

[文章编号] 1007-3949(2007)15-12-0899-04

• 实验研究 •

## 睾酮通过芳香化酶途径抑制人血管内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的基因表达

黄明学, 富路, 李丽敏, 高倩萍, 周立君, 陈彦东

(哈尔滨医科大学第一临床医学院 心内科与血液内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 内科学; 细胞培养; 睾酮; 人血管内皮细胞; 动脉粥样硬化; 单核细胞趋化蛋白 1; 芳香化酶抑制剂

[摘要] 目的 探讨睾酮对脐静脉内皮细胞生成单核细胞趋化蛋白 1 的影响与机制, 分析睾酮与内皮细胞功能及动脉粥样硬化的关系。方法 脂多糖刺激体外培养的脐静脉内皮细胞, 培养液中分别加入不同浓度睾酮( $3 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-6}$  mol/L 和  $3 \times 10^{-5}$  mol/L), ELISA 实验方法检测细胞上清液单核细胞趋化蛋白 1 蛋白含量, RT-PCR 方法检测单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 相对水平。培养液中加入雄激素受体拮抗剂或芳香化酶抑制剂, 重复上述实验。结果 与空白对照组( $374.16 \pm 10.2$ )比较,  $3 \times 10^{-10}$  mol/L 睾酮组上清液单核细胞趋化蛋白 1 蛋白含量明显增加( $424.50 \pm 11.3$ ,  $P < 0.05$ ), 随着睾酮浓度增加, 单核细胞趋化蛋白 1 逐渐减少,  $3 \times 10^{-5}$  mol/L 组差异具有统计学意义( $292.29 \pm 12.6$ ,  $P < 0.01$ )。与对照组比较,  $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L 组单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 水平明显降低。雄激素受体拮抗剂可逆转  $3 \times 10^{-10}$  mol/L 睾酮对单核细胞趋化蛋白 1 对蛋白生成的影响, 芳香化酶抑制剂可削弱睾酮对内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因表达与蛋白合成的抑制作用。结论 睾酮浓度降低, 可促进血管内皮细胞发生炎症反应; 睾酮达到生理浓度抑制内皮细胞发生炎症反应, 这种作用是睾酮通过细胞内芳香化酶转化为雌激素实现的。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Testosterone Reduces Mrna Level of Chemoattractant Protein of Human Umbilical Vein Endothelial Cell by Aminoglutethimide

HUANG Ming-Xue, FU Lu, LI Li-Min, GAO Qian Ping, ZHOU Li-Jun, and CHENG Yarr Dong

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

[KEY WORDS] Cell Culture; Testosterone; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Atherosclerosis; Monocyte Chemoattractant Protein 1; Aminoglutethimide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of different level testosterone on production of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in HUVEC and possible mechanism, so as to study the relationship between atherosclerosis and testosterone.

**Method** After foreclosed HUVEC with LPS and different testosterone (control,  $3 \times 10^{-10}$  mol/L, physiological concentration  $3 \times 10^{-9}$  and  $3 \times 10^{-8}$  mol/L,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  mol/L), protein production of MCP-1 was examined by ELISA and mRNA level by RT-PCR. To study the mechanism, we added Fluramide or Aminoglutethimide beforehand in the medium for 5 hours and reduplicated above experimental processes.

**Results** In contrast to control, protein production of lower testosterone was significantly increased and this effect was contracted by fluramide; while protein production were significantly decreased by  $3 \times 10^{-5}$  mol/L testosterone and mRNA level decreased by  $3 \times 10^{-9}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  mol/L testosterone, those effects were weakened by aminoglutethimide.

**Conclusion** Lower testosterone may stimulate inflammation of HUVEC; testosterone of physiological level or above could suppress HUVEC from inflammation and dysfunction by converting to estradiol.

大量临床研究和流行病学资料显示, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病率存在性别差异, 绝经前女性冠心病和心肌梗死的发病率低于同年龄组男性(1:3~4)。关于雌激素对女性心血管系统的保护

作用目前已基本明确, 因而雄激素曾一度被怀疑促进男性 As 的发生, 近年研究认为雄激素降低是 As 发生的危险因素<sup>[1]</sup>, 但其中的发生机制尚不完全明了。芳香化酶抑制剂可与细胞浆内的芳香化酶结合, 抑制后者将雄激素转化为雌激素。单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 是 As 过程中重要的炎症参与因子。本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为实验对象, 以芳香化酶抑制剂与雄激素受体拮抗剂为干预因素, 采用 ELISA 与 RT-PCR 方法,

