

睾酮对动脉粥样硬化雄兔血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

郭园园, 李牧, 李世军, 朱平, 李小鹰, 杨庭树

(中国人民解放军总医院南楼心血管一科, 北京市 100853)

[关键词] 睾酮; 动脉粥样硬化; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1

[摘要] **目的** 探讨睾酮对动脉粥样硬化雄兔血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响。**方法** 选取雄性新西兰白兔 18 只, 随机分为假手术组、去势-安慰剂组和去势-睾酮组, 并建立动脉粥样硬化模型。化学发光法测定各组血清总睾酮。胸主动脉 HE 染色, 图像分析测定内膜和中膜厚度。夹心双抗酶联免疫法检测血清氧化型低密度脂蛋白水平。半定量 RT-PCR、免疫组织化学分析法测定血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 雄兔去势-安慰剂组血清总睾酮水平显著下降, 而去势-睾酮组血清总睾酮水平未见降低, 较假手术组差异无显著性。去势-安慰剂组雄兔胸主动脉内膜和内膜/中膜厚度较假手术组显著增加。各组雄兔血清氧化型低密度脂蛋白水平差异无显著性。去势-安慰剂组雄兔胸主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的 mRNA 和蛋白表达较假手术组显著升高, 而去势-睾酮组胸主动脉均无明显改变。**结论** 睾酮对动脉粥样硬化雄兔血清氧化型低密度脂蛋白没有显著影响, 但是可影响血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因的转录和翻译, 睾酮可能通过调节血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 而非氧化型低密度脂蛋白, 进而影响动脉粥样硬化的进程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Testosterone on Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1 Expression in Atherosclerotic Male Rabbits

GUO Yuan-Yuan, LI Mu, LI Shi-Jun, ZHU Ping, LI Xiao-Ying, and YANG Ting-Shu

(Division of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Testosterone; Atherosclerosis; Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether testosterone plays a role in regulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) in atherosclerotic male rabbits. **Methods** The model of castrated and atherosclerotic male rabbits was prepared. Pathological sections of thoracic aorta were performed hematoxylin-eosin (HE) staining. Total plasma testosterone was measured using ADVIA Centaur Immunoassay (Bayer, Germany) with chemical luminescent method. Serum oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) was assayed using ELISA kit. The expression of LOX-1 of thoracic aorta was measured by methods of RT-PCR, immunohistochemistry. **Results** Serum testosterone significantly decreased in castrated rabbits, whereas testosterone replacement restored the circulating testosterone to normal levels. Intimal thickness and ratio of intima and media obviously increased in castrated rabbits compared with sham-operation rabbits. The serum ox-LDL wasn't significantly different between each animal. The expression of LOX-1 of thoracic aorta in mRNA and protein was significantly increased in castrated rabbits compared with those in sham-operation rabbits, and decreased in the castrated rabbits following testosterone replacement. **Conclusions** Testosterone has no effect on serum ox-LDL in atherosclerotic rabbits, but plays key roles in the mRNA and protein expression of LOX-1 of thoracic aorta. Testosterone possibly regulates the development of atherosclerosis via mediating LOX-1 but not ox-LDL.

氧化应激可以直接导致血管内膜损伤并释放氧自由基, 低密度脂蛋白进入内皮下, 被氧自由基

攻击修饰, 形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)。研究显示血凝素样氧

[收稿日期] 2011-08-26

[基金项目] 中华医学会临床医学科研专项资金-动脉粥样硬化研究资金立项课题(09010490204)

[作者简介] 郭园园, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化基础与临床, E-mail 为 guoyuan6969@163.com。李牧, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化基础与临床。通讯作者李世军, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化基础与临床, E-mail 为 lishijun817@126.com。

