

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.005

睾酮对内皮细胞妊娠相关血浆蛋白 -A mRNA 表达的影响 *

王 雨 邵国霞 张迎中 富 路[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院心内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察睾酮对内皮细胞妊娠相关血浆蛋白 -A(PAPP-A) mRNA 表达的影响。**方法:**人原代脐静脉内皮细胞,选择第 3~4 代生长状态良好的细胞用于实验。实验分组:①空白对照组;②肿瘤坏死因子(TNF)- α (终浓度 100 $\mu\text{g/L}$)培养细胞组;③ TNF- α (终浓度 100 $\mu\text{g/L}$)及睾酮 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 培养细胞组;④ 睾酮 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 培养细胞组。实验结束后收集各组细胞,用 RT-PCR 方法检测各组细胞 PAPP-A mRNA 表达水平。**结果:**TNF- α 作用 2 h 后,内皮细胞中 PAPP-A mRNA 表达水平升高($P < 0.05$),且随 TNF- α 作用时间的延长,PAPP-A 表达逐渐升高,在 16 小时达高峰;睾酮作用后,PAPP-A mRNA 表达水平较 TNF- α 组明显降低($P < 0.01$)。**结论:**TNF- α 上调内皮细胞 PAPP-A mRNA 的表达,而睾酮抑制了 TNF- α 对 PAPP-A 分泌增加的刺激作用。

关键词: 睾酮;妊娠相关血浆蛋白 A;肿瘤坏死因子 - α

中图分类号: R-33; R543.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)02-221-04

The Effect of Androgen on Inflammatory Factor PAPP-A mRNA in Endothelial Cells*

WANG Yu, TAI Guo-xia, ZHANG Ying-zhong, FU Lu[△]

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

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of testosterone on inflammatory factor PAPP-A in endothelial cells. **Methods:** HUVECs were treated with TNF- α for 16h and then with an addition of testosterone or not. PAPP-A mRNA were assessed by RT-PCR. **Results:** The pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF)- α , stimulated PAPP-A mRNA expression in HUVEC, and over time the expression increased. Maximal PAPP-A mRNA level is achieved at 16 h stimulated by TNF- α . Testosterone at a concentration of $1 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ was effectively inhibit PAPP-A mRNA expression stimulated by TNF- α . **Conclusion:** TNF- α stimulate PAPP-A mRNA high expression, Androgen can inhibit this function.

Key words: Testosterone; Pregnancy-associated plasma protein-A; Tumor necrosis factor- α

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R543.5 **Document Code :** A

Article ID: 1673-6273(2015)02-221-04

前言

正常成年男性血浆中的睾酮水平约为 $(1.0 \sim 3.5) \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。睾酮水平随着年龄的增加,于 25 岁达高峰,此后随年龄增长而逐渐下降,至 70 岁时仅为峰值的 20%,90 岁时仅为 5%^[1]。临床观察中发现男性随着年龄的增长,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发病率逐渐升高,目前大多数观点认为随年龄增长男性生殖功能逐渐下降,体内雄激素分泌量也减少,导致血脂代谢不良、胰岛素抵抗增加、内皮功能不稳定、凝血系统活性升高等等,从而促进 AS 的发生与发展^[2]。

对于 AS 发病的机制由脂质浸润学说、中膜平滑肌细胞增殖学说到血栓源学说等,这些均不能对 AS 的发生机制提供满意的解释。但一直到 1999 年 AS 是血管内皮损伤导致的过度炎症反应性疾病的理论才受到重视。有学者指出 AS 是对各种不同损害的过度的炎症纤维增生反应的结果^[3]。在这一过程中,内皮细胞、巨嗜细胞和平滑肌细胞构成病变的三要素,它们通

过生长因子、细胞因子等之间的相互作用促进动脉粥样硬化的发生、发展。而淋巴细胞是一种重要的免疫细胞,可导致病灶的免疫反应,加重这一网络的复杂性^[4,5]。因此探索雄激素与 AS 炎症关系的分子机制,可能是抗动脉粥样硬化治疗的新靶点,也可为临床上雄激素的替代治疗提供新的理论依据。

