

MEOX2 基因与阿尔兹海默病神经血管功能失调的相关性研究

何 倩, 常怡然, 旷 喜*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的脑退行性疾病。目前临床上极度缺乏预防及治疗 AD 的有效药物。同源盒 *MEOX2* 基因又称为 *GAX* 基因, 主要在心血管系统中高表达, 对血管的分化和血管的生成起多方面作用, 本课题旨在研究 *MEOX2* 基因与 AD 疾病中神经血管功能失调的相关性, 为 AD 疾病的治疗寻找新的思路。本实验通过双侧侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 建立 AD 大鼠模型, 应用 Morris 水迷宫、免疫组织化学染色、生化检测、免疫印迹 (Western blot) 及实时定量 PCR 等方法检测指标进行研究。实验动物饲养及处理均符合中国实验动物伦理学要求。实验结果表明, 与对照组相比, AD 模型组大鼠有明显的认知功能障碍, 伴随着脑内和血清中 $A\beta$ 的增加、脑内星形胶质指标纤维酸性蛋白 (GFAP)、小胶质细胞指标同种异体炎性因子 1 (AIF1)、内皮一氧化氮合酶 (eNOS) 表达的增加和特异性神经元烯醇酶 (NSE)、突触素 (SYN)、血管功能变化指标 CD34、血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的减少, 内皮素 (ET) 浓度增加, 一氧化氮 (NO) 浓度降低。此外, 在 AD 模型大鼠脑内 *MEOX2* 和低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP-1) 减少, 晚期糖基化末端产物受体 (RAGE) 表达增加, 表明 $A\beta$ 诱导的大鼠 AD 模型中神经血管功能失调可能与 *MEOX2* 的降低有关。同时, *MEOX2* 基因的作用与 $A\beta$ 转运受体 LRP-1 和 RAGE 水平的变化存在一定的相关性。

关键词: *MEOX2*; 神经血管功能障碍; 阿尔兹海默病; 低密度脂蛋白受体相关蛋白 1; 晚期糖基化末端产物受体

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2057-07

The relationship of *MEOX2* and neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease model

HE Qian, CHANG Yi-ran, KUANG Xi*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Present study investigated the role of mesenchyme homeobox 2 (*MEOX2*) gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease (AD) model rats by bilateral intracerebroventricular injection of $A\beta_{1-42}$. One week after surgery, Morris water maze, immunohistochemistry, biochemical detection, Western blot and real-time PCR were used to detect the indexes. The animal studies were conducted in accordance with the Regulations of Experimental Animal Administration issued by the State Committee of Science and Technology of the People's Republic of China. Compared to the Sham-operated rats, $A\beta_{1-42}$ -operated rats showed obviously cognitive dysfunction, accompanied by increased $A\beta$, glial fibrillary acidic protein (GFAP), allograft inflammatory factor 1 (AIF1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and decreased neuron specific enolase (NSE), synaptophysin (SYN), CD34, vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions of brain. $A\beta_{1-42}$ -operated rats also increased the endothelin (ET) level and decreased nitric oxide (NO) level in brain tissue. Moreover, *MEOX2*

收稿日期: 2018-07-10; 修回日期: 2018-08-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202540).

*通讯作者 Tel / Fax: 18908190075, E-mail: kuangxi56@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0633

expression was decreased correlated with low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) decreasing and receptor for advanced glycation end products (RAGE) increasing in brain tissues of AD model rats. We found the correlation between *MEOX2* gene expression and neurovascular dysfunction, in addition, the decreased *MEOX2* may involve in increasing the accumulation of $A\beta$ in brain by relating to the decreased LRP-1 and increased RAGE which is located in blood-brain barrier (BBB) in senescence-accelerated mice.

