

## 神经科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000086

## 雌激素替代治疗对卵巢切除大鼠海马 CA1 区有髓神经纤维及其髓鞘的影响

吕福林<sup>1</sup>, 肖倩<sup>1</sup>, 罗艳敏<sup>1</sup>, 何琦<sup>1</sup>, 晁凤蕾<sup>1</sup>, 陈林<sup>1</sup>, 仇玄<sup>1</sup>, 张蕾<sup>1</sup>, 张琪娟<sup>2</sup>, 肖晓秋<sup>3</sup>, 唐勇<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室、干细胞与组织工程学研究室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院临床营养科, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学附属第一医院脂糖代谢实验室, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**探讨雌激素替代治疗(estrogen replacement treatment, ERT)对卵巢切除(ovariectomy, OVX)大鼠海马 CA1 区有髓神经纤维及其髓鞘的影响。**方法:**对 10~11 月龄的雌性 SD 大鼠进行双侧卵巢切除术, 术后 1 月将成功切除卵巢的大鼠随机分为安慰剂对照组(OVX+O 组)和雌激素替代治疗组(OVX+E 组), 前者给予连续 4 周安慰剂(芝麻油)处理, 后者给予连续 4 周 17 $\beta$ -雌二醇替代治疗, 4 周后采用 Morris 水迷宫对 2 组大鼠的空间学习能力进行测试, 用化学发光法测定 2 组大鼠体内循环雌激素浓度, 用透射电子显微镜和体视学方法对两组大鼠海马 CA1 区有髓神经纤维及其髓鞘进行定量研究。**结果:**OVX+E 组大鼠体内循环雌激素浓度明显高于 OVX+O 组( $t=5.688, P=0.000$ ); OVX+E 组大鼠空间学习能力明显提高( $F=9.645, P=0.006$ )。2 组大鼠 CA1 区体积( $t=1.451, P=0.181$ )、有髓神经纤维体积( $t=-1.158, P=0.294$ )、有髓神经纤维髓鞘体积( $u=-0.642, P=0.521$ )、有髓神经纤维平均直径( $t=0.630, P=0.545$ )和有髓神经纤维髓鞘厚度( $u=-1.746, P=0.081$ )均不存在统计学差异, 但是 OVX+E 组直径在 0.6~0.7  $\mu\text{m}$  的有髓神经纤维髓鞘厚度比 OVX+O 组大鼠增加 14.1%( $t=2.428, P=0.038$ ), OVX+E 组直径在 0.8~0.9  $\mu\text{m}$  的有髓神经纤维直径与轴突直径差比 OVX+O 组大鼠增加 18.2%( $t=2.432, P=0.038$ )。**结论:**短期雌激素替代治疗可以改善大鼠空间学习能力并对海马 CA1 区有髓神经纤维髓鞘具有保护作用。

**【关键词】**有髓神经纤维髓鞘; 海马; 卵巢切除; 雌激素替代治疗; 体视学**【中图分类号】**R-332; R311; R322.81; R329.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-11-27

作者介绍: 吕福林, Email: 45674140@qq.com,

研究方向: 神经生物学。

通信作者: 唐勇, Email: ytang062@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 811171238, 31271288);

2012 年重庆市“百名学术学科领军人才”培养计划资助项目。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000086.html>focal cerebral ischemia in AQP-4-deficient mice[J]. *Neurosci Bull*, 2012, 28(6): 680-692.[38] Miyamoto K, Nagaosa N, Motoyama M, et al. Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neural Sci*, 2009, 276(1-2): 103-107.[39] Li L, Zhang H, Verkman AS. Greatly attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in aquaporin-4 knockout mice[J]. *BMC Neurosci*, 2009, 10: 94-99.[40] Li L, Zhang H, Varrin-Doyer M, et al. Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation[J]. *FASEB J*, 2011, 25(5): 1556-1566.[41] Saadoun S, Waters P, Bell A, et al. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice[J]. *Brain*, 2010, 133(Pt2): 349-361.[42] Kuwahara-Otani S, Maeda S, Tanaka K, et al. Systemic administration of lipopolysaccharide increases the expression of aquaporin-4 in the rat anterior pituitary gland[J]. *J Vet Med Sci*, 2013, 75(8): 1081-1084.[43] Shin KS, Choi HS, Zhao TT, et al. Neurotoxic effects of berberine on long-term L-DOPA administration in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease[J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(6): 759-767.

[44] 郭黎, 史长征, 胡艳, 等. 帕金森病患者脑灰质变化的 VBM-

MRI 研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2012, 38(6): 334-338.[45] 罗琴, 彭国光. 帕金森病 MPTP 慢性动物模型的研究进展[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007, 33(10): 632-634.[46] Chi Y, Fan Y, He L, et al. Novel role of aquaporin-4 in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cell development and severity of Parkinson's disease[J]. *Aging Cell*, 2011, 10(3): 368-382.[47] Liu L, Su Y, Yang W, et al. Disruption of neuronal-glial-vascular units in the hippocampus of ovariectomized mice injected with D-galactose[J]. *Neuroscience*, 2010, 169(2): 596-608.[48] Sawada T, Kato Y, Kobayashi M. Expression of aquaporin-4 in central nervous system tumors[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2007, 24(2): 81-84.[49] Nicchia GP, Srinivas M, Li W, et al. New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin 43[J]. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1674-1676.[50] Ng WH, Hy JW, Tan WL, et al. Aquaporin-4 expression is increased in edematous meningiomas[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(3): 441-443.[51] 滕良珠, 浦佩玉, 薛庆澄, 等. 脑膜瘤与瘤周脑水肿[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1994, 20(5): 270-273.