研究发现急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者的血清妊娠相关蛋白 -A(pregnancy associated plasma protein-PAPP-A, PAPP-A)水平显著增高,可作为预测不稳定斑块内炎症的一种新的血清学指标,对 ACS 进行早期识别、危险分层以及预后评价^[6,7]。内皮功能受损被认为是动脉粥样硬化的始动步骤,研究表明,动脉粥样硬化不稳定性斑块中炎症反应区域的巨噬细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等均可高表达 PAPP-A^[8]。本实验观察雄激素是否能够影响内皮细胞分泌 PAPP-A,从而推测雄激素对 AS 炎症过程可能发生的影响。

1 材料与方法

* 基金项目:黑龙江省青年科学基金项目(QC2009C37)

作者简介:王雨(1988-),女,硕士,主要研究方向:雄激素与冠心病, E-mail: xixi0628@hotmail.com

[△]通讯作者:富路, E-mail: fulunadia@aliyun.com

(收稿日期:2014-07-23 接受日期:2014-08-15)

1.1 试剂与仪器

1.1.1 材料及主要试剂 睾酮购自美国 sigma 公司、人原代脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自美国 Sciencell 公司,细胞复苏后于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养,所用细胞为 3-4 代、M199 (Gibco)、胎牛血清(Gibco)、TNF-α 购自美国 sigma 公司。

1.1.2 主要仪器 CO₂ 恒温培养箱(SANYO, Japan)、超净工作台(苏州净化配置厂)、梯度 PCR 仪(Bio-rad, USA)

1.2 实验步骤

1.2.1 内皮细胞培养 采用 3~4 代生长状态良好的人脐静脉内皮细胞株细胞(HUVECs)用于实验。培养基为 10% M199,待细胞铺满培养瓶底后,以 0.25% 的胰酶消化传代。

1.2.2 TNF-α 干预实验 取 HUVECs 悬液接种于 12 孔培养板,第 2 天换无血清培养基,分别予终浓度 100 μg/L 的 TNF-α 刺激,作用 2、4、8、16、24 h 后留取细胞待测。每组每浓度设 5 个孔。

1.2.3 PAPP-A mRNA 表达的测定 收集各组细胞, RNA 的提取方法为 Trizol 提取法。分别测定 RNA 纯度及浓度后,采用 Bioneer 公司逆转录试剂盒进行逆转录。将 Total RNA(2 μg)和 Oligo dT(100 pmol)加入 AccuPower RocketScript RT PreMix 管中,用 DEPC 水补至最终体积至 20 μL 后,37℃ 1min,50℃ 温育 1 h,95℃ 变性 5 min 后冰上骤冷用于 PCR 扩增。采用 Primer5.0 软件设计引物。PAPP-A 引物:上游引物 5'GCATCTCAGAAATCCAGTCC 3',下游引物 5'AGTCCG-TACAGTCGTCATCT 3',扩增片段为 210 bp。β-actin 引物:上

游引物 5'CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT 3',下游引物 5'ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA 3',扩增片段为 101bp。PCR 反应条件为:PAPP-A:预变性 94℃ 5 min,94℃ 45s,46℃ 45s,72℃ 1 min 循环 30 次,72℃ 延伸 10 min。β-actin:预变性 94℃ 5 min,94℃ 45s,60℃ 45s,72℃ 1 min 循环 30 次,72℃ 延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖电泳,并用凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司)进行光密度扫描,结果以 PAPP-A/β-actin 的积分光密度比值表示。

1.2.4 重复上述实验 实验分组:(1)空白对照组,(2) TNF-α 组,(3) TNF-α+ 睾酮组,(4) 睾酮组;其中 TNF-α 组及 TNF-α+ 睾酮组均添加 100 μg/L TNF-α, TNF-α+ 睾酮组及睾酮组添加 1×10⁻⁸ mol/L 睾酮。作用 16 h 后留取细胞待测。每组每浓度设 5 个孔。

