

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.003

APP/PS1 年轻小鼠的早期学习记忆缺陷及血清注射治疗效果分析 *

朱 珊¹ 黄亚楷^{2△} 张伟民¹ 董 丹¹ 闫俊强¹

(1 河南科技大学第一附属医院药学部 河南 洛阳 471000; 2 复旦大学附属肿瘤医院胃外科 上海 200032)

摘要 目的:明确经典阿尔兹海默症(Alzheimer's Disease, AD)小鼠模型 APP/PS1 的年轻小鼠是否存在学习记忆障碍,并探讨尾静脉注射同龄小鼠的血清是否可以改善老年 AD 小鼠的认知能力。**方法:**根据转基因小鼠的基因型,将同龄小鼠分为 wildtype(WT)和 APP/PS1 两组,首先用物体辨别实验(Novel object recognition, NOR)检测 2 个月龄小鼠的认知能力(90min retention: WT n=6, APP/PS1 n=8; 24hours retention: WT n=7, APP/PS1=8),同时用 Morris 水迷宫实验(Morris water maze, MWM)检测 2 个月龄小鼠的空间学习记忆能力(WT n=6, APP/PS1 n=5);采用内眦取血法从 8 月龄小鼠中获取全血,高速离心获得血清。将 8 月龄 APP/PS1 小鼠分为两组:对照组注射 PBS(n=7),实验组注射血清(n=6),每周注射两次,100 μ L/只/次,连续注射 3 周。注射结束后,用 NOR 法检测对照组和实验组小鼠的认知能力。**结果:**NOR 实验结果显示 APP/PS1 小鼠的辨别指数(Discrimination index(%))显著低于 WT 小鼠($P<0.05$);MWM 实验结果显示 APP/PS1 小鼠到达平台的时间明显长于 WT 小鼠,同时在测试阶段中,APP/PS1 小鼠在目的象限的探索时间及穿越次数显著低于 WT 小鼠 ($P<0.05$);治疗实验中,与对照组 APP/PS1 小鼠的辨别指数相比较,实验组 APP/PS1 小鼠在注射同龄小鼠的血清后,其物体辨别指数显著升高($P<0.05$),小鼠脑中的 A β 沉淀明显减少。**结论:**APP/PS1 小鼠在 2 个月左右就会表现出明显的学习记忆障碍;注射正常同龄鼠的血清可以明显改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力同时阻碍 A β 沉淀的形成。

关键词:阿尔兹海默症; APP/PS1; 认知能力; 学习记忆; 血清

中图分类号:R-33; R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)05-811-05

Serum Injection Rescues Learning and Memory Deficits in APP/PS1 Young Mice*

ZHU Shan¹, HUANG Ya-kai^{2△}, ZHANG Wei-min¹, DONG Dan¹, YAN Jun-qiang¹

(1 Department of pharmacy, First Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, 471000, China;

2 Department of Gastric Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai, 200032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the learning and memory ability in young Alzheimer's disease (AD) APP/PS1 mouse model, and identify whether serum injection can rescue these defects. **Methods:** According to the genotype, the same age male mice were divided into two groups, the wildtype (WT) and APP/PS1 groups. Firstly, we performed novel object recognition (NOR) to evaluate the recognition ability of two-months old male mice (90 min retention: WT n=6, APP/PS1 n=8; 24hours retention: WT n=7, APP/PS1=8), and carried out Morris water maze (MWM) to test the spatial learning and memory in two-months old mice (WT n=6, APP/PS1 n=5); Blood was collected from the inner canthus of 8-months old mice, and the serum was obtained by super-centrifugation. 8-months old APP/PS1 mice were divided into two groups, the control group which was injected by PBS buffer (APP/PS1 n=7), and the experimental group was injected with serum (APP/PS1 n=6), injection was performed twice a week, 100 μ L/mice/time, for 3 weeks. After injection, NOR was performed to evaluate the therapeutic effect. **Results:** Compared with the WT mice, the discrimination index of APP/PS1 mice is significantly decreased in NOR ($P<0.05$). The latency of APP/PS1 mice is obviously longer than that of WT mice ($P<0.05$). Moreover, compared with those of WT mice, the time spent and crossing number of APP/PS1 in target quadrant are significantly reduced during the testing stage ($P<0.05$). About the rescue experiment, we find that the group which injected with serum obtained higher discrimination index and less A β plaque than those in PBS injected group ($P<0.05$). **Conclusions:** Obvious learning and memory deficits occurred in APP/PS1 young mice at about 2-months old, and the same-age serum injection could rescue recognition defects and reduce A β formation in APP/PS1 mice.

