

• 专题研究 •

 β 淀粉样肽细胞毒作用研究进展

邢颖 张兰 李林*

[关键词] β 淀粉样蛋白;阿尔茨海默病;毒性作用;综述

中图分类号:R749.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)09-0523-04

虽然阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病机制不清,但越来越多的研究表明, β 淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)的生成、代谢及其毒性作用在 AD 的发生、发展过程中起了关键作用。

1 $A\beta$ 的形成和代谢

淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)是 $A\beta$ 的前体蛋白,异常代谢后形成 $A\beta$,聚集成老年斑。APP 的基因位于第 21 号染色体的长臂上,有 18 个外显子和 17 个内含子。该基因通过选择性剪辑产生数种 APP 的异构体,主要有 APP770、APP751、APP695。

1.1 APP 的 3 种代谢途径

1.1.1 通过 3 种分泌酶水解 APP 是一个跨膜糖蛋白,有胞外区、跨膜区和胞内区 3 部分。其分泌酶水解途径主要是经 α 分泌酶作用和 β 、 γ 分泌酶的连续作用。 α 分泌酶水解在 $A\beta$ 内部的 687Lys—688Leu 之间的肽键,生成的两个片段均不沉积,称为非淀粉样肽源途径。通常认为 α 分泌酶途径可以减轻正常脑内的 $A\beta$ 的产生,产生的可溶性片段 sAPP α 具有神经保护作用。最新的研究表明,细胞表面的膜锚定蛋白分解与金属蛋白酶家族 ADAM(a disintegrin and metalloprotease family)中的 ADAM9、ADAM10 和 ADAM17 有关。成胶质细胞瘤 A172 细胞中含有大量的 α 分泌酶,通过抑制这种细胞中 ADAMs 的表达,结果发现 α 分泌酶的活性被抑制,推测 ADAM9、ADAM10、和 ADAM17 可能是 α 分泌酶^[1]。

β 分泌酶水解 670Met—671Asp 之间的肽键,将 APP 一分为二,生成 670 个氨基酸的 APP 片段和带完整 $A\beta$ 的跨膜 C 段。后者经 γ 分泌酶水解镶嵌于质脂

双分子层内的 $A\beta$ C 末端 710—712 位氨基酸之间的肽键,形成长度不等的 $A\beta_{40-42}$ 片段。目前,已经克隆并表达出一种主要的 β 分泌酶 BACE^[2],BACE mRNA 在脑组织中高表达,原位杂交结果显示,海马、皮层及脑组织中 BACE 的信号特别强,且 BACE 在神经元中的表达远远高于胶质细胞。细胞免疫组化结果证明,BACE 蛋白主要存在于高尔基体和内吞泡中,在内质网和溶酶体有少量表达。研究表明,在细胞内 APP 蛋白的 α 分泌酶或 β 分泌酶的加工是一个相互竞争的过程。

γ 分泌酶是一种膜结合蛋白,由 7 个跨膜区组成。生化研究证明, γ 分泌酶的活性是通过含 PS1 的大分子复合物催化的。 γ 分泌酶有光反应性活性的抑制剂直接作用于 PS1 的活性位点,暗示 PS1 含有蛋白酶的活性位点^[3]。目前的观点认为,PS1 可能就是 γ 分泌酶或是 γ 分泌酶的主要部分。

1.1.2 溶酶体包涵体分解途径 溶酶体/包涵体的蛋白酶水解 $A\beta$ 两端的肽键,生成具有淀粉样源性的包含完整 $A\beta$ 在内的 C 端片段。

1.1.3 半胱天冬蛋白酶(caspase)酶切途径 caspase 家族成员也参与体内 APP 的酶切降解,如 caspase-3、caspase-6、caspase-8 等,其中 caspase-3 的酶切活性最强。

1.2 $A\beta$ 的降解 最近的研究发现,胰岛素降解酶(insulin degrading enzyme, IDE)可以降解 AD 病理变化中的 $A\beta$ 和 2 型糖尿病中的胰岛素。同时发现,IDE 缺乏的纯合子小鼠脑中 $A\beta$ 降解酶水平降低到 50%,表现为脑中内源性 $A\beta$ 聚集增高。同时,APP 在细胞内信号区水平也增高^[4]。 $A\beta$ 肽还可被 neprilysin 和 APOE 调节的受体呈递系统代谢^[5]。所以提高 IDE 的功能可以作为治疗 AD 药物的新靶点。

