

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)22-2061-03

## 植物雌激素对去势雌大鼠缺血脑组织 C-fos 表达的影响

么晓轶<sup>1</sup> 李颖<sup>1</sup> 么乃芬<sup>2</sup> ( <sup>1</sup> 哈尔滨医科大学第二临床医院老年病科, 黑龙江 哈尔滨 150086, <sup>2</sup> 哈尔滨医科大学第四临床医院心电图室 黑龙江 哈尔滨 150006 )

### Effects of phytoestrogen on C-fos protein expression in permanent focal cerebral ischemia tissue in ovariectomized female rats

YAO Xiao-Yi<sup>1</sup>, LI Ying<sup>1</sup>, YAO Nai-Fen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Geriatrics, Second Clinical Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China, <sup>2</sup>Department of ECG Examination, Fourth Clinical Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150006, China

**【Abstract】** AIM: To assess and compare the effects of estrogen and phytoestrogen on the expression of C-fos protein in permanent focal cerebral ischemia tissue in ovariectomized female rats. **METHODS:** Ninety ovariectomized female rats were divided into 3 groups: control group, estrogen group and phytoestrogen group, with 30 in each group. Then all rats were subjected to permanent MCA (middle cerebral artery) occlusion. Immunohistochemical method was used to detect the expression of C-fos protein in the 3 groups at different time points (8, 16, 24 h). **RESULTS:** The expression of C-fos protein in cerebral ischemia tissues decreased in both estrogen and phytoestrogen groups during the late phase of ischemic injury (16–24 h). At 8 h following cerebral ischemia, C-fos protein expression level in all 3 groups was not different statistically. While at 16 h and 24 h following cerebral ischemia, C-fos protein expression level was significantly higher in control group than in estrogen and phytoestrogen groups ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference between estrogen and phytoestrogen groups ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION:** Both estrogen and phytoestrogen attenuate the expression of C-fos protein in cerebral ischemia tissues.

**【Keywords】** brain ischemia; phytoestrogens; C-fos; apoptosis

**【摘要】** 目的: 对比研究哺乳动物雌激素和植物雌激素对大鼠局灶性脑缺血后脑组织 C-fos 表达的影响。方法: 将 90 只雌性去势 SD 大鼠随机分成空白对照组、雌激素组和葛根素组, 每组 30 只。所有大鼠均制作成右侧永久性大脑中动脉阻断模型。采用免疫组化方法检测去势雌性大鼠脑缺血后不同

时间点脑组织 C-fos 的表达。结果: 雌激素组和葛根素组大鼠脑缺血后脑组织 C-fos 的表达均下降, 发生作用的时间段在脑缺血后 16 h 至 24 h。在脑缺血后 8 h, 3 组表达 C-fos 的阳性细胞数无统计学差异。在 16 h 及 24 h 时间点, 用药组与对照组相比, C-fos 阳性细胞数明显减少 ( $P < 0.05$ ); 用药组之间相比无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 两种雌激素均能减弱脑缺血后脑组织 C-fos 的表达。

**【关键词】** 脑缺血 植物雌激素类 C-fos 细胞凋亡

**【中图分类号】** R743 **【文献标识码】** A

## 0 引言

研究表明, c-fos 基因表达与细胞凋亡关系密切, C-fos 表达的强弱与缺血状态下的组织细胞损伤的程度正相关。我们通过观察动物雌激素和植物雌激素对去势雌大鼠永久的局灶脑缺血后不同时间段的 C-fos 表达的影响, 进一步探讨植物雌激素对缺血脑组织的保护机制。我们应用葛根素作为植物雌激素的代表, 它的化学结构是 8-D 吡喃葡萄糖-4, 7-二羟基异黄酮苷, 属植物雌激素中异黄酮类。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 动物雌激素选用美国 Sigma 公司的 17-Beta 雌二醇, 葛根素由山东鲁银制药有限公司生产, C-fos 多克隆抗体及 C-fos 蛋白免疫组化试剂盒和 DAB 染色剂购自武汉博士德生物试剂公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型建立** 成年雌性 SD 大鼠 90 只 3~4 月龄, 体质量 230~260 g, 购自哈尔滨医科大学实验动物中心。所有动物制作脑缺血模型前 1 wk 均将双侧卵巢切除。各组动物在卵巢切除 1 wk 后, 用 100 g/L 的水合氯醛腹腔麻醉 (0.03 mL/kg)。然后用改良的 Loga<sup>[1]</sup> 法行永久性右侧大脑中动脉阻断模型。动物随机分成 3 组: 空白对照组, 雌激素组, 葛根素组, 每组 30 只。雌激素组腹腔注射 17-Beta 雌二醇 1 wk, 次/d (1 mg/kg), 葛根素组腹腔注射葛根素 1 wk, 次/d (500 mg/kg), 空白对照组不给予任何药物。