[收稿日期] 2007-05-24 [修回日期] 2007-12-14

[作者简介] 黄明学, 博士, 主治医师, 研究方向动脉粥样硬化, E-mail 为 mingxue@163.com。富路, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 nadiafu@yahoo.com.cn。李丽敏, 硕士, 主治医师, 研究方向骨髓移植, E-mail 为 lilimin@sohu.com。

观察睾酮对脐静脉内皮细胞生成 MCP-1 的影响与可能的细胞内机制,探讨睾酮与 As 的关系与机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

睾酮 (testosterone)、雄激素受体拮抗剂 (flutamide)、芳香化酶抑制剂 (aminoglutethimide) 购自 Sigma USA。人 MCP-1 双抗体夹心 ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。逆转录酶、EX Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司。

### 1.2 细胞培养

脐静脉内皮细胞与培养液购自 Cascade 公司。细胞复苏后于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。所用细胞为第 3 代。睾酮浓度分别为 3 × 10<sup>-10</sup>、3 × 10<sup>-9</sup>、3 × 10<sup>-8</sup>、3 × 10<sup>-6</sup>、3 × 10<sup>-5</sup> mol/L 及单纯培养基空白对照。

### 1.3 单核细胞趋化蛋白 1 蛋白含量的检测

将 3 代 HUVEC 密度接种 96 孔板, 24 h 后换液, 加入睾酮与脂多糖 (终浓度为 10 mg/L)。24 h 后收集细胞培养液, 检测蛋白含量。用雄激素受体拮抗剂 10 μmol/L 与芳香化酶抑制剂 50 μmol/L 分别预刺激 HUVEC 5 h, 换液与含睾酮培养液共同培养 24 h, 检测培养液 MCP-1 蛋白含量。

### 1.4 cDNA 的获得

细胞生长至 80% 融合给予睾酮刺激, 采用异硫氰酸胍一酚一氯仿一步抽提法提取 HUVEC 总 RNA, 检测 RNA OD 值 A<sub>260/280</sub> 值介于 1.8~2.0 之间。取 2 μg 总 RNA 逆转录反应获得 cDNA。分别用雄激素受体拮抗剂、芳香化酶抑制剂预处理 HUVEC 5 h, 加入睾酮与脂多糖, 重复实验获得 cDNA。

### 1.5 引物的设计与合成

内参照 β-内肌动蛋白 (β-actin) 引物序列分别为 5'-AAG CAG GAG TAT GAC GAG GAG TCC G-3' 与 5'-GCC TTC ATA CAT CTC AAG TTG G-3' (559 bp); MCP-1 引物分别为 5'-GCT CAT AGC AGC CAC CTT CAT TG-3' 与 5'-GTC TTC GGA GTT TGG GTT TGC-3' (421 bp)。

### 1.6 PCR 反应及电泳

PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min → 94℃ 变性 60 s → 54℃ 退火 60 s → 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μL, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统分析目标基因和内参照基因的电泳条带灰度积分, 二者比值代表目标基因的相对表达含量 (实验重复三次)。

### 1.7 统计学分析

所有数据均输入计算机, 应用 SPSS 12.0 软件分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验或方差分析, *P* < 0.05 认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脐静脉内皮细胞上清液单核细胞趋化蛋白 1 蛋白含量

与空白对照组比较, 3 × 10<sup>-10</sup> mol/L 睾酮组 hUVEC 上清液 MCP-1 蛋白含量明显增加 (*P* < 0.05); 随睾酮浓度增加, MCP-1 逐渐减少, 3 × 10<sup>-9</sup>、3 × 10<sup>-8</sup>、3 × 10<sup>-6</sup> mol/L 浓度组差异无统计学意义; 3 × 10<sup>-5</sup> mol/L 组 MCP-1 显著减少 (*P* < 0.01)。应用雄激素受体阻滞剂后, 对照组 MCP-1 含量无明显变化; 3 × 10<sup>-10</sup> mol/L 浓度组 MCP-1 含量显著减少; 余各浓度组均显示出减低趋势, 但差异无统计学意义。芳香化酶抑制剂干预后, 3 × 10<sup>-5</sup> mol/L 组含量显著增加 (*P* < 0.01); 余各组有增加趋势, 但差异无统计学意义 (表 1)。

