

研究论文

1型糖尿病小鼠前额叶皮层小胶质细胞数量和Iba1表达水平的变化

王汝月¹, 王玥², 韩松¹, 刘月¹, 李俊发¹, 赵丽^{1,*}¹首都医科大学基础医学院神经生物学系, 北京 100069; ²首都医科大学附属北京朝阳医院神经内科, 北京 100020

摘要: 本文旨在研究1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)小鼠前额叶皮层小胶质细胞的激活情况以及与神经退行性疾病相关的小胶质细胞新亚型(disease-associated microglia, DAM)标志性分子表达的变化。60只健康成年雄性C57BL/6J小鼠, 随机分为正常对照(CON)组和T1DM组, 每组30只。T1DM组小鼠腹腔注射链脲佐菌素(streptozocin, STZ)建立T1DM模型。模型构建成功后第8周通过Morris水迷宫检测小鼠空间学习记忆能力, 通过免疫荧光染色法和Western blot检测小鼠前额叶皮层小胶质细胞数量及激活情况, 通过RT-FQ-PCR法检测多个DAM标志性分子mRNA水平的变化。结果显示, 与CON组相比, T1DM组小鼠空腹血糖明显升高, 体重显著降低, 水迷宫逃避潜伏期明显延长, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与CON组相比, T1DM组小鼠前额叶皮层Iba1蛋白表达水平上调, 且小胶质细胞数目明显增多($P < 0.05$), 胞体增大, 呈现激活状态。同时, T1DM组小鼠前额叶皮层多个DAM标志性分子mRNA水平显著升高($P < 0.05$)。以上结果提示, T1DM小鼠前额叶皮层小胶质细胞被激活, 且向DAM型转化。

关键词: 1型糖尿病; 认知功能障碍; 小胶质细胞**中图分类号:** R322.81

Changes in microglia number and Iba1 expression level in the prefrontal cortex of type 1 diabetic mice

WANG Ru-Yue¹, WANG Yue², HAN Song¹, LIU Yue¹, LI Jun-Fa¹, ZHAO Li^{1,*}¹Department of Neurobiology, School of Basic Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; ²Department of Neurology, Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Abstract: The aim of the present study was to observe the activation of microglia in the prefrontal cortex of type 1 diabetes mellitus (T1DM) mice, and the expression of the marker genes of the disease-associated microglia (DAM) associated with neurodegenerative diseases. Sixty healthy adult male C57BL/6J mice were randomly divided into two groups, normal control (CON) group and T1DM group. Streptozocin (STZ) was injected intraperitoneally to induce T1DM mice. The spatial learning and memory function of mice was detected by Morris water maze at the 8th week after the successful model establishment. The number and activation of microglia in the prefrontal cortex of mice were detected by immunofluorescence staining and Western blot. Changes in the mRNA level of several DAM molecular markers were detected by RT-FQ-PCR. The results showed that, compared with CON mice, the fasting blood glucose of T1DM mice increased significantly, while the body weight of T1DM mice decreased remarkably ($P < 0.05$). The escape latency of water maze in T1DM mice was longer than that in CON mice ($P < 0.05$). Compared with CON group, the Iba1 protein expression and the number of microglia in prefrontal cortex of T1DM group increased significantly ($P < 0.05$). In addition, the mRNA levels of several DAM markers in prefrontal cortex of T1DM group were increased significantly ($P < 0.05$). These results suggest that

Received 2020-03-23 Accepted 2020-08-17

This work was supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 7192016), Scientific Research Common Program of Beijing Municipal Commission of Education (No. KM201910025029) and New Star Project of Chao-Yang Hospital, China (No. CYXX-2017-01).

*Corresponding author. E-mail: zhaoli@ccmu.edu.cn

the microglia are activated and transformed to DAM type in the prefrontal cortex of T1DM mice.

