论 著

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001182

雌激素缺乏通过 ERβ/GSK-3β 通路加重痴呆小鼠认知损害的机制初探

张 威,冯 敏,骆世芳,贺桂琼

(重庆医科大学基础医学院神经科学研究中心，重庆 400016)

【摘 要】**目的**:研究雌激素缺乏对 APP/PS1 双转基因小鼠认知功能和病理变化的影响以及对小鼠脑内雌激素受体 β(estrogen receptor β,ERβ)和糖原合成酶激酶 3β(glycogen synthase kinase-3β,GSK-3β)表达的影响,探讨雌激素缺乏促进阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)发生发展的分子机制。**方法**:将 3 月龄雌性 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为假手术组(AD-Sham 组)和手术组(AD-OVX 组),同月龄野生型小鼠为对照组(WT 组),每组 10 只。分别于术后 1 个月和术后 5 个月,采用多种方法检测小鼠外周血雌激素水平、行为学、脑组织形态学及相关蛋白的变化。**结果**:OVX 1 个月(F=22.441,P=0.002)和 5 个月(F=210.959,P=0.000)组 AD 小鼠体循环雌激素水平显著下调;OVX 1 个月组小鼠子宫无明显缩小,而 OVX 5 个月出现明显萎缩。Morris 水迷宫显示,OVX 1 个月后,与 AD-Sham 组相比,AD-OVX 组小鼠找到平台的平均潜伏期和路程显著增加(P<0.05),跨越平台的次数明显减小(P<0.05)。随着 OVX 时间的延长,至 OVX 5 个月后,AD-OVX 组小鼠找到平台的时间和经过的路程更进一步延长(P<0.05),跨越平台的次数也相应下降(P<0.05)。免疫荧光结果显示,与 AD-Sham 组相比,OVX 1 个月组 AD-OVX 组小鼠仅大脑皮质内老年斑增多(5.667 ± 0.577 vs. 3.333 ± 0,577,P=0.023),而 OVX 5 个月 AD-OVX 组小鼠大脑皮质(11.667 ± 1.528 vs. 6.000 ± 1.000,P=0.001)和海马内(6.333 ± 1.528 vs. 3.667 ± 0.577,P=0.013)老年斑均显著增加。Western blot 结果显示,与 AD-Sham 组相比,OVX 1 个月(F=65.625,P=0.000)及 5 个月(F=18.462,P=0.003)组 AD-OVX 组小鼠脑内 ERβ 蛋白水平出现进行性下调(P<0.05);相应地,AD 小鼠脑内 p- GSK-3β 水平降低的趋势与 ERβ 一致,尽管正常小鼠和 AD 小鼠脑内 GSK-3β 总蛋白无明显差异。**结论**:雌激素缺乏可能通过 ERβ/GSK-3β 通路加速脑内的病理改变,进而加重痴呆小鼠认知功能的障碍。

【关键词】雌激素缺乏;阿尔茨海默病;雌激素受体 β;糖原合成酶激酶 3β;老年斑

【中图分类号】R741.02 【文献标志码】A 【收稿日期】2017- 01-10

Mechanisms of estrogen deficiency on aggravating cognitive impairment of dementia mice via ERβ/GSK-3β signaling pathway

Zhang Wei, Feng Min, Luo Shifang, He Guiqiong

(*Institute of Neuroscience, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***:To examine the effects of estrogen deficiency on cognitive impairment and cerebral pathological changes in APP/PS1 double transgenic mice, as well as on the expression of estrogen receptor β(ERβ) and glycogen synthase kinase-3β(GSK-3β), so as to clarify the molecular mechanisms of estrogen deficiency leading to Alzheimer's disease(AD). ***Methods***:The 3-month-old APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into sham-operated group(AD-Sham)(n=10) and ovariectomized group(n=10), and age-matched wild type mice were as controls(WT)(n=10). Mice were examined at 1 month and 5 months after OVX or sham operation. The Morris water maze test, radioimmunoassay, Western blot and immunofluorescent staining were used to detect the learning and memory ability and the serum estrogen levels of mice, and senile plaques, ERβ and GSK-3βprotein levels in the brain of mice. ***Results***:Radioimmunoassay showed that the serum estradiol levels was dropped significantly at 1 month(F=22.441, P=0.002) and 5 months(F=210.959, P=0.000) after OVX, and the uterine began to atrophy at 1 month after OVX, and the sizes of uterine further atrophy at 5 months after OVX. Morris water maze test showed that compared with those of AD-Sham group, the escape latency and the path length were increased significantly and the passing times were decreased significantly of AD-OVX group at 1 month after OVX(P<0.05). With the time following

