

## I. 前言：

### 一、癡呆症：

失智症又稱癡呆症（dementia）是一個臨床症候群的統稱，其中又以發病原因加以分類<sup>(1)</sup>：1. 多發性腦梗塞癡呆症（vascular dementia）：由長期高血壓、腦動脈硬化或腦栓塞導致腦部血液供應不足或中風後使腦神經細胞功能受損所引起。2. 外傷引發性癡呆症（trauma dementia）：由於腦部受到外來傷害而直接使神經細胞受到創傷所引起的功能性退化表現。3. 阿茲海默氏症（Alzheimer's disease；AD）：與腦部傷害無關單純為一種老化過程引起的神經功能退化<sup>(2,3)</sup>。

### 二、阿茲海默氏症：

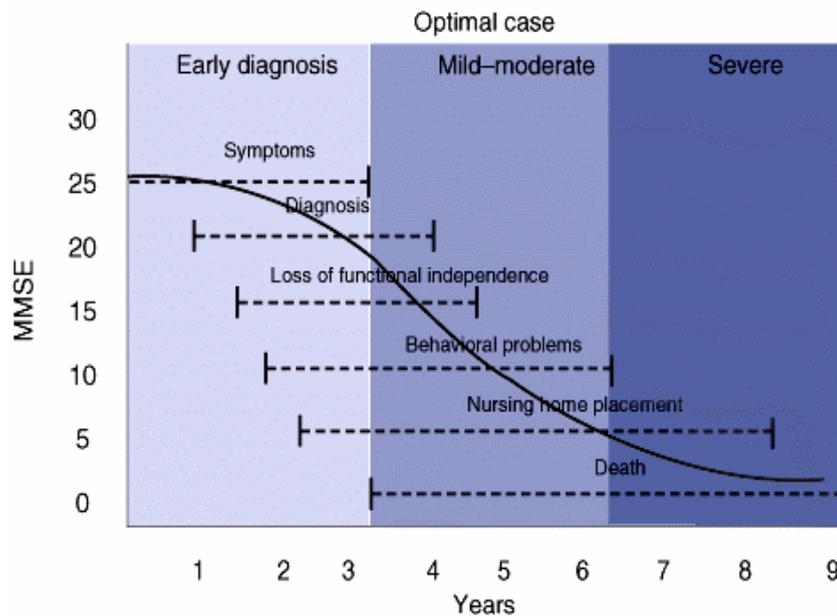
#### 1. 簡介：

阿茲海默氏症約佔所有癡呆症患者的 50~60%<sup>(4)</sup>。在美國，阿茲海默氏症據估計就有超過 400 萬人罹患此病且在成人死因排名第四位，僅次於心臟病、癌症及腦中風，每年需花費 1000 億美元以上來照顧這些患者。更令人怵目驚心的是，若不能即時發展出有效的防治方法，估計全球該病的患者數在公元 2025 年將突破兩千兩百萬，屆時造成的損失恐難以估計。此種腦神經細胞退化屬於漸行性發生，且為不可

逆的進行<sup>(5,6)</sup>。由於初期症狀與伴隨正常老化出現的某些生理及心理狀況相似，因此不易被診斷出來。通常在發病的初期患者並不自知，當發覺症狀到就醫診斷確定為阿茲海默氏症時，其病程可能都已有兩、三年了。

## 2. 臨床症狀：

此病在臨床上常見的初期症狀為記憶力逐漸的衰退如：輕微的忘記，東西常找不到或放錯地方，說話前後不太連貫，而且會重覆某些字眼或動作等。逐漸的，記憶力的減退越來越嚴重而影響社交生活或工作能力，通常在此時才會被家屬、親友或同事所注意。並且其判斷能力、抽象思考、計算能力均會發生障礙，而且個性及舉止上也會有異常的改變。當症狀越嚴重時，常會因方向感喪失而迷路，甚至晚上起來上洗手間時，也會因找不到廁所或無法回到自己的臥房。在情緒方面喜怒哀樂無法正確的表達及突發性的失控，也會誤認朋友及家人及有妄想或幻想及被害的想法。此時，不僅無法工作，連生活起居都需人照顧。在後期一直到嚴重時，會因行動困難最後終於臥病在床。通常自就醫診斷到死亡時間約五到十年甚至更長，引發死亡的主因為生理病徵所導致的營養不良及感染併發症如：肺炎 尿道感染……等<sup>(7,8)</sup>。



- **Typical occurrence of manifestations of Alzheimer's disease.**  
( National history of Alzheimer's disease, 1996. )

### 3. 病理特徵：

阿茲海默氏症又稱老年痴呆症是慢性腦神經細胞退化 ( neuron degenerative disease ) 所造成的疾病。在 1907 年由德國的神經病理學家阿茲海默 ( Alois Alzheimer ) 首先發現<sup>(10)</sup>。在解剖學上，阿茲海默氏症患者與正常人的腦部比較下發現幾項具代表性的特徵<sup>(9)</sup>：1. 大腦萎縮 ( brain atrophy )：在解剖後發現阿茲海默氏症的腦溝較明顯，在神經細胞的數量上隨著發病時間的增加，細胞減少的數目越明顯，平均少於同齡對照組約 50%<sup>(11)</sup>，神經細胞減少的區域包

含了有海馬迴的 CA1 區、邊緣皮質 ( Entorhinal cortex ) 第 2、4 層、相關皮質 ( Association cortex ) 第 3、5 層。(表一、二) 2. 神經細胞內出現許多神經纖維糾結 ( Neurofibrillary tangle ; NFT ) 的現象。3. 神經細胞外出現許多的老年性斑塊 ( Senile plaque ; SP ) 的過量堆積，雖然在大腦皮質也有表現但是最集中的區域是在海馬迴 ( hippocampus ) 以及相鄰的杏仁核 ( amygdala ) 區域聚集最多<sup>(12)</sup>。但此斑塊在腦內的存在是否與神經細胞死有直接的關係，目前正被許多研究熱烈的討論中。

