

編號：CCMP93-RD-055

表面電漿波相位生物感知器對中藥之單一成分抑制貝它類澱粉蛋白聚合化效用之量測

周 晟

國立陽明大學醫技系放射組

摘 要

A β 纖維束是形成阿滋海默氏症主要致病原因的來源，因此抑制纖維束的形成，成為治療阿滋海默氏症的一個重要途徑。過去對 A β 纖維束形成動力學的研究，均無法提供 A β 形成纖維束前的中間產物 (intermediate)，在早期纖維束形成前的動力學描述。在此我們將利用表面電漿波生物感測器，利用來自生物體本身具備的高特異性，高靈敏度，來接受待測物的選擇而產生專一性的反應，同時透過快速、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，本研究將對可抑制 A β 1-42 體外聚合反應的中草藥粗萃物，提供對早期 A β 纖維束形成動力學的研究，將有助於開發新的治療 AD 之藥物。

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 : CCMP93-RD-055

Effectiveness of single constituent of Chinese herbs with inhibitory activity on β -amyloid polymerization by use of phase-sensitive surface plasmon wave biosensor

Chien Chou

National Yang-Ming University

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is one of the leading causes of death in the elderly of the developed world. This widespread progressive neurodegeneration is characterized by the presence of proteinaceous deposits in the brain described as amyloid on the basis of tinctorial properties. Substantial evidence indicates that aggregation of β -amyloid ($A\beta$) peptides ($A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$) resulting neuronal toxicity probably play a causative role in the etiology of AD.

Past studies of the kinetics of $A\beta$ polymerization, utilizing turbidity, sedimentation and dye binding, 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. Besides, SPR technology can be conducted to collect kinetic data for rapid binding events of small molecular weight peptide on the seconds time scale. By use of this methodology, the kinetics of $A\beta$ polymerization

inhibited by extracts from Chinese herbs will be studied, this can be offered to develop these compounds into novel drugs for AD therapy.

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

壹、前言

一、簡介

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 β 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 β

或由 α 及 γ 分泌酵素切除之分子量比 A β 蛋白小一點的 3kDa amyloid 產物稱為 p3 蛋白，A β 蛋白及 p3 蛋白皆會自細胞膜上游離出去，其中游離的 A β 蛋白又會自行凝聚成團，形成所謂的老年性斑 (Esler & Walfe, 2001)。

A β 的聚合 (polymerization) 是一種依賴核心形成的聚合反應 (nucleation - dependent polymerization)。A β 在聚合時，可由：(1) 單體的 A β 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 β 的 monomer 或 dimer 之後再與 protofibril 形成 A β 纖維束 (fibril) (Walsh et al, 1997)。

可溶性的 A β 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 β 形成一模版 (template，已聚合形成核心化之 A β 的聚合體稱之) 的組合過程稱為凝集 (aggregation)，而更多的 A β 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 β 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 β 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 β 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 632.8 nm，輸出功率 0.5mW。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 ($D_{Ref.}$) 收集後，參考光 (沒有經過 SPR 系統) 所得的干涉訊號為：

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

其中， $\Delta\Phi = \Phi_p - \Phi_s = 0$ (因 P 波和 S 波為共同路徑)

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 ($D_{sig.}$) 收集後，得到的外差干涉訊號，可寫成：

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

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、 $A\beta$ 凝集反應

將 $A\beta_{1-28}$ (β -amyloid₁₋₂₈, Bachem, Switzerland) 溶於 DMSO (dimethyl sulfoxide, Gaylord, USA)，濃度為 1.2mM， $A\beta_{25-35}$ (β -amyloid₁₋₄₀, Bachem, Switzerland)，存放於 -20°C 溫度下。使用時以三次水稀釋到適當濃度，並維持 DMSO 在反應時均為 0.05%。

將實驗架構的入射角定在以 0.05% DMSO 水溶液的緩衝液做出的反射率曲線之最低點 (72.02 度)，並將製備好的感應片 (上面已固定有以濃度為 600nM 的 $A\beta_{1-42}$ 進行胺基偶合反應後之晶片) 固定於稜鏡耦合系統內，此時反應盒內裝有緩衝液，觀察鎖相放大器讀值當作初始背景值，等待一段時間觀察外差干涉訊號振幅穩定的情形，記錄一段時間後即可將待測物注入反應盒內，進行實驗。

(1) $A\beta_{1-28}$ 凝集反應

將預先配置的 1.2mM $A\beta_{1-28}$ 於測量前十五分鐘前，自冰箱取出，待溶解後，分別配製成反應濃度為 300、600nM 及 1.2 μ M 之溶液，以 pipette 滴入反應盒內，進行凝集反應。

(2) $A\beta_{25-35}$ 凝集反應

將預先配置的 1.2mM $A\beta_{25-35}$ 於測量前十五分鐘前，自冰箱取出，待溶解後，分別配製成反應濃度為 300、600nM 及 1.2 μ M 之溶液，以 pipette 滴入反應盒內，進行凝集反應。

三、緩衝液 pH 值變化的影響

0.05% DMSO 水溶液的緩衝液配製成 pH 值分別為 5.3、8.9 及 10.0，將 1.2 μ M $A\beta_{1-28}$ 以 pipette 滴入反應盒內，進行凝集反應。0.05% DMSO 水溶液的緩衝液配製成 pH 值分別為 8.9 及 10.0，將 1.2 μ M $A\beta_{25-35}$ 以 pipette 滴入反應盒內，進行凝集反應。

四、不同緩衝液下的聚合反應測試

將 1.2 μ M $A\beta_{1-28}$ 及 $A\beta_{25-35}$ 分別以 0.05% DMSO 水溶液及 10mM PBS (phosphate buffer solution), HBS(10mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-iperazineethanesulphonic Acid (HEPES), 0.15M NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05% surfactant P20 adjusted to pH 7.4 with sodium hydroxide) 測試其凝集反應。

五、nicotine 來抑制 $A\beta_{1-42}$ 在凝集反應

將預先配置的 1.2mM $A\beta_{1-42}$ 於測量前十五分鐘前，配製成反應濃度為 600nM 的溶液，進行下面兩個實驗。

- (一) $A\beta_{1-42}$ 以 pipette 滴入反應盒內，反應約 5 分鐘後，將 nicotine 滴入反應盒內，使反應時 nicotine 濃度為 10 μ g/ml，觀察 $A\beta_{1-42}$ 的凝集反應 30 分鐘。
- (二) $A\beta_{1-42}$ 以 pipette 滴入反應盒內，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，在反應盒內分別放置 10 μ M 及 36.33mM 的 nicotine，觀察 $A\beta_{1-42}$ 的解離 30 分鐘。並對 36.33mM 的 nicotine 再進一步觀察 6 小時，看 $A\beta_{1-42}$ 是否持續解離。

六、細胞毒性測試：MTT 試驗

為了瞭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；另外，本次計畫執行中，我們發現 Poly-L-lysine 具有增加 A β aggregation rate 的現象，因此，利用 MTT 實驗加以驗證此特性。12 μ M 的 A β ₁₋₂₈、A β ₂₅₋₃₅、A β ₁₋₄₀ 蛋白各別進行一個小時之凝集反應後處理細胞。12 μ M 的 A β ₂₅₋₃₅ 與 Poly-L-lysine 混和後於 37°C 進行凝集反應 12 小時（控制組為 A β ₂₅₋₃₅ 不加 Poly-L-lysine 單獨於 37°C 進行凝集反應 12 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腺體（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。

七、統計分析

所有實驗均重複三次以上，以三次具有意義代表性的實驗數值計算平均值、標準誤差，統計分析於軟體計畫後以 $P < 0.05$ 視為有意義。

參、結果

濃度為 1.2mM 的 $A\beta_{1-28}$ 及 $A\beta_{25-35}$ 在未聚合狀態下以胺基偶合法 (amine coupling method) 可以固定於晶片上做為鍵合物 (ligand)，結果分別如圖 3 及圖 8 所示。

不同濃度下的 $A\beta_{1-28}$ 蛋白聚合化反應在 pH=5.3 下，可以量測到 120nM 的低濃度反應 (圖 4)，當 pH 值提升後，各個濃度的聚合化反應均減緩下來。比較 1200nM 的 $A\beta_{1-28}$ 在 pH=5.3 信號反應值約為 pH=7.4 的 3.5 倍 (圖 5)。比較在不同 pH 值下的反應速率發現，隨著 pH 值逐漸增加聚合化亦呈現上升反應，在低 pH 值 (pH=5.2) 時聚合化反應明顯有高度提升聚合化反應的現象 (圖 6)，在 pH=5.3 下 1200nM 的 $A\beta_{1-28}$ 更有明顯得速率提升。

