

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

腺憫單磷酸活化激蕪對抗類澱粉蛋白導致之神經毒性機轉  
之研究(第3年)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-015-MY3  
執行期間：100年08月01日至101年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：林志立  
共同主持人：賴德仁  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：徐至蹊  
碩士班研究生-兼任助理人員：林嘉祥  
碩士班研究生-兼任助理人員：羅珮綺  
碩士班研究生-兼任助理人員：謝東穎  
博士班研究生-兼任助理人員：李欣樺

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 31 日

中文摘要：阿茲海默症(Alzheimer 's disease, AD)是國內目前最常見的失智症，是由一種稱為乙型類澱粉(A $\beta$ )的物質沈積在腦組織中而造成的神經性退化疾病。雖然阿茲海默氏症的罹患率相當高，但由於致病機轉尚不十分清楚，因此目前臨床上對此症也還沒有一種有效的治療方式。史他汀類(Statin)藥物的是典型的降血脂藥物，被用於控制血液中膽固醇的含量以及預防心血管疾病，特別是常使用於治療第二型糖尿病。由於流行病學上的研究指出，第二型糖尿病與阿茲海默症具有相當的關聯性，因此史他汀類藥物被認為可能也具有對抗阿茲海默症的效果，但其詳細的分子機轉目前並不十分明瞭。因此在本研究中，我們利用美伐他汀(mevastatin)作為研究對象，希望透過 In vitro 的方式，來探討史他汀類藥物可能的抗阿茲海默症分子機轉。初步的結果發現，實驗室的培養的神經細胞在加入美伐他汀時，具有明顯活化 AMPK 的能力，而這些被誘發的 AMPK 活性對於 mevastatin 對抗乙型類澱粉蛋白的神經保護效果是必需的。此外，在給予 mevastatin 時，乙型類澱粉蛋白所導致之 Tau 蛋白過磷酸化現象也顯著的抑制。另外 A $\beta$  會抑制細胞自噬的過程，但加入 Mevastatin 則能透過活化 AMPK 並細胞自噬，最終成功將 A $\beta$  清除完畢。總和以上的發現我們推測，美伐他汀可能會透過提升 AMPK 的活性來達到對抗乙型類澱粉蛋白的毒性，並進一步抑制 Tau 過磷酸化，來達到其神經保護的效果。

中文關鍵詞：阿茲海默症，Tau 蛋白過磷酸化，乙型類澱粉蛋白，美伐他汀，腺苷單磷酸活化激酶

英文摘要：Alzheimer 's disease (AD), the most widespread type of dementia, is a progressive neurodegenerative disease caused by an accumulation of A $\beta$  plaque deposits in the brains. Despite its high prevalence, the cause of AD is unknown, explaining the lack of effective medication for its treatment. Statins drugs is typical cholesterol-lowering drugs, is used to control blood cholesterol and prevention of cardiovascular diseases, in particular often used in the treatment of type II diabetes. Because epidemiological studies have indicated that type II diabetes and AD has considerable relevance, so history is that statins may also have effects against AD, but the detailed molecular mechanism switch current is not very clear. Therefore, in this study, we used mevastatin as the object of study. In vitro

approach aims to explore the history of statins may be anti-molecular mechanisms of AD. Preliminary results showed that laboratory cultured neural cells by adding mevastatin, the ability to have a significant activation of AMPK, which was induced AMPK activity against  $A\beta$  for the mevastatin neuroprotective effect of protein is required. The. In addition, the beta-amyloid caused by the Tau protein phosphorylation has also significantly inhibited by mevastatin treatments. Our preliminary results showed that the treatments of mevastatin could attenuate the  $A\beta$ -induced neurotoxicity by enhancing autophagy degradation pathway. Furthermore, we showed that the autophagy degradation pathway may through attenuating AKT activity and stimulating downstream LC3-II level potentially. In summary, we hypothesized that mevastatin may be through enhancing the activity of AMPK to achieve against the toxicity of beta-amyloid protein, and further inhibit the phosphorylation of Tau had to reach its neuroprotective effect.

英文關鍵詞： Alzheimer 's disease, Tau hyperphosphorylation,  $\beta$ -amyloid, Mevastatin, AMP-activated protein kinase

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

腺苷單磷酸活化激酶對抗類澱粉蛋白  
導致之神經毒性機轉之研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-040-015-MY3

執行期間：98年 8月 1日至 101年 7月 31日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學研究所

計畫主持人：林志立 助理教授

共同主持人：賴德仁 教授

計畫參與人員：黃建智 主治醫師

徐至蹠、林嘉祥、羅珮綺、謝東穎、邱麗文 碩士班研究生

李欣樺 博士班研究生

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

# 目錄

中文摘要	3
中文關鍵字	3
英文文摘要	4
英文關鍵字	4
前言	
阿茲海默症的簡介	5
阿茲海默症的腦部病理變化	5
A $\beta$ 、Tau 蛋白與阿茲海默症之間的關係	6
代謝症候群與阿茲海默症的相關性	7
美伐他汀(Mevastatin)	7
細胞自噬與其分子機轉	8
研究目的	9
研究結果	
處理美伐他汀可以減緩乙型類澱粉蛋白導 致之神經細胞死亡	9
美伐他汀之神經保護作用與 AMPK 的活 化作用有關	10
AMPK 活化對於內生性及外源性之 A $\beta$ 處 理均具神經保護效果	10
美伐他汀處理具有減低 A $\beta$ 導致之 Tau 過 磷酸化現象	10
美伐他汀對抗 A $\beta$ 之神經保護作用可能不 是透過抑制膽固醇生合成之過程	11
美伐他汀能誘使細胞自噬的活性增加	11
討論	11
重要參考文獻	12
附圖	15

# 中英文摘要及關鍵詞

## 中文摘要

阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是國內目前最常見的失智症，是由一種稱為乙型類澱粉(A $\beta$ )的物質沈積在腦組織中而造成的神經性退化疾病。雖然阿茲海默氏症的罹患率相當高，但由於致病機轉尚不十分清楚，因此目前臨床上對此症也還沒有一種有效的治療方式。史他汀類(Statin)藥物的是典型的降血脂藥物，被用於控制血液中膽固醇的含量以及預防心血管疾病，特別是常使用於治療第二型糖尿病。由於流行病學上的研究指出，第二型糖尿病與阿茲海默症具有相當的關聯性，因此史他汀類藥物被認為可能也具有對抗阿茲海默症的效果，但其詳細的分子機轉目前並不十分明瞭。因此在本研究中，我們利用美伐他汀(mevastatin)作為研究對象，希望透過 In vitro 的方式，來探討史他汀類藥物可能的抗阿茲海默症分子機轉。初步的結果發現，實驗室的培養的神經細胞在加入美伐他汀時，具有明顯活化 AMPK 的能力，而這些被誘發的 AMPK 活性對於 mevastatin 對抗乙型類澱粉蛋白的神經保護效果是必需的。此外，在給予 mevastatin 時，乙型類澱粉蛋白所導致之 Tau 蛋白過磷酸化現象也顯著的抑制。另外 A $\beta$  會抑制細胞自噬的過程，但加入 Mevastatin 則能透過活化 AMPK 並細胞自噬，最終成功將 A $\beta$  清除完畢。總和以上的發現我們推測，美伐他汀可能會透過提升 AMPK 的活性來達到對抗乙型類澱粉蛋白的毒性，並進一步抑制 Tau 過磷酸化，來達到其神經保護的效果。

關鍵字:阿茲海默症，Tau 蛋白過磷酸化，乙型類澱粉蛋白，美伐他汀，腺苷單磷酸活化激酶。

## Abstract

Alzheimer's disease (AD), the most widespread type of dementia, is a progressive neurodegenerative disease caused by an accumulation of A $\beta$  plaque deposits in the brains. Despite its high prevalence, the cause of AD is unknown, explaining the lack of effective medication for its treatment. Statins drugs is typical cholesterol-lowering drugs, is used to control blood cholesterol and prevention of cardiovascular diseases, in particular often used in the treatment of type II diabetes. Because epidemiological studies have indicated that type II diabetes and AD has considerable relevance, so history is that statins may also have effects against AD, but the detailed molecular mechanism switch current is not very clear. Therefore, in this study, we used mevastatin as the object of study. In vitro approach aims to explore the history of statins may be anti-molecular mechanisms of AD. Preliminary results showed that laboratory cultured neural cells by adding mevastatin, the ability to have a significant activation of AMPK, which was induced AMPK activity against A $\beta$  for the mevastatin neuroprotective effect of protein is required The. In addition, the beta-amyloid caused by the Tau protein phosphorylation has also significantly inhibited by mevastatin treatments. Our preliminary results showed that the treatments of mevastatin could attenuate the A $\beta$ -induced neurotoxicity by enhancing autophagy degradation pathway. Furthermore, we showed that the autophagy degradation pathway may through attenuating AKT activity and stimulating downstream LC3-II level potentially. In summary, we hypothesized that mevastatin may be through enhancing the activity of AMPK to achieve against the toxicity of beta-amyloid protein, and further inhibit the phosphorylation of Tau had to reach its neuroprotective effect.

Key words: Alzheimer's disease, Tau hyperphosphorylation,  $\beta$ -amyloid, Mevastatin, AMP-activated protein kinase.

# 前言

## 1. 阿茲海默症的簡介

根據行政院經建會推估，到 2011 年底台灣地區 65 歲以上老年人口將佔全國人口的 10.4%，因此台灣已漸漸面臨人口快速的老齡化的問題，如何解決老化相關的各類疾病，將成為今後醫學和社會上極重要的課題。其中，在老年人口的疾病當中，失智症(dementia)，特別是阿茲海默氏症(Alzheimer's disease，簡稱 AD)最為大家所關注。阿茲海默症約佔所有失智症(dementia)中的 60~70%，是最常見的一種失智症疾病。臨床上的觀察發現阿茲海默症是一種大腦皮質逐漸退化的疾病，隨著病程的進展，腦細胞會逐漸遭受破壞，在初期除導致病人產生短期記憶障礙外，依循時間的進展，往往也會伴隨著其他認知功能方面的損害，致使患者難以記憶、反應和思考(Marques et al., 2010)。這些心智功能的喪失通常是逐漸發生在十數年至數十年間，並且不會回復。雖然阿茲海默症患者間的個別症狀差異可能很大，但是每一個患者的症狀最終都會持續惡化，隨著病情發展到最後階段，就變成全面性的心智功能喪失，甚至最終會導致死亡。根據流行病學上的統計，截至 2009 年為止全世界至少有三千五百萬人以上的人罹患此症，根據這個趨勢估計，到了 2050 年，光在美國將可能有一千四百萬人以上罹患阿茲海默症。其中在超過六十五歲的總人口中約有 5 至 10 % 罹患阿茲海默症，而 85 歲以上的人口更是有一半左右是阿茲海默症的患者，由於年齡一直是阿茲海默症最主要的相關因素，是故阿茲海默氏症又常常被稱為老年失智症或是老年癡呆症。事實上，阿茲海默症高居美國成人死因第四位，每年大約有 10 萬人直接或間接死於阿茲海默症。相對之下，台灣目前對阿茲海默症現況的調查則較不完整，但根據大約的估計，國內老年失智症的盛行率約在 2~4% 左右，換算下來全國應約有二萬至四萬名的失智症患者，其中約五至九成約一萬五千名至三萬八千名之病患為阿茲海默氏症。這些患者最終終究會失去自理能力，因此需要大量的日夜照顧，而這些照顧者大多為家庭成員，往往承受高度情緒和身體的壓力，在此情況之下病患親友的日常生活往往也跟著受到很大的影響。所以，阿茲海默除了是台灣的醫療問題外，也會造成許多嚴峻的社會問題。目前臨床上阿茲海默症的治療情況，大多是以膽鹼酯分解酵素抑制劑(cholinesterase inhibitors)為主。Cholinesterase 是神經細胞傳導物 acetylcholine 分解反應中的關鍵酵素，這些膽鹼酯分解酵素抑制劑可藉著阻斷 cholinesterase 的作用來抑制 acetylcholine 的分解，進而提高病人腦中 acetylcholine 的含量。但這些藥物雖可暫時延緩記憶的喪失，其最終並不能治癒阿茲海默症，充其量只能減輕症狀而已，因此阿茲海默症目前仍是無法治癒的疾病。

