

[文章编号] 1674-8115(2011)10-1380-04

· 论著 ·

去势对雄性大鼠心肌结构的影响

施超, 李艳香, 翟华玲, 姜博仁, 郭明皓, 陆颖理

(上海交通大学医学院附属第九人民医院内分泌代谢病科, 上海 200011)

[摘要] 目的 研究低雄激素对心肌组织结构的影响。方法 雄性 SD 大鼠随机分为对照组($n=8$)、去势组($n=7$)和雄激素替代组($n=8$)。对照组进行假去势手术;去势组进行去势手术;雄激素替代组进行去势手术后肌肉注射十一酸睾酮替代治疗。10周后取各组大鼠血清,放射免疫法测定血清睾酮浓度;取各组大鼠心肌组织,苏木精-伊红染色后行光学显微镜观察;透射电子显微镜观察心肌超微结构。结果 与对照组和雄激素替代组相比,去势组血清睾酮浓度显著降低($P < 0.01$)。光学显微镜观察显示去势组心肌细胞肿胀肥大、变性,核明显增大,心肌纤维排列紊乱,断裂、溶解,收缩呈波浪状;电子显微镜观察可见去势组心肌纤维排列不规则,断裂、溶解,肌纤维间糖原、脂肪滴聚集,线粒体肿胀,线粒体大部分嵴不清晰,细胞闰盘增宽。与去势组相比,雄激素替代组病理改变明显减轻。结论 去势后雄性大鼠心肌出现明显的组织病理损伤,外源性睾酮替代治疗可以一定程度上改善病变,低雄激素水平对男性心肌有一定的损伤作用。

[关键词] 低雄激素; 心肌; 超微结构

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.10.005

[中图分类号] R58

[文献标志码] A

Influence of castration on myocardial structure of male rats

SHI Chao, LI Yan-xiang, ZHAI Hua-ling, JIANG Bo-ren, GUO Ming-hao, LU Ying-li

(Department of Endocrinology and Metabolism, the Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of low androgen on myocardial structure of male rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group ($n=8$), castration group ($n=7$) and androgen replacement group ($n=8$). Rats in control group underwent sham castration, those in castration group were castrated, and those in replacement group were given testosterone undecanoate after castration. Ten weeks later, serum concentration of testosterone was measured by radioimmunoassay. Pathological changes of myocardial tissues were observed by light microscopy and electron microscopy.

Results Serum concentration of testosterone in castration group was significantly lower than those in control group and androgen replacement group ($P < 0.01$). Light microscopy revealed that in castration group, there were myocardial swelling, hypertrophy, degeneration and nucleus enlargement, the nuclei significantly enlarged, the myocardial fibers fractured, dissolved, contracted and became wavy, and arranged in disorder. Electron microscopy revealed that in castration group, myocardial fibers arranged irregularly, fractured and dissolved, the glycogen and flat drop between muscle fibers accumulated, mitochondria swelled, most of the ridges in mitochondria were not clear, and the intercalated disk widened. Compared with castration group, the above-mentioned pathological changes in androgen replacement group were significantly lessened. **Conclusion** Obvious myocardial histopathological injury may occur in male rats after castration, and exogenous testosterone replacement therapy may work in some degree. Low androgen may do harm to myocardium of males.

[Key words] low androgen; myocardium; ultrastructure

近年来,雄激素与心血管疾病间的关系日益受到重视,但雄激素对心血管疾病影响的研究结论不一。流行病学调查显示男性性别是心血管疾病的独立危险因子^[1],且运动员中滥用雄激素造成的心血

管系统不良反应(左心室肥厚、心肌病、心肌梗死、猝死等)已有相关报道^[2],由此可以推论雄激素过量会对心脏产生有害作用。多项临床研究^[3,4]又表明,低雄激素水平可以导致冠心病发病率上升。因此,有

[基金项目] 上海市科委基金(09140903700)(Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 09140903700)。

[作者简介] 施超(1979—),男,住院医师,硕士生;电子信箱:shichaophy@163.com。

[通信作者] 陆颖理,电子信箱:luy662003@yahoo.com.cn。

关雄激素与心血管疾病两者间关系的许多问题有待进一步明确。到目前为止,雄激素对心血管系统影响的研究主要集中在血管内皮、血管平滑肌、糖脂代谢、凝血纤溶系统及血小板功能等冠心病相关因素方面,而心肌细胞结构才是决定心脏正常功能的基础,这方面的研究尚未见相关报道。本研究拟通过建立低雄激素大鼠模型,并采用外源性雄激素对去势大鼠进行替代治疗,光学显微镜和电子显微镜下观察大鼠心肌病理改变情况,探讨低雄激素对雄性大鼠心肌结构的影响,为临床防治中老年男性心血管疾病提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物来源及饲养

