



## 酶抑制剂及其构效优化在阿尔茨海默病中的应用\*

储超扬<sup>1)</sup> 肖彪<sup>1)</sup> 单江晖<sup>1)</sup> 陈是燊<sup>1)</sup> 张楚霞<sup>1)</sup> 周钰愉<sup>1)</sup> 方甜园<sup>1)</sup> 林志成<sup>1)</sup>  
谢凯<sup>2)</sup> 徐淑君<sup>1)</sup> 李丽萍<sup>1,2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup> 宁波大学医学部生理与病理学科, 宁波 315211; (<sup>2)</sup> 宁波大学附属第一医院康复科, 宁波 315211)

**摘要** 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经系统退行性病变, 而临床上缺乏有效治疗 AD 的药物。近些年来研究发现, 多种酶抑制剂如胆碱酯酶抑制剂、单胺氧化酶抑制剂、分泌酶抑制剂等能改善胆碱能系统的障碍、A $\beta$  的产生和沉积、Tau 蛋白的过度磷酸化、氧化应激损伤、突触可塑性下降等 AD 发生发展的不同环节, 从而改善 AD 症状和认知功能。本文综述了近年来酶抑制剂或抑制剂构效优化靶向调节胆碱酯酶、单胺氧化酶、分泌酶等在 AD 治疗中的研究进展, 以期 AD 的治疗和药物研发提供新思路。

**关键词** 阿尔茨海默病, 乙酰胆碱酯酶抑制剂, 单胺氧化酶抑制剂,  $\beta$  分泌酶抑制剂,  $\gamma$  分泌酶抑制剂, 糖原合成酶激酶抑制剂, 抑制剂构效优化

**中图分类号** R74

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0007

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿的进行性发展的神经退行性疾病, 临床主要表现为记忆障碍、失语、失用、失认、视空间能力损伤等。调查研究显示, 随着中国老年人口数量的增加, 2050 年 AD 患病人数将是 2015 年的 2.35 倍<sup>[1]</sup>。这意味着若无有效干预和治疗措施, 中国 AD 患病人数将会大幅度增长, 这对家庭和社会而言都将是巨大的经济负担。AD 的主要发病机制包括  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ) 代谢异常、神经元纤维缠结、神经递质障碍、神经炎症、脑肠轴功能紊乱等。目前临床上被批准使用治疗 AD 的经典药物包括他克林 (Tacrine)、多奈哌齐 (Donepezil)、卡巴拉汀 (Rivastigmine)、加兰他敏 (Galanthamine)、美金刚 (Memantine) 等, 然而这些药物无法治愈 AD, 只起到部分改善、延缓症状作用, 且存在较严重的不良反应, 例如他克林有严重的肝毒性<sup>[2]</sup>、多奈哌齐有胃肠道不良反应<sup>[3]</sup>。美国于 2021 年上市的阿杜卡奴单抗 (Aducanumab) 和 2023 年上市的仑卡奈单抗 (Lecanemab), 两种药物可以减少 A $\beta$  数量, 延缓疾病进展, 但仍然存在脑出血、脑水肿等不良反应, 需长期评估安全性和耐受性<sup>[4-5]</sup>。目前没有有效

效治疗 AD 的药物出现, 因此亟待研发治疗 AD 的药物。研究表明, 多种酶参与 AD 疾病的发生与发展, 针对酶抑制剂或抑制剂构效优化研发药物, 可能可以加快推动 AD 治疗进度。本文综述近年来酶抑制剂或抑制剂构效优化靶向调节胆碱酯酶、单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO)、 $\beta$  分泌酶 ( $\beta$ -secretase)、 $\gamma$  分泌酶 ( $\gamma$ -secretase, GS)、糖原合成酶激酶 (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 等在 AD 治疗中的研究进展和作用机制 (图 1), 以期 AD 的治疗和药物研发提供新思路。

\* 国家自然科学基金 (82001155), 浙江省自然科学基金 (Y23H090031), 浙江省省属高校基本科研业务费专项资金 (SJLY2023008), 宁波市自然科学基金 (2023J068), 浙江省医药卫生科技计划 (2022KY1144), 浙江省中医药科技计划 (2023ZL162), 宁波市重点研发计划 (2023Z173), 宁波市教育规划课题 (2023YGH003), 宁波大学教研项目 (JYXMXZD2023030), 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) (2022R405A045), 宁波大学“大学生科技创新计划” (2023SRIP1919, 2023SRIP1938) 和宁波大学海洋生物医药学科创新引智基地 (D16013) 资助。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0574-87609594, E-mail: liliping@nbu.edu.cn

收稿日期: 2024-01-04, 接受日期: 2024-03-14

## 1 胆碱酯酶抑制剂对AD的治疗作用

早期胆碱能假说被用来解释AD的发病机制, 研究发现, AD患者基底前脑Meynert基底核内胆碱能神经元严重丢失<sup>[6-7]</sup>, 脑内胆碱含量减少<sup>[8]</sup>, 而通过阻断胆碱能系统可以模拟出类似AD患者学习记忆能力下降症状<sup>[9]</sup>。乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)和丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BuChE)是两种主要的胆碱酯酶, 可以降解中枢乙酰胆碱(acetylcholine, ACh), AChE和BuChE表达水平增高可能诱发AD<sup>[10]</sup>, 提示通过胆碱酯酶抑制剂干预可能起到治疗AD的作用。

天然的植物提取化合物Umbelliferone (UMB)具有抑制AChE的活性。7~8周龄健康SD大鼠腹内注射东莨菪碱(SCOP, 1.5mg/(kg·d))建立记忆损伤模型后, 再口服UMB (100 mg/(kg·d))治疗, 发现UMB通过降低AChE活性和增强脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)等的表达, 改善SCOP诱导的记忆缺陷, 提示UMB通过抑制AChE可以改善学习和记忆能力<sup>[11]</sup>。一种多草药配方Medha Plus (MP)具有抗胆碱酯酶的活性, 且MP在1 μmol/L剂量下显示出与多奈哌齐相似的活性。SD成年大鼠海马CA1区注射Aβ寡聚体溶液(4.5 μg/侧)诱导散发AD模型大鼠后, 口服人等效剂量(human equivalent dose, HED: 40 g/L MP, 10 ml)和大鼠等效剂量(rat equivalent dose, RED: 40 g/L MP, 310 μl)的MP, 发现MP治疗可以显著抑制大鼠海马和皮质的AChE活性, 降低大鼠海马体的活性氧生成, 并清除Aβ和改善大鼠的记忆缺陷。同样, 家族性AD模型5×FAD小鼠, 通过口服HED和小鼠等效剂量(mouse equivalent dose, MED: 40 g/L MP, 61.5 μl)的MP, 改善了小鼠突触蛋白的表达和认知障碍<sup>[12]</sup>。此外, 从皮海绵科动物中提取一种名为Aaptamine的生物碱, Aaptamine通过氢键或π-π堆积与电鳗乙酰胆碱酯酶(*ee*AChE)、马血清丁酰胆碱酯酶(*eq*BuChE)的催化阴离子位点(CAS)和外周阴离子位点(PAS)结合, 发挥双重酶的抑制作用。在氯化铝(AlCl<sub>3</sub>)的诱导斑马鱼AD模型中, 给予低(5 μmol/L)、中(10 μmol/L)、高(20 μmol/L)不同剂量的Aaptamine治疗, 发现中、高剂量的Aaptamine治疗后显著改善了斑马鱼的运动障碍和反应速率, 与多奈哌齐(阳性组,

8 μmol/L)治疗效果相似, 提示Aaptamine在运动和反应障碍方面具有良好的治疗效果<sup>[13]</sup>。通过计算机分子对接模拟预测苹果中的天然化合物叶酸(PubChem CID: 135398658)可作为BuChE抑制剂, 苹果中的天然化合物脱抑素(PubChem CID: 12000657)可用作AChE抑制剂<sup>[14]</sup>。此外, 天然蜂蜜具有抑制胆碱酯酶的作用, 其中百里香蜂蜜和荞麦蜂蜜对AChE抑制效果最高。SCOP诱导Swiss小鼠口服蜂蜜(30 mg/kg) 15 d后, 全脑AChE活性降低<sup>[15]</sup>, 且发现蜂蜜中的酚类物质具有良好的抗ChE的作用, 蜂蜜总酚含量与抗ChE呈正相关<sup>[16-17]</sup>。阿达纳市和土耳其其余各地生产的向日葵蜂蜜具有抗胆碱酯酶活性, 表现出抑制AChE和BuChE的双重作用, 提示植物花粉的来源不同, 其抑制效果不同。摄入向日葵蜂蜜10 g/d可以对抗AD, 但蜂蜜的加工和保存会降低酶的抑制活性<sup>[18]</sup>。

基于多奈哌齐药效团的化学合成法是寻找有效抑制胆碱酯酶的方法。将带异色满酮结构的(±)-7,8-二羟基-3-甲基-异色满-4-酮-B ((±)-7,8-dihydroxy-3-methyl-isochroman-4-one-B, (±)-XJP-B)和多奈哌齐的药效团融合, 合成了新的异色满酮衍生物。评估发现, 在异色满酮衍生物10a~10s、13a~13p(表1)中, 10a是最有效的、综合型的胆碱酯酶抑制剂, 用IC<sub>50</sub>表示引起50%抑制时的浓度, 对*ee*AChE的IC<sub>50</sub>为1.61 nmol/L。异色满酮衍生物10a可与AChE的CAS位点和PAS位点结合, 从而有效地抑制AChE活性。通过硫黄素T(thioflavin T, ThT)检测和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)测定表明, 异色满酮衍生物10a还可以中等程度抑制Aβ和抗氧化活性, 提示异色满酮衍生物10a具有抑制AChE等多重功效, 可望作为一种防治AD的先导化合物<sup>[19]</sup>。另一项研究同样利用化学合成技术获得15种苯并咪唑氨基甲酸酯(benzimidazole carbamate), 其中化合物15d(表1)(IC<sub>50</sub>=0.62 μmol/L)和21d(表1)(IC<sub>50</sub>=0.15 μmol/L)表现出了良好的抑制人重组丁酰胆碱酯酶(*h*BuChE)的作用, 同时还激活大麻素受体2(cannabinoid receptor type 2, CB2R)产生神经保护作用。Swiss小鼠脑室内注射Aβ<sub>25-35</sub>肽(3 mmol/L)构建急性诱导AD模型小鼠, 再通过腹内注射化合物15d(0.1~3 mg/kg)治疗, 连续给药1周, 发现化合物15d通过抑制BuChE和激动CB2R受体发挥

双重保护效果,且呈剂量依赖性地减缓A $\beta_{25-35}$ 肽诱发的学习障碍<sup>[20]</sup>。此外,二苯甲基引中入苄支架合成一系列新型的苄基化合物7~23(表1),通过体外实验证实了苄基化合物对 $eqBuChE$ 具有选择性的抑制作用,其中苄基化合物22( $IC_{50}=(0.038\pm 0.001)\mu\text{mol/L}$ )具有最强抑制活性,通过ThT测定法发现其浓度10 $\mu\text{mol/L}$ 可以抑制A $\beta$ 聚集达37.4%,实验证实,苄基化合物不仅有效抑制胆碱酯酶的活性,而且还可以抑制A $\beta$ 聚集,具有多靶点的治疗效果<sup>[21]</sup>。

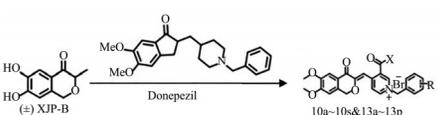
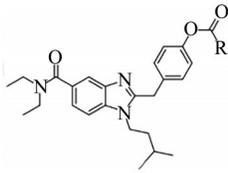
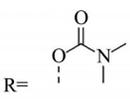
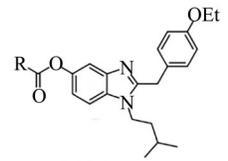
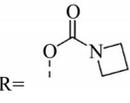
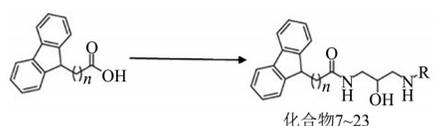
化合物磷亚基衍生物被称为一种有效的酶抑制剂。三苯基磷亚基衍生物8c(表1)是一种非选择性胆碱酯酶抑制剂,对AChE( $IC_{50}=97.04\text{ nmol/L}$ )和BuChE( $IC_{50}=84.83\text{ nmol/L}$ )都具有抑制效果,其中对AChE具有最高活性的抑制能力。ThT测定发现,三苯基磷亚基衍生物8c( $IC_{50}=302.36\text{ nmol/L}$ )可以抑制A $\beta_{1-42}$ 聚集。SCOP诱导的Swiss白化小鼠口服三苯基磷亚基衍生物8c(1 mg/kg)和多奈哌齐(1 mg/kg,阳性对照)后,发现化合物8c可改善SCOP诱导的认知障碍,且其神经保护活性与多

奈哌齐相似,提示化合物8c可作为治疗AD的候选药物<sup>[22]</sup>。另外,通过合成新型磷腈衍生物,也可以抑制AChE,其中化合物8b(表1)( $IC_{50}=34.96\text{ nmol/L}$ )具有同时结合AChE的PAS和CAS位点,表现出竞争性抑制的作用。ThT测试表明,化合物8b可抑制金属Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>诱导的A $\beta_{1-42}$ 的聚集,同时口服化合物8b(1 mg/kg)可改善SCOP诱导的Swiss白化小鼠的记忆损伤<sup>[23]</sup>。

