

# 雌激素缺乏对痴呆小鼠学习记忆及海马区细胞增殖和成熟的影响

罗敏<sup>1,2</sup> 赵月阳<sup>1</sup> 杜焯湘<sup>1</sup> 李彦臻<sup>1</sup> 贺桂琼<sup>1,3</sup> 汪克建<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016; <sup>2</sup>遂宁市中医院, 遂宁 629000;

<sup>3</sup>重庆医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 重庆 400016)

**摘要** 该文旨在研究雌激素缺乏不同时间段对APP/PS1双转基因小鼠学习记忆及海马区细胞增殖和成熟的影响及探究潜在的机制。将3月龄APP/PS1双转基因AD雌性小鼠行双侧卵巢切除(AD-OVX), 以假手术AD小鼠(AD-Sham)及同月龄正常野生型小鼠(WT)作为对照, 于术后1周(模拟绝经早期)和3月(模拟绝经中晚期), Morris水迷宫行为测试结果显示, 在APP/PS1双转基因AD小鼠中, OVX后1周, AD-OVX组与AD-Sham组比较, 其逃避潜伏期、搜索路径以及穿越平台的次数无明显差异( $P>0.05$ ); 而OVX后3月, AD-OVX组小鼠找到平台的时间和搜索路径显著延长( $P<0.05$ ), 穿越平台的次数也相应减少( $P<0.05$ ); 子宫重量结果、EDU细胞增殖状况、老年斑、脑内NeuN蛋白和芳香酶的变化水平分别显示, 在APP/PS1双转基因AD小鼠中, OVX后1周, AD-OVX组与AD-Sham组比较, 循环雌激素水平无明显变化; 小鼠脑内未见老年斑; 小鼠海马区新生阳性细胞数量和NeuN的表达反应性增多( $P<0.05$ ); 此时小鼠脑内芳香酶表达也呈反应性升高( $P<0.05$ )。而OVX后3月, AD-OVX组小鼠循环雌激素水平明显降低( $P<0.05$ ); 脑内老年斑显著增加( $P<0.05$ ); 小鼠海马区新生阳性细胞数量和NeuN的表达减少( $P<0.05$ ); 此时小鼠脑内芳香酶水平也显著降低( $P<0.05$ )。以上结果说明, 雌激素缺乏早期可反应性地增加痴呆小鼠海马区细胞的增殖和成熟, 对小鼠学习记忆无影响; 但随着雌激素缺乏时间的延长, 痴呆小鼠出现学习记忆的损害及海马区细胞增殖和成熟减少; 该作用可能与脑内芳香酶水平的变化密切相关。

**关键词** 雌激素缺乏; 阿尔兹海默病; 海马依耐性学习记忆; 细胞增殖; 神经元成熟; 芳香酶

## Effects of Estrogen Deficiency on Learning and Memory and Cell Proliferation and Maturation in Hippocampus of Dementia Mice

Luo Min<sup>1,2</sup>, Zhao Yueyang<sup>1</sup>, Du Yexiang<sup>1</sup>, Li Yanzhen<sup>1</sup>, He Guiqiong<sup>1,3</sup>, Wang Kejian<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Center of Neuroscience, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

<sup>2</sup>Suining Municipal Hospital of TCM, Suining 629000, China;

<sup>3</sup>Department of Human Anatomy, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** To investigate the effects of different estrogen deficiency time on learning, memory and hippocampal cell proliferation, maturation in APP/PS1 double transgenic mice, exploring its possible mechanisms, 3-month-old APP/PS1 double transgenic AD female mice underwent bilateral ovariectomy (AD-OVX), sham-operated AD mice (AD-Sham) and wild-type mice (WT) of the same age were used as controls. 1 week ovariec-

收稿日期: 2019-02-26 接受日期: 2019-04-24

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81671257)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13594627919, E-mail: wangkejian@cqmu.edu.cn

Received: February 26, 2019 Accepted: April 24, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671257)

\*Corresponding author. Tel: +86-13594627919, E-mail: wangkejian@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-08-12 15:04:25

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1504.020.html>

tomy (simulating early menopause) and 3 months (simulating mid-late menopause) respectively, Morris water maze showed that in APP/PS1 double transgenic AD mice, 1 week after OVX, there was no significant difference in escape latency, escape length and passing times between AD-OVX group and AD-Sham group ( $P>0.05$ ); However, after OVX 3 months, the time and escape length of the AD-OVX group were significantly prolonged ( $P<0.05$ ), and the passing times were also decreased ( $P<0.05$ ). uterine weight, EDU, immunofluorescence, Western blot were used to reflect estrogen levels, cell proliferation status, senile plaques, NeuN protein and aromatase levels in the brain of APP/PS1 double transgenic mice respectively. In APP/PS1 double transgenic AD mice, 1 week after OVX, circulating estrogen level was no obvious change. No senile plaques were found in the brain of mice. The number of neonatal positive cells in the hippocampus of mice and the expression of NeuN were increased in reactivity ( $P<0.05$ ). At this time, the expression of aromatase was also increased ( $P<0.05$ ). However, after OVX 3 months, the circulating estrogen level was significantly decreased ( $P<0.05$ ). The senile plaques in the brain were increased significantly ( $P<0.05$ ). The number of neonatal positive cells and the expression of NeuN in the hippocampus of mice were significantly decreased ( $P<0.05$ ). At this time, the level of aromatase was decreased significantly ( $P<0.05$ ). This results indicate that the early estrogen deficiency increases the proliferation and maturation of hippocampus cells in dementia mice reactively, and has no effect on learning and memory in mice. However, with the prolongation of estrogen deficiency, learning and memory impairment and proliferation and maturation cells in hippocampus are reduced in dementia mice. This effect may be closely related to changes in aromatase levels in the brain.

