

雌激素对乳鼠心肌细胞脑钠肽表达的影响及机制

吴凌凌¹, 陈艺莉¹, 黄艺仪², 周越¹, 何建桂^{1*}
(中山大学附属第一医院 1.心内科;2.急诊科,广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨雌激素对原代培养的心肌细胞内脑钠肽(BNP)的表达是否有影响以及雌激素影响 BNP 表达的机制。【方法】视实验目的给予无血清饥饿状态下的心肌细胞不同浓度的雌激素以及相应通路抑制剂处理,以 RT-PCR 测定细胞内 BNP 的 mRNA 水平,以 Western-Blotting 测定细胞内 BNP 的蛋白表达量以及相关通路的磷酸化水平,以免疫荧光技术观察雌激素刺激下心肌 BNP 的亚细胞定位。【结果】雌激素刺激能够显著上调心肌细胞内的 BNP mRNA 以及蛋白水平($P < 0.05$),雌激素受体抑制剂 ICI 182 780 能够抑制该效应($P < 0.05$)。雌激素处理能够上调心肌 Akt 以及 p38 蛋白磷酸化水平($P < 0.05$),但不能上调 Erk1/2 蛋白磷酸化水平。预处理 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 或 p38 MAPK 通路抑制剂 SB203580 均能够降低雌激素诱导的心肌细胞 BNP 表达($P < 0.05$)。【结论】雌激素能够特异性地通过其受体影响心肌细胞 BNP 的表达,并且 PI3K/Akt 通路以及 p38 MAPK 通路均参与了雌激素诱导的心肌细胞 BNP 表达过程。

关键词: 雌激素;BNP;Akt;p38;心肌细胞

中图分类号: Q2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)04-0488-06

Effect of Estrogen on Brain Natriuretic Peptide Expression of Neonatal Rat Cardiomyocytes

WU Ling-ling¹, CHEN Yi-li¹, HUANG Yi-yi², ZHOU Yue¹, HE Jian-Gui^{*}

(1.Department of Cardiology, 2.Department of Emergency, The First Affiliated Hospital of San Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study was to determine whether estrogen could regulate brain natriuretic peptide (BNP) expression in primary cultured cardiomyocytes and to examine the mechanism that are involved in this process. 【Methods】 Serum-starved neonatal rat ventricular cardiomyocytes (NRVCs) was treated with different concentrations of 17-beta-estradiol and related specific signal pathway inhibitors. BNP expression in NRVCs and related signal pathway was analyzed by RT-PCR and Western blotting. The subcellular localization of cardiac BNP under estrogen treatment was determined by immunofluorescence. 【Results】 Our data showed that estrogen treatment notably increased intracellular BNP expression of NRVCs in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$), which could be eliminated by estrogen receptor antagonist ICI 182 780 ($P < 0.05$). Estrogen treatment also upregulated the phosphorylation level of Akt and p38 ($P < 0.05$) but not Erk1/2. Furthermore, pretreatment of PI3-kinase/Akt inhibitor LY294002 or p38 MAPK inhibitor SB203580 decreased the estrogen-upregulated BNP expression in NRVCs ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Estrogen specifically induces intracellular BNP expression in primary cardiomyocytes via estrogen receptor. Both PI3-kinase/Akt and p38 MAPK signal pathways were involved in estrogen-induced BNP expression.

Key words: estrogen; BNP; Akt; p38; cardiomyocytes

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(4):488-493]

脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)是一种重要的心脏内分泌肽,最初由 Sudoh 等^[1]在 1988 年从猪脑分离出来而定名,属于钠尿肽家族的一

员,由于其利尿、利钠、舒张血管、抑制醛固酮和肾素合成、拮抗交感神经过度反应的效应,在调节血压、血容量和盐平衡方面起重要作用^[2]。BNP 在心

收稿日期:2014-03-17

基金项目:国家自然科学基金(81100171);广东省科技计划项目(2012B031800386)

作者简介:吴凌凌,硕士研究生,研究方向:心脏内分泌,E-mail:wllclub100@163.com; * 通信作者:何建桂,E-mail:hjgsysu@163.com

