论著

文章编号:1000-5404(2014)05-0432-05

雌激素替代治疗对中老年卵巢切除大鼠海马CA1区有髓神经纤维的影响

肖 倩[1,2],吕福林[1,2],罗艳敏[1,2],何 琦[1,2],晁凤蕾[1,2],黄春霞[3],张琪娟[4],肖晓秋[5],唐 勇[1,2],吴 宏[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院人体解剖与组织胚胎学教研室[1],干细胞与组织工程教研室[2],基础医学院生理学教研室[3],附属第一医院临床营养科[4],附属第一医院脂糖代谢实验室[5])

[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(ovariectomy,OVX)大鼠海马CA1区有髓神经纤维的影响。**方法** 选取10月龄SD雌性大鼠切除双侧卵巢,术后1个月将大鼠随机分为雌激素替代治疗组(OVX+E2组)(10只)和安慰剂组(OVX+Veh组)(9只)。其中OVX+E2组给予连续4周的17β-雌二醇皮下注射,OVX+Veh组给予连续4周的安慰剂(芝麻油)皮下注射。应用Morris水迷宫对其空间记忆能力进行测试。应用冰冻切片技术、电镜技术及体视学方法对海马及其CA1区体积,有髓神经纤维总长度、总体积、髓鞘总体积、轴突总体积以及平均直径进行定量研究。**结果** OVX+E2组大鼠Morris水迷宫的寻台潜伏期明显较OVX+Veh组短($P<0.05$),但两组大鼠的海马及CA1区的平均体积没有显著性改变($P=0.100$, $P=0.366$)。OVX+E2组有髓神经纤维总体积及髓鞘总体积均较OVX+Veh组显著增加($P=0.016$, $P=0.009$)。**结论** 雌激素替代治疗对中老年卵巢切除大鼠空间记忆能力及海马CA1区有髓神经纤维及其髓鞘结构均具有积极的保护作用。

[关键词] 卵巢切除术;雌激素替代治疗;Morris水迷宫;海马;CA1;有髓神经纤维;体视学

[中图法分类号] R-332; R322.81; R977.12 [文献标志码] A

Effects of estrogen replacement therapy on myelinated fibers in CA1 of hippocampus in middle-aged ovariectomized rats

Xiao Qian[1,2], Lyu Fulin[1,2], Luo Yanmin[1,2], He Qi[1,2], Chao Fenglei[1,2], Huang Chunxia[3], Zhang Qijuan[4], Xiao Xiaoqiu[5], Tang Yong[1,2], Wu Hong[1,2] ([1]Department of Histology and Embryology, [2]Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, [3]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences; [4]Department of Clinical Nutrition, [5]Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of estrogen replacement therapy (ERT) on the myelinated fibers in CA1 of the hippocampus in middle-old ovariectomized (OVX) rats. **Methods** Female rats of 10 months old were bilaterally ovariectomized, and then randomly divided into OVX+E2 group and OVX+Veh group. In 4 weeks after operation, 17β-estradiol (0.1 mg/mL, 0.25 μL/g) and placebo (sesame oil, 0.25 μL/g) were subcutaneously injected respectively to OVX+E2 rats and OVX+Veh rats for 4 weeks. Then, Morris water maze was applied to test the spatial reference memory. Microscopy and stereology were applied to quantitatively investigate the total volumes of the hippocampus, the CA1 of the hippocampus, the total length, total volume, and mean diameter of the myelinated fibers and the myelin sheaths in the hippocampal CA1. **Results** The mean escape latency in spatial navigation of Morris water maze was significantly shortened in OVX+E2 group from day 1 to 5 when compared to OVX+Veh group ($P<0.05$). There was no significant difference in the hippocampal volume and CA1 volume between 2 groups ($P=0.100$, $P=0.366$). When compared to OVX+Veh group, the total volume of the myelinated fibers and myelin sheaths in OVX+E2 group were significantly increased ($P=0.016$, $P=0.009$). **Conclusion** Continuous 4 weeks' ERT protects the spatial memory and the structure of myelinated fibers and myelin sheaths in the hippocampal CA1 of middle-aged ovariectomized rats.

