

本文引用: 雷华娟, 田丰铭, 易健, 邓涓, 李梓欧, 戴金城, 郭芬乐, 李乐, 刘柏炎. 养阴宁神方对去势小鼠海马神经元突触的可塑性调节[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 30-37.

养阴宁神方对去势小鼠海马神经元突触的可塑性调节

雷华娟^{1,2}, 田丰铭¹, 易健¹, 邓涓^{1,3}, 李梓欧^{1,3}, 戴金城⁴, 郭芬乐¹, 李乐², 刘柏炎^{3*}

1.湖南中医药大学第一附属医院麻醉科, 湖南长沙 410007; 2.长沙医学院, 湖南长沙 410219;

3.湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410013; 4.新疆医科大学, 新疆乌鲁木齐 830054

[摘要] **目的** 观察养阴宁神方对雌性小鼠去势后认知功能的影响。**方法** 将60只C57BL/6J雌性小鼠随机分为假手术组、模型组、雌激素组、低、中、高剂量组, 每组10只。假手术组仅切开皮肤和腹膜, 不摘除小鼠的卵巢; 其余各组均进行双侧卵巢切除术。假手术组、模型组均给予等容量的生理盐水(0.1 mL/10 g), 雌激素组[雌二醇(estradiol, E₂), 0.09 mg/kg]组及低剂量组(9.459 g/kg)、中剂量组(18.459 g/kg)、高剂量组(36.99 g/kg)灌胃药液, 均灌胃3周。记录小鼠术后伤口愈合时间, 去势前、去势1周、去势4周进行水迷宫潜伏实验和穿梭实验测试小鼠的学习记忆功能。采用ELISA法测定血清E₂含量; HE染色观察小鼠海马神经元的形态; 尼氏染色观察海马神经尼氏染色阳性细胞的数量; 共聚焦显微镜下观察小鼠海马神经元细胞超微结构情况。**结果** 与假手术组相比, 模型组伤口愈合时间延长($P<0.05$); 与模型组、雌激素组及低、高剂量组比较, 中剂量组伤口愈合时间缩短($P<0.05$)。去势1周, 与假手术组比较, 模型组、雌激素组及低、中、高剂量组逃避潜伏期延长、穿梭次数减少($P<0.05$)。去势4周, 与假手术组比较, 模型组逃避潜伏期延长、穿梭次数减少($P<0.05$); 与模型组相比, 雌激素组及低、中、高剂量组逃避潜伏期缩短、穿梭次数增加($P<0.05$)。去势4周, 与假手术组比较, 模型组E₂浓度明显降低($P<0.01$); 与模型组比较, 雌激素组及低、中、高剂量组E₂浓度明显增高($P<0.01$)。尼氏染色显示, 与假手术组比较, 模型组尼氏阳性细胞数减少($P<0.01$); 与模型组比较, 雌激素组及低、中、高剂量组尼氏阳性细胞数增加($P<0.01$)。HE染色显示, 假手术组、雌激素组、低、中、高剂量组锥体神经元增多, 且突起明显; 模型组锥体神经元较少、颗粒细胞较多。共聚焦显微镜下见, 假手术组、雌激素组、低、中、高剂量组海马神经元囊泡和突触粗面内质网结构增多; 模型组海马神经元囊泡和突触减少。**结论** 养阴宁神方可能通过提高血浆E₂水平、改善海马神经元突触形态和功能可塑性、增加去势小鼠的认知功能, 从而发挥脑保护作用。

[关键词] 养阴宁神方; 去势; 雌激素; 海马; 神经元; 突触可塑性

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.01.005

Modulation of synaptic plasticity of the hippocampus in ovariectomized mice by Yangyin Ningshen Formula

LEI Huajuan^{1,2}, TIAN Fengming¹, YI Jian¹, DENG Juan^{1,3}, LI Zi'ou^{1,3}, DAI Jincheng⁴,

GUO Fengle¹, LI Le², LIU Baiyan^{3*}

1. Department of Anesthesiology, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219, China; 3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan

410013, China; 4. Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China

[收稿日期] 2023-06-29

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(8210151330); 湖南省中医药管理局项目(C2023036); 湖南省自然科卫联合基金项目(2021JJ70107); 湖南中医药大学重点项目(2019XJJ040)。

[通信作者] *刘柏炎, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: liubaiyan@126.com。

