

# 睾酮通过上调血管内皮生长因子表达 促进外周血内皮祖细胞增殖

薛亚威, 任国庆, 王 芝, 孙文文, 张 浩

(江苏大学附属医院, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 内皮祖细胞; 睾酮; 雄激素受体; 细胞增殖; 血管内皮生长因子

[摘要] **目的** 探讨雄激素对外周血内皮祖细胞(PB-EPC)增殖能力的影响及其可能机制。**方法** 将健康志愿者外周血经密度梯度离心法分离的单个核细胞接种至人纤维连接蛋白包被的培养板中,EGM-2MV 培养 7 天后,多波长激光共聚焦显微镜鉴定 FITC 标记的荆豆凝集素和 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白双染色阳性为 PB-EPC。将贴壁细胞分为 5 组,前 4 组分别加入 0、1、10、100 nmol/L 睾酮,第 5 组加入 10 nmol/L 雄激素受体阻断剂氟他胺干预 3 h 后,再加 10 nmol/L 睾酮干预。培养 48 h 后,MTT 比色法检测各组 PB-EPC 的增殖能力。实时定量 PCR 检测血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 的表达变化,ELISA 检测 VEGF 分泌量的变化。**结果** 睾酮呈浓度依赖性促进 EPC 增殖,雄激素受体阻断剂氟他胺完全阻断睾酮对 EPC 的促进作用。与空白对照组相比,睾酮在 mRNA 和蛋白水平上调 PB-EPC 的 VEGF 表达,氟他胺可阻断此作用。**结论** 睾酮通过雄激素受体途径上调 VEGF 的表达,促进 PB-EPC 增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Testosterone Enhances the Proliferation of Peripheral-Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells by up-regulating Vascular Endothelial Growth Factor Expression

XUE Ya-Wei, REN Gong-Qing, WANG Zhi, SUN Wen-Wen, and ZHANG Hao

(Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cells; Testosterone; Androgen Receptor; Proliferation; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects and related mechanisms of testosterone on the proliferation of Peripheral-blood endothelial progenitor cells (PB-EPCs). **Methods** Total mononuclear cells(MNC) were isolated from peripheral blood of healthy volunteers by Ficoll density gradient centrifugation, culturing with EGM-2MV for 7 days in vitro. The adherent cells showed up taking of acetylated low-density (ac-LDL-DiI) and binding of lectin (FITC-UEA-I), observing with confocal laser scanning microscopy. PB-EPC were dealt with four concentrations of testosterone, as 0 nmol/L, 1 nmol/L, 10 nmol/L, and 100 nmol/L respectively, and in another group PB-EPC were pretreated with 10 nmol/L flutamide (androgen receptor antagonist) for 3h and then stimulated with 10 nmol/L testosterone. After 48 h, the ability of cell proliferation was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT). The VEGF expression was tested by quantitative real-time RT-PCR and ELISA assay. **Results** The proliferation of PB-EPC were increased by testosterone in a dose-dependent manner, however, these effects could be blocked by flutamide. Testosterone can up-regulate VEGF both on mRNA and protein level, however, these effects could be blocked by flutamide. **Conclusions** Testosterone enhances the proliferation of PB-EPCs by up-regulating VEGF expression via androgen receptor pathway.

流行病学调查显示,男性性别是独立的心血管疾病致病因子<sup>[1]</sup>,由此,雄激素曾一度被认为是引起男性心血管疾病发生的潜在危险因素。近年来

越来越多的临床数据显示血浆睾酮水平低下会增加男性患者心血管疾病的风险<sup>[2,3]</sup>,Sieveking 等<sup>[4]</sup>发现雄激素调控血管生成、参与血管修复,证实雄激

[收稿日期] 2011-04-06

[作者简介] 薛亚威,硕士研究生,研究方向为雄激素与循环内皮祖细胞,E-mail 为 dzxueyawei@126.com。通讯作者任国庆,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为缺血性心脏病的临床与基础,E-mail 为 doctorgq@sohu.com。

素对心血管系统存在保护作用。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)自骨髓动员到外周血,并归巢到血管损伤部位分化为成熟的内皮细胞,参与血管修复<sup>[5,6]</sup>。作者推论雄激素可能通过影响EPC功能发挥其调控血管生成的作用,本研究选择从不同浓度睾酮对PB-EPC增殖能力的影响角度,探讨雄激素通过影响EPC功能发挥其调控血管生成作用的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

EGM-2MV 培养液(Clontechs 公司),人淋巴细胞分离液(天津灏洋公司),人纤维连接蛋白(human fibronectin HFN, ChemiCon 公司),DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL, Invitrogen 公司),FITC 标记的荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I),二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、睾酮、氟他胺(Sigma 公司),1:250 胰蛋白酶(上海生物工程技术有限公司),引物(生工生物工程上海有限公司),Rever Tra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit (TOYOBO 公司),SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 公司),人 VEGF 的酶联免疫吸附法(Human enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(R&D systems 公司)。

