

# 阿尔茨海默病 RNA 测序生物信息学分析及关键基因预测

张帆<sup>1</sup>, 钟斯然<sup>1</sup>, 杨斯漫<sup>1</sup>, 韦宇婷<sup>1</sup>, 黄金兰<sup>2</sup>, 吴登攀<sup>2</sup>, 钟振国<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530021; 2. 徐州医科大学药学院, 徐州 221004)

**【摘要】目的:**通过转录组测序数据的分析,寻找与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病有关的关键功能基因。**方法:**从 GEO 数据库下载 GSE125050 RNA 测序数据,对数据进行质控和过滤后使用 edgeR 进行基因差异表达分析,使用 Matescape 数据库对差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行 GO 和 KEGG 富集分析;使用 clusterProfiler 对生物学意义显著的分组进行基因集富集分析(GSEA);使用 STRING 数据库对神经元的 DEGs 进行蛋白质-蛋白质相互作用网络进行分析,从蛋白质层面筛选核心基因。**结果:**差异分析中神经元、髓样细胞、星型胶质细胞、内皮细胞的样本差异表达基因数目分别为 561、491、223、3 072,神经元的 DEGs 与 G $\alpha$  信号传递、角质化作用有关,皮质区细胞的 DEGs 显著富集在嗅觉信号通路,GSEA 富集分析发现神经元表达差异与免疫激活相关,在 PPI 网络筛选中发现 TLR8、FCGR2A、CD19、LCK、CD2、CD40、ITGAM 等枢纽基因位于核心调控地位。**结论:**TLR8、FCGR2A、CD19、LCK、CD2、CD40、ITGAM 可能与 AD 在免疫、神经炎症方面相关,可能在 AD 疾病发生发展中扮演重要角色。

**【关键词】**阿尔茨海默病;转录组;生物信息学;神经炎症

**【中图分类号】**R541.1

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2019-09-29

## Bioinformatics analysis and hub genes prediction of Alzheimer's disease RNA sequencing data

Zhang Fan<sup>1</sup>, Zhong Siran<sup>1</sup>, Yang Siman<sup>1</sup>, Wei Yuting<sup>1</sup>, Huang Jinlan<sup>2</sup>, Wu Dengpan<sup>2</sup>, Zhong Zhenguo<sup>1</sup>

(1. Pharmacy School, Guangxi University of Chinese Medicine; 2. Pharmacy School, Xuzhou Medical University)

**【Abstract】Objective:** To uncover the key genes and biological process of Alzheimer's disease by RNA sequencing data analysis.

**Methods:** Initially, GSE125050 RNA sequencing data was obtained from the GEO database. After quality control and filtration, data were conducted genes differentially expression analysis by edgeR. Gene enrichment analysis of GO and KEGG were performed on differentially expression genes(DEGs) by Matescape database. Genes set enrichment analyses(GSEA) were performed on the biologically significant genes set. Protein-protein interaction network was constructed using neuron DEGs, to identify hub genes in protein level.

**Results:** The number of differentially expression genes from neuron, myeloid, astrocyte, endothelial samples was 561, 491, 223, 3 072, respectively. Neuron's DEGs were significantly correlated with G alpha(s) signaling events and keratinization. Endothelial DEGs were significantly enriched at olfactory signaling pathway. GSEA showed neuron differential expression was related to activation of immune response. TLR8, FCGR2A, CD19, LCK, CD2, CD40, ITGAM were screened out by PPI network as hub genes. **Conclusion:** TLR8, FCGR2A, CD19, LCK, CD2, CD40, ITGAM may play a significant role in neuroinflammation in AD occurrence.

**【Key words】**Alzheimer's disease; transcriptomics; bioinformatics; neuroinflammation

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年性痴呆,其特征表现为神经炎斑和神经纤维缠

结,并含有 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )沉积,是一种多因素引起的原发性大脑神经退行性疾病<sup>[1-2]</sup>。随着人口老龄化的加深,AD的发病率正逐年攀升,由于发病原因不明,目前尚无特效疗法。神经炎症作为AD病理机制的提出,且近年来备受关注<sup>[3-4]</sup>,神经炎症揭示了AD与固有免疫激活关系密切。

随着各种基因芯片、高通量测序技术的发展,基因组学、转录组学等以分子生物学核酸蛋白为核心的组学迅速发展,使生命科学进入以生物组学

作者介绍:张帆, Email: 819224217@qq.com,

研究方向:中药药效筛选与新药研究。

通信作者:钟振国, Email: gxtcmuzzg@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81660644);江苏省自然科学基金青年基金资助项目(编号:BK20170267);广西一流学科建设专项基金资助项目(编号:05019038)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20200929.1451.006.html>  
(2020-09-30)

