

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610162480.7

[51] Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月4日

[11] 公开号 CN 1991364A

[22] 申请日 2006.11.17

[21] 申请号 200610162480.7

[30] 优先权

[32] 2005.12.26 [33] CN [31] 200510112005.4

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路320号

[72] 发明人 裴 钢 倪燕翔 赵晓辉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书2页 说明书20页 附图10页

[54] 发明名称

预防和治疗阿尔兹海默症的G蛋白偶联受体拮抗剂

[57] 摘要

本发明提供了用于筛选治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变试剂的方法。本发明的方法包括以下步骤：(a) 激活受体并确定其内吞程度，此受体为G蛋白偶联受体并且和早老蛋白-1结合；(b) 在一种候选试剂存在下如(a)所述激活受体，再次确定受体的内吞程度；(c) 确定(a)和(b)中的内吞程度的差异；(d) 如果差异小于一定阈值则重复步骤(a)-(c)。本发明还提供了利用受体的拮抗剂制造治疗或预防阿尔兹海默症或相关的神经性病变的药物。这种受体拮抗剂能够抑制和早老蛋白-1结合的G蛋白偶联受体的内吞。

1. 一种筛选治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变的试剂的方法，其特征在于包括以下步骤：

- (a) 激活受体并确定其初始内吞程度，所述受体为与早老蛋白-1结合的G蛋白偶联受体；
- (b) 在一种候选试剂存在下，如(a)所述激活受体，再次确定受体的内吞程度；
- (c) 确定(a)和(b)中的内吞程度的差异；
- (d) 如果差异小于阈值则重复步骤(a)至(c)，或如果差异大于阈值，则确认所述候选试剂为治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变的试剂。

2. 一种筛选治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变的试剂的方法，其特征在于包括以下步骤：

- (a) 测量受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶的初始结合程度，所述受体为与早老蛋白-1结合的G蛋白偶联受体；
- (b) 在一种候选试剂存在下，如(a)所述再次测量受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶的结合程度；
- (c) 确定(a)和(b)中的结合程度的差异；
- (d) 如果差异小于一定阈值则重复步骤(a)至(c)，或如果差异大于阈值，则确认所述候选试剂为治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变的试剂。

3. 如权利要求1或2所述的方法，其特征在于，所述受体中至少一种选自 β 肾上腺素受体和 δ -阿片受体。

4. 如权利要求3所述的方法，其特征在于，所述 β 肾上腺素受体为 β_2 肾上腺素受体。

5. 如权利要求1至4所述的任一种的方法，其特征在于，所述受体被表达于已经转染了编码此受体基因的细胞上。

6. 如权利要求1、3、4或5所述的任一种的方法，其特征在于通过检测内吞小泡的数量、内吞小泡中的早老蛋白-1、晚内吞小泡和溶酶体中 γ -分泌酶的活性或淀粉样蛋白 β 的形成而确定所述的初始内吞程度和再次内吞程度。

7. 如权利要求2至5所述的任一种的方法，其特征在于通过检测荧光共振能量转移而确定所述的初始结合程度和再次结合程度。

8. 受体拮抗剂在制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物中的应用，其特征在于，在内吞过程中，所述受体拮抗剂抑制与早老蛋白-1结合的G蛋白偶联受体的内吞。

9. 一种试剂在制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物中的应用，其特征在于，所述试剂干扰G蛋白偶联受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶的结合。

10. 如权利要求8或9所述的应用，其特征在于，其中所述受体中至少一种选自 β 肾上腺素受体和 δ -阿片受体。

11. 如权利要求10所述的应用，其特征在于，其中所述 β 肾上腺素受体为 β_2 肾上腺素受体。

12. 如权利要求8、10或11所述的任一种的应用，其特征在于，所述拮抗剂中至少一种选自ICI 118,551、普萘洛尔、布他沙明或纳曲啉哌。

13. 如权利要求8、10或11所述的任一种的应用，其特征在于，所述拮抗剂为ICI 118,551或布他沙明。

预防和治疗阿尔兹海默症的G蛋白偶联受体拮抗剂

技术领域

本发明涉及预防或治疗阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease) 或相关的神经疾病, 尤其是涉及筛选预防或治疗阿尔兹海默症的药物的方法及 β -肾上腺素受体或阿片受体的拮抗剂在治疗阿尔兹海默症中的应用。

背景技术

阿尔兹海默症的特点为渐进性的痴呆和性格变化, 是最常见的与衰老相关的神经退行性病变。阿尔兹海默症影响 5-11% 的 65 岁以上年龄人群, 30% 的 85 岁以上年龄人群。阿尔兹海默症是由退化的神经元和活性的星型胶质细胞附近的淀粉样蛋白斑异常积累引起的。

淀粉样蛋白斑主要由淀粉样蛋白 β ($A\beta$) 组成。它是阿尔兹海默症的神经病理学标志, 其形成被认为是阿尔兹海默症的主要病因。此外, 最近的研究揭示了可弥散的寡聚化的 $A\beta$ 也可以是具有神经毒性而且和阿尔兹海默症相关(*Nature* **416**, 535-9, 2002)。

$A\beta$ 由 $A\beta$ 前体蛋白(APP)依次通过 β -和 γ -分泌酶的顺序剪切形成的。如图 1 所示, β -分泌酶剪切 $A\beta$ 前体蛋白后产生可溶的 APP_s - β 片断和 C99 片断, 后者随后被 γ -分泌酶剪切后产生 $A\beta$ 和 C60 片断。

$A\beta$ 至少有两种形式, 即 40 个氨基酸形式的 $A\beta_{40}$ 和 42 个氨基酸形式的 $A\beta_{42}$ 。42 个氨基酸形式的 $A\beta_{42}$ 更容易形成淀粉样蛋白斑, 被认为和阿尔兹海默症的病因更相关。 γ -分泌酶因为决定两种主要 $A\beta$ 形式($A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$)的比例而在阿尔兹海默症中起着关键作用。

如图 2 所示, γ -分泌酶复合物包括至少四种必需组分: 早老蛋白-1(PS1), nicastrin (NCSTN), APH-1, 和 PEN-2。其中一般认定的催化组分早老蛋白-1 的突变是引起大多数家族型阿尔兹海默症的原因, 由此推断 γ -分泌酶在阿尔兹海默症的病理发生中起重要作用(至少在家族型阿尔兹海默症的病理发生中)。

尽管早老蛋白-1 的突变和家族型阿尔兹海默症之间的关联为阿尔兹海默症的遗传病因提供了线索, 家族型阿尔兹海默症仅仅占有所有阿尔兹海默症病例的不足 10%。相比之下, 大多数阿尔兹海默症是散发型的, 说明早老蛋白-1 的突变以外的因素在阿尔兹海默症的病理发生中更重要。因此, 研究各种因素或环境作用如何对阿尔兹海默症的病理发生起作用是非常重要的。

以前的研究已经显示了体外细胞培养产生的 $A\beta$ 能够通过激活胞内信号通路或膜受体如毒蕈碱型乙酰胆碱受体被降低。最近的证据也显示了 $A\beta$ 水平和淀粉样蛋白斑的形成受生长抑素(somatostatin)或环境因素影响。

APP 的剪切也能够被神经递质和突触活性调控。例如, 激活与磷脂酰肌醇水解或激活蛋白激酶 C 相关的神经递质受体能够提高 APP 的代谢并降低 $A\beta$ 产生 (Ulus and Wurtman, J. Pharm. Exp. Ther., 281,149 (1997))。另一方面, 激活与 cAMP 的产生相关的神经递质受体能够抑制星型胶质细胞瘤细胞和原代星型胶质细胞中的组成型的和蛋白激酶 C/磷脂酰肌醇激活的分泌型 APP 的产生(Lee et al., J. Neurochem., 68,1830 (1997))。cAMP 对分泌型 APP 的产生的作用可能是星型胶质细胞特异的, 因为 cAMP 和蛋白激酶 A 激活分泌型 APP 的产生是在嗜铬细胞瘤 PC-12 细胞和人胚胎肾细胞中报导的(Xu et al., PNAS USA, 93, 4081 (1996); Marambaud et al., J. Neurochem., 67, 2616 (1996))。任何情况下, 以上结果提示了阿尔兹海默症中由于神经元退化和神经元突触丢失而引起的神经递质水平或第二信使信号转递的改变能够破坏 APP 的剪切并且导致产生淀粉样的或具有神经毒性的 APP 片断的积累。

进一步, 调控 β -肾上腺素受体, 引起 cAMP 升高的同时能够增加星型胶质细胞中 APP 的合成。基于此发现, 美国专利 6, 187, 756 和 6, 043, 224 报道了利用 β -肾上腺素受体拮抗剂调控 cAMP 水平来缓解 APP 异常表达导致的神经性病变的方法。此方法中, β -肾上腺素受体拮抗剂被用来通过调控 cAMP 水平抑制 APP 合成。

除了抑制 APP 合成, 调控 APP 代谢也可以被用来缓解 APP 相关的淀粉样蛋白斑形成引起的神经性病变。例如, 美国专利 5,385,915 报道了利用调控蛋白质磷酸化的试剂(即影响激酶或磷酸酶的试剂)改变 APP 剪切的方法和组合方式。对 APP 剪切的调控进而导致对淀粉样蛋白斑中积累的 $A\beta$ 的产生的调控。类似的, 在美国专利 5,242,932 报道了利用 chloroquine 和 primaquine 等化合物调控和影响哺乳动物细胞内蛋白质(包括 APP)细胞内转运和剪切的方法。

虽然上述报道看来对调控APP的产生和代谢以及对淀粉样蛋白斑形成是有效的, 但是还是有必要发展更多的治疗和预防阿尔兹海默症的方法和试剂。

发明内容

本发明的目的是提供用于筛选治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变试剂的方法, 进而提供一种试剂在治疗阿尔兹海默症中的应用。

在本发明的第一方面, 提供筛选治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变试剂的方法, 并提供两种技术方案。技术方案1包括以下步骤: (a)激活受体并确定其初始内吞程度, 所述受体为与早老蛋白-1结合的G蛋白偶联受体; (b)在一种候选试剂存在下, 如(a)所述激活受体, 再次确定受体的内吞程度; (c)确定(a)和(b)中的内吞程度的差异; (d)如果差异小于阈值则重复步骤(a)至(c); 或如果差异大于阈值, 则确认所

述候选试剂为治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变的试剂。技术方案2包括以下步骤：(a)测量受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶的初始结合程度，所述受体为与早老蛋白-1结合的G蛋白偶联受体；(b)在一种候选试剂存在下，如(a)所述再次测量受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶的结合程度；(c)确定(a)和(b)中的结合程度的差异；(d)如果差异小于一定阈值则重复步骤(a)至(c)，或如果差异大于阈值，则确认所述候选试剂为治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变的试剂。

在本发明的一个优选例中，所述受体中至少一种选自 β 肾上腺素受体和 δ -阿片受体。

在本发明的另一个优选例中，所述 β 肾上腺素受体可以为 β_2 肾上腺素受体(β_2AR)。

在本发明的另一个优选例中，所述受体被表达于已经转染了编码此受体基因的细胞上。

在本发明的另一个优选例中，通过检测内吞小泡的数量、内吞小泡中的早老蛋白-1、晚内吞小泡和溶酶体(LEL)中 γ -分泌酶的活性或淀粉样蛋白 $\beta(A\beta)$ 的形成而确定所述的初始内吞程度和再次内吞程度。

在本发明的另一个优选例中，通过检测荧光共振能量转移而确定所述的初始结合程度和再次结合程度。

在本发明的第二方面，提供在内吞过程中抑制与早老蛋白-1结合的G蛋白偶联受体的内吞的受体拮抗剂，用于制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物。

在本发明的第三方面，提供一种干扰G蛋白偶联受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶的结合的试剂，用于制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物。

在本发明的一个优选例中，提供 β -肾上腺素受体或阿片受体的拮抗剂，用于制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物。

在本发明的另一个优选例中，提供 β_2 肾上腺素受体(β_2AR)拮抗剂，用于制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物。

在本发明的另一个优选例中，提供的拮抗剂为ICI 118,551、普萘洛尔(propranolol)、布他沙明(butoxamine)或纳曲吡啶(naltrindole)中的至少一种，用于制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物。

在本发明的另一个优选例中，提供的拮抗剂为ICI 118,551 或 butoxamine，用于制备治疗或预防阿尔兹海默症或相关神经性病变药物。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图 1 显示了 β -分泌酶和 γ -分泌酶顺序作用于 APP 而产生 $A\beta$ 的过程。APP 首先被 β -分泌酶剪切产生可溶的 APPs- β 和 C99。C99 然后被 γ -分泌酶剪切产生 $A\beta$ 和 C60。

图 2 显示了 γ -分泌酶四个主要组分: 早老蛋白(Presenilin), nicastrin(NCSTN), APH-1 和 PEN-2。

图 3 显示了受体激活后内吞过程和内吞小泡向晚内吞小体和溶酶体(late endosomes and lysosomes, LEL)转运的过程。

图 4 显示了本发明涉及的一种筛选治疗或预防阿尔兹海默症的受体拮抗剂的方法的流程图。

图 5 显示了刺激 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)增加细胞系和原代培养海马细胞中 A β 的产生。(a-d)用 ELISA 方法测定细胞培养基中分泌型的 A β (A β ₄₀ 和 A β ₄₂)的水平。图中显示的是由至少三个独立实验得出的平均数 \pm 均数的标准误差与基本值之比(*P<0.01)。(a) 显示了 Iso 对共表达了 β_2 肾上腺素受体和 APP^{swe} 的 HEK293 细胞的分泌 A β 水平的作用。(b,c) Iso(b)或 DADLE(c)对共表达了 C99 和 β_2 肾上腺素受体 (b) 或 δ -阿片受体 (c) 的 HEK293 细胞的分泌 A β 水平的作用。(d) Iso 或 DADLE 对表达了 C99 的原代培养海马细胞的分泌 A β 水平的作用。(e)脉冲跟踪实验分析刺激 δ -阿片受体对 C99 剪切的作用。Pro, propranolol; DADLE, [D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin; NALT, naltrindole。

图 6 显示了刺激 β_2 肾上腺素受体增强 γ -分泌酶活性。(a)表达底物方法检测不同时间的 Iso 处理对 HEK293 细胞中的 C99 剪切和 C60 产生作用。(b-d)荧光底物方法检测 Iso 对 C6 胶质细胞(b), 大鼠海马切片(c)和 β_2 肾上腺素受体转染的野生型小鼠和早老蛋白-1 -2 双缺失小鼠的胚胎成纤维细胞(d)中的 γ -分泌酶活性的作用。

图 7 显示了 δ -阿片受体激活导致的 γ -分泌酶活性增强, 和增强的时程。SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞(a)和海马切片(b)显示用 DADLE 或 NALT 处理 30 分钟后分离的细胞膜组分通过荧光底物方法检测 γ -分泌酶活性。(c)显示了 β_2 肾上腺素受体激活增强 γ -分泌酶活性的时程。C6 胶质细胞用 Iso 按所示时间处理。细胞膜组分用荧光底物方法检测 γ -分泌酶活性。

