



阿尔茨海默症病理机制中的金属代谢和金属药物

张悦, 夏青, 杨晓达*, 王夔

天然和仿生药物国家重点实验室; 北京大学医学部药学院化学生物学系, 北京 100191

*通讯作者, E-mail: xyang@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2013-10-24; 接受日期: 2013-11-11; 网络版发表日期: 2014-02-18

doi: 10.1360/032013-322

摘要 随着人口老龄化进程的发展, 阿尔茨海默症(AD)已成为威胁中国和世界人口健康和经济的重大疾病. 本文综述了近年来 AD 病理的分子机制的新进展, 分析了其中金属代谢的意义. 研究发现, 在 AD 进程中, 围绕淀粉样斑块(AP)和神经缠结斑(NFT)的形成, 多因素相互联系并发挥作用, 这些主要因素包括金属内稳态、胰岛素抵抗、神经炎症、线粒体和血脑屏障改变等. 与 AD 病理过程密切相关的主要蛋白质均参与了金属元素的生理代谢过程, 而细胞金属离子的内稳态失衡加剧了 AD 病理的恶化. 金属药物在 AD 诊断和治疗中可能具有以下的发展潜力: (1) AD 早期诊断探针; (2) 调节金属内稳态的配体和/或微量元素补充; (3) 抗糖尿病金属配合物; (4) 神经元和血脑屏障(BBB)保护金属药物.

关键词

阿尔茨海默症
金属药物
金属内稳态
配体疗法
神经保护

1 引言

随着世界人口日益老龄化, 阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 患者人数不断增长. 据估计, 美国 65 岁以上人口中, 每 8 人中即有 1 人受此病困扰; 在 65 岁及以上住院患者中, 25% 患有阿尔茨海默症. 预计到 2050 年, 全球 AD 人数将超过 1 亿. 阿尔茨海默症已成为威胁世界人口健康和经济的重大疾病之一^[1, 2].

目前, AD 的治疗缺乏有效的方案. 同时, AD 治疗的费用昂贵, 给医保带来难以为继的负担. 每年用于治疗阿尔茨海默症的费用约为普通老年病治疗费用的 9 倍 (\$8419 vs. \$915)^[1]; 治疗阿尔茨海默症的巨额费用未来甚至有可能导致许多西方国家的医疗系统破产. 延缓或逆转 AD 病程的药物具有每年约 200 亿美元的巨大市场潜力^[1], 因此, AD 药物研发已成为制药和生物技术工业的优先对象.

早期的对 AD 患者的病理学研究发现, AD 具有

两个主要的病理特征: (1) 位于神经细胞外主要由淀粉多肽(A β ₄₀ 和 A β ₄₂)构成的淀粉样斑块(AP); (2) 位于神经细胞内的神经纤维缠结斑(NFT), 其中包含过度磷酸化的 tau 蛋白. Tau 蛋白与细胞微管的稳定性密切相关. 所以, 淀粉样蛋白假说(主要内容包括病理性的寡聚化、纤维化以及淀粉样蛋白(A β)和 tau 蛋白的聚积)已成为公认的 AD 病理机制^[1, 3]. 但越来越多的研究表明, AP 和 NFT 可能不是唯一的病理机制. 金属内稳态^[4, 5]、线粒体功能^[6, 7]、胰岛素抵抗^[8]、血脑屏障^[9]和血清同型半胱氨酸水平^[10]均涉及其中, 并且存在密切联系(图 1).

研究发现, AD 患者的神经突触有缺失, 在新大脑皮质和大脑边缘系统中有大量 NFT 形成, 这些症状和患者的认知障碍密切相关^[11]. 但是, NFT 等神经病变现象在相当比例的智力正常老人中也同样存在^[11], 说明从神经组织产生变化到临床可见的 AD 病理症状之间还存在一定距离. 这种病理变化和可见临床症状之间的不同步性可用“认知储备”假设来

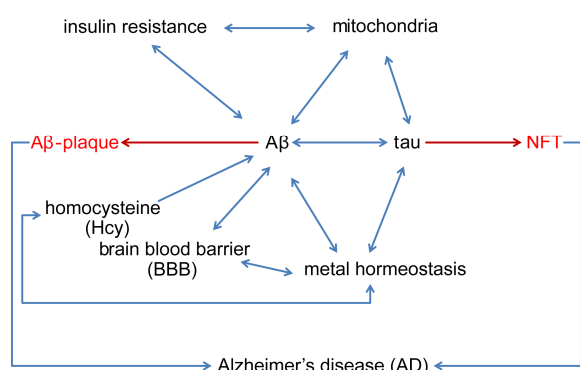


图 1 阿尔茨海默症(AD)的主要病理因素及相互关系. 在 AD 中, 核心机制是 A β 假设(amyloid hypothesis), 即在神经细胞外, A β 形成有毒的寡聚物和 AP; 在神经细胞内, 过度磷酸化的 tau 蛋白形成神经纤维缠结斑(NFT). 这些非正常折叠的蛋白沉淀造成神经突触损失和神经元死亡. A β 病变和 tau 蛋白过度磷酸化之间存在相互作用. 金属稳态、线粒体功能、胰岛素抵抗、血脑屏障和血清同型半胱氨酸水平等也均可能参与了 AD 的病理过程

解释. “认知储备”受多种因素影响, 包括教育程度、智力水平和信息刺激. 这些因素可能使大脑产生了适应性, 从而掩盖了神经病变的影响, 使病人保留了认知能力.

在过去的 20 多年中, 淀粉样蛋白假说一直是 AD 研究的焦点^[1, 3]. AD 治疗除了使用神经保护剂外, 大多数药物研发集中于非正常折叠蛋白的清除. 然而, 1998~2011 年间, 大约 100 种基于此策略的 AD 药物研发遭到失败. 这促使人们不得不重新审视 AD 病理机制和新药物发现的策略. 其中, 许多新机制的发现也给予了生物无机化学研究者发现 AD 病理中金属离子的角色和金属药物应用的新契机.

2 阿尔茨海默症的病理机制

在对 AD 病理机制的认识中, 目前以 A β -tau 蛋白聚集为核心环节. 其中 A β 的形成和代谢作用是两个关键问题. 新的研究发现, 高浓度的 A β 会产生神经毒性, 但低浓度的 A β 可能具有有益的生理作用. AP 和 NFT 的形成是相互关联的多因素过程, 而神经损伤的机制则涉及金属内稳态、线粒体功能、胰岛素抵抗和血脑屏障改变等复杂和长期的过程. 当长期的神经损伤积累超过了大脑“认知储备”的代偿能力后, 病人则逐渐显现 AD 的临床症状.

2.1 淀粉样蛋白前体(APP)的剪切过程以及 A β 的功能

A β 是由淀粉样前体蛋白(APP)经分泌酶剪切加工形成^[1, 3, 12]. APP 是 I 型跨膜糖蛋白, 在多种细胞如神经元细胞、神经胶质细胞、内皮细胞和成纤维细胞等上均有表达. APP 的酶切过程经由两条不同的途径进行: 非淀粉样蛋白途径和淀粉样蛋白途径(图 2).

在非淀粉样蛋白途径中, A β PP 在 α 分泌酶的剪切作用下分裂成胞外可溶性的 α -片段和 83AA 的 C 末端片段(C83). 之后在 γ 分泌酶的剪切作用下, C83 分裂为 p3 和 57-59AA 两个片段. α 分泌酶水平受到 NAD⁺依赖的 Sirtin-1 活性的调节^[13]. 当线粒体氧化磷酸化功能损伤、NAD⁺水平降低时, α 分泌酶表达下降^[14].

