

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000330

不同年龄段雌性 APP/PS1 双转基因小鼠脑内病理特征的动态变化

刘 刚, 廖 娥, 钟国超, 王凌晞, 周泽芬, 贺桂琼

(重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨不同年龄段雌性阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠脑内特征性病理改变的动态变化。**方法:**选取 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄雌性 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠各 6 只, 断头取脑后行石蜡包埋、切片、免疫组化染色, 光镜下观察。**结果:**免疫组化结果显示, 3 月龄 AD 模型小鼠脑内神经细胞外偶尔可见 β 淀粉样蛋白(amyloid β peptide, A β) 沉积形成的老年斑(senile plaque, SP), 且 SP 体积很小; 随着年龄的增长, AD 模型小鼠脑内 SP 不仅数量增多, 而且体积明显增大($M_3=0.600 \pm 0.235$, $M_8=8.933 \pm 1.730$, $M_{12}=28.470 \pm 1.841$, $M_{16}=94.130 \pm 4.287$; $P_1=0.025$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$ (M_3 、 M_8 、 M_{12} 、 M_{16} 分别代表 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄, P_1 、 P_2 、 P_3 分别代表 M_3 同 M_8 、 M_8 同 M_{12} 、 M_{12} 同 M_{16} 比较所得 P 值, 下同)]; AD 模型小鼠脑内神经元标志物 NeuN 的阳性细胞数量随年龄增长呈进行性下降的趋势 ($M_3=1\ 919.00 \pm 58.21$, $M_8=1\ 717.00 \pm 65.83$, $M_{12}=1\ 689.00 \pm 45.66$, $M_{16}=1\ 529.00 \pm 45.36$; $P_1=0.011$, $P_2=0.712$, $P_3=0.043$); 而星形胶质细胞(astrocyte, AC)标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的阳性细胞数量则随着年龄增长不断增多 ($M_3=9.2 \pm 6.7$, $M_8=1\ 053.0 \pm 171.3$, $M_{12}=2\ 058.0 \pm 210.8$, $M_{16}=3\ 283.0 \pm 240.30$; $P_1=0.000$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$); 而促进 A β 生成的关键酶 β -分泌酶(β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 的阳性细胞数量随年龄不断增长增多 ($M_3=2\ 183.00 \pm 85.43$, $M_8=3\ 466.0 \pm 142.5$, $M_{12}=4\ 555.00 \pm 83.23$, $M_{16}=5\ 237.00 \pm 133.40$; $P_1=0.000$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$), 蛋白质印迹(Western blot, WB)也得到同样的结果。**结论:**雌性 APP/PS1 双转基因小鼠 3 月龄开始出现典型 AD 病理改变, 随着年龄的增长, 病理改变逐渐加重, 无逆转迹象。

【关键词】阿尔茨海默病; 老年斑; 神经元; 星形胶质细胞; β -分泌酶**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-09

Dynamic pathological changes in the brain of female APP/PS1 double transgenic mice with different ages

Liu Gang, Liao E, Zhong Guochao, Wang Lingxi, Zhou Zefen, He Guiqiong

(Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To discuss the dynamic pathological changes in the brain of female Alzheimer's disease (AD) mice with different ages. **Methods:** Totally 24 APP/PS1 double transgenic mice with AD of 3, 8, 12, 16-month-age were chosen (6 mice for each age group). Light microscopic observation was performed after Paraffin embedding, sectioning and immunohistochemical staining. **Results** Immunohistochemical results showed that, amyloid β peptide (A β) and senile plaque (SP) can be occasionally observed. With the increase of the age, the volume and number of SP were increased ($M_3=0.600 \pm 0.235$, $M_8=8.933 \pm 1.730$, $M_{12}=28.470 \pm 1.841$, $M_{16}=94.130 \pm 4.287$; $P_1=0.025$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$) (M_3 , M_8 , M_{12} , M_{16} stands for 3, 8, 12, 16 months respectively; P_1 , P_2 , P_3 stands for the comparison of P value between M_3 and M_8 , M_8 and M_{12} , M_{12} and M_{16}). Accordingly, NeuN positive cells in the brain of mice were in a declined trend ($M_3=1\ 919.00 \pm 58.21$, $M_8=1\ 717.00 \pm 65.83$, $M_{12}=1\ 689.00 \pm 45.66$, $M_{16}=1\ 529.00 \pm 45.36$, $P_1=0.011$, $P_2=0.712$, $P_3=0.043$), glial fibrillary acidic protein-positive cells were increased ($M_3=9.2 \pm 6.7$, $M_8=1\ 053.0 \pm 171.3$, $M_{12}=2\ 058.0 \pm 210.8$, $M_{16}=3\ 283.0 \pm 240.3$; $P_1=0.000$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$) and β -site APP cleaving enzyme 1 positive cells were increased ($M_3=2\ 183.00 \pm 85.43$, $M_8=3\ 466.00 \pm 142.50$, $M_{12}=4\ 555.00 \pm 83.23$, $M_{16}=5\ 237.00 \pm 133.40$; $P_1=0.000$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$). Similar results were achieved by Western blot. **Conclusion:** Female APP/PS1 double transgenic mice display typical AD pathological changes from the age of 3 months to 16 months. The pathological changes gradually increase with increasing of age, without reversal.

