

編號：CCMP92-RD-115

表面電漿波相位生物感知器對中藥抑制貝 它澱粉樣蛋白 (A β) 聚合之評估

周晟

國立陽明大學

摘 要

阿滋海默氏症患者腦部散佈著類澱粉沈積 (amyloid deposits) 的病理特徵。類澱粉沈積的主要成分為 A β (β -amyloid protein)。

透過表面電漿波生物感知器快速、即時觀察、不需標示 (labeling) 的優點，我們可以即時觀察並記錄生物分子間的相互作用情形而進行動力學之分析，提供對早期 A β 纖維束形成動力學的研究。

以抑制劑抑制 A β_{1-42} 凝集反應中，發現 nicotine 及銀杏粗萃物 EGb761，可分別在凝集反應及解離反應中，抑制 A β_{1-42} 的聚合並促進 A β_{1-42} 凝集物解離。

關鍵詞：生物感知器、表面電漿波、澱粉樣蛋白、阿滋海默氏症

Number: CCMP92-RD-115

Phase-Sensitive Surface Plasmon Wave Biosensor for Identification of Chinese Herbs with Inhibitory Activity on Aggregation of β -amyloid

Chien Chou

National Yang-Ming University

ABSTRACT

Substantial evidence indicates that aggregation of β -amyloid ($A\beta$) peptides resulting neuronal toxicity probably play a causative role in the etiology of AD (Alzheimer's disease).

Past studies of the kinetics of $A\beta$ polymerization, could only provide information on the appearance of high molecular weight aggregates. Rate constants could not be determined by these approaches. In contrast, surface plasmon resonance (SPR) biosensor can be used to monitor binding events in real time without labeling, making them convenient for studying early-stage $A\beta$ polymerization.

Using nicotine and extract of *Gingko biloba*, EGb761, as inhibitors, it has been shown that both of them can retard $A\beta_{1-42}$ polymerization and promote dissociation in the association and dissociation phase.

Keywords : biosensor, β -Amyloid protein, SPR(surface plasmon resonance), Alzheimer's Disease

壹、前言

由於醫藥衛生的進步，人類壽命越來越長，高齡化社會已出現於包括台灣在內的已開發國家；因老化而衍生的疾病對人類健康造成的威脅亦日趨嚴重，其中又以干擾老年人生活品質的阿滋海默氏症（Alzheimer's disease）為害甚烈。據統計，六十五歲以上人口約有十分之一罹患此病；以美國為例，該病的患者數已逾四百萬，每年造成的直接及間接經濟損失超過一千億美金。若不能即時發展出有效的防治方法，估計全球該病的患者人數，在公元 2000 年已突破兩千萬，造成的損失難以估計。根據統計，在所有的癡呆症中，以阿滋海默氏症所佔的比例最高（約 50-60%），其次是多重梗塞型癡呆（約 10-20%）。由於阿滋海默氏症佔了 50-60% 的癡呆病例，且盛行於老年人（其發生率最高點在 60-70 多歲間），而病發後約 7-15 年死亡（原因多半是缺乏照顧所導致之感染或營養不良），加上社會的老年化趨勢，不知不覺間，阿滋海默氏症正逐漸地侵襲全世界。

1907 年，德國精神病學家 Alois Alzheimer 發現阿滋海默氏症患者腦部散佈著類澱粉沉積（amyloid deposits）的病理特徵，類澱粉沉積則廣泛存在於大腦皮質（cerebral cortex）、海馬迴（hippocampal）、杏仁核（amygdalae）等屬於認知相關的大腦區域（Selkoe, 2001）。