1.3 统计学处理

采用($\bar{x} \pm s$),组间比较,两组数据间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。所有数据采用 SPSS21.0 统计软件处理,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF-α 对内皮细胞 PAPP-A mRNA 表达的影响

静息状态下内皮细胞几乎不表达 PAPP-A。TNF-α 作用于内皮细胞后,随着时间的延长,内皮细胞 PAPP-A mRNA 表达水平逐渐升高,于 16 小时达高峰(图 1)。

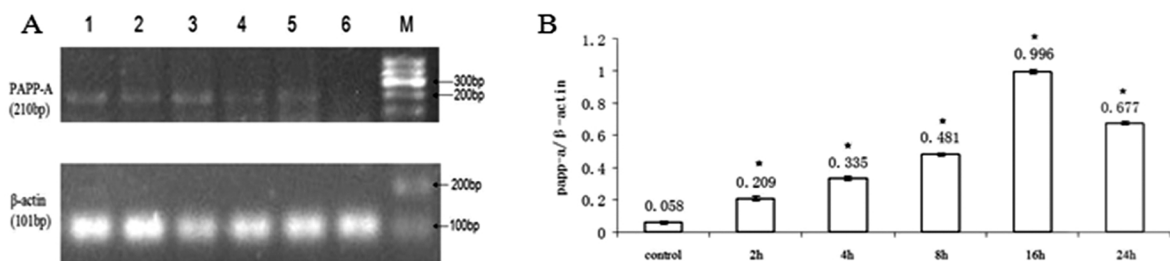


图 1 TNF-α (终浓度为 100ng/ml) 作用不同时间对 HUVEC PAPP-A mRNA 表达的影响: A: 1 为 24 h 组, 2 为 16 h 组, 3 为 8 h 组, 4 为 4 h 组, 5 为 2 h 组, 6 为空白对照组, M 为 Marker; B: * 与空白对照组, P<0.01

Fig.1 The level of PAPP-A mRNA in HUVECs which were stimulated with TNF-α (100ng/ml) for different times: A: 1 means 24 h group, 2 means 16 h group, 3 means 8 h group, 4 means 4 h group, 5 means 2 h group, 6 means control group. : B: *: P<0.05 compared with the control

2.2 睾酮对 TNF-α 损伤的内皮细胞 PAPP-A mRNA 表达的影响

TNF-α 与雄激素作用于内皮细胞后,内皮细胞 PAPP-A mRNA 表达水平较 TNF-α 组明显降低;雄激素组与空白对照组比较无统计学意义(图 2)。

3 讨论

随着对动脉粥样硬化发生机制的研究不断深入,动脉粥样硬化中新炎症因子及炎症介质的不断检出,炎症已成为 AS 发生发展过程中的重要因素。TNF-α 为炎症反应和免疫反应的重要递质,并与动脉粥样硬化活动性密切相关^[9]。研究显示 TNF-α 可抑制内皮细胞的增值、促进内皮细胞的凋亡、增加白

细胞黏附、诱导细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达等作用,导致血管损伤和血栓形成;促进心肌细胞凋亡引起心功能障碍,促进平滑肌细胞增殖、迁移和内皮细胞的活化,最终导致动脉粥样硬化形成和斑块的不稳定^[10]。Conover CA 和 Li W 等人发现 TNF-α 可诱导人冠状动脉内皮细胞、平滑肌细胞及人外周单核细胞中 PAPP-A mRNA 表达升高^[11,12]。

1974 年 Lin 等在妊娠妇女血浆中发现并提纯,最近国内外研究发现,PAPP-A 是一种金属蛋白酶,它可能参与 AS 的发生与发展^[3]。并已证明,AS 不稳定性斑块中炎症反应区域的内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞等均可高表达 PAPP-A。PAPP-A 可以裂解完整的胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)-4,释放胰岛素样生长因子(IGF)。IGF 可以促进巨噬细胞趋化,摄取过