健康的8周龄清洁级纯系SD雄性大鼠30只,由中国科学院上海实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(沪)2008-0016,使用许可证号为SYXK(沪)2007-0007。动物体质量260~273g,在室温18℃~25℃、相对湿度50%~80%的条件下分笼饲养于上海市第九人民医院SPF级动物房。

1.2 动物分组及模型建立

大鼠稳定饲养2周后,按体质量随机分为3组。
①去势组($n=7$):11只大鼠腹腔注射10%水合氯醛(4mL/kg)麻醉后睾丸纵切口,剪开睾丸鞘膜,挤出睾丸及附睾,结扎睾丸动脉,切除双侧睾丸,缝合皮肤,建成低雄激素模型,存活7只。
②对照组($n=8$):8只大鼠给予假去势手术,即按照上述步骤只切开皮肤,但不切除睾丸后缝合,全部存活。
③雄激素替代组($n=8$):11只大鼠施行去势手术后存活8只,给予十一酸睾酮(testosterone undecanoate,TU)(浙江仙琚制药股份有限公司)每月50mg/kg肌肉注射替代治疗。上述各组建模同时给予尾静脉采血用于血清睾酮检测。在相同条件下,继续正常饲养10周,每周测量大鼠体质量。

1.3 标本采集

大鼠模型建立10周后,将各组大鼠腹腔注射10%水合氯醛(4mL/kg)麻醉,常规消毒,暴露胸腔,心脏采血,离心分离血清;在左心室相同部位取各组大鼠的心肌组织迅速置于4%多聚甲醛固定,用于光学显微镜观察;各组另取约1mm³心肌组织迅速置于2.5%戊二醛磷酸缓冲液(pH=7.2)固定,用于电子显微镜观察。

1.4 血清睾酮浓度的测定

采用双抗体放射免疫法(radioimmunoassay,RIA)检测血清睾酮浓度。标记化合物分别为¹²⁵I-T,用γ-计数仪测定沉淀部分的放射强度(睾酮放射免疫试剂盒购自北京东雅生物技术研究所)。先用双管法以睾酮标准物浓度及其计数率绘制标准曲线,然后根据标准曲线双管法测量各标本睾酮浓度。

1.5 形态学检测

①光学显微镜观察:4%多聚甲醛固定的心肌标本经常规脱水,石蜡包埋,4~5μm厚度切片,每个标本切片2张,常规脱蜡、水化,苏木精染色10min,伊红染色1min,脱水、透明、封片,光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织的形态学变化。②透射电子显微镜观察:取2.5%戊二醛固定的心肌标本(每组随机抽取3个标本),1%四氧化锇固定,丙酮阶梯脱水、置换,EPON812包埋、切片,铀铅染色,在透射电子显微镜(PHILLIPS CM 120,荷兰)下观察各组大鼠心肌细胞的超微结构改变。

1.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间体质量和睾酮浓度比较采用student-t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模情况分析

造模前后对照组、去势组和雄激素替代组3组大鼠体质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验前三组大鼠睾酮浓度差异无统计学意义($P > 0.05$);造模后,去势组大鼠血清睾酮浓度显著低于对照组和雄激素替代组($P < 0.01$),表明去势致低雄激素的动物模型成功建立(表1)。

2.2 心肌组织病理学观察

苏木精-伊红染色显示对照组心肌细胞排列整齐,心肌纤维结构清晰,细胞间隙均匀(图1A);去势组心肌细胞肿胀肥大、变性,核明显增大,心肌纤维断裂、溶解,收缩呈波浪状,排列紊乱,间质水肿(图1B);与去势组相比,雄激素替代组心肌结构较去势组明显改善,大部分心肌纤维结构清晰,部分肌原纤维溶解,间质疏松(图1C)。

