

文章编号:1001-6880(2018)6-0958-06

# COX-2 特异性抑制剂罗非昔布对阿尔茨海默病 A $\beta$ 沉积的影响

王 玥,于 嵩,王 旭\*

辽宁中医药大学解剖组胚教研室,沈阳 110847

**摘要:**本文应用免疫荧光、Western blot 及 ELISA 等实验方法检测 COX-2 特异性抑制剂罗非昔布对阿尔茨海默病 A $\beta$  沉积的影响。实验分为三组,即对照组、AD 模型组以及罗非昔布处理组。实验结果发现,与对照组小鼠相比,APP/PS1 转基因小鼠脑内 A $\beta$  沉积及老年斑的数量增多、体积增大,A $\beta$ 1-40 和 A $\beta$ 1-42 的含量增加, $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶(包括 BACE1、PS1、PS2、NCT)表达升高,并且小鼠脑内 COX-2 表达升高;小鼠经罗非昔布干预后,脑内 A $\beta$  沉积和老年斑数量减少、APP 裂解酶和 COX-2 表达水平较 AD 模型组明显降低,以上结果说明 COX-2 特异性抑制剂罗非昔布可能通过抑制 COX-2 从而间接降低  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的活性,下调 PS1、PS2、BACE1、NCT 等分泌酶的表达,最终减少 A $\beta$  沉积和老年斑的形成,缓解阿尔茨海默病的发生与发展。

**关键词:**阿尔茨海默病;APP/PS1 转基因小鼠;环氧化酶-2;罗非昔布; $\beta$ -淀粉样蛋白;老年斑;APP 裂解酶

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.007

## The Effects of COX-2 Specific Inhibitor Rofecoxib on the Deposition of A Beta in Alzheimer's Disease

WANG Yue, YU Song, WANG Xu\*

Department of Tissue Culture, Liaoning University of Tradition Chinese Medicine, Shen Yang 110847, China

**Abstract:** In this study, we researched the effects of COX-2 specific inhibitor Rofecoxib on A beta deposition in Alzheimer's disease by immunofluorescence, Western blot and ELISA. The experiment was divided into three groups, that is wild type group, AD model group and Rofecoxib treatment group. The results showed that the number of A beta deposition and senile plaques increased, the volume enlarged compared with the wild type group, the contents of A beta 1-40 and A beta 1-42 increased, the expression of  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase (including BACE1, PS1, PS2, NCT) elevated, and the expression of COX-2 in mouse brain increased. After treatment with Rofecoxib, A beta deposition and senile plaques decreased, the expression level of APP lyase and COX-2 were obviously lower than those in AD group. These results suggest that COX-2 specific inhibitor Rofecoxib could inhibit COX-2 expression, indirectly reduce  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase activity, and downregulate PS1, PS2, BACE1 or NCT expressions, ultimately reduce the formation of A beta deposition and senile plaque, alleviate the occurrence and development of Alzheimer's disease.

**Key words:** Alzheimer's disease; APP/PS1 transgenic mice; COX-2; Rofecoxib; A $\beta$ ; senile plaque; APP lyase

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的神经退行性疾病,好发于老年期或老年前期,临床表现为记忆障碍、认知功能障碍,语言障碍,同时伴有精神行为异常以及人格障碍等。在我国,AD 的患者人数日益增加,每隔 5 年上升 1 倍,并且 AD 病死率随着年龄的增加而逐步增高<sup>[1]</sup>。在发达国家,AD 是继心脏病、癌症、中风后的第四位死因,

此病为患者的家庭和社会带来了沉重的负担,因此,深入研究 AD 发病机制与防治策略具有重要的理论意义和现实意义。

AD 的神经病理学改变主要有二点:(1)变性神经元内出现由过度磷酸化的 tau 蛋白聚集形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)<sup>[2]</sup>。(2)细胞外存在大量的以  $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid- $\beta$  protein, A $\beta$ )为核心和变性细胞碎片构成的老年斑(senile plaque, SP)。老年斑的核心成分是一种由 39~43 个氨基酸残基构成的小神经肽-A $\beta$ ( $\beta$ -amy-

收稿日期:2017-09-18 接受日期:2017-11-28

基金项目:辽宁省自然科学基金(20170540604)