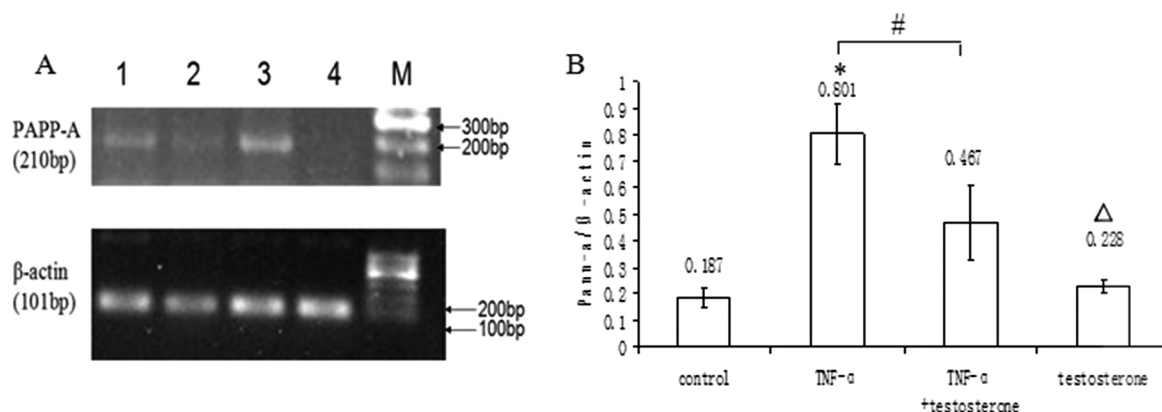


图2 睾酮对 TNF- α 损伤的内皮细胞 PAPP-A mRNA 表达的影响

Fig.2 The effect of testosterone on PAPP-A mRNA in HUVECs which were stimulated with TNF- α

A: 1 为睾酮组, 2 为 TNF- α + 睾酮组, 3 为 TNF- α 组, 4 为 TNF- α 组, M 为 Marker。B: * 与空白对照组比较, $P < 0.01$ 。# 与 TNF- α 组比较, $P < 0.01$ 。Δ 与空白对照组比较, $P > 0.05$

A: 1 means testosterone group, 2 means TNF- α and testosterone, 3 means TNF- α group, 4 means control group, M means Marker。B: *: $P < 0.05$ compared with the control. #: $P < 0.01$ compared with the cells stimulated with TNF- α for 16h. Δ: $P > 0.05$ compared with the control

量的 LDL-C 从而形成泡沫细胞, 促进血管平滑肌细胞及血管内膜细胞的增殖和凋亡, 合成分泌促炎因子, 细胞外基质重塑, 使纤维帽变薄, 甚至诱发斑块出血和破裂, 在 AS 的进展中起非常重要的作用^[14]。反过来胰岛素样生长因子又可加速 PAPP-A 对 IGFBP-4 的降解作用, 从而进一步增强其促进动脉粥样硬化发生发展的生物学作用^[15]。体外研究证明, PAPP-A 受促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的直接调节, NF- κ B 途径的激活是促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 诱导的 PAPP-A 基因表达和功能激活的主要信号传导途径^[16]。

流行病学研究显示: 老年男性的 CAS 发病率较女性高, 男性性别目前仍作为一个独立的冠心病危险因素, 而随着年龄增长, 老年男性雄激素水平逐渐降低。低睾酮水平与冠脉系统疾病有关, 另外, 睾酮缺乏是冠脉事件和总体死亡率的独立危险因素^[17]。睾酮由睾丸间质细胞合成, 研究发现雄激素受体除存在于睾丸间质细胞内之外, 也存在于心房肌、心室肌、主动脉、冠状动脉, 因此, 雄激素与心血管系统有密切的关系。随机试验研究证实给予冠脉疾病男患睾酮补充治疗对心肌缺血有保护作用^[18]。Yang 等人证明炎症细胞因子的升高与低睾酮水平有关, 且二者均与老年男性动脉粥样硬化有关^[19]。但目前缺少雄激素、炎症与 AS 三者之间的研究。

