

# 쥐 해마 절편배양에서 $\beta$ -아밀로이드 1-42분획 독성에 대한 종양괴사인자- $\alpha$ 억제제의 세포 보호 효과

허재혁<sup>1,2</sup>, 현재경<sup>1</sup>, 윤영철<sup>3</sup>

<sup>1</sup>서울의료원 임상의학연구소

<sup>2</sup>서울의료원 신경과

<sup>3</sup>중앙대학교병원 신경과

## Neuroprotective effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ inhibitor on rat hippocampal organotypic slice cultures treated with the 1-42 $\beta$ -amyloid

Jae-Hyeok Heo<sup>1,2</sup>, Jaeyoung Hyeon<sup>1</sup>, Young-Chul Youn<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Clinical Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Department of Neurology, Seoul Medical Center, Seoul, Korea

<sup>3</sup>Department of Neurology, Chung-Ang University Hospital, Seoul, Korea

**Received:** December 26, 2021

**Revised:** January 2, 2022

**Accepted:** January 3, 2022

**Corresponding author:**

Young-Chul Youn, MD, PhD  
Department of Neurology, Chung-Ang University Hospital, 102 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06973, Korea  
Tel: +82-2-6299-1485  
Fax: +82-2-6299-1493  
E-mail: [neudoc@cau.ac.kr](mailto:neudoc@cau.ac.kr)

**Background:** Alzheimer disease (AD) is a chronic degenerative neuronal disease. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitors involved in neuroinflammation in AD pathogenesis can be a potential treatment strategy for AD. Therefore, we performed organotypic hippocampal slice culture to investigate neuroprotective effects by TNF- $\alpha$  inhibitor from  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ )-induced neurotoxicity.

**Methods:** We cultured the hippocampus of a 7 days postnatal Sprague-Dawley rats with 450  $\mu$ m thick slices. The tissue slices had been exposed with 100  $\mu$ M A $\beta$  at an interval of 2 days since 14 days *in vitro*. Following co-treatment of the tissue slice with 100  $\mu$ g/ml adalimumab and A $\beta$ , we evaluated adalimumab effect on A $\beta$  induced neurotoxicity by morphological observation of the hippocampus slice cultures with 1  $\mu$ g/ml propidium iodide (PI) and measuring the expression levels of NeuN, Bcl2, and tau proteins.

**Results:** A $\beta$  (100  $\mu$ M) induced increase of PI-positive fluorescence in the hippocampal slice. The adalimumab as a TNF- $\alpha$  inhibitor showed protective effects for A $\beta$ -induced neurotoxicity, and reduced cell death of the CA1 region in hippocampal slice. The expression of NeuN and Bcl2 proteins was significantly decreased by 100  $\mu$ M A $\beta$ , and increased by co-treatment of 100  $\mu$ g/ml adalimumab. Phosphorylation of tau protein increased by 100  $\mu$ M A $\beta$  and decreased by co-treatment of 100  $\mu$ g/ml adalimumab.

**Conclusions:** Adalimumab reduced the A $\beta$ -induced neurotoxicity of the hippocampal slice culture, inhibited expression of NeuN, Bcl2 proteins and increasing of phosphorylated tau protein. These

findings would be useful as baseline data in the field of AD research and development of noble drugs for neurodegenerative diseases.

