



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.010
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(12):1725-1731.

· 基础研究 ·

他莫昔芬对腹主动脉瘤的治疗作用及其疗效性别差异的实验研究

高甫, 焦洋, 张小明, 李伟

(北京大学人民医院 血管外科, 北京 100044)

摘要

目的: 探讨他莫昔芬对小鼠腹主动脉瘤 (AAA) 的治疗作用及疗效的性别差异。

方法: 选择老年 (60 周龄) 野生型 C57BL/6 小鼠, 分 3 批进行实验, 分别行单纯 AAA 造模 (弹力蛋白酶诱导)、他莫昔芬预防性给药 + AAA 造模、AAA 造模 + 他莫昔芬治疗; 各批实验中的小鼠均雌雄各半, 并设假手术对照, 均于术后 14 d 取腹主动脉标本行相关指标检测。

结果: 第 1 批实验中雌雄鼠的 AAA 发生率均为 100%。第 2 批实验中, 雌鼠 AAA 的发生率明显低于雄鼠 (30% vs. 80%, $P < 0.05$); 血管的病理学改变明显轻于雄鼠, 且雌鼠血管组织中雌激素受体 α 、过氧化氢酶水平明显高于雄鼠, 而 PCNA 水平及炎症细胞及炎症因子水平明显低于雄鼠 (均 $P < 0.05$)。第 3 批实验中, 雌鼠 AAA 的发生率明显低于雄鼠 (50% vs. 100%, $P < 0.05$); 且雌鼠血管组织的病理改变、增殖反应、炎症反应均轻于雄鼠 (均 $P < 0.05$)。

结论: 他莫昔芬对 AAA 的发生、发展方面有明显的抑制作用, 但其作用有性别差异, 表现为对雌鼠的 AAA 有较好的预防及治疗作用, 对雄鼠有一定的预防作用而无治疗作用, 机制可能与其对雌性动物有较弱的雌激素受体诱导作用有关。

关键词

主动脉瘤, 腹; 他莫昔芬; 性别因素; 小鼠

中图分类号: R654.3

Therapeutic effect of tamoxifen on abdominal aortic aneurysm and gender difference in its efficacy: an experimental study

GAO Fu, JIAO Yang, ZHANG Xiaoming, LI Wei

(Department of Vascular Surgery, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

Abstract

Objective: To investigate the therapeutic effect of tamoxifen on abdominal aortic aneurysm (AAA) and gender difference in its efficacy in mice.

Methods: Aged C57BL/6 mice (60-week old) were used to conduct experiment in 3 batches, in which, the mice underwent AAA model creation (induced by elastase) alone, prophylactic tamoxifen administration plus AAA model creation or AAA model creation followed by tamoxifen treatment, respectively. In each batch of experiment, half of the mice were male and half were female, and sham operation controls were used, and the specimens of abdominal aorta in all mice were harvested on postoperative day 14 for observing the relevant parameters.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81470574); 北京大学人民医院研究与发展基金资助项目 (2118000537)。

收稿日期: 2016-09-23; **修订日期:** 2016-11-09。

作者简介: 高甫, 北京大学人民医院住院医师, 主要从事血管外科临床及动脉瘤基础方面的研究。

通信作者: 李伟, Email: mailtoweil@qq.com

Results: In the first batch of experiment, the AAA formation rate was 100% in either male or female mice. In the second batch of experiment, the AAA formation rate in female mice was significantly lower than that in male mice (30% vs. 80%, $P < 0.05$), and pathologic changes were remarkably milder, the levels of estrogen receptor α and catalase were significantly higher, while the levels of PCNA, inflammatory cells and cytokines were significantly lower in vascular tissues of female mice than those in vascular tissues of male mice (all $P < 0.05$). In the third batch of experiment, the AAA formation rate in female mice was significantly lower than that in male mice (50% vs. 100%, $P < 0.05$), with the milder pathologic changes, proliferative responses and inflammatory responses in vascular tissues of female mice than those in vascular tissues of male mice (all $P < 0.05$).

Conclusion: Tamoxifen has significant inhibitory effect on the occurrence and development of AAA. However, its action has gender difference which shows better preventive and therapeutic effect in female mice, and relative preventive effect but little therapeutic effect in male mice, and the mechanism may probably be associated with its strong estrogen receptor induction in female animals.