2 $A\beta$ 的毒性作用

2.1 可溶性寡克隆 $A\beta$ 具有毒性作用 $A\beta$ 在正常老年脑中也存在,是机体细胞如神经细胞和胶质细胞正常代谢的产物,但在 AD 患者脑内, $A\beta$ 明显高于正常人。脑内的 $A\beta$ 是以单克隆、可溶性寡克隆、不可溶性寡克隆和不可溶性淀粉样纤维等形式存在。在 APP 转基因小鼠脑内形成明显的淀粉样斑块之前已经出现

北京市科技新星计划项目(H020821390190);首都医学发展基金项目(No.2002—3002);北京市自然科学基金资助项目(No.7982006);国家重点基础研究发展计划“973”项目(No.G2000057010);北京市中医药重点学科项目(2001);首都二四八重大创新工程项目(H010210130113);北京市科委资助北京市重点科技实验室项目(No.951890600)。

作者单位:100053 北京市,首都医科大学宣武医院药理研究室,北京脑老化重点实验室。作者简介:邢颖(1977-),女,北京市人,硕士研究生,主要研究方向:神经药理学。*通讯作者:李林。

学习记忆功能的减退,将未聚集的 $A\beta$ 进行大鼠脑室注射复制 AD 动物模型,也可以出现学习记忆障碍,推测可溶性的 $A\beta$ 可能具有神经毒性作用。

在脑室内注射含有寡克隆和单克隆 $A\beta$ 的细胞液可以明显地抑制海马的长时程增强。如果选择性降解单克隆 $A\beta$ 不能阻止海马的长时程增强,但是用 γ 分泌酶抑制剂处理后,可以明显的降低寡克隆 $A\beta$ 的形成,海马的长时程增强被抑制的现象消失。在另一实验中发现,在 2—4 个月龄的 APP 转基因小鼠脑中突触前终末耗竭明显与可溶性 $A\beta$ 水平呈正相关,这时已经出现了学习记忆障碍,这说明在 AD 发病的早期还未出现明显的淀粉样斑块之前,学习记忆功能的减退与可溶性 $A\beta$ 水平升高所引起的突触功能障碍密切相关^[6]。在细胞学实验已经证明,针对可溶性寡克隆 $A\beta$ 的抗体可以中和其毒性^[7]。这些证据均证明在 AD 发病尤其是早期主要引起细胞毒性作用的物质是可溶性寡克隆 $A\beta$ 。

2.2 $A\beta$ 引起细胞毒作用的途径

2.2.1 诱导活性氧(ROS)产生

$A\beta$ 可以通过多条途径诱导 ROS 的产生:① $A\beta$ 的寡聚体与金属离子(Fe^{2+} 、 Cu^{2+})结合,通过 Fenton 反应,可以从过氧化物如 H_2O_2 中获得羟自由基;② $A\beta$ 可以与神经细胞和胶质细胞膜上的晚期糖化终末产物受体(receptor specific for advanced glycosylation end products, RAGE)结合,从而引起其下游 NADH 氧化酶的激活,产生 ROS^[8]。有学者认为是 $A\beta$ 直接作用 NADPH 细胞色素 P450,作为后者的异常底物而引起氧应激的;③间接作用: $A\beta$ 诱导局部的免疫反应,产生炎症因子,从而形成一个氧应激的微环境;④ $A\beta$ 的前体 APP 也可能在细胞氧化过程中有作用。因为 APP 结构上有 Cu 结合位点,可以与 Cu^{2+} 结合而聚合 Cu^{2+} ,通过 Fenton 反应而产生自由基产物,所以推测 APP 是某种 Cu 或 Zn 的转运体^[9]。

产生的活性氧包括 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 OH^{\cdot} 、 NO^{\cdot} 等,可以过度氧化细胞的生物大分子物质。产生的毒性效应主要通过以下途径引起细胞损伤:①氧化 DNA,引起核苷酸二聚体化,最终引起复制过程出现错误;②氧化细胞内很多重要的蛋白,如酶、结构蛋白等,使其功能改变;③氧化膜脂质,最终导致膜障碍以及细胞溶解^[10]。一旦神经元膜溶解,兴奋性氨基酸如谷氨酸就会从细胞内释放出来,谷氨酸与 NMDA 受体结合或与神经元上的胱氨酸反向转运体结合而诱导氧应激产生,同时还导致细胞氧化还原转换体 GSH 的缺乏^[11]。

④最近观点认为, $A\beta$ 诱导产生的 H_2O_2 是细胞凋亡的第二信使,它的产生可以激活与细胞凋亡相关的基因,如 c-Jun, NF- κ B, P53, caspase 等,从分子水平说明 $A\beta$

