

• 基础研究 •

外源性睾酮对高脂饮食去势雄兔冠状小动脉的影响

卢文宁 朱平 王蓉 武强 陈雯 李小鹰 江涛

【摘要】 目的 了解外源性睾酮对高脂饮食去势雄兔冠状小动脉的影响。方法 雄性新西兰白兔 35 只随机分成对照组、单纯去势组、低睾酮血症补充组、生理睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组共 5 组,除对照组外其余各组行去势手术,术后对后 3 组肌注十一酸睾酮(TU),剂量分别是 3,6,12mg/kg,形成低睾酮血症、生理水平睾酮血症、高睾酮血症,测定血清雌二醇(E₂)、睾酮(T)水平和 E₂/T 比值的变化,动物于第 12 周末处死,心肌切片染色,测定肌间小动脉硬化发生率、内膜增厚发生率、计算内膜面积占有率(RIA)、内膜/中膜比值。结果 肌间小动脉粥样硬化发生率、肌间小动脉内膜增厚率、RIA、内膜/中膜:对照组与生理睾酮血症补充组相当且均明显低于单纯去势组、低睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组($P < 0.05$)。结论 补充生理水平的外源性睾酮能降低高脂饮食去势雄兔的冠状小动脉粥样硬化发生率、肌间小动脉内膜增厚率、RIA,改善内膜/中膜比值,从而改善动脉粥样硬化。

【关键词】 睾酮;冠状小动脉;去势雄兔

Effects of exogenous testosterone on small coronary arteries in castrated cholesterol-fed rabbits

LU Wenning, ZHU Ping, WANG Rong, et al.

1. The Forth Department of Nanlou, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To study the effect of intravenous testosterone on the small coronary arteries in castrated cholesterol-fed rabbits. Methods Thirty-five male New Zealand white rabbits were randomly allocated to 5 groups: (1) control group, (2) castrated group, (3) small dosage (3mg/kg) intravenous testosterone and castrated group, (4) physiological dosage (6mg/kg) intravenous testosterone and castrated group, (5) large dosage (12mg/kg) intravenous testosterone and castrated group. All animals were fed with high cholesterol diet. At the end of the 12th week, the serum levels of testosterone (T), estrogen (E₂), estrogen/ testosterone (E₂/T) ratio were measured, and all rabbits were sacrificed by air embolism. Hearts were removed and kept in 10% formalin for a week. The ventricles were obtained for determination of the degree of arteriosclerosis by computer image analysis system. The incidences of atherogenesis and intimal thickening and the ratio of the intimal area to total area (intimal area plus intraluminal area) and intimal/medial ratio were determined. Results The incidences of atherogenesis and intimal thickening and the ratio of the intimal area to total area (intimal area plus intraluminal area) and intimal/medial ratio were markedly more serious in groups 2,3,5 than those in groups 1 and 4 ($P < 0.05$). Conclusions Intravenous testosterone at physiological dosage (6mg/kg) has beneficial effect on vascular endothelium and can decrease the incidences of atherogenesis and intimal thickening and the ratio of the intimal area to total area and intimal/medial ratio, thus benefiting the prevention of coronary atherosclerosis.

【Key words】 testosterone; coronary atherosclerosis; castrated rabbit

收稿日期:2006-01-09

基金项目:解放军总医院“十五”医学科研基金课题(001YQ02)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院南四科(卢文宁、王蓉、陈雯),南六科(朱平、武强、李小鹰);100850 北京市,军事医学科学院放射病理学研究室(江涛)

