

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 藉由Far Infrared Ray (FIR)能否增強天然酚在神經退 行性疾病中減少蛋白質摺疊、聚集的作用
------------	---

執行計畫學生：陳彥廷

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-043-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：王祖興

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 108年04月02日

題目:藉由 Far Infrared Ray (FIR)能否增強天然酚在神經退行性疾病中減少蛋白質摺疊、聚集的作用

摘要

隨著人類平均年齡的上升，老年人口逐漸地增加，統計發現罹患神經退行性疾病的人數也逐年增高，但是截至目前為止都還沒有很好的保健方法。目前比較新興的方法是利用天然酚來保健，但是也是沒有很好的效果。而近年來也有人利用 Far Infrared Ray (FIR)來保健這種令人困擾的疾病，但是效果也沒有像預期的那麼顯著。因此，鑒於以上原因，我就想找出更有效保健這種神經退行性相關疾病的方法。現今還鮮少有人把 FIR 與天然酚兩個對神經退行性疾病有效的保健方法做結合，因此本次計畫就是把 FIR 與天然酚結合在一起。會有這種想法是因為照射 FIR 的保健效果只侷限在身體的某部位，而使用天然酚則會被人體吸收，再經由血液流經全身，結合 FIR 與天然酚兩個有利於神經退行性疾病的保健方法，借此來達到全身性的保健。這次計畫是使用 MJD78 細胞來模擬神經退行性疾病，並且利用 MG132 來增強蛋白質的聚集，使蛋白質的堆積更容易被觀測。之後分別使用 FIR 與天然酚(EGCG/Oleuropein)來處理細胞，最後再把 FIR 與天然酚合併使用。最終比較 FIR 與天然酚的結合究竟是否比單獨使用天然酚對於神經退行性疾病還更具有減少蛋白質摺疊、聚集的作用。並用 WRL68 人類肝臟細胞、CHO-K1 中國倉鼠卵巢細胞為輔，探討 FIR 對氧化傷害的保護作用。實驗結果顯示 WRL68 細胞在照射 FIR120min 後，細胞對於 H₂O₂ 的氧化傷害具有增加 20% 的保護能力，最後推測 FIR 對 WRL68 細胞的抗氧化作用可能是藉由 FIR 的非熱效應所導致。

關鍵字: 神經退行性疾病、Far Infrared Ray(FIR)、天然酚(EGCG/Oleuropein)、MJD78、MG132、CHO-K1、WRL68、抗氧化作用、FIR 非熱效應

研究動機與研究問題

現今社會中發現具有阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)的人數愈來愈多，對於社會的負擔也越來越大，其發生的原因與蛋白質錯誤的摺疊和聚集有關，目前認為蛋白質折疊和聚集是由相似的物理化學性質決定的，因此是競爭過程【1】。錯誤的蛋白質折疊會使其本身變成不溶解且有細胞毒性，最後變成穩定有序的澱粉樣蛋白聚集體【2】。但是目前對於這些蛋白質錯誤的摺疊和聚集的疾病沒有很好的治療法【3】。而現在比較受關注的是利用天然酚(一種植物分子)，存在於綠茶，特級初榨橄欖油，紅酒，香料，漿果和香草，扮演澱粉樣蛋白抑制劑的角色，其作用是預防和治療澱粉樣蛋白，這也是幾種傳統飲食的有益作用的原因【4,5】。此外，FIR 對於預防蛋白質錯誤的摺疊和聚集也有不錯的功效【6】。另外 FIR 能改善在 H₂O₂ 中細胞的活力【42】。由於目前研究預防和治療澱粉樣蛋白的方法還沒有把天然酚與 FIR 做結合，因此本次的計畫就是結合 FIR 與天然酚。會讓我有這種想法是因為照射 FIR 只侷限在身體的某部位，而使用天然酚則會經由血液流經全身，結合 FIR 與天然酚兩個有利於神經退行性疾病的保健方法，借此來達到全身性的保健。會進行本次計畫目的是為了驗證出是否 FIR 能增強天然酚在神經退行性疾病中減少蛋白質摺疊、聚集的作用，進而找出更有利於保健神經退行性疾病的方法，並探討 FIR 對氧化傷害的保護作用。