[基金项目] 国家自然科学基金(81171238,31271288);重庆市首批"百名学术学科领军人才"培养计划(2012)

[通信作者] 吴 宏, E-mail:wuhong6368@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.2029.014.html(2013-12-19)

[**Key words**] ovariectomy; estrogen replacement therapy; Morris water maze; hippocampus; CA1; myelinated fiber; stereology

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171238, 31271288) and the Project of the First Batch of 100 Academic and Discipline Talented Leaders of Chongqing (2012). Corresponding author: Wu Hong, E-mail: wuhong6368@126.com.cn

大量流行病学研究显示,应用雌激素替代治疗围绝经期女性可以明显降低阿尔茨海默病的患病率[1-2]。在动物实验中同样发现,给予卵巢切除后的年轻及中老年啮齿类动物外源性雌激素替代治疗可以显著性增加其包括空间参考记忆在内的海马相关记忆能力[3-4]。而关于雌激素替代治疗对海马内结构的影响,有研究显示外源性雌激素不但改善双侧卵巢切除后大鼠 CA1 椎体细胞树突棘密度的下降,还增加了 CA1 区突触密度[5-6]。雌激素还有助于维持少突胶质前体细胞及少突胶质细胞的生物活动[7-8]。值得注意的是,树突棘和突触密度的增加并不一定代表其数量的增加,其中还可能存在参照空间体积(海马分区体积)的变化;而少突胶质细胞作为髓鞘形成细胞,其生物活动可以直接影响有髓神经纤维的功能,已有大量研究结果显示,有髓神经纤维及其髓鞘的结构异常同样是导致认知功能下降的一个重要原因[9]。因此,明确雌激素对海马及其分区总体积以及其对 CA1 区有髓神经纤维的影响就变得尤为重要了。现有的关于雌激素替代治疗对海马体积作用的研究结果仍有争议[10-12],且大脑海马总体积的改变并不能反映各分区体积的改变,目前关于雌激素替代治疗对海马总体积作用的研究仅限于对老年女性的影像学研究,雌激素替代治疗对实验动物海马及其 CA1 区体积影响尚不清楚。本团队前期研究[13]以及 Patel 等[14]的研究结果均提示雌激素与有髓神经纤维及其髓鞘之间存在相互作用。因此,本实验旨在进一步研究雌激素替代治疗作用中枢神经系统的具体机制,并提供有效的数据基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

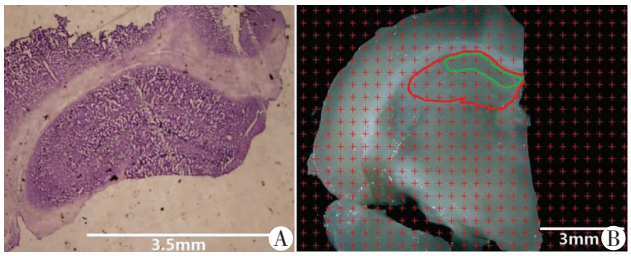
19 只 10 月龄的 Sprague-Dawley 雌性大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),体质量(322 ± 11) g,饲养于重庆医科大学实验动物中心,室温(22 ± 2)℃,每日光照 12 h,正常饲养。

1.2 双侧卵巢切除术

1% 的戊巴比妥钠 4 mL/kg 腹腔注射麻醉。然后备皮,消毒。于肋缘下 0.5 cm,脊柱旁 1 cm 处依次剪开皮肤、皮下组织、肌肉和腹膜,找到并切除大鼠卵巢。最后逐层关闭腹膜和皮肤。术后在温暖环境下待大鼠苏醒后再放归笼中饲养,并且给予术后连续 3 d 的青霉素(16 U/大鼠)腹腔注射以预防感染。

1.3 阴道涂片与血清雌激素测定

术后 1 周即对所有大鼠施行为期 6 d 的连续阴道涂片检查以监测其动情周期变化,术后 1 个月在乙醚麻醉条件下采集大鼠尾静脉血 1 ~ 2 mL,用化学发光法(UniCel DxI 800 Immunoassay System from Beckman Coulter,重庆医科大学附一医院内分泌科实验室)测定血清雌激素水平,并以大鼠阴道涂片结果呈持续动情后期(图 1),血清雌激素平均水平在 11 pg/mL 左右作为双侧卵巢切除手术成功的标准[15]。



