

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所



碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

探討數種天然化合物對 $A\beta_{1-42}$ 造成大鼠腦皮質神經細胞毒性

之保護功效

Neuroprotective effect of natural compounds against

$A\beta_{1-42}$ -induced toxicity in rat cortical neurons

邱肇祥

Tsao Hsiang Chiu

指導教授：孫璐西 博士

Advisor : Lucy Sun Hwang, Ph.D

中華民國102年7月

July, 2013

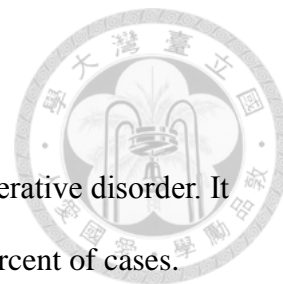
中文摘要



失智症 (Dementia) 是因為疾病或腦部受創而導致腦部神經細胞死亡或不正常運作的一種症狀，而阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease, AD) 是最為普遍的一種失智症，佔失智症患者的 60~80%。阿茲海默氏症是一種漸進式且不可逆的神經退化疾病，患者的大腦呈現萎縮的現象，就神經病理學來看，阿茲海默氏症主要有兩個病理特徵，細胞外的老化斑塊 (senile plaques)，和 tau 微管蛋白過度磷酸化後瓦解，導致細胞內神經纖維糾結現象 (neurofibrillary tangles, NFTs)。近年的研究認為，小分子具水溶性的一種胜肽鏈， β -類澱粉胜肽寡聚合物 ($A\beta$ oligomers) 是引發神經細胞毒性，造成神經細胞死亡的主要因素。截至目前為止，尚未開發出有效治療阿茲海默氏症的藥物，所以預防阿茲海默氏症的發生顯得非常重要。本實驗目的是利用 $A\beta_{1-42}$ 類澱粉胜肽寡聚合物誘導大鼠初代皮質神經細胞毒性作為模式，並以銀杏萃出物 (EGb761) 作為正控制組，探討天然化合物保護神經細胞對抗 $A\beta_{1-42}$ 誘導神經細胞死毒性以達到預防阿茲海默氏症的發生，樣品包括川陳皮素 (nobiletin)，橘皮素 (tangeretin)，四甲氧基類黃酮 (TMF)，芝麻素 (sesamin)，芝麻酚 (sesamol)，四氫薑黃素 (tetrahydrocurcumin)，茶胺酸 (L-theanine)，並且進一步的研究有效樣品對於神經細胞可能的保護機制。根據 MTT assay 細胞存活率的結果，七種樣品之中，tangeretin，nobiletin 抗 $A\beta_{1-42}$ 細胞毒性的效果較好，甚至比正控制組的效果更佳，TMF 也有不錯的效果。另外樣品清除自由基能力 (DCF-DA) assay 的結果顯示，EGb761 具有很強的清除 $A\beta_{1-42}$ 誘導胞內自由基的能力，但是其餘的樣品效果不佳；Western bolt 的結果顯示，EGb761 具有抑制聚集和解集 $A\beta_{1-42}$ 的效果，tangeretin 則可能具有促進 $A\beta_{1-42}$ 的聚集的能力以降低其對神經細胞的毒性，nobiletin 對 $A\beta_{1-42}$ 的聚集沒有影響，其可能透過其他機制保護神經細胞。

關鍵字：阿茲海默氏症，類澱粉胜肽寡聚合物，初代皮質神經細胞，銀杏萃出物，川橘皮素，橘皮素，四甲氧基類黃酮，芝麻素，芝麻酚，四氫薑黃素，茶胺酸。

Abstract

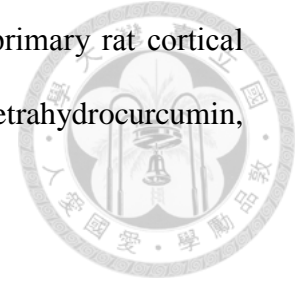


Alzheimer's disease is an irreversible, progressive neurodegenerative disorder. It is also the most common type of dementia, accounts for 60 to 80 percent of cases. Neuropathologically, there are three hallmarks of Alzheimer's disease including brain atrophy, extracellular amyloid beta plaques and intracellular neurofibrillary tangles. Recent researches suggest that amyloid beta peptide induces neurotoxicity and causes neuronal cell death. Therefore, the objective of this study is to find the potential phytochemicals that can protect the brain neuron against $A\beta_{1-42}$ oligomers induced neurotoxicity and thus prevent Alzheimer's disease.

Samples under investigation include nobiletin, tangeretin, L-theanine, sesamol, sesamin, tetramethoxyflavone, tetrahydrocurcumin and *Ginkgo biloba* extract, (EGb761) which is the positive control. Cells were treated with various concentrations of samples for 30 min before exposed to $1 \mu\text{M } A\beta_{1-42}$, 24 hr at 37°C . In this research, the pure compounds were used to evaluate their potential neuroprotective effects against $A\beta_{1-42}$ induced toxicity in primary rat cortical neurons by assessing the cell viability with MTT assay and further investigate their possible mechanisms.

According the results of viability assessed by MTT assay, the effective compounds are EGb761, nobiletin and tangeretin. In DCFDA assay, EGb761 has strong free radical scavenging activity but tangeretin and nobiletin do not have such activity. In Western blot, EGb761 was found to prevent $A\beta_{1-42}$ oligomers formation and inhibits $A\beta_{1-42}$ oligomers fibrillogenesis. Tangeretin possibly promotes the assembly $A\beta_{1-42}$ into fibrils but nobiletin doesn't have any effect on $A\beta_{1-42}$. It indicates that tangeretin lowering $A\beta_{1-42}$ oligomers toxicity may due to the promotion of $A\beta_{1-42}$ fibrils production and nobiletin protects neurons from $A\beta_{1-42}$ oligomers induced toxicity by other pathway.

Key Words : Alzheimer's disease (AD), Amyloid beta peptide, primary rat cortical neuron, nobiletin, tangeretin, TMF, sesamin, sesamol, tetrahydrocurcumin, L-theanine.



縮寫表



- AD : Alzheimer's disease
- ANOVA : analysis of variance
- ApoE : apolipoprotein E
- APP : amyloid precursor protein
- Ara-C : Cytosine β -D-arabinofuranoside
- ATP : adenosine-triphosphate
- A β : β -amyloid peptide
- BACE/ β -secretase : beta-site APP-cleaving enzyme
- BBB : blood-brain barrier
- BSA : Bovine serum albumin
- DMSO : dimethyl sulfoxide
- DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- ECL : enhanced chemiluminescence reagent
- EGb761 : *Ginkgo biloba* extract
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- EOAD : early-onset Alzheimer's disease
- ER : endoplasmic reticulum
- FAD : familial Alzheimer's disease
- HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution
- HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
- HRP : horseradish peroxidase
- LDH : lactate dehydrogenase
- LOAD : late-onset Alzheimer's disease

MTT : thiazolyl blue tetrazolium bromide

NFTs : Neurofibrillary Tangles

NMDA : N-methyl-D-aspartate

PB : phosphate buffer

PBS : phosphate buffer saline

PBST : phosphate buffer saline with tween 20

PS1/2 : presenilin 1/2

PVDF : polyvinylidene fluoride

RNS : Reactive nitrogen species

ROS : Reactive oxygen species

sAPP β : secreted fragment of APP

SD : standard deviation

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TB : trypan blue

TBST : tris-Buffered Saline with Tween 20

THC : Tetrahydrocurcumin

TMF : 5, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone



目錄



中文摘要.....	I
Abstract.....	II
縮寫表.....	IV
目錄.....	VI
圖次.....	IX
表次.....	XI
壹、前言.....	1
貳、文獻整理.....	2
一、阿茲海默氏症是最為普遍之失智症.....	2
二、阿茲海默氏症的兩大病理特徵.....	3
三、 β -類澱粉胜肽 (β -Amyloid peptide, A β) 介紹.....	6
四、A β 的聚合作用.....	9
五、A β 對於神經細胞的毒性.....	13
六、阿茲海默氏症之藥物治療.....	17
七、大鼠初代腦皮質神經細胞.....	17
八、樣品介紹.....	22
(一)銀杏葉萃出物 (<i>Ginkgo biloba extract</i> , EGb761).....	22
(二)芝麻酚 (Sesamol).....	24
(三)芝麻素 (Sesamin).....	24
(四)茶胺酸 (L-Theanine).....	24
(五)四氫薑黃素 (Tetrahydrocurcumin).....	25
(六)橘皮素 (Tangeretin).....	25
(七)川陳皮素 (Nobiletin).....	25

(八) 四甲氧基類黃酮 (TMF).....	26
參、研究目的與實驗架構.....	29
一、實驗目的.....	29
二、實驗架構.....	30
肆、材料與方法.....	32
一、實驗材料.....	32
(一) 實驗樣品.....	32
(二) 大鼠大腦初代皮質神經細胞 (Rat primart cortical neurons).....	32
(三) 試劑與試藥.....	33
(四) 裝置與儀器設備.....	35
二、實驗方法.....	37
(一) 實驗用溶液配方.....	37
(二) 樣品配製.....	40
(三) A β ₁₋₄₂ 定量與聚集.....	42
(四) 大鼠初代皮質神經細胞的分離與培養.....	42
(五) 以大鼠初代腦皮質神經細胞為模式之細胞試驗.....	48
(六) Tricine-SDS-PAGE 與西方墨點法.....	50
(七) Thioflavin T binding assay.....	52
伍、結果與討論.....	53
一、 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物對於初代神經細胞之毒性.....	53
二、 銀杏萃出物 (<i>Ginkgo biloba</i> extract, EGb761) 對初代神經細胞抵抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之保護功效.....	56
三、 樣品對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之保護效果.....	62
(一) 芝麻酚 (Sesamol) 與芝麻素 (sesamin).....	62
(二) 茶胺酸 (L-Theanine).....	68
(三) 四氫薑黃素 (Tetrahydrocurcumin).....	71

(四) 川陳皮素 (Nobiletin)、橘皮素 (tangeretin) 和 tetramethoxyflavone (TMF).....	74
四、樣品對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之機制探討.....	84
(一) 樣品對於細胞內自由基清除能力測定.....	84
(二) A β ₁₋₄₂ 寡聚合物電泳分析以及樣品抑制其聚集之探討.....	88
陸、結論.....	93
柒、參考文獻.....	97

圖次



圖 一、阿茲海默氏症導致患者腦部萎縮影響學習與記憶.....	4
圖 二、阿茲海默氏症兩大病理特徵.....	5
圖 三、類澱粉前趨蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 水解生成 A β	7
圖 四、Tau 蛋白的結構與作用.....	8
圖 五、A β ₄₀ 和 A β ₄₂ 的序列及結構.....	11
圖 六、A β ₄₂ 寡聚合物，原纖維和纖維狀的特性.....	11
圖 七、A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性顯著大於單體態和纖維狀.....	12
圖 八、A β 可能造成神經細胞死亡的途徑.....	14
圖 九、A β 形成鈣離子通道之假說.....	15
圖 十、水溶性 A β 寡聚合物與微量金屬離子結合將電子傳遞給氧產生過氧化氫.....	16
圖 十一、初代海馬迴神經細胞形態.....	19
圖 十二、大鼠皮質神經細胞免疫染色.....	21
圖 十三、銀杏萃出物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 黃酮類的化學結構.....	23
圖 十四、銀杏萃出物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 萜內酯類的化學結構.....	23
圖 十五、實驗樣品 sesamol、sesamin、tangeretine、nobiletin 之化學結構.....	27
圖 十六、實驗樣品 tetrahydrocurcumin、theanine、5, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone 之化學結構.....	28
圖 十七、初代大腦皮質神經細胞分離步驟.....	46
圖 十八、不同天數的初代神經細胞的細胞形態.....	47
圖 十九 A β ₁₋₄₂ 聚合物對於初代神經細胞之毒性.....	54
圖 二十 銀杏萃出物、(Ginkgo biloba extract, EGb761) 對初代神經細胞之毒性.....	58
圖 二十一 初代神經細胞與銀杏萃出物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 及.....	

A β ₁₋₄₂ 寡聚合物共同培養之細胞形態	59
圖 二十二、銀杏萃出物 (<i>Ginkgo biloba</i> extract, EGb761) 對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用	60
圖 二十三、芝麻酚 (Sesamol) 對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用	64
圖 二十四、芝麻素 (sesamin) 對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用	66
圖 二十五、茶胺酸 (L-Theanine) 對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用	69
圖 二十六、四氫薑黃素(Tetrahydrocurcumin)對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物 毒性之作用.....	72
圖 二十七、初代神經細胞與 nobiletin 及 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物共同培養之細胞形態	76
圖 二十八、川陳皮素(Nobiletin)對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用	77
圖 二十九、初代神經細胞與 tangeretin 及 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物共同培養之細胞形態	79
圖 三十、橘皮素(Tangeretin) 對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用 ..	80
圖 三十一、TMF 對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用	82
圖 三十二、有效樣品對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物誘導產生胞內自由基測 定.....	86
圖 三十三、A β ₁₋₄₂ 寡聚合物之 Tricine SDS-PAGE 電泳與有效樣品抑制聚集和解 集 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物之測定.....	91
圖 三十四、A β ₁₋₄₂ 寡聚合物 ThT 分析.....	92

表次



表 一、 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物對於初代神經細胞之毒性	55
表 二、銀杏葉萃取物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果.....	61
表 三、芝麻酚 (Sesamol) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果	65
表 四、芝麻素 (Sesamin) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果	67
表 五、茶胺酸 (L-Theanine) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果.....	70
表 六、四氫薑黃素(Tetrahydrocurcumin) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果.....	73
表 七、川陳皮素 (Nobiletin) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果.....	78
表 八、橘皮素 (Tangeretin) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果	81
表 九、TMF 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果.....	83
表 十、有效樣品抑制 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導初代神經細胞產生胞內自由基之能力	87
表 十一、樣品抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之神經細胞保護功效整理.....	95
表 十二、相同濃度樣品抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之神經細胞保護功效整理.....	96

壹、前言



近年來由於醫學的發達，全球人口的平均壽命增加，因此老年人口也逐年增加，全球必須面對老化社會帶來的問題，尤其是老化相關的疾病越來越受到重視。阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease, AD) 是最為普遍的失智症，佔失智症患者的 60~80%。阿茲海默氏症是一種漸進式且不可逆的神經退化疾病，通常好發於 65 歲以上的老年人且隨著年紀的增加，發病的機率也會隨之提高，其病徵包括短期的記憶力喪失、情緒不穩定，容易憂鬱或毫無感情、對於時間和空間感到困惑、出現語言和書寫困難、無法獨立生活，最終病患邁入死亡。阿茲海默氏症患者的大腦呈現萎縮的現象，就神經病理學來看，阿茲海默氏症主要有兩個病理特徵，細胞外的老化斑塊 (senile plaques)，和 tau 微管蛋白過度磷酸化後瓦解，導致細胞內神經纖維糾結現象 (neurofibrillary tangles, NFTs)，根據阿茲海默氏症協會的統計預估在 2030 年全球阿茲海默氏症的人口會增加到現在病患的兩倍，增加速度之快，而花費在治療與照顧病患的醫療費用也是相當的可觀。近年的研究認為，小分子具水溶性的一種胜肽鏈， β -類澱粉胜肽寡聚合物 ($A\beta$ oligomers) 是引發神經細胞毒性，造成神經細胞死亡的主要因素。

本實驗目的是利用 $A\beta_{1-42}$ 類澱粉胜肽寡聚合物誘導大鼠初代皮質神經細胞毒性作為模式，並以銀杏萃出物 (EGb761) 作為正控制組，探討天然化何物保護神經細胞對抗 $A\beta_{1-42}$ 誘導神經細胞毒性以達到預防阿茲海默氏症的發生，樣品包括川陳皮素 (nobiletin)，橘皮素 (tangeretin)，四甲氧基類黃酮 (TMF)，芝麻素 (sesamin)，芝麻酚 (sesamol)，四氫薑黃素 (tetrahydrocurcumin)，茶胺酸 (L-theanine)，並且進一步的研究有效樣品對於神經細胞可能的保護機制，希望朝向預防阿茲海默氏症的目標研究。

貳、文獻整理



一、阿茲海默氏症是最為普遍之失智症

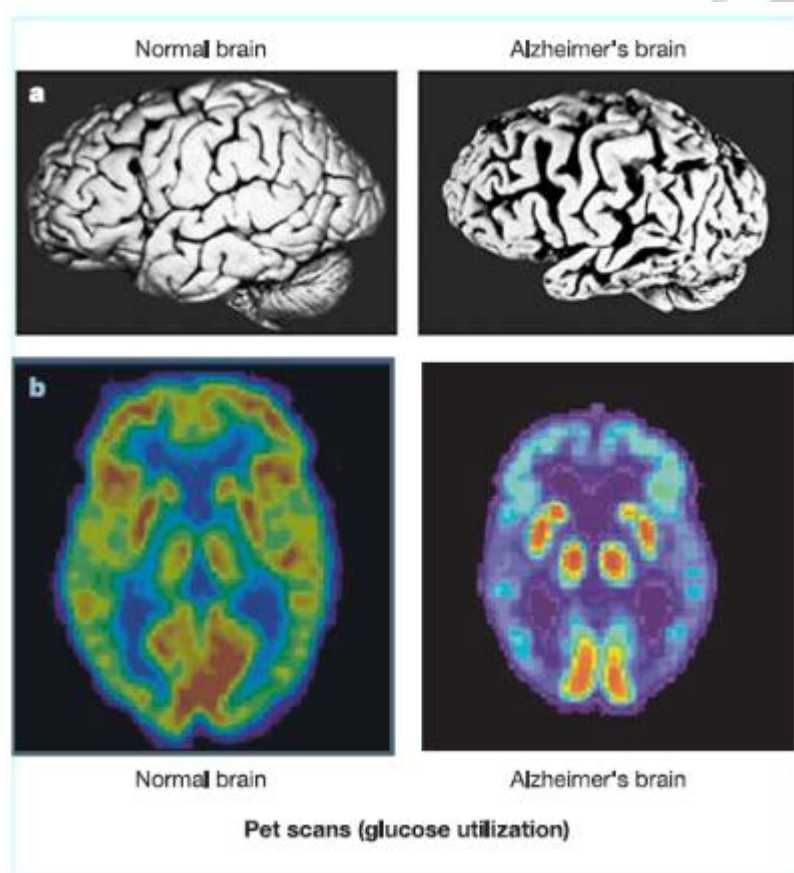
失智症 (Dementia) 是因為疾病或腦部受創而導致腦部神經細胞死亡或不正常運作的一種症狀，而阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease, AD) 是最為普遍的一種失智症。此種疾病最早是由德國醫生 Alois Alzheimer (1864-1915) 而得名，他在西元 1907 年發表，他從一位女性病患診斷出具有以下症狀，短期的記憶力喪失、情緒不穩定，容易憂鬱或毫無感情、對於時間和空間感到困惑、出現語言和書寫困難、最終病患邁入死亡，阿茲海默醫生從病患的大腦切片中發現，大腦皮質中有許多的類澱粉斑塊沉積 (plaques)，以及神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NFTs) 的現象。

阿茲海默氏症是一種不可逆的漸進式神經衰退疾病，可以分為早發型 (early-onset) 和晚發型 (late-onset)，早發型阿茲海默氏症好發於 65 歲以前，主要與家族性遺傳有關，而家族性遺傳常見的基因缺陷為位於第 21 條染色體 APP 基因位置，第 14 號和 1 號的染色體上初老年期因子-I (presenile-I, PS1)、初老年期因子-II (presenile-II, PS2)，家族性阿茲海默氏症佔阿茲海默氏病患的 10%。晚發型阿茲海默氏症佔阿茲海默氏病患的 90%，為偶發性的基因對偶因子所導致。Apolipoprotein E 基因有三個 alleles (E2, E3, E4) 影響 Apo E 的異構型，研究顯示，其中 E4 會增加造成阿茲海默氏症的風險，雖然 E4 造成 AD 的機制尚未被建立，但有證明 E4 會促使 A β 的聚集並減慢 A β 被清除的速度，偶發性得基因突變則與疾病，如糖尿病，高血壓，中風，腦部受創等還有環境影響相關，通常好發於六十五歲以上的老年人，隨著年紀的增加，發病的機率也會隨之提高。根據台灣失智症協會統計，2010 年 65 歲失智症社區人口數達到 124,263 人佔總人口數的 0.5%，2011 和 2012 年增加到 0.6%，根據推估到 2060 年失智症的人口數會占社區總人口數的 4.2%，另外台灣失智症社區盛行率在 65 歲到 69 歲為 1.2%、70 到 74 歲

為 2.2%、75 到 79 歲為 4.3%、80 到 84 歲為 8.4%、85 歲到 89 歲為 16.3%、90 歲以上則為 30.9% (台灣失智症協會官方網站)。

二、阿茲海默氏症的兩大病理特徵

阿茲海默氏症主要有兩個病理特徵，細胞外的老化斑塊 (senile plaques)，和 tau 微管蛋白過度磷酸化後瓦解聚集導致的細胞內神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NFTs) (圖二)，大腦顳葉和前葉的區域是記憶與學習相關的地方，在阿茲海默氏症的病人大腦中顳葉和前葉區有萎縮，腦室擴大並發現突觸衰弱和神經細胞死亡的現象。老化斑塊和神經纖維糾結兩個病理特徵出現行為和情緒的區域，如 entorhinal cortex, hippocampus, basal forebrain, amygdale (圖一 a, b) (Mattson, 2004)。 β -類澱粉胜肽 (Amyloid beta peptide)，簡稱為 $A\beta$ ，為阿茲海默氏症致病的主要原因，細胞外的老化斑塊內包含了聚集的 $A\beta$ fibrils 以及死亡的神經細胞，周圍有活化的神經膠細胞 (astrocytes)，microglial cells，載脂蛋白 E (apolipoprotein E, Apo E) 等蛋白質構成。



圖一、阿茲海默氏症導致患者腦部萎縮影響學習與記憶

Fig. 1. Alzheimer's disease results in shrinkage of brain regions involved in learning and memory which is correlated with major reductions in cellular energy metabolism in living patients.

a, Compared with the brain of a healthy person, the brain of an Alzheimer's disease patient exhibits marked shrinkage of gyri in the temporal lobe (lower part of the brain) and frontal lobes (left part of the brain). b, Positron emission tomography (Pet) images showing glucose uptake (red and yellow indicate high levels of glucose uptake) in a living healthy person and a normal control subject. The Alzheimer's patient exhibits large decreases in energy metabolism in the frontal cortex (top of brain) and temporal lobes (sides of the brain). (Mattson, 2004)

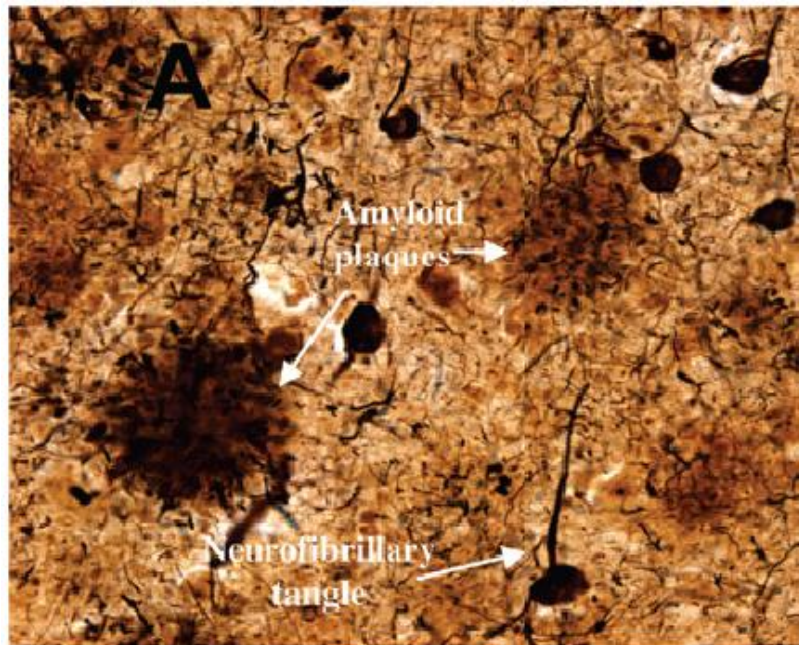


圖 二、阿茲海默氏症兩大病理特徵

Fig. 2. Pathological hallmarks of Alzheimer's disease.