Key words: type 1 diabetes mellitus; cognitive impairment; microglia

1型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是胰岛素分泌绝对缺乏导致的代谢紊乱症, 至今无法根治, 且其发病率近几年持续升高。T1DM 高发年龄为 10~14 岁, 正是儿童认知发育的关键时期。与正常儿童相比, T1DM 儿童记忆、智力、注意力、执行力和精神运动速度等认知能力明显下降。7 岁前发病的 T1DM 患者罹患认知障碍风险明显增加, 7 岁后发病的患者智力、精神运动效率和学业成绩等方面也有所降低^[1]。一项 Meta 分析进一步证实, T1DM 患者注意力不集中, 智力低下^[2]。然而, 目前国内缺乏对儿童 T1DM 认知功能障碍的研究, 其机制尚不清楚。

有研究表明, 小胶质细胞在神经退行性疾病中发挥至关重要的作用^[3]。小胶质细胞存在静息和激活两种状态。受其环境的影响, 活化的小胶质细胞又分为促炎的 M1 和抗炎的 M2 表型。M1 型小胶质细胞会释放大量炎症因子及氧自由基等有害物质, 清除外来病原体的同时, 破坏神经元结构的完整性和功能稳定性, 加重神经损伤^[4]。M2 型小胶质细胞通过分泌抗炎因子, 起到神经保护和修复的作用^[5]。然而, 2017 年, Amit 等利用单细胞 RNA 测序技术在阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 转基因动物模型 (5xFAD) 中发现了一种新型小胶质细胞, 定义为疾病相关小胶质细胞 (disease-associated microglia, DAM)^[6]。他们认为 DAM 型小胶质细胞的吞噬功能明显增强, 可有效限制 AD 进展。据此, 本研究拟利用 T1DM 小鼠模型, 观察前额叶皮层小胶质细胞的表达和激活, 并初步探讨 DAM 在 T1DM 认知功能障碍中的变化, 有望寻找到 DAM 型小胶质细胞激活的关键分子, 从而为 T1DM 认知功能障碍的治疗提供新的方向。

1 材料与方 法

1.1 材料 健康雄性成年 C57BL/6J 小鼠 60 只, 体重 18~22 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。本研究的动物实验方案通过首都医科大学伦理委员会审批。链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 购自 Sigma 公司; 抗 Iba1 抗体购自 Abcam 公司; 抗 β -actin 抗体购自 ABclonal 公司; 辣根过氧化物

酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗购自 Thermo Scientific 公司; Alexa Fluor[®] 488 驴抗兔 IgG (H+L) 购自 Molecular Probes 公司; ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit 以及 PowerUP[™] SYBR[™] Green Master Mix 均购自 ThermoFisher 公司。

1.2 模型的制备和标本收集 将 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分为两组: (1) CON 组, 共 30 只; (2) T1DM 组, 共 30 只。T1DM 组小鼠术前禁食 12 h, 腹腔注射新鲜柠檬酸缓冲液配制的 STZ (50 mg/kg), 连续注射 5 d, CON 组小鼠同时腹腔注射相同新鲜配制的柠檬酸缓冲液 (5 mL/kg), 连续注射 5 d^[7]。小鼠连续腹腔注射 STZ 后的第 8 天剪尾采血测空腹血糖, 如果小鼠空腹血糖大于 11.1 mmol/L, 则认为构建 T1DM 小鼠模型成功。模型构建成功后的第 8 周开始进行 Morris 水迷宫测试。

1.3 Morris 水迷宫测试 CON 组与 T1DM 组小鼠均测试 Morris 水迷宫。实验共进行 8 天, 前 5 天为学习阶段, 每只小鼠每天在每个象限学习 1 次, 设定最长游动时间为 90 s。池壁内侧贴有不同形状的标志物, 便于小鼠记忆。学习时将小鼠从任一入水点头面向池壁轻放入水中, 记录小鼠找到平台的时间 (逃避潜伏期)。第 6 天不做任何处理, 第 7、8 天为测试阶段, 试验结束后记录各组小鼠逃避潜伏期、游泳速度、在每个象限游泳时间百分比及游泳路径。

1.4 Western blot CON 和 T1DM 组小鼠在 Morris 水迷宫测试结束后, 断头取前额叶皮层, 加入 RIPA 裂解液, 匀浆、超声破碎, 待组织全部被溶解。BCA 法进行蛋白定量, 制备成样品, -80 °C 保存备用。取等量蛋白, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜, 室温下 10% 脱脂牛奶封闭 1 h, 然后将膜与抗 Iba1 抗体 (1:500) 溶液 4 °C 孵育过夜, TTBS 缓冲液漂洗 5 × 6 min, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:50 000), 室温孵育 1 h, TTBS 缓冲液漂洗 5 × 6 min, 根据 ECL 试剂盒反应步骤进行曝光, 用 Image J 软件对图像条带进行分析, 结果以各实验组与对照组样品的比值显示。

