



17 β 雌二醇对大鼠创伤性脑损伤的保护作用

王 迅¹, 冷晓磊¹, 矫永庆¹, 崔 鹏²

(1. 大连市第三人民医院神经外科, 辽宁, 大连 116033; 2. 大连医科大学附属三院神经外科, 辽宁, 大连 116000)

【摘要】 目的 探讨大鼠创伤性脑损伤后 17 β 雌二醇对脑组织的保护作用。**方法** 选择雄性成年 SD 大鼠 45 只, 按随机数字表法分为三组, 每组 15 只: 对照组仅开骨窗, 不损伤脑组织; 致伤组制大鼠自由落体脑撞击伤模型; 处理组在致伤组的基础上, 伤前 1 周腹腔注射 17 β 雌二醇溶液 (1 mg/kg), 1 次/d。余两组仅注射同体积的蓖麻油。在伤后 6 h、24 h 及 48 h 测量各组脑组织含水量、丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。**结果** 致伤组和处理组在伤后 6 h、24 h、48 h 三个时间点脑组织含水量均高于对照组 ($P < 0.05$)。在伤后 6 h, 致伤组和处理组脑组织含水量比较差异无统计学意义 [(58.39 $\pm$ 0.29)% 比 (57.03 $\pm$ 0.27)%] ($P > 0.05$), 而在伤后 24 h、48 h 致伤组脑组织含水量明显高于处理组, 差异有统计学意义 [(67.41 $\pm$ 0.37)% 比 (64.77 $\pm$ 0.33)%, (81.95 $\pm$ 0.47)% 比 (75.26 $\pm$ 0.41)%] ($P < 0.05$)。在伤后 6 h 致伤组、处理组 MDA 含量明显增加, 并且一直维持在较高水平, 而 SOD 活性则明显下降, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。处理组在伤后 6 h MDA 含量和 SOD 活性与致伤组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而在伤后 24 h、48 h MDA 含量显著降低 [(130.39 $\pm$ 7.02) μ mol/g 比 (149.41 $\pm$ 8.25) μ mol/g, (125.41 $\pm$ 6.59) μ mol/g 比 (157.72 $\pm$ 8.93) μ mol/g], SOD 活性则明显增高 [(88.46 $\pm$ 7.17) U/g 比 (80.10 $\pm$ 4.87) U/g, (97.31 $\pm$ 7.89) U/g 比 (84.29 $\pm$ 6.13) U/g], 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 17 β 雌二醇对创伤性脑损伤有保护作用。

【关键词】 雌二醇; 脑损伤; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 脑组织含水量; 大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 04-0023-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.004.005

Protective effect of 17 β -estradiol on traumatic brain injury in rats

WANG Xun¹, LENG Xiao-lei¹, JIAO Yong-qing¹, CUI Peng²

(1. Department of Neurosurgery, the Third People's Hospital of Dalian City, Dalian 116033, China;

2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000)

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of 17 β -estradiol on traumatic brain injury in rats. **Methods** A total of 45 adult male SD rats were divided into 3 groups using the random digit table, 15 rats in each group: the control group only exposed but not injured the brain, the injury group received traumatic brain injury (TBI) by Feeney's method, and the treatment group received the same handling with injury group, and pretreatment with 17 β -estradiol peritoneal injection, 1 mg/kg per day for one week. The other two groups were given the same volume of castor oil. At 6 h, 24 h and 48 h after injury, the brain tissue water content, malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were measured. **Results** At 6 h, 24 h and 48 h after injury, the levels of brain tissue water content in the injury group and treatment group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). At 6 h after injury, the brain tissue water contents in the injury group and treatment group were (99.83 $\pm$ 0.40)% and (99.53 $\pm$ 0.41)%,