Tangles and plaques in Alzheimer's disease. Neurofibrillary tangles are intraneuronal and consist of paired helical filaments, the subunit of which is a microtubule-associated protein called tau that has been phosphorylated at multiple sites (dark staining structures). Amyloid plaques are extracellular and are largely composed of a 4-kDa protein called the amyloid β -protein ($A\beta$) (round diffuse structures). (Irvine et al., 2008)

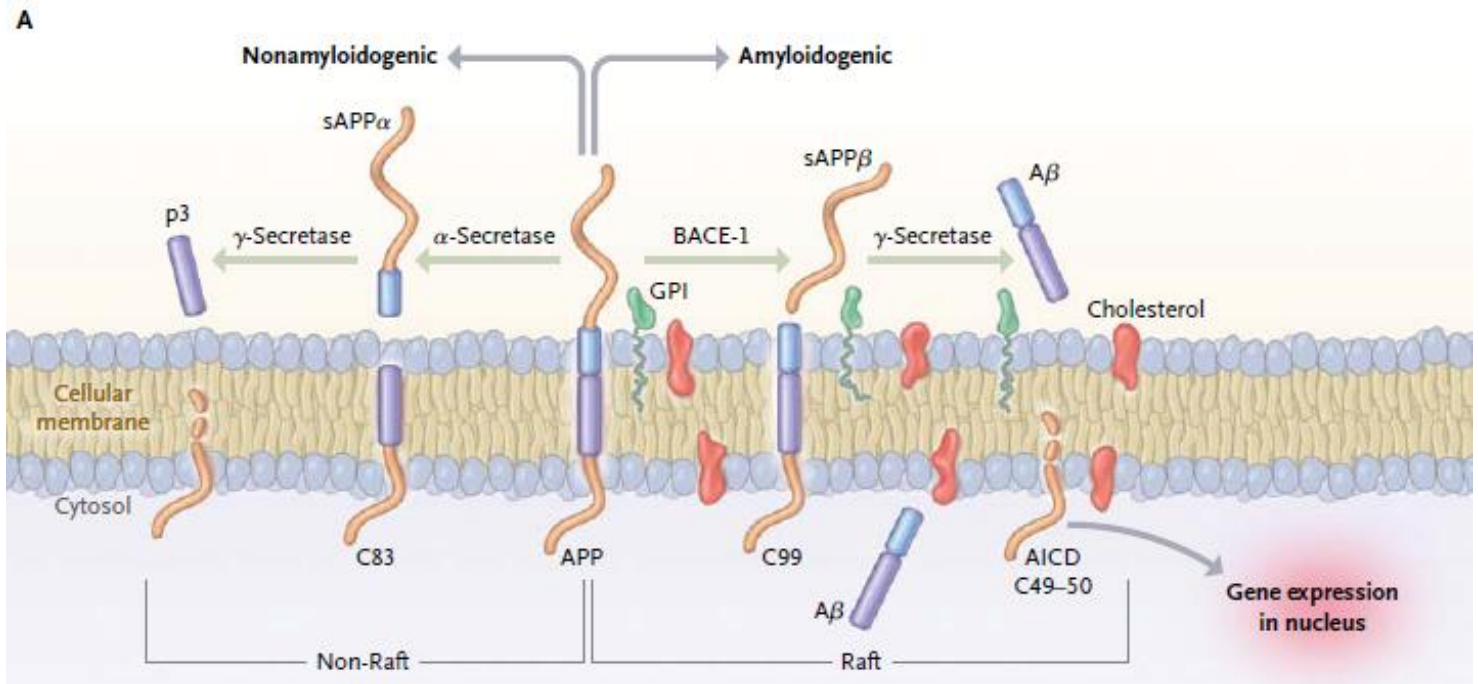
三、 β -類澱粉胜肽 (β -Amyloid peptide, $A\beta$) 介紹

早期阿茲海默醫生所發現大腦中的類澱粉蛋白斑塊，直到 1980 中期被證實出是由一種稱為 β -類澱粉胜肽 (β -Amyloid peptide, $A\beta$) 所聚集而形成的，這種胜肽主要由 40-42 個胺基酸所組成，分子量大約為 4 kD，而這些類澱粉胜肽是來至一個含有 695-771 個胺基酸的蛋白質，類澱粉前趨蛋白 (amyloid β -precursor protein, APP) 所水解出來的產物，類澱粉前驅蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 是一穿膜蛋白。其中參與水解的酵素包括 α -分解酶 (α -secretase)、 β -分解酶 (β -secretase/ β -site APP-cleaving enzyme 1, BACE 1)、 γ -分解酶 (γ -secretase)、nicastrin、anterior pharynx defective 和 presenilin enhancer 2 (圖三)。

APP 會進行兩條不同水解途徑，非類澱粉蛋白生成途徑 (non-amyloidogenic pathway) 和類澱粉生成途徑 (amyloidogenic pathway)。非類澱粉蛋白生成途徑為一條正常的途徑，APP 會先經由 α -分解酶 (α -secretase) 水解成 sAPP α 和一條含 83 個胺基酸殘基的胜肽 C83，接著 sAPP α 會被 γ -分解酶 (γ -secretase) 分解成胜肽鏈片段 p3，而在阿茲海默症患者腦部主要是往另一個不正常的途徑發展，APP 經由 β -分解酶 (β -secretase/ β -site APP-cleaving enzyme 1, BACE 1) 水解後，形成 sAPP β 以及一個具有 99 個胺基酸的胜肽片段 C99，而 C99 的 N 端會再經 γ -分解酶 (γ -secretase) 和其複合酵素水解釋出 $A\beta$ 。大部分的類澱粉胜肽是由 40 ($A\beta_{1-40}$) 或 42 ($A\beta_{1-42}$) 個胺基酸所組成，比例為 10:1。

阿茲海默氏症另一個病理特徵是神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NFTs)，神經纖維糾結是由一種 tau 蛋白磷酸化所導致，在正常的神經細胞中，細胞內的細胞骨架上維持細胞功能的微小管上有 tau 蛋白維持其穩定，而正常的 tau 蛋白磷酸化是針對其胜肽鏈上的 serine 和 threonine 作用，但是當細胞中受到 glycogen synthase kinase 3 (GSK-3 β)、cyclin-dependent kinase (cdk5) 和 p25 以及 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 表現時會使 tau 蛋白上的 proline 產生磷酸化，使得 tau 蛋白與微小管分離，造成微小管的崩解，tau 蛋

白的 self-aggregation，最終導致神經細胞死亡（圖四）。



圖三、類澱粉前趨蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 水解生成 A β

Fig. 3. Processing of Amyloid Precursor Protein.

Cleavage by α -secretase interior to the β -amyloid peptide (A β) sequence initiates nonamyloidogenic processing. A large amyloid precursor protein (sAPP α) ectodomain is released, leaving behind an 83-residue carboxy-terminal fragment. C83 is then digested by γ -secretase, liberating extracellular p3 and the amyloid intracellular domain (AICD). Amyloidogenic processing is initiated by β -secretase beta-site amyloid precursor protein–cleaving enzyme 1 (BACE-1), releasing a shortened sAPP β . The retained C99 is also a γ -secretase substrate, generating A β and AICD. γ -Secretase cleavage occurs within the cell membrane in a unique process termed “regulated intramembranous proteolysis.” sAPP α and sAPP β are secreted APP fragments after α -secretase and β -secretase cleavages, respectively. AICD is a short tail (approximately 50 amino acids) that is released into the cytoplasm after progressive ϵ -to- γ cleavages by γ -secretase. AICD is targeted to the nucleus, signaling transcription activation. Lipid rafts are tightly packed membrane micro-environments enriched in sphingomyelin, cholesterol, and glycoposphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Soluble A β is prone to aggregation. (Henry W. Querfurth and LaFerla., 2010)

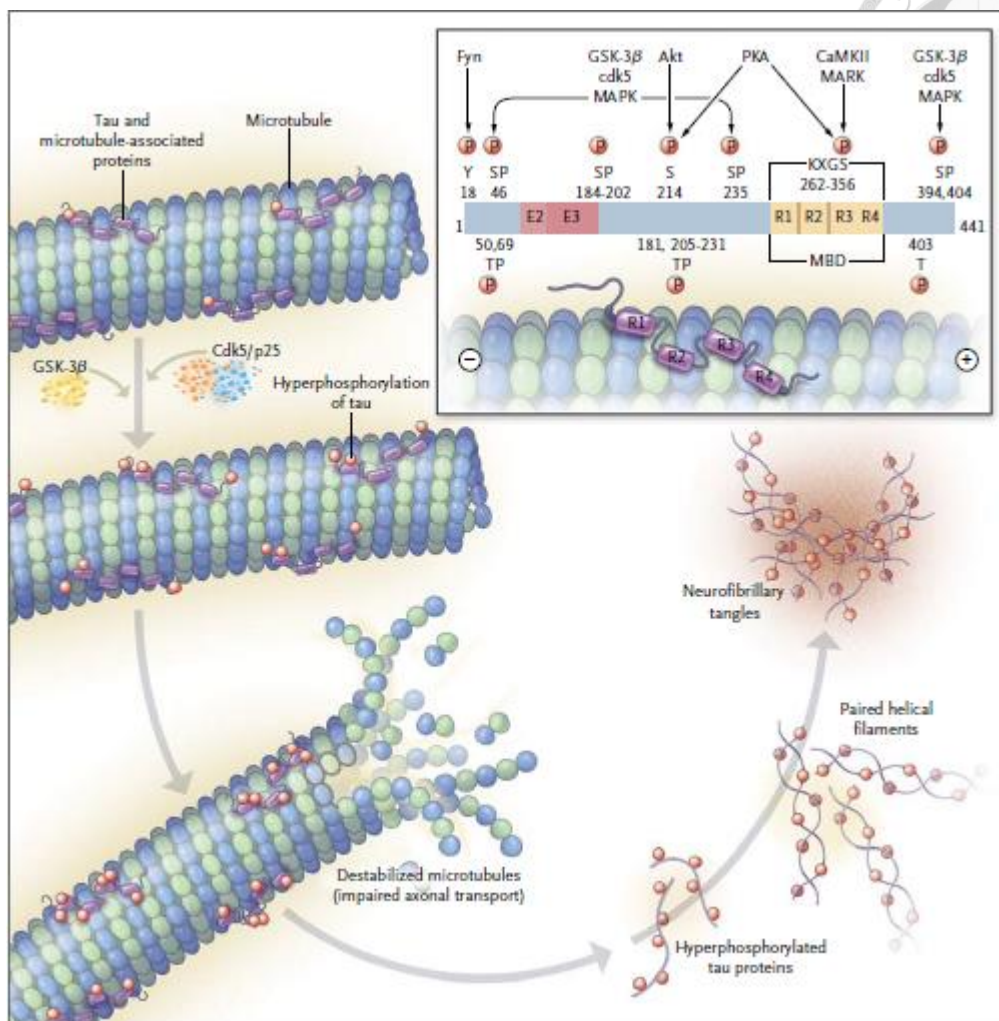


圖 四、Tau 蛋白的結構與作用

Fig. 4. Tau Structure and Function.

Four repeat sequences (R1-R4) make up the microtubule-binding domain (MBD) of tau. Normal phosphorylation of tau occurs on serine (S; inset, above horizontal bar) and threonine (T; inset, below horizontal bar) residues, numbered according to their position in the full tau sequence. When followed by proline (P), these amino acids are phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 (GSK-3 β), cyclin-dependent kinase (cdk5) and its activator subunit p25, or mitogen-activated protein kinase (MAPK). Nonproline-directed kinases — Akt, Fyn, protein kinase A (PKA), calcium-calmodulin protein kinase 2 (CaMKII), and microtubule affinity-regulating kinase (MARK) — are also shown. KXGS (denoting lysine, an unknown or other amino acid, glycine, and serine) is a target motif. Hyperphosphorylated sites specific to paired helical filament tau in Alzheimer's disease tend to flank the MBD. Tau binding promotes microtubule assembly and stability. Excessive kinase, reduced phosphatase activities, or both cause hyperphosphorylated tau to detach and

self-aggregate and microtubules to destabilize. (Henry W. Querfurth and LaFerla., 2010)

四、A β 的聚合作用

阿茲海默氏症一個主要的病徵是病患大腦中出現了類澱粉蛋白斑塊，在 1968 年認為這些蛋白斑塊與造成失智有明顯的關聯性 (Blessed et al., 1968; Selkoe et al., 2012)。而這些斑塊是由 A β ₁₋₄₀ 或 A β ₁₋₄₂ 胜肽所聚集成纖維狀再由板狀結構堆積產生的。當大腦中出現大量濃度的 A β 時，A β 會因為其雙性胜肽結構，在水相環境中，疏水區會藉由疏水性作用力自行聚集形成 β 摺板而進行摺疊的作用，而 A β 纖維是由大量的單體 A β 以 β 折板的結構排列整齊的推積起來。單體 A β 是由 1-40 或 42 個胺基酸所構成的胜肽鏈 (圖五)，A β ₁₋₄₂ 的結構中，N 端 1-17 是不參與構型的，18-42 會形成 β turn β 的結構，Phe19 與 Gly38 接觸，Met35 和 Ala42 這些 turn 結構是疏水端相吸引作用產生的。

經過體外試驗結果顯示，A β 聚集是由複雜的成核作用 (nucleation-dependent polymerization) 的機制所進行的，A β 聚集的速率是溶液中 nucleating species 的濃度而定，當單體 A β 形成 β 摺板結構以後，會開始進行聚合，由單體，雙倍體，三倍體，四倍體到寡聚合物，原纖維，最後產生纖維聚合物，沉積在腦中 (圖六)。有研究指出單體的 A β 是沒有毒性的，寡聚體才是真正具有毒性的，但過量的聚集又會降低對於神經細胞的毒性 (圖七)。所以 A β 中間時期所形成的低分子量的寡聚合物毒性較強，也是可能造成神經細胞大量死亡的主要原因。(Ahmed et al., 2010)

影響 A β 聚集的外在因素包括，(1) 溫度: A β 在 4°C 聚集六小時由顯微鏡下觀察到寡聚合物的結構，而在 37°C 聚集六個小時可以觀察到前纖維狀的構形，表示在 37°C A β 聚集的速度比在低溫的 4°C 聚集更快。(2) 濃度: A β 的濃度越高，聚集成纖維狀的速度也比較快。(3) 時間: 聚集的時間越長，會形成纖維狀的構形多於寡聚合物和單體態的 A β 。(4) pH 值: 在 pH 值 4-7，

A β 快速聚集成 β -sheets 。 (5) 金屬離子: 在體外試驗中, Al³⁺ 促進 A β ₁₋₄₀ 聚集, 也觀察到 AD plaques 和 tangles 中有 aluminosilicates , 雖然尚未完全被證實, 但是研究認為 Al , aluminosilicates A β 的構形並增加毒性, 是增加 AD 風險的一個危險因子。另外 Fe²⁺ 和 Zn²⁺ 也被研究對於 A β ₁₋₄₀ 有有效促進聚集的作用, 尤其是 Zn²⁺ , 鋅離子可在低濃度下 (micromolar) 與 A β ₁₋₄₂ 結合改變了 A β 構形以促使 A β 聚集。 (Iversen et al., 1995)

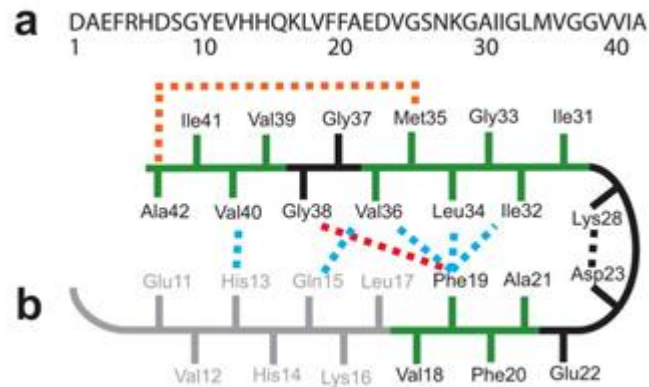


圖 五、 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的序列及結構

Fig. 5. Sequence and structure of the monomer unit in $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ fibrils.

Sequence of $A\beta_{42}$ that is derived from human APP. (b) Structural constraints in $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ fibrils. NMR measurements of $A\beta_{40}$ fibrils have shown that residues 1–10 are unstructured and residues 11–40 adopt a β -turn- β fold^{19,20}. Side chain packing is observed between Phe19 and Ile32, Leu34 and Val36 and between Gln15 and Val36 as well as between His13 and Val40 (blue dashed lines). In $A\beta_{42}$ fibrils, residues 1–17 may be unstructured (in gray), with residues 18–42 forming a β -turn- β fold¹⁴. Molecular contacts have been reported within the monomer unit of $A\beta_{42}$ fibrils between Phe19 and Gly38 (red dashed line)¹⁴ and between Met35 and Ala42 (orange dashed line)¹⁸. In both $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$, the turn conformation is stabilized by hydrophobic interactions (green residues) and by a salt bridge between Asp23 and Lys28 (black dashed line). (Ahmed et al., 2010)

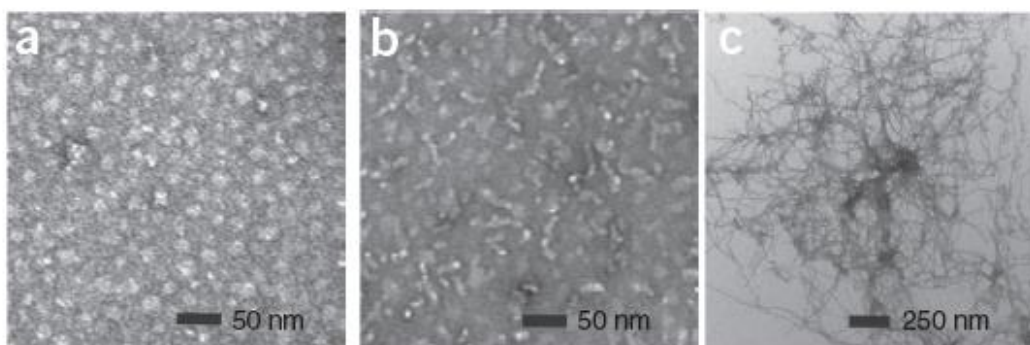
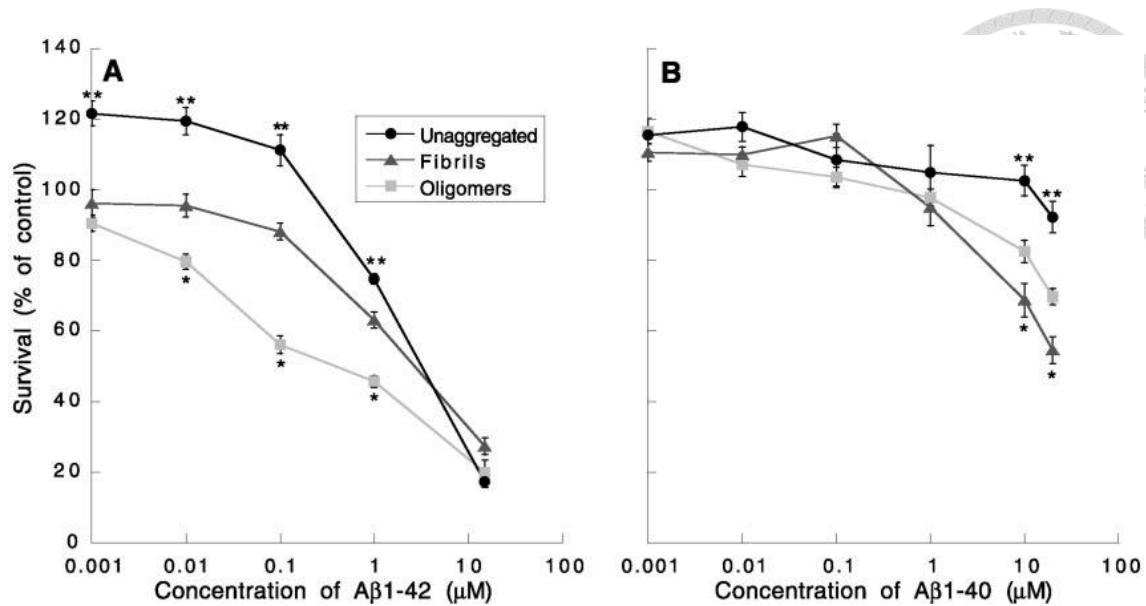


圖 六、 $A\beta_{42}$ 寡聚合物，原纖維和纖維狀的特性

Fig. 6. Characterization of $A\beta_{42}$ oligomers, protofibrils and fibrils.

(a) TEM of $A\beta_{42}$ oligomers incubated at 4 °C for 6 h. (b) TEM of $A\beta_{42}$ protofibrils incubated at 37 °C for 6 h. (c) TEM of $A\beta_{42}$ fibrils incubated at 37 °C for 12 d. (Mahiuddin Ahmed¹ and Aimoto³, 2010)



圖七、Aβ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性顯著大於單體態和纖維狀

Fig. 7. Oligomeric Aβ₁₋₄₂ reduces neuronal viability significantly more than fibrillar and unaggregated species.

Unaggregated, oligomeric and fibrillar preparations of Aβ₁₋₄₂ were incubated with Neuro-2A cells for 20 hr. For unaggregated peptide preparations, the 5 mM Aβ in Me₂SO was diluted directly into cell culture media. The MTT assay was used as an indicator of cell viability. The graph represents the mean ± S.E. for n ≥ 10 from triplicate wells from at least 3 separate experiments using different Aβ preparations. *, significant difference between oligomers and fibrils (p < 0.001). **, significant difference between unaggregated and both oligomers and fibrils (p < 0.001). B, effect of neuronal viability of Aβ₁₋₄₀ prepared under Aβ₁₋₄₂ oligomer and fibril forming conditions. Aβ₁₋₄₀ was prepared as an unaggregated species and under the Aβ₁₋₄₂ oligomer and fibril forming conditions and incubated with Neuro-2A cells for 20 h. The MTT assay was used as an indicator of cell viability. The graph represents the mean ± S.E. for n ≥ 8 from triplicate wells from at least two separate experiments using different Aβ preparations. *, significant difference between Aβ₁₋₄₀ prepared as Aβ₁₋₄₂ oligomers and fibrils (p < 0.01). **, significant difference between unaggregated and both Aβ₁₋₄₀ prepared as Aβ₁₋₄₂ oligomers and fibrils (p < 0.01). (Dahlgren et al., 2002)

五、A β 對於神經細胞的毒性

關於 A β 寡聚合物對於神經細胞造成毒性的分子機制說法有很多，並且環環相扣，互相影響（圖八）。根據文獻 A β 產生神經細胞毒性的機制可以分成下面幾種：(1) A β 改變了初代神經細胞、PC 12 cell 的細胞形態，並造成粒線體功能失調，抑制 MTT reduction 可以用來當作 A β 細胞毒性的指標（A β 造成細胞內氧化還原失衡，尤其是粒線體的酵素功能），(2) A β 寡聚合物鑲嵌在神經細胞膜上，形成鈣離子通道導致鈣離子失衡並引起自由基產生，造成 Tau 蛋白磷酸化，造成神經細胞死亡（圖九）(Kawahara et al., 2009)，(3) 產生活性氮分子 (RNS) 和活性氧分子 (ROS) 造成氧化壓力 (oxidatives stress)，A β 寡聚合物與微量金屬離子如 Cu 和 Fe 結合將電子傳遞給氧產生過氧化氫，A β 寡聚合物鑲嵌於細胞膜上產生的自由基造成細胞膜上的脂質連續的過氧化（圖十）(Butterfield and Bush, 2004)。 (4) 破壞神經細胞內的微小管 (microtubules) 和微絲 (microfilament)，使其分解造成神經細胞的突觸和樹突退化，造成細胞內鈣離子濃度失衡和細胞凋亡 (Fifre et al., 2006)，(5) 造成細胞凋亡 (Li et al., 1996)。

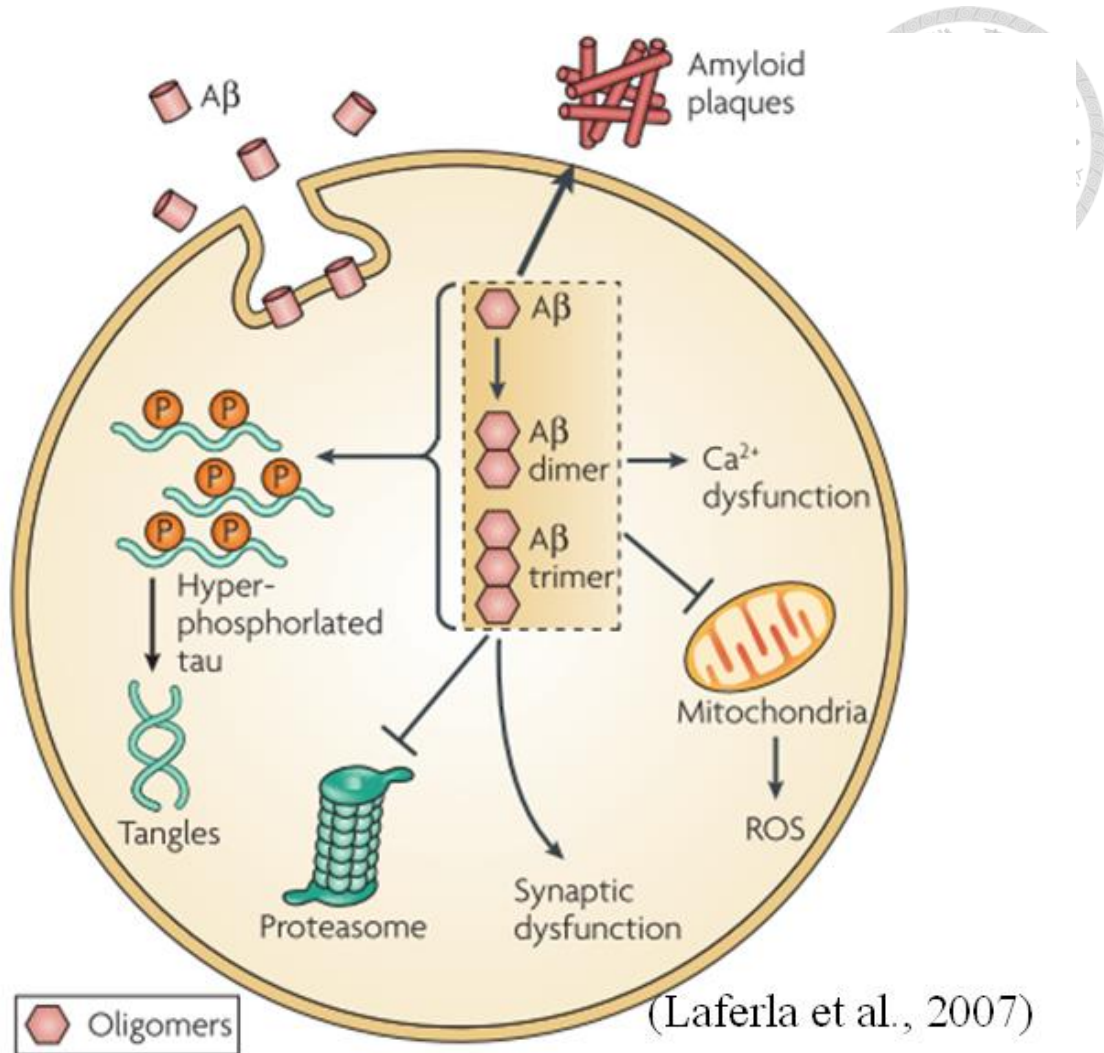


圖 八、Aβ 可能造成神經細胞死亡的途徑

Fig. 9. Pathological effects of Aβ.

