

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/00

A61K 49/00 C12N 9/00

G01N 33/48 G01N 33/53

G01N 33/537



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02807832.2

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1549721A

[22] 申请日 2002.2.27 [21] 申请号 02807832.2

[30] 优先权

[32] 2001. 2. 27 [33] US [31] 60/271,416

[32] 2001. 10. 17 [33] US [31] 60/329,505

[86] 国际申请 PCT/US2002/005672 2002. 2. 27

[87] 国际公布 WO2002/067764 英 2002. 9. 6

[85] 进入国家阶段日期 2003. 10. 8

[71] 申请人 布朗歇特洛克菲勒神经科学研究所

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 丹尼尔·L·阿尔孔 W·Q·赵

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 周承泽

权利要求书 8 页 说明书 29 页 附图 8 页

[54] 发明名称 基于促分裂原活化的蛋白激酶的磷酸化诊断阿尔茨海默氏病

[57] 摘要

根据用一种激活剂刺激后，患者细胞内的一种指标蛋白的磷酸化水平出现比基础磷酸化水平异常增高的现象，来诊断阿尔茨海默氏病的一种方法。该种指标蛋白是，例如，Erk1/2，激活剂是，例如，缓激肽。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种在受试者中诊断阿尔茨海默氏病的方法，所述方法包括：

(a) 对该受试者测定其细胞内一种指标蛋白磷酸化的基础水平；

5 (b) 使受试者的细胞与一种激活剂接触，所述激活剂和指标蛋白的挑选依据是，该受试者细胞中指标蛋白被活化的磷酸化过程，与取自无阿尔茨海默氏病的对照受试者细胞中被活化的磷酸化过程相比较，用激活剂处理时，在开始处理后的一段预定时间内，激活剂对该两者可引起不同的反应；

(c) 接触开始后，在所述受试者细胞中测定指标蛋白的被激活的磷酸化水平；

10 并

(d) 计算在步骤(c)中测定的被激活的磷酸化水平与步骤(a)的基础磷酸化水平的比率；并

(e) 将步骤(d)中计算的比值与过去确定的，在所述预定时间内，从已知阿尔茨海默氏病细胞与从非阿尔茨海默氏病细胞测定的被活化的磷酸化过程的比率相比较；

15 其特征在于，如果该计算的比值与过去对所述的已知阿尔茨海默氏病细胞所确定的比值没有统计学差异，诊断就是阳性，和/或，如果该计算的比值与过去对所述的非阿尔茨海默氏病细胞所确定的比值没有统计学差异，则诊断就是阴性。

2. 一种在受试者中诊断阿尔茨海默氏病的方法，所述方法包括：

20 (a) 在受试者细胞中，测定其中发送钙信号径路的指标蛋白的背景磷酸化水平，其磷酸化与该细胞内 IP-3R-敏感性  $Ca^{2+}$  升高相关；

(b) 采用一种对于阿尔茨海默氏病受试者和对照的非阿尔茨海默氏病受试者的细胞中指标蛋白的磷酸化水平可引起不同反应的激活剂 IP3R，对该受试者的细胞进行刺激处理；

25 (c) 然后，测定被处理的细胞中指标蛋白的反应磷酸化水平；并

(d) 对该指标蛋白所反应的磷酸化水平与背景水平相比较，确定其是否与已知的取自阿尔茨海默氏病受试者的细胞和健康的对照细胞所反应的水平相匹配。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述方法包括首先测定细胞培养物中的指标蛋白的基础磷酸化水平，然后在该培养物中添加激活剂 IP3R，再测定其

30 反应磷酸化水平。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述方法包括测定第一份细胞培养物的基础水平，再对同等份量的细胞培养物进行刺激处理，并测定其中的反应水平。

5. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述测定包括免疫测定。

6. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述测定包括对分裂的细胞进行免疫测定。

7. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述激活剂 IP3-R 选自缓激肽、铃蟾肽、缩胆囊肽、凝血酶、前列腺素 F<sub>2α</sub> 以及后叶加压素。

8. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述细胞选自成纤维细胞、颊黏膜细胞、神经元和血液细胞。

9. 在受试者中诊断阿尔茨海默氏病的方法，所述方法包括：

(a) 从所述受试者取得细胞；

10 (b) 对所述细胞中的指标蛋白测定基础磷酸化水平；

(c) 使所述细胞与一种对指标蛋白的磷酸化激活剂接触；

(d) 在接触处理开始后的预定时间内，测定所述细胞中指标蛋白的磷酸化水平；  
并

(e) 计算在步骤(d)中测定的水平与在步骤(b)中测定的水平的比值，作为第一  
15 项比值，将该所述的第一项比值，与过去确定的，从已知的阿尔茨海默氏病细胞在  
所述的预定时间所得到的所述水平的第二项比值，以及从已知的非阿尔茨海默氏病  
细胞在所述的预定时间所得到的所述水平的第三项比值进行比较；

其特征在于，(i) 如果步骤(e)的第一项比值与过去确定的第二项比值在统计学  
上无差异，诊断就是阳性，以及(ii) 如果步骤(e)第一项比值与过去确定的第三项  
20 比值在统计学上无差异，则诊断就是阴性。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，在步骤(d)所述的预定时间是步骤  
(c)中的第二项比值和第三项比值之间的差异达到最大时的时间。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述激活剂是选自缓激肽、铃蟾  
肽、缩胆囊肽、凝血酶、前列腺素 F<sub>2α</sub> 以及后叶加压素。

25 12. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述测定通过免疫测定进行，且  
其中所述受试者细胞是采用对磷酸化的指标蛋白具有特异性的抗体进行处理，使该  
抗体与该指标蛋白相结合，并检测与指标蛋白相结合的抗体。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述免疫测定法是放射免疫测定  
法、蛋白质印迹测定法、免疫荧光测定法、酶免疫测定法、免疫沉降测定法、化学  
30 发光测定法、免疫组织化学测定法、斑点印迹测定法或狭线印迹测定法等。

14. 在受试者中诊断阿尔茨海默氏病的方法，所述方法包括：

(a) 将所述受试者的细胞与用一种稀释剂配制的物质一起培育，其中，所述物

质可刺激一种指标蛋白的钙信号通道介导的磷酸化，从而产生激发型细胞；

(b) 事先，与步骤(a)同时或之后，用所述受试者的同型细胞与对照的物质或所述的稀释剂进行培育，从而产生非激发型对照细胞；

(c) 将激发型细胞中的指标蛋白的磷酸化水平与非激发型细胞中的指标蛋白的磷酸化水平进行比较；

其特征在于，与指征阿尔茨海默氏病的非激发型细胞相比较，激发型细胞中指标蛋白的磷酸化水平是增高的；

15. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述比较步骤(c)包括以下步骤：

(i) 将取自所述的激发型细胞和/或非激发型细胞的蛋白质样本，与可识别磷酸化的指标蛋白的抗体一起培育；并

(ii) 检测所述的抗体与所述的指标蛋白的结合状况。

16. 如权利要求 15 所述的方法，所述方法还包括将取自所述的激发型细胞和/或非激发型细胞的蛋白质样本，用可识别非磷酸化型的所述指标蛋白的抗体进行处理；并检测所述的抗体与非磷酸化的指标蛋白的结合状况。

17. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述比较步骤还包括，从所述激发型细胞和所述非激发型细胞取得蛋白质样本的步骤。

18. 在受试者中诊断阿尔茨海默氏病的方法，所述方法包括：

用一种可通过 1, 4, 5-三磷酸肌醇(IP3)受体激发细胞内的钙分释放的物质处理所述受试者的细胞，

在处理步骤之后的一个或若干时间点，测定所述受试者的细胞内 MAPK 蛋白质的磷酸化作用，并

对在一个或若干时间点的该所述受试者的细胞内的 MAPK 蛋白质的磷酸化作用，与用所述物质处理对照细胞之后，在相同的时间点对取自非阿尔茨海默氏病的受试者的对照细胞中的磷酸化作用进行比较，

其特征在于，所述受试者的细胞中 MAPK 蛋白质的磷酸化作用的增长，高于对照组细胞时，就可诊断为阿尔茨海默氏病。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述物质是缓激肽或缓激肽受体激活剂。

20. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述物质是铃蟾肽。

21. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述物质是可诱导 IP3-介导  $Ca^{2+}$  释放的激活剂。

22. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述 MAPK 蛋白质是 Erk1/2。

23. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述磷酸化作用是在处理步骤之后一个时间点进行测定的。

24. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述测定包括, 在处理步骤之后的第一时间点, 对所述受试者的细胞的第一份材料中的磷酸化作用进行测定, 以及  
5 对在处理步骤之后的第二时间点, 对所述受试者的细胞的第二份材料中的磷酸化作用进行测定。

25. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述时间点选自 0.5 分钟、1 分钟、2 分钟、2.5 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟和 30 分钟。

26. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞取自外周组织。

10 27. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞是皮肤成纤维细胞。

28. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述测定步骤包括检测所述受试者细胞的溶解产物中的磷酸化作用。

29. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述测定步骤在体外进行。

30. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述测定步骤包括凝胶电泳。

15 31. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述测定步骤包括蛋白质印迹。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 所述蛋白质印迹法包括使用一种抗-磷-MAP 激酶抗体。

33. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述磷酸化作用的生长是在单一时间点上磷酸化的蛋白质量增加的表现。

20 34. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述磷酸化作用的生长是磷酸化的蛋白质滞留时间增加的反映。

35. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 所述受试者缺乏阿尔茨海默氏病的临床表现。

25 36. 如权利要求 18 所述的方法, 它还包括, 用选自蛋白激酶 C 活性抑制剂、PI-3 激酶活性抑制剂、C-src 蛋白质酪氨酸激酶活性抑制剂、IP-3 受体抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂的一种或多种抑制剂处理所述受试者的细胞。

37. 如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于, 用选自蛋白激酶 C 活性抑制剂、C-src 蛋白质酪氨酸激酶活性抑制剂、PI-3 激酶活性抑制剂和 IP-3 受体抑制剂的一种抑制剂处理所述受试者细胞就可抑制磷酸化作用的生长。

30 38. 如权利要求 37 所述的方法, 其特征在于, 所述抑制剂选自 BiSM-1、PP1 以及 2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯。

39. 供鉴定用于治疗或预防阿尔茨海默氏病的一种化合物的各种物质的筛选方

法, 所述方法包括:

用一种筛选出来的物质处理取自阿尔茨海默氏病(AD)受试者的实验细胞,

在处理步骤之前、同时或之后, 用一种可通过 1, 4, 5-三磷酸肌醇(IP3)受体激发细胞内的钙释放的物质刺激该实验细胞,

5 在对该实验细胞施行刺激之后, 在一个或若干时间点测定在该实验细胞中 MAPK 蛋白质的磷酸化作用,

对在一个或若干时间点测定的该实验细胞中 MAPK 蛋白质的磷酸化作用, 与未用该化合物施行处理的阿尔茨海默氏病(AD)受试者提供的对照细胞在同样的一个或若干时间点的磷酸化作用相比较, 并

10 接受可抑制或预防磷酸化过程增长的一种化合物作为引导物质, 和排斥不能抑制或预防磷酸化过程增长的一种化合物。

40. 如权利要求 38 所述的方法, 其特征在于, 所述物质是缓激肽或缓激肽受体激活剂。

41. 如权利要求 38 所述的方法, 其特征在于, 所述 MAPK 蛋白质是 Erk1/2。

15 42. 如权利要求 38 所述的方法, 它还包括在处理步骤之后, 在单一的时间点测定磷酸化过程的程度。

43. 如权利要求 38 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞是皮肤成纤维细胞。

44. 如权利要求 38 所述的方法, 其特征在于, 所述测定步骤包括检测所述受试者细胞溶解产物中的磷酸化作用。

20 45. 在刺激反应试验中用作激活剂的各种化合物的筛选方法, 所述方法包括:

测定一种化合物对阿尔茨海默氏病细胞和对照细胞中的指标蛋白的磷酸化过程的作用, 并选择在阿尔茨海默氏病细胞的指标蛋白中可增进其磷酸化过程超过对照细胞的一种化合物。

25 46. 一种供阿尔茨海默氏病用的诊断测试试剂盒, 所述试剂盒包含抗-磷-MAPK 蛋白质抗体和缓激肽。

47. 为阿尔茨海默氏病患者选择药物治疗的方法, 所述方法包括:

选择一种可能适用的治疗用化合物,

对患者施用该种可能适用的治疗用化合物,

30 然后, 用可刺激患者细胞中的指标蛋白的磷酸化过程的一种化合物, 对该种细胞进行活化处理, 并检测其中的磷酸化水平是否存在异常增长的现象。如果其磷酸化水平出现增长现象, 就表明该种可能的治疗用化合物对于该患者无效, 如果其水平并无增长现象, 则该种可能的治疗用化合物对该患者确实具有治疗效果。

48. 如权利要求 47 所述的方法，它还包括，对受试者施用已知对患者具有治疗效果的一种化合物，进行阿尔茨海默氏病的治疗或预防。

49. 在受试者中治疗或预防阿尔茨海默氏病的方法，所述方法包括施用一种有效量的药物，这种药物能够

5 (a) 抑制或预防受试者细胞中的 MAPK 蛋白质的磷酸化过程，比对照细胞异常增高；和/或

(b) 抑制由于所述的 MAPK 蛋白质的磷酸化过程异常增高所引起的各种后果。

50. 如权利要求 49 所述的一种方法，其特征在于，所述药物可抑制 Erk1/2 的磷酸化过程。

10 51. 如权利要求 49 所述的一种方法，其特征在于，所述药物是蛋白激酶 C 活性、src 蛋白质酪氨酸激酶活性或 IP-3 受体的抑制剂。

52. 如权利要求 37 所述的一种方法，其特征在于，所述抑制剂选自 BiSM-1、PP1 和 2ABP。

53. 在受试者中诊断阿尔茨海默氏病的方法，所述方法包括：

15 (a) 用一种可激发磷酸化过程的有效浓度的缓激肽，对取自所述受试者以及非阿尔茨海默氏病受试者的皮肤成纤维细胞进行处理，

(b) 在蛋白质印迹测定法中，用对磷-Erk1/2 的特异性抗体，选定在 2 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟和 30 分钟等一个或若干时间点，测定在所述该受试者细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量；

20 (c) 在蛋白质印迹测定法中，使用对磷-Erk1/2 的特异性抗体，选定如(b)款同样的一个或若干时间点，测定在取自非阿尔茨海默氏病的对照受试者细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量；

其特征在于，在上述步骤(b)和(c)中测得的磷酸化的 Erk1/3 的数量，与所述的细胞中蛋白质的数量同样都在正常范围；

25 (d) 将在所述时间点的所述该受试者细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量，与对照受试者的细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量进行比较；

其特征在于，如果在一个或若干所述时间点时所述该受试者细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量比对照细胞有增长，就可诊断为阿尔茨海默氏病。

30 54. 如权利要求 53 所述的方法，它还包括使用一种或多种抑制剂处理所述受试者细胞，所述抑制剂选自：

(a) 蛋白激酶 C 活性抑制剂 BiSM-1，

(b) C-src 蛋白质酪氨酸激酶活性抑制剂 PP1，和

(c) IP-3 受体抑制剂 2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯;

