

[文章编号] 1007-3949(2006)14-03-0213-04

• 实验研究 •

睾酮在雄兔体内的抗动脉粥样硬化作用

高倩萍¹, 富路¹, 李元十¹, 金红², 李佳¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院心血管内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001;

2. 汕头大学医学院附属第一医院心内科, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 内科学; 睾酮抗动脉粥样硬化; 动物实验; 睾酮; 动脉粥样硬化; 血管内皮细胞; 纤溶酶原激活物抑制物

[摘要] 目的 探讨睾酮在雄兔动脉粥样硬化模型中是否具有血管保护作用。方法 雄性白兔, 饲以高脂饮食且分组。安慰剂组: 行去势术并给予安慰剂; 低睾酮组: 行去势术并予睾酮 0.25 mg/kg·d; 高睾酮组: 行去势术并予睾酮 2.5 mg/kg·d; 假手术组。3 个月后检测血中睾酮水平、血脂、纤溶酶原激活物抑制物活性、一氧化氮、内皮素、血管紧张素Ⅱ含量, 计算主动脉斑块占内膜面积百分比。结果 安慰剂组血清睾酮水平明显低于其它三组 ($2.56 \pm 0.28 \mu\text{g/L}$ 比 $7.67 \pm 0.61 \mu\text{g/L}$ 、 $40.16 \pm 0.93 \mu\text{g/L}$ 和 $7.79 \pm 0.61 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$); 一氧化氮含量安慰剂组明显低于其它三组 ($39.0 \pm 9.5 \mu\text{mol/L}$ 比 $62.8 \pm 8.9 \mu\text{mol/L}$ 、 $56.7 \pm 10.3 \mu\text{mol/L}$ 和 $51.5 \pm 9.3 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 纤溶酶原激活物抑制物活性安慰剂组高于低睾酮组 ($567.3 \pm 53.4 \text{ u/L}$ 比 $334.4 \pm 51.3 \text{ u/L}$, $P < 0.01$); 内皮素含量安慰剂组高于低睾酮组 ($911.9 \pm 15.4 \text{ ng/L}$ 比 $846.1 \pm 43.0 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$); 血管紧张素Ⅱ含量安慰剂组高于低睾酮组 ($687.2 \pm 36.5 \text{ ng/L}$ 比 $624.5 \pm 54.5 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$); 主动脉斑块占内膜面积百分比安慰剂组高于其它三组 ($46.4\% \pm 9.3\%$ 比 $20.6\% \pm 5.3\%$ 、 $22.7\% \pm 4.6\%$ 和 $28.5\% \pm 13.8\%$, $P < 0.01$)。结论 在高脂饮食诱发的雄兔动脉粥样硬化模型中, 睾酮可以发挥保护内皮细胞的作用, 从而减轻动脉粥样硬化病变的程度。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Testosterone's Anti-Atherosclerosis Effect in Male Rabbits

GAO Qian-Ping¹, FU Lu¹, LI Yuan-Shi¹, JIN Hong², and LI Jia¹

(1. Cardiovascular Department of the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2. Cardiovascular Department, the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

[KEY WORDS] Testosterone; Atherosclerosis; Endothelial Cell; Plasminogen Activator Inhibitor; Nitric Oxide; Endothelin

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of testosterone on endothelial cells in male rabbits atherosclerotic models.

Methods Male cholesterol-fed rabbits were divided into four groups at random: placebo group (castrated rabbits treated with placebo), group with low level testosterone (castrated rabbits treated with testosterone 0.25 mg/kg·d), group with high level testosterone (castrated rabbits treated with testosterone 2.5 mg/kg·d), sham operation group. Three months later, the rabbits were sacrificed. Testosterone level, lipids, plasminogen activator inhibitor activity (PAI), nitric oxide (NO), endothelin (ET) and angiotensinⅡ (AngⅡ) concentration were tested. And the ratio of aortic plaque area to total intima area was examined.

