

维生素 E 对老年雌性大鼠雌激素及海马芳香化酶表达的影响

孔亚坤 耿秀琴 尹俊杰 姚兰春¹ 周艳红 郭献山 (河南省新乡市中心医院, 河南 新乡 453000)

【摘要】目的 探讨维生素 E 用于防治绝经后女性中枢神经系统退行性疾病的作用及机制。方法 采用自然衰老雌性大鼠为动物模型, 实验组每日注射维生素 E 5 mg/kg(小剂量组)、15 mg/kg(中剂量组)、60 mg/kg(大剂量组)($n=8$)。采用放免法检测血清雌激素含量, 用免疫组化法观察维生素 E 对海马芳香化酶表达的影响, 并与成年大鼠(对照组)对比观察。结果 老年对照组较成年对照组雌激素水平下降, 中、大剂量组血清雌激素水平回升($P<0.05$), 海马芳香化酶表达阳性细胞数目多、表达强, 大剂量组呈强阳性。结论 一定剂量维生素 E 不仅可以提高血中雌激素水平, 而且可以通过增强海马芳香化酶的表达使局部雌激素浓度增加而发挥其神经保护作用。

【关键词】 维生素 E; 自然衰老大鼠; 雌激素; 芳香化酶; 神经保护

【中图分类号】 R339.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2009)09-1058-03

Effect of vitamin E on estrogen and expression of aromatase in hippocampus of senile female rats

KONG Ya-Kun, GENG Xi-Qin, YIN Jun-Jie, et al.

Central Hospital of Xinxiang, Xinxiang 453000 Henan, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of vitamin E (VitE) on estrogen and expression of aromatase in hippocampus of senile female rats and explore the effect of VitE on preventing from postmenopausal female central nerve system degenerative diseases and its mechanism. **Methods** The animal model was established using senile female rats. Rats in low, middle and high dose of VitE experimental groups ($n=8$) were respectively VitE 5, 15 and 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹. The levels of serum estrogen was detected by radioimmunoassay. The expression of aromatase in hippocampus was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with adult control group, the estrogen of elderly control group was low. And the estrogen of middle and high dose of VitE groups were recovered ($P<0.05$), the expressions of aromatase in hippocampus from the two groups increased. The expression of aromatase in hippocampus in high dose of VitE group showed strong positive. **Conclusions** Some dose of VitE may not only elevate the level of serum estrogen but strengthen the expression of aromatase in hippocampus, increase content of local estrogen and protect the nerve.

【Key words】 Vitamin E; Senescent rats; Estrogen; Aromatase; Neuronal protection

绝经后女性由于卵巢功能减退雌激素减少, 导致其靶器官之一的中枢海马异常改变而出现认知功能障碍进而可发展为阿尔茨海默病(AD), 目前国内外临床防治该种退行性疾病, 采用雌激素替代疗法, 因其副作用, 而遭到质疑^[1]。因此, 寻找疗效安全可靠的药物是目前亟待解决的问题。维生素 E(VitE) 不仅是一种促进性腺功能的酚类化合物, 而且是具有多种功能的重要因子^[2,3]。芳香化酶(ARO)是雌激素合成的限速酶, 脑内雌激素的有效质量浓度主要取决于脑局部芳香化酶表达水平^[4]。本文采用动物实验对照研究观察老年雌性大鼠应用 VitE 后对血清雌激素水平和海马神经元芳香化酶表达的影响, 探讨 VitE 对于中枢神经系统保护作用及可能机制, 为临床防治 AD 等神经退行性疾病提供理论依据。

1 材料与方

1.1 动物与分组 40 只 18~20 月龄, Wistar 老年雌性大鼠, 体重(415±20)g, 8 只 4 月龄, Wistar 成年雌性大鼠, 体重(200±20)g 由哈尔滨医科大学第二附属医院实验动物中心提

供。以成年鼠为对照组, 将老年大鼠随机分为 5 组($n=8$): 老年对照组、雌激素组(0.2 mg·kg⁻¹·3 d⁻¹)和小、中、大剂量 VitE 组(5、15 和 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 腹腔注射连续 9 w, 对照组注射等量的植物油。VitE 注射液(上海通用药业股份有限公司), 苯甲酸雌二醇(天津金耀氨基酸有限公司)。

1.2 标本的制备 实验终止时, 所有大鼠摘眼球取血, 4℃ 冰箱静置 8 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用于雌二醇(E₂)的测定。随机取 5 只大鼠用 4% 多聚甲醛常规灌流固定, 快速取脑, 延正中矢状裂把脑对称地分为左右两半, 自上丘至视交叉节段作 3~4 mm 冠状连续切片, 固定, 常规石蜡包埋, 用于 ARO 的测定。

