

[文章编号] 1007-3949(2007)15-11-0805-0

• 实验研究 •

睾酮及氟他胺对雄兔动脉粥样硬化斑块 稳定性与血清炎症因子的调节

李世军, 李小鹰, 李燕

(中国人民解放军总医院 南楼心血管一科, 北京市 100853)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化; 斑块; 稳定性; 睾酮; 氟他胺; 炎症因子

[摘要] 目的 探讨睾酮和氟他胺对动脉粥样硬化斑块稳定性与血清炎症因子的调节作用。方法 主动脉病理切片行 HE 染色和 Masson 氏三色染色。血浆睾酮采用 Advia Centaur 免疫检测系统测定, 血清肿瘤坏死因子和白细胞介素 6 采用放射免疫测定, 血清可溶性细胞间粘附分子 1 和基质金属蛋白酶 2 应用酶联免疫吸附测定法检测。结果 雄兔去睾丸后血浆睾酮水平显著降低, 补充十一酸睾酮(每 2 周 6 mg/kg) 使血浆睾酮恢复到正常水平, 而且十一酸睾酮这一作用不受雄激素受体拮抗剂氟他胺的影响。去睾丸雄兔补充十一酸睾酮显著减小动脉粥样硬化斑块的面积和内膜厚度, 并使斑块纤维帽增厚、胶原含量增加。然而, 同时补充雄激素受体拮抗剂氟他胺使去睾丸雄兔动脉粥样硬化斑块的面积和内膜厚度增加, 并使斑块纤维帽厚度减低、胶原含量下降。与假手术高脂喂养雄兔比较, 去睾丸雄兔血清肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、可溶性细胞间粘附分子 1 和基质金属蛋白酶 2 显著升高; 去睾丸雄兔补充十一酸睾酮后, 血清肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、可溶性细胞间粘附分子 1 和基质金属蛋白酶 2 较单纯去睾丸雄兔明显降低; 去睾丸雄兔同时补充氟他胺与十一酸睾酮, 血清肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、可溶性细胞间粘附分子 1 和基质金属蛋白酶 2 水平再次显著升高。结论 睾酮与氟他胺可以调节雄兔动脉粥样硬化斑块进展与斑块的稳定性, 并影响其血清炎症因子水平。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Regulation of Atherosclerotic Plaque Stability and Inflammatory Reaction by Testosterone and Flutamide in Male Rabbits

LI Shi-Jun, LI Xiao-Ying, and LI Yan

(Division of Geriatric Cardiology, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Plaque; Stability; Testosterone; Flutamide; Inflammatory Factors

[ABSTRACT] **Aim** To determine the influence of testosterone and flutamide on atherosclerotic plaque stability and inflammatory reaction. **Methods** Pathological sections of aorta were performed with hematoxylin eosin staining and Masson's trichrome staining. Total plasma testosterone was measured using Advia Centaur immunoassay system. The contents of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) were assayed using radioimmunoassay kit. The concentrations of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) were assayed using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the procedure described by the manufacturer. **Results** Testosterone undecanoate replacement reduced the plaque area and the aortic intimal thickness, and increased the fibrous cap thickness and collagen contents in castrated rabbits. However, presence of flutamide increased the plaque area and the aortic intimal thickness, and decreased the fibrous cap thickness and collagen contents in castrated rabbits again. Levels of serum TNF- α , IL-6, sICAM and MMP-2 increased in cholesterol-rich diet rabbits compared with standard diet rabbits. Castration caused an increase in levels of serum TNF- α , IL-6, sICAM and MMP-2 in castrated rabbits compared with sham operated rabbits. Treatment of testosterone undecanoate reduced the levels of serum TNF- α , IL-6, sICAM and MMP-2 in castrated rabbits. However, presence of flutamide increased the levels of serum TNF- α , IL-6, sICAM and MMP-2 again. **Conclusion** Testosterone at physiological dose and flutamide can influence atherosclerotic plaque growth and stability and the levels of inflammatory factors.

