

## 睾酮对维生素 D3 和尼古丁诱导的主动脉血管钙化的影响

王倩, 马涛, 程治源, 叶挺, 凌秋洋, 吴婷, 宗刚军

(安徽医科大学无锡临床学院, 江苏省无锡市 214044)

[关键词] 睾酮; 维生素 D3; 尼古丁; 血管钙化

[摘要] **目的** 建立 SD 大鼠血管钙化模型, 并观察睾酮在主动脉血管钙化中的作用。**方法** 将 10 周龄 SD 雄性大鼠分为: 对照组、钙化组、钙化+低剂量睾酮组和钙化+高剂量睾酮组, 每组 8 只。除对照组外, 其余三组采用维生素 D3 (300 kU/kg 一次肌肉注射) 和尼古丁 (25 mg/kg 溶于花生油中早、晚各灌胃 1 次) 诱导大鼠血管钙化模型; 低剂量睾酮组注射 1 mg/kg 外源性睾酮 (隔日注射 1 次), 高剂量睾酮组注射 2 mg/kg 睾酮 (隔日注射 1 次), 持续 8 周后处死。采用 ELISA 法测定大鼠血清睾酮和骨形态发生蛋白 4 (BMP-4) 含量, 采用试剂盒检测血管组织钙离子及碱性磷酸酶 (ALP) 含量, 蛋白免疫印迹分析 (Western blot) 检测主动脉血管组织 BMP-4、骨桥蛋白 (OPN) 的蛋白表达水平, Von Kossa 染色法观察血管钙化情况。**结果** (1) 成功制备了大鼠血管钙化模型; Von Kossa 染色可见钙化组大鼠血管中膜大量黑色颗粒样钙盐沉积, 而对照组血管结构完好, 未见黑色钙盐沉积物。(2) 睾酮对血管钙化的影响: 睾酮组钙含量、ALP、BMP-4、OPN 水平显著低于钙化组 ( $P < 0.01$ ), 且高剂量睾酮组低于低剂量睾酮组, 对照组水平最低; Von Kossa 染色可见钙化组血管中膜出现大量黑色颗粒样钙盐沉积, 而低剂量睾酮组和高剂量睾酮组均见少量钙盐沉积, 对照组无钙盐沉积。**结论** 外源性睾酮能一定程度上减轻维生素 D3 和尼古丁诱导的大鼠血管钙化。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

### Effects of testosterone on vitamin D3 and nicotine-induced aortic calcification

WANG Qian, MA Tao, CHENG Zhiyuan, YE Ting, LING Qiuyang, WU Ting, ZONG Gangjun

(Wuxi Clinical College, Anhui Medical University, Wuxi, Jiangsu 214044, China)

[KEY WORDS] testosterone; vitamin D3; nicotine; vascular calcification

[ABSTRACT] **Aim** To establish a model of vascular calcification in SD rats and observe the role of testosterone in aortic calcification. **Methods** 10-week-old SD male rats were divided into control group, calcification group, calcification+low-dose testosterone group, calcification+high-dose testosterone group, with 8 rats in each group. In addition to the control group, the other three groups were induced with vascular calcification in rats by vitamin D3 (300 kU/kg intramuscular injection) and nicotine (25 mg/kg dissolved in peanut oil in the morning and evening); The rats were injected 1 mg/kg exogenous testosterone (once every other day) in low-dose testosterone group, 2 mg/kg testosterone (once every other day) in high testosterone group, and sacrificed after 2 months. The serum testosterone and bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) levels were determined by ELISA method. The calcium and alkaline phosphatase (ALP) contents in vascular tissues were detected by kit. The protein expression levels of BMP-4 and osteopontin (OPN) in aortic vascular tissues were detected by Western blot. Von Kossa staining was used to observe vascular calcification. **Results** (1) The model of vascular calcification in rats was successfully prepared; Von Kossa staining showed a large amount of black granule-like calcium deposits in the vascular media of rats in the calcified group, while the vascular structure of the control group was intact and no black calcium deposits were observed. (2) Effects of testosterone on vascular calcification: calcium content, ALP, BMP-4, OPN levels were significantly lower in the testosterone group than those in the calcification group ( $P < 0.01$ ), lower in the high-dose testosterone group than in the low-dose testosterone group, and the lowest in the control group; Von Kossa staining showed a large amount of black granular calcium deposits in the vascular media of the

