

阿尔茨海默病蛋白质组学研究进展

熊燃 刘军 陈生弟

【关键词】 阿尔茨海默病； 蛋白质类； 综述文献

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.02.006

阿尔茨海默病(AD)是一种临床常见的中枢神经系统变性疾病。目前,全世界约有 2430 万例痴呆患者,每年新发病例 460 万^[1]。阿尔茨海默病的组织病理学特征为脑组织内含两种异常聚集的不溶性纤维成分,即大量 β -淀粉样蛋白(A β)聚集所形成的神经炎性斑[NPs, 又称老年斑(SP_s)]和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结(NFTs)。蛋白质组学(proteomics)由澳大利亚学者 William 和 Wilkins 于 1994 年首先提出。蛋白质组系基因组表达的所有蛋白质,是机体生命活动过程中表达所有蛋白质的总和。1995 年,Wasinger 等于 *Electrophoresis* 发表第一篇蛋白质组学论文后,蛋白质组学研究在短时间内即迅速发展。蛋白质组学及其技术的发展大大提高了人们对阿尔茨海默病的认识,本文将就目前阿尔茨海默病蛋白质组学研究进展进行简述。

一、 β -淀粉样蛋白的蛋白质组学研究

A β 形成于 β 和 γ 分泌酶对 β -淀粉样蛋白前体(APP)的降解过程。 β 分泌酶降解 APP 产生相对分子质量为 100×10^3 的可溶性氨基末端(N 末端)片段(可溶性 APP)和相对分子质量为 12×10^3 的羧基末端(C 末端)片段(CTF),后者又可被 γ 分泌酶降解并释放含有 40 和 42 个氨基酸的多肽 A β_{40} 和 A β_{42} ,其中 A β_{42} 易形成寡聚体和老年斑。另一种为 α 分泌酶,可于 A β 区域的中间降解 APP,再结合 γ 分泌酶而产生 A β_{17-42} 。许多研究显示,A β 异常聚集是阿尔茨海默病的发病原因之一^[2]。对罕见的家族性阿尔茨

海默病(FAD)患者进行研究发现,A β 形成及其代谢途径中的某些基因突变,例如 APP 基因突变可使 APP 的降解部位发生改变,产生更多的 A β_{42} ,从而造成 A β 异常聚集,产生神经毒性作用^[3]。对更为常见的散发性阿尔茨海默病(SAD)患者进行研究,提示发病风险与 A β 异常代谢之间存在明确的联系^[4]。近年来,有关 A β 的蛋白质组学研究也已取得了一些进展。A β 可以分为不同的亚型,例如寡聚体、羧基末端片段及氨基末端片段等不同形式。早期的研究者试图采用酶联免疫吸附法(ELISA)研究阿尔茨海默病患者脑脊液中 A β 表达水平,然而该方法无法区分 A β 的不同亚型,仅能检测脑脊液中总 A β 表达水平,结果显示,患者脑脊液中总 A β 水平与正常参考值相比并无明显改变^[5,6]。随着蛋白质组学技术的发展,对 A β 的检测也越来越容易。采用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)和质谱(MS)技术,比早期的 ELISA、Western blotting 等的分析结果更为精确^[7],不仅可以发现所要寻找的 A β ,还可以发现 A β 的各种修饰形式及相互作用蛋白,且可于一次实验中同时分析多种 A β 亚型。迄今为止,人类脑脊液中已发现 40 种 A β 亚型,其中 22 种可采用蛋白质组学质谱技术予以验证,其余 18 种尚未明确“身份”。各亚型的相对浓度反映了 APP 和 A β 代谢酶的活性,因此,A β 亚型质谱信号强度的不同分布可以为阿尔茨海默病的病因学研究提供有价值的信息,并有助于选择特异性更高的生物学标志。