\*通信作者 Tel:86-013591418380; E-mail:wangxu19790412@hotmail.com

loid peptide)<sup>[3,4]</sup>, 在脑内可沉积于脑实质和脑血管中<sup>[3,5]</sup>。A<sub>β</sub> 是淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的裂解产物, 脑内 APP 代谢有两条途径, 一条是 A<sub>β</sub> 生成途径, 另一条是非 A<sub>β</sub> 生成途径。非 A<sub>β</sub> 生成途径是  $\alpha$ -分泌酶在  $\alpha$  位点将 APP 水解成 sAPP $\alpha$  和 C83 两个片段, C83 接着被  $\gamma$ -分泌酶生成 P3 片段, 并没有 A<sub>β</sub> 的形成; 另一条途径是 APP 被  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶连续裂解从而产生产生难溶有毒的 A<sub>β1-40</sub> 和 A<sub>β1-42</sub><sup>[6]</sup>, 进而聚集形成老年斑, 同时引起自由基产生、炎症反应, 线粒体功能障碍等一系列神经细胞的损伤的表现。其中  $\beta$ -位点 APP 剪切酶 ( $\beta$ -site of APP cleaving enzyme1, BACE1) 是主要的  $\beta$ -分泌酶, 是调节 A<sub>β</sub> 生成的关键限速酶, 早老素 1 (presenilin-1, PS1)、早老素 2 (presenilin-2, PS2)、I 型跨膜糖蛋白 (Nicastin, NCT) 是主要的  $\gamma$ -分泌酶, 也是 A<sub>β</sub> 产生的另一个主要分泌酶<sup>[7]</sup>。因此, 抑制  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的活性, 是减少老年斑形成的关键所在。

近些年来, 神经免疫炎症与 AD 的发病关系密切。有趣的是, 根据流行病学和临床资料的调查显示, 非甾体消炎药 (NSAIDs) 可以延缓 AD 的进程<sup>[8]</sup>; 风湿性关节炎的患者服用了非甾体消炎药 (NSAIDs) 后, AD 的发病率会降低<sup>[9-12]</sup>, NSAIDs 的作用机制是其对环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 的抑制<sup>[13]</sup>。COX 有 COX-1 和 COX-2 两种异构体, 其中 COX-2 主要在炎症细胞中表达, 可引起炎症反应及组织损伤。在 AD 的发病初期, COX-2 就已经被高度激活<sup>[14,15]</sup>, 在大脑皮层的锥体细胞和海马都发现了 COX-2 免疫活性增加, 提示 COX-2 可能参与阿尔茨海默病发病, 并现已作为 AD 诊断、预防的生物标志物并预示着 AD 的发生<sup>[16]</sup>。基于 COX-2 在 AD 发病过程中的关键性作用, COX-2 特异性抑制剂用于防治 AD 的前景无疑是相当广阔的。本文将通过繁育 APP/PS1 转基因小鼠, 结合形态学及分子生物学的相关方法, 分析 COX-2 特异性抑制剂罗非昔布与 A<sub>β</sub> 聚集以及老年斑形成的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品

罗非昔布(湖北武汉新瑞化工有限公司);  $\beta$ -actin, A<sub>β</sub>, COX-2, PS-1, PS-2, BACE1, NCT, Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit IgG、HRP-labeled goat an-

ti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology), Inc. (Danvers, MA, USA); PVDF 膜、蛋白 marker (NEB 公司); ECL 发光试剂盒 (Pierce 公司)。

#### 1.1.2 实验仪器

低温离心机 (Allegra X-30R, Beckman, 美国), 电泳仪 (Mini-Protein II, BIO-RAD, 美国), 酶标仪 (iMark, Bio-Rad, 美国), BIO-RAD 凝胶图像分析系统 (Gel Doc 2000, BIO-RAD, 美国), 荧光共聚焦显微镜 (TCS-SP8, Leica, 德国); 冰冻切片机 (McIlwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd, 英国)。

#### 1.1.3 实验动物与分组

APP/PS1 转基因小鼠购于美国 Jackson Lab 公司 (Stock Number 004462), 小鼠出生后一个月进行基因型鉴定, 鉴定出 APP/PS1 转基因小鼠后, 分笼 10/12 h 昼夜交替饲养, 饲养室温度保持在 20~25 ℃。具体给药方法如下: 将选取的 1 月龄 APP/PS1 转基因雄鼠分为两组, 即 AD 模型组和罗非昔布治疗组, 每组 15 只; 同月龄同背景 C57BL/6 小鼠 15 只, 设为正常对照组。治疗组小鼠给予罗非昔布 (2 mg/kg/d) 饮水喂养处理 6 个月, 对照组和模型组均给予正常饮用水, 之后进行一系列相关实验。