**Keywords:** Alzheimer disease; Hippocampal slice culture; Beta-amyloid; Tumor necrosis factor inhibitors

## 서론

알츠하이머병(Alzheimer disease)은 치매의 가장 주요한 원인 질환이며, 최근의 인구 고령화 추세와 함께 급격히 증가되고 있다 [1]. 이러한 알츠하이머병의 치료에 있어서 발병 기전으로 사이토카인(cytokine) 매개 신경염증반응에 초점을 맞춘 연구들이 활발히 이뤄지고 있는데 그 중에서 종양괴사인자- $\alpha$  (tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ )가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다[2]. 알츠하이머 쥐 모델 연구에서 TNF- $\alpha$ 와  $\beta$ -secretase와  $\gamma$ -secretase 발현을 활성화시켜서  $\beta$ -아밀로이드( $\beta$ -amyloid,  $A\beta$ )의 생성을 증가시키는 것과 TNF- $\alpha$ 에 오래 노출되는 경우 신경세포의 괴사가 초래된다는 것 등 알츠하이머병에서 TNF- $\alpha$ 의 병리기전상 연관성이 보고된 바 있다[3,4]. 또 알츠하이머병 환자의 혈액 내 TNF- $\alpha$  수치가 정상인에 비해 유의하게 높았고, 뇌척수액에서도 다른 사이토카인(TNF- $\beta$ , interleukin [IL]-1 $\beta$ , IL-6)과 달리 TNF- $\alpha$ 의 수치가 증가된 것이 확인되었다[5,6]. 그러나 아직 TNF- $\alpha$  억제제를 이용한 알츠하이머병의 연구는 그 수가 매우 적을 뿐 아니라 etanercept, infliximab 등을 사용한 연구에서 결과가 일정하지 못하였다[2].

이에 본 연구진은 이미 류마티스 관절염 질환에서 널리 사용되는 주요 TNF- $\alpha$  억제제 중 하나인 adalimumab을 사용하여 알츠하이머 해마 절편 모델에서의 효과를 확인해 보고자 한다.

## 방법

### 1. 실험 쥐 해마의 기관형적 절편배양

실험 쥐 해마 배양은 Stoppini 등[7]에 의해 기술된 방법을 토대로 진행하였다. 생후 6일된 실험 쥐(Sprague-Dawley rats)를 (주)오리엔트바이오로부터 구입하여 1일간 검역 기간을 둔 후, 7일령 실험 쥐로부터 해마의 기관형적 절편배양을 시행하였다. 두피를 70% 알코올로 소독한 후 무균적으로 전 뇌를 박리하고 4°C dissection media가 담긴 페트리접시로 옮겼다. 다음으로 양쪽 해마부위를 분리하여 수동 조직 절단기(manual tissue chopper)를 사용하여 450  $\mu$ m 두께로 절편을 만든 후, 이 중 손상이 없는 좋은 상태의 절편만을 선택하여 porous membrane insert (Micropore)로 배치하였다. Inserts는 6 well plates에 위치시키고 1개의 insert에는 5-6개의 절편을 배열하였다. 조직 주변의 dissection media를 제거한 뒤 1 ml의 culture media (50% MEM, 25% HBSS, 25% heat inactivated horse serum, supplemented with D-glucose

to 6.5 mg/ml and glutamine 1 mM, pH 7.3, filtered)로 갈아주었다. 모든 과정이 완료된 절편이 들어있는 6 well plates를 36°C의 humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator로 옮긴 후 3일 간격으로 배양액을 갈아주며 해마조직을 지속적으로 배양하였다. 기술된 전 과정은 horizontal laminar flow hood에서 엄격한 무균 기법으로 진행되었다.

### 2. $A\beta$ 및 adalimumab 처리

$A\beta_{1-42}$  (#62-0-80B; American Peptide)는 사용 직전에 37°C에서 24시간 동안 배양하여 oligomer를 제작하였다. 실험군은 대조군,  $A\beta_{1-42}$  단독 실험군,  $A\beta_{1-42}$ 와 adalimumab (Humira; Eisai Korea Inc.) 동시 실험군의 세 군으로 나누어 각 군에 2 well plates씩을 무작위로 배정하였다. 배양 14일째에  $A\beta_{1-42}$  실험군과  $A\beta_{1-42}$ 와 Adalimumab (Humira) 동시 실험군을 구분하여 실험 대상이 될 insert에  $A\beta_{1-42}$ 와 adalimumab를 적정 농도로 점적해주었다. 해마조직에 100  $\mu$ M oligomer  $A\beta_{1-42}$ 를 이들에 한 번 간격으로 점적하였으며, adalimumab는 100  $\mu$ g/ml 농도로 3일마다 한 번씩 점적하였다[8-10]. 이 후, 9일 동안 36°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하면서 3일에 한 번씩 배양액을 새롭게 교체해주었다.

