

文章编号:1003-2754(2020)08-0680-05

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2020.0425

# 寡聚态 $\beta$ 淀粉样蛋白加剧小胶质细胞衰老

魏 振<sup>1</sup>, 崔晓丽<sup>2</sup>, 陈晓春<sup>3</sup>, 潘晓东<sup>3</sup>

**摘要:** **目的** 观察小胶质细胞体内外自发衰老现象,探讨  $\beta$  淀粉样蛋白对小胶质细胞体外衰老影响。**方法** Iba-1 免疫组织化学法观察年轻和老年小鼠大脑皮质小胶质细胞形态学变化,通过衰老相关  $\beta$ -半乳糖苷酶 (SA- $\beta$ -GAL) 染色法观察小胶质细胞衰老现象;原代培养纯化小胶质细胞,观察体外不同培养时间小胶质细胞自发衰老指标 SA- $\beta$ -GAL 染色变化。用不同浓度寡聚态  $A\beta$  (oligomeric  $A\beta$ , o $A\beta$ ) 诱导处理小胶质细胞不同时间后,检测小胶质细胞 SA- $\beta$ -GAL 表达,通过  $\gamma$ H2AX 免疫细胞化学染色检测 DNA 损伤标记物表达变化。**结果** 在体老年鼠可出现小胶质细胞衰老表型;一定时间范围内小胶质细胞体外培养越长,SA- $\beta$ -GAL 染色阳性率越高 ( $P < 0.001$ ),显示增龄性衰老变化。与对照组相比,o $A\beta$  处理组小胶质细胞 SA- $\beta$ -GAL 染色阳性率增加 ( $P < 0.05$ )。同时,处理组小胶质细胞  $\gamma$ H2AX 表达明显上调 ( $P < 0.05$ )。**结论** 小胶质细胞体内体外存在自发衰老现象,o $A\beta$  诱导并加剧小胶质细胞衰老可能与增加 DNA 损伤有关。

**关键词:**  $\beta$  淀粉样蛋白; 小胶质细胞; 细胞衰老; 阿尔茨海默病

**中图分类号:**R749.1

**文献标识码:**A

**开放科学(资源服务)标识码(OSID):**



**Oligomeric amyloid- $\beta$  accelerated microglia senescence** WEI Zhen, CUI Xiaoli, CHEN Xiaochun, et al. (Department of Neurology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the phenomenon of microglia senescence in vivo and in vitro, and to investigate the effect of amyloid on microglia senescence. **Methods** Iba-1 immunohistochemical method and senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -GAL) double staining in the cortex region of brains from young and aged mice was performed for visualizing microglial senescent phenotypes. Purified primary microglia cells were used to observed spontaneous senescence markers at different cultured time point in vitro. Various concentrations of oligomeric  $A\beta$  (o $A\beta$ )<sub>(1-42)</sub> were applied to primary microglia culture to simulate the manifestation. SA- $\beta$ -GAL staining was used to evaluate the degree of cellular senescence and DNA damage response was explored by  $\gamma$ H2AX immunocytochemistry staining. **Results** Microglia in the aged mouse exhibited aberrant morphological and senescent phenotypes. The increasing rate of SA- $\beta$ -GAL positive microglia cells was found with the prolongation of culture time in vitro ( $P < 0.001$ ). Compared with the control group, the positive rate of SA- $\beta$ -GAL staining of microglia cells was increased in the o $A\beta$  treatment group ( $P < 0.05$ ). At the same time, the expression of  $\gamma$ H2AX was upregulated in the o $A\beta$  treated microglial cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** These results implied that microglia existed spontaneous senescence phenomenon both in vivo and in vitro, which was contributed to aggravate the pathological aging by o $A\beta$ <sub>1-42</sub> in primary microglia via the underlying mechanisms of DNA damage response.