【Key words】Alzheimer's disease; senile plaque; neuron; astrocyte; β -site APP cleaving enzyme 1

作者介绍: 刘 刚, Email: adsl_3124210@126.com,

研究方向: 阿尔茨海默病的发生机制。

通信作者: 贺桂琼, Email: guiqionghe@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30970986); 教育部“新世纪优秀人才”支持计划资助项目(编号: NCET-11-1084); 留学人员科技活动项目择优资助项目[编号: 渝人社办(2011)235号]; 重庆医科大学大学生科研与创新实验资助项目(编号: 201221)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150127.1503.001.html>

(2014-05-23)

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种高发率的中枢神经系统退行性疾病,以进行性记忆力减退、认知功能障碍及人格改变为主要临床症状。目前关于 AD 的病因和发病机制尚未弄清。病理分析发现,AD 脑内的主要病理特征有:神经细胞外 β 淀粉样蛋白 (amyloid β peptide, A β) 沉积形成的老年斑 (senile plaques, SP)、细胞内 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)、大量神经元丢失以及 SP 周围胶质细胞的活化等。A β 被认为是 AD 发生发展的核心病理因素^[1-3]。A β 是淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 分别经 β -和 γ -分泌酶相继作用产生。 β -分泌酶 (β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 是 β -分泌酶的主要形式,且决定该酶的活性;而早老素 (presenilin, PS) 是 γ -分泌酶复合物的催化活性中心,其异常突变是引起家族性 AD 的主要原因^[4]。

研究 AD 的病理过程、发病机制及防治需要合适的动物模型。近年来由于 AD 转基因动物模型的培养,为 AD 的研究提供了理想的工具。但转基因动物的遗传背景 (如转基因的数量、插入位置等) 和性别对病理有很大影响。而近年来流行病学调查发现,女性 AD 的发病率为男性的 3 倍,因此本文研究不同年龄段雌性 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠脑内病理特征的动态变化,以探讨本课题组所获动物模型的应用价值,为女性 AD 患者的病理改变的发生发展机制提供一定的帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

鼠抗 GFAP 单克隆抗体 (Cell signaling, 3670), 鼠抗 4G8 单克隆抗体 (Covance, SIG-39240), 鼠抗 NeuN 单克隆抗体 (Millipore, MAB377B), 兔抗 BACE1 多克隆抗体 (Abcam, ab108394), ABC 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥, DAB 试剂盒购自美国 Pierce 公司,其他均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 雌性 B6C3-Tg (携带人 APP^{swe}, PSEN1 Δ 9) 双转基因 AD 模型鼠购自美国国立 Jackson 动物中心。取 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄雌性 APP/PS1 转基因小鼠 (每组 6 只, 体质量 25~30 g), 分笼喂养于光照/黑暗为 12 h/12 h 的恒温环境, 自由摄食和饮水。实验遵循重庆医科大学实验动物使用相关伦理要求。

1.2.2 脑组织形态学检测 动物标本的制备: 小鼠达实验所

需月龄后, 用 2% 水合氯醛麻醉, 经左心室快速灌注生理盐水 20 ml, 冰上取脑, 左侧脑组织 -80 °C 冻存; 右侧脑组织放入 4% 多聚甲醛固定 72 h, 常规 70% 酒精脱水、石蜡包埋, 然后进行冠状切片, 厚度 4 μ m。

