

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.002

多靶点抗 AD bis-MEP- 乙二酰胺杂合物 ZLA 抑制神经元型 AChE 活性及促智作用研究 *

管惠峰 谭小芳 宫 平 吴百川 侯丽娜 李 娟[△]

(上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:探究 ZLA 对神经元型 AChE 的抑制活性及其对中枢胆碱能神经功能障碍导致的学习记忆功能减退的改善作用。**方法:**通过体外实验观察 ZLA 对神经元型 AChE 活性的影响;通过 ex vivo 实验观察 ZLA 体内 AChE 抑制活性;利用 Morris 水迷宫行为学实验探讨 ZLA 对东莨菪碱诱发的小鼠学习记忆功能障碍的改善作用。**结果:**ZLA 明显抑制人 SH-SY5Y 神经元细胞和小鼠海马神经元来源的 AChE 活性。另外,ZLA 腹腔注射后以剂量依赖性方式抑制小鼠脑内 AChE 活性。Morris 水迷宫实验结果显示,ZLA 显著改善东莨菪碱引起的学习和记忆功能障碍。**结论:**ZLA 能够抑制神经元型 AChE 活性并具有促智作用。

关键词:阿尔茨海默病(AD);多靶点抗 AD 药物;AChE 抑制;认知改善

中图分类号:R-33;R338.1;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1206-05

A Multifunctional Bis-MEP-oxadiazide Hybrid Inhibits Neuronal AChE Activity and Improves Cognitive Deficits Caused by Central Cholinergic Dysfunction*

GUAN Hui-feng, TAN Xiao-fang, GONG Ping, WU Bai-chuan, HOU Li-na, LI Juan[△]

(Department of Pharmacology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of this study was to observe the inhibition activity of ZLA on neuron-derived AChE activity and its improving effect on learning and memory dysfunction caused by central cholinergic dysfunction. **Methods:** Inhibition of ZLA on neuron-derived AChE activity was detected through in vitro experiments. The in vivo effect of ZLA on AChE activity was observed through ex vivo experiments. The improvement effect of ZLA on learning and memory dysfunction induced by scopolamine was examined in Morris water maze task in mice. **Results:** ZLA inhibited activity of AChE derived from human SH-SY5Y and mouse hippocampal neurons. In addition, systematically injected ZLA inhibited AChE activity in the brains of mice in a dose-dependent manner. The results of Morris water maze test showed that ZLA significantly ameliorated the learning and memory dysfunction caused by scopolamine. **Conclusion:** ZLA can inhibit the activity of neuron-derived AChE. Moreover, ZLA can effectively ameliorate dementia caused by central cholinergic dysfunction.

Key words: Alzheimer's disease; Multi-target directed ligand; AChE inhibition; Cognitive amelioration

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338.1; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1206-05

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人中最常见的神经系统退行性疾病^[1]其发病机制复杂,关于其发病机制有诸多假说,包括胆碱能学说、 β 淀粉样蛋白学说等^[2,3]。胆碱能学说认为,AD 症状是由于脑内胆碱能神经元神经递质乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)产生减少而引起。其证据是 AD 患者脑内胆碱能神经元数量减少^[4]。ACh 是脑内重要的神经递质,在学习、记忆等认知活动中发挥重要作用。AD 患者脑内胆碱能神经元数量减少可导致 ACh 合成储存和释放减少,从而诱发

记忆减退和认知障碍为主的临床症状^[5]。AD 的典型病理特征之一为脑内存在由 β -淀粉样蛋白(β -amyloid peptide, A β)形成的老年斑^[6]。A β 是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor, APP)的酶解产物,具有神经毒性。A β 形成与清除之间的不平衡导致其聚集,可能成为 AD 的始动因素,这就是 β -淀粉样蛋白学说^[7]。近年来,脑内金属离子稳态失衡在 AD 发病机制中的作用越来越引起人们的重视,特别是具有氧化还原活性的 Cu²⁺ 稳态失衡可通过多种机制(如促进 A β 聚集、诱发氧化应激)导致神经元损伤,因而在 AD 发病中发挥重要作用^[8]。