文獻回顧及探討

蛋白質的錯誤摺疊和聚集

蛋白質的錯誤摺疊會缺乏最穩定的狀態，進而失去活性，而該過程也會使其具有毒性的型態，接著聚集成有序的聚合物或是與細胞的其他成分不當的結合，最終損害細胞的活動力與功能使細胞死亡【7】。錯誤的蛋白質折疊會使其本身變成不溶解且有細胞毒性，最後變成穩定有序的澱粉樣蛋白聚集體【2】。一般來說，蛋白質聚集成纖維原會導致合成增加、清除率降低、特异性突變、細胞機制缺陷，最後導致蛋白質內穩態不穩【8】。目前認為，在大多數情況下，蛋白質的功能型態變成聚集成澱粉樣蛋白纖維原是由折疊過程中產生的共有前驅物和動態平衡所導致。部分折疊狀態也可能由於錯誤加工，特定突變，微環境(溫度，pH，離子強度，壓力，剪切力，金屬離子或大分子濃度)的任何干擾或任何微環境，由天然狀態部分變性而產生【9】。在這些條件下，部分未折疊的分子顯示出改變的三級結構，同時保留或甚至增加次級結構，就像一些天然未折疊的蛋白質臨時獲得部分折疊型態一樣【10,11】。細胞暴露於早期聚集體之後，氧化壓力在細胞耐受性中起關鍵作用，這受到許多實驗數據的重視【12-14】。用抗氧化劑(如生育酚，硫辛酸，還原型穀胱甘肽或酚類物質)進行細胞處理可以保護細胞免於錯誤蛋白摺疊產生的毒【15-18】數據還指出通過降低蛋白酶體的活性和表達水平顯示老化和氧化壓力對

神經組織中細胞活力的直接影響 [19,20]，蛋白酶體被抑制可能導致氧化或其他損傷或蛋白質錯誤摺疊的累積，從而增加活性氧（ROS）的有害作用[21]。

蛋白質的錯誤摺疊和聚集造成的疾病

世界人口正在加速老化。隨著預期壽命的增加，更多的人將被診斷患有神經退行性疾病，例如阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)。這些疾病的特徵是大腦中異常蛋白質的聚集，其與特定的臨床症狀和認知缺陷相關聯。阿茲海默症的主要病理原因是由 β -澱粉樣蛋白纖維原和由過度磷酸化 tau 組成的神經纖維原纏結組成的神經炎斑【22】。這些疾病通常導致神經變性，但並不總是始於內側顳葉。儘管早期認知缺陷與記憶有關，隨著疾病進展，所有認知領域都出現下降【23-25】。帕金森病的主要病理原因是路易體，其主要由 α 突觸核蛋白組成【26】。雖然帕金森病的主要特徵是運動症狀逐漸惡化，但認知障礙和執行功能障礙也很常見【27-29】。

天然酚抗澱粉樣蛋白性質

EGCG:EGCG 是綠茶萃取物中最多多酚的，其對海馬神經元的 A β 毒性的保護主要歸因於其抗氧化活性【30】。EGCG 通過促進非澱粉樣蛋白 α -分泌酶蛋白水解途徑減少 A β 的產生和 A β -澱粉樣斑塊沉積【31】。EGCG 與澱粉樣蛋白的交互作用具有兩種不同的形式(i)EGCG 以非共價鍵隨機交互作用的方式與未摺疊或錯誤摺疊的蛋白質結合，使蛋白質聚集物從新導向形成小的非途徑寡聚物或無定形物質(ii)EGCG 結合蛋白質的天然型態藉由與特別殘基的側鏈的交互作用來預防蛋白質聚集【32,33】。EGCG 對蛋白酶體活性的抑制可以選擇性地控制腫瘤細胞的生長，並且能累積蛋白酶體蛋白基質例如:p27Kip1 和 I κ B-a。這一個發現以及 EGCG 的低毒性支持茶多酚在臨床治療中與目前的抗癌藥物聯合使用【34】。Oleuropein: 據報導橄欖苦苷是橄欖葉萃取物，橄欖油和橄欖的主要成分，可能通過蛋白酶體的型態變化而比其他已知的化學活化劑更強烈地增強體外蛋白酶體活性。此外，用橄欖苦苷連續處理早代的人胚胎成纖維細胞能降低細胞內活性氧的水平，並且在復制衰老期間能通過增加蛋白酶體介導的降解速率減少氧化蛋白的量並保留了蛋白酶體功能。【35】。大部分關於橄欖苦苷作為蛋白質聚集抑製劑的研究是在其苷元衍生物上進行的，其顯示干擾 hIAPP 和 A β 42 聚集【36,37】。

FIR 的功效

引起發熱的遠紅外輻射（FIR）包括波長在 4 和 1,000 μ m 之間的電磁波。最近有關 FIR 對健康和食品保存影響的研究很多，現有證據表明 FIR 的全身輻射有許多生物學效應。FIR 通過誘導 HO-1 能有效的抗發炎，在維持血液透析患者的血流量和 AVF 通暢性方面起到關鍵性的作用【38】。FIR 能控制熱休克蛋白（HSP）70A 的