(责任编辑: 关蕴良)

## Effects of estrogen replacement on myelinated nerve fibers and myelin sheaths in CA1 region of ovariectomized rats

Lyu Fulin<sup>1</sup>, Xiao Qian<sup>1</sup>, Luo Yanmin<sup>1</sup>, He Qi<sup>1</sup>, Chao Fenglei<sup>1</sup>, Chen Lin<sup>1</sup>,  
Qiu Xuan<sup>1</sup>, Zhang Lei<sup>1</sup>, Zhang Qijuan<sup>2</sup>, Xiao Xiaoqi<sup>3</sup>, Tang Yong<sup>1</sup>

(1. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Nutrition, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of short-term estrogen replacement on myelinated nerve fibers and myelin sheaths in CA1 region of ovariectomized rats. **Methods:** Female SD rats (10–11 month-old) were bilaterally ovariectomized. One month after ovariectomy, successful ovariectomized rats were randomly divided into placebo group (OVX+O) which received sesame oil for 4 weeks and estrogen replacement group (OVX+E) which received continuous 17 $\beta$ -estradiol replacement treatment for 4 weeks. After 4 weeks, spatial learning capacities of two groups were tested using the Morris water maze. Then, the serum estradiol levels were detected by chemiluminescence method. The myelinated nerve fibers and myelin sheaths in CA1 region were quantitatively investigated by transmission electron microscope and stereological methods. **Results:** The serum estradiol levels were significantly increased after estrogen replacement treatment ( $t=5.688, P=0.000$ ). The spatial learning capacity of OVX+E rats was significantly improved when compared with that of OVX+O rats ( $F=9.645, P=0.006$ ). There was no significant difference in the CA1 volume, the volume of myelinated nerve fibers, the volume of myelin sheaths, the mean diameter of the myelinated fibers and the mean thickness of myelin sheaths between two groups ( $P=0.181, P=0.294, P=0.521, P=0.545, P=0.081$ , respectively). The mean thickness of myelin sheaths of the myelinated fibers with diameters between 0.6 to 0.7  $\mu\text{m}$  was significantly higher by 14.1% in OVX+E group when compared with that of OVX+O group ( $t=2.428, P=0.038$ ). The difference between the mean diameter of myelinated nerve fibers and the mean diameter of axons with the mean diameter of 0.8 to 0.9  $\mu\text{m}$  in OVX+E group was significantly increased by 18.2% when compared with that of OVX+O group ( $t=2.432, P=0.038$ ). **Conclusions:** Short-term estrogen replacement can enhance the spatial learning capacity and can exert protective effects on the myelin sheaths in the CA1 region of middle-aged ovariectomized rats.

**[Key words]** cmyelin sheath; hippocampus; ovariectomy; estrogen replacement treatment; stereology

随着社会的发展,人类的寿命逐渐延长,围绝经期及绝经后妇女人口比重增加,这一群体的健康问题受到越来越多的关注。已有流行病学研究发现,绝经后女性罹患阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 的风险明显高于男性,而从围绝经期开始,女性体内的雌激素水平开始下降,雌激素的缺乏被认为与认知功能障碍和 AD 有关<sup>[1]</sup>。大脑也被认为是雌激素重要的靶器官,雌激素对大脑具有保护作用,其中海马对雌激素的作用极为敏感,大鼠动情周期内雌激素水平的波动会影响海马的结构和功能,高雌激素水平可以增加大鼠海马内 CA1 区树突棘密度和突触的数量,并且提高 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA 受体) 的活性,雌激素还可以促进海马齿状回内神经发生,而在卵巢切除之后,大鼠 CA1 区树突棘密度减少达到 30%,补充雌激素之后可以显著改善这种树突棘丢失<sup>[2]</sup>,此外雌激素能提高大鼠的空间记忆能力,改善认知能力<sup>[3]</sup>。老年大鼠海马内并不存在神经元死亡,但是有髓神经纤维存在显著性老年改变<sup>[4]</sup>。大脑内神经冲动主要依靠有髓神经纤维的快

速传导,有髓神经纤维结构的改变会影响传导速度,从而影响神经系统的功能。Gerstner 等<sup>[5]</sup>通过标记有髓神经纤维的髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 评估缺氧缺血条件下诱导的新生大鼠白质损伤,而给予 17 $\beta$ -雌二醇能够阻止这种白质损伤。Acs 等<sup>[6]</sup>应用双环己酮草酰二胺 (Cuprizone, CPZ) 诱导中枢神经系统产生脱髓鞘改变,给予雌激素也可以减轻脱髓鞘程度。这些研究表明雌激素对有髓神经纤维髓鞘具有保护作用,但是到目前为止,尚未见到雌激素替代治疗对海马有髓神经纤维及其髓鞘影响的定量研究。因此本实验选用卵巢切除后给予雌激素替代治疗模型,将电子显微镜技术与新的体视学方法结合起来,探讨雌激素对海马内有髓神经纤维髓鞘的影响,以期寻找延缓大脑衰老进程的手段提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

清洁级 19 只 10~11 月龄 SD 雌性大鼠 (第三军医大学动

物中心提供), 体质量( $300 \pm 20$ ) g。饲养条件: 室温  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 12 h 光照与 12 h 黑暗交替, 3~5 只/箱, 给予足够的食物和水。

### 1.2 卵巢切除与雌激素替代治疗

所有动物在戊巴比妥钠( $1\%$ ,  $0.4\text{ ml}/100\text{ g}$ )麻醉下行双侧卵巢切除术, 术后给予肌注青霉素预防感染, 连续 3 d。术后第 3 周行阴道涂片, 连续 5 d, 通过观察阴道内角化上皮细胞、白细胞、有核上皮细胞的比例, 判断大鼠动情周期变化, 周期恒定被认定为卵巢切除成功的标志之一<sup>[7]</sup>。术后第 4 周对所有大鼠行尾静脉取血, 分离血清, 在重庆医科大学附属第一医院内分泌实验室利用化学发光法(仪器为 UniCel DxI 800 Immunoassay System from Beckman Coulter)测定大鼠体内循环雌激素浓度。结合阴道涂片与循环雌激素浓度测定结果, 将卵巢切除成功的大鼠随机分为雌激素替代治疗组(OVX+E 组)(10 只)和安慰剂对照组(OVX+O 组)(9 只), OVX+E 组给予  $17\beta$ -雌二醇(Abcam, ab120657),  $10\text{ }\mu\text{g}$  溶于  $1\text{ ml}$  芝麻油, 皮下注射, 1 次/d, OVX+O 组给予芝麻油皮下注射, 连续 4 周<sup>[8-9]</sup>。最后 1 d 雌激素皮下注射后, 对所有大鼠行尾静脉取血  $2\text{ ml}$ , 测定循环雌激素浓度。

