

白藜芦醇改善青春期酒精暴露导致的成年期大鼠 认知功能损害

贾文歌 刘媛 王心雨 李昊隆 曾令宇 杨一帆 李晨晨 陈红云 赵斌* 魏来*
(新乡医学院法医学院, 新乡市法医毒理重点实验室, 新乡 453003)

摘要 该文旨在研究白藜芦醇(RSV)对青春期间歇性酒精(AIE)暴露大鼠认知功能的影响及潜在的机制。通过25%酒精灌胃建立AIE暴露大鼠模型, 并使用RSV进行干预。旷场实验结果显示, 与Con+Veh组相比, Eth+Veh组大鼠进入中心区域的次数($P<0.01$)、在中心区域活动距离减少($P<0.001$)。RSV治疗后, Eth+RSV组大鼠较Eth+Veh组进入中心区域的次数($P<0.01$)、在中心区域活动距离增加($P<0.05$)。高架十字迷宫实验结果显示, 与Con+Veh组相比, Eth+Veh组大鼠开放臂停留时间($P<0.01$)、进入开放臂次数显著减少($P<0.01$)。RSV治疗后, Eth+RSV组大鼠较Eth+Veh组进入开放臂次数显著增加($P<0.05$), 在开放臂停留时间有增多趋势, 但无统计学差异($P>0.05$)。Morris水迷宫实验结果显示, 与Con+Veh组相比, Eth+Veh组大鼠测试期逃避潜伏期增加($P<0.01$)、穿越目标平台次数明显减少($P<0.05$)。而RSV治疗后, Eth+RSV组大鼠较Eth+Veh组测试期逃避潜伏期降低($P<0.05$)、穿越目标平台次数明显增多($P<0.05$)。尼氏染色结果显示, 与Con+Veh组相比, Eth+Veh组大鼠内侧前额叶皮层(mPFC)神经元数量显著减少($P<0.001$)。与Eth+Veh组相比, Eth+RSV组大鼠mPFC神经元尼氏体数量显著增多($P<0.01$)。Western blot结果显示, 与Con+Veh组相比, Eth+Veh组大鼠mPFC内SIRT1($P<0.05$)、BDNF($P<0.05$)及PSD95($P<0.05$)蛋白表达水平显著降低。与Eth+Veh组相比, Eth+RSV组大鼠mPFC内SIRT1($P<0.01$)、BDNF($P<0.05$)及PSD95($P<0.05$)蛋白表达水平显著增高。该研究结果表明, RSV能够改善AIE导致的大鼠认知功能损害, 并增加mPFC内神经元尼氏体数量, 这种改善作用可能与mPFC中SIRT1、BDNF及PSD95的表达水平增加相关。

关键词 白藜芦醇; 青春期间歇性酒精暴露; 认知功能; 沉默信息调节因子1; 脑源性神经营养因子; 突触后密度蛋白95

Resveratrol Improves Cognitive Impairments Caused by Adolescent Intermittent Ethanol Exposure in Adult Rats

JIA Wenge, LIU Yuan, WANG Xinyu, LI Haolong, ZENG Lingyu, YANG Yifan,
LI Chenchen, CHEN Hongyun, ZHAO Bin*, WEI Lai*

(Xinxiang Key Laboratory of Forensic Toxicology, College of Forensic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract This study aimed to investigate the effects of RSV (resveratrol) on cognitive function in rats

收稿日期: 2023-11-27

接受日期: 2024-02-17

国家自然科学基金(批准号: U2004111)、新乡医学院研究生科研创新支持计划(批准号: YJSCX202289Y)和河南省高校大学生创新创业训练计划项目(批准号: 202210472021)资助的课题

*通信作者。Tel: 18790631373, E-mail: rodphine@xxmu.edu.cn; Tel: 13623907368, E-mail: weilai@xxmu.edu.cn

Received: November 27, 2023

Accepted: February 17, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.U2004111), the Postgraduate Scientific Research Innovation Support Project of Xinxiang Medical University (Grant No.YJSCX202289Y), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Henan Province (Grant No.202210472021)

*Corresponding authors. Tel: +86-18790631373, E-mail: rodphine@xxmu.edu.cn; Tel: +86-13623907368, E-mail: weilai@xxmu.edu.cn

exposed to AIE (adolescent intermittent ethanol) and its potential mechanisms. AIE-exposed rat models were established by intermittent gavage of 25% ethanol and the RSV or the Veh (vehicle) was administered intragastrically. The results of the open field test showed that compared with the Con+Veh group, the number of center zone entries ($P<0.01$) and the distance in center ($P<0.001$) of the Eth+Veh group were significantly reduced. After RSV treatment, compared with the Eth+Veh group, the number of center zone entries ($P<0.01$) and the distance in center ($P<0.05$) of the Eth+RSV group were significantly increased. The results of the elevated plus maze test showed that compared with the Con+Veh group, the open arm duration and the open arm entries of rats in the Eth+Veh group were significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the Eth+Veh group, the open arm entries of rats in the Eth+RSV group were significantly increased ($P<0.05$), but the open arm entries were no statistical difference ($P>0.05$). The results of the Morris water maze test showed that compared with the Con+Veh group, the latency to target of the Eth+Veh group was significantly increased ($P<0.01$) and the target crossings were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the Eth+Veh group, the latency to target and the target crossings of the Eth+RSV group were significantly decreased ($P<0.05$). The results of Nissl staining showed that compared with the Con+Veh group, the number of neurons in the mPFC (medial prefrontal cortex) in the Eth+Veh group was significantly decreased ($P<0.001$). Compared with the Eth+Veh group, the number of neurons in the Eth+RSV group was significantly increased ($P<0.01$). Western blot results showed that compared with the Con+Veh group, the protein expression levels of SIRT1 ($P<0.05$), BDNF ($P<0.05$), and PSD95 ($P<0.05$) in mPFC of rats in the Eth+Veh group were significantly decreased. Compared with the Eth+Veh group, the protein expression levels of SIRT1 ($P<0.01$), BDNF ($P<0.05$), and PSD95 ($P<0.05$) in the mPFC of rats in the Eth+RSV group were significantly increased. These results suggest that RSV can improve the cognitive impairment induced by AIE in rats and increase the number of neuronal in mPFC, which may be related to the increased expression of SIRT1, BDNF, and PSD95 in mPFC.