作者介绍:张 威,Email:1053349399@qq.com,
研究方向:阿尔茨海默病的发生机制。

通信作者:贺桂琼, Email:guiqionghe@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:81671257、81371221);
重庆市基础与前沿研究计划资助项目(编号:cstc2016jcyjA0069);重庆市渝中区科技资助项目(编号:20130132)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1056.018.html (2017-05-16)

after OVX, the escape latency, the path length and the passing times were showed a further decline ($P<0.05$). If results showed that compared with that of the AD-Sham group, the number of senile plaques was begun to increase in the cortex in the AD-OVX group at 1 month after OVX (5.667 ± 0.577 vs. 3.333 ± 0.577, $P=0.023$) as the incidence of OVX, the number of senile plaques was increased significantly in the hippocampus (6.333 ± 1.528 vs. 3.667 ± 0.577, $P=0.013$) and cortex (11.667 ± 1.528 vs. 6.000 ± 1.000, $P=0.001$). Western blot showed that compared with that of WT group, the ERβ was abnormally expressed in AD-Sham group ($P<0.05$). The expression of ERβ was down regulated at 1 month ($F=65.625$, $P=0.000$) and 5 months ($F=18.462$, $P=0.003$) after OVX ($P<0.05$), while a similarly consistent trend was found in the expression of p-GSK-3β (ser9) ($P<0.05$), although the expression of total GSK-3β showed no differences. ***Conclusion***: Estrogen deficiency induces cognitive dysfunction and aggravates pathological in APP/PS1 mice, the mechanism is related to the signaling pathway of ERβ/GSK-3β.

【Key words】estrogen deficiency; Alzheimer's disease; estrogen receptor β; glycogen synthase kinase-3β; senile plaques

阿尔茨海默病（alzheimer's disease, AD）又叫老年痴呆，是一种以记忆和认知功能逐渐丧失为主要临床表现的脑变性疾病[1]。细胞外 β 淀粉样蛋白（amyloid β peptide, Aβ）沉积形成的老年斑（senile plaques, SP）是 AD 脑的典型病理特征之一[2]。随着世界人口老龄化的日益加重，AD 的发病率日趋增高。然而 AD 的发病机制尚不清楚，目前还未找到有效治疗 AD 的方法。

流行病学调查显示，AD 发病具有明显的性别差异：绝经后的女性 AD 发病率比同年龄男性高约 3 倍[3]；研究还显示女性 AD 患者脑内的病理改变及认知功能障碍比男性更严重[4]；女性更年期卵巢功能衰退及雌激素分泌水平骤降与女性罹患 AD 的高风险性密切相关，内源性雌激素缺乏出现于 AD 发病之前[5]。但雌激素缺乏导致 AD 的分子机制尚不十分明确。雌激素通过雌激素受体（estrogen receptors, ER）发挥作用。ER 主要分 2 类：ERα 和 ERβ。ERα 和 ERβ 在人类及啮齿类动物全身广泛分布，在脑内均有高表达，ERα 主要分布于下丘脑、终纹床核等与生殖调节有关的脑区，而 ERβ 则强表达于嗅球、基底前脑、大脑皮质、海马等脑区[6]。纵观国内外大量的研究，目前关于雌激素缺乏对 ERα 影响的研究较多，但对 ERβ 的研究相对较少。既然 ERβ 主要分布于与学习记忆相关的脑区，那么明确女性绝经后脑内 ERβ 的动态变化有望从新的角度揭示雌激素缺乏引起认知功能障碍的分子机制。

鉴于此，本课题拟采用卵巢切除 AD 模型小鼠为研究对象，应用行为学、形态学及分子生物学技术，观察雌激素缺乏对痴呆小鼠认知功能和老年斑以及脑内 ERβ 及相关信号通路因子等的影响。本实验结果将为揭示 AD 的发病机制提供新的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

兔抗 ERβ 单克隆抗体（Abcam, ab3577）；鼠抗 GSK-3β 单克隆抗体（Abcam, ab93926）；鼠抗 p-GSK-3β（ser9）单克隆抗体（Santa Cruze, sc81495）；β-actin 鼠单克隆抗体（碧云天, AF003）；HRP 耦联的抗兔 IgG（碧云天, A0277）；HRP 耦联的抗鼠 IgG（碧云天, A0286）；4G8 单克隆抗体（Covance, SIG-39240）；CY3 标记的山羊抗小鼠 IgG（碧云天, A0433）；ECL 发光试剂（碧云天, P0018）；其他均为国产分析纯。

1.2 实验动物

清洁级 3 月龄雌性 B6C3-Tg（携带人 APPswe, PSEN1 △9）双转基因鼠（购自北京华阜康生物科技有限公司，合格证号：NO.114401300010893）20 只，体质量（23 ± 2）g，随机分为 2 组，即假手术组（AD-Sham 组）和手术组（AD-OVX 组），而手术组又根据雌激素缺乏时间不同，随机分为围绝经期模拟组（5 只）和绝经晚期模拟组（5 只），针对各处理组 AD 模型小鼠，分别设立等量的野生型对照组。将小鼠分笼喂养于光照/黑暗为 12 h/12 h 的恒温环境，自由摄食及饮水，每天观察并记录小鼠有无异常活动。本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所订制的伦理学标准。