### 1.3 Morris 水迷宫测试

采用 DMS-2 型电脑全自动程控 Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所)。Morris 水迷宫直径为  $150\text{ cm}$ , 高为  $50\text{ cm}$ , 将圆桶等分为 4 个象限, 设置 A、B、C、D 4 个入水点。将有机玻璃制的圆柱型平台(直径  $9.5\text{ cm}$ , 高  $28.5\text{ cm}$ )随机放入某一象限的中间。用墨汁将水染黑, 水温控制在  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  之间, 同时保持周围环境的安静。2 组大鼠均用 Morris 水迷宫进行连续 6 d 的空间学习能力的测试。前 5 d 为隐藏平台实验, 水面高于平台  $1\sim 2\text{ cm}$ , 每个入水点均要测试 1 次, 入水点顺序随机选择, 先把动物置于平台上  $15\text{ s}$ , 使其熟悉周围环境, 放动物入水时头朝向池壁, 轻放入水。记录动物的寻台时间(从入水到找到平台且四肢爬上平台的时间, 即潜伏期)。若入水  $180\text{ s}$  仍未找到水池中的平台, 则将其置于平台上  $15\text{ s}$ , 并且记录寻台时间为  $180\text{ s}$ 。若动物爬上平台停留未足  $15\text{ s}$  又入水游泳则继续计时, 直到其爬上平台停留  $15\text{ s}$  或游泳时间超过  $180\text{ s}$ 。一个入水点测试结束, 从平台上取下休息  $60\text{ s}$  后再进行下一个入水点的测试。测试环境及平台位置保持不变。第 6 天为可见平台实验, 重新选择一个象限放置平台, 平台高出水面  $1\sim 2\text{ cm}$ 。仅选择 2 个远离平台的入水点测试, 其他过程同隐藏平台实验。

### 1.4 标本的取材与固定

随机挑选 11 只大鼠, OVX+E 组(6 只), OVX+O 组(5 只), 用  $1\%$  戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 接着对大鼠进行心脏灌注固定, 之后开颅取脑, 去除小脑和脑干。然后将大脑左右半球分开, 再将大脑半球沿冠状线方向切成  $1\text{ mm}$  厚的连续等距切片, 每侧大脑平均切取  $13\sim 15$  片。随机抽取其中一侧大脑半球, 选取包含海马 CA1 区的脑组织切片( $5\sim 7$  片)。在选取的脑片上随机叠放透明等距测点框, 在测点击中海马 CA1 区的部位抽取  $1\text{ mm}^3$  大小的组织块, 每只动物抽取  $5\sim 6$  块标本。大鼠处死后, 分离取出子宫, 对子宫进行称重<sup>[10]</sup>。

### 1.5 电镜标本制作

将组织块在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下浸泡于  $4\%$  的戊二醛固定  $2\text{ h}$ , 经  $0.1\text{ mol/L}$  PBS(pH 7.2)冲洗 3 次后用锇酸( $\text{OsO}_4$ ) 在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件

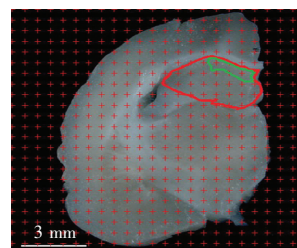
下染色  $2\text{ h}$ 。经  $50\%$ 、 $70\%$ 、 $90\%$  的乙醇,  $90\%$  乙醇与  $90\%$  丙酮混合物及  $100\%$  丙酮溶液中逐级脱水后, 浸泡在  $100\%$  的环氧树脂内<sup>[11]</sup>。将浸透好的组织块用球切法(isector)<sup>[12]</sup>包埋成直径为  $5\text{ mm}$  的小球, 以保证海马 CA1 区内的有髓神经纤维能够被各向同性均匀随机切取。接着按常规电镜包埋法包埋小球。从包埋好的每个组织块上随机切取一张  $60\text{ nm}$  的超薄切片, 在透射电子显微镜下, 每张超薄切片放大  $20\text{ }000$  倍后随机选取 10 个视野进行拍照, 每只动物拍得 50 张海马 CA1 区有髓神经纤维的电镜照片。

### 1.6 体视学定量研究

**1.6.1 海马 CA1 区体积计算** 在解剖显微镜下, 对抽取出的包含海马 CA1 区的脑片随机叠放等距测点框(图 1), 计数与 CA1 区重叠的测点数  $\Sigma P(\text{CA1})$ , 利用卡瓦列利原理计算 CA1 区的体积<sup>[13]</sup>:

$$V(\text{CA1}) = t \times a(p) \times \Sigma P(\text{CA1}) \quad (1)$$

上式中  $V(\text{CA1})$  代表整个海马 CA1 区的体积;  $a(p)$  为每一测点所对应的面积( $0.168\text{ mm}^2$ );  $t$  为切片厚度( $1\text{ mm}$ )。

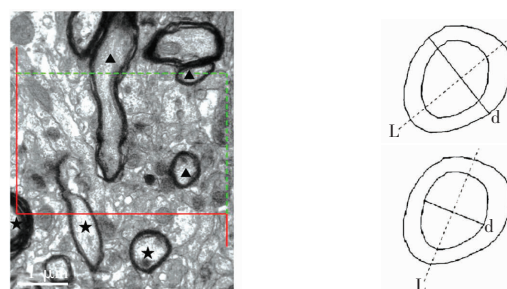


红色实线区域内为海马, 绿色实线区域内为 CA1

图 1 计算落在 CA1 区的测点数 ( $10 \times$ )

Fig.1 Number of points hitting the CA1 region ( $10 \times$ )

**1.6.2 海马 CA1 区有髓神经纤维直径及有髓神经纤维轴突的直径** 在  $20\text{ }000$  倍的电镜照片上随机叠放无偏视框, 根据禁线法则将所有位于计数框内和部分位于计数框内但并未与实线相交的纤维断面定为待测有髓神经纤维断面<sup>[12]</sup>。然后分别测量每个待测有髓神经纤维断面及其轴突断面的直径。首先确定每个有髓神经纤维断面及其轴突断面的最长轴, 分别垂直于二者最长轴的所有横轴中最长的横径为直径(图 2)。并求相应的比值和差值<sup>[12]</sup>。



A. 无偏计数框计数原则: 只计数完全落在框内及只与计数线(虚线)相交的有髓神经纤维断面(▲), 而不计数与排除线(实线)相交的有髓神经纤维断面(★)( $20\text{ }000\times$ )

B. 测量所有被无偏计数框计数的有髓神经纤维内、外径, 垂直于纤维断面最长轴 L 的最长横径 d 即为有髓神经纤维内、外径

图 2 无偏计数框计数原则和有髓神经纤维直径测量

Fig.2 Principle of unbiased counting frame and the measurement of myelinated fiber diameters

1.6.3 海马 CA1 区有髓神经纤维及其髓鞘的体积密度与体积测定 在 20 000 倍的电镜照片上随机叠放等距测点框, 分别计数落在整个海马 CA1 区和待测有髓神经纤维断面上及髓鞘上的测点数(图 3)。按照公式<sup>[11]</sup>计算海马 CA1 区有髓神经纤维的体积密度和髓鞘体积密度:

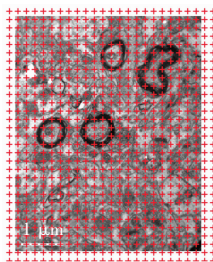


图 3 分别计数落在整个 CA1 区及 CA1 内有髓神经纤维及髓鞘的测点数 (20 000 ×)

Fig.3 Number of points hitting the CA1, the myelinated nerve fibers and the myelin sheaths (20 000 ×)

$$V_v(nf) = \Sigma P(nf) / \Sigma P(CA1) \quad (2)$$

$$V_v(m) = \Sigma P(m) / \Sigma P(CA1) \quad (3)$$

式中  $V_v(nf)$  代表 CA1 区有髓神经纤维的体积密度;  $\Sigma P(nf)$  代表落在有髓神经纤维上的测点数;  $V_v(m)$  代表 CA1 区髓鞘的体积密度;  $\Sigma P(m)$  代表落在髓鞘上的测点数;  $\Sigma P(CA1)$  为落在整个 CA1 区的测点数。

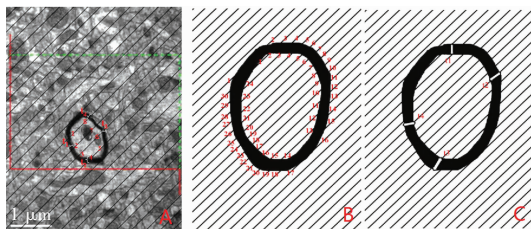
有髓神经纤维体积及其髓鞘体积则依据以下公式<sup>[11]</sup>计算:

$$V(nf) = V_v(nf) \times V(CA1) \quad (4)$$

$$V(m) = V_v(m) \times V(CA1) \quad (5)$$

式中  $V_v(nf)$  代表有髓神经纤维的体积密度;  $V(nf)$  代表有髓神经纤维体积;  $V_v(m)$  代表髓鞘的体积密度;  $V(m)$  代表髓鞘体积;  $V(CA1)$  为 CA1 区体积。

1.6.4 海马 CA1 区有髓神经纤维髓鞘的厚度 在 20 000 倍的电镜照片上随机叠放无偏体视框和等距平行测试线, 将待测有髓神经纤维断面的髓鞘内边界与测试线相交的点按顺序编号, 交点总数为  $I$ , 从前  $I/4$  个号码中随机选取 1 个作为测试髓鞘厚度的第一个点, 第 2 个点为第 1 个点位 +  $I/4$ , 第 3 个点为第 2 个点位 +  $I/4$ , 第 4 个点为第 3 个点位 +  $I/4$ , 在这 4 个点处分别测量从髓鞘内边界到髓鞘外边界最短的距离  $t_1, t_2, t_3, t_4$ ,  $t$  值的平均值即为髓鞘厚度<sup>[12]</sup>(图 4)。



A. 在电镜照片上随机叠加无偏体视框和等距平行测试线 (20 000 ×); B. 平行测试线与髓鞘内边界的交点总数为 24, 随机选择 1~6 中的数字位点, 本例中随机选择 3 号位点作为起始位点, 则下一个位点为  $3 + 24/4 = 9$  号位点, 第 3 个位点为 15 号位点, 最后一个位点为 21 号位点; C. 分别测量这 4 个点处髓鞘内边界到髓鞘外边界的最短距离, 分别记为  $t_1, t_2, t_3, t_4$ , 然后求平均值即可得到该断面有髓神经纤维髓鞘的平均厚度

图 4 CA1 区有髓神经纤维髓鞘厚度测量

Fig.4 Measurement of the thickness of the myelin sheaths of myelinated fibers in CA1 region

## 1.7 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 经过正态分布检验后, 用两独立因素  $t$  检验比较 OVX+E 组和 OVX+O 组大鼠干预后循环雌激素浓度、海马结构及其内有髓神经纤维各项参数的差异, 并按  $<0.5, 0.5 \sim 0.6, 0.6 \sim 0.7, 0.7 \sim 0.8, 0.8 \sim 0.9, 0.9 \sim 1.0, 1.0 \sim 1.1, \geq 1.2 \mu m$  有髓神经纤维的不同直径范围进行统计比较, 不符合正态分布的数据(子宫重量、Morris 水迷宫可见平台潜伏期、有髓神经纤维髓鞘体积、有髓神经纤维髓鞘厚度等)用 Mann-Whitney U 检验, 对 Morris 水迷宫隐藏平台潜伏期采用重复测量数据的方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 大鼠循环雌激素浓度和子宫质量

所有大鼠 ( $n=19$ ) 卵巢切除后第 4 周循环雌激素浓度(均数 ± 标准差)为  $(10.7 \pm 6.5) \text{ pg/ml}$ , 给予雌激素替代治疗后, OVX+E 组 ( $n=10$ ) 大鼠体内循环雌激素浓度为  $(162.7 \pm 78.3) \text{ pg/ml}$ , OVX+O 组 ( $n=9$ ) 大鼠循环雌激素浓度仅为  $(20.3 \pm 11.3) \text{ pg/ml}$ , OVX+O 组大鼠体内循环雌激素浓度较 OVX+E 组降低了 87.5% ( $t=5.688, P=0.000$ ) (图 5)。OVX+E 组大鼠的子宫质量(均数 ± 标准差)为  $(0.74 \pm 0.25) \text{ g}$ , OVX+O 组大鼠的子宫质量为  $(0.43 \pm 0.14) \text{ g}$ , OVX+O 组大鼠子宫质量较 OVX+E 组降低了 41.9% ( $u=-2.816, P=0.005$ ) (图 6)。本实验结果表明, 卵巢切除术后 1 月, 大鼠体内循环雌激素浓度下降, 给予雌激素替代治疗后, 循环雌激素水平迅速回升, 但是 OVX+O 组的循环雌激素浓度较术后仍略有上升, 故推测可能是由于后期肾上腺代偿性分泌少量雌激素引起<sup>[13]</sup>, 但是 2 组大鼠之间循环雌激素浓度存在统计学差异, 而且分离所有大鼠子宫, 观察到 OVX+E 组大鼠子宫外观饱满, OVX+O 组大鼠子宫萎缩(图 7), 2 组大鼠子宫重量也存在统计学差异。由此推断本模型中卵巢切除和雌激素替代治疗是成功的。