Keywords resveratrol; adolescent intermittent ethanol; cognitive function; silent information regulator 1; brain-derived neurotrophic factor; postsynaptic density protein 95

酒精暴露可导致脑组织结构损害和长期持久的认知功能障碍, 包括焦虑、学习记忆等^[1]。青春期是脑组织发育的关键时期, 研究表明, 青春期间歇性酒精(adolescent intermittent ethanol, AIE)暴露增加了成年期酒精的使用量和认知功能障碍发生的风险^[2]。内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)主要调控决策、动机、控制、命令、冲动性等高级认知功能, 是青春期变化最为显著的脑区之一^[3-4]。mPFC内神经元的形态、活动及突触可塑性的改变与焦虑样行为、学习记忆密切相关^[5-7]。青春期饮酒会降低mPFC内神经元树突棘密度和树突复杂性, 损害认知功能^[8-9]。

白藜芦醇(resveratrol, RSV)是存在于葡萄、花生等多种植物中的天然多酚化合物, 是一种植物抗毒素, 具有抗氧化、抗炎、神经保护、改善认知等多种功能^[10-11]。沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)依赖的组

蛋白去乙酰化酶, 可以调节多种组织和细胞的炎症反应, 改善认知功能^[12-13]。研究表明, RSV能够通过变构相互作用增加SIRT1对NAD⁺和乙酰化底物的亲和力, 提高SIRT1的活性^[14]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是脑内调节突触可塑性、维持大脑正常发育和功能的主要神经营养因子, 是神经元活动和学习记忆形成的基础, 与焦虑、抑郁、创伤后应激障碍等多种精神疾病相关^[15]。突触后密度蛋白95(postsynaptic density protein 95, PSD95)是参与突触组织和调控的重要支架蛋白, 可以协调突触的发育, 在突触稳定性和可塑性方面有重要作用^[16]。研究发现, SIRT1可以通过增加海马BDNF的表达, 减轻小鼠术后认知功能障碍; BDNF能通过增加PSD95的表达起到神经保护作用^[17-18]。因此, 我们推测, RSV能够通过增加mPFC内SIRT1、BDNF和PSD95的表达水平, 从而改善大鼠的认知功能。本研究旨在通过建立AIE暴露大鼠模型, 应用旷场实验、高架十字迷宫实验

和Morris水迷宫实验检测大鼠认知功能,探讨RSV在AIE暴露后成年期认知功能中的作用及机制,该研究为RSV治疗青春期酒精暴露致脑认知功能损害提供实验及理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

SPF级雄性SD大鼠(3周龄),购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],并将其随机分为3组,Control+Vehicle(Con+Veh)组、Ethanol+Vehicle(Eth+Veh)组、Ethanol+Resveratrol(Eth+RSV)组,9只/组。动物饲养室内温度20℃~25℃,相对湿度40%~60%,动物可自由觅食和饮水,光照与黑暗循环时间为12h。上述动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定进行,并已通过新乡医学院伦理委员会审查批准。伦理审查批件号:XYLL-20220657。

1.2 主要实验试剂和仪器

RSV购自北京索莱宝科技有限公司。尼氏染色液购自上海碧云天生物技术有限公司。BCA蛋白定量试剂盒购自南京诺唯赞生物技术有限公司。超敏ECL化学发光试剂盒购自郑州鼎国生物技术有限公司。抗SIRT1(1:1 000, #9475)、抗PSD95(1:1 000, #3409)、抗 β -actin(1:1 000, #3700)、HRP标记山羊抗小鼠二抗(1:10 000, #7076)、HRP标记山羊抗兔二抗(1:10 000, #7074)购自美国Cell Signaling Technology公司。抗BDNF(1:1 000, #66292-1-Ig)购自武汉三

鹰生物技术有限公司。实验仪器包括:冷冻高速离心机(ThermoFisher,美国)、多功能酶标仪(Spectra Max,中国)、全自动化学发光成像系统(BLT,中国)。

1.3 AIE模型的建立

大鼠适应饲养环境7天,自出生后(postnatal day, PND)28天开始,Eth+Veh组给予25%(v/v)酒精(3 g/kg)灌胃,连续灌胃4天,中断3天,为1个循环,共4个循环;Con+Veh组给予等体积的生理盐水;从PND28开始,Eth+RSV组在给予酒精灌胃前30 min,给予RSV溶液灌胃(20 mg/kg),连续灌胃28天。之后进行酒精戒断,直到成年(PND71)进行行为学实验。实验流程见图1。

1.4 旷场实验(open field test, OFT)

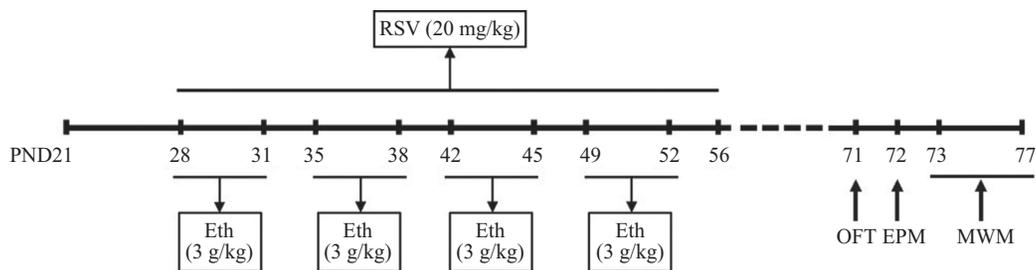
实验开始时,将大鼠放入旷场中心,同时进行摄像,计时10 min。记录大鼠进入中心区域的次数(center zone entries)、中心区域的活动距离(distance in center)与活动总距离(total distance),用于反映大鼠的焦虑程度。使用Smart v3.0软件实时视频行为学分析系统记录并分析。