[收稿日期] 2018-08-27

[修回日期] 2018-11-02

[基金项目] 无锡市卫计委重大科研项目 (Z201608)

[作者简介] 王倩, 硕士研究生, 研究方向为血管钙化机制, E-mail 为 wangqianvictor@163.com。通信作者宗刚军, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心脏免疫学, E-mail 为 zonggi@163.com。

calcification group, while a small amount of calcium salt deposits in the low-dose testosterone group and the high-dose testosterone group, and no calcium salt deposits in the control group. **Conclusion** Exogenous testosterone can alleviate vascular calcification induced by vitamin D3 and nicotine in rats to some extent.

血管钙化是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管病变、衰老等常见的并发症,主要表现为血管壁僵硬增加、顺应性下降、钙盐沉积,易导致心肌缺血、血栓形成、斑块破裂,是心脑血管疾病发病率和死亡率增加的重要因素之一。随着钙化性冠状动脉疾病以及钙化性主动脉狭窄的发病率增加,人们逐渐认识到,血管钙化并非过去几十年所认为的被动退化过程。相反,它是一个反应脉管系统可塑性的活跃、有组织、复杂且高度规范的过程<sup>[1]</sup>。血管钙化是环境、遗传和血管因素之间相互作用的结果。心血管疾病导致的动脉闭塞和僵硬,主要是由血管钙化的发展所驱动的,血管钙化还会影响血流动力学导致高血压、心肌梗死、中风和下肢缺血<sup>[2-3]</sup>。预防和控制血管钙化的进展可减少心血管事件的发生率和死亡率。然而,目前仍未出现减轻血管钙化的有效治疗措施。

与年龄相仿的女性相比,男性心血管疾病风险较高,这种性别差异暗示了性激素对心血管疾病的影响。Park 等<sup>[4]</sup>人的一项临床研究表明生物可利用睾酮与非肥胖男性的亚临床冠状动脉钙化程度呈负相关。还有研究指出睾酮可通过调节雄激素受体和雌激素受体的表达加重血管钙化<sup>[5-6]</sup>。最近 JAMA 发表有关睾酮替代治疗与冠状动脉斑块体积的研究显示,睾酮替代治疗能增加非钙化斑块(包括低衰减斑块、纤维脂质斑块、纤维斑块、密钙斑块)的体积而不影响钙化斑块的体积<sup>[7]</sup>。鉴于社会上对雄激素类药物的使用越来越多,外源性睾酮对心血管疾病影响的研究成了新的热点。本研究旨在以血管钙化模型大鼠为研究对象,探讨外源性睾酮对血管钙化的影响,为预防和治疗血管钙化寻求新的干预靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及药品

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 SD 大鼠由江苏省血吸虫病防治研究所动物房提供,约 10 周龄,300~350 g。维生素 D3 和尼古丁均购自 Sigma 公司;睾酮购自上海陶素生化科技有限公司(产品编号 T0842);钙离子测试盒购自美国博世生物技术有限公司;睾酮试剂盒、碱性磷酸酶

(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、BMP-4 试剂盒、Von Kossa 染色试剂盒、茜素红染色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;骨形态发生蛋白 4(bone morphogenetic protein 4, BMP-4)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)抗体及  $\beta$ -肌动蛋白抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;其余材料及试剂均由苏州斯麦尔生物技术服务有限公司提供。

