

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130905

胰岛素样生长因子-1 对 β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1 的影响谭家泽¹, 宦小芳²

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016; 2. 重庆市石柱县人民医院护理部, 石柱 409100)

【摘要】目的:探讨胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)对人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中 β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1(β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1)的影响以及可能的细胞信号机制。**方法:**用不同剂量 IGF-1(20、40 ng/ml 和 80 ng/ml)作用于人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 24 h, 荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 BACE-1 mRNA 及蛋白水平; Western blot 检测淀粉样前体蛋白、C99、C83 及磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(phosphoinositide 3-kinase/serine threonine kinase, PI3-K/Akt)通路相关蛋白的水平; ELISA 检测细胞培养液中 β -淀粉样蛋白 42(β -amyloid peptide, A β 42)的水平, 然后选择最佳剂量的 IGF-1(80 ng/ml)作用于人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y, 在此之前 30 min 加入 PI3-K 抑制剂 LY294002(25 μ mol/L 及 50 μ mol/L), 重复上述检测。**结果:**IGF-1 降低 BACE-1、C99 及 A β 42 的水平($P=0.000$), 提高 C83 的表达($P=0.000$), 增加 Akt 的磷酸化($P=0.000$), 而 LY294002 具有抑制 IGF-1 的上述作用。**结论:**IGF-1 降低 BACE-1 mRNA 及蛋白的水平, 其机制可能涉及 PI3-K/Akt 信号通路。

【关键词】胰岛素样生长因子-1; β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1; 磷脂酰肌醇-3 激酶; 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶

【中国图书分类法分类号】R741.02

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-30

Effects of insulin-like growth factor 1 on β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1TAN Jiase¹, HUAN Xiaofang²

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Nursing, the People's Hospital of Shizhu in Chongqing)

【Abstract】Objective: To observe the effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) and the possible cellular signaling mechanisms in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **Methods:** After SH-SY5Y human neuroblastoma cells being treated with 20, 40 ng/ml and 80 ng/ml IGF-1 for 24 h, qPCR was used to analyze the levels of BACE-1 and Western blot was used to detect the protein levels of BACE1, C99, C83, amyloid precursor protein, mRNA and related protein levels of phosphoinositide 3-kinase/serine threonine kinase (PI3-K/Akt). Cellular culture medium levels of β -amyloid peptide (A β 42) were analyzed by ELISA. For inhibition studies, 25 μ mol/L and 50 μ mol/L LY 294002, a specific PI3-K inhibitor, was administered 30 min prior to 80 ng/ml IGF-1 treatment. Then the above tests were repeated. **Results:** IGF-1 decreased levels of BACE-1, C99, and A β 42 ($P=0.000$) and increased expressions of C83 and pAkt ($P=0.000$). LY294002 inhibited the above effects of IGF-1. **Conclusion:** IGF-1-induced reduction of BACE-1 may involve in PI3-K/Akt signaling pathway.

【Key words】 insulin-like growth factor 1; β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1; phosphoinositide 3-kinase; serine threonine kinase

老年斑是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的一个主要组织病理学特征, 它是由细胞外 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, A β) 的异常聚集而形成, 而 A β 则是淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 在 β 分泌酶及 γ 分泌酶作用下产生的^[1-2]。 β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1) 是主要

的 β 分泌酶, 是 A β 形成的限速酶, 因此 BACE1 已成为 AD 治疗研究领域一个新的靶点。研究发现在转基因小鼠模型中, 胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 基因敲出可以增加小鼠脑内 A β 水平^[3]。然而, 迄今为止, IGF-1 对 BACE1 有无影响尚不清楚。因此, 本文旨在探讨 IGF-1 对 BACE1 的影响及其相关的细胞信号机制, 为 AD 的防治提供新的理论依据。

作者介绍: 谭家泽, Email: 258702855@qq.com,

研究方向: 脑血管疾病。

1 材料和方法

1.1 实验细胞及主要试剂

SH-SY5Y 人类神经母细胞瘤细胞株由重庆医科大学重庆市神经病学重点实验室提供;RPMI1640 培养基、小牛血清购自 Invitrogen 公司;PI3-k 抑制剂 LY294002 购于 Merck Biosciences 公司;IGF-1 购自 Sigma 公司;BACE-1、AHP538 (识别 APP、C99、C83)、Akt、pAkt 购自 Santa Cruz 公司;A β 42 ELISA 试剂盒购自 BioSource 公司。