1.5 高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)实验

实验开始时,将大鼠面向开放臂放入高架十字迷宫中央区域,同时进行摄像,计时10 min。记录大鼠进入开放臂停留时间(open arm duration)、开放臂次数(open arm entries)与活动总距离(total distance),用于反映大鼠的焦虑程度。使用Smart v3.0软件实时视频行为学分析系统记录并分析。

1.6 Morris水迷宫(Morris water maze, MWM)实验

Morris水迷宫由平台、圆形水池和记录装置组



PND(21~27)为SD大鼠适应阶段;PND(28~55)为SD大鼠AIE模型建立和RSV给药阶段,该阶段连续给予RSV 20 mg/kg,于PND(28~31)、PND(35~38)、PND(42~45)、PND(49~52)间歇给予Eth 3 g/kg(25% v/v 酒精);PND(71~77)为SD大鼠行为学实验阶段,其中PND71进行旷场实验(OFT),PND72进行高架十字迷宫实验(EPM),PND(73~77)进行水迷宫实验(MWM)。PND(出生后天数);Eth(酒精)。

PND (21-27) is the adaptation stage of SD rats, and PND (28-55) is the AIE model establishment and RSV administration stage of SD rats, in which RSV 20 mg/kg is given continuously, and Eth 3 g/kg (25% v/v ethanol) is given intermittently to PND (28-31), PND (35-38), PND (42-45) and PND (49-52). PND (71-77) was the behavioral test stage of SD rats, in which PND71 was used for OFT (open field test), PND72 for elevated plus maze test (EPM), PND (73-77) for MWM (Morris water maze) test. PND (postnatal day), Eth (ethanol).

图1 实验流程

Fig.1 Experimental process

成。每天开始实验时,在水池里注水 35 cm,水温维持在 (20 ± 5) °C。实验方法:(1) 训练期(PND73~76),将大鼠面朝池壁放入水迷宫中,自由探索 60 s。如果大鼠在 60 s内找到隐藏的目标平台,则允许它们在平台上停留 15 s,如果大鼠没有在 60 s内找到平台,则将大鼠引导至平台并停留 15 s。每只大鼠每天训练 4次,每次从不同的起点放入,训练间隔不少于 30 min,训练时间为 4天。记录大鼠每天从进入水中到找到平台所需的平均时间,即逃避潜伏期(escape latency)。(2) 测试期(PND77): 移除水迷宫中的隐藏平台,将大鼠在目标平台相反的方向面朝池壁放入水迷宫中,使其自由探索 90 s。记录大鼠第一次找到目标平台的时间(latency to target)、穿越平台区域的次数(target crossings)和游泳速度(swim speed),以评价各组大鼠的空间记忆能力。使用 Smart v3.0软件实时视频行为学分析系统记录并分析。

1.7 脑组织灌注和尼氏染色

深度麻醉大鼠(2%戊巴比妥, 65 mg/kg, 腹腔注射),将大鼠置于解剖位,用预冷的 0.9%生理盐水及 4%多聚甲醛进行充分灌注后,快速断头取脑,置于 4%多聚甲醛中室温固定 48 h。脱水、清理、浸蜡和组织包埋后切取 mPFC 脑区,切片厚度为 3 μ m。脱蜡和水化后,在 37 °C下,使用尼氏染色液染色 20 min。然后经过乙醇梯度脱水,二甲苯透明,并用中性胶密封。观察各组大鼠 mPFC 内神经元染色情况。使用 ImageJ 软件对神经元的数量进行统计分析。

1.8 Western blot

深度麻醉大鼠后,快速断头取脑,参照 Paxinos 和 Watson 大鼠脑立体定位图谱,于冰上快速分离 mPFC,经液氮速冻后置于 -80 °C 保存。提取 mPFC 内蛋白质,BCA 法检测蛋白浓度,用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离出凝胶条带,100 V 恒压冰上湿转 90 min,将目的蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭(37 °C、1 h),加一抗后 4 °C 过夜, TBST 洗膜后室温下二抗孵育 60 min。在全自动化学发光成像系统中进行化学发光显色,采用 ImageJ 软件分析灰度值,用目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值表示目的蛋白相对表达量。

1.9 统计学方法

应用 GraphPad Prism v9.3.1 软件进行统计学分析。实验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用单因素方差分析评价统计学显著性, $P<0.05$ 为显著性差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSV对AIE暴露大鼠成年期焦虑样行为的影响

旷场实验结果(图 2)显示,与 Con+Veh 组相比, Eth+Veh 组大鼠进入中心区域的次数($P<0.01$)、在中心区域的活动距离($P<0.001$)显著减少;与 Eth+Veh 组相比, Eth+RSV 组大鼠进入中心区域的次数($P<0.01$)、在中心区域的活动距离($P<0.05$)显著增加;各组大鼠活动总距离之间无显著差异($P>0.05$)。高架十字迷宫实验结果(图 3)显示,与 Con+Veh 组相比, Eth+Veh 组大鼠在开放臂的停留时间($P<0.01$)、开放臂进入次数($P<0.01$)显著减少;与 Eth+Veh 组相比, Eth+RSV 组大鼠在开放臂的停留时间未显著变化($P>0.05$),而开放臂进入次数显著增加($P<0.05$);各组大鼠活动总距离之间无显著差异($P>0.05$)。旷场和高架十字迷宫实验结果表明, RSV 治疗能够减轻 AIE 暴露大鼠成年期的焦虑样行为。