不同的緩衝液下，1200nM $A\beta_{1-28}$ 聚合化反應明顯受到影響，以 0.05% DMSO (H=7.4) 下 $A\beta_{1-28}$ 聚合化反應，與 HBS 及 PBS 緩衝液比較，僅有 0.05% DMSO (H=7.4) 有聚合化反應。

$A\beta_{25-35}$ 聚合化反應如圖 9 所示，其信號大小明顯小於 $A\beta_{1-28}$ 在相同條件下聚合化反應，此差異來自於 $A\beta_{1-28}$ 比 $A\beta_{25-35}$ 分子量大，造成的信號變化較大。但是在圖 9 感應圖的曲線明顯不同於 $A\beta_{1-28}$ 所表現，在 $A\beta_{1-28}$ 聚合化反應的曲線上較為和緩逐步上升，而 $A\beta_{25-35}$ 聚合化反應的曲線則呈現出快速直線上升後再平緩的逐漸變化上昇。

以不同的 pH 值下，觀察 1200nM 的 $A\beta_{25-35}$ 聚合化反應，發現在 pH=8.9 的條件下，初期反應信號較 pH=10 為低，但仍呈現上升趨勢，在 pH=10 的條件下，初期有較大反應但隨之信號略為減低後，即無變化。

緩衝液的影響上，0.05% DMSO 與 HBS 均有反應信號，唯 PBS 沒有信號變化。但 HBS 在反應時其 pH 值為 7.4 小於 $A\beta_{25-35}$ 的等電位點 (isoelectric point)，受此影響下蛋白被吸引至晶片表面造成信號上昇。

$A\beta_{1-28}$ 與 $A\beta_{25-35}$ 的反應速率常數計算，是根據前言部分反應速率微分方程式計算而得，在表一中列出 $A\beta_{25-35}$ 及 $A\beta_{1-28}$ 的速率常數與平衡常數。

圖 12 為利用 nicotine 來抑制 $A\beta_{1-42}$ 在凝集反應下的結果，經加入 10 μ M nicotine 後，在抑制劑與 $A\beta$ 作用前訊號先上昇一小段之後開始下降，隨後的曲線上明顯地可以看到連續上昇與下降中逐漸減低下來。從實驗中發現，雖然使用相同濃度進行實驗，但是在加入 $A\beta$ 進行反應時，可能由於以 pipette 滴入的速度與反應槽大小影響擴散到晶片上反應的快慢，可以看到在 nicotine 未加入前，兩

條感應曲線的訊號上昇速率並不相同。nicotine 對 $A\beta$ 解離反應，由 $A\beta_{1-42}$ 的凝集經由 600nM $A\beta_{1-42}$ 先反應三十分鐘後，以 10 μ M 及 36.33mM 的 nicotine 解離之。

圖 13 中，可以看出兩者的解離過程在前十五分鐘時，36.33mM 的 nicotine 約為 10 μ M 的兩倍。之後兩者的差異逐漸變小。為了解 36.33mM 的 nicotine 是否能繼續對 $A\beta$ 進行解離，所以繼續觀察解離反應 6 小時(圖 14)。結果發現，在這 6 小時的時間裏訊號的變化落在系統穩定度變化範圍內(圖 15)，所以 36.33 mM 的 nicotine 對 600nM 的 $A\beta_{1-42}$ 的解離反應，應該可以三十分鐘內完成。

圖 16 中可看出，在相同 condition 之下 $A\beta_{25-35}$ 對細胞造成的毒性明顯大於 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-28}$ ，而圖 17 中，與 Poly-L-lysine 混和進行凝結反應的 $A\beta_{25-35}$ 其毒性明顯提高。

肆、討論

A β 蛋白在 C-端的 10 個 residue 與第 17 到 21 個 residue 具有最大的疏水性 (hydrophobicity)，從第 28 到 42 個 residue 表現出 β -sheet 的結構，從第 9 到 21 個 residue 則可能表現出 α -helix 或 β -sheet 的構形 (conformation) (Soto, 1994)。在實驗中所用得 A β_{1-28} 與 A β_{25-35} 兩種 A β 蛋白分別具有不同的構型基礎，A β_{1-28} 的構形可能兼具有 α -sheet 與 β -sheet 的結構，A β_{25-35} 則具有高度的 β -sheet 結構。

在固定 A β_{25-35} 及 A β_{1-28} 到晶片的過程中，由於 A β_{1-28} 屬於中性蛋白，而 A β_{25-35} 偏向鹼性 (pI=8.6)，因此固定時僅以 pH7.4 緩衝液即可讓 A β_{25-35} 帶正電，快速吸引到晶片表面與連結層 (linker) 產生共價鍵結。同時在進行聚合化反應時也必須考慮到蛋白質本身帶電的電性是否會因為與連結層位活化分子之間產生吸引力。因此本實驗中，反應時溶液 pH 值均比蛋白質本身等電位點略高為宜，因此，對應不同序列的 A β ，所使用的 buffer PH 值均略高於其 PH 值。

不同的濃度下的 A β_{25-35} 及 A β_{1-28} 的感應圖，分別表現出不同的趨勢，對於 A β_{1-28} 而言，其聚合化反應明顯比 A β_{25-35} 較為緩和，此推測可能與兩種蛋白質本身構形反應時的變化造成曲線斜率明顯不同。從表一中，比較 A β_{25-35} 及 A β_{1-28} 的結合速率常數，可以看出 A β_{25-35} 較 A β_{1-28} 為高；但是就解離速率常數，A β_{25-35} 與 A β_{1-28} 在 pH7.4 兩值相近，但是當 pH 值降低至 5.3 時，可能因為在酸性溶液中較為容易產生 β 構形，因此其解離速率常數降低。

適當緩衝液條件的 pH 值與離子強度 (ionic strength) 是必須的，在使用的 0.05% DMSO 水溶液對於聚合化反應有較佳的反應條件，但實驗中並未對 PBS 及 HBS 分別降低聚合化反應之因有更進一步實驗結果，較為感到遺憾。

nicotine 是香煙的煙霧中主要成份，其正被研究作為臨床上治療阿滋海默氏症之用 (Wilson et al.,1995)，同時對 A β 所引發的神精毒性具有保護的作用 (Kihara et al.,1997)。在 nicotine 抑制 A β_{1-42} 的凝集實驗過程中 (圖 12)，600nM A β_{1-42} 加入 nicotine 後訊號即快速減低下來，此說明 nicotine 能夠加強 β -sheet 轉變為 α -helix 結構的作用而影響聚合 (Salomon et al., 1990)，並減緩 A β_{1-42} 纖維束形成的速率 [Moore et al.,2000]，之後的曲線呈現出在反覆的升降中逐漸減低訊號，推測是由 nicotine 與部分的 A β_{1-42} 上 α -helix 構造的結合，達到抑制 α -helix 轉化成 β -sheet 的過程 [Zagorski et al.,1999]；或由 nicotine 與俱可溶性的小分子 β -sheet 構造之 A β_{1-42} 結合，阻過了 A β 聚合 (aggregation) 的生成 [Zeng et al.,2001]；圖 13 中，nicotine 對已凝集的 A β_{1-42} 能夠快速的解離，可

能也是 nicotine 加強 β -sheet 轉變為 α -helix 結構的作用而抑制 A β 初期聚合反應。雖然對於 nicotine 在 in vivo 下是否對 A β 具有抑制聚合的效果仍屬未知；尼古丁的影響是對交感及副交感神經的刺激，會帶來心血管疾病，使血壓及心跳增加，肌肉放鬆，並增加腸胃蠕動及分泌。經過長時間持續性吸收後會產生依賴性，而當突然停止時則會產生後遺症狀 (Withdrawal symptoms)。新的證據顯示尼古丁刺激老鼠體內新的血管組織生長，也暗示了尼古丁會增加癌症跟心臟疾病的發生。相對的，這或許也暗示了尼古丁可以幫助帕金森氏症 (Parkinson's disease) 與阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease) 等疾病的治療。它將使用在局部的組織以促進血管的生長，中風、帕金森氏與阿茲海默氏症等疾病都能從血流供應量的增加而得到助益。因此使用尼古丁來治療將是種肯定的答案。另外，阿茲海默氏症病患腦部其尼古丁受體的水平較為低下，尼古丁受體分為兩種亞型：神經型和肌肉型。神經型尼古丁受體廣泛分佈在中樞神經和自主神經系統中。在自主神經系統中，尼古丁受體表達和分佈在神經節中，它的活動支配著交感神經和副交感神經的興奮及抑制，對整個身體與外界環境的平衡起著極大作用。尼古丁受體受損將導致心腦血管、呼吸系統、消化系統和泌尿生殖系統廣泛紊亂。神經型尼古丁受體的實質是細胞膜跨膜離子通道，其在機體內的表達極為複雜。臨床上，Nicotine 可以改善記憶力 (immediate free recall)、反應時間 (reaction time) 及視覺注意力 (visual attention) [Newhouse, P.A. et al. (1988) *Psychopharmacology* 95, 135]。