Key words: mesenchyme homeobox 2; neurovascular dysfunction; Alzheimer's disease; low density lipoprotein receptor-related protein 1; receptor for advanced glycation end products

阿尔兹海默病 (AD) 是一种以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的脑退行性疾病^[1]。目前对 AD 病因和发病机制的研究仍未完全清楚, 临床上极度缺乏预防及治疗 AD 的有效药物。传统观点认为脑内淀粉样蛋白 $A\beta$ 沉积是 AD 病理的始发及核心因素, 淀粉样蛋白假说主导阿尔茨海默病研究 20 多年, 但是在反复的临床试验中, 通过干扰 $A\beta$ 产生, 或减少 $A\beta$ 沉积都并没有得到好的临床试验效果。近年来一系列报道提出, 引起 AD 疾病的病因不仅是胆碱能神经元的损失或 $A\beta$ 产生过多, 还包括着脑血管功能障碍导致的慢性脑灌注不足^[2]。AD 血管因素概念是基于 AD 病理过程中代谢降低, 记忆功能障碍和神经退行性等一系列的异常病变所提出的^[3]。血管性损伤不仅在 AD 疾病中存在, 甚至更早于传统意义上的 AD 病理损伤^[4, 5]。目前这个假说在分子水平和细胞水平研究较少且未有明确的机制, 但脑血管系统的变化确实可能会造成认知能力下降, 同时增加 $A\beta$ 在脑和脑血管中的累积, 从而影响慢性神经退行性疾病的病理发展。

同源盒 *MEOX2* 基因又称为 *GAX* 基因, 主要在心血管系统中高表达, 对血管的分化和血管的生成起多方面作用^[6]。目前在国内外未见以血管性因素的角度探讨 *MEOX2* 基因在 AD 动物模型中作用的报道。本文拟从 AD 疾病中微血管系统损伤的角度, 研究 *MEOX2* 基因在 AD 疾病中的作用及其可能机制, 为 AD 疾病的治疗寻找新的思路。

材料与方法

实验动物 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体重 300~330 g, 购自于四川省中医药科学院中医研究所, 合格证号: SYXK (川) 2008-057。常规饲养, 饲养环境温度维持在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度 50%~70%, 12 h/12 h 昼夜节律, 自由摄食饮水。实验动物饲养及处理均符合中国实验动物伦理学要求, 相关操作均符合四川大学动物研究委员会标准。

材料与试剂 淀粉样蛋白 $A\beta_{1-42}$ (Sigma 公司); 一氧

化氮 (NO) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 大鼠内皮素 (ET-1)、 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司); Revert First Synthesis Kit (Thermo Scientific 公司); Ssofast EvaGreen SuperMix (Bio-Rad 公司); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物科技有限公司)。

$A\beta_{1-42}$ 单体聚化 用无菌生理盐水将 $A\beta_{1-42}$ 粉末状单体配制为溶液, 终质量浓度 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。置于 37°C 孵育 72 h 后存放于 4°C 备用。

实验动物分组及 AD 模型建立 实验大鼠随机分为两组, 对照组和模型组, 每组 12 只。将大鼠麻醉后固定于大鼠脑立体定位仪进行注射定位 (前囟后 0.8 mm, 中线左右旁开 1.5 mm, 硬膜下 3.5 mm), 钻开颅骨使用微量注射器注射。模型组每侧注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体 (质量浓度 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) $5\ \mu\text{L}$; 对照组每侧注射生理盐水 $5\ \mu\text{L}$ 。注射完毕后留针 5 min 后缓慢退针, 骨蜡封闭, 局部消毒后缝合头皮, 术后保温至动物清醒, 常规饲养。

Morris 水迷宫实验 在术后 1 周进行 Morris 水迷宫行为学实验。实验分为隐平台实验和空间探索实验。隐平台实验: 将大鼠随机从不同象限面壁置入池内, 每只动物每天 4 个不同方位各训练 1 次, 记录大鼠找到平台的时间即为潜伏期, 最长记录时间为 120 s, 用以评价大鼠的空间学习能力。空间探索实验: 在第 4 天隐平台实验结束后的 2 h, 撤去平台进行空间探索实验, 将大鼠从平台所在象限的对侧象限入水, 计时 120 s, 记录大鼠在靶象限 (原平台所在象限) 活动时间^[7], 用以评价大鼠的空间记忆能力。

