

· 实验研究 ·

雄激素对 HIBD 新生鼠 phosphacan 和 NG₂ 蛋白聚糖表达与轴突再生的影响研究

李占魁^{1,2}, 柯华¹, 倪黎明¹, 李清红¹

(1. 陕西省妇幼保健院新生儿科, 陕西 西安 710003; 2. 西安交通大学第二医院儿科, 陕西 西安 710003)

[摘要] 目的 了解雄激素对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生鼠脑组织磷酸蛋白聚糖(phosphacan, PC)及NG₂蛋白聚糖(NG₂)表达变化及其与缺血缺氧性脑损伤后轴突再生的关系, 探讨其神经保护作用机制。方法 制作新生鼠 HIBD 模型, 随机分为假手术组、HIBD 组、雄激素干预组(于模型制成后即刻注射丙酸睾丸酮 25 mg/kg)。于缺氧缺血(HI)后 24 h、72 h、7 d、10 d 取脑组织制作石蜡切片和电镜切片, 用免疫组化法观察 PC 和 NG₂ 蛋白聚糖在各组大鼠皮质和海马表达的动态变化, 应用透射电镜对比观察各组海马和皮层神经元超微结构变化、细胞凋亡、神经元轴突再生及胶质细胞增生情况。结果 ①HI 后脑组织超微结构变化: 假手术组于术后 24 h 细胞表面见较小的突起, 72 h、7 d 及 10 d 细胞表面可见大小不等的突起, 未见凋亡细胞; HIBD 组 HI 24 h、72 h、7 d 和 10 d 时细胞表面无突起或仅有较小突起; 雄激素干预组的神经元轴突较 HIBD 组后增长明显, 但较假手术组弱。②HI 后脑组织 PC 和 NG₂ 的表达: 假手术组海马和皮层均存在少量 PC 和 NG₂ 的表达, 海马的表达高于皮层。HIBD 组在 HI 后 24 h 表达开始呈阳性反应, HI 后 72 h 明显增多, 7 d 达高峰, 10 d 后开始下降, 但仍高于正常对照组; 雄激素干预组, PC 和 NG₂ 的表达时程和分布与 HIBD 组相似, HI 后 24 h、72 h、7 d 和 10 d 在皮层和海马的表达水平明显低于 HIBD 组, 均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 PC 和 NG₂ 可能是 HIBD 后抑制神经元轴突再生的重要因子之一, 雄激素可能通过调节胶质细胞形态结构和功能抑制 PC 和 NG₂ 表达促进神经元轴突再生, 从而发挥神经保护作用。
[中国当代儿科杂志, 2008, 10(3): 357-361]

[关键词] 脑缺氧/脑缺血; 雄激素; 磷酸蛋白聚糖; NG₂ 蛋白聚糖; 轴突再生; 新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)03-0357-05

Effects of androgen on phosphacan and NG₂ proteoglycan expression and neurite re-generation in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

LI Zhan-Kui, KE Hua, NI Li-Ming, LI Qing-Hong. Department of Pediatrics, Maternal and Child Health Care Hospital of Shanxi Province, Xi'an 710003, China (Email: lzk@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the effects of androgen on the expression of phosphacan and NG₂ proteoglycan (NG₂) and neurite regeneration in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) and the potential mechanism underlying the protective effect of androgen against HIBD. **Methods** One hundred and twenty neonatal Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: sham-operated, HIBD and androgen treatment. HIBD was induced by the ligation of left common carotid artery and hypoxia exposure. The androgen treatment group rats were injected with testosterone propionate (25 mg/kg) immediately after HIBD. Phosphacan and NG₂ expression in the cortex and the hippocampus was detected with the immunohistochemical method 24 and 72 hrs and 7 and 10 days after hypoxia-ischemia (HI). The ultrastructure and neurite regeneration of neurons in the cortex and the hippocampus were observed under a transmission electron microscope. **Results** The neurite regeneration was obvious in the sham-operated group, but seldom in the HIBD group. The androgen treatment group showed increased neurite regeneration compared with the HIBD group. There were fewer phosphacan and NG₂ positive cells in the cortex and the hippocampus in the sham-operated group. Phosphacan and NG₂ expression in the cortex and the hippocampus was observed at 24 hrs, increased at 72 hrs, and peaked at 7 days after HI in the HIBD group and remained at a higher expression 10 days after HI than in the sham-operated group. The levels of phosphacan and NG₂ expression in the cortex and the hippocampus in the androgen treatment group were significantly reduced compared with those in the HIBD group 24 and 72 hrs and 7 and 10 days after HI ($P <$