1.3 动物模型的建立及分组

所有实验动物用 1.5% 戊巴比妥（0.25 mL/100 g）腹腔麻醉后，取腹位固定，在背部两侧下方纵切两口，消毒被皮后，分别在脊柱两侧切开背肌 1 cm，拉开切口可见一白色脂肪团，将脂肪团用镊子拉出，见到粉红色卵巢，结扎摘除卵巢，同法摘除对侧卵巢，缝合手术伤口，术后碘酒消毒伤口。假手术组去除卵巢周围等量脂肪组织。在术后第 3 天开始阴道细胞涂片，连续 5~7 d 出现上皮角化细胞证明造模成功。

1.4 Morris 水迷宫测试

实验时平台随机至于第二象限，并固定于水下 1.0~1.5 cm，水温保持在 20 ℃~24 ℃。实验分为定位航行实验和空间探索实验两部分。①定位航行实验：实验历时 5 d，分别从 4 个象限任选一入水点将小鼠面向池壁放入水中，记录小鼠从入水到找到平台所需时间（逃避潜伏期，escape latency）及游动路程（path length）。如果 60 s 内小鼠未找到平台，则引导其至平台并停留 10 s。②空间探索实验：撤离平台，将小鼠轻柔放入水池中，记录 60 s 内小鼠穿过原平台所在位置的次数。

1.5 动物标本制备

小鼠年龄达实验所需月龄后，用 3.5%水合氯醛麻醉小鼠，经左心室快速灌注生理盐水 20 mL，冰上取脑，左侧脑组织-80 ℃冻存；右侧脑组织放入 4%的多聚甲醛固定 72 h，常规梯度蔗糖脱水，待组织沉底后，用 OTC 包埋剂包埋固定于恒冷切片机连续冠状切片，厚度 10 μm。测定循环雌激素浓度的小鼠直接麻醉后摘除双侧眼球取血，分离血清后送至北京北方生物科技研究所，利用放射免疫试剂盒检测体内循环雌激素水平。

1.6 免疫荧光染色

每组小鼠随机抽取 3 只，取右侧脑组织作冰冻切片，切片厚度 10 μm，贴附于多聚赖氨酸包被的载玻片上，PBS 清洗 5 min × 3 次，滴加 3%的 BSA 溶液，置于 37 ℃孵箱 40 min 后弃去擦干，加入 4G8 鼠单克隆抗体（Covance，1:250 稀释），置于湿盒 4 ℃冰箱孵育过夜后于次日 37 ℃复温 30 min，PBS 清洗 5 min × 3 次，滴加鼠二抗 Cy3（碧云天，1:250 稀释），于 37 ℃孵箱孵育 40 min 后清洗，DAPI 染核，封片保存。染色结果在荧光显微镜（奥林巴斯，日本）下随机选择 5 个 100 倍视野，对阳性细胞计数，进行统计分析。

1.7 Western blot 检测

每组小鼠随机抽取 3 只，取左侧半脑海马和大脑皮质提取蛋白，并按照 BCA 试剂盒测定蛋白的浓度。取样品蛋白 50 μg，经过 10%SDS-PAGE 凝胶电泳，恒流 250 mA 将蛋白转至 0.45 μm PVDF 膜上，以 Western blot 封闭液 37 ℃摇床封闭 2 h 后加入一抗 ERβ（1:1 000）/GSK-3β（1:1 000）/p-GSK-3β（ser9）（1:500），β-actin 抗体为 1:1 000 稀释，4 ℃孵育过夜，次日洗涤后加入 HRP 耦联的抗兔 IgG（1:8 000）和抗小鼠 IgG（1:6 000）37 ℃孵育 40 min 后，采用 BIO-RAD 仪器进行化学发光显色。Quantity One 软件对蛋白条带进行光密度计量学分析，计算目的蛋白的相对表达量，计算公式：目的蛋白的相对表达量=目的蛋白光密度值/β-actin 光密度值。

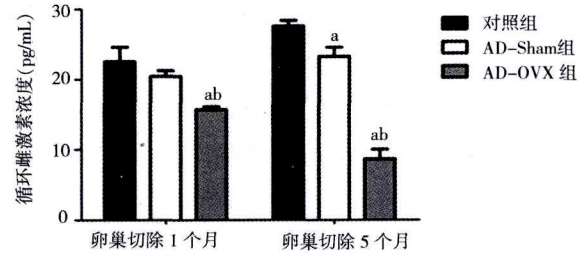
1.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对各组数据进行正态检验和方差齐性检验，本实验中所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组数据间采用单因素方差分析，组内两两比较采用 LSD-t 检验；水迷宫实验首先对重复测量数据在各时间点之间的关系进行球形检验，其检验的结果均为 $P>0.05$，说明重复测量数据之间实际上不存在相关性，资料满足 Huynh-Feldt 条件，使用重复测量设计资料的单变量方差分析处理资料。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 构建卵巢切除模型，检测各组小鼠体循环雌激素水平和子宫的变化

