

# 丙戊酸钠联合雌二醇对去卵巢APP/PS1双转基因小鼠精神行为及神经元的影响

李彦臻 张威 姜婷婷 罗敏 杜焯湘 贺桂琼 骆世芳\*

(重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

**摘要** 该文旨在研究丙戊酸钠(valproic acid, VPA)和雌二醇(17 $\beta$ -Estradiol, E2)联合用药对去卵巢APP/PS1双转基因小鼠精神行为和脑内神经元的影响及可能机制。将3.5月龄雌性APP/PS1双转基因小鼠进行双侧卵巢切除(ovariectomy, OVX), 1个月后随机将小鼠分为4组, 然后单独或联合应用VPA和E2处理1个月(生理盐水组为对照)。高架十字迷宫实验结果显示, 与对照组相比, VPA和E2单独用药组小鼠进入开放臂的次数和在开臂停滞时间均有上升, 但无统计学意义( $P>0.05$ ), 而VPA+E2联合用药组小鼠较对照组有显著上升( $P<0.05$ )。旷场实验结果显示, 与对照组相比, 各药物处理组小鼠在旷场中央区活动的路程和时间显著上调( $P<0.05$ ), 这可显著改善小鼠的焦虑情绪和自主性活动变化。与对照组相比, E2组和VPA+E2组NeuN的表达量升高具有统计学意义( $P<0.05$ ), VPA组无明显改变( $P>0.05$ ); 高尔基染色结果显示, VPA+E2组树突棘密度升高较对照组和E2组均具有统计学意义( $P<0.05$ ), 是VPA组的1.39倍, 但无显著统计学差异( $P>0.05$ )。Western blot结果显示, E2组和VPA+E2组与对照组相比ER $\alpha$ 的表达量升高具有统计学差异( $P<0.05$ ), 其中VPA+E2组升高更为显著, VPA组与对照组相比没有明显差异( $P>0.05$ ); VPA+E2组小鼠脑内Wnt3a表达量与对照组、VPA组和E2组相比其升高均具有统计学意义( $P<0.05$ ); E2组和VPA+E2组 $\beta$ -Catenin含量相对对照组升高具有显著统计学意义( $P<0.05$ )。上述结果说明, 丙戊酸钠联合雌二醇治疗可缓解小鼠的焦虑情绪并延缓小鼠脑内神经元的变性, 这种改善作用可能与ER $\alpha$ -Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路激活相关。

**关键词** 阿尔茨海默病; 焦虑; 神经元; 丙戊酸钠; 雌激素

## Effects of Valproic Acid Combined with 17 $\beta$ -Estradiol on Mental Behavior and Neurons in Ovariectomized APP/PS1 Double Transgenic Mice

Li Yanzhen, Zhang Wei, Jiang Tingting, Luo Min, Du Yexiang, He Guiqiong, Luo Shifang\*

(Chongqing Medical University Neuroscience Research Center, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the effects of valproic acid (VPA) and 17 $\beta$ -Estradiol (E2) on mental behavior and neurons in ovariectomized APP/PS1 double transgenic mice. The 3.5-month-old female APP/PS1 double transgenic mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After one month, the mice were randomly divided into 4 groups, and then treated with VPA and E2 alone or in combination for one month (Saline group as

收稿日期: 2019-01-04 接受日期: 2019-01-31

国家自然科学基金(批准号: 81671257、81371221)和重庆市基础与前沿研究计划项目(批准号: cstc2016jcyjA0069)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13594338153, E-mail: 100425@cqmu.edu.cn

Received: January 4, 2019 Accepted: January 31, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671257, 81371221) and Basic and Frontier Project of Chongqing District (Grant No.cstc2016jcyjA0069)

\*Corresponding author. Tel: +86-13594338153, E-mail: 100425@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-05-10 16:38:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1637.026.html>

control). The results of the elevated plus maze test showed that compared with the control group, the number of VPA group and E2 group mice entering the open arm and the open arm stagnation time increased, but there was no statistical significance ( $P>0.05$ ), while the VPA+E2 group showed a significant increase compared with the control group ( $P<0.05$ ). The results of open field experiments showed that compared with the control group, the distance and time of activity in the central area of the drug treatment groups were significantly upregulated ( $P<0.05$ ), which could significantly improve the anxiety and autonomic activity of mice. Compared with the control group, the expression of NeuN in E2 group and VPA+E2 group was statistically significant ( $P<0.05$ ), and there was no significant change in VPA group ( $P>0.05$ ). Golgi staining showed that the dendritic spine density in the VPA+E2 group was significantly higher than that in the control group and the E2 group ( $P<0.05$ ), which was 1.39 times higher than that in the VPA group, but there was no statistically significant difference ( $P>0.05$ ). Western blot showed that the expression of ER $\alpha$  in E2 group and VPA+E2 group was significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ), and the VPA+E2 group was more significant. There was no significant difference ( $P>0.05$ ) between VPA group and control group. The expression of Wnt3a in the brain of VPA+E2 group was significantly higher than that of the control group, VPA group and E2 group ( $P<0.05$ ). The content of  $\beta$ -Catenin in E2 group and VPA+E2 group compared with the control group was statistically significant ( $P<0.05$ ). These results indicate that sodium valproate combined with 17 $\beta$ -Estradiol can alleviate the anxiety of mice and delay the degeneration of neurons in the brain of mice, which may be related to the activation of ER $\alpha$ -Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway.

