

圣草酚改善 5×FAD 小鼠认知功能并调控 Nogo-A/NgR/ROCK2 信号通路

李梦迪^{1, 2}, 李娜^{1, 2}, 郭敏芳², 孟涛², 于婧文², 李雁冰^{1, 2}, 马存根^{1, 2}, 尉杰忠^{1, 2, 3}<https://doi.org/10.12307/2023.589>

投稿日期: 2022-08-30

采用日期: 2022-10-19

修回日期: 2022-12-05

在线日期: 2023-01-19

中图分类号:

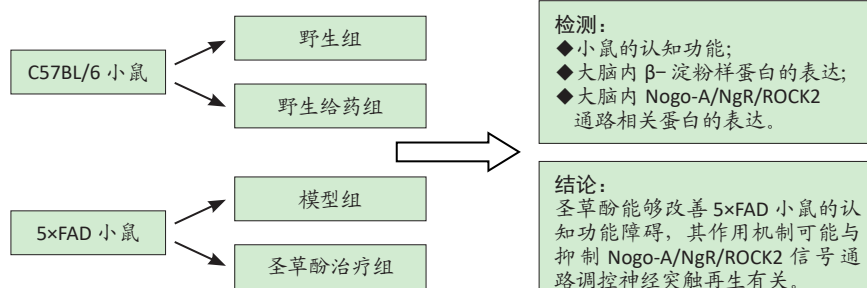
R459.9; R332; R741.02

文章编号:

2095-4344(2023)32-05097-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 圣草酚对 5×FAD 小鼠认知功能的影响



文题释义:

圣草酚: 是一种天然二氢黄酮类化合物, 广泛存在于水果、蔬菜、中药中, 过去人们曾利用富含圣草酚的植物治疗过敏性鼻炎、风湿等疾病, 随后展开的研究证明了圣草酚有抗氧化应激、抗炎等作用, 并对神经退行性疾病有一定的治疗效果。

5×FAD小鼠: 为携带5个突变基因的APP/PS1小鼠, 5个突变基因分别为APP中的瑞典型(K670N/M671L)、佛罗里达型(I716V)和伦敦型(V717I)突变, 以及PS1中的M146L和L286V突变, 是目前应用较为广泛的阿尔茨海默病模型之一。

Nogo-A/NgR/ROCK2信号通路: Nogo-A能够与下游相应受体结合, 最终激活下游的ROCK2信号, 参与细胞的各种生理活动, 包括抑制神经轴突的生长, 从而影响神经元的再生。

摘要

背景: 大量研究表明, 神经生长抑制因子A(nerve growth inhibitory factor A, Nogo-A)可以通过与其下游分子结合激活Rho相关卷曲螺旋激酶(Rho-associated kinase, ROCK), 从而对神经轴突的生长发挥抑制作用, 与阿尔茨海默病中β-淀粉样蛋白的累积密切相关。实验室前期已经证明圣草酚能够改善5×FAD小鼠的认知功能障碍, 但其对Nogo-A/NgR/ROCK2信号通路的调控尚未明确。

目的: 基于Nogo-A/NgR/ROCK2信号通路, 探讨圣草酚对5×FAD小鼠认知功能的影响。

方法: 选取8月龄雄性C57BL/6小鼠分为野生组、野生给药组, 8月龄雄性5×FAD小鼠分为模型组、圣草酚治疗组, 每组8只, 从小鼠33周龄开始, 野生给药组和圣草酚治疗组每日腹腔注射圣草酚10 μL/g, 野生组和模型组注射同等体积的生理盐水, 连续给药2个月, 进行水迷宫、Y迷宫等行学检测, 检测结束后采用Western blot和免疫组织化学方法检测小鼠脑内β-淀粉样蛋白1-42, Nogo-A, NgR, p75NTR, Lingo1, ROCK2, p-ROCK2等相关靶蛋白的表达。

结果与结论: ①行为学检测结果显示, 与野生组和野生给药组相比, 模型组小鼠空间记忆能力与新事物探索能力均下降; 与模型组相比, 圣草酚治疗组空间记忆能力与新事物探索能力得到改善; ②免疫组织化学与Western blot结果显示, 与野生组和野生给药组相比, 模型组β-淀粉样蛋白1-42、神经生长抑制因子Nogo-A及其神经生长抑制因子受体NgR, p75NTR, Lingo1的表达均升高; 与模型组相比, 圣草酚治疗组相关蛋白表达均有所下调; ③与野生组和野生给药组相比, 模型组Rho激酶相关蛋白ROCK2及p-ROCK2表达均升高; 与模型组相比, 圣草酚治疗组相关蛋白表达下调; ④结果表明, 圣草酚改善5×FAD小鼠的认知功能障碍与抑制Nogo-A/NgR/ROCK2信号通路相关。

关键词: 阿尔茨海默病; 圣草酚; 5×FAD小鼠; 神经保护; 认知功能

Eriodictyol improves cognitive function of 5×FAD mice by regulating Nogo-A/NgR/ROCK2 signaling pathway

Li Mengdi^{1, 2}, Li Na^{1, 2}, Guo Minfang², Meng Tao², Yu Jingwen², Li Yanbing^{1, 2}, Ma Cungen^{1, 2}, Yu Jiezhong^{1, 2, 3}

¹Research Center of Neurobiology/The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation for Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province, China; ²Institute of Brain Science, Shanxi Datong

¹山西中医药大学神经生物学研究中心 / 国家中医药管理局益气活血法治疗多发性硬化重点研究室, 山西省晋中市 030619; ²山西大同大学脑科学研究所, 山西省大同市 037009; ³大同市第四人民医院, 山西省大同市 037009