## 1.2 方法

### 1.2.1 小鼠脑组织取材

各组小鼠灌流处死, 立即取出大脑放于冰上, 从中间矢状缝切开, 一半放入 4% 多聚甲醛中固定, 常规制备冰冻切片, 用于免疫荧光染色; 另一半放入 EP 管内, -80 ℃ 保存备用, 用于 Western Blot 指标检测。

### 1.2.2 Western blot 检测

各组小鼠脑组织分别称重后, 剪刀冰上剪碎样品, 按 1:5 比例加入蛋白裂解液, 超声粉碎, 4 ℃ 裂解过夜, 4 ℃ 10000 rpm 低温离心 30 min, 取上清, BCA 法蛋白浓度测定, 每管 8  $\mu$ g 蛋白分装, -80 ℃ 冻存待用。

10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 4 ℃ 转膜过夜, 5% 脱脂奶粉封闭, PS-1, PS-2, BACE1, NCT (1:3300) 等抗体 4 ℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, ECL 发光 (ECL 试剂盒, Pierce, CA), Kodak-XAR 胶片曝光、显影。洗膜重新封闭后,  $\beta$ -actin 抗体 (1:10000) 孵育, 二抗孵育, 发光, 胶片曝光显影。以  $\beta$ -actin 作为上样量参照标准。胶片扫描后, 用 Image-pro Plus 6.0 软件包分析。

### 1.2.3 免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微术

切片正常羊血清室温预孵育 1 h, A $\beta$  抗体(1:100)孵育, 4 °C 过夜。切片经 0.01M 的磷酸盐缓冲液充分漂洗后, 用羊抗兔 IgG (1:200) 室温孵育 2 h, 漂洗后甘油封片剂封片。共聚焦激光扫描显微镜下观察实验结果并拍照, 图片经 Photoshop 8.0 软件处理并打印。

### 1.2.4 ELISA

采用双抗体夹心法测定小鼠脑组织中 A $\beta$ 1-40 和 A $\beta$ 1-42 水平, 按照试剂盒说明书的步骤进行实验。

(1) 样本处理: 将各组小鼠脑组织称重, 按照 1:9 的比例在 EP 管内加入 0.02 MPBS, 用超声波粉碎机进行匀浆, 3000 rpm 离心 20 min, 收集上清, 冰上静置, 备用。(2) 标准品的稀释: 按照说明书逐一的稀释 A $\beta$  标准品, 建立标准曲线。A $\beta$ 1-40 浓度依次为 600、400、200、100、50  $\mu$ g/L, 空白孔为 0  $\mu$ g/L。A $\beta$ 1-42 浓度依次为 15、10、5、2.5、1.25  $\mu$ g/L, 空白孔为 0  $\mu$ g/L。(3) 加样: 在酶标包被板上待测样品孔中先加入样品稀释液 40  $\mu$ L, 再加入待测样品 10  $\mu$ L(样品最终稀释度为 5 倍)。(4) 温育: 用封板膜封板后放置 37 °C 温育 30 min。(5) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复 5 次, 拍干。(6) 加酶: 每孔加入酶标

试剂 50  $\mu$ L, 空白孔除外。(7) 温育、洗涤(步骤同前)(8) 显色: 每孔先加入显色剂 A50  $\mu$ L, 再加入显色剂 B50  $\mu$ L, 轻轻震荡混匀(孔中液体颜色逐渐变蓝), 37 °C 避光显色 15 min。(9) 终止: 取出酶标包被板, 每孔加入终止液 50  $\mu$ L, 终止反应, 孔中颜色立即转为黄色。(10) 测定: 空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。用 CurveExpert1.4 软件先做出标准曲线, 根据曲线方程, 依次计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数 5 倍, 求出小鼠脑组织中的 A $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 的实际浓度。

### 1.2.5 统计分析

本实验所有数据均采用 Spss11.0 统计软件进行分析处理, 对数据进行 One-way ANOVA 分析, 结果以均值 ± 标准差表示( $X \pm SD$ ),  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 罗非昔布对 A $\beta$ 沉积的影响

