

[文章编号] 1007-3949(2007)15-01-0031-04

• 实验研究 •

早期给予雌激素对去卵巢兔动脉斑块及血脂、单核细胞趋化蛋白 1 的影响

连亚军^{1,2}, 李向平¹, 廖清池¹, 董海云¹

(1. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011; 2. 长治医学院附属和平医院心内科, 陕西省长治市 046000)

[关键词] 内科学; 雌激素; 去卵巢; 兔; 动脉粥样硬化; 血脂; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] 目的 观察早期不同剂量雌激素替代治疗对高脂饮食诱导的去卵巢兔动脉粥样硬化及血脂、单核细胞趋化蛋白 1 的影响。方法 健康雌性新西兰白兔 28 只, 随机分为假手术组、去卵巢组、去卵巢+ 小剂量雌激素替代治疗组(苯甲酸雌二醇 200 μg)和去卵巢+ 大剂量雌激素替代治疗组(苯甲酸雌二醇 1 mg)。术后给予高脂饲料喂养, 测定血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、雌二醇和单核细胞趋化蛋白 1 浓度, 并分离主动脉标本行组织形态学观察。结果 与假手术组比较, 去卵巢组高脂喂食后血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、单核细胞趋化蛋白 1 均明显升高, 血清高密度脂蛋白胆固醇、雌二醇水平下降; 而雌激素替代治疗组的上述指标与假手术组相似; 与小剂量雌激素替代治疗组比较, 大剂量雌激素替代治疗组 12 周后雌二醇水平较高、单核细胞趋化蛋白 1 水平较低。比较主动脉斑块面积, 去卵巢组大于假手术组, 而雌激素替代治疗两组明显小于去卵巢组和假手术组, 但雌激素替代治疗两组之间差异无显著性。主动脉斑块面积与高脂喂养 12 周后血清低密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇以及单核细胞趋化蛋白 1 水平呈明显正相关(r 分别为 0.765, 0.803, 0.829, P 均 < 0.01), 与血清高密度脂蛋白胆固醇($r = -0.441, P < 0.05$)、雌二醇水平呈负相关($r = -0.755, P < 0.01$)。结论 早期雌激素替代治疗可改善血脂代谢、降低单核细胞趋化蛋白 1 水平、减少主动脉斑块面积。雌激素的调脂、抗炎作用可能与其抗动脉粥样硬化作用有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effects of Early Estrogen Replacement Therapy on Atherosclerotic Lesions, Serum Lipid and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels in Ovariectomized Rabbits

LIAN Ya-Jun, LI Xiang-Ping, LIAO Qing-Chi, and DONG Hai-Yun

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Estrogen; Ovariectomized; Rabbits; Atherosclerosis; Serum Lipid; Monocyte Chemoattractant Protein 1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of early estrogen replacement therapy (ERT) of different doses on atherosclerotic lesions, serum lipid and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) levels in ovariectomized fat-fed female rabbits.

Methods Twenty-eight female New Zealand White rabbits were randomly divided into sham operation group, ovariectomized group, ovariectomized with low-dose ERT group (estradiol benzoate 200 μg) and ovariectomized with high-dose ERT (estradiol benzoate 1 mg) group. All rabbits were given high-fat diets after the surgery for 12 weeks. The levels of serum total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDLC), high density lipoprotein cholesterol (HDLC), estradiol and MCP-1 were measured. 12 weeks later, the aortas were taken for pathological analysis and for calculating the areas of atherosclerotic plaques.

Results Compared with sham operation group, the serum levels of TC, LDLC and MCP-1 in ovariectomized group were significantly increased after high-fat diet for 12 weeks, meanwhile the serum levels of HDLC and estradiol were decreased. But the above indexes had no differences between ERT groups and sham operation group. Compared with low-dose ERT group, high-dose ERT group had higher levels of estradiol and lower levels of MCP-1. After high-fat diet for 12 weeks, the extent of atherosclerotic lesions of aorta in ovariectomized group was remarkably bigger than that in sham operation group. The extent in both ERT groups was significantly smaller than that in sham operation group and ovariectomized group. There were no statistical difference in the aortic lesions among two ERT groups. The areas of atherosclerotic plaque were positively correlated with the serum levels of LDLC, TC, and MCP-1, but negatively correlated with the serum levels of HDLC and estradiol. **Conclusions** Early ERT can modulate the blood lipid, decrease the serum levels of MCP-1 and reduce the areas of atherosclerotic plaque. The antiatherogenic effect of early ERT may be associated with its effects of ameliorating the lipid metabolism and anti-inflammation.