第一作者: 李梦迪, 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 山西中医药大学在读硕士, 主要从事神经退行性变疾病的基础和应用研究。

共同第一作者: 李娜, 女, 陕西省榆林市人, 山西中医药大学在读硕士, 主要从事神经退行性变疾病的基础和应用研究。

通讯作者: 尉杰忠, 博士, 教授, 博士生导师, 山西中医药大学神经生物学研究中心 / 国家中医药管理局益气活血法治疗多发性硬化重点研究室, 山西省晋中市 030619; 山西大同大学脑科学研究所, 山西省大同市 037009; 大同市第四人民医院, 山西省大同市 037009

共同通讯作者: 马存根, 博士, 教授, 博士生导师, 山西中医药大学神经生物学研究中心 / 国家中医药管理局益气活血法治疗多发性硬化重点研究室, 山西省晋中市 030619; 山西大同大学脑科学研究所, 山西省大同市 037009

<https://orcid.org/0000-0002-6106-9146> (李梦迪)

基金资助: 山西省 2022 年度“四个一批”科技兴医创新计划项目 (2022XM33), 项目负责人: 尉杰忠; 山西省基础研究计划项目 (20210302123476), 项目负责人: 郭敏芳; 山西省卫健委医学科技领军团队 (2020TD05), 项目负责人: 马存根; 国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室开放课题项目 (2021-KF-21S), 项目负责人: 李梦迪

引用本文: 李梦迪, 李娜, 郭敏芳, 孟涛, 于婧文, 李雁冰, 马存根, 尉杰忠. 圣草酚改善 5×FAD 小鼠认知功能并调控 Nogo-A/NgR/ROCK2 信号通路 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32):5097-5102.



University, Datong 037009, Shanxi Province, China; ³Datong Fourth People's Hospital, Datong 037009, Shanxi Province, China
Li Mengdi, Master candidate, Research Center of Neurobiology/The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation for Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province, China; Institute of Brain Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi Province, China
Li Na, Master candidate, Research Center of Neurobiology/The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation for Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province, China; Institute of Brain Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi Province, China
Li Mengdi and Li Na contributed equally to this work.

Corresponding author: Yu Jiezhong, MD, Professor, Doctoral supervisor, Research Center of Neurobiology/The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation for Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province, China; Institute of Brain Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi Province, China; Datong Fourth People's Hospital, Datong 037009, Shanxi Province, China

Co-corresponding author: Ma Cungen, MD, Professor, Doctoral supervisor, Research Center of Neurobiology/The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation for Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province, China; Institute of Brain Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Numerous studies have shown that nerve growth inhibitory factor (Nogo-A) can activate Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) by binding to its downstream molecules, thereby exerting an inhibitory effect on nerve axon growth, which is closely related to the accumulation of β -amyloid protein in Alzheimer's disease. Pre-laboratory work has demonstrated that eriodictyol improves cognitive dysfunction in 5x-FAD mice, but its modulation of the Nogo-A/NgR/ROCK2 signaling pathway has not been clarified.

OBJECTIVE: To investigate the effect of eriodictyol on cognitive function in 5x-FAD mice via the Nogo-A/NgR/ROCK2 signaling pathway.

METHODS: Male C57BL/6 mice, 8 months old, were randomized into wild group and wild triodictyol-treated group, while 8-month-old male 5x-FAD mice were divided into model group and eriodictyol-treated group, with eight animals in each group. Starting from 33 weeks of age, the wild eriodictyol-treated group and the eriodictyol-treated group were injected intraperitoneally with 10 μ L/g eriodictyol daily, and the wild and model groups were injected with the same volume of saline for 2 months. Behavioral assays such as Morris water maze and Y-maze tests were performed, and the expression of β -amyloid 1-42, Nogo-A, NgR, p75NTR, Lingo1, ROCK2, p-ROCK2 and other related target proteins in brain were detected by western blot and immunohistochemistry after testing.

RESULTS AND CONCLUSION: Behavioral assay results showed that the spatial memory ability and novelty exploration ability were decreased in the model group compared with the wild group and the wild eriodictyol-treated group, while these abilities were improved in the eriodictyol-treated group compared with the model group. Immunohistochemistry and western blot results showed that the expression of β -amyloid 1-42, Nogo-A and its receptors such as NgR, p75NTR and Lingo-1 were increased in the model group compared with the wild group and the wild eriodictyol-treated group, and were all down-regulated in the eriodictyol-treated group compared with the model group. The expression of Rho kinase-related proteins ROCK2 and p-ROCK2 was increased in the model group compared with the wild group and wild eriodictyol-treated group, but was down-regulated in the eriodictyol-treated group compared with the model group. These findings suggest that eriodictyol treatment ameliorates cognitive dysfunction in 5x-FAD mice, which is associated with inhibition of the Nogo-A/NgR/ROCK2 signaling pathway.

Key words: Alzheimer's disease; eriodictyol; 5x-FAD mice; neuroprotection; cognitive function

Funding: Shanxi Province "Four Batches" Science and Technology for Medical Innovation Program in 2022, No. 2022XM33 (to YJZ); Shanxi Province Basic Research Program, No. 20210302123476 (to GMF); Medical Science and Technology Leading Team Project of Shanxi Provincial Health Care Commission, No. 2020TD05 (to MCG); Open Project of the Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation for Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 2021-KF-215 (to JMD)

How to cite this article: LI MD, LI N, GUO MF, MENG T, YU JW, LI YB, MA CG, YU JZ. Eriodictyol improves cognitive function of 5x-FAD mice by regulating Nogo-A/NgR/ROCK2 signaling pathway. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(32):5097-5102.

