



中枢神经系统疾病治疗的新技术——

# 蛋白质和核酸的人脑转运

Danbaizhi He Hesuan De Runao Zhuanyun

付爱玲 赵宝全 ◆ 编著



西南师范大学出版社

国家一级出版社 全国百佳图书出版单位



中國醫藥大學醫藥科學院學術講座——

# 蛋白質和核酸的人體轉運

中國醫藥大學藥學系 編著



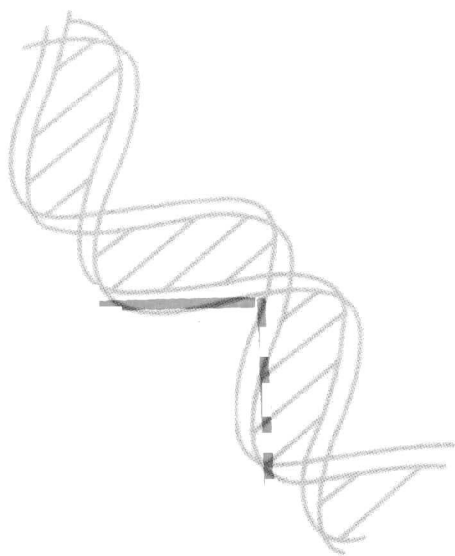
中國醫藥大學出版社

本著作受国家自然科学基金（31072098）、重庆市自然科学基金（CSTC20090182120017）和重庆市科学技术协会学术著作出版基金的资助。

中枢神经系统疾病治疗的新技术——  
**蛋白质和核酸的人脑转运**

Danbaizhi He Hesuan De Runao Zhuanyun

付爱玲 赵宝全 ❖ 编著



**西南师范大学出版社**  
国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

---

**图书在版编目(CIP)数据**

中枢神经系统疾病治疗的新技术:蛋白质和核酸的人脑转运 / 付爱玲,赵宝全编著. —重庆:西南师范大学出版社,2012.4

ISBN 978-7-5621-5678-9

I. ①中… II. ①付…②赵… III. ①中枢神经系统疾病—治疗 IV. ①R741.05

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 072391 号

---

中枢神经系统疾病治疗的新技术——

**蛋白质和核酸的人脑转运**

付爱玲 赵宝全 编 著

责任编辑:伯古娟

书籍设计:周 娟 廖明媛

照 排:夏 洁

出版、发行:西南师范大学出版社

(重庆·北碚 邮编:400715)

网址:www.xscbs.com)

印 刷:重庆川外印务有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:15

字 数:384 千字

版 次:2012 年 7 月第 1 版

印 次:2012 年 7 月第 1 次印刷

书 号:ISBN 978-7-5621-5678-9

---

定 价:29.00 元

中枢神经系统疾病药物治疗的瓶颈在于血脑屏障对物质转运的严格限制。以往的传统观念，外源性蛋白质和核酸难以通过血脑屏障，因此中枢神经系统疾病药物的研发局限于小分子化合物领域。近些年科技的发展更新了人们原有的观念，大分子蛋白质和核酸也可以在载体的协助下通透血脑屏障以及其他生物学屏障，进入中枢神经系统或其他组织系统中。《中枢神经系统疾病治疗的新技术——蛋白质和核酸的入脑转运》这本书总结了大分子蛋白质和核酸入脑转运的研究结果，并对纳米颗粒入脑转运进行了评述。此书内容丰富，可读性强，编者对资料的理解和对中枢神经系统生物药物越膜遣送的认识非常深刻。目前国内尚未见该方面的专著。本书对从事脑靶向药物遣送领域的科研工作者提供了重要的参考，也为从事中枢神经系统疾病研究的医务人员提供了有益的借鉴。这本著作值得向大家推荐。

中国科学院院士

2011年12月

孙曼霁

中枢神经系统疾病是指脑部和脊髓由于受到了感染、病变、先天遗传、外伤及新陈代谢障碍等多方面的影响所引起的一种疾病。随着现代人类社会的老龄化和全球生态环境的逐步恶化,中枢神经系统疾病逐渐成为危害人类生命和健康的重大疾病。中枢神经系统疾病包括神经退行性疾病,遗传性神经疾病,中枢神经系统肿瘤以及其他如中风、癫痫和中枢感染性疾病。此外,随着社会节奏的加快和压力的增加,焦虑、抑郁和精神分裂症等疾病的发病率也在大幅度增加。