Key words: Alzheimer's Disease; APP/PS1; Recognition; Learning and memory; Serum

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-811-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(U1304809)

作者简介:朱珊(1964-),男,副主任药师,电话:13938860555, E-mail: zhushan1964@163.com

△ 通讯作者:黄亚楷(1985-),男,博士,主治医师, E-mail: huangyakai@126.com

(收稿日期:2018-08-23 接受日期:2018-09-18)

前言

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性发展的神经系统退行性疾病,其的发病机制、治疗方式、药物开发一直是神经领域的研究热点。临床上,AD 患者的行为学改变主要表现为认知障碍、学习记忆障碍、执行功能障碍^[1];其病理学特点为在大脑中出现大范围神经元纤维缠结(neuronal tangles)和淀粉样蛋白斑(A β plaque),同时会伴随星形胶质细胞增生、神经元丢失、神经元营养不良等症状^[1]。针对 AD 的治疗药物开发主要集中在如何阻断 A β plaque 和 neuronal tangles 的形成和清除^[2],然而相关的临床药物研究大多止步于临床实践,因此 AD 的发病机制亟待进一步探索以便发现更多有效的新靶点。

越来越多与 AD 发病相关的致病基因被发现,例如 APOE4, PICALM 和 APOJ^[3,4]。为了更好地探究这些基因的致病机制,研究者构建了多种基因修饰的小鼠模型^[5],例如经典的 AD 小鼠模型 APP/PS1 小鼠^[6,7],用于小鼠以模拟临床上 AD 患者的病症。组织切片染色发现在年老的 APP/PS1 小鼠中可以观察到与人脑中类似的淀粉样蛋白斑(A β plaque)病变^[6,8],但是目前并没有研究阐释这些改变是引起行为学变化的原因还是 APP/PS1 小鼠发病后导致的病理性改变。在本研究中,我们通过对年轻 APP/PS1 小鼠进行认知、学习记忆能力的检测,阐释了 APP/PS1 小鼠在出现 A β plaque 之前就已经表现出明显的行为学异常。此外,目前有研究表明给痴呆小鼠注射年轻小鼠的血清,或者使二者共用一套血液循环系统,可以明显改善老年痴呆小鼠的学习记忆能力^[9]。基于此结果,本研究拟进一步明确同龄年老小鼠的血液是否同样可以达到治疗痴呆小鼠的效果。研究结果显示给痴呆小鼠注射同龄正常小鼠的血清同样可以改善痴呆小鼠的认知能力,提示除了年轻因子以外,血液中可能还存在其他成分可以影响小鼠的学习记忆能力。

1 材料与方法

1.1 APP/PS1 小鼠的繁殖、鉴定与饲养

APP/PS1 雄鼠购自北京华卓康公司,将 APP/PS1 小鼠与野生型小鼠进行杂交配种。幼鼠出生 10 天后,剪幼鼠鼠尾(2 mm 左右)进行基因型鉴定。裂解缓冲液 A(50 $\times$ 储存液):1.25 M NaOH, 10mM EDTA, pH=12;裂解缓冲液 B(50 $\times$ 储存液):2 M Tris-HCl, pH=5.0。每只鼠尾中加入 60 μ L 1 $\times$ 裂解缓冲液 A, 95 $^{\circ}$ C 进行裂解;1 小时后加入等体积 60 μ L 1 $\times$ 裂解缓冲液 B 进行中和,离心后获得裂解液上清。以裂解液为模板,进行 PCR 检测。APP 基因鉴定上游引物为:AATAGAGAACG-GCAGGAGCA;下游特异性引物为:GCCATGAGGGCAC-TAATCAT;PS1 基因鉴定上游引物为:GACTGACCACTC-GACCAGGTTCTG;下游引物为:CTTGTAAGTTGGATTCT-CATATCCG。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 30 sec, 35 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 1 hour。实验用小鼠饲养于 SPF 级鼠房中,室温(22 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C),5-6 只小鼠生活在同一个 IVC 鼠笼中。实验中所用的小鼠均为雄鼠。