## 2. 阿茲海默症的腦部病理變化

阿茲海默症的病因目前仍不清楚，但此疾病所產生的大腦病理變化在一百多年前就已確定。早在 1853 年德國知名的病理學家 Rudolf Virchow 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(amyloid plaque)。後來在 1906 年的時候，一位德國的神經病理家 Alois Alzheimer 便第一次記錄了阿茲海默症患者腦部的微觀變化。根據他的觀察，他發現此症的患者會有腦部萎縮與空洞化的現象，且腦部切片也發現有大量老化斑塊(senile

plaque) 與神經糾結(neurofibrillary tangle, 簡稱 NFTs)產生, 這些特徵只能藉著病理解剖被觀察到。Alzheimer 推測這些糾結和斑塊會阻斷神經彼此溝通和傳遞訊息的功能, 進一步導致阿茲海默症症狀的產生。越來越多證據顯示這些病理變化在阿茲海默症的發展上扮演極重要的角色, 事實上這些斑塊與神經糾結, 後來被發現皆屬於一類異常的蛋白質沈積, 會直接或間接引起腦神經細胞的發炎及壞死, 但目前並不清楚這些神經糾結及老化斑塊是如何形成的。在 NFTs 中, 一般而言, 神經糾結主要是在神經內部被發現, 其會導致細胞型態嚴重變形, 並且堆疊成團。目前的研究已指出一種名為 tau 的蛋白質的形成有高度相關。當 Tau 被過度磷酸化(hyperphosphorylation)時, NFT 和 NFTs 便會形成。但是神經糾結是如何形成的以及如何影響腦部, 目前都尚待解答。在老化斑塊方面, 和 NFTs 不同, 斑塊主要堆積在神經細胞的外部, 並可能透過細胞膜上的受體來影響神經細胞的功能。目前發現斑塊主要由名為  $\beta$  型類澱粉蛋白( $\beta$  amyloid, 簡稱 A $\beta$ )的蛋白質所組成。事實上, 類澱粉蛋白在我們腦中會自然的產生, 但老化時這些類澱粉蛋白會有製造過多的傾向, 最終以 A $\beta$  的形式在腦中堆積並形成斑塊。老化時究竟有哪些因子影響 A $\beta$  的形的製造與堆積, 目前尚無法完全明瞭, 不過截至目前為止研究已發現有至少有數種基因與阿茲海默症有關, 其中在家族性或早發型阿茲海默症(early-onset or familial AD)中有三種體染色體顯性基因, 這分別是: Presenilin 1, Presenilin 2, Amyloid precursor protein。而在晚發型阿茲海默症(late-onset or sporadic AD)中只找到一個易感性基因, 被稱為 ApoE (apolipoprotein E) epsilon 4 allele。進一步研究這些基因在阿茲海默症中的分子機轉, 對於未來發展此病治療的策略將有很大的助益。

### 3. A $\beta$ 、Tau 蛋白與阿茲海默症之間的關係

阿茲海默氏症的成因頗為複雜, 包含了前述之基因突變、環境因子甚至與個人習性都可能影響該病的發生及進展。不過目前的研究發現此症最主要主要的病徵是腦中老化斑塊的過度累積, 而 A $\beta$  不正確摺疊與沈積又正是老化斑塊形成之主要原因, 因此探究 A $\beta$  的形成過程與細胞神經毒性機制便成為阿茲海默氏症研究的極重要課題。A $\beta$  是在阿茲海默氏症患者的腦部組織中最主要的澱粉狀蛋白。1984 年 Glenner 和 Wong 第一次於 AD 患者腦血管中發現此分子量約為 4 kDa 的 A $\beta$  蛋白, 而之後科學家便直接從阿茲海默症患者大腦皮質中的 senile plaque 中純化出 A $\beta$ , 發現其種類有很多, 且由不同的氨基酸長度排列所組成。A $\beta$  是類澱粉蛋白前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)切割後的短肽鏈產物, 長度通常是介於 39 到 43 個 amino acid residues。在人類腦部裡最容易被發現的 A $\beta$  是由一條 42 個氨基酸組成的多肽鏈, 因其長度此蛋白又被稱為  $\beta$  amyloid 1-42 (簡稱為 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 或 A $\beta$ <sub>42</sub>)。一般認為, A $\beta$  會先因某種原因產生不當摺疊, 因而由可溶性分子轉變為不可溶的纖維分子, 進而纖維化並沈澱在神經元周邊, 最後造成神經退化的現象。APP 則是一個含有 770 個胺基酸所組成的膜蛋白, 其一部分是鑲嵌在神經細胞的細胞膜內, 另一部分則是伸出細胞膜外側。APP 經過某些酵素切割後便會產生 A $\beta$ , 目前已知有三種不同的酵素會去切斷細胞膜外的 APP, 這三種酵素分別為  $\alpha$ -secretase、 $\beta$ -secretase 與  $\gamma$ -secretase。當 APP 被  $\alpha$ -secretase 和  $\gamma$ -secretase 切斷時會產生較短且容易分解的碎片, 此時由於 A $\beta$  的結構被破壞, 因此不會導致老化斑塊的過度累積。但如果 APP 是被

$\beta$ -secretase 和  $\gamma$ -secretase 切斷的話，所產生 40 至 43 個胺基酸的碎片，即是我們所稱的 A $\beta$ 。其中 A $\beta$ 1-42 不但最不容易被分解，而且比其他的 A $\beta$  更容易聚集在一起。當 A $\beta$  產生聚集沈積時會誘發並被功能類似巨噬細胞的 microglia 細胞給吞噬消化，正常人腦部的 A $\beta$  大多可以透過此機制清除，然而若 A $\beta$  聚集過多時就成了我們所謂的 amyloid plaques，此時 microglia 細胞除無法順利將其吞噬，並反而被 A $\beta$  的聚集物刺激且不斷釋放出自由基，這反而會進一步對腦部造成傷害。Tau 是神經細胞內負責穩固細胞骨架的重要蛋白，通常而言，Tau 蛋白在 A $\beta$  聚集時會因某些原因導致特定的磷酸激酶被活化，進一步造成其本身過度磷酸化 (hyperphosphorylation) 的情形，此時神經細胞內的微小管便會發生瓦解，並且發生 Tau 蛋白聚集糾結的情況，在顯微鏡下我們可以看到神經纖維產生纏結的現象。這種神經纖維纏結對神經細胞所造成的傷害似乎比 A $\beta$  更為直接，因為神經纖維纏結不但會妨礙細胞內養分的運輸，更阻礙神經細胞間電流脈衝的傳遞，使神經細胞無法繼續發揮其最主要的功能。

#### 4. 代謝症候群與阿茲海默症的相關性

很多研究顯示血管危險因子和阿茲海默症發生率的關聯。包括高血壓、第二型糖尿病、肥胖、抽煙、心臟血管疾病、腦中風等都可能增加阿茲海默症的風險。最近的研究顯示，胰島素對腦部也很重要，已知胰島素異常和許多神經退化性疾病有關，包括阿茲海默症、Parkinson's disease 和 Huntington's disease 等。特別是第二型糖尿病，在很多研究都發現會造成記憶或認知的衰退，根據統計第二型糖尿病在增加阿茲海默症發生風險方面，相對風險值約增加 1.5 倍，且即使是邊緣性糖尿病，也會顯著升高阿茲海默症發生的風險，因此已有學者將阿茲海默症稱為“第三型糖尿病”。而第二型糖尿病與 Apolipoprotein E (ApoE)  $\epsilon$ 4 基因及高血壓對於升高阿茲海默症的風險又進一步有著交互作用。在發現 ApoE 和阿茲海默症之間的關係之前，許多研究其實已經指出 ApoE 與血液中膽固醇的攜帶與運送方面扮演很重要的角色。ApoE 基因位於人類第 19 對染色體上，這種蛋白質的對偶基因有三種天然的變異型，分別被命名為  $\epsilon$ 2、 $\epsilon$ 3 和  $\epsilon$ 4，其是一個與人類心血管疾病有高度關係的基因。基本上，每個人天生都有兩個對偶基因，所以在 ApoE 中一共會有 6 種可能的排列組合，包括  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 2、 $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3、 $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 4、 $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3、 $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4 和  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4 等。其中已知 ApoE 的各種基因分型組合與心血管疾病、腦中風以及阿茲海默症的發生率有一定程度的關係，一般認為  $\epsilon$ 2 和  $\epsilon$ 3 有保護作用，而  $\epsilon$ 4 則會增加阿茲海默症的罹患率，因此 E3/E4、E4/E4 這兩種基因型最具罹患這類疾病的風險，也就是阿茲海默症的高危險群。

#### 5. 美伐他汀(Mevastatin)

Mevastatin 為 *Penicillium Citrinum* 真菌的次生代謝產物，屬於 HMG-CoA 還原酶競爭性抑制劑，而該酶是膽固醇合成中最重要之酶。1976 年由 Akira Endo 發現，1976 年由 A. G. Brown 從 *Penicillium brvcompactum* 分離出來，其分子式為  $C_{23}H_{24}O_5$  屬於第一代的 Statin 藥物。由於高膽固醇濃度不僅被認為是包含中風的心血管疾病的風險因子，也被認為是形成 AD 的風險因子。因此，Statins 除了被認為具有減少膽固醇的功效外，許多研究亦證明 statins 能保護神經細胞，對抗我們已知會發生在 AD 病患腦中的傷害。由於 Mevastatin 已知具有顯著的促進 AMPK 活性的功能，因此在本研究中我們利用 Mevastatin 作為誘發細胞 AMPK 活化的起始物，並比

較與傳統 AMPK activator AICAR 在細胞反應上的差異。

## 6. 細胞自噬與其分子機轉

細胞自噬(autophagy 或 autophagocytosis)，字面上的解釋為細胞自我吞噬。哺乳動物細胞中，細胞自噬以吞噬蛋白質的方式不同分為三種形式 Macroautophagy、Microautophagy、Chaperone-mediated autophagy(CMA)。一般細胞自噬所指的為 Macroautophagy，這種方式也是最常見的方式，主要的吞噬目標為較大的蛋白質或胞器。Microautophagy 其形式類似 Macroautophagy，主要是吞噬較小的蛋白。而 Chaperone-mediated autophagy 則是一種藉由 chaperon 攜帶蛋白質到 Lysosome 的一種形式。綜合來說細胞自噬這個機制主要在分解生命週期長的蛋白(long-lived protein)及損壞、老舊的胞器 (organelle)，藉由此方式調控細胞的生長發展及維持其平衡[4]。目前的文獻中指出很多能誘導細胞自噬的因素，如饑餓、胞器損傷、微生物感染、蛋白質錯誤折疊或聚集、DNA 損傷、化療、放療。

