文章编号:1000-5404(2011)07-0663-04

论著

雌激素上调神经营养因子增加雄性小鼠中脑多巴胺神经元数量的实验研究

伊宏亮[1],郭文琼[1],孙卫忠[1],郭 亮[1],黄 伟[1],范晓棠[2],徐海伟[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部:生理学教研室[1],组织与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所[2])

【摘要】 **目的** 观察雌激素处理对成年雄性小鼠黑质多巴胺神经元数量的影响及可能的调控机制。**方法** 选用雄性C57/BL6小鼠10只,分成对照组、雌激素组(E_2),采用免疫组化检测雌激素处理对小鼠黑质多巴胺神经元与calbindin阳性神经元数量的改变;采用RT-PCR分析雌激素处理对小鼠中脑内多巴胺转运蛋白(DAT)、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)与脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA水平的影响。**结果** 雌激素处理可以增加小鼠黑质多巴胺神经元数量[E_2组(119.7±2.9)个 *vs* 对照组(93.5±5.1)个,$P=0.004$],并增加小鼠中脑内DAT的表达水平($P<0.05$),而对calbindin阳性神经元数量无影响[E_2组(88.0±2.0)个 *vs* 对照组(86.2±1.5)个]。雌激素处理同时可以上调小鼠中脑内IGF-1R与BDNF mRNA水平($P<0.05$)。**结论** 雌激素通过调节IGF-1R与BDNF的表达增加小鼠中脑内多巴胺神经元数量。

【关键词】 雌二醇;TH神经元;calbindin阳性神经元;胰岛素样生长因子1受体;脑源性神经营养因子
【中图法分类号】 Q591.9;R322.81;R329.24 **【文献标志码】** A

Estrogens enhances the number of dopamine neurons of adult male mice though upregulating neurotrophic factors

Yi Hongliang[1], Guo Wenqiong[1], Sun Weizhong[1], Guo Liang[1], Huang Wei[1], Fan Xiaotang[2], Xu Haiwei[1] ([1]Department of Physiology, [2]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To determine the effect of estrogens (E_2) on dopamine neurons in the substantia nigra (SN) of adult male mice and the underlying molecular mechanism. **Methods** Ten C57/BL6 mice were randomized to 2 groups, control group (with subcutaneous injection of 0.1 ml sesame oil for 10 d) and E_2 group (with subcutaneous injection of 2 μg/d 17-β estradiol solved in 0.1 ml sesame oil for 10 d). Immunohistochemistry was used to detect the positive neurons of tyrosine hydroxylase (TH) and calbindin. The expression levels of dopamine transporters (DAT), insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1Rm) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were detected by RT-PCR. **Results** E_2 increased the number of dopamine neurons [(119.7±2.9) *vs* (93.5±5.1)] ($P=0.004$) and the mRNA levels of DAT ($P<0.05$), but had no effect on the number of calbindin-positive neurons [(88.0±2.0) *vs* (86.2±1.5)] ($P=0.507$). E_2 increased the mRNA levels of IGF-1R and BDNF in the midbrain significantly ($P<0.05$). **Conclusion** E_2 can increase the number of dopamine neurons through upregulating the expression of IGF-1R and BDNF.

【Key words】 estradiol; TH positive neuron; calbindin positive neuron; insulin-like growth factor 1 receptor; brain-derived neurotrophic factor

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970947). Corresponding author: Fan Xiaotang, Tel: 86-23-68753231, E-mail: fanxiaotang2005@yahoo.com.cn; Xu Haiwei, Tel: 86-23-68752253, E-mail: Haiweixu2001@yahoo.com.cn

雌激素主要成分为雌二醇(E_2),属于类固醇激素,体内雌激素主要由睾丸、卵巢产生,脑内下丘脑与边缘系统的神经元亦能局部合成。研究显示雌性大鼠纹状体多巴胺(DA)能神经元的数量及多巴胺含量明显高于雄性大鼠;雌性小鼠卵巢摘除后DA神经元数目减少,给予外源性的雌激素后则增多[1]。此外,在帕金森病(PD)模型小鼠中雌激素能够减少和延缓纹状体多巴胺和黑质致密部DA神经元的减少[2-4]。临床流行病学资料显示PD发病率男性高于女性[5-6],提示体内雌激素具有保护DA能神经元的作用。

