网络出版时间:2024-02-01 15:14:33 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1115.018

# 过表达 NRF1 减轻阿尔茨海默病模型小鼠的 线粒体和认知功能障碍

苏立宁<sup>1</sup>,王艳兵<sup>2</sup>,张永财<sup>1</sup>

摘要 目的 探讨核呼吸因子1(NRF1)对阿尔茨海默病疾病(AD)模型小鼠线粒体及和认知功能障碍的影响。方法 以5×FAD小鼠作为 AD 模型小鼠,并用脑立体定位注射稀 疏标记的过表达 NRF1 的 AAV 病毒(AAV-NRF1)。Western blot 法测定海马中 NRF1 的表达;用透射电镜观察海马中线 粒体形态;用激光共聚焦显微镜观察 CA1 区稀疏标记神经 元的树突棘并计数;Morris 水迷宫实验评估小鼠认知和记忆 功能;电生理法检测突触效能的长时程增强效应(LTP)。结 果 脑立体注射 AAV-NRF1 后,海马中 NRF1 表达升高(P < 0.001),海马神经元中线粒体形态明显改善,小鼠的认知和 记忆功能提高(P < 0.01),海马 CA1 区神经元的树突棘密度

2023-12-19 接收

基金项目:河北省年度医学科学研究计划项目(编号:20200196);河 北北方学院省属高校基本科研项目(编号:JYT2023002); 河北北方学院校级科研项目(编号:H2022405030) 作者单位:<sup>1</sup>河北北方学院基础医学院,张家口 075000 <sup>2</sup>河北北方学院体育部,张家口 075000

作者简介:苏立宁,女,副教授,责任作者,E-mail:suliningll55@126. com 增加(P<0.001)并产生持久稳定的 LTP 且 fEPSP 斜率增高 (P<0.01)。结论 在5×FAD 小鼠 AD 模型中,NRF1 过表 达触发了线粒体功能障碍的修复,并改善了突触可塑性,推 测这些改变参与到了过表达 NRF1 对 AD 认知功能障碍改善 的治疗效果中。

关键词 阿尔茨海默病;海马;核呼吸因子1;线粒体;认知功能;基因治疗

中图分类号 R 741.02

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2024)02 - 0304 - 06 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.02.020

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是最 常见的年龄依赖性神经退行性疾病,目前尚没有治 愈的方法<sup>[1]</sup>。近来研究<sup>[2]</sup>显示,AD 的发病机制不 单独是淀粉样β蛋白(amyloid-β protein,Aβ)沉积 的线性下游结果,而是一种多种因素共同参与调控 的疾病。其中,线粒体功能障碍可能是驱动更为普 遍的散发迟发性 AD 病理生理学的主要损伤,并将 其称为"线粒体级联假说"<sup>[3-4]</sup>。线粒体生物发生

patients with uterine leiomyoma were enrolled as the control group. Immunohistochemical (IHC) assay was employed to determine YAP expression and sub-location. The relationship between YAP expression and the pathological parameters of the 120 patients with EOC was analyzed, so as to the prognosis of these patients. EOC cells (C13K and OV2008) were cultured with varying initial cell volumes. Ki67 expression and cell proliferation were tested by immunofluorescence and cloning assay respectively. YAP expression at mRNA and protein levels were detected by q-PCR and Western blot respectively when the cell conference of EOC cells reached to low (60%) and high (90%) cell density. **Results** The YAP nuclear expression was significantly higher in the EOC group compared to the control group (P < 0.05). The average diameter of stage I + II EOC was larger than that of stage II + IV EOC (P < 0.01). The high nuclear expression of YAP was positively associated with pathological grade, clinical stage and the level of Ca125 > 1 000 IU/ml, while negatively correlated with tumor size (all P < 0.05). Survival analyses showed that smaller tumor size (<10 cm) and higher YAP nuclear expression were negatively associated with the 3-year overall survival rate of EOC patients (P < 0.01). C13K and OV2008 cells cultured in the low density group exhibited a high number of clone formation, high Ki67 and YAP expression (P < 0.01). The down-regulation of YAP expression could decrease the cell viability of EOC cells in the low-and high-density groups (P < 0.05). **Conclusion** Higher level of YAP nuclear expression and smaller tumour size are inversely associated with the clinical prognosis of patients with EOC. Inhibiting YAP nuclear expression leads to a decrease in the proliferation capacity of EOC cells.