其特征在于, 由缓激肽诱导的所述该受试者细胞中磷酸化的 Erk1/2 数量超过对照细胞的生长现象, 可被所述的抑制剂减少。

55. 在受试者中诊断阿尔茨海默氏病存在情况的方法, 所述方法包括以下步骤:

5 a) 采用可使指标蛋白中的磷酸化过程增长的一种激活剂, 对取自所述受试者细胞进行刺激处理, 并

b) 将受刺激的细胞中的未磷酸化的指标蛋白水平和磷酸化蛋白质的水平, 与所述受试者同型的未受刺激的细胞中未磷酸化的指标蛋白水平和磷酸化的蛋白质水平进行比较,

10 其特征在于, 受刺激的细胞中磷酸化的指标蛋白的相对水平与未受刺激的细胞相比有所增长时, 就表明存在着阿尔茨海默氏病。

56. 筛选化合物以鉴别用于治疗或预防阿尔茨海默氏病的化合物的方法, 所述方法包括:

15 (a) 用筛选出的一种化合物对取自阿尔茨海默氏病 (AD) 受试者的实验皮肤成纤维细胞进行处理;

(b) 用所述的化合物的一种对照物质, 对所述受试者的对照皮肤成纤维细胞进行处理; 或将所述的对照成纤维细胞, 放在不含或(含有)所述化合物或所述对照物质中一起培育;

20 (c) 采用一种对磷-Erk1/2 的特异性抗体在蛋白质印迹测定法中, 选定在 2 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟和 30 分钟等一个或若干时间点, 测定在实验或对照的成纤维细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量;

(d) 在蛋白质印迹测定法中, 使用对磷-Erk1/2 的特异性抗体, 选定如 (b) 款同样的一个或若干时间点, 测定在取自非阿尔茨海默氏病的对照受试者的细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量; 其特征在于, 磷酸化的 Erk1/3 的数量, 与所述实验和对照的成纤维细胞中蛋白质的数量都是标准化的;

25 (e) 将实验的成纤维细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量, 与对照的成纤维细胞中磷酸化的 Erk1/2 的数量进行比较, 以确定该所述化合物是否可抑制或预防缓激肽诱导的实验细胞中磷酸化过程(比对照细胞)的增长;

30 其特征在于, 对于增长的磷酸化过程具有抑制或预防作用的一种化合物, 就可判定为对阿尔茨海默氏病具有治疗或预防作用。

57. 减少人类细胞中淀粉样前体蛋白的蛋白酶解、淀粉样蛋白质  $\beta$  的分泌和/或 tau 蛋白磷酸化过程的方法, 该所述的细胞与对照的受试者细胞相比较, 可使

---

MAPK 蛋白质的 IP3 受体介导的磷酸化过程增长，所述方法包括，用一种可有效地使磷酸化过程减少到对照细胞水平的 MAPK 磷酸化过程抑制剂处理所述细胞。

## 基于促分裂原活化的蛋白激酶的磷酸化诊断阿尔茨海默氏病

### 发明背景

本发明提出一种对阿尔茨海默氏病(“AD”)的诊断和筛选的试验方法。该试验方法的一个实施例是,用如缓激肽之类的激活剂或可刺激1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)受体之类的其他一些激活剂,对取自阿尔茨海默氏病的皮肤成纤维细胞进行刺激处理,然后检测该细胞中的1或2型细胞外信号调制激酶(“Erk1/2”)的异常增强的磷酸化过程,并与取自同年龄受试者的细胞进行比较。可采用对于磷酸化的蛋白质有特异性的抗体的蛋白质印迹测定法,或其他一些方法,测定这种增强的磷酸化过程。

据积累的证据表明,在阿尔茨海默氏病的早期发病过程中,就表现出细胞内钙成分的自体平衡过程紊乱,以及氧化作用性应激反应水平提高而使AD大脑内发生有刺激性的毒性和神经原死亡(Putney, 2000; Yoo 等, 2000; Sheehan 等, 1997)。已有一些研究报道指出,在AD大脑中细胞内Ca<sup>2+</sup>水平升高,以及在外周细胞中对于缓激肽受体的活化作用的反应,和K<sup>+</sup>通道的钝化作用(Ito 等, 1994; Etcheberrigaray 等, 1994; Hirashima 等, 1996; Gibson 等, 1996; Etcheberrigaray 等, 1998)。在与阿尔茨海默氏病的发病过程相关的,如淀粉样前体蛋白(APP)、早衰蛋白1和早衰蛋白2等这类关键性蛋白质的突变作用,据报道可诱发IP3受体(IP3R)和ryanodine受体(RYR-)介导的细胞内Ca<sup>2+</sup>自体平衡失调(Yoo 等, 2000; Leissring 等, 1999; 2000; Mattson 等, 2000; Barrow 等, 2000)。Jurenwei ju 据认为,细胞溶质的Ca<sup>2+</sup>浓度的改变,是阿尔茨海默氏病的一种病理生理过程,其中还包括,与病斑形成相关的神经毒性42氨基酸β-淀粉样肽(APβ)的产生,涉及神经原纤维紊乱状态形成的tau蛋白高磷酸化现象,以及加强对神经原的全面攻击以至细胞死亡。

缓激肽(BK)是一种强力血管活性的9元肽类,可在各种炎症过程中生成。这种缓激肽可与特异性细胞膜BK受体相结合,并使之活化,进而激发可导致蛋白质磷酸化过程的细胞内一系列串联性变化,以至被称为“促分裂原活化的蛋白激酶”(MAPK; 见后述)。蛋白质的磷酸化过程,就是在其中的Ser、Thr、或Tyr等残基基团上,发生磷酸酯的加成反应的过程。这一过程是由一大类各种酶类介导进行的,这些酶类统称为激酶类。磷酸化过程可改变蛋白质的各种功能,通常都是活

化作用。自体内环境平衡过程所要求的磷酸化作用是一种一过性过程，这是可通过磷酸酶类对基质的脱磷酸化作用的一种可逆性过程。在磷酸化过程或脱磷酸化过程中的任何反常现象，都可能对于各种生物化学途径以及多种细胞功能产生破坏作用。这类破坏作用很可能就是大脑的某些疾病的基础。

细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  含量在对缓激肽反应时的增长现象，至少是由一种 G-蛋白质结合的受体“2型”缓激肽受体(BKb2R)介导的。缓激肽对这种“2型”缓激肽受体的刺激作用可活化磷脂酶 C(PKC) 而促使产生二酰基甘油(DAG)和 1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)这两种二级信使，参与调节细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的水平，以及活化蛋白激酶 C(PKC)。这种 PLC/磷脂质/PKC 通路还可与能够激活 MAPK 通路的 Ras 传递信号通路相互作用。MAPK(或称 MAP 激酶)是指一类被称为“丝裂元活化的蛋白激酶”的酶类家族，其中的一个重要成员就是 1 或 2 型“细胞外发信号调节激酶”(“Erk1/2”) (Berridge, 1984; Bassa 等, 1999)。这种 Erk1/2 可接受来自多种信号传输通路的信号，并且是可通过一系列转录因素(包括环式一磷酸腺苷(c-AMP)-反应的要素相结合的蛋白质(CREB))对基因表达的调节作用而导致细胞增殖和分化的通路的一个部分。

对于 tau 蛋白，在多元的 Ser/Thr 部位，包括在 tau 的各个微管结合区的 Ser262 和 Ser356 部位，Erk1/2 可使其磷酸化(Reynolds 等, 2000)。Ser262 的磷酸化过程可严重影响 tau 使微管聚集和稳定的能力(Biernat 等, 1993; Lu 等, 1993)。凡是氧化作用性应激反应增高、淀粉样前体蛋白(APP)表达异常以及暴露于  $\text{A}\beta$ ，都可引起 MAPK 活化(McDonald 等, 1998; Ekinici 和 Shea, 1999; Grant 等, 1999)，并加强 tau 的磷酸化过程(Greenberg 等, 1999)。

Young LT 等(*神经科学通信*, 94: 198-202)对 10 例阿尔茨海默氏病受试者以及 10 例同等年龄的对照受试者的尸检大脑，研究了 IP3 受体的结合部位。发现在其顶骨皮质层和海马部 [ $^3\text{H}$ ]-IP3 的结合损失达 50 - 70%，而在前额部、后枕部以及颞侧部的皮质层、尾状核或扁桃体部，则并无显著的变化。据采用斯卡查德氏分析方法验证，其中受体密度减少胜过了亲和力的变化。同时，有许多神经递质、激素以及生长因子作用于细胞膜，刺激磷酸二酯酶促使 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)水解，而生成辅助信使 IP3 以及二酰基甘油(DAG)。在 DAG 刺激 KAC 时，在一开始 IP3 就可能活化特异性受体而(可能从内质网)导致细胞内钙的释放。

尽管早期的报道曾检测到， $^{32}\text{P}$ -IP3 可与肝脏和肾脏的微粒体，以及具有穿行能力的嗜中性细胞和肝细胞相结合，首先对 IP3 受体进行定位、分离、分析、然后制成纯系的是 Solomon Sneyder 研究组。Worley PF(*自然* 1987; 325: 159-161)

证实了关于  $^3\text{H}$ -和  $^{32}\text{P}$ -IP3 在大脑内的高度亲和性选择性结合部位的含量，要高于在其他各处外周组织所见的情况 100 -300 倍之钜。据认为，这类受体都与生理学过程有关，因为在 IP3 结合部位的各种肌醇同系物类的作用能力，与其从微粒体释放钙分的作用能力相当。大脑的自体显影图象显示，IP3 受体都离散分布于不同部位。该小组在 1988 年 (Supattapone S 等, *生物学和化学杂志* 1988, 263: 1530-1534) 报道了，对于取自大鼠小脑部的一种 IP3 受体的溶解性，同质性提纯处理，以及特性鉴定等技术。该种提纯的受体是一种球形的蛋白质，其在电泳过程移动形成一条蛋白质带，其 Mr 为 260 kDa。在一篇评论中，Snyder 等 (*细胞钙分*, 1989, 10: 337-342) 指出，据对该提纯的受体蛋白质采用抗血清进行免疫组织化学研究，确定了其存在部位，是在突触区域的粗糙内质网部位，并与细胞核膜密切相关。该 IP3 受体蛋白质可由 cAMP-依赖性蛋白激酶有选择地进行磷酸化作用。这种磷酸化过程可使 IP3 从大脑细胞膜释放钙分的能力削减 10 倍之多。Ferris CD 等 (*美国国家科学院学报* 1991, 88: 2232-2235) 后来研究了用提纯的受体蛋白质在脂质体中重组 (借以除去可能抑制蛋白激酶的洗涤剂成分) 的 IP3 受体的磷酸化过程。对 IP3 受体以化学计量法采用蛋白激酶 C (PKC) CaM 激酶 II, 以及蛋白激酶 A (PKA), 进行磷酸化处理。该三种酶类可加成并参与不同的肽序列而催化磷酸化过程，而对各种 IP3 受体进行调节。由 (1) 被  $\text{Ca}^{2+}$  和 DAG 刺激的 PKC, 以及由 (2) 要求  $\text{Ca}^{2+}$  的 CaM 激酶 II 所引起的磷酸化过程, 可为通过肌醇磷脂质转化过程形成的  $\text{Ca}^{2+}$  和 DAG 对各种受体的调节提供了手段。Chadwick CC 等 (*美国国家科学院学报* 1990, 87: 2132-2136) 论述了从平滑肌分离的 IP3 受体, 是一种 Mr 为 224kDa 的单一多肽的低聚体。Furuichi T 等 (*FEBS 通信* 1990, 267: 85-88) 对在小鼠体各部组织中的 IP3 受体的 mRNA 的分布状况进行了检验。其浓度在小脑组织中为最大。IP3 受体的 mRNA 在脑部的其他组织、胸腺、心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏以及子宫等部位内的分布量在中等程度。在骨骼肌以及睾丸组织中, 检测的 IP3 受体的 mRNA 是少量。据原位杂交法测定, 有相当量的 IP3 受体的 mRNA 分布于平滑肌细胞内, 例如: 动脉、支气管、输卵管和子宫等部位。据 Ferris CD 等 (*生物学和化学杂志* 1992, 27: 7036-7041) 查明了提纯的和重组的 IP3 受体具有丝氨酸自发性磷酸化现象, 并发现 IP3 受体的丝氨酸蛋白激酶对于特异性肽基质的活性作用。该组研究人员认为, IP3 受体蛋白质与磷酸化活性作用是处一同一种物质内。Ross CA 等 (*美国国立科学研究所* 1992, 89: 4265-4269) 已经从小鼠胎盘 cDNA 库中克隆制备了三种 IP3R cDNA, 其命名为 IP3R-II、-III 和 -IV。在细胞膜 M7 和 M8 所及范围内, 所有该三种成分都显示出与从小脑制备的原始的 IP3R-1 具有强烈的同族关系, 只是

主要在细胞质区域方面具有差异。该三种额外的 IP3R 的 mRNA 水平，一般都大大低于 IP3R-1。只是在胃肠道方面，其水平才相当。在小脑的普肯野细胞系中，可 Y 有两种或可能三种不同的 IP3R 表达，提示了在单一的细胞内 IP3 作用的异质性。Sharp AH(*神经科学* 1993, 53: 927-42)曾采用各种免疫组织化学方法，详细检验了大鼠的脑和脊髓中各种 IP3 受体的分布状况。IP3 受体都广泛分布于整个中枢神经系各区域的各种神经原细胞、纤维和末梢部位。其中包括，嗅球、丘脑细胞核和脊髓背侧角，脑室周围各种器官和神经内分泌结构中，例如，postrema 区域、脉络膜神经丛、合缝处下器官、松果腺和垂体。由磷酸肌醇支持信使系统介导的  $Ca^{2+}$  的释放，对于控制多种多样的生理过程是一个重要条件。据 Snyder 研究小组对淋巴细胞(T 细胞)的 IP3 受体进行的研究，确定了这类受体在细胞浆膜上的部位。与信号转换过程相关的 T 细胞受体-CD3 复合物的髓盖，伴随着 IP3 的髓盖。在 T 细胞上的 IP3 受体，对于可启动增殖反应的  $Ca^{2+}$  的引入可能起着主导作用(Khan AA 等, *科学* 1992, 257: 815-818)。