应用免疫荧光的方法观察三组小鼠海马和皮层 A $\beta$  沉积和老年斑的形成情况。结果显示, APP/PS1 转基因小鼠的大脑皮质及海马等区域均出现大量 A $\beta$  阳性神经元胞体及阳性斑块的老年斑, 老年斑反应物沉淀在细胞外, 大小不等, 形状为圆形或不规则形状, 边界较清晰(图 1B,E); 与 AD 模型组相比,

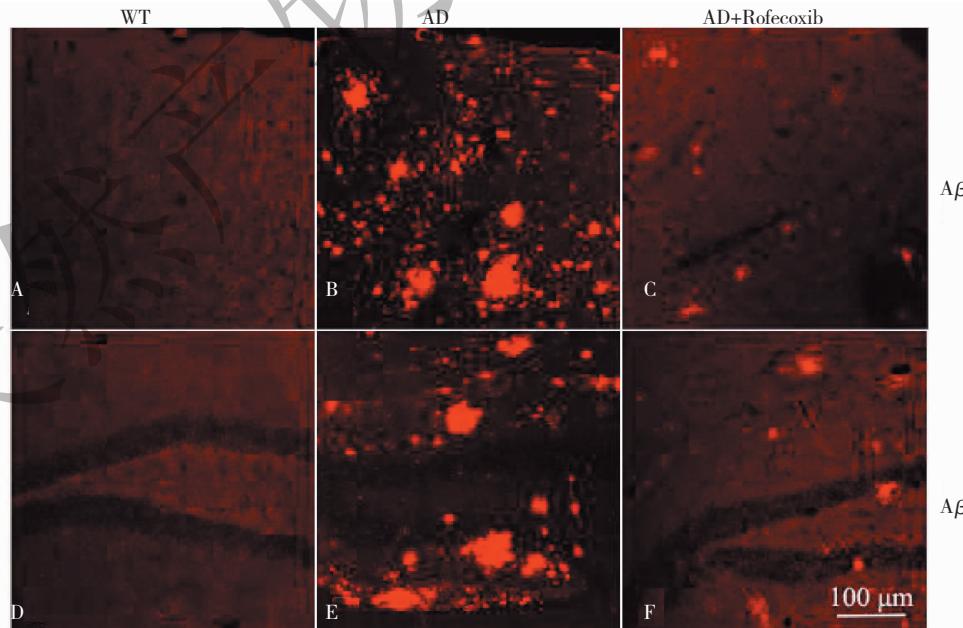


图 1 三组小鼠海马和皮层 A $\beta$  的聚集

Fig. 1 A beta aggregation in hippocampus and cortex of the three groups mice

A,D:对照组;B,E: AD 模型组;C,F:罗非昔布处理组

A,D: The wild type group; B,E: The AD model group; C,F: The Rofecoxib treatment group

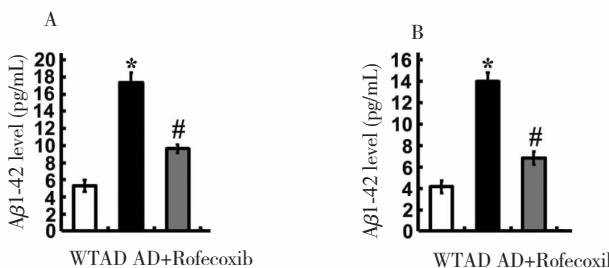


图 2 小鼠脑组织中 A $\beta$ 1-42 和 A $\beta$ 1-40 的含量变化

Fig. 2 The content change of A beta 1-40 and A beta 1-42 in mouse brain

注:A、各组小鼠脑内 A $\beta$ 1-42 含量的比较;B、各组小鼠脑内 A $\beta$ 1-40 含量的比较。与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$ 。

Note : A、The content comparison of the A beta 1-42 in each group mice brains; B、The content comparison of the A beta 1-40 in each group mice brains. Compared with the wild type group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with model group, #  $P < 0.05$ .