Amyloid-β (Aβ), produced intracellularly or taken up from extracellular sources, has various pathological effects on cell and organelle function. Intracellular Aβ can exist as a monomeric form that further aggregates into oligomers, and it may be any of these species that mediate pathological events in vivo, particularly within a dysfunctional neuron. Evidence suggests that intracellular Aβ may contribute to pathology by facilitating tau hyper-phosphorylation, disrupting proteasome and mitochondria function, and triggering calcium and synaptic dysfunction. (LaFerla et al., 2007)

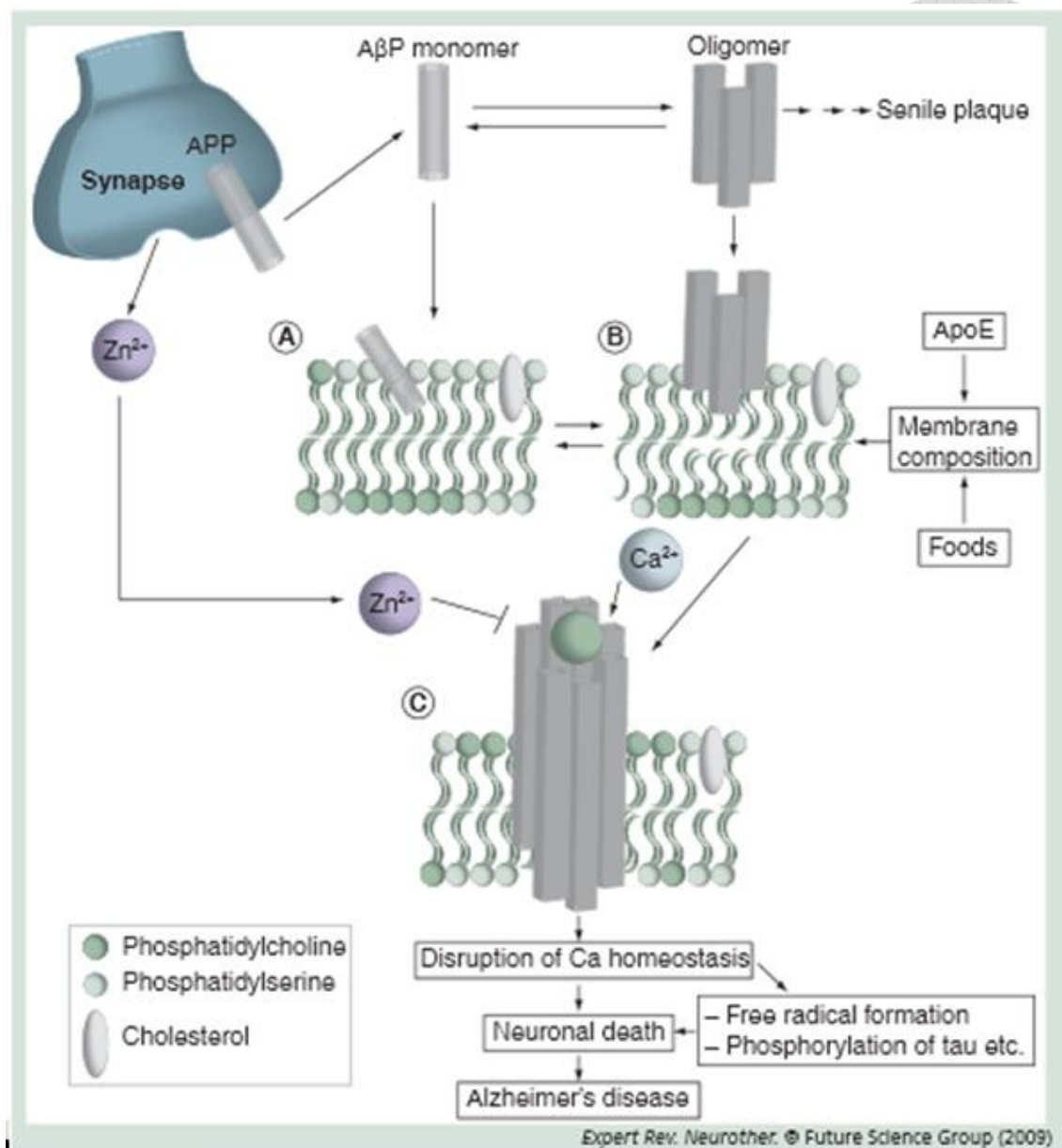


圖 九、Aβ 形成鈣離子通道之假說

Fig. 10. Hypothesis concerning amyloid channels

Secretion from synapses, direct incorporation and formation of oligomeric amyloid channels of Aβ are depicted.

AβP: Amyloid-β peptide; ApoE: Apolipoprotein E; APP: Amyloid precursor protein. (Kawahara et al., 2009)

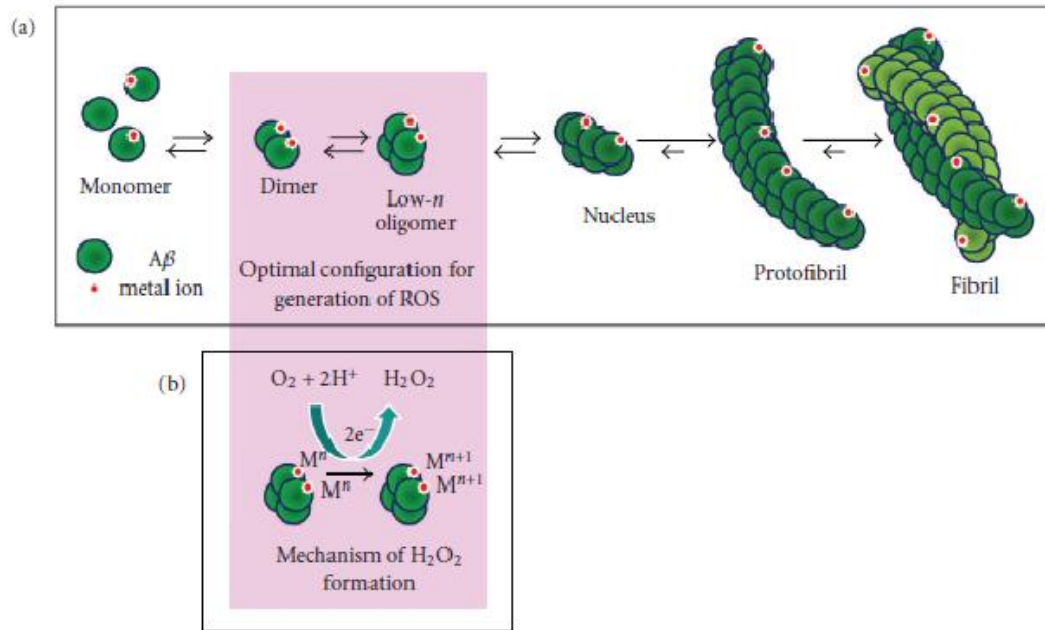


圖 十、水溶性 Aβ 寡聚合物與微量金屬離子結合將電子傳遞給氧產生過氧化氫
Fig. 8. Soluble oligomers, together with their associated redox-active metal ions, are potentially responsible for the generation of H₂O₂.

(a) Stages of Aβ aggregation, assuming that soluble oligomers are “on pathway” to fibril formation. The optimal configuration for generation of ROS may be at the small (low-*n*) oligomer stage. (b) Proposed mechanism for the generation of hydrogen peroxide. Here, M^n and M^{n+1} represent Cu (I) and Cu (II), or Fe (II) and Fe (III). The generation of H₂O₂ requires the synchronized transfer of two electrons from the bound metal ions and so reaction with the monomer is not favoured. Recent experimental evidence suggests that Cu ions remain bound to Aβ even in mature amyloid fibrils and so the lack of activity of higher-order aggregates is possibly due to some metal ions becoming sterically removed from any available O₂ molecules. (Tabner et al., 2010)

六、阿茲海默氏症之藥物治療

治療阿茲海默氏症的藥物主要為乙醯膽鹼酶抑制劑和麩胺酸受體 (NMDA) 拮抗劑，可減緩阿茲海默氏症患者的心智及認知功能退化的速度，乙醯膽鹼酶抑制劑有愛憶欣 (Aricept, donepezil)、憶思能 (Exelon, rivastigmine)、利憶靈 (Reminyl, galantamine)。麩胺酸受體拮抗劑則有：憶必佳 (Ebixa, memantine)、威智 (witgen, memantine)，麩胺酸受體拮抗劑對於中重度得阿茲海默氏症患者較有效果。

阿茲海默氏症是一種漸進式且不可逆的神經退化疾病，目前的醫療上無法完全治療阿茲海默氏症等等的神經失調的狀況，因為造成神經細胞死亡的分子機制路徑很多並且環環相扣，是可互相影響，可重疊的，如果只抑制單一條細胞死亡的路徑可能不足以保護神經細胞，最佳的方法應該是針對多途徑的方法抑制細胞進入死亡路徑的程序，以達到保護神經細胞。

七、大鼠初代腦皮質神經細胞

初代神經細胞是由活體大腦部分區域取出的組織經過物理（機械力、剪切力、過濾）和化學（酵素作用）的方式進行分離出細胞，進行培養的一種實驗模式。

初代神經細胞並不是由單純一種神經細胞組成，主要是包括神經元細胞 (neurons)、膠細胞、星狀細胞，和一些非神經細胞。本實驗主要的目的是研究樣品對於神經元細胞受 $A\beta_{1-42}$ 誘導毒性的保護功效，所以為了增加神經元細胞的純度，本實驗選擇懷胎 18 天 (E18) 母鼠體內的胎鼠的大腦皮質部分，且必須去除膠細胞和其他的非神經細胞，以降低初代神經細胞內的非神經元細胞的組成比例。未成熟的膠細胞、星狀細胞和其他非神經細胞，在培養的過程中會進行分裂增生，而神經元細胞，種植在培養盤中，貼附後便不會再進行分裂，因此可以藉由抑制細胞分裂的試劑 (cytosine β -D-arabino furanoside, Ara C)，抑制其他的非神經細胞進行生長。根據本實驗室過去的研究，透過細胞免疫螢光染色

(immunofluorescence) 分析初代神經細胞組成，利用細胞的專一性標記 (cell marker) 辨識不同的細胞，初代神經細胞中的星狀細胞 (astroglial cells)，使用 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 標記其專一的膠質纖維酸性蛋白；神經元的辨識以細胞骨架蛋白 (cytoskeletal protein) 其中一種微管蛋白亞型，使用 Neuronal class III β -tubulin (TUJ1) 進行標記；以 Ara C 處理的細胞，初代細胞神經元 (neurons) 比例由 61.8 % 提升至 92.5 %，非神經細胞則由 34.3 % 降至 6.8 %，星狀膠細胞僅佔 0.6% (圖十二)(蔡，2011)。

初代神經細胞在培養皿上生長分為四個階段，第一階段是當初代神經細胞懸浮液種植入培養皿中經過大約四個小時的時間，神經細胞會開始貼附在細胞基質 (poly-L-Lysine) 上，呈圓形的神經元細胞；接著神經細胞開始生長出神經突 (neurite)，長度大約 20-30 μ m；種植 36-48 小時後，其中的少部分的神經突會生長至其他神經突的兩到三倍，為第三階段；培養的初代神經細胞到了第四天時，神經元已經發展出成熟的神經細胞，並且與鄰近的神經元形成複雜的神經網路 (Kaech and Banker, 2006)。

A β 與初代神經細胞:

文獻中提到，使用高密度的成熟初代神經細胞測定 A β 的毒性時，無法得到 A β 直接造成神經細胞毒性導致神經細胞死亡的結果 (Iversen et al., 1995)，根據 Mattson 的團隊和 Cotman 的團隊描述，A β 的毒性影響初代神經細胞死亡的因素包括了初代神經細胞的生長成熟程度，種殖的細胞數目 (密度)，以及 A β 與神經細胞接觸的時間，另外還有 A β 的聚集程度 (Barger et al., 1995)。

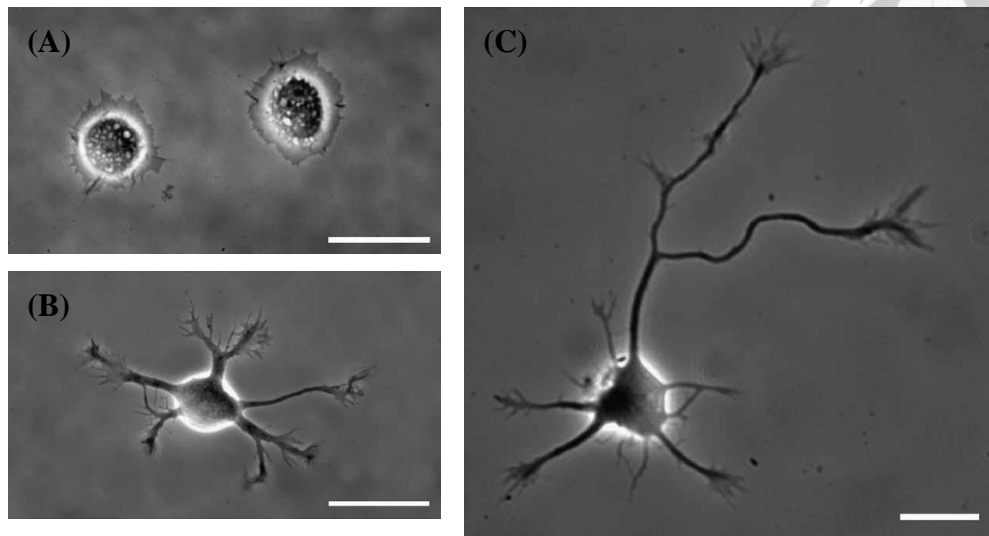
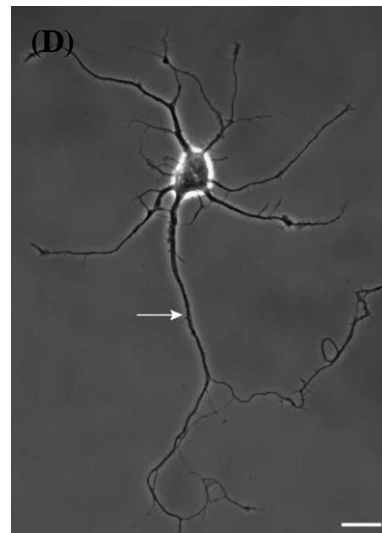


圖 十一、初代海馬迴神經細胞形態

Fig. 11. Phase-contrast images of hippocampal neurons during the first 4 d of culture.

(A) Upon attachment to the substrate, a continuous lamella extends around the cell body. (B) This is followed by the emergence of several minor neurites, 20–30 μm in length, which undergo intermittent growth and retraction (Developmental Stage 2). (C) Neurons enter Stage 3 when one of the minor neurites grows continuously for 2–3 h, becoming two to three times longer than the other neurites. This neurite is the axon. The transitions from Stage 1 to Stage 2 and from Stage 2 to Stage 3 do not occur synchronously across the cell population. Under optimal conditions, half of the neurons reach Stage 3 24 h after plating; more than 80% reach Stage 3 by 36–48 h. Scale bars, 25 μm . (D) Phase-contrast image of a Stage 4 neuron. By this stage, the dendrites have begun to grow and branch and to show their characteristic taper. The axon extends for many hundreds of micrometers, far beyond the field of view illustrated. This comparatively rare image was chosen because the axon and dendrites are easily distinguishable. More typically, recurrent branches of the axon intersect the dendrites and run along them. The change in dendritic morphology between Stage 3 and Stage 4 is more easily appreciated by immunostaining for the dendritic marker protein MAP2. The cell illustrated is 4 d old. Scale bar, 25 μm . (Kaech and Banker, 2006)



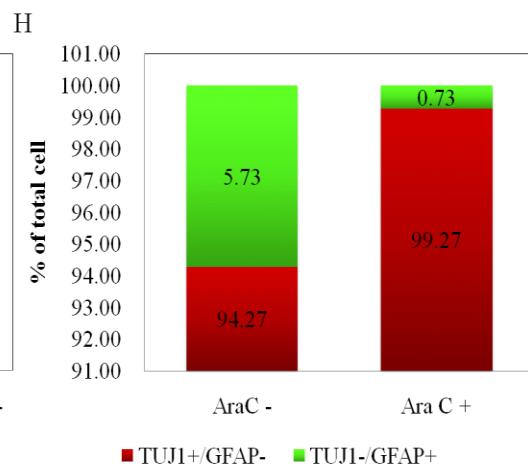
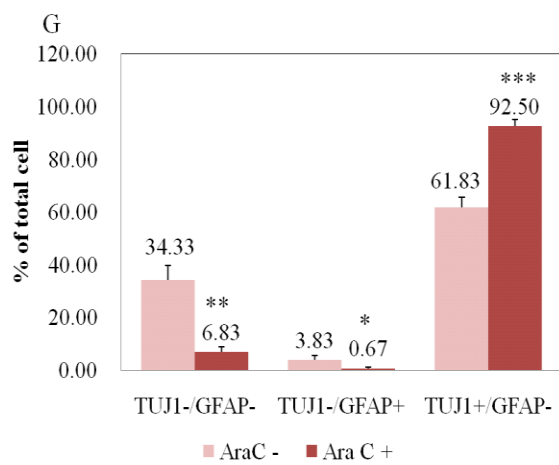
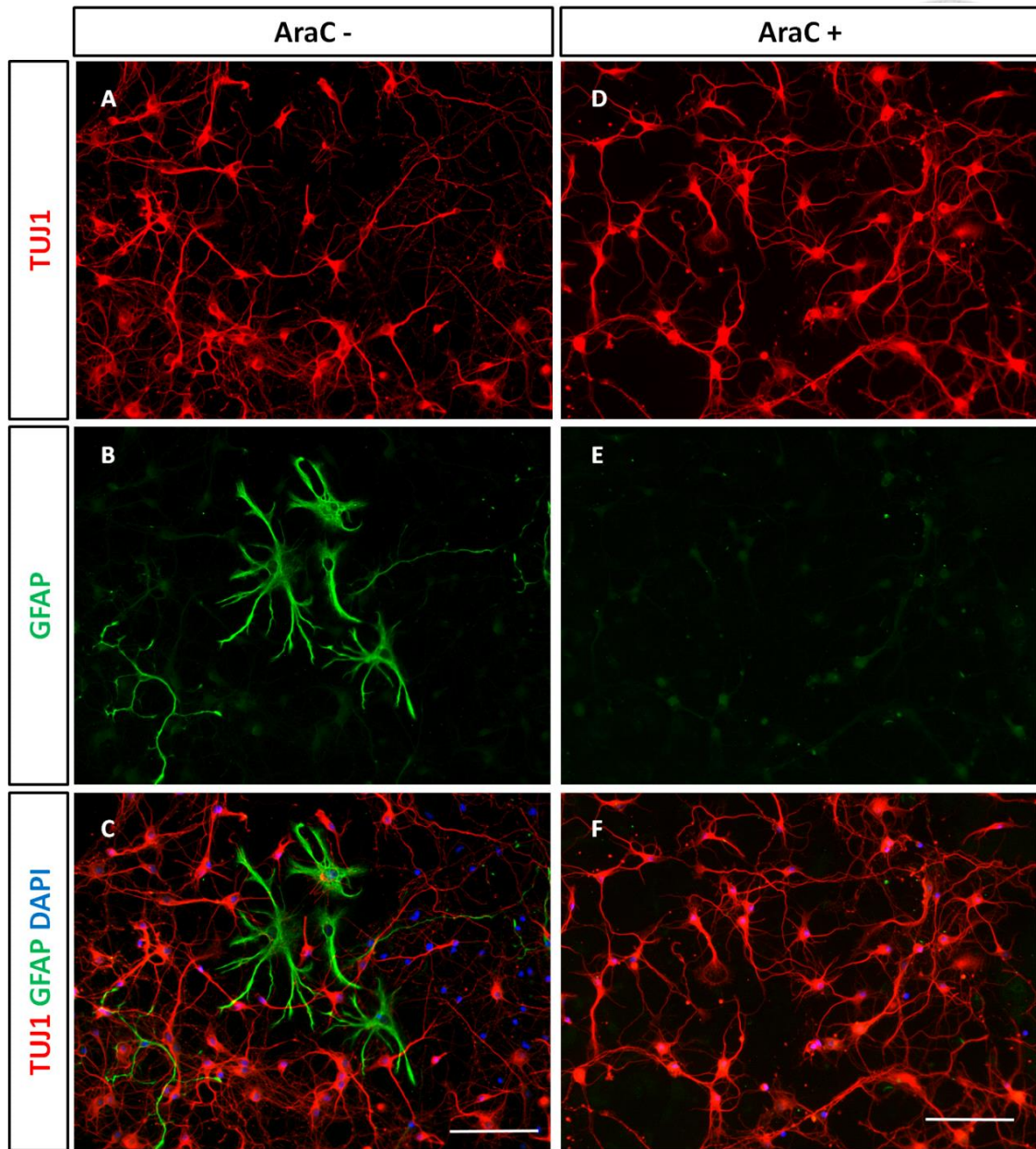


圖 十二、大鼠皮質神經細胞免疫染色


Fig. 12. Effects of Ara-C on rat cortical neuron cultures

Cortical neurons were seeded at 8×10^4 /well on 12mm coverglasses placed in 24 well and treated with or without Ara-C on 4 DIV for 24hr. Neuronal cultures were fixed on 5 DIV and characterized by immunofluorescence staining. **(A, D)** β III tubulin (*red*). **(B, E)** GFAP (*green*). **(C, F)** triple staining of β III tubulin (*red*), GFAP (*green*) and nuclear dye DAPI (*blue*). **(A-C)** Cells were treated without Ara-C. **(D-F)** Cells were treated with Ara-C. **(G)** Ratio between neuron (TUJ1+/GFAP-) , astrocyte (TUJ1-/GFAP+) and non-neuronal cells. (TUJ1-/GFAP-) **(H)** Ratio between neuron (TUJ1+/GFAP-) and astrocyte. (TUJ1-/GFAP+) Preparations were examined with a Zeiss Axioplan2 photomicroscope equipped with epifluorescence optics and photographed by AxioCam HRm CCD. Images were treated with Photoshop (Adobe). Scale bars = 100 μ m.

