

## · 基础研究 ·

## 雄激素对老龄大鼠血管平滑肌组织雄、雌激素受体基因表达的影响

吴赛珠 吕红松 吴迎星 马 瑞 王子东 郑 华 杨春莉 赖文岩

【摘要】 目的 探讨不同剂量的庚酸睾酮(TE)对老龄雄性大鼠血管平滑肌组织中雄激素受体(AR)及雌激素受体- $\beta$ (ER- $\beta$ )基因表达的影响。方法 21 月龄的老龄雄性 Sprague-Dawley 纯系大鼠 40 只随机分为 A 组(老龄对照组)、B 组(老龄低剂量组,肌注每次 TE 2.5mg/kg,1 次/周 $\times$ 16 周)、C 组(老龄中剂量组,肌注每次 TE 5.0mg/kg,1 次/周 $\times$ 16 周)、D 组(老龄高剂量组,肌注每次 TE 10.0mg/kg,1 次/周 $\times$ 16 周)。Western 印迹法检测血管平滑肌组织中 AR 及 ER- $\beta$  基因表达情况。结果 给予低、中、高 3 种剂量的 TE 作用后血管平滑肌组织 AR 蛋白条带吸光度分别为(99.50 $\pm$ 21.74), (125.38 $\pm$ 28.68), (101.98 $\pm$ 15.42)(对照组为 100); ER- $\beta$  蛋白条带吸光度分别为(92.34 $\pm$ 18.68), (47.72 $\pm$ 18.12), (82.13 $\pm$ 23.50)(对照组为 100)。结论 中剂量的 TE 可促进 AR 基因的表达量,而中、高剂量的 TE 则抑制 ER- $\beta$  基因的表达量。

【关键词】 睾酮;受体,雄激素;受体,雌激素;大鼠

### The effect of androgen on androgen receptor and estrogen receptor- $\beta$ expression in vascular smooth muscle of old rats

WU Saizhu, LÜ Hongsong, WU Yingxing, MA Rui, WANG Zidong,

ZHENG Hua, YANG Chunli, LAI Wenyan

Department of Cardiology, Nanfang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of testosterone enanthate (TE) on androgen receptor (AR) and estrogen receptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ) expression in vascular smooth muscle of old rats. Methods Forty aged male rats were randomly divided into 4 groups: group A (placebo group), group B (intramuscular injection of TE 2.5mg/kg, once a week), group C (intramuscular injection of TE 5.0mg/kg, once a week), group D (intramuscular injection of TE 10.0mg/kg, once a week). All animals were fed freely during the 16-week treatment period. The expression of AR and ER- $\beta$  was studied with Western blotting. Results AR expression in vascular smooth muscle tissue was regulated by TE, with protein band intensity being(99.50 $\pm$ 21.74), (125.38 $\pm$ 28.68) and (101.98 $\pm$ 15.42) for TE doses of 2.5, 5.0 and 10.0 mg/kg, respectively. The expression of ER- $\beta$  was also regulated by TE, with protein band intensity being(92.34 $\pm$ 18.68), (47.72 $\pm$ 18.12), (82.13 $\pm$ 23.50) (the data were expressed as  $\bar{x} \pm s$ , with control group taken as 100) for these groups, respectively. Conclusions TE at mid-dose (5.0mg/kg, once a week) stimulates the expression of AR, whereas the mid and high doses (5.0 and 10.0 mg/kg, once a week) inhibit the expression of ER- $\beta$ .

【Key words】 Testosterone; Receptors, androgen; Receptors, estrogen; Rats

在老年疾病中,冠心病的发病率和死亡率较高。引起冠心病的高危因素主要有:吸烟、糖尿病、高血

压、高血脂,这些因素可加速疾病的进展<sup>[1]</sup>。雄激素中的某些睾酮制剂,已被人们普遍认为其与男性冠心病发病有密切的关系<sup>[2]</sup>。有关雌激素对女性心血管系统保护作用的研究已成为医学界的一个研究热点,而探讨雄激素与男性心血管疾病的关系也逐渐引起人们的兴趣。近年来研究结果表明,心血管系统存在雄激素受体,雄激素的心血管作用部分由雄激素受体介导。为此,本实验采用了老龄大鼠作为动物模型在给予不同剂量的庚酸睾酮(testosterone enanthate, TE)后通过 Western 印迹法观察雌激素