Key words YAP; epithelial ovarian cancer; cell proliferation; tumor size; cell density; prognosis

在维持和调节线粒体稳态以及协调核基因组和线粒体基因组方面起着重要作用,但其受一系列信号因子调控。核呼吸因子1(nuclar respiratory factor-1,NRF1)是线粒体生物合成和功能的关键调节因子<sup>[5]</sup>。之前已有文献<sup>[6-7]</sup>显示NRF1在包括AD在内的多种神经退行性疾病中表达异常降低且其与线粒体生物发生和功能受损有关,并且扰乱线粒体稳态能加剧学习和记忆障碍<sup>[8]</sup>。这些研究提示了AD的进展与NRF1异常潜在相关,但其在AD中的具体作用和机制仍不明确。因此,该研究检测了NRF1对AD相关表型的调控作用及机制。

#### 1 材料与方法

# 1.1 材料

1.1.1 主要试剂与抗体 NRF1和 GAPDH 抗体 (美国 Sigma-Aldrich 公司), HRP 或 Alexa Fluor 488 标记羊抗兔 IgG 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),携带过表达 NRF1或对照(Con)的 AAV 载 体以及稀疏标记的 AAV(上海和元生物技术有限公 司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒以及 ECL 化学发光 底物试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1.2 小鼠 7月龄 SPF 级5×FAD 小鼠(n=40, 雄性,体质量26~30g)作为 AD 模型小鼠,WT 同窝 仔(C57BL/6J 小鼠,n=20,雄性,体质量26~30g) 作为正常对照小鼠。所有小鼠均购自常州卡文斯实 验动物有限公司[SCXK(苏)2021-0013],饲养在12 h 光/暗循环的标准 SPF 条件下,小鼠可自由获得食 物和水。本实验经河北北方学院动物伦理委员会的 批准。

1.1.3 主要仪器 EM UC7 型切片机(德国 Leica 公司); JEM-1400 PLUS 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); LSM880 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司); Western blot 印迹系统(美国 Bio-rad 公 司); e-Blot 凝胶成像系统(上海易孛特光电技术有 限公司);51730 型小鼠脑立体定位仪(上海玉研科 学仪器有限公司); BHV-M1 型 Morris 水迷宫视频分 析系统(北京必海微科技有限公司); MED64 型平面 微电极矩阵(电生理)记录系统(日本 Alpha Med Science 公司)。

# 1.2 方法

1.2.1 免疫荧光 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小 鼠后,用 PBS 灌注,然后用 4% 多聚甲醛灌注。将脑 取出,然后在4℃下在 4% 多聚甲醛中后固定 24 h。 之后,将脑在 30% 蔗糖溶液中脱水,直到脑沉入底 部。将样品嵌入最佳切割温度复合物(OCT)中包 埋,低温下用徕卡 EM UC7 切片机切为8 μm 厚的切 片。切片在室温下晾干, PBS 清洗 3 次,用含 0.3% Triton X-100 的 5% BSA 在 37 ℃封闭 2 h,然后在4 ℃孵育 NRF1 抗体(1:500)过夜,用 PBS 清洗 3 次 后, Alexa Fluor 488 标记羊抗兔 IgG 抗体(1:500) 在室温下孵育 1.5 h,用含 DAPI 的封片液封片,激 光共聚焦显微镜下观察。

1.2.2 脑立体定位显微注射 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,将其置于小鼠脑立体定位仪中。用 微量注射针将过表达 NRF1 和对照的 AAV 病毒及 其稀疏标记的 AAV 双侧注射入背侧海马 (AP = -2.0 mm, ML = 1.2 mm, DV = 2 mm, 0.5 μl),注射 后,留针 5 min,然后慢慢抽出。注射 14 d 后进行行 为测试。然后,麻醉下处死小鼠取双侧海马,通过 Western blot 和荧光评估 NRF1 的过表达情况;用电 镜观察海马线粒体形态;激光共聚焦显微镜下观察 CA1 区稀疏标记神经元的树突棘并计数。

