

# 外源性睾酮对雄性小鼠心功能和心脏衰老的影响

朱桂平 张 莉 周玉良 李博维 林忠伟 雷 达

**【摘要】** 目的:探讨外源性睾酮对雄性小鼠心功能和心脏衰老的影响。 方法:15 个月龄 C57/BL6 雄性小鼠分为 4 组:安慰剂组、睾酮组、沉默信息调节因子 1(Sirt1)抑制剂 EX-527 组(EX-527 组)和睾酮 + EX-527 组,每组 7 只。干预 3 个月后超声心动图检测小鼠心功能指标,ELISA 法检测小鼠血清睾酮浓度,分离小鼠左心室,组织化学染色法检测衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -gal),Western blot 检测心肌组织 B 型利钠肽(BNP)、Sirt1 蛋白表达水平,实时定量 RT-PCR 检测心肌组织肌球蛋白重链(MYH)6、MYH7、肌浆网钙 ATP 酶 2(SERCA2)和  $\alpha$ -肌动蛋白 1(ACTA1) mRNA 表达水平。 结果:睾酮组及睾酮 + EX-527 组血清睾酮水平较安慰剂组及 EX-527 组明显升高( $P$  均  $< 0.05$ )。与安慰剂组相比,睾酮组 SA- $\beta$ -gal 染色阳性面积比例明显减少[(17.13  $\pm$  7.12)%对 (35.88  $\pm$  10.74)%], $P < 0.05$ ],BNP 蛋白表达水平、MYH7 和 ACTA1 mRNA 表达水平明显降低( $P$  均  $< 0.05$ ),Sirt1 蛋白表达水平、MYH6 和 SERCA2 mRNA 表达水平明显升高( $P$  均  $< 0.05$ )。EX-527 组和睾酮 + EX-527 组上述各指标与安慰剂组相比无统计学差异,与睾酮组相比有显著性差异( $P$  均  $< 0.05$ )。超声心动图结果示各组左室舒张末期内径、室间隔厚度、左室后壁厚度、左室缩短分数、左室射血分数及 E/A 值无显著性差异( $P$  均  $> 0.05$ )。 结论:外源性睾酮可能通过 Sirt1 途径延缓雄性小鼠心肌细胞衰老,改善心衰相关的基因表达异常。

**【关键词】** 衰老;睾酮;心功能不全;沉默信息调节因子 1

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.06.014

**The effects of exogenous testosterone on cardiac function and myocardial senescence in male mice** ZHU Guiping, ZHANG Li, ZHOU Yuliang, LI Bowei, LIN Zhongwei, LEI Da. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong 510080, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effects of exogenous testosterone on cardiac function and myocardial senescence in male mice. **Methods:** Twenty-eight 15-month-old male C57/BL6 mice were divided into 4 experimental groups: placebo group, testosterone group, silent information regulator 1 (SIRT1) inhibitor EX-527 group (EX-527 group) and testosterone + EX-527 group. Echocardiography was performed under anesthesia after treatment for 3 months. ELISA was used to detect the serum concentration of testosterone. Senescence associated  $\beta$  galactosidase (SA- $\beta$ -gal) of left ventricular myocardium was measured by histochemical staining. Western blot was used to estimate the protein expression of B-type natriuretic peptide (BNP) and Sirt1, while real-time RT-PCR was used to assay the mRNA expression of myosin heavy chain (MYH)6, MYH7, sarcoendoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 2 (SERCA2) and  $\alpha$ -skeletal actin (ACTA1). **Results:** Serum testosterone levels in testosterone group