2.2 RSV对AIE暴露大鼠成年期空间记忆能力的影响

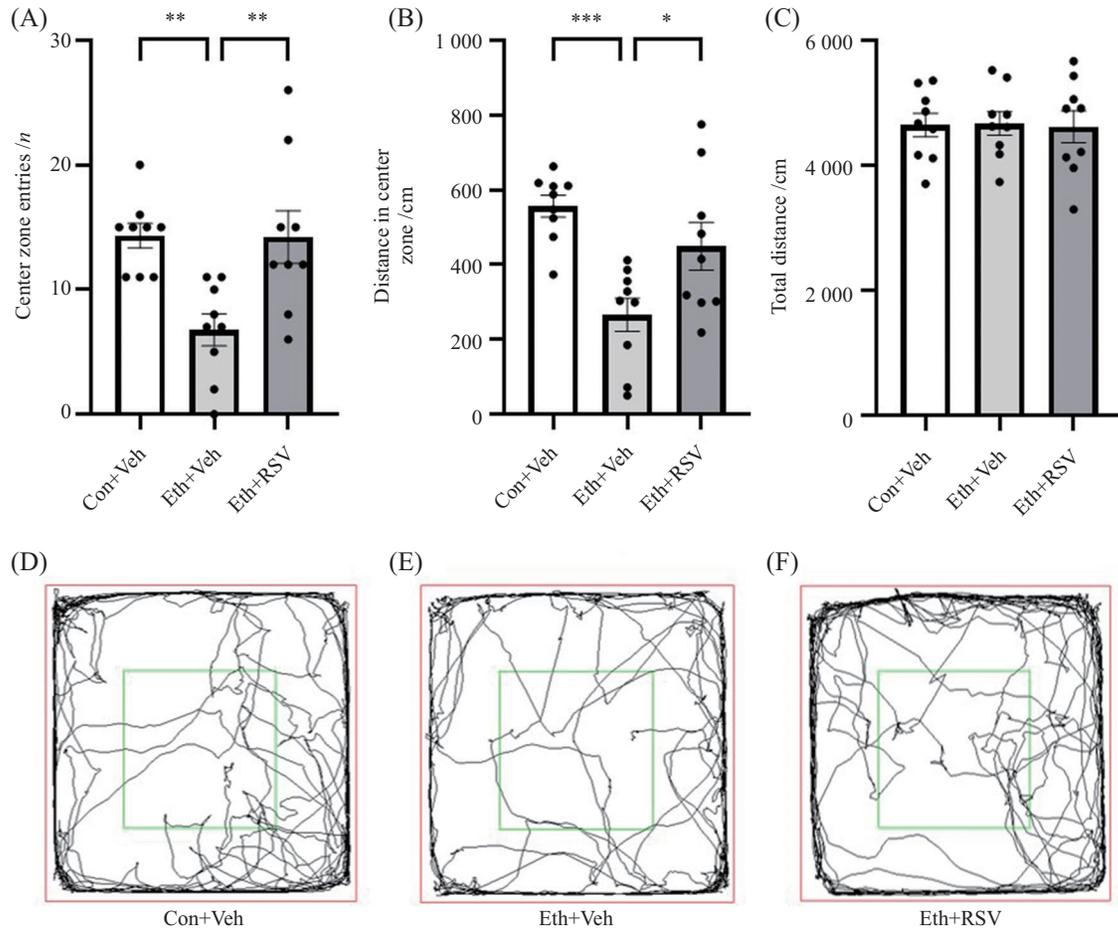
在 Morris 水迷宫实验训练期,各组之间的逃避潜伏期无显著差异($P>0.05$)。在 Morris 水迷宫实验测试期,与 Con+Veh 组相比, Eth+Veh 组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越目标象限次数显著减少($P<0.05$);与 Eth+Veh 组相比, Eth+RSV 组大鼠逃避潜伏期显著缩短($P<0.05$),穿越目标象限次数显著增多($P<0.05$);各组大鼠的游泳速度无显著差异($P>0.05$)。图 4 结果表明, RSV 治疗能有效改善 AIE 暴露成年期大鼠的空间记忆能力的损害。

2.3 RSV对AIE暴露大鼠成年期mPFC神经元病理学形态的影响

尼氏染色结果显示, Con+Veh 组大鼠 mPFC 神经元尼氏小体丰富,神经元排列整齐,细胞核明显,细胞形态完整;与 Con+Veh 组相比, Eth+Veh 组大鼠 mPFC 神经元数量显著减少($P<0.001$),尼氏体着色变浅,数量减少,出现尼氏体溶解,部分细胞水肿,细胞结构不完整;与 Eth+Veh 组相比, Eth+RSV 组大鼠 mPFC 神经元数量显著增多($P<0.01$),尼氏体着色加深,数量增多,细胞形态规则,损伤程度明显减轻。图 5 结果表明, RSV 治疗能够减轻 AIE 暴露大鼠 mPFC 内的神经元损伤。

2.4 RSV对AIE暴露大鼠成年期mPFC内SIRT1、PSD95和BDNF蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与 Con+Veh 组相比,



A: OFT实验进入中心区域的次数; B: OFT实验在中心区域的活动距离; C: OFT实验活动总距离; D: Con+Veh组OFT实验轨迹图; E: Eth+Veh组OFT实验轨迹图; F: Eth+RSV组OFT实验轨迹图。 $\bar{x} \pm s$, $n=9$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the center zone entries of the OFT; B: the distance in center zone of the OFT; C: the total distance of the OFT; D: Con+Veh group OFT track map; E: Eth+Veh group OFT track map; F: Eth+RSV group OFT track map. $\bar{x} \pm s$, $n=9$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 大鼠OFT结果及轨迹图