基金项目:“973”国家重点基础研究发展规划基金资助项目(G200057008),国家自然科学基金(39600169),军队医药卫生科研基金重点项目(012042)

作者单位:510515 广州,解放军第一军医大学南方医院心血管内科

作者简介:吴赛珠,女,医学博士,教授,主任医师,副主任

通讯作者:吴赛珠,电话:020-85141501;E-mail: wusaizhu@fimmu.edu.cn

受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体- $\beta$  (estrogen receptor beta, ER- $\beta$ ) 表达量的变化, 为进一步阐明冠心病的发病机理提供分子水平的物质基础。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** TE (Schering AG Germany)。细胞裂解液 (10 $\times$  细胞裂解缓冲液, Cell Signaling Technology Inc)。一抗: 抗 ER- $\beta$  多克隆兔抗鼠抗体 (Santa Cruz)、抗 AR 单克隆兔抗鼠抗体 (Santa Cruz)。二抗: 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (Santa Cruz)。TTBS 缓冲液 (pH7.4, Tris-HCl 100 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, 0.1% Tween-20)。硝酸纤维素膜 (PVDF 膜 New England Biolabs Inc.), ECL 监测试剂 (British Amersham Pharmacia Biotech)。凝胶电泳系统 (Bio-Rad Mini protein III System)

**1.2 建立动物模型** Sprague-Dawley (SD) 纯系雄性大鼠购自解放军第一军医大学实验动物中心, 体重 500~620g, 取 40 只 21 月龄健康老龄 SD 系雄性大鼠随机分为 4 组, A 组 (老龄对照组)、B 组 (肌注 TE 每次 2.5mg/kg, 1 次/周 $\times$ 16 周)、C 组 (肌注 TE 每次 5mg/kg, 1 次/周 $\times$ 16 周)、D 组 (肌注 TE 每次 10.0mg/kg, 1 次/周 $\times$ 16 周)。整个实验期间, 喂以标准育成鼠饲料, 自由饮水, 常规饲养。均于末次给药 1 周后, 禁食 24h, 上午 9:00 从腹主动脉取血, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 20 min, 取上清 -70 $^{\circ}$ C 保存。分离胸腹主动脉, 用生理盐水冲洗动脉条, 去除外膜, 纵行剪开血管, 刮去内皮, 生理盐水冲洗, 所取组织置于液氮保存。

### 1.3 测定指标与方法

**1.3.1 性激素的测定** 腹主动脉取血 6ml, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 20 min, 取上清 -70 $^{\circ}$ C 保存。用化学发光法在南方医院检验科 ACS:180SE 仪器上进行检测。

**1.3.2 平滑肌组织蛋白的提取** 于研钵中用液氮将平滑肌组织研磨成粉末状, 转移置匀浆器中加入一定量的 1 $\times$  细胞裂解缓冲液和苯甲基磺酰氟化物 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF) 继续研磨, 收

集组织裂解产物于 EP 管中, 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 15min, 上清蛋白 -70 $^{\circ}$ C 保存备用 (1 个月内检测)。Bradford 法测定蛋白浓度。

**1.3.3 Western 印迹法** 各取 30 $\mu$ g 蛋白进行变性的 7.5%、10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后电转移至 PVDF 膜上, 含有 5% 的牛奶的 TTBS 缓冲液封闭 1h, PVDF 膜与一抗 (1:800) 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, TTBS 漂洗 4 $\times$ 10min, 再与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:1 000) 室温下孵育 1h, TTBS 漂洗 3 $\times$ 10min, 最后用 ECL 法进行显色。图像分析仪 (UVIsoft) 定量测定杂交信号的吸光度。

