

外源性睾酮对雄性高脂血症大鼠早期动脉粥样硬化形成的影响

顾明标 秦永文 丁鸿钧 张璞^④

(第二军医大学长海医院心内科, 上海 200433)

主题词 睾酮, 外源性; 高脂血症; 动脉粥样硬化; 单核细胞; 主动脉; 大鼠

摘要 为研究外源性睾酮对雄性高脂血症大鼠早期动脉粥样硬化形成的影响及其作用机制, 将雄性 Wistar 大鼠随机均分为正常组、高脂组和治疗组(环戊丙酸睾酮, 2.5 mg/kg, 肌注), 12 周后分别测定血脂、血浆脂质过氧化物及肝脏和主动脉脂质含量, 光镜检查主动脉内膜形态。结果表明, 治疗组与高脂组相比, 血浆脂质及脂蛋白水平相差不显著, 血浆脂质过氧化物含量升高; 治疗组肝脏脂质含量低于高脂组, 而主动脉脂质含量高于高脂组, 治疗组主动脉内膜粘附的单核细胞数及油红染色阳性泡沫细胞数均多于高脂组。提示外源性睾酮促进雄性高脂血症大鼠早期动脉粥样硬化的形成。

Effects of Exogenous Testosterone on Early Atherosclerosis in Male Hypercholesterolemic Rats

GU Ming- Biao, QIN Yong- Wen, DING Hong- Jun and ZHANG Pu

(Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

MeSH Testosterone, Exogenous; Hypercholesterolemia; Atherosclerosis; Monocytes; Aorta; Rats

ABSTRACT **Aim** To determine the influence of exogenous testosterone on early atherosclerosis in cholesterol- fed male Wistar rats and its possible mechanisms. **Methods** Thirty- six male Wistar rats were randomly assigned to the three groups: normal group, cholesterol group, treated group (testosterone cypionate, 2.5 mg/kg, im.); plasma lipids and the lipids content of aorta and liver were analyzed

with enzymatic methods after twelve weeks, aortic intima were examined with light microscope. **Results** Plasma lipids and lipoproteins were not significantly different between cholesterol group and treated group, the treated rats had significantly higher plasma lipid oxidative peroxidation products value, lower hepatic lipids contents, but higher aortic lipids contents than the cholesterol group, the number of monocytes adhering to endothelial cells and oil red O positive foam cells was more in the treated group than the cholesterol group. **Conclusion** Exogenous testosterone accelerated early atherosclerosis in male hypercholesterolemic rats.

性别是心血管疾病的一个独立危险因素, 男性冠心病发病率明显高于女性, 且发病年龄较早。研究证明, 雌激素可以防止动脉粥样硬化的形成, 而雄激素在动脉粥样硬化形成中的作用还不清楚, 本实验通过外源性高脂血症大鼠动脉粥样硬化模型, 研究外源性睾酮在雄性大鼠早期动脉粥样硬化形成中的作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 36 只, 体重 280~ 300 g, 适应性喂养 1 周后, 随机等分为 3 组: 正常组, 喂饲普通大白鼠饲料; ④高脂组, 喂饲高脂饲料(4% 胆固醇、1% 胆酸钠加 95% 普通饲料配制而成); ④治疗组, 喂饲高脂饲料, 实验开始前 1 周用环戊丙酸睾酮

2.5 mg/kg 作大腿外侧深部肌肉注射^[1], 每周 2 次(其它组用生理盐水作对照注射)。自由进食, 饮水, 实验时间 12 周。

1.2 血脂、脂蛋白及血浆脂质过氧化物含量测定

观察大鼠进食及体重增长情况, 12 周末检测大鼠血常规及肝功能; 酶法测定 0 周及 12 周各组大鼠空腹静脉血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和极低密度脂蛋白(very LDL, VLDL)浓度; 12 周末血浆脂质过氧化物(lipid oxidative peroxidation products, LPO)含量测定采用 Ohkwa 法。

