·基础研究·

阿司匹林对 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经元炎性损伤的保护作用研究

王 越,王士博,于晓雯,杨 玲,拓西平*
(第二军医大学附属长海医院老年病科,上海 200433)

【摘 要】 **目的** 观察阿司匹林对 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经炎性反应中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素1β(IL-1β)、核因子κB(NF-κB)/p65核蛋白和磷酸化核因子κB抑制蛋白α(pIκB-α)总蛋白表达的影响,探讨NF-κB通路在此过程中的作用。**方法** 取孕龄17~18 d SD大鼠的海马神经元,将培养至第7天的神经元随机分为4组:(1)Aβ组:加入终浓度为20 μmol/L的 $A\beta_{25-35}$;(2)低剂量阿司匹林组:加入终浓度为50 μmol/L的阿司匹林和20 μmol/L的 $A\beta_{25-35}$;(3)高剂量阿司匹林组:加入终浓度为100 μmol/L的阿司匹林和20 μmol/L的 $A\beta_{25-35}$;(4)空白对照组:加入等量维持培养基。继续培养48 h后,采用双抗体夹心ELISA法测定上清液中TNF-α和IL-1β含量,Western-Blot法检测NF-κB/p65核蛋白和pIκB-α总蛋白表达水平。**结果** (1)与对照组比较,Aβ组TNF-α和IL-1β的含量明显升高($P<0.01$),NF-κB/p65核蛋白和pIκB-α总蛋白的表达水平也明显升高($P<0.01$);(2)与Aβ组比较,低剂量和高剂量阿司匹林均可降低TNF-α和IL-1β的含量($P<0.05$),并减少NF-κB/p65核蛋白和pIκB-α总蛋白表达水平($P<0.05$);(3)低剂量和高剂量阿司匹林组两组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 阿司匹林可能通过抑制NF-κB的激活来减轻 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经元的炎性损伤。

【关键词】 阿司匹林;阿尔茨海默病;神经炎性反应;核因子κB
【中图分类号】 R592 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.05.090

Protective effect of aspirin on neuronal inflammatory injury induced by $A\beta_{25-35}$ *in vitro*

WANG Yue, WANG Shi-Bo, YU Xiao-Wen, YANG Ling, TUO Xi-Ping*
(Department of Geriatrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of aspirin on the expression of interleukin 1β (IL-1β), tumor necrosis factor α (TNF-α), nuclear factor-kappa B (NF-κB)/p65 and total protein phosphorylated inhibitor protein α of nuclear factor κB (pIκB-α) in neuroinflammation induced by β amyloid protein 25-35 ($A\beta_{25-35}$) in order to investigate the role of NF-κB pathway in this process. **Methods** Hippocampal neurons were freshly isolated from fetal SD rats at embryonic day 17 to 18 and cultured for 7d. Then the neurons were randomly divided into 4 groups, that is, Aβ treatment group (20 μmol/L $A\beta_{25-35}$), low dose aspirin group (50 μmol/L aspirin and 20μmol/L $A\beta_{25-35}$), high dose aspirin group (100μmol/L aspirin and 20μmol/L $A\beta_{25-35}$), and the blank control group. After 48 hours' treatment, the levels of IL-1β and TNF-α in the supernatant were measured with ELISA, and the expression level of NF-κB/p65 and pIκB-α with Western blotting. **Results** Compared with the control group, Aβ treatment remarkably resulted in higher levels of TNF-α and IL-1β ($P<0.01$), as well as the expression of NF-κB/p65 and pIκB-α ($P<0.01$). Compared with Aβ group, low dose and high dose aspirin groups had lower levels of TNF-α and IL-1β ($P<0.05$), as well as the expression of NF-κB/p65 and pIκB-α ($P<0.05$). There were no statistical differences between the low and high aspirin groups ($P>0.05$). **Conclusion** Aspirin attenuates neuronal inflammatory injury induced by $A\beta_{25-35}$ through inhibiting the activation of NF-κB.