Key words Aortic Aneurysm, Abdominal; Tamoxifen; Sex Factors; Mice

CLC number: R654.3

腹主动脉瘤 (AAA) 是一种严重威胁人类生命健康的心血管疾病, 在老年人中 AAA 破裂是第 10 位的致死原因^[1]。多种因素影响 AAA 的发生、发展。其中包括性别^[2-3]、年龄^[4]、吸烟^[5]及体质量^[6]等。他莫昔芬是一种选择性的雌激素受体 (ER) 调控剂^[7], 可以抑制 AAA 的生长^[8]。他莫昔芬与 ER 结合后, 可以抑制炎症浸润, 减少活性氧的生成^[9]。并且发挥这种作用的中间环节 ER 现已确认存在于动脉壁中, 当数量功能上调时可以发挥血管保护作用^[10]。ER 在雌性体内明显高于雄性^[8]。所以, 不同性别间 ER 数量及功能的差异可能导致他莫昔芬对 AAA 治疗效果的差异。AAA 更容易在老年人中发病^[4], 但是已有的研究多是在年轻雄鼠上完成的, 所以得出的结论不一定适用于雌鼠及老年小鼠^[11]。目前, 针对 AAA 性别差异对治疗的影响的研究较少。本实验主要研究他莫昔芬在不同性别的老年小鼠上的治疗效果, 并且进一步明确造成这种差异的原因。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所有老年 C57BL/6 小鼠均来自北京大学医学部动物中心。小鼠均为 60 周龄。实验分 3 批进行: (1) 第 1 批 (单纯造模), 所有雌雄鼠均接受弹力蛋白酶诱导的肾下 AAA 手术 (每种性别均 20 只小鼠)。诱导 AAA 手术后 14 d 腹腔注射过量戊巴比妥钠安乐死, 进行 AAA 直径测量及取材进行相关

实验; (2) 第 2 批 (预防性给药), 所有的雌雄鼠均接受他莫昔芬腹腔注射 (Sigma-Aldrich), 剂量为 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[8], 4 d 后所有的小鼠接受弹力蛋白酶诱导的 AAA 手术 (每种性别均 20 只), 术后 14 d 安乐死, 对 AAA 进行直径测量及取材进行相关实验; (3) 第 3 批 (治疗性给药): 所有的雌雄鼠均接受弹力蛋白酶诱导的 AAA 造模 (每种性别均 20 只), 术后第 4 天开始所有小鼠接受他莫昔芬腹 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 腔注射, 术后 14 d 安乐死, 对 AAA 进行直径测量及取材进行相关实验。在以上 3 批实验小鼠中, 均单独分出一组作为对照组 (各组中每种性别 5 只小鼠), 除了使用高温灭活后的弹力蛋白酶诱导 AAA 外, 其余操作均和组内其它小鼠一致。实验流程在图 1 中有详细描述。本实验中所有操作均已通过北京大学人民医院伦理委员会审批。

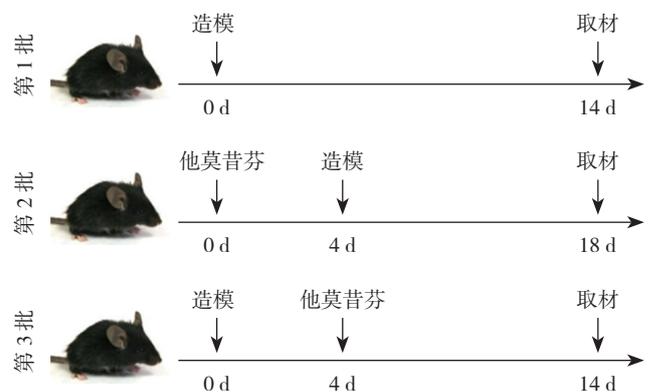


图 1 实验流程示意图

Figure 1 Experimental protocols

1.2 AAA 模型制备

本实验的小鼠模型已在参考文献^[12]中有详细的描述。麻醉后取腹部正中切口, 解剖游离出肾下腹主动脉后测量腹主动脉直径(作为基准直径)。然后在腹主动脉表面涂抹10 μL的100%的猪胰腺蛋白酶(或用热灭活后的猪胰腺蛋白酶作为对照组), 保持10 min。然后关闭腹腔。14 d后安乐死, 再次原位测量最宽处的腹主动脉直径后取材。AAA的标准为大于基准值的1倍以上^[12]。

