

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003016

脑红蛋白改善 AD 双转基因 (APP^{swe}/PS1dE9) 小鼠
认知功能及其机制研究田茗源¹, 张 雄², 邓 煜³(1. 重庆医科大学附属第二医院内分泌科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学基础医学院神经科学研究中心, 重庆 400016;
3. 重庆市精神卫生中心老年科, 重庆 400030)

【摘要】目的:观察过表达脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)双转基因(APP^{swe}/PS1dE9)小鼠认知功能的影响,并探讨其机制。**方法:**成功构建过表达 Ngb 质粒 pNgb 和对应的空质粒 pCDNA3.1,对 AD 双转基因小鼠进行侧脑室注射,使其过表达 Ngb。采用 Morris 水迷宫评价过表达 Ngb 对 AD 小鼠学习记忆能力和空间探索能力的影响;采用免疫组织化学法检测其对 β 淀粉样蛋白-42(amyloid β -protein 42, A β_{42})生成的影响;半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性检测试剂盒检测酶活性变化;Western blot 检测海马组织中磷酸化蛋白激酶 B p-Akt(ser473)、总 Akt、Caspase-3 和 Caspase-9 表达。**结果:**过表达 Ngb 提高了 AD 转基因小鼠的学习记忆和空间探索能力($P<0.05$);明显降低了转基因小鼠海马组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性及 A β_{42} 生成($P<0.05$);Western blot 显示过表达 Ngb 能抑制脑组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达($P<0.05$),而且还能促进 p-Akt(ser473)表达($P<0.05$);应用磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)抑制剂 LY294002 后, Caspase-3 和 Caspase-9 活性明显提高($P<0.05$)。**结论:**过表达 Ngb 对 AD 双转基因(APP^{swe}/PS1dE9)小鼠有明显的神经保护作用,其机制与 Ngb 减少 A β_{42} 生成及激活 PI3K/Akt 信号通路进而抑制 Caspase 依赖的细胞凋亡途径有关。

【关键词】阿尔茨海默病;脑红蛋白;PI3K/Akt 信号通路;半胱氨酸蛋白酶**【中图分类号】**R363**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-08-10Neuroglobin improves cognitive function of AD double transgenic
(APP^{swe}/PS1dE9) mice and its mechanismsTian Mingyuan¹, Zhang Xiong², Deng Yu³

(1. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Neuroscience Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University;

3. Department of Geriatrics, Chongqing Mental Health Center)

【Abstract】Objective: To observe the neuroprotective effect of overexpression of neuroglobin (Ngb) on the cognitive function of Alzheimer's disease (AD) double transgenic (APP^{swe}/PS1dE9) mice, and to explore its mechanisms. **Methods:** The Ngb plasmid pNgb and empty vector pCDNA3.1 were successfully constructed and injected into the lateral ventricle of AD double transgenic (APP^{swe}/PS1dE9) mice, which both led to overexpression of Ngb. Morris water maze was used to evaluate the effect of overexpression of Ngb on learning and memory ability and spatial exploration ability of AD mice; immunohistochemistry was used to detect the production of amyloid β -protein 42 (A β_{42}) in the brains; Caspase-3 and Caspase-9 activity detection kits were applied to detect

作者介绍: 田茗源, Email: mingyuant@163.com,

研究方向: 神经退行性疾病、糖尿病脑病。

通信作者: 邓 煜, Email: 18623358965@163.com。**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(编号: 81801389); 重庆市自然科学基金资助项目(编号: Cstc2019jcyj-msxmX0673); 重庆医科大学附属第二医院宽仁英才资助项目(编号: kryc-yq-2214)。**优先出版:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220424.1551.007.html>
(2022-04-25)

Caspase-3/9 enzyme activity. Finally, the expression of p-Akt (ser473), total Akt and Caspase-3/9 in the brain tissues were detected by Western blot. **Results:** Overexpression of Ngb significantly improved the learning and memory and spatial exploration ability of the AD mice ($P<0.05$), and reduced the activities of Caspase-3 and Caspase-9 and the generation of A β_{42} in the hippocampus ($P<0.05$). Finally, Western blot results showed that overexpression of Ngb could inhibit the expression of Caspase-