1.5 免疫荧光染色 CON 和 T1DM 组小鼠在 Morris 水迷宫测试结束后, 4% 多聚甲醛经左心室灌注固

定, 首先灌流 150 mL 0.9% 生理盐水, 时间约 3 min, 待小鼠四肢和肝脏完全变白之后换用 4% 多聚甲醛低速灌流 20~30 min, 断头取出脑组织。制备切片, PBS 洗 3 次, 0.3% Triton X-100 室温孵育 30 min; 10% BSA 室温孵育 1 h; 弃掉 BSA, 加入抗 Iba1 抗体 (1:200) 4 °C 孵育过夜; PBS 漂洗 5 × 6 min, 荧光二抗 (1:500) 室温避光孵育 1~2 h, PBS 漂洗 5 × 6 min, 荧光显微镜下观察并拍照保存。

1.6 RT-FQ-PCR 脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase,

LPL)、金属蛋白酶组织抑制剂 2 (tissue inhibitor of metalloproteinases 2, TIMP2) 和 II 型髓系细胞触发受体 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2) 是 DAM 标志性分子, 本研究采用 RT-FQ-PCR 检测这三个基因 mRNA 水平变化。CON 和 T1DM 组小鼠在 Morris 水迷宫测试结束后, 断头取前额叶皮层, 用 Trizol 法提取样本总 RNA。使用 Nanodrop 分光光度计 (美国 Thermo 公司) 检测 RNA 的纯度及浓度, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间为宜。

