

[文章编号] 1000 - 4718(2006)07 - 1442 - 03

睾酮对慢性心力衰竭雄性大鼠离体心肌收缩功能的作用

周强¹, 柯俊¹, 胡壮丽², 马业新¹(华中科技大学同济医学院¹附属同济医院心内科, ²药理学教研室, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的:探讨睾酮对慢性心功能不全雄性大鼠心肌收缩功能的影响。方法:67只SD大鼠分为:(1)正常对照组;(2)心衰组;(3)睾丸切除+心衰组;(4)睾丸切除+心衰+睾酮治疗组。采用离体心肌张力记录技术研究大鼠左室乳头肌收缩功能。结果:在睾丸切除的慢性心衰雄性大鼠,离体乳头肌的发展张力及张力上升最大速率随刺激频率变快而显著下降,生理量睾酮治疗明显改善了心衰心肌的此功能指标;并提高了心衰心肌对异丙肾上腺素(1 μmol/L)刺激的反应。结论:在慢性心功能不全雄性大鼠,睾酮能保护心衰心肌的收缩功能。

[关键词] 睾酮;心力衰竭;充血性;心肌收缩

[KEY WORDS] Testosterone; Heart failure, congestive; Myocardial contraction

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

慢性心力衰竭的治疗是目前心脏科医生面临的棘手问题。近年来随着ACE抑制剂、β受体阻滞剂和血管紧张素受体阻断剂的应用,慢性心力衰竭的治疗取得了重要的进展,但许多患者的临床症状如气短、乏力依然突出,严重影响了心衰患者的生活质量,而且慢性心力衰竭的死亡率仍然很高。深入揭示慢性心力衰竭的病理生理机制,寻找新的治疗药物或方法是目前心血管疾病研究的热点之一。有报道^[1]雄激素能增加男性慢性心力衰竭患者的劳力耐受,并改善患者的症状。然而这一治疗作用的机制尚不清楚。我们认为:除了雄激素对骨骼肌的合成代谢作用外,还可能作用于心肌,保护心力衰竭心肌的收缩功能?本实验通过注射阿霉素制备大鼠慢性心功能不全模型,从离体心肌水平探讨雄激素主要成份睾酮对雄性大鼠心肌收缩功能的影响。

材 料 和 方 法

1 实验分组

雄性SD大鼠,体重(230±20)g(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。随机分为4组:①正常对照组(control);n=12;②心力衰竭组(heart failure, HF);n=16;③睾丸切除+心力衰竭组(ORX+HF);n=19;④睾丸切除+心力衰竭+睾酮替代治疗组(ORX+HF+T);n=20。

2 动物模型复制

雄性大鼠睾丸切除术(orchidectomy, ORX)及睾酮(T)替代治疗:在6%水合氯醛(5 mL/kg)腹腔注射麻醉下,于大鼠阴囊行纵形切口,摘除双侧的睾丸。睾酮替代治疗:ORX+HF+T组术后2d起给予丙酸睾酮(溶剂)2 mg/kg皮下注射,每2d1次,剂量参照文献^[2]报道及预实验结果确定;其余各组给予皮下注射等量花生油作为阴性对照的安慰剂。

慢性心功能不全模型复制:腹腔注射盐酸阿霉素(AR,深

圳万乐药业公司),每次剂量为2.5 mg/kg,每5d1次,累积剂量达15 mg/kg,最后1次用药后观察3周,即成慢性心功能不全模型^[3]。Control组给等量生理盐水腹腔注射。

3 观测指标

3.1 血浆睾酮水平的测定 实验第7周处死大鼠,取腔静脉血EDTA-K₂抗凝,离心分离血浆,采用双抗体放射免疫法测血浆睾酮浓度。标记化合物为^[125I]-T,用γ-计数器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样品睾酮浓度。

3.2 离体心脏左室乳头肌收缩功能测定

①乳头肌标本制备 处死大鼠后取出心脏置于连续充气(95% O₂+5% CO₂)的改良K-H液中,仔细游离左室乳头肌并用3-0丝线结扎两端,腱索端连接于机械换能器,收缩信号经肌力换能器输入MS302型三道生理仪(附微分器)。左心室准确称重(LVM),并计算心脏重量指数LVW/BW(mg/g)。乳头肌用32℃改良K-H液非循环灌流(6 mL/min),95% O₂+5% CO₂混合气体充分供氧,pH值控制在7.35-7.45。乳头肌给予负荷1g,采用两根平行的铂金丝场刺激电极,输出频率0.5 Hz,方波波宽5 ms,刺激强度为120%阈强度。乳头肌平稳40 min后,调节微调以放松肌肉,再以静息张力为零时的肌肉长度开始,逐渐牵拉肌肉长度至最适初长L_{max},整个实验均保持L_{max}恒定。