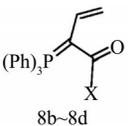
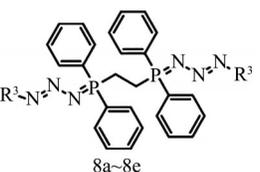
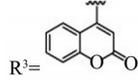
综上所述,提取天然化合物筛选抗胆碱酯酶活性物质,或人工合成化合物靶向抑制AChE、BuChE的CAS位点和PAS位点,通过单一或双重抑制AChE和BuChE活性,都可以有效缓解AD症状。针对胆碱酯酶的抑制,研发天然化合物或人工化合物优化,都有利于寻找治疗AD的先导化合物。在部分研究的行为学实验中,天然或人工合成的化合物表现出改善AD模型动物认知的作用,说明胆碱酯酶的确是一个抗AD的有效靶点,但值得注意的是,双抑制剂可能会增加不良反应的发生率<sup>[24]</sup>。

Table 1 Effect of enzyme inhibitors and their conformational optimization on cholinesterase inhibitory activity

表1 酶抑制剂及其构效优化对胆碱酯酶抑制活性的影响

化合物结构	化合物编号	基团	抑制活性 ( $IC_{50}$ )	参考文献
	10a	X=Me R=H	$eeAChE$ 1.61 nmol/L	[19]
	15d		$hBuChE$ 0.62 $\mu\text{mol/L}$	[20]
	21d		$hBuChE$ 0.15 $\mu\text{mol/L}$	[20]
	22	R=Cycloheptylmethyl $n=0$	$eqBuChE$ 0.038 $\mu\text{mol/L}$	[21]

续表1

化合物结构	化合物编号	基团	抑制活性 ( $IC_{50}$ )	参考文献
 8b-8d	8c	X=Me	AChE 97.04 nmol/L BuChE 84.83 nmol/L	[22]
 8a-8e	8b	 R <sup>3</sup> =	AChE 34.96 nmol/L	[23]

Me: 甲基即-CH<sub>3</sub>; *ee*AChE: 电鳗乙酰胆碱酯酶; *h*BuChE: 人重组丁酰胆碱酯酶; Cycloheptylmethyl: 环庚甲基; *eq*BuChE: 马血清丁酰胆碱酯酶。

## 2 靶向单胺氧化酶的化合物对AD多种病理机制的抑制作用

MAO是一种存在于哺乳动物催化神经递质脱氨的酶。在大脑中MAO导致多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)等神经递质浓度的变化与AD的发病有关。活化的MAO,一方面通过促进 $\beta$ 分泌酶和 $\gamma$ 分泌酶活性,导致A $\beta$ 的沉积,另一方面通过损伤胆碱能神经元,诱导认知障碍。而且,MAO还诱发氧化应激,导致神经变性<sup>[25]</sup>。因此降低MAO水平,可能减缓AD的多种神经病理。

从唇形科植物迷迭香中分离的一种天然酚酸类化合物迷迭香酸(rosmarinic acid, RA),具有抑制MAO和A $\beta$ 的作用。5月龄的Tg2576小鼠喂养RA 10个月,可增强大脑内DA信号通路和皮层单胺水平,抑制脑内A $\beta$ 聚集。RA还降低大脑黑质(SN)和腹侧被盖区(VTA)MAO-B水平,提示RA可能通过增加大脑单胺水平和减少A $\beta$ 的沉积,改善AD的病理<sup>[26]</sup>。微生物来源的MAO抑制剂近年来不断被研究,从海洋来源的链霉菌CNQ-031中分离出了3种化合物:两种色满酮类(化合物1、2)和一种吩嗪类(化合物3)(表2)。化合物1具有强选择性*h*MAO-A抑制作用( $IC_{50}$ =2.70  $\mu$ mol/L),化合物2具有低选择性人重组B型单胺氧化酶(*h*MAO-B)抑制作用( $IC_{50}$ =3.42  $\mu$ mol/L),而化合物3对*h*MAO-A和*h*MAO-B几乎没有抑制活性,且色满酮类化合物1和2都是可逆竞争性抑制剂<sup>[27]</sup>。内源性真菌ELF13来源的提取物对MAO-B抑制活性最高,分离出的5-羟基-2-甲基-色满-4-酮

(HMC)(表2)对*h*MAO-A( $IC_{50}$ =13.97  $\mu$ mol/L)和*h*MAO-B( $IC_{50}$ =3.23  $\mu$ mol/L)都具有抑制作用,是一种可逆竞争性抑制剂。HMC对MAO-B的亲合力(-7.3 kcal/mol)强于MAO-A(-6.1 kcal/mol)<sup>[28]</sup>。上述微生物来源的化合物表现出抑制MAO的能力,是治疗AD的潜在药物,但遗憾的是缺乏证明其有效性的体内实验。

将两种化合物的杂合改良,合成新型的化合物,对AD的治疗表现出更高效果。羟基吡啶酮的铁螯合能力可抑制氧化应激,色酮衍生物具有MAO抑制作用,将羟基吡啶酮和色酮衍生物3-羧色酮杂交,合成一系列化合物17a~17l(表2),其中17d具有良好的铁螯合潜力( $pFe^{3+}$ =18.52)和选择性*h*MAO-B抑制活性( $IC_{50}$ =(67.02 $\pm$ 4.3) nmol/L),可显著改善SCOP诱导ICR小鼠的认知损伤,提示改造后的化合物具有多种治疗效果<sup>[29]</sup>。香豆素衍生物具有MAO抑制作用,但将香豆素衍生物和羟基吡啶酮杂交合成新的化合物,发现绝大多数化合物都具有良好的铁螯合能力,而且其中化合物27b(表2)( $IC_{50}$ =0.68  $\mu$ mol/L)和27j(表2)( $IC_{50}$ =0.86  $\mu$ mol/L)表现出最优的MAO-B抑制能力<sup>[30]</sup>,提示新型的化合物具备*h*MAO-B抑制活性和铁螯合能力的协同治疗效果。其他MAO-B活性支架如异恶唑衍生物、查耳酮衍生物等与羟基吡啶酮杂交可能也会有相应的作用。10~12月龄的APP/PS1小鼠海马齿状回中GFAP阳性星形胶质细胞存在异常 $\gamma$ 氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA),利用不可逆性的MAO-B抑制剂司来吉兰(Selegiline)在短期内可降低APP/PS1小鼠脑内GABA水平,但长期使用会导致GABA合成酶——二胺氧化酶

(diamine oxidase, DAO) 基因代偿性激活。人工合成的含有联苯结构的  $\alpha$  氨基酰胺衍生物 KDS2010 (表2), 表现出强效、可逆性、选择性抑制 *h*MAO-B ( $IC_{50}=7.6$  nmol/L) 的能力, 克服了长期使用引起的不良代偿机制。8~11 月龄的 APP/PS1 小鼠每天口服 10 mg/kg 的 KDS2010, 持续 4 周, 发现 KDS2010 可以抑制星形胶质细胞的增生和异常 GABA 的产生, 增强突触传递。10~12 月龄的 APP/PS1 小鼠口服 10mg/kg 的 KDS2010 持续 28 d (短期) 或 37 d (长期), 均可以改善 AD 小鼠学习和记忆的损伤, 提示改造后可逆性的 MAO-B 抑制剂对 AD 的长期治疗具有更大的优势 [31]。

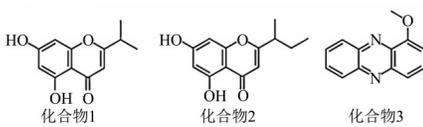
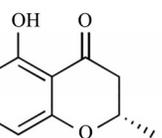
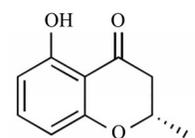
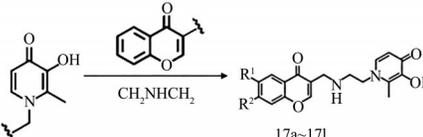
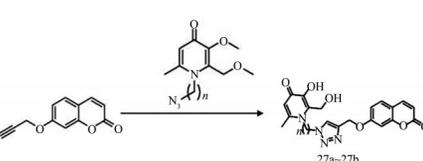
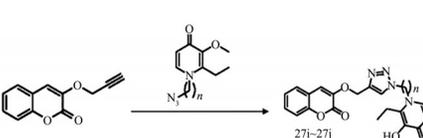
在 MAO-B 抑制剂 1-H-吡咯-[3,2-c]喹啉 (PQ) 中掺入氟原子, 合成新型化合物 26 (表2) (1-(3-氯苄基)-4-(4,4-二氟哌啶-1-基)-1H-吡咯[3,2-c]喹啉), 化合物 26 是可逆的、有效 *h*MAO-B 抑制剂。氟原子的引入使化合物对 *h*ERG (human ether-a-go-related gene) 通道表现出低亲和力, 因此克

服心脏毒性作用。0.25  $\mu$ mol/L 化合物 26 可以保护 C8-D1A 细胞 (小鼠脑星形胶质细胞) 免受阿霉素 (doxorubicin, DOX) 诱导的细胞毒性。新物体识别测试 (novel object recognition, NOR) 试验发现, 化合物 26 改善了 SCOP 诱导的 SD 大鼠认知损伤, 强迫游泳实验 (forced swimming test, FST) 中发现, 化合物 26 对 Swiss 白化小鼠产生抗抑郁作用, 提示 MAO-B 抑制剂 PQ 进行氟化修饰可作为 AD 的干预药物 [32]。

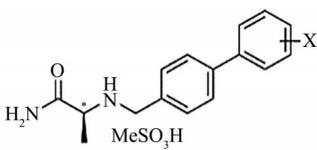
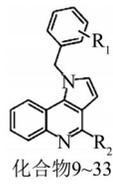
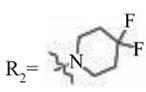
综上所述, 抗 MAO-B 活性支架如香豆素衍生物、色酮类衍生物和羟基吡啶酮杂交改良成新型的化合物, 通过铁螯合和 MAO-B 抑制剂双靶向治疗 AD。另外, 可逆性的 MAO-B 抑制剂可以防止 DAO 基因代偿性激活, 支持 AD 的长期治疗。天然迷迭香酸、海洋来源色满酮类化合物、微生物提取物 HMC、MAO 抑制剂引入基团修饰或氟原子, 都是潜在治疗 AD 的药物。

Table 2 Effect of enzyme inhibitors and their conformational optimization on monoamine oxidase inhibitory activity

表2 酶抑制剂及其构效优化对单胺氧化酶抑制活性的影响

化合物结构	化合物编号	基团	抑制活性 ( $IC_{50}$ )	参考文献
 <p>化合物1      化合物2      化合物3</p>	1	/	<i>h</i> MAO-A 2.70 $\mu$ mol/L	[27]
	2	/	<i>h</i> MAO-B 3.42 $\mu$ mol/L	
	HMC	/	<i>h</i> MAO-A 13.97 $\mu$ mol/L <i>h</i> MAO-B 3.23 $\mu$ mol/L	[28]
 <p>17a~17i</p>	17d	R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =CH <sub>3</sub> O	<i>h</i> MAO-B 67.02 nmol/L	[29]
 <p>27a~27b</p>	27b	$n=3$	<i>h</i> MAO-B 0.68 $\mu$ mol/L	[30]
 <p>27i~27j</p>	27j	$n=3$	<i>h</i> MAO-B 0.86 $\mu$ mol/L	[30]

续表2

化合物结构	化合物编号	基团	抑制活性 ( $IC_{50}$ )	参考文献
	KDS2010	X=4'-CF <sub>3</sub>	hMAO-B 7.6 nmol/L	[31]
	26	R <sub>1</sub> =3-Cl R <sub>2</sub> = 	hMAO-B 9 nmol/L	[32]

HMC: 5-羟基-2-甲基-色满-4-酮; hMAO-A: 人重组A型单胺氧化酶; hMAO-B: 人重组B型单胺氧化酶。

### 3 MAO抑制剂联合胆碱酯酶抑制剂对AD的协同治疗作用

MAO和胆碱酯酶都是AD疾病治疗的靶点。胆碱酯酶抑制剂是一种基于胆碱能假说的AD姑息疗法。MAO抑制剂和胆碱酯酶抑制剂都可以改善认知功能,联合MAO和胆碱酯酶的多靶点治疗可能是一种更为有效的治疗方法<sup>[33]</sup>。