Results It showed that testosterone level of placebo group was lower than those of the other groups ($2.56 \pm 0.28 \mu\text{g/L}$ vs $7.67 \pm 0.61 \mu\text{g/L}$, $40.16 \pm 0.93 \mu\text{g/L}$, $7.79 \pm 0.61 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$); NO content of placebo group was lower than those of the other groups ($39.0 \pm 9.5 \mu\text{mol/L}$ vs $62.8 \pm 8.9 \mu\text{mol/L}$, $56.7 \pm 10.3 \mu\text{mol/L}$, $51.5 \pm 9.3 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$); PAI of placebo group was higher than that of group with low level testosterone ($567.3 \pm 53.4 \text{ u/L}$ vs $334.4 \pm 51.3 \text{ u/L}$, $P < 0.01$); ET of placebo group was higher than that of group with low level testosterone ($911.9 \pm 15.4 \text{ ng/L}$ vs $846.1 \pm 43.0 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$); and AngⅡ of placebo group was higher than that of group with low level testosterone ($687.2 \pm 36.5 \text{ ng/L}$ vs $624.5 \pm 54.5 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$); the ratio of aortic plaque area to total intima area of placebo group was higher than others ($46.4\% \pm 9.3\%$ vs $20.6\% \pm 5.3\%$, $22.7\% \pm 4.6\%$, $28.5\% \pm 13.8\%$, $P < 0.01$).

Conclusions Testosterone is a protective factor for endothelial cells, thus to alleviate atherosclerotic lesion for male rabbits fed with high cholesterol stuff.

男性随着年龄的增长冠心病发病率上升, 临床

观察发现老年男性体内雄激素水平与血脂代谢、凝血系统等呈负相关, 上世纪末有人提出老年男性生殖功能降低可能是动脉硬化发病率上升的原因之一, 国外陆续有实验涉及于此, 国内研究也已开始^[1]。目前有关雄激素在动脉硬化发病中所扮演的角色仍是人们研究的热点。血管内皮细胞受损是动

[收稿日期] 2004-12-14 [修回日期] 2006-02-12

[作者简介] 高倩萍, 博士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 gaoqianping@sohu.com。富路, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 联系电话为 (0451) 53643849-5463。李元十, 硕士, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 lyshrbmu@163.com。

脉粥样硬化的启动步骤, 本实验运用雄兔动脉粥样硬化模型, 初步探讨雄激素是否具有血管保护作用, 从而减轻动脉硬化的程度。

1 材料和方法

1.1 实验对象

雄性哈尔滨大耳白兔 36 只, 体重 2.0~2.2 kg, 购自哈尔滨医科大学第一临床医学院动物实验中心(许可证号 P01105002), 随机分为 4 组, 各组均为 9 只。安慰剂组: 切除双侧睾丸并给予安慰剂; 低睾酮组: 切除双侧睾丸并予丙酸睾酮 0.25 mg/kg·d 肌肉注射; 高睾酮组: 切除双侧睾丸并予丙酸睾酮 2.5 mg/kg·d, 肌肉注射; 假手术组^[2]。实验前各组兔的年龄及平均体重差异无显著性。每周测量体重。自然条件下单笼饲养, 室温, 相对湿度约 55%, 每日光照约 12 h, 饲以高脂饮食(1.5% 胆固醇, 10% 鸡蛋黄, 5% 猪油) 每日 120 g, 饮水不限。实验时间为 93 天。安慰剂组 1 只兔因去势手术麻醉过量而死亡; 低睾酮组 1 只兔于实验 2 个月时处死取主动脉观察斑块是否出现而退出实验; 高睾酮组 1 只兔去势手术 1 周后死亡, 原因不明, 1 只兔死于肺炎; 假手术组 2 只兔分别于实验 2 个月、2.5 个月时突然死亡, 原因不明。故各组进入结果分析数量为: 安慰剂组 8 只, 低睾酮组 8 只, 高睾酮组 7 只, 假手术组 7 只。