基金项目:广东省公益研究与能力建设专项资金(2014A020212305);广东药学院附属第一医院院内课题

作者单位:510080 广州,广东药学院附属第一医院心内科

通信作者:雷 达,Email:gyleida@163.com

and testosterone + EX-527 group were significantly higher than those in placebo group and EX-527 group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the placebo group, the proportion of SA- $\beta$ -gal positive areas, protein expression of BNP, and mRNA expression of MYH7 and ACTA1 were significantly decreased, while the protein expression of Sirt1, and mRNA expression of MYH6 and SERCA2 were significantly increased in testosterone group (all  $P < 0.05$ ). These indexes in both EX-527 group and testosterone + EX-527 group had no significant difference as compared with placebo group, but had significant differences as compared with testosterone group ( $P < 0.05$ ). Echocardiography results such as left ventricular end diastolic diameter (LVEDd), interventricular septal thickness (IVST), posterior wall thickness (PWT), left ventricular fractional shortening (LVFS), left ventricular ejection fractions (LVEF) and E/A value had no significant difference in each group (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion:** Exogenous testosterone may retard the process of myocardial senescence and ameliorate the gene expression associated with cardiac dysfunction in male mice by Sirt1 pathway.

**【Key words】** Senescence; Testosterone; Cardiac dysfunction; Silent information regulator 1

心脏是雄激素作用的靶器官之一,总睾酮或游离睾酮水平降低与充血性心力衰竭死亡率增加有关<sup>[1]</sup>,睾酮治疗已作为心力衰竭(心衰)可选择的治疗措施<sup>[2]</sup>。心肌细胞衰老可导致心衰的发生发展<sup>[3-4]</sup>,我们前期研究发现低睾酮水平可诱导心肌细胞衰老,睾酮替代治疗可延缓心肌细胞衰老<sup>[5]</sup>。本研究通过体内实验,探讨外源性睾酮对雄性小鼠心功能和心脏衰老的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

15 个月龄 C57/BL6 雄性小鼠购自南方医科大学实验动物中心。实验共分 4 组,每组 7 只小鼠,SPF 条件下分笼饲养。(1)安慰剂组:小鼠肌肉注射芝麻油;(2)睾酮组:小鼠每 3 d 肌肉注射 3 mg/kg 丙酸睾酮<sup>[5]</sup>;(3)EX-527 组:小鼠每 3 d 腹腔内注射 10 mg/kg 沉默信息调节因子 1 (Sirt1) 抑制剂 EX-527;(4)睾酮 + EX-527 组:小鼠肌肉注射丙酸睾酮联合腹腔内注射 EX-527。各组干预时间均为 3 个月。

### 1.2 超声心动图检测

采用腹腔内注射 1.5%戊巴比妥钠对小鼠进行全身麻醉。左前胸脱毛后,左侧卧位固定于温度恒定的操作台上,心率控制在 400~500 次/min。使用美国 GE 公司 Vivid-7 超声仪,30MHz 探头行超声心动图分析,显示胸骨旁左室长轴切面,由二维 B 型超声测量左室舒张末期内径(LVEDd)、室间隔厚度(IVST)和左室后壁厚度(PWT),并计算左室缩短分数(LVFS)和左室射血分数(LVEF)。由心尖四腔切面获得二尖瓣舒张早期最大峰值速度(E 峰)和舒张晚期最大峰值速度(A 峰),计算 E/A 值。

### 1.3 ELISA 法检测睾酮浓度

各组小鼠在干预及处死前于上午 9 至 11 时之间眼球取血,静置 30 min 后,3 000 转/min 离心 10 min,取血清,ELISA 法测定睾酮浓度(试剂盒购自 R&D 公司)。

### 1.4 组织化学染色法检测衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶 (SA- $\beta$ -gal)

小鼠腹腔内注射肝素 5 000 U/kg,20 min 后行颈椎脱臼法处死小鼠,迅速开胸摘取心脏。37℃ PBS 缓冲液中分离左心室心肌组织,去除血液及脂肪组织。心肌组织石蜡包埋、切片,常规脱蜡后,根据 SA- $\beta$ -gal 染色试剂盒(上海碧云天公司)说明书对心肌组织进行 SA- $\beta$ -gal 染色,显微镜下观察组织染色,每组选取 3 张心肌组织石蜡切片,用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算每张切片的蓝染面积和总面积,其比值为蓝染阳性面积比例。