1.3 主动脉和肝脏脂质含量测定

12 周末大鼠戊巴比妥钠麻醉处死后, 分离胸主动脉, 去除附着的结缔组织, 滤纸吸干, 称重后放入试管, 加入 1 mL 1: 10 的 50% 氢氧化钾- 无水乙醇溶液, 37℃水浴 3 h, 摇匀; 福林- 酚试剂法测定蛋白质含量; 酶法测定 TG 含量; 余下溶液正己烷提取三

现在中国人民解放军第 81 医院心内科, 南京 210002

④第二军医大学基础部病理学教研室

次后,酶法测定正己烷中 TC 含量,结果表示为每克蛋白质组织所含 TC、TG 量($\mu\text{mol/g protein}$)。肝脏脂质含量测定方法及结果表示同主动脉。

1.4 主动脉形态学检查^[2]

主动脉横断面 HE 染色及内膜油红染色:12 周末大鼠戊巴比妥钠麻醉后,作左胸切口,经左心室用生理盐水灌注 1 min,4% 多聚甲醛灌注 20 min(灌注压 110 mmHg,流出道为损伤的右心耳),分离胸主动脉,去除附着的结缔组织及外膜,石蜡包埋切片,HE 染色,同时作主动脉内膜油红染色。

主动脉内膜硝酸银染色:多聚甲醛原位灌注固定后,继续用 0.15% 硝酸银灌注 1 min,3% 溴化钴和 1% 溴化铵溶液灌注 1 min,取胸主动脉于少量 4% 多聚甲醛中,60 瓦电灯照射固定 5 h,固定液保存,苏木素染色,计数每高倍镜视野下粘附于内皮表面的单核细胞数。

1.5 统计方法

所有测定值均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 t 检验作显著性检测,所有原始资料均经方差齐性检验。

2 结果

2.1 一般情况观察

各组大鼠饲料消耗量无明显差异。治疗组大鼠毛发欠光泽,部分微呈黄色,活动无明显变化,12 周末治疗组大鼠体重低于正常组及高脂组(分别为 $400.8 \pm 32.4 \text{ g}$ 、 $420.2 \pm 33.5 \text{ g}$ 和 $426.1 \pm 29.9 \text{ g}$, $P < 0.05$),各组血常规及肝功能检查无明显差异。

2.2 血脂、脂蛋白和血浆脂质过氧化物含量比较

实验 0 周,各组血脂及脂蛋白水平无显著差异;实验 12 周,各组 TG 浓度相差不明显,正常组血浆 TC、LPO 及脂蛋白水平均低于高脂组及治疗组($P < 0.01$);高脂组及治疗组之间血浆脂质及脂蛋白水平相差不显著;治疗组血浆 LPO 含量高于高脂组($P < 0.01$) (表 1, Table 1)。

表 1. 实验 12 周各组大鼠血浆脂质水平及脂质过氧化物含量比较

Table 1. Comparison of plasma lipids values and LPO contents between groups in week 12 ($n = 12$, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Groups	TC	TG	HDL	LDL+ VLDL	LPO(nmol/L)
Normal	1.68 ± 0.32^b	0.58 ± 0.11	0.50 ± 0.09^b	1.18 ± 0.23^b	10.61 ± 1.66^b
Cholesterol	10.83 ± 1.70	0.60 ± 0.12	2.77 ± 0.46	8.06 ± 1.21	23.22 ± 2.39
Treated	9.85 ± 1.85	0.57 ± 0.12	2.48 ± 0.47	7.38 ± 1.34	28.71 ± 3.10^b

b: $P < 0.01$, compared with cholesterol group

2.3 主动脉及肝脏脂质含量比较

正常组肝脏及主动脉 TC、TG 含量均低于高脂组及治疗组($P < 0.01$);治疗组肝脏 TC、TG 含量低于高脂组($P < 0.05$, $P < 0.01$),但主动脉 TC 含量高于高脂组($P < 0.05$),TG 含量相差不显著(表 2, Table 2)。