### 1.2 钙化动物模型的制备

将雄性 SD 大鼠随机分为四组,每组 8 只。钙化组:第 1 天 8:00 给予维生素 D3(300 kU/kg)肌肉注射,并予尼古丁(25 mg/kg)溶于花生油灌胃,下午 18:00 再次给予同样剂量的尼古丁灌胃一次;对照组:给予等量无水乙醇肌注和花生油灌胃;钙化+低剂量睾酮组和钙化+高剂量睾酮组:钙化模型同上,第 2 天起,每隔一天分别给予 1 mg/kg、2 mg/kg 睾酮肌肉注射(钙化组及对照组给予等量的无水乙醇肌肉注射),共给药 8 周。8 周后给予 5%水合氯醛麻醉后心脏采血,处死。血标本 4℃、3 000 r/min 离心,取上清置于-20℃待测。

### 1.3 Von Kossa 染色及茜素红染色观察血管钙化情况

取大鼠胸主动脉段,固定于 10%福尔马林中,常规脱水包埋,制成 5  $\mu$ m 厚度切片,脱蜡脱水,入 Von Kossa 银溶液紫外灯照射 30 min 后,用 5%硫代硫酸钠还原 2 min,HE 染色复染细胞核,脱水、透明、封片后光镜下观察;制蜡片同前,入茜素红染液染色 3 min,蒸馏水速洗,用光绿水溶液复染,用 2%醋酸水速洗后脱水、封片、观察。

### 1.4 睾酮及 BMP-4 浓度的测定

取待测血清标本,用 ELISA 试剂盒分别测定睾酮及 BMP-4 浓度。

### 1.5 ALP 活性及钙含量测定

取大鼠腹主动脉段血管组织 20 mg 加入裂解液进行冰浴匀浆 4℃、8 000 r/min 离心后取上清,分别用 ALP 活性试剂盒和钙离子测试盒测定其浓度。

### 1.6 BMP-4 及 OPN 的蛋白表达

取大鼠同等质量的胸主动脉血管组织提取蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶(12%分离胶,5%浓缩胶)电泳后,转入 PVDF 膜,加入一抗(OPN 及 BMP-2 均以 1:1 000 稀释)4℃孵育过夜,次日室温孵育二抗 1 h,以  $\beta$ -actin 作为内参进行对比,加 ECL 显影液曝光。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS23.0 软件进行统计分析, 所得数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较方差齐时采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠血浆睾酮水平

与对照组及钙化组相比, 补充外源性睾酮组大鼠睾酮水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而钙化+高剂量睾酮组睾酮水平较钙化+低剂量睾酮组升高 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

### 2.2 大鼠血管钙化情况

Von Kossa 染色及茜素红染色均可见钙化组血管中膜大量黑色颗粒样钙盐沉积, 而钙化+低剂量睾酮组及钙化+高剂量睾酮组钙盐沉积较少, 对照

组血管壁结构完整, 未见明显钙盐沉积 (图 1)。钙化组大鼠主动脉组织 ALP 活性及钙含量较对照组显著升高, 钙化+低剂量睾酮组和钙化+高剂量睾酮组主动脉组织 ALP 活性及钙含量较钙化组显著降低 ( $P < 0.01$ ; 表 2)。

表 1. 各组大鼠血清睾酮水平 ( $n=8$ )

Table 1. Serum levels of testosterone in rats of each group ( $n=8$ )

分 组	睾酮 (ng/L)
对照组	58.25±6.29
钙化组	55.38±7.87
钙化+低剂量睾酮组	68.25±5.60 <sup>ab</sup>
钙化+高剂量睾酮组	75.50±4.57 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与钙化组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与钙化+低剂量睾酮组比较。

