

雌雄激素联合作用对高脂血症小鼠 血脂水平及凝血功能的影响

戴雯, 李艳, 郑红云, 许淑文

(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430000)

【摘要】 目的 探讨雌雄激素联合作用对高脂血症小鼠血脂水平及凝血功能的影响。**方法** 对小鼠行去势手术后通过高脂饮食建立高脂血症模型,通过给予不同激素将老鼠分为 5 组。造模结束后采集小鼠血液,一部分小鼠分离血清检测小鼠血脂水平,一部分小鼠分离血浆检测凝血功能。**结果** 高脂饮食后,小鼠血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平较对照组相比明显升高,凝血酶原时间、活化部分凝血酶原时间时间明显缩短 ($P < 0.05$),给予雌雄激素联合治疗后,与造模组相比,小鼠血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平较对照组相比明显下降,凝血酶原时间、活化部分凝血酶原时间时间明显延长 ($P < 0.05$),而与对照组无明显差异。**结论** 雌雄激素联合治疗可以调节血脂,显著降低低密度脂蛋白的水平,调节凝血功能,提示雌雄激素联合作用可以降低冠心病的发病风险,为冠心病的激素治疗提供新思路。

【关键词】 雌激素;雄激素;高脂血症;凝血功能

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0029-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.007

The synergistic effect of estradiol and testosterone on the lipids and coagulation function in mice with hyperlipidemia

DAI Wen, LI Yan, ZHENG Hong-yun, XU Shu-wen

(Renmin Hospital of Wuhan University, Department of clinical laboratory, Wuhan 430000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of synergistic effect of estradiol and testosterone on the level of lipids and coagulation function in mice with hyperlipidemia. **Methods** We established a mouse model in hyperlipidemia, giving estradiol (1 $\mu\text{g}/\text{d}$), testosterone (7 $\mu\text{g}/\text{d}$) or estradiol combined testosterone (1 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 + 7T $\mu\text{g}/\text{d}$), respectively. After 14 weeks, we collected the blood from the mice, separated the serum to detect the lipids level, separated the plasma to test the coagulation function. **Result** Compared with controls, after high-fat diet, the serum level of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL) were significantly increased, PT and APTT were shorter ($P < 0.05$). However, after treating with estradiol combined testosterone, compared with cases, the serum level of C, TG and HDL were lower and PT, APTT were longer ($P < 0.05$), had no significance with controls. **Conclusion** The synergistic effect of estradiol and testosterone can mediate the lipids, reduce the level of LDL, regulate the coagulation function, reduce the risk of coronary heart disease, and also provide a new strategy for hormone therapy in coronary heart disease.

【Key words】 Estrogen; Androgen; Hyperlipidemia; Coagulation function

[基金项目] 武汉大学自主科研项目(410500191)。

[作者简介] 戴雯(1987-),女,博士生,研究方向:激素调节与冠心病的防治。Email:diane919@qq.com。

[通讯作者] 李艳(1961-),女,教授,研究方向:激素调节与冠心病的防治。Email:yanlitf120@163.com。

冠心病(coronary heart disease, CHD)是日益突出的公共健康问题。雌激素替代治疗是基于雌激素对心血管系统的保护作用的治疗方案,曾被尝试用于治疗冠心病,但是大规模的临床试验表明,雌激素替代治疗使凝血功能增强,增加静脉血栓和脑卒中的风险,因而建议停止使用^[1]。雄激素作为现今激素的研究的热点,为激素替代治疗提供了新思路。实验研究结果显示,睾酮(testosterone, T)可以有效降低促炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 水平,并增加抗炎细胞因子 I-4 和 IL-10 水平^[2],并可提高纤维蛋白溶解系统及抗凝血酶Ⅲ的活性起到强大的抗血栓作用,延缓动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的病理进程,降低血栓形成和卒中的风险^[3]。分析雌雄激素心血管系统中的利弊,为雌雄激素联合治疗提供了理论依据。高脂血症是 CHD 发生发展的病理基础,本研究拟在动物学水平探讨雌雄激素联合作用对高脂血症小鼠血脂水平及凝血功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物模型的建立