Fig.2 Experimental results and track map of OFT in rats

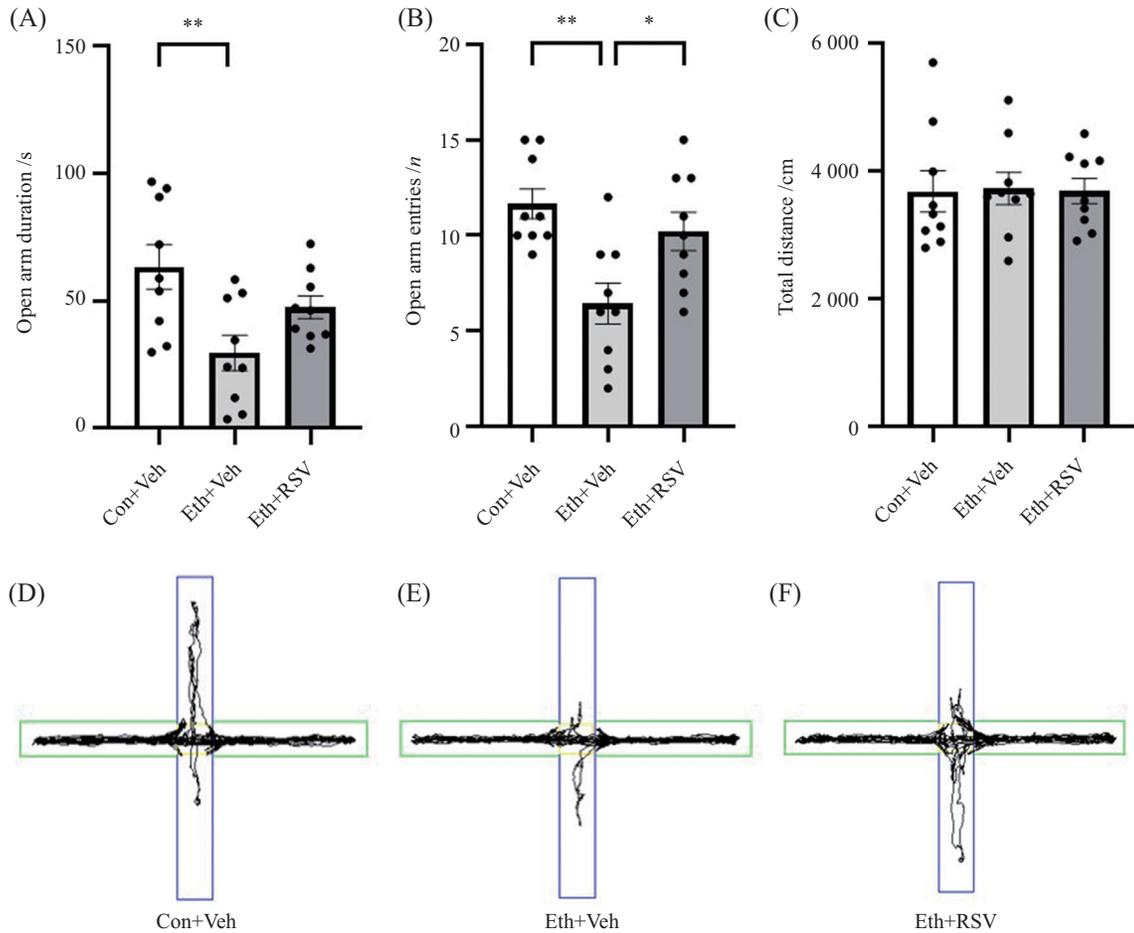
Eth+Veh组大鼠 mPFC内 SIRT1 ($P < 0.05$)、BDNF ($P < 0.05$)及 PSD95 ($P < 0.05$)蛋白表达水平显著降低; 与Eth+Veh组相比, Eth+RSV组大鼠 mPFC内 SIRT1 ($P < 0.01$)、BDNF ($P < 0.05$)及 PSD95 ($P < 0.05$)蛋白表达水平显著增高。图6结果表明, RSV能够通过激活 SIRT1、BDNF、PSD95信号通路, 改善AIE暴露大鼠成年期的认知功能损害。

3 讨论

饮酒是全球疾病负担的主要风险因素, 其中, 青春期饮酒一直是全球性的公共卫生问题之一。根据《Global Status Report on Alcohol and Health 2018》, 在15~19岁青少年中, 约1.55亿人饮酒^[19-20]。研究发现, 青春期饮酒能够影响前额叶皮层、海马、纹状体等脑区的结构和功能, 从而对认知功能造成损害^[21-22]。

本研究发现, AIE暴露大鼠在旷场实验中进入中心区域的次数、中心区域活动距离均减少; 在高架十字迷宫实验中开放臂停留时间、进入开放臂次数均显著减少; Morris水迷宫实验中测试期逃避潜伏期延长, 穿越目标平台次数明显减少; 这表明AIE暴露会导致大鼠成年后产生焦虑样行为和空间记忆能力受损; 同时研究发现, AIE暴露大鼠 mPFC内神经元尼氏体减少。与我们研究结果类似, PANDEY等^[23]发现, AIE暴露导致了大鼠成年后杏仁核神经元突触损伤, 并使大鼠产生焦虑样行为。

RSV是SIRT1的天然激活剂, 具有抗炎、抗氧化和保护神经等多种功能^[10]。SIRT1参与调节突触可塑性, 维持大脑正常认知功能^[24]。研究发现, RSV可以通过激活SIRT1, 进而激活海马BDNF-TrkB信号通路, 改善铅诱导的小鼠空间学习和记忆障碍, 也



A: EPM实验开放臂停留时间; B: EPM实验开放臂进入次数; C: EPM实验活动总距离; D: Con+Veh组EPM实验轨迹图; E: Eth+Veh组EPM实验轨迹图; F: Eth+RSV组EPM实验轨迹图。 $\bar{x} \pm s$, $n=9$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: open arm duration of EPM experiment; B: open arm entries of EPM experiment; C: the total distance of EPM experiment; D: Con+Veh group EPM experimental track map; E: Eth+Veh group EPM experimental track map; F: Eth+RSV group EPM experimental track map. $\bar{x} \pm s$, $n=9$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