### 1.5 Western blot 检测

蛋白提取液提取左心室心肌组织蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。各组均取 20  $\mu$ g 蛋白样品,凝胶电泳、转膜后,室温下用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,加入 Sirt1 抗体(1 : 2 000,abcam 公司)、B 型利钠肽 (BNP)抗体(1 : 500,Santa Cruz 公司)、GAPDH 抗体(1 : 5 000,Sigma 公司),4℃孵育过夜,洗膜后与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1 : 5 000,Invitrogen 公司)室温下孵育 1 h,洗膜后 ECL 显影,X 线胶片曝光,以目的条带和 GAPDH 条带吸光度的比值代表蛋白的相对表达量。

### 1.6 实时定量 PT-PCR 检测“胎儿”基因表达水平

RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)提取左心室心肌组织总 RNA,分光光度计测定 RNA 浓度。

500 ng RNA 用反转录试剂盒(Invitrogen 公司)反转录成 cDNA。采用 SYBR Green I 染料(Invitrogen 公司)进行定时定量 PCR,分析肌球蛋白重链(MYH)6、MYH7、肌浆网钙 ATP 酶 2(SERCA2)和  $\alpha$ -肌动蛋白 1(ACTA1)mRNA 表达水平,H1F0 作为内参基因。引物序列如下,MYH6 正义序列为 5'-TGAGACGGTGGTGGGTTTGT-3',反义序列为 5'-CACCGGTATCAGCAGAAGCATA -3'; MYH7 正义序列为 5'-TCCTCACATCTTCTCCATCTCTGA-3',反义序列为 5'-TGGACTGATTCTCCCGATCTG-3'; SERCA2 正义序列为 5'-CTCTGGAGTTTTCACGGGATAGAA-3',反义序列为 5'-TCCGGCTTGGCTTGTTTG-3'; ACTA-1 正义序列为 5'-TCGCTGACCGCATGCA-3',反义序列为 5'-GGGCGATGATCTTGATCTTCA-3'; H1F0 正义序列为 5'-AGCCACTACAAGGTGGGTGAGA-3',反义序列为 5'-TTGAGAACACCGGTGGTCACT-3'。扩增条件为:95℃预变性 10 min,然后进行 40 个循环,包括 95℃变性 15 s,60℃退火 1 min。计算以 H1F0 为对照的 mRNA 相对表达量,安慰剂组设为参考 mRNA,其相对表达量为 100。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,所得数据均采用均数  $\pm$  标准差表示。各组间比较采用单因素方差分析法,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  $P < 0.05$  为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组小鼠超声心动图结果

超声心动图检查结果示各组间 LVEDd、IVST、

PWT、LVFS、LVEF、E/A 值未见显著性差异( $P$  均  $> 0.05$ ,见表 1)。

2.2 各组小鼠血清睾酮水平

干预 3 个月后,睾酮组及睾酮 + EX-527 组血清睾酮水平分别为( $19.27 \pm 3.22$ ) nmol/L 和( $22.09 \pm 4.06$ ) nmol/L,较安慰剂组[( $5.26 \pm 1.39$ ) nmol/L]和 EX-527 组[( $3.99 \pm 1.06$ ) nmol/L]均明显升高( $P$  均  $< 0.05$ );睾酮组与睾酮 + EX-527 组血清睾酮水平无明显差异;EX-527 组与安慰剂组血清睾酮水平无明显差异。

2.3 各组小鼠心肌组织 SA- $\beta$ -gal 化学染色阳性面积比例

SA- $\beta$ -gal 染色后,心肌组织可见胞浆和胞核呈蓝染(见图 1)。对各组蓝染阳性面积比例进行计算,睾酮组 SA- $\beta$ -gal 蓝染阳性面积比例与安慰剂组相比明显减少[( $17.13 \pm 7.12$ )% 对 ( $35.88 \pm 10.74$ )%, $P < 0.05$ ];EX-527 组和睾酮 + EX-527 组蓝染阳性面积比例分别为( $30.51 \pm 10.12$ )% 和 ( $28.21 \pm 3.60$ )%,与睾酮组相比明显增加( $P$  均  $< 0.05$ );安慰剂组、EX-527 组与睾酮 + EX-527 组之间蓝染阳性面积比例无统计学差异。