**Keywords** estrogen deficiency; Alzheimer's disease; hippocampus-dependent learning and memory; cell proliferation; neuronal maturation; aromatase

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又叫老年性痴呆,是一种与年龄高度相关、以记忆和认知功能逐渐丧失为主要临床表现的最常见和最严重的脑变性疾病之一<sup>[1]</sup>。AD脑的特征性病理变化是:细胞外 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$  peptide, A $\beta$ )沉积形成的老年斑(senile plaques, SP)、细胞内tau蛋白过度磷酸化聚集形成神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT),以及这些病变引起的海马和大脑皮质的突触减少和记忆性神经元的变性、丢失等<sup>[2-3]</sup>。目前为止尚未找到有效阻止和延缓AD发生发展的治疗措施。

除年龄外,性别是AD的第二大主要危险因素。大量流行病学调查显示,AD发病具有明显的性别差异:绝经后女性AD的发病率比同年龄男性高约3倍<sup>[4]</sup>。然而到目前为止,导致这种性别差异的原因仍不清楚。雌激素具有促进记忆性胆碱能神经元的生长和生存、抑制A $\beta$ 的生成及毒性、加强神经营养等作用<sup>[5]</sup>。绝经后女性脑内雌激素的缺乏被认为是女性罹患AD的一个关键危险因素<sup>[6]</sup>。AD女性患者脑内雌激素水平较低,这被认为与AD脑内芳香酶受损相关<sup>[7-8]</sup>。芳香酶是雌激素生物合成的限速酶,在脑组织中,它在神经可塑性和神经保护方面的作用越来越引起人们的关注<sup>[9]</sup>。

目前大量研究已经证实,海马是与学习记忆密切相关的脑区<sup>[10-12]</sup>。在AD形成过程中,海马是大脑受损的主要区域,也是最早受影响的区域之一,其病理变化特别明显<sup>[13-14]</sup>。

那么雌激素缺乏是否影响海马区细胞的增殖和成熟,进而影响AD小鼠学习记忆功能和老年斑的呢?如果能,其机制如何?为弄清上述问题,本实验以APP/PS1双转基因AD模型小鼠为研究对象,于双侧卵巢切除术(ovariectomy, OVX)后1周(模拟绝经早期)和3月(模拟绝经中晚期),分别采用形态学和分子生物学技术,检测OVX对AD小鼠学习记忆、脑内老年斑、海马区细胞增殖和成熟以及脑内芳香酶的变化,以期AD的发病机制提供新的实验室依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雌性3月龄APP/PS1双转基因小鼠([D000268] B6/JNju-Tg(APP<sup>swe</sup>, PSEN1<sup>dE9</sup>)/Nju)购自南京大学-南京生物医药研究院。将24只雌鼠随机分为2组,即假手术组(AD-Sham组)12只和手术组(AD-OVX组)12只,手术组又根据双侧卵巢切除时间点的不同,随机分为OVX 1周组(OVX 1W, 6只)模拟绝经早期

和OVX 3月组(OVX 3M, 6只)模拟绝经中晚期, 每组分别设立正常野生型WT组(6只)。每笼小鼠以3~5只饲养于重庆医科大学动物中心IVC转基因动物室, 饲养室温度为(23±1) °C, 湿度为(55±5)%, 光照与黑暗循环时间为12 h, 动物可自由觅食与饮水。本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

## 1.2 主要实验试剂和仪器

Aromatase兔多克隆抗体购自美国 Affinity公司(1:1 000, #DF6884); 4G8鼠单克隆抗体购自美国圣地亚哥 Biolegend公司(1:250, #800704); NeuN兔多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司(1:1 000, #24307);  $\beta$ -actin鼠单克隆抗体购自美国 Sigma公司(1:1 000, #A5441); HRP标记山羊抗鼠二抗购自美国 ABClonal 公司(1:6 000, #AS003); HRP标记山羊抗兔二抗购自美国 Affinity公司(1:10 000, #S0001); Cy3山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自美国 Abbkine公司(1:200, #A22210-1); EdU细胞增殖检测试剂盒购自中国上海 RIBOBIO 锐博公司; 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 组织蛋白裂解液(P0013B)、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0010S)均购自上海碧云天生物技术有限公司; 超敏ECL化学发光底物试剂盒购自北京4A Biotech公司; 其他均为国产分析纯, 购自上海碧云天生物技术有限公司。实验仪器包括: 冷冻高速离心机(Thermo Fisher, 美国)、多功能酶标仪(Thermo, 美国)、化学发光成像系统(Bio-Rad, 美国)、荧光显微镜(Leica, 德国)。

## 1.3 动物模型构建—卵巢切除术(OVX术)

取3月龄雌性APP/PS1双转基因AD雌鼠( $n=24$ 只)和野生型雌鼠( $n=24$ 只)进行双侧卵巢切除, 每组设立假手术组。将小鼠用0.1%戊巴比妥深度麻醉, 备皮, 络合碘消毒皮肤, 以小鼠两侧后肢大腿根部上缘连线上0.5 cm与背部后正中中线交点为中心, 沿背部后正中中线作一长0.5~1.0 cm的皮肤切口, 沿皮下组织分别向左右游离手术切口皮肤, 先将皮肤切口向左侧水平牵开约0.5 cm, 透过菲薄的肌层, 在切口视野中可见乳白色发亮的脂肪团, 紧靠肾脏下极, 这是寻找卵巢重要的解剖标志。用镊子提起脂肪团表面的肌层, 沿腰大肌外侧缘用眼科剪纵形剪开肌层, 长约0.5 cm, 在该脂肪团中即可找到小鼠左侧卵巢。行卵巢切除后, 用5/0丝线单纯缝合一针以修复剪开的肌层, 同法切除小鼠右侧卵巢。修复剪开的肌层,

最后用5/0丝线一针缝合皮肤切口。假手术组经历了卵巢切除的相同步骤。术后给与常规饮食饮水保暖等措施, 密切观察小鼠的恢复情况。

## 1.4 EDU细胞增殖检测药物注射

EdU(5-Ethynyl-2'-deoxyuridine)是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶(T)渗入正在复制的DNA分子中, 通过基于EdU与Apollo®荧光染料的特异性反应快速检测细胞DNA复制活性。严格按照RIBOBIO锐博EdU细胞增殖检测使用说明进行, EdU初始给药量为5 mg/kg, 用0.01 mol/L PBS稀释, 浓度为0.5~1.0 mg/mL。每天固定于下午18时给小鼠腹腔注射1次, 总共注射3天, 最后将小鼠心尖灌注取材。