在高等動物裡海馬迴是學習新事物的中心，它可以接收各種感官所傳來的訊息並形成短期及長期記憶，而杏仁核掌控憤怒及恐懼的情緒表現，所以當此區域的神經細胞受損時會即刻的反應在記憶與情緒上。這可說明了阿茲海默氏症患者記憶力逐漸減退且情緒改變的症狀。只是引發神經纖維糾結與老年性斑塊過量堆積的原因至仍無定論，但卻有許多假說成立；在遺傳學上的研究指出阿茲海默氏症有早發性的家族性 ( Family AD ) 的遺傳傾向約佔 10 %，屬於早發性阿茲海默氏症多在 50 歲之前即發病。在這些患者的腦部也發現了  $\beta$ -類澱粉蛋白 ( beta - amyloid protein : 簡稱 A $\beta$  蛋白 ) 的過量表現。

#### 4. 臨床診斷：

阿茲海默氏症的診斷方式，直至目前並無簡便快速的方法。臨床上常用的標準可分為 DSM-IV 與 NINCDS-ADRDA 二種系統（表三、四），可藉由專業評估的方式來將它與癡呆症作區別診斷<sup>(1)</sup>。

#### 5. 阿滋海默氏症的成因與危險因子：

阿茲海默氏症的成因頗為複雜，包含了基因突變、環境因子與個人習性都可能影響該病的發生及進展。目前的研究的方向主要以引發病理特徵的因素為主：

- (1) 類澱粉蛋白過量堆積所產生的老年性斑塊。
- (2) tau 蛋白質磷酸化後所產生神經纖維的糾結表現。
- (3) 血管脂化蛋白 E4 (Apolipoprotein E4 ; APOE4 ) 促進類澱粉蛋白堆積的協同作用<sup>(13)</sup>。
- (4) 早老素 ( Presenilin I、II : PS ) 的過量表現<sup>(14)</sup>。

不少研究已找出與此病相關之危險因子。目前所公認之危險因子有三：

- (一) 年齡：年齡是罹患阿茲海默氏症主要危險因子，其比例隨年齡增加而增加，且女性較男性的罹病率為高。根據

統計，在 60-85 歲之間每增加 5 歲，罹患阿茲海默氏症的人就增加一倍。

(二) 家族史：約百分之五到十的阿茲海默氏症有家族史，如果直系親屬中有人有此症者，則其得病的機會為一般人之三倍。

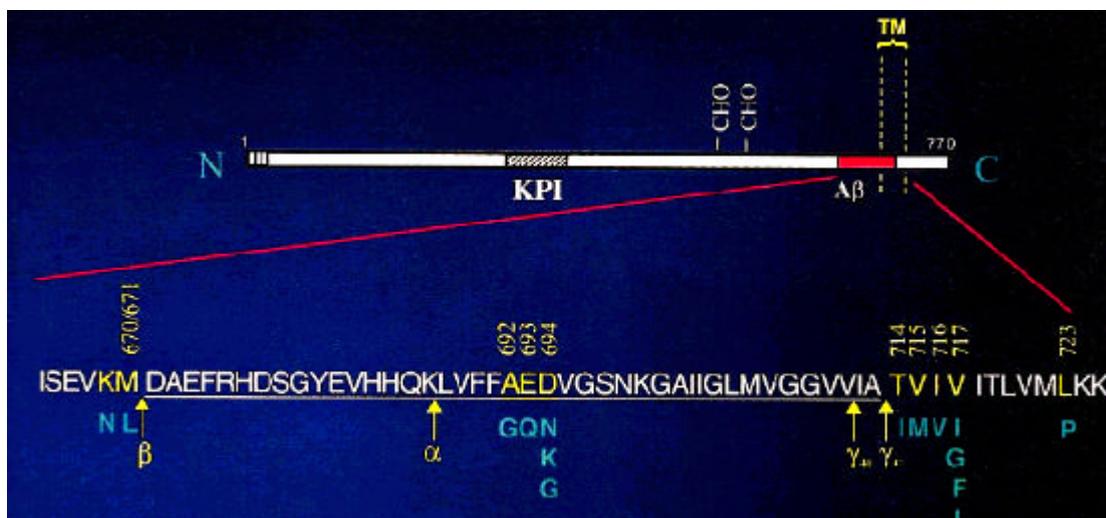
(三) 基因突變：唐氏症候群<sup>(15,16)</sup>、APP、APOE 4<sup>(13)</sup>、PS1<sup>(14)</sup>、PS2 的基因突變都會使得長片段的類澱粉蛋白 1-42、1-43 大量產生而進行堆積<sup>(15)</sup>。其中若  $\beta$ -APP 基因之胺基酸序列的第 670 位置若發生突變（由 Lys 變成 Asp），或第 671 位置突變（由 Met 變成 Leu），會使  $\beta$ -APP 容易被  $\beta$  分泌酵素切除而產生 A $\beta$  蛋白；另外若是第 717 位置突變（由 Val 變成 Phe、Gly 或 Isoleucine），第 692 位置突變（由 Ala 變成 Gly），或是第 693 位置突變（由 Glutamic acid 變成 Glutamine），都會使 A $\beta$  蛋白產量增加，所以遺傳上有  $\beta$ -APP 基因突變者容易早期罹病。而 PS1 的突變多在 50 歲之前即發病，佔家族性阿茲海默氏症（familial Alzheimer's disease; FAD）約 70~80%。（表五）

由於阿茲海默氏症目前仍無有效的治療方法及藥物，所以對於老年化社會除了對於照顧患者的家屬是一項很艱辛的長期奮鬥之外對於整個社會都是一項龐大的成本。

### 三、類澱粉蛋白：

#### 1. $\beta$ -類澱粉蛋白：

老年性斑主要由  $\beta$ -類澱粉蛋白聚集組成。早在 1907 年阿茲海默博士發表此疾病之前，德國的病理學家 Rudolf Virchow 於 1853 年就已注意到這種特殊的斑塊狀的沉澱物，並將此類沉澱物命名為類澱粉斑塊。它除了腦部之外也可在其他的器官如血管、腎臟、尿液……中產生堆積，並引發互不相甘的疾病<sup>(18,19)</sup>。於 1984 年 Glenner 和 Wong 於 AD 患者腦膜血管中發現分子量 4 kDa 的類澱粉蛋白<sup>(20)</sup>。Masker 等人於次年從阿茲海默症患者大腦皮質中的類澱粉沉積斑塊中純化出類澱粉，發現其序列含有 39 至 43 個氨基酸且種類有很多，由不同的氨基酸排列所組成。大部份於 CSF 中類澱粉蛋白 1-40 : 1-42 之比例約為 10 : 1<sup>(21,22)</sup>，造成阿茲海默氏症老年性斑的聚積核心主要以 1-42、1-43 個氨基酸排列所組成的類澱粉蛋白片段居多。

