

17 β -雌二醇降低大鼠慢性低灌注诱导的空间记忆损伤及其分子机制

朱莹,李宁,代永鑫,唐慧,王瑞敏*

(华北理工大学医学研究中心,科技部老年医学国际合作基地,神经生物学研究所,河北唐山 063000)

[摘要] 目的:观察慢性低灌注 3 个月大鼠空间学习、记忆能力的变化及 17 β -雌二醇(E2)的长期保护作用,揭示血管性痴呆进行性病变的分子机制。方法:永久性结扎成年雄性 SD 大鼠双侧颈总动脉,诱导慢性低灌注模型,并随机分为假手术(sham)组、安慰剂(placebo,Pla)组及 E2 处理组;采用免疫荧光染色或 Western blot 技术检测海马 CA1 区神经元及突触相关蛋白的变化,采用 Morris 水迷宫检测大鼠空间记忆能力。结果:①Morris 水迷宫结果显示,Pla 组大鼠发现水下平台所用时间与 sham 组大鼠相比无显著差异,而探索试验中在平台原所在象限探索的时间较 sham 组大鼠显著降低;②与 sham 组相比,Pla 组大鼠海马 CA1 区 NeuN 阳性染色细胞数及微管相关蛋白(microtubule-associated protein,MAP)-2 的蛋白表达水平无显著差异,而髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)-2 的蛋白表达水平显著降低;③Pla 组大鼠海马 CA1 区突出后致密蛋白 95 (post-synaptic density protein 95,PSD95) 及突触小泡蛋白的蛋白表达水平较 sham 组显著降低;④长期给予 E2 可显著治疗双侧颈总动脉结扎造成的以上变化。结论:双侧颈总动脉结扎 3 个月可导致大鼠空间记忆能力降低,长期给予 E2 可能通过上调海马 CA1 区神经元 MBP2、PSD95、突触小泡蛋白的蛋白表达,从而阻断血管性痴呆的进行性病变。

[关键词] 慢性低灌注;血管性痴呆;17 β -雌二醇;突触;学习记忆

[中图分类号] R749.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-716-05

doi:10.7655/NYDXBNS20160614

17 β -estradiol retards memory impairment induced by chronic hypoperfusion in rats and its molecular mechanism

Zhu Ying, Li Ning, Dai Yongxin, Tang Hui, Wang Ruimin*

(Neurobiology Institute of Medical Research Center, International Science & Technology Cooperation Base of Geriatric Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate change in spatial learning and memory function of rats following chronic hypoperfusion for 3 months, and the neuroprotective effect of long-term treatment with 17 β -estrogen(E2), which aims to outline the molecular mechanisms of progressive lesions in vascular dementia. **Methods:** Chronic hypoperfusion in adult male Sprague - Dawley rats was induced by permanent bilateral common carotid artery occlusion(BCCAO) and the rats were randomly assigned into three groups; the sham group, the placebo(Pla) and the E2 group. Morris water maze was performed to observe spatial learning and memory function of rats. Immunofluorescence staining and Western blot analysis were performed to detect protein expressions of synaptic markers in hippocampal CA1 region. **Results:** (1) Morris water maze analysis revealed no statistical differential in latency time to find sub-water platform between the sham and the Pla groups, but the Pla group significantly decreased probe time in the quadrant where the platform was previously located compared to sham animals. (2) Compared with the sham group, the number of NeuN-positive cells and the protein level of microtubule-associated protein (MAP) 2 of the Pla group had no significant changes, however, the levels of myelin basic protein(MBP)-2 were significantly decreased. (3) In the Pla group, post-synaptic density protein 95 (PSD95) and synaptophysin were significantly decreased compared to the sham group in hippocampal CA1 region. (4) Long-term treatment with E2 reversed these changes induced by BCCAO. **Conclusion:** BCCAO for 3 mon could lead to decreased spatial learning and memory function of rats. Long-term treatment of E2 may block progressive lesions in vascular dementia by up-regulating MBP2, PSD95 and synaptophysin in hippocampal CA1 region.

