

induced amnesia. BMC Pharmacol, 2008, 8(1): 1.

- [21] Tapp PD, Chu Y, Araujo JA, et al. Effects of scopolamine challenge on regional cerebral blood volume. A pharmacological model to validate the use of contrast enhanced magnetic resonance imaging to assess cerebral blood volume in a canine

model of aging. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005, 29(3): 399-406.

- [22] Elfenbein HA, Rosen RF, Stephens SL, et al. Cerebral beta-amyloid angiopathy in aged squirrel monkeys. Histol Histopathol, 2007, 22(2): 155-167.

## 脂质筏在阿尔茨海默病发病机制中的作用

刘丽 综述 曹云鹏 审校

中国医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110001

**摘要:**  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 是阿尔茨海默病 (AD) 的特征病理改变之一,  $A\beta$  的产生和聚集是 AD 发生和进展的重要因素之一。脂质筏为膜脂双层内含有特殊脂质和蛋白质的微区, 具有低流动性, 呈现有序液相, 富含胆固醇, 鞘脂和神经节苷酯 GM1。细胞膜的脂质筏参与  $A\beta$  的产生及  $A\beta$  聚集形成低聚体, 脂质筏及其组成成份的异常影响  $A\beta$  的产生及  $A\beta$  聚集形成低聚体。以脂质筏为靶点可能为 AD 患者的治疗提供一种新的途径, 选择性干预 APP 在脂质筏内的加工过程以调节  $A\beta$  的生成可能为一种有效的治疗方法。

**关键词:** 阿尔茨海默病; 脂质筏;  $\beta$  淀粉样蛋白

阿尔茨海默病 (AD) 是痴呆中最常见的一种类型, 是以渐进性记忆力和智能减退为特征的弥漫性中枢神经系统退行性疾病。年龄是阿尔茨海默病的主要危险因素。在 65 岁以上人群, 阿尔茨海默病的发生率为 4.4%, 而在 95 岁以上人群则为 40% ~ 50%<sup>[1]</sup>。截至 2010 年, 全球约有  $35.6 \times 10^6$  例阿尔茨海默病患者。预计此数字每 20 年增加近 1 倍, 至 2050 年, 世界上约有  $65.7 \times 10^6$  例患者<sup>[2]</sup>。阿尔茨海默病显著的神经组织学病理特征为大脑皮质和海马神经细胞外  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid protein,  $A\beta$ ) 沉积形成的老年斑和神经细胞内 tau 蛋白异常聚集形成神经元纤维缠结。虽然目前关于阿尔茨海默病的具体发病机制仍不十分明确, 但脑组织内  $A\beta$  片段异常增加或聚集是导致神经元死亡的主要原因, 因此  $A\beta$  的产生和聚集被认为是 AD 发生和进展重要因素之一。目前研究表明胆固醇的体内平衡影响  $A\beta$  的产生, 对于中年患高胆固醇血症的个体, 其晚年发生淀粉样蛋白沉积及患阿尔茨海默病的风险增高, 而应用降脂类药物可降低阿尔茨海默病的发病率, 但其具体分

子机制仍不明确<sup>[3,4]</sup>。最近研究认为  $A\beta$  的产生、代谢及聚集依赖于细胞膜上的富含胆固醇的微区——脂质筏<sup>[5]</sup>。而且还发现作为脂质筏的另一个主要组成成份——神经鞘磷脂同样参与 APP 的加工<sup>[6]</sup>。因此研究脂质筏与 AD 发病机制的相关性是极其必要的, 本文将对此进行综述。

### 1 $A\beta$ 的产生

#### 1.1 淀粉样蛋白生成途径

$A\beta$  由两种膜结合酶—— $\beta$ -及  $\gamma$ -分泌酶裂解淀粉样前体蛋白 (APP) 产生<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -分泌酶的主要成分为淀粉样蛋白前体  $\beta$  位点剪切酶-1 (BACE-1), 其在  $A\beta$  序列的氨基末端 (N 末端) 裂解 APP 产生一可溶性片段 sAPP $\beta$ , 之后由  $\gamma$  分泌酶裂解剩余羧基端片段  $\beta$ CTF 上  $A\beta$ 39-43 残基的任一肽键, 生成长短不等的  $A\beta$  分子<sup>[8]</sup>。 $\gamma$ -分泌酶由早老素 (PS)、nicastrin (NCT)、APH-1 (anterior pharynx defective-1) 和早老素增强因子-2 (PEN-2) 四种蛋白组成, 其中早老素为  $\gamma$  分泌酶的主要成份, 分为早老素-1 (PS-1) 和早老素-2 (PS-2)<sup>[8]</sup>。