肌的表达既往一般认为主要受到室壁张力影响,近来发现BNP还受到缺氧、炎症因子、神经内分泌等多种因素影响^[3]。许多信号通路如p38 MAPK以及Erk1/2都在各种因子调控心肌细胞BNP表达中扮演重要角色^[4]。临床研究观察表明,绝经前女性循环中的BNP水平较同龄男性高1.7倍,绝经后这种差异减小^[5]。而给予雌激素替代治疗后BNP水平又再升高^[6]。提示雌激素很可能是导致BNP男女循环水平差异的重要原因。本研究旨在通过建立原代心肌细胞体外模型,给予雌激素刺激心肌细胞,观察心肌细胞内的BNP的表达,并检测雌激素下游和BNP上游的信号通路的激活情况,给予相应的通路抑制剂以明确雌激素是否能够影响心肌细胞内BNP的表达以及雌激素调控心肌内BNP表达的具体机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级Sprague Dawley(SD)大鼠购自中山大学实验动物中心,1~2天龄,雌雄不限。许可证号:SCXK(粤)2004-2011。实验动物使用方案经过中山大学附属第一医院医学伦理委员会审核通过[2012(297)]。

1.2 主要试剂

活性炭/葡萄糖预处理的胎牛血清(Hyclone);无酚红DMEM-F12培养基(Sigma);17-beta-雌二醇(Sigma);苯肾上腺素(Sigma)雌激素受体抑制剂ICI 182 780 (Sigma);p38 MAPK 通路抑制剂SB203580(sigma);PI3K/Akt 通路抑制剂LY294002 (Cell Signaling Technology);RNA 提取试剂盒:Trizol reagent (Invitrogen);cDNA 合成试剂盒 RevertAid (Fermentas);普通 PCR 试剂盒 DreamTaq Green PCR Master Mix (Fermentas);蛋白提取试剂:Lysis Buffer (Cell Signaling Technology);蛋白 BCA 定量试剂盒 (Thermo Scientific);大鼠BNP 抗体(Santa Cruz);大鼠 p38、Akt、Erk1/2 磷酸化及非磷酸化抗体 (Cell Signaling Technology);大鼠 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology);HRP 标记的二抗 (Proteintech);FITC 标记的荧光二抗 (Proteintech);其他生化试剂均为进口分装或者国产分析纯。

1.3 主要仪器

PCR 仪(MT-Reserch);紫外凝胶检测和成像系统(Bio-Rad);荧光显微镜(BX51, Olympus);超微量紫外分光光度计 NanoDrop2000 (Thermo Scientific);图像处理分析系统(Image-Pro Plus);酶标仪 (Sunrise);蛋白电泳及转印系统:Mini-PROTEAN (Bio-Rad)。

1.4 实验方法

1.4.1 乳鼠心肌细胞的原代培养 参照本小组既往的方法^[7],无菌条件下开胸取出SD乳鼠(1~2d)心脏,剪碎至1~3 mm³大小,以0.8 g/L的胰蛋白酶消化5 min左右,使用100 mL/L的胎牛血清培养液终止消化,反复数次,直至碎片完全消化。将细胞沉淀以培养液悬浮,悬液收集于50 mL培养瓶中,差速贴壁60 min后,吸取未贴壁细胞按照10%/孔的密度接种至六孔培养板中,培养于100 mL/L活性炭/葡萄糖预处理的胎牛血清的无酚红DMEM-F12培养基中,并在培养液中加入0.1 mmol/L的5-BrdU,以抑制非心肌细胞的生长。心肌细胞在体积分数5% CO₂、37 °C条件下培养36 h后可以观察到超过90%的心肌细胞出现一致性跳动,反映心肌细胞的纯度以及活力。

1.4.2 雌激素以及相应通路抑制剂处理乳鼠心肌细胞 心肌细胞种板36 h观察到一致性跳动后,更换不含血清、无酚红的DMEM-F12培养基饥饿24 h后给予不同浓度(0.1~10 nmol/L)的17-beta-雌二醇(E2)处理心肌细胞24 h。ICI 182 780 (0.1 μmol/L)作为雌激素受体抑制剂,视实验目的与雌激素共刺激细胞。苯肾上腺素(5 μmol/L)处理组作为阳性对照。阻滞PI3K/Akt、p38 MAPK通路时,视实验目的分别在给予雌激素处理细胞前预先加入LY294002 (LY,10 μmol/L)和(或)SB203580(SB,10 μmol/L)处理细胞30 min。