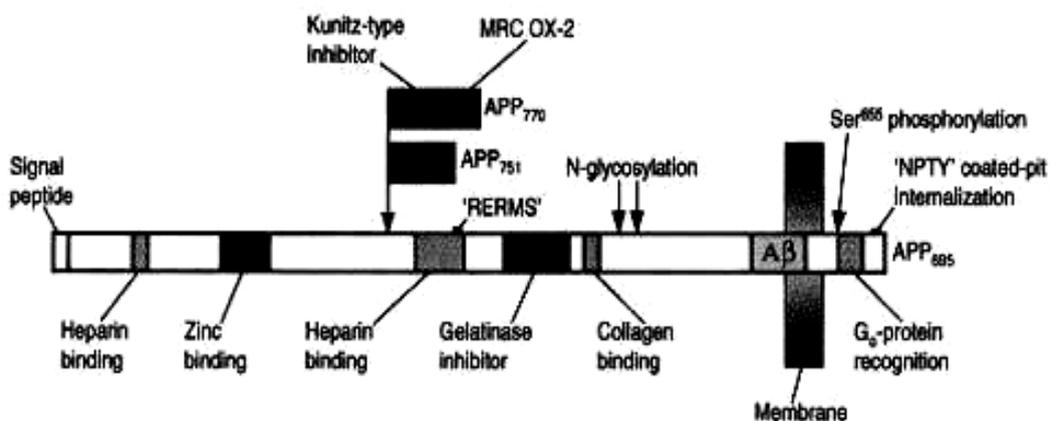


- **Beta-amyloid region of APP, showing the pathologic APP mutation and secretase cleavage sites.** ( Physiological Reviews, 2001 )

## 2. $\beta$ -類澱粉前驅蛋白：

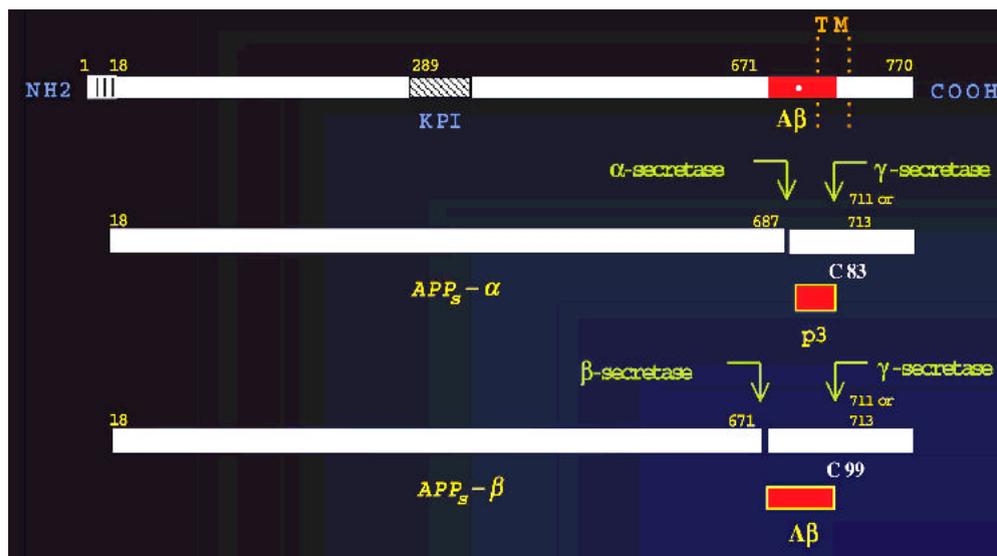
類澱粉蛋白是由其前驅蛋白經由分泌酵素的切割後所產生約 4KDa 的蛋白產物<sup>(38)</sup>，它存在於人體腦脊髓液及血液中並且可在許多的器官中產生堆積，如血管及腎臟並引發病症。而在培養狀態的細胞株可以將類澱粉蛋白分泌到培養基中被測出含量<sup>(39,40,41,42)</sup>。而其中以 1-40 片段的產量較多，但 1-42 片段的聚集能力較強也較易聚集形成不溶性老化斑塊<sup>(43,44)</sup>。Kang 等人於 1987 年分離出類澱粉的 cDNA<sup>(23)</sup>，發現該蛋白乃源自於一含 695 個氨基酸的蛋白質，將之命名為類澱粉前驅蛋白(beta- amyloid precursor protein, 簡稱  $\beta$ APP)。在電泳的分析下可發現此群蛋白質聚合物分子量的分佈約為 110~140 KDa<sup>(24)</sup>。APP 為一穿膜蛋白質，存在不同種類的細胞中，其基因位於第 21 對染色體上，表現出之初級 RNA 經由不同的剪接途徑( splicing )產生不同的 mRNA，並轉譯成不同的蛋白質，主要分為 695、751 及 770 三種不同長度序列，而在 APP 上可被切割出類澱粉蛋白的序列則

位於 C 端部分，穿含於細胞膜之中。其中 APP 695 大量的表現於神經細胞上<sup>(25)</sup>，而 751 及 770 雖在神經細胞上也有表現但主要表現於非神經細胞上佔大多數。而 751 / 770 與 695 之間不同的地方為在胺基酸的組成序列中多了一段 56 個胺基酸組成的片段稱 Kunitz - type of serine protease inhibitor ( KPI )<sup>(26,27)</sup>，在 KPI 的序列上具有參與血液凝集的重要 XIa 因子的序列。除此之外，APP 也可促進細胞間和細胞與細胞外基質(extracellular matrix)間交互作用，其亦可促進神經細胞軸突之延展(neurite extension)，並藉調控胞內鈣離子的平衡而保護神經細胞<sup>(28,29)</sup>。