目前在 AD 的临床治疗中应用最多的药物是乙酰胆碱酯

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81503044,81373417,30973538)

作者简介:管惠峰,硕士研究生,研究方向:神经药理学,电话:18817516807, E-mail: 2468118848@qq.com

[△] 通讯作者:李娟,硕士生导师,主要研究方向:神经药理学, E-mail: lijuanpharm@163.com

(收稿日期:2019-10-31 接受日期:2019-11-27)

酶抑制剂(acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs),其通过抑制脑内 AChE 来减少患者脑内突触间隙 ACh 的降解,提高 ACh 的水平,促进胆碱能神经传递功能,最终提高患者的学习认知能力从而改善患者的临床症状^[9]。FDA 批准的 AChEIs 包括他克林、多奈哌齐、利斯的明及加兰他敏。但是从长远来看,以上药物均不能阻断和逆转病程发展,只能暂时缓解临床症状^[10]。因此,寻找更有效的 AD 治疗药物具有重要的意义。

AChE 的活性位点含有两个重要的结构域,一个是催化位点(catalytic anionic site, CAS),另一个是外周阴离子位点(peripheral anionic site, PAS),在诱发 A β 聚集中发挥重要作用。传统的 AChEIs 多作用于 AChE 催化位点^[11]。本课题组近年研发了一种同时作用于 CAS 和 PAS 位点的新型双配基 AChEI Bis(9)-(-)-nor-meptazinol,其兼具抑制大脑皮层来源 AChE 催化活性和抑制 A β 聚集活性^[12]。在此化合物结构基础上,本课题组进一步合成了兼具金属离子螯合活性的化合物 --bis-MEP- 乙二酰胺杂合物(ZLA;其结构式见 Fig. 1A)。前期研究表明 ZLA 能够明显抑制小鼠前脑来源的 AChE 活性,该活性与利斯的明相似^[13]。另外 ZLA 具有金属离子(如 Cu²⁺、Zn²⁺)螯合活性,可抑制 Cu²⁺ 所致的体外 A β 聚集及中枢神经炎症反应^[13,14],因而有望成为潜在的多靶点抗 AD 先导化合物。脑组织来源的 AChE 为混合型,既包括神经元型 AChE(抑制其活性对于 AChEIs 改善 AD 脑内胆碱能神经突触传递功能是必需的,因而与非神经元型 AChE 相比,抑制神经元型 AChE 活性对于 AD 治疗可能具有更为重要意义),也包括非神经元型 AChE(如存在于胶质细胞内的 AChE)^[15,16]。ZLA 对神经元型 AChE 的抑制活性如何, ZLA 是否能够改善中枢胆碱能神经功能障碍导致的痴呆,目前并不清楚。本研究拟通过体内外实验和 Morris 水迷宫行为学实验进一步研究 ZLA 对神经元型 AChE 的抑制活性作用以及促智活性,研究结果将为评估 ZLA 作为新型多靶点抗 AD 先导化合物的潜在价值提供理论资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 ZLA 由本课题组依据本实验室之前的方法合成^[9]。乙酰硫胆碱,5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid, DTNB),色氨酸,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),阿糖胞苷,东莨菪碱,利斯的明,购自 Sigma-Aldrich。Neurobasal 神经元培养基, B27 补充剂,马血清, DMEM 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)/F-12(1:1),必需培养基(minimum essential media, MEM),0.25 胰蛋白酶, L-谷氨酰胺和青霉素/链霉素混合溶液来自 Gibco。**1.1.2 实验仪器和实验动物** 健康成年雄性昆明小鼠(18-22 g)购自中国科学院上海实验动物中心(中国上海)。所有实验方案均符合美国国立卫生研究院《实验动物的护理和使用指南》,并获得上海交通大学医学院的批准。

1.2 方法

1.2.1 神经元型 AChE 的制备 将人 SH-SY5Y 神经元细胞接种板后加入含有 10%FBS, 2 mM 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM / F-12(1:1),并培养于 37℃ 的含 5%CO₂ 的环境中。原代海马神经元应用我们报道的方法培