[收稿日期] 2008-03-05; [修回日期] 2008-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助 (No: 30471827)

[作者简介] 李占魁, 男, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。主攻方向: 新生儿缺氧缺血性脑病。

0.01)。 **Conclusions** Phosphacan and NG₂ may be important inhibitory factors for neurite regeneration following HIBD in neonatal rats. The neuroprotection of androgen against neonatal HIBD is produced possibly through an inhibition of phosphacan and NG₂ expression. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (3):357-361]

Key words: Brain hypoxia/ischemia; Androgen; Phosphacan; NG₂ proteoglycan; Neurite regeneration; Neonatal rats

近年来,新生儿缺氧缺血脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)发病机制的研究多集中在氧自由基、兴奋性氨基酸及其受体、NOS、细胞凋亡等方面,对 HIBD 后影响调控神经元轴突再生的因子尚未引起足够的重视;研究表明,磷酸蛋白聚糖(phosphacan, PC)和 NG₂ 蛋白聚糖(NG₂ proteoglycan, NG₂)与脑损伤后神经元轴突再生密切相关,已经证实雄激素对 HIBD 后脑损伤具有神经保护作用,是否通过抑制缺氧缺血(HI)后相关蛋白聚糖表达促进神经元轴突再生而起到神经保护作用,国内外尚未见有关报道。本研究以新生鼠 HIBD 模型为研究对象,应用雄激素对 HIBD 新生鼠进行干预,采用免疫组织化学、phosphacan 和 NG₂ 单克隆抗体、电镜等方法和技术,观察 PC 和 NG₂在假手术组、HIBD 组、雄激素干预组不同时间点大鼠脑组织的表达变化及其与神经元轴突再生的关系,并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠 120 只,一级动物,由第四军医大学实验动物中心提供,雌雄不限,体重 12~14 g。丙酸睾酮注射液由天津金耀氨基酸有限公司提供,每 1 mL 含 25 mg。小鼠抗大鼠 PC 抗体和兔抗大鼠 NG₂ 抗体由美国 Chemicon 公司提供,兔抗小鼠 I 抗 II、山羊抗兔 I 抗 II、SABC 试剂盒及 DAB 显色试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 新生鼠 HIBD 模型建立 7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠,按照经典的新生鼠 HIBD 模型制作方法制作 HIBD 模型^[1]。假手术组不结扎左颈总动脉,直接缝合切口,不吸低浓度氧,其余处理相同。

1.2.2 动物分组与处理 120 只 SD 大鼠随机分为 3 组:HIBD 组($n=40$)、雄激素干预组($n=40$)、假手术组($n=40$)。雄激素干预组于 HI 后立即给予丙酸睾酮 25 mg/kg 腹腔注射一次。

1.2.3 脑组织切片制备与免疫组化染色 分别于 HI 后 24 h、72 h、7 d、10 d,每组各取 8 只动物(假手术组在手术后 6 h),麻醉、开胸暴露心脏,经左心