图 8 显示了受体内吞和 γ -分泌酶活性增强的相关性。(a-e)用荧光底物方法检测 γ -分泌酶活性。(a)表达了 β_2 肾上腺素受体和 β_2 肾上腺素受体 T68F,Y132G,Y219A 突变体的 HEK293 细胞在 Iso 处理后的 γ -分泌酶活性。(b)C6 胶质细胞用霍乱毒素, forskolin 或 dybutyl cAMP 处理后的 γ -分泌酶活性。(c)把 C6 胶质细胞用刀豆蛋白 A, 蔗糖溶液或去钾溶液预处理后, 因 Iso 处理而增强的 γ -分泌酶活性消失。(d)表达 Dyn K44A 消除了 C6 胶质细胞中增强的 γ -分泌酶活性。(e)用 clathrin RNAi 抑制 HEK293 细胞中的 clathrin 表达消除了增强的 γ -分泌酶活性。胞质组分用 clathrin 和 actin 的抗体检测蛋白表达。(f,g) β_2 肾上腺素受体 L339,340A 突变体(β_2 ARLL)和 β_3 肾上腺素受体在 Iso 处理后不能内吞(f)或增强 γ -分泌酶活性(g)。CTX, 霍乱毒素; Fsk, forskolin; db-cAMP, dybutyl cyclic adenosine monophosphate; PTX, 百日咳毒素; Dyn K44A, dynamin II K44A; Con A, 刀豆蛋白 A; Suc, 蔗糖溶液; K⁺ dpl, 去钾溶液; NS RNAi, 非特异性 RNA 干扰; β_2 ARm, β_2 AR; Iso, 异丙肾上腺素(isoproterenol)。

图 9 显示了 δ -阿片受体激活导致的 γ -分泌酶活性增强不能够被百日咳毒素(PTX)消除。SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞用 200 ng/ml 百日咳毒素预处理 12 小时后再用 1 μ M DADLE 刺激 1 小时。细胞膜组分用荧光底物方法检测。

图 10 显示了 HEK293 细胞用 transferrin 如所标记的时间处理后, 细胞膜组分用荧光底物方法检测 γ -分泌酶活性。

图 11 显示了内吞小体内的 γ -分泌酶活性和 $A\beta$ 增加。(a,b)共转染了 $\beta 2$ 肾上腺素受体和图 10 中所标记的质粒的 HEK293 细胞用 Iso 处理后, 用于荧光底物方法(a), 或 $A\beta$ 特异的免疫沉淀和 western blot 实验(b)。胞质组分用 GFP 抗体检测。(c)免疫分离晚内吞小体和溶酶体实验显示了 Iso 处理增加了共转染 $\beta 2$ 肾上腺素受体, C99 和 Flag-Rab7 的 HEK293 细胞中的 $A\beta$ 产生。(d)免疫荧光实验分析 PS1(红)和 GFP-Rab7(绿)在 Iso 处理后 30 分钟的共定位。箭头所指为包含 PS1 和 GFP-Rab7 的准确结构。

图 12 显示了 DALDE 激活 δ -阿片受体后晚内吞小体和溶酶体内的 γ -分泌酶活性增加。

图 13 显示了富集 γ -分泌酶需要内吞转运。(a,b)免疫荧光实验分析 PS1 在转染的 HEK293 细胞中的定位。(a)对转染了 $\beta 2$ 肾上腺素受体和所标记的质粒 Dyn K44A 或 Rab5 S34N 的 HEK293 细胞中 PS1-NTF(红)和 Flag-Rab7(绿)的共定位的分析。(b)检测 DADLE 处理 3 分钟后的 PS1-NTF(红), HA-DOR(绿)和 β -adaptin(蓝)的共定位。箭头所指为包含 PS1-NTF, HA-DOR 和 β -adaptin 的准确结构。(c)Flag- $\beta 2$ 肾上腺素受体和 Flag- δ -阿片受体能够和内源的 γ -分泌酶的组分相互作用。(d)转染了 B2PB2 bradykinin 受体的 HEK293 细胞在用 bradykinin 处理后用荧光底物方法分析 γ -分泌酶活性。Con, 对照; Dyn K44A, dynamin II K44A 突变体; IB, immuno-blot 免疫印记法. BK, bradykinin.

图 14 显示了 γ -分泌酶活性, $A\beta$ 产生和淀粉样蛋白斑形成在活体实验中被增强, 而 $\beta 2$ 肾上腺素受体选择性拮抗剂 ICI 118,551 有效的抑制了淀粉样蛋白斑的形成。(a,b)大鼠用去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)或 clenbuterol(Cle)急性处理后, 海马的 γ -分泌酶活性(a)和分泌型 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平(b)被增强(* $P < 0.01$)。 (c~g) APP^{swe}/PS1 Δ E9 转基因小鼠的大脑内淀粉样蛋白斑在用 Iso(c), clenbuterol(d)或 ICI 118,551(f)慢性处理后被增强。图 c, d 和 f 为雌性(左)和雄性(右)小鼠的代表性的淀粉样蛋白斑。图 e 为图 c 和 d 的小鼠淀粉样蛋白斑的统计分析。图 g 为图 f 的小鼠淀粉样蛋白斑的统计分析。

图 15 显示了动物模型的实验结果。(a)可见平台实验的结果。没有发现基因型或物对本实验的作用($F = 2.145$, $P = 0.096$)。 (b)不可见平台实验的结果。发现对照组小鼠和野生型组小鼠表现出明显的差别($F = 28.754$, $P < 0.001$)。而且, propranolol 处理组小鼠与对照组小鼠相比表现出认知障碍被部分缓解($F = 4.571$, $P = 0.034$)。 nadolol(纳多洛尔)处理组小鼠与对照组小鼠相比没有差异($F = 1.192$, $P = 0.277$)。 (c)测验实验中小鼠处于平台象限中的时间百分比。发现对照组小鼠和野生型小鼠表现出明显的差异($P = 0.002$)。 propranolol 处理部分缓解认知障碍($P = 0.048$)。 nadolol 处理无效果($P = 0.969$)。

图 16 显示了受体亚型选择性拮抗剂在动物模型中的实验结果。Betaxolol 为能够通过血脑屏障的 β_1 肾上腺素受体选择性的拮抗剂。ICI 118,551 为能够通过血脑屏障的 β_2 肾上腺素受体选择性的拮抗剂。(a)在可见平台实验中, 没有发现药物作用($F = 0.0310, P = 0.969$)。(b)在不可见平台实验中, ICI 118,551 处理明显的缓解了认知障碍($F = 24.164, P < 0.001$)。Betaxolol 处理则表现了部分缓解作用, 但是效果不显著($F = 3.698, P = 0.057$)。(c)在测验实验中, ICI 118,551 的作用非常显著($P = 0.005$)。Betaxolol 处理则无效果($P = 0.552$)。

图 17 显示了受体亚型选择性拮抗剂在动物模型中的实验结果。Metoprolol 为能够通过血脑屏障的 β_1 肾上腺素受体选择性的拮抗剂。(a)在可见平台实验中, 没有发现药物作用($F = 2.017, P = 0.139$)。(b)在不可见平台实验中, Butoxamine 处理明显的缓解了认知障碍($F = 15.581, P < 0.001$)。Metoprolol 则无效果($F = 0.104, P = 0.748$)。(c)在测验实验中, Butoxamine 的作用显著($P = 0.020$)。Metoprolol 处理则无效果($P = 0.768$)。

图 18 显示了非转基因小鼠的结果。 β 肾上腺素受体的拮抗剂对非转基因小鼠无作用, 表明转基因是必需的。(a)可见平台实验中无药物作用($F = 2.327, P = 0.077$)。(b)不可见平台实验中无药物作用($F = 0.264, P = 0.851$)。(c)测验实验中无药物作用($P = 0.817$)。

图 19 显示了 δ -阿片受体选择性的拮抗剂 naltrindole 的动物实验结果。Naltrindole 为能够通过血脑屏障的 δ -阿片受体选择性的拮抗剂。(a)在可见平台实验中, 没有发现药物作用($F = 0.754, P = 0.391$)。(b)在不可见平台实验中, Naltrindole 处理明显的缓解了认知障碍($F = 4.945, P < 0.030$)。(c)在测验实验中, Naltrindole 的作用显著($P = 0.006$)。Metoprolol 处理则无效果($P = 0.768$)。

图 20 显示了对照组(control)、clenbuterol 处理和 ICI 118,551 处理的双转基因小鼠和非转基因小鼠在 Morris 水迷宫实验的可见平台实验中的逃逸时间。各组小鼠之间没有发现明显的药物或转基因作用($F = 2.714, P = 0.052$)。

图 21 显示了对照组(control)、clenbuterol 处理和 ICI 118,551 处理的双转基因小鼠和非转基因小鼠(NTg)在 Morris 水迷宫实验的不可见平台实验的逃逸时间。非转基因小鼠和对照组小鼠之间存在明显的转基因作用($F = 7.625, P = 0.010$)。ICI 118,551 处理组的小鼠比对照组小鼠表现出了更快的学习曲线($F = 16.075, P < 0.001$)。然而 clenbuterol 处理没有作用($F = 1.713, P = 0.198$)。

图 22 显示了最后一次不可见平台实验 24 小时后的测验实验中小鼠在平台象限停留时间百分比。相比之下, 非转基因小鼠($P = 0.026$)和 ICI 118,551($P = 0.041$)处理组小鼠在平台象限中停留了更长的时间。

图 23 显示了细胞表面 DOR 和 PS1 的相互作用。图 23A: 共转染了供体(donor) GFP-DOR 和受体(acceptor) HA-PS1(Cy3 荧光素)的 HEK293 细胞中, 用 561 nm 激光进行荧光漂白前(红线)和后(蓝线)的混合发射谱(激发波长 488 nm)。发射谱显示的是同一个细胞中的经过荧光漂白(左)和没有漂白(右)的两个区域。只有在经过荧光漂白的区域里供体

GFP 的发射光才会增加。图 23B: HEK293 细胞中受体荧光漂白前后非混合的 GFP-DOR 和 PS1-Cy3 图像。荧光漂白区域用白色线框显示。底部放大的伪彩显示了细胞表面在荧光漂白前后 GFP 发射光的强度。细胞表面的供体 GFP-DOR 发射光在受体 PS1-Cy3 荧光漂白后增强。标尺为 10 μm 。图 23C 显示了细胞表面 GFP-DOR 和 PS1-Cy3 平均能量转移效率。数字为实验中的细胞数。数据为三次独立试验所得。

具体实施方式

本发明涉及用于筛选预防或治疗阿尔兹海默症或其他相关神经性病变的药物的方法。

本发明还涉及肾上腺素受体或阿片受体的拮抗剂在治疗阿尔兹海默症中的应用,特别是 β -肾上腺素受体和 δ -阿片受体的拮抗剂。具体为,关于 β -肾上腺素受体的拮抗剂在阿尔兹海默症治疗中的新用途,和 δ -阿片受体的拮抗剂在阿尔兹海默症治疗中的新用途。本发明也涉及用于筛选可能被用来治疗阿尔兹海默症或其他相关神经性病变的试剂的方法。

如前所述,家族型阿尔兹海默症仅占有所有阿尔兹海默症的 10%。所以,遗传因素以外的因素可能在阿尔兹海默症的病因中起重要作用。环境因素,如应激,可能通过激活受体施加作用,包括 G 蛋白偶联受体中的 β -肾上腺素受体和 δ -阿片受体。中枢神经系统表达几种 G 蛋白偶联受体,尤其是 β 2-肾上腺素受体,表达在海马和皮层,即阿尔兹海默症病理发生过程中主要涉及的区域。在中枢神经系统中,这些受体作用于肾上腺素、多巴胺和阿片肽的信号转导,引起多种神经功能的调控,如刺激响应、学习、记忆和痛觉。

一旦被激活,这些受体偶联鸟嘌呤结合蛋白(G 蛋白)异源三聚体并且通过调控细胞内第二信使水平(如 cAMP)诱导下游信号。此外,激活的受体也会发生 clathrin 介导的内吞,这种内吞不仅在受体脱敏中也在信号转导中起关键作用。内吞后的 G 蛋白偶联受体通过早内吞小泡、晚内吞小泡和溶酶体(LEL)循环。不同内吞小泡的转运受 Rab GTPase 介导,其本身也可以作为各种小泡的标记。

本发明基于发明者的创新发现,即激活 β -肾上腺素受体(尤其是 β 2-肾上腺素受体)或 δ -阿片受体导致 γ -分泌酶在晚期内吞小体和溶酶体中的积累增加。 γ -分泌酶作为一种天冬氨酸蛋白酶,酸性 pH 的反应环境是其最佳条件。因此 γ -分泌酶在酸性的晚期内吞小体和溶酶体中的积累增加,导致其活性增强,并且使得 A β 的产生也增加。

图 3 显示了从激活 β -肾上腺素受体或 δ -阿片受体至增加 A β 产生的途径。如图3所示,激活 β -肾上腺素受体和 δ -阿片受体伴随着 clathrin 介导的内吞,包括形成 clathrin 包被的凹陷(clathrin-coated pits, CCP)以及 CCP 的脱离。本发明的发明人发现 γ -分泌酶的活性组分, 老年蛋白-1(PS1)组成型的结合这些受体。此内吞的结果为,老年蛋白-1 或 γ -分泌酶被带入内吞小泡。接着,通过 Rab5 和 Rab7 介导的小泡运输,这些内吞小泡被转化为晚期内吞小体和溶酶体(LEL),于是 γ -分泌酶活性在这里被增强。增强的 γ -分泌酶活性之后引起 A β 产生的增加。

这些发现提示了用拮抗剂抑制 β -肾上腺素受体和 δ -阿片受体能够防止 γ -分泌酶的活性增加。相应的,这些受体的拮抗剂可以用来降低 $A\beta$ 产生,因此可以用来预防或治疗阿尔兹海默症或相关神经性病变。本发明中,“拮抗剂”包括防止、降低或抑制受体激活的化合物。这类化合物可以和受体激活剂竞争相同的受体结合位点,或结合受体上的不同位点并降低受体激活剂的作用。

此外,这些发现提示可以通过检测相关受体的内吞来筛选潜在的可用于预防或治疗阿尔兹海默症或相关的神经性病变的拮抗剂。测定这些受体的内吞可以通过检测早老蛋白-1或 γ -分泌酶的内吞,晚内吞小体和溶酶体内早老蛋白-1或 γ -分泌酶的积累, γ -分泌酶的活性增强,或 $A\beta$ 产生增加来实现。

相应的,本发明具体的涉及关于筛选治疗或预防阿尔兹海默症或相关的神经性病变的试剂的方法。筛选方法可能是基于候选试剂抑制与早老蛋白-1或 γ -分泌酶结合的受体的内吞的能力,或者基于其减弱或消除受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶结合的能力。如图4所示,本发明的方法(方法40)包括测量候选试剂存在或不存在的条件下与早老蛋白-1或 γ -分泌酶结合的受体的内吞的程度,或者检测受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶结合的程度(步骤41)。这些受体包括内源或载体转染导入的G蛋白偶联受体。