1984 年，Glenner 和 Wong 在阿滋海默氏症患者腦膜血管中發現約 4kDa 的 amyloid（Glenner & Wang, 1984），1985 年 Masker 等人由阿滋海默氏症患者大腦皮質中的類澱粉沉積純化出貝他類澱粉蛋白質（ β -amyloid），簡稱 A β （Masker et al, 1985），至 1987 年 Kang 等人找出 A β 的 cDNA，發現 A β 來自於一約 695 個氨基酸的蛋白質，稱類澱粉前驅蛋白質（Amyloid Precursor Protein, APP）（Kang et al, 1987）。APP 為一個膜蛋白（transmembrane protein），其絕大部分裸露在細胞外即 Ectodomain，一小部分嵌在細胞膜內稱為 Transmembrane domain 及細胞質中的 Cytoplasmic tail，在不同種類的細胞中都有表現，其基因位在第 21 對染色體上，人體內至少表現出五種 APP，包括 APP₅₆₃，APP₆₉₅，APP₇₁₄，APP₇₅₁ 和 APP₇₇₀，而腦中則以 APP₆₉₅ 和 APP₇₅₁ 為主（Ashall et al, 1994）。

APP 的代謝途徑包括：（一）分泌途徑（secretory pathway）：APP 分別經由能夠切除 APP 的 3 種酵素： α 分泌酵素（Secretase）， β 分泌酵素，及 γ 分泌酵素進行蛋白分解反應（proteolysis），產物包括分泌之

APP (β -APPs 或 α -APPs) 及含 $A\beta$ 片段的產物，包括經過 β 及 γ 分泌酵素切除後的產物即 4kDa 的 $A\beta$ 或由 α 及 γ 分泌酵素切除之分子量比 $A\beta$ 蛋白小一點的 3kDa amyloid 產物稱為 p3 蛋白， $A\beta$ 蛋白及 p3 蛋白皆會自細胞膜上游離出去，其中游離的 $A\beta$ 蛋白又會自行凝聚成團，形成所謂的老年性斑 (Esler & Walfe, 2001)。

$A\beta$ 的聚合 (polymerization) 是一種依賴核心形成的聚合反應 (nucleation-dependent polymerization)。 $A\beta$ 在聚合時，可由：(1)單體的 $A\beta$ 先形成核心再伸展成 protofibril，最後變成纖維束；(2)由 protofibril 形成 fibril，由 protofibril 與 protofibril 頭尾相接或側面連結或藉由與 dimer 相連接；(3)protofibril 可分解成 $A\beta$ 的 monomer 或 dimer 之後再與 protofibril 形成 $A\beta$ 纖維束 (fibril) (Walsh et al, 1997)。

可溶性的 $A\beta$ 蛋白，從最初的單體 (monomer) 到聚合組成纖維束，其過程是相當複雜的，必須經過數個狀態 (phase) 與中間產物 (intermediate) 的改變而得。其中單體的 $A\beta$ 形成一模版 (template，已聚合形成核心化之 $A\beta$ 的聚合體稱之) 的組合過程稱為凝集 (aggregation)，而更多的 $A\beta$ 加入模版中形成纖維束的過程，則稱為沈積 (deposition)。

以往為了解聚合反應後定量 $A\beta$ 聚合的程度，以剛果紅 (Congo Red) 染色分析、Thioflavin T (ThT) 染色方法分析 (Wood et al, 1996) 及 FITC 螢光標定法 (The and Feltleamp, 1978)。因這些方式都需要做標示等等耗時繁複的手續，此為最大缺點，因此在此提出利用生物感測器，主要是利用這來自生物體本身具備的高特异性，能偵測到很小的待測物濃度，能選擇接受的待測物而產生專一性的反應，再加上另一部分，稱為換能器的構造，它可以將生物間快速作用的狀態以物理或電化學，反應熱等的方式立即回應表達出，因此可節省相當多的時間。

然而，這些方法所費的時間也相當長，一般在數小時到數天以上，不容易達到即時 (real time) 觀察的要求，同時為了便於觀測，常須加以標記 (labeling)，可能影響其作用的動力學特性而造成誤差，並且某些標記會有危害安全的困擾。基於預防勝於治療的觀點，由於 $A\beta$ 在 AD 的發展過程中扮演重要的角色，在此我們將提出利用表面電漿波生物感測器，透過其即時觀察不需標示的優點，記錄分子間交互作用的情形，進而進行動力學分析，對早期 $A\beta$ 聚合形成動力學的研究為本研究的主要目標。