罗非昔布处理组小鼠大脑皮层和海马的老年斑块数量明显减少,并且斑块体积缩小(图 1C,F);而正常野生型的对照组小鼠海马和皮层均无老年斑阳性反应(图 1A,D)。

APP 被  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶连续裂解从而产生有毒的 A $\beta$ 1-40 和 A $\beta$ 1-42,本文采用 ELISA 方法分别定量检测了对照组、模型组和罗非昔布处理组小鼠的脑组织中 A $\beta$ 1-40 和 A $\beta$ 1-42 含量变化。ELISA 结果显示,在野生型小鼠脑内, A $\beta$ 1-42 的含量为  $5.30 \pm 0.36$  pg/mL, APP/PS1 转基因小鼠脑内 A $\beta$ 1-42 含量显著增高,为  $17.37 \pm 2.10$  pg/mL(与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , 图 2A);当给予 APP/PS1 转基因小鼠罗非昔布处理后,小鼠脑内的 A $\beta$ 1-42 含量降低至  $9.63 \pm 1.18$  pg/mL(与 AD 组相比, #  $P < 0.05$ , 图 2A),差异有统计学意义。A $\beta$ 1-40 ELISA 检测结果显示,在野生型小鼠脑内, A $\beta$ 1-42 的含量为  $4.15 \pm 0.56$  pg/mL, APP/PS1 转基因小鼠脑内 A $\beta$ 1-40 的含量明显增高,为  $13.99 \pm 1.23$  pg/mL(与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , 图 2B),罗非昔布处理组小鼠脑内的 A $\beta$ 1-40 含量较 AD 组相比明显减少,为  $6.83 \pm 0.87$  pg/mL(\*  $P < 0.05$ , 图 2B),差异具有统计学意义。

## 2.2 NS398 对 APP/PS1 小鼠脑内 APP 代谢的影响

为了检测罗非昔布能否影响 APP/PS1 转基因小鼠脑内 COX-2 表达,实验中我们使用 Western Blot 的实验方法检测三组小鼠脑内 COX-2 的表达水平,结果发现,COX-2 在 AD 模型小鼠脑内表达水平明显高于野生型小鼠,而 COX-2 特异性抑制剂罗非昔布能够显著抑制 AD 模型小鼠脑内的 COX-2 表达;此外,我们应用同样的实验方法检测三组小鼠脑内

APP 裂解相关的裂解酶即  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶(包括 BACE1、NCT、PS1、PS2)的活性变化。统计学分析表明,与对照组相比,APP/PS1 转基因小鼠脑内 APP 裂解酶 BACE1、NCT、PS1、PS2 表达明显升高,而罗非昔布处理组小鼠脑内上述裂解酶的表达较 APP/PS1 转基因小鼠明显降低(与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ;与模型组相比, #  $P < 0.05$ ),实验结果具有统计学意义(图 3A-B)。

## 3 讨论

前列腺素一种是炎症的重要介质。1972 年,Vane 等人证实了环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸合成前列腺素的关键酶,而非甾体消炎药(NSAIDs)就是通过抑制 COX 来发挥抗炎作用的<sup>[17]</sup>。九十年代初,Needleman<sup>[18]</sup>等发现了 COX 存在着两种同功酶:COX-1 和 COX-2。NSAIDs 可同时抑制这两种 COX,但抑制后所产生的效应却完全不同,这也就对它的治疗作用和副作用提出了一个统一的解释。COX-1 为结构酶,存在于大部分组织、血管与血细胞中,它的生理功能是在正常情况下,通过促进某些部位肾上腺素(prostaglandins, PGs)的生物合成来维持机体的生理过程,保持内环境的稳定,尽管在一些激素和生长因子的激发下,COX-1 的水平可以升高到 2-4 倍,但在正常情况下还是保持在稳定的状态。COX-2 为诱导酶,它只存在于某些细胞中,在正常的组织中一般很少表达,只在一些致炎物质如细胞因子,细菌脂多糖等的刺激后才会生成。COX-2 在炎症和疼痛时可以诱导 PGs 的合成,促进了炎症反应和组织损伤<sup>[19]</sup>,而它的表达水平与炎症的严重程度呈正相关。近年来越来越多的研究发