表 1. 脐静脉内皮细胞上清液单核细胞趋化蛋白 1 蛋白含量

睾酮浓度 (mol/L)	睾酮	睾酮+ 雄激素受体即拮抗剂	睾酮+ 芳香化酶抑制剂
0 (对照组)	374.16 ± 10.2	365.32 ± 15.7	376.34 ± 20.3
3 × 10 <sup>-10</sup>	424.50 ± 11.3 <sup>a</sup>	370.21 ± 18.4 <sup>c</sup>	427.09 ± 16.4
3 × 10 <sup>-9</sup>	408.15 ± 9.6	389.24 ± 13.5	417.12 ± 10.8
3 × 10 <sup>-8</sup>	398.98 ± 13.2	390.56 ± 11.8	409.56 ± 15.4
3 × 10 <sup>-6</sup>	355.01 ± 8.9	388.41 ± 9.7	412.11 ± 13.7 <sup>e</sup>
3 × 10 <sup>-5</sup>	292.29 ± 12.6 <sup>b</sup>	280.96 ± 11.8	396.72 ± 9.8 <sup>d</sup>

a 为 *P* < 0.05, b 为 *P* < 0.01, 同组之间比较; c 为 *P* < 0.05, d 为 *P* < 0.01, 与同浓度睾酮组比较。

### 2.2 不同浓度睾酮对人脐静脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 水平的影响

以 cDNA 为模板, PCR 扩增产物如图 1。由表 2 可见, 与对照组比较, 3 × 10<sup>-9</sup>、3 × 10<sup>-6</sup>、3 × 10<sup>-5</sup> mol/L 组 MCP-1 mRNA 明显下降; 3 × 10<sup>-10</sup> mol/L 与 3 × 10<sup>-8</sup> mol/L 组表现出下降的趋势, 但无统计学意义。

### 2.3 雄激素受体拮抗剂对单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 水平的影响

以 cDNA 为模板, PCR 扩增产物如图 2。由表 3 可见, 加入雄激素受体拮抗剂后, 不同睾酮浓度组的 MCP-1 mRNA 相对水平没有发生显著性变化。

表 2. 人脐静脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 相对水平(灰度值)

睾酮浓度(mol/L)	MCP-1/ $\beta$ -actin
对照组	0.61 $\pm$ 0.03
$3 \times 10^{-10}$	0.55 $\pm$ 0.02
$3 \times 10^{-9}$	0.47 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
$3 \times 10^{-8}$	0.56 $\pm$ 0.03
$3 \times 10^{-6}$	0.32 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
$3 \times 10^{-5}$	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

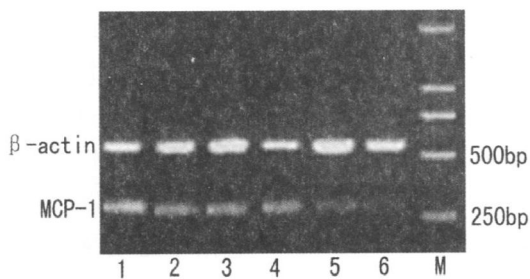


图 1. 睾酮对人脐静脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响 1 为空白对照组, 2-6 分别为睾酮浓度  $3 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L 组, M 为 Marker。

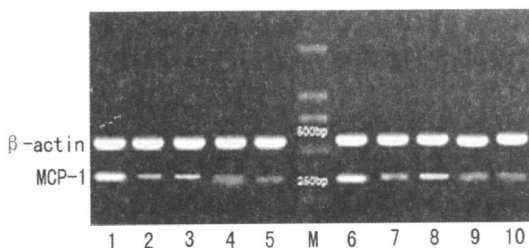


图 2. 雄激素受体拮抗剂对单核细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响 1~5 分别为睾酮浓度  $3 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L 组, 6~10 分别为雄激素受体拮抗剂+睾酮  $3 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L 组, M 为 Marker。

表 3. 雄激素受体拮抗剂对单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 水平的影响

睾酮浓度(mol/L)	睾酮	睾酮+ 雄激素受体拮抗剂
$3 \times 10^{-10}$	0.65 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.03
$3 \times 10^{-9}$	0.49 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.05
$3 \times 10^{-8}$	0.53 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.01
$3 \times 10^{-6}$	0.35 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.03
$3 \times 10^{-5}$	0.25 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.02