现代老年社会需要大量治疗中枢神经系统疾病的药物。然而,临床上的治疗药物严重不足。中枢神经系统疾病药物发展的主要障碍在于血脑屏障。血脑屏障阻挡了超过98%的小分子化合物和几乎所有的大分子蛋白质和核酸的入脑转运。药物的研究不能仅限于小分子化合物,将作用机制明确、具有治疗价值的大分子蛋白质和核酸用于疾病的治疗,是药物发展的一个重要方向。然而,在其他疾病进行蛋白质治疗和基因治疗已经走向临床应用的今天,中枢神经系统疾病的蛋白质治疗和基因治疗仍然是空白。

要使蛋白质和核酸药物在中枢神经系统中发挥作用,首先必须能够透过或绕过血脑屏障,并在脑脊液中达到有效的浓度,因此研究药物通过血脑屏障的方法十分重要。使用载体引导外源分子通过血脑屏障是一个有效的方法,其中以具有中枢神经系统靶向,甚至是细胞器靶向作用的多肽为载体,引导蛋白质和核酸向中枢神经细胞内的转运正成为全球药物研发的热点之一。目前有关蛋白质和基因治疗中枢神经系统疾病的研究报道逐年增多,但迄今国内尚没有一本完整地阐述蛋白质和核酸入脑转运治疗中枢神经系统疾病的专著。

全书概括了中枢神经系统疾病、具有治疗价值的蛋白质和核酸、蛋白质和核酸进入中枢神经系统的研究思路 and 策略,对蛋白质和基因治疗中枢神

经系统疾病的研究进行了系统阐述,又包括了代表性研究实例。本书既有基础的理论阐述,又有详细的研究方法及编写者的研究心得和体会。希望本书能够为从事中枢神经系统疾病研究的人员提供相关的理论基础、设计思路和研究方法,也为其他领域的研究者提供借鉴和参考,同时也希望对我国治疗中枢神经系统疾病的生物药物的研究和发展有所裨益。

衷心感谢国家自然科学基金(31072098)、重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5011)、教育部博士点基金(20090182120017)和重庆市科学技术协会学术著作出版基金对本书的大力支持。本书的编写也得到各有关院校、研究所的大力支持及帮助,特别是中国科学院院士孙曼霁研究员对本书的编写思路提出了许多有益的建议,并欣然作序,本书的内容凝聚了编写者的研究成果,也包含了众多研究生的辛勤工作和聪明智慧,军事医学科学院的周建平、李前博士;西南大学的徐兴然、李晓荣、李翀博士,以及王逸麟、周如梅、战丽萍、张苗苗、高飞燕硕士为本书的出版提供了大力帮助,在此一并致谢。

虽然已经尽了很大的努力,但限于个人的学术水平和学科的迅速发展,疏漏、不妥和错误的地方在所难免,恳请广大专家和读者批评指正。

付爱玲

2011年11月于重庆

# 目 录



CONTENTS

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| <b>第一章 中枢神经系统疾病</b>             | 1  |
| <b>第一节 神经退行性疾病</b>              | 1  |
| 一、阿尔茨海默氏病                       | 1  |
| 二、帕金森氏症                         | 7  |
| 三、肌萎缩侧索硬化症                      | 10 |
| <b>第二节 遗传性神经疾病</b>              | 13 |
| 一、亨廷顿舞蹈病                        | 13 |
| 二、戈谢病                           | 15 |
| 三、Lesch-Nyhan 病                 | 16 |
| <b>第三节 中枢神经系统肿瘤</b>             | 16 |
| 一、中枢神经系统肿瘤的病理分类                 | 17 |
| 二、胶质瘤                           | 17 |
| 三、中枢神经系统肿瘤的信号转导通路、侵袭和血管形成的分子机制  | 18 |
| 四、中枢神经系统肿瘤的药物治                  | 21 |
| 五、脑肿瘤的动物模型                      | 22 |
| <b>第四节 其他中枢神经系统疾病</b>           | 23 |
| 一、脑缺血及其再灌注损伤                    | 23 |
| 二、癫痫综合征                         | 28 |
| 三、中枢神经系统感染性疾病                   | 29 |
| <b>第五节 精神性疾病</b>                | 36 |
| 一、焦虑症                           | 36 |
| 二、抑郁症                           | 38 |
| 三、精神分裂症                         | 40 |
| <b>第二章 治疗中枢神经系统疾病常用的蛋白质及其核酸</b> | 44 |
| <b>第一节 蛋白质治疗与基因治疗</b>           | 44 |
| 一、蛋白质治疗                         | 44 |
| 二、基因治疗                          | 44 |
| <b>第二节 常用的治疗性蛋白质及其核酸</b>        | 49 |
| 一、酶类                            | 49 |



