

β -分泌酶抑制剂的筛选方法及其天然来源的研究进展

聂影影, 刘亚月, 张 翼*

广东海洋大学食品与科技学院 广东省水产品加工与安全重点实验室 广东省海洋食品工程技术研究中心
水产品深加工广东普通高等学校重点实验室 湛江市脑健康海洋药物与营养品重点实验室
广东海洋大学海洋药物研究所, 湛江 524088

摘要: β -淀粉样蛋白(A β)的聚集是目前公认的导致阿尔茨海默病(AD)发病的关键因素, 而 β -分泌酶(BACE1)是将大脑中的淀粉样 β -蛋白前体(APP)转化成 A β 的第一个蛋白酶, 也是 A β 产生的限速酶。因此, 对 BACE1 的抑制是有效治疗 AD 的策略之一。本文阐述了目前可用于 β -分泌酶抑制剂筛选的荧光法、可见光比色法和酵母细胞筛选模型的原理和特点, 并对来源于植物、微生物、动物的天然 β -分泌酶抑制剂的研究进展进行了综述, 为更多活性更强、毒副作用更小的抗 AD 天然产物先导化合物的发现和结构优化提供了借鉴和启示。

关键词: β -淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病; β -分泌酶抑制剂; 天然产物

中图分类号: O629

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.027

Review on the Screening Methods and Natural Sources of β -Secretase Inhibitors

NIE Ying-ying, LIU Ya-yue, ZHANG Yi*

College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University; Key Laboratory of Guangdong Province Aquatic Products Processing and Safety; Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Food; Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution; Zhanjiang Munciple Key Laboratory of Marine Drugs and Nutrition for Brain Health; Research Institute for Marine Drugs and Nutrition, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: The aggregation of amyloid β -protein is widely recognized as the key factor leading to Alzheimer's disease (AD), while β -secretase (BACE1) is the enzyme that initiates the production of A β by cleaving the extracellular domain of amyloid β -protein precursor (APP) and meanwhile the rate-limiting enzyme. Thus, inhibitors of BACE1 are being considered to be one of the effective strategies in the treatment of AD. This article describes the principle and characteristics of current screening models for the β -secretase inhibitors, including fluorescence, visible colorimetry, and the yeast cell screening models. In addition, the natural β -secretase inhibitors which come from plants, microorganisms and animals, were also reviewed. Thereby, it provided reference and inspiration on the finding and structural optimization of anti-AD natural product lead compounds with higher activity and lower toxic side effects.

Key words: amyloid β -protein; alzheimer's disease; β -secretase inhibitors; natural products

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年痴呆的一种主要类型, 它是一种不可逆的神经退化性疾病, 临床表现为记忆力减退、认知障碍等。其主要的病理原因是杏仁核、海马及大脑皮层的薄壁

组织中淀粉样蛋白的沉积 (淀粉样蛋白斑), 从而会导致老年斑的形成、神经纤维缠结、毛细血管淀粉样血管病以及神经突触的非正常损伤^[1,2]。淀粉样蛋白斑主要由 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 不同程度的聚集体组成, 而 A β 是由人体内的 β -分泌酶 (β -site APP cleaving enzyme1, BACE1) 和 γ -分泌酶切割淀粉样 β -蛋白前体 (β -amyloid precursor protein, APP) 产生的包含 39 ~ 43 个氨基酸残基的多肽片段, 在 AD 患者大脑内主要的 A β 亚型为 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂^[3-5]。因此, A β 的浓度是影响潜伏期和早期

收稿日期: 2016-10-08 接受日期: 2016-12-29

基金项目: 广东省“扬帆计划”引进紧缺拔尖人才项目 (201433009); 广东海洋大学引进人才科研启动项目 (E15155); 广东海洋大学创新强校项目 (GDOU2014030502); 广东省应用科技研发及重大科技成果转化项目 (2016B020235001)

* 通信作者 Tel: 86-759-2396046; E-mail: hubeizhangyi@163.com

AD 患者发病的关键因素。

β -分泌酶是一种跨膜天冬氨酸蛋白酶,其一级结构含有 501 个氨基酸残基,包括含 21 个氨基酸残基的信号肽、22 至 45 号 Aa 残基组成的前蛋白结构域、40 到 460 号 Aa 残基组成的成熟蛋白腔内结构域、17 个 Aa 残基组成的跨膜结构域和 24 个 Aa 残基组成的胞内部分,其三级结构是由两叶(每一叶相当于一个结构域)组成(N 端和 C 端各成一叶)。 β -分泌酶含有两个催化活性位点,分别是 DTG(93-95)和 DSG(289-291),催化基团是 Asp32 和 Asp228 两个残基,这两个位点在空间上相互靠近协同催化水解酰胺键。 β -APP 被 β -分泌酶在 M671 和 D672 之间切割出 β -分泌产物(sAPP β , 包括 18-671 残基),剩下的 99 个 C-端残基(β -CTF)在 V711 和 I712 或 A713 和 T714 之间被 γ -分泌酶进一步水解成 γ -分泌产物并释放出 A β 40 或 A β 42 碎片,A β 的异常聚集导致很强的神经细胞毒性^[6,7]。 β -分泌酶是将大脑中的 APP 转化成 A β 的第一个蛋白酶,并在 A β 产生过程中起决定作用。动物模型研究表明, β -分泌酶活性受到抑制,会降低大脑中 A β 的含量,从而减少 A β 的聚集^[8]。黄酮类抑制剂通过氢键与催化中心的 Asp 可逆性结合,非竞争抑制 β -分泌酶活性^[9-14]。同时,作为有潜质的对 AD 有治疗作用的药物应能轻松透过血脑屏障、预防及改善血脑屏障的功能紊乱,而适用于临床的理想 β -分泌酶抑制剂应同时具有高效率、低剂量、高选择性的特点^[16]。最近几年关于 β -分泌酶抑制剂的研究主要集中在化学合成方面^[17],但是人工合成的小分子化合物用于治疗 AD 多表现为毒性强,副作用大。而天然产物作为新药和功能食品的主要来源,毒副作用小,且更加安全可靠^[18],其针对 AD 的药用价值不容忽视。目前,天然来源的 β -分泌酶抑制剂相当一部分为黄酮类化合物,它是由基本骨架(图 1) C6-C3-C6 衍生出来的一系列化合物,而关于此类化合物与抑制 β -分泌酶活性的构效关系,尚需更进一步的研究。本文介绍了常用的 β -分泌酶抑制剂筛选方法及植物、微生物、动物来源的天然 β -分泌酶抑制剂

