

在阿尔茨海默病 (AD) 发生发展进程中, 铁、铜等金属离子缺乏可能主要与 AD 早期关系密切, 而铁、铜等金属离子过载可能主要与 AD 后期损伤关系密切. 天然抗氧化剂可以调节铁、铜等金属离子代谢失衡, 减少氧化应激损伤, 可能预防 AD 的发生和延缓 AD 进程.

——赵保路

## 金属离子代谢平衡失调与阿尔茨海默病早期发病机制\*

赵保路\*\* 万莉

(脑与认知国家重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 研究表明, 脑内金属离子代谢失衡与阿尔茨海默病(AD)有关, 但其机理尚需深入探讨. 结合本实验室研究结果, 作者对金属离子代谢紊乱与氧化应激, 金属离子代谢紊乱与  $\beta$ -淀粉样蛋白、转铁蛋白和转铁蛋白受体、铁调节蛋白、二价金属离子转运体以及天然抗氧化剂通过调节金属离子代谢平衡缓解  $\beta$ -淀粉样蛋白的毒性和保护细胞的作用进行探讨. 提出: 铁、铜等金属离子缺乏可能主要与 AD 早期关系密切, 而铁、铜等金属离子过载可能主要与 AD 后期损伤关系密切的学术观点.

**关键词** 阿尔茨海默病, 金属离子代谢失衡, 氧化应激,  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ ),  $\beta$ -淀粉样蛋白前体, 转铁蛋白和转铁蛋白受体, 铁调节蛋白, 二价金属离子转运体, 天然抗氧化剂.

学科分类号 R74

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00297

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的病因与多种因素有关, 发病机制十分复杂<sup>[1-2]</sup>, 如内外环境因素<sup>[3-4]</sup>、基因变异<sup>[5]</sup>、蛋白质异常修饰<sup>[7]</sup>及沉积<sup>[7]</sup>、神经营养及可塑性改变<sup>[8-9]</sup>、氧化应激<sup>[10-11]</sup>、离子通道<sup>[12]</sup>、能量代谢紊乱等等<sup>[13]</sup>. 但金属离子代谢紊乱在 AD 发生发展中的重要性<sup>[14]</sup>最近非常引人注意. 本文总结近年来相关领域的研究进展并结合本实验室的研究结果, 重点对铁、铜离子代谢紊乱和氧化应激,  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )和金属离子代谢紊乱, 铁铜过载或者缺失对 AD 的形成及天然抗氧化剂通过调节金属代谢平衡缓解 A $\beta$  毒性对诱导减轻细胞损伤的作用进行了深入讨论.

### 1 铁、铜代谢紊乱和氧化应激

氧化应激是指能导致化学或代谢来源的活性氧(ROS)和活性氮(RNS)及其代谢产物产生的一种细胞内或细胞外的损伤状态. 线粒体电子传递的许多

环境和基因因素都可以诱导产生过量的 ROS 及 RNS, 在铁的作用下, 发生 Fenton 反应, 形成氧化能力很强的羟基自由基. 大脑皮层神经元、小脑颗粒细胞和星形胶质细胞等多种细胞在病理条件下, 特别是在炎症条件下, 可以产生过量的一氧化氮(NO)和  $O_2^-$ , NO 与  $O_2^-$  反应可以生成反应活性更强的过氧亚硝基 ONOO<sup>-</sup> 及其代谢产物羟基自由基. 由于脑组织的氧化代谢率很高, 金属离子铜和铁的含量也很高, 同时抗氧化的保护机制又相对缺乏, 极易导致脑组织的氧化损伤和抗氧化防御之间失去平衡. 过量的 ROS 及 RNS 不仅可以影响细胞

\* 国家自然科学基金资助项目(30930036, 30870587).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888569, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-06-14, 接受日期: 2012-06-29

膜的通透性, 引起  $\text{Ca}^{2+}$  内流和细胞第二信使含量的升高, 进而激活多条氧化还原通路, 而且可以直接通过与线粒体的相互反馈调节作用, 启动细胞的凋亡通路。线粒体是 ROS 敏感的细胞器之一, 它的损伤还能反馈性地增加 ROS 的产生, 释放凋亡因子细胞色素 c, 激活 caspases 蛋白家族, 最后导致细胞凋亡。任何始发因素引起的神经元死亡, 都能导致脑内大量铁释放和活性氧物质生成的增加<sup>[15]</sup>。在脑内, 低浓度的谷胱甘肽和过氧化氢酶, 以及高比例的多不饱和脂肪酸使脑组织对氧化损伤极其敏感。多种神经退行性疾病都出现氧化应激, 使氧化-抗氧化稳态失衡, 朝氧化方向倾斜<sup>[16]</sup>。

细胞有氧代谢产生的  $\text{O}_2^-$  和过氧化氢, 特别是由铁、铜催化产生的羟自由基将造成涉及所有类型生物分子的损伤。细胞内产生这些自由基的部位包括线粒体、溶酶体、过氧化物酶体、细胞核、内质网和细胞质膜, 自由基和它们的产物也存在于细胞质中。自由基攻击的主要靶位置是细胞膜脂的不饱和链, 造成脂质过氧化, 引起膜流动性的降低, 膜上受体排布的改变, 最终可导致细胞的破裂。活性氧自由基可以引起一些含硫酶和其他蛋白质的损伤, 导致蛋白质的失活、交联和变性。活性氧自由基还可以攻击核酸, 造成 DNA 损伤而导致突变和癌变。自由基对糖类的损伤将导致主要由糖蛋白构成的细胞膜上各种受体功能的改变, 影响细胞信号转导的正常进行, 引起机体免疫和内分泌功能的改变。

