

· 基础研究 ·

不同剂量外源性睾酮对去势雄兔动脉粥样硬化的影响

龙 梅, 武 强

(解放军总医院国际医学中心, 北京 100853)

【摘 要】目的 探讨不同剂量的外源性睾酮对高胆固醇饲料饲养的去势(双侧睾丸切除)雄兔血清性激素、血脂、载脂蛋白水平以及动脉粥样硬化(AS)程度的影响。方法 成熟雄性新西兰白兔 35 只, 随机分为假手术组、单纯去势安慰剂组、低剂量睾酮补充组(3 mg/kg)、生理水平睾酮补充组(6 mg/kg)和高剂量睾酮补充组(12 mg/kg), 每组 7 只。术前 1 周和术后第 16 周采血, 测量血清总睾酮(TT)、雌二醇(E₂)、脱氢表雄酮(DHEA)及总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、载脂蛋白 A₁(ApoA₁)、载脂蛋白 B(ApoB)水平。计算 AS 指数(AI)。16 周末处死动物, 测量主动脉胆固醇含量, 观察主动脉病理形态改变, 测量血管内膜和中膜的厚度和比值。结果 雄兔去势和去势后补充不同剂量睾酮, 分别形成严重睾酮缺乏症及低睾酮血症、生理性睾酮血症和高睾酮血症。单纯去势安慰剂组, 低剂量睾酮补充组和高剂量睾酮补充组的血清 TC, TG, LDL-C 和 ApoB 水平及 LDL-C/HDL-C, AI 和 ApoB/ApoA₁ 均明显高于生理睾酮组和假手术组($P<0.01$)。雄兔补充睾酮后, 单纯去势安慰剂组、低剂量睾酮补充组和高剂量睾酮补充组的主动脉胆固醇含量最高, 分别是(75.8±5.9), (76.3±6.1) 和 (75.2±2.3) mmol/g 蛋白, 组间相比较无显著差异($P>0.05$), 为生理剂量睾酮补充组水平的 2.5 倍($P<0.01$)。生理剂量睾酮补充组的主动脉胆固醇含量最低, 相当于假手术组的 2/3[(21.0±5.6) vs (30.9±8.4) mmol/g, $P<0.01$]。单纯去势安慰剂组、低剂量睾酮补充组和高剂量睾酮补充组的主动脉血管内膜/中膜比分别为(0.65±0.21), (0.62±0.24) 和 (0.65±0.25), 组间相比较无显著差异($P>0.05$), 均明显大于假手术组(0.31±0.07) ($P<0.01$)。生理剂量睾酮补充组的血管内膜/中膜比最小(0.26±0.08), 明显低于假手术组($P<0.01$)。结论 外源性生理剂量的睾酮能改善高脂饲养的去势雄兔血脂、脂蛋白和载脂蛋白异常, 外源性高和低剂量睾酮均不能改善血脂、脂蛋白和载脂蛋白的异常, 且在抗 AS 方面无益。

【关键词】 睾酮; 雌二醇; 血脂; 脂蛋白; 载脂蛋白; 动脉粥样硬化; 去势; 兔

【中图分类号】 R543.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00063

Effects of different levels of exogenous testosterone on atherosclerosis in castrated rabbits