[作者简介] 王迅 (1980 -), 男, 研究方向: 神经外科基础 Email: fyw52512@sina.com。

[通讯作者] 崔鹏 (1978 -), 男, 研究方向: 神经外科基础 Email: wx626626@sina.com。

respectively, with a non-significant difference between the two groups ($P > 0.05$). At 24 h and 48 h after injury, the brain tissue water contents in the injury group was $(105.17 \pm 0.43)\%$ and $(107.54 \pm 0.39)\%$, in the treatment group was $(103.26 \pm 0.42)\%$ and $(105.89 \pm 0.43)\%$, respectively, showing a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). At 6 h after injury, the levels of MDA in the injury group and treatment group increased and maintained at a higher level, and the levels of SOD decreased. Compared with the control group, there had a significant difference ($P < 0.05$). The levels of MDA and SOD in the injury group and treatment group at 6 h after injury had a non-significant difference ($P > 0.05$). But at 24 h and 48 h after injury, the levels of MDA in the treatment group were significantly lower than those in the injury group [$(130.39 \pm 7.02) \mu\text{mol/g}$ vs. $(149.41 \pm 8.25) \mu\text{mol/g}$, $(125.41 \pm 6.59) \mu\text{mol/g}$ vs. $(157.72 \pm 8.93) \mu\text{mol/L}$], and the levels of SOD in the treatment group were significantly higher than those in the injury group [$(88.46 \pm 7.17) \text{U/g}$ vs. $(80.10 \pm 4.87) \text{U/mg}$, $(97.31 \pm 7.89) \text{U/g}$ vs. $(84.29 \pm 6.13) \text{U/g}$], with a significant difference ($P < 0.05$) between the two groups. **Conclusions** 17β -estradiol has a protective effect on traumatic brain injury.

【Key words】 Estradiol; Brain injury, traumatic; Malondialdehyde; Superoxide dismutase; Brain water content; Rats

颅脑损伤是当今威胁人类生命的主要疾患之一,其发生率和病死率仅次于癌症和心血管疾病而居第三位,在暴力性死亡中颅脑损伤的病死率居首位。雌激素作为一种内源性激素在全身多个系统中发挥重要作用,其中神经系统也是其靶器官^[1]。本研究旨在探讨 17β 雌二醇对创伤性脑损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取健康雄性 SD 大鼠 45 只,7~8 周龄,体重 220 g~250 g,由辽宁医学院动物实验中心提供(生产许可证号 SCXK(辽)2013-0007)。按随机数字表法分为对照组、致伤组和处理组,每组 15 只。使用许可证号:(SYXK(辽)2003-0019)。

1.2 仪器与试剂

17β 雌二醇粉剂(美国 Sigma 公司)。TA1300 电子天平(精确到 0.01,上海皓庄仪器有限公司),用于脑含水量测量;超声波细胞粉碎机(北京中科科仪仪器有限公司)、离心机(北京京立离心机有限公司)、红外线干燥箱(北京卓川电子科技有限公司),用于制成组织匀浆液及提取上清液,待用于 SOD 及 MDA 测定。SOD 试剂盒、MDA 试剂盒(购于南京建成生化有限公司)。

1.3 动物实验方法

1.3.1 动物模型制作:致伤组及处理组均采用改进的 Feeney 自由落体硬膜外撞击方法^[2];将 SD 大鼠称重后经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g 体重),俯卧固定于脑立体定位仪上。矢状中线切开头皮后分离骨膜,暴露前囟、冠状缝、矢状缝及顶

骨。以前囟后 3.0 mm,向右旁开矢状缝 3.0 mm 为中心作一直径约为 4~5 mm 颅骨钻孔。保持硬脑膜不受损伤。将自由落体装置底座置于右顶骨窗部的硬脑膜表面,以 25 g 重物自 40 cm 高沿套管下落打击致伤底座,其直径 3.5 mm,最大下陷距离 3.0 mm,硬膜保持完整,造成右顶局限性损伤。对照组仅开骨窗,不损伤脑组织。用牙托粉封闭骨窗,缝合头皮,置鼠笼喂养。

1.3.2 给药途径及方法:处理组于伤前 1 周腹腔注射 17β 雌二醇溶液(1 mg/kg),1 次/d,余两组仅注射同体积的蓖麻油。

1.3.3 标本处理及采集:各组在伤后 6 h、24 h 及 48 h 相应时间点分别取 5 只大鼠进行处理。采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g),断头处死,在冰盘上快速取全脑,0℃ PBS 缓冲液清洗,滤纸吸干备用。