**Key words:** Amyloid- $\beta$ ; Microglia; Cell senescence; Alzheimer's disease

老化或衰老 (aging) 是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 最重要的危险因素<sup>[1,2]</sup>。细胞衰老 (Cellular senescence, CS) 是器官衰老的重要组成部分<sup>[3]</sup>, CS 在驱动衰老及其相关疾病如阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病的发展中起重要作用<sup>[4]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统定居的免疫细胞,正常脑内静息状态的小胶质细胞对神经系统发挥积极的免疫监视、稳态维持、神经环路的重塑与修复<sup>[5]</sup>以及调节神经发生等作用,对维持神经元的和正常的学习记忆具有极其重要的功能<sup>[6]</sup>。近年来,小胶质细胞年龄相关性的激活和表型改变 (衰老相关分泌表型) 一直是 AD 衰老学说的主要研究内

容<sup>[7,8]</sup>。研究表明,寡聚态  $A\beta$  (Oligomeric Amyloid beta, o $A\beta$ ) 刺激小胶质细胞导致炎症性级联反应最强,是加剧神经元的损伤进而导致 AD 患者认知障

收稿日期:2020-04-17; 修订日期:2020-05-29

基金项目:国家自然科学基金面上项目 (No. 81571257); 福建省卫计委中青年骨干课题 (No. 2017-ZQN-22)

作者单位:(1. 福建省立医院神经内科,福建 福州 350001; 2. 福建中医药大学附属人民医院老年病科,福建 福州 350004; 3. 福建医科大学附属协和医院神经内科,福建省老年医学研究所,福建省分子神经病学重点实验室,福建 福州 350001)

通讯作者:潘晓东, E-mail: pxd77316@163.com; 陈晓春, E-mail: chenxc998@163.com

碍的普遍机制。尸检发现 AD 患者脑内小胶质细胞出现形态学异常<sup>[9]</sup>,实验室既往研究显示 oA $\beta$  预处理的小胶质细胞对纤维支状 A $\beta$  的吞噬功能明显降低<sup>[10]</sup>。作为脑内重要的固有免疫细胞,功能障碍尤其是老化的小胶质细胞在 AD 发病机制中作用仍未阐明<sup>[7,8,11]</sup>,小胶质细胞是否出现自发衰老现象以及 oA $\beta$  是否直接诱导小胶质细胞衰老和 DNA 损伤反应(DNA damage response, DDR)国内外文献鲜有报道。本研究旨在观察小胶质细胞体内体外衰老现象,体外研究 A $\beta$  对其影响。

## 1 材料和方法

1.1 动物 本实验脑组织染色所用小鼠为 C57BL/6J 背景的雄性鼠,成年鼠在福建医科大学实验动物中心无特定病原菌级(special pathogen free, SPF)环境繁殖饲养,原代培养用动物为出生 1 d 新生小鼠。

1.2 药物及试剂 冻干粉 A $\beta_{1-42}$  购自 Anaspec 公司, Iba1 一抗购自 Wako 公司,羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗均购自 KPL 公司。乙二醇和乙酸钠二甲亚砜(DMSO)均购自 Sigma 公司,生物素标记羊抗兔二抗购自 Vector 公司; Alexa Fluor488 标记羊抗鼠 IgG、DAPI 购自上海生工。胎牛血清、DMEM 培养基、0.25% 胰酶-EDTA、青霉素和链霉素购自 Hyclone 公司, Anti- $\gamma$ H2AX(ab2893) 抗体购自 Abcam 公司。

1.3 oA $\beta_{1-42}$  的制备 寡聚态 A $\beta_{1-42}$  的制备参考本实验室前期方法<sup>[10]</sup>。简言之,冻干粉 A $\beta_{1-42}$  经 100% 的 HFIP 溶解后风干至底部可见膜状物。用少量 DMSO 溶解(终浓度为 5 mmol),重悬于无酚红 Ham's F-12 培养基,配成浓度为 100  $\mu$ mol 的母液,水浴超声 10 min、涡旋,4  $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,分装保存于 -80  $^{\circ}$ C 备用。

1.4 免疫组织化学染色 3 m 龄和 18 m 龄小鼠麻醉后取脑,固定,冰冻切片机(CM1950, Leica, Germany)制作脑片,冠状位切成 40  $\mu$ m 厚度(参考小鼠脑立体定位图谱取额叶皮质)存于冻存液;用 TBS 漂洗脑片上的冻存液,随后用 3% 过氧化氢处理 10 min 去除组织内源性的过氧化氢酶,再漂洗,室温封闭 1 h,孵育一抗(Iba1 1: 2000 稀释,4  $^{\circ}$ C 48 h),TBST 漂洗后孵育生物素标记的抗鼠二抗(1: 600 稀释),孵育 ABC 放大液,DAB(2 mg/ml)显色。乙酸钠和 TBS 漂洗后行组织 SA- $\beta$ -GAL 染色,方法参考文献进行<sup>[12]</sup>。简言之,1 mg/ml 的 x-gal 反应液 37  $^{\circ}$ C 孵育 16 h(避光),然后 PBS 液洗涤两遍,后固定 4 min(后固定液 70% 乙醇,福尔马林:冰醋酸为 20: 2: 1),冲洗,贴片于多聚赖氨酸包被的载玻片,封片,拍照。