为研究对象的时代。人类基因组计划的完成,揭示所有人类的基因序列,高通量 RNA 测序(RNA-seq)除具有传统表达谱芯片的 RNA 定量分析外,还可进行可变剪切分析、融合基因分析等,为揭示疾病的发病机制、寻找新的治疗靶点提供更多的研究方法。Bioconductor(<http://www.bioconductor.org/>)是一个基于 R 语言、提供成熟高通量测序数据统计分析的扩展工具,包含大量对高通量数据进行质控、标准化差异分析、可视化等工具。

本研究通过对 AD 的 RNA-seq 数据进行分析,不同细胞类型组织在 AD 组与正常组间 mRNA 表达的差异,揭示不同组织细胞在 AD 疾病发生中转录组水平的改变,以及对基因的功能进行注释,利用转录组 mRNA 的改变预测下游蛋白质的改变,通过蛋白质-蛋白质相互作用关系,筛选 AD 发病的关键靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据收集与数据预处理

RNA 测序数据收集于 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>),数据编号为 GSE125050,芯片平台为 Illumina HiSeq 2500(GPL16791)。测序样本来源于 113 例(表 1)人源样本脑额上回组织,其中包含 48 例 Braak stages V 级或 VI 级阿尔茨海默病患者和 65 例正常人样本,样本信息来源于 Genentech 数据库(<https://www.gene.com/>),编号为 PRJ0018621。样本组织在冰上消化,根据不同的细胞标志物(星形胶质细胞 Gfap<sup>+</sup>、内皮细胞 Cd31<sup>+</sup>、髓样细胞 CD11b<sup>+</sup>和神经元 NeuN<sup>+</sup>)醇固定后分选细胞,随后使用 Nugen Ovation V2 进行 RNA 提取与扩增,最后进行测序。

表 1 RNA-seq 样本数诊断分组及细胞类型

诊断分组	星形胶质细胞	内皮细胞	髓样细胞	神经元
AD组	7	10	10	21
正常组	12	17	15	21

下载的测序基因计数(read count)通过 Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>)edgeR 程序包<sup>[5-6]</sup>,使用 edgeR 似然函数的差异分析流程进行<sup>[7]</sup>,首先去除 count-per-million(CPM)低于 0.5 的表达量过低的基因;通过 TMM 法<sup>[8]</sup>对不同样本测序深度的差异进行标准化,计算标准化因子用于下游分析;通过对样本进行多维尺度分析(multidimensional scaling, MDS)及作图,分析样本不同分组及测序深度之间、组间和组内的异质性和同质性进行质控及分析;最后根据标准化因子对不同细胞类型的样本分别进行差异分析,选择基因表达差异倍数 $|\log_2FC| > 1.5$ ,  $P < 0.01$  的基因作为差异表达基因(differentially express genes, DEGs),使用的软件中 R 版本为 3.6.1<sup>[9]</sup>,edgeR

3.26.8。

### 1.2 差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析

使用 Metascape 数据库(<http://metascape.org>)对 4 种不同类型细胞的 DEGs 进行基因功能(gene ontology, GO)富集分析和通路富集分析(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)。数据库利用超几何分布检验的算法,分析 DEGs 出现在某基因功能或通路中是否显著,并对差异表达基因进行注释。

### 1.3 基因集富集分析

R 环境下使用 clusterProfiler 3.12.0 package<sup>[10]</sup>,选取神经元和内皮细胞进行分析,先对整个基因集数据进行基因名转换,利用表达差异倍数进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)<sup>[11]</sup>,包括 GO 和 KEGG,并使用 enrichplot package 选取富集前三结果进行可视化。

### 1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

选取神经元的 DEGs,通过 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)<sup>[12]</sup>预测蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction network, PPI network),在蛋白质层面对 DEGs 进一步筛选。首先筛选去掉预测评分小于 0.4 的相互作用,使用 Cytoscape 绘制 PPI 网络图,通过 MCODE 插件对整个网络进行聚类,最后筛选核心子网络和连接度(degree)最高的蛋白质作为枢纽基因(hub genes)。

## 2 结果

### 2.1 表达矩阵的探索

对样本数据进行 MDS 降维可视化(图 1A)后,可以看出不同细胞类型的基因表达异质性较大,其中髓样细胞、神经元、基因表达有较大差异,而星形胶质细胞与内皮细胞表达更为相似,为此,往后的分析对不同细胞类型分组进行差异分析较为合理。在不同细胞类型中,AD 与正常对照的表达趋势较为均匀,说明在 AD 和正常组之间 DEGs 只是少部分,大部分基因表达趋势相似,不存在较明显的离群样本和批次效应。

