

第二章 大鼠去卵巢增加腦部脂質過氧化及 對抗氧化系統的影響

前言

隨著人類平均壽命的增加,阿茲海默症(Alzheimer's disease)的患者越來越多。據統計女性患有阿茲海默症的比例比男性多,65歲之後女性患有阿茲海默症的發生率為男性的2~3倍(Jorm et al.,1987; Gibbs and Aggarwal 1998),更年期婦女缺乏雌激素被認為是重要因素之一(Birge, 1998)。許多研究報告指出停經後婦女使用雌性素補充療法可延遲阿茲海默癡呆症的發生(Fillit et al., 1986; Henderson et al.,1994; Ohkura et al.,1994; Tang et al., 1996; Henderson, 1997)

已知雌激素是具有細胞膜穩定作用的抗氧化劑(Moosmann and Behl,1999; Wiseman, 1995)。臨床上發現兩側卵巢去除的婦女,其血中脂質過氧化程度上升(Yagi,1997)。鼠類兩側卵巢切除後,血清、肝臟、心臟的脂質過氧化明顯上升,此上升作用可因給予雌性素而降低(Yagi, 1997; Persky et al., 2000)。

最近,氧化應力(oxidative stress)假說在阿茲海默症病理機轉受到重視(Behl, 1999; Markesbery and Carney, 1999; Markesbery, 1997)。雖然如此,缺乏雌激素引起腦部氧化應力傷害的相關資料卻很少。本章實驗的目的在於探討大鼠兩側卵巢切除後對腦部氧化應力的影響,比較去卵巢後4週和24週脂質過氧化的程度,其為自由基傷害的指標之一,及對腦組織抗氧化酶

素活性的影響。

材料與方法

一、動物

使用雌性 Sprague-Dawley 大鼠，購自國科會動物中心。飼養室控制溫度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 $55 \pm 5\%$ ，明暗各 12 小時的環境。餵食福壽牌飼料，自動飲水系統供水。

實驗分成兩批，第一批在去卵巢 4 週後將大鼠犧牲，第二批在去卵巢 24 週後將大鼠犧牲。每批分成 3 組，即偽手術組一組和手術組兩組，手術組分別每天皮下注射生理食鹽水(0.1 ml / 100 g body weight) 或 17- β -estradiol (E2; 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。大鼠去卵巢是在 pentobarbital (30 mg/kg, i.p.) 麻醉下，由背部切除兩側卵巢，對照組大鼠進行偽手術。在最後動物犧牲時檢視去卵巢手術是否成功，手術失敗的動物檢體不使用。大鼠每週稱體重一次，並做為給藥劑量的依據。

實驗終了在乙醚麻醉下將大鼠犧牲，取下主要臟器以冰冷生理食鹽水洗淨，以濾紙吸乾水分後稱重， -80°C 下儲存備用。腦部依據 Glowinski and Iversen (1966) 的方法，在冰上取出大腦皮質、海馬、紋狀體等，即刻冰凍備用。

二、脂質過氧化的測定

以 tris-HCl (pH 7.4) 製備 2-10 % (w/v) 組織均漿。依據 Ohkawa et al. (1979) 的方法測定脂質過氧化的量，即取 0.3 ml 均漿順序加入 0.2 ml sodium dodecyl sulfate (8.1 %)、1.5 ml 2-thiobarbituric acid (0.8 %)，再的去離子水調整容積為 4 ml，99 °C 熱水中加熱一小時。取出，以自來水冷卻，加入 1 ml 去離子水、5 ml n-butanol / pyridine 混合液 (15 : 1, v/v)，混均後，在 25 °C，4000 rpm 下離心 10 分鐘，取有機層以分光光度計 (Hitachi U-2001; Japan) 測定 532 nm 的吸光值，組隻的脂質過氧化量以 nmol malondialdehyde (MDA) / mg protein 表示。均漿蛋白質依照 Lowry et al. (1951) 的方法測定，以牛血漿蛋白為標準品。

三、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase; SOD) 活性測定

參照 Marklund and Marklund (1975) 的方法，取組織 0.5g，加入 5ml 緩衝液 (0.32 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4)，以均質機均質化，離心 30 分鐘 (13600 xg, 4°C)。取上清液稀釋，稀釋液取 50 μ l，再加上 100 μ l tris buffer (pH 8.2, 50mM)，二次去離子水 830 μ l，最後加入 20 μ l pyrogallol (10 mM)，混合均勻後，於 420 nm 測量吸光值。每隔 40 秒測量一次，共測量 5 分鐘，計算每分鐘吸光值變化速率。SOD 活性以單位時間內抑制 pyrogallol 自動氧化速率達 50% 時的量，為一單位 (U)。組織內 SOD 活性以 U/mg protein 表示。

