

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.002

LC-MS/MS 测定小鼠血浆中多靶点抗 AD bis-MEP- 乙二酰胺杂合物 ZLA 浓度及药动力学研究 *

谭小芳¹ 李馨敏¹ 郑伟² 李娟¹ 唐亚斌^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院药理学教研室 上海 200025; 2 上海市计划生育科学研究所 上海 200032)

摘要 目的:建立检测小鼠血浆内新型多靶点抗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)药物双美普他酚-乙二酰胺杂合物(ZLA)浓度的高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS),并研究其在小鼠体内的药代动力学。**方法:**样品经甲醇沉淀去蛋白,应用 Waters Xbridge C18 色谱柱(2.1×100 mm, 3.5 μm),以甲醇-水(含 5 mM 甲酸铵, pH 9.8)(85:15, v/v)为流动相,流速 0.25 mL/min;采用电喷雾(ESI)离子源,选择正离子模式多反应监测,待测物分别为 m/z 304.3→107.0(ZLA)和 m/z 621.7→232.1(内标)。分别给予 KM 小鼠腹腔和尾静脉注射 ZLA 5mg/kg,不同时间点采集血浆用于 ZLA 定量分析。**结果:**ZLA 和内标保留时间分别为 3.2 min 和 2.5 min。血浆中 ZLA 线性范围为 1-1000 ng/mL。血浆中提取回收率超过 91%,日内和日间精密度 RSD 均小于 6%。药动力学研究结果显示,腹腔注射时 ZLA 可快速分布到血浆中,在 10.2 min 达到峰值,且能达到良好的生物利用度(47.6%)。**结论:**本研究建立的 ZLA 血药浓度测定方法快速、灵敏,特异性好,并成功应用于小鼠血浆中 ZLA 的药代动力学研究。本研究资料将为 ZLA 在 AD 治疗中的进一步临床前评估提供依据。

关键词:ZLA; 阿尔茨海默病; LC-MS/MS; 药代动力学; 小鼠血浆

中图分类号:R-33; R949.16; R96 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)01-6-06

Determination of Plasma Concentrations and Pharmacokinetic Parameters of a Multi-target Anti-AD Agent in Mice by LC-MS/MS*

TAN Xiao-fang¹, LI Xin-min¹, ZHENG Wei², LI Juan¹, TANG Ya-bin^{1Δ}

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

2 NPFFC Key Laboratory of Contraceptives and Devices, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai, 200032, China)

ABSTRACT Objective: To develop an LC-MS/MS method for the quantitative analysis of plasma concentrations of N1, N2-bis(3-(S)-meptazinol- propyl) oxalamide (ZLA), a new multi-target-directed agent for Alzheimer's disease (AD), and for study of its pharmacokinetic profile. **Methods:** Plasma samples of mice were pretreated with methanol for protein precipitation. The analytes were separated on a Waters Xbridge C18 column (2.1×100 mm, 3.5 μm) with a mobile phase consisting of methanol and water (containing 5 mM ammonium formate, pH 9.8) (85:15, v/v) and detected by positive electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode. MRM transitions were m/z 304.3→107.0 (ZLA) and m/z 621.7→232.1 (internal standard, IS), respectively. In the pharmacokinetic study, mice received intravenous or intraperitoneal ZLA (5 mg/kg) administration. The plasma samples were collected at different time points for analysis. **Results:** The retention time of ZLA and IS was 3.2 min and 2.5 min, respectively. The linear ranges of ZLA in plasma were 1-1000 ng/mL. The extraction recovery of ZLA in plasma was over 91%. The relative standard deviation of intra-day and inter-day variation was 3.1-5.9% and 4.6-5.1%, respectively. Pharmacokinetic studies revealed that ZLA reached peak concentration rapidly after intraperitoneal administration (T_{max} =10.2 min) and exhibited a satisfying bioavailability (47.6%). **Conclusion:** A specific and sensitive method was firstly reported for the quantification of ZLA, a novel candidate for multi-targeted AD therapy. This method was successfully applied to explore the pharmacokinetic profiles of ZLA in mice plasma. These data may be essential for the further preclinical evaluation of ZLA in AD therapy.