LONG Mei, WU Qiang

(International Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of different levels of exogenous testosterone on atherosclerosis, sex hormone, blood lipid and apolipoprotein in castrated rabbits. **Methods** Thirty-five male New Zealand white rabbits were randomly divided into sham operation group, placebo group, hypotestosteronemia group(3 mg/kg), phytotestosteronemia group(6 mg/kg), hypertestosteronemia group(12 mg/kg), with 7 in each group. Total testosterone (TT), estradiol (E₂), dehydroepiandrosterone(DHEA) lipids, total cholesterol(TC), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein cholesterol(LDL-C), triglyceride(TG), apolipoprotein A₁(ApoA₁), and apolipoprotein B(ApoB) were tested at 1 week before operation and 16 weeks after operation respectively. Atherosclerosis index(AI) was obtained(AI=(TC-HDL-C)/HDL-C). After 16 weeks, the aorta was observed morphometrically and immunohistologically, and the aortic cholesterol content was examined. **Results** Average serum lipids, atherogenic lipoproteins and apolipoproteins were significantly higher in placebo group, hypotestosteronemia and hypertestosteronemia groups than in sham operation group and phytotestosteronemia group ($P<0.01$). The aortic cholesterol content was (75.8±5.9), (76.3±6.1) and (75.2±2.3)mmol/g protein respectively in placebo group, hypotestosteronemia group and hypertestosteronemia group, with no significant difference between the three groups ($P>0.05$), which was 2.5 times of that of phytotestosteronemia group[(21.0±5.6)mmol/g protein]. The aortic cholesterol content was

收稿日期: 2011-03-04; 修回日期: 2011-07-24

基金项目: 解放军总医院“十五”医学科研基金课题(001YQ02)

通讯作者: 武 强, Tel: 010-68295753, E-mail: china301wuqiang@tom.com

(21.0 ± 5.6) and (30.9 ± 8.4) mmol/g respectively in phystestosteronemia group and sham operation group ($P < 0.01$). The ratio of intima/tunica media was (0.65 ± 0.21), (0.62 ± 0.24) and (0.65 ± 0.25) respectively in placebo group, hypoteststeronemia group and hyperteststeronemia group respectively, with no significant difference between the groups ($P > 0.05$), which was higher obviously than that in sham operation group [(0.31 ± 0.07) , $P < 0.01$]. It was the lowest in physteststeronemia group (0.26 ± 0.08), which was significantly lower than that in sham operation group ($P < 0.01$). **Conclusions** Exogenous testosterone, only at physiological level, has beneficial effects on serum lipids, lipoproteins, apolipoproteins and atherosclerosis in castrated male rabbits.

【Key words】 testosterone; lipid; lipoprotein; apolipoprotein; atherosclerosis; castration; rabbit

This work was supported by the Fifteenth Medical Scientific Research Foundation of Chinese PLA Hospital (001YQ02).

近年研究表明,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)与雄激素水平有着密切的关系^[1]。楼亚梅等^[2]研究揭示,生理水平的睾酮可以保护雄性家兔血管内皮,抑制动脉损伤后内膜增生;而Webb等^[3]对低水平睾酮的老年男性补充小剂量睾酮,缓解了老年男性心绞痛症状;宋静等^[4]也研究证实,冠心病患者较正常对照组患者睾酮水平明显降低。以上研究均表明低睾酮可能是AS及冠心病形成和发展中的一种重要的和潜在的危险因素。另外Bemini等^[5]报道,在睾酮水平低下的男性患者,超生理剂量的外源性雄激素也可能促进AS发生。本实验从病理生理方面,进一步观察血清睾酮水平对高脂血症雄兔AS的影响,为雄激素补充治疗男性冠心病的机制进行了有益的探索。

1 材料与方法

1.1 动物分组

成年健康(8~12周龄)的雄性新西兰白兔35只(解放军总医院动物实验中心提供)。给予相同环境和饮食2周后随机分成假手术对照组、单纯去势安慰剂组、低剂量睾酮补充组、生理剂量睾酮补充组和高剂量睾酮补充组,每组7只。所有家兔喂饲1%胆固醇饲料,每天100g,自由饮水。

1.2 去势雄兔模型制作及睾酮补充

氯胺酮(50mg/kg)肌内注射麻醉后,切开双侧阴囊正中皮肤,向两侧分离,去势组找到睾丸后予以切除,假手术组不摘除。去势术后睾酮补充组开始肌内注射十一酸睾酮(testosterone undecanoate, TU),每2周1次,根据预试验资料,低剂量睾酮补充组、生理剂量睾酮补充组和高剂量睾酮补充组的注射TU剂量分别选择3、6和12mg/kg,假手术组和安慰剂组肌内注射生理盐水,共16周。TU注射液由浙江仙居制药厂生产,批号(90)卫药准字X-144号。

