

盐酸帕罗西汀对卵巢切除大鼠学习记忆能力 及血清雌激素水平的影响

谢双燕*, 胡佳佳*, 周伯荣, 刘远波

摘要 目的 探讨抗抑郁剂盐酸帕罗西汀对卵巢切除大鼠学习记忆能力、血清雌激素水平及大鼠海马雌激素受体表达的影响。方法 采用 SD 雌鼠双侧卵巢切除(OVX) 作为雌激素波动引起的抑郁与认知障碍模型, 用 Morris 水迷宫实验来测试大鼠的学习记忆功能。实验共分为正常对照组、OVX 对照组、OVX 药物组。予 5-羟色胺重摄取抑制剂类药物: 盐酸帕罗西汀 10 mg/(kg · d) 干预 4 周。采用 ELISA 法测量 SD 大鼠血清黄体生成素、卵泡刺激素、雌激素。免疫组化法检测大鼠海马雌激素受体 α (ER α) 和雌激素受体 β (ER β) 的阳性细胞表达数。结果 ① Morris 水迷宫实验中, OVX 对照组和 OVX 药物组的逃避潜伏期明显缩短, 停留在平台

时间百分比明显增加。② OVX 药物组的血清雌激素较 OVX 对照组明显增加($P < 0.05$)。③ 药物组与非药物组的 ER α 、ER β 表达无明显差异。结论 帕罗西汀增加 OVX 大鼠血清雌激素水平和改善学习记忆能力, 而对海马 ER α 、ER β 表达无明显影响。

关键词 卵巢切除; 学习记忆; 雌激素; 雌激素受体

中图分类号 R 741.05

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015) 11-1602-04

2015-07-25 接收

基金项目: 广东省科技计划项目(编号: 2011B060300027); 广州医科大学附属第三医院项目(编号: 2012Y01)

作者单位: 广州医科大学附属第三医院神经内科, 广州 510150

作者简介: 谢双燕, 女, 医师;

周伯荣, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhoubr8@aliyun.com

* 对本文具有同等贡献

抑郁和认知障碍共同发生的现象或者说共病的发病率较高。Meta 分析显示老年抑郁、轻度认知障碍及老年痴呆可能是一个临床疾病的连续症状^[1]。目前, 关于抑郁与认知障碍共病的具体分子机制尚不清楚, 但不管是抑郁还是认知障碍, 女性的发病率远远高于男性, 所以雌激素作为区别于男女性别的重要激素而被关注。雌激素对情感和认知都有一定的影响, 文献^[2]报道雌激素水平的改变可以引起抑郁与认知障碍。雌激素也有治疗女性抑郁、改善女性认知障碍的作用。雌激素在大脑功能实现的信号通

was examined by the MTT assay. The combinational index (CI) was calculated by the CompuSyn software. Next K562 cells were treated by IM of 1 μ mol/L and THZ of 2 μ mol/L for 24 h alone or in combination. Apoptosis was detected by the Annexin V/PI staining and flow cytometry. Apoptosis related proteins, pPI3K and pAKT were detected by the Western blotting. **Results** Results of the MTT assay indicated that being treated by THZ of low concentrations alone had no significant influence on the inhibition of K562 cells, while being treated by THZ of 16 μ mol/L showed significant effect on inducing death of K562 cells. IM alone had effect on inducing death of K562 cells of a low concentration. K562 cells being treated by IM combined with THZ had a good synergistical effect on inducing death. Then K562 cells were treated with selected drug concentration according to CI values for 24 h, it revealed that thioridazine group had no significant apoptosis effect by flow cytometry, while in imatinib group, two-drug combination group there had different degree of apoptosis effect, and the control group was statistically significant ($P < 0.01$). Meanwhile, results of the Western blot showed that the increased expression of Cleaved Bid in each experimental group cells, while decreased expression of Procaspase 3. Up-regulation of anti apoptosis protein (Bcl-2, pPI3K and pAKT) expression and downregulation of apoptosis protein Bax expression demonstrated that the difference was statistically significant ($P < 0.01$) comparing each experimental groups with the control group. **Conclusion** IM plus THZ can synergistically induce caspase-independent apoptosis of K562 cells. The killing mechanism may be associated with the mitochondrial pathway and inhibition of the PI3K-AKT pathway.