本研究所选用的 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠购于武汉大学实验动物中心【SCXK(鄂)2014-0004】。无菌手术与动物饲养及给药均在武汉大学实验动物中心生物安全三级动物实验室内进行【SYXK(鄂)2014-0013】。对 8 周龄雌鼠进行分组,主要分为对照组和去势组。去势组行双侧卵巢切除术(ovariectomy, OVX)。OVX 2 周后,对小鼠进行剪尾采血。检测小鼠血清雌雄激素的水平,判断卵巢切除是否成功。在 10 周龄时,将小鼠分为以下 5 组:

A: 对照组(n=10)

B: 单纯造模组(n=10)

C: 造模+雌激素组(n=10)

D: 造模+雄激素组(n=10)

E: 造模+最适雌雄激素比例组(n=10)

BCDE 为去势组。对照组给予正常饮食喂养;单纯造模组给予高脂饮食(high fat diet, HD)(基础饲料 77.8%,蔗糖 2%,猪油 10%,胆固醇 2%,胆盐 0.2%)喂养;造模+雌激素组在给予高脂饮食喂养的同时,对小鼠进行雌二醇(estradiol, E2)(1 $\mu\text{g}/\text{d}$)灌胃治疗;造模+雄激素组在给予高脂饮食喂养的同时,对小鼠进行睾酮(7 $\mu\text{g}/\text{d}$)灌胃治疗;造模+雌雄激素联合组在给予高脂饮食喂养的同时,对小鼠进行雌激素(1 $\mu\text{g}/\text{d}$)和睾酮(7 $\mu\text{g}/\text{d}$)联合灌胃

治疗。造模与治疗持续 14 周。

1.2 小鼠血清与血浆取材

造模与治疗持续 14 周后,摘小鼠眼球,尽可能多的收集血液。每组中 5 只小鼠的血液收集至促凝的采血管中,用于分离血清;另 5 只小鼠的血液收集至枸橼酸钠抗凝(血液与抗凝剂的比例约为 9:1)的采血管中,用于分离血浆,进行凝血相关检查。

1.3 血清指标与凝血功能检测

小鼠雌、雄激素的检测采用 ELISA 方法。商品化小鼠雌二醇与睾酮检测试剂盒购于上海博谷生物公司。血脂的检测使用西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪进行检测。凝血功能的检测使用 sysmex CA7000 全自动凝血分析仪进行检测。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学分析软件进行统计分析,多组数据间比较应用 one-way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况分析

从表 1 可知,给予小鼠高脂饮食喂养后,体重明显增加($P < 0.05$)。对高脂饮食喂养的小鼠单纯的给予 E2 或 T 治疗,并不会使体重减轻($P < 0.05$)。然而,给予雌雄激素联合治疗组小鼠体重与造模组相比明显下降,与对照组小鼠体重无明显差异。

行 OVX 后,造模组血清 E2 和 T 水平较对照组均明显下降($P < 0.05$)。对小鼠进行 1 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 灌胃给药后,小鼠血清 E2 水平明显升高($P < 0.05$);对小鼠进行 7 $\mu\text{g}/\text{d}$ T 灌胃给药后,小鼠血清 T 水平,明显升高($P < 0.05$);而对小鼠进行 1 $\mu\text{g}/\text{d}$ E2 + 7 $\mu\text{g}/\text{d}$ T 联合给药时,小鼠血清 E2 和 T 的水平均明显升高($P < 0.05$),这提示通过灌胃给予小鼠 E2 和 T 治疗可以调节小鼠血清 E2 和 T 水平,证明给药有效。