室插管至主动脉,用 4% 的多聚甲醛 0.55 mol/L 的磷酸缓冲液心脏灌注固定。参照《大鼠脑立体定位图谱》,经乳头体及视交叉平面行冠状切面开颅取脑,4% 多聚甲醛液中固定过夜后,进行石蜡包埋,切片厚 5 μm 。PC 和 NG₂ 免疫组化染色采用 SABC 法,操作严格按照 PC 和 NG₂ 免疫组织化学程序进行。对照实验:用 0.01 MPBS 液代替小鼠抗大鼠 PC 液,其余步骤相同,中性树脂封片。以不加第一抗体(以 PBS 代替)做阴性空白对照,以胞浆或胞核有黄色颗粒沉着为阳性细胞。灰度分析,光学显微镜下观察,细胞质内反应物质呈棕黄色颗粒为免疫组化染色阳性细胞。用 LEICA QWIN 图像信号采集与分析系统进行处理,每张切片在皮层和海马区各随机取 6 个不重复的视野,应用 LEICA DC 300F 软件测量灰度值;取 6 个视野均值作为该片灰度值;每样本 2 张切片均值作为该样本实验结果;所测灰度分为 256 个等级,0 级为最暗,255 级为最亮,以“平均灰度值”反应免疫组化染色强弱时,其数值越低,说明着色越深,即表达越强。

1.2.4 透射电镜切片制作与神经元超微结构观察

各组各时间点分别取 2 只大鼠麻醉、开胸暴露心脏,经左心室插管至主动脉内,用 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液灌注、固定,取与光镜大致相同部位备用。样品取出后切成 1 mm³ 的小块,严格按照电镜片制作程序制作电镜切片,应用日本日立 H-600 透射式电子显微镜观察神经元超微结构并进行拍照。

1.3 统计学处理

计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析,两样本均数比较用 t 检验, $P<0.05$ 为统计学意义上的差异显著, $P<0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 脑组织 HIBD 后 PC 和 NG₂ 表达与轴突再生的关系

假手术组大鼠左侧大脑皮层和海马可见少量的 PC 和 NG₂ 蛋白聚糖免疫阳性细胞表达,海马表达高于皮层,镜下免疫阳性细胞呈黄色。假手术组术后 24 h、72 h、7 d 和 10 d 在海马和皮层的表达与 HIBD 组和雄激素干预组比较差异均具有显著性

(均 $P<0.01$)。HIBD 组 HI 后 24 h 大脑皮层和海马的 PC 和 NG₂ 蛋白聚糖免疫阳性细胞表达稍有增多,72 h 明显增多,HI 后 7 d 达到高峰后开始下降,10 d 后维持在较低水平。各组大鼠脑组织 PC 和 NG₂ 蛋白聚糖表达情况见表 1,2;图 1A~D。

2.2 雄激素干预后 PC 和 NG₂ 表达与轴突再生的关系

雄激素干预组大鼠左侧大脑皮层和海马 PC 和 NG₂ 蛋白聚糖免疫阳性细胞表达时程与 HIBD 相同,分布也较相似,但其免疫阳性细胞表达数量较 HIBD 组明显减少,并且在 HI 后 24 h,72 h,7 d,10 d 差异有显著性(均 $P<0.01$)。见表 1,2;图 2A~D。

2.3 电镜观察

电镜下假手术组细胞核圆形,核膜完整,核内染

色质分布均匀,常染色质丰富,核仁明显,细胞质内细胞器丰富,结构完整,粗面内质网及核糖体丰富,高尔基体发达,线粒体圆形,内嵴清晰可见,膜规则,基质均匀;神经胶质细胞数量不多;术后 24 h 细胞表面可见较小的突起,72 h,7 d 及 10 d 时细胞表面可见大小不等的突起,轴突再生存在,未见凋亡细胞,胶质细胞增生明显。电镜下 HIBD 组神经元细胞器减少,细胞水肿,核肿胀,染色质凝集成块状或溶解,线粒体减少,肿胀成球形,部分嵴断裂或溶解消失,透明成空泡,粗面内质网扩张,表面核糖体脱落;可见较多的凋亡细胞和凋亡小体;HI 后 24 h 海马和皮层胶质细胞呈轻度反应性增生,72 h 增生明显,7 d 病灶周围胶质细胞进一步增生,胞体增大,突起增多、增粗,呈网状或条索状,10 d 时增生稍有