(蔡，2011)

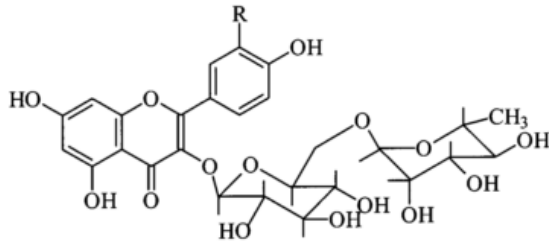
八、樣品介紹

(一) 銀杏葉萃出物 (*Ginkgo biloba extract*, EGb761)

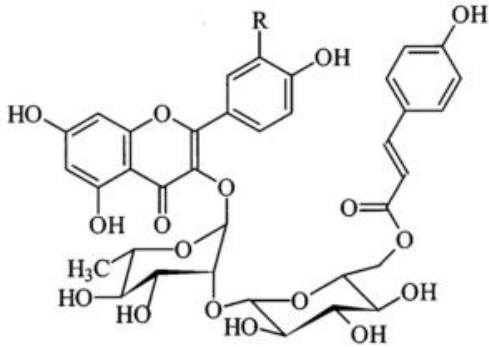


銀杏萃出物，*Ginkgo biloba extract* (EGb761) 是從銀杏葉以標準程序萃取出來的成分 (Drieu, 1986)。銀杏萃出物的化學成分主要含有 24% 類黃酮 (flavonol-O-glycoside) (圖十三)，6% 萜內酯類化合物 (gingolides A, B, C, M, J and bilobalide) (圖十四)，5-10% 有機酸 (kinurenic, hydroxykinurenic and vanillic acid) 和 >0.5% 的 proanthocyanidins。研究證明，銀杏萃出物多年來用於治療周邊血管，心血管和腦血管受損等疾病如高血壓、中風等 (Lee et al., 2002)，並在臨床上具有有效延緩阿茲海默氏症病患的病情，保護神經細胞和強化記憶能力的效果 (Dongen, 2003)。類黃酮類具有清除自由基，抗氧化的活性，並具有促進神經新生的效果 (neurogenesis)，萜內酯類則具有抗發炎之功效。目前對於 EGb761 具有神經保護功效的研究包括 (1) 增強老鼠的學習能力與記憶能力 (Winter, 1991)；(2) 具多方面功能的抗氧化能力並且清除造成 DNA，蛋白質，脂質氧化的 ROS (Bastianetto et al., 2000a)；(3) 抑制細胞產生 NO 的能力 (Kobuchi et al., 1997)；(4) 維持粒線體正常功能和調節腦中單胺氧化酶 (MAO) 的活性 (Sloley et al., 2000)，(5) 抗細胞凋亡 (Xin et al., 2000)。

另外已經有研究指出利用 EGb761 可以抑制 A β 和 H₂O₂ 誘導初代海馬迴神經細胞死亡，並且指出 EGb761 在濃度 10~100ppm 具有保護神經細胞的能力，利用 DCF-DA assay 說明 EGb761 具有清除 ROS 累積造成細胞死亡的功效 (Bastianetto et al., 2000a)。

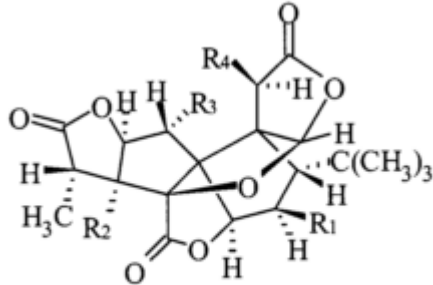


R = H: kaempferol-3-*O*-rutinoside
 R = OH: quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin)
 R = OCH₃: isorhamnetin-3-*O*-rutinoside

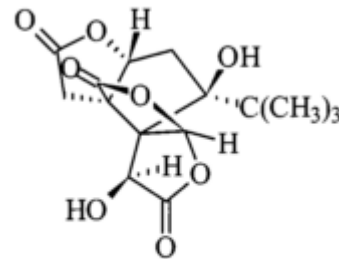


R = H: kaempferol-3-*O*-(6'''-*trans-p*-coumaroyl-2''-glucosyl)rhamnoside
 R = OH: quercetin-3-*O*-(6'''-*trans-p*-coumaroyl-2''-glucosyl)rhamnoside

圖 十三、銀杏萃出物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 黃酮類的化學結構
 Fig. 13. Chemical structures of typical flavonoids in EGb761. (Xin et al., 2000)



Ginkgolides



Bilobalide

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Ginkgolide A (GA)	H	OH	H	OH
Ginkgolide B (GB)	H	OH	OH	OH
Ginkgolide C (GC)	OH	OH	OH	OH
Ginkgolide J (GJ)	OH	OH	H	OH

圖 十四、銀杏萃出物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 萜內酯類的化學結構
 Fig. 14. Chemical structures of typical terpenes in EGb761. (Xin et al., 2000)

(二) 芝麻酚 (Sesamol)

芝麻酚， Sesamol (benzo [1,3] dioxol-5-ol) 是一種具抗氧化能力的酚類化合物 (圖十五 A)，在芝麻油中具有良好的抗氧化性質 (Uchida et al., 1996)，其結構為一個酚類延伸出一個 methylenedioxy group，分子量為 138，芝麻酚是由 sesamolin 熱裂解後的產物，主要出現在經過炒培的芝麻中和加工過後的芝麻油裡面，在未經炒培過程的芝麻中含量較低。本實驗室團隊的研究指出，芝麻酚以 50 mg/kg BW 的濃度餵食 SD 大鼠，其口服生物可利用率高達 35.5%，服用後 24 小時內會分佈在各個組織臟器和血漿中，對大鼠的大腦進行芝麻酚的分析時發現，經口服芝麻酚過後 24 小時內，腦中的芝麻酚含量都有在 2 μ g/g tissue 以上，最高大約達到 8 μ g/g tissue，此研究說明了芝麻酚具有可以通過血腦屏障 (BBB) 的能力 (Jan et al., 2008)。其他相關的芝麻酚研究指出，芝麻酚可以抑制 liposome 鐵離子誘導產生脂質過氧化 (Joshi et al., 2005; Uchida et al., 1996)，也可以降低膠細胞和星狀細胞產生過氧化氫和 NO 以及 MAO 的活性 (Kato et al., 1998)，具有神經保護功效 (Hou et al., 2006)，保護肝臟功能 (Hsu et al., 2006)，抗發炎和抗老化的效果 (Hou et al., 2006; Sharma and Kaur, 2006)。

(三) 芝麻素 (Sesamin)

Sesamin 為芝麻 (*Sesamum indicum*) 種子中的一個主要成分之一 (圖十五 B)，有研究指出 sesamin 可以有效對抗 hypoxia, H₂O₂, Kainic acid 誘導初代神經細胞和 PC12 細胞產生 ROS，脂質過氧化產生細胞毒性 (Hou et al., 2003b)，降低 BV2 微膠細胞中 LPS 誘導 NO 生成，具有抗發炎的效果，也具有神經保護的功效 (Hou et al., 2003a)。

(四) 茶胺酸 (L-Theanine)

茶胺酸，在化學結構上是 N-ethylamino-L-glutamic acid，又稱為 L-theanine (圖十六 B)，是只出現在茶樹植物中的一種獨特的天然胺基酸，來自綠茶 (*Camellia sinensis*) 萃出物中的風味物質，一種蕁類植物，*Xerocomus badius*, *Camellia*, *C. japonica* 也有茶胺酸成分，茶胺酸佔茶葉乾重的 1~2%。有文獻指

出，在動物模式中，給予老鼠腹腔注射茶胺酸 30 分鐘後會出現在腦部，而且沒有被代謝成其他的分子形式，給予老鼠 180 mg/day 的茶胺酸，在 operant test 和 Avoidance test 皆證明了茶胺酸提昇了老鼠的記憶和學習得能力，所以茶胺酸可以通過血腦屏障並發揮神經保護的效果以預防認知功能障礙 (Kakuda, 2011; Terashima et al., 1999) ，在 $A\beta$ 以 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, icv 誘導老鼠產生認知障礙的動物模式中，管餵老鼠 2 mg/kg 、 4 mg/kg 的茶胺酸可顯著降低老鼠的記憶受損 (Kim et al., 2009; Nagasawa et al., 2004) 。也有研究說明了茶胺酸針對暫時性缺血模式的神經死亡是具有的保護功效 (Kakuda et al., 2000) ，另外，茶胺酸也有其他的功能，例如降低血壓，抗焦慮等等，當人類口服 50~200 mg 的茶胺酸 30 分鐘後，大腦開始產生 α -腦波， α -腦波是一個放鬆 (relaxation) 的指標 (Yokogoshi et al., 1995 ; Kakuda et al., 2000) 。

(五)四氫薑黃素 (Tetrahydrocurcumin)


Tetrahydrocurcumin (THC) 為一種抗氧化物質 (圖十六 A)，是由 curcumin 在活體中經肝臟代謝還原而成 tetrahydrocurcumin ，為 curcumin 的主要代謝物，近來研究指出， tetrahydrocurcumin 具有抗氧化，抗發炎 (Murugan and Pari, 2006; Naito et al., 2002) 。

(六)橘皮素 (Tangeretin)

橘皮素 (tangeretin) 為一種柑橘類果皮中豐富的多甲氧基黃酮類 (圖十五 C) ，有研究指出具有抗菌 (Yao et al., 2012) ，抗發炎 (Chen et al., 2007) ，抗癌 (Kawaii S, 1999) 以及神經保護 (Datla et al., 2001) 等功效。在生物可利用率上也有研究指出 tangeretin 經管餵老鼠之後進行組織臟器的分析發現 tangeretin 分佈在大腦中的濃度明顯高於其他的組織，由其在海馬迴中的 tangeretin 濃度最高 (Datla et al., 2001) 。

(七)川陳皮素 (Nobiletin)

Nobiletin 川陳皮素 (圖十五 D)，柑橘類的果皮上如 *Citrus depressa*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon* 的多甲氧基黃酮類化合物，與橘皮素的化學結構相似，亦

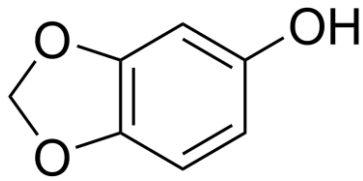


具有抗發炎 (Huang and Ho, 2010) , 抗癌 (Kandaswami et al., 1991) 以及可能具降低缺血性腦損傷的效果 (Yang et al., 2013) , 另外也有調節骨骼細胞和脂肪細胞葡萄糖攝取以達到抗肥胖的效果 (Lee et al., 2010) , 在生物可利用性上也有研究指出 nobiletin 以 50 mg/kg 的濃度經管餵老鼠之後進行大腦分析, 發現在大腦中的最高濃度在經管餵後的一個小時, nobiletin 的最高濃度可以到達 4.20 $\mu\text{g/mL}$ (Singh et al., 2011), 在神經保護功效的研究方面, Nobiletin 活化 ERK/MAPK-dependent 訊號路徑促使海馬迴神經細胞內的 CREB (cAMP response element-binding protein) 磷酸化和 CRE (cAMP response elements) 轉譯表現, CREB/CRE-dependent 轉譯路徑調節神經細胞的突觸形成 (synapse formation) 、神經細胞生長營養因子和長期記憶形成的基因表現, 有效提高嗅球切除導致記憶力受損的動物模式老鼠的記憶能力 (Matsuzaki et al., 2006; Nakajima et al., 2007; Onozuka et al., 2008)。

(八) 四甲氧基類黃酮 (TMF)

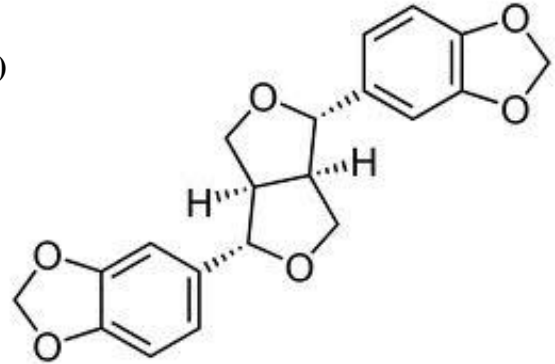
多甲氧基類黃酮大多存在於柑橘類的果皮中, 而四甲氧基類黃酮, 結構 (圖十六 D) 是其中一種主要的多甲氧基類黃酮類化合物由月橘 (*Murraya paniculata*)、胡椒屬植物 (*Piper porphyrophyllum*) 和黑薑 (*Kaempferia parviflora*) 中分離鑑定出來, 這些植物大多使用在治療許多疾病像是痢疾、消化不良、胃潰瘍、消化道疾病和過敏等等, 除了這些功效之外, 許多文獻提到這些植物另外也有抗過敏, 抗發炎, 抑菌的效果 (Ahmad et al., 2011)。文獻中提到黑薑 (*Kaempferia parviflora*) 的正己烷和二氯甲烷萃出液具有抑制乙酰膽鹼酶活性的能力, 暗示著其中的化合物可能具有抗阿茲海默氏症的功效 (Sawasdee et al., 2009), 而 TMF 可能是這些植物中主要存在的其中一種化合物 (Lu et al., 2012)。

(A)



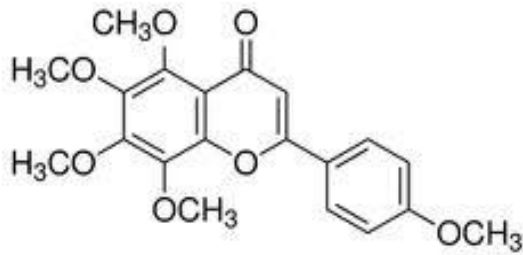
(Joshi et al., 2005)

(B)



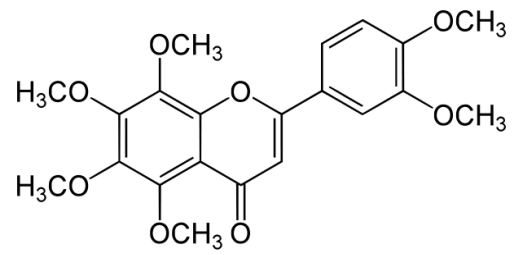
(Kato et al., 1998)

(C)



(Kandaswami et al., 1991)

(D)



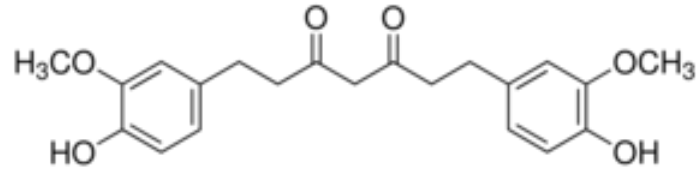
(Kandaswami et al., 1991)

圖 十五、實驗樣品 sesamol、sesamin、tangeretin、nobiletin 之化學結構

Fig. 15. Structure of (A) sesamol, (B) sesamin, (C) tangeretin, (D) nobiletin

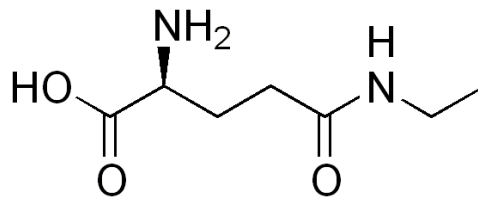


(A)



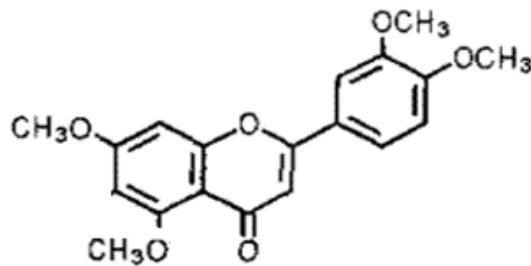
(Karthikesan et al., 2010)

(B)



(Kim et al., 2009)

(C)



(Lu et al., 2012)

圖 十六、實驗樣品 tetrahydrocurcumin、theanine、5, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone 之化學結構

Fig. 16. Structure of (A) tetrahydrocurcumin, (B) theanine, (C) 5, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone

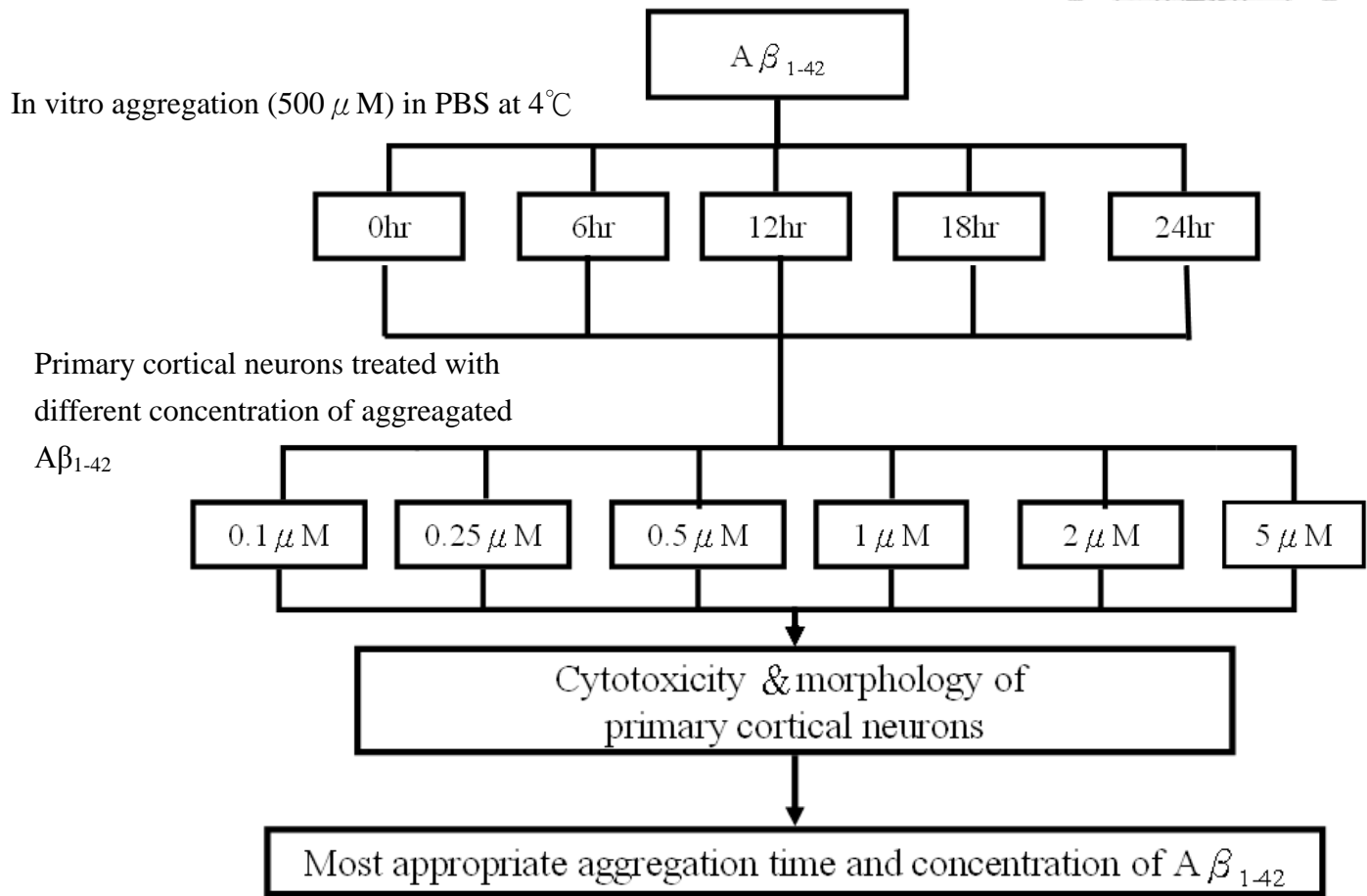
參、研究目的與實驗架構

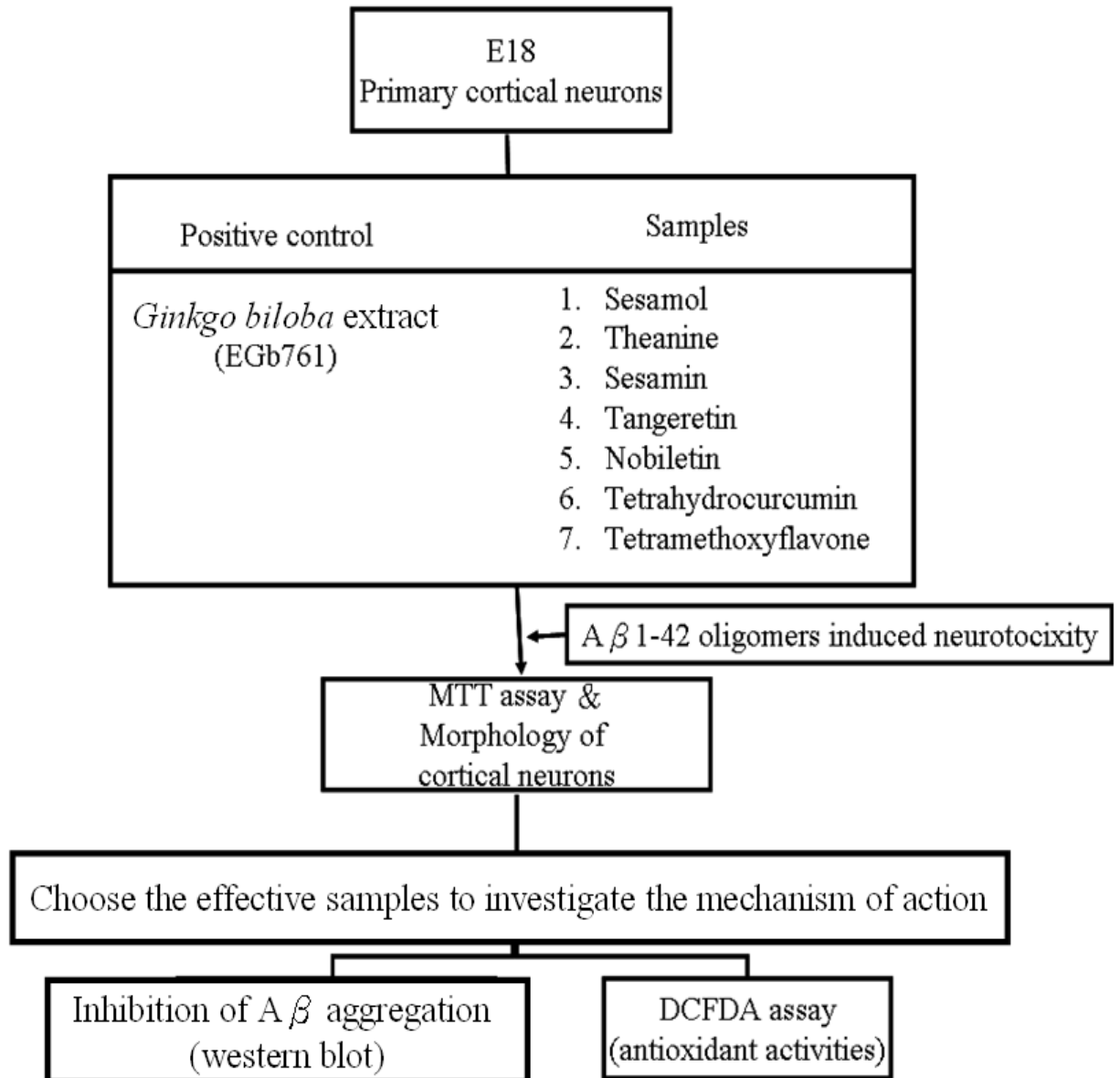


一、實驗目的

近年的研究指出，類澱粉蛋白 (β -amyloid peptides, A β) 是導致大腦神經細胞死亡並引起阿茲海默症的主要原因，本實驗目的是以懷孕十八天大鼠體內的胎鼠大腦之皮質初代神經細胞做為實驗模式，將 A β_{1-42} 進行體外聚集後，處理細胞以誘導神經細胞產生毒性和死亡。使用已經有研究指出具有神經保護功效的銀杏萃出物 (*Ginkgo biloba* extract, EGb761) 作為正控制組，試驗樣品為芝麻素、芝麻酚、茶胺酸、川陳皮素、橘皮素、TMF、四氫薑黃素純化合物，研究該植化素 (phytochemical) 是否具有對抗 A β_{1-42} 毒性的功效，並進一步探討可能的作用機制。

二、實驗架構





肆、材料與方法



一、實驗材料

(一) 實驗樣品

1、銀杏萃取物 (*Ginkgo biloba* extract, EGb761)

銀杏萃取物 (*Ginkgo biloba* extract CP2005, Ginkgolic Acid<5ppm) ，岑希環貿易有限公司 (Hong Kong, China) ， Lot:20101209 。承蒙美國 Rutgers 大學 (New Brunswick, New Jersey, USA) 食品科學系 何其懌教授提供。

2、5, 7, 3', 4' tetramethoxyflavone

由開南大學保健營養學系魏國晉教授合成。

3、L-Theanine

購自 wako 公司，Cat. No.320-93461，Lot: TLM0812。

4、Nobiletin

由開南大學保健營養學系魏國晉教授合成。

5、Sesamin

6、Sesamol

購自 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA) ，Cat. No. S8518。

7、Tangeretin

由開南大學保健營養學系魏國晉教授合成。

8、Tetrahydroxycurcumin

由國立高雄海洋科技大學水產食品科學系潘敏雄提供。

(二) 大鼠大腦初代皮質神經細胞 (Rat primart cortical neurons)

初代皮質神經細胞 (primary cortical neurons) 是由懷孕十八天 (E18) 的 Sprague Dawley 大鼠胚胎的大腦皮質取得。SD 大鼠購自陽明大學動物中心，購入時已經懷孕十四天，購入之後於台大食科所五樓動物房 (日照上午七時至下午七時，溫度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 40-60%) 飼養至懷孕十八天，進行犧牲取之胚胎期第十八天胎鼠的大腦皮質神經細胞。

(三) 試劑與試藥

β -amyloid₁₋₄₂ (A β ₁₋₄₂)

White lyophilized powder, HPLC 分析純度達 96.2% , 蛋白質含量 85.4% , 分子量 4514.1 , 購自 American peptide 公司 (Sunnyvale, California, USA) , Cat. No.62-0- 80 , Lot : 1207090T 。



細胞培養之試劑與藥品

1. Antibiotic-antimycotic solution : 購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York, USA) , Cat. No. 15240-062 。
2. B-27 Serum-Free Supplement (50X) : 購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York,, USA) , Cat. No. 17504-044 。
3. Cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C) : 購自 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA) , Cat. No.C1768 。
4. Deoxyribonuclease I (DNase I) : 蛋白 \geq 85% , 分子量~31 kDa , 購自 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA) , Cat. No.DN25 。
5. 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) : 純度 \geq 98% , 購自 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA) , Cat. No.M2128 。
6. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (1X) : 購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York, USA) , Cat. No.14175-095 。
7. HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) : 純度 99% , 購自 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA) , Cat. No.10,522-8 , Lot.58896HVMV 。
8. L-Glutamic acid, powder : 購自 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA) , Cat. No.G8415 。
9. L-Glutamine-200 mM (100X) : 購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York, USA) , Cat. No.25030-081 。
10. NEUROBASAL™ Medium (1X) : 購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York, USA) , Cat. No.21103-049 。

11. Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT) : 購 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA), Cat. No. M2128 。

12. 0.4 % Trypan Blue: 購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York, USA), Cat. No. 15250-061 。

13. 0.25 % Trypsin-EDTA (1X) : 購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York, USA), Cat. No. 25200-056 。

蛋白質電泳與西方墨點法之藥品

1. Ammonium persulfate (APS): 購自 Amreso 公司 (solon, OH, USA), Cat. NO. 0486

2. Anti-Mouse IgG polyclonal antibody, liquid: HRP-cinjugated secondary antibody , 購自 Gene Tex (IrVine, CA, USA), Cat. NO. GTX213111-01 。

3. Beta Amyloid (A β) Monoclonal Antibody, 6E10: primary antibody , 購自 Covance (Emeryville, CA, USA), Cat. NO. SIG-39300 。

4. Bovine serum albumin (BSA): 試藥分析級, 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA), Cat. NO. A4503 。

5. Glycerol: 純度 99 % , 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA), Cat. NO. G7757 。

6. Glycine: 純度 99 % , 購自林純藥株式會社(Osaka, Japan), Cat. NO. 012-3393 。

7. N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED): 純度 99 % , 購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany), Cat. NO. 1072 。

8. Sodium dodecyl sulfate (SDS): 純度 99 % , 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA), Cat. NO. L-4509 。

9. Tricine: 純度 99 % , 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA), Cat. NO. T0377 。

10. TWEEN 20: 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA), Cat. NO. P5927 。

溶劑

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 合成級, 購自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany), Cat. No.k36994512-713 。