3 and Caspase-9 in the hippocampus of the AD mice ($P < 0.05$), and also promote the phosphorylation of p-Akt (ser473) ($P < 0.05$). While, after the treatment of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) inhibitor LY294002, the activities of Caspase-3 and Caspase-9 were evidently increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Overexpression of Ngf has a significant neuroprotective effect on the AD double transgenic (APPswe/PS1dE9) mice, and the mechanisms may be related to the reduction of generation of $A\beta_{42}$, and the activation of PI3K/Akt signaling pathway, and then the inhibition of Caspase-dependent apoptosis pathway by Ngf.

[Key words] Alzheimer's disease; neuroglobin; PI3K/Akt signaling pathway; Caspase

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人最常见的神经退行性变性疾病。其临床表现为认知功能和学习能力逐渐下降, 而老年斑 (senile plaques, SPs)、神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 的形成和神经元丢失则是 AD 的 3 个主要病理特征, 神经元凋亡是神经元丢失的主要表现^[1]。

半胱氨酸蛋白酶 Caspases 家族是一类特异的凋亡信号转导分子。它的激活被认为是细胞凋亡机制中关键的因素之一。研究发现, 作为凋亡启动子的 Caspase-9 及凋亡执行子的 Caspase-3 在 AD 中发挥重要作用。它们不仅介导 AD 皮质和海马神经元的凋亡过程^[2], 还与 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β)^[3]、淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)^[4]、早老素 (presenilin 1, PS1)^[5] 和 NFTs^[6] 等密切相关。因此, 抑制半胱氨酸蛋白酶活性可能是 AD 防治的关键^[7]。

Burmester T 等^[8]研究发现, 脑红蛋白 (neuroglobin, Ngf) 作为一种新型携氧蛋白广泛分布于人体内, 主要分布在大脑皮层、海马、丘脑、下丘脑和小脑等具有内分泌功能的器官。越来越多的研究表明 Ngf 对 AD 有神经保护作用, 但其分子机制仍未阐明。因此, 本文以 AD 双转基因 (APPswe/PS1dE9) 小鼠为研究对象, 通过侧脑室注射使其过表达 Ngf, 观察 Ngf 的神经保护作用, 并探讨其机制是否与抑制 Caspase 依赖的细胞凋亡途径有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物

B6C3-Tg (APPswe/PSEN1dE9)85Dbo/J 品系转基因小鼠 (Tg2576) 购自南京大学动物模式研究所, 动物许可证号: SCXK (苏) 2010-0111。基因鉴定后, 选取 24 只雄鼠, 体重 25~30 g, 于实验中心 SPF 级饲养。室内温度维持在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$,

阳光、水和食物充足。10 月龄后, 随机分为 3 组: 痴呆模型组、空质粒组和转染 pNgf 组。

1.2 主要试剂

重组质粒 pNgf 及空质粒 pCDNA3.1 均由上海吉凯基因化学技术有限公司设计并合成; 质粒抽提试剂盒、总蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、PMSF、RIPA 蛋白裂解液和 ECL 发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 免疫组化试剂盒购自北京康为世纪有限公司; Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性检测试剂盒购自北京博赛森生物技术有限公司; 抗体 anti-Caspase-3、anti-Caspase-9、anti-pAkt (Ser473) 和 anti-Akt 购自北京博赛森生物技术有限公司; PI3K 抑制剂 LY294002 购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 侧脑室注射及 LY294002 处理 小鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛 0.10~0.15 mL (3.5 mL/kg) 进行麻醉, 然后将头部置于立体定向仪 (成都泰盟) 上。用聚乙烯套管植入侧脑室 (后 0.2 mm, 侧 1.3 mm, 腹 2.5 mm), 并固定在颅骨上。用微量注射器注入生理盐水约 5 μL 或生理盐水+空质粒 pCDNA3.1 (1 mg/mL), 或 pNgf (1 mg/mL), 每周 1 次, 连续 8 周^[9]。将 5 mg LY294002 溶于 10 mL 二甲基亚砜中, 形成终浓度为 0.5 mg/mL 的母液, 经尾静脉注射入 AD 小鼠体内, 注射浓度为 50 mg/kg, 每周 1 次, 连续 8 周^[10]。