表達水平，藉此來抑制癌細胞的增殖【39】。Hsp70 也能通過蛋白酶體促進蛋白水解去除氧化損傷的蛋白質【40】。

MJD(Machado-Joseph disease)78 細胞

MJD78 細胞是一種神經退行性疾病第三型小腦脊髓運動失調症（SCA3）的細胞模型，SCA3 是 ataxin-3 基因發生突變，通常含有 60-87 CAG 重複的延伸。這種疾病通常呈現在 45 至 70 歲之間，取決於 CAG 重複數量。SCA3 的特點是第四腦室由於變性而擴大腦幹和小腦逐漸發展為伴有共濟失調的肌肉萎縮。與其他神經退行性 PolyQ 疾病一樣，SCA3 的病理學機制涉及突變蛋白的聚集，線粒體功能障礙，細胞壓力最終導致細胞死亡。MJD26/78 是由神經母細胞瘤（SK-N-SH）轉導成不具致病性 ataxin-3-26Q 而具致病性 ataxin-3-78Q【6】。

蛋白酶體抑制劑

蛋白酶體負責參與細胞週期進程、基因表達、DNA 修復、細胞凋亡和信號轉導以及異常和錯誤折疊蛋白質的降解。蛋白酶體介導的蛋白質降解涉及泛素與特定蛋白質的共價連接以形成 Lys-48 連接的多聚遍在蛋白鏈，隨後將這些蛋白質募集至蛋白酶體進行降解。蛋白酶體 26S 是最常見的蛋白酶體形式，由含有蛋白酶活性的一個 20S 核心顆粒結構（700kDa）和兩個 19S 調節帽（每個 900kDa）組成。20S 核心顆粒內有三種類型的蛋白水解活性：半胱天冬酶樣，胰蛋白酶樣和胰凝乳蛋白酶樣活性。蛋白酶體抑制劑，包括 MG132 阻斷蛋白酶體複合物的蛋白水解活性【41】。

整體而言，本次的計畫就是結合 FIR 與天然酚來驗證出是否 FIR 能增強天然酚在神經退行性疾病中減少蛋白質摺疊、聚集的作用，進而找出更有效保健神經退行性疾病的方法，並探討 FIR 對氧化傷害的保護作用。

研究方法與步驟

細胞培養

本次計畫採用 MJD78 細胞來模擬神經退行性疾病，並用 MJD26 細胞當作對照組。MJD26/78 細胞在 DMEM-HG (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 培養基中生長，其中包括 10% 熱滅活的 FBS (FBS, GIBCO), 1% L-glutamine (GIBCO), 1% NEAA (GIBCO) 和 1% penicillin/streptomycin (GIBCO)。培養基每兩天換一次並在 5% CO₂、37 度的培養箱中生長。WRL68 細胞在 Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC, Catalog No. 30-2003) 培養基中生長，其中包括 10% 熱滅活的 FBS (FBS, GIBCO,) 和 1% penicillin/streptomycin/ neomycin (GIBCO)。培養基每兩天換一次並在 5% CO₂、37 度的培養箱中生長。CHO-K1 細胞在 McCoy's 5A (GIBCO) 培養基中生長，其中包括 10% 熱滅活的 FBS (FBS, GIBCO), 1% L-glutamine (GIBCO), 和 1% penicillin/streptomycin / neomycin (GIBCO)。

Western blot 分析

把細胞用 RIPA buffer 裂解其中含有蛋白酶和磷酸酶抑制劑 (10 mM NaPO₄, pH 7.2, 0.3 M NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 1% Na deoxycholate, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail [Roche, Nutley, NJ], and Halt Phosphatase Inhibitor [Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA])。之後使用 Bio-Rad 蛋白質測定法 (Bio-Rad, Hercules, CA) 測定蛋白質濃度。接著在 SDS-PAGE 上解析等量的總細胞蛋白質，之後把蛋白轉漬到轉漬膜上，再來與指定的一抗作用，接著換二抗作用，最後使用特定受質來與二抗結合使結果成色。