1.4.3 RT-PCR 检测BNP mRNA的表达 以Trizol法提取细胞总RNA,经超微量紫外分光光度计测定核酸浓度及纯度。按照说明书利用随机引物进行cDNA合成,取一定量的cDNA和特异性引物使用PCR仪进行目的基因扩增。引物序列:BNP:Forward 5'-GGGCTGTGACGGCTGAGGT-3', Reverse: 5'-AGTTTGTGCTGGAGATAGA-3';GAPDH:Forward 5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3' Reverse: 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。以GAPDH为内参,扩增条件:首次循环95 °C 5 min,其后30个循环:95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 min,

最后 72℃ 5 min。PCR 产物分析,取 10 μ L 产物进行 3%琼脂糖凝胶电泳,结果使用紫外凝胶检测和成像系统拍照分析。

1.4.4 Western Blotting 检测 BNP 蛋白水平以及相应通道蛋白磷酸化水平 测定心肌细胞内 BNP 蛋白表达量时,药物处理细胞 24 h。测定相应通道蛋白磷酸化水平时,药物处理细胞 30 min。取处理完毕的心肌细胞,冰上裂解细胞并提取蛋白。提取出的蛋白标本利用 BCA 试剂盒测定浓度。取 20 ~ 30 μ g 蛋白,在 8%的或 15%的 SDS-PAGE 进行凝胶电泳(100 V,1 h 30 min),然后以 250 mA,1 h 30 min 转印至 PVDF 膜。使用质量体积分数为 5% (0.05 g/mL)的 BSA 或脱脂奶粉(稀释于 TBST)室温封闭 1 h,而后加入相应抗体 4℃孵育过夜 (BNP 1:400;GAPDH 1:8 000;p-p38,p-Akt,p-Erk1/2,p38,Akt,Erk1/2 1:1 000)。孵育后以 TBST 洗膜,而后加入 HRP 标记的相应二抗室温孵育 1 h,再次用 TBST 洗膜后使用 ECL 试剂发光,并使

用 X 线胶片记录。结果以 GAPDH 为内参,使用 Quantity One(Bio-rad)软件分析。

1.4.5 免疫荧光法检测 BNP 在心肌细胞内的亚细胞定位 原代培养的心肌细胞以 0.2×10^6 /孔的密度种于预先置有载玻片的 24 孔板之中。药物处理细胞完毕后,以 PBS 洗 3 次,而后使用 40 g/L 的多聚甲醛溶液固定 30 min。PBS 清洗 3 次后使用 2 mL/L 的 Triton X-100 处理 5 min。PBS 清洗 3 次后以 10%BSA 封闭 30 min,而后使用大鼠 BNP 特异性一抗 (1:50)4℃孵育过夜。孵育过后使用 PBS 洗三遍,加入 FITC 标记的荧光二抗(1:100)室温避光孵育 1 h。再次用 PBS 清洗 3 次,孵育 DAPI 染核(1:1 000)10 min。PBS 清洗 3 次后取出玻片倒置于载玻片上在荧光显微镜下观察。以 Image-Pro Plus 处理图像结果。

1.5 统计学处理

全部试验均独立重复 3 次以上,试验数据应用 SPSS13.0 进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差

