

• 专题研究:神经退行性疾病 •

## 丰富环境改善5×FAD小鼠社会行为障碍

王乙淼,王 泽,余雨竹,张艳丽\*,肖 明\*

南京医科大学江苏省神经退行性疾病重点实验室,江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的:阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种逐步进展且不可逆的神经退行性疾病,其主要病理特征包括 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )的异常沉积、胶质细胞的过度活化、突触损伤以及髓鞘功能的损害。丰富环境(enriched environment, EE)作为一种非药物干预手段,因其对神经可塑性的潜在促进作用而受到广泛关注。然而,EE在AD早期阶段对社会行为以及相关神经病理学影响的研究仍存在不足。本研究利用5×FAD小鼠模型,系统探讨了EE对AD早期病理进展的影响,为EE在AD防治中的应用提供新的证据支持。**方法:**将2月龄5×FAD小鼠随机分配到标准环境(standard environment, SE)组或EE组,每笼5只,在相应的饲养环境中持续饲养4周,随后进行Y迷宫实验、旷场实验、高架十字迷宫实验和三箱社交实验的行为学检测。随后通过免疫组织化学方法以及Western blot实验技术检测内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex, mPFC)中突触后致密蛋白95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)、突触素(synaptophysin, SYP)和髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)的分布和表达情况。结合免疫荧光染色和透射电子显微镜实验观察神经元、突触结构及髓鞘形态的变化。以评估相关神经病理特征的变化。**结果:**EE并未影响5×FAD小鼠的短期空间记忆和焦虑样行为,但显著增强了其社交互动能力。在病理层面,5×FAD小鼠mPFC区域存在明显的A $\beta$ 沉积及胶质细胞活化现象。相比SE组,EE组小鼠的mPFC区域表现出A $\beta$ 沉积和胶质细胞活化的显著减少。此外,EE改善了该区域的髓鞘结构完整性,而对突触蛋白、突触超微结构及神经元存活未见明显影响。**结论:**EE能够有效减缓5×FAD小鼠的AD病理发展,并显著改善其社会行为障碍,突出其在干预AD相关社会功能缺失中的潜在价值,提示环境干预可能通过调节神经炎症、降低A $\beta$ 沉积以及维持髓鞘稳态,在AD发展过程中发挥潜在的神经保护效应。

**[关键词]** 丰富环境;社交行为障碍;内侧前额叶皮质

**[中图分类号]** R749.16

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2025)10-1375-11

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250432

## Enriched environment alleviates social behavioral deficits in 5×FAD mice

WANG Yimiao, WANG Ze, SHE Yuzhu, ZHANG Yanli\*, XIAO Ming\*

Jiangsu Key Laboratory of Neurodegeneration, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder characterized by pathological features including abnormal  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) deposition, glial hyperactivation, synaptic impairment, and myelin dysfunction. The enriched environment (EE), a non-pharmacological intervention, has garnered attention for its potential to enhance neuroplasticity. However, the effects of EE on social behavior and associated neuropathology during the early stages of AD remain insufficiently explored. This study utilized the 5×FAD mouse model to systematically investigate the impact of EE on early pathological progression in AD, providing new evidence to support the application of EE in the prevention and treatment of AD. **Methods:** Two-month-old 5×FAD mice were randomly assigned to a standard environment (SE) group or an EE group (5 mice per cage) and maintained in their respective housing conditions for four weeks. Behavioral tests, including the Y-maze, open field, elevated plus maze, and three-chamber social interaction assays were conducted. Subsequently, immunohistochemistry and Western blot were used to detect the distribution and expression of postsynaptic density protein-95 (PSD-95), synaptophysin (SYP) and myelin basic protein (MBP) in the medial prefrontal cortex (mPFC). Immunofluorescence staining and transmission electron microscopy were combined to

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82304466);江苏省自然科学基金(BK20241869)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanlizhang0229@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0001-8173-2024); mingx@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0001-5528-9102)

observe the changes in neuronal, synaptic structure and myelin morphology to evaluate neuropathological changes. **Results:** EE did not affect short-term spatial memory or anxiety-like behaviors in 5×FAD mice but significantly enhanced their social interaction capabilities. Pathologically, 5×FAD mice exhibited marked A $\beta$  deposition and glial activation in the mPFC. Compared with the SE group, EE mice showed significantly reduced A $\beta$  accumulation and glial activation in the mPFC. Furthermore, EE improved myelin structural integrity in this region, while no significant effects were observed on synaptic proteins, synaptic ultrastructure, or neuronal survival. **Conclusion:** EE effectively mitigates AD-related pathology in 5×FAD mice and alleviates social behavioral deficits, highlighting its potential for addressing AD-associated social dysfunction. These findings suggest that environmental interventions may exert neuroprotective effects by modulating neuroinflammation, reducing A $\beta$  deposition, and preserving myelin homeostasis during AD progression.

[Key words] enriched environment; social behavior deficits; medial prefrontal cortex

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(10): 1375-1385]

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是引发痴呆症的最普遍原因,已经成为日益严峻的全球健康问题,给家庭和社会带来了沉重负担<sup>[1]</sup>。社交障碍往往是AD的早期迹象,随后会逐渐演变为严重的社交功能障碍<sup>[2]</sup>。尽管近年来在AD的病理机制和疾病概念完善方面取得了显著进展,但有效的治疗方法仍然匮乏<sup>[3]</sup>。因此,研究AD早期诊断和干预策略对于延缓疾病进程和提升患者生活质量至关重要。

目前AD的临床治疗仍存在显著局限性<sup>[4]</sup>。在现有干预手段中,生活方式的干预因其非侵入性和多方面的调节潜力,日益成为AD防治研究的重要方向<sup>[5-6]</sup>。特别是丰富环境(enriched environment, EE)通过整合感觉、运动和社交刺激,已被证实能够增强突触可塑性并延缓神经退行性病变<sup>[7]</sup>。包括笔者团队在内的多项研究显示,EE在一定程度上能够减缓AD患者大脑结构和功能的损伤<sup>[8-9]</sup>。然而,EE是否能够有效改善AD进程中逐渐恶化的社交行为能力以及相关病理变化,仍需进一步深入研究。

内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex, mPFC)是调控认知和情绪的关键中枢,尤其在社交行为、认知功能以及情感控制方面发挥着至关重要的作用<sup>[10]</sup>。研究显示,mPFC在AD患者及其动物模型中经常遭受显著损伤,其功能障碍与社交缺陷和认知障碍紧密相关<sup>[11-12]</sup>。因此,关注mPFC的病理机制并探索其功能恢复策略,已成为当前AD研究的关键方向之一。现有证据表明,mPFC是EE影响最为显著的脑区之一,EE对其具有一定的保护作用,能够缓解该区域的病理损伤<sup>[13-14]</sup>。然而,EE对mPFC的病理改变与社交行为之间的关系仍然复杂,尚未被完全阐明。

EE是一种常见的行为学范式,并成熟运用于啮

齿动物中,主要设计包括物理、感官和社交刺激方面。在物理刺激方面,EE组笼具内配置多样化的运动和探索设施以增强小鼠的运动能力和空间探索欲望;感官刺激通过提供不同材质、颜色和形状的玩具,以及定期更换这些设施的位置或种类,保持环境的新颖性,促进小鼠的感官适应性;社交刺激则通过多只小鼠共同饲养的方式增强其社会互动频率<sup>[7,15]</sup>。本研究采用5×FAD小鼠模型,研究EE对认知功能、焦虑样行为以及社交行为的影响,旨在为环境因素在AD病理进程中的调节作用提供新的证据,为AD的临床治疗策略提供新的视角。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物