1.3 血清性激素和血清、载脂蛋白胆固醇水平的测量

去势前1周内,实验最后一次肌内注射TU后7d,雄兔空腹24h后,上午8:00耳缘静脉采集血标本,测量血清总睾酮(total testosterone, TT)、雌二醇(estradiol, E₂)、脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone,

DHEA)以及总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、甘油三酯(triglyceride, TG)、载脂蛋白A₁(apolipoprotein A₁, ApoA₁)、载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)。计算AS指数(atherogenic index, AI), $AI = (TC - HDL-C) / HDL-C$ 。性激素检测试剂:美国DPC公司产品,TT试剂盒,批号LKTT10156;E₂试剂盒,批号:LKE210239;DHEA-SO₂试剂盒,批号:LKED-S10162。由解放军总医院内分泌实验室应用Immulite自动生化仪器检测。血脂和载脂蛋白指标由解放军总医院生化科自动生化仪检测。

1.4 主动脉壁和肝脏脂质含量测量

末次TU注射后7d,麻醉处死实验雄兔。自降主动脉起始处至髂总动脉分叉处剥离主动脉,剔除结缔组织和脂肪,滤纸吸干。取一段胸主动脉,切碎研磨后以氯仿/甲醇(2:1体积比)浸泡24h萃取脂肪,进行生化测量。主动脉胆固醇含量采用蛋白质含量进行校正。结果表示为每克蛋白质组织所含TC量(mmol/g蛋白)。采用同样方法测量肝脏脂质含量。

1.5 主动脉形态学检查

取胸主动脉一段,4%甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋后,连续切薄片(切片厚度4μm),找到最大粥样斑块,进行HE染色和免疫组化染色检测平滑肌标记物,平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, SMA)。

1.6 主动脉血管内膜和中膜厚度测量

每组动脉切片10张,采用Image tool多媒体彩色病理图像分析系统测量内膜、中膜厚度。所取线段以与内外弹力板垂直为准,且取内膜的最大厚度,每张切片取6个视野测定,取平均值,计算内膜厚度/膜厚度值。

1.7 统计学处理

使用SPSS9.0统计软件进行数据分析,所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对性激素影响

实验前雄兔体重、月龄、血清 TT、E₂、E₂/TT 和血常规及肝、肾功能等基础值各组间无差异 ($P>0.05$)。假手术组实验前后血清 TT、E₂ 和 E₂/TT 无明显改变, 安慰剂组血清 TT 水平明显低于去势前和假手术组水平 ($P<0.01$), 睾酮补充后, 低剂量睾酮补充组略高于安慰剂组, 仍明显低于假手术组和去势前水平 ($P<0.01$), 相当于低睾酮血症; 生理水平睾酮组血清 TT 水平明显高于安慰剂组 ($P<0.01$), 接近假手术组和去势前水平 ($P>0.05$); 高剂量睾酮补充组血清 TT 水平明显高于去势前和假手术组水平 ($P<0.01$), 相当于高睾酮血症。

2.2 对血清和载脂蛋白胆固醇水平的影响

实验前血清 TC, TG, LDL-C, HDL-C, ApoA₁, ApoB 和 LDL-C/HDL-C, AI, ApoB/ApoA₁ 等基础值组间比较无明显差异 ($P>0.05$)。组内比较各实验组雄兔 TC, TG, LDL-C, ApoB 和 LDL-C/HDL-C, AI, ApoB/ApoA₁ 在补充 TU 后明显升高 ($P<0.01$), ApoA₁ 明显降低 ($P<0.01$)。安慰剂组, 低剂量睾酮补充组和高剂量睾酮补充组的 TC, TG, LDL-C, LDL-C/HDL-C, AI, ApoB, ApoB/ApoA₁ 组间相比无