0 引言 Introduction

阿尔茨海默病作为一种典型的神经退行性疾病,以记忆、语言、认知功能、行为等障碍甚至丧失生活能力为主要表现,其主要病理特征是 β -淀粉样蛋白(Amyloid- β , A β)过度累积形成的老年斑以及Tau蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结,这些病理过程均会导致神经突触退化以及神经元丢失,并引起明显的脑萎缩^[1-2]。Rho相关卷曲螺旋激酶(Rho-associated kinase, ROCK)在细胞的各种生理活动过程中发挥着重要功能,包括ROCK1和ROCK2两种亚型^[3],其中ROCK2在脑和脊髓中大量表达。目前已经证实,ROCK2激活可以导致A β 的累积和Tau蛋白的过度磷酸化,进而发生神经炎症以及突触损伤,引起阿尔茨海默病的发生^[4]。神经生长抑制因子A(nerve growth inhibitory factor A, Nogo-A)作为一种神经生长抑制因子,能够抑制神经突触的生长并改变神经元的代谢,其过表达能够促进A β 42的生成。Nogo-A与Nogo受体(Nogo receptor, NgR)特异性结合,再与含有Ig结构域的Nogo受体相互作用蛋白1(leucine-rich repeat and Ig domain-containing Nogo receptor-interacting protein, Lingo1)以及神经营养因子受体p75(neurotrophin receptor p75, p75NTR)相互作用,最终激活ROCK2^[5-6]。研究表明,Nogo-A/NgR/ROCK2信号通路

的激活能够促进阿尔茨海默病的发展^[7-8],因此抑制该信号通路的激活为治疗阿尔茨海默病带来更多可能。

圣草酚(Eriodictyol)是一种天然的黄酮类化合物。越来越多的证据表明,黄酮类化合物可以保护神经元,刺激神经元再生,并且能够减缓神经退行性疾病的进展以及改善动物的认知功能和学习能力^[9-10]。课题组前期研究已经证实,圣草酚能够抗氧化应激损伤并且抑制SY5Y细胞凋亡,以及通过促进小胶质细胞的增殖,改善5x-FAD小鼠的认知功能^[11-12]。但是,对Nogo-A/NgR/ROCK2信号通路是否具有调控作用尚未明确。5x-FAD小鼠是目前被广泛应用于阿尔茨海默病研究的动物模型。该实验以5x-FAD小鼠为研究对象,观察圣草酚对5x-FAD小鼠神经元以及认知功能的影响,探讨其作用机制,为临床治疗阿尔茨海默病带来新的契机。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2021年3月至2022年6月在山西大同大学脑科学研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选择8月龄雄性健康SPF级5x-FAD小鼠和

C57BL/6 小鼠各 16 只, 体质量为 23 g 左右。购于北京华阜康生物科技有限公司, 动物许可证号: SCXK(京)2020-0004。所有实验程序均按照国际实验动物科学理事会 6 项指导原则进行, 并经中国山西大同大学伦理委员会批准(批准号 2019020)。将小鼠置于室温为 (25±2) °C, 光照 12 h, 黑暗循环 12 h 的无菌环境中, 提供足够的水和食物。

实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探讨圣草酚对 5xFAD 小鼠的治疗效果及作用机制
借鉴已有标准	参考文献 [12] 构建阿尔茨海默小鼠模型
实施动物造模	
动物来源及品系	SPF 级 5xFAD 小鼠和 C57BL/6 小鼠购买于北京华阜康生物科技有限公司
动物数量及分组方法	选取 8 月龄雄性 C57BL/6 小鼠作为野生组, 野生给药组, 8 月龄雌性 5xFAD 小鼠作为模型组和圣草酚治疗组, 每组 8 只
造模后实验观察指标	小鼠的行为学; 小鼠皮质区 A β 的表达; 小鼠大脑中 Nogo-A/NgR/ROCK2 通路相关蛋白的表达
伦理委员会批准	动物实验由山西大同大学动物伦理委员会批准(审批编号 2019020)

1.3.2 实验试剂与仪器 圣草酚(成都德思特生物技术有限公司, 货号 552-58-9); PEG400(无锡市亚泰联合化工有限公司); 兔抗 A β 1-42(Cell Signaling, 货号 14974T); 兔抗 Nogo-A(CST, 货号 13401S); 兔抗 Nogo 受体 (Abcam, 货号 ab184556); 兔抗 p75NTR(CST, 货号 8238S); 兔抗 Lingo1(Abclonal, 货号 WH245018); 兔抗 p-ROCK2(Abcam, 货号 ab228008); 兔抗 GAPDH(CST, 货号 5174S); 鼠抗 ROCK2(BD, 货号 610624); 兔抗 NeuN(Abcam, 货号 ab177487); 鼠抗 NeuN(Abcam, 货号 ab104224); 山羊抗兔 IgG 二抗 (Abclonal, 货号 AS014); 山羊抗鼠 IgG 二抗 (EARTH, 货号 E03010-01); Alex Flour 488 羊抗鼠 IgG 荧光二抗 (Abcam, 货号 ab150113); Alex Flour 594 羊抗兔 IgG 荧光二抗 (Abcam, 货号 ab150080); Alex Flour 488 羊抗兔 IgG 荧光二抗 (Abcam, 货号 ab150077); Alex Flour 594 羊抗鼠 IgG 荧光二抗 (Abcam, 货号 ab150120); 凝胶成像分析仪(美国 BIO RAD); 多功能高速大容量离心机(德国 eppendorf, 型号 5805); 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific); 激光共聚焦显微镜(日本 Olympus)。