研究显示,阿尔茨海默病组患者脑脊液中 A β_{42} 表达水平显著低于对照组^[8],而且 A β 表达水平的降低早于临床痴呆症状的出现^[9],因此,可以作为正常老年人认知功能减退的预测因子^[10]。更具临床意义的是,阿尔茨海默病患者脑脊液 A β_{42} 和 A β_{40} 的比例(A β_{42} /A β_{40})明显下降,比单纯检测 A β_{42} 表达水平以预测轻度认知损害是否为早期阿尔茨海默病更

基金项目:上海市科学技术委员会科研项目(项目编号:08ZR1414100);上海市科学技术委员会科研项目(项目编号:09PJ1407500)

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经科,上海交通大学医学院神经病学研究所

通信作者:刘军(Email:jly0520@hotmail.com)

有临床价值^[11]。同时,应用蛋白质组学技术还可于脑脊液中检测出多种羧基末端 truncation 缺失的 A β 亚型,如 A β_{1-37} 、A β_{1-38} 、A β_{1-39} ,其中含量最丰富者为 A β_{40} ,其次依次为 A β_{38} 、A β_{42} 、A β_{39} 和 A β_{37} ^[12]。阿尔茨海默病患者脑脊液 A β_{40} 和 A β_{38} 表达水平相对升高, A β_{42} 表达水平下降,联合检测脑脊液中这 3 种 A β 亚型的表达水平也可以作为轻度认知损害是否为早期阿尔茨海默病的预测因子。偏最小二乘多元判别分析研究显示, A β_{1-16} 、A β_{1-33} 、A β_{1-39} 、A β_{1-42} 等亚型用于鉴别散发性阿尔茨海默病患者与正常对照者,灵敏性较高^[13]。而采用同位素标记 A β 各亚型,则可以提高对 A β 亚型的定量分析水平^[14],例如,采用性能稳定的同位素 ¹³C 或 ¹⁵N 标记氨基酸,检测健康志愿者脑脊液 A β 代谢变化,发现 A β 代谢率为总 A β 表达水平的 7%~8%。通过这种实验室检测方法,有可能解决长期未能解答的假设,如散发性阿尔茨海默病患者是否具有 A β 高生成、低清除或二者兼具,甚至能够评价阿尔茨海默病治疗药物在影响 A β 生成和清除方面的有效性。

阿尔茨海默病患者脑组织存在蛋白质氧化、脂质过氧化、DNA 氧化、3-硝基酪氨酸(3-NT)形成等一系列氧化应激表现^[15],蛋白质组学技术可鉴定分离阿尔茨海默病患者脑组织中发生氧化变性的蛋白质,这些蛋白质的氧化与兴奋性神经毒性作用、蛋白酶体降解功能异常、能量产生异常等关系密切, A β_{1-42} 第 35 位甲硫氨酸残基(Met35)易被氧化的性质使得 A β 成为氧化应激和神经毒性的起因,导致神经元发生变性死亡^[16]。

蛋白质组学技术的不断发展加深了对 A β 的认识,但是 A β 的疏水性使之易于聚集并结合于载体蛋白,因此,对其深入研究仍存在一定困难^[17]。在今后的研究工作中借助相关技术的发展,鉴定、分离新的 A β 亚型或其他形式,例如寡聚体等,采用优化并标准化分析手段,同时控制混杂因素,有可能获得更佳的可重复性结果,甚至实现对血液中 A β 的可靠的分析。

二、tau 蛋白的蛋白质组学研究

tau 蛋白是一种可溶性微管相关蛋白(MAP),主要存在于中枢神经系统中。tau 蛋白不存在于神经元的树突,而主要于神经元远端轴突发挥活性功能,具有一定的弹性和可塑性,起稳定微管作用。其弹性作用赋予其可与多种蛋白质发生相互作用的能力,主要功能之一是微管蛋白(tubulin)发生