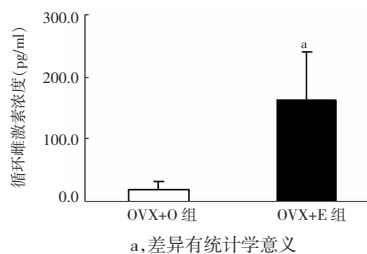


图 5 OVX+O 组和 OVX+E 组大鼠循环雌激素浓度比较  
Fig.5 Comparison of serum estradiol levels between OVX+O group and OVX+E group

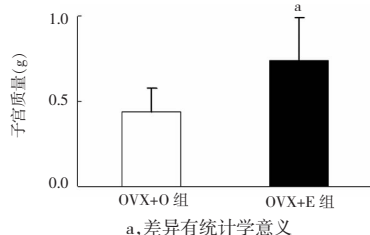


图 6 OVX+O 组和 OVX+E 组大鼠子宫质量比较  
Fig.6 Comparison of uterine weight between OVX+O group and OVX+E group



A. OVX+O 组大鼠子宫

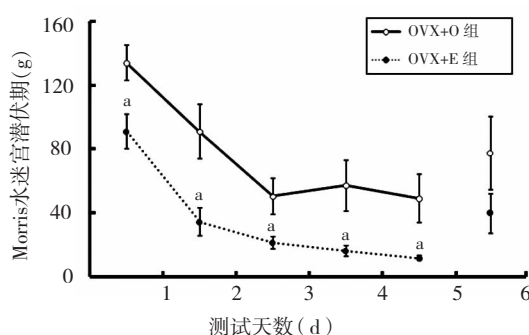
B. OVX+E 组大鼠子宫

图 7 OVX+O 组和 OVX+E 组大鼠子宫大体照片

Fig.7 Uterine photographs of OVX+O rats and OVX+E rats

## 2.2 Morris 水迷宫测试结果

在前 5 d 的隐藏平台实验中,OVX+E 组大鼠的平均潜伏期较 OVX+O 组明显缩短( $F=9.645, P=0.006$ ),而在可见平台实验中,2 组大鼠的潜伏期之间没有统计学差异( $u=-1.551, P=0.121$ )(图 8)。



a, 差异有统计学意义

图 8 OVX+O 组和 OVX+E 组大鼠 Morris 水迷宫潜伏期的比较

Fig.8 Comparison of the escape latency in Morris water maze between estrogen OVX+O group and OVX+E group

## 2.3 大鼠海马 CA1 区体积

OVX+E 组大鼠海马 CA1 区体积(均数 $\pm$ 标准差)为( $27.85 \pm 1.15$ )  $\text{mm}^3$ ,OVX+O 组大鼠海马 CA1 区体积为( $26.83 \pm 1.17$ )  $\text{mm}^3$ ,2 组间不存在统计学差异( $t=1.451, P=0.181$ )(图 9)。

## 2.4 大鼠 CA1 区有髓神经纤维髓鞘超微结构

OVX+E 组大鼠 CA1 区内有髓神经纤维髓鞘平均厚度为( $0.081 \pm 0.003$ )  $\mu\text{m}$ ,OVX+O 组髓鞘厚度为( $0.073 \pm 0.006$ )  $\mu\text{m}$ ,OVX+E 组较 OVX+O 组增加了 11%( $u=-1.746, P=0.082$ )(图 10),但 2 组间不存在统计学差异;2 组大鼠 CA1 区内有髓神

经纤维体积( $t=-1.158, P=0.294$ )、有髓神经纤维髓鞘体积( $u=-0.642, P=0.521$ )、有髓神经纤维直径( $t=0.630, P=0.545$ )、有髓神经纤维轴突直径( $t=-0.054, P=0.958$ )、有髓神经纤维直径与其轴突直径差( $u=-1.723, P=0.085$ )、有髓神经纤维轴突直径与纤维直径比( $t=-1.392, P=0.197$ )均未发现统计学差异( $P>0.05$ )(表 1)。

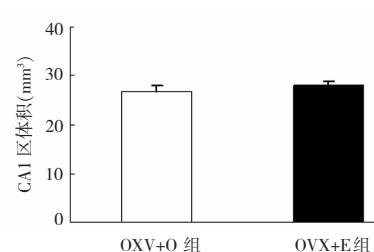


图 9 OVX+O 组和 OVX+E 组海马 CA1 体积比较

Fig.9 Comparison of the volume of CA1 region between OVX+O group and OVX+E group

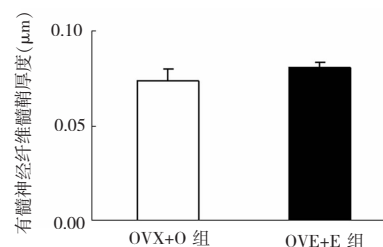


图 10 OVX+O 组和 OVX+E 组有髓神经纤维髓鞘厚度比较

Fig.10 Comparison of myelin sheath thickness of the myelinated fibers between OVX+O group and OVX+E group

## 2.5 大鼠 CA1 区有髓神经纤维超微结构各数据的分段比较

2.5.1 不同直径的有髓神经纤维髓鞘体积 2 组大鼠各直径段之间有髓神经纤维髓鞘体积的比较未发现统计学差异( $P>0.05$ )(表 2)。

2.5.2 不同直径的有髓神经纤维髓鞘厚度 OVX+E 组大鼠平均直径为 0.6~0.7  $\mu\text{m}$  的有髓神经纤维髓鞘平均厚度比 OVX+O 组大鼠增加了 14.1%( $t=2.428, P=0.038$ )(图 11)。其余各段之间的比较未发现统计学差异( $P>0.05$ )。

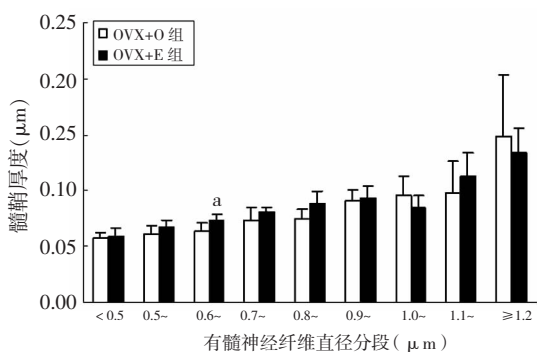
2.5.3 不同直径的有髓神经纤维直径与轴突直径差 OVX+E 组大鼠平均直径为 0.8~0.9  $\mu\text{m}$  的有髓神经纤维直径与轴突直径差较 OVX+O 组大鼠增加了 18.2%( $t=2.432, P=0.038$ )(图 12)。其余各段之间的比较未发现统计学差异( $P>0.05$ )。