## 1.5 Morris水迷宫测试

实验时, 将水池内冲水, 并将白色无毒染料加入水中, 使水成为白色浑浊状, 水深为45 cm, 水温为(23±2) °C。实验方法: (A)定位航行实验(place navigation test), 用于测量小鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力(实验历时6天)。第1天为可视平台实验, 平台露出水面1 cm, 以便小鼠发现平台。按程序将小鼠放入水中, 通过影像跟踪系统记录实验过程中小鼠的运动行为, 包括在60 s内找到平台的时间——逃避潜伏期(escape latency)及所经过的路程(escape length)。若小鼠在60 s结束时没有找到平台, 则帮助其找到平台, 并允许小鼠在台上学习记忆30 s。第2~6天为隐蔽平台实验, 整个过程固定平台位置, 让小鼠从不同入水点入水。训练方式与可视平台实验相同。(B)空间探索实验(spatial Probe test): 第7天将平台从水中移走, 在同一入水点将小鼠面向池壁放入水中, 使小鼠在水池内搜索平台60 s, 观察小鼠跨过平台相应位置的次数, 作为评价小鼠空间学习记忆能力的指标。

## 1.6 动物标本制备

在EDU药物注射72 h后, 深度麻醉小鼠, 将小鼠置于解剖位, 用预冷的0.9%生理盐水进行充分地心尖灌注后, 于冰上快速断头取脑, 一半脑组织立即保存在-80 °C低温冰箱, 用于分子病理学检测; 一半脑组织在4%的多聚甲醛溶液中后固定, 4 °C冰箱过夜后取出, 用0.01 mol/L的PBS配置10%、20%、30%的蔗糖溶液, 进行梯度脱水, 每个梯度见脑组织沉底后即可换下一梯度, 共72 h。脱水完成后, 将脑组织用OCT包埋剂包埋固定, 在温度为-25 °C冰冻切片

机下,连续冠状位切片,厚度为10  $\mu\text{m}$ 。将包含有海马区域的脑片依次放入装有0.01 mol/L PBS的6孔板中,贴片,晾干后用于后续组织化学染色。

### 1.7 甲硫素染色和免疫染色(荧光和组化)

将保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的脑组织切片取出,选取相同切面,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵箱复温30 min;染老年斑需要将切片在88%的甲酸溶液中,室温孵育10 min;5%胎牛血清封闭,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min(勿洗);分别加入一抗工作液,置于湿盒,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复温60 min;加入相应的二抗工作液Cy3(1:200),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,避光;加入DAPI工作液染核,室温7 min;抗荧光淬灭封片剂封片,每一步骤的衔接都需用0.01 mol/L PBS清洗。甲硫素染色按照规范的标准说明操作。对于EDU细胞增殖检测严格按照说明书方法进行。免疫组织化学染色按照试剂盒参考进行。结果在荧光显微镜下采图并计数。

### 1.8 Western blot 检测

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出200 mg的冰冻脑组织,放进提前预冷的匀浆器中,加入10 mL/g的RIPA和100  $\mu\text{L/g}$ 的PMSF溶液,充分匀浆,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温离心机12 000 r/min,离心15 min,取上清,再次离心,取上清。BCA法测蛋白浓度。按照40  $\mu\text{g}$ 的上样量依次上样;10% SDS-PAGE凝胶电泳,80 V,待样品到达分离胶的位置,将电压调至120 V;电转,按照纤维帕、滤纸、胶、PVDF膜、滤纸、纤维帕的顺序放入电转夹中,250 mA;电转时间根据检测目的蛋白的分子量来决定。5% BSA封闭2 h;放入一抗工作液中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBST洗膜,10 min $\times$ 3次;放入相应二抗工作液中,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育40 min;洗膜,20 min $\times$ 3次;ECL显影,用Bio-Rad公司的Image Lab软件对条带进行灰度值检测,结果用计

算公式:目的蛋白的相对表达量=目的蛋白光密度值/ $\beta$ -actin光密度值。

### 1.9 统计学方法

应用GraphPad Prism 5统计软件,本实验中所有计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,两组均数比较用 $t$ 检验,水迷宫实验首先对重复测量数据在各时间点之间的关系进行球形检验,其检验的结果均为 $P>0.05$ ,说明重复测量数据之间实际上不存在相关性,资料满足Huynh-Feldt条件,使用重复测量设计资料的双因素方差分析处理资料。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 绝经模型的构建

我们根据上海实验动物科学中心对小鼠卵巢切除术入路的改良的文献参考,缩小创面,减少出血,降低对小鼠的伤害,顺利找到小鼠的卵巢并切除,该模型的构建已非常成熟,也是国际上公认模拟绝经的模型(图1)。

### 2.2 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠子宫的变化情况

结果如图2所示,OVX后对子宫大小的影响:OVX 1周组AD小鼠子宫与假手术组和正常小鼠子宫比较,子宫的体积已开始缩小,子宫重量降低,但无统计学意义( $P>0.05$ );随着OVX时间延长至3个月,到绝经晚期,子宫的体积明显缩小,重量也急剧降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.3 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠空间学习记忆的变化

Morris水迷宫如图3显示,OVX 1周后,与正常野生型小鼠相比,AD组小鼠找到平台的平均潜伏

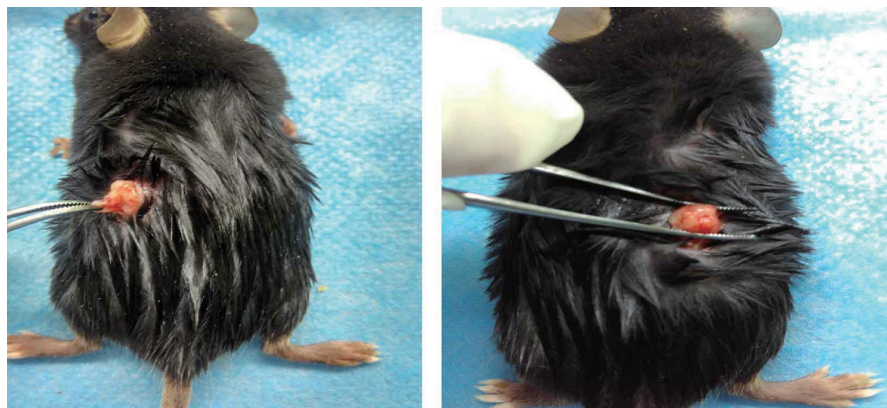
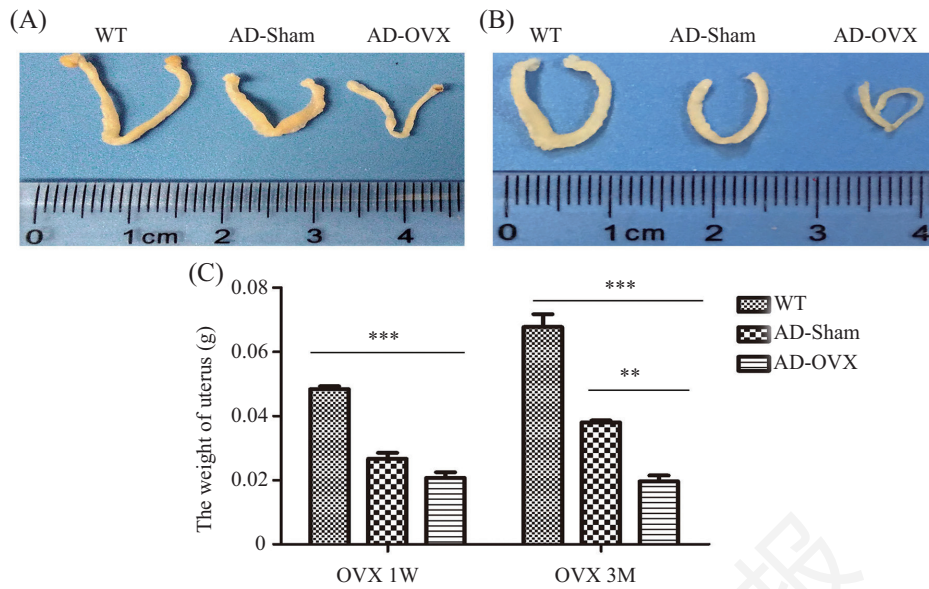