|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| 二、神经营养因子 .....                             | 57         |
| 三、细胞凋亡和肿瘤相关蛋白 .....                        | 68         |
| 四、热休克蛋白 .....                              | 73         |
| <b>第三章 血脑屏障与侵人性脑内给药方式 .....</b>            | <b>78</b>  |
| <b>第一节 血脑屏障 .....</b>                      | <b>78</b>  |
| 一、血脑屏障的结构 .....                            | 78         |
| 二、维持血脑屏障功能的细胞分子基础 .....                    | 80         |
| 三、BBB 的物质转运机制 .....                        | 84         |
| 四、影响 BBB 通透性的因素 .....                      | 89         |
| <b>第二节 侵入性注射蛋白质和核酸进入中枢神经系统 .....</b>       | <b>91</b>  |
| 一、侵入性给药方法 .....                            | 92         |
| 二、侵入性脑内给予蛋白质和核酸 .....                      | 93         |
| 三、侵入性给药方式存在的问题 .....                       | 95         |
| <b>第四章 细胞穿透肽介导蛋白质进入中枢神经系统 .....</b>        | <b>96</b>  |
| <b>第一节 细胞穿透肽介导蛋白质入脑转运 .....</b>            | <b>96</b>  |
| 一、CPPs 家族的研究历史 .....                       | 97         |
| 二、CPPs 的分类 .....                           | 97         |
| 三、CPPs 与外源物质的连接方法 .....                    | 102        |
| 四、穿膜机制 .....                               | 104        |
| 五、CPPs 体内转运蛋白质 .....                       | 109        |
| 六、CPPs 的毒性研究 .....                         | 110        |
| <b>第二节 CPPs 引导蛋白质入脑转运的临床前研究和临床应用 .....</b> | <b>110</b> |
| 一、含有 CPPs-药物的临床前研究 .....                   | 110        |
| 二、含有 CPPs-药物的临床试验 .....                    | 116        |
| <b>第三节 CPPs 引导蛋白质靶脑转运 .....</b>            | <b>118</b> |
| 一、促进蛋白质靶向性的策略 .....                        | 118        |
| 二、靶脑多肽载体的开发 .....                          | 119        |
| <b>第四节 靶向细胞器转运的多肽载体 .....</b>              | <b>129</b> |
| 一、细胞质靶向肽 .....                             | 130        |
| 二、细胞核靶向肽 .....                             | 130        |
| 三、线粒体靶向肽 .....                             | 131        |
| 四、溶酶体靶向肽 .....                             | 131        |
| 五、内质网靶向肽 .....                             | 132        |

|                                        |     |
|----------------------------------------|-----|
| <b>第五章 血脑屏障上受体介导的蛋白质入脑转运</b>           | 133 |
| <b>第一节 BBB 内皮细胞受体的抗体或配体为载体的蛋白质靶脑转运</b> | 133 |
| 一、以 BBB 内皮细胞上受体的抗体为载体                  | 133 |
| 二、以 BBB 内皮细胞上受体的内源性配体为载体               | 137 |
| 三、以阳离子化白蛋白或免疫球蛋白为载体                    | 139 |
| 四、其他                                   | 140 |
| 五、转运载体与蛋白质的连接                          | 141 |
| <b>第二节 噬菌体展示技术筛选靶向血脑屏障内皮细胞的多肽</b>      | 143 |
| <b>第六章 核酸的人脑转运</b>                     | 146 |
| <b>第一节 病毒载体对 CNS 疾病的基因治疗</b>           | 146 |
| 一、病毒载体的分类                              | 146 |
| 二、病毒载体介导对 CNS 疾病的基因治疗                  | 149 |
| 三、病毒载体介导基因转移存在的问题                      | 152 |
| <b>第二节 介导核酸向体内转运的非病毒载体</b>             | 152 |
| 一、裸 DNA                                | 153 |
| 二、阳离子脂质体                               | 156 |
| 三、阳离子聚合物                               | 157 |
| 四、CPPs 引导核酸的细胞内转运                      | 160 |
| <b>第三节 介导核酸进入中枢神经系统的非病毒载体</b>          | 165 |
| 一、CPPs 介导核酸的脑靶向转运                      | 166 |
| 二、免疫脂质体介导的核酸脑靶向转运                      | 166 |
| 三、亲和素—生物素系统                            | 170 |
| 四、纳米粒子介导核酸的脑靶向转运                       | 171 |
| <b>第七章 蛋白质和核酸的鼻腔给药</b>                 | 180 |
| 一、鼻腔的结构及药物由鼻腔至脑的转运方式                   | 180 |
| 二、鼻腔内药物吸收的影响因素                         | 182 |
| 三、鼻腔给药传递蛋白质和核酸进入中枢神经系统                 | 183 |
| 四、鼻腔给药存在的问题及对策                         | 185 |
| <b>第八章 蛋白质和核酸通透血脑屏障的其他方法</b>           | 187 |
| <b>第一节 开放 BBB 的评价方法</b>                | 187 |
| 一、示踪剂法                                 | 187 |
| 二、组织切片法                                | 188 |
| 三、影像学评价                                | 188 |