OVX 对外周血雌激素水平的影响：放射免疫法结果显示，卵巢切除手术后 1 个月，各组 AD 小鼠体内都出现了循环雌激素的明显下降（$F=22.441$，$P=0.002$），AD-OVX 组小鼠外周血雌激素（15.703 ± 0.425）较 AD-Sham 组（22.547 ± 2.028）显著下调（$P=0.004$），而 AD-Sham 组小鼠与对照组小鼠（22.547 ± 2.028）相比，外周血雌激素水平无明显差异（$P=0.091$）。卵巢切除手术后 5 个月，各组 AD 小鼠体内循环雌激素含量进一步下降（$F=210.959$，$P=0.000$），AD-OVX 组小鼠外周血雌激素水平（8.673 ± 1.349）急剧下降，与 AD-Sham 组（23.240 ± 1.318）相比，差异有统计学意义（$P=0.000$），如图 1 所示。



a：与对照组相比，$P<0.05$（$n=3$）；b：AD-OVX 组与 AD-Sham 组相比，$P<0.05$（$n=3$）

图 1 卵巢切除对各组小鼠体循环雌激素浓度的影响

Fig.1 Effect of Ovariectomy on serum estradiol levels of various groups of mice

OVX 对子宫大小的影响：OVX 1 个月组 AD 小鼠子宫与假手术和正常小鼠子宫大小略有缩小，但术后 5 个月组 AD 小鼠子宫大小较假手术和正常小鼠明显缩小（图 2）。综上结果表明，本实验所用卵巢切除模型建立成功。

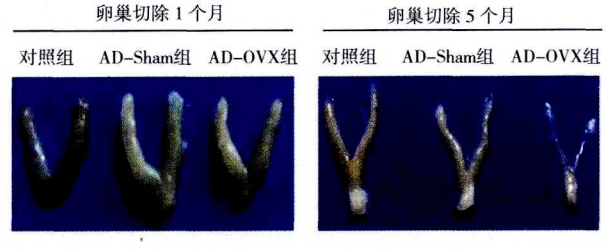


图 2 卵巢切除对各组小鼠子宫大小的影响

Fig.2 Effect of ovariectomy on uterus size of various groups of mice

2.2 雌激素缺乏对各组小鼠空间学习记忆能力的影响

Morris 水迷宫结果显示(图 3),在隐蔽平台实验中,无论是术后 1 个月还是 5 个月,随着训练时间的延长,AD-OVX 组和 AD-Sham 组小鼠找到平台的潜伏期和路程均较正常对照组小鼠明显延长,提示 AD 小鼠已出现空间学习记忆障碍。术后 1 个月组,AD-OVX 组小鼠找到平台的平均潜伏期较 AD-Sham 组小鼠明显增加(P=0.017),找到平台所经过的平均路程也明显增多(P=0.022)。术后 5 个月组,AD-OVX 组小鼠找到平台的平均潜伏期和平均路程也较 AD-Sham 组小鼠的平均潜伏期(P=0.043)和平均路程(P=0.037)显著增加。

在空间探索实验中,术后 1 个月和 5 个月组 AD 组小鼠穿越平台的次数明显少于正常对照组,同样印证了 AD 小鼠认知功能的障碍这一结果。术后 1 个月组,AD-OVX 组小鼠跨越平台的次数(5.37 ± 0.25)较 AD-Sham 组小鼠(6.20 ± 0.18)明显减少(P=0.012)。术后 5 个月组,与 AD-Sham 组小鼠(3.67 ± 1.16)相比,AD-OVX 组小鼠跨越平台的次数进一步减少(1.00 ± 1.00,P=0.039)。

2.3 雌激素缺乏对各组小鼠脑内老年斑的影响

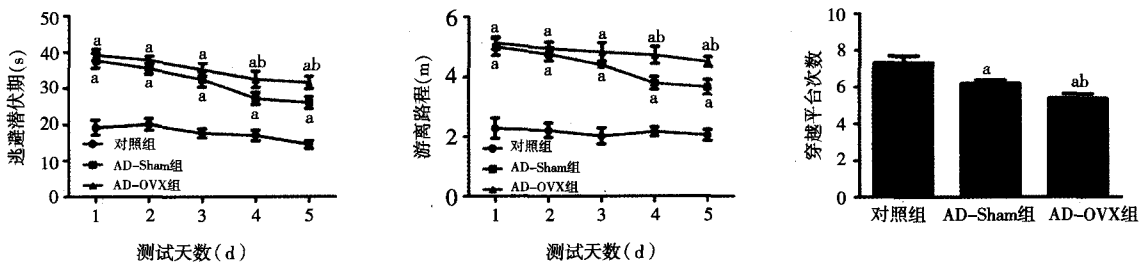
4G8 免疫荧光抗体为靶向 Aβ17-24 氨基酸序列的抗体,4G8 阳性表达即为 Aβ 沉积形成的老年斑。免疫荧光结果显示(图 4),各组 AD 小鼠脑内均出现了大小不等的 4G8 阳性斑块,但对照组小鼠各脑区未见阳性斑块出现。术后 1 个月组中,AD-OVX 组与 AD-Sham 组相比,海马区老年斑数目无明显差异(1.333 ± 0.577 vs. 1.000 ± 1.000,P=0.563),但大脑皮质老年斑数目明显增多(5.667 ± 0.577 vs. 3.333 ± 0.577,P=0.023)。而术后 5 个月组中,AD-OVX 组小鼠与 AD-Sham 组相比,海马区(6.333 ± 1.528 vs. 3.667 ± 0.577,P=0.013)与大脑皮质(11.667 ± 1.528 vs. 6.000 ± 1.000,P=0.001)阳性斑块均显著增多。