**Keywords** Alzheimer's disease; anxiety; neurons; valproate acid; 17 $\beta$ -Estradiol

随着世界人口老龄化的日益加重, 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)已成为当今人类所面临的最大的全球公共健康挑战之一。该病是一种以进行性记忆力减退、认知功能障碍为主要临床表现的慢性神经退行性疾病。AD脑内大量神经元的变性丢失是其典型的病理特征之一<sup>[1]</sup>。除了具有认知功能方面的障碍之外, AD患者还存在显著的行为和精神症状(psychological and behavioral symptoms of dementia, BPSD)<sup>[2]</sup>。

丙戊酸钠(valproic acid, VPA)是具有神经保护、促进神经营养因子释放以及神经再生作用的药物。课题组前期研究发现, 丙戊酸钠对雄性APP/PS1双转基因小鼠的保护作用优于雌性小鼠, 特别是老年雌性小鼠<sup>[3-7]</sup>。流行病学报告显示, AD患病率女性远高于男性, 这与脑内雌激素减少密切相关<sup>[8]</sup>。尽管研究证明雌激素替代疗法可有效改善女性发生AD的危险性, 但其效果取决于应用时间, 对绝经早期AD患者有显著疗效, 而对绝经晚期AD患者无效甚至具有副作用。深入研究发现, 这与AD患者脑内雌激素受体含量变化有关<sup>[9]</sup>。那么上调雌激素受体表达是否能提高雌激素的疗效呢? 经查阅, 发现国际上有一篇关于使用VPA联合ER $\alpha$ 高亲和力药物处理ER $\alpha$ 阴性表达的乳腺癌细胞株的文献, 其结果发现VPA

能恢复乳腺癌细胞株ER $\alpha$ 的表达, 从而提高该细胞株对药物处理的效果<sup>[10]</sup>。那么, VPA和雌二醇联合用药能否通过互补作用对绝经后期AD模型小鼠发挥保护作用? 关于这一问题尚无文献报道。ER $\alpha$ 的减少与AD发生的高危险性密切相关, Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路在AD的发生和发展过程中发挥重要作用, 参与多种神经系统发育过程的调节, 包括突触发生及功能形态变化。多篇报道证实了ER $\alpha$ -Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路在大鼠BMSCs成骨分化过程中具有重要意义<sup>[11-12]</sup>, 那么, VPA和雌二醇联合用药是否也能通过ER $\alpha$ -Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路发挥互补作用?

鉴于此, 本研究采用丙戊酸钠联合雌二醇处理双侧卵巢切除1个月后的APP/PS1双转基因小鼠, 通过行为学、形态学及分子生物学技术, 观察联合药物对去卵巢APP/PS1双转基因小鼠的精神行为及小鼠脑内典型病理特征的影响, 同时探讨联合用药发挥作用的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

丙戊酸钠和雌二醇购自Sigma公司; 兔抗 $\beta$ -Catenin单克隆抗体及兔抗NeuN多克隆抗体购自Cell Signaling Technology公司; 兔抗ER $\alpha$ 购自

Abcam公司; 兔抗Wnt3a单克隆抗体购自Affinity Biosciences公司; 鼠抗 $\beta$ -actin单克隆抗体及ECL发光试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; 其他均为国产分析纯。

## 1.2 实验动物及鉴定

购自南京大学-南京生物医药研究院的3月龄雌性B6C3-Tg(携带人APPswe/PSEN1dE9)双转基因鼠28只, 合格证号为NO.114401300010893。将购入的三月龄小鼠鼠尾末端剪下约0.5 cm, 采用BIMAKE鼠尾鉴定试剂盒, 按试剂盒说明书提取基因组DNA进行PCR反应扩增APP和PS1, 将PCR扩增产物点样进行电泳观察。在长波紫外光下观察PCR条带, 在350 bp和608 bp处均出现条带者即为APP/PS1阳性双转基因小鼠。将阳性小鼠随机分为4组, 即Control组、VPA组、E2组以及VPA+E2组。小鼠分笼饲养于25~28 °C、12 h光照/12 h黑暗的房间内, 摄食饮水均自由, 每天观察小鼠活动情况并记录体重。本文涉及动物实验符合重庆医科大学实验动物伦理学标准。

## 1.3 卵巢切除及分组

用3.5%水合氯醛(1 mL/100 g)对3.5月龄雌性APP/PS1双转基因小鼠进行麻醉, 俯卧位固定后在背部消毒备皮, 于大腿根部与脊柱连线2/3处切开背肌约1 cm, 拉出切口处的白色脂肪团, 可见粉色蜂窝状卵巢, 结扎并摘除卵巢。同理切除对侧卵巢, 进行伤口缝合, 并进行术后消毒。1月后随机将小鼠分为4组: 对照组、VPA组(每天腹腔注射VPA 30 mg/kg)、E2组(每天皮下注射E2 2.4  $\mu$ g/只)、VPA+E2组(每天腹腔注射VPA 30 mg/kg+每天皮下注射E2 2.4  $\mu$ g/只), 药物处理1个月。