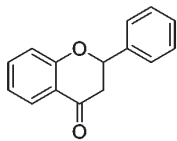


图 1 黄酮类化合物基本结构

Fig. 1 Fundamental structure of flavonoids

的研究进展,以为抗 AD 天然产物先导化合物的发现和结构优化提供借鉴和启示。

1 β -分泌酶抑制剂的筛选方法

1.1 荧光法

迄今,在 β -分泌酶抑制剂筛选中使用最多的是荧光法^[18],主要包括荧光共振能量转移法(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)、时间分辨荧光法(Time Resolved Fluorescence, TRF)和荧光关联光谱法(Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)等^[19]。

FRET 方法用得较多,其原理是短肽类的底物(如 APP 的 Swedish 突变体)一端偶联荧光基团(荧光供体),另一端偶联荧光淬灭基团(荧光受体),且两个基团的空间距离小于 3-6 nm(Förster 半径)。当 BACE-1 酶活没有受到抑制时,多肽被切割,可检测到荧光供体被激发光激发产生的荧光;而当有酶抑制剂存在时,多肽不被切割,荧光被淬灭。但这类方法中,偶联有荧光基团的底物常具有水溶性差、背景荧光偏高等特点,导致使用时底物浓度低(远低于酶的米氏常数 K_m)影响反应速度和灵敏度而被迫使用高的酶浓度,这并不利于抑制剂的筛选。另外,如果被筛化合物具有共轭的芳环结构,它也会淬灭或发射荧光,从而造成假阳性或假阴性,这就要求激发波长一般要高于 400 nm 并采用带相应荧光基团的底物,以避免来自样品的干扰^[1,19],目前文献报道的关于天然来源的 BACE-1 抑制剂的筛选方法多采用这种方法。

TRF 方法实际上是在 FRET 法基础上改进而来,早期的 TRF-FRET 技术采用镧系元素作为荧光供体,检测荧光随着时间变化的函数,但仍未很好解决底物浓度低于 K_m 的问题。而均相时间分辨荧光法(Homogeneous Time Resolved Fluorescence, HTRF)采用铕(Eu^{3+})螯合物作为荧光供体,其激发光为 330 nm、发射光为 615 nm,且半衰期长,其与酶的亲和力高、 K_m 值远较通常的 FRET 底物低(290 nM),底物使用浓度可达 400 nM,具有灵敏度高、均相性好、本底干扰小、高特异性等特点,在高通量筛选中应用较多^[1,19]。

2007 年, Mancini 等报道了一种采用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的酪蛋白为底物的荧光增强法(Fluorescence enhancement, FRE),其原理是当蛋白被 β 分泌酶水解后,荧光会增强,其方法具有酶用量

少(每孔0.0066 U)、底物亲和力高($K_m = 110$ nM)而水溶性好(测试浓度超过1300 nM)、催化效率高出FRET底物5倍等优点^[18]。

1.2 可见光比色法

Mancini 等也同时报道了一种可采用普通酶标仪的可见光比色法。其基本原理是以 L-BAPNA 作为 BACE1 的底物,生成产物为对硝基苯胺,通过检测孵育 60 min 之后反应体系在 405 nm 处吸光度值的变化来确定 BACE1 抑制剂抑制活性的大小,不足的是该方法反应不够灵敏,对底物和酶的用量需求太大,因而不利于抑制剂的大规模筛选^[18]。

1.3 酵母细胞生长筛选法

Middendorp 等^[20,21]采用将 BACE-1 基因、底物 APP-蔗糖转运酶融合基因及半乳糖苷酶基因等偶联重组的方法建立了利用酵母生长筛选系统来鉴定 BACE1 抑制剂的抑制效果。正常的重组酵母细胞内,BACE1 的活性使其在蔗糖为唯一碳源的条件下无法生长,而低毒或无毒的小分子抑制剂则能够通过渗透作用进入酵母细胞内抑制 BACE1 活性,从而促进细胞在蔗糖为唯一碳源条件下的生长。该模型的优点在于专一性强、成本低廉,适合大量样品的筛选,可以评价其对于 α -/ β -分泌酶的抑制选择性,并在一定程度上反映胞内活性,而且还能排除那些虽有抑制活性但细胞毒性强从而药用前景较低的化合物。

除上述方法外,荧光极化法(FRP)、酶联免疫吸附法(ELISA)、生物传感器法(BS)、等温滴定量热法(ITTC)、高效液相色谱法(HPLC)和质谱法(MS)也可用于 β -分泌酶抑制剂的筛选,但因为灵敏度低、成本高、筛选通量低等原因,不太适合对于大量样品的高通量筛选^[19],本文不做详细介绍。

2 天然来源的 β -分泌酶抑制剂

目前 β 分泌酶抑制剂越来越受重视,合成化学家在这方面做了大量工作,这类抑制剂主要包括肽类或拟肽类,多为 APP 的 Swedish 突变体 β -分泌酶切位点附近氨基酸序列的过渡态类似物。这类抑制剂体外活性强(多数 IC_{50} 达到 nM 数量级),但缺点是分子量大、口服利用度低、透膜性差;还有一些为非肽类小分子,这类口服利用度高、透膜性好,但活性强度不如肽类(IC_{50} 值范围从 nM 到 μ M 数量级都有)。而且合成的 β 分泌酶抑制剂都有一个共同缺点就是跨越血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)能力