**1.2.2 标本采集** 3 组大鼠按大脑中动脉阻断的时间各分为 8 h 组, 16 h 组, 24 h 组。在相应时间点将

收稿日期 2007-07-11; 接受日期 2007-09-20

作者简介: 么晓轶, 硕士, 主治医师。Tel: (0451) 86605722 Email:

emmaxxin@sina.com

大鼠断头取脑,将脑组织切除脑干,其余脑组织冠状平均切成5等分,取中间的切片(约距额极4~7 mm)。然后用40 g/L的多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋,制成蜡块,切成厚约4 μm的薄片。

1.2.3 标本检测 ABC免疫组化法检测C-fos蛋白的表达。切片常规脱腊至水,灭活内源性酶,热抗原修复滴加1:100稀释的兔抗C-fos抗体,4℃过夜,滴加生物素化羊抗兔IgG,滴加试剂SABC,DAB显色,苏木素轻度复染。C-fos阳性细胞计数方法:在各样本相同部位,在缺血侧梗死灶边缘区选择5个不重叠的视野,计数每个视野下每100个细胞中阳性染色的细胞数。然后再除以5,所得的数据作为一个标本的C-fos表达的阳性细胞数。

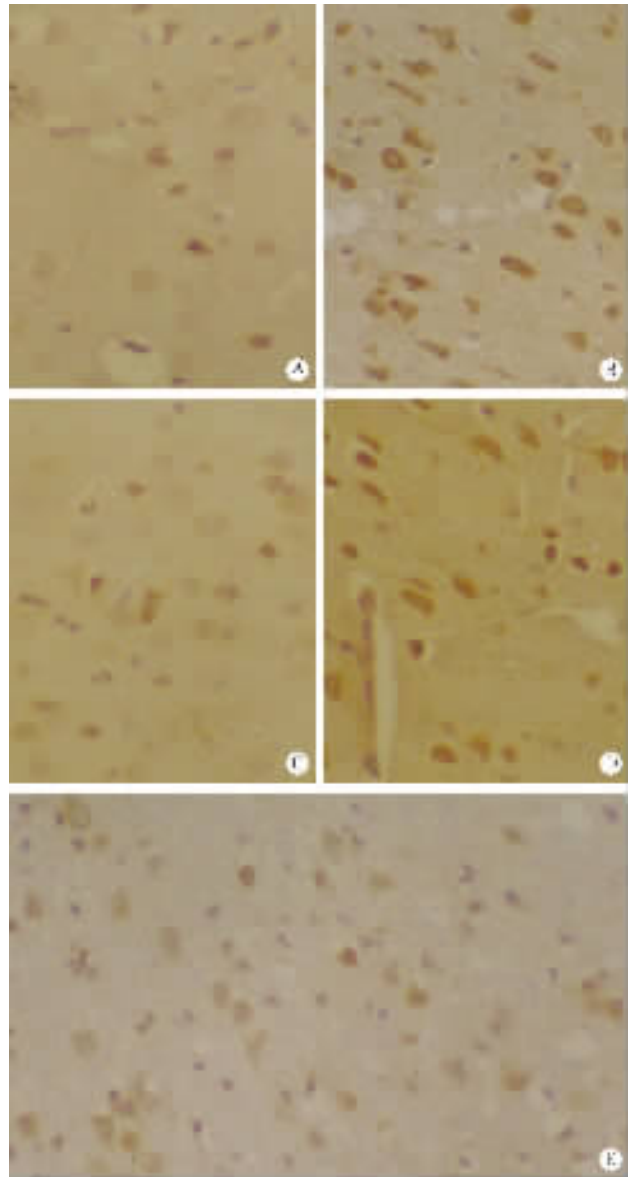
统计学处理:上述数据均经SPSS10.0统计软件处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多因素方差分析方法进行显著性检验。