表 1 各组大鼠左侧大脑皮层 PC 和 NG₂ 表达的灰度值变化 (x̄±s)

	HI 后 24 h		HI 后 72 h		HI 后 7 d		HI 后 10 d	
	PC	NG ₂	PC	NG ₂	PC	NG ₂	PC	NG ₂
假手术组	198.33±2.94	187.26±1.69	197.16±3.01	185.26±0.91	195.94±2.45	183.27±0.86	196.56±1.34	183.39±0.74
HIBD 组	185.27±1.32 ^a	175.22±0.90 ^a	176.47±0.92 ^a	170.52±0.69 ^a	163.27±1.14 ^a	159.68±1.12 ^a	165.73±0.95 ^a	165.30±1.47 ^a
雄激素组	190.17±2.94 ^{a,b}	180.93±1.64 ^{a,b}	197.16±3.01 ^{a,b}	178.30±1.37 ^{a,b}	175.67±1.03 ^{a,b}	171.74±2.32 ^{a,b}	170.46±0.74 ^{a,b}	175.87±0.67 ^{a,b}

a:与假手术组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$

表 2 各组大鼠左侧大脑海马 PC 和 NG₂ 表达的灰度值变化 (x̄±s)

	HI 后 24 h		HI 后 72 h		HI 后 7 d		HI 后 10 d	
	PC	NG ₂	PC	NG ₂	PC	NG ₂	PC	NG ₂
假手术组	179.49±0.79	175.82±0.94	178.50±1.22	174.32±0.83	176.69±1.24	172.75±1.13	177.51±1.95	173.30±0.96
HIBD 组	162.93±1.69 ^a	162.67±1.12 ^a	158.40±1.20 ^a	154.52±0.70 ^a	145.68±1.13 ^a	138.35±1.42 ^a	150.52±1.16 ^a	142.36±0.79 ^a
雄激素组	173.45±1.75 ^{a,b}	170.34±1.41 ^{a,b}	169.36±1.13 ^{a,b}	161.57±0.99 ^{a,b}	160.66±1.02 ^{a,b}	145.65±1.23 ^{a,b}	164.48±0.97 ^{a,b}	152.38±0.81 ^{a,b}

a:与假手术组比较, $P<0.01$; b:与 HIBD 组比较, $P<0.01$

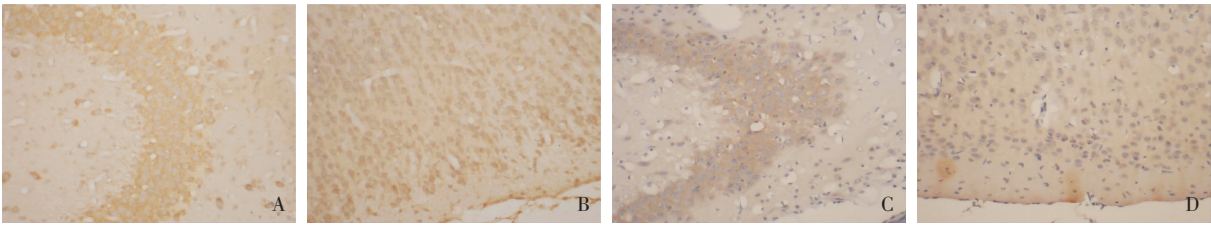


图 1 HIBD 组在 HI 后 7 d 海马,皮层 PC,NG₂ 的表达(免疫组化×100) A:HIBD 组在 HI 后 7 d 海马 PC 表达达高峰; B:HIBD 组 HI 后 7 d 皮层 PC 表达最强; C:HIBD 组在 HI 后 7 d 海马 NG₂ 表达达高峰; D:HIBD 组在 HI 后 7 d 皮层 NG₂ 表达最强