1.3.2 Morris 水迷宫 定位航行实验: 实验第 1 天, 使水面略低于平台约 1 cm, 固定平台于第 2 象限, 平台上插一面小红旗。任意选择 1 个象限放入小鼠并开始计时, 若小鼠在 1 min 内找到并爬上平台, 这一时间段称作逃避潜伏期, 并记录下时间; 若小鼠在 1 min 后仍未找到平台, 则将小鼠放置在平台并停留 10 s。每只小鼠训练 5 次, 分别从不同的象限放入水中, 每一轮训练至少间隔 1 h。在实验第 2~5 天, 让水面略高于平台约 1 cm, 放入小鼠, 每只小鼠每天训练 5 次, 记录逃避潜伏期。空间探索实验: 在实验第 6 天, 把平台撤掉, 任意选择 1 个象限 (第 4 象限) 放入小鼠, 使之在池内游泳 1 min, 记录小鼠游泳轨迹, 观察其穿过原平台位置的次数、时间和游泳距离。

1.3.3 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性检测 采用 Caspase-3、Caspase-9 酶活性检测试剂盒测定各组细胞中及脑组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性。根据 Caspase-3 酶活性变化

释放的 pNA 与 Caspase-3 的活性呈正比,将 pNA 释放的吸光度值作为 Caspase-3 酶的活性值。试验重复 3 次。

1.3.4 免疫组化 将小鼠麻醉灌注后迅速去除颅骨,获得脑组织,经固定、脱水、透明和包埋后制备 4~5 μm 切片。按照免疫组化试剂盒上说明进行操作,主要包括以下几个步骤:脱蜡、抗原修复、内源性过氧化物酶处理、血清封闭、抗体 $\text{A}\beta_{42}$ 孵育 4℃ 过夜、生物素标记二抗工作液孵育、辣根过氧化物酶标记工作液孵育、DAB 显色、苏木素复染和树胶封片。

1.3.5 Western blot 收集各组海马脑组织,加入 1 mL RIPA 蛋白裂解液,充分裂解后于 4℃,13 000 r/min 离心 15 min 后,用 Bradford 法测定每组蛋白样品浓度并分装保存。配置 8%~10% 的 Page 胶,上样 50 μg 经 SDS-PAGE 电泳,将蛋白电转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,然后置入 TBST 稀释的抗体,4℃ 孵育过夜;充分洗涤后加入 1:5 000 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,最后用 ECL 发光试剂盒行曝光显影,经 Bio-rad Chemical Dox XRS 凝胶成像系统进行条带的分析。

1.4 统计学处理

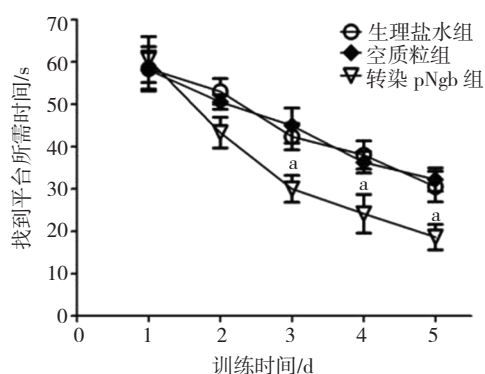
使用 SPSS 20.0 进行统计学分析。所有数据都以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用多因素方差分析,组间