[Abstract] Objective To observe the effects of Yangyin Ningshen Formula (YYNSF) on cognitive function in ovariectomized female mice. **Methods** Sixty C57BL/6J female mice were randomly divided into sham-operated group, model group, estrogen group, and low-, medium-, and high-dose YYNSF groups, with 10 mice in each group. Sham-operated group underwent skin and peritoneal incision without removing the ovaries, while the rest groups were subject to bilateral ovariectomy. Sham-operated and model groups were given equal volume of saline (0.1 ml/10 g), while estrogen group [estradiol (E_2), 0.09 mg/kg], and low- (9.459 g/kg), medium- (18.459 g/kg), and high-dose (36.99 g/kg) YYNSF groups were given corresponding medications. All groups were treated by gavage for three weeks. The wound healing time after surgery was recorded. Morris water maze with recording latency and cross times were carried out before ovariectomy, one week and four weeks after ovariectomy respectively, in order to assess the learning and memory function of the mice. ELISA was used to measure the level of serum E_2 ; HE staining was performed to observe morphology of the hippocampal neurons; Nissl staining was used to observe the number of Nissl-positive cells in the hippocampus; confocal microscopy was used to observe the ultrastructures in the hippocampal neurons. **Results** The wound healing time of model group was longer than that of sham-operated group ($P<0.05$). Compared with model, estrogen, and low- and high-dose YYNSF groups, the wound healing time of medium-dose YYNSF group was shortened ($P<0.05$). The Morris water maze test revealed that compared with sham-operated group, all other groups showed prolonged escape latency and reduced cross times at one week after ovariectomy ($P<0.05$). At four weeks after ovariectomy, model group showed prolonged escape latency and reduced cross times compared with sham-operated group ($P<0.05$). Compared with model group, estrogen and low-, medium-, and high-dose YYNSF groups showed shorter escape latency and more cross times ($P<0.05$). Compared with sham-operated group, E_2 level in model group decreased significantly at four weeks after ovariectomy ($P<0.01$); while compared with model group, E_2 level in estrogen and low-, medium-, and high-dose YYNSF groups increased significantly ($P<0.01$). Compared with sham-operated group, Nissl staining demonstrated a decrease in the number of Nissl-positive cells in the hippocampus of model group ($P<0.01$); while compared with model group, the number of Nissl-positive cells in the hippocampus of estrogen and low-, medium-, and high-dose YYNSF groups showed an increase ($P<0.01$). HE staining showed increased pyramidal neurons and their dendritic synapses in sham-operated, estrogen, and low-, medium-, and high-dose YYNSF groups, and fewer pyramidal neurons and more granule cells in model group. Confocal microscopy showed increased synaptic vesicles and rough endoplasmic reticula in the hippocampal neurons of sham-operated, estrogen, and low-, medium-, and high-dose YYNSF groups, and decreased synapses and their vesicles in the hippocampal neurons of model group. **Conclusion** YYNSF may exert protective effects on the brain by increasing plasma E_2 level, improving synaptic morphology and plasticity of the hippocampal neurons, and enhancing cognitive function of the ovariectomized mice.

[Keywords] Yangyin Ningshen Formula; ovariectomy; estrogen; hippocampus; neuron; synaptic plasticity

随着全球老龄人口逐渐上升,2025年全球围绝经期和绝经后妇女人口预计增长至11亿^[1]。围绝经期指生殖能力衰退至完全丧失的阶段,临床上指最后一次月经至最后一次月经结束后的一年^[2]。大多数围绝经期跨度为1~2年,长者可达10年^[3],围绝经期综合征主要以潮热、盗汗、心烦、围绝经期健忘等为临床表现^[4],其中,围绝经期健忘主要以学习及记忆能力下降、注意力变差为主要表现,可伴有焦虑、抑郁或者其他异常情绪^[5]。然而,围绝经期健忘由于无特征性的临床表现,易被个人、家庭和临床忽视。患者很少因围绝经期认知功能减退单独就诊,常出现漏诊、误诊^[6],不仅影响女性的生活质量,还会增加阿尔茨海默病的患病风险^[7]。

围绝经期健忘是围绝经期脑功能衰老最主要的表现之一,与雌激素水平降低有关^[8]。雌激素不仅参

与维持正常生殖功能,在大脑神经元能量代谢、氧化应激、神经营养及再生维持和炎症抑制等方面也发挥重要生理作用^[9]。研究表明,围绝经期雌激素水平变化,通过电生理、代谢、神经化学、微观结构和行为学等对脑产生影响,特别是海马雌激素可通过对雌激素受体 α (estrogen receptor α , $ER\alpha$)的调节,发挥对记忆功能的调控^[10]:一方面,雌二醇(estradiol, E_2)通过海马神经元能量代谢调节影响 $ER\alpha$ 的功能;另一方面, $ER\alpha$ 调节神经元网络兴奋性,通过对海马神经元突触结构和功能的可塑性调节而调控认知功能,从而影响预后和转归^[11]。

中医学将围绝经期健忘归属于“呆症”范畴。围绝经期健忘病位在脑,与肝、肾关系最密切,主要临床表现为脑对记忆力的存储、处理和输出功能下降。刘柏炎教授在多年的临床观察中发现,肝肾阴虚、肝

郁气滞是围绝经期健忘的主要病因、病机。围绝经期健忘与肾虚肝郁关系密切。基于肝肾同源理论,肾精不足,肝气郁结,神失所养导致“脑”核心的记忆功能失调^[2]。因此,刘柏炎教授提出,“肾-肝-脑”轴理论在围绝经期健忘中有重要意义^[3]。养阴宁神方为刘柏炎教授自创的经验方,由清代著名医书《傅青主女科》中所记载的益经汤化裁而来。益经汤是治疗围绝经期综合征的经典名方,主要用于治疗围绝经期综合征之烦躁、盗汗、失眠、眩晕、焦虑和抑郁症状^[4]。目前,养阴宁神方对围绝经期健忘的影响鲜有研究,养阴宁神方化裁后通过大补肾水、疏肝解郁、养血柔肝,共奏补精生髓益智、养阴宁神之效,进而改善围绝经期雌激素下降所致健忘。

