论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0546-04

短期丰富生存环境干预下中老年大鼠海马结构有髓神经纤维的性别差异

黄春霞[1],仇 玄[2,3],卢 伟[2,3],杨 姝[3],李 琛[3],夏 磊[2,3],唐 勇[2,3] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:生理学教研室[1],组织学与胚胎学教研室[2],干细胞与组织工程学研究室[3])

[摘要] **目的** 研究短期丰富生存环境干预下正常中老年大鼠海马结构有髓神经纤维的性别差异。**方法** 将20只14月龄的SD大鼠(雌雄各10只)随机均分为丰富生存环境组与普通环境组,前者在丰富生存环境条件下饲养4个月,后者在普通环境中饲养4个月,运用透射电子显微镜和体视学方法对两组大鼠海马结构有髓神经纤维进行定量研究。**结果** 普通环境组雌性大鼠海马结构内有髓神经纤维的总体积、平均直径均显著大于雄性大鼠($P<0.05$),而海马结构总体积、海马结构内有髓神经纤维的总长度雌雄两组之间不存在显著性差异($P>0.05$)。丰富生存环境组雌性大鼠海马结构内有髓神经纤维的平均直径显著小于雄性大鼠($P<0.05$),而海马结构总体积、海马结构内有髓神经纤维的总体积、总长度雌雄两组之间不存在显著性差异($P>0.05$)。**结论** 普通环境组和丰富环境组中老年大鼠海巴结构有髓神经纤维存在的性别差异,提示雌、雄性中老年大鼠对短期丰富生存环境干预的反应不同。

[关键词] 大鼠;丰富生存环境;海马结构;有髓神经纤维;性别差异;体视学

[中图法分类号] R322.81;R338.11;R339.5 **[文献标志码]** A

Sex differences of short-term enriched environment on myelinated nerve fibers in the hippocampal formation of middle-aged rats

Huang Chunxia[1], Qiu Xuan[2,3], Lu Wei[2,3], Yang Shu[3], Li Chen[3], Xia Lei[2,3], Tang Yong[2,3] ([1]Department of Physiology, [2]Department of Histology and Embryology, [3]Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the sex differences of the myelinated nerve fibers in the hippocampal formation of mid-aged standard and enriched rats. **Methods** Twenty 14-month Sprague-Dawley (SD) rats, 10 female and 10 male rats, were randomly divided into enriched group and standard group. Enriched rats were reared in enriched environment and standard rats were reared in standard environment for 4 months. Then, the total volume of the hippocampal formation and the myelinated nerve fibers in the hippocampus were quantitatively estimated by transmission electron microscopy and stereological methods. **Results** The total volume and mean diameter of the myelinated nerve fibers in the hippocampal formation of standard female rats were significantly bigger than those of standard male rats ($P<0.05$), but there was no statistically significant change of the total volume of the hippocampal formation and the total length of the myelinated nerve fibers in the hippocampal formation of standard female rats when compared to those of standard male rats ($P>0.05$). The mean diameter of the myelinated nerve fibers in the hippocampal formation of enriched female rats was significantly smaller than that of enriched male rats ($P<0.05$), but there was no statistically significant difference of the total volume of the hippocampal formation and the total volume and total length of the myelinated nerve fibers in the hippocampal formation of enriched female rats when compared to those of enriched male rats ($P>0.05$). **Conclusion** The sex differences of the myelinated nerve fibers in the hippocampal formation of mid-aged

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(200806310007);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2009BA5035);重庆医科大学校级重点课题(XBZD200801)

[通信作者] 唐 勇,电话:(023)68485633, E-mail:ytang062@yahoo.com.cn

standard and enriched rats are significantly different, which indicates the response to the enriched environment in the mid-aged male and female rats is different.