相互作用,调节神经元轴突微管结构的稳定性,并促进微管蛋白装配成微管结构。

tau 蛋白具有多种亚型和磷酸化形式,通过这两种多样化形式来调节微管结构的稳定性。脑组织内共有 6 种 tau 蛋白亚型,源于 tau 蛋白基因第 2、3 和 10 个外显子的选择性剪接。tau 蛋白的分子结构中有 85 个可被蛋白激酶磷酸化的丝氨酸/苏氨酸或酪氨酸残基,其中 45 个残基在阿尔茨海默病患者脑组织中发现了其磷酸化形式^[18]。例如,某种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶被激活后,可磷酸化 tau 蛋白,使 tau 蛋白无法发挥功能,最终导致细胞微管结构破坏。tau 蛋白的高度磷酸化可导致 tau 蛋白错误折叠,螺旋状和线状神经丝自动组装成神经原纤维缠结,形成不溶性沉积物在神经元中沉淀,这种病理现象在阿尔茨海默病及其他一些含异常聚集 tau 蛋白的神经变性疾病患者中均存在。此外,从阿尔茨海默病患者脑组织中分离获得的 tau 蛋白还可发生泛素化、氧化或硝基化。经过这些翻译、修饰形成了多种不同的 tau 蛋白,构成了阿尔茨海默病的 tau 蛋白质组。从而引出以下问题:在不同修饰形式的 tau 蛋白中,究竟哪一种在阿尔茨海默病的病因和发病机制中起主要作用?哪一种可以帮助神经元抵抗外界环境因素的侵袭?为了回答这些复杂的问题,采用了多种不同的蛋白质组学研究方法,分别从功能、结构、信号转导通路、相互作用 4 个方面对阿尔茨海默病患者脑组织内的 tau 蛋白进行了研究,发现 tau 蛋白是阿尔茨海默病发病机制中诱发神经纤维变性的主要诱导物和驱动力^[19];采用特殊的抗 tau 蛋白聚集的双螺旋细丝(PHF)核心的单克隆抗体对 tau 蛋白进行结构分析显示,tau 蛋白羧基末端的六肽结构对双螺旋细丝的形成起着重要作用^[20],从而为探讨 tau 蛋白如何装配成双螺旋细丝和研发药物抑制阿尔茨海默病的神经纤维变性提供了理论基础。与此同时,tau 蛋白含有可发生磷酸化的多个氨基酸残基,使其可能参与多个调节性信号转导通路,并有可能位于多个信号转导通路的交叉点^[21]。采用蛋白质组学研究方法,既可以找到正常 tau 蛋白在疾病进展过程中发生错误聚集的相关信号转导通路,也可以为确定药物作用靶点提供理论依据,并将致病 tau 蛋白作为临床前阿尔茨海默病的生物学诊断标志。tau 蛋白的可塑性使其可与多种蛋白质发生相互作用,业已确定并能够与 tau 蛋白发生相互作用的蛋白质包括细胞结构蛋白,例

如:微管蛋白、肌动蛋白(actin)、肽酰-脯氨酰-顺反异构酶(PPIase)、动力蛋白复合体、蛋白质的分子伴侣(protein chaperones)、细胞质和细胞膜耦联激酶(cytoplasmic and membrane-bound kinases)、磷酸酶 2A(PP2A)、S-100B 蛋白(S-100B)、 α -突触核蛋白(α -Syn)等^[22-27]。将 tau 蛋白及其相互作用蛋白的复合物免疫共沉淀后,利用双向凝胶电泳和质谱技术可以找到真正与 tau 蛋白发生相互作用并促进或延缓疾病进展的蛋白质,从而提供了干预治疗甚至逆转疾病进展的靶点。蛋白质组学时代带来了蛋白质研究新技术的快速发展和应用,应用新技术正确解码阿尔茨海默病的 tau 蛋白蛋白质组将更有助于揭开从病理性错误折叠的 tau 蛋白到神经变性的分子学机制^[20]。

