· 基础研究 ·

雄激素对高盐饮食状态下雄性大鼠血管内皮功能的影响

王晓慧, 谈世进*, 金俊, 王艳妮

(上海交通大学附属第六人民医院老年科, 上海 200233)

【摘要】目的 探讨不同水平雄激素对高盐饮食状态下雄性大鼠血管内皮功能的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 32 只随机分为 4 组, 每组各 8 只: 假手术组 (Sham), 去势组 (Cas), 去势后补充睾酮组 (TC), 去势后补充睾酮和氟他胺组 (FTC)。各组均以 8%NaCl 高盐颗粒饲料喂养, Sham 组施以假手术, Cas、TC 及 FTC 组均施以去势手术。TC 及 FTC 组予以丙酸睾酮 (TP) 2mg/(kg·2d) 皮下注射, FTC 组同时予以氟他胺 1mg/(kg·d) 灌胃, 持续 8 周。尾动脉血压法测定各组实验前、实验 4 周、实验 8 周后尾动脉血压, 8 周后酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定血清中睾酮 (T)、内皮素 1 (ET-1) 的浓度, 比色法测定血浆中一氧化氮 (NO) 水平。**结果** (1) 与 Sham 组血压相比, Cas 组和 FTC 组明显下降 [Cas 组: (124.8 ± 4.4) vs (135.9 ± 3.7) mmHg, $P < 0.01$; FTC 组: (127.7 ± 3.0) vs (135.9 ± 3.7) mmHg, $P < 0.01$]; 与基础血压相比, Sham 组和 TC 组明显升高 ($P < 0.01$); (2) 与 Sham 组 T 浓度相比, Cas 组的明显下降 [(0.26 ± 0.02) vs (3.15 ± 0.54) μg/L, $P < 0.01$], 而 FTC 组明显升高 [(5.47 ± 1.29) vs (3.15 ± 0.54) μg/L, $P < 0.01$]; (3) 与 Sham 组血清 ET-1 浓度相比, Cas 组和 FTC 组明显下降 [Cas 组: (0.77 ± 0.23) vs (1.08 ± 0.15) μg/L, $P < 0.01$; FTC 组: (0.80 ± 0.21) vs (1.08 ± 0.15) μg/L, $P < 0.05$]; TC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); (4) 与 Sham 组 NO 浓度相比, Cas 组和 FTC 组明显升高 [Cas 组: (42.37 ± 15.74) vs (17.20 ± 7.32) mmol/L, $P < 0.01$; FTC 组: (33.44 ± 8.50) vs (17.20 ± 7.32) mmol/L, $P < 0.01$]; TC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 高盐饮食下, 雄激素水平的变化可能影响雄性大鼠血管内皮功能。

【关键词】 雄激素; 高血压; 内皮素; 一氧化氮; 大鼠

【中图分类号】 R544.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00241

The effect of androgen in vascular endothelial function of male rats under high-salt diet

