第二军医大学学报 2009年7月第30卷第7期 http://www.ajsmmu.cn
Academic Journal of Second Military Medical University, Jul. 2009, Vol. 30, No. 7

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00790

·论 著·

替勃龙对大鼠脑缺血再灌注后神经元凋亡的影响

田文艳[1],张洪义[2],苏立凯[1],申文增[2]
1.河北大学附属医院神经内科,保定 071000
2.河北大学基础医学院试验中心,保定 071000

[摘要] **目的**:研究雌激素对缺血性脑损害的神经保护作用是否与抗神经元凋亡有关。**方法**:30只雌性成年SD大鼠,随机分为假手术组(sham),手术对照组(OVX),替勃龙组[0.25 mg/(kg·d)];采用大鼠大脑中动脉闭塞制成局灶性脑缺血模型。在缺血2 h、再灌注24 h后立即断头取脑,应用2,3,5-三苯基氯化四唑(TTC)染色观察脑梗死体积,TUNEL法检测凋亡细胞,链酶菌抗生物素蛋白过氧化物酶(SP)法检测抗凋亡基因Bcl-2、细胞凋亡诱导因子Bax和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶caspase-3的表达。**结果**:替勃龙用药组较手术对照组脑梗死体积显著缩小($P<0.05$),TUNEL阳性细胞数减少($P<0.01$),Bcl-2阳性细胞增多($P<0.01$),Bax及caspase-3阳性细胞减少($P<0.01$)。**结论**:替勃龙可抑制去卵巢大鼠局灶性脑缺血再灌注时神经细胞凋亡,具有神经保护作用。

[关键词] 替勃龙;脑缺血;再灌注损伤;细胞凋亡
[中图分类号] R 363 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2009)07-0790-03

Effects of tibolone on apoptosis of neurons after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

TIAN Wen-yan[1], ZHANG Hong-yi[2], SU Li-kai[1], SHEN Wen-zeng[2]
1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China
2. Experimental Center, College of Basic Medical Sciences, Hebei University, Baoding 071000

[**ABSTRACT**] **Objective**: To study whether the neuroprotective effect of tibolone during cerebral ischemia injury is associated with its anti-apoptosis effect. **Methods**: A total of 30 healthy adult female Sprague Dawley rats were evenly randomized into sham-operated group, ovariectomized group, and tibolone group(0.25 mg/[kg·d]). Brain ischemia model was induced by left middle cerebral artery occlusion(MCAO) for 2 hours followed by 24 hours reperfusion. All animals were killed and the cerebral infarction volumes were determined by 2,3,5-triphenyltetrazlium chloride (TTC) staining and image analysis. Apoptotic cells were labeled by Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression of Bcl-2, Bax, and caspase-3 was analyzed by immunohistochemical SP method. **Results**: Compared with the sham-operated group($P<0.05$), cerebral infarction volume was significantly reduced, TUNEL positive cells was significantly decreased($P<0.01$), Bcl-2 positive cells were significantly increased, and Bax($P<0.01$), caspase-3 postive cells were significantly reduced compared with tibolone treated groups ($P<0.01$). **Conclusion**: Tibolone can inhibit the neuron apoptosis following cerebral ischemia injury in OVX rats, displaying a neuroprotective effect.

[**KEY WORDS**] tibolone; cerebrovascular disorders; reperfusion injuries; apoptosis
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7): 790-792]

流行病学调查研究表明,绝经前女性较同龄男性的脑卒中发病率低,而绝经后女性的脑卒中发病率明显增高[1]。这一现象可能与妇女绝经后雌激素水平减低有关。临床上使用雌激素替代疗法可使发生卒中的相对危险度下降[2],与卒中有关的死亡率下降。替勃龙(tibolone,7-甲基异炔诺酮)为一种组织特异性的甾体类固醇,对骨及阴道组织能产生雌激素样作用,但不刺激子宫内膜和乳腺组织。本研究主要评价小剂量替勃龙对去势大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤中的神经保护作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 *实验动物* 5个月龄健康雌性SD大鼠30只,体质量250~270 g,由河北医科大学实验动物中心提供