本計劃中對於初生態 (nascent state) A β 蛋白利用 Nicotine 抑制其聚合化，抽菸者平均體內的血漿濃度為 10~50ng/ml (0.062-0.31 μ M)，在吸煙下可再升高至 30~150ng/ml (0.18~0.90 μ M) [Benowitz, N. L. (1990) *Pharmacokinetic Considerations in Understanding Nicotine Dependence*, John Wiley and Sons, New York]，因此體內濃度均小於 1 μ M，若使用高濃度 Nicotine 作為臨床治療藥物確有其他如毒性等考量的必要。然而，實驗的目的在於避免 A β 蛋白聚合化造成老化斑 (plaque) 形成後，導致腦部神經細胞的死亡，若能抑制 A β 蛋白聚合化無疑的將減緩或停滯病症的惡化，如此方可以控制阿茲海默氏症的病情。反觀於 Nicotine 對於改善尼古丁受體低下，並不能解決 A β 蛋白聚合化造成的細胞毒性，因此將無法停滯病症的惡化，最後仍將在大腦皮質及海馬迴等腦部區域造成大量細胞死亡。

伍、結論與建議

本計劃中，對 $A\beta_{25-35}$ 及 $A\beta_{1-28}$ 的聚合化反應分別量測出速率常數與平衡常數，可以看到不同構型的 $A\beta$ 片段造成聚合化反應速率的差異，對於不同片段中的 amino acid 扮演在聚合化時動力學角色，可以再以取代不同位置的 amino acid 以取得聚合反應更確切機制。

$A\beta$ 聚合化屬於核心依賴型反應 (nucleation-dependent process)，對 $A\beta_{25-35}$ 及 $A\beta_{1-28}$ 的聚合化反應時，所使用的濃度可以低至 120nM ($A\beta_{1-28}$)，此將對 in vitro 下 Ab 聚合化反應所需臨界濃度朝向一個更低濃度的範圍。

對於以 SPR 生物感知器所量測出對 $A\beta_{25-35}$ 及 $A\beta_{1-28}$ 的聚合化反應速率，目前文獻中並無相關論文可以提供比較，但也因此顯示出此種量測技術的重要性，可以在低濃度與低分子量的條件下量測生物分子間即時反應動力的特性。

為了更進一步瞭解 $A\beta_{1-28}$ 和 $A\beta_{25-35}$ 的聚合化反應，本研究進行多通道 SPR 生物感知器，同時進行：(1) $A\beta_{1-28} - A\beta_{1-28}$ (2) $A\beta_{25-35} - A\beta_{25-35}$ 的反應動力等常數的量測。主要原因是 $A\beta_{1-28}$ 可能是 α -helix 和 β -sheet 混和體，然而 $A\beta_{25-35}$ 則可推論為 β -sheet 的結構，如能在 Ab_{1-28} 的聚合化反應過程中介入例如 Nicotine，而能引起 $A\beta_{1-28}$ 進行 α -helix 或 β -sheet 轉變 (conformation)，由於可假設 Ab (α -helix) 的 specific hydrophobic interaction 遠小於 $A\beta$ (β -sheet)，因此 Nicotine 介入應可清楚觀察到 $A\beta_{1-28}$ 聚合化反應過程中的二次結構的改變 (conformation)，而能配合理論進一步瞭解 $A\beta$ 蛋白的聚合化反應，相反的 $A\beta_{25-35}$ 已形成 β -sheet，則在 Nicotine 的介入下應保持不變。由 $A\beta_{1-28}$ 或 $A\beta_{25-35}$ 中觀察其動力學的變化則更能對 Nicotine 如何轉變 $A\beta$ 從 α -helix 轉變成 β -sheet 的機制進行瞭解，如此在進行中草藥例如銀杏及九層塔等是否可抑制 $A\beta$ 類澱粉蛋白聚合化反應，實驗中所需設計同時量測蛋白質聚合反應：

$A\beta_{1-28} \quad \text{--} \quad A\beta_{1-28}$	$A\beta_{25-35} \quad \text{--} \quad A\beta_{25-35}$
$A\beta_{1-28} \quad \text{--} \quad A\beta_{1-28}$ + (Nicotine)	$A\beta_{25-35} \quad \text{--} \quad A\beta_{25-35}$ + (Nicotine)

由 conformation 所引起的聚合化反應應是本研究計畫的主要關鍵以及主要的研究課題，這將是進一步申請後續研究計畫的主要方向，期望能獲得補助完成此一 $A\beta$ 蛋白聚合反應動力學的基礎研究以及中草藥對抑制 $A\beta$ 蛋白聚合的精密度量測。

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 CCMP93-RD-055 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

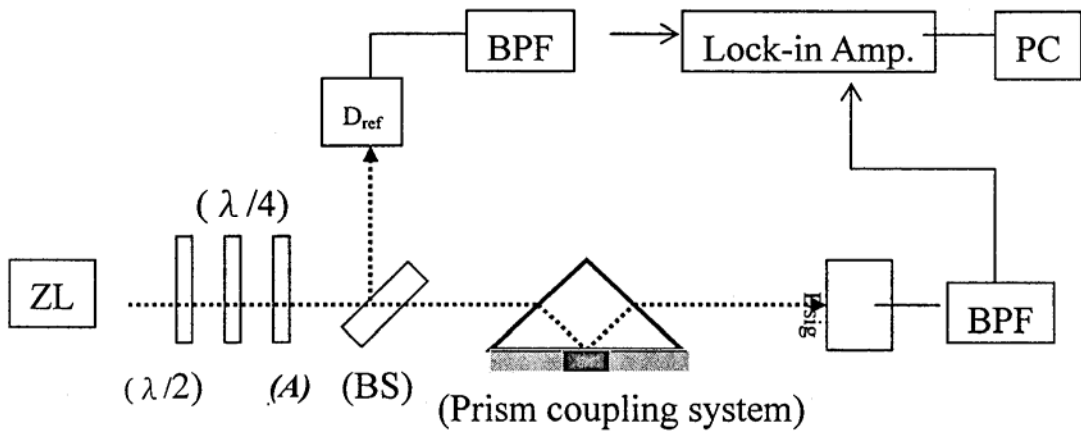
陸、參考文獻

1. Ashall N, & Goate AM (1994) Role of the β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Trend Biochem. Sci.* 19: 42-45.
2. Checler F (1995) Processing of the β -amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 65: 1431-1444.
3. Chibata I (1978) *Immobilized Enzymes- Research and Development.* Chap.2, John Wiley, New York.
4. Esler WP, Wolfe MS (2001) A portrait of Alzheimer's disease- new features and familiar faces. *Science* 293(24): 1449-1454.
5. 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.
6. Hardy J (1997) The Alzheimer family of disease: many etiologies, one pathogenesis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:2095-2097.
7. 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.
8. Jarrett J, Berger EP, & Lansbury Jr. PT.(1993b) The carboxy terminus of β -amyloid protein is critical for seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem.* 32:4693-4697.
9. Johnsson B, Lofas S, & Lindquist G (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran -modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analy. Biochem.* 198:268-277.
10. 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.
11. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, et al (1997): Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann Neurol* 42:159-163.