显著差异, 均明显高于生理睾酮组和假手术组 ($P<0.01$; 表 1)。

2.3 对主动脉壁胆固醇含量的影响

假手术组的主动脉胆固醇含量相当于安慰剂组的 44%[(21.24±2.51) vs (48.68±23.96) mmol/g 蛋白, $P<0.01$]; 高剂量睾酮补充组和低剂量睾酮补充组相近, 分别为 (98.2±32.1) 和 (106.8±65.2) mmol/g 蛋白, 明显高于其它各组; 生理睾酮组为 (13.14±3.6) mmol/g 蛋白, 仅相当于假手术组的 2/3 ($P<0.01$)。

2.4 主动脉形态学观察

5 组主动脉内膜均有不同程度的增厚、粗糙或脂纹。安慰剂组、高剂量睾酮补充组和低剂量睾酮补充组动脉内膜增厚最明显, 泡沫细胞最多。假手术组动脉内膜增厚程度和泡沫细胞数量略低, 而生理睾酮组内膜增厚不明显, 泡沫细胞数最少 (图 1, 图 2)。

与对主动脉壁胆固醇含量的影响结果相似, 假手术组的主动脉内膜/中膜比相当于安慰剂组的 1/2, 而高剂量睾酮组和低剂量睾酮补充组与安慰剂组相近, 生理剂量睾酮补充组最低, 明显低于假手术组 ($P<0.01$; 表 2)。

表 1 去势和补充不同剂量的十一酸睾酮对兔血脂和脂蛋白的影响

($n=7$, $\bar{x} \pm s$)

指标		假手术组	单纯去势安慰剂组	低睾酮血症补充组	生理睾酮补充组	高睾酮血症补充组
TC(mmol/L)	补充前	1.21±0.05	1.20±0.08	1.12±0.19	1.17±0.59	1.19±0.13
	补充后	7.19±0.88**	17.27±0.70***	13.25±2.10***	3.90±1.57**△	11.13±2.80***
TG(mmol/L)	补充前	0.68±0.22	0.69±0.17	0.67±0.13	0.68±0.18	0.70±0.20
	补充后	0.97±0.40	1.89±0.57***	2.30±0.93***	0.93±0.27**△	1.46±0.19***
LDL-C(mmol/L)	补充前	0.27±0.12	0.29±0.17	0.26±0.16	0.28±0.18	0.29±0.15
	补充后	3.31±0.67	5.38±0.29***	4.82±0.80***	1.63±0.61**△	4.56±0.82***
HDL-C(mmol/L)	补充前	0.48±0.12	0.49±0.17	0.48±0.11	0.52±0.13	0.51±0.10
	补充后	0.75±0.34	0.85±0.17	0.77±0.18	0.83±0.51	0.80±0.17
LDL-C/HDL-C	补充前	0.58±0.23	0.59±0.17	0.55±0.22	0.57±0.18	0.59±0.17
	补充后	5.07±1.85	6.44±0.94***	6.63±1.87***	3.35±0.27**△	13.50±4.49***
AI	补充前	1.37±0.22	1.39±0.17	1.35±0.21	1.34±0.18	1.35±0.32
	补充后	10.38±2.91	19.74±3.63***	16.84±3.42***	7.10±1.69**△	13.50±4.48***
ApoA ₁ (mmol/L)	补充前	0.22±0.02	0.23±0.03	0.21±0.03	0.22±0.02	0.22±0.02
	补充后	0.03±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.02	0.04±0.02
ApoB(mmol/L)	补充前	0.09±0.01	0.10±0.02	0.09±0.03	0.11±0.05	0.09±0.02
	补充后	0.21±0.03	0.21±0.12***	0.19±0.01***	0.12±0.05**△	0.22±0.07***
ApoB/ApoA ₁	补充前	0.45±0.03	0.49±0.07	0.48±0.03	0.50±0.11	0.51±0.10
	补充后	7.13±0.69	9.55±1.87***	11.42±2.69***	8.04±2.04**	9.63±2.65***