②左室乳头肌收缩功能测定 测定指标包括发展张力(DT, g/mm²),张力上升最大速率(+dT/dt_{max}, g·s⁻¹/mm²)。实验完成后乳头肌吸干称重,计算其横截面积(CSA),张力和张力变化速率用CSA校正。测定乳头肌收缩功能:①不同刺激频率对心肌收缩功能的影响:即张力频率曲线。依次在

[收稿日期]2004-09-29

[修回日期]2004-11-25

Tel: 027-83663545; E-mail: zhouQ@tjh.tjmu.edu.cn

0.5、1、2、4 Hz 频率下刺激 2 min。后记录以上各指标,每改变频率时在基础频率 0.5 Hz 下平衡 5 min; ②异丙肾上腺素(ISO)对心肌收缩功能的影响:停止灌流后,ISO(1 μmol/L)(Sigma 公司,美国)通过微量移液管加入浴槽中,分别在加药前、加药后 3 min 时记录实验数据。

4 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异比较使用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较使用 *q* 检验(*q* test)。

结 果

1 实验大鼠基本指标及血浆雄激素水平

腹腔注射 AR 后大鼠出现中毒症状,表现为活动及进食减少,体重减轻,后期出现腹水。ORX + HF + T 组大鼠则依然活跃,一般情况较好。HF 组血浆 T 浓度明显低于正常对照组(175.5 vs 557.6 ng/dL, *P* < 0.01); 睾丸切除术后雄性大鼠血浆 T 水平极度下降,经 T 替代治疗恢复血浆 T 浓度至正

常水平。T 替代治疗显著增加了慢性心衰大鼠的心脏重量。实验大鼠基本指标见表 1。

2 左室乳头肌收缩功能

Control、HF、ORX + HF 和 ORX + HF + T 组在 0.5 Hz 频率下的基础 DT 分别为 1.65 ± 0.34、1.51 ± 0.31、1.52 ± 0.36、1.55 ± 0.33(g/mm²), 4 组对比并无显著差异。

2.1 不同刺激频率下的心肌收缩功能 如图 1 所示,随着刺激频率的增加,大鼠乳头肌发展张力均逐渐降低,表现为负性张力频率曲线,其中心衰大鼠乳头肌张力下降更明显。以 0.5 Hz 时 DT 为 100%,刺激频率从 0.5 Hz 增加到 4 Hz, control(*n* = 12)、HF(*n* = 9)、ORX + HF(*n* = 11) 和 ORX + HF + T(*n* = 14) 组大鼠乳头肌 DT 分别降低了(43.1 ± 8.8)%、(51.6 ± 6.2)%、(54.4 ± 7.9)% 和 (48.4 ± 6.3)%。HF 组 DT 比对照组降低更明显(*P* < 0.05)。与 ORX + HF 组相比,ORX + HF + T 组大鼠乳头肌 DT 下降较少,其差别显著(*P* < 0.05)。

表 1 实验大鼠基本指标及血浆雄激素水平

Tab 1 Animal characteristics and hormone determination ($\bar{x} \pm s$)

	BW(g)	LVW(mg)	Mortality rate (%)	LVW/BW(mg/g)	T(ng/dL)
Control(<i>n</i> = 12)	350 ± 25	924 ± 36	0	2.68 ± 0.08	557.6 ± 321.0
HF(<i>n</i> = 16)	294 ± 37	758 ± 56*	38%	2.52 ± 0.08*	175.5 ± 86.0*
ORX + HF(<i>n</i> = 19)	291 ± 40	736 ± 46	42%	2.49 ± 0.07	1.5 ± 1.3
ORX + HF + T(<i>n</i> = 20)	297 ± 46	826 ± 51*#	30%	2.72 ± 0.11#	596.6 ± 249.0#

* *P* < 0.01 vs control; # *P* < 0.01 vs ORX + HF. BW = body weight; LVW = left ventricle weight; T = testosterone serum levels.