免疫组化染色: 步骤依照 S-P 试剂盒说明书进行, 具体如下: 切片经二甲苯脱蜡, 常规水化 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), pH7.4, 冲洗 3 次 (5 min/次), 枸橼酸钠水浴抗原修复后, 1 $\times$ PBS 冲洗 3 次 (5 min/次), 分别加入 I 抗: 4G8 (浓度 1:500)、GFAP (浓度 1:150)、NeuN (1:300)、BACE1 (1:100), 4 °C 过夜; 1 $\times$ PBS 冲洗 3 次 (5 min/次), 分别加入二抗 (北京中杉), 于 37 °C 孵育 30 min 后, 1 $\times$ PBS 冲洗 3 次 (5 min/次), 用硫酸镍氨加强法 DAB (Pierce, USA) 显色。常规脱水、透明、封片, 光镜下观察。

1.2.3 Western blot 检测 取左侧半脑海马和大脑皮质提取蛋白, 并按照 BCA 试剂盒测定蛋白的浓度。取蛋白样品 100 μ g, 经过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白电转至 0.45 μ m PVDF 膜上, 以 Western blot 封闭液 (中山金桥) 室温封闭 120 min 后, 加入一抗 BACE1 抗体 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 洗涤后加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗 (1:1 000) 37 °C 孵育 30 min 后, 电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 曝光显影压制成胶片, 采用 Image Pro Plus 6.0 分析测定各蛋白条带的强弱。

1.3 统计学处理

用 Image Pro Plus 6.0 软件对免疫组化显示免疫阳性细胞或斑块数量进行分析, 每只小鼠选择同一平面大脑皮质切片, 每张切片随机选取 3 个大脑皮质视野进行分析; Western blot 反应条带灰度值。采用 SPSS 17.0 统计软件先进行单因素方差分析, 两组之间差异比较采用 SNK- q 检验, 统计结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并用 GraphPad Prism 5 做柱状图分析, 检验水准 ($\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 各年龄段雌性 AD 模型小鼠脑内 A β 及 SP 的动态变化

免疫组化实验中所用抗体 4G8, 为靶向 A β 17-24 氨基酸序列的抗体, 4G8 阳性即代表 A β 沉积形成的 SP。实验结果显示, 3 月龄小鼠脑内偶可见深褐色的 4G8 阳性斑块, 体积小, 主要见于大脑皮质 (图 1A); 8 月龄、12 月龄和 16 月龄小鼠脑内 SP 数量随年龄增长而递增, 斑块体积大小不等, 广泛分布于大脑皮质及海马各层 (图 1B~1D)。

4G8 阳性斑块计数及统计分析结果显示, 各年龄段 AD 模型小鼠脑内 SP 数量存在差异, 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠 SP 数量分别为 0.600 ± 0.235 、 8.933 ± 1.730 、 28.470 ± 1.841 和 94.130 ± 4.287 ($F=273.437$, $P=0.000$), 然后相邻年龄段进行比较, 差异具有统计学意义 ($P_1=0.025$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$, 其中 P_1 、 P_2 、 P_3 分别代表 3 月龄同 8 月龄、8 月龄同 12 月龄、12 月龄同 16 月龄采用 SNK 法比较所得 P 值, 下同)。

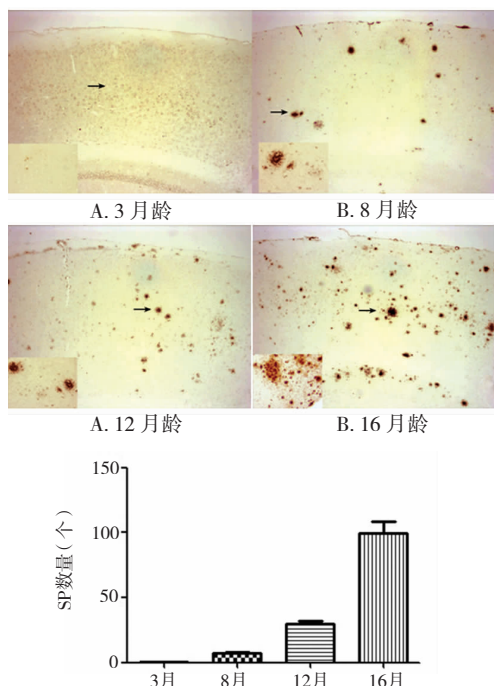


图 1 SP 在 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠脑内表达(100×)