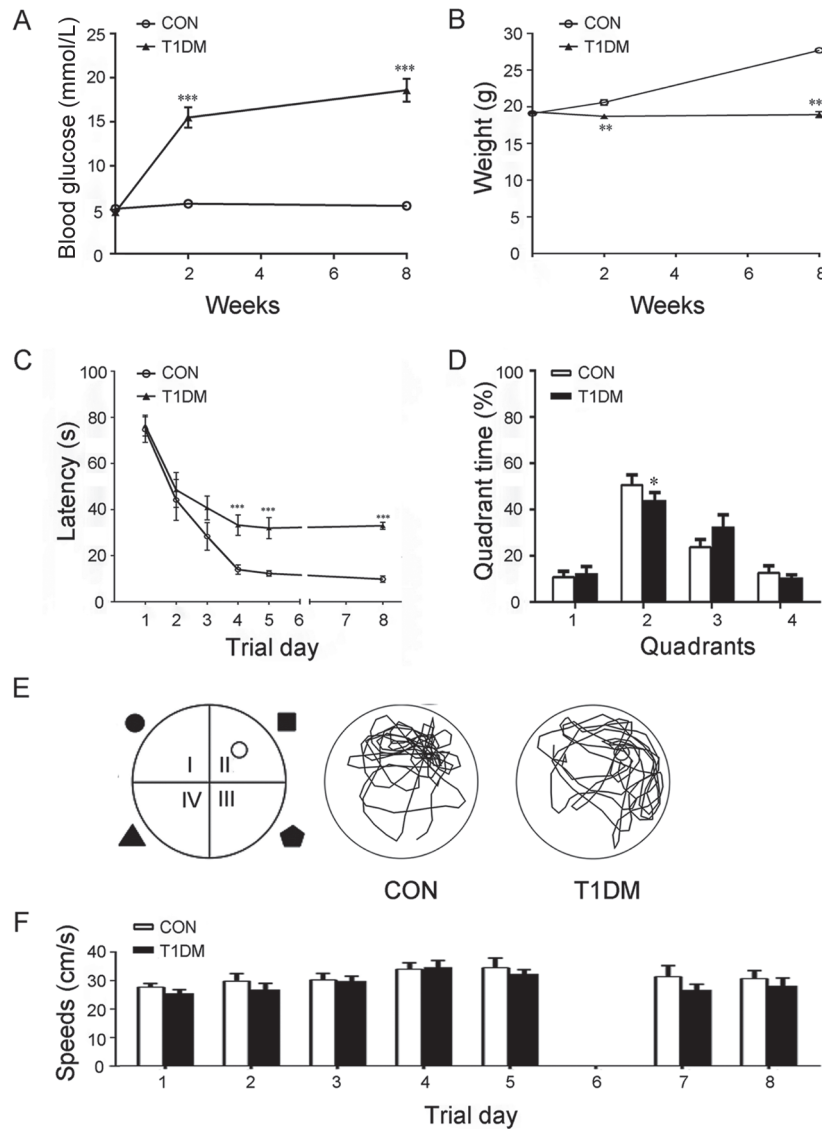


图 1. 1型糖尿病小鼠体重、血糖和学习记忆功能情况

Fig. 1. Body weight, blood glucose, learning and memory function of type 1 diabetic (T1DM) mice. *A*: Statistical results of blood glucose of mice in each group. *B*: Statistical results of body weight of mice in each group. *C*: The graph showed that the escape latency of each group during 5 consecutive days of learning process and visible test (days 7 and 8). *D*: Statistical results of the time spent in every quadrant measured on day 7 by removing the platform. *E*: The graph showed the swim path of each group on day 7. The inner walls of the four quadrants were labeled with different shapes, which was convenient for mouse memory. *F*: Statistical results of speeds of each group every day. Mean \pm SEM, $n = 30$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (CON) group.

使用逆转录试剂盒合成 cDNA 作为模板进行扩增。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成，上下游引物序列如下：GAPDH 上游引物 5'-AGAACATCATCCCTGCATCC-3'，下游引物 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'；Lpl 上游引物 5'-GGGAGTTTGCTCCAGAGTTT-3'，下游引物 5'-TGTGTCTTCAGGGTCTTAG-3'；TIMP2 上游引物 5'-TCAGAGCC-

AAAGCAGTGAGC-3'，下游引物 5'-GCCGTGTAGATAAATCGATGTC-3'；TREM2 上游引物 5'-GCACCAACTTCAGATCCTCACT-3'，下游引物 5'-GCAAAAAGTAGCAGAAACAGAAGTC-3'。RT-FQ-PCR 结果使用相对定量法进行分析，显示扩增曲线和熔解曲线，比较各组目的基因表达量。