Key words: N1,N2-bis(3-(S)- meptazinol- propyl) oxalamide; Alzheimer's disease; LC-MS/MS; Pharmacokinetics; Mouse plasma

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R749.16; R96 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-6-06

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373417, 30973538, 21202098, 81573018);

上海市“科技创新行动计划”生物医药领域科技支撑项目(14431901800);上海市青年科技英才-扬帆计划项目(15YF1406700)

作者简介:谭小芳(1993-),硕士研究生,研究方向:神经药理学,电话:1831258683, E-mail: glimmer2015@163.com

Δ 通讯作者:唐亚斌,硕士,主要研究方向:肿瘤代谢组学, E-mail: leonyabin@163.com

(收稿日期:2017-10-20 接受日期:2017-11-12)

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人群中最为常见的神经退行性疾病之一,临床表现为进行性认知功能障碍。AD 相关神经元退变涉及多种病因以及复杂的病理生理机制。 β 淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)是导致 AD 神经元退变的关键致病分子,其在 AD 脑内异常聚集,经过寡聚体、纤维等阶段最终沉积形成老年斑,后者为 AD 脑内关键病理学特征^[1-7]。目前, FDA 批准的 AD 治疗药物包括乙酰胆碱酯酶抑制剂(Acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs)^[8-10] 和 NMDA 受体拮抗剂美金刚,尽管这两类药能部分改善认知功能,但不能逆转病程。针对 AD 多因素发病机制和复杂的病理生化改变,采用单一分子针对单一靶点进行干预的药物难以有效逆转 AD 病程。近年来,多靶向配体(multi-target directed-ligands, MTDLs)设计成为研发具有疾病修饰作用抗 AD 新药的重要策略^[11-13]。

大量证据表明,过渡金属离子在 A β 聚集过程中发挥了关键作用^[14]。具有氧化还原活性的 Cu²⁺ 可与 A β 单体相互作用,促进 A β 寡聚体形成^[15-17]。Cu²⁺ - A β 相互作用还能导致 H₂O₂ 的产生,造成氧化应激^[18]。因此, Cu²⁺ 螯合策略对 AD 的潜在治疗作用越来越受到重视^[19-21]。Cu²⁺/Zn²⁺ 螯合剂如 PBT2 已进入临床研究,并对部分 AD 患者有效^[21]。

AChE 除了水解乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)外,还可通过其外周阴离子位点与 A β 相互作用促进 A β 纤维形成^[22,23]。因此,研发既能抑制 AChE 催化位点,又能抑制其外周阴离子位点的双配基 AChEI,不仅能增加突触间隙内 ACh 水平,还可以延缓 A β 聚集乃至老年斑形成,从而可能发挥疾病修饰作用。

我们之前报道了一种具有金属螯合活性的新型双配基 AChEI ZLA(N1,N2-bis(3-(S)- meptazinol- propyl) oxalamide)^[24]。该化合物为双美普他酚-乙二酰胺杂合物,不仅具有与利斯的明相似的 AChE 抑制活性,还能抑制 AChE 以及 Cu²⁺ 诱导的 A β 聚集。行为学研究显示, ZLA(5 mg/kg)腹腔内给药能够抑制东莨菪碱以及海马内 Cu²⁺ 微注射导致的认知功能障碍(待发表资料)。因此, ZLA 可能是一个极有希望的多功能抗 AD 候选化合物。

本研究首次建立了小鼠血浆 ZLA 含量的 LC-MS/MS 检测方法学,并利用该方法考察了腹腔注射和尾静脉注射两种给药途径下 ZLA 在小鼠体内的药动学特点,为 ZLA 在 AD 治疗中的进一步临床前评估提供重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 ZLA 和内(N,N'-(1',3'- propylene)- bis(2-(3-((S)-3-ethyl-3-(3-hydroxyphenyl)azepan-1-yl)-N-methylacetamide; internal standard, IS) 由复旦大学药学院药物化学教研室合成, HPLC 分析显示纯度均超过 99.5%, 甲醇和甲酸铵均为色谱纯, 购自美国 Tedia 公司, 纯水由 Millipore 公司 Milli-Q plus 系统制备, 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 实验仪器和实验动物 液相色谱-质谱联用仪(LC-MS/MS)购自美国安捷伦科技公司, 型号为 Agilent 6410, -80 °C 低温冰箱购自美国 Thermo fisher scientific 公司, 高速冷