1.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱内培养人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y。每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞处理及分组

将细胞分为正常对照组、IGF-1 组 (20、40、80 ng/ml) 和 LY294002 预处理组 (25、50 μ mol/L),调整细胞密度约 2×10^5 个/ml,每组设 6 个复孔,每孔 100 μ l 细胞悬液接种到 96 孔板中,在培养箱中培养 48 h 后弃去上清液,用 PBS 轻洗 2 次,每孔加入不含胎牛血清的培养液使其总量为 100 μ l。在 IGF-1 组分别加入不同浓度的 IGF-1 (20、40、80 ng/ml);在 LY294002 预处理组,先加入 25 μ mol/L 及 50 μ mol/L LY294002,30 min 后再滴入 80 ng/ml IGF-1,在相同培养箱中培养 24 h。

1.4 Western blot

取处理后的人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y,收集上清液,用 PBS 轻洗细胞 3 次,转移至离心管中离心 5 min,同样方法洗 3 次,弃上液,加 4 $\times$ 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 上样缓冲液,沸水中水浴 5 min,测蛋白浓度后置 -70 $^{\circ}$ C 保存。20 μ g 蛋白样品用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后,350 mA 恒流湿法电转移 1 h 至硝酸纤维素膜,6% 的脱脂奶粉室温密封 1 h,加入兔抗大鼠 BACE1、AHP538、Akt、pAkt 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,含吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (PBST) 洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗室温孵育 1 h,洗膜、化学发光、显影、扫描,凝胶分析系统分析蛋白表达的灰度值变化。蛋白表达量以各组灰度值占对照组灰度值的百分比来表示。

1.5 Real-time PCR

提取 RNA,逆转录 cDNA。qPCR 在 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪中用 Brilliant SYBR Green qPCR Core Reagent Kit 进行。引物序列由上海生工生物技术有限公司设计。BACE-1 上游引物:5'-TTCCGCATCACCATCCTT-3',下游引物:5'-ATGACCGCTCCCATAACG-3'。 β -actin 上游引物:5'-CACC-CGCGAGTACAACCTTC-3',下游引物:5'-CCCATACCCA-CCATCACACC-3'。BACE1 及 β -actin 的退火温度分别为 54 $^{\circ}$ C 和 60.4 $^{\circ}$ C。记录观察扩增曲线和溶解曲线,确定各扩增产物为特异性目的基因,在曲线上读出 CT 值,以 β -actin 为内参照,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 BACE1 mRNA 的相对表达量。 $\Delta\Delta CT =$

各组 (CT 检测指标-CT _{β -actin})-对照组 (CT 检测指标-CT _{β -actin}), 各组基因表达量/对照组基因表达量= $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

1.6 ELISA

细胞培养液中的 A β 42 水平由大鼠 A β 42 ELISA 试剂盒进行检测。先取出酶标板分别加入 50 μ l 的标准品溶液于空白微孔中,再加入 50 μ l 的样品,空白对照加入 50 μ l 的蒸馏水;在样品孔中加入 10 μ l 的生物素,然后在各孔中加入 100 μ l 的酶标记溶液,将酶标板用封口胶密封后,37 $^{\circ}$ C 孵育反应 1 h;充分清洗酶标板 3~5 次,然后用吸水纸彻底拍干;各孔加入显色剂 A、B 液各 50 μ l,在 20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 下避光反应 15 min;最后各孔加入 50 μ l 终止液,终止反应。

1.7 统计学处理

全部数据采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组均数间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。 $P \leq 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-1 作用后 BACE1 mRNA 及蛋白的表达