然后,确定存在或不存在候选试剂情况下的内吞或结合程度的差异(步骤42)。如上所述,内吞程度可以用计量内吞小泡、内吞的早老蛋白-1或 γ -分泌酶、LEL中早老蛋白-1或 γ -分泌酶的增加、LEL中 γ -分泌酶活性的增强或 $A\beta$ 产量的增加来实现。受体与早老蛋白-1或 γ -分泌酶结合的程度可用任意适当的方法测定,例如下面将详细描述荧光共振能量转移实验(fluorescence resonance energy transfer, FRET)。

如果内吞或结合的差异(经步骤42测定)是显著的或者超过了某个阈值,则候选试剂可能被用来治疗或预防阿尔兹海默症或相关的神经性病变(如步骤43所示)。如果差异不显著,则可以用另一候选试剂重复前一步骤(如步骤44所示)。注意图4所示的方法是顺序显示的,每次试验一个候选试剂,本领域技术人员会愿意同时试验多种试剂,例如通过使用多孔板或其它高通量方法。本领域技术人员可以通过所熟知的统计学方法获得该阈值,即如果细胞中G蛋白偶联受体与早老蛋白1的再次内吞程度在统计学上低于初始内吞程度(优选显著低于,比如G蛋白偶联受体与早老蛋白1的再次内吞程度是初始内吞程度的60%或更低),就表明差异显著。所述初始内吞程度指使用候选试剂前激活受体并确定的内吞程度,再次内吞程度是指于同一试验体系中使用候选试剂后激活受体并确定的内吞程度。

本发明具体的涉及通过给人体服用有效量的结合 β -肾上腺素受体(尤其是 β_2 -肾上腺素受体)和/或 δ -阿片受体的拮抗剂用以治疗或防治阿尔兹海默症或其他相关神经性病变的方法。有效剂量的拮抗剂足以减少导致 γ -分泌酶向晚期内吞小体和溶酶体转运的受体内吞。本发明还涉及将结合 β -肾上腺素受体(尤其是 β_2 -肾上腺素受体)和 δ -阿片受体的拮抗剂应用于生产治疗或防治阿尔兹海默症和其他神经性病变的药物。

结合 β -肾上腺素受体和/或 δ -阿片受体的拮抗剂的有效剂量将依赖于向病人输送药物的服药方式, 服药频率, 和药剂组分, 以及病人的体重, 性别, 年龄和身体状况。典型的, 有效剂量的范围可以为从每天 $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 体重至 $10 \text{mg}/\text{Kg}$ 体重。虽然存在个体差异, 本领域技术人员有能力确定每种成分的最佳有效剂量。向病人给药可以通过任何合适的类似药剂的给药途径, 包括口服, 注射, 透皮贴剂等。

本发明涉及的化合物或组分可以用于治疗哺乳动物(人或其他哺乳动物)的阿尔兹海默症或其他相关神经性病变。这些化合物或组分包括药剂学上可以接受的载体和/或赋形剂, 例如生理盐水, 缓冲液, 葡萄糖, 甘油、乙醇, 淀粉等。此外, 这些化合物或组分可以制备成类似药剂常用的剂量剂型, 包括针剂, 片剂, 胶囊, 贴剂等。这些剂量剂型的制备方法为已知技术。

尽管有不同降低 $A\beta$ 产生的方法已被报导, 包括调控 APP 的产生(如美国专利 6,187,756 和 6,043,224)和抑制 APP 的剪切(如美国专利 5,242,932), 但本发明的内容是基于一种不同的机制, 即抑制导致 γ -分泌酶向晚期内吞小体和溶酶体转运的受体内吞。以下的实验和实施例清楚地阐述了将 β -肾上腺素受体(尤其是 β_2 -肾上腺素受体)和/或 δ -阿片受体的拮抗剂或抑制剂用于治疗或防治阿尔兹海默症的基本原理。

实施例 1 激活 β_2 -肾上腺素受体增加 $A\beta$ 产生

首先在 HEK293 细胞中检验激活 β_2 -肾上腺素受体对 $A\beta$ 产生的作用。HEK293 细胞具有有功能的 G 蛋白偶联受体的信号通路, 并且能正常分泌 $A\beta$ 。本实验中使用的 HEK293 细胞转染了 β_2 -肾上腺素受体和 APP 的突变体(APP_{swe})。突变体 APP_{swe} 是家族型阿尔兹海默症的“Swedish”突变, 即在第 670 和 671 个密码子的突变。如图 5a 所示, 用激动剂 isoproterenol (Iso)激活 β_2 -肾上腺素受体, 增加了两种 $A\beta$ 亚型($A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$)的分泌水平。另一方面, 加入了 β_2 -肾上腺素受体的拮抗剂 propranolol (Pro)则消除了 Iso 对 $A\beta$ 分泌水平的增加作用, 而其本身并无作用。 $A\beta$ 产生的增加需要 γ -分泌酶, 因为用 γ -分泌酶的特异性抑制剂 L685,458 预处理消除了 $A\beta$ 产生的增加。

将 HEK293 细胞共转染了 γ -分泌酶的底物(C99)和 β_2 -肾上腺素受体的实验进一步证实了 γ -分泌酶参与了 β_2 -肾上腺素受体引起的 $A\beta$ 产生的增加。C99 是 β -分泌酶介导的 APP 剪切的产物(见图 1)。C99 是 γ -分泌酶的直接底物和 $A\beta$ 的直接前体。图 5b 显示了在共转染的 HEK293 细胞中用 Iso 刺激 β_2 -肾上腺素受体导致了 $A\beta$ 产生的增加, 并且和此前描述的共转染了 APP_{swe} 和 β_2 -肾上腺素受体的细胞相当。同样的, 这个增加也能被 Pro 消除, 而其本身并无作用。因此, 分泌的 $A\beta$ 产生增加是由于 γ -分泌酶的活性增加导致的。

除了 β_2 -肾上腺素受体, 激活 δ -阿片受体也能够导致分泌的 $A\beta$ 水平的增加。如图 5c 所示, DADLE (D-Ala₂-D-Leu₅-enkephalin, δ -阿片受体的激动剂)处理转染了 C99 的 HEK293 细胞导致 $A\beta$ 产生的增加。使用 δ -阿片受体的拮抗剂 NALT (naltrindole)则消除了 DADLE 的作用。尽管以上实验使用的是经过转染受体的细胞, 但在内源受体上也得到了

同样的结果。图 5d 显示了在转染了 C99 的原代海马细胞中, 激活内源的 β -肾上腺素受体或 δ -阿片受体同样引起 $A\beta$ 的分泌增加。

以上实验清楚地证明了激活 β -肾上腺素受体或 δ -阿片受体会引起 $A\beta$ 的分泌增加。脉冲追踪实验显示了分泌的 $A\beta$ 是由转染的 C99 剪切产生的。如图 5e 所示, C99 的代谢速度在 DADLE 刺激的共转染了 δ -阿片受体和 C99 的 HEK293 细胞中比对照细胞更快。此结果提示了受体的激活促进了 C99 的剪切。因此, 激活 β -肾上腺素受体(尤其是 β_2 -肾上腺素受体)和/或 δ -阿片受体加强了 $A\beta$ 的产生和分泌, 是由于 γ -分泌酶对 C99(或类似底物)的剪切增强导致的。

实施例 2 激活 β_2 -肾上腺素受体增加 γ -分泌酶的活性

以上所述的激活 β -肾上腺素受体或 δ -阿片受体引起的 $A\beta$ 的产生增加可能是因 γ -分泌酶的表达水平或活性增加而导致的。为了回答这个问题, 发明人检验了 β_2 -肾上腺素受体激活对 γ -分泌酶的表达水平和活性的作用。如图 6a 所示, 在 Iso 处理的转染了 C99 的 HEK293 细胞中, C60 的产生增加了。C60 是 C99 被 γ -分泌酶介导的剪切产生的。但是, 相同的处理没有对 PS1 的表达水平产生任何改变。PS1 是 γ -分泌酶的活性位点亚基, 以氨基和碳基末段片段的异源二聚体形式存在(即 PS1-NTF 和 PS1-CTF)。此结果提示了激活 β_2 -肾上腺素受体后, γ -分泌酶的活性增加而 γ -分泌酶的表达没有改变。

为直接测量 γ -分泌酶的酶活性, 使用了荧光底物。此荧光底物基于连接了荧光报告分子的 γ -分泌酶特异的底物序列。C6 胶质细胞瘤的内源 β -肾上腺素受体被刺激 30 分钟后 γ -分泌酶的活性增强(图 6b)。此效果在海马切片中被验证(图 6c)。小鼠胚胎纤维组织母细胞缺失了 presenilin 后 Iso 引起的 γ -分泌酶活性增强被消除, 验证了此方法对 γ -分泌酶活性的特异性(图 6d)。综上所述, 这些结果显示了激活 β_2 -肾上腺素受体刺激了 γ -分泌酶活性, 导致 $A\beta$ 的产生增加。

激活受体而增强 γ -分泌酶活性并不仅限于 β -肾上腺素受体。刺激 SH-SY5Y 神经母细胞瘤(图 7a)或培养的原代海马细胞(图 7b)的内源 δ -阿片受体也能够获得类似结果。进一步, 检测 γ -分泌酶的活性显示了 γ -分泌酶的活性在刺激 β_2 -肾上腺素受体 30 分钟左右达到最大值, 约 60 分钟时恢复到本底水平(图 7c)。

实施例 3 增强的 γ -分泌酶活性不依赖于 cAMP 信号

如上所述, G 蛋白偶联受体(包括 β_2 -肾上腺素受体)一旦被激活, 会诱导 Gs 蛋白依赖的腺苷酸环化酶的激活, 导致细胞内 cAMP 水平升高。为了描述 β_2 -肾上腺素受体激活导致 γ -分泌酶活性增强的分子机制, 在后续实验中使用了一个无法激活 Gs 蛋白的 β_2 -肾上腺素受体的突变体(β_2AR T68F, Y132G, Y219A, 或 β_2AR TYY)。这个突变体无法消除 γ -分泌酶活性的增强(图 8a)。这个结果排除了 Gs 蛋白信号通路参与 β_2 -肾上腺素受体对于 γ -分泌酶的作用。进一步, 用诸如霍乱毒素(cholera toxin, CTX), forskolin, 和 dybutyl-cAMP 等

能够模拟 Gs 蛋白激活和 cAMP 水平升高的试剂处理细胞, 无法导致 γ -分泌酶活性的增强(图 8b)。因此, 激活 β -肾上腺素受体而增强的 γ -分泌酶活性并没有 cAMP 信号通路的参与。

事实上 cAMP 信号通路并没有参与增强 γ -分泌酶的活性可能对于 δ -阿片受体也成立。已知 δ -阿片受体激活百日咳毒素(PTX)敏感的 Gi/o 蛋白并且通过抑制腺苷酸环化酶降低 cAMP 水平。用百日咳毒素对 SH-SY5Y 神经母细胞瘤预处理不能改变 DADLE 刺激引起的 γ -分泌酶活性增强(图 9)。此结果显示了激活 δ -阿片受体引起的 γ -分泌酶活性不由 cAMP 调控。因此, β 2-肾上腺素受体或 δ -阿片受体对 γ -分泌酶的调控不依赖于 G 蛋白信号通路或经典的 cAMP 通路。

实施例 4 受体内吞与 γ -分泌酶的活性增强相关

如果 G 蛋白信号通路或 cAMP 通路不参与增强 γ -分泌酶的活性, 那么其机制是什么? 如前针对图 3 的讨论, GPCR(包括 β -肾上腺素受体和阿片受体)激活通常伴随着受体内吞, 及其引起特异性的信号通路。受体内吞及其相关的信号转导是否参与了 γ -分泌酶活性的提高可以用不同的内吞通路抑制剂来检测。

图 8c 显示了 Iso 对 γ -分泌酶活性的作用可以被内吞抑制剂如刀豆蛋白(Con A), 高渗透压溶液(Suc)和无钾溶液(K^+ dpl)的预处理消除。图 8d 显示了 Iso 引起的 γ -分泌酶活性增强可以被 dynamin 的显性负突变体 Dyn K44A(能够抑制 clathrin 或 caveolin 介导的内吞)消除。因为 β 2-肾上腺素受体主要通过 clathrin 介导的机制内吞, 所以针对 clathrin 重链的小干扰 RNA(small interfering RNA)可以被用来去除细胞内的 clathrin 表达。图 8e 显示了 Iso 引起的 γ -分泌酶活性增强可以被 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)消除。这些结果显示了 β 2-肾上腺素受体引起的 γ -分泌酶活性增强是通过激动剂诱导的 clathrin 介导的内吞作用调控的。

为了进一步确证激动剂引起的 β 2-肾上腺素受体内吞对于 γ -分泌酶活性增强是必需的, 在实验中使用了另一个 β 2-肾上腺素受体的突变体(β_2 AR L339/340A, β_2 AR LL)和另一个内在的肾上腺素受体 β 3-肾上腺素受体, 这两个受体都不具有激动剂引起的内吞现象。在 HEK293 细胞内激活这些受体确实提高 cAMP 水平, 但是既不能引起受体内吞(图 8f)也不能增强 γ -分泌酶活性(图 8g)。这些结果清楚的提示了激动剂引起的 clathrin 介导的 β 2-肾上腺素受体内吞参与了调控 γ -分泌酶活性增强的机制。

上述实验说明 clathrin 介导的内吞是激活受体而引起的 γ -分泌酶活性增强的必要条件。但是, clathrin 介导的内吞其本身是否足以引起 γ -分泌酶活性增强仍不清楚。为了回答这个问题, 用 transferrin 处理 HEK293 细胞, 导致 transferrin 受体的 clathrin 介导的持续内吞。如图 10 所示, transferrin 处理虽然能引起持续内吞, 但不能增强 γ -分泌酶的活性。这些结果提示了 clathrin 介导的内吞对于 β 2-肾上腺素受体引起的 γ -分泌酶的活性增强是必需的但不是充分的。

实施例 5 γ -分泌酶的活性和 $A\beta$ 产生增强和内吞途径联系

如图 3 所示,一旦进入细胞内,内吞小泡就被通过各种特异性的内吞途径转运至其目的地。这些内吞途径涉及 Rab 鸟苷三磷酸酶(Rab GTPase)调控的胞内囊泡转运。现已知从细胞膜向早内吞小体和继续向晚内吞小体和溶酶体的内吞运输能够分别被早内吞小体标记 Rab5 和溶酶体标记 Rab7 的显性负突变体 Rab5 S34N 和 Rab7 T22N 抑制。如图 11a 和 b 所示,在 HEK293 细胞中表达 Rab5 S34N 或 Rab7 T22N 能够消除激活 β 2-肾上腺素受体引起的 γ -分泌酶的活性(图 11a)和 $A\beta$ 产生(图 11b)的增强。这些结果说明 γ -分泌酶的活性和 $A\beta$ 产生的增强必需有内吞小泡向晚内吞小体和溶酶体的转运,因此晚内吞小体和溶酶体的参与对 β 2-肾上腺素受体引起的 γ -分泌酶活性和 $A\beta$ 产生起着关键作用中。