养^[17]。用木瓜蛋白酶处理新生 24 h 小鼠的海马组织 20 分钟后以 1000 rpm 离心 5 分钟,然后将沉淀重悬于含 10%FBS 和 5%马血清的 MEM 中。将细胞接种到 6 孔板中,并在 4 h 后将培养基更换为含 B27 补充剂的神经元培养基。第二天将阿糖胞苷(10 μ M)添加到培养体系中。每 3 天用新鲜培养基替换一半的培养基。为了获得神经元型 AChE,将含培养至第 3 天的 SH-SY5Y 和培养至第 14 天的海马神经元培养基分别在 900 $\times$ g 下于 4℃ 离心 5 分钟,然后将上清液于冰冻干燥机(Alpha 1-4/LD plus; Marin Christ, Osterode, Germany)中冰冻干燥。将冻干的粉末重溶于 1 mL 生理盐水中用于 AChE 活性测定。

1.2.2 体外 AChE 活性测定 应用改良的 Ellman 方法检测 AChE 活性^[18]。将 pH=7.2 的 0.05 M 磷酸盐缓冲液和 0.25 mM DTNB 混合,然后加入人 SH-SY5Y 神经元和海马神经元培养基冻干粉溶液和不同浓度的测试药物,并孵育 20 分钟。加入 0.5 mM 的乙酰基硫代胆碱作为底物,应用多功能酶标仪(Thermo, Waltham, MA, USA)在 412 nm 处检测吸光度。通过与对照组比较确定在测试药物存在下对 AChE 的抑制百分比。

1.2.3 ex vivo AChE 活性测定 将小鼠分为 5 组(n=5),分别腹腔注射 1, 2, 5 mg / kg ZLA, 3.25 mg / kg 利斯的明和赋形剂,40 分钟后处死。制备小鼠前脑匀浆液,测定残留的 AChE 活性。

1.2.4 Morris 水迷宫实验 应用 Morris 水迷宫实验评估小鼠的学习和记忆功能^[19]。在实验开始前 2 天让小鼠适应实验环境。将一个黑色的圆形水池(直径 140 厘米)放置在实验室的中间。水池中注水(22 $\pm$ 1.0℃)至 30 cm 的深度。将水池分成 4 个相等的象限,将一个黑色平台(直径 9 厘米)浸没在一个象限中心水面下方 1 厘米处让其对小鼠不可见并在整个测试过程中保持在同一个位置。将摄像机放置在水池中心上方,用来捕获小鼠游泳轨迹的图像。

每天在实验前 30 分钟腹腔注射 ZLA(1, 2, 5 mg/kg)或利斯的明(3.25 mg/kg),东莨菪碱为 M 胆碱能受体阻断剂,可阻断乙酰胆碱对 M 受体的激动作用,造成了学习记忆功能障碍,每次实验前 15 分钟腹腔注射东莨菪碱(2 mg/kg)进行造模^[20]。在为期 4 天的定位航行试验中,每只小鼠每天进行 4 次试验,连续 4 天,两次试验之间间隔 30 秒。每天的起始位置是随机的,但是对于所有小鼠,其保持相同的顺序,并保证每天均从 4 个象限内入水一次。每个试验持续到小鼠找到平台为止,或者持续 90 s。在 90 s 内未成功的小鼠被引导到平台并让其在平台上休息 30 秒。在第 5 天的探索试验中,将平台从水池中移出,每只小鼠分别从两个象限入水游泳 2 次,以检测小鼠对平台空间位置的长时程巩固记忆能力。允许每只小鼠探索 60 s。使用自动跟踪软件(吉量软件技术有限公司,上海)记录并分析所有运动轨迹。

1.2.5 旷场实验 将每只小鼠单独放置在试验区的中心区域(40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 40 cm)中,并使其自由活动 5 分钟。在开始新的测试前用 70%的乙醇溶液清洁实验装置以消除异味记录每只鼠的运动轨迹,并用具有跟踪系统的摄像机进行分析,以获得小鼠在中心区域的距离与时间百分比。