Key words: rats; enriched environment; hippocampal formation; myelinated fibers; sex difference; stereology

Supported by the Speical Research Foundation for Doctoral Program of High Colleges and Universities of Ministry of Education in 2008 (200806310007), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5035), and the Key Program of Chongqing Medical University (XBZD200801). Corresponding author: Tang Yong, Tel: 86-23-68485633, E-mail: ytang062@yahoo.com.cn

众多研究已经发现大脑的结构和功能都存在着性别差异[1-10]。其中包括对大脑某些结构内神经纤维性别差异的报道。有研究显示成年大鼠胼胝体压部神经纤维轴突数目密度存在性别差异,但轴突总数目不存在性别差异[6];雌性大鼠胼胝体无髓神经纤维比例较大[7]。运用体视学方法的定量研究发现,年轻组雄性SD大鼠大脑白质体积、白质内有髓神经纤维体积及其髓鞘体积均显著大于雌性大鼠,而中老年组雌性大鼠大脑白质体积、白质内有髓神经纤维体积及其髓鞘体积显著大于雄性大鼠[8]。已有的大量研究认为丰富生存环境对大脑功能具有积极的保护作用。为了解丰富生存环境干预下对衰老极其敏感的海马结构神经纤维有无性别差异,本研究通过给予14个月的SD大鼠短期丰富生存环境刺激,再应用透射电子显微镜和新的体视学方法研究丰富生存环境下中老年雌、雄性大鼠海马结构总体积及海马内有髓神经纤维总体积、总长度、平均直径等情况,从而探讨丰富生存环境干预下中老年雌、雄性大鼠的海马结构有髓神经纤维的反应性,并为将来进一步的研究提供参考数值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20只14月龄的SD大鼠(雌雄各10只)体质量(280±20)g,由第三军医大学实验动物中心提供。普通环境组10只(雌雄各半),丰富生存环境组10只(雌雄各半)。

1.2 干预方法

丰富生存环境的建立参照文献[11-13]设计。将丰富生存环境组放入到120 cm×60 cm×50 cm大木箱中饲养,每箱8~12只,在笼内放置不同形状、颜色的物体,比如管道、积木、彩球等。每周更换物体1次。将普通环境组饲养于无特殊刺激的40 cm×30 cm×30 cm的普通箱子中,每箱3~6只。丰富生存环境组和普通环境组均雌、雄分笼,饲养条件相同(室温20~23 ℃,12 h光照与12 h黑夜交替,自由进食饮水,定期换笼,总饲养时间为4个月)。

1.3 标本固定与取材

饲养4个月后,首先对大鼠进行腹腔麻醉,进行心灌流固定,之后将大脑完整取出[8]。将大脑半球沿着冠状线切成1 mm厚的连续等距切片。每只大鼠随机抽取一侧大脑半球,取出包含有海马结构的脑组织切片。再将透明的等距测点框随机地叠加在抽取的脑组织切片上,将与测点重叠处的海马组织块(1 mm^3)取出,以保证海马结构内各个部位的组织有相同的概率被抽取[14]。每只动物抽取5份标本。

1.4 制作各向同性电镜切片

按常规电镜切片制作方法制作超薄切片,在透射电子显微镜下放大9 000倍随机选取视野拍照,每只动物拍得75张海马结构的电镜照片。在按常规电镜包埋方法包埋小球之前用球切法(isector)包埋[14-15]。

1.5 体视学定量研究

1.5.1 海马结构总体积 随机地叠加透明的等距测点框在抽取的脑组织切片上,在解剖显微镜下计数所有落在海马结构的测点。再利用卡瓦列里原理计算海马结构的总体积[8,15-18]。

1.5.2 海马结构内有髓神经纤维的体积分数与总体积 在电镜照片上随机叠加透明的等距测点框,分别计数落在有髓神经纤维上的测点数以及落在整个照片内的海马结构测点数。再根据相应公式计算有髓神经纤维的体积分数以及总体积[8,15-18]。