老年男性随着年龄的增加睾酮水平下降。与同龄健康男性比较, 男性冠心病患者的生物有效性

睾酮较低^[1]。血睾酮水平降低与主动脉或颈动脉粥样硬化危险性增加有关^[2]。睾酮替代治疗可明显抑制去睾丸雄性动物动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的进展^[3]。然而, 雄激素在 As 斑块稳定性中的作用尚不清楚, 其作用机制尚待进一步阐释。老年男性处于促炎症反应状态, 其血清白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α ,

[收稿日期] 2007-04-09 [修回日期] 2007-10-22

[基金项目] 全军“十一五”联合科技攻关项目(01MA301); 中国博士后科学基金(20060400477)

[作者简介] 李世军, 博士后, 主治医师, 研究方向为高血压、动脉粥样硬化与血栓性疾病, E-mail 为 lishijun817@126.com。通讯作者李小鹰, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心力衰竭与冠心病。

TNF- α)和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 明显升高^[4]。Norata 等^[5]报告二氢睾酮抑制 TNF- α 、脂多糖诱导人血管内皮细胞的炎症反应。而慢性炎症在 As 发生、发展以及斑块稳定性中发挥重要作用。本文拟探讨睾酮及雄激素受体拮抗剂氟他胺对 As 进展和斑块的稳定性以及血清炎症因子的调节。

1 材料与方法

1.1 试剂

十一酸睾酮(testosterone undecanoate, TU)购自浙江仙琚制药厂;氟他胺(flutamide, Flut)购自上海复华药业公司;TNF- α 、IL-6 放射免疫试剂盒购自中国人民解放军总医院放射免疫研究所;可溶性细胞间粘附分子 1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)和基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自 RapidBio 公司(加利福尼亚,美国)。

1.2 动物

30 只成熟雄性新西兰白兔(2~2.5 kg)购自本院医学动物实验中心,饲养条件为光照时间 12 h/d、相对湿度 55% \pm 5%、室温 20 \pm 2 $^{\circ}$ C。

1.3 动物模型制备与药物治疗

实验动物以标准兔饲料喂养、自由饮水 2 周。随机分为 5 组(每组 6 只),并随机进行假手术(切开阴囊皮肤后缝合)或行双侧睾丸切除术(20%乌拉坦 5 mL/kg 腹腔麻醉)。手术 7 天后行以下处理:假手术+标准饲料组:行假手术,予标准饲料喂养;④假手术+高脂饲料组(cholesterol-rich diet, CRD):行假手术,予高脂饲料(标准饲料中加入 1%胆固醇粉、7.5%蛋黄粉和 2%猪油)喂养;④去睾丸+高脂饲料+安慰剂组:行双侧睾丸切除术,予高脂饲料喂养,肌注生理盐水;去睾丸+高脂饲料+睾酮组:去睾丸,高脂饲料,肌注 TU(每 2 周 6 mg/kg)^[6];去睾丸+高脂饲料+睾酮+氟他胺组:行双侧睾丸切除术,予高脂饲料喂养,肌注 TU(每 2 周 6 mg/kg),口服氟他胺[28.75 mg/(kg \cdot d)]。持续 12 周后,在 20%乌拉坦(5 mL/kg)腹腔麻醉下行右心室采血,离心分离血浆,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。解剖分离主动脉(自主动脉根部到腹主动脉分叉),剥离血管外周脂肪,置于 10% 甲醛中保存待测。

1.4 组织病理学检查

取主动脉弓、胸主动脉和腹主动脉中段,常规石蜡包埋切片,分别制成 4 μ m 厚的病理切片,连续两张切片分别行 HE 染色及 Masson 氏三色染色。应

用计算机图像分析系统(Image-Pro Plus Version 5.0.1)进行图像分析,测量主动脉内膜厚度、斑块面积、血管横截面积、胶原面积和最小纤维帽厚度,计算校正斑块面积(斑块面积/血管横截面积)、校正胶原面积(胶原面积/血管横截面积),每个样本取 3 张切片的平均值。