雌激素对雄性小鼠多巴胺系统同样具有保护作

【基金项目】 国家自然科学基金(30970947)
【通信作者】 范晓棠,电话:(023)68753231,E-mail:fanxiaotang2005@yahoo.com.cn
徐海伟,电话:(023)68752253,E-mail:Haiweixu2001@yahoo.com.cn

用,然而神经保护作用的机制并不清楚。Tripanichkul等[7]在雄性小鼠中发现雌激素明显增加黑质DA神经元的数量,但是对分泌因子有无影响并不清楚。calbindin是钙结合蛋白的一种,也是中间神经元的特异性标记物之一,在中脑黑质致密部与DA神经元共存[8],表现出一定的神经保护作用[9-11],而雌激素能否通过调节calbindin而影响中脑DA神经元的存活目前尚不清楚。因此本实验将从中间神经元和神经营养因子方面探讨外源性雌激素对雄性小鼠DA神经元的保护作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

3个月龄健康雄性C57BL/6J小鼠10只,体质量20~25 g,由我校实验动物中心提供,实验室环境为光照时间08:00~20:00,室温控制在18~22 ℃,给予足够的食物和水。饲养2周后,将小鼠分为2组,每组5只。对照组:颈部皮下注射oil(纯芝麻油);雌激素组(E_2):颈部皮下注射外源性雌激素(17-β雌二醇)。

1.2 主要药物和试剂

17-β雌二醇购自上海博蕴生物公司,纯芝麻油购自Sigma公司,兔抗calbindin抗体、鼠抗TH抗体购自Chemicon公司,生物素标记的羊抗兔、兔抗鼠购自Zymed公司,SABC复合物购自Vector公司,DAB显色试剂盒购自北京中杉公司,mRNA提取试剂盒购自北京天根公司,反转录及PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.3 给药方式

雌激素组皮下注射17-β雌二醇2 μg/d(溶于0.1 ml纯芝麻油中),对照组皮下注射0.1 ml纯芝麻油,2组均同时连续注射10 d[12]。

1.4 TH和calbindin免疫组化

最后1次注射完药物后,隔天取材。0.3%戊巴比妥(60 mg/kg)将小鼠腹腔麻醉,仰卧固定,快速开胸,暴露心脏,经左心室插管至升主动脉,剪开右心耳,进行心脏灌注:先以无菌生理盐水100 ml快速冲去血液,后用4 ℃预冷的4%多聚甲醛250 ml灌流固定,后取出脑组织置于4%多聚甲醛4 ℃过夜后固定;30%蔗糖脱水。冰冻切片(厚35 μm)收集在防冻液中保存。0.01 mol/L PBS漂洗;3%过氧化氢封闭,室温30 min;漂洗后3% BSA封闭,室温1 h;分别与含有兔抗calbindin(1∶1 000)、鼠抗TH(1∶1 000)的一抗工作液孵育,4 ℃过夜;漂洗后与生物素化的兔抗鼠(1∶200)、羊抗兔(1∶200)IgG,37 ℃孵育2 h;漂洗后与SABC复合物室温孵育2 h;漂洗后DAB显色,自然风干后酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照以PBS或BSA代替calbindin和TH一抗,其他步骤相同。

1.5 RT-PCR检测DAT、IGF-1R、BDNF的表达

检测对照组和雌激素组多巴胺转运蛋白(DAT)、胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)、脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA水平。小鼠处死后取中脑组织,按北京天根组织全RNA试剂盒说明书提取标本总mRNA,测定mRNA浓度及纯度,TaKaRa反转录试剂盒反转录成cDNA。采用Primer Premier 5.0软件设计引物,引物序列:DAT上游5′-AAGATCTGCCCTGTCCTGAAAG-3′,下游5′-CATCGATCCACACAGATGCCTC-3′;IGF-1R上游5′-CATCACCCCGCATACACCTG-3′,下游5′-ATCCCACGCCTCTGGACAAA-3′;BDNF上游5′-TTATTTCATACTTCGGTTGCA-3′,下游5′-AGTGTCAGCCAGTGATGTCG-3′;β-actin上游5′-CCAACCGCGAGAAGATGA-3′,下游5′-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3′;引物由上海生工公司合成。RT-PCR反应条件及扩增程序:按试剂盒说明书加入试剂、引物及样本cDNA,反应体系为25 μl。取10 μl扩增产物于含溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像。Quantity one软件分别计算目的基因和内参β-actin所对应的条带光密度值,以目的基因光密度值与β-actin光密度值的比值表示目的基因的表达丰度。