### 1.2 外周血内皮祖细胞的分离与体外培养

取健康成年(20~30岁)男性外周血 20 mL(肝素抗凝),用人淋巴细胞分离液经密度梯度离心法获得单个核细胞,加 EGM-2MV 培养基调整细胞至  $2 \sim 5 \times 10^6$  mL 接种至人纤维蛋白包被的 24 孔培养板中,放入培养箱(37℃, 5% CO<sub>2</sub>、湿度 95%)中培养,4 天后去除未贴壁细胞,以后隔天换液。培养过程中在 40 倍倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化。

### 1.3 外周血内皮祖细胞的双荧光染色鉴定

培养至第 7 天,对贴壁细胞进行鉴定:加入 DiI-ac-LDL(2.4 mg/L) 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗两次,加 4% 多聚甲醛固定细胞,用 PBS 浸洗 3 次,晾干后将 10 mg/L 的 FITC-UEA-I 加于上述标本于 37℃ 下孵育 1 h,再用 PBS 洗 3 次,吹干待检,滴上缓冲甘油(甘油一份,0.01 mmol/L、PH7.2 的 PBS 一份)一滴。多波长激光共聚焦显微镜鉴定,双染色阳性细胞为正在分化的 PB-EPC。

### 1.4 外周血内皮祖细胞增殖能力的检测

收集贴壁细胞随机分成 5 组,空白对照组、1 nmol/L 睾酮干预组、10 nmol/L 睾酮干预组、100

nmol/L 睾酮干预组、10 nmol/L 氟他胺干预 3 h 后再加 10 nmol/L 睾酮干预组。培养 48 h 后,加入 5 g/L MTT 20 μL,避光孵育 4 h 后弃上清,加入 150 μL DMSO,于微量振荡器中充分震荡 10 min,波长 492 nm 测吸光度值(OD)。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 检测 VEGF mRNA 水平

将贴壁细胞随机分成 3 组,空白对照组(control)、10 nmol/L 睾酮干预组、10 nmol/L 氟他胺预处理组。采用 Real-time PCR 法检测各组 VEGF mRNA 表达。收集贴壁细胞,用 Trizol 提取 PB-EPCs 总 RNA,紫外分光光度法测定其含量与纯度,逆转录 cDNA,反应体系:65℃ 5 min 预变性,37℃ 15 min 逆转录,98℃ 5 min 酶失活。以 18 S ribosomal RNA 为内参,上游 5'-TGG TTG CAA AGC TGA AAC TTA AAG-3',下游 5'-AGT CAA ATT AAG CCG CAG GC-3';VEGF 引物上游 5'-ATC AGT TCG AGC AAA GGG AAA G-3',下游 5'-GAG GCT CCA GGG CAT TAG AC-3',用 RT-PCR 试剂盒(SYBR Green Real-time PCR Master Mix, TOYOBO 公司)和 Strata gene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪进行 Real-time PCR 扩增。反应体系:95℃ 30 s,40 个循环(95℃ 5 s,60℃ 10 s,72℃ 15 s),扩增后统计 CT 值之差,比较各组 mRNA 表达量的变化。产物琼脂糖凝胶电泳,自动成像分析系统下成像,重复 3 次。

### 1.6 ELISA 检测细胞上清中的 VEGF 水平

将贴壁细胞随机分成 3 组,空白对照组、10 nmol/L 睾酮干预组、10 nmol/L 氟他胺预处理组。收集各组细胞上清液,1 000 r/min 离心 10 min 去除颗粒和聚合物,根据 ELISA 试剂盒说明书加入试剂,自动酶标仪上以 450 nm 波长测定光密度值。

### 1.7 统计学处理

所有数据以表示,应用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,采用单因素方差分析比较组间差异, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外周血内皮祖细胞的鉴定

倒置相差显微镜下细胞形态学特征:培养到第 4 天可以观察到椭圆形、短梭形细胞(图 1A);培养到第 7 天,梭形细胞逐渐增多,并呈簇生长(图 1B)。细胞双荧光染色鉴定:在激光共聚焦显微镜下,EPC 吸附 FITC-UEA-I 呈绿色(图 1C),染色阳性率近 100%;EPC 吸附 DiI-ac-LDL 呈红色(图 1D),染色阳性率近 100%;EPC 同时吸附 FITC-UEA-I 和 DiI-