1.7 统计学处理 所有数据均以 mean \pm SEM 表

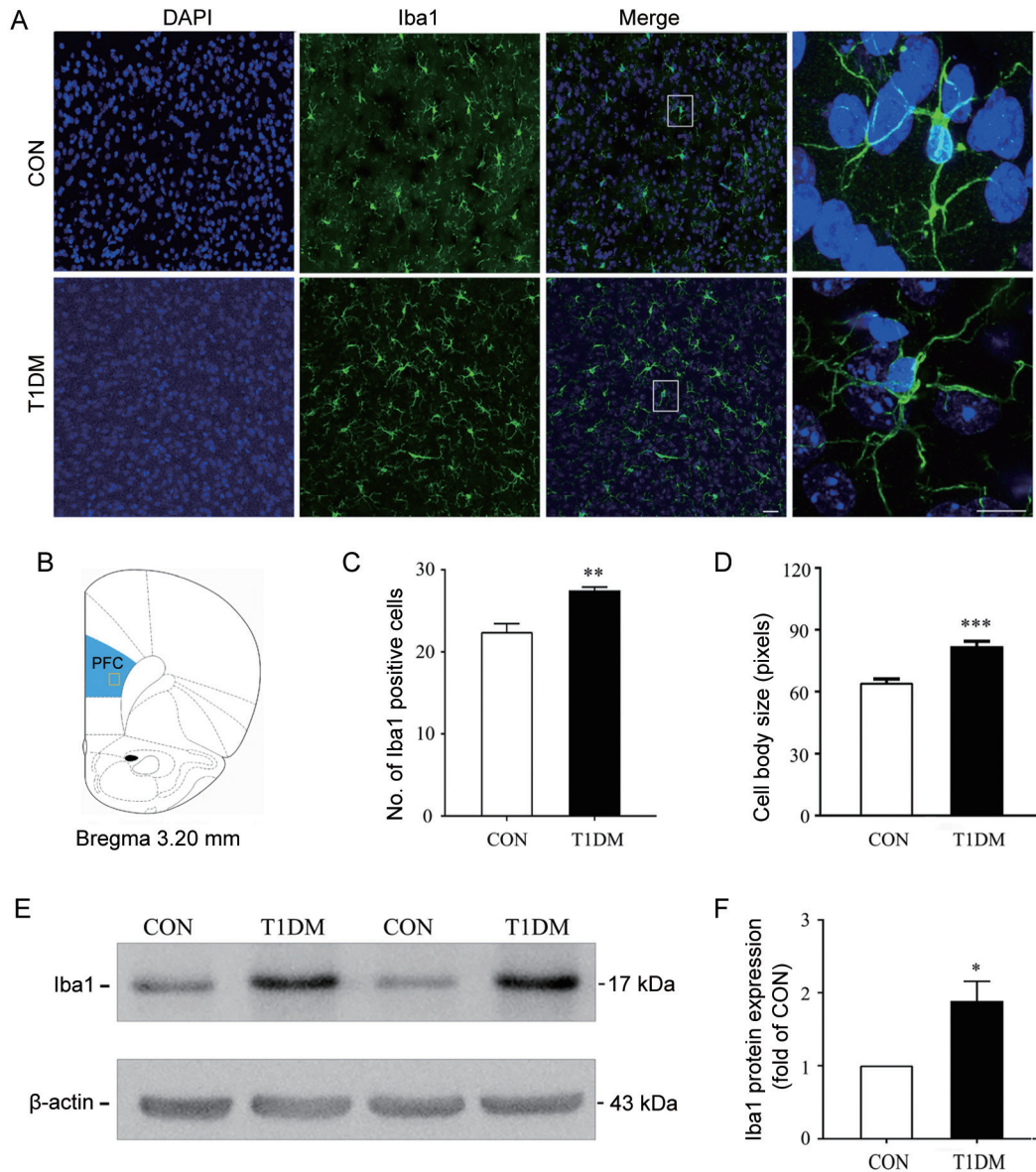


图 2. 1型糖尿病小鼠前额叶皮层小胶质细胞数量和激活情况

Fig. 2. Quantity and activation of microglia in the prefrontal cortex (PFC) of type 1 diabetes (T1DM) mice. *A*: Representative confocal images showing Iba1⁺ microglia (green) in the PFC of the CON and T1DM mice. The fourth column pictures were the enlarged pictures of the framed areas in the third column pictures. Scale bar, 10 μ m. *B*: The schema graph for observing microglia coordinates (Bregma 3.20 mm). *C*, *D*: Quantification of the number (*C*) and body size (*D*) of Iba1⁺ cells in the PFC ($n = 10$ per group). *E*, *F*: Representative results (*E*) and quantitative analysis (*F*) of Western blot. Mean \pm SEM, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (CON) group.

示, 用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计分析, 两组样品均数间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T1DM小鼠一般特征、空腹血糖和体重变化

与 CON 组小鼠相比, T1DM 组小鼠活动减少, 精神萎靡, 进食量和饮水量增加, 尿量增加。CON 组小鼠血糖维持在 (5.65 ± 1.45) mmol/L, 波动范围比较小。T1DM 组血糖水平明显升高, 在 STZ 注射后第 2 周为 (17.45 ± 6.25) mmol/L, 第 8 周为 (19.65 ± 6.45) mmol/L, 均明显高于 CON 组 ($P < 0.05$, 见图 1A)。CON 组小鼠体重处于持续上升的状态, 第 2 周时为 (20.25 ± 1.75) g, 在第 8 周时为 (27.9 ± 1.3) g。T1DM 组小鼠体重几乎没有升高, 在 STZ 注射后第 2 周时为 (18.75 ± 0.75) g, 在第 8 周时为 (18.81 ± 2.11) g, 均显著低于 CON 组 ($P < 0.05$, 见图 1B)。以上结果说明 T1DM 小鼠模型建立成功。

2.2 T1DM小鼠空间学习记忆能力评价

Morris 水迷宫实验的第 1 天, 与 CON 组小鼠相比, T1DM 组小鼠逃避潜伏期无明显变化; 第 2、3 天, T1DM 组小鼠逃避潜伏期延长, 但没有统计学差异; 第 4、5、8 天, T1DM 组小鼠逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$, 见图 1C)。在第 7 天撤除第二象限中的平台后发现, CON 组小鼠立即向目标区域游泳, 试图找到平台, 并在第二象限来回游泳。而 T1DM 组小鼠游泳路径较为混乱 ($n = 30$, 见图 1E), 停留在第二象限的时间百分比明显下降 ($P < 0.05$, 见图 1D)。为了排除小鼠游泳速度的差异, 我们统计了各组小鼠每天的游泳速度, 发现没有统计学差异 ($P > 0.05$, 见图 1F)。上述结果表明, T1DM 小鼠存在明显空间记忆障碍。