天然的提取物是良好的抑制剂来源,从天然常绿阔叶树中提取5种鞣花酸及其衍生物,其中化合物3(表3)是可逆性、竞争性的*ee*AChE ( $IC_{50}$ =10.1  $\mu$ mol/L)和hMAO-B ( $IC_{50}$ =7.27  $\mu$ mol/L)的双作用抑制剂。在细胞毒性实验中,不同浓度(1、3、10、30、50  $\mu$ mol/L)化合物3对细胞MDCK(犬肾细胞)和HL-60(人急性早幼粒白血病细胞)都表现为无明显毒性,提示双效抑制剂化合物3可作为AChE和MAO的多靶点的候选药<sup>[34]</sup>。喹啉衍生物(quinoline)在MAO抑制剂的开发中发挥重要的作用。喹啉衍生物由8-羟基喹啉-2甲酐合成了喹啉硝酮(QNs),其中QN19(表3)是hBuChE ( $IC_{50}$ =(1.06±0.31) nmol/L)和hMAO-B ( $IC_{50}$ =(4.46±0.18)  $\mu$ mol/L)的有效抑制剂,对MAO-B抑制是可逆的。SCOP诱导的Swiss白化小鼠经过双重酶抑制剂QN19治疗后,在主被动回避实验(passive avoidance test, PA)和新物体识别实验中表现出良好的记忆改善作用。在APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9转基因小鼠中,QN19(0.62 mg/(kg·d))皮下给药2个月可降低5月龄小鼠A $\beta$ 负荷,而对10月龄小鼠即便治疗周期延长至4个月A $\beta$ 降低也不理想,提示双重酶抑制剂QN19可能仅针对早期疾病治疗<sup>[35]</sup>。查耳酮支架是设计MAO-B和胆碱酯酶抑制

剂的起点,通过吗啉取代查尔酮的苯基环,获得9种含有吗啉的化合物MO1~MO9(表3),可作为治疗AD的候选化合物。其中MO5可以透过血脑屏障(blood brain barrier, BBB),是AChE ( $IC_{50}$ =6.1  $\mu$ mol/L)和hMAO-B ( $IC_{50}$ =1.31  $\mu$ mol/L)的双效抑制剂。在HeLa细胞(一种人源性的癌细胞系)实验中,40 mg/L双靶点抑制剂MO5可降低H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的活性氧升高,提示MO5除了具有双效抑制AChE和MAO作用,可能具有抗氧化的功效<sup>[36]</sup>。另一项研究中,通过杂合查尔酮-维生素E-多奈哌齐合成一系列化合物17a~17f(表3),化合物17f是混合型AChE(大鼠乙酰胆碱酯酶*rat*AChE  $IC_{50}$ =0.41  $\mu$ mol/L, *ee*AChE  $IC_{50}$ =1.88  $\mu$ mol/L)和选择性MAO-B的抑制剂(hMAO-B  $IC_{50}$ =8.8  $\mu$ mol/L)。化合物17f通过与AChE的CAS和PAS结合,可以显著抑制人重组乙酰胆碱酯酶(hAChE)诱导的A $\beta$ 的聚集,抑制率为53.9%,化合物17f还能够抑制和解聚A $\beta$ <sub>1-42</sub>自聚合为淀粉样纤维,抑制率和解聚率分别为78%和72.3%,提示化合物17f可作为多靶点抗AD的先导化合物<sup>[37]</sup>。基于相同原理的策略,胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐和MAO抑制剂色酮杂有着光明的前景。利用酰胺将色酮和多奈哌齐的苄基哌啶组合合成一系列化合物4a~4g和5a~5g(表3)。其中,化合物5c可以穿透BBB,是一种混合型AChE (*ee*AChE  $IC_{50}$ =0.37  $\mu$ mol/L)和竞争性BuChE抑制剂(*eq*BuChE  $IC_{50}$ =5.24  $\mu$ mol/L),同时也是可逆性和选择性的hMAO-B抑制剂( $IC_{50}$ =0.272  $\mu$ mol/L,选择指数(selectivity index, SI)=247),表现出了平衡的酶抑制能力。此外,不同浓度(6.25、12.5、25、50  $\mu$ mol/L)的化合物5c对大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12)无毒,以上特性支撑

化合物5c可能成为抗AD候选药物<sup>[38]</sup>。

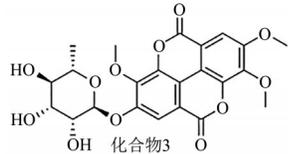
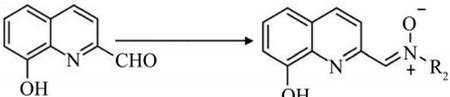
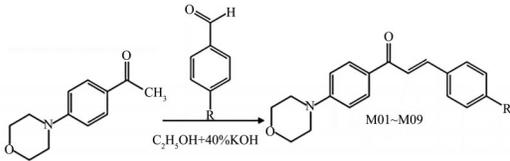
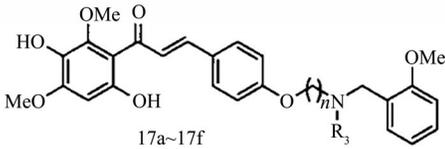
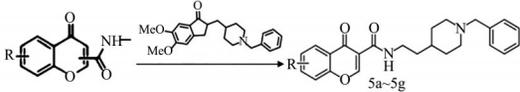
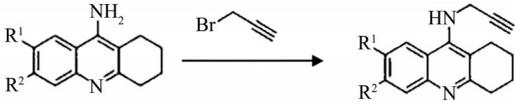
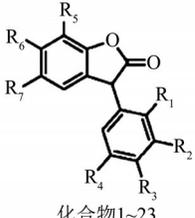
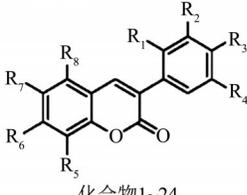
炔丙基可与MAO-B的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)辅因子结合,从而抑制酶活性。他克林是一种非选择性胆碱酯酶抑制剂,他克林及其衍生物通过炔丙基化,合成的一系列化合物9~15(表3),可能成为抗AD的多靶点药物。一种名为7-苯氧基-N-(丙基-2-炔-1-基)-1,2,3,4-四氢吡啶-9-胺盐酸盐的化合物15,具有*hAChE* ( $IC_{50} = (1.472 \pm 0.024) \mu\text{mol/L}$ )、*hBChE* ( $IC_{50} = (0.659 \pm 0.077) \mu\text{mol/L}$ )和*hMAO-B* ( $IC_{50} = (40.39 \pm 5.98) \text{nmol/L}$ )抑制作用,有着平衡的药理学特征,是一种值得研究的新配体。评估化合物15在人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y,  $IC_{50} = (23.39 \pm 2.55) \mu\text{mol/L}$ )和肝癌细胞(HepG2,  $IC_{50} = (16.94 \pm 0.77) \mu\text{mol/L}$ )中的毒性发现,化合物15在1  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下是相对安全的,但毒性仍然高于他克林<sup>[39]</sup>。苯并咪唑酮及其衍生物是一种潜在的抗AD等精神病药物,也是一种良好的胆碱酯酶抑制剂。一项研究中合成了一系列3-芳基苯并咪唑酮衍生物1~23(表3),化合物13是可逆性*eeAChE* ( $IC_{50} = (0.28 \pm 0.01) \mu\text{mol/L}$ )和*eqBuChE* ( $IC_{50} = (9.91 \pm 0.48) \mu\text{mol/L}$ )抑制剂,同时也抑制大鼠B型单胺氧化酶(*ratMAO-B*,  $IC_{50} = (11.24 \pm 0.72) \mu\text{mol/L}$ )。此外大多数化合物都表现出中等至高的抑制活性。采用相同的方法体外测定3-芳基香豆素类衍生物1~24(表3)对相同来源酶的抑制活性,发现化合物22具有较强的ChE的抑制活性(*eeAChE*  $IC_{50} = 3.04 \mu\text{mol/L}$ 、*eqBuChE*  $IC_{50} = 8.37 \mu\text{mol/L}$ ),且体外*ratMAO-B*抑制活性最强( $IC_{50} = 27.03 \mu\text{mol/L}$ ),表现出最强的抗氧化能力。化合物20表现出选择性*eeAChE*抑制活性( $IC_{50} = 19.21 \mu\text{mol/L}$ ),化合物2表现出选择性*eqBuChE*抑制活性( $IC_{50} = 13.06 \mu\text{mol/L}$ )。AlCl<sub>3</sub>诱导健康的斑马鱼构建的AD模型,用10、50、100、1 000 mg/L 4种不同浓度的化合物2、化合物20和化合物22处理斑马鱼,仅化合物22表现出改善了斑马鱼的运动能力,提示化合物22具有双效抑制剂作用,有着更加优异的治疗作用。相比较而言,3-芳基苯并咪唑酮类化合物比3-芳基香豆素化合物对AChE选择性抑制作用更高,且不良反应较弱<sup>[40-41]</sup>。将具有酶抑制功效的1,2,3,4-四氢异喹啉和苄基哌啶基团与具有抗炎抗氧化功效的肉桂酸分别杂合,合成一系列肉桂酸衍生物4a~4p(表3)和5a~5p,也具

有良好的治疗AD潜力。化合物4e相比于其他化合物,具有*eqBuChE* ( $IC_{50} = 2.1 \mu\text{mol/L}$ ), *hBuChE* ( $IC_{50} = 2.5 \mu\text{mol/L}$ )和*hMAO-B* ( $IC_{50} = 1.3 \mu\text{mol/L}$ )多重抑制效果,表现出了平衡的抑制能力。SH-SY5Y细胞暴露于25  $\mu\text{mol/L}$  A $\beta_{1-42}$ ,然后将5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ 化合物4e分别处理,结果发现化合物4e可以减轻A $\beta$ 的毒性,具有神经保护的作用。另外,用0.2、0.4、0.8 mg/L(最大耐受浓度)化合物4e处理AlCl<sub>3</sub>诱导的斑马鱼AD模型,发现化合物4e呈剂量依赖性地改善斑马鱼运动障碍和反应能力。6周龄昆明小鼠(Kunming mice, KM小鼠)腹内注射SCOP(2 mg/kg)诱导AD模型,然后口服不同剂量(50、10、2 mg/kg)的化合物4e,发现化合物4e呈剂量依赖性的改善小鼠记忆能力<sup>[42]</sup>。联苯衍生物具有对ChE抑制特性,醚连接氨基联苯取代化合物可以对抗AD多种靶点。通过哌啶、环己亚胺、3-甲基哌啶、4-甲基哌啶取代合成一系列衍生物2~17(表3),其中具有3个碳原子的醚连接体的环己亚胺取代的化合物5(*hH<sub>3</sub>R*  $K_i = 9.2 \text{nmol/L}$ ; *eeAChE*  $IC_{50} = 2.63 \mu\text{mol/L}$ ; *hAChE*  $IC_{50} = 16.5 \mu\text{mol/L}$ ; *eqBuChE*  $IC_{50} = 1.30 \mu\text{mol/L}$ ; *hBuChE*  $IC_{50} = 4.61 \mu\text{mol/L}$ ; *hMAO-B*  $IC_{50} = 1.4 \mu\text{mol/L}$ )被认为最具有希望治疗AD的化合物。利用成年Swiss白化小鼠皮下注射SCOP诱导AD模型联合腹腔注射地卓西平(dizocilpine, MK801)诱导精神分裂症模型,构建急性AD和精神分裂双症状模型小鼠,采用腹内注射不同剂量(0、10、15、30 mg/kg)的化合物5,仅15 mg/kg中等剂量化合物5显著减轻了SCOP诱导的记忆障碍,但不影响MK801诱导的精神损伤,而30 mg/kg高剂量起着镇静作用,显著抑制小鼠运动率,对SCOP诱导记忆损伤的没有显著性改善<sup>[43]</sup>,提示中等剂量化合物5可能通过抑制AChE、BuChE和MAO活性改善记忆障碍。

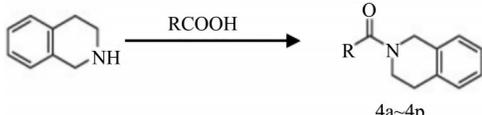
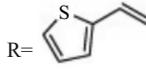
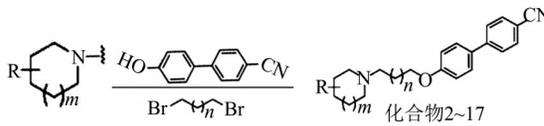
综上所述,基于多奈哌齐、他克林等具有胆碱酯酶抑制活性支架和基于色酮和查尔酮等的具有单胺氧化酶的抑制活性支架的杂合化合物,是近来的化学合成的热门方法,合成新型的化合物有望成抗AD的先导化合物。部分新型的化合物在AlCl<sub>3</sub>诱导的斑马鱼、SCOP诱导的AD模型小鼠中表现出改善学习和记忆障碍的作用。相对于单一的抑制剂而言,双效抑制剂既可以改善认知又减缓AD病理,拥有更为广阔的前景,但在临床应用上仍需进一步研究。

**Table 3 Enzyme inhibitors and their conformational optimization for dual inhibition of cholinesterase and monoamine oxidase**

