

· 基础研究 ·

睾酮抑制高盐喂养下雄性大鼠血管内皮生长因子的表达和释放

王晓慧¹, 谈世进^{2*}

(¹苏州大学医学部老年医学专业2010级, 苏州 215123; ²上海交通大学附属第六人民医院老年科, 上海 200233)

【摘要】目的 探讨不同水平睾酮对高盐饮食下雄性大鼠血管内皮生长因子的影响。**方法** 雄性Wistar大鼠32只随机分为4组: 假手术组(Sham组), 去势组(Cas组), 去势后补充睾酮组(TC组), 去势后补充睾酮和氟他胺组(FTC组)。每组8只。各组大鼠均以8%氯化钠高盐颗粒饲料喂养; Sham组施以假手术, Cas、TC及FTC组均施以去势手术。TC组及FTC组予丙酸睾酮2mg/kg、隔日1次皮下注射, FTC组同时予氟他胺1mg/kg、每日1次灌胃, 持续8周。8周后采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定各组血清中睾酮、血管内皮生长因子(VEGF)的浓度, 实时定量PCR(RT-PCR)测定血管内皮中VEGF mRNA的表达水平。**结果** (1) Cas组睾酮浓度[(0.26 ± 0.02) μg/L]与Sham组[(3.15 ± 0.54) μg/L]相比明显下降, 而FTC组[(5.47 ± 1.29) μg/L]、TC组[(2.80 ± 0.30) ng/L]则明显升高(均 $P < 0.01$); (2) 与Sham组的血清VEGF浓度[(20.837 ± 13.823) ng/L]相比, Cas组[(47.246 ± 19.733) ng/L, $P < 0.01$]和FTC组[(46.043 ± 22.607) ng/L, $P < 0.05$]明显升高, TC组[(22.870 ± 12.057) ng/L]则无明显差异($P > 0.05$); (3) 与Sham组相比, Cas组和FTC组血管内皮细胞VEGF mRNA表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$), 而TC组无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 高盐饮食下, 睾酮水平增高抑制血管内皮生长因子的表达和释放。

【关键词】 睾酮; 高血压; 血管内皮生长因子类; 实时聚合酶链反应

【中图分类号】 R544.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00134

Testosterone suppresses expression and release of vascular endothelial growth factor in rats under high-salt diet

WANG Xiao-Hui¹, TAN Shi-Jin^{2*}

(¹Section of Geriatrics, Medical School, Soochow University, Suzhou 215123, China; ²Department of Gerontology, Affiliated 6th People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of different doses of testosterone on vascular endothelial growth factor (VEGF) in high-salt fed rats. **Methods** Thirty-two Wistar male rats were randomly assigned to 4 groups, sham-operation (Sham) group, castration (Cas) group, testosterone supplement after castration (TC) group, and flutamide-treated testosterone supplemented castrated (FTC) group, with 8 rats in each group. After all animals were fed with high-salt diet (8% NaCl) for 8 weeks, the rats of Sham group received a sham operation, while those in Cas, TC and FTC groups received surgical castration. Testosterone propionate (TP) was injected subcutaneously at 2mg/kg, once every 2 days in TC and FTC groups, and flutamide 1mg/(kg · d) was given intragastrically in FTC group, for 8 weeks after surgery. Serum levels of testosterone and VEGF were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Expression of VEGF mRNA in the blood samples were determined by real-time PCR (RT-PCR). **Results** Serum levels of testosterone was obviously lower in Cas group, but significantly higher in TC and FTC groups when compared with Sham group [(0.26 ± 0.02), (2.80 ± 0.30), (5.47 ± 1.29) vs (3.15 ± 0.54) μg/ml, $P < 0.01$]. For serum level of VEGF, Cas FTC groups had obviously increased levels than Sham group [(47.246 ± 19.733), (46.043 ± 22.607) vs (20.837 ± 13.823) ng/L, $P < 0.01$, $P < 0.05$], but no difference was found between Sham group and TC group [(22.870 ± 12.057) ng/L, $P > 0.05$]. Cas group and FTC group had lower expression of VEGF mRNA compared with Sham group ($P < 0.01$), but no difference with TC group ($P > 0.05$). **Conclusion** Under high-salt diet, high level of testosterone suppresses the expression and release of VEGF.

