

神经科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000147

雌激素替代治疗对中老年卵巢切除大鼠白质及白质内有髓神经纤维髓鞘超微结构作用的研究

何琦¹, 罗艳敏¹, 吕福林¹, 肖倩¹, 晁凤蕾¹, 张琪娟², 肖晓秋³, 唐勇¹

(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代谢实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy, ERT)对中老年卵巢切除雌性 SD 大鼠大脑白质及白质内有髓神经纤维髓鞘超微结构的作用, 为以后进一步运用 ERT 延缓大脑衰老进程和防治脱髓鞘疾病提供科学依据。**方法:**选用 40 只 10~12 月龄中老年雌性 SD 大鼠行双侧卵巢切除术, 术后 1 月将成功去势的 19 只卵巢切除大鼠按完全随机设计方式分为实验组($n=10$)与对照组($n=9$), 前者给予 17 β -雌二醇颈背部皮下注射 4 周, 后者给予安慰剂颈背部皮下注射 4 周。然后采用 Morris 水迷宫测试 2 组大鼠的空间参考记忆能力, 运用电镜技术及相应的体视学方法对 2 组大鼠大脑白质及白质内有髓神经纤维髓鞘超微结构进行定量研究。**结果:**实验组大鼠与对照组相比, 其空间参考记忆能力明显增强($F=9.645, P=0.006$)。与对照组大鼠相比, 实验组大鼠大脑白质内有髓神经纤维髓鞘总体积和髓鞘内外周长之差均明显增加[(32.94 ± 5.97) mm^3 , (25.93 ± 2.83) mm^3 , $t=2.391, P=0.040$; (1.16 ± 0.10) μm , (1.03 ± 0.09) μm , $t=2.325, P=0.045$]。统计学相关分析发现, 白质内有髓神经纤维髓鞘总体积与 Morris 水迷宫第 1 天潜伏期呈负相关($r=-0.744, P=0.009$)。**结论:**ERT 对中老年卵巢切除大鼠的空间参考记忆能力及白质内有髓神经纤维髓鞘均有积极的保护作用。

【关键词】中老年雌性大鼠; 白质; 髓鞘; 雌激素替代治疗; 体视学

【中图分类号】R332; R311; R322.81; R329.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-18

Effect of estrogen replacement on the white matter and the myelin sheath ultrastructure of the myelinated fibers in the white matter of middle-aged ovariectomized rats

He Qi¹, Luo Yanmin¹, Lyu Fulin¹, Xiao Qian¹, Chao Fenglei¹, Zhang Qijuan², Xiao Xiaoli³, Tang Yong¹

(1. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Laboratory of Stem Cells 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 the short-term estrogen replacement therapy (ERT) on the white matter and the myelin sheath ultrastructure of the myelinated fibers in the white matter of ovariectomized middle-aged rats in order to provide a scientific basis for delaying the process of brain aging and combating demyelination diseases with estrogen replacement therapy in the future. **Methods:** Middle-aged female sprague-dawley rats of 10–12 month (40 rats) were bilaterally ovariectomized and the serum estrogen levels were examined one month after the surgery. The female Sprague-Dawley rats (19 rats) with successful castration were randomly divided into experimental group ($n=10$) and control group ($n=9$). Experimental rats were subcutaneously injected 17 β -estradiol and control rats were subcutaneously injected placebo for 4 weeks. Then, the spatial reference memory capacities of two group rats were tested with Morris water maze. The white matter and the myelinated nerve fibers in the white matter of two group rats were quantitatively investigated with the transmission electron microscope technique and the stereological techniques. **Results:** The spatial reference memory capacity of the experimental rats was significantly enhanced compared with that of the control rats ($F=9.645, P=0.006$). The total volume of the myelin sheaths and the difference between outer perimeter and inner perimeter of myelin sheaths in the myelinated fibers of the white matter in

作者介绍: 何琦, Email: heqiawyncdq@163.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: 81171238、31271288、81301149、31300985); 重庆市科委自然科学基金资助项目 (编号: CSTC2011jjA10066); 2012 年重庆市首批“百名学术学科领军人才”培养计划资助项目; 重庆医科大学基础医学院中青年教师科研基金资助项目 (编号: JC201313)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000147.html>

experimental rats were significantly increased compared with those of control rats ($(32.94 \pm 5.97) \text{ mm}^3$, $(25.93 \pm 2.83) \text{ mm}^3$, $t=2.391$, $P=0.040$; $(1.16 \pm 0.10) \mu\text{m}$, $(1.03 \pm 0.09) \mu\text{m}$, $t=2.325$, $P=0.045$). The correlation analyses suggested that the total myelin sheath volume of the myelinated fibers in the white matter was significantly and negatively correlated with the escape latency on the first day of Morris water maze ($r=-0.744$, $P=0.009$). **Conclusions**: Estrogen replacement had positive protective effects on the spatial reference memory capacity and the myelin sheaths of the myelinated fibers in the white matter of the middle-aged ovariectomized rats.