1.3 血清 E₂ 水平检测 采用放免法, 测定时血清样品取 100 μl 严格按照试剂盒说明书操作步骤进行, 用 γ 计数仪计数, 浓度单位用 pg/ml 表示。

1.4 海马区 ARO 的表达 采用 SABC 法。一抗、试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 具体操作按说明书进行, DAB 显色, 苏木素复染。ARO 抗体为兔多克隆抗体, 工作浓度为 1:100 用 PBS 代替一抗作阴性对照。光镜下 ARO 定位于海马区神经元内质网, 胞浆内出现棕黄色颗粒的为阳性细胞。观察海马同一部位的齿状回(×400), 经日本产 Moticam 1300 照相系统采样后, 采用北航医学图像分析管理系统进行分析, 计算 ARO 染色阳性细胞的阳性单位值和平均光密度值, 分别为

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(D200642)

¹ 哈尔滨医科大学生理学教研室

通讯作者: 姚兰春(1954-), 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事中枢退行性疾病防治的研究。

第一作者: 孔亚坤(1983-), 女, 硕士, 主要从事生殖内分泌研究。

表达含量的多少和强度的大小。

1.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件包, 首先进行方差齐性检验, 再行 OneWay ANOVA 和 Student Newman-Kuels (SNK) 检验。

2 结果

2.1 血清 E_2 水平 与成年对照组 [(14.10 ± 3.25) pg/ml] 比较, 老年对照组 E_2 水平 [(5.16 ± 1.51) pg/ml] 下降 ($P < 0.05$), 雌激素组 E_2 水平 [(46.35 ± 3.5) pg/ml] 显著升高 ($P < 0.01$)。VitE 组 E_2 水平回升, 中 [(27.08 ± 3.19) pg/ml]、大 [(26.81 ± 3.87) pg/ml] 剂量组较老年对照组差异显著 ($P < 0.05$), 小剂量 VitE 组 E_2 水平为 [(20.77 ± 3.18) pg/ml], 各组 E_2 水平均显著低于雌激素组 ($P < 0.05$)。

2.2 海马区芳香化酶的表达 成年对照组阳性细胞数目多, 老

年对照组 ARO 表达减弱, 阳性细胞数目减少 ($P < 0.01$)。与老年对照组比较, VitE 组 ARO 表达增强, 阳性细胞数目增多, 中、大剂量 VitE 组 ARO 呈强阳性反应, 阳性细胞数目多; 雌激素组呈阳性反应, 阳性细胞数目中等 (均 $P < 0.01$)。见图 1 表 1。

表 1 各组大鼠海马区 ARO 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	阳性单位值	OD 值
成年对照组	45.67 ± 1.54	0.53 ± 0.03
老年对照组	26.95 ± 2.99 ¹⁾	0.30 ± 0.02 ¹⁾
雌激素组	34.99 ± 1.63 ²⁾	0.37 ± 0.02 ²⁾
小剂量 VitE 组	31.51 ± 2.22	0.34 ± 0.03
中剂量 VitE 组	33.81 ± 1.67 ²⁾	0.37 ± 0.04 ²⁾
大剂量 VitE 组	36.27 ± 1.82 ²⁾	0.41 ± 0.03 ²⁾

与成年对照组比较: 1) $P < 0.05$ 与老年对照组比较: 2) $P < 0.01$

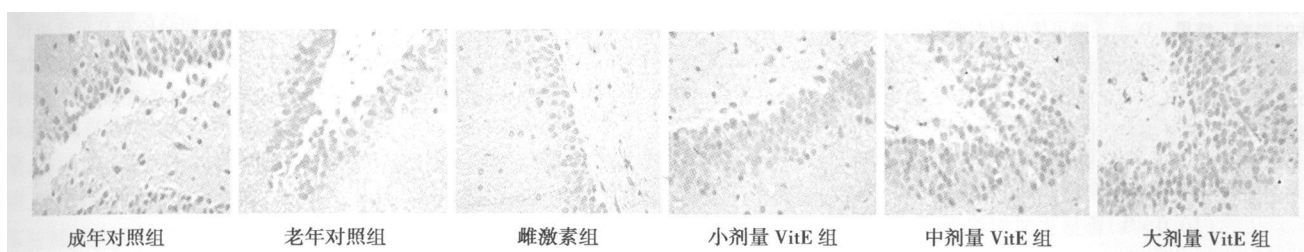


图 1 各组大鼠海马齿状回颗粒细胞层 ARO 的表达 (DAB 染色, × 400)