【Key words】 testosterone; hypertension; vascular endothelial growth factors; real-time polymerase chain reaction

This work was supported by the Shanghai Jiao Tong University Biomedical Engineering(LI) cross research foundation(2010)(YG2012MS35).

Corresponding author: TAN Shi-Jin, E-mail: sjxt@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-11-21; 修回日期: 2012-12-20

基金项目: 上海交通大学“医工(理)交叉研究基金(2010年)”(YG2010MS35)

通信作者: 谈世进, Tel: 021-24056077, E-mail: sjxt@yahoo.com.cn

高盐负荷下血压升高的特性被称作血压的盐敏感性,由高盐引起的血压升高为盐敏感性高血压。雄激素的作用十分广泛,在心血管系统中起重要作用,在雄性个体中,雄激素的浓度及活性随年龄的增长而降低^[1]。在雄激素中,起主要生理活性作用的是睾酮。笔者之前的研究表明,高雄激素水平可促进高盐喂养下雄性大鼠血压的升高,而去势处理可以降低高盐喂养所引起的血压升高幅度^[2]。其他学者的研究也有类似发现^[3]。而雄激素对盐敏感高血压的影响机制尚未完全阐明,血管内皮在调节体内心血管生理功能、维持血压的平衡中起着极其重要的作用,雄激素影响高盐饮食下大鼠的血压水平,是否与内皮功能的变化有关,值得关注。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是主要存在于血管内皮中,可特异性地刺激血管内皮细胞增殖的活性肽^[4],推测VEGF作为有效的血管生成因子、内皮细胞特异性有丝分裂原和强烈的血管通透因子^[5],其含量的变化可对内皮功能产生重要影响。本实验通过建立高盐饮食雄性大鼠实验模型,探讨不同水平的睾酮对高盐饮食下雄性大鼠血管VEGF的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性Wistar大鼠32只,8周龄左右,体重质量(200 ± 10)g,由上海西普尔-必凯实验动物公司提供。

1.2 实验药物

丙酸睾酮注射液(上海通用药业股份有限公司,生产批号100404);氟他胺片(flutamide,上海复旦复华药业有限公司,生产批号110902);盐酸氯胺酮注射液(福建古田药业有限公司,生产批号101103)。

1.3 主要试剂

大鼠睾酮、VEGF酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(Biotech公司)。

1.4 主要仪器

电子称,自动平衡离心机,高速冷冻离心机(BECKMAN公司),超低温冰箱(Sanyo公司,中国),酶标仪(美国BioTek公司,型号ELx800),荧光定量PCR仪(FTC3000型),多样品组织研磨机(净信科技公司, TissueLyser-24型)。

1.5 实验方法

1.5.1 实验模型与分组 32只雄性Wistar大鼠随机分为4组:假手术组(Sham组),去势组(Cas组),去势后补充睾酮组(TC组),去势后补充睾酮和氟他胺组(FTC组)。每组8只。全部在适应性喂养2周后开始实验。Cas组、TC组及FTC组大鼠均施以去势手术。2ml/kg体重盐酸氯胺酮腹腔注射麻醉后,碘伏消毒阴囊处皮肤,沿纵膈正中切开一纵形切口,剪开鞘膜后,分别将双侧睾丸与附睾分离并切除睾丸,然后把附睾放回阴囊,青霉素冲洗切口预防感染,缝合切口。Sham组只睾丸与附睾的分离处理,不做切除,然后放回阴囊,青霉素冲洗并缝合切口。各组大鼠术后均用 2×10^5 U青霉素连续腹腔注射3d预防感染。

1.5.2 动物饲养与给药 手术后各组均以8%氯化钠高盐颗粒饲料喂养,自由摄食,自由饮用自来水,TC组、FTC组给予丙酸睾酮2mg/kg、皮下注射、隔日1次^[6],其余各组分别以等量的玉米油皮下注射,FTC组同时给予氟他胺1mg/kg、每日1次灌胃,其余组以等量的生理盐水灌胃。