[收稿日期] 2009-01-12 [接受日期] 2009-03-11
[基金项目] 河北省科技厅科技基金(03276196D-52). Supported by Grant from Science and Technology Committee of Hebei Province(03276196D-52).
[作者简介] 田文艳,硕士,副教授、副主任医师. E-mail:twy7172@yahoo.com.cn

(动物使用许可证号 SCXK2003-1-003)。按体质量随机分为 3 组:假手术组(sham)、对照组(OVX)、替勃龙组(tibolone),各 10 只。假手术组行下腹切开,见到双侧卵巢,但不切除任何组织;其余 2 组于脑缺血术前 14 d 切除双侧卵巢。替勃龙组,替勃龙(荷兰欧加农生产,南京欧加农制药分装) 0.25 mg/(kg·d),绝经后妇女应用替勃龙改善更年期症状用量 2.5 mg/d,按动物与人的公斤体质量折算系数[3],计算确定大鼠的试验用剂量,灌胃;对照组,每日用等量蒸馏水灌胃。实验期间所有动物置于同一室内,二级环境分笼饲养,自由饮水,室温(21±4)℃,光照 12 h,黑暗 12 h。

1.2 脑缺血再灌注大鼠模型制备 用改良 Longa 法制作大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)模型。以 10%水合氯醛(0.33 g/kg)ip 麻醉后,暴露并钝性游离左侧颈总动脉(CCA),结扎同侧 CCA 近心端和颈外动脉(ECA)分叉部,距 CCA 末端约 5 mm 处剪口,用直径 0.24 mm 的日本尼龙线沿颈内动脉(ICA)方向插入,深度由分叉部算约 (18.5±0.5) mm,于 ICA 近心端结扎该动脉,全层缝合切口,再灌注时抽出尼龙线 10 mm。以动物清醒后爬行时向右转圈(追尾现象),严重时向右跌倒,提尾时右前肢内收屈曲,为入选标准。于脑缺血手术 2 h 后再灌注,24 h 后断头取脑。

1.3 指标检测及方法

1.3.1 脑梗死体积测定 取左侧大脑半球,冠状面均匀切成 2 mm 厚脑片,染色固定,照相测量并计算出总的梗死体积。用计算机多媒体彩色图像分析系统测量脑梗死体积。

1.3.2 免疫组化细胞凋亡的检测 距额极 3～5 mm 冠状切取材,放入 4%多聚甲醛固定 24 h 后,制成石蜡切片,用于免疫组织化学染色。

采用 TUNEL 法原位标记 DNA 片段检测凋亡细胞。具体步骤参照产品说明书,原位细胞凋亡检测试剂盒为美国 ROCHE 公司出品。

采用链酶菌抗生物素蛋白过氧化物酶法(streptavidin peroxidase,SP)检测抗凋亡基因 Bcl-2、细胞凋亡诱导因子 Bax 和半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶 caspase-3 的表达。Bcl-2、bax、caspase-3 多克隆抗体购于河北博海生物工程有限公司。

采用多功能真彩色细胞图像分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus),在光镜下分析图像,每张切片采集缺血周边区具有代表性 10 个高倍视野,计算平均数。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 10.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较进行方差分析及两两比较 q 检验。

2 结 果

2.1 梗死体积 替勃龙组与对照组比较梗死体积缩小,并有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 替勃龙对脑缺血模型大鼠梗死体积的影响

Tab 1 Effect of tibolone on infarction volume of brain ischemia

($n=10,\bar{x}\pm s$)

Group	Volume of hemisphere V/mm^3	Volume of infarction V/mm^3	Percentage (%)
Sham	259.65±8.01	47.31±4.74	18.21±2.17
OVX	259.78±7.41*	64.87±4.28*	25.32±2.36*
Tibolone	260.27±7.62△	47.32±4.32△	18.17±2.21△