## 1.4 高架十字迷宫实验

实验开始时将小鼠从中央格面向闭合臂放入迷宫, 记录5 min内的活动情况。观察指标包括: 开放臂进入次数(必须有2只前爪进入臂内)、开放臂停留时间、闭合臂进入次数、闭合臂停留时间。计算开放臂停留时间比例、开放臂进入次数比例、高架十字迷宫中总进入次数。实验完成后将小鼠取出, 将两臂清理干净, 喷洒酒精除去气味, 最后用Xeye动物行为学软件进行数据分析。进入开放臂次数及停留时间与小鼠的焦虑情绪呈负相关, 进入开放臂次数越少, 停留时间越短, 说明小鼠的焦虑情绪越严重。

## 1.5 旷场实验

实验开始时, 将动物放入箱内底面中心, 同时

进行摄像和计时。本实验主要记录单位时间内动物在中央格的活动路程及时间, 这反映小鼠的趋避性和焦虑水平。

## 1.6 实验标本制备

行为学测试过后, 用3.5%水合氯醛麻醉小鼠, 心尖灌注生理盐水约30 mL至肝脏变白为止, 上述操作均在冰上进行。左侧脑组织-80 °C冰箱保存; 右侧放入4 °C多聚甲醛固定, 送入病理室进行石蜡包埋。石蜡切片机连续冠状切片, 厚度约5  $\mu$ m。进行高尔基染色的小鼠, 深度麻醉后直接断头取脑, 在冰上迅速剥离脑组织, 以避免损伤或压迫神经, 随后用生理盐水快速冲掉脑组织表面血液。

## 1.7 Western blot

取出于-80 °C保存的样本, 冰上裂解提取小鼠脑内蛋白质。BCA法检测蛋白质浓度并用裂解液配平。用10% SDS-PAGE凝胶电泳分离出凝胶条带, 250 mA恒流冰上湿转60 min, 将目的蛋白转移至PVDF膜, 5% BSA封闭37 °C封闭2 h, 分别加一抗后于4 °C过夜, PBST洗膜后二抗孵育50 min。在Bio-Rad公司的化学发光成像系统中进行化学发光显色, 采用Image Lab分析灰度值, 用目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin灰度值表示目的蛋白相对表达量。

## 1.8 高尔基染色

按试剂盒标示, 取组织前一天1:1配置A和B混合液, 常温避光。取组织后脑组织放入混合液中, 室温避光2周, 6 h后更换新的混合液。随后转移组织到溶液C中避光反应72 h, 在反应结束24 h后更换溶液。在-22~-20 °C的条件下, 用冰冻切片机以100  $\mu$ m厚度切片, 整齐裱片于滴有溶液C的明胶包被的载玻片上, 室温下自然晾干。用双蒸水冲洗切片2次, 每次4 min。按1:1:2的比例配制溶液D、溶液E和双蒸水混合的显色工作液。把切片置于工作液中10 min。再次双蒸水冲洗, 梯度乙醇溶液脱水, 在二甲苯中透明, 中性树脂封片, 常温晾干。

## 1.9 统计学处理

应用Prism 6软件对各组数据进行分析。本实验均采用单因素方差分析, 组内两两比较采用Tukey's test检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 去卵巢AD小鼠子宫形态及重量变化

行为学测试后, 处理小鼠同时收集子宫, 在形态上VPA组与对照组无明显差异, 但E2组和VPA+E2

组子宫肿大且有结节出现。子宫称重显示, VPA组和对照组子宫重量无明显变化( $P>0.05$ ), E2组和VPA+E2组相较VPA组和对照组子宫重量显著增加( $P<0.01$ )(图1)。

## 2.2 药物处理改善小鼠的焦虑行为

高架十字迷宫实验(elevated plus maze, EPM)检测小鼠进入开放臂总次数(total entries, OE)、进入开放臂的次数百分比(percentage of total entries, OE%)、进入开放臂的总时间(total time, OT)以及进入开放臂的时间百分比(percentage of total time, OT%)。结果显示, VPA+E2组小鼠进入开放臂次数及其百分比均明显高于对照组( $P<0.05$ ); 且VPA+E2组在开放臂停留时间及停留时间百分比显著高于对照组( $P<0.05$ ); VPA组和E2组与对照组相比OE、OT、OE%、OT%均有升高但无统计学差异( $P>0.05$ )(图2)。

## 2.3 药物处理对小鼠自主性活动及焦虑状态的影响

考虑到小鼠需要休息, 旷场实验于高架十字迷宫结束后第三天开始, 实验结果显示, 各药物处理组小鼠在旷场中间区域行进的路程明显高于对照组( $F=10.29$ ,  $P=0.0012$ ); E2组[(29.350±1.399) s]和VPA+E2组[(29.450±1.071) s]小鼠在中间区域停留的时间明显长于对照组( $F=4.89$ ,  $P=0.0191$ )(图3)。