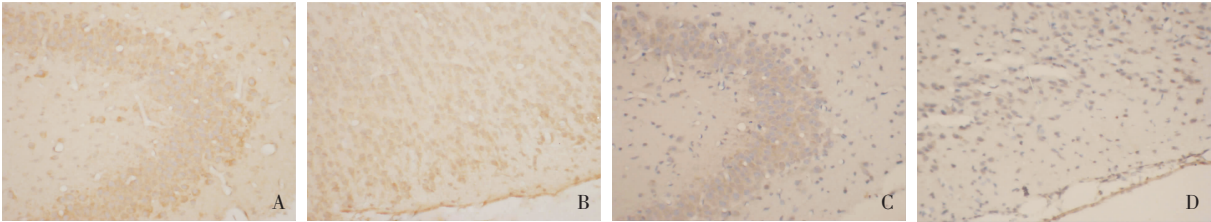


图 2 雄激素干预组 HI 后 7 d 海马,皮层 PC,NG₂ 的表达(免疫组化×100) A:雄激素干预组 HI 后 7 d 海马 PC 免疫阳性细胞表达较 HIBD 组明显减少; B:雄激素干预组 HI 后 7 d 皮层 PC 表达数量明显减少,与 HIBD 组相比差异有显著性; C:雄激素干预组 HI 后 7 d 大脑海马 NG₂ 表达明显减少; D:雄激素干预组 HI 后 7 d 大脑皮层 NG₂ 免疫阳性细胞数明显减少

减少;HI 后 24 h、72 h、7 d 及 10 d 时细胞表面无突起或仅有较小的突起,轴突再生不明显(图 3A,B)。

电镜下雄激素干预后神经元核膜完整,染色质均匀,胞浆内细胞器较丰富,可见大量线粒体,形态基本正常,嵴稍模糊,内质网核糖体较丰富,细胞水肿现象较轻;术后 24 h、72 h、7 d 及 10 d,与 HIBD

组比较,神经胶质细胞数量稍增加,胞体大小渐趋正常,胶质细胞突起无增多、增粗;神经细胞轴突再生明显,以 HI 后 7 d 尤甚,与 HIBD 对照组相比,其神经元轴突增长、增粗、数量明显增多;凋亡细胞少见(见图 3C)。

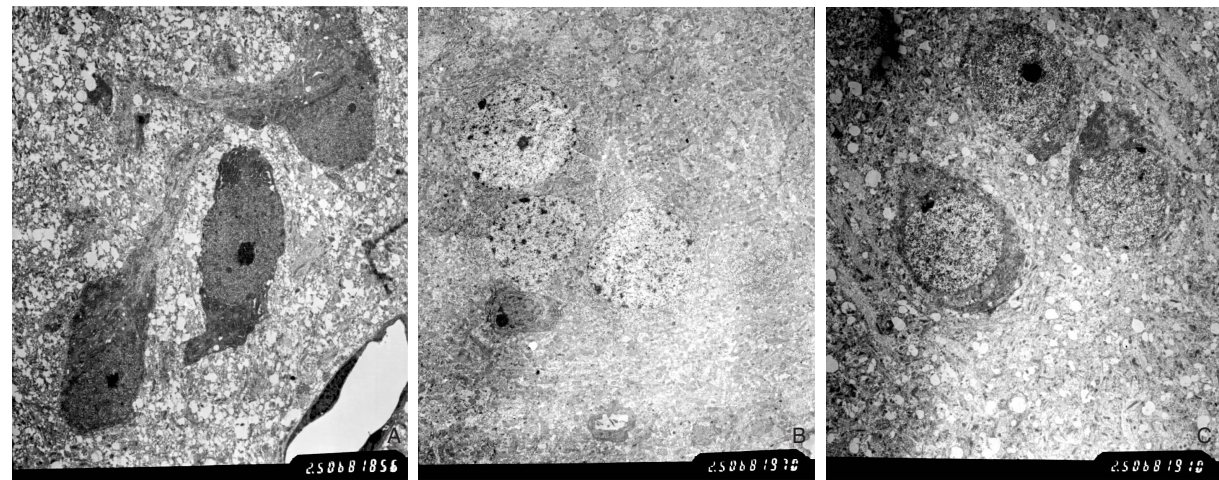


图 3 电镜下各组 HI 后 7 d 大脑皮层神经元轴突再生 (×2 500) A:假手术组 HI 后 7 d 大脑皮层细胞表面可见大小不等的突起,神经元轴突再生存在; B:HIBD 组 HI 后 7 d 大脑皮层神经元轴突再生不明显; C:雄激素组 HI 后 7 d 大脑皮层神经元轴突再生明显,与 HIBD 组相比,其神经元轴突增长、增粗,数量明显增多。