### 2.2 差异基因的筛选

在对不同样本的测序深度进行标准化后,根据细胞类型分组对数据进行差异分析,使用 ggplot2<sup>[12]</sup>并绘制火山图(图 2),其中神经元 DEGs 为 561 个,髓样细胞 DEGs 为 491 个,星形胶质细胞 DEGs 为 223 个,内皮细胞 DEGs 为 3 072 个。通过图 1B 可以看出不同细胞类型的上下调基因情况。

### 2.3 差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析

对 4 种不同细胞类型样本的 DEGs 进行富集分析发现,神经元的 DEGs 显著富集在 G $\alpha$  信号传递(R-HSA-418555)、角质化作用(GO:0031424)、模式识别过程(GO:0007389)等;皮质区细胞的 DEGs 显著富集在嗅觉信号通路(R-HSA-381753)、角质化作用、GPCR 配体结合(R-HSA-500792);髓

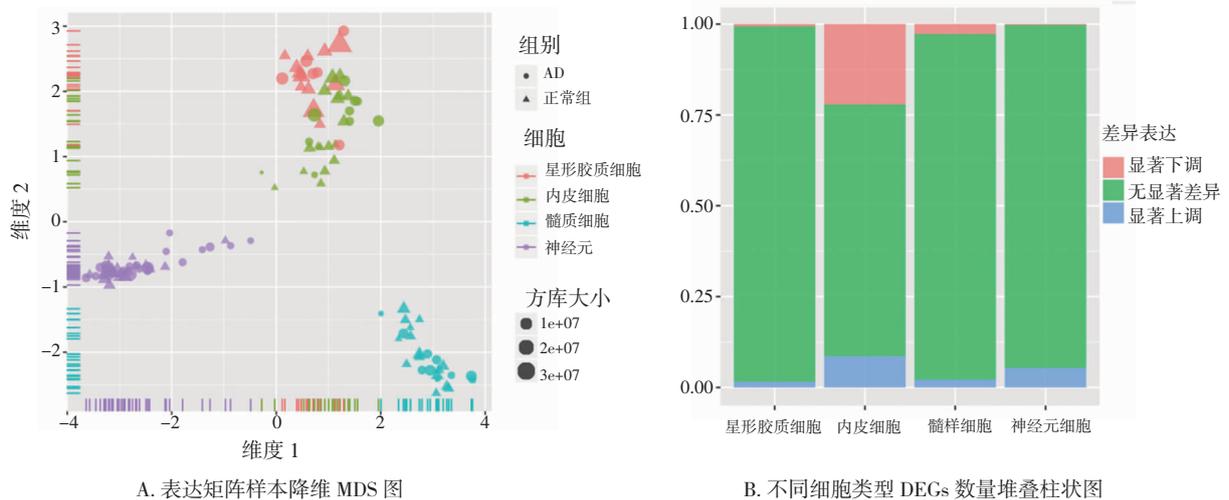


图 1 样本基因表达趋势和差异表达情况

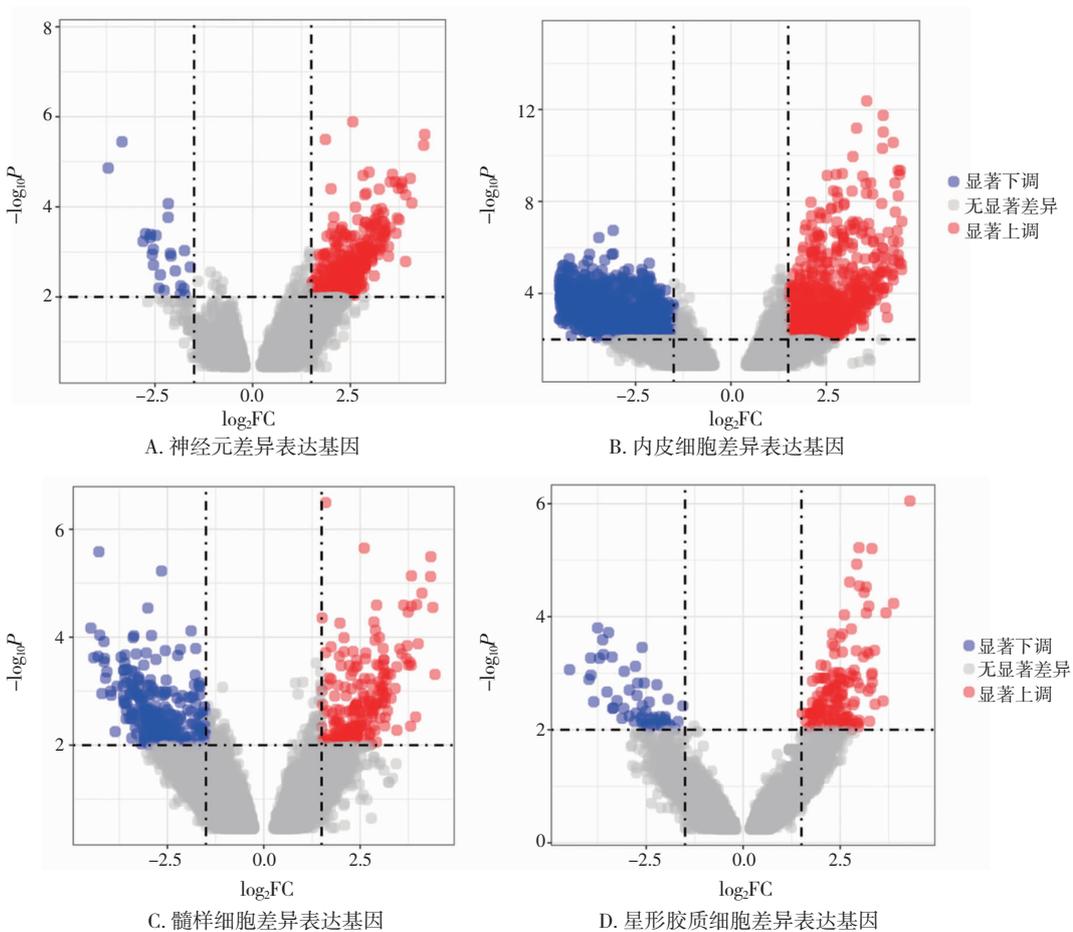


图 2 差异表达基因的火山图

质区细胞的 DEGs 显著富集在跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路(GO:0007178)、嗅觉传导(hsa04740);星型胶质细胞的 DEGs 显著富集在表皮发育(GO:0008544)。

2.4 基因集富集分析(GSEA)

选取神经元和皮质区细胞的 AD 与正常对照的基因集,利用差异表达倍数分别进行 GSEA 分析,其中神经元的差异表达与抗坏血酸和醛酸代谢(hsa00140,图 3)、免疫激活(GO:

0002250,图 3)有关;皮质区细胞的差异表达与 G 蛋白偶联受体激活(GO:0004930,图 4)、类固醇激素生物合成(hsa00140,图 4)有关。

2.5 蛋白质-蛋白质相互作用网络枢纽基因的筛选

根据富集分析的结果,神经元在 AD 和正常组筛选出来的 DEGs 与众多的生物学过程和通路相关,所以选取神经元的 DEGs,通过 STRING 数据库与 Cytoscape 软件,进一步对