四、過氧化氫□(Catalase)活性之測定

實驗參照 Aebi (1984)所描述之方法進行。取組織 0.5g 加入 5 ml 緩衝液，以均質機均質化，高速離心 30 分鐘 (13600 xg, 4⁰ C)，取上清液 0.9 ml 加入 0.1 ml triton X-100 (10%)，混合均勻。取混合液以磷酸鹽緩衝液 (50 mM, pH 7.0) 稀釋，將 4 ml 稀釋液加入 2 ml H₂O₂ (30 mM)，混合均勻後，在溫控 25⁰、波長 240 nm 條件下測吸光值，每隔 5 秒測量一次，時間總共 1 分鐘。計算求得反應速率常數 K (1 / min)。組織 catalase 活性以 K / mg protein 表示。

$$K = (2.3 / t) \log A_1 / A_2$$

t :時間間隔 (分鐘)。

A₁ : T₁ 時間，檢品之吸光值。

A₂ : T₂ 時間，檢品之吸光值。

五、谷胱甘太過氧化□(Glutathione peroxidase;GSH-Px)活性之測定

實驗參照 Hafeman et al. (1974) 所描述之方法進行，取組織 0.5 g 加 5 ml 緩衝液，以均質機均質化，高速離心 30 分鐘樓 (13600 xg、4⁰ C)。取上清液稀釋。稀釋液取 0.4ml 加入 0.4 ml GSH (1 mM)，置於 37⁰ 水浴加熱 3 分鐘。之後再加入 H₂O₂ 0.2 ml，置於 37⁰ 水浴加熱 5 分鐘。然後迅速置於冰中冷卻。冷卻後加入 4 ml 偏磷酸鈉溶液 (偏磷酸鈉 0.635% ，NaCl 30% ，EDTA 0.2%)，混合後離心 10 分鐘，3000 rpm。取上清液 2 ml，加入 2 ml Na₂HPO₄

溶液(0.4M)與 1 ml 5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(0.04% , sodium citrate 1%)溶液, 混合均勻後於 412 nm 測量吸光值,。另外測量非酵素所造成 GSH 的氧化, 其步驟與測量酵素反應步驟相同, 兩者差別只是將組織稀釋液以蒸餾水取代。GSH-Px 以 Hafeman 單位(U)表示, Hafeman 單位定義為單位時間內檢品消耗之 GSH 濃度對數值 ($\log[\text{GSH}]_E$), 減去非酵素反應消耗之 GSH 濃度對數值($\log[\text{GSH}]_{NE}$), 所得值之千分之一為 GSH-Px 活性單位(U):

$$U = (\log[\text{GSH}]_E - \log[\text{GSH}]_{NE}) / 1000 \times t$$

組織內 GSH-Px 活性以 U / mg protein 表示。

六、試藥

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、sucrose、sodium citrate、 FeCl_2 等購自 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.。reduce glutathione、2-thiobarbituric acid、KCl、pyridine、NaCl、Trichloroacetic acid (TCA)、sodium dodecyl sulfate (SDS)、 NaN_3 、Tris-base、triron X-100、pyrogallol、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、Vit.C 等購自 sigma chemical CO.P.O.。n-butanol 購自聯工化學廠。5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 購自 Fluka chemie:AG CH-9470 Buchs。methanol 購自 BDH Laboratory supplies Poole, BH 15 1TD, England。metaphosphoric acid (NaPO_3)_n 購自 Hayashi pure chemical Industries Ltd. Japan。 H_2O_2 購自 Ferak laborat gmbh berlin (west), acetic acid 購自 Shimakyu's pure

chemicals。

七、統計方法

以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)方法分析，並進行 Dunnet 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

結 果

一、體重和臟器重量

如表 2-1 所示，在兩批實驗，大鼠去卵巢後 4 週體重明顯較偽手術組

重，E2 的處理可以抑制去卵巢大鼠體重的上升。在第二批實驗，大鼠去卵巢後 12 和 24 週體重仍明顯較偽手術組重，E2 的處理可以抑制去卵巢大鼠體重的上升。

如表 2-2 所示，大鼠去卵巢後 4 週後子宮和心臟相對重量明顯低於偽手術組。去卵巢後 24 週子宮、肝臟和心臟相對重量明顯低於偽手術組。E2 的處理可以防止子宮、肝臟和心臟重量的減輕。