A:HE 染色观察;B:计数落在海马(红线所绘区域)以及 CA1 区(绿线所绘区域)的点数

图 1 海马分区定位和体视学计算海马及其分区体积的方法

1.4 雌激素替代治疗

将成功去势的 SD 大鼠按完全随机抽样方法分成 OVX + E2 组(10 只大鼠)和 OVX + Veh 组(9 只大鼠),于注射前 1 d 剪除大鼠颈背部毛发,充分暴露注射区皮肤,以确保每次注射成功。然后称量记录。接着于每日同一时间(8:00 左右)准时给予每只实验大鼠 0.1 mg/mL 17β-雌二醇溶液(ABcam ab120657)(0.000 25 mL/g)皮下注射,持续 4 周。同时,为避免长期注射所形成的皮肤硬结,应尽量避免在同一皮肤位置重复注射,每只动物注射后应观察数分钟以确保注射处无药液溢出。OVX + Veh 组给予皮下注射相同剂量的芝麻油(0.000 25 mL/g),操作细节同 OVX + E2 组。

1.5 Morris 水迷宫

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)。水迷宫直径为 150 cm,高为 50 cm,将圆桶等分为 4 个象限,设置 A、B、C、D 4 个入水点。将有机玻璃制圆柱形平台(直径 9.5 cm,高 28.5 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 ~ 25 ℃之间,同时保持周围环境的安静。两组大鼠均用 Morris 水迷宫进行连续 6 d 的空间记忆能力的测试。前 5 d 为隐藏平台实验,水面高于平台 1 ~ 2 cm,每个入水点均要测试 1 次,入水点顺序随机选择,先把动物置于平台上 15 s,让其熟悉周围环境,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 s 仍未找到水池中的平台,则将其置于平台上 15 s,并且记录寻台时间为 180 s。若动物爬上平台停留未足 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。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保持不变。第 6 天为可见平台实验,重新选择 1 个象限放置平台,并把水放出一些,使平台高出水面 1 ~ 2 cm。仅选择两个离平台距离较远的入水点测试,其他过程同隐藏平台实验[16]。

1.6 标本的固定与取材

Morris水迷宫测试结束后，给予大鼠1%戊巴比妥钠(4 mL/kg)腹腔麻醉后，使用2%多聚甲醛和2.5%戊二醛混合固定液(pH=7.4)进行心脏灌流固定，固定后取出大脑。以冠状方向切成1 mm厚的连续脑组织切片，平均每个大脑半球可切14~17张切片。从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(6~8片)，以枕面朝上用解剖显微镜拍照(×15)，然后用冰冻切片包埋剂(OCT)包埋速冻并切取1张10 μm厚的脑片做苏木精染色显示神经元，以区分CA1区范围[17]。然后结合大鼠解剖学图谱，在对应的脑片上明确CA1的范围(图1A)。

1.7 制作各向同性电镜切片

取另一侧大脑半球，取出包含有海马结构的脑组织切片(6~8片)。然后将透明的等距测点框随机地叠加在抽取的脑组织切片上，然后将与测点重叠处的海马CA1区组织块(1 mm^3)取出，每只动物抽取5块标本。这样抽取组织块的目的是保证海马CA1区内各个部位的组织有相同的概率被抽取[18]。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。经50%、70%、90%的乙醇，90%乙醇与90%丙酮混合物及100%丙酮溶液中逐渐脱水后，浸泡在100%环氧树脂(618)(四川晨光化工研究所)中，将浸透好的组织块先用球切法(isector)[19]包埋成直径为5 mm的小球("球切法"包埋的目的是保证海马CA1区的神经纤维在三维空间内各个方向上有相同的概率被抽取)再按常规电镜包埋方法包埋小球。从包埋好的每个组织块上随机切取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8 000倍后随机选取15个视野进行拍照(第1个视野在左上部随机选择，随后"之"形等距移动视野)，每个动物拍得75张海马CA1区有髓神经纤维的电镜照片。