在淀粉样蛋白途径中, A β PP 被 β 分泌酶分裂成胞外可溶性的 β -片段和 99AA 的 C 末端片段(C99). 随后, C99 被 γ 分泌酶主要分裂为 A β ₄₀ 或 A β ₄₂. A β 蛋白有强烈的多聚化、聚集和形成纤维的倾向. A β ₄₂ 比 A β ₄₀ 多两个疏水性的氨基酸 Ile41 和 Ala42, 更容易聚集形成淀粉样沉淀. A β 蛋白 N 末端的第 3 或 11 位残基可被焦谷氨酸盐(pyroglutamate)修饰. 修饰后的 A β 蛋白疏水性增加, 因此更容易聚集, 并可成为启动 A β 多聚化和

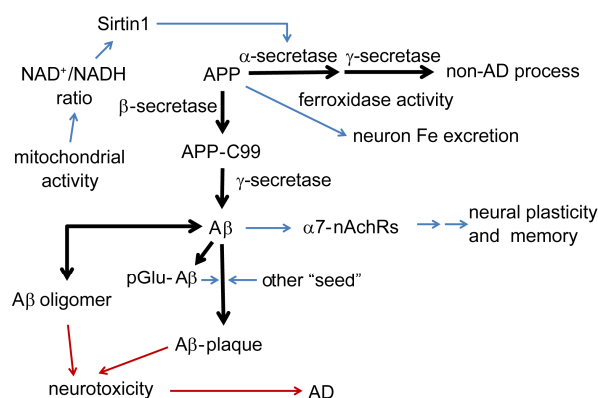


图 2 淀粉样蛋白前体(APP)的剪切过程以及 A β 的功能. APP 经 β 和 γ 分泌酶剪切后, 形成 A β 肽段. A β 的生理功能可能是调节神经铁排出和通过 $\alpha 7$ 尼古丁受体($\alpha 7$ -nAChR)调节神经可塑性和记忆形成等. 高浓度的 A β 一方面形成多种具有神经毒性的可溶性寡聚体, 另一方面在同类蛋白质“晶种”诱导下, 形成不溶性 A β 斑块. APP 的非 AD 病理剪切是通过 α 和 γ 分泌酶. α 分泌酶水平受 NAD⁺依赖的 Sirtin-1 活性的调节. 当线粒体氧化磷酸化功能损伤, NAD⁺水平降低时, α 分泌酶表达下降

聚集过程的晶种^[15]。

APP 是一个具有多种生理功能的重要蛋白^[16], 对脑发育、神经分化、神经突触形成和功能等方面均具有重要意义。在神经铁代谢中, APP 控制了神经元的铁排出功能。而 A β 蛋白具有抗氧化活性和抗菌活性, 在智力发育、视觉功能、神经元分化、突触形成、轴突生长和突触黏附过程中均有生理作用^[16]。在神经效应上, A β 蛋白则表现出剂量依赖的双向效应。

在生理浓度(pmol/L 浓度)时, A β 对不同种类的神经元有营养作用, 有助于神经突触和记忆力的形成^[16]。对健康鼠脑内源性 A β 功能的研究发现, 使用 A β 抗体或通过 siRNA 沉默 A β 表达均会损伤突触可塑性并损害记忆力; 而外加 A β 后, 可使突触可塑性和记忆力得到恢复。A β 可促进神经元的生长和存活, 并通过激活磷酸肌醇 3 激酶(P13K)保护神经元免受氧化性损伤。A β 可使体内神经元总数增加并呈现剂量依赖。内源性和外源性 A β 均可调节神经递质释放。

而在高浓度时, A β 则表现为明显的神经毒性, 可使成熟的神经元产生退行性病变^[16]。AP 即由 A β 的自聚集作用产生, 并进一步影响 tau 蛋白的过度磷酸化, 促进 NFT 形成。

2.2 A β 的神经损伤机制及其信号转导途径

在神经系统中, A β 的存在形式包括可溶性的 A β 单体、寡聚体以及不溶性 AP。A β 寡聚体和 AP 均可造成神经损伤(图 3)。

2.2.1 A β 不溶性斑块的神经毒性

AP 存在于神经组织的细胞间隙。过去一度认为, AP 直接具有神经毒性^[3, 17]。但新的认识认为, 胞外的 AP 通过结合大量的 Zn 和 Cu 离子, 导致神经细胞 Zn、Cu 缺乏和金属内稳态紊乱(详见 2.3 小节)。

A β 也可大量沉积于脑毛细血管壁, 造成一系列后果^[9], 包括: (1) 抑制脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP-1) 的活性, LRP-1 是脑组织排除 A β 的主要通道, 其活性降低将导致脑组织 A β 积累; (2) 降低血脑屏障(BBB)上重要的外排转运体 Pgp 的表达, Pgp 是脑组织排除代谢废物和有害小分子的关键转运体, Pgp 功能降低将造成脑组织中毒性分子浓度升高; (3) 通过 Ca²⁺-钙调磷酸酶(calcineurin, CaN)途径破坏紧密连接的完整性^[18], 引起 BBB 细胞旁路渗透性增加, 这将使血液中的有毒分子有可能进入脑组织, 造成神经损伤。

2.2.2 可溶性 A β 寡聚体的神经毒性

A β 寡聚物存在于细胞内外。越来越多的研究发现, A β 寡聚物是神经毒性最强的物种^[19]。胞外的 A β 寡聚物可与多种细胞膜表面受体结合, 抑制受体功能。A β 寡聚物可通过与属于肿瘤坏死因子的 p75 神经营养受体(p75NTR)结合, 诱导神经生长因子受体(NGFR)介导的神经元死亡^[20]。A β 还可干扰 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)介导的长时程增强作用。其机制是调节 NMDAR 的多种下游信号转导, 如 CaN、钙调蛋白激酶(CaMKII)、蛋白磷酸酶 1 及 cAMP 响应元素结合蛋白等。此外, A β 通过 NMDAR 可产生过量的活性氧物种(ROS), 从而导致线粒体的损伤、神经元内 Ca²⁺水平的迅速上升。胰岛素受体(IR)介导的信号传导对 A β 寡聚物对其产生的干扰作用非常敏感^[21]。A β 与 IR 结合后可干扰 IR 诱导的自磷酸化^[22]。A β 与 Fz 受体结合可抑制 Wnt 信号, 导致 tau 蛋白磷酸化和 NFT 的形成。

细胞膜离子通透性的增加与 A β 毒性密切相关。A β 可与人工磷脂双层结合形成特异的阳离子通道^[23], 促进 Ca²⁺和其他金属离子(如 Fe²⁺、Cu²⁺和 Zn²⁺)向神经细胞的渗透。一方面, 膜电导的增加可导致细胞膜电位去极化而使神经细胞功能受损; 另一方面, 钙离子内流可激活钙蛋白酶(calpain)和 p25, 进而激活 tau 激酶, 引起 tau 过磷酸化^[12]。

A β 可与细胞低密度脂蛋白受体结合, 通过快速的内吞作用进入细胞并在神经细胞内聚集^[24, 25], 而且胞内的 A β 聚集先于胞外 AP 的形成。内质网(ER)和高尔基体(golgi)分泌途径的异常情况可能是 A β 在线粒体内发生病理堆积的原因。A β 作用于线粒体, 导致呼吸链复合物 III、IV 的酶活性降低, ATP 合成下降以及 ROS 升高^[26]。此外, A β 也损伤蛋白酶体, 抑制细胞的修复性自噬功能^[27]。

2.2.3 A β 毒性和 tau 蛋白过度磷酸化之间的对话

Tau 蛋白过度磷酸化是 NFT 形成的原因。A β 的毒性是 tau 蛋白过磷酸化的一个重要因素。A β 在细胞内外影响多种细胞信号传导途径, 例如, A β 与 p75NTR 结合可刺激 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)通路^[20], A β 引起的胞内 Ca²⁺水平的升高可促进 ROS 产生, 上调细胞周期依赖性蛋白激酶 5 (Cdk5)活性, 影响细胞糖代谢而增加糖原合成激酶 3 β (GSK-3 β)活性, A β 引起的