Fig.1 SP expression in the brains of 3, 8, 12, 16-month-age mice(100×)

2.2 各年龄段雌性 AD 模型小鼠脑内 BACE1 表达的动态变化

免疫组化结果显示,3 月龄小鼠 BACE1 阳性细胞广泛分布于全脑(图 2A);8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠脑内 BACE1 阳性细胞逐渐增加,且出现由其组成的团状大小不等斑块样改变,数量上也逐渐增加(图 2B~2D)。

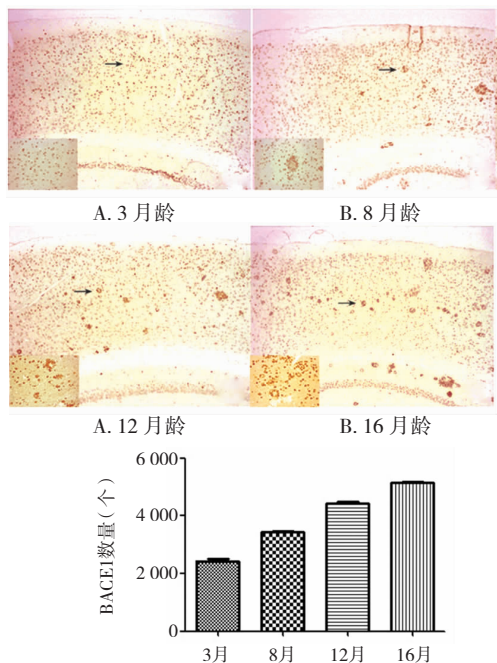


图 2 BACE1 在 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠脑内表达(100×)

Fig.2 BACE1 expression in the brains of 3, 8, 12, 16-month-age mice(100×)

BACE1 免疫阳性细胞计数及统计分析结果显示,各年龄段 AD 模型小鼠脑内 BACE1 数量存在差异,3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠 BACE1 数量分别为 $2\ 183.00 \pm 85.43$ 、 $3\ 466.00 \pm 142.50$ 、 $4\ 555.00 \pm 83.23$ 和 $5\ 237.00 \pm 133.40$ ($F=163.173$, $P=0.000$),然后相邻年龄段进行比较,差异具有统计学意义($P_1=0.000$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$)。

2.3 各年龄段雌性 AD 模型小鼠脑内星形胶质细胞(astrocyte, AC)的动态变化

GFAP 为 AC 的特异性抗原。实验结果显示,3 月龄小鼠脑内 GFAP 阳性细胞仅在海马内表达(图 3A),随着年龄的增长,小鼠大脑皮质内 GFAP 数量逐渐增加,至 16 月,GFAP 阳性细胞已在皮质全层均有表达,而在海马内表达未见明显改变(图 3B~3D)。

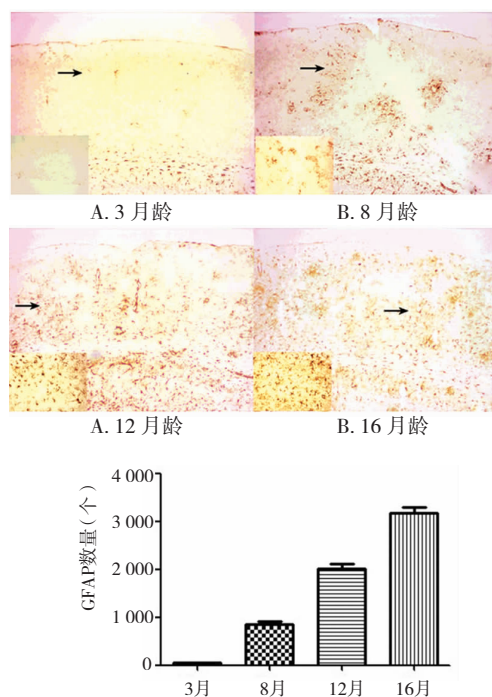


图 3 GFAP 在 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠脑内表达(100×)