彗星分析

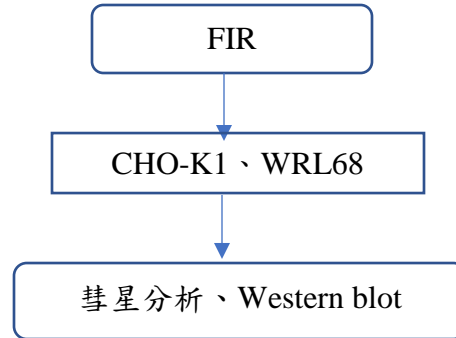
把細胞從培養皿萃取下後溶在 LAMP gel (低溶點的膠)，之後在霧面的玻片上依序鋪上 NMA gel (正常溶點的膠) 150 μL、LAMP gel (有細胞) 75 μL、LAMP gel (無細胞) 75 μL 共三層，每次鋪膠都必須在冰上放置 5min 等膠凝固，之後在進行下一步鋪膠。鋪完膠後實驗組處理 H₂O₂，之後放入 lysing solution 1hr，之後放入電泳液中靜置 20min，接著進行跑膠 20min (300mA、25V)，電泳結束後用 neutralization buffer 沖洗 3~5 次，最後用 EtBr 75 μL 進行染色，置於暗盒中 20min 以上後即可用螢光顯微鏡觀察，並利用軟體分析 DNA 之拖尾長度。

FIR 裝置

使用陶瓷 FIR 發射器來提供 FIR 照射。該 FIR 發射器產生波長在 3~25 μm 範圍內的電磁波。將細胞培養在 4ml 培養基 6cm 培養皿中然後用 FIR 照射。通過改變 FIR 發射的功率來調整 FIR 的強度。

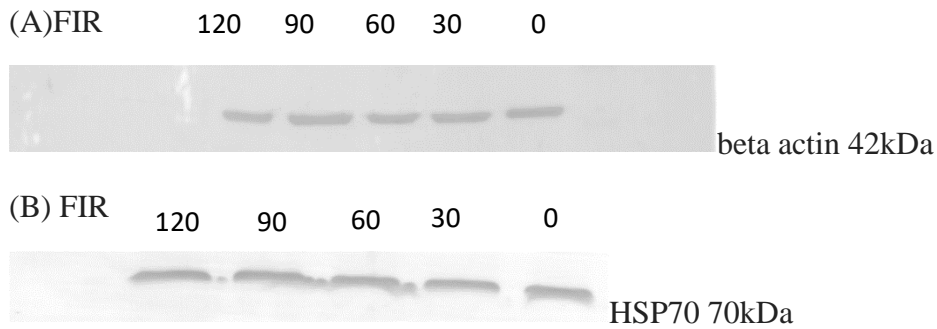
研究步驟

1. 把 WRL68 細胞、CHO-K1 細胞培養在 6mm 培養皿後用 FIR 照射 120min，之後經過 1 天後進行 Western blot 分析、彗星分析。



結果

Figure1.



(C)

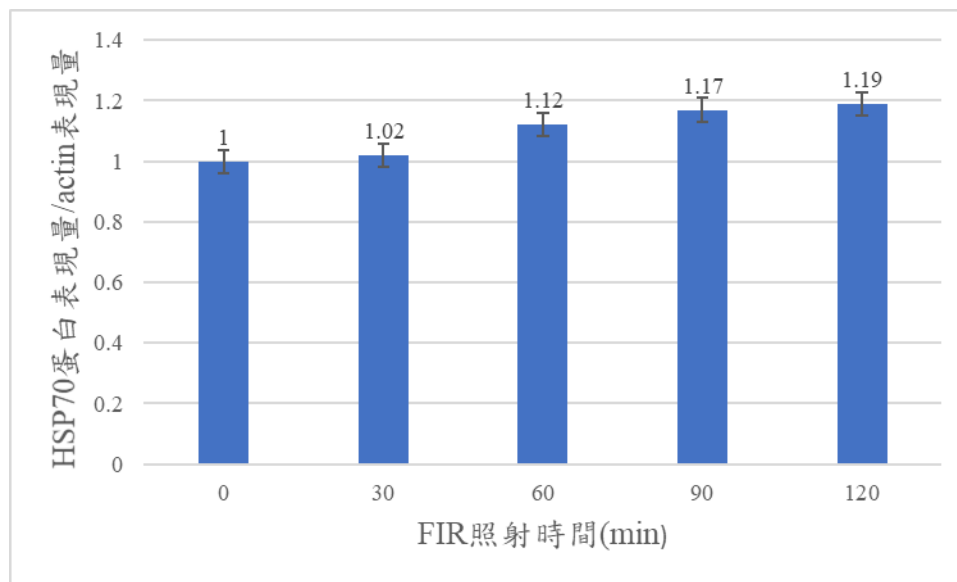


Fig1. FIR 對 CHO-K1 細胞 HSP70 蛋白表現的影響。細胞用 FIR 分別照射 30、60、90、120min 後經過 24hr 收集蛋白質並定量，beta actin 蛋白表現量(A)、HSP70 蛋白表現量(B)用免疫西方轉漬法進行分析。蛋白質表現程度以 ImageJ 軟體分析定量，以相對於 actin 表現量的比值表示(C)。數據為 2 次試驗的平均值。

Figure2.