标本采集 动物行为学测试结束后, 麻醉大鼠, 每组取 8 只用预冷的生理盐水灌流, 取出大脑用液氮急冻, 置于 -80°C 保存, 用于 Western blot 及试剂盒的测定。每组其余 4 只用预冷的生理盐水灌流后, 再用 4% 多聚甲醛溶液灌流, 取出大脑, 用 4% 甲醛固定 24~48 h, 从大脑前囟前 2 mm 到前囟后 3 mm 的

冠状脑组织, 石蜡包埋, 制作厚度约 5 μm 的脑部冠状切片, 用于免疫组化染色。

免疫组化染色 采用 SABC 法对动物脑组织切片进行免疫组化显色。每组 4 只动物, 每只动物取 3 张切片。所用一抗浓度见表 1。染色结束后, 用显微图像采集系统进行图像采集, 并采用图象处理与分析系统对阳性表达进行累积光密度 (IOD) 分析, 每张切片同一区域中, 随机选取 3 个视野, 检测面积相同, 取其平均值作为该切片目标区域的 IOD 值。

Table 1 Primary antibodies. NSE: Neuron specific enolase; SYN: Synaptophysin; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; AIF1: Allograft inflammatory factor 1; VEGF: Vascular endothelial growth factor; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; LRP-1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1; RAGE: Receptor for advanced glycation end products

Antibody	Host	Application	Dilution	Source
NSE	Rabbit	IHC	1 : 100	Boster, China
SYN	Mouse	IHC	1 : 100	Santa Cruz, USA
GFAP	Rabbit	IHC	1 : 100	Boster, China
AIF1	Rabbit	IHC	1 : 100	Bioss, China
CD34	Rabbit	IHC	1 : 100	Boster, China
$A\beta_{1-42}$	Rabbit	IHC	1 : 50	Bioss, China
VEGF	Rabbit	IHC	1 : 50	Boster, China
eNOS	Rabbit	IHC	1 : 100	Bioss, China
MEOX2	Rabbit	WB	1 : 500	Bioss, China
LRP-1	Rabbit	WB	1 : 20 000	Abcam, UK
RAGE	Goat	WB	1 : 400	Santa Cruz, USA
β -Actin	Mouse	WB	1 : 1 000	Santa Cruz, USA

比色法与 ELISA 法测定 按照试剂盒说明书操作方法进行动物脑组织匀浆液 NO、ET-1 浓度及血清

中 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 含量的检测。 $A\beta_{\text{total}}$ 为 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 两者之和^[8]。

Real-time PCR 检测 用 Trizol 从大鼠脑组织中分离总 RNA, 并逆转录为 cDNA, 随后进行 qPCR 反应。特异性引物序列见表 2。MEOX2、低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP-1)、晚期糖基化末端产物受体 (RAGE) 水平归一化为 GAPDH。结果表示为使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法相对于空白对照组的阈循环 (Ct) 值的倍数变化。

Western blot 检测 常规提取动物脑组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 定量后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用相关抗体进行 Western blot 检测。所用一抗浓度见表 1。使用 ECL 化学发光试剂盒进行显影分析, 并用 Gel Pro Analyzer 6.0 测定每条带的 OD 值。对免疫印迹结果进行定量分析, 并表示为各组相对于对照组的比值。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验结果用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 水迷宫实验潜伏期采用 two-way ANOVA 分析, 其余组间比较采用成对 t 检验分析的方法进行, 显著性结果以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示。

结果

1 AD 大鼠认知功能障碍

水迷宫实验是检测动物学习记忆功能的经典实验^[9], 实验可分为隐匿平台实验和探索实验两个阶段。如图 1 所示, $A\beta$ 诱导的 AD 大鼠模型具有明显的认知功能障碍, 表现为在隐匿平台实验阶段, 对照组