本研究通过雌性小鼠双侧卵巢切除术建立去势模型,模拟围绝经期雌激素急剧变化,观察去势后小鼠认知功能的变化^[4]。通过养阴宁神方干预,判断其对去势小鼠海马神经元可塑性的影响,以期围绝经期健忘的防治提供实验证据。

1 材料

1.1 实验动物

健康 C57BL/6J 雌性小鼠 60 只,鼠龄 6 个月,体重 20~25 g,饲养温度 22~26 °C,湿度 50%~70%。所有动物均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号: SCXK(湘)2019-0004。动物自购入之日起,饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级实验动物中心,光暗周期 12 h/12 h,自由摄取食物与水,按实验动物 3R 原则给予人道关怀。本动物实验通过湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理审查(编号:ZYFY20190418)。

1.2 试验药物及制备

养阴宁神方:熟地黄 30 g,炒酸枣仁 15 g,山茱萸 12 g,柴胡、白芍、沙参、牡丹皮各 10 g,当归 8 g。药材购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科,由湖南省超微中药工程技术中心制备药液,浓缩至含生药 1.5 g/mL,分装入 200 mL 广口无菌试剂瓶中,于 4 °C 冰箱中保存备用。戊酸雌二醇(1 mg/片,国药准字:J20171038,德国拜耳公司)。

1.3 主要试剂

小鼠 E₂、睾酮 ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号:JL11790、JL12550);尼氏抗体(江苏菲亚生物科技有限公司,批号:G1430);苏木素、伊红、结晶紫染色液(武汉博士德生物工程有限公

司,批号:AR1180-1、AR1180-2、C8470);2.5%戊二醛(北京索莱宝生物科技有限公司,批号:P1126);Epon-812 包埋剂(美国 SPI 公司,批号:SPI-02660);戊巴比妥钠(德国 Merck KGaA 公司,批号:P3761)。

1.4 主要仪器

光学显微镜、图像分析系统(日本 Olympus 公司,型号:BX51、Image-Pro Express 4);水迷宫软件(西班牙 Panlab 公司,型号:Smart3.0);动物质量天平(上海精密仪器仪表有限公司,型号:YB102);透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司,型号:HT7700);摊片机、超薄切片机(德国 LEICA 公司,型号:UC-7);恒温干燥箱(上海福码实验设备有限公司,型号:DGX-9073B-1)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

60 只 6 月龄雌性小鼠自购入之日起,适应性饲养 1 周后,随机分为 6 组:假手术组、模型组、雌激素组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 10 只。所有动物均喂养普通饲料,并用耳标钳打好记号。

2.2 模型制备与鉴定

2.2.1 雌性小鼠的去势模型制备 雌性小鼠用 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)行腹腔注射,等待到达足够的麻醉深度^[5],运用聚维酮碘常规消毒侧腹部皮肤,剪除约 1.5 cm 毛发,于髂前上棘上 1 cm 切开皮肤及腹部肌肉,切开腹膜,分离结扎双侧卵巢动脉后,切除双侧卵巢,止血后缝合腹膜、肌肉和皮肤。假手术组仅切开皮肤和腹膜,不摘除小鼠的卵巢。每天给予伤口换药一次。

2.2.2 去势模型鉴定 将小鼠放在鼠笼盖上,用一个单独尖端含有无菌蒸馏水(25~50 μL)的负压吸引管冲洗阴道口。然后将冲洗液滴在玻片涂片上,干燥、结晶紫染色 1 min、无菌蒸馏水冲洗 2 次后进行观察。去势后 3、7、10 d,共检测 3 次小鼠阴道脱落细胞,去势成功的标准为:小鼠阴道涂片细胞多为白细胞,而未去势小鼠为多形上皮细胞^[6]。

2.3 动物给药

取熟地黄 30 g,炒酸枣仁 15 g,山茱萸 12 g,柴胡、白芍、沙参、牡丹皮各 10 g,当归 8 g,总共 105 g 生药,以 60 kg 的成人用量,按体表面积计算为 1.75 g/kg,假设人的标准体质量为 60 kg,人的标准体表面积为 1.62 m²;假设小鼠的标准体质量为 0.02 kg,小鼠的标准体表面积为 0.007 m²,设定 K=

标准体质量/标准体表面积,则 $Rab=K_{人}/K_{小鼠}=12.33$,根据人与小鼠的标准质量换算公式: $Db=Da \cdot Rab$,成人即 1.75 g/kg , Rab 取 12.33 , 养阴宁神方小鼠中剂量则为 21.5775 g/kg ,低剂量为 10.7887 g/kg ,高剂量为 43.1550 g/kg ^[17]。采用旋转蒸发仪浓缩养阴宁神方药液至含生药剂量为 1.5 g/mL 。根据小鼠体积 (10 mL/kg) 计算灌胃剂量,灌胃 2 次/d,连续 21 d。戊酸雌二醇灌胃剂量为 0.09 mg/kg ^[18]。

2.4 小鼠伤口愈合时间观察

给予聚维酮碘消毒伤口,每天 1 次,并记录去势后每只小鼠的伤口愈合时间。

2.5 水迷宫实验

采用 Morris 水迷宫系统评估小鼠的空间学习记忆能力^[19],选取潜伏期和穿梭次数进行分析,水迷宫被分为 1、2、3、4 象限,第 4 象限设置平台,水位淹没平台 1 cm ,并被牛奶颜色所覆盖。