1.2.3 透射电子显微镜 戊巴比妥钠(50 mg/kg) 麻醉小鼠后,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline,PBS)灌注,然后再用4%多聚甲醛灌注。将海马组织(1 mm<sup>3</sup>)小块快速解剖分离,并用2.5%戊 二醛在4℃下固定过夜,再1%锇酸固定1h,将组织被嵌入 Eponate 12 包埋树脂中,并用徕卡 EM UC7 切片机沿冠状面切成60~80 nm 厚的切片。铅染后,由双盲的病理学家通过 JEM - 1400 PLUS 透射电子显微镜检测线粒体形态。

1.2.4 Western blot 用 RIPA 缓冲液裂解海马组 织,然后按操作说明书步骤,在4℃下 11 000 r/min 离心 25 min 收集蛋白上清液。根据制造商的说明, 通过 BCA 法检测蛋白的浓度。每样品取蛋白上清 液(含 25 µg 蛋白)与上样缓冲液在 100℃下煮沸 5 min,然后进行电泳分离和转印。在室温下,用 5% 牛奶封闭 1.5 h,然后在4℃下孵育一抗(GAPDH, 1:8 000;NRF1,1:1 000)过夜。PBS-T 缓冲液(含 0.05% 吐温 20 的 PBS)洗涤 3次后,室温下孵育 HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)1.5 h。用 ECL 试剂显示条带,并用 e-Blot 成像系统采集图像。 用 Image J 软件分析条带的强度。

1.2.5 Morris 水迷宫 用 Morris 水迷宫视频分析 系统(内径 120 cm,高 50 cm,可升降的站台直径 9 cm)评估小鼠的空间记忆。将其充满不透明的水并 保持在 23 ℃(水深 30 cm),分成 4 个象限,站台位 于水面下 1 cm 处。测试小鼠在 1 d 内从 4 个象限

释放,在90s内自由游泳,若老鼠没有找到隐藏的 站台,引导老鼠到隐藏的站台并停留15 s。在最后 一次训练24 h 后进行空间探测试验,站台降至水 底,从放置隐藏平台的相反象限释放小鼠,记录小鼠 停留在隐藏站台的时间。之后,通过在对面的水面 上放置一个带有旗帜的水下站台来进行暗示测试。 对每只小鼠进行1次试验,并记录到达站台的时间。 1.2.6 海马离体脑片电生理学 小鼠麻醉后,迅速 取出大脑,分离出海马体,置于人工脑脊液(由124 mmol/L NaCl\_3 mmol/L KCl\_26 mmol/L NaHCO3 1. 25 mmol/L NaH2PO4 2 mmol/L CaCl2 1 mmol/L MgSO4 和 10 mmol/L D-葡萄糖组成)在室温下孵育 2 h,并制作 400 μm 厚的海马切片。在 CA1 区的 Schaffer 侧支 - 连合纤维 CA1 锥体细胞通路中记录 场电位反应。用100 Hz 脉冲以30 s 的间隔刺激,记 录兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential,fEPSP)。在稳定基线开始后 20 min 引入 两列高频刺激(high frequency stimulation, HFS: 100 Hz,1 秒内 100 个脉冲,间隔 30 s),诱导长时程增强 效应(long-term potentiation, LTP)。通过将 HFS 期 后 90 min 的平均 fEPSP 斜率与基线期的平均 fEPSP 斜率进行比较并计算相对于基线的百分比变化来量 化 LTP。

**1.3 统计学处理** 所有结果均以 *x* ± *s* 表示。用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。两组之 间的比较用 *t* 检验进行分析。Morris 水迷宫的数据

采用双向重复测量方差分析,其他多组的比较使用 单向方差分析,用 LSD 事后检验进行均数两两比 较。P<0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

2.1 AD 模型小鼠中 NRF1 蛋白表达情况和 NRF1 过表达模型构建 免疫荧光染色结果显示,5×FAD 小鼠海马 NRF1 染色荧光强度相对于 WT 小鼠下降 (图 1A)。Western blot 结果,与 WT 对照相比,5× FAD 小鼠海马 NRF1 蛋白水平显著降低(t = 6.251, P < 0.001)(图 1B)。将过表达 NRF1 的 AAV 病毒 注射到 5×FAD 小鼠的海马区域,荧光显微图片显 示 AAV 病毒注射成功(图 1C);同时用 Western blot 验证 NRF1 过表达的效率,与 AAV-Con 组相比, AAV-NFR1 组 NRF1 蛋白显著上调(图 1D, t =8.432,P < 0.001),表明 NRF1 基因在海马中过表达 成功。

