DOI:10.16016/j.2097-0927.202309156

n-3 多不饱和脂肪酸调节小胶质细胞激活及极化改善 APPPS1 小鼠学习记忆能力

邓梦延,朱晓辉,黄 力,白 倩,李韦昉,王 斌,糜漫天 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系营养与食品安全研究中心,重庆市医学营养研究中心,营养与健康重庆市重点实验室

[摘要] **目的** 建立 Fat-1/APPPS1 转基因小鼠的体内模型及小胶质细胞体外模型,探讨 n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acids,n-3 PUFAs)调节小胶质细胞激活及极化改善 APPPS1 小鼠学习记忆能力的效果和机制。**方法** 将杂合子 Fat-1 雄性小鼠与杂合子 APPPS1 雌性小鼠进行杂交,筛选子代得到 WT、Fat-1、Fat-1/APPPS1 以及 APPPS1 雄性小鼠,培育至 9 月龄。运用 Morris 水迷宫实验评估小鼠的学习记忆能力;气-质联用技术(GS-MS)测定小鼠脑组织内多不饱和脂肪酸水平;运用免疫组织化学法检测小鼠大脑海马区 β 淀粉样蛋白(β-amyloid protein, Aβ)沉积情况;运用组织免疫荧光、qRT-PCR 及酶联免疫吸附实验检测各组小鼠中枢神经系统(central nervous system, CNS)炎症水平,小胶质细胞激活及极化水平,基因 *Iba*-1 的转录及表达小胶质细胞激活水平,基因 *CD*86、*CD*206 的转录及表达小胶质细胞极化水平。采用脂多糖(LPS)诱导小鼠来源的永生化 BV2 小胶质细胞损伤建立细胞炎症模型,用二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)和二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)对细胞预处理,运用细胞免疫荧光、qRT-PCR 和蛋白免疫印迹技术检测各组小胶质细胞炎症、激活及极化水平,采用的激活与极化指标与动物实验相同。**结果** 与 APPPS1 小鼠相比,内源性表达 n-3 PUFAs 的 Fat-1/APPPS1 小鼠学习记忆障碍明显改善($P<0.05$),海马区 Aβ 沉积有效缓解($P<0.05$),CNS 炎症水平以及小胶质细胞激活水平显著降低($P<0.05$),同时小胶质细胞激活表型从 M1 向 M2 型转化($P<0.05$)。DHA+EPA 预处理显著降低了 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症水平($P<0.05$),且促使细胞从 M1 向 M2 型转化($P<0.05$)。**结论** n-3 PUFAs 可以抑制 APPPS1 小鼠大脑小胶质细胞激活,调节小胶质细胞由 M1 向 M2 转化,降低中枢神经炎症水平,改善 APPPS1 小鼠学习记忆障碍。

[关键词] n-3 多不饱和脂肪酸;阿尔茨海默症;神经炎症;小胶质细胞
[中图法分类号] R322.81; R338.64; R977.6 [文献标志码] A

n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate learning and memory abilities in APPPS1 mice by regulating microglial activation and polarization

DENG Mengyan, ZHU Xiaohui, HUANG Li, BAI Qian, LI Weifang, WANG Bin, MI Mantian Research Center for Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Health, Chongqing Medical Nutrition Research Center, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a model of Fat-1/APPPS1 transgenic mice and a cellular model of microglia and explore the improvement effect and underlying mechanism of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) on the learning and memory abilities of APPPS1 mice by regulating microglial activation and polarization. **Methods** After the male mice with heterozygous Fat-1 genotype were mated with the female ones with heterozygous APPPS1 genotype, genetic identification was used to screen the male offspring with Fat-1/APPPS1 genotype. Then after the male wild-type (WT) mice and those with Fat-1, Fat-1/APPPS1, and APPPS1 genotypes were bred until 9 months old, their learning and memory abilities were evaluated with

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81773410)
[通信作者] 王 斌,E-mail: yy_bwang@hotmail.com
糜漫天,E-mail: mantian_mi@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Morris water maze (MWM) test. In addition, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed to detect the concentration of PUFAs in the brain, and immunohistochemistry (IHC) was applied to detect the deposition of β-amyloid protein (Aβ) in the hippocampal regions. Moreover, immunofluorescence assay, qRT-PCR, and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were conducted to measure inflammation, and transcription and expression of Iba-1 (indicating the microglial activation) and CD86 and CD206 (indicating microglial polarization) in central nervous system (CNS). After pretreated with DHA+EPA (25 μmol/mL: 25 μmol/mL), microglial model of inflammatory injury was established in immortalized mouse BV2 cells induced by LPS (1 μg/mL). Afterwards, immunofluorescence assay, qRT-PCR and Western blotting were used to detect inflammation and microglial activation and polarization. **Results** Compared with the APPPS1 mice, endogenous n-3 PUFAs effectively improved the learning and memory disorders in Fat-1/APPPS1 ones ($P<0.05$), remarkably alleviated Aβ deposition in the hippocampal regions ($P<0.05$), evidently reduced CNS inflammation and microglial activation ($P<0.05$) and transformed the activated microglia from M1 to M2 ($P<0.05$). Furthermore, BV2 cells with DHA+EPA pretreatment obviously resisted LPS-induced cellular inflammation and induced activated ones from M1 to M2 ($P<0.05$). **Conclusion** n-3 PUFAs inhibit the microglial activation, regulate the microglial polarization from M1 to M2, reduce CNS inflammation, and thus alleviate learning and memory disorders in APPPS1 mice.

[**Key words**] n-3 polyunsaturated fatty acids; Alzheimer's disease; neuroinflammation; microglia

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81773410). Corresponding author: WANG Bin, E-mail: yy_bwang@hotmail.com; MI Mantian, E-mail: mantian_mi@tmmu.edu.cn

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知功能降低和行为损害为特征的中枢神经系统(central nervous system, CNS)退行性疾病,是最常见的痴呆症。随着全球人口老龄化加剧,预计到2050年,全球痴呆患者人数可达1.53亿[1]。我国是世界上老龄化最快的国家之一,截至2019年,AD在我国的死因排名上升至第5位,死亡率达23.3/10万,患病率达788.3/10万,残疾调整生命年率达368.5/10万,均高于全球水平[2]。积极探索并推广AD防治的有效措施,对提高我国居民健康水平、减轻社会负担具有重要意义。

越来越多的研究认为,慢性神经炎症在AD发展中发挥重要作用。小胶质细胞作为CNS的固有免疫细胞,占健康成人脑实质细胞总数的10%~15%[3],是慢性神经炎症的核心参与者。生理状态下,小胶质细胞呈静息态,一旦收到内源性危险信号就会被激活呈多种表型,而慢性的感染或损伤会使其逐渐向经典激活表型(M1型)极化,后者不但吞噬作用较弱,而且还表现为以NLRP3炎症小体激活为主的神经炎症毒性反应[5-6];Aβ沉积也可激活NLRP3炎症小体,进一步加重神经炎症[7]。而抗炎因子可以诱导小胶质细胞向替代激活表型(M2型)极化,大大提升吞噬能力并产生多种抗炎因子抑制炎症,促进组织损伤修复[8-9]。诱导小胶质细胞向M2极化可以改善脊髓损伤急性期炎症反应[10];抗炎因子IL-4在体外可以抵消Aβ诱导的小胶质细胞的神经毒性[11]。

n-3 PUFAs主要包括来源于植物性食物的α-亚麻酸(α-linolenic acid, ALA)和来源于深海鱼类的EPA、DHA。EPA和DHA既是神经细胞的重要组成成分,也在促进大脑发育、维持神经细胞膜流动性、增强突触可塑性等神经功能调控中起关键作用。越来越多的研究认为n-3 PUFAs因其较强的抗炎作用,具有较好的神经保护作用。然而有关n-3 PUFAs是否通过调节中枢小胶质细胞激活及极化来改善AD相关的病理和学习记忆障碍的研究还比较少。

APPPS1小鼠因携带*APP*、*Psen*1基因使得小鼠在6~8周就开始出现大脑淀粉样变性的病理学变化,在8个月后可以表现出认知功能障碍[12],成为研究AD最常见的动物模型。同时,Fat-1小鼠因其携带的*fat*-1基因可以天然而稳定地将体内n-6 PUFAs转化为n-3 PUFAs[13],近年来被越来越多的学者当作研究n-3 PUFAs的基本动物模型。本研究采用Fat-1、Fat-1/APPPS1、APPPS1 3种转基因小鼠开展体内研究以及BV2细胞开展体外研究,其中Fat-1/APPPS1小鼠来源于APPPS1小鼠与Fat-1小鼠杂交繁育获得,为研究n-3 PUFAs能否通过调节小胶质细胞激活及极化有效改善AD提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