細胞自噬主要調控路徑為第一型 PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)/mTOR(mammalian target of rapamycin)、第三型 PI3K/Beclin-1(ATG6)、ATG conjugation pathway。第一型 PI3K/mTOR pathway 透過誘導第一型 PI3K 激酶，活化下游的 AKT，AKT 進一步抑制 TSC1/2(tuberous sclerosis complex)，最後間接活化 mTOR，誘導細胞自噬形成。第三型 PI3K/Beclin-1(ATG6) pathway 是當兩者結合後，會活化下游 ATG conjugation 路徑，誘導細胞自噬形成[10]。ATG conjugation pathway 有 ATG12-ATG5-ATG16 conjugation 及 LC3(ATG8) conjugation pathway。透過 ATG7、ATG10 使得 ATG12-ATG5-ATG16 conjugation 形成，有助於扁平狀的雙層脂質體構造擴張。LC3(ATG8) conjugation pathway 則透過 ATG3、ATG4、ATG7 使得 LC3-I 接上一個脂類，形成 LC3-II 複合體，LC3-II 則會聚集於自噬體的膜上。在哺乳動物中，mTOR (mammalian target of rapamycin) 這個蛋白質激酶在養分的代謝與生長訊號的傳遞扮演著中心者的角色；當 mTOR 活化時會促進細胞生長與複製，然而 mTOR 的抑制則可能活化細胞自噬。mTOR 激酶是胺基酸、ATP 和激素的受器，對細胞生長具有重要調節作用，抑制細胞自噬的發生，是細胞自噬的負調控因子，哺乳動物細胞中的核糖體蛋白質 S6 (p70S6)激酶的活化，會抑制細胞自噬的發生，它位於 mTOR 訊號路徑的下游，其活性受 mTOR 調節。Rapamycin 可以抑制 mTOR 的活性，進而抑制 p70S6 激酶 (p70S6 kinase, p70S6K) 活性、誘導細胞自噬發生的作用。mTOR 激酶抑制細胞自噬的訊號傳遞目前尚未完全明瞭，在酵母菌裡，mTOR 激酶可能透過抑制 ATG1 激酶的活性來抑制細胞自噬的發生。此外，p53 在基因毒性與其他的壓力下也扮演著關鍵的角色，在正常細胞中，p53 的含量極低，但是當細胞受到壓力，如放射線傷害、缺氧、營養缺乏、DNA 受損時則會引起 p53 的活化。而研究發現，用 etoposide 誘導 p53 的表現後，藉由來抑制 mTOR 與 p70S6K-Thr389 的磷酸化，進而導致細胞自噬，包含了 AMP 激酶的活化且經 TSC1/TSC2 複合物的來抑制 mTOR。先前的研究亦發現，DRAM(damage-regulated autophagy modulator)p53 的下游基因可以轉譯出 Lysosome 蛋白造成細胞自噬(macroautophagy)。此外，在過去的研究也發 3-MA (3-methyladenine)作用在 phosphatidylinositol 3-phosphatase kinase(class IIIPI3K)的位置且可以抑制細胞自噬的形成。另

外，有文獻發現  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (ammonium chloride) 是一個 Lysosome 的抑制劑，也能抑制細胞自噬產生。

## 研究目的

由於流行病學上的研究指出，第二型糖尿病與阿茲海默症具有相當的關連性，因此史他汀類藥物被認為可能也具有對抗阿茲海默症的效果。事實上，許多研究亦指出史他汀類藥物確實具有對抗阿茲海默症的效果。例如 2008 一篇墨西哥裔美國人社區年長者族群基礎的世代研究發現，在 5 年的追蹤期間，statin 類藥物的使用者發生失智或者認知缺損的機會是未服用對照組的一半。美伐他汀(mevastatin)是史他汀類(statin)的降血脂藥物，用於控制血液中膽固醇的含量以及預防心血管疾病，特別是常使用於治療第二型糖尿病。美伐他汀已被認為具有調節細胞能量狀態的功用，其中與阿茲海默症最重要的則是其與 ApoE 之間的關係。ApoE 的是一種膽固醇去脂蛋白，可以調節血液中脂肪的含量並調整身體中膽固醇進出神經細胞的平衡，咸信 ApoE 基因的三種 subtype  $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$  與  $\epsilon 4$ ，其中一個原因便是由於其調控神經細胞內膽固醇平衡能力的不同，才導致我們在流行病學上所觀察到這三種基因型在阿茲海默症罹患率上的差異。美伐他汀另一個可能影響能量平衡的機制便是透過影響神經細胞內 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) 的活性，已知 AMPK 之主要功能為細胞內能量狀態的感測者，其會介入並調節細胞代謝途徑之運作。由於能量代謝失衡是肥胖和代謝症候群的主要原因，因此設法提高 AMPK 的活性高低在對抗代謝症候群中被認為扮演著重要的角色。同時，在先前的研究也證明，若能提高 AMPK 的活性，亦可以達到對抗阿茲海默症的效果，由這個觀點推論，AMPK 活性的調控或許便是阿茲海默症與代謝症候群這兩種疾病致病機轉的共同交集點。雖然史他汀類藥物被認為可能也具有對抗阿茲海默症的效果，但其詳細的分子機轉目前並不十分明瞭。由於我們實驗室在之前的研究中發現，statin 類降血脂藥物可能不是單純經由膽固醇的調控來減少  $\text{A}\beta$  的神經毒性，此外在先前的研究顯示，statin 類藥物明確地具有提升 AMPK 活性的能力，因此我們希望能找出 statin 另外可能對抗  $\text{A}\beta$  的機制，並詳細探討題分子機轉及應用的可能性。因此，在本研究中，我們選用美伐他汀(mevastatin)作為研究模式，透過人類神經細胞株體外培養的實驗方式，來探討美伐他汀是否透過調控神經細胞內 AMPK 活性的方式，來達到其對抗阿茲海默症之可能的分子機轉，我們希望經由我們的研究結果，或許可為阿茲海默症治療上帶來另一個思考方向。

## 研究結果

### 1. 處理美伐他汀(mevastatin)可以減緩乙型類澱粉蛋白( $\text{A}\beta$ )導致之神經細胞死亡

由於先前的研究明確指出 statin 類藥物確實具有神經保護的能力。因此，在本研究中，我們利用人類神經細胞株 SK-N-MC 體外培養的實驗方式，經由直接由 medium 外加  $\text{A}\beta 1-42$  蛋白，探討美伐他汀(mevastatin)是否透過調控神經細胞內 AMPK 活性的方式，來達到保護神經

受損之可能的分子機轉。首先我們先檢驗美伐他汀(mevastatin)是否具有對抗 A $\beta$  毒性的能力，在圖一中我們發現，在外加 10  $\mu$ M 之 A $\beta$  乙型類澱粉蛋白時，經過 48 小時後 SK-N-MC 神經細胞在有明顯的數目降低，但若此同時加入 20  $\mu$ M 之美伐他汀時，SK-N-MC 神經細胞數目降低的情況則有明顯的改善，由此我們可以得知，美伐他汀可能可以減緩 A $\beta$  所導致之神經細胞死亡。為更進一步證明美伐他汀的效果，我們則是利用 MTT 實驗證明處理美伐他汀可以減緩 A $\beta$  導致之神經細胞死亡(圖二)，在外加 A $\beta$  10  $\mu$ M 時，SK-N-MC 神經細胞有明顯的死亡情形。但在同時加入美伐他汀(mevastatin)時，神經細胞死亡的情況有明顯的降低，此種美伐他汀保護的情形自 36 小時起具有顯著差異。

## 2. 美伐他汀(mevastatin)之神經保護作用與 AMPK 的活化作用有關

前面的實驗已指出美伐他汀在於對抗 A $\beta$  確實具有神經保護的效果，為進一步驗證我們先前的假設，接下來將測試美伐他汀是否透過提昇 AMPK 活性的方式來達到效果。圖三指出美伐他汀處理 SK-N-MC 神經細胞具有誘發 AMPK Thr172 磷酸化的情形。由 Western blotting 實驗結果發現，在 Control 及加入 10  $\mu$ M A $\beta$  時，AMPK 並不具有顯著磷酸化的現象。而再美伐他汀時或 AMPK 的促進劑 AICAR 時，SK-N-MC 神經細胞在 24 小時後 AMPK 有明顯的磷酸化，由於 AMPK Thr172 磷酸化的程度與活性成正比關係，因此實驗結果顯示美伐他汀可使 AMPK 進入活化的狀態。為再驗證美伐他汀與 AMPK 活化之間的關係，我們利用 gene knockdown 技術來進行反證。圖四指出當 AMPK 的活化作用受 gene knockdown 而減低時，美伐他汀的神經保護作用也隨之降低。由此我們推論，美伐他汀可能透過提昇 AMPK 活性的方式，來達到發揮對抗 A $\beta$  毒性的神經保護效果。

## 3. AMPK 活化對於內生性(Endogenous)及外源性(Exogenous)之 A $\beta$ 處理均具神經保護效果

由於先前的實驗均是利用外源性(Exogenous)之 A $\beta$  處理來達到神經毒性模式，為更接近生理現象，我們在此利用一株我們實驗是先前構築好的神經細胞株 MC65 來進行實驗。MC65 cells 源自於 SK-N-MC cells，但其中其被轉殖入 APP 的中間代謝產物 C99 片段，並經條件式誘發(tetracycline off mode)的方式來產出目標蛋白，而 C99 目標蛋白在神經細胞中可自發性的轉化為 A $\beta$ 。因此，我們便利用 MC65A $\beta$  細胞株作為內生性(Endogenous) A $\beta$  的實驗模式。由圖五的實驗結果發現，在加入 AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside) 這種 AMPK 活性促進劑時，神經細胞的存活率有明顯增加，而這種保護現象同時在內生性(圖 A，MC65 cells)及外源性(圖 B，SK-N-MC cells)給予 A $\beta$  均存在顯著的保護作用。因此本結果明確指出，活化 AMPK 而保護神經的作用，同時存在於內生性(Endogenous)及外源性(Exogenous)之 A $\beta$  處理方式。

## 4. 美伐他汀(mevastatin)處理具有減低 A $\beta$ 導致之 Tau 過磷酸化現象

許多研究均指出，在阿茲海默的致病機轉裡，病人的 Tau 蛋白均有過磷酸化的現象(Iqbal et al., 2010a)，而進一步的研究亦指出，A $\beta$  的毒性作用可能可以誘發 Tau 蛋白過磷酸化現象，進

而引發神經細胞死亡。為瞭解美伐他汀經由活化 AMPK 而減低 A $\beta$  毒性之過程，是否會影響神經細胞中 Tau 蛋白的磷酸化變化，我們便對 SK-N-MC 神經細胞進行免疫螢光染色及 Western blotting 實驗。由圖六之實驗結果發現，美伐他汀處理確實具有減低 A $\beta$  導致之 Tau 過磷酸化現象，本實驗同時由免疫螢光染色(A 圖)與 Western blotting(B 圖)的結果均產生一致的現象。同時在加入 AICAR 時，Tau 蛋白的過磷酸化也有明顯的減低。以上的結果證實，美伐他汀確實可經由活化 AMPK 而減低神經細胞中 Tau 蛋白的過磷酸化現象，此點跟先前觀察之減緩 A $\beta$  毒性之結論呈現一致的情形。

#### 5. 美伐他汀(mevastatin)對抗 A $\beta$ 之神經保護作用可能不是透過抑制膽固醇生合成之過程

關於 Statin 藥物，大家最所熟知的便是其抑制 HMG-CoA 還原酶的特性，使得其成為療效最佳的降血脂藥物之一。鑑於這個特性，我們便想驗證美伐他汀對抗 A $\beta$  之神經保護作用是否也是透過抑制 HMG-CoA 還原酶的機制所達成，為證實這個觀點，我們直接補充 HMG-CoA 還原酶的直接代謝產物 Mevalonic acid，看看在美伐他汀給予之下神經保護作用是否會因為 Mevalonic acid 的再補充而有所拮抗。圖七的實驗結果顯示，單獨加入美伐他汀時神經細胞具有明顯的保護作用，但此時若直接加入 HMG-CoA 還原酶之下游中間產物 Mevalonic acid (50  $\mu$ M)時，神經保護作用的現象仍存在，美伐他汀依然具有明顯的神經保護效果。因此我們認為美伐他汀對抗 A $\beta$  之神經保護作用可能不是透過抑制膽固醇生合成之過程來達成。