2.4 雌激素缺乏对各组小鼠脑内 ERβ 的影响

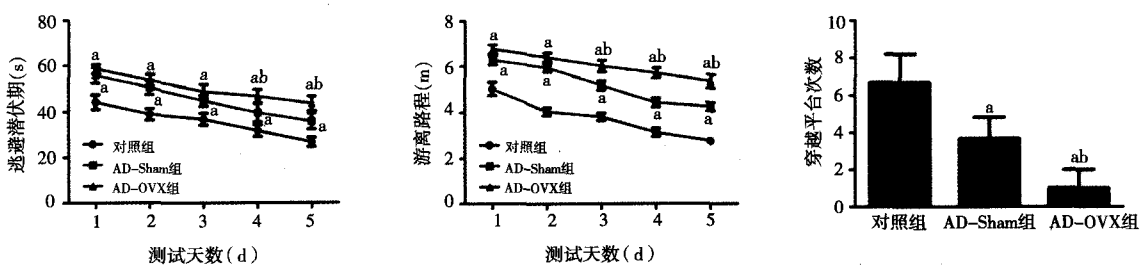
Western blot 结果显示,无论术后 1 个月(F=65.625,P=0.000)还是 5 个月(F=18.462,P=0.003),各组 AD 小鼠脑内 ERβ 的表达水平较各自对照组小鼠均出现明显下降。术后 1 个月组小鼠,AD-OVX 组小鼠脑内 ERβ 蛋白水平较 AD-sham 组小鼠明显降低(0.383 ± 0.021 vs. 0.433 ± 0.012,P=0.010)。术后 5 个月组 AD 小鼠脑内 ERβ 变化趋势与术后 1 个月组 AD 小鼠一致(0.137 ± 0.021 vs. 0.203 ± 0.032,P=0.023),且 OVX 时间越长,脑内 ERβ 表达水平更低(图 5)。

2.5 雌激素缺乏对各组小鼠脑内 GSK-3β 的影响

Western blot 结果显示,各组小鼠脑内 GSK-3β 全蛋白水平无显著差异。卵巢切除手术后 1 个月(F=54.950,P=0.000)和 5 个月(F=82.321,P=0.000),各组 AD 小鼠脑内GSK-3β 在 Ser9 位点的磷酸化水平(p-GSK-3β)均明显降低。不同月龄段 AD 小鼠之间的比较中,OVX 后 1 个月与 AD-Sham 组相比,AD-OVX 组小鼠脑内 p-GSK-3β 水平已出现明显下调(0.428 ± 0.049 vs. 0.682 ± 0.045,P=0.000)。随着 OVX 时间的延长,到 OVX 后 5 个月,AD-OVX 组小鼠脑内 p-GSK-3β 水平下调更明显(0.233 ± 0.029 vs. 0.371 ± 0.029,P=0.000)(图 6)。