关于 IP3 的更进一步的情况，据 Wilcox 等(*药物科学的发展趋向* 1998, 19: 467-475)指出，由受体介导的使 PLC 活化而产生 IP3 的过程，是在哺乳动物系统中的一种普遍性的信号发布通路。由三个 IP3 受体亚型单体家族可形成功能性的四聚体，并可具有 IP3 效应器的作用，从而提供一个配体-门控通道，而使  $Ca^{2+}$  离子可在各个细胞间隔之间移动。由于各种 IP3 受体虽然不是专一地但却是主要地处于内质网膜上，这类 IP3 据认为是可使  $Ca^{2+}$  从细胞内贮库中释放出来，而产生多种多样的生理性和病理生理性现象的一种支持性信使。Patel S 等(*细胞内钙分* 1999, 25: 247-264)已对各种 IP3 受体的分子特性进行了综述评论。对于 I 型 IP3 内部的若干  $Ca^{2+}$  的结合部位，以及  $Ca^{2+}$ -依赖性的钙调节蛋白的结合区域，都已经绘制了分布图。并且，据对提纯的小脑 IP3 受体进行的研究提示，还有第二个  $Ca^{2+}$ -不依赖性的钙调节蛋白的结合区域。IP3 受体的过度表达过程，还进一步对于有关在细胞内部存在的各个 IP3 受体的异构体的调节作用，以及其在 IP3-依赖性信号发生方面所起的作用提供了线索。IP3 受体可参与增殖和凋亡等各种细胞过程。Abdel-Latif AA(*实验生物医学* 2002, 3 月; 226(3): 153-63)对于来自血管性和非血管性平滑肌两个方面的有关各种环式核苷酸、cAMP 和 cGMP 通过其各自的蛋白激酶，对参与激活剂诱导其收缩作用的  $Ca^{2+}$ -依赖性-和  $Ca^{2+}$ -不依赖性-发送信号通路之间的相互干扰作用的证据，进行了综述评论。其中包括，IP3- $Ca^{2+}$ -CaM-肌浆球蛋白轻链激酶(MLCK)通路，以及包括 PKC、MAP 激酶和 Rho-激酶等各种  $Ca^{2+}$ -不依赖性通路。Mikoshiha K 等(*科学 STKE* 2000, 9 月, 26: 2000(51): P)对于 IP3

受体对细胞内贮库中释放钙分的调节作用，以及这种释放机制与通过贮藏运作的各种钙通道的细胞外环境的相互作用，进行了论述。他们展示了在功能和器质方面与细胞外和原浆膜相结合的钙通道的一种模型。

尽管有关阿尔茨海默氏病(AD)的严重脑部损伤以及记忆丧失，已经是普遍知晓的问题，但是在躯体的其他部位也可表现出各种病理变化，并且能够在细胞水平上进行检测。处于皮肤深层的皮肤成纤维细胞，就可显示出阿尔茨海默氏病性损害的细胞和分子水平的异常现象。皮肤成纤维细胞很容易获取和培养以供诊断之用(美国专利号 6,107,050,“阿尔茨海默氏病的诊断测试方法”，2000,8,22 发行，本发明已收列以供参考)。然而，对于阿尔茨海默氏病的诊断，仍然需要一些更为简便、经济、精确而可靠实用的各种方法。

例如，从美国专利号 6,107,050 (Alkon 等) 已知，已经能够测定可促使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的释放的一种激活剂的不同作用。健康型的与阿尔茨海默氏病型的细胞系都可表现钙分从库存内释放的现象，但是，阿尔茨海默氏病细胞系的释放量则要大得多。有关测定  $\text{Ca}^{2+}$  (i) 的释放状况的各种方法有，荧光指示剂法、吸光率指示剂法或  $\text{Ca}^{2+}$  “接线夹” 电极法，等，这类方法也可供诊断方面应用。不过，目前还是迫切需要可用于测定各种 IP3R 的激活剂，以供诊断、研究以及临床等方面应用的，更加有效的各种技术。

### 发明概述

本发明提供了可用于对患者诊断阿尔茨海默氏病的一种方法，其原理是，采用可激发患者细胞内的指标蛋白的磷酸化过程的一种物质，使其细胞活化后，检测其中磷酸化的指标蛋白水平有无异常增高现象，如果出现增高现象，就可作出阿尔茨海默氏病的阳性诊断。

这种诊断方法是，用一种激活剂物质对患者的细胞进行刺激处理后，在预定的时间内，测定该细胞中的指标蛋白的磷酸化水平，并与未进行刺激处理的基础磷酸化水平相比较。

本发明提供了用于对患者诊断阿尔茨海默氏病一种方法，该方法包括：  
(a) 对取自一个受试者的细胞测定其指标蛋白中的磷酸化的基础水平；  
(b) 对取自该受试者的细胞用一种激活剂处理。该激活剂和指标蛋白的选择依据是，对所述受试者的细胞，与非阿尔茨海默氏病的受试者的对照细胞相比较，在开始处理之后的预定时间内，激活剂引起该两者的指标蛋白激活的磷酸化反应是各不相同的；  
(c) 在处理开始后的预定时间内，对所述受试者细胞测定其指标蛋白被激活的磷酸

化水平；并(d)对步骤c)中测定的激活的磷酸化水平，与步骤(a)的基础磷酸化水平，计算其比值；以及(e)将步骤(d)所计算的比值，与以前确定的，在预定的时间对已知的阿尔茨海默氏病细胞以及已知的非阿尔茨海默氏病细胞测定的激活的磷酸化水平比值进行比较：其特征不在于，所计算的比值，与以前对所述的已知阿尔茨海默氏病细胞的比值之间，若是没有统计学差异，则其诊断结果就是阳性。和/或如果是，所计算的比值，与以前对所述的已知非阿尔茨海默氏病细胞的比值之间，没有统计学差异，则其诊断结果就应当是阴性。

本发明还提供了用于对患者诊断阿尔茨海默氏病一种方法，其中包括：对取自一个受试者的细胞，测定其指标钙信号发送通路蛋白质中的背景磷酸化水平，其磷酸化过程与细胞内的IP-3R-敏感性Ca<sup>2+</sup>的增高相关；对取自该受试者的细胞用一种IP3R激活剂进行刺激处理，对于阿尔茨海默氏病受试者的细胞的指标蛋白，与非阿尔茨海默氏病的对照细胞相比较，该激活剂对该两类细胞所引起的指标蛋白的磷酸化反应水平各不相同；因而，对于受处理的细胞进行其指标蛋白的磷酸化反应的测定，并确定指标蛋白的磷酸化反应水平，与背景水平相比较，是与已知的阿尔茨海默氏病受试者的反应水平相当，还是与健康对照细胞的反应水平相当。

其方法可包括，首先测定一种细胞培养物中的指标蛋白的背景磷酸化水平，然后，在培养物中添加一种IP3R激活剂，再测定其磷酸化反应水平。该方法还可以是，取第一份细胞，先测定其背景水平，再取同样一份细胞进行刺激处理，并测定其反应水平。

激活既可以是选自缓激肽、铃蟾肽、缩胆囊素、凝血素、前列腺素F $\alpha$ 和血管加压素等。

所述的细胞可选自成纤维细胞、颊黏膜细胞、神经元和血液细胞等。

本发明提出的对阿尔茨海默氏病受试者诊断的方法，的操作原理是，(a)从所述受试者取得细胞；(b)测定所述细胞中的指标蛋白的基础磷酸化水平；(c)用一种对指标蛋白的磷酸化过程的激活剂处理所述的细胞；(d)对所述的细胞在开始处理后的预定时间测定其指标蛋白中的磷酸化水平；并(e)计算步骤(d)中测定的水平与步骤(b)中测定的水平的第一项比值，并将所述的第一项比值，与以前确定的，从已知的阿尔茨海默氏病细胞在所述的预定时间所取得的所述水平的第二项比值，以及从已知的非阿尔茨海默氏病细胞在所述的预定时间取得的所述水平的第三项比值相比较；其特征不在于，(i)若是步骤(e)的第一项比值与以前确定的第二项比值并无统计学差异，其诊断结果就是阳性，而(ii)若是步骤(e)的第一项比值

与以前确定的第 s 三项比值没有统计学差异，其诊断结果就是阴性。步骤(d)的预定时间，可能是第二项比值与步骤(c)的第三项比值之间的差异达到最大时的时间。

在本发明的各种方法中，其测定方法可包括对破碎的细胞进行的一种免疫测定法，所述受试者的细胞可采用对磷酸化指标蛋白的一种特异性抗体进行处理，使该抗体与指标蛋白相结合，再检测与指标蛋白结合的抗体。免疫测定法可以是，放射免疫测定法、蛋白质印迹测定法、免疫荧光测定法、酶免疫测定法、免疫沉降测定法、化学发光测定法、免疫组织化学测定法、斑点印迹测定法、或者狭线印迹测定法。

本发明另外一种对受试者诊断阿尔茨海默氏病的方法，包括：

(a) 将取自所述受试者的细胞与用稀释剂配制的一种化合物一起培育。其特征在于，该化合物可刺激指标蛋白的钙信号发送通路介导的磷酸化过程，从而可产生受刺激的细胞；

(b) 在步骤(a)之前、同时、或之后，用对照化合物或所述的稀释剂，与该受试者的同型的细胞一起培育时，则可产生不受刺激的细胞；

(c) 对受刺激的细胞中磷酸化的指标蛋白的水平，与不受刺激的对照细胞中磷酸化的指标蛋白的水平进行比较，其特征在于，在受刺激的细胞中磷酸化的指标蛋白的水平比不受刺激的细胞增高时，就表明是阿尔茨海默氏病。

在进行比较的步骤(c)中，可包括如下几个步骤：(i)对取自所述的受刺激的细胞和/或所述的不受刺激的细胞的蛋白质样本，用一种可识别磷酸化的蛋白质的抗体进行处理；以及(ii)检测所述的抗体与所述的指标蛋白的结合状况。

该方法另外还可包括，对取自所述的受刺激的细胞和/或所述的不受刺激的细胞的蛋白质样本，用一种可识别非磷酸化型所述的蛋白质的抗体进行处理，使蛋白质水平标准化。该比较步骤还可包括，从所述的受刺激的细胞和/或所述的不受刺激的细胞取得蛋白质样本。

诊断一个受试者患有阿尔茨海默氏病的方法，可包括如下几个步骤：a) 采用可使指标蛋

白质的磷酸化过程增高的一种激活剂对取自所述受试者的细胞进行刺激处理，并 b) 对所述的受试者中同型的受刺激的细胞中的非磷酸化指标蛋白和磷酸化指标蛋白的水平，与不受刺激的细胞中的非磷酸化指标蛋白和磷酸化指标蛋白的水平进行比较，其特征在于，在受刺激的细胞中的磷酸化指标蛋白的相对水平比不受刺激的细胞增高时，就表明患有阿尔茨海默氏病。

本发明提出的对受试者的诊断方法，包括：采用可通过 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP<sub>3</sub>) 受体激发细胞内钙分释放的一种物质，对取自该受试者的细胞进行处理，在处理步骤之后一个或若干时间点，测定该受试者细胞中的 MAPK 蛋白质的磷酸化作用。将在一个或若干时间点该受试者的细胞中的 MAPK 蛋白质的磷酸化作用，与对非阿尔茨海默氏病对照受试者的对照细胞用该物质处理后的同样的时间点的磷酸化作用进行比较，其特征在于，在该受试者细胞中的 MAPK 蛋白质的磷酸化作用比对照细胞增高时，就可诊断为阿尔茨海默氏病。

在本发明的各种方法中，所采用的物质可以是缓激肽或缓激肽受体的激活剂、或铃蟾肽，也可能是可诱导 IP<sub>3</sub> 介导 Ca<sup>2+</sup> 释放的一种激活剂。

磷酸化作用可以在处理之后单一的时间点进行测定。按照本发明的要求，测定步骤可包括，在处理步骤之后的第一时间点，对该受试者细胞的第一份材料进行磷酸化作用的测定，以及在处理步骤之后的第二时间点，对该受试者细胞的第二份材料进行磷酸化作用的测定。对于各种细胞类型、激活剂和指标蛋白的一些组合物的时间点，可以是约 0.5 分钟或更短、0.5 分钟、1 分钟、2 分钟、2.5 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、45 分钟或 1 小时以至更长。

所述的细胞一般都是取自外周组织，例如，皮肤成纤维细胞。

本发明的各种方法中的测定步骤可任选包括，在体外检测受试者细胞的溶解产物中的磷酸化作用，还可包括采用抗-磷-MAPK 抗体和/或反-正规 MAPK 蛋白质抗体的凝胶电泳，蛋白质印迹法。

磷酸化作用的增长可以在单一的时间点磷酸化的蛋白质数量的提高，或者是磷酸化的蛋白质的持续时间的延长。

这些方法可有效地用于对缺乏临床表现的阿尔茨海默氏病受试者进行诊断。

根据本发明的要求，这类方法还包括，用选自如下各种物质的一种或多种抑制剂，对受试者的细胞进行处理：例如，蛋白激酶 C 活性抑制剂、PI-3 激酶活性抑制剂、C-src 蛋白质酪氨酸激酶活性抑制剂、IP-3 受体抑制剂以及蛋白磷酸酶抑制剂。另外，根据本发明特有的各种实施例，这类方法在利用抑制剂对受试者的细胞进行处理后，还表现出可将增长的磷酸化现象予以抑制的特性，这类抑制剂可选自蛋白激酶 C 活性、C-src 蛋白质酪氨酸激酶活性、PI-3 激酶活性以及 IP-3 受体等抑制剂。在这类方法中，所述的抑制剂还可选自 BiSM-1、PP1 以及 2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯等物质。

本发明还提出了可用于对各种化合物进行筛选，以鉴定对阿尔茨海默氏病的治疗和预防适用的物质的一种方法。

将筛选出来的化合物对取自阿尔茨海默氏病受试者的实验细胞进行处理；

在处理步骤之前、期间和之后，采用可通过 1, 4, 5-三磷酸肌醇(IP3)受体而激发细胞内钙分释放的一种物质，对实验细胞进行刺激处理；

在对实验细胞进行刺激处理之后的一个或若干时间点，测定其中的 MAPK 蛋白质的磷酸化作用；

对在一个或若干时间点对实验细胞中的 MAPK 蛋白质的磷酸化作用，与从未经受该种化合物处理的阿尔茨海默氏病受试者取得的对照细胞，在同样的一个或若干时间点的磷酸化作用进行比较。

本方法还包括，将可抑制或预防磷酸化水平增高的化合物，接受作为首选物质；而淘汰对增长的磷酸化水平没有抑制或预防作用的化合物。在本发明的所有各种方法中，这类物质是缓激肽或缓激肽受体的激活剂，而 MAPK 蛋白质是 Erk1/2。这类方法可包括，在处理步骤之后的单一时间点测定磷酸化作用。

另一项实施例提出了一种方法，可用于筛选各种化合物，以供在刺激反应测定法中作为激活剂使用。其中包括，测定该类化合物对于阿尔茨海默氏病细胞和对照细胞中的指标蛋白的磷酸化过程的作用，从中筛选出可使阿尔茨海默氏病细胞中的指标蛋白的磷酸化过程在程度和/或持续时间方面，都比对照细胞增长的化合物。

本发明的还有一项实施例，是可供阿尔茨海默氏病诊断用的测试试剂盒，其中包括，抗-磷-MAPK 蛋白质以及缓激肽。

在一项实施例中提出了可供筛选阿尔茨海默氏病患者使用的药物的一种方法。其中包括，选择一种可能的治疗物质，将该可能的治疗物质施用于患者，然后，对该患者的细胞用可刺激其指标蛋白磷酸化过程的一种物质进行活化处理，再测定其磷酸化的指标蛋白水平是否有异常增长的现象，若有这类水平增长的现象，就表明该种可能的治疗物质并无效果。如果未出现这种现象时，就表明这种可能的治疗物质对于患者具有治疗作用。该方法还包括，对阿尔茨海默氏病患者施用对该种疾病具有治疗作用的物质进行治疗或预防。