冻离心机购自德国 Sigma 公司。

健康 KM 小鼠, 雌雄各半, 体重 25-30 g, 由上海交通大学医学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(沪)2004-0001, 动物研究方案获得上海交通大学医学院动物伦理委员会批准。

1.1.3 检测条件 色谱条件: 色谱柱: Waters Xbridge C18 柱(2.1×100 mm, 3.5 μ m, Waters Technologies, MI, USA); 流动相: 甲醇:水(含 5 mM 甲酸铵, 氨水调 pH=9.8)=85:15; 流速: 0.25 mL/min; 柱温: 30 °C, 进样量: 5 μ L。

质谱条件: ESI 离子源, 采用正离子模式; 干燥气体流速为 8 L/min, 温度为 350 °C, 喷雾气压力为 40 psi, 毛细管电压为 3500 V, 信号采集方式为多反应监测(MRM), 待测物 ZLA: m/z 304.3→107.0 (碎片电压 140 V, 碰撞能量 17 eV), 内标: m/z 621.7→232.1 (碎片电压 135 V, 碰撞能量 33 eV), 使用 MassHunter 软件包(版本 B.04.00, Agilent Technologies, Inc., USA)进行质量数据处理。

1.2 方法

1.2.1 ZLA 储备液配制 精确称取 ZLA 1 mg, 用甲醇溶解, 得 1 mg/mL 标准储备液, 用甲醇稀释成浓度分别为 10, 20, 50, 100, 1000, 2000, 5000, 10000 ng/mL 标准品溶液。

1.2.2 空白血浆样品的制备 小鼠清醒状态下眼底静脉丛取血约 0.2 mL 至包被肝素钠的 EP 管中。立即将 EP 管放置到冰盒中, 在 1 h 内 4 °C 下 4000 rpm 离心 10 min。吸取上清, -80 °C 保存。

1.2.3 血浆样品处理与测定 取离心后的小鼠血浆 45 μ L, 加入甲醇 5 μ L 混匀后, 加入含内标 10 ng/mL 的甲醇溶液 200 μ L 沉淀蛋白, 涡旋震荡 1 min 后 14000 rpm 离心 5 min, 取上清 100 μ L 于 LC-MS/MS 分析。

1.2.4 标准曲线制备及质控样本制备 取 45 μ L 空白血浆样品, 加入 5 μ L 上述不同浓度的 ZLA 标准品溶液。得到终浓度分别为 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/mL 系列样品, 混匀后按照 "1.2.3" 项下的操作进行处理与测定, 以样品药物浓度(X)与样品 ZLA 与 IS 峰面积之比(Y)进行线性回归。同法配制终浓度为 3, 200, 750 ng/mL 的系列质控样本, 按照 "1.2.3" 项下的操作进行处理与测定。

1.2.5 方法的专属性 取小鼠空白血浆 45 μ L, 加入甲醇溶液 5 μ L 混匀后, 按 "1.2.3" 项下方法操作, 得空白血浆色谱图。取小鼠空白血浆 45 μ L, 加入 ZLA(1000 ng/mL)标准溶液 5 μ L 混匀后, 按 "1.2.3" 项下方法操作得色谱质谱图。取小鼠静脉注射 ZLA(5 mg/kg)5 min 后的血浆, 按 "1.2.3" 项下方法操作得色谱质谱图。考察血浆中的内源性杂质是否干扰 ZLA 和 IS 的测定。

1.2.6 提取回收率与基质效应 ZLA 质控样本, 按 "1.2.3" 项下方法操作, 取上清进样得峰面积 A₁; 另取空白血浆 45 μ L, 加入甲醇 200 μ L, 涡旋震荡 1 min 后 14000 rpm 离心 5 min 后, 取全部上清, 分别加入 30, 2000, 7500 ng/mL ZLA 标准溶液 5 μ L, 混匀后进样得峰面积 A₂; 另取纯水 45 μ L, 加入甲醇 200 μ L, 涡旋震荡 1 min 后, 分别加入 30, 2000, 7500 ng/mL ZLA 标准溶液 5 μ L, 14000 rpm 离心 5 min, 取上清进样得峰面积 A₃。上述实验中每个浓度平行做 5 份。以 A₁/A₂×100%考察提取回收率, 以 A₂/A₃×100%考察基质效应。