貳、材料與方法

一、實驗架構

以 Zeeman laser (ZL) 為光源 (圖 1)，此種雷射輸出為兩道互相垂直的線偏極光 (P 波和 S 波)，P 波和 S 波的頻率分別為 ω_p 和 ω_s ，本實驗所使用的 Zeeman 雷射 (Hp5517A) P 波和 S 波的頻率約相差 ($\Delta\omega = \omega_p - \omega_s$) 2.46MHz，強度分別表示為 A_p 及 A_s ，中心波長為 632.8nm，輸出功率 1mW。其後放一 $\lambda/2$ wave plate，作用為將原本雷射輸出的兩道線偏極光偏轉一個角度，使得 P 波平行光學桌 X 軸，S 波平行光學桌 Y 軸。經分光片 (BS) 將光束分成兩束後，將檢偏器 (A) 調整極化角度與平行 x 軸呈 45° ，使得 P 波和 S 波兩道偏極光產生干涉，由帶通濾波器 (band pass filter, BSF) 濾波與偵測器 (DRef.) 收集後，參考光 (沒有經過 SPR 系統) 所得的干涉訊號為：

$$I_{\text{ref}}(\Delta\omega t) = A_p A_s \cos(\Delta\omega t + \Delta\Phi)$$

其中， $\Delta\Phi = \Phi_p - \Phi_s$

另一道訊號光進入稜鏡耦合系統 (prism coupling system) 其反射光被偵測器 ($D_{\text{sig.}}$) 收集後，得到的外差干涉訊號，可寫成：

$$I_{\text{sig}}(\Delta\omega t) = A_p' A_s' \cos(\Delta\omega t + \Delta\Phi')$$

其中， $\Delta\Phi' = \Phi_p' - \Phi_s'$

參考光與訊號光的干涉訊號再送入鎖相放大器 (Lock-in Amp.) 作處理，得到相位 $\Delta\Phi$ 隨時間變化的情形。

二、A β 聚合化實驗

(一) Thioflavin T (ThT) 試驗

為了解 A β_{1-42} 以胺類偶合法固定於晶片時，是否 A β 蛋白本身在反應時間內已經產生凝集，因此，將 100 及 600nM 之 A β_{1-42} 未經反應以及溶於 sodium acetate (pH4.0) 內在室溫下反應三十分鐘，分別取此凝集反應後的溶液 10 μ L，加入 990 μ L 的 3 μ M Thioflavin T (ThT) 溶液 (溶於 50mM sodium phosphate buffer, pH 6.0)，混合後立刻以螢光分光光度計 (Hitachi F-4500) 在 450nm 的激發波長及 482 nm 的發射波長下，量測螢光值 (Tomiya et al., 1996)。

(二) 細胞毒性測試：MTT 試驗

為了解在我們的凝集反應過程中所生成的 A β 蛋白聚合體具有毒性，因此必須將 A β 蛋白在進行過凝集反應後做細胞存活率之測定，以判定經此凝集反應的 A β 蛋白聚合體仍具有細胞毒性。100 及 600nM 的 A β 蛋白各別進行不同時間之凝集反應後處理細胞，凝集時間分別為 0.5、1 及 24 小時。採用的細胞為老鼠腎上腺親鉻細胞瘤細胞株 (rat adrenal pheochromocytoma cell line)，簡稱 PC12 細胞。MTT 是一種 tetrazolium salt，全名是 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide，為一黃色的染劑，它可被活細胞吸收並被粒線體 (mitochondria) 中的 succinate tetrazolium reductase (一種 succinate dehydrogenase) 還原成藍色的 formazan，常用來檢測細胞的生長及增殖的變化。