2.3 各组小鼠心肌组织 Sirt1、BNP 蛋白表达水平

与安慰剂组相比,睾酮组心肌组织 Sirt1 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),BNP 蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ );与睾酮组相比,EX-527 组和睾酮 + EX-527 组 Sirt1 蛋白表达水平明显降低( $P$  均  $< 0.05$ ),BNP 蛋白表达水平明显升高( $P$  均  $< 0.05$ );安慰剂组、EX-527 组、睾酮 + EX-527 组之间 Sirt1 和 BNP 蛋白表达水平无统计学差异。见图 2、表 2。

表 1 各组小鼠超声心动图检测结果

	安慰剂组	睾酮组	EX-527 组	睾酮 + EX-527 组
LVEDd/mm	4.05 $\pm$ 0.23	4.00 $\pm$ 0.20	4.12 $\pm$ 0.22	4.07 $\pm$ 0.10
IVST/mm	1.12 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.10	1.10 $\pm$ 0.09	1.13 $\pm$ 0.12
PWT/mm	1.08 $\pm$ 0.12	1.05 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.12
LVFS/%	25.07 $\pm$ 2.23	28.74 $\pm$ 2.02	26.95 $\pm$ 4.36	27.50 $\pm$ 4.27
LVEF/%	57.83 $\pm$ 3.78	63.74 $\pm$ 3.07	60.68 $\pm$ 7.12	61.57 $\pm$ 6.65
E/A	1.05 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.12	1.07 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.14

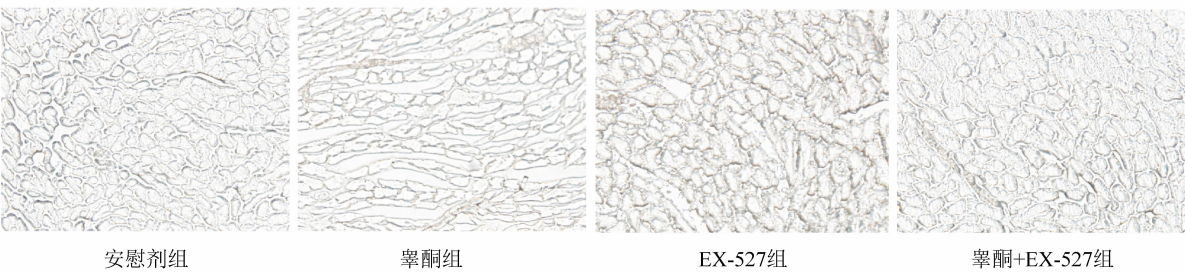


图 1 各组小鼠心肌组织衰老相关 β-半乳糖苷酶化学染色 (×20)

2.4 各组小鼠心肌组织“胎儿”基因 mRNA 表达水平

与安慰剂组相比,睾酮组 MYH6 和 SERCA2 mRNA 表达水平明显升高 ( $P$  均 $<0.05$ ), MYH7 和 ACTA1 mRNA 表达水平明显降低 ( $P$  均 $<0.05$ );与睾酮组相比,EX-527 组和睾酮 + EX-527 组 MYH6 和 SERCA2 mRNA 表达水平明显降低 ( $P$  均 $<0.05$ ), MYH7 和 ACTA1 mRNA 表达水平明显升高 ( $P$  均 $<0.05$ );安慰剂组、EX-527 组、睾酮 + EX-527 组之间上述“胎儿”基因表达水平无统计学差异。见表 3。