为了进一步显示晚内吞小体和溶酶体的作用,利用 Flag 抗体从转染了 Flag-Rab7 的细胞中免疫分离晚内吞小体和溶酶体的小泡,随后用早内吞小体的标记 EEA1(early endosome antigen 1)和晚内吞小体和溶酶体的标记 LAMP-1(lysosome-associated membrane protein-1)确证了组分。如图 11c 所示,在 β 2-肾上腺素受体经 1 小时刺激后发现晚内吞小体和溶酶体中的 $A\beta$ 含量明显增加,而 Flag-Rab7 或 LAMP-1 无显著变化,显示了晚内吞小体和溶酶体中的 $A\beta$ 产生因 β 2-肾上腺素受体激活而增加,且无需增加晚内吞小体和溶酶体的数量。

同样,晚内吞小体和溶酶体参与增强 γ -分泌酶活性也不仅限于 β -肾上腺素受体。图 12 显示了晚内吞小体和溶酶体中的 γ -分泌酶活性也在 δ -阿片受体激活后增强了。图 12 的实验是用 1 μ M DADLE 对 SH-SY5Y 神经母细胞瘤刺激 30 分钟后进行亚细胞组分分离,再将各组分用于碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)和荧光底物分析。结果显示 DADLE 处理只增强了含有碱性磷酸酶细胞组分的 γ -分泌酶活性(*P < 0.01)。

综上所述,以上图 11 和图 12 所示结果提示了晚内吞小体和溶酶体在 β 2-肾上腺素受体或 δ -阿片受体激活对 $A\beta$ 产生的作用中起非常重要的角色。这个发现和以前的关于内吞囊泡为 γ -分泌酶活性提供适宜环境的报导相一致。

为了进一步确证晚内吞小体和溶酶体中的 γ -分泌酶和 $A\beta$ 产生增加相关,应用免疫荧光显微术检测刺激 β 2-肾上腺素受体是否增加了 γ -分泌酶在晚内吞小体和溶酶体中的定位。在细胞实验中,晚内吞小体和溶酶体用表达的 GFP-Rab7 标记。图 11d 展示在转染的 HEK293 细胞中,激活 β 2-肾上腺素受体 30 分钟后,发生了 PS1(γ -分泌酶活性位点亚基)和 GFP-Rab7 的共定位。在海马切片的实验中,晚内吞小体和溶酶体用 LAMP-1 的抗体标记。图 11e 展示了 Iso 处理后 PS1 或 nicatrin(另一 γ -分泌酶组分)和 LAMP-1 的共定位增强。综上所述,以上结果提示了刺激 β 2-肾上腺素受体增强了 γ -分泌酶在晚内吞小体和溶酶体中定位,此作用导致了 γ -分泌酶活性和 $A\beta$ 产生的增加。

实施例 6 组成型 PS1/ γ -分泌酶和 β 2-肾上腺素受体的相互作用

Dyn K44A 和 Rab5 S34N 有效的防止了 β 2-肾上腺素受体刺激后 PS1 在晚内吞小体和溶酶体中定位增强(图 13a), 此结果提示 PS1 可能是被从细胞膜向晚内吞小体和溶酶体转运。利用 β -adaptin(其能够标记 clathrin 包被的凹陷和小泡)发现刺激 HEK293 细胞中的 δ -阿片受体 3 分钟后 PS1 和 β -adaptin 以及内吞的受体形成共定位(图 13b)。这些发现提示了 PS1 和激活的 β 2-肾上腺素受体或 δ -阿片受体在激动剂刺激后形成共内吞。而此结果并不意外, 因为 PS1 能够组成型的结合膜蛋白, 例如 APP 和 Notch, 而且 β 2-肾上腺素受体能够通过形成异源二聚体介导其他跨膜蛋白的内吞。为了证明确实如此, 应用免疫共沉淀方法检测了 PS1 和 β 2-肾上腺素受体或 δ -阿片受体的结合。

如图 13c 所示, 四个 γ -分泌酶的必须组分 PS1, nicastrin, APH-1a(anterior pharynx defective-1a)和 PEN-2(presenilin enhancer-2)在含有 CHAPSO 的缓冲液中被 β 2-肾上腺素受体或 δ -阿片受体共沉淀(图 13c), 在此缓冲液中 γ -分泌酶保持为蛋白复合物。用 Trinton X-100 替换 CHAPSO 能够解聚 γ -分泌酶蛋白复合物, 并且破坏了受体与 nicastrin, APH-1a 和 PEN-2 的共沉淀, 而不影响经 PS1-NTF 或 PS1-CTF 抗体检测到的受体与 PS1 的共沉淀(图 13c)。这些结果提示了 β 2-肾上腺素受体或 δ -阿片受体通过直接结合 PS1 与 γ -分泌酶相互作用。但是, 并非所有 G 蛋白偶联受体(GPCR)都有这种结合, 因为另一 GPCR 成员, B2 bradykinin 受体(B2R), 无法结合 PS1/ γ -分泌酶(图 13c)或引起 γ -分泌酶的活性增强(图 13d)。综上所述, 这些结果提示 β 2-肾上腺素受体或 δ -阿片受体与 PS1 的相互作用是特异性的, 并且提供了它们调控受体激活引起的 γ -分泌酶活性增强的机制基础。此外, 这些结果也提示能够减弱或消除受体与早老蛋白1 结合的试剂是潜在的治疗或预防阿尔兹海默症或其他相关的神经性病变的药物。

实施例 7 筛选能够减弱或消除受体与早老蛋白1 结合的试剂

通过任何合适的方法, 如荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET), 可以筛选能够消除或减弱早老蛋白1与受体结合的试剂。荧光共振能量转移是能量从近距离结合(≤ 10 nm)的供体荧光素向受体荧光素转移的过程。因此, 这项技术可被用来检测物理上结合在一起的蛋白质。在能量转移中, 非放射性的能量转移减弱了供体的荧光发射。因此通过比较供体在同一样品被破坏受体荧光素(如荧光漂白的办法)前后的荧光发射的强度来检测能量转移。如果发生能量转移, 则供体的荧光发射在荧光漂白受体后增强。

例如在共转染的 HEK293 细胞中检测有绿色荧光蛋白(GFP)标记的 δ -阿片受体(GFP-DOR)和早老蛋白 1-Cy3 之间的能量转移效率在荧光漂白前后的变化。细胞共转染了 GFP 标记的 δ -阿片受体(GFP-DOR)和有 HA 标记的早老蛋白 1(HA-PS1)。HA-PS1 的表达可以通过 HA 的第一抗体和连接 Cy3 荧光素的第二抗体(Jackson ImmunoResearch 公司)检测, GFP-DOR 的表达通过 GFP 荧光素检测。

图 23A-23C 显示了此类实验的结果之一。用 Leica 共聚焦显微镜获取图像，包括供体 GFP-DOR 和受体 PS1-Cy3 荧光素的混合发射谱(488nm 激光激发)。首先检测在共表达两个蛋白质的 HEK293 细胞中供体(GFP-DOR)发射光的强度在受体(PS1-Cy3)荧光漂白后是否增强。图 23A 显示了细胞在荧光漂白前后的荧光漂白和非荧光漂白区域的图像。选定的区域用 Cy3 吸收谱内的 561 nm 激光漂白。GFP-DOR 发射光相应的强度在荧光漂白的区域与相同细胞的非漂白区域相比有较大增强。此结果显示了 GFP 和 Cy3 之间发生了能量转移，且此能量转移能够通过荧光漂白 Cy3 被消除或降低。

图 23B 显示了转染的 HEK293 细胞中 GFP-DOR 和 PS1-Cy3 在受体经 561 nm 激光荧光漂白前后代表性的图像。GFP-DOR 的图像显示了受体的荧光发射(伪彩强度图像)在荧光漂白后增强，且此增强只在细胞内荧光漂白的区域发生。

如图 23C 所示，细胞表面附近的 GFP-DOR 和 PS1-Cy3 的平均相对能量转移效率大约为 $22.8 \pm 3.9\%$ ，显示了两者的相互作用。在阳性对照中，表达了 GFP-DOR 的细胞用 GFP 第一抗体以及连接了 Cy3 的第二抗体孵育。此阳性对照的能量转移效率为 $27.9 \pm 5.3\%$ 。将表达了 GFP-DOR 的细胞用针对非特异性蛋白 actin 的第一抗体以及连接了 Cy3 的第二抗体孵育作为阴性对照。此阴性对照的能量转移效率为 $7.8 \pm 4.7\%$ 。这些结果都显示了 δ -阿片受体和早老蛋白 1 之间的相互作用。

实施例 8 动物体内 γ -分泌酶活性的增强， $A\beta$ 产生和淀粉样蛋白斑的形成

进一步在动物体内对 β 2-肾上腺素受体与这些阿尔兹海默症相关分子的作用进行研究。大鼠体内实验显示急性注射了肾上腺素受体内源配体去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)或 β 2-肾上腺素受体选择性的激动剂 clenbuteral(Cle)后，大鼠海马的 γ -分泌酶活性(图 14a)和 $A\beta$ 水平(图 14b)都显著升高了。基于这些结果，可以预料对动物模型长期给予这些受体激动剂处理可能加剧阿尔兹海默症的病理变化。在阿尔兹海默症的小鼠模型(APPswe/PS1 Δ E9 双转基因小鼠)中的实验证实了这一点。这种小鼠在给予 Iso 或 Cle 慢性处理 30 天后显示出了增多的大脑淀粉样蛋白斑(图 14c-14e)。这个发现说明激活 β 2-肾上腺素受体能够增进 γ -分泌酶活性， $A\beta$ 产生和淀粉样蛋白斑形成。所以，这些受体的拮抗剂应可以被用来降低 $A\beta$ 产生或淀粉样蛋白斑形成。图 14f 和 14g 中的结果验证了这一点，因为 β 2-肾上腺素受体特异性的拮抗剂 ICI 118,551 显著的降低了淀粉样蛋白斑的数量。

实施例 9 动物模型体内实验

为了衡量 β -肾上腺素受体的拮抗剂的体内有效性，对阿尔兹海默症的转基因模型小鼠(APPswe/PS1 Δ E9 双转基因小鼠)给予了这些化合物。在大约 6 个月龄时，这种小鼠已产生进行性的空间记忆缺陷，并且伴随着大脑内 $A\beta$ 水平升高和淀粉样蛋白斑增多。

在以下实验中，APPswe/PS1 Δ E9 小鼠和非转基因(NTg)的同窝小鼠被按照性别和年龄匹配的方式分组。实验化合物通过口服给药，从 4 个月的年龄开始并持续 1 个或 2 个月。

利用 Morris 水迷宫的实验评价各种化合物对 APP^{swe}/PS1 Δ E9 小鼠和非转基因小鼠的作用。

Morris 水迷宫实验由神经科学家 Richard G. Morris 于 1984 研制，现今为常用的研究海马在空间记忆形成中作用的方法。实验中的迷宫为一注入了 24-25 °C 水的圆形水池(直径 1.2 米)，并加入奶粉使水不透明。水池周围放置固定的空间指示，包括印有醒目图案的帘布和置有明显物体的架子。实验期间，小鼠被小心的面对池壁至于水中。小鼠首先接受一定数量的可见平台训练(即连续两天，每天八次)，学习游至一有杆标记的升高的圆形平台(直径 10 厘米)上。可见平台训练被分为每天两组(即每组四次训练)以进行统计学数据分析。可见平台训练期间，每次训练的平台位置(东北，东南，西南或西北)和起始位置(东、南、西或北)为伪随机决定。

不可见平台训练也进行一定天数(即连续 6 天，每天四次)，其间小鼠被允许寻找置于水面以下 1.5 厘米处的平台。小鼠如无法在 60 秒内找到平台则被指引到平台。不可见平台实验期间，平台的位置保持不变，小鼠则按照从四个方向(东、南、西或北)中伪随机选择的一个方向进入水池。每一次训练结束后，小鼠在平台上停留 30 秒后再被从平台上转移到笼内。

最后一次不可见平台训练的二十四小时后，进行一次测验实验。这时平台被移走，小鼠则允许游泳 60 秒钟试图寻找平台。所有实验被固定于水池正上方的的摄像机检测并记录，记录用计算机跟踪系统进行分析。

动物模型试验 1

在这一组实验中，APP^{swe}/PS1 Δ E9 转基因小鼠和非转基因小鼠被给予 propranolol 和 nadolol 以评价 β -肾上腺素受体的拮抗剂对淀粉样蛋白斑形成的作用。APP^{swe}/PS1 Δ E9 转基因小鼠和非转基因小鼠被按照性别和年龄匹配的方式分组。化合物通过口服给药，从 4 个月年龄开始持续直至 6 个月。Propranolol 能够容易的通过血脑屏障，因此，它能够拮抗中枢神经系统的 β -肾上腺素受体。另一方面，nadolol 也是一种 β -肾上腺素受体的拮抗剂，但是不能通过血脑屏障。小鼠然后用 Morris 水迷宫实验进行空间学习和记忆检测。

在 Morris 水迷宫任务中，小鼠首先进行两天的可见平台训练，每天进行两组训练。在每组训练中，记录小鼠找到并且爬上平台所耗费的时间(逃逸时间)。此训练中没有显示基因型或药物作用($F = 2.145$, $P = 0.096$, 图 15a)。

接着，小鼠进行了六天不可见平台训练，每天进行一组训练。对照组小鼠相比非转基因组小鼠表现出明显的障碍($F = 28.754$, $P < 0.001$, 图 15b)。propranolol 处理与对照组相比能够部分缓解小鼠的障碍($F = 4.571$, $P = 0.034$)，但是 nadolol 处理则表现为无效($F = 1.192$, $P = 0.277$)。

最后，小鼠在最后一次不可见平台训练后 24 小时进行一次测验实验。在此实验中，小鼠被允许自由游泳 1 分钟以寻找平台。对小鼠耗费在平台象限的时间比例进行分析(图

15c)。同样,转基因小鼠和非转基因小鼠表现出显著的基因型作用($P = 0.002$)。Propranolol 处理部分地缓解了转基因小鼠的空间记忆障碍($P = 0.048$),而 nadolol 则表现为无效($P = 0.969$)。Propranolol 在平台实验中显示的效果并非是由游泳速度差异造成的(图 15d)。

以上研究清楚地显示了 propranolol 能够拮抗中枢神经系统的 β -肾上腺素受体。因为 propranolol 是一种非选择性的 β -肾上腺素受体拮抗剂,所以进一步利用亚型选择性的 β -肾上腺素受体拮抗剂研究体内哪一种亚型能够引起上述效果。使用的亚型选择性的 β -肾上腺素受体拮抗剂包括 Betaxolol(倍他洛尔)和 ICI 118,511。Betaxolol 是一种能够通过血脑屏障的 β_1 -肾上腺素受体。ICI 118,511 是一种能够通过血脑屏障的 β_2 -肾上腺素受体。