大量证据表明, 过渡金属离子, 特别是铁、铜离子, 作为生物分子氧化损伤的催化剂, 是引起氧化应激的一个重要因素。铁离子除了参与体内活性氧的产生外, 自身在氧化还原过程中所形成的与氧结合的复合物也能引起脂质过氧化、DNA 损伤、各种蛋白质和非蛋白质中巯基的氧化, 并改变细胞内钙离子的浓度。铁离子与其他过渡金属离子(如铜、铬、镉、铅、汞、镍和钒)一样, 可以引起对神经、肝和肾的毒性作用<sup>[17]</sup>。

另外, 铜和铁是还原态的金属, 它们在很多酶中都有很重要的催化活性。铜和铁的含量在生物体内是受严密调控的, 以免其过量地诱导 ROS 的产生而对细胞产生损害。过氧化氢可以自由地穿透细胞膜, 如果过氧化氢没有被抗氧化酶如过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶等充分清除, 就会和  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  反应产生羟基自由基, 导致脂质过氧化、蛋白质羧基修饰、核酸加和物(如

8-羟基鸟苷)生成等<sup>[18-21]</sup>。我们研究发现, 过表达  $\text{A}\beta$  的 SH-SY5Y 细胞和线虫中, 铁的含量显著升高, 氧化应激明显加强<sup>[22]</sup>。反之, 如果铜和铁过少, 一些抗氧化酶如过氧化氢酶(铁是活性中心)和 SOD(铜是活性中心)的催化活性就不高, 不足以清除细胞内产生的 ROS, 也会引起氧化应激, 导致神经损伤<sup>[22]</sup>。

目前 AD 的具体发病机理还不是很清楚, 研究发现自由基的损伤和 AD 有着密切的联系<sup>[23-24]</sup>。在 AD 中, 最主要的自由基来源是由过渡态金属产生的<sup>[25-26]</sup>。在 AD 病人脑中的  $\text{A}\beta$  蛋白沉积斑中发现了高浓度的铜、锌和铁离子<sup>[27-28]</sup>。 $\text{A}\beta$  蛋白与金属元素之间的相互作用产生的活性氧导致了  $\beta$ -淀粉样蛋白的神经毒性, 是 AD 大脑氧化损伤的直接诱因。

## 2 铁、铜缺乏与 AD 早期发病的关系

金属离子过载引起其代谢失衡和 AD 中氧化应激损伤密切相关。相反, 金属离子缺乏也会引起其代谢失衡, 与 AD 的发病机制也密切相关。这方面的研究报道很少。铁和铜是人体必需微量元素, 由于其独特的化学反应活性, 在维持细胞和机体正常代谢过程中起着至关重要的作用, 如氧气的输送、线粒体电子转移、神经递质、DNA 合成、氮的固定、电子传递等都离不开金属离子, 特别是一些抗氧化酶的活性中心就是金属离子。因此金属离子, 特别是铁铜的缺乏与 AD 的关系应更加引起我们的注意和研究。

铁的获取对脑细胞非常重要是因为神经元的活动特别依赖需氧代谢。铁是细胞色素蛋白中血红素的关键成分, 在细胞呼吸过程中介导线粒体内的电子传递, 所以铁代谢对脑组织的功能活动极为重要。近年来的研究发现, AD 病理中的关键蛋白——淀粉样蛋白前体(APP)在铁代谢中有重要作用。APP 是  $\text{A}\beta$  的前体蛋白, 在  $\text{A}\beta$  的形成中起重要作用。在 AD 发病机理的研究中, 大多是针对突变型 APP 进行的, 忽视了对野生型 APP 的研究。家族性 AD 病人的脑中 APP 水平上升, APP 过量表达导致早发型 AD<sup>[29-30]</sup>。在转基因鼠中, 过表达的 APP 导致突触传导障碍。海马区神经形成减少及学习和记忆能力下降<sup>[31-33]</sup>。APP 蛋白基因位于人的第 21 对染色体上, 21 三体综合征(唐氏综合征)又称为先天愚型, 患者比正常人多了一条 21 号染色体, 细胞中的 APP 蛋白也相应过量。唐氏综合

征患儿的脑部存在着多种脑发育的异常,包括迟发性脱髓鞘病、神经元数目较少、突触密度的减少以及乙酰胆碱神经递质受体减少等。患者常在30岁以后出现老年性痴呆症状,中年以后大脑呈现淀粉斑,患AD的比率较高<sup>[34-35]</sup>。APP定位于线粒体,过表达APP会影响线粒体蛋白运输通道的正常运行,导致线粒体功能紊乱<sup>[36]</sup>。在AD发病过程中,有多种炎性因子参与病理过程,白介素21(IL-21)可通过蛋白激酶2C(iprotenkinase2C, PKC)途径促进APP的合成和分泌裂解,促进A $\beta$ 的产生和沉积。 $\beta$ 2转化生长因子(TGF2 $\beta$ )是脑部对损伤及炎症反应的关键调节剂,可上调APP的表达。严重的脑外伤可致APP表达增加,脑外伤是AD的危险因素之一。

