



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101478977 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200780012280. 6

(22) 申请日 2007. 03. 29

(30) 优先权数据

60/787, 240 2006. 03. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2007/000391 2007. 03. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02007/109851 EN 2007. 10. 04

(73) 专利权人 维拉科治疗学控股有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 C·霍文斯 N·科尔科兰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

A61K 33/04 (2006. 01)

A61P 25/16 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 03066071 A1, 2003. 08. 14, 全文.

W0 03066071 A1, 2003. 08. 14, 全文.

W0 2005/023274 A1, 2005. 03. 17, 全文.

US 2005/0142216 A1, 2005. 06. 30, 全文.

审查员 李晓林

权利要求书 1 页 说明书 37 页 附图 16 页

(54) 发明名称

神经变性疾病的治疗

(57) 摘要

本发明涉及硒酸盐或其药学上可接受的盐在提高蛋白磷酸酶 PP2A 活性的方法和组合物中的应用。还描述了减少 Tau 蛋白磷酸化、抑制 GSK3 活性和治疗或预防神经变性疾病的方法。

1. 硒酸盐或其药学上可接受的盐在制造治疗或预防神经变性疾病药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述神经变性疾病是 tau 蛋白病或 α -共核蛋白疾病。
3. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在于,所述 tau 蛋白病选自早老性痴呆、老年痴呆、阿尔茨海默病、与染色体 17 连锁的帕金森综合征(FTDP-17)、进行性核上麻痹、皮克病、原发进行性失语症、额颞叶痴呆和皮质基底痴呆。
4. 如权利要求 3 所述的应用,其特征在于,所述 tau 蛋白病选自早老性痴呆、老年痴呆或阿尔茨海默病。
5. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在于,所述 α -共核蛋白疾病选自帕金森病、伴痴呆的帕金森病、伴有雷维小体的痴呆、皮克病、唐氏综合征、多发性系统性萎缩、淀粉样侧索硬化症(ALS)或哈-斯综合征。
6. 如权利要求 5 所述的应用,其特征在于,所述 α -共核蛋白疾病是帕金森病。
7. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,该药物用于与治疗或预防神经变性疾病的另一种疗法或能缓解神经变性疾病症状的治疗一起给予。
8. 硒酸盐或其药学上可接受的盐在制备抑制或降低神经元、神经胶质细胞或雷维小体中 tau 蛋白磷酸化的药物中的应用。
9. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于,所述 tau 蛋白是微管相关的 tau 蛋白。
10. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于,所述 tau 蛋白位于神经原纤维缠结中。
11. 如权利要求 10 所述的应用,其特征在于,所述药物抑制或防止 tau 蛋白的超磷酸化。
12. 硒酸盐或其药学上可接受的盐在制备增强 PP2A 活性的药物中的应用。
13. 如权利要求 12 所述的应用,其特征在于,所述 PP2A 是去磷酸化 Akt 的同工型。
14. 如权利要求 13 所述的应用,其特征在于,所述 PP2A 是去磷酸化 tau 蛋白的同工型。
15. 如权利要求 14 所述的应用,其特征在于,所述 tau 蛋白是在神经元、神经胶质细胞或雷维小体中发现的微管相关的 tau 蛋白。
16. 硒酸盐或其药学上可接受的盐在制备抑制神经元或神经胶质细胞中 GSK3 β 活性的药物中的应用。
17. 一种药物组合物,其包含硒酸盐或其药学上可接受的盐,和另一种治疗或预防神经变性疾病的药物,其中所述组合物包含 5-700 毫克的硒酸盐或其药学上可接受的盐。
18. 如权利要求 17 所述的药物组合物,其特征在于,所述其它药物选自:胆碱酯酶抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂、雌激素制剂、非类固醇消炎药物、左旋多巴、多巴脱羧酶抑制剂、多巴胺激动剂、单胺氧化酶 B 抑制剂、抗胆碱能药物和 COMT 抑制剂中的一种或多种。
19. 如权利要求 18 所述的药物组合物,其特征在于,其中所述其它制剂选自:他克林、杜尼匹次、加兰他敏、雷司替明、美金刚胺、倍美力、阿斯匹林、布洛芬、左旋多巴、卡比多巴、苄丝肼、溴隐亭、硫丙麦角林、派拉米苏、罗比尼洛、卡麦角林、阿朴吗啡、稠环乙脲、司来吉兰、拉撒斯林、苯并托品甲磺酸溴隐亭、盐酸苯海索、恩他卡朋、托卡朋或金刚胺。

神经变性疾病的治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及硒酸盐或其药学上可接受的盐在提高 PP2A 活性的方法和组合物中的应用。本发明还涉及硒酸盐或其药学上可接受的盐在抑制或降低 tau 蛋白磷酸化的方法,抑制 GSK3 β 活性的方法,具体说是治疗或预防神经变性疾病的方法中的应用。在某些实施方式中,本发明涉及将硒酸盐或其药学上可接受的盐与其它治疗药物联合用于治疗或预防神经变性疾病的方法中的应用。

[0002] 发明背景

[0003] 神经变性疾病是一些疾病的总称,包括使脑功能正常的神经元受损而致的脑控制自身或机体能力的丧失。神经变性疾病是老年人的主要疾病。随着预期寿命的增长,世界人群活得更长,神经变性疾病患者的数目随之增多。

[0004] 在一些神经变性疾病中,脑中的神经元或神经胶质细胞中存在异常 tau 蛋白的沉积。例如,在阿尔茨海默病 (AD) 特征性神经原纤维缠结中发现了异常的 tau 蛋白。神经原纤维缠结 (NT) 是 AD 的二种神经病理改变之一 [Lee 等,2001]。形成配对的螺旋纤维是 NT 的主要成分,其主要由微管相关蛋白 tau 组成 [Lee 等,1991 ;Grundke-Iqbal 等,1986a ;Grundke-Iqbal 等,1986b]。PHF-tau (从 PHF 分离的 tau 蛋白) 是高度不溶性的蛋白,在 SDS 凝胶 (电泳) 中显示停滞不移动,不能结合微管,因为它被异常磷酸化 (与正常 tau 蛋白相比,有多个位点磷酸化) [Lee 等,1991 ;Grundke-Iqbal 等,1986a ;Grundke-Iqbal 等,1986b]。去磷酸化后,PHF-tau 蛋白变成可溶性蛋白而如同正常 tau 蛋白那样能结合和促进微管装配 [Wang 等,1995 ;Wang 等,1996 ;Bramblett 等,1993]。认为是 tau 蛋白异常磷酸化引起了 tau 功能不全、微管不稳定、轴突转运丧失、神经变性和与 AD 相关的痴呆。

[0005] 一种异常类型的 tau 蛋白是超磷酸化的 tau 蛋白。已知体内糖原合酶的激酶 3 β (GSK3 β) 可使 tau 蛋白的多个磷酸化位点,包括阿尔茨海默病的特有 Ser³⁹⁶ 残基磷酸化 [Li 和 Paudel,2006]。进而,已知蛋白激酶 Akt 可使 GSK3 β 磷酸化,已知蛋白磷酸酶 PP2A 可减弱 Akt 的活性。

[0006] PP2A 是一种异质三聚体全酶,存在多种形式,由结合于不同调节亚基的共同核心结构组成 [Mumby 和 Walter,1993]。此酶的核心是由催化 (C) 亚基和结构 (A) 亚基组成的复合体。第三种亚基称为 B 亚基,其包括能调节 PP2A 活性和特异性的几种多肽 [Mumby 和 Walter,1993 ;Kamibayashi 等,1994]。PP2A 的 ABC 同工型重要部分能与神经元微管结合 [Sontag 等,1995],意味着 PP2A 可能调节微管相关蛋白 (MAP) 如 tau 蛋白的磷酸化状态。已证明含 B 调节亚基的 PP2A,而非其它形式 (即含 B' 和 B'' 亚基) 的 PP2A 能在体外结合 tau 蛋白使之强效去磷酸化。另外,抑制 PP2A 的 ABC 同工型可诱导 tau 蛋白超磷酸化、tau 蛋白与微管分离、和丧失 tau 蛋白导致的微管稳定性 [Sontag 等,1996]。近年来证明 PP2A 占人脑 tau 蛋白磷酸酶总活性的约 71% [Liu 等,2005]。AD 病人脑中磷酸酶总活性和 PP2A 针对 tau 蛋白的活性显著降低,而 AD 脑中的其它磷酸酶如 PP2B 的活性实际上升高 [LIU 等,2005]。人脑中 PP2A 活性与大多数磷酸化位点的 tau 蛋白磷酸化水平呈负相关。这表明 PP2A 是主要的 tau 蛋白磷酸酶,调节着人脑多处部位的 tau 蛋白磷酸化。这意味着 AD 脑中

tau 蛋白的异常超磷酸化部分是由于 PP2A 活性下调所致,因此其作用是能提高 PP2A 活性,特别是能提高 PP2A 的 ABC 同工型活性的制剂将具有临床用途,可治疗或预防神经变性疾病的发展。

[0007] 有证据证明,tau 蛋白异常磷酸化的逐渐增多可能与存在异常的 α -共核蛋白(α -synuclein)的神经变性疾病相关。在阿尔茨海默病、帕金森病、Guarn-帕金森-ALS-痴呆复合症和由 α -共核蛋白突变引起的帕金森病中 tau 蛋白和 α -共核蛋白二者发生病变 [Duda 等,2002 ;Forman 等,2002 ;Ishizawa 等,2003]。

[0008] α -共核蛋白看来在帕金森病 (PD) 的病理生理学中起着重要作用。雷维小体 (Lewy body) 是 PD 的病理学标志,其主要由 α -共核蛋白组成 [Spillantini 等,1997 ;Spillantini 等,1998b]。

[0009] 认为 α -共核蛋白在 PD 的病理生理学中起着关键作用,因为它在雷维小体中积累,且因为遗传学研究鉴定到 α -共核蛋白中存在与家族性 PD 相关的突变 [Kruger 等,1998 ;Polymeropoulos 等,1997 ;Singleton 等,2003 ;Spillantini 等,1998b ;Zarranz 等,2004]。

[0010] α -共核蛋白中的 A53T 和 A30P 突变导致 α -共核蛋白聚集倾向升高看来是 PD 的病因。这二种突变提高了 α -共核蛋白自发性聚集或因对外源因子如金属和氧化应激的反应而聚集的倾向 [Conway 等,2000 ;Hashimoto 等,1999 ;Kruger 等,1998 ;Ostreova-Golts 等,2000 ;Paik 等,1999、2000 ;Polymeropoulos 等,1997]。

[0011] 在转基因小鼠和果蝇中, α -共核蛋白的 A53T 和 A30P 突变也可引起年龄依赖的 α -共核蛋白聚集和神经元损伤 [Feany 和 Bender,2000 ;Giasson 等,2002 ;Kahle 等,2001 ;Masliah 等,2000]。这些研究结果强调了 α -共核蛋白与神经变性相关。

[0012] 异常磷酸化的 tau 蛋白存在于散发 PD 病人的雷维小体中,出现在靠近含 α -共核蛋白病态微管装配体区域的神经元中 [Ishizawa 等,2003]。体外证据也将 α -共核蛋白与 tau 蛋白相联系,因为 α -共核蛋白在体外能结合 tau 蛋白和通过蛋白激酶 A 刺激 tau 蛋白磷酸化 [Giasson 等,2003 ;Jensen 等,1999]。近年的研究表明 α -共核蛋白体外能提高 tau 蛋白的纤维化,而异常的 tau 蛋白纤维存在于过度表达 A53T 突变型 α -共核蛋白的有症状转基因小鼠脑中 [Giasson 等,2003]。

[0013] Frasier M 等,2005 证明,在过度表达 A30P α -共核蛋白转基因小鼠中,A30P α -共核蛋白聚集发生在病理性 tau 蛋白旁边,即产生的 α -共核蛋白聚集与病理性 tau 蛋白平行分布,并证明有症状的 A30P α -共核蛋白转基因小鼠出现异常的 tau 蛋白磷酸化,这种磷酸化与 c-jun 激酶活化相关。

[0014] 除了 α -共核蛋白 (α -Syn) 聚集外,氧化应激和接触某些神经毒素如 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 与 PD 的病变相联系。在小鼠和灵长动物中 MPTP 能诱导黑质纹状体多巴胺能 (神经) 通路的选择性变性,如 PD 中所见,此与 α -Syn 表达水平和聚集升高相关,但不诱生真正的雷维小体 [Dauer 和 Przedborski,2003],而连续给予 MPTP 可引发对泛素和 α -共核蛋白具有免疫反应性的黑质包涵体形成 [Fornai 等,2005]。某些雷维小体的另一种成分是异常磷酸化的 tau 蛋白 [Ishizawa 等,2003]。已报导在家族性阿尔茨海默病 (AD)、唐氏综合征和雷维小体病病人的脑中 tau 蛋白和 α -Syn 作为聚集体或包涵体共同定位在神经元中,或位于某些雷维小体或雷维小体样包涵体内部 [Kotzbauer

等,2001 ;Lippa 等,1999 ;Arima 等,1999 ;Iseki 等,1999]。

[0015] tau 蛋白和 α -Syn 之间的相似处包括在突触前神经元中的表达、体内半寿期长、它们的“天然不折叠”性质使它们对热稳定,和它们通过疏水性残基臂形成装配纤维的核心纤维化倾向 [Friedhoff 等,2000 ;Serpell 等,2000]。

[0016] [396/404]S3E 双突变(模拟 PHF-1 磷酸化位点的伪磷酸化结构,其中在最长的人 tau 蛋白同工型 -ht40 中 396 位和 404 位的二个丝氨酸残基被替换成谷氨酸残基)的 tau 蛋白的其它体外资料也表明,Ser396/404 的超磷酸化可引起 tau 蛋白 C 末端采取更为延伸的构型,而改变其对 tau 蛋白寡聚化的抑制作用和提高纤维形成的速度 [Abraha 等,2000]。

[0017] Duka 等,2006 现已证明,MPTP 诱导的中脑多巴胺能神经元 α -Syn 表达水平升高促进了 tau 蛋白 PHF-1 结合位点(Ser396/404)磷酸化模式的改变,导致这二种蛋白的失位(mislocation),促进其共同免疫沉淀,并提高了十二烷基肌氨酸钠不溶性超磷酸化 tau 蛋白的水平,提示 MPTP- 诱导的帕金森病机理和神经毒性的启动步骤是 α -Syn 指导的 tau 蛋白 Ser396/404 超磷酸化。

[0018] MPTP 引起 α -Syn 与微管分离增加和与细胞骨架结合分数有关的磷酸化 tau 蛋白水平降低的发现,也可能是与神经变性过程的机制相关。tau 蛋白的超磷酸化大大降低了 tau 蛋白对微管的亲和力,导致其失去稳定 [Drechsel 等,1992 ;Biernat 等,1993 ;Michaelis 等,2002]。此外,也知道磷酸化的 tau 蛋白能结合其它微管结合蛋白如 MAP1 和 MAP2 并从微管上除去这些蛋白 [Iqbal 和 Grundke-Iqbal,2005]。然而,由于已知 α -Syn 能结合微管 [Wersinger 和 Sidhu,2005] 并且在轴突信号转运中可能起作用 [Sidhu 等,2004],因此该蛋白与微管分离有可能进一步加剧微管的不稳定,破坏细胞骨架网络和细胞内稳态。因此,在导致与包涵体形成相关的神经变性过程的链式反应中, α -Syn 与微管分离和结合于微管的 tau 蛋白发生异常可能包含另一种联系。

[0019] MPTP- 诱导的 α -Syn 水平异常调节着磷酸化 tau 蛋白的形成,具体说,tau 蛋白的 PHF-1 形式使我们能够了解 PHF 形成和重要神经功能相关丧失的早期阶段的情况,提示 MPTP- 诱导的帕金森综合征或神经毒性可能是 tau 蛋白疾病,伴随使人联想到共核蛋白病的 α -Syn 改变。

[0020] 这提示,已知 AD 发病中的 tau 蛋白异常移动也可能出现在帕金森病中,但发生在与 AD 不相关的脑部区域中,因此提示其在某些神经变性疾病的发生中有相当大的重叠。由此提出,看似无关的神经变性疾病实际上可能有着共同的触发机制和后续病理变化,启动了运动神经元的变性。

[0021] 因此需要能影响 tau 蛋白磷酸化的,临床上可用于治疗或预防神经变性疾病的制剂。

[0022] 发明概述

[0023] 本发明部分是基于以下发现,即蛋白磷酸化酶 PP2A 接触硒酸盐或其药学上可接受的盐可提高其活性。提高 PP2A 活性可降低或抑制 tau 蛋白的磷酸化,特别是超磷酸化,包括二种分支方法:i) 去磷酸化灭活 Akt,从而降低 GSK3 β 的磷酸化,然后降低 tau 蛋白的磷酸化,和 ii) tau 蛋白直接去磷酸化。降低 tau 蛋白磷酸化特别是超磷酸化水平可减少或防止神经元或神经胶质细胞中异常 tau 蛋白的积累或沉积,因而可用于治疗或预防神经变性疾病。

[0024] 因此,在一方面内容中,本发明提供治疗或预防对象神经变性疾病的方法,包括给予所述对象有效量的硒酸盐或其药学上可接受的盐。在某些实施方式中,所述神经变性疾病是 tau 蛋白疾病。在某些实施方式中,所述神经变性疾病是 α -共核蛋白疾病。在特定实施方式中,所述神经变性疾病选自早老性痴呆、老年痴呆、阿尔茨海默病和帕金森病。

[0025] 在本发明另一方面内容中,提供抑制或降低神经元、神经胶质细胞或雷维小体中 tau 蛋白磷酸化的方法,包括使神经元或神经胶质细胞接触有效量的硒酸盐或其药学上可接受的盐。在某些实施方式中,所述 tau 蛋白是微管相关 tau 蛋白。在某些实施方式中,所述 tau 蛋白位于神经原纤维缠结中。在某些实施方式中,抑制或防止了 tau 蛋白的超磷酸化。

[0026] 在另一方面内容中,本发明提供增强 PP2A 活性的方法,包括使 PP2A 接触有效量的硒酸盐或其药学上可接受的盐。在某些实施方式中,所述 PP2A 是去磷酸化 Akt 的一种同工型。在某些实施方式中,所述 PP2A 是去磷酸化 tau 蛋白,特别是在神经元、神经胶质细胞和雷维小体中发现的微管相关 tau 蛋白的一种同工型。

[0027] 在另一方面内容中,本发明提供抑制神经元或神经胶质细胞中 GSK3 β 活性的方法,该方法包括使神经元或神经胶质细胞接触有效量的硒酸盐或其药学上可接受的盐。

[0028] 在本发明还有一方面内容中,提供硒酸盐或其药学上可接受的盐在制造治疗或预防神经变性疾病药物中的应用。

[0029] 在上述已广泛描述的方法和应用的某些实施方式中,硒酸盐或其药学上可接受的盐与适合治疗或预防神经变性疾病的其它疗法,或与适合减轻神经变性疾病症状的疗法联用。

[0030] 发明详述

[0031] 1. 定义

[0032] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员共同理解的含义。虽然与本文所述相似或等同的任何方法和材料可用于实施或测试本发明,但本文描述的是优选的方法和材料。对于本发明的目的,下面定义了以下术语。

[0033] 本文所用冠词“一个”和“一种”指该冠词语法对象有一个或一个以上(即至少一个)。例如,“一种元件”指一个元件或一个以上元件。

[0034] 本文所用术语“约”指与参比品的数量、水平、数值、维度、大小或用量相比,差异可高达 30%、20% 或 10% 的数量、水平、数值、维度、大小或用量。

[0035] 在全篇说明书和权利要求书中,除非另有要求,以下词语“包含”和其变体“含有”和“包括”应理解为意指包括所述的整体或步骤,或一组整体或步骤,但不排除任何其它整体或步骤,或其它一组整体或步骤。

[0036] 术语“去磷酸化”本文用于指用化学方法去除生化物质如蛋白质中的磷酸基团(PO_4^{2-})。在细胞环境中,可通过酶如磷酸酶的酶促作用实现去磷酸化。

[0037] 本文所用术语“胶质细胞”指非神经元细胞,它们能为中枢神经系统的神经元提供结构和代谢支持。胶质细胞也称为神经胶质细胞或胶质。

[0038] 术语“超磷酸化”指某生化物质如蛋白质中所有可利用的磷酸化位点都被磷酸化。该生化物质不会发生进一步磷酸化。短语“抑制或减少超磷酸化”包括防止该生化物质所有的位点被磷酸化,和减少其所有磷酸化位点被磷酸化的生化物质的数量。

[0039] 本文所用的术语“联用”指用至少二种制剂治疗对象,使得它们对神经变性疾病的作用在同一段时间内至少发挥一部分。可在一种组合物中同时给予至少二种制剂,或可用分开的组合物同时或依次给予各制剂。

[0040] 术语“雷维小体”指神经细胞中发生的蛋白异常聚集。雷维小体中的主要蛋白聚集体由 α -共核蛋白组成。

[0041] 术语“神经变性疾病”本文用于指特征为神经元丧失或变性的神经疾病。神经变性疾病包括神经变性运动疾病和与记忆丧失和/或痴呆相关的神经变性疾病。神经变性疾病包括 tau 蛋白病和 α -共核蛋白病。神经变性疾病的例子包括但不限于:老年性痴呆、老年痴呆、阿尔茨海默病、与染色体 17 连锁的帕金森综合征 (FTDP-17)、进行性核上麻痹 (PSP)、皮克病、原发进行性失语症、额颞叶痴呆、皮质基底(核)痴呆、帕金森病、伴痴呆的帕金森病、伴有雷维小体的痴呆、唐氏综合征、多发性系统性萎缩、淀粉样侧索硬化症 (ALS) 和哈-斯综合征。

[0042] 术语“神经原纤维缠结”本文用于指位于脑中的异常结构,其由成对的螺旋纤维丝(神经原纤维和微管)的致密阵列组成。神经原纤维缠结中包含有 tau 蛋白,特别是微管相关 tau 蛋白。认为脑中存在的神经原纤维缠结数量与对象痴呆程度相关。神经原纤维缠结是阿尔茨海默病的一种区别特征。

[0043] 本文所用术语“神经元”指在中枢神经系统中发现的细胞,它们是专门接收、加工和传输信息的细胞。神经元也可称为神经细胞。

[0044] 本文所用术语“营养量”包括能提供每日平均摄入硒量的硒用量。在美国每日平均摄入量是 80—120 微克/天。

[0045] 与硒酸盐相关的本文所用的“药学上的盐”指对于人类和动物给药毒理学安全的金属离子盐。例如,合适的药学上可接受的盐包括但不限于:药学上可接受的无机酸如氢氯酸、硫酸、磷酸、硝酸、碳酸、硼酸、磺酸和氢溴酸的盐,或药学可接受的有机酸如乙酸、丙酸、丁酸、酒石酸、马来酸、羟基马来酸、延胡索酸、马来酸、柠檬酸、乳酸、粘酸、葡糖酸、苯甲酸、琥珀酸、草酸、苯乙酸、甲烷磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸、水杨酸、苯磺胺酸、天冬氨酸、谷氨酸、乙二胺四乙酸、硬脂酸、棕榈酸、油酸、月桂酸、泛酸、鞣酸、抗坏血酸和正戊酸的盐。