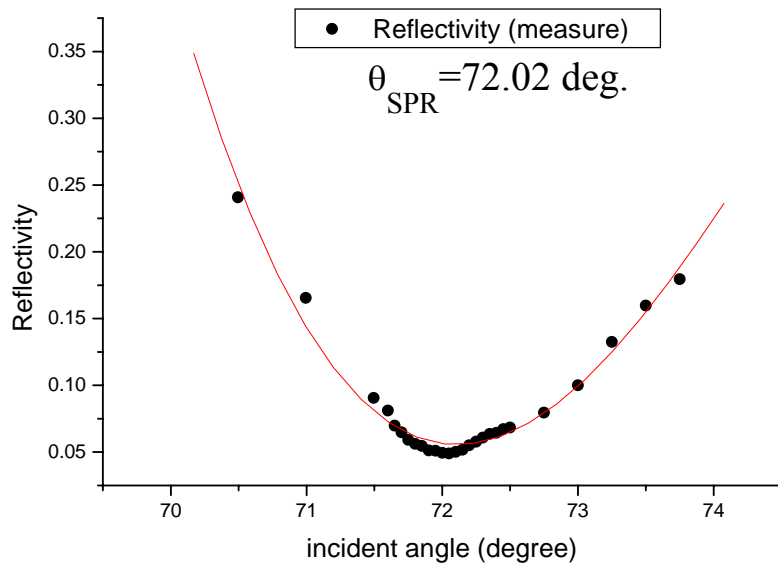
12. Lorenzo A, Yankner BA (1994) β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo Red. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 12243-12247.
13. Moore S, Davies Y, Gilson G (2000): Do inhibitors of beta-amyloid aggregation also inhibit the aggregation of other amyloid-forming peptides? Neurobiol Aging 21:S54.
14. Myszka DG, Wood SJ, & Biere AL (1999) Analysis of fibril elongation using surface plasmon resonance biosensors. Methods in Enzymol. 309, 386-402.
15. Patel N, Davies MC, Heaton RJ, Roberts CJ, Tendler SBJ, & Williams PM (1998) A scanning probe microscopy study of the physisorption and chemisorption of protein molecules onto carboxylate terminated self-assembled monolayers. Appl. Phys. A 66:S569-s574.
16. Pike CJ, Burdick JD, Walencewicz AJ, Glabe CG, & Morphy RM (1993) Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. J. Neurosci. 13: 1676-1687.
17. Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. Cell 6: 487-498.
18. Selkoe DJ (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotype, and treatments. Science 275: 630-631.
19. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol. Rev. 81(2): 741-766.
20. Salomon AR, Marcinowski KJ, Friedland RP, and Zagorski MG (1996) Nicotine Inhibits Amyloid Formation by the β -Peptide. Biochemistry, 35, 13568-13578
21. Soto C., Branes M., Blake C (1994). The molecular basis of amyloidoses. J. Neurol. Chem. 218: 149-16.
22. Stenberg E, Urbaniczky C et al.(1991) Quantitative determination of surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. Journal of Colloid and interface science. 143(2): 513-526.
23. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, & Teplow DB (1997) Amyloid β -protein fibrillogenesis. J. Biol. Chem. 272(75): 22364-22372.

24. Wilson AL, McCarten JR, Langley Lk, et al (1995): Transdermal Nicotine Administration in Alzheimer's Disease: Effects on Cognition, Behavior, and Cardiac Function. New York:Wiley.
25. Wisniewski T, Ghiso J & Rogers J (1994) Alzheimer's disease and soluble A β . Neurobiol. Aging 15(2): 143-152.
26. Zagorski MG (1999): The molecular mechanisms of amyloids in Alzheimer's disease. In: Snyder JK, Cooper R, editors. The Biology-Chemistry Interface, Vol 14. New York: Marcek Dekker, 397-430.
27. Zeng H, Zhang Y, Ping LJ, Shao H, Menon NK, Yang J, Salomon AR, Freidland RP, Zagorski MG (2001): Nicotine and amyloid formation. Biol Psychiatry 49:248-257.
28. 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）。
29. Grigshy J. ,Blanch H. , Prousnity J. .(2002): "Effect of secondary structure on the potential of mean force for poly-L-lysine in the a-helix and b-sheet conformations". Biophysical Chemistry 99 (2002) 107 – 116
30. JOHN GOERS, VLADIMIR N. UVERSKY, ANTHONY L. FINK." Polycation-induced oligomerization and accelerated fibrillation of human α -synuclein in vitro". Protein Science (2003), 12:702 – 707.
31. Benowitz, N. L.(1990) Pharmacokinetic Considerations in Understanding Nicotine Dependence, John Wiley and Sons, New York
32. Newhouse, P.A. et al. (1988) Psychopharmacology 95, 135".