1.5.3 采集血样及组织 高盐饲料喂养8周后取材。氯胺酮2ml/kg腹腔注射麻醉后,剖开胸腔,充分暴露心脏并于右心房处采血,注入普通管,管口封好后放入4℃冰箱中1~2h,然后取出以2500r/min的速度离心10min,分离上清并分装,-80℃冰箱冻存备用。采血后迅速分离并剪取胸主动脉及腹主动脉,生理盐水冲洗干净后置-80℃冰箱冻存备用。

1.5.4 ELISA法测定血清中睾酮和VEGF浓度 将待测血清样本置冷水中复融,采用ELISA法测定,严格按照试剂盒说明操作。

1.5.5 RT-PCR测定血管内皮中VEGF mRNA的表达 按说明抽提总RNA,核酸分析仪测定RNA样品浓度, A_{260nm}/A_{280nm} 在1.8~2.0之间,说明提取的RNA纯度高,无蛋白质和DNA的残余。取1.6μg RNA为模板反转录为cDNA。PCR引物:VEGF上游5'-CCTGGCTTTACTGCTGTACCT-3',下游5'-GCTGGTAGACGTCCATGAACT-3';GAPDH上游5'-GACGCTTTTGGTGAAGAACTGA-3',下游5'-CACACGGCAATAAATGACATGAG-3'。产物用2%琼脂糖凝胶电泳,对照相对分子质量标准检测扩增结果,凝胶成像分析系统对目的DNA条带进行扫描,并采用BandScan 5.0凝胶图像分析软件进行吸光度(A)值分析。软件自动算出每个基因Ct值的均数及标准差,并计算出mRNA相对于内参GAPDH的表达量,以各组VEGF与自身GAPDH吸光度值的比值

作为各组细胞中VEGF mRNA的相对含量 (M)。

1.6 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据处理采用SPSS16.0统计软件, 各组间均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 满足方差齐性的多重比较采用LSD法, 不满足方差齐性的多重比较采用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的血清睾酮和VEGF浓度

与Sham组相比, Cas组血清睾酮浓度明显降低 ($P < 0.01$), TC组差异则无统计学意义, FTC组升高近2倍 ($P < 0.01$)。与Sham组相比, Cas组、FTC组大鼠血清VEGF浓度明显升高(分别为 $P < 0.01$, $P < 0.05$), TC组大鼠无明显差异 ($P > 0.05$; 表1)。

表1 各组大鼠血清睾酮、VEGF浓度
Table 1 Serum testosterone and VEGF contents in rats ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Testosterone(ng/L)	VEGF(μ g/L)
Sham group	3.15 ± 0.54	20.837 ± 13.828
Cas group	$0.26 \pm 0.02^{**}$	$47.246 \pm 19.733^{**}$
TC group	2.80 ± 0.30	22.870 ± 12.057
FTC group	$5.47 \pm 1.29^{**}$	$46.043 \pm 22.070^{*}$

VEGF: vascular endothelial growth factor; Sham group: control group; Cas group: castration group; TC group: testosterone supplement after castration group; FTC group: flutamide-treated testosterone supplemented castrated group. Compared with Sham group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

2.2 各组大鼠的血管内皮中VEGF mRNA表达

与Sham相比, Cas组、FTC组大鼠血管内皮VEGF mRNA 表达水平明显升高 (均 $P < 0.01$) ; TC组差异则无统计学意义 ($P > 0.05$; 图1, 图2)。

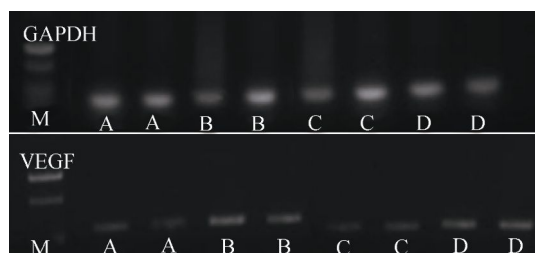


图1 RT-PCR检测血管内皮中VEGF mRNA的含量
Figure 1 VEGF mRNA expression in vascular endothelium