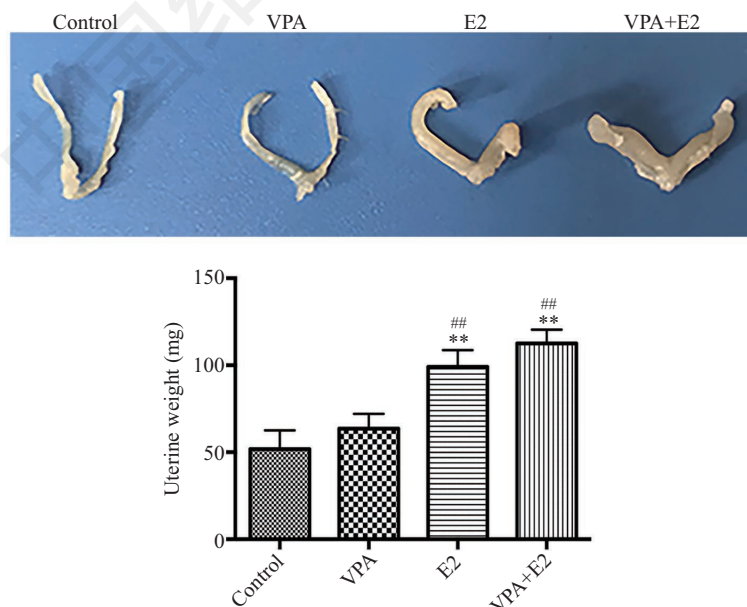
## 2.4 联合药物处理对小鼠脑内神经元的影响

对成熟神经元标志物NeuN的表达情况进行检测。免疫印迹结果显示, 各药物处理组中NeuN的表达与对照组(100.00±14.01)相比, 差异具有统计学意义( $F=9.1$ ,  $P=0.0059$ ), 以VPA+E2组(300.00±35.01)上升最为显著, 是对照组含量大约3倍之多。树突棘是神经元形成兴奋性突触的结构基础, 本研究采用高尔基染色检测树突棘的改变, 比较各组小鼠树突棘的密度, 结果如图5所示, 发现药物处理后树突棘的密度较对照组(0.03018±0.00360)有所上升( $F=8.122$ ,  $P=0.0007$ ), 其中VPA+E2组(0.07246±0.00830)上升最为显著(图4)。

## 2.5 药物处理对小鼠脑内ER $\alpha$ 、Wnt3a和 $\beta$ -Catenin表达的影响

Western blot结果显示, 各药物处理组与对照组(0.1749±0.0078)相比, ER $\alpha$ 的表达量均有所升高( $F=33.2$ ,  $P<0.0001$ )。其中, VPA(0.2669±0.0215)升高没有明显差异( $P>0.05$ ), E2组和VPA+E2组升高均具有统计学意义( $P<0.05$ ), 以VPA+E2组(0.6522±0.0662)升高最为显著(图6)。

VPA+E2组(0.3039±0.0081)小鼠脑内Wnt3a表达量较对照组显著增多( $F=35.06$ ,  $P=0.0001$ ); 相比较于对照组, E2组(1.6790±0.1403)和VPA+E2组

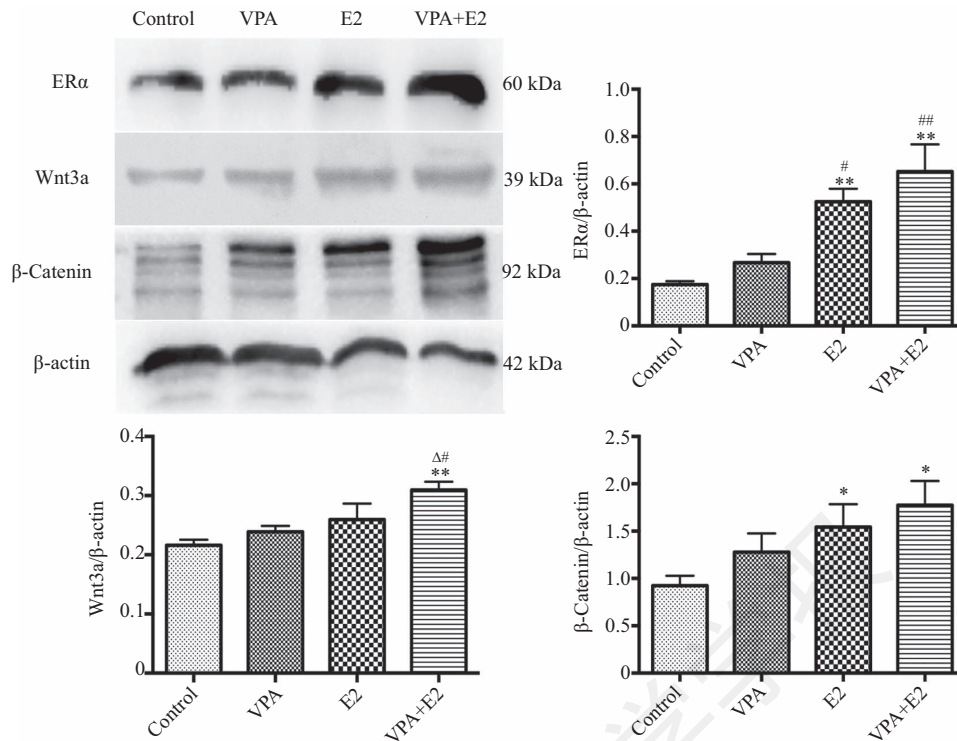


\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , 与VPA组比较。

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs VPA group.