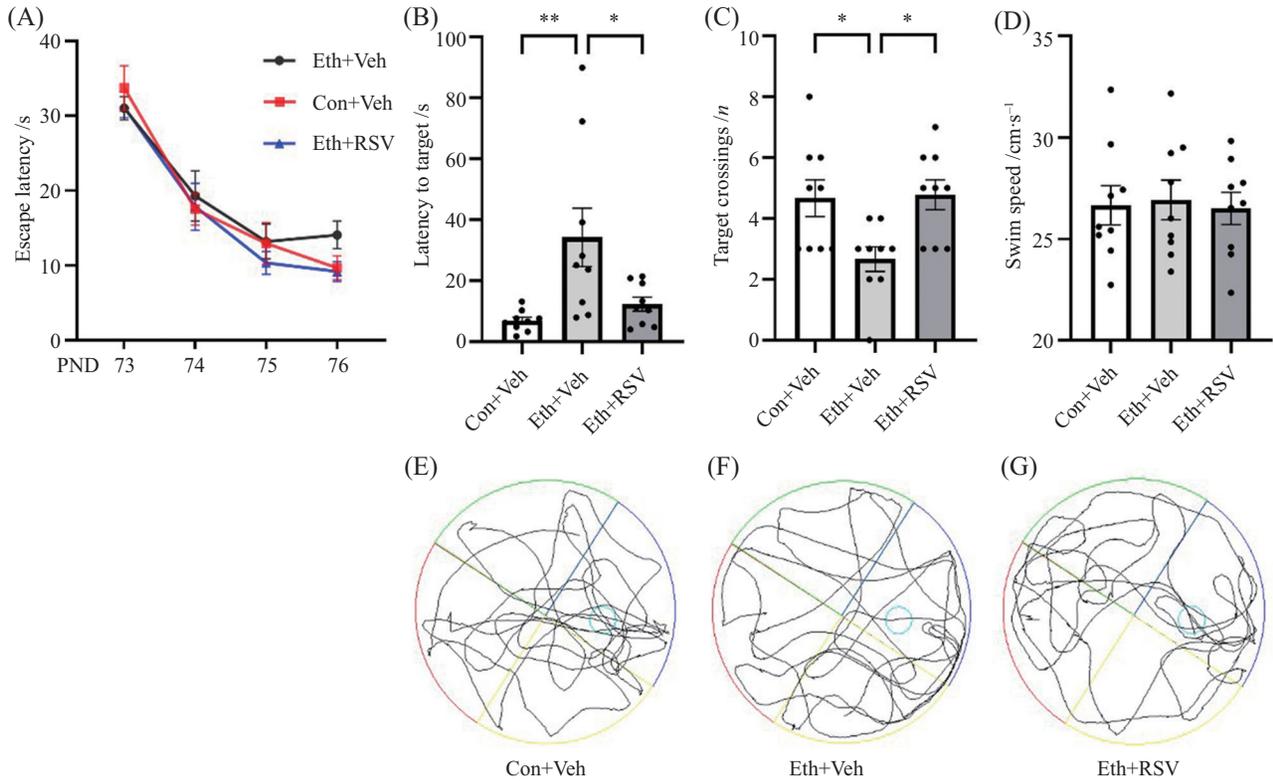
图3 大鼠EPM实验结果及轨迹图

Fig.3 Experimental results and track map of EPM in rats

可以通过激活 Sirt1/NF- κ B 信号通路改善小鼠母爱剥夺引起的焦虑、抑郁样行为^[25-26]。本研究中, AIE 暴露大鼠在成年后 mPFC 内神经元尼氏体减少、SIRT1 表达水平明显降低, 并产生焦虑样行为和空间记忆能力受损。RSV 治疗后, AIE 暴露大鼠 mPFC 内神经元尼氏体增多、SIRT1 表达升高, 焦虑样行为减轻、空间记忆能力改善。此外, 我们还发现, RSV 治疗后, AIE 暴露大鼠在旷场中的焦虑样行为明显改善, 在高架十字迷宫实验中进入开放臂的次数明显增多, 但在开放臂的停留时间虽有升高趋势, 却无统计学差异。我们认为可能的原因是相较于旷场中心区域, 高架十字迷宫开放臂是一个开放且高位的区域^[27], AIE 暴露可改善大鼠对未知开放区域所产生的焦虑样行为, 但无法改善高度产生的焦虑样行为。因此,

我们认为, RSV 能够通过激活 SIRT1, 减轻 mPFC 内神经元损伤, 改善大鼠成年后的认知功能。

PSD95 是突触发生和神经发育过程中必不可少的支架蛋白, 与学习记忆功能密切相关^[28]。小鼠海马 SIRT1 基因敲除可引起 PSD95 蛋白的表达水平降低, 从而损害小鼠空间学习记忆能力^[29]。在慢性酒精暴露小鼠模型中, 酒精导致海马突触丢失、PSD95 表达水平降低和认知功能障碍^[30]。BDNF 在突触活动转化为长期突触记忆的过程中起着至关重要的作用^[15]。研究发现, 激活海马 SIRT1-BDNF 信号通路, 不仅可以改善精神分裂症大鼠的认知障碍, 还能促进正常小鼠学习和记忆的形成^[31-32]。此外, 青春期长期饮酒导致大鼠海马 BDNF 表达水平下降, 神经认知功能受到损害^[33]。RSV 能够通过激活海马

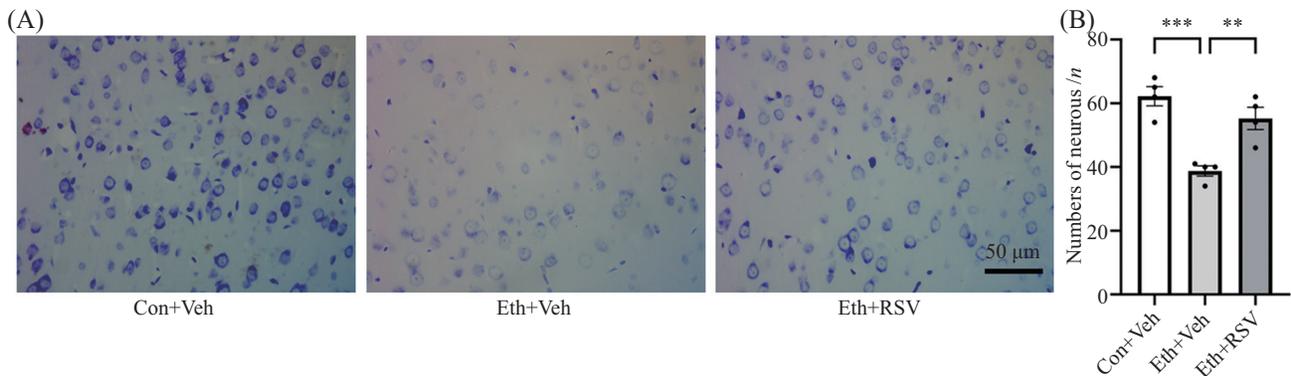


A: MWM训练期间逃避潜伏期; B: MWM测试期逃避潜伏期; C: MWM测试期目标象限的穿越次数; D: MWM测试期游泳速度; E: Con+Veh组MWM测试期轨迹图; F: Eth+Veh组MWM测试期轨迹图; G: Eth+RSV组MWM测试期轨迹图。 $\bar{x} \pm s$, $n=9$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: escape latency during MWM training; B: latency to target during MWM test period; C: MWM test period target crossing; D: MWM test period swimming speed; E: Con+Veh group MWM test phase track map; F: Eth+Veh group MWM test phase track map; G: Eth+RSV group MWM test phase track map. $\bar{x} \pm s$, $n=9$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图4 大鼠MWM实验结果及轨迹图