从哈佛医学院脂类医学与技术研究中心(美国)引进8~10周龄Fat-1纯合子雄性小鼠,适应3 d后与

3 月龄 C57BL/6J 雌性小鼠交配,经基因鉴定筛选获得子一代 Fat-1 杂合子雄性小鼠。将子一代小鼠培育至 8~10 周龄,与 8~10 周龄 APPPS1 杂合子雌性小鼠(莱比特,重庆)杂交获得子二代雄性小鼠,经基因鉴定筛选后将动物分为 4 组,即 WT 组、Fat-1 组、Fat-1/APPPS1 组、APPPS1 组,每组动物 8 只。根据文献调研,选择将上述 4 组子二代小鼠饲养至 9 月龄后开展实验[12,14]。所有小鼠饲养于陆军军医大学免疫学研究所无特定病原体(SPF)级层流动物房,恒温、恒湿条件下自由摄食、饮水。动物实验程序均严格按照《实验动物护理与使用指南》和动物福利条例进行,并经陆军军医大学动物管理和使用委员会批准[SYXK(渝)20170002]。Morris 水迷宫实验完成后处死小鼠,获取小鼠脑组织(含海马),左半脑于 4%多聚甲醛中固定,右半脑于-80 ℃中冻存备用。

1.2 小鼠基因鉴定

采用鼠尾直接 PCR 试剂盒(Bimake,美国),所有实验步骤根据说明书进行(引物序列见表 1)。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
fat-1	上游:CGGCTTGATGCTCGTCATTG
	下游:TACTCTAGAACGGCACGGGA
APP	上游:GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG
	下游:CTTGTAAGTTGGATTCTCATATCCG
*Psen*1	上游:AATAGAGAACGGCAGGAGCA
	下游:GCCATGAGGGCACTAATCAT
Iba-1	上游:ATTATGTCCTTGAAGCGAATGC
	下游:TCTCAAGATGGCAGATCTCTTG
*CD*86	上游:ACGGAGTCAATGAAGATTTCCT
	下游:GATTCGGCTTCTTGTGACATAC
*CD*206	上游:CCTATGAAAATTGGGCTTACGG
	下游:CTGACAAATCCAGTTGTTGAGG
iNOS	上游:AGCAAACCACCAAGTGGAGGA
	下游:GCTGGCACCACTAGTTGGTTGT
IL-6	上游:CTCCCAACAGACCTGTCTATAC
	下游:CCATTGCACAACTCTTTTCTCA
TGF-β	上游:CCAGATCCTGTCCAAACTAAGG
	下游:CTCTTTAGCATAGTAGTCCGCT
*NLRP*3	上游:GCCGTCTACGTCTTCTTCCTTTCC
	下游:CATCCGCAGCCAGTGAACAGAG
Caspase-1	上游:AGAGGATTTCTTAACGGATGCA
	下游:TCACAAGACCAGGCATATTCTT
IL-1*β*	上游:CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC
	下游:TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGTAC
IL-18	上游:AGACCTGGAATCAGACAACTTT
	下游:TCAGTCATATCCTCGAACACAG
β-actin	上游:GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG
	下游:ATGCCACAGGATTCCATACC

1.3 Morris 水迷宫实验

4 组小鼠满 9 月龄后开展 Morris 水迷宫实验测试其学习记忆能力。Morris 水迷宫由摄像监视系统、直径为 120 cm 的圆形水池、直径为 9 cm 的水下平台以及 smart 分析软件构成,水下平台位于第一象限,离池壁 30 cm,低于水平面约 1 cm。用二氧化钛粉末使池内水变成乳白色混悬液,水温控制在 21~25 ℃,并由摄像监视系统拍摄记录小鼠找到水下平台的潜伏期和轨迹。水环境适应(无平台,2 min/只)1 d 后,连续训练 5 d,每只小鼠每天分别从 4 个象限进入水迷宫 1 次,每次训练 60 s,若 60 s 内未找到水下平台,则潜伏期记为 60 s,并将其引导至水下平台上停留 20 s。第 7 天将水下平台撤去,记录 60 s 每只小鼠的水下平台搜索运动轨迹。

1.4 脑组织中长链脂肪酸分析

采用 Trace 1310-ISQ 7000 气-质联用仪(Thermo,美国)平台对小鼠脑组织进行中长链脂肪酸绝对定量分析。脂肪酸混标溶液由正己烷溶解配制。称取约 50 mg/样本在一定条件下研磨、酯化、萃取得到待检测溶液,进入 Thermo Trace 1300(Thermo,美国)气相系统进行检测。

1.5 免疫组织化学

1.5.1 制片 将浸泡在多聚甲醛中的组织捞出进行常规石蜡包埋脱水。抗原修复后阻断内源性过氧化物酶,采用 BSA 血清室温封闭 30 min。然后加入 Aβ 抗体(60342-1-Ig,1∶100)湿盒内 4 ℃孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后加入二抗(GB23303,1∶200)室温孵育 50 min。PBS 洗涤 3 次后滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,自来水冲洗切片终止显色。苏木精复染细胞核,流水冲洗,脱水封片。

1.5.2 成像及统计 在明场白光显微镜下成像(版本 OLYMPUS VS-ASW),运用 Fiji Image J 对图像进行平均光密度值统计分析。

1.6 组织免疫荧光

1.6.1 组织免疫荧光制片 将浸泡在多聚甲醛中的组织捞出进行常规石蜡包埋脱水。抗原修复后双氧水封闭,10%的兔血清室温封闭后加入 CD206 抗体(AF2535,1∶1 000)湿盒内 4 ℃孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后滴加二抗(GB23204,1∶500)室温孵育 50 min。BSA 血清室温封闭后加入 Iba-1 抗体(234011,1∶100)、CD86 抗体(PA5-88284,1∶500)的混合试剂,湿盒内 4 ℃孵育过夜。PBS 洗涤后滴加二抗(GB21301,1∶300;GB25303,1∶400)室温孵育 50 min。滴加 DAPI 复染细胞核避光室温孵育 10 min,加入自发荧光淬灭剂并流水冲洗,抗荧光淬灭剂封片。

1.6.2 成像及统计 激发光波长分别为405、488、543、633 nm,采用LSM 880 AxioObserver(Plan-Apochromat)显微镜采集图像,ZEN2012 black edition(Carl Zeiss Microscopy GmbH)系统进行平均荧光强度统计。

1.7 ELISA

采用Iba-1、IL-6、iNOS、TGF-β试剂盒(云克隆,武汉),所有实验步骤根据相应说明书进行。

1.8 细胞实验与分组

BV2细胞购自赛百慷(上海)生物技术公司,培养条件为含10% FBS、100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素的高糖培养基DMEM(HyClone,美国),温度37 ℃,含5% CO_2。

n-3 PUFAs的干预分为4组,即Control组、DHA+EPA(25 μmol/mL∶25 μmol/mL)组、DHA+EPA+LPS(25 μmol/mL∶25 μmol/mL∶1 μg/mL)组以及LPS(1 μg/mL)组,干预剂量根据文献[14-15]与1.9细胞活力检测结果综合得到。干预时10% FBS换为1% BSA-V(索莱宝,北京)以排除FBS中含有的脂肪酸对实验结果造成影响。DHA+EPA+LPS组的处理:提前1 h采用DHA+EPA对BV2细胞进行预处理,后再加入LPS干预24 h。其中DHA购于MCE(美国),EPA购于MCE(美国),LPS购于Sigma-Aldrich(美国)。

1.9 细胞活力检测

将BV2细胞以1×10^4/孔(100 μL/孔)接种于96孔板上:①暴露于0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1、2、4 μg/mL的LPS中24 h;②暴露于0、10、50、100、200 μmol/mL的DHA或EPA中24 h;③暴露于0、20、50、100、150、200 μmol/mL(DHA∶EPA=1∶1)的DHA+EPA混合试剂中1 h后,各组再加入1 μg/mL LPS暴露24 h。上述各组的后续实验步骤根据CCK-8试剂盒(碧云天,上海)说明书进行。

1.10 细胞免疫荧光

将BV2细胞以2×10^4/孔(500 μL/孔)接种于24孔板上,按1.8干预后,采用免疫荧光染色固定液(碧云天,上海)室温固定,含0.1% Triton X-100的PBST室温通透,山羊血清(碧云天,上海)室温封闭,加入Iba-1抗体(234011,1∶1 000)、CD86抗体(PA5-88284,1∶1 000)和CD206抗体(AF2535,1∶1 000)的混合试剂,湿盒内4 ℃孵育过夜。0.2% PBST清洗后滴加用荧光素标记的3种二抗(A0423,1∶200;A0473,1∶200;A0502,1∶200)混合试剂室温避光孵育1 h。0.2% PBST避光浸洗后滴加DAPI染色液(碧云天,上海),避光室温孵育,乙醇溶液浸洗,抗荧光淬灭封片液封片。成像及统计同1.6.2所述。