[0046] 碱盐包括但不限于:与药学上可接受的阳离子如钠、钾、锂、钙、镁、铁、镍、锌、铵和烷基铵形成的那些盐。

[0047] 可用诸如低级烷基卤如甲基、乙基、丙基、丁基氯、溴和碘;二烷基硫酸盐如二甲基和二乙基酸盐;和其它盐制剂季铵化碱性含氮基团。

[0048] 合适的硒酸的金属离子盐包括但不限于:钠、钾、锂、镁、钙、铁、镍、锌、铵和烷基铵盐。在某些实施方式中,所述盐不是硒酸锂。优选的硒酸盐是钠盐 Na_2SeO_4 。

[0049] 术语“磷酸化”本文用于指在生化物质如蛋白质中化学加入磷酸基团(PO_4^{2-})。在细胞环境中,可通过酶如激酶的酶促作用实现磷酸化。短语“抑制或减少磷酸化”包括防止生化物质的一个或多个磷酸化位点发生磷酸化,包括防止所有的磷酸化位点发生磷酸化,如超磷酸化。此短语也包括通过防止一个或多个磷酸化位点的磷酸化降低生化物质的磷酸化程度,或导致在该生化物质的一个或多个磷酸化位点发生去磷酸化。

[0050] 术语“对象”或“个体”或“病人”本文中可互换使用,指需要预防或治疗的任何对象,特别是脊椎动物对象,更具体说是哺乳动物对象。合适的属于本发明范围的脊椎动物对

象包括但不限于：灵长类、禽类、家畜动物（如猪、绵羊、牛、马、驴）、实验动物（如家兔、小鼠、大鼠、豚鼠、猪、仓鼠）、陪伴动物（如猫和狗）和捕获的野生动物（如狐狸、鹿、野狗）。优选的对象是需要治疗或预防神经变性疾病，特别是阿尔茨海默病或痴呆的人。然而，应理解以上术语不暗示存在症状。

[0051] 术语“超营养量”本文用于指所用剂量高于认为符合营养要求的量。在美国，平均每日的硒摄入量为 80-120 微克 / 天。超营养的硒用量向对象提供了高于推荐的每日允许量。例如，超营养硒量可以是每天：3 μ g-20mg/kg、每天 0.015mg-20mg/kg、0.1mg-20mg/kg、0.1mg-14mg/kg、0.1mg-13mg/kg、0.1mg-12mg/kg、0.1mg-10mg/kg、0.1mg-9mg/kg、0.1mg-8mg/kg、0.1mg-7mg/kg、0.1mg-6mg/kg、0.15mg-5mg/kg、0.15mg-4mg/kg、0.15mg-3mg/kg、0.15mg-2mg/kg、0.15mg-1mg/kg，具体是每天 0.1mg-14mg/kg、0.07mg-6.5mg/kg 或 0.15mg-54mg/kg，更具体说是每天 0.07mg-2mg/kg。

[0052] 本文所用的术语“ α -共核蛋白病”指涉及脑神经细胞中和 α -共核蛋白聚集或异常 α -共核蛋白的神经变性疾病或病症。 α -共核蛋白病包括但不限于：帕金森病、伴痴呆的帕金森病、伴有雷维小体的痴呆、唐氏综合征、多发性系统性萎缩、淀粉样侧索硬化症 (ALS) 和哈 - 斯综合征。

[0053] 在治疗或预防神经变性疾病，或抑制或降低 tau 蛋白磷酸化，或抑制 GSK3 β 活性的本文描述中所用术语“有效量”指以单剂量或一系列剂量的一部分给予或加入的硒酸盐或其药学上可接受的盐的用量，该用量能有效提高 PP2A 的活性，具体是能有效预防神经变性疾病相关的症状、维持对症状的控制和 / 或治疗现有症状。此有效量取决于所治疗个体的健康和身体状况，所治疗个体的分类类别、组合物配方、医疗状况的评估和其它相关因素。预计所述剂量范围较广，可通过常规试验确定。在具体实施方式中，有效量是营养量或超营养量。

[0054] 术语“tau 蛋白病”本文用于指涉及脑神经元和胶质细胞中异常 tau 蛋白沉积的神经变性疾病或病症。tau 蛋白病包括的疾病和病症中，tau 蛋白异常磷酸化，包括 tau 蛋白超磷酸化。tau 蛋白病包括但不限于：早老性痴呆、老年痴呆、阿尔茨海默病、与染色体 17 连锁的帕金森综合征 (FTDP-17)、进行性核上麻痹 (PSP)、皮克病、原发进行性失语症、额颞叶痴呆、皮质基底（核）痴呆。

[0055] 2. 治疗或预防神经变性疾病的方法

[0056] 本发明的预测部分基于确定硒酸盐或其药学上可接受的盐能有效提高 PP2A 的活性，进而可通过 GSK3 β 导致减少 tau 蛋白的磷酸化和 / 或提高 tau 蛋白去磷酸化的速率。本发明的方法通常包括使神经元或胶质细胞中的 PP2A 接触能增强 PP2A 活性用量的硒酸盐或其药学上可接受的盐。在某些实施方式中，硒酸盐或其药学上可接受的盐的用量，具体是硒酸盐或其盐的用量每日为约 0.015mg-20mg/kg，常为约 0.1mg-14mg/kg、0.07mg-6.5mg/kg 或 0.15mg-5mg/kg，例如每日 0.07mg-2mg/kg。

[0057] 本发明可有效用于治疗或预防神经变性疾病。神经变性疾病包括神经变性运动疾病和与记忆丧失相关的神经变性疾病，包括 tau 蛋白病和 α -共核蛋白病。神经变性疾病的示范性例子包括：早老性痴呆、老年痴呆、阿尔茨海默病、与染色体 17 连锁的帕金森综合征 (FTDP-17)、进行性核上麻痹 (PSP)、皮克病、原发进行性失语症、额颞叶痴呆、皮质基底（核）痴呆、帕金森病、伴痴呆的帕金森病、伴有雷维小体的痴呆、唐氏综合征、多发性系

统性萎缩、淀粉样侧索硬化症 (ALS) 和哈 - 斯综合征。在优选的实施方式中, 本发明适合治疗或预防 tau 蛋白病, 特别是阿尔茨海默病和痴呆。在其它实施方式中, 本发明适合治疗或预防 α - 共核蛋白病, 特别是帕金森病。硒酸盐或其药学上可接受的盐的适合有效用量是营养性或超营养性硒酸量。在某些实施方式中, 硒酸盐或其药学上可接受的盐的用量是 0.015mg-20mg/kg, 通常为每日约 0.1mg-14mg/kg 或 0.07mg-6.5mg/kg 或 0.15mg-5mg/kg, 例如每日 0.07mg-2mg/kg。在优选实施方式中, 硒酸盐或其药学上可接受的盐是硒酸钠 (Na_2SeO_4)。

[0058] 在某些实施方式中, 给予硒酸盐或其药学上可接受的盐时联用另一种能治疗或预防神经变性疾病的药物。可与硒酸盐或其药学上可接受的盐联用的治疗或预防神经变性疾病的示范性例子包括但不限于: 胆碱酯酶抑制剂如他克林(Cognex®)、杜尼匹次、加兰他敏和雷司替明; N- 甲基 -D- 天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂如美金刚胺; 雌激素制剂如倍美力; 非类固醇消炎药物 (NSAID) 如阿斯匹林和布洛芬; 左旋多巴 (L- 多巴), 多巴脱羧酶抑制剂如卡比多巴和苄丝肼, 或左旋多巴和多巴脱羧酶抑制剂如信尼麦®和Stalevo®联用; 多巴胺激动剂如溴隐亭(Parlodel®)、硫丙麦角林(Permax®)、派拉米苏(Mirapex®)、罗比尼洛(Requip®)、卡麦角林、阿扑吗啡 (APOKYN™) 和稠环乙脲; 单胺氧化酶 B 抑制剂如司来吉兰 (Eldepryl®和Carbex®) 和拉撒斯林 (rasasiline) (Azilect®); 抗胆碱能药物如苯并托品甲磺酸溴隐亭(Cogentin®)和盐酸苯海索(Artane®); 以及 COMT 抑制剂如恩他卡朋(Commtan®)和托卡朋(Tasmar®); 或其它药物如酒石酸雷司替明(Exelon®)和金刚胺(Symmetrel®); 或左旋多巴、多巴脱羧酶抑制剂、多巴胺激动剂、单胺氧化酶 B 抑制剂、抗胆碱能药物和 COMT 抑制剂的二种或多种混合物。

[0059] 联合治疗可包括有效量的硒酸盐或其药学上可接受的盐, 和通常在缺乏硒酸盐时所用的一定量的治疗或预防神经变性疾病的 (其它) 药物。例如盐酸他克林可作为联用药物的一部分与硒酸盐或其药学上可接受的盐一起给予神经变性疾病如 AD 病人, 用量为 40mg-160mg/ 天, 或可给予用量 5-10mg/ 天的杜尼匹次。可给予痴呆病人剂量达到 1.25mg/ 天偶联马雌激素 (CEE) 的倍美力。或者, 由于与硒酸盐或其药学上可接受的盐共同给药, 可减少治疗神经变性疾病所用的药物剂量。在某些实施方式中, 这种联用可显示协同效应。

[0060] 本发明的某些实施方式涉及治疗或预防对象神经变性疾病的方法, 该方法通常包括给予所述对象有效量的硒酸盐或其药学上可接受的盐。为实施这些方法, 治疗该对象的人员可根据该对象的具体情况和环境确定硒酸盐或其药学上可接受的盐的有效剂量。硒酸盐的有效剂量是能有效治疗或预防神经变性疾病, 包括预防症状, 维持对症状的控制或治疗症状的用量。在某些实施方式中, 此有效量是营养量。在其它实施方式中, 此有效量是超营养量。在具体实施方式中, 所述硒酸或其药学上可接受的盐是硒酸钠。

[0061] 以下叙述用于本发明方法的给药方式, 硒酸盐的给药量和硒酸盐制剂。对于所要治疗的神经变性疾病, 可通过测定能表明此类疾病进程的一种或多种诊断参数并与合适的对照相比而确定。以对象是人为例, “合适的对照”可以是治疗前的该个体, 或可以用安慰剂治疗的人 (年龄相配或类似的对照)。按照本发明, 神经变性疾病的治疗包括但不限于: (i) 预防有患神经变性疾病倾向但尚未诊断此病的对象发生此病, 因此这种治疗是对神经变性疾病的预防性治疗; (ii) 抑制神经变性疾病, 即制止神经变性疾病的发展; 或 (iii) 缓解神经变性疾病产生的症状。

[0062] 本发明的方法适合治疗已诊断为神经变性疾病, 怀疑患有神经变性疾病, 或已知被怀疑和认为可能发生神经变性疾病的个体。

[0063] 在上述方法的某些实施方式中, 所述神经变性疾病是 tau 蛋白病, 特别是帕金森病, 所述治疗任选还包括给予适合治疗上述 α -共核蛋白病的其它药物。

[0064] 在优选实施方式中, 所述硒酸盐是硒酸钠。

[0065] 可用本发明方法治疗的对象例子是脊椎动物, 特别是哺乳动物。在某些实施方式中, 所述对象选自: 人、绵羊、牛、马、母牛、猪、狗和猫。优选的对象是人。

[0066] 可采用药物递送领域已知的以下任何技术配制硒酸盐或其药学上可接受的盐。当然要记住, 可以许多方式给予硒酸盐或其药学上可接受的盐, 但并非所有的制剂都适合每种给药途径。可给予固体或液体形式的硒酸盐或其药学上可接受的盐。其应用可经口服、直肠、鼻、局部 (包括口颊、舌下) 或吸入途径。硒酸盐或其药学上可接受的盐可与常规的药学上可接受的辅佐剂、载体和 / 或稀释剂一起给药。

[0067] 给药可用的固体剂型包括片剂、胶囊、粉剂、药丸、糊剂、栓剂和颗粒形式。它们也可包含载体或添加剂, 如调味剂、染料、稀释剂、软化剂、粘合剂、防腐剂、持久剂和 / 或包裹材料。给药的液体剂型包括溶液、混悬液和乳液。这些也可与上述添加剂一起给予。

[0068] 具有合适粘度易于使用的硒酸盐或其药学上可接受的盐的溶液和混悬液可用于注射。如需要, 对注射而言太过粘稠的混悬液可用设计的装置将其植入 (体内)。可通过肠胃道外途径或肠溶装置给予持续释放剂型。肠胃道外给药是用于实施本发明给予硒酸盐或其药学上可接受的盐的另一种途径。“肠胃道外”包括适合注射和经鼻、阴道、直肠和口颊给药的制剂。

[0069] 硒酸盐或其药学上可接受的盐给药可包括口服延长给药剂型。口服制剂优选以缓释胶囊或片剂剂型, 或者以水溶液形式每日给药 1—3 次。可每日、连续、一周一次或一周三次经静脉内给予硒酸盐或其药学上可接受的盐。

[0070] 硒酸盐或其药学上可接受的盐的给药可包括每日给药, 优选采用缓释胶囊或片剂剂型每日给予一次, 或每日给予一次水溶液。

[0071] 硒酸盐或其药学上可接受的盐与适合治疗神经变性疾病的至少一种药物联用时, 可采用单一制剂或组合物, 或采用分开的制剂或组合物的固体或液体剂型给药。在某些实施方式中, 硒酸盐或其药学上可接受的盐和治疗神经变性疾病的这种药物, 可作为单一片剂或胶囊, 或作为分开的片剂或胶囊口服给药。在其它实施方式中, 硒酸盐或其药学上可接受的盐和治疗神经变性疾病的这种药物, 可作为单一组合物或分开的组合物静脉内给药。

[0072] 本发明也提供含营养量或超营养量硒酸盐或其药学上可接受的盐的治疗或预防神经变性疾病的药物组合物。在某些实施方式中, 所述组合物含有 0.5mg-1.0g, 例如 5-450mg 的硒酸盐或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。在某些实施方式中, 硒酸盐或其药学上可接受的盐的用量是约 5.0-700mg 或 5-450mg。在说明性例子中, 硒酸盐或其药学上可接受的盐的用量是 1.6mg-450mg、5-450mg、7.5-250mg, 具体是 50-200mg, 例如 50-100mg 或 100-150mg, 每日一次或分几次给药。在某些实施方式中, 所述药物组合物可用于治疗或预防 tau 蛋白病, 特别是阿尔茨海默病或痴呆。在其它实施方式中, 所述药物组合物可用于治疗或预防 α -共核蛋白病, 特别是帕金森病。

[0073] 含有硒酸盐或其药学上可接受的盐的药物组合物也可包含其它治疗或预防神经

变性疾病的药物。例如,所述组合物可含硒酸盐或其药学上可接受的盐,和胆碱脂酶抑制剂如他克林、杜尼匹次、加兰他敏或雷司替明;N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂如美金刚胺;雌激素制剂如倍美力;或非类固醇消炎药物(NSAID)如阿斯匹林或布洛芬;左旋多巴,多巴脱羧酶抑制剂;左旋多巴和多巴脱羧酶抑制剂联用;和/或COMT抑制剂;多巴胺激动剂;单胺氧化酶B抑制剂;抗胆碱能药物;COMT抑制剂或其它药物如酒石酸雷司替明或金刚胺。

[0074] 本发明的药物组合物可包含作为整个分子而无免疫原性、与硒酸盐生物相容的、能生物吸收、可生物降解而消除的任何其它成分。所述制剂可以即用剂型提供,或以给药前需加入运载体的灭菌粉末或液体剂型提供。如需无菌,可在无菌条件下制备该制剂,可灭菌混合物的各成分,或可除菌过滤该制剂后再使用。这种溶液还可含适当的药物载体,例如但不限于缓冲剂、盐、赋形剂、防腐剂等。

[0075] 在某些实施方式中,本发明方法采用缓释的口服剂型给予硒酸盐或其药学上可接受的盐。这些制剂通常所含的硒酸盐或其药学上可接受的盐溶解性较低以延缓其被吸收入血流中。此外,这些制剂可包含也能延缓硒酸盐或其药学上可接受的盐吸收的其它成分、药物、载体等。可能或可能不会发生生物腐蚀的微胶囊、聚合物包裹系统和渗透泵也可用于延缓或控制硒酸盐或其药学上可接受的盐从胶囊或基质中释放。

[0076] 硒酸盐或其药学上可接受的盐可单用,或作为另一种药物的组成部分使用。因此,本发明也考虑含有用于治疗神经变性疾病的硒酸盐或其药学上可接受的盐的药物。

[0077] 为了更清楚了解本发明的性质和付诸实施,现参考以下非限制性实施例描述本发明的特别优选实施方式。

[0078] 附图的简要说明

[0079] 图1A是治疗后,PC3细胞的完整细胞中和无细胞环境中磷酸化Akt水平的比较报告。

[0080] 图1B是采用卡尔生物化学公司(Calbiochem)K-LISATM Akt活性检测试剂盒,比较硒酸钠与星孢素(一种非特异性的蛋白激酶强抑制剂)对重组人Akt1酶活性影响的示意图。

[0081] 图2A是存在硒酸钠或冈田酸(一种红海藻类的聚醚毒素,能抑制磷酸蛋白的磷酸酶PP1和PP2A)时,Akt在Ser⁴⁷³位点磷酸化的比较图。

[0082] 图2B是存在硒酸钠,或一些磷酸蛋白的磷酸酶抑制剂、互变霉素、冈田酸、内皮肽A(endothallin A)、花萼海绵诱癌素A(calyculin A)和环孢菌素A时,Akt在Ser⁴⁷³位点磷酸化的比较图。

[0083] 图2C提供PC3细胞中的Akt的免疫沉淀图,显示在缺乏(对照)和存在硒酸盐(ATE)或胎牛血清(FCS)时,与PP2A形成复合物的Akt量。

[0084] 图2D是在存在或缺乏硒酸钠时,PC3细胞中磷酸酶PP2A活性的示意图。

[0085] 图3是PP2A磷酸酶活性翻译后调节及底物特异性的示意图(LCMT-亮氨酸羧甲基转移酶,PME-1-磷酸酶甲基酯酶1,PTPA-磷酸酪氨酰(phosphotyrosyl)磷酸酶激活剂)。

[0086] 图4A(i)是在缺乏(对照)或存在硒酸钠或冈田酸(OKA)时,PP2A磷酸酶相对活性的示意图。

[0087] 图4A(ii)示意图显示,硒酸钠对PP2A磷酸酶作用下丝氨酸磷酸肽释放无机磷酸

浓度的影响。

[0088] 图 4B 是显示硒酸钠对 PP1 的磷酸酶活性影响的示意图。

[0089] 图 5A 是在氧化环境中 PP2A 失活的示意图。

[0090] 图 5B 显示硒酸钠和过氧化氢对 Akt 磷酸化水平的影响。

[0091] 图 5C 是在存在 N- 乙基马来酰亚胺 (NEM)、过氧化氢、硒酸钠、硒酸钠和过氧化氢时, PP2A 磷酸酶中的游离巯基示意图。

[0092] 图 5D 是有或没有过氧化氢时,用硒酸钠或 N- 乙酰半胱氨酸 (NAC) 处理的细胞的荧光分布图。

[0093] 图 5E 示意图显示,用过氧化氢、硒酸钠、过氧化氢和硒酸钠、NAC、过氧化氢和 NAC 处理时,荧光细胞的平均百分数。

[0094] 图 6A 示意图显示,用硒酸钠 (ATE500 μ M) 或内皮肤 A (ETA100 μ M) 或不用添加剂 (对照) 时,免疫沉淀的 PP2A 的相对磷酸酶活性。

[0095] 图 6B 是以冈田酸 (OKA500nM) 预处理或不预处理时,用 LY294003 (LY

[0096] 50 μ M) 或硒酸钠 (ATE500 μ M) 处理后,磷酸化 p70S6K 水平的比较图。

[0097] 图 6C 是用能识别 Akt 的抗体检测 PP2A 的不同 B 家族亚基 (B 和 B') 的比较报告。Akt 只与 PP2A 的 B 家族亚基共沉淀。

[0098] 图 7 显示硒酸钠对 GSK3 β 活化的影响。

[0099] 图 8 是显示硒甲硫氨酸不影响 Akt 磷酸化水平,而硒酸盐抑制 Akt 磷酸化的比较图。

[0100] 图 9 是显示不同的硒化合物对 Akt 活化影响的示意图。处理:对照 (con);硒酸钠 (ATE);硒酸 (Sel acid);亚硒酸钠 (ITE);二氧化硒 (SeO_2);硫化硒 (SeS_2);甲基硒代半胱氨酸 (MSC);和硒代半胱氨酸 (SeC)。活性 Akt 信号的相对强度与 Akt 蛋白总水平相关,显示在 y- 轴上。此图表明只有硒酸钠 (ATE) 才能抑制 Akt 的活化,使磷酸化 Akt 的水平降低到对照 (con) 水平之下。相反,硒酸 (Selacid)、亚硒酸钠 (ITE)、二氧化硒 (SeO_2)、硫化硒 (SeS_2)、甲基硒代半胱氨酸 (MSC)、硒代半胱氨酸 (SeC) 均导致 Akt 活化高于对照 (con) 水平。

[0101] 图 10A 和 10B 示意图显示,在用 pNPP (图 10A) 或丝氨酸磷酸肽 (图 10B) 作为底物的 pNPP 水解试验中,硒酸钠 (ATE)、亚硒酸钠 (ITE) 和硒甲硫氨酸 (SeMet) 对 PP2A 磷酸酶活性的影响。

[0102] 图 11 是在不同包被条件下存在 (+) 或缺乏 (-) 硒酸钠时,人神经母细胞瘤 BE2M17 细胞系用抗人 PHF-tau 蛋白抗体作免疫印迹的比较图。

[0103] 图 12 是在不同包被条件下存在 (+) 或缺乏 (-) 硒酸钠时,人神经母细胞瘤 SY5Y 细胞系用抗人 PHF-tau 蛋白抗体 AT270 (图 12A) 和 HT-7 (图 12B) 作免疫印迹的比较图。

[0104] 图 13 是在存在 (+) 或缺乏 (-) 硒酸钠时,14 周龄 Balb/cNu Nu 雄性裸小鼠的全脑裂解物用抗人 PHF-tau 蛋白抗体 AT100 (图 13A)、AT180 (图 13B)、AT270 (图 13C) 和 HT-7 (图 13D) 作免疫印迹的比较图。

[0105] 图 14 示意图显示,在场地自主活动试验 (趋触性 (thigmotaxis)) 轮次 1 (图 14A) 和轮次 2 (图 14B) 中,硒酸钠处理对所测试行为的影响。

[0106] 图 15 示意图显示,在以逃离潜伏期 (时间:秒,图 15A) 和游泳路径 (长度:米,图

15B) 进行评估的 Morris 水迷宫试验中, 硒酸钠治疗对 (小鼠) 学习和记忆力的影响。

[0107] 图 16 示意图显示, 在 hTAU441 转基因 TMHT 小鼠中, 用 HT7 免疫组化方法测定, 硒酸钠对脑海马回 (图 16A) 和脑扁桃体 (amygdala) (图 16B) 中 tau 蛋白载量的影响。

[0108] 图 17 示意图显示, 在 hTAU441 转基因 TMHT 小鼠中, 用 AT180 免疫组化方法测定, 硒酸钠对脑海马回 (图 17A) 和脑扁桃体 (图 17B) 中 tau 蛋白载量的影响。