[基金项目] 国家自然科学基金(31171354);华北理工大学培育基金(GP201303);华北理工大学青年基金(Z201135)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ruimin-wang@163.com

[Key words] chronic hypoperfusion; vascular dementia; 17 β -estradio; synapse; learning and memory

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06): 716-720, 729]

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年期痴呆的主要类型。心血管疾病、动脉粥样硬化、中风等各种原因引发的长期脑血流灌注不足是 VD 发生的主要病因^[1], 已有研究表明 25%~80% 的痴呆出现 VD 和 AD 的混合病理, 并且目前尚无理想的 VD 行为学诊断标准^[2], 所以研究 VD 病理进展的分子机制, 探索有效治疗措施具有重要临床价值。

临床资料表明, 在围绝经期给予激素 (雌激素或联合孕激素) 补充治疗, 可以降低女性患老年痴呆症的风险。本课题组以往的研究发现, 17 β -雌二醇 (17 β -estradiol, E2) 可降低缺血性锥体神经元损伤, 改善双侧卵巢切除大鼠缺血后海马依赖的空间学习、记忆缺陷^[3-4]。Locklear 等^[5]采用 Barnes 迷宫研究发现 E2 可影响成年雄性大鼠的空间认知功能。提示雌激素可能在痴呆发生、发展进程中具有重要作用, 然而其机制尚不清楚。

永久性结扎双侧颈总动脉 (bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO) 为目前公认的 VD 动物模型^[6]。本研究选择 BCCAO 后 3 个月, 并长期给予低剂量 E2, 观察大鼠的空间记忆能力以及突触相关蛋白的变化, 探讨雌激素保护大鼠脑慢性低灌注后认知功能缺陷的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 (250~300 g), 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 (许可证编号: SCXK 京 2004-0004)。本研究所有动物试验均严格按照华北理工大学动物伦理委员会要求进行。

抗突触后致密蛋白 95 (post-synaptic density protein 95, PSD95) 抗体 (ab18258)、抗突触小泡蛋白 (Synaptophysin) 抗体 (ab8049-1) (Abcam 公司, 美国), 抗微管相关蛋白 (microtubule-associated protein, MAP)-2 抗体 (sc-56561)、抗髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP)-2 抗体 (sc109316)、抗 β -actin 抗体 (sc-81178)、抗 α -tubulin 抗体 (sc-398103) (Santa Cruz 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

69 只大鼠随机分为假手术 (sham) 组、安慰剂 (placebo, Pla) 组及长期 E2 处理组。21 只大鼠用于 Western blot 实验, 21 只大鼠用于行为学及免疫荧光染色实验, 27 只大鼠用于 NeuN 染色, 造模过程中死亡 6 只。造模动物采用间隔 7 d 分 2 次永久性结扎大鼠双侧颈总动脉, E2 处理组在第 1 次结扎颈总动脉时皮下埋植 42 d 微量释放泵 (Alzet 2006, 0.15 μ L/h), 保证 E2 释放量为 0.05 μ g/h, 雌激素溶剂为 20% 环糊精, 此剂量可维持雌性大鼠血清雌二醇的生理剂量^[3]; Pla 组采用同样方法给予同等体积 20% 环糊精; sham 组只分离但不结扎双侧颈总动脉, 其余步骤与造模动物相同。

1.2.2 蛋白样品制备

将各组大鼠断头快速取脑、沿海马裂分离出 CA1 区, 并置液氮中冻存、备用。从液氮中取出组织, 加入 1.2 mL 匀浆裂解液匀浆, 4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 20 min, 移取上清液于 4 $^{\circ}$ C 17 000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀, 吸取上清液即为胞浆蛋白。采用 BCA 法检测蛋白浓度。50 μ g 蛋白经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至 PVDF 膜上, 3% BSA 封闭 1 h, 一抗 PSD95 (1:1 000)、Synaptophysin (1:1 000)、MAP-2 (1:200)、MBP-2 (1:200)、 β -actin (1:1 000)、 α -tubulin (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜, 加入相应的碱性磷酸酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜, NBT/BCIP 显色。