### 3. Propidium iodide를 이용한 신경원 손상의 평가

배양 14일째 각각의 insert에 포함되어있는 배양액을 모두 제거한 후 propidium iodide (PI, 1  $\mu$ g/ml in serum free media; Sigma)를 첨가하였다. 24시간 동안 배양한 다음 역형광 현미경(inverted fluorescence microscope)을 이용하여 해마조직의 구조와 신경세포 분포 상태 및 형광발현 양상을 관찰하였다.

### 4. Western blot을 이용한 단백질 발현분석

72시간 동안 36°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 해마조직들을 각 군별로 모아 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)과 Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Sigma)을 첨가한 RIPA buffer (Sigma)를 사용하여 단백질을 추출하였다. 준비된 단백질 시료는 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo)를 사용해 정량한 뒤, 30  $\mu$ g로 각 실험군에서 동일한 농도의 단백질을 loading하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 다음으로 transfer buffer에서 nitrocellulose membrane (Biorad)으로 단백질을 이동시켜 western blot을 실시하였다. 0.1% ponceau S로 염색하여 단백질의 전기영동 상태를 관찰하였고, TBST로 여러 번 씻어 ponceau S를 제거하였다.

Membrane을 5% nonfat dry skim milk 또는 5% BSA가 포함된 TBST의 blocking solution에 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Primary antibody는 blocking solution에 1:500으로 희석시켜 4°C에서 밤 사이에 반응시킨 후, TBST로 10분씩 세 번 세척하였고, 1:1,000으로 희석한 HRP-conjugated secondary antibody와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분씩 3번 세척한 뒤 ECL Start Western Blotting Detection Reagent (Amersham)를 사용하여 단백질 발현을 가시화하였다. 사용된 primary antibody로는 NeuN (#12943; Cell Signaling), Bcl2 (#2870; Cell Signaling),  $\beta$ -actin (#3700; Cell Signaling), pTau<sub>181</sub> (#12885; Cell Signaling), Tau (#4019; Cell Signaling)를 사용하였다. Secondary antibody로는 bovine anti-rabbit IgG-HRP (sc-2370; Santa Cruz Biotechnology), goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다. Western blot 밴드는 ImageJ 1.49 Program을 이용하여 농도를 구함으로써 각 단백질의 발현 양을 비교분석하였다.

## 결과

### 1. Adalimumab의 신경세포 보호 효과

100  $\mu$ M  $A\beta$  처리군과 100  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$ 와 100  $\mu$ g/ml adalimumab을 동시에 처리한 군에서 신경세포 보호 효과를 분석하였다. 기관형적 해마조직 절편배양 기술을 통하여 쥐 해마조직을 6 well plates의 insert 위에 위치시킨 후, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양을 실시하였다. 배양 14일째 되는 날부터  $A\beta_{1-42}$ 와 adalimumab을 일정 농도로 2일, 3일 간격으로 점적한 뒤 PI 염색을 실시하였다 (Figure 1). 대조군과 비교하였을 때 100  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$  실험군에서 해마 절편 CA1 부분의 손상을 보여주는 PI-positive한 형광발현 면적이 유의하게 증가하였다( $p=0.018$ ). TNF- $\alpha$  억제제인 adalim-