1.3 统计学分析

所有数据均表示为 Mean $\pm$ SEM。应用单因素或双因素方差分析(ANOVA)进行统计分析。 $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 ZLA 抑制神经元型 AChE 活性

我们用人 SH-SY5Y 神经元细胞或小鼠海马神经元细胞作为神经元型 AChE 的来源。我们发现 ZLA 能够剂量依赖性抑制上述细胞来源的 AChE 活性, IC_{50} 值分别为 1.01 ± 0.02 M 和 0.81 ± 0.04 M (图 1B 和 C), 与利斯的明的 IC_{50} 值 (分别为 26.55 ± 4.26 M 和 0.68 ± 0.18 M; 图 1D 和 E) 相近。

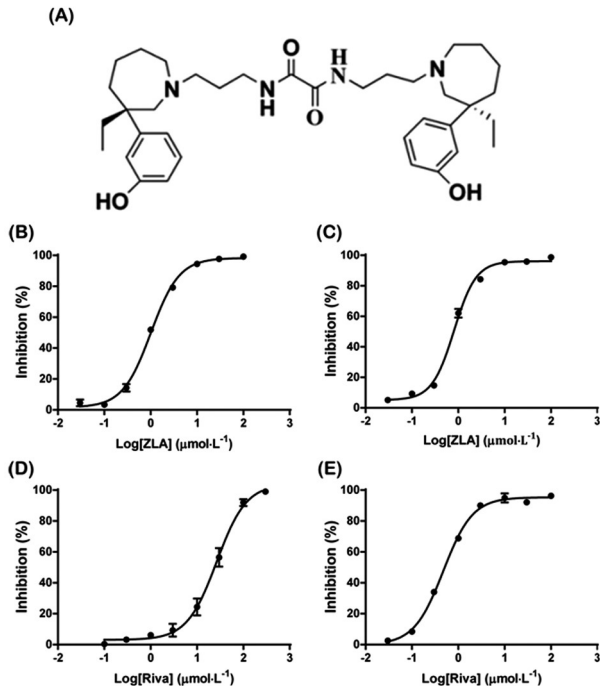


图 1 ZLA 抑制神经元型的 AChE 活性。(A) ZLA 的化学结构。ZLA 和利斯的明对人 SH-SY5Y (B, D) 和原代小鼠海马神经元细胞 (C, E) AChE 活性的抑制浓度曲线。

Fig.1 ZLA inhibits neuron-derived AChE activity. (A) Chemical structure of ZLA. Inhibition-concentration curves of ZLA and rivastigmine on the activity of AChE from human SH-SY5Y (B, D) and primary mouse hippocampal (C, E) neuronal cells.

2.2 ZLA 抑制体内 AChE 活性

我们的体外实验结果显示 ZLA 能够抑制神经元型 AChE 活性, 而是否具有体内 AChE 活性尚不清楚。我们发现给予小鼠腹腔注射 ZLA 后, 能够剂量依赖性地抑制小鼠前脑 AChE 活性 (图 2)。ZLA 在 1 mg/kg 剂量下对脑内 AChE 活性抑制作用轻微, 而在 2 和 5 mg/kg 的剂量下, 能够显著降低脑内 AChE 活性 (与对照组比较, $P < 0.05$), 该作用与利斯的明 (3.25 mg/kg) 作用相似。应用 ZLA 的动物均未出现明显的共济失调, 上睑下垂, 镇静, 流涎, 震颤或死亡等不良反应。

2.3 ZLA 改善东莨菪碱引起的小鼠学习和记忆障碍

接下来我们应用东莨菪碱诱发小鼠学习记忆功能障碍, 观察了 ZLA 的促智作用。Morris 水迷宫实验结果显示, 在为期 4 天的定向航行试验中, 对照组小鼠的上台潜伏期逐渐减少 (从第 1 天的 58.53 s 减少到第 4 天的 20.83 s)。与对照组相比, 东莨菪碱处理组小鼠的上台潜伏期于第 3 天和第 4 天明显延长 (与对照组比较, $P < 0.05$) (Fig. 4A), 提示东莨菪碱诱发了小鼠