Key words chronic myeloid leukemia; Thioridazine; Imatinib; apoptosis; apoptosis related proteins; apoptosis regulating protein; PI3K-AKT pathway

路主要是通过雌激素受体(estrogen receptors ,ERs) 调节,经典的 ERs 包括 ER α 和 ER β ,而且大脑雌激素不仅来源于外周的雌二醇(estradiol ,E2) ,还可以自身合成^[3]。对于女性抑郁,因雌激素替代治疗存在的诸多弊端,非激素治疗越来越多的应用在绝经期症候群,特别是 5-羟色胺重摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor ,SSRI) 对于改善绝经后抑郁有着明显的效果,而且 SSRI 联合雌激素使用时抗抑郁作用加强^[4]。另外一方面,SSRI 在抗抑郁治疗中,女性的效果明显好于男性,同时具有改善认知功能和重塑神经细胞的作用^[5]。SSRI 类药物有性别的差异和对认知功能改善的效果,其原因文献^[6]报道是雌激素对 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine ,5-HT) 系统有影响,但 SSRI 对雌激素系统的作用,除了对水生动物的少量研究外,在大鼠中的研究鲜有报道,所以该研究采用双侧卵巢切除(ovariectomized ,OVX) SD 大鼠,初步探讨 SSRI 抗抑郁剂是否影响大鼠体内血清雌激素水平及其受体在海马的表达,来间接反映大脑中的雌激素水平。

1 材料与方法

1.1 实验方案 应用 SD 雌性大鼠双侧 OVX 模型作为低雌激素的女性抑郁^[7]和认知障碍模型^[8],按是否应用 SSRI 类药物(盐酸帕罗西汀) 干预进行亚组分组,另设立成年健康假手术组作为空白对照。治疗前后进行 Morris 水迷宫实验来验证帕罗西汀对大鼠学习记忆能力的影响;ELISA 方法测量大鼠血清黄体生成素(luteinizing hormone ,LH)、卵泡刺激素(follicle stimulating hormone ,FSH)、雌激素;免疫组化法观察大鼠海马 ER α 和 ER β 的阳性细胞表达数。

1.2 实验动物模型制作和分组 约 3 月龄成年健康 SD 大鼠 250 ~ 300 g,购自广东省实验动物中心,于广州医学院动物中心饲养。成年大鼠随机分为双侧卵巢切除大鼠空白对照组(OVX 对照组)、双侧卵巢切除大鼠帕罗西汀干预组(OVX 药物组)、正常大鼠空白对照组(正常对照组),每组 8 只。双侧卵巢切除术:大鼠检疫 1 周通过后进行双侧卵巢切除术,在动物实验室进行。对于正常对照组大鼠,除了未切除大鼠双侧卵巢,其他操作同前。所有大鼠搬回另一动物室,喂养充足的水和饲料,1 周后大鼠基本恢复。药物干预:帕罗西汀的用药剂量是 10 mg/kg,实验组每只大鼠药物干预前称重,每 10 mg 帕罗西汀用 5 ml 生理盐水稀释,蒸馏水的灌胃容积 5

ml/kg,灌胃 4 周;正常对照组和 OVA 对照组用等量的生理盐水灌胃 4 周,每天上午 9:00 ~ 10:00 灌胃。Morris 水迷宫实验:于治疗前和治疗结束后的第 1 天行学习记忆能力测定。采用 Morris 水迷宫(定位航行实验和空间探索实验) 检测大鼠空间学习记忆功能。

1.3 ELISA 法检测雌激素、LH、FSH 水平 ELISA 试剂盒购自北京绿源博德生物科技有限公司,空白孔加标准品稀释液或标本,其余相应孔中加测试标本,所有标本集中检测。

1.4 免疫组化法检测大鼠海马 ER α 和 ER β 的表达 免疫组化 S-P 超敏试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;ER α 抗体(sc-542)、ER β 抗体(sc-6821) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。通过取材固定和冰冻切片,生物素标记 DAB 显色等;空白对照实验,用 PBS 代替一抗,其余步骤不变。最后在放大 200 倍照片上用 I-magine J 软件采用人工计数的方法来计算 ER α 和 ER β 的表达的细胞数。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 13.0 统计软件分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析(ANOVA)。不符合方差齐性或非正态分布数据采用对数转换,使其符合正态分布。