Table 2 The primer sequence of real time-PCR

Gene	Primer sequence forward (5'-3')	Primer sequence reverse (5'-3')
MEOX2	GCTCAGGACTGGGATTAG	GCTCAGGACTGGGATTAG
LRP-1	AGCACCCGACAGACCACA	CCACAAAGTAGAAGTTCCAGT
RAGE	CTACCGAGTCCGAGTCTACC	CTTCAGGCTCAACCAACAG
β -Actin	GTAAGACCTCTATGCCAACA	GGACTCATCGTACTCTGCT

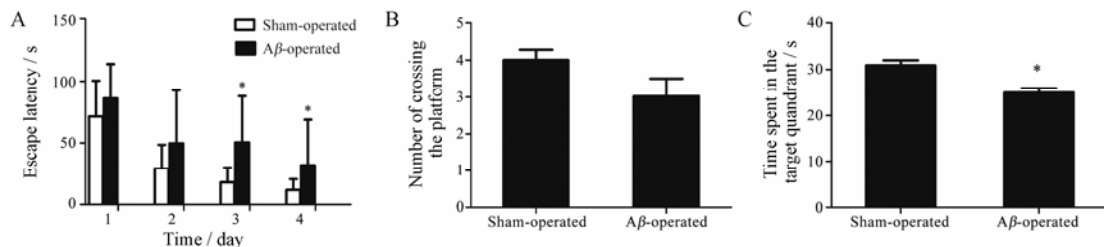


Figure 1 Cognitive impairment showed in Alzheimer's disease (AD) rat model induced by bilateral intracerebroventricular injections of $A\beta_{1-42}$. The mean latency time (A) during the hidden-platform test and the number of crossing the platform (B) and the time spent in the target quadrant (C) during the probe test are shown. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs Sham-operated group

和模型组动物找到平台的时间随着训练天数的增加都有所减低。在训练期的前两天两组间没有显著差异,到第3天观察到两组之间具有显著性差异 ($P < 0.05$, 图 1A)。在空间探索阶段,与对照组相比,模型组穿越平台的次数较少,无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 1B),但在靶象限活动的时间明显降低 ($P < 0.05$, 图 1C)。结果说明,模型组动物出现了明显的行为学障碍,模型建立成功。

2 AD 大鼠 A β 沉积

脑中淀粉样蛋白的异常沉积是 AD 疾病的典型病理特征,被认为是 AD 病理机制的中心环节。异常沉积的 A β 淀粉样蛋白诱发包括氧化、炎症、细胞凋亡等在内的级联反应,从而促进疾病的发生发展。如图 2 所示,与对照组相比,模型组大鼠脑皮层中 A β_{1-42} 阳性表达明显增加 ($P < 0.01$) (图 2A、B),可见 A β 沉积形成的斑块;且模型组大鼠血清中 A β_{1-40} 、A β_{1-42} 及 A β_{total} 均明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 2C)。模型组

动物脑内淀粉样蛋白的异常沉积,与行为学功能的障碍结果一致。

3 AD 大鼠神经病理改变与胶质细胞活化

AD 疾病中神经元细胞的损伤和胶质细胞的异常活化均为疾病的病理特征。神经元细胞的损伤与学习记忆功能的障碍关系密切;胶质细胞的活化引起炎症介质的释放,导致炎症反应的发生。如图 3 所示,与对照组相比,模型组大鼠出现了明显的神经元损伤刺激的胶质细胞活化以及突触功能障碍,表现为脑内皮质区特异性神经元烯醇酶 (NSE) 明显降低 ($P < 0.05$) (图 3A、C),脑内星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 和小胶质细胞标记物同种异体炎症因子 1 (AIF1) 显著增加 ($P < 0.05$) (图 3A、D),海马区突触素 (SYN) 明显降低 ($P < 0.01$) (图 3B、E)。以上结果说明,脑部定位注射淀粉样蛋白造成模型组动物神经元细胞的损伤并诱导胶质细胞引起的炎症反应。

