



睾酮对血管平滑肌细胞中雄激素受体mRNA表达的调控

男性冠心病的发病率显著高于同年龄组女性,近年来有关雄激素在男性冠心病发病中的作用逐渐受到了研究者的重视,临床试验、动物实验和体外研究均提示雄激素在血管功能调节中起重要作用。

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(AR)存在的靶组织细胞中行使其生物学功能,雄激素作用的强弱与细胞内AR含量密切相关,对AR表达调控的研究有重要的生物学意义。

血管平滑肌细胞(VSMCs)在动脉粥样硬化的发生过程中起着关键性的作用,以往研究业已证实VSMCs中存在雄激素受体[1]。本实验旨在观察睾酮对VSMCs内AR mRNA表达的自身调控作用。

1 材料与方 法

1.1 药物配制

精确称取睾酮在无水乙醇中搅拌溶解配制成 4×10^{-3} mol/L浓度,用培养基依次稀释为 4×10^{-6} 、 4×10^{-7} 、 4×10^{-8} 和 4×10^{-9} mol/L(乙醇终浓度均小于0.1%)。

1.2 细胞培养

取雄性SD大鼠(2月龄,160~180 g)胸主动脉,贴块法培养VSMCs,细胞鉴定采用免疫荧光法。在给以药物刺激的6天前,将培养液中的普通FBS替换为葡聚糖-活性炭预处理后的FBS以消除其中性激素对实验的干扰作用。实验用10代以内的细胞,在实验过程中没有观察到细胞凋亡、脱落及活力降低等毒性反应。

1.3 实验步骤

培养的VSMCs达80%融合时换用无血清DMEM静止24 h,使细胞周期实现同步化,然后给以不同刺激因素于1% FBS/DMEM培养液中作用相应时间。

1.4 细胞计数

VSMCs以等密度接种于六孔培养板,不同刺激作用相应时间后用胰酶消化,细胞计数板计数。

1.5 [^3H]-胸腺嘧啶([^3H]-TdR)掺入测定

VSMCs以等密度接种于96孔板,给以不同浓度睾酮作用的同时加入 1.85×10^4 Bq/孔 [^3H]-TdR(北京原子能研究所),继续培养24 h后终止反应,样品收集至玻璃纤维滤膜, Beckman LS-6500液体闪烁计数仪测定。

1.6 AR cDNA探针的制备

人/大鼠AR cDNA质粒pBluescript[®]II SK+由中科院上海生化所张永莲研究员提供,随机引物法标记其570 bp BamHI-SalI片段。

1.7 总RNA的抽提和Northern印迹分析

采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法从培养的VSMCs提取总RNA,各取30 μg 样品进行在1.0%琼脂糖/17.9%甲醛变性凝胶上电泳,毛细管虹吸法将RNA转移至尼龙膜,紫外交联仪固定后于杂交液中65 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交2 h,再与标记好的AR cDNA探针65 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜,洗膜后-70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影7~10 d。图像分析仪(UVIsoft)定量测定杂交信号的吸光度。

1.8 统计学分析

实验结果用均数±标准差表示，所有分析用SPSS统计软件完成，各组间比较采用One-Way ANOVA，多重比较采用LSD法。

2 结果

2.1 不同浓度睾酮对VSMCs中AR mRNA表达水平的影响

不同浓度睾酮($0\sim 4\ \mu\text{mol/L}$)作用24 h，VSMCs内AR mRNA表达水平呈剂量相关性增加(表1)。

表 1 不同浓度睾酮作用 24h 对 VSMCs 中 AR mRNA 表达水平的影响 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab.1 Effects of 24 hour testosterone treatment on AR mRNA expression in VSMCs ($n=3, Mean\pm SD$)

Group	Relative AR mRNA level normalized to 28sRNA
Control(0.1%ethanol)	97.67±7.22
Testosterone	
4 nmol/L	98.00±13.58
40 nmol/L	143.33±10.99*
400 nmol/L	177.67±14.62**
4 $\mu\text{mol/L}$	185.67±19.97**

$F=9.113, P=0.002; *P<0.05, **P<0.01$ vs control group

2.2 睾酮作用不同时间对VSMCs中AR mRNA表达水平的影响

VSMCs与生理水平的睾酮(40 nmol/L)作用10 min~12 h 细胞中AR mRNA水平无显著性改变，24 h时方能显著增加AR表达(表2)。睾酮的这种延时性作用提示VSMCs中AR mRNA的自身上调是需要转录过程介导的。