1.5 原代小胶质细胞培养 采用新生 24 h 内 C57BL/6J 小鼠,喷洒酒精消毒、断头,取脑,分离大脑皮质,木瓜蛋白酶的盐溶液消化、吹打,收集细胞并计数,接种。培养至 12 ~ 14 d 取出,放入摇床振荡,260 rpm,1 ~ 2 h。离心去上清,收集沉淀即获得纯化的小胶质细胞,以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于含有细胞玻片的 24 孔板用于实验需要,从纯化接种后开始计算培养时间。

1.6 小胶质细胞 SA- $\beta$ -GAL 染色步骤 SA- $\beta$ -GAL 细胞化学染色亦参考文献进行<sup>[12]</sup>。取出预先接种有小胶质细胞的玻片,4  $^{\circ}$ C 0.01 mol PBS 冲洗后用 2% 甲醛-0.2% 戊二醛固定 10 min,PBS 洗两遍,予 1 mg/ml 的 x-gal 反应液 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h(避光),PBS 洗涤,后固定 4 min(后固定液 70% 乙醇:福尔马林:冰醋酸为 20: 2: 1),双蒸水冲洗。核固红复染 5 min 后烤干,中性树胶封片。每张片计 200 个细胞,确定 SA- $\beta$ -GAL 阳性细胞数百分比( $n=3$ )。

1.7 小胶质细胞免疫荧光单标 原代培养小胶质细胞 A $\beta$  处理后,PBS 洗两次,经多聚甲醛固定后 PBS 漂洗。室温下封闭后孵育一抗 Iba1,设置阴性对照。PBST 漂洗后孵育二抗(Alex Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG,1: 1000 稀释),DAPI(1: 5000)复染细胞核。贴片于载玻片,封片。共聚焦显微镜 LSM 780(Carl Zeiss, Germany)拍照、分析结果。

1.8 小胶质细胞免疫化学染色 小胶质细胞  $\gamma$ H2AX 细胞化学染色一抗步骤同细胞免疫荧光,孵育生物素标记兔抗 IgG,随后室温孵育 Vector Elite avidineperoxidase,DAB Ni 显色,贴片封片同前。拍照、ImageJ 软件分析图片。

1.9 统计学分析 本研究实验资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 GraphPad Prism 5.0 作图和统计分析。两组间比较采用  $t$  检验,多组间采用单因素方差分析(one-way ANOVA),设  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 老年鼠脑内出现小胶质细胞自发衰老表型 通过对 3 m 龄年轻鼠和 18 m 龄老年鼠脑组织行 Iba1 免疫组织化学染色,可以看到年轻鼠小胶质细胞呈高度分支或网态(ramified phenotype),胞体小,分支清晰明显,为静息状态,且细胞之间排列有序,无明显空白区域,监视范围大(圆圈所示),无 SA- $\beta$ -GAL 阳性细胞(见图 1A)。相反,老年鼠脑片(见图 1B)染色看到小胶质细胞分支扭曲、断裂、细短,欠清晰,细胞之间排列紊乱,如蓝色圆圈所示,细胞监视范围小,细胞之间存在空白区域,部分呈阿米巴样形

态(activated amoeboid shape),提示一定的衰老或营养不良状态(dystrophic senescent phenotype)。重要的是,如箭头所示,镜下可见一定数量的 Iba1 与 SA-β-GAL 共定位细胞,SA-β-GAL 主要存在于胞体的胞浆,以上结果提示老化使小胶质细胞产生明显的衰老相关表型,即在体的小胶质细胞呈现自发衰老现象。