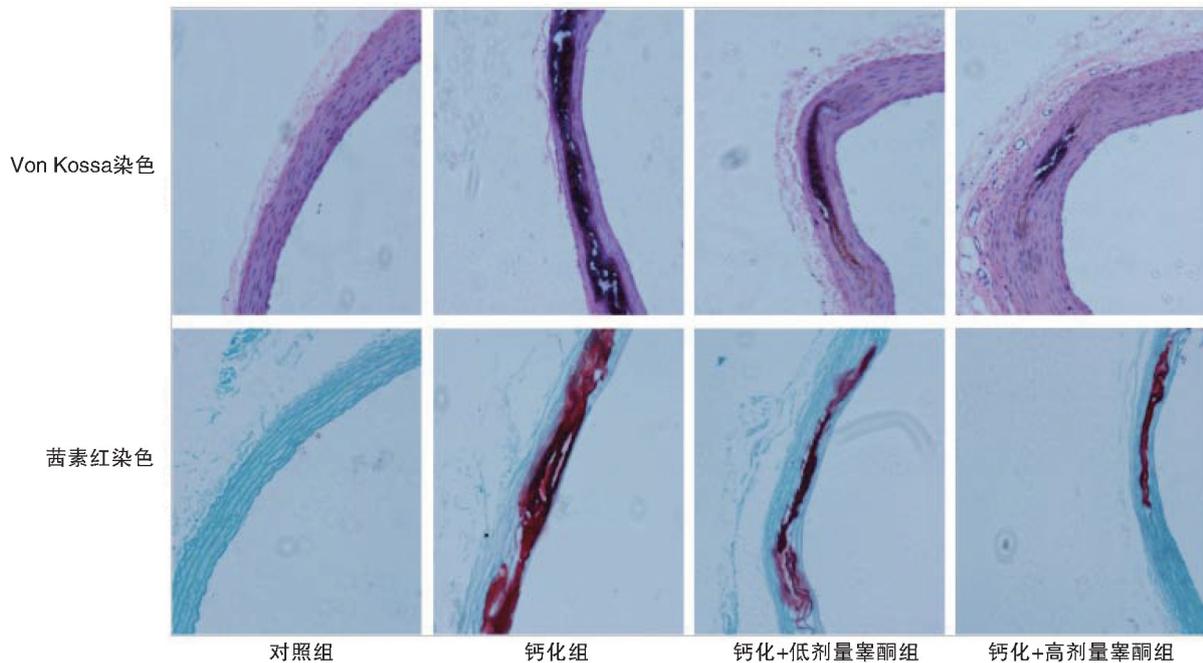


图 1. 主动脉 Von Kossa 染色及茜素红染色 (200×)

Figure 1. Von Kossa staining and alizarin red staining of aorta (200×)

表 2. 各组大鼠主动脉 ALP 活性和钙含量 ( $n=8$ )

Table 2. The levels of alkaline phosphatase and calcium content of rats aorta of each group ( $n=8$ )

分 组	ALP 活性 (U/g)	钙含量 (mmol/L)
对照组	233.75±60.53	4.12±0.27
钙化组	932.25±196.07 <sup>b</sup>	5.78±0.30 <sup>b</sup>
钙化+低剂量睾酮组	428.38±99.97 <sup>bc</sup>	4.21±0.34 <sup>c</sup>
钙化+高剂量睾酮组	356.63±64.68 <sup>ac</sup>	3.93±0.22 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与钙化组比较。

### 2.3 钙化相关因子的表达

ELISA 法检测血清中 BMP-4 水平发现, 钙化组血清 BMP-4 水平较对照组显著升高, 而钙化+低剂量睾酮组和钙化+高剂量睾酮组较钙化组显著降低 ( $P < 0.05$ ; 表 3)。Western blot 结果表明, 与对照组比较, 钙化组 BMP-4 和 OPN 蛋白表达升高, 钙化+低剂量睾酮组及钙化+高剂量睾酮组较钙化组降低, 但仍高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

表 3. 各组大鼠血清 BMP-4 水平 (ng/L)

Table 3. Serum levels of BMP-4 in rats of each group (ng/L)

分 组	BMP-4
对照组	1.445±0.541
钙化组	3.754±0.538 <sup>a</sup>
钙化+低剂量睾酮组	3.149±0.492 <sup>ab</sup>
钙化+高剂量睾酮组	2.743±0.990 <sup>ac</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , c 为  $P<0.01$ , 与钙化组比较。