本实验使用5×FAD转基因小鼠,这是一种广泛应用于AD研究的经典动物模型,其显著特点是快速发展的AD相关病理学变化。在1.5月龄时,5×FAD小鼠皮层已开始出现 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )斑块的沉积;到2月龄时,观察到胶质细胞的明显活化;在3月龄,小鼠逐渐表现出社会行为减退和情绪障碍;至4月龄时,开始显现出认知功能的显著下降<sup>[16-18]</sup>。本研究将2月龄5×FAD小鼠随机分成5只小鼠合笼群体分配到标准环境(standard environment, SE)组和EE组。SE组饲养在标准有机玻璃笼(31 cm×22 cm×15 cm)中,提供基础的食物和水源,无额外的环境复杂性或刺激源,EE组饲养在大型有机玻璃笼(47 cm×30 cm×23 cm)中,笼内有多种物体,如跑轮、爬梯、木屋等,以增强小鼠感官、运动刺激,这些物品每3~4 d更换1次,以保持新颖。小鼠购自并饲养在南京医科大学实验动物中心。小

鼠饲养在恒定温度(20~26 ℃)和湿度(30%~70%)的环境中,在12 h的光照/黑暗循环下,可以自由获取食物和水。所有动物实验均按照南京医科大学实验动物护理和使用指南进行(伦理编号:1812054-4)。

### 1.1.2 试剂与器材

突触后致密蛋白95(post-synaptic density protein 95, PSD-95)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、神经元细胞核(neuronal nuclei, NeuN)抗体(Abcam公司,美国);突触素(synaptophysin, SYP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(武汉 Proteintech 公司);离子钙结合适配蛋白1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1)(WAKO公司,日本);DAB显色液(南京凯基生物); $\beta$ -淀粉样蛋白1-16(anti- $\beta$ -amyloid, 1-16, 6E10)(Biolegend公司,美国);Western blot实验与免疫组化实验中兔二抗和大鼠二抗(北京中杉金桥公司);免疫荧光实验中兔二抗、大鼠二抗和小鼠二抗(Thermo Fisher Scientific公司,美国);硫磺素S(SIGMA公司,美国);超薄切片机(EM UC7)(Leica公司,德国);电子显微镜(Tecnaï G2)(FEI公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 行为学测试

**Y迷宫:**Y型迷宫测试利用1个由3个臂组成的Y形迷宫(尺寸为30 cm×15 cm×8 cm,夹角为120°)来评估小鼠的短期工作记忆能力。测试包括训练阶段和测试阶段,两阶段间隔1~2 h。在训练阶段,通过木板封闭新奇臂,仅允许小鼠在剩余两个臂内自由活动5 min;而在测试阶段,打开新奇臂,小鼠可以自由探索所有臂,同样持续5 min。实验过程中,利用跟踪软件(TopScan, CleverSys, Inc., 美国)记录小鼠进入新奇臂的次数及探索时间。

**旷场实验:**旷场实验用于评估小鼠的整体运动活性、焦虑水平和探索行为。实验中,将单只小鼠置于一个封闭的平台内(尺寸为60 cm×60 cm×25 cm),并让其自由活动5 min。通过高架摄像机记录小鼠的移动距离、在中心区域(30 cm×30 cm)的停留时间、进入中心区域的次数,以及实验期间的粪便数和尿液数。

**十字高架实验:**十字高架实验是一种用于评估小鼠焦虑行为的经典行为学测试方法。实验装置包括一个中央平台(10 cm×10 cm),连接两个开放臂(50 cm×10 cm)和两个封闭臂(50 cm×10 cm×40 cm),整体高度距地面100 cm。实验过程中,小鼠被放置

在装置中,自由活动5 min,记录其进入开放臂的次数以及在开放臂内的停留时间。

**三箱社交实验:**三箱社交实验用于评估小鼠的社交偏好及社交记忆能力。实验装置由3个大小相同的矩形室组成,每个室的尺寸为40 cm×40 cm×30 cm。相邻的两个室通过有机玻璃墙隔开,并在墙上开设矩形通道(8 cm×8 cm),允许小鼠自由出入。实验中,使用金属笼隔离1只同性别、同基因型背景,以及年龄相近的陌生小鼠,两侧分别放置1个金属笼。实验分为3个阶段:第1阶段为适应期,小鼠在装置中自由探索10 min;第2阶段评估社交偏好,将1只陌生小鼠(stranger 1)置于一侧的金属笼内,被测小鼠自由探索5 min;第3阶段评估社交记忆,在另一侧金属笼内放入另一只陌生小鼠(stranger 2),小鼠再次探索5 min。通过记录实验小鼠在各阶段于不同区域的停留时间,分析其社交能力。

### 1.2.2 取材与脑组织制备

对实验小鼠进行腹腔注射氯胺酮(80 mg/kg)和甲苯噻嗪(8 mg/kg)进行麻醉,在药物充分发挥作用后,使用0.01 mol/L的磷酸缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)通过心脏灌注,直到肝脏呈现无血色状态。随后,将脑组织收集到EP管中,并立即置于液氮中冷冻,保存于-80 ℃以用于后续的蛋白免疫印迹实验。对于免疫组化和免疫荧光实验,待肝脏无血色后,改用4%PFA溶液继续灌注5 min以固定组织,然后将组织储存在4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)中,在4 ℃下固定12 h。石蜡切片的制备过程包括:将固定后的脑组织在梯度乙醇中脱水,接着用二甲苯和石蜡处理,最终进行石蜡包埋,并使用石蜡切片机制作出5  $\mu$ m厚的连续切片。对于冰冻切片制备,先将固定后的脑组织分别用20%和30%的蔗糖溶液进行梯度脱水处理,再用OCT胶包埋,使用徕卡切片机制作20  $\mu$ m厚的切片。在进行后续操作之前,石蜡切片需要经过烘片和脱蜡处理,而冰冻切片则需在PBS中清洗后贴附于玻片上,晾干后立即进行后续实验步骤。

### 1.2.3 硫磺素-S染色

硫磺素-S是一种标准的荧光染色剂,它能够特异性地结合淀粉样蛋白沉积物。本研究采用硫磺素对A $\beta$ 斑块进行了分析。具体操作为:对脱蜡并水化的组织切片使用0.1%的硫磺素S进行避光染色5 min,接着用流水冲洗5 min,再用70%酒精进行分色处理5 min,最后封片并在荧光显微镜下进行观察和拍摄。

