

## 雌激素抑制去卵巢家兔实验性主动脉粥样硬化的形成

刘彤<sup>①</sup> 沈潞华

(首都医科大学附属友谊医院心内科, 北京 100050)

### Inhibiting Effect of Estrogen on Experimental Aortic Atherosclerosis in Ovariectomized Rabbits

LIU Tong and SHEN Lu-Hua

(Department of Cardiology, Beijing Friendship Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To study the effect of estrogen (E) or estrogen combined with progestogen (P) on atherogenesis and the mechanism in ovariectomized rabbits.

**Methods** 40 ovariectomized rabbits were randomized into low E, low EP, high E, high EP and control groups. Each group was fed high cholesterol diet for 14 weeks. Group low E, low EP, high E, high EP were replaced different dose of estrogen or estrogen combined with progestogen. Before the experiment, at the end of the fourth or fourteenth week, the serum lipid, MDA and SOD were determined. At the end of the experiment, the plasma 6-keto-PGF<sub>1α</sub>TXB<sub>2</sub> and ox-LDL levels were assayed. After killing the animals, pathomorphological examination was carried out.

**Results** Compared with the control group, the serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), MDA and plasma ox-LDL, TXB<sub>2</sub> concentrations were significantly lower ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ) in the groups of the hormone replacement. While the plasma 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> concentrations were significantly higher ( $P < 0.05$ ). The plaque areas percent of the whole aortic intima surface areas in the therapy groups re-

duced by 57.8% averagely ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Estrogen could inhibit the aortic atherogenesis of the rabbits, its mechanisms might be associated with serum lipid-lowering, inhibition of the lipidoxidation and regulation of the prostaglandin metabolism. Progestogen had no anti-atherosclerotic effect on ovariectomized rabbits.

**KEY WORDS** Atherosclerosis; Estrogen; Progestogen; Replacement therapy

**摘要** 为探讨雌激素对动脉粥样硬化的作用和机制,以不同剂量雌激素或联合应用孕激素来替代治疗去卵巢动脉粥样硬化家兔。分别于实验前、第4和14周末分别测定血清脂质、丙二醛和超氧化物歧化酶,实验第14周末测定血浆氧化型低密度脂蛋白、6-酮基-前列腺素F<sub>1α</sub>和血栓素B<sub>2</sub>浓度,并做病理形态学检查。结果发现,与对照组相比,激素替代治疗各组血清总胆固醇、甘油三酯、丙二醛、氧化型低密度脂蛋白及血栓素B<sub>2</sub>浓度显著降低( $P < 0.01, P < 0.05$ );而血浆6-酮基-前列腺素F<sub>1α</sub>浓度显著增高( $P < 0.05$ );激素替代治疗组主动脉斑块面积百分比平均减少了57.8%( $P < 0.01$ )。孕激素对雌激素的作用无影响。以上提示雌激素能够抑制家兔主动脉粥样硬化形成,其机制可能与改善脂质作用,抑制过氧化形成和调节前列腺素代谢有关。

**关键词** 动脉粥样硬化; 雌激素; 孕激素; 替代治疗

流行病学提示雌激素对妇女冠心病具有保护作用<sup>[1,2]</sup>,动物实验也证实雌激素能抑制动脉粥样硬化形成,但作用机制不太清楚。同时,雌激素与孕激素联合治疗是否影响前者的抗动脉粥样硬化效应报道也不一致。本实验旨在观察雌激素对动脉粥样硬化的作用并探讨其机制。

<sup>①</sup>现在首都医科大学附属北京红十字朝阳医院心脏中心,北京 100020

# 1 材料与方法

## 1.1 动物模型的建立和分组

新西兰雌性家兔 40 只,月龄 3~4 月,体重  $2.35 \pm 0.29$  kg。双侧卵巢摘除术后 1 周,随机分成五组,每组 8 只家兔,在每周的前三天,给予激素治疗。①低剂量雌激素组(estrogen, 简称低 E 组):每天肌注苯甲酸雌二醇  $200 \mu\text{g}/\text{只}$ ;②低剂量雌激素+孕酮组(estrogen+progesterone, 简称低 EP 组):每天肌注苯甲酸雌二醇  $200 \mu\text{g}/\text{只}$ +孕酮  $5 \text{ mg}/\text{只}$ ;③高剂量雌激素组(estrogen, 简称高 E 组):每天肌注苯甲酸雌二醇  $1 \text{ mg}/\text{只}$ ;④高剂量雌激素+孕酮组(estrogen+progesterone, 简称高 EP 组):每天肌注苯甲酸雌二醇  $1 \text{ mg}/\text{只}$ +孕酮  $5 \text{ mg}/\text{只}$ ;⑤对照组(Control):不加激素治疗。各组同时喂养高胆固醇饮食。实验第 1~6 周,每天喂饲胆固醇  $1.0 \text{ g}/\text{只}$ ,均匀混于标准兔饲料中。第 7 周后将胆固醇减为每天  $0.5 \text{ g}/\text{只}$ ,实验共 14 周。