3 讨论

在动物生殖周期研究中发现, 啮齿类动物的雌激素波动与人类相似^[5]。本实验中成年雌鼠卵巢功能处于旺盛时期, 雌激素浓度的周期变动是相当明显的, 所以本次测定血清 E_2 的浓度有可能处于中等水平。老年雌鼠卵巢退化萎缩、功能衰退, 当出现动情周期长、之后持续动情、反复假妊娠时, 确认为老年早期鼠, 但卵巢仍有一定的内分泌功能, 所以血中雌激素浓度降低并可保持一定水平。在卵巢合成分泌 E_2 的“双重细胞学说”过程中, 反应均在线粒体中进行。VitE 作为抗氧化剂, 广泛存在于机体组织细胞线粒体中, 可避免过度氧化所造成的线粒体损伤, 保护其正常功能。中枢神经系统退行性病变常伴随体内 VitE 水平的下降或缺失, 而适当增加体内 VitE 的浓度可改善这一状况^[6]。本实验中, 对老年早期的自然衰老雌性大鼠, 连续给予不同剂量 VitE 9 w, 中、大剂量组血清 E_2 水平升高。说明适宜剂量的 VitE 可起到营养、改善性腺功能的作用, 延缓卵巢功能过早衰退, 甚至还可能影响肾上腺、脂肪等组织的代偿性反应, 从而维持机体内源性雌激素在一定水平, 可改善雌激素匮乏而致的中枢神经系统退行性病变。

ARO 主要存在于卵巢、胎盘组织、睾丸、脂肪组织以及脑组织中。在脑组织中 ARO 分布于与学习和记忆、情绪相关的脑区如基底前脑、海马、豆状核、中脑缝等。ARO 是由 CYP19 基因编码, 采用分子生物学的方法敲除小鼠 CYP19 基因, 无论对雄性或雌性小鼠来说, 学习记忆能力都受到严重损伤, 而切除性腺则对学习记忆的影响较微弱^[7]。在海马各区及皮质锥体层区域, 有报道 ARO 为弱阳性, 甚至有报道在猴脑海马及扣带

皮质等区域未检测到 ARO mRNA^[8]。本研究用免疫组化法检测到成年大鼠海马 ARO 强阳性, 这与 Kretz 等^[9]的结果基本一致。海马是一个与学习记忆突触可塑性有密切关系的脑区, 而大脑皮质是认知的高级整合区, 因此, 这些脑区内 ARO 的高表达提示其可能参与了局部雌激素对学习、认知的调节。本实验结果表明 VitE 可以提高老年雌性大鼠海马 ARO 的活力, 提示海马局部 ARO 可能通过对底物的催化, 使局部雌激素水平增高从而增强空间学习记忆能力。

体外研究表明, E_2 及双氢睾酮能够以协同方式诱导成年大鼠脑内 ARO 的活性^[4]。本实验发现给予老年雌性大鼠 VitE 后不仅可使血中雌激素水平升高, 而且使海马区 ARO 表达上调, 两者是否有协同作用还是单独作用, 还需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Veiga S, Melcangi RC, DonCarls LL. Sex hormones and brain aging [J]. *ExperGeront* 2004; 39(11-12): 1623-31.
- 2 孔亚坤, 姚兰春, 卢长柱, 等. 维生素 E 对老年雌性大鼠海马区 PS-1 表达和 $A\beta$ 生成的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2007; 23(2): 237-40.
- 3 Brigelius-Flohe R, Kelly FJ, Salonen JT. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research [J]. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(4): 703-16.
- 4 Prange-Kiel J, Rune GM. Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2006; 138(3): 765-72.
- 5 吴赛珠. 性激素平衡紊乱与疾病 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 120-1.

6 Behl C. Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection[J]. *Int J Vitamin Nutr Res* 1999; 69(3): 213-9.

7 Balhazart J, BallGF. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter [J]? *Neuroscience* 2006 29(5): 241-9.

8 Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A. Aromatase a neuroprotective enzyme[J]. *Neurobiology* 2003 71(1): 31-41.

9 Kretz O, Fester L, Wehrenberg U. Hippocampal synapses depends on hippocampal estrogen synthesis[J]. *J Neurosci* 2004; 24(26): 5913-21.