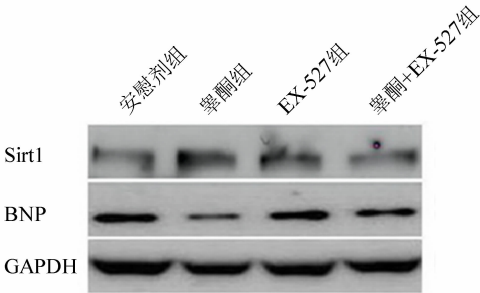


图 2 各组小鼠心肌组织 Sirt1 和 BNP 蛋白表达水平

表 2 各组小鼠心肌组织 Sirt1 和 BNP 蛋白相对表达水平的比较

	安慰剂组	睾酮组	EX-527 组	睾酮 + EX-527 组
SIRT1	0.25 ± 0.09	0.63 ± 0.06 <sup>(1)</sup>	0.37 ± 0.04 <sup>(2)</sup>	0.32 ± 0.07 <sup>(2)</sup>
BNP	0.79 ± 0.15	0.41 ± 0.08 <sup>(1)</sup>	0.74 ± 0.12 <sup>(2)</sup>	0.65 ± 0.06 <sup>(2)</sup>

注:与安慰剂组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与睾酮组相比,<sup>(2)</sup> $P<0.05$

表 3 各组小鼠心肌组织“胎儿”基因 mRNA 相对表达水平的比较

	安慰剂组	睾酮组	EX-527 组	睾酮 + EX-527 组
MYH6	100	165.70 ± 12.06 <sup>(1)</sup>	104.47 ± 17.42 <sup>(2)</sup>	99.37 ± 19.02 <sup>(2)</sup>
MYH7	100	59.73 ± 9.19 <sup>(1)</sup>	99.97 ± 12.88 <sup>(2)</sup>	94.10 ± 10.05 <sup>(2)</sup>
SERCA2	100	134.93 ± 23.30 <sup>(1)</sup>	94.07 ± 5.62 <sup>(2)</sup>	107.03 ± 14.25 <sup>(2)</sup>
ACTA1	100	71.33 ± 10.57 <sup>(1)</sup>	113.00 ± 16.57 <sup>(2)</sup>	107.10 ± 21.37 <sup>(2)</sup>

注:与安慰剂组相比,<sup>(1)</sup> $P<0.05$ ;与睾酮组相比,<sup>(2)</sup> $P<0.05$

3 讨论

睾酮水平降低与衰老的许多病理状态如性功能障碍、内脏性肥胖、骨骼和肌肉强度减弱及情绪障碍等相关<sup>[6-7]</sup>。边瓯等<sup>[8]</sup>研究显示,高龄男性慢性心衰患者中,发生 2 型心肾综合征的患者血清睾酮水平降低,可出现血管内皮功能不全、肾动脉硬化和肾脏纤维化。睾酮治疗可改善老年及去势 C57BL/6 小鼠的脑衰老<sup>[9]</sup>,抑制快速老化模型 SAMP8 小鼠海马区血管内皮细胞衰老<sup>[10]</sup>。本研究 中睾酮组及睾酮 + EX-527 组血清睾酮水平较安慰

剂组和 EX-527 组均明显升高,提示外源性睾酮治疗后可使小鼠血清睾酮水平升高。SA-β-gal 是衰老细胞的特异性标志物,本研究中睾酮组与安慰剂组相比,心肌组织 SA-β-gal 蓝染阳性面积比例减少,提示外源性睾酮治疗可延缓心肌组织衰老。

心衰患者血浆睾酮水平下降<sup>[11]</sup>,尤其是老年患者。Pugh 等<sup>[12]</sup>对 20 例男性心衰患者的研究中发现,12 周的睾酮治疗能明显改善患者的生活质量和心衰相关的临床症状。给予 76 例中重度心衰患者生理剂量睾酮治疗 12 个月,可使患者运动耐量和心

衰症状明显改善<sup>[2]</sup>。但对于老年男性,睾酮替代治疗纠正心衰是否通过延缓心脏衰老来实现尚不明确。

心肌细胞衰老时,心肌僵硬度增加,收缩与舒张功能下降,其发生与“胎儿”基因表达改变有关,表现为 MYH6 向 MYH7 转化、SERCA2 表达下降和 ACTA1 表达增加<sup>[13]</sup>。这些“胎儿”基因的表达改变同时是成人心衰的典型表现,且心肌细胞损伤及功能障碍时还可出现 BNP 表达异常。本研究发现睾酮治疗可改善衰老心肌组织中“胎儿”基因的表达改变,下调 BNP 表达水平,提示睾酮治疗可能通过延缓心肌细胞衰老,改善心功能。

