

不同时期雌激素替代疗法对行卵巢切除术大鼠血管内皮功能的影响研究

张倩榕¹, 郑小璞², 李冰¹, 高登峰³

【摘要】 背景 绝经后女性冠心病发病风险升高与其失去雌激素保护有关, 但雌激素替代疗法 (HRT) 可能存在“治疗时间窗”, 即 HRT 在绝经后一定时间内对心血管系统有益, 且具体机制尚未明确。目的 探讨不同时期 HRT 对行卵巢切除术大鼠血管内皮功能的影响。方法 2017 年 4—7 月, 采用随机数字表法将 32 只无特殊病原体 (SPF) 级健康 SD 雌性大鼠分为正常对照组、无卵巢组、早期干预组及晚期干预组, 每组 8 只。正常对照组大鼠仅给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 去卵巢组大鼠于卵巢切除术后 1 周开始给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 早期干预组大鼠于卵巢切除术后 1 周开始行 HRT, 晚期干预组大鼠于卵巢切除术后 16 周开始行 HRT; 4 组大鼠均干预 8 周。比较 4 组大鼠干预后血清一氧化氮 (NO)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 水平及血管环舒张度。结果 (1) 干预后去卵巢组和晚期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平低于正常对照组, 早期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平高于去卵巢组和晚期干预组, 晚期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平低于去卵巢组 ($P<0.05$)。(2) 干预后去卵巢组大鼠血管环舒张度低于正常对照组, 早期干预组和晚期干预组大鼠血管环舒张度高于去卵巢组, 早期干预组大鼠血管环舒张度高于晚期干预组 ($P<0.05$)。结论 早期 HRT 对卵巢切除术后大鼠血管内皮功能具有一定保护作用, 而晚期 HRT 对卵巢切除术后大鼠血管内皮功能无保护作用。

【关键词】 雌激素替代疗法; 卵巢切除术; 血管内皮功能; 大鼠; 不同时期

【中图分类号】 R 459.1 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.02.011

张倩榕, 郑小璞, 李冰, 等. 不同时期雌激素替代疗法对行卵巢切除术大鼠血管内皮功能的影响研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27 (2): 48-51. [www.syxnf.net]

ZHANG Q R, ZHENG X P, LI B, et al. Impact of estrogen replacement therapy at different stages on vascular endothelial function in ovariectomized rats [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27 (2): 48-51.

Impact of Estrogen Replacement Therapy at Different Stages on Vascular Endothelial Function in Ovariectomized Rats

ZHANG Qianrong¹, ZHENG Xiaopu², LI Bing¹, GAO Dengfeng³

1. Department of Geriatric Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710006, China

3. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

【Abstract】 **Background** Increased risk of coronary heart disease is related to loss of estrogen protection in postmenopausal women, but estrogen replacement therapy (HRT) may have a "therapeutic window", that is, it is beneficial to cardiovascular system within a certain period after menopause, while the specific mechanism is not clear yet. **Objective** To investigate the impact of HRT at different stages on vascular endothelial function in ovariectomized rats. **Methods** Thirty-two SPF female SD rats were divided into normal control group, ovariectomized group, early intervention group and late intervention group according to random number table from April to July 2017, with 8 rats in each group. Rats in normal control group received gavage of 0.9% sodium chloride solution only, rats in ovariectomized group received gavage of 0.9% sodium chloride solution one week after ovariectomy, rats in early intervention group received HRT one week after ovariectomy, while rats in late intervention group received HRT 16 weeks after ovariectomy; rats in the four groups were intervened for 8 weeks. Serum levels of NO and eNOS, and vasodilation degree of vascular rings were compared in four groups after intervention. **Results** (1) After intervention, serum levels NO and eNOS in ovariectomized group and late intervention group were statistically significantly

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81570382)

1.710004 陕西省西安市, 西安交通大学第二附属医院老年心血管内科 2.710006 陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院心内科 3.710004 陕西省西安市, 西安交通大学第二附属医院心内科

lower than those in normal control group, those in early intervention group were statistically significantly higher than those in ovariectomized group and late intervention group, meanwhile those in late intervention group were statistically significantly lower than those in ovariectomized group ($P < 0.05$). (2) After intervention, vasodilation degree of vascular rings in ovariectomized group was statistically significantly lower than that in normal control group, that in early intervention group and late intervention group was statistically significantly higher than that in ovariectomized group, respectively, meanwhile that in early intervention group was statistically significantly higher than that in late intervention group ($P < 0.05$). **Conclusion** Early intervention of HRT has certain protective effect on vascular endothelial function in ovariectomized rats, while late intervention of HRT has no protective effect on vascular endothelial function in ovariectomized rats.