2.3 心肌组织超微结构观察

超微结构观察显示:对照组心肌纤维结构清晰,

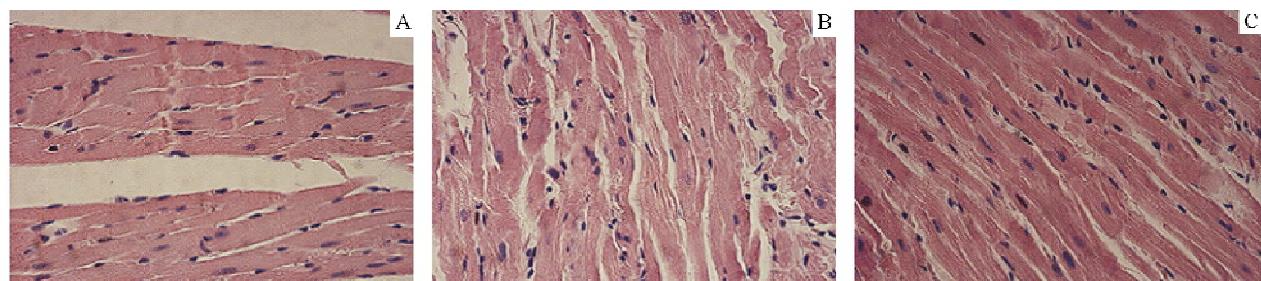
肌丝排列规则,H带M线明显,细胞核形态规则,核膜完整,线粒体数量和形态正常,线粒体膜完整,线粒体嵴清晰可见,肌质网及二联体结构正常;去势组部分心肌细胞变性,肌纤维排列不规则、断裂,部分肌浆溶解,肌纤维间大量糖原、脂肪滴聚集,核膜凹陷,皱折不规则,线粒体肿胀、大小不等,线粒体嵴断

裂、溶解及空泡形成,肌质网及二联体高度扩张,细胞闰盘增宽;雄激素替代组与去势组相比,心肌纤维排列较规则,部分有断裂、溶解,肌纤维间散在糖原、脂肪滴聚集,线粒体排列较规则,部分有轻度肿胀伴小空泡形成,部分线粒体嵴不清晰,肌质网及二联体轻度扩张,细胞闰盘完整(图2)。

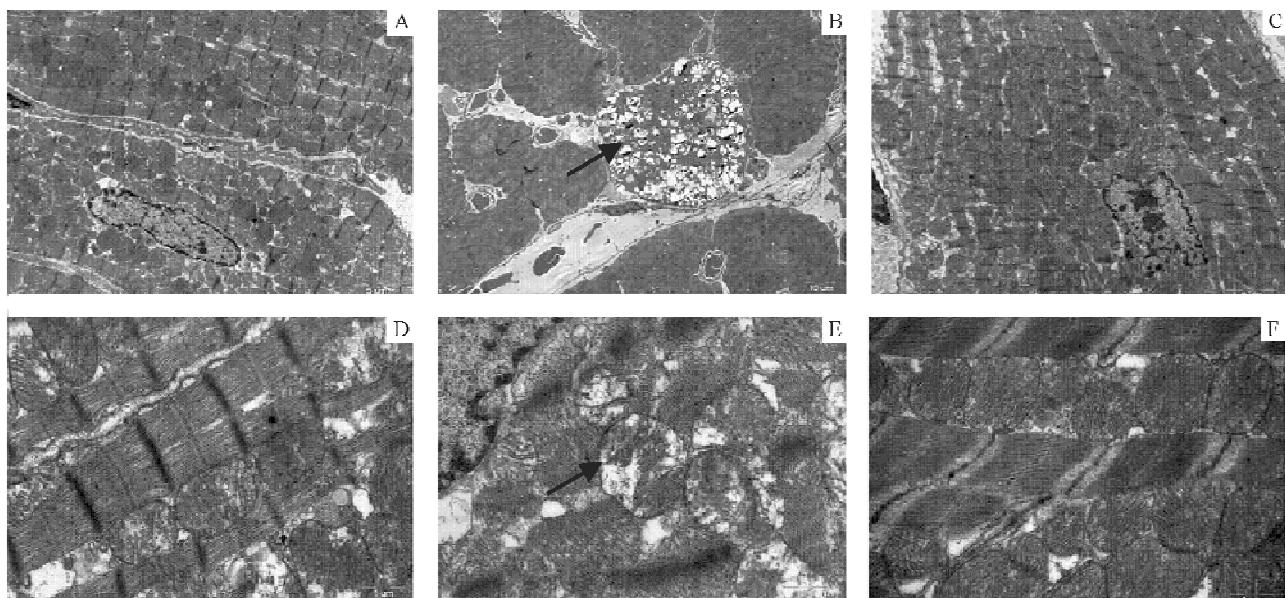
表 1 各组大鼠体质量和血清睾酮浓度比较($\bar{x} \pm s$)Tab 1 Body weight and serum concentration of testosterone in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量/g		血清睾酮/(nmol/L)	
	造模前	造模后	造模前	造模后
对照组(n=8)	388.4 ± 14.0	513.2 ± 33.5	14.53 ± 5.55	11.52 ± 3.84 ^①
去势组(n=7)	390.3 ± 10.1	518.9 ± 30.8	15.33 ± 4.04	2.83 ± 1.43
雄激素替代组(n=8)	387.0 ± 16.5	507.8 ± 28.7	13.96 ± 3.47	9.86 ± 4.05 ^①