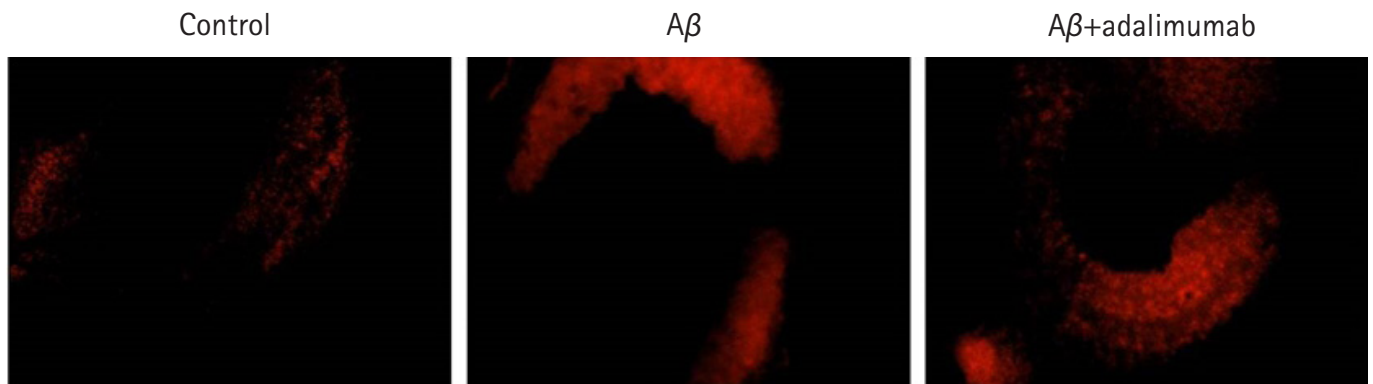
umab을 100  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$ 와 함께 100  $\mu$ g/ml의 농도로 점적한 군에서는 PI 형광발현이  $A\beta_{1-42}$ 만을 첨가한 실험군보다 억제되어 세포 사멸이 감소된 것을 확인할 수 있었다( $p=0.035$ ). 이를 통해 adalimumab이  $A\beta_{1-42}$ 로 인한 세포사멸을 막아주는 신경세포 보호 효능을 가지는 것으로 생각된다.

### 2. NeuN과 Bcl2 단백질 발현의 억제

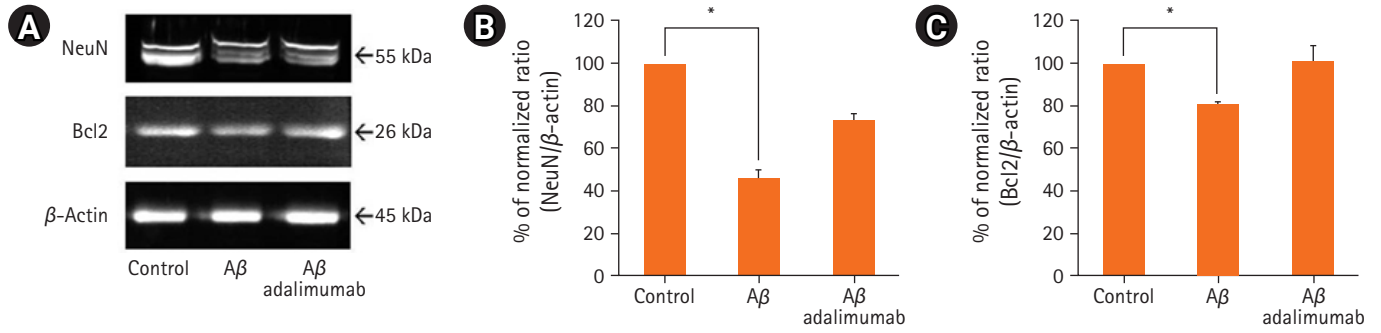
$A\beta_{1-42}$ 로 인한 독성에 대한 adalimumab의 신경보호 효과를 확인하기 위하여 각 군의 해마조직 절편으로부터 단백질을 추출하여 western blot을 수행하였다(Figure 2). 신경원 세포의 표식자인 NeuN과 항-세포사멸(anti-apoptosis) 단백질인 Bcl2의 발현과 분화에 관여하는 것으로 알려진 Bcl2 단백질의 발현을 측정하였다. 대조군과 비교하였을 때 NeuN과 Bcl2 단백질의 발현은 100  $\mu$ M의  $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유의하게 감소하였다( $p=0.04$ ,  $p=0.02$ ). 100  $\mu$ g/ml adalimumab과  $A\beta_{1-42}$ 가 함께 처리된 그룹에서는 adalimumab이 포함되지 않은 배지에서 배양한 조직군보다 NeuN과 Bcl2 단백질 발현 양이 유의하지 않았으나 증가하는 경향을 보였고, 대조군과 비교하였을 때 유의한 감소도 관찰되지 않았다.