本实验结果提示, 静息状态下 HUVEC 几乎不表达 PAPP-A mRNA, 炎性作用可诱发 PAPP-A 高表达, 且随着刺激时间的延长, PAPP-A mRNA 表达量在 2、4、8、16、24 小时均增加, TNF- α 作用 2 小时后 PAPP-A 的 mRNA 表达明显增加, 随后, 在 TNF- α 作用 16 小时 PAPP-A mRNA 表达达高峰。本研究发现在 TNF- α 的作用下 PAPP-A mRNA 增加, 提示 PAPP-A 在转录水平上受促炎因子的直接调控, 也进一步证明了 PAPP-A 和炎症的相关性。目前炎症因子对 PAPP-A 表达的调控机制仍不清楚。有研究在培养人成纤维细胞的研究中发现, TNF- α 影响 PAPP-A 的表达主要是通过 NF- κ B 通路实现的, NF- κ B 的抑制剂 BAY11-7082 能阻断 TNF- α 所诱导的人成纤维细胞中 PAPP-A mRNA 和蛋白的高表达^[20]。但缺少 TNF- α 影

响内皮细胞表达 PAPP-A 机制研究的报道。

如前所述, 有研究显示, 睾酮缺乏与冠脉事件有显著的关系, 睾酮补充治疗可保护心肌, 减少缺血的发生。根据本实验结果, 雄激素可以抑制内皮细胞的 PAPP-A mRNA 的表达, 可推断雄激素可抑制内皮细胞的炎症反应。但近年来关于雄激素水平与炎症反应的研究相对较少。有实验表明, 男性在性功能低下时体内炎症反应一般也较重, 血清中炎症因子包括 CRP、IL-6、IL-8 等水平较高, 而睾酮的补充治疗可降低某些炎症因子的水平^[21]。Malkin 等人也进行了一项关于雄激素补充治疗的研究, 实验中应用外源性睾酮补充治疗后, TNF- α 和 IL-1 水平明显下降, 由此 Malkin 提出: 雄激素补充治疗能够减少炎症反应^[22]。关于雄激素与炎症反应的机制研究, 有报道指出雄激素降低炎症因子可能是由于: 当游离睾酮与雄激素受体结合后, 核因子- κ B 和活化蛋白-1 的活化受到影响, 间接起到了抑制炎症因子分泌的作用。

目前越来越多的研究证实 PAPP-A 不仅能够成为不稳定性斑块的标记物, 而且还可作为急性冠脉综合征预后的预测因子, PAPP-A 的升高提示可能因斑块不稳定而再发急性缺血等不良事件风险增高。本实验结果提示, 雄激素可抑制炎症因子诱导的 PAPP-A 的表达, 说明雄激素也许可以减轻动脉粥样硬化的炎症反应。因此推测睾酮水平的降低可能同时伴有某种程度的炎症反应, 在低睾酮人群体内其慢性炎症反应更加严重, 同正常人群相比, 动脉粥样硬化程度也更加严重。这在某种程度上解释了睾酮水平降低与血管疾病发生率升高二者的关系。本实验未进行睾酮抑制 PAPP-A 表达的机制方面的研究, 仍不能确定睾酮是通过何种途径减少 PAPP-A 在内皮细胞中的表达。另外, 雄激素与炎症因子及动脉粥样硬化的关系尚不明确, 关于此三者之间的研究可使睾酮与血管疾病之间的关系更加明确, 并且也许能为临床上睾酮的替代治疗提供新的理论依据。

参考文献(References)

