

· 基础研究 ·

雄激素对雄性大鼠心脏衰老相关的 β -半乳糖苷酶的影响

王艳妮, 谈世进

(上海交通大学附属第六人民医院老年病科, 上海 200233)

【摘要】 目的 观察补充外源性睾酮及给予雄激素受体阻断剂后对衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 的影响, 探讨雄激素与心脏衰老的关系。方法 雄性 Wistar 大鼠 40 只随机分为去势组 (10 只)、补充睾酮组 (去势+生理剂量睾酮组, 10 只)、氟他胺组 (去势+生理剂量睾酮+氟他胺组, 10 只)、假手术组 (10 只)。干预 8 周后测定各组血浆睾酮浓度, 取心肌组织用 HE 染色观察心肌组织学变化; 组织化学染色观察心肌组织细胞 SA- β -Gal 的活性。结果 较假手术组睾酮浓度, 氟他胺组升高近 3 倍 ($P < 0.01$); 与假手术组比较, 去势组 SA- β -Gal 活性明显增强 [(2.0 ± 0.9) vs (1.2 ± 0.7) , $P < 0.01$]; 与去势组比较, 生理剂量补充睾酮组 SA- β -Gal 活性 (0.9 ± 0.8) 明显减弱 ($P < 0.01$); 与单纯补充生理剂量睾酮组比较, 氟他胺组 SA- β -Gal 活性 (2.1 ± 0.8) 反而增强 ($P < 0.01$); 补充生理剂量睾酮组与假手术组 SA- β -Gal 的活性相比差异无统计学意义 ($P=0.309$)。结论 雄激素缺乏可能影响雄性大鼠心肌组织中 SA- β -Gal 的活性, 提示心脏老化可能与雄激素水平相关。

【关键词】 雄激素; 雄激素拮抗药; 心肌; 衰老; β -半乳糖苷酶

【中图分类号】 R361⁺²

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00014

Androgen and expression of senescence-associated- β -galactosidase in heart of male rats

WANG Yanni, TAN Shijin

(Department of Geriatrics, Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of exogenous testosterone replacement and androgen receptor block agent administration on the expression of senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -Gal), and to determine the relationship between androgen and myocardial senescence. **Methods** Forty male Wistar rats were randomly divided into castrated group, testosterone group (castrated + physiological dose of testosterone), flutamide group (castrated + physiological dose of testosterone+flutamide) and sham group, with 10 in each group. After 8 weeks, blood testosterone concentration was measured; myocardium tissues were examined for histomorphology by HE staining; activity of SA- β -Gal was determined immunohistochemically. **Results** Compared with sham operation group, testosterone concentration was almost three times higher than that in flutamide group ($P < 0.01$). The activity of SA- β -Gal was obviously enhanced in castrated group than in sham group [(2.00 ± 0.86) vs (1.15 ± 0.67) , $P < 0.01$]. Compared with castrated group, the activity of SA- β -Gal was significantly weakened in testosterone group [(0.90 ± 0.79) , $P < 0.01$]. Compared with testosterone group, the activity of SA- β -Gal was enhanced in flutamide group [(2.05 ± 0.76) , $P < 0.01$]. There was no statistical difference in the activity of SA- β -Gal between testosterone group and sham group ($P=0.309$). **Conclusions** Androgen deficiency may influence the activity of SA- β -Gal in the heart of male rats. It suggests that myocardial senescence is possibly associated with androgen levels.

【Key words】 androgen; antagonists, androgen; myocardium; senescence; β -galactosidase

This work was supported by "Biomedical Engineering (Management) Corss-Fund (YG2010MS35)" of Shanghai Jiao Tong University.

近年来大量研究表明, 随着年龄的增长, 男性体内雄激素水平逐渐下降是引起多种老年疾病和衰老的重要因素; 有研究证实外源性睾酮替代治疗恢复

睾酮水平至正常可改善许多性腺功能减退引发的症状^[1], 雄激素改善认知能力、氧自由基及抗氧化系等方面衰老进程已有报道^[2,3]。早在 1995 年, 有学者研究发

收稿日期: 2011-05-18; 修回日期: 2011-09-29

基金项目: 上海交通大学“医工(理)交叉基金(YG2010MS35)”