2.3 T1DM小鼠前额叶皮层小胶质细胞数量和激活

免疫荧光染色结果显示, Iba1 标记的小胶质细胞散在分布于 CON 组和 T1DM 组小鼠前额叶皮层。CON 组小胶质细胞胞体较小, 突起细长, 而 T1DM 组小鼠在 STZ 注射后第 8 周时, 前额叶皮层小胶质细胞的胞体明显增大, 数量也明显增多 ($P < 0.05$, 见图 2A~D)。

Western blot 结果显示, 与 CON 组相比, T1DM 组小鼠前额叶皮层 Iba1 表达明显增加 ($P < 0.05$, 见图 2E, F)。以上结果表明 T1DM 小鼠前额叶皮层中小胶质细胞数量增多, 且处于激活状态。

2.4 T1DM小鼠前额叶皮层DAM标志性蛋白mRNA水平变化

应用 RT-FQ-PCR 检测 DAM 标志性蛋白 Lpl、TIMP2 和 TREM2 mRNA 水平, 结果显示, 与 CON 组相比, STZ 注射后第 8 周 T1DM 组小鼠前额叶皮层 Lpl、TIMP2 和 TREM2 mRNA 水平均显著升高, 其中 TREM2 增加最为明显 ($P < 0.05$, 见图 3)。

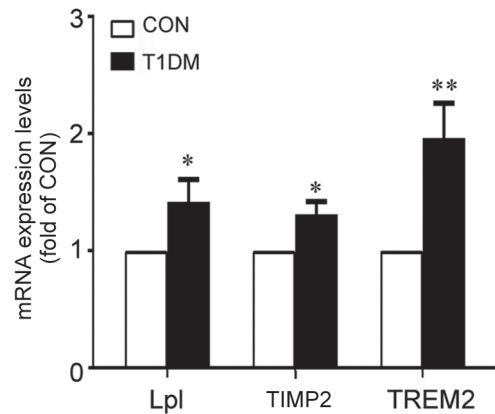


图 3. 1型糖尿病小鼠前额叶皮层DAM标志性分子mRNA水平的变化

Fig. 3. Changes of mRNA level of the DAM markers in the prefrontal cortex of type 1 diabetic (T1DM) mice. Levels of Lpl, TIMP2 and TREM2 transcripts were examined by RT-FQ-PCR. GAPDH was used as an internal control. Mean \pm SEM, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (CON) group.

3 讨论

小胶质细胞是中枢神经系统固有的免疫细胞。小胶质细胞通过不断移动来监测大脑环境, 维持大脑稳态。除此之外, 小胶质细胞还参与神经元回路构成、与活动依赖的可塑性构建和学习过程^[8]。研究表明, 激活后的小胶质细胞直接或间接地参与了神经退行性疾病的发生和发展^[9]。本研究结果显示, STZ 注射 8 周后 T1DM 小鼠出现明显认知功能障碍, 同时其前额叶皮层 Iba1 表达显著上调, 小胶质细胞数目增多, 呈现激活状态, 提示小胶质细胞可能参与 T1DM 小鼠认知功能障碍的发生、进展过程。

研究显示, 小胶质细胞在神经退行性疾病中发挥双重作用^[10]。一方面小胶质细胞被激活后产生多种炎症因子和神经毒素, 加重神经元损伤; 另一方面, 活化的小胶质细胞可以吞噬凋亡神经元、异常聚集蛋白(如 β 淀粉样蛋白)、鞘磷脂碎片等, 并分泌神经生长因子等保护中枢神经系统。然而, 也