人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 给予不同浓度 IGF-1 (20、40、80 ng/ml) 作用后,结果显示 3 组 BACE1 mRNA 的值分别为 0.591 ± 0.160 、 0.413 ± 0.008 、 0.194 ± 0.009 ,BACE1 mRNA 的表达随剂量增加而逐渐减少,如图 1;BACE1 蛋白的表达也随 IGF-1 剂量的增加而减少,其值分别为 52.740 ± 2.027 、 44.753 ± 1.282 、 38.740 ± 1.497 ,如图 2、3。不同浓度 IGF-1 作用后 BACE1 mRNA 的表达与对照组相比均明显降低,20 ng/ml 组 (LSD- $t=44.39$, $P=0.000$)、40 ng/ml 组 (LSD- $t=133.549$, $P=0.000$)、80 ng/ml 组 (LSD- $t=160.144$, $P=0.000$),差异有统计学意义。IGF-1 对 BACE1 蛋白表达的影响与 mRNA 类似,20 ng/ml 组 (LSD- $t=40.375$, $P=0.000$)、40 ng/ml 组 (LSD- $t=74.666$, $P=0.000$)、80 ng/ml 组 (LSD- $t=70.877$, $P=0.000$),差异有统计学意义。

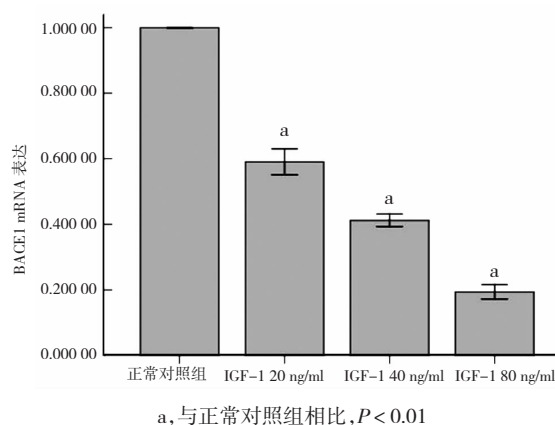


图 1 IGF-1 作用后 BACE1 mRNA 的表达

Tab.1 Expressions of BACE1 mRNA in SH-SY5Y cells after being treated with IGF-1

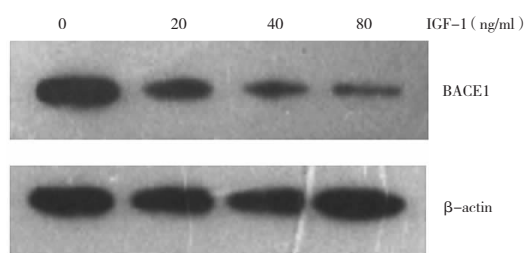


图2 Western blot 显示的 BACE1 蛋白表达

Tab.2 Expressions of BACE1 protein demonstrated by Western blot

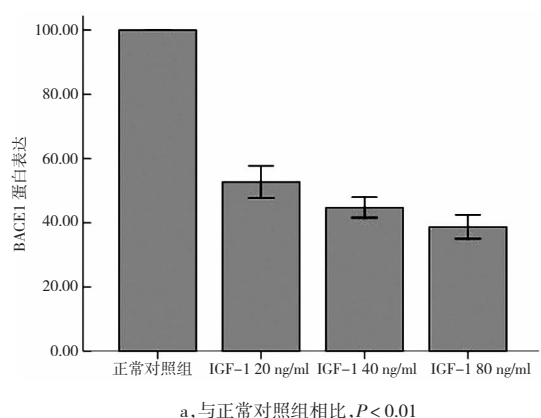


图3 IGF-1 作用后 BACE1 蛋白表达

Tab.3 Expressions of BACE1 protein in SH-SY5Y cells after being treated with IGF-1

2.2 IGF-1 对 C99、C83、APP 蛋白的影响

不同浓度 IGF-1 (20、40、80 ng/ml) 作用于人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 后, Western blot 显示细胞中 C99 蛋白表达减少, C83 蛋白表达增加, 而对 APP 蛋白的影响不大, 见图 4 不同浓度 IGF-1 作用后, C99 蛋白的表达与对照组相比均明显降低, 分别是 20 ng/ml 组 (56.117 ± 0.528 , $\text{LSD}-t=44.39$, $P=0.000$)、40 ng/ml 组 (50.150 ± 0.428 , $\text{LSD}-t=133.549$, $P=0.000$)、80 ng/ml 组 (21.293 ± 0.540 , $\text{LSD}-t=160.144$, $P=0.000$), 差异有统计学意义, 见图 5。C83 蛋白表达与对照组比较均明显增加, 分别是 20 ng/ml 组 (125.427 ± 2.262 , $\text{LSD}-t=-19.470$, $P=0.000$)、40 ng/ml 组 (215.667 ± 2.427 , $\text{LSD}-t=-82.558$, $P=0.000$)、80 ng/ml 组 (251.050 ± 5.107 , $\text{LSD}-t=-51.225$, $P=0.000$), 差异有统计学意义, 见图 6。而 IGF-1 各剂量对 APP 的蛋白表达均无影响。