两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

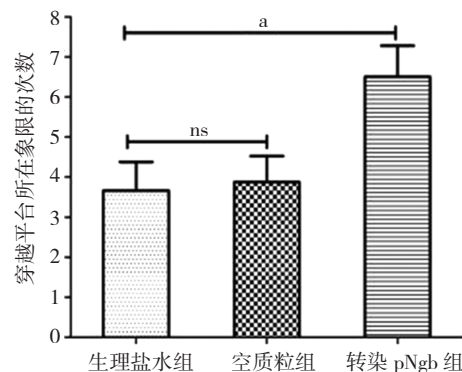
2.1 过表达 Ngb 改善了 AD 双转基因小鼠的学习记忆和空间探索能力

侧脑室注射 pNgb 后 8 周,用 Morris 水迷宫测试小鼠的学习记忆和空间探索能力。如图 1A 所示,各组小鼠经过连续 5 d 的训练,其逃逸潜伏期均呈逐日下降趋势 ($F=10.990, P<0.001$)。另外,不同组间的逃逸潜伏期存在统计学差异 ($F=30.570, P<0.001$)。进一步组间两两比较发现,过表达 Ngb 的 AD 双转基因小鼠逃逸潜伏期明显短于注射生理盐水组和空质粒组 ($P<0.001, P<0.001$) (图 1A, 表 1),生理盐水组和空质粒组没有统计学差异 ($P=0.527$);没有发现训练天数和组别的交互作用对逃逸潜伏期有影响 ($F=0.980, P=0.457$)。此外,在第 6 天,与注射盐水或空质粒组比较,过表达 Ngb 的 AD 双转基因小鼠在移除平台后,穿越平台位置的次数更多 ($F=28.778, P=0.000$) (图 1B),在目标象限内行走的距离更长 ($F=56.027, P=0.000$) (图 1C),且在目标象限内花费的时间更多 ($F=29.542, P=0.000$) (图 1D),差异有统计学意义。



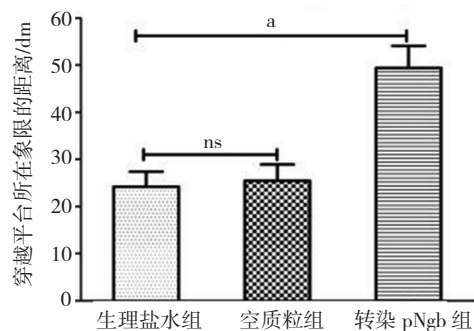
注:a,与生理盐水组或空质粒组相比, $P<0.01$

A. 连续 5 d 训练后各组小鼠的逃逸潜伏期



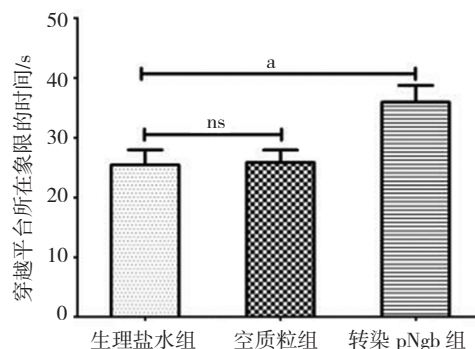
注:a,与生理盐水组或空质粒组相比, $P<0.01$;ns 表示无统计学差异

B. 各组小鼠在平台所在象限内穿越的次数



注:a,与生理盐水组或空质粒组相比, $P<0.01$;ns 表示无统计学差异

C. 各组小鼠在平台所在象限内穿越的距离



注:a,与生理盐水组或空质粒组相比, $P<0.01$;ns 表示无统计学差异

D. 各组小鼠在平台所在象限穿越的时间

图 1 过表达 Ngb 改善了 AD 双转基因小鼠的学习记忆能力和空间探索能力 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表 1 连续 5 d 训练后各组小鼠逃逸潜伏期的统计学分析
($\bar{x} \pm s, h$)

训练时间/d	生理盐水组	空质粒组	转染 pNgb 组
1	57.58 ± 4.01	55.23 ± 8.18	55.58 ± 6.56
2	52.40 ± 7.47	50.50 ± 3.96	47.07 ± 5.87
3	45.42 ± 6.89	45.31 ± 4.63	38.98 ± 5.86
4	43.53 ± 7.35	43.10 ± 7.95	31.57 ± 8.96
5	37.95 ± 5.36	37.57 ± 7.48	26.63 ± 7.10