低^[19]。天然产物是新颖结构药物先导化合物的重要源泉,在 β -分泌酶抑制剂方面的潜力也受到了关注。目前报道的从天然产物中分离得到的 β 分泌酶抑制剂有很多,主要来自植物,也有一些微生物与动物来源的报道。研究者们希望能从中发现分子量小、选择性好且可透过 BBB 的先导结构。

2.1 植物来源的 β -分泌酶抑制剂

植物物种多样性高,是人类利用最多的天然药物资源,三七、远志等很多中草药都被报道过具有预防老年痴呆的功效^[22]。目前也已有越来越多植物来源的 β -分泌酶抑制剂的报道。

2004 年,高博等^[23]从 *Homalomena gigantea* (大千年健)的石油醚萃取相中分离出 Stigamast-4-en-3-one (**1**) 和 Stigamast-4,22-ien-3-one (**2**) 的混合物,其表现出较强的 BACE1 抑制活性,在浓度为 100 μ g/mL 时的抑制率为 42.06%,二者化学结构式的区别是后者比前者在 22 位上多个双键。另外,他从 *Aloe arborescens* (木立芦荟)的乙酸乙酯提取相中分离得到四种化合物 p-coumaroyl aloenin (**3**)、feruloyl aloerin (**4**)、7-O-methylaloesin A (**5**)、barbaloin A (**6**),它们均具有较强的 β -分泌酶抑制活性,浓度为 100 μ g/mL 时抑制率分别为 32.58%、36.24%、35.77%、30.18%。同年,杨庆云等人^[24]则从 *Aloe vera* L (库拉索芦荟)中也分离出 barbaloin A,并得到单体化合物 aloeresin D (**7**),后者显示出极强的 BACE1 抑制活性,在浓度为 100 μ g/mL 时抑制率为 81.24%,并且具有抗氧化活性。另外,他用 95% 的乙醇浸泡中药植物 *Aristolochia manshu Yiensis Kom* (关木通),提取分离得到苯丙烯酸酯苷类化合物 6-O-p-coumaroyl-D-glucopyronose (**8**) 和 6-O-feruloyl-D-glucopyronose (**9**),这是关木通中主要的 BACE1 抑制剂,其 IC_{50} 分别为 162.73 和 105.67 μ M。

2008 年,Choi 等^[25]从 *Perilla frutescens* var (白苏子)叶子的甲醇萃取物中分离得到木犀草素 (**10**) 和迷迭香酸 (**11**),迷迭香酸是唇形科所为人熟知的神经保护、抗菌、抗炎、抗氧化的活性成分,这两种化合物均能够特异的非竞争抑制 BACE1 活性,以(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯作为阳性对照,检测到二者的 IC_{50} 值分别为 0.5 μ M 和 21 μ M。

Lv 等人^[26]从 *Aloe vera* (芦荟)提取物中得到化合物 8-C-glucosyl-7-methoxy-(R)-aloesol (**12**) 和 C-2'-decoumaroyl-aloesin G (**13**),以 N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Leu-leucinal 为阳性对照,二者对 BACE1 的抑

制活性存在剂量依赖性。在 B103 神经细胞中,浓度为 30 ppm 时,其对 $A\beta_{1-42}$ 的产生抑制率分别为 7.4% 和 12.3%。

2009 年韩国学者 Jung 等^[27] 采用反复柱层析、中压液相色谱和反相中压液相色谱相结合的方法对 *Aralia cordata* (当归) 的根部提取物进一步分离纯化,得到三种具有很好的抑制 BACE1 活性的二萜类化合物:7-oxo-ent-pimara-8 (**14**), 15-diene-19-oic acid (**14**)、16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid (**15**) 和 17-hydroxy-ent-kaur-15-en-19-oic acid (**16**)。以五羟黄酮作为阳性对照,545 nm 为激发荧光,检测 585 nm 处荧光强度得出三种物质的 IC_{50} 值分别为 24.10、18.58 和 23.40 μM 。同时研究发现,化合物 **16** 也具有抑制乙酰胆碱酯酶的活性 ($IC_{50} = 61.82 \mu\text{M}$)。

2010 年, Lee 等^[28] 综合利用正相、反相和葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 色谱层析相结合的方法从 *Osmanthus fragrans* (桂花) 的花朵中分离得到一类裂环烯醚萜昔:(8E)-女贞子昔(**17**),这是第一次从桂花花朵中分离得到该化合物。运用蛋白质印记法(Western blot)对其活性分析发现,它是通过调节 APP 的表达来间接抑制 BACE1 的活性而非直接起作用,并且存在剂量依赖性,这项研究为阿尔茨海默症的治疗或预防提供了重要信息。Jung^[29] 利用从 *Eisenia bicyclis* (一种海带科褐藻) 的乙酸乙酯萃取物中分离得到了四个多酚类化合物:dioxinodihydroeckol (**18**)、eckol (**19**)、phlorofuroeckol-A (**20**) 和 Idieckol (**21**)。活性研究表明,它们均具有极强的 BACE1 抑制活性,其 IC_{50} 值分别为 5.35、12.20、2.13 和 2.21 μM 。这表明褐藻多酚可用于预防和治疗 AD,并为 BACE1 选择性抑制剂的设计合成提供指导。同时,酶动力学研究表明,四个化合物均为非竞争性抑制剂。Sasaki 等^[30] 从 *Cycas revoluta* (苏铁) 和 *Cephalotaxus harringtonia* (柱冠粗榧) 等裸子植物的丙酮和三氯甲烷相提取物中,分别分离到一个双黄酮类化合物:2,3-二氢穗花双黄酮(**22**) 和 2,3-二氢-6-甲基银杏黄酮(**23**),它们对 BACE1 表现出极强的抑制活性,其 IC_{50} 分别为 0.75 μM 和 0.35 μM 。