2. HEPES Buffer Solution (1 M)：購自 GIBCO 公司 (Grand Island, New York, USA)，Cat. No.15630-080。

(四) 裝置與儀器設備

一般儀器設備

1. 分析天平 (Analytical balance)：Model 1712，Sartorius 製造 (Goettingen, Germany)。

2. -20℃ 冷凍櫃 (-20°C Freezer): Model LFD-300，FRIGIDAIRE 公司製造 (Ontario, Canada)。

3. 多功能全光譜分析儀 (Multiple-detection microplate reader, ELISA)：Syner HT，BIO-TEC 公司製造 (Atlanta, GA, USA)。

4. 冰箱 (Refrigerator): Model RT-4502GS，Westinghouse 公司授權聲寶公司製造 (台北，台灣)。

5. 酸鹼度計 (pH meter)：Model Seven EasyTM pH meter S20，Mettler-Toledo 公司製造 (Flawil, Switzerland)。

6. 離心式真空濃縮機 (Speed-Vac evaporator)：Model SCV100H，Savant 公司製造 (Farmingdale, New York, USA)。

7. -80℃ 冷凍櫃 (Ultra-Low Freezer): Model MDF NU-6511，NuAire 公司製造 (Plymouth, MN, USA)；Model MDF-04086S，聲寶公司製造 (SANYO electrical biomedical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)。

細胞實驗相關儀器設備及耗材

1. 24 MicroWellTM Plates：NunclonTMΔ 細胞用，購自 Nunc 公司 (Roskilde, Denmark) Cat No. 142475。

2. 10 mL、25 mL Pipette：細胞用，購自 Corning 公司-Costar corp. (Cambridge, Massachusetts, USA)。

3. Medical Millex-GS Filter Unit：sterilized 孔徑 0.22 μm，直徑 33 mm，



- 
- Millipore公司 (Bedford, Massachusetts, USA) , Cat No. SLGSM33SS。
4. 細胞過濾篩 (Cell Strainer) : 40 μm Nylon, blue , 購自 BD Falcon™ (San Jose, California, USA) , Cat No. 352340。
 5. 離心機 (Centrifuger) : Model 2100 , KUBOTA 公司製造 (Tokyo, Japan) 。
 6. 二氧化碳恆溫培養箱 (CO₂ incubator) : Model 3100 , Thermo Forma 公司製造 (Ohio, USA) , 購自尚上儀器公司 (Taipei, Taiwan) 。
 7. 數位照相機 (Digital camera) : C-7070 , Canon 公司製造 (Tokyo, Japan) ; AxioCam HRm CCD , Carl Zeiss 公司製造 (Oberkochen, Germany) 。
 8. 倒立式光學顯微鏡 (Inverted photomicroscope) : Model TE300 Nikon 公司製造 (Kanagawa , Japan) ; Model CKX41 , Olympus 公司製造 (Tokyo, Japan) 。
 9. 生物安全操作台 (Laminar flow) : Model TBH-420 , 炬安儀器公司製造 (Taipei, Taiwan) 。
 10. 單鍵式計數器 (Manual Counter) : 購自 Milky公司(Taipei, Taiwan) 。
 11. 八爪微量分注器 (Multiple pipetman) : Model P200 , Brand 公司製造 。
 12. 血球計數盤 (Neubauer improved bright-line Hemocytometer) : Neubauer 公司製造 (Marienfeld, Germany) 。
 13. 電動吸管輔助器 (Pipet-Aid) : Model Portable XP , Drummond 公司製造 (Broomall, Pennsylvania, USA) 。
 14. 微量分注器 (Pipetman) : Model P2, P20, P200, P1000 , Gilson 公司製造 (Middletown, Wisconsin ,USA) 。
 15. 恆溫水浴槽 (Water bath) : Model 905 , Hotech 公司製造 (Taipei, Taiwan) 。
 16. 超純水設備 (Water purification device) : Mili-Q system , 購自 Millipore 公司 (Bedford, Massachusetts, USA) 。

西方墨點法器材

1. 電泳膠體製備器 (Dual gel caster): Model SE245 , Hoefer 公司製造 (Holliston, MA, USA)

2. 電泳電源供應器 (Electrophoresis Power supply): Model 250-90, Thermo 公司製造 (Milford, MA, USA)
3. 小型蛋白質電泳槽 (Mini-vertical gel electrophoresis unit): Model SE260, Hofer 公司製造 (Holliston, MA, USA)
4. 影像分析儀 (UVP biospectrum image system): Biospectrum 500, UVP 公司製造 (Upland, CA, USA)。



二、實驗方法

(一) 實驗用溶液配方

1. 細胞用溶液

Poly-L-Lysine stock solution (5 mg/ml)

50 mg	poly-L-Lysine
10 ml	sterile PBS (pH7.4)

* 以0.22 μm膜過濾，存放-20 °C 冰箱，使用前以PBS稀釋到100 μg/mL

0.25% Trypsin/EDTA + 10 mM HEPES

50 μl	1M HEPES
5 ml	0.25% Trypsin/EDTA

DNase I solution (10 mg/mL)

10 mg	DNase I
1 ml	sterile ddH ₂ O

* 以0.22 μm膜過濾，存放-20 °C 冰箱

10 mM L-glutamic acid solution

10 mg	L-glutamic acid
6.8 ml	sterile ddH ₂ O

* 以0.22 μm膜過濾，存放-20 °C 冰箱。

10 mM Ara-C stock solution

12.16 mg	Cytosine β -D-arabinofuranoside
5 ml	sterile ddH ₂ O

*以0.22 μ m膜過濾，存放-20 °C冰箱，使用前以ddH₂O稀釋到500 μ M



0.5mg/mL MTT solution

50 mg	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT)
100 ml	Neuronal basal medium

*每次實驗前新鮮配製。

2. 蛋白質電泳與西方墨點法用溶液

Transfer buffer (5X)	1L
125mM tris-HCL (pH 8.9)	15g
960 mM glycine	72g
dd H ₂ O	1L
Transfer buffer working solution	
Transfer buffer (5X)	1L
ddH ₂ O	3L
Methanol	1L
Running buffer	
Transfer buffer (5X)	1L
H ₂ O	4L
0.1% SDS	1g

**PBST (0.5% (v/v) Tween 20 in PBS)**

Components	g/500 ml
Tween 20	2.5 ml
PBS	500 ml

Phosphate-buffered saline (PBS), 1X

Ingredients	g/L	mM
NaCl	8.0	136.9
KCl	0.2	2.7
KH ₂ PO ₄	0.2	1.5
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.43	8.0

調至 pH 7.4

Blocking solution

Components	g/100ml
20mM Tris-HCl pH7.4	0.24g
125mM NaCl	0.7g
0.2% Tween 20	0.2ml
1% bovine serum albumin	1g
PBS	100ml



TBST (1X)

Ingredients	g/L	mM
NaCl	8.8	150
KCl	0.2	2.7
Tris-base	3	10
Tween 20	0.5ml	8.0

調至 pH 7.4

(二) 樣品配製

- 1、*Ginkgo biloba* extract (EGb761): 每次作實驗前新鮮配製，將 EGb761 粉末以 DMSO 配製成 10^5 ppm 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，再以培養基稀釋十倍後以百分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1% DMSO）。
- 2、Sesamol: 每次作實驗前新鮮配製，將 sesamol 粉末以 DMSO 配製成 10^5 μ M 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，再以培養基稀釋十倍後以百分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1% DMSO）。
- 3、Theanine: 每次作實驗前新鮮配製，將 theanine 粉末以 ddH₂O 配製成 10^5 μ M 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，再以培養基稀釋十倍後以百分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1% DMSO）。

- 4、Nobiletin: 每次作實驗前新鮮配製，將 nobiletin 粉末以 DMSO 配製成 10^5 μM 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，再以培養基稀釋一百倍後以十分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1% DMSO）。
- 5、Tangeretin: 每次作實驗前新鮮配製，將 tangeretin 粉末以 DMSO 配製成 50000 μM 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，再以培養基稀釋一百倍後以十分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1%DMSO）。
- 6、Tetramethoxyflavone: 每次作實驗前新鮮配製，將 TMF 粉末以 DMSO 配製成 10000 μM 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，再以培養基稀釋十倍後再以百分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1% DMSO）。
- 7、Sesamin: 每次作實驗前新鮮配製，將 Sesamin 粉末以 DMSO 配製成 10^5 μM 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，再以培養基稀釋一百倍後以十分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1% DMSO）。
- 8、Tetrahydrocurcumin: 每次作實驗前新鮮配製，將 tetrahydrocurcumin 粉末以 DMSO 配製成 10^5 μM 的 stock，先以 VOTEX 震盪均勻，再以超音波震盪器震盪 2 分鐘。用 DMSO 序列稀釋成不同濃度，取相同體積不同濃度之樣品，在以培養基稀釋一百倍後以十分之一的體積加入初代神經細胞的培養液中（最終培養基中含 0.1% DMSO）。



(三) $A\beta_{1-42}$ 定量與聚集

1. 單體化 (Monomerization)

將購自 America peptide 公司 (Sunnyvale, CA, USA) 的 $A\beta_{1-42}$ ，與 HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) 置於冰上 15 分鐘，由於 HFIP 極易揮發，故需降低 HFIP 的溫度並在抽風櫃中操作。以 1 ml HFIP 將 1mg $A\beta_{1-42}$ 溶解，封上 parafilm，於 VOTEX 上震盪均勻並以超音波震盪 2 分鐘後靜置室溫 1 小時待解集反應進行，再分裝至微量離心管中，於抽風櫃放置 24 小時使其自然揮發。隔日再以 speedvac 離心 10 分鐘將剩餘 HFIP 抽乾，得到單體狀態的 $A\beta_{1-42}$ 保存於 -80°C 。

2. 定量與聚集 (Quantification and aggregation)

以 DMSO 將 $A\beta_{1-42}$ 回溶成 5 mM 的 stock，再以 PBS 稀釋成 500 μM ，於 4°C 冰箱搖晃 (100 rpm) 使其聚集 6 小時。聚集前先取 2 μl , 500 μM , $A\beta_{1-42}$ 以去離子水稀釋 10 倍，以 BSA 標準曲線進行定量分析：將 BSA stock (0.75 mg/ml) 以去離子水稀釋成 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，在 96 孔盤分別加入 5 μl 各濃度的 BSA 以及以去離子水稀釋 10 倍的 $A\beta_{1-42}$ ，再加入 200 μl , 1X Coomassie Blue dye，避光靜置 15 分鐘待反應進行後，ELISA reader 測定 595 nm 吸光值，繪製 BSA 標準曲線，將 $A\beta_{1-42}$ 吸光值代入標準曲線公式計算 $A\beta_{1-42}$ 濃度。將聚集後的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物保存於 -80°C ，待進行後續實驗。

(四) 大鼠初代皮質神經細胞的分離與培養

1、細胞培養皿之塗覆 (Coating of cell culture plates)

無菌操作台內，將 Poly-L-Lysine (PLL) 以 PBS 配置成 stock solution (5 mg/ml)，以 0.22 μm 膜過濾後存放於 -20°C 備用。Coating 前，再以 PBS 將 PLL stock solution 稀釋成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PLL working solution，於 24 孔盤的每個 well 中加入 300 μl PLL working solution，蓋上蓋子於無菌操作台內避光放置隔夜，隔日使用將 24 孔盤中的 working solution 吸除，加入 300 μL 無菌水 wash

後吸除，打開上蓋風乾，最後以 parafilm 將 24 孔盤密封後包覆鋁箔，保存於 -20°C 冰箱備用，保存時間最多不可超過兩個禮拜，種植細胞前取出冰箱放置到室溫後使用。

2、初代腦皮質神經細胞取得及培養 (Isolation and culturing of cortical neurons)

將懷孕第 18 天的 SD 母鼠以 CO₂ 使其昏迷安樂死後，以 70% 酒精將腹部毛皮噴濕，以滅過菌的剪刀剪開毛皮後再將肌肉層剪開，將子宮取出放在裝有 CMF-HBSS 的培養皿 (放置在冰上保持低溫)，將子宮剪開取出胚胎，將胚胎移至另一個裝有低溫新鮮的 CMF-HBSS 之培養皿中，接著以鑷子夾住固定胎鼠頸部，以眼科手術尖鑷由胎鼠鼻尖劃開皮膚及腦殼，剝開至兩側露出大腦，再以眼科手術尖鑷將大腦夾擠出，放入裝有低溫新鮮的 CMF-HBSS 之培養皿，以鑷子小心將左右半腦分開並移除後腦，並將左右半腦的腦膜剝除後，放入新的 CMF-HBSS 中，迅速移至無菌操作台內。將腦皮質放到 Parafilm 上以手術刀片切成 1mm 大小的碎片，再放入裝有 37°C，0.25% trypsin /EDTA+10mM HEPES 的離心管中，於 37°C 水浴鍋反應 15 分鐘。反應結束後將 0.25% trypsin /EDTA+10 mM HEPES 上清液取出，加入 5 ml 新鮮 37°C 的 CMF-HBSS 稀釋後靜置 3 分鐘待組織沉澱，再將上清液去除。此步驟重複兩次，最後將 CMF-HBSS 加到 5 ml 的體積後加入 25 µl DNase I (最終濃度 0.05 mg/ml)。接著以 10 ml 吸管反覆打碎細胞十次，再接上 200 µl tip 反覆打碎十次。將細胞液通過 40 µm 尼龍細胞過濾篩 (cell strainer)，以 100 g 離心 5 分鐘後，將上清液去除，加入 5 ml neuronal basal medium 輕拍離心管底部並將細胞 pellet 打散，取 50 µl 細胞液以 trypan blue 染色至血球計數器 (hemocytometer) 計算活細胞數，將細胞種在經塗覆 PLL 後的 24 孔盤中，每個 well 接種 160,000 個活細胞，輕拍盤子邊緣使細胞均勻種在整個 well 中，將含有初代腦皮質神經細胞的 24 孔盤放入 37°C、5% CO₂、9% O₂ 之培養箱中進行培養。在體外培養第三天 (3DIV) 時，加入 Ara-C (cytosine-β-D-arabinofuranoside, 最終濃度 5 µM) 以抑制神經膠細胞生長、增加

神經細胞之純度 (蔡, 2011) 。於 24 小時後 (4 DIV) 將 medium 替換成新鮮的 neuronal basal medium 。體外培養第五天 (5DIV) 時開始進行後續樣品毒性及樣品抑制 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之神經保護實驗。



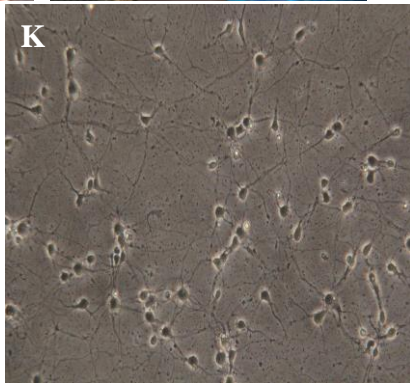
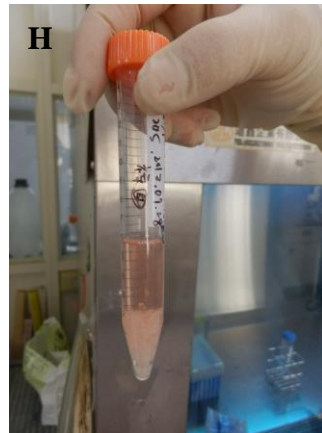
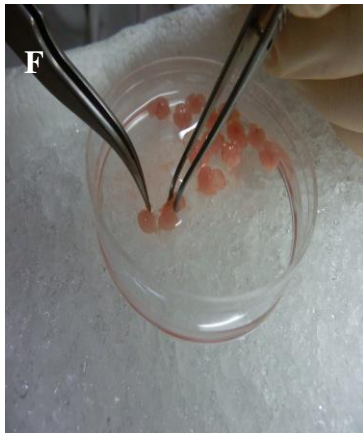
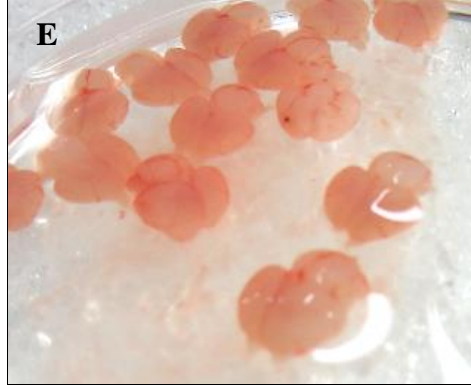
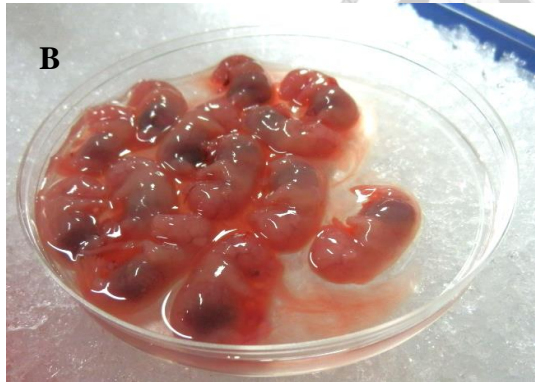
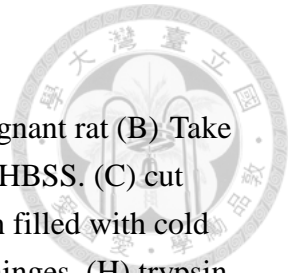


圖 十七、初代大腦皮質神經細胞分離步驟

Fig. 17. Isolation of primary cortical neurons from E18 rats.

Cortical neurons prepared as follows: (A) dissection of the time pregnant rat (B) Take out the fetuses from uterus and place in a petri dish with cold CMF-HBSS. (C) cut open the skull. (D) Squeeze the brain out. (E) put in a new Petri dish filled with cold CMF-HBSS. (F) Bisect the cortex into halves. (G) Remove the meninges. (H) trypsin digestion at 37°C for 30 min. (I) Filtered through a 40µm nylon cell strainer. (J) Centrifuge the tube with 100g. (K) Cortical neurons were seeded in PLL-coated 24-well plates.



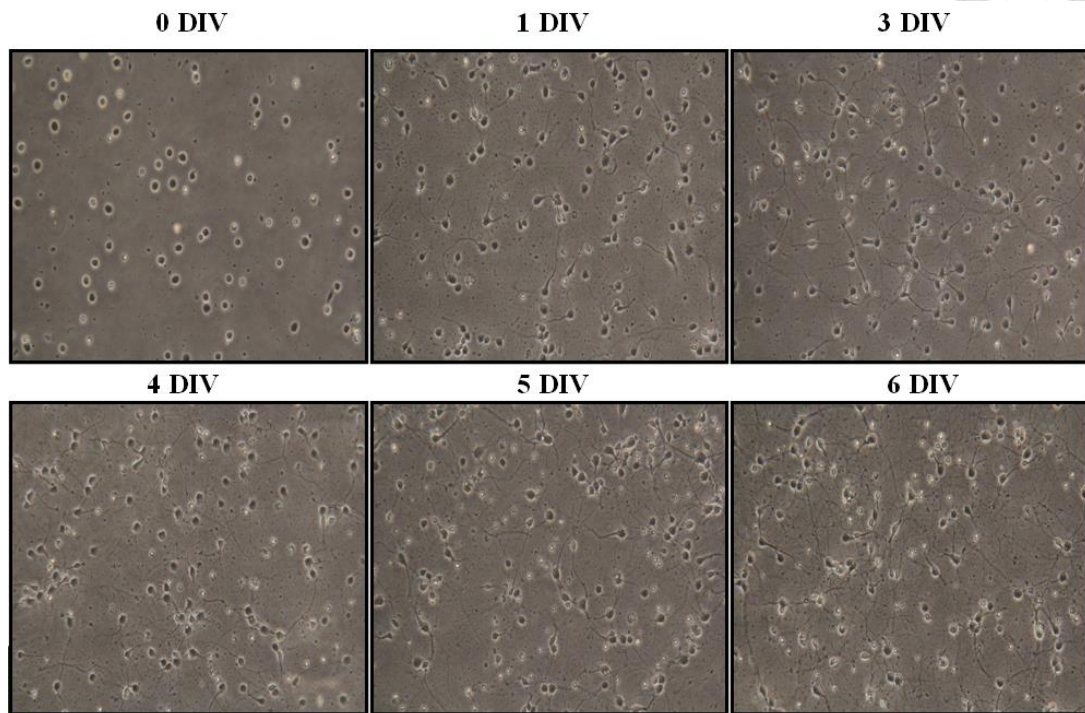


圖 十八、不同天數的初代神經細胞的細胞形態

Fig. 18. Morphological characteristics of cortical neurons from different days.

Cortical neurons were seeded in PLL-coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. Cells were attached to the bottom of the well after 4 hours from seeding and cortical neuronal cells presented a global shape (0 DIV). Neurons started to extend and spread neurites after 24 hours (1 DIV) and neurons grew mature and connected to each other day after day (2 DIV-6 DIV).

(五) 以大鼠初代腦皮質神經細胞為模式之細胞試驗

1. A β ₁₋₄₂ 寡聚合物之毒性試驗

將自 E18 (embryonic day 18) 大鼠胚胎取下的腦皮質神經細胞種 (seeding) 在以 PLL 塗覆的 24 孔盤中 (160,000 cells/well) ，於 37°C, 5% CO₂, 9% O₂ 條件下培養至第五天 (5 DIV) 進行實驗。試驗組以聚集不同時間 (0, 6, 12, 18, 24 hr) 之 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物以濃度 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2, 5 μ M ，而控制組則加入 PBS (含 0.01% DMSO) 。處理後立刻放入培養箱，24 小時之後以顯微鏡拍下其細胞形態並以 MTT assay 測定細胞存活率。若以 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物處理後存活率太低，樣品加入後神經細胞可能將無法有效抵抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物的毒性，因此選擇存活率約 60%~70% 的濃度作為進行後續誘導神經細胞毒性之劑量。

2. 樣品之毒性試驗

將自 E18 (embryonic day 18) 大鼠胚胎取下的腦皮質神經細胞種 (seeding) 在以 PLL 塗覆的 24 孔盤中 (160,000 cells/well) ，於 37°C 、5% CO₂ 、9% O₂ 條件下培養至第五天 (5 DIV) 後始可進行實驗。試驗組以不同濃度樣品進行處理，而控制組則加入 neurobasal medium (含 0.1% DMSO) ，放入培養箱，於 24 小時之後以顯微鏡拍下其細胞形態並以 MTT assay 測定細胞存活率，選擇沒有顯著毒性的劑量進行後續樣品抑制 A β ₁₋₄₂ 毒性之試驗。

3. 樣品抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之保護試驗

將自 E18 (embryonic day 18) 大鼠胚胎取下的腦皮質神經細胞種殖在以 PLL 塗覆的 24 孔盤中 (160,000 cells/well) ，於 37°C 、5% CO₂ 、9% O₂ 條件下培養至第五天 (5 DIV) 後進行實驗。實驗組先加入不同劑量 (經毒性試驗沒有顯著毒性) 的樣品，正控制組則加入銀杏葉萃取物 (EGb761, 最終濃度 60 ppm) ，而控制組加入 neurobasal medium (含 0.1% DMSO) 。間隔 30 分鐘後，實驗組及正控制組皆加入聚集 6 小時之 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物 (最終濃度 1 μ M) ，而控制組則加入 PBS (含 0.01% DMSO) ，放入培養箱，於 24 小時之後以顯微鏡拍下其細胞形態並以 MTT assay 測定細胞存活率。

4. 細胞存活率之測定

存活率以 MTT reduction assay 進行測定，參考 Mosmann (1983) 的方法進行修改。實驗前先以細胞培養液配製 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液，將上述實驗組別所培養的細胞培養液吸出，加入 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液，放回培養箱 2 小時，再將 MTT 溶液吸除，加入 300 μ l DMSO 將紫色結晶溶出後，吸取 150 μ L 至 96 孔盤以多功能全光譜分析儀 (ELISA reader) 測定在 570 nm 之吸光值。存活率計算方法如下：

$$\text{Cell viability(\%)} = \frac{(\text{As}-\text{Ab})}{(\text{Ac}-\text{Ab})} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

5. 樣品對於細胞內自由基清除能力測定

將 E18 天胎鼠的初代皮質神經細胞，以 5×10^4 的細胞密度，種植在依前述方法塗覆 Poly-L-lysine 的不透明 96 孔盤中，每個 well 100 μ l，於體外培養第五天 (5 DIV) 將具有保護初代神經細胞對抗 $A\beta_{1-42}$ 有效的樣品，預先加入細胞中 30 分鐘，再加入 1 μ M 的 $A\beta_{1-42}$ 於 37°C, 5% CO_2 , 9% O_2 條件下的培養箱中培養 24 小時，進行細胞內自由基清除能力測定 (DCF-DA assay)，實驗前將 DCF-DA stock 10000 μ M (溶於 DMSO)，使用細胞培養液 (neuronal basal medium) 配製成 DCF-DA working solution (10 μ M)，將 96 孔盤中的 medium 吸除後加入 100 μ l DCF-DA working solution，於培養箱中避光培養 30 分鐘後，以溫的 CMF-HBSS wash 一次以細胞螢光測定儀測定，激發 (emission) 波長為 483 nm，發散 (excitation) 波長為 538 nm。

(六) Tricine-SDS-PAGE 與西方墨點法

1. 鑄膠 (casting gel)

- a. 將厚片與薄片玻璃合併，凹面朝內，放在鑄膠台的固定架上，在水平之桌面上對齊後固定鎖緊。
- b. 實驗當天取配製好的 10% 的 APS，先於離心館中加入 resolving gel 和 stacking gel 的各溶液後最後加入 APS，混合均勻後注入 resolving gel 於玻璃夾層中，避免出現泡泡，在 resolving gel 上面加入 1ml 的 isopropanol 去除氣泡和壓膠，等待膠體凝固後，注入 stacking gel 並插上齒梳，等待膠體凝固。
- c. 拔出齒梳，放在電泳槽上，加入 running buffer，準備進行電泳