## 1.2 血液生物化学指标检测

实验前、第 4 和第 14 周末分别从家兔耳缘静脉采血,提取血清,总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)采用酶法测定。利用高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)沉淀剂或低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)沉淀剂酶法测定 HDL 胆固醇(HDL cholesterol, HDLC)或 LDL 胆固醇(LDL cholesterol, LDLC)。采用蛋白浊度比色法测定载脂蛋白 A 和 B。采用可见分光光度计测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。实验第 14 周末血浆经分离提取后采用放射免疫法分别测定 6-酮基-前列腺素  $\text{F}_{1\alpha}$  (6-keto-prostaglandin  $\text{F}_{1\alpha}$ , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ )和血栓素  $\text{B}_2$  (thromboxane  $\text{B}_2$ , TXB $_2$ ) (放免盒由中国医学科学院基础医学研究所药理室提供)并用液体闪烁计数器测定。

采用酶联免疫吸附试验和酶标仪测定血浆氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)。

## 1.3 病理形态学检查

1.3.1 主动脉病变大体标本观察 实验结束处死动物,取出主动脉(自主动脉弓至髂动脉分叉处),行苏丹 N 染色,照像,采用计算机图像处理系统测量动脉粥样斑块面积占主动脉内膜表面总面积的百分比。

1.3.2 主动脉形态学观察 各组分别在主动脉弓、胸主动脉和腹主动脉处各取两块组织做成石蜡切片,行 HE 和弹力纤维染色,做成冰冻切片,行油红 O 染色,光镜下观察。

## 1.4 数据处理

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS/PC 软件包进行方差分析。

# 2 结果

## 2.1 血清脂质浓度

实验前各组血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 A 和 B 没有显著性差异( $P > 0.05$ )。表 1 示实验第 4 周和第 14 周末治疗组家兔血清总胆固醇和甘油三酯浓度明显低于对照组( $P < 0.05$ ),各治疗组间无差异。对照组第 14 周时总胆固醇和甘油三酯比第 4 周时降低,考虑为实验第 7 周后胆固醇喂养量减少所致。

实验第 4 周末治疗组血清载脂蛋白 A 浓度与对照组相比有明显差异( $P < 0.05$ ),各治疗组间无统计学差异。其他各项指标治疗组与对照组间及各治疗组间均无差异。

Table 1. The serum lipids concentrations of all groups at the fourth and the fourteenth week of the experiment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ ).

Groups	E Dose (mg/single)	ApoA (mg/L)		ApoB (mg/L)		HDL-C (g/L)		LDL-C (g/L)		TC (g/L)		TG (g/L)	
		4th w	14th w	4th w	14th w	4th w	14th w	4th w	14th w	4th w	14th w	4th w	14th w
Control	0	$4 \pm 3$	$4 \pm 1$	$47 \pm 13$	$33 \pm 1$	$2.5 \pm 0.002$	$2.4 \pm 0.4$	$57 \pm 5$	$47 \pm 8$	$140 \pm 39$	$63 \pm 7$	$10 \pm 1.5$	$5.1 \pm 0.5$
Low E	0.2	$43 \pm 3^a$	$8 \pm 3$	$41 \pm 11$	$29 \pm 2$	$3.0 \pm 0.004$	$3.2 \pm 0.5$	$40 \pm 5$	$36 \pm 12$	$127 \pm 23^a$	$55 \pm 9^a$	$5.8 \pm 0.9^a$	$4.2 \pm 1.0^a$
Low EP	0.2	$49 \pm 2$	$6 \pm 2$	$42 \pm 19$	$30 \pm 15$	$2.9 \pm 0.003$	$3.1 \pm 0.4$	$46 \pm 5$	$41 \pm 16$	$125 \pm 33^a$	$55 \pm 12^a$	$6.9 \pm 1.0^a$	$5.3 \pm 0.7^a$
High E	1.0	$32 \pm 2^a$	$3 \pm 2$	$39 \pm 12$	$26 \pm 8$	$3.2 \pm 0.003$	$3.2 \pm 0.5$	$50 \pm 5$	$45 \pm 14$	$121 \pm 1^a$	$51 \pm 10^a$	$5.4 \pm 0.9^a$	$5.0 \pm 0.6^a$
High EP	1.0	$46 \pm 1^a$	$4 \pm 3$	$36 \pm 15$	$25 \pm 3$	$2.9 \pm 0.004$	$2.9 \pm 0.3$	$54 \pm 5$	$49 \pm 13$	$122 \pm 45^a$	$51 \pm 21^a$	$6.8 \pm 1.1^a$	$6.0 \pm 0.6^a$

a:  $P < 0.05$ , compared with control group. E: estrogen. EP: estrogen+progesterone.

