DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.007
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1391-03

论著

雌二醇对慢性脑缺血去卵巢大鼠脑病理改变的影响

李露斯,王兴华,范文辉 (第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨苯甲酸雌二醇对大鼠额部皮质和海马CA1区细胞形态和数量的影响,初步研究雌激素对血管性痴呆(Vascular dementia,VD)大鼠的神经保护作用。方法 利用双侧颈总动脉持久性结扎及卵巢切除大鼠模型,利用光镜、电镜结合图像分析,观察大鼠额叶皮质和海马CA1区的病理和超微结构变化。结果 手术组较治疗组大鼠额部皮质和海马CA1区细胞形态改变明显,数量减少,统计学分析呈显著差异。结论 雌激素具有一定的神经保护作用,可以为缓解血管性痴呆的症状提供结构基础。

关键词:苯甲酸雌二醇;血管性痴呆
中图法分类号:R743.31;R977.12 文献标识码:A

Effects of estradiol benzoate on the pathological changes of brain in 2VO-OVX rats

LI Lu-si, WANG Xing-hua, FAN Wen-hui (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of estradiol benzoate on the morphology and number of neurons in cerebral frontal cortex and hippocampal CA1 area of 2VO-OVX rats. Methods Eighteen female Wistar rats were randomly divided into 3 groups, that is, sham-operation, 2VO-OVX (bilateral common carotid artery occlusion and ovariectomy)+ sesame oil, and 2VO-OVX+ estrogen replacement (named as S, O and E groups respectively). The changes of morphology and number of neurons in frontal cortex and hippocampal CA1 were studied with light and electron microscopy. Results The numbers and shape of neurons in frontal cortex and CA1 were well maintained in E group, better than in O group but worse than in S group. Significant differences were found in neuron number among 3 groups ($P<0.01$). Conclusion Estrogen can exert neuroprotection to some extent, which may be used to ameliorate the symptoms of vascular dementia.

Key words: estradiol benzoate; vascular dementia

近年研究表明,雌激素可以通过多种机制对抗损害因素,发挥神经保护作用,从而有益于多种神经疾病的治疗,尤其对于绝经后妇女。有资料表明雌激素能够降低绝经后妇女的心脑血管疾病发病率,可以减轻Alzheimer's disease (AD)患者的认知功能障碍,并延缓其发病的时间。既往的雌激素的脑保护的研究绝大多数都是细胞培养和急性脑缺血的实验结论,关于雌激素在慢性脑缺血持续存在的情况下,其神经保护作用如何,很少研究。本实验利用双侧颈总动脉持久结扎模型,使老龄大鼠产生慢性前脑灌注不足,对额叶皮层和海马CA1区进行神经组织形态学观察,初步探讨苯甲酸雌二醇对神经细胞的影响,为在病理条件下研究雌激素的神经保护作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性Wistar大鼠18只,18月龄,体重300~400 g,由附属大坪医院野战外科实验动物中心提供。苯甲酸雌二醇:灭菌油溶液,上海第九制药厂生产。

1.2 实验动物及其处理

大鼠术前8~12 h禁食,自由饮水。小容器乙醚棉球罩头麻醉成功后,仰卧固定于手术台上,颈部皮肤剪毛备皮,碘酒、酒精消毒,以无菌器械在颈侧部切开皮肤及皮下组织,长度约1.5 cm,暴露颈部肌肉后,在一侧颈前肌肉和侧方肌肉间隙钝性分离颈总动脉,以4号丝线双重结扎,间断缝合皮肤。术后送第三军医大学实验动物中心饲养。间隔1周后进行另一侧颈总动脉结扎(VO)及开腹行卵巢(OVX)切除。假手术组只暴露术野,不做结扎和切除;对照组给予苯甲酸雌二醇溶媒类似物——煮沸过的麻油。分组及给药:随机分为3组。①S组($n=6$):假手术组+麻油;②O组($n=6$):2VO+OVX+麻油;③E组($n=6$):2VO+OVX+苯甲酸雌二醇。第2次手术后当天开始给药,腹腔内注射,每周两次。药物剂量为1 mg/kg体重,约为每只大鼠300 μg。所有大鼠于术后饲养2月。