注: $F_{\text{训练时间}}=30.570, P_{\text{训练时间}}<0.001; F_{\text{分组}}=10.99, P_{\text{分组}}<0.001; F_{\text{训练时间} \times \text{分组}}=0.980, P_{\text{训练时间} \times \text{分组}}=0.457; P_{\text{转染组 vs. 生理盐水组}}<0.001, P_{\text{转染组 vs. 空质粒组}}<0.001, P_{\text{生理盐水组 vs. 空质粒组}}=0.527$

2.2 过表达 Ngb 抑制 AD 双转基因小鼠海马组织中 $A\beta_{42}$ 的生成

免疫组织化学染色结构显示,侧脑室注射生理盐水或空质粒的 AD 双转基因小鼠的海马组织内显示大、圆且致密的 $A\beta_{42}$ 斑块(图 2A、B)。而侧脑室注射 pNgb 后,小鼠海马组织内 $A\beta_{42}$ 斑块体积明显较小,数量也减少(图 2C)。经统计分析显示,在生理盐水组和空质粒组小鼠的海马组织内, $A\beta_{42}$ 阳性面积分别为 $(5.53 \pm 1.43)\%$ 和 $(5.41 \pm 1.22)\%$,明显高于过表达 Ngb 小鼠海马组织内 $A\beta_{42}$ 的阳性面积,即 $(2.78 \pm 0.54)\%$ (图 2D),差异有统计学意义($F=30.680, P=0.000$)。

2.3 过表达 Ngb 抑制 AD 双转基因小鼠海马组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性

生理盐水组和空质粒组中 Caspase-3 的酶活性分别为 2.75 ± 0.73 和 2.65 ± 0.47 ,Caspase-9 的酶活性分别为 $2.59 \pm$

0.56 和 2.52 ± 0.28 ,两两比较无统计学差异($P_1=0.351, P_2=0.266$)。侧脑室注射 pNgb 后,AD 小鼠脑组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性分别为 1.34 ± 0.38 和 1.28 ± 0.42 ,与生理盐水组和空质粒组比较,差异有统计学意义($P_1=0.000; P_2=0.000$)。具体见表 2。

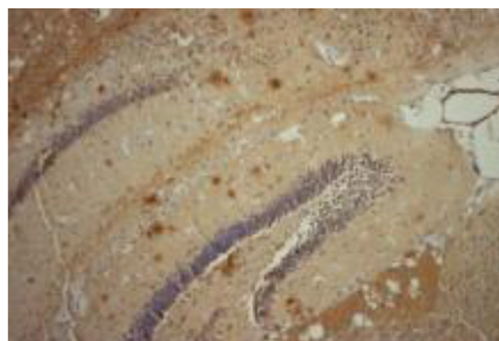
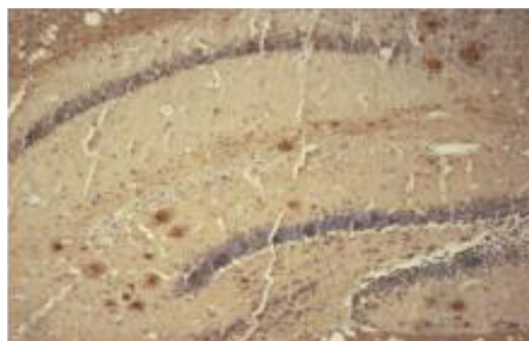
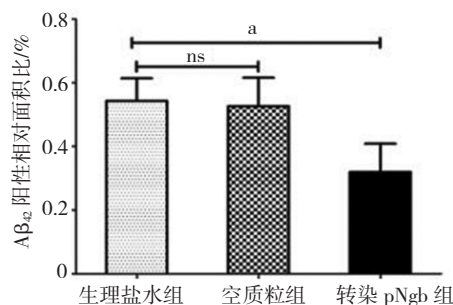
表 2 过表达 Ngb 对 AD 双转基因小鼠海马组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3	Caspase-9
生理盐水组	2.75 ± 0.73	2.59 ± 0.56
空质粒组	2.65 ± 0.47	2.52 ± 0.28
转染 pNgb 组	1.34 ± 0.38^a	1.28 ± 0.42^a
F 值	406.041	353.112
P 值	0.000	0.000