1.2 蛋白免疫印迹实验

取 PCR 阳性(APP/PS1 小鼠)及阴性(野生型小鼠)的小鼠脑组织,主要取皮层与海马。RIPA 裂解液(50 mM Tris-HCl (pH

7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 100 mM PMSF) 裂解组织,组织研磨仪振动破碎 3 min, 4 $^{\circ}$ C 再裂解 1 hours; 12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 min 离心后收集上清,即为细胞裂解液。BCA 法测定蛋白浓度后制备 western 样品。上样量为 50 μ g 总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,检测 APP 及内参 GAPDH。

1.3 小鼠物体辨别实验

小鼠基因型鉴定后,选择年龄相同的雄鼠进行分组实验,根据基因型的类别分为两组:野生型组和 APP/PS1 组,每组小鼠只数 $\geq$ 6 只。实验分为 3 个阶段^[9,10]:适应阶段(2-3 天),适应环境及熟悉实验者,排除操作者对小鼠的影响;训练阶段(10 分钟),使小鼠在相同的时间内对长方体木块进行学习和记忆;检测阶段(5 分钟),短时程记忆检测时—训练阶段结束 90 分钟后,将两个长方体木块中的其中一个换为烧瓶,记录小鼠对烧瓶和长方体木块的探索时间;长时程记忆—训练阶段结束 24 小时后,将两个长方体木块中的其中一个换为烧瓶,记录小鼠对烧瓶和长方体木块的探索时间。数据分析时,统计小鼠在检测阶段对烧瓶和长方体木块的探索时间,并计算小鼠的物体辨别指数:(探索烧瓶的时间 - 探索长方体的时间)/(探索烧瓶的时间 + 探索长方体的时间) $\times$ 100%。

1.4 小鼠 Morris 水迷宫实验

根据基因型鉴定结果将年龄一致的雄鼠分为两组:野生型小鼠和 APP/PS1 小鼠,每组小鼠只数 $\geq$ 6 只。实验分为 3 个阶段^[10]:可视平台训练阶段,检测小鼠的视力是否存在明显差异,一般 3-4 天;隐藏平台学习阶段,每天训练小鼠找到隐藏平台 3 次,持续训练 5-6 天;检测阶段,去掉隐藏平台,记录小鼠 1 分钟内的探索路径。数据分析:小鼠的学习能力分析—计算隐藏平台学习阶段中小鼠到达平台的时间;小鼠的记忆能力分析—计算检测阶段小鼠在各个象限探索的时间百分比,及其穿越平台所在区域的次数。

1.5 小鼠尾静脉血清注射及行为学检测

野生型小鼠内眦取血获得全血后 12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 30 min 离心,收集上层血清后储存于 -80 $^{\circ}$ C, 备用。APP/PS1 同龄小鼠分为两组:对照组注射生理盐水 100 μ L/ 次,实验组注射血清, 100 μ L/ 次,每周注射两次,连续注射 3 周^[9]。血清注射结束后,将两组小鼠进行行为学检测,操作步骤同物体辨别实验。

1.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism5 进行作图统计分析,两组计量资料之间的比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 APP 在 APP/PS1 小鼠中呈高表达

从北京华卓康购买 APP/PS1 雄鼠后,将其与野生型的 C57/BL6 小鼠进行繁殖。用特异性引物进行 PCR 鉴定基因型。结果如图 1A 所示,若 APP 及 PS1 为双重阳性,则该小鼠为 APP/PS1 小鼠;若无阳性条带,则为野生型小鼠。为了进一步确认,根据 PCR 检测结果取野生型和 APP/PS1 小鼠的皮层及海马组织进行蛋白免疫印迹检测。实验结果显示:与野生型小鼠皮层和海马中的 APP 相比较,APP/PS1 小鼠皮层和海马中的 APP 表达量显著升高(图 1B),说明 APP/PS1 小鼠中的 APP 确实表达异常。