【**Key words**】 aspirin; Alzheimer's disease; neuroinflammation; nuclear factor-kappa B
This work was supported by the Key Project of Scientific Research of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning in the Year of 2014 (201440022).
Corresponding author: TUO Xi-Ping, E-mail: xptuo_01@126.com

收稿日期:2015-11-02;**修回日期**:2015-12-28
基金项目:2014年度上海市卫生和计划生育委员会科研课题重点项目(201440022)
通信作者:拓西平,E-mail:xptuo_01@126.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种神经退行性疾病,以β淀粉样蛋白(β amyloid protein,Aβ)沉积、神经原纤维缠结以及引起神经元死亡和认知功能障碍的炎性反应为特点[1]。AD的发生发展与神经系统炎性反应密切相关[2]。正常老年人脑组织中也会有Aβ的沉积,但并没有认知功能减退,AD患者的脑组织中除了有Aβ沉积外,还有神经炎性反应[3]。神经炎性反应可刺激肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor,TNF-α)、白细胞介素1β(interleukin 1β,IL-1β)、IL-6和活性氮氧物质等炎性因子释放增加[4]。而在慢性炎性反应过程中,炎性因子的不断积累又可产生神经毒性作用,加重认知功能减退[5]。有动物实验显示,抑制核因子κB(nuclear factor κB,NF-κB)的活性可下调IL-1β和TNF-α的表达,改善由Aβ介导的动物空间学习记忆能力损害[6]。

临床资料显示,服用阿司匹林(aspirin)的人群AD患病率较未服用者明显减少[7]。鉴于阿司匹林具有抗炎作用,推测其降低AD的发生风险可能与抗炎作用有关。AD作为一种中枢神经系统疾病,其治疗药物需能透过血脑屏障(blood brain barrier,BBB)进入脑组织中发挥作用。Prinsa等[8]在动物实验中发现阿司匹林可部分穿透BBB,其在脑组织和血液中药物浓度之比约为0.49。本研究使用$A\beta_{25-35}$制造AD神经损伤模型,通过阿司匹林的干预来探究其对神经炎性反应中TNF-α、IL-1β、NF-κB/p65和磷酸化核因子κB抑制蛋白α(phosphorylated inhibitor protein α of nuclear factor κB,pIκB-α)表达的影响及其作用机制,以期能为AD的防治提供新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

孕龄17~18 d SD大鼠,由第二军医大学实验动物中心提供。特级胎牛血清购自Biosun公司,Dulbecco's改良Eagle培养基:营养混合物F-12(DMEM/F-12)、Neurobasal培养基、B27添加剂均购自Gibco公司,胰蛋白酶、多聚-L-赖氨酸、$A\beta_{25-35}$和阿司匹林均购自Sigma公司,青霉素-链霉素溶液(双抗)购自HyClone公司,大鼠TNF-α和IL-1β酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒均购自欣博盛公司,大鼠NF-κB/p65和pIκB-α蛋白检测用蛋白质印迹法(Western Blot)一抗试剂盒均购自武汉谷歌生物科技公司。

1.2 胎鼠海马神经元原代培养

孕鼠用10%水合氯醛腹腔麻醉后,打开腹腔,取出胎鼠,75%乙醇中消毒后,断头处死。打开颅骨,取出全脑,解剖显微镜下剥离大脑皮质,取出海马,并去除被膜及血管。用组织剪将其剪碎成1 mm×1 mm×1 mm的组织块,然后加入等量0.25%胰酶,置于37 ℃,5% CO_2孵箱中消化20 min。再加入种植培养基(含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM/F-12)终止消化,用蓝枪头缓慢均匀吹打约20次后,以800 转/min离心4 min,弃上清液,再加入种植培养基,100 μm筛网过滤后,使用细胞计数器调整悬液密度为1×10^6/ml。然后将细胞接种在预先铺有0.1 g/L多聚赖氨酸的6孔板上,将其置于孵箱中。孵育4~6 h后去除种植培养基,换用维持培养基(含2% B27和1%双抗的Neurobasal培养基)。之后每2 d更换半量培养基,第7天更换全量培养基。

1.3 细胞分组及处理

将$A\beta_{25-35}$溶于DMSO中,加入三蒸水配成1 mmol/L的母液,再加入维持培养基稀释至50 μmol/L,置于37 ℃,5% CO_2孵箱中老化3 d备用。将阿司匹林溶于无水乙醇,配成100 mmol/L的母液,4 ℃冰箱中保存备用。将培养至第7天的神经元随机分为4组:(1)Aβ组加入终浓度为20 μmol/L的$A\beta_{25-35}$;(2)低剂量阿司匹林组加入终浓度为50 μmol/L的阿司匹林和20 μmol/L的$A\beta_{25-35}$;(3)高剂量阿司匹林组加入终浓度为100 μmol/L的阿司匹林和20 μmol/L的$A\beta_{25-35}$;(4)空白对照组加入等量维持培养基。继续培养48 h后,分别取上清液及细胞检测相关指标。