【Key words】middle-aged female rats; white matter; myelin sheaths; estrogen replacement therapy; stereology

传统的观点认为,老年大脑存在皮质神经元的显著性死亡^[1-2]。但体视学研究表明老年大脑皮质神经元并没有显著性的死亡,而其白质体积存在显著性的下降^[3-4],并且是由于白质内有髓神经纤维总长度下降引起的^[4-5]。有研究表明,老年大脑存在认知功能的障碍,而女性在绝经后,雌激素的缺乏更会加速其认知功能下降的进程^[6]和增加其罹患阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)的风险^[7]。中枢神经系统作为雌激素的靶器官,已有众多研究显示:雌激素可以改善大脑的认知能力^[8]和空间参考记忆能力^[9],能够防止和延缓脑萎缩^[10],提高单胺类和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的水平^[9]。此外,雌激素还有助于维持少突胶质前体细胞和少突胶质细胞的生物活动^[11-12];而少突胶质细胞作为髓鞘细胞,其生物活动直接影响着有髓神经纤维的功能;已有研究证实,有髓神经纤维及其髓鞘的结构异常是导致认知功能下降的重要原因之一^[13-14],由此,雌激素对于维持有髓神经纤维及其髓鞘的结构正常起着至关重要的作用。流行病学研究还显示,对围绝经期女性给予雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy, ERT)可以明显降低其 AD 的患病率^[15-16]。并且早期有学者运用高分辨率磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)和优化三维像素研究发现女性绝经期后 ERT 能够改善包括白质在内的大脑结构^[17]。长期补充雌激素可以防护老年的白质丢失^[18]。这些研究都表明雌激素对大脑白质具有保护作用。可见,雌激素与大脑衰老和白质内有髓神经纤维及髓鞘之间的关系甚密。因此,本实验对中老年雌性 SD 大鼠行双侧卵巢切除术旨在模拟人类绝经后雌激素缺乏状态下^[19]大脑白质内有髓神经纤维及髓鞘结构异常的条件,并运用电镜技术和体视学三维精确定量方法研究 ERT 对白质及白质内有髓神经纤维髓鞘超微结构的作用,以了解雌激素对老年大脑白质和髓鞘病变的影响。本实验结果将为以后进一步运用 ERT 延缓大脑衰老进程和防治髓鞘疾病提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40 只中老年(10~12 月龄)雌性 SD 大鼠(由第三军医大学实验动物中心提供),在重庆医科大学实验动物中心饲养。

1.2 建立卵巢切除模型

将 40 只大鼠按体质量以 0.4 ml/100 g 的浓度腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠进行术前麻醉,行背部肋下切口,俯卧位固定于动物手术台,对手术部位备皮,常规消毒,切开皮肤、肌肉,然后摘除双侧卵巢。术后以每天每只 16 万单位的剂量连续 3 d 对大鼠注射青霉素以进行抗感染。术后 1 月运用化学发光法检测大鼠的血清雌激素水平。本实验筛选出血清雌激素水平在 11 pg/ml 左右的 19 只大鼠作为成功去势的卵巢切除模型^[19]。

1.3 ERT

将筛选出的 19 只卵巢切除大鼠随机分为实验组与对照组(实验组 10 只,对照组 9 只)。实验组大鼠按 0.025 $\mu\text{g/g}$ (E2/体质量)的剂量,给予 10 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ (E2/芝麻油)浓度的 17 β -雌二醇(abcam 公司, ab120657)颈背部皮下注射 4 周,对照组大鼠给予同等剂量的安慰剂颈背部皮下注射 4 周,2 组大鼠均每日同一时间(9:00 am)注射 1 次^[19-20]。ERT 4 周后再次运用化学发光法检测血清雌激素水平。

1.4 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)测试 2 组大鼠的空间参考记忆能力^[21]。水迷宫直径为 150 cm,高为 50 cm,将圆筒等分为 4 个象限,设置 A、B、C、D 共 4 个入水点。将 1 个有机玻璃制圆柱型平台(直径 9.5 cm,高 28.5 cm)随机放入某一象限的中间。水池内加入自来水,水温控制在 23 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 之间,为使水变得不透明,应用墨汁进行染色,并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 的空间学习记忆能力的测试。前 5 d 为隐藏平台实验,水面高出平台 1~2 cm,每个入水点均要测试 1 次,入水点顺序随机选择。首先,把动物置于平台上 15 s,让其熟悉周围环境,放动物入水池时头朝向池壁,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)。其次,若入水 180 s 仍未找到水池中的平台,可将其置于平台上 15 s,并记录寻台时间为 180 s。若动物爬上平台未停留 15 s 又入水游泳则继续计时,直到其爬上平台停留 15 s 或游泳时间超过 180 s。最后,一个入水点测试结束,从平台上取下休息 60 s 后再进行下一个入水点的测试。测试环境及平台位置相对不变。第 6 日为

可见平台实验,重新选择一个象限放置平台,并把水放出一些,使平台高出水面 1~2 cm。仅选择 2 个离平台距离较远的入水点测试,其它过程同隐藏平台实验。

1.5 标本固定与取材

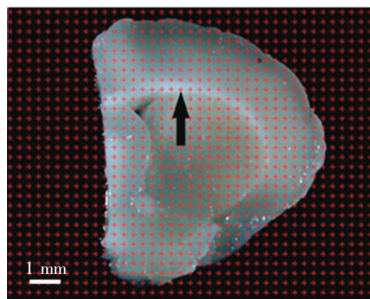
Morris 水迷宫测试结束后,从实验组中随机抽取 6 只大鼠,从对照组中随机抽取 5 只大鼠,总共 11 只大鼠,以 1%戊巴比妥钠(0.4 ml/100 g)腹腔麻醉,2%多聚甲醛和 2.5%戊二醛混合固定液(pH 7.4)心脏灌流固定。去除小脑、脑干,将大脑完整取出。冷却后,将左右大脑半球分别沿冠状线切成 1 mm 的连续等距切片。每侧大脑半球平均切取 14~16 张切片。每只大鼠随机抽取一侧大脑半球,每 3 张脑组织切片抽取 1 张,第 1 张切片则在前 3 张中随机确定。在抽取的脑组织切片上随机叠放测点,在测点击中白质的地方抽取白质组织块,保证白质的各个部位都有相同的抽中机率^[2],每只大鼠抽取电镜标本 5 块。