1.5 血清肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、可溶性细胞间粘附分子 1 和基质金属蛋白酶 2 的测定

血清 TNF- α 和 IL-6 根据放射免疫试剂盒推荐步骤,于中国人民解放军总医院放射免疫研究所测定完成。血清 sICAM-1 和 MMP-2 应用 ELISA 试剂盒推荐步骤,于中国人民解放军总医院内分泌实验室测定完成。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One way ANOVA)及 q 检验。

2 结果

2.1 血浆睾酮水平变化

高脂喂养雄兔较标准饲料喂养雄兔血浆睾酮水平显著升高($P < 0.05$)。与假手术+高脂饲料组比较,去睾丸+高脂饲料+安慰剂组雄兔血浆睾酮水平显著降低($P < 0.05$),补充十一酸睾酮使血浆睾酮水平恢复到假手术+高脂饲料组水平,而且十一酸睾酮这一作用不受雄激素受体拮抗剂氟他胺的影响($P > 0.05$,表 1)。

表 1. 各组间血浆睾酮水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	睾酮 (nmol/L)
假手术+标准饲料组	13.55 \pm 4.84
假手术+高脂饲料组	20.81 \pm 3.37 ^a
去睾丸+高脂饲料+安慰剂组	1.56 \pm 0.50 ^{ab}
去睾丸+高脂饲料+睾酮组	18.74 \pm 6.15 ^a
去睾丸+高脂饲料+睾酮+氟他胺组	19.13 \pm 5.45 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与假手术+标准饲料组比较; b 为 $P < 0.05$, 与假手术+高脂饲料组比较。

2.2 睾酮及氟他胺对去睾丸雄兔主动脉粥样硬化斑块进展与稳定性的调节

HE 染色见高脂喂养雄兔主动脉内膜形成局限性或环行弥漫性粥样斑块。与假手术+高脂饲料组比较,去睾丸+高脂饲料+安慰剂组的粥样斑块面积、主动脉内膜厚度显著增加,纤维帽厚度减低($P < 0.05$);而去睾丸+高脂饲料+睾酮组比去睾丸+

高脂饲料+ 安慰剂组斑块面积、主动脉内膜厚度减低, 纤维帽厚度增加, 且与假手术+ 高脂饲料组无明显差异 ($P > 0.05$); 但是去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮+ 氟他胺组比去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮组斑块面积、主动脉内膜厚度增加, 纤维帽厚度减低 ($P < 0.05$, 表 2 及图 1)。Masson 氏染色见去睾丸+ 高脂

饲料+ 安慰剂组与去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮+ 氟他胺组主动脉斑块内有大量胆固醇结晶和泡沫细胞, 胶原 (呈蓝绿色) 含量较少; 而假手术+ 高脂饲料组与去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮组主动脉斑块内泡沫细胞较少, 纤维帽较厚, 胶原含量较多 (表 2 和图 2)。

表 2. 高脂饲料喂养雄兔主动脉斑块面积、纤维帽厚度、胶原含量与内膜厚度变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	校正斑块面积	内膜厚度 (μm)	纤维帽厚度 (μm)	校正胶原面积
假手术+ 高脂饲料组	16.02% \pm 0.14%	44.8 \pm 19.98	21.28 \pm 5.18	51.97% \pm 0.07%
去睾丸+ 高脂饲料+ 安慰剂组	42.82% \pm 0.22% ^a	78.55 \pm 21.59 ^a	14.14 \pm 5.67 ^a	35.34% \pm 0.04% ^a
去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮组	17.22% \pm 0.14% ^b	43.25 \pm 7.14 ^b	24.76 \pm 12.41 ^b	47.73% \pm 0.03% ^b
去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮+ 氟他胺组	37.44% \pm 0.25% ^a	81.78 \pm 39.24 ^a	15.75 \pm 7.2 ^a	38.37% \pm 0.1% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与假手术+ 高脂饲料组比较; b 为 $P < 0.05$, 与去睾丸+ 高脂饲料+ 安慰剂组比较。