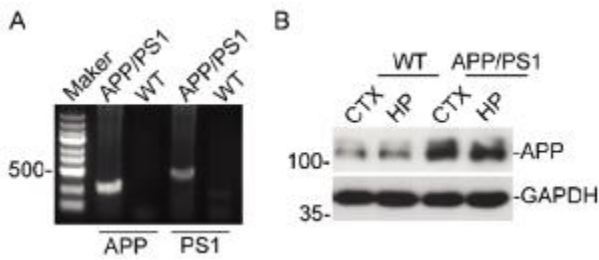


图1 APP/PS1 小鼠基因型鉴定及 APP 表达情况

Fig.1 Genotyping of APP/PS1 mice and APP expression in cortex and hippocampus of APP/PS1 mice

2.2 APP/PS1 小鼠表现出早期认知能力障碍

APP/PS1 小鼠作为经典的 AD 小鼠模型,在年老小鼠中出现明显的 A β plaque^[68]。AD 典型的行为学表征为认知、学习记忆能力障碍,那么在 APP/PS1 小鼠模型中,是先发生认知障碍还是先产生 A β plaque, 目前尚不清楚。因此,我们对年轻的 APP/PS1 小鼠(2-3 months old)进行了行为学检测。首先,采用小鼠新旧物体辨别实验检测小鼠的认知能力(图 2A)。实验结果显示:年轻 APP/PS1 小鼠在短时程和长时程物体辨别实验中的辨别指数均明显低于野生型 (WT) 小鼠 (图 2B, 图 2C), 说明 APP/PS1 小鼠的认知能力在早年就已经存在明显缺陷。

2.3 APP/PS1 小鼠的空间学习记忆能力受损

我们进一步采用经典的 Morris 水迷宫实验对 APP/PS1 小鼠(2-3 months old)的空间学习记忆能力进行检测。实验结果显示:在学习阶段,野生型小鼠花费较少的时间便可以找到隐藏平台,而 APP/PS1 小鼠需要花费更多的时间找到隐藏平台(图 3A)。通过计算检测阶段小鼠的探索路线,我们发现野生型小鼠花费更多的时间在目的象限内进行探索,而 APP/PS1 小鼠在四个象限中花费的探索时间差异无统计学意义(图 3B),APP/PS1