VEGF: vascular endothelial growth factor; M: marker; A: control group; B: castration group; C: testosterone supplement after castration group; D: flutamide-treated testosterone supplemented castrated group

3 讨论

众所周知, 高盐饮食可以对血压产生重要影响。在此基础上, 既往研究又发现高盐诱导下, 高雄激素水平对雄性大鼠血压的升高有促进作用, 通过去

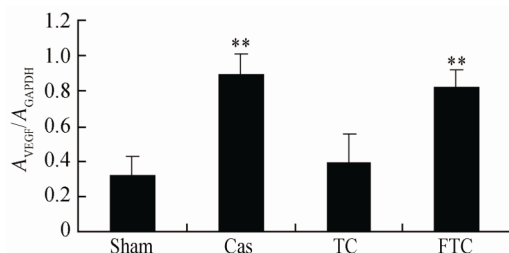


图2 血管内皮中VEGF的相对表达
Figure 2 Relative VEGF expression in endothelial cells
VEGF: vascular endothelial growth factor; Sham: control group; Cas: castration group; TC: testosterone supplement after castration group; FTC: flutamide-treated testosterone supplemented castrated group. Compared with Sham group $^{**}P < 0.01$

势处理降低雄激素水平可相应的降低血压水平。但雄激素在此过程中具体的作用机制尚未完全阐明。

Hu等^[7]的研究表明, 雄激素可能是通过激活肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin-system, RAS), 促进高盐饮食下大鼠血压的升高, 同时也加重了肾脏的损伤。RAS不是血压调节中唯一起作用的途径, 血管内皮在血压调节中也起重要作用。Oloyo等^[8]研究发现, SD大鼠的主动脉环对乙酰胆碱的最大舒张效应在高盐饮食下降低, 而在去势处理后升高, 如果在去势的基础上补充生理剂量的睾酮, 舒张效应又转为降低, 提示雄激素可能通过直接作用于血管内皮产生影响。

血管内皮是介于循环血液与血管平滑肌细胞之间的, 能够合成、分泌多种重要血管活性物质的生理屏障。VEGF主要存在于血管内皮细胞, 为特异刺激血管内皮细胞增殖的活性肽, 可刺激血管内皮细胞分化、移行、增生和管腔形成, 是一种强有力的促血管生成因子^[4]; 可增加血管的通透性及参与新生血管的形成^[9]; 同时还可以选择性地增强血管内皮细胞的有丝分裂, 刺激内皮细胞增殖^[10]。因此, VEGF含量的变化可对血管内皮的功能产生重要的影响。

临床研究发现, 高血压人群血清VEGF含量明显高于正常血压人群^[11]。刺激VEGF分泌的因素主要有缺血、缺氧、牵拉、炎症细胞因子等, 其中最主要的为缺血和缺氧。血压升高导致血管内皮局部环境的缺血、缺氧, 刺激VEGF分泌, 而VEGF可以促进血管内皮细胞的分裂、增殖, 同时增加血管的通透性, 使血管中过多的水分渗入到组织中, 可对高血压起代偿作用。

另一方面, 在抗肿瘤药物的研究中, 抑制VEGF信号通路的药物是最新的抗肿瘤药物之一, 多位学者在研究中发现该类药物最明显的副作用是造成血压升高^[12,13], 也从侧面证明VEGF可对血压的变化产生有益的代偿作用。在本实验中, 雄激素完整组 (Sham

组和TC组)的大鼠血清VEGF浓度较低,低雄激素水平组(Cas组)的大鼠血清VEGF浓度较高,FTC组虽然睾酮浓度最高,但由于雄激素受体(androgen receptor, AR)阻滞剂氟他胺的作用,睾酮作用不能得到发挥,故VEGF浓度也较高。同时血管内皮中VEGF mRNA的表达也呈现类似的水平。由此推测,雄激素可能抑制了VEGF的表达与释放,导致VEGF水平降低,因而由高盐饮食造成的内皮损害得不到相应的代偿性修复,使血管内皮细胞的功能受损。VEGF本身可通过刺激血管内皮细胞的分裂、增殖,增加血管壁的通透性等作用对血管内皮的功能产生影响,同时有学者研究发现,VEGF还可调控一氧化氮合酶的表达而对血管内皮产生影响^[14,15]。