[收稿日期] 2006-07-07 [修回日期] 2006-12-12

[基金项目] 湖南省科技厅资助项目(05FJ4056)

[作者简介] 连亚军, 硕士, 医师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 sxlyj99@163.com。李向平, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事冠心病和动脉粥样硬化疾病防治研究, E-mail 为 lixp@medmail.com.cn。廖清池, 硕士, 医师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 lqchl@sohu.com。

雌激素的抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用及其机制一直是心血管领域研究的热点,但绝经后妇女雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy, ERT)是否有益目前仍存在着较大的争议。近年来,大量研究^[1,2]已证实As是一种慢性炎症性疾病。单核细胞趋化蛋白1^[3](monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)作为主要的炎症因子在As发生发展中起重要作用。有临床研究^[4]显示,绝经期妇女或双侧卵巢切除的妇女血液中炎症因子不同程度的增高。ERT与As及炎症之间的关系近年来也引起人们的关注,但目前的研究尚未得出一致的结论。有学者认为,ERT的临床研究结果不一可能与雌激素干预时间早晚、使用剂量不同等因素有关。本实验通过观察高胆固醇喂养的去卵巢雌兔早期给予不同剂量ERT前后血清中MCP-1的变化及主动脉粥样硬化斑块形成情况,以探讨ERT早期干预对As及MCP-1的影响,为As的防治提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备、分组和标本的采集

健康3个月龄雌性新西兰白兔28只,体重 2.089 ± 0.137 kg。购入后常规单笼饲养适应环境1周,然后按体重随机均分为四组。假手术组(实验期间因麻醉意外和腹泻死亡各1只);去卵巢组:行双侧卵巢切除,不给予ERT(因肠梗阻死亡1只);小剂量ERT组:行双侧卵巢切除,并给予苯甲酸雌二醇200 μ g,肌注,隔日1次;大剂量ERT组:行双侧卵巢切除,并给予苯甲酸雌二醇1 mg,肌注,隔日1次(因麻醉意外死亡1只)。所有动物于术后第7天开始喂饲高脂颗粒饲料(含1%胆固醇、7.5%蛋黄粉、8%猪油,120~150 g/d),两个ERT组与此同时开始给予相应的ERT共12周。分别于术前、高脂喂食4周和12周后在动物禁食12 h后经耳中央动脉抽取血标本3~4 mL,静置30 min后离心取血清置入-20℃冰箱冻存,待标本收齐后统一检测。实验结束时处死动物并分离主动脉标本。

1.2 血脂测定

采用酶法测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)浓度,化学遮蔽法测定血清低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)浓度。由我院检验科专人质控检测。

1.3 血清雌二醇水平测定

采用放射免疫分析法检测。试剂盒购自北京原

子高科股份有限公司,严格按照说明书操作步骤进行检测。

1.4 血清单核细胞趋化蛋白1浓度测定

采用双抗夹心ELISA法检测。试剂盒购自浙大生物基因工程有限公司,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 主动脉标本分析

取主动脉标本(从近主动脉弓部到腹腔干分支处)浸入4%多聚甲醛固定24 h,0.5%油红O染色后取出,70%乙醇浸洗,并用蒸馏水充分水洗,将标本铺平后用数码相机照相。在北航病理图像分析系统中,由本院有经验的病理科医师进行As斑块面积测定,并用其占主动脉内膜面积的百分比表示。

1.6 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用One-Way ANOVA方差分析,两组间比较采用t检验。因素间的相关性采用Spearman分析。

2 结果

2.1 雌二醇水平

基线时各组兔雌二醇水平无明显差异;高脂喂养4周和12周后,去卵巢组血清雌二醇浓度明显低于其它三组(P 均 < 0.01);12周后小剂量ERT组与假手术组差异无显著性($P > 0.05$),大剂量ERT组明显高于假手术组($P < 0.01$)和小剂量ERT组($P < 0.05$;表1)。

表1. 实验兔不同阶段血清雌二醇水平的变化($\bar{x} \pm s$, ng/L)