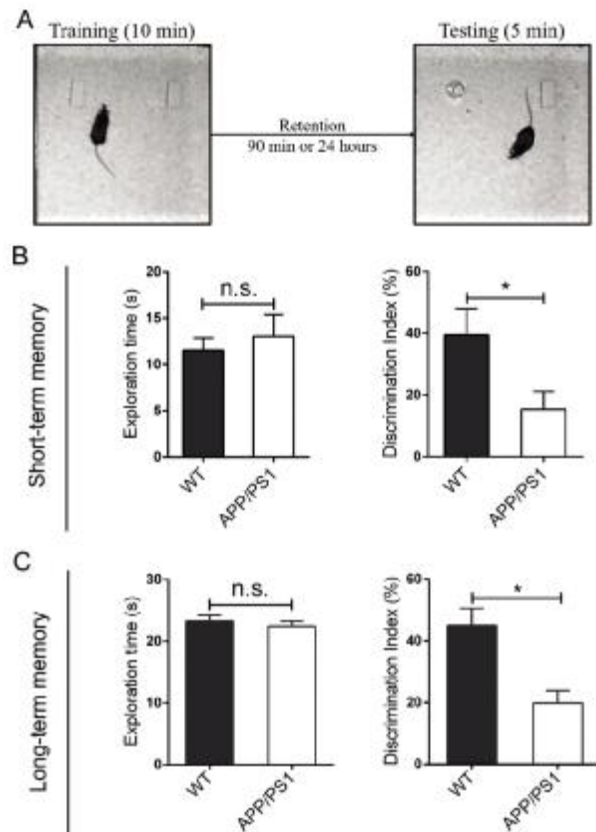


图2 APP/PS1 小鼠表现出明显的认知能力障碍

Fig.2 Recognition ability was impaired in APP/PS1 young mice

小鼠穿越平台所在区域的次数明显少于野生型小鼠的穿越次数(图 3C)。以上数据说明 APP/PS1 小鼠在较年轻的时候就表现出明显的空间学习记忆障碍。

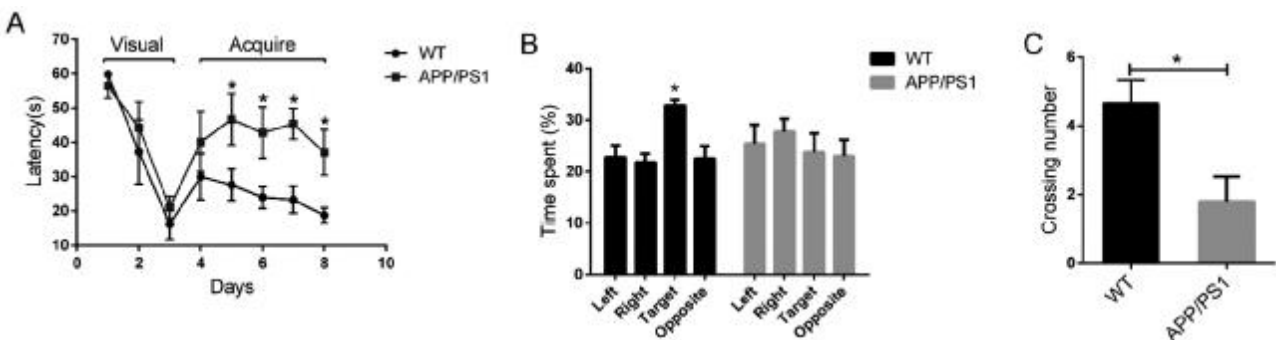


图3 APP/PS1 小鼠表现出明显的空间学习记忆障碍

Fig.3 Spatial learning and memory was impaired in APP/PS1 young mice

2.4 同龄野生型小鼠的血清注射明显改善 APP/PS1 小鼠的认知障碍

近期有研究显示给痴呆小鼠注射年轻小鼠的血清或者与年轻小鼠共用血液循环系统,可以明显改善痴呆小鼠的学习记忆能力,这一现象主要由血液中的年轻因子介导^[8,11-13]。然而,我们依旧好奇血液中的年轻因子是否是唯一的介导者? 同龄的野生型小鼠的血清是否对 APP/PS1 小鼠的学习记忆障碍有治疗的作用? 为了回答这些问题,我们从野生型小鼠(8-months old)中采用内眦取血法获取全血后,离心后获取血清,并将血清通

过尾静脉注射的方式注射入 APP/PS1 小鼠 (8-months old) 中, 100 μ L/ 次 / 只,每周注射两次,持续注射 3 周(图 4A)。行为学检测结果显示:Serum 实验组小鼠的物体辨别指数显著高于 PBS 对照组小鼠(图 4B),说明同龄正常小鼠血清注射可以明显改变同龄 APP/PS1 小鼠的认知能力。

2.5 血清注射后的 AD 小鼠中的淀粉样沉淀显著减少

APP/PS1 小鼠模型作为广泛应用的 AD 模型, 其小鼠在 6 月龄左右将出现明显的淀粉样沉淀斑块^[14],在我们的实验结果中也检测到相同的结果。如图 5 所示,7 月龄的 APP/PS1 出现

数量较多的 A β 斑块,而同龄的野生型小鼠中无明显的 A β 斑块。为了进一步检测注射同龄野生型小鼠的血清是否会影响 APP/PS1 小鼠脑中 A β 沉淀的形成,我们取 5 月龄野生型小鼠的血清,通过尾静脉注射的方式注射至同龄 APP/PS1 小鼠中,待

小鼠至 7 月龄时进行检测。实验结果显示:注射血清后的 APP/PS1 小鼠脑区内 A β 斑块的数量明显减少,说明早期注射野生型小鼠的血清有助于减少 APP/PS1 小鼠中 A β 沉淀的形成。