通讯作者: 谈世进, Tel: 021-64369181, E-mail: sjxt@yahoo.com.cn

现组织中 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 染色阳性率随年龄增加而增加, 他们把这种中性的 β -半乳糖苷酶定义为衰老相关的 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated- β -galactosidase, SA- β -Gal)^[4], 目前 SA- β -Gal 作为一种体内外细胞衰老的公认标志物已在老年医学研究中广泛采用。但是体内 SA- β -Gal 活性在心肌组织细胞内随雄激素水平的变化如何变化, 与心脏衰老关系如何, 目前研究不多。本研究以大鼠去势为模型, 研究补充生理剂量睾酮及雄激素受体阻断剂干预后对心脏 SA- β -Gal 的影响, 以期揭示睾酮变化与心脏衰老的相关性, 为研究抗衰老的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠, 3~4 月龄, 体质量 250 g 左右, 共 40 只, 由中国科学院动物实验中心提供。

1.1.2 实验药物 丙酸睾酮注射液由上海通用药业股份有限公司提供, 批号 100404, 氟他胺由上海复旦复华药业有限公司提供, 批号 100702。

1.1.3 主要试剂和仪器 SA- β -Gal 染色试剂盒, T 放射免疫试剂盒, 冰冻切片机, Sn-695B 型 γ 放射免疫计数器, 自动平衡式离心机, 光学显微镜等。

1.2 动物模型和组织标本的制备

1.2.1 大鼠去势模型的建立和分组 将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 4 组: 去势组、补充睾酮组 (去势后补充睾酮组)、氟他胺组 (去势后补充睾酮+雄激素受体阻断剂组)、假手术组, 每组 10 只。全部适用性喂养 2 周后开始实验。在腹腔注射氯胺酮 (2mg/kg) 麻醉后, 需要去势的 3 组大鼠碘酒、酒精消毒阴囊皮肤, 纵膈正中切开一纵行切口, 剪开鞘膜后, 分别将双侧睾丸与附睾分离并且切除睾丸, 然后把附睾放回阴囊, 青霉素冲洗腹腔后逐层缝合皮肤, 术后腹腔注射青霉素, 2×10^4 U/d, 共 3 d; 假手术组只找出双侧睾丸与附睾分离但不切除, 然后放回阴囊。

1.2.2 动物饲养与给药 常规条件下分笼饲养, 光线保持 12 h 昼夜循环, 室温控制在 27℃ 左右, 湿度维持在 40%~50%, 自由进水、进食, 标准颗粒饲料。去势组, 大鼠去势后皮下注射等量芝麻油正常饲养至 8 周; 补充睾酮组, 大鼠去势后注射生理剂量睾酮, 2mg/(kg·2d), 8 周^[5]。氟他胺组, 大鼠去势后注射生理剂量睾酮 [2mg/(kg·2d)]+氟他胺 [1mg/(kg·d)]^[6] 灌胃, 8 周, 丙酸睾酮注射液用无菌芝麻油稀释后皮下注射。除氟他胺组外其余各组均给予等量生理盐

水灌胃为对照。

1.2.3 取材 给药 8 周后取材。麻醉大鼠后, 剖开胸腔, 暴露心脏并取血, 分别注入预先制备好的 EDTA 抗凝管及普通管, 管口封闭好并颠倒混匀即放入 4℃ 冰箱中 1~2h, 取出后 2500 g 4℃ 离心 7 min, 分离出血浆或血清, 取上清分装, -80℃ 冰箱冻存备用; 取出心脏用冰生理盐水冲洗后剪取左心室, 然后分两半, 一半心肌组织做新鲜组织冰冻切片作组织化学染色; 另一半心肌组织入多聚甲醛液中固定 24h 后石蜡包埋作 HE 染色。

1.3 观察内容和检测指标

1.3.1 血浆睾酮水平的放射免疫测定 将待测血浆样本冷水复融, 采用碘标记的放射免疫测定法, 严格按照试剂盒说明操作。

1.3.2 各组大鼠心肌组织 HE 染色病理形态学变化 石蜡切片做 HE 染色, 严格按照 HE 染色的操作步骤进行, 最后在光学显微镜下观察, 并在高倍显微镜下拍照。