2. 加入樣本與電泳 (Loading sample ($A\beta$) and running gel)

- a. 將最有效濃度的 EGb761、nobiletin、tangeretin 三個樣品 (方法同二、實驗方法之 (二) 樣品配製) 於其最有效濃度下分別處理聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物，在 37°C 靜置培養 4 小時。在微量離心管中加入配製好濃度的樣品 10 μ l 和 10 μ l 的 sample buffer (最終含有 0.5 μ g 的 $A\beta$) 混合均勻，將 10 μ l 樣本注入膠體的齒槽 (well) 中。



b. 接著以電壓 30V ，電流 500 mA stacking 30 分鐘後，改成電壓 100 V ，電流 500mA ，進行 2 小時的電泳。

3. 轉印 (transfer)

a. 將 PVDF 膜裁成膠體大小，以甲醇 (methanol) 活化 10 分鐘，以去離子水和轉印緩衝液 (transfer buffer) 潤洗，以備使用，海綿和 3M 濾紙也以轉印緩衝液浸泡潤濕。

b. 將轉印夾板 (cassette) 打開平放先墊上濕潤的海綿，在鋪上 3M 濾紙。

c. 膠體由玻璃夾層取出後將 stacking gel 去除，在轉印緩衝液中浸潤後將膠體與 PVDF 膜對齊夾在一起，放在 3M 濾紙上，以刮板刮過膠體表面趕走氣泡，避免影響轉印的效果，在放上另一張 3M 濾紙和海綿，將轉印夾板合起放入轉印槽中。

d. 注入轉印緩衝液 (transfer buffer) ，於 4°C 冷凝機中浸行電壓 100V ，電流 350mA 轉印四小時。

4. Blocking & 抗體免疫染色

a. 將轉印完成的 PVDF 膜 (轉印面朝上) 取出放入小盒子中，於室溫 blocking 1 小時，接著以 TBST 震盪清洗 30 分鐘 (每 10 分鐘更換一次 TBST 溶液)。

b. 加入一級抗體 (6E10, 1 : 500 in blocking solution) 於 4°C 冰箱迴旋震盪放至隔夜 (大於 8 小時小於 12 小時)。

c. 以 TBST 震盪清洗 30 分鐘 (每 10 分鐘更換一次 TBST 溶液) 後，加入二級抗體 (anti-mouse-IgG-conjugated to HRP, 1 : 20000 in blocking solution) ，於室溫下迴旋震盪反應 1 小時，在以 TBST 震盪清洗 30 分鐘 (每 10 分鐘更換一次 TBST 溶液)。

5. ECL 呈色與螢光偵測

a. 將 PVDF 膜於紙巾上稍微瀝乾，ECL 的 A 液和 B 液以 1:1 的比例混合後，讓 PVDF 膜均勻的浸在 ECL 中

b. 將 PVDF 膜移至另一個容器中將些許的 ECL 滴至 PVDF 膜上幫助完全呈

色。

c. 打開 UVP 軟體，將 PVDF 膜放入暗房中按下 UVP biospectrum 軟體中 preview 調整位置，關上門後按 stop preview 。

d. 選擇 western normal 偵測，並儲存檔案。



三、數據之統計與分析

實驗數據以平均值 \pm 標準差 (mean \pm standard deviation) 表示，統計方式以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 各組數據間差異後，再以變尾 student's t test (two-tailed student's t test) 比較各組間差異，以 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 表示具有統計上的顯著差異。

(七) Thioflavin T binding assay

將最有效濃度的 EGb761、nobiletin、tangeretin 三個樣品 (方法同二、實驗方法之 (二) 樣品配製) 於其最有效濃度下分別處理聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚物，在 37 °C 靜置培養 4 小時。實驗前新鮮配製 ThT working solution，1mM Thioflavin T stock solution 以 PBS 稀釋到 10 μ M，於 96 孔黑盤中加入 50 μ l 各樣品 (含 10 μ M $A\beta$)，50 μ l ThT working solution，混合均勻後反應 90 分鐘，以螢光測定儀測定，激發 (emission) 波長為 355 nm，發散 (excitation) 波長為 460 nm。

伍、結果與討論



一、 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物對於初代神經細胞之毒性

$A\beta_{1-42}$ 單體擁有易聚集成聚合物的特性，並且在不同的聚集時間，不同的聚集溫度和不同的濃度甚至是不同的產品批號，皆會影響其對於初代神經細胞的毒性。本研究首先必須建立 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導初代神經細胞毒性，造成神經細胞受損及死亡的模式，將 $A\beta_{1-42}$ 以 PBS 配製成 $500\ \mu\text{M}$ 濃度後於 4°C 冰箱搖晃 (100 rpm) 使其聚集，聚集時間分別為 0, 6, 12, 18, 24 小時。將 $A\beta_{1-42}$ 配製成 $1\ \mu\text{M}$ 的濃度與初代神經細胞在 37°C 培養箱中共同培養 24 小時後，以 MTT assay 測定細胞存活率。結果表一 (A) 及圖十九 (A) 顯示細胞在加入聚集不同小時的 $A\beta_{1-42}$ 處理之後，存活率皆有顯著的下降，其中又以聚集 6 小時和 12 小時的 $A\beta_{1-42}$ 聚合物其細胞毒性最強。

選擇聚集 6 小時和 12 小時的 $A\beta_{1-42}$ 聚合物配製不同濃度 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 μM) 處理初代神經細胞，結果表一 (B) 及圖十九 (B) 顯示聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 聚合物在不同濃度的細胞存活率分別為 91.5%, 81.7%, 81.3%, 66.0%, 57.2%, 53.4%；而聚集 12 小時不同濃度，其細胞的存活率為 93.6%, 86.1%, 83.8%, 76.2%, 62.9%, 59.2%，比較 6 小時和 12 小時聚集時間，不同濃度 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的毒性，可以明顯的發現，在各濃度下聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 聚合物毒性皆高於 12 小時者，且濃度越高毒性越強。為了避免毒性過於強烈而導致樣品無法抑制其毒性，本實驗選擇毒性了聚集 6 小時濃度為 $1\ \mu\text{M}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 聚合物 (細胞存活率為 66.0 ± 5.0) 作為誘導初代神經細胞毒性的聚集時間和濃度。

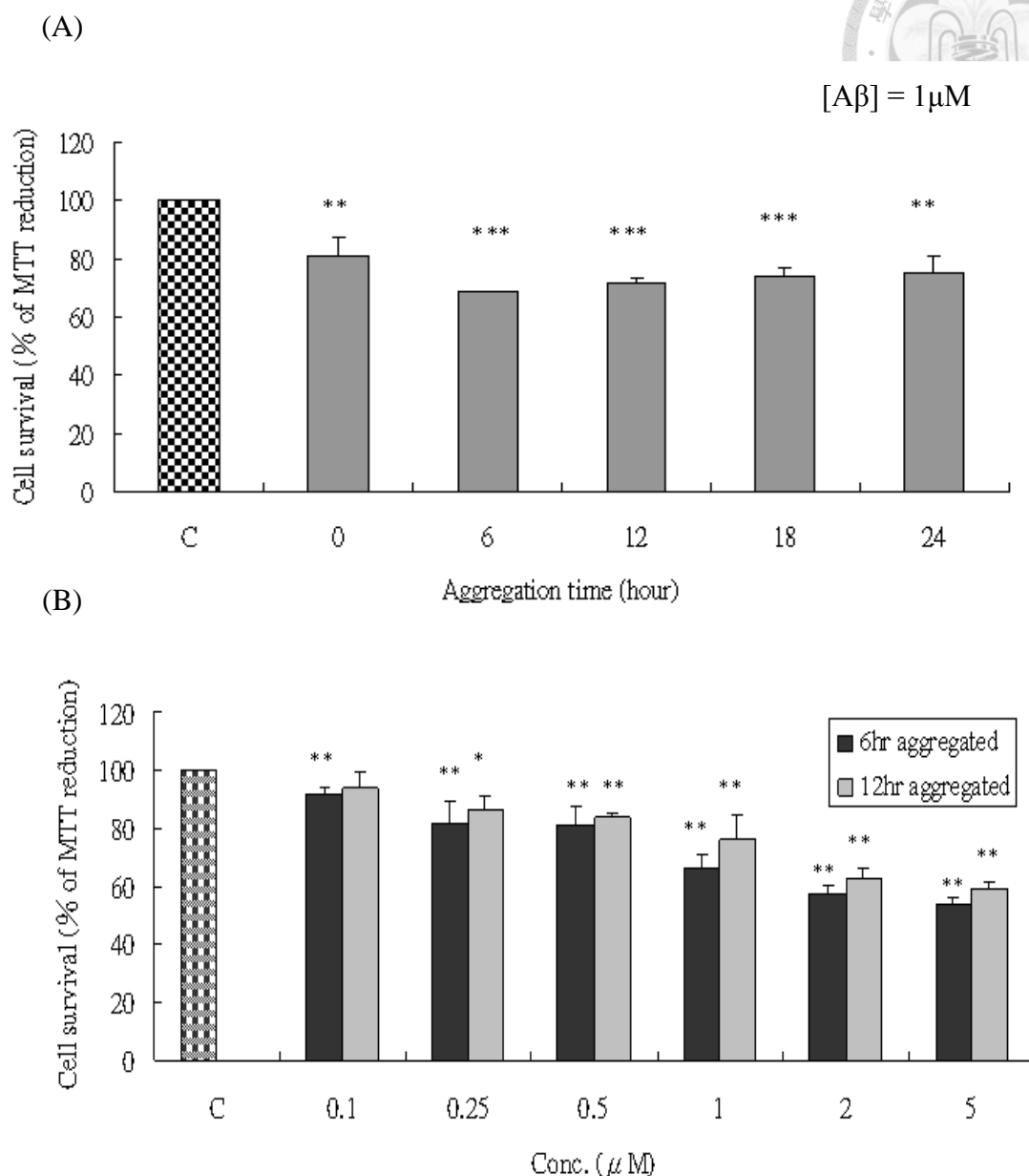
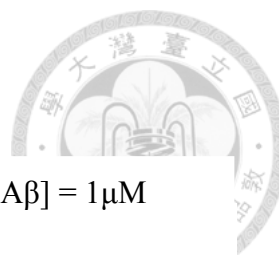


圖 十九 A β ₁₋₄₂ 聚合物對於初代神經細胞之毒性

Fig. 19. Toxicity of aggregated A β ₁₋₄₂ on primary neurons.

Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cell/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. (A) Cells were treated with 1 μ M of A β ₁₋₄₂ aggregated for 0, 6, 12, 18, 24 hr. (B) Cells were treated with various concentrations (0.1 - 5 μ M) of 6hr and 12 hr aggregated A β ₁₋₄₂ for 24 h at 37°C. Cell survival (%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control.

表一、Aβ₁₋₄₂寡聚合物對於初代神經細胞之毒性

Table 1. Toxicity of Aβ₁₋₄₂ oligomers on primary neurons

(A)	Aggregation time (hour)	Conc. (μM)	Cell viability (% of MTT reduction)
Control		-	100
Aβ ₁₋₄₂ oligomers	0		81.2 ± 5.9**
	6		68.4 ± 0.6***
	12	1	72.0 ± 0.9***
	18		73.7 ± 2.8***
	24		74.7 ± 6.24**

(B)	Aggregation time (hour)	Conc. (μM)	Cell viability (% of MTT reduction)
Control		-	100
Aβ ₁₋₄₂ oligomers	6	0.1	91.5 ± 1.8**
		0.25	81.7 ± 7.6**
		0.5	81.3 ± 6.3**
	12	1	66.0 ± 5.0**
		2	57.2 ± 2.9**
		5	53.4 ± 2.3**
		Aβ ₁₋₄₂ oligomers	0.1
0.25	86.1 ± 4.8*		
0.5	83.8 ± 1.3**		
1	76.2 ± 8.2**		
2	62.9 ± 2.9**		
	5	59.2 ± 2.6**	

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

(A) The significance of differences among 0, 6, 12, 18, 24 (hours) and C groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean ± S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control.

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(\text{As}-\text{Ab})}{(\text{Ac}-\text{Ab})} \times 100\%$$

二、銀杏萃出物 (*Ginkgo biloba* extract, EGb761) 對初代神經細胞抵抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護功效

本研究目的在於測試不同樣品對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物對初代神經細胞的毒性，首先選擇文獻報導具有初代神經細胞保護功效的銀杏萃出物 (*Ginkgo biloba* extract, EGb761) 作為本研究的正控制組 (Bastianetto, 2000; Bastianetto et al., 2000b; Longpre et al., 2006)，對照試驗樣品的保護效果。進行樣品保護神經細胞功效實驗時，本研究先以樣品直接處理初代神經細胞，以測試樣品本身對於神經細胞的毒性，再選擇較為適合的濃度範圍進行樣品保護神經細胞對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性的實驗。

測試 EGb761 毒性試驗中 (圖二十)，以不同濃度之 EGb761 (10~90 ppm) 處理初代神經細胞，結果在 50 ppm 以下的濃度，其細胞存活率皆大於 95%，而濃度超過 50 ppm 的組別，神經細胞存活率開始下降，在 60 ppm 以上出現與控制組具顯著差異的結果。根據文獻結果顯示，EGb761 在 50 ppm 以上具有對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的毒性並且保護初代神經細胞的功效 (Bastianetto, 2000)，因此本研究選用 40, 50, 60, 70 ppm 四個濃度作為進行 EGb761 對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性的劑量。

樣品保護神經細胞對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的毒性試驗，將 24 孔盤分成六組別，分別為控制組 (空白處理組)、 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物組和樣品 (EGb761, 40~70ppm) 抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性試驗組。首先將剛分離出的初代神經細胞種在 24 孔盤中，經培養至第五天時 (DIV5)，加入不同濃度樣品之 EGb761 40~70 ppm 進行前處理，經過 30 分鐘後，每組再加入 $1\ \mu\text{M}$ 聚集後之 $A\beta_{1-42}$ ，繼續培養 24 小時，以 MTT assay 測定細胞的存活率。結果如圖二十二 和表二所顯示，將控制組設定為細胞存活率 100%，單獨處理 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的組別細胞存活率從 100% 降低到 61.0% (圖二十二及表二)，而經過 EGb761 40 至 60 ppm 前處理的組別，存活率隨著濃度的提高而增加，到了 60 ppm 時存活率達到 73.9%，抑制 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性的比率為 33.1%；而 70 ppm 濃度的 EGb761

較 60 ppm 濃度存活率略為降低 (71.2%)，推測原因是 EGb761 在 70 ppm 的濃度下對於初代神經細胞略有毒性 (82.6% 存活率)，所以降低了 EGb761 對於初代神經細胞抵抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的保護效果。從顯微鏡下觀察神經細胞生長的情形可以發現 (圖二十一) 加入 $1\mu M A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的組別，初代神經細胞的神經突出現斷裂和產生破碎的現象，而加入 EGb761 的各濃度組別，神經突較接近為控制組的神經樣貌，神經細胞隨樣品濃度增加，呈現神經突完整的狀態。此實驗結果與本研究室之前的研究相較，EGb761 的保護功效皆在 60~70 ppm 效果最佳 (蔡, 2011 ; 陳, 2012)，因此本研究選擇 EGb761 毒性在 91.8%，且保護功效最好 (74.0% 存活率) 的濃度 EGb761 60 ppm，作為正控制組最佳的劑量。

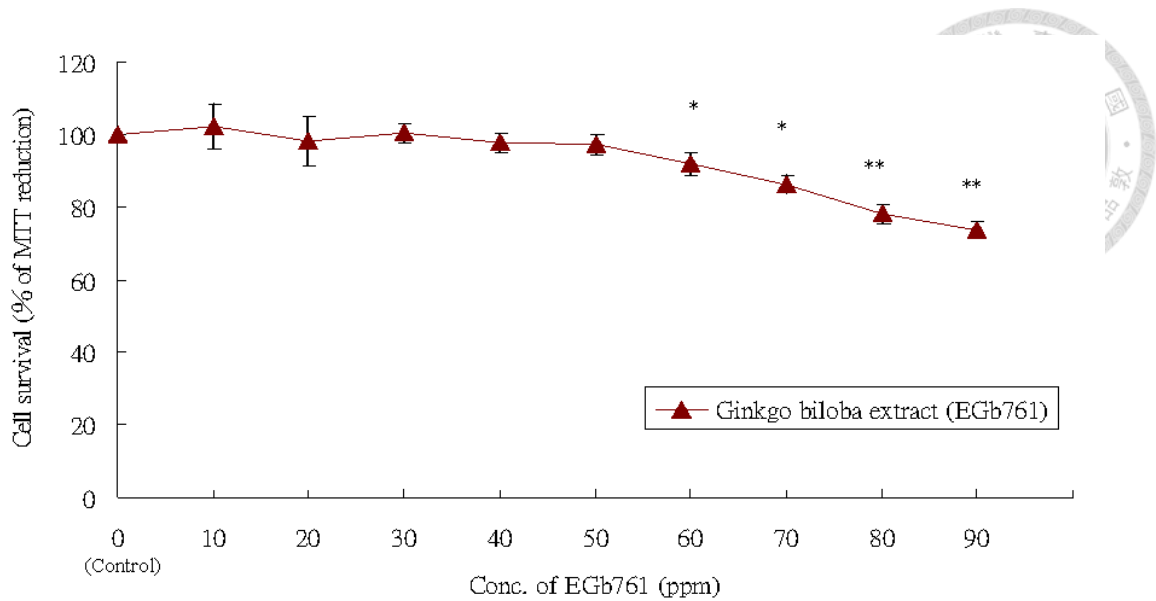


圖 二十 銀杏萃出物、(*Ginkgo biloba* extract, EGb761) 對初代神經細胞之毒性

Fig. 20. Toxicity of Ginkgo biloba extract (EGb761) on primary neurons

Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cell/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (10~90 ppm) of EGb761 for 24 h at 37°C . Cell survival(%) was assessed by MTT assay. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control.

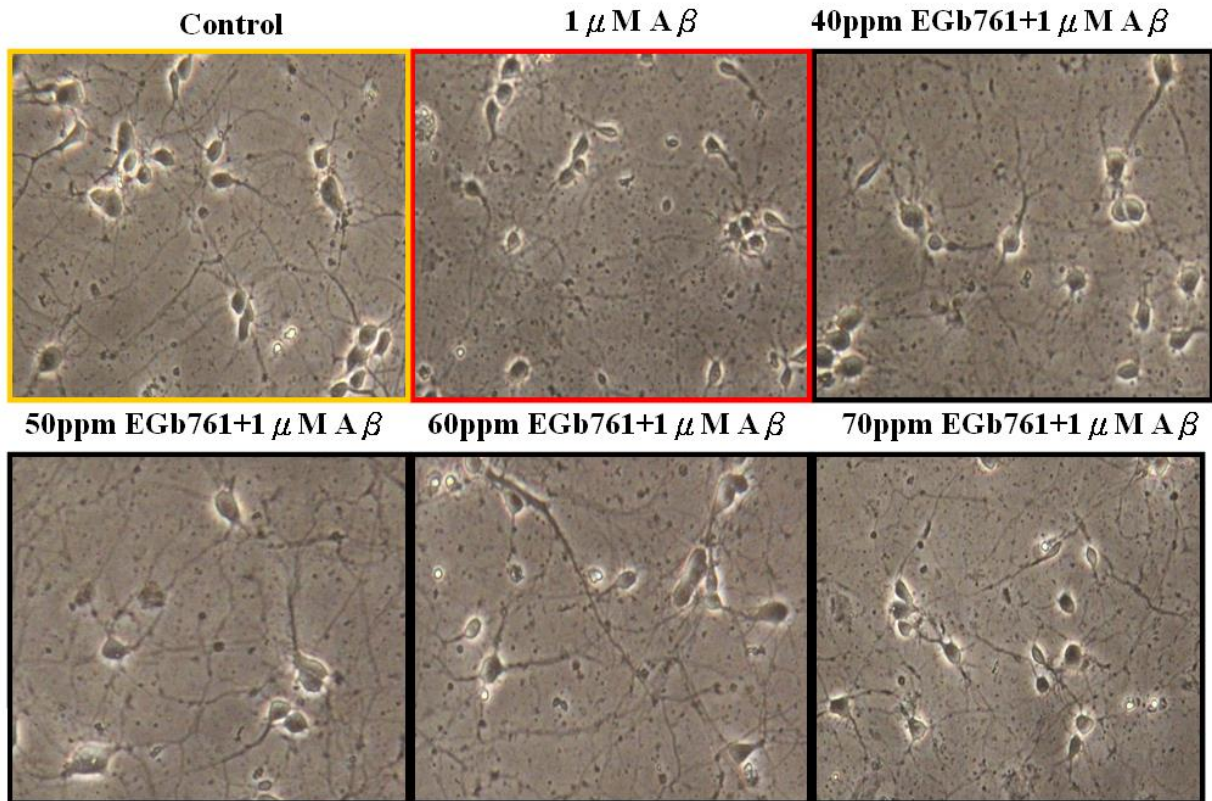


圖 二十一 初代神經細胞與銀杏萃出物 (*Ginkgo biloba* extract, EGb761) 及 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物共同培養之細胞形態

Fig. 21. Morphology of primary cortical neurons co-treated with EGb761 and $A\beta_{1-42}$ oligomers (200X). Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cell were treated with or without 40~60 ppm EGb761 for 30 min before exposed to $1 \mu M A\beta_{1-42}$ oligomers.

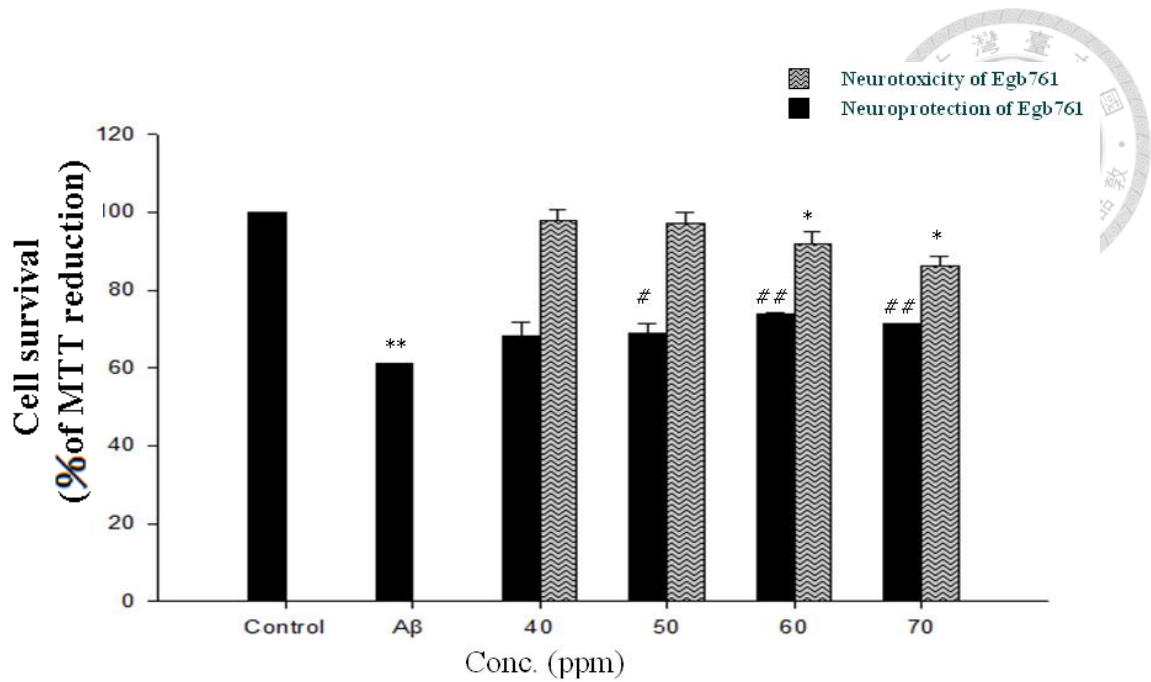


圖 二十二、銀杏萃出物 (*Ginkgo biloba* extract, EGb761) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之作用

Fig. 22. Protective effect of *Ginkgo biloba* extract(EGb761) on $A\beta_{1-42}$ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (40~70 ppm) of EGb761 for 30 min before exposed to $1 \mu M A\beta_{1-42}$, 24 hr at $37^\circ C$. Cell survival (%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus $A\beta_{1-42}$ treated group .