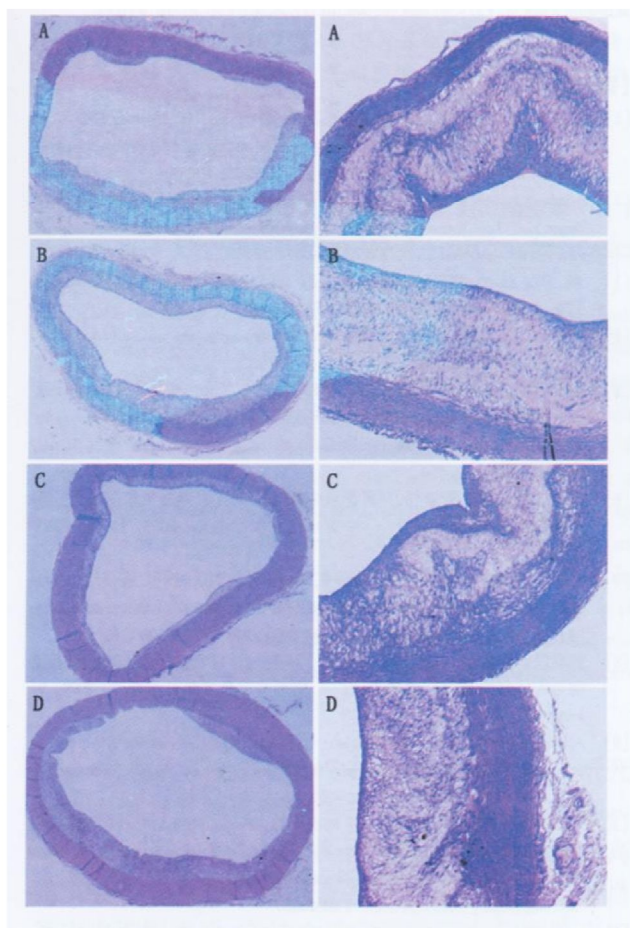


图 1. 高脂饲料喂养雄兔动脉粥样硬化斑块面积 (左, $\times 40$) 及纤维帽厚度 (右, $\times 100$) 的变化 A 为假手术组, B 为去睾丸+ 安慰剂组, C 为去睾丸+ 睾酮组, D 为去睾丸+ 睾酮+ 氟他胺组。

2.3 血清肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、可溶性细胞间粘分子 1 和基质金属蛋白酶 2 的变化

与假手术+ 高脂喂养雄兔比较, 去睾丸雄兔血

清 TNF- α 、IL-6、sICAM-1 和 MMP-2 显著升高; 去睾丸雄兔补充十一酸睾酮后, 血清 TNF- α 、IL-6、sICAM-1 和 MMP-2 水平较单纯去睾丸雄兔明显降低; 去睾丸雄兔同时补充氟他胺与十一酸睾酮后, 血清 TNF- α 、IL-6、sICAM-1 和 MMP-2 水平再次显著升高 (表 3)。

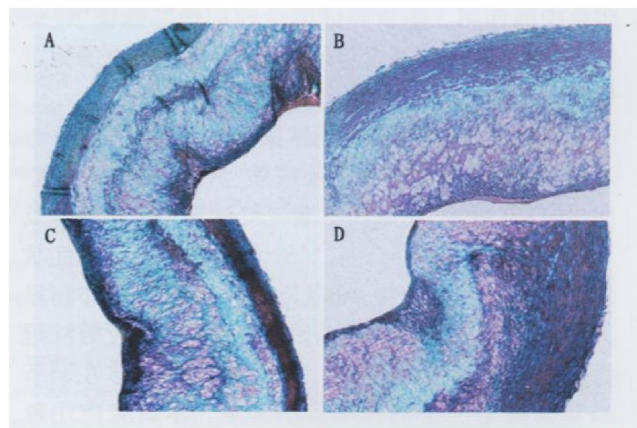


图 2. 高脂饲料喂养雄兔动脉粥样硬化斑块内胶原含量的变化 ($\times 100$) A 为假手术组, B 为去睾丸+ 安慰剂组, C 为去睾丸+ 睾酮组, D 为去睾丸+ 睾酮+ 氟他胺组。