3 讨论

细胞活动包括细胞迁移、轴突生长、延伸成束,这些都是中枢神经系统(CNS)发育的必要过程,由精密的分子机制引导形成。细胞外基质分子(ECM)是神经系统发育中的重要分子信号。我们已经知道硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPGs)是 ECM 的重要组成部分,它参与了神经网络的形成^[1]。PC 和 NG₂ 是 CNS 中重要的 CSPGs^[2],在生理情况下,它主要表达在大脑皮层、海马、小脑、嗅觉系统和视网膜等区域。它们在脑内虽然含量很少,但对神经细胞的发育、成熟以轴突生长的调控起着重要的作用^[3]。大量的体外研究显示 PC 和 NG₂ 对胚胎期轴突延伸具有导向作用,但在活体内的具体的调控机制目前仍不清楚^[4,5]。

本实验通过制作新生大鼠 HIBD 模型,研究 HI 后不同时间点新生大鼠脑组织 PC 和 NG₂ 蛋白聚糖表达变化。结果表明,HI 后 24 h 大脑皮层和海马 PC 表达开始增加,72 h 明显增加,7 d 达高峰,10 d 后开始下降,但仍高于假手术组。说明新生大鼠大脑皮层和海马对 HI 损伤反应比较迅速,HI 后 PC 和

NG₂ 的含量能很快增加。而电镜下,假手术组在术后 24 h 细胞表面可见较小的突起,72 h、7 d 及 10 d 时细胞表面可见大小不等突起,即轴突再生存在,HIBD 组 HI 后 24 h、72 h、7 d 和 10 d 时细胞表面无突起或仅见较小突起,说明轴突再生不明显。由此可看出在 HIBD 时 PC 和 NG₂ 表达时程和轴突再生存在一定的负相关关系,即 HI 后 PC 和 NG₂ 的表达越强神经元轴突再生越不明显。由此推测 PC 和 NG₂ 可能是 HIBD 后抑制神经元轴突再生的重要因子之一。对于 CSPG 抑制轴突生长的机制非常复杂且尚未明确,多数学者认为 CSPGs 核心蛋白通过 ECM 或细胞表面分子连接相关大分子而相互作用,使粘多糖硫酸多糖链处于可以遮蔽或改变靶分子结构的有利位置,从而抑制了靶分子对轴突再生的促进作用。其次,CSPG 的作用机制也可能与 Rho 信号转导通路有关,其具体机制还有待于进一步研究^[6-8]。

课题组前期的研究已经证明^[9,10],新生大鼠 HI 后可发生氧化损伤,损伤程度有时间相关性,于 HI 后 24 h 到 48 h 损伤达高峰,48 h 后逐渐减轻。雄激素不仅可以通过诱导 HIBD 新生大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)的表达、减少脂质过氧化物的生