(三) 銀杏粹取物 EGb761 (extract of ginkgo biloba) 對 A β_{1-42} 凝集反應與解離反應的影響

將預先配置的 1.2mM A β_{1-42} 於測量前十五分鐘前，配製成反應濃度為 600nM 的溶液。以 pipette 將上述 A β_{1-42} 溶液滴入反應盒內，反應約 5 分鐘後，將 EGb761 (Tebonin, Germany) 滴入反應盒內，使反應時 EGb761 濃度為 10 μ g/mL，觀察 A β_{1-42} 的凝集反應 30 分鐘。將 600nM 的 A β_{1-42} 反應 30 分鐘後，將反應溶液自反應盒內吸出，並以緩衝液清洗數次後，在反應盒內滴入 250 μ L 濃度為 10 μ g/mL 的 Egb761，觀察 A β_{1-42} 的解離反應 30 分鐘。

參、結果

一、Thioflavin T (ThT) 試驗

討論固定的鍵合物是否在固定化反應過程中，產生聚合。所以將可抑制 $A\beta_{1-42}$ 構形由 α -helix 轉變成 β -sheet 的 HFP (1,1,1,3,3,3-hexafluoropropanol)、DMSO (100%) (Serpell, 2000) 與固定 $A\beta_{1-42}$ 所使用的緩衝液 sodium acetate (pH4.0)，利用 Thioflavin T 染色分析法對 $A\beta$ 聚合程度的實驗 (圖 2) 後發現，溶於 sodium acetate 內的 100nM $A\beta_{1-42}$ 蛋白在反應 12 小時後，與溶於 DMSO 中的 100nM $A\beta_{1-42}$ 蛋白相比，螢光強度並未升高，在反應 24 小時後與 DMSO 及 HFP 的結果相比，於 sodium acetate 內的 $A\beta_{1-42}$ 蛋白略高於其他兩種溶劑。所以在感應片上固定鍵合物時， $A\beta_{1-42}$ 蛋白在這段時間內，應尚未發生凝集，因此實驗中所觀察到的是未存在預先形成之 $A\beta$ 模板的凝集反應。

二、細胞毒性測試

此實驗將 $A\beta_{1-42}$ 蛋白在 0.05%DMSO 水溶液中進行過凝集反應後做 PC12 細胞存活率之 MTT 試驗 (圖 3)，結果顯示在 30 分鐘、一小時及 24 小時的凝集反應過後，所產生的聚合體對 PC12 細胞均具有細胞毒性，證明在所使用的 0.05% DMSO 水溶液中形成的 $A\beta$ 蛋白聚合體是可以成為具有細胞毒性的纖維束。

三、銀杏粗萃物 EGb761 對 $A\beta$ 凝集反應開始的影響

從 (圖 4) 中可看出，加入 EGb761 後由於 $A\beta$ 分子在吸附中受到擾動導致訊號略為下降，之後擾動的影響減小使訊號持續爬昇，直到 EGb761 與 $A\beta$ 作用後產生解離，訊號開始下降，由此可發現 EGb761 對初期的凝集反應狀態下的 $A\beta$ 聚合體具解離的能力。為觀察 EGb761 在 $A\beta$ 凝集反應後的解離反應，經由 600nM $A\beta_{1-42}$ 先反應三十分鐘後，以 10 μ g/mL 的 EGb761 解離，在 (圖 5) 可看到 $A\beta_{1-42}$ 呈現出解離的反應使訊號下降。所以，不論 $A\beta_{1-42}$ 在反應開始時及反應三十分鐘後加入 EGb761，均可抑制及降低的 $A\beta$ 聚合。

