\text{mol/L}$ ) NE 促进 Occludin 和 ZO-1 的表达, 这与 CCK-8 结果一致, 15  $\mu\text{mol/L}$  NE 处理后促进细胞增殖。研究<sup>[9]</sup>表明 NE 可促进肿瘤细胞增殖, 课题组前期的实验<sup>[10]</sup>表明, NE 长时间处理人结肠癌细胞 Caco-2 促进细胞增殖, 同时, NE 处理正常大鼠胸主动脉内皮细胞后, 短时间促进细胞增殖, 但长时间处理则对细胞活性影响不明显, 而该研究结果显示, 高浓度 NE

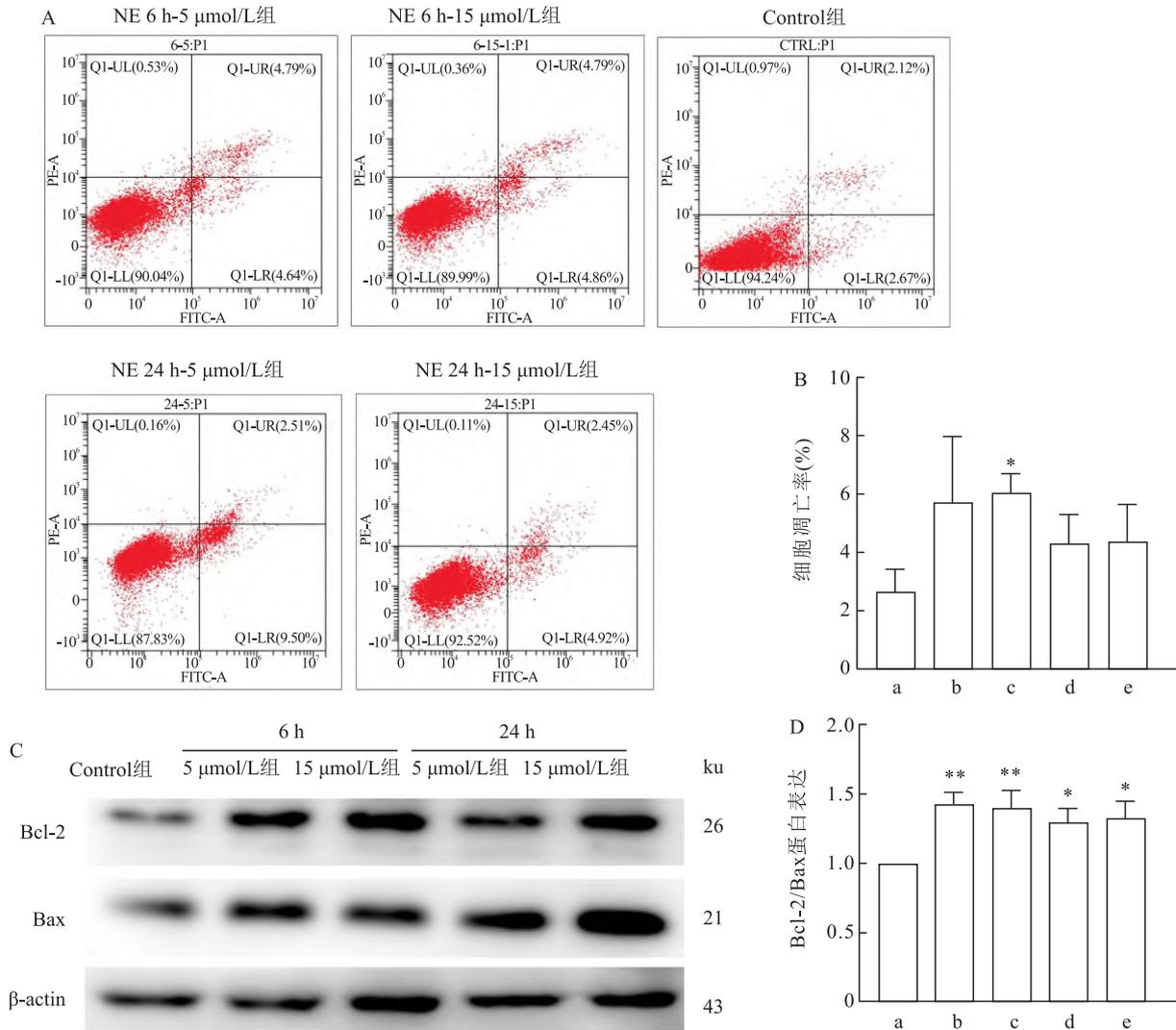


图4 NE处理对hEECs细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达的影响

A: 流式细胞术检测 NE 处理后 hEECs 凋亡情况; B: 流式细胞术检测 NE 干预后细胞凋亡率; C: Western blot 检测 NE 处理后 hEECs 的 Bcl-2 和 Bax 表达情况; D: Western blot 结果分析凋亡相关蛋白表达; a: Control 组; b: NE 6 h - 5  $\mu\text{mol/L}$  组; c: NE 6 h - 15  $\mu\text{mol/L}$  组; d: NE 24 h - 5  $\mu\text{mol/L}$  组; e: NE 24 h - 15  $\mu\text{mol/L}$  组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