心脏衰老时,超声心动图无特异性改变。心肌细胞衰老可导致左室舒张末期压力升高,舒张早期充盈速度下降,表现为 E/A 值下降<sup>[5]</sup>。外源性睾酮治疗对超声心动图指标的影响,目前的研究结果不尽一致。有研究显示,外源性睾酮可改善去势大鼠 LVEDd 和 LVEDs 的增加<sup>[14]</sup>及 EF、左心室形成压(LVDP)和左心室压力最大上升速率( $\pm dp/dtmax$ )的下降<sup>[11,15]</sup>。本研究显示,与安慰剂组相比,睾酮治疗后 LVEDd、IVST、PWT、LVFS、LVEF、E/A 均未见显著性差异。虽然本研究提示睾酮治疗可明显改善心衰相关的基因异常,但并未发现睾酮能够改善与心衰相关的心脏结构,与其他研究不一致的原因可能为衰老程度尚不足以引起小鼠心脏结构变化、样本量少、治疗周期短等。

Sirt1 的表达增加可改善衰老相关的心肌肥大、凋亡及心功能不全,使衰老相关标志物表达下调<sup>[16]</sup>。心脏局部分泌的胰岛素生长因子对氧化应激引起的心肌细胞损害具有保护作用,可调节心肌细胞衰老,而这一作用由 Sirt1 介导<sup>[15]</sup>。Kataoka 等<sup>[17]</sup>研究发现皮下注射睾酮可增加大鼠海绵体 Sirt1 mRNA 的表达。Ota 等<sup>[10]</sup>也发现睾酮干预可增加血管内皮细胞 Sirt1 的表达;而 Sirt1 小干扰 RNA(siRNA)转染或 Sirt1 抑制剂预处理内皮细胞可抑制睾酮延缓细胞衰老的作用,提示睾酮通过 Sirt1 途径延缓血管内皮细胞衰老。目前尚无心肌细胞中睾酮与 Sirt1 关系的研究。本研究发现,睾酮组心肌组织 Sirt1 表达水平较安慰剂组明显上调,抑制 Sirt1 可拮抗睾酮减少 SA- $\beta$ -gal 蓝染阳性面积比例的作用,并抑制睾酮对“胎儿”基因及 BNP 表达的作用,提示睾酮延缓心肌细胞衰老、改善心脏功能的作用可能是通过 Sirt1 途径来实现的。

综上所述,睾酮可能通过 Sirt1 途径延缓雄性小鼠心肌细胞衰老,改善心衰相关的基因表达异常。进一步通过体内及体外实验探讨其分子学机制对研究衰老相关的心脏疾病具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Morgentaler A, Miner MM, Caliber M, et al. Testosterone therapy and cardiovascular risk: advances and controversies [J]. Mayo Clin Proc, 2015, 90(2):224-251.
- [2] Malkin CJ, Pugh PJ, West JN, et al. Testosterone therapy in men with moderate severity heart failure: a double-blind randomized placebo controlled trial [J]. Eur Heart J, 2006, 27(1): 57-64.
- [3] Chimenti C, Kajstura J, Torella D, et al. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure [J]. Circ Res, 2003, 93(7):604-613.
- [4] Wong LS, van der Harst P, de Boer RA, et al. Aging, telomeres and heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2010, 15(5): 479-486.
- [5] Zhang L, Wu SZ, Ruan YJ, et al. Testosterone therapy delays cardiomyocyte aging via androgen receptor-independent pathway [J]. Braz J Med Bio Res, 2011, 44(11):1118-1124.
- [6] Samaras N, Papadopoulou MA, Samaras D, et al. Off-label use of hormones as an antiaging strategy: a review [J]. Clin Interv Aging, 2014, 23(9): 1175-1186.
- [7] Pongkan W, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Role of testosterone replacement in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2016, 21(1): 27-43.
- [8] 边 瓯,马 宁,乔 锐,等. 高龄男性 2 型肾综合征患者血清睾酮水平的研究 [J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(5): 350-352.
- [9] Frye CA, Edinger K, Sumida K. Androgen administration to aged male mice increases anti-anxiety behavior and enhances cognitive performance [J]. Neuropsychopharmacology, 2008, 33(5): 1049-1061.
- [10] Ota H, Akishita M, Akiyoshi T, et al. Testosterone deficiency accelerates neuronal and vascular aging of SAMP8 mice: protective role of eNOS and SIRT1 [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29598.
- [11] Pongkan W, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Chronic testosterone replacement exerts cardioprotection against cardiac ischemia-reperfusion injury by attenuating mitochondrial dysfunction in testosterone-deprived rats [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0122503.
- [12] Pugh PJ, Jones RD, West JN, et al. Testosterone treatment for men with chronic heart failure [J]. Heart, 2004, 90(4): 446-447.
- [13] Vinciguerra M, Santini MP, Martinez C, et al. mIGF-1/JNK1/Sirt1 signaling confers protection against oxidative stress in the heart [J]. Aging Cell, 2012, 11(1):139-149.
- [14] Wang F, Yang J, Sun J, et al. Testosterone replacement