【Key words】 Estrogen replacement therapy; Ovariectomy; Vascular endothelial function; Rats; Different stages

流行病学调查显示, 绝经后女性冠心病发病率明显升高, 其原因与失去雌激素保护有关^[1]。雌激素替代疗法(HRT)指对存在雌激素缺乏的绝经后妇女补充雌激素及孕激素以缓解其更年期症状的治疗。近年来研究发现, HRT对绝经早期女性心血管系统有益, 但对绝经晚期或年龄>60岁女性心血管系统无益甚至有害^[2]。因此, 有学者提出HRT的“时间窗假设”, 即HRT仅在绝经后一定时间内对心血管系统有益^[3]。动脉粥样硬化的特点是受累动脉病变从内膜开始, 而一氧化氮(NO)对内皮细胞具有保护作用, 是机体重要的内皮源性舒张因子, 其在调节血管张力、抗动脉粥样硬化过程中具有重要作用; 一氧化氮合酶(NOS)是催化合成NO的重要酶, 内皮型一氧化氮合酶(eNOS)主要表达于血管内皮细胞和心肌细胞, eNOS功能障碍可导致血管舒缩功能紊乱, 冠状动脉痉挛、血栓形成, 进而促进冠心病发生发展。既往研究表明, 雌激素可通过上调eNOS表达而促进NO生成, 进而扩张血管^[4-5]。本研究旨在探讨不同时期HRT对行卵巢切除术大鼠血管内皮功能的影响, 以探索HRT存在“治疗时间窗”的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2017年4—7月, 选取无特殊病原体(SPF)级健康SD雌性大鼠32只, 月龄10~12个月, 平均体质量(450 ± 10)g, 均购自西安交通大学医学部动物部。饲养条件: 室温20~22℃, 手术室温27~28℃, 相对湿度55%~60%。

1.2 主要试剂及仪器 离体组织器官恒温灌流装置(成都态盟科技有限公司生产, 型号: SV-8), 电子天平(德国赛多利斯公司生产, 型号: BP221s), 高速离心机(上海安亭科学仪器厂生产, 型号: TGL-16G), 透射显微镜(日本日立公司生产, 型号: 7650), 体视显微镜(海光光学仪器厂生产, 型号: XTZ-E), eNOS、NO试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司生产)。

1.3 实验方法 将SD大鼠依次编号, 采用随机数字表法分为正常对照组、无卵巢组、早期干预组及晚期干预组, 每组8只。正常对照组大鼠于1周后给予0.9%氯

化钠溶液灌胃, 1次/d; 去卵巢组大鼠于卵巢切除术后1周开始给予0.9%氯化钠溶液灌胃, 1次/d; 早期干预组大鼠于卵巢切除术后1周开始行HRT, 1次/d; 晚期干预组大鼠于卵巢切除术后16周开始行HRT, 1次/d, 4组大鼠均干预8周。HRT方法: 8粒炔雌醇环戊醚(CEE)(0.625 mg/粒)+8粒醋酸甲基孕酮(MPA)(2 mg/粒)溶于0.9%氯化钠溶液100 ml, 相当于每2 ml液体中含0.1 mg CEE、0.32 mg MPA, 每日灌胃容积=鼠体质量(g)/1 000×1.4。所有大鼠给予普通饲料并在统一环境下饲养, 每周称重1次, 根据大鼠体质量调整灌胃容积。

1.4 卵巢切除术模型制备 模型制备大鼠于术前晚20:00禁食过夜, 不禁水, 称重, 采用10%水合氯醛0.3 ml/100 g腹腔注射麻醉, 麻醉成功(肌肉松弛、角膜反射减弱、心跳呼吸平稳)后固定大鼠, 背部备皮, 安尔碘消毒, 铺洞巾, 取腰背部切口进入, 找到腰椎两侧肾后方小球状卵巢, 采用丝线结扎后切除, 丝线双层缝合关腹^[6]。术后第5天行阴道细胞涂片, 如动情周期消失则证明模型制备成功^[7-9]。