1.3 组织学染色及免疫组化染色

免疫组化中应用以下几种抗体: 增殖细胞核抗原(PCNA)(1:100, ZM-0213, ZSGB-BIO)、巨噬细胞标志物(MAC3)(1:40, 550292, BD pharmingen)及MMP-9(1:50, 10375-2-AP, Proteintech)。应用苏木精复染, 免疫组化染色后应用ImageJ软件对图像进行分析。阳性细胞百分比为单个视野中(400倍放大率)阳性细胞数与总细胞数的比值(≥10张切片/小鼠)。TUNEL染色采用Roche公司的试剂盒(In Situ Cell Death Detection kit), 按说明书步骤进行操作。

1.4 实时定量 PCR (RT-PCR)

应用TRIzol (nvtrogen) 提取标本中的总RNA^[13], RT-PCR应用iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) 及Sensifast SYBR Supermix (Bioline)^[10]。

1.5 统计学处理

数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计主要采用Fisher确切概率法与单因素方差分析。数据应用Prism 6.0软件进行分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 第 1 批与第 2 批实验的成瘤情况

第1批中所有雌鼠与雄鼠均发生AAA, 发生率为100%。第2批中应用他莫昔芬后30%的雌鼠发生了AAA, 而雄鼠有80%发生AAA, 雌雄鼠AAA发生率差异有统计学意义(P<0.05)。病理学观察发现, 第1批中雌雄小鼠的动脉壁均破坏严重, 而第2批应用他莫昔芬后, 雌鼠动脉壁的破坏比雄鼠明显减轻(图2)。