肆、討論

近年來，傳統用於治療氣喘、支氣管炎的銀杏（ginkgo biloba）被證明具有治療 AD 的功效。事實上，銀杏葉抽出物之製程已被標準化，其產品稱為 EGb761，內含 24% 之黃酮醣（flavone glycoside）及 6% 的雙萜化合物（terpenoid，例如 bilobalide, ginkgolide A, B, C, J, M）。EGb761 無論在組織培養或動物實驗上，皆被證明具有良好的中樞神經保護作用，此作用可能與 EGb761 的抗氧化、清除自由基有關（Pincemail et al., 1989）；EGb761 也能藉由抑制血小板活化因子（platelet activating factor）而產生消炎作用（Lamant et al., 1987）；在臨床上 EGb761 除了用以改善周邊血液循環外（Jung et al., 1990），亦已被德國政府核准使用於癡呆症的治療。EGb761 在 *in vitro* 下抑制 A β 聚合已經由染色分析中得知（張佩德，1998）。而在我們的實驗中，以銀杏粗萃物 EGb761 抑制 A β_{1-42} 凝集反應裏，由（圖 4）知，當加入 EGb761 到凝集反應中的 A β 溶液時，除了阻止凝集反應之外，也能對已經凝集的 A β_{1-42} 聚合體產生解離；（圖 5）是 600nMA β_{1-42} 已經凝集反應 30 分鐘後，EGb761 對 A β_{1-42} 產生解離的效果，從圖中可以看出，只有 0.05% DMSO 水溶液時，A β_{1-42} 聚合體就可以產生解離，而加入 EGb761 後解離能力更為提高，以上的實驗可以顯示出 EGb761 確可抑制 A β 初期體外聚合，由於 EGb761 的內含物眾多，其產生的作用極可能是數種成分協同作用的結果，造成對中藥的特性及其研究上棘手的問題，其有效而未知的成分，值得做更深入的研究。

伍、結論與建議

前一年度計畫報告中，對類澱粉蛋白 $A\beta_{1-42}$ 形成纖維束的過程中，就核心形成前的凝集反應，以表面電漿波生物感知器的量測來探討此反應在動力學上的表現，就目前我們已知的理論，提出了一個 $A\beta_{1-42}$ 凝集反應時，可以解釋的合理模型；在抑制 $A\beta_{1-42}$ 產生凝集反應的實驗，討論銀杏粗萃物 EGb761 可否抑制 $A\beta$ 聚合，分別在凝集與解離反應中，得到 EGb761 可以有效的對 $A\beta$ 初期聚合體抑制生成並可逆向解離，這可以對中草藥上抑制 $A\beta$ 聚合提出直接的證據。

類澱粉蛋白的聚合是一個依賴核心形成的聚合反應，其初期聚合反應在生理濃度範圍的量測，以目前的觀測技術雖可量測 nM 的低濃度，但無法做動態量測提供動力學量測數據，以評估分子與分子之間的即時交互作用，所以對於藥物抑制類澱粉蛋白的聚合無法提出對不同階段抑制作用之確切數據。而表面電漿波生物感知器具有無須前處理及標記 (labeling)、即時、專一性、靈敏度高等特點足可彌補以往實驗方式的缺點，利用此種方式確可在動力學量測上得到完整數據。

類澱粉蛋白的聚合在不同階段（以核心形成前後區分）將表現出不同動力學特性，尤其對初期聚合的動力學描述，由於不易觀察，目前並無確切的模型，若能夠利用表面電漿波生物感知器，提出對不同聚合程度的 $A\beta$ 動力學描述，利用模型對藥物抑制類澱粉蛋白的聚合提出在藥物動力學上確實證據，這對於目前非常熱門的中藥尤其能驗證是否具有藥效之用，可以對於類澱粉蛋白的聚合所引發的阿滋海默氏症提出正確解決之道。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP92-RD-115 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Selkoe DJ (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotype, and treatments. *Science* 275: 630-631.
2. Glenner, G.C. & Wang, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 885-890.
3. Kang, J., Leimair, H.-G., Underbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Crzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K & Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325: 733-736.
4. Ashall N, & Goate AM (1994) Role of the β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Trend Biochem. Sci.* 19: 42-45.
5. Esler WP, Wolfe MS (2001) A portrait of Alzheimer's disease - new features and familiar faces. *Science* 293(24): 1449-1454.
6. Wisniewski T, Ghiso J & Rogers J (1994) Alzheimer's disease and soluble A β . *Neurobiol. Aging* 15(2): 143-152.
7. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81(2): 741-766.
8. Jarrett JT, & Lansbury PT, Jr (1993a) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73: 1055-1058.
9. Roher AE, Baudry J, Chaney MO, Kuo YM, Stine WB, & Emmerling MR (2000) Oligomerization and fibril assembly of the amyloid- β protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1502: 31-43.
10. Chibata I (1978) Immobilized Enzymes- Research and Development. Chap.2, John Wiley, New York.
11. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, & Teplow DB (1997) Amyloid β -protein fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 272(75): 22364-2237.
12. Tomiyama Y, Shoji A, Kataoka K, Suwa Y, Asano S, Kaneko H & Endo N (1996) Inhibition of amyloid β protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. *J. Biol. Chem.* 271(2): 6839-6844.