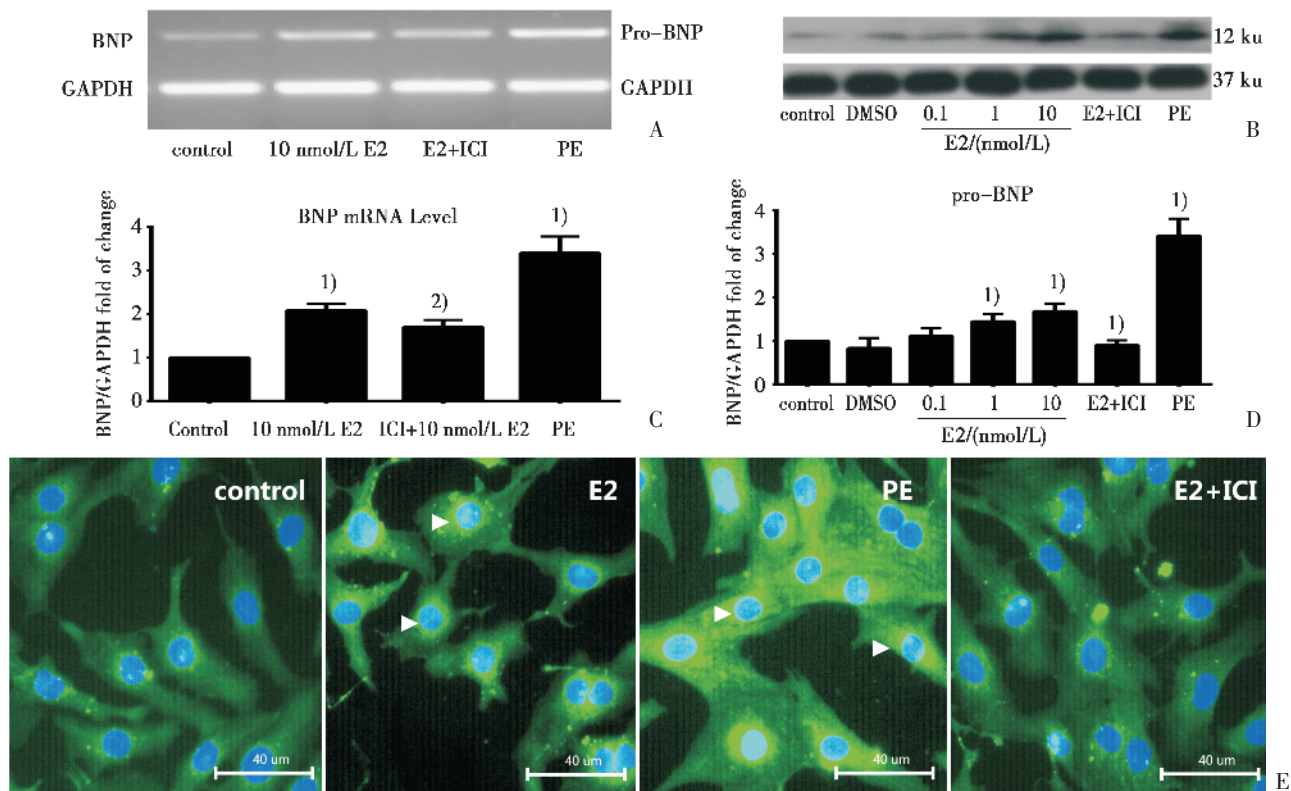


图 1 雌激素对新生乳鼠心肌细胞内 BNP 表达的影响

Fig.1 Estrogen effects on intracellular BNP expression of neonatal rat ventricular cardiomyocytes (NRVC)

A: RT-PCR analysis of BNP mRNA level in NRVCs under estrogen (E2) treatment. B: Representative Western blot showing E2 effect on the protein level of proBNP of NRVCs. Middle panel: The Semi-quantification of BNP mRNA level (C) and proBNP protein level (D) was generated from 4 independent experiment using densitometry. Value are presented as mean \pm SD, 1) $P < 0.05$ vs control conditions; 2) $P < 0.05$ vs 10 nmol/L E2 treatment group ($n = 4$). (E): Subcellular localization of E2 induced-BNP expression in NRVC.

表示($\bar{x} \pm s$), 多组均数差异检验采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 两组间比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结 果

2.1 雌激素处理对乳鼠心肌细胞内 BNP 表达的影响

24 h 的 17- β -雌二醇(E2)处理能够上调乳鼠心肌细胞内的 BNP mRNA 水平 (图 1A, $P < 0.05$) 以及前体 BNP(proBNP)的蛋白水平(图 1B, $P < 0.05$)。而且这种刺激作用呈浓度依赖性, 在 10 nmol/L 的 E2 作用下, 心肌 BNP 转录水平(图 1C; $P < 0.05$) 及翻译水平(图 1D; $P < 0.05$) 相较于对照组均显著增高。E2 对 BNP 表达的这种刺激作用可被其选择性的受体抑制剂 ICI 182 780 (ICI) 所抑制($P < 0.05$), 提示雌激素的刺激 BNP 效应是

其受体依赖性的。作为阳性对照, 苯肾上腺素明显上调心肌细胞内 BNP 的水平($P < 0.05$)。进一步利用特异性的 BNP 抗体对雌激素处理的心肌细胞进行免疫荧光染色分析则发现, 苯肾上腺素及 E2 均能明显提高心肌细胞细胞核周的 BNP 表达水平 (图 1E 白色箭头), 而雌激素受体抑制剂 ICI 182 780 能够抑制雌激素诱导的核周 BNP 表达。

