

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-05-0398-03

睾酮对雄性家兔腹主动脉损伤后内膜增生的作用

任国庆, 黄从新¹, 孙广辉, 侯建民

(镇江医学院附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001; 1. 武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[主题词] 睾酮; 增生; 兔

[摘要] 探讨雄激素睾酮对雄性家兔腹主动脉球囊损伤后内膜增生的作用, 选择健康雄性新西兰白兔 24 只, 随机分成对照组(假去势)、低睾酮血症组(单纯去势)和睾酮替代组(去势一周后加用长效十一酸睾酮单次肌注, 14 mg/kg), 去势 10 天后对所有动物行腹主动脉球囊损伤术。损伤后两周检测血浆睾酮、一氧化氮、超氧化物歧化酶及丙二醛水平, 并截取腹主动脉进行图像和增殖细胞核抗原分析。结果发现, 假去势对照组和睾酮替代组新生内膜面积和增殖细胞核抗原增殖指数明显低于低睾酮血症组 ($P < 0.01$), 且血浆一氧化氮水平明显上升, 丙二醛水平显著下降 ($P < 0.01$ 或 0.05)。结果提示, 生理水平的睾酮(内源或外源补充)有抑制动脉损伤介导的内膜增生作用, 其机制可能与睾酮增加一氧化氮的产生和抗氧化作用有关。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

Effect of Testosterone on Neointimal Proliferation after Rabbit Abdominal Aorta Injury

REN Guo-Qing, HUANG Cong-Xin¹, SUN Guang-Hui, and HOU Jian-Min

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001; 1. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

MeSH Testosterone; Hyperplasia; Rabbits

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect of testosterone on intimal proliferation after rabbit abdominal aorta balloon injury. **Methods** 24 male New Zealand white rabbits were divided randomly into control group ($n = 8$, sham castration), hypotestosteronemia group ($n = 8$, castration) and testosterone replacement group ($n = 8$, castration + testosterone undecanoate, 14 mg/kg). Abdominal aorta was not injured with 3 mm PTCA balloon until testosterone undecanoate had been injected for three days. After injury two weeks later, blood samples were obtained for detection of plasma testosterone, nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), and all the abdominal aortas were excised to be analyzed by computer.

Results The intimal area and PCNA proliferation index of control group and testosterone replacement group were significantly decreased than those of hypotestosteronemia group ($P < 0.01$), together with a significant increase in NO plasma level and significant decrease in MDA plasma level. No difference was observed between control group and testosterone replacement group in all parameters.

Conclusions Testosterone, at physiological level, inhibits the intimal proliferation induced by balloon injury in male rabbit abdominal aorta. It might be related to increasing the synthesis of NO and the effect antioxidation.

目前, 雌激素对女性心血管系统有保护作用已基本定论, 而雄激素与男性心血管系统的关系仍存在许多争议, 至少有两个事实使人们有理由怀疑雄激素对男性心血管系统存有不利影响, 一是男性冠心病的发病率较绝经前同年龄段女性高 3~5 倍, 另

一是男性运动员滥用雄激素导致心血管系统疾病提前发生。但是, 近年来的许多临床调查却发现雄激素不足会增加男性心血管系统疾病的发病危险^[1]。基础实验也证实, 雄激素能显著抑制巨噬细胞对胆固醇的摄取和泡沫细胞形成, 减少胆固醇在动脉粥样硬化模型兔主动脉壁中的聚集^[2], 降低内膜厚度^[3]。还有研究表明, 雄激素可通过非基因途径直接调节血管张力, 扩张冠状动脉, 增加心脏血液供应^[4,5]。本文探讨雄激素睾酮对内皮损伤后内膜增生的影响。

[基金项目] 镇江市科委基金(批准号为 SG2000086)资助。

[作者简介] 任国庆, 男, 1964 年 10 月出生, 硕士, 主治医师, 课题负责人, 现从事心血管内科临床、教学和科研工作, 研究方向为心脏病的介入诊治。黄从新, 男, 1951 年 6 月出生, 教授, 博士研究生导师, 国务院特殊津贴获得者。孙广辉, 男, 1945 年 10 月出生, 教授, 硕士研究生导师。

1 材料和方法

1.1 动物分组

成年健康雄性新西兰白兔 24 只(镇江医学院动物中心提供),随机分成对照组(假去势)、低睾酮血症组(单纯去势)和睾酮替代组(去势一周后加用长效十一酸睾酮单次肌注, 14 mg/kg), 每组 8 只, 均普通颗粒饲料饲养, 自由饮水。长效十一酸睾酮由浙江仙居制药厂生产。