在过表达野生型APP的细胞中,我们发现氧化应激增强。细胞的铁含量下降,过氧化氢酶(catalase)活力下降,活性氧和钙离子浓度升高,线粒体膜电位下降<sup>[37]</sup>。在细胞培养过程中,发现过表达APP的细胞长得很慢。用电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)方法测定细胞里的金属元素含量,过表达APP的细胞中铁元素含量显著低于对照细胞。铁不足导致过氧化氢酶活力下降,清除羟基自由基能力减弱,细胞内总ROS水平升高,钙离子浓度增加,线粒体膜电位下降。铁是过氧化氢酶的辅基,过氧化氢酶催化过氧化氢生成水和氧。

APP mRNA 5'非编码区有一个铁应答元件IRE,与铁调节蛋白IRP1结合<sup>[38-39]</sup>。Duce等发现,APP有亚铁氧化酶活性,能将二价铁离子氧化成三价铁离子,具有输出细胞内铁的功能,并且APP和铁输出蛋白都位于细胞膜上,它们之间有相互作用<sup>[40]</sup>。在我们的实验中观察到,细胞中过量的APP蛋白将铁输出细胞,使得细胞处于缺铁状态,50 mg/L柠檬酸亚铁铵(FAC)处理细胞,对照细胞活力没有显著变化,却使过表达APP的细胞活力显著上升,加入少量的铁就提升了细胞活力。100 mg/L FAC处理后,对照细胞活力显著下降,过表达APP的细胞活力没有变化。过表达APP的细胞加入FAC后,活性氧和钙离子浓度都显著下降<sup>[39]</sup>。

细胞里的铁主要以血红素的形式存在,血红素是血红蛋白的重要组成成分,贫血中缺铁性贫血占很大一部分。铁缺乏时,许多其他重要的含铁蛋白活性减低,如细胞色素c、细胞色素氧化酶、琥珀酸脱氢酶、过氧化氢酶、乌头酸酶、黄嘌呤氧化

酶、肌红蛋白等,很多组织细胞代谢和机能发生紊乱,神经系统机能出现障碍。缺铁的患者单胺氧化酶活性降低,神经和智力发育受到损害。血红素缺乏引起的代谢异常与AD病人神经元的功能紊乱有相似之处<sup>[41]</sup>。一项研究表明,在没有痴呆的老年人中,过低的血红蛋白水平与高风险的AD和快速的认知下降有关联<sup>[42]</sup>。调查结果表明,患AD的人群中,农村人口比例高于城市,女性高于男性。我们认为这与营养状况和贫血有关,在广大的农村贫困地区营养不良容易造成缺铁性贫血。女性在特定的生理时期,也容易出现贫血。我们推测铁缺乏和供血不足可能是AD病理的一个早期事件,与轻度认知障碍期(MCI)有关。

AD发病机制比较复杂,一直以来比较推崇 $\beta$ -淀粉样蛋白学说,认为 $\beta$ -淀粉样蛋白是AD发病机制的核心,其余影响发病的因素只是 $\beta$ -淀粉样蛋白的上行或下行通路起作用,但这种说法存在局限,不能仅用这一种机制完全解释该病。AD患者脑中常见有A $\beta$ 斑块,但A $\beta$ 的量并不与疾病严重程度成正比。在新药研制方面,一种用于清除AD患者脑内淀粉样蛋白斑块的疫苗虽然在清除斑块上十分有效,但却并不能阻止由该疾病引起的神经系统的退化。疫苗可以减少甚至完全清除斑块,但患者症状并未得到相应的改善。新近的研究对 $\beta$ -淀粉样蛋白学说提出了很多质疑:a.临床-病理研究发现部分脑内老年斑广泛存在的患者并无痴呆表现;b.与老年斑相比,脑细胞内神经纤维缠结程度与患者临床痴呆程度有更好的相关性;c.迄今为止,几乎所有基于 $\beta$ -淀粉样蛋白学说的治疗方案均被临床研究否决,而未能形成有效的治疗手段。有学者提出, $\beta$ -淀粉样蛋白沉积和老年斑并不是AD病理损害的初始和主要损害机制,而仅仅是AD病理损害过程中伴发的病理标志,虽然它们在一定程度上可以反过来加重AD的病理损害。

在我们的细胞模型中,过表达APP的细胞和对照细胞分泌到培养基中的A $\beta$ 含量没有显著性差异,但过表达APP的细胞却受到了明显的氧化损伤。有研究表明,过表达人APP的转基因鼠中的早期认知障碍和神经病理学改变与A $\beta$ 水平无关<sup>[43]</sup>。铁缺乏、贫血和脑供血不足在很大程度上是一致的。AD的神经血管假说是在2005年由Zlokovic首次提出,他认为神经血管功能的衰退使神经血管解耦联、血管退化、脑血流低等,最终影响血脑屏障功能,从而导致神经外环境失衡,神