本发明提出一种方法，用于对受试者中的阿尔茨海默氏病进行治疗或预防，其中包括，施用一种具有如下有效量的药物：

(a) 可抑制或预防该受试者的细胞中的 MAPK 蛋白质比对照细胞异常增长的磷酸化过程；和/或

(b) 可抑制所述的 MAPK 蛋白质异常增长的磷酸化过程所引起的各种问题。  
这种药物可抑制 Erk1/2 的磷酸化过程，并且可以是蛋白激酶活性、src 蛋白

## 质酪氨酸

激酶活性、或 IP-3 受体等类的抑制剂。这种抑制剂还可选自 Bism-1、PP1 以及 2ABP。

尤其是,本发明提出了一种可从患者中诊断阿尔茨海默氏病的方法,其中包括:

(a) 用一种有效的具有磷酸化过程刺激浓度的缓激肽,对取自该受试者的以及阿尔茨海默氏病对照受试者的皮肤成纤维细胞进行处理;

(b) 选定在 2 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟和 30 分钟的一个或若干时间点,采用对磷-Erk1/2 具有特异性的抗体进行蛋白质印迹试验,测定该受试者细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量;

(c) 采用对磷-Erk1/2 的特异性抗体进行蛋白质印迹试验,在如步骤(b)相同的一个或若干时间点,测定非阿尔茨海默氏病的对照受试者细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量;其特征在于,在步骤(b)和(c)中的磷酸化 Erk1/3 的数量,与在所述的细胞中的蛋白质的数量同样在正常水平;

(d) 在所述的若干时间点,对该受试者细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量与对照细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量进行比较,其特征在于,在一个或若干所述的时间点该受试者细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量比对照细胞有所增长时,就可诊断为阿尔茨海默氏病。

该方法中还包括,采用选自蛋白激酶 C 活性的抑制剂 Bism-1, C-src 蛋白质酪氨酸激

酶活性的抑制剂 PP1, 以及 IP-3 受体的抑制剂 2-氨基乙氧二苯基硼酸酯等一种或数种抑制剂,对该受试者的细胞进行处理,其特征在于,该所述的抑制剂,可使由缓激肽诱导的该受试者的细胞中磷酸化数量,比之对照细胞增长的现象有所减少。

本发明的还有一项实施例提出了一种方法,可供筛选各种化合物,并从中鉴定出适用于治疗或预防阿尔茨海默氏病的物质。其中包括:

(a) 用筛选出来的物质,对取自阿尔茨海默氏病受试者的皮肤成纤维细胞进行处理;

(b) 用作为该物质的对照物,对取自所述受试者的对照皮肤成纤维细胞进行处理,或者将所述的对照成纤维细胞在不含有所述的物质或所数的对照物的条件下进行培育;

(c) 在步骤(a)和(b)之前、同时或之后,对实验或对照的成纤维细胞,采用有效的具有刺激磷酸化过程的浓度的缓激肽进行处理;

(d) 在选定的 2 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟和 30 分钟的一个或若干时间点，对实验成纤维细胞中的和在对照的成纤维细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量，采用对磷-Erk1/2 的特异性抗体进行蛋白质印迹试验进行测定，其特征在于，其磷酸化 Erk1/3 的数量，与在所述的实验的成纤维细胞和对照的成纤维细胞中的蛋白质的数量同样在正常水平；

(e) 在所述的若干时间点，对实验的成纤维细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量，与对照的成纤维细胞中的磷酸化 Erk1/2 的数量进行比较，借以确定，该物质对于被缓激肽诱导的磷酸化 Erk1/2 的数量，在实验细胞中比对照细胞有所增长的现象，是否能够具有抑制或预防作用；

(e) 其特征在于，对于增长的磷酸化现象具有抑制或预防作用的化合物，就可鉴定为适用于治疗或预防阿尔茨海默氏病。

本发明有一种方法，是一种可使受试者细胞(其中由 IP3 介导的 MAPK 蛋白质的磷酸化过程比对照的受试者细胞有所增长)中的淀粉样前体蛋白的蛋白质溶解作用、淀粉样蛋白质 $\beta$ 的分泌过程和/或 tau 蛋白的磷酸化过程减少的一种方法。其中包括，用可使 MAPK 的磷酸化水平有效地减到对照细胞的水平的一种抑制剂，对细胞进行处理。

在此引述的本发明的各种要素，都能够由一般技术水平的人员掌握，而结合到所论述的各项实施例中，或者从中删除。

### 附图简述

图 1A1、1A2 和 1B 经 BK 刺激活化的 Erk1/2 的经过时间历程。对阿尔茨海默氏病

细胞以及同年龄的正常对照细胞(“AC”)，用 10 纳克分子的 BK 进行处理，不同的处理和终止反应的时间在各项实施例中都已有论述。对于每一例的对照组都要加入同等容量的 PBS。其中上方各例图象都是取自阿尔茨海默氏病细胞以及正常对照细胞的活化的 Erk1/2 (P-Erk1/2) 的蛋白质印迹试验的结果。每份样本的平均密度，都与采用抗-“正规 MAP 激酶”抗体(P-Erk1/2)所确定的总蛋白质数量达到同样的标准化水平。据采用非配对的 Student 的 t-测验法进行的评定表明，11 份独立的细胞系的数值，都具有统计学上的显著性意义。其结果都汇总列示在下方的曲线图中。

图 2A 和 2B 经 BK10 分钟刺激处理之后，在阿尔茨海默氏病细胞以及同年龄的正常对照细胞之间的 Erk1/2 磷酸化作用的分散曲线的分布情况比较(图 2A)。对

20 例阿尔茨海默氏病患者和 22 例同龄对照受试者所取得的细胞用 BK 进行处理，并按图 1 所示进行调制。分别采用相应的抗体进行蛋白质印迹试验，检测其中活化的 Erk1/2 和总 Erk1/2 情况。其调制和分析的结果如图 1 所示。图 2B 显示的是每份随机选出的细胞系分别进行的三次重复检测的，有关 BK 刺激的 Erk1/2 磷酸化作用。

**图 3A1、3A2、3B1 和 3B2** 受试者成纤维细胞中活化的 Erk1/2 的免疫细胞化学染色情况。将取自阿尔茨海默氏病患者的成纤维细胞以及正常对照细胞的成纤维细胞，放在盖玻片上培育，并用 10 纳克分子的 BK 进行刺激处理 10 分钟。再用抗磷-Erk1/ Erk2 抗体检测活化的 Erk1/2。其结果显示，同龄的正常对照细胞在用 BK 处理之前和之后(上列图象)，两者之间没有显著性差异。然而，阿尔茨海默氏病细胞则在经处理(10 分钟)的细胞中则显示出免疫荧光信号明显增强的现象(下右列图象，3B2)。

**图 4A1、4A2、4B1、4B2、4C1、4C2、4D1 和 4D2** 不同的各种抑制剂对 BK 刺激活化的 Erk1/2。的作用。阿尔茨海默氏病患者的成纤维细胞和同龄对照的成纤维细胞，分别在 37°C 下进行预培育：分别用 50 微克分子的 2APB 经 30 分钟(图 4A)、5 微克分子的 Bism-1 经 15 分钟(图 4B)、10 微克分子的 PP1 经 15 分钟(图 4C)和 5 微克分子的 LY294002 经 15 分钟(图 4D)。每种细胞系的第二个培养瓶的细胞中加入同等容量的 DMSO 媒体进行培育。培育结束时，用 10 纳克分子的 BK 处理 5 分钟终止反应过程。然后，用上述的两种抗体分别进行稀释银渍测定法检测活化型的以及“正规型”的 Erk1/2。在图上显示 11 例阿尔茨海默氏病患者和同龄对照的两类细胞系的汇总结果，左侧的图列是蛋白质印迹法结果，右侧是曲线图。**\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ .**

**图 5A、5B1、5B2、5C1 和 5C2** 经用 BK 刺激处理之后，CREB 的磷酸化过程以及数量的变化。对同龄对照细胞和阿尔茨海默氏病细胞用 10 微克分子的 BK 处理 5 或 10 分钟。采用抗-磷-CREB-Ser133 抗体进行蛋白质印迹法检测。其中的 P-CREB 的平均密度，与采用抗-“正规 CREB”抗体测定的总量，据统计分析表明，都达到了标准化水平。图 5A 显示的是在经 5 和 10 分钟处理之后的 BK 诱导的 CREB 磷酸化作用。图 5B 显示的是，在用 BK 处理经 10 分钟之后，其 CREB 的数量显著减少。

**图 6A1、6A2、6B1、6B2、6C1 和 6C2** 不同的各种抑制剂对于经 BK 刺激的 CREB 磷酸化过程的作用。对同龄对照细胞和阿尔茨海默氏病细胞用 5 微克分子的 BiSM-1 (图 26A)、10 微克分子的 PP1(图 6B)、或 5 微克分子的 LY294002(图 6C)在 37°C 下预培养处理 15 分钟，再用纳克分子的 BK 培育 10 分钟。并按图 5A - 5C

进行标准化处理，2-方式的 ANOVA 进行评定其差异的统计学显著性意义。 $** p < 0.0001$ ;  $* p < 0.05$ 。

**图 7A 和 7B** 在受试者皮肤成纤维细胞中 BKb2 受体的分布状况。将成纤维细胞与抗 BKb2 受体的抗体一起培育，再用荧光标记的第二抗体进行培育。图中上图表示细胞的差分干涉对比(DIC)图象，下图表示成纤维细胞中 BK b2 受体的免疫荧光图象。

**图 8** 缓激肽对于亨廷顿氏痴呆症(HD)受试者的成纤维细胞中的 Erk1/2 磷酸化现象的作用。N = 4, P = 0.39, t 测验。

### 本发明的详细论述

按照本发明的要求，凡是在本领域具有一般技术的人员，都能够使用本文所披露的各种

方法，根据“背景”一节所述有关 IP3 受体以及各种释放通路的公开的资料，来鉴定一种激活剂或可刺激 IP3 介导的使细胞内钙分释放的一种物质。

在受刺激的/不受刺激的磷酸化过程的水平或比率异常增高的现象，意味着在预定的时

间超过了原来确定的已知非阿尔茨海默氏病的细胞中的水平，其数量是阿尔茨海默氏病的细胞中具有统计学显著性意义的特征，而不是非阿尔茨海默氏病的细胞的特征。

指标蛋白或 MAPK 蛋白质这两个术语，在本文中通常是可以通用互换的。其含义是，

在对施用的一种激活剂发生反应而出现磷酸化过程，成为钙分的信号发送通路的一个部分的一种蛋白质。在阿尔茨海默氏病的细胞中，其磷酸化作用要比对照细胞中有差别地更高。这种指标蛋白可以是一种钙分发送信号通路的蛋白质，其磷酸化过程与细胞中的 IP3R-敏感性  $Ca^{2+}$  的增高相关。这类指标/MAPK 蛋白质包括，对介导的钙分释放发生反应磷酸化蛋白质，例如，Erk1/2。

细胞的激活过程或刺激过程的含义是，在体外对完整的细胞用一种激活剂，通常是添加一种含有激活剂的溶液，或者以本领域的一般技术人员已知的其他方式进行处理。

激活剂，是在导入受试者内之后，能够刺激指标蛋白发生磷酸化过程的一种物质。各种激活剂对于阿尔茨海默氏病的细胞中的指标蛋白的磷酸化水平，与非阿尔茨海默氏病的对照细胞的水平相比较，可引起不同的反应。将各种激活剂输送

入细胞培养基中时也同样有此效应。各种激活剂可以是指 IP3R 的各种激活剂，因为其具有可诱导 IP3R 介导的细胞内钙分增高的作用，无论是直接作用还是间接作用。

一种指标蛋白的磷酸化水平，通常可通过测定磷酸化的指标蛋白的数量，和任选地，测定非磷酸化指标蛋白的数量，并对磷酸化的蛋白质数量，与所分析的该样本中的指标蛋白总量进行标准化处理。这样，所计算的反应磷酸化水平，与基础的或背景磷酸化水平，就不会受到在指定时间的指标蛋白的绝对数量差异的影响。

对细胞用激活剂进行刺激处理之后，对差别时间点或预定时间的选择依据是，应能够达到已知的阿尔茨海默氏病细胞和已知的对照细胞的指标蛋白的磷酸化水平之间经过标定的统计学显著性差异。其差异在该预定的时间可达到最大值，而不要求和依赖于测试方法的其他各项参数。

对于任何一种指定的激活剂，其适应的指标蛋白的种类数量都是有限的，反之亦然。按照本发明的要求，对于激活剂和指标蛋白组合的选择依据是，采用激活剂处理之后，在预定的时间，对于阿尔茨海默氏病受试者的细胞中的指标蛋白的磷酸化水平，与健康的对照细胞相比较，可引起不同的反应。具有一般技术水平的人员都能够通过确定是否发生这种不同的磷酸化反应，来选择适用的指标蛋白和激活剂种类。一旦选定了配套的指标蛋白和激活剂之后，就可根据差别时间点、蛋白质和激活剂的适宜浓度、对磷酸化蛋白质和非磷酸化蛋白质适宜的抗体类、或其他各种检测手段等等，确定最优化的试验参数。

对于激活的磷酸化水平与基础的磷酸化水平的计算当然是可以倒换的。这就是说，为了方便起见，我们所指的激活的/基础的水平的比率，都是高于已知的水平。对于在本领域的熟练技术人员来说，显然，如果从非激活的磷酸化过程低于已知水平方面来看，则将该比率的分子与分母的位置调换，就仍然可以得出同样的结果。因而，单纯根据本文对其比率的计算，一般的技术人员都会了解，其中包括了反向的计算。同样，也能够按照本发明的要求有效地利用本文所论述的对于其比率的计算，而有助于提出有效的比较数据，并可用于计算在激活的与基础的磷酸化水平之间以及在测试受试者与对照受试者之间的绝对差异。

以往对于已知的阿尔茨海默氏病细胞和非阿尔茨海默氏病的细胞在预定的或不同的时间所确定的比值，可用卡片记录下来，或者输入计算机数据库中，并可从中确定其诊断结果。相应地在实践方面，可安排一项诊断性测试方法，来计算出激活的/基础的磷酸化水平。如果该项计算的比值，与以往对于已知的阿尔茨海

默氏病细胞所确定的比值相当或更大时，其诊断结果就是阳性。如果计算的比值小于过去对于非阿尔茨海默氏病细胞所确定的比值时，其诊断结果就是阴性。

本发明提出了对于阿尔茨海默氏病的一种诊断试验方法，其中包括，测定 MAP 激酶 (MAPK) 蛋白质对于 BK 的刺激作用的反应。将阿尔茨海默氏病细胞的反应情况与同龄的对照受试者的细胞 (其中可包括患有与痴呆症相关的其他疾病的受试者) 进行比较。在一项优选的实施例中，该种试验方法的原理是，在用 BK 对其皮肤成纤维细胞进行刺激处理之后，检测该种细胞中的 Erk1/Erk2 异常高的磷酸化现象，作为对阿尔茨海默氏病 (包括家族型和非家族型) 的诊断依据。可以采用蛋白质印迹法或其他方法进行磷酸化过程的评定。

磷酸化过程是一种生物化学反应过程。在其蛋白质中的 Ser、Thr、或 Tyr 等各残基中加入了一个磷酸酯基团，并由蛋白激酶产生催化作用。通常磷酸化过程可修饰蛋白质的功能、一般是引起激活作用。作为细胞的自体内环境平衡的各种机制的一个组成部分，磷酸化过程只是一种一过性过程，可由被称为磷酸酯酶的各种酶类引起可逆性变化。在这种反应过程的两个方面 (磷酸化过程和脱磷酸化过程) 的任何偏移失常，都有可能破坏细胞的功能。这类破坏作用就是脑部各种疾病的基本支持因素。