与同浓度睾酮组比较,  $P < 0.05$

### 2.4 芳香化酶抑制剂对单核细胞趋化蛋白 1mRNA 水平的影响

以 cDNA 为模板, PCR 扩增产物如图 3。培养液

中加入芳香化酶抑制剂后, MCP-1mRNA 水平增高,  $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-6}$  与  $3 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度组 MCP-1/ $\beta$ -actin 水平均显著高于同浓度睾酮组(表 4)。

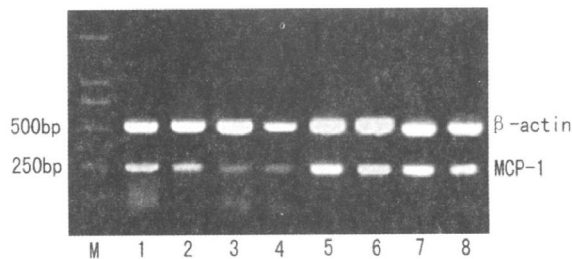


图 3. 芳香化酶抑制剂与睾酮对单核细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响 1~4 分别为睾酮浓度  $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L 组, 5~8 分别为芳香化酶抑制剂+睾酮  $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L 组, M 为 Marker。

表 4. 芳香化酶抑制剂对单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 水平的影响

睾酮浓度(mol/L)	睾酮	睾酮+ 芳香化酶抑制剂
$3 \times 10^{-9}$	0.45 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.03
$3 \times 10^{-8}$	0.42 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
$3 \times 10^{-6}$	0.23 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
$3 \times 10^{-5}$	0.25 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与同浓度睾酮组比较。

### 3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, 其中 MCP-1 是主要的炎症趋化因子之一, MCP-1 趋化、激活单核细胞滤过至内皮下转化为泡沫细胞, 在 As 发生与发展中发挥着重要的促进作用。血管内皮细胞是血管第一道屏障, 内皮细胞功能改变是 As 发生的始动环节。正常内皮细胞很少表达或不表达 MCP-1, As 或内皮细胞受损时表达增加。脂多糖是细菌内毒素的主要成分, 低浓度脂多糖(10 mg/L)对血管内皮细胞不具有强烈的毒性作用, 即血管内皮细胞的结构与形态无明显改变, 而以影响其功能为主, 在实验研究中常作为外源性刺激物制备细胞功能障碍模型<sup>[2]</sup>。本实验利用脂多糖刺激 hUVEC, 体外模拟内皮细胞功能障碍, 促进内皮细胞生成 MCP-1, 观察睾酮对 MCP-1 蛋白合成及基因表达的影响及其细胞内机制, 分析睾酮在 As 炎症过程中的作用。睾酮是人体内含量最丰富, 生理作用最强的雄激素, 血浆生理浓度为  $22.7 \pm 4.3$  nmol/L。成年后睾酮随年龄增长, 其含量逐渐降低; 而滥用雄激素的病人常伴发更高的血栓发生率。因此, 本实验参考相关文献报道, 采用了 5 个睾酮浓度梯度, 包括了低于生理( $3 \times$

$10^{-10}$  mol/L)、正常( $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-8}$  mol/L)及高于生理浓度组( $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L),观察睾酮对MCP-1的影响。Mukherjee TK等<sup>[3]</sup>研究发现睾酮抑制hUVEC VCAM-1的产生,但尚缺乏睾酮与MCP-1方面的研究。实验发现,低于生理浓度的睾酮增加hUVEC上清液中MCP-1蛋白含量,随浓度增加MCP-1蛋白含量逐渐降低,达到 $3 \times 10^{-5}$  mol/L时表现为显著下降。但在基因表达水平的研究中,结果与蛋白水平并不完全一致。MCP-1 mRNA的表达水平随着睾酮浓度的增加而受到抑制, $3 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-5}$  mol/L浓度组明显低于对照组。提示老年男性睾酮水平降低,体内抑制MCP-1生成的作用削弱,体内的炎症与粘附过程增强,进而加剧体内的动脉粥样硬化过程。