1.2 球囊损伤动脉内膜

去势 10 天后对所有动物行腹主动脉内膜损伤术。以氯氨酮肌注麻醉后, 分离并穿刺右侧股动脉, 成功置入 5F 动脉鞘管后送入球囊导管(Cordis 公司产品, 球囊直径 3 mm, 长 20 mm) 20 cm 左右, 向球囊内注入肝素生理盐水维持在 5 个大气压, 慢慢回拉至股动脉, 如此反复三遍后, 撤出导管和鞘管, 压迫止血。所有过程均为无菌操作。

1.3 标本收集和处理

动脉损伤两周后从耳缘静脉采血检测血浆睾酮、一氧化氮(nitric oxide, NO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平。放射免疫法测定睾酮(试剂盒购于天津德普生物技术和医学产品有限公司), 硝酸还原酶法测定 NO(试剂盒购于温州伊利康生物技术有限公司), 黄嘌呤氧化酶法和分光光度法分别测定 SOD 和丙二醛(试剂盒购于南京建成生物工程研究所)。

表 1. 各组血浆睾酮、一氧化氮、超氧化物歧化酶和丙二醛水平的比较

Table 1. Comparison of the plasma levels of testosterone, NO, SOD and MDA in different groups

Groups	Testosterone (nmol/L)	NO (μ mol/L)	SOD (NU/L)	MDA (μ mol/L)
Control	6.73 \pm 1.11 ^b	61.93 \pm 10.17 ^b	103.11 \pm 8.87 ^a	3.68 \pm 0.40 ^b
Hypotestosteronemia	0.76 \pm 0.26	48.28 \pm 8.64	88.23 \pm 9.36	4.99 \pm 0.35
Testosterone replacement	7.58 \pm 1.09 ^b	59.74 \pm 10.82 ^b	97.60 \pm 12.01	3.84 \pm 0.59 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with hypotestosteronemia group.

2.2 免疫组织化学及图像分析结果

与低睾酮血症组相比, 对照组和睾酮替代组新生内膜面积、内膜与中膜面积之比及 PCNA 增殖指

抽血后迅速分离并截取腹主动脉 1.5 cm, 用 0.9% 生理盐水冲洗后放入 10% 甲醛溶液中固定 12~14 h, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色。用免疫组织化学中的 S-P 法检测血管壁中平滑肌细胞增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达(试剂盒均购于福州迈新生物技术开发公司), 用 HPIAS2000 型图像分析软件测量管腔面积、内弹力板包绕面积、外弹力板包绕面积。并计算内膜面积(内弹力板面积-管腔面积)、中膜面积(外弹力板面积-内弹力板面积)及内膜与中膜面积之比。

1.4 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 三组间比较用方差分析, 两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 血浆睾酮、一氧化氮、超氧化物歧化酶和丙二醛含量的变化

与低睾酮血症组相比, 对照组和睾酮替代组血浆睾酮和 NO 水平显著升高, 而丙二醛明显下降(P 均 < 0.01)。对照组 SOD 明显高于低睾酮血症组($P < 0.05$), 睾酮替代组 SOD 较低睾酮血症组有升高趋势, 但无统计学差异。对照组与睾酮替代组间各指标差异不显著(表 1, Table 1)。

数显著下降, 管腔面积明显增大($P < 0.01$ 或 0.05)。但对照组与睾酮替代组之间各指标差异不显著(表 2, Table 2)。

表 2. 腹主动脉增殖细胞核抗原增殖指数及图像分析结果

Table 2. Results of PCNA proliferation index and morphometric analysis to the abdominal aorta

Groups	Proliferation index	Luminal area (mm^2)	Intimal area (mm^2)	Area ratio of intimal to media (%)
Control	0.62 \pm 0.07 ^b	0.27 \pm 0.06 ^b	0.14 \pm 0.03 ^b	32.29 \pm 7.80 ^a
Hypotestosteronemia	0.76 \pm 0.06	0.15 \pm 0.05	0.18 \pm 0.02	38.77 \pm 3.80
Testosterone replacement	0.66 \pm 0.07 ^a	0.26 \pm 0.08 ^b	0.15 \pm 0.01 ^b	31.06 \pm 5.99 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with hypotestosteronemia group.