1.4 实验方法

1.4.1 药物配置 将粉末状圣草酚 10 mg 与药物助溶剂(3 mL PEG400+7 mL 生理盐水)混合均匀并超声至淡黄色透明液体, 质量浓度为 1 mg/mL, 4 °C 储存备用。

1.4.2 小鼠模型分组及干预 选取 8 月龄雄性 C57BL/6 小鼠分为野生组、野生给药组, 8 月龄雌性 5xFAD 小鼠分为模型组、圣草酚治疗组, 每组 8 只, 从小鼠 33 周龄开始, 野生给药组和圣草酚治疗组每日腹腔注射圣草酚 10 μ L/g, 野生组和模型组注射相同体积的生理盐水, 连续注射 2 个月。

1.4.3 水迷宫实验 小鼠注射结束后第 2 天开始进行水迷宫实验。水迷宫为一个直径 90 cm 呈圆形的水槽, 水池中装满水, 水温保持在 21 °C 左右, 水池被分成 4 个象限, 在其中 1

个象限水下 1.0–2.0 cm 放置 1 个平台, 平台直径约 5 cm。小鼠将在水池中进行每天 2 次、持续 6 d 的训练, 训练小鼠自主找到平台, 如果在 60 s 内未能找到目标, 小鼠会被引导到平台并停留 10 s。第 7 天正式测试撤去平台, 记录小鼠找到水下平台所花费的时间、穿梭平台所在位置的次数、在平台所在象限停留时间与总时间的百分比。采用自动分析系统记录(西班牙 Panlab, SMART V3.0 系统)。

1.4.4 Y 迷宫实验 水迷宫实验后第 2 天开始 Y 迷宫实验检测。该实验用于测量小鼠的短期记忆能力, 由 3 个完全相同的黑色臂组成, 臂的尺寸为 30 cm×8 cm×15 cm(长×宽×高), 放置在安静昏暗的环境内, 随机将 3 只臂命名为起始臂、新异臂和其他臂, 将新异臂与其他两臂隔开, 小鼠从起始臂放置, 让它自由探索 10 min, 10 min 结束后休息 1 h, 对其进行测试, 测试前用乙醇擦拭迷宫以去除影响实验结果的气味。开放所有臂, 将小鼠放在起始臂中, 让其自由探索 5 min, 记录第 1 次进入新异臂的时间、在新异臂停留的时间与在 Y 迷宫内停留总时间的比值等, 以检测探索能力和空间区分记忆能力。使用自动分析系统记录 (SMART V3.0 系统)。

1.4.5 样本提取 行为实验结束后, 选择每组中的一半小鼠 ($n=4$) 注射 0.5% 戊巴比妥钠麻醉, 用生理盐水进行心脏灌注, 并提取其大脑, 用 RIPA 缓冲液加 1% PMSF 超声裂解大脑, 用超微分光光度计测定提取的蛋白质浓度。将另一半小鼠 ($n=4$) 同样灌注生理盐水后, 继续灌注 40 g/L 多聚甲醛进行固定, 取出大脑浸泡在多聚甲醛中, 4 °C 下放置 12 h, 用蔗糖溶液逐级脱水, 放入 OTC 中然后置于 -80 °C 冷冻, 使用低温恒温切片机将组织切成 10 μ m 厚切片, 保存至 -80 °C 冰箱备用。

1.4.6 Western blot 检测 提取的 40 μ g 蛋白质样品采用 10%–12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后转移到 0.2 μ m 聚偏氟乙烯膜上, 室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 避免非特异性位点的结合, 4 °C 过夜孵化以下抗体: Nogo-A(1 : 1 000), NgR(1 : 1 000), p75NTR(1 : 1 000), Lingo1(1 : 1 000), p-ROCK2(1 : 1 000), ROCK2(1 : 1 000), GAPDH(1 : 1 000), 第 2 天用 1×TBST 洗涤样品 3 次, 室温下与相应的二抗一起孵育 2 h, 再用 TBST 冲洗 3 次, 通过增强化学发光 (ECL) 用凝胶成像分析仪观察记录, 并用 Image Lab 软件进行定量分析。

1.4.7 免疫荧光染色 将冰冻切片组织与 1%BSA 加 0.3% TritonX-100 在室温下孵育 2 h, 1×PBS 洗涤 3 次, 每次 3–5 min, 4 °C 下过夜孵化以下抗体: A β 1-42(1 : 1 600), NgR(1 : 200), p-ROCK2(1 : 200), 每个抗体均与 NeuN(1 : 1 000) 共同孵育, 第 2 天 1×PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 切片与相对应的荧光二抗在常温下暗处放置 2 h, 1×PBS 洗涤 3 次, 然后用 DAPI 封固, 激光共聚焦显微镜进行观察。

1.5 主要观察指标 ①小鼠的认知功能; ②小鼠大脑皮质区 A β 的免疫荧光表达; ③小鼠大脑组织中 Nogo-A/NgR/ROCK2 信号通路相关蛋白的表达, 海马区 NgR、p-ROCK2 免疫荧光的表达。