**1.3.4 统计学分析** 以上实验重复 3~4 次, 实验结果用均数 $\pm$ 标准差表示, 各组间比较采用 one-way ANOVA (LSD 法)。

## 2 结果

### 2.1 各组雄鼠血清睾酮 (testosterone, T)、雌二醇 (estrogen, E<sub>2</sub>)、孕酮 (progesterone, P) 的水平

如表 1 所示, 老龄组的 T 下降有明显的统计学意义, E<sub>2</sub> 相对升高, T/E<sub>2</sub> 比例下降, P 无明显的改变。补充雄激素后 T 和 E<sub>2</sub> 升高, 其中 C 和 D 两组的 T 和 E<sub>2</sub> 升高有明显的统计学意义; 从表 1 还可见, B 组的 T 低于生理剂量, C 组的 T 接近生理剂量, 而 D 组的 T 高于生理剂量, 但均无统计学意义 (6 月龄的雄性大鼠血清 T、E<sub>2</sub> 和 P 的水平为正常对照分别为 (912.17 $\pm$ 438.37) $\mu$ g/L, (86.12 $\pm$ 19.81) ng/L, (8.66 $\pm$ 5.60) $\mu$ g/L。

**2.2 TE 对血管平滑肌组织 AR 及 ER- $\beta$  表达量的影响** 免疫印迹结果显示, 雄性 SD 大鼠主动脉血管平滑肌组织中存在 AR 和 ER- $\beta$ 。在给予中剂量的 TE 后, AR 的表达量最高。ER- $\beta$  的表达量受抑制, 尤其以中剂量最为明显 (表 2, 图 1, 图 2)。

## 3 讨论

高血压和冠心病患者中, 男性多于绝经前期女性, 有关雌激素及其受体与女性冠心病发病机制的

表 1 各组雄大鼠血清性激素水平比较

| 分组  | 例数 | 睾酮 ( $\mu$ g/L)        | 雌二醇 (ng/L)            | 睾酮/雌二醇 | 孕酮 ( $\mu$ g/L) |
|-----|----|------------------------|-----------------------|--------|-----------------|
| A 组 | 10 | 359.71 $\pm$ 358.30    | 129.32 $\pm$ 54.46    | 5      | 8.66 $\pm$ 2.03 |
| B 组 | 10 | 684.71 $\pm$ 303.24    | 129.54 $\pm$ 47.94    | 6      | 8.66 $\pm$ 3.20 |
| C 组 | 10 | 962.50 $\pm$ 284.20*   | 253.28 $\pm$ 81.01*** | 4      | 8.68 $\pm$ 4.43 |
| D 组 | 10 | 1 333.33 $\pm$ 493.29* | 332.07 $\pm$ 99.53*** | 4      | 8.68 $\pm$ 3.71 |

注: 与 A 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 B 组比较, ##  $P < 0.01$

表 2 各组雄大鼠 AR 和 ER-β OD 值的比较

| 分组  | 雄激素受体                        | 雌激素受体-β                        |
|-----|------------------------------|--------------------------------|
| A 组 | 100 <sup>△</sup>             | 100 <sup>△△</sup>              |
| B 组 | 99.50 ± 21.74 <sup>△</sup>   | 92.34 ± 18.68 <sup>△△</sup>    |
| C 组 | 125.38 ± 28.68 <sup>*#</sup> | 47.72 ± 18.12 <sup>*==▲▲</sup> |
| D 组 | 101.98 ± 15.42 <sup>△</sup>  | 82.13 ± 23.50 <sup>△△</sup>    |

注:  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , 与 A 组比较, \*  $P < 0.01$ , \* \*  $P < 0.001$ ; 与 B 组比较, #  $P < 0.01$ , # #  $P < 0.001$ ; 与 C 组比较, △  $P < 0.01$ , △△  $P < 0.001$  与 D 组比较, ▲  $P < 0.01$ , ▲▲  $P < 0.001$