#### 6. 美伐他汀能誘使細胞自噬的活性增加

在過去的研究中發現，膽固醇的剝奪會造成細胞自噬的活性上升，因此我們想觀察加入了 Mevastatin 處理 24 小時後是否會造成自噬的活性，結果發現，SK-N-MC 細胞以 10 $\mu$ M Mevastatin 處理後會抑制 AKT 活性，進而活化 LC3-II cleavage form 的蛋白量。有趣的是，當以 A $\beta$  處理 24 小時後會造成 LC3-II 的蛋白量減少，卻會同時減少 AKT 活性，結果也發現 A $\beta$  處理 24 小時後會抑制 Beclin-1 蛋白的量(圖八)，我們更進一步以不同濃度的 A $\beta$  處理，圖八所示加入 5、10  $\mu$ M A $\beta$  處理後，Beclin-1 蛋白的量顯著的下降。以上結果顯示 A $\beta$  會抑制細胞自噬活性，而 Mevastatin 則會促使細胞自噬活性提高。

## 討論

本研究初步的結果發現美伐他汀(mevastatin)會造成神經細胞內 AMPK 的活性上升，進而發揮其神經保護的效果。過去研究也曾發現 statin 藥物確實會造成 AMPK 活性上升，並進一步改變細胞內能量平衡的情況。更有文獻指出 statin 主要是干擾脂肪代謝中膽固醇生合成的途徑來發揮藥效，因此 statin 藥理作用曾被公認為是透過抑制 HMG-CoA reductase 活性來達成，但其中是透過何種詳細的機制去調控細胞仍不是很清楚。在本研究中，我們根據實驗結果推論美伐他汀確實會經由誘發神經細胞內 AMPK 活性上升的方式，來達到其對抗 A $\beta$  所導致之毒性。而在本研究中，我們透過進一步回補 Mevastatin 作用下游分子 Mevalonate，卻發現不會對細胞

存活率有顯著的影響，因此我們推論若美伐他汀確實會影響細胞的存活，有可能是透過 HMG-CoA Reductase 以外途徑的影響造成。因此很意外地，詳細的神經保護機轉可能不是透過抑制 HMG-CoA reductase 活性來達成。關於此部分，究竟美伐他汀是否有其他另外的作用機制，則仍有待進一步的實驗來加以探討。

先前我們實驗室曾發現以 A $\beta$  處理後的細胞，再加入 statins 類的藥物(e.g. Simvastatin、Mevastatin、Lovastatin 等)皆會回復 A $\beta$  處理後細胞的存活率，且其機制主要是透過提升細胞自噬(Autophagy)來達到減緩 A $\beta$  對神經細胞所造成的傷害。過去的文獻中發現細胞自噬對神經退化性疾病具有很大的影響，在一些生命週期較長或是不正常堆疊的蛋白，其通常都是在代謝循環時細胞自噬作用失去正常的調節功能，不正常摺疊蛋白迅速累積，進而造成許多神經退化性疾病。例如在阿茲海默症中之 A $\beta$  乙型類澱粉蛋白堆積，帕金森氏症中之  $\alpha$ -synuclein 不正常堆積而使細胞自噬活性下降、狂牛症(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)也是由於 prion 蛋白的不正常摺疊堆積而產生。由此可見細胞自噬在神經退化性疾病確實扮演重要的角色。

在過去的文獻中也發現細胞自噬會影響神經細胞之 A $\beta$  蛋白代謝，若細胞自噬受到不正常的抑制，則可能會造成 A $\beta$  蛋白的累積，進一步產生神經毒性並導致阿茲海默症的產生。由於美伐他汀的神經保護效果目前仍不是非常清楚，因此在未來我們將去進一步確認美伐他汀是否會誘導細胞自噬，並透過此機制來減少 A $\beta$  在神經細胞中累積的量。我們希望透過我們的研究能釐詳細的機轉，能有助於在未來對於發展新的治療阿茲海默症策略能有所助益。

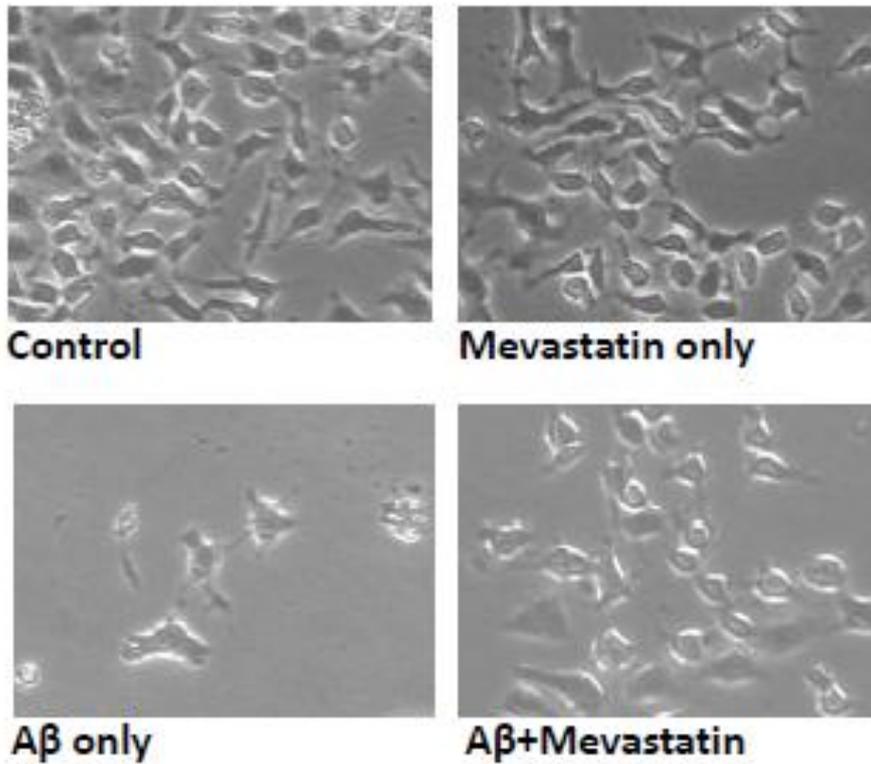
## 重要參考文獻

1. Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., Tsuang, D.W., 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23, 213-27.
2. Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2009. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 783-93.
3. Cardoso, S., Correia, S., Santos, R.X., Carvalho, C., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., Moreira, P.I., 2009. Insulin is a two-edged knife on the brain. *J Alzheimers Dis.* 18, 483-507.
4. Carlsson, C.M., 2010. Type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20, 711-22.
5. Chuang, W.L., Hsieh, Y.C., Wang, C.Y., Kuo, H.C., Huang, C.C., 2010. Association of apolipoproteins e4 and c1 with onset age and memory: a study of sporadic Alzheimer disease in Taiwan. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23, 42-8.
6. Craft, S., 2009. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol.* 66, 300-5.
7. Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V., Eanes, E.D., 1984. The amyloid deposits

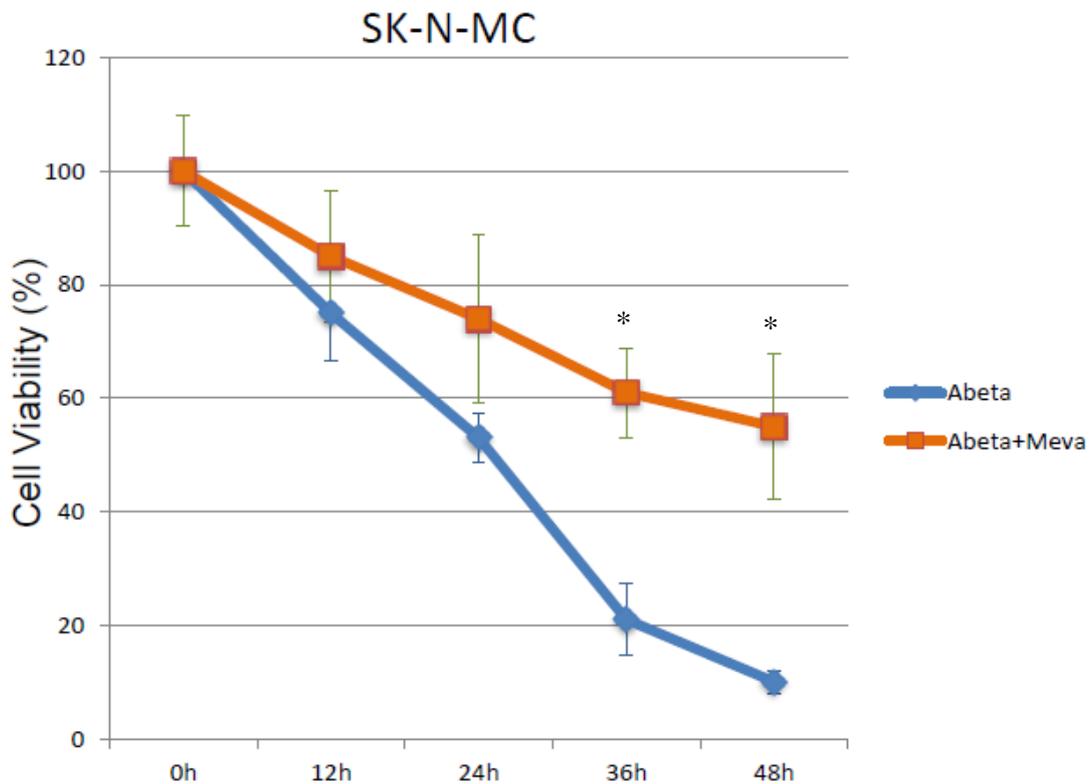
- in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2, 357-69.
8. Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I., 2010a. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 7, 656-64.
  9. Iqbal, K., Wang, X., Blanchard, J., Liu, F., Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I., 2010b. Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration: pivotal and multifactorial. *Biochem Soc Trans.* 38, 962-6.
  10. Ittner, L.M., Gotz, J., 2011. Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 12, 65-72.
  11. Leduc, V., Jasmin-Belanger, S., Poirier, J., 2010. APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 16, 469-77.
  12. Marques, S.C., Oliveira, C.R., Outeiro, T.F., Pereira, C.M., 2010. Alzheimer's disease: the quest to understand complexity. *J Alzheimers Dis.* 21, 373-83.
  13. Murphy, M.P., LeVine, H., 3rd, 2010. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis.* 19, 311-23.
  14. Osborn, G.G., Saunders, A.V., 2010. Current treatments for patients with Alzheimer disease. *J Am Osteopath Assoc.* 110, S16-26.
  15. Rafalski, V.A., Brunet, A., 2011. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Prog Neurobiol.* 93, 182-203.
  16. Schurks, M., Zee, R.Y., Buring, J.E., Kurth, T., 2008. Interrelationships among the MTHFR 677C>T polymorphism, migraine, and cardiovascular disease. *Neurology.* 71, 505-13.
  17. Verghese, P.B., Castellano, J.M., Holtzman, D.M., 2011. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* 10, 241-52.
  18. Vingtdeux, V., Giliberto, L., Zhao, H., Chandakkar, P., Wu, Q., Simon, J.E., Janle, E.M., Lobo, J., Ferruzzi, M.G., Davies, P., Marambaud, P., 2010. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem.* 285, 9100-13.
  19. Vishal, S., Sourabh, A., Harkirat, S., 2011. Alois Alzheimer (1864-1915) and the Alzheimer syndrome. *J Med Biogr.* 19, 32-3.
  20. Yap, F., Craddock, L., Yang, J., 2011. Mechanism of AMPK Suppression of LXR-dependent Srebp-1c Transcription. *Int J Biol Sci.* 7, 645-50.
  21. Klionsky, D.J., Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(11): p. 931-7.
  22. Stromhaug, P.E. and D.J. Klionsky, Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*, 2001. 2(8): p. 524-31.
  23. Mizushima, N., et al., Autophagy fights disease through cellular self-digestion.

