

综述与专论

Alzheimer 氏病淀粉样前体蛋白的研究进展*

陈培利 童坦君 张宗玉

(北京医科大学生化与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 Alzheimer 氏病 (AD) 是一种发生于老年人群的原发性退行性脑病, 其特征性病变为细胞内神经纤维缠绕 (NFT) 及细胞外老年斑 (SP). 构成 SP 的主要成分 β 淀粉样多肽 (β A) 为一由淀粉样前体蛋白 (APP) 剪切而来的分子质量约为 4 ku 的多肽, 其神经毒性可能由其氧化作用和在脂质双层中形成的 Ca^{2+} 通道所致. APP 的功能目前尚未完全明了, 可能具有促进细胞粘附、维护突触膜稳定性等功能. APP 主要通过两种途径进行加工修饰: 一为分泌途径, 由一些假定的分泌酶催化; 另一为胞内体-溶酶体途径. 在形成 SP 的 β A 中, 较长者比短者更易聚集, 因此一些 APP 突变由于能够释放出更多的较长的 β A 或者使较短的 β A 生成量增加而致发家族性 AD. 一些可能在 APP 的代谢中起着重要作用的因素, 如早衰蛋白的突变, 也可通过增加 β A 的生成量而致发 AD.

关键词 Alzheimer 病, β 淀粉样前体蛋白, β 淀粉样多肽

学科分类号 R749.16

Alzheimer 氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是发生于老年人群的一种原发性退行性脑病, 65 岁以上的老年人口发病率约为 5%~10%. 患者的思维及记忆功能首先受累, 而后出现情感及行为的异常. 随着病情的加重, 患者日常生活不能自理, 直至病程后期卧床不起. 该病自然病程约为 3~15 a (年), 自 1907 年 Alois Alzheimer 首次描绘该病病例以来, 有诸多研究者对其危险因素和发病机理进行了深入的探讨, 但至今尚无确切的说明. 该病的病理学改变主要有广泛的神经元的减少或丢失 (尤其在皮层及海马)、细胞内神经纤维缠绕 (neurofibrillary tangles, NFT)、细胞外老年斑 (senile plaque, SP) 及嗜刚果红的淀粉样脑血管病变 (cerebral amyloid angiopathy, CAA) (主要累及软脑膜和皮层血管). 目前, 随着社会人口预期寿命的延长, 该病越来越成为影响老年人精神健康的重要问题之一.

近年来关于淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 对 AD 影响的研究报道甚多. APP 的剪切产物, β 淀粉样多肽 (β -amyloid peptide, β A), 是构成 AD SP 的主要成分. APP 作为一种管家基因在人体的多种组织中均有表达, 但其功能目前尚不清楚. APP 的高表达及某些突变可以引发某些家族的早发性 AD, 故此 APP 的致病作用受到了充分的重视.

1 APP 剪切产物—— β A 及其在 AD 中的作用

构成 SP 及 CAA 的主要成分是由 APP 剪切而来的分子质量约为 4 ku 的多肽, 因其呈 β 片层结构 (β -pleated sheet), 故文献中将其称为 $\text{A}\beta$ 、 β A 或 β A4. β A 由 39~42/43 个氨基酸残基组成, 体外人工合成的 β A 可以自发聚集成为呈淀粉样结构的纤维. 免疫组织化学实验证明, 在 SP (及 NFT) 中尚存在有其他蛋白质成分, 如 α_1 抗糜蛋白酶 (α_1 -antichymotrypsin)、载脂蛋白 (apolipoprotein, Apo) E、载脂蛋白 J (ApoJ) 等. 这些蛋白质成分可以促进 β A 的聚集过程, 故被称之为陪伴蛋白 (chaperone protein).

虽然目前对于 β A 聚集物在 AD 中的作用尚未取得一致意见, 有些实验确实观察到其对神经元细胞具有直接或间接的毒性作用. 这种毒性作用可能由: a. 氧化作用所致^[1]. 此氧化作用可能由高级糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 所介导^[2]. b. β A 能够在脂质双层中形成独特的 Ca^{2+} 通道. 这种通道可以影响或消除膜两侧的离子梯度进而影响神经元的功能^[3]. c. β A 尚能够诱导培养的神经元细胞发生凋亡. 组织学检测也发现 AD 的脑组织具有细胞凋亡

* 国家“九五”老年性痴呆攻关课题 (96-906-05-07).