图1 双侧卵巢切除模型构建示意图

Fig.1 Diagram of ovariectomy model

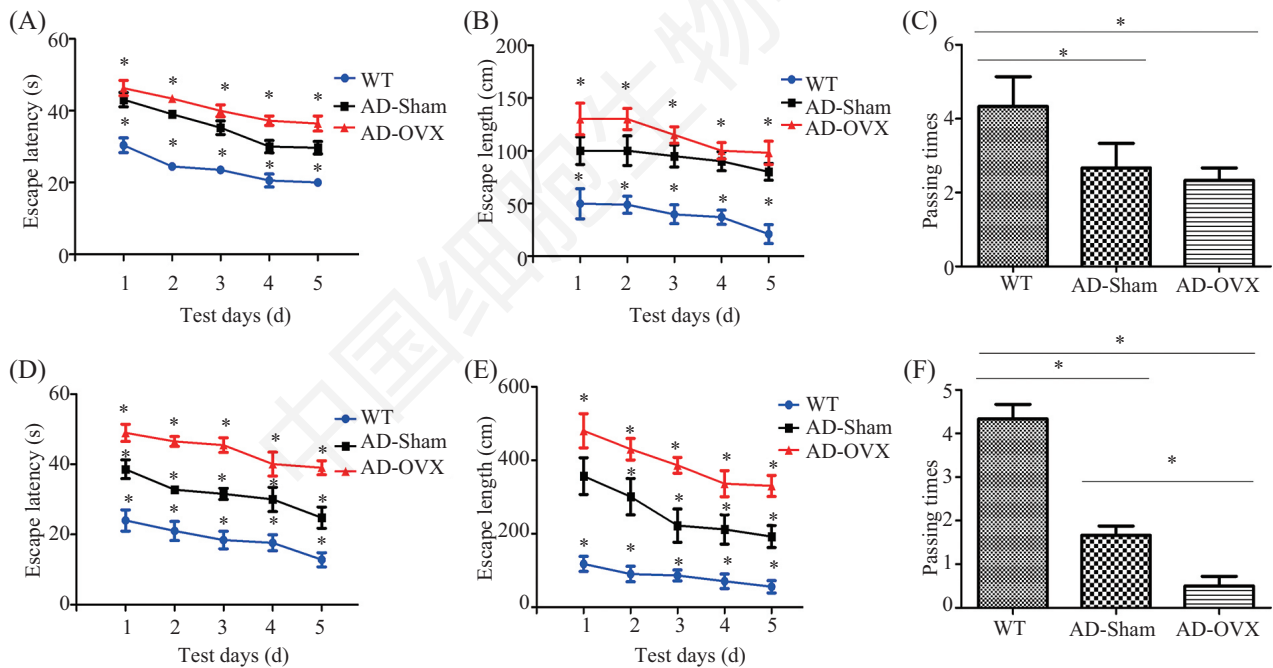


A: 双侧卵巢切除1周后子宫大小变化; B: 双侧卵巢切除3个月后子宫大小变化; C: 统计结果分析, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: the change of uterine size 1 week after bilateral ovariectomy; B: the change of uterine size 3 months after bilateral ovariectomy; C: statistical analysis, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图2 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠子宫的变化

Fig.2 Effect of different time of estrogen deficiency on uterus in APP/PS1 mice



A~C: 卵巢切除1周各组小鼠逃避潜伏期、搜索路径及穿越平台的次数; D~F: 卵巢切除3个月各组小鼠逃避潜伏期、搜索路径及穿越平台的次数。\* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