在基础频率时,各组的张力上升最大速率(+*dT/dt*_{max}, g · s⁻¹/mm²)未显示出显著差异。而在 4 Hz 刺激频率下, control、HF、ORX + HF 和 ORX + HF + T 组大鼠乳头肌 +*dT/dt*_{max} 分别是 10.2 ± 2.5、7.7 ± 2.4、6.3 ± 2.2 和 8.6 ± 2.6 g · s⁻¹/mm²。ORX + HF 组大鼠乳头肌 +*dT/dt*_{max} 显著低于 ORX + HF + T 组(见图 2)。

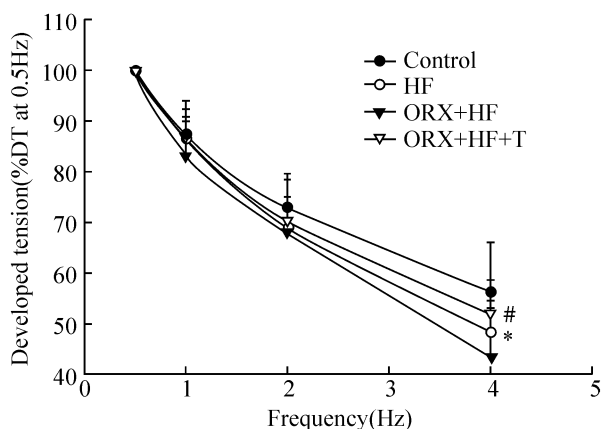


Fig 1 Influence of testosterone treatment on force - frequency relationships in ventricular muscle preparations of the male rats with chronic heart failure. * *P* < 0.05 vs control; # *P* < 0.05 vs ORX + HF.

图 1 睾酮治疗对慢性心衰雄性大鼠左室乳头肌张力频率曲线的影响

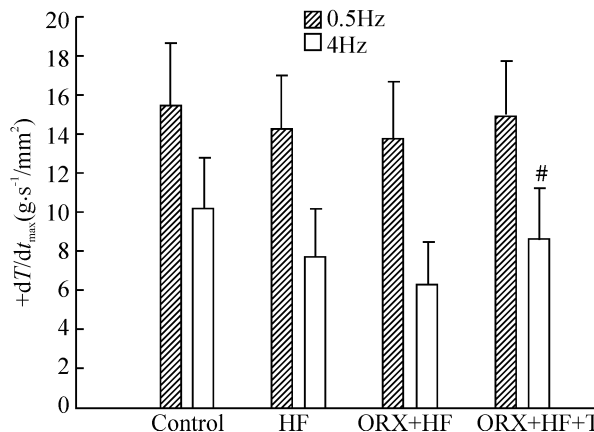


Fig 2 Influence of testosterone treatment on maximum velocity of tension development of ventricular muscle preparations at 0.5 and 4Hz stimulation. # *P* < 0.05 vs ORX + HF.

图 2 睾酮治疗对大鼠左室乳头肌张力上升最大速率的作用

2.2 异丙肾上腺素(ISO)对心肌收缩功能的影响 加用 ISO(1 μmol/L)后乳头肌张力很快增加,约 3 min ISO 作用达到稳定。各组大鼠乳头肌对 ISO 刺激反应程度并不一致。在 0.5 Hz 刺激频率下,ISO 使 control、HF、ORX + HF 和 ORX + HF + T 组大鼠乳头肌 DT 分别升高了(50.0 ± 14.0)%、(43.9 ± 16.0)%、(37.1 ± 15.0)%、(53.7 ± 18.0)%。ORX + HF + T 组大鼠乳头肌对 ISO 刺激反应最强,其 DT 的增加显著高于 ORX + HF 组(*P* < 0.05)。

讨 论

心血管系统存在雄激素受体,在心肌细胞,雄激素能调控多个基因的表达,对心肌细胞的功能有重要调控作用。现已知道,雄激素在骨骼肌有明显的增强其机械收缩功能的作用,而对心肌收缩功能是否具有相似的作用呢?许多动物和临床研究^[4]发现在慢性心力衰竭时,体内睾酮水平明显下降。本实验结果亦证实这一点。虽然原因尚不清楚,但睾酮水平的下降却可能对心功能产生负面作用。本研究首次发现,在阿霉素致慢性心功能不全雄性大鼠,睾酮治疗减轻了心衰心肌收缩功能的下降。