2.2 各组小鼠海马神经元中线粒体形态变化 用透射电镜观察 AD 模型小鼠海马区神经元线粒体损伤情况,对照 WT 小鼠海马区神经元线粒体正常,5×FAD 小鼠海马区神经元的线粒体结构发生了显著改变,呈现线粒体肿胀且线粒体嵴消失(图 2A)。进一步观察了过表达 NRF1 对海马神经元线粒体损伤的影响(图 2B),AAV-NFR1 组 5×FAD 小鼠海马神经元线粒体肿胀和线粒体嵴的丧失的病理变化较AAV-Con组减轻,表明NRF1可改善AD小鼠的线



#### 图 1 各组小鼠中海马 NRF1 表达情况

A:WT 组和 5×FAD 组海马 NRF1 免疫荧光染色图像(比例尺:1 mm,×100);B:WT 组和 5×FAD 组 NRF1 蛋白表达的 Western blot 检测; C:AAV-NRF1 注射海马区后的荧光显微示意图(×40);D:Western blot 验证注射 AAV-NRF1 后的海马中 NRF1 表达的蛋白质印迹条带及其定 量分析结果;与 WT 组比较:\*\*\*P<0.001;与 Vehicle 组比较:<sup>###</sup>P<0.001



图 2 各组小鼠海马神经元线粒体的代表性透射电镜图

A:WT 组和 5 × FAD 组海马神经元代表性透射电镜图;B:AAV-Con 组和 AAV-NRF1 组海马神经元代表性透射电镜图;上图:×8 000;下图:×25 000;红色箭头:线粒体

#### 粒体损伤。

2.3 NRF1 过表达缓解 5 × FAD 小鼠的认知和记忆功能 Morris 水迷宫测试评估过表达 NRF1 对 5 × FAD 小鼠的空间学习和记忆。各组训练路径中的游泳速度相似,在第 2 至 5 天, AAV-NFR1 组隐藏站台的逃避潜伏期比对照组显著降低(图 3A, t = 4.014、5.906、10.132、12.048, P < 0.01 或 P <

0.001),在用于评估记忆回忆的测试(隐藏站台被 移除)中,与AAV-Con组相比,AAV-NFR1在目标象 限中的时间百分比以及穿过平台的次数间均显著增 多(图 3B、3C,t = 11.536、18.062, P < 0.001)。这 些结果表明,在海马中的 NRF1 过表达能增强了 AD 小鼠的认知和记忆功能。

2.4 过表达 NRF1 改善海马突触可塑性 为确定 过表达 NRF1 对树突棘的影响,在小鼠的海马中使 用稀疏标记染色定量树突棘,与 AAV-Con 组相比, AAV-NFR1 组小鼠的树突棘密度显著增高(图4A、 B,t = 9.532,P < 0.001),表明过表达 NRF1 降低了 5 × FAD 小鼠树突棘的丢失。为测试过表达 NRF1 是否可挽救 AD 中受损的海马突触可塑性,研究了 其对长时程增强的影响,与 AAV-Con 组相比,AAV-NFR1 组在整个 90 min 的记录时间周期内产生了持 久稳定的 LTP(图4C),fEPSP 斜率显著增高(图4D, t = 3.408,P < 0.01),表明 NRF1 干预可使受损的 LTP 得到挽救。

# 3 讨论

几十年来,Aβ一直被认为是缓解 AD 的主要靶 点,但迄今为止,以靶向 Aβ 为主的方法在临床试验 中均产生了令人失望的结果<sup>[9]</sup>。与此同时,近期越 来越多的文献<sup>[3-4]</sup>揭示了 AD 患者脑的海马神经元 线粒体功能受损,提示以线粒体为细胞生物能学靶 点治疗 AD 的策略的可能性。然而,在 AD 的发生 和发展过程中,线粒体功能障碍的具体受影响的分 子机制仍不清楚。本研究结果表明,NRF1 介导的 线粒体功能障碍在 AD 模型的 5 × FAD 小鼠中调控 了 AD 病程的进展。