Fig.4 Experimental results and track map of MWM in rats



A: 大鼠mPFC尼氏染色结果; B: 大鼠mPFC内神经元数量。 $\bar{x} \pm s$, $n=4$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: results of mPFC Nissl staining in rats; B: the number of neurons in the rat mPFC. $\bar{x} \pm s$, $n=4$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

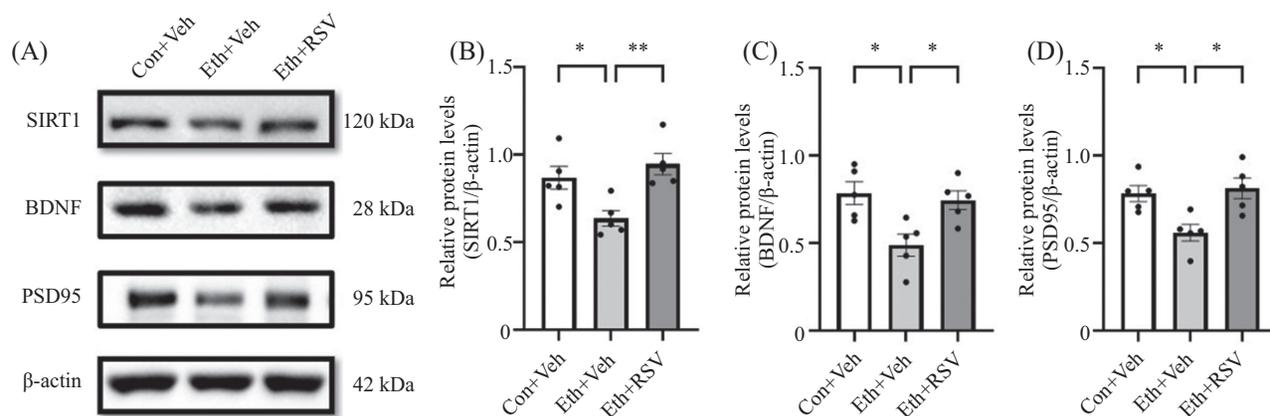
图5 大脑切片Nissl染色

Fig.5 Nissl staining of brain slices

SIRT1-BDNF信号通路,改善阿尔茨海默病小鼠的认知功能及精神分裂症大鼠的学习障碍^[31-34]。在本研究中也发现AIE暴露大鼠mPFC内BDNF、PSD95表达水平降低和认知功能障碍,经RSV治疗后,BDNF和PSD95均趋于正常水平,认知障碍得到明显改善。

实验结果表明,RSV能够通过激活mPFC内SIRT1-BDNF-PSD95信号通路,减轻AIE暴露大鼠的认知功能损害(图7)。

综上所述,RSV能够通过逆转AIE暴露导致的成年期大鼠mPFC中SIRT1、BDNF及PSD95的表



A: Western blot 代表性图片; B: mPFC 内 SIRT1 相对蛋白表达量; C: mPFC 内 BDNF 相对蛋白表达量; D: mPFC 内 PSD95 相对蛋白表达量。 $\bar{x} \pm s$, $n=5$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

A: Western blot representative images; B: the relative protein expression of SIRT1 in mPFC; C: the relative protein expression of BDNF in mPFC; D: the relative protein expression of PSD95 in mPFC. $\bar{x} \pm s$, $n=5$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

图6 Western blot 检测蛋白表达水平

Fig.6 Western blot detection of protein expression

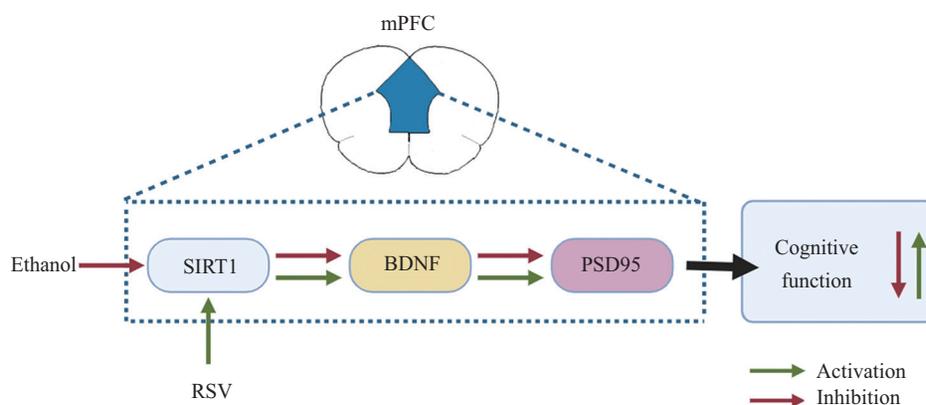


图7 SIRT1-BDNF-PSD95信号通路示意图

Fig.7 Diagram of SIRT1-BDNF-PSD95 signaling pathway

达,减轻神经元的损伤,进而改善认知功能的损害。本研究证实,RSV能够对青春期间歇性酒精暴露导致的焦虑样行为和空间记忆能力损害起到治疗作用,其机制可能是通过激活mPFC内的SIRT1,增加BDNF及PSD95的表达水平来实现。本研究为RSV改善青春期间歇性酒精暴露致成年期认知损害,特别是焦虑和空间记忆障碍提供了新的证据,为青春期间歇性酒精暴露导致认知功能损害的治疗提供了新的思路。

参考文献 (References)

[1] CREWS F T, VETRENO R P, BROADWATER M A, et al. Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior [J]. *Pharmacol Rev*, 2016, 68(4): 1074-109.