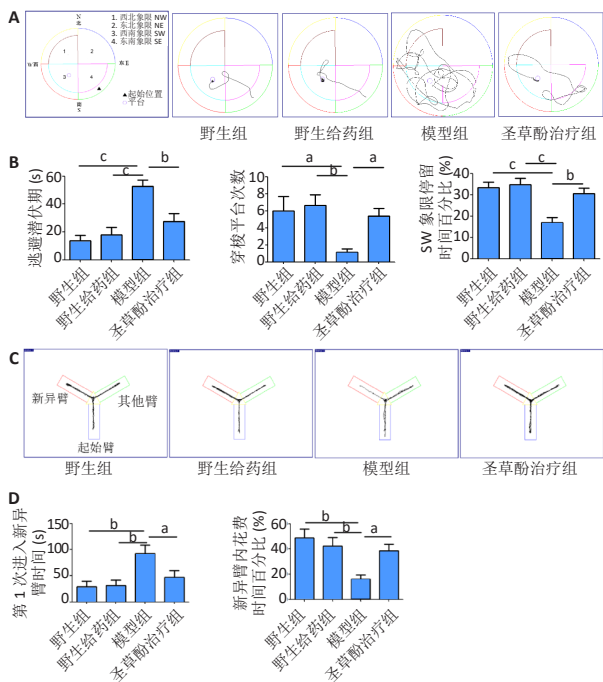
1.6 统计学分析 数据使用 GraphPadPrism 5.0 统计软件进行处理。测量数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过单因素方差分析数据，事后进行 Dunnett t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过山西大同大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验动物数量 32 只，进入结果分析数量 32 只，中途无脱落。

2.2 圣草酚对 5×FAD 小鼠行为学的影响 研究证明，5×FAD 小鼠 3 月龄后空间记忆能力以及认知功能会出现障碍^[13]。水迷宫实验结果显示，与野生组和野生给药组相比，模型组小鼠找到位于 SW 象限平台的时间明显增加，逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.001$)，穿梭平台次数降低 ($P < 0.05$)，在 SW 象限停留时间百分比降低 ($P < 0.001$)，这说明 5×FAD 小鼠的学习能力出现障碍。与模型组相比，圣草酚治疗组找到 SW 区平台的时间显著缩短 ($P < 0.01$)，穿梭平台次数增加 ($P < 0.05$)，在 SW 象限停留时间百分比增加 ($P < 0.01$)，见图 1A, B，这些说明圣草酚可以改善 5×FAD 小鼠的认知功能障碍。

在 Y 迷宫实验测试中，与野生组和野生给药组相比，模型组小鼠第 1 次进入新异臂的时间增长 ($P < 0.01$)，新异臂内花费的时间百分比减少 ($P < 0.01$)；与模型组相比，圣草酚治疗组第 1 次进入新异臂的时间减短 ($P < 0.05$)，新异臂内花费的时间百分比增加 ($P < 0.05$)，见图 1C, D。由此可知，圣草酚改善了 5×FAD 小鼠的探索能力和空间记忆能力。



图注：图 A 为水迷宫测试 4 组小鼠的运动轨迹，B 为各组小鼠逃避潜伏期、穿梭平台次数、在 SW 象限停留时间与总时间的百分比；C 为 Y 迷宫测试 4 组小鼠的运动轨迹；D 为各组小鼠第 1 次进入新异臂的时间和在新异臂内花费时间的百分比。^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.001$

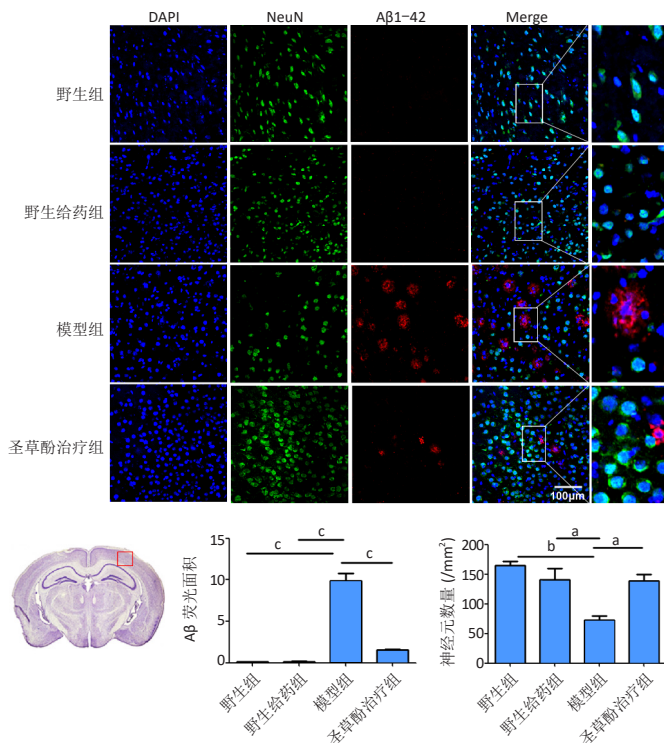
图 1 | 圣草酚治疗后改善 5×FAD 小鼠的认知功能 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 1 | Eriodictyol treatment improves cognitive function in 5×FAD mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.3 圣草酚减少 5×FAD 小鼠大脑皮质中 A β 斑块的沉积 为评估圣草酚对小鼠脑中 A β 生成的影响，对其进行免疫荧光检测，结果显示，与野生组和野生给药组相比，模型组小鼠大脑皮质中的 A β 累积明显增加 ($P < 0.001$)，神经元数量减少 ($P < 0.01$)，与模型组相比，圣草酚治疗后 A β 的表达降低 ($P < 0.001$)，神经元数量增多 ($P < 0.05$)，见图 2。说明圣草酚能够抑制 5×FAD 小鼠脑中 A β 的生成。

2.4 圣草酚抑制 Nogo-A 及其受体 NgR/p75NTR/Lingo1 的表达 免疫荧光结果显示，与野生组和野生给药组相比，模型组小鼠脑中海马 CA2 区域 NgR 的表达增加 ($P < 0.001$)，圣草酚治疗后 NgR 的表达降低 ($P < 0.001$)，见图 3A。Western blot 结果显示，与野生组和野生给药组相比，模型组 Nogo-A ($P < 0.05$) 及其受体 NgR ($P < 0.01$)、p75NTR ($P < 0.05$)、Lingo1 ($P < 0.05$) 表达均增加。与模型组相比，圣草酚治疗组 Nogo-A ($P < 0.05$) 及其受体 NgR ($P < 0.01$)、p75NTR ($P < 0.05$)、Lingo1 ($P < 0.01$) 表达均下降，见图 3B-F。说明圣草酚能够减少神经元突触的损伤，起到神经保护作用。