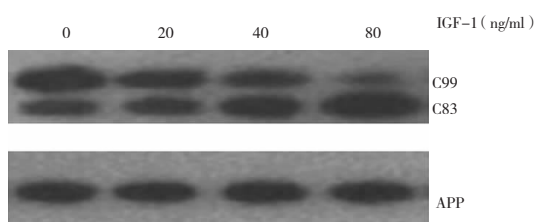


图4 Western blot 显示的 C99、C83、APP 蛋白表达

Tab.4 Expressions of C99, C83 and APP demonstrated by Western blot

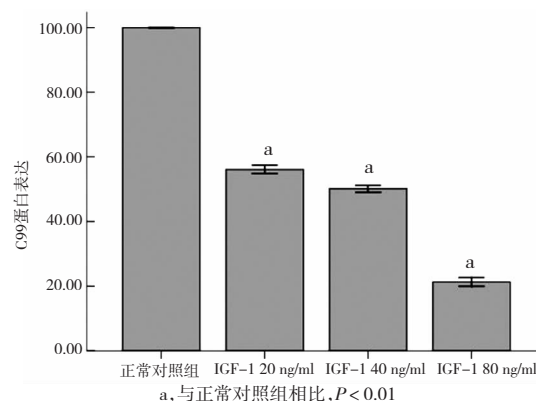


图5 IGF-1 作用后 C99 蛋白的表达

Tab.5 Expressions of C99 protein in SH-SY5Y cells after being treated with IGF-1

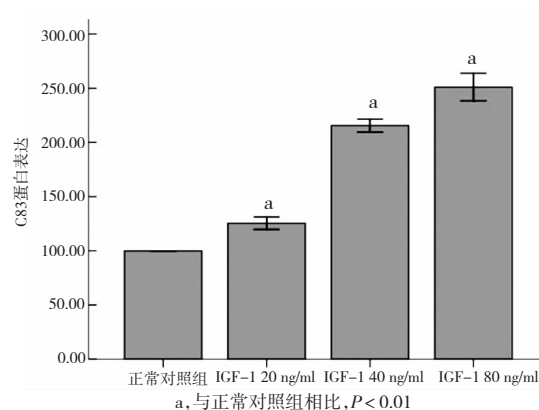
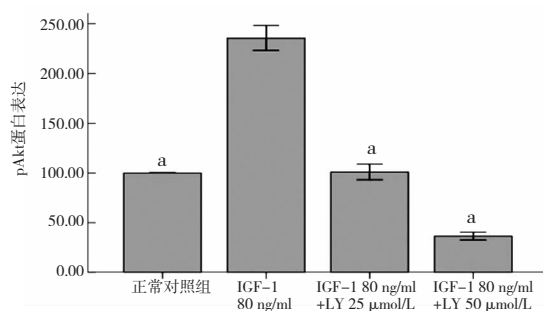


图6 IGF-1 作用后 C83 蛋白的表达

Tab.6 Expressions of C83 protein in SH-SY5Y cells after being treated with IGF-1

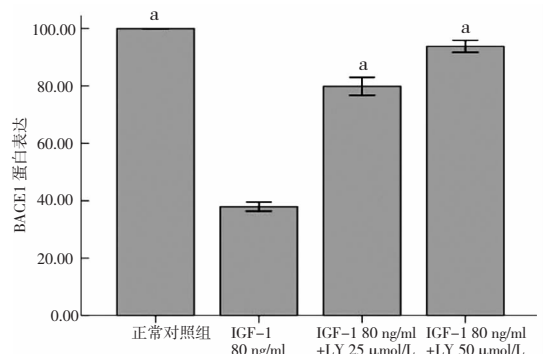
2.3 IGF-1 和 LY294002 在磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(phosphoinositide 3-kinase/serine threonine kinase, PI3-K/Akt)信号通路中的作用