收稿日期: 1997-10-19, 修回日期: 1998-03-11

的某些形态学特征, 如染色质固缩、核碎裂等. 并且, 上述凋亡现象与 *bcl-2* 基因的表达异常相关. 然而 Yamatsuji 等^[4]却发现高达 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 βA (1~40 或 42) 并不能引起 COS-NK1 细胞发生凋亡, 而由于 APP 发生 London 突变 ($\text{APP}_{695:\text{V642-I/F/G}}$) 所致的功能异常则可能是引起凋亡原因. 故而 Yamatsuji^[4]及 Ikezu 等^[5]认为异常的 APP- G_0 信号传递作用可能是致发 AD 的原因, 而由 βA 聚集形成的淀粉样斑块则不过作为附属产物, 仅为 AD 的表现之一而已. 后一组研究者随后的研究进一步证实突变的 $\text{APP}_{695(\text{V642-I/F/G})}$ 可以通过与 G_0 (V642-F) 羧基端耦联而对 cAMP 反应元件 (cAMP response element, CRE) 具有负性调控作用.

在形成 SP 的 βA 中, 含 42~43 个氨基酸残基者比含 40 个氨基酸残基的 βA 更易形成淀粉样纤维, 因此某些 APP 的突变体 (如 London 突变体) 由于能够释放出更多的较长的 βA ^[6], 而导致其携带个体发生早发性家族性 AD (EOAD). 这些较长的 βA 片段可能首先聚集而后在其基础上较短的 βA 片段进一步沉积而形成 SP. 因此, 另外一些 APP 突变体则可能是通过增加含 40 个氨基酸残基的 βA 的生成量而致发 EOAD 的^[7].

除了上述 APP 自身基因外, 某些基因的突变也可影响其剪切过程及 βA 的生成. 早衰蛋白 (或早衰素, *presenilin*, PS) 1 及 PS2 均为跨膜蛋白, 其基因分别定位于 14q24.3 及 1 号染色体上, 结构高度同源 (67%). 同 APP 一样, PS 在人体的多种组织也有广泛的表达, 但其功能亦尚未确定. 在已知的 EOAD 家族中, 70% 以上的病例含有 PS1 及 PS2 的突变. 目前已检出的 PS1 及 PS2 的误义突变分别有 40 余种和 2 种之多. 虽然 PS (PS1) 的这些突变发生在遍布 PS 的各区域中, 但目前为止尚未发现其对 PS 自身的剪切具有广泛的影响. 由于 PS 的突变, 其携带者 βA_{42} 的生成量增加, 从而导致其携带者在较早的年龄 (40~50 岁) 即发生 AD, 这在转染细胞及转基因鼠中也均已得到证实^[8]. 究其原因, 可能在于: PS 在 APP 的正确折叠和细胞中的分拣 (sorting)、定位中起着重要作用^[9], 其结构或功能的缺陷影响了 APP 的转运和酶切加工, 从而导致 βA_{42} 的生成增加; 或者, PS 作为一种可能的离子通道 (Ca^{2+}) 其突变导致通道的开放异常^[10], 从而导致细胞的功能异常, 甚至凋亡.

2 APP 及其功能

如前所述 βA 是由其前体蛋白 APP 剪切生成的, APP 为一跨膜糖蛋白, 结构类似于细胞表面受体. APP 基因定位于 21q21.2, 与遗传学连锁分析定位的 EOAD 基因位点相重叠. APP 基因至少由 18 个外显子组成, 其转录产物的剪接方式不同可以生成若干种 APP 的亚型. 其中最主要的三种为 APP_{695} , APP_{751} , APP_{770} (数字表示氨基酸残基数目). 以上三种亚型中均包含了 βA 多肽的部分. 三者的差别在于后两者分别包含了 Kanitz 蛋白酶抑制物序列 (Kanitz protease inhibitor, KPI, exon7) 和 KPI 及 MRC ox-2 抗原序列 (exon 8). APP 作为一种管家基因 (housekeeping gene) 在多种组织中均有所表达, 但不同组织的 APP 亚型有所不同, 如脑组织中主要为 APP_{695} , 并且有实验证明在 AD 患者的脑组织中有 APP 亚型分布失调的现象.