#### 1.2.4 免疫组化染色和免疫荧光染色

石蜡切片在脱蜡水化后,需通过枸橼酸钠修复液微波修复15 min,修复完毕后,脑片在修复液中自然降至室温。冷却后的切片用PBS清洗3次,每次5 min。免疫组化染色时,使用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对清洗后的切片灭活15 min,随后PBS清洗3次,每次5 min。PBS配置的5% BSA封闭1 h后,加入一抗4 ℃孵育过夜。一抗:PSD-95(1:200),SYP(1:800)。次日PBS洗净一抗,加入对应的二抗37 ℃孵育1 h。弃去二抗后PBS清洗切片3次,每次10 min。随后配制DAB显色液避光显色,镜下观察显色情况并控制显色条件一致。显色完成后,PBS清洗切片,经过梯度酒精脱水和二甲苯透明后用中性树脂封片。自然晾干后使用显微镜拍摄。进行免疫荧光染色时,对冷却后清洗完毕的切片直接使用5% BSA封闭1 h,弃去后加入一抗4 ℃孵育过夜。一抗:GFAP(1:200),Iba1(1:200),MBP(1:200)。洗去一抗后加入相应的二抗,室温避光孵育2 h。结束后清洗切片3次,10 min/次,用PBS溶液1:1 000配置的4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对细胞核染色10 min,在PBS清洗后封片。

#### 1.2.5 透射电镜

对麻醉小鼠实施0.01 mol/L PBS灌注,以清除脑组织中的血液,接着使用4% PFA溶液灌注7 min以固定组织。取出脑组织,分离出mPFC区域,并在2.5%戊二醛中于4 ℃条件下进行为期一周的后固定。经PBS清洗后,脑组织在0.5%醋酸铀和75%乙醇溶液中孵育1 h,再依次进行乙醇梯度脱水和环氧丙烷渗透处理后,进行Epon包埋,并在60 ℃温箱中孵育24 h。对Epon包埋组织进行修剪与重新定位,使用超薄切片机制作70 nm厚度的切片。最后,通过FEI Tecnai G2电子显微镜在120 kV的加速电压下观察样品。

#### 1.2.6 蛋白质免疫印迹实验

在冰盒上切取mPFC脑区于EP管中,完全浸没于含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA蛋白裂解液中,加入钢珠后使用匀浆机剧烈匀浆,取出EP管插于冰上摇床快摇30 min使其充分裂解,随后吸出钢珠,以12 000 r/min转速离心15 min,吸取上清液。对于细胞,直接向孔板中加入裂解液,使用细胞刮将细胞收集于EP管中并插入冰上,置于摇床快摇30 min后,以12 000 r/min转速离心15 min,吸取上清液。记录每个样品上清液的体积。使用BCA试剂盒进行蛋白定量,计算浓度,并向剩余蛋

白裂解液中加入上样缓冲液,95 ℃金属浴加热蛋白5 min,冷却后保存于-20 ℃。将20~30 μg蛋白样品加入10%~15%的SDS聚丙烯酰胺凝胶上,首先使用80 V恒压电泳35 min分离蛋白Marker,随后120 V恒压电泳60 min。电泳结束后将凝胶上的蛋白以300 mA恒流转移至PVDF膜上。转膜完成后用5%脱脂奶粉/TBST进行封闭1 h,根据目的蛋白分子量对PVDF膜进行剪裁,与各自一抗在4 ℃孵育过夜。一抗:PSD-95(1:1 000);SYP(1:8 000);MBP(1:1 000)。次日用TBST溶液洗3次,每次10 min,随后将膜与相应辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h后,TBST溶液充分清洗,使用增强型ECL对蛋白印记进行可视化处理。实验中均以GAPDH作为蛋白的内参。

#### 1.3 统计学方法

采用Prism 8.0(GraphPad Software, USA)软件执行统计学分析。数据以均值±标准误( $\bar{x} \pm S_x$ )表示,两组样本数据通过Student's *t*检验进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EE改善5×FAD小鼠的社交行为障碍

为探究EE对AD样病理生理进程的影响,本研究将2月龄的5×FAD小鼠随机分成SE和EE组。饲养4周至3月龄后,进行行为学和病理组织学分析(图1A)。通过Y迷宫实验测试评估各组小鼠的短期空间记忆能力,结果显示,与SE组小鼠相比,给予EE刺激后的小鼠在新奇臂内停留时间和进入次数没有显著增加(图1B)。同时,通过十字高架实验和旷场实验评估小鼠焦虑样表型,结果显示EE组小鼠在十字高架的开放臂内停留时间百分比和进入次数与SE组相比,差异无统计学意义(图1C)。旷场实验也证实EE对其探索活动并无影响,表现为在中心区域停留的时间和进入次数差异无统计学意义(图1D)。

本研究进一步通过三箱实验来探究EE对5×FAD小鼠的社会交往行为的影响。三箱实验结果表明,3月龄的5×FAD小鼠在社会交往能力存在缺陷,表现为在Stranger 1室停留的时间百分比低于Empty室停留的时间百分比;同时也表现为社交记忆的障碍,表现为在Stranger 2室停留的时间百分比低于Stranger 1室停留的时间百分比。EE干预明显改善5×FAD小鼠的社交表现(图1E、F)。综上所述,EE并未对SE-5×FAD小鼠的认知功能和焦虑样