2.2 体外原代小胶质细胞的纯化鉴定 Iba-1 几乎在所有的体内外小胶质细胞高表达,是小胶质细胞特异性标记物。原代培养的小胶质细胞(primary microglia, PM) 经过 Iba1 免疫荧光染色显示为绿色,细胞核通过 DAPI 复染显示为蓝色,不同视野计数 500 个细胞,计算 Iba-1 阳性与 DAPI 阳性比率,结果显示本实验 PM 细胞纯度达 94% 以上,可满足实验需求(见图 2)。

2.3 小胶质细胞在体外显示增龄性衰老变化

SA-β-GAL 染色阳性是细胞衰老的重要标志物。为观察体外培养的原代小胶质细胞是否出现衰老特征,通过获取同一批新生鼠培养的原代小胶质细胞进行同条件小胶质细胞原代培养,分别于体外培养(Culture in vitro, DIV) 至 2 d (DIV2)、5 d (DIV5)、8 d (DIV8) 以及 11 d (DIV11) 时取出立即行 SA-β-GAL 细胞染色。SA-β-gal 染色阳性细胞,胞浆为青绿色,SA-β-GAL 阴性的细胞,细胞核快红复染为红色。纯化的小胶质细胞在体外 2 d 时 SA-β-GAL 染色阳性率仅为 25.04% (25.04% ± 6.523%), 培养至 5 d 升至 42.47% (42.47% ± 5.852%), 同 2 d 相比差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 体外培养至 8 d (87.42% ± 8.138%) 和 DIV11 (94.20% ± 4.884%) 明显大于培养至 5 d ( $P < 0.001$ ), DIV8 以及 DIV11 时绝大部分出现 SA-β-GAL 染色阳性,提示体外培养时间延长,小胶质细胞显示增龄性衰老变化(见图 3)。

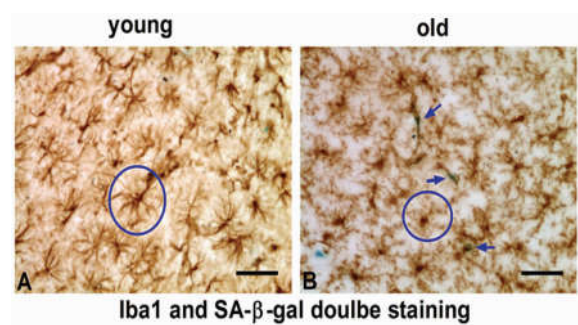
2.4 寡聚态 Aβ 加剧小胶质细胞体外衰老

首先,为了进一步观察体外 Aβ 诱导的小胶质细胞衰老是否出现经典的 SA-β-gal 阳性,不同剂量(含等剂量 DMSO 对照组,0.5 μm/L,1.0 μm/L)的寡聚态 Aβ 处理原代培养的小胶质细胞 4 h 和 24 h 后行 SA-β-gal 染色,明场拍照显示细胞轮廓计数。结果显示,与对照组相比,0.5 μmol 和 1.0 μmol 处理 24 h 均明显增加小胶质细胞 SA-β-gal 染色阳性率 ( $P < 0.001$ ),且 1.0 μmol 浓度组 SA-β-gal 阳性率较前者高,提示一定的浓度依赖性。相比对照组,0.5 μmol 作用 4 h 组尽管存在增加趋势但无出统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与此同时,1.0 μmol 作用 4 h 组较相应空白对照组 SA-β-gal 阳性率增加 ( $P <$