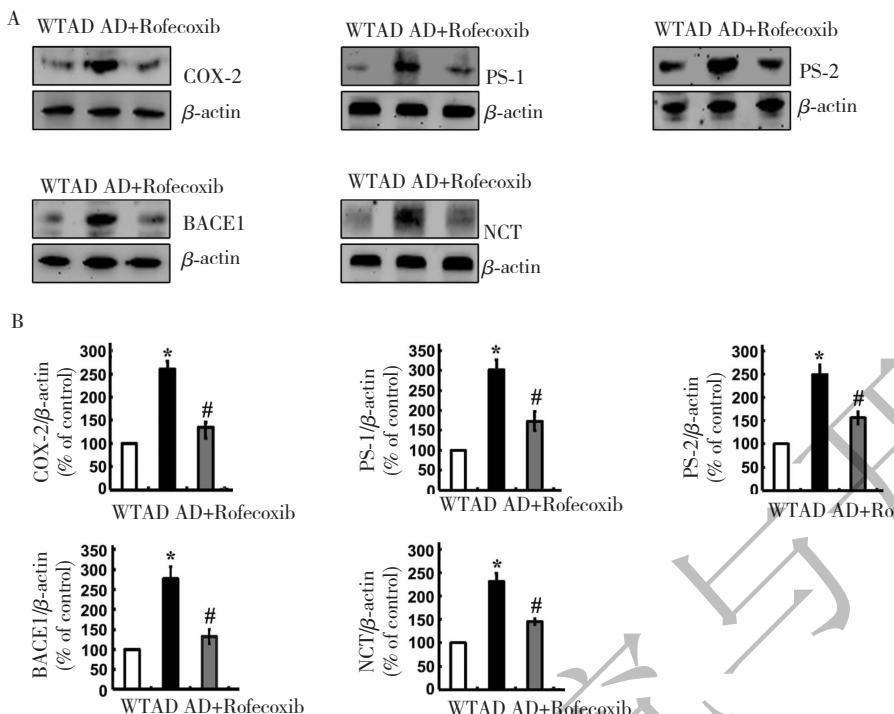


图 3 罗非昔布对各组小鼠 COX-2 表达及 APP 代谢的影响

Fig. 3 The effect of Rofecoxib on COX-2 expression and APP metabolism in each group mice

注:A-B、各组小鼠脑内 COX-2, PS-1, PS-2, BACE1, NCT 的表达变化。与对照组相比, \*P < 0.05; 与模型组相比, #P < 0.05。

Note: A-B, The expression changes of COX-2, PS-1, PS-2, BACE1 and NCT. Compared the wild type group \*P < 0.05; Compared with model group, #P < 0.05.

现,炎症反应在 AD 发病机制中起着重要作用。为此,本文通过分子生物学方法观察 APP/PS1 转基因小鼠脑内 COX-2 表达水平,结果提示 COX-2 表达明显高于正常组小鼠,与文献报道相一致。除了 COX-2 在 AD 发病过程中的关键性作用之外,COX-2 的代谢产物—PGs(包括:PGE2, PGD2, 15d-PGJ2, PGI2, PGF2a 和 TXA2)与 AD 的关系逐渐受到了人们的重视,已有研究提示 COX-2<sup>[20,21]</sup> 及其代谢产物<sup>[22]</sup>在早期 AD 患者脑中被高度激活;PGE2 在早期 AD 患者脑脊液(Cerebrospinal fluid, CSF)中的水平远远高于正常人的水平<sup>[22]</sup>,此外,作为 COX-2 的另外一种代谢产物的 15d-PGJ2 也参与调控 AD 的炎症反应<sup>[23]</sup>。综上所述,COX-2 及其代谢产物在调控 AD 发病具有重要的生物学意义。

AD 的抗炎治疗源于炎症假说,目前,常用的是 NSAIDs,其抗炎的主要机制是抑制 COX-2,减少 PGs 合成。据流行病学调查,发现患有风湿性关节炎的患者在服用 NSAIDs 后,其 AD 的发病率较低,或者是能够延缓 AD 病的进程。1993 年, Koges 用 NSAIDs 呋喃美辛作了半年的临床观察后发现,