2.2 雌雄激素联合作用对小鼠血脂的影响

如表 2 所示,与对照组相比,造模组血清 TC、TG 和 LDL 水平明显升高($P < 0.05$),HDL 水平明显降低($P < 0.05$)。而雌雄激素联合治疗中小鼠血清 TG 和 HDL 水平升高,TC 和 LDL 明显降低。这提示,雌雄激素联合治疗时对小鼠血脂具有明显的调节作用。

表 1 小鼠的一般情况分析($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 General features of experimental animals ($\bar{x} \pm s$)

	对照组 Control (n = 9)	造模组 OVX + HD (n = 9)	雌激素组 OVX + HD + E2 (n = 9)	雄激素组 OVX + HD + T (n = 10)	雌雄激素联合组 OVX + HD + E2 + T (n = 9)
体重 Body weight(g)	22.13 ± 0.25	46.75 ± 0.79 *	32.28 ± 1.21 *	44.68 ± 0.86 *	25.46 ± 0.44
雌二醇浓度 E2 (ng/ml)	2.63 ± 0.51	1.96 ± 0.34 *	3.74 ± 0.47 *	2.16 ± 0.98	5.37 ± 1.72 *
睾酮浓度 T (ng/ml)	13.00 ± 1.52	12.48 ± 1.40 *	13.56 ± 0.51	19.32 ± 4.31 *	15.32 ± 2.76 *
雌雄比值 E2/T ratio	0.19 ± 0.09	0.16 ± 0.02 *	0.28 ± 0.04 *	0.11 ± 0.04 *	0.35 ± 0.05 *

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。
Note: * Compared with control, $P < 0.05$.

表 2 不同组小鼠血脂水平检测($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 The level of plasma lipids in mice ($\bar{x} \pm s$)

	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
对照组 Control	2.43 ± 0.08	1.18 ± 0.17	1.26 ± 0.06	0.41 ± 0.01
造模组 OVX + HD	3.59 ± 0.23 *	2.10 ± 0.29 *	0.98 ± 0.06 *	0.52 ± 0.05 *
雌激素组 OVX + HD + E2	3.41 ± 0.25 *	0.74 ± 0.16 *#	1.17 ± 0.01	0.34 ± 0.03 **
雄激素组 OVX + HD + T	4.42 ± 0.11 *	2.15 ± 0.37 *	1.88 ± 0.20 *#	0.46 ± 0.03 #
雌雄激素联合组 OVX + HD + E2 + T	4.30 ± 0.14 *	1.14 ± 0.24 #	2.17 ± 0.12 **	0.27 ± 0.06 **

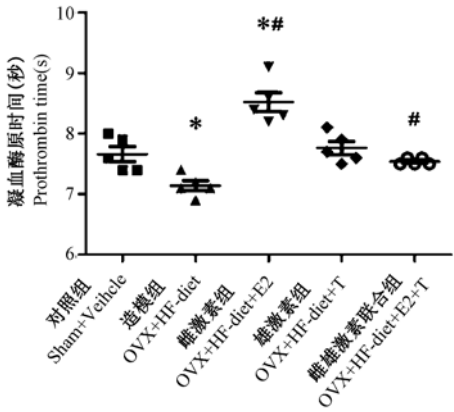
注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义; # 与造模组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。
Note: * Compared with control, $P < 0.05$; # Compared with OVX + HD, $P < 0.05$.

2.3 雌雄激素协同作用对小鼠血浆凝血指标的影响

凝血功能在动脉粥样硬化中具有重要作用,而目前对于激素替代治疗中对凝血功能的影响存在广泛争议,因此在本研究中我们用凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和活化部分凝血酶原时间(activated partial thromboplastin time, APTT)来评价小鼠的凝血功能。结果如图 1、2 所示,与对照组相比,造模组小鼠 PT 与 APTT 明显缩短($P < 0.05$),单纯 E2 治疗组中 PT 明显延长 APTT 明显缩短($P < 0.05$)。然而雌雄激素联合治疗组中 PT 和 APTT 时间恢复到对照水平,与对照组无差异。