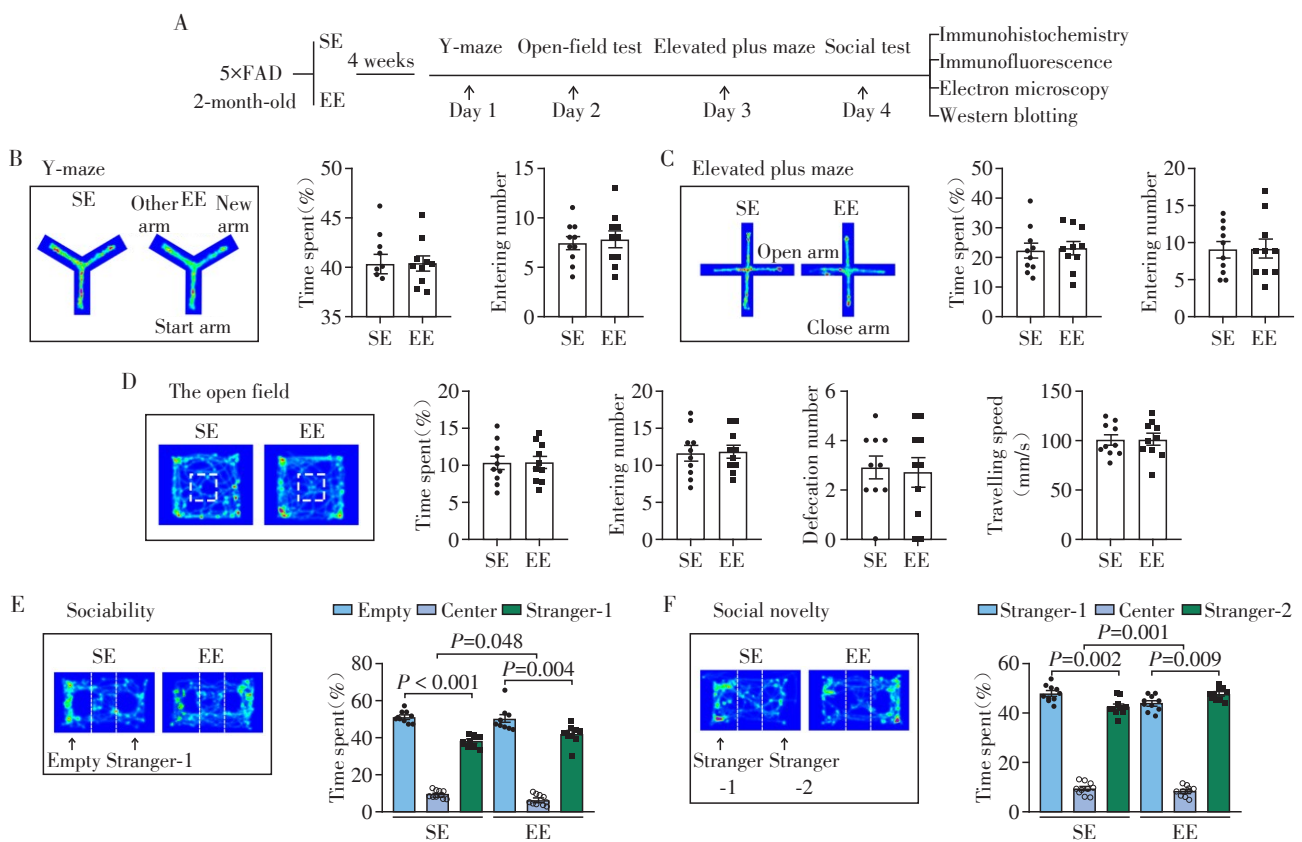
表型产生影响,但是改善了小鼠的社交障碍。

## 2.2 EE改善5×FAD小鼠的Aβ负荷与胶质细胞活化

6E10免疫荧光染色和硫磺素染色结果均显示3月龄的5×FAD小鼠mPFC中已经有Aβ斑块沉积,而EE组Aβ斑块沉积有所改善(图2A~D)。在6E10阳性Aβ斑块周围存在GFAP阳性星形胶质细胞和Iba1阳性的小胶质细胞的分布。与SE组相比,EE组小鼠mPFC中GFAP阳性的星形胶质细胞面积百分比和Iba1阳性的小胶质细胞面积百分比均减少,提示EE降低了5×FAD小鼠mPFC中星形胶质细胞和小胶质细胞的活化(图2E~H)。

## 2.3 EE改善5×FAD小鼠mPFC的髓鞘结构完整性,但未影响突触相关指标

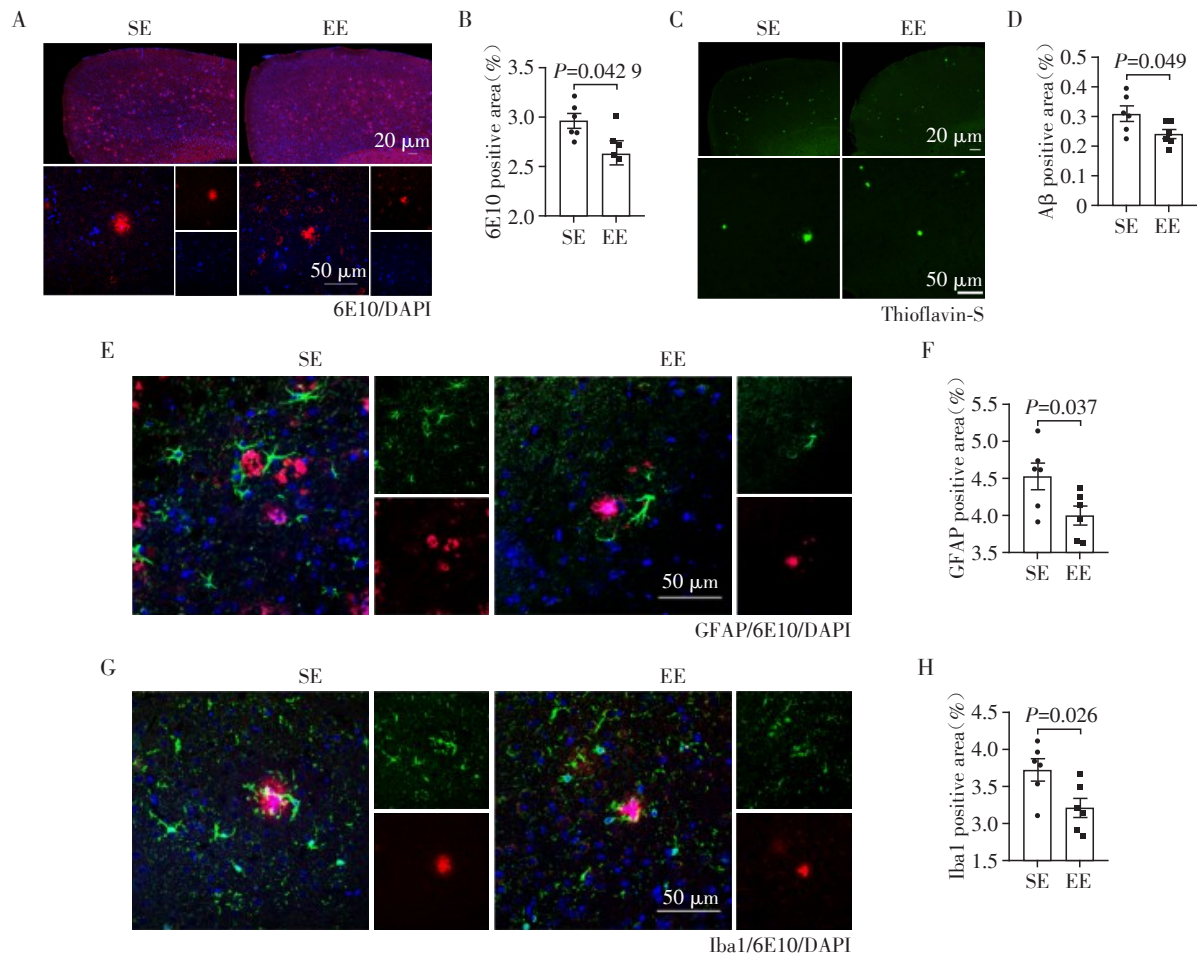
有研究表明,mPFC是识别记忆、情绪调控以及社会行为的调控的关键脑区<sup>[19-20]</sup>。本研究探讨了EE对5×FAD小鼠mPFC神经元数量以及突触的影响。结果显示两组动物mPFC NeuN阳性神经元数量没有显著差异(图3A、B)。PSD-95和SYP的免疫组织化学以及免疫印迹实验证实EE并未影响mPFC突触蛋白的表达和分布(图3C~F,图4A~C)。与此一致,透射电镜与定量分析结果显示EE对5×FAD小鼠mPFC脑区的突触相关指标无显著性影响,两组



A: Schematic diagram of the experimental design. Two-month-old 5×FAD mice were randomly divided into two groups and housed under different conditions for four weeks. Behavioral tests were conducted sequentially: Y-maze test on Day 1, open field test on Day 2, elevated plus maze test on Day 3, and social interaction test on Day 4. Pathological analyses, including immunofluorescence, immunohistochemistry, electron microscopy, and Western blotting, were performed after behavioral assessments. B: On the left is a heatmap of the movement trajectories of the mice during the Y-maze test. On the right are the statistical analyses of the percentage of time spent and the number of entries into the novel arm. C: On the left is a heatmap of the movement trajectories of the mice during the elevated plus maze test. On the right are the statistical analyses of the percentage of time spent and the number of entries into the open arms. D: On the left is a heatmap of the movement trajectories of the mice during the open field test. On the right are the statistical analyses of the percentage of time spent and the number of entries into the central area, fecal pellet counts, and movement speed. E: On the left is a heatmap of the movement trajectories of the mice during the sociability test in the three-chamber social interaction experiment. On the right is the statistical analysis of the percentage of time spent in each chamber during the sociability test. F: On the left is a heatmap of the movement trajectories of the mice during the social memory test in the three-chamber social interaction experiment. On the right is the statistical analysis of the percentage of time spent in each chamber during the social memory test. Compared with the SE group mice (n=10).