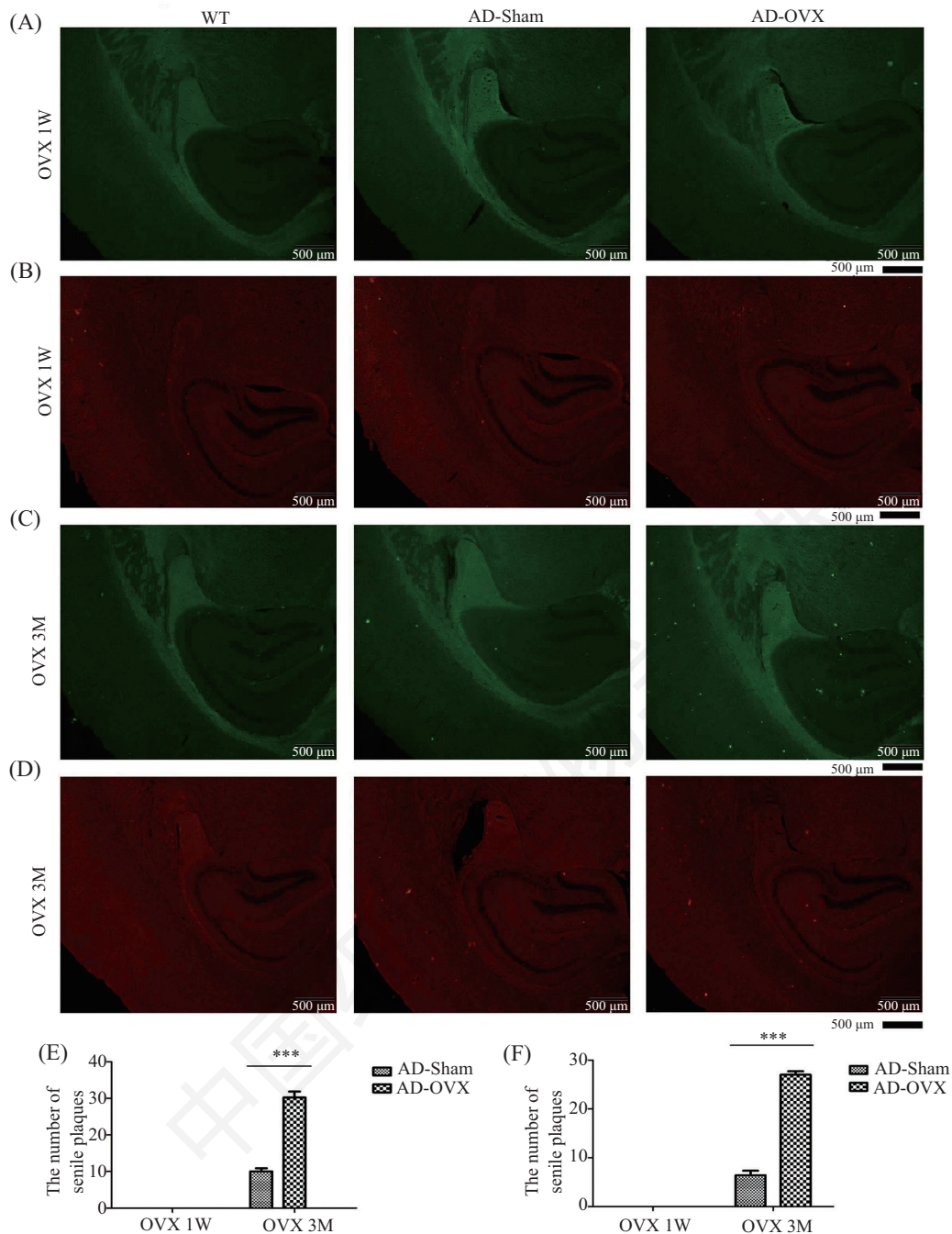
A~C: escape latency, escape length and number of times of crossing the platform in each group after 1 week ovariectomy; D~F: escape latency, escape length and number of crossing the platform in each group after ovariectomy for 3 months. \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ .

图3 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠空间学习记忆的变化

Fig.3 Effect of different time of estrogen deficiency on spatial learning and memory in APP/PS1 mice

期、搜索路径显著延长, 穿越平台的次数也减少; 与AD-Sham组相比, AD-OVX组小鼠找到平台的平均潜伏期、搜索路径及穿越平台的次数无明显

差异( $P > 0.05$ )。随着OVX时间的延长, 至OVX 3个月, AD-OVX组小鼠找到平台的时间和经过的路程显著延长( $P < 0.05$ ), 穿越平台的次数也相应减少



A: 卵巢切除1周甲硫素染色; B: 卵巢切除1周4G8(老年斑)染色; C: 卵巢切除3个月甲硫素染色; D: 卵巢切除3个月4G8(老年斑)染色; E: 定量分析Aβ的沉积情况; F: 定量分析老年斑的聚集情况。\*\*\* $P<0.001$ 。

A: methionine staining for 1 week after ovariectomy; B: 4G8 staining for 1 week after ovariectomy; C: methionine staining for 3 months after ovariectomy; D: 4G8 staining for 3 months after ovariectomy; E: quantitatively analyze the deposition of Aβ; F: quantitative analysis of plaques in the elderly. \*\*\* $P<0.001$ .

图4 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠脑内老年斑的变化

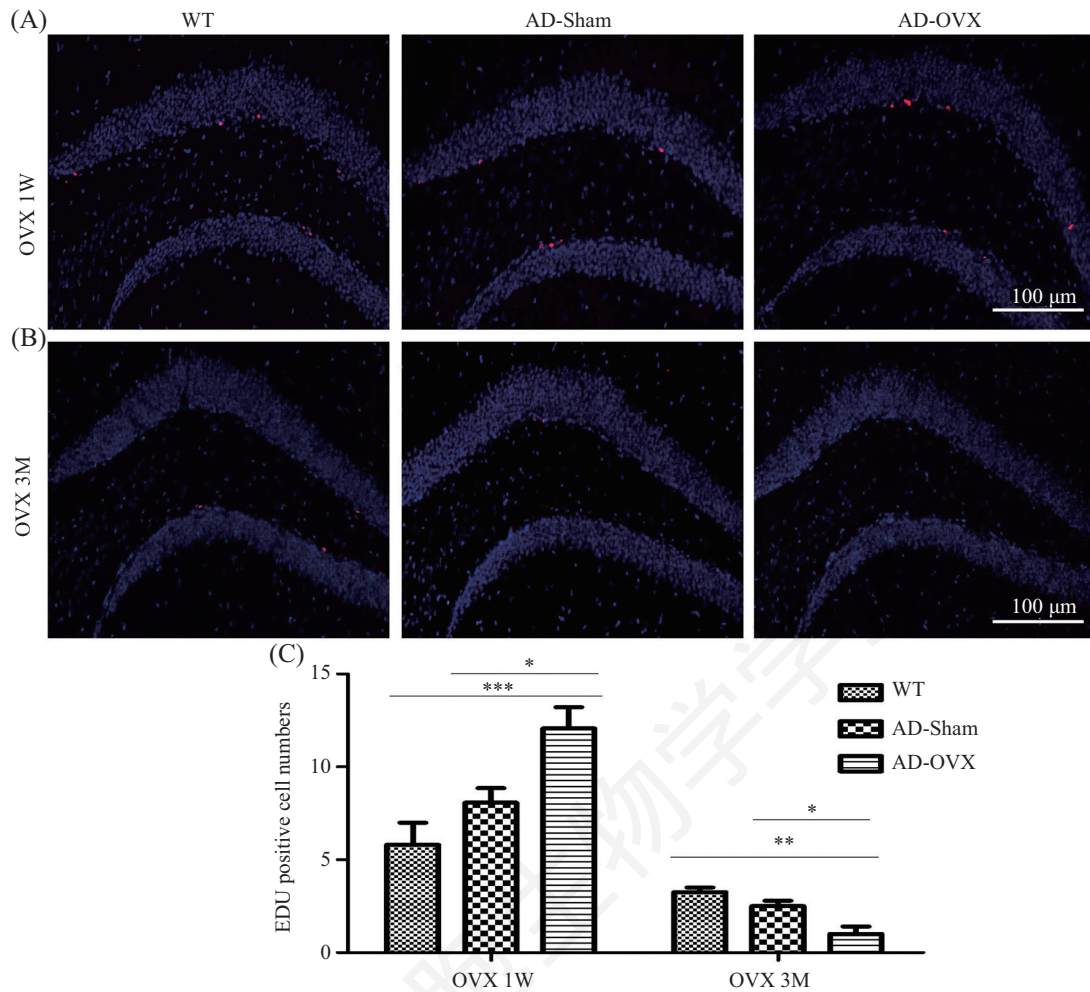
Fig.4 Effect of different time of estrogen deficiency on senile plaques in the brain of APP/PS1 mice