在可见平台训练中,没有显示出药物作用(图 16a, $F = 0.0310$, $P = 0.969$)。然而,在不可见平台训练中(图 16b),ICI 118,551 处理显著的缓解了认知障碍($F = 24.164$, $P < 0.001$)。Betaxolol 表现出一定效果。但是,这个效果($F = 3.698$, $P = 0.057$)和 ICI 118,551 相比不显著。在测验实验中(图 16c),ICI 118,551 的作用很显著($P = 0.005$)。同样, Betaxolol 的效果($P = 0.552$)和 ICI 118,551 相比则表现不显著。Propranolol 在实验中显示的效果并非是由游泳速度差异造成的(图 16d)。

另一比较亚型选择性的 β -肾上腺素受体拮抗剂的实验证实了 β_2 -肾上腺素受体拮抗剂的效果更强。图 17a-17d 显示了与图 16 相似的动物实验结果。Metoprolol(美托洛尔)是一种能够通过血脑屏障的 β_1 -肾上腺素受体拮抗剂。Butoxamine 是一种能够通过血脑屏障的 β_2 -肾上腺素受体拮抗剂。如图 17a 所示,在可见平台训练中,没有显示出药物作用($F = 2.017$, $P = 0.139$)。但是,在图 17b 显示的不可见平台训练中, Butoxamine 处理显著的缓解了认知障碍($F = 15.581$, $P < 0.001$)。相反, Metoprolol 处理则表现为无效($F = 0.104$, $P = 0.748$)。图 17c 显示了在测验实验中 butoxamine 的作用很显著($P = 0.020$),而 metoprolol 则无效($P = 0.768$)。同样,实验中显示的效果并非是由游泳速度差异造成的(图 17d)。

综上所述,以上结果提示 β -肾上腺素受体拮抗剂主要靶向中枢神经系统的 β -肾上腺素受体以实现降低 γ -分泌酶活性和 $A\beta$ 产生。进一步,大部分所需要的缓解空间记忆缺陷的作用可以通过抑制 β_2 -肾上腺素受体实现,而抑制 β_1 -肾上腺素受体没有作用。因此,根据本发明的目的,用来防治或治疗阿尔兹海默症的 β -肾上腺素受体拮抗剂应更倾向于作用于 β_2 -肾上腺素受体。

进一步实验中,这些 β -肾上腺素受体拮抗剂对非转基因小鼠表现为无效。如图 18 所示,可见平台训练(图 18a, $F = 2.327$, $P = 0.077$),不可见平台训练(图 18b, $F = 0.264$, $P = 0.851$)以及测验实验(图 18c, $P = 0.817$)都没有表现出药物作用。这些结果提示了尽管这些 β -肾上腺素受体拮抗剂在缓解记忆缺陷中有效,但是对于没有记忆缺陷的正常个体则没有明显效果。

图 19a-19c 显示了与图 15 相似的动物实验结果,但这里使用的是 δ -阿片受体拮抗剂 Naltrindole。Naltrindole 是一种能够通过血脑屏障的 δ -阿片受体拮抗剂。如图 19a 所示,在可见平台训练中,没有显示出药物作用($F = 0.754$, $P = 0.391$)。在图 19b 显示的不可见平

台训练中, Naltrindole 处理显著的缓解了认知障碍($F = 4.945, P < 0.030$)。图 19c 显示了 Naltrindole 在测验实验中的显著作用($P = 0.006$)。

动物模型试验 2

在进一步的动物实验中, 4 月龄的 APP^{swe}/PS1 Δ E9 双转基因小鼠口服生理盐水(Sal), 2 mg/kg clenbuterol(β_2 -肾上腺素受体激动剂)或 1 mg/kg ICI 118,551(β_2 -肾上腺素受体拮抗剂)30 天后用 Morris 水迷宫实验(如上所述)检测空间学习和记忆。

实验中的迷宫为一注入了 24-25 °C 水的圆形水池(直径 1.2 米), 并加入奶粉使水不透明。水池周围放置固定的空间指示, 包括印有醒目图案的帘布和置有明显物体的架子。实验期间, 小鼠被小心的面对池壁至于水中。小鼠首先接受一定数量的可见平台训练(即连续两天, 每天八次), 学习游至一有杆标记的升高的圆形平台(直径 10 厘米)上。可见平台训练被分为每天两组(即每组四次训练)以进行统计学数据分析。可见平台训练期间, 每次训练的平台位置(东北, 东南, 西南或西北)和起始位置(东、南、西或北)为伪随机决定。

图 20 显示了对照组、clenbuterol(克伦特罗)处理和 ICI 118,551 处理的双转基因小鼠和非转基因小鼠在 Morris 水迷宫实验的可见平台实验的逃逸时间。各组小鼠之间没有发现明显的药物或转基因作用($F = 2.714, P = 0.052$)。

不可见平台训练连续进行 6 天(每天 4 次训练), 小鼠寻找水面以下 1.5 cm 处的一平台。如果在 60 秒内无法找到平台, 小鼠则被引领到平台处。在不可见平台训练中, 平台的位置保持不变, 小鼠则从四个方向(东、南、西或北)中伪随机选择的一个方向进入水池。在每次不可见平台训练后, 小鼠在平台上停留 30 秒后再被从平台上转移到笼内。

图 21 显示了对照组、clenbuterol 处理和 ICI 118,551 处理的双转基因小鼠和非转基因小鼠在 Morris 水迷宫实验的不可见平台实验的逃逸时间。非转基因小鼠和对照组小鼠之间存在明显的转基因作用($F = 7.625, P = 0.010$)。ICI 118,551 处理组的小鼠比对照组小鼠表现出了更快的学习曲线($F = 16.075, P < 0.001$)。然而 clenbuterol 处理没有作用($F = 1.713, P = 0.198$)。这些结果提示 ICI 118,551 可以有效的缓解转基因小鼠的空间记忆障碍。

最后一次不可见平台训练的二十四小时后, 进行一次测验实验。这时平台被移走, 小鼠则允许游泳 60 秒钟试图寻找平台。所有实验被固定于水池正上方的的摄像机检测并记录, 记录用计算机跟踪系统进行分析。

图 22 显示了最后一次不可见平台实验 24 小时后的测验实验中小鼠在平台象限停留时间百分比。相比之下, 非转基因小鼠($P = 0.026$)和 ICI 118,551($P = 0.041$)处理组小鼠在平台象限中停留了更长的时间。

实验方法和试剂

下面对上述的实验和实施例中一些特殊的步骤进行描述。对本技术领域的一般技术人员来说熟知的一般性生物化学和分子生物学技术, 在此不再赘述。

质粒和试剂

所有试剂除非特别标明都是购自于 Sigma。人全长 APP 克隆入 pcDNA3 载体, 通过 PCR 突变为 APP^{swe}。带有 APP 信号肽的 C99 克隆入 pcDNA3 载体。DNA 序列的准确性通过测序确定。人 clathrin 重链的 RNAi 质粒按以下序列设计 5'-GCTGGGAAA ACTCTTCAGATT-3'。对照 (NS) RNAi 质粒为 5'-GGCCGCAAAGACCTTGTCCTTA-3'。

动物和药物处理

所有动物实验都严格遵照美国国立卫生研究院有关实验动物的护理与使用的规定。急性处理实验中, Sprague-Dawley (SD)大鼠(购自上海实验动物中心)被侧脑室注射 2 微克去甲肾上腺素。坐标为前-后(anterior-posterior), $\bar{-0.9}$ mm; 左-右(left-right), $\bar{-1.5}$ mm; 背-腹(dorsal-ventral), $\bar{-3.8}$ mm。大鼠腹腔急性注射 0.5 mg/kg clenbuterol。30 天慢性处理实验中, 5 个月龄的 APP^{swe}/PS1 Δ E9 双转基因小鼠(购自 The Jackson Laboratory)安装插管(前-后, ~ 0.9 mm; 左-右, ~ 1.5 mm; 背-腹, ~ 3.8 mm)后每天注射生理盐水(n = 4, 2 个雌性和 2 个雄性)或 3 nM Iso(n = 6, 4 个雌性和 2 个雄性)。APP^{swe}/PS1 Δ E9 双转基因小鼠每天给予口服生理盐水(n = 6, 3 个雌性和 3 个雄性), 2 mg/kg clenbuterol(n = 7, 4 个雌性和 3 个雄性), 和 1 mg/kg ICI 118,551(n = 6, 3 个雌性和 3 个雄性)。

免疫组织化学和计数淀粉样蛋白斑

小鼠麻醉后通过心脏生理盐水灌流。分离大脑, 半脑用 4%多聚甲醛在 4°C 固定 5 小时。半脑冠状切片成 10 微米。切片经 A β 抗体 6E10 孵育, 再用 TRITC 连接的二抗孵育。切片然后用激光共聚焦显微镜(Leica 公司 TCS SP2)观察。淀粉样蛋白斑的面积用 Image-Pro Plus 5.1 软件(Media Cybernetic 公司)统计。

海马培养和急性切片制备

原代海马培养从新生 SD 大鼠制备, 用 Amaxa Nucleofector 系统电转, 培养于 B27/neurobasal 培养基(Invitrogen 公司)两周后用于激动剂处理实验。急性海马切片用 8 周龄的 SD 大鼠制备。

酶联免疫吸附检测(ELISA)淀粉样蛋白 β

细胞用 Iso 或 DADLE 处理 1 小时后继续培养 6 小时。培养基用于酶联免疫吸附试剂盒(Biosource 公司)检测 A β_{40} 和 A β_{42} 。大鼠海马匀浆后于 100,000 \times g 离心 1 小时。上清用于酶联免疫吸附试剂盒(Wako 公司)检测 A β_{40} 和 A β_{42} 。

免疫沉淀

HEK293 细胞或大鼠海马切片于 RIPA 缓冲液中裂解。Flag 标记的受体和内源 δ -阿片受体用 Flag 抗体连接的琼脂糖珠或 δ -阿片受体抗体(Santa Cruz 生物技术公司)免疫沉淀。免疫沉淀复合物用 SDS-PAGE 分离后用免疫印记法检测。

表达底物方法

实验步骤如 Journal of Biological Chemistry **276**, 481-7 (2001)所述。HEK293 细胞裂解后, 分成含总蛋白 50 微克蛋白的等份于 $13,000 \times g$ 离心 15 分钟。细胞膜组分重悬后于 50 微升含有蛋白酶抑制剂 1, 10-菲咯啉 (phenanthroline), 抑肽酶 (aprotinin) 和亮肽素 (leupeptin) 的反应缓冲液中与 37°C 孵育反应 2 小时。反应完成后以免疫印记法检测膜组分中产生的 C60。

荧光底物方法

实验方法如 Journal of Biological Chemistry **278**, 24277-84 (2003)所述。细胞或海马组织裂解或匀浆。含有 50 微克蛋白的等份于 $13,000 \times g$ 离心 15 分钟。细胞膜组分重悬后于 50 微升含有 12 微摩尔荧光底物(Calbiochem 公司)的反应缓冲液中 37°C 孵育反应 2 小时。之后, 用分光光度计测量激发波长为 355nm 和发射波长为 440nm 的荧光强度。

脉冲跟踪实验

共转染了 HA-C99 和 DOR 的 HEK293 细胞用不含有甲硫氨酸和血清的培养基 (Invitrogen 公司) 饥饿 2 小时后, 用 $500\mu\text{Ci}$ [^{35}S] 甲硫氨酸(GE Healthcare 公司)在有或无 DADLE 刺激的情况下脉冲标记 1 小时。随后细胞在含有过量甲硫氨酸的培养基中跟踪 3 小时。细胞裂解液中的 C99 用 HA 抗体免疫沉淀, 再用放射自显影分析。

免疫分离晚内吞小体和溶酶体

本实验方法依照 Journal of Biological Chemistry **278**, 11386-92 (2003)所述小泡分离方法改进。共转染了 $\beta_2\text{AR}$, C99 和 Flag-Rab7 的 HEK293 细胞匀浆后于 $500 \times g$ 离心 10 分钟。获得的上清与 M2 抗体连接的琼脂糖珠于 4°C 孵育 8 小时。分离的晚内吞小体和溶酶体用 LAMP-1 和 EEA1 抗体(BD Biosciences 公司)以 western blot 方法检测。

免疫荧光显微镜术

转染了 HA 标记的受体和/或 GFP-Rab7 或 GFP-Rab7 T22N 的 HEK293 细胞中, 首先用 HA 抗体孵育 30 分钟, 然后用激动剂处理并固定。转染了 Flag-Rab7 和 HA-Dyn K44A 或 GFP-Rab5 S34N 的细胞实验中, 细胞用激动剂处理并固定。急性海马切片实验中, 切片首先用 Iso 或 DADLE 处理然后固定并切片。后续染色用第一抗体(包括 PS1-NTF, Flag, LAMP-1 或 β -adapitin 抗体或 FITC 连接的 HA 抗体)和第二抗体(Cy3 连接的抗兔和 FITC

连接的抗鼠抗体,均购自 Jackson ImmunoResearch 公司)。用激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP2)获取图像。衰老蛋白-1N 端(PS1-NTF)抗体购自 Calbiochem 公司。

荧光共振能量转移实验测量受体与衰老蛋白1之间的相互作用

用于荧光共振能量转移实验的图像由 Leica TCS SP2 共聚焦显微镜获取并用相应软件分析。HEK293 细胞共转染了 GFP-DOR 和 HA-PS1。HA-PS1 表达用 HA 的第一抗体和连接了 Cy3 荧光素的第二抗体检测, GFP-DOR 表达用 GFP 荧光检测。细胞的 GFP-DOR 或 PS1-Cy3 的荧光谱用 488 nm 激光在 λ 模式获取。为了测量能量转移效率,用 Leica 软件实现受体荧光漂白。选定的细胞表面区域用 561 nm 激光荧光漂白 Cy3 荧光素。共转染了 GFP-PS1 和 HA-PS1 的 HEK293 细胞中 Cy3 信号在荧光漂白后平均下降 $84 \pm 5.3\%$ ($n = 50$)。能量转移表示为 GFP-DOR(供体)信号在 PS1-Cy3(受体)荧光漂白后的增加。相对能量效率按计算为 $(1 - [\text{Cy3 } I \text{ 漂白前} / \text{Cy3 } I \text{ 漂白后}]) \times 100\%$ 。细胞表面没有荧光漂白的区域进行能量转移分析以作为对照。

数据分析

细胞实验的数据用 t-test 比较平均值。小鼠数据用方差分析和 t-test 分析显著性差异。

以上结合有限数量的具体实施例阐述了本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。此外,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