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| <b>第二节 开放 BBB 的方法</b> .....             | 189 |
| 一、渗透性 BBB 开放法 .....                     | 189 |
| 二、超声波开放 BBB .....                       | 190 |
| 三、血管活性肽开放 BBB .....                     | 192 |
| 四、利用具有芳香开窍作用的中药开启 BBB .....             | 193 |
| 五、细菌葡萄糖肽开放 BBB .....                    | 194 |
| 六、抗菌抗体 .....                            | 194 |
| 七、油酸 .....                              | 195 |
| 八、烟碱 .....                              | 195 |
| 九、利用多药耐药性(MDR)逆转剂提高脑内药物转运 .....         | 195 |
| <br><b>第九章 蛋白质和核酸人脑转运研究中的技术难点</b> ..... | 196 |
| <b>第一节 连接方法</b> .....                   | 196 |
| 一、基因工程技术实现多肽载体与蛋白质的连接 .....             | 196 |
| 二、多肽修饰纳米颗粒的制备 .....                     | 202 |
| 三、多肽载体的抗原性检测 .....                      | 205 |
| <b>第二节 药物通透血脑屏障的研究方法</b> .....          | 206 |
| 一、药物透过血脑屏障的在体研究 .....                   | 207 |
| 二、药物透过血脑屏障的离体研究 .....                   | 207 |
| <b>第三节 大脑神经细胞的原代培养</b> .....            | 209 |
| 一、皮层神经元的培养 .....                        | 209 |
| 二、海马神经元的培养 .....                        | 210 |
| 三、神经胶质细胞的原代培养 .....                     | 212 |
| <br><b>附录</b> .....                     | 213 |
| 附录一、组成生物体 20 种氨基酸的结构与基本性质 .....         | 213 |
| 附录二、20 种氨基酸的密码子 .....                   | 217 |
| 附录三、大肠杆菌偏爱的密码子 .....                    | 217 |
| 附录四、罕用密码子 .....                         | 218 |
| 附录五、英文缩写与中文对照 .....                     | 218 |
| <br><b>参考文献</b> .....                   | 226 |

## 第一章 中枢神经系统疾病

中枢神经系统疾病是指脑部和脊髓由于受到了感染、病变、先天遗传、外伤及新陈代谢障碍等多方面的影响所引起的一种疾病。随着现代人类社会的老龄化和全球生态环境的逐步恶化,中枢神经系统疾病逐渐成为危害人类生命和健康的重大疾病。中枢神经系统疾病包括神经退行性疾病、遗传性神经疾病、中枢神经系统肿瘤以及其他如中风、癫痫和中枢感染性疾病。此外,随着社会节奏的加快和压力的增加,焦虑和抑郁等疾病的发病率也在大幅度增加。本章将对中枢神经系统疾病进行介绍。

### 第一节 神经退行性疾病

#### 一、阿尔茨海默氏病

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)是一种在老年期发生的以进行性痴呆为主要特征的中枢神经系统退行性疾病。在 1907 年由德国医生 Alois Alzheimer 首次描述。其主要临床表现为进行性认知功能障碍和记忆力衰退,性格和行为改变,意识错乱,思考及判断力丧失,生活自理能力丧失,最终死亡。这种破坏性的大脑退行性疾病剥夺了受害者最具人类特征的品质——记忆、推理、抽象化和语言的能力。AD 在西方国家是继心血管疾病、癌症和中风的第四大死因,严重危害老年人的身体健康和生活质量。本病多起病缓,难以确定病期,待痴呆明显而就诊时,常在发病后 1~2 年半以上。另外,该病病程长,约 3~20 年,给社会、家庭和患者带来沉重的负担和痛苦。

在生物医学历史上,有关 AD 的话题几乎没能引起科学家们多少兴趣。这种情况在 20 世纪下半叶发生了戏剧性的变化,当时美国的人均预期寿命从 49 岁增加到 76 岁,使得个体年龄增加到了神经退行性疾病普遍发生的年龄。AD 发生于老年人,衰老是 AD 肯定的危险因素。随着年龄的增长,AD 患病率呈指数升高趋势。一般认为,超过 65 岁,每增加 5 岁患 AD 病的比例就增加一倍。随着世界人口老龄化发展,AD 已成为 65 岁以上痴呆患者最常见的病因,在发达国家已被认为是一个主要的公众健康问题。