- Nature, 2008. 451(7182): p. 1069-75.
24. Chen, N. and V. Karantza-Wadsworth, Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1793(9): p. 1516-23.
  25. Yoshimori, T., Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 313(2): p. 453-8.
  26. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 2010. 221(1): p. 3-12.
  27. Liang, X.H., et al., Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 1999. 402(6762): p. 672-6.
  28. Schmid, D. and C. Munz, Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*, 2007. 27(1): p. 11-21.
  29. Ohsumi, Y., Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(3): p. 211-6.
  30. Araki, M. and K. Motojima, Hydrophobic statins induce autophagy in cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 367(2): p. 462-7.
  31. Cheng, J., et al., Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 351(1): p. 246-52.
  32. Ohsumi, Y., Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(3): p. 211-6.
  33. Lee, J.A. and F.B. Gao, Regulation of Abeta pathology by beclin 1: a protective role for autophagy? *J Clin Invest*, 2008. 118(6): p. 2015-8.
  34. Yoon, S.Y., et al., Okadaic acid increases autophagosomes in rat neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 2008. 86(14): p. 3230-9.

## 附圖

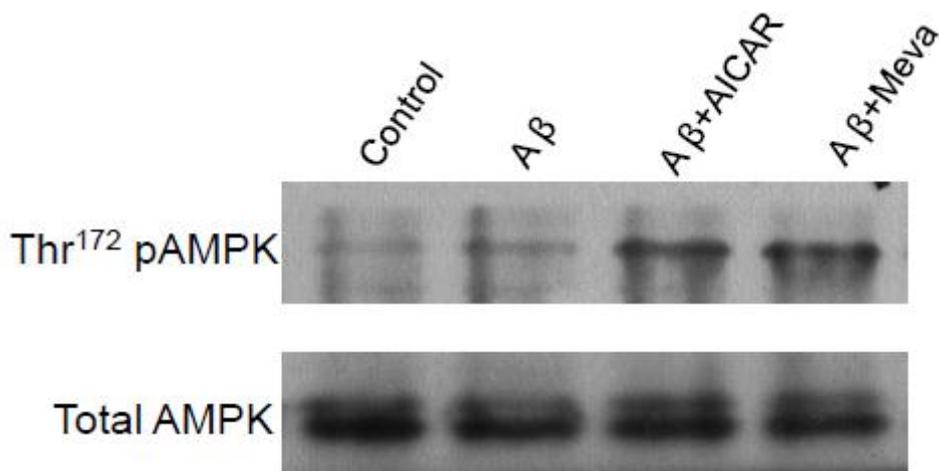


圖一、美伐他汀(mevastatin)可以減緩乙型類澱粉蛋白(A $\beta$ )導致之神經細胞死亡。由圖中發現，在外加乙型類澱粉蛋白(A $\beta$ ) 10 $\mu$ M 時，神經細胞在 48 小時後有明顯的死亡情形。但在同時加入美伐他汀(mevastatin)時，神經細胞死亡的情況則有明顯的降低。

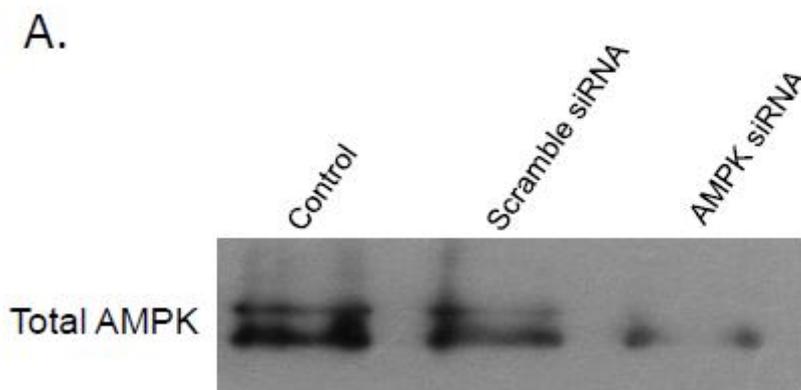


圖二、處理美伐他汀(mevastatin)可以減緩乙型類澱粉蛋白(A $\beta$ )導致之神經細胞死亡。由 MTT Cell viability 實驗發現，在外加乙型類澱粉蛋白(A $\beta$ ) 10 $\mu$ M 時，SK-N-MC 神經細胞在

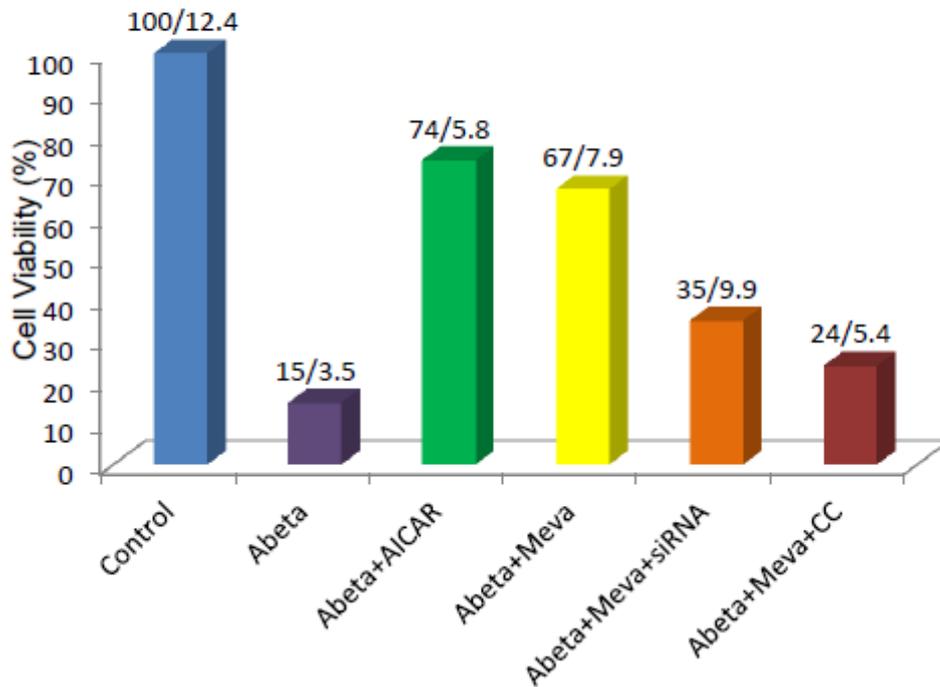
48 小時後有明顯的死亡情形。但在同時加入美伐他汀(mevastatin)時，神經細胞死亡的情況有明顯的降低，此種美伐他汀保護的情形自 36 小時起具有顯著差異。(\* represents as  $P < 0.05$ )



圖三、美伐他汀(mevastatin)處理 SK-N-MC 神經細胞具有誘發 AMPK Thr<sup>172</sup> 磷酸化的情形。由 Western blotting 實驗結果發現，在 Control 及加入 10  $\mu$ M A $\beta$  時，AMPK 並不具有顯著磷酸化的現象。而再美伐他汀(mevastatin)時或 AMPK 的促進劑 AICAR 時，SK-N-MC 神經細胞在 24 小時後 AMPK 有明顯的磷酸化，代表此時 AMPK 進入活化的狀態。

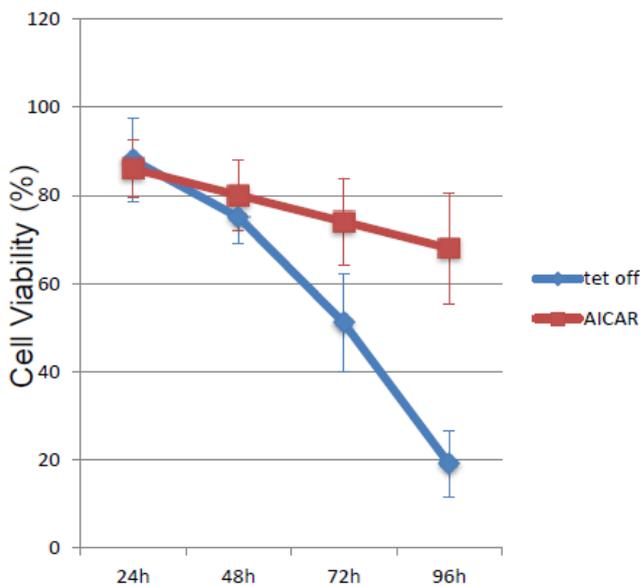


B.

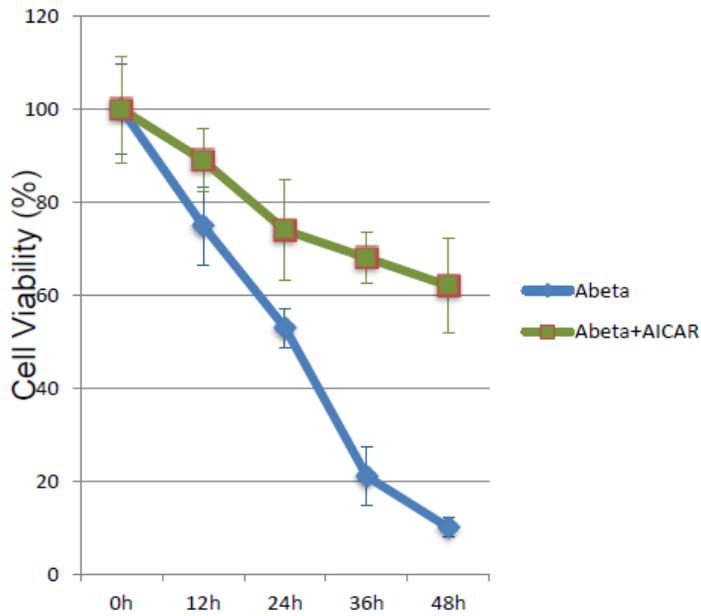


圖四、美伐他汀(mevastatin)的神經保護作用與 AMPK 的活化作用有關。A 圖說明當利用 AMPK siRNA 進行 gene knockdown 時，神經細胞內的 AMPK 蛋白質表現確實具有顯著的抑制作用。B 圖結果顯示，若利用 siRNA 將 AMPK 蛋白表現抑制後，美伐他汀(mevastatin)的神經保護效果便有明顯的降低。