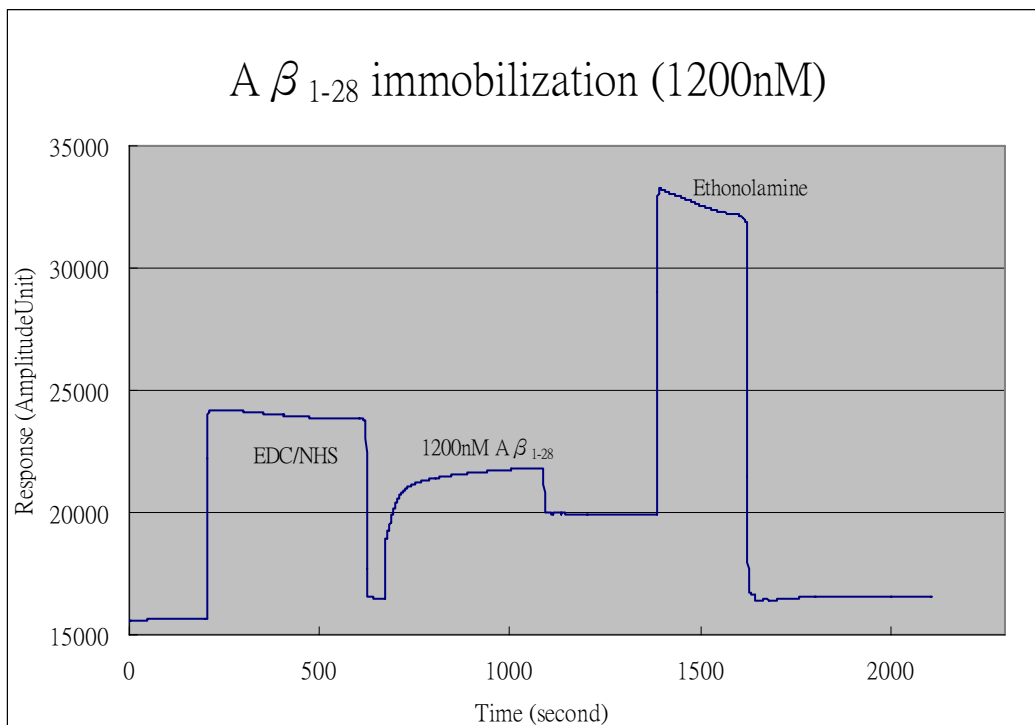
柒、圖表



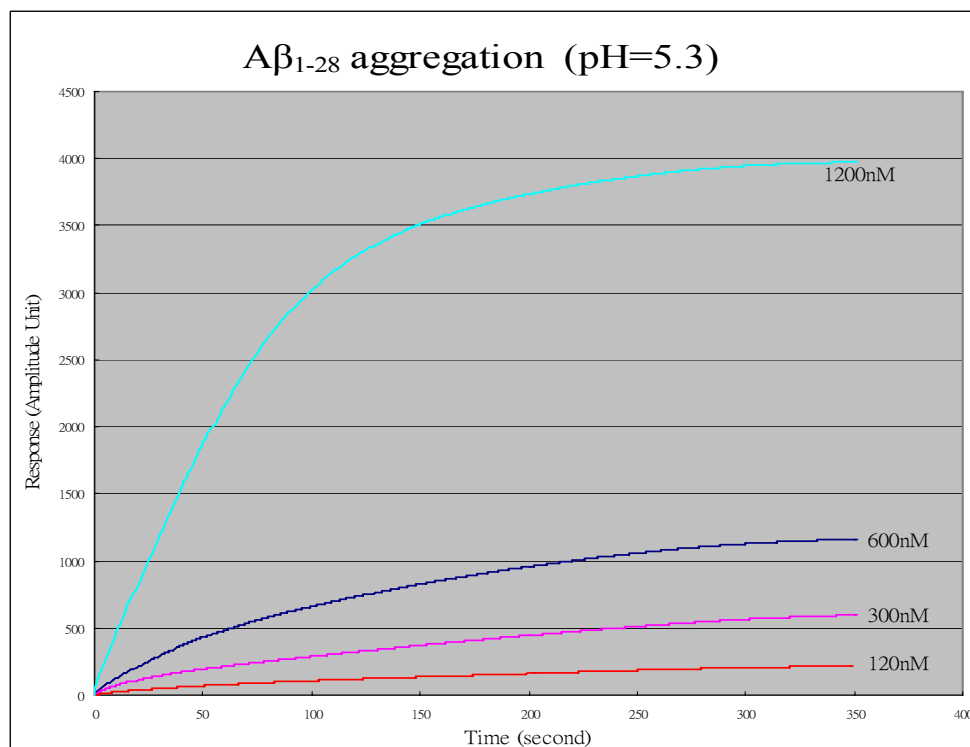
圖一、SPR 生物感測器量測系統



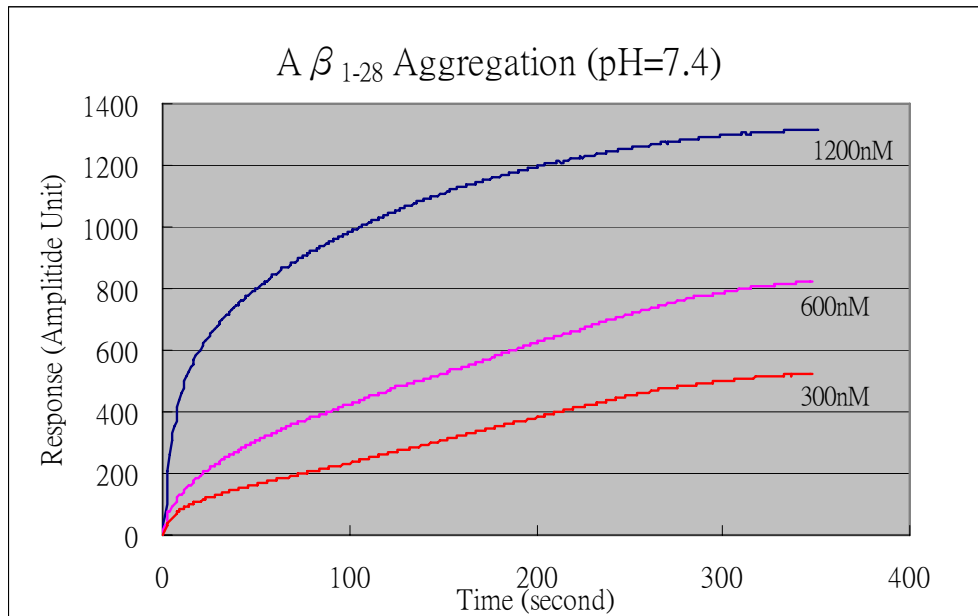
圖二、測量緩衝液共振角所得的反射率最低點之曲線



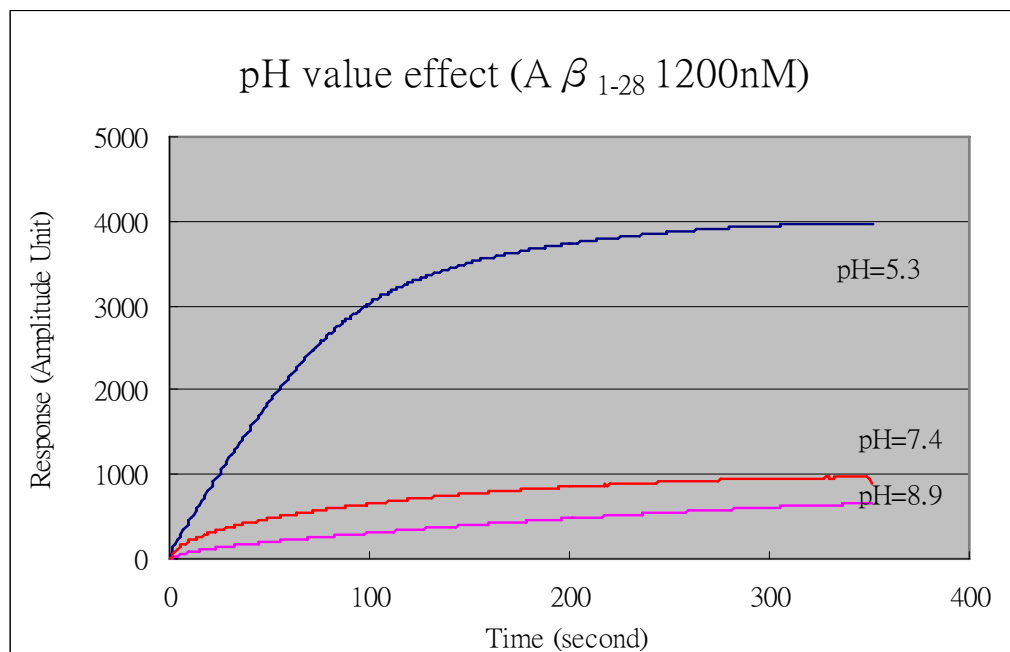
圖三



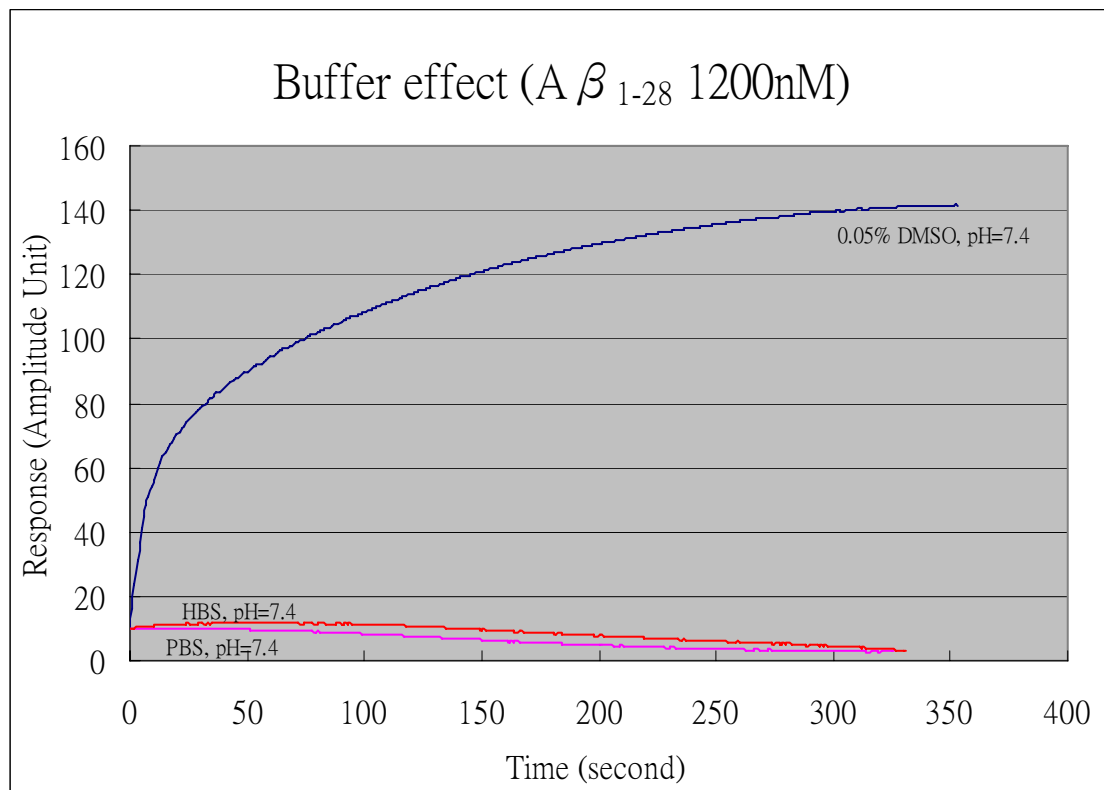