收稿日期: 2011-08-02; 修回日期: 2011-11-14

作者简介: 刘丽 (1980-), 女, 在读博士, 主要从事阿尔茨海默病的诊断与治疗研究。E-mail: liuli800519@sohu.com。

通讯作者: 曹云鹏 (1963-), 男, 教授, 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事阿尔茨海默病的研究。E-mail: ypengcao@yahoo.com。

## 1.2 非淀粉样蛋白生成途径

另外一种能裂解 APP 的酶为  $\alpha$  分泌酶,属 ADAMs (a disintegrin and metalloprotease) 家族成员,其水解 APP 氨基酸序列第 687 位,生成一个可溶性片段 sAPP $\alpha$  和  $\alpha$ -CTF,后经  $\gamma$  分泌酶作用可生成 APP<sub>17-40</sub> 和 APP<sub>17-42</sub>,但由于  $\alpha$  分泌酶的作用点位于 A $\beta$  结构域内,不能产生完整的 A $\beta$  片段<sup>[9]</sup>。

## 2 脂质筏概述

### 2.1 脂质筏结构

脂质筏概念先由 Brown 和 Rose<sup>[10]</sup> 在 1992 年提出,而 Simons 和 Ikonen<sup>[11]</sup> 在 1997 年观察到了筏结构。脂质筏为膜脂双层内含有特殊脂质和蛋白质的微区,富含胆固醇和鞘脂<sup>[5, 11-13]</sup>。脂质的双层有不同的脂筏:外层的微区主要含有鞘脂,胆固醇及 GP12 锚定蛋白。因鞘脂含有长链饱和脂肪酸, Tm 温度较高,流动性差,而且粘稠;邻近的磷脂区其脂肪酸多不饱和, Tm 温度较低,所以出现分相<sup>[11-13]</sup>。因缺乏适宜的研究方法,对内层的微区特性知之甚少。近来 Hayashi 等<sup>[14]</sup> 应用新方法证实膜内侧也有相似的富含胆固醇的微区,与外侧的脂质不完全相同,主要是在此区有许多酰化的蛋白质,特别是信号转导蛋白。虽然两层分别有脂质筏,但他们是偶联的。

脂质筏的脂质和蛋白在反面高尔基复合体组装,胆固醇耗竭或抑制鞘糖脂合成会阻断反面高尔基复合体分泌小泡的形成<sup>[15]</sup>。脂质筏内含有特异的蛋白成份,包括糖基磷脂酰肌醇锚固蛋白,双酰基化蛋白如 src 酪氨酸激酶,胆固醇偶联的软脂酰化蛋白如 Hedgehog 和软脂酰化的跨膜蛋白<sup>[13]</sup>。不同的脂质筏有其各自的特异蛋白,并有不同功能。

### 2.2 脂质筏的特征

脂质筏因富含胆固醇、鞘糖脂、鞘磷脂保持一种液态有序相,并且不溶于某些非离子洗涤剂,筏内的特异蛋白亦不溶于这些洗涤剂<sup>[8]</sup>。用此类洗涤剂(如 1% Triton-x100 或者 0.45% 诺乃 p-40 或者 0.45% 吐温 20)可以从哺乳动物细胞提取出脂质筏<sup>[8]</sup>。

脂质筏很小,约 10 ~ 20 nm,传统显微镜观察不到,当细胞受体受刺激时,小的脂筏会通过蛋白间或蛋白与脂质间的相互作用聚集成更大的结构而变得稳定<sup>[12]</sup>。目前霍乱毒素 B 亚基(CTB),因其与脂质筏成分之一神经节苷酯 GM1 特异性结合,已广泛应用于检测脂质筏<sup>[16]</sup>。

