

• 学科进展与展望 •

# 国家自然科学基金资助阿尔茨海默病 基础研究项目概述

张俊芳<sup>1</sup>     洪 微<sup>2</sup>

(1 山西医科大学生理教研室, 太原 030001; 2 国家自然科学基金委员会生命科学部, 北京 100085)

**[摘 要]** 本文总结了近 5 年(2003—2007 年)国家自然科学基金资助阿尔茨海默病(AD)基础研究概况,反映我国目前 AD 的研究方向和发展动态,提出了今后的资助策略。

**[关键词]** 阿尔茨海默病(AD),基础研究,自然科学基金,资助项目

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)由 1907 年德国精神病和神经病理学家 Alois Alzheimer 首先描述,又名早老性痴呆,是一种原因不明的进行性痴呆,是老年期痴呆中最主要的类型,主要症状为认知和行为功能不可逆的缓慢丧失,至今尚无有效的治疗方法。在 60 岁以上的老年人群中,年龄每增加 5 岁,AD 的患病危险可增加 1.85 倍<sup>[1]</sup>。我国 AD 患者已超过 500 万,占全世界患者总数的 1/4。现对近 5 年(2003—2007)国家自然科学基金委员会(以下简称自然科学基金委)有关 AD 基础研究项目的受理、资助情况及其研究进展作一概述分析。

## 1 自然科学基金委受理及资助 AD 研究概况

自然科学基金委自 2003—2007 年 5 年间,受理有关 AD 研究各类申请项目 688 项,资助 82 项,平均资助率 11%,资助金额共计 2006.8 万元(表 1, 2)。近 5 年间申报和资助项目数总体呈快速增加态势,2007 年较 2003 年资助项目数提高了 3.2 倍,资助金额增加 5.6 倍;项目类别参见表 2。报送的申请代码主要集中在老年医学、神经病学与神经生物学、中医药学和药理学等。

表 1 2003—2007 年国家自然科学基金受理、  
资助 AD 研究概况

	2003 年	2004 年	2005 年	2006 年	2007 年
受理项数(项)	81	118	152	172	165
资助项数(项)	5	20	11	25	21
资助率(%)	6	16	7	14	12
资助经费(万元)	80.2	416	333.6	649	528

本文于 2009 年 2 月 10 日收到。

表 2 2003 年—2007 年国家自然科学基金资助  
AD 研究的项目类型

	面上 项目	青年 基金	地区 基金	专项 基金	重点 项目	重大 项目	国家杰出 青年基金	合 计
2003 年	2	1	0	2	0	0	0	5
2004 年	17	1	2	0	0	0	0	20
2005 年	4	6	1	0	0	0	0	11
2006 年	17	5	2	1	0	0	0	25
2007 年	12	8	1	0	0	0	0	21

## 2 国内 AD 基础研究现状和趋势

AD 患者脑组织的典型病理改变是细胞外出现大量的老年斑(senile plaques, SP)和细胞内形成神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)。SP 的主要成分—— $\beta$ -淀粉样蛋白(Amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ),是淀粉样肽前体蛋白( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP)分别经  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶的酶切作用产生;异常过度磷酸化的微管相关蛋白 tau 是 NFTs 的主要成分。AD 发病机理复杂,属多因异质性疾病。迄今最具有说服力的发病机理数淀粉样蛋白瀑布假说,其核心内容是:遗传或环境因素导致 A $\beta$  在细胞外异常堆积,形成淀粉样斑块,同时激活神经胶质细胞,产生多种炎症介质,通过氧化反应、细胞凋亡、钙离子紊乱等多种途径对神经元和突触造成直接损害;部分炎症介质又可以进一步促进神经元产生更多的 A $\beta$ 。这种神经元和神经胶质细胞之间的相互作用,不断加强脑组织中的炎症反应,导致 AD 神经元变性和慢性病程。其他发病机理假说包括脂