#### 1 AD 的病理特征

AD 患者脑内主要的组织病理学改变包括老年斑(senile plaques, SP)、神经元纤维缠结(neuro fibrillary tangles, NFT)、颗粒空泡变性、平野小体、神经元缺失和淀粉样血管改变(amyloid angiopathy)。其中具有特征性的是 SP 和 NFT 的形成。这些损伤主要发生于海马、前脑基底和大脑皮质。 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid peptide, A $\beta$ )是 SP 的主要成分。

### 1.1 老年斑

SP 是老年性痴呆的特征性病理改变之一,它是神经细胞外的斑块状沉积,老年斑的核心含有淀粉样肽,并围绕变性的轴索、树突突起、类淀粉纤维和胶质细胞及其突起。老年斑可分为 3 种类型:①弥散斑:边界不规则,主要由  $A\beta$  组成,代表最早期斑;②神经炎斑:是球状结构,直径  $50\sim 200\ \mu\text{m}$ ,中心为  $A\beta$  蛋白,围绕以营养不良的神经轴突、胶质细胞突和异常的细胞器;③燃烧斑:由孤立致密  $A\beta$  组成,斑的多少与年龄和脑的部位有关。

### 1.2 神经元纤维缠结

NFTs 为 AD 的第二个特征性组织学改变,是由异常细胞骨架组成的神经元包涵体(其构型随神经元的形状不同而不同),在锥体细胞中呈火舌样,而在脑干神经元中呈线球样改变。NFTs 是由配对缠绕的螺旋丝和  $15\ \text{nm}$  的直丝组成,位于细胞体,并可伸向树突,但不见于轴突。螺旋细丝由蛋白丝排列成管状,含有异常磷酸化 Tau 蛋白。神经元纤维缠结最早见于内嗅皮层,向边缘皮层进展,最后到达新皮层。神经元纤维缠结也见于非 AD 的中枢神经系统疾病,如进行性核上性麻痹、帕金森氏病、拳击手痴呆、进行性硬化性全脑炎等。因此,其特异性不如老年斑。

### 1.3 颗粒空泡变性

颗粒空泡变性是 AD 另一个组织学改变,是海马锥体神经元细胞质内的一种异常结构,由一个或多个直径  $3.5\ \mu\text{m}$  的空泡组成,每个空泡的中心都有一个颗粒。

### 1.4 平野小体

在 HE 染色切片中呈突出的桃红色,均质状定位在海马锥体细胞的细胞质中,横切面呈圆形,纵切面上呈梭梭形状,且随年龄的增加而增加。在 AD 脑内,海马的神经元减少最严重,神经元受累平均达  $47\%$ ,CA1 区锥体细胞主要减少约  $40\%$ ,而终板和 CA2 区很少受影响。

## 2 AD 病因

近一个世纪以来,许多科学家就 AD 的确切病因及发病机制进行了不倦的探索和研究,但因其致病因素复杂,至今尚不十分清楚。近年国内外大量研究的重点集中在遗传学、免疫学、病毒感染、神经递质和神经内分泌等方面,表明许多因素与该病发病机制和病因有关。一般认为,AD 是由遗传学因素、环境因素和代谢因素等多种因素共同作用所引起的一种病理过程。目前对 AD 的发病机理有多种学说:胆碱能学说、病毒学说、级联假说、金属中毒学说、炎症学说、凋亡学说、细胞周期异常学说、基因突变学说、谷氨酸能假说、糖皮质激素假说、蛋白质突变学说、 $A\beta$  学说、代谢缺陷假说、金属中毒学说、兴奋毒性和氧化应激假说等。这些学说从不同角度反映了 AD 的某些特点。AD 病因研究中较为突出的是胆碱能学说、 $A\beta$  学说、Tau 异常磷酸化学说和神经突触学说等。

### 2.1 $A\beta$ 学说

$A\beta$  是由  $\beta$  淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)经蛋白酶水解生成的。APP 属于 I 型跨膜糖蛋白家族,在多种细胞上均有表达。APP 的基因定位于 21 号染色

体上,至少由 18 个外显子组成。其表达过程包括复杂的外显子剪接,产生不同的 mRNA,以及一系列翻译后修饰,如糖基化、磷酸化、硫酸化等,形成 APP365、APP563、APP695、APP714、APP751、APP770 等六种变异体,其氨基酸残基由 365 至 770 不等。正常人以 APP695 表达为主,而 AD 患者的 APP751 表达增多。

正常情况下,APP 有两种蛋白分解代谢途径(图 1.1)。一条为  $\alpha$  分泌酶介导的非淀粉样肽源途径,是一条主要代谢途径。该途径不能产生完整的  $A\beta$ ;另一条为  $\beta$ 、 $\gamma$  分泌酶介导的淀粉样肽源途径。 $\beta$  分泌酶水解 APP596~597 位、APP671~672 位或 APP682~683 位的肽键, $\gamma$  分泌酶水解  $A\beta$ 39~43 之间的肽键,从而将  $A\beta$  肽段从 APP 上水解下来。由于  $A\beta$  的疏水性很强,因此易发生聚集沉积形成斑块。