1.6 电镜照片的制备

将组织块在 4℃冰箱中用 4%的戊二醛浸泡固定 2 h,经 0.1 mol/L PBS(pH 7.2)冲洗 3 次后用锇酸(OsO_4)在 4℃条件下染色 2 h。脱水、浸透、醋酸双氧铀染色。为保证获得各向同性切片,将经过电镜染色的标本按“球切法”^[22]处理包埋成直径 5 mm 的小球,再按常规电镜包埋方法包埋小球。从包埋好的每个电镜组织块随机切取 1 张 60 nm 厚的超薄切片。在透射电子显微镜下,每张超薄切片放大 20 000 倍后随机选取 12 个视野进行拍照,每只大鼠拍得 60 张白质神经纤维的电镜照片。

1.7 白质及白质内有髓神经纤维的体视学定量分析

1.7.1 白质总体积 在解剖显微镜下,在每一片脑组织薄片上随机叠放计数点,记录击中白质测试点的个数(图 1),计算击中每只动物白质的总测点数。然后利用卡瓦列里原理^[4,22]计算白质总体积。



将等距测点框随机叠加在 1 mm 厚的脑组织切片上,计数落在白质内的测点数,如图中箭头所示

图 1 计数落在白质上的测点数(解剖显微镜)

Fig.1 Number of points hitting the white matter (anatomic microscope)

1.7.2 有髓神经纤维的总长度 在电镜照片上随机叠加无偏计数框($839.4 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$)(图 2),计数完全落在计数框内和只与计数线(绿线)相交的有髓神经纤维断面,任何与禁止线(红线)相交的断面均被排除在外不被计数^[14]。然后运用相关体视学方法^[4,22]计算白质内有髓神经纤维的总长度。

1.7.3 有髓神经纤维的总体积 在电镜照片上随机叠加等距测点框(图 3),分别计数落在白质内、有髓神经纤维上的

测点数。然后运用相关体视学方法^[4,22]计算白质内有髓神经纤维的总体积。

1.7.4 白质内有髓神经纤维髓鞘的总体积 在电镜照片上随机叠加等距测点框,分别计数落在整个白质区域和有髓神经纤维髓鞘上的测点数(图 3)。然后运用相关体视学方法^[4,22]计算白质内有髓神经纤维髓鞘总体积。

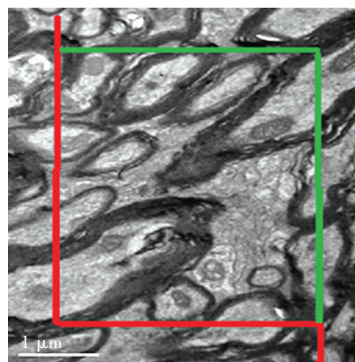


图 2 根据禁线法则计数落在无偏计数框内的白质内有髓神经纤维断面数(20 000 ×)

Fig.2 All myelinated fiber profiles in the white matter inside the unbiased counting frame according to the forbidden line rule (20 000 ×)

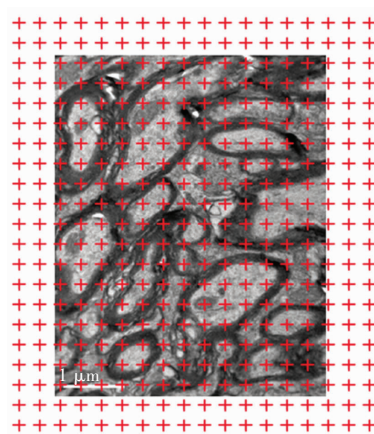


图 3 计数落在白质、有髓神经纤维和髓鞘上的测点数(20 000 ×)

Fig.3 Number of points on the white matter, the myelinated fibers and the myelin sheath (20 000 ×)

1.7.5 有髓神经纤维内、外径及有髓神经纤维髓鞘内、外周长和厚度 在电镜照片上随机叠加无偏计数框,根据禁线法则确定待测的有髓神经纤维断面,分别测每个待测有髓神经纤维断面的内、外径(图 4)。首先分别确定有髓神经纤维轴突断面及有髓神经纤维断面的最长轴,分别与有髓神经纤维轴突断面及有髓神经纤维断面最长轴相垂直的所有横轴中最长的横径为其内/外径^[22]。

随机叠加等距测试线,计数每个待测有髓神经纤维髓鞘断面的内、外边界与测试线的交叉点数(图 5)。根据公式: $b = d \times \sum I \times \pi / 2$ 分别计算出有髓神经纤维髓鞘断面的内、外周长,并求出其比值^[15]。式中, b 代表有髓神经纤维髓鞘断面的内、外周长, d 为测试线间距 ($0.028 \mu\text{m}$), $\sum I$ 为有髓神经纤维髓鞘断面内/外边界与测试线的交叉点数。