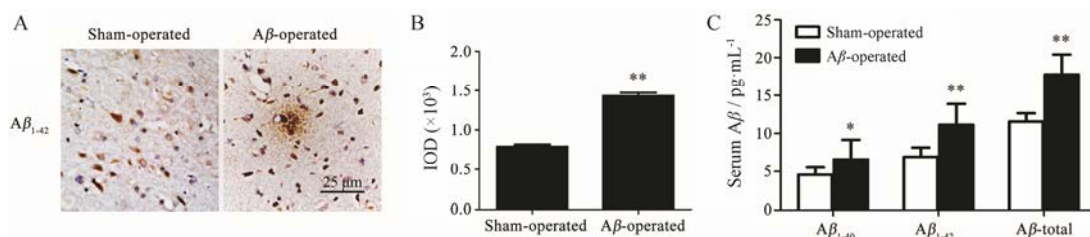


Figure 2 Accumulation of A β burden in brain showed in AD rat model induced by bilateral intracerebroventricular injections of A β_{1-42} . A: Representative immunostaining of A β_{1-42} and NSE staining in the cerebral cortex areas ($\times 400$ magnification); B: Quantification of the immunohistochemical analysis based on the IOD of the protein immunostaining per field using Image Pro Plus 6.0; C: A β (A β_{40} , A β_{42} and A β_{total}) levels in the serum were assayed by ELISA. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$ (exception of $n = 4$ in A and B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham-operated group

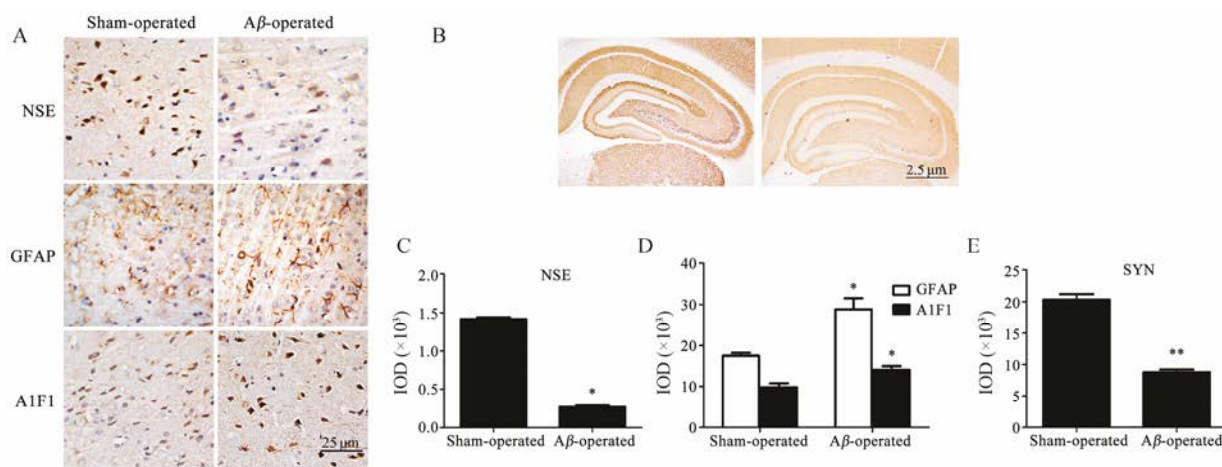


Figure 3 Neuropathological changes showed in AD rat model induced by bilateral intracerebroventricular injections of A β_{1-42} . A: Representative immunostaining of NSE, GFAP and AIF1 staining in the cerebral cortex areas ($\times 400$ magnification); B: Representative immunostaining of SYN staining in the hippocampus areas ($\times 40$ magnification); C-E: Quantification of the immunohistochemical analysis based on the IOD of the protein immunostaining per field using Image Pro Plus 6.0. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham-operated group