1.4 观察指标

1.4.1 脑组织含水量测定:致伤组及处理组均取伤灶周围脑组织,对照组取对应部位脑组织,使用电子分析天平分别称取脑湿重 100 mg,然后将标本置于 90℃ 红外线干燥箱中 24~48 h 至恒重,称取值为干重。脑组织含水量用湿重的百分比表示,采用 Eliot 公式计算即脑组织含水量(%) = (湿重 - 干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

1.4.2 脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量测定:将采集的全脑标本于冰浴中迅速分离脑组织,取损伤侧半球脑组织称重,按 1:10 比例(每 1 g 组织加 10 mL 生理盐水)加入冰生理盐水,用组织匀浆机分别制成 10% 组织匀浆,离心 10 min,并用生理盐水将上清液稀释成 1% 组织匀

浆。根据 SOD 试剂盒说明、MDA 试剂盒说明进行测定 SOD 活性及 MDA 含量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计软件进行分析,正态分布的计量资料用均数 ± 标准差表示,多组比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组伤后不同时间点脑组织含水量比较

致伤组和处理组在伤后 6 h、24 h、48 h 三个时间点脑组织含水量均高于对照组($P < 0.05$)。在伤后 6 h,致伤组和处理组脑组织含水量比较差异无

统计学意义($P > 0.05$),而在伤后 24 h、48 h 致伤组脑组织含水量明显高于处理组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 三组伤后不同时间点 MDA 含量及 SOD 活性变化

在伤后 6 h 致伤组、处理组 MDA 含量明显增加,并且一直维持在较高水平,而 SOD 活性则明显下降,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。处理组在伤后 6 h MDA 含量和 SOD 活性与致伤组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而在伤后 24 h、48 h MDA 含量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 三组 SD 大鼠伤后不同时间点脑组织含水量比较(% , $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of the brain tissue water content in the rats of three groups at different time points after injury (% , $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	例数 Cases	伤后 6 h(5 例) 6 h after injury (5 cases)	伤后 24h(5 例) 24 h after injury (5 cases)	伤后 48h(5 例) 48 h after injury (5 cases)
对照组 Control	15	53.67 ± 0.21	53.28 ± 0.22	53.89 ± 0.24
致伤组 Injury	15	58.39 ± 0.29 ^a	67.41 ± 0.37 ^a	81.95 ± 0.47 ^a
处理组 Treatment	15	57.03 ± 0.27 ^a	64.77 ± 0.33 ^{ab}	75.26 ± 0.41 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与致伤组比较,^b $P < 0.05$

Note. ^a $P < 0.05$ compared with the control group; ^b $P < 0.05$ compared with the injury group.

表 2 三组伤后不同时间点 MDA 含量及 SOD 活性变化($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Changes of MDA content and SOD activity in the brain tissue in the rats of three groups at different time points($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	例数 Cases	丙二醛(MDA)含量(μmol/g) MDA content (μmol/g)	超氧化物歧化酶(SOD)活性(U/g) SOD activity (U/g)
对照组 Control	15		
伤后 6 h 6 h after injury	5	116.55 ± 5.92	120.35 ± 4.43
伤后 24 h 24 h after injury	5	118.31 ± 5.25	119.89 ± 4.68
伤后 48 h 48 h after injury	5	117.47 ± 6.17	121.44 ± 5.04
致伤组 Injury group	15		
伤后 6 h 6 h after injury	5	145.38 ± 7.71 ^a	79.99 ± 5.21 ^a
伤后 24 h 24 h after injury	5	149.41 ± 8.25 ^a	80.10 ± 4.87 ^a
伤后 48 h 48h after injury	5	157.72 ± 8.93 ^a	84.29 ± 6.13 ^a
处理组 Treatment group	15		
伤后 6 h 6h after injury	5	144.42 ± 7.49 ^a	81.95 ± 6.62 ^a
伤后 24 h 24h after injury	5	130.39 ± 7.02 ^{ab}	88.46 ± 7.17 ^{ab}
伤后 48 h 48h after injury	5	125.41 ± 6.59 ^{ab}	97.31 ± 7.89 ^{ab}

注:与对照组相同时间点比较,^a $P < 0.05$,与致伤组相同时间点比较,^b $P < 0.05$

Note. Compared with the control group at the same time point, ^a $P < 0.05$; compared with the injury group at the same time point, ^b $P < 0.05$.