1.11 Western blot检测

BV2细胞在含有1%的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解缓冲液(Sigma-Aldrich,美国)中裂解。用BCA试剂盒(碧云天,上海)测定蛋白质浓度。而后进行蛋白质印迹实验,将电泳后的分离胶转移到聚偏二氟乙烯膜上。用5%脱脂牛奶封闭膜1 h,加入NLRP3抗体(68102-1-Ig,1∶1 000)、TGF-β抗体(ab179695,1∶1 000)4 ℃孵育过夜。含TBST缓冲液清洗后,用辣根过氧化物酶(碧云天,上海)标记的二抗室温孵育1 h,清洗后的免疫染色条带用Fusion FX(Vilber Lourmat,法国)和Immobilon Western化学发光HRP底物(Millipore,美国)显示和测定。利用Image J软件分析蛋白表达水平,并根据内参蛋白GADPH计算蛋白相对表达量。

1.12 qRT-PCR检测

小鼠脑组织或BV2细胞加入RNAiso Plus(TaKaRa,日本),分离总的RNA,利用核酸蛋白测定仪NanoDrop2000检测各样本RNA浓度。用TaKaRa反转录酶试剂盒,逆转录合成cDNA。按照SYBR Green Master Mix说明书配制反应体系,PCR反应体系为20 μL,采用实时荧光定量PCR仪(Thermo,美国)完成反应,测定基因mRNA的表达水平。以β-actin作为内参,用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法分析基因的相对表达量。引物序列见表1。

1.13 统计学分析

采用OriginPro 2021 9.8.0.200绘制标准曲线,SPSS Statistics R26.0进行数据统计分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示。符合正态分布以及方差齐的多组数据之间比较采用单因素方差分析、双因素方差分析。$P<0.05$认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 携带*fat*-1基因小鼠脑内源性n-3 PUFAs水平

测量小鼠脑组织中长链脂肪酸含量发现,各组小鼠因基因型不同而PUFAs的水平存在差异。与WT小鼠相比,APPPS1小鼠的总PUFAs含量有所降低($P<0.05$),而n-6/n-3比值没有明显变化;Fat-1/APPPS1小鼠的总PUFAs含量较APPPS1小鼠明显提升($P<0.05$),n-6/n-3比值明显降低($P<0.05$);Fat-1小鼠总PUFAs含量最高,n-6/n-3比值最低($P<0.05$)。见图1。

在主要的PUFAs中,APPPS1小鼠与Fat-1/APPPS1小鼠的差异主要体现在DHA和花生四烯酸(arachidonic acid,AA)上($P<0.05$),而ALA、EPA、DPA、亚油酸(linoleic acid,LA)在这2组小鼠之间没有明显差异。见表2。

上述实验结果表明,携带 *fat*-1 基因的 Fat-1、Fat-1/APPPS1 小鼠能在自身体内有效地将 n-6 PUFAs 转化为 n-3 PUFAs。

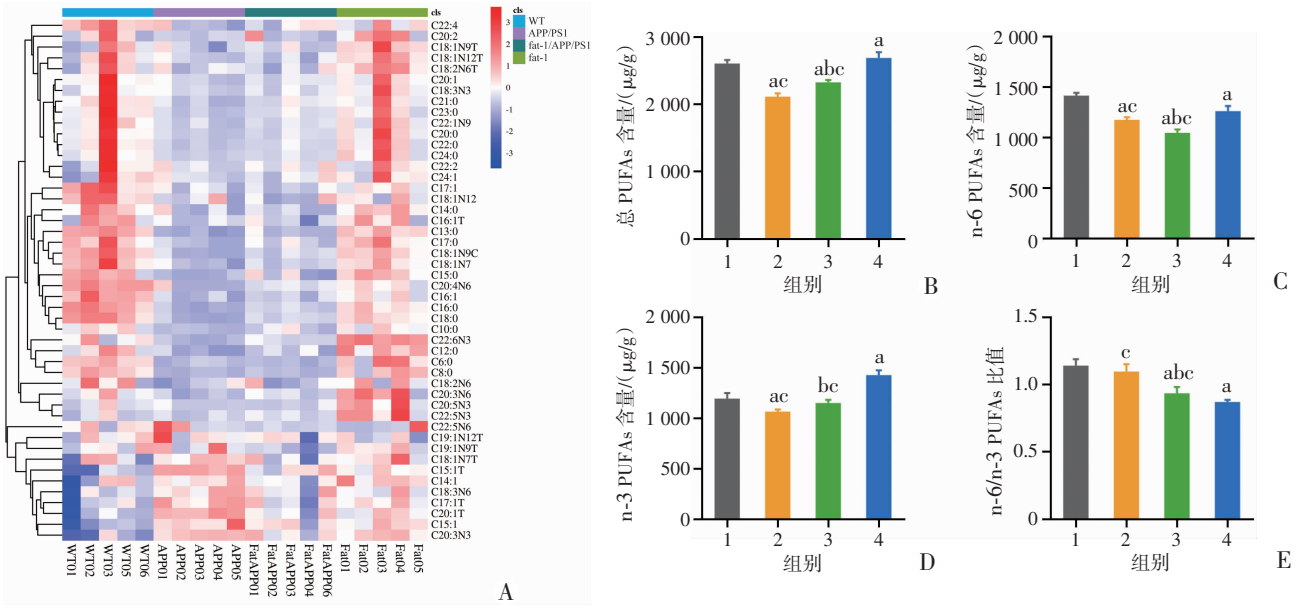
2.2 内源性 n-3 PUFAs 可改善 APPPS1 小鼠的学习记忆障碍

2.2.1 定位航行能力测试 定位航行训练发现,各组小鼠的逃逸潜伏期(找到水下平台所需时间)随着训练次数的增加均有不同程度的缩短。第 5 天训练时,各组小鼠之间的逃逸潜伏期差异更加显著,与 WT 组相比,APPPS1 组的逃逸潜伏期显著延长,Fat-1/APPPS1 组较 APPPS1 组明显缩短,Fat-1 组耗时最短($P<0.05$)。见图 2A、B。

2.2.2 空间探索能力测试 空间探索实验发现,与 WT 组相比,APPPS1 组在目标象限停留时间百分比明显缩短,Fat-1/APPPS1 组较 APPPS1 组明显提升,Fat-1 组明显延长($P<0.05$)。见图 2C。

2.2.3 轨迹图分析 在定位航行训练后期及空间探索测试中,APPPS1 小鼠的平台搜索策略多为外圈绕池壁航行,明显区别于另外 3 组的内圈环形或对角线直线穿越搜索策略。见图 2D。

综合上述实验结果发现,APPPS1 小鼠学习记忆能力最差,Fat-1/APPPS1 小鼠有所改善,而 Fat-1 小鼠的记忆能力最好,甚至优于 WT 小鼠,这表明内源性 n-3 PUFAs 可有效改善 APPPS1 小鼠的学习记忆障碍。



1:WT 组;2:APPPS1 组;3:Fat-1/APPPS1 组;4:Fat-1 组;a:$P<0.05$,与 WT 组比较;b:$P<0.05$,与 APPPS1 组比较;c:$P<0.05$,与 Fat-1 组比较