表 2 Metascape GO 和 KEGG 分析结果

细胞类型	功能编号	富集功能	基因数	log <sub>10</sub> P
神经元	R-HSA-418555	G蛋白的 α 亚基信号	31	-10.99
	GO:0031424	角质化过程	16	-7.17
	GO:0007389	模式特异性过程	21	-6.12
	M5885	NABA ECM 相关蛋白	28	-5.88
	GO:0002325	自然杀伤细胞分化参与免疫应答	3	-4.63
	GO:0035136	前肢形态发生	5	-3.67
	GO:0052548	内肽酶活性的调节	16	-3.65
	GO:0098542	对其他生物体的防御反应	19	-3.54
	hsa04060	细胞因子 - 细胞因子受体相互作用	12	-3.51
	GO:0032760	肿瘤坏死因子生成的正调控	6	-2.97
	GO:0042445	激素代谢过程	10	-2.91
	GO:0002366	白细胞活化参与免疫反应	20	-2.81
	GO:0007190	腺苷酸环化酶活性的激活	4	-2.74
内皮细胞	R-HSA-381753	嗅觉信号通路	96	-31.42
	GO:0031424	角质化过程	60	-22.00
	R-HSA-500792	GPCR 配体结合	72	-12.66
	M5885	NABA ECM 相关蛋白	86	-7.56
	GO:0018149	肽交联	15	-5.58
	GO:0007218	神经肽信号通路	19	-4.73
	GO:0019730	抗微生物体液反应	21	-4.69
	GO:0001990	激素对体动脉血压的调节作用	11	-4.67
	GO:0050953	光刺激的感觉知觉	29	-3.94
	GO:0007178	跨膜受体蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶信号通路	13	-3.97
髓样细胞	hsa04740	嗅觉传导	14	-3.79
	GO:0021892	大脑皮层 GABA 能中间神经元分化	3	-3.74
	GO:0009954	近端/远端模式形成	4	-3.52
星型胶质细胞	GO:0008544	表皮发育	12	-4.49
	hsa04950	青少年成熟型糖尿病	3	-3.27