注: TC: 总胆固醇; TG: 甘油三酯; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; AI: 动脉粥样硬化指数。与补充前比较, ** $P<0.01$; 与生理剂量睾酮补充组和假手术组补充后比较, *** $P<0.01$; 与假手术组以及其他各组补充后比较, △ $P<0.01$

图 1 各组实验兔主动脉形态

A: 正常雄兔; B: 单纯去势安慰剂组; C: 低睾酮补充组; D: 高睾酮补充组; E: 生理睾酮补充组; F: 假手术组
单纯去势安慰剂组、低睾酮血症补充组及高睾酮血症补充组兔主动脉管腔均粗糙, 内膜可见针尖至绿豆大小的圆形或不规则形黄色斑块或者脂质条纹, 油红 O 染色明显着色。生理睾酮血症补充组组主动脉管腔粗糙程度及油红 O 染色的大小和范围明显减轻

3 讨 论

雄兔去势和去势后补充不同剂量的外源性睾酮可产生不同水平的血清 TT, E₂ 和 E₂/TT, 因而形成严重睾酮缺乏症以及低睾酮血症、生理性睾酮血症和高睾酮血症。低睾酮血症时, 血清 TT 水平低下, E₂/TT 仍高于正常; 高睾酮血症时血清 TT 水平较高, E₂/TT 明显低于正常; 生理睾酮血症时血清 TT 接近正常水平, 去势后轻度升高, E₂ 水平保持不变, E₂/TT 也接近正常。

实验发现, 与假手术相比, 高胆固醇饲养雄兔去势后内源性睾酮严重缺乏导致 AS 性血脂和载脂蛋白异常加重, 动脉血管壁胆固醇含量和主动脉内膜厚度增加明显, 最终导致 AS 加重, 表明内源性雄激素对雄性 AS 具有很强的抑制作用。此外, 研究还观察到, 雄兔去势后补充睾酮过量或不足, 其高脂血症致 AS 性血脂和载脂蛋白的异常以及 AS 并无改善和减轻, 即只有外源性睾酮生理性补充, 血脂和载脂蛋白异常才得明显改善, AS 程度明显减轻。Nettleship 等^[6]在其研究中也观察到生理性睾酮补充对动脉的保护作用; 而外源补充过量睾酮或补充睾

图 2 主动脉内膜免疫组化染色 (DAB×100)

A: 低睾酮补充组; B: 生理睾酮补充组
低睾酮补充组明显增厚的内膜和中膜 SMA 均呈强阳性, 细胞浆着棕黄色颗粒状染色(安慰剂组、高睾酮补充组亦呈强阳性); 生理睾酮补充组增厚内膜 SMA 染色较弱, 呈弱阳性, 细胞浆着浅黄色, 中膜 SMA 呈强阳性, 细胞浆着棕黄色颗粒状染色

表 2 各组兔主动脉内膜、中膜厚度 (n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	内膜(μm)	中膜(μm)	内膜/中膜
假手术组	169.8±19.1	526.1±19.1	0.31±0.07
单纯去势安慰剂组	554.9±30.8**	828.3±25.6**	0.65±0.21**
低睾酮补充组	681.5±48.6**	997.1±41.9**	0.62±0.24**
生理睾酮补充组	426.8±17.9##	643.8±10.0##	0.26±0.08##
高睾酮补充组	150.1±78.8**	580.5±20.6**	0.65±0.25**