经血管功能对 AD 的严重程度起着重要作用<sup>[44]</sup>。铁缺乏及由此导致的缺铁性贫血在老年人中很常见。AD 患者脑血液流量及耗氧量明显低于同龄正常人。我们推测铁缺乏和供血不足可能是 AD 病理的一个早期事件, 与轻度认知障碍有关。老年性痴呆病人常伴有血管性痴呆, 存在广泛的缺血性病损。在临床上, 脑血管性痴呆与老年性痴呆在同一病人身上同时存在的情况十分常见。在人的短暂又漫长的一生中, 或许儿童期或青少年时期的贫血导致了老年时的痴呆。

与高浓度铜加速 A $\beta$  线虫的瘫痪相反, 我们研究发现低浓度的铜( $10^{-4}$  mol/L)却减少了 A $\beta$  线虫的瘫痪行为。这说明了铜的浓度高低影响了 A $\beta$  发挥毒性的程度。低浓度铜处理 A $\beta$  线虫后, 还能够降低活性氧水平、改善瘫痪行为的原因主要是显著地高表达超氧化物歧化酶 sod-1、硫氧还蛋白还原酶 prdx-2 和氧化应激调控因子 skn-1。这些现象说明 A $\beta$  线虫本身其实是缺少铜的, 适当地补充铜可以改善 A $\beta$  线虫的瘫痪行为<sup>[39]</sup>。

以上结果表明, 铁、铜缺乏同样可以引起氧化应激, 损伤神经细胞, 可能主要与 AD 早期形成关系更密切一些。

### 3 铁、铜过载与 AD 后期脑损伤的关系

尽管铁、铜在脑的正常生理功能中具有十分重要的意义, 但脑铁、铜过量将会破坏细胞功能促使神经元死亡, 导致多种中枢神经系统疾病, 铁过载与 AD 密切相关, 在其发病机制中发挥重要作用<sup>[45]</sup>。在 AD 病人脑中的  $\beta$ -淀粉样蛋白沉积斑中发现了高浓度的铜、锌和铁离子<sup>[46]</sup>。铜和铁可以伴随 A $\beta$  在大脑中沉积, 也会诱导 APP 和 A $\beta$  产生 ROS, 这是 AD 中氧化应激的主要来源, 氧化应激越来越被认为和 AD 有着密切的联系, 在 AD 的大脑中表现出了蛋白质、脂类和核酸的氧化<sup>[47]</sup>, 金属元素的失衡是机体处于氧化应激状态的重要原因<sup>[48]</sup>。大脑中的铜和铁的含量会随着年龄的增长而增加, 它们会和 A $\beta$  反应产生活性氧, 最终导致神经元的损伤, 金属代谢紊乱是衰老的一个不可避免的结果。铜和铁的含量在生物体内是受严密调控的, 以免其过量诱导活性氧的产生而对细胞产生损害。作为 APP 水解产物的 A $\beta$  在 AD 大脑皮层中大量聚集, A $\beta$  可以把 Cu<sup>2+</sup> 还原成 Cu<sup>+</sup>, 把 Fe<sup>3+</sup> 还原成 Fe<sup>2+</sup>, 并在这一过程中催化产生过氧化氢<sup>[49]</sup>。过氧化氢可以自由地穿透细胞膜, 就会和 Cu<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 反应产生

羟基自由基, 导致脂质过氧化, 蛋白质羧基修饰, 核酸加和物(如 8-羟基鸟苷)生成等<sup>[50]</sup>。由于脑组织的氧化代谢率很高, 金属离子和铁的含量也很高, 同时抗氧化的保护机制又相对缺乏, 极易导致脑组织的氧化损伤和抗氧化防御之间失去平衡, 出现氧化应激, 损伤神经细胞<sup>[15]</sup>。

铁代谢的紊乱可以发生在铁的摄取和释放、贮存、细胞内代谢和调节等多个层次。细胞通过转铁蛋白(Tf)循环来不断地获取铁。血浆中的转铁蛋白受体(TfR)是细胞从转铁蛋白中摄取铁过程中的重要蛋白质。脑主要通过 Tf-TfR 介导和非 Tf-TfR 介导的途径摄取铁。DMT1 是二价金属离子转运蛋白, 可转运 Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 和 Pb<sup>2+</sup> 等二价金属离子<sup>[51]</sup>, 在非 Tf-TfR 依赖型的铁摄取中具有重要作用。TfR 广泛地分布在脑的各个区域, 脑内铁和 TfR 的分布是不一致的, 含 TfR 高的部位含铁量并不高, 而含铁量高的部位 TfR 的含量却很低<sup>[17]</sup>。在 AD 病人脑中, 海马和视皮层内 TfR 的密度都显著下降<sup>[52]</sup>。过表达 A $\beta$  的 SH-SY5Y 细胞、APP/PS1 转基因鼠和 AD 病人脑中 DMT1 的表达都明显增加<sup>[53]</sup>。

当铁进入细胞后, 其中有一部分不是马上被细胞利用, 而是被储存在铁蛋白(ferritin)和 ferritin 类似的蛋白质中。机体在许多病理条件下可以导致铁游离释放增多, 造成细胞死亡和组织损伤。铁蛋白常常被看作是一种安全的铁贮库, 但在病理条件下, 组织内生成大量 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 可作用于铁蛋白使铁被还原释放, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 亦可作用于血红蛋白(Hb), 使其氧化降解, 亦可导致铁的游离, 游离铁通过 Fenton 反应生成羟基自由基, 造成组织损伤。