( $P<0.05$ )。以上结果提示,长时间的雌激素缺乏可加重损害AD小鼠的学习记忆功能。

#### 2.4 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠脑内老年斑的变化

图4免疫组织化学结果显示,OVX后1周,各组

小鼠脑内均未检测到老年斑;而OVX后3个月,绝经晚期,AD-OVX组小鼠脑内老年斑的数量及斑块面积明显大于AD-Sham组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),正常小鼠脑内未见老年斑。以上结果提示,长时间的雌激素缺乏可增加AD小鼠脑内老年斑的沉积。



A: 卵巢切除1周海马区EDU细胞增殖检测; B: 卵巢切除3个月海马区EDU细胞增殖检测; C: 定量分析卵巢切除1周、3个月海马区EDU细胞增殖数量的变化, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: detection of EDU cell proliferation in hippocampus for 1 week after ovariectomy; B: detection of EDU cell proliferation in hippocampus for 3 months after ovariectomy; C: quantitative analysis of the proliferation of EDU cells in hippocampus at 1 week and 3 months after ovariectomy, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图5 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠脑内海马区细胞增殖的变化

Fig.5 Effect of different time of estrogen deficiency on cell proliferation in hippocampus of APP/PS1 mice

## 2.5 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠脑内海马区细胞增殖的变化

EDU细胞增殖检测结果如图5显示, OVX后1周, AD-OVX组脑内海马区新生细胞数量较AD-Sham组和正常小鼠有明显的增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 卵巢切除后3个月, AD-OVX组脑内海马区EDU阳性细胞数量较AD-Sham组和正常小鼠有明显的降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。以上结果提示, 长时间的雌激素缺乏可减少AD小鼠脑内海马区新生细胞数量。

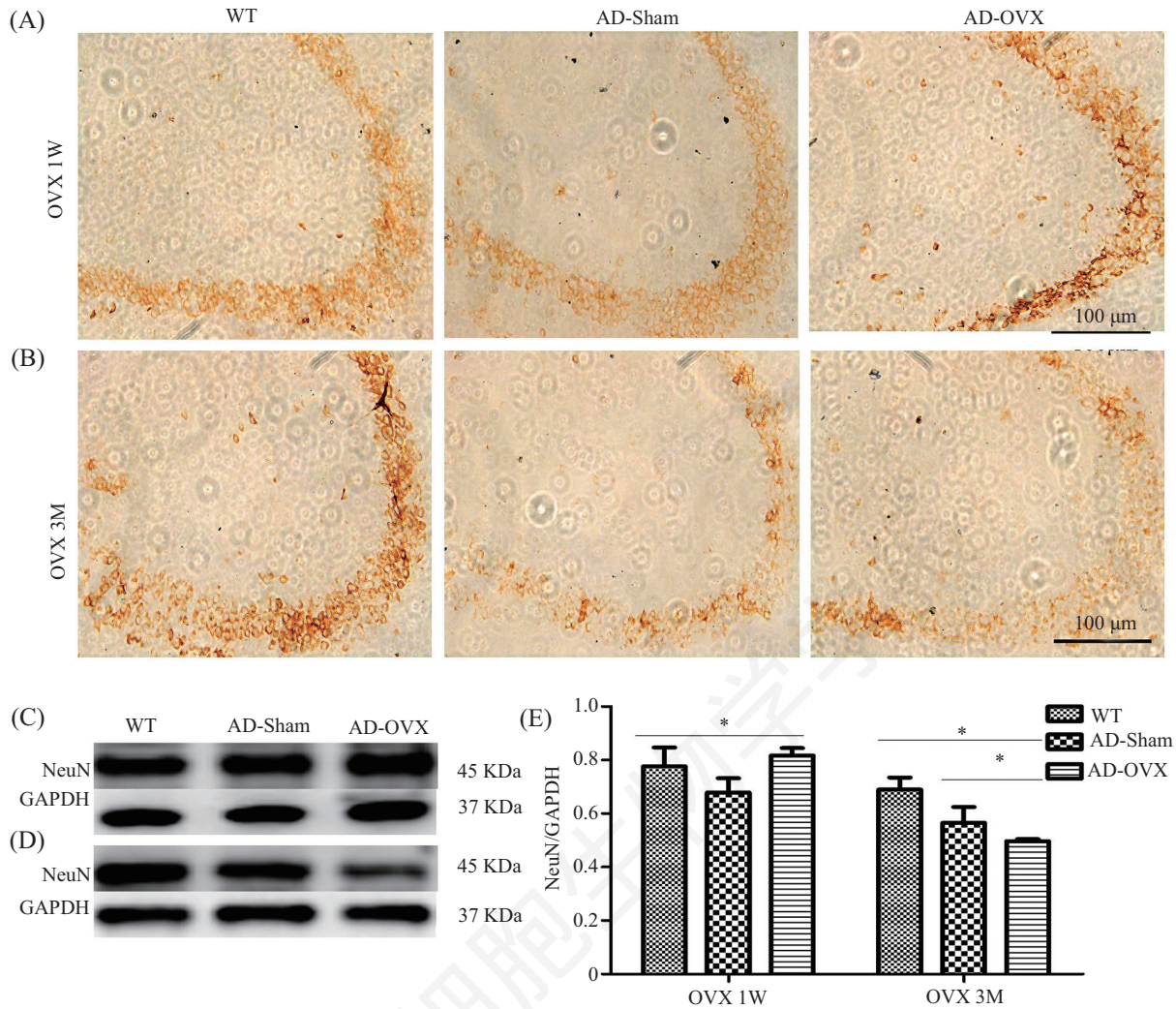
## 2.6 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠脑内成熟神经元的变化