[0109] 实施例

[0110] 实施例 1: 硒酸钠通过间接机制使 Akt 去磷酸化

[0111] 硒酸钠能一致地诱导前列腺癌完整细胞中的 Akt 去磷酸化。这种去磷酸化可能是由于对 Akt 蛋白本身的直接抑制作用。或者可能是通过增强对 Akt 磷酸化的负调节或抑制其正调节而间接实现。为鉴别直接与间接作用机制, 在无细胞环境中测定了硒酸钠对 Akt 磷酸化和活性的影响。将 PC3 前列腺癌细胞接种在 100mm 平皿中, 当细胞达到 70-80% 铺满时血清饥饿过夜。为检测对完整细胞中 Akt 磷酸化的作用, 用新鲜无血清培养液配的 500 μ M 硒酸钠处理 PC3 细胞 1 小时。裂解细胞, 用活化特异性抗体作免疫印迹分析测定 Akt Ser473 位点的磷酸化水平, 与表达的 Akt 蛋白水平作比较。为检测对纯化 Akt 的作用, 类似地接种但不处理 PC3 细胞, 用 RIPA (磷酸酶负调节剂, 一种严谨的细胞裂解缓冲液, 能最大程度降低对蛋白-蛋白复合物的维持) 裂解。用泛 Akt 单克隆抗体作免疫沉淀纯化得到等量 (40-500 μ g) 全细胞裂解液 (WCL) 中的 Akt, 然后在 37°C 金属加热块上与 500 μ M 硒酸钠一起培育 1 小时。如上所述用免疫印迹分析分辨免疫沉淀蛋白和测定 Akt 活化水平。图 1A 比较了 PC3 细胞的完整细胞与无细胞环境经处理后的磷酸化 Akt 水平。完整 PC3 细胞用 500 μ M 硒酸钠处理 1 小时后 Akt 磷酸化大为降低。

[0112] 为验证这些发现, 用卡尔生物化学公司的 K-LISATM Akt 活性检测试剂盒检测了硒酸钠对重组人 Akt 酶活性的作用, 将其与星孢素 (一种非特异性的蛋白激酶抑制剂) 的作用相比较。此 ELISA 试验采用的生物素化肽底物 (GRPTSSFAEG) 在第二个丝氨酸处被 Akt 磷酸化。在链霉亲和素包被孔中将 250ng 的重组人 Akt 加或不加 500 μ M 硒酸钠或 1 μ M 星孢素, 与生物素化 Akt 底物一起 30°C 培育 30 分钟。用磷酸丝氨酸的检测抗体, 然后用 HRP- 抗体偶联物和 TMB 底物产生的颜色, 来测定结合的磷酸化底物。测定 450nm 吸光值和 590nm 参比值。总结三次独立实验的结果, 计算出平均吸光值 ($A_{450}-A_{590}$ - 空白) $\pm$ SEM, 见图 1B 所示。与以上发现相一致, 没有检测到硒酸钠对重组人 Akt 激酶活性的直接作用。相反, 非特异性抑制剂星孢素强烈抑制了 Akt 的激酶活性。

[0113] 小结: 这些数据表明, 硒酸钠对 Akt 活性无直接抑制作用, 说明观察到的去磷酸化必然是通过一种间接机制完成。

[0114] 实施例 2: 硒酸钠通过刺激 PP2A 的磷酸酶活性而去磷酸化 Akt

[0115] 通过防止最初的 Akt 磷酸化, 或提高 Akt 去磷酸化, 可间接降低 Akt 的净活性 [Kohn 等, 1996]。然而, 鉴于硒酸钠诱导的 Akt 磷酸化为双向反应 (起初是瞬间增强, 随后是深度和持续减弱), 似乎硒酸钠的作用不可能是简单地减弱上游激酶磷酸化 Akt 的能力。因此测定了硒酸钠的蛋白磷酸酶抑制作用能否诱导 Akt 去磷酸化。先用冈田酸, 一种红潮藻类的聚醚毒素 (是导致有壳水生生物造成毒性腹泻的致病因子), 其能抑制磷酸化蛋白的磷酸酶 PP1 和 PP2A (二种调节 Akt 去磷酸化的磷酸酶) [Fernandez 等., 2002]。在 6 孔板的每孔中接种 5×10^5 个 PC3 前列腺癌细胞, 使细胞贴壁 8 小时, 然后血清饥饿过夜。在

无血清的新鲜培养液中用或不用 5nM 或 1000nM 的冈田酸预处理细胞 30 分钟,然后加入最终浓度 500 μ M 的硒酸钠培养 1 小时。用 SDS-PAGE 分辨裂解的细胞,然后用能特异性识别 AktSer⁴⁷³ 残基位点磷酸化的抗体作免疫印迹分析,检测 Akt 该位点的磷酸化,与表达的 Akt 蛋白总水平作比较(图 2A)。用硒酸钠处理 PTEN 缺陷的 PC3 细胞,如预期那样显著降低了该细胞系中观察到的长期 Akt 磷酸化高水平,这种降低不受先前与 5nM 冈田酸培育的影响。相反,用 1000nM 冈田酸预处理不仅增强了非硒酸盐对照中的 Akt 磷酸化,而且完全抵消了硒酸钠的抑制作用。

[0116] 为进一步精细辨别参与的磷酸酶,筛检了范围广泛的一组磷酸化蛋白的磷酸酶(PPP)抑制剂(它们对 PPP 抑制的特异性不相同)能否抵消硒酸钠对 Akt 磷酸化的抑制作用。这组(抑制剂)包括:500 μ M 互变霉素(PP1)、500 μ M 冈田酸(低剂量 PP2A>PP1)、100 μ M 内皮肽 A(PP2A A)、2nM 花萼海绵诱癌素 A(低剂量 PP1>PP2A)、10nM 花萼海绵诱癌素 A(高剂量抑制 PP1 和 PP2A)和 400ng/ml 环孢菌素 A(PP2B)。基本上按如上所述,接种 PC3 前列腺癌细胞,类似地用 500 μ M 硒酸钠处理 1 小时,之前用或不用 PPP 抑制剂预处理 30 分钟。另外,用 SDS-PAGE 分辨细胞裂解液,用能特异性识别 Akt Ser⁴⁷³ 残基位点磷酸化的抗体作免疫印迹分析,检测细胞膜上 Akt 该位点的磷酸化,与表达的 Akt 蛋白总水平作比较,见图 2B 所示。没用 PP1 或 PP2B 特异性 PPP 抑制剂预处理,或处理的细胞,接触硒酸钠后导致 Akt 磷酸化的显著降低。相反,用低剂量冈田酸或内皮肽 A(PP2A 的特异性或相对特异性抑制剂)处理细胞完全阻断了硒酸钠诱导的 Akt 去磷酸化。

[0117] 硒酸钠可能通过提高 PP2A 与 Akt 之间复合物的形成速率,或提高已结合于 PP2A 的磷酸酶固有活性,或二者而增强 PP2A 介导的 Akt 去磷酸化。为有助于鉴别这二种机制,先测定了硒酸钠上否能提高 PP2A 与 Akt 之间形成复合物的水平。将 1×10^6 PC3 前列腺癌细胞接种在 6cm 平皿上,让其贴壁 8 小时然后血清饥饿过夜。用新鲜无血清培养液或 10% FCS 配的 500 μ M 硒酸钠处理细胞 1.5 小时,然后用 ELB 缓冲液裂解。用捕获在蛋白 A-琼脂糖珠上的抗 Akt 单克隆抗体免疫沉淀每份 400 μ g 全细胞裂解液中的总 Akt。阴性对照裂解液(空白)省略免疫沉淀抗体。洗涤减少非特异性结合后,在 3x SDS 蛋白加样缓冲液中煮沸珠 5 分钟,高速离心后用 SDS-PAGE 分辨上清液。用能特异性识别此磷酸酶催化亚基的抗体作免疫印迹分析,测定 PP2A 结合水平,与珠结合的 Akt 量和沉淀抗体(IgG)的浓度作比较。如图 2C 所示,免疫沉淀去除未处理 PC3 细胞中的 Akt,将可检测到的 PP2A 催化亚基量提高到高于非特异性结合于珠(空白)的量,表明即使在基础状态下也有高水平的 Akt 磷酸化,至少某些 Akt 已与 PP2A 形成了复合物。用硒酸钠处理促进了 PP2A 催化亚基与 Akt 的结合,而用血清刺激使复合物的形成降低到基础水平之下。为了定量测定复合物形成的这种增加,数字化三次独立实验的免疫印迹数据,进行光密度分析,按每次实验的对照标准化。检测值为(检测的)PP2A 催化亚基量与免疫沉淀得到的 Akt 总蛋白量的平均比率 $\pm$ SEM。见图 2C 所示,观察到硒酸钠处理后,PP2A 催化亚基与 Akt 的结合提高了大约 50%。

[0118] 为了确定硒酸钠对 Akt 去磷酸化的作用是否完全可用简单促进这二种蛋白之间的结合来解释,检测了硒酸钠对 Akt-相关磷酸酶活性的作用。将 2×10^6 个 PC3 前列腺癌细胞接种在 10cm 平板上,让其贴壁 8 小时然后血清饥饿过夜。用或不用新鲜无血清培养液配的 500 μ M 硒酸钠处理细胞 1 小时,再用低浓度磷酸缓冲液裂解。用抗 Akt 单克隆抗体(1:100)和 30 μ l 蛋白 A 浆液免疫沉淀得到的总蛋白 500-600 μ g,为了检测洗涤后有无磷酸污

染,将 25 μ l 最终洗涤缓冲液与孔雀绿一起培育。30℃与 500 μ M 合成的磷酸化苏氨酸培育 10 分钟,检测免疫沉淀物的磷酸酶活性。每个样品一式二份加入孔雀绿溶液,读取 590nm 吸光值检测游离磷酸盐。三次独立实验的平均磷酸酶活性 $\pm$ SEM 见图 2D。用硒酸钠处理的 PC3 细胞使得与免疫沉淀 Akt 蛋白相关的磷酸酶活性高二倍以上,显著高于先前观察到的 PP2A 结合的简单增加。

[0119] 小结:这些数据表明,硒酸钠是间接通过磷酸化蛋白的磷酸酶,特别是 PP2A 诱导了 Akt 去磷酸化。虽然硒酸钠提高了 PP2A 与 Akt 的结合量,但相关的磷酸酶活性却提高了约二倍,表明硒酸钠主要是影响酶活性。

[0120] 实施例 3:硒酸钠直接增强 PP2A 核心二聚体的磷酸酶活性

[0121] PP2A 的核心结构由 36kD 的催化亚基 (PP2Ac) 和 65kD 的调控亚基 (PR65 或 A 亚基) 组成。与第三个调节性 B 亚基结合可调节底物特异性 [Wera 和 Hemmings,1995]。PP2A 磷酸酶的活性受翻译后修饰的调节,其示意图见图 3。已证明体外 PP2A 可被受体和非受体酪氨酸激酶二者,如 EGFR、胰岛素受体 p60v-src 和 p56lck 磷酸化 [Chen 等,1992]。体内也鉴定到此种磷酸化,在用血清或 EGF 刺激或用 p60v-src 转化的成纤维细胞中此种磷酸化增加,而血清饥饿使其减少 [Chen 等,1992]。毗邻的 Thr304 磷酸化也与磷酸酶活性显著丧失相关 [Guo 和 Damuni,1993]。与 Tyr307 相反,看来 Thr304 是通过自身磷酸化激活的蛋白激酶作用而磷酸化,从而放大了最初的抑制信号。二种情况中,PP2A 的作用是其自身的磷酸酶,因为用冈田酸或微囊藻素-LR 抑制提高了磷酸化 [Chen 等,1994,Guo 和 Damuni,1993]。因此,去除抑制性刺激后 PP2A 可水解二者的磷酸基团而快速再生活性磷酸酶。PP2Ac 也受羧基末端赖氨酸残基 L309 的可逆性甲基化调节。亮氨酸羧基甲基转移酶可催化此甲基化反应 [Xie 和 Clarke,1994],这看来是亚基正确结合形成活性三聚体所需 [Wu 等,2000, Tulstylch 等,2000, Bryant 等,1999]。磷酸酶甲基酯酶 1 (PME-1) 可去除 PP2A 的甲基 [Lee 等,1996]。令人感兴趣的是,据报导 PME-1 也能结合并明显稳定 PP2A 二聚体及三聚体的无活性构型,一种先前鉴定到的能刺激 PP2A 酪氨酸磷酸酶活性的磷酸酪氨酸磷酸酶激活剂 (PTPA) 可逆转此情况 [Cayla 等,1994, Langin 等,2004, Van Hoof 等,2005]。

[0122] 为了确定观察到的硒酸钠增强 PP2A 磷酸酶活性不依赖于对上游参与翻译后调节成分的作用,测定了在存在或缺乏硒酸钠时培育的从血红细胞纯化得到的人 PP2A A-C 异质二聚体的酶活性。在初步试验中,采用了磷酸酶催化作用的化学底物对-硝基苯磷酸 (pNPP),其磷酸基团水解后可产生对-硝基苯酚,一种碱性条件下可溶解的深黄色色素。37℃将 0.05 单位的纯化 PP2A 二聚体与 5 μ M 的硒酸钠或 500nM 的冈田酸一起培育 30 分钟,测定产生的对-硝基苯酚量,作为磷酸酶活性的读数,与未处理对照样品作比较。一式二份地测定各样品的 405nm 吸光值,以 590nm 值为参比值。用以下公式计算 PP2A 活性:

[0123] 活性 = (样品体积升数) $\times$ $A_{405}/1.78 \times 10^4 \text{M}^{-1}/\text{cm}$ (消光系数) $\times 0.25\text{cm} \times 15 \text{分} \times 0.05\text{U 酶}$

[0124] 提供的数据是至少三次独立实验的磷酸酶相对平均活性 $\pm$ SEM。如图 4A(i) 所示,即使用如此低浓度的纯化酶,磷酸酶的活性也相当明显,但与冈田酸一起培育完全消除了此活性。相反,PP2A 与硒酸钠一起培育观察到的磷酸酶活性几乎为三倍。

[0125] 接着通过检测硒酸钠对 PP2A A-C 二聚体由内部苏氨酸残基上磷酸化的合成的 6 氨基酸肽释放无机磷酸的作用的影响,来确定磷酸酶活性的增强是否为底物特异性。37℃

培育 0.01–0.05U PP2A 与 500 μ M 磷酸化肽 15 分钟,加或不加 50 μ M 硒酸钠。酶活性释放的无机磷酸量通过加入孔雀绿测定,读取 590nm 吸光值。在存在钼酸盐和正磷酸盐时孔雀绿形成稳定的绿色复合物,得以检测存在的无机磷酸浓度。提供的数据为至少三次独立实验的平均 590nm 吸光度 $\pm$ SEM。见图 4A(ii) 所示,硒酸钠再次使丝氨酸磷酸化肽因 PP2A 磷酸酶的作用而释放的无机磷酸浓度升高二倍以上。

[0126] PP1 的催化亚基与 PP2A 的催化亚基具有大约 50% 的序列同源性,这是任何相关磷酸酶中最高的 [Barton 等,1994]。为了确定硒酸钠刺激增强磷酸酶活性是否对 PP2A 有特异性,测定了它对 PP1 活性的影响。37°C 培育从家兔骨骼肌纯化的 0.05U PP1 与 500 μ M 磷酸化苏氨酸合成肽 15 分钟,加或不加 50 μ M 硒酸钠,游离磷酸的浓度如上所述用孔雀绿检测。提供的数据为三次独立实验的平均 590nm 吸光度 $\pm$ SEM。见图 4B 所示,硒酸钠不影响 PP1 的磷酸酶活性。

[0127] 实施例 4:硒酸钠不影响 PP2A 的氧化还原调节

[0128] 不断增长的工作提示,可逆性氧化是负调节蛋白磷酸酶的常见机制 [Wang 等,1996,Barrett 等,1999,Sohn 和 Rudolph 2003]。催化结构域中的保守性半胱氨酸残基是它们酶活性的关键,但在氧化环境中,此结构域可能通过形成分子内二硫键或磺酰胺键而受到修饰(图 5A)丧失了磷酸酶活性 [Salmeen 等,2003,Kwon 等,2004]。鉴于硒化合物可能影响细胞的氧化还原状态,研究了硒酸钠通过减轻对氧化的抑制作用而激活 PP2A 的可能性。

[0129] 先测定硒酸钠诱导的 Akt 去磷酸化是否对细胞氧化状态敏感。在 6 孔板的每孔中接种 5×10^5 个 PC3 前列腺癌细胞,使细胞贴壁 8 小时,然后血清饥饿过夜。用或不用 500 μ M 以新鲜培养液配的硒酸钠处理细胞,然后使其接触 0.25mM 或 1mM 的过氧化氢 10 分钟。分析等量全细胞裂解液,然后进行免疫印迹测定磷酸化 Akt Ser⁴⁷³ 的水平。与表达的 Akt 蛋白总水平作比较。如图 5B 所示,用硒酸钠处理细胞显著降低了 Akt 磷酸化水平,并且不受紧急加入 0.25mM 过氧化氢的影响。相反,紧急接触高剂量的 1mM 过氧化氢完全消除了硒酸钠的去磷酸化作用,表明这种阻断是氧化敏感的。

[0130] 使蛋白磷酸酶的可逆性氧化作用失活涉及到催化结构域中关键半胱氨酸的修饰,最终导致形成分子内二硫键或磺酰胺键。为了确定硒酸钠是否对 PP2A 的半胱氨酸有修饰作用,用 Ellman 试验 [Ellman,1958] 定量测定各种处理后纯化人 PP2A A-C 二聚体中游离巯基的数目。Ellman 试剂 (5,5'-二硫-二(2-硝基苯甲酸),DTNB) 能与游离的巯基迅速形成二硫键,伴随释放色素磺酸盐离子。37°C 培育 0.01U PP2A 与 10mM N-乙基马来酰亚胺 (NEM),或 10mM 过氧化氢,或 10mM 硒酸钠,或 10mM 硒酸钠和 10mM 过氧化氢 15 分钟。加入 Ellman 试剂然后检测 412nm 吸光值来测定磷酸酶中游离巯基的量(图 5C)。与 NEM(一种巯基烷化剂)和过氧化氢二者培育后显著降低了存在的游离巯基数目。相反,与硒酸钠一起培育没有作用,特别是不能保护 PP2A 的巯基不受到过氧化氢介导的修饰。实际上,过氧化氢对巯基的修饰在存在硒酸钠时更显著有效。

[0131] 接着用二乙酸 2',7'-二氯二氢荧光素 (DCFDA) 测定硒酸钠是否影响了完整细胞的氧化电势。DCFDA 无荧光可自由渗透入细胞,但在存在活性氧物质 (ROS) 时可快速转变成不能渗透细胞但发出亮荧光的 2',7'-二氯二氢荧光素 (DCF) [Bass 等,1983]。在 60mm 平板中接种 1×10^6 个 PC3 前列腺癌细胞,使细胞贴壁 8 小时,然后血清饥饿过夜。细胞

用 5 μ M DCFDA 培育 15 分钟然后处理。

[0132] 细胞用 500 μ M 硒酸钠或 1mM N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 处理 1 小时,然后接触 500 μ M 过氧化氢 10 分钟。用流式细胞仪测定荧光细胞比例。图 5D 显示各处理组的荧光分布图。图 5E 小结了三次独立实验的荧光细胞平均百分比。如预计的那样,PC3 细胞接触过氧化氢导致胞内氧自由基的显著增加,如分布图中峰形向右偏移所示。用硒酸钠预处理细胞对荧光细胞的基础比例无影响,不能保护细胞在接触过氧化氢后不产生 ROS。相反,用氢供体 NAC 预处理导致荧光细胞基础比例的微小降低,特别是显著减弱了过氧化氢所产生的 ROS。

[0133] 小结:这些数据表明,虽然硒酸钠诱导的 Akt 磷酸化对细胞氧化还原状态敏感,但硒酸钠不能通过减轻固有、可逆的抑制性氧化作用而增强 PP2A 的磷酸酶活性。

[0134] 实施例 5:硒酸钠刺激 PP2A 的磷酸酶活性显示有底物特异性

[0135] PP2A 是一种遍在的高表达蛋白质,估计占细胞总蛋白的 0.1-1% [Gallego M 和 Virshup 2005;Cohen,1997],涉及调节的蛋白底物数量不断增加 [Zhu 等,2004;Woetmann 等,2003;Silverstein 等,2002]。控制 PP2A 底物特异性的机制尚不完全了解,但特异性调节 B 亚基的差异性结合看来至关重要 [Van Kanegan 等,2005]。检测了对于特定异质三聚体硒酸钠刺激的 PP2A 磷酸酶活性增强是否不加选择或有特异性。

[0136] 上面已证明,硒酸钠能增强从 PC3 前列腺癌细胞免疫沉淀的 Akt 相关的磷酸酶活性,和硒酸钠能直接刺激纯化的 PP2A-C 二聚体的磷酸酶活性。为了确定这种磷酸酶活性的增强是否遍在化,用 500 μ M 硒酸钠或 100 μ M 内皮素 A 处理 1 小时和用抗 PP2A 催化亚基的单克隆抗体检测从 PC3 细胞免疫沉淀得到的 PP2A。使细胞裂解液通过脱盐柱除去游离磷酸,用磷酸化丝氨酸酸肽和孔雀绿检测磷酸酶活性。不同条件下免疫沉淀的 PP2A 的磷酸酶活性见图 6A,为三次独立实验的平均吸光度 $\pm$ SEM。用硒酸钠处理 PC3 细胞不影响胞内 PP2A 混合物的磷酸酶活性。相反,用 PP2A 磷酸酶特异性抑制剂内皮素 A 处理显著降低了磷酸酶活性。

[0137] 检测了硒酸钠对另一种已知的 PP2A 底物 p70S6K 的作用 [Peterson 等,1999]。在 6 孔板的每孔中接种 5×10^5 个 PC3 前列腺癌细胞,使细胞贴壁 8 小时,然后血清饥饿过夜。用或不用 500nM 冈田酸预处理 30 分钟,然后用 50 μ M 的 LY294002 或 500 μ M 的硒酸钠处理细胞 1 小时。用 SDS-PAGE 分析等量全细胞裂解液 (75 μ g),用能特异性识别 Thr389 位磷酸化的 p70S6K 蛋白的抗体作免疫印迹分析,测定 p70S6K 磷酸化水平。与蛋白加载对照 β 微管蛋白作比较。如图 6B 所示,即使在基础条件下,p70S6K 的磷酸化也很明显,用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理可消除此现象。与已知冈田酸是 p70S6K 磷酸化的负调节剂作用相符,用此酸抑制 PP2A 提高了所观察的磷酸化水平。然而与硒酸钠诱导 Akt 去磷酸化相反,在类似条件下 p70S6K 的磷酸化不受影响。

[0138] 尝试了检测前列腺癌细胞中哪个 B 亚基家族可与 Akt 形成复合物。在 100mm 平皿中接种 2×10^6 个 PC3 前列腺癌细胞,使细胞贴壁 8 小时,然后血清饥饿过夜。用 ELB(一种温和的洗涤剂缓冲液)裂解细胞。用泛 -Akt 单克隆抗体 (1:100) 和 30 μ l 蛋白 A 琼脂糖珠免疫沉淀 500 μ g 裂解液中的总 Akt 蛋白。阴性对照(空白)中省略免疫沉淀抗体。反复洗涤后在 3x SDS 蛋白加样缓冲液中煮沸 5 分钟,高速离心,用凝胶电泳分析得到的上清液。在同一凝胶上将 100 μ g 全细胞裂解液跑电泳,用能特异性识别 B 或 B' 家族亚基的抗体检测得到的膜。用识别泛 -Akt 的抗体检测相同印迹斑证实已成功将 Akt 去除。如图 6C