铁调节蛋白(iron regulatory protein, IRP)能与特定的 RNA 上 3'端或 5'端的非翻译区存在的铁反应元件(iron responsive element, IRE)结合, 从而控制铁蛋白和转铁蛋白受体的表达水平。IRP 具有一个活跃的 Fe-S 中心, 是细胞内铁水平分子感应器。当细胞内铁过多时, IRP 与 IRE 的亲合力下降, TfR 的 mRNA 不稳定, 易遭受核酸酶的攻击而致 TfR 的表达下降, 细胞摄铁的过程亦减少。而铁蛋白的 mRNA 因 IRP 与 IRE 结合力下降而使其翻译增加, 铁蛋白表达增加, 细胞内过多的铁被贮存在铁蛋白里而封闭起来, 细胞的铁稳态得以维持。相反, 当细胞内铁耗竭时, 执行相反的调控过程, 使细胞摄铁增加而贮铁减少, 同样起到了维持

细胞内铁稳态的作用。膜铁转运蛋白(ferroportin), 又称铁调节转运体(Fe-regulated transporter 1, IREG1)或金属转运蛋白(metal transport protein 1, MTP1), 是一种跨膜的将铁输出细胞的蛋白质。铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CP)是人体重要的亚铁氧化酶。它的主要作用是催化二价铁成为三价铁, 从而促进铁与转铁蛋白结合, CP对机体铁转运和铁平衡起着重要作用。

我们在研究中发现, 稳定转染人 APP 突变基因 (APP<sup>sw</sup>, Swedish mutation) 的 SH-SY5Y 细胞模型中, 过表达 A $\beta$  的 APP<sup>sw</sup> 细胞中铁含量显著高于对照细胞。另外, APP<sup>sw</sup> 细胞中铜元素含量也明显增加<sup>[28]</sup>。与对照细胞相比, APP<sup>sw</sup> 细胞中活性氧强度增加、钙离子浓度升高、一氧化氮水平升高。APP<sup>sw</sup> 细胞线粒体中的钙离子浓度也显著高于对照细胞<sup>[54]</sup>。APP<sup>sw</sup> 细胞中转铁蛋白受体 (TfR) 表达降低、线粒体膜电位下降、SOD 酶活力和细胞抗氧化水平下降。另外, 铁处理降低了细胞活力和线粒体膜电位, 增加了脂质过氧化水平并促进了 A $\beta$  的分泌。细胞的实验结果在线虫(*C. elegans*)上得到了印证, 表达人 A $\beta$  的线虫 CL2006 中, 铁含量显著高于对照线虫 N2<sup>[22]</sup>。APP<sup>sw</sup> 细胞中 O $_2^{\cdot-}$  和 NO 自由基含量增加也使得细胞内的铁增多。O $_2^{\cdot-}$  和 NO 能促进铁从铁蛋白中释放出来, 成为游离铁。研究已发现将 NO 生成剂硝普钠加入铁蛋白中会引起铁蛋白中铁的释放, 同时激发脂质过氧化反应。由此推测, 体内 NO 的生成会导致铁蛋白中铁的转移、破坏胞内铁的平衡、升高活性氧水平、引起脂质过氧化反应<sup>[55]</sup>。

我们研究发现, 高浓度的铜( $10^{-3}$  mol/L)在成虫后第 8 天左右显著地加重了 A $\beta$  线虫的瘫痪行为, 这说明铜和 A $\beta$  要发挥显著的行为学效果需要一个缓慢的时间过程, 同时也证实了高浓度铜加剧 A $\beta$  的毒性。应用同步辐射微束 X 射线荧光扫描技术分析线虫体内元素含量的分布变化发现, A $\beta$  线虫体内的铜含量在头部、中部随着时间变化而显著变化, 主要是在 8 天以前。在高浓度铜处理后, A $\beta$  线虫体内铜的含量在第 4 天就已经有显著增加, 相应地, 锌和铁的含量此时在头部也有显著增加。这些都说明铜处理后确实影响了 A $\beta$  线虫体内铜、锌、铁的含量分布, 这也暗示细胞质中的 CuZn-sod、硫氧还蛋白还原酶 prdx-2 和线粒体中的 Mn-sod 等基因表达会受到影响<sup>[56]</sup>。高浓度铜 ( $10^{-3}$  mol/L)处理后, 在第 4 天的时候 A $\beta$  线虫活性

氧的水平显著升高了 75%, 同时显著提高线粒体应激反应因子 hsp-60 和内质网应激反应因子 hsp-16.2 表达, 显著降低过氧化氢酶 ctl-2 表达。

将行为学实验和活性氧检测联系起来看, 高铜处理 A $\beta$  线虫后所导致的活性氧显著变化的时间发生在瘫痪行为显著变化之前。说明活性氧升高是 A $\beta$  导致线虫瘫痪的一个重要原因。高浓度的铜显著地增加了 A $\beta$  线虫的瘫痪行为, 说明铜和 A $\beta$  可以协同地发挥毒性。铜与 A $\beta$ (1~42)协同作用发挥毒性的体内机制主要是, 通过与氧化应激相关的氧化应激调控因子 skn-12、线粒体应激反应因子 hsp-60、内质网应激反应因子 hsp-16.2 及过氧化氢酶 ctl-2 的表达水平来影响线虫体内活性氧水平发生氧化损伤, 从而最终导致行为上的显著变化。