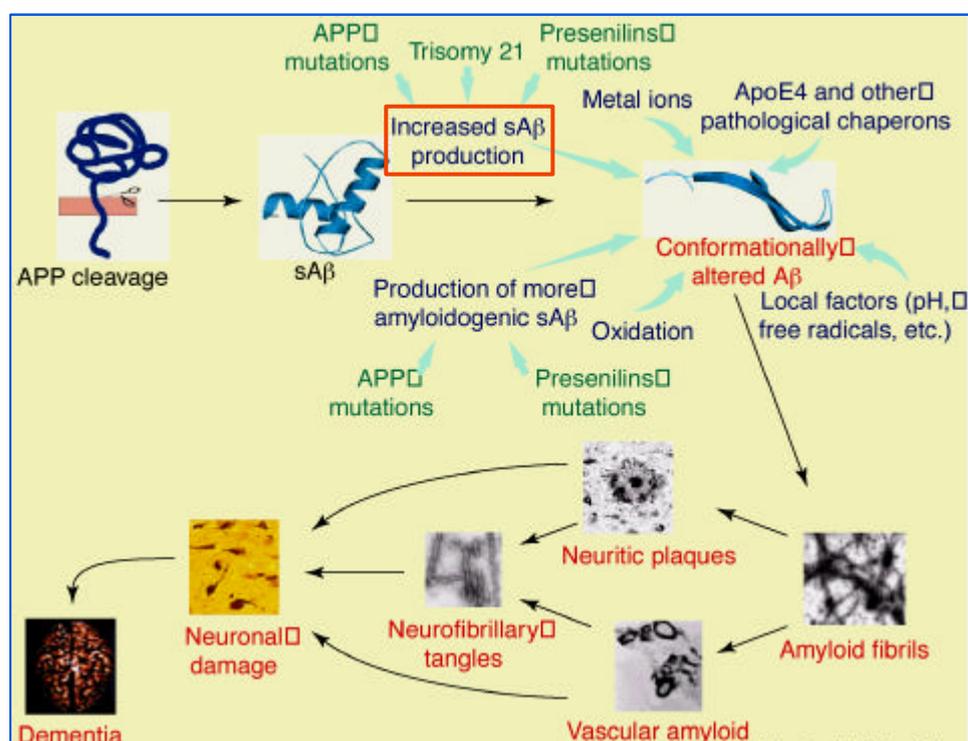
- **Structure of APP types , showing some of the major functional domains.** ( Alzheimer' s Disease Method and Protocol, 2000 )

APP 為穿膜性的蛋白質，絕大部分裸露在細胞外，一小部分嵌在細胞膜內。而類澱粉蛋白的產生即由切割酵素，對 APP 序列上作專一性位置的切割後所產生的片段蛋白。目前已知的類澱粉切割酵素 (Beta Amyloid Cleavage Enzyme; BACE) 有 3 種： $\alpha$ 、 $\beta$  及  $\gamma$  分泌酵素 (Secretase)，而類澱粉蛋白就是經過  $\beta$ -分泌酵素可以切斷連接 671、672 的氨基酸鍵結，及  $\gamma$  分泌酵素對 APP 上 713 附近位置切割後可產生類澱粉蛋白片段。在酵素對胺基酸序列上切割時，除了 1-40、1-42 片段之外也會產生其餘的片段。如 APP 若單被  $\gamma$  分泌酵素切割產生 sAPP 與 p10 kDa 的片段，而 p10 又可被  $\beta$  分泌酵素切割產生 p3 與 p7 片段，其中 p3 為一小片段的類澱粉蛋白。另外，如 APP 若單被  $\beta$  分泌酵素切割產生 sAPP  $\beta$  與 p12kDa 的片段。p12 片段也可再次被  $\gamma$  分泌酵素切割產生類澱粉蛋白與 p7 片段<sup>(30,31)</sup>。這些小片段在



- **Beta-amyloid precursor protein (APP) and its principal metabolic derivatives.** ( Physiological Reviews, 2001 )

腦中雖無聚集的能力，但可以證明不同型態分泌酵素的切割活性表現。當 APP 經過  $\beta$  與 分泌酶 (secretase) 的分解產生各型態的出類澱粉蛋白，其中可溶性的類澱粉蛋白並不具毒性，必須經聚合形成纖維束 (fibril) 後對神經細胞才具有毒性。類澱粉蛋白聚合物存在於腦部時，能活化腦中的微膠細胞 (microglia) 及星細胞 (astrocyte)<sup>(32)</sup>。此反應中會釋放多種神經毒素、致發炎物質、一氧化氮、超氧分子等自由基去攻擊神經細胞<sup>(33)</sup>，造成傷害。類澱粉蛋白在阿茲海默氏症患者腦部中，經由未知的因素協同慢慢的進行堆積而產生斑塊的表現，而誘導此現象的原因及引發阿茲海默氏症的病因及其相關的機轉仍需進一步的研究。



- **Hypothesis of Alzheimer's disease.** (Molecular Medicine Today, 1999 )