处理正常 hEECs 后,长时间和短时间均促进细胞增殖,可见 NE 对不同种类细胞的增殖影响不同。同时,该实验也观察了 NE 处理后对细胞凋亡率及凋亡相关因子的影响,结果显示,NE 处理后,细胞的凋亡率升高,特别是 15  $\mu\text{mol/L}$  NE 处理细胞 6 h 明显促进细胞凋亡,但 24 h 处理组的升高不如 6 h 处理组明显,同时 Bcl-2/Bax 也高于对照,提示虽然发生了凋亡,但是细胞的保护作用要强于凋亡效应。有研究<sup>[11]</sup>显示,高浓度 NE (50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 会引起海马 HT 22 细胞凋亡显著增加,而该研究中虽然观察到 NE 处理后,hEECs 细胞的凋亡率升高,但是除了 15  $\mu\text{mol/L}$  处理细胞 6 h 观察到了显著性差异,其他差异均无统计学意义,这可能与细胞种类及给

药浓度的差异有关。

NE 可引起细胞氧化应激,NE 直接刺激可明显上调培养的棕色脂肪细胞胞质中的 HO-1<sup>[4]</sup>,在大鼠主动脉正常血压情况下,HO-1 表达于中膜平滑肌细胞及外膜,而在血管紧张素 II 和 NE 灌注时,HO-1 在外膜和内膜上皮细胞的表达明显上调<sup>[12]</sup>,该研究表明 NE 处理后,明显上调 HO-1 和 Nrf2 表达。HO-1 是 Nrf2 的靶基因,可调节抗炎基因表达,抑制炎症因子水平进而抑制炎症进展<sup>[13]</sup>,发挥细胞保护作用<sup>[14]</sup>,调节包括 SOD 在内的抗氧化酶的表达,检测细胞培养基中 SOD 水平,显示 NE 处理后 SOD 水平升高,MDA 水平没有明显升高,这进一步提示了 NE 激活 Nrf2/HO-1 信号调节了细胞的氧化应激。