attenuates mitochondrial damage in a rat model of myocardial infarction [J]. *Endocrinol*, 2015, 225(2): 101-111.

- [15] Eleawa SM, Sakr HF, Hussein AM, et al. Effect of testosterone replacement therapy on cardiac performance and oxidative stress in orchidectomized rats [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 209(2): 136-147.
- [16] Alcendor RR, Gao S, Zhai P, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart [J]. *Circ Res*,

2007, 100(10): 1512-1521.

- [17] Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, et al. Assessment of androgen replacement therapy for erectile function in rats with type 2 diabetes mellitus by examining nitric oxide-related and inflammatory factor [J]. *J Sex Med*, 2014, 11(4): 920-929.

(收稿: 2016-05-19 修回: 2016-09-11)

(本文编辑: 胡晓静)

(上接第 368 页)

- [5] Iqbal J, McRae S, Banaudha K, et al. Mechanism of hepatitis C virus (HCV)-induced osteopontin and its role in epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(52): 36994-37009.
- [6] Chuang CY, Chang H, Lin P, et al. Up-regulation of osteopontin expression by aryl hydrocarbon receptor via both ligand-dependent and ligand-independent pathways in lung cancer [J]. *Gene*, 2012, 492(1): 262-269.
- [7] Guan H, Cai J, Zhang N, et al. Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(3): 593-601.
- [8] Murthy S, Ryan AJ, Carter AB. SP-1 regulation of MMP-9 expression requires Ser586 in the PEST domain [J]. *Biochem J*, 2012, 445(2): 229-236.
- [9] Azahri NS, Di Bartolo BA, Khachigian LM, et al. Sp1, acetylated histone-3 and p300 regulate TRAIL transcription; mechanisms of PDGF-BB-mediated VSMC proliferation and migration [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(8): 2597-2606.
- [10] Yang HM, Kim BK, Kim JY, et al. PPARgamma modulates vascular smooth muscle cell phenotype via a protein kinase

G-dependent pathway and reduces neointimal hyperplasia after vascular injury [J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45: e65.

- [11] Shi JH, Zheng B, Chen S, et al. Retinoic acid receptor alpha mediates all-trans-retinoic acid-induced Klf4 gene expression by regulating Klf4 promoter activity in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(14): 10799-10811.
- [12] Salabei JK, Hill BG. Implications of autophagy for vascular smooth muscle cell function and plasticity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 693-703.
- [13] Milewicz DM, Guo DC, Tran-Fadulu V, et al. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections; focus on smooth muscle cell contractile dysfunction [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008, 9: 283-302.
- [14] Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, et al. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(9): 1139-1147.

(收稿: 2016-06-17 修回: 2016-08-24)

(本文编辑: 胡晓静)