Morus lhou (桑树) 作为一种常见的中草药,在许多国家都用作功能食品的原料。2011 年 Jung 等^[31] 从其茎皮中分离出黄酮类化合物 24~27,其分子量均小于 700 Da,能够轻易通过血脑屏障,并可

非竞争性抑制 BACE1 的活性。以桑黄素作为阳性对照,采用 FRET 法测定四者的 IC_{50} 分别为 60.6 μM 、3.4 μM 、59.4 μM 、5.3 μM 。

Hong 等^[32] 在筛选抗老年痴呆的活性物质的过程中,利用荧光法检测酶活反应,并运用 MTT 法在小鼠神经母细胞 B103 中进行毒性测试,发现 *Petasites japonicus* (蜂斗菜) 叶子的正丁醇提取相不仅能够抑制 BACE1,而且具有神经保护功能,其浓度在 30 ppm 时的抑制率达到 95.3%。

单宁酸是一种多酚鞣酸,目前来源主要包括天然植物或植物虫瘿五倍子 (*Rhus chinensis* Mill.)^[33]。2012 年, Mori 等人^[34] 利用单宁酸 (**28**),通过监测在 335 nm 处的激发荧光和 495 nm 处的发射荧光来检测其对 BACE1 抑制活性,在最低剂量 1.563 μM 时即表现出明显的抑制活性,表明其作为 BACE1 的天然抑制剂能够预防认知障碍;同时又能改善小鼠老年痴呆的症状,并且几乎没有副作用,提供了一条可以通过营养膳食来缓解老年痴呆症状的新思路。

2014 年, Jung 等人^[35] 利用细胞悬浮培养的技术从莲的胚胎中分离得到多种化合物,以 Sophoraflavanone G 作为阳性对照,以 545 nm 作为激发荧光,检测 585 nm 处的荧光吸收,化合物莲心碱 (**29**) 和牡荆素 (**30**) 均表现出较强的 BACE1 抑制活性 (IC_{50} 分别为 6.37 μM 和 19.25 μM),同时还具有抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) (IC_{50} 分别为 0.34 μM 和 16.62 μM) 和丁酰胆碱酯酶 (BChE) (IC_{50} 分别为 9.96 μM 和 11.53 μM) 的活性,这是对该化合物的 AChE 和 BACE1 抑制活性的首次报道,这些化合物或可以成为治疗或预防老年痴呆的理想候选药物。Kim 等人^[36] 利用酵母诱导紫茉莉科植物 *Abronia nana*,进行悬浮培养,分离纯化得到化合物 C-甲基鱼藤酮 (**31**),其能与底物特异性结合,非竞争性抑制 BACE1 活性,并存在剂量依赖性,荧光法检测 IC_{50} 为 5.57 μM ,这是首次报道 C-甲基鱼藤酮具有 BACE1 抑制活性。Rauf 等人^[37] 报道了一种从 *Pistacia integerrima* Stewart (黄连) 中提取出的被命名为 PA (Pistagremic acid, **32**) 的新的三萜酸化合物,它表现出显著的 BACE1 抑制活性 (IC_{50} 值为 350 nM)。构效研究表明,对酶的抑制活性与化合物中含有羧基有关。同时它对 AChE 和 BChE 不显示抑制作用,却能特异性的抑制 BACE1 的活性,对于治疗 AD 的药物来说是一个很好的模板化合物。

2016年, Youn等^[38]从 *Kaempferia parviflora* (黑姜皮) 中提取出三种多甲氧基黄酮化合物: 5, 7-dimethoxyflavone (DMF) (**33**)、5, 7, 4'-trimethoxyflavone (TMF) (**34**) 和 3, 5, 7, 3', 4'-Pentamethoxyflavone (PMF) (**35**)。活性研究表明, 这三种多甲氧基黄酮化合物均对 BACE1 具有潜在的抑制作用, 却对 α-分泌酶或其它丝氨酸蛋白酶不显示抑制效果, 表明它们可能是 BACE1 的选择性抑制剂。同时, 酶动力学研究表明, 它们均是非竞争性抑制剂。并采用计算机模拟分子对接的方式评价多甲氧基黄酮与 BACE1 对接的可能性, 发现该类化合物理论上可以成为潜在的 AD 治疗药物。最后利用荧光法检测其 IC₅₀ 分别为 49.5 μM、36.9 μM 和 59.8 μM。

2.2 微生物来源的 β-分泌酶抑制剂

微生物种类繁多, 生长周期短, 代谢产物化学多样性高并可通过大量发酵得到, 目前也有关于从其中的真菌类群中陆续发现了一些具有较好 BACE1 抑制活性的化合物或组分的文献报道。2004年, Park等^[39]从一种陆生担子菌 *Phellinus linteus* 中分离到一种苯乙基取代的 α-吡喃酮类化合物 hispidin (**36**), 可非竞争性抑制 β-分泌酶, IC₅₀ 为 4.9 μM。

2006年, Lee等人^[40]将大型真菌 *Clavicornora pyxidata* (珊瑚菌) 24 °C 培养 20 d, 利用真空抽滤得到菌丝体的乙醇提取物。活性研究表明, 该乙醇提取物对 BACE1 具有抑制作用, 并且具有剂量依赖性。

2007年 Lee等^[41]从 *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母) 中分离得到一种分子量大小为 697 Da 的新型寡肽, 氨基酸序列为 Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Ile-Gly-Ser, 它完全不同于其它的肽类 BACE1 抑制剂。这种纯的寡肽在 70 °C 的条件下可以稳定 30 min, 能够非竞争性抑制 BACE1 的活性, 抑制率达到 75%。