所示,此系统中只有 B 家族调节性亚基才能与 Akt 共沉淀,提示 PP2Ac、A 和 R2B 亚基家族成员的三聚体才能介导这些细胞中的 Akt 去磷酸化。

[0139] 实施例 6

[0140] 胰岛素的代谢作用受 Akt 的直接下游底物糖原合酶激酶 3(GSK-3) 介导。GSK-3 是一种遍在表达的丝氨酸 / 苏氨酸激酶,能磷酸化和灭活糖原合酶。在对胰岛素受体活化的反应中,Akt 磷酸化和灭活了阻抑蛋白 GSK-3,因而刺激了糖原的合成 [Cross 等,1995]。此外,GSK-3 涉及对蛋白质翻译的控制,细胞周期进程和 Wnt 信号传递 [Diehl 等,1998,Welsh 等,1996,He 等,1995]。为了测定硒酸钠处理对 GSK-3 β 活化的影响,接种 PC3 前列腺癌细胞,使细胞血清饥饿过夜,然后用新鲜培养液配的 500 μ M 硒酸钠处理(图 7)所示的不同时间。用只能特异性识别 Ser9 位磷酸化(此位点是其激酶活性的关键位点)的 GSK-3 β 的抗体作免疫印迹分析全细胞裂解液,与作为加样对照的细胞骨架蛋白 β 微管蛋白相比较。对照泳道(0 时)观察到的高度磷酸化表明,PC3 细胞中 GSK-3 β 基础活化水平高。用硒酸钠处理导致磷酸化显著降低,1 小时和 3 小时最大,6 小时时间点回复到基础水平。为定量测定硒酸钠导致的抑制程度,制备数字化的免疫印迹结果,比较 500 μ M 硒酸钠 3 小时与 50 μ M LY2940021 小时的效果,并测定 GSK-3 β 磷酸化程度,光密度表示表达蛋白质的比例。硒酸钠平均降低了 GSK-3 β 超过 20%,而 LY294002 导致磷酸化水平降低约 60%。

[0141] 实施例 7:硒酸钠而非硒甲硫氨酸强烈抑制了 Akt/ 蛋白激酶 B 的活化

[0142] 为了测定硒酸钠能否干扰 PI3K 通路的活性,用 500 μ M 硒酸钠处理 PC3 细胞不同时间。用活化特异性抗体检测全细胞裂解液中的 Akt 磷酸化状态。因为即使不加入血清 PTEN 也会丧失,故(认为)Akt 的 Ser473 和 Thr308 二个位点被强激活。加入硒酸钠在接触的 10 分钟内诱导了 Akt 此二位点磷酸化增强。这种增强之后是显著和长久的失活,同时细胞的总 Akt(泛 Akt) 水平基本上维持不变。

[0143] 用 500 μ M 各化合物处理不同时间评估 Akt 的 Ser473 磷酸化(情况),将硒酸钠对激活 PC3 细胞 Akt 的作用与与硒甲硫氨酸相比较。如图 8 所示,硒甲硫氨酸不影响所测定的所有时间点的 Akt 磷酸化水平,而硒酸钠明显抑制了 Akt 磷酸化。

[0144] 实施例 8:诱导 Akt 去磷酸化的能力是硒酸钠独有的

[0145] 鉴于硒酸钠一直能诱导关键的激酶 Akt 深度去磷酸化而硒甲硫氨酸无此作用,测定了此能力是否为硒酸钠所独有或是与其它化学形式的硒所共有。测试了其它无机硒(硒酸钠、二氧化硒、硫化硒和硒酸)和有机硒物质(甲基硒半胱氨酸、硒半胱氨酸)能否影响 Akt 活化。除了硫化硒溶于 DMSO 外,所有形式的硒均溶于水,以 500 μ M 浓度将它们加入血清饥饿的 PC3 细胞中 1 小时。分析全细胞裂解液,用能特异性识别 Akt Ser⁴⁷³ 位点磷酸化的抗体作免疫印迹分析,检测 Akt 该位点的活化状态,以及 Akt 表达总水平(泛 Akt)。为了定量测定 Akt 活化程度,将免疫印迹结果数字化,以光密度测定磷酸化 Akt 与总 Akt 的比例。图 9 小结了三次独立实验测定的磷酸化 Akt 与总 Akt 蛋白水平的平均比例 $\pm$ SEM。与未处理细胞相比,用 500 μ M 硒酸钠处理 PC3 细胞 1 小时导致 Akt 的 Ser473 位磷酸化降低 80%以上($p < 0.05$,斯氏 t- 检验)。相反,在相同条件下用其它无机和有机硒物质处理 PC3 细胞对 Akt 磷酸化程度无显著影响。小结:这些数据表明诱导 Akt 去磷酸化的能力是硒酸钠独有的。

[0146] 实施例 9:提高 PP2A 活性的能力是硒酸钠独有的

[0147] 在实施例 7 中,数据显示所有测试的化学形式硒中,只有硒酸钠能显著诱导 Akt 去磷酸化。为了明确对 PP2A 活性的不同影响可否解释这种特异性,在 pNPP 水解试验中分别用 pNPP 和丝氨酸磷酸肽作为底物,比较了硒酸钠 (5mM 或 50 μ M)、亚硒酸钠 (5mM 或 50 μ M) 和硒甲硫氨酸 (5mM 或 50 μ M) 对 PP2A 磷酸酶活性的影响 (图 10A 和 10B)。与观察到的用硒酸钠明显增强磷酸酶活性相反,亚硒酸钠或硒甲硫氨酸均不显著影响 PP2A 磷酸酶活性。

[0148] 实施例 1—9 的材料和方法

[0149] 试剂

[0150] 细胞系 :实验程序中所用的哺乳动物细胞系详情列于表 1 中。

[0151] 表 1

[0152]

细胞系	起源	来源	参考文献
Pc3	衍生自 62 岁高加索男性 IV 级前列腺腺癌的骨转移	ATCC	(Kaighn ME 等, 1979)

[0153] 所有培养物维持在含 5 % 或 10 % 二氧化碳的 37 ℃ 富马科技公司 (FormaScientific) 培养箱中,按照标准在培养液 RPMI1641 中加入 L- 谷氨酰胺 (吉布科英杰公司 (Gibco Invitrogen) #11875-119)、青霉素 (100U/ml)、链霉素 (100 μ g/ml) 和两性霉素 B (25ng/ml) (吉布科英杰公司 #15240-062)。作为常规,细胞用 5 % 或 10 % 胎牛血清 (吉布科英杰公司 #10099-141) 培养,除非另有说明。将接近铺满的细胞用胰蛋白酶 -EDTA (吉布科英杰公司 #15400-054) 消化后传代。

[0154] 购得的商品化抗体

[0155] 在上述实验中采用了许多商品购得的第一抗体和辣根过氧化物酶偶联的或荧光标记的或生物素化的第二抗体,其详细情况小结如下 :

[0156] 兔抗 -Akt 多克隆抗体,商品目录号 9272,细胞信号转导技术公司 (CellSignalling Technology, CST) ;

[0157] 小鼠抗 -Akt (5G3) 单克隆抗体,商品目录号 2966, CST ;

[0158] 兔抗磷酸化 Akt (ser473) 多克隆抗体,商品目录号 9271, CST ;

[0159] 兔抗磷酸化 GSK3 β (ser9) 多克隆抗体,商品目录号 9336, CST ;

[0160] 不同的抗 -PP2A 抗体,商品目录号 05-421、06-2221、07-334 和 05-592,安普斯特公司 (Upstate)。

[0161] 激酶、激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和纯化的磷酸酶

[0162] 表 2 :激酶和磷酸酶抑制剂

[0163]

	名称	所抑制的酶	来源	商品目录号	稀释剂	贮液浓度	工作浓度
激酶抑制剂	LY294002	PI2K	普洛麦格公司 (Promega)	V1201	DMSO	50 mM	10-50 μ M
磷酸酶抑制剂	互变霉素	PP1	百莫公司 (Biomol)	109946-35-2	乙醇	500 μ M	500 μ M
磷酸酶抑制剂	内肽肽	PP2A	卡尔生物化学公司 (Calbiochem)	324760	H ₂ O	100 mM	100 μ M

磷酸酶抑制剂	花萼海 绵诱癌 素 A	PP2A = PP1	卡尔生物化学 公司	208821	DMSO	80 μ M	10nM
磷酸酶抑制剂	冈田酸	PP2A> >PP1	卡尔生物化学 公司	495604	乙醇	50 mM	500 nM
磷酸酶抑制剂	环孢菌 素 A	PP2B	卡尔生物化学 公司	239835	DMSO	400 μ g/mL	400 ng/mL

[0164] 表 3 :纯化的磷酸酶和重组的激酶

[0165]

	名称	物种	来源	目录号	工作浓度
纯化的磷酸酶	PP2A	人	安普斯特公司	14-111 (批号 #28002)	0.01-0.05U
纯化的磷酸酶	PP1	兔	安普斯特公司	14-110 (批号 #26200)	0.05U
重组的激酶	Akt1	人	安普斯特公司	14-276 (批号 #25089BU)	

[0166] 缓冲液、溶液和培养基

[0167] 所有溶液贮存在室温 (RT) 除非另有说明。

[0168]

EDTA0.5M	186.1g Na ₂ EDTA·2H ₂ O 溶于 1 升蒸馏水中,用 NaOH 调 pH 至 8.0
鸡蛋裂解缓冲液 (ELB)	250mM NaCl,50mM Hepes pH7.0,5mM EDTA,1mM DTT,10% Triton-X100
NaCl5M	292.2g NaCl 溶于 1 升蒸馏水中,高压灭菌
PBS	NaCl8.0g、KCl0.2g、Na ₂ HPO ₄ 1.44g、KH ₂ PO ₄ 0.24g,加水溶解至 1 升, pH7.4
RIPA 裂解缓冲液	10%甘油、20mM Tris-HCl pH7.5,2mM EDTA,1% Triton-X100,1% NP40,137mM NaCl,0.1% SDS,新鲜制备置冰上
SDS20%	200g SDS 溶于 1 升蒸馏水中
SDS-PAGE 电泳胶	0.375M Tris pH8.8,0.1% SDS,APS,TEMED 和 6-14.5% 丙烯酰胺
SDS-PAGE 样品缓冲液 4x	15%甘油、0.6M2-巯基乙醇、2% SDS,62.5mM Tris-HCl pH6.8 和 0.1% w/v 溴酚蓝
SDS-PAGE 浓缩胶	0.125M Tris pH6.8,0.1% SDS,4.8% 丙烯酰胺 (伯乐公司 (Biorad))、过硫酸铵 (APS) 和 TEMED
SDS-PAGE 电泳缓冲液	9g Tris 碱 (25mM) pH8.3,43.2g 甘氨酸 (0.19M) 和 3g SDS (0.1%) 加蒸馏水溶解至 500ml
TBS10X	80g NaCl,2g KCl,30g Tris pH7.4 加蒸馏水溶解至 1 升
TBS-T0.1%	500ml TBS10x,5ml 吐温-20 加蒸馏水溶解至 1 升
Tris-HCl	121.1g Tris 溶于 1 升蒸馏水中,用浓 HCl 调 pH 至 6.0-8.8,高压灭菌
Western 印迹转移缓冲液	14.4g 甘氨酸、3.03g Tris,800ml 蒸馏水和 200ml 甲醇

Western 印迹转移缓冲液	3.03g Tris 碱, 14.4g 甘氨酸溶于 800ml 蒸馏水和 200ml 甲醇
Western 印迹样品缓冲液 4x	1ml 0.5M Tris pH6.8、800 μ l 甘油、800 μ l 20% SDS、400 μ l β -巯基乙醇、400 μ l 1% 溴酚蓝

[0169] 硒化合物

[0170] 硒酸钠购自西格玛公司 (Sigma)。所有溶液用蒸馏水新鲜制备, 按说明浓度使用。

[0171] 蛋白表达

[0172] SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0173] 按说明处理后, 用 PBS 洗涤培养的细胞一次, 然后 4℃ 在细胞刮刀帮助下, 用含蛋白酶抑制剂混合物 (卡尔生物化学公司的蛋白酶抑制剂混合物, 编号 #539131) 和磷酸酶抑制剂 (10mM 正钒酸盐和 10mM 氟化钠) 的鸡蛋裂解缓冲液 (ELB) 或 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞。4℃, 14,000rpm 离心 15 分钟澄清样品液, 用上清液分析。用二辛可宁酸溶液试验 (BCA) 检测样品的蛋白浓度。取 1 μ l 裂解液在 96 孔板中用蒸馏水作 1:25 稀释。各样品中加入 200 μ l 二辛可宁酸溶液和 4% (w/v) 硫酸铜的 80:1 溶液, 37℃ 培育 30 分钟。检测一系列蛋白标准液的 590nm 吸光度 (珀金埃尔玛公司 (Perkin Elmer) MBA2000)。

[0174] 用变性聚丙烯酰胺凝胶 (包括浓缩胶和分离胶) 电泳分析蛋白质样品。将不同浓度的 50-100 μ g 蛋白质加到 SDS-PAGE 凝胶上。在加样前加入与样品相等体积的 SDS 样品缓冲液 100℃ 煮沸 5 分钟。以大约 100V 跑凝胶电泳。利用各凝胶上加有的蛋白大小标记 (伯乐万花筒 (Biorad Kaleidoscope)) 评估感兴趣蛋白质的分子量。

[0175] Western 印迹分析

[0176] 将 (电泳) 分离的蛋白质转移到 PVDF 膜 (Immobilon P, 密理博公司 (Millipore)) 后, 将此膜浸入 100% 甲醇中 10 分钟, 用蒸馏水淋洗, 用印迹转移缓冲液平衡, 室温 100V 转移 1.5 小时或 4℃ 过夜。用 TBS-T 洗涤膜 5 分钟后让其干燥 1 小时。用含 3% 奶粉和 0.1% 吐温的 TBS 室温封闭 1 小时。用 TBS-T 洗涤此膜 5 次后, 与用 3% 奶粉 / 0.1% TBS-T 或 3% BSA / 0.1% TBS-T 稀释的第一抗体在室温下轻轻搅拌培育 1—2 小时或 4℃ 培育过夜。用 0.1% TBS-T 洗涤 5 分钟三次, 将此膜与辣根过氧化物酶偶联的第二抗体 (用封闭缓冲液配) 一起培育。再洗涤此膜 5 分钟三次, 然后用 Super Signal[®] WestDura 时间延长底物 (皮尔斯公司 (Pierce) #34075) 或 ECL Western 印迹检测试剂 (安玛西亚生物科学公司 (Amersham Biosciences) #RPN2106) 进行增强化学发光反应, 以检测抗体结合。用 CL-曝光胶片 (柯达公司 (Kodak)) 记录放射自显影的发光。初步分析免疫印迹条带后用膜剥离缓冲液 (62.5mM TRIS pH7, 2% SDS, 7% β -巯基乙醇) 60℃ 剥离 15 分钟, 以 TBS-T 洗涤三次后封闭, 可用于再探测。

[0177] 光密度分析

[0178] 用 Vista 数字扫描仪 (优麦公司 (Umax)) 以第 8 版科勒尔照片绘图软件 (Corel Photo-Paint) (科勒尔公司 (Corel Corporation)) 将有关免疫印迹条带转换成 .tif 文件。采用为 Windows 设计的专业图像软件 (Image-Pro-Plus) V4.5.1.22 版 (媒体控制公司 (Media Cybernetics)) 进行光密度分析。采用线性校正法, 其中白色值设为 0, 黑色值设为 225, 选择对应于有关条带的感兴趣区域测定其信号强度。

[0179] 免疫沉淀

[0180] 在转台上的微量离心管中将 100-500 μ g 的全细胞裂解液与 1:100 稀释的不同抗

体在室温下培育 1-2 小时或 4℃培育 16 小时。简单离心后,各管加入 30-40 μ l 的预先洗涤过的 50%蛋白 A 琼脂糖快速流动珠(西格玛 #9424),室温或 4℃转动 1 小时。简单离心后,弃上清液用 500 μ l 细胞裂解缓冲液洗涤沉淀。如此洗涤三次后用珠作酶试验,或用 3x SDS 蛋白加样缓冲液煮沸 5 分钟洗脱蛋白质,在 SDS-PAGE 凝胶上分析。

[0181] 磷酸酶试验

[0182] 将纯化的人 PP2A 和兔 PP1 用提供的稀释缓冲液稀释到 0.01U/ μ l,分装等份 -20℃保存。

[0183] 用纯化磷酸酶进行的磷酸肽试验

[0184] 将 1mg 合成的磷酸肽 K-R-pT-I-R-R(安普斯特公司 #12-219)和 R-R-A-pS-V-A(安普斯特公司 #12-220)溶于 1.10-1.285ml 蒸馏水中制备 1mM 溶液,然后分装等份 -20℃保存待用。将从人红细胞纯化的 0.01-0.05U 纯化 PP2A A-C 二聚体,或 0.05U 由骨骼肌纯化的兔 PP1 与 500 μ M 磷酸肽混合,在存在的所示不同处理条件下在 37℃加热块上培育 15 分钟。各反应物总体积为 25 μ l,由 pNPP 缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.0, 100 μ M CaCl₂)组成。加入 100 μ l 孔雀绿溶液(用 10mM 钼酸铵、1N HCl、3.4%乙醇、0.01%吐温-20 液配制的 0.034%孔雀绿)终止酶反应。孔雀绿在存在钼酸盐和正磷酸盐时可形成稳定的绿色复合物,得以检测无机磷酸存在的量。读取每个样品一式二份 590nm 的吸光度。

[0185] PP2A 免疫沉淀和磷酸酶试验

[0186] 将 1×10^6 个 PC3 前列腺癌细胞接种在 60mm 平板上,让其贴壁 8 小时然后血清饥饿过夜。如所示进行各种处理后,吸弃培养液,细胞用 TBS 洗涤一次。用 0.3ml 裂解缓冲液(20mM Tris-HCl, pH7.0, 1% Igepal-CA, 2mMEDTA, 2mM EGTA, 1x 蛋白酶完全抑制剂混合液)裂解细胞,使裂解液通过 2ml Zeba 脱盐离心柱(皮尔斯公司 #89890)除去磷酸。脱盐后裂解液所含蛋白尝试用上述 BCA 试验检测。用 4 μ g 抗 PP2A 单克隆抗体和 30 μ l 蛋白 A 琼脂糖珠浆液 4℃免疫沉淀 100-150 μ g 总蛋白 2 小时。14,000rpm 离心样品 1 分钟,用过量 TBS 洗涤三次, pNPP 试验缓冲液洗涤一次。最后一次离心后小心除去所有的上清液,在珠中加入 500 μ M 磷酸苏氨酸肽,终体积 80 μ l。30℃搅拌培育样品 10 分钟,加入孔雀绿溶液终止反应。读取每个样品一式二份 590nm 的吸光度。

[0187] pNPP 水解试验

[0188] 对-硝基苯磷酸(pNPP)是磷酸酶的一种化学底物,磷酸部分水解后产生对-硝基苯酚是一种深黄色色素,在碱性条件下可溶。检测磷酸酶相对活性的试验,在微离心管中将 0.05U 纯化的 PP2A 与 5 μ l 40mM NiCl₂ 和 5 μ l BSA 液(5mg/ml)混合。如所示加入不同的处理液,用 pNPP 试验缓冲液调体积至 80 μ l。样品 37℃预培育 15 分钟。每次试验前新鲜配制 pNPP 底物液,将用 50mM Tris-HCl, pH7.0 溶解 pNPP 至 1.5mg/ml。为启动磷酸酶反应,加入 120 μ l pNPP, 37℃再培育样品 15 分钟。检测每个样品一式二份的 405nm 吸光度,以 590nm 吸光度作参比。

[0189] 用以下公式计算 PP2A 活性:

[0190] 活性 = (样品体积升数) $\times$ $A_{405}/1.78 \times 10^4 \text{M}^{-1}/\text{cm}$ (消光系数) $\times 0.25\text{cm} \times 15\text{分} \times 0.05\text{U}$ 酶

[0191] 检测游离巯基总含量

[0192] 用 Ellman 试剂检测不同处理后纯化 PP2A 中游离巯基的变化。将 0.01U PP2A 加

到 37.5 μ l 稀释缓冲液 (30mM Tris-HCl, 3mM EDTA, pH8.2)、12.5 μ l DTNB 试剂 (Ellman 试剂) 和 200 μ l 甲醇中, 室温培育样品 5 分钟, 然后检测每个样品一式二份的 412nm 消光 (extinction)。结果与用 N-乙酰半胱氨酸产生的标准曲线相比较。

[0193] Akt 激酶活性试验

[0194] 用 K-LISATM AKT 活性试剂盒 (卡尔生物化学公司 #CBA019) 检测硒酸钠对重组人 Akt1 激酶活性的影响。此 ELISA 试验采用生物素化的肽底物 (GRPRTSSFAEG), 其第二个丝氨酸可被 Akt1、Akt2、Akt3、SGK (血清糖皮质激素酶) 和 MSK1 磷酸化。生物素化的 Akt 底物和 Akt 样品在链霉亲和素包被的 96 孔板孔中与 ATP 一起培育, 得以在一步中磷酸化和捕获底物。用磷酸丝氨酸检测抗体检测磷酸化的底物, 然后用 HRP- 抗体偶联物处理, 用 TMB 底物显色检测。

[0195] 每次试验开始时, 用蒸馏水 1:100 稀释生物素化 Akt 底物贮存液制备其新的工作液等份。按以下顺序加入各孔: 10 μ l 15x 激酶试验缓冲液; 10 μ l 生物素化 Akt 底物工作溶液; 含 250ng 重组人 Akt1 的 10 μ l 蒸馏水; 含 500 μ M 硒酸钠或 1 μ M 星孢素的 10 μ l 蒸馏水, 或只用水的阳性对照; 10 μ l 15xATP/MgCl₂ 混合液, 每孔总体积 50 μ l。用密封条密封平板, 微孔板振荡器上简单混合, 37°C 培育 30 分钟。各孔加入 10 μ l 激酶终止液终止激酶反应。倒弃各孔中内容物, 用 1x ELISA 洗涤液 (将 ELISA 贮存液用水 1:20 稀释制备) 洗涤三次, 倒置在印迹纸垫上拍打干。各孔加入 100 μ l 磷酸丝氨酸检测抗体工作溶液 (用蒸馏水 1:1000 稀释磷酸丝氨酸抗体贮存液制备) 室温培育 1 小时。如上所述洗涤平板。然后各孔加入 100 μ l HRP- 抗体偶联物工作溶液 (每次试验全部用蒸馏水 1:1000 稀释 HRP- 抗体贮存液得以新鲜制备) 室温培育 1 小时。再如上所述洗涤平板。各孔加入 100 μ l TMB 底物, 室温发色 20 分钟。各孔加入 100 μ l ELISA 终止液以停止反应, 用微孔板读板仪读取 450nm 吸光度, 以 590nm 吸光度为参比。

[0196] 细胞内氧化还原状态试验

[0197] 细胞内氧化还原状态可用二乙酸 2', 7' - 二氯二氢荧光素 (DCFDA) 测定。DCFDA 无荧光, 可自由渗透入细胞, 但在存在活性氧物质 (ROS) 时可快速转变成不能渗透细胞但具有亮荧光的 2', 7' - 二氯二氢荧光素 (DCF)。先用 5 μ M DCFDA 平衡细胞 15 分钟再进行不同处理。然后收获贴壁细胞, 用 PBS 洗二次, 用流式细胞术立即检测荧光细胞比例。