## 2 结果

不同预处理组在永久的右侧的大脑中动脉阻断后8、16、24 h三个时间点缺血脑组织都有大量的C-fos的表达,阳性细胞广泛分布在缺血侧的新皮层、远离梗死灶的海马、扣带回及部分丘脑。梗死灶中心未见阳性表达,梗死灶周围的半暗带区有较强的表达,未见缺血侧纹状体区域有C-fos蛋白的表达。在脑缺血后8 h,对照组、雌激素组和葛根素组C-fos阳性细胞数分别是 $20.3 \pm 0.8$ 、 $19.4 \pm 0.6$ 和 $19.6 \pm 0.5$ ,对照组与用药组之间两两比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而对照组C-fos阳性细胞数在缺血后16 h达高峰( $40.9 \pm 1.3$ ),与8 h相比差异显著( $P < 0.05$ )。雌激素组和葛根素组在16 h时C-fos阳性细胞数与8 h时相比,差异无统计学意义。16 h,雌激素组和葛根素组相比,C-fos阳性细胞数分别是 $21.3 \pm 1.0$ 和 $21.4 \pm 0.6$ ,差异亦无统计学意义( $P > 0.05$ )。在24 h时间点,对照组C-fos阳性细胞数与16 h相比略有减少,为 $32.9 \pm 1.27$ ,而雌激素组和葛根素组C-fos的表达阳性细胞数分别是 $24.3 \pm 1.5$ 和 $23.5 \pm 1.0$ ,与16 h时间点相比稍有增多。在16 h及24 h时间点,两处理组与对照组相比,C-fos的表达明显减弱( $P < 0.05$ ),而雌激素组和葛根素组之间相比较差异无统计学意义。各处理组不同时间点C-fos蛋白的表达见图1。

## 3 讨论

脑缺血后形成脑梗死的过程中,细胞发生了两种方式的死亡:即梗死中心的急性细胞死亡和梗死周边



A:脑缺血后8 h;B:对照组脑缺血后16 h;C:雌激素组和葛根素组脑缺血后16 h;D:对照组脑缺血后24 h;E:雌激素组和葛根素组脑缺血后24 h。

图1 各组动物脑缺血后不同时间点梗死周围半暗带区C-fos蛋白的表达

半暗带区的细胞凋亡。后者的发生需要时间和能量的动态过程,它的发生较坏死缓慢,持续时间长。即刻早基因c-fos基因正是与这一过程相关的一种转录调节因子。

C-fos基因表达的机制是通过N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体介导的,并随谷氨酸释放的增多而上升<sup>[2]</sup>。另外细胞内钙离子的增加,也可诱导神经细胞c-fos的表达。而已有研究证实17-β雌二醇可通过NMDA受体,抑制谷氨酸的释放,并可减少神经细胞内兴奋性氨基酸的含量。另外它还可抑制钙超载。因此,推测雌激素可通过上述途径下调c-fos基因的