A. 卵巢切除 1 个月各组小鼠逃避潜伏期、游动路程及穿越平台次数

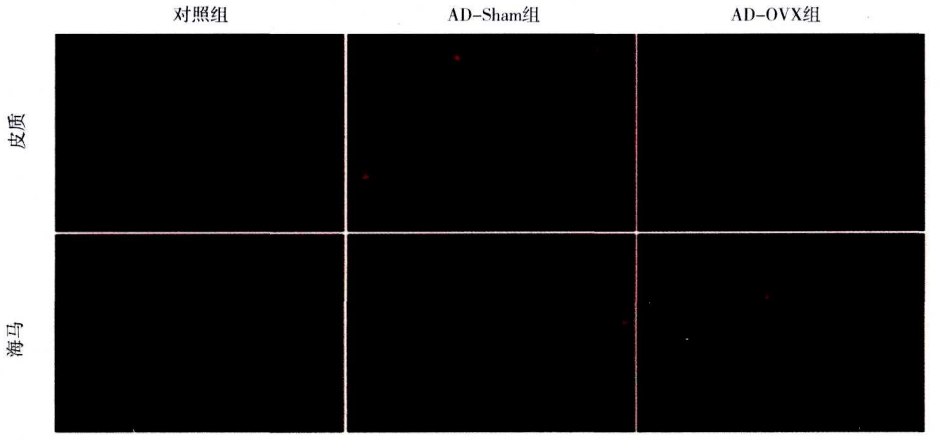


B. 卵巢切除 5 个月各组小鼠逃避潜伏期、游动路程及穿越平台次数

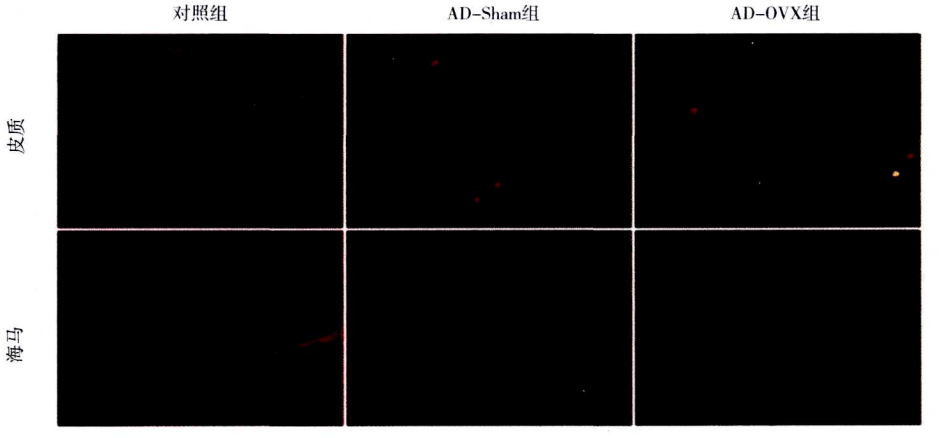
a:与对照组相比,P<0.05(n=3);b:AD-OVX 组与 AD-Sham 组相比,P<0.05(n=3)

图 3 卵巢切除对各组小鼠空间学习记忆能力的影响

Fig.3 Effect of ovariectomy on spatial learning and memory of various groups of mice



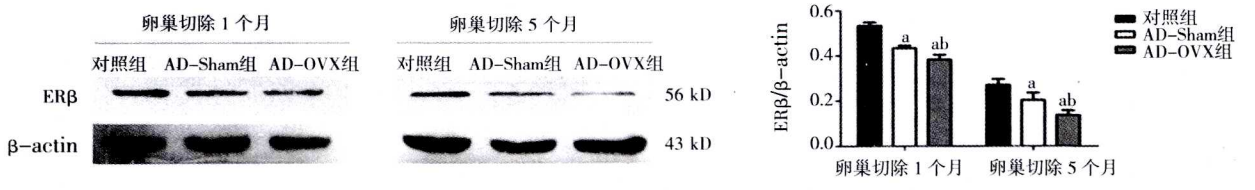
A. 卵巢切除 1 个月各组小鼠皮质及海马区的老年斑表达分布



B. 卵巢切除 5 个月各组小鼠皮质及海马区的老年斑表达分布

图 4　卵巢切除对各组小鼠脑内老年斑的影响(100×)

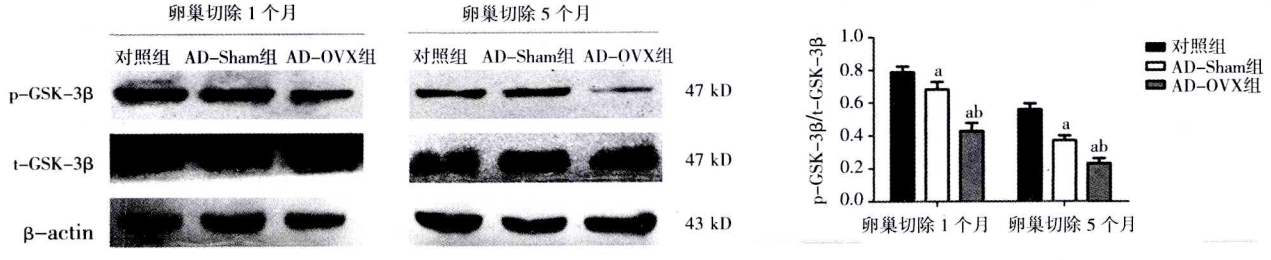
Fig.4　Effect of ovariectomy on senile plaques of various groups of mice(100×)



a：与对照组相比，$P<0.05(n=3)$；b：AD-OVX 组与 AD-Sham 组相比，$P<0.05(n=3)$

图 5　Western blot 检测卵巢切除对各组小鼠脑内 ERβ 表达水平的影响

Fig.5　Effect of ovariectomy on brain ERβ protein level of various groups of mice



a：与对照组相比，$P<0.05(n=3)$；b：AD-OVX 组与 AD-Sham 组相比，$P<0.05(n=3)$

图 6　Western blot 检测卵巢切除对各组小鼠脑内 GSK-3β 表达的影响

Fig.6　Effect of ovariectomy on brain GSK-3β protein level of various groups of mice