化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1, LOX-1) 是 ox-LDL 的受体, LOX-1 介导 ox-LDL 对内皮细胞的损伤并参与巨噬细胞摄取 ox-LDL 的过程, 使巨噬细胞内脂质含量增加, 形成泡沫细胞并在损伤的内皮下聚积, 从而导致动脉粥样硬化的发生和发展^[1-3]。氧化应激是炎症过程中的伴随现象, 两者互为因果, 相互促进, 影响动脉粥样硬化进程。最新证据显示雄激素在男性动脉粥样硬化进程中可能是一种保护性因素^[4,5]。有报道睾酮缺乏的胆固醇酯转运蛋白 (cholesterylester transfer protein, CETP) 转基因大鼠抗 ox-LDL 抗体水平增加^[6]。老年男性总睾酮与抗 ox-LDL 抗体水平呈负相关^[7]。然而, 睾酮对 LOX-1 是否具有影响尚不明确。本研究旨在探讨雄激素睾酮是否对动脉粥样硬化雄兔 LOX-1 的表达存在影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

十一酸睾酮 (testosterone undecanoate, TU) 购自浙江仙琚制药厂; ox-LDL ELISA 试剂盒购自北京奇松生物科技有限公司; RT-PCR 引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成; 羊抗 LOX-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 二抗购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 动物

成熟雄性新西兰白兔 (2 ~ 2.5 kg) 18 只 (购自中国人民解放军总医院实验动物中心), 饲养条件为光照时间 12 h/天, 相对湿度 (55 ± 5)%, 室温 (20 ± 2)°C。本动物实验是经我院动物管理委员会许可后进行的。

1.3 动物模型建立与药物治疗

18 只成熟雄性新西兰白兔以标准兔饲料喂养、自由饮水 2 周。随机分为 3 组 (每组 6 只), 20% 乌拉坦 (5 mL/kg) 腹腔注射麻醉下分别进行假手术 (切开阴囊皮肤后缝合) 或行去势手术 (切除双侧睾丸)。手术 1 周后给予高脂饲料喂养, 并行以下分组处理: 假手术组行假手术; 去势-安慰剂组行去势手术, 肌注生理盐水; 去势-睾酮组行去势手术, 肌注十一酸睾酮 (6 mg/kg), 每 2 周一次。持续 12 周后, 禁食、水 12 h, 在 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉下行右心室采血, 离心分离血清, 于 -70°C 冰箱保存待测。解剖分离胸主动脉, 剥离血管外周脂肪, 置于 10% 甲醛中保存待测。

1.4 组织病理学检查

取胸主动脉中段常规石蜡包埋切片, 制成 4 μm 厚的病理切片, 行苏木素-伊红 (HE) 染色。应用计算机图像分析系统 (Image-Pro Plus Version 5.1) 进行图像分析, 测量胸主动脉内膜和中膜厚度, 每个标本测量 3 个部位 (胸主动脉近段、中段、远段), 每组测量 5 个标本取均值, 同时计算出内膜/中膜厚度比值。

1.5 血清总睾酮测定

取冻存血清 300 μL, 应用 Advia Centaur 免疫检测系统 (Bayer, 德国), 采用化学发光免疫分析法检测血清睾酮。

1.6 氧化型低密度脂蛋白的测定

清晨空腹心脏右心室采血 1.5 ~ 2 mL, 加入保护剂 (ox-LDL 检测试剂盒配备, 内含抗氧化剂及抗凝剂) 混匀, 于 2 h 内以 3000 r/min 离心 10 min, 提取血浆, 标本于 -70°C 冰箱中保存。采用夹心双抗酶联免疫法检测, 将特异性单克隆抗体包被固相载体, 与待测血浆样品中 ox-LDL 结合, 再加入酶标记特异性抗体, 然后加入底物显色, 应用酶标仪在 492 nm 处测定。标准血清浓度与 OD 值进行回归后计算出样品的浓度。