**表3 酶抑制剂及其构效优化对胆碱酯酶和单胺氧化酶的双重抑制作用**

化合物结构	化合物编号	基团	抑制活性 ( $IC_{50}$ )	参考文献
 化合物3	3	/	<i>ee</i> AChE 10.1 $\mu$ mol/L <i>h</i> MAO-B 7.27 $\mu$ mol/L	[34]
 化合物17~19	19	$R_2 = \text{Bn}$	<i>h</i> BuChE 1.06 nmol/L <i>h</i> MAO-B 4.46 $\mu$ mol/L	[35]
 M01-M09	M05	$R =$ $N(\text{CH}_3)_2$	AChE 6.1 $\mu$ mol/L <i>h</i> MAO-B 1.31 $\mu$ mol/L	[36]
 17a~17f	17f	$n = 6$ $R_3 = \text{C}_2\text{H}_5$	<i>rat</i> AChE 0.41 $\mu$ mol/L <i>ee</i> AChE 1.88 $\mu$ mol/L <i>h</i> MAO-B 8.8 $\mu$ mol/L	[37]
 5a-5g	5c	$R = 6\text{-OBn}$	<i>ee</i> AChE 0.37 $\mu$ mol/L <i>eq</i> BuChE 5.24 $\mu$ mol/L <i>h</i> MAO-B 0.272 $\mu$ mol/L	[38]
 化合物9~15	15	$R^1 = \text{OPh}$ $R^2 = \text{H}$	<i>h</i> AChE 1.472 $\mu$ mol/L <i>h</i> BChE 0.659 $\mu$ mol/L <i>h</i> MAO-B 40.39 nmol/L	[39]
 化合物1~23	13	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OCH}_3$ $R_3 = \text{OCH}_3$ $R_4 = \text{H}$ $R_5 = \text{H}$ $R_6 = \text{OCH}_3$ $R_7 = \text{OH}$	<i>ee</i> AChE 0.28 $\mu$ mol/L <i>eq</i> BuChE 9.91 $\mu$ mol/L <i>rat</i> MAO-B 11.24 $\mu$ mol/L	[40]
 化合物1~24	22	$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{OH}$ $R_4 = \text{OH}$ $R_5 = \text{OH}$ $R_6 = \text{OH}$ $R_7 = \text{H}$ $R_8 = \text{H}$	<i>ee</i> AChE 3.04 $\mu$ mol/L <i>eq</i> BuChE 8.37 $\mu$ mol/L <i>rat</i> MAO-B 27.03 $\mu$ mol/L	[41]

续表3

化合物结构	化合物编号	基团	抑制活性 ( $IC_{50}$ )	参考文献
 4a-4p	4e	 R=	<i>eg</i> BuChE 2.1 $\mu\text{mol/L}$ <i>h</i> BuChE 2.5 $\mu\text{mol/L}$ <i>h</i> MAO-B 1.3 $\mu\text{mol/L}$	[42]
 化合物2~17	5	R=H m=2 n=1	<i>ee</i> AChE 2.63 $\mu\text{mol/L}$ <i>h</i> AChE 16.5 $\mu\text{mol/L}$ <i>eg</i> BuChE 1.30 $\mu\text{mol/L}$ <i>h</i> BuChE 4.61 $\mu\text{mol/L}$ <i>h</i> MAO-B 1.40 $\mu\text{mol/L}$	[43]

Bn: 苄基; *rat*AChE: 大鼠乙酰胆碱酯酶; *h*AChE: 人重组乙酰胆碱酯酶; Ph: 苯基; *rat*MAO-B: 大鼠B型单胺氧化酶。

#### 4 $\beta$ 分泌酶和 $\gamma$ 分泌酶的抑制剂对A $\beta$ 产生的双重抑制效果

A $\beta$ 是淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 通过淀粉样变性途径产生。APP 首先被  $\beta$  分泌酶 1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 切割生成 C 端片段  $\beta$  (CTF- $\beta$ ), CTF- $\beta$  片段随后被  $\gamma$  分泌酶切割, 将 A $\beta$  释放到细胞外<sup>[44-45]</sup>。细胞外的 A $\beta$  片段会在病理环境下聚集成 A $\beta$  斑块<sup>[46]</sup>。脑实质中的 A $\beta$  斑块会对周围组织产生神经毒性作用, 引起神经炎症, 诱导神经纤维缠结和破坏钙稳态<sup>[47]</sup>。因此通过抑制剂抑制  $\beta$  分泌酶和  $\gamma$  分泌酶, 可以抑制 A $\beta$  的产生 (表4)。

海洋来源的真菌提取物是有效的 BACE1 抑制剂, 可以降低 A $\beta$  的水平, 减轻 A $\beta$  诱发的毒性损伤。一项研究中, 从曲霉菌 MPUC239 中提取出乙酸乙酯 (EtOAc) 和 CHCl<sub>3</sub> 两种物质, 这两种化合物在 10 mg/L 的浓度下均可以抑制 A $\beta$  聚集。从 CHCl<sub>3</sub> 提取物进一步引导分离出了化合物 10 (表5), 可以抑制 BACE1 ( $IC_{50}$ =28.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 活性, 进而抑制 A $\beta$  的聚集。此外, 10  $\mu\text{mol/L}$  的化合物 10 还可以显著减轻 A $\beta$  神经毒性对 SH-SY5Y 细胞的损伤<sup>[48]</sup>。比较有趣的是, 补充雌激素可能成为预防 AD 的一种重要策略。研究人员发现, 4 月龄 C57BL/6 小鼠特异性敲除雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha^{-/-}$ ) 和雌激素受体  $\beta$  (ER $\beta^{-/-}$ ) 后, 持续 7 d 接受皮下注射雌二醇 (E2, 20  $\mu\text{g/次}$ ), 发现 E2 诱导内源性雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha$ )、雌激素受体活性的抑制因子 (REA) 和 BACE1 启动子中的雌激素反应元件 (ERE) 结合, 形成 E2-ER $\alpha$ -REA-ERE 复合物, 从而抑制小鼠脑内 BACE1 的表达。在敲低 REA 的 SH-SY5Y 细胞中, 用 100 nmol/L E2 处理, 发现敲

低 REA 消除 E2 诱导的 BACE1 转录活性下降的效应, 提示 REA 参与抑制 BACE1 的水平。在临床上, 观察到女性 AD 患者皮层的 REA 耗竭现象, 也间接佐证 REA 参与 BACE1 表达的结论。综上所述, E2 可与 REA 和 ER $\alpha$  结合形成复合物, 通过与 BACE1 启动子 ERE 结合, 抑制 BACE1 的水平, 提示补充雌激素可能减少女性患 AD 的风险<sup>[49]</sup>。糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 中存在的一种名为硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 的类别, HS 和肝素 (heparin, Hp) 被证实是 BACE1 的有效抑制剂, 可以抑制 A $\beta$  的产生, 但因存在出血风险的副作用被限制应用。研究人员从沙丁鱼 (*Sardina pilchardus*) 提取到了另一种 GAG, 主要由硫酸软骨素 A (chondroitin sulfate A, CSA) 组成的。当沙丁鱼来源的提取物 GAG 浓度大于 10 mg/L 时, 表现出最大的抑制 BACE1 能力 ( $IC_{50}$ =4.8 mg/L)<sup>[50]</sup>。在远海梭子蟹 (*Portunus pelagicus*) 中发现了另一种 GAGs 提取物, 由缺乏 HS 结构域和 Hp 高度磷酸化区域杂交构成的。在 pH=4.0 条件下, 梭子蟹来源 GAGs 提取物在低浓度 (小于 5 mg/L) 情况下使 BACE1 酶活性增强, 酶最大活化为 625  $\mu\text{g/L}$ , 而浓度等于或高于 5 mg/L 时表现出最大抑制 *h*BACE1 的水平 ( $IC_{50}$ =1.9 mg/L), 抑制率为 90.7%, 结果表明, 梭子蟹来源 GAGs 提取物对 BACE1 呈剂量依赖性的先促进后抑制<sup>[51]</sup>。南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 中也被发现存在着主要由 HS、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 和小部分硫酸皮肤素 (dermatan sulfate, DS) 构成的 GAGs。在浓度为 10 mg/L 时, 发现提取物 F4 ( $IC_{50}$ =4.6 mg/L) 和 F5 ( $IC_{50}$ =5.9 mg/L) 表现出最大抑制 *h*BACE1 的活性, 同样低浓度的提取物 F4 和 F5 也表现出激动剂的作用。

用<sup>[52]</sup>。上述沙丁鱼、远海梭子蟹和南美白对虾来源的3种GAG提取物都呈剂量依赖性地破坏BACE1的稳定性, 有着显著降低的抗凝活性, 表现出相同BACE1酶抑制的机制。海洋来源的非肝素类GAG虽然有着不俗的BACE1酶抑制能力、更小的抗凝活性、更经济的效益和良好的治疗潜力, 但由于其存在着低浓度激动BACE1的特性, 需要进一步实验探究。

安全、有效的药物是长期治疗AD的前提, 高选择性的BACE1抑制剂能减少不良反应的发生。2018年研发出一种名为CNP520(表5)的BACE1抑制剂, CNP520是一种有效的、高选择性的BACE1抑制剂( $hBACE1 IC_{50} = (11 \pm 0.4) \text{ nmol/L}$ ,  $mBACE1 IC_{50} = (10 \pm 0.3) \text{ nmol/L}$ ), 具有安全性高的特点。单次口服CNP520可以显著降低3~4月龄的SD大鼠和4月龄的比格犬脑脊液内的A $\beta$ 浓度。连续6个月口服低剂量(4 mg/(kg·d))和高剂量(40 mg/(kg·d))CNP520可以呈剂量依赖性地降低12~14月龄APP23转基因小鼠前脑中的A $\beta$ 沉积, 减少斑块相关的神经炎症。更振奋人心的临床试验结果显示, CNP520呈剂量依赖性地显著降低60岁以上健康成人脑脊液内A $\beta$ 的含量, 且人体内耐受良好<sup>[53]</sup>。一种基于氢键、疏水和静电力三重相互作用(triple-interaction)稳定化方法将siRNA和半乳糖修饰的聚合物络合成Gal-NP@siRNA, 具有良好的稳定性, 能够通过血糖控制的Glut1介导的内吞作用, 靶向作用于大脑, 不会产生髓鞘再生障碍及肝脏、肾脏的不良反应, 具有良好的转化前景。8月龄APP/PS1小鼠尾静脉注射Gal-NP@siRNA(1 mg/(kg·3d))治疗10周, 结果发现, 药物可以显著降低小鼠海马和皮层的BACE1蛋白水平, 进而减少A $\beta$ 斑块沉积和Tau蛋白的磷酸化, 改善小鼠认知损伤<sup>[54]</sup>。此外, 靶向BACE1的纳米抗体VHH, 从16种VHH中筛选出了VHH-B9, 发现体外抑制 $hBACE1$ 活性最强( $EC_{50} = 99.2 \text{ nmol/L}$ ), 且有着较高的选择性, 对人和小鼠的BACE1有高亲和力, 而对BACE2无亲和力。6周龄APP<sup>NL-G-F</sup>小鼠尾静脉注射AAV-VHH-B9( $1 \times 10^{12} \text{ vg/只}$ ), 结果显示VHH-B9可以抑制小鼠海马和皮层BACE1, 显著降低A $\beta$ 和炎症细胞的水平, 可减缓社交记忆损害。此外, AAV-VHH-B9可以预防APP<sup>NL-G-F</sup>小鼠中的突触效能长时程增强(long-term potentiation, LTP)丢失, 改善突触可塑性, 进而恢复认知功能, 提示VHH-B9是一种有效的靶向治疗AD的新

策略<sup>[55]</sup>。靶向小胶质细胞的BACE1可以减少因广泛BACE1抑制引起髓鞘再生障碍和突触功能障碍的发生。在2月龄5×FAD小鼠构建条件性基因敲除小胶质细胞中BACE1基因, 连续5d腹内注射他莫昔芬(Tamoxifen, 100 mg/kg), 可特异性降低小胶质细胞中BACE1的蛋白质水平, 进而促进小胶质细胞对A $\beta$ 的吞噬, 显著降低皮层和海马的A $\beta$ 水平, 提高突触功能, 并改善5×FAD小鼠的认知功能<sup>[56]</sup>。

$\gamma$ 分泌酶参与A $\beta_{40}$ 和A $\beta_{42}$ 切割, 炎症可以增强 $\gamma$ 分泌酶的活性, 从而促进神经毒性A $\beta_{40}$ 和A $\beta_{42}$ 的产生。研究发现, 干扰素诱导跨膜蛋白3(interferon induced transmembrane protein 3, IFITM3)参与调节 $\gamma$ 分泌酶。在4月龄IFITM3全部敲除(IFITM3 KO)的5×FAD小鼠中, 发现IFITM3 KO可以显著降低 $\gamma$ 分泌酶的活性, 从而显著降低5×FAD小鼠海马和皮层的淀粉样斑块沉积, 提示IFITM3正向调控 $\gamma$ 分泌酶的活性。用炎症因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)和 $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )分别处理小鼠原代神经元和人星形胶质细胞, 发现均可上调IFITM3和增加 $\gamma$ 分泌酶活性, 提示炎症因子可驱动IFITM3和 $\gamma$ 分泌酶介导的A $\beta$ 的产生<sup>[57]</sup>。天然的 $\gamma$ 分泌酶抑制剂( $\gamma$ -secretase inhibitors, GSI)经济效益高, 因此开发GSI有着广阔的前景。来自女贞果实提取物的两个活性成分RF9-C31和RF9-C32中的3-氧-反式-对香豆酰-马斯里酸(反式OCMA), 是一种靶向 $\gamma$ 分泌酶的物质。用浓度0.5、1和5  $\mu\text{mol/L}$ 的反式OCMA处理N2a/APP695细胞, 结果显示, 反式OCMA通过靶向抑制 $\gamma$ 分泌酶活性, 进而呈剂量依赖性降低A $\beta_{38}$ 、A $\beta_{40}$ 和A $\beta_{42}$ 的水平。另外, 6~7月龄的APP/PS1小鼠腹内注射反式OCMA(85  $\mu\text{mol/(kg·d)}$ ), 持续4周, 可以挽救APP/PS1小鼠的LTP缺陷, 重塑突触可塑性<sup>[58]</sup>。

