

IV. 結果：

一、 初代海馬迴神經細胞免疫組織化學染色結果：

取第四天體外培養之第 18 天胚胎海馬迴神經細胞，以光學顯微鏡觀察染色結果，並利用 FREEMAX Image Pro Plus 影像處理系統計數，於 200X 視野下觀察超過 2000 個細胞。加入 PBS 組為對照組，以比較以 NSE 實驗組之呈色表現。計算呈現陽性反應的細胞數後以百分比表示。在染色結果中觀察初代海馬迴細胞對神經細胞專一性抗體 NSE，其表現約有 95.95 % 呈現陽性反應⁽⁵⁹⁾。(圖一)

二、 初代海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白之細胞外觀變化：

添加 10 μ M 類澱粉蛋白 1-42 於初代培養神經細胞中，於 6、12、24、48、72 小時後觀察細胞外觀的變化。細胞不論是未添加與添加類澱粉蛋白兩者比較上，在光學顯微鏡下以 200X 視野觀察下其結果並無神經死或軸突萎縮的現象。(圖二)

三、 初代培養海馬迴細胞生存率染色結果：

我們利用 tryphan blue 染色法觀察初代培養海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白 6、12、24、48、72 小時後細胞存活的情形。結果顯示初代培養神經細胞於添加類澱粉蛋白後，在各時間點存活細胞數目並無明顯減少表現。(圖三)

四、 初代海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白後細胞凋亡結果 (TUNEL-like 染色法)：

我們利用 TUNEL 染色法觀察初代培養海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白 6、12、24、48、72 小時後細胞凋亡的情形。結果顯示未添加與添加類澱粉蛋白的初代培養神經細胞與對照組比較下，並無細胞凋亡的陽性反應。(圖四)

五、 初代海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白後 DNA 片段裂解表現：

添加 10 μ M 類澱粉蛋白於初代培養神經細胞中，於 72 小時後抽取細胞 DNA 觀察是否有 DNA 階梯裂解的現象 (DNA fragmentation)。結果顯示未添加與添加類澱粉蛋白的初代培養神經細胞，皆無 DNA 階梯裂解的現象。(圖五)

六、 CHO 及 APP₆₉₅ 細胞株內 APP 蛋白質表現量差異：

萃取 CHO 及轉入永久表現 APP₆₉₅ 基因細胞株之蛋白質，利用西方轉漬法以 APP 專一性抗體偵測細胞內 APP 之含量。結果顯示 APP₆₉₅ 細胞株中的含量比 CHO 約 1.3 倍增加。(圖六)

七、 初代海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白與 APP 及 CHO 細胞株經血清再刺激後其 p53 與 p21 蛋白質變化：

由於 p53 在細胞的修復、生長及分化中扮演了重要的角色，我們用 p53 與 p21 專一性抗體 (D0-1、Pab 240 ; F-5) 以西方墨點法偵測蛋白質的變化。初代培養神經細胞於 6 , 12、24、48 及 72 小時添加 10 μ M 類澱粉蛋白。在添加 12 小時後其 p53 蛋白質的表現量比未添加增加 3.5 倍，p21 蛋白質的表現量比未添加增加 6 倍 (圖七) 另外在 CHO 與轉入永久表現基因型 APP 細胞株中，以無血清狀態培養 24 小時後於 6 , 12、24、48 及 72 小時加入含 10% FBS 培養基再刺激後觀察 p53 與 p21 蛋白質變化。相較於 CHO 細胞株之 p53 蛋白質表現一定 (圖九)，overexpression APP 細胞株可發現 p53 蛋白質在 24 小時後之表現量比未經刺激時增

加 2 倍，而 p21 蛋白質的表現量比未經刺激時增加 4 倍（圖八）。此結果顯示了在類澱粉蛋白存在下初代培養神經細胞中 p53 及 p21 蛋白質的表現量有增加傾向。類似結果也可發現大量表現類澱粉前驅蛋白的細胞株中，藉由血清再刺激後其 p53 及 p21 蛋白質的表現量也有增加傾向。