1.7 半定量 RT-PCR 检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达

应用 Trizol 试剂盒提取兔胸主动脉组织中总 RNA, 进行反转录获取 cDNA。反应总体积为 20 μL, 先将 RNA 1.5 μg 与 DEPC 水 13.5 μL 混合均匀, 72 °C 变性 10 min, 冰浴 5 min, 然后加 10 mmol/L dNTP 1 μL, 2.5 μmol/L Oligo-dT 1 μL, 5000 kU /L AMV 0.5 μL, 5 × buffer 4 μL, 42°C 60 min, 95°C 5 min, 4°C 5 min, 反转录反应结束。随后进行 PCR: LOX-1 mRNA 上游引物 5'-CAAGAGGCTCT-GAAGAGAATGG-3', 下游引物 5'-TATGCACAGGT-GCCTGAAGG-3', 产物长度 344 bp; GAPDH mRNA 上游引物 5'-GCCCTGGTCACCAGGGCTGCTT-3', 下游引物 5'-TGCCGAAGTGGTCGTGGATGACCT-3', 产物长度 465 bp。扩增条件为 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72°C 延伸 7 min。10 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下照相。将凝胶电泳图像输入美国 Kodak 凝胶分析系统, 计算 LOX-1 与 GAPDH 扩增条带光密度比值作为其相对表达量。

1.8 免疫组织化学半定量检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达

采用亲合素-生物素复合物 (ABC) 染色法。兔

胸主动脉石蜡切片常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,0.1 mol/L PBS (pH = 7.4) 清洗,加热修复抗原,1.5% 封闭血清 PBS 液孵育 1 h 消除非特异性染色,甩去血清,加羊抗 LOX-1 多克隆抗体,4℃ 孵育过夜,0.1 mol/L PBS 冲洗,加生物素标记的马抗山羊 IgG,37℃ 作用 1 h 后,PBS 清洗,加入 ABC 过氧化物酶复合物室温作用 1 h,然后 DAB 显色 3~5 min,苏木精复染。非免疫性山羊 IgG 作为阴性对照,0.1% 盐酸酒精分化,二甲苯透明,中性树脂封片,镜检。LOX-1 阳性染色呈棕黄色。观察并计算每张切片 LOX-1 阳性表达细胞面积与镜下视野面积的比值 (LOX-1%) 作为 LOX-1 蛋白表达水平。实验中各组免疫组织化学染色在同一时间进行。阴性对照照片以 PBS 替代 LOX-1 多克隆抗体。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清总睾酮与氧化型低密度脂蛋白水平

去势-安慰剂组血清总睾酮水平较假手术组显

著降低;而去势-睾酮组血清总睾酮水平未见降低,较假手术组差异无显著性,但与去势-安慰剂组比较,血清总睾酮水平显著升高。去势-安慰剂组和去势-睾酮组血清 ox-LDL 水平与假手术组相比差异均无显著性(表 1)。

表 1. 各组雄兔总睾酮和氧化型低密度脂蛋白水平 (μg/L)
Table 1. Serum testosterone and ox-LDL levels in each group

分 组	总睾酮	ox-LDL
假手术组	1.39 ± 0.45	289.16 ± 76.23
去势-安慰剂组	0.04 ± 0.00 ^a	262.52 ± 91.76
去势-睾酮组	2.23 ± 0.89 ^b	280.42 ± 55.16

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与去势-安慰剂组比较。

2.2 胸主动脉内膜厚度和内膜/中膜厚度

胸主动脉 HE 染色结果显示,去势-安慰剂组胸主动脉内膜厚度和内膜/中膜厚度较假手术组显著增加;去势-睾酮组胸主动脉内膜厚度和内膜/中膜厚度则未见明显增加,较假手术组差异无显著性,但显著小于去势-安慰剂组(表 2 和图 1)。