2 结果

2.1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验数据比较 各组大鼠在动物行为学观察前的体重见表 1。方差分析示 3 组平均体重差异无统计学意义。研究表明随着训练时间的推移,大鼠的逃避潜伏时间明显缩短,初始训练的平均时间为(17.82 \pm 7.64),结束训练为(11.31 \pm 4.52),表明动物的学习能力不断的提升。方差分析显示,OVX 对照组相对于正常对照组的逃避潜伏期有明显升高($F = 5.78$, $P = 0.021$),而在目标象限停留的时间百分比明显缩短($F = 10.16$, $P = 0.034$);帕罗西汀使 OVX 大鼠的逃避潜伏期明显缩短($F = 12.39$, $P = 0.001$);使在目标象限停留的时间百分比明显提高($F = 6.39$, $P = 0.027$)。见表 1。

表 1 各组 Morris 水迷宫的认知行为相关指标之间比较

组别	平均体重 (g)	逃避潜伏期 (s)	到达目标区域的 时间百分比(%)
正常对照	305 \pm 8.25	9.44 \pm 3.29*	35.33 \pm 5.36*
OVX 对照	310 \pm 6.57	13.20 \pm 3.75	29.42 \pm 4.74
OVX 药物	298 \pm 5.50	10.16 \pm 4.09#	33.01 \pm 4.96#

与 OVX 对照组比较: * $P < 0.05$; 与 OVX 对照组比较: # $P < 0.05$

2.2 ELISA 法检测血清雌激素、FSH、LH 的结果与正常对照组比较,OVX 对照组和 OVX 药物组血清雌激素水平明显下降 ($P < 0.05$); OVX 药物组较 OVX 对照组雌激素明显升高 ($P < 0.05$); OVX 药物组与正常对照组比较, LH 水平下降 ($P < 0.05$); OVX 药物组的血清 FSH、LH 水平较 OVX 对照组存在下降趋势,但无明显差异 ($P = 0.140, 0.068$)。见表 2。

表 2 各组血清雌激素、FSH、LH 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	雌激素 (ng/L)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)
正常对照	525.44 ± 11.92	17.91 ± 0.66	10.01 ± 0.33
OVX 对照	394.70 ± 37.05*	16.95 ± 0.65	9.42 ± 0.47
OVX 药物	454.61 ± 32.99* #	14.24 ± 0.65	8.01 ± 0.69*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与 OVX 对照组比较: # $P < 0.05$

2.3 大鼠海马 ER α 和 ER β 的表达情况在放大 400 倍显微镜下, ER α 和 ER β (图 1) 在大鼠海马椎体细胞层表达量都很高, 统计分析得出各组海马 CA1 区 ER β 的阳性表达量明显高于 ER α 。采用非参数 Mann-whitney 检验, OVX 组、海马 CA1 区和 CA3 区 ER α 和 ER β 的阳性细胞表达数较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$); OVX 两组和组内大鼠海马 CA1 区、CA3 区 ER α 和 ER β 的阳性细胞表达数差异均无统计学意义。见表 3。

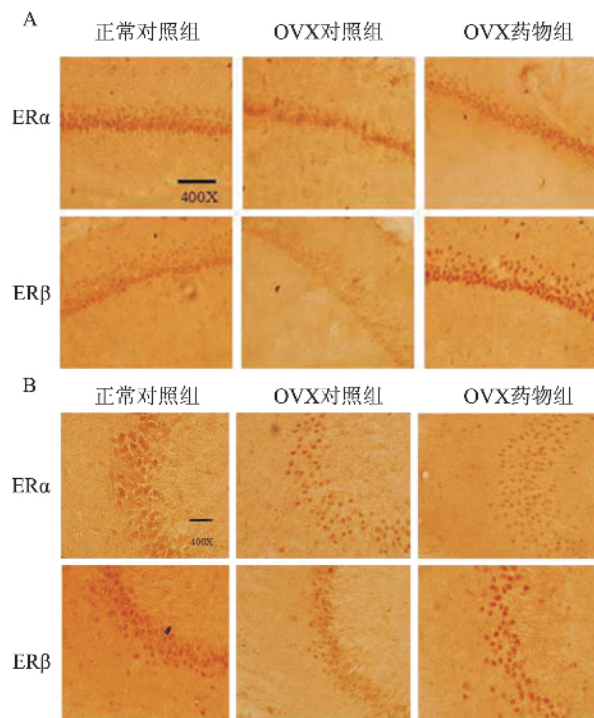


图 1 免疫组化方法检测海马 CA1 区、CA3 区 ER α 、ER β 的阳性细胞 $\times 400$
A: 海马 CA1 区; B: 海马 CA3 区

