

睾酮对损伤后血管内膜增生的抑制作用 及对血脂的影响

归崎峰,徐哲荣,楼亚梅,杨云梅

(浙江大学医学院附属第一医院干部病房,浙江 杭州 310031)

[摘要] 目的:观察不同浓度睾酮对损伤后血管内膜增生的抑制作用及对血脂的影响。方法:25只雄性白兔随机分为5组,第1组为对照组行假去势术,第2~5组为去势组。去势术后1周开始给第3~5组分别按3 mg/kg、6 mg/kg、12 mg/kg 肌注睾酮。第2组未肌注睾酮。去势术后2周各组行右髂动脉内膜剥脱术。内膜剥脱术后2周采血测睾酮及血脂水平,并截取右髂动脉进行图像分析。结果:5组间同时时间点(脱内皮术前及脱内皮术后2周)相比均为:在去势组(除第2组,即3~5组)中随外源性睾酮的补充,血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)逐渐降低,血浆高密度脂蛋白(HDL-C)逐渐升高,第5组变化最明显,血脂水平已接近第1组,第2组和第1组比较差异最显著($P < 0.05$),各组脱内皮术后2周和脱内皮术前比较,TC、TG、LDL-C、HDL-C差异无显著性($P > 0.05$)。在去势组(除第2组,即3~5组)中随外源性睾酮的补充,新生内膜面积及内膜和中膜面积比值逐渐降低,第5组变化最明显,第5组已接近第1组,第2~4组和第1组比较差异显著($P < 0.01$),其中第2组差异最显著。电镜下第2组内皮细胞修复最差,从第3~5组中可见内皮细胞逐渐光滑、平整,第5组新生内皮细胞修复与第1组接近。结论:在生理浓度范围内,睾酮有抑制损伤动脉内膜增生的作用,其作用随浓度增加而增强;同时对血脂代谢存在有益作用,其作用也随浓度增加而增强。

[关键词] 睾酮/病理学;睾酮/投药和剂量;内皮,血管/病理学;内膜增生;内皮损伤;球囊损伤;兔

[中图分类号] R 541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)04-0393-06

Effect of testosterone on neointimal proliferation and blood lipids after balloon-induced aorta injury in rabbits

GUI Qi-feng, XU Zhe-rong, LOU Ya-mei, YANG Yun-mei (VIP Wards, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of testosterone on neointimal proliferation and blood lipids after balloon-induced aorta injury in male rabbits. **Methods:** Twenty-five male white rabbits were randomly divided into five groups with 5 in each. G1 underwent sham castration

收稿日期:2007-04-23 修回日期:2007-08-03

基金项目:浙江省卫生厅科研基金资助项目(2003B045)。

作者简介:归崎峰(1981-),男,从事心内科方面研究。

通讯作者:杨云梅(1955-),女,硕士生导师,主任医师,主要从老年心血管疾病方面研究;E-mail:guiqifeng2005@163.com.

served as control group, rabbits in remaining 4 groups were castrated. One week after the castration, rabbits in G3, G4, G5 groups received 3 mg/kg, 6 mg/kg, 12 mg/kg testosterone undecanoate i. m, respectively, G2 was not received. Two weeks after the castration, deendothelializing balloon-induced injury in right iliac artery was performed in all animals. Two weeks after the injury, blood samples were drawn for measurement of plasma testosterone and lipids, and the right iliac arteries were excised for computer imagining analysis. **Results:** Compared with G1, plasma levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein (LDL) in G3, G4 and G5, gradually decreased, plasma levels of high density lipoprotein (HDL) gradually increased. There were most significant differences of plasma TC, TG and LDL ($P < 0.05$) between G2 and G1. There were not significant differences of plasma TC, TG, HDL and LDL among all groups before endothelial denudation and 2 weeks after endothelial denudation ($P > 0.05$). In G3, G4 and G5 the intimal area and radio of intima/media gradually decreased, there were significant differences between G2, G3, G4 and G1 ($P < 0.05$), the differences between G1 and G2 were most significant, and those of G5 were close to G1. Endothelial cell repair was observed with electron microscope. Endothelial cells from G2 to G5 became smoother gradually, which in G5 were very close to G1. **Conclusion:** Testosterone inhibits the intima proliferation induced by balloon-induced injury and improves blood lipids levels. The effects are enhanced by the dose increasing.