分 组	术前	高脂喂养4周后	高脂喂养12周后
假手术组	660 \pm 210	646 \pm 124	645 \pm 105
去卵巢组	616 \pm 155	137 \pm 43 ^a	125 \pm 45 ^a
小剂量ERT组	649 \pm 201	569 \pm 56 ^b	770 \pm 97 ^b
大剂量ERT组	597 \pm 99	627 \pm 87 ^b	983 \pm 105 ^{abc}

a为 $P < 0.01$,与假手术组比; b为 $P < 0.01$,与去卵巢组比; c为 $P < 0.05$,与小剂量雌激素替代治疗组比。

2.2 血脂变化

基线时各组兔血清TC、LDLC和HDLC水平无明显差异。给予高脂喂养后,上述三项指标均较基线明显升高(P 均 < 0.01)。12周后,血清TC、LDLC水平,去卵巢组显著高于其它三组(P 均 < 0.01),两个ERT组间差异无显著性;血清HDLC水平去卵巢组明显低于其它三组(P 均 < 0.01),两个ERT组间以及ERT组与假手术组间差异无显著性(表2)。

表 2. 实验兔不同阶段血脂的变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	TC		LDLC		HDLC	
	术前	高脂喂养 12 周	术前	高脂喂养 12 周	术前	高脂喂养 12 周
假手术组	1.12 ± 0.26	28.20 ± 1.15	0.51 ± 0.15	16.78 ± 1.32	0.41 ± 0.04	2.76 ± 0.31
去卵巢组	1.10 ± 0.30	33.03 ± 2.05 ^a	0.52 ± 0.19	20.06 ± 1.37 ^a	0.41 ± 0.10	2.08 ± 0.33 ^a
小剂量 ERT 组	1.04 ± 0.16	24.46 ± 2.03 ^{ab}	0.54 ± 0.11	13.38 ± 1.43 ^{ab}	0.40 ± 0.07	2.67 ± 0.34 ^b
大剂量 ERT 组	0.95 ± 0.11	24.31 ± 1.74 ^{ab}	0.47 ± 0.13	13.64 ± 1.35 ^{ab}	0.45 ± 0.08	2.68 ± 0.15 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与去卵巢组比较。

2.3 单核细胞趋化蛋白 1 水平

基线时各组兔血清 MCP-1 浓度差异无显著性。予高脂饮食后, 各组兔血清 MCP-1 浓度均较术前增高, 尤以去卵巢组变化明显 (P 均 < 0.01)。去卵巢组 MCP-1 浓度明显高于其它三组 (P 均 < 0.01); 高脂喂养 12 周后, 两个 ERT 组血清 MCP-1 浓度低于假手术组 (P 均 < 0.01), 与小剂量 ERT 组比, 大剂量 ERT 组 MCP-1 降低幅度更明显 ($P < 0.01$, 表 3)。

表 3. 血清单核细胞趋化蛋白 1 水平变化 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

分 组	术前	高脂喂养 4 周后	高脂喂养 12 周后
假手术组	105 ± 6	133 ± 12	342 ± 31
去卵巢组	107 ± 9	207 ± 27 ^b	542 ± 48 ^b
小剂量 ERT 组	109 ± 8	158 ± 14 ^{ac}	251 ± 30 ^{bc}
大剂量 ERT 组	105 ± 5	144 ± 9 ^{cd}	178 ± 14 ^{ce}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; c 为 $P < 0.01$, 与去卵巢组比较; d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与小剂量 ERT 组比较。

2.4 各组兔主动脉病理形态学变化

肉眼观察, 各组兔均见主动脉内膜表面粗糙不平、油红 O 着色的动脉粥样斑块, 呈小片状分布, 多位于大动脉分叉处, 去卵巢组病变最明显, 两个 ERT 组病变最轻(图 1)。

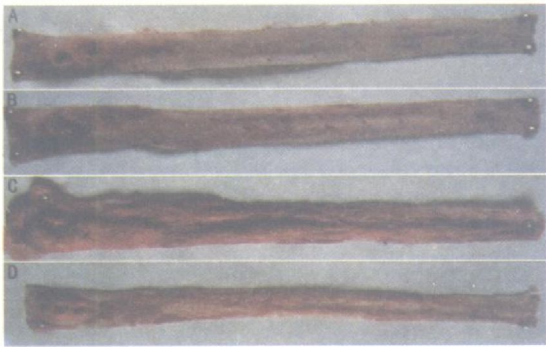


图 1. 主动脉标本形态学观察 A 为假手术组, B 为去卵巢组, C 为小剂量雌激素替代治疗组, D 为大剂量雌激素替代治疗组。

2.5 各组兔主动脉斑块面积的比较

去卵巢组斑块面积 ($81.2\% \pm 8.7\%$) 明显大于其它三组 (P 均 < 0.01); 小剂量 ERT 组 ($16.8\% \pm 4.6\%$) 和大剂量 ERT 组 ($15.8\% \pm 3.9\%$) 小于假手术组 ($32.4\% \pm 2.6\%$, P 均 < 0.01); 而两个 ERT 组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.6 影响兔主动脉斑块面积的相关因素分析