图1 EE对5×FAD小鼠的行为影响

Figure 1 Effects of EE on behavioral outcomes in 5×FAD mice



A: Representative immunofluorescence images of 6E10 staining in the mPFC region of mice (scale bars: upper panel, 20 μm; lower panel, 50 μm). B: Percentage of 6E10 positive area in the mPFC region across groups (n=6). C: Thioflavin-S staining images of the mPFC region (scale bars: upper panel, 20 μm; lower panel, 50 μm). D: Percentage of Thioflavin-S positive area in the mPFC region across groups (n=6). E: Immunofluorescence images of GFAP staining in the mPFC region. Scale bar: 50 μm. F: Percentage of GFAP positive area across groups (n=6). G: Immunofluorescence images of Iba1 staining in the mPFC region (scale bar: 50 μm). H: Statistical analysis of the percentage of Iba1-positive area across groups (n=6).

图2 不同饲养条件下小鼠mPFC Aβ沉积和胶质细胞活化

Figure 2 Aβ deposition and activation of glial cells in the mPFC region of mice under different housing conditions

小鼠的突触后密度、突触间隙宽度、活性区长度和突触曲率均无显著性差异(图3G~K)。

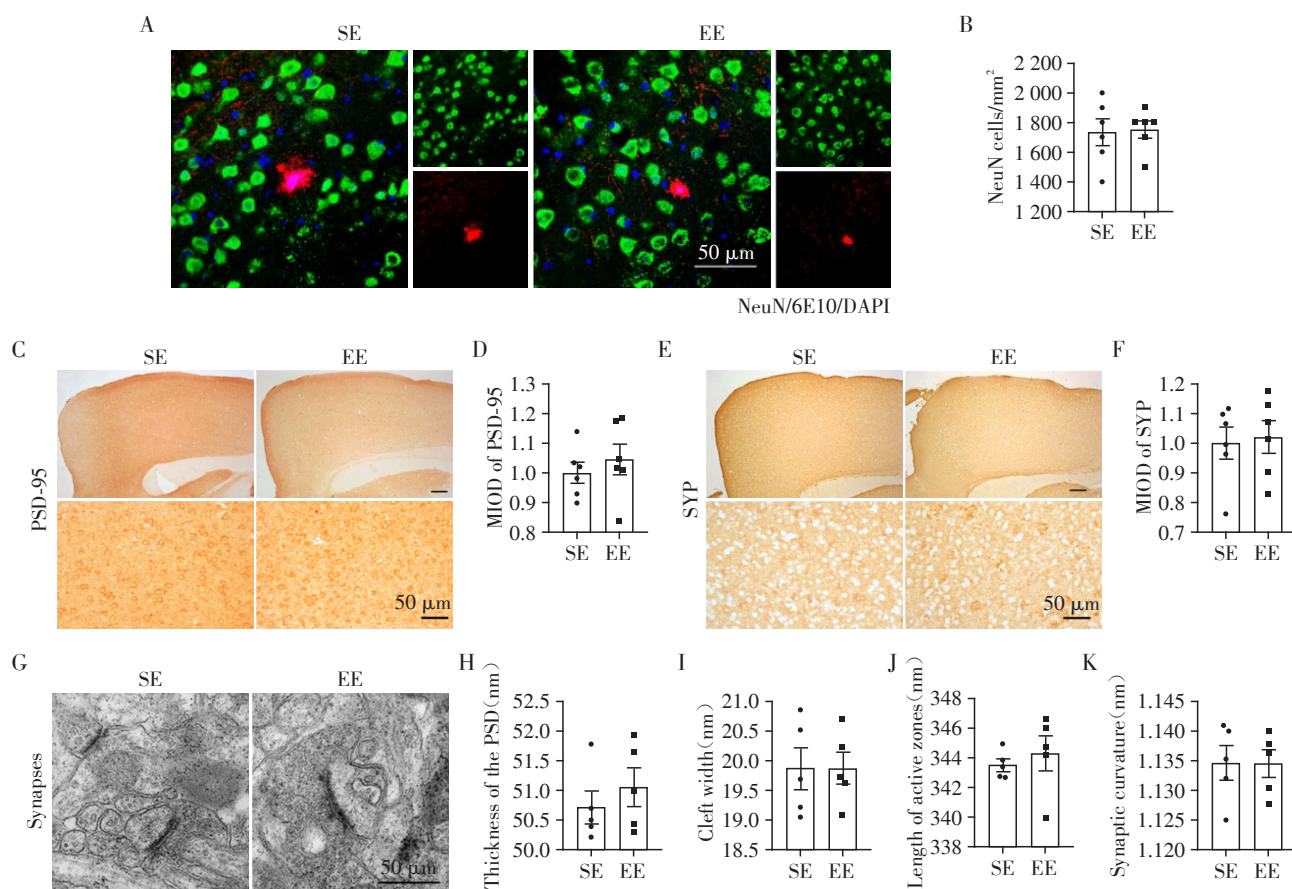
本研究还通过MBP的免疫荧光和免疫印迹实验来检测各组动物mPFC髓鞘化情况。结果表明,EE能够显著改善3月龄5×FAD小鼠在mPFC区域髓鞘化状况,MBP排列更加有序(图5A、B)。此外,EE组小鼠MBP的蛋白表达水平也显著高于SE组(图4A、D)。与此一致,EM结果显示,与SE-5×FAD小鼠相比,EE-5×FAD小鼠髓鞘化明显增加,表现为髓鞘g值减少和少突胶质细胞异染色质增加(图5C~F)。

### 3 讨论

AD在现代社会依然是一个未被完全征服的医

学挑战,其复杂的发病机制至今尚未完全明了<sup>[21]</sup>。目前研究表明,AD是遗传、年龄、环境以及社会行为等多种风险因素综合作用的结果,而健康的生活方式在预防和干预AD方面显示出显著的正面效果<sup>[22]</sup>。本研究旨在探讨EE对5×FAD小鼠早期行为表现及病理变化的影响。研究结果表明,EE显著缓解了3月龄AD小鼠的社交行为障碍。通过病理分析发现,EE不仅改善了小鼠mPFC区域的髓鞘结构完整性,还有效减少了Aβ沉积和胶质细胞的活化水平,尽管它并未明显影响该脑区神经元数量与突触结构的完整性。

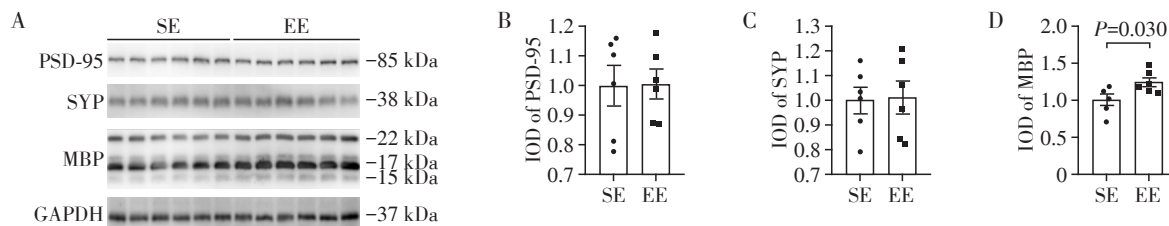
EE作为一种多维度的神经保护策略,在延缓神经退行性疾病进程方面显示出巨大的应用潜力。其作用机制包括多模态感官输入的协同调控,结合