[Key words] Testosterone/pharmacol; Testosterone/admin; Endothelium, vascular/pathol; Neointimal proliferation; Endothelial Injury; Balloon-induced injury; Rabbit

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008, 37(4):393-398.]

睾酮由胆固醇在体内合成,是体内的主要雄激素。男性人群心血管疾病患病率明显高于女性,即使考虑到其他疾病危险因素,男性性别仍是一个独立的心血管疾病危险因素。这提示雄激素与心血管疾病存在有一定的关系^[1]。老年男性多伴有不同程度的雄激素水平下降,尤其是有生物学活性的雄激素成分,提示雄激素与冠状动脉硬化性心脏病(atherosclerosis, AS)和其他心血管疾病的发生存在一定关系。虽然也有研究认为^[2],雄激素增加单核细胞与血管内皮细胞的粘附性,促进AS的发生,增加男性冠心病的发病率,但多数临床研究和动物实验均表明^[3-4],睾酮可以扩张人、动物(犬和兔)的冠状动脉和鼠的主动脉,增加血流量;小剂量睾酮可以抑制血管平滑肌细胞的增生,对血管壁起保护作用;老年冠心病患者服用睾酮可以缓解心绞痛症状、改善运动诱发的心肌缺血;雄激素可以抑制AS的形成和进展,对心血

管系统有益。但关于雄激素对心血管系统的作用机理则存在很多争论,目前尚无统一意见。为了解雄激素和AS的关系及机制,笔者曾行实验发现^[5-7]AS患者存在低雄激素水平和脂质代谢紊乱的现象,正常水平睾酮可能具有延缓AS发生、发展的生理效应,雄激素影响AS进程可能与脂质代谢有关,并提示雄激素水平越低冠脉病变越严重。为进一步探讨雄激素在AS发生、发展中的作用及为临床使用生理剂量的雄激素防治AS提供可靠的理论依据,本研究在球囊脱内皮损伤模型基础上,使用不同浓度的外源性雄激素来观察血管内膜新生情况及对血脂的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组 成年健康的雄性新西兰白兔 25 只(由浙江大学医学院实验动物中心提供)。随机分成 5 组,每组 5 只;第 1 组为假去势组,第

2组为去势组(未予睾酮肌注),第3~5组为去势组,予睾酮肌注(分别为3 mg/kg、6 mg/kg、12 mg/kg)。各组均普通颗粒饲料饲养、自由饮水2周后实验。长效十一酸睾酮由浙江仙居制药厂生产。

1.2 去势手术 喂养2周后开始行去势术,方法为常规备皮,消毒后用1%利多卡因局麻后,切开双侧阴囊正中间皮肤,向两侧分离,去势组找到睾丸、附睾后予以摘除,假去势组只切开皮肤不摘除睾丸及附睾。术中止血,术后予肌注青霉素2 d,每日40万单位。

1.3 肌注十一酸睾酮 去势术后1周开始给第3~5组兔子肌注睾酮,剂量分别为3 mg/kg、6 mg/kg、12 mg/kg。每周1次,共3次。

1.4 球囊损伤动脉内膜 去势2周后对各组白兔行右髂动脉内膜损伤术。方法:1%利多卡因局麻后分离并穿刺股动脉,用美国Maverick的球囊导管沿导丝送入,插入约15 cm后向球囊内注入空气使之膨胀,回撤球囊导管,来回反复3次。撤出球囊导管,结扎股动脉,手术过程均为无菌操作。

2 观察指标

2.1 一般情况 观察动物进食及体重增减情况。

2.2 血清睾酮、血脂水平 各组动物均于脱内皮术前、脱内皮术后2周,采早晨8时空腹耳正中动脉血2 ml,离心制备血清,送生化室测定血脂,测定后-20℃保存。应用放射免疫法测定睾酮水平(具体操作步骤按说明书进行)。

2.3 光镜观察 动物处死后,取损伤的右髂动脉约2 cm,以10%福尔马林溶液固定24 h,常规石蜡包埋,切片、HE染色,光镜观察血管病理形态的变化,并截取光镜下图片。最后用HPLAS1000型图像分析软件测量血管内膜面积、中膜面积,并计算内膜和中膜面积比值。