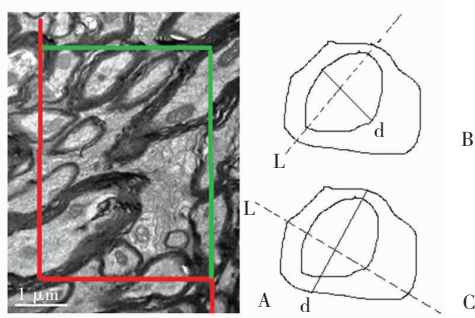


图 4 测量有髓神经纤维的内、外径
Fig.4 Inner diameter and outer diameter of the myelinated fibers

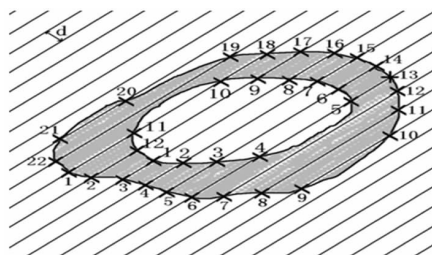


图 5 计数每个待测有髓神经纤维髓鞘断面的内、外边界与测试线的交叉点数

Fig.5 Number of intersections between the inner and outer boundary of the myelinated fiber and test lines

将髓鞘内边界(轴突外界)与测试线的交点按顺序编号,总数记为 I ,从前 $I/4$ 个号码中随机选取 1 个作为第 1 个测试髓鞘厚度的点,第 2 个为 1 号点位置 $+I/4$,第 3 个为 2 号点位置 $+I/4$,第 4 个为 3 号点位置 $+I/4$,在这 4 个点处分别测量从髓鞘的内边界到外边界最短的距离(图 6),其平均值则为髓鞘的厚度^[23]。

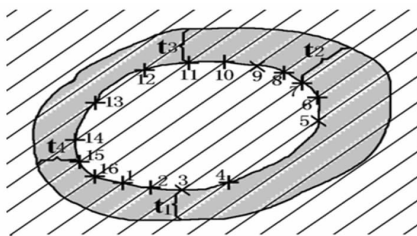


图 6 测量 t1、t2、t3、t4 位点的髓鞘厚度

Fig.6 Thickness of myelin sheaths in t1, t2, t3, t4 positions

1.8 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。雌激素水平、Morris 水迷宫可见平台实验的数据和体视学数据经过正态分布检验后,对正态分布资料进行两独立样本的 t 检验,对偏态分布资料进行非参数检验中的两独立样本的 Wilcoxon

秩和检验(Mann-Whitney U 检验);对 Morris 水迷宫隐藏平台实验的数据进行重复测量数据的方差分析。文中涉及相关分析采用双变量相关分析,满足正态分布时采用 Pearson 相关分析,不满足正态分布时采用 Spearman 相关分析,并对 P 值进行 Bonferroni 校正。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

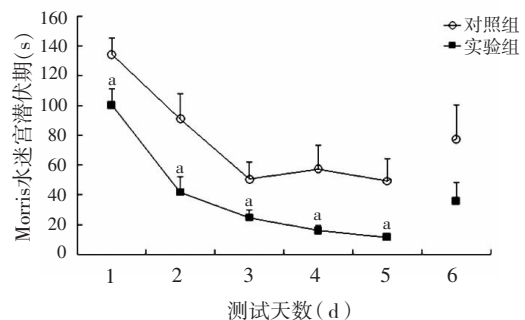
2 结果

2.1 雌激素水平的结果

术后检测的 2 组大鼠血清雌激素水平(均数 $\pm$ 标准差)分别为:实验组为(10.30 ± 4.62) pg/ml,对照组为(11.78 ± 4.47) pg/ml,差异无统计学意义($t=-0.707, P=0.489$)。ERT 后检测的 2 组大鼠血清雌激素水平分别为:实验组为(139.90 ± 80.90) pg/ml,对照组为(18.33 ± 13.17) pg/ml,差异具有统计学意义($t=4.683, P=0.001$)。

2.2 Morris 水迷宫的结果

经统计学软件分析,雌性 SD 大鼠在前 5 d 的隐藏平台实验中,实验组与对照组的潜伏期之间存在统计学差异($F=9.645, P=0.006$),而在第 6 天的可见平台实验中,2 组大鼠的潜伏期没有区别($Z=-1.796, P=0.072$)(图 7)。



a: 与对照组相比, $P < 0.05$

图 7 对照组($n=9$)与实验组($n=10$)

大鼠水迷宫潜伏期的比较($\bar{x} \pm s$)

Fig.7 Comparison of escape latency of Morris water maze between control group ($n=9$) and experimental group ($n=10$) ($\bar{x} \pm s$)

2.3 白质及白质内有髓神经纤维的体视学定量分析结果

实验组和对照组大鼠白质内有髓神经纤维的体视学研究结果见表 1。2 组大鼠白质总体积及白质内有髓神经纤维总长度、有髓神经纤维总体积、髓鞘内周长、髓鞘外周长、髓鞘内外周长之比、髓鞘厚度、有髓神经纤维直径、有髓神经纤维轴突直径、有髓神经纤维直径及其轴突直径之差、有髓神经纤维轴突直径及其有髓神经纤维直径之比均无统计学差异($P>0.05$)。但是,与对照组大鼠相比,实验组大鼠大脑白质内有髓神经纤维髓鞘总体积和髓鞘内外周长之差均明显增加($t=2.391, P=0.040; t=2.325, P=0.045$)。

2.4 体视学和行为学阳性指标间的相关分析

对差异有统计学意义的主要体视学参数髓鞘总体积和 Morris 水迷宫行为学参数进行相关分析,结果见表 2。

表 1 大鼠大脑白质及白质内有髓神经纤维的体视学结果 ($\bar{x} \pm s$)Tab.1 Stereological results of the white matter and the myelinated fibers of the white matter in the brain of rats ($\bar{x} \pm s$)