1.2.3 免疫荧光染色

按本室已经建立的方法^[7-8], 行为学实验结束后, 大鼠经过 20% 水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 迅速开胸暴露心脏, 经心脏快速灌注温生理盐水 50 mL, 随即快注冷的 4% 多聚甲醛固定液 100 mL 后, 断头取脑置 4% 多聚甲醛中固定 4~6 h。30% 蔗糖脱水至组织完全下沉。OCT 包埋后冷冻切片连续冠状切片 (25 μ m)。切片用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 0.4% Triton-PBS 打孔 1 h; 10% 驴血清室温封闭 1 h 后加相应的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 0.1% Triton-PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入相应荧光二抗 (1:200), 室温避光孵育 1 h, 0.1% Triton-PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 贴片, 甘油-PBS 封片。Olympus FV1000 激光扫描共聚焦显微镜观察, 并采集图像。

1.2.4 大鼠行为学检测

采用 Morris 水迷宫法检测大鼠空间学习记忆功能。水迷宫由安徽淮北正华生物仪器设备有限公司生产 (MWM)。按本室已建立的技术^[4,7-8], 大鼠进行 7 d 潜伏实验, 并记录其到达平台的潜伏时间、路径及平均速度。在第 3、7 天分别进行探索实验, 并记录其探索路径、平均速度及原平台所在象限时间百分比等相关数据, 检测大鼠空间记忆能力。

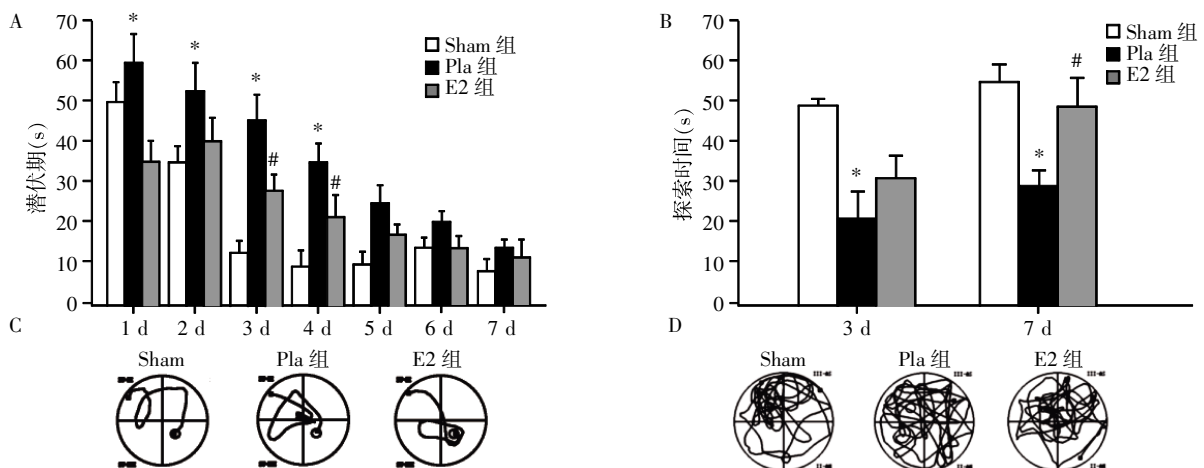
1.3 统计学方法

实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并用 Sigma Plot10.0 软件作图。用 Image J (Version 1.30 v) 分析软件作灰度分析, 使用 Sigma STAT32 统计软件采用单因素方差分析 (ANOVA), 多个实验组与一个对照组比较用最小显著差法 (LSD), 实验组之间比较采用 q 检验 (Newman-keuls test), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 长期生理剂量 E2 有效改善 BCCAO 后大鼠的空间记忆能力