1.4 TNF-α和IL-1β定量ELISA测定

本实验采用双抗体夹心ELISA法测定上清液中TNF-α和IL-1β含量。

1.5 NF-κB/p65和pIκB-α蛋白含量检测

收集细胞后提取总蛋白和核蛋白,经过蛋白浓度测定、SDS-PAGE电泳、转膜、免疫反应和化学发光后,对所得图像进行分析。

1.6 统计学处理

所得数据用SPSS18.0软件进行统计分析。数据以均值±标准差表示,计量资料组间比较采用*t*

检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组上清液中 TNF-α 和 IL-1β 含量

各组上清液中 TNF-α 和 IL-1β 含量分别见图 1 和图 2。与对照组比较，Aβ 组 TNF-α 和 IL-1β 含量均明显升高（$P<0.01$），表明 Aβ 组炎性反应较为明显；与 Aβ 组比较，低剂量阿司匹林组 TNF-α 和 IL-1β 含量均降低（$P<0.05$），高剂量阿司匹林组 TNF-α 含量明显降低（$P<0.01$），IL-1β 含量也降低（$P<0.05$），表明低剂量和高剂量阿司匹林组炎性反应受到抑制；低剂量和高剂量阿司匹林组两组 TNF-α 和IL-1β 含量比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

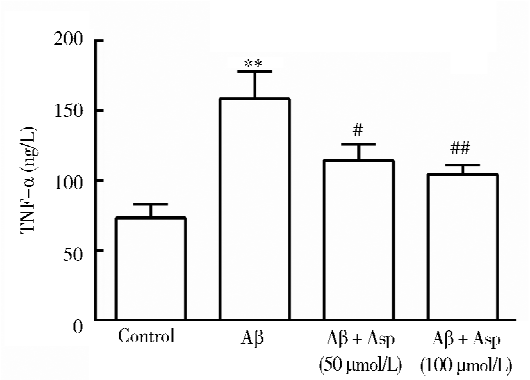


图 1 各组上清液中 TNF-α 含量

Figure 1 Levels of TNF-α in four groups

TNF-α: tumor necrosis factor alpha; Aβ: β amyloid protein; Asp: aspirin. Compared with control group, $^{**}P<0.01$; compared with Aβ group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$

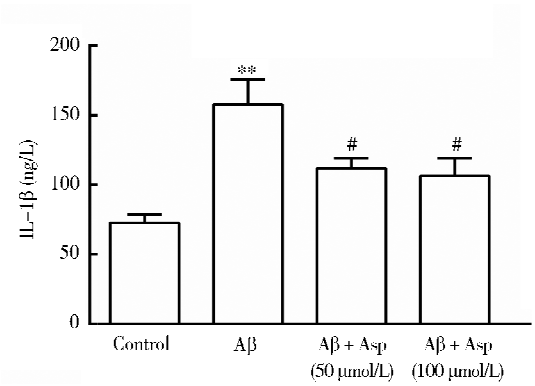


图 2 各组上清液中 IL-1β 含量

Figure 2 Levels of IL-1β in four groups

IL-1β: interleukin-1β; Aβ: β amyloid protein; Asp: aspirin. Compared with control group, $^{**}P<0.01$; compared with Aβ group, $^{\#}P<0.05$

2.2 各组细胞中 NF-κB/p65 核蛋白和 pIκB-α 总蛋白表达水平

各组细胞中 NF-κB/p65 核蛋白和 pIκB-α 总蛋白表达水平分别见图 3 和图 4。与对照组比较，Aβ 组 NF-κB/p65 核蛋白和 pIκB-α 总蛋白表达水平明显升高（$P<0.01$），表明 Aβ 组 NF-κB 被激活并进入核内；与 Aβ 组比较，低剂量阿司匹林组 NF-κB/p65 核蛋白表达水平偏低（$P<0.05$），pIκB-α 总蛋白表达水平明显降低（$P<0.01$），高剂量阿司匹林组 NF-κB/p65 核蛋白表达水平偏低（$P<0.05$），pIκB-α 总蛋白表达水平明显降低（$P<0.01$），表明低剂量和高剂量阿司匹林组 NF-κB 的激活受到抑制。低剂量和高剂量阿司匹林组两组 NF-κB/p65 核蛋白和 pIκB-α 总蛋白表达水平比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