体视学数据	对照组 (n=5)	实验组 (n=6)	t (Z) 值	P 值
白质总体积 (mm ³)	86.97 ± 12.55	97.60 ± 10.57	1.528	0.161
有髓神经纤维总长度 (μm)	87.21 ± 11.12	98.57 ± 27.19	0.870	0.407
有髓神经纤维总体积 (mm ³)	50.84 ± 5.53	61.77 ± 10.45	2.095	0.066
髓鞘的总体积 (mm ³)	25.93 ± 2.83	32.94 ± 5.97 ^a	2.391	0.040
有髓神经纤维髓鞘的内周长 (μm)	2.61 ± 0.22	2.66 ± 0.17	0.378	0.714
有髓神经纤维髓鞘的外周长 (μm)	3.64 ± 0.29	3.82 ± 0.25	-0.915 ^b	0.360
有髓神经纤维髓鞘的内外周长之差 (μm)	1.03 ± 0.09	1.16 ± 0.10 ^a	2.325	0.045
有髓神经纤维髓鞘的内外周长之比	0.72 ± 0.02	0.70 ± 0.02	-1.934 ^b	0.053
髓鞘的厚度 (μm)	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.02	-0.556	0.592
有髓神经纤维的平均直径 (μm)	0.74 ± 0.04	0.75 ± 0.03	0.697	0.503
有髓神经纤维轴突的平均直径 (μm)	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.190	0.854
有髓神经纤维直径及其轴突直径之差 (μm)	0.25 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.650	0.532
有髓神经纤维直径及其轴突直径之比	0.66 ± 0.03	0.65 ± 0.03	-0.512	0.621

注:a,与对照组相比, $P < 0.05$;b,Wilcoxon 秩和检验 (Mann-Whitney U 检验) 中的 Z 值,其余均为 t 检验中的 t 值

表 2 体视学参数和行为学参数相关分析

Tab.2 Correlation analyses of the stereological parameters and the behavioral parameters

体视学参数	统计量	第 1 天潜伏期	第 2 天潜伏期	第 3 天潜伏期	第 4 天潜伏期	第 5 天潜伏期
髓鞘总体积	r	-0.744 ^a	-0.546	-0.544	-0.604	-0.559
	P	0.009	0.082	0.084	0.049	0.074

注:a,与对照组相比, $P < 0.01$ ($\alpha=0.05/5$,经 Bonferroni 校正)

3 讨 论

众所周知,人体内雌激素主要由卵巢、胎盘或肾上腺皮质所产生,是一种十八碳固醇类激素。绝大部分哺乳动物的雌激素主要是 E1 (estrone)、E2 (estradiol)、E3 (estriol),作用最强的是 E2。17β-雌二醇 (estradiol, E2) 是育龄期女性体内最重要的雌激素,并且作为 ERT 的主要物质^[19-20]。尽管女性记忆健康倡议研究 (Women's Health Initiative Memory Study, WHIMS) 显示绝经后女性接受雌激素替代治疗可能诱发妇科肿瘤的风险^[24]。但是,后来研究发现 WHIMS 雌激素替代治疗所采用的是结合雌激素,也就是雌激素与孕激素相结合进行替代治疗。并已有研究表明结合 ERT 可能诱发妇科肿瘤及损害老年功能^[25]。因此,本研究使用非结合雌激素 (17β-雌二醇) 进行替代治疗。

在本实验术后检测 2 组大鼠血清雌激素水平均值约为 11 pg/ml,与此前报道一致^[9],表明卵巢切除模型成功建立。ERT 后,实验组大鼠血清雌激素水平明显高于对照组,表明 ERT 对模型组体内雌激素水平的提高是有效的。

老龄化引起的认知能力的下降与大脑白质的萎缩有关。已有一些研究表明,ERT 对老龄化引起

的大脑功能的下降具有积极的效应。Feng 等^[20]研究发现,以皮下注射雌激素的方式给予长期 ERT (4 个月) 对 3~4 月龄年轻的卵巢切除雌性 SD 大鼠的空间参考记忆能力具有积极的促进作用。然而, Kiss 等^[9]研究发现,对 12 月龄中老年卵巢切除的雌性 Wistar 大鼠以皮下植入雌激素胶囊的方式进行为期 30 d 的 ERT,其空间参考记忆能力得到了更加显著的提高。那么,为何年轻大鼠进行了更长时间的疗程 (4 个月),才达到与中老年大鼠进行了短时间疗程 (30 d) 的相同的疗效 (即对空间参考记忆能力具有积极的保护作用)? 目前尚不清楚具体原因,可能是因为各自给予雌激素的方式与开始和持续时间以及选用的大鼠不同。窗口期假说^[26]指出,雌激素对绝经后妇女的认知能力具有保护作用,其差异在于开始给予雌激素时间的不同。Whitmer 等^[27]研究进一步发现,只有在中年服用雌激素才能对抗认知能力的下降,而在老年服用雌激素反而可能会损坏中枢神经系统。而 Lefevre 等^[28]认为,10~12 月龄雌性大鼠开始进入绝经过渡期,并持续几个月的时间,但雌性大鼠的过渡期,并没有卵巢功能的下降,这点与人类的围绝经期出现卵巢功能的下降 (出现雌激素水平降低) 有很大不同。并且, Gibbs^[29]认为在卵巢切除后 3 个月以内对中老年大鼠进行 ERT 可以提高其空间参考记忆能力,而在术后 10 个月再给予 ERT