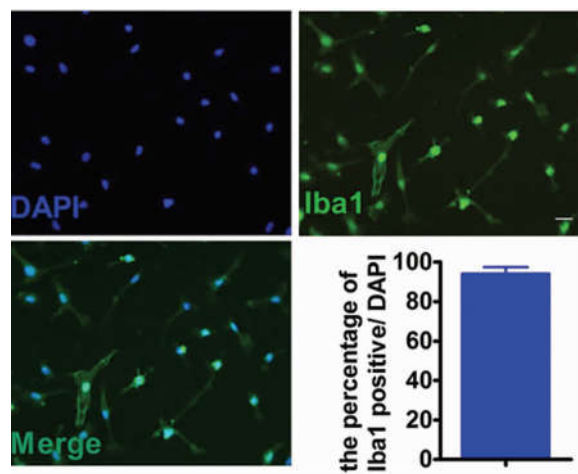
0.05)。以上结果提示 Aβ 加快体外小胶质细胞衰老(见图 4)。

2.5 小胶质细胞衰老可能与 DNA 损伤有关

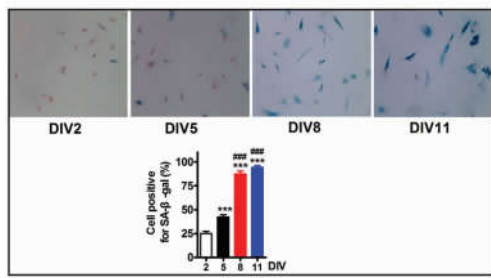
γH2AX 作为一种衰老生物标志物,可反映 DNA 损伤程度。为研究 oAβ 是否通过增加小胶质细胞 DNA 损伤反应。0.5 μmol oAβ 分别处理小胶质细胞 4 h (4 h)、24 h (24 h) 后行 γH2AX 细胞化学染色,γH2AX 阳性为细胞核内呈点状或斑片状黄色致密物(黑色箭头),胞浆无着色。与空表对照组相比,0.5 μmol oAβ 处理 24 h 后小胶质细胞细胞核内 γH2AX 化学染色强度明显增加 ( $P < 0.05$ ),点密度定量分析增加 48%。对照组多为背景染色,仅个别细胞出现。尽管 0.5 μmol 4 h 组存在增加趋势,但无统计学意义。以上结果提示 oAβ 加速小胶质细胞衰老可能增加 γH2AX 表达诱发 DNA 损伤反应(见图 5)。



小胶质细胞 Iba1 及 SA-β-GAL 共染色 ( $n = 5$ )。A: 3 m 龄; B: 18 m 龄。bar = 20 μm  
图 1 老化对在体小胶质细胞衰老表型影响

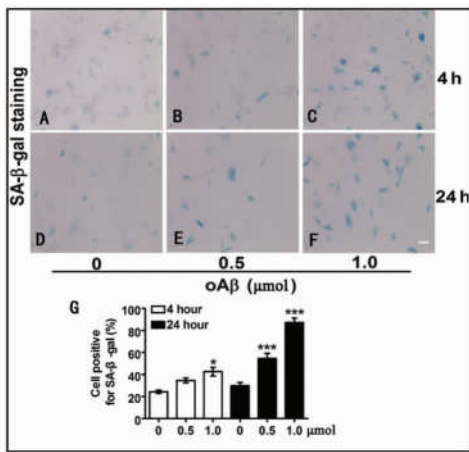


柱状图 Iba1 (绿色) 阳性与 DAPI (蓝色) 阳性比值百分比  $n = 3$ 。bar = 20 μm  
图 2 体外小胶质细胞培养的纯化鉴定



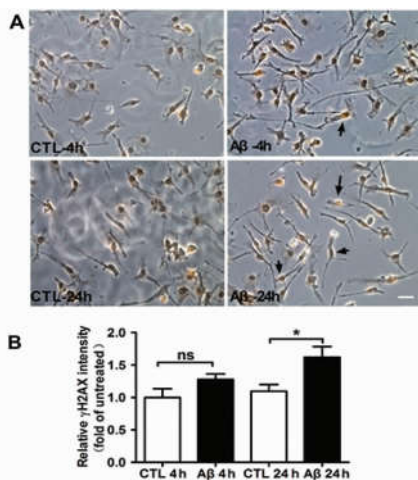
小胶质细胞体外不同时间(DIV2、DIV5、DIV 8、DIV 11) SA-β-gal 染色,  $n=3$ 。柱状图统计分析结果, \*\*\*  $P < 0.001$  表示 DIV5、DIV8、DIV11 vs. DIV2; ### 表示 DIV8 或 DIV11 vs DIV5; bar = 20  $\mu\text{m}$

图3 小胶质细胞在体外显示增龄性衰老变化



A ~ F: oAβ 处理小胶质细胞后 SA-β-gal 染色,  $n=3$ 。Bar = 20  $\mu\text{m}$ 。G: SA-β-gal 阳性细胞百分比。\*  $P < 0.05$  ; 1  $\mu\text{mol}$  干预 4 h 组与相应的对照组比。\*\*\*  $P < 0.001$ ; 0.5  $\mu\text{mol}$  和 1  $\mu\text{mol}$  干预 24 h 组与相应对照组比