有研究报道激活的小胶质细胞还可以吞噬脑内健康神经元, 从而引起神经元丢失^[11]。令人振奋的是, 2017年发现的 DAM 只存在于 β 淀粉样蛋白周围, 吞噬 β 淀粉样蛋白斑块, 并不会引起炎症, 损伤正常神经^[6]。DAM 出现可以分为两个阶段: 在第一阶段, 在 AD 及年龄等因素的刺激下, P2ry12、CX3CR1 和 CD200R1 等大量免疫相关分子表达下调, 而 TREM2 适配体 Tyrobp 表达上调, 小胶质细胞转化为中间状态的细胞; 第二阶段依赖 TREM2, 当 TREM2 蛋白与 Tyrobp 蛋白结合后, 上调与吞噬及脂质代谢相关基因, 可以使中间状态的小胶质细胞转化为完全激活的 DAM^[12]。

TREM2 是 DAM 激活第二阶段过程中的关键蛋白, 在脑内特异表达于小胶质细胞, 是小胶质细胞表面的一种跨膜蛋白, 具有识别磷脂、凋亡细胞和脂蛋白的作用, 是小胶质细胞对神经变形反应(包括增殖、存活、聚集及吞噬)所需的表面受体。TREM2 R47H 或 R62H 突变增加了散发 AD 的风险, 并损害了与磷脂配体的结合^[13]。研究显示, TREM2 和 Tyrobp 结合形成信号复合物, 在 AD 中可增强小胶质细胞的吞噬能力, 促进 β 淀粉样蛋白清除, 并通过抑制小胶质细胞介导的细胞因子的产生和分泌降低炎症反应^[14]。越来越多的证据表明, TREM2 可能延缓神经炎症和认知障碍, 在维持正常的认知功能中起着至关重要的作用^[15, 16]。

Lpl 是 DAM 激活第二阶段过程中, 与小胶质细胞溶酶体功能、吞噬功能相关的分子, 是 DAM 的标志性基因。Lpl 是一种参与脂质代谢的酶, 它可以水解脂肪分子中的甘油三酯和极低密度脂蛋白, 产生游离脂肪酸和 2-甘油单酸酯^[17]。Lpl 存在于包括大脑在内的许多器官中, 可以将总胆固醇传递给神经元。Lpl 可以结合载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 脂蛋白颗粒和低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)。由于 ApoE 和 LRP 的多态性都会影响 AD 的风险, 因此有研究证明了 Lpl 突变会增加 AD 的患病风险^[18]。Lpl 和 ApoE、LRP 共同存在于 AD 患者淀粉样斑块中。ApoE 可以结合 β 淀粉样蛋白聚集体, LRP 可以结合 ApoE, 导致其内在化和降解, 而 Lpl 可以促进这一功能。

TIMP2 是 DAM 的另外一个标志性基因, 在 DAM 激活的第二阶段表达上调。TIMP2 是一类多功能分泌蛋白, 可促进各种细胞类型的生长并调节

细胞周期^[19]。TIMP2 通过与活性形式的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 形成紧密但相对较低的选择性复合物来抑制 MMP 活性。TIMP2 与 MMP 的相互作用可以维持细胞外基质的完整性, 而这是突触可塑性相关的结构变化必需的。有研究表明, TIMP2 的空间分布和时间调控在已知的与学习和记忆有关的脑区(包括大脑皮层、海马和杏仁核)参与对突触可塑性的调控^[20]。脑内 TIMP2 增多可显著增强突触可塑性并改善老年小鼠的学习和记忆能力^[21]。

本研究结果显示, STZ 注射 8 周后 T1DM 小鼠前额叶皮层 DAM 的标志性基因 TREM2、Lpl 和 TIMP2 水平均明显升高, 尤其是 TREM2, 该研究结果表明, STZ 注射 8 周后已经有 DAM 激活, 可能会有利于延缓 T1DM 认知功能障碍的发展。

综上所述, 本研究结果显示, T1DM 小鼠出现明显认知功能障碍。在此过程中, 小胶质细胞数量增多, 其中 DAM 被激活, 可能起到神经保护作用, 不过 DAM 在 T1DM 认知功能障碍中具体作用及机制有待于进一步探讨。

参考文献

- 1 Nieuwesteeg AM, Hartman EE, Aanstoot HJ, van Bakel HJ, Emons WH, van Mil E, Pouwer F. The relationship between parenting stress and parent-child interaction with health outcomes in the youngest patients with type 1 diabetes (0–7 years). *Eur J Pediatr* 2016; 175(3): 329–338.
- 2 He J, Ryder AG, Li S, Liu W, Zhu X. Glycemic extremes are related to cognitive dysfunction in children with type 1 diabetes: A meta-analysis. *J Diabetes Investig* 2018; 9(6): 1342–1353.
- 3 Baalman K, Marin MA, Ho SY, Godoy M, Cherian L, Robertson C, Rasband MN. Axon initial segment-associated microglia. *J Neurosci* 2015; 35(5): 2283–2292.
- 4 Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2016; 53(2): 1181–1194.
- 5 Orihuela R, Mcpherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 2016; 173(4): 649–665.
- 6 Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M, Schwartz M, Amit I. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* 2017; 169(7): 1276–1290.e17.