雄激素发挥作用主要是通过AR, AR主要位于睾丸间质细胞核内,也存在于神经系统、肾及肾上腺、大部分心房及心室肌、主动脉、冠状动脉中,这也是雄激素作用广泛的原因。Lin等^[16]最早发现血管壁中存在AR,血管壁各层均有分布,以内层为主。氟他胺是一种非类固醇类抗雄激素药物,主要通过抑制靶细胞受体对睾酮的摄取和(或)结合,进而干扰雄激素作用^[17]。在本实验氟他胺组,即使睾酮浓度很高,也不能正常发挥作用,表明雄激素主要是通过AR发挥作用。

本研究表明,以睾酮为代表的雄激素可对高盐饮食大鼠的VEGF水平产生影响,高浓度雄激素可降低VEGF水平,而低浓度则导致VEGF升高,且这种影响是通过AR进行的。但确切的影响机制尚需进一步证实。雄激素可能通过影响VEGF的水平直接影响血管内皮功能,这可能是雄激素影响盐敏感高血压作用的机制之一。

【参考文献】

- [1] 张春萍, 方宁远, 康近方. 老年人9种性激素的化学发光免疫分析[J]. 中国老年杂志, 2006, 26(8): 1030-1031.
- [2] 胡剑平, 谈世进, 丁在威. 雄性激素在高盐引发高血压中的作用[J]. 中华高血压杂志, 2008, 16(11): 991-993.
- [3] Yanes LL, Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, *et al.* Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296 (4): F771-F779.
- [4] Breier G, Albrecht U, Sterrer S, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation[J]. *Development*, 1992, 114(2): 521-532.
- [5] Anteby EY, Greenfield C, Natanson-Yaron S, *et al.* Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(4): 229-235.
- [6] Lin SM, Tsao CM, Tsai SK, *et al.* Influence of testosterone on autotomy in castrated male rats[J]. *Life Sci*, 2002, 70(20): 2335-2340.
- [7] Hu J, Tan S, Zhong Y. Effects of testosterone on renal function in salt-loaded rats[J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342(1): 38-43.
- [8] Oloyo AK, Sofola OA, Anigbogu CN. Orchidectomy attenuates impaired endothelial effects of a high-salt diet in Sprague-Dawley rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89(4): 295-304.
- [9] Miller JW, Adamis AP, Shima DT, *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model[J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(3): 574-584.
- [10] Vyzantiadis T, Karagiannis A, Douma A, *et al.* Vascular endothelial growth factor and nitric oxide serum levels in arterial hypertension[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2006, 28(7): 603-609.
- [11] 廖贵红. 高血压患者血清VEGF和ET-1检测的临床意义[J]. 中国热带医学, 2007, 7(9): 1616-1619.
- [12] Belcik JT, Qi Y, Kaufmann BA, *et al.* Cardiovascular and systemic microvascular effects of anti-vascular endothelial growth factor therapy for cancer[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 20(7): 618-625.
- [13] Maitland ML, Bakris GL, Black HR, *et al.* Initial assessment, surveillance, and management of blood pressure in patients receiving vascular endothelial growth factor signaling pathway inhibitors[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(9): 596-604.
- [14] Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2 controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression[J]. *Hypertension*, 2009, 54(3): 652-658.
- [15] Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, *et al.* Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism[J]. *Nat Med*, 2009, 15(5): 545-552.
- [16] Lin AL, McGill HC Jr, Shain SA. Hormone receptors of the baboon cardiovascular system: Biochemical characterization of myocardial cytoplasmic androgen receptors[J]. *Circ Res*, 1981, 49 (4): 1010-1016.
- [17] Goldspiel BR, Kohler DR. Flutamide: an antiandrogen for advanced prostate cancer[J]. *DICP*, 1990, 24(6): 616-623.

(编辑: 胡晓晖)