2011年, Azzeme^[42]从马来西亚药用植物中分离纯化得到若干株内生菌。经活性筛选发现, 属于 *Cytospora rhizophorae* 的四株菌株的提取物活性最强, 分别是 HAB16R13 (IC₅₀ = 2.15 μg/mL)、HAB16R18 (IC₅₀ = 2.40 μg/mL)、HAB16R14 (IC₅₀ = 2.85 μg/mL) 以及 HAB8R24 (IC₅₀ = 2.85 μg/mL)。由上述的活性数值可知, 这些提取物组分的 IC₅₀ 值均小于 3.0 μg/mL, 而 HAB16R13 显示出最好的抑制性, 这也是内生菌首次被报道具有 BACE1 抑制活性。

2012年, 韩国的 Hang^[43]则在利用热水从桑树

的寄生真菌桑黄子实体中纯化出具有很好的 BACE1 抑制活性的高分子量水溶性多糖。该多糖在浓度为 100 μg/mL 时的抑制率为 48%, 同时其也表现出较强的 DPPH 自由基清除能力。

2015年, Harms等人^[44]发现一株海洋真菌 *Dichotomomyces cejpii* 所产生的甾酮糖苷 16-O-desmethylasporierygosterol-β-D-mannoside (**37**) 和黄青霉素衍生物 xanthocillin X dimethyl ether (**38**) 也可显著抑制转染 APP695 基因的 N2a 细胞中 Aβ42 蛋白的产生, 提高细胞存活率, 其胞内作用机制与 β-分泌酶或 γ-分泌酶抑制之间的关系尚在研究之中。

2.3 动物来源的 β-分泌酶抑制剂

相对于植物和微生物而言, 目前关于动物来源的 BACE1 抑制剂的报道较少。

2005年, Byun^[45]利用超滤方法从螃蟹壳中分离得到不同分子量和脱乙酰度的异壳聚糖, 它们表现出极强抑制活性 (25 ~ 42 μM) 的成分的分子量都在 3 ~ 5 kDa, 远大于 700 Da, 可能不适合作为临床的 BACE1 抑制剂药物来进行深入研究。

在 2015年 Lee^[46]利用不同的蛋白酶来水解鳕鱼皮肤, 得到的水解产物抑制 BACE1 的强度不同, 中性蛋白酶水解产物的抑制作用最强 (IC₅₀ = 0.56 mg/mL)。并从中纯化得到新型的 BACE1 抑制蛋白: Gln-Gly-Try-Arg-Pro-Leu-Arg-Gly-Pro-Glu-Phe-Leu (IC₅₀ = 24.26 μM), 在对其人工合成的肽片段活性研究中, 发现四肽 Pro-Glu-Phe-Leu 具有最强的抑制活性 (IC₅₀ = 14.66 μM), 应为核心活性片段。该研究是首次从鳕鱼皮肤水解物中发现抑制 BACE1 的活性小肽, 并对相关活性肽及类肽分子的合成提供了有益启示。

3 结语

虽然目前临床使用的治疗老年痴呆药物多为乙酰胆碱酯酶抑制剂, 如他克宁、多奈哌齐、加兰他敏、利斯的明等, 但它们都只能缓解症状, 却无法减缓 AD 的进程^[47]。而 β-分泌酶抑制剂有可能从根本上阻断关键致病因子——Aβ 的聚集, 这对于阿尔茨海默氏症的治疗意义重大。加快 BACE1 抑制剂的研究及其临床应用, 可望阻止 AD 患者病情的进一步恶化。对于 AD 这一不可逆的神经性疾病, 预防和早期治疗远比应症治疗更重要。而目前化学合成的肽类/拟肽和小分子抑制剂因为分子量、生物利用度、透膜性或跨越血脑屏障等方面的缺陷还不够理

表 1 天然来源的小分子 BACE1 抑制剂
Table 1 Small molecule BACE1 inhibitors from natural resources