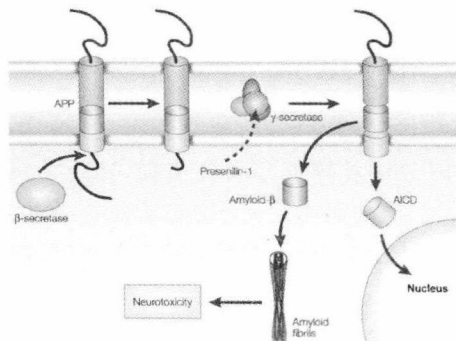


图 1.1 APP 蛋白的分解途径和  $A\beta$  的生成

APP 细胞内区(AICD),可能与核内钙信号的调节有关。(引自 Buckingham et al. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2003,4, 631~640)

溶解状态的  $A\beta$  具有神经元营养作用,而聚集态的  $A\beta$  具有毒性作用。将不成熟的原代培养的皮质和海马细胞暴露于低浓度( $\text{pm} \sim \text{nm}$ )溶解状态的  $A\beta$  时,可增加神经元的生存时间。用新配置的  $A\beta$ 1~42 与海马神经元共同孵育后,观察到有细胞轴突生长,而海马神经元暴露于老化 2~4 d 的  $A\beta$ 1~42(即有  $A\beta$  的聚集)24 h,几乎所有的神经元都发生死亡,表明  $A\beta$  在空间结构转换成  $\beta$  折叠后,形成的  $A\beta$  纤维状聚合物具有细胞毒性作用,引起神经元变性,突触丢失,直至死亡。

## 2.2 Tau 蛋白异常磷酸化学说

Tau 蛋白的细胞功能在于与微管结合促进形成微管。Tau 蛋白结合的微管蛋白可作为微管组装早期的核心,进而促进其他微管蛋白在此核心上聚集延伸形成微管。Tau 蛋白还可以在微管之间形成横桥,维持并加强微管的稳定性,降低微管蛋白的解离,并诱导微管成束。参与神经元的生长发育,维持轴突的形态。

AD 患者脑中的 Tau 蛋白产生异常磷酸化。每个分子 Tau 蛋白磷酸基团由正常的 2~3 个增加到 5~9 个。在 AD 患者的脑中通常存在 3 种形式 Tau 蛋白:(1)细胞浆中正常的 Tau 蛋白;(2)可溶性异常磷酸化的 Tau 蛋白;(3)聚集成 PHF 的异常磷酸化的 Tau 蛋白。异常过度磷酸化的 Tau 蛋白聚集成成了成对螺旋纤维细丝(paired helical filaments, PHF),丧失了促进微管组装的生物活性,导致细胞骨架的结构异常化,进而导致神经细胞的凋亡。蛋白激酶和磷酸酯酶共同调节 Tau 蛋白的磷酸化,这个平衡的紊乱可能是导致 Tau 蛋白异常过度磷酸化的重要原因。

## 2.3 遗传因素

与 AD 有关的遗传位点至少有 5 个,分别是第 1 号染色体上的早老素 2(presenilin-2,PS-2)基因、第 12 号染色体上的  $\alpha 2$  巨球蛋白基因、第 14 号染色体上的早老素 1(PS-1)基因、第 19 号染色体上的载脂蛋白 E $\epsilon 4$ (apolipoprotein E $\epsilon 4$ ,Apo E $\epsilon 4$ )基因和第 21 号染色体上的 APP 基因。其中 Apo E $\epsilon 4$  基因在迟发性家族性和散发性 AD 患者中呈高频分布,成为研究得比较透彻的基因之一。Apo E 基因有 3 种等位基因  $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ ,分别表达 Apo E $\epsilon 2$ 、Apo E $\epsilon 3$ 、Apo E $\epsilon 4$ 。Apo E $\epsilon 4$  是 AD 相关联的危险因素。有 Apo E $\epsilon 4$  等位基因者,患 AD 的风险增加,并可使发病年龄提前。

## 2.4 金属中毒学说

环境中铝的含量过高与痴呆的发病率、死亡率有一定的关系。NFTs 中发现有铝沉积。一些老年性痴呆者脑内含铝量较正常明显增高,铝过多可引起神经纤维变性,可能参与 SP 及 NFTs 的形成。铝能抑制与记忆、认知功能有关的胆碱能系统功能和降低乙酰胆碱转化酶的活性,从而使病人发生老年性痴呆。但对铝是否为老年性痴呆的重要因素,目前尚有分歧。