按照本发明的要求，在诊断分析中，可从阿尔茨海默氏病患者检出，对于指标蛋白对钙分发送信号通路的调节器发生反应，而产生磷酸化过程增高的异常的磷酸化活动。在指定的时间磷酸化过程增高或减少的异常现象，与一名外观健康的患者的细胞中的水平有关。从各部外周组织 (即，除中枢神经系统之外) 中的 MAPK 内的阿尔茨海默氏病-特异性差异的检测，可作为对阿尔茨海默氏病早期诊断，以及供筛选和鉴定可用于治疗目的的药物研制的一种经济的测试方法的基础。为此，本发明提出了用于检测是否存在阿尔茨海默氏病的各种方法、试剂以及诊断用试剂盒。

MAPK 的各种酶类，在将细胞外的各种信号传输入细胞核内，以主导控制其基因表达方面，起着一种核心的作用。它们还可参与对于阿尔茨海默氏病的发病过程的关键性活动，即，调节微管-相关性蛋白质 tau 的磷酸化过程，以及产生和分泌淀粉样蛋白质。按照本发明的要求，在对 BK 的刺激处理发生反应的阿尔茨海默氏病成纤维细胞中 (与同年龄的对照受试者相比较)，可发生，并可检出 MAPK Erk1/2 的异常延长的磷酸化过程。

尽管本发明小组成员在其初期的测试方法中，采用了 BK 作为刺激物，因为当时认为，BK 是唯一能够对细胞内的各种 IP3 受体产生刺激作用的物质。因此，本

文在此引述 BK，可以理解为，还应包括其他适用的激活剂或各种刺激性化合物。这种刺激处理可作为用于提高阿尔茨海默氏病特有的 Erk1/2 磷酸化过程的一种常规步骤。确实，已经观察到的 IP3 受体全面抵制由 BK 刺激的磷酸化现象，提示了这种表现是由 IP3-敏感性的  $Ca^{2+}$  释放过程所造成的。在阿尔茨海默氏病特异性的 Erk1/2 磷酸化现象的增长过程方面，还伴有在阿尔茨海默氏病细胞中对于 PKC 和 MAP 激酶 (MAPK/Erk 激酶或 MEK) 各种异型体的基因表达增长的过程，以及可减少对于微管相关的蛋白质 tau 和 MAPK 具有脱磷酸酯作用的磷酸酯酶 1, 2A、B 的基因表达过程。在阿尔茨海默氏病细胞中的基因表达过程的变化，对于能够赋予这种阿尔茨海默氏病特异性延长的 Erk1/2 活动的各种蛋白激酶与磷酸酯酶，以及可在阿尔茨海默氏病的脑部形成神经原纤维紊乱的 tau 过度磷酸化过程之间的各种活动的平衡状态发生变化。在皮肤的成纤维细胞中这类 Erk1/2 的各种异常活动的检出，反映了在脑部存在着同样的一些变化，因而可用于对阿尔茨海默氏病的早期病理过程进行诊断。

由此可见，按照本发明的要求，BK 的刺激作用可使阿尔茨海默氏病的成纤维细胞中的 Erk1/2 的磷酸化过程异常延长，这是有赖于 IP3 受体介导的  $Ca^{2+}$  的释放过程的一种变化。而 IP3 激酶似乎可参与由 BK 刺激的非阿尔茨海默氏病对照受试者的细胞中 Erk1/2 的磷酸化过程，在阿尔茨海默氏病的细胞中的这种 Erk1/2 的磷酸化过程则并不依赖于 IP3 激酶。

阿尔茨海默氏病特异性的 Erk1/2 磷酸化过程的增长，是随 IP3 介导的  $Ca^{2+}$  的释放过程而发生的。根据 PKC 的抑制物 bisindolylmaleimide-1 (双顺丁烯二酰亚胺-1) 和 c-Src 的抑制物 PP1 能够完全取消 BK-刺激处理引起的 Erk1/2 磷酸化过程的结果表明，蛋白激酶 C (PKC) 以及非受体蛋白质酪氨酸激酶 (PTK) c-Src 都参与了 Erk1/2 活化过程的上游发信号通路。PI-3 激酶 LY924002 可部分地参与对在对照的非阿尔茨海默氏病细胞中的 Erk1/2 磷酸化过程的抑制作用。但是在阿尔茨海默氏病的细胞中则未显示此种作用，这种情况提示了，BK-诱导的 Erk1/2 磷酸化过程有可能参与了与 PI-3 激酶不相干的一些信号发送通路。

在用 BK 刺激处理之后，也可观察到根据在 Ser-133 的磷酸化过程增高而测出的 c-AMP 反应要素结合蛋白质 (CREB) 的活化作用。这种由 BK 诱导的 CREB 磷酸化过程与 Erk1/2 磷酸化过程相类似，在同龄对照受试者 (AC) 和阿尔茨海默氏病受试者 (AD) 的细胞两方面，都可完全被 PKC 和 c-src 这类抑制物所抑制。只有同龄的对照受试者中的 CREB 磷酸化过程可部分地被 IP-3 激酶抑制物 LY294002 所抑制，而阿尔茨海默氏病的细胞则不然。

上述这类结果提示, 阿尔茨海默氏病细胞中对 BK 发生反应而引起的各信号发送通路的扰乱, 可导致 Erk1/2 磷酸化过程和活化过程异常增高和延长, 这种情况又转而可搅乱各种细胞活动过程, 例如, 基因转录过程、APP(淀粉样前体蛋白)加工过程以及 tau 蛋白磷酸化过程等, 所有这些问题都是阿尔茨海默氏病发病过程的基本因素。查明这类通路中的各种变化, 有助于揭开阿尔茨海默氏病在早期的记忆丧失这一特征的根源。此外, 检测在各部外周组织中的 MAPK 中的阿尔茨海默氏病特异性差异, 可提出(1)对阿尔茨海默氏病进行早期诊断的一种有效手段, 以及(2)对于鉴定治疗目标以供药物研制的一种生物化学基础。

如上所述, 并且因为同样的细胞也可以不同组合用于编码各种外来信息的细胞内  $Ca^{2+}$  释放信使, 因而, 凡是可刺激 IP3 受体而引起内存钙分释放的任何药物, 都可在本发明的测试方法中用作使阿尔茨海默氏病特有的磷酸化过程增高的诱导剂。再则, 这类物质除 BK 之外, 还有其他一些 BK 受体激活剂也具有类似的作用。还有, 可作为 IP3 受体的配体的一类物质, 也同样有用。由于 IP3 受体是由 ATP、钙分以及蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和  $Ca^{2+}$  调钙蛋白-依赖性蛋白激酶 II (CaM 激酶 II) 的磷酸化作用进行调节的, 因而, 凡是能够调节 ATP 或这类激酶的水平或活性的各种药物, 都可发挥相似的作用, 并可作为本发明所采用的 BK 的替代品。

这类药物之一是一种 14 氨基酸肽类的 bombesin (Anastasi A 等, *生物化学和生物物理学文件*, 1972, 148: 443-446); Woodruff GN 等, *纽约科学院年报*, 1996, 780: 223-243, 或生物学活动同类物或其片断 (Rivier JE 等, *生物化学*, 1978, 17: 1766-71; Orloff MS 等, *肽类*, 1985, 6 增刊 3: 63-68)。另一种是缩胆囊素。对于铃蟾肽和缩胆囊素诱导的钙分, 都可通过 IP3 和 IP3 受体 sec 发送信号, 例如, (Cook SJ 等, *生物化学杂志*, 1990, 265: 617-620; Schulz I 等, *生物学和化学*, 1999, 380: 903-908; Burdakov D 等, *现代生物学*, 2000, 10: 993-996)。虽然在此示例的测试方法都是采用皮肤成纤维细胞, 其他各种细胞只要是获取和处理方便, 也都可在本发明的测试方法中使用。例如, 血液细胞, 最好是淋巴细胞、或单核细胞, 都较容易从外周血液中制备, 并按照本发明的要求使用。一般的技术人员都能够使用适合的各种指标蛋白和激活剂, 标定适合的时间点和各种试验条件, 以制定用这类细胞为基础的诊断方法。

本发明发现, 一种被称为促分裂原活化的蛋白激酶 (MAP 激酶) 的重要酶类 MAPK, 可对阿尔茨海默氏病的皮肤成纤维细胞刺激引起持续间隔 (比同年龄的对照受试者的细胞) 异常延伸的现象。如下列述的各项实施例显示了, 阿尔茨海默氏病的成纤维细胞在用 BK 进行刺激处理之后, 其 Erk1/2 磷酸化过程的持续时间延伸

的情况。IP<sub>3</sub>受体介导的Ca<sup>2+</sup>的释放以及PKC和非受体蛋白质酪氨酸激酶(PTK)c-Src的活性,对于这种Erk1/2磷酸化过程,都是基本要素。尽管IP<sub>3</sub>激酶在同龄的对照受试者的细胞中参与了BK刺激的Erk1/2磷酸化过程,但是在阿尔茨海默氏病的细胞中的这种磷酸化过程则是与IP<sub>3</sub>激酶是不相干的。

按照本发明的要求,用可刺激IP<sub>3</sub>受体以释放细胞内的钙分的一种物质来刺激细胞。这种物质的实施例有BK及其同系物。BK是一种强力的非肽类物质。能够与特异性BK受体相结合并使之活化,进一步又会激发一系列细胞内的分子变化活动,包括对的刺激作用,以及MAPK蛋白质的磷酸化过程。磷酸化过程是一种生物化学反应过程,首先是由称为蛋白激酶的一种酶类,使磷酸酯基团附着在蛋白质上;通常这样就可修饰目标蛋白质的功能,一般是引起该种蛋白质活化。由于细胞都需要对其功能保持一种平衡的系统,因而这种磷酸化过程只是一种一过性过程,此时还需要有另一种酶类使其能够转变,这种酶类就是磷酸酯酶。在其反应过程的两侧面可能发生的任何失常现象(磷酸化过程与脱磷酸化过程),都有可能破坏其分子结构的完整性,从而搅乱其细胞的功能。这类破坏作用都可能成为各类脑部疾病的基本支持因素。

在阿尔茨海默氏病的成纤维细胞中的MAPK的如此持久的磷酸化过程表明,在这类细胞内,该种酶的活性异常提高。这类阿尔茨海默氏病的特异性作用,看来还与其他一些异常的细胞活动以及酶活动有关。例如,MAPK磷酸化过程的持久存在,是由于IP<sub>3</sub>受体介导的从细胞内特定的库存中过量释放Ca<sup>2+</sup>而继发造成的。

MAPK磷酸化过程部分地须依赖于PI<sub>3</sub>激酶的活性,据查明,在阿尔茨海默氏病的细胞中,有一种PI<sub>3</sub>激酶依赖性机制参与了MAPK的磷酸化过程。

在对于阿尔茨海默氏病的细胞与同等年龄的对照受试者的细胞中的基因表达情况进行的比较方面,本组发明人员发现,在阿尔茨海默氏病的细胞中的PKC和MEK的表达是增长的。这类PKC和MEK两者都是可催化MAPK磷酸化过程的上游分子物质。本组发明人员还发现,在对MAPK脱磷酸化方面,有些磷酸酯酶的表达是减少的。因而,在对于MAPK的磷酸化过程的调节方面的各种酶类的数量和活性结合一起的变化不平衡性,对于阿尔茨海默氏病细胞-延长的MAPK磷酸化过程的诊断效果就会造成差异。

这种在阿尔茨海默氏病中MAPK活性异常增高的现象是首次发现的。这种MAPK族的酶类对于在细胞内从细胞膜向细胞核发送信号方面起着关键性的作用。它们可受到作用于细胞表面的或可导致细胞分裂(有丝分裂过程)的不同的信号(如,促分裂原类)的刺激作用。这是细胞的生长和发育所需,以及对于因损伤或疾病而破

坏的细胞可进行更新和/或修复的一种过程。

对于承担学习和记忆之类功能的各种神经元在传输信号方面，MAPK 也起着重大的作用。在脑内的各种细胞中，MAPK 还能够调节淀粉样肽  $\beta$ Ap 的分泌过程，以及 tau 蛋白的磷酸化过程。 $\beta$ Ap 在神经细胞之外的蓄积，和 tau 的过度磷酸化过程，都对神经原具有高度毒性，分别可导致蚀斑形成，以及神经原纤维的紊乱(NFT)。这两种变化正是阿尔茨海默氏病的脑组织中特有的病理特征。

根据本发明的研究，异常增高的 MAPK 活性，造成了淀粉样蛋白质的加工过程，以及 tau 蛋白功能方面的超常活动。本研究结果对于阿尔茨海默氏病的脑组织中正常记忆的形成以及其病理生理过程，在分子学基础上提供了一系列崭新的观点。对于这方面的认识，预期将在该疾病的预防和治疗方面，导向新的分子学研究目标。

在当前的实践方面来说，现有的这类结果更具有迫切的临床诊断意义。因为，(a) 皮肤成纤维细胞可表现出阿尔茨海默氏病(包括家族性和非家族性)所特有的 MAPK 活性的各种变化，(b) 皮肤成纤维细胞十分容易取得(相对于脑组织)，因而，利用皮肤成纤维细胞实施以 MAPK 为基础的诊断方法，就可提供一套简便而经济实用的测试手段，对阿尔茨海默氏病进行早期诊断。

本发明有关在采用 BK 刺激处理的阿尔茨海默氏病的成纤维细胞中可检测出过量钙信号的一些新发现，与其他研究人员的发现是相一致的(Ito 等, 1994; Gibson 等, 1996; Etcheberrigaray 等, 1998)。

## 实例 1

本项研究所采用的皮肤成纤维细胞，都是取自年龄在 52 – 67 岁范围之间的 20 例阿尔茨海默氏病患者，以及 22 例同年龄的对照受试者。有一些样本是原来库存的受试者皮肤细胞，还有一些则是新鲜采集和培养的细胞。

### 材料和方法

取自家族性(FAD)和非家族性(nFAD)的阿尔茨海默氏病患者以及同年龄的对照受试者的库存皮肤成纤维细胞，都采购自 Coriell 医学研究所。所采用的培养基是补加胎牛血清(FBS; Bio Fluids)的 Dulbecco 氏改良型 Eagle 氏培养基(DMEM; Gibco BRL)。缓激肽、二苯基硼酸 2-氨基乙基酯(2ABP)、蛋白酶和磷酸酯酶混合抑制剂等都来自 Sigma 公司；双吡啶基顺丁烯二亚胺-1(BiSM-1)和 LY294002 是得自 Alexis 公司；PP1 由普林斯顿大学的 Avthony Bishop 博士提供。抗磷-Erk1/2、

抗-磷-CREB 和抗-CREB 等抗体都通过：细胞信号技术部“取得；抗-Erk1/2 抗体来自“北部生物技术部”。4 - 20 %SDS-微凝胶取自 Invertrogene Novex 公司。硝基纤维素膜来自 Scheicher & Schuell 公司。SDS 电泳分析所用各种试剂都取自 BioRad 公司。超级信号化学发光酶解物试剂盒由 Pierce 公司提供。