WANG Xiaohui, TAN Shijin*, JIN Jun, WANG Yanni

(Department of Geriatrics, Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of different levels of androgen in the vascular endothelial function of high-salt fed male rats. **Methods** Thirty-two Wistar rats were randomly assigned to 4 groups, sham-operation (Sham) group, castration (Cas) group, testosterone supplement after castration (TC) group, and flutamide-treated testosterone supplemented castrated (FTC) group, with eight rats in each. All animals were fed high-salt diet (8% NaCl) for 8 weeks. Animals in Sham group received sham operation, while those in Cas, TC and FTC group received surgical castration. Subcutaneous injection of testosterone propionate (TP) 2mg/(kg·2d) was performed in TC and FTC groups, and intragastric administration of flutamide 1mg/(kg·d) in FTC group continuously for 8 weeks. The blood of tail artery was measured at baseline, 4 and 8 weeks after experiment respectively. At 8 weeks after experiment, content of testosterone (T) and endothelin-1(ET-1) in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and colorimetric assay was used to detect the level of nitric oxide(NO) in plasma. **Results** (1) Compared with Sham group, blood pressure at 4 and 8 weeks declined significantly in Cas group and FTC group [Cas: (124.8 ± 4.4) vs (135.9 ± 3.7)mmHg, $P < 0.01$; FTC:(127.7 ± 3.0) vs (135.9 ± 3.7)mmHg, $P < 0.01$], while increased significantly ($P < 0.01$) from baseline in Sham and TC groups. (2) Compared with Sham group, serum T content obviously decreased in Cas group [(0.26 ± 0.02) vs (3.15 ± 0.54)μg/L, $P < 0.01$], and increased significantly in FTC groups [(5.47 ± 1.29) vs (3.15 ± 0.54)μg/L, $P < 0.01$]. (3) Compared with Sham group, serum ET-1 content declined significantly in Cas group and FTC group [Cas: (0.77 ± 0.23) vs (1.08 ± 0.15)μg/L, $P < 0.01$; FTC: (0.80 ± 0.21) vs (1.08 ± 0.15)μg/L, $P < 0.05$], and had no significant difference with TC group ($P > 0.05$). (4) NO content, compared with Sham group, increased significantly in Cas group and FTC group

[Cas: (42.37 ± 15.74) vs (17.20 ± 7.32) mmol/L, $P < 0.01$; FTC: (33.44 ± 8.50) vs (17.20 ± 7.32) mmol/L, $P < 0.01$], and had no significant difference with TC group ($P > 0.05$). **Conclusion** Under high-salt diet, change of androgen can influence vascular endothelial function of male rats.

【Key words】 androgen; hypertension; endothelin-1; nitric oxide; rat

长期的高盐饮食可引起机体高血压和心血管疾病已经成为人们的共识,在疾病的发生发展过程中,高盐饮食损害血管内皮细胞是导致心血管疾病产生的重要机制。在影响高盐饮食对机体的作用中,雄激素水平的变化也起了重要作用。体内激素水平的变化随年龄的增长发生变化。以睾酮为代表的雄激素在维持男性性征及其他相关生理活动中起重要作用,其在体内浓度及活性的变化随年龄的增长而降低^[1]。盐摄入量过多对高血压的影响已得到大家的公认,而雄激素水平的高低在高盐导致的高血压中的影响也日益得到大家的关注^[2,3],我们之前的研究^[4]发现雄激素促进高盐诱导下大鼠血压的升高,去势处理可以降低高盐所诱导的血压升高幅度。因此,在高盐饮食状态下,机体的血压升高、内皮功能受到损伤,但雄激素浓度的变化,对高盐饮食引起的血管内皮功能有何影响,目前报道不多。本研究是通过建立高盐饮食状态下的高血压大鼠动物模型,观察不同水平雄激素对高盐饮食下雄性大鼠血管内皮相关功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 32 只,8 周龄左右,体质量 (200 ± 10) g,由上海西普尔-必凯实验动物公司 SCXK (沪) 提供。

1.2 实验药物

丙酸睾酮 (testosterone propionate, TP) 注射液 (上海通用药业股份有限公司,生产批号 100404); 氟他胺片 (Flutamide, 上海复旦复华药业有限公司,生产批号 110902); 盐酸氯胺酮注射液 (福建古田药业有限公司,生产批号 101103)。

1.3 主要试剂

大鼠睾酮 (testosterone, T), 内皮素 (endothelin-1, ET-1), 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (biotech 公司), 大鼠一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.4 主要仪器

电子称、自动平衡离心机、超低温冰箱[Sanyo

公司(中国)], 酶标仪: 美国 BioTek 公司 (型号 ELx800), 731 型分光光度计 (南京鑫耀分析仪制造有限公司)。RBP-1 型尾动脉血压计 (北京中日友好临床研究所)。