1.5.3 海马结构内有髓神经纤维的长度密度与总长度 在所得到的电镜照片上随机叠加无偏计数框,按照无偏计数框原则[8]计数海马结构内有髓神经纤维断面数。然后根据公式计算出海马结构内有髓神经纤维的长度密度以及总长度[8,15-18]。

1.5.4 有髓神经纤维直径 测量所有被无偏计数框计数的海马有髓神经纤维断面的直径[8]。

1.6 统计学处理

使用SPSS 16.0统计软件进行处理。对两组大鼠海马结构总体积及海马内有髓神经纤维体积分数和总体积、长度密度和总长度、平均直径的性别差异等数据以 $\bar{x} \pm s$ 计数,行student-t检验,然后计算两组的雌雄性之间各参数的变化率值。

2 结果

2.1 普通环境组大鼠大脑海马结构有髓神经纤维的性别差异

普通环境组大鼠海马结构总体积和海马结构内有髓神经纤维总长度雌雄之间,但不存在显著性差异($P>0.05$)。雌性大鼠海马内有髓神经纤维总体积显著大于雄性大鼠($P<0.05$)。海马内有髓神经纤维的平均直径雌性和雄性大鼠间差异显著($P<0.05$)。见表1。

表1 2组的大鼠海马结构及海马内有髓神经纤维的体视学研究结果（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	海马结构体积（mm^3）	有髓神经纤维体积分数	有髓神经纤维总体积（mm^3）	有髓神经纤维的长度密度（km/mm^3）	有髓神经纤维的总长度（km）	有髓神经纤维平均直径（μm）
普通环境组						
雌性大鼠	74.4±4.63	0.08±0.02	5.73±1.41	0.11±0.01	8.26±1.11	0.80±0.09
雄性大鼠	84.7±12.8	0.04±0.01[a]	3.64±1.22[a]	0.08±0.02[b]	6.68±1.62	0.63±0.07[a]
丰富生存环境组						
雌性大鼠	84.2±11.7	0.12±0.01	10.1±1.09	0.19±0.04	15. 7±1.48	0.76±0.06
雄性大鼠	88.6±14.6	0.08±0.02[a]	7.38±2.59	0.13±0.03[a]	11.5±4.14	0.84±0.03[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与同组雌性大鼠比较

2.2 丰富生存环境组大鼠大脑海马结构有髓神经纤维的性别差异

雌性大鼠丰富生存环境组大鼠海马内有髓神经纤维的平均直径显著小于雄性（$P<0.05$）。而雌、雄性丰富生存环境组大鼠海马结构总体积、海马内有髓神经纤维总体积和总长度差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见表1。

3 讨论

海马结构被认为是学习与记忆功能的重要脑区，也是激素作用的主要脑区[19,20]。因此，已经有研究人员对海马结构的性别差异进行了研究[9,10,21]。国内张海军等[21]进行了中国人脑立体定位MRI海马结构体积的测定，他们研究发现男女海马结构体积分别为（2 981.39±297.47）mm^3和（2 970.43±330.13）mm^3，海马结构体积不存在显著性性别差异。本研究结果显示，无论是普通环境组还是丰富生存环境干预组，中老年SD大鼠的海马结构体积不存在显著性性别差异。虽然我们不能把目前的研究结果直接与以前对人海马研究所获得的结果进行直接比较，但目前的结果进一步支持海马体积不存在显著性性别差异的结论。

大量研究已经表明，丰富生存环境对大脑具有积极的保护作用。其中，McConnell等[22]研究发现不论之前是否有营养不良，丰富生存环境干预使雌鼠脑重显著增加，但对雄性鼠脑重量没有显著的影响。Pereira等[23]的研究表明，早期丰富生存环境（产后8～30 d内干预）对低氧缺血脑损伤的雌性Wistar新生大鼠的记忆缺损具有部分修复作用，但对雄性新生鼠没有作用。与之相反，有研究发现丰富生存环境干预使年轻组雄性大鼠的探索行为能力提高，但对雌性大鼠没有作用[24]。本课题组以前的研究发现，短期丰富生存环境干预对中老年雌性大鼠的空间学习能力具有显著性促进作用，但对于中老年雄性大鼠的空间学习能力没有显著性作用[25]。