Fig.3 GFAP expression in the brains of 3, 8, 12, 16-month-age mice (100×)

GFAP 免疫阳性细胞在大脑皮质计数及统计分析结果显示,随着 AD 模型鼠年龄的增加,GFAP 数量快速增长,3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠 GFAP 数量分别为 9.2 ± 6.7 、 $1\ 053.0 \pm 171.3$ 、 $2\ 058.0 \pm 210.8$ 和 $3\ 283.0 \pm 240.3$ ($F=59.525$, $P=0.000$),然后相邻年龄段进行比较,差异具有统计学意义($P_1=0.000$, $P_2=0.000$, $P_3=0.000$)。

2.4 各年龄段雌性 AD 模型小鼠脑内神经元的动态变化

NeuN 为神经元特异的核蛋白抗原。实验结果显示,各年龄段小鼠脑内 NeuN 阳性细胞均广泛分布于全脑(图 4A~4D)。

NeuN 免疫阳性细胞计数及统计分析结果显示,随着年龄的增长,AD 模型小鼠大脑皮质内神经元逐渐减少,行单因素

方差分析显示($F=8.625, P=0.000$), 3 月龄($1\ 919.00 \pm 58.21$)与 8 月龄($1\ 717.00 \pm 65.83$)比较($P_1=0.011$), 12 月龄($1\ 689.00 \pm 45.66$)与 16 月龄($1\ 529.00 \pm 45.36$)比较($P_3=0.043$), 具有统计学差异; 而 8 月龄与 12 月龄小鼠相比, 无统计学差异($P_2=0.712$)。

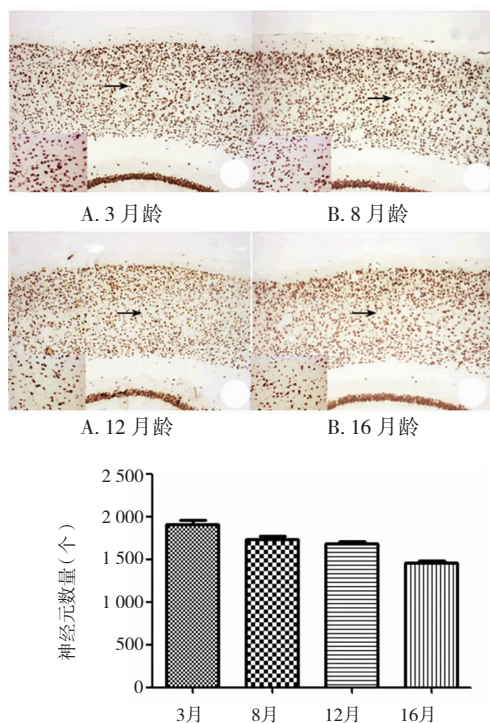


图4 神经元在 3 月龄、8 月龄、12 月龄、16 月龄小鼠脑内表达(100×)

Fig.4 NeuN expression in the brains of 3, 8, 12, 16-month-age mice(100×)

2.5 各年龄段雌鼠大脑皮质及海马 BACE1 蛋白表达变化

Western blot 结果分析显示, 随着小鼠年龄增加, BACE1 蛋白含量在小鼠大脑皮质海马区域也逐渐增加(图 5、图 6)。3、8、12、16 月龄蛋白表达量分别为 $2\ 946\ 000 \pm 323\ 000$ 、 $4\ 757\ 000 \pm 484\ 500$ 、 $6\ 691\ 000 \pm 177\ 800$ 和 $7\ 697\ 000 \pm 285\ 300$ ($F=44.707, P=0.000$), 然后相邻年龄段进行比较, 差异具有统计学意义($P_1=0.000, P_2=0.000, P_3=0.042$)。

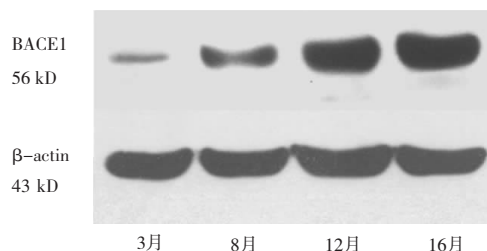


图5 Western blot 检测各年龄段小鼠脑内 BACE1 蛋白表达

Fig.5 BACE1 expression in the brains of mice with different ages detected by Western blot