表达,抑制细胞的凋亡,本实验表明雌激素发生作用的主要部位是在非梗死区的扣带回皮层。

早在1991,就有学者报道大鼠(雌、雄)局灶性脑缺血后脑组织中 C-fos 表达均增加<sup>[3]</sup>。既往研究显示脑缺血后 C-fos 表达的峰值在缺血后 2~4 h,而在 24 h 后恢复到基线水平。更有学者证明在脑缺血后半小时 C-fos 表达达到高峰,而在缺血 2 h 再灌注 4 h 时,回归至基线水平<sup>[4]</sup>。另有学者应用永久的脑缺血模型证明 C-fos 表达的高峰在脑缺血后 4 h,而后在 24 h 返回基线水平<sup>[5-6]</sup>。本文研究表明 C-fos 的大量表达可持续至缺血后 24 h。我们分析,与以往研究结果不同的原因在于我们应用的不是雄性大鼠,而是卵巢切除后的去势雌性大鼠。这一点可能暗示性别及雌性荷尔蒙影响了缺血脑组织 c-fos 基因表达的时间及持续时间长短。雌激素对两性大鼠都具有神经保护作用<sup>[7-8]</sup>,但脑缺血后去势大鼠和雄性大鼠 C-fos 表达的方式明显不同,这一点提示雌激素对两性动物的脑保护机制可能有所不同。

本研究同时应用了哺乳动物雌激素(17-beta 雌二醇)和来自天然植物的雌激素(葛根素),对比观察了两种雌激素对单侧大脑中动脉阻断后去势雌大鼠缺血脑组织 C-fos 表达的影响,发现植物雌激素与 17-beta 雌二醇同样可减弱脑梗死周边半暗带区域的 C-fos 的表达数量,并且发生作用的方式也极为相似。雌激素替代治疗增加子宫内膜癌、乳腺癌及一些消化道肿瘤的发病率,这使雌激素替代治疗难以在临床上推广。近年来出现的植物雌激素具有与动物雌激素相似的化学结构,而且显示一定的雌激素活性,包括 1 对羟基和 1 个酚环,后者对它吸附于雌激素受体起着决定性的作用。这类雌激素具有抗增殖、抗肿瘤的特性,且来源广泛,应用安全,不受性别的限制。目前国外的研究人员证实植物雌激素可以减少由谷氨酸盐和 beta-淀粉样蛋白诱发的神经细胞损害,表现为自神经细胞释放乳酸脱氢酶的减少,它可以减少反应性氧自由基的积聚,保护细胞膜的完整性。这类激素还能抑制 caspase(天冬氨酸半胱氨酸特异性蛋白酶,是一类在细胞凋亡中起关键作用的蛋白酶家

族)的激活,延缓神经细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。这些研究表明植物雌激素在缺血性脑血管病的防治方面有广阔的应用前景。

## 【参考文献】

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] Adkins DL, Voorhies AC, Jones TA. Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions [J]. *Neuroscience* 2004, 128(3): 473-486.
- [3] Uemura Y, Kowal NW, Moskowitz MA. Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex [J]. *Brain Res*, 1991, 552(1): 99-105.
- [4] Dietrich WD, Truettner J, Prado R. Thromboembolic events lead to cortical spreading depression and expression of c-fos, brain-derived neurotrophic factor, glial fibrillary acidic protein, and heat shock protein 70 mRNA in rats [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(1): 103-111.
- [5] Johansson IM, Wester P, Hakova M. Early and delayed induction of immediate early gene expression in a novel focal cerebral ischemia model in the rat [J]. *Eur J Neurosci* 2000, 12(10): 3615-3625.
- [6] Kinoshita Y, Ueyama T, Senba E. Expression of c-fos, heat shock protein 70, neurotrophins, and cyclooxygenase-2 mRNA in response to focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate [J]. *J Neurotrauma* 2001, 18(4): 435-445.
- [7] Diwakar L, Kenchappa RS, Annepu J, et al. Down-regulation of glutaredoxin by estrogen receptor antagonist renders female mice susceptible to excitatory amino acid mediated complex I inhibition in CNS [J]. *Brain Res* 2006, 1125(1): 176-184.
- [8] Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Finkelstein DI. Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication. *Brain Res*, 2006, 1084(1): 28-37.
- [9] Wang CN, Chi CW, Lin YL, et al. The neuroprotective effects of phytoestrogens on amyloid beta protein-induced toxicity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons [J]. *J Biol Chem* 2001, 276(7): 5287-5295.
- [10] Azcoitia I, Moreno A, Carrero P, et al. Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain. [J] *Gynecol Endocrinol*, 2006, 22(2): 63-69.

编辑 王雪萍