2.4 电镜观察 另取兔右髂动脉约0.5 cm,用生理盐水冲洗后放入戊二醛固定约24 h后送电镜室。观察电镜下各组血管内皮形态变化,并截取图片。

2.5 统计学处理 所有数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,5组间比较用方差分析,两两比较用 q 检验。 $P <$

0.05为有统计学意义。

3 结果

3.1 术后第1组睾酮水平最高,为(3.69 ± 0.58)nmol/L,在第3~5组中,随外源性睾酮的补充,睾酮浓度逐渐增高,浓度分别为(1.27 ± 0.24)nmol/L, (2.22 ± 0.16)nmol/L, (3.43 ± 0.28)nmol/L,第5组睾酮水平接近第1组,未肌注睾酮的第2组睾酮浓度最低,为(0.67 ± 0.17)nmol/L。和第1组比较,第2~4组均有显著性差异($P < 0.05$)。

3.2 和第1组相比,5组间同时间点(脱内皮术前及脱内皮术后2周)相比均存在:在去势组(第2~5组)中随睾酮浓度的下降,血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)逐渐升高,血浆高密度脂蛋白(HDL-C)逐渐降低,其中第2组(未补充睾酮组)变化特别明显,两者比较有统计学意义($P < 0.05$)。随外源性睾酮的补充,TC、TG、LDL-C逐渐降低,HDL-C逐渐升高,以第5组变化尤为明显,第5组TC、TG、LDL-C、HDL-C水平和第1组接近(表1、2)。各组脱内皮术后2周和脱内皮术前比较,TC、TG、LDL-C、HDL-C差异无显著性($P > 0.05$)。

3.3 光镜下应用HPLAS1000型图像分析软件观察内膜面积、中膜面积及两者的比值,与第1组比较,在去势组(第2~5组)中随睾酮浓度的下降,损伤血管的内膜和中膜面积比值及内膜面积逐渐升高,第2~4组和第1组比较差异显著($P < 0.01$),其中第2组差异最显著。随外源性睾酮的补充,损伤血管的内膜和中膜面积比值及内膜面积逐渐降低,以第5组降低尤为明显,已和第1组接近(表3、图1)。

3.4 电镜观察结果 扫描电镜下正常血管内皮细胞(vascularendothelial cell,VEC)应呈梭形,镶嵌排列,排列有序,大小均一。本实验脱内皮术后2周各组血管内膜均几乎完全被新生内皮覆盖,偶有缺失,再生VEC胞体肥大,排列较规则,但轮廓模糊,在去势组(第2~5组)中第2组内皮细胞修复最差,随着睾酮浓度升高,内皮细胞修复逐渐完善,VEC排列逐渐规则,VEC形态逐渐呈梭形,大小逐渐均一,其中第5组内皮细胞修复和第1组接近(图2)。

表 1 术前各组血浆总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白水平比较

Table 1 Comparison of the plasma levels of TC,TG,LDL-C,HDL-C before operation

组别	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
1 组	0.49±0.11	0.45±0.19	0.70±0.16	0.95±0.18
2 组	0.99±0.43 [*]	0.26±0.06	1.21±0.34 [*]	1.55±0.35 [*]
3 组	0.68±0.42	0.32±0.13	0.83±0.09	1.29±0.33
4 组	0.55±0.12	0.36±0.19	0.76±0.11	1.20±0.17
5 组	0.53±0.07	0.43±0.11	0.70±0.19	1.09±0.11

和第一组比较,^{*}*P*<0.05

表 2 术后各组血浆总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白水平比较

Table 2 Comparison of the plasma levels of TC,TG,LDL-C,HDL-C after operation

组别	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
1 组	0.51±0.18	0.35±0.07	0.62±0.12	1.11±0.29
2 组	1.07±0.27 [*]	0.19±0.05	1.40±0.51 [*]	2.12±0.51 [*]
3 组	0.73±0.35	0.25±0.07	0.89±0.29	1.62±0.11
4 组	0.57±0.15	0.27±0.05	0.80±0.47	1.24±0.32
5 组	0.53±0.15	0.31±0.10	0.72±0.62	1.17±0.36