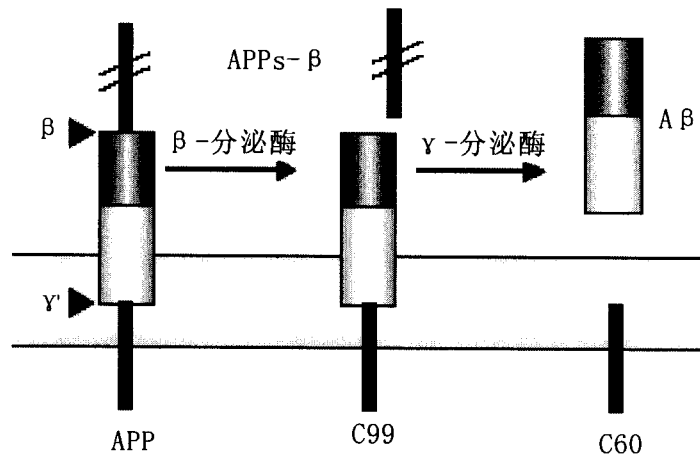


图 1

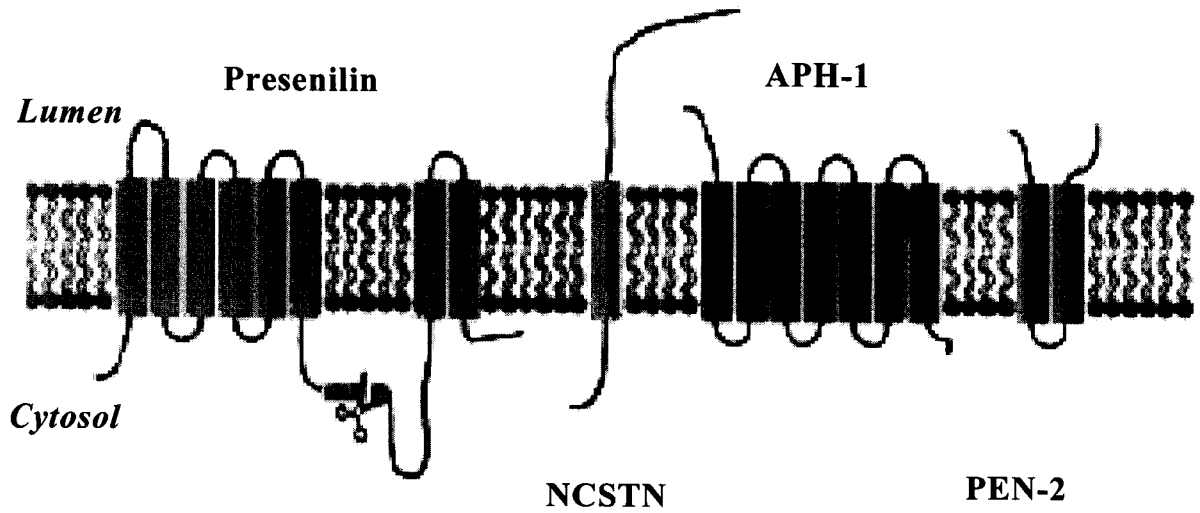


图 2

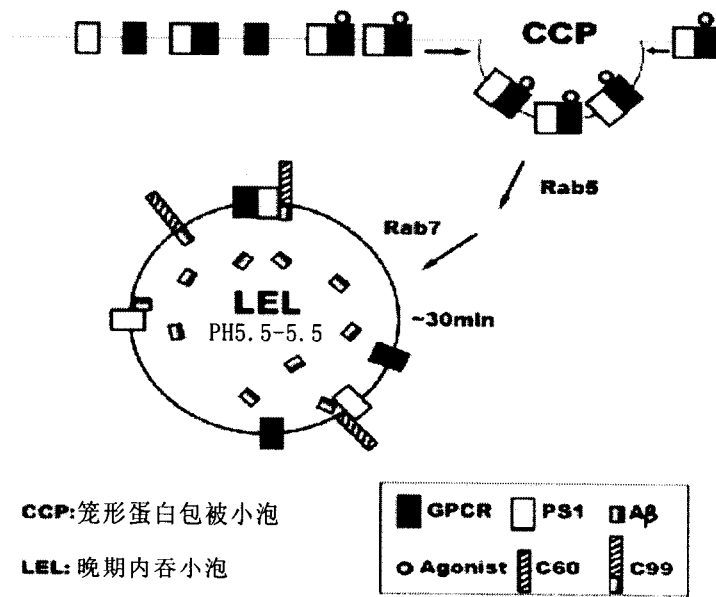


图 3

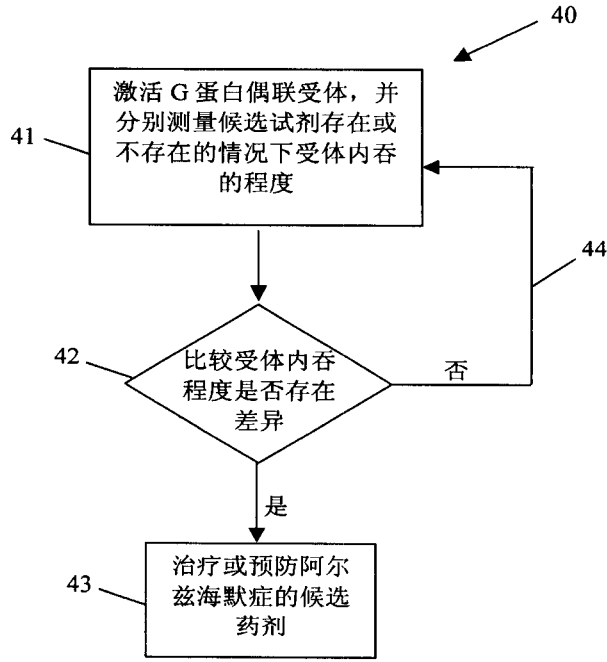


图 4

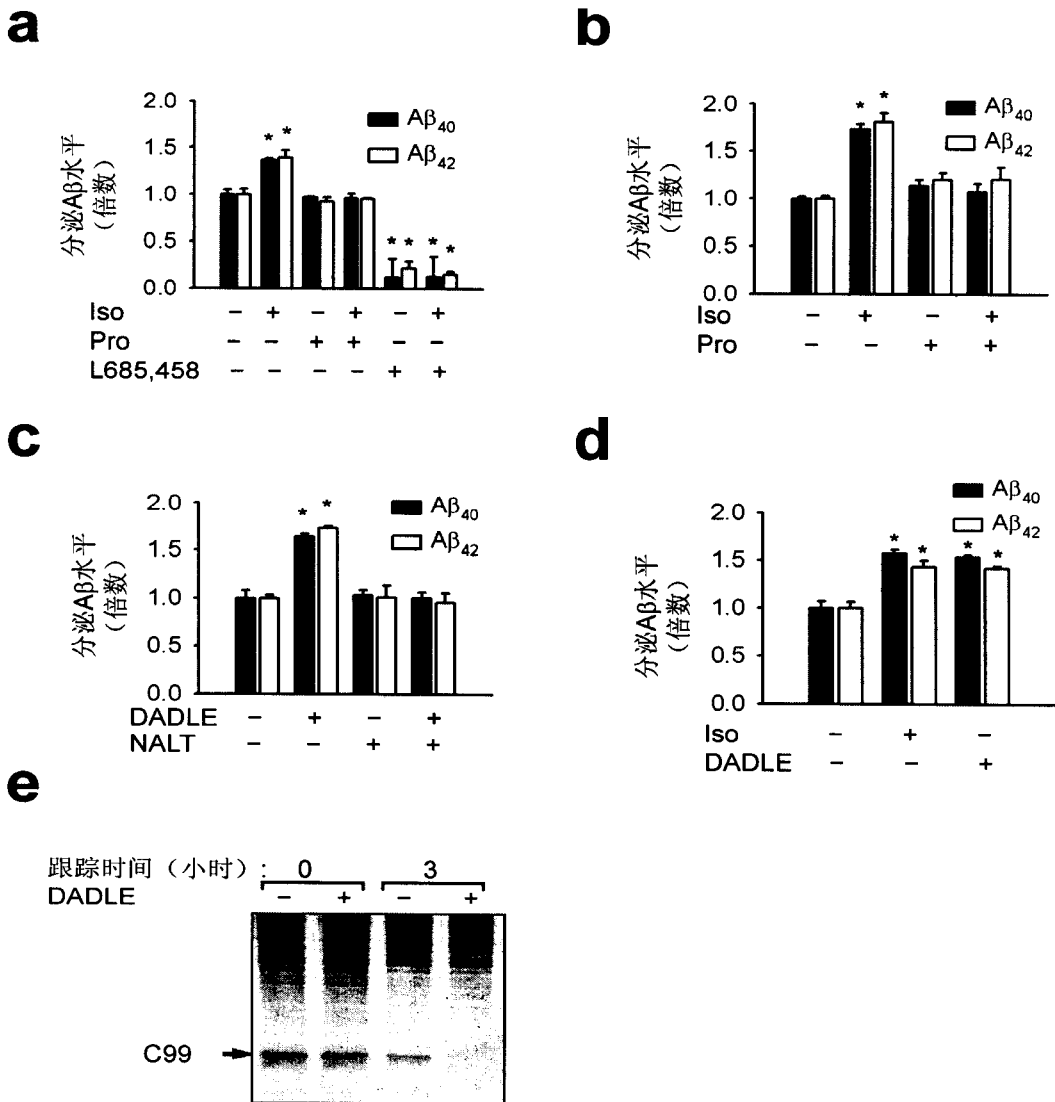
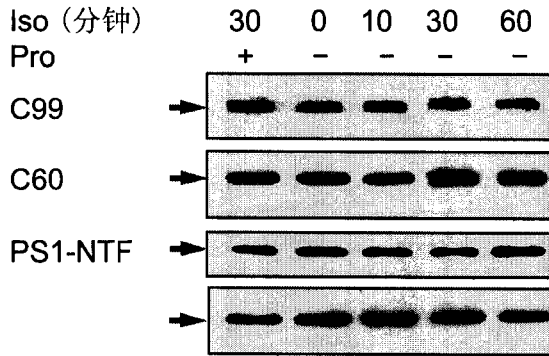
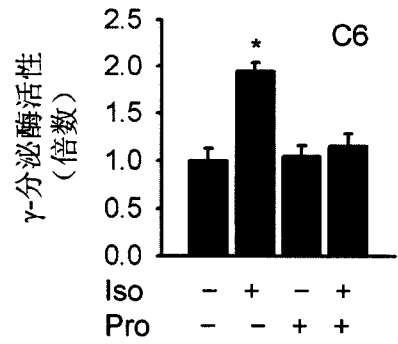


图 5

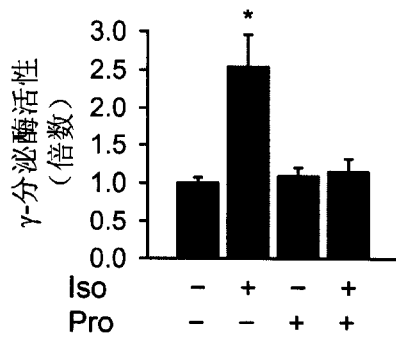
a



b



c



d

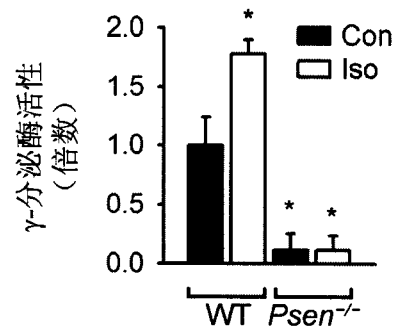


图 6

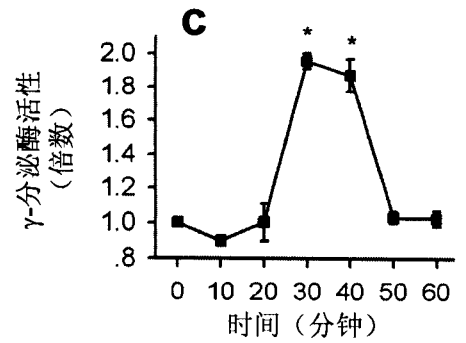
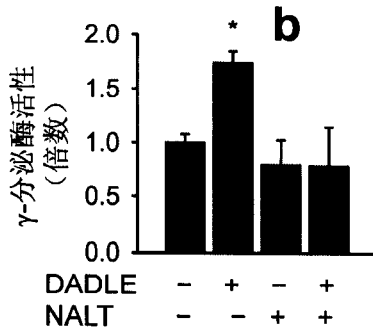
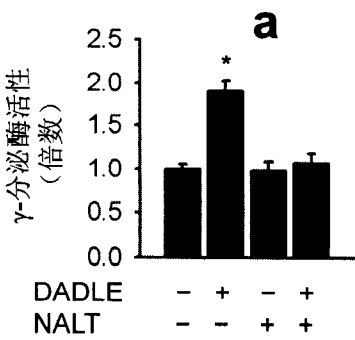