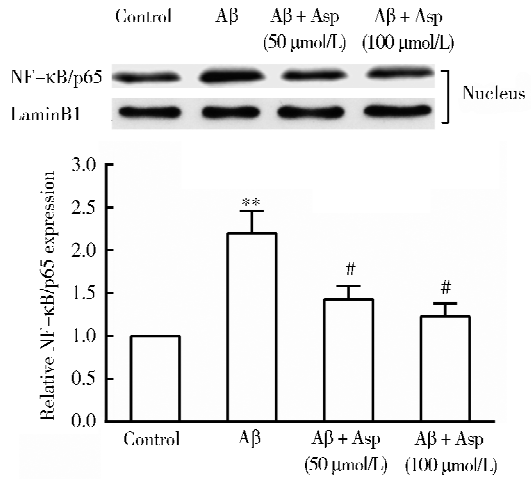


图 3 各组细胞中 NF-κB/p65 核蛋白表达水平

Figure 3 Expression levels of nucleoprotein NF-κB/p65 in four groups

NF-κB: nuclear factor κB; Aβ: β amyloid protein; Asp: aspirin. Compared with control group, $^{**}P<0.01$; compared with Aβ group, $^{\#}P<0.05$

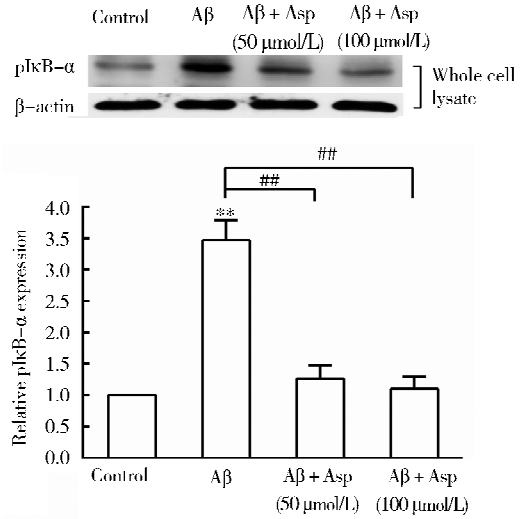


图 4 各组细胞中 pIκB-α 总蛋白表达水平

Figure 4 Expression levels of total protein pIκB-α in four groups

pIκB-α: phosphorylated inhibitor protein α of NF-κB; Aβ: β amyloid protein; Asp: aspirin. Compared with control group, $^{**}P<0.01$; compared with Aβ group, $^{\#\#}P<0.01$

3 讨 论

Aβ是淀粉样前体蛋白(amyloid-β protein precursor, APP)的分解产物,由39~43个多肽组成[9]。Aβ的沉积,不论是以可溶性低聚物还是淀粉样斑块的形式,在AD的病理发展中都具有关键的启动作用[10]。本研究中使用的$Aβ_{25-35}$片段处于Aβ全长片段的核心毒性区域,是可产生与全长Aβ片段相似神经毒性的最短活性区[11,12]。而与$Aβ_{1-40}$和$Aβ_{1-42}$相比,$Aβ_{25-35}$由于毒性片段更小,因此更易渗透进入细胞膜[13]。也有动物实验证明,侧脑室注射$Aβ_{25-35}$可使小鼠出现神经炎性反应、反应性胶质增生、氧化应激、海马锥体细胞层神经元减少、胆碱能神经元丢失和记忆功能障碍等典型AD表现[14]。$Aβ_{25-35}$可通过化学简易合成,诸多实验已证明其性能稳定,可在体内和体外实验中模拟出AD特征性的神经损伤症状,因此本研究选择这一片段来制造AD神经损伤模型。