表 2. 肝脏和主动脉总胆固醇及甘油三酯含量比较

Table 2. Comparison of TC, TG contents in the livers and thoracic aortas of rats ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/g protein}$)

Groups	Liver		Aorta	
	TC	TG	TC	TG
Normal	21.3 ± 2.1^b	84.9 ± 13.3^b	10.2 ± 1.6^b	21.2 ± 2.9^b
Cholesterol	138.1 ± 13.9	124.8 ± 13.2	37.4 ± 3.7	46.8 ± 4.1
Treated	123.6 ± 14.4^a	104.1 ± 12.9^b	42.2 ± 4.0^a	51.1 ± 4.9

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, compared with cholesterol group

2.5 主动脉形态学检查

主动脉横断面 HE 染色显示:正常组主动脉内

膜较薄、平坦,高脂组及治疗组主动脉横断面可见密集细胞群,单核细胞粘附于内皮表面,移行于内皮下,未见斑块形成。主动脉内膜油红染色示:正常组表现为少数分散的桔红色样物质,高脂组及治疗组表现为内皮表面或内皮下小的、红色葡萄样物质,高倍镜下可见细胞轮廓,部分融合,治疗组油红染色阳性细胞多于高脂组。硝酸银染色示:高脂组主动脉内膜粘附的单核细胞数多于正常组,治疗组多于高脂组(图 1, Figure 1)。

3 讨论

大鼠喂饲高胆固醇饲料一年后可形成典型动脉粥样硬化病变,经光镜和电镜证实,病变形成过程与人类相似^[2];因此,近年来人们开始用大鼠作为动脉粥样硬化模型。由于本实验时间较短,仅见到动脉脂质浸润增加、内膜单核细胞粘附增多等动脉粥样

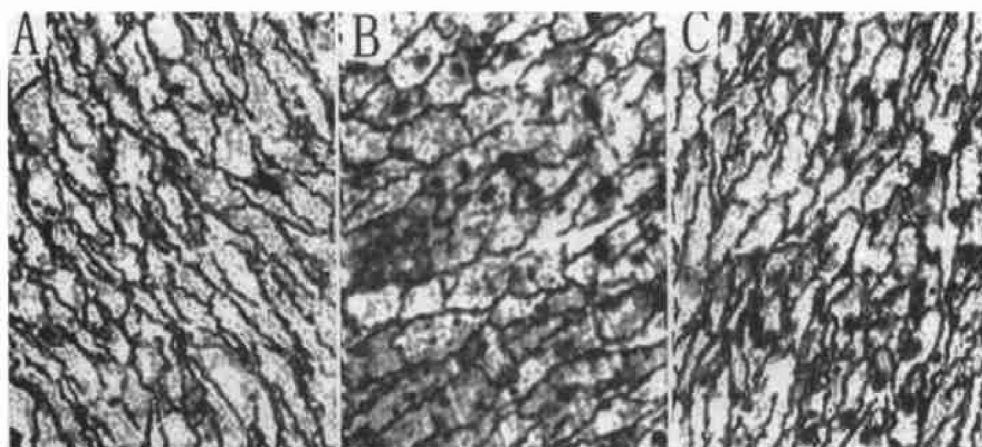


图 1. 各组大鼠主动脉内膜硝酸银、苏木素染色(×200)

Figure 1. Aortic intima viewed en face after stained with AgNO₃ and hematoxylin. In this preparation the endothelial nuclei are bare visible, and therefore the hematoxylin has stained the nuclei of superficial medial cells. In the normal group (A), the monocytes were rare and single, they became more in hypercholesterolemic rats (B, C), the monocytes adhering to the endothelium were more in the treated group (C) than the cholesterol group (B) (magnification ×200)