2.5.1 定位巡航实验 实验共历时 5 d,每天固定时间段,每个时间段训练 4 次,每次训练 90 s ,间隔 20 s ,训练 4 次后进行测试,记录第 5 天小鼠找到平台的时间(逃避潜伏期),作为小鼠定位巡航的成绩。

2.5.2 空间探索实验 在训练的第 6 天撤除平台,小鼠从第 1 象限入水,记录小鼠在 60 s 内跨越原平台的穿梭次数,作为空间探索实验的成绩。整个实验过程中水温控制在 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.6 ELISA 检测

采用 ELISA 法测定小鼠血浆 E_2 7 个浓度梯度点,通过链酶素-HRP 反应,封板、温育、洗涤,吸水拍干,显色、加样、加酶,最后在空白孔调零, 450 nm 波长处测量 OD 值。

2.7 HE 染色

海马组织依次通过不同浓度乙醇脱水,依次浸泡于 2 个二甲苯中透明;再将海马组织浸泡于 2 个石蜡缸包埋制成蜡块。将海马蜡块预冷后固定、切片,然后烤片。石蜡切片脱蜡,最终染色并使用中性树胶封片。

2.8 尼氏染色

石蜡切片用 4% 多聚甲醛固定 10 min ,蒸馏水洗涤 2 min ,换用新鲜蒸馏水再洗涤 2 min ,尼氏染色液染色 10 min 。蒸馏水洗涤,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片后显微镜下观察尼氏阳性细胞数量,并用 Image J 软件进行处理。

2.9 电镜观察海马神经元超微结构

在冰上解剖海马组织,并放入 2.5% 戊二醛中固定,然后用 0.01 mmol/L PBS (pH 7.3) 漂洗,1% 锇酸室温固定后脱水,脱水后用 Epon-812 包埋剂包埋海马,再用超薄切片机,将小鼠海马组织切成 $60\sim 80 \text{ nm}$ 超薄切片,最后用电子显微镜观察。

2.10 统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计分析,所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析检验,符合正态分布、方差齐者采用 LSD 法,符合正态分布、方差不齐者采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠伤口愈合时间比较

与假手术组相比,其余各组小鼠伤口愈合时间延长 ($P < 0.05$);与模型组、雌激素组、低剂量组、高剂量组相比,中剂量组小鼠伤口愈合时间缩短 ($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组小鼠伤口愈合时间比较 ($n=10, \bar{x} \pm s, d$)

组别	术后愈合时间
假手术组	8.08 ± 0.82
模型组	$10.59 \pm 0.96^*$
雌激素组	$9.63 \pm 0.96^*$
低剂量组	$9.92 \pm 0.92^*$
中剂量组	$7.89 \pm 0.70^{* \text{§} \text{¶}}$
高剂量组	$9.60 \pm 0.96^{* \text{▲}}$

注:与假手术组比较, $*P < 0.05$;与模型组比较, $^{\text{¶}}P < 0.05$;与雌激素组比较, $^{\text{§}}P < 0.05$;与低剂量组比较, $^{\text{¶}}P < 0.05$;与中剂量组比较, $^{\text{▲}}P < 0.05$ 。

3.2 各组小鼠水迷宫测试结果比较

3.2.1 定位巡航实验 去势前,各组小鼠寻找平台的逃避潜伏期时间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。去势 1 周,与假手术组比较,其余各组小鼠寻找平台的逃避潜伏期时间延长 ($P < 0.05$)。去势 4 周,与假手术组比较,模型组小鼠寻找平台的逃避潜伏期时间延长 ($P < 0.05$);与模型组比较,雌激素组及低、中、高剂量组小鼠寻找平台的逃避潜伏期时间缩短 ($P < 0.05$)。与去势前比较,去势 1 周,模型组、雌激素组及低、中、高剂量组小鼠寻找平台的逃避潜伏期时间延长 ($P < 0.05$)。与去势 1 周比较,去势 4 周,雌激素组及低、中、高剂量组小鼠寻找平台的逃避潜伏期时间延长 ($P < 0.05$)。详见图 1、表 2。

表2 各组小鼠平台逃避潜伏期的比较($n=10, \bar{x} \pm s, s$)

组别	去势前	去势1周	去势4周
假手术组	41.67±4.76	39.33±3.33	43.17±4.26
模型组	40.67±6.44	64.17±4.71* [▲]	61.33±4.89*
雌激素组	39.33±15.06	62.83±7.03* [▲]	47.33±6.25* [△]
低剂量组	39.93±5.79	62.67±4.93* [▲]	49.01±2.53* [△]
中剂量组	48.33±9.83	63.51±5.01* [▲]	46.33±7.74* [△]
高剂量组	49.33±6.98	63.33±4.03* [▲]	47.33±5.61* [△]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与去势前比较,[▲] $P<0.05$;与去势1周比较,[△] $P<0.05$ 。

3.2.2 空间探索实验 去势前,各组小鼠穿梭次数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。去势1周,与假手术组相比,其余各组小鼠穿梭次数减少($P<0.05$)。去势4周,与假手术组比较,模型组小鼠穿梭次数减少($P<0.05$);与模型组比较,雌激素组及低、中、高剂量组小鼠穿梭次数增加($P<0.05$)。与去势前比较,去势1周,模型组、雌激素组及低、中、高剂量组小鼠穿梭次数减少($P<0.05$)。与去势1周比较,去势4周,雌激素组及低、中、高剂量组小鼠穿梭次数增加($P<0.05$)。详见图1、表3。