水迷宫结果显示, 与 sham 组相比, Pla 组大鼠 1~4 d 到达平台的潜伏期显著延长, 但两组于潜伏实验的 5~7 d 无显著差异 (图 1A、C); 但是在探索实验的 2 个时间点 (实验第 3、7 天), Pla 组大鼠在平台原所在象限探索的时间较 sham 组显著减少 (图 1B、D)。E2 处理组与 Pla 组相比, 大鼠于实验第 3、4 天的潜伏期显著降低, 其余时间点无显著差异 (图 1A、C)。在探索实验的第 3、7 天, Pla 组大鼠在平台原所在象限探索时间均较 sham 组显著缩短; 而 E2 处理组大鼠只在第 7 天在平台所在原象限探索的时间较 Pla 组显著延长, 第 3 天两组无显著差异 (图 1B、D)。各组大鼠在潜伏实验及探索实验的平均速度均无显著差异 (结果未显示)。



A: 水迷宫实验中各组到达平台的潜伏期, 与 sham 组比较, $*P < 0.05$; 与 Pla 组比较, $#P < 0.05$ ($n=6$)。B: 各组在平台原所在象限探索的时间, 与 sham 组比较, $*P < 0.05$; 与 Pla 组比较, $#P < 0.05$ ($n=6$)。C: 水迷宫实验各组运动轨迹结果。D: 探索实验各组运动轨迹结果。

图 1 长期低剂量 E2 对 BCCAO 3 个月大鼠空间学习记忆的影响

Figure 1 Effect of long-term treatment with low dose of E2 on spatial learning and memory of the rats underwented BCCAO after 3 months