### 3 讨 论

血管钙化是心血管疾病发病率及死亡率增加的危险因素之一, 预防血管钙化对降低心血管不良事件具有重要意义。血管钙化是一种活跃、复杂的生理过程, 主要表现为血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的收缩表型向成骨样细胞状态转化<sup>[8]</sup>。过去的几十年研究发现, 多种危险因素如高磷血症、继发性甲状旁腺功能亢进、慢性炎症及氧化应激均可诱导血管钙化形成<sup>[9]</sup>。研究发现血管钙化过程中伴随着骨基质蛋白表达增加, 如 BMP、OPN、骨保护素及骨钙蛋白<sup>[10]</sup>。在此过程中 BMP/Smad<sup>[11-12]</sup>、Notch/Msx2 和 Wnt/ $\beta$ -catenin 等多个信号通路及其下游分子 Runx2 和 Osterix 被激活, 参与血管钙化的发生和发展<sup>[13-14]</sup>。临床发现中老年男性睾酮水平随年龄增长而下降, 而动脉粥样硬化等心血管风险增加<sup>[15]</sup>, 提示睾酮水平变化可能与血管钙化有关。探索睾酮对血管钙化的影响, 能为抑制血管钙化、降低心血管不良事件提供一个新的治疗靶点。

本研究中, 我们利用尼古丁和维生素 D3 制备大鼠血管钙化模型, 通过 Von Kossa 染色及茜素红染色可见血管中膜有大量黑色钙盐沉积物, 表明大鼠血管钙化模型制备成功。并在钙化模型的基础上通过增加外源性睾酮刺激后, 睾酮组血管钙含量、ALP、BMP-4、OPN 表达水平较钙化组明显降低, 表明睾酮能在一定程度上减轻血管钙化。

既往关于睾酮对血管钙化影响的机制尚不清楚。Son 等<sup>[16]</sup>人研究表明, 睾酮可通过抑制无机磷酸盐诱导的 VSMC 凋亡消减血管钙化, 还可以通过雄激素受体调节生长抑制特异性基因 6 转录, 从而抑制血管钙化。有临床研究指出生物可利用睾酮与血管钙化程度呈负相关<sup>[4]</sup>, 其可能机制是: 睾酮不仅可以通过刺激内皮细胞产生一氧化氮保护血

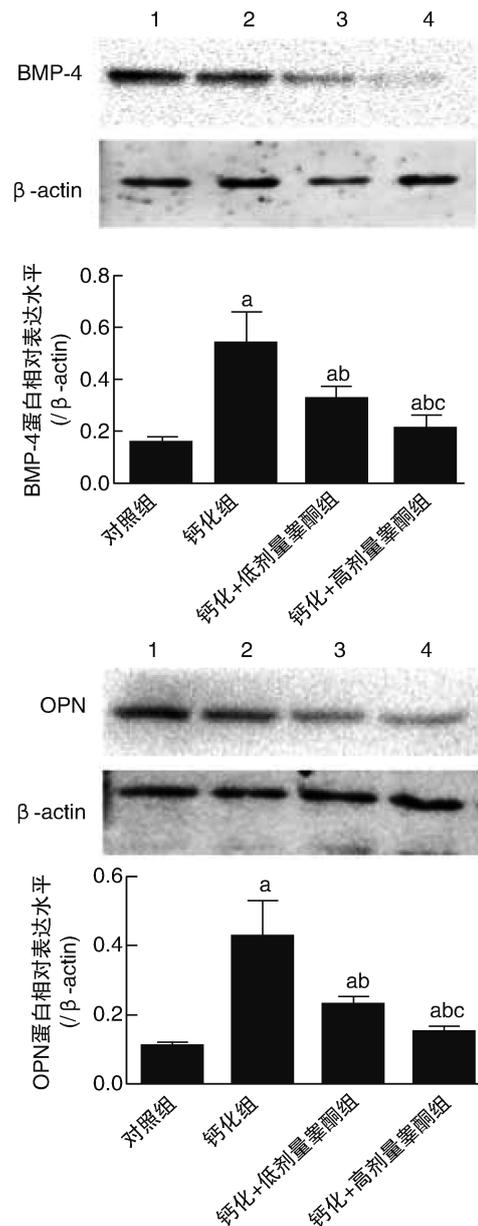


图 2. 各组大鼠主动脉 BMP-4 和 OPN 的蛋白表达水平

1 为钙化组, 2 为钙化+低剂量睾酮组, 3 为钙化+高剂量睾酮组, 4 为对照组。a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与钙化组比较; c 为  $P<0.05$ , 与钙化+低剂量睾酮组比较。