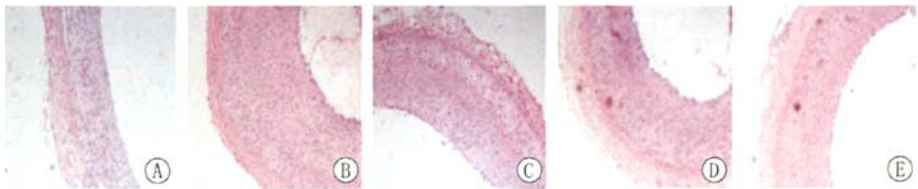
和第一组比较,^{*}*P*<0.05

表 3 右髂动脉内膜面积、中膜面积及内膜和中膜的比值

Table 3 The areas of intima,media and the ratio of them

组别	内膜面积/(m ² ×10 ⁻¹⁰)	中膜面积/(m ² ×10 ⁻¹⁰)	内膜和中膜比值/%
1 组	3726±912	17005±845	21.93±5.24
2 组	26363±5373 ^b	21347±6100	125.72±10.20 ^b
3 组	19764±2449 ^b	22068±1517	89.63±10.02 ^b
4 组	16461±3141 ^b	22275±1766	73.68±11.30 ^b
5 组	5085±717	20654±4012	26.34±6.81

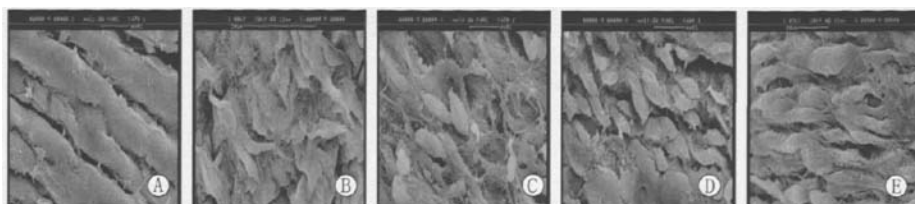
和第一组比较,^b*P*<0.01



A-E:1~5 组(HE 染色;×140)

图 1 损伤髂动脉病理切片

Fig. 1 Impaired arteria iliaca pathological sections



A-E:1~5组(JEM 1230 扫描电镜;×1050)

图2 损伤髂动脉病理切片电镜照片

Fig. 2 Impaired arteria iliaca pathological sections under electron microscope

4 讨论

血清睾酮随年龄增长逐渐降低而AS随年龄增长逐渐增多,表明睾酮可能具有抗AS的作用。血管内皮是介于循环血液与血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)之间的生理屏障,能分泌许多重要的血管活性物质,内皮受到机械损伤后,在细胞因子及原癌基因等的共同作用下,中膜VSMC向内膜迁移增殖,并产生过量的细胞外基质,这是导致内膜增生和管腔狭窄的主要病理基础。本实验发现,和假去势组相比,去势组(第2~4组)损伤血管的内膜和中膜面积比值增加显著($P<0.01$),并且在去势组(第2~5组)中发现,随着外源性睾酮补充的增加,内膜增生作用逐渐降低,提示睾酮可以抑制血管内膜增生,随剂量的增加,其抑制作用逐渐增强。同时发现睾酮对血脂代谢有有益作用,且随睾酮浓度升高,其有益作用更加明显。由结果得知低浓度睾酮时内膜增生明显,并引起脂质代谢紊乱,生理浓度睾酮时对内膜增生起抑制作用,对血脂的调节起有益作用,这两方面可能和睾酮对AS的保护作用有重要关系。

在AS的发病机理中,VSMC增殖有确切的病理生理学意义,同时动脉肌性内膜增生是反映VSMC增殖的标志,它的增殖与迁移可加重动脉粥样改变。通过测量不同浓度雄激素对内皮破坏后内膜增生的影响,可探讨不同浓度雄激素在AS发生、发展中的作用。本实验发现睾酮可以抑制血管内膜增生,并且随剂量的增加,其抑制作用逐渐增强。这和基础研究^[8-9]和临床实验^[10]结果相符。

脂质代谢紊乱是动脉粥样硬化的一个重要发病机制,LDL-C和TC升高是AS发生的重要因素。HDL-C则具有抗AS、保护心血管系统的作用。很多学者发现^[11]低水平睾酮引起血脂紊乱,而补充睾酮可以纠正血脂紊乱,本实验发现当血清睾酮水平下降时,HDL-C水平亦下降,TC、LDL-C、TG水平而升高,而补充睾酮后HDL-C水平上升,TC、LDL-C、TG水平下降,表明睾酮具有纠正血脂紊乱的作用。