## 2.3 脂质筏的功能

脂质筏假说认为以胆固醇和鞘脂构成的有坚硬的隔间的舱室(有序的)漂浮进入甘油磷脂类的“海洋”(无序的),这种坚硬的舱室也被称为阀,被认为参与许多细胞过程,如信号转导<sup>[5, 13]</sup>、病原体入侵<sup>[17]</sup>、蛋白质和脂质的胞吞和细胞内的运输<sup>[18]</sup>、神经退行性疾病和血管生成等。胆固醇被认为在脂质筏的相关功能中起重要作用<sup>[13]</sup>。

## 3 脂质筏在 AD 发病机制中的作用

### 3.1 APP 的加工与脂质筏关系

许多研究表明 APP 经淀粉样蛋白生成途径的降解在脂质筏内进行,而经非淀粉样蛋白生成途径的降解在膜内非脂质筏区进行<sup>[16]</sup>,当去除胆固醇后将抑制  $\beta$  分泌酶对 APP 的裂解和 A $\beta$  的生成,促进  $\alpha$  分泌酶对 APP 的裂解<sup>[16]</sup>。

#### 3.1.1 非淀粉样蛋白生成途径

有关  $\alpha$  分泌酶同胆固醇及脂质筏关系的相关研究较少。无论对应用胆固醇培养的细胞,还是对给予高胆固醇饮食的 APP 转基因鼠的研究均表明 sAPP 的产量下降,而当去除细胞内的胆固醇或转基因鼠服用降低胆固醇的药物治疗后 sAPP $\alpha$  的水平升高<sup>[8]</sup>。

$\alpha$  分泌酶为 ADAMs 蛋白酶家族成员之一,主要为 ADAM10。Kojro 等研究表明去除细胞内胆固醇后可出现 ADAM10 的高表达,进而  $\alpha$  分泌酶的活性增加。而且,在正常情况下,ADAM10 的部分小片段位于脂质筏内,当应用脂筏的破坏剂——菲律宾毒素处理细胞而破坏细胞膜的脂质筏后,位于脂质筏内的 ADAM10 片段减少,进而可见 sAPP $\alpha$  产量增加。这些表明细胞内胆固醇水平降低可使 ADAM10 从脂质筏区移位至膜的非脂质筏区,这一移位增加  $\alpha$  分泌酶对 APP 的裂解,亦表明非淀粉样蛋白生成途径主要位于非脂质筏区<sup>[8, 9]</sup>。

#### 3.1.2 淀粉样蛋白生成途径

大量间接的证据证明,APP 的淀粉样蛋白加工过程发生在脂质筏内。首先,脂质筏内含有 BACE<sup>[19]</sup>。其次,构成  $\gamma$  分泌酶复合体的早老素、nicastrin、aph-1 和 pen-2 均存在于脂质筏内。抑制  $\gamma$  分泌酶的活性后脂质筏内 APP CTFs 的聚集异常增多。可见,由  $\gamma$  分泌酶介导的 APP 淀粉样蛋白加工过程在脂质筏内进行<sup>[20]</sup>。Vetrivel 等<sup>[21]</sup> 研究发现在胚胎发育期  $\gamma$  分泌酶位于膜的非脂质筏区,以便于蛋白水解多种底物,成年后  $\gamma$  分泌酶移位至脂

质筏内,仅处理加工包括 APP CTFs 在内的特殊性底物,而限制对其它底物的水解。再者, Lee 等<sup>[22]</sup>证实 A $\beta$  可能主要在高尔基复合体,质膜及溶酶体合成。这些细胞器内均有脂质筏存在<sup>[23]</sup>。亦有研究表明,脂质筏内含有 A $\beta$ <sup>[23]</sup>。因此可以认为脂质筏与 A $\beta$  的形成有关。