1.5 实验方法

1.5.1 实验模型与分组 32 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 每组各 8 只: 假手术组 (Sham), 去势组 (Cas), 去势后补充睾酮组 (TC), 去势后补充睾酮和氟他胺组 (FTC)。全部在适应性喂养 2 周后开始实验。Cas 组、TC 组及 FTC 组大鼠均施以去势手术。2ml/kg 盐酸氯胺酮腹腔注射麻醉后, 碘伏消毒阴囊处皮肤, 沿纵膈正中切开一纵形切口, 剪开鞘膜后, 分别将双侧睾丸与附睾分离并切除睾丸, 然后把附睾放回阴囊, 青霉素冲洗切口预防感染, 缝合切口。Sham 组只做睾丸与附睾的分离处理, 不做切除, 然后放回阴囊, 青霉素冲洗并缝合切口。各组大鼠术后均用 2×10^5 U 青霉素连续腹腔注射 3d 预防感染。

1.5.2 动物饲养与给药 手术后各组均给以 8% NaCl 高盐颗粒饲料喂养, 自由摄食, 自由饮用自来水, TC 组、FTC 组给予 TP 2mg/(kg·2d) 皮下注射, 其余各组分别以等量的玉米油皮下注射, FTC 组同时给予 1mg/(kg·d) 氟他胺灌胃, 其余组等量的生理盐水灌胃。

1.5.3 大鼠血压测定 分别在实验前, 实验 4 周, 实验 8 周, 采用尾动脉脉压测定各组大鼠清醒状态下的血压, 连续测定 3 次, 取平均值。

1.5.4 采集血样 高盐饲料喂养 8 周后采集血样。盐酸氯胺酮 2ml/kg 腹腔注射麻醉后, 剖开胸腔, 充分暴露心脏并于右心房处采血, 分别注入普通管和 EDTA 抗凝管, 管口封好后放入 4℃ 冰箱中 1~2 h, 然后取出以 2500r/min 的速度离心 10min, 分离出血清或血浆, 并分装, 于 -80℃ 冰箱冻存备用。

1.5.5 ELISA 法测定血清中 T, ET-1 浓度 将待测血清样本冷水中复融, 采用 ELISA 法测定, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.5.6 比色法测定血浆中 NO 的水平 通过测定亚硝酸盐和硝酸盐浓度间接测定 NO 的浓度。NO 含量 ($\mu\text{mol/L}$) = [(测定管吸光度 - 空白管吸光度) /

(标准管吸光度-空白管吸光度) × 标准品浓度 (100μmol/L) × 样品测试前稀释倍数。

1.6 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 满足方差齐性的多重比较采用 LSD 法, 不满足方差齐性的多重比较采用非参数检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠尾动脉血压值比较

表 1 结果表明, 各组大鼠基础血压值差异无统计学意义 (P > 0.05)。实验 4 周、8 周后, 各组血压均较基础血压升高, 与 Sham 组血压相比, Cas 组和 FTC 组明显下降 (P < 0.01); 与各组相应的基础血压相比, Sham 组和 TC 组明显升高 (P < 0.01)。

表1 各组大鼠尾动脉血压的比较
Table 1 Comparison of blood pressure between four groups
(n = 8, mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	基础	4 周	8 周
Sham 组	116.1 ± 3.2	134.7 ± 4.8 [#]	135.9 ± 3.7 [#]
Cas 组	116.5 ± 4.4	123.4 ± 5.0 ^{**}	124.8 ± 4.4 ^{**}
TC 组	115.2 ± 4.8	134.4 ± 3.7 [#]	135.5 ± 3.5 [#]
FTC 组	115.9 ± 4.0	127.5 ± 3.1 ^{**}	127.7 ± 3.0 ^{**}

注: Sham 组: 假手术组; Cas 组: 去势组; TC 组: 去势后补充睾酮组; FTC 组: 去势后补充睾酮和氟他胺组。1mmHg = 0.133kPa。与 Sham 组比较, ^{**}P < 0.01; 与各组相应的基础血压比较, [#]P < 0.01