## 2.5 神经突触学说

与记忆和遗忘最有关的和最合理的原因是突触的形成和丧失(或沉默)。突触是相邻两个神经元之间的联系,是神经元之间递质的产生与释放、传递、接受的结构。AD 患者的一个重要临床症状是学习记忆障碍,这牵涉到新皮层和海马中突触的丧失。无论是 A $\beta$ 、Tau 蛋白磷酸化或者金属离子,最终导致的突触丧失可能是引起临床症状的直接原因。突触丧失中断了脑内很多功能通路中的联系,引起多方面的功能障碍,尤其严重的是认知和记忆衰竭。

在中枢神经系统中,一个神经元丧失它的许多轴突末梢之后,其胞体仍可原封不动地存活一个时期。这一重要事实可以说明为何在 AD 的大脑皮层中突触的丧失比神经元丧失更为严重,也可解释为什么细胞计数与一些变性疾病中的功能无关。这一事实也给 AD 的研究者们提供了一种乐观的设想,即在给予合适的刺激和环境的条件下,突触末梢可能再生。

## 3 AD 的胆碱能学说与治疗策略

彻底揭示 AD 的本质,从根本上治疗老年痴呆还有待时日。根据 AD 病因的不同学说,已发展起多种防治 AD 的方法。

AD 的胆碱能学说认为,中枢胆碱能系统与学习、记忆密切相关。AD 患者胆碱能神经细胞明显丢失,胆碱能神经纤维发生退变,导致中枢胆碱能系统功能紊乱,皮层、基底前脑的胆碱乙酰化转移酶(acetylCoA: choline-O-acetyltransferase, EC2.3.1.6; ChAT)表达减少,并以海马最为明显,乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)的生成和释放量降低。ACh 是脑中与学习记忆等智能状态相关的重要分子,由 ChAT 合成,胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)水解,通过 ACh 受体发挥生物学作用。ACh 水平降低被认为是

引起 AD 患者学习记忆等认知功能障碍的主要原因之一。目前国内外临床治疗 AD 的首选药物仍然是可逆性 AChE 抑制剂,如石杉碱甲和他克林等。

AD 的治疗方法还包括:①替代疗法及基因疗法:如胆碱乙酰基转移酶、神经生长因子、脑源神经生长因子、胶质细胞衍生神经生长因子、 $\beta$ -分泌酶、血管活性肠肽(VIP)等;② $A\beta$ 阻滞疗法:如 $\beta$ -分泌酶抑制剂、 $\gamma$ -分泌酶抑制剂、 $A\beta$ 清除剂( $A\beta$ 抗体、 $A\beta$ 疫苗)等;③抗氧化及清除自由基疗法:如维生素 E、维生素 C、N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、超氧化物歧化酶、艾地苯醌等;④抗炎疗法:包括固醇类、非固醇类,氯喹、氢化氯喹等;⑤钙拮抗剂:如尼莫地平;⑥中药及成方:人参皂苷、黄皮酰胺,及化痰开窍、填精益脑、益气活血、补肾降浊、平肝熄风方等;⑦其他:如铝螯合剂、雌激素疗法等。

#### 4 AD 动物模型

由于 AD 的病因与发病机制非常复杂,是环境因素与遗传因素共同作用的结果,是以渐进性认知功能损害为特征的多病因的疾病或临床综合征,它有其特征性的神经病理表型和神经递质表型。所以目前还没有一个完全具备 AD 特征的理想动物模型,这大大制约了 AD 治疗药物的研究。根据 AD 的特征,理想的 AD 动物模型应具备以下三个方面的特征:(1)具有 AD 的主要神经病理学特征——SP 和 NFT;(2)出现大脑神经元死亡、突触丢失和反应性胶质细胞增生等 AD 的重要病理变化;(3)出现认知和记忆功能障碍。目前的动物模型种类很多,大多只模拟出 AD 的一部分特征,难以完全模拟出 AD 整个疾病的特征。

AD 动物模型大致可概括为自然衰老模型、损害模型和转基因动物模型三大类。每一种模型都在一定的程度或某些方面模拟了 AD 的症状和病理改变,它们各自具有自己的适用范围和作用,又各有优势和不足,应根据不同的实验目的选择合适的模型。一般而言,转基因动物现已是公认的 AD 模型。