[1] Busso JM, Satterlee DG, Roberts ML, et al. Testosterone manipulation

- postcastration does not alter cloacal gland growth differences in male quail selected for divergent plasma corticosterone stress response[J]. Poultry science, 2010, 89(12): 2691-2698
- [2] Yeap BB. Androgens and cardiovascular disease [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010, 17(3): 269-276
- [3] 褚现明,李冰,安毅,等.炎症与动脉粥样硬化关系研究进展[J].中国分子心脏病学杂志, 2010, 11(3): 184-188
Chu Xian-ming, Li Bing, An Yi, et al. The Progression of The Relation Between Inflammation and Atherosclerosis [J]. Molecular Cardiology of China, 2010, 11(3): 184-188
- [4] Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice [J]. Circ J, 2010, 74(2): 213-220
- [5] De Tena JG, Mehta J, Dinerman J, et al. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 353: 429-430
- [6] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes: comparison with markers of systemic inflammation, platelet activation, and myocardial necrosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(2): 229-237
- [7] You L, Li L, Zhang F, et al. A pilot study of the clinical relevance of the relationship between the serum level of pregnancy-associated plasma protein A and the degree of acute coronary syndrome[J]. J Int Med Res, 2010, 38(2): 625-632
- [8] 边云飞,赵欣,肖传实.肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 对内皮细胞妊娠相关血浆蛋白A表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(4): 260-264
Bian Yun-fei, Zhao Xin, Xiao Chuan-shi. Effects of TNF- α and IL- 1β on the Expression of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A in Endothelial Cells and Its Mechanism[J]. Chin J Arterioscler, 2009, 17(4): 260-264
- [9] 杨丽,孙根义,刘玉洁.不同类型冠心病患者血清炎症细胞因子水平比较[J].临床心血管病杂志, 2009, 25(2): 153-154
Yang Li, Sun Gen-yi, Liu Yu-jie. Compare of inflammatory cytokine levels in Different types of coronary heart disease patients [J]. Clin Cardiol (China), 2009, 25(2): 153-154
- [10] 黄炜,陈清枝,燕宪亮,等. C-反应蛋白、白细胞介素-6和肿瘤坏死因子- α 在冠心病中的变化 [J]. 临床心血管病杂志, 2004, 20(7): 398-400
Huang Wei, Chen Qing-zhi, Yan Xian-liang, et al. CRP, IL-6 and TNF- α in patients with coronary heart disease [J]. Clin Cardiol (China), 2004, 20(7): 398-400
- [11] Conover CA, Harrington SC, Bale LK. Differential regulation of pregnancy associated plasma protein-A in human coronary artery endothelial cells and smooth muscle cells [J]. Growth Horm IGF Res, 2008, 18(3): 213-220
- [12] Li W, Li H, Gu F. CRP and TNF- α Induce PAPP-A Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells [J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012: 697832
- [13] Lin T M, Galbert S P, Kiefer D, et al. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins [J]. American journal of obstetrics and gynecology, 1974, 118(2): 223
- [14] Henning BB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): A local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs[J]. Growth Hormone IGF Research, 2007, 17(1): 10-18
- [15] Gyru C, Oxvig C. Quantitative analysis of insulin-like growth factor-modulated proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 by pregnancy-associated plasma protein-A [J]. Biochemistry, 2007, 46(7): 1972-1980
- [16] Resch ZT, Oxvig C, Bale LK, et al. Stress-activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts[J]. Endocrinology, 2006, 147(2): 885-890
- [17] Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Terentes-Printzios D, et al. Plasma total testosterone and incident cardiovascular events in hypertensive patients[J]. American journal of hypertension, 2013, 26(3): 373-381
- [18] Saad F. Androgen therapy in men with testosterone deficiency: can testosterone reduce the risk of cardiovascular disease? [J]. Diabetes/metabolism research and reviews, 2012, 28(s2): 52-59
- [19] Yun-mei Y, Xue-ying L, Wei-dong H, et al. Study of androgen and atherosclerosis in old-age male [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2005, 6(9): 931-935
- [20] Resch ZT, Oxvig C, Bale LK, et al. Stress-activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts[J]. Endocrinology, 2006, 147(2): 885-890
- [21] Yesilova Z, Ozata M, Kocar IH, et al. The effects of gonadotropin treatment on the immunological features of male patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000, 85(1): 66-70
- [22] Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004, 89(7): 3313-3318