2.2 雌激素调控心肌细胞 BNP 表达的机制

为了探索刺激上调心肌细胞 BNP 表达的机制, 我们首先检测了雌激素下游通道 PI3K/Akt 通路以及 BNP 表达相关的 p38 MAPK、Erk1/2 通道在雌激素处理下的心肌细胞中的激活情况。相较于对照组, E2 能够上调 Akt(图 2C, $P < 0.05$), p38 (图 2C, $P < 0.05$) 蛋白的磷酸化水平, 但是对 Erk1/2 蛋白的磷酸化水平却没有明显的影响。预处理 PI3K/Akt 通路抑制剂(LY294002, LY)或 p38 MAPK 通路抑制剂(SB203580, SB)均能够显著降

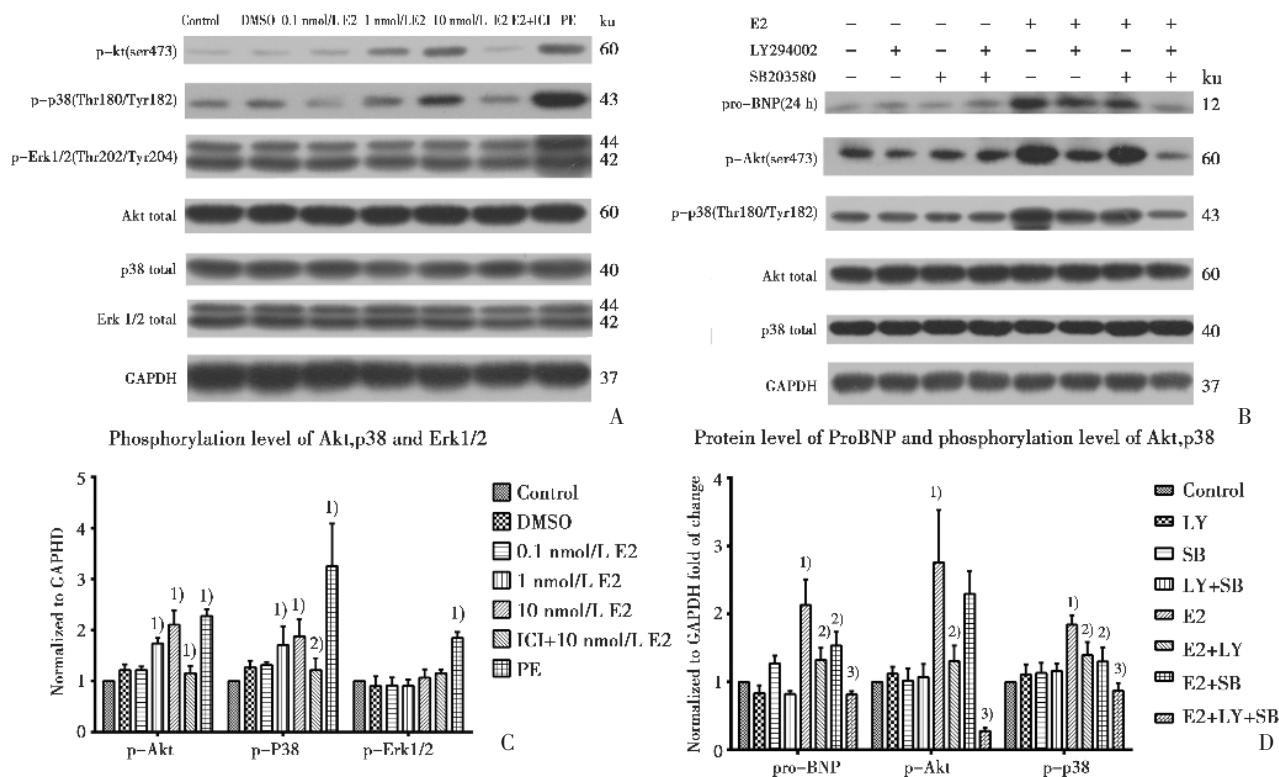


图 2 雌激素调控的心肌 BNP 表达与 PI3K/Akt 以及 p38MAPK 信号通路有关

Fig.2 Both PI3-kinase/Akt and p38 MAPK signaling pathways were involved in estrogen-induced BNP expression

A: Representative Western blot showing E2 treatment upregulates Akt, p38 MAPK phosphorylation level in NRVCs, but not Erk1/2. B: Representative Western blot showing the stimulating effects of E2 on BNP expression in NRVCs was eliminated by blocking PI3K/Akt and p38 MAPK signal pathway. C: Semi-quantification of Akt, p38 and Erk1/2 phosphorylation level after E2 treatment, as described in Fig 2A caption. D: Semi-quantification of proBNP protein level and Akt, p38 phosphorylation level after cotreatment of E2 and inhibitors, as described in Fig 2B caption. 1) $P < 0.05$ vs control conditions; 2) $P < 0.05$ vs 10nM E2 treatment group. 3) $P < 0.05$ vs E2+ LY294002 or E2+ SB203580 treatment group; $n = 3$.