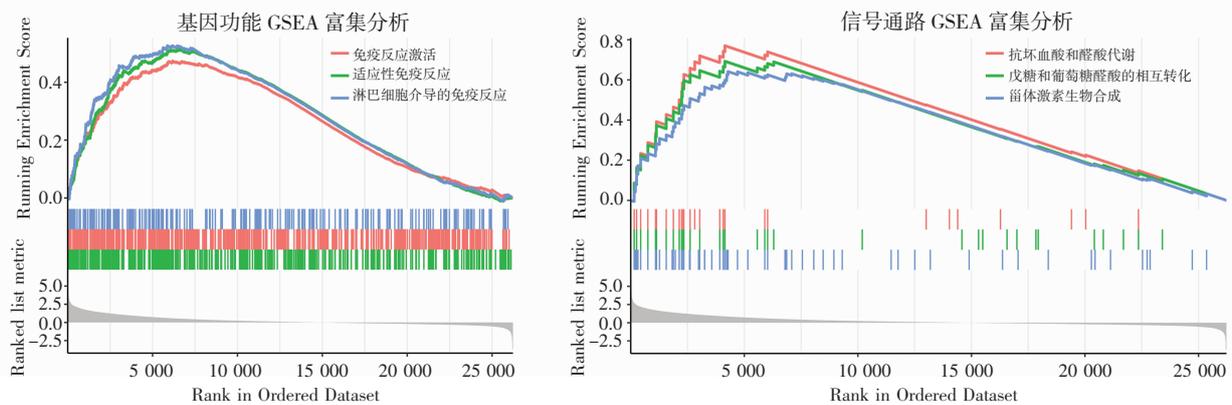


图 3 神经元差异表达基因集富集分析

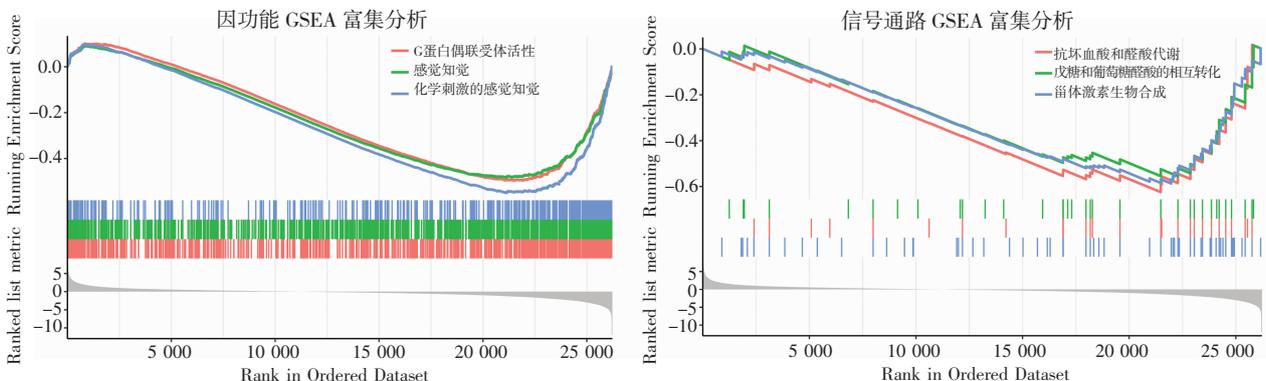
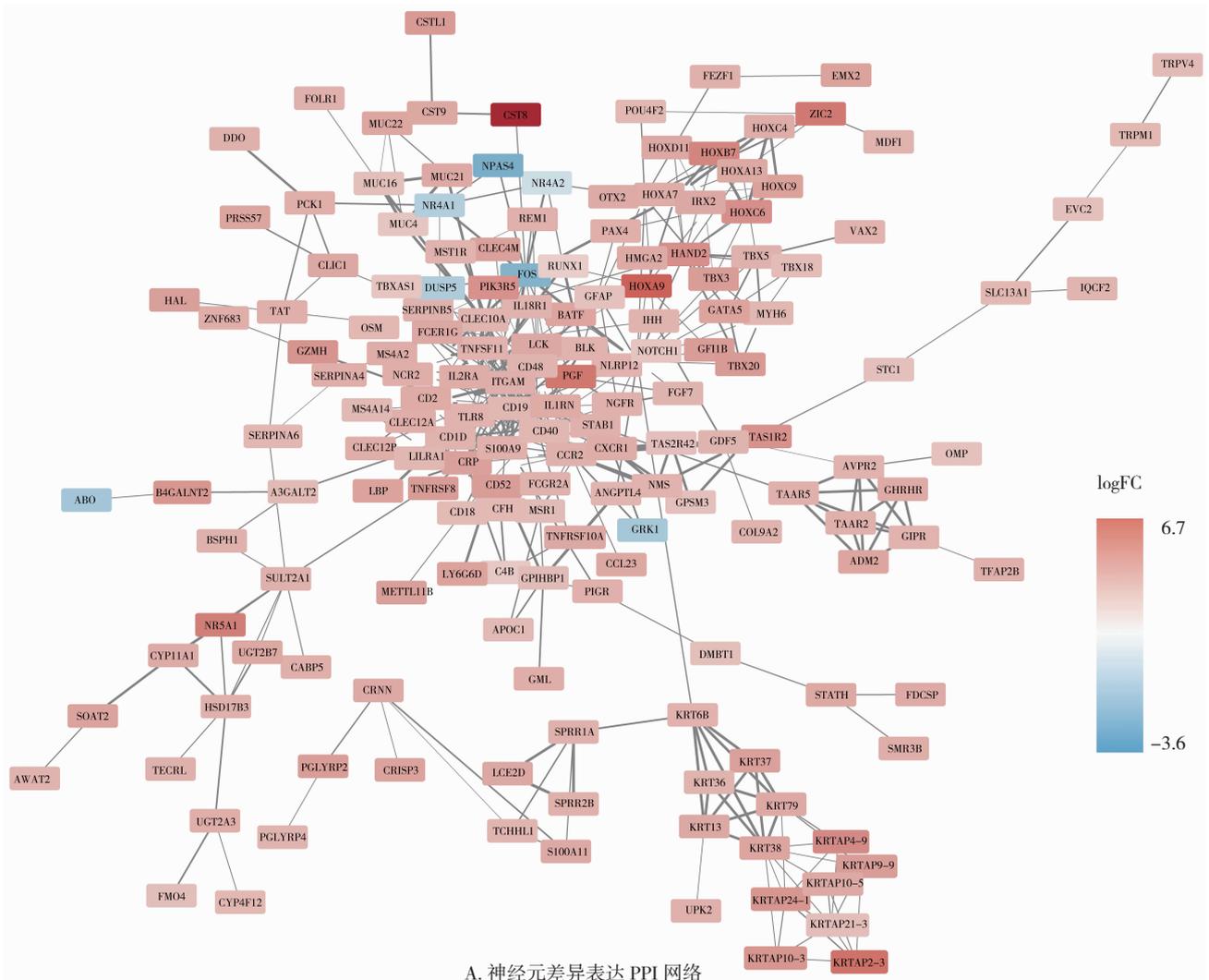
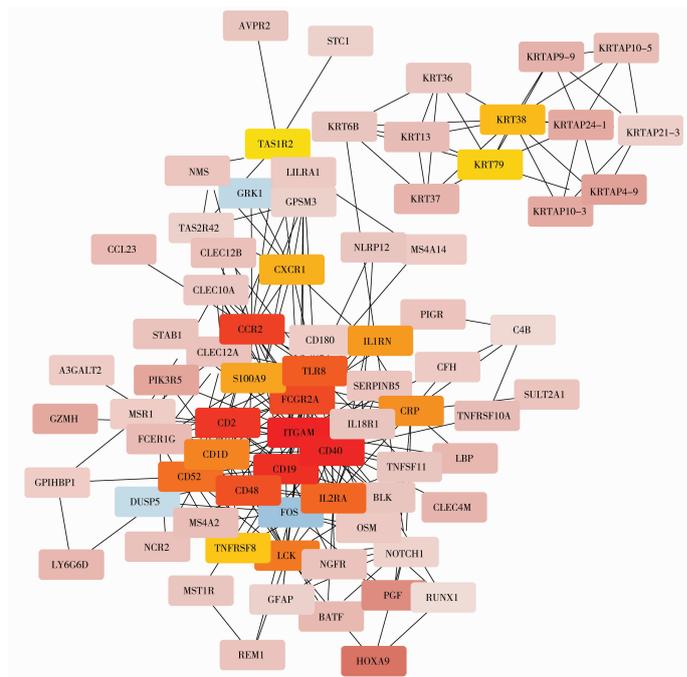


图 4 内皮细胞差异表达基因集富集分析



A. 神经元差异表达 PPI 网络



B. PPI 网络中连接度最高的 20 个蛋白 (从红色到黄色) 及与其直接相连的蛋白

图 5 差异基因的 PPI 网络分析

神经元 mRNA 表达差异的下游蛋白相互作用进行预测。使用 MCODE 对整个网络进行聚类分析,发现 TLR8、FCGR2A、CD19、LCK、CD2、CD40、ITGAM 等 12 个基因为核心的子网络(图 6),通过网络中连接度(degree)筛选发现最高的 20 个枢纽基因(图 5B),其中多个基因同时处于核心子网络中。