综上所述, 靶向BACE1和GS可以减少A $\beta$ 产生, 但仍需进一步验证药物的毒性和疗效。开发选择性或靶向抑制BACE1的化合物, 以及针对特定细胞类型靶向抑制BACE1, 可减少一些因广泛抑制BACE1、BACE2、组织蛋白酶D(cathepsin D, CatD)等酶引起的不良反应, 是目前的研究重点领域。除此之外, 经济有效的天然来源的BACE1抑制剂和GS抑制剂也是非常有前景的候选药物。

Table 4 Inhibitors targeting  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase for A $\beta$  production表4  $\beta$ 分泌酶和 $\gamma$ 分泌酶的抑制剂对A $\beta$ 产生的抑制作用

动物品系或细胞类型	年龄	干预手段	作用机制	干预效果	参考文献
SH-SY5Y细胞	/	10 $\mu$ mol/L 曲霉菌提取物处理	抑制BACE1活性	显著减轻A $\beta$ 神经毒性和聚集	[48]
ER $\alpha^{-/-}$ 和ER $\beta^{-/-}$ C57BL/6NJ	4月龄	皮下注射20 $\mu$ g的E2, 7 d	E2与REA和ER $\alpha$ 结合形成复合物, 通过与BACE1启动子ERE结合, 抑制BACE1的水平	抑制小鼠脑内BACE1的表达	[49]
APP23	12~14月龄	口服4 mg/(kg·d)、40 mg/(kg·d) CNP520, 6个月	选择性抑制BACE1的活性	呈剂量依赖性地降低小鼠前脑中的A $\beta$ 沉积	[53]
APP/PS1	8月龄	尾静脉注射1 mg/(kg·3d) Gal-NP@siRNA, 10个周期	通过SiRNA特异性地降低小鼠海马和皮层的BACE1蛋白水平	减少A $\beta$ 斑块沉积和Tau蛋白的磷酸化, 改善小鼠认知损伤	[54]
APP <sup>NL-G-F</sup>	6周龄	尾静脉注射1 $\times$ 10 <sup>12</sup> vg/只 AAV-VHH-B9	抑制BACE1的活性	显著降低A $\beta$ 和炎症细胞的水平, 缓解社交记忆损害	[55]
5 $\times$ FAD	2月龄	腹内注射100 mg/kg他莫昔芬, 5 d	降低小胶质细胞中BACE1的水平	降低小鼠皮层和海马的A $\beta$ 水平, 提高突触功能, 改善小鼠的认知功能	[56]
5 $\times$ FAD	4月龄	敲除IFITM3	降低 $\gamma$ 分泌酶的活性	显著降低小鼠海马和皮层内的淀粉样斑块的沉积	[57]
N2a/APP695细胞	/	0.5、1和5 $\mu$ mol/L的反式OCMA处理	抑制 $\gamma$ 分泌酶的活性	剂量依赖性地降低A $\beta$ <sub>38</sub> 、A $\beta$ <sub>40</sub> 和A $\beta$ <sub>42</sub> 的水平	[58]

SH-SY5Y细胞: 人神经母细胞瘤细胞; ER $\alpha^{-/-}$ 和ER $\beta^{-/-}$ C57BL/6NJ: 敲除了雌激素受体ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 的C57BL/6NJ小鼠; E2: 雌二醇; REA: 雌激素受体辅助抑制因子; ERE: 雌激素反应元件; Gal-NP@siRNA: 一种基于三重相互作用稳定的糖基化siRNA纳米药物; AAV-VHH-B9: 一种名为B9的基于腺相关病毒的单链抗体; 他莫昔芬: Tamoxifen; IFITM3: 干扰素诱导跨膜蛋白3; N2a/APP695细胞: 稳定表达人APP695的神经母细胞瘤N2a细胞; 反式OCMA: 3-O-*trans-p*-coumaroyl maslinic acid.

## 5 调控GSK-3 $\beta$ 对AD神经毒性的治疗作用

GSK-3 $\beta$ 是Tau蛋白磷酸化的主要激酶, GSK-3 $\beta$ 也参与APP的切割过程, 影响A $\beta$ 的产生, 而A $\beta$ 的产生会正反馈调节GSK-3 $\beta$ 的活性, 进而促进Tau磷酸化。GSK-3 $\beta$ 通过直接或间接方式调节A $\beta$ , 进而影响Tau磷酸化, 进一步引起神经元纤维缠结<sup>[59]</sup>。因此, 靶向调控GSK-3 $\beta$ 成为一种治疗AD的潜在方法。

褪黑素是一种调节睡眠的激素, 同时也是细胞激酶的调节激素。有研究发现, 50  $\mu$ mol/L的褪黑素处理冈田酸(okadaic acid, OA)诱导的N2a细胞, 可以通过降低N2a细胞中的GSK-3 $\beta$  mRNA的转录表达, 抑制总体GSK-3 $\beta$ 的蛋白质水平, 进而降低磷酸化(p-Thr181和p-Thr212-pSer214) Tau蛋白的水平, 减少对神经细胞N2a的损伤, 提示褪黑素可能通过降低GSK-3 $\beta$ 水平抑制Tau的过度磷酸化<sup>[60]</sup>。值得注意的是, GSK-3 $\beta$ 不仅通过抑制Tau蛋白磷酸化影响细胞微管稳定性, 还可通过坍塌反应调节蛋白2(collapsin response mediator

proteins-2, CRMP2)影响微管的稳定性。6月龄的SAMP8小鼠给予黄连解毒汤和三黄泻心汤灌胃治疗, 可抑制大脑皮层GSK-3 $\beta$ 活性和抑制CRMP2磷酸化, 改善微管的稳定性, 防止老化引起的短期工作记忆缺陷。除此之外, 黄连和三黄两种中药配方中的黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素三种黄酮类化合物在体外呈浓度依赖性地抑制GSK-3 $\beta$ 的活性, 但作用有限, 可能存在其他的有效成分参与了酶活性的调控<sup>[61]</sup>。程序性死亡受体1(programmed death-1, PD-1)/程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)是一组常见的免疫检查点。一项研究发现, PD-1和PD-L1的水平在9~12月龄的APP/PS1小鼠脑内、9~10月龄5 $\times$ FAD小鼠脑内和SH-SY5Y-APP细胞系中显著上调。9~10月龄5 $\times$ FAD小鼠腹腔注射PD-1抗体(10 mg/kg, 2次/3 d), 持续1个月, 干扰PD-1和PD-L1的结合, 可显著升高小鼠海马体内的pSer9-GSK-3 $\beta$ 的水平, 降低GSK-3 $\beta$ 的活性和p-Tau蛋白的水平, 减轻认知能力的受损, 提示PD-1抗体靶向调控pSer9-GSK-3 $\beta$ 活性, 是治疗AD的方法之一<sup>[62]</sup>。

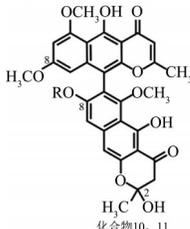
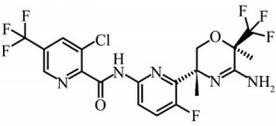
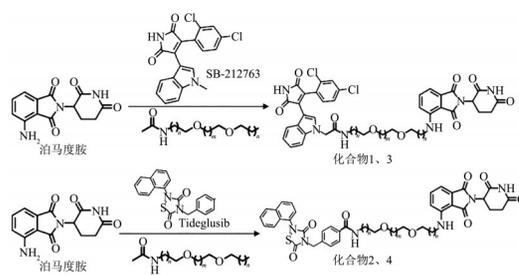
H<sub>2</sub>S可通过与GSK-3 $\beta$ 的某一位点结合, 形成GSK-3 $\beta$ 硫疏基化修饰, 调节酶活性。AD患者皮层和3 $\times$ Tg-AD模型小鼠中大脑皮层和海马中的H<sub>2</sub>S合成酶胱硫醚- $\gamma$ -裂合酶 (cystathionine- $\gamma$ -lyase, CSE) 表达减少, 整体硫疏基化水平降低。6月龄3 $\times$ Tg-AD小鼠腹腔注射NaGYG (H<sub>2</sub>S供体, 100 mg/(kg $\cdot$ d)), 连续12周, 发现NaGYG释放出的H<sub>2</sub>S通过GSK-3 $\beta$ 的Cys218位点硫疏基化, 抑制GSK-3 $\beta$ 活性和Tau蛋白磷酸化, 进而改善AD小鼠的运动障碍和认知缺陷。因此, 体内通过H<sub>2</sub>S代谢途径靶向GSK-3 $\beta$ 的Cys218位点硫疏基化修饰, 可能是治疗AD的新兴靶点<sup>[63]</sup>。一种血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抑制剂vatalanib可通过GSK-3 $\beta$ 的Ser9位点磷酸化, 改善AD的病理。3月龄的5 $\times$ FAD小鼠给予vatalanib (20 mg/(kg $\cdot$ d)), 持续14 d, 发现增加GSK-3 $\beta$ 的Ser9位点的磷酸化和抑制GSK-3 $\beta$ 、Tau蛋白的磷酸化, 减少皮层中的A $\beta$ 斑块数量和面积<sup>[64]</sup>, 提示vatalanib可作为AD的候选药物。除了经典的抑制剂, 基于蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera, PROTACs) 技术的抑制剂具有更优良的调控GSK-3 $\beta$ 的特性。两种不

同的GSK-3 $\beta$ 抑制剂SB-216763和Tideglusib通过不同长度的连接体, 分别与E3连接酶招募剂泊马度胺 (Pomadomide) 相连接, 合成了化合物1~4 (表5), 其中化合物1是最有效的PROTAC。不同浓度的化合物1 (0.5~1  $\mu$ mol/L) 处理SH-SY5Y细胞, 通过泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin proteasome system, UPS) 介导, 降低GSK-3 $\beta$ 的水平, 进而显著降低由硫酸铜和A $\beta$ <sub>25-35</sub>肽在SH-SY5Y细胞中诱导产生的神经毒性<sup>[65]</sup>。

综上所述, 通过内源性激素调控GSK-3 $\beta$ 的活性, 是更经济的预防AD的策略。天然草药中的黄酮类化合物有着抑制GSK-3 $\beta$ 的效应, 但作用有限, 仍需进一步研究。靶向修饰GSK-3 $\beta$ 的不同位点, 如通过H<sub>2</sub>S途径进行GSK-3 $\beta$ 硫疏基化修饰, 调控GSK-3 $\beta$ 的活性, 有着巨大的发展空间。现有的GSK-3 $\beta$ 抑制剂SB-216763和Tideglusib通过PROTACs技术改进, 获得更大的抑制效果和更优的调控特性。以上不同途径皆是抑制GSK-3 $\beta$ 的活性, 来抑制Tau蛋白或CRMP2等下游靶蛋白的磷酸化, 进而改善神经纤维缠结, 最终改善AD的学习和记忆能力。

Table 5 Effect of enzyme inhibitors and their conformational optimization on BACE1 and GSK-3 $\beta$  inhibitory activity

表5 酶抑制剂及其构效优化对BACE1和GSK-3 $\beta$ 抑制活性的影响

化合物结构	化合物编号	基团	抑制活性 ( $IC_{50}$ )	参考文献
	10	R=H	BACE1 28.0 $\mu$ mol/L	[48]
	CNP520	/	<i>h</i> BACE1 11 nmol/L <i>m</i> BACE1 10 nmol/L	[53]
	1	$n=2$ $m=3$	GSK-3 $\beta$ 833 nmol/L	[65]