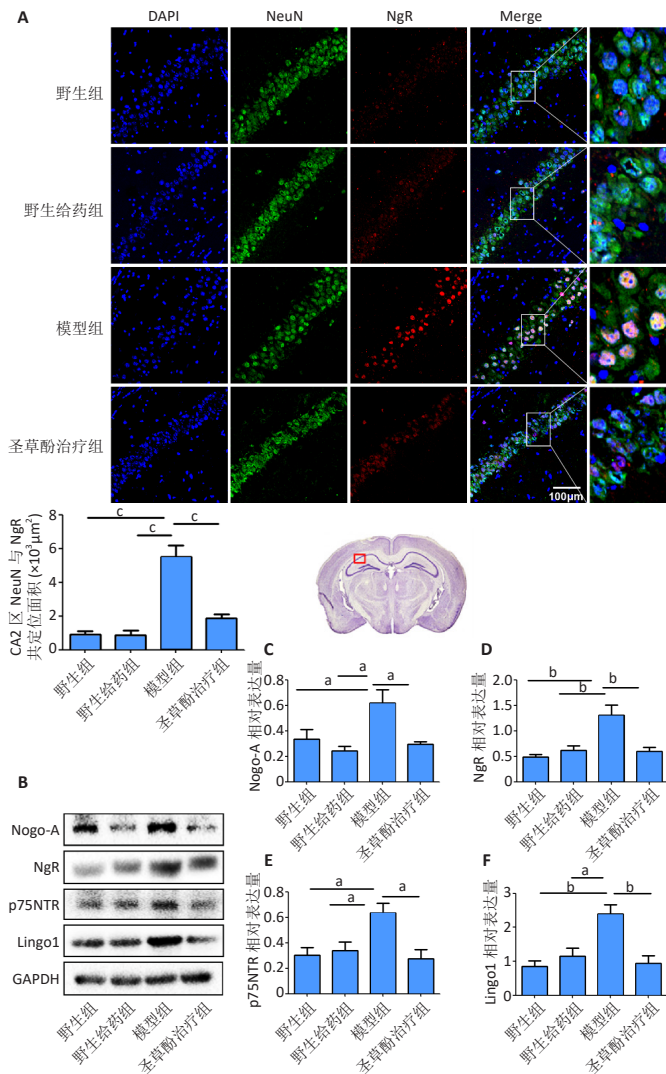
2.5 圣草酚减少 ROCK2 的表达并抑制其激活 免疫荧光结果显示，与野生组和野生给药组相比，模型组小鼠脑中海马 CA2 区域 p-ROCK2 的表达增加 ($P < 0.001$)，圣草酚治疗后 p-ROCK2 的表达降低 ($P < 0.001$)，见图 4A。Western blot 结果显示，与野生组和野生给药组相比，模型组 ROCK2 ($P < 0.05$) 及 p-ROCK2 ($P < 0.01$) 的表达均增加。与模型组相比，圣草酚



图注：免疫荧光染色法检测小鼠大脑皮质 A β (红色) 的表达以及神经元 (绿色) 的数量，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.001$

图 2 | 圣草酚对 5×FAD 小鼠大脑皮质中 β -淀粉样蛋白 (A β) 斑块沉积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 | Effect of eriodictyol on β -amyloid plaque deposition in the cerebral cortex of 5×FAD mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



图注：图 A 为免疫荧光染色法检测小鼠大脑海马 CA2 区 NgR (红色) 在神经元 (绿色) 中的表达；B-F 为蛋白免疫印迹检测小鼠大脑组织中神经生长抑制因子相关蛋白 Nogo-A, NgR, p75NTR, Lingo1 的表达量。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

图 3 | 圣草酚抑制 Nogo-A 及其受体 NgR/p75NTR/Lingo1 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

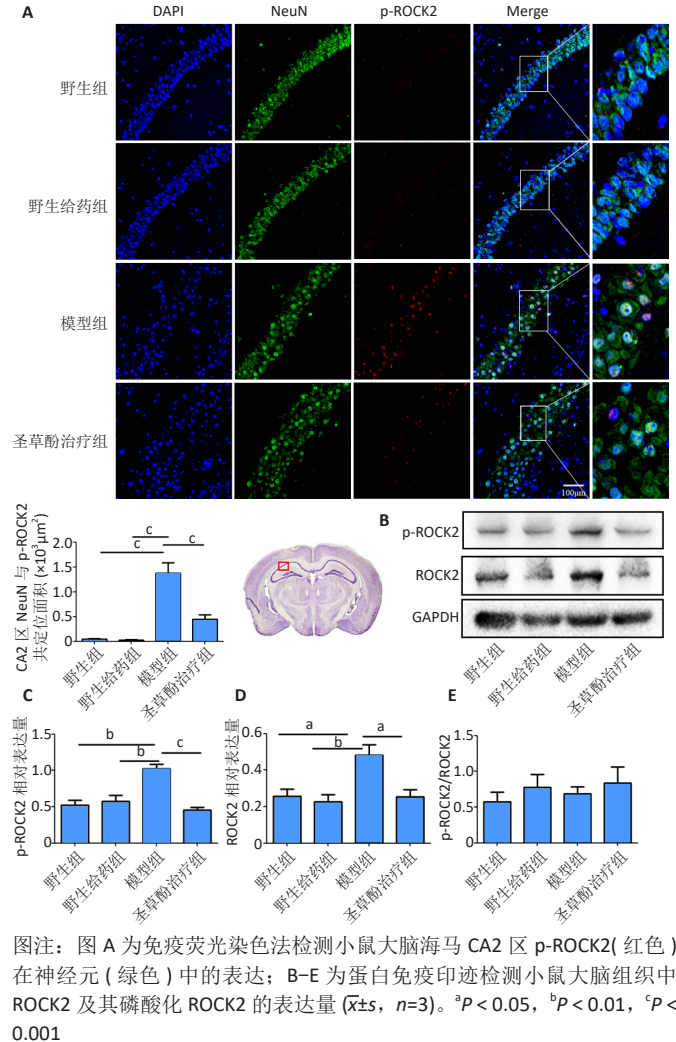
Figure 3 | Eriodictyol inhibits the expression of Nogo-A and its receptors NgR/p75NTR/Lingo1 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