表 1 2 组大鼠 CA1 区有髓神经纤维髓鞘的体视学结果( $\bar{x} \pm s$ )Tab.1 Stereological results of myelin sheaths of myelinated fibers in CA1 region of two groups( $\bar{x} \pm s$ )

| 体视学结果                            | OVX+O 组 (n=5)     | OVX+E 组 (n=6)     | 变化率 (%) |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|---------|
| 有髓神经纤维体积 ( $\text{mm}^3$ )       | $2.68 \pm 0.45$   | $2.42 \pm 0.22$   | -9.7    |
| 有髓神经纤维髓鞘体积 ( $\text{mm}^3$ )     | $0.81 \pm 0.09$   | $0.80 \pm 0.04$   | -1.2    |
| 有髓神经纤维直径 ( $\mu\text{m}$ )       | $0.73 \pm 0.04$   | $0.74 \pm 0.03$   | 1.3     |
| 有髓神经纤维轴突直径 ( $\mu\text{m}$ )     | $0.58 \pm 0.05$   | $0.58 \pm 0.04$   | 0.0     |
| 有髓神经纤维髓鞘厚度 ( $\mu\text{m}$ )     | $0.073 \pm 0.006$ | $0.081 \pm 0.003$ | 11      |
| 有髓神经纤维直径与轴突直径差 ( $\mu\text{m}$ ) | $0.15 \pm 0.02$   | $0.17 \pm 0.01$   | 13.3    |
| 有髓神经纤维轴突直径与纤维直径比                 | $0.79 \pm 0.03$   | $0.77 \pm 0.02$   | -2.5    |

表 2 2 组大鼠 CA1 区不同直径的有髓神经纤维髓鞘体积的体视学结果 ( $\bar{x} \pm s$ )Tab.2 Stereological results of the myelin sheath volume of the myelinated fibers with different diameters in CA1 region of two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

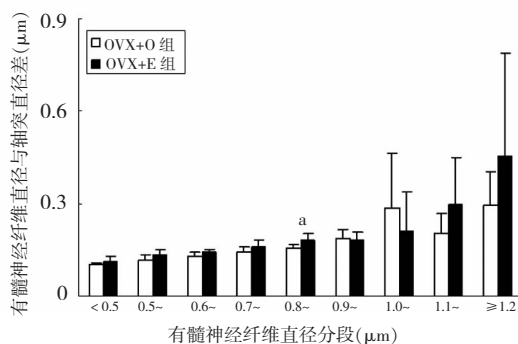
| 有髓神经纤维直径 ( $\mu\text{m}$ ) | OVX+O 组有髓神经纤维髓鞘体积 ( $\text{mm}^3$ ) ( $n=5$ ) | OVX+E 组有髓神经纤维髓鞘体积 ( $\text{mm}^3$ ) ( $n=6$ ) | 变化率 (%) |
|----------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------|
| <0.5                       | 0.019 $\pm$ 0.011                             | 0.020 $\pm$ 0.008                             | 5.3     |
| 0.5~                       | 0.049 $\pm$ 0.027                             | 0.043 $\pm$ 0.010                             | -12.2   |
| 0.6~                       | 0.057 $\pm$ 0.026                             | 0.071 $\pm$ 0.020                             | 24.6    |
| 0.7~                       | 0.064 $\pm$ 0.022                             | 0.084 $\pm$ 0.008                             | 31.3    |
| 0.8~                       | 0.054 $\pm$ 0.011                             | 0.050 $\pm$ 0.016                             | -7.4    |
| 0.9~                       | 0.037 $\pm$ 0.019                             | 0.049 $\pm$ 0.020                             | 32.4    |
| 1.0~                       | 0.034 $\pm$ 0.007                             | 0.023 $\pm$ 0.013                             | -32.4   |
| 1.1~                       | 0.012 $\pm$ 0.009                             | 0.027 $\pm$ 0.016                             | 125     |
| $\geq 1.2$                 | 0.032 $\pm$ 0.017                             | 0.042 $\pm$ 0.027                             | 31.3    |



a, 差异有统计学意义

图 11 不同直径段有髓神经纤维髓鞘厚度的分布

Fig.11 Distribution of myelin sheath thickness of the myelinated fibers with different diameters in two groups



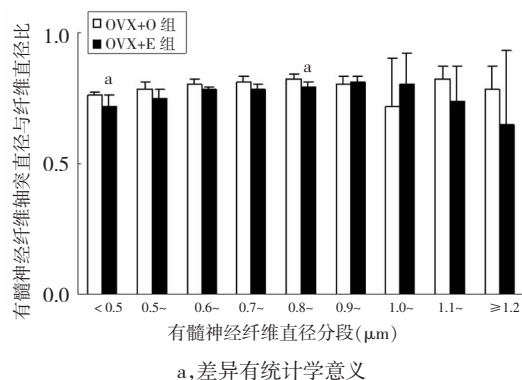
a, 差异有统计学意义

图 12 不同直径段有髓神经纤维直径与轴突直径差值的分布

Fig.12 Distribution of diameter difference of the myelinated nerve fibers and axons in two groups

2.5.4 不同直径的有髓神经纤维轴突直径与纤维直径比  
OVX+E 组大鼠平均直径小于 0.5  $\mu\text{m}$  的有髓神经纤维轴突直径与纤维直径比比 OVX+O 组大鼠降低了 5.2% ( $u = -2.008$ ,  $P = 0.045$ ), OVX+E 组大鼠平均直径为 0.8~0.9  $\mu\text{m}$  的有髓神

经纤维轴突直径与纤维直径比比 OVX+O 组大鼠降低了 3.8% ( $t = -2.327$ ,  $P = 0.045$ ) (图 13)。其余各段之间的比较未发现统计学差异 ( $P > 0.05$ )。



a, 差异有统计学意义

图 13 不同直径段有髓神经纤维轴突直径与纤维直径比的分布

Fig.13 Distribution of diameter of the myelinated nerve fibers and axons in two groups