3 讨论

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖是动脉粥样硬化发生的中心环节,也是经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的主要病理基础^[6]。因此,寻找有效抑制 VSMC 增殖的途径对防治动脉粥样硬化和经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄具有十分重要的意义。本实验发现,内源性睾酮或外源性睾酮替代至正常生理水平对雄性家兔内皮损伤介导的内膜增生有抑制作用,其机制可能与睾酮能提高 NO 释放和增加抗氧化能力有关。

NO 由 L-精氨酸在内皮细胞内合成,其功能比较广泛,除调节血管张力、抑制血小板粘附和聚集、阻止单核细胞在内皮细胞上的粘附、抑制脂质过氧化外,NO 还可以明显减少血小板源生长因子诱导的 VSMC 增殖。张月兰等^[7]发现 NO 可通过环磷酸鸟苷或环磷酸腺苷途径降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,使血管平滑肌舒张并抑制其细胞增殖。李玉光等^[8]在给糖尿病家兔服用 L-精氨酸提高血中 NO 浓度后,发现 NO 能显著抑制血管内膜增生。本实验在对雄性家兔去势后,NO 水平明显下降,导致 NO 抑制 VSMC 增殖的保护作用被削弱,从而促进内皮损伤后的内膜增生。

血管在受到介入损伤后,局部 VSMC 和成纤维细胞可通过 NADH/NADPH 氧化酶途径产生大量的活性氧,而活性氧作为第二信使可以激活细胞内多种蛋白激酶和转录因子,诱导 VSMC 的 sis 基因表达^[9],促进 VSMC 增殖,因此,机体清除活性氧的能力直接影响着内皮损伤后 VSMC 增殖的程度。Barud 等^[10]报道伴有雄激素不足的男性心肌梗死病人血中间接反应活性氧水平的 MDA 明显升高。本实验在单纯去势的雄性家兔中也观察到了类似结果,同时还发现睾酮水平与具有清除活性氧能力的 SOD 活性呈正相关关系,睾酮通过提高血液 SOD 活性,增加了机体清除活性氧的能力,从而抑制 VSMC 增殖和内膜增生。

高脂血清可促进培养的 VSMC 发生表型改变并增殖^[11],而降脂治疗能显著抑制内皮损伤后的内膜增生^[12]。Hussein 等^[13]报道单纯去势可使雄性家兔脂质代谢明显异常,本实验也发现去势后雄性家兔的总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白显著增高(另

外报道),因此可以推测,调节血脂可能是抑制内膜增生的又一途径。

参考文献

- [1] English KM, Mandour O, Steeds RP, et al. Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms [J]. *Eur Heart J*, 2000, **21**: 890-894
- [2] Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, et al. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: A study in castrated, cholesterol-fed rabbits [J]. *Circ Res*, 1999, **84**: 813-819
- [3] Bruck B, Brehme U, Gugel N, et al. Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 2192-199
- [4] Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, et al. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 1690-696
- [5] Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, et al. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo [J]. *Circulation*, 1996, **94**: 2614-619
- [6] Macleod DC, Strauss BH, Jong M, et al. Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1994, **23**: 59-65
- [7] 张月兰, 齐国先, 刘利, 等. 非洛地平对家兔血管成形术后内皮功能及内膜增生的影响 [J]. *中国循环杂志*, 1999, **14**: 78-80
- [8] 李玉光, 盛小刚, 宋卉, 等. 糖尿病兔动脉损伤后内膜增生的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 226-228
- [9] Gadiparthi NR, Bradford CB. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and protooncogene expression [J]. *Circ Res*, 1992, **70**: 593-599
- [10] Barud W, Wojcicka G, Palusinski R, et al. Dihydrotestosterone therapy of men with coronary artery disease and processes of peroxidation [J]. *Pol Merkuriusz Lek*, 1999, **7**: 248-250
- [11] 周晓霞, 苏佩清, 杨鹤梅, 等. 三七总皂甙对人高脂血清诱发的胎儿血管平滑肌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 43-45
- [12] Igarashi M, Takeda Y, Ishibashi N, et al. Suppression of neointimal thickening by a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, BAYW6228, and its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth [J]. *British J of Pharmacol*, 1997, **120**: 1172-1178
- [13] Hussein SA, Azab ME, Abdel Maksoud H. Metabolic changes concerning the effect of castration on some blood constituents in male rabbits [J]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 1999, **106**: 113-118

(此文 2001-04-05 收到, 2001-09-27 修回)

(此文编辑 文玉珊)