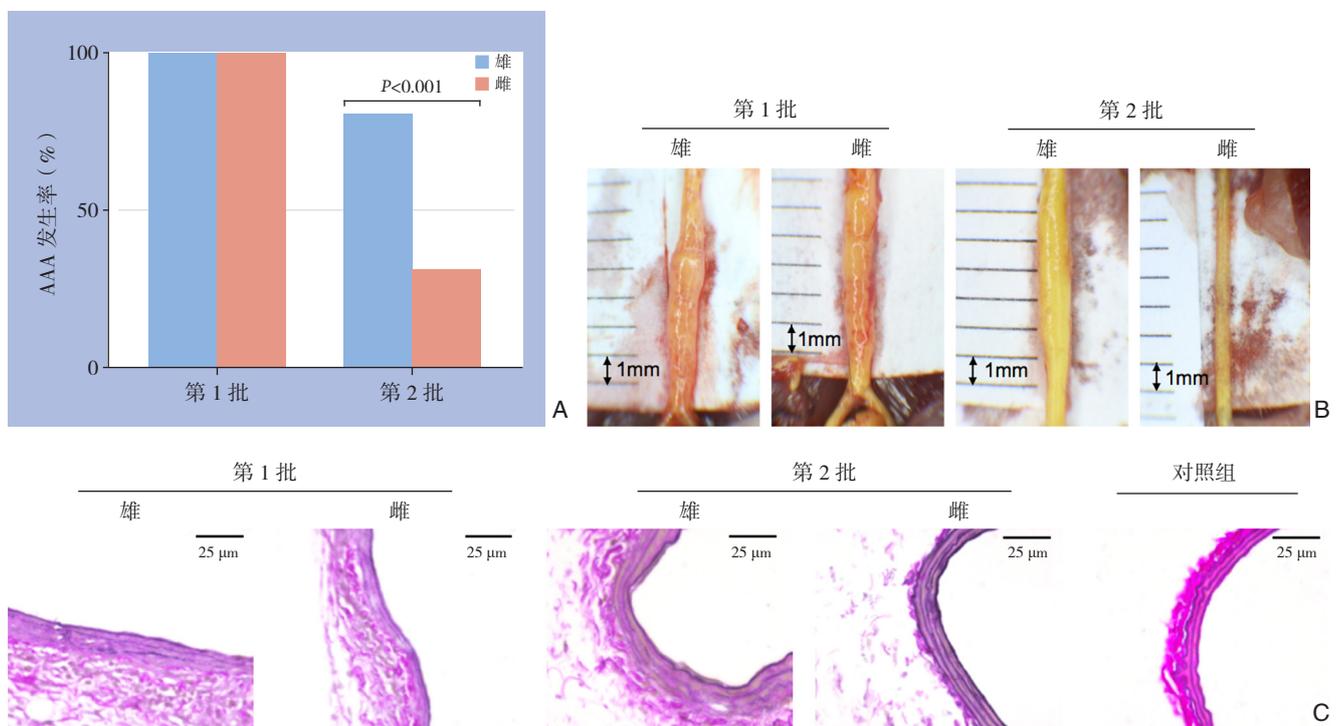


图 2 AAA 发生情况他莫昔芬的作用
Figure 2 AAA formation and influence of tamoxifen
C: Pathologic observations

A: AAA 发生率比较; B: 造模后血管形态; C: 病理学观察
A: Comparison of AAA formation rate; B: Vascular appearance after modeling;
C: Pathologic observations

2.2 他莫昔芬对 AAA 血管组织 ER α 、过氧化氢酶增殖信号的影响

第2批实验小鼠中，RT-PCR检测结果显示，雌鼠血管组织中的ER α 明显增高，而雄鼠中ER增

高并不明显；与ER α 相一致，雌鼠血管中的过氧化氢酶的mRNA水平也明显高于雄鼠（图3）。此外，免疫组化结果显示，雄鼠血管组织PCNA水平明显高于雌鼠（均 $P<0.05$ ）（图4）。

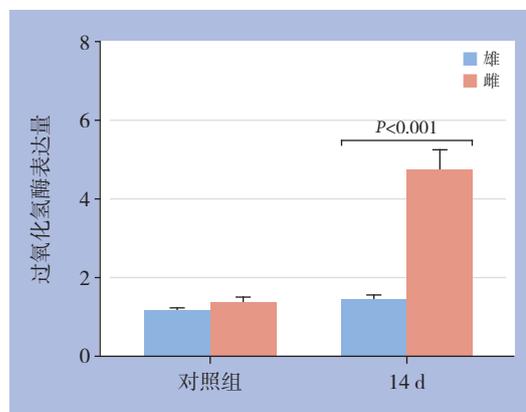
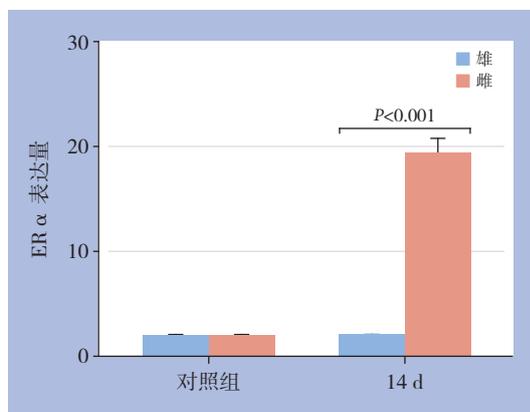