##### 4.1 与衰老有关的 AD 动物模型

AD 是一种与年龄相关的疾病,衰老是 AD 的肯定因素。此类模型是以衰老动物来作为 AD 模型。这种动物模型包括下面几种。①自然衰老认知障碍模型:老年动物如猕猴、狒狒、猩猩、恒河猴、松鼠猴、罗猴,以及老年狗、兔或鼠类,通过行为筛选,选择带有认知和记忆严重缺失的个体作为 AD 模型。常用的是老年小鼠和大鼠。②快速老化小鼠模型:通过对 AKR/J 自然变异小鼠进行近交延代培养得到快速老化小鼠(senescence accelerated mouse, SAM),该家族品系众多,其中 SAMP/8 和 SAMP/10 寿命短、老化快、老化特征显著,是较理想的 AD 模型。③D-半乳糖诱导的亚急性衰老模型:D-半乳糖(D-gal)能够使机体糖和蛋白质代谢紊乱,出现衰老特征。将 D-gal 于小鼠皮下注射或腹腔注射一段时间后,可制备 AD 动物模型。

##### 4.2 与胆碱能神经元损害有关的 AD 动物模型

中枢神经胆碱能系统活性与人的学习记忆和认知功能密切相关。基底前脑胆碱能神经元、海马和皮层及其之间的通路,是学习记忆的重要结构基础。通过各种方法破坏胆碱能神经系统的功能,制作 AD 动物模型。



#### 4.2.1 兴奋性氨基酸毁损模型

将兴奋性氨基酸如鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IBO)、海人酸(kainic acid, KA)、使君子酸(quisqualic acid, QA)或 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)等注入动物的基底 Meynert 核建立大鼠和猴的 AD 模型。由于基底核胆碱能神经元常与非胆碱能细胞群交叉分布,目前所用的神经兴奋性毒素对胆碱能细胞的选择性普遍较差。

#### 4.2.2 与 A $\beta$ 沉积有关的 AD 动物模型

脑室内或海马内注射 A $\beta$  可引起神经元功能丧失和学习记忆损害。利用 A $\beta$  选择性损毁海马、前脑 Meynert 基底核等胆碱能神经元集中的部位,制作的 AD 模型一度成为研究 AD 的主要工具。常用的 A $\beta$  片段有 A $\beta$ 25~35、A $\beta$ 22~35、A $\beta$ 1~40 和 A $\beta$ 1~42。

#### 4.2.3 免疫毒素毁损模型

免疫毒素 192-IgG-Saporin(192-IgG-SAP)能够通过破坏蛋白合成酶系统选择性损毁基底前脑胆碱能细胞,而不影响其他功能的神经元。大鼠双侧侧脑室注射 192-IgG-SAP 后,内侧隔核胆碱乙酰转移酶阳性细胞绝大多数丢失,学习记忆能力明显下降。

#### 4.3 双因素联用诱导的 AD 模型

包括下面几种。①A $\beta$  与 D-gal 联合诱导的 AD 模型:在腹腔注射 D-gal 的基础上,海马内注射 A $\beta$  获得。②氯化铝与 D-gal 联合诱导的 AD 模型:采用 D-gal 腹腔注射和 AlCl<sub>3</sub> 灌胃合并制备 AD 模型。③Wortmannin 和 GF2109203x 联用损害模型:在大鼠侧脑室或双侧海马注射 wortmannin(磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂)和 GF2109203x(蛋白激酶 C 抑制剂),制备 AD 动物模型。④其他双因素联用损伤 AD 模型:如喹啉酸与 D-gal 联合诱导的 AD 模型、IBO 脑内注射结合大鼠腹腔注射 D-gal 方式,或将 A $\beta$ 1-40 和小剂量的 IBO 共同注入大鼠海马制作 AD 模型,均能较好地模拟出类似 AD 的部分病理变化。

#### 4.4 AD 转基因动物模型

AD 是一种多基因遗传病。与 AD 相关的基因包括 APP 基因、PS-1 和 PS-2 基因, ApoE 基因和 Tau 蛋白基因。近年来,转基因动物研究取得了很大进展,该模型是使外源性基因在染色体基因组中表达并遗传给后代,后代动物过多表达该基因后引起 AD 相关的病理学改变。

转基因动物模型针对明确的病因,成功模拟了 AD 病理学和行为学改变的特征,可望成为研究 AD 发病机制及治疗药物的理想模型。

##### 4.4.1 转 APP 基因小鼠

包括下面几种。①PDAPP 小鼠,是转人类 APP695swe 和 APP717V2F 突变的 PDAPP 鼠,由 C57BL/6 鼠与 DBA/2FI 鼠交配产生。②Tg2576 小鼠,是转人类 APP695 基因小鼠,存在 2 个位点突变,即 670 位赖氨酸突变成天门冬酰胺和 671 位蛋氨酸突变成亮氨酸。③APP23 小鼠,由转人类 APP695 基因仓鼠和 APPV7171 鼠交配得来。④TGCRND8 小鼠,由转人类 APP695 鼠和 APPV717F 鼠交配得来,表达 2 个突变人类家族性 ADPSI(M146L 和 L286V)基因。