*$P<0.05$ *vs* sham group; △$P<0.05$ *vs* OVX. OVX: Ovariectomized group; Sham: Sham-operated group

2.2 TUNEL 标记结果 缺血组对侧仅见数个阳性细胞散在分布,缺血侧可见大量黄棕色阳性细胞,以圆形为主。假手术组阳性细胞数 10%,替勃龙组阳性细胞数 11%,明显少于 OVA 组阳性细胞数 28%,差异有显著性($P<0.01$),见图 1。

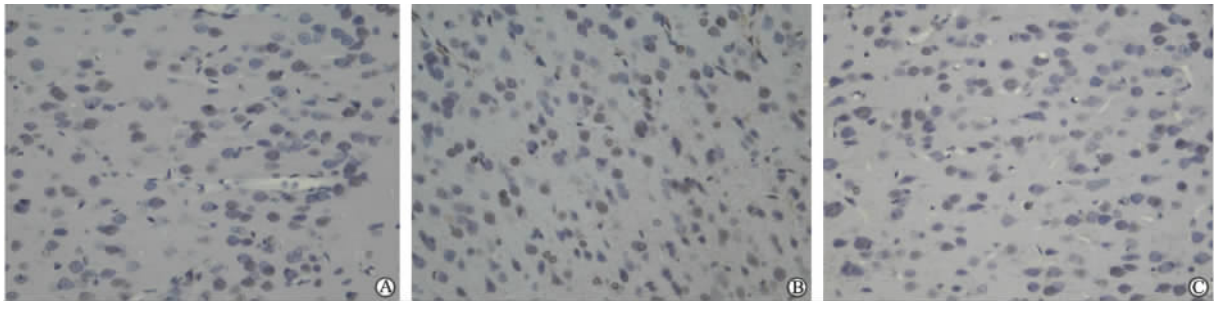

图 1 各组缺血侧皮层 TUNEL 染色结果

Fig 1 TUNEL staining on ischemia pallium in each group

A: Tibolone group; B: OVX group; C: Sham group. Original magnification: ×400

2.3　Bcl-2、Bax 在同侧皮质表达的百分率　在脑组织切片中，Bcl-2、Bax 阳性表达表现为胞质棕黄色深染。替勃龙组较对照组 Bcl-2 阳性细胞增多（$P<0.01$），Bax 及 caspase-3 阳性细胞减少（$P<0.01$）。见表 2。

表 2　替勃龙对脑缺血模型大鼠脑皮质 Bcl-2、Bax、caspase-3 表达的影响

Tab 2　Effect of tibolone on expression of Bcl-2, Bax, and caspase-3 in rats cerebral ischemia model

（$n=10$，$\bar{x}\pm s$，%）

Group	Bcl-2	Bax	Capase-3
Sham	32±2	12±1	4±1
OVX	5±1**	60±2**	49±2**
Tibolone	33±2△△	11±1△△	5±1△△

** $P<0.01$ *vs* sham group; △$P<0.01$ *vs* OVX. OVX: Ovariectomized group; Sham: Sham-operated group

3　讨　论

脑缺血再灌注后的细胞死亡是一个极其复杂的病理过程，细胞凋亡即细胞程序性死亡，是脑缺血后神经元死亡的一种重要形式，由多个基因参与调控的非炎症性死亡。

有研究证实了外源性雌激素可以明显降低实验性 MCAO 大鼠的死亡率，减少脑梗死面积，证明外源性雌激素具有缺血性神经保护作用[4]，然而外源性雌激素因增加乳腺及妇科肿瘤发病率而限制了临床应用。替勃龙是一种组织选择性雌激素活性调节剂，它对身体的某些特殊部分产生雌激素活性。但是，它在子宫内膜上不起雌激素的作用，不刺激子宫内膜增殖，对乳腺无雌激素效应。