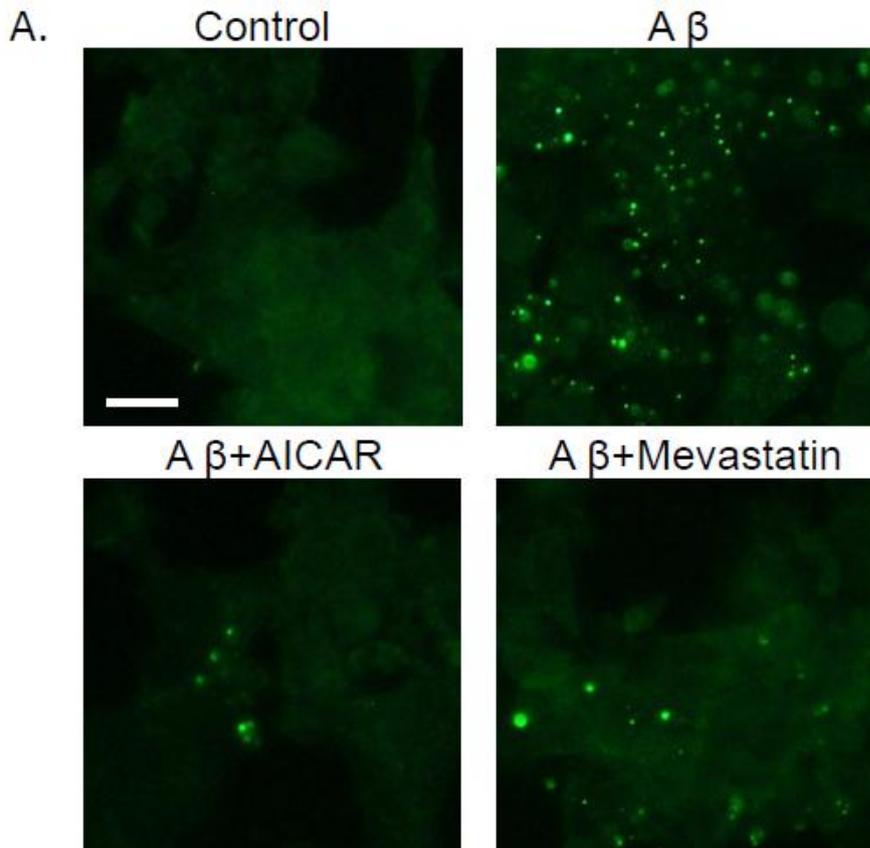
A. MC65 cell



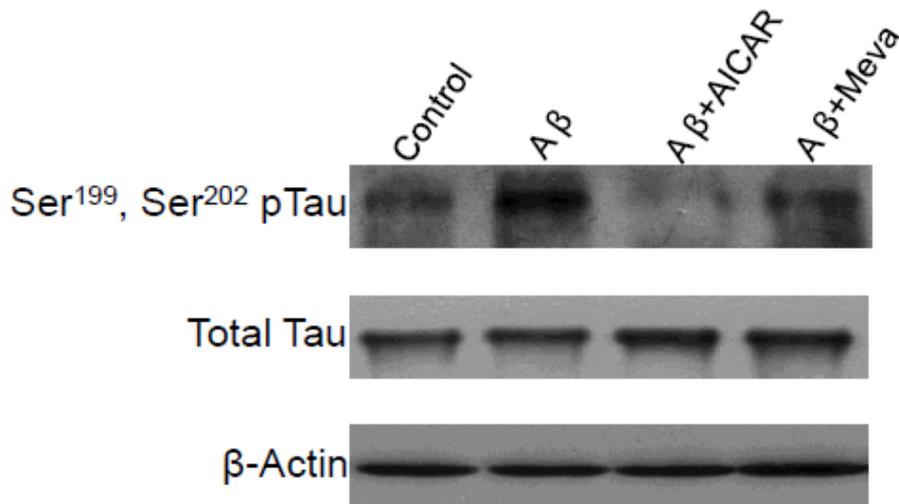
## B. SK-N-MC cell



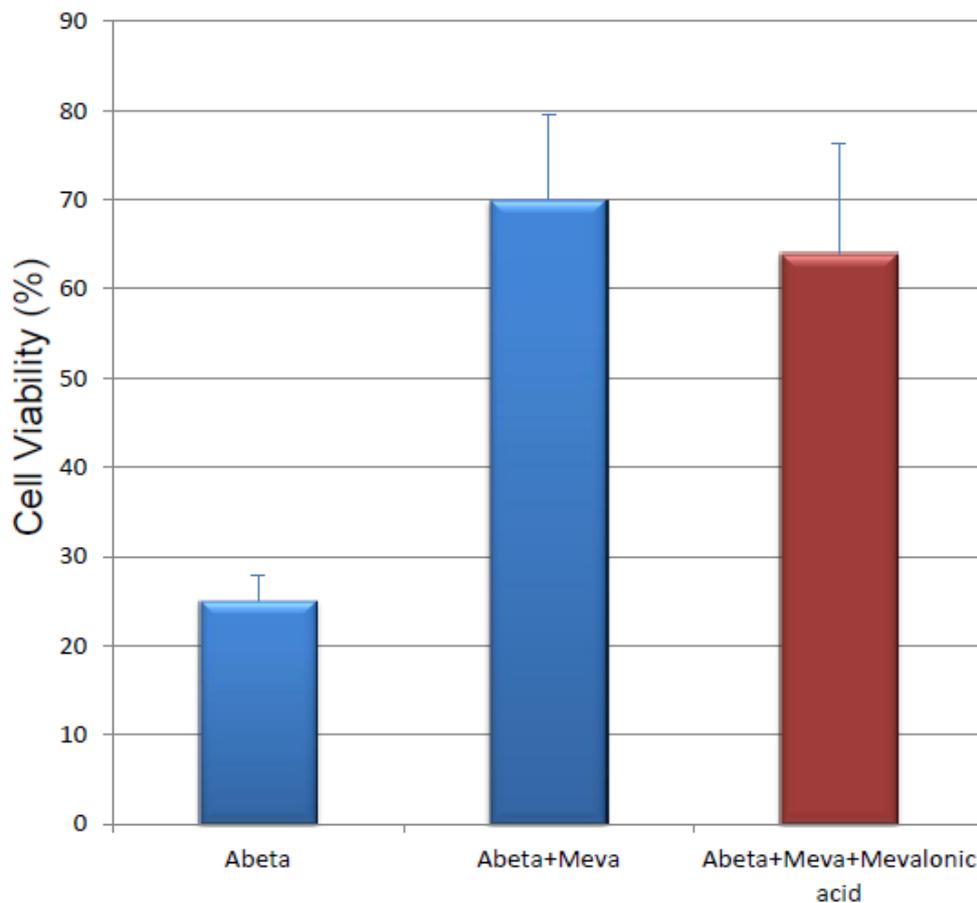
圖五、活化 AMPK 而保護神經的作用，同時存在於內生性(Endogenous)及外源性(Exogenous)之  $A\beta$  處理。由圖中發現，在加入 AICAR 這種 AMPK 活性促進劑時，神經細胞的存活率有明顯增加，而這種保護現象同時在內生性(圖 A, MC65 cells)及外源性(圖 B, SK-N-MC cells)給予  $A\beta$  均存在顯著的保護作用。



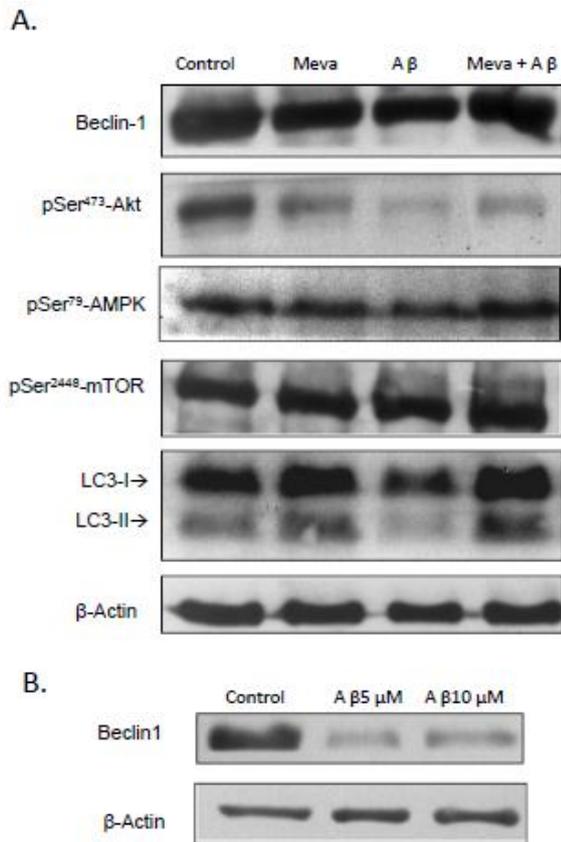
B.



圖六、美伐他汀(mevastatin)處理具有減低 A $\beta$  導致之 Tau 過磷酸化現象。同時由免疫螢光染色(A 圖)與 Western blotting(B 圖)的結果發現，在加入 AICAR 或美伐他汀(mevastatin)時，Tau 蛋白的磷酸化有明顯的減低。

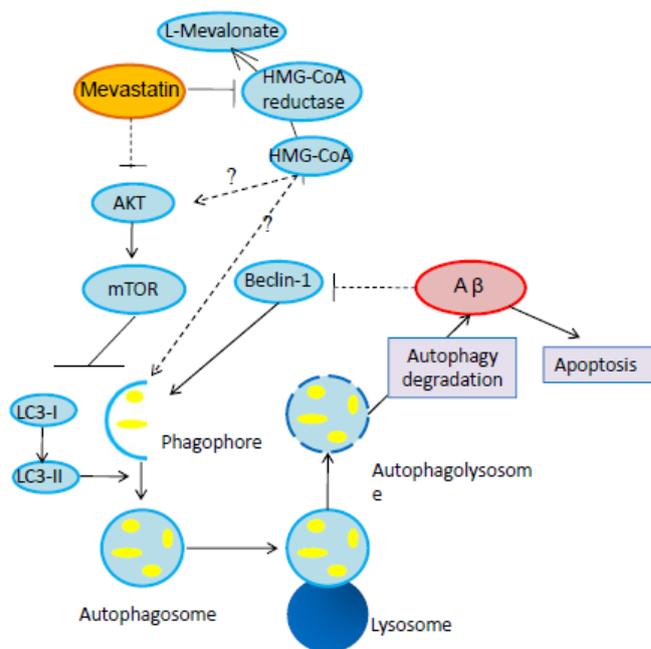


圖七、美伐他汀(mevastatin)對抗 A $\beta$  之神經保護作用可能不是透過抑制膽固醇生合成之過程。由圖中的實驗結果發現，在直接加入膽固醇生合成之速率決定酵素 HMG-CoA 之下游中間產物 Mevalonic acid (50  $\mu$ M)時，美伐他汀(mevastatin)仍具有明顯的神經保護效果。



圖八、Aβ 會抑制細胞自噬活性，而 Mevastatin 則會促使細胞自噬活性提高。

以上結果顯示 Aβ 會抑制細胞自噬活性，而 Mevastatin 則會促使細胞自噬活性提高。(a)加入 3 μM Aβ 處理後，會使細胞自噬的活性顯著的下降，而再加入 Mevastatin 則會回復減低的細胞自噬活性。(B) SK-N-MC 細胞加入 5、10 μM Aβ 處理後，Beclin-1 蛋白的量顯著的下降。



圖九、Mevastatin 與細胞自噬相互關係的模式圖。

**國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議  
心得報告**

日期：101年10月30日

計畫編號	NSC 98-2320-B-040-015-MY3		
計畫名稱	腺苷單磷酸活化激酶對抗類澱粉蛋白導致之神經毒性 機轉之研究		
出國人員 姓名	林志立	服務機 構及職 稱	中山醫學大學醫學研究所 助理教授
會議時間	101年7月 14日至 101年7月 18日	會議地  點	CCIB,  Barcelona, Spain
會議名稱	(中文) 第八屆歐洲神經年會 (英文) 8 <sup>th</sup> The Federation of European Neuroscience Societies		
發表論文 題目	(中文) A $\beta$ 經由活化 antizyme 路徑干擾神經細胞內 tubulin 之正常組合 (英文) Amyloid $\beta$ interferes with assembly of tubulin by an antizyme dependent pathway in neuronal cells		

## 一、參加會議經過

FENS (Federation of European Neuroscience Societies)為歐洲地區最大規模之神經學定期會議，也是歐洲影響力最大的神經科學盛會。此會議間隔每兩年舉辦一次，今年選擇在西班牙的巴塞隆納舉辦。根據大會公告今年有將近 1500 篇的海報被發表，3000 位以上註冊的會員參與本次會議，關於此次會議的參加心得報告，以下將就與會活動參與的數項內容簡要說明：