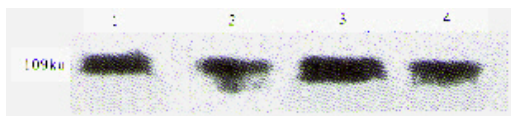


图 1 Western 印迹法显示的 AR 蛋白印迹  
注: 1 老龄对照组; 2 低剂量组; 3 中剂量组; 4 高剂量组

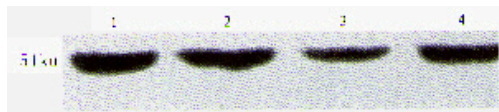


图 2 Western 印迹法显示的 ER-β 蛋白印迹  
注: 1 老龄对照组; 2 低剂量组; 3 中剂量组; 4 高剂量组

研究已较深入,但是有关雄激素及其受体与男性冠心病发病机制的研究却很少。血管壁中雄激素受体是 20 世纪 80 年代初 Lin 等<sup>[3]</sup>用放射性标记的双氢睾酮示踪显示发现的,并用实验证实了该受体具有饱和性、特异性以及高亲和力。雄激素受体属核受体家族,雄激素可以扩散进入靶组织和非靶组织,但它只在雄激素受体存在的靶组织细胞中行使其生物学功能。Fujimoto 等<sup>[4]</sup>、Higashiura 等<sup>[5]</sup>先后用 RT-PCR 和 Western 印迹法在培养的大鼠主动脉平滑肌细胞中发现有 AR mRNA 和蛋白存在。本实验的结果也证实了血管平滑肌组织中也存在 AR,而且发现其蛋白表达量受睾酮浓度的调节,接近生理剂量的睾酮可促进 AR 的表达量,而低于及高于生理剂量的睾酮对 AR 表达量却没有明显的影响,这可能与高生理剂量的睾酮在芳香酶的作用下转变成  $E_2$  有关,同时也说明了该受体具有特异性。此外,在类固醇激素受体家族中存在自动调节是相当普遍的现象,其自身调节的机制可能包括以下方面:一是在转录水平影响 AR mRNA 的表达量<sup>[6]</sup>;二是睾酮通过延长 AR mRNA 在多聚核糖体的滞留,增强 AR mRNA 的稳定性而在翻译水平发挥调控作用<sup>[7]</sup>。

雄激素通过与其受体结合而发挥其生物学作用。研究表明,男性冠心病患者服用睾酮能缓解心绞痛症状,即刻改善运动诱发的心肌缺血;睾酮可直接舒张犬和兔冠状动脉,快速引起大鼠主动脉舒张。

雄激素在其靶器官内可被 5-α 还原酶还原成生物活性较强的双氢睾酮,也可在芳香酶的作用下转变成  $E_2$ 。雌激素通过与其受体结合这一经典途径而发挥其生物学意义。雌激素受体分为 α 和 β 两种亚型,但其生物学意义尚不明确。本实验发现在雄大鼠血管平滑肌组织中还存在 ER-β,ER-β 的表达量与 AR 的表达量之间存在一定的关联。中剂量的 AR 的表达量最高,而 ER-β 的表达量却最低,高剂量的 ER-β 的表达量较中剂量的却有所升高,这可能与雄激素在芳香酶的作用下转变成雌激素,雌激素与其受体结合有关。中剂量抑制 ER-β 的表达效果最好,这可能与雄激素具有双相调节 ER-β 的表达有关。

雄激素与男性动脉粥样硬化、心肌病变、高血压等多种心血管疾病的发病相关,目前这方面的研究还不多,雄激素对男性心血管系统起有益还是不利作用,尚未达成共识。心血管系统中雄激素受体的发现及其功能的进一步研究,为从分子水平阐明雄激素的心血管系统作用提供了可能。但这方面的研究现在还处于起步阶段,仍有许多问题亟待阐明。此问题的逐步阐明将为男性冠心病的防治提供一个新的思路。

#### 参考文献

- Castelli WP. Lipids, risk factors and ischemic heart disease. *Atherosclerosis*, 1996, 124: S1-S9.
- Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids*, 1990, 55: 330-352.
- Lin AL, McGill HC Jr, Shain SA. Hormone receptors of the baboon cardiovascular system. Biochemical characterization of myocardial cytoplasmic androgen receptors. *Circ Res*, 1981, 49: 1010-1016.
- Fujimoto R, Morimoto I, Morita E, et al. Androgen receptors, 5-α-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994, 50: 169-174.
- Higashiura K, Mathur RS, Halushika PV, et al. Gender-related differences in androgen regulation of thromboxane  $A_2$  receptors in rat aortic smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997, 29: 311-315.
- Grad JM, Dai JL, Wu S, et al. Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Mol Endocrinol*, 1999, 13: 1896-1911.
- Mora GR, Mahesh VB. Autoregulation of the androgen receptor at the translational level: testosterone induces accumulation of androgen receptor mRNA in the rat ventral prostate polyribosomes. *Steroids*, 1999, 64: 587-591.

(收稿日期: 2002-03-05)

(本文编辑 李娜)