成而增强脑组织的抗氧化能力,减轻氧化应激损伤,抑制 HI 后神经细胞凋亡,而且可以雄激素受体介导促进神经生长因子表达而发挥脑保护作用。因此,本实验应用丙酸睾酮对 HIBD 新生大鼠进行干预,观察雄激素干预后不同组别不同时间点脑组织 PC 和 NG₂ 表达及神经元轴突再生,结果表明,雄激素干预组 HI 大鼠脑组织 PC 和 NG₂ 表达明显降低,与 HIBD 组相比差异存在显著性($P < 0.01$);而 HI 后 24 h,72 h,7 d 和 10 d 左侧海马区 PC 和 NG₂ 的表达进一步提高,与 HIBD 组相比,差异有显著性(均 $P < 0.01$),雄激素干预组 PC 和 NG₂ 的表达时程与 HIBD 组基本一致,但表达量明显减少;雄激素干预后,神经胶质细胞数量无明显改变,但胞体大小渐趋正常,胶质细胞突起无增多、增粗,神经元轴突增长、增粗、数量也明显增多,即轴突再生较 HIBD 组明显。这说明丙酸睾酮可以降低 HIBD 新生大鼠脑组织 PC 和 NG₂ 的表达,使之在 HI 后 24 h,72 h,7 d 和 10 d 均维持在较低水平,从而发挥其神经保护作用。研究发现^[11],PC 和 NG₂ 的表达随神经胶质细胞的变化而变化,全长的 PC 和 NG₂ 主要由第一脑室和侧脑室的祖原胶质细胞表达。PC 则在已经迁移至侧脑室的较成熟的胶质细胞中有很高的表达。也有研究报告神经元和胶质细胞都能表达 PC 量、分子大小及糖链的组成随年龄的不同而变化,从而有利于神经细胞的迁移。实验研究表明,雄激素对缺氧缺血后神经胶质细胞的形态、功能具有明显调节作用,也包括对其合成、表达 NGF 等神经营养因子的影响,从而起到促进受损神经组织修复再生的作用^[12]。因此,我们推断 HIBD 时雄激素可能通过调节神经胶质细胞形态、结构和功能使其对 PC 和 NG₂ 的表达减少,减弱了 PC 和 NG₂ 对轴突再生的抑制作用,使轴突再生增加,从而起到神经保护作用,其详细的作用机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immatu-

rity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981,9(2):131-141.

[2] Hayashi N, Miyata S, Yamada M, Kamei K, Oohira A. Neuronal expression of chondroitin sulfate proteoglycans receptor-type proteintyrosine phosphatase β and phosphacan[J]. *Neuroscience*, 2004,131(2):331-348.

[3] Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000,374(1):24-34.

[4] Clarriss HJ, Rauch U, Key B. Dynamic spatiotemporal expression patterns of neurocan and phosphacan indicate diverse roles in the developing and adult rat olfactory system[J]. *Comp Neurol*, 2000,423(1):98-111.

[5] Leung KM, Margolis RU, Chan SO. Expression of phosphacan and neurocan during early development of mouse retinofungal pathway[J]. *Dev Brain Res*, 2004,152(1):1-10.

[6] Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henk-Fahle S, Mueuer BK. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003,22(3):319-330.

[7] Snow DM, Mullins N, Hynds DL. Nervous system-derived chondroitin sulfate proteoglycans regulate growth cone morphology and inhibit neurite outgrowth;a lingt, epifluorescence, and electron microscopy study[J]. *Microsc Res Tech*, 2001,54(5):273-286.

[8] Tang X,Davies JE,Davies SJ, James W. Changes indistribution, cell associatrions and protern expression level of NG₂, neurocan, phosphacan, brevican, versicanV2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue[J]. *Neulosci Res*, 2003,71(3):427-444.

[9] 李占魁,冯晋兴,赵春艳. 雄激素对新生大鼠缺氧缺血脑损伤的保护作用及机制研究[J]. *中国当代儿科杂志*,2006,8(6):441-446.

[10] 冯晋兴,李占魁,赵春艳,雷雅梅,郑纯礼. 雄激素干预后缺氧缺血新生大鼠脑组织超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的变化[J]. *中国临床康复杂志*,2006,10(42):70-72.

[11] Galtrey CM, Fawcett JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system[J]. *Brain Res Rev*, 2007,54(1):1-18.

[12] Bimonte-Nelson HA, Singleton RS, Nelson ME, Ecakman CB, Barber J, Scott TY, et al. Testosterone, but not nonaromatizable dihydrotestosterone, improves working memory and alters nerve growth factor levels in aged male rats[J]. *Exp Neurol*, 2003,181(2):301-312.

(本文编辑:吉耕中)