图4 寡聚态 Aβ 加剧小胶质细胞体外衰老



A: 0.5  $\mu\text{mol}$  oAβ 处理小胶质细胞 4 h、24 h 后行  $\gamma\text{H2AX}$  染色,  $n=4$ , bar = 20  $\mu\text{m}$ 。B: 相对  $\gamma\text{H2AX}$  点密度分析 \*  $P < 0.05$

图5 oAβ 促进小胶质细胞衰老可能与 DNA 损伤反应

### 3 讨论

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发病机制未明的退行性病变,主要表现为进行性认知功能障碍、日常生活能力下降,常伴有行为和情感的异常<sup>[13]</sup>。近年以发现小胶质细胞功能相关基因 SNP 突变 (ABCA7、TREM2、CD33 等) 为晚发型 AD 危险因子<sup>[14,15]</sup> 支持 AD 发病的免疫衰老学说<sup>[16]</sup>。本研究在体发现老年鼠脑内小胶质细胞出现形态上的营养不良和 SA-β-gal 染色阳性,或许可以部分解释老年鼠认知障碍;这与前期 AD 脑内尸检结果一致<sup>[17]</sup>。

不同于永生化的小胶质细胞系如 BV2、CHME-5,本实验使用原代培养小胶质细胞可以更好的模拟动物疾病研究。小胶质细胞在纯化之前与胶质细胞共培养,纯化后纯度高达 94% 以上,保证实验的准确性、可靠性。体外培养结果表明,一定时间范围内,小胶质细胞体外培养时间越长,SA-β-gal 染色阳性率越高,这可能与老化的小胶质细胞代谢废物的蓄积,导致细胞内溶酶体半乳糖苷酶表达 (GLB1 基因的转录和翻译) 的增加有关<sup>[18]</sup>。

过度沉积的 Aβ 刺激胶质细胞分泌大量的细胞因子和炎症介质,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL6 等,对神经元产生毒性作用导致 AD 发病的经典机制<sup>[19]</sup>。近年研究显示 Aβ 对胶质细胞老化产生重要影响。为了回答 Aβ 是否加速小胶质细胞的衰老这一核心问题。我们发现 oAβ 处理小胶质细胞后明显增加小胶质细胞 SA-β-gal 阳性率,与既往 Aβ 加速海马神经干细胞<sup>[20]</sup> 和脑内血管内皮细胞衰老的研究结果一致<sup>[21]</sup>。此外,也有学者报道高浓度的 Aβ<sub>1-42</sub> 可导致体外星形胶质细胞 SA-β-gal 阳性增加<sup>[22]</sup>,提示作为 Aβ 始作俑者在神经退行性疾病发病过程中诱发胶质细胞功能障碍存在一定的普遍性。

除端粒缩短导致复制衰老外<sup>[23]</sup>,目前已知的触发细胞衰老的因素还包括异常癌基因 (p16, p21, p53 等) 的激活、电离辐射、氧化应激、自噬功能障碍以及 DNA 损伤反应 (DDR) 等<sup>[2,23]</sup>。DDR 直接体现于染色体结构改变和组蛋白 H2AX 的活化异常。在各种理化因素刺激下,细胞 DNA 双链发生断裂,染色体组蛋白 H2A 家族成员 H2AX 上的第 139 位丝氨酸发生磷酸化修饰,形成  $\gamma\text{H2AX}$  是细胞衰老的直接体现和重要标记。动物实验显示,衰老的组织如肺泡、肝脏、脾脏、小肠等组织器官中激活的组蛋白 H2AX 明显活化,即  $\gamma\text{H2AX}$  表达上调<sup>[24]</sup>。临床研究表明,与对照组相比,AD 患者脑内  $\gamma\text{H2AX}$  表达明显亦增加<sup>[25]</sup>。甚至有学者提出患者外周血淋

巴细胞  $\gamma$ H2AX 表达上调可作为 AD 早期诊断分子标记物<sup>[26]</sup>。为此,本实验对 A $\beta$  处理后小胶质细胞  $\gamma$ H2AX 表达进行了研究,结果证实 oA $\beta$  增加  $\gamma$ H2AX 表达。提示 A $\beta$  加速细胞衰老可能通过 DNA 损伤反应。