1.3.3 心肌组织 SA- β -Gal 活性检测 组织化学染色法, 在 pH 6.0 的条件下染色 16h 检测 SA- β -Gal 活性; pH 7.4 的条件下, 所有组织 SA- β -Gal 活性均为阴性 (作为对照)。具体步骤按试剂盒操作手册进行, 光学显微镜下观察, 阳性细胞染成靛蓝色或紫蓝色。采用半定量计分法进行结果分析^[7]: 0 分, 无阳性信号出现; 1 分, 偶见阳性染色信号; 2 分, 局灶性阳性染色信号出现; 3 分, 弥漫性阳性信号出现。光学显微镜下每例大鼠随机选 2 张切片, 每张切片选取细胞分布均匀的 5 个高倍视野作为观察区, 计算平均值。

1.4 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据处理采用 SPSS13.0 统计软件, 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 Dunnett's T3 法。P<0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血浆睾酮浓度的变化

与假手术组睾酮浓度相比 [(2.47±0.53) μg/L], 去势组明显降低 [(0.28±0.07) μg/L, P<0.01], 补充睾酮组无明显差异 [(2.92±0.94) μg/L, P>0.01], 而氟他胺组升高近 3 倍 [(6.13±0.42) μg/L, P<0.01]。

2.2 心肌组织形态学变化

与假手术组比较, 去势组有明显的心肌组织细胞病理损伤改变, 而补充生理剂量睾酮组心肌组织

病理损伤不明显, 氟他胺组与去势组有类似的组织病理变化 (图 1)。

图 1 心肌组织病理形态学改变

Figure 1 Pathological changes of myocardial tissue(HE ×200)
A: 去势组, 心肌细胞肥大且伴有空泡变性, 细胞核形态退变, 小区肌纤维有溶解与断裂; B: 补充睾酮组, 细胞形态基本正常, 未见明显纤维溶解; C: 氟他胺组, 心肌细胞空泡样变性明显, 细胞核形态欠规则, 且心肌细胞的排列极性消失; D: 假手术组, 细胞形态正常, 心肌纤维化程度不明显

2.3 心肌组织衰老相关 -半乳糖苷酶活性变化

与假手术组比较, 去势组 SA-β-Gal 活性明显增强[(2.0 ± 0.9) vs (1.2 ± 0.7), $P < 0.01$]; 与去势组比较, 生理剂量补充睾酮组 SA-β-Gal 活性[(0.9 ± 0.8) vs (2.0 ± 0.9)]明显减弱 ($P < 0.01$); 与单纯补充生理剂量睾酮组比较, 氟他胺组 SA-β-Gal 活性[(2.1 ± 0.8) vs (0.9 ± 0.8)]反而增强 ($P < 0.01$); 补充生理剂量睾酮组与假手术组 SA-β-Gal 活性相比[(0.9 ± 0.8) vs (1.2 ± 0.7)], 差异无统计学意义 ($P = 0.309$, 图 2)。

3 讨论

1995 年, Dimri 等^[4]研究结果提示 SA-β-Gal 是体内外细胞衰老研究的标志。目前老年医学研究中广泛采用 SA-β-Gal 作为一种公认标志物。刘新强等^[8]以 H₂O₂ 为刺激因子刺激乳鼠心肌成纤维细胞, 促使乳鼠发生衰老, 并用生理浓度睾酮干预其衰老, 结果表明 H₂O₂ 刺激后 72h, SA-β-Gal 染色阳性率升高, 细胞增殖能力减弱, 细胞发生衰老; 当给予乳鼠生理浓度的睾酮干预后, 可增加细胞增殖率, 抑制 SA-β-Gal 阳性细胞的表达, 减轻细胞的衰老, 而雄

图 2 心肌组织 SA-β-Gal 检测

Figure 2 Myocardial SA-β-Gal staining (×200)
A: 去势组; B: 补充睾酮组; C: 氟他胺组; D: 假手术组

激素受体阻断剂氟他胺则可部分阻断上述生理浓度睾酮的保护作用。本研究以去势雄性大鼠为动物模型, 给予外源性干预后观察心肌组织中 SA-β-Gal 活性的变化。结果表明, 去势后未补充丙酸睾酮的大鼠血浆睾酮浓度明显低于假手术组, 心肌组织中 SA-β-Gal 活性显著增强, 与此同时 HE 染色发现形态学变化较假手术组明显, 出现心肌细胞肥大伴空泡样变性, 部分心肌纤维发生溶解与断裂, 但心肌纤维化程度不明显; 而给予生理浓度睾酮补充后, 心肌组织中 SA-β-Gal 活性与假手术组无明显差异, 同时形态学变化差异也不明显。研究中心肌组织的病理改变与 SA-β-Gal 活性虽然不能一一对应, 但是衰老细胞不管处于哪一期都不再发挥生理功能, 这样的细胞不断增多后势必出现组织形态上的改变。这一结果与刘新强等人的研究结果相一致。