(A)FIR 120 90 60 30 0



(B)

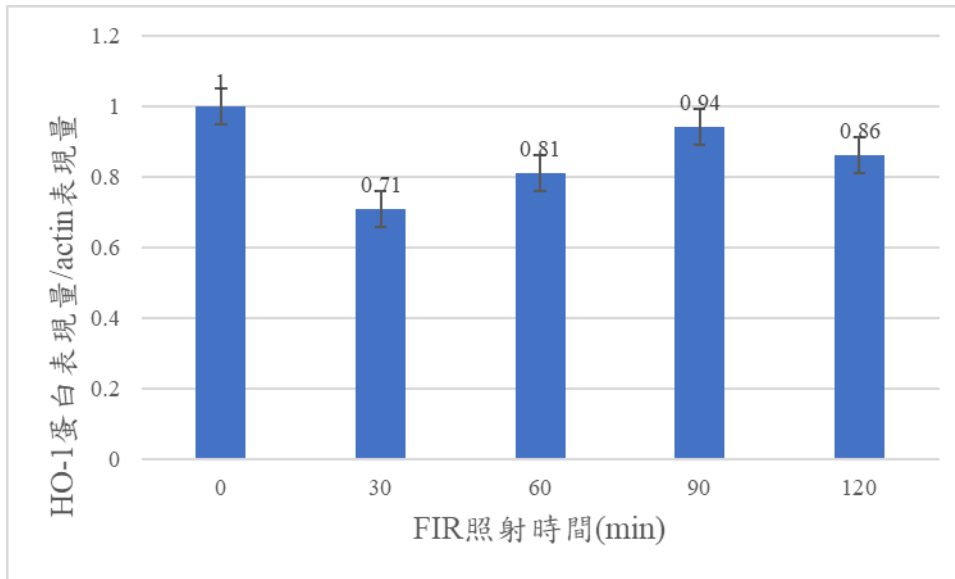


Fig2. FIR 對 CHO-K1 細胞 HO-1 蛋白表現的影響。細胞用 FIR 分別照射 30、60、90、120min 後經過 24hr 收集蛋白質並定量，beta actin 蛋白表現量(Fig1.(A))、HO-1 蛋白表現量(A)用免疫西方轉漬法進行分析。蛋白質表現程度以 ImageJ 軟體分析定量，以相對於 actin 表現量的比值表示(B)。數據為 2 次試驗的平均值。

Figure3.

(A) 0 30 60 90 120



(B) 0 30 60 90 120



(C)