1.8 体视学分析

1.8.1 海马总体积与CA1区总体积 在获得的脑片照片上随机叠加等距测点框，分别计数落在海马及CA1区的测点数(图1B)，其中OVX+E2组海马及CA1平均测点数分别为262个和82个，OVX+Veh组海马及CA1平均测点数分别为256个和79个，然后利用卡瓦列里原理[19]分别计算每只动物的海马总体积和CA1区总体积。

1.8.2 海马CA1区有髓神经纤维体积密度和有髓神经纤维总体积 在所得到的电镜照片上随机叠加等距测点框，分别计数落在整个CA1区、有髓神经纤维上的测点数，平均每侧CA1区有髓神经纤维上的测点数为3 354个(其中OVX+Veh组为2 896个，OVX+E2组为3 736个)，然后利用卡瓦列里原理[19]分别计算每只动物的CA1区有髓神经纤维体积密度和有髓神经纤维总体积。

1.8.3 海马CA1区髓鞘体积密度和髓鞘总体积 在所得到的电镜照片上随机叠加等距测点框，分别计数落在整个CA1区、有髓神经纤维髓鞘上的测点数，平均每侧CA1区有髓神经纤维髓鞘上的测点数为1 567个(其中OVX+Veh组为1 335个，OVX+E2组为1 761个)，然后利用卡瓦列里原理[19]分别计算每只动物的CA1区有髓神经纤维髓鞘体积密度和有髓神经纤维髓鞘总体积。

1.8.4 海马CA1区轴突体积密度和轴突总体积 在所得到的电镜照片上随机叠加等距测点框，分别计数落在整个CA1区、有髓神经纤维轴突上的测点数，平均每侧CA1区有髓神经纤维轴突上的测点数为1 787个(其中OVX+Veh组为161个，OVX+E2组为175个)，然后利用卡瓦列里原理[19]分别计算每只动物的CA1区有髓神经纤维轴突体积密度和有髓神经纤维轴突总体积。

1.8.5 海马CA1区有髓神经纤维长度密度和总长度 在所得到的电镜照片上随机叠加无偏计数框(2 370 mm^2)，计数框内以及仅与计数线相交的有髓神经纤维断面数，平均每侧海马CA1区有髓神经纤维断面数为411个(其中OVX+Veh组为366个，OVX+E2组为448个)，然后利用卡瓦列里原理[19]分别计算每只动物的CA1区有髓神经纤维长度密度和有髓神经纤维总长度。

1.8.6 海马CA1区有髓神经纤维平均直径 测量所有被无偏计数框计数的有髓神经纤维断面的直径。在确定有髓神经纤维断面的最长轴的基础上，与这个最长轴相垂直的所有横轴中最长的一条横径为其直径[19]。

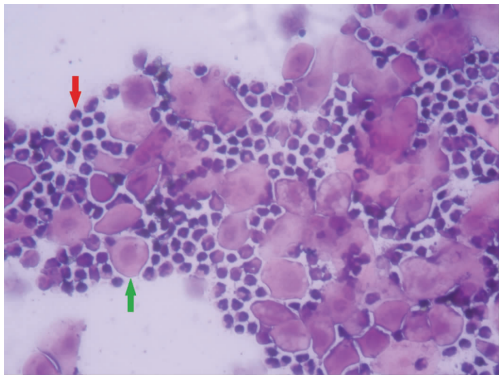
1.9 统计学分析

使用SPSS 19.0统计软件，经过正态分布检验后对Morris水迷宫隐藏平台实验数据进行重复测量数据的方差分析，可见平台实验数据用非参数检验进行分析；对给药前的全部大鼠、OVX+E2组和OVX+Veh组大鼠血清雌激素浓度进行单因素方差分析，对给药后OVX+E2组和OVX+Veh组大鼠血清雌激素浓度、海马及其分区CA1体积及CA1区有髓神经纤维各项参数采用student-*t*检验。