3 讨论

以往研究^[6]表明去睾丸雄兔补充十一酸睾酮 (每 2 周 6 mg/kg) 可使血浆睾酮水平升至假手术雄兔相似的水平。本研究也证明去睾丸雄兔补充十一酸睾酮后, 其血浆睾酮浓度与假手术组差异无显著性; 而高脂喂养雄兔血浆睾酮水平显著升高, 这可能是由于胆固醇是雄激素在体内合成的原料, 其中睾酮在睾丸间质细胞合成, 在高脂喂养时睾酮合成增加。以往研究^[7]表明氟他胺 [10 mg/kg 或 50 mg/

表 3. 各组雄兔间血浆肿瘤坏死因子、白细胞介素 6、可溶性细胞间粘附分子 1 和基质金属蛋白酶 2 的水平

分 组	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	IL-6 (ng/L)	sICAM ($\mu\text{g/L}$)	MMP-2 ($\mu\text{g/L}$)
假手术+ 标准饲料组	0.77 \pm 0.06	59.97 \pm 17.66	86.10 \pm 0.09	36.66 \pm 7.18
假手术+ 高脂饲料组	4.45 \pm 0.21 ^a	182.58 \pm 33.92 ^a	186.96 \pm 0.12 ^a	56.32 \pm 7.77 ^a
去睾丸+ 高脂饲料+ 安慰剂组	5.66 \pm 0.55 ^{ab}	289.25 \pm 37.08 ^{ab}	297.66 \pm 0.22 ^{ab}	84.30 \pm 15.55 ^{ab}
去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮组	3.73 \pm 0.32 ^a	186.84 \pm 17.71 ^a	220.58 \pm 0.17 ^a	55.75 \pm 8.92 ^a
去睾丸+ 高脂饲料+ 睾酮+ 氟他胺组	5.91 \pm 1.16 ^{ab}	416.91 \pm 50.19 ^{ab}	314.88 \pm 0.22 ^{ab}	76.17 \pm 23.46 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与假手术+ 标准饲料组比较; b 为 $P < 0.05$, 与假手术+ 高脂饲料组比较。

($\text{kg}\cdot\text{d}$) 足以阻断成年雄性大鼠或仓鼠的雄激素受体。根据公式: $D_b = D_a \times (K_b/K_a) \times (W_a/W_b) 1/3^{[8]}$, 本研究使用 28.75 mg/($\text{kg}\cdot\text{d}$) 氟他胺足以阻断成年雄兔的雄激素受体。

男性血浆睾酮水平降低与主动脉或颈动脉粥样硬化密切相关。睾酮替代治疗可明显抑制去睾丸雄性动物 As 的进展。本研究表明生理剂量雄激素治疗可以减缓 As 的进展。斑块的易损性与纤维帽变薄、胶原含量减低有关。Alexandersen 等^[9] 研究证明去睾丸雄兔补充生理剂量雄激素具有抗 As 的作用, 然而该研究没有探讨生理剂量雄激素在 As 斑块稳定性中的作用。本研究证明生理剂量睾酮使 As 斑块纤维帽增厚、胶原含量增加, 进而增加斑块的稳定性。