图3 他莫昔芬对血管组织 ER α 、过氧化氢酶的影响

Figure 3 Effects of tamoxifen on ER α and catalase in vascular tissue

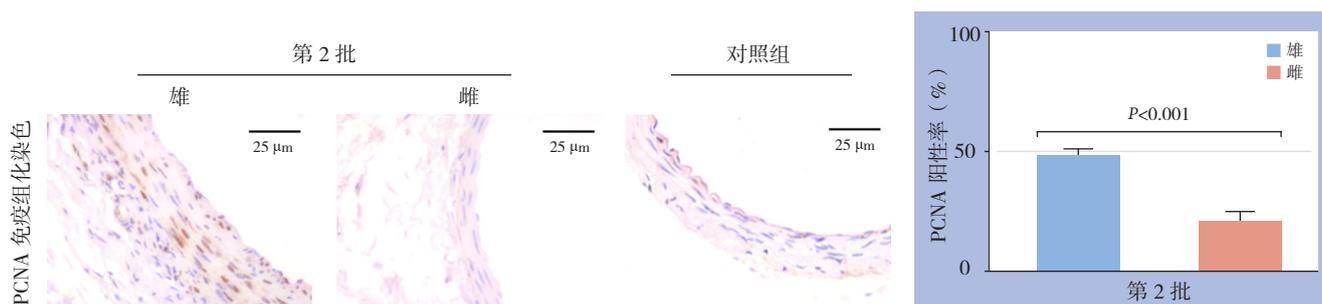


图4 他莫昔芬对血管组织 PCNA 表达的影响

Figure 4 Effects of tamoxifen on PCNA expression in vascular tissue

2.3 他莫昔芬对 AAA 血管组织炎症反应的影响

炎症细胞增高对于AAA的发展有重要的作用^[15]。故本实验研究了他莫昔芬对于弹力蛋白酶诱导的AAA中炎症反应的作用。第2批实验小鼠中，免疫组化检测结果显示，他莫昔芬可以明显抑制雌鼠血管组织中巨噬细胞（MAC3）的增高，而在雄鼠中这种抑制作用并不明显；RT-PCR检测结果显示，雄鼠血管组织的CD68、MCP1^[16-18]、MMP-9^[19]的mRNA水平明显均高于雌鼠（均 $P<0.05$ ）。应用免疫组化的方法进一步证明雄鼠血管组织MMP-9水平较雌鼠明显增高（ $P<0.05$ ）（图5）。

2.4 他莫昔芬对已形成的 AAA 的作用

为了进一步研究他莫昔芬对已存在的AAA的作用，故设计了第3批实验。结果显示，在雌鼠中，他莫昔芬可以明显抑制AAA的增长，而在雄鼠中，他莫昔芬对AAA没有明显的抑制作用。雌鼠最终的AAA发生率明显低于雄鼠（50% vs. 100%， $P<0.05$ ）（图6）。

与AAA发病率相一致的是，应用他莫昔芬后雌鼠腹主动脉壁的破坏也明显减轻，而雄鼠的腹主动脉壁破坏严重。同样，他莫昔芬对雌鼠AAA中平滑肌细胞的破坏（PCNA）、巨噬细胞（MAC3）的增多、MMP-9的增高也有明显的抑制，而对雄鼠却没有明显作用（图7）。