## 2.2 丙二醛、超氧化物歧化酶和氧化型低密度脂蛋白浓度

实验前各组间丙二醛和 SOD 浓度无差异。从表 2 (Table 2) 可见, 实验第 14 周末治疗组血清丙二醛和氧化型 LDL 浓度显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 各治疗组间无差异 ( $P > 0.05$ )。实验第 4 周和第 14 周末各组血浆 SOD 浓度呈下降趋势, 各组之间没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

Table 2. Serum MDA, SOD and ox-LDL levels of all groups at the 14th week of experiment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ ).

Groups	E Dose (mg/single)	MDA (nmol/L)	SOD (Nμ/L)	OLDL (μg/L)
Control	0	15100±1690	56130±30	1180±262
Low E	0.2	3660±1700 <sup>b</sup>	51740±50	188±42 <sup>b</sup>
Low EP	0.2	4290±900 <sup>b</sup>	71670±20	415±13 <sup>b</sup>
High E	1.0	5140±2800 <sup>b</sup>	63290±10	148±5 <sup>b</sup>
High EP	1.0	5500±1900 <sup>b</sup>	71490±20	415±27 <sup>b</sup>

b:  $P < 0.01$ , compared with control group. E: estrogen. EP: estrogen + progesterone.

## 2.3 6-酮基-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 和血栓素 $B_2$ 浓度

从表 3 (Table 3) 可见, 与对照组比较, 实验第 14 周末时治疗组血浆 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  浓度显著增高 ( $P < 0.05$ ), TXB $_2$  浓度显著降低 ( $P < 0.05$ )。各治疗组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

Table 3. Serum 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  and TXB $_2$  concentrations at the 14th week of the experiment ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L,  $n=8$ ).

Groups	E dose (mg/single)	PGF $_{1\alpha}$	TXB $_2$	PGF $_{1\alpha}$ /TXB $_2$
Control	0	34.8±0.8	66.0±0.7	0.52±0.01
Low E	0.2	41.6±0.5 <sup>a</sup>	53.5±0.6 <sup>a</sup>	0.77±0.02 <sup>a</sup>
Low EP	0.2	41.6±0.5 <sup>a</sup>	57.2±0.5 <sup>a</sup>	0.72±0.01 <sup>a</sup>
High E	1.0	43.7±1.0 <sup>a</sup>	57.0±0.8 <sup>a</sup>	0.76±0.02 <sup>a</sup>
High EP	1.0	41.5±0.6 <sup>a</sup>	55.5±0.5 <sup>a</sup>	0.74±0.02 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with control group. E: estrogen. EP: estrogen + progesterone.

## 2.4 病理形态学检查

大体标本观察发现家兔主动脉全部发生程

度不等的动脉粥样硬化病变, 其中对照组家兔主动脉受累广泛, 整个主动脉内膜表面都可见呈奶油样的粥样斑块。激素替代治疗组家兔的主动脉病变较轻, 只有胸主动脉出现病变, 其粥样硬化面积占内膜总面积百分比 (%) (低 E 组: 16.31±0.02; 低 EP 组: 16.73±0.01; 高 E 组: 15.88±0.01; 高 EP 组: 16.28±0.02) 比对照组 (73.67±0.02) 平均减少 57.8% ( $P < 0.01$ )。各治疗组之间主动脉内膜受累程度相似, 无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。光镜观察治疗组主动脉内膜增厚轻, 有少量泡沫细胞形成, 对照组胸主动脉内膜增厚明显, 有大量泡沫形成。

## 3 讨论

许多动物实验发现, 正常家兔和去卵巢家兔对外源性胆固醇喂养后脂质代谢变化和动脉粥样硬化发生程度不同<sup>[3]</sup>。同时, 绝经妇女雌激素低下时冠心病发生率上升<sup>[4]</sup>。临床上试图用雌激素治疗来抑制动脉粥样硬化的发生和发展, 预防和降低妇女冠心病的发生。目前多数实验室都采用以去卵巢动物不加激素治疗为对照组, 去卵巢动物行激素治疗为治疗组, 这样既能模拟人体绝经期性激素改变, 克服正常动物性激素周期性变化对实验造成的影响, 又能达到实验目的。本实验结果显示, 激素替代治疗各组主动脉病变明显比对照组减轻, 斑块面积百分比平均降低 57.8%, 提示雌激素能够抑制家兔主动脉粥样硬化的进展, 实验中两个不同的雌激素剂量产生相似的抗动脉粥样硬化效应, 推测不存在剂量相关效应。同时也证明孕激素没有影响雌激素的保护作用, 这与 Haarbo 等<sup>[3]</sup>的报道是一致的。