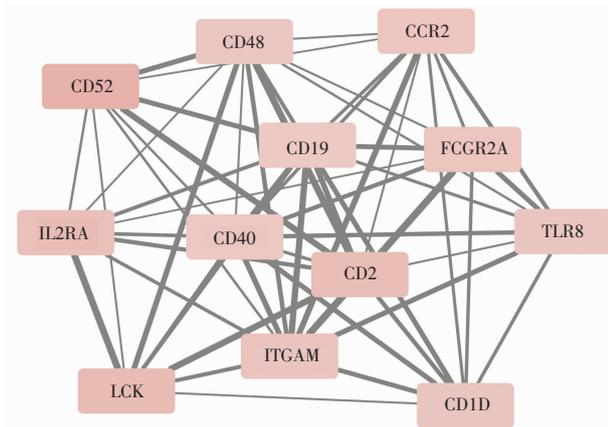


图 6 PPI 网络中筛选的核心子网络

### 3 讨论

#### 3.1 生物信息学与疾病研究

高通量测序技术的日益成熟,给疾病的研究带来巨大的机遇,通过转录组测序可从转录组 mRNA 水平上对疾病的 mRNA 表达差异进行筛选,后续研究可进一步从蛋白上验证。结合蛋白的功能、蛋白的核定位、蛋白所在的信号通路展开一系列研究,最后为药物的开发或研究疾病的发病机制等研究提供靶基因或靶蛋白。本研究差异分析使用 edgeR 程序包,其中包含一系列基于负二项分布的统计方法,包括经验贝叶斯估计、精确检验、广义线性模型和准似然检验,是 Bioconductor 中最常用的 RNA-seq 差异分析 R 包之一。基因集富集分析(GSEA)<sup>[11]</sup>对整个基因数据集的差异表达进行功能和通路的富集得分计算,没有选定差异表达的阈值,可以包含表达变化较小却在功能水平上有整体改变的通路,而传统的 GO 和 KEGG 指定差异基因的阈值,对选中的基因也没有表达差异大小的区别,容易遗漏部分差异表达不显著却有重要生物学意义的基因,因此 GSEA 预期得到更为理想的结果。

#### 3.2 AD 发病的免疫学研究

由于 AD 发病原因不明,目前尚无特效疗法,目前该病已成为严重影响人群生活质量的疾病之一。它的主要表现为认知功能障碍,且研究发现在 AD 早期就已出现认知功能损害,因此,深入探讨 AD 认知

功能损害的机制,对于探寻治疗 AD 药物作用的靶点、开发防治 AD 的药物具有重要意义。

越来越多的证据证明 AD 的发病不仅限于中枢神经  $\beta$  淀粉样蛋白沉积和神经纤维缠结,许多基于  $\beta$  淀粉样蛋白沉积理论开发的药物都宣告失败后, $\beta$  淀粉样蛋白理论受到质疑,AD 的药物开发和疾病的基础理论研究遇到极大的困难<sup>[4,14-15]</sup>。最近很多研究发现 AD 的发病与脑内免疫、炎症激活紧密相关<sup>[16-17]</sup>,甚至还有使用抗炎药物治疗 AD 的研究。

#### 3.3 神经炎症相关的核心基因

本研究从美国国立生物技术信息中心 GEO 数据库下载 AD 脑额上回组织、RNA-seq 数据的基因计数表达矩阵,其中包含分离的内皮细胞、髓样细胞、星型胶质细胞、神经元 4 种细胞类型的样本。通过对 4 种细胞类型的表达矩阵、样本进行 MDS 降维可视化,观察样本间异质性与匀质性,包括对样本的 AD 组与正常组、4 种不同组织、不同的样本测序深度这几个标准观察数据的分布特征,从而对整个表达矩阵有整体的认识。从图 1A 看出,星型胶质细胞的表达与内皮细胞表达较为相似,而其他几种细胞间的表达异质性较高,同时不同样本间的测序深度相差不大。对 4 种细胞分别进行差异表达分析,筛选表达差异倍数  $|\log_2FC| > 1.5$  且  $P < 0.01$  作为 DEGs,并进行富集分析和对差异基因的功能和通路进行注释,对差异基因的生物学意义进行研究和分析。

综合对 4 种细胞类型的 DEGs 富集分析结果,选取富集分析最显著的神经元部分 DEGs 进行蛋白质-蛋白质相互作用网络进行分析,从蛋白质层面上寻找网络中调控的枢纽基因。

通过 GSEA 的 GO 富集分析发现神经元的差异表达与免疫激活、适应性免疫激活等多种免疫功能相关,同时 metascape 的富集分析也显示与免疫调控的生物学功能(淋巴细胞调控的免疫激活、细胞因子受体相互作用等)相关,结合 PPI 网络中核心子网络与枢纽基因,都发现其中枢纽基因大部分与免疫功能相关。