[2] KYZAR E J, ZHANG H, PANDEY S C. Adolescent alcohol

exposure epigenetically suppresses amygdala Arc enhancer RNA expression to confer adult anxiety susceptibility [J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85(11): 904-14.

[3] ZHOU X, ZHU D, QI X L, et al. Neural correlates of working memory development in adolescent primates [J]. *Nature Commun*, 2016, 7: 13423.

[4] EUSTON D R, GRUBER A J, MCNAUGHTON B L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making [J]. *Neuron*, 2012, 76(6): 1057-70.

[5] FELIX-ORTIZ A C, BURGOS-ROBLES A, BHAGAT N D, et al. Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex [J]. *Neuroscience*, 2016, 321: 197-209.

[6] ITO S, DEYAMA S, DOMOTO M, et al. Effects of the synthetic cannabinoid 5F-AMB on anxiety and recognition memory in mice [J]. *Psychopharmacology*, 2019, 236(7): 2235-42.

[7] BURGDORF J, COLECHIO E M, STANTON P, et al. Positive emotional learning induces resilience to depression: a role for NMDA receptor-mediated synaptic plasticity [J]. *Curr Neuro-*

- pharmacol, 2017, 15(1): 3-10.
- [8] HAMILTON G F, CRISS K J, KLINTSOVA A Y. Voluntary exercise partially reverses neonatal alcohol-induced deficits in mPFC layer II/III dendritic morphology of male adolescent rats [J]. *Synapse*, 2015, 69(8): 405-15.
- [9] BROADWATER M, SPEAR L P. Consequences of ethanol exposure on cued and contextual fear conditioning and extinction differ depending on timing of exposure during adolescence or adulthood [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 256: 10-9.
- [10] GALINIAK S, AEBISHER D, BARTUSIK-AEBISHER D. Health benefits of resveratrol administration [J]. *Acta Biochim Pol*, 2019, 66(1): 13-21.
- [11] TU W, SONG M, FAN X. Does resveratrol improve cognition in humans? A scientometric study to an in-depth review [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(9): 2413-29.
- [12] CHEN J, ZHOU Y, MUELLER-STEINER S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(48): 40364-74.
- [13] YANG Y, LIU Y, WANG Y, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 831168.
- [14] HOWITZ K T, BITTERMAN K J, COHEN H Y, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan [J]. *Nature*, 2003, 425(6954): 191-6.
- [15] COLUCCI-D'AMATO L, SPERANZA L, VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7777.
- [16] EL-HUSSEINI A E, SCHNELL E, CHETKOVICH D M, et al. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses [J]. *Science*, 2000, 290(5495): 1364-8.
- [17] BHAT A, TAN V, HENG B, et al. Papaverine, a phosphodiesterase 10A inhibitor, ameliorates quinolinic acid-induced synaptotoxicity in human cortical neurons [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(4): 1238-50.
- [18] MA Y, JI Y, XU L, et al. Obesity aggravated hippocampal-dependent cognitive impairment after sleeve gastrectomy in C57/BL6J mice via SIRT1/CREB/BDNF pathway [J]. *Exp Brain Res*, 2022, 240(11): 2897-906.
- [19] COLLABORATORS G B D A. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10152): 1015-35.
- [20] Global status report on alcohol and health 2018 [J]. World Health Organization, 2018. Retrieved from <https://www.who.int/>.
- [21] RICE J, COUTELLIER L, WEINER J L, et al. Region-specific interneuron demyelination and heightened anxiety-like behavior induced by adolescent binge alcohol treatment [J]. *Acta Neuro-pathol Commun*, 2019, 7(1): 173.
- [22] VIDAL-INFERRA A, AGUILAR M A, MINARRO J, et al. Effect of intermittent exposure to ethanol and MDMA during adolescence on learning and memory in adult mice [J]. *Behav Brain Funct*, 2012, 8: 32.
- [23] PANDEY S C, SAKHARKAR A J, TANG L, et al. Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety and alcohol intake during adulthood [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 82: 607-19.
- [24] MICHAN S, LI Y, CHOU M M, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(29): 9695-707.
- [25] ZHANG L, TU R, WANG Y, et al. Early-life exposure to lead induces cognitive impairment in elder mice targeting SIRT1 phosphorylation and oxidative alterations [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 446.
- [26] WEI R M, ZHANG Y M, FENG Y Z, et al. Resveratrol ameliorates maternal separation-induced anxiety- and depression-like behaviors and reduces Sirt1-NF-kB signaling-mediated neuroinflammation [J]. *Front Behav Neurosci*, 2023, 17: 1172091.
- [27] 王维刚, 吴文婷, 周嘉斌, 等. 应用高架十字迷宫分析小鼠焦虑行为[J]. *中国细胞生物学学报*(WANG W G, WU W T, ZHOU J B, et al. The use of the elevated plus maze to analyze anxiety behavior in mice [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2011, 33(5): 466-72.
- [28] COLEY A A, GAO W J. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism [J]? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 82: 187-94.
- [29] SUN Z, ZHAO S, SUO X, et al. Sirt1 protects against hippocampal atrophy and its induced cognitive impairment in middle-aged mice [J]. *BMC Neurosci*, 2022, 23(1): 33.
- [30] LAN L, WANG H, ZHANG X, et al. Chronic exposure of alcohol triggers microglia-mediated synaptic elimination inducing cognitive impairment [J]. *Exp Neurol*, 2022, 353: 114061.
- [31] NIU J, CAO Y, JI Y. Resveratrol, a SIRT1 activator, ameliorates MK-801-induced cognitive and motor impairments in a neonatal rat model of schizophrenia [J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 716.
- [32] EL HAYEK L, KHALIFEH M, ZIBARA V, et al. Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through SIRT1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(13): 2369-82.
- [33] SILVA-PENA D, GARCIA-MARCHENA N, ALEN F, et al. Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats [J]. *Addict Biol*, 2019, 24(5): 1019-33.
- [34] ZHAO Y N, LI W F, LI F, et al. Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(4): 597-602.