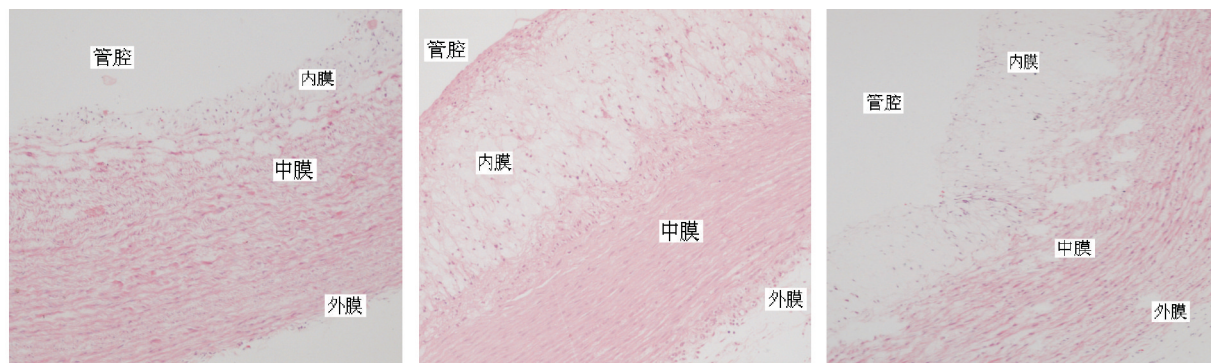


图 1. 各组雄兔胸主动脉内膜厚度和内膜/中膜厚度 (×100)

从左到右依次为假手术组、去势-安慰剂组和去势-睾酮组。

Figure 1. Intimal thickness and intima/media ratio in thoracic aorta in each group

表 2. 各组雄兔胸主动脉内膜厚度和内膜/中膜厚度的比较

Table 2. Intimal thickness and intima/media ratio in thoracic aorta in each group

分 组	内膜厚度 (μm)	内膜/中膜厚度比值
假手术组	69.76 ± 9.45	0.71 ± 0.34
去势-安慰剂组	97.51 ± 14.03 ^a	1.68 ± 0.29 ^a
去势-睾酮组	74.85 ± 10.89 ^b	0.84 ± 0.63 ^b

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与去势-安慰剂组比较。

2.3 胸主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达

半定量 RT-PCR 结果显示,去势-安慰剂组胸主动脉 LOX-1 mRNA 表达较假手术组显著升高;而去势-睾酮组 LOX-1 mRNA 表达未见明显升高,较假手术组差异无显著性,但与去势组比较,胸主动脉 LOX-1 mRNA 表达显著下降(表 3 和图 2)。

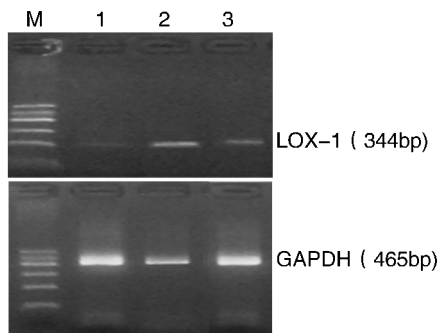


图2. 雄兔胸主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1 mRNA 表达 M 为 Marker, 1 为假手术组, 2 为去势-安慰剂组, 3 为去势-睾酮组。

Figure 2. Expression of LOX-1 mRNA in thoracic aorta tissues of different groups

2.4 胸主动脉氧化型低密度脂蛋白受体1蛋白表达 去势-安慰剂组雄兔胸主动脉有较多棕黄色

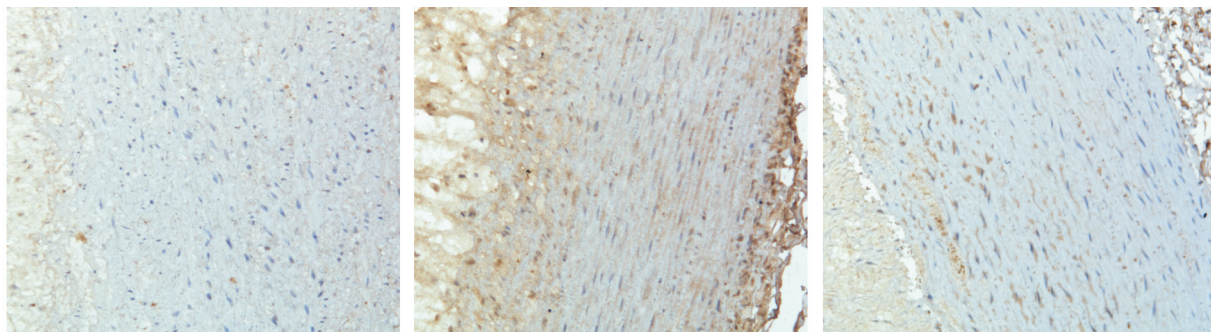


图3. 免疫组织化学检测各组雄兔胸主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1蛋白表达($\times 100$) 从左到右依次为假手术组、去势-安慰剂组和去势-睾酮组。