Eehalt 等<sup>[24]</sup>利用抗体使 APP 与 BACE 在细胞膜上的脂质筏内交联,之后 A $\beta$  的生成量明显增加,但是当脂质筏结构破坏时, A $\beta$  的生成量无变化,因此可以认为脂质筏的存在及其结构的完整性是 A $\beta$  所必需的。Cordy 等<sup>[19]</sup>研究发现 BACE 由非脂质筏区移位至脂质筏区后, sAPP $\beta$  及 A $\beta$  的产量上调。由此可见, BACE 的活性与脂质筏结构密切相关, BACE 对 APP 的裂解过程主要发生在脂质筏内。然而亦有相反的观点,近来 Vetrivel 等<sup>[25]</sup>通过抑制 BACE 的 S-棕榈酰化使 BACE 移除脂质筏后,发现在培养细胞中 BACE 对 APP 的裂解作用及 A $\beta$  的产量均未受影响,据此认为 BACE 对 APP 的加工过程发生在非脂质筏区。Abadrodriuez 等<sup>[26]</sup>研究发现,适度降低胆固醇水平使 BACE 离开脂质筏区,促进 BACE 和 APP 在膜非脂质筏区结合,增加  $\beta$  分泌酶对 APP 的裂解。

由于脂质筏很小,每个脂质筏个体仅含不到 30 个蛋白分子<sup>[27]</sup>, Eehalt 等<sup>[24]</sup>提出相关假说,认为在正常情况下, APP 和 BACE 可能存在于脂质筏内,也可能存在于磷脂区,而且 APP 和 BACE 即使存在于脂质筏内,也不可能同时存在于同一脂质筏内。脂质筏需要经过胞吞而聚集在一起,使 APP 和 BACE 相互接触。当衰老或胆固醇水平升高时,脂质筏的数目及体积均增大,含脂质筏的质膜相对增多, APP 及 BACE 位于同一脂质筏内的可能性就会增大,进而使 A $\beta$  生成增多,增加个体 AD 的患病风险。

### 3.2 脂质筏在 AD 发病机制中的其它作用

目前大多数有关胆固醇及脂质筏与 AD 发病相关性的研究的焦点集中于 A $\beta$  的生成过程,然而,近来亦有研究证实,脂质筏及其重要成份——胆固醇与 A $\beta$  的聚集及毒性作用密切相关<sup>[28]</sup>。随着年龄增高,突触质膜外层胆固醇浓度增加<sup>[16]</sup>,而质膜外层胆固醇的增高加速 A $\beta$  的聚集<sup>[29]</sup>,相反,移除细胞内胆固醇后,细胞可抵抗 A $\beta$  对其的毒性作用<sup>[30]</sup>。另有研究表明,在脑内形成神经节苷脂 GM1 结合 A $\beta$ ,即 GA $\beta$ (GM1 ganglioside-bound A $\beta$ ),

是 AD 的早期的病理改变<sup>[31]</sup>, GA $\beta$  如同“种子”一样启动并加速 A $\beta$  的聚集<sup>[32, 33]</sup>。而且, A $\beta$  寡聚体与神经节苷脂 GM1 结合会降低膜的流动性,刺激 APP 加工,进而形成一种恶性循环,导致 A $\beta$  的生成增多<sup>[34]</sup>。GA $\beta$  在富含胆固醇、鞘磷脂、神经节苷脂 GM1 的脂质筏内生成<sup>[31]</sup>,胆固醇可诱导脂质筏内 GM1 聚集,促进 GA $\beta$  生成<sup>[30]</sup>。Kohei 等<sup>[31]</sup>用鞘磷脂酶抑制剂处理 PC12 细胞后发现细胞表面 GA $\beta$  依赖的  $\beta$  淀粉样蛋白的生成明显增加。故可认为鞘磷脂聚集促进神经节苷脂 GM1 诱导的  $\beta$  淀粉样蛋白的组装。Molander-Melin 等<sup>[35]</sup>对 AD 患者颞叶及枕叶脑组织的脂质筏的研究表明 GM1 和 GM2 水平明显高于对照组。

综上所述,脂质筏及其相关成份的异常与 AD 的发病密切相关, APP 经淀粉样蛋白生成途径的降解过程可能主要在脂质筏内进行。以脂质筏为靶点可能为 AD 患者的治疗提供一种新的途径,选择性干预 APP 在脂质筏内的加工过程以调节 A $\beta$  的生成可能为一种有效的治疗方法。但目前的研究结果存在矛盾,因此需更多的相关研究进一步证实。