### 3 讨论

围绝经期是女性生殖衰老过程的重要组成部分,女性卵巢功能从中老年期开始逐渐衰退,体内雌激素水平也迅速下降,而雌激素能够影响人类和动物的认知能力。早期的临床研究发现,雌激素可以调节情绪,改善抑郁状态<sup>[14]</sup>,绝经后妇女使用雌激素替代治疗可延缓和减少 AD 的风险<sup>[15]</sup>。但是,2003 年 WHIMS 的一系列研究结果显示,65 岁以上女性服用雌激素(倍美力)不会减少其患老年痴呆的风险,并且对接受雌激素替代治疗时已有轻度认知障碍的患者将产生不利的影响<sup>[16-17]</sup>。对此, Sherwin 和 Henry<sup>[18]</sup>以及 Rocca 等<sup>[19]</sup>提出雌激素对大脑的神经保护作用可能存在一个“临界期”——雌激素水平开始下降的时间点以及接受雌激素替代治疗的时间点,2 个时间点越接近,雌激素才能更好的发挥其对神经系统的有益影响。然而在动物实验中,大鼠并不存在类似人类女性的围绝经期,大鼠在 9~14 月龄开始出现动情周期的紊乱,体内的循环雌激素并没有出现大幅下降,所以选用卵巢切除大鼠模型可以近似模拟女性围绝经期的雌激素减退过程,而且动物实验中发现卵巢切除后长期的雌激素缺乏状态将会对随后的雌激素替代治疗效果产生不利影响<sup>[20-21]</sup>, Gibbs<sup>[22]</sup>发现对中老年大鼠进行双侧卵巢切除术后 3 个月之内给予雌激素替代治疗可以提高大鼠的空间记忆能力,而卵巢切除术后 10 个月再给予雌激素替代治疗则没能改善大鼠的空间记忆能力。本实

验中运用的 Morris 水迷宫是最常用的测试动物空间学习记忆能力的行为学方法, Talboom 等<sup>[3]</sup>对不同年龄段的卵巢切除大鼠进行 Morris 水迷宫测试, 发现雌激素仅对青年组和中老年组大鼠的空间记忆能力有改善, 而对老年组空间记忆能力则没有影响, 本实验中 OVX+E 组大鼠在隐藏平台的平均潜伏期明显缩短, 与 Talboom 等<sup>[3]</sup>的研究结果一致。可见平台实验反映的是啮齿类动物的游泳能力和视力, 这些因素可能会对水迷宫成绩产生影响, 而 2 组大鼠在可见平台的潜伏期并没有统计学差异, 说明本实验中获得的空间学习能力未受到游泳能力和视力等因素的影响。由此推断 OVX 术后 1 月给予 4 周雌激素替代治疗能够改善大鼠的空间记忆能力。

海马是与学习、记忆功能密切相关的重要脑区, 同时海马在衰老和神经退行性疾病如阿尔茨海默病中极易受损<sup>[23-25]</sup>。张蕾等<sup>[26]</sup>对青年、中老年及老年雌性大鼠海马内有髓神经纤维髓鞘超微结构的研究发现, 老年雌性大鼠海马内有髓神经纤维同时存在脱髓鞘和髓鞘再生的现象, 这种脱髓鞘改变以细小直径 (直径  $<0.3\ \mu\text{m}$ ) 的纤维脱髓鞘为主, 而髓鞘再生则在中等直径段 ( $0.4\sim0.5$ 、 $0.5\sim0.6$ 、 $0.7\sim0.8\ \mu\text{m}$ ) 较为明显, 提示中枢神经系统的髓鞘形成细胞, 即少突胶质细胞, 具有活跃的再生能力。Tinkler 等<sup>[27]</sup>发现, 对猴进行卵巢切除后, 缺乏雌激素的一组其前额叶皮质内胆碱能纤维的密度降低, 给予雌激素替代治疗的一组其胆碱能纤维密度和正常对照组相差不大, 提示雌激素可以防止大脑内神经纤维的丢失。在 CPZ 脱髓鞘动物模型中发现雌激素可以减少胼胝体内脱髓鞘改变, 增加胼胝体内髓鞘碱性蛋白的表达<sup>[6]</sup>。Jung-Testas 等<sup>[28]</sup>发现, 雌激素在离体少突胶质细胞细胞培养中可以促进少突胶质细胞增殖, 增加髓鞘碱性蛋白的合成。本实验中 OVX+E 组大鼠 CA1 区有髓神经纤维髓鞘厚度较 OVX+O 组大鼠增加 11%, 但是并不存在统计学差异。进一步对髓鞘的超微结构分布情况进行分析发现,  $0.6\sim0.7\ \mu\text{m}$  直径段 OVX+E 组大鼠的有髓神经纤维髓鞘厚度较 OVX+O 组显著性增加; 有髓神经纤维直径与轴突直径差及有髓神经纤维轴突直径与纤维直径比可以间接反映髓鞘的变化,  $0.8\sim0.9\ \mu\text{m}$  直径段 OVX+E 组大鼠的有髓神经纤维直径与轴突直径差值显著性高于 OVX+O 组, 小于  $0.5\ \mu\text{m}$  直径段和  $0.8\sim0.9\ \mu\text{m}$  直径段 OVX+E 组大鼠有髓神经纤维轴突直径与纤

维直径比值显著低于 OVX+O 组, 表明大鼠接受雌激素替代治疗后在这些直径段可以防止有髓神经纤维髓鞘丢失和(或)促进髓鞘形成增加。由于有髓神经纤维髓鞘厚度的值是在 4 个不同位点进行直接测量后通过求平均值的方法得到, 髓鞘厚度越不规则, 所测得的值变异越大, 所以 2 组大鼠 CA1 区有髓神经纤维髓鞘平均厚度并不存在显著性差异。

Eberling 等<sup>[29]</sup>发现, 接受过雌激素治疗的女性其海马体积要大于从未接受雌激素替代治疗女性, 而 WHIMS 一项后期 MRI 研究发现, 雌激素治疗的女性海马体积较对照组略小<sup>[30]</sup>, 此外 Low 等<sup>[31]</sup>对 60~64 岁年龄绝经后妇女的大脑 MRI 发现, 接受雌激素替代治疗与未接受雌激素替代治疗 2 组女性其大脑白质、海马、灰质等区域的体积没有显著性改变。上述研究关于雌激素替代治疗后海马体积结果差异的原因可能有: ①雌激素作用对象的不同(年龄、地域等不同); ②持续接受雌激素治疗的时间不同; ③临界期假说。卢伟等<sup>[4]</sup>通过体视学方法对青年、中老年及老年雌性大鼠海马及其内有髓神经纤维的研究发现, 各年龄段大鼠的海马总体积以及海马内有髓神经纤维总体积并没有显著性改变, 但是有髓神经纤维的总长度尤其是细小直径纤维的总长度存在先增加后降低的趋势, 而细小直径的有髓神经纤维改变对大脑体积及有髓神经纤维体积的影响并不明显。作者研究发现, 短期雌激素替代治疗后中老年大鼠海马 CA1 区体积、CA1 区有髓神经纤维体积及其髓鞘体积较雌激素缺乏大鼠并没有显著性改变, 但是 OVX+E 组大鼠细小直径有髓神经纤维髓鞘形成增加。Yang 等<sup>[32]</sup>发现短期丰富环境干预后大鼠有髓神经纤维髓鞘大量再生, 其结果是细小直径有髓神经纤维大量增多, 此类型的有髓神经纤维集中分布在额叶白质, 与大脑认知功能密切相关。小直径有髓神经纤维改变对大鼠 CA1 体积及有髓神经纤维体积影响不明显, 但对海马 CA1 区神经传导的影响有待进一步深入研究。