质代谢紊乱学说、兴奋性氨基酸毒性学说、钙离子平衡紊乱学说、氧化应激反应学说等,上述假说所阐述的病理过程可能同时存在于AD的发病过程之中。

自然科学基金委资助AD基础研究涉及其发病机制、诊断、治疗、流行病学等各个方面,基本反映了同时期国际AD研究的前沿及热点。本文仅对老年医学领域资助AD基础研究项目做一概述。

## 2.1 发病机制

### (1) $\beta$ -淀粉样蛋白研究

$A\beta$ 通过多种途径,如诱导细胞凋亡、激发炎症级联反应、产生氧化应激、作用于线粒体影响能量代谢、加剧tau蛋白磷酸化和NFTs的形成、降低兴奋性毒性的阈值等,引发神经元功能障碍。近年来自然科学基金委资助 $A\beta$ 相关研究8项,主要围绕 $A\beta$ 来源、其毒性作用靶点及机制等方面。

Nicestrin(NCT)作为 $\gamma$ -分泌酶的组分之一,其表达变化对 $\gamma$ -分泌酶活性、AD中 $A\beta$ 的产生起重要调节作用。目前初步明确了NCT的降解与蛋白酶体和溶酶体有关,且NCT在降解之前经泛素化修饰,需进一步揭示细胞内NCT的降解途径及泛素化降解机制<sup>[2,3]</sup>。 $\beta$ -分泌酶-BACE1含量的增加是 $A\beta$ 异常增多的主要原因,故抑制BACE1的产生是防治AD的新途径。

西安交通大学解剖学实验室设计合成与BACE1同源的siRNA(siBACE1),通过表达siBACE1的逆转录病毒,感染AD细胞模型,发现siBACE可有效抑制细胞模型内的BACE1以及 $A\beta$ 的产量,细胞的形态、生长状况较模型细胞有明显的改善,细胞凋亡减少,从细胞水平证明siBACE对AD有治疗作用<sup>[4]</sup>。动物试验发现,siBACE-APP的转基因小鼠与APP转基因小鼠相比较,三月时两组动物的行为学检测(Morris水迷宫)和脑内的病理改变(组化和免疫组化染色)尚未见明显差异,现正在进一步研究中。

对 $A\beta$ 毒性作用靶点及其机制的研究,涉及胆碱能神经系统、肾上腺素能系统、NMDA受体、突触囊泡功能、局部caspases活化、整合素、线粒体内钙浓度、膜电位、酶和通道等结构和功能改变,及利用电生理手段观察其对学习记忆的关键部位海马的毒性作用等方面。

### (2) tau蛋白研究

tau蛋白研究主要集中于翻译后修饰异常及导致tau蛋白过度磷酸化的机制。已发现tau蛋白的修饰方式主要有磷酸化、糖化、泛素化、经典糖基化、

硝基化和O-GlcNAc糖基化。2004年资助项目探讨神经元生物大分子甲基化障碍促进tau蛋白异常磷酸化和聚积的信号转导途径,采用鼠海马原代神经元和N2a细胞株建立甲基化障碍细胞模型,发现 $A\beta$ 产生过多使PP2A(L309)脱甲基化增加,导致AD脑内PP2A活性下降,进而使磷酸化的tau蛋白脱磷酸化减弱<sup>[5]</sup>;且 $A\beta$ 产生过多还可使PP2A磷酸化(Y307)增加,也引起tau蛋白过度磷酸化<sup>[6]</sup>。南通大学神经再生实验室研究AD时蛋白激酶A和糖元合成激酶3 $\beta$ 对tau蛋白异常磷酸化的影响<sup>[7,8]</sup>;还发现O-GlcNAc糖基化负调控tau蛋白的磷酸化,在AD患者脑中,O-GlcNAc糖基化修饰降低<sup>[9]</sup>。从葡萄糖摄入、UDP-GlcNAc的合成和O-GlcNAc糖基转移酶的表达等层面研究tau蛋白过度磷酸化的机制。有关tau蛋白磷酸化的调控机制,从tau蛋白硝基化、分子伴侣、蛋白质降解系统异常(包括溶酶体(lysosome)、泛素-蛋白酶小体(ubiquitin-proteasome)、 $Ca^{2+}$ 激活的中性蛋白酶(calpain)系统)等环节都有资助项目进行研究。