表 3 各组海马 CA1 区、CA3 区的 ER α 和 ER β 的阳性细胞表达数比较

组别	CA1 区 ER α	CA1 区 ER β	CA3 区 ER α	CA3 区 ER β
正常对照	128.62 ± 3.40	165.50 ± 7.73*	63.18 ± 3.35	76.00 ± 3.43
OVX 对照	75.55 ± 2.26*	89.53 ± 1.95* #	38.64 ± 1.50*	35.00 ± 0.88*
OVX 药物	76.24 ± 2.45*	91.03 ± 3.57* #	35.59 ± 1.59*	38.84 ± 1.29*

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与 CA1 区 ER α 阳性细胞数比较: # $P < 0.05$

3 讨论

本研究中的 OVX 组较正常对照组血清雌激素明显降低, 验证了本实验 OVX 模型成功。帕罗西汀药物治疗组明显提高 OVX 组的雌激素水平。研究^[9]显示, 日本青鳉饲养在含 0.1 和 0.5 g/L 氟西汀的水缸 4 周后血清中雌激素水平明显增加, 对斑马鱼的研究显示, 暴露在含 20 和 200 ng/L 氟西汀的水中 6 d, 在 200 ng/L 氟西汀的水中, 该生物体内的雌激素水平上升了 1.5 倍^[10]。SSRIs 已经被报道影响多种细胞色素的 P450 酶, 而这类酶又同时负责很多的内源性和外源性的单体转化, 包括类固醇。在 OVX 药物组, 可能是 SSRI 对 P450 的抑制作用, 从而使雌激素分解速度下降。但 LH 下降说明 SSRI 对 HPG 轴同样发挥着影响。综合以上, SSRI 对于雌激素的影响是多种因素综合的结果, 在双侧卵巢切除鼠中雌激素水平相对较低时, SSRI 对雌激素水平的升高作用占主导。并且 Morris 水迷宫实验数据显示, 帕罗西汀明显改善 OVX 大鼠的学习记忆能力, 雌激素具有保护神经细胞的作用, 提示雌激素的提高可能是帕罗西汀改善大鼠学习记忆能力的原因。

研究^[6]已证实雌激素系统对 5-HT 系统的合成和降解、释放和自抑制及突触后膜受体都有影响。研究^[11-12]显示外周雌激素对 ER 在脑的表达的实验都显示出不同的结果。Mitchner et al^[11]发现 SD 大鼠服用雌激素后下丘脑 ER α 和 ER β mRNA 的表达并没有变化。成年大鼠服用苯甲酸 E2 后脑垂体的 ER α 和 ER β mRNA 显示出时间依赖性的下降^[12]。卵巢切除术后的大鼠, 服用 E2 后 ER α 的表达增加, 但对海马 ER β 没有任何影响^[13]。这些都表明了外周雌激素可上调或下调大脑 ER α 和 ER β 的表达, 而且这种作用依赖雌激素服用的时间、大脑的部位及实验对象本身的状态。5-HT 系统对雌激素系统影响研究并不多, 目前仅知 SSRI 有影响雌激素体内降解作用, 有研究^[14]显示, SSRI 有雌激素受体激动剂的作用。海马自身合成雌激素^[7], 在雌激素受体 ER α 和 ER β 表达中起着直接和重要的作

用。结合本研究 OVX 组的雌激素受体 ER α 和 ER β 表达较正常成年鼠明显下降,提示 ER 与雌激素水平波动或下降相关,可能与抑郁或学习记忆能力障碍相关。另一方面,SSRI 对外周雌激素水平存在影响,但并没有影响海马雌激素受体,表明 SSRI 对外周雌激素的影响可能不足以影响到大脑海马雌激素或海马自身合成雌激素的水平。