注: 与生理睾酮组比较, **P<0.01; 与假手术组比较, ##P<0.01

酮不足均可能促进 AS 的发生^[7]。过量睾酮可能使促进损伤的血管细胞黏附分子-1 表达增加和内膜增生、血浆脂质过氧化物升高、主动脉脂质含量增加、主动脉内膜黏附的单核细胞及泡沫细胞数增加,从而促进雄性早期 AS 的形成。外源性生理性睾酮补充可能降低血致炎细胞因子如白介素 1 及肿瘤坏死因子水平,升高抗炎因子白介素 10 水平、减少主动脉内皮细胞中细胞黏附分子 1 的表达,使血管舒张、增加血管反应性,同时减少血栓前因子纤溶酶原激活物抑制剂和纤维蛋白素原、减少 LDL-C、增加胰岛素敏感性等,从而防止 AS^[8-12]。研究还表明,雄激素使体外培养的小鼠动脉平滑肌细胞中芳香化酶活性明显升高,推测睾酮可能通过芳香化酶转化成雌激素,使血清 E₂ 水平轻度升高,动脉壁长期与高水平的雌激素接触,而对 AS 起预防作用。Montalcini 等^[13]研究也表明,绝经期妇女内皮功能损伤是雌激素水平和睾酮水平双重下降的结果。

综上所述,去势后雄兔形成严重的内源性睾酮缺乏,发生血脂代谢异常,AS 加重。外源性睾酮补充时,形成不同水平的血清睾酮,对去势雄兔血脂和 AS 影响不同。外源性高和低睾酮血症对改善血脂异常、抗 AS 均无益,仅外源性生理剂量睾酮能改善高脂饲养的去势雄兔血脂异常,减轻 AS。但生理水平睾酮补充组与假手术组间为何会出现主动脉胆固醇含量、内膜增厚程度、泡沫细胞数量及主动脉内膜/中膜值的差异还有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 高倩萍, 富路, 李佳, 等. 雄激素对家兔动脉粥样硬化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(1): 72-74.
- [2] 楼亚梅, 徐哲荣, 杨云梅, 等. 十一酸睾酮对雄性家兔动脉内膜损伤后的修复作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(4): 272-275.
- [3] Webb CM, Elkington AG, Kraidly MM, *et al.* Effects of oral testosterone treatment on myocardial perfusion and vascular function in men with low plasma testosterone and coronary heart disease[J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101(5): 618-624.
- [4] 宋静, 魏毅东, 徐亚伟, 等. 血清睾酮水平与男性冠状动脉性心脏病的相关性[J]. 上海医学, 2010, (5): 459-461.
- [5] Bernini G, Versari D, Moretti A, *et al.* Vascular reactivity in congenital hypogonadal men before and after testosterone replacement therapy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(5): 1691-1697.
- [6] Nettleship JE, Jones TH, Channer KS, *et al.* Physiological testosterone replacement therapy attenuates fatty streak formation and improves high-density lipoprotein cholesterol in the Tfm mouse: an effect that is independent of the classic androgen receptor[J]. *Circulation*, 2007, 116(21): 2427-2434.
- [7] Svartberg J, von Mühlen D, Mathiesen E, *et al.* Low testosterone levels are associated with carotid atherosclerosis in men[J]. *J Intern Med*, 2006, 259(6): 576-582.
- [8] 张红霞, 李茵茵. 脂肪因子与动脉粥样硬化[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(17): 1761-1763.
- [9] 胡剑平, 谈世进. 雄激素对内皮相关心血管系统影响[J]. 国际心血管病杂志, 2009, 36(1): 44-46.
- [10] Nettleship JE, Pugh PJ, Channer KS, *et al.* Inverse relationship between serum levels of interleukin-1beta and testosterone in men with stable coronary artery disease[J]. *Horm Metab Res*, 2007, 39(5): 366-371.
- [11] Kienitz T, Quinkler M. Testosterone and blood pressure regulation[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(2): 71-79.
- [12] 龚群林. 睾酮与男性动脉粥样硬化相关危险因素研究进展[J]. 心血管病学进展, 2010, 31(1): 47-49.
- [13] Montalcini T, Gorgone G, Gazzaruso C, *et al.* Endogenous testosterone and endothelial function in postmenopausal women[J]. *Coron Artery Dis*, 2007, 18(1): 9-13.

(编辑: 任开环)