1.2.7 精密度与准确度考察 ZLA 质控样本(3,200,750 ng/mL),按"1.2.3"项下方法操作,连续测定3 d(3天),每个浓度平行做5份。测定日内、日间精密度(RSD)和准确度(RE)。精密度的RSD值应小于15%。

1.2.8 稳定性考察 取ZLA质控样本分别考察室温放置2 h、样本处理后于自动进样器放置6 h、反复冻融3次及-80℃保存30 d(30天)的稳定性。

1.2.9 药代动力学血浆样本制备 小鼠清醒状态下分别以腹腔注射和尾静脉注射的方式给药,每组6-8只,雌雄各半,于给药后5,10,20,30,40,50,60,180,360 min分别眼底静脉丛取血约0.2 mL至肝素化试管中,4000 rpm离心10 min,取血浆于-80℃保存。样品按"1.2.3"项下方法操作,计算各时间点的药物浓度,绘制血药浓度-时间曲线。

1.3 统计学分析

采用WinnNolin (Version 6.3)软件对数据进行拟合,通过非房室模型计算药代动力学参数。绝对生物利用度计算公式如下:

$$F = \frac{AUC_{(0-\infty)(ip)}}{AUC_{(0-\infty)(iv)}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 ZLA 与内标的质谱特征

在ESI正离子电离方式全扫描模式下,ZLA生成分子离子峰([M+2H]²⁺)为m/z 304.3,IS生成分子离子峰([M+H]⁺)为m/z 621.7。经碰撞后产物离子质谱图如图1所示。