## 四、細胞老化：

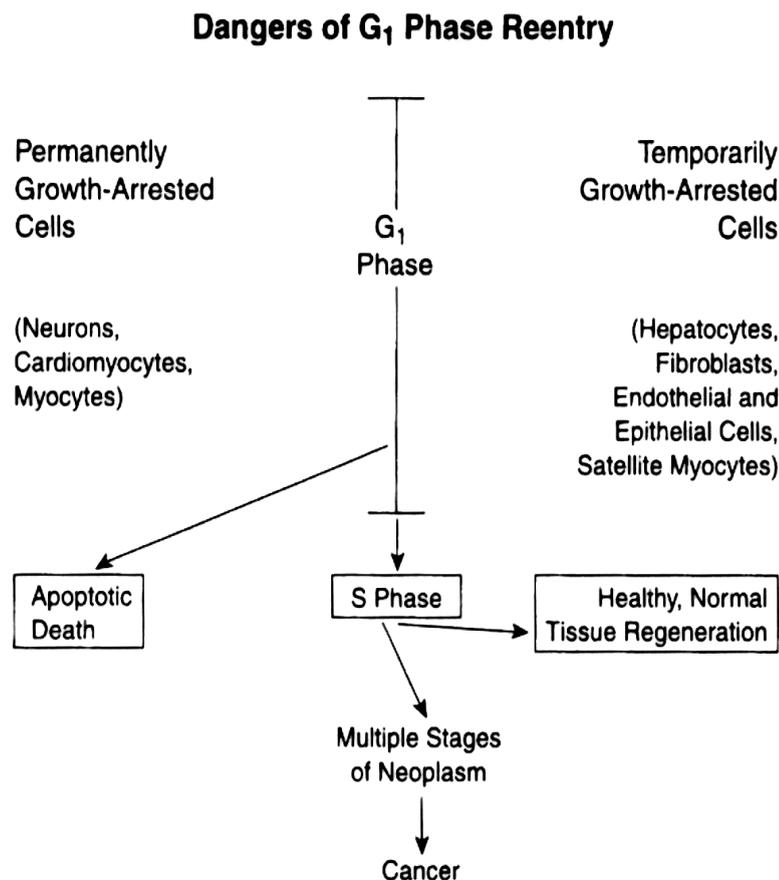
### 1. 老化：

老化可分為正常性的老化（normal or usual aging）與病理性老化（pathological aging）二種。正常的老化是指生理上或心理上沒有罹患明顯的生理疾病，隨著年齡的增長而逐漸出現的衰退老化現象。而病理性的老化是指受疾病侵害引發加速老化的過程，此類型與年齡並非完全相關，最典型的例子就是阿茲海默氏症<sup>(34,35)</sup>。

生命年長衰老是緣由於細胞增長分裂到一定代數後，其增長和分裂速度減慢導致影響正常功能的運作，例如生理上皮膚老化、臟器衰退……等。當細胞在正常的運作下需有養份的供給以執行細胞功能，在同時與體內環境形成一種平衡的新陳代謝狀態。當環境改變或是接受了外來的刺激時細胞會藉由體內調控機轉將蛋白質表現呈現出來。表現出的蛋白質可以反應在細胞週期（cell cycle）的改變上，哺乳動物的細胞週期可分為四階段：G1 期（gap 1 phase）、S 期（DNA replication）、G2（gap 2 phase）、及 M 期（Mitosis），

有些特殊類型的細胞如：纖維母細胞、神經細胞...會長期處於靜止狀態，當受到特定的刺激或訊號時才會使細胞週期產生變動。

當長期處於靜止期的神經細胞的週期產生變動時，可能使細胞導向凋亡的途徑或是停滯表現出老化的狀態。而週期的改變即受到許多激西每與蛋白質的調控所致。



- **Cell type and cell cycle G<sub>1</sub> arrest.** ( Handbook of Aging, 1990 )

## 2. p53 與 p21 途徑：

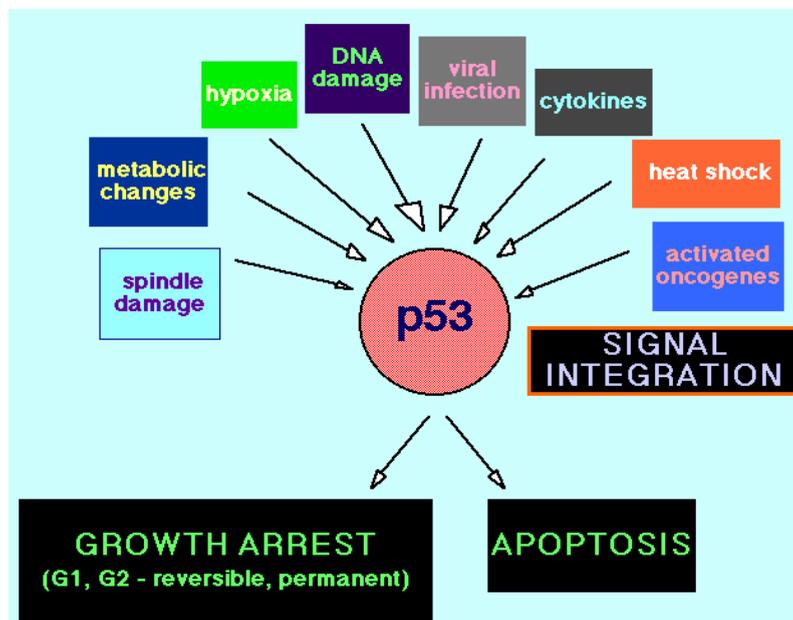
當細胞分裂進行時，為了檢查 DNA 的完整性可將週期停留在 G1、G2，可避免將不正常的 DNA 複製到子代而造成突變，而 p53 即扮演了這個檢查者的角色（check point）<sup>(47,48,49,50)</sup>。p53 基因位於第 17 對染色體上於 1979 年被首度發現，又稱腫瘤抑制基因。其產物為 53KDa 的蛋白質，它對於調節細胞週期的進行與參與細胞凋亡的途徑非常重要。在正常的人體中 p53 的含量很低，當細胞受到外來物質、輻射或自由基的影響，使 DNA 受損時才會促使 p53 蛋白質大量表現，進而讓週期停於 G0/G1 期並進行修補的工作。

當 DNA 無法修復完全時，則促使細胞走向凋亡以維持平衡狀態。而 p53 蛋白質所主導的功能有以下幾種：

1. 刺激 p21 基因發生變動：p21 為推動細胞週期前進的 CDK（cyclin dependent kinase）之抑制性蛋白，當 p21 被活化時可以由抑制 CDK 使細胞週期停滯於 G1<sup>(53,54)</sup>。
2. 刺激 DNA 修補基因表現：當 DNA 受損時會引發 p53 表現增加，阻止細胞進入 S 期並同時促進修補 DNA 的基因產生變動，將不正常的 DNA 在複製之前進行修復，但其機轉至今仍不清楚。

