

去卵巢对骨质疏松大鼠皮肤衰老的影响

祁珊珊

(陕西理工大学维生素D生理与应用研究所,陕西汉中 723000)

【摘要】 目的 用去卵巢大鼠构建的骨质疏松症模型是研究绝经后骨质疏松疾病的最适模型,然而大鼠卵巢去除后对皮肤的影响如何,这方面的研究甚少。本研究旨在观察去卵巢对大鼠皮肤衰老指标的影响。**方法** 3月龄健康SD雌性大鼠20只,随机分为假手术组(Sham组)和去卵巢组(OVX组),卵巢去除后3个月,测定血清雌二醇,以及皮肤组织中与衰老相关的生化指标如过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性以及丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)、脂褐质(LF)含量,并观察皮肤组织病理学变化,用计算机图像分析系统定量分析。**结果** OVX组大鼠血清雌二醇水平显著降低;组织病理学观察显示OVX组表皮、真皮厚度较Sham组显著变薄($P < 0.01$),皮肤胶原纤维减少,排列疏松;与Sham组相比,OVX组大鼠皮肤CAT、GSH-Px和SOD活性显著降低($P < 0.01$),MDA含量较Sham组明显增加($P < 0.01$),皮肤组织中HYP含量明显减少,LF含量显著增多($P < 0.01$)。**结论** 3月龄大鼠卵巢去除后3个月可导致皮肤衰老,可能是研究绝经后皮肤衰老的适宜模型。

【关键词】 大鼠;去卵巢;骨质疏松;皮肤;衰老

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2017)03-0325-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.017

Effect of ovariectomy on the skin aging in rats with osteoporosis

QI Shan-shan

(Vitamin D Research Institute, Shaanxi Sci-tech University, Hanzhong Shaanxi 723000, China)

【Abstract】 Objective Ovariectomized rats are the most suitable model for the study of postmenopausal osteoporosis. However, the effect of ovariectomy on rat skin is little studied. The aim of this study was to observe the effect of ovariectomy on the skin aging indexes in rats. **Methods** 20 healthy 3-month-old female SD rats were randomly divided into sham group and ovariectomized (OVX) group. Serum estradiol was detected at 3 months after ovariectomy, the skin aging-related biochemical indexes such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) activity and the content of malondialdehyde (MDA), hydroxyproline (HYP) and lipofuscin (LF) were also detected. The structure of skin tissue was observed and detected using a pathological image analysis system. **Results** The serum E_2 of OVX rats was significantly lower than that in the sham group, the thickness of epidermis and dermis of OVX group was significantly thinner than that of the sham group ($P < 0.01$), the amount of collagen fibers was decreased and their arrangement was very loose. Compared with the sham group, the activity of CAT, GSH-Px and SOD in the OVX group was significantly decreased ($P < 0.01$), and the content of MDA was significantly increased ($P < 0.01$). The content of HYP in skin tissue was significantly decreased, and LF content was significantly increased ($P < 0.01$) in the OVX group. **Conclusions** Skin aging can be induced at 3 months after ovariectomy in 3-month old rats, which may be a good model for the study of skin aging in postmenopausal women.

【Key words】 Rats; Ovariectomy; Osteoporosis; Skin; Aging

Corresponding author: QI Shan-shan. E-mail: qishanshan101@126.com

【基金项目】陕西省科技创新团队项目(2012KCT-29);陕西省科协青年人才托举项目(20160128);秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心培育项目(QBXT-Z(P)-15-18);陕西理工大学博士后项目(SLGBH16-03)。

【通讯作者】祁珊珊(1984-),女,讲师,博士,主要从事维生素D生理与应用研究。E-mail: qishanshan101@126.com

用去卵巢大鼠构建的骨质疏松症模型是研究绝经后骨质疏松疾病的最适模型^[1],我们先前的研究表明,3 月龄 SD 大鼠卵巢去除后 3 个月不仅呈现明显的骨质疏松症状,而且还伴有生殖系统(子宫、阴道)结构和功能的损伤^[2,3],然而大鼠卵巢去除后对皮肤的影响如何,这方面的研究甚少。大鼠卵巢去除后会导致体内雌激素的骤降,很多研究表明,雌激素参与了许多生理和病理过程(如骨的生成以及其他内分泌疾病)^[4],人类皮肤老化与体内性激素水平降低有关^[5]。但是目前的研究均集中于 D-半乳糖诱导的皮肤衰老模型,该模型对于研究更年期和绝经后人群的皮肤衰老并不适合^[6],因此,本实验在前期绝经后骨质疏松大鼠模型的基础上,研究了大鼠卵巢切除对皮肤形态和功能的影响,旨在为抗绝经后皮肤衰老药物的开发提供可靠的实验模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 12 周龄未孕 SD 大鼠 20 只,体重(245 ± 33) g,由第四军医大学实验动物中心提供【SCXK(军)2012-0007】。实验操作在陕西理工大学维生素 D 生理与应用研究所动物房进行【SYXK(陕)2015-006】。分笼饲养,自由饮水,动物房温度 22~26℃,适应性饲养一周后进行试验。实验过程中所有的操作均符合动物福利的要求。