Figure 3. Expression of LOX-1 protein in thoracic aorta tissues of different groups using immunohistochemistry staining

3 讨论

血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1(LOX-1)作为 ox-LDL 受体在动脉粥样硬化中起重要作用。以往动物实验研究显示雄激素睾酮与雄激素受体参与调节雄兔动脉粥样硬化斑块进展与斑块的稳定性^[8], 雄激素不足时将通过影响脂质代谢而促进动脉粥样硬化的发生。对于性腺功能减退的男性在补充雄激素后可显著改善其脂质代谢, 而起到抗动脉粥样硬化的作用^[9]。睾酮缺乏致 CETP 转基大鼠抗 ox-LDL 抗体水平增加^[6]。临床研究也提示老年男性总睾酮与抗 ox-LDL 抗体水平呈负相关^[7]。为证明雄激素通过 ox-LDL/LOX-1 调节进而影响动脉粥样硬化进程, 我们进行了以下研究。本研究参照以往的方法^[10], 通过去除雄兔双侧睾丸、喂养高

LOX-1 表达, LOX-1 在内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞以及血管外膜均有表达, 定量分析显示与假手术组差异有显著性; 去势-睾酮组雄兔胸主动脉棕黄色 LOX-1 表达分布稀疏, 较去势-安慰剂组差异有显著性, 但较假手术差异无显著性(表3和图3)。

表3. 各组雄兔胸主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1 mRNA 和蛋白表达

Table 3. Expression of LOX-1 mRNA and protein in thoracic aorta tissues of different groups

分 组	LOX-1 mRNA	LOX-1 蛋白
假手术组	0.17 \pm 0.02	24.26% \pm 5.47%
去势-安慰剂组	2.09 \pm 0.48 ^a	52.17% \pm 8.19% ^a
去势-睾酮组	0.35 \pm 0.44 ^b	29.35% \pm 3.85% ^b

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与去势-安慰剂组比较。

脂饲料成功建立了雄激素缺乏的动脉粥样硬化模型, 结果显示雄兔去势后血清总睾酮水平较假手术组显著降低; 雄兔去势补充睾酮后血清总睾酮水平则未见降低, 较假手术组差异无显著性, 但与去势-安慰剂组比较, 血清总睾酮水平显著升高。胸主动脉 HE 染色结果显示, 雄兔去势后胸主动脉内膜厚度和内膜/中膜厚度比值较假手术组显著增加; 雄兔去势补充睾酮后胸主动脉内膜厚度和内膜/中膜厚度比值则未见显著增加。通过去势、喂养高脂饲料方法建立雄激素缺乏的动脉粥样硬化模型得到了大多数学者的认可^[11]。

以往研究认为血清睾酮与 ox-LDL 水平呈负相关^[7,12], 但血清睾酮水平降低与 ox-LDL 浓度升高之间的因果关系还不清楚。我们通过夹心双抗酶联免疫法测定各组雄兔血清 ox-LDL 的水平, 结果发现

雄兔去势后血清 ox-LDL 水平较假手术组差异无显著性;去势补充睾酮后血清 ox-LDL 水平较假手术组亦差异无显著性。提示雄激素睾酮对雄兔动脉粥样硬化时血清 ox-LDL 水平并无调节作用。