ac-LDL 呈黄色(图 1E),表示为正在分化的 EPC,双染阳性率为  $83.87\% \pm 1.20\%$ 。

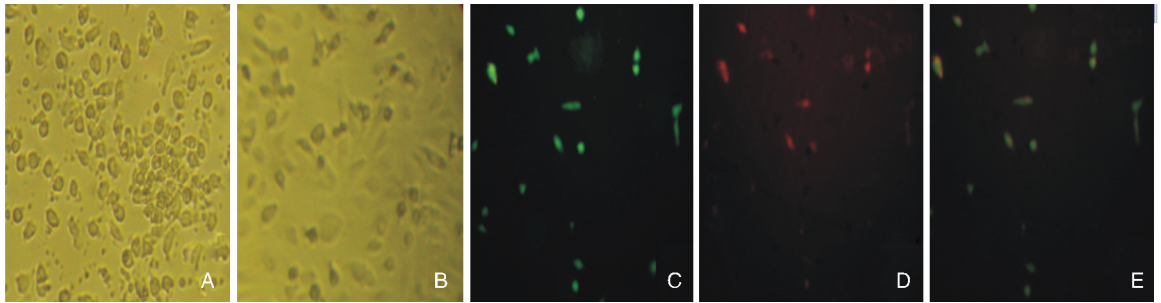


图 1. 内皮祖细胞的鉴定结果( $\times 200$ ) A 为培养 4 天, B 为培养 7 天, C 为 EPC 吸附 FITC-UEA-I 呈绿色, D 为 EPC 吸附 DiI-ac-LDL 呈红色, E 为 EPC 同时吸附 FITC-UEA-I 和 DiI-ac-LDL 呈黄色。

Figure 1. The results of identification of endothelial progenitor cells

## 2.2 睾酮通过雄激素受体途径促进外周血内皮祖细胞的增殖能力

睾酮呈浓度依赖性促进 EPC 增殖(492 nm OD 值: 0 nmol/L,  $0.156 \pm 0.025$ ; 1 nmol/L,  $0.237 \pm 0.031$ ; 10 nmol/L,  $0.249 \pm 0.047$ ; 100 nmol/L,  $0.269 \pm 0.047$ ;  $P < 0.05$ ), 雄激素受体阻断剂氟他胺完全阻断睾酮对 EPC 的促进作用( $0.154 \pm 0.020$ ), 与空白对照组相比差异无显著性。

## 2.3 睾酮对 PB-EPC VEGF 表达的影响

实时定量 PCR 结果显示, 与对照组相比, 睾酮能上调 PB-EPC VEGF mRNA 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与睾酮组相比, 氟他胺能阻断睾酮的促进作用, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 睾酮能促进 PB-EPC 的 VEGF 分泌, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与睾酮组相比, 氟他胺能阻断睾酮的促进作用, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ; 表 1)。

表 1. PB-EPC 的 VEGF mRNA 表达和蛋白分泌量变化( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. The expression of VEGF mRNA and protein

分 组	VEGF mRNA	VEGF 分泌量 (ng/L)
空白对照组	$0.13 \pm 0.16$	$106.66 \pm 18.26$
睾酮干预组	$11.05 \pm 2.19^a$	$252.25 \pm 9.33^a$
氟他胺预处理组	$0.55 \pm 0.78^b$	$122.09 \pm 21.89^b$

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与睾酮干预组相比。

## 3 讨 论

本实验结果显示, 睾酮以浓度依赖性模式促进 PB-EPC 增殖, 其机制与睾酮通过雄激素受体途径上调 PB-EPC VEGF 的表达有关。实验结果证实了

我们最初的推论, 证明了雄激素有参与血管修复并保护血管系统的作用。

睾酮是体内主要循环雄激素, 其正常血浆浓度为  $22.7 \pm 4.3$  nmol/L, 由睾丸间质细胞合成的, 在靶器官内经  $5\alpha$ -还原酶还原为双氢睾酮再与靶细胞内的受体结合而发挥作用。男性内源性睾酮水平与心血管疾病的死亡率和危险因素之间呈现负性相关关系<sup>[7]</sup>, 雄激素缺乏会增加总胆固醇和低密度脂蛋白水平, 增加炎症因子的产生, 从而导致动脉壁增厚和内皮功能不全, 给予外源性睾酮后可以逆转上述作用<sup>[8]</sup>, 提示血循环中睾酮水平低下是男性冠心病发病率和死亡率增加的危险因素<sup>[9]</sup>。研究发现睾酮可增加老年男性的血管内皮功能, 舒张冠状动脉, 缓解老年男性心绞痛症状, 改善缺血心肌的供血<sup>[10]</sup>。Sieveking 等<sup>[4]</sup>证实雄激素通过雄激素受体途径促进雄性小鼠内皮细胞的增殖、迁移和成血管能力来发挥其促进血管生成的效应。