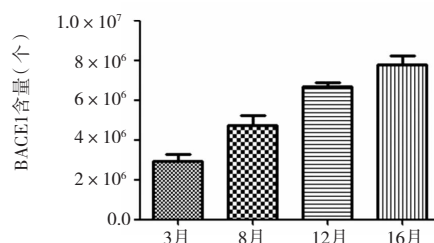


图6 BACE1 各年龄段小鼠脑内的蛋白表达量及其比较分析

Fig.6 BACE1 expression in the brains of mice with different ages and its comparison

3 讨论

AD 是引起老年人进行性智力障碍最常见的病因。既往研究表明, APP 和(或)PS 基因突变是引起家族性 AD 的主要原因, 而利用转基因技术将突变的 AD 致病基因导入动物体内所建立起来的转基因动物模型为研究 AD 提供了新途径。目前最为广泛使用的是突变 APP 和 1 或 PS 基因的单转或双转基因动物, 这类转基因动物能模拟 AD 渐进性的退行性改变, 成为用于研究 AD 病理过程和药物开发的理想模型。但不同遗传背景的 AD 模型小鼠, 其脑内病理变化的特点及出现的时间不尽相同。因此, 明确所使用转基因小鼠行为学及脑组织形态学变化的特征, 将有助于为后续的 AD 发病机制及药物筛选的研究提供可靠的基础。

$A\beta$ 是由其前体蛋白 APP 分别经 β -和 γ -分泌酶相继作用产生, β -分泌酶是 $A\beta$ 形成的关键限速酶, 直接参与 $A\beta$ 的形成, 而 $A\beta$ 过量堆积导致 SP 的形成。目前确定的 β -分泌酶有 BACE1、BACE2、memapsin2 和 Asp2。BACE1 是一种具有跨膜结构的天冬氨酸酶, 具有该酶已知的所有功能和特性, 在多种组织都有表达, 而在脑和胰腺中存在高表达, 但在胰腺中 BACE1 无活性片段, 脑内神经元中活性较高。AD 患者脑内, 有 $A\beta$ 沉积的前皮层中 BACE1 的表达量是无 $A\beta$ 沉积的小脑的 3 倍^[5]。Brady 等^[6]发现, BACE1 缺失的小鼠脑内不产生 SP; β -分泌酶基因敲除小鼠(BACE1^{-/-})生长正常, 对形态学、组织学、解剖学、血液学以及动物行为等分析结果显示它们与正常小鼠(BACE1^{+/+})无统计学差异, 而且 BACE1^{-/-}小鼠的脑中 β -分泌酶活性消失。SP 最早出现时间与转基因模型小鼠品系密切相关, 本课题组所使用的该品系 AD 模型小鼠 3 月龄时脑内即可见极少量 SP, 随年龄的增长, SP 不仅数量增多、分布更广且体积明显增大^[7], 且 SP 的增多与小鼠脑内 BACE1 表达的增强呈正相关; Western blot 结果

也证实随着小鼠年龄的增加, 大脑皮质及海马中 BACE1 蛋白含量逐渐增加。本实验进一步印证了 BACE1 增强可加速 APP 水解, 产生过量的 A β , 从而导致 SP 沉积增多。

AC 是中枢神经系统的免疫吞噬细胞, 是胶质细胞的主要类别, 几乎囊括了胶质细胞的所有功能。大量尸检结果表明, AD 患者脑内存在严重的局灶性炎症反应, 皮质及神经炎性斑中都发现大量活化的小胶质细胞和 AC, 而正常人无此反应^[8]。AC 活化后产生和释放的神经递质、神经营养因子和毒性代谢产物, 在受体、离子通道、抗原传递、基因转录等各级水平全面影响和调节神经元的兴奋性, 参与 AD 的发病过程^[9]。A β 堆积产生的神经炎性斑也会进一步激活 AC, 释放炎性分子, 并产生细胞因子和神经毒性物质, 其机制尚未完全阐明, 但 A β 和 AC 细胞表面受体互相作用已被证实。可以说, 在 AD 患者脑内, 活化的 AC 是神经炎斑块的基本组成成分。本实验观察到, 随着年龄的增大, AD 模型小鼠脑内 AC 逐渐增加, 并与 SP 的增多呈正相关。研究显示, 在长期应激作用下, AC 内 BACE1 含量增加, 进一步加重 AD 的病理变化^[10]。在 AD 临床前阶段的病人中, 同样发现胶质细胞内 BACE1 蛋白的表达和酶的活性都增加^[11]。