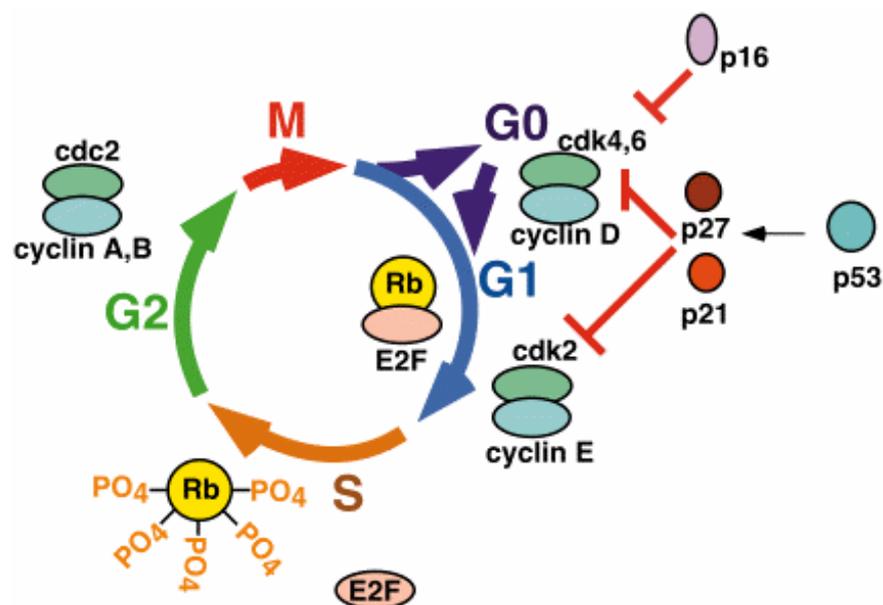
3. 刺激 Bax 基因的表現：當受損的 DNA 無法進行修補時，p53 可促進其下游之一的 bax 表現導致”細胞凋亡”（Apoptosis），使已產生變異且無法修復的細胞死亡。

若已產生變異的細胞無法走向凋亡，則會帶著變異的 DNA 進行複製藉由細胞分裂將錯誤的訊息傳遞到子代而產生許多的疾病，癌症就是一種典型的疾病。p53 的存在可使細胞的複製錯誤減低，並選擇性的將已失去功能的細胞自然的進行淘汰，維護正常的生理功能。



➤ The p53 pathway. ( Mol. Cell. Biochem, 1998. )

p53 之所以可以調節細胞週期進行的原因，是藉由促進其下游 CDK 的抑制性蛋白 p21 蛋白質表現的緣故。在目前的研究中指出當細胞老化時，會減弱或無法進行正常的訊息傳導、新陳代謝……進而表現於生理上產生病徵。在 DNA 損害及老化表現的細胞中，p21 的過量的表現可促使細胞週期停滯，而引發了相關的疾病如：動脈硬化症、阿茲海默氏症、類澱粉沉積症、及關節炎等。所以在老化發生的過程中，當 DNA 受到損害時可促使 p53 蛋白質表現上升，而引發下游 p21 增加，同時使得細胞週期停滯於 G1 導致影響正常功能而表現出老化現象。



- **The p21 pathway.** (Molecular Biology 3th.)

## 五、研究目的：

雖然引發阿滋海默氏症神經老化性表現的原因目前仍無定論。但是綜合以上所述，我們可知類澱粉蛋白所堆積的老年性斑塊為阿茲海默氏症的病理特徵，但類澱粉蛋白的存在是否與神經細胞的老化過程有關目前仍未被探討。

所以我們藉由體外初代培養胚胎大白鼠海馬迴神經細胞添加 10 $\mu$ M 澱粉蛋白 1-42 及以去血清方式刺激永久表現 APP<sub>695</sub> 細胞株後，觀察澱粉蛋白的存在是否會影響神經細胞中可調節細胞週期的 p53 與 p21 蛋白質。以能更深入了解類澱粉蛋白對神經細胞老化的影響，並有助於對阿茲海默氏症的治療。

## II. 材料：

### 1. 細胞來源與處理：

#### (1) SD 大白鼠海馬迴神經細胞初代培養 ( SD primary hippocampus neuron cell culture )：

以體外大白鼠海馬迴神經細胞初代培養模式為材料進行實驗<sup>(56,57,58)</sup>。取懷孕第 18 天之 SD 大白鼠，施以頸椎分離後快速取出胚胎，移於解剖顯微鏡下分離大腦及海馬迴並置於 HBSS buffer ( Gibco ) 中臥於冰上。將海馬迴及腦膜完全分離後以電動吸管以沖吸的方式利用 HBSS buffer 打散海馬迴組織後，將細胞懸浮液以 70  $\mu$  M 過濾篩 ( Faclone ) 過濾。過濾後之細胞懸浮液再以 1500 rpm 離心 5 分鐘後以初次培養基內含：DMEM medium ( Gibco ) 2% B-27 ( Gibco ) 10% 馬血清 ( Hyclone )、1% Penicillin / Streptomycin ( Gibco ) 0.5mM glutamate ( Sigma ) 均勻沖散細胞。

均勻沖散初次培養基內細胞懸浮液後取 150 $\mu$ l 加入細胞染劑 150 $\mu$ l Tryphen blue ( Gibco ) 並混合均勻，靜置 1 分鐘後以毛細管將細胞液注入細胞計數器中在顯微鏡下觀察計

數。其判別方法為核內染上色為死細胞，核發亮代表活細胞為條件下共計數四個視野求其平均值代入公式：

$$\boxed{\text{每 ml 之細胞數為：count} \times 2 \times 10^4}$$

計算出所需細胞數並培養於已 coating Poly-D-Lysin (Sigma) 之培養皿上。於 4 小時後觀察細胞狀況並更換培養基 (為除去 10%HS 之初代培養基)，於 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 條件之培養箱中生長。第三天再次更換培養基 (為除去 10%HS 及 2%B-27 之初代培養基) 後於第四日加藥進行實驗。將神經細胞培養  $1 \times 10^7$  / ml 細胞於 10cm 培養皿或  $4 \times 10^5$  / ml 細胞於 3.5 cm 培養皿後，於 6、12、24、48 及 72 小時加入 10 $\mu$ M  $\beta$ -amyloid (1-42) 後觀察細胞變化。