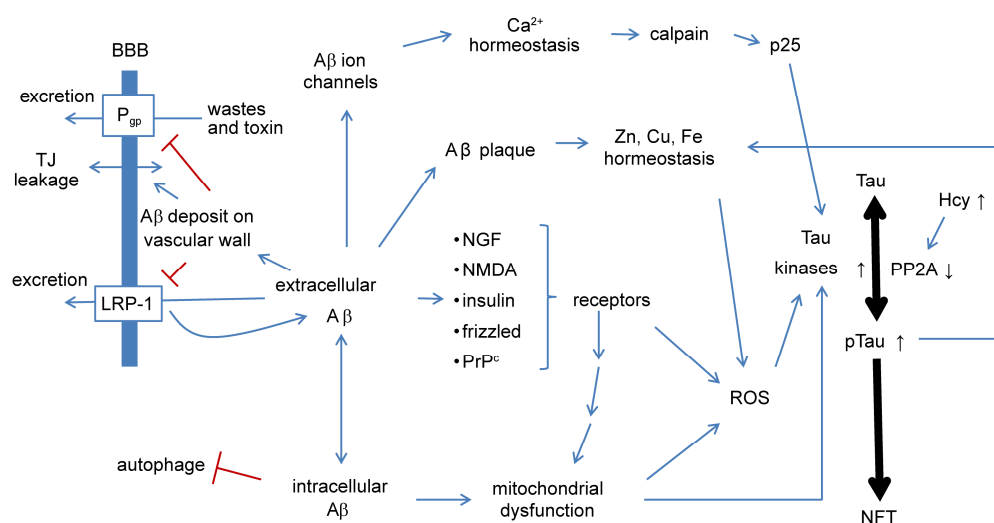


图3 A β 的信号转导主要途径及神经损伤机制. A β 通过多种途径导致神经系统功能和信号转导异常: (1) 胞外的 A β 形成不溶性斑块, 可结合大量的 Zn 和 Cu 离子, 导致神经细胞 Zn、Cu 缺乏和金属稳态失衡; (2) 胞外的 A β 作用于细胞膜的多种受体, 导致非正常细胞信号转导和引起细胞氧化应激; (3) 胞外的 A β 在细胞膜上形成离子通道, 导致钙离子内流, 进而激活 calpain 和 p25; (4) 胞内的 A β 作用于线粒体, 线粒体功能损伤; (5) 胞内的 A β 也损伤蛋白酶体, 抑制细胞修复性自噬功能; (6) 胞外的 A β 沉积于脑毛细血管壁, 抑制脂蛋白受体相关蛋白 1 (LRP-1) 的功能、降低 BBB 对 A β 的排除, 同时降低 BBB 重要的外排转运体 Pgp 的表达, 降低脑组织有害小分子的排除, 同时也引起 BBB 紧密连接的渗透性增加; (7) 同型半胱氨酸(Hcy)是一个独立的心脑血管疾病和 AD 的危险因子, Hcy 通过下调蛋白磷酸酯酶 2A (PP2A), 减少 tau 蛋白的去磷酸化. 其中, 途径(1~4)均导致 tau 激酶(主要包括 JNK、Cdk5 和 GSK-3 β)活化, 引起 tau 过度磷酸化和 NFT 形成; 而 tau 过度磷酸化也反过来影响细胞金属内稳态和 A β 形成

小神经胶质细胞和星形胶质细胞的慢性活化可导致促炎细胞因子(IL-1、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-17 和 TNF- α)的释放, 并激活包括 JNK、Cdk5、GSK-3 β 和 p38 有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)在内的 tau 蛋白激酶^[12]. 这些均最终导致 tau 的过度磷酸化.

反过来, tau 蛋白也可促进 A β 的形成. 由于 tau 激酶可导致 APP 胞膜区域的 Thr668 磷酸化^[12], 这一修饰使 APP 在 γ 分泌酶作用下优先在形成 A β 的位点断裂; tau 蛋白也介导 APP 向细胞膜转运, tau 蛋白的过度磷酸化会引起 APP 滞留, 导致膜 APP 功能缺失以及细胞内 A β 的沉积. 此外, PKA 磷酸化胞外 A β 的 Ser8 可稳定 β 折片, 促进 A β 寡聚物聚集. 使用 Pin1 抑制 GSK-3 β 的活性可减少 A β 生成^[28].

2.2.4 独立危险因素同型半胱氨酸

临床研究早已确认, 同型半胱氨酸(Hcy)是导致心脑血管疾病和 AD 的独立危险因素^[10]. Hcy 是一种促炎因子^[29], 血清中 Hcy 升高可导致细胞的严重氧化应激, 促进 A β 引起的 Ca²⁺内流. 如上所述, 这些作

用会促进 A β 的形成和引起 tau 蛋白激酶的活化. 另一方面, Hcy 可修饰蛋白磷酸酶 2A (PP2A), 导致酶失活^[10], 而 PP2A 是最重要的 tau 蛋白去磷酸化酶^[30]. 因此, Hcy 可导致 tau 蛋白的过度磷酸化, 从而促进 NFT 形成.

2.3 阿尔茨海默症中的金属代谢(the metal theory of AD)

铝是第一个被与神经退行性变联系在一起的金属元素. 富铝饮用水可使患 AD 的风险增大 1.5 倍^[31]. 向动物的脑部注射铝盐可诱导 NFT 产生^[31]. 但是, 铝在人体中的吸收极少, 在脑部没有生理功能且在神经元中的含量低, 所以, 近期研究普遍集中在有重要生理功能的过渡金属 Zn、Cu 和 Fe 上.

A β 与铜、锌和铁离子有较强的结合作用; A β 与金属离子的结合化学得到了详尽的研究^[32]. 过去一度认为, 金属离子诱导 A β 沉淀的作用是 AP 形成并产生神经毒性的原因. 但是, 近几年大量的以抑制 A β 产生或清除 A β 的药物的临床试验均告失败, 没有一种以

A β 为靶的药物具有有效的防止认知能力下降的作用^[1]. 事实上, 有些 AD 患者的脑部没有 AP 存在^[11]. 以上证据均对 A β 假说提出了严重挑战. 对 AD 患者脑部金属内稳态变化的研究发现(图 4), 在 AP 中存在大量的 Cu 和 Zn, 但在神经元内 Cu 和 Zn 的浓度很低; 相反, Fe 却在神经元内大量累积. 广泛的病理、生化、药理和基因学证据均提示: 与 AD 病理过程密切相关的蛋白质(A β 、APP、tau 蛋白及早老素等)均参与金属元素的生理代谢过程, 导致神经金属离子的内稳态失衡、加剧 AD 病理的恶化, 即 Bush 提出的新的“AD 金属理论”(the metal theory of Alzheimer's disease)^[4, 5]. 与以往的“金属代谢紊乱 $\rightarrow$ A β 沉淀斑块 $\rightarrow$ 神经毒性”思路不同, 新的观点思路为: A β 负担(A β burden) $\rightarrow$ 金属代谢紊乱 $\rightarrow$ 加重 A β 负担 $\rightarrow$ ……的恶性循环.

2.3.1 A β 对神经 Zn 代谢的作用

人体中, 脑部的含 Zn²⁺量最高, Zn²⁺是数百种酶和转录因子的主要组成元素. 神经元内的正常 Zn 含量对于记忆力和认知的维持是必需的^[33]. 突触内的主要功能蛋白如 SNAP25、PSD95、AMPA 受体及 NMDA 受体 2a 和 2b; 神经元营养支持蛋白如双肾上

腺素皮质激素; 脑源性神经营养因子(BDNF)前体和酪氨酸激酶 B(TrkB)等. Zn²⁺具有维持这些蛋白正常水平和脊椎神经正常密度的作用^[33]. 与 Ca²⁺相似, 胞外的 Zn²⁺具有第二信使的功能. Zn²⁺的细胞摄取被认为主要由 Zrt-和 Irt-蛋白(ZIP)介导. 约 50% Zn²⁺的细胞摄取需要早老素(PS)的存在, 机制尚未明确. 胞内 Zn 的外排由锌转运蛋白(ZnT)蛋白家族介导. ZnT3 负责向分泌小体中泵出 Zn²⁺, 从而控制神经递质的释放.

A β 蛋白以 6~28 位残基与 Zn²⁺结合, 诱导 A β 聚集并形成不溶物. Zn²⁺与 A β 的键合可掩蔽水解位点, 抑制 A β 的降解, 同时也将 Zn²⁺包裹在淀粉样斑块中. 当神经元外的 A β 沉淀大量束缚 Zn²⁺时^[34], 神经细胞内的 Zn²⁺浓度则明显下降, 神经细胞因锌缺乏而功能失常, 兴奋性毒性增加. 此外, Zn²⁺抑制钙调神经磷酸酶的活性. Zn²⁺浓度下降, 导致钙调神经磷酸酶活性升高, 可导致 tau 蛋白激酶的活化和 A β 蛋白的生成增加^[35].

2.3.2 A β 对神经 Cu 代谢的作用

Cu²⁺对于许多金属酶生理功能的执行必不可少, 包括催化超氧自由基分解的超氧化物歧化酶(SOD)、参与电子传递的细胞色素 C 氧化酶(COX)、将 Fe²⁺氧化成 Fe³⁺的血浆铜蓝蛋白和催化黑色素生成的酪氨酸酶. 细胞通过铜转运蛋白(CtR1)摄取铜, 并通过铜伴侣蛋白 Atox1 在细胞内转运, 通过 ATP7A/B 将铜离子排出^[5, 32].

和 Zn²⁺一样, Cu²⁺可与 A β 发生相互作用. Cu²⁺促进的二酪氨酸与 A β 的交联被认为是刺激 A β 迅速聚集的种子^[36]. 与 Zn²⁺不同的是, Cu²⁺介导的 A β 聚集形成的是不能被硫磺素 T 识别的 A β 寡聚物而非纤维^[37]. 因此, Cu²⁺富集于 AP 和 NFT, 同时也导致了神经细胞铜缺乏的严重问题^[38], 特别是 SOD 水平下降可导致严重的细胞氧化应激.

此外, Cu²⁺与 A β 形成的配合物存在细胞毒性. 体外培养实验显示, Cu²⁺与 A β 配合物可经由循环催化机制产生羟自由基^[39], Cu²⁺被螯合或被竞争性抑制可减轻 A β 诱导的细胞凋亡.

APP 也可与 Cu²⁺产生相互作用^[32]. Cu²⁺在 APP 的 142~166 位残基与之键合, 催化 Cu²⁺还原成 Cu⁺. Cu²⁺可促进 APP 的内化; Cu²⁺缺乏促进 A β 的产生.