治疗后 ROCK2 ($P < 0.05$) 及 p-ROCK2 ($P < 0.001$) 的表达降低, 见图 4B-E。说明圣草酚能够抑制 ROCK2 的活性及其磷酸化, 从而促进神经元的再生。

3 讨论 Discussion

阿尔茨海默病作为痴呆中最常见的类型, 关于其临床特征、发病机制以及治疗方面都存在着广泛的争议。目前对于阿尔茨海默病的治疗只有 5 种药物得到了承认, 并且这些药物只能用于改善症状而不能改变阿尔茨海默病的进展^[14-15], 寻找合适的药物已经成为了急需解决的问题, 其主要的发病机制 A β 及神经纤维缠结均与神经元损伤和突触丧失密切相关, 而突触功能障碍和可塑性受损也是阿尔茨海默病发病过程中的关键病理表现^[16]。

Nogo-A 是一种神经生长抑制因子, 能够抑制中枢神经



图注：图 A 为免疫荧光染色法检测小鼠大脑海马 CA2 区 p-ROCK2 (红色) 在神经元 (绿色) 中的表达；B-E 为蛋白免疫印迹检测小鼠大脑组织中 ROCK2 及其磷酸化 ROCK2 的表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

图 4 | 圣草酚减少 ROCK2 的表达并抑制其激活

Figure 4 | Eriodictyol reduces the expression of ROCK2 and inhibits its activation

系统损伤后轴突的再生, 主要表达在生成髓鞘的少突胶质细胞以及海马和皮质的神经元中^[5]。Nogo-A 由 1 192 个氨基酸构成, 其中 2 个结构域已经被证明能够诱导生长锥塌陷并且抑制神经突的生长, 包括 Nogo-66 环 (1 055-1 120 个氨基酸残基) 和 Nogo-A-D20 (544-725 个氨基酸残基)^[17-18]。实验结果表明, 圣草酚能够抑制 5x FAD 小鼠脑中 Nogo-A 的表达。Nogo-66 能够与位于神经细胞膜上的 Nogo-66 受体 (NgR) 相结合^[19], NgR 作为一种糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白, 只表达于细胞膜外, 不包含跨膜结构域, 因此位于神经元和神经胶质细胞胞质内的 p75NTR 与膜外的 NgR 发挥协同作用, 共同与 Nogo-66 结合形成受体复合物^[20-21]。Lingo1 是一种 1 型跨膜蛋白, 和 NgR 具有相似的富含亮氨酸的重复结构域, 能够与 p75NTR 同为 NgR 的辅助受体^[22-24], 共同活化下游的小分子 GTP 结合蛋白 Rho, 最终激活位于下游的 ROCK 蛋白, 其包括 1 个 N-末端激酶结构域、1 个含有 Rho 结合位点的 α -螺旋卷曲结构域和 1 个位于 C-末端的富含半胱氨酸的结构域, Rho 被激活后与 ROCK 上的相应位点结合, 消除了 ROCK 自身的抑制作用, 被激活后可能会破坏树突棘的结构和功能, 并影响神经突的形态、延伸和生长, 从而导致轴突生长抑制、

突触损伤和突触丢失^[25-27]。目前已经有研究表明, ROCK2上调能够引起认知功能障碍^[28], 并且敲除 Nogo-A 可改善 APP 转基因小鼠疾病早期/中期阶段的学习和记忆缺陷^[29]。实验室前期结果显示, APP/PS1 小鼠的 Nogo-A/NgR/ROCK2 信号通路被激活, 法舒地尔作为一种经典的 ROCK 抑制剂, 能够抑制该信号通路的激活, 改善阿尔茨海默病小鼠的认知功能, 保护神经元的突起^[30]。而圣草酚作为黄酮类化合物, 对神经元具有保护作用, 其是否能够抑制 Nogo-A/NgR/ROCK2 信号通路的激活尚不清楚。实验结果表明, 5×FAD 小鼠中 Aβ1-42、Nogo-A 及其受体 NgR、p75NTR、Lingo1 表达均增加, 其下游 ROCK2 及 p-ROCK2 表达增加, 说明 Nogo-A 及其相关受体的表达增加, 会导致 Nogo-A 与其相关受体结合形成的复合物增加, 活化下游的 Rho 分子, 从而激活 ROCK, 引起 ROCK2 及磷酸化的 ROCK2 表达增加, 促进 Aβ 的生成。圣草酚治疗后改善了这一状况, 降低了 Nogo-A 及其相关受体的表达, 减少了 Aβ 的生成以及减少了神经元的凋亡。这表明圣草酚可能是通过抑制 Nogo-A 与其受体的结合, 减少 ROCK2 的表达及其磷酸化, 从而改善神经元损伤。