[2008-07-17 收稿 2009-02-11 修回]

(编辑 张 铭)

月见草油与维生素 E 对衰老模型小鼠骨丢失的影响

张益嘉 吴 铁 崔 燎¹ 苏 华 李 响² 袁红江 (广东医学院药理学教研室, 广东 湛江 524023)

〔摘要〕目的 观察月见草油和维生素 E 对 D-半乳糖致衰老小鼠骨丢失的预防作用, 从骨代谢方面探讨其可能的机制。方法 40 只 8 周龄昆明雌性小鼠随机分为 4 组: 青年对照组, 衰老模型组, 维生素 E 组, 月见草油组, 每组 10 只, 以颈背部皮下注射半乳糖 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 造成亚急性衰老模型, 并预防灌胃用药 6 w, 观察月见草油和维生素 E 对小鼠骨丢失时骨量、骨长度、骨有机质、骨钙、磷等骨矿物质以及血清骨代谢相关酶活性的影响。结果 D-半乳糖可使小鼠骨量、骨长度、骨有机质减少 ($P < 0.05$), 血清碱性磷酸酶 (AKP) 活性下降 ($P < 0.01$); 同时给药月见草油和维生素 E 分别能使骨量、骨长度、骨矿物质及骨有机质得到恢复 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 并提高血清 AKP 活性 ($P < 0.01$), 月见草油还能有效抑制抗酒石酸酸性磷酸酶 (StACP) 活性 ($P < 0.05$)。结论 D-半乳糖可导致小鼠骨丢失, 月见草油和维生素 E 均可预防衰老模型小鼠骨丢失, 而其机制可能与成骨细胞、破骨细胞活性的调控有关。

〔关键词〕 月见草油; 维生素 E; 半乳糖; 衰老; 骨代谢

〔中图分类号〕 R599 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9202(2009)09-1060-03

Protective effects of evening primrose oil and Vitamin E on osseous changes in the aging mice induced by D-galactose

ZHANG Yi Jia, WU Ti, CUI Liao *et al.*

Department of Pharmacology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To study the protective effects of evening primrose oil (EPO) and Vitamin E (VitE) on osseous changes in the aging mice induced by D-galactose (D-gal) and their mechanisms of bone metabolism. Methods 40 female Kunming mice were injected with D-gal for 6 weeks to establish the aging models. Bone routine parameters such as bone dry weight, bone length, bone hydroxyproline content, bone calcium, bone microelements and bone metabolism parameters such as serum alkaline phosphatase (AKP) activity, serum tartrate-resistant acid phosphatase (StACP) activity were tested and compared among control, D-gal(model), VitE and EPO groups. Results The bone dry weight, bone length, bone hydroxyproline content and serum AKP activity were significantly decreased in model group than those in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The above changes of VitE and EPO groups were significantly higher than those in model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). VitE and EPO also enhanced the content of bone calcium and microelements ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, EPO decreased serum StACP activity ($P < 0.05$) comparing with that in control group. Conclusions The high doses of D-gal for short term could induce aging related osteopenia. EPO and VitE could improve osseous changes induced by D-gal. These changes probably are related to the regulatory effects of the activities of osteoblast and osteoclast.

【Key words】 Evening primrose oil; Vitamin E; D-galactose; Aging; Bone metabolism

月见草油系由柳叶科多年生草本植物月见草种子榨取的, 它含有亚油酸、油酸、棕榈酸、亚麻酸等多种人体必需不饱和脂肪酸、维生素和矿物质等。不饱和脂肪酸在骨质疏松治疗和预防中的潜力通过研究逐渐显现出来^[1]。然而富含不饱和脂肪酸的月见草油进一步深入的抗骨质疏松实验却未见报道。D-半乳糖能使机体自由基积聚^[2], 是常用的亚急性衰老模型工具药, 其致大鼠、小鼠骨丢失作用亦被多次报道^[3,4]。本研究尝试通过

D-半乳糖致动物衰老模型, 同时以自由基清除剂维生素 E 为阳性对照药, 观察月见草油对骨丢失的预防作用及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药物 D-半乳糖, 生化试剂 (上海试剂厂生产, 生产批号: F2006025); 精制月见草油 (大连浓华生物工程有限公司生产), 出厂检测主要含 γ -亚麻酸 9.2%、亚油酸 74.1%、维生素 E 0.093 mg/g 维生素 E 油剂 (广东医学院医药科技开发中心提供)。

1.1.2 试剂 羟脯氨酸测试盒、碱性磷酸酶 (AKP) 活性测试盒、抗酒石酸酸性磷酸酶 (StACP) 活性测试盒 (均购自南京建成生物工程公司); 其余试剂均为市售分析纯。

基金项目: 广东省科技计划项目 (2005B10401037)

1 广东天然药物研究与开发重点实验室

2 广东医学院附属医院整形外科

通讯作者: 吴 铁 (1955-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事皮肤黏膜药理及抗骨质疏松研究。

第一作者: 张益嘉 (1983-), 男, 硕士, 主要从事中药抗衰老药理的研究。