圖四



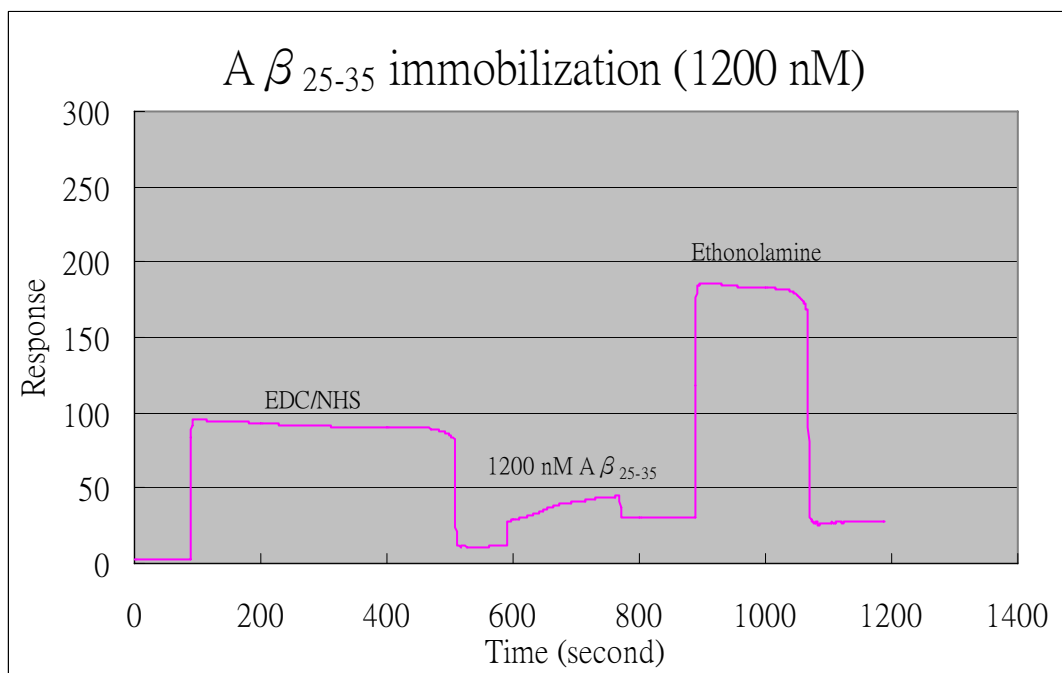
圖五



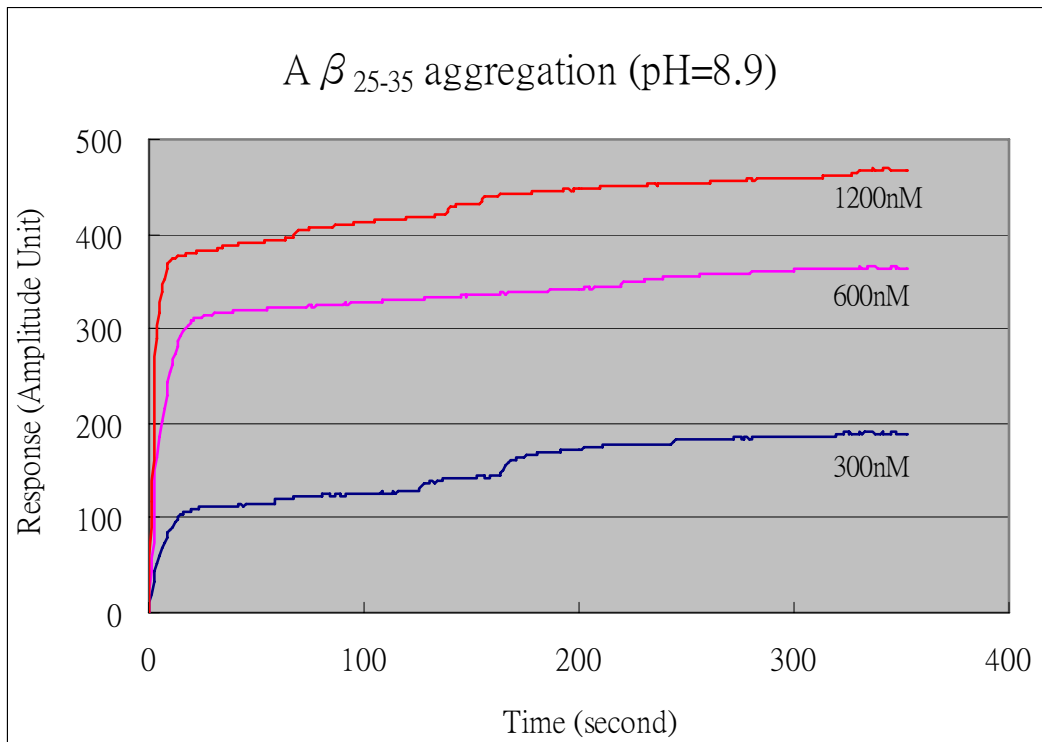
圖六



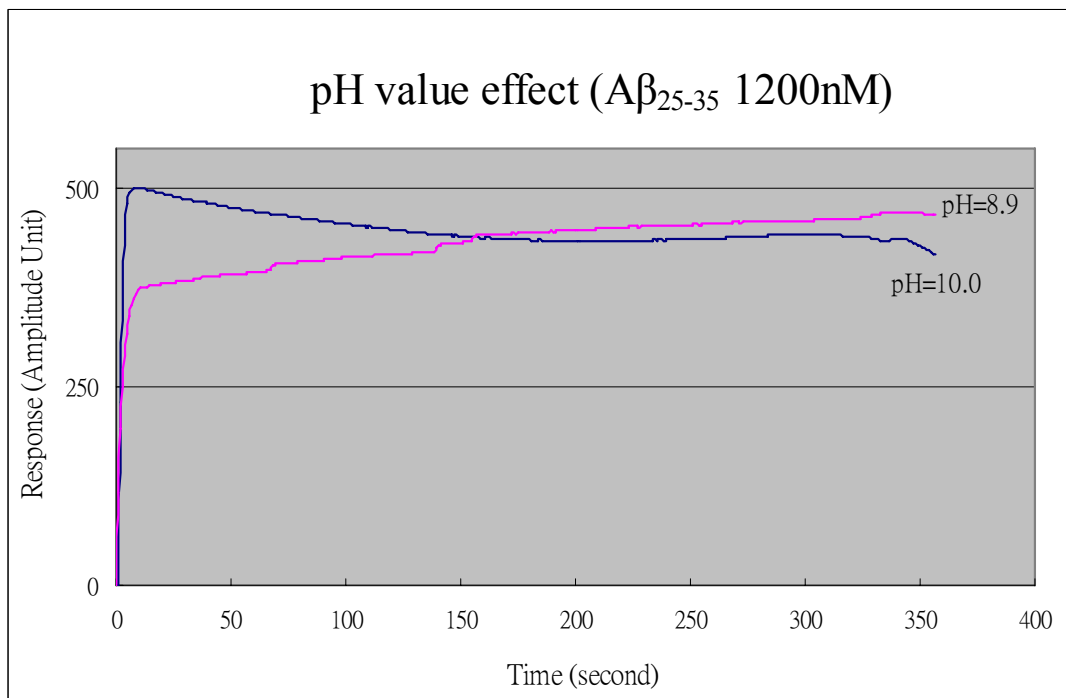
圖七



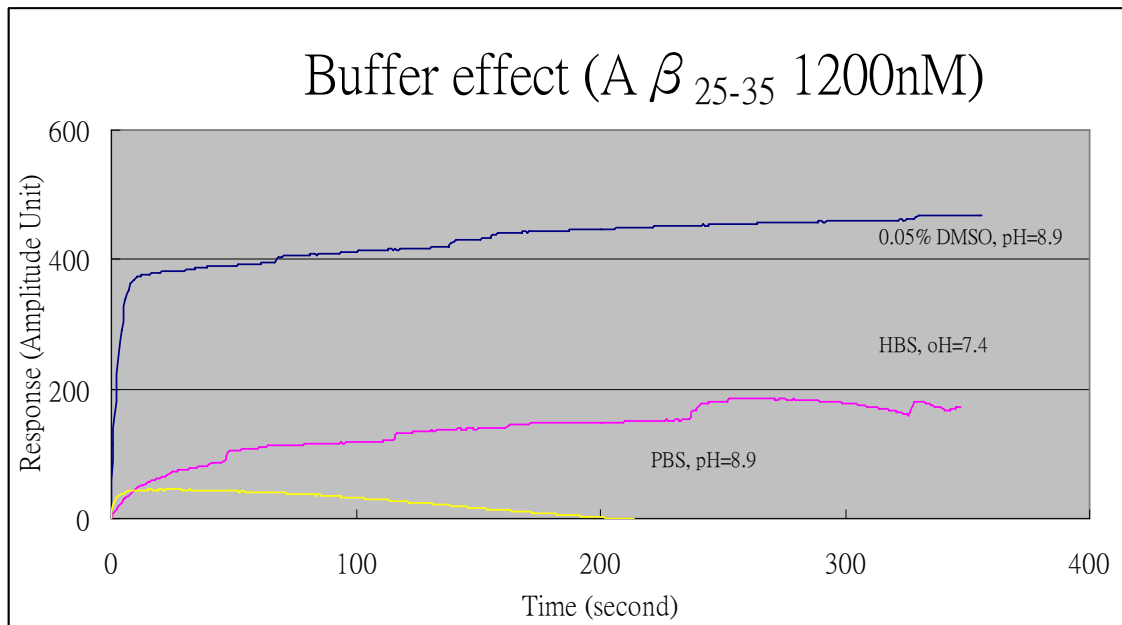
圖八



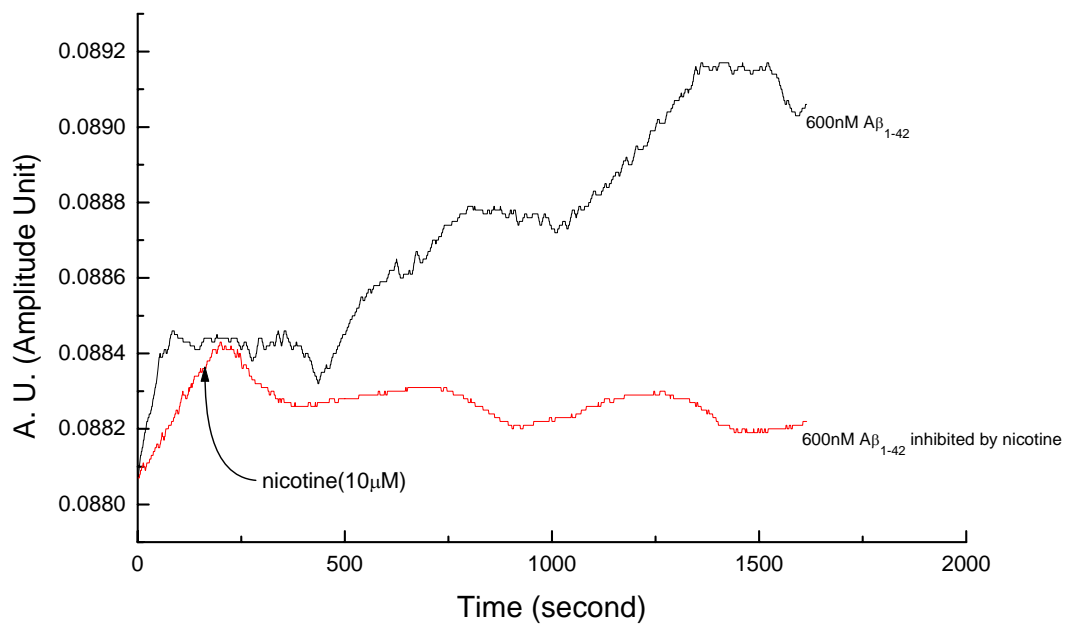
圖九