### 参 考 文 献

- [1] Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci*, 2009, 11(2): 111-128.
- [2] Bettens K, Sleegers K, Broeckhoven CV. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(R1): R4-R11.
- [3] Lai AY, McLaurin J. Mechanisms of Amyloid-Beta Peptide Uptake by Neurons: The Role of Lipid Rafts and Lipid Raft-Associated Proteins. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 548380.
- [4] 李志安,艾清龙. 营养在阿尔茨海默病中的作用. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2011, 38(1): 81-84.
- [5] Vetrivel KS, Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(8): 860-867.
- [6] Rushworth JV, Hooper NM. Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 603052.
- [7] Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, 2008, 283(44): 29615-29619.
- [8] Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol*, 2006, 23

- (2) : 111-122.
- [ 9 ] Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, et al. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 2003, 74(3) : 342-352.
- [ 10 ] Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 1992, 68(3) : 533-544.
- [ 11 ] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387(6633) : 569-572.
- [ 12 ] Pike LJ. Rafts defined. *J Lipid Res*, 2006, 47(7) : 1597-1598.
- [ 13 ] Pike LJ. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, 2004, 378(Pt2) : 281-293.
- [ 14 ] Hayashi M, Shimada Y, Inomata M, et al. Detection of cholesterol-rich microdomains in the inner leaflet of the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(3) : 713-718.
- [ 15 ] Brugger B, Sandhoff R, Wegehingel S, et al. Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol*, 2000, 151(3) : 507-598.
- [ 16 ] Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Hayashi M. Plasma membrane microdomains in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int*, 2010, 1 : S41-52.
- [ 17 ] Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*, 2002, 110(5) : 597-603.
- [ 18 ] Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt6) : 1099-1102.
- [ 19 ] Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, et al. Exclusively targeting  $\beta$ -secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition upregulates  $\beta$ -site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20) : 11735-11740.
- [ 20 ] Hutter-Paier B, Huttunen HJ, Puglielli L, et al. The ACAT inhibitor CP-113, 818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 2004, 44(2) : 227-238.
- [ 21 ] Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, et al. Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem*, 2005, 280(27) : 25892-25900.
- [ 22 ] Lee EB, Skovronsky DM, Abtahian F, et al. Secretion and intracellular generation of truncated Abeta in beta-site amyloid-beta precursor protein-cleaving enzyme expressing human neurons. *J Biol Chem*, 2003, 278(7) : 4458-4466.
- [ 23 ] Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, et al. Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2004, 24(15) : 3801-3809.
- [ 24 ] Ehehalt R, Keller P, Haass C, et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, 2003, 160(1) : 113-123.
- [ 25 ] Vetrivel KS, Meckler X, Chen Y, et al. Alzheimer disease Abeta production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. *J Biol Chem*, 2009, 284(6) : 3793-3803.
- [ 26 ] Abad-Rodriguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, et al. Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol*, 2004, 167(5) : 953-960.
- [ 27 ] Pralle A, Keller P, Florin EL, et al. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol*, 2000, 148(5) : 997-1008.
- [ 28 ] Matsuzaki K, Kato K, Yanagisawa K. A $\beta$  polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(8) : 868-877.
- [ 29 ] Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, et al. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J Biol Chem*, 2001, 276(27) : 24985-24990.
- [ 30 ] Wang SS, Rymer DL, Good TA. Reduction in cholesterol and sialic acid content protects cells from the toxic effects of beta-amyloid peptides. *J Biol Chem*, 2001, 276(27) : 42027-42034.
- [ 31 ] Yuyama K, Yanagisawa K. Sphingomyelin accumulation provides a favorable milieu for GM1 ganglioside-induced assembly of amyloid  $\beta$ -protein. *Neurosci Lett*, 2010, 481(3) : 168-172.
- [ 32 ] Thakur G, Pao C, Micic M, et al. Surface chemistry of lipid raft and amyloid A $\beta$ (1-40) Langmuir monolayer. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87(2) : 369-377.
- [ 33 ] Okada T, Ikeda K, Wakabayashi M, et al. Formation of toxic Abeta(1-40) fibrils on GM1 ganglioside-containing membranes mimicking lipid rafts: polymorphisms in Abeta(1-40) fibrils. *J Mol Biol*, 2008, 382(4) : 1066-1074.
- [ 34 ] Peters I, Igbavboa U, Schutt T. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(5) : 964-972.
- [ 35 ] Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, et al. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development: increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent resistant membrane domains. *J Neurochem*, 2005, 92(1) : 171-182.