**同年龄对照受试者和阿尔茨海默氏病受试者患者的成纤维细胞的培养** 包括家族型 (FAD) 和非家族型 (nFAD) 两类的阿尔茨海默氏病患者的和同年龄对照受试者 (AC) 的库存的成纤维细胞，用盛有 DMEM + 10 %FBS 的 t-25/t-75 培养瓶分别保存和传代。细胞样本都采集自年龄在 52 - 67 岁范围的受试者，其中有 80 % 以上取自男性。细胞样本在传代至 6 - 17 次期间取用。

**新鲜活检的成纤维细胞样本的处理和培养** 从新鲜取得的皮肤组织中采集和培养成纤维细胞的方法如下：在 Copper Ridge 研究所 (Sykesville, MD) 和 John Hopkins 医院 (Baltimore, MD), 由有资格人员按规定方案，以活体穿孔方法，从非阿尔茨海默氏病的患者和同年龄的对照受试者采集皮肤组织样本。将样本放置在 1x PBS 中，再转移入过渡性培养基送至实验室供制备处理。从过渡性培养基中取出样本，用 PBS 淋洗后，切碎成 1 毫米的小块供移植之用。分别将移植用的组织小块放置在开口的 T-25 培养瓶的生长表面，瓶内装有含有 45 % FBS 及 100 单位/毫升青霉素和 100 单位/毫升链霉素 (Pen/Strep) 的 3 毫升活检培养基。组织样本经 37°C 培育 24 小时后，再加入含有 10 % FBS 的 2 毫升活检培养基。经 48 小时后，再用 5 毫升含有 10 % FBS 和青/链霉素的常规培养基将原有培养基更新。然后，依法对各份细胞样本进行继代保存处理。

**用各种药用物质进行成纤维细胞样本的处理** 用 BK 以及其他一些抑制物质对成纤维细胞进行处理。其他各类抑制物质包括：IP3 受体抑制剂、二苯基硼酸 2-氨基乙基酯 (2-ABP)、蛋白激酶抑制剂、双吡啶基顺丁烯二亚胺 I (BiSM-1)、c-src 蛋白质酪氨酸激酶抑制剂 (PP1) 以及 PI3 激酶抑制剂 LY294002。

待库存的 AC 和 AD 成纤维细胞样本生长至 80 % -100 % 融合成片时，再移入无血清的 DMEM 中进行“饥饿”处理过夜。然后，将细胞按不同的间隔在下用 10 纳克分子的 BK 进行处理，制备成 BK 作用效应的时间系列。在每个细胞系的对照培养瓶中加入同等容量的 PBS。终止反应过程的方法是，将培养基倒去，并迅速用预冷的 pH 7.4 的 PBS 淋洗细胞，再将培养瓶移放在干冰/乙醇浴中。

从新鲜的活检组织分离的细胞样本，用最适浓度的 BK (0.1 纳克分子) 一起在 37°C 培育 10 分钟。

进行抑制研究时，将细胞样本以如下浓度的抑制剂按指定的时间间隔在 37°C

下进行培育: 2ABP (50 微克分子, 30 分钟)、PP1 (10 微克分子, 15 分钟)、LY294002 (5 微克分子, 15 分钟) 和 BiSM-1 (5 微克分子, 15 分钟)。另外, 同时制备用同等容量的 DMSO 媒体培育的对照培养瓶。在培育过程结束素时, 再加入指定浓度的同样的抑制剂, 随即加入 BK, 使最终浓度达到 10 纳克分子。在 DMSO 对照组中也要加入 BK (10 纳克分子)。还有基础对照组, 则 BK 与抑制剂都不加。在 37°C 培育 5 分钟之后, 再按上述方法终止反应过程。

用各组细胞样本分别制备细胞溶解产物。将干冰/乙醇浴中的培养瓶取出, 移入冰水之中。在每个培养瓶中分别加入 1 毫升溶解缓冲液 (10 毫克分子 pH 7.4 的 Tris、150 毫克分子 NaCl、1 毫克分子 EDTA、1 毫克分子 pH 8 的 EGTA、0.5 % NP-40、1 % Triton X-100、1 % 蛋白酶抑制剂混合剂) (Sigma 公司)、1 % 的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 磷酸酯酶抑制剂与酪氨酸 (Tyr) 磷酸酯酶抑制剂混合剂 (Sigma 公司)。经在低温小室内经连续振摇 30 分钟之后, 用细胞刮板分别采集每个培养瓶中的细胞。细胞经超声处理并以 5000 转/分离心处理 5 分钟, 再取其上清液样本进行蛋白质印迹试验方法检查。

**蛋白质印迹试验方法** 细胞溶解产物样本分别加入同等容量的 2X SDS-样本缓冲液, 经 10 分钟。每份样本中的蛋白质被溶入 4 - 20 % 微量梯度凝胶体上, 并转移入硝化纤维素膜上。采用超级信号 ECL 检测试剂盒用抗-磷-Erk1/2 抗体检测磷酸化的 Erk1/2。为了将磷酸化的 Erk1/2 对-Erk1/2 的总量进行标准化处理, 将用同样的抗体进行印迹处理的该同一份纤维素膜, 用分散缓冲液 (62.5 毫克分子 pH 6.7 的 Tris-HCl、2 % SDS 和 100 毫克分子 2-巯基乙醇) 在 60°C 进行分带处理 45 分钟。经用含有 0.01 % 聚山梨醇酯 80 的 10 毫克分子 pH 7.4 的 PBS 洗涤之后 (每次 10 分钟, 共 3 次)。再用抗非磷酸化 Erk1/2 抗体进行印迹法处理, 就可计算出在该凝胶体上载荷的 Erk1/2 的总量。

可采用同样的方法检测 CREB。

**数据资料分析** 采用 Fujifilm LAS-1000 Plus 型的扫描仪, 对发自磷酸化的和非磷酸化的 Erk1/2 的各种信号进行扫描测定。利用 NIH Image 软件检测每一条蛋白质条带的平均光密度值。对发自磷酸化 Erk1/2 的各种信号的数值, 分别按 Erk1/2 的总信号值进行标准化处理。经标准化处理之后, 将各项经处理的细胞的数据, 换算成对基础对照组的百分率, 以供进行统计分析。

**免疫细胞化学** 成纤维细胞在覆有 0.02 毫克 % 的聚赖氨酸的盖玻片上生长。对细胞样本按上述方法采用 BK 进行处理之后, 再迅速用 PBS 冷液进行淋洗, 并在室温下用 4 % 甲醛的 PBS 溶液固定处理 15 分钟。再分别用 PBS 洗涤 5 分钟, 共进

行 3 次，并在室温下用 0.1 % TritonX-100d 的 PBS 溶液渗透处理 30 分钟。再在室温下加入 10 % 正常马血清的 PBS 溶液培育 30 分钟，细胞再与抗磷酸化 Erk1/2 的抗体 (1: 200) 一起置放在 4°C 下培育过夜。用 PBS 洗涤盖玻片 3 次，并加上 1: 200 的荧光标记的小鼠 IgG (Vector Lab)，置室温下培育 60 分钟。经用 PBS 洗涤 3 次之后，再用 Vectashield 密封胶 (Vector Lab) 密封，置荧光显微镜下观察细胞中的免疫染色信号。采用 BioRad Quantity One® 软件 (BioRad 公司) 测定其中荧光信号的强度值。对于成纤维细胞中的 BK 受体的定位方法，对于正常的成纤维细胞可采用单克隆制备的抗 BK B2 抗体处理，再加入 CY5-结合的小鼠 IgG，用圆光显微镜检查细胞情况。

## 结果

### 对于同龄对照受试者和阿尔茨海默氏病患者的细胞 Erk1/2 由 BK 诱导的活化过程

对于取自对照受试者的受试者皮肤成纤维细胞中的 Erk1/2，BK 可引发明显而呈一过性的磷酸化现象 (图 1)。大约在刺激处理之后 2.5 分钟可发生磷酸化过程的高峰，随后 Erk1/2 的磷酸化过程就会消退并在刺激处理之后 10 分钟恢复到对照组的水平。在经用 BK 处理后 20 分钟时，Erk1/2 的磷酸化程度已是对照组的 68 % (图 1)。然而，在阿尔茨海默氏病患者中，其 Erk1/2 磷酸化水平增长的程度可大大维持其持久期限 (图 1)。在 5 分钟时其统计学差异 (Student 氏 t 测验) 就具有显著性意义 ( $p < 0.01$ )，至 10 分钟可达到最大差距 ( $p < 0.0001$ )。在经用 BK 刺激处理之后 20 分钟时，测定在阿尔茨海默氏病患者与同年龄对照受试者之间的细胞中，仍然存在着显著性差异 ( $p = 0.002$ )。

图 2 中展示了有关从阿尔茨海默氏病患者与同年龄对照受试者取得的新鲜组织中，以及从库存的阿尔茨海默氏病患者与同年龄对照受试者取得的皮肤成纤维细胞，在用 BK 刺激处理之后 10 分钟检验的 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化现象的研究结果。在阿尔茨海默氏病成纤维细胞中的 Erk1/2 磷酸化作用始终比同年龄对照受试者增高 (图 2A)。同样，在各细胞系中由 BK 刺激处理的 Erk1/2 磷酸化现象，在阿尔茨海默氏病患者的各个细胞系中都可再现地增高，如图 2B 所示，其中显示了 3 次独立的重复检测 (随机选自阿尔茨海默氏病患者与同年龄对照受试者和阿尔茨海默氏病患者的细胞系)。当用抗磷酸化 Erk1/2 抗体进行免疫染色，再经 BK 处理之后 10 分钟，在阿尔茨海默氏病患者的细胞系中可显现磷酸化的 Erk1/2 水平的增高现象，在同年龄的对照组受试者的细胞中则否 (图 3)。这类增强的信号都集中

在细胞核旁区域(兔, 下右图)。

### **IP3 受体抑制剂对于 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化现象的作用**

BK 的刺激处理可从 IP3-敏感性贮库中释放  $Ca^{2+}$  (Cruzblanca 等, 1998; Pascale 等, 1999)。在本项研究中, 对于在 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化过程中  $Ca^{2+}$  的释放与 IP3 的关系进行了检验。在同年龄对照受试者与阿尔茨海默氏病患者两者的细胞中, 在 BK 之前先添加 IP-3R 的一种强力的可穿透细胞膜的抑制剂 2ABP, 就都可完全阻止 BK 刺激诱导的 Erk1/2 磷酸化过程(图 4A)。据双向 ANOVA 测试法表明, 这类处理的效果具有高度的显著性意义( $F_{1,36} = 187.4, p < 0.0001$ )。此项研究结果证实了, 在细胞内的 Erk1/2 的磷酸化过程及其后来的分子串联现象, 是处于 IP-3R-敏感性  $Ca^{2+}$  增高过程的下游部位。

### **PKC 抑制剂 BiSM-1 对于 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化现象的作用**

在此项实验过程中, 在用 BK 处理之前, 对于同年龄对照受试者与阿尔茨海默氏病患者两者的细胞, 都先用特异性的抑制剂 BiSM-1 进行预培育处理。如图 4 所示, 此时仍然表现出 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化过程被阻止的现象(在同年龄对照受试者与阿尔茨海默氏病患者两者的细胞都是如此)。据双向 ANOVA 测试法证实, 这类处理的效果具有显著性意义。此项研究结果表明, 在同年龄对照受试者与阿尔茨海默氏病患者两者的细胞中, 对于 Erk1/2 的磷酸化过程要求有 PKC 的活化作用参与其间。

### **C-src 蛋白质酪氨酸激酶抑制剂 PP1 对于 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化现象的作用**

为了测试这种非受体的蛋白质酪氨酸激酶(PTK)C-src 是否参与由 BK 对 Erk1/2 的活化作用, 在使用 BK 进行处理之前, 将同年龄对照受试者与阿尔茨海默氏病患者两者的细胞用 10 微克分子的 PP1 进行预培育处理。其结果, 如同上述的 2ABP 和 BiSM-1 一样, PP1 可完全抑制 BK 诱导的 Erk1/2 的磷酸化过程(图 4C)。据双向 ANOVA 测试法证实, 这类处理的效果具有显著性意义( $F_{1,40} = 234, p < 0.0001$ )。因而, 此项研究结果提示, 在 BK 对于 Erk1/2 的活化作用方面, C-src 同样也参与其间活动。

### **PI3 激酶抑制剂 LY294002 对于 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化现象的作用**

为测试 PI3 激酶是否参与 BK 刺激的 Erk1/2 活化过程的活动, 设置了此项研究。

在使用 BK 之前,对成纤维细胞用 5 微克分子 LY294002 进行培育。在这方面与以前的 IP-3R、PCK 和 C-src 不同,LY294002 可在同年龄的对照受试者的细胞中,引起适度但还是明显的对 Erk1/2 的磷酸化过程抑制的现象(图 4D),却并不能抑制在阿尔茨海默氏病的细胞中由 BK 诱导的 Erk1/2 的磷酸化过程(图 4D)。据双向 ANOVA 测试法证实,这类处理的效果具有显著性意义( $F_{1,20} = 11.55, p < 0.05$ )。此项研究结果提示,PI3 激酶并未参与在阿尔茨海默氏病患者的细胞中 BK 诱导的 Erk1/2 的磷酸化过程。

### **BK 对于环式-AMP 反应要素结合的蛋白质(CREB)的活化过程的作用**

在本项研究中,对于 BK 对在正常情况下处于 Erk1/2 下游的 CERB 的活化过程方面的作用进行了测试。如图 5 所示,对于 AC 和 AD 两者的细胞中的 CERB,10 纳克分子的 BK 都可诱导高度显著性的磷酸化现象。早在经用 BK 刺激处理之后 5 分钟时,就可检测出磷酸化过程增长的现象,并且在 10 分钟时还仍然在持续增长(图 5A)。据双向 ANOVA 测试法证实,这类处理具有显著性意义的时间效果( $F_{1,28} = 14.90, p < 0.001$ ),但却没有群体效果。图 5B 显示,在 AC 和 AD 两者的细胞中,经 BK 处理之后 10 分钟,CERB 的磷酸化过程同样是增长的。这种 BK 的处理还可在 10 分钟内引起 CERB 蛋白质的总量明显减少的现象。(图 5C)( $p < 0.001$ )。总之,在 AC 和 AD 两者的细胞之间,由 BK 诱导的 CERB 磷酸化现象或 CERB 的总量减少方面,并无显著性差异。

### **PKC、C-src 以及 PI3 激酶等抑制剂对于 BK 诱导的 CERB 磷酸化现象的作用**

用 PKC 抑制剂 BiSM-1 处理成纤维细胞,就可完全制止由 BK 刺激而产生的 CERB 磷酸化现象(图 6A)。据双向 ANOVA 测试法证实,这类处理具有显著性意义( $F_{1,30} = 53.76, p < 0.0001$ ),但却没有群体效果。同样,c-src 抑制剂 PP1 也可抑制由 BK 刺激而产生的 CERB 磷酸化现象(图 6B)。这类结果再次指出,PKC 和 c-src 两者都参与了有助于 BK 促使 Erk1/2 和 CERB 两者活化的发送信号通路。PI3 激酶抑制剂 LY294002 则与 Erk1/2 的作用相仿,可在同年龄对照受试者的细胞中部分地抑制 CERB 磷酸化现象,但是对于阿尔茨海默氏病的细胞中的 CERB 磷酸化现象则毫无作用(图 6C)。据双向 ANOVA 测试法证实,这类处理具有显著性意义( $F_{1,30} = 36.23, p < 0.0001$ ),并且也有群体效果( $F_{1,30} = 4.7, p < 0.05$ )。