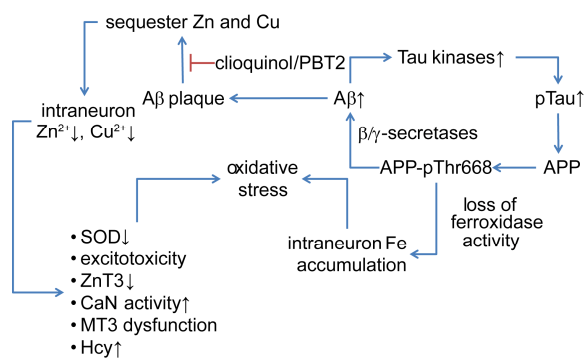


图 4 A β 与神经金属内稳态的相互作用. AP 可以结合大量的 Zn²⁺和 Cu²⁺离子, 引起胞内 Zn 和 Cu 的缺乏, 导致胞内 SOD 等一系列酶活性的改变, 引起细胞氧化应激和 tau 蛋白激酶的激活. 此外, ZnT3 表达的下降可影响神经递质释放, 诱导兴奋性毒性, 而铜代谢异常还将影响细胞的蛋氨酸代谢, 引起 Hcy 水平升高. 另外, 过度磷酸化的 tau 蛋白可导致 APP 的 Thr668 磷酸化, 带来两个后果: (1) 使 APP 失去亚铁氧化酶活性, 损伤细胞的铁外排机制, 导致神经铁积累; (2) 加速 APP 的酶剪切, 生成更多的 A β . 铁螯合剂 8-羟基喹啉及其衍生物 PBT-2 可作为 Zn²⁺和 Cu²⁺的载体, 增加细胞对 Zn 和 Cu 摄取、减少对这些离子的束缚

2.3.3 A β 对神经 Fe 代谢的作用

Fe 是生物体中能量代谢的基础物质, 其储存和运输经由转铁蛋白、铁蛋白(铁储蛋白)和铁转运蛋白进行^[40, 41]. 转铁蛋白在脑内由少突胶质细胞分泌, 在胞外, 转铁蛋白结合 Fe^{3+} , 通过转铁蛋白受体介导被内吞. 在内吞囊泡中, Fe^{3+} 被铁还原酶还原成 Fe^{2+} , 然后进入细胞被利用. 未利用的 Fe^{2+} 被氧化后, 以三价形式与铁蛋白结合储存. 铁排出则经由铁转运蛋白, 这一过程需要一些细胞膜上的铁氧化酶协助, 将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} . 在神经元细胞中, APP 充当了铁外排所需的铁氧化酶的角色^[42].

Tau 蛋白介导 APP 向细胞膜的转运. 在 AD 患者脑中, tau 蛋白被过度磷酸化, 导致 APP 不能到达细胞膜^[43]. 此外, tau 激酶可导致 APP 胞膜区域的 Thr668 磷酸化, 使其更易被 γ 分泌酶剪切形成 $\text{A}\beta^{\text{[1]}}$. 因此, 在 AD 患者脑中, Fe 在神经元中发生严重的积累, 进而引发严重的细胞氧化应激和神经元死亡.

与 Zn^{2+} 类似, Fe^{3+} 也可与 $\text{A}\beta$ 结合, 促进 $\text{A}\beta$ 聚集和 Fe 在老年斑中的累积^[40, 41]. 结合了 $\text{A}\beta$ 的 Fe 可经由 Fenton 反应, 产生大量 ROS 而产生细胞毒性^[44].

此外, 在 AD 相关金属代谢与稳态平衡调控中, 金属硫蛋白-3 也可能具有重要的作用, 此方面研究在文献[32]中有详细总结.

2.4 阿尔茨海默症和糖尿病的关联

AD 和糖尿病(DM)的关系非常密切^[8, 45~48]。这两种病症不仅分享着许多共同的病理现象,而且可以相互促进彼此的病理进程(图 5)。II 型糖尿病(T2DM)患者罹患 AD 的风险比健康人群多两倍;而在超过 80%的 AD 患者身上,观察到了不正常的血糖水平或是胰岛素抵抗症状。越来越多的研究显示,AD 和 DM 可能具有相同的致病机制,因此,AD 被一些研究者称为 III 型糖尿病^[49]或脑型糖尿病。

II型糖尿病患者一般表现有高胰岛素血症。胰岛素可促进 $A\beta$ 从其主要的产生部位内质网和高尔基体向细胞膜迁移,使胞内 $A\beta$ 的浓度显著下降^[50]。胰岛素也可以通过增加 γ 分泌酶的活性,使胞外 $A\beta$ 水平上升^[51]。胰岛素降解酶(IDE)同时也是一种主要的 $A\beta$ 降解酶^[52],因此, $A\beta$ 的降解受到胰岛素的竞争性抑制,导致 $A\beta$ 累积。

在正常胰岛素信号通路中,胰岛素受体被激活后,可激活 MAPK 和 PI3K/Akt (苏氨酸激酶)这两个

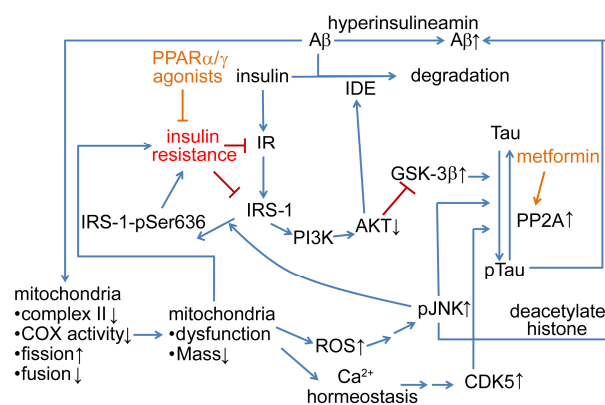


图 5 胰岛素抵抗和阿尔茨海默症的关联。一方面, 胰岛素抵抗导致细胞 PI3K/Akt 信号下降, 不再磷酸化抑制 GSK-3 β 活性; GSK-3 β 是主要的 tau 蛋白激酶之一; 另一方面, 胞内的 A β 可作用于线粒体, 导致线粒体功能和动态损伤, 进而激活另外两个主要 tau 蛋白激酶 JNK 和 Cdk5. 而 JNK 的激活则可通过磷酸化胰岛素受体底物的 Ser636, 导致胰岛素抵抗; 同时也可通过去乙酰化组蛋白, 诱导 A β 水平升高。此外, 在神经系统中, A β 和胰岛素均通过胰岛素降解酶(IDE) 分解, 而 Akt 调节 IDE 的表达, 胰岛素抵抗可降低 IDE 的水平, 同时高胰岛素症通过竞争抑制、减少 A β 分解; 反过来, 高水平的 A β 也可导致高胰岛素症, 加剧胰岛素抵抗。抗糖尿病药物二甲双胍可以升高 PP2A 活性, 促进 tau 蛋白去磷酸化; 而 PPAR α/γ 激动剂则可消除胰岛素抵抗, 抑制 GSK-3 β 活性。因此, 抗糖尿病药物有可能用于 AD 的治疗。

主要的信号转导^[53]。PI3K/Akt 信号可导致 GSK-3 β 磷酸化, 从而抑制其激酶活性^[54]; 而 GSK-3 β 是控制 tau 蛋白磷酸化的三大激酶之一。IR 敲除小鼠 PI3K 激活受阻, 随后 GSK-3 β 磷酸化上调, 进而促进神经元细胞中 tau 蛋白的磷酸化^[55]。相反, 增强的胰岛素信号则抑制 GSK-3 β 、降低 tau 蛋白的磷酸化程度, 并促进 tau 蛋白与微管的结合。在胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 基因敲除的 T2DM 小鼠的海马体内, 可检测到 NFT 的累积^[56]。在神经元胰岛素基因敲除的小鼠体内, tau 蛋白的磷酸化水平升高^[57]。胰岛素生长因子 1 (IGF1) 的缺失也促进 tau 蛋白的磷酸化水平升高和 NFT 的形成^[58]。可见, tau 蛋白过度磷酸化是 DM 和 AD 病理之间的关联因素之一。

糖尿病的发病机制尚不清楚,许多证据表明,T2DM 的发生与 β 胰岛细胞等线粒体 DNA 的突变和线粒体 DNA 损伤密切相关^[59]. 细胞内 90%以上的 ATP 由线粒体通过三羧酸循环和氧化磷酸化产生;线粒体也是 ROS 的主要来源之一. 神经元内的糖酵

解能力很有限, 并且神经递质的传递、离子通道和离子泵活性的开启均为高耗能过程, 这些使神经元对线粒体供能特别依赖. 因此, 神经元对线粒体的结构、定位和功能的改变特别敏感.