综上所述, 圣草酚能够改善 5×FAD 小鼠的认知功能障碍, 减少神经元的损伤及 Aβ 的生成, 这可能是通过抑制 Nogo-A/NgR/ROCK2 信号通路实现的。圣草酚对 5×FAD 小鼠认知功能的改善是显而易见的, 然而其作用机制尚未明确, 该实验为下一步研究圣草酚对 5×FAD 小鼠治疗的具体机制提供了新的思路, 为今后阿尔茨海默病的治疗提供一个新的方向。

致谢: 感谢山西大同大学脑科学研究所提供的实验平台。

作者贡献: 李梦迪负责动物给药、免疫蛋白印迹实验、实验数据分析处理、论文撰写(第一作者); 李娜负责动物处理、免疫荧光染色(共同第一作者)。郭敏芳负责数据和文章的校对; 孟涛负责实验评估; 于婧文负责采集标本; 李雁冰负责动物饲养。马存根和尉杰忠负责实验设计及论文的定稿(通讯作者)。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- LANE CA, HARDY J, SCHOTT JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018; 25(1):59-70.
- BREIJEH Z, KARAMAN R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020;25(24):5789.
- JULIAN L, OLSON MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases*. 2014;5:e29846.
- CAI R, WANG Y, HUANG Z, et al. Role of RhoA/ROCK signaling in Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2021;414:113481.
- KEMPF A, SCHWAB ME. Nogo-A represses anatomical and synaptic plasticity in the central nervous system. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(3):151-163.

- 刘颖, 刘敬. Rho-ROCK 信号通路研究进展 [J]. 中国儿童保健杂志, 2012, 20(9):822-825.
- MUELLER BK, MACK H, TEUSCH N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(5):387-398.
- KOCH JC, TATENHORST L, ROSER AE, et al. ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. *Pharmacol Ther*. 2018;189:1-21.
- HE P, YAN S, ZHENG J, et al. Eriodictyol Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Amyloidogenesis, and Cognitive Impairments via the Inhibition of NF-κB in Male C57BL/6J Mice and BV2 Microglial Cells. *J Agric Food Chem*. 2018;66(39):10205-10214.
- JING X, SHI H, ZHU X, et al. Eriodictyol Attenuates β-Amyloid 25-35 Peptide-Induced Oxidative Cell Death in Primary Cultured Neurons by Activation of Nrf2. *Neurochem Res*. 2015;40(7):1463-1471.
- 李苏垚, 郭敏芳, 于婧文, 等. 圣草酚对过氧化氢所致 SH-SY5Y 细胞线粒体动力学失衡及凋亡的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(31): 4975-4981.
- 张婧. 圣草酚通过促进小胶质细胞增殖改善阿尔茨海默病认知功能 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
- WEBSTER SJ, BACHSTETTER AD, NELSON PT, et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*. 2014;5:88.
- FERRARI C, SORBI S. The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle. *Physiol Rev*. 2021;101(3):1047-1081.
- BRIGGS R, KENNELLY SP, O'NEILL D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond)*. 2016;16(3):247-253.
- SPIRES-JONES TL, HYMAN BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2014;82(4):756-771.
- XU YQ, SUN ZQ, WANG YT, et al. Function of Nogo-A/Nogo-A receptor in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(6):479-485.
- OERTLE T, VAN DER HAAR ME, BANDTLOW CE, et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci*. 2003; 23(13):5393-5406.
- XIAO F, LIN LF, CHENG X, et al. Nogo-66 receptor activation inhibits neurite outgrowth and increases β-amyloid protein secretion of cortical neurons. *Mol Med Rep*. 2012;5(3):619-624.
- VENKATESH K, CHIVATAKARN O, LEE H, et al. The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci*. 2005;25(4):808-822.
- ZHOU XF, LI HY. Roles of glial p75NTR in axonal regeneration. *J Neurosci Res*. 2007;85(8):1601-1605.
- ANDREWS JL, FERNANDEZ-ENRIGHT F. A decade from discovery to therapy: Lingo-1, the dark horse in neurological and psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;56:97-114.
- THEOTOKIS P, GRIGORIADIS N. p75NTR and TROY: Uncharted Roles of Nogo Receptor Complex in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mol Neurobiol*. 2018;55(8):6329-6336.
- SAHA N, KOLEV M, NIKOLOV DB. Structural features of the Nogo receptor signaling complexes at the neuron/myelin interface. *Neurosci Res*. 2014; 87:1-7.
- SCHMANDKE A, SCHMANDKE A, STRITTMATTER SM. ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist*. 2007;13(5):454-469.
- TAN HB, ZHONG YS, CHENG Y, et al. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage. *Int J Ophthalmol*. 2011;4(6):652-657.
- LIU J, GAO HY, WANG XF. The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system. *Neural Regen Res*. 2015;10(11):1892-1896.
- LU W, WEN J, CHEN Z. Distinct Roles of ROCK1 and ROCK2 on the Cerebral Ischemia Injury and Subsequently Neurodegenerative Changes. *Pharmacology*. 2020;105(1-2):3-8.
- MASLIAH E, XIE F, DAYAN S, et al. Genetic deletion of Nogo/Rtn4 ameliorates behavioral and neuropathological outcomes in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience*. 2010;169(1):488-494.
- GUO MF, ZHANG HY, ZHANG PJ, et al. Fasudil reduces β-amyloid levels and neuronal apoptosis in APP/PS1 transgenic mice via inhibition of the Nogo-A/NgR/RhoA signaling axis. *J Integr Neurosci*. 2020;19(4):651-662.

(责任编辑: MZH, ZN, ZJP)