*h*BACE1: 人重组 $\beta$ 分泌酶1; *m*BACE1: 小鼠 $\beta$ 分泌酶1。

## 6 其他酶的抑制剂对AD的治疗作用

上述综述靶向胆碱酯酶、MAO、 $\beta$ 分泌酶、 $\gamma$ 分泌酶、GSK-3 $\beta$ 的抑制剂及其抑制剂优化在治疗AD方面的潜力，然而在AD疾病中仍然存在着其他酶类，可能成为治疗AD的潜在靶点。

a. 脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN) 抑制剂。一项研究发现，9月龄的APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9转基因小鼠口服非瑟酮衍生物CMS121药物 (34 mg/(kg·d))，连续3个月，发现CMS121通过抑制FASN，进而抑制过多的脂质过氧化，减少了AD小鼠海马体内脂质过氧化标志物4-羟基壬烯醛 (4-HNE) 的水平 and 星形胶质细胞标志物GFAP的水平，减少神经炎症，改善了AD小鼠的认知障碍<sup>[66]</sup>。因此脂质过氧化可能参与了AD的病理，靶向调控FASN的水平或者活性，可以纠正紊乱的脂质代谢，可能起到预防和治疗AD的作用，提示FASN可能成为治疗AD的潜在靶点之一。

b. 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 抑制剂 (HDACs参与基因表达的表现遗传修饰)。HDACs介导的组蛋白去乙酰化，参与调节神经元突触可塑性。在一项研究中，15  $\mu$ mol/L的I类HDACs抑制剂HDACi (BG45) 处理APP<sup>swe</sup>转染的SH-SY5Y细胞，可特异性地抑制细胞HDAC1和HDAC2的表达，提高细胞活力，降低APP的表达，增加突触相关蛋白表达。此外，在体内实验中，APP/PS1小鼠腹腔注射BG45 (30 mg/(kg·d))，发现BG45可以抑制小鼠海马神经元中的HDAC1和HDAC2的表达，增加突触相关蛋白的表达，降低A $\beta$ 的沉积和p-Tau蛋白的水平，挽救突触损伤和海马神经元的丢失，提示BG45通过特异性地抑制HDAC1和HDAC2改善AD的病理。BG45还参与早期AD突触的保护作用<sup>[67]</sup>。2月龄APP/PS1小鼠分别在2月和6月用BG45 (30 mg/(kg·d)) 治疗，持续12 d，分析发现，BG45通过抑制AD小鼠内嗅皮层中的HDAC1、HDAC2和HDAC3的表达，增加H3K9和K14的乙酰化，通过促进下游CREB/BDNF/NF- $\kappa$ B途径，进而增加突触相关蛋白的表达和突触可塑性，改善突触功能和神经炎症。I类HDACi在突触可塑性和神经炎症的调节中发挥着重要的作用，而且连续注射两次比仅注射一次的治疗效果更加显著，提示通过重复给药BG45，对AD的治疗可能更有效<sup>[68]</sup>，提示HDAC的抑制剂是治疗AD

的潜在药物。

c. 血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制剂 (ACE参与肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)，调节机体血压、血容量和水盐平衡)。正常衰老的情况下皮层ACE1和血管紧张素II (angiotensin II, AngII) 蛋白水平升高，而AD患者皮层中ACE1在疾病早期活性增强<sup>[69]</sup>。在AD患者脑脊液中ACE1活性显著升高，且与t-Tau和p-Tau相关。这些结果提示，ACE可能参与AD的发生发展<sup>[70]</sup>。现有普利类的抗高血压药物也在AD动物模型中得到证实，具有改善AD病理的作用。有研究发现，AlCl<sub>3</sub> (100 mg/kg) 诱导Wister大鼠记忆损伤模型，口服BBB穿透性较高的培哚普利 (Perindopril, 0.5~1 mg/kg) 治疗，发现大鼠海马体内的A $\beta$ <sub>42</sub>、AChE、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和TNF- $\alpha$ 水平显著降低，且记忆障碍改善，提示培哚普利具有改善AD的病理作用<sup>[71]</sup>。分别口服卡托普利 (Captopril, 30 mg/kg) 和培哚普利 (5 mg/kg)，发现卡托普利比培哚普利有着更强的降低大鼠脑内A $\beta$ <sub>42</sub>水平的能力，卡托普利对改善AlCl<sub>3</sub>诱导Wister模型大鼠的记忆认知能力也比培哚普利强<sup>[72]</sup>。从上述来看，现有ACE1抑制剂如卡托普利和培哚普利可改善AD大鼠的认知和病理表现，提示ACE1抑制剂有望发展为干预AD的潜在药物。

d. 精氨酸酶 (arginase, ARG) 抑制剂 (精氨酸参与体内的尿素代谢，同时精氨酸酶在大脑内存在两种形式：精氨酸酶I (ARGI) 和精氨酸酶II (ARGII))。精氨酸酶的活性与一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 有关，抑制精氨酸酶可阻止衰老有关的内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 功能丧失<sup>[73]</sup>。有研究发现，AD患者海马体内精氨酸酶的活性显著提高<sup>[74]</sup>。4月龄的3 $\times$ Tg-AD小鼠给予精氨酸酶抑制剂L-正缬氨酸 (1.5 mg/d) 治疗，持续10周，可降低海马体内淀粉样变性区ARGI的表达，增加树突棘的密度和突触相关蛋白的表达，降低A $\beta$ 寡聚体和原纤维的水平，减少小胶质细胞增生，并改善3 $\times$ Tg-AD小鼠的认知缺陷<sup>[75]</sup>。A $\beta$ 介导的局部免疫反应与精氨酸的代谢相关，4月龄的3 $\times$ Tg-AD小鼠口服L-正缬氨酸 (250 mg/L)，持续2.5个月，可显著降低小鼠海马区的局部免疫反应和A $\beta$ 的水平，提示L-正缬氨酸可延缓AD的病理进

展<sup>[76]</sup>。抑制精氨酸酶可缓解AD小鼠病理, 提示精氨酸酶可能成为治疗AD的一个新型靶点, 但遗憾的是在AD方面的相关研究数据还相对较少。

### 7 展 望

目前AD药物的研发几乎是一座难以逾越的大山, 一度被世界几大制药巨头公司称之为“天坑”。药物治疗相对物理干预又有着其独特的优势, 如用药依从性高、起效快、接受度高, 因此AD药物的研发虽困难重重, 但仍然有着巨大的潜力和吸引力。将近20年之久, 美国食品药品监督管理局(FDA)才新批准了新药Aducanumab的上市, 但此药一年单人治疗成本需要花费将近5.6万美元, 这并非普通家庭能够负担得起。据研究显示, 2015年全球痴呆的治疗成本估计为9 575.6亿美元, 2030年将达到2.54万亿美元, 2050年将达到

9.12万亿美元<sup>[77]</sup>。随着中国老龄化的进展, 经济、有效、安全的药物将会受到广大家庭的青睐。近年来, 参与AD进展的关键酶受到了研究者的广泛关注, 通过靶向抑制AChE、MAO、BACE1、GS、GSK-3 $\beta$ 等酶的活性, 有望改善AD相关的神经病理和认知, 以达到防治AD的目的(图1)。此外, 靶向多种酶的抑制剂可能存在着协同作用, 有着更大的治疗前景。本文综述的部分研究中应用的是天然化合物, 其来源广泛和经济, 在成本控制上有着独特的优势。而对化合物进行构象的优化, 可增强抑制效应, 有着更为优异的理化性质, 在AD治疗上更加有效。但值得注意的是, 药物研究大部分仅局限于体外或基于动物模型的体内研究, 仍需进一步评估临床应用价值。另外, 靶向药物的剂量、给药方式、BBB通透性和生物毒性等问题, 也需要在动物模型和人体内进一步评估。近年来, 不断出

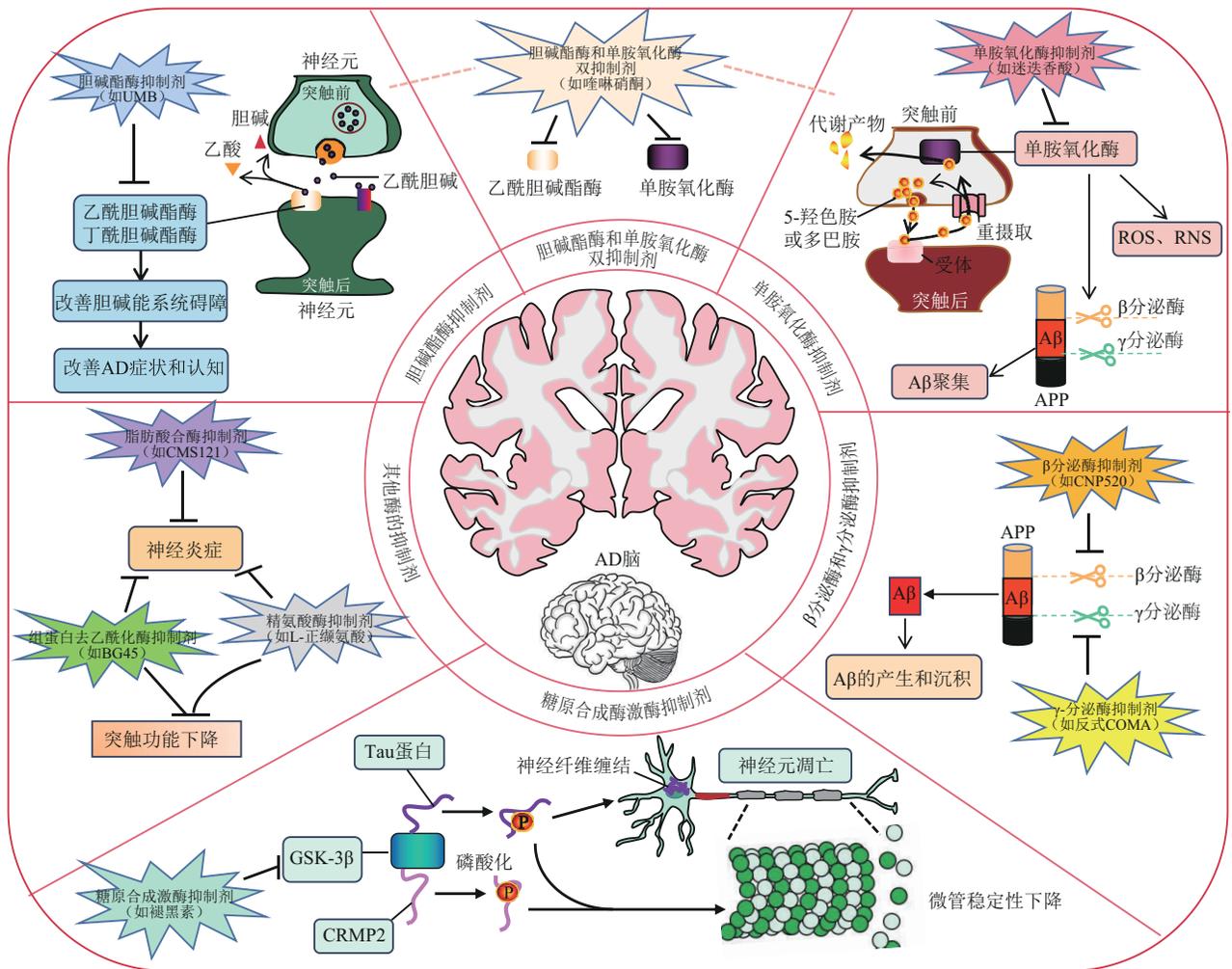


Fig. 1 The mechanism of various enzyme inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease

图1 各类酶抑制剂在治疗阿尔茨海默病中的作用机制

ROS: 活性氧类 (reactive oxygen species); RNS: 活性氮 (reactive nitrogen species)。

现新的药物进入到临床试验,为酶抑制剂的研发带来了曙光。BACE是A $\beta$ 肽产生过程中的关键酶,靶向抑制BACE研发出多种候选药物。Verubecestat (MK-8931)是默克公司(Merck)开发的一种降低脑脊液A $\beta$ 水平的药物,在55~85岁轻度和中度AD患者III期临床试验(NCT01739348、NCT01953601)研究表明,可使脑脊液中A $\beta_{40}$ 和A $\beta_{42}$ 含量降低81%,并提高患者日常活动能力,但是会出现跌倒和受伤、自杀意念、体重减轻、皮疹、睡眠障碍、头发颜色改变等不良反应,由于不良事件风险增加和没有达到减缓疾病的进展,因此Verubecestat面临失败<sup>[78]</sup>; Elenbecestat (E2609)是药企卫材(Eisai)和百健(Biogen)公司联合研发一种胍类衍生物的口腹BACE1抑制剂,可降低脑脊液中A $\beta$ 水平,但其潜在疗效和不良事件情况比安慰剂更糟糕,终止于III期临床试验(NCT03036280)<sup>[79]</sup>。LY3202626是礼来(Eli Lilly)公司研发的BACE1抑制剂,在II期临床试验(NCT02791191、NCT03367403)中发现其治疗效果与安慰剂相比没有显著性影响,而停止临床试验;Atabecestat (JNJ-54861911)是杨森(Janssen)公司开发的一款有效穿透BBB的BACE1活性抑制剂,旨在降低脑脊液A $\beta$ 水平,但在双盲试验(ALZ2002)和扩展试验(ALZ2004)中发现患者认知能力下降、肝酶升高趋势与Atabecestat有关,试验提前终止<sup>[80]</sup>。新型乙酰胆碱酯酶抑制剂八氢氨基吡啉(octohydroaminoacridine)在II期多中心随机对照试验中显著改善了轻至中度AD患者的认知<sup>[81]</sup>。GSK-3 $\alpha/\beta$ 抑制剂Benfotiamine在IIa期随机安慰-对照临床试验中对轻度认知功能障碍(mild cognitive impairment, MCI)和轻度AD患者是安全的,且可能有效,但仍需更大规模的临床数据加以验证<sup>[82]</sup>。截至2023年1月1日,在ClinicalTrials.gov上检索出了GSK-3 $\beta$ 抑制剂AL001和胆碱酯酶抑制剂IVL3003进入了II期临床试验,脂肪酸合酶抑制剂CMS121和胆碱酯酶抑制剂GB5001进入了I期临床试验<sup>[83]</sup>。尽管针对酶抑制剂的药物开发也在面临着失败,但仍然有大量的药物进入临床试验,说明针对这些酶的抑制剂在AD的治疗中仍有着巨大的潜力。在未来老龄化的社会大背景下,期望有着更多靶向关键酶的药物投入研发和使用,为AD的预防和治疗提供丰富的选择。