3 讨论

雌激素替代治疗,已有几十年的历史,但结果存在广泛争议。大部分基础研究证实雌激素可以通过舒张血管、调节血脂、抗炎效应等对心血管具有保护作用。然而随着研究的深入,越来越多的学者认为,单纯给予雌激素不能完全预防和治疗女性冠心病。临床试验荟萃分析显示,口服雌激素



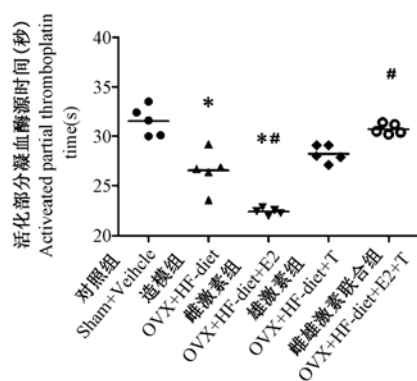
注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义;
与造模组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 1 雌雄激素对小鼠 PT 的影响

Note: * Compared with control, $P < 0.05$;
Compared with OVX + HD, $P < 0.05$.

Fig.1 The influence of estradiol combined testosterone on PT in mice

可增加凝血因子 VII,降低血纤维蛋白原、纤溶酶原激活物抑制剂 1^[4]。这种治疗可能增加静脉血栓栓



注: * 与对照组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义;

与造模组相比, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

图2 雌雄激素对小鼠 APPT 的影响

Note: * Compared with control, $P < 0.05$;

Compared with OVX + HD, $P < 0.05$.

Fig. 2 The influence of estradiol combined testosterone on APPT in mice

塞或脑卒中的风险。WHI (women health initiative) 的研究结果也认为: 雌激素联合孕激素治疗会增加冠心病、中风和肺栓塞发病危险性, 并建议停止使用。由此可见无论是雌激素替代治疗还是雌/孕激素联合治疗 CHD 效果均不理想。

针对雌激素治疗冠心病的不足, 越来越多的研究者开始研究雄激素对心血管系统的保护作用。雄激素尤其是睾酮可通过代谢产物间接和直接影响人类脉管系统, 进而对心血管起到积极的保护作用^[5]。大量实验研究结果一致认为: 睾酮可以有效降低促炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNF、IFN- γ 水平, 增加抗炎细胞因子 IL-4 与 IL-10 水平。此外, 睾酮自身作为免疫抑制剂可调节凝血系统。一方面可激活血栓素 A2 受体及血小板聚集, 另一方面可提高纤维蛋白溶解系统及抗凝血酶 III 的活性起到抗血栓、抗心绞痛的作用^[3]。睾酮强大的抗血栓作用可显著延缓 AS 病理进程并降低其发生静脉血栓甚至中风的危险。

国内外最新研究已开始关注雌雄激素联合治疗在动物疾病模型中的应用。有研究表明在雌雄激素在前列腺增生中发挥了重要的作用^[6]。只有当雌雄激素比例为 1:100 时, 才能在去势大鼠的体内明显减少前列腺基质的改变。另一个研究关注了雌雄激素平衡与脑血管系统的关系^[7]。他们的研究发现, 不同比例的雌雄激素对脑血管的血管功能、内皮功能、氧化应激和炎症有不同的影响。同时也有研究已初步观察雌激素联合雄激素治疗对

绝经后妇女心血管系统的影响。随机双盲研究显示^[8]: 绝经后妇女给予雌二醇 (2 mg) 联合睾酮 (40 mg) (E2/T) 治疗 24 周后检测 CHD 高危因子-CRP, IL-6、TNF- α 、VCAM-1 水平, 结果发现: E 联合 T 治疗可明显降低 CRP 水平。因此, 研究雌雄激素协同作用对动脉粥样硬化的影响, 对绝经后女性 CHD 的防治具有重要意义。