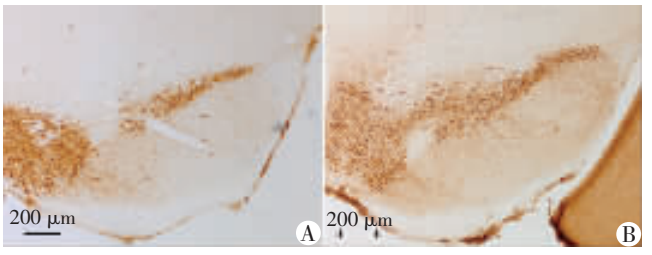
1.6 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 雌激素对TH标记多巴胺能神经元数量的影响

免疫组化结果显示:雄性小鼠给予外源性的雌激素后,黑质致密部TH阳性神经元数量相比于对照组明显增多[E_2组(119.7±2.9)个 *vs* 对照组(93.5±5.1)个,$P=0.004$]。提示雌激素能够增加黑质致密部TH阳性神经元的存活,见图1。

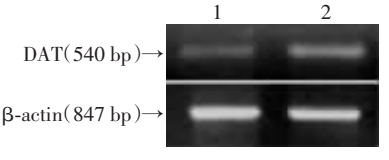


A:对照组;B:E_2组

图1 免疫组化染色检测雌激素对雄性小鼠TH标记多巴胺能神经元数量的影响 (SABC)

2.2 雌激素对中脑DAT表达的影响

RT-PCR结果表明,雄性小鼠给予雌激素处理后目的条带DAT与内参β-actin比值有所改变[E_2组(0.37±0.06) *vs* 对照组(0.07±0.01),$P<0.05$],说明雌激素能够增加中脑DAT mRNA的水平(图2)。



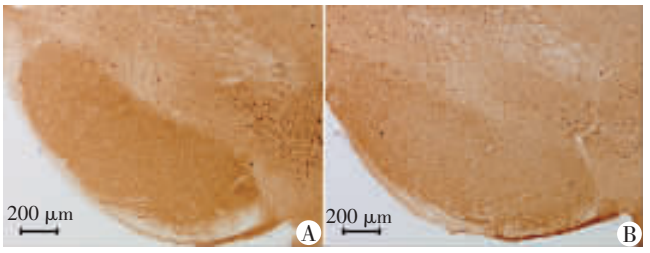
1:对照组;2:E_2组

图2 RT-PCR检测雌激素对雄性小鼠中脑DAT蛋白表达的影响

2.3 雌激素对calbindin标记的中间神经元表达的影响

calbindin标记的中间神经元数量在给予雌激素后相对于

对照组并无明显变化[E_2组(88.0 ± 2.0)个 *vs* 对照组(86.2 ± 1.5)个,$P > 0.05$]。见图 3。

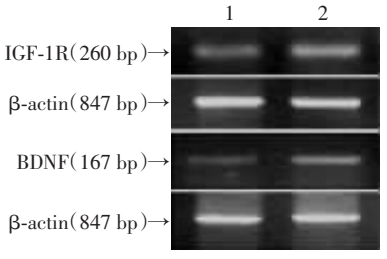


A:对照组;B:E_2 组

图 3 免疫组化染色检测雌激素对雄性小鼠中脑 calbindin 标记的中间神经元表达的影响 (SABC)

2.4 雌激素对 BDNF 和 IGF-1R 表达的影响

RT-PCR 结果表明,在给予雌激素后,中脑 BDNF mRNA 表达水平相对于对照组明显升高[E_2组(0.43 ± 0.03) *vs* 对照组(0.23 ± 0.03),$P < 0.05$]。同时有效刺激 IGF-1R 的表达上调[E_2组(0.51 ± 0.07) *vs* 对照组(0.23 ± 0.02),$P < 0.05$],见图 4。