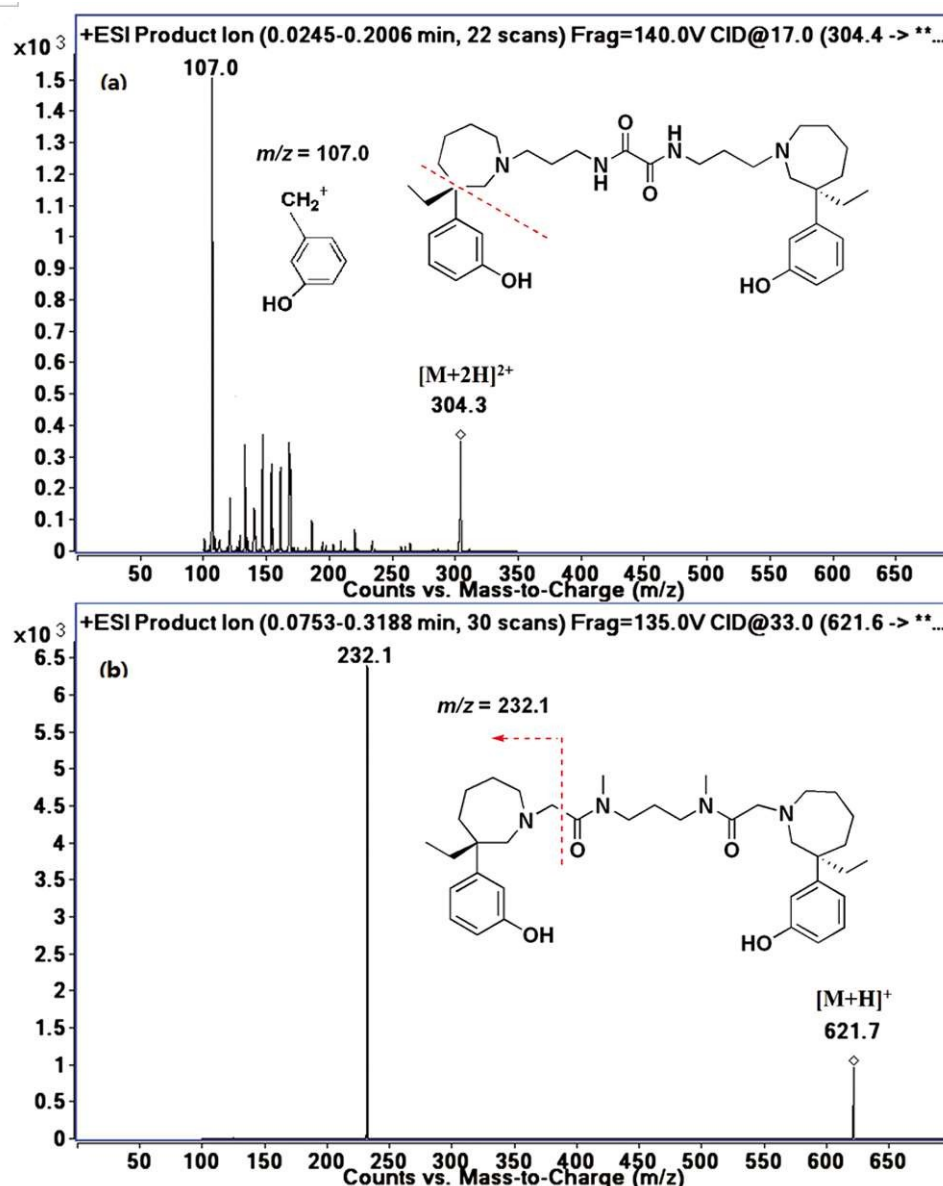


图1 ZLA (a)和IS (b)的质谱图

Fig. 1 Collision-induced dissociation mass spectra of ZLA (a) and IS (b)

2.2 方法的专属性

将血浆样品采用甲醇沉淀去蛋白后进行LC-MS/MS分析,结果表明ZLA和IS的保留时间分别为3.2 min和2.5 min,

ZLA和IS无杂质峰干扰且峰形良好,提示本方法特异性较高。小鼠血浆的代表性MRM色谱图如图2所示。

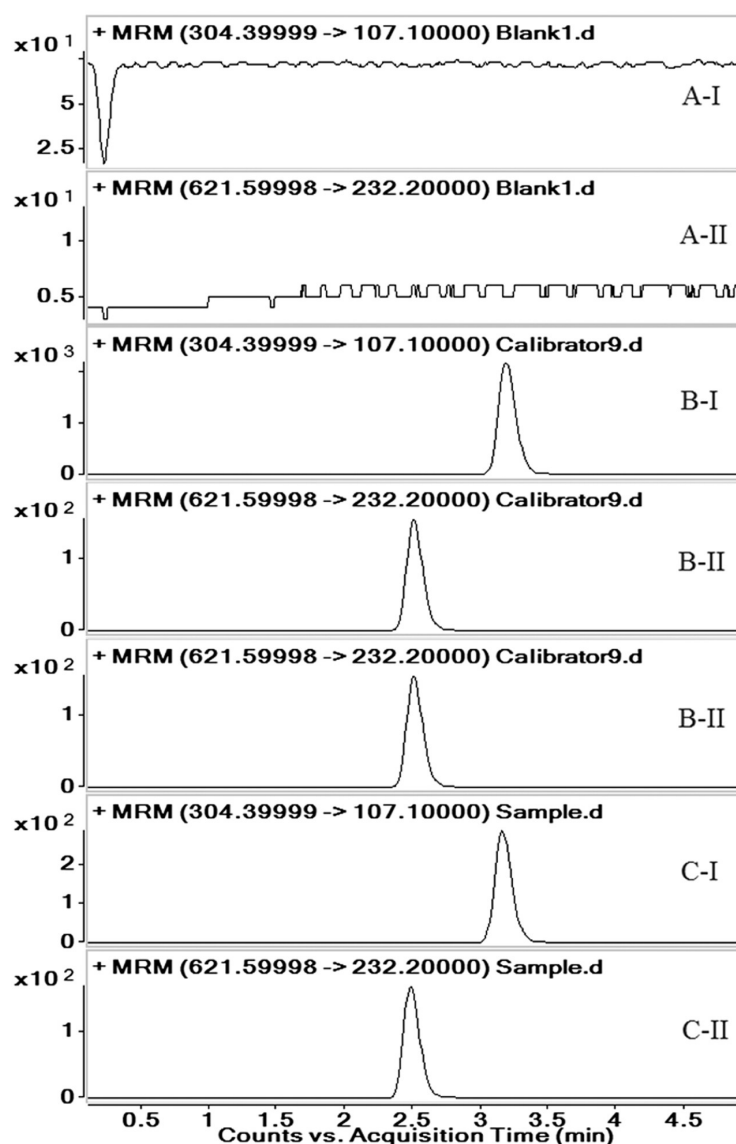


图2 (A)空白小鼠血浆,(B)以1000 ng/mL掺入ZLA的空白小鼠血浆和(C)静脉注射ZLA(5 mg/kg)后5 min获得的小鼠血浆的代表性色谱图。峰I,ZLA;峰II,IS

Fig. 2 Representative chromatograms of (A) blank mouse plasma, (B) blank mouse plasma spiked with ZLA at 1000 ng/mL, and (C) mouse plasma obtained 5 min after intravenous injection of ZLA (5 mg/kg). Peak I, ZLA; Peak II, IS.