## (2) CHO cell line :

中國倉鼠卵巢細胞株 (Chinese hamster ovary cell line) 以 DMEM 培養基內含 10%FBS 培養於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 狀態。將細胞於 80% 培養密度時，以去血清之培養基培養 24 小時後再以加入含 10% FBS 培養基觀察 6、12、24、48 及 72 小時後觀察細胞變化。

### **( 3 ) APP cell line :**

為 CHO 細胞株轉入永久表現 APP<sub>695</sub> 基因 ( wide type ) 之細胞株。以 DMEM 培養基內含 10%FBS , G418 選擇下培養於 37 °C , 5% CO<sub>2</sub> 狀態。將細胞於 80%培養密度時以去血清之培養基培養 24 小時後 , 再以加入正常之培養基觀察 6、12、24、48 及 72 小時後細胞變化。

### **( 4 ) $\beta$ - Amyloid ( 1-42 ) 前處理 :**

此實驗所採用之  $\beta$  -amyloid ( Calbiochem<sup>®</sup> ) 為 1-42 片段。將  $\beta$  -amyloid( 1-42 ) 溶於無菌水後 , 置於 37 °C 、 5 天 , 使其老化產生聚集性蛋白質後以 10 $\mu$ M 為投與濃度。

## **2. 儀器 :**

- a. 震盪器。
- b. 照相式光學顯微鏡 ( Olympus , Japan )。
- c. FREEMAX Imago Pro Plus 影像處理軟體。
- d. NIH Image Analysis 影像處理軟體。

- e. 離心機【Microfuge<sup>®</sup> R】( Beckman , USA )。
- f. 真空乾燥機【Savant<sup>®</sup> R】( USA )。
- g. Spectrophotometer ( Beckman , USA )。
- h. Bio-red miniprep gel system ( USA )。
- i. Bio-red wet-transfer system ( USA )。
- j. Map-II gel electrophoresis system ( Japan )。
- k. Flowcytometry ( 5400 , Beckman , USA )。

### 3. 試藥：

- a. 30% $H_2O_2$  ( Merk , USA )。
- b. Alcohol ( Merk , USA )。
- c. Hematoxylin ( Merk , USA )。
- d. DAB ( Sigma , USA )。
- e. 10X PBS ( pH=7.4 ; 2.74g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  , 15.22g  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  , 85g NaCl 溶於 1000ml 水中 )。
- f. Isopropranol GR ( Merk , USA )。
- g. Agarose ( Gibco , USA )。
- h. 100bp DNA ladder ( Gibco , USA )。

- i. MBI protein marker ( MBI , USA )。
- j. Ethidium Bromide ( 10mg/ml )。
- k. ECL-plus ( ENE , USA )。
- l. Film ( Bio-max , Kodak )。
- m. 顯影、定影劑 ( Kodak )。
- n. 化學組織免疫染色試劑組 ( Vector , USA )。
- o. 細胞凋亡偵測試劑組 : ( Cashmere , U.S.A )
- p. P53 抗體 ( Santa-Cruz : Do-1 1:1000 )。
- q. P21 抗體 ( Santa-Cruz : F-5 1:1000 )。
- r. Alpha- tubulin 抗體 ( Santa-Cruz : 1:1000 )。
- s. Anti-mouse HRP 二次抗體 ( Santa-Cruz 1:1000 )。
- t. TTBS ( Tris 36.342g、 NaCl 27g、 Tween 20 3ml dilute to 3 liter )。
- u. Running buffer ( Tris 9g、 Glycin 43.2g 、 10% SDS 30ml dilute to 3 liter )。
- v. Transfer buffer ( Tris 36.36g、 Glycin 43.26g、 Methanol 600ml dilute to 3 liter )。

### III. 方法：

#### 1. 免疫組織化學染色 ( Immunohistochemical stain )：

將第 4 天初代培養海馬迴神經細胞移除培養基後以 PBS 沖洗 5 分鐘 3 次。將細胞以 4% paraformaldehyde 浸漬固定 10 分鐘後以 PBS 沖洗 3 次，細胞浸置於 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 十分鐘以去除內生性因子。加入阻斷試劑 (Blocking agent) 於室溫下反應 30 分鐘，以防止非特異性結合降低偽陽性；相對於對照組，實驗組加 NSE-? (neuron specific enolase – ? primary antibody ; 1:1000) 抗體，於室溫下反應 1 小時，以 PBS 清洗 5 分鐘 3 次後。加入二次抗體 (secondary antibody) 室溫反應 1 小時，加入標誌試劑 ( labeling reagent : streptavidin / peroxidase complex ) 室溫下反應一小時。以 PBS 清洗 5 分鐘 3 次後以 DAB 溶液 ( DAB 0.05g、 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 67 μl 溶於 100ml 1X PB buffer ) 呈色 5 分鐘後以水清洗停止反應。以 Hematoxylin 做核染色並將結果以 Image Plus 影像系統分析。

## 2. 初代培養海馬迴細胞生存率( Tryphan blue 染色法) :

初代培養海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白 6、12、24、48、72 小時後移除培養基。以 0.5% Trypsin/EDTA( Sigma ) 將細胞剝離後，加入含 10 % 胎牛血清之培養基中止反應。將細胞懸浮液移入離心管中，1500 rpm 離心 5 分鐘。以 PBS 均勻沖散初次培養基內細胞懸浮液後取 150 $\mu$ l 加入細胞染劑 150 $\mu$ l Tryphen blue ( Gibco ) 並混合均勻，靜置 1 分鐘後以毛細管將細胞液注入細胞計數器中。於顯微鏡下以核內染上色為死細胞，核發亮代表活細胞為條件下觀察計數。