4 AD 大鼠脑血管功能障碍

近年来的研究指出,引起 AD 疾病的病因不仅仅是 $A\beta$ 异常沉积,还包括脑血管功能障碍导致的慢性脑灌注不足。如图 4 所示,与对照组相比,模型组大鼠出现了明显的脑内血管内皮稳态失衡,毛细血管密度降低,血管功能异常,表现为模型组大鼠脑皮层中 CD34、血管内皮生长因子 (VEGF) 表达明显降低 ($P < 0.05$),内皮一氧化氮合酶 (eNOS) 表达明显增加 ($P < 0.01$),脑组织中内皮素 (ET) 含量明显增加 ($P < 0.05$),一氧化氮 (NO) 含量明显降低 ($P < 0.05$)。说明在 AD 疾病过程中,血管性损伤包括新生血管生

成以及血管内皮功能障碍的存在。

5 AD 大鼠中 *MEOX2*、LRP-1 及 RAGE 表达

为研究 *MEOX2* 基因与 AD 疾病发生的相关性,本研究检测了动物脑部 *MEOX2* 的水平以及 $A\beta$ 转运受体 LRP-1 和 RAGE 的表达。如图 5 所示,免疫印迹和实时 PCR 分析结果显示,与对照组相比,模型组大鼠脑内 *MEOX2* 和 LRP-1 表达减少 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),RAGE 表达增加 ($P < 0.05$)。上述结果表明, $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 大鼠模型动物脑部 *MEOX2* 基因水平降低, $A\beta$ 转运受体 LRP-1 升高而 RAGE 降低,这两者之间可能具有相关性,其中的机制需要进一步

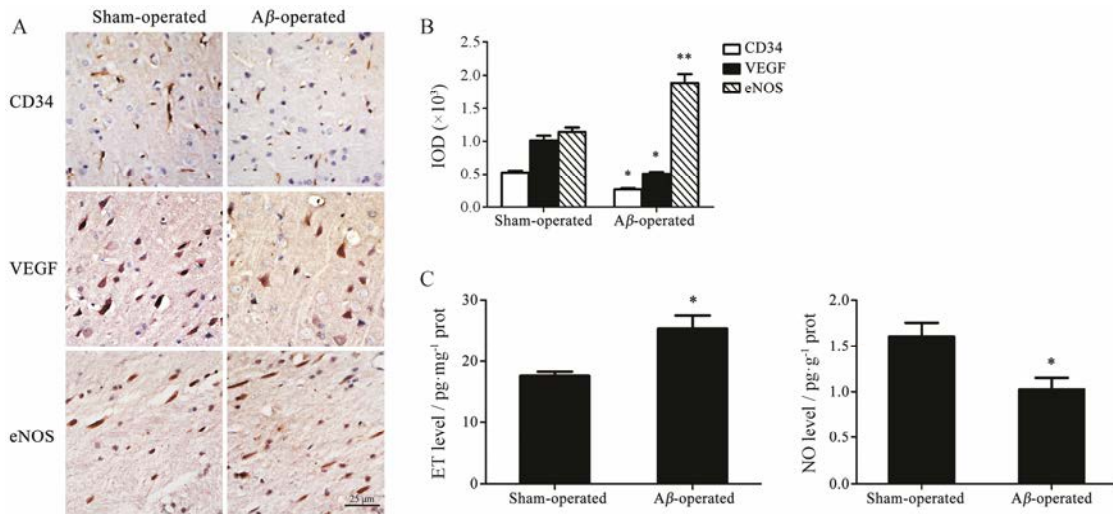


Figure 4 Cerebrovascular dysfunction showed in AD rat model induced by bilateral intracerebroventricular injections of $A\beta_{1-42}$. A: Representative immunostaining of CD34, VEGF and eNOS staining in the cerebral cortex areas ($\times 400$ magnification); B: Quantification of the immunohistochemical analysis based on the IOD of the protein immunostaining per field using Image Pro Plus 6.0; C: ET level in brain tissues were assayed by ELISA and NO level were obtained by biochemical analysis. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$ (exception of $n = 4$ in A and B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham-operated group