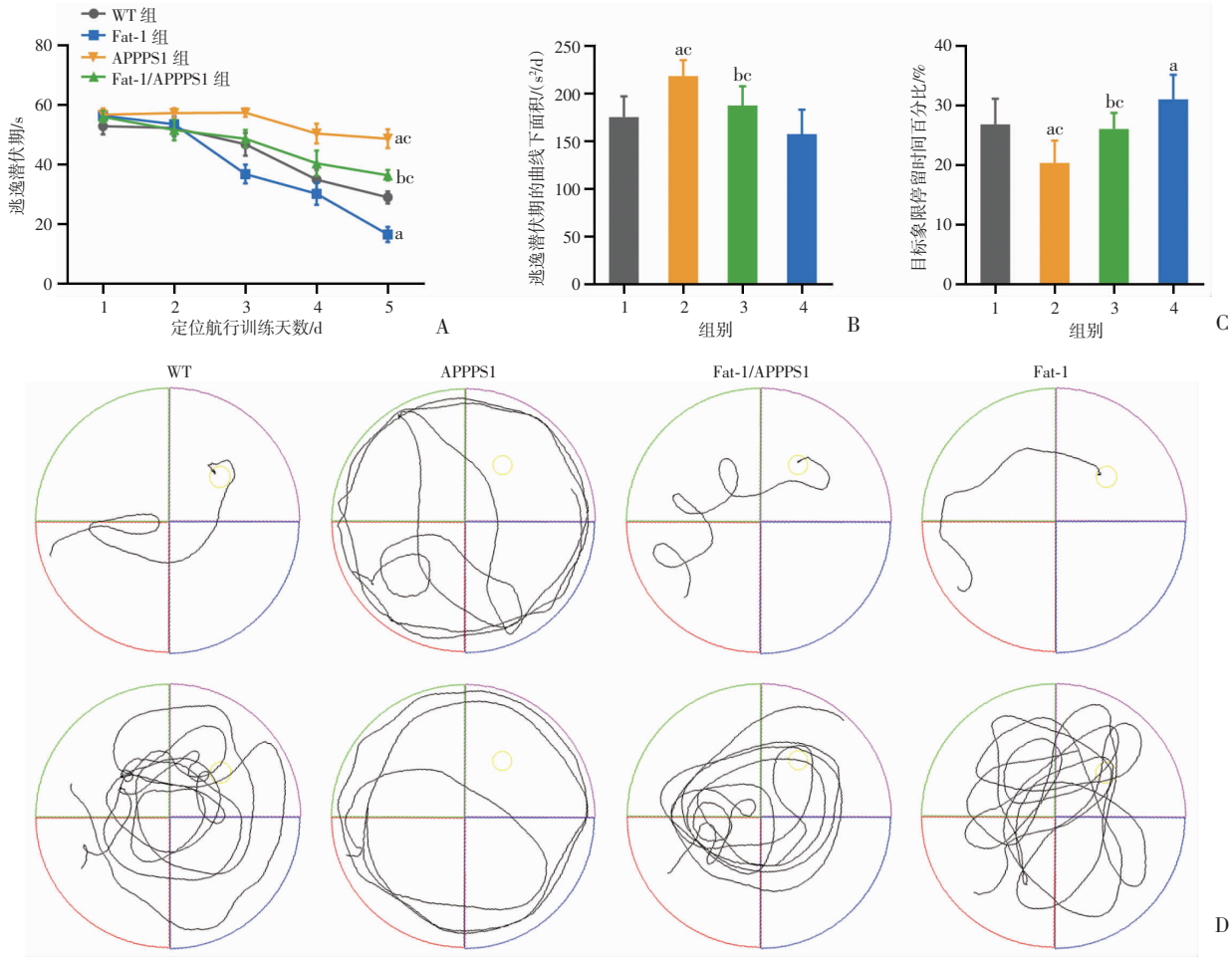
A:中长链脂肪酸水平热图;B:总 PUFAs;C:n-6 PUFAs;D:n-3 PUFAs;E:n-6/n-3 PUFAs 比值

图 1 不同基因型小鼠脑内源性 n-3 PUFAs($n=5$)

表 2 各组小鼠脑组织内 PUFAs 含量(μg/g,$n=5$,$\bar{x}\pm s$)

PUFAs	WT 组	APPPS1 组	Fat-1/APPPS1 组	Fat-1 组
n-3				
总 n-3	1 193.782±55.671	1 065.508±22.746^{ac}	1 150.471±31.594^{bc}	1 428.273±45.937^{a}
ALA	2.124±0.219	1.730±0.163^{c}	1.970±0.257^{c}	2.785±1.050
EPA	3.931±0.521	3.434±0.367^{c}	3.557±0.623^{c}	8.749±2.694^{a}
DPA	15.811±2.555	14.036±1.111^{c}	15.375±1.217^{c}	26.518±5.575^{a}
DHA	1 171.398±60.362	1 045.613±23.501^{ac}	1 114.236±53.548^{bc}	1 393.864±39.558^{a}
n-6				
总 n-6	1 413.435±28.809	1 173.666±27.723^{ac}	1 046.436±32.973^{abc}	1 260.885±51.630^{a}
LA	49.960±7.749	45.793±5.134	41.962±4.364	49.605±7.422
AA	1 065.521±17.874	878.834±18.234^{a}	782.265±28.784^{abc}	890.881±66.669^{a}
n-6/n-3 比值	1.141±0.047	1.097±0.055^{c}	0.935±0.047^{abc}	0.871±0.016^{a}
AA/EPA+DPA+DHA 比值	0.868±0.037	0.823±0.036^{c}	0.735±0.054^{abc}	0.658±0.011^{a}

a:$P<0.05$,与 WT 组比较;b:$P<0.05$,与 APPPS1 组比较;c:$P<0.05$,与 Fat-1 组比较



1:WT 组;2:APPPS1 组;3:Fat-1/APPPS1 组;4:Fat-1 组;a:$P<0.05$,与 WT 组比较;b:$P<0.05$,与 APPPS1 组比较;c:$P<0.05$,与 Fat-1 组比较

A、B:定向航行训练期-逃逸潜伏期及曲线下面积;C:空间探索实验期-目标象限停留时间百分比;D:d5-定向航行实验运动轨迹(上排)和空间探索实验运动轨迹(下排)

图 2 内源性 n-3 PUFAs 对小鼠学习记忆能力的影响($n=8$)

2.3 内源性 n-3 PUFAs 可降低 APPPS1 小鼠海马区 Aβ 沉积

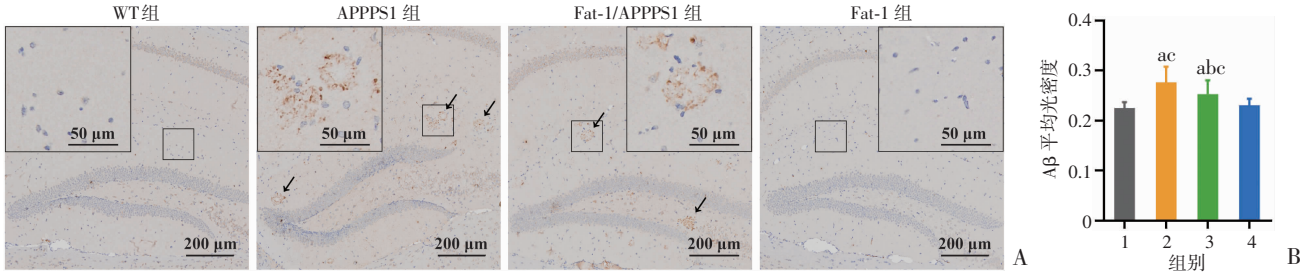
对小鼠脑组织进行组织免疫化学染色发现,APPPS1 小鼠海马区 Aβ 沉积较 WT 小鼠明显增多($P<0.05$),Fat-1/APPPS1 小鼠虽高于 WT 和 Fat-1 小鼠($P<0.05$),但相比 APPPS1 小鼠明显下降($P<0.05$),WT 和 Fat-1 小鼠差别不大。这表明内源性 n-3 PUFAs 可以显著减少 APPPS1 小鼠海马区的 Aβ 沉积。见图 3。

2.4 内源性 n-3 PUFAs 可调节小胶质细胞激活及极化,抑制中枢神经炎症

2.4.1 小胶质细胞激活及极化水平变化 组织免疫荧光共染小鼠大脑发现,APPPS1 小鼠的海马区小胶质细胞表达 Iba-1、CD86、CD206 较 WT 组显著升高($P<0.05$);而 Fat-1/APPPS1 组表达 Iba-1 较 APPPS1 小鼠显著降低($P<0.05$),仍高于 Fat-1 组($P<0.05$),同时 Fat-1/APPPS1 小鼠表达 CD206 较 APPPS1 小鼠显著升高($P<0.05$),其 CD206/CD86 比值较 APPPS1 小鼠明显升高($P<0.05$)。上述实验结果表明,APPPS1 小鼠的小胶质细胞呈高水平激活且整体激活水平偏 M1 型,Fat-1/APPPS1 小鼠的小胶质细胞激活程度较 APPPS1 小鼠明显降低,且整体激活水平偏 M2 型,这提示内源性 n-3 PUFAs 可有效抑制 APPPS1 小鼠中枢小胶质细胞激活,并调节小胶质细胞向 M2 型转化。见图 4。