2.2 各组大鼠血清 T、ET-1 浓度比较

表 2 结果表明, 与 Sham 组相比, Cas 组 T 浓度明显降低 (P < 0.01); TC 组 T 浓度差异无统计学意义 (P = 0.355), FTC 组 T 浓度较 Sham 组升高近 2 倍 (P < 0.01); Cas 组血清 ET-1 浓度明显降低 (P < 0.01), TC 组血清 ET-1 浓度差异无统计学意义 (P = 0.915), FTC 组血清 ET-1 浓度显著降低 (P = 0.02)。

表2 各组大鼠血清睾酮、内皮素浓度
Table 2 Comparison of serum T and ET-1 content between four groups
(n=8, μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	睾酮	内皮素-1
Sham 组	3.15 ± 0.54	1.08 ± 0.15
Cas 组	0.26 ± 0.02 ^{**}	0.77 ± 0.23 ^{**}
TC 组	2.80 ± 0.30	1.09 ± 0.26
FTC 组	5.47 ± 1.29 ^{**}	0.80 ± 0.21 [*]

注: Sham 组: 假手术组; Cas 组: 去势组; TC 组: 去势后补充睾酮组; FTC 组: 去势后补充睾酮和氟他胺组。与 Sham 组比较, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01

2.3 各组大鼠血浆 NO 浓度

与 Sham 组 NO 浓度相比, Cas 组[(42.37 ± 15.74) vs (17.20 ± 7.32) mmol/L, P < 0.01]和 FTC 组[(33.44 ± 8.50) vs (17.20 ± 7.32) mmol/L, P < 0.01]明显升高; TC 组差异无统计学意义 (P > 0.05)。

3 讨论

高盐饮食是高血压的危险因素之一, 对于盐敏感人群, 食物中的盐摄入量过高, 其升高血压的效应明显, 既往的流行病学调查显示, 人群中盐敏感的比例并不低^[5], 且随着年龄的增长而增加^[6], 因此高盐的危害势必引起重视。动物实验中高雄激素水平对高盐诱导下的雄性大鼠血压的升高有促进作用, 通过去势处理降低雄激素水平可以降低血压。但是雄激素对盐敏感高血压的影响机制尚不十分明确。

血管内皮是介于循环血液与血管平滑肌细胞之间的, 能够分泌多种重要血管活性物质的器官, 在维持心血管生理功能、调节血压等方面起极其重要的作用, 内皮功能障碍增加单纯收缩期高血压患者的动脉僵硬度^[7]。我们既往的研究^[8]发现雄激素可以通过肾素-血管紧张素系统促进高盐饮食下大鼠血压的升高, 并造成肾脏损害, 而 Oloyo 等^[9]在动物研究中发现了睾酮可降低高盐饮食大鼠主动脉环的舒张效应, 由此可看出, 雄激素对血管的舒张与血压的变化产生了重要的影响。我们的研究发现, 雄激素可对高盐饮食下雄性大鼠的血管内皮功能产生显著的影响。

血管内皮可分泌多种血管活性物质, 其中 ET-1 和 NO 是其中重要物质之一。ET-1 是目前已知的缩血管作用最强的细胞因子, 是一种血管性缩性多肽, 同时具有类似生长因子的作用, 能促进平滑肌细胞增殖^[10]。ET-1 通过钙离子通道开放或者胞内存储钙离子释放引起的胞内钙离子浓度升高实现血管收缩^[11], 并能增加血管对其他缩血管物质, 如去甲肾上腺素和 5-羟色胺的缩血管反应, 增加外周血管阻力而升高血压^[12]。在本实验中, Cas 组大鼠血清内皮素浓度明显低于 Sham 组与 TC 组 (P < 0.01), 说明高雄激素水平对血管内皮 ET-1 合成的抑制作用可因去势减弱。

NO 由一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化左旋精氨酸和分子氧反应生成, 属内皮源性血管舒张因子, 血浆中 NO 浓度的高低直接影响血管的舒张功能。EiHafidi 等^[13]研究发现, 雄激素通过降低 NO 的生物合成, 促进高血压的发展。