低 E2 诱导的心肌细胞 BNP 表达, 而共给予这两种抑制剂则能够进一步的降低 E2 诱导的心肌细胞 BNP 的表达(图 2D, $P < 0.05$)。

3 讨 论

尽管有不少临床证据显示雌激素可能能够影响 BNP 的水平^[8], 雌激素对 BNP 水平影响的国内外基础实验证据却较为有限^[4], 本研究证实了雌激素能够影响体外培养的心肌细胞内的 BNP 表达水平, 并发现了雌激素诱导的 BNP 表达在细胞中呈核周分布特点。除此以外, 本研究还首次发现了 PI3K/Akt 通路与 p38 MAPK 通路参与了雌激素上调心肌细胞 BNP 表达过程, 进一步明确了雌激素影响心肌细胞内 BNP 表达的具体机制。

我们在实验中发现, 雌激素上调心肌细胞内脑钠表达的能力要弱于苯肾上腺素(阳性对照)。作为 α 肾上腺素受体激动剂, 苯肾上腺素被证实能够刺激心肌细胞肥大, 而 BNP 作为心肌细胞肥厚的标志物, 其上调往往提示的是一种病理性的过程^[9]。但是在我们给予生理浓度的(1 nmol/L)雌激素刺激心肌细胞时, BNP 升高的程度并不是十分明显(但差异仍然具有统计学意义)。因此我们推测, 雌激素诱导的心肌细胞 BNP 表达的增高反映的是可能一种生理学的过程。

雌激素对心肌 PI3K/Akt 通路的激活已在很多实验中被证实, 其中往往都与心肌细胞保护有关。在缺血再灌注模型中, 雌激素能够通过 PI3K/Akt 通路抑制 ROS 的产生从而保护心肌细胞^[10], 而在心肌肥厚模型中, 雌激素则能够通过激活 PI3K/Akt 通路减轻心肌细胞的肥大^[11]。在 Fan 等人^[12]的试验中, 雌激素还能够通过该通路直接抑制心肌细胞凋亡。由于 BNP 同样具有许多心肌细胞保护作用^[2], 因此我们的实验发现还可能为 PI3K/Akt 通路介导的雌激素心肌细胞保护作用提供依据。但是我们的实验并没有涉及心肌细胞疾病模型, 所以仍有待进一步的实验来证实。

相较于 PI3K/Akt, 文献对雌激素是否影响 p38MAPK 的报道不一致。在一些文献中, Nuedling 等人^[13]报道, 雌激素处理心肌细胞(浓度不详)对于 p38 MAPK 通路没有明显的刺激效应。而 Kulpa 等人^[14]则报道, 雌激素的受体选择性上调剂能够激活 p38 MAPK 通路。上述研究结果的不一

致除了有可能与具体的实验条件以及检测方法差异有关, 还有可能与 p38 MAPK 的异构体有关。p38 MAPK 在心肌中被证实主要有 α 和 β 两种异构体, 其中 p38 α 的激活与心肌细胞凋亡有关^[15], 而 p38 β 的激活则与心肌细胞生长有关^[16]。而雌激素对该两种异构体的激活程度并不一致, Liu 等^[17]报道, 雌激素能够显著激活 p38 β , 而同时抑制 p38 α 。因此, 实验中观察到的 p38 MAPK 的磷酸化水平变化有可能是两种 p38 异构体磷酸化水平反向变化的反映。尽管如此, 由于本实验没有能够区分两种异构体的磷酸化水平, 并且本实验使用的 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 在 10 μ mol/L 的浓度下被证实对两种异构体均有明显抑制作用^[18], 因此本实验的结果只能提示 p38 MAPK 通路参与了雌激素对体外心肌细胞脑钠肽的表达调控, 不同 p38 异构体在这一过程中所起的作用仍有待进一步的研究来阐明。