2 结果

2.1 双侧卵巢切除术后模型鉴定结果

术后1周连续6 d的阴道涂片结果为持续性的动情后期表现，其特点为阴道涂片含有大量白细胞以及角化阴道上皮细胞(图2)。术后4周全体大鼠尾静脉血血清雌激素平均水平为(10.4±6.2) pg/mL，给药前随机分为OVX+E2组(10只)和OVX+Veh组(9只)，其血清雌激素平均浓度分别为(11.1±7.8) pg/mL和(10.6±4.2) pg/mL，三者之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。连续4周雌激素替代治疗后，OVX+E2组血清雌激素浓度为(162.4±78.8) pg/mL，显著高于OVX+Veh组($P<0.01$)。结果显示无论是双侧卵巢切除建模还是雌激素替代治疗均已成功。

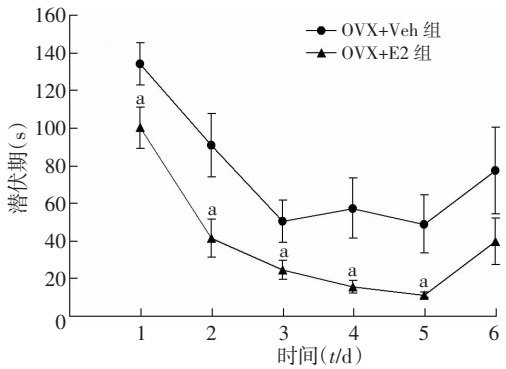


红色箭头示阴道涂片含有大量白细胞；绿色箭头示角化阴道上皮细胞

图2 阴道涂片观察大鼠动情周期变化 (HE ×400)

2.2 水迷宫结果

在前 5 d 的隐藏平台实验中，OVX + E2 组平均潜伏期较 OVX + Veh 组明显缩短（$P<0.05$，图 3），而在第 6 天的可见平台实验，两组大鼠的寻台时间未见显著性差异（$P>0.05$，图 3）。



a：$P<0.05$，与 OVX + Veh 组比较

图 3 2 组大鼠 Morris 水迷宫测试结果

2.3 体视学结果

结果见表 1。连续 4 周雌激素替代治疗后，与 OVX + Veh 组相比，OVX + E2 组大鼠海马平均体积无显著性改变（$F=2.199$，$P=0.100$）；OVX + E2 组大鼠和 OVX + Veh 组大鼠的 CA1 平均体积的差异无统计学意义（$F=0.848$，$P=0.366$）。而 OVX + E2 组大鼠 CA1 区有髓神经纤维总体积较 OVX + Veh 组显著增加了 31.4%（$P=0.016$），OVX + E2 组大鼠有髓神经纤维髓鞘总体积较 OVX + Veh 组显著增加了 37.8%（$P=0.009$）。而相较 OVX + Veh 组，OVX + E2 组 CA1 区有髓神经纤维轴突总体积（$P=0.087$）、有髓神经纤维总长度（$P=0.105$）以及有髓神经纤维平均直径（$P=0.828$）均无统计学差异。

3 讨论

1952 年 Caldwell 和 Watson 的临床评估报告首次提出雌激素治疗有助于提升老年妇女的记忆力[20]，此后已有大量临床研究及动物实验结果支持雌激素替代治疗可以改善年龄相关卵巢激素撤退造成的记忆力减退[3-4,21]。本实验中应用水迷宫测试大鼠空间记忆能力，其结果显示连续 4 周雌激素替代治疗后的中老年卵巢切除大鼠的寻台潜伏期较安慰剂治疗组明显缩短。这一结果与既往的研究[3-4]报道相一致，说明雌激素对大鼠空间记忆能力确实具有保护作用。而 Wide 等[22]应用 T 字迷宫研究苯甲酸雌二醇对记忆的影响发现雌激素损害记忆能力。由于不同行为学手段用于检测不同脑区的功能，得出不同的行为学结果[23]。因此，本实验结果与 Wide 等的研究结果不一致可能是因为所使用的行为学检测手段不同：本实验所采用的水迷宫测试的重点是海马相关空间记忆能力，而 Wide 等[22]的实验所采用的 T 字迷宫测试的主要是反映前额皮质相关记忆能力。