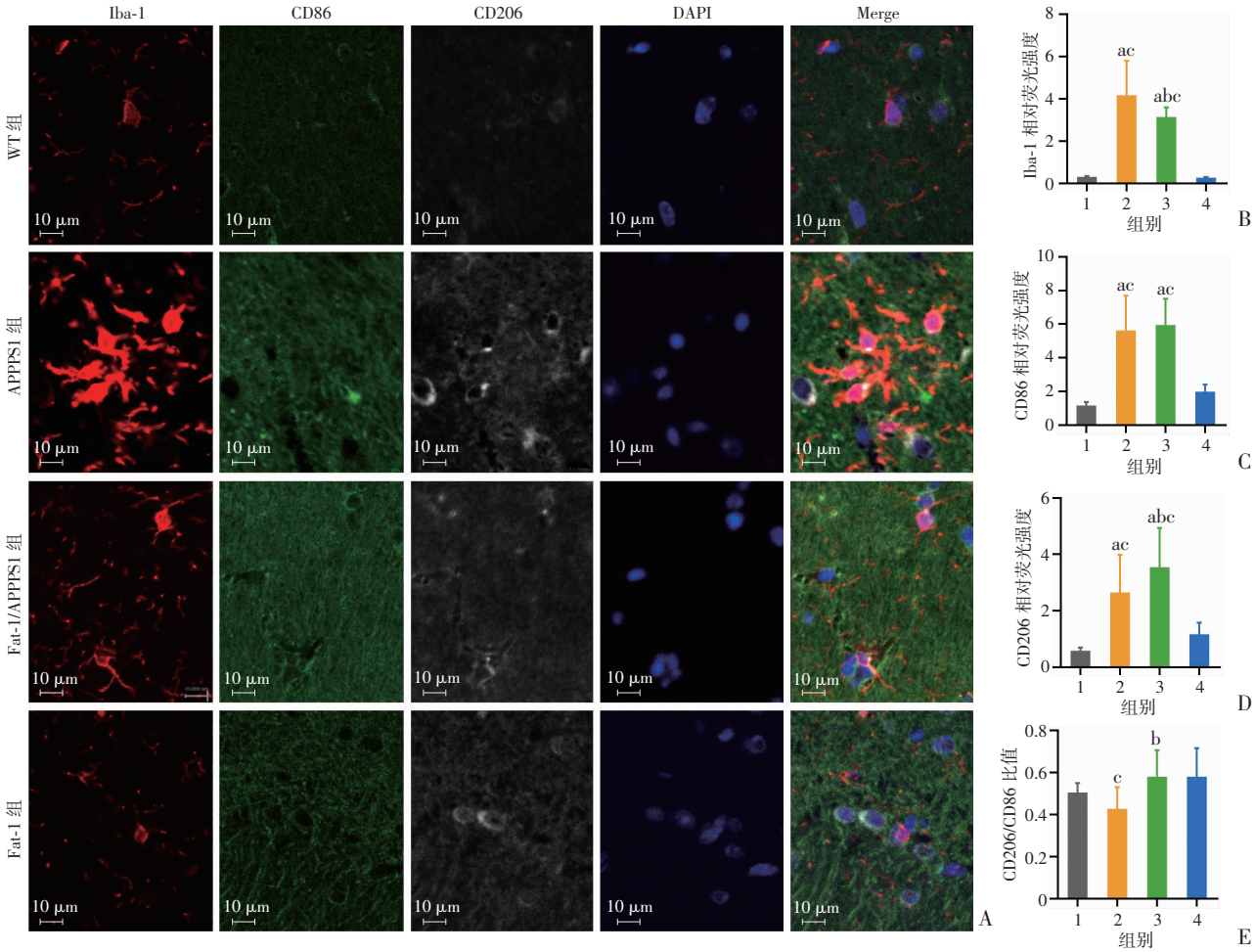
2.4.2 中枢神经炎症水平变化 qRT-PCR 结果显示,APPPS1 小鼠大脑的 *NLRP3*、*Caspase*-1、*IL*-1β、*IL*-18 mRNA 表达水平较 WT 小鼠显著升高($P<0.05$),Fat-1/APPPS1 小鼠大脑的 *NLRP3*、*Caspase*-1、*IL*-1β、*IL*-18 mRNA 表达水平较 APPPS1 小鼠明显降低($P<0.05$),仍高于 Fat-1 小鼠($P<0.05$)。ELISA 结果显示,

APPPS1 小鼠大脑的 Iba-1、IL-6、iNOS 表达水平较 WT 小鼠显著升高($P<0.05$),TGF-β 表达水平显著降低($P<0.05$);而 Fat-1/APPPS1 小鼠大脑的 Iba-1、IL-6、iNOS 表达水平较 APPPS1 小鼠显著降低($P<0.05$),TGF-β 表达水平显著升高($P<0.05$)。上述实验结果表明,APPPS1 小鼠的中枢呈高神经炎症水平,促炎因子表达增加,抗炎因子表达降低;Fat-1/APPPS1 小鼠的中枢神经炎症水平较 APPPS1 小鼠明显降低,促炎因子水平降低,抗炎因子水平升高。提示内源性 n-3 PUFAs 可显著降低中枢神经炎症水平。见图 5。



A:脑组织 Aβ 的组织免疫化学染色;B:Aβ 平均光密度值　1:WT 组;2:APPPS1 组;3:Fat-1/APPPS1 组;4:Fat-1 组;a:$P<0.05$,与 WT 组比较;b:$P<0.05$,与 APPPS1 组比较;c:$P<0.05$,与 Fat-1 组比较

图 3　内源性 n-3 PUFAs 对小鼠海马区 Aβ 沉积的影响($n=6$)



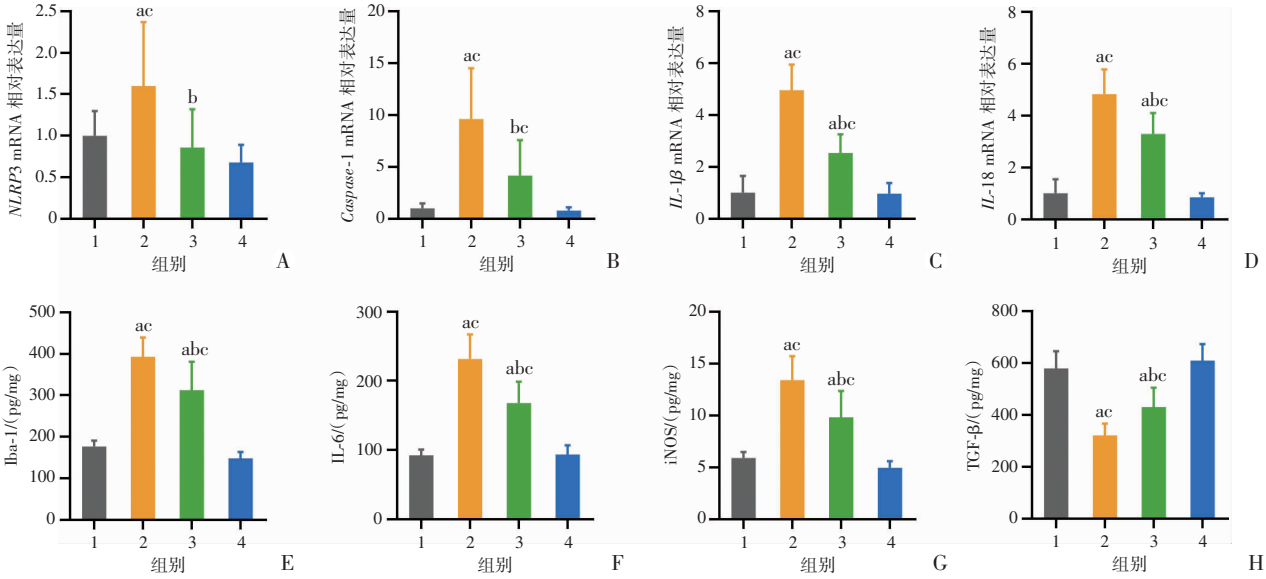
1:WT 组;2:APPPS1 组;3:Fat-1/APPPS1 组;4:Fat-1 组;a:$P<0.05$,与 WT 组比较;b:$P<0.05$,与 APPPS1 组比较;c:$P<0.05$,与 Fat-1 组比较

A:海马区组织免疫荧光化学染色;B:Iba-1 平均荧光强度;C:CD86 平均荧光强度;D:CD206 平均荧光强度;E:CD206/CD86 荧光强度比值

图 4　内源性 n-3 PUFAs 对小鼠中枢小胶质细胞激活及极化水平的影响($n=6$)