### 3. Tau 단백질 과인산화의 억제

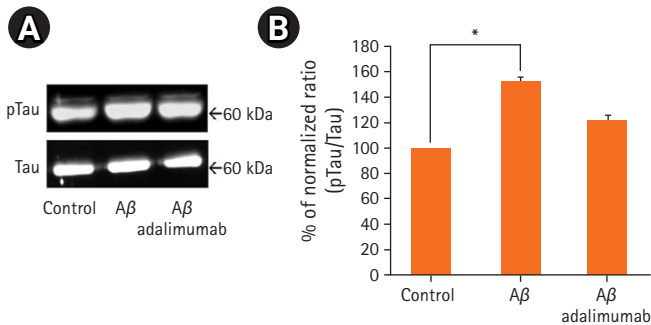
쥐 해마 절편에서  $A\beta_{1-42}$ 로 인한 신경독성이 tau 단백질의 과인산화와 관련 있는지 알아보기 위하여 과인산화된 tau 단백질의 발현 정도를 western blot으로 확인하였다(Figure 3). 100  $\mu$ M의  $A\beta_{1-42}$  처리군에서 과인산화된 tau의 단백질 발현 정도가 대조군에 비해 유의하게 증가하였고( $p=0.03$ ), 100  $\mu$ g/ml adalimumab을 동시에 처리한 군에서는  $A\beta_{1-42}$ 만을 첨가한 실험군보다 유의하지 않았으나 감소하는 경향을 보였으며 대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 따라서  $A\beta_{1-42}$ 로 인한 신경독성은 알츠하이



**Figure 1.** Propidium iodide fluorescence staining of rat hippocampal slice cultures after exposure to 100  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$  and 100  $\mu$ g/ml adalimumab. Organotypic hippocampal slice cultures were untreated or treated with 100  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$  in the presence or absence of 100  $\mu$ g/ml adalimumab.  $A\beta$ ,  $\beta$ -amyloid.



**Figure 2.** NeuN and Bcl2 protein expressions in rat hippocampal slice cultures with 100  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  and 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  adalimumab. (A) Representative immunoreactivities for NeuN, Bcl2 and  $\beta$ -actin loading controls. NeuN and Bcl2 protein expression is normalized by  $\beta$ -actin. (B) Quantification of NeuN/ $\beta$ -actin and (C) Bcl2/ $\beta$ -actin optical density ratio of the western blotting of rat hippocampal slice cultures. NeuN and Bcl2 protein expression have decreased by treatment of 100  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-42}$ , and then reduced by co-treatment of 100  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  adalimumab (\* $p=0.04$  and \* $p=0.02$ , respectively).  $\text{A}\beta$ ,  $\beta$ -amyloid.



**Figure 3.** Tau and phosphorylated Tau (pTau<sub>181</sub>) protein expressions in rat hippocampal slice cultures with 100  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  adalimumab. (A) Representative immunoreactivities for tau phosphorylation and (B) corresponding histogram showing increased levels of pTau<sub>181</sub> following 100  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  (\* $p=0.03$ ). An increase in pTau<sub>181</sub> levels following treatment with  $\text{A}\beta_{1-42}$  was decreased in co-treatment with adalimumab.  $\text{A}\beta$ ,  $\beta$ -amyloid.