图 7

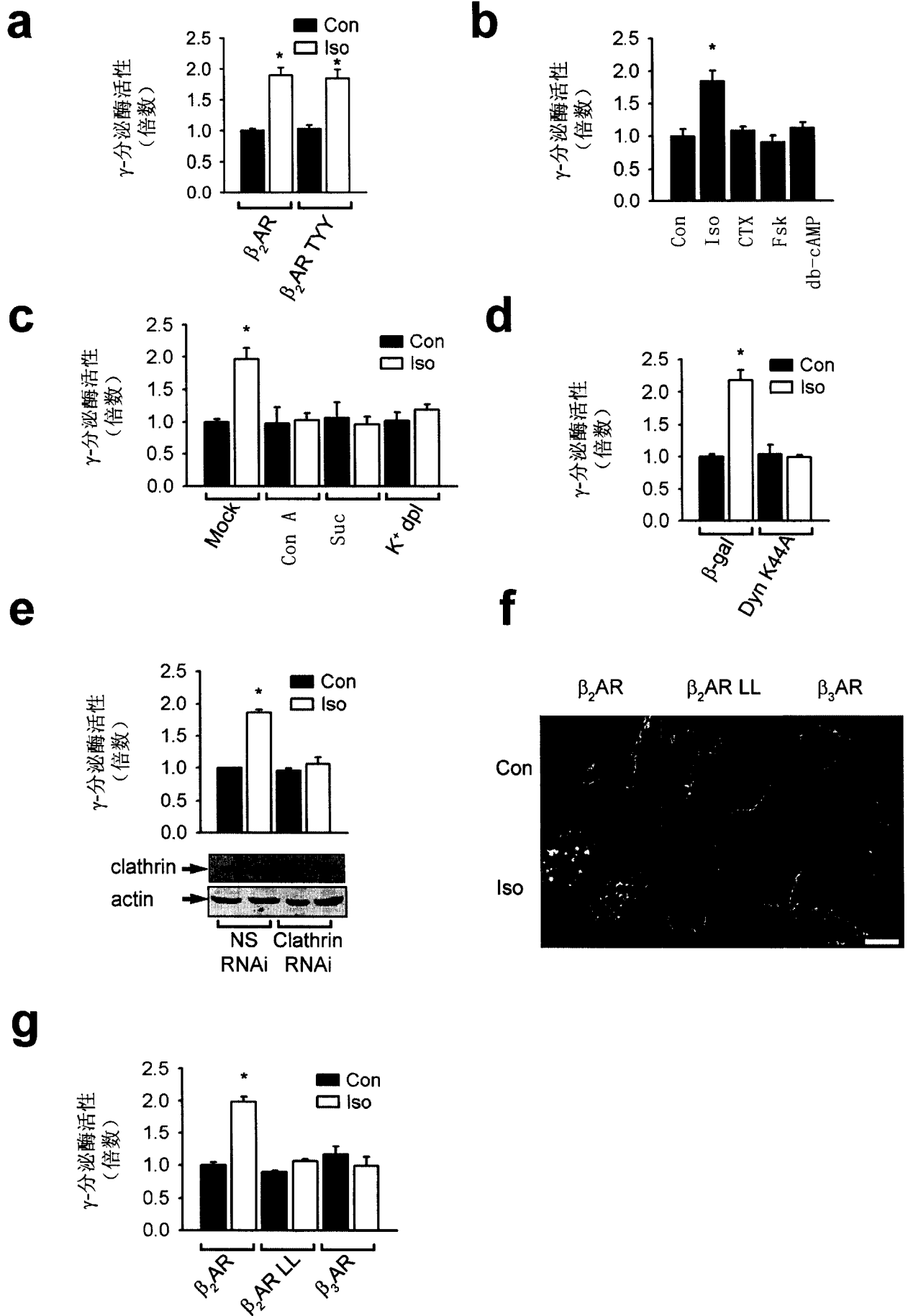


图 8

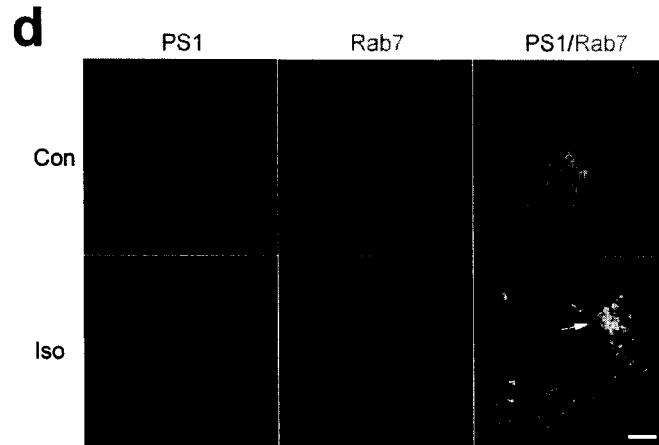
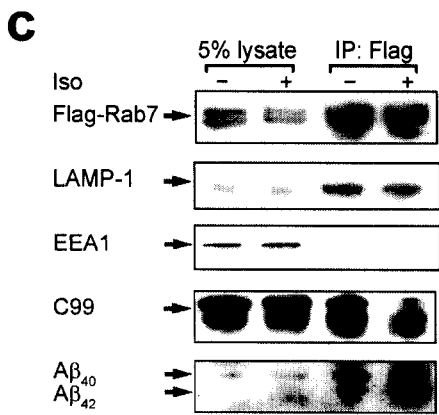
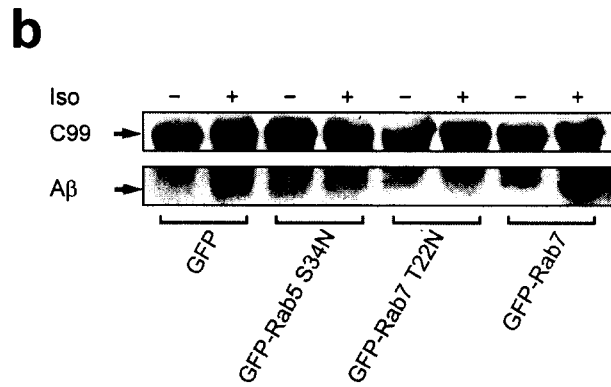
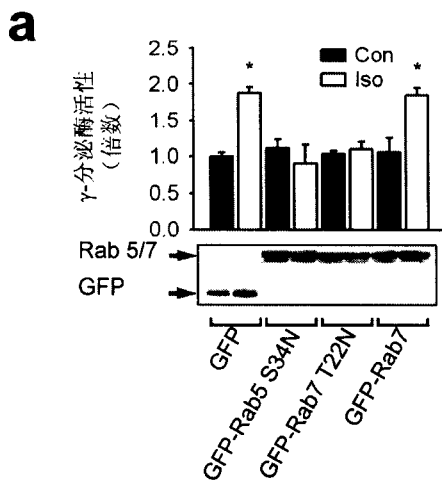
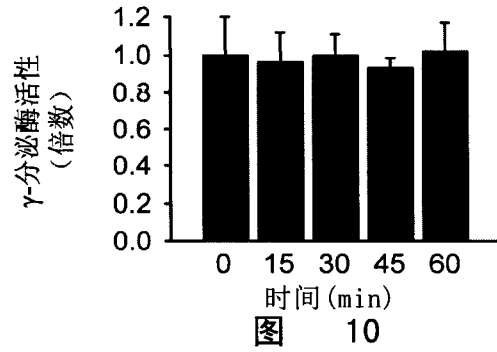
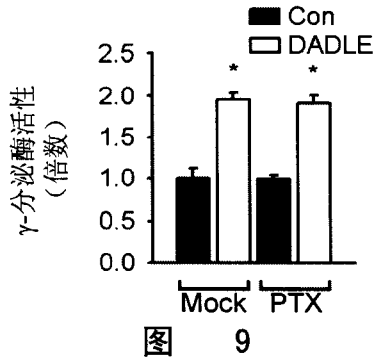