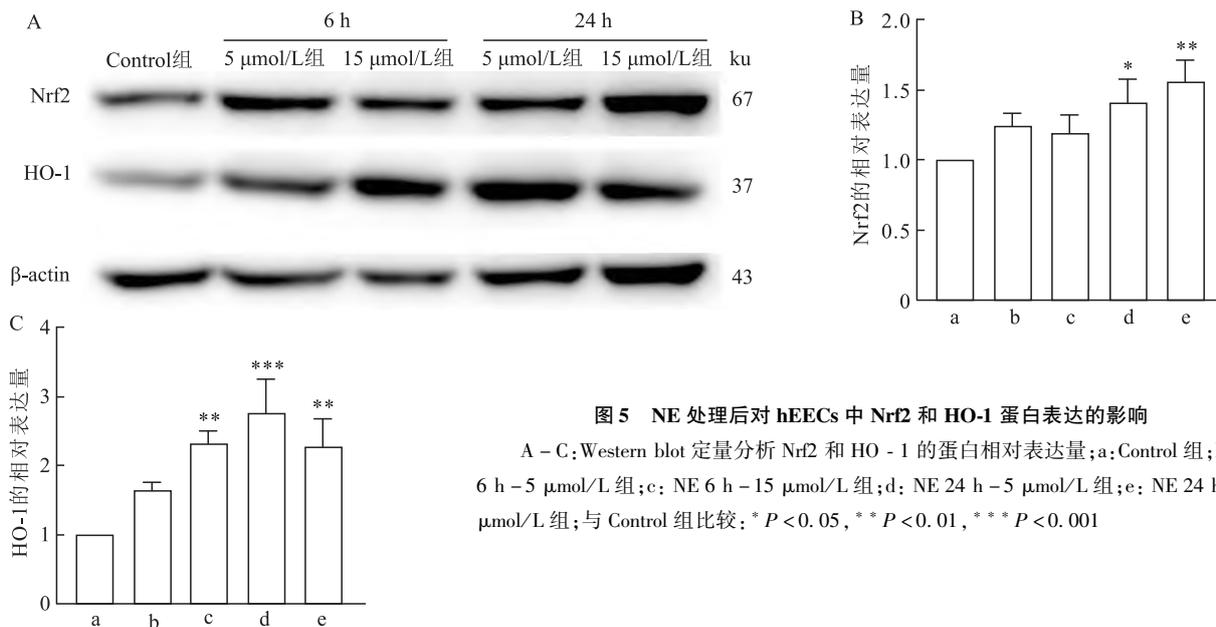


图5 NE处理后对hEECs中Nrf2和HO-1蛋白表达的影响

A-C: Western blot 定量分析 Nrf2 和 HO-1 的蛋白相对表达量; a: Control 组; b: NE 6 h - 5 μmol/L 组; c: NE 6 h - 15 μmol/L 组; d: NE 24 h - 5 μmol/L 组; e: NE 24 h - 15 μmol/L 组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

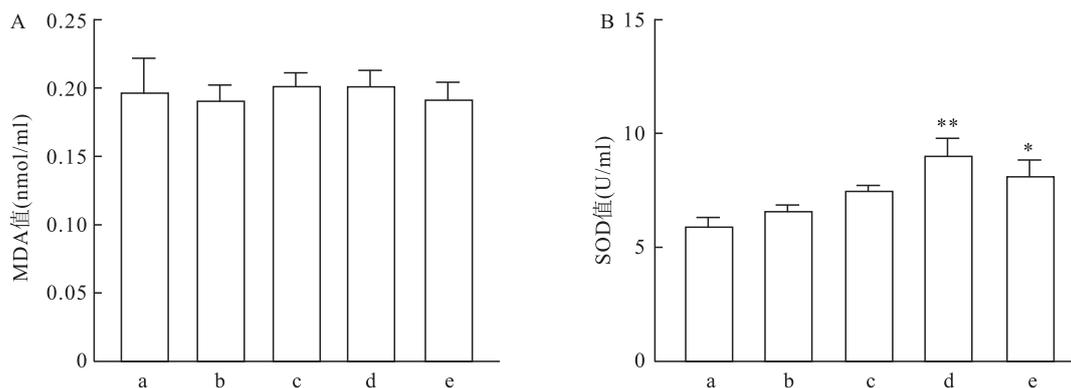


图6 NE处理后对MDA和SOD的影响

A, B: NE 干预后 MDA、SOD 水平; a: Control 组; b: NE 6 h - 5 μmol/L 组; c: NE 6 h - 15 μmol/L 组; d: NE 24 h - 5 μmol/L 组; e: NE 24 h - 15 μmol/L 组; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

参考文献

[1] 江楠, 马瑞红, 赵晓丽, 等. 氧化应激与生殖相关疾病研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2021, 40(5): 402-6.

[2] Jana B, Calka J, Bulc M, et al. Role of noradrenaline and adrenoceptors in regulating prostaglandin E2 synthesis cascade in inflamed endometrium of pigs[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5856.

[3] Jana B, Calka J. Effect of blocking of alpha1-adrenoceptor isoforms on the noradrenaline-induced changes in contractility of inflamed pig uterus[J]. PLoS One, 2023, 18(2): e280152.

[4] Giordano A, Nisoli E, Tonello C, et al. Expression and distribution of Heme oxygenase-1 and -2 in rat brown adipose tissue; The

modulatory role of the noradrenergic system [J]. FEBS Lett, 2000, 487(2): 171.

[5] Shen H, Chen Z, Mokhtar A D, et al. Expression of beta-adrenergic receptor subtypes in human normal and dilated ureter[J]. Int Urol Nephrol, 2017, 49(10): 1771-8.

[6] Jana B, Calka J, Bulc M. Roles of alpha-2-adrenergic receptor isoforms in inflamed pig uterus contractility *in vitro* [J]. Theriogenology, 2022, 183: 41-52.

[7] Asif H, Barnett S D, Saxon D, et al. β3 adrenergic receptor activation modulates connexin 43 activity to relax human myometrium [J]. Cell Signal, 2023, 106(40): 110640.