雄激素受体属于核受体家族的一员, 广泛分布于各种组织中, 包括肾上腺皮质、肝脏、成年人的心房、心肌纤维、动脉内皮细胞及血管平滑肌细胞及人外周血白细胞。Liu 等^[10] 研究发现在无自觉症状的男性冠心病患者中, 雄激素受体表达与冠心病显著负相关。雄激素受体基因 CAG 多态性与男性冠心病严重性密切相关^[11]。但是, 雄激素受体在调节 As 斑块稳定性中的作用尚不清楚。本研究应用氟他胺拮抗雄激素受体, 结果发现高脂喂养雄兔 As 斑块的面积增加、纤维帽变薄、胶原含量降低, 使粥样斑块趋于不稳定。慢性炎症在 As 发生、发展以及斑块稳定性中发挥着重要作用。老年男性处于促炎症状态, 其炎症因子如 IL-6、TNF- α 与 IL-1 β 水平升高, 同时老年男性血清睾酮又处于低水平状态。体外研究表明二氢睾酮抑制 TNF- α 、脂多糖诱导人血管内皮细胞的炎症反应; 睾酮抑制 TNF- α 诱导的人主动脉内皮细胞血管细胞粘附分子的表达^[12]。在体内研究中, 雄激素对炎症反应的影响还不清楚。本研究发现去睾丸雄兔血清 TNF- α 、IL-6、sICAM-1 和 MMP-2 水平显著升高, 但是去睾丸雄兔补充十一酸睾酮后, 血清 TNF- α 、IL-6、sICAM-1 和 MMP-2 水平较

单纯去睾丸雄兔明显降低, 去睾丸雄兔同时补充氟他胺与十一酸睾酮后, 血清 TNF- α 、IL-6、sICAM-1 和 MMP-2 水平再次显著升高。这一资料说明雄激素以及氟他胺在调节 As 雄兔炎症反应中具有重要作用。

综上所述, 睾酮与氟他胺可以调节雄兔 As 斑块进展与稳定性, 并影响其血清炎症因子水平。

[参考文献]

- [1] English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS. Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms [J]. *Eur Heart J*, 2000, **21**: 890-894.
- [2] Svarthberg J, von Muhlen D, Mathiesen E, Joakimsen O, Bonna KH, Stensland Bugge E. Low testosterone levels are associated with carotid atherosclerosis in men [J]. *J Intern Med*, 2006, **259** (6): 576-582.
- [3] Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease [J]. *Endocr Rev*, 2003, **24**: 313-340.
- [4] Wu FC, von Eckardstein A. Androgen and coronary artery disease [J]. *Endocr Rev*, 2003, **24**: 183-217.
- [5] Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, Poletti A, Catapano AL. Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cell [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, **91** (2): 546-554.
- [6] 武强, 李小鹰, 胥学伟. 外源性睾酮对去睾丸家兔性激素以及血脂和载脂蛋白水平的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2003, **19** (3): 295-297.
- [7] Kishi H, Itoh M, Wada S, Yukinari Y, Tanaka Y, Nagamine N, et al. Inhibin is an important factor in the regulation of FSH secretion in the adult male hamster [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, **278** (4): E744-751.
- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 郑青山, 孙瑞元. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, **9**: 1 069-072.
- [9] Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits [J]. *Circ Res*, 1999, **84** (7): 813-819.
- [10] Liu PY, Christian RC, Ruan M, Miller VM, Fitzpatrick LA. Correlating androgen and estrogen steroid receptor expression with coronary calcification and atherosclerosis in men without known coronary artery disease [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, **90** (2): 1 041-046.
- [11] Alevizaki M, Cimponeriu AT, Garofallaki M, Sarika HL, Alevizaki CC, Pampichael C, et al. The androgen receptor gene CAG polymorphism is associated with the severity of coronary artery disease in men [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, **59** (6): 749-755.
- [12] Corrales JJ, Almeida M, Burgo R, Mories MT, Miralles JM, Orfao A. Androgen replacement therapy depresses the ex vivo production of inflammatory cytokines by circulating antigen-presenting cells in aging type 2 diabetic men with partial androgen deficiency [J]. *J Endocrinol*, 2006, **189** (3): 595-604.

(此文编辑 许雪梅)