为证明睾酮是否通过调节 ox-LDL 的下游分子,即 LOX-1,进而发挥调节动脉粥样硬化的作用,我们进一步观察了雄激素睾酮对 LOX-1 mRNA 和蛋白表达的调节作用。以往研究显示二氢睾酮对雄兔主动脉 LOX-1 的 mRNA 表达具有抑制作用^[11],但是在 LOX-1 基因蛋白质翻译水平二氢睾酮是否具有同样作用还不清楚;而且该项研究使用的雄激素是二氢睾酮,而非睾酮。在体内睾酮不但可由 5 α 还原酶作用下转化为二氢睾酮,而且可以在芳香酶作用下转化为雌二醇。因此,为充分了解雄激素对 LOX-1 基因表达的调节作用,仅仅使用二氢睾酮是不够的。实时定量 PCR 实验结果显示雄兔去势后胸主动脉 LOX-1 mRNA 表达较假手术组显著升高;雄兔去势补充睾酮组的 LOX-1 mRNA 表达则并无显著改变。免疫组织化学半定量分析结果显示,LOX-1 在胸主动脉内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞以及血管外膜均有表达,去势-安慰剂组雄兔胸主动脉有较多棕黄色 LOX-1 表达,与假手术组比差异有显著性;雄兔去势补充睾酮后胸主动脉高棕黄色 LOX-1 表达分布稀疏,较去势-安慰剂组差异有显著性增加。这一结果提示雄激素睾酮在基因转录和翻译水平上对 LOX-1 表达均具有调节作用。雄激素睾酮对动脉粥样硬化的调节作用很可能是通过调节 LOX-1 而非 ox-LDL 实现的。以往的研究显示,去势雄兔血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6、可溶性细胞间黏附分子 1 水平显著升高;而去势雄兔补充酸睾酮后,这些血清炎症因子水平再次显著下降^[7];而 Moriwaki 等^[13]研究证明肿瘤坏死因子 α 能够上调巨噬细胞 LOX-1 的表达。雄激素睾酮对 LOX-1 转录和翻译水平的调节作用,是否通过调节炎症反应实现值得进一步研究。

总之,睾酮对动脉粥样硬化雄兔血清 ox-LDL 没有显著影响,但是对 LOX-1 基因的转录和翻译均发挥重要调节作用,睾酮可能通过调节 LOX-1 而非 ox-LDL,进而影响动脉粥样硬化的进程。

[参考文献]

[1] Li D, Liu L, Chen H, et al. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metal-

loproteinases in human coronary artery endothelial cells [J]. *Circulation*, 2003, 107(4): 612-617.

- [2] Reiss AB, Anwar K, Wirkowski P. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) in atherogenesis: a brief review[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(21): 2 641-652.
- [3] Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, et al. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy [J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342(2): 135-142.
- [4] Traish AM, Kypreos KE. Testosterone and cardiovascular disease: an old idea with modern clinical implications[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(2): 244-248.
- [5] Corona G, Rastrelli G, Vignozzi L, et al. Testosterone, cardiovascular disease and the metabolic syndrome [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(2): 337-353.
- [6] Casquero AC, Berti JA, Salerno AG, et al. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by CETP expression in transgenic mice [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(7): 1 526-534.
- [7] Barud W, Palusiński R, Beltowski J, et al. Inverse relationship between total testosterone and anti-oxidized low density lipoprotein antibody levels in ageing males [J]. 2002, 164(2): 283-288.
- [8] 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.
- [9] Traish AM, Abdou R, Kypreos KE. Androgen deficiency and atherosclerosis: the lipid link [J]. *Vasc Pharmacol*, 2009, 51(5-6): 303-313.
- [10] Li S, Li X, Li Y. Regulation of atherosclerotic plaque growth and stability by testosterone and its receptor via influence of inflammatory reaction [J]. *Vasc Pharmacol*, 2008, 49(1): 14-18.
- [11] Qiu Y, Yanase T, Hu H, et al. Dihydrotestosterone suppresses foam cell formation and attenuates atherosclerosis development [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(7): 3 307-316.
- [12] Linna MS, Ahotupa M, Irjala K, et al. Smoking and low serum testosterone associates with high concentration of oxidized LDL [J]. *Ann Med*, 2008, 40(8): 634-640.
- [13] Moriwaki H, Kume N, Kataoka H, et al. Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha [J]. *FEBS Lett*, 1998, 440(1-2): 29-32.

(此文编辑 许雪梅)