的毒性作用。

$A\beta$ 可以诱导 ROS 产生,同时 ROS 如 H_2O_2 也可以在 APP 基因不影响表达的情况下,导致 β 裂解酶的产生,使全长 APP 蛋白水平下降, $A\beta$ 的产生和聚集增加。所以 $A\beta$ 和氧应激间形成了恶性循环。

2.2.2 诱导神经元的凋亡

大量研究表明,caspase 系统在许多凋亡模型中有重要的作用。caspase-3、-6 可以直接导致细胞死亡^[12]。目前认为 caspase-3 引起凋亡的机制可能是裂解 APP,产生碳氧段断裂的片段(APP delta C31)。这个片段有细胞毒作用,其毒性作用依赖其内含的 $A\beta_{1-20}$ 区段最终引起细胞凋亡^[13]。最近的研究表明,caspase 途径引起的细胞凋亡除了 caspase-3 外,caspase-8 也有很重要的作用。研究发现, $A\beta$ 诱导的凋亡途径和 Fas/ TNFR 家族很相似,都需要 caspase-8 的活性和调节子蛋白。用 caspase-8 的抑制剂可以阻断 $A\beta$ 诱导的细胞死亡^[14]。另外,微管相关蛋白 tau 也是 caspase-3 的底物,在神经细胞出现凋亡时,tau 蛋白的 C 端被 caspase-3 裂解,其裂解产物可能在神经细胞凋亡的进展中有一定的意义^[15]。最近还有报道, $A\beta$ 还能直接引起线粒体肿胀,细胞色素 C 释放,后者激活 caspase-3、-9,引起凋亡,这条途径在线粒体的电子传递体完整时才能实现,说明可能是通过线粒体能量传递产生活性氧完成的^[16]。

2.2.3 诱导炎症产生

研究表明,AD 的发病与脑内的炎症有关。主要通过 $A\beta$ 诱导小胶质细胞、星形细胞产生炎症因子 NO、M-CSF 等物质,激发炎症反应,引起神经损伤。最近的报道提出,在发病的早期,炎症反应有利于 $A\beta$ 的清除,对神经有保护作用。如激活的小胶质细胞过度表达转换生长因子(TGF),可引起 hAPP 转基因小鼠 $A\beta$ 的聚集减少 50%;小鼠脑中补体 C_3 水平明显上升。当拮抗 C_3 作用时, $A\beta$ 沉积会上升 2—3 倍,说明补体激活产生可以抵抗 $A\beta$ 诱导的神经毒作用,减少 $A\beta$ 的聚集,加速 $A\beta$ 的清除^[17]。

在发病的后期,炎症反应使病变进行性加重。Lue 发现,抗体条理化了的 $A\beta$ 沉积可以和小胶质细胞表达的免疫球蛋白 Fc γ 受体结合,一方面清除 $A\beta$ γ 沉积,另一方面激活 Fc γ 受体介导的巨噬细胞,引发炎症反应。且小胶质细胞上抗原-抗体复合物结合本身能加剧炎症反应^[18],同时也测到小胶质细胞表达 Fc γ 受体 I、IIa、IIIb 的 mRNA,但 II 的表达还有争议。

激活的小胶质细胞可以分泌多种细胞因子,如 IL-1 β , IL-6, TNF- α ,还可以分泌多种蛋白如 α_2 巨球蛋白,导致神经细胞损伤。同时 IL-1 β 也可介导星形胶质细胞增生。所以小胶质细胞和星形细胞均可被纤维性或可溶性 $A\beta$ 激活^[19]。

流行病学调查发现,环氧酶-2(cyclooxygenase-2,

COX-2) 抑制剂非甾体类抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 可以延缓或阻止 AD 的发病。在 APP(swe)/PS1/COX-2 转基因鼠脑中, COX-2 的表达可以增强淀粉样斑块的形成, 而且与 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的水平升高相一致, 但 APP 的表达和含量没有改变, 说明 COX-2 还可以通过影响 APP 的代谢过程, 推动淀粉样变性病的产生^[20]。研究发现, 非甾体类抗炎药可以明显刺激 α 分泌酶作用, 使 sAPP α 的形成增加。这种 sAPP α 的释放可以被 PKC 和丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 抑制剂调节, 说明非甾体类抗炎药的作用机制之一是通过 MAPK 信号系统作用的^[21]。