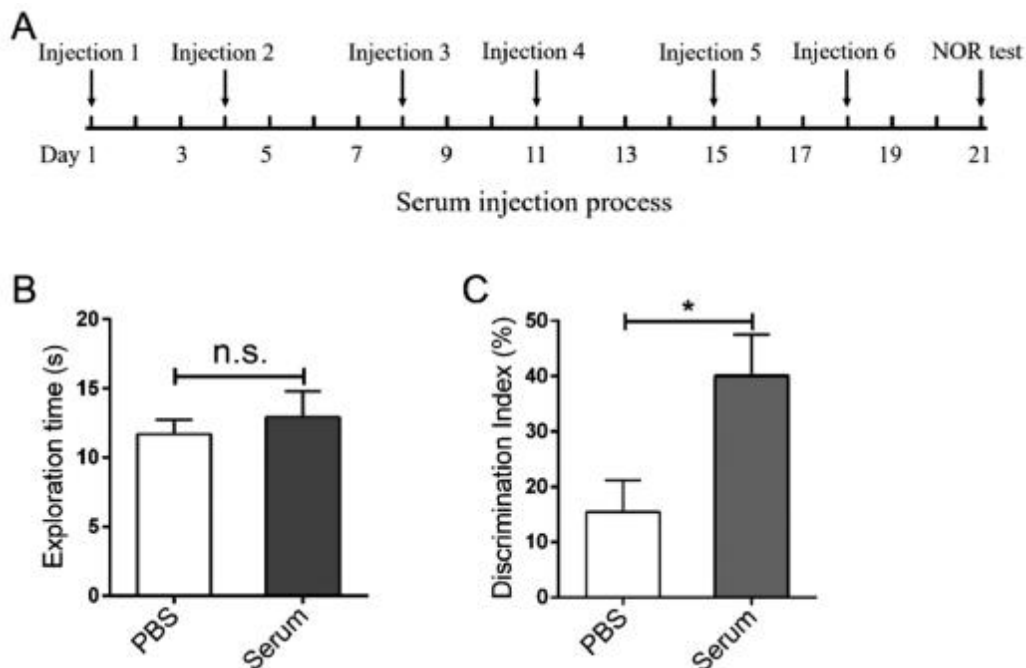


图 4 注射同龄野生型小鼠的血清可以改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力

Fig.4 Learning and memory of APP/PS1 mice could be restored by serum injection from wild-type mice

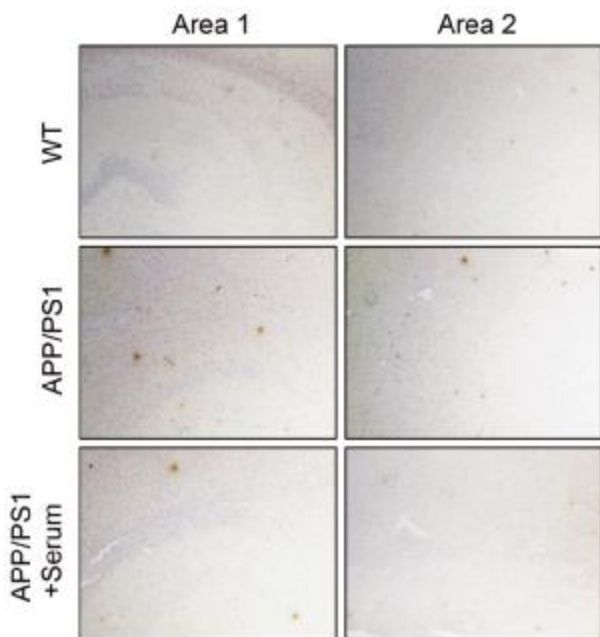


图 5 注射同龄野生型小鼠的血清可以减少 APP/PS1 小鼠中 A β 斑块的形成

Fig.5 Formation of A β plaque in APP/PS1 mice could be reduced by serum injection from wild-type mice

3 讨论

早期关于 APP/PS1 小鼠的研究表明该小鼠在 6 月龄左右才出现明显的 A β plaque 沉淀^[14],本研究采用行为学检测方法

发现经典 AD 小鼠模型 APP/PS1 小鼠在 2 月龄左右即出现显著的学习记忆障碍,提示 APP/PS1 小鼠行为学的改变早于 A β plaque 的形成。另有研究表明 A β plaque 的形成将会直接影响神经元突触的活动并扰乱其调控网络^[15],最终造成大面积的神经元功能丧失或神经元死亡^[16-18],说明 A β plaque 的形成将加快 AD 的发病病程,加强 AD 的严重程度。因此,我们的研究更加明确了 A β plaque 的形成并不是 AD 最初的致病因素。那么,APP/PS1 小鼠中的行为学改变与 A β plaque 的出现在时间是否存在一定的交集?何种机制导致了 APP/PS1 小鼠出现早期学习记忆障碍?这些问题目前我们还没有具体的研究数据阐明,这将是我们的研究重点。