13. Pincemail J, Dupuis M, Nasr C, et al. (1989) Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of ginkgo biloba extract. *Experimentia* 45: 708-712.
14. Lamant V, Mauco G, Braquet P, et al.(1987) Inhibition of the metabolism of platelet activating factor (PAF-acether) by three specific antagonists from ginkgo biloba. *Biochem. Pharm.* 36(17): 2749-2752.
15. 張佩德，篩選俱抑制 β -Amyloid 聚合或降低 β -Amyloid 聚合物毒殺 PC12 細胞活性的物質。藥理學研究所碩士學位論文（1998，6）。

柒、圖

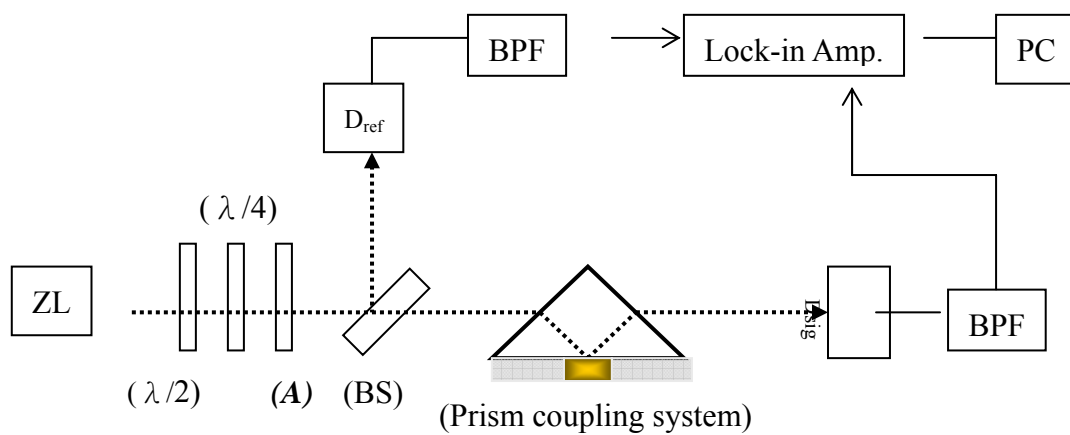


圖 1 SPR 生物感測器量測系統

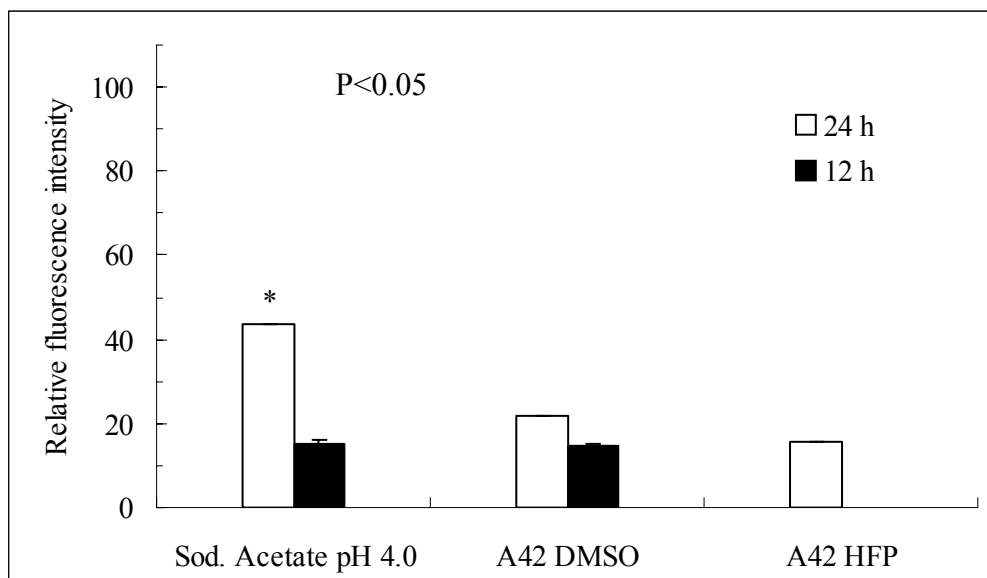