学习记忆功能障碍。应用 ZLA (2 或 5 mg/kg) 治疗的小鼠, 第 4 天时的上台潜伏期明显短于仅用东莨菪碱处理的小鼠 ($P < 0.05$)。在 1 mg/kg 的剂量下, ZLA 对小鼠的学习记忆功能障碍没有明显改善作用。在空间探索试验中, 东莨菪碱造模组小鼠在平台所在象限中的游泳距离和时间百分比明显低于对照组 ($P < 0.05$), 而 ZLA (2 或 5 mg/kg) 治疗组的小鼠在平台所在象限中的游泳距离和时间百分比与单独东莨菪碱处理组相比显著上升 ($P < 0.05$)。1 mg/kg 的 ZLA 未能表现出明显作用 (图 3B, C)。同样, 利斯的明能够显著缩短小鼠第 4 天的上台潜伏期, 并增加第 5 天小鼠在平台所在象限中的游泳距离和时间百分比, 其作用强度与 ZLA 相似 (图 3)。撤掉平台后小鼠游泳轨迹图见图 3D (a, 对照组; b, 东莨菪碱处理组; c, 2 mg/kg ZLA 治疗组; d, 3.25 mg/kg 利斯的明治疗组)。

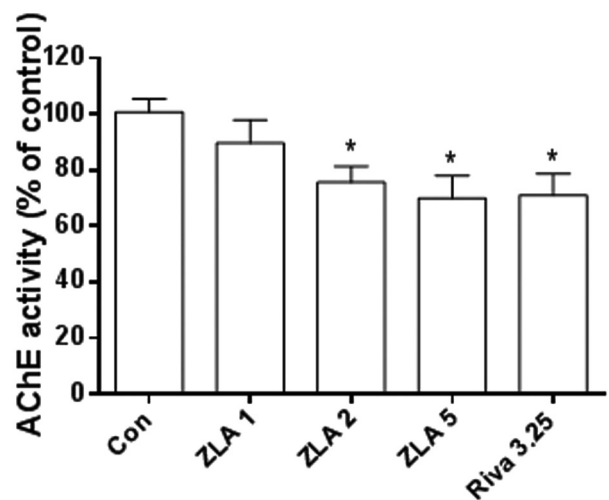


图 2 ZLA 剂量依赖性抑制小鼠脑内 AChE 活性。* $P < 0.05$

Fig.2 Effect of systemically injected ZLA on AChE activity of mouse forebrain. * $P < 0.05$

2.4 ZLA 对矿场试验小鼠运动能力的影响

随后的矿场试验结果显示, 各实验组在试验中心区域的活动距离和时间百分比没有显著差异 (图 4)。这些数据表明 ZLA 改善东莨菪碱所致学习和记忆功能障碍作用不是由于小鼠运动能力的差异所造成的。

3 讨论

AD 的发病机制复杂, 脑内 $A\beta$ 异常聚集以及金属离子稳态失衡等机制均参与其中^[21]。在以往的治疗中采用的针对单个致病因素的药物不能阻断和逆转病程发展, 只能起到暂时缓解临床症状的作用^[10]。因此采用联合疗法 (如美金刚联合多奈哌齐^[22]或者使用多靶向配基药物 (multi-target directed ligand, MTDL) 或许可以改善 AD 患者的病程进展。但是采用多种药物联合疗法时, 药物间的相互作用会增加不良反应的发生^[23]。因此, MTDL 药物可能有更好的应用前景。尽管在近年来的研究中有多种 MTDL 药物的生物学特征显示其很有希望成为抗 AD 的药物, 但最终都未获成功^[24-26]。因此, 寻找新型的 MTDL 药物对于 AD 治疗具有重要意义。该项工作目前仍在进行中^[27-29]。本课题组合成的 ZLA 具有 MTDL 的生物学活性, 既具有双配基抗 AChE 活性, 又兼具金属离子螯合活性^[14]; 另外, 能够通过血