表二、銀杏葉萃取物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 對初代神經細胞抗 A β_{1-42} 寡聚合物毒性之保護效果

Table 2. Effects of EGb761 on A β_{1-42} oligomers induced toxicity on primary neurons

Sample	Conc. of samples		Toxicity of samples	Inhibition of A β_{1-42} toxicity	Inhibition ratio(%)
	μ M	ppm(μ g/ml)	Cell viability (%) of MTT reduction)	Cell viability (%) of MTT reduction)	
Control			-	100	-
A β_{1-42} oligomers	1	-	-	66.3 \pm 4.3**	-
A β_{1-42} with EGb761		10	102.1 \pm 6.2	-	-
		20	98.2 \pm 6.8	-	-
		30	100.5 \pm 2.6	-	-
		40	97.8 \pm 2.7	68.2 \pm 3.5	18.4
		50	97.0 \pm 3.1	68.9 \pm 2.6 [#]	20.2
		60	91.8 \pm 3.2*	74.0 \pm 0.3 ^{##}	33.1
		70	86.2 \pm 2.5*	71.2 \pm 0.3 ^{##}	26.0
		80	78.1 \pm 2.5**	-	-
	90	73.7 \pm 2.3**	-	-	

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Each Group is analyzed by one-way ANOVA . All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control; [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01, ^{###}P < 0.001 compared with A β_{1-42} treated group.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_b)} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Inhibition ratio} (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A=100-(cell viability of A β_{1-42} treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and A β_{1-42})

三、樣品對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之保護效果

本研究在測試各種樣品時，與前述 EGb761 的作法相同，首先測定樣品本身對初代神經細胞的毒性，找出對神經細胞不具毒性的樣品濃度範圍，再測定樣品對初代神經細胞抵抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性的效果。本研究所使用的樣品不同於銀杏萃出物 (EGb 761)，皆為高純度的標準品，所以其濃度以 μM 來表示。

(一) 芝麻酚 (Sesamol) 與芝麻素 (sesamin)

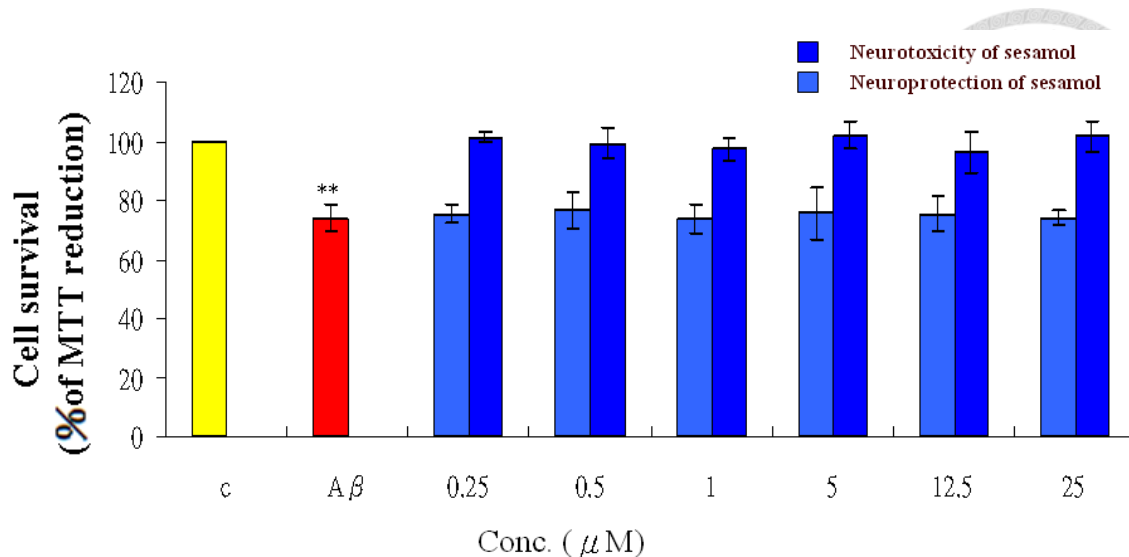
芝麻酚和芝麻素分別是芝麻油及芝麻中重要的成分，芝麻酚具有很強的抗氧化效果，而芝麻素則可以間接的清除神經細胞內的活性氧和提升膠細胞抗發炎的功效 (Uchida et al., 1996 ; Hou et al., 2003a) 。

芝麻酚樣品本身毒性的濃度測試範圍為 $0.25\sim 100\ \mu\text{M}$ ，結果 (表三) 顯示芝麻酚對於初代神經細胞沒有明顯的毒性，濃度在 $50\ \mu\text{M}$ 以上的時候細胞存活率仍然有 98.1% ($50\ \mu\text{M}$) 和 95.4% ($100\ \mu\text{M}$) 。

芝麻素的樣品本身毒性試驗濃度範圍為 $0.25\sim 100\ \mu\text{M}$ ，結果 (表四) 顯示芝麻素在 $12.5\ \mu\text{M}$ 以下的濃度對神經細胞沒有毒性，細胞存活率皆在 98.0% 以上，當細胞濃度到達 $50\ \mu\text{M}$ 以上時，細胞存活率開始出現明顯的下降情形，存活率分別是 83.8% ($50\ \mu\text{M}$)， 65.9% ($75\ \mu\text{M}$)， 66.0% ($100\ \mu\text{M}$)。細胞存活率出現明顯下降的可能原因是芝麻素的親水性較芝麻酚差，在高濃度下 ($50\ \mu\text{M}$ 以上) 樣品開始出現結晶析出的現象，在顯微鏡下可以觀察到此現象 (圖未顯示於論文中)，推測樣品的結晶現象會影響神經細胞的生長。

芝麻酚和芝麻素使用相同劑量範圍 ($0.25\ \mu\text{M}\sim 25\ \mu\text{M}$)，測試對神經細胞的保護功效，結果顯示，在芝麻酚的部分 (圖二十三和表三)，試驗中單獨處理 $A\beta_{1-42}$ 的組別，細胞存活率從 100% 下降至 73.9% ，而經過了芝麻酚前處理的組別，細胞存活率的結果皆與單獨處理 $A\beta_{1-42}$ 的組別沒有顯著的差異，存活率分別為 75.2% ($0.25\ \mu\text{M}$)， 76.4% ($0.5\ \mu\text{M}$)， 73.9% ($1\ \mu\text{M}$)， 75.5% ($5\ \mu\text{M}$)， 75.4% ($12.5\ \mu\text{M}$) 及 73.9% ($25\ \mu\text{M}$)，芝麻酚的部分也作了高濃度的試驗組別 ($50\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$)，也沒有顯著的效果 (數據未顯示於論文中)。芝麻素的部分 (圖

二十四和表四)，試驗中單獨處理 $A\beta_{1-42}$ 的組別，細胞存活率從 100% 下降至 70.0% ，經過了芝麻素前處理的組別，細胞存活率的結果一樣是沒有與單獨處理 $A\beta_{1-42}$ 的組別有顯著差別，存活率分別為 71.3% (0.25 μ M), 71.5% (0.5 μ M), 73.6% (1 μ M), 70.4% (5 μ M), 68.8% (12.5 μ M) 及 70.6% (25 μ M) 。由本實驗結果可以得知，芝麻酚和芝麻素在初代神經細胞以 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導神經細胞死亡的模式中沒有保護的功效。



圖二十三、芝麻酚 (Sesamol) 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之作用

Fig. 23. Protective effect of sesamol on $A\beta_{1-42}$ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (0.25~25µM) of sesamol for 30 min before exposed to 1µM $A\beta_{1-42}$, 24 hr at 37°C. Cell survival(%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P<0.05,##P<0.01 versus $A\beta_{1-42}$ treated group .

表三、芝麻酚 (Sesamol) 對初代神經細胞抗 A β_{1-42} 寡聚合物毒性之保護效果
 Table 3. Effects of sesamol on A β_{1-42} oligomers induced toxicity on primary neurons

Sample	Conc. of samples		Toxicity of samples	Inhibition of A β_{1-42} toxicity	
	μ M	ppm(μ g/ml)	Cell viability (% of MTT reduction)	Cell viability (% of MTT reduction)	Inhibition ratio(%)
Control			-	100.0	-
A β_{1-42} oligomers	1		-	74.0 \pm 4.4**	-
A β_{1-42} with sesamol	0.25	0.04	101.2 \pm 1.7	75.3 \pm 3.3	4.9
	0.5	0.07	100.5 \pm 5.0	76.4 \pm 6.4	9.4
	1	0.14	99.6 \pm 3.9	74.0 \pm 4.9	-
	5	0.7	103.1 \pm 4.6	75.6 \pm 8.6	6.12
	12.5	1.75	99.3 \pm 7.0	75.4 \pm 5.9	5.6
	25	3.5	95.5 \pm 5.4	74.0 \pm 2.6	-
	50	7.0	98.1 \pm 5.3	-	-
	100	14.0	95.4 \pm 4.7	-	-

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus A β_{1-42} treated group .

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(As - Ab)}{(Ac - Ab)} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A=100-(cell viability of A β_{1-42} treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and A β_{1-42})

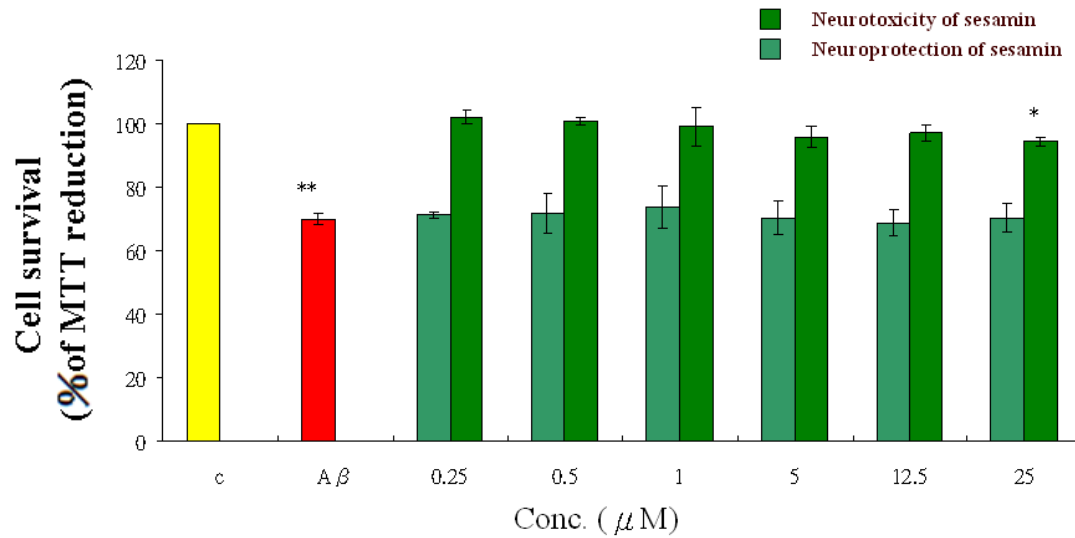


圖 二十四、芝麻素 (sesamin) 對初代神經細胞抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之作用

Fig. 24. Protective effect of sesamin on $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cell/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (0.25~25 μM) of sesamin for 30 min before exposed to 1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$, 24 hr at 37 $^{\circ}\text{C}$. Cell survival(%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus $\text{A}\beta_{1-42}$ treated group.

表四、芝麻素 (Sesamin) 對初代神經細胞抗 Aβ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之保護效果
 Table 4. Effects of sesamin on Aβ₁₋₄₂ oligomers induced toxicity on primary neurons

Sample	Conc. of Samples		Toxicity of samples	Inhibition of Aβ ₁₋₄₂ toxicity	
	μM	ppm(μg/ml)	Cell viability (% of MTT reduction)	Cell viability (% of MTT reduction)	Inhibition ratio(%)
Control			-	100.0	-
Aβ ₁₋₄₂ oligomers	1		-	70.0 ± 1.6 **	-
Aβ ₁₋₄₂ with sesamin	0.25	0.89	102.1 ± 2.2	71.4 ± 0.8	4.5
	0.5	0.18	100.7 ± 1.2	71.6 ± 6.3	5.2
	1	0.35	99.0 ± 6.0	73.7 ± 5.3	12.1
	5	1.75	95.8 ± 3.3	70.4 ± 5.3	1.3
	12.5	4.38	97.0 ± 2.6	68.8 ± 4.3	-
	25	8.75	94.6 ± 1.5*	70.6 ± 4.5	1.8
	50	17.5	83.8 ± 3.3*	-	-
	75	26.3	66.0 ± 4.0*	-	-
	100	35	65.0 ± 2.1**	-	-

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean ± S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus Aβ₁₋₄₂ treated group.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(As - Ab)}{(Ac - Ab)} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A=100-(cell viability of Aβ₁₋₄₂ treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and Aβ₁₋₄₂)

(二) 茶胺酸 (L-Theanine)

茶胺酸在神經細胞毒性試驗中 (圖二十五和表五) , 濃度 (100 μM – 300 μM) 皆沒有顯著的毒性 (存活率皆在 98.8% 以上) , 雖然 400 μM 和 500 μM 和控制組比較的結果出現統計上的顯著差異, 但其細胞的存活率也在 97.0% 和 96.1% , 由於茶胺酸在高濃度 (100 μM ~ 500 μM) 下對於初代神經細胞沒有毒性, 所以選擇了高濃度 (100 μM ~ 500 μM) 進行抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性的保護功效試驗。結果顯示 (圖二十五, 表五) , 試驗中單獨處理 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的組別, 細胞存活率從 100% 下降至 72.8% , 在茶胺酸前處理組別的結果部分, 在各個組別對 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導神經細胞毒性的保護功效都沒有顯著的效果, 存活率為 74.4% (100 μM), 75.1% (200 μM), 71.2% (300 μM), 73.8% (400 μM), 71.8% (500 μM) , 在 100 μM 和 200 μM 的組別存活率有些微的上升, 但統計上沒有顯著的差異。根據文獻報告, 茶胺酸餵食動物可以預防缺血性的神經損害而提高動物的認知能力, 也可以對抗以 $\text{A}\beta_{1-42}$ 直接注射進入老鼠腦部產生類澱粉沉澱並影響老鼠認知能力 (Kakuda, 2011; Kim et al., 2009) , 但在本實驗結果並沒有顯著的看到茶胺酸保護神經細胞的現象。所以本實驗的結果說明了茶胺酸在對抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導初代神經細胞毒性實驗中, 在 100 μM 和 200 μM 的濃度只出現了些微的保護效果, 但是沒有統計上的顯著差異。

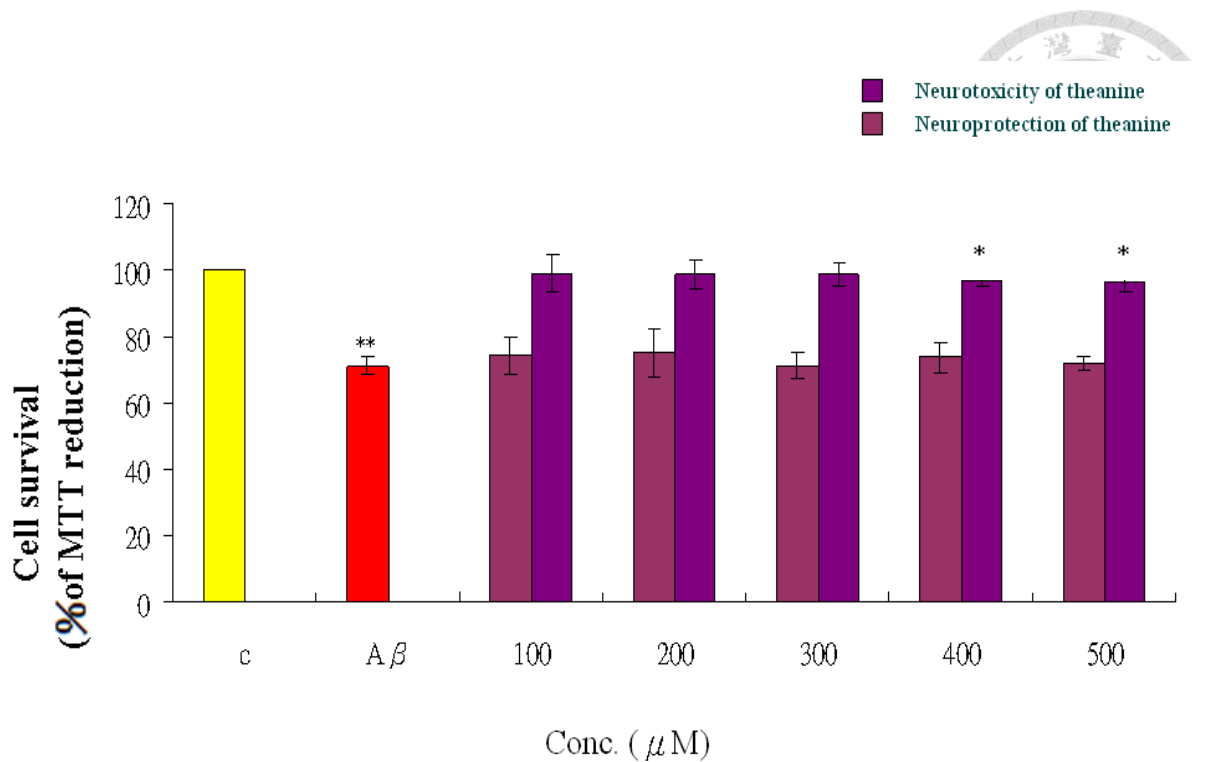


圖 二十五、茶胺酸 (L-Theanine) 對初代神經細胞抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之作用

Fig. 25. Protective effect of theanine on $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cell/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (100~500 μM) of theanine for 30 min before exposed to 1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$, 24 hr at 37°C. Cell survival(%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus $\text{A}\beta_{1-42}$ treated group.

表 五、茶胺酸 (L-Theanine) 對初代神經細胞抗 Aβ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之保護效果

Table 5. Effects of theanine on Aβ₁₋₄₂ oligomers induced toxicity on primary neurons

Sample	Conc. of samples		Toxicity of samples	Inhibition of Aβ ₁₋₄₂ toxicity	Inhibition ratio(%)
	μM	ppm (μg/ml)	Cell viability (% of MTT reduction)	Cell viability (% of MTT reduction)	
Control			-	100.0	-
Aβ ₁₋₄₂ oligomers	1		-	71.2 ± 2.8**	-
Aβ ₁₋₄₂ with theanine	100	17.4	99.0 ± 6.0	74.4 ± 5.8	11.2
	200	34.8	98.9 ± 4.3	75.1 ± 7.5	13.9
	300	52.2	98.8 ± 3.5	71.2 ± 4.1	0.3
	400	69.6	97.0 ± 2.1*	73.8 ± 4.7	9.1
	500	87	96.1 ± 2.5*	71.9 ± 2.1	2.5

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean ± S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus Aβ₁₋₄₂ treated group.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(\text{As}-\text{Ab})}{(\text{Ac}-\text{Ab})} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

A=100-(cell viability of Aβ₁₋₄₂ treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and Aβ₁₋₄₂)

(三) 四氫薑黃素 (Tetrahydrocurcumin)

四氫薑黃素是一種具有抗氧化能力的化合物，是薑黃素經過體內代謝而來的代謝產物，在樣品毒性試驗結果中（表六），使用樣品濃度 0.25~100 μM 測定神經細胞毒性實驗，四氫薑黃素在低濃度下（0.25~1 μM ）四氫薑黃素對於神經細胞沒有產生毒性，細胞存活率在 100.6% (0.25 μM), 99.81% (0.5 μM), 99.26% (1 μM)，濃度在 5 μM 以上時，四氫薑黃素對神經細胞開始出現顯著的毒性，存活率在 94.43% (5 μM), 86.12% (12.5 μM)，當濃度到達了 25 μM 時，細胞存活率只有 65.78%，50 μM 以上細胞存活率只有 40%~25%，神經細胞幾乎全部死亡。而在抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導神經細胞毒性實驗中（圖二十六），單獨處理 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的組別細胞存活率從 100% 下降至 73.2%，選用了低濃度的四氫薑黃素去處理神經細胞（0.25 μM ~12.5 μM ），在 0.25 μM , 0.5 μM , 1 μM 濃度下四氫薑黃素對於神經細胞有些微的保護功效，細胞存活率上升至 77.1% (0.25 μM), 77.9% (0.5 μM), 77.2% (1 μM)，濃度到了 5 μM 和 12.5 μM 時細胞的存活率又下降 73.6% 和 71.8%，可能的原因是四氫薑黃素本身對於神經細胞在此濃度範圍下開始出現毒性，所以四氫薑黃素在低濃度時具有些微的神經保護功效，但是濃度到了 5 μM 以上沒有保護神經細胞的功效反而造成神經細胞死亡。

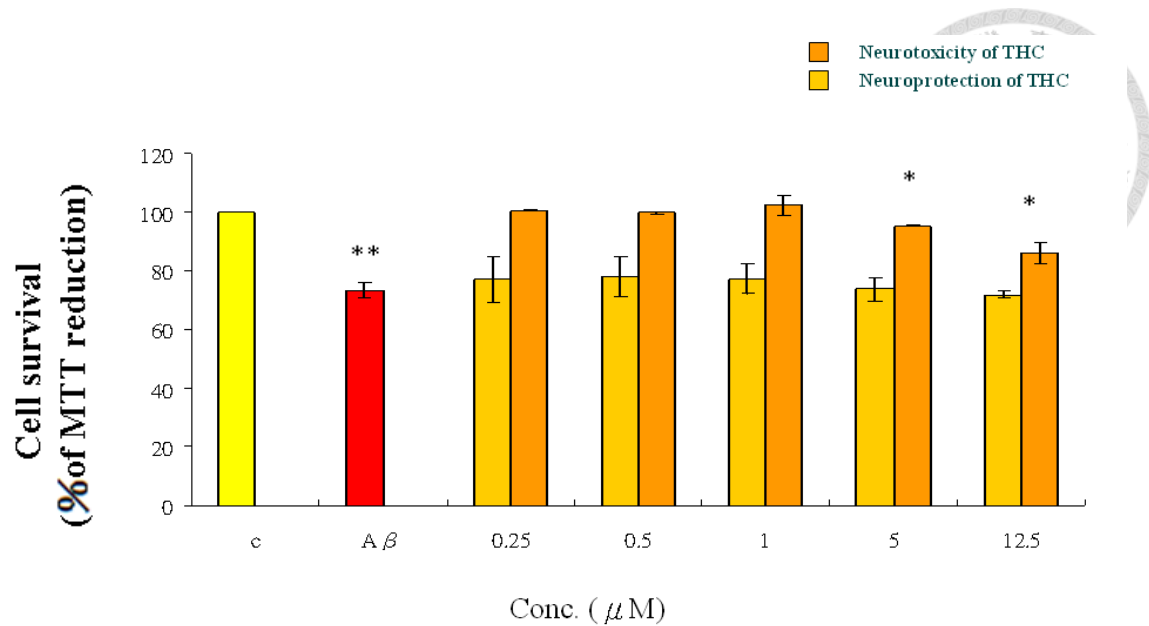


圖 二十六、四氫薑黃素(Tetrahydrocurcumin)對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之作用

Fig. 26. Protective effect of tetrahydrocurcumin on $A\beta_{1-42}$ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (0.25~12.5 μM) of tetrahydrocurcumin for 30 min before exposed to 1 μM $A\beta_{1-42}$, 24 hr at 37 $^{\circ}\text{C}$. Cell survival (%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus $A\beta_{1-42}$ treated group.