表 2 睾酮(40nmol/L)作用不同时间对 VSMCs 中 AR mRNA 表达水平的影响 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Tab.2 Effects of 40 nmol/L testosterone on AR mRNA expression in VSMCs ($n=3, Mean\pm SD$)

Time	Relative AR mRNA level normalized to 28sRNA
0	97.00±4.04*
10min	89.67±8.97
1 h	96.33±4.49
12 h	113.67±5.55
24 h	126.67±8.97*

$F=5.032, P=0.017; *P<0.05$

2.3 不同浓度睾酮对VSMCs数量及活力的影响

以往研究显示雄激素可以增强血管内皮细胞的凋亡相关损伤[2]，为排除雄激素对VSMCs活力可能的影响对上述实验结果的干扰，我们采用细胞计数和 $[^3H]$ -TdR掺入法观察了睾酮对VSMCs生长速率的影响，结果显示不同浓度睾酮与静止的VSMCs作用24 h，细胞数量和DNA合成均无显著性改变(表3)，说明实验过程中细胞活力稳定。

表 3 不同浓度(0~4 μ mol/L)睾酮作用 24 h 对 VSMCs 数量及 DNA 合成的影响 ($n=4, \bar{x}\pm s$)

Tab.3 Effects of a 24 hour testosterone treatment (0-4 μ mol/L) on cell number and DNA synthesis of VSMCs ($n=3, Mean\pm SD$)

Group	Cellcount	$[^3H]$ thymidine incorporation assay
Control(0.1%ethanol)	98.75±2.17	106.87±1.65
Testosterone		
4nmol/L	96.25±3.31	105.66±1.85
40nmol/L	102.50±5.40	101.60±2.33
400nmol/L	105.63±5.90	106.09±1.19
4 μ mol/L	102.50±3.68	104.87±1.65

$F=0.717, P=0.593$ for cellcount; $F=1.330, P=0.304$ for $[^3H]$

thymidine incorporation assay

睾酮能够有效抑制动脉内膜损伤后斑块的形成，这一作用由AR介导[3]，而VSMCs在动脉粥样硬化的产生过程中起着重要作用。本实验证实了VSMCs中存在AR的自身调控：不同浓度睾酮($0\sim 4\ \mu\text{mol/L}$)与VSMCs作用24 h使细胞内AR mRNA表达水平呈剂量相关性增加；生理水平的睾酮($40\ \text{nmol/L}$)与VSMCs孵育24 h，细胞内AR mRNA含量较对照组明显上升。由此提示睾酮可以对VSMCs的生物学功能进行直接调节，VSMCs是睾酮作用的靶细胞。有研究发现[3]，睾酮($1\sim 10\ \text{ng/ml}$)与兔主动脉环孵育21 d使动脉壁中AR mRNA表达量较空白对照组增加50%左右，本实验从细胞水平进一步证实了上述观点。

AR自身调控水平因细胞和组织的不同而异，包括基因转录水平、mRNA稳定性、翻译水平、蛋白稳定性等多方面。研究中我们同时观察了相同条件下睾酮对VSMCs中AR蛋白表达的调控作用，发现睾酮亦呈剂量和时间依赖性地增加细胞内AR蛋白表达(结果待发表)，但上调程度明显高于AR mRNA，即mRNA上调不足90%，而蛋白含量增加达5倍以上；睾酮对二者正向调控幅度的不平衡，也提示VSMCs中AR自身调控过程的复杂性，而不仅仅是基因转录水平的调控。与此类似，在体研究也证实了雄激素对血管功能的调节既有基因组效应[4][5]，也有非基因组效应[6]。

VSMCs增殖是动脉粥样硬化过程中的一个关键性事件，以往研究结果显示雄激素能够刺激VSMCs增殖[7]，另外的实验则显示这种刺激没有显著性作用[8]。出现上述矛盾的原因可能在于实验条件的差异，一个重要因素是细胞培养液组成的不同，即有高浓度的血清或者额外给以生长因子刺激，而导致其与雄激素作用的累加效应[9](我们的前期研究也显示当培养液中血清浓度为15%时，睾酮可以呈剂量相关性地影响VSMCs增殖[10])；另一个原因可能是雄激素作用时VSMCs生长状态的差异，因为细胞的生物学特征随分化阶段不同而异[11]，AR活性和水平也随细胞周期变化，在G1/S期时最低[12]，实验中以静止后同步化的VSMCs为研究对象也正是基于上述考虑。