- 7 Zheng J, Wang Y, Han S, Luo Y, Sun X, Zhu N, Zhao L, Li J. Identification of protein kinase C isoforms involved in type 1 diabetic encephalopathy in mice. *J Diabetes Res* 2018; 2018: 8431249.
- 8 Choudhury ME, Miyanishi K, Takeda H, Islam A, Matsuoka N, Kubo M, Matsumoto S, Kunieda T, Nomoto M, Yano H, Tanaka J. Phagocytic elimination of synapses by microglia during sleep. *Glia* 2020; 68(1): 44–59.
- 9 Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2018; 217(2): 459–472.
- 10 Baik S H, Kang S, Lee W, Choi H, Chung S, Kim JI, Mook-Jung I. A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease. *Cell Metab* 2019; 30(3): 493–507.e6.
- 11 Brown GC, Nethen JJ. Eaten alive! Cell death by primery phagocytosis 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(8): 325–332.
- 12 Mou YS (牟永山), Ren HJ, Fu XF, Zhang LJ. Research status of microglia on Alzheimer's disease. *Chin J Neuroanat (神经解剖学杂志)* 2018; 34(4): 527–530 (in Chinese with English abstract).
- 13 Ulland TK, Song WM, Huang SC, Ulrich JD, Sergushichev A, Beatty WL, Loboda AA, Zhou Y, Cairns NJ, Kambal A, Loginicheva E, Gilfillan S, Cella M, Virgin HW, Unanue ER, Wang Y, Artyomov MN, Holtzman DM, Colonna M. TREM2 maintains microglial metabolic fitness in Alzheimer's disease. *Cell* 2017; 170(4): 649–663.e13.
- 14 Ma J, Jiang T, Tan L, Tan L, Yu JT. TYROBP in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 2015; 51(2): 820–826.
- 15 Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, Yuan P, Mahan TE, Shi Y, Gilfillan S, Cella M, Grutzendler J, DeMattos RB, Cirrito JR, Holtzman DM, Colonna M. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med* 2016; 213(5): 667–675.
- 16 Parhizkar S, Arzberger T, Brendel M, Kleinberger G, Deussing M, Focke C, Nuscher B, Xiong M, Ghasemigharagoz A, Katzmarski N, Krasemann S, Lichtenthaler SF, Müller SA, Colombo A, Monasor LS, Tahirovic S, Herms J, Willem M, Pettkus N, Butovsky O, Bartenstein P, Edbauer D, Rominger A, Ertürk A, Grathwohl SA, Neher JJ, Holtzman DM, Meyer-Luehmann M, Haass C. Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque associated ApoE. *Nat Neurosci* 2019; 22(2): 191–204.
- 17 Scacchi R, Gambina G, Broglio E, Moretto G, Ruggeri M, Corbo RM. The H⁺ allele of the lipoprotein lipase (LPL) *HindIII* intronic polymorphism and the risk for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2004; 367(2): 177–180.
- 18 Baum L, Chen L, Masliah E, Chan YS, Ng HK, Pang CP. Lipoprotein lipase mutations and Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 1999; 88(2): 136–139.
- 19 Tuna G, Yener GG, Oktay G, İşlekel GH, Kırkalı FG. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in plasma from patients with neurodegenerative dementia. *J Alzheimers Dis* 2018; 66(3): 1265–1273.
- 20 Jaworski DM, Boone J, Caterina J, Soloway P, Falls WA. Prepulse inhibition and fear-potentiated startle are altered in tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) knockout mice. *Brain Res* 2005; 1051(1–2): 81–89.
- 21 Castellano JM. Blood-based therapies to combat aging. *Gerontology* 2019; 65(1): 84–89.