[8] Tatalovic N, Vidonja U T, Orescanin D Z, et al. Ibogaine-mediated ROS/antioxidant elevation in isolated rat uterus is beta-adrenergic receptors and K(ATP) channels mediated [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(11): 1792.

- [9] Zhang X, Zhang Y, He Z, et al. Chronic stress promotes gastric cancer progression and metastasis: An essential role for ADRB2 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11):788.
- [10] Luo Y, Ma H, Niu S, et al. Effects of norepinephrine on colonic tight junction protein expression during heat stress [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5):421.
- [11] Wang Y, Hu H, Wu Y, et al. Norepinephrine promotes neuronal apoptosis of hippocampal HT22 cells by up-regulating the expression of long non-coding RNA MALAT1 [J]. *Stress*, 2023, 26(1): 2252905.
- [12] Ishizaka N, de Leon H, Laursen J B, et al. Angiotensin II-induced hypertension increases Heme oxygenase-1 expression in rat aorta [J]. *Circulation*, 1997, 96(6):1923-9.
- [13] Saha S, Buttari B, Panieri E, et al. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation [J]. *Molecules*, 2020, 25(22):5474.
- [14] 张霜梅, 祝维峰, 王安荣, 等. 红景天苷通过 Nrf2-HO-1 保护 A $\beta$ 25-35 诱导的原代皮层神经元损伤 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1):101-6.

## NE activates Nrf2/HO-1 signaling pathway to regulate oxidative stress in human endometrial epithelial cells

Yang Xue<sup>1,3</sup>, Ma Ruixin<sup>1,4</sup>, Li Jiabin<sup>1</sup>, Kong Xuerui<sup>1</sup>, Li Junping<sup>1</sup>, Luo Yan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Basic Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750000;

<sup>2</sup>Basic Medical College, Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526000;

<sup>3</sup>Dept of Ophthalmology, People's Hospital of Wuzhong Attached to The Ningxia Medical University,

Wuzhong 751100; <sup>4</sup>Dept of Gerontology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410000)

**Abstract Objective** To investigate whether norepinephrine (NE) regulates the oxidative stress in human endometrial epithelial cells (hEECs) by activating nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase -1 (HO-1) signal pathway. **Methods** Cultured hEECs were used. The expression of  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Cell counting kit -8 (CCK-8) assay was applied to test the effect of NE on cell viability, then the cells were divided into Control group and NE treatment group, and the appropriate concentrations were chosen. The expression of tight junction proteins Occludin and zona occludens-1 (ZO-1), apoptosis-related proteins apoptosis-related protein B-cell lymphoma-2 protein (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax), antioxidant proteins Nrf2 and HO-1 were examined by Western blot. The apoptosis was detected by flow cytometry. The malonaldehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in the cell culture medium were detected by enzyme-linked immunosorbent assays kit (ELISA). **Results** The mRNA expression of  $\alpha$ 1 a,  $\alpha$ 1 b,  $\alpha$ 2 a,  $\alpha$ 2 b,  $\alpha$ 2 c,  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 was detected in the hEECs. After the NE treatment, no significant change in cell viability was observed in low concentration (5  $\mu$ mol/L and 10  $\mu$ mol/L) groups, while 15  $\mu$ mol/L and 20  $\mu$ mol/L NE treatments for 6 h or 24 h promoted the cell viability significantly. The expression of ZO-1 and Occludin increased significantly in 15  $\mu$ mol/L group after 24 h treatment, the expression of ZO-1 decreased in 6 h treatment group, significant down regulation was observed after 15  $\mu$ mol/L NE application, the expression of Occludin increased in 6 h group. The cell apoptosis increased compared with the control group after NE stimulation, especially a significantly increase in 6 h 15  $\mu$ mol/L group was detected, while the fall in increased apoptosis was observed after 24 h treatment. The ration of Bcl-2/Bax > 1. The expression of Nrf2 and HO-1 was elevated by NE. There was no obvious change in MDA level while significant elevation in SOD was detected in cell culture medium. **Conclusion** Nrf2/HO-1 signal is activated after application of NE to the hEECs, which may responsible for the upregulation of SOD, antioxidant and anti-apoptotic effect in the hEECs.

**Key words** noradrenaline; Nrf2; HO-1; human endometrial epithelial cells; ZO-1; Occludin; Bax; Bcl-2