[0198] 本文所引用的每一项专利、专利申请和出版物, 其内容纳入本文作参考。

[0199] 本文对任何参考文献的引用不代表承认这些参考文献是本申请的“现有技术”。

[0200] 本说明书的目的是描述本发明的优选实施方式, 而不是将本发明限制于任何一种实施方式或具体的特征集合。因此, 本领域技术人员将明白, 借助本文可对示范性的具体实施方式进行各种修改和变化, 但这不脱离本发明的范围。所有这类修改和变化都包括在附件权利要求书的范围内。

[0201] 实施例 10: 硒酸盐对小鼠脑组织和人神经母细胞瘤细胞系 tau 蛋白磷酸化的影响

[0202] 材料和方法

[0203] 细胞培养。人神经母细胞瘤细胞 SY5Y 和 BE2M17 细胞获自 Janetta Culvenor (墨尔本大学病理学系, VIC)。SY5Y 细胞常规培养在添加 10% 胎牛血清 (FBS, 英杰公司 (Invitrogen), 吉布科 (GIBCO))、1% 非必须氨基酸 (美国密苏里州圣路易斯的西格玛公司 (Sigma, St Louis, MO, USA))、10mM HEPES (英杰公司, 吉布科 (GIBCO))、1mM 丙酮酸钠 (英杰

公司,吉布科 (GIBCO)) 和 1% 抗生素 / 抗霉菌素混合物 (Invitrogen, GIBCO) 的 RPMI1640 培养基 (新西兰奥克兰的英杰公司 (Invitrogen, Auckland, New Zeal)) 中,。BE2M17 细胞培养在添加 1% FBS (英杰公司, 吉布科)、1% 非必须氨基酸 (美国密苏里州圣路易斯的西格玛公司)、10mM HEPES (英杰公司, 吉布科)、1mM 丙酮酸钠 (英杰公司, 吉布科) 和 1% 抗菌素 / 抗霉菌素混合物 (英杰公司, 吉布科) 的 OPTI-MEM1 血清减少的培养基 (英杰公司, 吉布科) 中。37°C / 5% CO₂ 培养细胞。硒酸钠获自西格玛公司 (美国密苏里州圣路易斯)。

[0204] 抗体:除非另有说明,以下抗体均购自美国洛克福特 (Rockford, USA) 的皮尔斯公司 (Pierce) Endogen: 抗人 PHF-Tau 单克隆抗体 (克隆 AT100 ;AT180 ;AT270) 和抗人 Tau 单克隆抗体 (克隆 HT-7)。多克隆山羊抗小鼠免疫球蛋白 /HRP (丹麦大科公司 (Dako, Denmark)) 和抗微管蛋白 (G712A, 普洛麦格公司)。

[0205] 体外试验:在有包被或无包被表面的 Falcon6 孔板每孔中接种 2×10^5 个 SY5Y 或 B2M17 细胞,在 5% CO₂/37°C 和完全生长培养基中让其贴壁过夜 (如前所述)。用含 100 μ M 浓度硒酸钠的新鲜完全生长培养基置换旧培养基,培养 3 小时。细胞培养在用 0.1% 明胶 (美国密苏里州圣路易斯的西格玛公司)、基质胶 (目录号 #354234, BD, NSW, 澳大利亚) 或用 0.5 μ g/ml 纤连蛋白 (美国密苏里州圣路易斯的西格玛公司) 包被表面的 Falcon6 孔板中。

[0206] 体内试验:14 周龄 Balb/C Nu Nu 雄小鼠购自 ARC。小鼠接受 300 μ g 硒酸钠 / 200 μ l PBS 的一次皮下注射。注射后在不同时间点处死小鼠,收集血液和脑标本。

[0207] 制备裂解液和免疫印迹:用冷 PBS 洗涤细胞,用 150 μ l 冷 RIPA 缓冲液 (含 10% 甘油、20mM Tris、137mM NaCl、0.1% SDS、0.05% IGEPAL、1% Triton X-100、2mM EDTA、10% NaV、2% NaF 和 4X 蛋白酶抑制剂) 裂解,类似地,在干冰上用研钵和碾槌匀浆脑组织,用 150 μ l RIPA 缓冲液裂解。冰上培育样品 30 分钟,然后 4°C,13000rpm 离心 10 分钟。收集上清液用 BCA 试剂 (Sigma) 计算各样品的蛋白估计值。将等量蛋白加到 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶的各泳道中。(电泳后) 将蛋白转移到 PVDF 膜 (密理博公司) 上用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 小时。封闭膜后加入第一抗体:或抗人 PHF-Tau 抗体 (AT100 为 1:200 ;AT180 为 1:1000 ;AT270 为 1:2500),或抗人 Tau 蛋白抗体 (HT-7 为 1:1000),在 5% 脱脂奶粉溶液中 4°C 培育过夜。加二抗培育前,用含 0.01% 吐温的 Tris 缓冲盐水室温淋洗膜三次 3x5 分钟。然后加入用 5% 脱脂奶粉溶液 1:10000 稀释的偶联辣根过氧化物酶 (HRP) 的山羊抗小鼠多克隆第二抗体 (丹麦大科公司),室温培育 1 小时。按上述洗涤膜用安玛西亚 ECL western 印迹检测试剂 (英国白金汉郡的安玛西亚生物科学公司 (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)) 检测。用 2% SDS/ β - 巯基乙醇剥离缓冲液剥离膜,重新探测微管蛋白 (普洛麦格) 以验证蛋白加样量。

[0208] 在存在 (+) 或缺乏 (—) 硒酸钠时,在不同包被表面用抗人 PHF-Tau 抗体免疫印迹人神经母细胞瘤 BE2M17 细胞系,见图 11 所示。BE2M17 完全培养基中含 100 μ M 硒酸钠。在纤连蛋白包被、未包被 (塑料) 或基质胶包被的表面上用硒酸钠培养细胞 3 小时 (如方法章节中所述)。

[0209] 结果:

[0210] 在 68kDa 处检测到抗人 PHF-Tau 克隆 AT100。培养在纤连蛋白和基质胶表面上的细胞在硒酸钠存在时的 PHF-Tau 信号似乎比不用硒酸盐处理的细胞更低。

[0211] 在 71kDa 和 67kDa 处检测到抗人 PHF-Tau 克隆 AT180。培养在纤连蛋白、塑料（未包被）和基质胶上的硒酸钠处理细胞的 PHF-Tau 信号似乎比不用硒酸盐处理的细胞更弱。培养在基质胶上的细胞在 67kDa 产生的 PHF-Tau 信号比纤连蛋白和塑料上培养的细胞更强。

[0212] 在 66kDa 和 63kDa 处检测到抗人 PHF-Tau 克隆 A T270。培养在纤连蛋白、塑料（未包被）和基质胶上的硒酸钠处理细胞的 PHF-Tau 信号似乎比不用硒酸盐处理的细胞更弱。注意，培养在基质胶上的硒酸钠处理和不处理的细胞之间只有轻微差异。

[0213] 在 68、64 和 57kDa 检测到抗人 PHF-Tau 克隆 HT-7。在纤连蛋白上培养硒酸钠处理的细胞似乎能降低 Tau 蛋白的表达。

[0214] 抗微管蛋白检测显示蛋白加样量相等。

[0215] 在存在（+）或缺乏（—）硒酸钠时，在不同培养表面用抗人 PHF-Tau 抗体免疫印迹人神经母细胞瘤 SY5Y 细胞系，见图 12 所示。SY5Y 完全培养基中含 100 μ M 硒酸钠。在明胶、纤连蛋白、未包被（塑料）或基质胶包被表面上用硒酸钠培养细胞 3 小时（如方法章节中所述）。

[0216] 结果：

[0217] 在 70kDa 处特异性检测到抗人 PHF-Tau 克隆 AT270。相比，培养在明胶和纤连蛋白表面上的硒酸盐处理细胞的 PHF-Tau 信号似乎比不用硒酸钠处理的细胞更弱。

[0218] 在 60kDa 处检测到抗人 PHF-Tau 克隆 HT-7。基质胶和纤连蛋白似乎降低了抗 Tau 信号。具体说，培养在纤连蛋白表面用硒酸钠处理的细胞的抗 Tau 信号似乎比不用硒酸钠处理的培养细胞更弱。

[0219] 抗微管蛋白检测显示蛋白加样量相对等量。

[0220] 用抗人 PHF-Tau 免疫印迹 14 周龄 Balb/C Nu Nu 雄小鼠存在（+）或缺乏（—）硒酸钠时的全脑裂解液（如指示的那样），见图 13。皮下注射 1.5 μ g/ μ l 硒酸钠处理小鼠，不注射硒酸钠的小鼠（—）皮下注射 PBS。在不同时间点：0、2 和 6 小时收集脑组织（如方法章节中所述）。

[0221] 结果：

[0222] PBS 似乎对所有研究的克隆（AT100，AT180 和 AT270）抗人 PHF-Tau 信号有影响。为验证蛋白加样量相等，按方法章节中所述剥离所有膜，并再检测微管蛋白。

[0223] 图 13A 显示抗人 PHF-Tau 克隆 AT100 在 60kD 处有免疫反应。存在硒酸钠时的 2 和 6 小时时间点，PHF-Tau 信号似乎比不用硒酸钠处理的细胞低。

[0224] 图 13B 显示抗人 PHF-Tau 克隆 AT180 在 60kD 处有免疫反应。存在硒酸钠时的 2 和 6 小时时间点，PHF-Tau 信号比不用硒酸钠处理的细胞显著降低。

[0225] 图 13C 显示 AT270 的免疫反应信号与 AT180 克隆相似。看来 AT270 克隆能检测到 73、70 和 60kDa 的三种 PHF-Tau 蛋白同工型。

[0226] 图 13D 显示在存在（+）或缺乏（—）硒酸钠时小鼠全脑裂解液中的 Tau 蛋白表达。抗人 Tau 蛋白，特别是克隆 HT-7 在小鼠脑组织中似乎无特异性。

[0227] 实施例 11：硒酸钠对过度表达人 Tau441 转基因小鼠（TMHT）的行为和脑 Tau 蛋白病理学的影响

[0228] 方法

[0229] 序言 :设计此项研究以评价用硒酸钠治疗对过度表达在脑特异性小鼠 Thy-1 启动子控制下的人 TAU441 基因 (含二处突变 V337M 和 R406W) 的 TAU441 转基因 (Tg) TMHT 小鼠 (C57BL6 背景) 的行为和脑形态的影响。评价治疗后 1.5 和 3 个月在开场 (Open Field, OF) 试验、旋转杆 (Rota Rod, RR) 试验和伸鼻 (Nose poke) 好奇心和活动试验 (后者是评价好奇心行为的试验) 中所有 Tg 小鼠的行为。治疗结束时另在莫利斯 (Morris) 水迷宫 (MWM) 试验中评价记忆和学习能力。也用 OF 试验、RR 试验、鼻触试验和 MWM 任务测定未治疗的基线组小鼠。先检测每个治疗组 3 只动物的脑 TAU 病理学变化。

[0230] 动物 :所用的 Tg TMHT 雄性和雌性小鼠表达人 TAU441, 其携带有在脑特异性小鼠 Thy-1 启动子调控下的错义突变 V337M 和 R406W。在奥地利格拉茨的 JSW 研究中心 (JSW-Research, Graz, Austria) 中繁殖和育种小鼠。这些小鼠的 C57BL/6 背景导致小鼠具有所知的良好学习能力。此小鼠模型类似于人阿尔茨海默病的 Tau 蛋白病理。治疗开始时小鼠为 5 个月 $\pm$ 2 周龄, 这也是基线组的年龄。

[0231] 动物辨认和饲养 :小鼠靠耳环标记辨认, 饲养在单个通风笼子 (IVC) 中, 笼子中装有由 ABEDD 提供的标准鼠类草垫。每只笼子最多装 5 只小鼠。按照基于国际标准的标准操作规程保持饲养小鼠。

[0232] 每只笼子用颜色卡片辨认, 表明研究的动物数目、性别、个体登记号 (IRN)、出生日期及筛选日期和治疗组分配。

[0233] 研究期间的温度维持在大约 24°C, 相对湿度维持约 40—70%。在恒定的光照周期 (12 小时光照 / 黑暗) 下饲养动物。

[0234] 动物可自由获得干燥的颗粒状鼠类饼干 (Altromin) 和普通自来水。

[0235] 治疗 :将小鼠随机分配到 A 组 (硒酸钠)、B 组 (运载体) 和 C 组 (基线)。治疗组 A 通过饮水接受硒酸钠 12 周, 而对照组 (B) 小鼠可饮用普通自来水。为了应用, 将 1.2mg 硒酸钠溶于 100ml 灭菌水, 记录重量, 将水瓶放在笼子中, 每周一、三、五这样做, 换瓶时测定消耗的水重量。

[0236] 行为试验

[0237] 开场试验 :最标准化的通用运动功能检测是开场 (OF) 试验中的自主活动。本项研究采用 Plexiglas 开场 (48x48cm; TSE-System) 试验。将红外光束置于盒子周围 1.4cm 距离。为检测后腿站立, 将另一排光束固定在第一束光上方 4cm 处。测试持续 5 分钟以检查小鼠在新环境中的行为和习惯。然后, 计数粪团数目作为情绪激动的衡量。每只鼠活动后用 70% 乙醇清洗 OF 去除味道痕迹。试验在标准的昼夜节律光照期室内光照条件下进行。

[0238] 旋转杆试验 :利用该试验来检测 TAU Tg 小鼠可能的运动缺陷。在加速的 5 道旋转杆 (TSE-Systems®) 上进行研究。小鼠必须在最多 300 秒内完成程序。它们开始时的速度为 5rpm, 120 秒后杆旋转速度达到 60rpm。此后, 计算出跌倒的潜伏期和当时的速度。

[0239] 伸鼻好奇心和活动试验 :洞板装置提供检测小鼠对新环境反应的简单方法, 其优点是利用了小鼠的好奇心和它们将鼻子伸入洞内的倾向。在装配有洞板 (每板 16 个洞) 的 OF 盒中进行好奇心行为研究。头伸入洞即阻断了刚好装在每只洞边缘下方的红外光束。计算出每只动物在 5 分钟内头伸入的次数和时间。

[0240] 莫利斯水迷宫 (MWM) 试验 :莫利斯水迷宫 (MWM) 试验在直径 100cm 的黑色圆形水池中进行。水池装满自来水, 温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 水池实际上分成 4 区。透明平台 (直径 8cm) 安

置在水表面下方约 0.5cm 处。整个试验期间,除了预测试,平台都位于水池的西南 1/4 区。

[0241] 在 4 天持续训练课程前一天,动物必须进行所谓的“预试验”(二次 60 秒试验)以确保每只动物的视力正常。只有完成这种试验的动物才继续 MWM 试验。

[0242] 在 MWM 任务中,每只小鼠必须在连续 4 天内进行三次试验。一次试验持续最长一分钟。在这段时间,小鼠有机会找到隐藏的模糊目标。如果动物不能找到离开水的“路”,研究人员可引导或将此小鼠放到平台上。每次训练后让小鼠在平台上休息 10—15 秒。此时小鼠可能弄清周围的方向。研究在昏暗的光照条件下进行以防止跟踪系统受到不良影响(Kaminski ;PCS,生物医学研究系统公司 (Biomedical Research Systems))。在水池四周池壁上,贴有固定的黑色醒目的几何符号(如圆圈和方块),使小鼠可利用这些符号作为定向标志。

[0243] 每次游泳训练一组有 5—6 只小鼠,以保证训练间隙约 5—10 分钟。

[0244] 为了定量测定逃脱潜伏期(小鼠找到隐藏的平台而从水中逃脱的以秒计的时间)、路径(以米计的到达目标的游泳轨迹长度)和在目标 1/4 区停留的时间,采用计算机处理的跟踪系统。将计算机连接于水池中央上方放置的照相机。用照相机检测用小发夹固定在小鼠尾巴上的发光二极管(LED)的信号。

[0245] 探索试验(Probe Trial):第 4 天最后一次训练后 1 小时,小鼠必须完成所谓的探索试验。此时,拆去水池中的平台,在一分钟探索试验中,实验者计算出(小鼠)穿越先前平台位置的次数。测定在此 1/4 区停留的时间。

[0246] 组织的制备和取样

[0247] 治疗结束和完成所有的行为测试后,处死各动物,采集血液(血浆和血清)、CSF 和脑,立即加工或贮存待进一步实验。

[0248] 为此目的,用标准吸入麻醉剂(异氟烷, Baxter)镇定所有小鼠。钝性解剖并暴露枕骨大孔,获得脑脊液。暴露时,将巴斯得(Pasteur)移液器尖头插入枕骨大孔内约 0.3-1mm 深处。依靠抽吸和毛细管作用收集 CSF 直到液流完全停止。立即 -80℃ 冻存各样品,直到用 ELISA 进行分析。

[0249] CSF 取样后,将各小鼠置于背平卧位,用套在 1ml 注射器上的 26 号针头插入胸腔通过横隔膜深入约 2cm。向针头施加轻微吸力,通过回血确认已将针头置于小鼠的心室中。抽取血液直到血流停止。将血液收集在 EDTA 小瓶中 -20℃ 保存待用。

[0250] 采集转基因小鼠血样后心内灌注 0.9%氯化钠。迅速取出脑,右半侧浸没在新配制的 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋作组织学检查。左半球在干冰上冻结,于 -80℃ 保存用于随后可能进行的生化分析。

[0251] 先进行 9 个脑半球(每个 Tg 小鼠组 ≥ 3 个)的组织学评价以定量和定性评价 Tau 蛋白病变。

[0252] 按照 Paxinos 和 Franklin 编著的“小鼠脑”(The Mouse Brain)(第 2 版)的形态学实验集选择在大脑前卤的 -1.82 与 -1.34mm 之间的不同 5 层,在各层中切取厚 5 μ m 的 15 张冠状连续切片(Leica SM2000R),作 Gallyas 染色,用特异性抗体(AT180 和 HT7)检测 Tau 蛋白病理变化。以精确相同的方法操作研究的所有转基因小鼠组织以避免由于此方法的差异引起的偏差。保存和储存未使用的剩余的脑半球或组织,直到负责人决定如何处理或直到研究结束。

[0253] 免疫组化检测 Tau 蛋白病理变化

[0254] 用单克隆 TAU- 抗体 AT180 和 HT7 (皮尔斯公司 **Endogen®**) 检测 Tau 蛋白的沉积。AT180 能识别 PHF-TAU 和形成的纤维缠结 [此抗体识别的表位是磷酸化的 Thr231 残基], HT7 识别正常人 Tau 蛋白及 PHF-TAU [此抗体识别的表位在人 Tau 蛋白的残基 159 与 163 之间]。

[0255] 用上述单克隆小鼠抗人 Tau 蛋白抗体 (AT180—1:100 ;HT7—1:1000) 处理不同 5 层各层的 5 μ m 厚冠状石蜡切片,用抗小鼠 Cy3 二抗 (1:500,杰克逊实验室公司 (Jackson Laboratories) **®**) 显色。染色的详细方法见下:检测人 PHF-TAU 蛋白沉积的 AT180 培育方法

[0256] 1.) 使组织切片通过组织清洗液 (樱花 (Sakura) **®**) 和一系列等级酒精 (**Merck®**) 脱蜡和水化。

[0257] 2.) 用重蒸馏水 (Fresenius-Kabi **®**) 洗涤 2 分钟。

[0258] 3.) 将组织切片置于 10% 柠檬缓冲液 (**Labvision®**) 中在 95℃ 蒸气中蒸 15 分钟然后冷却到室温 15 分钟,以便进行抗原暴露 (unmasking)

[0259] 4.) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。

[0260] 5.) 室温用 1% 过氧化氢 (**Linaris®**) 的甲醇 (**Merck®**) 溶液封闭内源性过氧化物酶 10 分钟。

[0261] 6.) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。

[0262] 7.) 在潮湿室中用 MOM- 封闭试剂 (**Vector®**) 在室温下封闭非特异性结合 60 分钟。

[0263] 8.) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。

[0264] 9.) 用 MOM- 稀释液 (**Vector®**) 在室温下封闭非特异性结合 5 分钟。

[0265] 10.) 在潮湿室中与 AT180 (皮尔斯公司 **Endogen®**; 用 MOM- 稀释液 1:100 稀释) 一起于室温下培育 60 分钟。

[0266] 11.) 用 PBS 洗涤切片 3x5 分钟。

[0267] 12.) 在潮湿室中用 10% 非免疫山羊正常血清 (Dako **®**) 封闭非特异性结合 10 分钟。

[0268] 13.) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。

[0269] 14.) 在潮湿室中与 Cy3 山羊抗小鼠抗体 (Jackson **®**; 用 MOM- 稀释液 1:500 稀释) 一起于室温下培育 60 分钟。

[0270] 15.) 用 PBS 洗涤切片 5 分钟。

[0271] 16.) 用重蒸馏水洗涤切片 5 分钟。

[0272] 17.) 用香柏油 (Moviol) 和盖玻片覆盖切片。

[0273] 化学试剂:

[0274] 1% 过氧化氢的甲醇溶液:

[0275] 60mL 甲醇 + 2mL 30% 过氧化氢 + 0.6mL Triton X-100 (**Amresco®**)。

[0276] MOM- 封闭试剂:

[0277] 2 滴 MOM- 小鼠 IgG 封闭试剂 (来自 MOM- 试剂盒 (**Vector®**)) + 2.5mL PBS。

[0278] MOM- 稀释液:

- [0279] 10mL PBS+800 μ L 蛋白浓缩液 (来自 MOM- 试剂盒(**Vector®**))。
- [0280] 抗体 AT180 :
- [0281] 用 MOM- 稀释液 1:100 稀释
- [0282] 抗体 Cy3 山羊抗小鼠 :
- [0283] 用 MOM- 稀释液 1:500 稀释
- [0284] 检测正常人 Tau 蛋白和 PHF-Tau 蛋白沉积的 HT7 培育方法
- [0285] 1) 使组织切片通过组织清洗液 (樱花 (Sakura) ®) 和一系列等级酒精(**Merck®**) 脱蜡和水化。
- [0286] 2) 用重蒸馏水 (Fresenius- **Kabi®**) 洗涤 2 分钟。
- [0287] 3) 将组织切片置于 10% 柠檬缓冲液(**Labvision®**)中在 95℃ 蒸气中蒸 15 分钟然后冷却到室温 15 分钟,以便进行抗原暴露。
- [0288] 4) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。
- [0289] 5) 室温用 1% 过氧化氢(**Linaris®**)的甲醇(**Merck®**)溶液封闭内源性过氧化物酶 10 分钟。
- [0290] 6) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。
- [0291] 7) 在潮湿室中用 MOM- 封闭试剂(**Vector®**)在室温下封闭非特异性结合 60 分钟。
- [0292] 8) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。
- [0293] 9) 用 MOM- 稀释液(**Vector®**)在室温下封闭非特异性结合 5 分钟。
- [0294] 10) 在潮湿室中与 HT7 (皮尔斯公司 Endogen ®;用 MOM- 稀释液 1:1000 稀释) 一起于室温下培育 60 分钟。
- [0295] 11) 用 PBS 洗涤切片 3x5 分钟。
- [0296] 12) 在潮湿室中用 10% 非免疫山羊正常血清(**Dako®**)封闭非特异性结合 10 分钟。
- [0297] 13) 用 PBS 洗涤切片 2x5 分钟。
- [0298] 14) 在潮湿室中与 Cy3 山羊抗小鼠抗体 (**Jackson®**;用 MOM- 稀释液 1:500 稀释) 一起于室温下培育 60 分钟。
- [0299] 15) 用 PBS 洗涤切片 5 分钟。
- [0300] 16) 用重蒸馏水洗涤切片 5 分钟。
- [0301] 17) 用香柏油 (Moviol) 和盖玻片覆盖切片。
- [0302] 化学试剂 :
- [0303] 1% 过氧化氢的甲醇溶液 :
- [0304] 60mL 甲醇 +2mL30% 过氧化氢 +0.6mL Triton X-100 (**Amresco®**)。
- [0305] MOM- 封闭试剂 :
- [0306] 2 滴 MOM- 小鼠 IgG 封闭试剂 (来自 MOM- 试剂盒(**Vector®**))+2.5mLPBS。
- [0307] MOM- 稀释液 :
- [0308] 10mL PBS+800 μ L 蛋白浓缩液 (来自 MOM- 试剂盒(**Vector®**))。
- [0309] 抗体 HT7 :
- [0310] 用 MOM- 稀释液 1:100 稀释抗体 Cy3 山羊抗小鼠 :
- [0311] 用 MOM- 稀释液 1:500 稀释
- [0312] 评价