通过本研究结果我们发现, 雌雄激素联合作用可以明显降低高脂饮食诱导到的体重减轻。同时, 也可以调节血脂, 显著降低 LDL-C 的水平, 提示雌雄激素联合作用可以降低冠心病的发病风险。

虽然, 大多数研究表明雌激素具有抗动脉粥样硬化效应。然而, 临床研究显示 E2 可紊乱凝血功能^[9], 增加血液粘度、增加血栓发生的风险, 这也是公认的雌激素替代治疗失败的主要原因。本研究在早期动脉粥样硬化模型小鼠中给予生理剂量的 E2 后, 发现小鼠的 PT 时间明显延长而 APTT 时间明显缩短, 这提示小鼠的内源性和外源性凝血途径均紊乱, 为雌激素替代治疗的不良反应提供了理论依据。近期有一项研究表明睾酮可以抑制血栓形成^[10]。这提示睾酮可以抵抗雌激素紊乱凝血功能的不良效应, 为雌雄激素联合治疗提供了理论基础。

也有不少研究表明睾酮替代治疗对雄鼠的动脉粥样硬化具有保护作用。然而, 极少有睾酮替代治疗在 OVX 雌鼠中的研究。本研究结果显示, 与单纯 E2 治疗相比, 给予小鼠单纯 T 治疗对小鼠的凝血功能具有相反的效应。然而, 在给予雌雄激素联合治疗时, 小鼠的凝血功能得到了纠正。这也充分体现了雌雄激素联合治疗的互补作用。

在本研究中, 雌雄激素联合治疗可有效的调节血脂及凝血功能, 而且这些效应明显优于单纯雌二醇或睾酮治疗。这提示在早期动脉粥样硬化模型中雌激素与雄激素具有协同作用, 雌雄激素联合治疗可明显抑制动脉粥样硬化的发展。总而言之, 本研究为雌雄激素联合治疗提供了实验基础, 为冠心病的防治提供新思路。

参考文献:

- [1] Lee, L. V., J. M. Foody, Women and heart disease[J]. Cardiol Clin, 2011. 29: 35-45.
- [2] Manolakou, P., R. Angelopoulou, C. Bakoyiannis, et al. The effects of endogenous and exogenous androgens on cardiovascular disease risk factors and progression[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2009. 7: 44.

- [3] Brodin, E. , T. Vikan, J. B. Hansen, *et al.* Testosterone, hemostasis, and cardiovascular diseases in men [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2011. 37: 87 – 94.
- [4] Braunstein, J. B. , D. W. Kershner, P. Bray, *et al.* Interaction of hemostatic genetics with hormone therapy: new insights to explain arterial thrombosis in postmenopausal women [J]. *Chest*, 2002. 121: 906 – 920.
- [5] Villablanca, A. C. , M. Jayachandran, C. Banka, Atherosclerosis and sex hormones: current concepts [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010. 119: 493 – 513.
- [6] Xiang – Yun, L. , X. Ying-Wen, X. Chen-Jing, *et al.* Possible mechanism of benign prostatic hyperplasia induced by androgen-estrogen ratios in castrated rats [J]. *Indian J Pharmacol*, 2010. 42: 312 – 317.
- [7] Krause, D. N. , S. P. Duckles, R. J. Gonzales, Local oestrogenic/androgenic balance in the cerebral vasculature [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011. 203: 181 – 186.
- [8] Kocoska-Maras, L. , A. L. Hirschberg, B. Bystrom, *et al.* Testosterone addition to estrogen therapy - effects on inflammatory markers for cardiovascular disease [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2009. 25: 823 – 827.
- [9] Marjoribanks, J. , C. Farquhar, H. Roberts, *et al.* Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. 7: CD004143.
- [10] Li, S. , X. Li, J. Li, *et al.* Experimental arterial thrombosis regulated by androgen and its receptor via modulation of platelet activation [J]. *Thromb Res*, 2007. 121: 127 – 134.

[修回日期] 2015-07-14