参考文献

- [1] Panza F, Frisardi V, Capurso C, et al. Late-Life depression, mild cognitive impairment, and dementia: possible continuum? [J]. *Am J Geriatr Psychiatry* 2010, 18(2): 98 - 116.
- [2] Freeman E W, Sammel M D, Lin H, et al. Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression [J]. *Arch Gen Psychiatry* 2006, 63(4): 375 - 82.
- [3] Kancheva R, Hill M, Novak Z, et al. Neuroactive steroids in periphery and cerebrospinal fluid [J]. *Neuroscience*, 2011, 191: 22 - 7.
- [4] Morgan M L, Cook I A, Rapkin A J, et al. Estrogen augmentation of antidepressants in perimenopausal depression: A pilot study [J]. *J Clin Psychiatry* 2005 66(6): 774 - 80.
- [5] Keers R, Aitchison K J. Gender differences in antidepressant drug response [J]. *Int Rev Psychiatry* 2010, 22(5): 485 - 500.
- [6] Müller J C, Imazaki P H, Boare A C, et al. *In vivo* and *in vitro* estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine [J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 34(1): 80 - 5.
- [7] Walf A A, Frye C A. Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model [J]. *Gen Med* 2009, 6(1): 300 - 11.
- [8] Feng Z, Cheng Y, Zhang J T. Long-term effects of melatonin or 17 beta-estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired, ovariectomized adult rats [J]. *Pineal Res* 2004, 37(3): 198 - 206.
- [9] Foran C M, Weston J, Slattery M, et al. Reproductive assessment of Japanese medaka (*oryzias latipes*) following a four week fluoxetine (SSRI) exposure. [J]. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004, 46(4): 511 - 7.
- [10] Lister A, Regan C, Van Zwol J, et al. Inhibition of egg production in zebra fish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation [J]. *Aquat Toxicol* 2009, 95(4): 320 - 9.
- [11] Mitchner N A, Garlick C, Ben-Jonathan N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptor α and in the rat pituitary gland [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(9): 3976 - 83.
- [12] Tena-Sempere M, Gonzalez L C, Pinilla L, et al. Neonatal imprinting and regulation of estrogen receptor α and β mRNA expression by estrogen in the pituitary and hypothalamus of the male rat [J]. *Neuroendocrinology* 2001(73): 12 - 25.
- [13] Rodgers S P, Bohacek J, Daniel J M. Transient estradiol exposure during middle age in ovariectomized rats exerts lasting effects on cognitive function and the hippocampus [J]. *Endocrinology* 2010, 151(3): 1194 - 203.
- [14] Yang L C, Zhang Q G, Zhou C F, et al. Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus [J]. *PLoS One* 2010 5(5): e9851.

Effect of paroxetine on learning and memory ability and serum estrogen in rats

Xie Shuangyan, Hu Jiajia, Zhou Borong, et al

(*Dept of Neurology, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong 510150*)

Abstract Objective To observe whether paroxetine affects rats' learning and memory ability, serum estrogen and the expression of estrogen receptors in hippocampus. **Methods** The SD ovariectomized (OVX) rats were adopted as the model of estrogen's fluctuation leading to depressive symptoms and cognition disorder, treated with paroxetine by intragastric administration at 10 mg/(kg \cdot d) for 4 weeks, and the sham rats as control group. Morris water maze was used to testify the effect of paroxetine on learning and memory ability. The level of serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estrogen was measured by ELISA. Expressions of ER α and ER β in hippocampal neurons were detected by immunohistochemistry. **Results** ① In Morris water maze experiment, compared to the control group, the escape latency of two drug-groups were obviously shortened; the time of staying in the platform significantly increased. ② Serum estrogen of drug-group was significantly increased compared with the control groups ($P < 0.05$). ③ The ER expression between groups treated with paroxetine and the group without paroxetine in OVX rats had no difference. **Conclusion** Paroxetine increases serum estrogen levels and improves the learning and memory ability, and has no significant effect on ER expression in hippocampal neurons.

Key words ovariectomy; learning and memory ability; estrogen; estrogen receptor