1.2 试剂与仪器

大鼠雌二醇(E₂)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)、脂褐质(LF)测定试剂盒均购自南京建成生物工程公司。仪器主要有酶标仪(Biotek),石蜡组织切片机(Leica RM2235),计算机图像分析系统(Image-Pro Plus 6.0)。

1.3 卵巢去除手术

将 20 只 SD 大鼠分为假手术组(sham 组)和去卵巢组(OVX 组),其中 sham 组 10 只,OVX 组 10 只。OVX 组大鼠参考我们先前报道的方法实施卵巢去除手术^[7]。Sham 组大鼠实施假手术,术后一周对 OVX 组大鼠进行阴道涂片,连续 5 d,去卵巢组不出现动情周期,表明卵巢去除成功。

1.4 血液和皮肤组织样本采集

去除卵巢后 3 个月,所有大鼠 CO₂ 麻醉后眼眶静脉采血,离心收集血清检测血清雌二醇(E₂)含量。取背部正中皮肤约 1.0 cm × 1.0 cm 大小,放

入 3.7% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规石蜡包埋,进行皮肤组织切片,H&E 染色和组织形态计量学观察及定量分析(应用 Image-Pro Plus 显微测量系统,进行皮肤组织形态计量学相关静态参数的测定,共测量 3 个参数,即表皮、真皮厚度和胶原纤维面积/μm²)。另取背部皮肤 1.5 cm × 1.5 cm 大小皮肤组织用于生化指标测定。

1.5 血清 E₂ 检测

按照大鼠血清雌二醇(E₂)ELISA 检测试剂盒说明书进行检测。

1.6 皮肤生化指标的测定

采血结束后,颈椎脱臼处死大鼠,取 1.5 cm × 1.5 cm 背部脱毛皮肤,PBS 中漂洗,滤纸拭干,剪碎,加入冷的生理盐水和少量蛋白裂解液,用组织匀浆机进行匀浆,将制备好的 10% 匀浆置于冷冻离心机 3000 r/min 离心 15 min,取适量离心好的匀浆上清液,按试剂盒说明测定并计算皮肤组织中过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活性以及丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)、脂褐质(LF)含量。

1.7 统计学处理

利用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素组间方差分析和比较,结果以“平均值 ± 标准差”表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

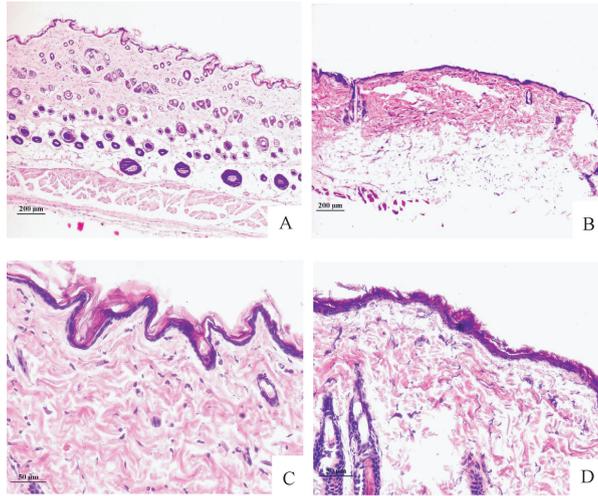
2 结果

2.1 血清 E₂ 检测结果

大鼠血清 E₂ 检测结果表明,大鼠卵巢去除前两组大鼠血清 E₂ 差异无显著性($P > 0.05$),分别是(21.53 ± 3.12) ng/L 和(20.46 ± 2.98) ng/L;卵巢去除后 3 个月,OVX 组大鼠血清 E₂ 较 Sham 组显著降低($P < 0.01$),Sham 组和 OVX 组血清 E₂ 分别是(20.68 ± 3.48) ng/L 和(5.73 ± 0.54) ng/L。

2.2 皮肤组织病理学形态观察及定量分析

组织学观察显示,Sham 组大鼠背部皮肤表皮层次清晰,结构完整,表皮突可见,胶原纤维排列紧密;OVX 组表皮及真皮萎缩,表皮突消失,细胞层数减少,真皮变薄,胶原纤维断裂,分布不均匀,局部区域胶原纤维缺失,基底膜分界不清,皮下结构疏松(如图 1 所示)。显微形态计量学分析结果显示,两组大鼠皮肤表皮厚度、真皮厚度及胶原纤维面积均差异显著(如表 1 所示)。



注: A. Sham 组背部皮肤 (HE ×40); B. OVX 组背部皮肤 (HE ×40); C. Sham 组背部皮肤 (HE ×200); D. OVX 组背部皮肤 (HE ×200)。

图 1 各实验组大鼠皮肤组织结构

Note. A. Back skin in the sham group, HE staining, ×40; B. Back skin in the OVX group, HE staining, ×40; C. Back skin in the sham group, HE staining, ×200; D. Back skin in the OVX group, HE staining, ×200.