我们的实验结果为临床上观察到绝经前女性循环中 BNP 水平较同龄男性更高的现象提供了实验依据。雌激素的心血管保护作用在体内和体外实验都已被证明^[19], 而临床证据也显示, 女性在绝经前心血管疾病发病率明显低于同龄男性, 但是在绝经后则心血管疾病发病率则明显升高^[20]。这些证据都提示雌激素能够保护心血管系统, 而结合我们本次实验的结果, 有可能雌激素的心血管保护作用有一部分是介由上调 BNP 的表达来完成的。但是本实验并没有干预 BNP 且为体外试验, 所以雌激素在活体条件下对心肌、循环中 BNP 的水平的影响以及雌激素心血管保护作用是否与 BNP 有关仍有待于将来进一步的研究的阐明。

参考文献

- [1] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain [J]. *Nature*, 1988, 332(6159): 78-81.
- [2] Hayek S, Nemer M. Cardiac natriuretic peptides: from basic discovery to clinical practice [J]. *Cardiovasc Ther*, 2011, 29(6): 362-376.
- [3] Nishikimi T, Kuwahara K, Nakao K. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides [J]. *J Cardiol*, 2011, 57(2): 131-140.
- [4] Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, et al. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role

- and clinical utility of cardiac natriuretic hormones [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(1): H12-H20.
- [5] Lam CS, Cheng S, Choong K, et al. Influence of sex and hormone status on circulating natriuretic peptides [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(6): 618-626.
- [6] Maffei S, Del RS, Prontera C, et al. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2001, 101(5): 447-453.
- [7] 夏文静, 黄艺仪, 何建桂, 等. 急性心肌缺氧对乳鼠心肌细胞脑钠肽表达的影响及其作用机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(05): 852-857.
- Xia WJ, Huang YY, He JG, et al. Effect of acute hypoxia on expression of brain natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2012, 28(05): 852-857.
- [8] Hsich EM, Grau-Sepulveda MV, Hernandez AF, et al. Relationship between sex, ejection fraction, and B-type natriuretic peptide levels in patients hospitalized with heart failure and associations with inhospital outcomes: findings from the Get With The Guideline-Heart Failure Registry[J]. *Am Heart J*, 2013, 166(6): 1063-1071.
- [9] Shannon R, Chaudhry M. Effect of alpha1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology [J]. *Am Heart J*, 2006, 152(5): 842-850.
- [10] Kim JK, Pedram A, Razandi M, et al. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(10): 6760-6767.
- [11] Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, et al. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(28): 26339-26348.
- [12] Fan MJ, Huang-Liu R, Shen CY, et al. Reduction of TLR4 mRNA stability and protein expressions through inhibiting cytoplasmic translocation of HuR transcription factor by E (2) and/or ERalpha in LPS-treated H9c2 cardiomyoblast cells[J]. *Chin J Physiol*, 2014, 57(1): 8-18.
- [13] Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, et al. Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes [J]. *FEBS Lett*, 1999, 454(3): 271-276.
- [14] Kulpa J, Chinnappareddy N, Pyle WG. Rapid changes in cardiac myofilament function following the acute activation of estrogen receptor-alpha [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41076.
- [15] 刘永国, 任澎, 李国庆. 抑制 p38MAPK 对大鼠缺血再灌注损伤心肌中 TNF-a 表达及细胞凋亡的影响 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2013, 22(06): 538-541.
- Liu YG, Ren P, Li GQ. Influence of inhibiting p38MAPK on TNF-alpha expression and myocardial cell apoptosis in rats with ischemia/reperfusion injury [J]. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2013, 22(06): 538-541.
- Wang Y, Huang S, Sah VP, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(4): 2161-2168.
- Liu H, Pedram A, Kim JK. Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 alpha-mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 beta [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(1): 119-128.
- Clark JE, Sarafraz N, Marber MS. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(2): 192-206.
- 高原, 惠宁. 雌激素对女性心血管系统保护作用的研究 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2014, 15(01): 90-92.
- [19] Gao Y, Hui N. The protective effect of estrogen on female's cardiovascular system [J]. *Chin J Clin Obstet Gynecol*, 2014, 15(01): 90-92.
- Yang XP, Reckelhoff JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011, 20(2): 133-138.
- (编辑 孙慧兰)