硬化早期病变。临床研究表明,男性青春期后,随着血浆睾酮水平升高,血浆 HDL 浓度降低,LDL 浓度升高;健康男性肌注睾酮后,血浆 HDL 水平降低,LDL 水平升高^[3]。实验发现,外源性睾酮对血浆脂质及脂蛋白水平的影响差异不显著,但大鼠肌注外源性睾酮后,血浆脂质过氧化代谢产物浓度增高,说明外源性睾酮有促进 LDL 过氧化修饰作用,而氧化型 LDL 是动脉粥样硬化斑块中 LDL 的主要形式,Zhu 等^[4]研究发现,睾酮促进培养的巨噬细胞中 LDL 的过氧化修饰及氧化型 LDL 对巨噬细胞的损伤。脂质浸润是动脉粥样硬化形成过程的最早病变,高脂饲养大鼠主动脉脂质含量高于正常组,但未见明显斑块形成,治疗组大鼠主动脉脂质含量高于高脂组,说明外源性睾酮有促进主动脉脂质沉积的作用。此外,高脂饲养大鼠肌注睾酮后,肝脏脂质含量减少,而主动脉脂质含量增加,其机理未明。Hutchison 等^[5]认为睾酮可以降低主动脉内皮依赖性舒张反应,加重高脂血症所引起的主动脉内皮细胞功能紊乱,促进脂质沉积;内皮损伤或激活时,内皮细胞产生粘附因子,使血流中的单核细胞与内皮细胞粘附,并活化形成巨噬细胞,二者通过膜上的清道夫受体摄入大量的脂质成为泡沫细胞,逐渐形成脂质条纹。实验发现,睾酮促进高脂血症大鼠主动脉内膜单核细胞粘附及泡沫细胞形成,这可能继发于睾酮所引起的主动脉脂质浸润增加、氧化型 LDL 对循环单核细胞的趋化作用及睾酮对内皮细胞的直接损伤作用。有研究发现睾酮可增加雄性大鼠主动脉平滑肌细胞及血小板血栓素 A₂ 受体密度,使主动脉对血栓

素 A₂ 类似物收缩反应增强^[1]。Fujimoto 等^[6]证实,大鼠主动脉平滑肌细胞表面有睾酮结合位点,睾酮可直接促进平滑肌细胞脱氧核糖核酸的合成。研究结果表明,外源性睾酮促进高脂血症大鼠主动脉脂质沉积、主动脉内膜单核细胞粘附,因而在高脂血症大鼠早期动脉粥样硬化形成中起着促进作用;提示睾酮可能在男性人群动脉粥样硬化的发生发展中起着一定的作用。

参考文献

- 1 Matsuda K, Ruff A, Morinelli Ta, et al. Testosterone increases thromboxane A₂ receptor density in rat aortas and platelets. *Am J Physiol*, 1994, **H36**: 887- 893
- 2 Joris I, Zand T, Nunnari JJ, et al. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol*, 1983, **113**: 341- 358
- 3 Meriggola MC, Marcovina S, Paulsen C, et al. Testosterone enanthate at a dose of 200 mg/week decreases HDL- cholesterol levels in healthy men. *Int J Androl*, 1995, **18**: 237- 244
- 4 Zhu XD, Knoop RF. Effects of sex hormones on oxidative modification of low density lipoproteins by placental macrophages and troblast and their susceptibility to cytotoxicity. *Circulation*, 1993, **88**(S1): 32- 33
- 5 Hutchison SJ, Sudhir K, Chou TM, et al. Testosterone worsens endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia and environmental tobacco smoke exposure in male rat aorta. *J Am Cell Cardiol*, 1997, **29**: 800- 805
- 6 Fujimoto R, Morimoto I, Morita E, et al. Androgen receptors, 5 alpha- reductase and androgen- dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994, **50**: 169- 174

(此文 1999- 05- 04 收到, 1999- 11- 03 修回)

(此文编辑 朱雯霞)