Fig. 1 Histological structure of the rat skin in each group

表 1 各组大鼠皮肤表皮、真皮厚度及弹力纤维面积形态计量学分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Morphometric analysis of the epidermis, dermis thickness and the area of elastic fibers in each group of rats

组别 Groups	表皮厚度/ μm Epidermis thickness	真皮厚度/ μm Dermis thickness	胶原纤维面积/ μm^2 Area of elastic fibers
Sham	29.43 ± 3.78 **	561.35 ± 24.34 **	798.71 ± 35.20 **
OVX	21.51 ± 2.39	400.56 ± 17.86	563.42 ± 29.14

注: 与 OVX 组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the OVX group.

2.3 皮肤组织 CAT、GSH-Px、SOD 活性及 MDA、HYP、LF 含量

如表 2 所示, 大鼠去除卵巢后 3 个月, 与 Sham 组相比, OVX 组大鼠皮肤组织过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和超氧化物歧化酶

(SOD) 活性显著降低 ($P < 0.01$); 丙二醛 (MDA) 含量较 Sham 组明显增加 ($P < 0.01$); 与 Sham 组比较, OVX 大鼠皮肤组织中羟脯氨酸 (HYP) 含量明显减少 ($P < 0.01$), 脂褐质 (LF) 含量明显增多 ($P < 0.01$)。

表 2 皮肤组织 CAT、GSH-Px、SOD 活性及 MDA、HYP、LF 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 The activity of CAT, GSH-Px, SOD, and the content of MDA, HYP and LF in the rat skin

组别 Groups	CAT U/mL	GSH-Px U/mL	SOD U/mL	MDA nmol/mL	HYP $\mu\text{g}/\text{mg}$	LF $\mu\text{g}/\text{g}$
Sham	50.01 ± 5.29	31.43 ± 4.08	89.85 ± 7.90	8.12 ± 1.15	45.67 ± 5.36	4.56 ± 0.56
OVX	33.67 ± 4.21	23.33 ± 2.79	62.45 ± 5.78	15.78 ± 2.17	22.56 ± 3.12	7.43 ± 1.21

3 讨论

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量减少和骨组织微观结构退化为特征, 骨的脆性增加, 易发生骨折的全身性骨骼疾病。在骨质疏松症研究中, 去卵巢大鼠是美国食品与药物管理局 (FDA) 和世界卫生组织 (WHO) 推荐的绝经后骨质疏松症的适合模型^[1]。

我们先前的研究通过骨组织形态计量学、血钙、血清 ALP 等证实 3 月龄大鼠去卵巢后 3 个月呈现明显的骨质疏松症状, 且伴随生殖系统 (子宫、阴道) 的萎缩^[3]。表皮、真皮厚度以及胶原纤维的排列和数量均是皮肤衰老的形态学指征^[8,9]。本实验研究发现, 去卵巢骨质疏松大鼠随着体内雌激素水平的骤降, 使其皮肤形态也发生明显变化, 卵巢去除后 3 个月大鼠真皮萎缩, 表皮突消失, 细胞层数减少, 真皮变薄, 胶原纤维断裂, 分布不均匀, 局部区域

胶原纤维缺失,基底膜分界不清,皮下结构疏松,形态计量数据显示与 Sham 组相比,OVX 组大鼠皮肤表皮、真皮厚度减小,且胶原纤维的面积也显著减少 ($P < 0.05$)。这些皮肤的组织形态学变化表明,大鼠卵巢去除后 3 个月皮肤发生衰老病变。