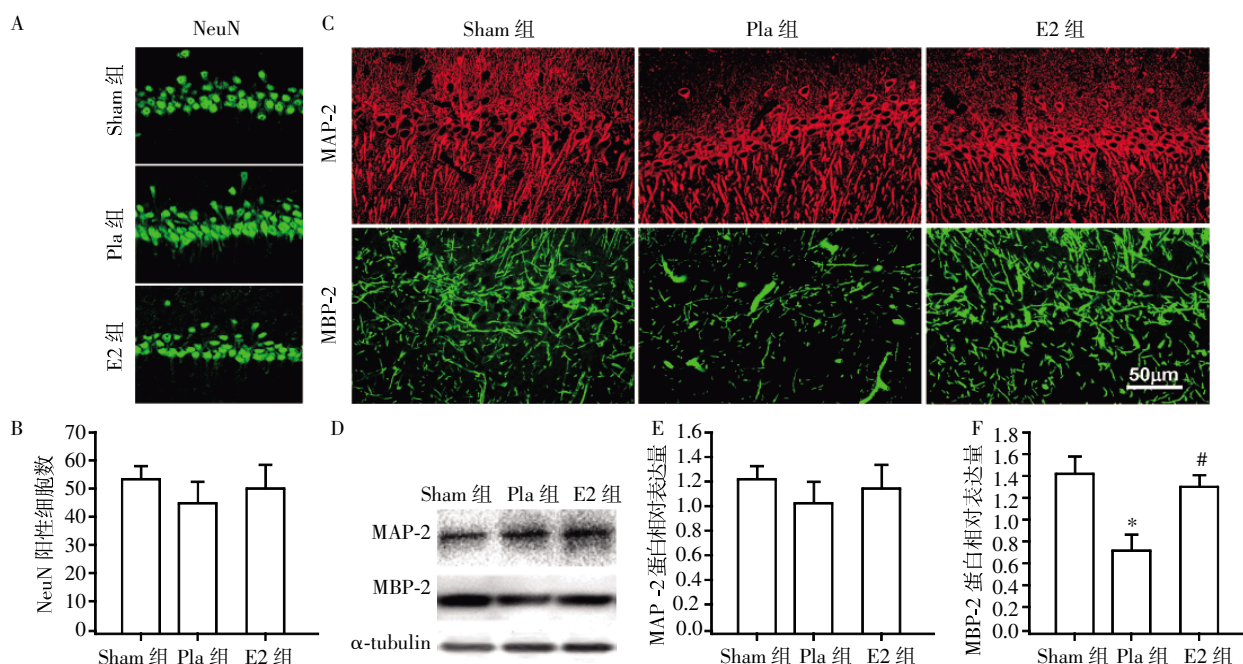
2.2 长期给予 E2 上调海马 CA1 区神经元 MBP-2 的蛋白水平

NeuN 阳性染色 (绿色) 代表生存的神经元。Pla 组大鼠海马 CA1 区生存神经元数量与 sham 组、E2 处理组相比无显著差异 (图 2A、B); 3 组之间海马 CA1 区 MAP-2 免疫荧光染色 (红色) 无显著差异, 而 Pla 组 MBP-2 免疫荧光染色 (绿色) 较 sham 组显著减弱, 长期 E2 处理可显著逆转此变化 (图 2C); Western blot 技术进一步验证了免疫荧光的结果 (图

2D~F)。

2.3 长期给予 E2 上调 BCCAO 3 个月大鼠海马 CA1 区神经元突触蛋白的表达

如图 3A 免疫荧光结果显示 Pla 组大鼠海马 CA1 区突触后致密蛋白 PSD95 (绿色) 及突触小泡蛋白 synaptophysin (红色) 蛋白表达较 sham 组显著降低, 长期 E2 处理可显著逆转此变化, DAPI (蓝色) 为神经元细胞核的标记; Western blot 分析结果 (图 3B、C) 进一步验证了免疫荧光的结果。



A:3 组海马 CA1 区 NeuN 阳性染色免疫荧光结果(标尺=50 μm , $\times 40$);B:海马 CA1 区 NeuN 阳性染色定量结果($n=15$);C:MAP-2 (红) and MBP-2 (绿)免疫荧光染色结果;D~F:Western blot 检测各组海马 CA1 区 MAP-2 和 MBP-2 的蛋白表达,与 sham 组比较,* $P < 0.05$;与 Pla 组比较,# $P < 0.05$ ($n=5-6$)。