表3 不同小组小鼠穿梭次数的比较($n=10, \bar{x} \pm s, \text{次}/60\text{s}$)

组别	去势前	去势1周	去势4周
假手术组	7.83±1.17	7.52±1.05	8.33±1.51
模型组	8.01±0.89	4.17±0.75* [▲]	4.33±1.03*
雌激素组	8.02±0.73	4.67±1.63* [▲]	8.61±1.03* [△]
低剂量组	7.87±1.05	3.67±1.03* [▲]	8.48±1.05* [△]
中剂量组	7.92±0.52	3.17±1.17* [▲]	8.83±1.17* [△]
高剂量组	8.06±1.41	3.83±2.14* [▲]	8.67±1.03* [△]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与去势前比较,[▲] $P<0.05$;与去势1周比较,[△] $P<0.05$ 。

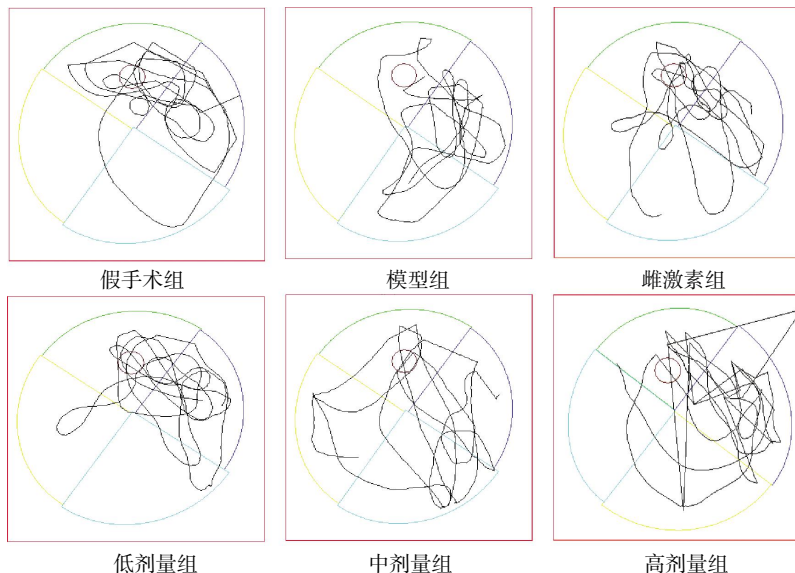


图1 各组小鼠水迷宫轨迹图

3.3 各组小鼠 E_2 浓度的比较

去势4周,与假手术组比较,模型组 E_2 浓度降低($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组及低、中、高剂量组 E_2 浓度增高($P<0.01$)。详见表4。

3.4 各组小鼠 HE 染色比较

假手术组小鼠海马区神经元细胞排列紧密、整齐,锥体神经元数量较多,核浓染,神经元突触细长且明显。模型组海马区表现为颗粒细胞多、锥体神经元稀少。雌激素组及低、中、高剂量组锥体神经元数量增多,树突突起增加。详见图2。

3.5 各组小鼠海马神经元尼氏染色比较

去势4周,与假手术组比较,模型组尼氏染色阳性细胞数减少($P<0.01$);与模型组比较,雌激素组及低、中、高剂量组尼氏染色阳性细胞数明显增加($P<0.01$)。详见图3、表5。

3.6 各组小鼠海马神经元突触可塑性比较

假手术组神经元突触量多,突触内囊泡清晰可见。去势4周,模型组可见囊泡、突触减少,海马神经元出现核糖体稀疏、粗面内质网减少。与模型组相比,雌激素组及低、中、高剂量组突触和粗面内质网结构增多。详见图4。

4 讨论

围绝经期综合征除生殖系统改变明显外,还出现潮热、心慌、出汗、记忆力下降等一系列临床表现^[4]。目前,围绝经期大脑记忆功能减退备受关注,围绝经期女性健忘的发生率是绝经前的1.4倍,其独立于