综合目前资料, APP 可能具有促进细胞粘附、维护突触膜稳定性、抑制丝氨酸蛋白酶活性及参与中枢神经系统免疫反应等功能. APP 可能以位于氨基端的 96~110 位氨基酸残基的肝素结合区与细胞外基质中的硫酸类肝素蛋白多糖 (heparan sulphate proteoglycans), 层粘连蛋白 (laminin, LN) 及胶原 IV 等相结合而具有参与细胞粘附的功能. 在培养细胞中 APPs (soluble APP) 具有保护神经元免受 βA 毒性和促进细胞存活、生长以及刺激神经元轴突长成的作用. 严重的脑外伤可致 APP 表达增加, 提示 APP 可能在脑组织损伤后的修复中发挥一定的作用. 但是令人费解的是脑外伤同时又是 AD 的危险因素之一, 因此 APP 表达增高在神经组织修复中的意义有待于进一步研究. 存在于血小板 α 颗粒中的 APP 在血小板被激活时可以释放出 APPs, 后者是否参与组织修复目前亦尚属未知. 另外, APPs 中包含的丝氨酸蛋白酶抑制物 (KPI) (或 Nexin II 蛋白酶) 序列具有抑制血小板凝血因子 XIa 及激肽释放酶 (Kallikrein) 活性的作用, APPs 由此可能参与凝血进程的调节. APP (APPs) 另一重要的功能是其可以调节神经元细胞内的 Ca^{2+} 浓度, 从而影响神经元对谷氨酸 (GLU) 的应答过程^[11]. GLU 是一种对发育过程中突触发生及成人的学习记忆过程起重要作用的兴奋性神经递质. AD 患者早期出现的思维及记忆功能障碍是否与 APP 未能有效抑制 βA 形成的 Ca^{2+} 通道的作

用相关目前尚无说明。

3 APP 的加工及代谢

APP 主要通过两种途径进行加工修饰: 一为分泌途径, 另一为胞内体-溶酶体途径。APP 的初级翻译产物经硫酸化、磷酸化及糖基化等加工修饰后成为成熟的 APP 分子。分泌方式的剪切发生在相当于 β A 的 16~17 位氨基酸残基之间, 由假定的 α 分泌酶 (secretase) 催化裂解成为由膜外部分构成的分泌片段 (APPs) 和仍与膜相连的分子质量为 10 ku 的羧基端片段 (P10)。因两片段均不含完整的 β A, 故该方式不会导致 SP 的形成。另外一种不同于 α 分泌酶的 β 分泌酶则可在毗邻 β A 氨基端的位置切断 APP, 生成一截短的 APPs 和一包含 β A 的分子质量约为 11 ku 的羧基端片段 (P11), 后者又可被 γ 分泌酶在 β A 的羧基端降解释放出 β A。一些引起 EOAD 的 APP 突变, 如 London 突变 (APP₆₉₅: V642-I/F/G), Swedish 突变 (APP₆₉₅: L595-N, M596-L) 等, 因其发生在邻近 β A 处分泌酶的作用位点上, 致使生成 β A 片段延长或生成量增加而引发 EOAD。如在 α 分泌酶的作用位点处引入双突变可使 APP 的分泌下降。以该突变的 APP 基因制备的转基因鼠在皮质、海马等区出现神经细胞坏死等病变, 实验动物出现随转移的 APP 基因表达增高而加重的多种精神症状^[12]。在正常培养细胞的培养液及无智力障碍者的脑脊液中均有 β A 的存在不仅改变了即往认为 β A 只来自 APP 异常剪切的概念, 而且也支持上述 β , γ 分泌酶剪切活性的存在。这些“正常”的 β A 氨基端及羧基端的氨基酸构成都有显著的异质性, 这或许是不同分泌酶作用的序列特异性不同或者是一类酶作用的结果^[13, 14]。近年来对上述各种 (类) 分泌酶进行了众多的研究并获得一些成果, 如 β 分泌酶的序列特异性较高, 仅作用于锚定于质膜上的底物; γ 分泌酶的序列特异性则较低等等^[15]。以上发现或许能够说明为何 β A 的羧基端更具异质性。此外, 也发现了一些具有上述活性的酶, 如明胶酶 (gelatinase) A 就具有 β 分泌酶的活性^[16]。但目前为止这些分泌酶的细胞定位及作用方式尚不清楚。