1:对照组;2:E_2 组

图 4 RT-PCR 检测雌激素对雄性小鼠 BDNF 与 IGF-1R 表达的影响

3 讨论

PD 是一种常见于中老年的神经系统退行性疾病,其特征性病理改变为黑质致密部 DA 神经元的丢失和纹状体多巴胺的减少,进而导致运动功能失调、震颤和麻痹等症状。流行病学调查研究表明 PD 发病率男性明显高于女性,在女性,雌激素降低使患 PD 的危险性增加,而接受雌激素治疗者患病风险下降。PD 模型中研究表明雌激素能够通过抗凋亡、抗炎性反应、抗氧化等机制保护 DA 能神经元。本实验研究中我们证实外源性雌激素能够增加雄性小鼠中脑多巴胺神经元数,并观察到 DAT 水平的明显上调,显示雌激素增加多巴胺神经元存活的作用。

calbindin 是钙结合蛋白家族的一员,中间神经元特异性标记物之一,具有调节胞内钙稳态和调节神经元功能的作用。本实验结果表明,雄性鼠给予外源性的雌激素后,calbindin 标记的中间神经元在表达数量上并没有发生变化,因此推测在雄性鼠中雌激素并非通过调节 calbindin 表达影响 DA 神经元的数目。

胶质细胞表达雌激素受体,介导部分雌激素的生理功能,同时能够分泌 GDNF、BDNF 等神经营养因子,其中 BDNF 在中枢神经系统表达广泛,能够影响神经元的分化和存活,例如中脑 DA 神经元。在体实验研究表明雌激素可以调节海马等脑内区域 BDNF 的表达[13-14],本实验的研究结果证明雌激素在增加中脑 DA 神经元数目的同时伴随着 BDNF 表达水平的升高。IGF-1 具有神经营养效应,可刺激特定神经元的分化和存活,其生理功能是通过其受体 IGF-1R 发挥的。雌激素受体(ER)和 IGF-1R 共表达于中脑黑质神经元和胶质细胞中[15],雌激素信号通路与 IGF-1 信号通路相互作用,互相调节发挥神经保护作用[16-17]。本实验证实在雄性小鼠雌激素能够上调中脑 IGF-1R 的表达,而这很有可能与雌激素增加多巴胺能神经元的数量有关。

本研究提示,在雄性小鼠,外源性雌激素能够增加黑质多巴胺神经元的数量,而对中间神经元的数量无明显作用。雌激素增加 DA 神经元的数量可能与其上调神经营养因子的表达有关。

参考文献:

[1] Leranth C, Roth R H, Elsworth J D, *et al*. Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory[J]. J Neurosci, 2000, 20(23): 8604-8609.

[2] Disshon K A, Dluzen D E. Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release[J]. Brain Res, 1997, 764(1/2): 9-16.

[3] Bains M, Cousins J C, Roberts J L. Neuroprotection by estrogen against MPP^+-induced dopamine neuron death is mediated by ERalpha in primary cultures of mouse mesencephalon[J]. Exp Neurol, 2007, 204(2): 767-776.

[4] Li X L, Cheng W D, Li J, *et al*. Protective effect of estrogen on apoptosis in a cell culture model of Parkinson's disease[J]. Clin Invest Med, 2008, 31(5): E258-E264.

[5] Haaxma C A, Bloem B R, Borm G F, *et al*. Gender differences in Parkinson's disease[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007, 78(8): 819-824.

[6] Wooten G F, Currie L J, Bovbjerg V E, *et al*. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women?[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004, 75(4): 637-639.

[7] Tripanichkul W, Jaroensuppaperch E O, Finkelstein D I. Estrogen enhances the number of nigral dopaminergic neurons of adult male mice without affecting nigral neuroglial number and morphology[J]. Neurosci Lett, 2008, 435(3): 210-214.

[8] Liang C L, Sinton C M, German D C. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: co-localization with Calbindin-D28K and calretinin[J]. Neuroscience, 1996, 75(2): 523-533.

[9] Airaksinen M S, Thoenen H, Meyer M. Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice[J]. Eur J Neurosci, 1997, 9(1): 120-127.

[10] D'Orlando C, Fellay B, Schwaller B, *et al*. Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in

transfected P19 cells[J]. Brain Res, 2001, 909(1/2): 145-158.
[11] Choi W S, Lee E, Lim J, *et al*. Calbindin-D28K prevents drug-induced dopaminergic neuronal death by inhibiting caspase and calpain activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(1): 127-131.
[12] 包晓航，伊宏亮，郭文琼，等. 雌激素对福尔马林致痛后小鼠脊髓背角c-Fos和P物质的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(8)：739-743.
[13] Singh M, Meyer E M, Simpkins J W. The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats[J]. Endocrinology, 1995, 136(5): 2320-2324.
[14] Gibbs R B. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain[J]. Brain Res, 1999, 844(1/2): 20-27.
[15] Quesada A, Romeo H E, Micevych P. Distribution and localization patterns of estrogen receptor-beta and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the female rat substantia nigra: Localization of ERbeta and IGF-1R in substantia nigra[J]. J Comp Neurol, 2007, 503(1): 198-208.
[16] Mendez P, Wandosell F, Garcia-Segura L M. Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-Ⅰ receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms[J]. Front Neuroendocrinol, 2006, 27(4): 391-403.
[17] Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura L M. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling[J]. J Neurosci Res, 1999, 58(6): 815-822.