EPC 作为血管内皮细胞的前体细胞, 在各种刺激因素作用下从骨髓动员分化到外周血, 并归巢到受损伤血管处分化为成熟的内皮细胞, 参与血管修复和新生<sup>[11]</sup>, 是预测冠心病发病程度和预后的可靠指标。循环 EPC 数目减少和功能减退会增加冠心病心血管事件反复发生的风险<sup>[12,13]</sup>, 我们前期研究发现, 冠心病患者晚期 EPC 的集落数及增殖、迁移和黏附能力较非冠心病组明显降低<sup>[14]</sup>。性功能减退的男性患者外 PB-EPC 数目下降, 而应用睾酮替代治疗后数目恢复正常<sup>[15]</sup>, 睾酮能够促进 EPC 动员到外周血。已有研究证实 EPC 存在雄激素受体(AR)的表达<sup>[16]</sup>, 睾酮能够通过雄激素受体途径促进 PB-EPC 增殖和迁移能力<sup>[17]</sup>, 这一点与本实验中验证的雄激素受体阻断剂氟他胺能够阻断睾酮促进 EPC 增殖能力的结果相一致。

为进一步研究睾酮刺激 EPC 增殖的机制,我们从 mRNA 和蛋白水平检测了 VEGF 的表达。VEGF 是一种有丝分裂原,能够特异性地促进内皮细胞的生长和血管新生,增加内皮通透性。Asahara 等<sup>[17]</sup>发现 VEGF 参与 EPC 从骨髓向外周血的动员过程,给予外源性 VEGF 能够有效增加外周血中的 EPC 水平。Walter 等<sup>[18]</sup>用 VEGF164 基因的腺病毒载体转染 EPC 后, EPC 分泌的 VEGF 量显著增加并且 EPC 的增殖能力明显增强。有报道认为血管紧张素 II 可能通过上调 VEGF 的表达,改善 EPC 的增殖、迁移、黏附和体外血管生成能力<sup>[19]</sup>。本实验结果表明,睾酮显著上调了信号因子 VEGF 的转录及蛋白水平的表达,可能是睾酮提高 EPC 增殖能力的机制之一。

近年来男性雄激素水平与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)之间的关系备受关注,目前比较公认的观点是生理浓度睾酮具有抗 As、防治冠心病的作用。但是睾酮抗 As 的作用机制仍不十分清楚,后续实验将会进一步研究睾酮对 EPC 的迁移和黏附能力的影响情况,并探讨相关的信号通路。

#### [参考文献]

- [1] English KM, Mandour O, Steeds RP, et al. Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms [J]. *Eur Heart J*, 2000, 21: 890-894.
- [2] Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. Low serum testosterone and mortality in older men[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93: 68-75.
- [3] Vikan T, Schirmer H, Njolstad I, et al. Endogenous sex hormones and the prospective association with cardiovascular disease and mortality in men: the Tromso Study[J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 161: 435-442.
- [4] Sieveking DP, Lim P, Chow RW, et al. A sex-specific role for androgens in angiogenesis[J]. *J Exp Med*, 2010, 207: 345-352.
- [5] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964.
- [6] Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(3): C572.
- [7] Khaw KT, Chirr MB, Mitch D, et al. Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular dis-

ease, and cancer in men [J]. *Circulation*, 2007, 116: 2694-701.

- [8] Abdulmageed M, Farid S, Robert J, et al. The Dark Side of Testosterone Deficiency: III. Cardiovascular Disease [J]. *Journal of Andrology*, 2009, 30: 477-494.
- [9] Laughlin GA, Barrett CE, Bergstrom J, et al. Low serum testosterone and mortality in older men[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93: 68-75.
- [10] Webb CM, Elkington AG, Kraidly MM, et al. Effects of oral testosterone treatment on myocardial perfusion and vascular function in men with low plasma testosterone and coronary heart disease[J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101(5): 618-624.
- [11] Vikan T, Schirmer H, Njolstad I, et al. Endogenous sex hormones and the prospective association with cardiovascular disease and mortality in men: the Tromso Study[J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 161: 435-442.
- [12] Mihail H, Wolfgang E, Peter C, et al. Endothelial Progenitor Cells: Mobilization, Differentiation, and Homing. *Arterioscler [J]*. *Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 1185-1189.
- [13] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 999-1007.
- [14] 汪奕斌,任国庆,张浩,等. 冠心病患者外周血晚期内皮祖细胞集落数量与功能的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(2): 137-140.
- [15] Foresta C, Caretta N, Lana A, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men [J]. *J Clin Endocrinol and Metab*, 2006, 91: 4599-602.
- [16] Foresta C, Zuccarello D, De Toni L, et al. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway [J]. *Clin Endo*, 2008, 68: 284-289.
- [17] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to post-natal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *EMBO J*, 1999, 18: 3964-972.
- [18] Walter D H, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *Circ J*, 2002, 105: 3017.
- [19] 孙文文,任国庆,张浩,等. 血管紧张素 II 对外周血早期内皮祖细胞血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(8): 651-654.

(此文编辑 李小玲)