圖 2 Thioflavin T 對 Aβ₁₋₄₂ 蛋白在不同溶劑中的聚集反應之比較

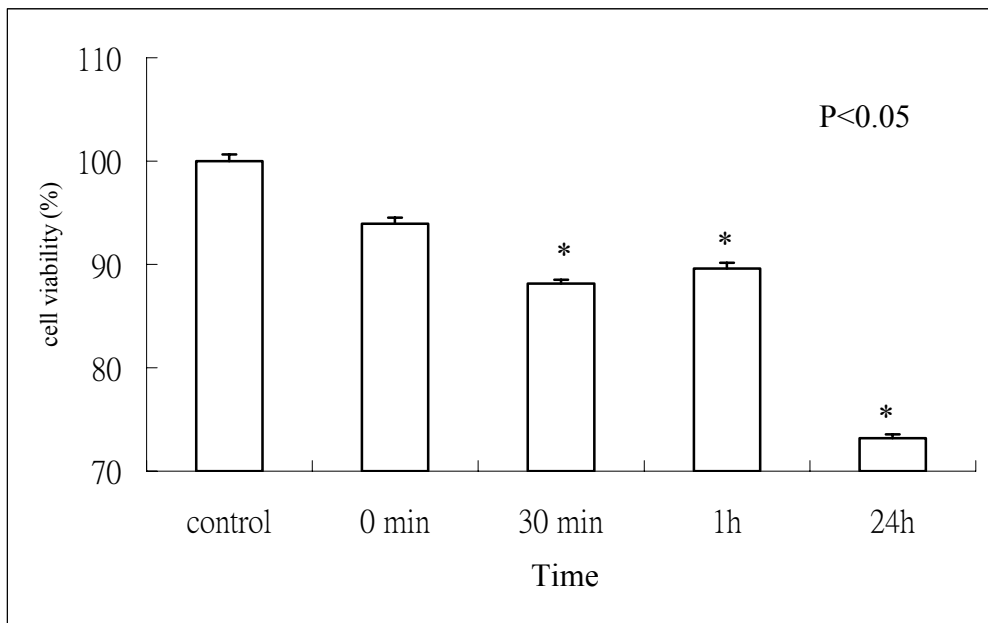


圖 3 $A\beta_{1-42}$ 蛋白細胞毒性測試

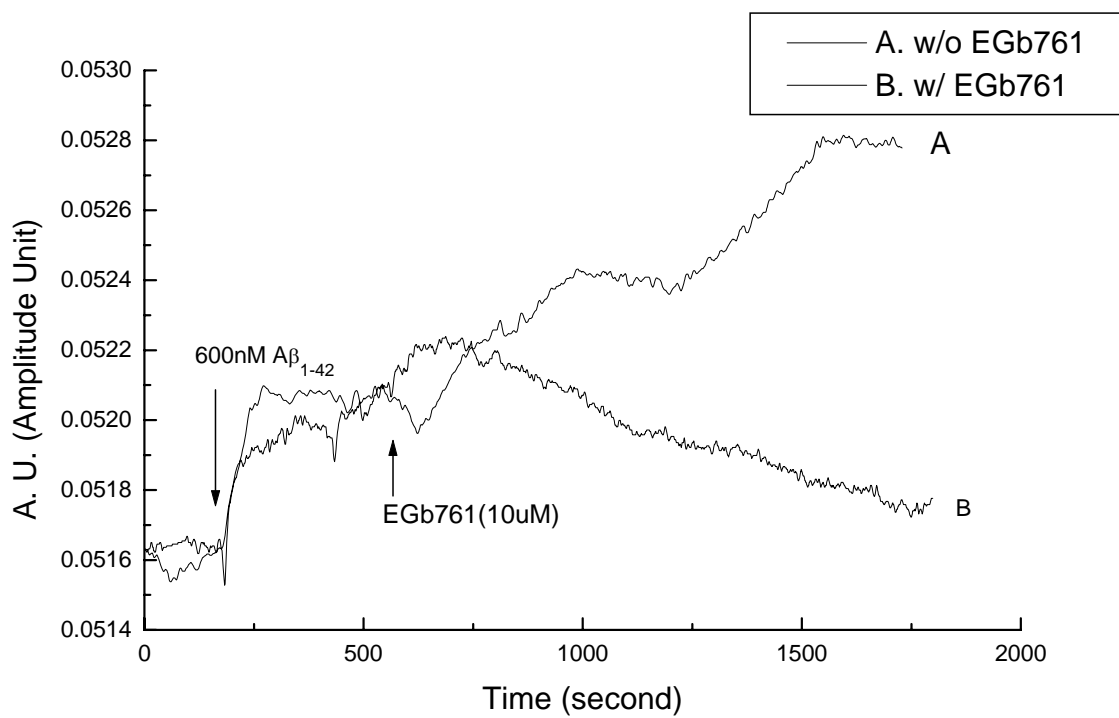


圖 4 EGb761 對抑制 600nM $A\beta_{1-42}$ 進行凝集反應之感應圖

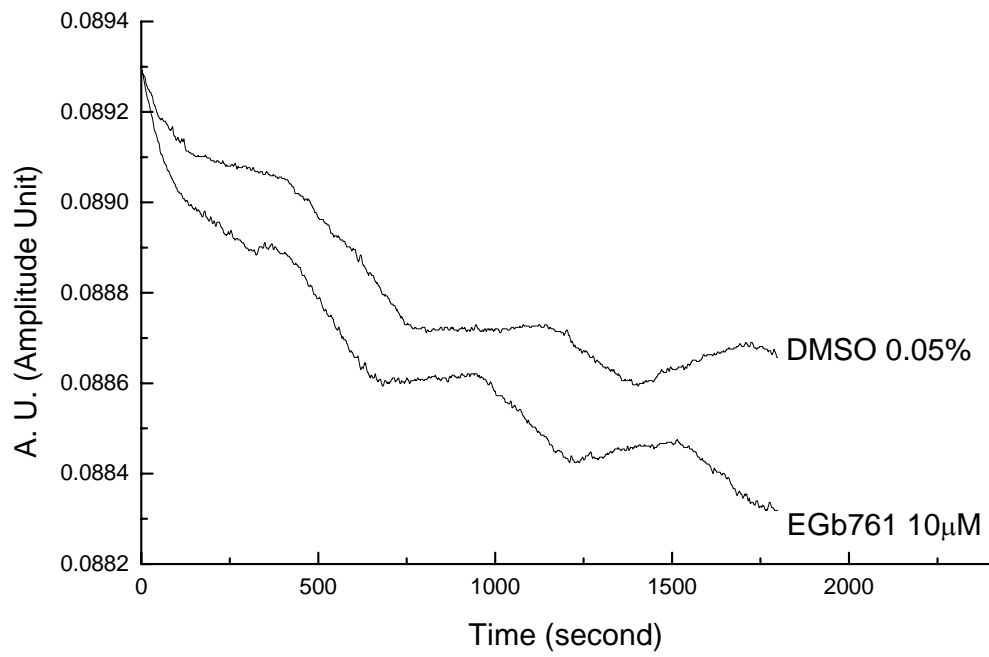


圖 5 600nM 的 $A\beta_{1-42}$ 進行凝集反應後以 EGb761 解離的感應圖