80 ng/ml IGF-1 作用于人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 后, 其 pAkt 蛋白的表达明显增加 (pAkt 蛋白均值 235.680 ± 5.074 , $\text{LSD}-t=-46.319$, $P=0.000$), 说明 IGF-1 能够激活 PI3-K/Akt 信号通路; 而 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 LY294002 能抑制 pAkt 蛋白的增加 (pAkt 蛋白均值 36.453 ± 1.597 , $\text{LSD}-t=68.931$, $P=0.000$), 说明 PI3-K 抑制剂 LY294002 对上述激活能起到逆转的作用, 见图 7。同时 LY294002 亦能抑制 IGF-1 对 BACE1 蛋白水平的减少, 25 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 对抗组为 79.913 ± 1.260 ($\text{LSD}-t=-51.311$, $P=0.000$); 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 对抗组为 93.813 ± 0.855 ($\text{LSD}-t=-90.329$, $P=0.000$), 差异有统计学意义, 见图 8。LY294002 也能抑制 IGF-1 对 C99 水平的减少, 25 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 对抗组为 95.277 ± 0.663 ($\text{LSD}-t=-43.864$, $P=0.000$), 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 对抗组为 121.680 ± 0.831 ($\text{LSD}-t=-63.625$, $P=0.000$), 差异有统计学意义, 见图 9。同时 LY294002 还能抑制 IGF-1 对 C83 水平的增加, 25 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 对抗组为 81.707 ± 0.225 ($\text{LSD}-t=68.310$, $P=0.000$), 50 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 对抗组为 67.397 ± 0.564 ($\text{LSD}-t=81.756$, $P=0.000$), 差异有统计学意义, 见图 10。LY294002 的上述作用均呈剂量依赖性, 但 LY294002 对 APP 蛋白表达没有明显影响 (图 3)。



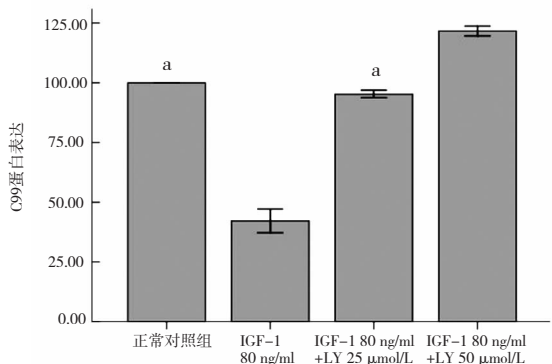
a, 与正常对照组相比, $P < 0.01$

图 7 IGF-1 和 LY294002 对 pAkt 蛋白表达的影响
Tab.7 Effects of IGF-1 and LY294002 on expressions of pAkt protein



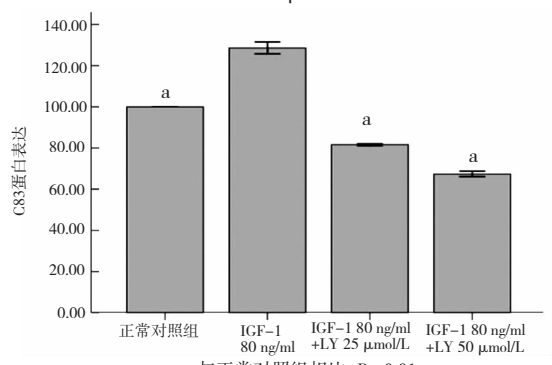
a, 与正常对照组相比, $P < 0.01$

图 8 IGF-1 和 LY294002 对 BACE1 蛋白表达的影响
Tab.8 Effects of IGF-1 and LY294002 on expressions of BACE1 protein



a, 与正常对照组相比, $P < 0.01$

图 9 IGF-1 和 LY294002 对 C99 蛋白表达的影响
Tab.9 Effects of IGF-1 and LY294002 on expressions of C99 protein