A: Representative immunofluorescence images of the neuronal marker NeuN in the mPFC region of mice (scale bar: 50  $\mu$ m). B: Number of neurons per unit area in the mPFC in different groups of mice ( $n=6$ ). C: Representative immunohistochemical images of PSD-95 in each group of mice (scale bar: 50  $\mu$ m). D: Statistical chart showing the mean integrated optical density (MIOD) of PSD-95 in each group of mice ( $n=6$ ). E: Representative immunohistochemical images of SYP in each group of mice (scale bar: 50  $\mu$ m). F: Statistical chart showing the MIOD of SYP in each group of mice ( $n=6$ ). G: Representative transmission electron microscope images showing synaptic morphology in the mPFC of mice from different groups (scale bar: 500 nm). H-K: Quantification of PSD (H), synaptic cleft width (I), active zone length (J), and synaptic curvature (K) in SE (50 synapses) and EE (50 synapses) groups ( $n=5$  for each group).

图3 EE并未改善5×FAD小鼠mPFC的突触相关指标

Figure 3 EE did not improve synapse-related indicators in the mPFC of 5×FAD mice



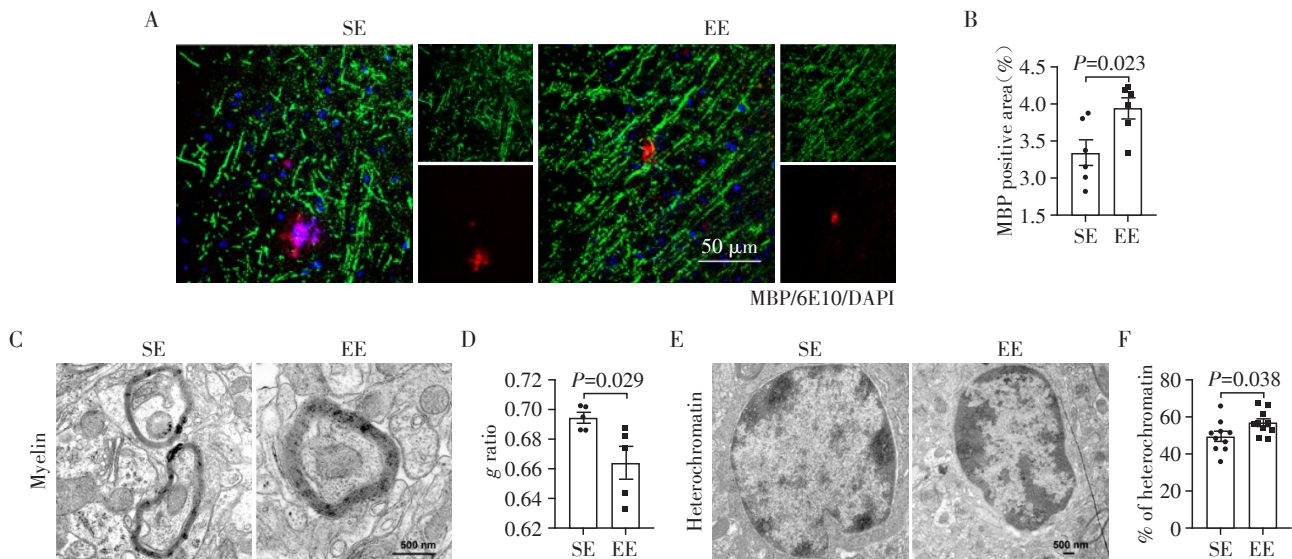
A: Representative Western blot bands of PSD-95, SYP, and MBP in the mPFC of mice from each group. B-D: Statistical analysis of grayscale values of PSD-95 (B), SYP (C), and MBP (D) Western blot bands in the mPFC of each group of mice ( $n=6$ ).

图4 不同饲养条件下突触和髓鞘相关蛋白的表达水平

Figure 4 Expression levels of synapse and myelin-related proteins under different housing conditions

视觉、听觉和嗅觉刺激,能够激活多个脑区的神经网络,增强突触可塑性,并优化情绪调节功能<sup>[23-24]</sup>。这与既往研究发现相一致,即保持积极的生活方式不仅有助于延缓与年龄相关的行为衰退,还能显著降低患AD及其他神经退行性疾病的风险<sup>[25]</sup>。研究

表明,EE能够减轻AD模型小鼠中A $\beta$ 沉积和tau蛋白神经原纤维缠结<sup>[26-27]</sup>;促进脉络丛外泌体的分泌,从而改善认知功能<sup>[9]</sup>。此外,EE还显著增加了新生神经元的数量,提升突触可塑性,进而缓解了记忆缺陷<sup>[28]</sup>。基于这些生物学机制,EE已被广泛纳入



A: Immunofluorescence images of the myelin marker MBP in the mPFC region of mice (scale bar: 50  $\mu$ m). B: Statistical chart showing the percentage area of MBP immunofluorescence signal in the mPFC of each group of mice ( $n=6$ ). C: Representative transmission electron images showing myelin morphology in the mPFC of mice from different groups (scale bar: 500 nm). D: Statistical chart of the mean  $g$ -ratio of myelin in SE (50 axons) and EE (50 axons) groups of mice ( $n=5$ ). E: Representative transmission electron images showing oligodendrocyte nuclear heterochromatin in the mPFC of mice from different groups (scale bar: 500 nm). F: Statistical chart of the mean percentage of nuclear heterochromatin area in oligodendrocyte from SE (10 nuclei) and EE (10 nuclei) groups of mice ( $n=5$ ).

图5 EE改善5x FAD小鼠mPFC的髓鞘形态

Figure 5 EE improved the myelin morphology in the mPFC of 5x FAD mice

AD防治研究的前沿领域。其非侵入性的干预特性为开发协同治疗方案提供了全新的视角和路径<sup>[29]</sup>。本研究进一步支持了EE在调控AD病理网络中的广泛效应,强调了其在改善病理过程及行为功能中的潜在应用价值。

本研究还发现,在社交障碍出现前或疾病早期实施EE干预,能够显著改善5x FAD小鼠的社交能力及相关病理表现。然而,已有文献报道,对于幼龄小鼠进行长期EE干预,尽管可以部分改善5x FAD小鼠的运动功能缺陷,但在降低焦虑水平和恢复工作记忆缺陷方面效果有限,同时对A $\beta$ 沉积、淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)加工及炎症表型的影响并不显著<sup>[30]</sup>。也有研究显示,对8~12月龄的AD转基因小鼠 PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>(TG)进行4个月的EE干预,可降低脑内A $\beta$ 斑块的沉积,改善空间记忆<sup>[26]</sup>。但是,EE对于高龄5x FAD小鼠是否有治疗效应,有待进一步探究。因此,未来的研究可系统比较不同月龄小鼠对EE干预的反应,以明确最佳治疗时间窗。此外,探索将EE与药物或基因治疗联合应用的策略,可能有助于克服EE的局限性,更有效地调控复杂的病理特征。这些研究将为EE在AD防治中的临床转化应用提供重要的理论依据和实践指导。