### (3) AD分子遗传学研究

至今已发现5种基因的突变或多态性与AD有关。我国对痴呆遗传学研究几乎全部集中在散发性AD方面,对家族性AD(FAD)的研究尚欠缺。首都医科大学宣武医院神经内科课题组在自然科学基金资助下收集保存了我国FAD家系遗传资源,建立了中国人FAD遗传资源库和AD脑库,采用候选基因定位、基因组扫描方法对我国FAD基因进行定位突变分析,研究分子基因型与疾病分型、神经病理表型等的关系<sup>[10]</sup>。扬州大学课题组发现了8个FAD家系,对2个FAD家系的研究中发现了PS1基因2个新的错义突变位点。地区基金项目资助了新疆维族AD的分子流行病学研究,探讨维、汉等不同民族人群AD患病情况、影响因素、相关基因位点及多态性特征等差异。

### (4) 衰老与AD间关系的研究

“衰老相关疾病的发生和发展机理研究”是自然科学基金委生命科学部“十一五”优先发展领域。衰老伴随着神经退行性疾病的发病机会增加,因此对两者间内在联系的分子基础、相互作用的关键分子的研究日益引起关注。

肽类丙酰异构酶Pin1是进化过程中保守的小分子蛋白,参与一系列磷酸化/脱磷酸化细胞信号通路的调节。复旦大学神经生物学研究所课题组前期研究发现,AD患者多个脑区Pin1水平与神经纤维

性变负相关,Pin1可恢复磷酸化tau蛋白的微管结合功能<sup>[11]</sup>;Pin1基因敲除后,APP酶切发生改变,不溶性A $\beta$ 1-42在神经元胞体内聚集,脑内A $\beta$ 1-42含量增高<sup>[12]</sup>。近来他们发现Pin1可能涉及衰老过程:Pin1基因敲除小鼠脑内神经突触结构与功能出现异常变化,多个脑区神经元胞体显著减小、树突棘形态转为瘦长,这与老年小鼠某些脑区神经元树突呈现类似的变化<sup>[13]</sup>。基于上述前期研究基础,该课题拟采用遗传性加速衰老小鼠、AD转基因小鼠和Pin1基因敲除小鼠模型,观察AD病理过程的进展速度和学习记忆功能的改变、分析遗传因素在衰老促进AD中的作用,探讨Pin1在自然衰老和加速衰老小鼠模型中的变化及其调节的分子机制,验证Pin1是否是两者相互联系的分子基础的假设。该项目获2007年自然科学基金资助。

2006年资助的青年科学基金项目通过比较不同年龄正常小鼠及AD模型鼠脑内沉默突触与功能性突触的数目、分布与功能差异,明确AD中存在沉默突触与功能性突触间的转变异常,发现树突棘素的表达随着年龄的改变而变化,这种变化可能与不同年龄段大鼠小脑组织中突触的可塑性变化有关<sup>[14]</sup>。

#### (5) 其他有关机制的研究

从功能学上,主要采用神经电生理手段如场电位记录技术、膜片钳技术、结合分子生物学方法,研究AD认知缺陷的突触功能障碍、神经信息处理的功能改变等动力学机制,及行为学干预手段对细胞的效应及其神经动力学机制等。另外,糖尿病与散发性AD的发病间关系、载脂蛋白E4结构和功能改变在AD发病中的作用等都有研究项目涉及。