1.3 标本采集

用1%戊巴比妥钠(50 mg/kg体重)腹腔注射麻醉,打开胸腔,暴露心脏,左心室插管至升主动脉,用丝线结扎以防止脱落,然后切开右心耳放血。灌注37 ℃的生理盐水至流出液不见血色为止。然后注入4 ℃的4%多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 7.4)灌注固定,约300 ml/kg体重,5~10 ml/min,先快后慢。当机体变硬、尾巴震颤消失时停止灌注。置于4 ℃冰箱过夜,于次日仔细剥离出完整脑组织。每组各取3只标本,分别切取皮质和海马部位的小组织块浸于3%戊二醛溶液中,送电镜技术室;余下组织块及其它标本浸于上述灌注液中,送本校病理研究所。

1.4 图像分析

在40×10倍显微镜下,运用体视学方法的测试网格进行细胞计数,以"0.9 mm^2"为单位。每组检测6个标本,均检测皮质、海马CA1区相近部位的2个视野,取其平均值作为测量结果。

1.5 统计学处理方法

对资料进行 t 检验。

基金项目:国家自然科学基金资助项目:39770273
作者简介:李露斯(1945—),女,黑龙江省哈尔滨市人,主任医师,教授,主要从事脑血管疾病的防治方面的研究,已发表论文30余篇。电话:(023)68752682
收稿日期:2002-07-17;修回日期:2002-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 光镜结果

正常对照组未发现明显的病理变化。手术组皮层下、内囊区及海马区结构松散，出现较大的软化灶，伴有胶质细胞和小血管增生，其它白质内散在有胶质细胞增生小结；灰质内见部分神经元呈缺血性形态改变，胞体缩小，胞膜与周围分界清楚，胞核固缩，多呈三角形，核仁消失，胞浆致密，周围出现空晕；毛细血管密度明显增加；海马 CA1 区的胞体明显变小，胞间距离较大。雌激素组皮质偶见小软化灶，胞体缩小，但形状与正常接近，数量多于手术组；海马 CA1 区的胞体大小与正常接近，可见明显的众多神经纤维。3 组皮质和海马 CA1 区的细胞计数见表 1。3 组海马细胞改变见图 1～3。

2.2 电镜结果

正常对照组未发现明显的病理变化。手术组皮层和海马部分神经元固缩，异染色质增多，核仁消失或变小，胞浆电子密度增加，出现变性细胞器，脂褐素明显增多，线粒体肿胀，数量减少，胞浆膜部分扩张；散在灶性神经纤维及髓鞘溃变；突触间隙增宽、轴浆水肿，突触小泡减少，突触后膜肿胀；神经毡内出现点状软化灶，星形细胞数量增加；部分毛细血管的内皮细胞线粒体肿胀、周细胞变性、基底膜不规则增厚伴纤维化；部分毛细血管周围缺乏星形细胞足突，提示新生血管形成。雌激素组神经元线粒体肿胀，胞浆内较多致密颗粒，胞质内局灶性坏死，神经元突起间多个突触连接，突触间隙较窄，突触前膜囊泡较多，后膜增厚；小血管基底膜增厚，内皮细胞线粒体肿胀，程度轻于手术组。3 组血管基底膜的改变见图 4～6。

表 1 皮质和海马 CA1 区的神经元细胞计数($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1 Number of neuron in the front cortex and hippocampal CA1 of S, O and E groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

	S group	O group	E group
Cortex	128.20±6.76	92.40±5.57	110.60±9.09 *
CA1	91.60±6.84	65.80±3.49	78.60±4.45 *