图1 AD小鼠子宫形态和重量变化

Fig.1 Changes of the uterus and weight in AD mice

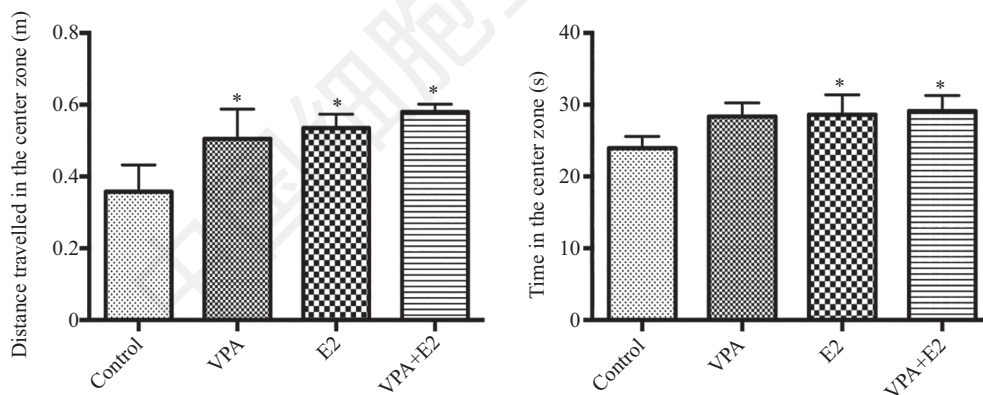


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与VPA组比较;  $\Delta P < 0.05$ , 与E2组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs VPA group;  $\Delta P < 0.05$  vs E2 group.

图2 各组AD小鼠OE、OT、OE%、OT%的比较

Fig.2 Comparison on OE, OT, OE%, OT% in the EPM test



\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

\* $P < 0.05$  vs control group.

图3 各组AD小鼠中间区域行进路程和时间

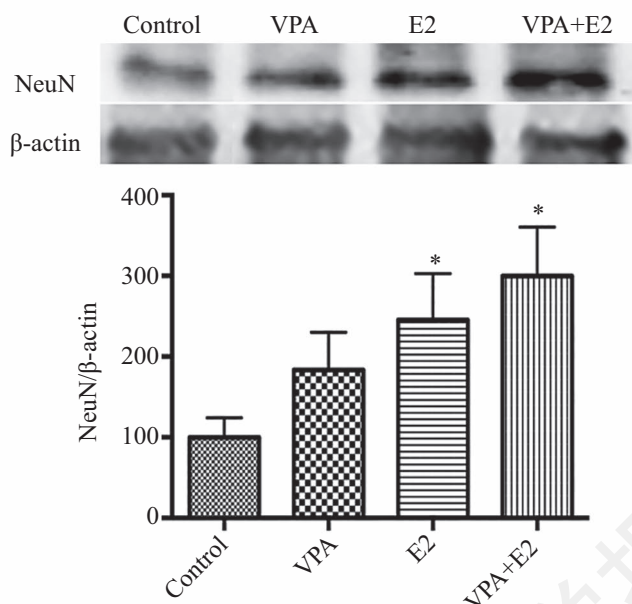
Fig.3 Comparison on distance and time in the OFT

( $1.9140 \pm 0.1486$ )小鼠脑内 $\beta$ -Catenin表达升高( $F = 9.1$ ,  $P = 0.0059$ ), 上述变化以VPA+E2组增加最为显著。

### 3 讨论

阿尔茨海默病是以进行性认知功能障碍、记忆力减退和精神行为的改变为主要临床表现特征的慢性进行性神经退行性疾病。而AD的发病具有明显

的性别差异, 绝经后女性的AD发病率远远高于同年龄的男性。目前的研究显示, 雌激素治疗对绝经早期AD患者有效, 但对绝经后期AD患者不仅无效, 而且有引发中风、生殖系统肿瘤的风险。因此, 本研究探讨丙戊酸钠和雌激素联合用药能否对绝经后期AD模型小鼠的焦虑情绪和脑内特征性病理改变有改善作用。研究选用的APP/PS1双转基因小鼠是近



\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

\* $P < 0.05$  vs control group.