^①P < 0.01 与去势组比较。



A. 正常对照组；B. 去势组；C. 雄激素替代组。

图 1 三组大鼠心肌组织病理学观察 苏木精-伊红染色 $\times 200$ Fig 1 Histopathological observation of myocardium in three groups HE staining $\times 200$ 

A、D. 对照组；B、E. 去势组；C、F. 雄激素替代组；A~C. $\times 5800$ ；D~F. $\times 24500$ 。图 B 中箭头显示部分心肌细胞变性；图 E 中箭头显示线粒体嵴断裂、溶解及空泡形成。

图 2 三组大鼠心肌组织超微结构观察

Fig 2 Ultrastructure of myocardium in three groups

3 讨 论

雄激素是一种由胆固醇合成的类固醇激素, 对维持生殖机能和机体的发育有重要作用。各种雄激素中, 双氢睾酮的生物活性最强, 睾酮次之, 其余雄激素的生物活性仅及睾酮的 1/5。95% 以上的睾酮均由睾丸 Leydig 细胞合成和分泌, 其分泌受下丘脑-垂体-性腺轴的调节。血浆中 50%~60% 的睾酮与性激素结合球蛋白 (sex hormone binding globulin, SHBG) 结合, 40%~50% 与白蛋白结合, 1%~3% 为游离状态, 后两种形式具有生物有效性, 称为生物有效性睾酮 (bioavailable testosterone, Bio-T)。Bio-T 在 50 岁时下降可达 50%, 70 岁时可降至 20%, 老年男性更年期的临床症状与 Bio-T 下降明显相关。

近年来, 雄激素水平降低与心血管疾病的关系引起越来越多的关注。国外报道^[5], 50% 以上老年心血管患者血浆睾酮水平低于该年龄组正常范围。欧洲癌症前瞻性研究 (EPIC-Norfolk)^[6] 显示, 男性内源性睾酮水平与心血管疾病及总的致死率存在负相关。目前认为, 男性睾酮水平或其活性下降将促进高血压和动脉粥样硬化等疾病的发生发展, 其共同的病理生理机制为血管内皮系统即内皮祖细胞-内皮细胞的损伤, 并最终导致心肌的有氧代谢障碍。本实验通过建立低雄激素大鼠模型, 观察大鼠心肌组织的形态学变化。光学显微镜观察发现, 去势组心肌细胞肿胀肥大, 心肌纤维断裂溶解, 排列紊乱呈波浪状; 电子显微镜观察显示, 去势组心肌纤维间大量糖原、脂肪滴聚集, 线粒体集中、肿胀变性。上述结果表明: 睾酮水平降低对雄性大鼠心肌造成了实质性组织病理损伤。同时, 本研究采用肌注 TU 的方法作为替代治疗^[7], 发现替代组心肌组织的病理损伤有明显改善。

低雄激素致心肌病理改变是一个多途径的复杂过程。首先, 以往研究认为雄激素主要通过其受体发挥作用。雄激素受体属于介导亲脂类配体的核受体超家族一员, 主要位于睾丸间质细胞核内, 也存在于心肌、动脉、血管平滑肌等多种组织器官中^[8,9], 睾酮可以通过受体直接作用于上述组织和器官。在动物实验, 用睾酮输注狗的冠状动脉和小血管可以使血管舒张^[10]; 睾酮替代治疗可以使有或无内膜的离体兔主动脉和冠状动脉显著扩张, 且无性别间的差异^[11]。在人群研究中, Webb 等^[12]发现, 生理量的睾酮能够改善老年男性的血管内皮功能, 舒张冠状动

脉, 缓解心绞痛症状, 改善心肌缺血。其次, 雄激素亦可以通过非受体途径发挥调节代谢等作用。近年的研究^[13,14] 表明, 雄激素缺乏促进男性代谢综合征及 2 型糖尿病的发展, 而代谢综合征是心血管疾病的一种早期状态。用睾酮干预疗法不仅可以改善性腺功能减退, 而且对多种代谢参数如腰围、腹部内脏肥胖指数、胰岛素敏感性、血糖控制及高血脂具有正面效应^[15,16], 而这些参数均为影响正常心肌代谢的危险因子。此外, 雄激素也具有抗凋亡、降低炎症因子(如肿瘤坏死因子、白介素-1 和 -6)表达以及促进抗炎因子表达的作用^[17]。但到目前为止, 有关雄激素缺乏对心血管系统的影响机制仍存在一定的分歧, 有待于进一步的实验研究。