## 2.2 诊断

AD的诊断基本上是一种排除性诊断,国际上应用最广泛的是NINCDS-ADRDA或DSM-IV诊断标准,神经心理量表起着重要的作用,尚缺乏特异标志物的实验室诊断标准和影像学检查手段。通过目前手段能够诊断的AD,其认知功能损害通常已经达到了临床很难有所作为的程度,因此AD的早期诊断是目前研究的热点。轻度认知障碍(mild cognitive impairment, MCI)就是针对这一目标提出的概念。首都医科大学宣武医院神经内科课题组采用A $\beta$ 1-42寡聚体刺激培养的人原代星形胶质细胞,运用基因芯片技术进行基因谱扫描,分析并筛选出差异表达基因所编码的分泌蛋白,确定用于AD早期诊断的候选标志物;对MCI病例进行随访,动态

观察血浆和脑脊液中候选标志物的水平,结合患者的临床资料和病情转归综合分析,有望找到可预测MCI进展为AD的生物学标志物谱<sup>[15]</sup>。

在影像学研究方面,所资助项目主要采用MRI技术对AD动物模型进行检测,建立相关资料库,动物模型包括转基因小鼠模型、不同工具药物诱导的tau蛋白异常磷酸化和聚积的AD样动物模型等。

## 2.3 治疗

迄今美国FDA批准的AD的治疗药物只能部分地控制症状或延缓其进展,且不良反应多,进一步研究疗效高、特异性强、安全性和耐受性更好的抗AD药势在必行。利用中药方剂、中药或植物提取物、传统中药组方干预A $\beta$ 沉积和tau蛋白过度磷酸化的机制研究,是我国在AD治疗研究上特色,在中医中药和药物药理学科领域资助了上述相关研究。

近年兴起的A $\beta$ 1-42免疫疗法,虽然已经引起世人的关注并已取得令人鼓舞的动物实验成果,但终因人体II期临床试验中部分受试者出现无菌性脑膜炎而中止。如何诱导机体产生特异、高效、安全的抗A $\beta$ 免疫反应是AD免疫治疗的瓶颈与难点。2005年受资助项目通过非免疫途径筛选出一种人源单链抗体,并通过基因工程的方法将人源单链抗体转化为全人的基因工程抗体,为AD的被动免疫治疗提供新型治疗药物<sup>[16-18]</sup>。该项目研制出的单链抗体分子很小,和鼠源的单克隆抗体相比,具有小型化和人源化的优势,更容易穿透血脑屏障,而且不易引起人抗小鼠抗体反应(HAMA反应);且被动免疫的抗体,避免了疫苗免疫病人出现的自身免疫问题。中国医科大学课题组在既往研究基础上选用10次以上重复A $\beta$ 3-10的基因为抗原基因,制备能表达A $\beta$ 3-10的基因重组腺病毒为疫苗,以最方便的皮肤表面免疫方法进行接种,其研究目标是解决两个难题:A $\beta$ 1-42多次应用可能会出现其脑内的沉积及其脑细胞毒性的危险、A $\beta$ 1-42接种后部分病人出现脑内炎症反应。

国际上发现的胚胎干细胞选择性诱导技术使其成为高选择性的、具有受体自身遗传物质的神经干细胞,为AD的干细胞治疗提供理论依据,针对如何找到细胞移植途径的多项研究获得了资助。

## 3 结语

纵观近5年来自然科学基金资助AD研究项目,基本反映了我国目前AD基础研究的现状:能够

紧跟国际前沿和热点问题,但尚缺乏在某一研究方向上进行连续、深入研究的项目,方向较散,缺乏整体性、系统性;缺乏从衰老的生物学机制角度探讨AD的发病机理;缺乏在国际上具有影响力的研究成果。作为老年医学学科领域,在资助策略上,应鼓励申请者充分利用我国病例资源的优势,加强衰老和AD间关系的整合研究;鼓励基础和临床结合的转化研究。