本实验结论证实氟他胺可部分阻断上述生理浓度睾酮的保护作用, 这也提示衰老的心肌组织可能从生理浓度的睾酮治疗中获益, 产生此效应的途径与组织内存在的雄激素受体 (androgen receptor, AR) 相关。既往研究结果表明, 正常雄性大鼠心肌组织中 AR 分布很广泛。本研究提示雄激素对心肌衰老的干预作用是通过 AR 途径, 但是其机制尚未阐明, 对于衰老的两大类理论机制具体有何种影响还需更深入的研究来证实。本研究存在的问题是干预时间短, 对于延长干预时间后有何变化是否还和现在的结果一致并未观察, 另外去势后给予干预时间起点还存在争议。

衰老细胞和处于死亡相 M_2 期的细胞都可以表达 β -Gal (pH=6), X-Gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷)染色不能区分这两类^[9], 不能认为染色阳性就是衰老细胞, 但是这两种状态下的细胞都不再分裂增殖, 故可以认为染色阳性的细胞已处于增殖死亡状态, 丧失其应有的生理功能, 进而组织器官出现功能障碍。近年来大量研究结果显示, β -Gal 的表达在老化细胞中显著增强, 且这种增强与细胞衰老表型的出现和细胞增殖能力的丧失相平行, 可间接反应细胞的老化程度。笔者的研究发现, 维持生理浓度睾酮的大鼠心肌组织病理形态无明显改变, 但低于生理浓度睾酮的大鼠心肌组织细胞肥大且伴有空泡变性, 细胞核形态退变, 小区肌纤维有溶解与断裂; 给予氟他胺后血浆睾酮浓度显著高于生理浓度, 形成较高浓度的睾酮结果对心肌组织损害加重。这就涉及到雄激素治疗的安全性问题, 故在应用雄激素治疗某些疾病时要充分权衡其利弊。但是, 笔者实验中并未观察到心肌纤维化程度的明显变化, 各组之间的差异很小, 出现这样的结果可能与干预措施的持续时间长短有关, 这也就提示我们人体激素紊乱对机体功能的影响是个慢性的过程, 关于是否对老年男性早期给予雄激素补充或在机体功能障碍时给予补充治疗, 还需要全面权衡其利弊。

总之, 雄激素水平的变化可影响心肌组织中 SA- β -Gal 活性, 其效应可能是通过 AR 的途径发挥的, 提示心脏老化与雄激素密切相关, 但其机制尚不清楚, 有待进一步的探索。

【参考文献】

- [1] Gooren LJ. Androgens and male aging: Current evidence of safety and efficacy[J]. Asian J Androl, 2010, 12(2): 136-151.
- [2] Rizk A, Robertson J, Raber J. Behavioral performance of tfm mice supports the beneficial role of androgen receptors in spatial learning and memory[J]. Brain Res, 2005, 1034(1-2): 132-138.
- [3] Tunez I, Feijoo M, Coado JA, *et al.* Effect of testosterone on oxidative stress and cell damage induced by 3-nitropropionic acid in striatum of ovariectomized rats[J]. Life Sci, 2007, 80(13): 1221-1227.
- [4] Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9363-9367.
- [5] Lin SM, Tsao CM, Tsai SK, *et al.* Influence of testosterone on autotomy in castrated male rats[J]. Life Sci, 2002, 70(20): 2335-2340.
- [6] Yamasaki K, Noda S, Muroi T, *et al.* Effects of in utero and lactational exposure to flutamide in SD rats: comparison of the effects of administration periods[J]. Toxicology, 2005, 209(1): 47-54.
- [7] 李开龙, 王建民, 赵玲, 等. 缺血再灌注损伤后肾小管上皮细胞的衰老演变及其意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21(10): 610-615.
- [8] 刘新强, 吴赛珠, 邢晓雯, 等. 睾酮对心脏老化过程中心肌纤维化的干预研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2009, 11(9): 726-730.
- [9] Wei W, Sedivy JM. Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures[J]. Exp Cell Res, 1999, 253(2): 519-522.

(编辑: 周宇红)