本次研討會的研究論文都是以摘要的形式先行投稿，經審閱後被接受刊登的研究性論文(僅計海報式發表)共有 160 個子議題被發表，此外另有 32 個 sessions 的討論議程進行。進入大會展覽廳後第一個映入眼簾的便是與會各國的國旗，其中也包括我們青天白日的國旗，載遠離他鄉的地方看見自己國家的國旗心情確實十分激動，但與大會整體比較而言，來自台灣發表的論文篇數還是相對較少，由於這種大型學術活動對於進行國際交流深具學術價值，希望將來也能有更多的國人能參與本會，將有益於提高台灣在本領域的國際能見度與貢獻度。

本次 FENS 討論的主題涵蓋所有神經科學相關議題，但今年除往年所注重之疾病分子機轉外，今年特別強調心理以及認知科學的研究討論。今年的開場演講便請來牛津大學的 Matthew

Rushworth，講題是關於 Reward-guided learning and decision making in the frontal lobe，Dr. Rushworth 是 MRI 研究的專家，深入淺出的敘述了額葉在進行學習與決定時的運作路徑。而個人的海報論文被大會安排至 7 月 16 號上午於編號 C102 的位置展示，並訂於同日上午 11：15 至 12：15 擔任解說與答辯。

## 二、與會心得

本次會展的位置位在巴塞隆納較偏遠的地區，但是進入會場後便發現人潮洶湧，讓人感覺到歐洲的神經研究的氛圍似乎完全沒有受金融危機的影響。還是非常感謝國科會能予以個人補助本次出國會議，藉此機會能與來自全球各地的專家學者齊聚一堂，針對個人的研究相關議題相互觀摩討論交流。在會中我們特別參與了由 Sandra Ceccatelli 與 Jordi Llorens 所主持的”Mechanisms of neurotoxicity and implications for neurological disorders”討論，會中敘述到許多最新關於神經病理相關的知識與看法，包括混沌不明的 Autophagy-induced neuronal death 等觀念，均有相係而有系統的加以論述闡說，對個人未來的研究思考影響甚大。希望國內同仁今後能有機會多參與此類活動，將十分有助益於跟上國際的腳步，同時也希望國內的神經學研究技術日新月異、快速發展。

### 三、考察參觀活動(無是項活動者略)

無考察參觀活動

### 四、建議

FENS 歷年來所舉辦的會議皆極具規模及專業水準，因此根據我的觀察提出以下兩點建議：

(1) 由於在台灣神經科學領域目前沒有辦法像 FENS 一樣舉辦一個專門的研討會，經常都是附屬於各種基礎研究之中的一個小部份而已。因此若在未來有機會，國科會應積極爭取類似的大型國際會議在台灣舉辦，除能提高國際知名度外，觀摩他人一流的研究成果也將有益於刺激國內研究成果更上一層樓。

(2) 與往常相同，這次會議台灣的參與者人數似乎又來得比往年更少，相對的中國大陸的學者不但數量年年增多，在研究成果質的方面也幾乎與歐美最先進的研究水準不相上下。我個人認為這對台灣的研究界來說真的是一個嚴重警訊，台灣是一個物資缺乏的國家，要能在國際立足就必須持續的維持一定的研發能量，希望主政者能據此有更高更宏觀的視野，來避免台灣未來落入研究上二流國家的窘境。

以上各點為我觀察結果，最後，本人再一次由衷地感謝國科會能補助個人參加本次論文發表的費用，能與各國許多傑出的研究學

者當面交流討論，所獲得的經驗知識是難以取代的。同時也警惕自己必須時時努力不懈，以免落後那些學術研究先趨的腳步。

## 五、攜回資料名稱及內容

1. 大會會議手冊及議程表 (一套)
2. 大會發表論文摘要(電子檔)
3. Poster speaker 識別證
4. 藥廠及儀器商所提供之相關資料

## 六、其他

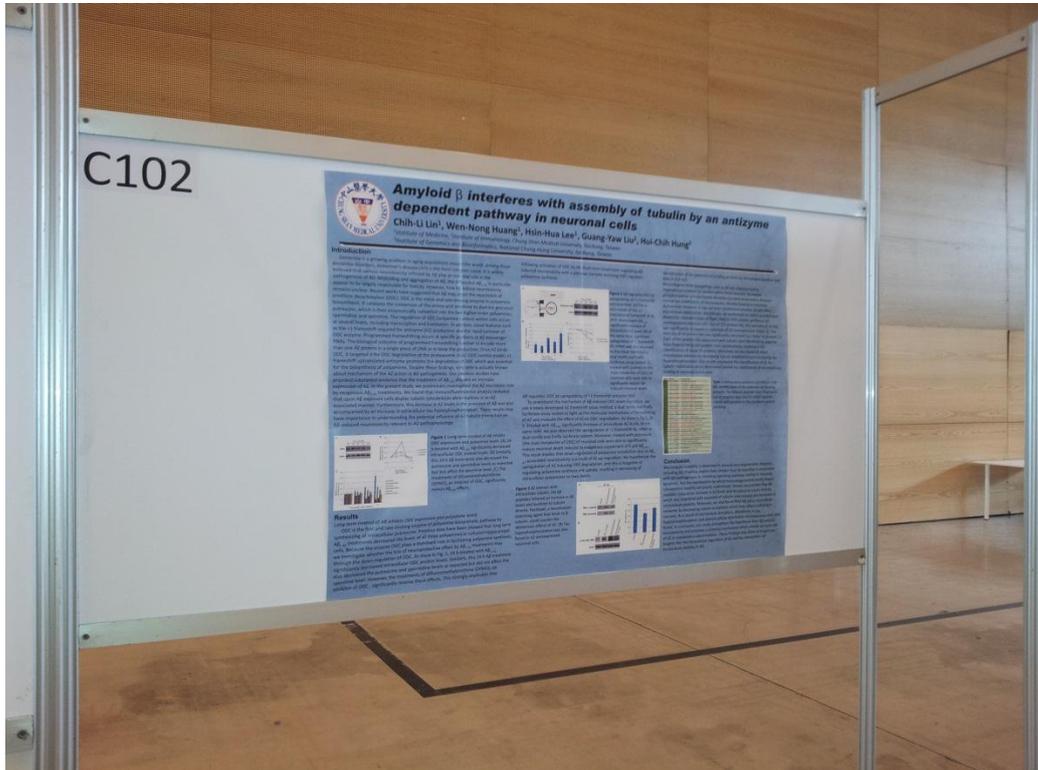
參與大會之照片



大會會場入口



大會展覽廳一覽



本次會議所發表的海報論文

## 大會投稿論文接受函

寄件者: FENS Forum 2012 <fensforum2012@abstractserver.com>  
寄件日期: 2012年2月28日星期二下午 7:08  
收件者: dll@csmu.edu.tw  
主旨: FENS Forum 2012 - Abstract Presentation Notification A-471-0088-01019  
重要性: 高

Abstract Presentation Notification  
**The 8th FENS Forum of Neuroscience**  
Barcelona, Spain, 14 - 18 July, 2012

Dear Chih-Li Lin,

On behalf of the Scientific Programme Committee, we are pleased to inform you that your abstract A-471-0088-01019 entitled "**AMYLOID B INTERFERES WITH ASSEMBLY OF TUBULIN BY AN ANTIZYME DEPENDENT PATHWAY IN NEURONAL CELLS**" has been accepted as a **POSTER PRESENTATION** at the *The 8th FENS Forum of Neuroscience*.

Detailed guidelines for the preparation of your poster are available on the congress website at [http://www2.kenes.com/fens/Pages/Abstract\\_instructions.aspx](http://www2.kenes.com/fens/Pages/Abstract_instructions.aspx)

Your poster allocation and scheduling will be sent to you in the near future.

Please refer to the *FENS Forum 2012* scientific programme on <http://fens2012.neurosciences.asso.fr/pages/index2.php?sub=10&left=105> for updates or changes from time to time.

1. If you have not already paid your registration fees you are requested to do so online via the link: <https://www.kenes.com/fens2012/reg/reg.asp>

**Only abstracts of participants who have paid their fees by April 15, 2012 will be included in the programme.**

2. We also encourage you to book your accommodation promptly, as availability may be limited in some hotels. Click on [http://www2.kenes.com/fens/Pages/Hotel\\_Accommodation.aspx](http://www2.kenes.com/fens/Pages/Hotel_Accommodation.aspx) for more information on available hotels for the Meeting.

3. Please do visit the congress website on <http://fens2012.neurosciences.asso.fr/index.php> regularly for any updates or changes to the Scientific Programme.

### FURTHER INFORMATION

For technical questions regarding your abstract submission please contact [fensforum2012@abstractserver.com](mailto:fensforum2012@abstractserver.com). For all other queries, please do contact the secretariat at [FENS@kenes.com](mailto:FENS@kenes.com)

Yours sincerely,

FENS Forum 2012 Abstract Team on behalf of the Scientific Programme Committee

## 投稿論文摘要

Title:

Amyloid  $\beta$  interferes with assembly of tubulin by an antizyme dependent pathway in neuronal cells

Authors:

Chih-Li Lin<sup>1</sup>, Wen-Nong Huang<sup>1</sup>, Hsin-Hua Lee<sup>1</sup>, Guang-Yaw Liu<sup>2</sup>, Hui-Chih Hung<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Medicine, <sup>2</sup>Institute of Immunology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.*

<sup>3</sup>*Institute of Genomics and Bioinformatics, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan.*

Microtubule instability is observed in several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). Studies have shown that amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) deposition is associated with AD pathogenesis by initiating signaling pathways leading to neuronal apoptosis, but the mechanisms by which neurodegenerative insults impact cytoskeleton stability are poorly understood. Our previous studies have provided substantial evidence that the treatment of  $A\beta$  showed an increase expression of antizyme (AZ), a negative regulator of ornithine decarboxylase (ODC) enzyme activity and polyamine transportation. However, immunofluorescence analysis revealed that upon  $A\beta$  exposure cells display cytoskeleton abnormalities in an AZ-associated manner. Herein we show that  $A\beta$  peptides induced an increase in AZ levels and localized to tubulin directly, which was interfered with assembly of tubulin and related with decreases in microtubule stability. Moreover, we also found that  $A\beta$  alters microtubule networks by decreasing tubulin acetylation which may affect trafficking in neurons. As a result of microtubule disruption, alterations in tau hyperphosphorylation and altered cellular distribution of ODC were also found. In conclusion, our study strengthens the hypothesis that  $A\beta$ -induced neurotoxicity and provides a potential mechanism which reveals an early role of AZ in cytoskeleton abnormalities. These findings may allow us to get new insights into the intracellular regulation of AZ and tau interactions on microtubule stability in AD.



## Amyloid $\beta$ interferes with assembly of tubulin by an antizyme dependent pathway in neuronal cells

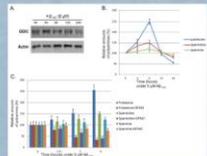
Chih-Li Lin<sup>1</sup>, Wen-Nong Huang<sup>1</sup>, Hsin-Hua Lee<sup>1</sup>, Guang-Yaw Liu<sup>2</sup>, Hui-Chih Hung<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medicine, <sup>2</sup>Institute of Immunology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.  
<sup>3</sup>Institute of Genomics and Bioinformatics, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan.