由于细胞表面标记的 APP 可被细胞摄取, 并且在胞内体-溶酶体中有完整的 APP 及 P10 等更大的羧基端片段的存, 因而有理由认为 APP 及其与膜相连的羧基端剪切产物可被内化摄取并进一步降解。由于亮抑酶肽等溶酶体酶抑制剂可以使包含

β A 的一系列羧基端片段生成量增加, 故此这一系列的羧基端片段可能是在溶酶体中剪切形成的。这些羧基端片段可能被溶酶体中的其他酶, 如组织蛋白酶 (cathepsin) S 等, 进一步降解而释放出 β A^[17]。由于删除胞质内段的 APP 分子仍可产生 APPs 及 β A, 部分 APP 分子也可能直接由反式 Golgi 网定向于胞内体-溶酶体而进行加工剪切。布雷菲得菌素 (brefeldin) A 可完全抑制 β A 的产生也表明 APP 在 Golgi 体中转送为产生 β A 所必需。但究其何种机制调节 APP 分子的分拣和细胞内的定位并进而影响 β A 的生成目前未见报道。

关于影响或调节 β A 生成的机制目前知之甚少, 跨膜信号传递可以影响 APP 的不同剪切方式。如蛋白激酶 A (PKA)^[18]、蛋白激酶 C (PKC)^[19] 激活时可以使 APPs 的释放增加, β A 的生成减少。但由于 APP 本身并无磷酸化状态的改变 (PKC), 该过程可能是通过激活另一种蛋白 (可能是 α 分泌酶) 而发挥作用。上述跨膜信号可由神经递质、生长因子及细胞因子与相应的受体结合后介导。如乙酰胆碱及 5-羟色胺 (serotonin) 在与相应的受体 (分别为 muscarinic receptors M1 and M3 及 5-HT2a and 5-HT2c^[20]) 结合后即表现出上述效应。但该方面的详细机制尚有待于进一步阐明。

总之, 随着对 APP 生理功能的了解及代谢加工机制的研究, APP 及 β A 在 AD 中的作用将日渐明了, 从而可能找到一些治疗和预防措施以阻断或减缓 AD 进程。

参 考 文 献

- 1 Hensley K, Carney J M, Mattson M P, *et al.* A model for β amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (8): 3270~3274
- 2 Yan S D, Chen X, Fu J, *et al.* RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 1996, **382** (6593): 685~691
- 3 Pollard H B, Arispe N, Rojas E. Ion channel hypothesis for Alzheimer amyloid peptide neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol*. 1995, **15** (5): 513~526
- 4 Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, *et al.* Expression of V₆₄₂ APP mutant cause cellular apoptosis as Alzheimer trait-linked phenotype. *EMBO J*, 1996, **15** (3): 498~509
- 5 Ikezu T, Okamoto T, Komatsuzaki K, *et al.* Negative transactivation of cAMP response element by familial Alzheimer's mutants of APP. *EMBO J*, 1996, **15** (10): 2468~2475
- 6 Suzuki N, Cheung T T, Cai X-D, *et al.* An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (APP717) mutants. *Science*, 1994, **264** (5163): 1336~1340
- 7 Cai X-D, Golde T E, Younkin S G. Release of excess amyloid β