3 讨 论

雌激素是人体许多组织合成的一种类固醇激素，最早仅被认为对生殖系统有作用，但近年来的研究发现雌激素对大脑构造和功能亦发挥十分重要的作用，这些作用主要包括突触可塑性、记忆、神经发生和神经保护等。大量临床和流行病学研究表明，AD 的发病存在性别差异，绝经期后女性 AD 患者的发病率要远高于男性患者。女性 AD 的患病率比男性高的重要原因之一是绝经后雌激素水平降低，说明雌激素缺乏是 AD 的危险因素。但雌激素缺乏引起 AD 的机制仍不十分明确。为探讨该机制，本实验采用国际上公认的双侧卵巢切除术（ovariectomy，OVX）模拟绝经模型[7]。实验发现，OVX 1 个月后 AD 小鼠外周血中雌激素水平明显下降，但子宫仅出现轻度缩小；OVX 5 个月后小鼠雌激素水平下降非常显著，子宫也出现严重萎缩，提示绝经模型已成功建立。

大量研究表明雌激素对 AD 患者的认知功能有重要影响[8-9]。本实验采用经典的 Morris 水迷宫实验来检测雌激素缺乏如何影响 AD 小鼠的空间学习记忆能力。在隐蔽平台实验中，所有 AD 小鼠搜索平台的潜伏期及找到平台所经过的路程均比对照组小鼠增加，提示 AD 小鼠已出现认知功能的损害。与假手术组 AD 小鼠相比，OVX 组 AD 小鼠找到平台的潜伏期及所经过的路程明显延长，而跨越平台的次数显著减小，提示雌激素缺乏可加重 AD 小鼠学习记忆能力的损害，且 OVX 时间越长，AD 小鼠认知功能下降越显著。提示雌激素下降水平与认知功能紊乱呈正相关，这一结果与之前 Lebrun 等观察到的雌激素水平同整体认知功能呈正相关这一研究结果相一致[10]。

大脑皮质及海马区 Aβ 沉积形成的老年斑（SP）是 AD 的特征性病理改变之一。为检测雌激素缺乏加重 AD 小鼠空间学习记忆能力的损害是否源于脑内 SP 增加引起，本实验进行了免疫荧光染色，结果显示 OVX 组 AD 小鼠和假手术组 AD 小鼠大脑皮质和海马内均出现了 4G8 阳性斑块，这与本课题组前期的实验发现相一致[11]。但 OVX 组 AD 小鼠脑内 SP 的数量显著高于假手术组，且随着 OVX 时间的延长，AD 小鼠脑内 Aβ 沉积形成的 SP 增加更多，提示雌激素缺乏可通过加速脑内 Aβ 的沉积，进而加重 AD 小鼠的认知功能损害。那么，雌激素缺乏如何启动认知功能的损害，其内在的分子机制是什么尚不明确。

雌激素通过其受体发挥作用。ER 是核受体超家族成员之一，与雌激素特异结合后，再通过雌激素应答元件调节靶基因的转录。在大脑中，ERα 和 ERβ 空间分布模式和表达水平不同，ERα 主要分布在下丘脑、杏仁核和终纹床核等与生殖调节有关的脑区，ERβ 主要分布在嗅球、基底前脑、大脑皮质、海马和内嗅皮质等与学习记忆密切相关的脑区。研究表明，ERβ 基因多态性与加速脑的老化及女性患 AD 的易感性相关，而 ERα 基因多态性与认知功能下降无关[12]。还有研究表明，ERα mRNA 的表达与小鼠记忆能力呈负相关，与增龄无显著相关性；ERβ mRNA 在脑内的表达水平与小鼠学习记忆能力呈正相关，而与增龄呈负相关[13]。以上研究提示 ERβ 而非 ERα 极可能介导了雌激素对学习记忆的调节[14]。本实验观察到，实验所用的 AD 模型小鼠与正常对照小鼠相比，ERβ 蛋白水平已出现异常，而 OVX 后 AD 小鼠脑内 ERβ 蛋白水平下调更显著，提示 ERβ 对雌激素的变化非常敏感，这与 Waters 等在正常老龄大鼠海马内观察到的结果相吻合[15]。那么，雌激素缺乏后如何通过下调 ERβ 蛋白水平从而加重 Aβ 的沉积及认知功能异常？

结合课题组前期研究及文献报道发现，GSK-3β 活性异常是促进 AD 发生发展的另一重要因素[16-17]。GSK-3β 是一种在细胞内很活跃的富含丝氨酸（Ser）和苏氨酸（Tyr）的激酶，是多种细胞信号传导通路的重要中介物，其第 Ser9 位点磷酸化后活性将被抑制。本实验观察到 AD 小鼠脑内 GSK-3β 在 Ser9 位点的磷酸化水平（p-GSK-3β）较同月龄正常对照组小鼠明显降低，同时，OVX 后 AD 小鼠脑内 p-GSK-3β 蛋白水平下调更显著，提示雌激素缺乏可导致 GSK-3β 活性增强。近期研究发现 GSK-3β 活性异常可通过影响 ERβ 的小泛素样修饰因子（small ubquitin-like modificator，SUMO）的修饰来调节该受体的水平和活性[18]。SUMO（包括 SUMO1、2、3）与 AD 的发生发展关系密切，在 APP 转基因 AD 模型小鼠脑内观察到大量 SUMO1 阳性斑块[19]。近期研究揭示了 ERβ 也是 SUMO1 的靶蛋白，ERβ-SUMO1 的结合可被 GSK-3β 调控[18]。当 GSK-3β 过