大量文献支持,联合检测脑脊液 $A\beta_{42}$ 和总 tau 蛋白、磷酸化 tau 蛋白表达水平对于确诊阿尔茨海默病十分有效,甚至在临床发病早期也有极高的敏感性^[28]。许多临床医疗中心将陆续开展通过腰椎穿刺术检测脑脊液 $A\beta_{42}$ 和 tau 蛋白表达水平以评价有认知功能障碍症状的患者^[18]。随着社会对痴呆认知度的提高,许多仅处于轻度认知损害阶段的患者也会积极寻求医疗帮助,以了解是否会进展为阿尔茨海默病、是否需要早期干预治疗, $A\beta_{42}$ 和 tau 蛋白作为具有临床意义的生物学标志将可能逐渐成为临床诊断常规项目。如果某种新的针对老年斑或神经原纤维缠结的药物在临床试验中显示可延缓疾病进展,检测脑脊液生物学标志将会更加有参考价值。定量蛋白质组学技术的发展也将为寻找有意义的诊断金标准提供基础,同时指导阿尔茨海默病病因学研究,最终服务于研发出更具有针对性、更有效的治疗药物。

参 考 文 献

- [1] Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005, 366:2112-2117.
- [2] Crews L, Rockenstein E, Masliah E. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct*, 2009. [Epub ahead of print].
- [3] Shen J, Kelleher RJ 3rd. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:403-409.
- [4] Leissring MA. Proteolytic degradation of the amyloid beta-protein: the forgotten side of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2006, 3:431-435.
- [5] Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 1992, 359:322-325.
- [6] Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 1995, 38:643-648.
- [7] Ackermann BL, Berna MJ. Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4:175-186.
- [8] Blennow K. CSF biomarkers for Alzheimer's disease: use in early diagnosis and evaluation of drug treatment. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, 5:661-672.
- [9] Skoog I, Davidsson P, Aevansson O, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 is reduced before the onset of sporadic dementia: a population-based study in 85-year-olds. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2003, 15:169-176.
- [10] Gustafson DR, Skoog I, Rosengren L, et al. Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007, 78:461-464.
- [11] Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, et al. Age-dependent change in the levels of Abeta 40 and Abeta 42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of Abeta 42 to Abeta 40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *Eur Neurol*, 2000, 43:155-160.
- [12] Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, et al. Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem*, 2002, 81:481-496.
- [13] Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, et al. An Alzheimer's disease-specific beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett*, 2006, 409:215-219.
- [14] Portelius E, Tran AJ, Andreasson U, et al. Characterization of amyloid beta peptides in cerebrospinal fluid by an automated immunoprecipitation procedure followed by mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2007, 6:4433-4439.
- [15] Butterfield DA, Boyd-Kimball D, Castegna A. Proteomics in Alzheimer's disease: insights into potential mechanisms of neurodegeneration. *J Neurochem*, 2003, 86:1313-1327.
- [16] Butterfield DA. Amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*, 2002, 36:1307-1313.
- [17] Portelius E, Zetterberg H, Gobom J, et al. Targeted proteomics in Alzheimer's disease: focus on amyloid-beta. *Expert Rev Proteomics*, 2008, 5:225-237.
- [18] Hanger DP, Byers HL, Wray S, et al. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem*, 2007, 282:23645-23654.
- [19] Kovacech B, Zilka N, Novak M. New age of neuroproteomics in Alzheimer's disease research. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(6/7):799-805.
- [20] Sevcik J, Skrabana R, Dvorsky R, et al. X-ray structure of the PHF core C-terminus: insight into the folding of the intrinsically disordered protein tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett*, 2007, 581:5872-5878.
- [21] Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37:215-246.
- [22] Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, et al. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1739(2/3):216-223.
- [23] Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, et al. The high-affinity

HSP90 - CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest*, 2007, 117:648-658.

[24] Iqbal K, Grundke - Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med*, 2008, 12:38-55.

[25] Lee G. Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1739(2/3):323-330.

[26] Lim J, Lu KP. Pinning down phosphorylated tau and tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1739(2/3):311-322.