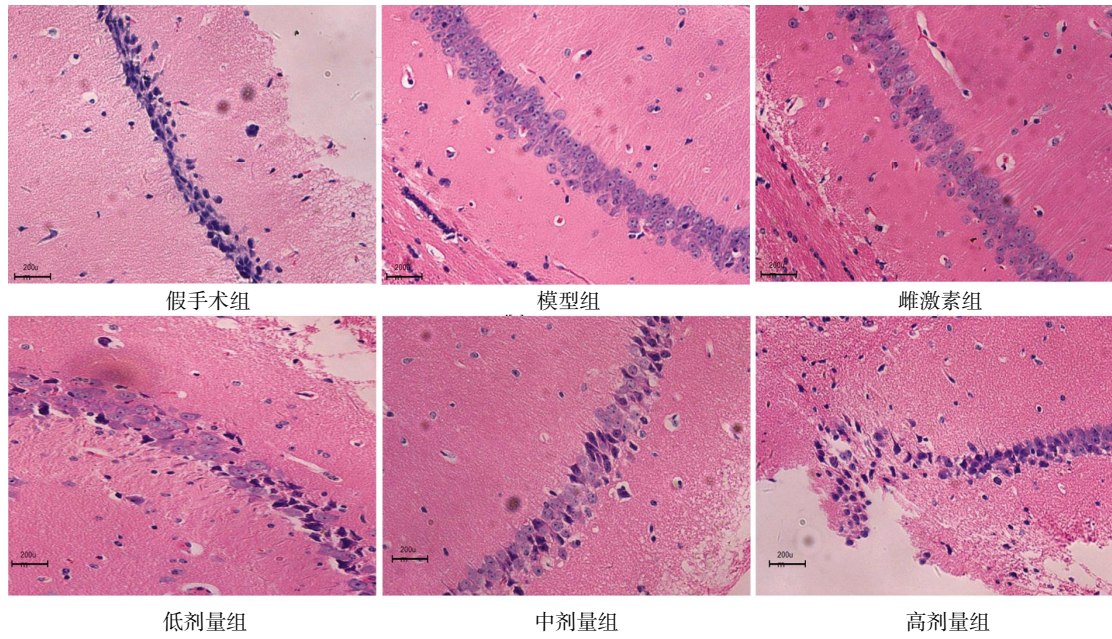


图 2 各组海马组织 HE 染色图(×200)

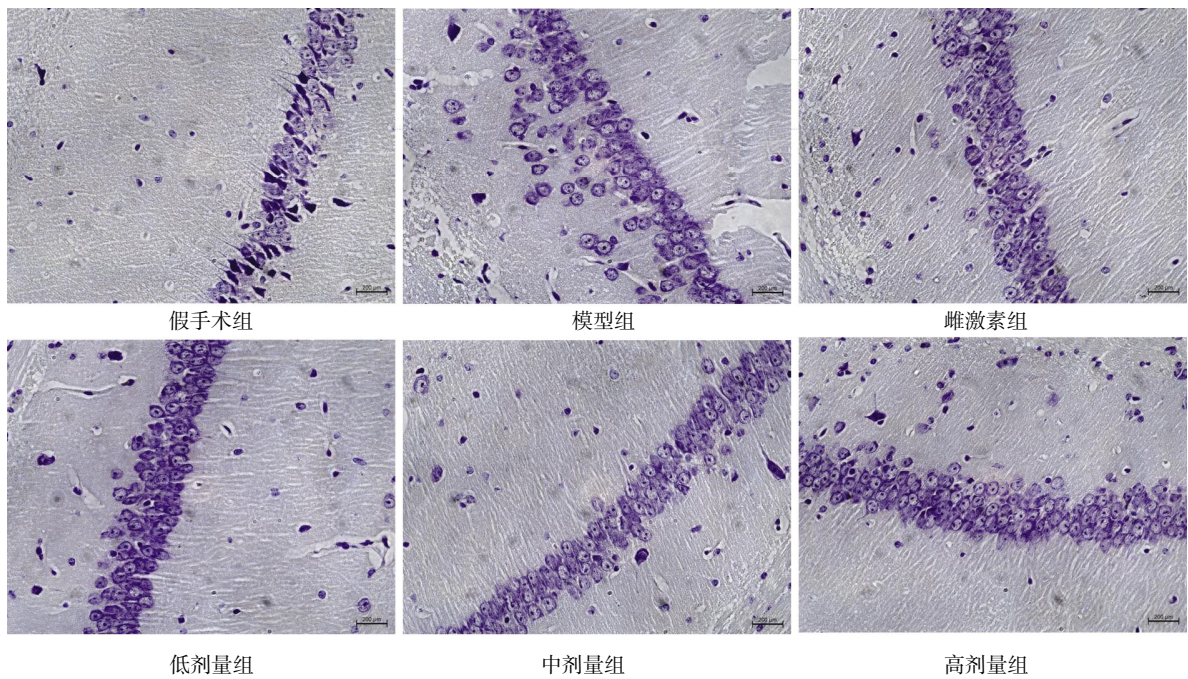


图 3 各组海马组织尼氏染色图(×200)

表 4 各组小鼠去势 4 周血浆 E₂ 浓度比较(n=10, $\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	E ₂ 浓度
假手术组	1 586.58±125.30
模型组	1 167.78±94.04**
雌激素组	1 552.80±44.56 ^{##}
低剂量组	1 438.65±243.37 ^{##}
中剂量组	1 591.92±99.48 ^{##}
高剂量组	1 433.59±116.22 ^{##}

注:与假手术组比较,**P<0.01;与模型组比较,^{##}P<0.01。

表 5 各组海马神经元尼氏染色阳性细胞数(n=10, $\bar{x} \pm s$, 个/HP)

组别	尼氏阳性细胞数
假手术组	78.61±11.96
模型组	40.21±8.84**
雌激素组	73.13±16.53 ^{##}
低剂量组	70.54±15.65 ^{##}
中剂量组	80.17±17.35 ^{##}
高剂量组	72.45±9.25 ^{##}