图4 各组AD小鼠脑内NeuN含量

Fig.4 Comparison of NeuN protein level

年来被公认的比较成功的痴呆模型,可以对AD患者的行为缺陷和病理改变进行较为完整的模拟<sup>[13]</sup>。据文献查阅,卵巢切除后即刻到2周内相当于人类绝经后6个月内,此为绝经早期,卵巢切除3周以后即为绝经中晚期<sup>[14-15]</sup>。因此,本实验取3.5月龄雌性APP/PS1双转基因AD模型小鼠进行双侧卵巢切除,于术后1月进行药物处理,模拟绝经后期。

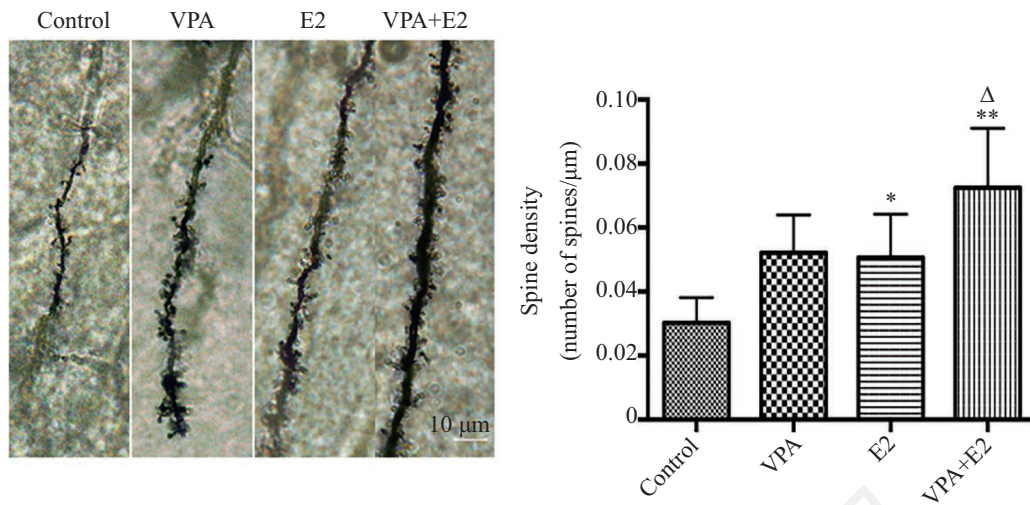
IPA于1996年定义了BPSD,即痴呆患者出现的知觉紊乱、抑郁、焦虑及行为错乱等精神行为症状。相对于痴呆的认知功能障碍,BPSD是可治疗的,因此对AD患者的BPSD的治疗研究同样重要,在AD患者中焦虑情绪最为常见<sup>[16]</sup>。本实验采用的高架十字迷宫实验和旷场实验是评价动物焦虑状态的经典行为实验<sup>[17-18]</sup>。高架十字迷宫实验和旷场实验结果显示,联合药物处理显示出明确的抗焦虑作用。

焦虑情绪的发生与AD脑内神经元丢失相关,本研究对成熟神经元标记物NeuN蛋白水平表达量进行检测,结果显示联合药物处理组的NeuN表达量显著高于对照组。神经元的存活数量直接影响神经突触的可塑性,与突触相关的树突棘是兴奋性突触形成的结构基础,是突触可塑性的关键,直接关系到记忆在大脑中的储存情况,同时可以反应神经元形态和生理成熟情况<sup>[19]</sup>。脑内树突棘形态的破坏及数量

减少会导致包括进行性学习记忆障碍的退行性疾病在内的多种神经系统疾病。通过高尔基染色我们可以检测到异常的树突和树突棘,结果验证了联合药物处理组对神经元功能的恢复更为有效。

上述结果显示,联合用药可以逆转去卵巢AD小鼠焦虑情绪,增强突触可塑性,但其发生机制尚不清楚。有研究表明,雌激素通过其 $\alpha$ 型受体介导对神经元起保护作用,雌二醇对ER $\alpha$ 有激活作用<sup>[20]</sup>。Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路是人体重要的信号转导通路之一,并且参与神经元的发育过程<sup>[21-22]</sup>。那么,联合药物对于AD小鼠的保护作用是否与ER $\alpha$ -Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路信号通路有关?本课题Western blot结果显示,联合药物处理可以增加模型小鼠脑内ER $\alpha$ 的表达量,以及Wnt通路中主要相关因子Wnt3a及 $\beta$ -Catenin的表达,即联合药物处理可能是激活ER $\alpha$ -Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路,对AD发挥保护作用。

综上所述,丙戊酸在钠雌二醇联合用药能够逆转小鼠的焦虑情绪,并一定程度上改善神经元变性,这可能是由于激活ER $\alpha$ -Wnt/ $\beta$ -Catenin通路所致。但联合药物处理对AD中认知功能障碍、老年斑和神经原纤维缠结的作用尚不明确,有待于进一步研究。