2.3 标准曲线范围与定量下限 (lower limit of quantification, LLOQ)

ZLA在KM小鼠血浆中定量范围在1-1000 ng/mL浓度范围内线性关系良好,未见明显杂质干扰。标准曲线的回归方程为: $y = 0.017354x + 0.130561$ ($r^2=0.999$, $1/x$ 加权), LLOQ表示测定样品中符合精密度和准确度要求的最低药物浓度。我们对标准曲线最低浓度点(1 ng/mL)的准确度(RE表示)和精密度(RSD表示)进行了考察,日内准确度与精密度分别为3.3%、2.0%,日间准确度与精密度分别为5.4%、6.0%,均满足最低定量限要求。因此可以认为1 ng/mL为LLOQ。

2.4 提取回收率和基质效应

低、中、高3个浓度ZLA质控样品的提取回收率为91.8-100.1%,基质效应为62.2-67.9%。小鼠血浆中的提取回收率和基质效应见表1。

2.5 精密度与准确度

低、中、高3个浓度ZLA质控样品的日内、日间精密度(RSD)均小于6%,准确度(RE)为1.8-10.5%。精密度和准确度均满足生物样品分析要求。结果见表2。

2.6 稳定性

取3个浓度的ZLA质控样品分别考察室温放置2 h,样品处理后进样器放置6 h,反复冻融3次,-80℃冰箱保存30 d的稳定性,每个浓度检测6份样品,结果见表3。RSD值均符合生物样品测定要求,表明在此放置条件下ZLA较稳定。

2.7 ZLA在小鼠血浆内的药代动力学

利用所建立的小鼠血浆中ZLA的LC-MS/MS检测方法,我们对静脉和腹腔注射给药后ZLA的药代动力学特点进行了探讨。小鼠血浆内ZLA浓度-时间曲线如图3所示,其主要药代动力学参数见表4。静脉给药后,ZLA达峰时间(T_{max})为0.08 h,峰浓度(C_{max})为648.67 ng/mL,半衰期为0.68 h。腹腔给药后,在10.2 min时血液中ZLA浓度可达到峰值($C_{max}=160.15$ ng/mL),半衰期为0.63 h。ZLA的绝对生物利用度为47.6%。

表 1 ZLA 在小鼠血浆中的提取回收率和基质效应(n = 5)

Table 1 Absolute recovery and matrix effect of method for determination of ZLA and IS in mouse plasma (n=5)

	Matrix	Conc. (ng/mL)	Absolute recovery (%)		Matrix effect (%)	
			Mean	RSD	Mean	RSD
ZLA	Plasma	3	91.8	8.7	67.9	13.6
		200	100.1	10.0	63.3	5.7
		750	96.7	12.7	62.2	5.0

表 2 ZLA 在小鼠血浆中的日内、日间精密度和准确度(n = 5)

Table 2 Intra-day and inter-day precision and accuracy of method for determination of ZLA in mouse plasma (n=5)

Matrix	Conc. (ng/mL)	Intra-day		Inter-day (%)	
		RSD (%)	RE (%)	RSD (%)	RE (%)
Plasma	3	3.5	2.2	4.7	3.9
	200	5.1	7.5	4.6	10.5
	750	5.9	1.8	5.1	7.8

表 3 ZLA 在小鼠血浆中的稳定性(n=6)

Table 3 The stability of ZLA in mouse plasma (n=6)

Matrix	Conc. (ng/mL)	Room temperature for 2 h (%)		Auto sampler for 6 h (%)		Freeze-thaw 3 times (%)		-80 ℃ for 30 days(%)	
		RSD	RE	RSD	RE	RSD	RE	RSD	RE
Plasma	3	4.8	-1.7	3.5	1.1	12.2	-10.4	4.1	-5.6
	200	3.6	2.5	10.1	13.2	8.6	-9.9	11.0	-5.7
	750	4.6	-0.5	6.0	2.6	8.5	-4.6	7.2	5.1