编号 No.	化合物名称 Compound name	IC ₅₀		特异性抑制 BACE1	抑制常数 K _i (10 ⁻⁶ M)	来源 Source
		样品 Sample (μ M)	阳性对照			
1	stigamast-4-en-3-one	NA	NA	NA	NA	<i>Homalomena gigantea</i>
2	stigamast-4,22-ien-3-one	NA	NA	NA	NA	同上
3	<i>p</i> -coumaroyl aloenin(对-香豆芦荟宁)	NA	NA	NA	NA	<i>Aloe arborescens</i>
4	Feruloyl aloerin(阿魏阿尔佩林)	NA	NA	NA	NA	同上
5	7-O-methylaloesin A	NA	NA	NA	NA	同上
6	Barbaloin A(芦荟甙 A)	NA	NA	NA	NA	同上
7	Aloeresin D(芦荟苦素 D)	39.05	NA	NA	NA	<i>Aloe vera L</i>
8	6-O- <i>p</i> -coumaroyl- <i>D</i> -glucopyronose (6-氧-对-香豆- <i>D</i> -吡喃葡萄糖)	162.73	NA	NA	NA	<i>Aristolochia manshu Yiensis Kom</i>
9	6-O-feruloyl- <i>D</i> -glucopyronose (6-氧-阿魏酸- <i>D</i> -吡喃葡萄糖)	105.67	NA	NA	NA	同上
10	Luteolin(木犀草素)	0.5	1.6	是	62	<i>Perilla frutescens var</i>
11	Rosmarinic acid(迷迭香酸)	21	1.6	是	39	
12	8-C-glucosyl-7-methoxy-(<i>R</i>)-aloesol	39	11.6	NA	NA	<i>Aloe vera</i>
13	C-2'-decoumaroyl-aloesin G	20.5	11.6	NA	NA	同上
14	7-oxo- <i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-oic acid	24.1	7.41	否	NA	<i>Aralia cordata</i>
15	16 α -hydroxy-17-isovaleryloxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	18.58	7.41	否	NA	同上
16	17-hydroxy- <i>ent</i> -kaur-15-en-19-oic acid	23.4	7.41	否	NA	同上
17	(8E)-ligstroside((8E)-女贞子苷)	1g/mL	NA	NA	NA	<i>Osmanthus fragrans</i>
18	Dioxinodehydroeckol	5.35	10.82	NA	8	<i>Eisenia bicyclis</i>
19	Eckol(鹅掌菜酚)	12.2	10.82	NA	13.9	同上
20	Phlorofurofuceckol-A	2.13	10.82	NA	1.3	<i>Eisenia bicyclis</i>
21	Dieckol(二鹅掌菜酚)	2.21	10.82	NA	1.5	<i>Eisenia bicyclis</i>
22	2,3-dihydroamentoflavone(2,3-二氢穗花双黄酮)	0.75	0.07	NA	NA	<i>Cycas revoluta</i>
23	2,3-dihydro-6-methylginkgetin(2,3-二氢-6-甲基银杏黄酮)	0.35	0.07	NA	NA	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>
24	Norartocarpetin	60.6	12.3	NA	82.6	<i>Morus thou</i>
25	Kuwanon C(桑酮 C)	3.4	12.3	NA	2.2	同上
26	Morusin(桑辛素)	59.4	12.3	NA	64.1	同上
27	Kuwanon A(桑酮 A)	5.3	12.3	NA	10.6	同上
28	Tannic acid(单宁酸)	NA	NA	NA	NA	Sigma
29	Liensinine(莲心碱)	6.37	4.27	否	NA	<i>Nelumbo</i>
30	Vitexin(牡荆素)	19.25	4.27	否	NA	同上
31	C-methylisoflavones(C-甲基鱼藤酮)	5.57	NA	是	3.79	<i>Abronia nana</i>
32	Pistagremic acid	0.35	NA	NA	NA	
33	5,7-Dimethoxyflavone(5,7-二甲氧基黄酮)	49.5	NA	是	NA	<i>Kaempferia parviflora</i>
34	5,7,4'-trimethoxyflavone(5,7,4'-三甲氧基黄酮)	36.9	NA	是	NA	同上
35	3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (3,5,7,3',4'-五甲氧基黄酮)	59.8	NA	是	NA	同上
36	Hispidin	4.9	NA	否	8.4	<i>Phellinus linteus</i>
37	16-O-desmethylasporergosterol- β - <i>D</i> -mannoside	NA	DAPT	NA	NA	<i>Dichotomyces ceipii</i>
38	xanthocillin X dimethyl ether	NA	DAPT	NA	NA	同上

注:NA 表示没有数据,DAPT 是 N-[N-(3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-](S)-phenylglycine-t-butylester。

Note:NA indicated no data,DAPT is N-[N-(3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-](S)-phenylglycine-t-butylester.

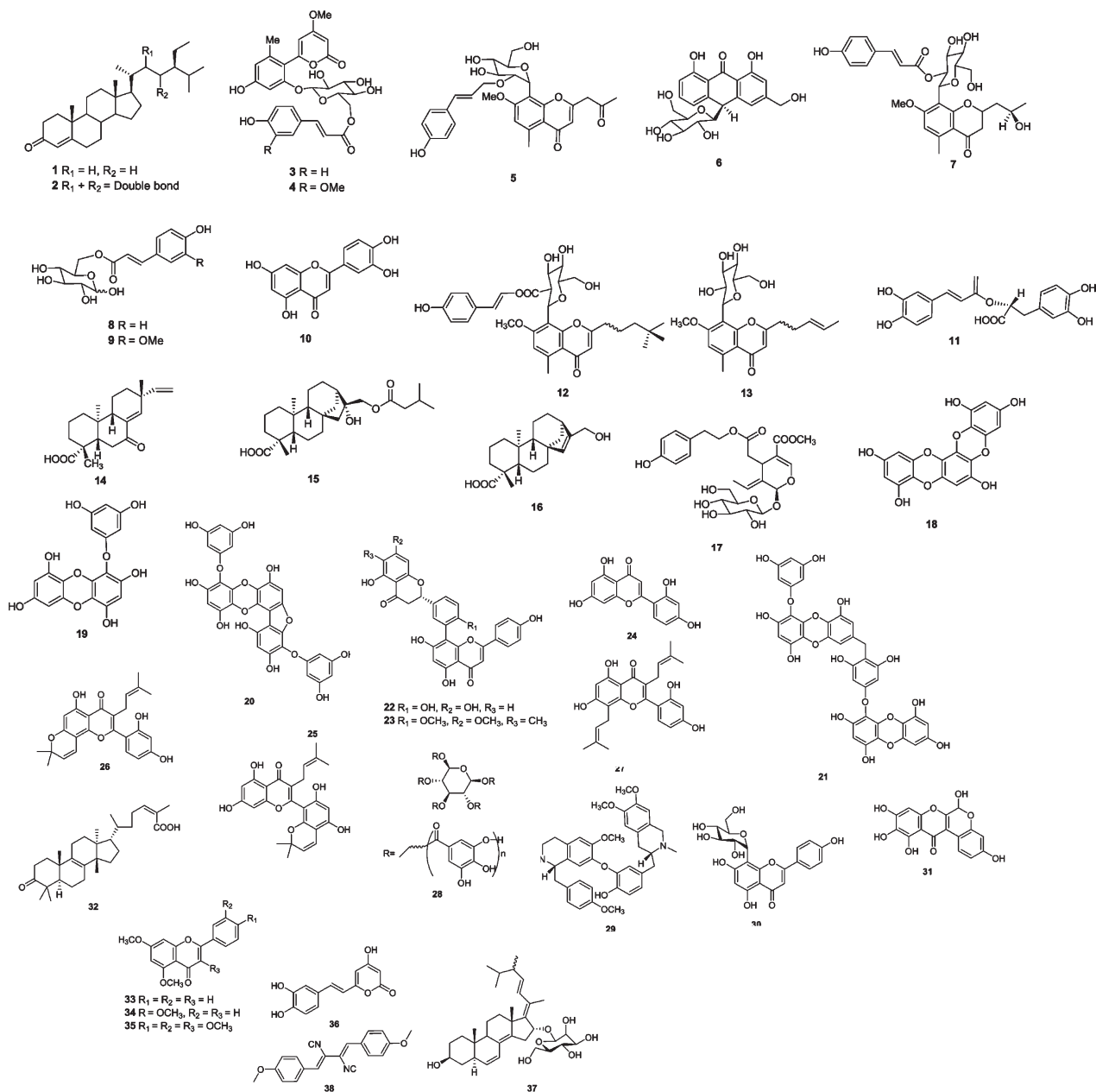


图2 BACE1 天然抑制剂化学结构式(1~38)