已有研究指出人类老年海马的体积可以作为反映老年记忆能力[8]和预兆痴呆发生[5]的指标。已有研究者运用影像学手段研究雌激素替代治疗对海马体积的影响，但是研究结果仍存在争议。Eberling 等[11]研究发现雌激素替代治疗显著性增加右侧及额侧海马体积。Greenberg 等[10]应用核磁共振成像技术研究并发现接受雌激素替代治疗的老年女性其海马总体积较对照组没有显著性差异。而女性记忆健康倡议研究（WHIMS）则显示绝经后女性接受雌激素替代治疗其海马体积反较对照组的缩小[12]。WHIMS 在替代治疗中所采用的是结合雌激素。研究表明，结合雌激素替代治疗可能损害老年认知功能，加重老年海马体积萎缩[12,24]。因此，我们推测所选用的雌激素不同可能是造成上述结果不一致的主要原因。而神经影像学技术虽然是一种很好的进行活体研究的手段，但通过影像学成像技术获取的海马数据仍然是间接且不精确的[25]。因此，本实验采用新的体视学方法精确定量研究了海马及其 CA1 区体积。结果显示雌激素替代治疗 4 周对海马总体积没有显著性影响，这与 Greenberg 等[10]的研究结果一致，但与 Eberling 等[11]的研究结果不同。其中定量研究方法的不同及对海马分区定义的不同可能是导致结果不一致的重要原因。

此外，本团队的前期研究和国外的研究报道均提示雌激素可能对中枢神经系统有髓神经纤维具有保护作用[13-14]。Patel 等[14]应用雌激素治疗 CPZ 处理过的去性腺小鼠，发现接受雌激素替代治疗的小鼠其胼胝体内的有髓神经纤维数量明显较安慰剂组增加，而且其胼胝体内轴突的 g 比率（轴突直径/有髓神经纤维直径）明显低于安慰剂组。尽管这些研究提示雌激素替代治疗对有髓神经纤维及其髓鞘具有保护作用，但因为没有正确运用定量研究方法，其研究结果仅为半定量信息。因此，我们应用电镜技术结合体视学三维定量方法研究海马 CA1 区有髓神经纤维并发现，雌激素替代治疗后海马 CA1 区有髓神经纤维的总体积以及髓

表 1 连续 4 周雌激素替代治疗对 OVX 大鼠海马 CA1 区有髓神经纤维的影响

组别	n	海马平均体积（mm^3）	CA1 平均体积（mm^3）	有髓神经纤维				
				总体积（mm^3）	髓鞘总体积（mm^3）	轴突总体积（mm^3）	总长度（km）	平均直径（μm）
OVX + Veh 组	9	87.308	26.848	1.689	0.773	0.852	3.612	0.721
OVX + E2 组	10	89.023	27.880	2.219[a]	1.066[b]	1.150	4.630	0.712

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 OVX + Veh 组比较

鞘的总体积较安慰剂治疗组显著增加，这与 Patel 等[14]的研究结果相一致。但因 CA1 区有髓神经纤维的总体积占 CA1 区体积的比例很小，CA1 区内有髓神经纤维体积的增加不足以显著性影响 CA1 区总体积。因此，本研究发现 OVX + E2 组 CA1 区有髓神经纤维及髓鞘的总体积较 OVX + Veh 组显著性增加，但是 OVX + E2 组和 OVX + Veh 组的 CA1 区体积并不存在显著性差异。而中枢神经系统有髓神经纤维髓鞘是由少突胶质细胞包裹轴突形成的，而少突胶质细胞又是由胶质前体细胞分化而来。大量研究显示 17β-雌二醇有助于卵巢切除大鼠胶质前体细胞的增殖[7]、促进少突胶质细胞对髓鞘板层样结构的构建以及髓鞘碱性蛋白的合成[8]。根据这些研究结果，我们推测雌激素替代治疗可能是通过活化前体细胞以及少突胶质细胞，从而增加了有髓神经纤维总体积及其髓鞘总体积。同时，我们必须承认 4 周的雌激素替代治疗相对较短。为明确雌激素替代治疗对中老年海马的影响，我们将在后期进一步的研究长期雌激素替代治疗对中老年海马及 CA1 区体积的影响。