Table 2-1 Effects of ovariectomy (OVX), 17 β -estradiol (E2) on body weight in rats

Treatment	Before OVX	Week 4	Week 12	Week 24
Experiment I				
Sham	223.6 \pm 4.7	268.3 \pm 5.7		
OVX	244.0 \pm 5.0	329.7 \pm 7.0**		
OVX + E2	228.7 \pm 5.6	264.3 \pm 5.6		
Experiment II				
Sham	263.2 \pm 5.3	307.2 \pm 6.7	359.1 \pm 10.5	412.7 \pm 13.1
OVX	263.9 \pm 7.8	360.0 \pm 9.0**	426.3 \pm 11.12**	484.6 \pm 15.7**
OVX + E2	273.9 \pm 9.4	319.6 \pm 12.0	367.6 \pm 16.6	427.9 \pm 24.2

All values are mean \pm S.E.(n=10). **P<0.01 compared with shamed operated group.

Table 2-2 Effects of ovariectomy (OVX), 17 β -estradiol (E2) on relative organ weights.

Measure	Sham	OVX	OVX + E2
---------	------	-----	----------

Experiment I (4 weeks)

Uterus(g / 100 g body weight)	0.21 ± 0.03	0.03 ± 0.00 ^{###}	0.16± 0.01 ^{***}
Liver (g / 100 g body weight)	2.48 ± 0.05	2.33 ± 0.05	2.77± 0.07 ^{***}
Heart (g / 100 g bodyweight)	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.00 ^{##}	0.28± 0.01 ^{***}

Experiment II (24 weeks)

Uterus(g / 100 g body weight)	0.23 ± 0.02	0.02 ± 0.00 ^{###}	0.14± 0.01 ^{***}
Liver (g / 100 g body weight)	2.21 ± 0.06	1.82 ± 0.04 ^{###}	2.27± 0.05 ^{***}
Heart (g / 100 g bodyweight)	0.32 ± 0.00	0.29 ± 0.01 [#]	0.33± 0.01 ^{***}

All values are means ± S.E. (n=10). ^{##}P<0.01, ^{###}P<0.001 compared with shame operated group. ^{***}P<0.001 compared with OVX group.

二、肝臟、子宮和心臟脂質過氧化

如圖 2-1 所示，大鼠去卵巢 4 週後，肝臟、子宮的脂質過氧化程度較偽手術組高，但心臟則無差異。E2 的處理明顯減少子宮的脂質過氧化程度，但對肝臟和心臟的脂質過氧化沒有影響。大鼠去卵巢 24 週後，肝臟、子宮的脂質過氧化程度也較偽手術組高，但心臟則無差異，E2 的處理明顯減少子宮的脂質過氧化程度，但對肝臟和心臟的脂質過氧化沒有影響。

大鼠去卵巢 24 週後，子宮的脂質過氧化程度顯著高於去卵巢 4 週後，但在肝臟和心臟則無。

三、肝臟 SOD、catalase 和 GSH-Px 的活性

如圖 2-2 所示，大鼠去卵巢 4 週後，肝臟 SOD 活性與偽手術組比較明顯下降，但 catalase 與 GSH-Px 的活性沒有改變。E2 的處理可以提升 SOD 的

活性，對 catalase 與 GSH-Px 的活性沒有影響。

大鼠去卵巢 24 週後，肝臟 SOD 活性與偽手術組比較有下降情形，但 catalase 與 GSH-Px 的活性沒有改變。E2 的處理可以提升 SOD 的活性，對 catalase 與 GSH-Px 的活性沒有影響。

在肝臟，大鼠去卵巢 24 週後，僅 SOD 活性較去卵巢 4 週後高，但在偽手術組之間則無差異。

四、腦部脂質過氧化

如圖 2-3 所示，大鼠去卵巢 4 週後，大腦皮質，紋狀體和海馬迴的脂質過氧化程度較偽手術組高。E2 的處理僅降低大腦皮質的脂質過氧化值，對紋狀體和海馬迴沒有影響。

大鼠去卵巢 24 週後，大腦皮質，紋狀體和海馬迴的脂質過氧化程度較偽手術組高。E2 的處理可以降低此三部位的脂質過氧化值。

大鼠去卵巢 24 週後，大腦皮質，紋狀體和海馬迴的脂質過氧化值並沒有較去卵巢 4 週後的值高。偽手術組亦同。但 E2 的處理，對紋狀體的脂質過氧化值較大鼠去卵巢 4 週後的值低。