## 3. 細胞凋亡之偵測 ( TUNEL-like 偵測法 )

初代培養海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白 6、12、24、48、72 小時後移除培養基。以 4 % paraformadehyde 浸漬固定細胞 10 分鐘，加入 Proteinase K 於室溫中放置 20 分鐘，再浸置於 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中 5 分鐘以去除內生性因子之干擾。之後加入已配置的 TdT Equilibration Buffer，放置 30 分鐘；後去除 TdT Equilibration Buffer，加入含 TdT 酵素的反應混合試劑於 37 反應 90 分鐘。接著加入 Stop Solution 反應 5 分鐘，加入 Blocking Buffer 10 分鐘，拭乾後加入 Conjugate

Buffer, 反應 30 分鐘後, 以 DAB 呈色 10 分鐘, methyl green 作背景染色後脫水, 並於光學顯微鏡下觀察並照相。

#### 4. DNA Fragementation :

將細胞剝離後, 以 1500rpm 離心 5mins, 吸除上清液並將細胞彈散。以 PBS 清洗二次後, 吸除上清液, 加入 0.5ml lysis buffer ( 20mM Tris-HCl pH=7.4、 10mM EDTA、 0.2% Triton-X 100 ) 後靜置於冰上 10mins。13000 rpm 離心 10mins。取上清液, 加入 10  $\mu$ l Proteinase K 與 5  $\mu$ l RNase 置於 50 24hrs。加入 1ml ( phenol : chloroform : isopanyl Alcohol = 25 : 24 : 1 ) 振動均勻。13000rpm 離心 10mins。加入等量的 isopropanol 及 1  $\mu$ l glycogen, -20 放置隔夜。將 sample 回溫後, 13000rpm 離心 10mins 去上清液、加入 1ml 絕對酒精後, 13000rpm 離心 10mins 去上清液。加入 1ml 70%酒精後, 13000rpm 離心 10mins。去上清液後冷凍乾燥, 將所抽取之 DNA 以 DDW 溶解後注入 1.5% agarose 待 DNA 分離後, 以 Ethidium Bromide 染色並於 UV 下觀察。

## 5. 西方轉漬法 ( Western blotting ) :

### (A) 蛋白質萃取 :

細胞以 PBS 沖洗 3 次後置於冰上以 0.1%SDS 刮取細胞，保存於-80 。

### (B) 蛋白質定量法 ( Bradford protein assay ) :

#### 甲、標準曲線製作 :

將已知濃度之標準蛋白質溶液 1mg/ml Bovine Serum Albumin ( BSA ) 依序稀釋等倍濃度分別為：0、50、100、200、400  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，由其中各取 20 $\mu\text{l}$  加入 1ml 已 5 倍稀釋的蛋白質染劑 ( Bio-red ) 中混合均勻靜置反應 10 分鐘。利用分光光度計 595 波長檢測吸光值，再利用線性迴歸畫出標準曲線 (  $r^2 > 0.99$  )。

#### 乙、檢體蛋白質定量 :

將萃取之蛋白質檢體置於冰水上，以超音波震動 20 秒後立刻移於冰上靜置 20 秒，重複四次後置入沸水 5 分鐘，快速移於冰上。取上述經沸水處理後的蛋白質 20 $\mu\text{l}$  加入 1ml 已 5 倍稀釋的蛋白質染劑 ( Bio-red ) 中混合均勻靜置反應 10 分鐘。利用分光光度計 595 波長檢測吸光值，再代入標

準曲線中求出檢體的蛋白質濃度。將檢體蛋白質分裝 100 $\mu$ g / tube 以 Savant<sup>®</sup> 濃縮乾燥後保存於-80 。

### **(C) 蛋白質電泳 ( protein electrophoresis ) :**

將已製備 7~10%的 separating gel 注入玻璃夾層中後，上層加水以維持平衡，約 20 分鐘凝膠。將水倒掉加入 stacking gel 插上 comb，待膠凝固後將 comb 移除加入 running buffer 至覆蓋過膠。注入 5 $\mu$ l marker ( MBI ) 及 20~30 $\mu$ g/ well 之檢體蛋白質。通入電流 70 伏特 2.5 小時。

### **(D) 蛋白質轉漬 ( transfer ) :**

於電泳結束後將已分離之蛋白質膠體取出，並截去上層 stacking gel。依正極至負極方向依序疊放：海綿、3M paper、蛋白質膠、已用甲醇溼潤的 PVDF 轉漬膜 3M paper 及海綿，將其組合完成後將以轉漬盒夾緊放入充滿轉漬緩衝液之轉漬盒中 ( Bio-red )，置於 4℃，以 100 伏特轉漬 1 小時。轉漬完成後，取出轉漬膜並於右上方截去一角以作標示，再將轉漬膜浸置於 5 % 脫脂奶/ TTBS 室溫震搖 1 小時。

### **(E) 蛋白質偵測 ( Immunoblotting ) :**

將 Blocking 完成之轉漬膜浸於一次抗體溶液中置於 4 震搖 overnight。以 TTBS 溶液沖洗轉漬膜 10 分鐘三次。加入接有 HRP 標誌之二次抗體後置於室溫下震搖 1 小時以上。以 TTBS 溶液沖洗轉漬膜 10 分鐘三次。加入 ECL 螢光反應劑反應一分鐘，以 X 光片感光呈像，經顯影、定影後將底片晾乾，以 NIH Image analysis 影像系統分析。

#### 6. 以流氏細胞儀偵測細胞週期：

以 0.5% Trypsin/EDTA ( Sigma ) 將細胞剝離，加入含 10%胎牛血清之培養基中止反應。將細胞懸浮液移入離心管中，1500 rpm 離心 5 分鐘。去上清液，加入 5ml PBS 彈散細胞團塊後 1500 rpm 離心 5 分鐘，將上清液移除。逐滴加入 70%EtOH ( Merk ) 並振搖細胞懸浮液避免細胞形成團塊至總量為 3ml。移置於-20 保存隔夜。取出檢體，1500 rpm 離心 5 分鐘。上清液移除後加入 5ml PBS 1500 rpm 離心 5 分鐘。移除上清液，加入 1ml Propidium Iodide stain sol'n ( PI )，須避光並於 1 小時內上機。