Maier 等^[5]研究发现心力衰竭时,心肌功能的下降主要表现在应激条件下(如快频率刺激、前负荷增加、 $[Ca^{2+}] \uparrow$ 、肾上腺素能刺激等),而在静息时心衰心肌与正常心肌的收缩功能并无明显差异,也即心肌“储备收缩功能”下降。本实验结果显示,在基础频率 0.5 Hz 时,正常与心衰心肌间 DT 无明显不同;当刺激频率由 0.5 Hz 增加到 4 Hz,各组大鼠乳头肌 DT 均下降,其中 ORX + HF 及 HF 组下降明显,而经睾酮替代治疗的去势心衰大鼠较未经替代治疗的去势心衰大鼠心肌收缩功能有明显改善。肾上腺素刺激反应的迟钝是心衰心肌的另一个重要特点^[6]。在心力衰竭时,由于长期的交感神经过度激活,导致心肌细胞 β_1 -肾上腺素能信号途径的异常。主要表现为 β_1 受体密度下降以及受体后对钙调控蛋白调节能力的下降。所以在心衰心肌,给予肾上腺素能激动剂,心肌收缩功能并没有相应的增加,甚至会有下降。实验中给予 ISO 刺激,ORX + HF + T 组乳头肌张力比 ORX + HF 组有更显著的增加。说明雄激素对于维持心肌正常的肾上腺素能刺激反应具有重要作用,睾酮补充治疗能改善心衰心肌迟钝的肾上腺素能刺激反应。由此我们认为:在慢性心力衰竭时,睾酮具有保护雄性大鼠心衰心肌储备收缩功

能的作用。

阿霉素具有较强的剂量依赖性心脏毒性,用于复制伴有严重充血性心力衰竭的扩张性心肌病模型。我们的实验结果显示生理量睾酮治疗在保护心肌功能的同时,引起心室壁增厚,阻止了因阿霉素导致的心室重量降低。由于过量使用雄激素可(Sullivan 等)导致心肌的过度肥厚、心脏猝死,因此睾酮治疗对于慢性心衰长期预后的影响有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Pugh PJ, Jones RD, West JN, et al. Testosterone treatment for men with chronic heart failure[J]. *Heart*, 2004, 90(4): 446 - 447.

[2] 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.

[3] Kunihiko T, Masaharu H, Kyoko Y, et al. Progressive cardiac dysfunction in adriamycin - induced cardiomyopathy rats [J]. *Eur J Heart Fail*, 2000, 2(4): 373 - 378.

[4] Noirhomme P, Jacquet L, Underwood M, et al. The effect of chronic mechanical circulatory support on neuroendocrine activation in patients with end - stage heart failure [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999, 16(1): 63 - 67.

[5] Maier LS, Bers DM, Pieske B. Differences in $Ca(2+) - handling$ and sarcoplasmic reticulum $Ca(2+) - content$ in isolated rat and rabbit myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(12): 2249 - 2258.

[6] Layland J, Kentish JC. Effects of $\alpha_1 - or \beta - adrenoceptor$ stimulation on work - loop and isometric contractions of isolated rat cardiac trabeculae [J]. *J Physiol*, 2000, 524 (Pt 1): 205 - 219.

(上接第 1441 页)

化物。这些脂质过氧化物不仅直接损伤细胞的 DNA,诱导内皮细胞凋亡,而且作为一种重要的信使分子,介导多种细胞信号的转导。Cominacini 等^[5]研究表明 Lox - 1 表达和激活与 ROS 产生有关,而 Mehta 等^[6]研究发现 PPAR γ 配体具有抗氧化作用。本实验观察罗格列酮对 ox - LDL 诱导的系膜细胞自由基产生情况。结果表明,ox - LDL 可使系膜细胞分泌 MDA 增多,SOD 活性降低,而罗格列酮干预可使系膜细胞 MDA 含量显著下降,SOD 活性增高,证实罗格列酮可抑制自由基产生从而保护系膜细胞,减轻 ox - LDL 对系膜细胞的损伤。

[参 考 文 献]

[1] 文重远,刘永明,王 腾,等. 罗格列酮对 2 型糖尿病心肌能量底物代谢的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(6): 1081 - 1084.

[2] Bakris G, Viberti LT, Weston WM, et al. Rosiglitazone reduces urinary albumin excretion in type2 diabetes [J]. *J Hum Hypertens*, 2003, 17(1): 7 - 12.

[3] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial

receptor for oxidized low - density lipoprotein [J]. *Nature (London)*, 1997, 386(6620): 73 - 77.

[4] Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, et al. Oxidized low density lipoprotein (ox - LDL) binding to ox - LDL receptor - 1 in endothelial cells induces the activation of NF - κB through an increased production of intracellular reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12633 - 12638.

[5] Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, et al. The binding of oxidized low - density lipoprotein (ox - LDL) to ox - LDL receptor - 1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(17): 13750 - 13755.

[6] Mehta JL, Hu B, Chen J, et al. Rosiglitazone inhibits Lox - 1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(12): 2203 - 2208.