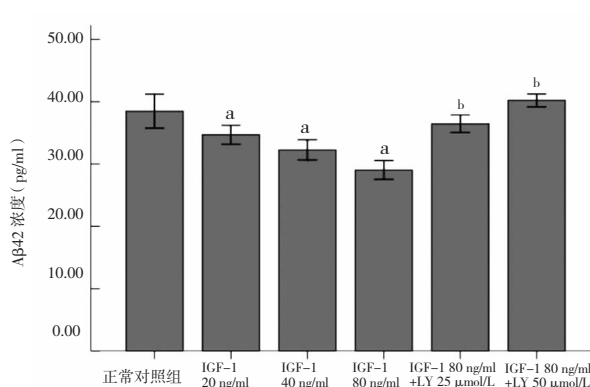


a, 与正常对照组相比, $P < 0.01$

图 10 IGF-1 和 LY294002 对 C83 蛋白表达的影响
Tab.10 Effects of IGF-1 and LY294002 on expressions of C83 protein

2.4 IGF-1 及 LY294002 对 Aβ42 的作用

IGF-1 降低 Aβ42 的水平, 而 LY294002 对这种作用具有抑制性。ELISA 显示, IGF-1 降低人类神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 培养液中 Aβ42 的水平 ($P < 0.01$), 而这种作用可被 LY294002 所抑制 ($P < 0.01$), 见图 11。



a, 与正常对照组相比, $P < 0.01$; b, 与 IGF-1 各组相比, $P < 0.01$

图 11 IGF-1 及 LY294002 对 Aβ42 的影响

Tab.11 Effects of IGF-1 and LY294002 on expressions of Aβ42

3 讨论

APP 是一种含有 770 个氨基酸残基的跨膜蛋白, 它在许多组织中表达而其功能尚不清楚^[2]。在正常情况下 APP 有 2 条代谢途径, 即非淀粉样物质途径 (α 途径) 和淀粉样物质途径 (β 途径), 前者是主要途径, 少量 APP 经 β 途径代谢。在非淀粉样物质途径中, APP 被 α -分泌酶切割, α -分泌酶的切割位点位于 Aβ 结构域内部, 因此能阻止完整 Aβ 的生成。而在淀粉样物质途径中, β -分泌酶在 Aβ 的 N-末端裂解 APP, 产生可溶性片段 sAPPβ 和含膜成分的 C-末端片段 C99。C99 进一步由 γ -分泌酶裂解产生 Aβ^[2-4]。在某些病理条件下, 如 APP 基因突变, APP 主要经 β -分泌酶和 γ -分泌酶裂解途径代谢, 产生过多的 Aβ, 导致 AD 发生。因此, 在病理条件下将 APP 的代谢途径从 β 途径向 α 途径调节, 将减少 Aβ 的产生, 减轻 AD 的病理损害, 延缓或缓解 AD 的临床症状。

在 AD 患者脑内及淀粉样蛋白斑块周围, BACE1 水平增高^[5-6]。AD 动物模型中, BACE1 在其病理及认知功能方面扮演着重要角色^[7-8]; BACE1 基因缺失可以阻止 APP 的 β 途径、减少 Aβ 的产生及存积、挽救认知和海马胆碱能神经功能障碍^[9-10]。BACE1 已成为 AD 诊断的一个生物标志物^[11-12], BACE1 的抑制剂正在研究用于 AD 的治疗^[13]。正因为 BACE1 在 AD 发病中的关键作用, BACE1 逐渐成为 AD 治疗研究领域

一个引人注目及有趣的靶点。

IGF-1 作为一种强大的神经生长因子,在中枢神经系统的发展和成熟过程中扮演着重要作用。Watanabe 等^[14]报道,AD 患者血清 IGF-1 浓度与简易精神状态检查评分有着密切联系,血清 IGF-1 水平低可能导致认知功能受损。同时,IGF-1 与小鼠脑内 A β 水平密切相关。但迄今为止,IGF-1 与 BACE1 的关系尚未见相关报道。本研究结果显示,用 IGF-1 处理过的 SH-SY5Y 人类神经母细胞瘤细胞 BACE1 的 mRNA 及蛋白表达明显降低,且这种作用具有剂量依赖性。同时,IGF-1 还降低 C99 及 A β 42 的水平、增加 C83 的表达,这与 Adlerz 等^[15]研究认为 IGF-1 增加 sAPP α 的释放、减少 A β 的水平相一致。本实验说明:IGF-1 促进 APP 的代谢从 β 途径向 α 途径转变,这种作用可能与 IGF-1 抑制 BACE1 的基因表达有关。