注:与假手术组比较,**P<0.01;与模型组比较,^{##}P<0.01。

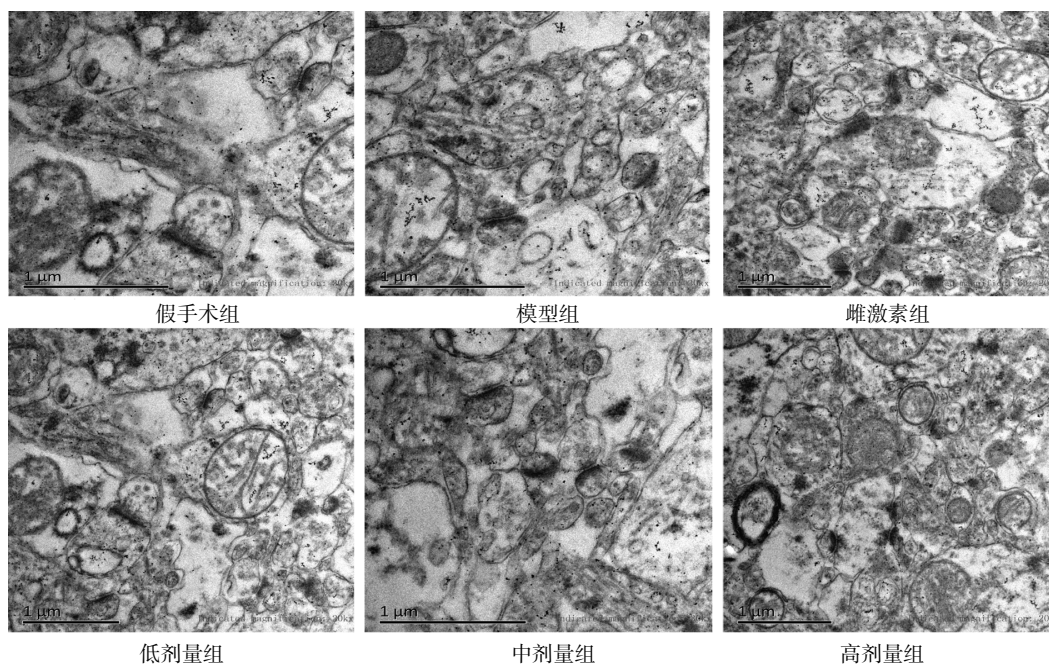


图 4 各组海马神经元突触的电镜图($\times 10\ 000$)

潮红、焦虑、抑郁之外,需要引起临床医师的重视^[18]。围绝经期综合征与卵巢功能密切相关,生物学特征为血液中雌激素剧烈波动,特别是血浆 E_2 水平。近几十年来, E_2 已成为治疗雌激素缺乏(双侧卵巢切除致绝经)和雌激素减少(自然绝经)的一线用药。除对生殖功能的影响,雌激素还能改善大脑功能,在研究中得到越来越多的重视^[20]。 E_2 片剂临床用量是 1 mg/d ,为 $0.02\sim 0.33\text{ mg/kg}$ ^[21]。早期补充雌激素的效果更佳,特别是对记忆功能的改善作用。但是长期雌激素治疗可能增加子宫内膜癌、乳腺癌等肿瘤和血栓发生的风险^[22],如何利用雌激素改善记忆功能,同时又不增加肿瘤和血栓发生的风险是目前临床上的难点之一。

养阴宁神方是刘柏炎教授的经验方,刘柏炎教授从中医肾、肝、脑的关系出发,指出围绝经期易出现肾虚肝郁,而导致精虚髓亏,从而发生健忘,以“肾-肝-脑”轴立论阐述围绝经期健忘的病因病机,基于“养阴宁神定智”创立了“养阴宁神方”治疗围绝经期健忘。本研究用雌性小鼠去势模拟围绝经期,通过养阴宁神方干预观察其对去势小鼠认知功能的影响。

各组小鼠去势后伤口愈合时间比较发现,与假手术组比较,模型组,雌激素组,低、高剂量组小鼠伤口愈合时间延长;与模型组、雌激素组、低剂量组、高剂量组相比,中剂量组小鼠伤口愈合时间缩短。去势 1 周,水迷宫测试发现,与假手术组比较,其余各组去势后学习、记忆功能下降;去势 4 周,除模型组

外,其余各组逃避潜伏期缩短、穿梭次数增加。说明雌激素、养阴宁神方可增强小鼠海马神经元的学习、记忆等认知功能。模型小鼠去势后,血浆 E_2 水平显著下降。去势 4 周,在外源性的 E_2 和养阴宁神方干预后,各组血浆 E_2 水平明显高于模型组。说明养阴宁神方可增加血浆 E_2 水平,与口服 E_2 片剂效果一致。结合行为学的结果和血浆 E_2 水平的变化,说明去势后 E_2 水平急剧下降是学习认知功能减退的主要原因之一,养阴宁神方通过升高血浆 E_2 的水平而改善学习记忆能力。HE 染色发现,雌激素组和养阴宁神方各组海马锥体神经元粗大、核浓染,突起明显,养阴宁神方各组锥体神经元的数量增加,相反,模型组海马锥体神经元稀少而颗粒细胞居多,突起不明显。尼氏染色发现,模型组尼氏染色阳性细胞数量明显低于其他组,提示雌激素组及养阴宁神方各组均可增强去势后海马神经元蛋白合成功能。电镜结果提示,模型组小鼠海马神经元胞浆内粗面内质网和突触数量减少,而雌激素组及养阴宁神方各组均能增加去势后神经元突触数量,从而改善海马神经元突触可塑性。