Milan F 等<sup>[18]</sup>发现 AD 患者把  $A\beta$  转运到溶酶体内分解的能力变弱,正常组细胞在  $A\beta$  的刺激下能通过上调 TLRs、MGAT3 对  $A\beta$  的分解起调控作用,并证明天然产物姜黄素通过调控 AD 患者的固有免疫系统,和 Toll 样受体起治疗作用。本研究中 PPI 也发现 TLR8 的核心网络位置。同时结合富集分析结果,提示通过筛选具有免疫调节作用的中药用于 AD 的治疗有相当的潜力。

核心的子网络分析结合文献检索,发现其中大部分基因都被报道与 AD 相关,如 CD40 被发现与 A $\beta$  的协同促炎反应及神经元损伤有关<sup>[19]</sup>,CCR2 与调控 AD 的趋化因子 MCP-1 共同介导 AD 的炎症过程<sup>[20]</sup>,而 FCGR2A、IL2RA、CD48、CD52、CD1D 未发现与 AD 的研究。结合基因蛋白数据库,FCGR2A 是细胞膜上的免疫相关蛋白,与吞噬作用相关,而膜蛋白的功能可能与胞外免疫信号的传递及 A $\beta$  的代谢相关,可作为新的 AD 研究候选靶点基因,对其功能进行研究也许能发现更多与 AD 发病相关的功能分子。

内皮细胞 GSEA 的 KEGG 富集分析发现,AD 与类固醇激素合成通路相关,同时也有众多文献报道雌激素和孕激素的急剧消耗会增加 AD 发病的易感性,类固醇激素具有对抗炎症反应和众多 AD 的风险因素,对 AD 具有保护作用<sup>[21-22]</sup>。同时,根据本文的分析推测此作用可能与调控内皮细胞的功能有关。

综上所述,本研究通过公共数据库资源分析了 AD 患者脑内 4 种细胞类型样本的转录组 RNA-seq 数据,通过对数据的质控、差异表达分析、基因功能富集分析和 PPI 网络的构建,发现神经元部分的 DEGs 中 TLR8、FCGR2A、CD19、LCK、CD2、CD40、ITGAM 等基因处于蛋白质网络的核心调控位置,GSEA 富集发现 DEGs 与固有免疫激活、类固醇激素合成等通路有关,通过差异基因的分析为 AD 发病的分子机制研究和药物开发提供新的靶点、通路和方向。

## 参 考 文 献

[1] Mormino EC. The relevance of beta-amyloid on markers of Alzheimer's disease in clinically normal individuals and factors that influence these associations[J]. *Neuropsychol Rev*, 2014, 24(3): 300-312.

[2] Ikonovic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, et al. Precuneus amyloid burden is associated with reduced cholinergic activity in Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 2011, 77(1): 39.

[3] McGeer EG, McGeer PL. Innate immunity in Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions[J]. *Mol Interv*, 2001, 1(1): 22-29.

[4] Venegas C, Kumar S, Franklin BS, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid-beta in Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2017, 552(7685): 355-361.

[5] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.

[6] McCarthy DJ, Yunshun C, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(10): 4288-4297.

[7] Chen Y, Lun A, Smyth GK. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline[J]. *F1000Research*, 2016, 5: 1438.

[8] Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data[J]. *Genome Biol*, 2010, 11(3): 1-9.

[9] Dudoit S, Gentleman RC, Quackenbush J. Open source software for the analysis of microarray data[J]. *Biotechniques*, 2003, 35: 45-51.

[10] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287.

[11] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545-15550.

[12] Andrea F, Damian S, Sune F, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D): 808-815.

[13] Ginestet C. ggplot2: elegant graphics for data analysis by H. Wickham[J]. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc*, 2011, 174(1): 245-246.

[14] Heneka MT, Carson MJ, Joseph EK, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 14(4): 243-256.

[15] Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease[J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(5): 307-321.

[16] Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, et al. Neuroinflammation and Alzheimer's disease: implications for microglial activation[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(11): 1140-1148.

[17] Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(6): 719-732.

[18] Milan F, Liu PT, Araceli EJ, et al. Innate immunity and transcription of MGAT-III and Toll-like receptors in Alzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31): 12849-12854.

[19] Town T, Tan J, Mullan M. CD40 signaling and Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Neurochem Int*, 2001, 39(5-6): 371-380.

[20] Kai Z, Haiping W, Mei X, et al. Role of MCP-1 and CCR2 in ethanol-induced neuroinflammation and neurodegeneration in the developing brain[J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 197.

[21] Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER, et al. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2009, 30(2): 239-258.

[22] Uchoa MF, Moser VA, Pike CJ. Interactions between inflammation, sex steroids, and Alzheimer's disease risk factors[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2016, 43: 60-82.