本研究结果显示,$Aβ_{25-35}$可使神经元表达IL-1β和TNF-α增多,炎性反应较为明显。炎性反应是机体固有的生理防御机制,具有消除生理危险因素和恢复细胞内稳态的功能,目的是在感染和创伤时保护健康组织[15]。然而AD中的慢性或持久性炎性反应则为有害的过程,可引起细胞内稳态紊乱,最终导致海马和额叶皮质神经元死亡和进行性神经退行性变[16]。Aβ沉积可引起机体对其清除的慢性炎性反应状态。在这种慢性炎性反应状态中,星形胶质细胞和小胶质细胞可释放出细胞因子、趋化因子、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)等,不仅会对神经元结构产生直接毒性作用,还会进一步增加Aβ的产生,潜在加速疾病进展[17]。IL-1β和TNF-α是AD炎性反应中常见的两种炎性因子,在AD的病理机制中起到了一定的作用。Álvarez等[18]研究发现轻度认知功能障碍(mild cognitive impairment, MCI)和AD患者较对照组血清TNF-α水平明显升高。IL-1β可增加神经元产生APP和Aβ[19]。Centonze等[20]在体外实验中发现,IL-1β和TNF-α具有神经毒性作用,可影响神经突触的传递功能。

本研究还发现$Aβ_{25-35}$可上调NF-κB/p65核蛋白和pIκB-α总蛋白水平。NF-κB通路在基因调节中起着重要的作用,与炎性反应、氧化应激和凋亡息息相关[21]。NF-κB家族包括5个亚单位:p50、p65、c-Rel、p52和RelB。最常见的NF-κB二聚体由p65与p50组成。在静息细胞中,NF-κB与其抑制因子IκB结合,以无活性形式存在于胞质中。当细胞受到细胞因子、氧化应激、凋亡介质和细菌产物等刺激后,可活化IκB激酶(IκB kinase, IKK)复合体,使IκB磷酸化为pIκB,并活化NF-κB两个亚单位,使之从胞质转移到胞核内,与特异性炎性基因结合,诱导炎性因子转录,从而诱发炎性反应[22]。有学者经比较发现,炎性因子TNF-α和IL-1β是NF-κB最有效的刺激因子[23]。而激活的NF-κB可继续诱导IL-1β、TNF-α、Toll样受体和脂多糖等细胞因子表达,形成慢性炎性反应的恶性循环[24]。

在本研究结果中,阿司匹林可降低神经元中IL-1β和TNF-α的表达,并下调NF-κB/p65核蛋白和pIκB-α总蛋白水平,表明阿司匹林可能通过抑制NF-κB的活化从而减轻神经炎性反应。虽然目前还未证实阿司匹林对AD的治疗效果,但其在防治AD中的潜在作用已经吸引了越来越多学者的注意。Doost Mohammadpour等[25]用阿司匹林干预AD大鼠,发现阿司匹林可恢复其已受损的记忆,改善突触功能障碍。Lee等[26]在使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)/干扰素(interferon, IFN)γ刺激的人小胶质细胞中预先加入阿司匹林,其条件培养液可使SH-SY5Y细胞tau蛋白表达明显减少。2014年的一篇荟萃分析[27]也认为阿司匹林和非阿司匹林的非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)均可预防AD的发生,并且长期使用NSAIDs较短期使用有更明显的预防保护作用。然而,也有研究认为阿司匹林可能会增加认知功能损伤的风险[28]。之所以会有不同的结论,可能是由于许多临床对照研究具有短期性、干预时间较晚、样本量小以及使用药物的剂量和评价指标不同[29]。因此,对阿司匹林在长期AD一级预防中的风险与获益的研究还需要不断完善试验设计、选择合适的人群和分析方法[30]。

本研究中高剂量和低剂量阿司匹林组两组相比较无统计学差异,若进行动物实验,为了避免高剂量阿司匹林产生的胃肠道副作用,建议使用低剂量阿司匹林。综上所述,我们从本研究的初步结果中推测阿司匹林可能通过抑制NF-κB的活化,减少TNF-α和IL-1β的生成,从而对$Aβ_{25-35}$诱导的神经元炎性损伤起到保护作用。提示炎性反应可能在AD发生发展中具有不可忽视的作用,以及AD抗炎治疗的潜在可能性。

【参考文献】

[1] Nilsson P, Saido TC. Dual roles for autophagy: Degradation and secretion of Alzheimer's disease Aβ peptide[J]. Bioessays, 2014, 36(6): 570-578.

[2] Morales I, Guzman-Martinez L, Cerda-Troncoso C, *et al*. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 112.

[3] Singha G, Jaehne EJ, Corrigan F, *et al*. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review[J]. Front Neurosci, 2014, 8: 315.

[4] Zhang F, Jiang L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2015, 11: 243-256.

[5] Nazem A, Sankowski R, Bacher M, *et al*. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 74.