1.5 观察指标

1.5.1 血清NO、eNOS水平 各组大鼠均于最后1次灌胃后采用10 ml注射器于腹主动脉根部穿刺动脉, 抽取血液, 将2 ml血液注入不抗凝干燥玻璃试管中, 静置30 min, 血液凝固后3 000 r/min离心15 min(离心半径13.5 cm), 分离血清并冻存于-20℃冰箱待测; 采用硝酸还原酶法检测血清NO、eNOS水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5.2 血管环制备及血管环舒张度检测 抽取腹主动脉血后50 min内处死各组大鼠, 取出胸主动脉, 置于预冷的通有95%氧气(O₂)和5%二氧化碳(CO₂)的改良K-H液(NaCl 118.3 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、MgSO₄ 4.7 mmol/L、H₂O 1.2 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25 mmol/L、glucose 11.1 mmol/L)冰水浴中漂洗, 小心剪去血管周围脂肪和结缔组织, 清除血管内血液, 采用眼科剪将血管剪成3~4 mm血管环。采用两根不锈钢微型挂钩贯穿血管环管腔, 水平悬挂于盛有10 ml K-H液的器官浴管中, 下方固定,

上方用一细钢丝与张力换能器相连。浴管中持续通有 95%O₂+5%CO₂ 的混合气体。调节最适前负荷至 1.0 g，平衡 90 min，期间更换 K-H 液，1 次 /15 min。待血管环稳定后将张力换能器系统调零，采用 KCl (100 mmol/L) 检测血管环反应性，待收缩反应曲线至平台期后冲洗 3 次后平衡 20 min，张力基本恢复至基线，再次给予 KCl (100 mmol/L)，待收缩反应曲线至平台期，比较 2 次收缩幅度。之后再次冲洗 3 次后给予 1 μmol/L 去氧肾上腺素 (PE) 预收缩血管，达峰值约 10 min 后采用累积浓度法依次给予 1×10⁻⁹、1×10⁻⁸、1×10⁻⁷、1×10⁻⁶、1×10⁻⁵ mol/L 乙酰胆碱 (ACh)，观察血管张力变化。待累积反应稳定后冲洗 3 次，平衡至基线后，采用 1 μmol/L PE 再次收缩血管，血管收缩达峰值后采用累积浓度法依次给予 1×10⁻⁹、1×10⁻⁸、1×10⁻⁷、1×10⁻⁶、1×10⁻⁵ mol/L 硝普钠，观察血管张力变化。血管环舒张度以血管舒张张力占 PE (1×10⁻⁶ mol/L) 引起收缩张力的百分比表示^[10]。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 *q* 检验。以 (双侧) *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 NO、eNOS 水平 干预后 4 组大鼠血清 NO、eNOS 水平比较，差异有统计学意义 (*P*<0.05)；去卵巢组和晚期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平低于正常对照组，早期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平高于去卵巢组和晚期干预组，晚期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平低于去卵巢组，差异有统计学意义 (*P*<0.05，见表 1)。

表 1 4 组大鼠干预后血清 NO、eNOS 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, μmol/L)
Table 1 Comparison of serum levels of NO and eNOS in the four groups after intervention

| 组别 | 只数 | NO | eNOS |
|------------|----|----------------------------|----------------------------|
| 正常对照组 | 8 | 38.30 ± 5.55 | 2.59 ± 0.16 |
| 去卵巢组 | 8 | 28.99 ± 8.20 ^a | 2.10 ± 0.88 ^a |
| 早期干预组 | 8 | 36.70 ± 5.30 ^b | 3.08 ± 0.18 ^b |
| 晚期干预组 | 8 | 5.60 ± 0.55 ^{abc} | 1.09 ± 0.06 ^{abc} |
| <i>F</i> 值 | | 57.63 | 27.77 |
| <i>P</i> 值 | | <0.01 | <0.01 |

注：NO= 一氧化氮，eNOS= 内皮型一氧化氮合酶；与正常对照组比较，^a*P*<0.05；与去卵巢组比较，^b*P*<0.05；与早期干预组比较，^c*P*<0.05

2.2 血管环舒张度 干预后正常对照组大鼠血管环舒张度为 (0.822 ± 0.234) %，去卵巢组大鼠为 (0.691 ± 0.187) %，早期干预组大鼠为 (0.890 ± 0.074) %，晚期干预组大鼠为 (0.756 ± 0.146) %。4 组大鼠血管环舒张度比较，差异有统计学意义 (*F*=3.20, *P*=0.04)；