从 STZ 糖尿病大鼠脑分离出的线粒体中, 辅酶 Q9 (CoQ9) 水平下降, 呼吸链复合物 III、IV、V 的活性下降, ATP 的合成减少, 脂质过氧化、氧化应激和硝化应激上升^[14, 53]. 将 AD 患者血小板中的线粒体转移到线粒体 DNA 清除的神经元细胞后, 可观察到线粒体功能失调标志物质 COX 活性下降和 ROS 产生增加^[60]. 线粒体损伤导致氧化应激和细胞钙内稳态失调, 从而激活另外两个重要的 tau 蛋白激酶 JNK 和 Cdk5, 促进 tau 蛋白的磷酸化^[61, 62].

另一方面, A β 可破坏线粒体功能, 从而促进胰岛素抵抗发生^[14, 53, 60]. 在移位酶的作用下, A β 可进入线粒体并定位于线粒体脊. A β 与线粒体直接结合活化 A β 键合乙醇脱氢酶, 线粒体膜通透性增加, 与呼吸链有关的酶活性降低. A β 可造成突触线粒体损伤, 诱导胞膜脂质过氧化和 4-羟基壬烯酸的产生. A β 可促进 Ca²⁺内流和诱导神经元 ROS 上升, 从而导致线粒体通透转运孔道(mPTP)的开放. 此外, 线粒体损伤引起的氧化应激激活 JNK 磷酸化, JNK 的激活可导致胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 636 位丝氨酸的磷酸化, 从而抑制胰岛素信号转导, 导致胰岛素抵抗的产生^[63]. 在 APP 转基因小鼠脑内, IR 活性下降而 GSK-3 β 活性上升并伴随 AP 增多和 tau 蛋白的磷酸化增强, 说明小鼠在患有 AD 的同时并发了 DM^[48, 55].

3 阿尔茨海默症治疗、诊断和金属药物

综上所述, 在 AD 病理中, AP 和 NFT 是关键机制. 金属内稳态紊乱、线粒体功能损伤、胰岛素抵抗、血脑屏障功能和血清同型半胱氨酸水平均涉及其中, 并且存在密切的相互联系. 因此, 在 AD 治疗中, 金属药物可能在以下方面发挥作用: (1) 通过配体和微量元素补充调节金属内稳态; (2) AD 早期诊断探针; (3) BBB 和神经保护金属药物; (4) 抗糖尿病金属配合物. 而后两者目前尚有待研究开发.

3.1 金属配体疗法

疏水性的配体 5-氯-7-碘-8-羟基喹啉(clioquinol, PBT-1, 图 6)是一种在美国已经被禁用的抗生素. 该化合物是铁螯合剂, 能结合铜和锌离子. PBT-1 是第一个进入临床研究的抗 AD 螯合剂, 并且是少数几个具有明确延缓 AD 进程的药物之一.

研究发现, PBT-1 的治疗能够降低 AD 小鼠模型的脑 A β 沉淀, 改善动物的认知功能和提高整体健康状况^[64-66]. 原先预期 PBT-1 可螯合铁, 但研究发现, PBT-1 的作用机制是作为一种离子载体^[65], 提高了神经细胞对铜和锌离子的摄取, 从而恢复 AD 引起的神经细胞铜和锌的缺乏. 研究发现, PBT-1 与维生素 B12 联用时抗 AD 效果更好. 但 PBT-1 毒性较大, 治疗实验中常导致 AD 模型动物的早夭; 在治疗期间同时给予铜补充则可基本消除此副作用^[67]. 由于合成技术等问题, PranaBiotech 公司放弃了 PBT-1 的开发.

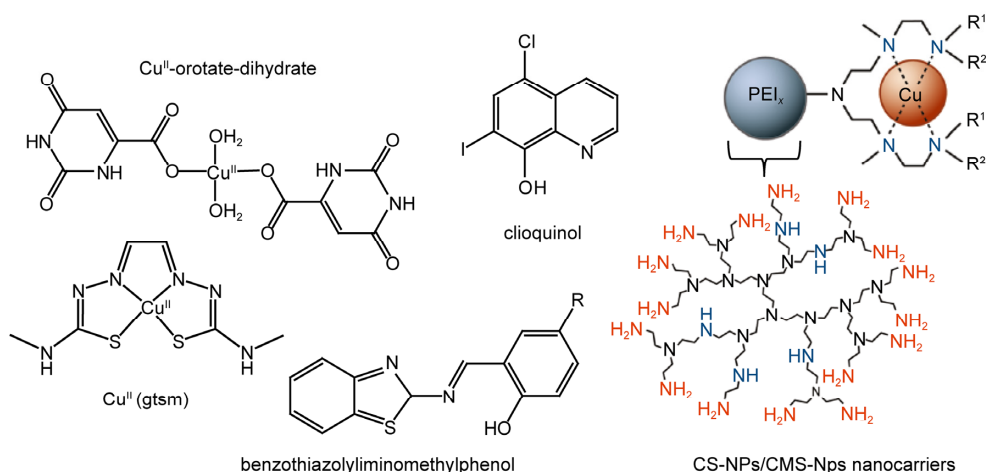


图 6 调节 AD 相关金属稳态的一些重要配体和制剂. Clioquinol 是第一个对 AD 有效的金属配体; 苯并噻唑亚氨基甲酚(benzothiazolyliminomethylphenol)具有结合 A β 和抗氧化性质; 乳清酸铜是第一个临床试验的补铜制剂; Cu^{II}(gtsm)的同系物 Cu^{II}(atsm)因不能有效传递 Cu²⁺, 而没有治疗效果

PBT-2 (prana biotechnology Ltd.)是第二代治疗AD的8-羟基喹啉衍生物^[4, 5]. PBT-2可作为活性更好的Cu和Zn细胞摄取的离子载体, 既能促进Zn从AP中迁移出来, 又能促进Zn进入神经元抑制GSK-3 β , 从而降低A β 水平. 口服PBT-2可在开始服药6天内使AD模型鼠的认知障碍得到改善. PBT-2可显著降低AD动物脑脊液(CSF)中A β_{42} 水平. 在PBT-2的二期临床试验中^[4, 5], 药物的耐受性非常好, 治疗降低了患者CSF中A β_{42} 的含量, 并改善了病人的健康状况. 目前, 该药物的三期临床研究仍未启动.

国内研究者也开发了新的铜螯合剂, 曲晓刚等^[68]采用水杨醛和可识别A β 的苯并噻唑合成了新的小分子螯合剂苯并噻唑亚氨基甲酚(图6). 该螯合剂不仅能够高效地识别A β , 与复合物中的Cu²⁺结合生成铜螯合物-A β 复合物, 从而抑制A β 聚集, 而且该复合物具有超氧化物歧化酶的活性, 具有抗氧化和细胞保护能力.

3.2 铜配合物疗法

如前所述, AD引起金属内稳态紊乱, 主要导致了神经细胞的铜缺乏. 除了可用PBT-2离子载体调节铜、锌离子转运, 从而恢复细胞铜水平外, 直接给AD患者补充铜, 可能发挥同样作用. 补充铜的好处在于: (1) 提高神经细胞的抗氧化酶如SOD水平, 提高线粒体活力, 从而促进APP非淀粉样途径的酶切、减少A β 生成^[4, 5, 66, 69]; (2) 铜调节细胞甲基化和蛋氨酸循环中的关键酶, 即AdoHcy水解酶的活性^[70], 从而降低独立AD风险因子Hcy的水平, 这与PBT-1与维生素B12联用效果相一致; (3) 给AD小鼠通过饮水中补铜(硫酸铜)发现, 补铜治疗可完全恢复SOD-1的活性, 显著延长AD动物的寿命^[71].

在一项给AD患者补铜治疗的临床试验中^[5, 72-74], 患者口服乳清酸铜(每日8 mg Cu)治疗12个月. 结果发现, 患者对治疗完全耐受; 但与对照组相比, 患者的认知能力并没有得到明显改善, 在患者的CSF中, tau蛋白及其磷酸化水平也没有变化. 但是CSF中A β_{42} 的指标得到了明显改善, 显示了补铜治疗仍有正面的作用.

值得注意的是, 本次临床研究中, 随机分成的对照组的血清铜水平自一开始即比治疗组高. 而在治疗组, 补铜组血清铜的水平一直也没像预期的那样得到提高. 此外, 在AD患者中, 相当比例的患者血

清铜蓝蛋白缺乏多铜氧化酶的活性^[75]. 铜的吸收和转运过程在体内受到了严格的控制, 还需跨越血脑屏障. 其中任何一种酶或转运蛋白功能损伤均可能导致口服的铜制剂不能达到目标的神经组织.

避开体内的自然铜吸收和转运系统, 建立更直接的铜转运体系, 可能是更好的补铜方法. 纳米铜载体系统使用核壳(core-shell)纳米微粒(CS-NPs)和同核多壳(core-multishell)纳米微粒(CMS-NPs)架构^[76]. 该系统可以特异地将铜运输到细胞的内吞囊泡并释放. 体外实验表明, 可将细胞铜水平提高到正常水平的3倍. 但纳米微粒药物能否跨越血脑屏障尚未得到确认.