脑屏障进入脑内^[30],并改善海马内注射 Cu 导致的中枢炎症反应及认知功能障碍^[13,14]。因此ZLA 可能为具有潜在价值的多靶点抗 AD 先导化合物。值得注意的是,AChE 除了在中枢胆碱能突触表达外,还能够非神经元细胞如星形胶质细胞中表达,在星形胶质细胞的迁移中可能发挥作用^[15,16,31]。抑制神经元型 AChE 活性对于 AChEIs 改善 AD 脑内胆碱能神经传递功能是必需的,因而该抑制作用对于该类药物对 AD 的治疗可能具有重要价值。在本研究中,我们发现 ZLA 明显抑制神经元(人 SH-SY5Y 神经元和小鼠海马神经元)来源的 AChE 活性,该作用与利斯的明相似,提示 ZLA 对于神经元型 AChE 具有明显的抑制作用,这对于其作为 AD 治疗的先导化合物具有重要价值。

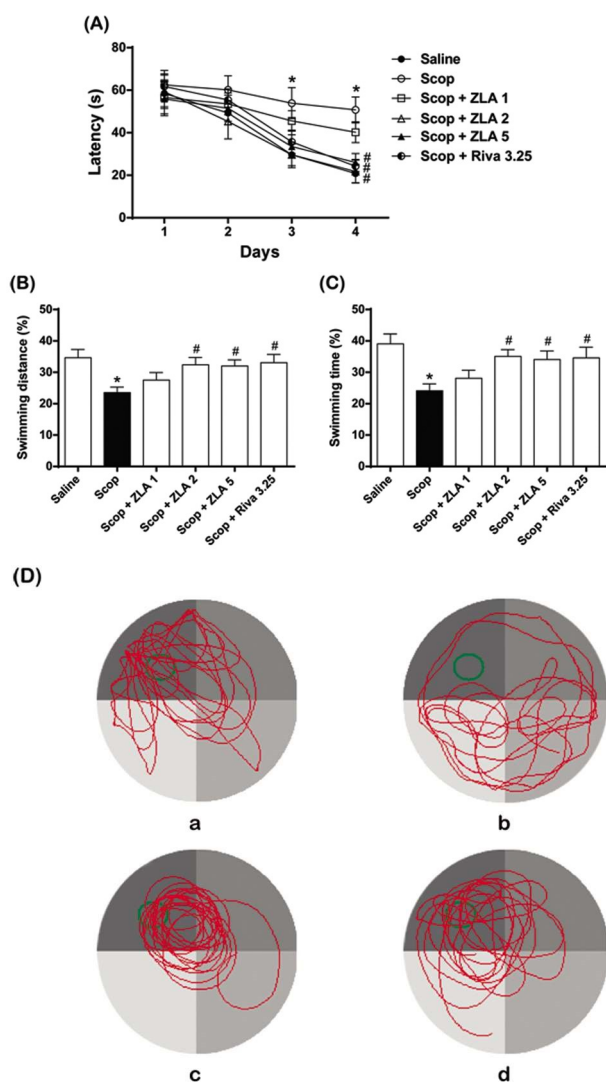


图3 ZLA 改善了东莨菪碱引起的学习和记忆功能障碍。(A)第1-4天定位航行试验中的潜伏期。第5天空间探索实验中目标象限的游泳距离(B)时间(C)的百分比以及不同组的游泳轨迹(D)。

Fig. 3 ZLA ameliorates scopolamine-induced learning and memory deficits. (A) Escape latency during the acquisition testing (days 1-4). Percentages of swimming distance (B) and time (C) in the target quadrant during the probe trial (day 5).