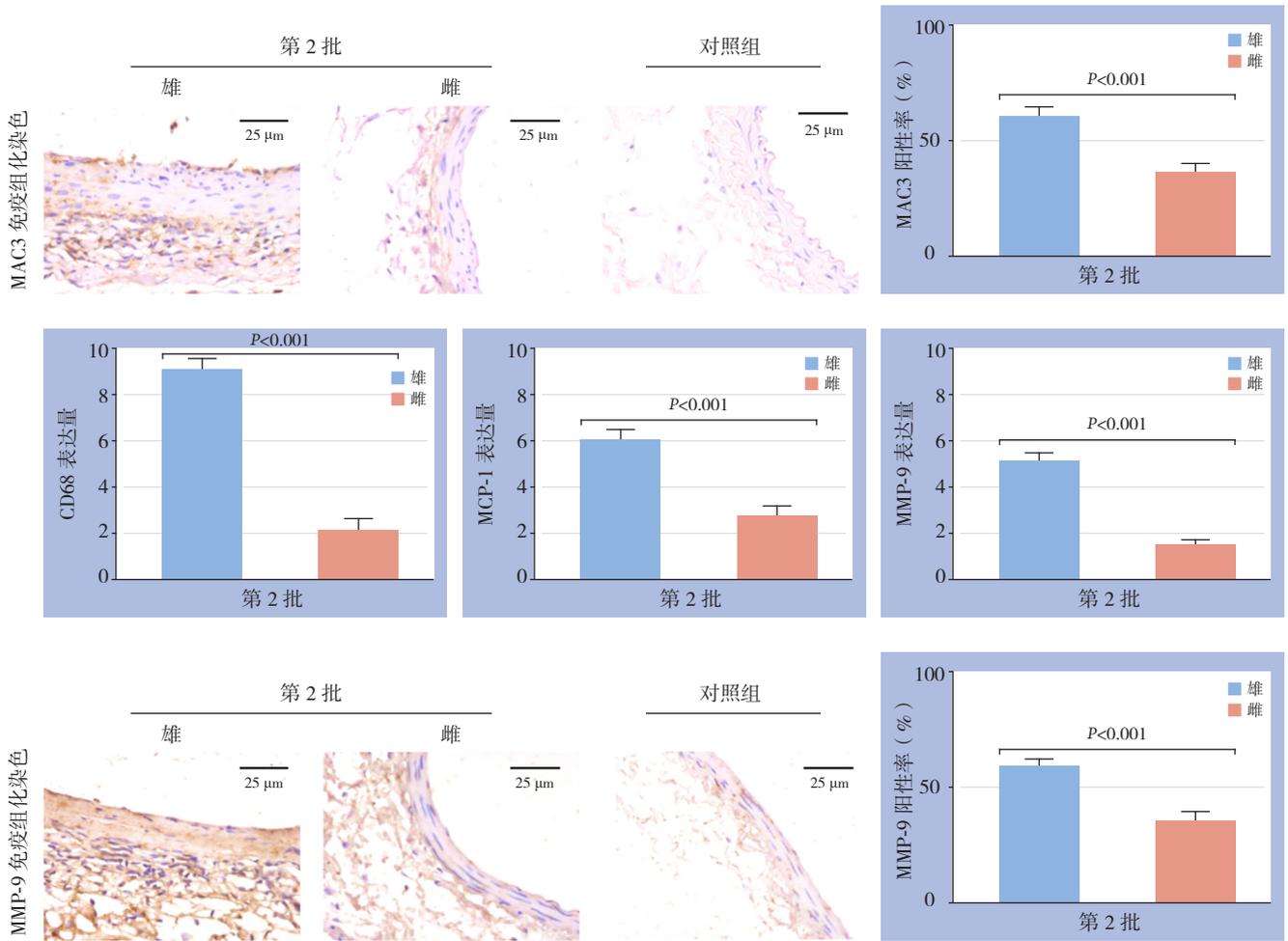


图 5 他莫昔芬对血管组织 PCNA 表达的影响

Figure 5 Effects of tamoxifen on inflammatory responses in vascular tissue

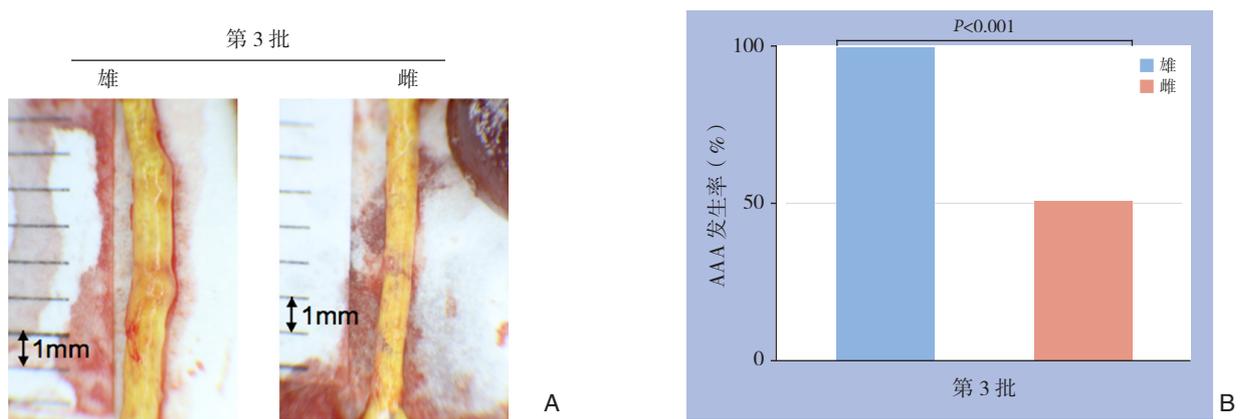


图 6 他莫昔芬对 AAA 治疗的作用

A: AAA 大体标本; B: AAA 发生率比较

Figure 6 Therapeutic effects of tamoxifen on AAA

A: Gross specimens of AAA; B: Comparison of AAA formation rate

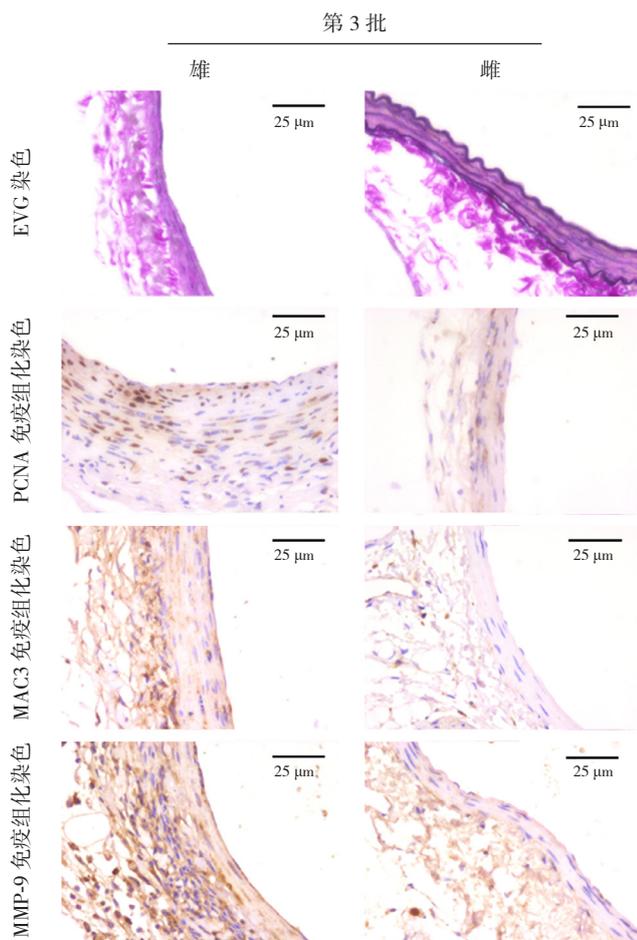


图7 他莫昔芬对AAA血管组织病理学改变及炎症反应的影响

Figure 7 Effects of tamoxifen on pathologic changes and inflammatory responses in vascular tissue

3 讨论

AAA有明显的性别差异，在男性及老年女性中AAA发病率明显增高^[20]。之前有研究^[21]表明，男性AAA发病率是女性的4倍。并且女性进入更年期后AAA的发病率明显增加^[22]。AAA发病率在老年人中也明显增高^[4]。所以不同性别及年龄的人群，对同一种AAA的治疗方法，可能会有不同结果。但是目前的大部分研究都是在非老年雄鼠上操作验证的，而采用这种结果的话，对其他性别及年龄的群体可能是无效的。所以，本实验设计了跟临床更相近的在老年小鼠AAA模型中验证他莫昔芬对不同性别的作用有何区别。