八、 初代海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白後與 APP 及

CHO 細胞株經血清再刺激後其細胞週期變化：

細胞在 6, 12, 24, 48 及 72 小時收集並利用 70% EtOH 固定後加入 PI 染色。以流式細胞儀藉由細胞內含物的變化，檢視 DNA 細胞週期的改變。由於神經細胞屬於不分化的細胞，細胞週期的 G0/G1 有明顯停滯的現象。在初代培養神經細胞添加 10 μ M 類澱粉蛋白 12 小時後，細胞週期之 G1/G0 停滯的比例有略增加的傾向。另外在 CHO 與永久表現基因型 APP 細胞株的細胞週期中，相對於 CHO 細胞株的細胞週期，APP 細胞株 G1/G0 停滯的現象有明顯增加的傾向。此結果顯示了初代培養神經細胞在類澱粉蛋白的存在下，細胞週期 G1/G0 停滯的比例有增加的傾向。類似結果在帶有永久表現基因型 APP 細胞株中，藉由血清再刺激也可發現細胞

週期 G1/G0 停滯增加，而在 CHO 細胞株中並無明顯增加傾向。(圖十)

V. 討論：

阿茲海默氏症神經細胞死亡是引發病徵最重要的因素，但是確實引發死亡的原因仍未知，而類澱粉蛋白斑塊在患者腦部過表現的情形應為致病重要的因素之一。在本實驗中藉由體外培養神經細胞添加類澱粉蛋白 1-42 片段的方式，來觀察類澱粉蛋白與神經細胞死亡之間的相關性。結果顯示，添加類澱粉蛋白 1-42 片段於初代培養神經細胞中，並無促使神經細胞死亡或凋亡的表現。以去血清刺激永久表現 APP₆₉₅ 細胞株中也無細胞死亡的現象，但是此二者細胞內 p53 與 p21 蛋白質都有增加的傾向，且細胞週期 G1 停滯表現增加。

回顧以往關於澱粉蛋白對神經細胞毒性作用的研究文獻，其中仍有許多的爭議。在 1997 年 Dr. Irizarry 等人以基因轉殖鼠的模式將 human APP_{V717F} 基因轉入老鼠並大量表現老化性斑塊後，觀察到第 18 個月的老鼠腦部老化性斑塊病理表現較幼鼠增加約 30%。將腦部皮質及海馬迴區域以立體切片法 (stereological) 及 crystal violet 染色技術分析邊緣系統 (limbic system) 中，各區域神經細胞的數量。其結

果發現，在大量老化性斑塊的存在下並無伴隨著神經細胞死亡的現象^(36,37)。但同時利用共軛焦顯微觀察到在斑塊的周圍圍繞了許多的 neuropil 樣細胞，此研究顯示類澱粉蛋白斑塊對神經細胞的生長或訊息傳遞所造成的影響，可能需這些細胞的作用參與而成⁽⁶⁰⁾。

Dr. Michael E.等人於 1998 年對 APP_{K670N/M671L} 型基因轉殖鼠上以同樣的方式檢測 CA1 區域⁽⁵⁹⁾ 有瀰漫性斑塊 (diffuse type plaque) 產生，且神經細胞減少約 14~25%。雖然有部份動物實驗指出有神經細胞減少的現象，但是仍無法直接證明類澱粉蛋白與神經細胞死亡之間的關係，並排除神經纖維糾結與膠細胞 (microglia) 對細胞造成的影響。

而本實驗中以免疫染色法 95%陽性表現的神經細胞中，添加類澱粉蛋白後觀察以神經細胞為主要細胞狀態下此兩者之間的關係。在添加類澱粉蛋白 1-42 片段後，於顯微鏡下觀察細胞外觀及生存率後發現，並無神經細胞死亡表現；以 Tunel 染色法偵測細胞內 DNA 裂解情形，並無陽性表現。抽取細胞 DNA 於 agarose gel 中分離後，也無細胞凋亡特徵階梯式裂解表現。在本實驗結果中顯示類澱粉蛋白的添加並無法促使神經細胞死亡。

也有許多研究將類澱粉蛋白藉由體外實驗添加 25-35、1-40 或 1-42 片段於細胞株或初代培養的神經細胞中，誘導產生細胞凋亡的表現⁽⁶¹⁻⁶⁶⁾。其添加濃度約為 20-50 μM 之間或更高，實際在人體腦部藉由免疫偵測法可得知皮質中不溶性 1-42 片段的含量約 400 pmol /gm；而海馬迴中約為 200 pmol /gm⁽⁴⁵⁾，此濃度遠比研究中添加的低很多。