临床试验表明^[12],对睾酮水平低的老年男性补充小剂量睾酮制剂后有防治冠心病、缓解心绞痛的作用。本实验发现,对去势术后兔子补充睾酮后(补充后浓度不高于生理浓度)可以对血脂调节产生有益的作用,并抑制损伤内膜增生,而且发现随剂量的增加,其抑制作用逐渐增强。故认为对去势术后兔子补充生理剂量范围内睾酮,可以对血脂调节产生有益的作用,抑制损伤内膜增生,并随剂量增加,疗效更明显。这为临床上对睾酮水平低的老年男性补充小剂量睾酮提供了依据。而补充大于生理剂量的睾酮后,是否能对调节血脂产生更大的有益作用和抑制内膜增生,则需进一步验证。

References:

- [1] BONNA K H. An alternative hypothesis explaining the gender differences in risk of coronary heart disease [J]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2002, 122(18): 1783-1787.
- [2] MCCROHON J A, JESSUP W, DAVID J H, et al. Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule [J]. *Circulation*, 1999, 99

- (17);2317-2322.
- [3] ALEXANDERSEN P, HAARBO J, BYRJAL-SEN L, et al. Natural androgens inhibit male atherosclerosis-a study in castrated, cholesterol-fed rabbits [J]. *Circulation Research*, 1999, 84(7):813-819.
- [4] SOMJEN D, KOHEN F, JAFFE A, et al. Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells [J]. *Hyperension*, 1998, 32(1):39-45.
- [5] SONG Mei-qing, YANG Yun-mei, XU Zhe-rong (宋美情, 杨云梅, 徐哲荣). The relation between androgen and lipids level in old-age male with arteriosclerosis [J]. *Chinese Journal of Gerontology* (中国老年学杂志), 2004, 24(6): 491-492. (in Chinese)
- [6] YANG Yun-mei, XU Zhe-rong, WU Ling-jiao, et al (杨云梅, 徐哲荣, 吴灵娇, 等). Atherosclerosis and androgen levels in elderly males [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2005, 34(6): 547-550. (in Chinese)
- [7] GU Hai-feng, YANG Yun-mei, XU Zhe-rong, et al (顾海峰, 杨云梅, 徐哲荣, 等). Analysis of the relationship between androgen and pathological changes of coronary atherosclerosis [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(4): 382-385. (in Chinese)
- [8] MARO R I, WILLIAMS, SHAN Hong-ling, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(1):176-181.
- [9] SOMJEN D, KOHEN F, GAYER B, et al. Role of putative membrane receptors in the effect of androgens on human vascular cell growth [J]. *J Endocrinol*, 2004, 180(1):97-106.
- [10] DEMIRBAG R, YILMAZ R, ULUCAY A, et al. The inverse relationship between thoracic aortic intima media thickness and testosterone level [J]. *Endocr Res*, 2005, 31(4):335-344.
- [11] MALKIN C J, PUQUH P J, JONES R D, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(7):3313-3318.
- [12] JONES R D, NETTLESHIP J E, KAPOOR D, et al. Testosterone and atherosclerosis in aging men: purported association and clinical implications [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2005, 5(3):141-154.

[责任编辑 张荣连]

《中华危重症医学杂志(电子版)》征稿启事

经国家新闻出版总署批准,由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办,中华医学电子音像出版社出版,浙江大学医学院附属第一医院承办的《中华危重症医学杂志(电子版)》即将创刊。本刊为双月刊,以光盘附纸质导读形式面向全国公开发行,图文声像并茂。本刊的办刊宗旨:贯彻党和国家的卫生工作方针、政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针,图文与影视相结合,反映我国危重症医学领域临床及科研工作的新成果、新进展、新经验,介绍世界新的发展趋势,构筑起自由的学术交流舞台,提倡学术争鸣,促进跨学科的学术交流,从而提高从事危重症救治工作的各科医务人员的业务水平,推动临床医学发展。本刊的主要栏目有专家述评、论著、短篇论著、临床研究、基础研究、临床经验、综述、病例报告、视频讲座、经典操作、动态影像分析、学术动态、护理园地等,欢迎投稿!

投稿地址:杭州市庆春路79号 浙江大学医学院附属第一医院《中华危重症医学杂志(电子版)》编辑部;邮编:310003;联系人:黄卫东,陆远强;电话:0571-87236561;E-mail:zhwzzyx@yahoo.cn。