去卵巢组大鼠血管环舒张度低于正常对照组，早期干预组和晚期干预组大鼠血管环舒张度高于去卵巢组，早期干预组大鼠血管环舒张度高于晚期干预组，差异有统计学意义 (*P*<0.05)。

3 讨论

基础及临床试验证实，雌激素对心血管具有保护作用，因此绝经前女性冠心病发病率较低，围绝经期及绝经后女性冠心病发病率较高^[1]。既往研究表明，雌激素缺乏是冠心病的独立危险因素之一^[11-13]，女性绝经前心血管疾病发生年龄较男性约晚 10 年，绝经后随着雌激素水平降低，女性心血管疾病发生风险明显升高^[14]。

既往研究表明，绝经后合并高胆固醇血症患者口服雌激素后纤溶酶原激活剂抑制剂 1 (PAI-1) 和选择素 E 水平降低^[15]；WINGROVE 等^[16] 研究表明，17β-雌二醇和雌激素可以抑制正常人冠状动脉内皮细胞 (CAEC) 刺激内皮素 1 释放的能力及 eNOS 表达能力。KOH 等^[17] 研究表明，HRT 能有效抑制纤维蛋白溶解及减少血管炎性标志物生成，故对心血管系统有益。此外，雌激素还可不依赖内皮细胞发挥作用，而是通过 Ca²⁺ 通道促进血管舒张。KOH 等^[18] 研究表明，Ca²⁺ 浓度增加可导致动脉环收缩，而增加雌二醇可以抑制动脉环收缩。既往研究还表明，雌二醇可抑制心肌细胞 Ca²⁺ 内流，进而减少细胞内游离 Ca²⁺^[19]；同时，雌激素可以作用于 BKCa 通道而松弛冠状动脉^[20]。但有大型随机双盲对照试验并不推荐 HRT 作为冠心病的一级预防药物^[21]。LEE 等^[22] 研究结果显示，绝经后一定时期内行 HRT 者冠心病发生概率明显低于绝经后较长时间行 HRT 者，推测绝经后一定时间内雌激素具有心血管保护作用，即雌激素“治疗时间窗”，但具体机制尚不明确。笔者所在课题组提出假设，女性随着绝经时间延长其衰老及体内激素环境改变 (如雌激素水平低下) 导致雌激素受体表达、机体炎症反应相关因子活化受影响，雌激素在特定组织中的作用通路发生改变，进而导致机体免疫、血管等组织中 eNOS、NO 含量较低而无法有效维持血管内皮功能。

本研究通过制备卵巢切除术模型大鼠模拟女性绝经后状态，并探讨不同时期 HRT 对大鼠血管内皮功能的影响，结果显示，干预后去卵巢组和晚期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平低于正常对照组，早期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平高于去卵巢组和晚期干预组，晚期干预组大鼠血清 NO、eNOS 水平低于去卵巢组；干预后去卵巢组大鼠血管环舒张度低于正常对照组，早期干预组和晚期干预组大鼠血管环舒张度高于去卵巢组，早期干预组大鼠血管环舒张度高于晚期干预组，提示早期 HRT 对卵巢切除术后大鼠血管内皮功能具有一定保护作用，而晚期 HRT 对卵巢切除术后大鼠血管内皮功能

无保护作用,即HRT存在“治疗时间窗”。

综上所述,早期HRT对卵巢切除术后大鼠血管内皮功能具有一定保护作用,而晚期HRT对卵巢切除术后大鼠血管内皮功能无保护作用。本研究仍存在以下不足:(1)大鼠月龄为10~12个月,不能排除老龄对心血管的影响^[23]; (2)由于研究经费及时间原因而未深入探讨HRT存在“治疗时间窗”的机制;(3)雌激素使用剂量及具体时间尚有待进一步研究。