2.5　DHA+EPA 预处理对 LPS 诱导的 BV2 细胞损伤的影响

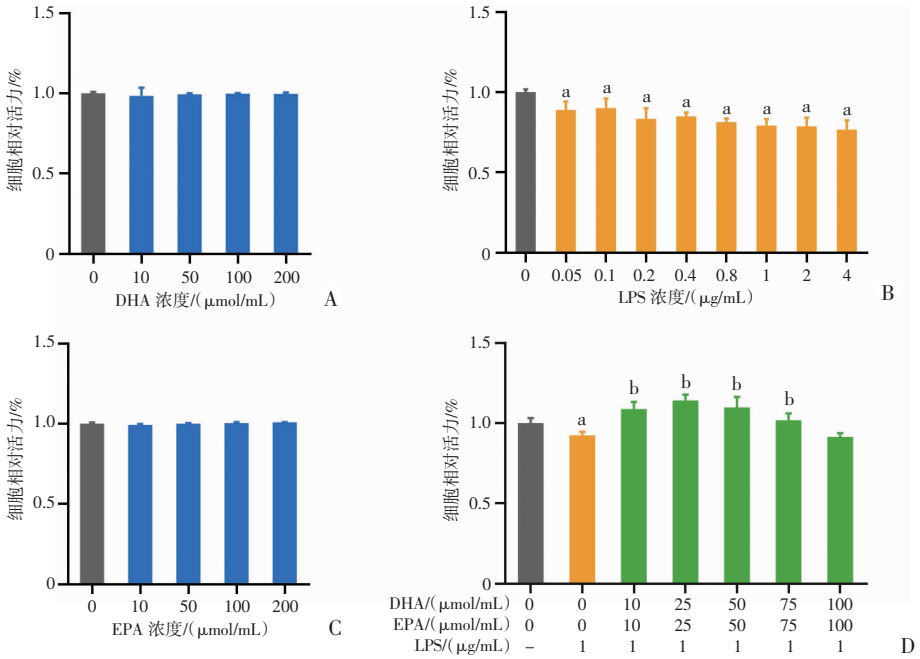
与 Control(0 μg/mL LPS)比较,经 LPS 处理 24 h 后,BV2 的细胞活力呈剂量依赖性地明显下降($P<0.05$),而采用 20~150 μmol/mL(浓度比 1∶1)DHA+EPA 预处理 BV2 细胞后可明显减轻 LPS 诱导的细胞损伤($P<0.05$),这种保护效应呈现明显的剂量效应关系,在 DHA∶EPA 的浓度为25 μmol/mL∶25 μmol/mL 时,保护效应最明显。见图 6。



1:WT 组;2:APPPS1 组;3:Fat-1/APPPS1 组;4:Fat-1 组;a:$P<0.05$,与 WT 组比较;b:$P<0.05$,与 APPPS1 组比较;c:$P<0.05$,与 Fat-1 组比较

A:*NLRP3* mRNA 转录水平;B:*Caspase*-1 mRNA 转录水平;C:*IL*-1β mRNA 转录水平;D:*IL*-18 mRNA 转录水平;E:Iba-1 表达水平;F:IL-6 表达水平;G:iNOS 表达水平;H:TGF-β 表达水平

图 5　内源性 n-3 PUFAs 对小鼠中枢神经炎症水平的影响($n=8$)



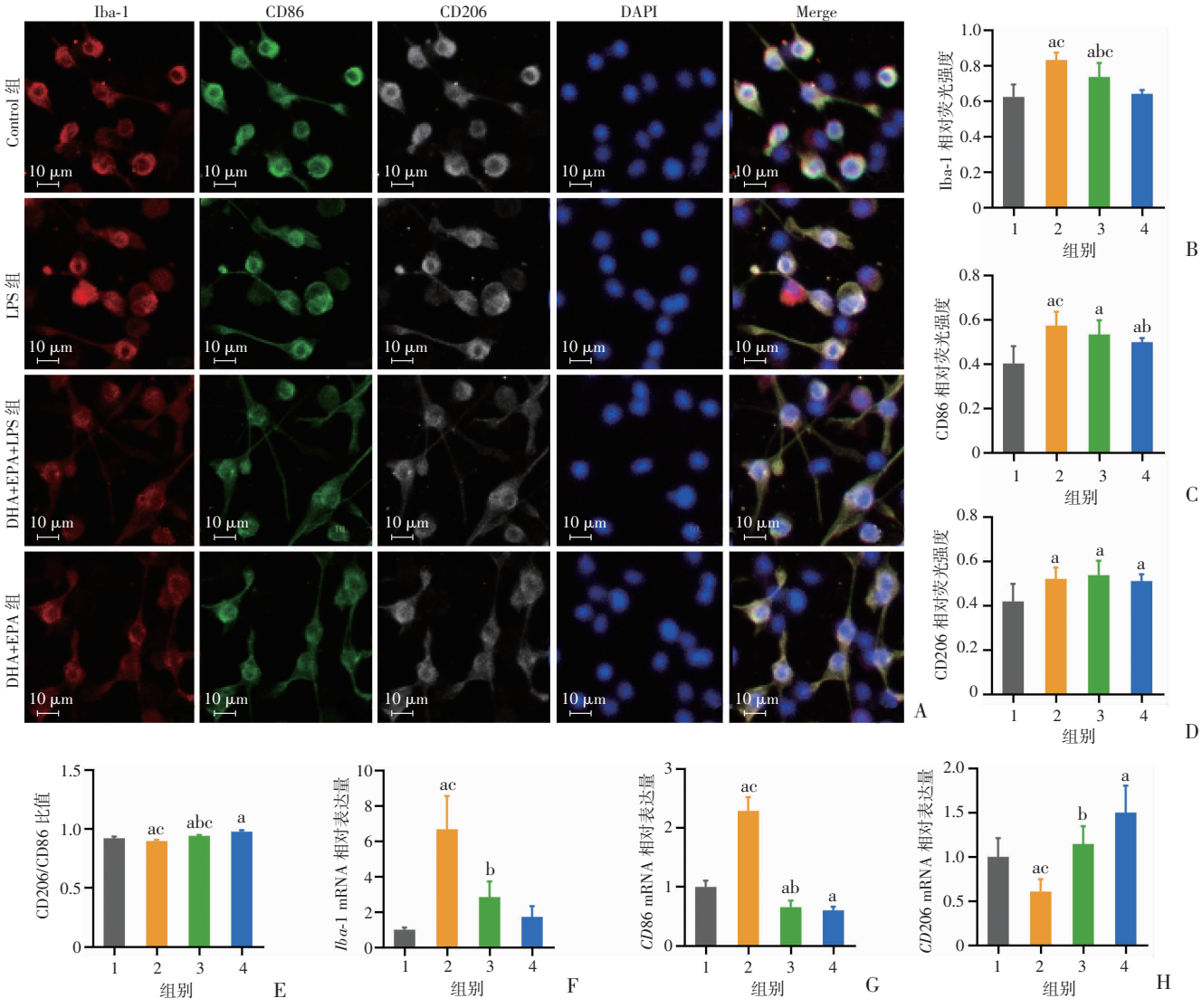
a:$P<0.05$,与 Control(0 μg/mL LPS)比较;b:$P<0.05$,与 LPS 干预比较

A:DHA 的 CCK-8 结果($n=6$);B:LPS 的 CCK-8 结果($n=6$);C:EPA 的 CCK-8 结果($n=6$);D:DHA+EPA+LPS 的 CCK-8 结果($n=4$)

图 6　DHA、EPA 对 LPS 诱导的细胞损伤的保护作用

2.6　DHA+EPA 预处理可调节 LPS 诱导的 BV2 细胞激活及极化，抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症

2.6.1　BV2 细胞激活及极化水平变化　　免疫荧光共染 BV2 细胞发现，LPS 组表达 Iba-1、CD86、CD206 较 Control 组显著升高（$P<0.05$），DHA+EPA+LPS 组表达 Iba-1、CD86 较 LPS 组显著降低（$P<0.05$）；而各组两两比较 CD206/CD86 比值均有统计学差异（$P<0.05$）。qRT-PCR 结果与免疫荧光共染类似，LPS 组的 *Iba*-1、*CD*86 mRNA 表达水平较 Control 组显著升高（$P<0.05$），*CD*206 mRNA 表达水平显著降低（$P<0.05$），DHA+EPA+LPS 组的 *Iba*-1、*CD*86 mRNA 表达水平较 LPS 组显著降低（$P<0.05$），*CD*206 mRNA 表达水平显著升高（$P<0.05$）。上述实验结果表明，LPS 处理后的 BV2 细胞呈高水平激活且整体激活水平偏 M1 型，而经 DHA+EPA 预处理的 BV2 细胞在受到 LPS 刺激后激活程度明显降低，同时整体激活水平偏 M2 型，这提示 DHA+EPA 可有效抑制 BV2 细胞激活，并调节 BV2 细胞向 M2 型转化。见图 7。



1：Control 组；2：LPS 组；3：DHA+EPA+LPS 组；4：DHA+EPA 组；a：$P<0.05$，与 Control 组比较；b：$P<0.05$，与 LPS 组比较；c：$P<0.05$，与 DHA+EPA 组比较（A～E：$n=6$；F～H：$n=4$）