[6] Gao J, He H, Jiang W, *et al*. Salidroside ameliorates cognitive impairment in a D-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease[J]. Behav Brain Res, 2015, 293: 27-33.

[7] Etminan M, Gill S, Samii A. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. BMJ, 2003, 327(7407): 128.

[8] Prinsa LH, du Preezb JL, van Dyk S, *et al*. Polycyclic cage structures as carrier molecules for neuroprotective non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(6): 2577-2582.

[9] Lee L, Sakurai M, Matsuzaki S, *et al*. SUMO and Alzheimer's disease[J]. Neuromolecular Med, 2013, 15(4): 720-736.

[10] Rosset MB, Lui G, Dansokho C, *et al*. Vaccine-induced Aβ-specific $CD8^+$ T cells do not trigger autoimmune neuroinflammation in a murine model of Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 95.

[11] Park MY, Jung YS, Park JH, *et al*. PMC-12, a prescription of traditional Korean medicine, improves amyloid β-induced cognitive deficits through modulation of neuroinflammation[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 768049.

[12] Fan S, Zhang B, Luan P, *et al*. PI3K/AKT/mTOR/p70S6K pathway is involved in $A\beta_{25-35}$-induced autophagy[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 161020.

[13] Kim JH, Wang Q, Choi JM, *et al*. Protective role of caffeic acid in an $A\beta_{25-35}$-induced Alzheimer's disease model[J]. Nutr Res Pract, 2015, 9(5): 480-488.

[14] Lahmy V, Long R, Morin D, *et al*. Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/σ1 ligand ANAVEX2-73, a tetrahydrofuran derivative, in $A\beta_{25-35}$ peptide-injected mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 463.

[15] Eikelenboom P, Hoozemans JJ, Veerhuis R, *et al*. Whether, when and how chronic inflammation increases the risk of developing late-onset Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Res Ther, 2012, 4(3): 15.

[16] Zimmer ER, Leuzy A, Benedet *al*, *et al*. Tracking neuroinflammation in Alzheimer's disease: the role of positron emission tomography imaging[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 120.

[17] Berk M, Dean O, Drexhage H, *et al*. Aspirin: a review of its neurobiological properties and therapeutic potential for mental illness[J]. BMC Med, 2013, 11: 74.

[18] Álvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, *et al*. Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-1 in Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2007, 28(4): 533-536.

[19] Liu L, Chan C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease[J]. Ageing Res Rev, 2014, 0: 6-15.

[20] Centonze D, Muzio L, Rossi S, *et al*. The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(7): 1083-1091.

[21] Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-KappaB in long-term memory and structural plasticity in the adult mammalian brain[J]. Front Mol Neurosci, 2015, 8: 69.

[22] Gu SM, Park MH, Hwang CJ, *et al*. Bee venom ameliorates lipopolysaccharide-induced memory loss by preventing NF-kappaB pathway[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 124.

[23] Listwak SJ, Rathore P, Herkenham M. Minimal NF-κB activity in neurons[J]. Neuroscience, 2013, 250: 282-299.

[24] Wang P, Guan PP, Wang T, *et al*. Aggravation of Alzheimer's disease due to the COX-2-mediated reciprocal regulation of IL-1β and Aβ between glial and neuron cells[J]. Aging Cell, 2014, 13(4): 605-615.

[25] Doost Mohammadpour J, Hosseinmardi N, Janahmadi M, *et al*. Non-selective NSAIDs improve the amyloid-β- mediated suppression of memory and synaptic plasticity[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2015, 132: 33-41.

[26] Lee M, McGeer E, McGeer PL. Activated human microglia stimulate neuroblastoma cells to upregulate production of beta amyloid protein and tau: implications for Alzheimer's disease pathogenesis[J]. Neurobiol Aging, 2015, 36(1): 42-52.

[27] Wang J, Tan L, Wang HF, *et al*. Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis[J]. J Alzheimers Dis, 2015, 44(2): 385-396.

[28] Wichmann MA, Cruickshanks KJ, Carlsson CM, *et al*. NSAID use and incident cognitive impairment in a population-based cohort[J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2015. [Epub ahead of print]

[29] Sindi S, Mangialasche F, Kivipelto M. Advances in the prevention of Alzheimer's disease[J]. F1000Prime Rep, 2015, 7: 50.

[30] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, *et al*. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(6): 614-629.

（编辑：周宇红）