双胺苯硫脲铜是一个医学影像用试剂. 常见的两个化合物Cu^{II}(gtsm)和Cu^{II}(atasm)均具有很好的血脑屏障穿透能力^[77]. 研究了这两种化合物对AD小鼠模型的作用^[69]. 结果发现, Cu^{II}(gtsm)运送铜的生物利用度好; Cu^{II}(gtsm)治疗可以抑制大脑组织GSK3 β 的活性, 降低tau蛋白磷酸化水平, 减少毒性的A β 三聚体含量, 基本恢复动物Y迷宫试验的表现. 并且, 迷宫试验的表现改善和A β 三聚体降低量直接相关. 而Cu^{II}(atasm)不能有效运送铜离子. 相应地, Cu^{II}(atasm)治疗对AD标识物以及动物行为功能均没有作用. 这一结果表明, 有效提高AD疾病组织的细胞铜水平可能对AD治疗具有意义.

3.3 金属配合物探针用于A β 成像

如前所述, 由于“认知储备”的存在, 从早期的AP和NFT出现到临床认知问题显现有一段较长的时期. 如果能在临床症状出现前早期诊断, 则可能防止或至少延缓临床AD病症的发生.

AP的形成和后续的A β 沉淀是AD病理进程中最早期的病理事件^[78, 79]. 因此, AP可作为一种最重要的早期诊断标识物; 而通过正电子成像术(positron emission tomography, PET)或磁共振医学影像(magnetic resonance imaging, MRI)检测AP是非侵入性并可可视化的诊断方法, 不仅可用于早期发现AD, 也可用于评价AD治疗药物的效果. 目前, 仅有很少的针对A β 斑块的诊断试剂开发^[79]; A β 斑块的诊断试剂在未来一段时期是大有可为的研究领域^[80].

钆造影剂是一种临床常用的非靶向的MRI造影剂. 向AD动物脑室注射钆造影剂, 发现药物可迅速扩散到大脑中, 获得高清晰度的影像, 能够分辨皮层和海马区中的单个AP^[81]. 采用此方法, 观察到AP随

年龄增加, 并且 MRI 的观察结果和组织学解剖观察结果一致性很好^[81].

对临床诊断来讲, AP 斑块成像试剂的首要要求是穿透 BBB 的能力^[82]. 可用 A β 结合分子如刚果红等修饰金属配体, 制备 ^{99m}Tc 配合物, 但化合物的 BBB 渗透力不好^[83, 84]. 二苯乙烯修饰的 ⁶⁴Cu-双胺苯硫脲配合物可透过 BBB, 与 A β 蛋白特异性结合, 可用于 PET 法的 AP 成像^[85]. 将具有成像能力的金属配合物或纳米颗粒和可与 A β 蛋白特异性结合的分子结构相结合形成 BBB 通透性试剂, 是未来的一个研究方向.

3.4 具有研究潜力的抗 AD 金属药物

3.4.1 抗糖尿病钒化合物的新功能

基于 MD 和 AD 病理机制的相关性, 胰岛素增敏型的抗糖尿病药物有可能用于 AD 的治疗^[8, 45~48]. 抗 MD 药物二甲双胍是 AMPK 激动剂. 研究发现, 二甲双胍可以升高 PP2A 的活性, 促进 tau 蛋白去磷酸化. PPAR α / γ 激动剂如罗格列酮(avandia)和吡格列酮可消除胰岛素抵抗, 抑制 GSK-3 β 活性. 体内外研究表明, PPAR α / γ 激动剂可消除 A β 诱导的炎症因子分泌、降低氧化应激水平. 在一系列临床研究中, 罗格列酮在早期 AD 患者中, 可以提高其选择性认知功能和改善 A β 40/42 的比例^[46]; 吡格列酮在 MD 和 AD 合并患者中, 可提高整体认知水平和陈述性记忆^[46]. 但是, 对罗格列酮的三期临床试验在轻度至中度 AD 患者中没有明显的疗效, 这可能是由于药物干预过晚.

钒化合物是具有胰岛素增敏作用的具有开发潜力的金属药物. 钒化合物抗糖尿病的机制包括: (1) 通过抑制蛋白质酪氨酸磷酸酶增强 PI3K-Akt 信号转导^[86], 而活化的 Akt 可抑制 tau 激酶 GSK-3 β ; (2) 作为一种新型的 PPAR γ 调节剂, 上调脂肪、胰腺和肌肉等细胞中的 PPAR γ 蛋白表达, 调节 PPAR γ 的磷酸化修饰和转录活性, 激活脂联素和 AMPK 信号转导, 抑制 tau 蛋白激酶 JNK 的磷酸化活化^[87, 88], 因此, 可能发挥降低 tau 蛋白磷酸化水平和抗炎保护作用; (3) 上调伴侣分子蛋白 BiP/GRP78, 抑制了促凋亡蛋白 CHOP 表达, 降低内质网应激和恢复细胞钙内稳态, 发挥细胞保护作用^[89], 因此, 有可能在 AD 进程中具有抑制神经细胞死亡的作用; (4) 在糖尿病大鼠模型上, 钒化合物可减缓糖尿病神经功能损伤, 显著提

高动物的空间学习和记忆能力^[90]. 腹腔注射钒的化合物, 明显提高脑缺血诱导的神经生长^[91]. 综上所述, 钒化合物可能在 AD 治疗中发挥作用, 实现金属药物的新突破.

3.4.2 血脑屏障和神经保护金属药物

在过去几年的临床研究中, 所有以 A β 为靶的药物均告失败. 一个重要的原因是, 至临床症状发生, A β 损伤已经相当严重, 神经元细胞已经开始了大量的凋亡. 此时, 抑制 AP 形成已经为时过晚, 更重要的则是神经保护治疗.

脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是在神经系统广泛表达、含量最多的神经营养因子^[92]. BDNF 与 TrkB 结合后, 激活 Ras-MAPK 通路, 最后在 CAMP 反应元件结合蛋白(CREB)的丝氨酸位点激活 CREB, 增加抗凋亡蛋白基因 BCL-2 的表达. 同时, BDNF 也可作用于线粒体, 促进氧化磷酸化并降低 ROS 生成. BDNF 可促进神经细胞生存, 增进突触可塑性及神经生长^[92]. 在 AD 动物模型正在退化的海马体, BDNF 呈现出显著的神经保护作用^[92]. AD 鼠模型的 AD 临床症状显现后, 施以 BDNF 基因治疗, 可以逆转突触丢失、部分纠正异常表达的基因、改善细胞间通讯并使学习能力和记忆力得到恢复^[92]. 在大龄老鼠模型身上注射 BDNF 可逆转认知力下降, 改善并恢复与年龄增长相关的基因表达的扰动现象^[92].

BDNF 是一种蛋白质, 难以跨越 BBB. 因此, 可激活大脑 BDNF 产生的药物, 可能在 AD 中发挥治疗作用. 本课题组^[93]发现, 稀土离子(Gd³⁺)可作用于大脑星形胶质细胞, 诱导细胞的保护性未折叠蛋白响应, 上调 BDNF 的表达和分泌, 从而保护神经元细胞. 此外, 稀土化合物还是自由基猝灭剂. 氧化钪纳米颗粒在体外实验中表现了很好的神经保护作用^[94, 95]. 因此, 具有抗氧化和促进 BDNF 作用的膜通透性稀土配合物可能在 AD 治疗中发挥作用.

在神经保护中, 血脑屏障的保护也是一个重要的环节. 如 2.2.1 小节所述, A β 损伤 BBB 是脑 A β 沉积和神经细胞死亡的原因之一. Zn 和 Vc 联用具有增强的抗氧化作用^[96]. 在 MDCK 细胞单层 BBB 模型上, Zn 和 Vc 联用可有效阻止重金属引起的细胞紧密连接开放^[96].

4 结论

近年来, 人们对 AD 病理的分子机制的研究获得了重要的进展, 在 A β 假说的基础上, 对 A β 作用的两面性和 A β 蛋白及寡聚体的毒性产生的机制有了崭新的认识. 人们更加清楚, AD 是一个多因素的神经退行性病变, 其中金属内稳态失衡、线粒体功能变化、胰岛素抵抗、血脑屏障损伤和血清同型半胱氨酸水平

均涉及其中, 并且存在密切的相互联系. 而新的 AD “金属理论”为金属药物和制剂在 AD 诊断和治疗中提供了新的理论依据. 在未来的研究中, 金属药物和诊断试剂在下列 4 个方面具有发展机会: (1) 通过配体和金属伴侣分子调节金属稳态; (2) 抗糖尿病金属配合物去除胰岛素抵抗; (3) 神经元和 BBB 保护金属药物; (4) 针对 AP 的早期 AD 医学影像探针.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20971008, 21271012)、教育部博士点基金、方正创新药物基金资助和天然和仿生国家重点实验室有组织项目支持, 特此一并致谢.