为证实5×FAD小鼠(AD模型小鼠)与AD病



#### 图 3 过表达 NRF1 减轻 5 × FAD 小鼠的认知和记忆功能障碍(n=8)

A:AAV-Con 组和 AAV-NRF1 组小鼠的逃避潜伏期; B、C:AAV-Con 组和 AAV-NRF1 组小鼠在目标象限中的时间百分比和穿越次数; 与 AAV-Con 组比较: \*\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001





A、B:稀疏标记的海马树突棘示意图和树突棘密度的量化结果(比例尺 = 10 μm, × 800);C、D:高频刺激下海马 LTP 的变化、fEPSP 初始斜 率以及刺激 90 min 后 fEPSP 平均斜率;与 AAV-Con 组比较: \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

人在线粒体病理改变方面的一致性,本研究首先对 5×FAD 小鼠海马神经元的线粒体形态进行电镜观 察,确认了线粒体损伤的发生。NRF1 是一种核转 录因子,主要作为线粒体生物发生相关基因的正调 节因子<sup>[5]</sup>。本研究中, NRF1 在 5 × FAD 小鼠海马中 显著降低,这提示了 NRF1 相关的线粒体功能异常 可能在5×FAD 小鼠 AD 相关症状进展中发挥作 用。为验证课题组提出的 NRF1 在 AD 发挥作用中 的假设,本实验利用携带过表达 NRF1 的 AAV 病毒 对5×FAD小鼠进行脑立体定位注射干预,并在确 认病毒工具工作良好后进行疾病表型直接相关的认 知功能检测。水迷宫的空间学习记忆表现是反映海 马损伤和神经认知性能的重要指标<sup>[10-11]</sup>。本研究 通过 Morris 水迷宫表现,建立了直接干预海马中 NRF1 与5×FAD 小鼠空间学习和记忆之间的联系。 正如预期,NRF1 过表达小鼠表现出更短的到达站 台的时间,此外,其在目标象限花费的时间及穿越次 数也显著增多,这些 Morris 水迷宫测试的结果表明, 5×FAD 小鼠空间学习缺陷的原因至少部是由于其 海马神经元的 NRF1 表达降低所致。并且在随后的 线粒体检测中,本研究结果与之前报道的一致, NRF1 表达刺激线粒体生物发生,在维持足够的功 能性神经元线粒体质量中发挥重要作用[6-7,12]。

· 308 ·

越来越多的证据<sup>[13-14]</sup>表明 AD 患者的树突棘 减少,而维持适当的树突棘密度对于 AD 患者和 AD 小鼠的突触功能和认知行为至关重要。本研究评估 了过表达 NRF1 干预对 5 × FAD 小鼠树突棘密度的 影响,结果显示过表达 NRF1 干预的小鼠海马组织 中更为丰富的树突棘形态学改变。众所周知,线粒 体结构和功能的变化对维持突触可塑性的功能至关 重要<sup>[15]</sup>。神经元末梢结构受损的线粒体功能,可能 无法在突触处产生 ATP,导致突触损伤<sup>[16]</sup>。本研究 利用 NRF1 过表达病毒的干预逆转了这一突触的解 剖结构的缺陷,且后续的 LTP 功能实验也佐证了过 表达 NRF1 可挽救 5 × FAD 小鼠海马突触可塑性受损。

综上所述,本研究观察表明 NRF1 异常表达途 径介导的线粒体功能异常可能是 AD 表现发展的病 理机制之一,这种机制直接参与了认知功能相关的 突触可塑性改变。从治疗角度来看,利用 NRF1 相 关的线粒体干预靶点可能是一种减缓 AD 发病的潜 在的药理学方法。