3 讨论

本文建立了一种快速,简便,灵敏的小鼠血浆中 ZLA 检测的LC-MS/MS 方法,并利用该方法对 ZLA 在小鼠血浆内的药代动力学特征进行了研究。

本研究采用的全扫描模式既可检测到单质子离子,也可检测到双质子离子。与 $[M+H]^+(m/z\ 607.5)$ 相比, $[M+2H]^{2+}(m/z\ 304.3)$ 具有更大的离子丰度,因此选用其作为母离子。选用的内标与 ZLA 结构相似,物理化学性质相似,质谱行为学特征相近,而且出峰时间与 ZLA 互不干扰。我们采用四倍体积甲醇,既有效沉淀血浆样品中的蛋白质,又可以充分稀释基质。最低定量浓度为 1 ng/mL 时信噪比仍然达到 15,因而完全满足定量分析要求。

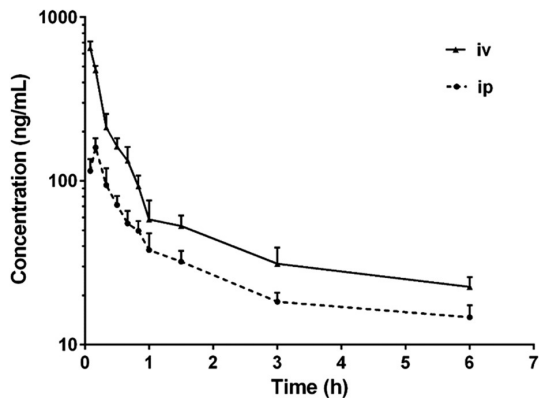


图 3 两种给药途径(静脉或腹腔注射)下 ZLA(5 mg/kg)在小鼠血浆中的浓度 - 时间曲线(mean ± S.D., n = 6)。

Fig.3 Plasma concentration versus time profile of ZLA (5 mg/kg) in mice (mean ± S.D., n = 6) with two routes of administration (intravenous, iv; intraperitoneal, ip).

表 4 两种给药途径(静脉和腹腔注射)下 ZLA(5 mg/kg)在小鼠血浆中的药代动力学参数(mean ± S.D., n=6)

Table 4 The pharmacokinetic parameters of ZLA (5 mg/kg) in mice (mean ± S.D., n=6) plasma with two routes of administration (intravenous; intraperitoneal)

Parameters	Intravenous	Intraperitoneal
AUC ₍₀₋₆₎ (ng h/mL)	389.85	182.71
AUC _(0-∞) (ng h/mL)	411.85	196.18
MRT ₍₀₋₆₎ (h)	1.49	1.89
T _{1/2} (h)	0.68	0.63
T _{max} (h)	0.08	0.17
C _{max} (ng/mL)	648.67	160.15
VZ/F (L/kg)	11.86	23.35
CL/F (mL/h/kg)	12.14	25.49

ZLA 是一个两性化合物,同时具有酸性(酚羟基)和碱性基团(叔胺基),所以流动相的 pH 值对 ZLA 的保留行为起到决定性作用,直接影响其保留时间与峰形。因此在方法学建立过程中,我们对色谱柱、流动相组成、样品前处理进行了系统的考察和优化。我们发现,酸性条件下,ZLA 在反相 C18 柱中基本不保留,而在 pH 为 9.8 条件下,可以得到很好的保留,因而我们选用可耐受碱性流动相的 Waters Xbridge C18 色谱柱(pH 最大可耐受 12);为维持稳定的 pH 环境及合适的缓冲能力,同时满足质谱检测中对缓冲盐苛刻的要求,我们选择 5 mM 甲酸铵的缓冲体系,并用氨水作 pH 调节剂。通过对有机相不同比例下保留时间的考察,最终选择 85%甲醇。在该流动相下,ZLA 保留时间约为 3.2 min,满足高通量检测要求。同时,由于使用了极高的有机相比比例,不仅增加了离子化效率,同时也使得样品

经过蛋白沉淀后,其上清可以直接吸取进样而不需要进一步用水稀释。综上,本研究建立了高效、便捷的血浆中 ZLA 生物检测方法,并进行了系统的方法学验证。结果显示该方法满足 ZLA 体内组织浓度的检测需要,可用于 ZLA 药动学特征的研究。