综上所述, 本实验的结果表明雌激素可以提高中老年雌性大鼠空间记忆能力, 而雌激素下降会导致海马 CA1 区有髓神经纤维髓鞘发生老年性改变, 早期雌激素替代治疗可以防止这种改变和(或)促进髓鞘再生, 为未来进一步认识雌激素替代治疗保护海马内有髓神经纤维连接完整性以及延缓大脑衰老进程提供了理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Henderson MS, Victor W. Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease[J]. *Am J Med*, 1997, 103(3A): 11S-18S.
- [2] Morrison JH, Brinton RD, Schmidt PJ, et al. Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(41): 10332-10348.
- [3] Talboom JS, Williams BJ, Baxley ER, et al. Higher levels of estradiol replacement correlate with better spatial memory in surgically menopausal young and middle-aged rats[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2008, 90(1): 155-163.
- [4] 卢伟, 杨姝, 李琛, 等. 大鼠海马结构内有髓神经纤维老年性改变的体视学研究[J]. *解剖学报*, 2009, 40(6): 851-856.
- [5] Gerstner B, Lee J, DeSilva TM, et al. 17 $\beta$ -estradiol protects against hypoxic/ischemic white matter damage in the neonatal rat brain[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(9): 2078-2086.
- [6] Acs P, Kipp M, Norkute A, et al. 17 $\beta$ -estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice[J]. *Glia*, 2009, 57(8): 807-814.
- [7] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations[J]. *Braz J Biol*, 2002, 62(4A): 609-614.
- [8] Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, et al. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(14): 5792-5801.
- [9] Yankova M, Hart SA, Woolley CS. Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3525-3530.
- [10] Yildirim M, Janssen WGM, Lou WY, et al. Effects of estrogen and aging on the synaptic distribution of phosphorylated Akt-immunoreactivity in the CA1 region of the female rat hippocampus[J]. *Brain Res*, 2011, 1379: 98-108.
- [11] Tang Y, Nyengaard JR. A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter[J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 73(2): 193-200.
- [12] 李琛, 杨姝, 张伟, 等. 大脑白质有髓神经纤维髓鞘超微结构定量研究的体视学方法[J]. *解剖学杂志*, 2009, 32(5): 588-594.
- [13] Moorthy K, Sharma D, Basir SF, et al. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats[J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(4): 295-302.
- [14] Schmidt PJ, Nieman L, Danaceau MA, et al. Estrogen replacement in perimenopause-related depression: a preliminary report[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 183(2): 414-420.
- [15] Tang MX, Jacobs D, Stern Y, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 1996, 348(9025): 429-432.
- [16] Espeland MA, Rapp SR, Shumaker SA, et al. Conjugated equine estrogens and global cognitive function in postmenopausal women[J]. *JAMA*, 2004, 291(24): 2959-2968.
- [17] Shumaker SA, Legault C, Kuller L, et al. Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women[J]. *JAMA*, 2004, 291(24): 2947-2958.
- [18] Sherwin BB, Henry JF. Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2008, 29(1): 88-113.
- [19] Rocca WA, Grossardt BR, Shuster LT. Oophorectomy, menopause, estrogen treatment, and cognitive aging: clinical evidence for a window of opportunity[J]. *Brain Res*, 2011, 1379: 188-198.
- [20] Chakraborty TR, Gore AC. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004, 229(10): 977-987.
- [21] Daniel JM. Estrogens, estrogen receptors, and female cognitive aging: the impact of timing[J]. *Horm Behav*, 2013, 63(2): 231-237.
- [22] Gibbs RB. Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats[J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(1): 107-116.
- [23] Raz N, Lindenberger U, Rodrigue KM, et al. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers[J]. *Cereb Cortex*, 2005, 15(11): 1676-1689.
- [24] de Leeuw FE, Barkhof F, Scheltens P. White matter lesions and hippocampal atrophy in Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 2004, 62(2): 310-312.
- [25] de Toledo-Morrell L, Stoub TR, Wang C. Hippocampal atrophy and disconnection in incipient and mild Alzheimer's disease[J]. *Prog Brain Res*, 2007, 163: 741-823.
- [26] 张蕾, 卢伟, 闵琦理, 等. 大鼠大脑海马结构内有髓神经纤维髓鞘老年性改变的体视学研究[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(19): 2053-2057.
- [27] Tinkler GP, Tobin JR, Voytko ML. Effects of two years of estrogen loss or replacement on nucleus basalis cholinergic neurons and cholinergic fibers to the dorsolateral prefrontal and inferior parietal cortex of monkeys[J]. *J Comp Neurol*, 2004, 469(4): 507-521.
- [28] Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, et al. Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992, 41(3-8): 621-631.
- [29] Eberling JL, Wu C, Haan MN, et al. Preliminary evidence that estrogen protects against age-related hippocampal atrophy[J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24(5): 725-732.
- [30] Resnick SM, Espeland MA, Jaramillo SA, et al. Postmenopausal hormone therapy and regional brain volumes: the WHIMS-MRI study[J]. *Neurology*, 2009, 72(2): 135-142.
- [31] Low LF, Anstey KJ, Maller J, et al. Hormone replacement therapy, brain volumes and white matter in postmenopausal women aged 60-64 years[J]. *Neuroreport*, 2006, 17(1): 101-104.
- [32] Yang S, Li C, Qiu X, et al. Effects of an enriched environment on myelin sheaths in the white matter of rats during normal aging: a stereological study[J]. *Neuroscience*, 2013(234): 13-21.

(责任编辑:唐宗顺)