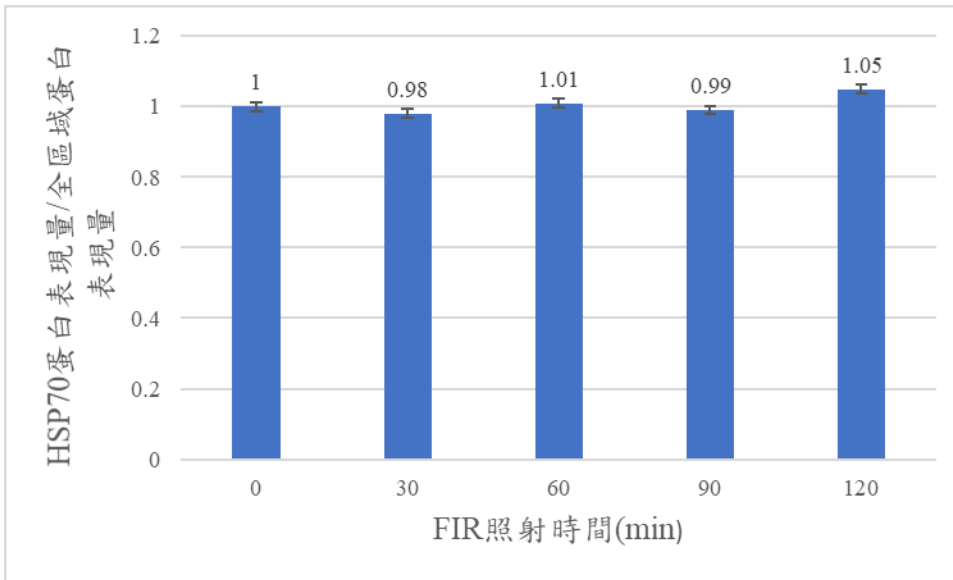
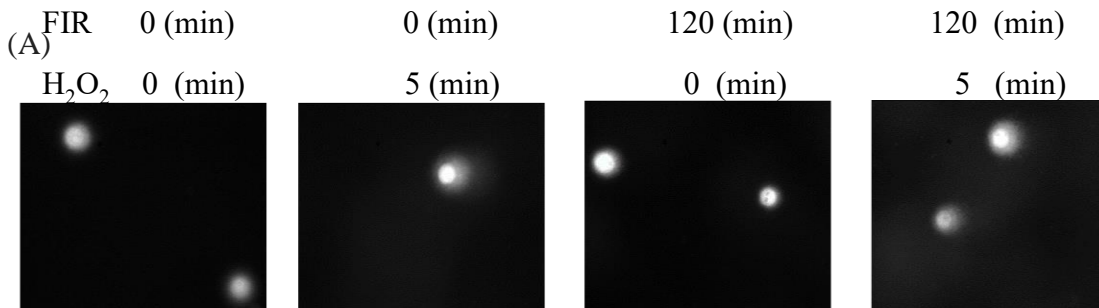
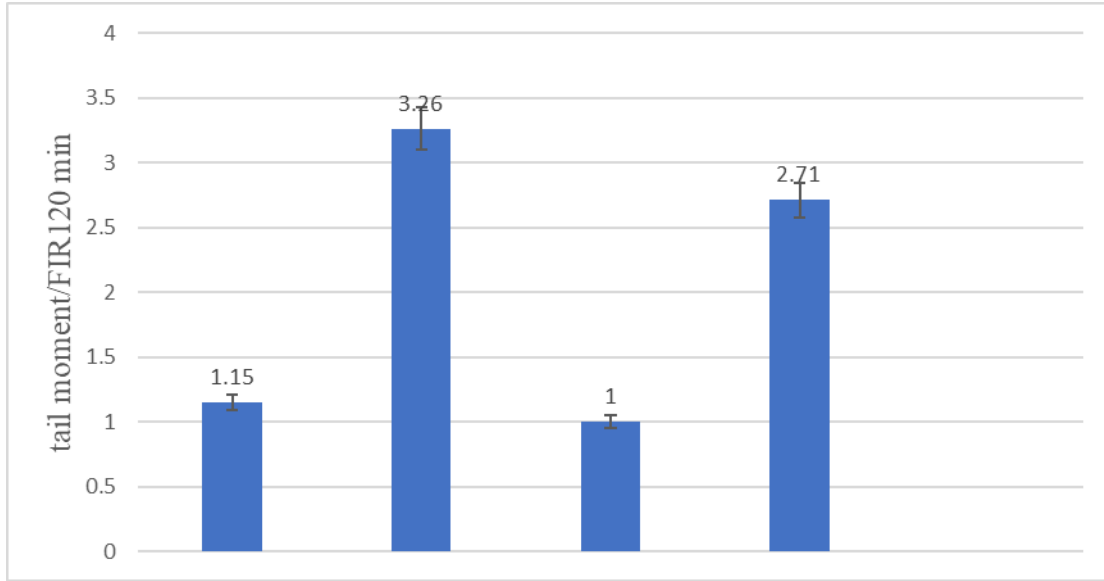


Fig3.FIR 對 WRL68 細胞 HSP70 蛋白表現的影響。細胞用 FIR 分別照射 30、60、90、120min 後經過 24hr 收集蛋白質並定量，HSP70 蛋白表現量(A)、全區域蛋白表現量(B)用免疫西方轉漬法進行分析。蛋白質表現程度以 ImageJ 軟體分析定量，以相對於全區域蛋白表現量的比值表示(C)。數據為 3 次試驗的平均值。

Figure4.



(B)



FIR	0 (min)	0 (min)	120 (min)	120 (min)
H ₂ O ₂	0 (min)	5 (min)	0 (min)	5 (min)

Fig4. FIR 對 WRL68 細胞抗氧化作用。細胞用 FIR 照射 120min 後經過 24hr 後進行彗星分析，實驗組在進行彗星分析時處理 H₂O₂ 50 μ L 5min。彗星分析圖(A)，細胞 DNA 的拖尾程度以相對於照射 FIR120min 為比值(B)，拖尾程度用軟體分析。數據為 3 次的平均值。