注:a,与生理盐水组或空质粒组相比, $P<0.01$

2.4 过表达 Ngb 通过激活 PI3K/Akt 通路抑制 AD 双转基因小鼠海马中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达

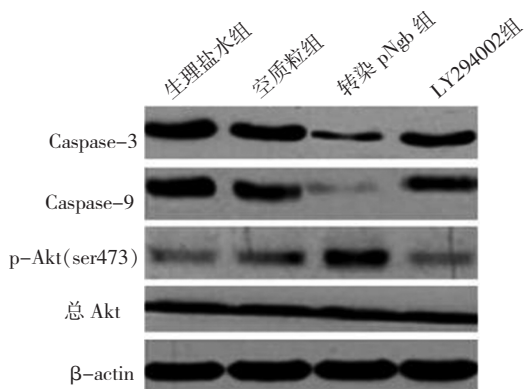
在 AD 双转基因小鼠海马组织中,与生理盐水组和空质粒组比较,侧脑室注射 pNgb 后,海马组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达明显降低($P_1=0.002, P_2=0.001$);而 p-Akt (ser473)表达明显增强($P=0.009$);总 Akt 无任何明显变化($P=0.535$)。经 PI3K 抑制剂 LY294002 处理后,AD 小鼠海马组织中 p-Akt(ser473)表达明显降低($P=0.002$),Caspase-3 和 Caspase-9 表达反弹性增强,差异有统计学意义($P_1=0.007, P_2=0.004$)。见图 3。

A. 生理盐水组小鼠海马组织内 $A\beta_{42}$ 的表达B. 空质粒组小鼠海马组织内 $A\beta_{42}$ 的表达C. 转染 pNgb 组小鼠海马组织内 $A\beta_{42}$ 的表达

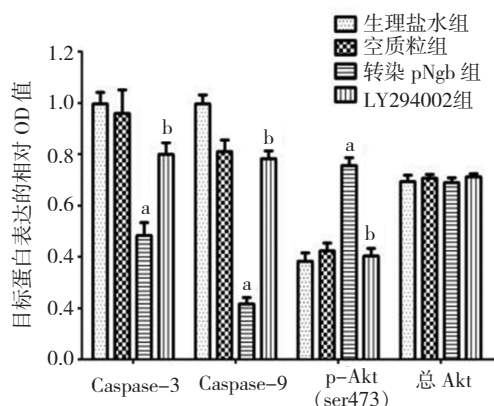
注:a,与生理盐水组或空质粒组相比, $P<0.01$;ns 表示无统计学差异

D. 海马组织内 $A\beta_{42}$ 的阳性表达相对面积比($\bar{x} \pm s, n=8$)

图 2 过表达 Ngb 对转基因 AD 小鼠海马组织中 $A\beta_{42}$ 生成的影响



A. Ngf 对各组 AD 小鼠海马组织中 Caspase-3 和 Caspase-9、pAkt 和 Akt 蛋白表达的影响



注: a, 与生理盐水组或空质粒组相比, $P < 0.01$; b: 与转染 pNgf 组相比, $P < 0.01$

B. 各目的蛋白表达的相对 OD 值分析 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

图 3 过表达 Ngf 通过激活 PI3K/Akt 通路抑制 AD 双转基因小鼠海马组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白的表达

3 讨论

A β 在大脑内生成增多和沉积不仅导致老年斑的形成,还诱导神经元的凋亡或死亡,这被公认为 AD 关键的发病机制之一^[11]。A β 的神经毒性体现在多方面,其中有证据表明 A β 诱导的细胞凋亡可能是引起认知功能障碍的主要原因。因此,抑制或减少 A β 的产生可能延缓 AD 神经元凋亡。