Fig. 2 Chemical structures of natural BACE1 inhibitors(1-38)

想^[48]。天然产物作为药物研发先导化合物最重要的来源,随着高通量活性筛选技术、分离纯化手段和结构鉴定技术的不断进步和发展,已经有越来越多天然产物来源的 BACE1 抑制剂被开发,其中一些活性强度较好,IC₅₀ 已达到 nM 数量级或亚 μM 级,或表现出了较好的动物体内活性,甚至少数的 BACE1 抑制剂已经进入临床试验阶段^[49]。但是体内还包括胃蛋白酶、组织蛋白酶 D、凝乳酶等一系列天冬氨酸蛋白酶,这就要求 BACE1 抑制剂要对 β-分泌酶具

有极其高的选择性,否则将对机体产生严重的副作用,从构效关系分析目前发现的这些天然来源的 BACE1 抑制剂,化合物(17、31、32)及系列化合物(33、34、35)在对 β-分泌酶抑制的特异性方面表现出明显优势,并且骨架相对新颖,这将为治疗 AD 的药物的开发与研究提供了很好的模板。

从原料来看很多来自中草药或药食同源植物、大型真菌或水产品,这为防治 AD 的药物或功能食品(保健品)的开发奠定了基础。中国有着上千年

的中药使用背景和得天独厚的海陆生物资源优势,在天然产物来源的 BACE1 抑制剂的研究方面有望取得更大的突破。

参考文献

- Mancini F, et al. Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of *in vitro* methods for characterization of inhibitors. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400: 1979-1996.
- Yan R, et al. Targeting the β -secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol*, 2014, 13: 319-329.
- Attems J, et al. Capillary CAA and perivascular A beta-deposition: Two distinct features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurol Sci*, 2010, 299.
- G? tz J, et al. Modes of A β toxicity in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 3359-3375.
- Huang JF, et al. Beta-amyloid precursor protein cleavage enzyme-1 expression in adult rat retinal neurons in the early period after lead exposure. *Neural Regene Res*, 2011, 6: 1045-1051.
- Liu JK (刘家阔). Design, synthesis and structure-activity relationship study of β -secretase inhibitors. Beijing: Academy of Military Medical Sciences(中国人民解放军军事医学科学院), PhD. 2016.
- Gao SY (高善云). Design, synthesis and structure-activity relationship study of β -secretase inhibitors. Beijing: Academy of Military Medical Sciences(中国人民解放军军事医学科学院), MSc. 2010.
- Qi W, et al. Triptolide treatment reduces Alzheimer's disease (AD)-like pathology through inhibition of BACE1 in a transgenic mouse model of AD. *Dis Model Mech*, 2014, 7: 1385-1395.
- Yoshiari S, et al. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure-activity relationship in cell-free, cell-based and *in silico* studies reveal novel pharmacophore features. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1780: 819-825.
- Hwang EM, et al. BACE1 inhibitory effects of lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens*. *Bioorgan Med Chem*, 2008, 16: 6669-6674.
- Yang ZX (杨志欣), et al. Pharmacological activity and structure-activity relationship of Sophoraflavanone G. *J Chin Med Mater*(中药材), 2016, 39: 457-461.
- Dash R, et al. Molecular docking of fisetin with AD associated AChE, ABAD and BACE1 proteins. *Bioinformation*, 2014, 10: 562-568.
- Zhao GG (赵关关). The mechanisms of therapeutic potential of flavonoids for Alzheimer disease. *Med Recapitul*(医学综述), 2013, 19: 3086-3089.
- Shangguan S, et al. Design, synthesis and evaluation of 3-(2-aminoheterocycle)-4-benzyloxyphenylbenzamide derivatives as BACE-1 inhibitors. *Molecules*, 2013, 18: 3577-3594.
- Stamford A, et al. Inhibitors of BACE for treating Alzheimer's disease: a fragment-based drug discovery story. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 320-328.
- Ghosh AK, et al. Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2012, 120(Suppl 1): 71-83.
- Gravenfors Y, et al. New aminoimidazoles as β -secretase (BACE-1) inhibitors showing amyloid- β (A β) lowering in brain. *J Med Chem*, 2012, 55: 9297-9311.
- Mancini F, et al. Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 388: 1175-1183.
- Zhou JW (周金武), et al. Establishment of high-throughput screening system for BACE1 inhibitors *in vitro*. *Int J Pharm Res*(国际药学研究杂志), 2010, 37: 302-309.
- Middendorp O, et al. Yeast growth selection system for the identification of cell-active inhibitors of β -secretase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2004, 1674: 29-39.
- Lüthi U, et al. Human β -secretase activity in yeast detected by a novel cellular growth selection system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2003, 1620: 167-178.
- Meng Y (孟焯), et al. Advances in active constituents of traditional chinese medicines for treating Alzheimer's disease. *Lett Biotechnol*(生物技术通讯), 2015, 4: 587-590.
- Gao B (高博). Studies on the active constituents as inhibitors of beta secretase from *Homalomena gigantea* and *Aloe arborescens*. Beijing: Peking Union Medical College(中国协和医科大学), Peking Union Medical College, Tsinghua University(清华大学医学部) Chinese Academy of Medical Sciences(中国医学科学院), MSc. 2006.
- Yang QY (杨庆云). Bioassay-guided isolation and preliminary structure-activity relationship studies of β -secretase inhibitors from *Aloe vera* L. and *Aristolochia manshu* Yiensis Kom. Beijing: Peking Union Medical College(中国协和医科大学), Peking Union Medical College, Tsinghua University(清华大学医学部) Chinese Academy of Medical Sciences(中国医学科学院), MSc. 2006.
- Choi SH, et al. β -secretase (BACE1) inhibitors from *Perilla frutescens* var. *Acuta*. *Arch Pharmacol Res*, 2008, 31: 183-187.
- Lv L, et al. BACE1 (beta-secretase) inhibitory chromone glycosides from *Aloe vera* and *Aloe nobilis*. *Planta Med*, 2008, 74: 540-545.
- Jung HA, et al. Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia cordata*. *Arch Pharmacol Res*, 2009, 32: 1399-1408.