1.2 主要试剂

丙酸睾酮注射剂(天津氨基酸制药厂), 纤溶酶原激活物抑制物活性(plasminogen activator inhibitor activity, PAI)测定试剂盒(上海太阳生物技术公司), 一氧化氮(nitric oxide, NO)含量测定盒(南京建成生物工程研究所), ¹²⁵I 内皮素(endothelin, ET)放射免疫药盒及 ¹²⁵I 血管紧张素(angiotensin, Ang)放射免疫药盒(北京北免东雅生物技术研究所)。

1.3 实验步骤

实验动物分别于实验前及饲以高脂饮食 3 个月(93 天)耳缘静脉采血, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清-70℃冷冻待测睾酮、血脂及 NO; 加入 0.109 mol/L 枸橼酸钠注射剂抗凝(全血: 抗凝剂为 9: 1), 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清-70℃冷冻待测 PAI; 加入 7.5% 依地酸二钠和抑肽酶, 混匀, 4℃, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆-70℃冷冻待测内皮素及 Ang。放射免疫法检测血清睾酮水平、血浆内皮素、血浆 Ang 含量, 血清血脂浓度包括甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白

胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)由生化实验室协助检测, 发色底物法测血浆 PAI, 硝酸还原酶法测血清 NO 含量。上述指标均按照试剂盒说明书操作完成。处死动物, 自主动脉起始处至髂总动脉分叉处分离主动脉, 纵向剖开, 苏丹Ⅳ染色后做计算机图像分析(HPIAS-1000), 计算斑块占总内膜面积百分比。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析, 两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 实验前后各组体重与血清睾酮水平变化

实验前各组体重、血清睾酮水平相比差异无显著性($P > 0.05$)。3 个月后各组相比体重差异无显著性($P > 0.05$), 血清睾酮水平安慰剂组明显低于其它三组($P < 0.01$), 而低睾酮组与假手术组接近($P > 0.05$)(表 1)。

表 1. 实验前后各组体重、血清睾酮水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	体 重 (kg)		血清睾酮 (μg/L)	
		实验前	3 个月后	实验前	3 个月后
安慰剂组	8	1.9 ± 0.6	2.6 ± 0.5	7.26 ± 0.63	2.56 ± 0.28
低睾酮组	8	2.0 ± 0.3	2.7 ± 0.4	7.80 ± 0.57	7.67 ± 0.61 ^a
高睾酮组	7	2.1 ± 0.2	2.8 ± 0.2	7.17 ± 0.63	40.16 ± 0.93 ^a
假手术组	7	2.0 ± 0.3	2.7 ± 0.2	7.84 ± 0.53	7.79 ± 0.61 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与安慰剂组相比。

2.2 实验前后各组血清血脂变化

实验前各组血清 TG、LDLC、HDLC 比较无统计学差异($P > 0.05$)。3 个月后各组血清 TG、LDLC 差异无显著性($P > 0.05$), HDLC 安慰剂组明显低于其它三组($P < 0.01$)(表 2)。

2.3 3 个月后各组纤溶酶原激活物抑制物活性与一氧化氮、内皮素和血管紧张素含量

安慰剂组 PAI 明显高于低睾酮组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); NO 含量安慰剂组明显低于其它各组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 内皮素含量安慰剂组明显高于低睾酮组($P < 0.05$); Ang 含量安慰剂组高于低睾酮组($P < 0.05$)(表 3)。

2.4 动脉斑块占内膜面积百分比

各组动脉剖开后均可见隆起的灰黄色动脉粥样硬化斑块, 主要分布在主动脉弓处, 其中安慰剂组、低睾酮组、高睾酮组分别有 4 只、2 只、2 只兔动脉斑块呈大片融合状, 其余呈分散的大小不一的点状、

条索状斑块。假手术组中 1 只兔的主动脉无肉眼可见斑块,但该兔颈下逐渐生长一巨大脂肪瘤,直径最终达 10 cm。各组斑块占内膜面积百分比如下:安慰剂组 $46.4\% \pm 9.3\%$,低睾酮组 $20.6\% \pm 5.3\%$,高睾酮组 $22.7\% \pm 4.6\%$,假手术组 $28.5\% \pm 13.8\%$,安慰剂组显著高于其它各组($P < 0.01$)。而左心室