* $P<0.01$ *vs* S group and O group

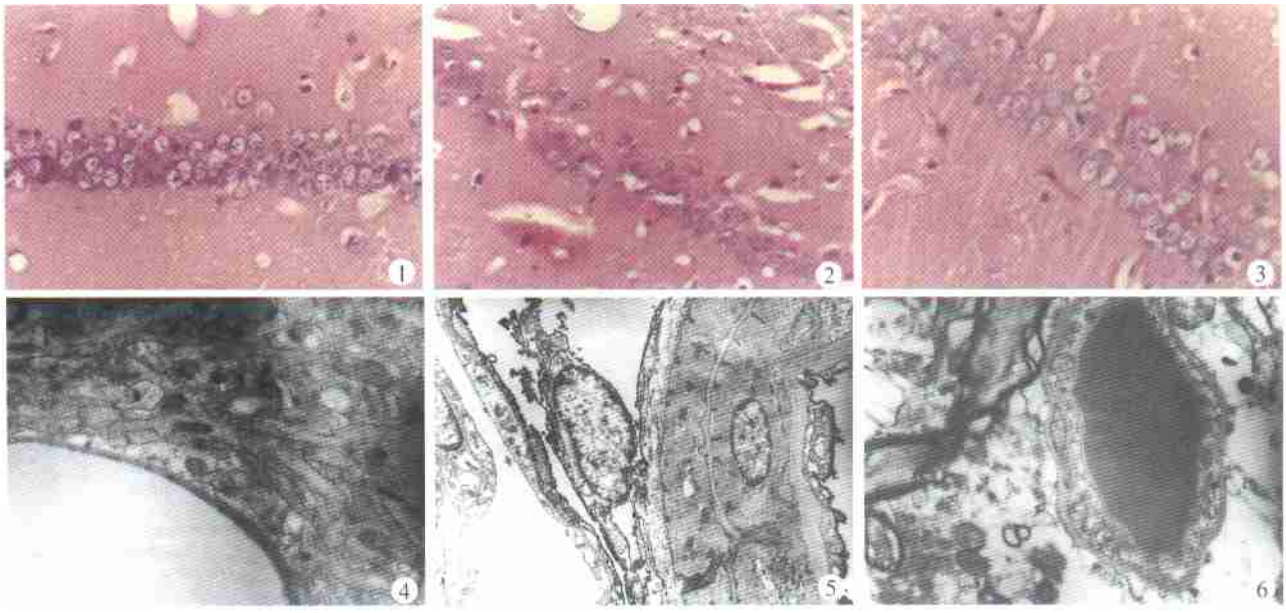


图 1 假手术组海马 CA1 区的神经细胞形态 (HE× 400)

Fig 1 Neurons in hippocampal CA1 area of S group (HE× 400)

图 2 手术组海马 CA1 区的神经细胞形态：胞体缩小，排列紊乱 (HE× 400)

Fig 2 Neurons in hippocampal CA1 area of O group, cell bodies reduced and diffusely arranged (HE× 400)

图 3 雌激素治疗组海马 CA1 区的神经细胞形态：明显的神经纤维 (HE× 400)

Fig 3 Neurons in hippocampal CA1 area of E group with obvious neuronal fibers (HE× 400)

图 4 假手术组的微血管基底膜 (EM× 12 000)

Fig 4 Basement membrane of micro-vessel in S group (EM× 12 000)

图 5 手术组的微血管基底膜：基底膜增厚 (EM× 2 500)

Fig 5 Thickened basement membrane of micro-vessel in O group (EM× 2 500)

图 6 雌激素治疗组的微血管基底膜 (EM× 12 000)

Fig 6 Basement membrane of micro-vessel in E group (EM× 12 000)

3 讨论

近来的研究表明，大鼠 2VO 所致的慢性脑灌注不足模型可以出现进行性神经损害。Bennett 等[1] 研究显示 2VO 大鼠于术后 2～27 周脑内出现凋亡形态学改变和 DNA 解链，27 周时锥体细胞数下降，迷宫学习能力和 CA1 区的凋亡神经元数呈强相关。Narri 等[2] 研究发现大鼠 2VO 后 1～3 d 出现白质稀疏、皮质和海马神经元皱缩，7 d 后出现纹状体梗塞。本实验室以往研究亦发现大鼠 2VO 所致的慢性脑灌注不足模型可以

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

出现进行性认知功能障碍[3]。李露斯[4]研究发现 2VO 后主要出现两种损害,第一种为梗塞,可能为急性缺血所致,术后 1 月皮质的梗塞区占 28.6%,纹状体可达 42.9%,到术后 4 月该比例无明显改变;第二种为海马和白质的进行性神经元损害,海马 CA1 的损害发生在术后 4 月,白质损害术后 1 月即出现,4 月后显著增加。本实验以术后 2 月为观测时相点,可以明显的观察到皮质和海马的神经元的形态学异常,并且发现雌激素对细胞形态和数量具有保护作用,但不能完全防止病理损害的发生,说明了雌激素效应的局限性。

在 O 组可以观察到白质内有散在的神经纤维和髓鞘溃变,神经毡内出现软化灶,E 组改变较轻。研究发现,痴呆的白质改变与灰质改变的严重程度不平行,可表现为组织疏松、轻度胶质增生、非类淀粉性小血管硬化、小血管密度降低等。Dettmers 等[5]在实验中观察到了反复中度的低血压所致的脑组织改变的累积效应,认为白质疏松的一个重要机制是深部白质内走行很长的穿动脉长期处于低灌注状态。而雌激素具有保护血管和扩张血管增加脑血流的作用,这可能是其发挥白质保护作用的基础。