# 参考文献

- [1] 吴 越,吴兴启,汪 凯,等. 阿尔茨海默病前扣带回亚区体 积与认知损伤相关性[J]. 安徽医科大学学报,2020,58(8):
   1256-9.
- [2] Bondi M W, Edmonds E C, Salmon D P. Alzheimer's disease: past, present, and future[J]. J Int Neuropsychol Soc, 2017, 23 (9-10): 818-31.
- [3] Kerr J S, Adriaanse B A, Greig N H, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(3):151-66.
- [4] Macdonald R, Barnes K, Hastings C, et al. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? [J]. Biochem Soc Trans, 2018, 46(4):891-909.
- [5] Hu S, Feng J, Wang M, et al. Nrf1 is an indispensable redox-determining factor for mitochondrial homeostasis by integrating multihierarchical regulatory networks [J]. Redox Biol, 2022, 57: 102470.
- [6] Li PA, Hou X, Hao S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration[J]. J Neurosci Res, 2017, 95(10): 2025 -9.
- Kandimalla R, Manczak M, Fry D, et al. Reduced dynamin-related protein 1 protects against phosphorylated Tau-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease
  [J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(22): 4881 97.
- [8] Liu Q, Wang X, Hu Y, et al. Acetylated tau exacerbates learning

and memory impairment by disturbing with mitochondrial homeostasis[J]. Redox Biol, 2023, 62:102697.

- [9] Lloret A, Esteve D, Lloret M A, et al. When does Alzheimer's disease really start? The role of biomarkers [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22):5536.
- [10] Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice [J]. J Vis Exp, 2011, 53:2920.
- [11] Sun X Y, Li L J, Dong Q X, et al. Rutin prevents tau pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1):131.
- [12] Fan H, Ding R, Liu W, et al. Heat shock protein 22 modulates NRF1/TFAM-dependent mitochondrial biogenesis and DRP1sparked mitochondrial apoptosis through AMPK-PGC1α signaling

pathway to alleviate the early brain injury of subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Redox Biol, 2021, 40:101856.

- [13] Pchitskaya E I, Zhemkov V A, Bezprozvanny I B. Dynamic microtubules in Alzheimer's disease: association with dendritic spine pathology[J]. Biochemistry (Mosc), 2018, 83(9): 1068-74.
- [14] Ettcheto M, Busquets O, Cano A, et al. Pharmacological strategies to improve dendritic spines in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 82(s1):S91 – S107.
- [15] 石青青,喻理晟,王世全,等.异氟醚对不同年龄段小鼠海马 线粒体和神经元树突形态的影响[J].空军军医大学学报, 2022,43(2):53-9.
- [16] Walker C K, Herskowitz J H. Dendritic spines: mediators of cognitive resilience in aging and Alzheimer's disease [J]. Neuroscientist, 2021, 27(5): 487 – 505.

# **Overexpression of NRF1 alleviates mitochondrial and cognitive dysfunction in mice models of Alzheimer's disease**

Su Lining<sup>1</sup>, Wang Yanbing<sup>2</sup>, Zhang Yongcai<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Hebei North University, Zhangjiakou 075000; <sup>2</sup>Dept of Sports, Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract *Objective* To investigate the effects of nuclear respiratory factor 1 (NRF1) on mitochondrial and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease (AD) model mice. Methods The 5 × FAD mice were utilized as a model for Alzheimer's disease, and the sparsely labeled AAV virus overexpressing NRF1 (AAV-NRF1) was administered via stereotaxic injection into the brain. The expression of NRF1 in hippocampus was determined by Western blot, the morphology of mitochondria in hippocampus was observed by transmission electron microscope, the dendritic spines of sparsely labeled neurons in the CA1 region were visualized and quantified using confocal laser microscopy, cognitive and memory functions of mice were evaluated using the Morris water maze test, while electrophysiological methods were employed to detect long-term potentiation (LTP) of synaptic efficacy. *Results* The expression of NRF1 in the hippocampus was significantly upregulated following stereotactic injection of AAV-NRF1 (P < 0.001). This intervention led to notable improvements in mitochondrial morphology within hippocampal neurons, as well as enhanced cognitive and memory functions in mice (P < 0.01). Moreover, there was a significant increase in dendritic spine density among neurons located in the CA1 region of the hippocampus (P < 0.001), accompanied by long-lasting and stable long-term potentiation (LTP) and a substantial elevation in fEPSP slope (P <0.01). Conclusion The overexpression of NRF1 in a 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease (AD) initiated the restoration of mitochondrial dysfunction and enhanced synaptic plasticity, indicating that these alterations may contribute to the therapeutic efficacy of NRF1 overexpression in ameliorating cognitive dysfunction associated with AD.

**Key words** Alzheimer's disease; hippocampus; nuclear respiratory factor 1; mitochondria; cognitive function; gene therapy