AChEIs 必须进入脑内才能发挥其药理作用。体内研究结果显示,给予小鼠腹腔注射 ZLA 后,能够剂量依赖性地抑制小鼠前脑 AChE 活性,该活性与利斯的明相似。上述结果提示,

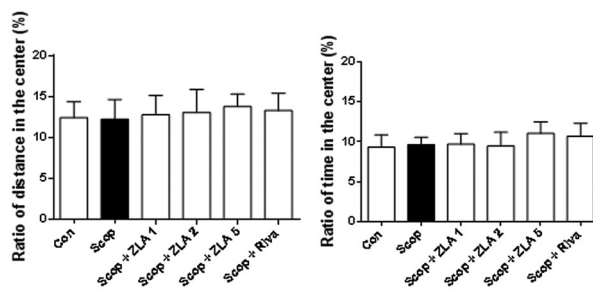


图4 旷场实验中小鼠的表现

(A)中心区域的距离比率(B)中心区域的时间比率

Fig.4 The performance of mice in the open field test

(A) Ratio of distance in the center area. (B) Ratio of time in the center area

ZLA 腹腔注射后能够进入脑组织内发挥 AChE 抑制作用。接下来,我们进一步观察了 ZLA 对东莨菪碱所致小鼠学习记忆功能障碍的改善作用。Morris 水迷宫实验结果显示,与利斯的明(3.25 mg/kg)作用相似,ZLA 在 2 和 5 mg/kg 剂量下能够显著改善东莨菪碱所致的小鼠学习记忆功能障碍,表现为缩短上台潜伏期,并增加小鼠在平台所在象限的游泳距离和时间,表明其有效地改善了东莨菪碱引起的痴呆症状。旷场试验结果提示,ZLA 对东莨菪碱所致痴呆的改善作用不是由于运动能力的差异所致的。由于能够有效抑制神经元型 AChE 活性,我们推测其促智作用可能与 ZLA 抑制中枢胆碱能神经元 AChE 活性,改善中枢胆碱能突触传递功能有关。

综上所述,本研究表明 ZLA 可有效改善东莨菪碱诱导的学习和记忆功能障碍。该作用可能与 ZLA 对脑内神经元型 AChE 活性的抑制有关。因此,ZLA 既可以通过螯合金属离子,又可以有效抑制神经元型 AChE 而发挥促智作用,有望成为有价值的多靶点治疗 AD 的先导化合物。

参考文献(References)

- [1] Hussenoeder FS, Riedel-Heller SG. Primary prevention of dementia: from modifiable risk factors to a public brain health agenda? [J]. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol, 2018, 53(12): 1289-1301
- [2] Du Xiao-guang, Wang Xin-yi, Geng Mei-yu. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies [J]. Translational Neurodegeneration, 2018, 7(1): 2
- [3] Bales K R. Interaction of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease and the choline transporter [J]. 2007
- [4] 周瑾,黄敬耀.老年性痴呆的发病机制和中枢胆碱能系统的关系[J].实用老年医学,1998,12(3): 122-123
- [5] Henry W, Frank M, LaFerla, et al. Alzheimer's Disease [J]. The new england journal of medicine, 2010, 362(4): 329-344
- [6] E Sipos, A Kurunczi, A Kasza, et al. β -Amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: Implications for Alzheimer's disease [J]. Neuroscience, 2007, 147(1): 28-36
- [7] Xu Gui-hua, Guan Lei, Sun Jun-liang, et al. Oxidation of cholesterol and beta-sitosterol and prevention by natural antioxidants [J]. Agric Food Chem, 2009, 57(19): 9284-9292
- [8] Bandyopadhyay S, Huang Xu-dong, K Lahiri D, et al. Novel drug targets based on metallobiology of Alzheimer's disease [J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(11): 1177-1197
- [9] 程鹏,李泰明.乙酰胆碱酯酶抑制剂在阿尔兹海默症治疗中的研究进展[J].科学技术创新,(9): 55-56