综上所述,本研究揭示小胶质细胞存在自发衰老现象, $\beta$  淀粉样蛋白加快小胶质细胞衰老进一步支持免疫衰老在 AD 发病中的作用<sup>[16]</sup>,为从小胶质细胞角度探索 AD 发病机制提供一定的理论依据。尽管小胶质细胞表达衰老相关标记物,但其衰老具体分子信号通路、衰老表型的功能改变以及体内体外的异质性需要未来进一步深入研究,尤其是如何找到干预小胶质细胞老化的药物靶点。未来抗衰老和调节免疫研究有望成为 AD 发病机制和治疗靶点新方向<sup>[27]</sup>。

### [参考文献]

- [1] Verkhatsky A, Zorec R, Rodriguez-Arellano JJ, et al. Neuroglia in Ageing[J]. *Adv Exp Med Biol*,2019,1175:181-197.
- [2] Kritsilis M, Rizou SV, Koutsoudaki PN, et al. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease[J]. *Int J Mol Sci*,2018, 19(10):2937.
- [3] Lapez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging[J]. *Cell*,2013,153(6):1194-1217.
- [4] Tominaga K. The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology[J]. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*,2015,5:27743.
- [5] Sundal C. Microglia: multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury[J]. *Neurology*,2014,82(20):1846.
- [6] Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Lopes-Araujo A, et al. What do microglia really do in healthy adult brain[J]. *Cells*,2019, 8(10):1293.
- [7] Holtzman D, Ulrich J. Senescent glia spell trouble in Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*,2019,22(5):683-684.
- [8] Streit WJ, Xue QS. Microglial senescence[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*,2013,12(6):763-767.
- [9] Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity[J]. *Glia*,2008,56(10):1048-1060.
- [10] Pan XD, Zhu YG, Lin N, et al. Microglial phagocytosis induced by fibrillar  $\beta$ -amyloid is attenuated by oligomeric  $\beta$ -amyloid; implications for Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*,2011,6:45.
- [11] Streit WJ, Xue QS. Life and death of microglia[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*,2009,4(4):371-379.
- [12] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1995,92(20):9363-9367.
- [13] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*,2010,362(4):329-344.
- [14] Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis[J]. *Biol Psychiatry*,2015,77(1):43-51.
- [15] Zhou Y, Ulland TK, Colonna M. TREM2-dependent effects on microglia in Alzheimer's disease[J]. *Front Aging Neurosci*,2018, 10:202.
- [16] Rawji KS, Mishra MK, Michaels NJ, et al. Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system[J]. *Brain*,2016,139(3):653-661.
- [17] Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, et al. Dystrophic microglia in the aging human brain[J]. *Glia*,2004,45(2):208-212.
- [18] Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase(SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo[J]. *Nat Protoc*,2009,4(12):1798-1806.
- [19] Yan SD, Chen X, Fu J, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease[J]. *Nature*,1996,382(6593):685-691.
- [20] He N, Jin WL, Lok KH, et al. Amyloid-beta(1-42) oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2[J]. *Cell Death Dis*,2013,4:e924.
- [21] Singh Angom R, Wang Y, Wang E, et al. VEGF receptor-1 modulates amyloid  $\beta$  1-42 oligomer-induced senescence in brain endothelial cells[J]. *FASEB J*,2019,33(3):4626-4637.
- [22] Bhat R, Crowe EP, Bitto A, et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease[J]. *PLoS One*,2012,7(9):e45069-45069e45069.
- [23] Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2014,15(7):482-496.
- [24] Wang C, Jurk D, Maddick M, et al. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice[J]. *Aging Cell*,2009,8(3):311-323.
- [25] Silva AR, Santos AC, Farfel JM, et al. Repair of oxidative DNA damage, cell-cycle regulation and neuronal death may influence the clinical manifestation of Alzheimer's disease[J]. *PLoS One*,2014,9(6):e99897.
- [26] Siddiqui MS, Francois M, Hecker J, et al. gammaH2AX is increased in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer's disease patients in the South Australian Neurodegeneration, Nutrition and DNA Damage (SAND) study of aging[J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*,2018,829-830:6-18.
- [27] Hu MY, Lin YY, Zhang BJ, et al. Update of inflammasome activation in microglia/macrophage in aging and aging-related disease[J]. *CNS Neurosci Ther*,2019,25(12):1299-1307.