以上结果表明铁、铜过载可以引起氧化应激, 损失神经细胞, 可能主要与 AD 后期损伤关系更密切一些。

#### 4 天然抗氧化剂通过调节金属代谢平衡缓解 A $\beta$ 的毒性

很多抗氧化剂都是铁、铜等金属的螯合剂。我们研究了尼古丁降低 A $\beta$  毒性的机制及其对阿尔茨海默病(AD)的防护作用和机理, 发现与 A $\beta$  和铁、铜和锌之间的反应与 A $\beta$  的沉积有很密切的联系。我们研究了尼古丁对金属离子在 APPv717I 转基因鼠的海马和皮层的代谢平衡的影响。结果发现, 尼古丁可以显著降低铁、铜离子和锌离子在老年沉积斑和其周围神经细胞元中的含量。在海马 CA1 区的一个亚区中也观察到了铁、铜离子和锌离子的分布密度的减少。进一步用转染 A $\beta$  的 SH-SY5Y 细胞研究了尼古丁介导的金属代谢平衡的可能机理。发现尼古丁处理可以显著降低细胞内的铁、铜的含量, 并且这个作用是不依赖尼古丁乙酰胆碱受体的。这些结果表明尼古丁降低 A $\beta$  的毒性是部分通过调节金属离子的代谢平衡来达到的<sup>[57-62]</sup>。

我们研究发现, 染料木黄酮能抑制 A $\beta_{25-35}$  导致的海马神经细胞凋亡, 其表现为染料木黄酮抑制 A $\beta_{25-35}$  导致的细胞活力降低, 抑制 A $\beta_{25-35}$  导致的核凝集和片段化, 抑制 A $\beta_{25-35}$  导致的细胞内自由钙离子的增加、活性氧的积累, 抑制 caspase-3 的激活。我们还发现, 不同浓度的染料木黄酮对 A $\beta_{25-35}$  导致的海马神经凋亡的抑制作用是通过不同的机制实现的: 在高浓度( $40 \mu\text{mol/L}$ )时, 主要通过其抗氧化性作用; 在低浓度( $0.1 \mu\text{mol/L}$ )时, 通过

激活雌激素受体作用<sup>[21]</sup>.

我们还使用过表达 APP<sup>sw</sup> 的 SH-SY5Y 细胞, 并用铁、铜离子处理, A $\beta$  的毒性显著地被提高了. 木瓜素(FPP)是一种发酵的有很强抗氧化性的天然提取物. 在实验中发现 FPP 预处理细胞可以缓解由 A $\beta$  引起的细胞内钙离子升高、ROS 的过量产生、一氧化氮的升高, 从而保护 A $\beta$  对细胞的损害<sup>[28]</sup>.

## 5 结 语

铁、铜代谢紊乱、氧化应激与 AD 关系非常密切, 铁、铜过载可能主要与 AD 后期损伤关系更密切, 而铁、铜缺乏可能主要与 AD 早期形成关系更密切, 金属螯合剂和天然抗氧化剂通过调节金属代谢平衡对缓解 A $\beta$  毒性诱导细胞损伤有明显保护作用(图 1). 今后在这方面进行深入研究是非常必要的, 这对阐明 AD 的发病机理和寻找预防策略都具有重要意义.

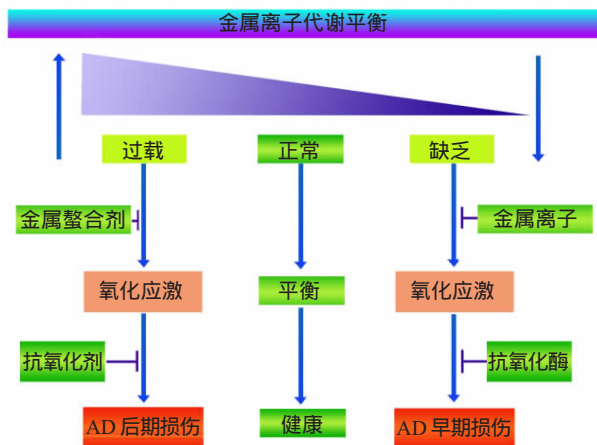


Fig. 1 Relation of Mental metabolic homeostasis and AD

图 1 金属离子代谢平衡与 AD 的关系

铁、铜等金属离子缺乏引起的氧化应激可能主要与 AD 早期关系密切, 而铁、铜等金属离子过载引起的氧化应激可能主要与 AD 后期损伤关系密切, 补充天然抗氧化剂和天然抗氧化酶可以调节铁、铜等金属离子代谢失衡, 可能预防 AD 的发生和延缓 AD 进程. 只有保持金属离子代谢平衡才能维持健康.