神经元的丢失是 AD 患者典型的病理表现。在 AD 患者脑内, 活化的 AC 会诱导 A β 产生细胞毒性, 激活 caspase-3 酶活性, 引起细胞凋亡, 从而导致神经元的丢失。脑神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 属于神经营养因子家族, 主要在中枢神经系统内表达, 具有调控神经元的生存、生长、分化和凋亡, 能有效防止神经元的变性死亡的作用^[12]。在 AD 患者脑内, A β 可诱导 AC 快速产生 BDNF, 减轻细胞毒性, 减少神经元的丢失。研究发现, 随着 AD 模型鼠年龄段的增加, 神经元的数量逐渐减少, 但在 8 月龄和 12 月龄 AD 模型小鼠之间, 尽管 AC 仍然大量增加, SP 的数量并未减少, 神经元的丢失却得到了暂时的抑制。这是否就是本研究在寻找的活化 AC 这把双刃剑在神经元这单一因素的平衡点呢?

综上, 本课题所使用 APP/PS1 双转基因 AD 模型雌性小鼠脑内 3 月龄时即可见 SP。随着年龄的增加, 小鼠脑内的 A β 在 BACE1 作用下逐渐堆积, SP 进行性增多, 至 16 月龄, SP 的产生仍在继续。而 SP 堆积的结果导致 A β 与活化 AC 的相互作用, 从而增强 AC 内 BACE1 对 APP 加工过程, 产生过量具有神经毒性的 A β , 诱导神经元的凋亡。尽管 AC 可局限

和吞噬病损的神经元, 维持细胞的微环境, 但这种作用随着疾病的进展而逐渐丧失。由于 AC 本身受到损伤, 释放各种有害因子, 产生毒性作用, 加重神经元损伤, 总体上呈现出有害的趋势。在 AD 研究的进程中, 越来越多的证据显示 AD 的发病是多种因素作用的结果。所以, 针对 AD 患者, 怎样抑制 BACE1 活性以减少 A β 的堆积、怎样调控 AC 的功能并使其向保护神经元的方向发展, 从而给予新的治疗方案, 将成为深入研究的方向。

参 考 文 献

- [1] Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, et al. Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration[J]. *Neurosci Res*, 2006, 84(4): 782-789.
- [2] Laird FM, Cai H, Savonenko AV, et al. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions[J]. *Neurosci*, 2005, 25(50): 11693-11709.
- [3] Ji B, Maeda J, Sawada M, et al. Imaging of peripheral benzodiazepine receptor expression as biomarkers of detrimental versus beneficial glial responses in mouse models of Alzheimer's and other CNS pathologies[J]. *Neurosci*, 2008, 28(47): 12255-12267.
- [4] Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, et al. Lipoprotein lipase is a novel amyloid beta (A β)-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A β in astrocytes[J]. *Biol Chem*, 2011, 286(8): 6393-6401.
- [5] Zohar O, Cavallaro S, D'Agata V, et al. Quantification and distribution of beta-secretase alternative splice variants in the rat and human brain[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 115(1): 63-68.
- [6] Brady SF, Singh S, Crouthamel MC, et al. Rational design and synthesis of selective BACE-1 inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14(3): 601-604.
- [7] 龙志敏, 赵蕾, 贺桂琼, 等. 丙戊酸钠对雌雄 APP/PS1 双重转基因小鼠行为学及老年斑的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2011, 20(3): 205-207.
- [8] Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia[J]. *Lancet*, 2001, 358(9280): 461-467.
- [9] Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, et al. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(26): 10058-10063.
- [10] Carter SF, Scholl M, Almkvist O, et al. Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracers PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG[J]. *J Nucl Med*, 2012, 53(1): 37-46.
- [11] Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, et al. Astrocytes in Alzheimer's disease[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 399-412.
- [12] Mufson EJ, Counts SE, Fahnestock M, et al. Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4(4): 340-350.

(责任编辑: 唐宗顺)