作者简介:卢文宁,女,1975年7月生,北京市人,医学硕士,主治医师

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的患者以及存在危险因素的男性,睾酮水平明显降低^[1],提示男性睾酮水平下降可能是AS发生的预示因素之一。有研究发现心脏小动脉可发生AS病变^[2~4]。现今的研究显示,雄激素对AS的影响因动物种类、雄激素种类甚至给药途径等因素不同而结果各异^[5~7],其中尚未有人从冠状小动脉角度研究不同血清睾酮水平对AS的影响。我们对高脂饮食去势雄兔给予不同剂量的外源性睾酮血清,形成低睾酮血症补充组、生理睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组,针对管径在100~199 μm 受累最明显^[8,9]冠状动脉进行病理切片观察,计算了肌间小动脉AS发生率、肌间小动脉内膜增厚率、内膜面积占有率(ratio of internal area to total area, RIA)、内膜/中膜的比值,试图从冠状小动脉角度来探讨不同剂量外源性睾酮在去势雄兔早期AS形成中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组 健康成熟(8~12周)的雄性新西兰白兔35只(解放军总医院动物实验中心提供),预处理2周后随机分成对照组(假手术组不切除睾丸, A组)、单纯去势组(手术切除睾丸, B组)、低睾酮血症补充组(手术切除睾丸后补充雄性激素, 3mg/kg, C组)、生理睾酮血症补充组(手术切除睾丸后补充雄性激素, 6mg/kg, D组)和高睾酮血症补充组(手术切除睾丸后补充雄性激素, 12mg/kg, E组)5组, 每组7只。根据预试验资料, 低睾酮血症补充组、生理睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组去势术后第5周开始分别肌注十一酸睾酮(testosterone undecanoate, TU) 3, 6, 12mg/kg, 假手术对照组肌注生理盐水, 每2周1次, 至术后第8周, 共注射4次。TU注射液由浙江仙居制药厂生产, 批号:(90)卫药准字X-144号。所有动物均以1%胆固醇饲料喂养, 每天100g, 自由饮水。

1.2 样本收集和处理 (1)性激素水平测试: 去势前, 去势后第4周及肌注TU后第8周, 上午8:00采集血标本, 测量血清总睾酮(total testosterone, TT)、雌二醇(estradiol, E₂)。性激素检测试剂: 美国DPC公司产品, 由解放军总医院内分泌实验室应用IMMULITE自动生化仪器检测。(2)血脂水平测试: 去势前及去势后TU补充8周, 上午8:00采集血标本, 测量血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipopro-

tein cholesterol, HDL-C), 低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 甘油三酯(triglycerides, TG), 载脂蛋白A1(apolipoprotein A1, ApoA1), 载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)。由解放军总医院生化科自动生化仪检测。(3)冠状动脉标本获得: 动物于实验第12周末气栓法处死, 立即取出心脏, 应用10%中性甲醛固定1周, 平心心脏室乳头肌水平横断心室, 石蜡包埋, 切取厚度5 μm 的切片, 分别行HE、ET+VG染色。

1.3 冠状小动脉粥样硬化程度的评价 在10 \times 40高倍视野对所确定图像送入CMINS-II显微微机图像分析仪, 进行扫描, 并自动记录、显示数据。HE染色切片在10 \times 40高倍视野下, 动脉内膜中出现明显的泡沫细胞(细胞体积较大, 胞浆内含有无数微小空泡, 使细胞呈泡沫状, 故称其为泡沫细胞)为硬化(图1), 未见泡沫细胞但是内皮下部分区域有明显的脂质样物质侵入并增厚为内膜增厚。每张片子选取10个视野, 电脑测量血管管径100~199 μm 肌间小动脉血管总数、硬化血管数、内膜增厚血管数, 计算小动脉硬化发生率、内膜增厚发生率。测定横断面肌间小动脉截面的管腔面积、内膜和管腔的总面积, 按公式计算RIA。RIA=内膜面积/(内膜+管腔)横切面积 \times 100%。石蜡切片以ET+VG染色, 10 \times 40倍光镜联机摄像, 选取内膜(管腔缘至内弹力板内缘)最厚处为基点, 将环状管壁等距分为3点(含基点), 测3点的内膜、中膜(内弹力板内缘至外缘)厚度, 分别计算内膜/中膜比值, 取平均值, 每张片子取10根血管, 取平均值。

1.4 数据分析 性激素数据, 内膜/中膜用均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用F检验方法进行统计, 硬化率、内膜增厚率、RIA采用Person卡方检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 雄兔去势及补充不同剂量TU对血清性激素水平的影响 去势前各剂量组血清性激素(T, E₂)及E₂/T未见明显不同, 血清T水平在去势后明显下降, 均明显低于对照组($P < 0.05$), 3mg/kg TU补充后轻度升高, 仍明显低于对照组($P < 0.05$), 形成低睾酮血症, 6mg/kg TU补充后与对照组相比无显著差异($P > 0.05$), 接近生理水平, 12mg/kg TU补充后明显升高($P < 0.05$), 形成高睾酮血症。血清E₂水平对照组和生理水平组相近并最低($P > 0.05$), 单纯去势组