## 参 考 文 献

- [1] 王英全,梁景宏,贾瑞霞,等. 2020-2050年中国阿尔茨海默病患病情况预测研究. 阿尔茨海默病及相关病, 2019, **2**(1): 289-298  
Wang Y Q, Liang J H, Jia R X, *et al.* Chinese Journal of Alzheimer's Disease and Related Disorders. 2019, **2**(1): 289-298
- [2] Watkins P B, Zimmerman H J, Knapp M J, *et al.* Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. JAMA, 1994, **271**(13): 992-998
- [3] Rogers S L, Farlow M R, Doody R S, *et al.* A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. Neurology, 1998, **50**(1): 136-145
- [4] Yang P, Sun F. Aducanumab: the first targeted Alzheimer's therapy. Drug Discov Ther, 2021, **15**(3): 166-168
- [5] Wu W, Ji Y, Wang Z, *et al.* The FDA-approved anti-amyloid- $\beta$  monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Eur J Med Res, 2023, **28**(1): 544
- [6] Whitehouse P J, Price D L, Struble R G, *et al.* Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science, 1982, **215**(4537): 1237-1239
- [7] Burns A, Whitehouse P, Arendt T, *et al.* Alzheimer's disease in senile dementia: loss of neurones in the basal forebrain. Whitehouse, P., Price, D., Struble, R., Clarke, A., Coyle, J. and DeLong, M. Science (1982), 215, 1237-1239. Int J Geriatr Psychiatry, 1997, **12**(1): 7-10
- [8] Richter J A, Perry E K, Tomlinson B E. Acetylcholine and choline levels in post-mortem human brain tissue: preliminary observations in Alzheimer's disease. Life Sci, 1980, **26**(20): 1683-1689
- [9] Bartus R T, Dean R L, Beer B, *et al.* The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, 1982, **217**(4558): 408-414
- [10] Nordberg A, Ballard C, Bullock R, *et al.* A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. Prim Care Companion CNS Disord, 2013, **15**(2): PCC.12r01412
- [11] Choi G Y, Kim H B, Cho J M, *et al.* Umbelliferone ameliorates memory impairment and enhances hippocampal synaptic plasticity in scopolamine-induced rat model. Nutrients, 2023, **15**(10): 2351
- [12] Paidi R K, Sarkar S, Ambareen N, *et al.* Medha Plus - A novel polyherbal formulation ameliorates cognitive behaviors and disease pathology in models of Alzheimer's disease. Biomed Pharmacother, 2022, **151**: 113086
- [13] Miao S, He Q, Li C, *et al.* Aaptamine - a dual acetyl - and butyrylcholinesterase inhibitor as potential anti-Alzheimer's disease agent. Pharm Biol, 2022, **60**(1): 1502-1510
- [14] Jamal Q M S, Khan M I, Alharbi A H, *et al.* Identification of natural compounds of the apple as inhibitors against cholinesterase for the treatment of Alzheimer's disease: an *in silico* molecular docking

- simulation and ADMET study. *Nutrients*, 2023, **15**(7): 1579
- [15] Warad VB, Shastri R, Habbu P, *et al.* Preparation and screening of Swarnaprashana for nootropic activity. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis*, 2014, **4**(3): 170
- [16] Szwajgier D, Baranowska-Wójcik E, Winiarska-Mieczan A, *et al.* Honeys as possible sources of cholinesterase inhibitors. *Nutrients*, 2022, **14**(14): 2969
- [17] Baranowska-Wójcik E, Szwajgier D, Winiarska-Mieczan A. Honey as the potential natural source of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Plant Foods Hum Nutr*, 2020, **75**(1): 30-32
- [18] Şahin B. Can sunflower honey have a protective effect against Alzheimer's disease?. *J Omg Chem Res*, 2021, **6**(1): 6-9
- [19] Li X, Jia Y, Li J, *et al.* Novel and potent acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease from natural ( $\pm$ )-7, 8-dihydroxy-3-methyl-isochroman-4-one. *Molecules*, 2022, **27**(10): 3090
- [20] Spatz P, Steinmüller S A M, Tutov A, *et al.* Dual-acting small molecules: subtype-selective cannabinoid receptor 2 agonist/butyrylcholinesterase inhibitor hybrids show neuroprotection in an Alzheimer's disease mouse model. *J Med Chem*, 2023, **66**(9): 6414-6435
- [21] Pasięka A, Panek D, Zaręba P, *et al.* Novel drug-like fluorenyl derivatives as selective butyrylcholinesterase and  $\beta$ -amyloid inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem*, 2023, **88-89**: 117333
- [22] El-Hussieny M, Abd-El-Maksoud M A, Soliman F M, *et al.* Dual-target ligand discovery for Alzheimer's disease: triphenylphosphoranylidene derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase and  $\beta$ -amyloid aggregation. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2023, **38**(1): 2166040
- [23] El-Sayed N F, El-Hussieny M, Ewies E F, *et al.* New phosphazine and phosphazide derivatives as multifunctional ligands targeting acetylcholinesterase and  $\beta$ -Amyloid aggregation for treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Chem*, 2020, **95**: 103499
- [24] Liston D R, Nielsen J A, Villalobos A, *et al.* Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*, 2004, **486**(1): 9-17
- [25] Manzoor S, Hoda N. A comprehensive review of monoamine oxidase inhibitors as Anti-Alzheimer's disease agents: a review. *Eur J Med Chem*, 2020, **206**: 112787
- [26] Hase T, Shishido S, Yamamoto S, *et al.* Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid  $\beta$  aggregation by increasing monoamine secretion. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 8711
- [27] Oh J M, Lee C, Nam S J, *et al.* Chromone derivatives as monoamine oxidase inhibitors from marine-derived MAR4 clade *Streptomyces* sp. CNQ-031. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, **31**(7): 1022-1027
- [28] Jeong G S, Kang M G, Han S A, *et al.* Selective inhibition of human monoamine oxidase B by 5-hydroxy-2-methyl-chroman-4-one isolated from an endogenous lichen fungus *Daldinia fissa*. *J Fungi (Basel)*, 2021, **7**(2): 84
- [29] Zhang C, Zhang Y, Lv Y, *et al.* Chromone-based monoamine oxidase B inhibitor with potential iron-chelating activity for the treatment of Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2023, **38**(1): 100-117
- [30] Mi Z, Gan B, Yu S, *et al.* Dual-target anti-Alzheimer's disease agents with both iron ion chelating and monoamine oxidase-B inhibitory activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, **34**(1): 1489-1497
- [31] Park J H, Ju Y H, Choi J W, *et al.* Newly developed reversible MAO-B inhibitor circumvents the shortcomings of irreversible inhibitors in Alzheimer's disease. *Sci Adv*, 2019, **5**(3): eaav0316
- [32] Grychowska K, Olejarz-Maciej A, Blicharz K, *et al.* Overcoming undesirable *h*ERG affinity by incorporating fluorine atoms: a case of MAO-B inhibitors derived from 1 H-pyrrolo-[3, 2-c]quinolines. *Eur J Med Chem*, 2022, **236**: 114329
- [33] Ibrahim M M, Gabr M T. Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, 2019, **14**(3): 437-440
- [34] Oh J M, Jang H J, Kang M G, *et al.* Acetylcholinesterase and monoamine oxidase-B inhibitory activities by ellagic acid derivatives isolated from *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 13953
- [35] Knez D, Diez-Iriepa D, Chioua M, *et al.* 8-Hydroxyquinolylnitrones as multifunctional ligands for the therapy of neurodegenerative diseases. *Acta Pharm Sin B*, 2023, **13**(5): 2152-2175
- [36] Sasidharan R, Eom B H, Heo J H, *et al.* Morpholine-based chalcones as dual-acting monoamine oxidase-B and acetylcholinesterase inhibitors: synthesis and biochemical investigations. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, **36**(1): 188-197
- [37] Sang Z, Song Q, Cao Z, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of chalcone-vitamin E-donepezil hybrids as multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, **37**(1): 69-85
- [38] Wang X B, Yin F C, Huang M, *et al.* Chromone and donepezil hybrids as new multipotent cholinesterase and monoamine oxidase inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. *RSC Med Chem*, 2020, **11**(2): 225-233
- [39] Chrienova Z, Nepovimova E, Andrys R, *et al.* Privileged multi-target directed propargyl-tacrines combining cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, **37**(1): 2605-2620
- [40] Yang J, Yun Y, Miao Y, *et al.* Synthesis and biological evaluation of 3-arylbenzofuranone derivatives as potential anti-Alzheimer's disease agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020, **35**(1): 805-814
- [41] Yang J, Zhang P, Hu Y, *et al.* Synthesis and biological evaluation of 3-arylcoumarins as potential anti-Alzheimer's disease agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, **34**(1): 651-656
- [42] Wang K, Shi J, Zhou Y, *et al.* Design, synthesis and evaluation of cinnamic acid hybrids as multi-target-directed agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Chem*, 2021, **112**: 104879
- [43] Godyń J, Zaręba P, Łażewska D, *et al.* Cyanobiphenyls: novel H<sub>3</sub>

- receptor ligands with cholinesterase and MAO B inhibitory activity as multitarget compounds for potential treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Chem*, 2021, **114**: 105129
- [44] Hampel H, Hu Y, Hardy J, *et al.* The amyloid- $\beta$  pathway in Alzheimer's disease: a plain language summary. *Neurodegener Dis Manag*, 2023, **13**(3): 141-149
- [45] Hampel H, Hardy J, Blennow K, *et al.* The amyloid- $\beta$  pathway in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*, 2021, **26**(10): 5481-5503
- [46] Guo T, Zhang D, Zeng Y, *et al.* Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 2020, **15**(1): 40
- [47] Alawode D O T, Fox N C, Zetterberg H, *et al.* Alzheimer's disease biomarkers revisited from the amyloid cascade hypothesis standpoint. *Front Neurosci*, 2022, **16**: 837390
- [48] Fujihara K, Hashimoto T, Sasaki H, *et al.* Inhibition of A $\beta$  aggregation by naphtho- $\gamma$ -pyrone derivatives from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. MPUC239. *J Nat Med*, 2023, **77**(3): 516-522
- [49] Cui J, Ait-Ghezala G, Sambamurti K, *et al.* Sex-specific regulation of  $\beta$ -secretase: a novel estrogen response element (ERE) - dependent mechanism in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2022, **42**(6): 1154-1165
- [50] Mycroft-West C J, Devlin A J, Cooper L C, *et al.* Inhibition of BACE1, the  $\beta$ -secretase implicated in Alzheimer's disease, by a chondroitin sulfate extract from *Sardina pilchardus*. *Neural Regen Res*, 2020, **15**(8): 1546-1553
- [51] Mycroft-West C J, Cooper L C, Devlin A J, *et al.* A glycosaminoglycan extract from *Portunus pelagicus* inhibits BACE1, the  $\beta$  secretase implicated in Alzheimer's disease. *Mar Drugs*, 2019, **17**(5): 293
- [52] Mycroft-West C J, Devlin A J, Cooper L C, *et al.* Glycosaminoglycans from *Litopenaeus vannamei* inhibit the Alzheimer's disease  $\beta$  secretase, BACE1. *Mar Drugs*, 2021, **19**(4): 203
- [53] Neumann U, Ufer M, Jacobson L H, *et al.* The BACE-1 inhibitor CNP520 for prevention trials in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*, 2018, **10**(11): e9316
- [54] Zhou Y, Zhu F, Liu Y, *et al.* Blood-brain barrier-penetrating siRNA nanomedicine for Alzheimer's disease therapy. *Sci Adv*, 2020, **6**(41): eabc7031
- [55] Marino M, Zhou L, Rincon M Y, *et al.* AAV-mediated delivery of an anti-BACE1 VHH alleviates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Mol Med*, 2022, **14**(4): e09824
- [56] Singh N, Das B, Zhou J, *et al.* Targeted BACE-1 inhibition in microglia enhances amyloid clearance and improved cognitive performance. *Sci Adv*, 2022, **8**(29): eabo3610
- [57] Hur J Y, Frost G R, Wu X, *et al.* The innate immunity protein IFITM3 modulates  $\gamma$ -secretase in Alzheimer's disease. *Nature*, 2020, **586**(7831): 735-740
- [58] Luo W, Ip F C F, Fu G, *et al.* A pentacyclic triterpene from *Ligustrum lucidum* targets  $\gamma$ -secretase. *ACS Chem Neurosci*, 2020, **11**(18): 2827-2835
- [59] Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, **1867**(5): 118664
- [60] Das R, Balmik A A, Chinnathambi S. Melatonin reduces GSK3 $\beta$ -mediated tau phosphorylation, enhances Nrf2 nuclear translocation and anti-inflammation. *ASN Neuro*, 2020, **12**: 1759091420981204
- [61] Fujiwara H, Yoshida J, Dibwe D F, *et al.* Orengedokuto and san'oshashinto improve memory deficits by inhibiting aging-dependent activation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *J Tradit Complement Med*, 2018, **9**(4): 328-335
- [62] Zou Y, Gan C L, Xin Z, *et al.* Programmed cell death protein 1 blockade reduces glycogen synthase kinase 3 $\beta$  activity and tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease mouse models. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 769229
- [63] Giovinazzo D, Bursac B, Sbodio J I, *et al.* Hydrogen sulfide is neuroprotective in Alzheimer's disease by sulfhydrating GSK3 $\beta$  and inhibiting tau hyperphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(4): e2017225118
- [64] Jeon S G, Lee H J, Park H, *et al.* The VEGF inhibitor vatalanib regulates AD pathology in 5xFAD mice. *Mol Brain*, 2020, **13**(1): 131
- [65] Guardigni M, Pruccoli L, Santini A, *et al.* PROTAC-induced glycogen synthase kinase 3 $\beta$  degradation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci*, 2023, **14**(11): 1963-1970
- [66] Ates G, Goldberg J, Currais A, *et al.* CMS121, a fatty acid synthase inhibitor, protects against excess lipid peroxidation and inflammation and alleviates cognitive loss in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Redox Biol*, 2020, **36**: 101648
- [67] Han Y, Chen L, Liu J, *et al.* A class I HDAC inhibitor rescues synaptic damage and neuron loss in APP-transfected cells and APP/PS1 mice through the GRIP1/AMPA pathway. *Molecules*, 2022, **27**(13): 4160
- [68] Wang C, Shen D, Hu Y, *et al.* Selective targeting of class I HDAC reduces microglial inflammation in the entorhinal cortex of young APP/PS1 mice. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(5): 4805
- [69] MacLachlan R, Kehoe P G, Miners J S. Dysregulation of ACE-1 in normal aging and the early stages of Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2022, **77**(9): 1775-1783
- [70] Kehoe P G, Al Mulhim N, Zetterberg H, *et al.* Cerebrospinal fluid changes in the renin-angiotensin system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2019, **72**(2): 525-535
- [71] Alzahrani Y M, Alim A Sattar M A, Kamel F O, *et al.* Possible combined effect of perindopril and azilsartan in an experimental model of dementia in rats. *Saudi Pharm J*, 2020, **28**(5): 574-581
- [72] Mohapatra D, Kanungo S, Pradhan S P, *et al.* Captopril is more effective than perindopril against aluminium chloride induced amyloidogenesis and AD like pathology. *Heliyon*, 2022, **8**(2): e08935
- [73] Garate-Carrillo A, Navarrete-Yañez V, Ortiz-Vilchis P, *et al.* Arginase inhibition by (-)-epicatechin reverses endothelial cell