[0313] 行为

[0314] 在开场 (OF) 试验中,检测了水平和垂直运动、排便次数、直立次数和持续时间、过度活动及在开场中心与外围消耗的时间比例

[0315] 在伸鼻好奇心和活动试验中,计算了小鼠头伸入(洞)的次数和持续时间。

[0316] 在旋转杆 (Rota Rod) 试验中,计算了跌倒的潜伏期和当时的杆旋转速度。

[0317] 在莫利斯水迷宫 (MWM) 试验中,记录了游泳路径的长度和逃离潜伏期。游泳速度的计算方法为游泳路径长度除以逃离潜伏期。在探索试验中,拆去平台进行试验,在记录纸上记录(小鼠)穿越先前平台位置的次数,以及在水池每一 1/4 区消耗的时间。

[0318] 神经病理学变化:为测定脑海马回和脑扁桃体中的 Tau 蛋白免疫反应性程度,采用专用的图象分析软件(专业图像软件(Image Pro Plus),4.5.1.29 版)。评价和计算了以下参数:

[0319] 每张切片的脑海马回和脑扁桃体区域面积;

[0320] 特定脑区域海马回和扁桃体中免疫反应阳性细胞所占的绝对面积;

[0321] 免疫反应阳性面积与海马回和扁桃体特定脑区域面积之比。

[0322] 定量测定方法:

[0323] a) 调整该图像的对比度以更好观察切片形状,但不应将该对比度施加于该图像。

[0324] b) 人机交互绘制海马回轮廓图测量其面积(=区域面积)

[0325] c) 人机交互绘制感兴趣区域(AOI),其中检测到高于强度阈值水平的染色对象。为检测此域值,人机交互绘制在靠近 AOI 的没有可见免疫反应区域中的线直方图。此线直方图所有像素的平均强度水平,加上一个常数,得到此强度域值水平。排除小于 $7 \mu\text{m}^2$ 的对象。

[0326] d) 测定各对象的面积和 AOI 中染色面积之和,

[0327] e) 对脑扁桃体重复步骤 a)-d),

[0328] f) 计算相对 Tau 蛋白免疫阳性面积(= Tau 蛋白免疫反应性的总面积/区域面积 $\times 100$)

[0329] g) 将数据自动输出到 Excel 电子数据表中,包括参数“图像标题、区域面积、Tau 总面积和 Tau 面积百分比”。利用注释区分别记录图像质量和排除标准。排除标准是该切片的丢失部分、许多是皱纹和明显裂缝。

[0330] h) 关闭该图像而不保存(以保留原始数据)。

[0331] 统计学处理:计算所有测定参数的平均值、标准差或 SEM。

[0332] 结果

[0333] 一般观察:一般说,用硒酸钠治疗不会导致不良副作用或引起成熟前死亡。

[0334] 行为试验结果:

[0335] 开场试验:

[0336] 虽然硒酸钠治疗不影响活动参数(活动、过度活动和直立行为),但硒酸钠治疗小鼠在第一次 OF 试验中显示趋触行为被扰乱。这导致在该开场盒的中心区停留时间显著延长,意味着第一轮治疗后与运载体相比硒酸钠治疗的动物的趋触性差(见图 14—“趋触性”,治疗组动物的 T 检验: $p = 0.019$)。第二轮治疗结束时,将趋触性行为按运载体对照组水平标准化。

[0337] 一个半月后,与所研究的二个治疗组相比,OF 试验中基线动物的特征是排便率较高(二个治疗组的 ANOVA 分析 : $p = 0.018$, $p < 0.05$),表明实验动物对此试验方法有较高的情绪反应。

[0338] 旋转杆 (Rota Rod) 试验,硒酸钠治疗不会改变小鼠的运动行为。

[0339] 伸鼻好奇心和活动试验,硒酸钠治疗不会改变小鼠的好奇心行为。

[0340] 莫利斯水迷宫 (MWM) 试验,图 15 显示了二个不同治疗组加基线 (5 月龄动物治疗) 的莫利斯水迷宫 (MWM) 行为结果,表 4 显示其统计学分析结果。此 MWM 任务深刻揭示在某些情况下 (见表 4),与运载体组、甚至是年幼 3 个月的基线组相比,硒酸钠治疗动物之间差异的显著性甚至更高。

[0341] 表 4:莫利斯水迷宫 (MWM) 试验结果的 Mann Whitney U- 检验结果表:

[0342]

时间				长度			
硒酸钠与运载体				硒酸钠与运载体			
	n 硒酸钠	n 运载体	p-值		n 硒酸钠	n 运载体	p-值
第 1 天	15	16	0.0020	第 1 天	15	16	0.4945
第 2 天	15	16	0.0082	第 2 天	15	16	0.4701
第 3 天	15	16	0.0267	第 3 天	15	16	0.6823
第 4 天	15	16	0.1015	第 4 天	15	16	0.5196
硒酸钠与基线				硒酸钠与基线			
	n 硒酸钠	n 基线	p-值		n 硒酸钠	n 基线	p-值
第 1 天	15	15	0.0295	第 1 天	15	15	0.6236
第 2 天	15	15	0.6827	第 2 天	15	15	0.8063
第 3 天	15	15	0.3669	第 3 天	15	15	1.0000
第 4 天	15	15	0.5125	第 4 天	15	15	0.9349
运载体与基线				运载体与基线			
	n 运载体	n 基线	p-值		n 运载体	n 基线	p-值
第 1 天	16	15	0.5196	第 1 天	16	15	0.6260
第 2 天	16	15	0.0655	第 2 天	16	15	0.7701
第 3 天	16	15	0.1195	第 3 天	16	15	0.7112
第 4 天	16	15	0.1751	第 4 天	16	15	0.6260

[0343] 此结果清楚表明硒酸钠能够提高认知功能。

[0344] 脑组织学和免疫组化检测结果

[0345] 总结果:

[0346] 在 AT180 和 HT7IHC 定量中,在所有受检脑中海马回和扁桃体区的区域面积高度恒定,排除了免疫组化染色步骤中对组织的不良作用 (如皱缩、切割环境不同),因此进一步

表明治疗不会导致萎缩。检测到的 Tau 蛋白含量数据与切片的个别区域大小相关,能应对小差异。

[0347] HT7 和 AT180 :与运载体组 (ANOVA : $p < 0.05$, 治疗组 T- 检验 : $p = 0.04$) 和未治疗的基线组 (ANOVA : $p < 0.05$, 见图 16A) 相比, 硒酸钠 (1.2mg) 治疗的动物海马回中 HT7-Tau 相对面积的百分比显著降低。这种作用在扁桃体中更显著 (见图 16B), 其中与未治疗基线组 (ANOVA : $p < 0.01$) 和运载体治疗动物 (ANOVA : $p < 0.05$, 治疗组 T- 检验 : $p = 0.0018$) 相比, 硒酸钠治疗小鼠的 HT7-Tau 相对面积百分比明显降低。

[0348] 与 HT7-Tau 类似, 硒酸钠 (1.2mg) 治疗的动物海马回中 AT180-Tau 相对面积的百分比低于运载体组 (治疗组 T- 检验 : $p = 0.04$, 见图 17A), 然而显著性水平更低。还有, 这种作用在扁桃体中更显著 (见图 17B), 其中硒酸钠治疗小鼠的 HT7-Tau 相对面积百分比显著低于运载体组 (ANOVA : $p < 0.05$, 治疗组 T- 检验 : $p = 0.0045$), 但不低于未治疗基线组。

[0349] 海马回和扁桃体中的 AT180 和 HT7 免疫反应阳性神经元显示在与 PHF-Yau 紧密挤在一起的神经元细胞体中有大量的 Tau 蛋白沉积。硒酸钠治疗显著减少扁桃体和海马回 CA1 区神经元层中的 Tau 蛋白载量和 Tau 阳性细胞。

[0350] 作用小结和结论

[0351] 在硒酸钠治疗转基因小鼠中, 治疗开始后一个半月趋触性降低, 表明与扁桃体样结构相关的恐惧心理变化。经长期硒酸钠治疗后, 小鼠在第二轮开场试验处死之前, 趋触行为恢复到与运载体治疗对照组相仿和正常的水平。

[0352] 硒酸钠治疗不影响所有的运动参数, 如旋转杆能力、开场活动、过度活动和直立行为。

[0353] 硒酸钠治疗可提高小鼠在莫利斯水迷宫 (MWM) 试验中的认知能力。第 1、2 和 3 天硒酸钠治疗动物找到平台明显快于运载体组动物 ($p \leq 0.01$), 第 1 天也快于基线组的年幼 3 个月的动物。

[0354] 当评价 TMHT Tg 小鼠海马回和扁桃体中的 HT7 免疫阳性 Tau 蛋白沉积和 Tau 蛋白载量时, 可见硒酸钠治疗的显著影响。

[0355] 与未治疗的基线组相比, 甚至在扁桃体中也可与运载体 (水) 治疗的对照相比, 可观察到这种治疗显著减少了海马回和扁桃体中 HT7 阳性 Tau 蛋白区域面积。

[0356] HT7-Tau 沉积的结果得到 AT180 培育的支持。硒酸钠治疗后海马回和扁桃体中的 AT180 阳性 Tau 蛋白比运载体 (水) 治疗对照组显著减少。

[0357] 参考文献

[0358]

[0359] Alonso, A. D. C. 等, 阿尔茨海默病神经原纤维缠结和失装配微管中超磷酸化的 Tau 蛋白整合正常 Tau 蛋白 (Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules.) Nat. Med., 1996. 2 :p. 783-787。

[0360] Barrett, W. C. 等., 过氧自由基离子在蛋白酪氨酸磷酸 1B 可逆性调节介导的信号转导中的作用 (Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B.). J Biol Chem, 1999. 274(49) :p. 34543-6。

[0361] Barton, G. J., P. T. Cohen 和 D. Barford, 蛋白丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶的保守分析和结构预测 : 与大肠杆菌二腺苷四磷酸酶序列相似提示此二蛋白磷酸酶同源 (Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases) *Eur J Biochem*, 1994. 220(1) : p. 225-37。

[0362] Bass, D. A. 等, 流式细胞计数研究中性白细胞氧化产物的形成 : 指导对膜刺激的应答 (Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : a graded response to membrane stimulation) *J Immunol*, 1983. 130(4) : p. 1910-7。

[0363] Bramblett, G. T. 等, 阿尔茨海默病中 Tau 蛋白 Ser396 位的异常磷酸化改变了对减少微管结合发生的贡献 (A normal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding). *Neuron*, 1993. 10 : p. 1089-1099。

[0364] Bryant, J. C., R. S. Westphal, 和 B. E. Wadzinski, PP2A 催化亚基的甲基化 C-末端亮氨酸残基对调节 α 亚基的结合至关重要 (Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory α subunit). *Biochem J*, 1999. 339(Pt2) : p. 241-6。

[0365] Cayla, X. 等, 能激活蛋白磷酸酶 2A 的酪氨酸磷酸酶活性的蛋白 PTPA 的分子克隆、表达和特征鉴定 (Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A). *J Biol Chem*, 1994. 269(22) : p. 15668-75。

[0366] Chen, J., B. L. Martin 和 D. L. Brautigan, 酪氨酸磷酸酶可调节蛋白丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶 2A (Regulation of protein serine-threonine phosphatase type 2A by tyrosine phosphorylation) *Science*, 1992. 257(5074) : p. 1261-4。

[0367] Chen, J., S. Parsons 和 D. L. Brautigan, 蛋白磷酸酶 2A 的酪氨酸在对成纤维细胞生长刺激和 v-src 转化应答反应中磷酸化 (Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts). *J Biol Chem*, 1994. 269(11) : p. 7957-62。

[0368] Cohen, P. T., 新的蛋白丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶 : 多样化是生命的调味品 (Novel protein serine/threonine phosphatases : variety is the spice of life) *Trends Biochem Sci*, 1997. 22(7) : p. 245-51。

[0369] Conway, K., Harper, J., Lansbury, P., 1998. 与早期发作帕金森病有关的突变 α - 共核蛋白加速了体内纤维结形成 (Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease). *Nat. Med.* 4, 1318-1320。

[0370] Cross, D. A. 等, 胰岛素介导的蛋白激酶 B 抑制糖原合酶的激酶 3 (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated protein kinase B). *Nature*, 1995. 378(6559) : p. 785-9。

[0371] Diehl, J. A. 等, 糖原合酶的激酶 3 β 调节周期蛋白 D1 的水解和细胞定位

(Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and cellular localization). *Genes Dev.*, 1998. 12(22) :p. 3499-511.

[0372] Duda, J. E. , Giasson, B. I. , Mabon, M. E. , Miller, D. C. , Golbe, L. I. , Lee, V. M. , Trojanowski, J. Q. , 2002. 在脑挫伤亲属中同时发生的 α -共核蛋白病和 Tau 蛋白病 (Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred). *Acta Neuropathol. (Berl.)* 104, 7-11.

[0373] Ellman, G. L. , 检测低浓度硫醇的比色方法 (A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans). *Arch Biochem Biophys*, 1958. 74(2) :p. 443-50.

[0374] Feany, M. B. , Bender, W. W. , 2000. 帕金森综合征的果蝇模型 (A *Drosophila* model of Parkinson's disease). *Nature* 404, 394-398.

[0375] Fern 和 ez, J. J. , 等, 研究细胞过程的有用工具冈田酸 (Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes). *Curr Med Chem*, 2002. 9(2) :p. 229-62.

[0376] Forman, M. S. , Schmidt, M. L. , Kasturi, S. , Perl, D. P. , Lee, V. M. , Trojanowski, J. Q. , 2002. Guam 帕金森综合征痴呆复合体扁桃体中的 Tau 蛋白和 α -共核蛋白病理学 (Tau and alpha-synuclein in pathology in amygdala of Parkinsonism-dementia complex patients of Guam). *Am. J. Pathol.* 160, 1725-1731.

[0377] Frasier, M. 等. 实验神经病学 (Experimental Neurology) 192(2005) 274-287 285.

[0378] Gallego, M. 和 Virshup, D. M. , 2005. 蛋白丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶 : 生、死和睡眠 (Protein serine/threonine phosphatases : life, death, and sleeping) *Curr Opin Cell Biol*, 17(2) : 197-202.

[0379] Giasson, B. I. , Duda, J. E. , Quinn, S. M. , Zhang, B. , Trojanowski, J. Q. , Lee, V. M. , 2002. 表达 A53T α -共核蛋白小鼠的 α -共核蛋白病和严重运动障碍 (Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein). *Neuron* 34, 521-533.

[0380] Giasson, B. I. , Forman, M. S. , Higuchi, M. , Golbe, L. I. , Graves, C. L. , Kotzbauer, P. T. , Trojanowski, J. Q. , Lee, V. M. , 2003. Tau 蛋白和 α -共核蛋白启动和协同神经纤维缠结形成 (Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein). *Science* 300, 636-640.

[0381] Grundke-Iqbal, I. 等, 微管相关蛋白 Tau 蛋白, 阿尔茨海默病成对螺旋纤维缠结的一种成分 (Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments) *J. Biol. Chem.* 1986a. 261 :p. 6084-6089.

[0382] Grundke-Iqbal, I. 等, 在阿尔茨海默病细胞骨架病理学中微管相关蛋白 Tau 蛋白的异常磷酸化 (Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986b. 83 : p4913-4917.

[0383] Guo, H. 和 Z. Damuni, 自身磷酸化活化的蛋白激酶可磷酸化灭活蛋白磷酸酶 2A (Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates

protein phosphatase 2A) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90 (6) : p. 2500-4.

[0384] Hashimoto, M., L.J. H., Xia, Y., Takeda, A., Sisk, A., Sundsmo, M., Masliah, E., 1999. 体外氧化应激诱导 NACP/ α -共核蛋白形成淀粉样聚集物 (Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/ α -synuclein in vitro). *NeuroReport* 10, 717-721.

[0385] He, X. 等, 非洲爪蟾胚胎中的糖原合酶的激酶 3 和背腹图式 (Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral pattern in *Xenopus* embryos) *Nature*, 1995, 374 (6523) : p. 617-22.

[0386] Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., Dickson, D. W., 2003. Tau 蛋白和 α -共核蛋白表位在雷维小体中共位 (Colocalization of tau and α -synuclein epitopes in Lewy bodies). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 389-397.

[0387] Jensen, P. H., Hager, H., Nielsen, M. S., Hojrup, P., Gliemann, J., Jakes, R., 1999. α -共核蛋白结合 Tau 蛋白并刺激蛋白激酶催化 Tau 蛋白的丝氨酸残基 262 和 356 磷酸化 (α -Synuclein binds to tau and stimulates the protein kinase A catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356) *J. Biol. Chem.* 274, 25481-25489.

[0388] Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoj, S., Okamoto, N., Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N., Riederer, P., Kretschmar, H. A., Haass, C., 2001. 转基因小鼠模型中人雷维小体病的 α -共核蛋白选择性不溶被重新捕获 (Selective insolubility of α -synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model). *Am. J. Pathol.*

[0389] 159, 2215-2225.

[0390] Kamibayashi, C. 等, 含不同 B 亚基的异质三聚体蛋白磷酸酶 2A 的比较 (Comparison of heterotrimeric protein phosphatases 2A containing different B subunits). *J. Biol. Chem.* 1994. 269 : p. 20139-20148.

[0391] Kohn, A. D., F. Takeuchi, 和 R. A. Roth, Akt, 一种含普列克底物蛋白结构域的激酶主要被磷酸化活化 (Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation). *J Biol Chem*, 1996. 271 (36) : p. 21920-6.

[0392] Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J., Schols, L., Riess, O., 1998. 帕金森综合征中编码 α -共核蛋白的基因发生 Ala30Pro 突变 (Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease). *Nat. Genet.* 18, 106-108.

[0393] Kwon, J. 等, 用肽生长因子刺激可逆性氧化灭活细胞中的肿瘤抑制子 PTEN (Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101 (47) : p. 16419-24.

[0394] Lee, J., 等, 一种特异性蛋白羧基甲酯酶能去除牛脑中磷蛋白磷酸酶 2A 的甲基 (A specific protein carboxyl methyl esterase that demethylates phosphoprotein

phosphatase2A in bovine brain). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996. 93(12) : p. 6043-7.

[0395] Lee, V.M-Y. 等, 神经变性 Tau 蛋白病 (Neurodegenerative Taupathies). *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. 24 :p. 1121-1159.

[0396] Lee, V.M-Y. 等, A68 :正常 Tau 蛋白成对螺旋纤维丝的主要亚基和衍生形式 (A68 : Amajorsubunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau). *Science*, 1991. 251 :p. 675-678.

[0397] Li, T. 和 Paudel, H. K., 糖原合酶的激酶 3 β 通过序列机制磷酸化阿尔茨海默病微管相关 Tau 蛋白的 396 位特异性丝氨酸 (Glycogen Synthase Kinase 3 β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism). *Biochemistry*, 2006, 45(10) :p. 3125-3133.

[0398] Liu, F. 等, 蛋白磷酸酶 PP1, PP2A, PP2B 和 PP5 调节 Tau 蛋白磷酸化的贡献 (Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation). *Eur. J. Neurosci.* 2005. 22(8) :p. 1942-50.

[0399] Longin, S. 等, 蛋白磷酸酶 2A 群失活与甲脂酶相关可被磷酸酪氨酸磷酸酶激活剂重新活化 (An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methyl esterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator). *Biochem J*, 2004. 380(Pt1) :p. 111-9.

[0400] Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., Mucke, L., 2000. α -共核蛋白病小鼠多巴胺能功能丧失和包涵体形成 :提示患神经变性疾病 (Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice : implications for neurodegenerative disorders) *Science* 287, 1265-1269.

[0401] Mumby, M. C. 和 Walter, G., 细胞生长中的蛋白丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶 : 结构、调节和功能 (Protein serine/threonine phosphatases : structure, regulation and functions in cell growth). *Physiol. Rev.* 1993. 73 :p. 673-700.

[0402] Ostrerova-Golts, N., Petrucelli, L., Hardy, J., Lee, J., Farrer, M., Wolozin, B., 2000. A53T α -共核蛋白提高铁依赖性聚集和毒性 (The A53T α -synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity). *J. Neurosci.* 20, 6048-6054.

[0403] Paik, S., Shin, H., Lee, J., Chang, C., Kim, J., 1999. 铜 (II) 诱导的 α -共核蛋白自身寡聚化 (Copper(II)-induced self-oligomerization of α -synuclein). *Biochem. J.* 340, 821-828.

[0404] Paik, S. R., Shin, H. J., Lee, J. H., 2000. 存在铜 (II) 和过氧化氢时 α -共核蛋白的金属催化氧化 (Metal-catalyzed oxidation of α -synuclein in the presence of copper(II) and hydrogen peroxide). *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 269-277.

[0405] Peterson, R. T., 等, 1999. 蛋白磷酸酶 2A 能与 70-kDa S6 激酶相互反应和通过抑制 FKBP12- 协帕霉素相关蛋白而被激活 (Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin associated protein). *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(8) :4438-42.

[0406] Polymeropoulos, M. H. , Lavedan, C. , Leroy, E. , Ide, S. E. , Dehejia, A. , Dutra, A. , Pike, B. , Root, H. , Rubenstein, J. , Boyer, R. , Stenroos, E. S. , Ch 和 rasekharappa, S. , Athanassiadou, A. , Papapetropoulos, T. , Johnson, W. G. , Lazzarini, A. M. , Duvoisin, R. C. , Di Iorio, G. , Golbe, L. I. , Nussbaum, R. L. , 1997. 在帕金森病家族中鉴定到 α -共核蛋白基因中的突变 (Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease). *Science* 276, 2045-2047.

[0407] Salmeen, A. 等, 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 的氧化还原调节涉及磺酰胺介导 (Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves asulphenyl-amide intermediate). *Nature*, 2003. 423 (6941) :p. 769-73.

[0408] Silverstein, A. M. , 等, 2002. PP2A 对 MAP 激酶和凋亡的作用受不同调节亚基的介导 (Action of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits). *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (7) :4221-6.

[0409] Singleton, A. B. , Farrer, M. , Johnson, J. , Singleton, A. , Hague, S. , Kachergus, J. , Hulihan, M. , Peuralinna, T. , Dutra, A. , Nussbaum, R. , Lincoln, S. , Crawley, A. , Hanson, M. , Maraganore, D. , Adler, C. , Cookson, M. R. , Muentert, M. , Baptista, M. , Miller, D. , Blancato, J. , Hardy, J. , Gwinn-Hardy, K. , 2003. α -共核蛋白基因座三聚化导致帕金森病 (α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease). *Science* 302, 841.

[0410] Sohn, J. 和 J. Rudolph, 氧化/还原调节 cdc25 磷酸化的催化和化学能力 (Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction). *Biochemistry*, 2003. 42 (34) :p. 10060-70.