和低睾酮血症组相近,高睾酮血症组最高, E_2/T 在对照组和生理水平组相近并最小,单纯去势组最大,低睾酮血症组大于高睾酮血症组(表1)。

2.2 去势和补充 TU 对雄兔血脂水平的影响 与对照组相比,单纯去势组,低睾酮血症和高睾酮血症组,血清 TC、LDL-C、TG、ApoB 显著升高($P < 0.05$)。HDL-C、ApoA1 无明显变化($P > 0.05$)。LDL-C/HDL-C 和 ApoB/ApoA1 明显升高($P < 0.05$);生理水平组血清 TC、LDL-C、TG、ApoB、

ApoA1、LDL-C/HDL-C 和 ApoB/ApoA1 均接近对照组($P > 0.05$;表2)。

2.3 血清睾酮不同水平对冠状循环肌间小动脉的影响 组织学形态观察:HE 染色光镜可见单纯去势组、低睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组动脉内膜明显增厚,其中有大量排列无序的泡沫细胞、平滑肌细胞,中膜弹力纤维断裂,形成典型 AS 病变。生理睾酮血症补充组与对照组相同,内膜病变程度明显减轻,未发现泡沫细胞(图1)。

表1 雄兔去势及补充不同剂量 TU 对血清性激素水平的影响 ($x \pm s, n=7$)

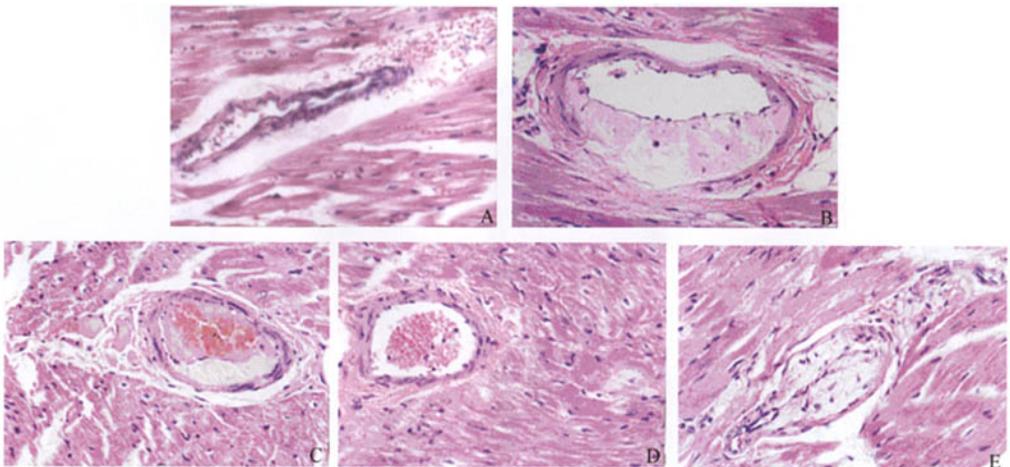
组别	T (nmol/L)			E_2 (pmol/L)			E_2/T		
	去势前	去势后	补充后	去势前	去势后	补充后	去势前	去势后	补充后
A组	14.9±3.7	13.9±4.6	13.8±3.9	139.2±21.6	140.6±27.2	138.6±18.3	20.3±5.1	22.3±6.2	20.8±4.3
B组	14.3±3.6	0.7±0.1*		138.7±20.4	180.9±22.7*		121.1±4.3	257.2±50.4*	
C组	14.1±3.7	0.7±0.1*	4.0±2.1#	139.4±21.6	183.9±23.9*	166.4±43.2#	20.2±5.3	258.2±51.4*	89.9±10.6#
D组	13.1±3.8	0.7±0.1*	11.2±5.1 [△]	144.7±48.4	195.2±119.0*	150.6±46.2 [△]	23.8±6.1	281.5±71.6*	23.1±3.7 [△]
E组	15.0±8.7	0.7±0.1*	29.0±5.4#	140.5±23.3	194.5±93.7*	229.6±52.0#	19.1±5.8	274.4±37.0*	30.8±5.3#