NO 的合成可能还受到血液中 ET-1 的影响, 血液中 ET-1 升高可使内皮功能失调, NO 合成下降。Wedqwood 等^[14]研究表明, ET-1 可使 NOS 基因启动因子的活性下降 40%, 使 NO 的产生显著下降。在本实验中, Sham 组与 TC 组血浆 NO 浓度较去势组大鼠显著降低, 也说明高雄激素水平加重高盐造成的血管内皮细胞的损伤, 抑制血管的舒张功能。

本实验中 FTC 组大鼠 ET-1 和 NO 的浓度与 Cas 组相仿, 说明雄激素对血管内皮功能的影响主要是通过雄激素受体 (androgen receptor, AR) 起作用。AR 分布广泛, Lin 等^[15]最早发现血管壁中存在 AR, 同时也发现 AR 在血管壁各层均有分布, 以内层为主, 这是雄激素可以对血管内皮产生直接影响的基础。多位学者的研究发现雄激素可促进高盐饮食下雄性大鼠的血压升高^[4], 本实验的结果同样表明雄激素可促进血压升高, 并可通过直接对血管内皮产生作用, 这可能是雄激素影响高盐饮食大鼠血压变化的另一机制。在此基础上可通过验证睾酮对动脉环舒张效应的影响进一步证实睾酮对血管内皮功能的作用。

血管内皮在血压调节及其他心血管功能中起重要作用, 雄激素可加重高盐饮食对血管内皮的损害, 高盐饮食状态下, 雄激素促进以 ET-1 为主的收缩性物质的释放, 抑制以 NO 为主的舒张性物质的释放。在老龄男性人群中, 普遍存在低雄激素状态, 因此对于这部分人群是否有必要进行严格的限盐干预需要进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 张春萍, 方宁远, 康近方. 老年人 9 种性激素的化学发光免疫分析[J]. 中国老年杂志, 2006, 26(8): 1030-1031.
- [2] Yanes LL, Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, *et al.* Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(4): F771-F779.
- [3] Gerhold D, Bagchi A, Lu M, *et al.* Androgens drive divergent responses to salt stress in male versus female rat kidneys[J]. *Genomics*, 2007, 89(6): 731-744.
- [4] 胡剑平, 谈世进, 丁在咸. 雄性激素在高盐引发高血压中的作用[J]. 中华高血压杂志, 2008, 16(11): 991-993.
- [5] 刘治全. 血压的盐敏感性与盐敏感性高血压[J]. 中华高血压杂志, 2005, 13(3): 131-132.
- [6] 沈潞华. 老年高血压的临床特点[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2011, 10(3): 193-195.
- [7] Wallace SM, Yasmin, McEnery CM, *et al.* Isolated systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction[J]. *Hypertension*, 2007, 50(1): 228-233.
- [8] Hu J, Tan S, Zhong Y. Effects of testosterone on renal function in salt-loaded rats[J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342(1): 38-43.
- [9] Oloyo AK, Sofola OA, Anigbogu CN. Orchidectomy attenuates impaired endothelial effects of a high-salt diet in Sprague-Dawley rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89(4): 295-304.
- [10] Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1[J]. *Pflügers Arch*, 2010, 459(6): 951-958.
- [11] Brás-Silva C, Leite-Moreira AF. Myocardial effects of endothelin-1[J]. *Rev Port Cardiol*, 2008, 27(7-8): 925-951.
- [12] Naicker S, Bhoola KD. Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 90(1): 61-88.
- [13] EiHafidi M, Perez I, Carrillo S, *et al.* Effect of sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrose diet in male rats[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2006, 28(8): 669-681.
- [14] Wedqwood S, Black SM. Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide[J]. *Am J Physiol Lung Cell Physiol*, 2005, 288(3): L480-L487.
- [15] Lin AL, McGill HC Jr, Shain SA. Hormone receptors of the baboon cardiovascular system. Biochemical characterization of myocardial cytoplasmic androgen receptors[J]. *Circ Res*, 1981, 49(4): 1010-1016.

(编辑: 周宇红)