2.2.4 引起突触功能障碍 很多证据表明, 早期 AD 的记忆障碍起始于海马突触的细微改变。病史为 2—4 年的 AD 患者颞叶和前脑皮层的形态学定量研究显示, 脑中突触密度降低 25%—35%, 突触数目降低 15%—35%。同时 AD 患者的认知障碍程度还和海马和相关皮层的突触囊泡蛋白突触体素的多少相关, 在轻微认知障碍和轻度 AD 患者皮层中突触体素的免疫活性比同龄对照组降低 25%。在 2—3 个月的 APP 转基因鼠脑中突触体素阳性的突触前终末和微管相关蛋白阳性神经元降低 30%, 且出现在 $A\beta$ 斑块出现之前。在多个 APP 转基因小鼠系中显示海马有明显的基础突触递质和/或长时程增强 (与突触可塑性相关的电生理指标) 不足, 如在 V717F APP 转基因鼠脑海马脑片中, 基础突触递质有 40% 丧失。这说明 AD 发病早期的认知和记忆障碍是由于海马和相关皮层的神经元突触功能障碍引起的, 而突触的改变是可溶性寡克隆 $A\beta$ 引起的^[6]。

2.2.5 钙超载 钙是脑内重要的胞内信息物质, 对神经的发育、突触信息的传递及可塑性、调节各种脑内代谢均十分重要。在 AD 患者脑内出现钙稳态的打乱。体外培养神经元细胞发现 $A\beta$ 可以在人工脂质双层膜上形成 Ca^{2+} 通道, 诱导 Ca^{2+} 内流, 升高胞内 Ca^{2+} , 导致 Ca^{2+} 稳态失调, 引起胞内 Ca^{2+} 超载。而在 APP 和早老素造成神经元突触功能障碍和神经退行性变中发现, 神经元退变过程与细胞调节钙功能不良关系密切, 是通过多条信号传导通路实现的。胞内 Ca^{2+} 超载, 一方面损伤氧化磷酸化, 另一方面导致钙依赖性 ATP 酶的超常活动, 结果导致细胞的能量不足甚至耗竭, 细胞结构和功能破坏, 影响长时程突触增强效应, 突触可塑性下降。同时胞内 Ca^{2+} 超载还促进脂质过氧化和自由基生成, 增加细胞对氧化应激和兴奋性毒性的敏感性, 加剧细胞损伤。

2.2.6 加速 tau 蛋白磷酸化 研究发现, AD 患者脑内 $A\beta$ 聚集是在量和种类上增加, 和 tau 蛋白的病理呈正

比增加。 $A\beta_{42}$ 聚集在产生 tau 蛋白的病理早期就可以观察到, 而可溶性 $A\beta_{40}$ 则在后期才能发现。 $A\beta$ 聚集分布广泛, tau 蛋白随之产生, 也广泛分布。这说明, $A\beta_{42}$ 和 AD 的病理变化产生关系密切, APP 和 tau 的空间分布一致提示神经元的退行性变不是细胞外的 $A\beta$ 直接引起的, 可能是通过 tau 蛋白的异常生成, 导致 $A\beta$ 的聚集引起的。Lewis 将 $A\beta_{42}$ 注射到 P301L 突变的 tau 转基因小鼠脑内, 发现在神经元注射部位 NFTs 数量增加了 5 倍, 说明 $A\beta_{42}$ 在体内可以加速 NFT 的形成^[22]。

$A\beta$ 诱导 P35 裂解为 P25。Cyclin 依赖激酶 5 (cdk5) 和它的神经特异性激活体 P35 在神经生长和皮层分化中是必需物质。P35 的蛋白裂解产物是 P25, 后者在 AD 患者脑内出现聚集。而 P25/cdk5 可以过度磷酸化 tau 蛋白, 从而破坏细胞骨架, 促进细胞凋亡。实验发现, $A\beta$ 可以诱导原代培养的皮层神经元细胞产生 P25, 加入钙也可以刺激 P35 裂解为 P25。

2.2.7 影响 Wnt 信号传导系统 PKC 可以增加非淀粉源性 α 分泌酶裂解 APP 的作用^[23]。糖元合成酶 (glycogen synthase kinase, GSK)-3 β 可以增加 tau 蛋白的磷酸化。PKC 和 GSK-3 β 都是 Wnt 信号通路的成员, 这条通路的信号转导对细胞粘附和细胞命运决定有关键性的作用。已经发现, 在成年大鼠的某些区域存在 Wnt 信号转导, 该信号转导功能的丧失一定程度上引起 AD 主要病理学改变的发生发展。