### **BK B2 受体在成纤维细胞中的表达**

本研究项目是采用 2 型 BK 受体的特异性抗体 (BKb2R) 进行蛋白质印迹试验, 测定阿尔茨海默氏病的细胞和同年龄对照受试者的细胞中 BK 的表达, 以确定在对于 BK 发生反应时, Erk1/2 和 CERB 的磷酸化过程增长的现象, 是否是由于在阿尔茨海默氏病的细胞所表达的 BK 受体数量增长所造成的。然而, 并未观察到在受体的表达方面有何显著性差异。

采用荧光染色测定法检验, 证实了在成纤维细胞的细胞溶质、细胞核以及核旁区域, 都发现有 BK2bR 存在(图 7)。然而, 在阿尔茨海默氏病与 AC 两者的细胞中所见到的 BKb2R, 无论在荧光强度方面, 还是在分布状态方面, 都并没有明显差别。

### 实验结果讨论

在阿尔茨海默氏病以及其他各种遗传性疾病的研究方面, 成纤维细胞都可作为一种有效的模型。据推测, 在动物体内的分布遍及全身这类细胞, 能够表达与脑组织一些疾病相关的各种遗传性异常的信息。本研究项目提出的证据表明, 在阿尔茨海默氏病的成纤维细胞中, 当 BK 受体受到刺激之后, 就可通过 MAPK 通路传递异常信号。BK 是一种最强力的内源性痛觉和炎原性物质, 在外伤、疾病以及中枢神经系统和外周组织发炎过程中起着重要的作用。在本研究中发现, 在阿尔茨海默氏病的细胞中, 由 BK 引起的刺激作用, 可以依赖于从 IP3 受体释放  $Ca^{2+}$  的方式, 而提高并延长其中的 Erk1/2 磷酸化过程。此项发现, 与以往报道的, 有关阿尔茨海默氏病的皮肤成纤维细胞受到 BK 的刺激作用之后, 可检测到 IP3-敏感性  $Ca^{2+}$  的释放增高的现象 (Gibson 等, 1996; Etcheberrigaray 等, 1998) 是一致的。然而, 这种阿尔茨海默氏病的 Erk1/2 的磷酸化过程的延长, 都不是由于 BKb2 受体或 Erk1/2 的表达有所增长所致, 因为, 与对照组的细胞相比较, 在阿尔茨海默氏病的细胞中, 该两种蛋白质无论在表达方面, 还是在浓度方面, 都并没有什么差别。因而, 在阿尔茨海默氏病的诊断方面, 除了涉及这种信号传递通路的其他各种分子物质的一些变化之外, 还不可能排除其在 BK 受体和/或 IP3 受体的性质或敏感性等方面的其他各种特异性变化。

BK2bR 的活化过程可刺激 PLC 系统的活化过程, 继之, 该两者又可与细胞内  $Ca^{2+}$  的增长过程一起诱导 PKC 的活化过程。此外, 已知有些 G 型蛋白质结合的受体 (“GPCRs”) 可激发 c-src PTK 的活性。这种 c-src PTK 是细胞发送信号的关键性媒介物, 也可参与 Erk1/2 的活化过程。本研究对于 PKC 和 c-src PTK 两者参与 BK 激发磷酸化过程的情况进行了测试。关于 PKC 抑制物 BiSM-1 以及 c-src 抑制物 PP1 可制止这种磷酸化过程的实际情况表明, Erk1/2 的活性是受着多种上游蛋白激酶

的协同作用所制约的。与 IP3 受体抑制物 2ABP 的情况相仿, BiSM-1 和 PP1 两者对于制止 Erk1/2 磷酸化过程的作用, 在 AD 和对照组双方的细胞中也都是相类似的。因而, 关于在阿尔茨海默氏病中所表现的 Erk1/2 磷酸化过程的增高现象, 不可能由 PKC 或 c-src PTK 的活性增强所造成的。

对于作为阿尔茨海默氏病-特异性 Erk1/2 磷酸化过程增高现象的基础的(各条)信号发送通路的分析方面, 本组研究人员测试了涉及 GPCR 类对 Erk1/2 活化过程的另一种酶 PI-3 激酶的参与情况。根据在不同系统中进行的各项研究表明, GPCR 所激发的 PI-3 激酶的活化过程, 依赖于在 Ras 下游并包括 c-src PTK 的 PKC 的活化过程。特异性 PI-3 激酶抑制物 LY294002, 只能在对照的成纤维细胞中, 对由 BK 诱导的 Erk1/2 磷酸化过程引起适度的抑制作用, 但是对于阿尔茨海默氏病的细胞则毫无作用。这种情况提示, PI-3 激酶在正常的成纤维细胞中, 可部分地作用于由 BK 活化的 Erk1/2 磷酸化过程, 而在阿尔茨海默氏病的细胞中的 Erk1/2 磷酸化过程则并不依赖于这种酶。

Erk1/2/MAPK 的主要功能是, 通过若干转录因素的调节作用, 活化基因表达过程。在本研究中也已观察到 CERB 的活化作用(Ser133 的磷酸化作用)。与在对照细胞中经 BK 处理之后滞留不到 10 分钟的 Erk1/2 磷酸化过程不同, 无论在阿尔茨海默氏病细胞还是在对照细胞中的高度磷酸化的 CERB, 在经 BK 处理之后都可持续 10 分钟。这种情况提示了, 对于 CERB 的活化过程经历的时间是不同的。PKC、c-src 和 PI3 激酶等抑制物对于 CERB 磷酸化过程的抑制作用方式, 与其对于磷酸化过程的抑制方式相似, 这提示, CERB 的活化过程是由同样的信号通路所制约的。PP1 则可完全抑制由 BK 所激发的 CERB 磷酸化过程, 它可提高对照细胞中 CERB 蛋白质的表达过程。(图 6B), 这可能反映了是一种正常的补偿性机制。然而, 在阿尔茨海默氏病细胞中则不能观察到 PP1 的这种作用, 这提示, 在阿尔茨海默氏病方面, 对于 CERB 表达过程的调节机制可能已被破坏。

本研究的结果提出的有关涉及与 MAPK 相关的各种分子串联错乱的阿尔茨海默氏病发病原理的论据, 汇总如图 6 所示。据其他研究结果提示, 对于神经元的可塑性例如, 学习和记忆有关的脑部功能, MAPK 具有重要作用。Erk 可在 tau 蛋白的多个 Ser/Thr 部位, 包括在 tau 的各处微管结合区的 Ser262 和 Ser356(Reynolds 等, 2000)形成磷酸化过程。Ser262 的磷酸化过程对于 tau 在微管组织的装配和稳定性的能力方面, 具有重大的损害作用。随着涉及 MAPK 的各条信号发送通路受损, 细胞就会对来自细胞内外的各种信号发生反应, 而诱导对于多种其他蛋白质的异常表达过程。

诸如 MAPK 磷酸化过程的加强和延长之类的分子发送信号的异常状态的全身性表现，可反映出中枢神经系统的各种紊乱现象，例如，记忆丧失，这是一种具有重大的行为性/认识性后果的病态。因而，从容易接触的外周部位寻找一种细胞，例如成纤维细胞，从中检测 MAPK 及其相关的各条传送通路中的阿尔茨海默氏病特异性的异常问题，就可为阿尔茨海默氏病的早期诊断，以及鉴定和研制其治疗用药物，提供一套有效而可靠的手段。

## 实施例 2

利用取自亨廷顿氏痴呆 (HD) 受试者的皮肤成纤维细胞，进行测试，以确定由 BK 诱导的 Erk1/2 活性延长现象，是否具有阿尔茨海默氏病特异性。图 8 所示为缓激肽对于成纤维细胞上的磷酸化过程方面的作用。N = 4, P = 0.39, t 测验。用 10 纳克分子 BK 对该种亨氏痴呆病的细胞处理 10 分钟。其 Erk1/2 磷酸化水平与其同年龄对照受试者的细胞并无差别的情况表明，在亨廷顿氏痴呆症中并不存在由 BK 诱导的 Erk1/2 活性增高的现象。因而，对于这种亨廷顿氏痴呆症呈现阴性的本发明用于阿尔茨海默氏病诊断方面的 MAP 激酶测定法，是对于阿尔茨海默氏病具有特异性的一种试验方法。

在本发明的上述各优选的实施例中，都采用了专用术语，以求表达明确。然而，本发明并无局限于所选用的这些术语的意图。应当注意的是，其中每一个专用成分，包括所有的技术等价成分，都是以同等的操作方式来完成同样的目标。

本发明的上述各项实施例，都可予以修改或变更，若干要素可以增添或者删削，都不至于背离本发明，并且根据上述的教导，本领域的资深技术人员都会予以赞赏。在此引用的每一种参考文献，都是作为资料工具分别编制的。

## 参考文献

2001/2/27 归档的美国临时专利申请书 60/312,064，以及下列各项申请书，都在此收编为参考文献。

1. Barrow, PR, Empson, RM, Gladwell, SJ, Anderson, CM, Killick, R, Yu, X, Jefferys, JG 和 Duff, K. (2000) 神经生物性疾病 7, 119-126 (“Barrow 等, 2000”)。
2. Bassa BV, Roh DD, Vaziri ND, Kirschenbaum MA, Kamanna VS (1999) 美国生理学杂志 277, F328-337 (“Bassa 等, 1999”)。
3. Berridge MJ (1984) 生物化学杂志 220, 345-360 (“Berridge 等, 1984”)。
4. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EW 和 Mandelkow E (1993) 神

经元 11, 153-163 ( “Biernat 等, 1993” )。

5. Cruzblanca H, Koh DS, Hille B. (1998) 在大鼠的交感系神经元中缓激肽通过磷酸酯酶 C 和从 IP<sub>3</sub>-敏感性 Ca<sup>2+</sup>库存释放 Ca<sup>2+</sup>而对 M 流的抑制作用。美国国家科学院学报 95: 7151-7156( “Cruzblanca 等, 1998” )。

6. Ekinici FJ 和 Dhea TB(1999)细胞分子神经生物学 19, 249-260( “Ekinici 和 Shea, 1999” )。

7. Etcheberrigaray E, Gibson GE, Alkon DL (1994) 记忆和阿尔茨海默氏病的病理生理学的分子学原理。纽约科学院年报 747: 245-55( “Etcheberrigaray 等, 1994” )。

8. Etcheberrigaray R, Hirashima N, Nee L, Prince J, Govoni S, Racchi M, Tanzi R, E, 和 Alkon DI (1998) 神经生物性疾病 5, 37-45 ( “Etcheberrigaray 等, 1998” )。

9. Gibson GE, Zhang H, Toral-Barza L, Szolosi S, 和 Tofel-Grehl B(1996) 生物化学和生物物理学文集 1316, 71-77( “Gibson 等, 1996” )。

10. Grant SM, Morinville A, Maysinger D, Szyf M, Cuello AC(1999) 脑研究分子学脑研究 72, 115-20( “Grant 等, 1999” )。

11. Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS (1994) 分泌的乙型淀粉样前体蛋白对促分裂原活化的蛋白激酶的激发作用以及对 tan 磷酸化过程的提高作用。美国国家科学院学报, 91, 7104-7108( “Greenberg 等, 1994” )。

12. Hirashima N, Etcheberrigaray R, Bergamashi S, Racchi M, Bataini F, Binetti, G. Govoni S, Alkon DL (1996) 神经生物性老化过程 17, 549-555 ( “Hirashima 等, 1996” )。

13. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie M, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1994) 阿尔茨海默氏病患者的成纤维细胞中内源性 Ca<sup>2+</sup>流动状态的变化。美国国家科学院学报, 91, 534-538( “Ito 等, 1994” )。

14. Leissring MA, Akban Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP 和 Laferla FM (2000) 细胞生物学杂志 149, 793-798( “Leissring 等, 2000” )。

15. Leissring MA, Parker L, LaFerla FM (1999) 生物学和化学杂志 274, 32535-32538( “Leissring 等, 1999” )。

16. Lu Q, Soria JP, 和 Wood JG (1993) 神经科学研究杂志 35, 439-444( “Lu 等, 1993” )。

17. Mattson MP, Zhu H, Yu J 和 Kindy MS (2000) 神经科学杂志 20, 1358-1364 ( “Mattson 等, 2000” )。

18. McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE (1998) 神经科学杂志 18, 4455-4460(“McDonald 等, 1998”)。
19. Pascale A, Bhagayan S, Nelson TJ, McPhie DL, Etcheberrigaray R (1999) 在表达淀粉样前体蛋白的 C-100 片段的 PC12 细胞中 BK 诱导的钙分的加强反应。脑研究分子学脑研究, 71: 205-2(“Pascale 等, 1999”)。
20. Putney JW Jr, (2000) 神经元 27, 411-412(“Putney 等, 2000”)。
21. Reynolds CH, Betts jc, Blackstick WP, Nebreda AP, 和 Anderson BH (2000) 神经化学杂志 74, 1587-1595(“Reynolds 等, 2000”)。
22. Sheehan JP, Swerdlow RH, Miller SW, Davis RE, Parks JK, Parker WD, Tuttle JB, (1997) 神经科学杂志 17, 4612-4622(“Sheehan 等, 1997”)。
23. Yoo AS, Cheng I, Chung S, Grenfell TZ, Lee H, Pack-Chung E, Handler M, Shen J., 获能的钙入口早老素介导的调制作用。神经元 2000, 9 月; 27(3): 561-72 ( “Yoo 等, 2000” )。