[27] Magnani E, Fan J, Gasparini L, et al. Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J*, 2007, 26:4546-4554.

[28] Monge - Argiles JA, Sanchez - Paya J, Munoz - Ruiz C, et al. Biomarkers in the cerebrospinal fluid of patients with mild cognitive impairment: a meta - analysis of their predictive capacity for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Rev Neurol*, 2010, 50:193-200.

(收稿日期:2010-02-20)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(二)

疾病名称

阿尔茨海默病 Alzheimer disease(AD)

白质病变 white matter lesion(WML)

痴呆行为和精神症状 behavioral and psychological symptoms of dementia(BPSD)

代谢综合征 metabolic syndrome(MS)

[胰岛素抵抗综合征 insulin-resistant syndrome(IRS)]

单认知域非遗忘型轻度认知损害 non-amnesic mild cognitive impairment-single domain (naMCI-s)

单认知域遗忘型轻度认知损害 amnesic mild cognitive impairment-single domain (aMCI-s)

淀粉样脑血管病 cerebral amyloid angiopathy(CAA)

多发性硬化 multiple sclerosis(MS)

多认知域非遗忘型轻度认知损害 non-amnesic mild cognitive impairment-multiple domain (naMCI-m)

多认知域遗忘型轻度认知损害 amnesic mild cognitive impairment-multiple domain (aMCI-m)

额颞叶痴呆 frontotemporal dementia(FTD)

非遗忘型轻度认知损害 non-amnesic mild cognitive impairment(naMCI)

复发性视神经脊髓炎 relapsing neuromyelitis optica(RNMO)

孤立性纤维性肿瘤 solitary fibrous tumor(SFT)

亨廷顿病 Hungtington disease(HD)

混合性痴呆 mixed dementia(MD)

家族性阿尔茨海默病 family Alzheimer disease(FAD)

克雅病 Creutzfeldt-Jakob disease(CJD)

路易体痴呆 dementia with Lewy body(DLB)

难治性癫痫 refractory epilepsy(RE)

帕金森病痴呆 Parkinson disease dementia(PDD)

皮质基底节变性 corticobasal ganglionic degeneration(CBD)

桥本脑病 Hashimoto encephalopathy(HE)

轻度认知损害 mild cognitive impairment(MCI)

缺血性卒中出血性转化 hemorrhagic transformation of infraction(HT)

散发性阿尔茨海默病 sporadic Alzheimer disease(SAD)

视神经脊髓炎 neuromyelitis optica(NMO)

无症状性出血性转化 hemorrhagic in pallid transformation of infraction(HI)

血管外皮瘤 hemangiopericytoma(HPC)

血管性痴呆 vascular dementia(VD)

亚急性脊髓视神经病 subacute myelo-optico-neuropathy(SMON)

亚洲视神经脊髓型多发性硬化 Asian optico spinal multiple sclerosis(AOSMS)

遗忘型轻度认知损害 amnesic mild cognitive impairment(aMCI)

与自身免疫性甲状腺炎相伴类固醇反应性脑病 steroid-responsive encephalopathy associated with autoimmune thyroiditis(SREAT)

症状性出血性转化 pallid hematoma transformation of infraction(PH)

临床试验

北美症状性颈动脉内膜切除术试验 North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial(NASCET)

抗精神病药物治疗阿尔茨海默病有效性临床试验 Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness-Alzheimer Disease(CATIE-AD)

Honolulu-Asia 老龄化研究 Honolulu-Asia Aging Study(HAAS)

美国 Framingham 心脏研究 Framingham Heart Study(FHS)

欧洲收缩期高血压研究 Systolic Hypertension in Europe(Syst-Eur)Study

欧洲协作组急性脑卒中研究 European Cooperation of Acute Stroke Study(ECASS)

培哚普利预防脑卒中复发研究 Perindopril Protection against Recurrent Stroke Study (PROGRESS)

全基因组相关性研究 Genome-Wide Association Study(GWAS)