- 28 Lee DG, *et al.* Secoiridoid glycoside from the flowers of *Osmanthus fragrans*, var. *aurantiacus*, makino inhibited the activity of β-secretase. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2010, 53: 371-374.
- 29 Jung HA, *et al.* Molecular docking studies of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* with BACE1 inhibitory activity. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2010, 20:3211-3215.
- 30 Sasaki H, *et al.* β-Secretase (BACE-1) inhibitory effect of biflavonoids. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2010, 20:4558-4560.
- 31 Cho JK, *et al.* Inhibition and structural reliability of prenylated flavones from the stem bark of *Morus lhou*, on β-secretase (BACE-1). *Bioorgan Med Chem Lett*, 2011, 21:2945-2948.
- 32 Hong SY, *et al.* Suppression of β-secretase (BACE1) activity and β-amyloid protein-induced neurotoxicity by solvent fractions from *Petasites japonicus* leaves. *Prevent Nutr Food Sci*, 2011, 16(1):18-23.
- 33 Shi SS(石闪闪), *et al.* Tannic acid and the progress of its application. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2012, 33:410-412.
- 34 Mori T, *et al.* Tannic acid is a natural β-secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *J Biol Chem*, 2012, 287: 6912-6927.
- 35 Jung HA, *et al.* BACE1 and cholinesterase inhibitory activities of *Nelumbo nucifera* embryos. *Arch Pharmacol Res*, 2014, 38:1178-1187.
- 36 Kim SI, *et al.* A β-secretase (BACE1) -inhibiting C-methylrotenoid induced by Yeast elicitation in *Abronia nana* suspension cultures. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172: 3529-3537.
- 37 Rauf A, *et al.* Pistagremic acid, a novel β-secretase enzyme (BACE1) inhibitor from *Pistacia integerrima* Stewart. *Nat Prod Res*, 2014, 29(18):1-4.
- 38 Youn K, *et al.* Discovery of polymethoxyflavones from black ginger (*Kaempferia parviflora*) as potential β-secretase (BACE1) inhibitors. *J Func Foods*, 2016, 20:567-574.
- 39 Park IH, *et al.* A beta-secretase (BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Planta Med*, 2004, 70:615-618.
- 40 Lee TH, *et al.* Effect of mycelial extract of *Clavicornia pyxidata* on acetylcholinesterase and β-secretase activity *in vitro*. *J Microbiol*, 2006, 44:502-507.
- 41 Lee DH, *et al.* Characterization of a new antimentia β-secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technol*, 2007, 42(1):83-88.
- 42 Harun A, *et al.* BACE1 inhibitory activity of fungal endophytic extracts from Malaysian medicinal plants. *BMC Complement Alter Med*, 2011, 11:103-126.
- 43 Hang SJ, *et al.* Characterization and β-secretase inhibitory activity of water-soluble polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* fruiting body. *Korean J Mycol*, 2012, 40:229-234.
- 44 Harms H, *et al.* Aβ-42 lowering agents from the marine-derived fungus *Dichotomomyces cejpii*. *Steroids*, 2015, 104:182-188.
- 45 Byun HG, *et al.* Chitoooligosaccharides as a novel β-secretase inhibitor. *Carbohydr Polym*, 2005, 61:198-202.
- 46 Lee JK, *et al.* Characterization of β-secretase inhibitory peptide purified from skate skin protein hydrolysate. *Eu Food Res Technol*, 2015, 240:129-136.
- 47 Cacabelos R. Pharmacogenomics, nutrigenomics and therapeutic optimization in Alzheimers disease. *Aging Health*, 2016, 1:303-348.
- 48 Zhou Y(周禹), *et al.* Progress on drugs targeting on β-secretase in the therapy of Alzheimer's disease. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2012, 28:149-154.
- 49 Vassar R. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Therapy*, 2013, 6(9):1-14.

(上接第 901 页)

- 66 Liu H(刘慧), *et al.* Study and exploration of phycobiliprotein of *Spirulina*. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2006, 34:5463-5464.
- 67 Zhu HX(朱海霞), *et al.* A review: structure distribution properties and physiological functions of lutein. *China Food Addit*(中国食品添加剂), 2005, 5:48-55.
- 68 Liao PT(廖萍泰), *et al.* Study on the singlet-oxygen quenching of lutein from marigold flower *in vitro*. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2005, 4(12):46-49.
- 69 Wang LB(王鲁波), *et al.* Effect of natural xanthophylls on growth performance and body pigmentation of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *J Fisher China*(水产学报), 2012, 36:1102-1110.
- 70 Wei D(魏东), *et al.* Super-antioxidant activity of natural astaxanthin and its application. *Chin J Marine Drugs*(中国海洋药物), 2001, 4:45-50.
- 71 Tomimaga K, *et al.* Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochim Polonica*, 2012, 59(1):43-47.
- 72 Kurashige M, *et al.* Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1990, 22-27.
- 73 Li C(李才), *et al.* Progress on the research of inhibitors of advanced glycation end products formation. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2001, 10(2):85-88.