图 2 长期低剂量 E2 对 BCCAO 后海马 CA1 区神经元生存及其骨架蛋白(MAP-2、MBP-2)表达的影响

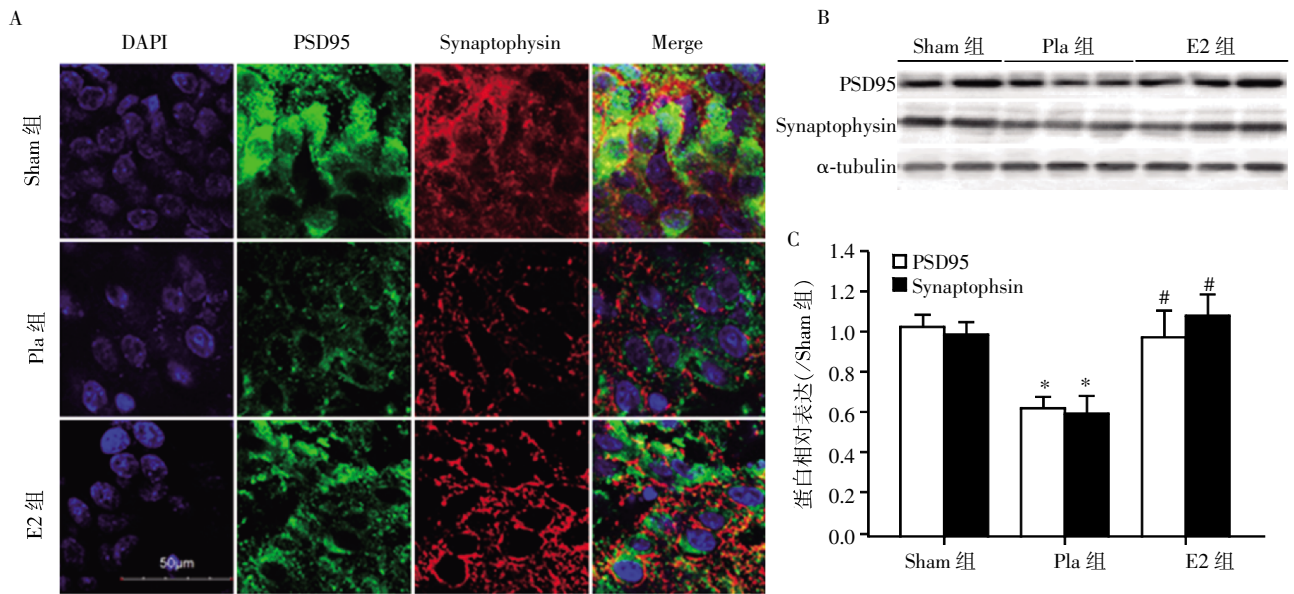
Figure 2 Effects of long-term treatment with low dose of E2 on neuronal survival and skeleton proteins (MAP-2,MBP-2) 3 months after BCCAO in hippocampal CA1 region

3 讨论

BCCAO 是目前公认的血管性痴呆动物模型,然而其病理进展的分子机制尚不清楚。本研究发现,与 sham 组大鼠相比,Pla 组大鼠发现水下平台所用的时间在实验 1~4 d 有所增加,后续 3 d(5~7 d)无显著差异;而在探索试验中 Pla 组大鼠在平台原所在象限探索的时间较 sham 组大鼠显著减少。众所周知,海马是学习记忆的结构基础,CA1 区神经元损伤或丢失可导致学习记忆等认知功能缺陷^[3-4,7,9]。然而进一步研究发现,与 sham 组大鼠相比,Pla 组大鼠海马 CA1 区生存的神经元(NeuN 阳性细胞数)无显著差异。此结果提示 BCCAO 3 个月大鼠记忆能力缺陷的分子机制可能与海马 CA1 区锥体神经元数量无直接关系。

文献报道,学习记忆减退的衰老大鼠和小鼠齿状回颗粒细胞、海马 CA1 以及 CA3 区的锥体细胞并无明显的神经元减少,学习记忆减退可能与神经元更微细的结构如轴棘突触的改变密切相关^[10]。本研究进一步显示,在 BCCAO 3 个月,大鼠海马 CA1 区 PSD95 及 Synaptophysin 蛋白水平较 sham 组明显下降。研究表明 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-

D-aspartate,NMDA)受体依赖的突触可塑性是记忆储存的基础^[11],突触后致密蛋白 PSD95 通过结合 NMDA 受体在突触水平调节细胞蛋白表达和酶的活性,从而对兴奋性信号转导进行整合;敲除 PSD95 基因的小鼠出现 LTP 诱导障碍及记忆能力下降^[12]。Synaptophysin 是突触前终末的特异标记蛋白,主要参与突触囊泡的运输与循环、神经递质的释放及突触的形成。与本研究结果一致,Fang 等^[13]研究发现脑缺血再灌注后海马 Synaptophysin 表达降低,小鼠学习记忆功能受损。基于文献报道,本研究提示突触的损伤甚至丢失可能是导致 BCCAO 3 个月后大鼠记忆缺陷的重要因素。MAP-2 为树突最重要的骨架蛋白,MBP-2 为构成轴突髓鞘的主要蛋白,二者在调节突触可塑性方面起着关键作用。本研究结果显示,与 sham 组相比,Pla 组大鼠海马 CA1 区 MBP2 的蛋白表达显著降低,而 MAP-2 的蛋白表达无显著差异。与本研究结果不同,赵晖等^[14]研究发现 BCCAO 50 d 海马 CA1/3 区 MAP-2 蛋白免疫染色较控制组显著降低;其原因可能与 BCCAO 模型差异,或研究时间点不同有关。也有研究发现,MAP-2 主要分布在树突的骨架,只有极少量分布在树突颈部,在 Tau 缺失的小鼠过表达 MAP-2 并未能改善其