则无法改善其空间参考记忆能力。因此,本研究选用 10~12 月龄中老年雌性 SD 大鼠建立卵巢切除模型,模拟人类绝经后雌激素水平下降的条件,术后 1 个月对大鼠进行 ERT。并且,白质功能主要反映在认知功能上;尽管 Morris 水迷宫反映海马相关认知功能^[21,30],但目前为止,还没有一种行为学测试手段能特异性地反映白质功能。因此,本实验采用 Morris 水迷宫测试大鼠的空间参考记忆能力。通过对 2 组大鼠前 5 d 的潜伏期进行重复测量数据的方差分析,结果显示,实验组大鼠在隐藏平台实验中寻台潜伏期较对照组明显缩短^[19],与既往的研究报道相一致^[9,29]。这表明 ERT 对中老年大鼠的空间参考记忆能力确实具有积极的保护作用。

早期有学者运用 MRI 和优化三维像素研究发现,女性绝经期后 ERT 能改善包括白质在内的大脑结构^[17]。长期补充雌激素可以对抗随着年龄增长而出现的白质体积的减少^[18]。但是,对 ERT 使用者大脑结构改变的研究的结论并不完全一致。Low 等^[31]运用 MRI 技术对 60~64 岁绝经期女性研究发现:在 ERT 既往使用者、ERT 目前使用者和 ERT 从未使用者中,她们的灰质体积、白质体积以及海马体积等之间两两比较并没有出现差异。Greenberg 等^[32]研究也发现 ERT 对绝经后女性的大脑白质体积没有显著影响。而这些研究结果存在差异的根本原因在于 MRI 仅仅是定性或半定量研究。本实验获得的体视学三维精确定量研究结果显示 2 组大鼠白质总体积没有统计学的差异,但是不排除 ERT 对一些脑区的大脑白质体积具有保护作用的可能性。然而,白质内神经纤维错综复杂;其中,胼胝体作为大脑中最大的白质纤维束,主要连接双侧的前额叶、顶叶、颞叶及枕叶的脑区^[33-34],对双侧脑区的信息整合起着至关重要的作用;并且,弥散张量成像的结果显示某些白质纤维束如上纵束、下纵束、钩束等^[35-36]的各向异性值降低表明大脑白质纤维完整性受到破坏;此外,Frith 等^[37]研究指出前额皮质和颞叶皮质之间的连接功能异常,也是导致疾病的重要原因之一。在解剖结构上很难对白质进行清楚分区,而体视学定量研究又必须要求对边界进行清楚的界定。因此,本实验对全脑白质进行了研究,下一步将探索白质分区的方法,然后对各功能区域的白质进行系统、深入的研究。

众所周知,中枢神经系统内有髓神经纤维髓鞘是由少突胶质细胞包裹轴突形成的。已有大量的研究表明雌激素具有防止脱髓鞘的作用。有学者研究发现,17 β -雌二醇能保护雄性小鼠免受 CPZ 诱导的脱髓鞘作用和少突胶质细胞的丢失^[38]。现知道多发性

硬化症是一种脱髓鞘和神经退行性的疾病。而 Niino 等^[39]的文献报道,雌激素通过调节雌激素受体而对多发性硬化症起着治疗药物的作用。Gold 等^[40]研究发现雌激素通过雌激素受体 α 而治疗性地减少自身免疫性脑脊髓疾病的基质金属蛋白酶-9。同时,也有研究表明,雌激素具有促进髓鞘再生的作用。Ragerdi 等^[41]研究报道 17 β -雌二醇对增强脂肪间充质干细胞对多发性硬化症小鼠模型的髓鞘再生具有促进和增强作用。Kumar 等^[42]研究表明雌激素受体 β 配体通过激活介导少突胶质细胞的 PI3K/Akt/mTOR 通路并促进髓鞘再生对多发性硬化症小鼠模型起治疗作用。Hirahara 等^[43]研究表明雌激素通过调节表达于少突胶质细胞上的 GPR30 而促进脱髓鞘病变后的髓鞘再生。在本实验中,实验组大鼠大脑白质内有髓神经纤维髓鞘的总体积较对照组明显增加。那么,这一结果究竟只是由雌激素对脱髓鞘病变的抑制作用引起的,还是由雌激素对脱髓鞘病变的抑制和雌激素具备的促进髓鞘再生的共同作用引起的呢?目前尚无定论。但本研究结果至少表明了雌激素有效地抑制了实验组大鼠脱髓鞘病变的进展。髓鞘内外周长之差、内外周长之比能较好地反映髓鞘的变化情况。当然,有髓神经纤维直径及其轴突直径之差、有髓神经纤维直径及其轴突直径之比也能较好地反映髓鞘的变化,但是它们反映髓鞘变化的准确性不如髓鞘内外周长之差和髓鞘内外周长之比强。因为需要分别计数多个交叉点数才能计算出髓鞘的内、外周长,而仅需分别测量一个值便能得出有髓神经纤维直径及其轴突直径。对髓鞘内、外周长的研究结果显示:实验组髓鞘内外周长之差较对照组明显增加,这为实验组大鼠髓鞘总体积明显性增加提供了结构基础,并进一步证明了雌激素有效地抑制了脱髓鞘改变的进程。