[0411] Sontag, E. 等, 一种新的蛋白磷酸酶 2A 混合物与微管相关在细胞周期中受到调节 (A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle). *J. Cell Biol.*, 1995. 128 :p. 1131-1144.

[0412] Sontag, E. 等, 蛋白磷酸酶 2A 调节 Tau 蛋白的磷酸化状态和微管结合活性 (Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A). *Neuron*, 1996. 17 :p. 1201-1207.

[0413] Spillantini, M. , Schmidt, M. , VM-Y, L. , Trojanowski, J. , Jakes, R. , Goedert, M. , 1997. 雷维小体中的 α -共核蛋白 (α -Synuclein in Lewy bodies). *Nature* 388, 839-840.

[0414] Spillantini, M. G. , Crowther, R. A. , Jakes, R. , Hasegawa, M. , Goedert, M. , 1998b. 帕金森病和伴雷维小体的痴呆症包含在雷维小体中的纤维缠结中的 α -共核蛋白 (α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6469-6473.

[0415] Tolstykh, T. 等, 羧基甲基化通过控制调节亚基的结合调节磷酸化蛋白的磷酸酶 2A (Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits). *Embo J.*, 2000. 19 (21) :p. 5682-91.

[0416] Van Hoof, C. , 等, PP2A 和 PP2A 样磷酸酶与酵母菌 PTPA 同源物 Ypa1 和 Ypa2 的特异性相互作用 (Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2). *Biochem J.*, 2005. 386 (Pt1) :p. 93-102.

[0417] Van Kanegan, M. J., 等, 2005. 不同的蛋白磷酸酶 2A 异质三聚体调节生长因子信号传导给胞外信号调节激酶和 Akt (Distinct proteinphosphatase2A heterotrimers modulate growth factor signalling to extracellular signal-regulated kinases and Akt). *J Biol Chem*, 280 (43) : 36029-36.

[0418] Wang, J. Z., 等, 蛋白磷酸酶 2A 和 2B 使阿尔茨海默病成对纤维丝去磷酸化 (Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by proteinphosphatase2A and 2B). *J. Biol. Chem.* 1995. 270 : p. 4854-4860.

[0419] Wang, J. Z. 等, 用蛋白磷酸酶 2A、2B 和 1 去磷酸化使阿尔茨海默病异常的磷酸化 Tau 蛋白恢复生物学活性 (Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with proteinphosphatase2A, 2B and 1). *Mol. Brain Res.* 1996. 38 : p. 200-208.

[0420] Wang, X., V. C. Culotta, 和 C. B. Klee, 超氧化物歧化酶保护钙调蛋白免于被灭活 (Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation). *Nature*, 1996. 383 (6599) : p. 434-7.

[0421] Welsh, G. I. 等, T-细胞活化导致快速刺激翻译启动因子 eIF2B 和灭活糖原合酶的激酶 3 (T-cell activation leads to rapid stimulation of translation initiation factor eIF2B and inactivation of glycogen synthase kinase-3) *J. Biol. Chem.* 1996. 271 (19) : p. 11410-3.

[0422] Wera, S. 和 B. A. Hemmings, 蛋白丝氨酸 / 苏氨酸蛋白磷酸酶 (Serine/threonine protein phosphatases) *Biochem J*, 1995. 311 (Pt1) : p. 17-29.

[0423] Woetmann, A., 等, 2003. 蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 调节白介素-4 介导的 STAT6 信号传导 (Protein phosphatase2A (PP2A) regulates interleukin-4-mediated STAT6 signaling). *J Biol Chem*, 278 (5) : 2787-91.

[0424] Wu, J., 等, 体内磷酸化蛋白的磷酸酶 2A 催化亚基的羧基甲基化促进了与调节亚相关的功能 (Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo). *Embo J*, 2000. 19 (21) : p. 5672-81.

[0425] Xie, H. 和 S. Clarke, 牛脑中蛋白磷酸酶 2A 的 C-末端亮氨酸残基甲基脂化可逆性调节了其活性 (Protein phosphatase2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain). *J Biol Chem*, 1994. 269 (3) : p. 1981-4.

[0426] Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Tortosa, E. G., Del Ser, T., Munoz, D. G., De Yébenes, J. G., 2004. α -共核蛋白中新发现的突变 E46K 导致帕金森病和雷维小体痴呆 (The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia). *Ann. Neurol.* 55, 164-173.

[0427] Zhu, D. 等, 2004. Galpha12 能直接与 PP2A 相互反应: 微管相关 Tau 蛋白的 FOR Galpha12-刺激的 PP2A 磷酸酶活性和去磷酸化证据 (Galpha12 directly interacts with PP2A: evidence FOR Galpha12-stimulated PP2A phosphatase activity and

dephosphorylation of microtubule-associated protein, tau). J Biol Chem, 279(53) : 54983-6。

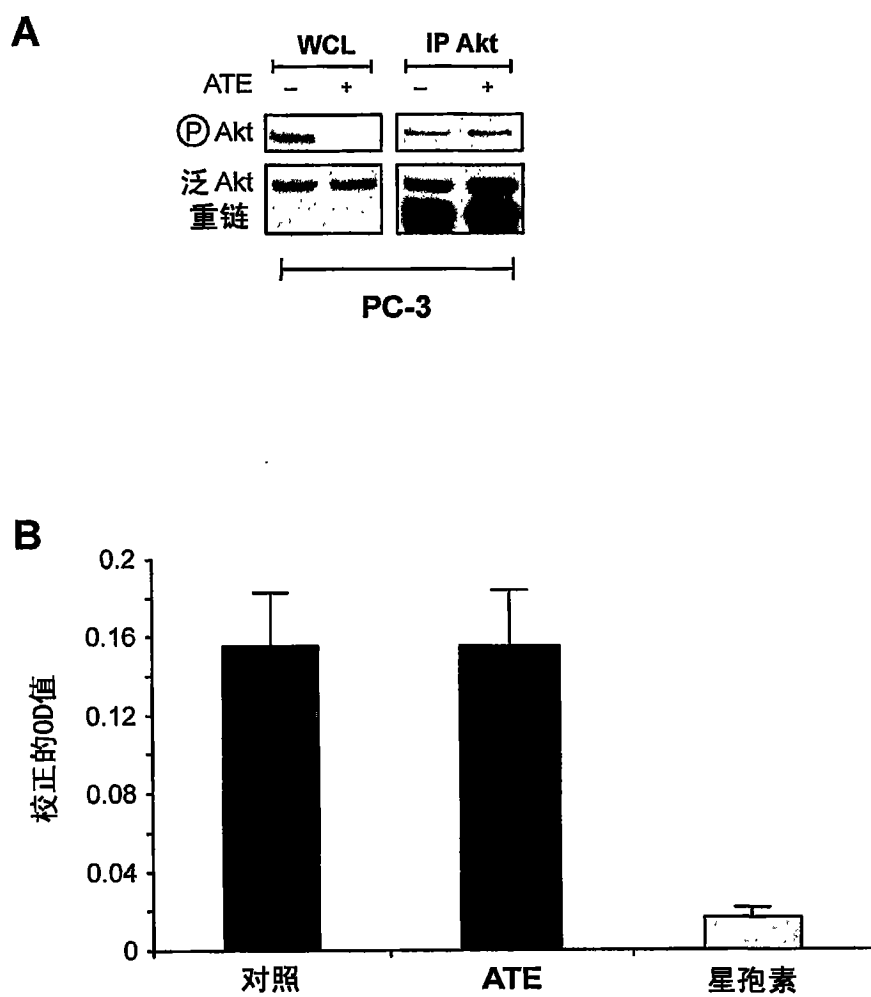


图 1

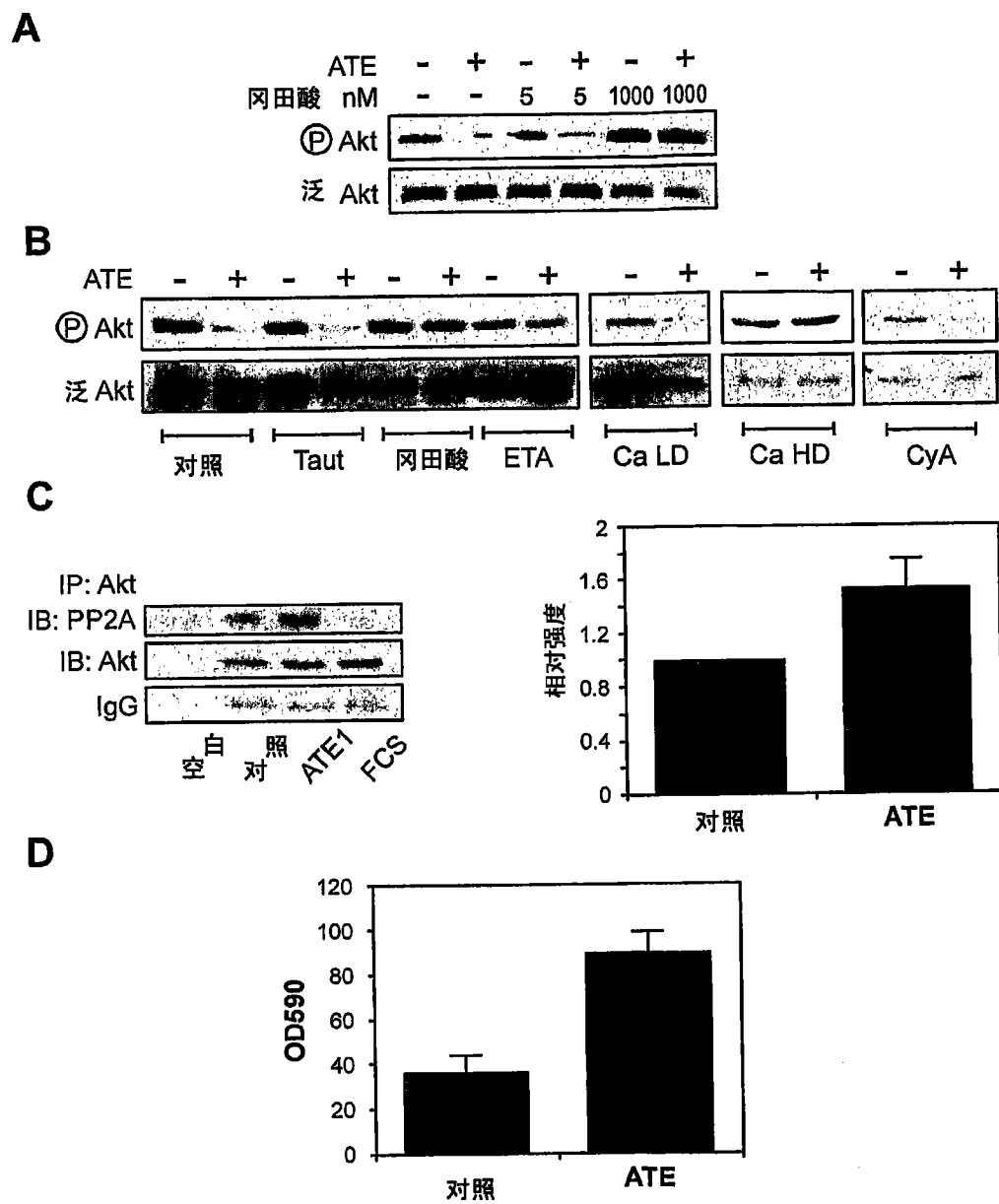


图 2

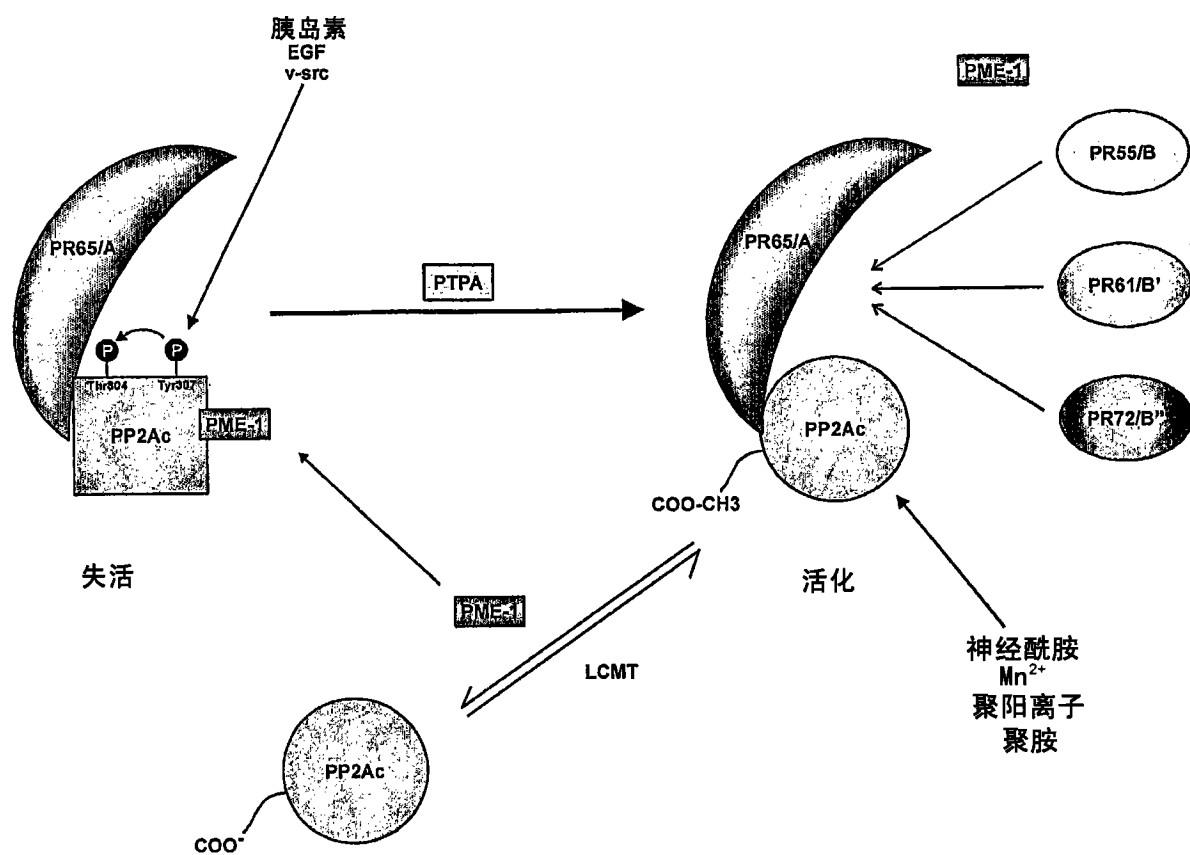


图 3

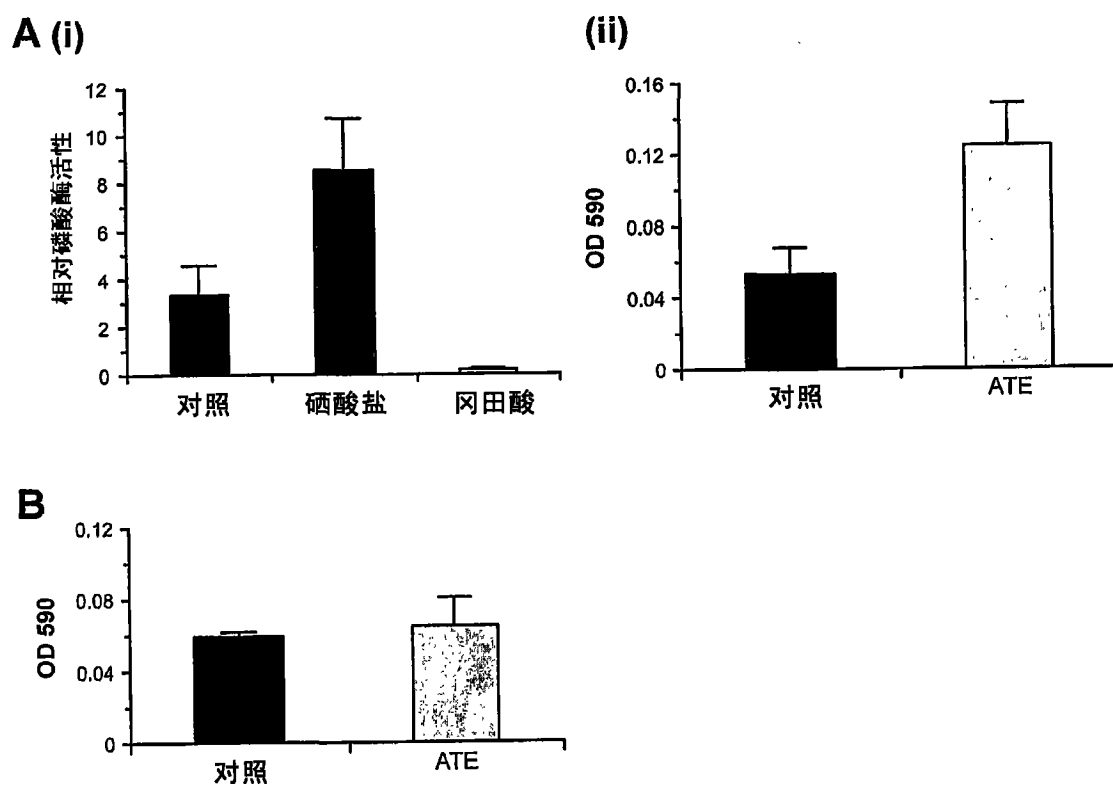
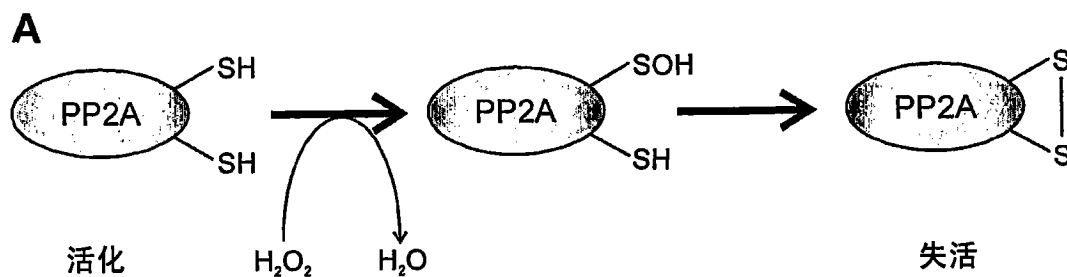
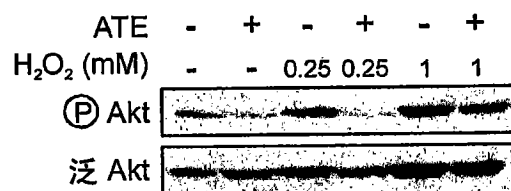
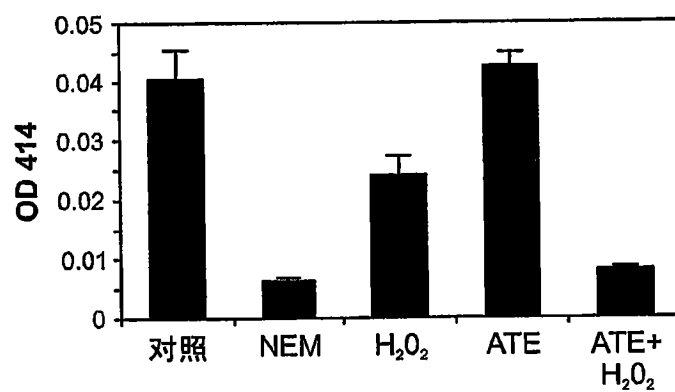


图 4

**B****C**

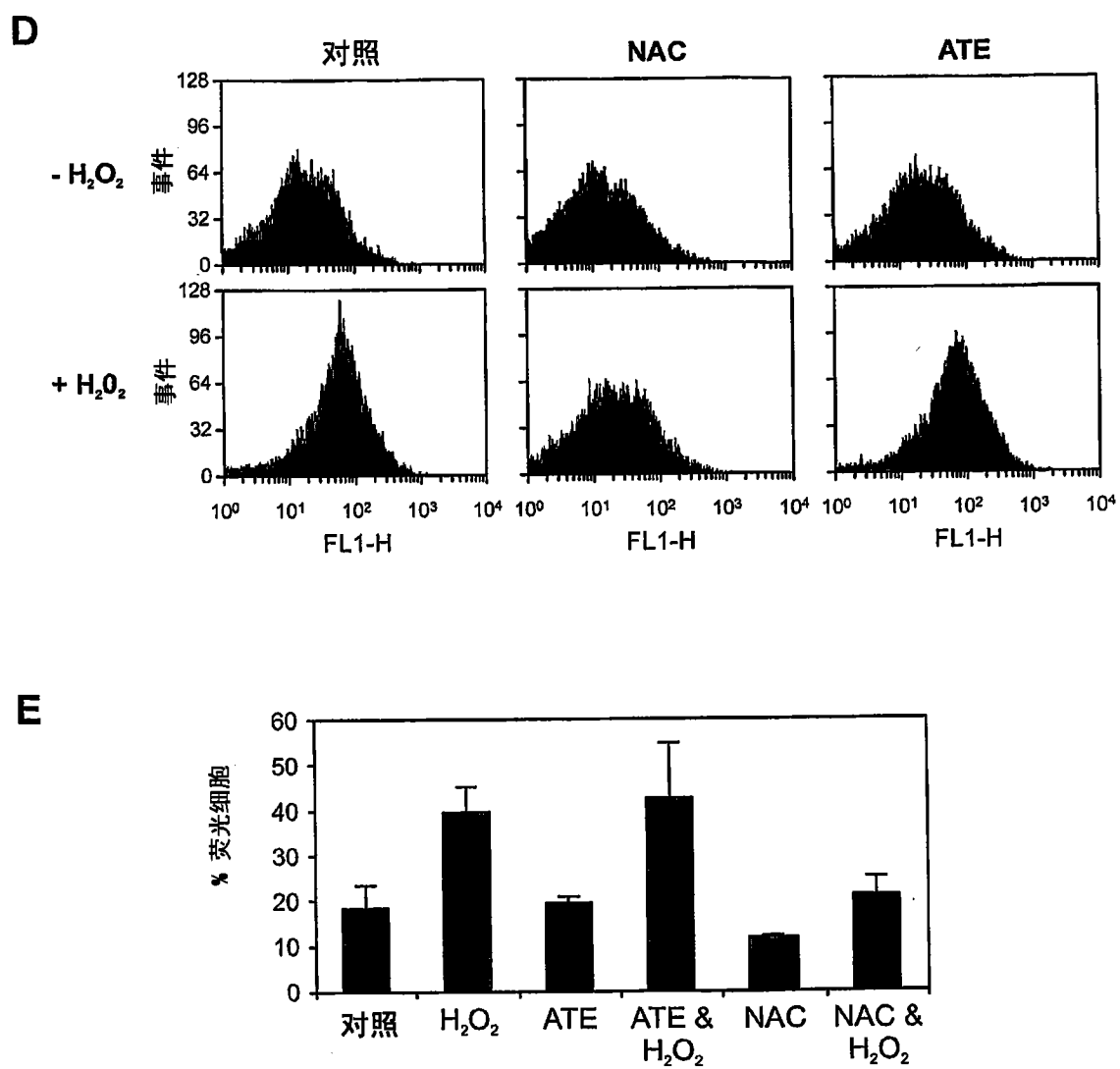


图 5

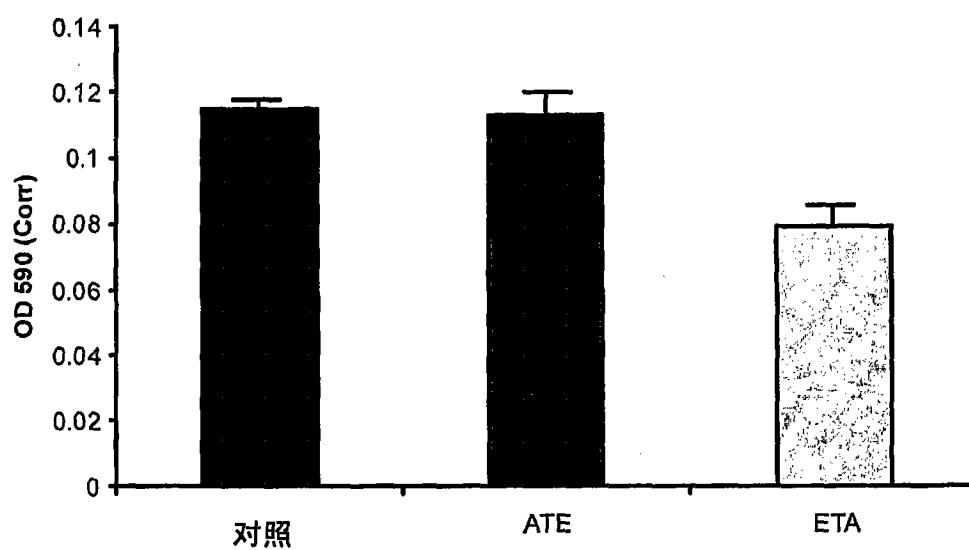
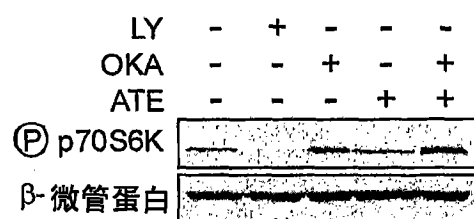
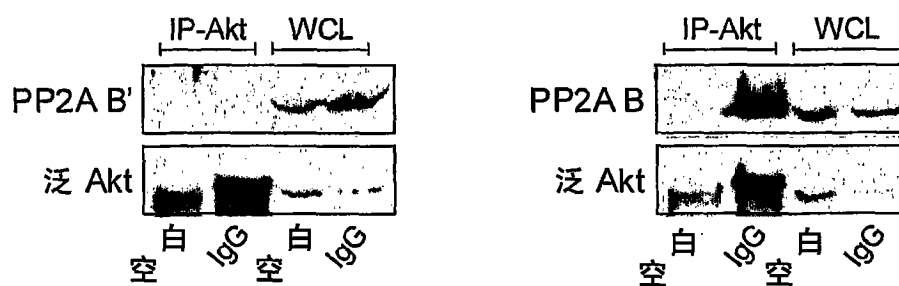
A**B****C**