参考文献

- Mullane K, Williams M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis-but what lies beyond? *Biochem Pharmacol*, 2013, 85: 289–305
- Weiner MW. Dementia in 2012: further insights into Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9: 65–66
- Ubhi K, Masliah E. Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S185–S194
- Bush AI. The metal theory of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S277–S281
- Ayton S, Lei P, Bush AI. Metallostatics in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 76–89
- Zhu X, Perry G, Smith MA, Wang X. Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S253–S262
- Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 90–101
- Vignini A, Giulietti A, Nanetti L, Raffaelli F, Giusti L, Mazzanti L, Provinciali L. Alzheimer's disease and diabetes: new insights and unifying therapies. *Curr Diabetes Rev*, 2013, 9: 218–227
- Burgmans S, van de Haar HJ, Verhey FR, Backes WH. Amyloid-beta interacts with blood-brain barrier function in dementia: a systematic review. *J Alzheimers Dis*, 2013, 35: 859–873
- Hinterberger M, Fischer P. Folate and Alzheimer: when time matters. *J Neural Transm*, 2013, 120: 211–224
- Riley KP, Snowdon DA, Markesbery WR. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study. *Ann Neurol*, 2002, 51: 567–577
- Duarte AI, Candeias E, Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Placido A, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Crosstalk between diabetes and brain: glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832: 527–541
- Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L. SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell*, 2010, 142: 320–332
- Selfridge JE, Lezi E, Lu JH, Swerdlow RH. Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 2013, 51: 3–12
- Walker LC, Diamond MI, Duff KE, Hyman BT. Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases. *JAMA Neurol*, 2013, 70: 304–310
- Puzzo D, Arancio O. Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S111–S120
- Nussbaum JM, Seward ME, Bloom GS. Alzheimer disease: a tale of two prions. *Prion*, 2013, 7: 14–19
- Kook SY, Hong HS, Moon M, Ha CM, Chang S, Mook-Jung I. A β_{1-42} -RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca²⁺-calcineurin signaling. *J Neurosci*, 2012, 32: 8845–8854
- Kayed R, Lasagna-Reeves CA. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S67–S78
- Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M, Yanagisawa K. A ganglioside-induced toxic soluble A β assembly. Its enhanced formation from A β bearing the Arctic mutation. *J Biol Chem*, 2007, 282: 2646–2655

- 21 Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*, 2007, 27: 2866–2875
- 22 Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J*, 2008, 22: 246–260
- 23 Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J*, 2001, 15: 2433–2444
- 24 Bu G, Cam J, Zerbinatti C. LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1086: 35–53
- 25 Deane R, Du Yan S, Subramanyam RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*, 2003, 9: 907–913
- 26 Keil U, Hauptmann S, Bonert A, Scherping I, Eckert A, Muller WE. Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant AbetaPP and tau protein mutations. *J Alzheimers Dis*, 2006, 9: 139–146
- 27 Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M, LaFerla FM. A β inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging*, 2008, 29: 1607–1618
- 28 Ma SL, Pastorino L, Zhou XZ, Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 promotes amyloid precursor protein (APP) turnover by inhibiting glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) activity: novel mechanism for Pin1 to protect against Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 2012, 287: 6969–6973
- 29 Schini-Kerth VB. Homocysteine, a proinflammatory and proatherosclerotic factor: role of intracellular reactive oxygen species. *Circ Res*, 2003, 93: 271–273
- 30 Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Terro F. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Res Rev*, 2013, 12: 39–49
- 31 Yumoto S, Kakimi S, Ohsaki A, Ishikawa A. Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem*, 2009, 103: 1579–1584
- 32 吕小平, 谭相石. 阿尔茨海默病相关的金属内稳态平衡调控研究. *化学进展*, 2013, 25: 511–519
- 33 Sensi SL, Paoletti P, Koh JY, Aizenman E, Bush AI, Hershfinkel M. The neurophysiology and pathology of brain zinc. *J Neurosci*, 2011, 31: 16076–16085
- 34 Miller LM, Wang Q, Telivala TP, Smith RJ, Lanzitotti A, Miklossy J. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J Struct Biol*, 2006, 155: 30–37
- 35 Crouch PJ, Savva MS, Hung LW, Donnelly PS, Mot AI, Parker SJ, Greenough MA, Volitakis I, Adlard PA, Cherny RA, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ, White AR. The Alzheimer's therapeutic PBT2 promotes amyloid-beta degradation and GSK3 phosphorylation via a metal chaperone activity. *J Neurochem*, 2011, 119: 220–230
- 36 Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD, Ling KQ, Huang X, Moir RD, Wang D, Sayre LM, Smith MA, Chen SG, Bush AI. Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. *Biochemistry*, 2004, 43: 560–568
- 37 Tougu V, Karafin A, Zovo K, Chung RS, Howells C, West AK, Palumaa P. Zn(II)- and Cu(II)-induced non-fibrillar aggregates of amyloid-beta (1-42) peptide are transformed to amyloid fibrils, both spontaneously and under the influence of metal chelators. *J Neurochem*, 2009, 110: 1784–1795
- 38 Magaki S, Raghavan R, Mueller C, Oberg KC, Vinters HV, Kirsch WM. Iron, copper, and iron regulatory protein 2 in Alzheimer's disease and related dementias. *Neurosci Lett*, 2007, 418: 72–76
- 39 Sayre LM, Perry G, Harris PL, Liu Y, Schubert KA, Smith MA. *In situ* oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem*, 2000, 74: 270–279
- 40 Mills E, Dong XP, Wang F, Xu H. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Med Chem*, 2010, 2: 51–64
- 41 Qian ZM, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends Mol Med*, 2001, 7: 103–108
- 42 Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikke K, Leong SL, Perez K, Johanssen T, Greenough MA, Cho HH, Galatis D, Moir RD, Masters CL, McLean C, Tanzi RE, Cappai R, Barnham KJ, Ciccotosto GD, Rogers JT, Bush AI. Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, 2010, 142: 857–867
- 43 Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Spoerri L, Ciccotosto GD, Wright DK, Wong BX, Adlard PA, Cherny RA, Lam LQ, Roberts BR, Volitakis I, Egan GF, McLean CA, Cappai R, Duce JA, Bush AI. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron

- export. *Nat Med*, 2012, 18: 291–295
- 44 Fenton JM, Pellin MJ, kaufmann KJ. Primary photochemistry of the reaction center of photosystem I. *FEBS Lett*, 1979, 100: 1–4
- 45 De Felice FG. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. *J Clin Invest*, 2013, 123: 531–539
- 46 Craft S, Cholerton B, Baker LD. Insulin and Alzheimer's disease: untangling the web. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S263–275
- 47 Ahmad W. Overlapped metabolic and therapeutic links between Alzheimer and diabetes. *Mol Neurobiol*, 2013, 47: 399–424
- 48 Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*, 2013, 108: 21–43
- 49 Grens K. Alzheimer's: Type 3 diabetes? *Scientist*, 2007, 21: 78
- 50 Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci*, 2001, 21: 2561–2570
- 51 Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, 2003, 423: 435–439
- 52 Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*, 1998, 273: 32730–32738
- 53 Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res*, 2012, 1441: 64–78
- 54 Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995, 378: 785–789
- 55 Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldiks N, Kustermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Bruning JC. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 3100–3105
- 56 Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci*, 2003, 23: 7084–7092
- 57 Freude S, Plum L, Schnitker J, Leeser U, Udelhoven M, Krone W, Bruning JC, Schubert M. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation *in vivo*. *Diabetes*, 2005, 54: 3343–3348
- 58 Cheng CM, Tseng V, Wang J, Wang D, Matyakhina L, Bondy CA. Tau is hyperphosphorylated in the insulin-like growth factor-I null brain. *Endocrinology*, 2005, 146: 5086–5091
- 59 Moreira PI, Santos MS, Seica R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci*, 2007, 257: 206–214
- 60 Mosconi L, de Leon M, Murray J, Lezi E, Lu J, Javier E, McHugh P, Swerdlow RH. Reduced mitochondria cytochrome oxidase activity in adult children of mothers with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2011, 27: 483–490
- 61 Piaceri I, Rinnoci V, Bagnoli S, Failli Y, Sorbi S. Mitochondria and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 2012, 322: 31–34
- 62 Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol*, 2013, 23: 64–71
- 63 Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 2002, 420: 333–336
- 64 Grossi C, Francese S, Casini A, Rosi MC, Luccarini I, Fiorentini A, Gabbiani C, Messori L, Moneti G, Casamenti F. Clioquinol decreases amyloid-beta burden and reduces working memory impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2009, 17: 423–440
- 65 Treiber C, Simons A, Strauss M, Hafner M, Cappai R, Bayer TA, Multhaup G. Clioquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 2004, 279: 51958–51964
- 66 Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, Gautier E, Robb E, Cortes M, Volitakis I, Liu X, Smith JP, Perez K, Laughton K, Li QX, Charman SA, Nicolazzo JA, Wilkins S, Deleva K, Lynch T, Kok G, Ritchie CW, Tanzi RE, Cappai R, Masters CL, Barnham KJ, Bush AI. Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial A β . *Neuron*, 2008, 59: 43–55
- 67 Schäfer S, Pajonk FG, Multhaup G, Bayer TA. Copper and clioquinol treatment in young APP transgenic and wildtype mice: effects on life expectancy, body weight, and metalion levels. *J Mol Med*, 2007, 85: 405–413
- 68 Geng J, Li M, Wu L, Ren J, Qu X. Liberation of copper from amyloid plaques: making a risk factor useful for Alzheimer's disease treatment. *J Med Chem*, 2012, 55: 9146–9155