将四组兔合并, 对主动脉斑块面积的影响因素进行 Spearman 相关分析, 结果发现主动脉斑块面积与高脂喂养 12 周时血清 LDLC、TC 以及 MCP-1 水平呈明显正相关 (r 分别为 0.765、0.803 和 0.829, P 均 < 0.01); 与血清 HDLC ($r = -0.441$, $P < 0.05$) 和雌二醇水平 ($r = -0.755$, $P < 0.01$) 呈负相关。

3 讨论

以往有研究观察到, 绝经后妇女或手术切除双侧卵巢的妇女应用 ERT 可降低血清 TC、LDLC 水平, 其心血管病的发病率亦明显下降^[5], 因此认为 ERT 可以通过调节血脂, 对心血管系统产生一定的保护作用。本实验以去卵巢雌兔为观察对象, 结果表明在高脂饮食喂养后, 去卵巢组血脂水平均明显增高, 而 ERT 组 TC、LDLC 明显低于去卵巢组, HDLC 明显高于去卵巢组。这与以往研究结果^[6,7] 相符, 提示早期 ERT 可产生有益的调脂效应。本研究还发现 ERT 组大、小剂量疗效相当, 说明在雌激素缺乏状态下, 给予适量 ERT 即可达到有效的调脂作用。

国内刘彤等^[7] 报道, 单用雌激素可以抑制去卵巢兔实验性主动脉粥样硬化形成, 而 Hanke 等^[8] 在去卵巢兔中合并应用雌、孕激素, 并未观察到此效应。本实验比较各组兔主动脉斑块面积发现, 去卵巢组兔斑块面积明显大于假手术组, 而 ERT 组兔斑块面积明显小于去卵巢组, 支持早期单用 ERT 能够明显抑制 As 的形成。相关分析表明, 兔主动脉斑块面积与血 TC、LDLC 呈正相关, 与 HDLC、雌二醇呈负相关, 提示 ERT 改善及调节血脂代谢的作用可能是

其抑制 As 形成和发展的机制之一。

有学者认为,雌激素对血脂的有益作用只能部分解释其抗 As 的效应,而约 50%~75%可能是通过非脂质机制实现的^[9]。大量研究证实炎症参与 As 的发生和发展,ERT 与炎症之间的关系近年来也引起一些学者的关注。已知 MCP-1 是主要的炎症因子之一,它在早期 As 的形成中具有重要作用^[1-3]。基础研究^[10]显示,雌二醇可降低 MCP-1 蛋白表达,并且呈时间和剂量依赖性地下调 MCP-1 mRNA 的表达。Pervin 等^[11]研究发现去卵巢雌兔早期予以皮下注射 17 β -雌二醇后,MCP-1 表达减少。Miller 等^[12]也报道去卵巢雌兔早期肌肉注射雌二醇后,可降低 MCP-1 水平。另有研究则认为雌激素可能会促进 MCP-1 的表达^[13]。本研究中,高脂喂养后各组兔血清 MCP-1 浓度均增高,尤以去卵巢组增高明显,早期 ERT 则可以显著降低其血清 MCP-1 浓度。提示早期 ERT 可能具有一定的抗炎作用。本研究还观察到,大剂量 ERT 组 MCP-1 降低更为明显,这与 Pervin 等^[11]的研究结果一致,提示雌激素的抗炎作用可能存在一定的剂量依赖性。

雌激素降低 MCP-1 的机制尚不十分明确。一方面,氧化应激通过增加核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的活性上调 MCP-1,而雌激素可促进血管壁中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 生成,高浓度 NO 反馈抑制核因子 κ B 活性^[14],因此雌激素可能通过增加 NO 含量间接抑制血管内皮细胞 MCP-1 表达;另一方面,雌激素可抑制成纤维细胞、平滑肌细胞生长和胶原合成,并通过雌激素受体影响 MCP-1 分泌及抑制 MCP-1 介导的单核细胞迁移^[15,16]。白细胞介素 6 可通过上调核因子 κ B 活性来增加 MCP-1 表达,有研究^[17]显示,绝经期或手术切除双侧卵巢的妇女行 ERT 后可以降低循环中多种炎症因子、粘附分子的水平,进而影响 MCP-1 的表达,发挥抗 As 作用。研究^[18]还发现,雌激素可以上调转化生长因子 β 1 的水平,后者直接抑制 MCP-1 表达。可见,雌激素抑制 MCP-1 的机制可能是多方面的。