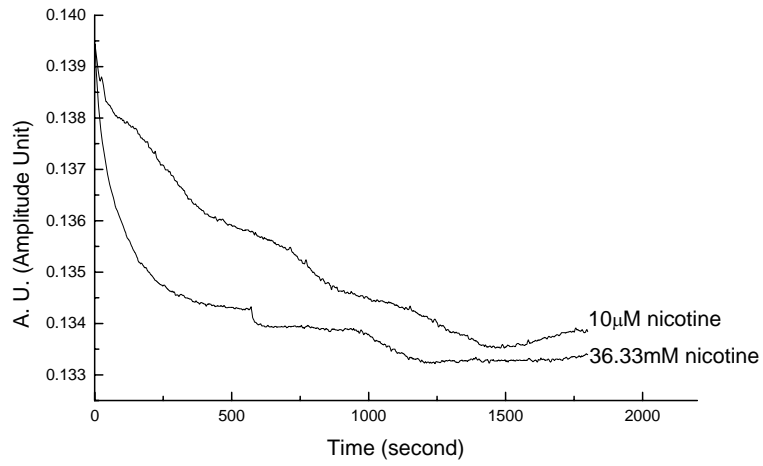
圖十



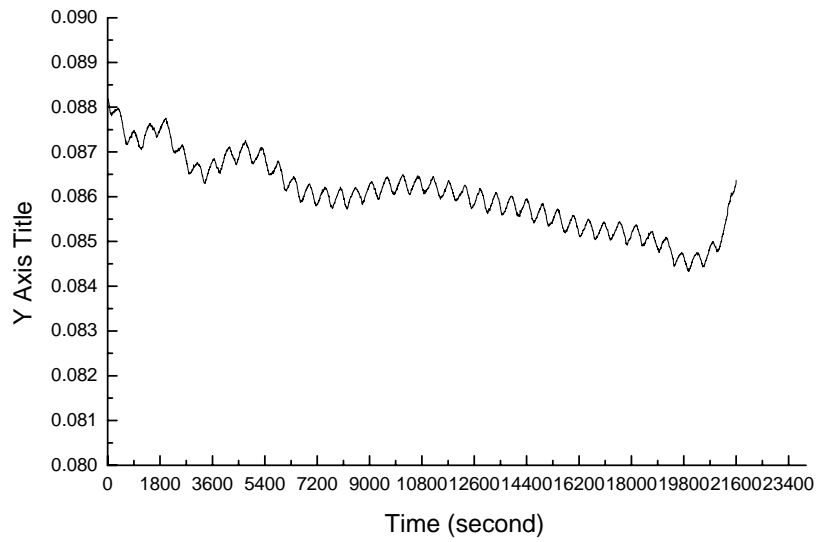
圖十一



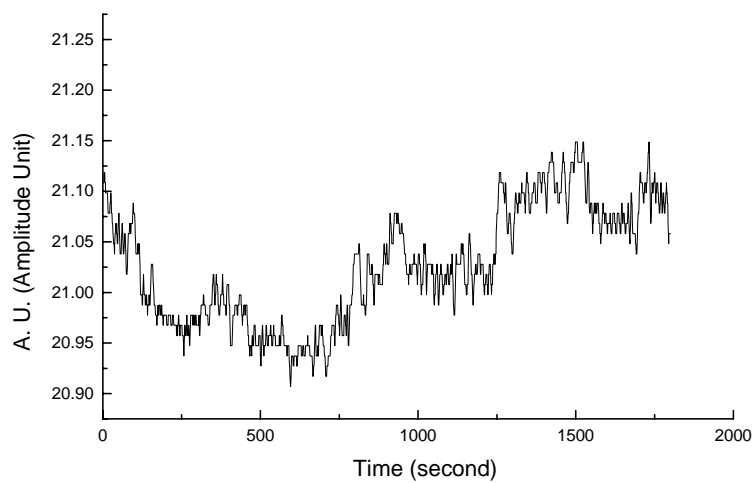
圖十二、10 μ M 抑制 $A\beta_{1-42}$ 進行凝集的感應圖



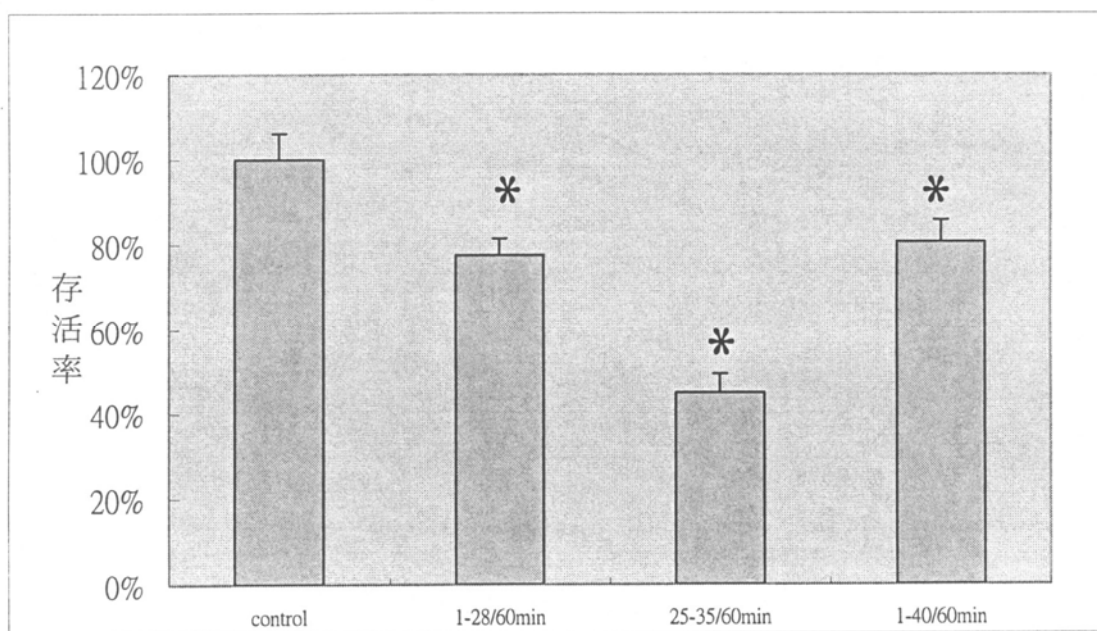
圖十三、以 10μM 及 36.33mM nicotine 解離 Aβ₁₋₄₂ 的感應圖