結果與討論

由於 MJD78 細胞為帶有疾病的細胞，這次實驗並沒有成功養出，因此用較易養活的 WRL68 細胞、CHO-K1 細胞來做為替代，並探討 FIR 對氧化傷害的保護作用。藉由以上的實驗可以發現 CHO-K1 細胞照射不同時間的 FIR，HSP70 蛋白隨著照射的時間增加蛋白的量與強度也會隨之增加，整體而言比起控制組的量與強度都要來的高。而 HO-1 蛋白則不同，整體而言比起控制組蛋白的量與強度都要來的低，但量與強度會隨著照射時間的增加而上升。而 WRL68 細胞則不同，HSP70 蛋白不會隨著射的時間增加蛋白的量與強度，但 WRL68 細胞在照射 FIR120min 後，細胞對於 H₂O₂ 的氧化傷害具有增加 20% 的保護能力，相對於對照組而言，細胞在接受氧化傷害後，DNA 拖尾程度有下降的趨勢。由以上的結果可以推測 FIR 對 WRL68 細胞的抗氧化作用可能是藉由 FIR 的非熱效應所導致，因為照射不同時間的 FIR，HSP70 蛋白的量與強度都不會明顯的增加。而 HSP70 蛋白對於熱具有高敏感性，因此推測 FIR 對 WRL68 細胞的抗氧化作用可能是藉由 FIR 的非熱效應所導致。

參考文獻

1. Jahn, T.T.; Radford, S.E. Folding *versus* aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, *469*, 100–117.
2. Serpell, L.C.; Sunde, M.; Benson, M.D.; Tennent, G.A.; Pepys, M.B.; Fraser, P.E. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 2000, *300*, 1033–1039.
3. Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2006, *75*, 333–366.
4. Ferreira, N.; Santos, S.A.O.; Domingues, M.R.M.; Saraiva, M.J.; Almeida, M.R. Dietary curcumin counteracts extracellular transthyretin deposition: Insights on the mechanism of amyloid inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, *1832*, 39–45.
5. Ferreira, N.; Saraiva, M.J.; Almeida, M.R. Epigallocatechin-3-gallate as a potential therapeutic drug for TTR-related amyloidoses: —*In vivo* evidence from FAP mice models. *PLoS One* 2012, *7*, e29933.
6. Jui-Chih Chang; Shey-Lin Wu; Fredrik Hoel; Yu-Shan Cheng; Ko-Hung Liu; Mingli Hsieh; August Hoel; Karl Johan Tronstad; Kuo-Chia Yan; Ching-Liang Hsieh; Wei-Yong Lin; Shou-Jen Kuo; Shih-Li Su & Chin-San Liu. Far-infrared radiation protects viability in a cell model of Spinocerebellar Ataxia by preventing polyQ protein accumulation and improving mitochondrial function. *Scientific Reports* 2016, *10*, 1038.
7. Stefani, M.; Dobson, C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* 2003, *81*, 678–699.
8. Powers, E.T.; Balch, W.E. Diversity in the origins of proteostasis networks—A driver for protein function in evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, *14*, 237–248.
9. Radford, S.E.; Dobson, C.M. From computer simulations to human disease: Emerging themes in protein folding. *Cell* 1999, *97*, 291–298.
10. Vivekanandan, S.; Brender, J.R.; Lee, S.Y.; Ramamoorthy, A. A partially folded structure of Amyloid-Beta (1–40) in an aqueous environment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, *411*, 312–316
11. Yonemoto, I.T.; Kroon, G.J.; Dyson, H.J.; Balch, W.E.; Kelly, J.W. Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry* 2008, *47*, 9900–9910.
12. Sochocka, M.; Koutsouraki, E.S.; Gašiorowski, K.; Leszek, J. Vascular oxidative stress and mitochondrial failure in the pathobiology of Alzheimer’s disease: New approach to therapy. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 2013, in press.
13. Milhøvet, O.; Lehmann, S. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res. Rev.* 2002, *38*, 328–339.
14. Butterfield, D.A.; Swomley, A.M.; Sultana, R. Amyloid β -peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and