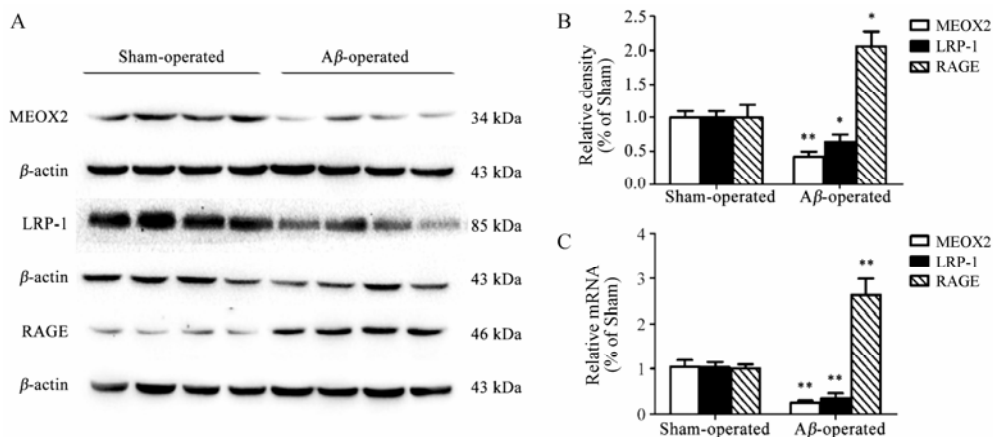


Figure 5 Decreased *MEOX2* mRNA and protein expression induced by bilateral intracerebroventricular injections of $A\beta_{1-42}$ may correlated to LRP-1 inhibition and RAGE upregulation. A: Representative Western blot of the expression of *MEOX2*, LRP-1 and RAGE; B: Quantitative analysis of the expression of *MEOX2*, LRP-1 and RAGE; C: Quantitative analysis of the mRNA levels of *MEOX2*, LRP-1 and RAGE. The results were normalized to the corresponding reporter gene β -actin and presented as fold change relative to the Sham-operated group. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham-operated group

深入研究。

讨论

AD 疾病脑部病变包括: 神经胶质细胞异常活化, 神经元细胞损伤丢失增加, 突触素减少, 内皮功能障碍, $A\beta$ 累积增加等, 从而表现为一系列神经功能性损伤。在 AD 中, 血管功能障碍和微脉管/内皮的血脑屏障障碍是评估 $A\beta$ 累积及其斑块形成的重要的参数^[2, 3]。已有研究表明, NO 和 ET 分子对于维持脑内血管稳态具有非常重要的作用^[10], 且 NO 和 ET 表达失衡早于淀粉样沉积^[11]。并且, 在 AD 脑内会出现毛细血管异常^[12, 13], 包括内皮细胞的产生和崩解^[14], 表明在 AD 病理进程中血管新生的能力降低。作用于血管的蛋白 eNOS 和 VEGF 影响血管通透性^[15], CD34、VEGF 和 eNOS 表达水平可以表明毛细血管的密度及血管的功能^[16, 17], 因此它们可能参与血管淀粉样蛋白的累积。VEGF 水平降低和 eNOS 增加导致脑血管生成的损伤, 可能引起 BBB 渗透性降低, 从而影响 $A\beta$ 清除。在本研究中, AD 模型大鼠中确实存在 NO 和 ET 表达的失常、毛细血管密度降低和血管功能障碍。已有研究表明, MEOX2 具有影响血管生成和血管功能的作用^[18], AD 大鼠模型中血管方面的异常可能与 MEOX2 表达降低有关。