- aging. *Eur J Pharmacol*, 2020, **885**: 173442
- [74] Liu P, Fleete M S, Jing Y, *et al.* Altered arginine metabolism in Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging*, 2014, **35**(9): 1992-2003
- [75] Polis B, Srikanth K D, Elliott E, *et al.* L-norvaline reverses cognitive decline and synaptic loss in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2018, **15**(4): 1036-1054
- [76] Polis B, Srikanth K D, Gurevich V, *et al.* L-norvaline, a new therapeutic agent against Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, 2019, **14**(9): 1562-1572
- [77] Jia J, Wei C, Chen S, *et al.* The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide. *Alzheimers Dement*, 2018, **14**(4): 483-491
- [78] Egan M F, Mukai Y, Voss T, *et al.* Further analyses of the safety of verubecestat in the phase 3 EPOCH trial of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 2019, **11**(1): 68
- [79] Roberts C, Kaplow J, Giroux M, *et al.* Amyloid and APOE status of screened subjects in the elenbecestat missionAD phase 3 program. *J Prev Alzheimers Dis*, 2021, **8**(2): 218-223
- [80] Novak G, Streffer J R, Timmers M, *et al.* Long-term safety and tolerability of atabecestat (JNJ-54861911), an oral BACE1 inhibitor, in early Alzheimer's disease spectrum patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study and a two-period extension study. *Alzheimers Res Ther*, 2020, **12**(1): 58
- [81] Xiao S, Wang T, Ma X, *et al.* Efficacy and safety of a novel acetylcholinesterase inhibitor octahydroaminoacridine in mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase II multicenter randomised controlled trial. *Age Ageing*, 2017, **46**(5): 767-773
- [82] Gibson G E, Luchsinger J A, Cirio R, *et al.* Benfotiamine and cognitive decline in Alzheimer's disease: results of a randomized placebo-controlled phase IIa clinical trial. *J Alzheimers Dis*, 2020, **78**(3): 989-1010
- [83] Cummings J, Zhou Y, Lee G, *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2023. *Alzheimers Dement*, 2023, **9**(2): e12385

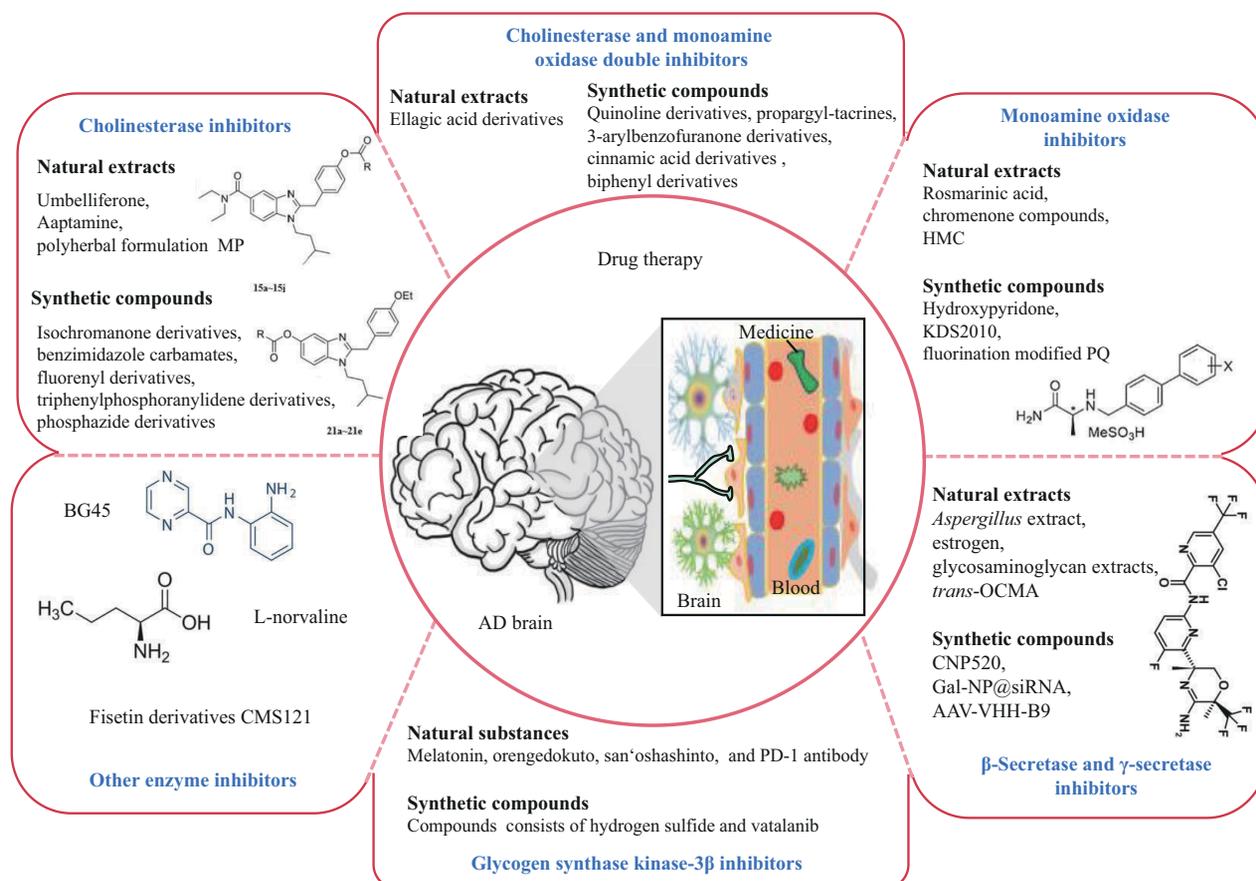
## Application Study of Enzyme Inhibitors and Their Conformational Optimization in The Treatment of Alzheimer's Disease\*

CHU Chao-Yang<sup>1)</sup>, XIAO Biao<sup>1)</sup>, SHAN Jiang-Hui<sup>1)</sup>, CHEN Shi-Yu<sup>1)</sup>, ZHANG Chu-Xia<sup>1)</sup>, ZHOU Yu-Yu<sup>1)</sup>, FANG Tian-Yuan<sup>1)</sup>, LIN Zhi-Cheng<sup>1)</sup>, XIE Kai<sup>2)</sup>, XU Shu-Jun<sup>1)</sup>, LI Li-Ping<sup>1,2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Health Science Centre, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

<sup>2)</sup>Rehabilitative Department, the First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

### Graphical abstract



\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82001155), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y23H090031), the Fundamental Research Funds for the Provincial Universities of Zhejiang (SJLY2023008), the Natural Science Foundation of Ningbo (2023J068), the Medical Health Science and Technology Project of Zhejiang Provincial Health Commission (2022KY1144), Zhejiang Traditional Chinese Medicine Science and Technology Planning Project (2023ZL162), Ningbo Key Research and Development Plan Project (2023Z173), Ningbo Education Science Planning Project (2023YGH003), Ningbo University Teaching and Research Project (JYXMXZD2023030), College Students' Scientific and Technological Innovation Project (Xin Miao Talent Plan) of Zhejiang Province (2022R405A045), the Student Research, Innovation Program (SRIP) of Ningbo University (2023SRIP1919, 2023SRIP1938), and National 111 Project of China (D16013).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-574-87609594, E-mail: liliping@nbu.edu.cn

Received: January 4, 2024 Accepted: March 14, 2024

**Abstract** Alzheimer's disease (AD) is a central neurodegenerative disease characterized by progressive cognitive dysfunction and behavioral impairment, and there is a lack of effective drugs to treat AD clinically. Existing medications for the treatment of AD, such as Tacrine, Donepezil, Rivastigmine, and Aducanumab, only serve to delay symptoms and but not cure disease. To add insult to injury, these medications are associated with very serious adverse effects. Therefore, it is urgent to explore effective therapeutic drugs for AD. Recently, studies have shown that a variety of enzyme inhibitors, such as cholinesterase inhibitors, monoamine oxidase (MAO) inhibitors, secretase inhibitors, can ameliorate cholinergic system dysfunction, A $\beta$  production and deposition, Tau protein hyperphosphorylation, oxidative stress damage, and the decline of synaptic plasticity, thereby improving AD symptoms and cognitive function. Some plant extracts from natural sources, such as Umbelliferone, Aaptamine, Medha Plus, have the ability to inhibit cholinesterase activity and act to improve learning and cognition. Isochromanone derivatives incorporating the donepezil pharmacophore bind to the catalytic active site (CAS) and peripheral anionic site (PAS) sites of acetylcholinesterase (AChE), which can inhibit AChE activity and ameliorate cholinergic system disorders. A compound called Rosmarinic acid which is found in the *Lamiaceae* can inhibit monoamine oxidase, increase monoamine levels in the brain, and reduce A $\beta$  deposition. Compounds obtained by hybridization of coumarin derivatives and hydroxypyridinones can inhibit MAO-B activity and attenuate oxidative stress damage. Quinoline derivatives which inhibit the activation of AChE and MAO-B can reduce A $\beta$  burden and promote learning and memory of mice. The compound derived from the combination of propargyl and tacrine retains the inhibitory capacity of tacrine towards cholinesterase, and also inhibits the activity of MAO by binding to the FAD cofactor of monoamine oxidase. A series of hybrids, obtained by an amide linker of chromone in combine with the benzylpiperidine moieties of donepezil, have a favorable safety profile of both cholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activity. Single domain antibodies (such as AAV-VHH) targeted the inhibition of BACE1 can reduce A $\beta$  production and deposition as well as the levels of inflammatory cells, which ultimately improve synaptic plasticity. 3-O-*trans-p*-coumaroyl maslinic acid from the extract of *Ligustrum lucidum* can specifically inhibit the activity of  $\gamma$ -secretase, thereby rescuing the long-term potentiation and enhancing synaptic plasticity in APP/PS1 mice. Inhibiting  $\gamma$ -secretase activity which leads to the decline of inflammatory factors (such as IFN- $\gamma$ , IL-8) not only directly improves the pathology of AD, but also reduces A $\beta$  production. Melatonin reduces the transcriptional expression of GSK-3 $\beta$  mRNA, thereby decreasing the levels of GSK-3 $\beta$  and reducing the phosphorylation induced by GSK-3 $\beta$ . Hydrogen sulfide can inhibit GSK-3 $\beta$  activity *via* sulfhydration of the Cys218 site of GSK-3 $\beta$ , resulting in the suppression of Tau protein hyperphosphorylation, which ameliorate the motor deficits and cognitive impairment in mice with AD. This article reviews enzyme inhibitors and conformational optimization of enzyme inhibitors targeting the regulation of cholinesterase, monoamine oxidase, secretase, and GSK-3 $\beta$ . We are hoping to provide a comprehensive overview of drug development in the enzyme inhibitors, which may be useful in treating AD.

**Key words** Alzheimer's disease, acetylcholinesterase inhibitors, monoamine oxidase inhibitors,  $\beta$ -secretase inhibitors,  $\gamma$ -secretase inhibitors, glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors, inhibitors conformational optimization

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0007