总之，本研究证实了VSMCs中存在AR的自身调控，睾酮呈剂量和时间相关性地上调AR mRNA表达，且调控过程中细胞活力保持稳定，研究结果提示雄激素对VSMCs中AR表达的调控作用部分需要基因转录水平的参与。

参考文献：

- [1] Higashiura K, Mathur RS, Halushika PV, et al. Gender-related differences in androgen regulation of thromboxane A2 receptors in rat smooth-muscle cells[J]. *J Cardiol Pharm*, 1997, 29(3): 311-5.
- [2] Ling S, Dai A, Williams MR, et al. Testosterone (T) enhances apoptosis-related damage in human vascular endothelial cells[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(3): 1119-25.
- [3] Hanke H, Lenz C, Hess B, et al. Effect of testosterone on plaque development and androgen receptor expression in the arterial vessel wall[J]. *Circulation*, 2001, 103(10): 1382-5.
- [4] Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, et al. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits[J]. *Circ Res*, 1999, 84(7): 813-9.
- [5] Bruck B, Brehme U, Gugel N, et al. Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(10): 2192-9.
- [6] Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, et al. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo[J]. *Circulation*, 1996, 94(10): 2614-9.
- [7] Fujimoto R, Morimoto I, Morita E, et al. Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994, 50(3-4): 169-74.
- [8] Nakao J, Change WC, Murota SI, et al. Testosterone inhibits prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture[J]. *Atherosclerosis*, 1981, 39(2):

[9] Mizokami A, Saiga H, Matsui T, et al. Regulation of androgen receptor by androgen and epidermal growth factor in a human prostatic cancer cell line, LNCaP[J]. *Endocrinol Jpn*, 1992, 39(3): 235-43.

[10] 马 瑞, 吴赛珠, 吕红松, 等. 睾酮对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及其与雄激素受体水平变化的关系[J]. *中华心血管病杂志*, 2003, 31(6): 440-3.

Ma R, Wu SZ, Lü HS, et al. The effect of testosterone on the proliferation of vascular smooth muscle cells and its relation to androgen receptor expression in those cells[J]. *Chin J Cardiol*, 2003, 31(6): 440-3.

[11] Ross R. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components[J]. *Arteriosclerosis*, 1981, 1(5): 293-311.

[12] Martinez ED, Danielsen M. Loss of androgen receptor transcriptional activity at the G(1)/S transition[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(33): 29719-29.

参考文献:

[1] Higashiura K, Mathur RS, Halushika PV, et al. Gender-related differences in androgen regulation of thromboxane A2 receptors in rat smooth-muscle cells[J]. *J Cardiol Pharm*, 1997, 29(3): 311-5.

[2] Ling S, Dai A, Williams MR, et al. Testosterone (T) enhances apoptosis-related damage in human vascular endothelial cells[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(3): 1119-25.

[3] Hanke H, Lenz C, Hess B, et al. Effect of testosterone on plaque development and androgen receptor expression in the arterial vessel wall[J]. *Circulation*, 2001, 103(10): 1382-5.

[4] Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, et al. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits[J]. *Circ Res*, 1999, 84(7): 813-9.

[5] Bruck B, Brehme U, Gugel N, et al. Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(10): 2192-9.

[6] Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, et al. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo[J]. *Circulation*, 1996, 94(10): 2614-9.

[7] Fujimoto R, Morimoto I, Morita E, et al. Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994, 50(3-4): 169-74.

[8] Nakao J, Change WC, Murota SI, et al. Testosterone inhibits prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture[J]. *Atherosclerosis*, 1981, 39(2): 203-9.

[9] Mizokami A, Saiga H, Matsui T, et al. Regulation of androgen receptor by androgen and epidermal growth factor in a human prostatic cancer cell line, LNCaP[J]. *Endocrinol Jpn*, 1992, 39(3): 235-43.

[10] 马 瑞, 吴赛珠, 吕红松, 等. 睾酮对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及其与雄激素受体水平变化的关系[J]. *中华心血管病杂志*, 2003, 31(6): 440-3.

Ma R, Wu SZ, Lü HS, et al. The effect of testosterone on the proliferation of vascular

smooth muscle cells and its relation to androgen receptor expression in those cells[J].
Chin J Cardiol, 2003, 31(6): 440-3.

[11] Ross R. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components[J]. Arteriosclerosis, 1981, 1(5): 293-311.

[12] Martinez ED, Danielsen M. Loss of androgen receptor transcriptional activity at the G(1)/S transition[J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 29719-29.

[回结果列表](#)