- protein from a mutant amyloid β protein precursor. Science, 1993, **259** (5094): 514~ 516
- 8 Citron M, Westaway D, Xia W, *et al.* Mutant presenilin of Alzheimer's disease increases production of 42-residue amyloid β protein in both transfected cells and transgenic mice. Nat Med, 1997, **3** (1): 67~ 72
 - 9 Xia W, Zhang J, Perez R, *et al.* Interaction between amyloid precursor protein and presenilin in mammalian cells: Implication for the pathogenesis of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (15): 8208~ 8213
 - 10 Guo Q, Sopher B L, Furukawa K, *et al.* Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β peptide: involvement of calcium and oxyradicals. J Neurosci, 1997, **17** (11): 4212~ 4222
 - 11 Mattson M P, Barger S W, Cheng B, *et al.* β -amyloid precursor protein metabolites and loss of neural Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. Trends Neurosci, 1993, **16** (10): 409~ 414
 - 12 Moechars D, Lorent K, De Strooper B, *et al.* Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the α -secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. EMBO J, 1996, **15** (6): 1265~ 1274
 - 13 Haass C, Capell A, Citron M, *et al.* The Vacuolar H^{+} -ATPase inhibitor bafilomycin A_1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild type β amyloid precursor protein. J Biol Chem, 1995, **270** (11): 6186~ 6192
 - 14 Klafki H W, Abramowski D, Swoboda R, *et al.* The carboxyl termini of β -amyloid peptide 1~ 40 and 1~ 42 are generated by distinct γ -secretase activities. J Biol Chem, 1996, **271** (45): 28655~ 28659
 - 15 Selkoe D J, Yamazaki T, Citron M, *et al.* The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid β protein. Ann N Y Acad Sci, 1996, **777**: 57~ 64
 - 16 Le Page R N, Fosang A J, Fuller S J, *et al.* Gelatinase A possesses a β -secretase-like activity in cleaving the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. FEBS Lett, 1995, **377** (2): 267~ 270
 - 17 Munger J S, Haass C, Lemere C A, *et al.* Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A β peptides: a distinct role for cathepsin S. Biochem J, 1995, **311** (Pt 1): 299~ 305
 - 18 Xu H, Sweeney D, Greengard P, *et al.* Metabolism of Alzheimer β -amyloid precursor protein: regulation by protein kinase A in intact cells and in a cell-free system. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (9): 4081~ 4084
 - 19 Hung A-Y, Selkoe D J. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of β amyloid precursor protein. EMBO J, 1994, **13** (3): 534~ 542
 - 20 Nitsch R M, Deng M, Growdon J H, *et al.* Serotonin 5-HT $_2\text{a}$

and 5-HT $_2\text{c}$ receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. J Biol Chem, 1996, **271** (8): 4188~ 4194

Advances in the β -Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease. CHEN Pei-Li, TONG Tarr-Jun, ZHANG Zong-Yu (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a primary neurodegenerative disorder mainly affecting aged people over 60 years old. It is characterized by extracellular senile plaques (SPs) and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) in patients' brains. The major component of SP is β -amyloid peptide (βA) with molecular weight of about 4 ku which is a neurotoxic derivative of β -amyloid precursor protein (APP) and can cause cell damage mainly through oxidative stress and being able to form calcium channels in lipid bilayers. The precursor, APP, whose function is not yet elucidated in detail but evidence exists that it may mediate cell adhesion, maintain synaptic plasticity and so on, can be processed in conventional secretory way by several putative secretases and alternatively in endosomal/lysosomal way. Longer βA is more predisposed to aggregate to form SP than its shorer counterpart, so some APP mutants may cause familial AD through producing more longer βA s or increasing the production of shorter ones. The changes of some factors which are important for the metabolism of APP, for example, mutations of presenilins, may also cause AD by increased generation of βA .

Key words Alzheimer's disease, β -amyloid precursor protein, β -amyloid peptide

抗真菌药物作用靶酶羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶研究*

季海涛 张万年 周有骏
(第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶是普遍存在于高等植物、真菌和哺乳动物体内的 P450 蛋白, 是氮唑类抗真菌药

* 军队“九五”重点课题 (96z030) 和国家自然科学基金资助课题 (39470830). 收稿日期: 1997-10-07, 修回日期: 1998-02-23