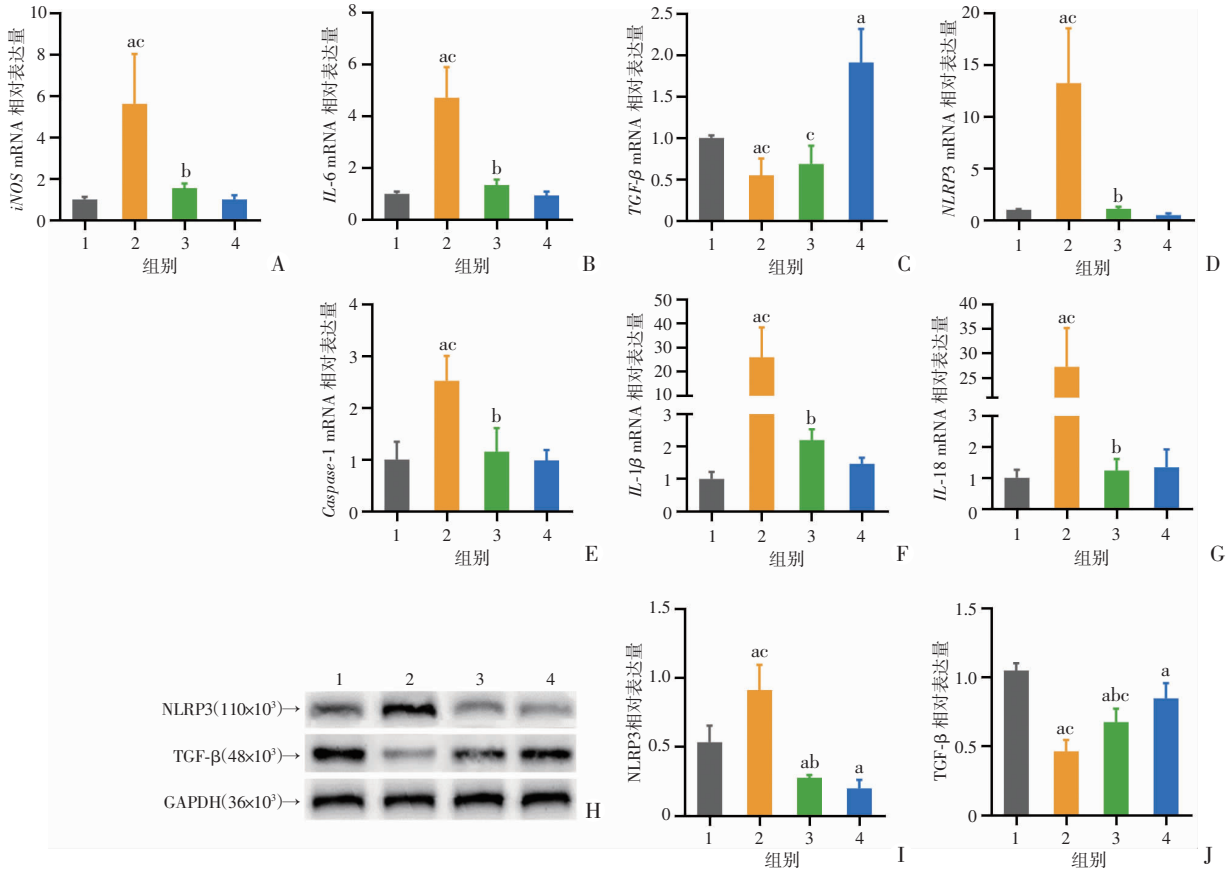
A：细胞免疫荧光化学；B：Iba-1 平均荧光强度；C：CD86 平均荧光强度；D：CD206 平均荧光强度；E：CD206/CD86 荧光强度比值；F：*Iba*-1 mRNA 转录水平；G：*CD*86 mRNA 转录水平；H：*CD*206 *mRNA* 转录水平

图 7　DHA+EPA 对 LPS 诱导的 BV2 细胞激活及极化水平的影响

2.6.2　BV2 细胞炎症水平变化　　qRT-PCR 结果显示,LPS 组的 *NLRP*3、*Caspase*-1、*IL*-1β、*IL*-18、*IL*-6、*iNOS* mRNA 表达水平较 Control 组显著升高($P<0.05$),DHA+EPA+LPS 组的 *NLRP*3、*Caspase*-1、*IL*-1β、*IL*-18、*IL*-6、*iNOS* mRNA 表达水平较 LPS 组明显降低($P<0.05$)。蛋白质印迹实验结果显示,与 Control 组相比,LPS 处理可显著上调 NLRP3 蛋白表达、下调 TGF-β 蛋白表达($P<0.05$);而经 DHA+EPA 预处理的 BV2 细胞在被 LPS 诱导后 NLRP3 蛋白表达下降、TGF-β 蛋白表达上升($P<0.05$)。上述实验结果表明,DHA+EPA 的预处理可以抑制 LPS 对 BV2 细胞的炎症诱导作用,降低促炎因子表达,提高抗炎因子表达,提高细胞抗炎水平,从而起到保护 BV2 细胞的作用。见图 8。

3　讨论

目前,对于口服补充 n-3 PUFAs 对 AD 患者是否确切有益尚存争议,但主流观点认为 n-3 PUFAs 可以延缓轻中度 AD 患者的认知与行为功能障碍。也有部分研究认为,人们需要同时摄入如 B 族维生素、维生素 E 和类胡萝卜素等其他营养素才能充分发挥 n-3 PUFAs 的神经保护作用[16-17]。这些人群干预的研究结论与绝大部分实验室结果或流行病学的观察结果并不一致,可能与不同受试人群膳食本底、n-3 PUFAs 来源及干预剂量等混杂因素有关。为了排除外源性 n-3 PUFAs 剂量比例及其他膳食混杂营养成分干预所导致的实验结果不稳定的情况,本研究采用以能够自身合成内源性 n-3 PUFAs 的 Fat-1 基因小鼠为基础构建 Fat-1/APPPS1 转基因小鼠作为体内研究模型,再辅以 DHA+EPA 预处理及 LPS 诱导损伤 BV2 细胞作为体外研究模型进行细胞水平的验证,从多个维度提升该研究结论的可信度。然而本研究中作为阴性对照的 WT、Fat-1 小鼠,不论是 n-6/n-3 PUFAs 比值还是 AA/EPA+DPA+DHA 比值都显著异于文献[13]报道的比值。仔细对比发现,既往研究模型大多为 8~12 周龄小鼠,而本研究中均为 9 月龄小鼠,我们推测,PUFAs表达以及*fat*-1基因的作用与小鼠年龄存在一



1:Control 组;2:LPS 组;3:DHA+EPA+LPS 组;4:DHA+EPA 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较;c:$P<0.05$,与 DHA+EPA 组比较

A:*iNOS* mRNA 转录水平;B:*IL*-6 mRNA 转录水平;C:*TGF-β* mRNA 转录水平;D:*NLRP*3 mRNA 转录水平;E:*Caspase*-1 mRNA 转录水平;F:*IL*-1β mRNA 转录水平;G:*IL*-18 mRNA 转录水平;H:Western blot 检测结果;I:NLRP3 相对表达水平;J:TGF-β 相对表达水平

图 8　DHA+EPA 对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症水平的影响($n=4$)

定相关性,这有待进一步研究证实。

慢性神经炎症是 AD 发展中的重要环节,沉积的 Aβ 周围聚集了多种炎症介质,浓集区域也与神经退行性变的区域高度相关。有意思的是,炎症反应是一个动态变化的过程,表现出与小胶质细胞极化类型密切相关的时空特异性,激活的小胶质细胞的极化表型之间并不是绝对孤立的,它们之间可以因微环境的变化而相互转化,具有高度的异质性和可塑性,以满足在炎症反应的不同阶段执行不同的功能。而在 AD 的不同模型以及发病的不同阶段,激活的小胶质细胞也会表现为不同的表型,以发挥不同的病理作用,其中 APPPS1 小鼠主要表现为 M1 型[18]。在 APPPS1 小鼠的海马中发现,吞噬能力较强的 M2 型仅局限于 Aβ 沉积周围,此时小鼠的神经炎症反应较轻;而在神经炎症反应较重的 APPPS1 小鼠脑内,M1 型还扩展到没有 Aβ 沉积的其他脑区[19]。随着机体年龄的增长、Aβ 沉积增多以及持续的慢性炎症,小胶质细胞的吞噬能力显著降低[20]。然而 ITALIANI 等[21]发现人类单核细胞极化为 M1 型后,可以随着培养条件的连续变化而转变为 M2 型;LI 等[6]发现依达拉奉可以通过抑制 NLRP3 炎症小体通路,调节小胶质细胞的极化,抑制 BV2 细胞的炎症反应,改善 LPS 诱导的多巴胺能神经元损伤和帕金森模型大鼠的运动障碍;YANG 等[22]发现白藜芦醇可以激活 SIRT1,上调过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)-1α,抑制小胶质细胞激活,促进 M1 向 M2 型转化,从而改善 BV2 细胞炎症反应。这些研究均表明,诱导 M1 型小胶质细胞向 M2 型转化,可以产生促进损伤修复、组织再生等积极作用,减弱神经炎症的毒性反应。