（收稿：2010-11-02 修回：2010-12-13）
（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2011)07-0666-01

吡拉西坦治疗75例高血压脑出血术后患者的临床疗效

王 俊，王 超，杨承勇，张 勇，王 曲，马 俊 （550002 贵阳，贵州省人民医院神经外科）

【关键词】 吡拉西坦；脑出血，高血压性
【中图法分类号】 R743.205 【文献标志码】 B

高血压脑出血死亡率高，幸存者往往留下严重后遗症，如何选择合理的治疗方案使患者安全度过围手术期，减少继发性脑损伤，最大限度地促进脑功能恢复是治疗的关键。本科自2007年8月至2010年7月采用大剂量吡拉西坦氯化钠注射液对75例高血压脑出血术后患者进行高颅压的控制及神经营养治疗，疗效满意，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 入选标准及分组

①有明确的高血压病史；②入院时呈浅昏迷或中度昏迷，CT提示一侧基底节区出血，出血量及占位效应均达到开颅手术指征，并进行开颅血肿清除术；③排除心、肺、肾等重要脏器功能衰竭者；④排除出血量小、无手术指征者或入院时呈深昏迷、双侧瞳孔散大者；⑤排除基底节区以外的其他部位出血者或出血破入脑室者。将符合入选标准的146例患者分为吡拉西坦治疗组（$n=75$）和甘露醇治疗对照组（$n=71$），2组年龄、性别、入院时意识状况、出血量及手术方式等临床资料具有可比性（$P>0.05$）。

1.2 临床表现及诊断

高血压脑出血患者146例，其中男性104例，女性42例，年龄38~69岁，平均62.9岁，入院时均呈昏迷状态，其中浅昏迷84例，中度昏迷62例。均有一侧肢体不同程度的偏瘫，其中一侧瞳孔散大、对光反射迟钝或消失27例。CT表现：所有患者为一侧基底节区出血，出血量40~75 ml，同侧脑室明显受压，中线移位。全部病例符合1996年中华医学会第4次全国脑血管病学术会议制定的脑出血诊断标准。

1.3 治疗方法

①所有病例在入院后立即在全麻下开颅，显微镜下行基底节区血肿清除术，其中16例因脑水肿严重而行去骨瓣减压术，术后应用法国生产的Sophysa PSO-3000型颅内压检测仪监测颅内压。②术后常规给予控制血压、防治并发症等常规综合治疗，呼吸不畅者行气管切开。在常规治疗的基础上，治疗组应用20%吡拉西坦氯化钠注射液100 ml（山东威高药业有限公司生产，吡拉西坦20 g，氯化钠0.9 g）快速静脉滴注，每日2~3次；对照组应用20%甘露醇注射液（石家庄四药有限公司生产）250 ml快速静脉滴注，每日2~3次。2组病例根据颅内压监测的情况调整用药量，5~8 d减量，2~3周停药。

1.4 疗效评定指标

①治疗1周内意识状态及颅内压控制情况；②治疗1周复查CT，评定脑水肿程度，其中脑室无明显受压者为轻度；脑室受压、中线居中者为中度；中线移位者为重度；③用药3个月后疗效：采用巴氏指数（Barthel index，BI）评定日常生活活动能力（满分100分），0~20分为极严重日常活动能力缺陷，25~45分为严重缺陷，50~70分为中度缺陷，75~95分为轻度缺陷，100分为正常；采用简明精神状态检查量表（mini mental state examination，MMSE）评价认知功能（满分30分），包括定向力、记忆力、注意力和计算力、回忆力、语言能力。

1.5 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件，计数资料行χ^2检验，BI、MMES分值行t检验。

【通信作者】 王 俊，电话：(0851)5933152，E-mail：wjhtgj@yahoo.cn

（下转670页）