머 질병에 특이적인 단백질인, tau의 과인산화를 증가시키며 이러한 현상은 adalimumab를 함께 처리하였을 경우 억제되는 결과가 확인되었다.

### 고찰

본 연구에서  $\text{A}\beta_{1-42}$  실험군은 신경원 세포사멸로 인해 해마조직의 CA1 부분의 PI uptake가 증가되었고, 신경원 세포의 특이적 표지 단백질인 NeuN과 항-세포사멸 단백질인 Bcl2의 발현이 감소되었다. 또  $\text{A}\beta_{1-42}$  실험군에서 세포사멸과 관련된 과인산화된 tau 단백질의 비율이 유의하게 증가된 것이 관찰되었다. 이러한 검사 결과는 알츠하이머 해마 절편 모델을 이용하여  $\text{A}\beta_{1-42}$  실험군의 신경독성이 객관적으로 확인된 것으로 볼 수 있다.

이러한  $\text{A}\beta_{1-42}$  실험군의 신경독성에 의한 신경원 세포 손상 및 사멸은  $\text{A}\beta_{1-42}$ 와 함께 TNF- $\alpha$  억제제인 adalimumab을 처리하였

을 때  $\text{A}\beta_{1-42}$ 에 의해 유도되었던 PI uptake 증가, NeuN과 Bcl2의 발현 감소, 과인산화되었던 tau 단백질 비율의 증가 등이 발생되지 않는 것으로 보아 adalimumab이  $\text{A}\beta_{1-42}$ 에 의한 신경독성을 완화시켜주는 것으로 추정된다.

기존의 연구에서 TNF- $\alpha$  억제제는 알츠하이머병 환자와 동물 모델에서 신경 보호 효과를 갖는 것으로 보고되었다[11-13]. 알츠하이머병 쥐에서 TNF- $\alpha$  억제제를 대뇌에 주입했을 때 신경염증의 매개체인 TNF를 억제함으로써 해마, 피질, 편도 부위에서 만성 염증에 의해 유발되는  $\text{A}\beta$  병리 소견이 감소됨이 확인되었다 [11]. TNF- $\alpha$  억제제인 infliximab을 알츠하이머병 쥐의 뇌실에 주입하였을 때 TNF- $\alpha$ , amyloid plaque, tau 과인산화 등이 줄어드는 것이 확인되었고 TNF- $\alpha$  억제제에 의해 활성화된 CD11c positive dendritic like cell이 amyloid plaque의 제거과정에 관련된 것으로 추정되었다[12]. 최근 TNF가 병리기전에 관여되고, 치료제로 TNF 억제제가 사용되는 염증성 질환을 가진 환자들을 대상으로 실제 임상자료(real-world data)를 활용한 후향적 연구가 있었는데, 류마티스 관절염, 건선, 염증성 장질환 등의 염증성 질환 환자들은 알츠하이머병에 걸릴 위험이 유의하게 높았으나 adalimumab 등 TNF 억제제를 사용한 환자의 경우 이러한 위험이 낮아진 것이 확인된바 있다[13].

통상 adalimumab과 같은 TNF- $\alpha$  억제제는 뇌질환에 대한 치료를 목적으로 개발된 약제가 아니므로 뇌혈관 장벽(blood brain barrier, BBB)을 투과하지 못하는 한계가 있다[14]. 그러나 뇌척수액에 직접 약물을 주입하는 등 침습적인 방법은 알츠하이머병의 만성적 치료를 고려하였을 때 안전성 및 임상 적용에 제한이 되기 때문에 이를 극복하기 위해 특정 단일클론항체를 부착해 BBB를 통과시키는 일명 트로이목마(Trojan horse) 기법에 대한 연구도 활발히 이뤄지고 있다[2, 14]. 또 TNF- $\alpha$  억제제의 말초 투여로도 중추신경계의 TNF- $\alpha$  수준을 정상화시킬 수 있음이 확인된 연구를 통해 말초 투약을 통한 치료 전략도 수립 가능성을 시

사한다[15].