注:A:对照组;B:单纯去势组;C:低睾酮血症补充组;D:生理睾酮血症补充组;E:高睾酮血症补充组
与去势后 A 组比较,* $P < 0.05$,与补充后 A 组比较,# $P < 0.05$;[△] $P > 0.05$

表2 去势和补充 TU 对雄兔血脂水平的影响 ($x \pm s, n=7$)

组别	TC(nmol/L)	LDL-C(nmol/L)	HDL-C(nmol/L)	TG(nmol/L)	LDL-C/HDL-C	ApoB(g/L)	ApoA1(g/L)	ApoB/ApoA1
A组	1.15±0.18	0.25±0.12	0.47±0.13	0.76±0.17	0.53±0.25	0.10±0.08	0.23±0.03	0.43±0.11
B组	1.75±0.32*	0.46±0.15*	0.50±0.15	0.88±0.24*	0.92±0.57*	0.16±0.04*	0.23±0.06*	0.69±0.28*
C组	1.64±0.38*	0.41±0.12*	0.47±0.13	0.87±0.57*	0.96±0.18*	0.17±0.08*	0.24±0.03*	0.71±0.09*
D组	1.16±0.45#	0.27±0.17#	0.49±0.15	0.78±0.30#	0.55±0.11#	0.10±0.07#	0.22±0.07#	0.46±0.13#
E组	1.70±0.41*	0.43±0.21*	0.50±0.13	0.86±0.36*	0.90±0.43*	0.16±0.06*	0.23±0.03*	0.69±0.12*

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 A 组比较,# $P > 0.05$



A:对照组;B:单纯去势组;C:低睾酮血症补充组;D:生理睾酮血症补充组;E:高睾酮血症补充组

图1 不同水平血清睾酮对冠状循环肌间小动脉影响的病理改变(HE染色,光镜3.3×40)

肌间小动脉 AS 发生率、肌间小动脉内膜增厚率、RIA、内膜/中膜:对照组与生理睾酮血症补充组相当且均明显低于单纯去势组、低睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组($P < 0.05$),见表 3、4。

表 3 肌间小动脉粥样硬化发生率、内膜增厚率比较

组别	硬化率(%)	内膜增厚率(%)
A 组	26.7	28
B 组	48*	51*
C 组	35*	33*
D 组	25#	30#
E 组	40*	45*

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;# $P > 0.05$

表 4 肌间小动脉内膜面积占有率、
内膜/中膜比值比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	内膜面积占有率(%)	内膜/中膜
A 组	6.74 \pm 1.32	0.08 \pm 0.03
B 组	23.22 \pm 2.31*	1.31 \pm 0.09*
C 组	13.41 \pm 1.87*	0.82 \pm 0.06*
D 组	10.12 \pm 1.45#	0.24 \pm 0.10#
E 组	16.11 \pm 2.01*	1.02 \pm 0.11*

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;# $P > 0.05$

3 讨论

一般认为 AS 病灶发生主要累及弹力型动脉(主动脉及其一级分支)和弹力肌型动脉(如冠状动脉、脑动脉等),很少对脏器实质内的细小动脉分支进行详细的观察。有研究发现载脂蛋白 E 基因敲除小鼠冠状动脉主干以下的分支血管(包括心肌内小分支)有在原位生成的 AS 病灶^[2]。晚期糖尿病患者各脏器小动脉可见明显脂质沉积和斑块形成^[3],通过对心肌活检研究显示糖尿病病人冠脉小动脉可见内膜增生,血管壁粥样斑块形成,伴有胆固醇沉积^[4]。微血管性心绞痛病人内心膜活检标本中发现小冠脉纤维肌性增生,中膜肥厚,内皮增殖及内皮细胞变性。提示心脏冠状循环小动脉可发生 AS 病变。