PI3-K/Akt 信号通路是脑内一种重要的胰岛素信号通路,近年有证据表明 PI3-K/Akt 信号通路除调节脑内能量平衡外,还与认知功能及神经保护有关^[16]。本研究表明,IGF-1 增加 SH-SY5Y 人类神经母细胞瘤细胞 Akt 的磷酸化水平,PI3-K 抑制剂 LY294002 明显抑制 Akt 的磷酸化,同时,LY294002 具有抑制 IGF-1 对 BACE1 的作用,提示 IGF-1 对 BACE1 的调节作用可能是通过 PI3-K/Akt 信号通路实现的。

有学者认为,AD 患者脑内 A β 的聚集可能是 A β 的降解受损而不是 A β 产生增加^[17]。本研究发现 IGF-1 同时减少 BACE1 及 A β 42 的水平,而 BACE1 是 A β 形成的限速酶,故推测 IGF-1 减少 A β 42 的水平是通过抑制 BACE1 的表达实现的。本研究结果与学者认为的是不一样的,需要一个转折来把两者的关系理清。

总之,本研究显示 IGF-1 具有降低 BACE1 表达的作用,这种作用可能是通过 PI3-K/Akt 信号通路实现的。IGF-1 水平的降低或 PI3-K/Akt 信号通路的受损均可能导致 BACE1 水平的异常,从而导致 A β 的增加及加速 AD 的发生与发展,为 AD 的预防与治疗提供了新的靶点。

参 考 文 献

- Zetterberg H, Blennow K, Hansen E. Amyloid β and APP as biomarkers for Alzheimer's disease[J]. *Experimental Gerontology*, 2010, 45(1): 23-29.
- Müller T, Meyer H E, Egensperger R, et al. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease[J]. *Progress in Neurobiology*, 2008(4), 85: 393-406.
- Carro E, Trejo J L, Gomez-Isla T, et al. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels[J]. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1390-1397.
- Volbracht C, Penzkofer S, Mansson D, et al. Measurement of cellular β -site of APP cleaving enzyme 1 activity and its modulation in neuronal assay systems[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 387(2): 208-220.
- Harada H, Tamaoka A, Ishii K, et al. β -Site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains[J]. *Neuroscience Research*, 2006, 54(1): 24-29.
- Zhao J, Fu Y, Yasvoina M, et al. β -Site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(14): 3639-3649.
- McConlogue L, Buttini M, Anderson J P, et al. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP transgenic mice[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(36): 26326-26334.
- Ohno M, Sametsky E A, Younkin L H, et al. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2004, 41(1): 27-33.
- Laird F M, Cai H, Savonenko A V, et al. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(50): 11693-11709.
- Ohno M, Sametsky E A, Younkin L H, et al. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 2004, 41(1): 27-33.
- Hampel H, Shen Y, Walsh D M, et al. Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease[J]. *Experimental Neurology*, 2010, 223(2): 334-346.
- Zetterberg H, Blennow K, Hansen E. Amyloid β and APP as biomarkers for Alzheimer's disease[J]. *Experimental Gerontology*, 2010, 45(1): 23-29.
- Zhu H, Young M B, Nantermet P G, et al. Rapid P1 SAR of brain penetrant tertiary carbinamine derived BACE inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(5): 1779-1782.
- Watanabe T, Miyazaki A, Katagiri T, et al. Relationship between serum insulin-like growth factor-1 levels and Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2005, 53(10): 1748-1753.
- Adlerz L, Holback S, Multhaup G, et al. IGF-1-induced processing of the amyloid precursor protein family is mediated by different signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10203-10209.
- Carro E, Torres-Aleman I. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1-3): 127-133.
- Selkoe D J. Clearing the brain's amyloid cobwebs[J]. *Neuron*, 2001, 32(2): 177-180.

(责任编辑:冉明会)