对 ZLA 在小鼠血浆内的药动学参数进行分析后发现,腹腔注射 ZLA 后其血药浓度迅速达到峰值($T_{max}=0.17\text{ h}$),半衰期较短($T_{1/2}=0.63\text{ h}$),在 6 h 时基本完全清除,提示 ZLA 在腹腔注射给药途径下吸收和消除均较为迅速。其绝对生物利用度为 47.6%。静脉或腹腔给予 ZLA 后,其表观分布容积(V)分别为 11.86 L/kg 和 23.35 L/kg,表明 ZLA 广泛分布于血浆和细胞内、外液中。在以后的研究中,我们将进一步考察 ZLA 在脑内的药物浓度以及药动学特点,为其改善学习记忆的药理学效应提供实验依据。

参考文献(References)

- [1] Jarosz-Griffiths HH, Noble E, Rushworth JV. Amyloid- β receptors: the good, the bad and the prion protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 291: 271-274
- [2] Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 32046-32053
- [3] Jekabsone A, Mander PK, Tickler A, et al. Fibrillar beta-amyloid peptide A β 1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF- α release and H $_2$ O $_2$ derived from NADPH oxidase: a cell culture study[J]. *J Neuroinflammation*, 2006, 3: 24
- [4] Maezawa I, Zimin PI, Wulff H, et al. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(5): 3693-3706
- [5] Mancuso M, Orsucci D, Logerfo A, et al. Clinical Features and Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Involvement of Mitochondria and Mitochondrial DNA [M]. *Diseases of DNA Repair*. Springer New York, 2010: 34-44
- [6] Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies[J]. *Progress in Neurobiology*, 2002, 68(3): 209-245
- [7] Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration[J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(2): 555-563
- [8] Dooley M, Lamb HM. Donepezil [J]. *Drugs & Aging*, 2000, 16(3): 199-226
- [9] Lilienfeld S. Galantamine--a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease[J]. *Cns Drug Reviews*, 2002, 8(2): 159-176
- [10] Maria Luisa O, Marianna T, Eugenio A. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update [J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2007, 2(1): 17-32
- [11] Leon R, Garcia AG, Marco-Contelles J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Med Res Rev*, 2013, 33(1): 139-189
- [12] Ismaili L, Refouvelet B, Bencheikroun M, et al. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 151(12): 4-34
- [13] Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, et al. Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and beta-amyloid in aging and Alzheimer's disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 173(13): 2080-2094
- [14] Han SH, Park JC, Mook-Jung I. Amyloid beta-interacting partners in Alzheimer's disease: From accomplices to possible therapeutic targets[J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 137: 17-38
- [15] Duce JA, Bush AI. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics[J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 92(1): 1-18
- [16] Keskitalo S, Farkas M, Hanenberg M, et al. Reciprocal modulation of A β 42 aggregation by copper and homocysteine [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 237
- [17] Sharma AK, Pavlova ST, Kim J, et al. The effect of Cu $^{2+}$ and Zn $^{2+}$ on the A β 42 peptide aggregation and cellular toxicity [J]. *Metalomics*, 2013, 5(11): 1529-1536
- [18] Hung YH, Bush AI, Cherny RA. Copper in the brain and Alzheimer's disease[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2010, 15(1): 61-76
- [19] Segal-Gavish H, Danino O, Barhum Y, et al. A multifunctional bio-compatible drug candidate is highly effective in delaying pathological signs of Alzheimer's disease in 5XFAD mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 58(2): 389-400
- [20] Nguyen M, Bijani C, Martins N, et al. Transfer of copper from an amyloid to a natural copper-carrier peptide with a specific mediating ligand[J]. *Chemistry*, 2015, 21(47): 17085-17090
- [21] Faux NG, Ritchie CW, Gunn A, et al. PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's Disease: additional phase II analyses [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 20(2): 509-516
- [22] Johnson G, Moore SW. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2006, 12(2): 217-25(9)
- [23] Inestrosa NC, Dinamarca MC, Alvarez A. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease [J]. *FEBS J*, 2008, 275(4): 625-632
- [24] Zheng W, Li J, Qiu Z, et al. Novel bis- (-)-nor-meptazinol derivatives act as dual binding site AChE inhibitors with metal-complexing property[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(1): 65-72