Ngf 是一类新型携氧球蛋白,广泛分布于大脑的不同区域,在神经元、某些内分泌细胞和视网膜杆细胞中表达量特别高。研究表明,Ngf 在人体内的表达水平会随年龄增长而降低,Ngf 的缺乏与年龄相关的神经退行性变性疾病存在紧密联系^[12];Sun F

等^[13]通过 Western blot 和免疫组化染色检测了 AD 患者的海马脑组织,发现在早期和中晚期 AD 中,海马 Ngf 增加,而重度 AD 时 Ngf 的表达恢复到对照水平,这一现象提示 Ngf 的表达随 AD 严重程度呈动态变化。因此,本实验选取 13 月龄的 AD 双转基因小鼠为研究对象,旨在检测过表达 Ngf 对 AD 小鼠中 A β 生成及认知功能的影响,并探讨 Ngf 对 AD 体内模型发挥保护作用的机制。研究表明,过表达 Ngf 不仅改善了 AD 小鼠的学习记忆和空间认知功能,也能明显减少脑内 A β_{42} 的产生,这说明 Ngf 确实发挥了神经保护作用。

自 2000 年发现 Ngf 以来,人们提出 Ngf 的一些潜在作用机制。起初,研究认为 Ngf 是一种新的携氧血红蛋白,与肌球蛋白、血红蛋白等相似,具有储备氧的功能。然而,进一步研究表明 Ngf 经历了快速的自氧化,并且与氧的结合率相对较低^[14]。接着,又提出 Ngf 是一种 NO 清除剂^[15]。最近,Ngf 又被证明能抑制 Rac1 介导的肌动蛋白组装和膜微区聚集,这些微区参与死亡信号转导途径的调节^[16]。事实上,大量研究都表明 Ngf 在缺氧缺血性脑疾病^[17]和神经再生性疾病^[18]中具有抗凋亡作用,本研究团队的体内外实验结果也支持这一观点。

Caspases 激活被认为是细胞凋亡机制中最关键的因素之一。Caspase 家族成员中最为重要的 2 个成员是 Caspase-3 和 Caspase-9,前者是凋亡的执行者,后者是凋亡的启动子。当细胞受到外界不良因子刺激时,细胞内的细胞色素 C 被释放到细胞质中,与凋亡蛋白酶激活因子-1 及 dATP 形成凋亡小体,然后吸附 Caspase-9 前体蛋白,进而激活 Caspase-9;活化的 Caspase-9 作用于下游的众多效应蛋白 (Caspase-2、Caspase-3、Caspase-6 等),这些效应蛋白则切割 DNA,使 DNA 修复等过程失效,促使染色质凝聚,最终导致细胞凋亡。因此,Caspase-3 和 Caspase-9 的活性高低直接反映了凋亡程度,抑制其活性,可以抑制凋亡,对细胞起保护作用。

研究表明,Caspase 活化在 AD 发生发展中起重要作用。Caspase 激活与 Caspase 介导的 APP 分解和神经元突触的丢失密不可分^[4];在 5xFAD 模型中,Caspase-6 基因敲除后对痴呆小鼠的学习记忆能力及神经功能等有良好的影响^[19];给予 Caspase-1 抑制剂可延缓 AD 进程和衰老小鼠模型的认知能力下降^[20]。

因此,抑制 Caspase 活性对 AD 的发生发展有抑制作用。本研究结果表明,过表达 Ngb 不仅抑制转基因 AD 小鼠脑内 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性,也抑制其蛋白表达。因此,Ngb 通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 活性减轻 A β 诱导的神经元死亡,减轻小鼠的学习记忆和空间探索障碍。