Figure 2. Protein expression levels of BMP-4 and OPN in aorta of rats in each group

管内皮<sup>[17]</sup>, 还可通过刺激内皮祖细胞促进内皮修复<sup>[18]</sup>。Lu 等<sup>[19]</sup>人也提出低剂量睾酮与主动脉内皮的超微结构损伤有关。本研究发现给予外源性睾酮的 SD 大鼠血管钙化程度减轻, 同时还发现这种钙化程度的减轻与 BMP-4 的蛋白表达水平呈正相关。既往有研究表明 BMP/Smad 信号通路参与血管钙化的发生与发展, 我们猜测睾酮对血管钙化的影响除上述机制外可能还与 BMP/Smad 信号通路

有关,但其具体的发生机制还需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Bostrom KI. Where do we stand on vascular calcification [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 84: 8-14.
- [2] Wu XH, Chen XY, Fan YH, et al. High extent of intracranial carotid artery calcification is associated with downstream microemboli in stroke patients [J]. *Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26(2): 442-447.
- [3] Zettervall SL, Marshall AP, Fleser P, et al. Association of arterial calcification with chronic limb ischemia in patients with peripheral artery disease [J]. *Vasc Surg*, 2017, 67(2): 507-513.
- [4] Park BJ, Shim JY, Lee YJ, et al. Inverse relationship between bioavailable testosterone and subclinical coronary artery calcification in non-obese Korean men [J]. *Asian J Androl*, 2012, 14(4): 612-615.
- [5] Zhu DX, Hadoke PWF, Wu JX, et al. Ablation of the androgen receptor from vascular smooth muscle cells demonstrates a role for testosterone in vascular calcification [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24807.
- [6] McRobb L, Handelsman DJ, Heather AK, et al. Androgen-induced progression of arterial calcification in apolipoprotein E-Null mice is uncoupled from plaque growth and lipid levels [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(2): 841-848.
- [7] Dhindsa S, Wilson MF, Dandona P. Changes in coronary artery plaque with testosterone therapy [J]. *JAMA*, 2017, 317(23): 708-716.
- [8] Evrard S, Delanaye P, Kamel S, et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 438: 401-414.
- [9] 吉庆伟, 周玉杰. 动脉钙化: 一种慢性炎症性疾病 [J]. *心肺血管病杂志*, 2015, 34(1): 67-69.
- [10] Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: up-regulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers [J]. *Circ Res*, 2001, 89: 1147-1154.
- [11] Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, et al. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus [J]. *Circ Res*, 2011, 108(4): 446-457.
- [12] Rong S, Zhao XZ, Jin XC, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease is induced by bone morphogenetic protein-2 via a mechanism involving the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(6): 2049-2060.
- [13] Kopan R, Ilgan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216-233.
- [14] 叶挺, 程治源, 凌秋洋, 等. Notch1 蛋白在人心脏瓣膜间质细胞凋亡与钙化关系中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(2): 122-128.
- [15] Naderi S. Testosterone replacement therapy and the cardiovascular system [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2016, 18(4): 1-6.
- [16] Son BK, Akishita M, Iijima K, et al. Androgen receptor-dependent transactivation of growth arrest-specific gene 6 mediates inhibitory effects of testosterone on vascular calcification [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(10): 7537-7544.
- [17] Miller VM, Mulvagh SL. Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28: 263-270.
- [18] Foresta C, Caretta N, Lana A, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91: 4599-4602.
- [19] Lu YL, Kuang L, Zhu H, et al. Changes in aortic endothelium ultrastructure in male rats following castration, replacement with testosterone and administration of 5-alpha-reductase inhibitor [J]. *Asian J Androl*, 2007, 9: 843-847.

(此文编辑 许雪梅)