五、腦部 SOD、catalase 和 GSH-Px 的活性

如圖 2-4 所示，大鼠去卵巢 4 週後，大腦皮質 SOD、catalase 和 GSH-Px 的活性與偽手術組比較沒有差異。E2 的處理，對此三種抗氧化酵素的活性

沒有影響。大鼠去卵巢 24 週後，大腦皮質 catalase 的活性較偽手術組低，但 SOD、GSH-Px 的活性沒有差異。E2 的處理可以提升此三種抗氧化酵素的活性。大鼠去卵巢 24 週後 catalase、GSH-Px 的活性較去卵巢後 4 週的活性低，偽手術組之間三個酵素活性沒有差異。

如圖 2-5 所示，大鼠去卵巢 4 週後，紋狀體 GSH-Px 的活性較偽手術組低，SOD、catalase 的活性沒有差異，E2 的處理可以提升 GSH-Px 的活性，對 SOD、catalase 的活性沒有影響。大鼠去卵巢 24 週後，紋狀體 GSH-Px 的活性與偽手術組沒有差異，但 SOD、catalase 的活性較偽手術組低。E2 的處理可以提升 catalase 的活性，對 SOD、GSH-Px 的活性沒有影響。與去卵巢後 4 週比較，大鼠去卵巢後 24 週紋狀體 catalase 活性下降，GSH-Px 活性上升。偽手術組之間沒有差異。

如圖 2-6 所示，大鼠去卵巢 4 週後，海馬迴 SOD 活性較偽手術組高，catalase、GSH-Px 的活性沒有差異，E2 的處理對此三種抗氧化酵素的活性沒有影響。大鼠去卵巢 24 週後，海馬迴 SOD、catalase、GSH-Px 的活性較偽手術組低，E2 的處理可以提升 SOD、catalase、GSH-Px 的活性。與去卵巢後 4 週比較，大鼠去卵巢後 24 週海馬迴 SOD、GSH-Px 的活性下降，偽手術組之間沒有差異。

討 論

由於雌激素的酚 A 環有氫氧基結構類似維他命 E，因此能抑制自由基產生的脂質過氧化反應(Green et al., 1997)。另外，雌性素具油溶性能直接保護細胞膜磷脂質的脂質過氧化作用(Sugioka et al., 1987)。因此雌激素被認為具有抗氧化作用(Moosmann and Behl, 1999 ; Wiseman, 1995)，反之，當體內雌激素降低時應會增加自由基的傷害。

大鼠去卵巢後肝臟及心臟的自由基傷害已有文獻(Yagi, 1997; Persky et al., 2000)。本研究的重心雖然在腦部，但由於動物的不同，或去卵巢的時間長短不一，因此對肝臟、心臟及子宮的氧化傷害也加以探討。

在本實驗大鼠去卵巢 4 週後或 24 週後，體重增加，肝臟、心臟及子宮的重量明顯下降，E2 的處理可以防止體重上升，及增加肝臟、心臟及子宮的重量。這些結果支持這三個器官受到卵巢來的雌激素作用，也有文獻指出這些臟器存在雌激素接受體 (Mohamed and Abdel-Rahman, 2000)。

大鼠去卵巢後肝臟脂質過氧化明顯高於偽手術組，類似的實驗也指出大鼠去卵巢後肝臟的脂質過氧化增加(Sreelathakumari et al., 1993, Yagi, 1997)。E2 的處理沒有降低脂質過氧化的作用，卵巢來的激素除雌激素外，尚有其它如 progesterone，其對肝臟的抗氧化系統也有影響 (Kasapovic et al., 1997)，由此推測去卵巢導致肝臟脂質過氧化有雌激素以外的因素參與。大鼠去卵巢後肝臟 SOD 活性明顯下降，但 catalase、GSH-Px 的活性不

受影響，E2 的處理可以保存 SOD 的活性，Kasapovic et al. (1997)和 Sreelathakumari et al. (1993) 的實驗也有相同的結果。去卵巢大鼠 4 週後，肝臟 SOD 活性的下降，會因缺雌激素時間的延長而部分回升，顯示肝臟在抗氧化平衡上有一定的能力。

雖有文獻指出大鼠去卵巢後心臟脂質過氧化有增加的情形(Persky, 1999)，本實驗及其他實驗(Sreelathakumari et al., 1993)都發現去卵巢對心臟的脂質過氧化沒有影響，其差異或許與實驗條件不同有關。