综上所述，给予双侧卵巢切除大鼠为期 4 周的雌激素替代治疗可以明显保护大鼠的空间记忆能力，增加海马 CA1 区有髓神经纤维总体积和髓鞘总体积。本研究结果表明雌激素替代治疗对中老年卵巢切除大鼠空间记忆能力及海马 CA1 区有髓神经纤维及其髓鞘结构均具有积极的保护作用。

参考文献：

[1] Paganini-Hill A, Henderson V W. Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease[J]. Arch Intern Med, 1996, 156(19): 2213 - 2217.

[2] Tang M X, 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.

[3] Talboom J S, Williams B J, Baxley E R, *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] Kiss A, Delattre A M, Pereira S I, *et al*. 17β-estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas[J]. Behav Brain Res, 2012, 227(1): 100 - 108.

[5] Adams M M, Shah R A, Janssen W G, *et al*. Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(14): 8071 - 8076.

[6] Murphy D D, Segal M. Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones[J]. J Neurosci, 1996, 16(13): 4059 - 4068.

[7] 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.

[8] Arevalo M A, Santos-Galindo M, Bellini M J, *et al*. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1800(10): 1106 - 1112.

[9] Peters A, Moss M B, Sethares C. Effects of aging on myelinated nerve fibers in monkey primary visual cortex[J]. J Comp Neurol, 2000, 419 (3): 364 - 376.

[10] Greenberg D L, Payne M E, MacFall J R, *et al*. Differences in brain volumes among males and female hormone-therapy users and nonusers [J]. Psychiatry Res, 2006, 147(2/3): 127 - 134.

[11] Eberling J L, Wu C, Haan M N, *et al*. Preliminary evidence that estrogen protects against age-related hippocampal atrophy[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(5): 725 - 732.

[12] Resnick S M, Espeland M A, Jaramillo S A, *et al*. Postmenopausal hormone therapy and regional brain volumes: the WHIMS-MRI Study [J]. Neurology, 2009, 72(2): 135 - 142.

[13] 黄春霞，仇玄，卢伟，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2010，32(6)：546 - 549.

[14] Patel R, Moore S, Crawford D K, *et al*. Attenuation of corpus callosum axon myelination and remyelination in the absence of circulating sex hormones[J]. Brain Pathol, 2013, 23(4): 462 - 475.

[15] Chakraborty T R, Gore A C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2004, 229(10): 977 - 987.

[16] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1984, 11(1): 47 - 60.

[17] 李永德，王芸，程国华，等. 不同双环己酮草酰二腙剂量诱导小鼠行为学改变及海马 CA1 区和 DG 区内有髓神经纤维改变[J]. 第三军医大学学报，2013，35(13)：1331 - 1336.

[18] 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.

[19] 卢伟，杨殊，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.

[20] Caldwell B M, Watson R I. An evaluation of psychologic effects of sex hormone administration in aged women. I. Results of therapy after six months[J]. J Gerontol, 1952, 7(2): 228 - 244.

[21] Sherwin B B. Estrogen and cognitive aging in women[J]. Neuroscience, 2006, 138(3): 1021 - 1026.

[22] Wide J K, Hanratty K, Ting J, *et al*. High level estradiol impairs and low level estradiol facilitates non-spatial working memory[J]. Behav Brain Res, 2004, 155(1): 45 - 53.

[23] Galea L A, Wide J K, Paine T A, *et al*. High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning, stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory [J]. Behav Brain Res, 2001, 126(1/2): 115 - 126.

[24] Espeland M A, Rapp S R, Shumaker S A, *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] Scholz J, Klein M C, Behrens T E, *et al*. Training induces changes in white-matter architecture[J]. Nat Neurosci, 2009, 12(11): 1370 - 1371.

（**收稿**：2013-09-18；**修回**：2013-11-05）

（编辑　吴培红）