本實驗結果顯示，類澱粉 1-42 片段的存在下並無法促使神經細胞死亡，那究竟類澱粉蛋白在阿茲海默氏症腦部的過量表現又代表了什麼意義？所以在本實驗中我們利用外來添加類澱粉蛋白及基因表現的方式，來探討細胞對類澱粉蛋白存在時細胞內蛋白質的變動的情形，以更進一步的了解類澱粉蛋白對神經細胞的影響。

因神經細胞老化表現是引發阿茲海默氏症的重要原因之一，Dr. LaFerla 等人在產生老年性斑塊特徵基因轉殖鼠腦部中，藉由免疫染色法偵測到 p53 蛋白質較對照組有過量表現⁽⁵¹⁾。但截至目前，對於類澱粉蛋白對神經細胞在老化過程中是否有促進作用目前仍未知。

因此我們以 western blotting 的方式偵測添加類澱粉蛋白神經細胞及經血清刺激轉入永久表現 APP₆₉₅ 基因細胞株

中蛋白質變動表現，以更進一步的了解其作用。結果發現此二組細胞內 p53 及 p21 蛋白質也同樣有增加傾向。此結果可以推測類澱粉蛋白對神經細胞的影響並非直接引發細胞死亡之外，可能藉由 p53 與 p21 的變動表現的途徑使得訊息傳導產生了變化而緩慢的表現出細胞老化的現象。

在與細胞老化相關的研究當中以 Human diploid fibroblast (HDF) 細胞株具有代表性，當細胞株過度分化後即可由外觀型態表現出老化⁽⁶⁷⁾。纖維母細胞在正常狀態為靜止表現，當受到刺激後會開始進行分化、細胞週期產生變動。在相關研究中^(68, 69)顯示當纖維母細胞老化形態表現的同時，p53 與 p21 蛋白質會產生增加，且影響週期激酶的表現使細胞週期會停滯於 G1 期。p53 蛋白質對於調節細胞生存與分化非常重要，可調節細胞週期的進行與參與細胞凋亡途徑的重要蛋白質^(46,47,48,49,50)。在細胞遭受到壓力來源，如：DNA 受損、缺氧、放射線照射時都可以刺激 p53 蛋白質的表現以調控細胞的修復或者死亡。

p53 下游主要蛋白質 p21 為細胞週期進行依賴激酶的抑制劑，它可抑制 CDK2 / Cyclin 複合物使細胞週期無法由 G1 期進入 G2 期於是停滯於 G1 期，而無法進行正常的分化

或修補。在 Dr. Chang 利用基因晶片的分析比對，觀察細胞在大量表現 p21 後基因變動的情形中指出⁽⁵²⁾，p21 基因變動與癌化、老化及年齡相關疾病上有許多的關聯，其中同時發現 p21 也牽涉了 APP 基因變動，由此可推測 p53 及其下游 p21 蛋白質的活化參與了老化及相關疾病的過程。

神經細胞屬於分化性低的細胞，所以在大多數的細胞停留於 G1/G0 期，而阿茲海默氏症患者的腦細胞則比正常人的 G1/G0 停滯比例更高⁽⁵³⁾。且因此特殊現象，當神經細胞將受到刺激時會促使細胞週期產生變動。於是在本實驗中，我們藉由 PI 染色後以流氏細胞儀分析初代海馬迴神經細胞添加類澱粉蛋白與 APP₆₉₅ 經去血清刺激後細胞內含物的變動情形。發現此兩組細胞的細胞週期 G1 停滯現象比未加藥前或 CHO 細胞株皆有提高的現象。於 2001 年 Dr. Arun K. Raina 等人研究老化性指標蛋白質 MORF-4，它在阿茲海默氏症患者腦部有過量表現且協同週期 G1 停滯增加，所代表的是阿茲海默氏症患者神經細胞可藉由 G1 停滯增加而表現出老化現象而非細胞凋亡⁽⁵⁴⁾。

綜合上述討論在我們的實驗中發現，類澱粉蛋白添加後神經細胞的外觀型態及生存率並無明顯變化。在細胞凋亡表

現方面也無 DNA 裂解及 TUNEL 陽性表現情形，此二項結果都顯示了類澱粉蛋白並無促使細胞死亡或凋亡的作用。反而在初代培養神經細胞與 APP₆₉₅ 細胞中，引發 p53 與 p21 的表現增加，且協同了細胞週期 G1 停滯比例增加。由此結果推論：類澱粉蛋白存在於阿茲海默氏症患者腦中可能藉由使細胞週期 G1 停滯增加，而促使神經細胞的功能老化。