大鼠18月龄左右进入老年期。有研究显示老年大鼠的皮质有髓神经纤维的总长度和总体积出现下降，但无统计学意义[26]，而中老年雄性大鼠白质有髓神经纤维和髓鞘体积较年轻组丢失明显，雌性大鼠没有下降反而增加，出现这样的情况大概与雌鼠髓鞘分层以及雌激素的保护作用有关系[8]。我们的实验结果表明，18月龄普通环境组雄性大鼠的海马有髓神经纤维的总体积、平均直径显著小于雌性。我们猜测进入老年，雌、雄性大鼠的海马有髓神经纤维和髓鞘的不同改变，导致普通环境下雄性大鼠有髓神经纤维的总体积和平均直径显著小于雌性大鼠。

本研究还发现短期丰富生存环境组的雌性中老年大鼠的海马有髓神经纤维平均直径显著小于雄性大鼠。原因可能有两方面：①雌性大鼠有髓神经纤维的平均直径较普通环境组稍有下降。Nilsson等[27]研究发现在丰富生存环境中生活1个月后，成年大鼠海马齿状回增生的祖细胞数量显著增加，导致分化出来的新生神经元数量增加。近年又有研究认为雌激素能够促进海马神经元增殖以及突触发生等[28]。即丰富生存环境干预可能促进中老年大鼠的齿状回新生神经元数量增加，神经元伸出轴突，由髓鞘包裹形成新的有髓神经纤维，且以细小直径有髓神经纤维为主。我们的结果显示短期丰富生存环境干预后中老年雌性大鼠海马有髓神经纤维总长度与普通环境组比较显著性增加，且细小直径的有髓神经纤维增加使得雌性大鼠有髓神经纤维的平均直径稍有下降。因此，丰富生存环境干预使雌性大鼠海马结构新生有髓鞘神经纤维更多。②雄性大鼠的平均直径在丰富生存环境干预之后出现显著增加。雄激素与髓鞘的形成有关。有研究已经发现5α-还原酶也存在于髓鞘，此酶在雄激素的代谢和生物活性中起关键性作用，因为它催化睾酮转化为活性更强的双氢睾酮[29]。我们推测，丰富生存环境的干预，可能使中老年雄性大鼠海马结构已经发生了

脱髓鞘改变的有髓神经纤维的髓鞘再生,使原本裸露的轴突被新生的髓鞘包裹,使原有有髓神经纤维的髓鞘板层增厚,从而出现了丰富生存环境组雄性大鼠海马结构有髓神经纤维平均直径的增加。

本研究结果表明,无论是否施加短期丰富生存环境干预,中老年SD大鼠海马结构内有髓神经纤维都存在性别差异。因此,在将来设计对海马神经纤维的研究时,应该考虑性别差异对研究结果的影响。同时,本实验结果提供了丰富生存环境干预下,中老年雌、雄性SD大鼠海马结构总体积及海马内有髓神经纤维的体视学定量研究,为将来进一步的研究工作提供了参考数值。

参考文献:

[1] Leonard C M, Towler S, Welcome S, *et al*. Size matters: cerebral volume influences sex differences in neuroanatomy [J]. Cereb Cortex, 2008, 18(12): 2920-2931.

[2] Bishop K M, Wahlsten D. Sex differences in the human corpus callosum: myth or reality? [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1997, 21(5): 581-601.

[3] Nopoulos P, Flaum M, O'Leary D, *et al*. Sexual dimorphism in the human brain: evaluation of tissue volume, tissue composition and surface anatomy using magnetic resonance imaging [J]. Psychiatry Res, 2000, 98(1): 1-13.

[4] Schmithorst V J, Holland S K, Dardzinski B J. Developmental differences in white matter architecture between boys and girls [J]. Hum Brain Mapp, 2008, 29(6): 696-710.