图 6

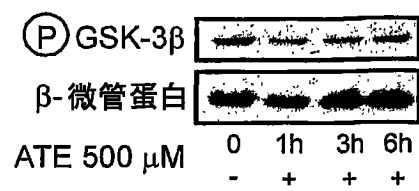


图 7

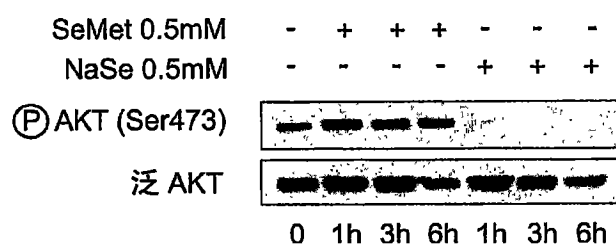


图 8

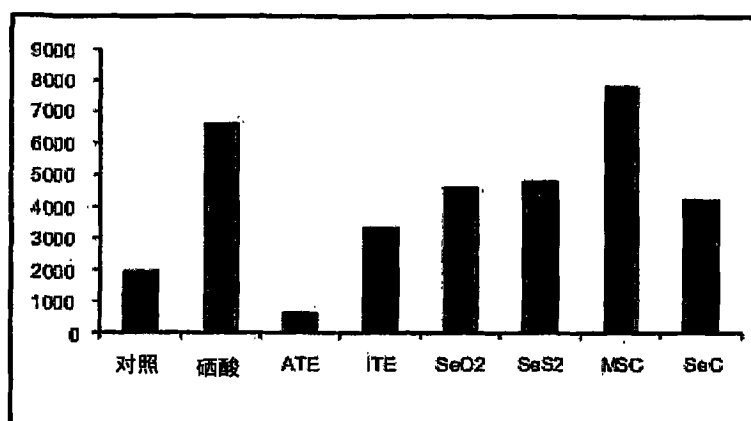


图 9

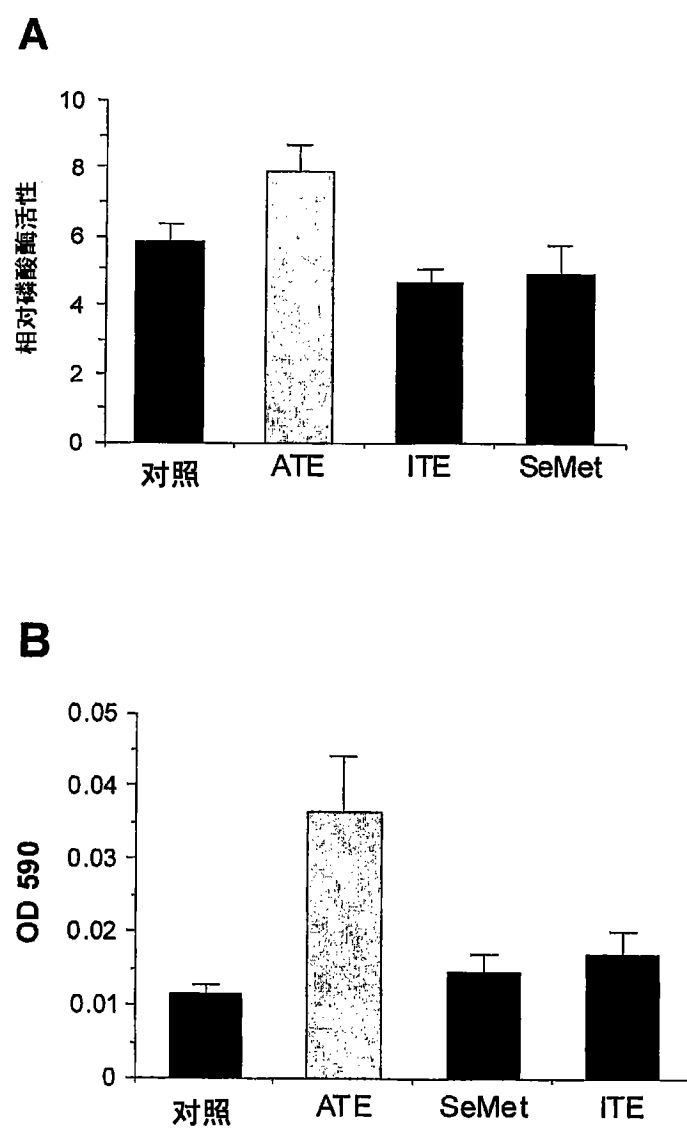


图 10

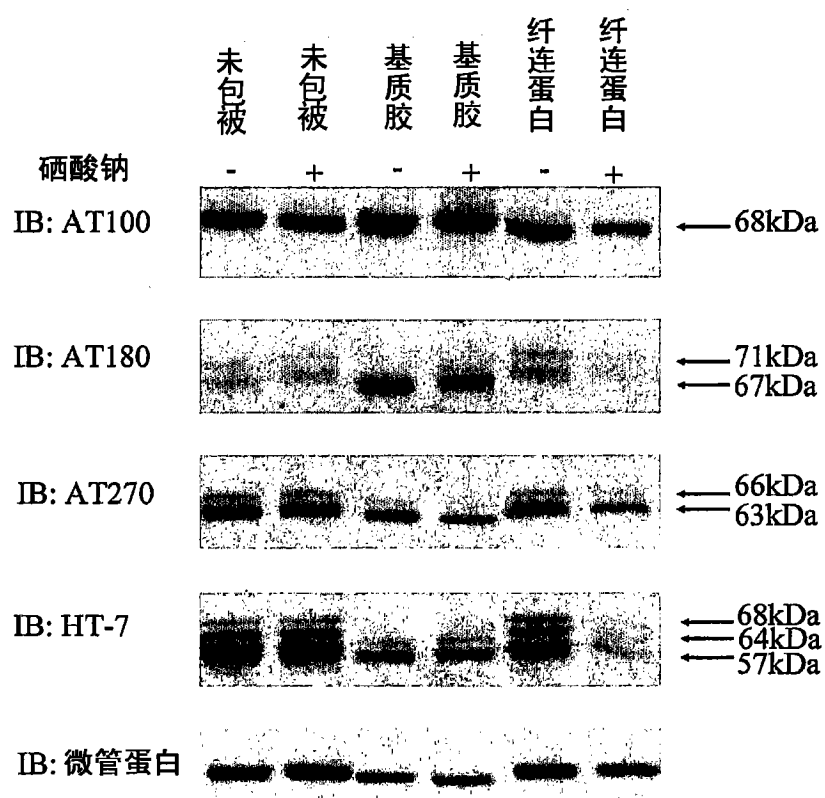
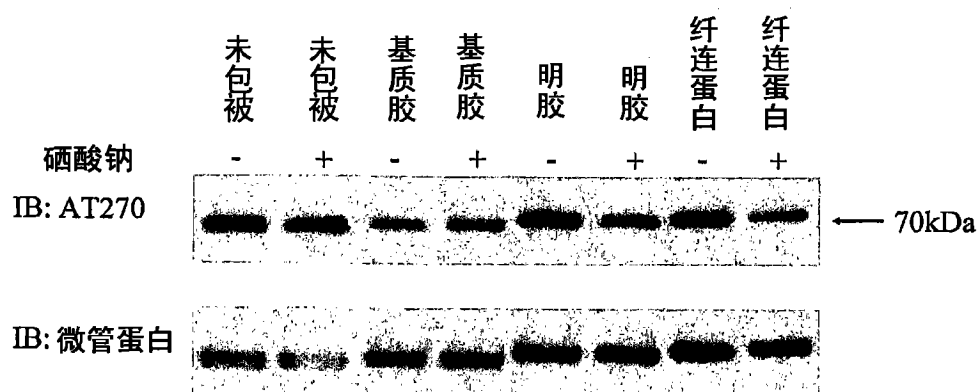


图 11

A



B

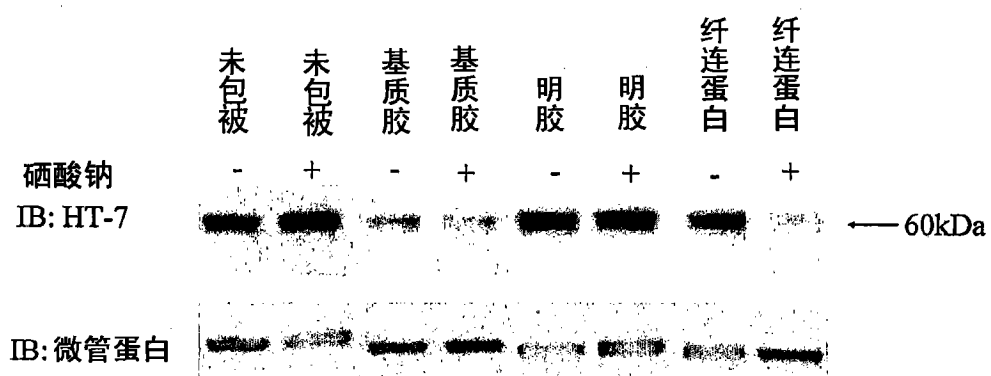


图 12

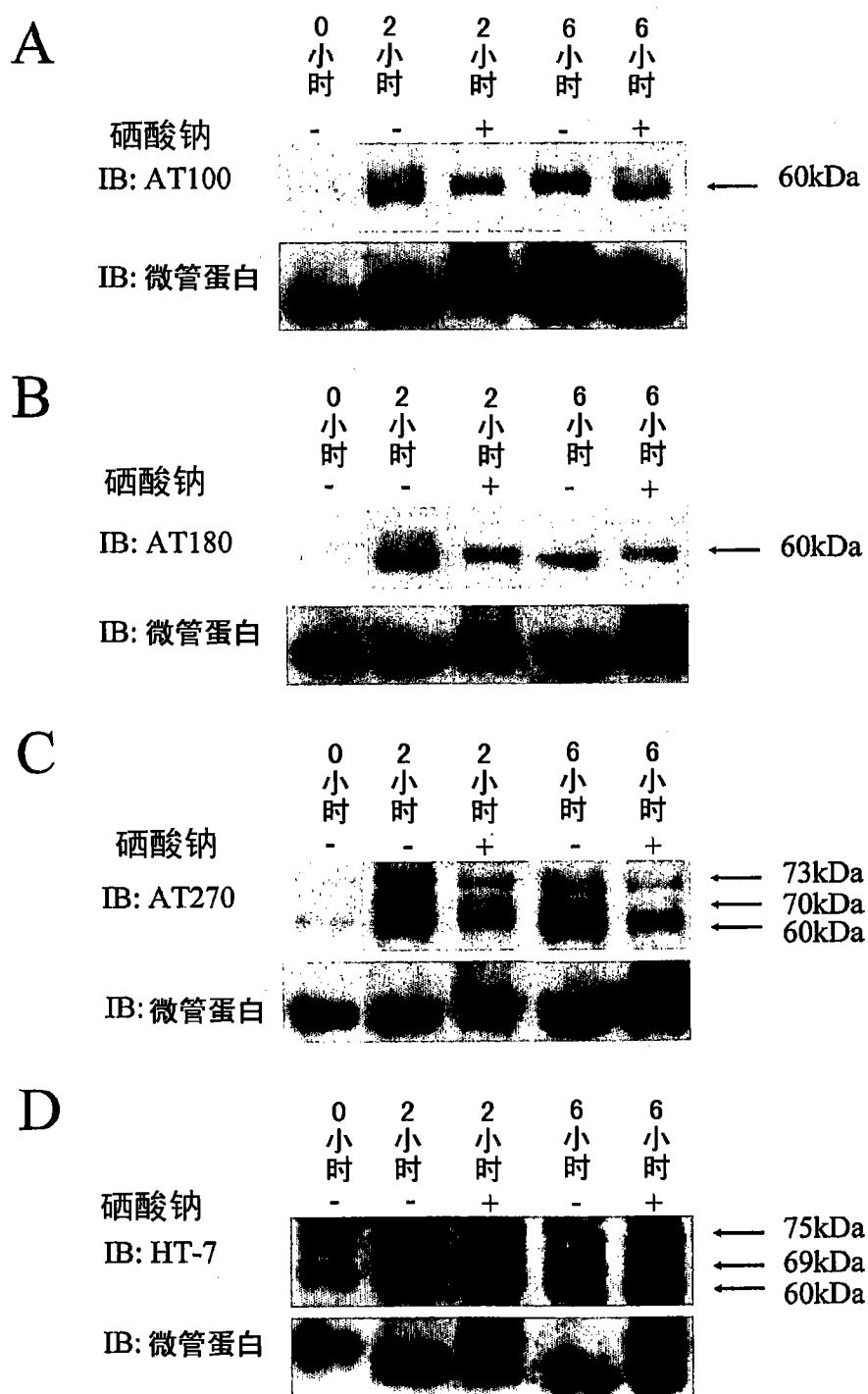
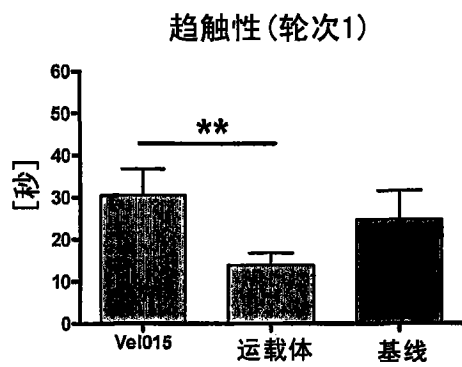


图 13

A



B

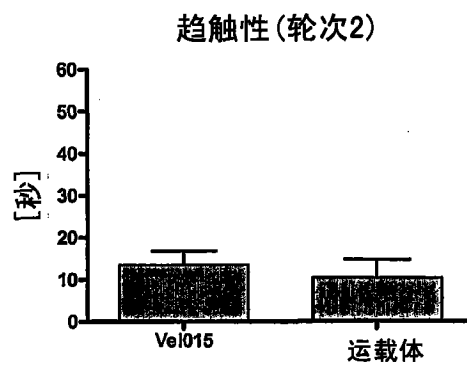
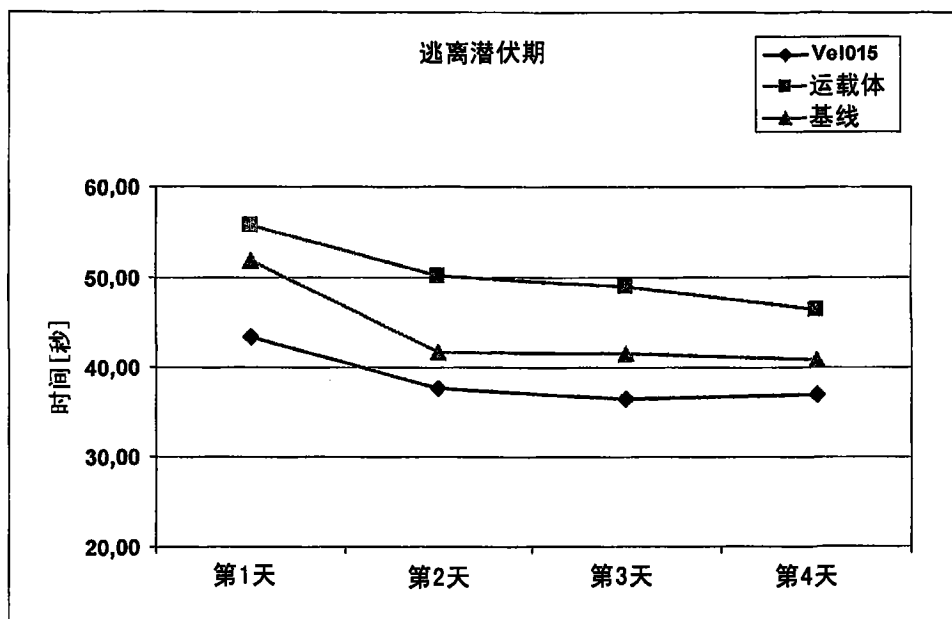


图 14

A



B

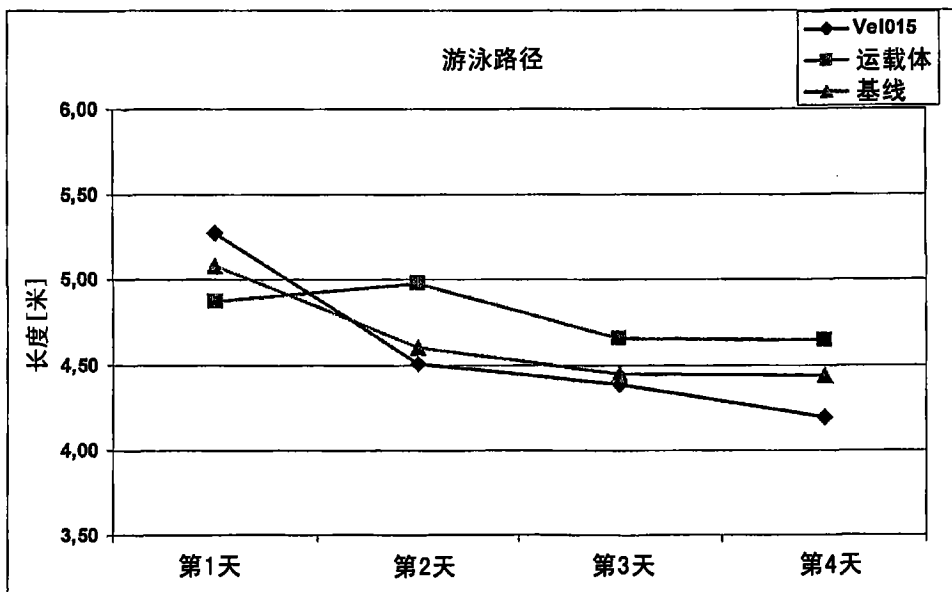


图 15

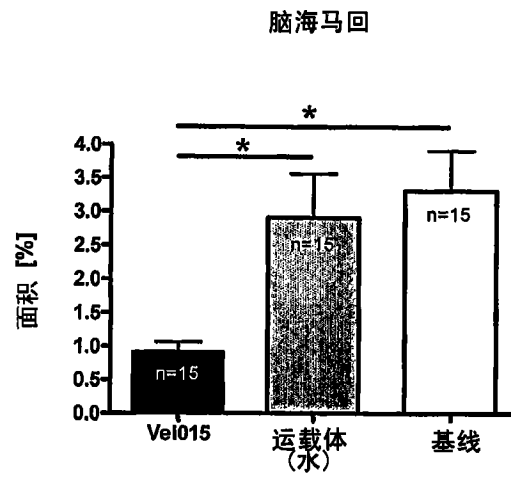
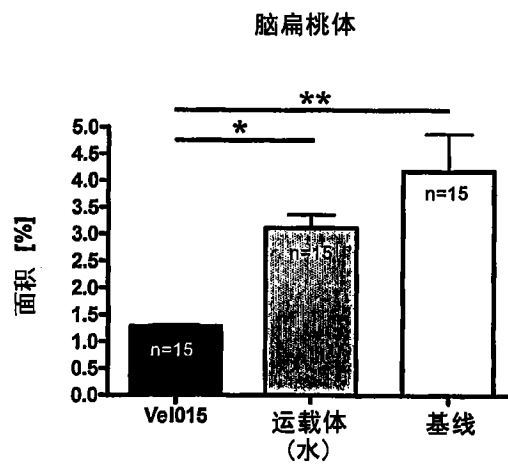
A**B**

图 16

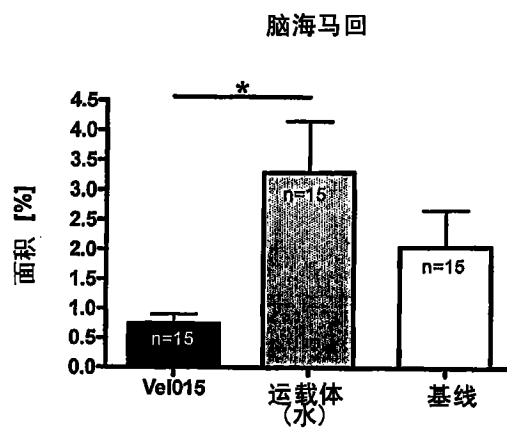
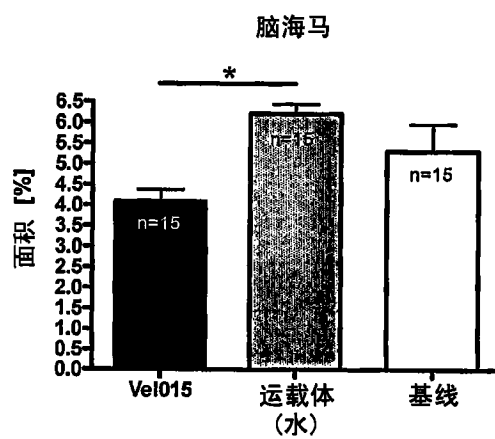
A**B**

图 17