图6结果显示, OVX后1周, AD-OVX组脑内NeuN

的表达水平较AD-Sham组有增加, 蛋白水平和免疫组织化学结果一致; OVX后3个月, AD-OVX组脑内NeuN的表达较AD-Sham组有明显的降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。以上结果提示, 长时间的雌激素缺乏可减少AD小鼠脑内海马区NeuN的表达量。

## 2.7 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1脑内芳香酶的变化

图7结果显示, 作为雌激素合成的限速酶, OVX 1周组AD小鼠脑内芳香酶的表达水平较AD-Sham组和正常对照组有显著的增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而OVX 3个月组较AD-Sham组和正常对照组有了明显的降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A、B: 免疫组织化学染色检测卵巢切除1周、3个月对海马CA3区成熟神经元NeuN的影响; C、D: Western blot检测卵巢切除1周、3个月小鼠脑内NeuN的变化; E: 定量分析卵巢切除1周、3个月NeuN的相对表达量, \* $P < 0.05$ 。

A,B: the effect of ovariectomy for 1 week and 3 months on NeuN in hippocampal CA3 region was detected by histochemical staining; C,D: changes of NeuN level in brain of mice after ovariectomy for 1 week and 3 months by Western blot; E: quantitative analysis of the relative expression of NeuN in 1 week and 3 months after ovariectomy, \* $P < 0.05$ .

图6 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1小鼠脑内成熟神经元的变化

Fig.6 Effect of different time of estrogen deficiency on NeuN expression in hippocampus of APP/PS1 mice

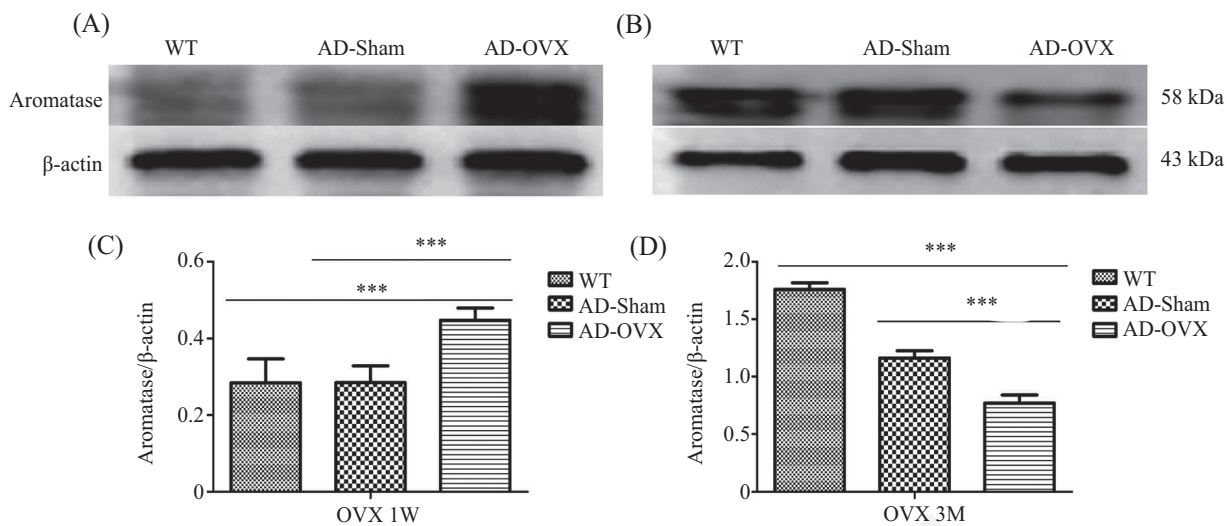
### 3 讨论

大量证据和流行病学调查表明女性比男性更容易患老年痴呆, 绝经后女性AD的发病率比同年龄男性高约3倍<sup>[4]</sup>, 这其中主要的原因之一是绝经后女性雌激素分泌水平骤降, 雌激素缺乏被认为是女性罹患AD的高危险因素<sup>[6]</sup>。但是到目前为止, 雌激素缺乏引起AD的机制仍不清楚。大量研究报道, 在许多脑损伤疾病当中, 芳香酶可以通过上调其表达量来保护神经元免遭死亡<sup>[7-8]</sup>。研究发现, 女性AD患者脑内低水平雌激素很可能是由于脑内芳香酶的表达受损所致<sup>[7]</sup>。而与此一致的是, 有研究从基因层面发

现, 脑部芳香酶基因变异可能是导致许多疾病的危险因素, 这其中就包括AD<sup>[15-16]</sup>。

小鼠卵巢切除6天以内相当于女性绝经早期<sup>[17]</sup>, 小鼠卵巢切除3个月以后相当于女性绝经晚期<sup>[18]</sup>。基于以上的研究, 本实验采用国际上公认的双侧卵巢切除术来模拟绝经状态<sup>[19]</sup>。选用3月龄体成熟的成年小鼠为实验对象, 分别选取双侧卵巢切除后1周、3个月来模拟人类绝经早期和晚期。在目前的研究中, 子宫重量被广泛用作生物测定来确认卵巢产生的激素水平, 子宫重量的变化是实验性OVX和雌激素治疗功效的独立指标<sup>[20]</sup>。本实验结果发现,





A: Western blot检测卵巢切除1周小鼠脑内芳香酶的变化; B: Western blot检测卵巢切除3个月小鼠脑内芳香酶的变化; C: 卵巢切除1周Aromatase相对表达量; D: 卵巢切除3个月Aromatase相对表达量。\*\*\* $P < 0.001$ 。

A: changes of aromatase level in brain of mice after ovariectomy for 1 week by Western blot; B: changes of aromatase level in brain of mice after ovariectomy for 3 months by Western blot; C: relative expression of Aromatase at 1 week after ovariectomy; D: relative expression of Aromatase at 3 months after ovariectomy. \*\*\* $P < 0.001$ .