既往研究表明,应用高浓度 PI3K 抑制剂可以阻断 Akt 磷酸化,降低 Caspase-3 活性,抑制凋亡过程,促进神经细胞存活^[21]。本研究结果表明,PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 阻止 Ngb 诱导的 Caspase-3、Caspase-9 和 Akt 磷酸化,表明 Ngb 抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 的上游信号通路也是 PI3K/Akt。激活的 PI3K/Akt 对其下游靶基因的调控作用是促进细胞存活的重要途径,尤其是在生长因子介导的细胞存活中起关键作用,为治疗 AD 提供了一个潜在的靶点。

总之,过表达 Ngb 增强了 AD 转基因小鼠的学习记忆和空间探索能力,其机制可能是通过激活 PI3K/Akt 通路抑制 Caspase 活性,进而阻止神经元的凋亡,起着保护神经元的作用。进一步探索 Ngb 的抗凋亡特性可能为新的药物预防或缓解 AD 提供新的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 802–809.
- [2] Zhang SJ, Su SH, Gao JF. Electroacupuncture improves learning-memory ability possibly by suppressing apoptosis and down-regulating expression of apoptosis-related proteins in hippocampus and cerebral cortex in immature mice with Alzheimer's disease[J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2020, 45(8): 611–616.
- [3] Chen NN, Wang J, He YQ, et al. Trilobatin protects against A β_{25-35} -induced hippocampal HT22 cells apoptosis through mediating ROS/p38/Caspase-3-dependent pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 584.
- [4] Park G, Nhan HS, Tyan SH, et al. Caspase activation and Caspase-mediated cleavage of APP is associated with amyloid β -protein-induced synapse loss in Alzheimer's disease[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(13): 107839.
- [5] Ali T, Kim T, Rehman SU, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of

- Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(7): 6076–6093.
- [6] Cieri D, Vicario M, Vallese F, et al. Tau localises within mitochondrial sub-compartments and its Caspase cleavage affects ER-mitochondria interactions and cellular Ca²⁺ handling[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(10): 3247–3256.
- [7] Chen H, Tian J, Guo L, et al. Caspase inhibition rescues F1Fo ATP synthase dysfunction-mediated dendritic spine elimination[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17589.
- [8] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 520–523.
- [9] Zhu J, Tang WY. Cerebroprotection with recombinant neuroglobin plasmid in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. *Neural Regen Res*, 2010, 5(1): 52–57.
- [10] Meng Y, Yin Q, Ma Q, et al. FXII regulates the formation of deep vein thrombosis via the PI3K/Akt signaling pathway in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(5): 87.
- [11] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541–5554.
- [12] Ascenzi P, di Masi A, Leboffe L, et al. Neuroglobin: from structure to function in health and disease[J]. *Mol Aspects Med*, 2016, 52: 1–48.
- [13] Sun F, Mao XO, Xie L, et al. Neuroglobin protein is upregulated in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 36(4): 659–663.
- [14] Brunori M, Vallone B. A globin for the brain[J]. *FASEB J*, 2006, 20(13): 2192–2197.
- [15] Zara S, Porzionato A, de Colli M, et al. Human carotid body neuroglobin, vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase expression in heroin addiction[J]. *Histol Histopathol*, 2013, 28(7): 903–911.
- [16] Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 691–704.
- [17] Guidolin D, Tortorella C, Marcoli M, et al. Neuroglobin, a factor playing for nerve cell survival[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): E1817.
- [18] Dai JL, Lin Y, Yuan YJ, et al. Regulatory effect of neuroglobin in the recovery of spinal cord injury[J]. *J Spinal Cord Med*, 2019, 42(3): 371–377.
- [19] Angel A, Volkman R, Royal TG, et al. Caspase-6 knockout in the 5xFAD model of Alzheimer's disease reveals favorable outcome on memory and neurological hallmarks[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): E1144.
- [20] Flores J, Noël A, Foveau B, et al. Pre-symptomatic Caspase-1 inhibitor delays cognitive decline in a mouse model of Alzheimer disease and aging[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4571.
- [21] Liu HD, Wang J, Zhang QB, et al. Protective effect of fucoidan against MPP⁺-induced SH-SY5Y cells apoptosis by affecting the PI3K/Akt pathway[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(6): E333.

(责任编辑:冉明会)