圖十四、在圖 21 中 36.33mM nicotine 繼續解離 6 小時的感應圖

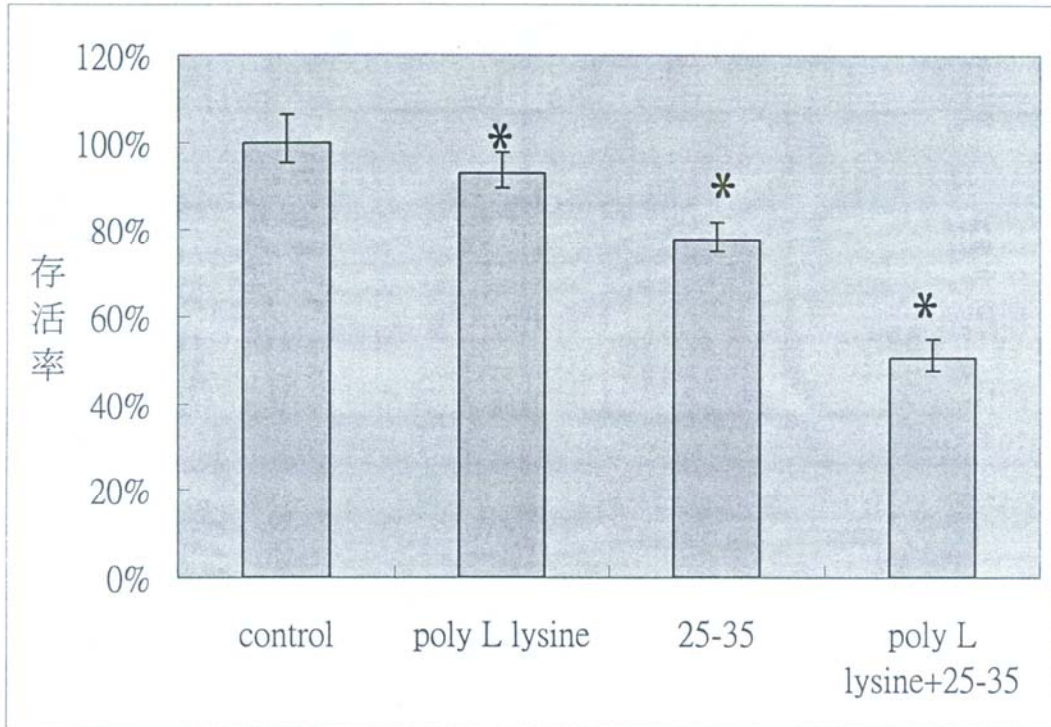


圖十五、系統穩定度量測



*:P-value < 0.05, in comparison with the control culture

圖十六

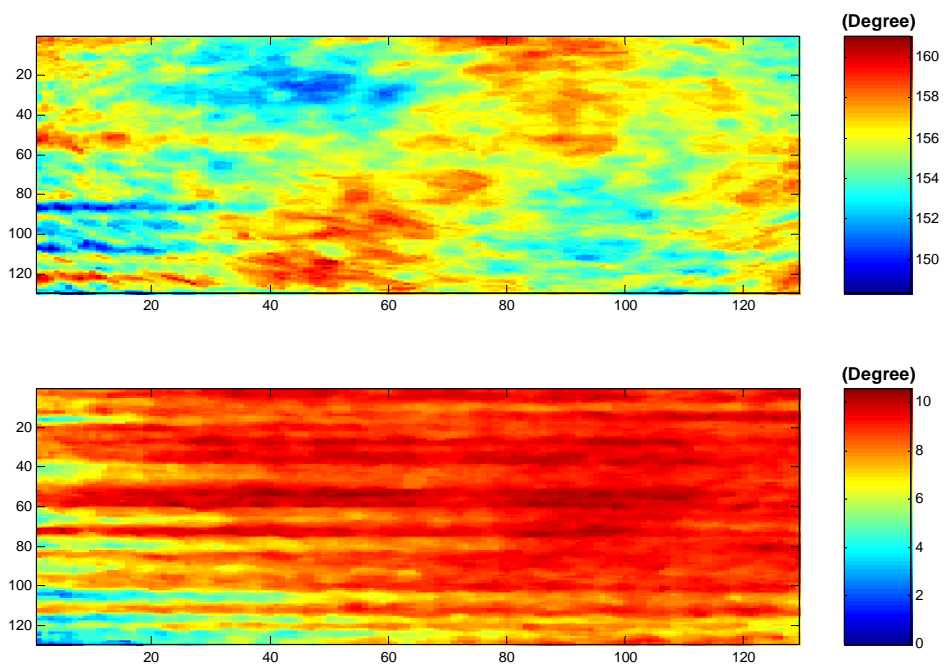


*:P-value < 0.05, in comparison with the control culture

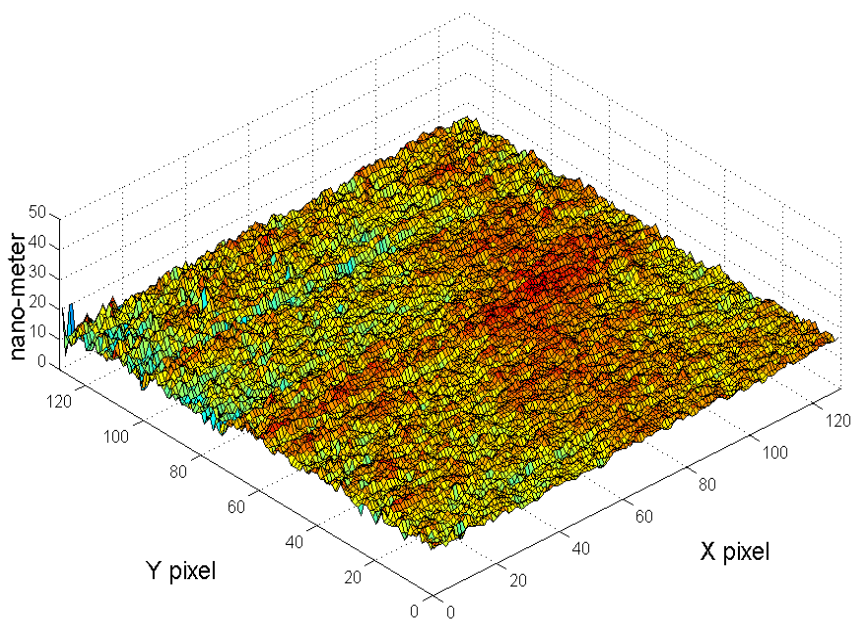
圖十七

表一、 $A\beta_{25-35}$ 及 $A\beta_{1-28}$ 的速率常數與平衡常數

	$A\beta_{1-28}$		$A\beta_{25-35}$
	pH=5.3	pH=7.4	pH=8.9
$k_a(1/Ms)$	$1.20E+04$	$1.30E+04$	$6.80E+04$
$k_d(1/s)$	$9.00E-04$	$7.50E-02$	$7.50E-02$
$K_A(1/M)$	$1.33E+07$	$1.73E+05$	$9.07E+05$
$K_D(M)$	$7.50E-08$	$5.77E-06$	$1.10E-06$



圖十八、70 度入射角之二維橢圓參數分布



圖十九、70 度入射角之 SiO₂ 厚度

(圖十八、十九為本實驗室新建立之 3D 影像擷取圖)