睾酮在细胞水平的作用机制主要包括雄激素受体途径与芳香化酶途径,睾酮对内皮细胞功能影响的细胞机制,国内外研究有着不同的观点。雄激素受体是介导雄激素在靶细胞中发挥的关键大分子,主要分布于睾丸间质细胞,在主动脉、冠状动脉、股动脉等心血管系统也存在。雄激素受体包括细胞核受体与细胞膜受体,前者通过第二信使途径发挥作用,后者参与调节基因表达与蛋白合成。本课题组前期研究发现,睾酮通过雄激素受体影响人血管内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活物抑制剂1,增强内皮细胞的纤溶活性<sup>[4]</sup>。李世军等<sup>[6]</sup>发现睾酮及其受体在调节雄兔动脉粥样硬化斑块病变进展及稳定性发挥着重要作用。芳香化酶存在于哺乳动物多种细胞的细胞浆内,可以将雄激素在细胞内转化为雌激素,后者再通过与雌激素受体结合而发挥作用。Nathan L等人<sup>[5]</sup>研究发现芳香化酶抑制剂逆转睾酮对去势雄性大鼠的As保护作用。而且这一结论在体外实验中亦得到验证<sup>[3]</sup>。本实验发现,低浓度睾酮促进HUVEC蛋白分泌而对基因表达没有影响,而这种作用在加入雄激素受体拮抗剂后消失,提示低浓度睾酮可能与细胞膜受体结合,通过第二信使途径促进MCP-1的释放。睾酮达到生理浓度后抑制MCP-1基因表达与蛋白合成,这种作用可被芳香化酶抑制剂逆转,提示睾酮浓度提高到一定水平,进入细胞内在芳香化酶作用下转化为雌激素,推测后者可能与雌激素受体结合在基因水平发挥作用。提示睾酮对hUVEC MCP-1的作用

机制多机制参与的,推测蛋白含量检测与RT-PCR结果不完全一致,可能与睾酮对MCP-1浓度依赖性双向调节有关。

国内、外一些临床研究通过对男性冠心病病人血脂代谢、纤溶活性、胰岛素抵抗与雄激素水平的观察<sup>[7-9]</sup>,认为男性雄激素水平降低是心血管系统的不利因素。本课题组在前期动物实验中证实雄激素对雄性家兔的动脉粥样硬化具有保护作用<sup>[10]</sup>。本实验发现,睾酮对内皮细胞的作用效果与睾酮浓度密切相关。睾酮达到生理水平抑制MCP-1合成,进而抑制内皮细胞发生炎症反应,改善内皮细胞功能,延缓动脉粥样硬化进程;生理或病理因素导致雄激素水平下降可损害内皮细胞功能,激活炎症过程,促进动脉粥样硬化。提示适当浓度的雄激素通过改善内皮细胞功能,对男性心血管系统发挥保护作用。可以设想,对雄激素水平低下的冠心病病人可以考虑应用雄激素补充治疗。但治疗效果与远期预后的判断,尚需要在未来的研究中深入探索,更需要循证医学的证据。

#### [参考文献]

- [1] Van den Beld AW, Bots ML, Janssen JA, Pols HA, Lamberts SW, Grobbee DE. Endogenous hormones and carotid atherosclerosis in elderly men [J]. *Am J Epidemiol*, 2003, **157** (1): 25-31.
- [2] 李珊珊, 李澎, 黄启福. 脂多糖对体外培养人脐静脉内皮细胞分泌功能及活力的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (7): 658-666.
- [3] Mukherjee TK, Dinh H, Chaudhuri G, Nathan L. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: Implications in atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (6): 4 055-060.
- [4] 富路, 金红, 梅轶芳, 周立君, 李少君. 睾酮通过雄激素受体影响人血管内皮细胞分泌tPA、PAI-1[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (6): 545.
- [5] Nathan L, Shi W, Dinh H, Mukherjee TK, Wang X, Lusic AJ, et al. Testosterone inhibits early atherogenesis by conversion to estradiol: critical role of aromatase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (6): 3 589-593.
- [6] 李世军, 李小鹰, 李燕. 睾酮及其受体在调节雄兔动脉粥样硬化斑块病变进展及稳定性中的作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, **35** (9): 858-860.
- [7] 王立真, 徐忠, 蔡尚郎. 血清雄激素水平与男性动脉粥样硬化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (11): 993-996.
- [8] 宋美情, 杨云梅, 徐哲荣. 老年男性动脉粥样硬化患者雄激素与血脂水平的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2004, **24** (6): 491-492.
- [9] Dominique S, Marie AC, Najiba L. Androgen therapy improves insulin sensitivity and decreases leptin level in healthy adult men with low plasma total testosterone: a 3-month randomized placebo controlled trial [J]. *Diabetes Care*, 2001, **24**: 2 149-156.
- [10] 高倩萍, 富路, 李元十, 金红, 李佳. 睾酮在雄兔体内的抗动脉粥样硬化作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (3): 213-216.

(此文编辑 李小玲)