MARCUS 等[23]发现 DHA 可以抑制 γ-分泌酶和 β-分泌酶-1,增加并激活 α-分泌酶,使淀粉样前蛋白代谢途径从淀粉样蛋白生成途径向非淀粉样蛋白生成途径转变,从而减少 Aβ 沉积;除此之外,GRIMM 等[24]还发现 DHA、EPA 均能增强胰岛素降解酶活性,促进其介导的 Aβ 降解。LUKIW 等[25]发现 DHA 与其衍生物之一的神经保护素 D1 能显著上调抗凋亡家族信号蛋白 Bcl-xl、Bcl-2 和 Bfl-1(A1)表达,从而减少神经元凋亡;同时阻断 NF-κB 介导的小胶质细胞激活,下调促炎细胞因子 IL-1β、TNF-α 以及环氧化酶 COX-2 表达,从而降低中枢神经系统炎症水平。MINOGUE 等[26]发现大鼠短期内摄入大量 EPA 可抑制 Aβ 对 IL-1β 的诱导和长时程增强的抑制,上调 PPARγ 使 Aβ 诱导的小胶质细胞的毒性作用降低。这些研究与本研究有关内源性 n-3 PUFAs 可以抑制 Aβ 沉积和小胶质细胞激活的结论并不矛盾。进一步发现内源性 n-3 PUFAs 可以调节 M1/M2 的极化比例,抑制 NLRP3 分泌,促进 TGF-β 分泌,从而降低 CNS 炎症水平,改善 APPPS1 小鼠的学习记忆障碍。让人意外的是,Fat-1/APPPS1 组与 APPPS1 组小鼠大脑 EPA 水平差异并不明显,而 DHA 水平差异很明显($P<0.05$),我们推测可能对于老年 APPPS1 小鼠来说 DHA 比 EPA 作用更大,这或许与 XIA 等[27]发现 DHA 与 EPA 虽均能逆转老年 SD 大鼠海马区 M1/M2 的极化失衡,但 DHA 的作用比 EPA 更大的结论具有相似之处,而这可能与 DHA、EPA 下调 NLRP3 表达,上调 TGF-β 表达的具体作用机制通路有关,尚需进一步研究。

本研究通过在 Fat-1/APPPS1 三基因小鼠与 BV2 细胞模型上的系列实验,证实了内源性 n-3 PUFAs 可抑制 Aβ 沉积和小胶质细胞激活,同时可通过调节 M1/M2 的极化比例,降低 CNS 炎症水平,改善 APPPS1 小鼠的学习记忆障碍。这对于加深人们对 AD 病理机制的认识,进一步揭示 n-3 PUFAs 改善 AD 的抗炎作用机制具有重要意义,可为后续通过膳食营养途径防治 AD 提供理论支撑。

参考文献:

[1] GBD Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet Public Health, 2022, 7(2): e105-e125. DOI: 10.1016/S2468-2667(21)00249-8.

[2] REN R J, QI J L, LIN S H, *et al*. The China Alzheimer report 2022[J]. Gen Psychiatr, 2022, 35(1): e100751. DOI: 10.1136/gpsych-2022-100751.

[3] CARSON M J, DOOSE J M, MELCHIOR B, *et al*. CNS immune privilege: hiding in plain sight[J]. Immunol Rev, 2006, 213: 48-65. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x.

[4] PIERRE W C, SMITH P L P, LONDONO I, *et al*. Neonatal microglia: the cornerstone of brain fate[J]. Brain Behav Immun, 2017, 59: 333-345. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.08.018.

[5] HE X F, XU J H, LI G, *et al*. NLRP3-dependent microglial training impaired the clearance of amyloid-beta and aggravated the cognitive decline in Alzheimer's disease[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 849. DOI: 10.1038/s41419-020-03072-x.

[6] LI J P, DAI X P, ZHOU L Y, *et al*. Edaravone plays protective effects on LPS-induced microglia by switching M1/M2 phenotypes and regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 691773. DOI: 10.3389/fphar.2021.691773.

[7] MILNER M T, MADDUGODA M, GÖTZ J, *et al*. The NLRP3 inflammasome triggers sterile neuroinflammation and

Alzheimer's disease[J]. Curr Opin Immunol, 2021, 68: 116-124. DOI: 10.1016/j.coi.2020.10.011.

[8] MICHELUCCI A, HEURTAUX T, GRANDBARBE L, *et al*. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta[J]. J Neuroimmunol, 2009, 210(1/2): 3-12. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.003.

[9] CHERRY J D, OLSCHOWKA J A, O'BANION M K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 98. DOI: 10.1186/1742-2094-11-98.

[10] GUO Y, ZHANG H, YANG J, *et al*. Granulocyte colony-stimulating factor improves alternative activation of microglia under microenvironment of spinal cord injury[J]. Neuroscience, 2013, 238: 1-10. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.047.

[11] BUTOVSKY O, KORONYO-HAMAOUI M, KUNIS G, *et al*. Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(31): 11784-11789. DOI: 10.1073/pnas.0604681103.

[12] RADDE R, BOLMONT T, KAESER S A, *et al*. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology[J]. EMBO Rep, 2006, 7(9): 940-946. DOI: 10.1038/sj.embor.7400784.

[13] KANG J X, WANG J D, WU L, *et al*. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids[J]. Nature, 2004, 427(6974): 504. DOI: 10.1038/427504a.

[14] SERNEELS L, VAN BIERVLIET J, CRAESSAERTS K, *et al*. Gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease[J]. Science, 2009, 324(5927): 639-642. DOI: 10.1126/science.1171176.

[15] MO Z H, TANG C G, LI H Q, *et al*. Eicosapentaenoic acid prevents inflammation induced by acute cerebral infarction through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. Life Sci, 2020, 242: 117133. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117133.

[16] FOURRIER C, REMUS-BOREL J, GREENHALGH A D, *et al*. Docosahexaenoic acid-containing choline phospholipid modulates LPS-induced neuroinflammation *in vivo* and in microglia *in vitro*[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 170. DOI: 10.1186/s12974-017-0939-x.

[17] JERNERÉN F, CEDERHOLM T, REFSUM H, *et al*. Homocysteine status modifies the treatment effect of omega-3 fatty acids on cognition in a randomized clinical trial in mild to moderate Alzheimer's disease: the OmegAD study[J]. J Alzheimers Dis, 2019, 69(1): 189-197. DOI: 10.3233/JAD-181148.

[18] NOLAN J M, POWER R, HOWARD A N, *et al*. Supplementation with carotenoids, omega-3 fatty acids, and vitamin E has a positive effect on the symptoms and progression of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2022, 90(1): 233-249. DOI: 10.3233/JAD-220556.

[19] COLTON C A, MOTT R T, SHARPE H, *et al*. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD[J]. J Neuroinflammation, 2006, 3: 27. DOI: 10.1186/1742-2094-3-27.

[20] JIMENEZ S, BAGLIETTO-VARGAS D, CABALLERO C, *et al*. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic[J]. J Neurosci, 2008, 28(45): 11650-11661. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3024-08.2008.

[21] ITALIANI P, MAZZA E M C, LUCCHESI D, *et al*. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes *in vitro*[J]. 2014, 9(2): e87680. DOI: 10.1371/journal.pone.0087680.

[22] YANG X D, XU S Q, QIAN Y W, *et al*. Resveratrol regulates microglia M1/M2 polarization *via* PGC-1α in conditions of neuroinflammatory injury[J]. Brain Behav Immun, 2017, 64: 162-172. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.03.003.

[23] BAZINET R P, LAYÉ S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15(12): 771-785. DOI: 10.1038/nrn3820.

[24] GRIMM M O W, MICHAELSON D M, HARTMANN T. Omega-3 fatty acids, lipids, and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention[J]. J Lipid Res, 2017, 58(11): 2083-2101. DOI: 10.1194/jlr.R076331.

[25] LUKIW W J, CUI J G, MARCHESELLI V L, *et al*. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2774-2783. DOI: 10.1172/JCI25420.

[26] MINOGUE A M, LYNCH A M, LOANE D J, *et al*. Modulation of amyloid-beta-induced and age-associated changes in rat hippocampus by eicosapentaenoic acid[J]. J Neurochem, 2007, 103(3): 914-926. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04848.x.

[27] XIA J, YANG L E, HUANG C Y, *et al*. Omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid improved ageing-associated cognitive decline by regulating glial polarization[J]. Mar Drugs, 2023, 21(7): 398. DOI: 10.3390/md21070398.

(收稿:2023-09-28;修回:2023-12-28)

(编辑 邓强庭)