[5] Luders E, Steinmetz H, Jancke L. Brain size and grey matter volume in the healthy human brain [J]. Neuroreport, 2002, 13(17): 2371-2374.

[6] Kim J H, Ellman A, Juraska J M. A re-examination of sex differences in axon density and number in the splenium of the rat corpus callosum [J]. Brain Res, 1996, 740(1-2): 47-56.

[7] Mack C M, Boehm G W, Berrebi A S, *et al*. Sex differences in the distribution of axon types within the genu of the rat corpus callosum [J]. Brain Res, 1995, 697(1-2): 152-160.

[8] 杨姝, 李琛, 张伟, 等. 大鼠大脑白质及白质内有髓神经纤维的性别与年龄差异[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(1): 80-84.

[9] Caviness V S Jr, Kennedy D N, Richelme C, *et al*. The human brain age 7-11 years: a volumetric analysis based on magnetic resonance images [J]. Cereb Cortex, 1996, 6(5): 726-736.

[10] Tabibnia G, Cooke B M, Breedlove S M. Sex difference and laterality in the volume of mouse dentate gyrus granule cell layer[J]. Brain Res, 1999, 827(1-2): 41-45.

[11] Kempermann G, Kuhn H G, Gage F H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment [J]. Nature, 1997, 386(6624): 493-495.

[12] Frick K M, Fernandez S M. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice [J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(4): 615-626.

[13] Kempermann G, Gast D, Gage F H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment [J]. Ann Neurol, 2002, 52(2): 135-143.

[14] 杨正伟. 均匀随机方向上的体视学测试: 各向同性随机测试[J]. 川北医学院学报, 2006, 21(5): 399-412.

[15] Tang Y, Nyengaard J R. 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.

[16] Gundersen H J, Bendtsen T F, Korbo L, *et al*. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis [J]. APMIS, 1988, 96(5): 379-394.

[17] 杨正伟. 形态计量 [M] // 成令忠, 钟翠平, 蔡文琴. 现代组织学. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 34-39.

[18] 徐璋, 李琛, 杨姝, 等. 运用新的体视学方法研究大鼠胼胝体及胼胝体额区有髓神经纤维[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 56-59.

[19] McEwen B S, Alves S E. Estrogen actions in the central nervous system [J]. Endocr Rev, 1999, 20(3): 279-307.

[20] McEwen B S. Mood disorders and allostatic load [J]. Biol Psychiatry, 2003, 54(3): 200-207.

[21] 张海军, 林志国, 陈晓光, 等. 中国人脑立体定位MRI海马结构体积的测定[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2008, 21(4): 193-195.

[22] McConnell P, Uylings H B, Swanson H H, *et al*. Sex differences in effects of environmental stimulation on brain weight of previously undernourished rats [J]. Behav Brain Res, 1981, 3(3): 411-415.

[23] Pereira L O, Strapasson A C, Nabinger P M, *et al*. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia [J]. Brain Res, 2008, 1218: 257-266.

[24] Pena Y, Prunell M, Dimitsantos V, *et al*. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent [J]. Behav Brain Res, 2006, 174(1): 181-187.

[25] 黄春霞, 杨俊卿, 卢伟, 等. 短期丰富生存环境对中老年大鼠空间学习能力的作用及性别差异[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(5): 521-524.

[26] 张伟, 杨姝, 李琛, 等. 大鼠大脑皮质有髓神经纤维老年性改变的定量研究[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(6): 749-752.

[27] Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, *et al*. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory [J]. J Neurobiol, 1999, 39(4): 569-578.

[28] Yankova M, Hart S A, Woolley C S. 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.

[29] Martini L, Melcangi R C. Androgen metabolism in the brain [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991, 39(5B): 819-828.

(**收稿**:2009-08-20;**修回**:2009-10-12)

(编辑 吴培红)