Villeda SA 等研究者发现给老年老鼠注射年轻小鼠的血清可以改善年老小鼠的学习记忆能力^[19]。Middeldorp J 等研究者的研究进一步阐明这一治疗效应主要是由血液中所含的一些年轻因子介导的^[20]。而我们的研究结果显示 APP/PS1 小鼠通过尾静脉注射同龄野生型小鼠的血清后学习记忆及认知能力明显改善,我们进一步对后期 AD 的标志物 A β plaque 进行检测,发现 APP/PS1 小鼠中注射野生型小鼠的血清后 A β plaque 沉淀在脑中的累积明显减少,说明血清中的年轻因子并不是唯一能改善认知能力的介导者,血液中可能还有更多的非年轻因子可以发挥调节痴呆小鼠认知能力的功能。我们推测这些非年轻因子很可能可以通过抑制 A β plaque 的形成或者清除 A β plaque 的方式减少 A β plaque 在脑区中的累积,但仍需进一步的研究以明确。

胶质细胞是脑中发挥免疫功能的主要细胞,目前已有较多

的研究开始集中研究胶质细胞在 AD 中的作用,例如胶质细胞的清除功能^[19],新型胶质细胞类型的发现^[20,21]。本研究采用血清注射的方式治疗小鼠痴呆,血清中富含多种与免疫相关的因子,我们推测血清中的免疫相关因子很可能通过影响胶质细胞的功能发挥治疗痴呆的作用。

综上所述,本研究结果表明经典 AD 疾病小鼠模型 APP/PS1 小鼠的行为学的异常早于病理学改变,A β 斑块并不是 AD 早期的致病因素。同时,血清注射可改善痴呆小鼠的认知能力并减少了 A β 斑块在脑中的累积,为探索 AD 的发生机制提供了新线索。

参考文献(References)

- [1] De Strooper B, Karran E. The cellular phase of Alzheimer's disease[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 603-615
- [2] Colin L. Masters, Randall Bateman, Kaj Blennow, et al. Alzheimer's disease[R]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 15(1)
- [3] Verghese PB, Castellano JM, Garai K, et al. ApoE influences amyloid-beta (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (19): E1807-1816
- [4] Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, et al. Central role for PICALM in amyloid-beta blood-brain barrier transcytosis and clearance [J]. *Nature neuroscience*, 2015, 18(7): 978-987
- [5] Nilsson P, Saito T, Saido TC. New mouse model of Alzheimer's[J]. *ACS chemical neuroscience*, 2014, 5(7): 499-502
- [6] Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins [J]. *Neuron*, 1997, 19 (4): 939-945
- [7] Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes [J]. *Nature medicine*, 1998, 4(1): 97-100
- [8] Middelkamp J, Lehallier B, Villeda SA, et al. Preclinical assessment of young blood plasma for Alzheimer disease [J]. *JAMA neurology*, 2016, 73(11): 1325-1333
- [9] Knafo S, Sanchez-Puelles C, Palomer E, et al. PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models[J]. *Nature Neuroscience*, 2016, 19(3): 443-453
- [10] Wang P, Mei F, Hu J, et al. PTEN α Modulates CaMKII Signaling and Controls Contextual Fear Memory and Spatial Learning [J]. *Cell Reports*, 2017, 19(12): 2627-2641
- [11] Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(6): 659-663
- [12] Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function [J]. *Nature*, 2011, 477(7362): 90-94
- [13] Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors[J]. *Science*, 2014, 344(6184): 630-634
- [14] Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, et al. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS2dE9 mouse model of Alzheimer disease[J]. *J Comp Pathol*, 2017, 156(4): 389-399
- [15] Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks[J]. *Nature Neuroscience*, 2010, 13(7): 812-818
- [16] Roychoudhuri R, Yang M, Hoshi MM, et al. Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(8): 4749-4753
- [17] Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, et al. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments[J]. *Neuroreport*, 1997, 8(15): 3213-3217
- [18] Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, et al. Amyloid beta -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(20): 13217-13221
- [19] Ulland TK, Song WM, Huang SC, et al. TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease [J]. *Cell*, 2017, 170 (4): 649-663.e613
- [20] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1276-1290.e1217
- [21] Sarlus H, Heneka MT. Microglia in Alzheimer's disease[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2017, 127(9): 3240-3249