## 参 考 文 献

[1] Goedert M, Ghetti B. Alois Alzheimer: his life and times. *Brain Pathol*, 2007, **17**(1): 57-62  
 [2] Vickers J C, Dickson T C, Adlard P A, *et al.* The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 2000, **60**(2): 139-165  
 [3] He R Q, Lu J, Miao J Y. Formaldehyde stress. *Sci China Life Sci*,

2010, **53**(12): 1399-1404  
 [4] Tong Z Q, Zhang J L, Luo W H, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia. *Neurobiology of Aging*, 2011, **32**(1): 31-41  
 [5] Zhou J W. Recent progress in neurodegenerative disorder research in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 348-355  
 [6] Liu Y Y, Qiang M, Wei Y, *et al.* A novel molecular mechanism for nitrated  $\alpha$ -synuclein-induced cell death. *J Molecular Cell Biology*, 2011, **3**(4): 239-249  
 [7] 卢 静, 苗君叶, 潘 荣, 等. 甲醛诱导的磷酸化减弱 Tau 蛋白与 DNA 相互作用. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(12): 1113-1120  
 Lu J, Miao J Y, Pan R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(12): 1113-1120  
 [8] Zhang X H, Poo M M. Progress in neural plasticity. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 322-329  
 [9] Luo Z G. Synapse formation and remodeling. Axon guidance and neuronal migration research in China. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 315-321  
 [10] Zhang M, Zhao Z M, He L, *et al.* A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(1): 112-124  
 [11] Sun P, Zhang Q, Han J Y, *et al.* TLR4 signaling induced TLR2 expression in the process of mimic cerebral ischemia/reperfusion *in vitro*. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(2): 223-228  
 [12] Wang Y Z, Xu T L. Ion channels in neuronal survival. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(3): 342-347  
 [13] 刘玲玲, 盛柏杨, 龚 锴, 等. 淀粉样肽 A $\beta$  导致线粒体功能紊乱的体内和体外研究. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(2): 154-160  
 Liu L L, Sheng B Y, Gong K, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(2): 154-160  
 [14] Luo Y F, Zhang J, Liu N Q, *et al.* Copper ions influence the toxicity of  $\beta$ -amyloid (1-42) in a concentration-dependent manner in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(6): 527-534  
 [15] Zhao B L. Natural antioxidants for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*, 2005, **31**(2): 283-293  
 [16] Stohs S J, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, 1995, **18**(3): 321-336  
 [17] Huang X, Atwood C S, Hartshorn M A, *et al.* The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*, 1999, **38**(13): 7609-7616  
 [18] Smith M A, Perry G, Richey P L, *et al.* Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 1996, **382**(2): 120-121  
 [19] Sayre L M, Zelasko D A, Harris P L, *et al.* 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 1997, **68**(11): 2092-2097  
 [20] Nunomura A, Perry G, Pappolla M A, *et al.* RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1999, **19**(10): 1959-1964  
 [21] Zeng H, Chen Q, Zhao B L. Genistein ameliorated  $\beta$ -amyloid



- peptide -induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Rad Biol Med*, 2004, **36**(2): 180-188
- [22] Wan L, Nie G J, Zhang J, *et al.*  $\beta$ -amyloid peptide increases levels of iron content and oxidative stress in human cell and *C. elegans* models of Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, **50**(2): 122-129
- [23] Butterfield D A, Howard B, Yatin S, *et al.* Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sci*, 1999, **65**(10): 1883-1892
- [24] Bains J S, Shaw C A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev*, 1997, **2**(3): 335-358
- [25] Bush A I. Metals and neuroscience. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, **4**(2): 184-191
- [26] Sayre L M, Perry G, Harris P L R, *et al.* *In situ* oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem*, 2000, **74**(2): 270-279
- [27] Lovell M A, Robertson J D, Teesdale W J, *et al.* Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci*, 1998, **158**(31): 47-52
- [28] Zhang J, Mori A, Zhao B L. Fermented papaya preparation attenuates APP: A $\beta$  mediated copper neurotoxicity in APP and APPsw overexpressing SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 2006, **143**(1): 63-72
- [29] Spiers T L, Meyer-Luehmann M, Stern E A, *et al.* Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci*, 2005, **25**(12): 7278-7287
- [30] Naumann N, Alpar A, Ueberham U, *et al.* Transgenic expression of human wild-type amyloid precursor protein decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus*, 2010, **20**(6): 971-979
- [31] Simon A M, Schiapparelli L, Salazar-Colocho P, *et al.* Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to A $\beta$  levels. *Neurobiol Dis*, 2009, **33**(3): 369-378
- [32] Wan L, Nie G, Zhang J, *et al.* Overexpression of human wild-type amyloid- protein precursor decreases the iron content and increases the oxidative stress of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Alzheimer's Disease*, 2012, **30**(4): 523-530
- [33] Tenenbaum A, Malkiel S, Wexler I D, *et al.* Anemia in Children with Down Syndrome. *International J Pediatrics*, 2011: Article ID 813541
- [34] Devi L, Prabhu B M, Galati D F, *et al.* Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain: is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*, 2006, **26**(35): 9057-9068
- [35] Duce J A, Tsatsanis A, Cater M A, *et al.* Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, 2010, **142**(8): 857-867
- [36] Dixon N E, Crissman B G, Smith P B, *et al.* Prevalence of iron deficiency in children with down syndrome. *J Pediatrics*, 2010, **157**(9): 967-971
- [37] Rogers J T, Randall J D, Cahill C M, *et al.* An iron-responsive element type in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J Biol Chem*, 2002, **277**(13): 45518-45528
- [38] Cho H H, Cahill C M, Vanderburg C R, *et al.* Selective translational control of the Alzheimer amyloid precursor protein transcript by iron regulatory protein-1. *J Biol Chem*, 2010, **285** (15): 31217-31232
- [39] Atamna H, Killilea D W, Killilea A N, *et al.* Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(12): 14807-14812
- [40] Shah R C, Buchman A S, Wilson R S, *et al.* Hemoglobin level in older persons and incident Alzheimer disease. *Neurology*, 2011, **77**(2): 219-226
- [41] Liu Q, Zhao B-L. Nicotine attenuates  $\beta$ -amyloid peptide induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Brit J Pharmacol*, 2004, **141**: 746-754
- [42] Zhang J, Liu Q, Liu N Q, *et al.* Nicotine reduces  $\beta$ -amyloidosis by regulating metal homeostasis. *FASEB J*, 2006, **20**(10): 1212-1214
- [43] Liu Q, Zhang J, Qin C, *et al.* Dissecting the signalling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model. *FASEB J*, 2007, **21**(1): 61-73
- [44] Zhao B L. The prevention mechanisms of nicotine against Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Acta Biophys Sinica*, 2007, **23**: 81-92
- [45] Zhao B L. Smoking, free radicals and health. *Acta Biophys Sinica*, 2007, **28**: 332-340
- [46] Pu Y M, Wang Q, Qian Z M. Effect of iron and lipid peroxidation on development of cerebellar granule cells *in vitro*. *Neuroscience*, 1999, **89**(3): 855-861
- [47] Mandel S, Amit T, Bar-Am O, *et al.* Iron dysregulation in Alzheimer's disease: Multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents. *Prog Neurobiol*, 2007, **82**(6): 348-360
- [48] Lovell M A, Robertson J D, Teesdale W J, *et al.* Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci*, 1998, **158**(1): 47-52
- [49] Smith M A, Rottkamp C A, Nunomura A, *et al.* Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1502** (2): 139-144
- [50] Barnham K J, Masters C L, Bush A I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**(2): 205-214
- [51] Nunomura A, Perry G, Pappolla M A, *et al.* RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 1999, **19**: 1959-1964
- [52] I Bannon D, Portnoy M E, Olivi L, *et al.* Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **295**(4): 978-984