前壁及肺组织经 HE 染色发现,安慰剂组冠状动脉前降支的分支及肺小动脉管腔内均存在脂质斑块,管腔明显狭窄,其它各组相对较轻,苏丹 Ⅲ 染色也发现安慰剂组冠状动脉小分支的内皮下存在大量脂质沉积。

表 2. 实验前后各组血清血脂变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TG (mmol/L)		LDLC (mmol/L)		HDLc (mmol/L)	
		实验前	3 个月后	实验前	3 个月后	实验前	3 个月后
安慰剂组	8	0.96 ± 0.05	23.31 ± 2.41	1.67 ± 0.32	9.49 ± 0.98	1.09 ± 0.06	0.26 ± 0.09
低睾酮组	8	1.02 ± 0.11	23.04 ± 4.14	1.58 ± 0.21	9.17 ± 0.81	1.22 ± 0.17	0.96 ± 0.14^a
高睾酮组	7	0.89 ± 0.07	20.69 ± 4.64	1.71 ± 0.27	9.24 ± 1.57	1.31 ± 0.12	0.59 ± 0.11^a
假手术组	7	0.96 ± 0.13	20.31 ± 3.32	1.82 ± 0.19	9.31 ± 0.99	1.16 ± 0.21	0.87 ± 0.09^a

a 为 $P < 0.01$, 与安慰剂组相比。

表 3. 3 个月后各组纤溶酶原激活物抑制物活性和一氧化氮、内皮素、血管紧张素 Ⅱ 含量 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	PAI (u/L)	NO (μmol/L)	ET (ng/L)	Ang Ⅱ (ng/L)
安慰剂组	8	567.3 ± 53.4	39.0 ± 9.5	911.9 ± 15.4	687.2 ± 36.5
低睾酮组	8	334.4 ± 51.3^b	62.8 ± 8.9^b	846.1 ± 43.0^a	624.5 ± 54.5^a
高睾酮组	7	505.1 ± 50.4	56.7 ± 10.3^a	858.3 ± 59.8	636.7 ± 62.0
假手术组	7	517.7 ± 23.2	51.5 ± 9.3^a	870.2 ± 34.5	675.7 ± 38.2

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与安慰剂组相比。

3 讨论

血管内皮细胞受损是动脉粥样硬化的启动步骤,血管内皮细胞功能下降会引起正常的抗凝、抗细胞粘附、抗氧化机能降低。目前很多实验涉及雄激素对内皮细胞的影响,人们试图从这一角度推断雄激素对动脉粥样硬化的影响。

血管内皮细胞的功能之一在于合成 NO,从而抗凝、抗氧化、抗细胞粘附、介导血管舒张等。内皮细胞受损,NO 合成减少。20 世纪 90 年代曾盛行激素替代疗法,很多老年男性服用雄激素后心绞痛症状缓解,心电图所记录的心肌缺血也减少,当时将机制归功于血脂的改善,但血脂的改善晚于心绞痛症状的缓解,提示还有其它机制,也许是雄激素增加了 NO 的合成与释放,从而改善内皮依赖性血管舒张。Medras^[3] 认为雄激素能诱导一氧化氮合成酶,引发冠状动脉扩张。本实验也发现对高脂饮食诱发的家兔动脉粥样硬化模型,内源性睾酮和外源性睾酮均可促进 NO 合成,尤其当外源性睾酮水平接近生理浓度时其促进 NO 合成的作用最强,随着给药剂量增大,促进 NO 合成的作用未见增强。对 Ang Ⅱ 和内

皮素而言,内源性睾酮对二者的合成具有降低的趋势,如增大样本量也许会有统计学意义。外源性睾酮接近生理水平时可以减少二者的含量,但当外源性睾酮剂量增大至 10 倍,对二者的抑制作用消失,呈现剂量双重性。