本实验中通过电镜观察了微血管的基底膜的改变情况,发现雌激素可以明确抑制基底膜的增厚,保护血管的完整性。Torre[6]研究显示,慢性脑灌注不足的鼠脑出现:微血管密度减少,萎缩的索状血管数目增加,血管曲度增加,基底膜增厚,外膜细胞坏死和管腔扭曲。De Jong 等[7]研究显示 17 月龄大鼠的海马 CA1 区即可出现毛细血管的改变:周细胞变性、基底膜增厚甚至纤维化,2VO 大鼠上述改变则可以成倍增加,进而认为毛细血管的完整性在维持脑功能的诸条件中起决定性作用。

有证据表明雌激素水平低下,可直接影响神经元的的活性及修复,特别是在海马、基底节、前脑和杏仁核,胆碱能神经元减少,突触数目降低;雌激素缺乏可加速神经元缺失,影响轴突和树突的形成,同时影响多种神经递质如 Ach、5-HT、NE、及 NGF 等,干扰正常的递质代谢和信息传递。也就是说雌激素可以影响胆碱能系统和海马,影响认知功能。神经元树状棘突在大脑的信息加工和记忆形成中起重要作用。本实验发现雌激素可以增加突触密度,缩窄突触间隙,丰富突触前膜囊泡。雌激素促进树突的机制还未完全阐明,其中之一可能是雌激素具有显著的促进成年鼠脑细胞微管蛋白合成的作用,有利于神经元轴突、树突的分化与发育,延缓神经元的萎缩和老化[8]。进一步的研究发现,雌激素诱导的新棘突主要存在 NMDA 受体,高密度的树状棘突总是伴随着对 NMDA 受体的高敏感度,提示雌激素可能通过作用于兴奋性递质和 NMDA 受体,发挥促进棘突形成的作用。

本实验从光镜和电镜两方面对雌激素的神经保护作用进行了观察,发现雌激素在维持细胞形态和数量、促进突触连接的建立、减轻慢性缺血损害等方面,具有确实效果,能够为神经功能的恢复提供结构基础,具有一定的神经保护作用。

参考文献:

[1] Bennett S A, Tenniswood M, Chen J H, *et al*. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment[J]. Neuroreport, 1998, 9(1): 161—166.

[2] Narri M, Watanabe H. Availability of 2VO rats as a model for chronic cerebrovascular disease[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 1999, 113(2): 85—95.

[3] Ni J W, Matsumoto K, Li H B, *et al*. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat[J]. Brain Res, 1995, 673(2): 290—296.

[4] 李露斯, 刘之荣. 慢性脑血流灌注不足认知功能障碍与环孢素 A 治疗作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(11): 1042—1045.

[5] Dettmers C, Hagendorff A, Luderitz B, *et al*. Progressive cerebral parenchyma damage caused by recurrent arterial hypotension[J]. Nervenarzt, 1997, 68(8): 625—663.

[6] de la Torre J C. Critical threshold cerebral hypoperfusion causes AD[J]. Acta Neuropathol(Berl), 1999, 98(1): 1—8.

[7] De Jong G I, Farkas E, Stienstra C M, *et al*. Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment[J]. Neuroscience, 1999, 91(1): 203—210.

[8] 郭守祥, 田德润, 李云生, 等. 性激素对成年小鼠脑微管蛋白合成的影响[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(2): 164—168.

[9] Woolley C S, Weiland N G, McEwen B S, *et al*. Estradial increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. [J] Neurosci, 1997, 17(5): 1848—1859.

（编辑　汪勤俭）

（上接 1390 页）

3　老年患者心理辅导

惧怕伤口疼痛或裂开是普遍心理障碍,注意心理疏导并取得家属配合,积极鼓励主动锻炼,避免角色强化行为[3],告诉患者患侧臂力经锻炼可胜任过去的工作和生活角色,增强其信心。

4　结果

随访 43 例 1 至 2 年,凡坚持正确长期锻炼者,均能胜任日常工作及生活,承担了一定的社会及家庭角色,生活质量高。

（承蒙詹新恩教授指导,谨此致谢!）

关键词: 老年妇女; 乳腺癌; 功能锻炼
中图法分类号: R737.909　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 杨健华. 中老年妇女乳腺增生与乳腺癌发生情况分析[J]. 实用老年医学, 1997, 11(3): 138.

[2] 金宗浩. 当代乳腺癌的诊断和治疗[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 328—329.

[3] 王友平, 李恩昌. 医学心理学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1990. 148—149.

（编辑　潘式文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net