- [53] Hill J M. The distribution of iron in the brain. In: Youdiu MBH ed. Brain iron: neurochemical and behavioral aspects. London, New York and Philadelphia: Taylor and Francis, 1988
- [54] Beard J L, Connor J R, Jones B C. Iron in the brain. *Nutr Rev*, 1993, **51**: 157-170
- [55] Zheng W, Xin N, Chi Z H, *et al.* Divalent metal transporter 1 is involved in amyloid precursor protein processing and A generation. *FASEB J*, 2009, **23**(13): 4207-4217
- [56] Wu Z F, Zhang J, Zhao B L. Superoxide anion regulates the mitochondrial free Ca<sup>2+</sup> through uncoupling proteins. *Antioxid Redox Signal*, 2009, **11**(12): 1805-1818
- [57] Luo Y, Zhang J, Liu N, *et al.* Copper ions influence the toxicity of beta-amyloid (1-42) in a concentration-dependent manner in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Sci China Life Sci*, 2011, **54**(5): 527-534
- [58] Reif D W, Simmons R D. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys*, 1990, **283**(5): 537-541
- [59] Li Y, Pan W, Song T. Magnetite mechanisms in Alzheimer's disease. *Acta Biophysica Sinica*, 2011, **27**(2): 121-126
- [60] Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, *et al.* Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain*, 2006, **129**(15): 2966-2976
- [61] Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, *et al.* APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Genet*, 2006, **38**(1): 24-26
- [62] Saganich M J, Schroeder B E, Galvan V, *et al.* Deficits in synaptic transmission and learning in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice require C-terminal cleavage of APP. *J Neurosci*, 2006, **26**(13): 13428-13436

## Metal Metabolic Homeostasis Disruption and Early Initiation of Mechanism for Alzheimer's Disease\*

ZHAO Bao-Lu\*\*, WAN Li

(State Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Many studies have shown there is a close relationship between metal homeostasis disruption and Alzheimer's disease (AD), but the mechanism needs to be discussed. Recent progresses about these studies are reviewed especially the results in author's laboratory are discussed. Iron and copper homeostasis disruption, oxidative stress,  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ), amyloid precursor protein (APP), iron regulatory protein (IRP) and divalent metal transporter 1 (DMT1) are discussed in detail. We suggested that the overload of iron and copper might have closer relationship with the oxidative stress damage in the later phase in AD and the deficiency of iron and copper might have closer relationship with the early initiation of AD. The protective effects of natural antioxidant against AD through regulating iron and copper homeostasis disruption and oxidative stress are also discussed. This review may be useful for further research and prevention and therapy of AD.

**Key words** Alzheimer's disease (AD), metal iron homeostasis disruption, oxidative stress,  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ), amyloid precursor protein (APP), iron regulatory protein (IRP), divalent metal transporter 1 (DMT1), natural antioxidants

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00297

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30930036, 30870587).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888569, E-mail: zhaobl@sun5.ibp.ac.cn

Received: June 14, 2012 Accepted: June 29, 2012