NSAIDs 可以延缓 AD 病的进程,与 AD 病的发生呈负相关<sup>[24]</sup>,其作用机制是其对 COX-2 的抑制作用。虽然目前炎症和免疫的机制在 AD 的发病机制中还有很多不清楚的地方,但我们在开展基础研究的同时,也很有必要进行治疗学方面的研究。罗非昔布是一种最新研究发现的选择性 COX-2 抑制剂,具有特异性的抑制细胞内的 COX-2,从而发挥抗炎作用。因此,本实验利用 APP/PS1 转基因小鼠,给予其罗非昔布喂水处理,采用常用分子生物学及形态学实验方法观察罗非昔布是否可以降低 COX-2 表达,并且能否通过减少 APP/PS1 转基因小鼠脑内的炎症反应,从而降低  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的活性,最终减少  $\text{A}\beta$  沉积和老年斑形成。结果发现,罗非昔布能够显著抑制 AD 小鼠脑内的 COX-2 表达,并且免疫荧光实验发现,与野生型小鼠相比,APP/PS1 转基因小鼠大脑皮层和海马组织内,  $\text{A}\beta$  沉积和老年斑的数量与体积明显增加,而罗非昔布处理组的小鼠,其脑内的老年斑数量明显减少,体积也减小了;ELISA 结果同样显示,APP/PS1 转基因小鼠组,其脑内的  $\text{A}\beta 1-40$  和  $\text{A}\beta 1-42$  的表达增加,罗非昔布处理

组小鼠脑内的 A $\beta$ 1-40 和 A $\beta$ 1-42 的表达较 AD 模型组组有所降低。之后,我们采用 Western blot 的方法检测各组小鼠脑内 APP 代谢相关的裂解酶(包括 PS1、PS2、BACE1、NCT)的表达,结果表明,在 APP/PS1 转基因小鼠脑内,PS1、PS2、BACE1、NCT 的表达明显升高,而经罗非昔布处理后,上述裂解酶的表达较 AD 组小鼠显著降低。就此结果而言,初步提示罗非昔布可能通过抑制 AD 模型小鼠脑内 COX-2 的表达,参与 APP 代谢的调节,从而抑制  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的活性,减少 A $\beta$  的沉积和老年斑的形成,最终起到延缓 AD 发生与发展的作用。

## 参考文献

- 1 Ferr CP, Prince M, Brayne C, et al. Alzheimer's disease international global prevalence of dementia: a Delphi consensus study [J]. *Lancet*, 2005, 366:2112-1227.
- 2 Xu Jie, Wen Shi-rong, Yu Yan-hong, et al. The role of the Tau protein in Alzheimer's disease [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 3:573-575.
- 3 Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 120:885-890.
- 4 Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a Unique cerebrovascular amyloid fibril protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 122:1131-1135.
- 5 Glenner GG, W. CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 120:885-890.
- 6 Logan CY, Nusse R. the Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20:781-810.
- 7 Cheng HP, Vetrivel KS, Gong P, et al. Mechanism of disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease-targeting amyloid precursor protein processing in lipid rafts [J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3:374-382.
- 8 Roger J, Kirby LC, Hempelman SR, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease [J]. *Neurology*, 1993, 43: 1609-1611.
- 9 Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21:383-421.
- 10 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, 327:128.
- 11 Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory Drugs and the Risk of Alzheimer's disease [J]. *New England Journal of Medical*, 2001, 345:1515-1521.
- 12 Szekely CA, Thorne JE, Zandi PP, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review [J]. *Neuroepidemiology*, 2004, 23:159-169.
- 13 Vane J. The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanisms of action [J]. *Drugs*, 1987, 33: 18-27.
- 14 Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, et al. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs [J]. *Brain Res*, 1999, 830:226-236.
- 15 Yermakova AV, O Banion MK. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2001, 22:823-836.
- 16 Ho L, Purohit D, Haroutunian V, et al. Neuronal cyclooxygenase 2 expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer's disease [J]. *Arch Neurol*, 2001, 58:487-492.
- 17 Bernd LF, Barbara M, Martina B, et al. Interleukin 1 induces cyclooxygenase2 and prostaglandin E2 synthesis in human neuroblastoma cells [J]. *J Neurochem*, 2000, 75:2020-2028.
- 18 Wollheim FA. New function for Cox-2 in health and disease [J]. *Arthritis Res*, 1999, 1:45-49.
- 19 Raymond ND, Steven BA, Leslie C, et al. Cyclooxygenase in biology and disease [J]. *FASEB J*, 1998, 12:1063-10673.
- 20 Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, et al. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs [J]. *Brain Res*, 1999, 830:226-236.
- 21 Yermakova AV, O Banion MK. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. [J] *Neurobiol Aging*, 2001, 22:823-836.
- 22 Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, et al. Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD [J]. *Neurology*, 1999, 53:1495-1498.
- 23 Gilroy DW, Colville Nash PR, Willis D, et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties [J]. *Nat Med*, 1999, 5:698-701.
- 24 Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease [J]. *Neurology*, 1993, 43:1609-1611.