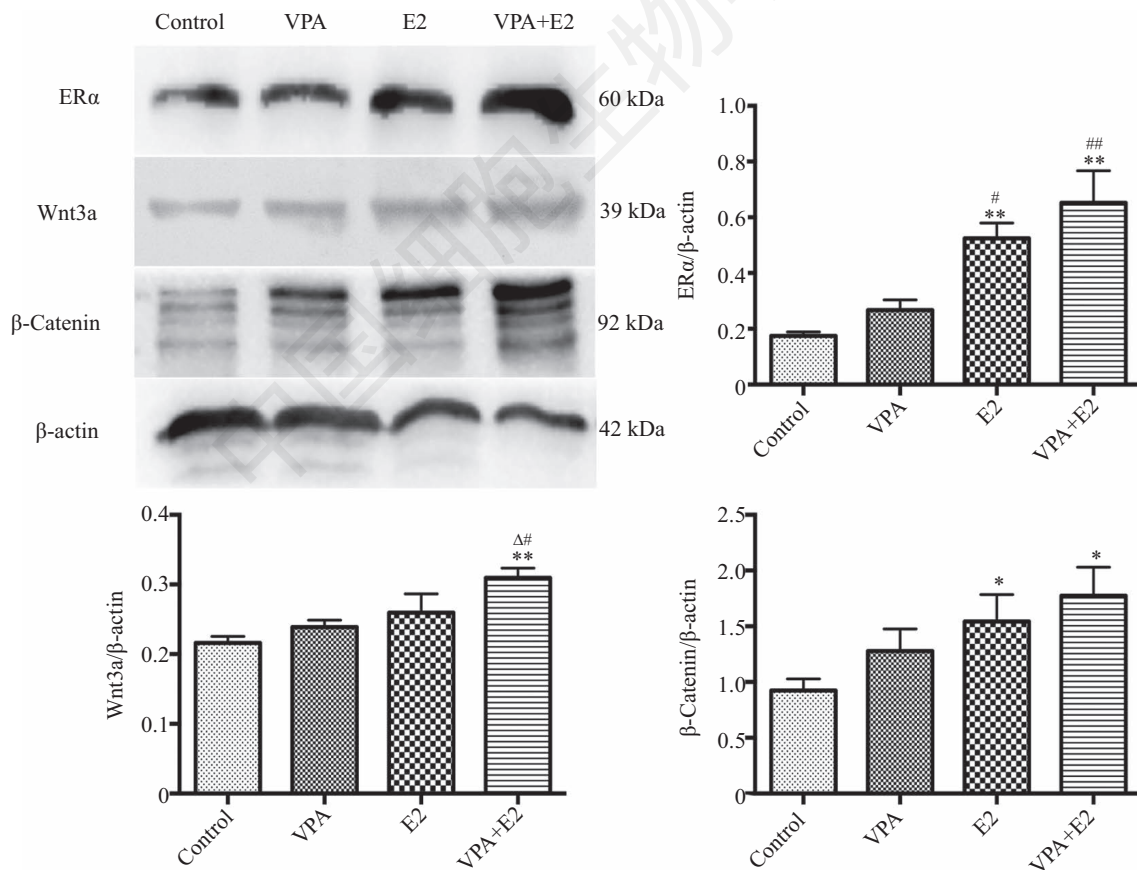


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较;  $\Delta P < 0.05$ , 与E2组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs E2 group.

图5 各组AD小鼠脑内树突棘形态和密度

Fig.5 Morphology and density of dendritic spines in each group of AD mice



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与VPA组比较;  $\Delta P < 0.05$ , 与E2组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs VPA group,  $\Delta P < 0.05$  vs E2 group.