- 69 Crouch PJ, Hung LW, Adlard PA, Cortes M, Lal V, Filiz G, Perez KA, Nurjono M, Caragounis A, Du T, Laughton K, Volitakis I, Bush AI, Li QX, Masters CL, Cappai R, Cherny RA, Donnelly PS, White AR, Barnham KJ. Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 381–386
- 70 Li M, Li Y, Chen J, Wei W, Pan X, Liu J, Liu Q, Leu W, Zhang L, Yang X, Lu J, Wang K. Copper ions inhibit S-adenosylhomocysteine hydrolase by causing dissociation of NAD⁺ cofactor. *Biochemistry*, 2007, 46: 11451–11458
- 71 Bayer TA, Schafer S, Simons A, Kemmling A, Kamer T, Tepest R, Eckert A, Schussel K, Eikenberg O, Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Staufenbiel M, Multhaup G. Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14187–14192
- 72 Kaden D, Bush AI, Danzeisen R, Bayer TA, Multhaup G. Disturbed copper bioavailability in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 2011: 345614
- 73 Kessler H, Bayer TA, Bach D, Schneider-Axmann T, Supprian T, Herrmann W, Haber M, Multhaup G, Falkai P, Pajonk FG. Intake of copper has no effect on cognition in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. *J Neural Transm*, 2008, 115: 1181–1187
- 74 Kessler H, Pajonk FG, Bach D, Schneider-Axmann T, Falkai P, Herrmann W, Multhaup G, Wiltfang J, Schafer S, Wirths O, Bayer TA. Effect of copper intake on CSF parameters in patients with mild Alzheimer's disease: a pilot phase 2 clinical trial. *J Neural Transm*, 2008, 115: 1651–1659
- 75 Brewer GJ, Kanzer SH, Zimmerman EA, Celmins DF, Heckman SM, Dick R. Copper and ceruloplasmin abnormalities in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, 2010, 25: 490–497
- 76 Treiber C, Quadir MA, Voigt P, Radowski M, Xu S, Munter LM, Bayer TA, Schaefer M, Haag R, Multhaup G. Cellular copper import by nanocarrier systems, intracellular availability, and effects on amyloid β peptide secretion. *Biochemistry*, 2009, 48: 4273–4284
- 77 Fodero-Tavoletti MT, Villemagne VL, Paterson BM, White AR, Li QX, Camakaris J, O'Keefe G, Cappai R, Barnham KJ, Donnelly PS. Bis(thiosemicarbazonato) Cu-64 complexes for positron emission tomography imaging of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2010, 20: 49–55
- 78 Rowe CC, Villemagne VL. Amyloid imaging with PET in early Alzheimer disease diagnosis. *Med Clin North Am*, 2013, 97: 377–398
- 79 Villemagne VL, Rowe CC. Long night's journey into the day: amyloid-beta imaging in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S349–359
- 80 Braskie MN, Toga AW, Thompson PM. Recent advances in imaging Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33 (Suppl 1): S313–S327
- 81 Petiet A, Santin M, Bertrand A, Wiggins CJ, Petit F, Houitte D, Hantraye P, Benavides J, Debeir T, Rooney T, Dhenain M. Gadolinium-staining reveals amyloid plaques in the brain of Alzheimer's transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 2012, 33: 1533–1544
- 82 Andrieux K, Couvreur P. Nanomedicine as a promising approach for the treatment and diagnosis of brain diseases: the example of Alzheimer's disease. *Ann Pharm Fr*, 2013, 71: 225–233
- 83 Cui M, Tang R, Li Z, Ren H, Liu B. 99mTc- and Re-labeled 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as imaging probes for beta-amyloid plaques. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 1064–1068
- 84 Dezutter NA, Dom RJ, de Groot TJ, Bormans GM, Verbruggen AM. 99mTc-MAMA-chrysamine G, a probe for beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med*, 1999, 26: 1392–1399
- 85 Lim S, Paterson BM, Fodero-Tavoletti MT, O'Keefe GJ, Cappai R, Barnham KJ, Villemagne VL, Donnelly PS. A copper radiopharmaceutical for diagnostic imaging of Alzheimer's disease: a bis(thiosemicarbazonato)copper(II) complex that binds to amyloid-beta plaques. *Chem Commun*, 2010, 46: 5437–5439
- 86 Zhang Z, Gao N, He H, Huang C, Luo J, Shi X. Vanadate activated Akt and promoted S phase entry. *Mol Cell Biochem*, 2004, 255: 227–237
- 87 Zhao P, Yang X. Vanadium compounds modulate PPARgamma activity primarily by increasing PPARgamma protein levels in mouse insulinoma NIT-1 cells. *Metallomics*, 2013, 5: 836–843
- 88 Wu Y, Huang M, Zhao P, Yang X. Vanadyl acetylacetonate upregulates PPARgamma and adiponectin expression in differentiated rat adipocytes. *J Biol Inorg Chem*, 2013, 18: 623–631
- 89 Gao Z, Zhang C, Yu S, Yang X, Wang K. Vanadyl bisacetylacetonate protects beta cells from palmitate-induced cell death through the unfolded protein response pathway. *J Biol Inorg Chem*, 2011, 16: 789–798
- 90 Mao X, Zhang L, Xia Q, Sun Z, Zhao X, Cai H, Yang X, Xia Z, Tang Y. Vanadium-enriched chickpea sprout ameliorated hyperglycemia and impaired memory in streptozotocin-induced diabetes rats. *Biometals*, 2008, 21: 563–570
- 91 Shioda N, Han F, Morioka M, Fukunaga K. Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) enhances neurogenesis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal regulated kinase activation in the hippocampal subgranular zone after mouse focal cerebral ischemia.

- Neuroscience*, 2008, 155: 876–887
- 92 Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2009, 15: 331–337
- 93 Xia Q, Feng X, Yuan L, Wang K, Yang XD. Brain-derived neurotrophic factor protects neurons from GdCl₃-induced impairment in neuron-astrocyte co-cultures. *Sci China Chem*, 2010, 53: 2193–2199
- 94 Schubert D, Dargusch R, Raitano J, Chan SW. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 86–91
- 95 Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, Ludington JS, Chatani P, Mosenthal WP, Leiter JC, Andreescu S, Erlichman JS. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51: 1155–1163
- 96 Xu ZH, Wang XY, Xiao RY, Yang XD. Combination of vitamin C and zinc gluconate prevented vanadium-induced tight junction leakage of MDCK cell monolayer. *J Chin Pharm Sci*, 2013, 22: 403–408

Metallostasis and metal-based drugs for Alzheimer's disease

ZHANG Yue, XIA Qing, YANG XiaoDa^{*}, WANG Kui

State Key Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs; Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

^{*}Corresponding author (email: xyang@bjmu.edu.cn)

Abstract: With the advance of aging, Alzheimer's disease (AD) is creating unsustainable challenges to healthcare and economy in China and worldwide. Recent researches demonstrated that the mechanism of AD involves a multiple of metabolic disorders, i.e. metallostasis, insulin resistance, neuroinflammation, alteration of mitochondria, and changes of blood brain barrier (BBB) function, linked with each other in the core mechanism of amyloid plaque and neurofibrillary tangles (NFT). Strong evidences indicated that each of the major protein participants in AD pathology has physiologically important interactions with transition metals. The amyloid pathology causes disorders of metal homeostasis in neurons, which inversely aggravate AD progress. Metal-based drugs/agents are of great potential in AD diagnosis and therapy, i.e. (i) probes for early AD diagnosis, (ii) metal ligands and/or complexes modulating metallostasis, (iii) anti-diabetic metal complexes, and (iv) BBB and neuron protective metal compounds.

Keywords: Alzheimer's disease, metal-based drugs, metallostasis, ligand therapy, neuroprotection