羟脯氨酸 (HYP) 是皮肤胶原蛋白和弹性蛋白中的一种主要且相对恒定的氨基酸,可稳定蛋白结构,增加纤维韧性,使皮肤光滑、有弹性,利用 HYP 在胶原蛋白中含量最高这一特点,通过测定皮肤 HYP 的含量,可了解皮肤胶原蛋白分解代谢情况,研究表明皮肤组织中 HYP 含量会随着皮肤的衰老而降低^[10,11]。此外,研究证实脂褐质 (LF) 在皮肤成纤维细胞沉积会导致细胞损伤,脂褐质的含量与皮肤衰老和老化程度呈显著正相关,因此,皮肤组织中 HYP 和 LF 的含量是评价皮肤衰老的可靠指标^[12,13]。同时,生物体内抗氧化酶 (CAT、GSH-Px、SOD 等) 活性降低会造成自由基堆积,过多的自由基会使成纤维细胞羟化酶损伤并出现羟化功能障碍,导致羟脯氨酸生成减少,从而破坏胶原蛋白和弹性蛋白的结构与功能,使皮肤的柔韧性和弹性下降而出现衰老^[14]。脂质过氧化损伤的产物丙二醛 (MDA) 会导致蛋白质、核酸等大分子的交联聚合,形成脂褐质 (LF)^[15]。本实验研究发现,大鼠去除卵巢后 3 个月,皮肤组织 CAT、GSH-Px 和 SOD 活性显著降低,MDA 含量较 Sham 组明显增加。羟脯氨酸 (HYP) 含量明显减少,脂褐质 (LF) 含量明显增多。上述指征均表明卵巢去除 3 个月后大鼠皮肤发生了明显衰老。

去卵巢大鼠构建的骨质疏松模型是研究绝经后骨质疏松症的最适模型,绝经后由于卵巢雌激素的缺失,使得骨密度、骨结构和骨生化指标发生明显变化,本实验研究发现雌激素不仅调控骨生成,而且是导致皮肤衰老的关键因素。正常皮肤成纤维细胞表达 ER,研究发现雌激素可直接调控成纤维细胞的增殖,提高其活性,增加胶原含量^[16]。Brincat 等^[17,18]的研究发现,雌激素会对更年期以及绝经后妇女皮肤厚度产生调节作用,可能的机制是雌激素可促进成纤维细胞的胶原合成,促进 TGF- β 1、VEGF 和 EGF 等细胞因子分泌,对成纤维细胞增殖及胶原合成起促进作用。目前,有关去卵巢骨质疏松症大鼠模型的研究很多,但是对其皮肤衰老的实验研究甚少,本文将为绝经后皮肤衰老相关研究提供可靠的实验模型,因此,去卵巢大鼠不仅是研究绝经后骨质疏松症的最适模型,也是研究和开发抗绝经后皮肤

衰老药物以及相关研究的良好模型。

参 考 文 献

- [1] 张亚军,刘忠厚,张鹏. 绝经后骨质疏松症流行病学研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志,2010,16(3): 229-234.
- [2] 祁珊珊,王永吉,辛薇. SD 大鼠绝经后骨质疏松疾病动物模型的构建 [J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(1): 49-52.
- [3] 祁珊珊,王永吉,庞田田,等. 去卵巢大鼠骨、生殖系统的组织病理学与形态计量学观察 [J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(7): 774-779.
- [4] Muromatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions? [J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,270:1-10.
- [5] Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin [J]. Exp Dermatol,2002,11:487-502.
- [6] 王喆,李瑞生. 衰老动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志,2013,23(3): 67-70.
- [7] 祁珊珊,杨祎琦,庞田田,等. 去卵巢法建立 SD 大鼠绝经后骨质疏松模型手术探讨 [J]. 中国兽医杂志,2014,2(50): 27-29.
- [8] Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin [J]. J Am Acad Dermatol, 1986,15: 571-585.
- [9] Farage MA, Miller KW, Elsner P, et al. Structural characteristics of the aging skin: a review [J]. Cutan Ocul Toxicol,2007, 26: 343-357.
- [10] Yang CY, Xu B, Sun YN. Effects of acupuncture and moxibustion on MDA, GSH-Px, and Hyp in the skin of senile mice [J]. J Acupunct Tuina Sci, 2011, 9(3): 142-144.
- [11] Worsfold M, Davie M, Haddaway M. Age-related changes in body composition, hydroxyproline, and creatinine excretion in normal women [J]. Calcif Tissue Int,1999, 64: 40-44.
- [12] Maroso EJ. Physiological system markers of aging [J]. Exp Gerontol,1988, 23: 391-394.
- [13] Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging [J]. Clin Dermatol,2011,29:3-14.
- [14] Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, et al. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin [J]. Mutat Res, 1999,423:11-21.
- [15] Dai M, Ma XP, Shi Z, et al. Effect of acupuncture on serum SOD and MDA of rats in menopause [J]. J Acupunct Tuina Sci, 2008, 6(2): 79-82.
- [16] Makrantonaki E, Vogel K, Fimmel S, et al. Interplay of IGF-I and 17beta-estradiol at age specific levels in human sebocytes and fibroblasts in vitro [J]. Exp Gerontol, 2008,43:939-946.
- [17] Brincat M, Moniz CJ, Studd JW, et al. Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness [J]. Br J Obstet Gynaecol,1985,92:256-259.
- [18] Brincat M, Versi E, Moniz CF, et al. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy [J]. Obstet Gynecol,1987,70:123-127.