去卵巢後子宮脂質過氧化明顯高於偽手術組，E2 的處理可以降低脂質過氧化程度。去卵巢後子宮重量的變化較其他臟器顯著，且去卵巢後 24 週僅子宮的氧化傷害程度顯著高於去卵巢後 4 週。與心臟、肝臟比較，雌激素對子宮有較好抗氧化保護作用。

已知婦人停經後缺乏雌性素會影響到腦部功能 (Birge, 1998)，雖然 Kume-Kick et al. (1996)指出去卵巢大鼠會降低腦部維生素丙的含量而增加氧化應力，但缺乏雌性素與腦部氧化應力相關的研究卻很少。本章實驗主要探討大鼠去卵巢 4 週與 24 週後腦部氧化應力的變化，以大腦皮質、海馬迴、紋狀體三部位為主，因此三部位是腦部神經退化性疾病相關的部位，也容易受到自由基的攻擊(Bromonet et al., 1989)，雌激素對此三部位也有影響 (Toran-Allerand et al., 1999; Wang et al., 1999)。

在本實驗大鼠去卵巢 4 週或 24 週，大腦皮質、海馬迴、紋狀體的脂質

過氧化明顯較偽手術組高，經 E2 處理 24 週後可以有效防止此三部位脂質過氧化的上升，此顯示大腦皮質、海馬迴、紋狀體的脂質過氧化增加與雌激素缺乏有關。然而經 E2 處理 4 週後，僅能有效抑制大腦皮質脂質過氧化的上升，對海馬迴及紋狀體沒有改善作用，大腦皮質脂質過氧化的增加（1.7 倍）較海馬迴（1.2 倍）、紋狀體（1.1 倍）明顯，此或許可解釋 E2 的作用在大腦皮質較顯著，在海馬迴和紋狀體的作用則需更長時間的投予。

抗氧化酵素系統是組織對抗含氧自由基傷害的主要方法之一，其中 SOD 是最主要的，其可以很快的將 $\bullet\text{O}_2^-$ 轉成 H_2O_2 ，SOD 的功效還要其他酵素如 catalase 和 GSH-Px 的配合，catalase 和 GSH-Px 可以很快的將 SOD 的產物 H_2O_2 轉成 H_2O 和 O_2 ，但是在腦部 catalase 的活性很低，因此清除 H_2O_2 主要靠 GSH-Px (Reiter, 1995)。在本實驗也同樣的發現 catalase 的活性相當低。

大鼠去卵巢後 4 週，大腦皮質、紋狀體和海馬迴的三個抗氧化酵素活性與偽手術組比較變化很小，僅紋狀體的 GSH-Px 活性較偽手術組低，海馬迴的 SOD 較偽手術組高。E2 的處理可以防止紋狀體 GSH-Px 活性降低，缺乏雌激素時間延長（即去卵巢後 24 週），紋狀體 GSH-Px 活性可以回升，顯示紋狀體也有一定的抗氧化平衡能力。E2 的處理對海馬迴的 SOD 活性卻沒有影響，顯示海馬迴的 SOD 活性上升與缺雌激素無關，事實上在大鼠去卵巢後 24 週，海馬迴的 SOD 活性是下降的。

大鼠去卵巢後 24 週，大腦皮質的 catalase 活性，紋狀體的 SOD 和 catalase 活性，及海馬迴的 SOD、catalase 和 GSH-Px 活性較偽手術組低，這些活性的降低可因 E2 的處理而消失。這些結果顯示腦部缺雌激素的時間長的話，受到影響的抗氧化酵素活性也較廣，其中以 catalase 的活性最易受到影響。

年齡對腦部抗氧化酵素活性的影響有很多研究，不同的實驗有不同的結果，很難一致 (Benzi and Moretti, 1995)。在本章兩批實驗的偽手術組年齡差 5 個月，大腦皮質、紋狀體及海馬迴的三個抗氧化酵素活性沒有顯著差異。大鼠去卵巢後的時間增加 5 個月，卻可發現大腦皮質的 catalase、GSH-Px，紋狀體的 catalase，海馬迴的 SOD、GSH-PX 的活性降低。這些差異在 E2 處理組消失，足見長期雌激素缺乏會使抗氧化酵素活性下降。雌激素具有抗氧化作用，缺雌激素合理的推論應使抗氧化酵素活性增強，然而實際上卻下降。此或許因雌激素長期缺乏，導致機體功能下降，酵素的合成能力減退。

本章實驗證實缺乏雌激素會誘發腦部自由基傷害的增加，腦部抗氧化酵素的活性變化也隨著雌激素缺乏時間的增長而明顯。