图6 各组AD小鼠脑内ERα、Wnt3a和β-Catenin的表达

Fig.6 Comparison of ERα, Wnt3a and β-Catenin protein levels

## 参考文献 (References)

- 1 Lista S, Hampel H. Synaptic degeneration and neurogranin in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 2017; 17(1): 47.
- 2 葛高琪, 王晶晶, 齐冲, 张秀敏, 高玉霞. 阿尔茨海默病患者行为精神症状相关因素研究进展. *中国老年学杂志(Ge gaoqi, Wang Jingjing, Qi Chong, Zhang Xiumin, Gao Yuxia. Advances in research on related factors of behavioral psychosis in patients with Alzheimer's disease. Chinese Journal of Gerontology)* 2017; 37(2): 507-9.
- 3 Hong Q, Guiqiong H, Philip T, Christopher JF, Matthias S, Fang C, *et al.* Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 2008; 205(12): 2781-9.
- 4 Zhimin L, Min Z, Lei Z, Peng X, Cong S, Yanan C, *et al.* Valproic acid attenuates neuronal loss in the brain of APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice model. *Curr Alzheimer Res* 2013; 10(3): 261-9.
- 5 龙志敏, 赵蕾, 姜蓉, 贺桂琼. 丙戊酸钠对雌雄APP/PS1双重转基因小鼠行为学及老年斑的影响. *中国行为医学与脑科学杂志(Long Zhimin, Zhao Lei, Jiang Rong, He Guiqiong. The effect of valproic acid on behavior and senile plaques in the male and female APP/PS1 double transgenic mouse model. Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science)* 2011; 20(3): 205-7.
- 6 龙志敏, 赵蕾, 高宝兵, 汪克建, 贺桂琼. 丙戊酸钠对APP/PS1双重转基因小鼠脑内老年斑和神经元的影响. *中国神经精神疾病杂志(Long Zhimin, Zhao Lei, Gao Baobing, Wang Kejian, He Guiqiong. The effect of valproic acid on senile plaques and neuron in the brain of APP/PS1 double transgenic AD model mouse. Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases)* 2011; 37(8): 477-81.
- 7 赵蕾, 龙志敏, 贺桂琼, 宋冲, 楚亚楠. 丙戊酸钠对APP/PS1双重转基因小鼠脑组织Tau蛋白的影响. *第三军医大学学报(Zhao Lei, Long Zhimin, He Guiqiong, Song Chong, Chu Yannan. Effect of sodium valproate on Tau in brain tissues of APP/PS1 double transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Journal of Third Military Medical University)* 2012; 34(12): 1167-70.
- 8 Keith RL, Karen I, Tim MG. Sex differences in cognitive impairment in Alzheimer's disease. *World J Psychiatry* 2016; 6(1): 54-65.
- 9 Katia JS, Stan BF, Liisa AMG. Systemic and local administration of estradiol into the prefrontal cortex or hippocampus differentially alters working memory. *Neurobiol Learn Mem* 2006; 86: 293-304.
- 10 Fortunati N, Bertino S, Costantino L, De BM, Compagnone A, Bandino A, *et al.* Valproic acid restores ER- $\alpha$  and antiestrogen sensitivity to ER $\alpha$ -negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 314: 17-22.
- 11 Yingxing X, Chengliang W, Yan W, Peijian T, Hongting J, Nanze Y, *et al.* Epimedium-derived flavonoids modulate the balance between osteogenic differentiation and adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells of ovariectomized rats via Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway activation. *Chin J Integr Med* 2012; 18(12): 909-17.
- 12 Xinzheng L, Junhong W, Xin W, Lei Z, Li W, Xiaowen Z, *et al.* Ginsenoside Rg1 promotes bone marrow stromal cells proliferation via the activation of the estrogen receptor-mediated signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29(10): 1209-14.
- 13 McGowan E, Sanders S, Iwatsubo T, Takeuchi A, Saido T, Zehr C, *et al.* Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol Dis* 1999; 6(4): 231.
- 14 Wang JM, Hou X, Adeosun S, Hill R, Henry S, Paul I, *et al.* A dominant negative ER $\beta$  splice variant determines the effectiveness of early or late estrogen therapy after ovariectomy in rats. *PLoS One* 2012; 7(3): e33493.
- 15 Lopez-Gruoso R, Gambini J, Abdelaziz KM, Monleón D, Díaz A, Alami ME, *et al.* Early, but not late onset estrogen replacement therapy prevents oxidative stress and metabolic alterations caused by ovariectomy. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(2): 236-46.
- 16 Burgio L. Interventions for the behavioral complications of Alzheimer's disease: behavioral approaches. *Int Psychogeriatr* 1996; 8 Suppl 1: 45.
- 17 Donatti AF, Soriano RN, Leite-Panissi CRA, Branco LGS, Souza AS. Anxiolytic-like effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in rats exposed and re-exposed to the elevated plus-maze and open field tests. *Neurosci Lett* 2017; 642: 77-85.
- 18 王维刚, 刘震泽, 吴文婷, 万颖寒, 严惠敏. 旷场实验在小鼠行为分析中的应用. *中国细胞生物学学报(Wang Weigang, Liu Zhenze, Wu Wenting, Wan Yinghan, Yan Huimin. The use of open field test in the behavior analysis of mice. Chinese Journal of Cell Biology)* 2016; 33(11): 1191-6.
- 19 Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti PI. Synaptic plasticity, dementia and Alzheimer disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2017; 16(3): 220-33.
- 20 沈向华, 潘登, 范奎奎, 李强, 李婷, 杜晨光, 等. Ghrelin通过弓状核区域 $\alpha$ 型雌二醇受体神经元介导雌性小鼠采食调控. *畜牧兽医学报(Shen Xianghua, Pan Deng, Fan Kuikui, Li Qiang, Li Ting, Du Chenguang, et al. Ghrelin mediate female mice food intake via affecting on estrogen receptor-alpha neuro in arcuate nucleus. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences)* 2017; 48(12): 2399-406.
- 21 盛宝英, 姜尧佳, 李莹, 任秀敏, 教伟, 王增冕, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin信号调控对海马区A $\beta$ 1-42诱导的神经干细胞损伤的影响. *黑龙江医药科学(Sheng Baoying, Jiang Yaojia, Li Ying, Ren Xiumin, Jiao Wei, Wang Zengmin, et al. Effect of Wnt/ $\beta$ -catenin signal regulation on neural stem cell injury induced by A $\beta$ 1-42 in hippocampus. Heilongjiang Medicine And Pharmacy)* 2017; 40(6): 101-3.
- 22 Catriona Y, Logan, Roel N. The WNT signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20(20): 781-810.