A $\beta$ 斑块的出现通常是AD最早期的病理改变,随后会触发一系列下游的病理变化。因此,A $\beta$ 的产生与清除机制一直是AD研究的重要关注点<sup>[31]</sup>。本研究发现,EE对A $\beta$ 的沉积具有一定的改善作用,表现为EE显著减轻了5x FAD小鼠mPFC区域的A $\beta$ 沉积。近年来研究表明,髓鞘在A $\beta$ 清除过程中起到重要作用,其功能障碍或脱髓鞘会加剧A $\beta$ 沉积,而健康的髓鞘对A $\beta$ 斑块的形成具有抑制作用<sup>[32-33]</sup>。本研究发现,EE能够显著降低mPFC区域的A $\beta$ 斑块负荷,同时增加MBP的表达,并改善髓鞘结构的完整性,这提示EE可能通过改善髓鞘形态,促进A $\beta$ 的清除。这一发现为进一步探讨EE在AD病理改善中的潜在机制提供了新线索。然而,这一推论仍需更多研究来证实,以揭示髓鞘在A $\beta$ 清除中的具体作用。

研究表明,神经炎症在AD的发展过程中扮演关键角色,其中胶质细胞的激活是神经炎症的一个重要指标<sup>[34]</sup>。本项研究发现,EE显著减少了mPFC区域星形胶质细胞和小胶质细胞的阳性面积,这提示EE可能通过降低神经炎症水平来改善AD的病理进程。此外,小胶质细胞在AD的发生和发展中扮演了多重角色,例如通过吞噬A $\beta$ 和分泌神经营养因子来减缓疾病进程,从而延缓症状的出现<sup>[35]</sup>。基

于这一机制,本研究推测,EE可能通过调节小胶质细胞的吞噬功能,进一步减少了mPFC区域的A $\beta$ 负荷。小胶质细胞的激活状态及其在A $\beta$ 清除中的作用,仍然是AD研究中的一个重要课题,未来研究有望进一步揭示EE在这一过程中的具体调控机制。

社会行为不仅是维系社会正常运作的基石,也是推动个体及群体健康发展的关键因素<sup>[36]</sup>。值得注意的是,AD患者在疾病初期就表现出渐进性的社交回避行为,这包括社交动机的减退和社会情境适应性的下降。这种变化不仅进一步削弱了患者的社交能力,还形成了恶性循环,加速了疾病进展<sup>[37]</sup>。包括本实验室在内的多项研究表明,社会性群居生活对于髓鞘的形成及其长期维持至关重要。同时,高级脑功能的实现,如社交互动与合作,也高度依赖髓鞘的正常可塑性<sup>[38]</sup>。本研究结果显示,EE组小鼠在mPFC区域的髓鞘化水平显著提升,提示环境丰富化可能通过改善髓鞘结构,从而缓解与AD相关的社交障碍。这一发现进一步表明,在AD的防治过程中,维持患者既有的社会关系并增加社交互动,可能是延缓病情进展和改善生活质量的重要策略。

mPFC不仅在认知与决策过程中起着至关重要的作用,还参与社交行为和社会互动的调节<sup>[10,39-41]</sup>。研究表明在自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)模型小鼠中,mPFC髓鞘形成的改善对社交互动的提升具有重要作用<sup>[42]</sup>。此外,改变精神分裂症患者mPFC中神经递质的产生,会导致社会行为障碍<sup>[43]</sup>。本研究发现EE组小鼠社会行为明显改善,伴随着mPFC中神经炎症反应减轻,A $\beta$ 沉积显著减少,以及髓鞘化水平恢复。这些病理改善进一步表明,mPFC在调控社交行为方面的关键作用,并强调mPFC在应对社会环境刺激中的显著可塑性。由此推测,mPFC是改善AD相关社交行为缺陷疾病中的关键脑区。

值得注意的是,本研究发现EE并未显著提升mPFC区域的突触蛋白表达和突触超微结构。这可能是因为在AD早期阶段,突触可塑性仍然存在,突触损伤尚未达到不可逆的程度。这一发现进一步证实了髓鞘损伤可能先于突触丧失,是AD早期的主要病理特征,并为临床诊断和治疗提供了一个关键的干预时间窗口<sup>[44]</sup>。然而,EE对认知功能和突触结构恢复的有限效果也暗示,单一的行为干预手段在应对AD时可能具有局限性。因此,未来研究可以探索将EE与药物治疗、基因干预或细胞治疗相

结合的方法,以期提高综合治疗效果。此外,EE干预的最佳时机、持续时间以及刺激内容的多样性可能对效果产生显著影响,这些变量需要进一步的系统评估和优化。

综上所述,本研究揭示了EE通过髓鞘保护改善AD社交障碍的新机制,并通过抑制胶质细胞的活化及减少A $\beta$ 沉积来发挥潜在的神经保护作用。这一发现为探索生活方式干预与髓鞘功能的关系提供了新视角,并强调了EE在调控神经行为和病理中的潜在价值,为AD的早期干预策略提供了重要的理论依据和实践参考。

#### 利益冲突声明:

我们声明,肖明作为通讯作者之一,担任本期刊副主编,未参与本文的评审与决策。审稿遵循双盲原则,所有编辑决策由独立编辑和审稿人完成,确保评审公正透明。

#### Conflict of Interests:

We declare that XIAO Ming, as one of the corresponding authors and the associate editor-in-chief of this journal, did not participate in the review or decision-making of this article. The review process followed a double-blind principle, and all editorial decisions were made by independent editors and reviewers, ensuring fairness and transparency in the review process.

#### 作者贡献声明:

王乙淼、王泽和余雨竹进行了实验与数据分析;王乙淼负责论文撰写;肖明与张艳丽负责研究方向指导与论文修改。

#### Author's Contributions:

WANG Yimiao, WANG Ze, and SHE Yuzhu performed the experiments and data analysis; WANG Yimiao wrote the initial draft of the manuscript; XIAO Ming and ZHANG Yanli were responsible for research direction guidance and paper revision.

#### 参考文献

- [1] ABEYSINGHE A T, DESHAPRIYA R S, UDAWATTE C. Alzheimer's disease: a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117996
- [2] PORCELLI S, VAN DER WEE N, VAN DER WERFF S, et al. Social brain, social dysfunction and social withdrawal [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 97: 10-33
- [3] CUMMINGS J L, ZHOU Y, VAN STONE A, et al. Drug repurposing for Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders [J]. *Nat Commun*. 2025, 16(1): 1755
- [4] BEATA B K, WOJCIECH J, JOHANNES K, et al. Alzheimer's disease - biochemical and psychological background for diagnosis and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1059
- [5] DE LA ROSA A, OLASO-GONZALEZ G, ARC-CHAGN-