- [10] Inestrosa NC, Dinamarca MC, Alvarez A. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease[J]. FEBS J, 2008, 275(4): 625-632
- [11] 郑伟, 谢琼, 陈良康, 等. 双位点作用的乙酰胆碱酯酶抑制剂[J]. 化学进展, 2013, 25(11): 1974-1979
- [12] Xie Qiong, Wang Hao, Xia Zheng, et al. H.Bis(-)-nor-meptazinols as novel nanomolar cholinesterase inhibitors with high inhibitory potency on amyloid- β aggregation[J]. J Med Chem, 2008, 51: 2027-2036
- [13] Zheng Wei, Li Juan, Qiu Zhuibai, et al. Novel bis(-)-nor-meptazinol derivatives act as dual binding site AChE inhibitors with metal-complexing property [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 264: 65-72
- [14] Xiaofang Tan, Yan Zhou, Ping Gong, et al. A multifunctional bis(-)-nor-meptazinol-oxalamide hybrid with metal chelating property ameliorates Cu (II)-induced spatial learning and memory deficits via preventing neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2019, 52: 199-208
- [15] Anderson AA, Ushakov DS, Ferenczi MA, et al. Morphoregulation by acetylcholinesterase in fibroblasts and astrocytes [J]. Cell Physiol, 2008, 215(1): 82-100
- [16] Thullberty MD, Cox HD, Schule T, et al. Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells [J]. Cell Biochem, 2005, 96(3): 599-610
- [17] Hu Zhu-qin, Yu Feng-xiang, Ping Gong, et al. Subneurotoxic copper (II)-induced NF- κ B-dependent microglial activation is associated with mitochondrial ROS[J]. Toxicol. Appl. Pharmacol, 2014, 276(2): 95-103
- [18] Worek F, Eyer P, Thiermann H. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning[J]. Drug Test Anal, 2012, 4(3-4): 282-291
- [19] Barnhart C D, Yang D, Lein P J. Using the Morris Water Maze to Assess Spatial Learning and Memory in Weanling Mice[J]. 2015, 10(4): e0124521
- [20] 段新, 马光瑜, 张艳美. 纳洛酮对东莨菪碱所致大鼠空间工作记忆障碍的干预效应[J]. 中国组织工程研究, 2005, 9(20): 248-251
- [21] Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease [J]. Eur J Neurol, 2018, 25(1): 59-70
- [22] Owen RT. Memantine and donepezil: a fixed drug combination for the treatment of moderate to severe Alzheimer's dementia [J]. Drugs Today (Barc), 2016, 2(4): 239-248
- [23] 龚涛. 老年性痴呆的常用药物及研究进展[J]. 中国社区医师, 2004, 20(20): 21-22
- [24] Lecoutey C, Hedou D, Freret T, et al. Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(36): E3825-30
- [25] Sang Zhi-pei, Li Yan, Qiang Xiao-ming, et al. Multifunctional scutellarin-rivastigmine hybrids with cholinergic, antioxidant, biometal chelating and neuroprotective properties for the treatment of Alzheimer's disease[J]. Bioorg Med Chem, 2015, 23(4): 668-680
- [26] Wang L, Esteban G, Ojima M. Donepezil + propargylamine + 8-hydroxyquinoline hybrids as new multifunctional metal-chelators, ChE and MAO inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease [J]. Eur J Med Chem, 2012, 80: 543-561
- [27] de Freitas Silva, Matheus, Dias, Kris S T, et al. Multi-Target Directed Drugs as a Modern Approach for Drug Design Towards Alzheimer's Disease: An Update [J]. Current Medicinal Chemistry, 2018, 25(29): 3491-3525
- [28] Akhil Kumar A T, Sharma A. Changing paradigm from one target one ligand towards multi target directed ligand design for key drug targets of Alzheimer disease: An important role of Insilco methods in multi target directed ligands design [J]. Current Neuropharmacology, 2018, 16(6): 726-739
- [29] Asha Hiremathad, Karam Chand, Rangappa S Keri. Development of Coumarin and Benzofuran Conjugated Hybrids as the Versatile Multi-targeted Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2018, 92(2): 1497-1503
- [30] 谭小芳, 李馨敏, 郑伟, 等. LC-MS/MS 测定小鼠血浆中多靶点抗 AD bis-MEP- 乙二胺杂合物 ZLA 浓度及药动学研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 1(18): 6-11
- [31] Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease [J]. Mech Ageing Dev, 2001, 122(16): 1961-1969