A: 免疫荧光检测各组 PSD95 (绿色) 和 Synaptophysin (红色) 蛋白的表达 (n=5, 标尺=50 μm, ×63); B、C: Western blot 检测 PSD95 和 Synaptophysin 的蛋白表达水平, 与 sham 组比较, *P < 0.05; 与 Pla 组比较, #P < 0.05 (n=5~6)。

图 3 长期给予 E2 对 BCCAO 3 个月大鼠海马 CA1 区神经元突触蛋白水平的影响

Figure 3 Effects of continuously treatment with E2 on protein levels of synaptic markers (PSD95, synaptophysin) in hippocampal CA1 3 months after BCCAO

认知缺陷^[15-16], 支持本研究的结果。本研究进一步提示, 轴突的损伤及 Synaptophysin 表达的降低, 以及 PSD95 依赖的兴奋性信号整合紊乱是 BCCAO 3 个月大鼠记忆缺陷的重要机制。

雌激素可调节突触可塑性以及海马介导的记忆能力^[11]。本研究结果显示, 长期低剂量雌激素不但可增加 BCCAO 3 个月大鼠海马 CA1 区 Synaptophysin、PSD95 及 MBP-2 的蛋白表达, 而且可有效改善 BCCAO 3 个月大鼠的空间记忆功能。体内外研究证明 E2 可促进突触前、突触后蛋白的表达, 增加海马树突棘的数量及成熟, 从而改善空间记忆能力^[17]。雌激素影响突触可塑性也与 NMDA 受体活性相关。雌激素在诱导海马锥体细胞树突棘密度增加和新突触形成过程中, 同时调控 NMDA 受体活性; 而雌激素对树突棘密度增加和突触形成的诱导作用可被 NMDA 受体拮抗剂阻断^[11-12]。雌激素阻断血管性痴呆的分子机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Wu L, Feng XT, Hu YQ, et al. Global gene expression profile of the hippocampus in a rat model of vascular dementia[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2015, 237(1): 57-67
 [2] Day RJ, Mason MJ, Thomas C, et al. Caspase-cleaved Tau co-localizes with early tangle markers in the human vascular dementia brain[J]. *PLoS One*, 2015, 10 (7):

e0132637

[3] Zhang QG, Han D, Wang RM, et al. C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)-mediated degradation of hippocampal estrogen receptor-alpha and the critical period hypothesis of estrogen neuroprotection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(35): E617-E624
 [4] Yang LC, Zhang QG, Zhou CF, et al. Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e9851
 [5] Locklear MN, Kritzer MF. Assessment of the effects of sex and sex hormones on spatial cognition in adult rats using the Barnes maze [J]. *Horm Behav*, 2014, 66(2): 298-308
 [6] Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, et al. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion; what can be learned from experimental models [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 203-204: 263-266
 [7] Wang RM, Tu JY, Zhang Q, et al. Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Hippocampus*, 2013, 23 (7): 634-647
 [8] Zhou CF, Tu JY, Zhang Q, et al. Delayed ischemic post-conditioning protects hippocampal CA1 neurons by preserving mitochondrial integrity via Akt/GSK3 beta signaling [J]. *Neurochem Int*, 2011, 59(6): 749-758
 [9] Lu Q, Tucker D, Dong Y, et al. Neuroprotective and functional improvement effects of methylene blue in global cerebral

(下转第 729 页)