有髓神经纤维是大脑白质的主要成分,正常老年大脑白质存在有髓神经纤维的显著性丢失^[4]。有髓神经纤维及其髓鞘的结构异常则是导致老年大脑认知功能下降的重要原因之一^[13-14]。而女性在绝经后,雌激素的缺乏更会加速其认知功能下降的进程^[6]。可见,雌激素与老年大脑白质内有髓神经纤维及其髓鞘结构和认知功能之间的关系密切。在本实验中,ERT 明显地增加了卵巢切除大鼠白质内有髓神经纤维髓鞘的总体积,这与雌激素防止脱髓鞘^[38-40]和促进髓鞘再生^[41-43]的研究报道一致;并且,本实验发现 ERT 明显地提高了卵巢切除大鼠的空间参考记忆能力,这也与既往的研究报道相一致^[9,29]。同时,本实验还发现卵巢切除大鼠白质内髓鞘总体积与 Morris 水迷宫中第 1 天潜伏期(前 5 d 均反映大鼠

的空间参考记忆能力)具有相关性,这一结果提示 ERT 可能通过对卵巢切除大鼠白质内髓鞘的积极保护作用,从而有效地提高其空间参考记忆能力。

综上所述,本研究结果表明 ERT 能明显地提高中老年大鼠的空间参考记忆能力,并且明显地增加白质内有髓神经纤维髓鞘的总体积。本研究结果为将来探讨如何运用 ERT 延缓大脑衰老进程及防治髓鞘疾病提供了一定的科学依据。

参 考 文 献

- [1] Brody H. Organization of the cerebral cortex (Ⅲ): a study of aging in the human cerebral cortex[J]. *J Comp Neurol*, 1955, 102(2): 511–516.
- [2] Peters A, Morrison JH, Rosene DL, et al. Feature article: are neurons lost from the primate cerebral cortex during normal aging[J]. *Cereb Cortex*, 1998, 8(4): 295–300.
- [3] Pakkenberg B, Gundersen HJ. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age[J]. *J Comp Neurol*, 1997, 384(2): 312–320.
- [4] Tang Y, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation[J]. *Neurobiol Aging*, 1997, 18(6): 609–615.
- [5] Marner L, Nyengaard JR, Tang Y, et al. Marked loss of myelinated fibers in the human brain with age[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 462(2): 144–152.
- [6] Halbreich U, Lumley LA, Palter S, et al. Possible acceleration of age effects on cognition following menopause[J]. *J Psychiatr Res*, 1995, 29(3): 153–163.
- [7] Henderson VW. Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease[J]. *Am J Med*, 1997, 103(3A): 11S–18S.
- [8] Wang AC, Hara Y, Janssen WG, et al. Synaptic estrogen receptor- α levels in prefrontal cortex in female rhesus monkeys and their correlation with cognitive performance[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(38): 12770–12776.
- [9] Kiss A, Delattre AM, Pereira SI, et al. 17 β -Estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227(1): 100–108.
- [10] Xu J, Kobayashi S, Yamaguchi S, et al. Gender effects on age-related changes in brain structure[J]. *Am J Neuroradiol*, 2000, 21(1): 112–118.
- [11] Marin-Husstege M, Muggironi M, Raban D, et al. Oligodendrocyte progenitor proliferation and maturation is differentially regulated by male and female sex steroid hormones[J]. *Dev Neurosci*, 2004, 26(2–4): 245–254.
- [12] Arevalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, et al. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800(10): 1106–1112.
- [13] Peters A, Moss MB, Sethares C. Effects of aging on myelinated nerve fibers in monkey primary visual cortex[J]. *J Comp Neurol*, 2000, 419(3): 364–376.
- [14] Peters A, Sethares C. Is there remyelination during aging of the primate central nervous system[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 460(2): 238–254.
- [15] Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease[J]. *Arch Intern Med*, 1996, 156(19): 2213–2217.
- [16] 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.
- [17] Erickson KI, Colcombe SJ, Raz N, et al. Selective sparing of brain tissue in postmenopausal women receiving hormone replacement therapy[J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(8): 1205–1213.
- [18] Ha DM, Xu J, Janowsky JS. Preliminary evidence that long-term estrogen use reduces white matter loss in aging[J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(12): 1936–1940.
- [19] Chakraborty TR, Gore AC. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptor and neuroendocrine function[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004, 229(10): 977–987.
- [20] Feng Z, Cheng Y, Zhang JT. Long-term effects of melatonin or 17 β -estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired, ovariectomized adult rats[J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(3): 198–206.
- [21] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11(1): 47–60.
- [22] 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.
- [23] Larsen JO. Stereology of nerve cross sections[J]. *J Neurosci Methods*, 1998, 85(1): 107–118.
- [24] Espeland MA, Rapp SR, Shumaker SA, et al. Conjugated equine estrogens and global cognitive function in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study[J]. *JAMA*, 2004, 291(24): 2959–2968.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Whitmer RA, Quesenberry CP, Zhou J, et al. Timing of hormone therapy and dementia: the critical window theory revisited[J]. *Ann Neurol*, 2011, 69(1): 163–169.
- [28] Lefevre J, McClintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior[J]. *Biol Reprod*, 1988, 38(4): 780–789.
- [29] 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.
- [30] Klempin F, Kempermann G. Adult hippocampal neurogenesis and aging[J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2007, 257(5): 271–280.
- [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] Greenberg DL, Payne ME, MacFall JR, et al. Differences in brain volumes among males and female hormone-therapy users and nonusers[J]. *Psychiatry Res*, 2006, 147(2–3): 127–134.
- [33] Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, et al. Fiber composition of the human corpus callosum[J]. *Brain Res*, 1992, 598(1–2): 143–153.
- [34] Hofer S, Frahm J. Topography of the human corpus callosum revisited—comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging[J]. *Neuroimage*, 2006, 32(3): 989–994.