其它几项反映内皮细胞功能的指标如血栓素、纤溶酶原激活物抑制物 1 等也常用于反映动脉硬化的程度。临床研究发现,对男性而言血浆睾酮水平与纤维蛋白原、凝血因子、纤溶酶原激活物抑制物 1 呈负相关。男性性功能低下者给予雄激素可减少血栓性疾病的发生,但滥用雄激素的男性发病率反而增加。可能存在一个临界剂量,超过这个剂量,雄激素由促进纤溶(作用于纤溶酶原激活物抑制物 1)转为促进血栓形成(作用于血小板),这部分解释了滥用雄激素者心血管疾病死亡率增加^[4]。基础实验也发现剂量双重性:睾酮小剂量时抑制纤溶酶原激活物抑制物 1,大剂量时纤溶酶原激活物抑制物 1 水平升高^[5]。本实验选择纤溶酶原激活物抑制物进行观察,发现接近生理浓度的外源性睾酮可抑制兔纤溶酶原激活物抑制物活性,剂量增大至 10 倍,不再抑制纤溶酶原激活物抑制物活性,从而在动物实验角度对剂量双重性加以补充。

上世纪 80 年代很多临床研究涉及雄激素对血脂的影响,我们检测了几项常见指标,发现睾酮对 HDLC 的影响较为明显,而对 TG、LDLC 无明显影响,但睾酮对 PAI、NO 等指标的影响可能不仅仅通过影响血脂代谢来实现。而且实验中外源性睾酮对 PAI、Ang Ⅱ 和内皮素这几项指标的影响呈现剂量双重性,其机制有待进一步探索。

国内任国庆等人研究了睾酮对家兔腹主动脉损伤后内膜增生的影响,发现睾酮可抑制动脉损伤介导的内膜增生,其机制可能涉及睾酮增加 NO 的合成及抗氧化作用^[6]。我们采用高脂饮食诱导的慢性动脉硬化模型,观察主动脉大体标本发现低雄激素家兔动脉粥样硬化病变较其它组重,提示睾酮可减轻动脉粥样硬化斑块的形成。其中涉及雄激素对纤溶酶原激活物抑制物、细胞粘附因子的影响,尤其包括对血脂代谢的影响等。

有关雄激素与内皮细胞的实验大多涉及雄激素受体^[7],本实验结果发现接近生理浓度的外源性睾酮的血管保护作用强于内源性睾酮,是否外源性睾酮改变了睾酮受体数量,从而导致了这种作用的差别,或者受体后信号转导有所改变,将由进一步实验检验。本实验所用睾酮为临床药品,兔的生物利用

度差别也可能是原因之一。

[参考文献]

- [1] 任国庆,孙广辉. 睾酮与男性冠心病的关系[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2002, **29** (2): 81-83
- [2] Peter Alexandersen, Jens Harbo, Inger Byrjalsen, Henrik Lavaetz, Claus Christiansen. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits [J]. *Circ Res*, 1999, **84** (16): 813-819
- [3] Medras M, Jankowska E. Testosterone and atherosclerosis in males during arrhythmia [J]. *Pol Merkuriusz Lek*, 1999, **6** (34): 205-207
- [4] Winkler UH. Effects of androgens on haemostasis [J]. *Maturitas*, 1996, **24** (3): 147-155
- [5] Sobel MI, Winkel CA, Macy LB, Liao P, Björnsson TD. The regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in endothelial cells by sex hormones [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, **173** (3pt1): 801-808
- [6] 任国庆,黄从新,孙广辉,侯建民. 睾酮对雄性家兔腹主动脉损伤后内膜增生的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (5): 398-400
- [7] Ling S, Dai A, Williams MR, Myles K, Dille RJ, Komesaroff PA, et al. Testosterone (T) enhances apoptosis-related damage in human vascular endothelial cells [J]. *Endocrinology*, 2002, **143** (3): 1 119-125

(此文编辑 胡必利, 许雪梅)