脂质代谢异常是动脉粥样硬化发生的重要原因, 雌激素对脂质代谢的影响一直受到人们的关注<sup>[5]</sup>。本实验结果显示激素替代治疗各组血清 TC 水平均显著低于对照组, 这与以前文献报道是一致的。雌激素可能通过加快肝脏对脂蛋白残余的分解代谢和降低极低密度脂蛋白的合成来降低家兔的高胆固醇水平。雌激素对 TG 的影响文献报道不一致, 本文显示雌激素

能够降低血清 TG 水平。本实验第 4 周末,激素替代治疗各组血清载脂蛋白 A 水平比对照组明显升高,说明雌激素能够影响血清载脂蛋白 A 水平。上述改变均可能对动脉粥样硬化具有一定抑制作用。

孕激素能否减轻雌激素单独治疗时对心血管系统的保护作用,目前尚不清楚。本实验雌孕激素联合治疗,发现孕激素对雌激素的有益作用没有影响。

大量资料表明,氧化修饰的 LDL 具有多种致动脉粥样硬化的效应。它易被巨噬细胞吞噬,形成泡沫细胞沉积在内皮下形成脂肪纹。脂质过氧化产生的自由基介导了 LDL 的氧化修饰。过氧化产物丙二醛可直接修饰 LDL<sup>[6]</sup>,许多体外细胞实验证明雌激素具有抗氧化作用。本实验观察到对照组血清丙二醛和血浆氧化型 LDL 浓度高于激素治疗组,提示家兔高脂血症时,体内脂质过氧化作用加强,氧自由基生成增多,而雌激素可抑制其脂质过氧化。

许多体外实验提示雌激素刺激血管壁细胞合成及释放 PGI<sub>2</sub><sup>[7]</sup>。本实验治疗第 14 周时激素替代治疗各组家兔血浆 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量比对照组显著性增加, TXB<sub>2</sub> 含量显著性减少,两者比值比对照组升高 0.23,提示雌激素可能通过间接降低血清脂质过氧化,保护 PGI<sub>2</sub> 合成酶,或者直接通过与其受体结合刺激家兔血管壁细胞分泌前列腺环素<sup>[8,9]</sup>,抑制血小板粘附和分泌 TXA<sub>2</sub>,调节血管紧张性,改善血管动力学和流变学,从而发挥其抗动脉粥样硬化的作用。

雌激素对动脉粥样硬化的影响很复杂,其机制涉及多方面。今后我们还需要从分子生物学水平,深入探讨激素影响动脉内膜细胞和分子相互作用的机制,这将为临床推广应用激素替代治疗提供有益的指导作用。

## 参考文献

- 1 Sullivan J, Fowlkes L. The clinical aspects of estrogen and the cardiovascular system. *Obstet Gynecol*, 1996, **87**: 36S~43S.
- 2 Bush T, Barret L, Cowan L, et al. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen on woman: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation*, 1987, **75**: 1 102~109.
- 3 Haarbo J, Leth-Espensen P, Stender S, et al. Estrogen monotherapy and combined estrogen-progestogen replacement therapy attenuate aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest* 1991, **87**: 1 274~279.
- 4 Kannel WB, Boston MPH. Metabolic risk factor for coronary heart disease in women; Perspective from the Framingham Study. *Am Heart J*, 1987, **114**(2): 413~420.
- 5 Sullivan JM, EL-Zeky F, Zwaag RV, et al. Estrogen replacement therapy increases existence rate after the coronary artery bypass graft surgery. *Am J Cardiol*, 1997, **79**: 847~852.
- 6 Fogelman AM, Shechter I, Seagee J, et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-Proc Natl Acad Sci USA macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 2 214.
- 7 Mikkola T, Turunen P, Avela K, et al. 17 $\beta$ -estradiol stimulates prostacyclin, but not Endothelin-1, production in human vascular endothelial cells. *J Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995, **80**: 1 832~836.
- 8 Nakao J, Chang WC, Orimo H, et al. Estradiol-binding sites in rat aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*, 1981, **38**: 75.
- 9 Venkov C, Rankin A, Vaughan D. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells: a potential mechanism for steroidhormone regulation of endothelial function. *Circulation*, 1996, **94**: 727~733.

(此文 1998-07-06 收到, 1998-10-30 修回)

(此文编辑: 朱雯霞)