作者贡献:张倩榕、郑小璞进行文章的构思与设计;张倩榕、李冰进行数据收集、整理、分析;张倩榕进行结果分析与解释,负责撰写论文;李冰负责文章的质量控制及审校;高登峰对文章整体负责,监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] KANNEL W B, WILSON P W. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage [J]. *Arch Intern Med*, 1995, 15 (51): 57-61.
- [2] MOSCA L, BENJAMIN E J, BERRA K, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 Update: A guideline from the American Heart Association [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57 (12): 1404-1423. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.02.005.
- [3] SCARABIN P Y, OGER E, PLU-BUREAU G, et al. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk [J]. *Lancet*, 2003, 362 (9382): 428-432.
- [4] STEVENSON J C. Cardiovascular effects of oestrogens [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 74 (5): 387-393.
- [5] STEVENSON J C. Metabolic effects of the menopause and oestrogen replacement [J]. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1996, 10 (3): 449-467.
- [6] 刘丽娜, 严晶, 徐祥涛, 等. 逍遥散对卵巢切除联合慢性应激大鼠的抗焦虑和抗抑郁作用 [J]. *中成药*, 2018, 40 (9): 1897-1902. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.001.
- [7] MOIENAFSHARI F, KENYON E, CHOY J C, et al. Long-term effects of ovariectomy and estrogen replacement treatment on endothelial function in mature rats [J]. *Maturitas*, 2003, 45 (3): 213-223.
- [8] GIBBS R B. Impairment of basal forebrain cholinergic neurons associated with aging and long-term loss of ovarian function [J]. *Exp Neurol*, 1998, 151 (2): 289-302.
- [9] MARKOWSKA A L. Sex dimorphisms in the rate of age-related decline in spatial memory: relevance to alterations in the estrous cycle [J]. *J Neurosci*, 1999, 19 (18): 8122-8133.
- [10] LI Y, CUI X, SOLOMON S B, et al. Anthracis edema toxin increases cAMP levels and inhibits phenylephrine-stimulated contraction in a rat aortic ring model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 305 (2): H238-250. DOI: 10.1152/ajpheart.00185.2013.
- [11] BARRETT-CONNOR E, LAUGHLIN G A. Hormone therapy and coronary artery calcification in asymptomatic postmenopausal women: the Rancho Bernardo Study [J]. *Menopause*, 2005, 12 (1): 40-48.
- [12] HOFBAUER L C, KHOSLA S, SCHOPPET M, et al. Estrogen therapy and coronary-artery calcification [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357 (12): 1253-1254.
- [13] BRINTON E A, HODIS H N, MERRIAM G R, et al. Can menopausal hormone therapy prevent coronary heart disease? [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19 (6): 206-212. DOI: 10.1016/j.tem.2008.03.002.
- [14] OUYANG P, MICHOS E D, KARAS R H. Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System: Lessons Learned and Unanswered Questions [J]. *Drugs*, 2006, 47 (9): 1741-1753.
- [15] WINGROVE C S, STEVENSON J C. 17 beta-Oestradiol inhibits stimulated endothelin release in human vascular endothelial cells [J]. *Eur J Endocrinol*, 1997, 137 (2): 205-208.
- [16] WINGROVE C S, GARR E, PICKAR J H, et al. Effects of equine oestrogens on markers of vasoactive function in human coronary artery endothelial cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 150 (1/2): 33-37.
- [17] KOH K K, CARDILLO C, BUI M N, et al. Vascular Effects of Estrogen and Cholesterol-Lowering Therapies in Hypercholesterolemic Postmenopausal Women [J]. *Circulation*, 1999, 99 (3): 354-360.
- [18] KOH K K, BUI M N, MINCEMOYER R, et al. Effects of hormone therapy on inflammatory cell adhesion molecules in postmenopausal healthy women [J]. *Am J Cardiol*, 1997, 80 (11): 1505-1057.
- [19] MÜGGE A, RIEDEL M, BARTON M, et al. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 -oestradiol in vitro [J]. *Cardiovasc Res*, 1993, 27 (11): 1939-1942.
- [20] JIANG C, POOLE-WILSON P A, SARREL P M, et al. Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes [J]. *Br J Pharmacol*, 1992, 106 (3): 739-745.
- [21] ANDERSON G L, LIMACHER M, ASSAF A R, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2004, 291 (14): 1701-1712.
- [22] LEE T M, LIN M S, CHANG N C. Physiological concentration of 17 beta-estradiol on sympathetic reinnervation in ovariectomized infarcted rats [J]. *Endocrinology*, 2008, 149 (3): 1205-1213.
- [23] MEYER M R, HAAS E, BARTON M. Need for research on estrogen receptor function: Importance for postmenopausal hormone therapy and atherosclerosis [J]. *Gend Med*, 2008, 5 (Suppl A): S19-33. DOI: 10.1016/j.genm.2008.03.004.

(收稿日期: 2018-11-20; 修回日期: 2019-02-10)

(本文编辑: 谢武英)