研究表明, PKC 可能是通过 MAPK 促进 sAPP α 的产生, 起到细胞保护作用。PKC 还能够传导 Wnt/Wingless 信号导致海马和皮层神经元 GSK-3 β 受抑制, 从而引起 tau 蛋白磷酸化减少。这说明 Wnt 信号系统可能在 APP 代谢和 tau 蛋白磷酸化过程中扮演一个重要的角色^[24]。

综上所述, 通过对 α 、 β 、 γ 分泌酶的研究, 人们已经对 $A\beta$ 的产生过程有了更深刻的了解。而 $A\beta$ 产生的细胞毒作用主要是通过诱导氧自由基、凋亡、炎症、引起钙超载、影响 Wnt 系统等多种途径产生的。所以, 从 $A\beta$ 的生成入手, 通过调节 α 、 β 、 γ 分泌酶的活性和表达, 阻断可溶性 $A\beta$ 的产生, 同时抑制 $A\beta$ 聚集, 是一条很有发展前途的预防 AD 的途径。当然, 一旦 $A\beta$ 产生, 抑制其产生的细胞毒作用, 使其损害作用减少到最小, 也是治疗 AD 的重要靶点。

[参考文献]

- [1] Asai M, Hattori C, Szabo B, et al. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(1): 231—235.
- [2] Martin E. β -secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Neurosci Res, 2002, 70: 373—379.

- [3] Xu M, Lai MT, Huang Q, et al. Gamma-secretase: characterization and implication for Alzheimer disease therapy[J]. Neurobiol Aging, 2002, 23(6) :1023—1030.
- [4] Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7) :4162—4167.
- [5] Ling X, Martins RN, Racchi M, et al. Amyloid beta antagonizes insulin promoted secretion of the amyloid beta protein precursor[J]. J Alzheimers Dis, 2002, 4(5) :369—374.
- [6] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure[J]. Science, 2002, 298(5594) :789—791.
- [7] Lambert MP, Viola KL, Chromy BA, et al. Vaccination with soluble A beta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies[J]. J Neurochem, 2001, 79(3) :595—605.
- [8] Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease[J]. Neuron, 1996, 16(5) :921—932.
- [9] Strausak D, Mercer JFB, Dieter HH, et al. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases[J]. Brain Res Bul, 2001, 55(2) :175—185.
- [10] Sies H. Biochemistry of Oxidative Stress[M]. Angew Chem Int Ed Engl, 1986. 1058—1079.
- [11] Schubert D, Piasecki D. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade[J]. J Neurosci, 2001, 21 :7455—7462.
- [12] Zhang Y, Cynthia G, Andren LB. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjection with active caspase-3, -6, -7 and -8[J]. J Neurosci, 2000, 20(22) :8384—8389.
- [13] Nishimura I, Uetsuki T, Kuwako K, et al. Cell death induced by a caspase-cleaved transmembrane fragment of the Alzheimer amyloid precursor protein[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(2) :199—208.
- [14] Rohn TT, Head E, Nesse WH, et al. Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(6) :1006—1016.
- [15] Chung CW, Song YH, Kim IK, et al. Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(1) :162—172.
- [16] Morishima YS, Gotoh Y, Zieg J, et al. β -Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal Kinase pathway and the induction of Fas ligand[J]. Brain Res, 2002, 931(2) :117—125.
- [17] Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, et al. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(16) :10837—10842.
- [18] Lue LF, Walker DG. Modeling Alzheimer's disease immune therapy mechanisms: interactions of human postmortem microglia with antibody-opsonized amyloid beta peptide[J]. J Neurosci Res, 2002, 70(4) :599—610.
- [19] Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, et al. Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Am J Pathol, 2001, 158(4) :1345—1354.
- [20] Xiang Z, Ho L, Yemul S, et al. Cyclooxygenase-2 promotes amyloid plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease neuropathology[J]. Gene Expr, 2002, 10(5—6) :271—278.
- [21] Avramovich Y, Amit T, Youdim MB, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs stimulate secretion of non-amyloidogenic precursor protein[J]. J Biol Chem, 2002, 277(35) :31466—31473.
- [22] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP[J]. Science, 2001, 293(5534) :1487—1491.
- [23] Kozikowski AP, Nowak I, Petukhov PA, et al. New amide-bearing benzolactam-based protein kinase C modulators induce enhanced secretion of the amyloid precursor protein metabolite sAPP alpha[J]. J Med Chem, 2003, 46(3) :364—373.
- [24] Mudger A, Chapman S, Richardson J, et al. Dishevelled regulates the metabolism of amyloid precursor protein via protein kinase c/ Mitogen Activated protein kinase and c-Jun terminal kinase[J]. J Neurosci, 2001, 21(14) :4987—4995.