---

### Introduction

Dementia is a growing problem in aging populations around the world. Among these demented disorders, Alzheimer's disease (AD) is the most common cause. It is widely believed that various neurotoxicity inflicted by  $A\beta$  play an essential role in the pathogenesis of AD. Misfolding and aggregation of  $A\beta$ , the 42 residue  $A\beta_{1-42}$  in particular, appear to be largely responsible for toxicity. However, how  $A\beta$  induce neurotoxicity remains unclear. Recent works have suggested that  $A\beta$  may affect the expression of ornithine decarboxylase (ODC). ODC is the initial and rate-limiting enzyme in polyamine biosynthesis. It catalyzes the conversion of the amino acid ornithine to diamine precursor putrescine, which is then enzymatically converted into the two higher-order polyamines, spermidine and spermine. The regulation of ODC/polyamine content within cells occurs at several levels, including transcription and translation. In addition, novel features such as the +1 frameshift required for antizyme (AZ) production and the rapid turnover of ODC enzyme. Programmed frameshifting occurs at specific positions of AZ messenger RNAs. The biological outcome of programmed frameshifting is either to encode more than one AZ protein in a single piece of DNA or to keep the production. Once AZ binds ODC, it targeted it for ODC degradation at the proteasome. In AZ-ODC control model, +1 frameshift uptranslated-antizyme promotes the degradation of ODC which was essential for the biosynthesis of polyamines. Despite these findings, very little is actually known about mechanism of the AZ action in AD pathogenesis. Our previous studies have provided substantial evidence that the treatment of  $A\beta_{1-42}$  showed an increase expression of AZ. In the present study, we preliminary investigated the AZ neurotoxic role by exogenous  $A\beta_{1-42}$  treatments. We found that immunofluorescence analysis revealed that upon  $A\beta$  exposure cells display tubulin cytoskeleton abnormalities in an AZ-associated manner. Furthermore, this increase in AZ levels in the presence of  $A\beta$  was also accompanied by an increase in intracellular tau hyperphosphorylation. These results may have importance in understanding the potential influence of AZ-tubulin interaction on  $A\beta$ -induced neurotoxicity relevant to AD pathophysiology.

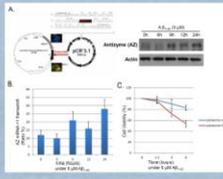


**Results**

*Long-term treated of  $A\beta$  inhibits ODC expression and polyamine levels*

ODC is the first and rate-limiting enzyme of polyamine biosynthetic pathway by synthesizing of intracellular putrescine. Previous data have been showed that long term  $A\beta_{1-42}$  treatments decreased the levels of all three polyamines in cultured hippocampal cells. Because the enzyme ODC plays a dominant role in facilitating polyamine synthesis, we investigate whether the loss of neuroprotective effect by  $A\beta_{1-42}$  treatments may through the down-regulation of ODC. As show in Fig. 1, 24 h-treated with  $A\beta_{1-42}$  significantly decreased intracellular ODC protein levels. Similarly, this 24 h  $A\beta$  treatment also decreased the putrescine and spermidine levels as expected but did not affect the spermine level. However, the treatments of difluoromethylornithine (DFMO), an inhibitor of ODC, significantly reverse these effects. This strongly implicates that

following activation of ODC by  $A\beta$  short-term treatments regulating  $A\beta$ -induced neurotoxicity with a pathway partially involving ODC regulates polyamine synthesis.

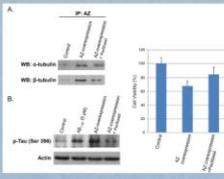


*$A\beta$  regulates ODC by upregulating of +1 frameshift antizyme RNA*

To understand the mechanism of  $A\beta$ -induced ODC down-regulation, we use a newly developed AZ frameshift assay method: a dual *renilla* and firefly luciferase assay system to light up the molecular mechanisms of frameshifting of AZ and evaluate the effect of AZ on ODC degradation. As show in Fig. 5, 24 h-treated with  $A\beta_{1-42}$  significantly increase of intracellular AZ levels. At the same time, we also observed the upregulation of +1 frameshift AZ mRNA in dual *renilla* and firefly luciferase assay system. Moreover, treated with putrescine (the main metabolite of ODC) of neuronal cells were able to significantly reduce  $A\beta$ -induced neuronal death.

*$A\beta$  regulates ODC by upregulating of +1 frameshift antizyme RNA*

To understand the mechanism of  $A\beta$ -induced ODC down-regulation, we use a newly developed AZ frameshift assay method: a dual *renilla* and firefly luciferase assay system to light up the molecular mechanisms of frameshifting of AZ and evaluate the effect of AZ on ODC degradation. As show in Fig. 5, 24 h-treated with  $A\beta_{1-42}$  significantly increase of intracellular AZ levels. At the same time, we also observed the upregulation of +1 frameshift AZ mRNA in dual *renilla* and firefly luciferase system. Moreover, treated with putrescine (the main metabolite of ODC) of neuronal cells were able to significantly reduce neuronal death induced by exogenous supplement of 5  $\mu$ M  $A\beta_{1-42}$ . This result implies that down-regulation of polyamine metabolism due to  $A\beta_{1-42}$ -associated neurotoxicity is a result of AZ up-regulation. We hypothesize the upregulation of AZ inducing ODC degradation, and this is incapable of regulating polyamine synthesis and uptake, resulting in decreasing of intracellular polyamines to toxic levels.



*AZ interact with intracellular tubulin*

(A)  $A\beta$  peptides induced an increase in AZ levels and localized to tubulin directly, paclitaxel, a microtubule-stabilizing agent that binds to  $\beta$ -tubulin, could counter the deleterious effects of AZ. (B) Tau hyperphosphorylation was also found in AZ overexpressed neuronal cells.

*Identification of the potential AZ binding proteins by Immunoprecipitation and MALDI-TOF-MS*

Neurodegenerative tauopathies such as AD are characterized by hyperphosphorylated tau protein within brain neurons. Increased phosphorylation and decreased solubility has been proposed to diminish normal tau stabilization of microtubules, thereby leading to neuronal dysfunction. However, it has not been established whether AZ will affect microtubule stabilization. Accordingly, we performed an matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) protein profiles of AZ-overexpressed neuronal cells. Out of 293 protein hits, the intensity of 26 hits was significantly increased by induction of AZ overexpression (Table 1). The intensity of 35 protein hits was significantly increased by a factor of at least 1.5. Eight of the proteins hits associated with tubulin were identified by peptide mass fingerprinting and tandem mass spectrometry, resulting in the identification of above 35 proteins. Moreover, we also found AZ alters microtubule networks by decreasing tubulin stabilization and increasing tau hyperphosphorylation. Our results emphasize the identification of AZ for tubulin stabilization which diminished normal tau stabilization of microtubules leading to neuronal dysfunction.

Protein	Accession
1	Q99752
2	P04637
3	P04637
4	P04637
5	P04637
6	P04637
7	P04637
8	P04637
9	P04637
10	P04637
11	P04637
12	P04637
13	P04637
14	P04637
15	P04637
16	P04637
17	P04637
18	P04637
19	P04637
20	P04637
21	P04637
22	P04637
23	P04637
24	P04637
25	P04637
26	P04637
27	P04637
28	P04637
29	P04637
30	P04637
31	P04637
32	P04637
33	P04637
34	P04637
35	P04637

**Conclusion**

Microtubule instability is observed in several neurodegenerative diseases, including AD. Previous studies have shown that  $A\beta$  deposition is associated with AD pathogenesis by initiating signaling pathways leading to neuronal apoptosis, but the mechanisms by which neurodegenerative insults impact cytoskeleton stability are poorly understood. Herein we postulate that  $A\beta$  peptides induced an increase in AZ levels and localized to tubulin directly, which was interfered with assembly of tubulin and related with decreases in microtubule stability. Moreover, we also found that  $A\beta$  alters microtubule networks by decreasing tubulin acetylation which may affect trafficking in neurons. As a result of microtubule disruption, alterations in tau hyperphosphorylation and altered cellular distribution of polyamines were also found. In conclusion, our study strengthens the hypothesis that  $A\beta$ -induced neurotoxicity and provides a potential mechanism which reveals an early role of AZ in cytoskeleton abnormalities. These findings may allow us to get new insights into the intracellular regulation of AZ and tau interactions on microtubule stability in AD.

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/30

國科會補助計畫	計畫名稱: 腺 單磷酸活化激酶對抗類澱粉蛋白導致之神經毒性機轉之研究
	計畫主持人: 林志立
	計畫編號: 98-2320-B-040-015-MY3 學門領域: 醫學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：林志立		計畫編號：98-2320-B-040-015-MY3				計畫名稱：腺脲單磷酸活化激酶對抗類澱粉蛋白導致之神經毒性機轉之研究	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	3	3	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	4	5	100%	人次	
		博士生	0	1	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	3	3	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>本計畫結果曾獲國際資料庫 Faculty 1000 Medicine 推薦入選</p>
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本研究初步的結果發現美伐他汀(mevastatin)會造成神經細胞內 AMPK 的活性上升，並透過誘發 AMPK 活性增加造成細胞自噬的活性上升，進而發揮其神經保護的效果。事實上，而過去研究也已發現 statin 藥物確實會造成 AMPK 活性上升，並進一步改變細胞內能量平衡的情況。更有文獻指出 statin 主要是干擾脂肪代謝中膽固醇生合成的途徑來發揮藥效，因此 statin 藥理作用曾被公認為是透過抑制 HMG-CoA reductase 活性來達成，但其中是透過何種詳細的機制去調控細胞仍不是很清楚。但在本研究成果中，我們發現進一步回補 Mevastatin 作用下游分子 Mevalonate，卻發現不會對細胞存活率有顯著的影響，因此我們推論若美伐他汀確實會影響細胞的存活，有可能是透過 HMG-CoA Reductase 以外途徑的影響造成。因此很意外地，詳細的神經保護機轉可能不是透過抑制 HMG-CoA reductase 活性來達成。關於此部分，究竟美伐他汀是否有其他另外的作用機制，則仍有待進一步的實驗來加以探討。此外，已知啟動細胞自噬的機制與脂肪酸代謝途徑息息相關，過去的文獻中發現細胞自噬對神經退化性疾病有很大的影響，一些生命週期較長或是不正常堆疊的蛋白通常都由細胞自噬代謝循環發生障礙所致，因此，若細胞自噬作用失去功能的時候便會造成很多的疾病，特別是在神經退化性疾病，其通常都由不正常摺疊蛋白的堆積造成，例如在阿茲海默症中由 A $\beta$  類澱粉蛋白堆積造成、帕金森氏症則由於 Beclin-1 異變而使細胞自噬活性下降、狂牛症也是由於 prion 蛋白的不正常摺疊堆積等，由此可見細胞自噬在神經退化性疾病扮演重要的角色。在過去的文獻中也發現細胞自噬會加速 A $\beta$  代謝，而在我們的研究結果亦指出增加細胞自噬可減輕 A $\beta$  所導致的神經毒性。此外，本研究初步的結

果發現  $A\beta$  會抑制 Beclin-1 蛋白，造成細胞自噬的活性下降，由此可知 Beclin-1 依賴的細胞自噬途徑在阿茲海默中扮演重要角色，並可以透過細胞自噬開啟一個新的治療阿茲海默症方式。因此在未來我們需要再去確認 Mevastatin 所誘導的細胞自噬實際上是否會減少細胞內  $A\beta$  的量，也需更進一步的探討其他的類似物，例如 resveratrol 在促進 AMPK 活性中所扮演的角色。總合來說，阿茲海默症目前在臨床上尚無任何直接針對  $A\beta$  累積所導致的神經毒性進行治療的藥物，而根據我們的研究發現，或許透過誘發細胞自噬將是一個全新的治療思維，特別是我們在另外一個國科會計畫中也已發現能誘發中樞神經系統細胞自噬的藥劑(NSC 99-2314-B-040-010)。我們希望經由本研究結果能藉著不同的方向切入，將來能在治療阿茲海默症能有新的想法及策略出現以造福病人。