- AUD C, et al. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease[J]. *J Sport Health Sci*, 2020, 9(5): 394-404
- [6] ORNISH D, MADISON C, KIVIPELTO M, et al. Effects of intensive lifestyle changes on the progression of mild cognitive impairment or early dementia due to Alzheimer's disease: a randomized, controlled clinical trial [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2024, 16(1): 122
- [7] ISHIWARI K, KING C P, MARTIN C D, et al. Environmental enrichment promotes adaptive responding during tests of behavioral regulation in male heterogeneous stock rats[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 4182
- [8] CAO M, HU P P, ZHANG Y L, et al. Enriched physical environment reverses spatial cognitive impairment of socially isolated APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice before amyloidosis onset[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(3): 202-211
- [9] NAKANO M, KUBOTA K, HASHIZUME S, et al. An enriched environment prevents cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by enhancing the secretion of exosomal microRNA - 146a from the choroid plexus [J]. *Brain Behav Immun Health*, 2020, 9: 100149
- [10] LI M, WANG S Z, ZHAO Y B, et al. Rac1 in parvalbumin neurons of the medial prefrontal cortex governs rapid forgetting of social memory [J]. *Mol Psychiatry*, 2025, 30(8): 3740-3751
- [11] PENG J Z, TANG Q, LI Y L, et al. Neuromorphic deviations associated with transcriptomic expression and specific cell type in Alzheimer's disease[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 7460
- [12] MISRANI A, TABASSUM S, HUO Q W, et al. Mitochondrial deficits with neural and social damage in early-stage Alzheimer's disease model mice[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 748388
- [13] NACHTIGALL E G, DE FREITAS J D R, MARCONDES L A, et al. Memory persistence induced by environmental enrichment is dependent on different brain structures [J]. *Physiol Behav*, 2023, 272: 114375
- [14] DARNA M, BECKMANN J S, GIPSON C D, et al. Effect of environmental enrichment on dopamine and serotonin transporters and glutamate neurotransmission in medial prefrontal and orbitofrontal cortex [J]. *Brain Res*, 2015, 1599: 115-125
- [15] KEMPERMANN G, LOPES J B, ZOCHER S, et al. The individuality paradigm: automated longitudinal activity tracking of large cohorts of genetically identical mice in an enriched environment [J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 175: 105916
- [16] OAKLEY H, COLE S L, LOGAN S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(40): 10129-10140
- [17] LOCCI A, ORELLANA H, RODRIGUEZ G, et al. Comparison of memory, affective behavior, and neuropathology in APP<sup>MLGF</sup> knock-in mice to 5x FAD and APP/PS1 mice [J]. *Behav Brain Res*, 2021, 404: 113192
- [18] KOSEL F, TORRES MUNOZ P, YANG J R, et al. Age-related changes in social behaviours in the 5x FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 362: 160-172
- [19] MENON V, D'ESPOSITO M. The role of PFC networks in cognitive control and executive function [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2022, 47(1): 90-103
- [20] KLUNE C B, JIN B, DENARDO L A. Linking mPFC circuit maturation to the developmental regulation of emotional memory and cognitive flexibility [J]. *Elife*, 2021, 10: e64567
- [21] YANG Y, QIU L. Research progress on the pathogenesis, diagnosis, and drug therapy of Alzheimer's disease [J]. *Brain Sci*. 2024, 14(6): 590
- [22] ZHANG X X, TIAN Y, WANG Z T, et al. The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention [J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2021, 8(3): 313-321
- [23] TAI L W, YEUNG S C, CHEUNG C W. Enriched environment and effects on neuropathic pain: experimental findings and mechanisms [J]. *Pain Pract*, 2018, 18(8): 1068-1082
- [24] LAMBERT K, HYER M, BARDI M, et al. Natural-enriched environments lead to enhanced environmental engagement and altered neurobiological resilience [J]. *Neuroscience*, 2016, 330: 386-394
- [25] PARAMBATH S K, KRISHNA N, KRISHNAMURTHY R G. Environmental enrichment: a neurostimulatory approach to aging and ischemic stroke recovery and rehabilitation [J]. *Biogerontology*, 2025, 26(3): 92
- [26] BALTHAZAR J, SCHÖWE N M, CIPOLLI G C, et al. Enriched environment significantly reduced senile plaques in a transgenic mice model of Alzheimer's disease, improving memory [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 288
- [27] MATE V, SMOLEK T, KAZMEROVA Z V, et al. Enriched environment ameliorates propagation of tau pathology and improves cognition in rat model of tauopathy [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 935973
- [28] ZHANG X Q, WEI X J, MEI Y F, et al. Modulating adult

- neurogenesis affects synaptic plasticity and cognitive functions in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(12): 3005-3019
- [29] MERCERÓN-MARTÍNEZ D, IBACETA-GONZÁLEZ C, SALAZAR C, et al. Alzheimer's disease, neural plasticity, and functional recovery [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 82(s1): S37-S50
- [30] HÜTTENRAUCH M, WALTER S, KAUFMANN M, et al. Limited effects of prolonged environmental enrichment on the pathology of 5×FAD mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 6542-6555
- [31] PICHET BINETTE A, GAITERI C, WENNSTRÖM M, et al. Proteomic changes in Alzheimer's disease associated with progressive A $\beta$  plaque and tau tangle pathologies [J]. *Nat Neurosci*, 2024, 27(10): 1880-1891
- [32] WOOD H. Myelin damage links brain ageing to amyloid- $\beta$  deposition [J]. *Nat Rev Neurol*, 2023, 19(8): 457
- [33] DEPP C, SUN T, SASMITA A O, et al. Myelin dysfunction drives amyloid- $\beta$  deposition in models of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2023, 618(7964): 349-357
- [34] LENG F D, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172
- [35] MERIGHI S, NIGRO M, TRAVAGLI A, et al. Microglia and Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12990
- [36] OKABE-MIYAMOTO K, WALSH L C, OZER D J, et al. Measuring the experience of social connection within specific social interactions: the Connection During Conversations Scale (CDCS) [J]. *PLoS One*, 2024, 19(1): e0286408
- [37] SARIS I M J, AGHAJANI M, JONGS N, et al. Cross-disorder and disorder-specific deficits in social functioning among schizophrenia and Alzheimer's disease patients [J]. *PLoS One*, 2022, 17(4): e0263769
- [38] ZHANG Y L, FENG W X, WANG Z, et al. Early growth response 2 in the mPFC regulates mouse social and cooperative behaviors [J]. *Lab Anim(NY)*, 2023, 52(2): 37-50
- [39] JOBSON D D, HASE Y, CLARKSON A N, et al. The role of the medial prefrontal cortex in cognition, ageing and dementia [J]. *Brain Commun*, 2021, 3(3): fcab125
- [40] CHEN H, XIONG X X, JIN S Y, et al. Dopamine D2 receptors in pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex regulate social behavior [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 199: 107042
- [41] CANDEMIR E, FATTAKHOV N, LEARY A O, et al. Disrupting the nNOS/NOS1AP interaction in the medial prefrontal cortex impairs social recognition and spatial working memory in mice [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2023, 67: 66-79
- [42] MAKINODAN M, OKUMURA K, IKAWA D, et al. Effects of cross-rearing with social peers on myelination in the medial prefrontal cortex of a mouse model with autism spectrum disorder [J]. *Heliyon*, 2017, 3(11): e00468
- [43] EISINGER B E, DRIESSEN T M, ZHAO C J, et al. Medial prefrontal cortex: genes linked to bipolar disorder and schizophrenia have altered expression in the highly social maternal phenotype [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8: 110
- [44] PAPUĆ E, REJDAK K. The role of myelin damage in Alzheimer's disease pathology [J]. *Arch Med Sci*, 2020, 16(2): 345-351

[收稿日期] 2025-04-11

(本文编辑:戴王娟)

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆  
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询  
稿件审理情况。