根据 AD 神经血管假说, BBB 损伤导致中枢神经系统中 $A\beta$ 累积增加。在 AD 中血脑屏障上主要转运 $A\beta$ 蛋白的两个受体是 LRP-1 和 RAGE^[19]。LRP-1 介导脑内 $A\beta$ 经血脑屏障途径转运出脑, RAGE 介导 $A\beta$ 经血脑屏障途径转运进脑, LRP-1 和 RAGE 的表达可能是反向耦合的。对于 AD 中 MEOX2、LRP-1、RAGE 的变化研究很少, 有一项在人脑内皮细胞的体外实验中发现, 沉默 MEOX2 基因表达, LRP-1 表达会降低。同时他们也观察到在敲除 MEOX2 的转基因小鼠中 LRP-1 表达减少^[20]。在本实验研究中表明, AD 大鼠模型中 LRP-1 的下调和 RAGE 的上调可能与 MEOX2 基因表达的降低具有一定的相关性, LRP-1 和 RAGE 表达的失常影响了脑内 $A\beta$ 的清除。

综上所述, 推测 AD 大鼠模型中的神经血管功能的障碍与 MEOX2 基因水平的降低有关。并且, MEOX2 基因的作用可能与 $A\beta$ 转运受体 LRP-1 和 RAGE 有一定的相关性。这些结果表明, MEOX2 可能是治疗 AD 的一个新靶点, 而 MEOX2 在 AD 疾病中具体的作用机制, 以及 MEOX2 基因与 $A\beta$ 沉积之间的因果关系还需进一步深入研究。

References

- [1] de la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2012, 9: 35–66.
- [2] Ambrose CT. Neuroangiogenesis: a vascular basis for Alzheimer's disease and cognitive decline during aging [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 32: 773–788.
- [3] Drachman DA. The amyloid hypothesis, time to move on: amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10: 372–380.
- [4] Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12: 723–738.
- [5] Zlokovic BV. Neurodegeneration and the neurovascular unit [J]. *Nat Med*, 2010, 16: 1370–1371.
- [6] Shen XZ, Liu SK, Lin JJ. MEOX2 and cardiovascular [J]. *Dis Chin Heart J (心脏杂志)*, 2009, 21: 875–877.
- [7] Wang Y, Zhao XY, Li XY, et al. Militarine alleviates white matter damage and cognitive impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 738–742.
- [8] Dean RA, Demattos R, Gelfanova V, et al. ELISA-based measurement of plasma total $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$, and CSF total and free $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ in the presence of solanezumab, a mid-domain anti- $A\beta$ antibody [J]. *Alzheimers Dement*, 2009, 5: 133.
- [9] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues [J]. *Learn Motiv*, 1981, 12: 239.
- [10] Gates PE, Strain WD, Shore AC. Human endothelial function and microvascular ageing [J]. *Exp Physiol*, 2009, 94: 311–316.
- [11] Tong XK, Hamel E. Simvastatin restored vascular reactivity, endothelial function and reduced string vessel pathology in a mouse model of cerebrovascular disease [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35: 512–520.
- [12] Fisher VW, Siddiqi A, Yusufaly Y. Altered angioarchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 1990, 79: 672–679.
- [13] Buee L, Hof PR, Delacourte A. Brain microvascular changes in Alzheimer's disease and other dementias [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, 826: 7–24.
- [14] Kalaria RN, Hedera H. Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease [J]. *Neuroreport*, 1995, 6: 477–480.
- [15] Jeynes B, Provias J. The case for blood-brain barrier dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *J*

- Neurosci Res, 2011, 89: 22–28.
- [16] Wang P, Xie ZH, Guo YJ, et al. VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411: 620–626.
- [17] Provias J, Jaynes B. The role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of senile plaques in Alzheimer's disease [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2014, 2014: 191863.
- [18] Liu P, Zhang C, Zhao YX, et al. Gax gene transfer inhibits vascular remodeling induced by adventitial inflammation in rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 212: 398–405.
- [19] Deane R, Bell RD, Sagare A, et al. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009, 8: 16–30.
- [20] Zlokovic BV, Wu Z, Guo H, et al. Role of the *MEOX2* homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease [J]. *Nat Med*, 2005, 11: 959–965.