图 11

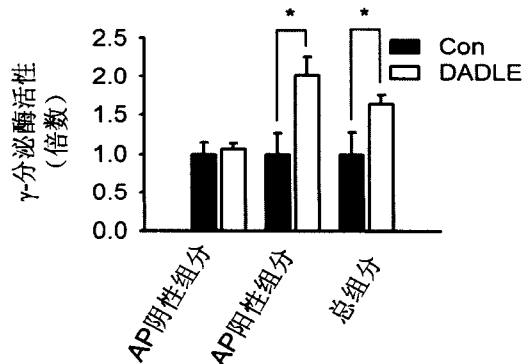


图 12

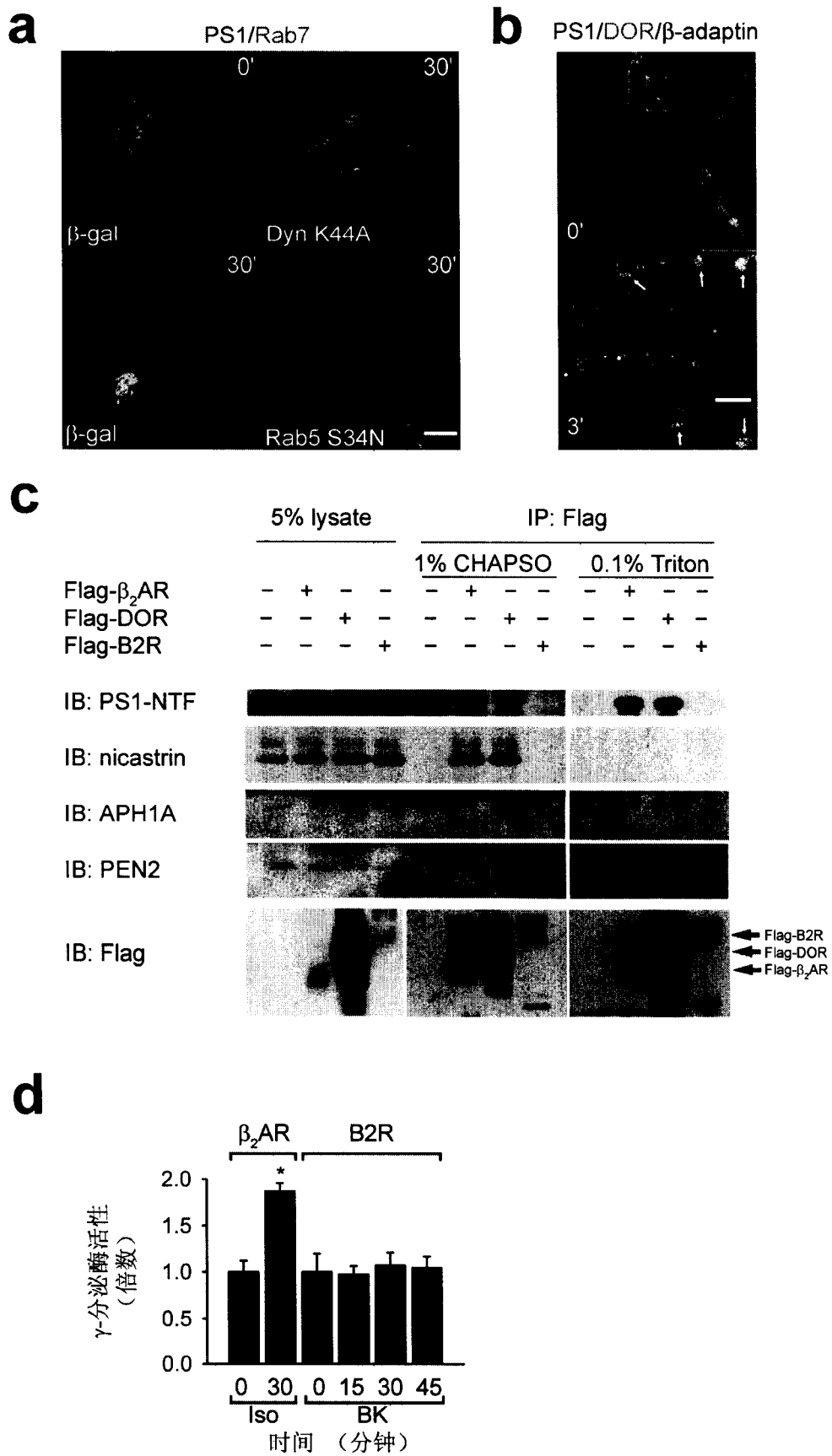


图 13

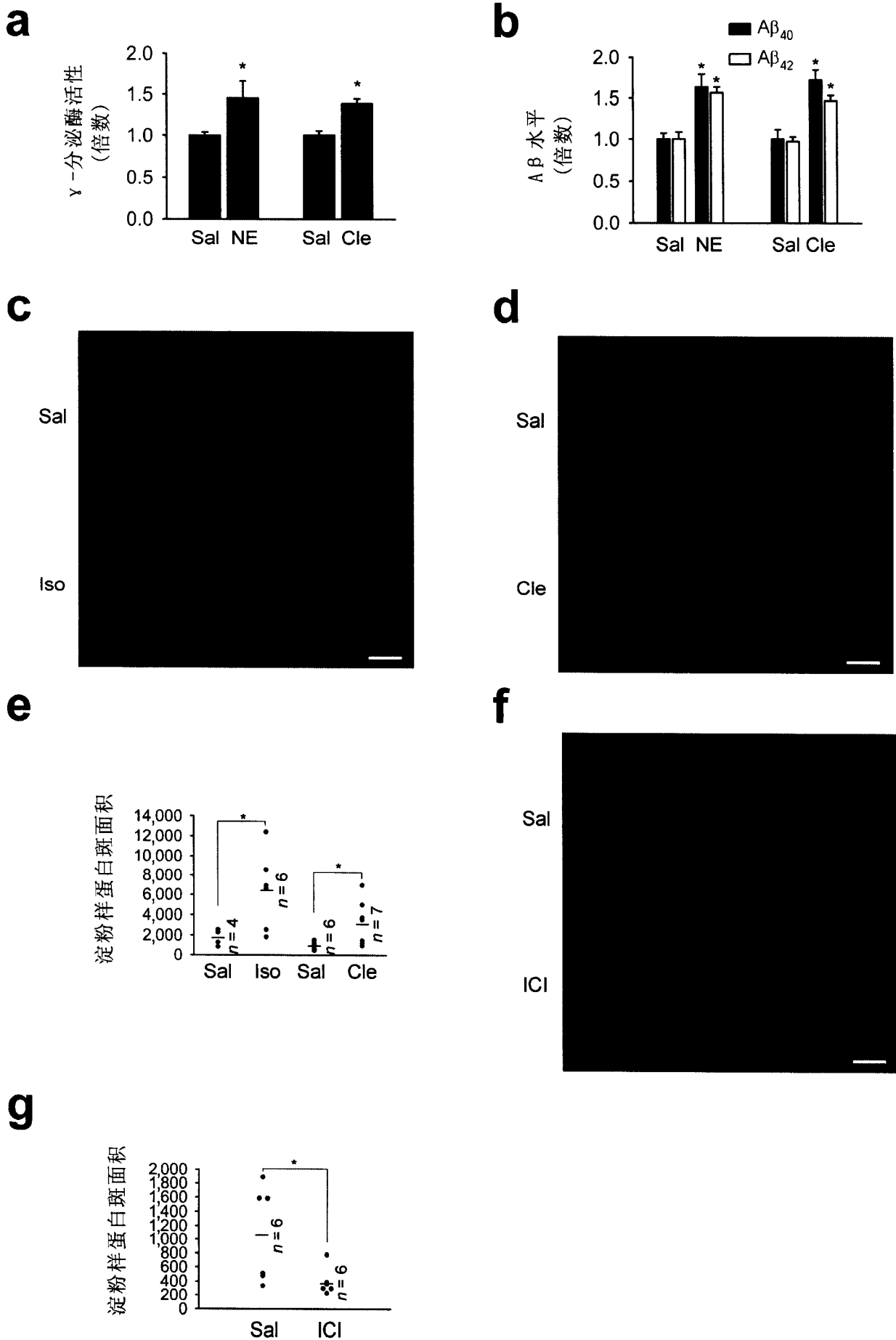


图 14

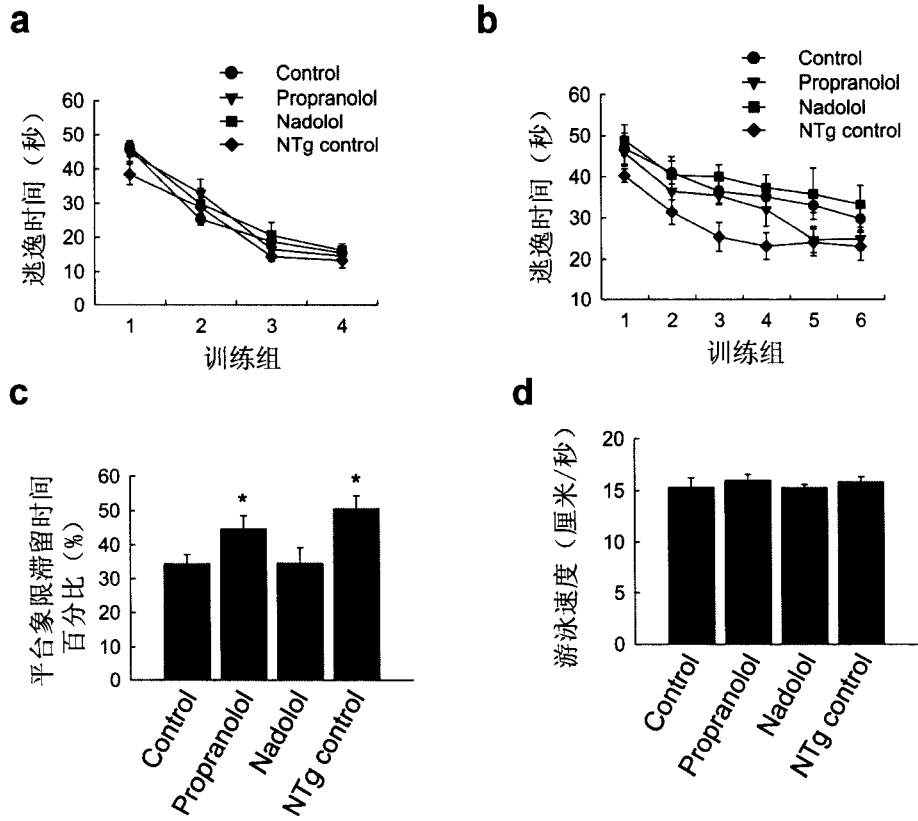


图 15

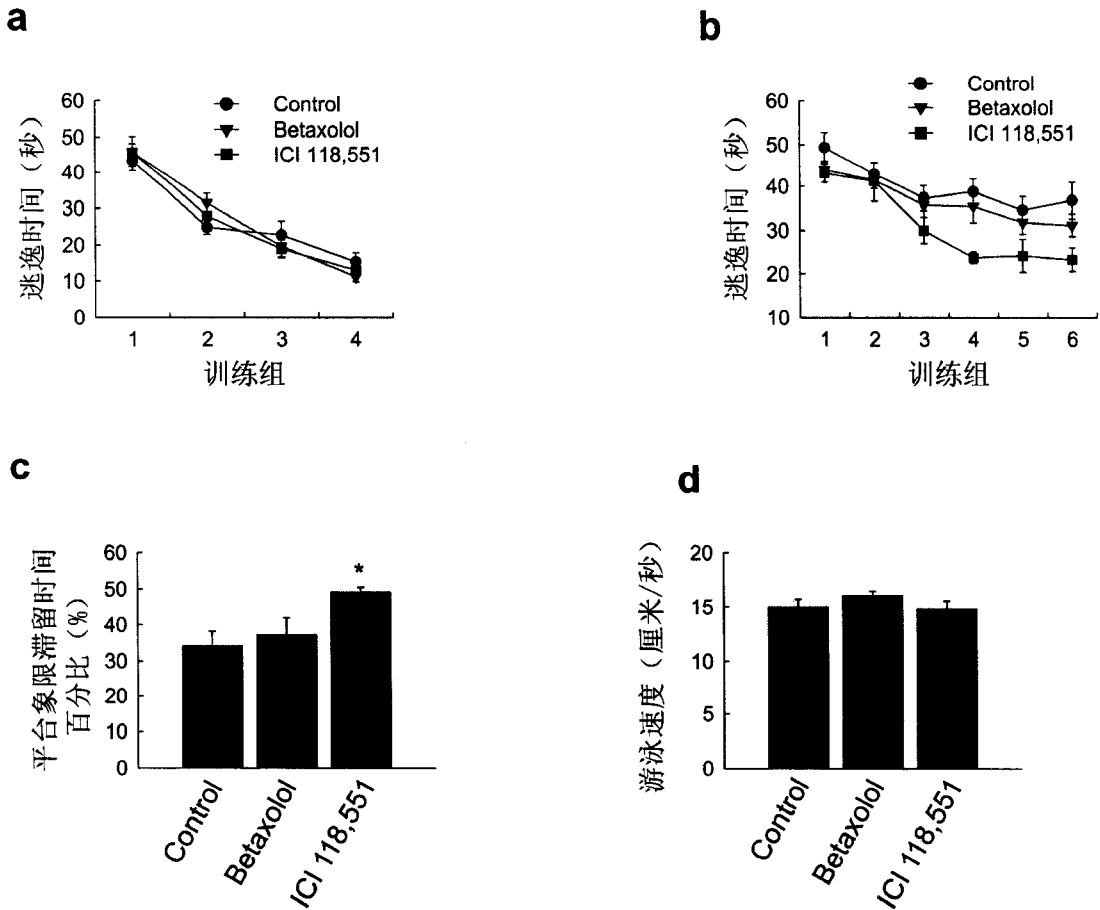


图 16

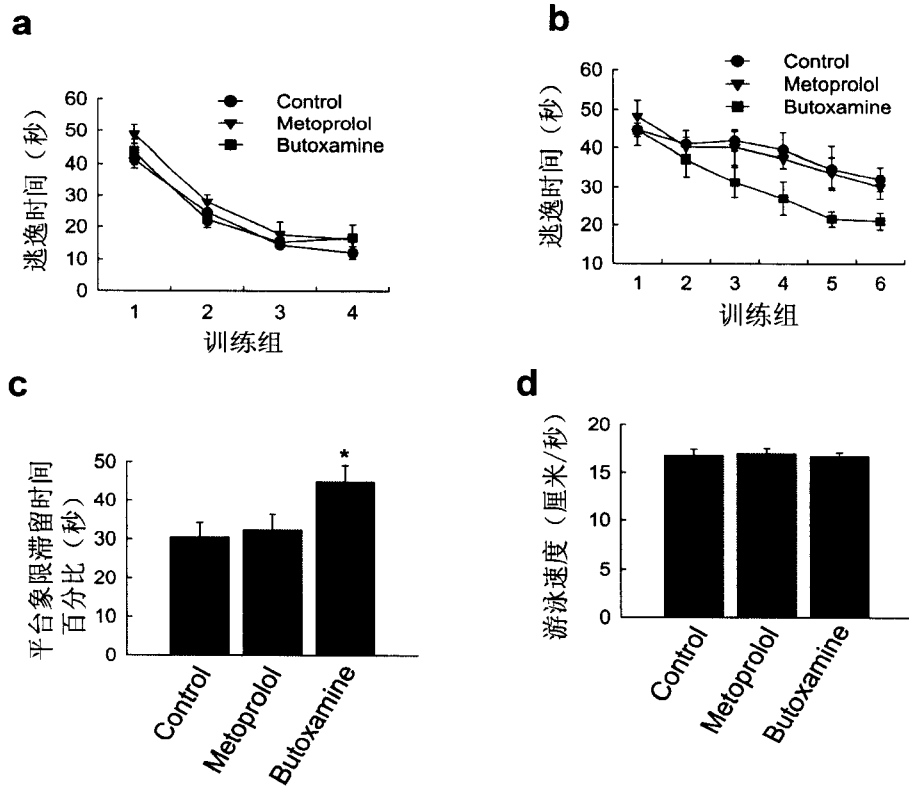


图 17

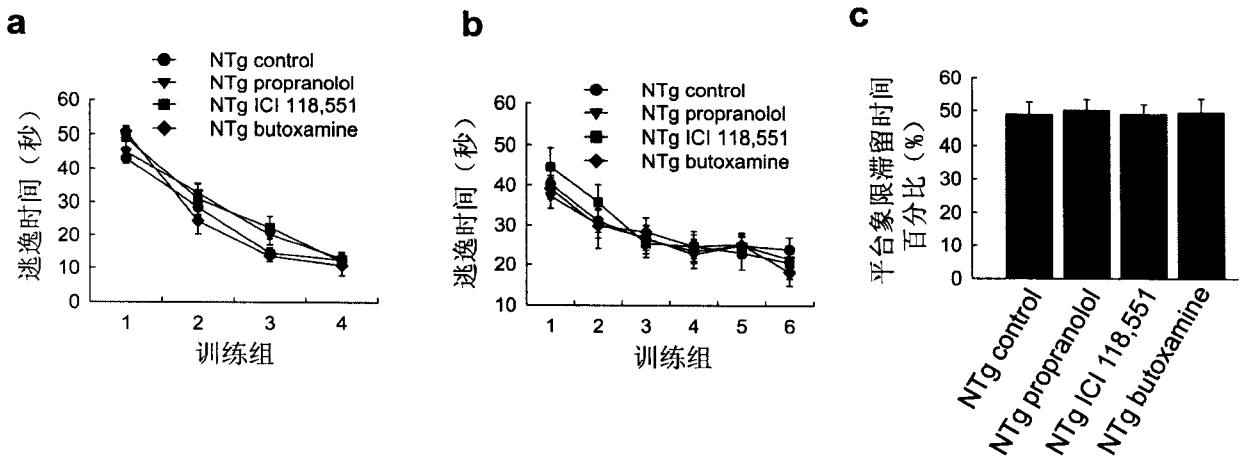


图 18

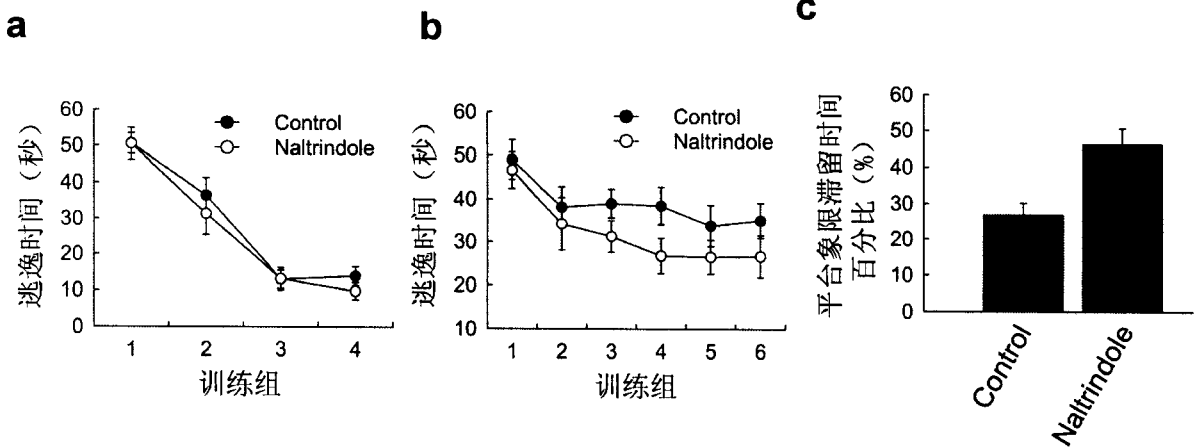
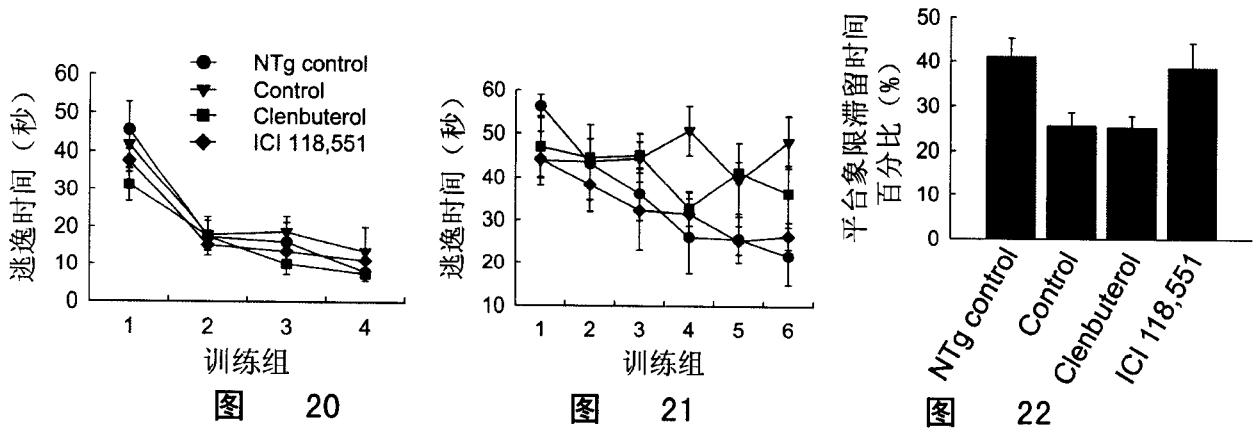
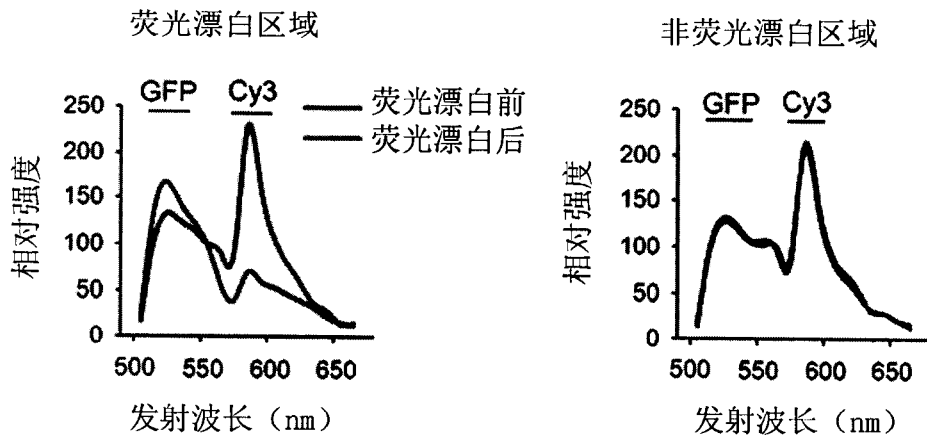


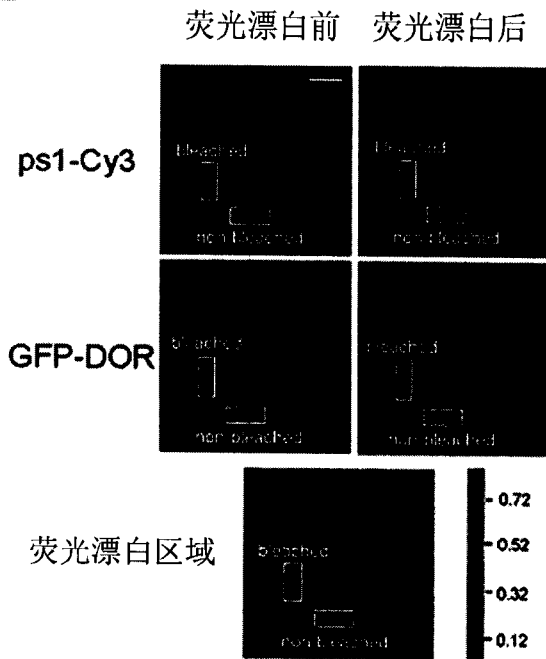
图 19



A



B



C

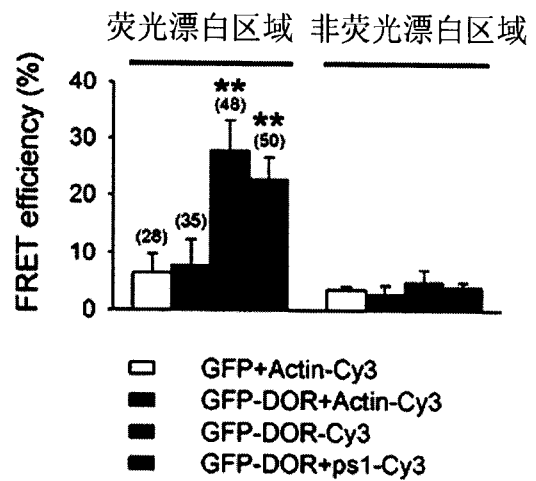


图 23