他莫昔芬是一种选择性ER调节剂。有研究^[8]认为它可以升高过氧化氢酶并且抑制炎症反应，进而抑制AAA的发展。但是他莫昔芬抑制AAA的

具体机制目前还不明确。

目前有研究表明他莫昔芬可能通过以下途径抑制AAA：(1) 他莫昔芬可以增高动脉壁中的过氧化氢酶的表达，而过氧化氢酶可以抑制MMP的激活^[9]。并且MMP在AAA的启动阶段发挥关键作用^[19]。(2) 他莫昔芬可以直接发挥抗氧化作用，可以直接抑制AAA中的超氧化因子^[23]。(3) 他莫昔芬可以降低AAA中的炎症反应及MMP的活性。

前期有研究^[10]证明AAA发生时雌雄小鼠中的ER是不同的。可能是这种ER的不同导致了AAA在不同性别中发病率的不同。

ER α 与ER β 在心血管系统有重要作用，ER α 对于内皮细胞调节血管损伤有重要作用，而ER β 对于调节血压有重要作用。有研究表明ER增高可以抑制AAA。而在AAA发生时，ER会明显降低。通过提高ER α 及过氧化氢酶，他莫昔芬可以抑制AAA的发生^[9, 24]。并且过氧化氢酶可以抑制血管平滑肌细胞对MMP的激活，而MMP对AAA的发生有重要作用^[19]。所以本实验检验了他莫昔芬对腹主动脉壁中ER α 和过氧化氢酶的作用。动脉壁中平滑肌细胞的减少和炎症细胞的增多是人类AAA的典型特征^[17]。平滑肌细胞的变化可以反映AAA的严重程度^[25]，所以在本实验通过检测平滑肌细胞的增殖来检测他莫昔芬在不同性别中作用的不同。

绝大多数关于抑制AAA的研究都是在诱导AAA之前就开始治疗措施。而这与现实中的先发现动脉瘤后开始临床治疗是不符合的。所以在AAA发生后抑制AAA比预防AAA有更重要的临床意义。为了评价他莫昔芬的转化医学价值，本实验中先诱导AAA，而后才开始应用他莫昔芬。实验结果表明他莫昔芬可以抑制老年雌鼠中已经诱导的AAA继续发展，进而证明了他莫昔芬对于老年女性的转化医学价值。