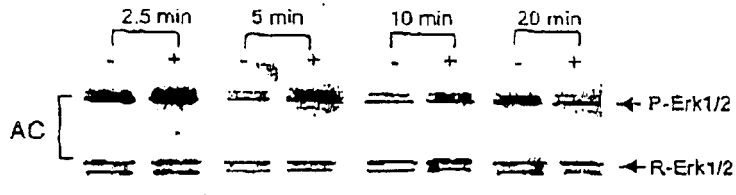


图 1A1

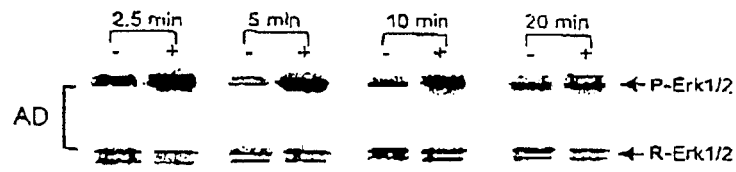


图 1A2

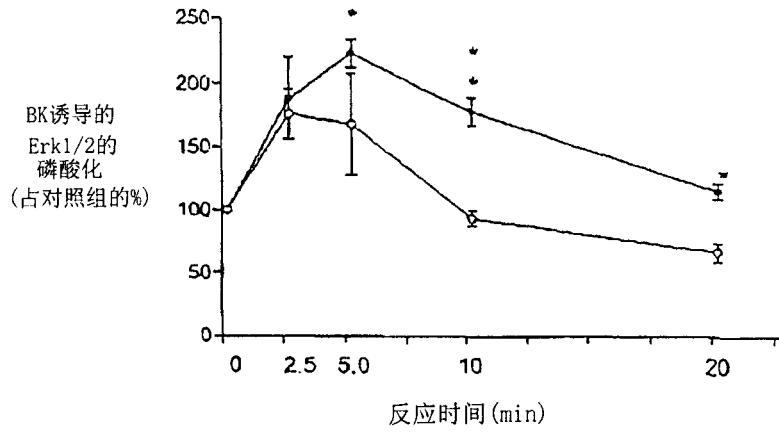


图 1B

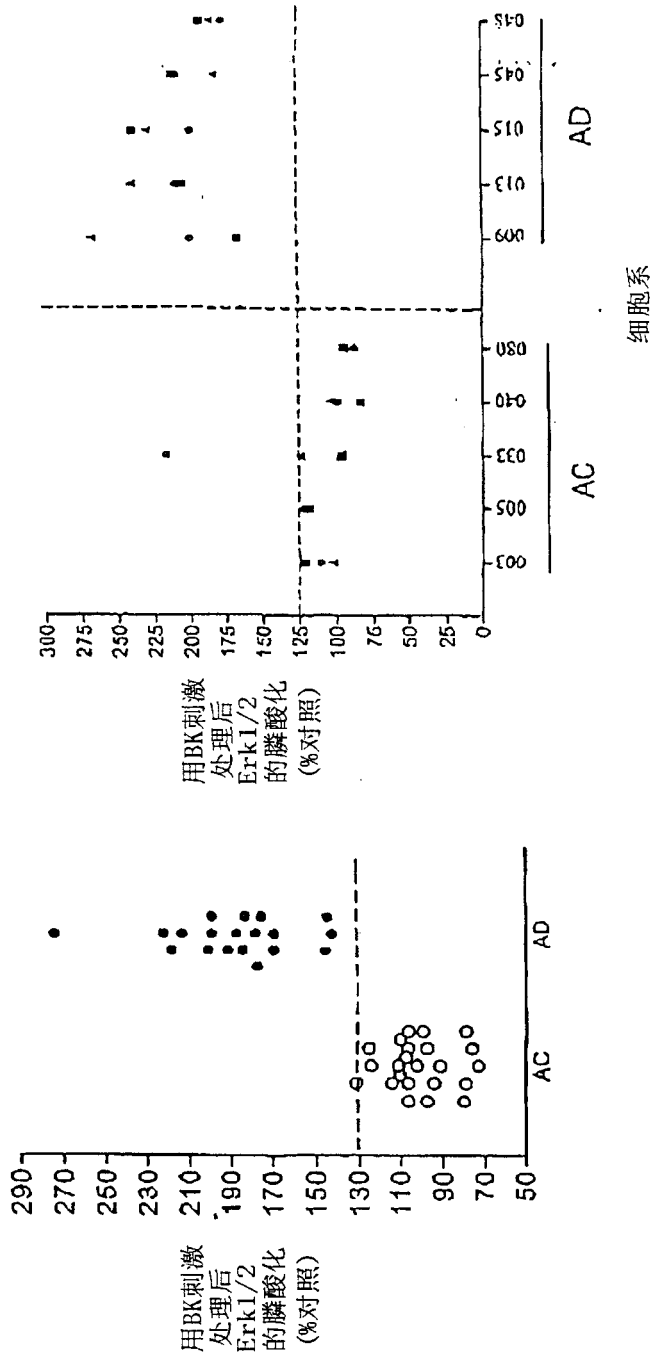


图 2A

图 2B



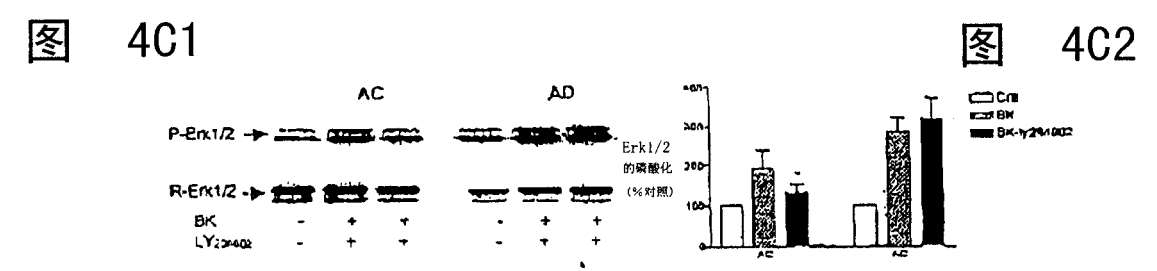
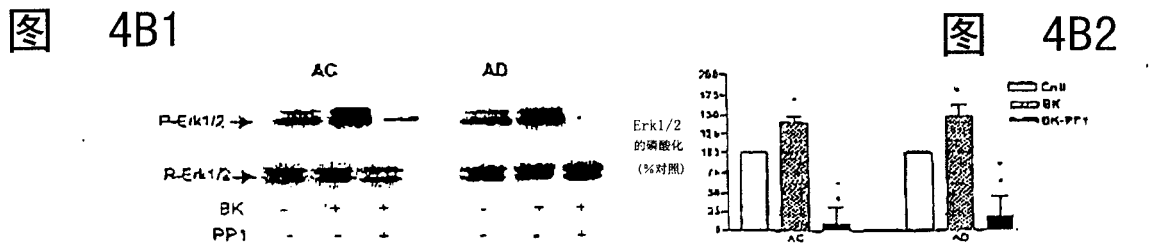
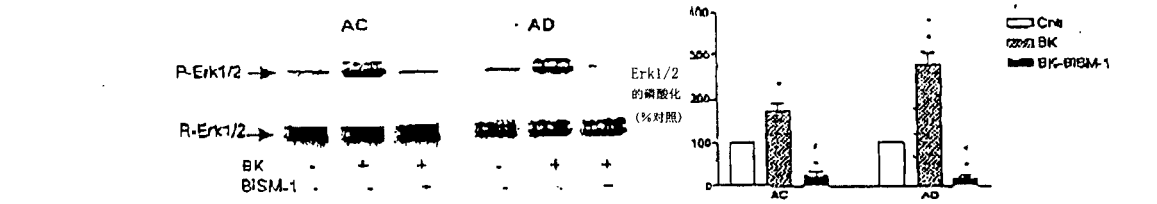
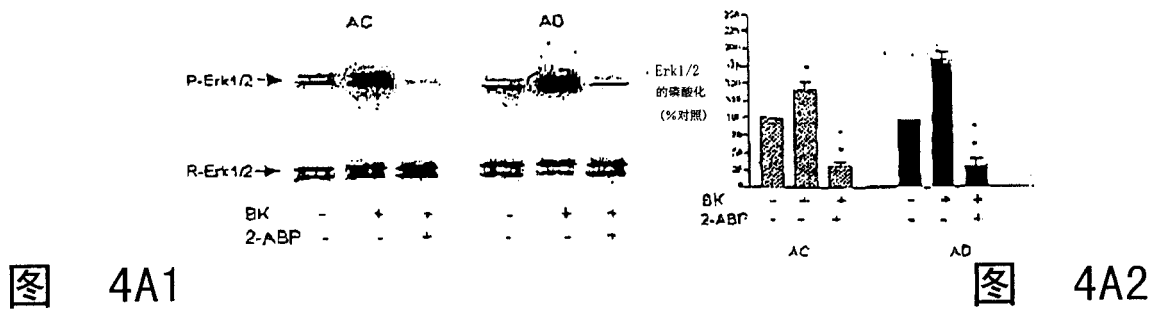


Figure 4A1, 4A2, 4B1, 4B2, 4C1, 4C2, 4D1, 4D2

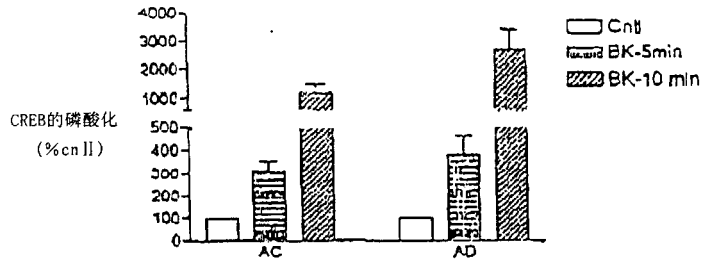


图 5A

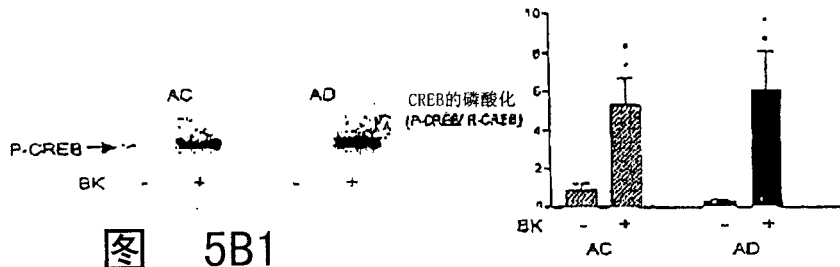


图 5B1

图 5B2

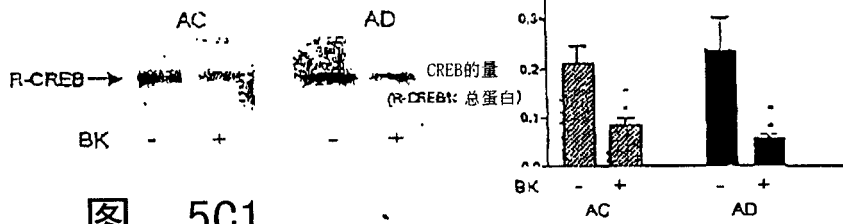


图 5C1

图 5C2

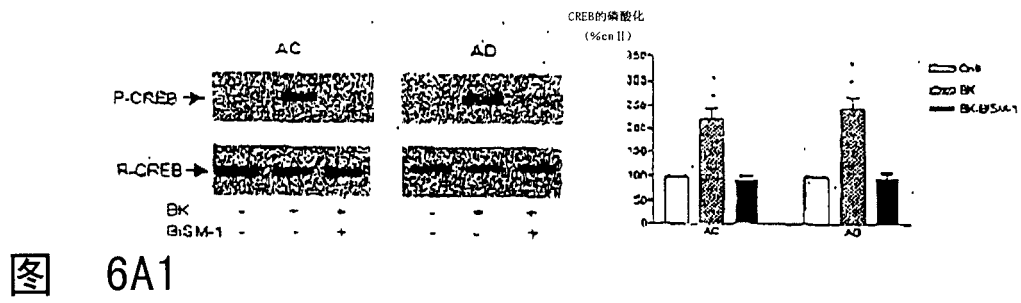


图 6A1

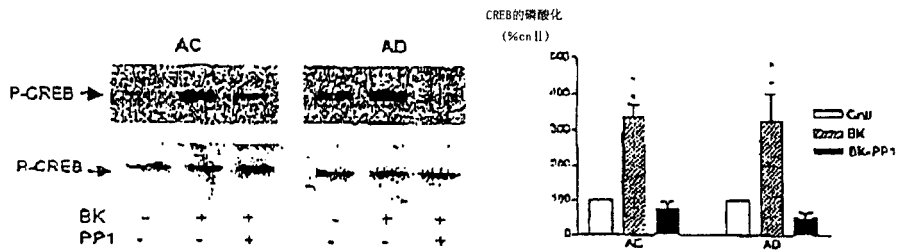


图 6B1

图 6B2

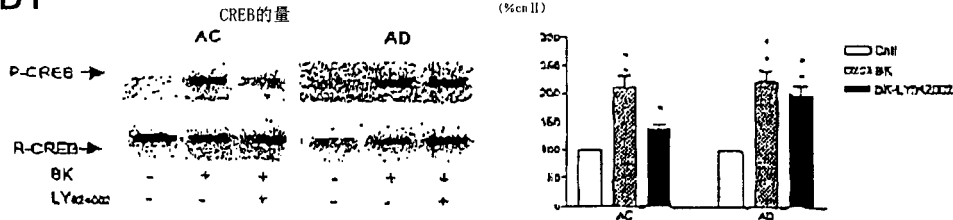


图 6C1

图 6C2

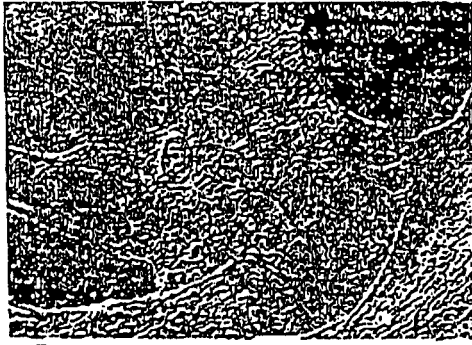


图 7A

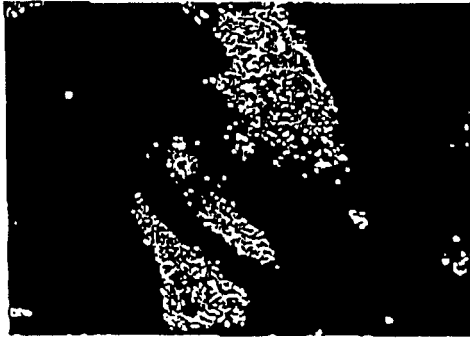


图 7B

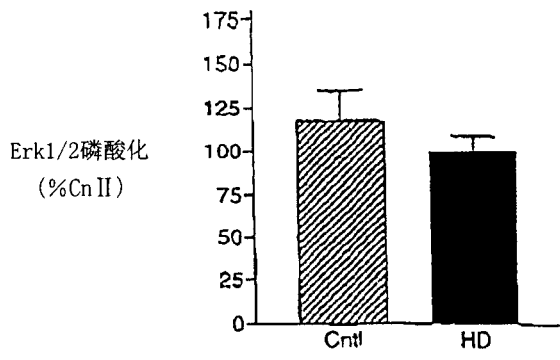


图 8

专利名称(译)	基于促分裂原活化的蛋白激酶的磷酸化诊断阿尔茨海默氏病		
公开(公告)号	<a href="#">CN1549721A</a>	公开(公告)日	2004-11-24
申请号	CN02807832.2	申请日	2002-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	布朗歇特洛克菲勒神经科学研究所		
申请(专利权)人(译)	布朗歇特洛克菲勒神经科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	布朗歇特洛克菲勒神经科学研究所		
发明人	丹尼尔·L·阿尔孔 W·Q·赵		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P25/28 A61P43/00 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68 A61K38/00 A61K49/00 C12N9/00 G01N33/48 G01N33/537		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2500/00 G01N2800/2821 A61P25/28 A61K31/404 A61K31/519 A61K31/5377 A61K31/69 G01N2333/91205 G01N2500/10		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/271416 2001-02-27 US 60/329505 2001-10-17 US		
其他公开文献	CN1549721B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

根据用一种激活剂刺激后，患者细胞内的一种指标蛋白的磷酸化水平出现比基础磷酸化水平异常增高的现象，来诊断阿尔茨海默氏病的一种方法。该种指标蛋白是，例如，Erk1/2，激活剂是，例如，缓激肽。