Vergouwen 等[5]研究发现去势雌性 Wistar 大鼠在大脑中动脉栓塞前 30 min 静脉给予低剂量和高剂量替勃龙均不能改变梗死体积；在脑缺血术前 7 d 皮下给予低剂量（20 μg/10 d）替勃龙对梗死体积无影响，而高剂量替勃龙（200 μg/10 d）可使梗死体积缩小。小剂量替勃龙对梗死体积无影响，可能与 Wistar 大鼠不如 SD 大鼠对性激素敏感有关。替勃龙只有慢性治疗可发挥对脑缺血的保护作用也提示替勃龙在脑缺血再灌注中发挥保护作用可能通过基因组机制。

本实验发现替勃龙替代治疗可抑制去卵巢大鼠局灶性脑缺血再灌注时神经细胞凋亡，减少凋亡细胞数，明显缩小脑梗死体积，具有神经保护作用，其发挥神经保护作用、抗凋亡的机制为上调脑缺血再灌注后 Bcl-2 的表达，减低 Bax 及 Caspase-3 的表达。研究表明，Bcl-2 能阻止上游 Caspase 的活化，阻止自由基的生成、促进钙离子的清除及中和促凋亡因子如 Bax 和 Bad，其阻止神经元发生缺血性死亡的作用已被过度表达 Bcl-2 的小梗死灶转基因鼠所证实。细胞凋亡的最后实施是通过 Caspase-3 的激活而实现的，处于凋亡过程的下游阶段，是十分重要的凋亡执行蛋白，它能直接或间接裂解细胞结构如细胞骨架、核酸等，从而使凋亡发生。而雌激素的脑保护作用不仅参与了凋亡起始的多个机制如抑制自由基的产生[6]、防止线粒体受损等[7]，还有可能直接影响凋亡相关基因的表达而起到脑保护的作用。另外，雌激素还可能通过清除自由基[6]、抗氧化[8]、抑制脑内白细胞介素-1 等炎性因子[9]活性参加了脑保护作用。

我们的实验结果显示：切除卵巢大鼠造成的雌激素缺乏使得大脑中动脉缺血再灌注时脑组织损害加重，而替勃龙替代治疗可显著改善这种缺血再灌注损伤。当然替勃龙替代治疗对绝经后妇女缺血性脑血管病的保护及治疗作用还需要进一步的临床试验研究。

[参 考 文 献]

[1] Lobo R A. Menopause and stroke and the effects of hormonal therapy[J]. Climacteric, 2007, 10(Suppl 2): 27-31.

[2] 田文艳，武红利，钟亚丽，苏立凯. 替勃龙对绝经后妇女动脉硬化的预防作用[J]. 第二军医大学学报，2008，29：220-222.
Tian W Y, Wu H L, Zhong Y L, Su L K. Tibolone in prevention of arteriosclerosis in postmenopausal women [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 220-222.

[3] 俞丽霞. 药理学实验[M]. 杭州：浙江大学出版社，2004：133-136.

[4] Won C K, Kim M O, Koh P O. Estrogen modulates Bcl-2 family proteins in ischemic brain injury[J]. J Vet Med Sci, 2006, 68: 277-280.

[5] Vergouwen M D, Anderson R E, Meyer F B. Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2000, 878: 88-97.

[6] Billeci A M, Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. Hormone replacement therapy and stroke[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2008, 6: 112-123.

[7] Westberry J M, Prewitt A K, Wilson M E. Epigenetic regulation of the estrogen receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats[J]. Neuroscience, 2008, 152: 982-989.

[8] Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin N M, Simpkins J W, Prokai L. Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative [J]. Steroids, 2008, 73: 280-288.

[9] Grigoryants V, Hannawa K K, Pearce C G, Sinha I, Roelofs K J, Ailawadi G, et al. Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysm[J]. J Vasc Surg, 2005, 41: 108-114.

[本文编辑]　尹　荼