家兔是最早用于复制 AS 模型的动物,给予高脂饮食(胆固醇 0.3g/d)8 周后即可见明显 AS 早期病变,故本研究血脂检查结果证明模型建立成功。研究表明家兔冠状动脉病变与人体不同,管径在 50~550 μ m 间的冠脉分支均可受累,其中以管径在 100~199 μ m 间的微血管受累最重,阳性率达 95%,并且重度受损者 > 70%^[8]。故本研究选用管径在 100~199 μ m 受累最明显冠状动脉进行病理切片观察,计算了肌间小动脉 AS 发生率、肌间小动脉内膜增厚率、RIA、内膜/中膜比值,试图从小动脉病变角度来探讨不同剂量外源性睾酮在去势雄兔早期 AS 形成中的作用及其可能机制。

万方数据

在 AS 的发病机制中,血管内皮细胞功能紊乱,血管平滑肌细胞增殖是反映动脉肌性内膜增生和损伤程度的标志。付海霞等^[10]发现雄性兔去势后补充高剂量的睾酮使血清睾酮水平升高可损伤其血管内皮细胞功能,促进新生内膜增生。Hanke 等^[11]发现提示睾酮可能剂量依赖性改善内皮功能。Somjen 等^[12]发现 E₂ 及二氢睾酮均可以剂量依赖性抑制平滑肌增殖。生理剂量雄激素增加机体清除活性氧能力,抑制平滑肌细胞增殖和血管内膜增生,起到抗 AS 作用。本研究光镜可见单纯去势组、低睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组动脉内膜明显增厚,其中有大量排列无序的泡沫细胞、平滑肌细胞,中膜弹力纤维断裂,形成典型 AS 病变。生理睾酮血症补充组与对照组相同,内膜病变程度明显减轻,未发现泡沫细胞。与文献报道一致,提示生理剂量雄激素改善内皮功能,减轻 AS 程度。

计算肌间小动脉 AS 发生率、肌间小动脉内膜增厚率,可以评估 AS 的发生程度,RIA,内膜/中膜均可反映内膜增生、脂质浸润程度,是否存在平滑肌增殖及其增殖程度,是量化 AS 发生程度的指标。肌间小动脉 AS 发生率、肌间小动脉内膜增厚率结果显示:对照组与生理睾酮血症补充组相当且均明显低于单纯去势组、低睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组($P < 0.05$)。从内膜/中膜比值可见,与单纯去势组、低睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组比较,生理睾酮血症补充组的比值明显减小($P < 0.05$)。单纯去势组 RIA 明显升高,各睾酮血症补充组 RIA 有所下降。生理睾酮血症补充组 RIA 率减少更为明显,与低睾酮血症补充组和高睾酮血症补充组差异有显著性($P < 0.05$)。提示生理性睾酮补充可以抑制内膜增生和保护内皮功能,抑制平滑肌细胞增殖,而过高或过高剂量补充睾酮对此无改善作用。

总之,雄激素紊乱与男性动脉粥样硬化发病过程有关,血清睾酮水平和雌雄激素比值影响血管内皮功能,影响血管平滑肌的增殖,影响血管微循环状态,补充生理性外源性睾酮, E₂/TT 比值接近正常水平能降低肌间小动脉 AS 发生率、肌间小动脉内膜增厚率、RIA,改善内膜/中膜比值,从而抑制内膜增生和保护内皮功能,抑制血管平滑肌细胞增殖,改善 AS;外源性高和低睾酮血症加重障碍,对 AS 无益。

目前从不同血清睾酮水平探讨对 AS 的影响少有研究,而且尚无从冠状循环小动脉角度的研究,此问题的逐步阐明将为男性 AS 的防治提供一个新的思路。但是由于人和家兔血脂代谢和 AS 存在较大差异,动物研究资料推及到人尚需谨慎。

参考文献

1 English KM, Mandour O, Steeds RP, et al. Men with coronary heart disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *Eur Heart*, 2000,21:890-894.

2 高琳琳,翟同钧,陈融,等. 外膜炎症诱发载脂蛋白 E 基因敲除鼠冠状动脉粥样硬化病灶. *中国动脉硬化杂志*, 2003,11:415-418.

3 谷伯起,张筠庭,崔可心,等. 80 岁以上尸检动脉年龄性改变及粥样硬化病变的观察. *中华病理学杂志*, 1985,14:3-6.