이 연구는 이미 임상에서 널리 활용되고 있는 TNF- $\alpha$  억제제인 adalimumab이 알츠하이머병의 대표적 병리기전으로 알려진 A $\beta$ <sub>1-42</sub>의 신경 독성에 대한 보호 효과, 즉 NeuN과 Bcl2 단백질 발현의 증가와 tau 단백질 과인산화의 억제하는 것을 확인하였으므로, 향후 알츠하이머 치매 환자에 적용하는 후속 연구의 진행이 용이할 것으로 생각된다. 다만 세포 수준의 연구이므로 동물실험을 통해 인지기능의 개선과 BBB의 통과 등에 대한 추가적인 연구가 필요하겠다.

## Notes

### Conflicts of Interest

The authors have no potential conflicts of interest to disclose.

### Funding

This work was supported by grants of the Seoul Medical Center Clinical Research Institute.

### Author Contributions

Conceptualization: YCY; Data curation: JHH, JH; Formal analysis: JH; Investigation: JH, YCY; Methodology: JHH, YCY; Project administration: JH; Writing—original draft: JHH, JH; Writing—review & editing: all authors.

### ORCID

Young-Chul Youn, <https://orcid.org/0000-0002-2742-1759>

## References

- Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT. The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *J Prev Alzheimers Dis* 2021;8:313–321.
- Chang R, Yee KL, Sumbria RK. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibition for Alzheimer's disease. *J Cent Nerv Syst Dis* 2017;9:1179573517709278.
- Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH, Wolfe MS. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interferon- $\gamma$  stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem* 2004;279:49523–49532.
- Janelins MC, Mastrangelo MA, Park KM, Sudol KL, Narrow WC, Oddo S, et al. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor- $\alpha$  expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am J Pathol* 2008;173:1768–1782.
- Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1991;129:318–320.
- Tarkowski E, Liljeroth AM, Minthon L, Tarkowski A, Wallin A, Blennow K. Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Res Bull* 2003;61:255–260.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991;37:173–182.
- Youn YC. The effects of (-)-epigallocatechin gallate on rat hippocampal organotypic slice cultures treated with the 1-42 beta-amyloid protein. *J Korean Neurol Assoc* 2005;23:806–813.
- Evans HG, Roostalu U, Walter GJ, Gullick NJ, Frederiksen KS, Roberts CA, et al. TNF- $\alpha$  blockade induces IL-10 expression in human CD4+ T cells. *Nat Commun* 2014;5:3199.
- Hwang S, Kim JK. Effects of NADPH oxidase inhibitors and mitochondria-targeted antioxidants on amyloid  $\beta$ 1-42-induced neuronal deaths in mouse mixed cortical cultures. *Chonnam Med J* 2018;54:159–166.
- McAlpine FE, Lee JK, Harms AS, Ruhn KA, Blurton-Jones M, Hong J, et al. Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol Dis* 2009;34:163–177.
- Shi JQ, Shen W, Chen J, Wang BR, Zhong LL, Zhu YW, et al. Anti-TNF- $\alpha$  reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cell in the APP/PS1 transgenic mouse brains. *Brain Res* 2011;1368:239–247.
- Zhou M, Xu R, Kaelber DC, Gurney ME. Tumor Necrosis Factor (TNF) blocking agents are associated with lower risk for Alzheimer's disease in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. *PLoS One* 2020;15:e0229819.
- Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Zhou QH, Pardridge WM. Selective targeting of a TNFR decoy receptor pharmaceutical to the primate brain as a receptor-specific IgG fusion protein. *J Biotechnol* 2010;146:84–91.
- Detrait ER, Danis B, Lamberty Y, Foerch P. Peripheral administration of an anti-TNF- $\alpha$  receptor fusion protein counteracts the amyloid induced elevation of hippocampal TNF- $\alpha$  levels and memory deficits in mice. *Neurochem Int* 2014;72:10–13.