表达或异常激活时，也会导致 ERβ-SUMO1 的表达增多，游离状态的 ERβ 减少。本研究中发现，雌激素缺乏后，GSK-3β 的活性显著增强。可能系雌激素缺乏引起 ERβ-SUMO1 的表达增多，从而对 GSK-3β 产生反馈调节作用。同时，GSK-3β 的激活也可以正反馈作用于 Aβ，从而促进了 Aβ 的生成。

综上所述，本文研究结果表明，雌激素缺乏显著加速了 AD 小鼠脑内的病理改变及认知功能的进一步恶化，其机制可能与 ERβ 表达障碍及 GSK-3β 的异常激活有关。这一研究成果有望为 AD 的临床治疗提供新的思路和方法，但是有关雌激素缺乏引起 ERβ 的表达障碍及 GSK-3β 活性异常的分子机制尚不清楚，有待进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Carrillo MC, Dean RA, Nicolas F, et al. Revisiting the framework of the National Institute on Aging-Alzheimer's Association diagnostic criteria[J]. Alzheimers & Dementia the Journal of the Alzheimers Association, 2013, 9(5): 594-601.

[2] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years[J]. EMBO Molecular Medicine, 2016, 8(6): 595-608.

[3] Carter CL, Resnick EM, Mallampalli M, et al. Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research [J]. Journal of Women's Health, 2012, 21(10): 1018-1023.

[4] Irvine K, Laws KR, Gale TM, et al. Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis[J]. Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology, 2012, 34(9): 989-998.

[5] 杨 华，屈秋民，郭 峰，等. 雌激素在阿尔茨海默病患者的改变及其意义[J]. 中国神经精神疾病杂志，2007，33(3)：179-182.

[6] Osterlund MK, Grandien K, Keller E, et al. The human brain has distinct regional expression patterns of estrogen receptor alpha mRNA isoforms derived from alternative promoters[J]. Journal of Neurochemistry, 2000, 75(4): 1390-1397.

[7] 常 艳，傅一山，朱心强. 小鼠卵巢切除术入路的改良[J]. 上海实验动物科学，1999，19(4)：30-36.

[8] Yaffe K, Barnes D, Lindquist K, et al. Endogenous sex hormone levels and risk of cognitive decline in an older biracial cohort[J]. Neurobiology of Aging, 2007, 28(2): 171-178.

[9] Berent-Spillson A, Persad CC, Love T, et al. Hormonal environment affects cognition independent of age during the menopause transition[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2012, 97(9): E1686-1694.

[10] Lebrun CE, van der Schouw YT, de Jong FH, et al. Endogenous oestrogens are related to cognition in healthy elderly women[J]. Clinical Endocrinology, 2005, 63(1): 50-55.

[11] 刘 刚，廖 娥，钟国超，等. 不同年龄段雌性 APP/PS1 双转基因小鼠脑内病理特征的动态变化[J]. 重庆医科大学学报，2015，40(1)：13-17.

[12] Ryan J, Carriere I, Amieva H, et al. Prospective analysis of the association between estrogen receptor gene variants and the risk of cognitive decline in elderly women[J]. European Neuropsychopharmacology: the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 2013, 23(12): 1763-1768.

[13] Pirskanen M, Hiltunen M, Mannermaa A, et al. Estrogen receptor beta gene variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women[J]. European Journal of Human Genetics: EJHG, 2005, 13(9): 1000-1006.

[14] Zhao L, Woody SK, Chhibber A. Estrogen receptor beta in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutics[J]. Ageing Research Reviews, 2015, 24(Pt B): 178-190.

[15] Waters EM, Yildirim M, Janssen WG, et al. Estrogen and aging affect the synaptic distribution of estrogen receptor beta-immunoreactivity in the CA1 region of female rat hippocampus[J]. Brain Research, 2011, 1379: 86-97.

[16] Long ZM, Zhao L, Jiang R, et al. Valproic acid modifies synaptic structure and accelerates neurite outgrowth via the glycogen synthase kinase-3beta signaling pathway in an Alzheimer's disease model[J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2015, 21(11): 887-897.

[17] Llorens-Martin M, Jurado J, Hernandez F, et al. GSK-3beta, a pivotal kinase in Alzheimer disease[J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2014, 7: 46.

[18] Picard N, Caron V, Bilodeau S, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta[J]. Molecular and Cellular Biology, 2012, 32(14): 2709-2721.

[19] Takahashi K, Ishida M, Komano H, et al. SUMO-1 immunoreactivity co-localizes with phospho-Tau in APP transgenic mice but not in mutant Tau transgenic mice[J]. Neuroscience Letters, 2008, 441(1): 90-93.

（责任编辑：张辉洁）