神经科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000142

桡神经-肌皮神经变异 1 例报道

许亚玲¹, 杨佳¹, 余政廷¹, 路鹏飞¹, 朱淑娟²

(重庆医科大学 1. 2010 级临床医学儿科专业; 2. 基础医学院人体解剖学教研室, 重庆 400016)

【中图分类号】R323.7

【文献标志码】B

【收稿日期】2013-04-24

从 upper limb 神经分布情况来看, 一般以肌皮神经变异居多, 而桡神经变异的现象较为罕见。笔者在局部解剖学实验课的解剖操作过程中, 发现 1 例左侧桡神经浅支并肌皮神经变异现象: 桡神经浅支分布到前臂部分屈肌肌群, 而肌皮神经延续至前臂浅出深筋膜后, 在腕上方发出分支分布于虎口区、拇指食指中指背侧区皮肤。具体报道如下。

1 解剖资料

成年男性尸体, 身高约 155 cm, 上肢标本, 左侧臂丛的各干、股、束形成正常。桡神经在外上髁下方约 3 cm 处分为浅深 2 支, 其浅支下行约 4 cm 穿入前臂前区, 支配肱桡肌和指浅屈肌。肌皮神经终末支离开肱二头肌腱外侧浅出向下续为前臂外侧皮神经, 行走于前臂前区外侧区域, 在桡骨茎突上方 5 cm 处分为 2 支, 进入手背区共同支配拇指、食指、中指及虎口区侧的皮肤, 代替传统的桡神经浅支支配的相应部位。见图 1。

2 讨论

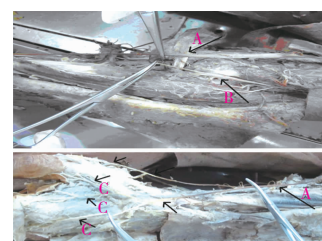
了解神经变异, 有助于临床上的诊断和治疗。临床上, 当

作者介绍: 许亚玲, Email: 1615954420@qq.com,

研究方向: 人体解剖学。

通信作者: 朱淑娟, Email: zhushjd@126.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000142.html>



A 为前臂外侧皮神经; B 为桡神经浅支; C 为前臂外侧皮神经的分支

图 1 前臂外侧和手背部位肌皮神经和桡神经分支现象

Fig.1 Branches of musculocutaneous nerve and radial nerve in the outer forearm and the back of the hand

患者出现虎口区区域感觉功能减退或消失时; 或是前臂屈肌功能异常, 如果用正常结构的理论解释不了的时候, 当考虑神经行程和支配区域结构变异的存在。因此, 积累丰富的人体解剖学数据资料, 为临床工作者提供形态学依据^[1-3], 对指导临床工作具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 周 维, 孟 宾, 牛鹏辉, 等. 肌皮神经变异 1 例[J]. 局解手术学杂志, 2009, 18(2): 146-147.
- [2] 杨 津, 李 迪, 夏长丽, 等. 肌皮神经的解剖及其临床意义[J]. 解剖学研究, 2011, 33(2): 124-126.
- [35] Nakamura K, Kawasaki Y, Takahashi T, et al. Reduced white matter fractional anisotropy and clinical symptoms in schizophrenia: a voxel-based diffusion tensor imaging study[J]. Psychiatry Res, 2012, 202(3): 233-238.
- [36] Kubota M, Miyata J, Sasamoto A, et al. Alexithymia and reduced white matter integrity in schizophrenia: a diffusion tensor imaging study on impaired emotional self-awareness[J]. Schizophr Res, 2012, 141(2-3): 137-143.
- [37] Frith CD, Friston KJ, Herold S, et al. Regional brain activity in chronic schizophrenic patients during the performance of a verbal fluency task[J]. Br J Psychiatry, 1995, 167(3): 343-349.
- [38] Taylor LC, Puranam K, Gilmore W, et al. 17 β -estradiol protects male mice from cuprizone-induced demyelination and oligodendrocyte loss[J]. Neurobiol Dis, 2010, 39(2): 127-137.
- [39] Niino M, Hirofumi M, Fukazawa T, et al. Estrogens as potential therapeutic agents in multiple sclerosis[J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2009, 9(2): 87-94.
- [40] Gold SM, Sasidhar MV, Morales LB, et al. Estrogen treatment decreases matrix metalloproteinase(MMP)-9 in autoimmune demyelinating disease through estrogen receptor alpha(ER α)[J]. Lab Invest, 2009, 89(10): 1076-1083.
- [41] Ragerdi Kashani I, Hedayatpour A, Pasbakhsh P, et al. 17 β -Estradiol enhances the efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells on remyelination in mouse model of multiple sclerosis[J]. Acta Med Iran, 2012, 50(12): 789-797.
- [42] Kumar S, Patel R, Moore S, et al. Estrogen receptor β ligand therapy activates PI3K/Akt/mTOR signaling in oligodendrocytes and promotes remyelination in a mouse model of multiple sclerosis[J]. Neurobiol Dis, 2013, 56: 131-144.
- [43] Hirahara Y, Matsuda KI, Yamada H, et al. G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination[J]. Glia, 2013, 61(3): 420-431.

(责任编辑: 冉明会)