4 陆菊明. 糖尿病大血管病变. *临床内科杂志*, 1997,14:121-122.

5 Haug A, Hostmark AT, Spydevold O, et al. Hypercholesterolaemia, hypotriacylglycerolaemia and increased lipoprotein lipase activity following orchidectomy in rats. *Acta Endocrinol*, 1986,113:133-139.

6 Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, et al. Natural androgens inhibit male atherosclerosis, a study in castrated, cho-

lesterol-fed rabbits. *Circ Res*, 1999,84:813-819.

7 Benghuzzi HA, England BG. Long-term sustained delivery of androgens by means of TCPL devices and the effect on high-density lipoprotein in castrated rams. *Biomed Sci Instrum*, 1995,31:165-170.

8 施新猷. *医学实验动物方法*. 北京:人民卫生出版社, 1980. 325-326.

9 Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, et al. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*, 1998,98:256-261.

10 付海霞,许家,蒋锡嘉,等. 雄激素对损伤的血管组织 VCAM-1 的表达和内膜增殖的影响. *中华老年心脑血管病杂志*, 2001,3(增刊):63-66.

11 Hanke H, Lemz C, Hess B, et al. Effect of testosterone on plaque development and androgen receptor expression in the arterial vessel wall. *Circulation*, 2001,103:1382-1385.

12 Somjen D, Kohen F, Jaffe A, et al. Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cell. *Hypertension*, 1998,32:39-45.

(上接第 291 页)

点,在腱-骨连接部位可见潮线深染带,在生物学和力学作用下形成了比较牢固的愈合。这提示我们在进行临床病人的康复指导时,术后 1~2 个月内应在支具保护下进行限制性功能锻炼是十分必要的;术后 3 个月时,可以进行积极的康复训练。

参考文献

1 Butler DL, Noyes FR, Grood ES. Ligament restraints to anterior-posterior drawer in the human knee: a biomechanical study. *J Bone Joint Surg*, 1980,62:259-270.

2 敖英芳. 关节镜下重建膝十字韧带的临床现状. *中华骨科杂志*, 2001,21:588.

3 陈百成,张庆民,冯建刚,等. 自体中 1/3 髌韧带重建前十字韧带术后膝关节内并发症的探讨. *中华骨科杂志*, 2000,20:216-218.

4 Rosenberg TD, Franklin JL, Baldwin GN, et al. Extensor mechanism function after patellar tendon graft harvest for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med*, 1992,20:519-525.

5 Aglieitti P, Buzzi R, D'Andria S, et al. Long-term study of anterior cruciate ligament reconstruction for chronic instability using the central one-third patellar tendon and a lateral extraarticular tenodesis. *Am J Sport Med*, 1992,20:38-45.

6 Hamner DL, Brown CH Jr, Steiner ME, et al. Hamstring tendon grafts for reconstruction of the anterior

cruciate ligament; biomechanical evaluation of the use of multiple strands and tensioning techniques. *J Bone Joint Surg Am*, 1999,81:549-557.

7 Allum R. Aspects of current management: complications of arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg*, 2003,85:12-17.

8 刘玉杰,李众利,王志刚,等. 腓绳肌腱结嵌压固定法重建交叉韧带的临床应用与生物力学研究. *中华外科杂志*, 2005,42:239-242.

9 刘玉杰,王志刚,王岩,等. 半腱肌腱股薄肌腱打结骨栓嵌入固定镜下重建前十字韧带的初步观察. *中华创伤杂志*, 2003,19:167-169.

10 刘玉杰,王志刚,李众利,等. 腓绳肌腱结与骨栓嵌入固定法关节镜下重建后交叉韧带初探. *中国运动医学杂志*, 2003,22:375-378.

11 Goradia VK, Rochat MC, Grana WA, et al. Tendon-to-bone healing in a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model. *Am J Knee Surg*, 2000,13:143-151.

12 Yoshiya S, Nagano M, Kurosaka M, et al. Graft healing in the bone tunnel in reconstruction. *Clin Orthop Relat Res*, 2000,376:278-286.

13 Brian SD, Brian EM, Eugene RM. Observation on a retrieved patellar tendon autograft used to reconstruct the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg*, 2002,84:1433-1437.