### 参 考 文 献

- [1] Ferri C P, Prince M, Brayne C et al. Global prevalence of dementia; a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005, 366 (9503): 2112—2117.
- [2] He G, Qing H, Cai F et al. Ubiquitin-proteasome pathway mediates degradation of A $\beta$ 1. *J Neurochem*, 2006, 99 (5): 1403—1412.
- [3] He G, Qing H, Tong Y et al. Degradation of nicastrin involves both proteasome and lysosome. *J Neurochem*, 2007, 101(4): 982—992.
- [4] 董炜疆, 宫惠琳, 冯改丰等. 真核表达载体 pcDNA3.1- $\beta$ 淀粉样前体蛋白裂解酶的构建及其在 COS-7 细胞中瞬时表达. *中国修复重建外科杂志*, 2006, (4): 423—426.
- [5] Zhou X W, Gustafsson J A, Tanila H et al. Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiol Dis*, 2008, 31(3): 386—394.
- [6] Liu R, Zhou X W, Tanila H et al. Phosphorylated PP2A (tyrosine 307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(1): 241—257.
- [7] 刘飞, 施建华, 丁绍红等. 糖元合成酶激酶 3 $\beta$  对微管相关蛋白 tau 的磷酸化作用. *生物化学与生物物理进展*, 2007, (9): 945—951.
- [8] 施建华, 钱慰, 丁绍红等. 蛋白激酶 A 催化微管相关蛋白 tau 磷酸化的研究. *江苏大学学报: 医学版*, 2006, (6): 485—488, 492.
- [9] 钱慰, 刘飞, 朱俐等. 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰对 tau 蛋白磷酸化修饰的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2003, (4): 623—628.
- [10] 邵延坤, 贾建平, 方伯言等. 野生型与突变型 Ps1 真核表达载体的构建及其在 Sh-Sysy 细胞中的表达. *中国实验诊断学*, 2005, (6): 853—856.
- [11] Lu P J, Wulf G, Zhou X Z et al. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*, 1999, 399(6738): 784—788.
- [12] Pastorino L, Sun A, Lu P J et al. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature*, 2006, 440(7083): 528—534.
- [13] Liou Y C, Sun A, Ryo A et al. Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*, 2003, 424(6948): 556—561.
- [14] 周琳娜, 魏建峰, 王芳等. 树突棘素在大鼠小脑中的表达和年龄变化. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2007, (1): 87—91.
- [15] Jia J P, Meng R, Sun Y X et al. Cerebrospinal fluid tau, Abeta1-42 and inflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett*, 2005, 383(1—2): 12—16.
- [16] 蔡炯, 李方, 刘飞等. 阿尔茨海默病  $\beta$  淀粉样肽 40 人单链抗体的生物活性. *中国医学科学院学报*, 2007, (5): 647—650.
- [17] 蔡炯, 李方, 王世真等. 阿尔茨海默病患者  $\beta$  淀粉样肽 40 人单链抗体在大肠杆菌的表达和纯化. *中国临床康复*, 2006, (2): 114—116.
- [18] 蔡炯, 李方, 王世真等. 阿尔茨海默病 A $\beta$ 40 人单链抗体在毕赤酵母的表达. *医学研究杂志*, 2006, (10): 11—13.

## OVERVIEW AND ANALYSIS OF BASIC RESEARCH PROJECTS ON ALZHEIMER'S DISEASE FUNDED BY NSFC DURING 2003—2007

Zhang Junfang<sup>1</sup> Hong Wei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Department of physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001;

<sup>2</sup> National Natural Science Foundation of China, Beijing 100085)

**Abstract** This paper reviews the fundamental research projects on Alzheimer's disease(AD) supported by National Natural Science Foundation of China (NSFC) from 2003 to 2007, introduces the research fields and progress, and puts forward the strategies of supporting the basic research on AD by NSFC.

**Key words** Alzheimer's disease(AD), basic research, NSFC, projects funded