- progression. *Antioxid. Redox Signal.* 2013, in press
15. Zhang, L.; Xing, G.Q.; Barker, J.L.; Chang, Y.; Maric, D.; Ma, W.; Li, B.-S.; Rubinow, D.R. α -Lipoic acid protects rat cortical neurons against cell death induced by amyloid and hydrogen peroxide through the Akt signalling pathway. *Neurosci. Lett.* 2001, 312, 125–128.
 16. Yang, S.G.; Wang, W.Y.; Ling, T.J.; Feng, Y.; Du, X.T.; Zhang, X.; Sun, X.X.; Zhao, M.; Xue, D.; Yang, Y.; *et al.* α -Tocopherol quinone inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity, disaggregates preformed fibrils and decreases the production of reactive oxygen species, NO and inflammatory cytokines. *Neurochem. Int.* 2010, 57, 914–922.
 17. Zampagni, M.; Wright, D.; Cascella, R.; D'Adamio, G.; Casamenti, F.; Evangelisti, E.; Cardona, F.; Goti, A.; Nacmias, B.; Sorbi, S.; *et al.* Novel S-acyl glutathione derivatives prevent amyloid oxidative stress and cholinergic dysfunction in Alzheimer disease models. *Free Radic. Biol. Med.* 2012, 52, 1362–1371.
 18. Choi, D.Y.; Lee, Y.J.; Hong, J.T.; Lee, H.J. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 2012, 87, 144–153.
 19. Rogers, I.; Kerr, F.; Martinez, P.; Hardy, J.; Lovestone, S.; Partridge, L. Ageing increases vulnerability to A β 42 toxicity in *Drosophila*. *PLoS One* 2012, 7, e40569.
 20. Keller, J.N.; Huang, F.F.; Markesbery, W.R. Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience* 2002, 98, 149–156.
 21. Fratta, P.; Engel, W.K.; McFerrin, J.; Davies, K.J.; Lin, S.W.; Askanas, V. Proteasome inhibition and aggresome formation in sporadic inclusion-body myositis and in amyloid-beta precursor protein-overexpressing cultured human muscle fibers. *Am. J. Pathol.* 2005, 167, 517–526.
 22. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991, 82:239–259
 23. Hedden T, Oh H, Younger AP, Patel TA. Meta-analysis of amyloid-cognition relations in cognitively normal older adults. *Neurology* 2013,80:1341–1348.
 24. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* 2013,12:207–216.
 25. Murray ME, Graff-Radford NR, Ross OA, et al. Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2011,10:785–796.
 26. Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004, 318:121–134.
 27. Robbins TW, Cools R. Cognitive deficits in Parkinson's disease: a cognitive neuroscience perspective. *Mov Disord* 2014, 29:597–607.

28. Svenningsson P, Westman E, Ballard C, Aarsland D. Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment. *Lancet Neurol* 2012, 11:697–707.
29. Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW. Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2010, 9:1200–1213.
30. Choi, Y.T.; Jung, C.H.; Lee, S.R.; Bae, J.H.; Baek, W.K.; Suh, M.H.; Park, J.; Park, C.W.; Suh, S.I. The green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci.* 2001, 70, 603–614.
31. Kuriyama, S.; Hozawa, A.; Ohmori, K.; Shimazu, T.; Matsui, T.; Ebihara, S.; Awata, S.; Nagatomi, R.; Arai, H.; Tsuji, I. Green tea consumption and cognitive function: A cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83, 355–361.
32. Ehrnhoefer, D.E.; Duennwald, M.; Markovic, P.; Wacker, J.L.; Engemann, S.; Roark, M.; Legleiter, J.; Marsh, J.L.; Thompson, L.M.; Lindquist, S.; et al. Green tea (–)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Hum. Mol. Genet.* 2006, 15, 2743–2751.
33. Cao, P.; Raleigh, D.P. Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols. *Biochemistry* 2012, 51, 2670–2683.
34. Nam S, Smith DM & Dou QP Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001, 276, 13322–13330.
35. Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ & Gonos ES The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res* 2007, 10, 157–172.
36. Rigacci, S.; Guidotti, V.; Bucciantini, M.; Parri, M.; Nediani, C.; Cerbai, E.; Stefani, M.; Berti, A. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin. *J. Nutr. Biochem.* 2010, 21, 726–735.
37. Rigacci, S.; Guidotti, V.; Bucciantini, M.; Nichino, D.; Relini, A.; Berti, A.; Stefani, M. A β (1–42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon. *Curr. Alzheimer Res.* 2011, 8, 841–852.
38. Chih-Ching Lin, Xiao-Ming Liu, Kelly Peyton, Hong Wang, , Wu-Chang Yang, Shing-Jong Lin, and William Durante. Far Infrared Therapy Inhibits Vascular Endothelial Inflammation via the Induction of Heme Oxygenase-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008,28(4): 739–745.
39. Ishibashi J, Yamashita K, Ishikawa T, Hosokawa H, Sumida K, Nagayama M, Kitamura S. The effects inhibiting the proliferation of cancer cells by far-infrared radiation (FIR) are controlled by the basal expression level of heat shock protein (HSP) 70A. *Med Oncol.* 2008;25(2):229–37.

40. Reeg S, Jung T, Castro JP, Davies KJA, Henze A, Grune T. The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome. *Free Radic Biol Med.* 2016 Oct;99:153-166.
41. Lee DH, Goldberg AL Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 1998, 8, 397–403.
42. Leung TK, Lin YS, Lee CM, Chen YC, Shang HF, Hsiao SY, Chang HT, Chao JS. Direct and indirect effects of ceramic far infrared radiation on the hydrogen peroxide-scavenging capacity and on murine macrophages under oxidative stress. *J Med Biol Eng.* 2011;31(5):345–51.