目前 ERT 主要用于治疗围绝经期综合症、预防骨质疏松,长期使用 ERT 有可能引起一些副作用,如肝功能损害、静脉栓塞和乳腺癌、子宫内膜癌的危险性增加。因此国内外正在研究不同剂量和给药途径 ERT 治疗以及有关植物性雌激素^[19,20]的作用机制,以减少或避免相应不良反应的发生。

本研究相关分析发现,主动脉斑块面积与血清 MCP-1 水平呈明显正相关,支持早期 ERT 的抗 As 作用可能也与其抗炎作用有关。研究中 ERT 治疗组

的主动脉斑块面积不但小于单纯去卵巢组,而且还小于假手术组,这是否与 ERT 治疗组的雌激素水平较高、抗炎作用较强有关,仍有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126.
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (9): 1135-143.
- [3] Harrington JR. The role of MCP-1 in atherosclerosis [J]. *Stem Cells*, 2000, **18** (1): 65-66.
- [4] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women [J]. *N Engl J Med*, 2000, **342** (12): 836-843.
- [5] Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM. Effect of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins [J]. *N Engl J Med*, 1991, **325** (17): 1196-204.
- [6] 张辰, 吴宜勇, 段金虹, 陆媛, 张仪华, 程锦轩, 等. 雌激素对去势兔血脂、内皮素及动脉粥样硬化形成的影响 [J]. *中华妇产科杂志*, 2000, **35** (7): 413-416.
- [7] 刘彤, 沈潞华. 雌激素抑制去卵巢家兔实验性动脉粥样硬化的形成 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (4): 321-324.
- [8] Hanke H, Hanke S, Finking G, Muhic-Lohrer A, Muck AO, Schmahl FW, et al. Different effects of estrogen and progesterone on experimental atherosclerosis in female versus male rabbits: Quantification of cellular proliferation by bromodeoxyuridine [J]. *Circulation*, 1996, **94** (2): 175-181.
- [9] Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women [J]. *JAMA*, 1991, **265** (14): 1861-867.
- [10] Seli E, Pehlivan T, Selam B, Garcia-Velasco JA, Arici A. Estradiol down regulates MCP-1 expression in human coronary artery endothelial cells [J]. *Fertil Steril*, 2002, **77** (3): 542-547.
- [11] Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Navab M, Chaudhuri G, Nathan L. Estradiol suppresses MCP-1 expression in vivo: implications for atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (10): 1575-582.
- [12] Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, et al. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries [J]. *Circulation*, 2004, **110** (12): 1664-669.
- [13] Bengtsson AK, Ryan EJ, Giordano D, Magaletti DM, Clark EA. 17 beta-estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte derived dendritic cells [J]. *Blood*, 2004, **104** (5): 1404-410.
- [14] Hayashi T, Jayachandran M, Sumi D, Thakur NK, Esaki T, Muto E, et al. Physiological concentration of 17 beta-estradiol retards the progression of severe atherosclerosis induced by a high-cholesterol diet plus balloon catheter injury: role of NO [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (6): 1613-621.
- [15] Seli E, Selam B, Mor G, Kayisli UA, Pehlivan T, Arici A. Estradiol regulates monocyte chemotactic protein 1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect [J]. *Menopause*, 2001, **8** (4): 296-301.
- [16] Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2003, **36** (9): 1143-158.
- [17] Stork S, von Schacky C, Angerer P. The effect of 17 beta-estradiol on endothelial and inflammatory markers in postmenopausal women: a randomized, controlled trial [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **165** (2): 301-307.
- [18] Kitamura M. Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein 1 as TGF-beta 1 [J]. *J Immunol*, 1997, **159** (3): 1404-411.
- [19] 戴顺龄, 段金虹, 陆媛, 张仪华, 程锦轩, 赵小元, 等. 新的植物雌激素 α 玉米赤霉醇明显抑制实验性动脉粥样硬化发病进程 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 385-390.
- [20] 戴顺龄, 段金虹, 陆媛, 徐海珊, 程锦轩, 邓文慧, 等. α 玉米赤霉醇——一个值得重视的新的植物雌激素 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (5): 670-672.

(此文编辑 许雪梅)