本实验探索了他莫昔芬治疗AAA的性别差异，证明了他莫昔芬作为一种选择性ER调节剂，在老年女性中有明显的治疗作用。并且不同于以往大多数的预防性实验，他莫昔芬可以抑制已经发生的AAA，进一步证明了他莫昔芬的临床应用价值。

参考文献

- [1] Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, et al. Yield of repeated

- screening for abdominal aortic aneurysm after a 4-year interval. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators[J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160(8):1117-1121.
- [2] Cornuz J, Sidoti Pinto C, Tevæearai H, et al. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies[J]. *Eur J Public Health*, 2004, 14(4):343-349.
- [3] Simoni G, Pastorino C, Perrone R, et al. Screening for abdominal aortic aneurysms and associated risk factors in a general population[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1995, 10(2):207-210.
- [4] Pleumeekers HJ, Hoes AW, van der Does E, et al. Aneurysms of the abdominal aorta in older adults. The Rotterdam Study[J]. *Am J Epidemiol*, 1995, 142(12):1291-1299.
- [5] Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review[J]. *J Vasc Surg*, 2003, 38(2):329-334.
- [6] Golledge J, Clancy P, Jamrozik K, et al. Obesity, adipokines, and abdominal aortic aneurysm: Health in Men study[J]. *Circulation*, 2007, 116(20):2275-2279.
- [7] Dubey RK, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Estrogen and tamoxifen metabolites protect smooth muscle cell membrane phospholipids against peroxidation and inhibit cell growth[J]. *Circ Res*, 1999, 84(2):229-239.
- [8] Grigoryants V, Hannawa KK, Pearce CG, et al. Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms[J]. *J Vasc Surg*, 2005, 41(1):108-114.
- [9] Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS[J]. *Circulation*, 2003, 108(16):1912-1916.
- [10] Parastatidis I, Weiss D, Joseph G, et al. Overexpression of catalase in vascular smooth muscle cells prevents the formation of abdominal aortic aneurysms[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(10):2389-2396.
- [11] Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice[J]. *Nature*, 2009, 460(7253):392-395.
- [12] Bhamidipati CM, Mehta GS, Lu G, et al. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase[J]. *Surgery*, 2012, 152(2):238-246.
- [13] Sharma AK, Lu G, Jester A, et al. Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment[J]. *Circulation*, 2012, 126(11 Suppl 1):S38-45.
- [14] Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, et al. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability[J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(11):2572-2579.
- [15] Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5):987-994.
- [16] Moehle CW, Bhamidipati CM, Alexander MR, et al. Bone marrow-derived MCP1 required for experimental aortic aneurysm formation and smooth muscle phenotypic modulation[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 142(6):1567-1574.
- [17] Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, et al. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(2):92-102.
- [18] Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, et al. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases[J]. *Circulation*, 1997, 95(1):205-212.
- [19] Longo GM, Xiong W, Greiner TC, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(5):625-632.
- [20] Golledge J, Muller J, Daugherty A, et al. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(12):2605-2613.
- [21] Singh K, Bonna KH, Jacobsen BK, et al. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: The Tromso Study[J]. *Am J Epidemiol*, 2001, 154(3):236-244.
- [22] La Vecchia C, Decarli A, Franceschi S, et al. Menstrual and reproductive factors and the risk of myocardial infarction in women under fifty-five years of age[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1987, 157(5):1108-1112.
- [23] Wassmann S, Laufs U, Stamenkovic D, et al. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production[J]. *Circulation*, 2002, 105(17):2083-2091.
- [24] Ulker S, McMaster D, McKeown PP, et al. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59(2):488-500.
- [25] Brophy CM, Reilly JM, Smith GJ, et al. The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm disease[J]. *Ann Vasc Surg*, 1991, 5(3):229-233.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 高甫, 焦洋, 张小明, 等. 他莫昔芬对腹主动脉瘤的治疗作用及其疗效性别差异的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(12):1725-1731. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.010
Cite this article as: Gao F, Jiao Y, Zhang XM, et al. Therapeutic effect of tamoxifen on abdominal aortic aneurysm and gender difference in its efficacy: an experimental study[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(12):1725-1731. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.010