3 讨论

创伤性脑损伤后引起的出血、缺血及缺血再灌注等均伴有大量的氧自由基产生,由于细胞膜脂质内含有大量的胆固醇及多不饱和脂肪酸,易遭受自由基的侵害,发生脂质过氧化反应,致细胞膜通透性改变,细胞水肿坏死^[3]。SOD 是一种金属酶,此酶可催化超氧自由基发生歧化反应,能够清除氧自由基,保护生物膜免受自由基的伤害。自由基可使脑组织 MDA 含量升高,SOD 活性下降。通过研究脑组织线粒体 MDA 和 SOD 水平的变化,可以反映药物治疗的效果是否通过对抗自由基而发挥其治疗作用^[4]。

雌激素是由雌激素合成酶催化雄激素转化而来的,主要由卵巢分泌产生,胎盘、肾上腺皮质和男性的睾丸也能产生少量的雌激素。本实验选用的 17 β 雌二醇是体内含量最多、活性最强的,在临床及实验研究中大多都采用 17 β 雌二醇,具有一定的代表性。

雌激素作为内源性激素主要是通过作用于表达雌激素受体(estradiol receptor, ER)的靶器官来发挥其生理及药理作用的^[5]。ER 在体内分布广泛,神经系统也是雌激素的靶器官,在中枢神经系统,ER 存在于中间、感觉神经元,胶质细胞等。近来,国内外研究发现^[6],在多种脑损伤(缺血、兴奋性氨基酸刺激、低糖)模型和多种培养细胞(初级神经元、肿瘤源性的神经细胞系、混合培养的神经元和星形胶质细胞)上,都观察到不同浓度的 17 β 雌二醇能缓解神经元的凋亡,发挥保护作用。其作用机理包括经典的受体依赖机制和新的受体非依赖机制。而受体非依赖途径包括改善血液循环、降低白细胞黏附、减少过氧化反应、抑制 Ca^{2+} 内流、减少一氧化氮的产生、减少谷氨酸的神经毒性等^[7]。本实验结果表明,致伤组和处理组在伤后 6、24、48 h 三

个时间点脑组织含水量均高于对照组($P < 0.05$)。在伤后 6 h,致伤组和处理组脑组织含水量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而在伤后 24 h、48 h 致伤组脑组织含水量明显高于处理组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在伤后 6 h 致伤组、处理组 MDA 含量明显增加,并且一直维持在较高水平,而 SOD 活性则明显下降,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。处理组在伤后 6 h MDA 含量和 SOD 活性的变化与致伤组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而在伤后 24 h、48 h MDA 含量显著降低,SOD 活性则明显增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见,17 β 雌二醇对大鼠脑创伤有保护作用,其作用机制可能通过减少脂质过氧化,抑制自由基生成来发挥其保护作用。

参考文献:

- [1] Asl SZ, Khaksari M, Khachki AS, et al. Contribution of estrogen receptors alpha and beta in the brain response to traumatic brain injury [J]. J Neurosurg, 2013, 119(2): 353 - 361.
- [2] 陈梅花,陈贵菊,贾万钧,等. 改良大鼠弥漫性脑损伤模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 7(1): 42 - 46.
- [3] 王蓉,唐玉,张丽,等. 大鼠海马神经元突触超微结构的增龄变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 4(1): 115 - 117.
- [4] 刘井波,彭双清. 脂质过氧化作用与线粒体损伤 [J]. 中国预防医学杂志, 2005, 6(2): 167 - 170.
- [5] Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease [J]. J Clin Invest, 2006, 116 (3): 561 - 570.
- [6] Oesterreich S, Davidson NE. The search for ESR1 mutations in breast cancer [J]. Nature Genetics, 2013, 45 (12): 1415 - 1416.
- [7] Fuente-Maritin E, Garcia-Caceres C, Morselli E, et al. Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine control of metabolism [J]. Rev Endocr Metab Disord. 2013, 14 (4): 331 - 338.

[修回日期]2015-02-02