图7 雌激素缺乏不同时间段APP/PS1脑内芳香酶的变化

Fig.7 Effect of different time of estrogen deficiency on aromatase level in the brain of APP/PS1 mice

OVX后1周AD小鼠的子宫开始缩小,这说明绝经早期卵巢产生的循环雌激素水平已经开始变化,但这种变化无统计学意义,提示在绝经早期循环雌激素水平变化不大,而到了OVX 3个月AD小鼠的子宫严重萎缩,子宫重量明显下降,说明此时循环雌激素水平急剧降低。

通过子宫的重量我们可以判断卵巢产生的循环雌激素水平的变化,验证了绝经模型的构建成功。那么,我们关注的绝经后AD小鼠脑内雌激素水平是否也发生了相同的变化呢?最新的文献报道,芳香酶是一种将睾酮转化为雌激素的酶,产生于包括人类在内的各种生物的大脑海马和皮质。当芳香酶途径被阻断时,记忆缺陷就会随之发生。而通过服用芳香酶抑制剂治疗雌激素依赖性乳腺癌的患者也被报道有记忆障碍<sup>[21]</sup>。它还可以通过增加受损神经元中的局部雌激素水平来发挥神经保护作用<sup>[22]</sup>。本实验通过检测OVX后脑内芳香酶的蛋白表达的相对含量,小鼠的学习记忆功能,海马区细胞增殖和神经元成熟情况,结果显示在绝经早期,AD-OVX组小鼠脑内芳香酶增加,海马区新生细胞数量和成熟神经元增多,早期学习记忆功能未出现明显障碍,提示在早期芳香酶可能出现代偿性表达增高,从而起到促进细胞增殖以及增加成熟神经元的表达来发挥其对

认知功能的保护作用。而到了绝经晚期,AD-OVX组小鼠脑内芳香酶表达明显减少,同时,脑内海马区新生细胞减少,成熟神经元受损,该小鼠脑内出现大量老年斑的形成,说明随着雌激素缺乏时间的延长,不仅循环雌激素呈现低水平,脑内芳香酶也减少,导致脑内合成的雌激素也相应降低,从而使得细胞增殖减少、神经元成熟障碍,进一步加重AD的学习记忆功能障碍以及脑内的病理特征。关于芳香酶是否直接影响AD小鼠脑内发生的这些改变有待进一步深入探讨。

综上所述,雌激素缺乏早期可反应性地增加痴呆小鼠海马区细胞的增殖和成熟,对小鼠学习记忆无影响;随着雌激素缺乏时间的延长,痴呆小鼠出现学习记忆的损害及海马区细胞增殖和成熟减少;该作用可能与脑内芳香酶水平的变化密切相关。这为AD的有效防治提供了新的思路,同时为绝经早期为女性AD患者的有效治疗时间窗提供了新的实验室依据。

#### 参考文献 (References)

- 1 Carrillo MC, Dean RA, Nicolas F, Miller D, Berman R, Khachaturian Z, *et al*. Revisiting the framework of the national institute on aging-Alzheimer's association diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* 2013; 9(5): 594-601.

- 2 Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, *et al.* The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex. *Nature* 2003; 422(6930): 438-41.
- 3 Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 2016; 8(6): 595-608.
- 4 Carter CL, Resnick EM, Mallampalli M. Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research. *J Womens Health (Larchmt)* 2012; 21(10): 1018-23.
- 5 Simpkins JW, Yang SH, Wen Y, Singh M. Estrogens, progestins, menopause and neurodegeneration: basic and clinical studies. *Cell Mol Life Sc* 2005; 62(3): 271.
- 6 杨华, 屈秋民, 郭峰, 韩建峰, 武成斌. 雌激素在阿尔茨海默病患者的改变及其意义. *中国神经精神疾病杂志*(Yang Hua, Qu Qiumin, Guo Feng, Han Jianfeng, Wu Chengbin. Changes and significance of estrogen in patients with Alzheimer's disease. *Chinese Journal of Neuromental Disorder* 2007; 33(3): 179-82.
- 7 Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Li R. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 2(3): 19198-203.
- 8 Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez J, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 82(8): 2396-402.
- 9 卫永旭. 脑芳香酶的神经保护作用. *中国微侵袭神经外科杂志* (Wei Yongxu. Neuroprotective effects of brain aromatase. *Chinese Journal of Micro-Invasive Neurosurgery*) 2011; 16(4): 187-9.
- 10 Hajszan T, Milner TA, Leranath C. Sex steroids and the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 2006; 163(4): 399-415.
- 11 Parducz A, Hajszan T, Maclusky NJ, Hoyk Z, Csakvari E, Kunczi A, *et al.* Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience* 2006; 138(3): 977-85.
- 12 Weiland NG, Orikasa C, Hayashi S, McEwen BS. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neuro* 2015; 388(4): 603-12.
- 13 Braak H, Braak E, Bohl J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol* 1993; 33(6): 403-8.
- 14 Ikonovic MD, Abrahamson EE, Uz T, Manev H, Dekosky ST. Increased 5-lipoxygenase immunoreactivity in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem* 2008; 56(12): 1065-73.
- 15 Sasano H, Edwards DP, Anderson TJ, Silverberg SG, Evan DB, Santen RJ, *et al.* Validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry: progress report. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86(3): 239-44.
- 16 McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Oz OK, Hurn PD. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci* 2003; 23(25): 8701.
- 17 Maffucci, Jacqueline A. Handbook of Models for Human Aging/ Age-related changes in hormones and their receptors in animal models of female reproductive senescence. *Handbook of Models for Human Aging* 2006; 533-52.
- 18 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: e33493.
- 19 常艳, 傅一山, 朱心强. 小鼠卵巢切除术入路的改良. *上海实验动物科学*(Chang Yan, Fu Yishan, Zhu Xinqiang. Improvement of ovariectomy approach in mice. *Shanghai Experimental Animal Science*) 1999; 19(4): 30-6.
- 20 Yao J, Irwin R, Chen S, Hamilton R, Cadenas E, Brinton RD. Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial  $\beta$ -amyloid. *Neurobiol Aging* 2012; 33(8): 1507-21.
- 21 Lu Y, Sareddy GR, Wang J, Wang R, Li Y, Dong Y, *et al.* Neuron-derived estrogen regulates synaptic plasticity and memory. *J Neurosci* 2019; 1970-18.
- 22 Hiltunen M, Iivonen S, Soininen H. Aromatase enzyme and Alzheimer's disease. *Minerva Endocrinol* 2006; 31(1): 61-73.