综上所述, 本实验观察到低雄激素大鼠存在明显的心肌病变, 外源性睾酮替代治疗可以一定程度上改善病变。再次证实低雄激素水平状态对男性心肌有一定的损伤作用, 低雄激素水平是男性心血管疾病的一个独立危险因素, 也为雄激素替代治疗提供了理论依据。

致谢: 感谢上海交通大学基础医学院细胞生物学教研室朱平老师的指导及帮助。

[参考文献]

- [1] Janghorbani M, Hedley AJ, Jones RB, et al. Gender differential in all-cause and cardiovascular disease mortality [J]. Int J Epidemiol, 1993, 22(6): 1056–1063.
- [2] Dickerman RD, Schaller F, Prather I, et al. Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids [J]. Cardiology, 1995, 86(2): 172–173.
- [3] Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C, et al. The relationship of natural androgens to coronary heart disease in male: a review [J]. Atherosclerosis, 1996, 125(1): 1–13.
- [4] Barrett-Connor EL. Testosterone and risk factors for cardiovascular disease in men [J]. Diabete Metab, 1995, 21(3): 156–161.
- [5] Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, et al. Low serum testosterone and mortality in male veterans [J]. Arch Intern Med, 2006, 166(15): 1660–1665.
- [6] Khaw KT, Dowsett M, Folkard E, et al. Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular disease and cancer in men: European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) Prospective Population Study [J]. Circulation, 2007, 116(23): 2694–2701.
- [7] Callies F, Kollenkirehen U, von zur Muhlen C, et al. Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003, 111(4): 203–208.

(下转第 1397 页)

- [2] Beloosesky R, Gold R, Almog B, et al. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio [J]. Int J Mol Med, 2004, 14(2): 207.
- [3] Kaltsas GA, Androulakis II, Tziveriotis K, et al. Polycystic ovaries and the polycystic ovary syndrome phenotype in women with active acromegaly [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2007, 67(6): 917–922.
- [4] Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson BM, et al. Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3: 44–48.
- [5] Berga SL, Daniels TL. Can polycystic ovary syndrome exist without concomitant hypothalamic dysfunction? [J]. Semin Reprod Endocrinol, 1997, 15(2): 169–175.
- [6] Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance polycystic ovary syndrome and type 2 diabetes mellitus [J]. Fertil Steril, 2002, 77(6): 1095–1105.
- [7] Jayagopal V, Kipatrick ES, Jennings PE, et al. The biological variation of testosterone and sex hormone-binding globulin (SHBG) in polycystic ovary syndrome: implications for SHBG as a surrogate marker of insulin resistance [J]. Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(4): 1528–1533.
- [8] Qin KN, Rosenfield RL. Role of cytochrome P450c17a in polycystic ovary syndrome [J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 145: 111–121.
- [9] Prelevic GM. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 1997, 9(3): 193–201.
- [10] Teede HJ, Hutchison S, Zoungas S, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease risk in women with PCOS [J]. Endocrine, 2006, 30(1): 45–53.
- [11] Li CZ, Zhang SH, Shu CD, et al. Rat model of insulin-resistant induced by high-fat feed [J]. Basic Medical Science and Clinics, 2000, 20(3): 93–95.

[收稿日期] 2011-06-14

[本文编辑] 吴 洋

(上接第 1383 页)

- [8] 王彩云, 雷立权, 邱曙东. 大鼠心肌中雄激素受体的免疫组化研究 [J]. 西安医科大学学报, 2000, 1(5): 345–347.
- [9] 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.
- [10] Medras M, Jankowska E. Testosterone and atherosclerosis in males during andropause [J]. Pol Merkur Lekarski, 1999, 6(34): 205–207.
- [11] Yue P, Challerjeck K, Beale C, et al. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta [J]. Circulation, 1995, 91(4): 1154–1160.
- [12] 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.
- [13] Traish AM, Guay A, Feeley R, et al. The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction [J]. J Androl, 2009, 30(1): 10–22.
- [14] Traish AM, Seid F, Guay A. The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance [J]. J Androl, 2009, 30(1): 23–32.
- [15] Altman R, Motton DD, Kota RS, et al. Inhibition of vascular inflammation by dehydroepiandrosterone sulfate in human aortic endothelial cells: roles of PPARalpha and NF-kappaB [J]. Vascul Pharmacol, 2008, 48(2–3): 76–84.
- [16] Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, et al. Low testosterone level is an independent determinant of endothelial dysfunction in men [J]. Hypertens Res, 2007, 30(11): 1029–1034.
- [17] Malkin GJ, Pugh PJ, Jones RD, 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.

[收稿日期] 2011-07-01

[本文编辑] 吴 洋