E_2 是脑强力调节剂,是调节神经元存活、可塑性、神经保护的重要激素之一^[23]。该激素对学习和记忆调节具有不可替代的作用^[24]。前额皮质、海马等区域都含有大量的雌激素受体^[24]。 E_2 能通过海马组织 $ER\alpha$ 等,调节海马神经元发生和树突形成^[25]。 E_2 可通过调节 $ER\alpha$ 神经内分泌反应而改善认知功能。本研究发现小鼠去势后认知功能下降与 E_2 的水平密

切相关。养阴宁神方可模拟 E_2 的作用,通过雌激素-神经-内分泌网络,改善去势神经元突触可塑性,从而发挥对去势小鼠海马神经功能的保护作用,其中,养阴宁神方中剂量组效果最好。

参考文献

- [1] CARPENTER J S, SHENG Y, PIKE C, et al. Correlates of palpitations during menopause: A scoping review[J]. *Women's Health*, 2022, 18: 1-14.
- [2] GTRIOIA L, MARTONE S, MORGANTE G, et al. Management of perimenopause disorders: Hormonal treatment[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2021, 37(3): 195-200.
- [3] LEGA I C, FINE A, ANTONIADES M L, et al. A pragmatic approach to the management of menopause[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2023, 195(19): E677-E672.
- [4] 初怡静, 王福玲, 娄艳辉, 等. 青岛地区女性围绝经期症状流行病学调查分析[J]. *现代妇产科进展*, 2012, 21(7): 553-556.
- [5] SOARES C N, SHEA A K. The midlife transition, depression, and its clinical management[J]. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 2021, 48(1): 215-229.
- [6] SANTORO N, ROECA C, PETERS B A, et al. The menopause transition: Signs, symptoms, and management options[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2021, 106(1): 1-15.
- [7] MCCARTHY M, RAVAL A P. The peri-menopause in a woman's life: A systemic inflammatory phase that enables later neurodegenerative disease[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 317.
- [8] KOYSOMBAT K, MCGOWN P, NYUNT S, et al. New advances in menopause symptom management[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2023, 11: 101774.
- [9] ECHEVERRIA V, ECHEVERRIA F, BARRETO G E, et al. Estrogenic plants: To prevent neurodegeneration and memory loss and other symptoms in women after menopause[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 644103.
- [10] FESTER L, RUNE G M. Sex neurosteroids: Hormones made by the brain for the brain[J]. *Neuroscience Letters*, 2021, 753: 135849.
- [11] BAUMGARTNER N E, DANIEL J M. Estrogen receptor α : A critical role in successful female cognitive aging[J]. *Climacteric: the Journal of the International Menopause Society*, 2021, 24(4): 333-339.
- [12] 宁港, 吴梅, 李波男, 等. 肝细胞生长因子是“乙癸同源”可能的物质基础探讨[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(10): 1720-1724.
- [13] 雷华娟, 刘柏炎. 基于“肾-肝-脑”轴探讨围绝经期健忘的中医防治[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(12): 2300-2304.
- [14] 金凡惠, 刘雁峰, 郑涵予, 等. 《傅青主女科》肝脾同治法在妇科病中的应用[J]. *现代中医临床*, 2023, 30(2): 74-77.
- [15] WANG Y, PAN Q, TIAN R, et al. Repeated oxytocin prevents central sensitization by regulating synaptic plasticity via oxytocin receptor in a chronic migraine mouse model[J]. *The Journal of Headache and Pain*, 2021, 22(1): 84.
- [16] EKAMBARAM G, SAMPATH-KUMAR S K, JOSEPH L D. Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method[J]. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2017, 11(1): AC05-AC07.
- [17] 郑旭霞, 柴爽, 魏立伟, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路的骨松益骨方对去势大鼠的骨保护作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(12): 1691-1699.
- [18] 顾仁艳, 何丽, 张秋梅, 等. 滋阴温阳序贯方对卵巢功能减退动物模型的调节作用[J]. *吉林中医药*, 2022, 42(10): 1189-1194.
- [19] 雷华娟, 滕永杰, 税林辉, 等. 七氟烷对老年大鼠认知功能和海马突触可塑性的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(6): 842-846.
- [20] BAUMGARTNER N E, MCQUILLEN S M, PERRY S F, et al. History of previous midlife estradiol treatment permanently alters interactions of brain insulin-like growth factor-1 signaling and hippocampal estrogen synthesis to enhance cognitive aging in a rat model of menopause[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2022, 42(42): 7969-7983.
- [21] 刘燕, 张静. 戊酸雌二醇片对围绝经期综合征患者更年期综合征评分、雌激素水平与不良反应的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2020, 24(1): 109-111.
- [22] MARJORIBANKS J, FARQUHAR C, ROBERTS H, et al. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women[J]. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017, 1(1): CD004143.
- [23] PEROVIĆ M, HEFFERNAN E M, EINSTEIN G, et al. Learning exceptions to category rules varies across the menstrual cycle[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 21999.
- [24] BRANN D W, LU Y J, WANG J, et al. Brain-derived estrogen and neural function[J]. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2022, 132: 793-817.
- [25] KRAUSE W C, RODRIGUEZ R, GEGENHUBER B, et al. Oestrogen engages brain MC4R signalling to drive physical activity in female mice[J]. *Nature*, 2021, 599(7883): 131-135.

(本文编辑 周旦)