表六、四氫薑黃素(Tetrahydrocurcumin) 對初代神經細胞抗 A β_{1-42} 寡聚合物毒性之保護效果

Table 6. Effects of tetrahydrocurcumin on A β_{1-42} oligomers induced toxicity on primary neurons

Sample	Conc. of samples		Toxicity of samples	Inhibition of A β_{1-42} toxicity	Inhibition ratio(%)
	μ M	ppm(μ g/ml)	Cell viability (% of MTT reduction)	Cell viability (% of MTT reduction)	
Control			-	100.0	-
A β_{1-42} oligomers	1		-	73.3 \pm 2.9**	-
A β_{1-42} with tetrahydrocurcumin	0.25	0.09	100.6 \pm 0.24	77.1 \pm 8.1	14.5
	0.5	0.19	99.8 \pm 0.3	78.0 \pm 7.0	17.7
	1	0.37	102.4 \pm 3.4	77.2 \pm 5.3	3.4
	5	1.85	95.2 \pm 0.2**	73.6 \pm 3.8	0.2
	12.5	4.63	86.1 \pm 3.6**	71.8 \pm 1.4	-
	25	9.26	65.8 \pm 10.3**	-	-
	50	18.52	39.3 \pm 0.6**	-	-
	100	37.04	26.5 \pm 4.0**	-	-

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus A β_{1-42} treated group.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(As - Ab)}{(Ac - Ab)} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Inhibition ratio} (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A=100-(cell viability of A β_{1-42} treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and A β_{1-42})

(四) 川陳皮素 (Nobiletin) 、橘皮素 (tangeretin) 和 tetramethoxyflavone (TMF)

川陳皮素、橘皮素和 TMF 皆是多甲氧基類黃酮，其結構相似，不同的地方在於川陳皮素有六個甲氧基，橘皮素有五個甲氧基，TMF 則有四個甲氧基。川陳皮素本身毒性的試驗濃度為 1~100 μM ，橘皮素和 TMF 因為溶解度的關係，在配製高濃度樣品的時候會出現結晶析出的現象，所以橘皮素配製的濃度是 1~50 μM ，而 TMF 的溶解度最差，在配製 stock 時 TMF 只能配製成 15000 μM 在 DMSO 溶液中，高於 15000 μM 則會有不溶的現象，所以最終濃度只能作 1~15 μM 的試驗濃度。樣品毒性實驗的結果顯示，川陳皮素（圖二十八和表七）對於神經細胞並不會產生毒性影響細胞存活率，細胞存活率為 97.8% (1 μM), 95.8% (5 μM), 96.7% (12.5 μM), 98.3% (25 μM), 98.9% (50 μM), 99.0% (75 μM)，濃度到達了 100 μM 時存活率為 89.1%，和控制組有顯著的差異，可能的原因是高濃度下川陳皮素在培養液中出現析出產生結晶的關係（圖二十七），影響了初代神經細胞的生長；橘皮素的溶解度較川橘皮素差，在培養液中濃度到 50 μM 出現析出結晶，但在較低的濃度中橘皮素的神經細胞存活率皆和控制組沒有顯著差異，存活率為 102.2% (1 μM), 98.8% (5 μM), 100.9% (12.5 μM), 100.4% (25 μM)，50 μM 細胞存活率為 88.2%，和川陳皮素一樣在高濃度的時候出現結晶析出的現象（圖二十九），推測細胞可能受到了結晶的阻礙影響了細胞存活率。

在樣品保護神經細胞對抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物的實驗，川陳皮素以 1~50 μM ，由抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導神經細胞毒性實驗中的細胞形態可以發現（圖二十七），僅加入 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物的組別神經細胞的神經突 (neurite) 出現變短、斷裂，產生許多碎片的現象，細胞體也有出現裂成碎片的現象，經過川橘皮素前處理的組別，從低濃度到高濃度皆可以發現神經細胞的 neuritis 都比 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物的組別完整健康。以 MTT assay 分析結果（圖二十八和表七），單獨加入 1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物處理的組別細胞存活率為 68.5%，顯示 1 μM $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚合物對於神經細胞具有顯著的細胞毒性，以 1~50 μM 川橘皮素前處理的組別，細

胞存活率為 76.4 (1 μ M)、80.2% (5 μ M)、80.8% (12.5 μ M)、79.3% (25 μ M)、81.4% (50 μ M)；抑制 $A\beta_{1-42}$ 毒性的比率分別是 25.0%、37.2%、39.0%、34.0%、41.0% ，正控制組 EGb761 (60ppm) 的細胞存活率為 75.6% ，抑制 $A\beta_{1-42}$ 毒性的比率為 22.5% ，在加入川陳皮素 1 μ M 的組別細胞存活率就已經有高於正控制組的結果，隨著濃度的增加細胞存活率有上升的趨勢，於 50 μ M 的濃度下具有最高的細胞存活率，表示在此濃度下有最佳的保護效果，效果比正控制組更好。

橘皮素以 1~25 μ M ，抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導神經細胞毒性實驗中的細胞型態可以發現 (圖二十九) ，經過橘皮素前處理的組別，從低濃度到高濃度也發現神經細胞的 neurites 比 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的組別完整且健康。以 MTT assay 分析結果 (圖三十和表八) ，單獨加入 1 μ M $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物處理的組別細胞存活率為 72.2% ，以 1~50 μ M 橘皮素前處理的組別，細胞存活率為 73.4% (1 μ M)、78.5% (5 μ M)、80.6% (12.5 μ M)、88.9% (25 μ M)；抑制 $A\beta_{1-42}$ 毒性的比率分別是 4.2%、22.5%、30.3%、60.0%，正控制組 EGb761 (60ppm) 的細胞存活率為 81.0% ，抑制 $A\beta_{1-42}$ 毒性的比率為 31.7% ，在加入橘皮素的組別細胞存活率隨著濃度的增加有上升的趨勢，於 25 μ M 的濃度下具有最高的細胞存活率，表示在此濃度下有最佳的保護效果，效果比正控制組好。

TMF 以 0.5~15 μ M 前處理初代神經細胞，以 MTT assay 分析結果 (圖三十一和表九) ，單獨加入 1 μ M $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物處理的組別細胞存活率為 71.0% ，以 0.5~15 μ M TMF 前處理的組別，細胞存活率為 75.0% (0.5 μ M)、74.1% (1 μ M)、77.0% (5 μ M)、75.3% (10 μ M)、79.2% (15 μ M)；抑制 $A\beta_{1-42}$ 毒性的比率分別是 13.8%、10.6%、20.7%、14.9%、28.2%，雖然沒有與 1 μ M $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物處理的組別有顯著的差異，但從細胞存活率可以看到 TMF 對於神經細胞略有保護功效且於 15 μ M 的濃度下具有最高的細胞存活率。

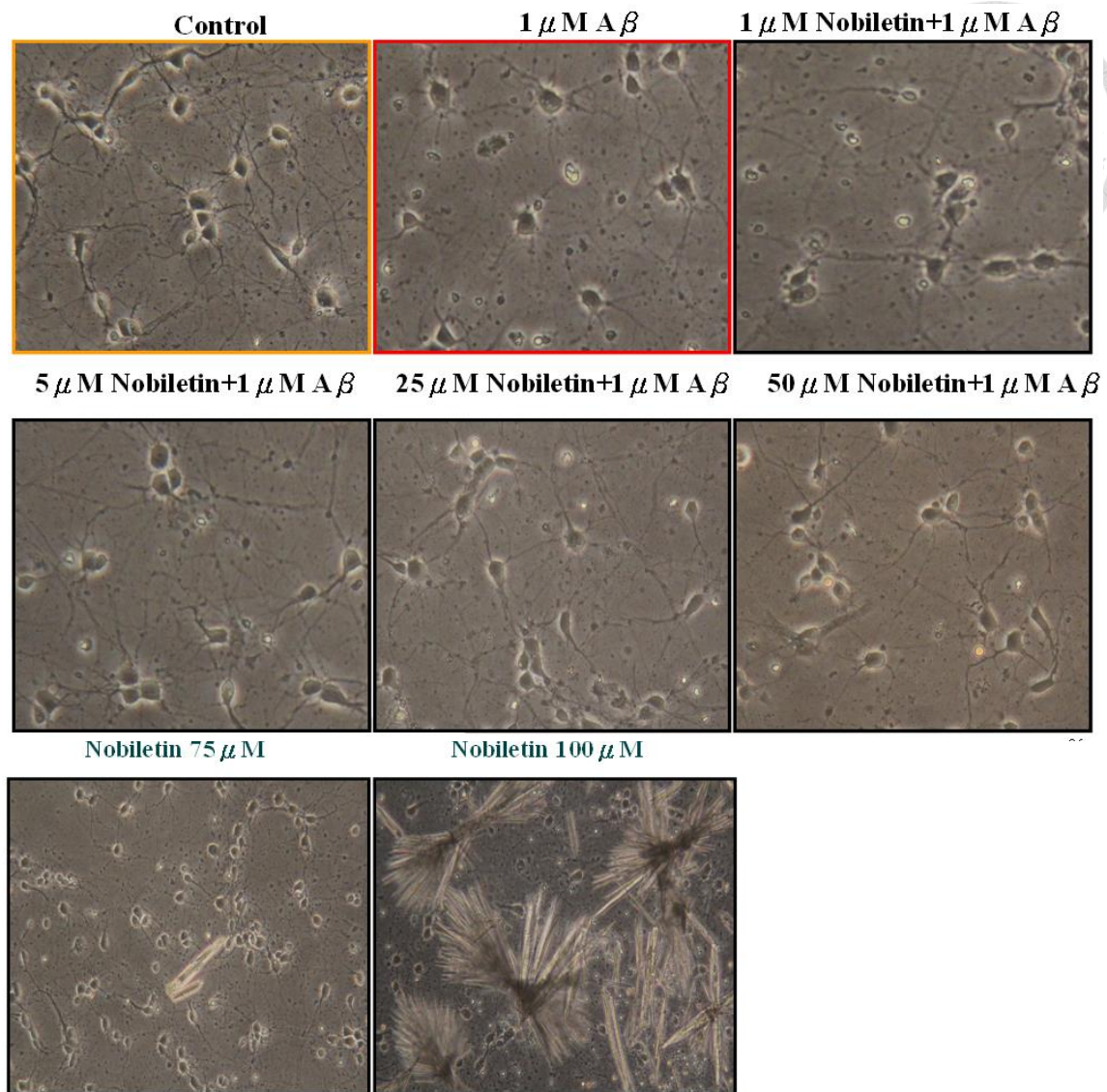
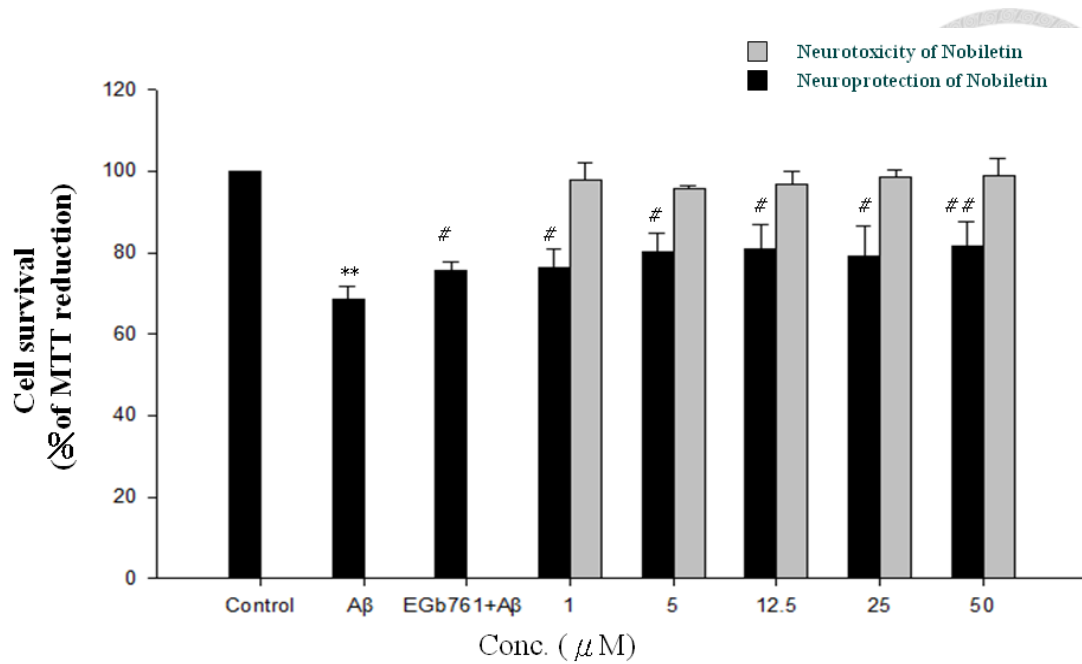


圖 二十七、初代神經細胞與 nobiletin 及 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物共同培養之細胞形態
Fig. 27. Morphology of primary cortical neurons co-treat with nobiletin and $A\beta_{1-42}$ oligomers (200X). Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cell were treated with or without 1, 5, 12.5, 25 and 50 μM nobiletin for 30 min before exposed to $1\mu\text{M}$ $A\beta_{1-42}$ oligomers.



圖二十八、川陳皮素(Nobiletin)對初代神經細胞抗 A β_{1-42} 寡聚合物毒性之作用
Fig. 28. Protective effect of nobiletin on A β_{1-42} oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (1~50 μ M) of nobiletin for 30 min before exposed to 1 μ M A β_{1-42} , 24 hr at 37 $^{\circ}$ C. Cell survival (%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus A β_{1-42} treated group.

表七、川陳皮素 (Nobiletin) 對初代神經細胞抗 A β_{1-42} 寡聚合物毒性之保護效果

Table 7. Effects of nobiletin on A β_{1-42} oligomers induced toxicity on primary neurons

Sample	Conc. of samples		Toxicity of samples	Inhibition of A β_{1-42} toxicity	Inhibition ratio(%)
	μ M	ppm(μ g/ml)	Cell viability (%) of MTT reduction)	Cell viability (%) of MTT reduction)	
Control			-	100.0	-
A β_{1-42} oligomers	1	-	-	68.5 \pm 3.1**	-
A β_{1-42} with EGb761	-	60	91.8 \pm 3.2	75.6 \pm 3.2 [#]	22.5
A β_{1-42} with nobiletin	1	0.4	97.8 \pm 4.3	76.4 \pm 4.4 [#]	24.9
	5	2	97.3 \pm 0.6	80.2 \pm 4.6 [#]	37.2
	12.5	5	99.5 \pm 3.0	80.8 \pm 6.1 [#]	39.0
	25	10	100.7 \pm 1.9	79.3 \pm 7.2 [#]	34.1
	50	20	98.5 \pm 4.4	81.4 \pm 6.1 ^{###}	41.0
	75	30	100.6 \pm 2.2	-	-
	100	40	89.1 \pm 3.5*	-	-

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. [#]P < 0.05, ^{###}P < 0.01 versus A β_{1-42} treated group.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(As-Ab)}{(Ac-Ab)} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

A=100-(cell viability of A β_{1-42} treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and A β_{1-42})

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

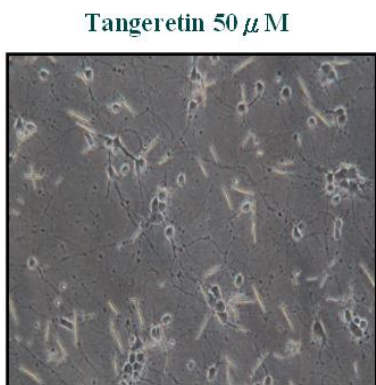
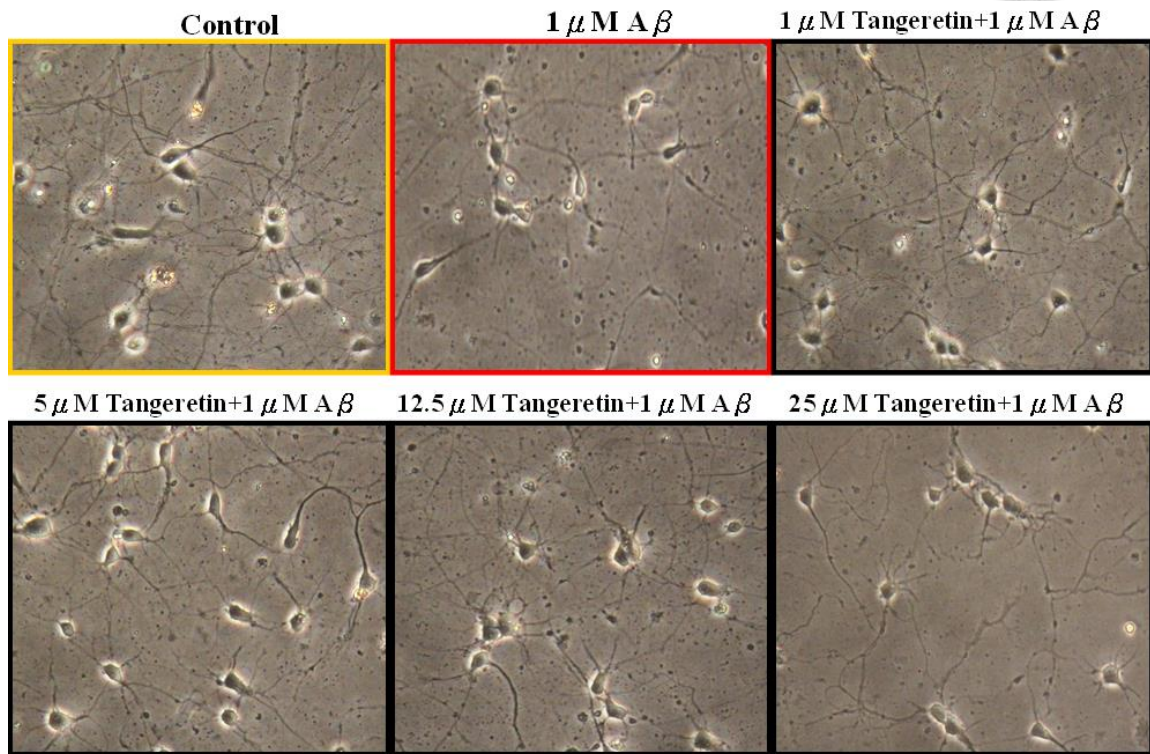
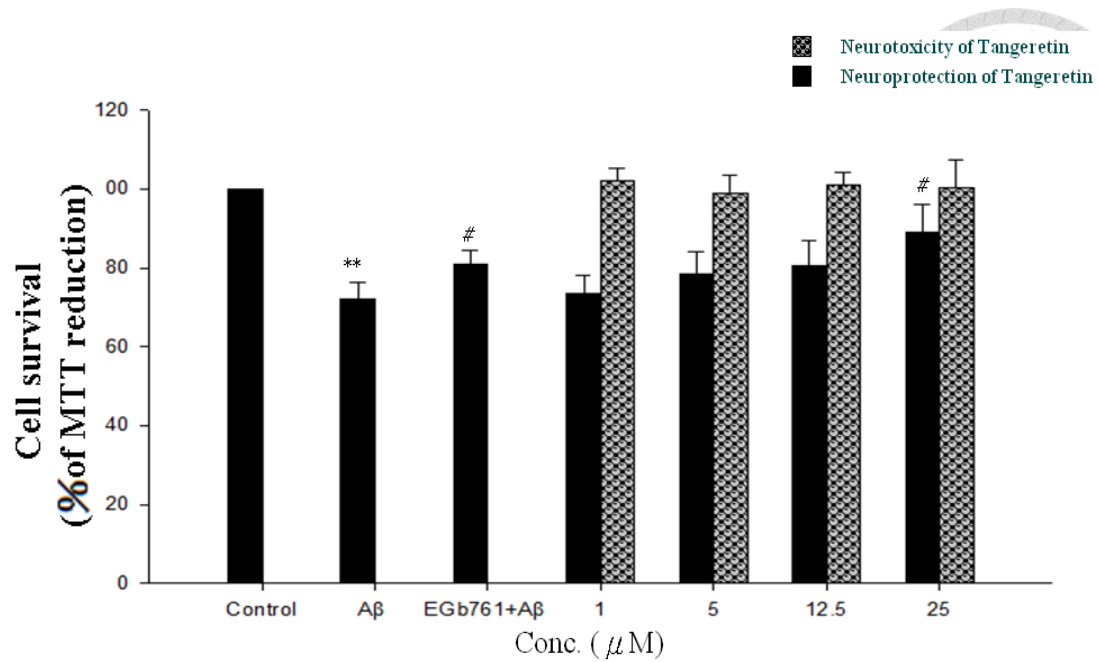


圖 二十九、初代神經細胞與 tangeretin 及 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物共同培養之細胞形態

Fig. 29. Morphology of primary cortical neurons co-treat with tangeretin and $A\beta_{1-42}$ oligomers (200X). Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cell were treated with or without 1, 5, 12.5, 25 μ M tangeretin for 30 min before exposed to 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oligomers.



圖三十、橘皮素(Tangeretin) 對初代神經細胞抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之作用

Fig. 30. Protective effect of tangeretin on A β ₁₋₄₂ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (1~25 μ M) of tangeretin for 30 min before exposed to 1 μ M A β ₁₋₄₂, 24 hr at 37°C. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus A β ₁₋₄₂ treated group.

表八、橘皮素 (Tangeretin) 對初代神經細胞抗 Aβ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之保護效果

Table 8. Effects of nobiletin on Aβ₁₋₄₂ oligomers induced toxicity on primary neurons.

Sample	Conc. of samples		Toxicity of samples	Inhibition of Aβ ₁₋₄₂ toxicity	
	μM	ppm(μg/ml)	Cell viability (% of MTT reduction)	Cell viability (% of MTT reduction)	Inhibition ratio(%)
Control			-	100.0	-
Aβ ₁₋₄₂ oligomers	1		-	72.2 ± 4.2**	-
Aβ ₁₋₄₂ with EGb761	-	60	91.8±3.2	81.0 ± 3.5 [#]	31.7
Aβ ₁₋₄₂ with tangeretin	1	0.4	102.2 ± 3.0	73.3 ± 4.5	4.2
	5	2	98.8 ± 4.8	78.4 ± 5.6	22.4
	12.5	5	100.9 ± 3.2	80.6 ± 6.1	30.3
	25	10	100.5 ± 6.8	88.9 ± 7.2 [#]	60.0
	50	20	88.3± 6.0**	-	-

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean ± S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01 versus Aβ₁₋₄₂ treated group.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(As - Ab)}{(Ac - Ab)} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A=100-(cell viability of Aβ₁₋₄₂ treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and Aβ₁₋₄₂)

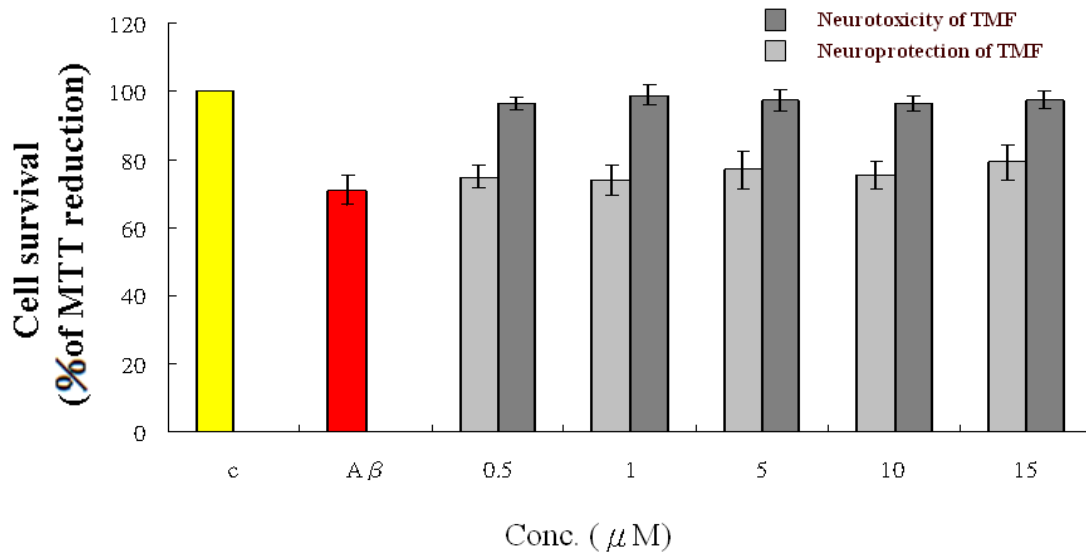


圖 三十一、TMF 對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之作用

Fig. 31. Protective effect of TMF on $A\beta_{1-42}$ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons. Cortical neurons were seeded in Poly-L-lysine coated 24 well culture plates at 16×10^4 cells/well. All the experiments were conducted with 5 DIV cells. Cells were treated with various concentrations (1~15 μM) of TMF for 30 min before exposed to 1 μM $A\beta_{1-42}$, 24 hr at 37°C. Cell survival (%) was assessed by MTT assay. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus $A\beta_{1-42}$ treated group.

表九、TMF 對初代神經細胞抗 Aβ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之保護效果

Table 9. Effects of TMF on Aβ₁₋₄₂ oligomers induced toxicity on primary neurons.

Sample	Conc. of samples		Toxicity of samples	Inhibition of Aβ ₁₋₄₂ toxicity	Inhibition ratio(%)
	μM	ppm(μg/ml)	Cell viability (% of MTT reduction)	Cell viability (% of MTT reduction)	
Control			-	100.0	-
Aβ ₁₋₄₂ oligomers	1		-	71.0 ± 4.3**	-
Aβ ₁₋₄₂ with TMF	0.5	0.17	95.3 ± 1.8	75.0 ± 3.4	13.8
	1	0.34	99.0 ± 2.9	74.1 ± 4.5	10.6
	5	1.70	97.4 ± 3.1	77.0 ± 5.6	20.7
	10	3.40	96.5 ± 2.4	75.4 ± 3.9	14.9
	15	5.13	99.9 ± 2.7	79.2 ± 5.1	28.3

Cell viability was measured by MTT reduction assay.

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean ± S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05, ##P < 0.01 versus Aβ₁₋₄₂ treated group.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(As - Ab)}{(Ac - Ab)} \times 100\%$$

Ab: Abs. of DMSO

As: Abs. of sample

Ac: Abs. of control

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A=100-(cell viability of Aβ₁₋₄₂ treatment)

B=100-(cell viability of pre treatment with sample and Aβ₁₋₄₂)

四、樣品對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性之機制探討

(一) 樣品對於細胞內自由基清除能力測定

從樣品對於初代神經細胞之保護功效的結果發現，樣品中的川陳皮素 (nobiletin)、橘皮素 (tangeretin) 的保護效果最佳，甚至於比正控制組銀杏萃出物 (EGb761) 的保護效果更好。接下來探討樣品如何保護初代神經細胞抵抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性。前人因為有許多的研究顯示， $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物會誘發神經細胞產生自由基，包括過氧化氫、reactive oxygen species 和 reactive nitrogen species，進而影響脂質氧化及蛋白質氧化，使神經細胞無法正常代謝導致死亡，文獻指出 50 ppm EGb761 具有對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性的作用，其作用機制包括清除細胞內的自由基，抗氧化以及抑制 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的聚集 (anti amyloidogenic) 等等 (Bastianetto, 2000)。未明瞭樣品是否具有清除細胞內自由基之能力，本實驗使用 DCF-DA assay 測定細胞內自由基的濃度。

從圖三十二與表十的結果可以發現將濃度為 $1\ \mu\text{M}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物處理初代神經細胞可以誘發神經細胞產生自由基的濃度約為控制組的 1.5 倍 ($146.3 \pm 6.7\%$)，而以正控制組 EGb761 60 ppm(樣品保護神經細胞功效中的最有效濃度) 預先處理神經細胞 30 分鐘後加入 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物 24 小時誘發神經細胞產生自由基，結果顯示正控制組 EGb761 可以非常有效降低細胞內自由基的產生，甚至比控制組的胞內自由基還要降低很多 ($70.7 \pm 8.5\%$)。另外芝麻酚是一種很強的抗氧化的化合物，將芝麻酚以低濃度和高濃度 ($25\ \mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$) 處理神經細胞，發現兩個組別具有濃度效應地有效清除 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導胞內產生的自由基，分別為 $125.9 \pm 6.7\%$ ($25\ \mu\text{M}$) 和 $104.6 \pm 4.1\%$ ($50\ \mu\text{M}$)。川陳皮素和橘皮素個別配製了其最有效的濃度，川陳皮素 (nobiletin $50\ \mu\text{M}$)，橘皮素 (tangeretin $25\ \mu\text{M}$)，預處理 30 分鐘後加入 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物 24 小時，以 DCF-DA assay 測定胞內自由基的量，結果顯示川陳皮素組別胞內自由基的量為控制組的 $126.5 \pm 4.7\%$ ，橘皮素為 $131.4 \pm 1.2\%$ ，對於 $1\ \mu\text{M}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的組別具有顯著的差異，但是清除效果並沒有優於正控制組 EGb761，表

示川陳皮素和橘皮素在 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘發細胞產生自由基造成細胞死亡的這條路徑，僅略具有幫助細胞清除胞內的自由基達到保護神經細胞的能力，可能尚有其他路徑來保護神經細胞。



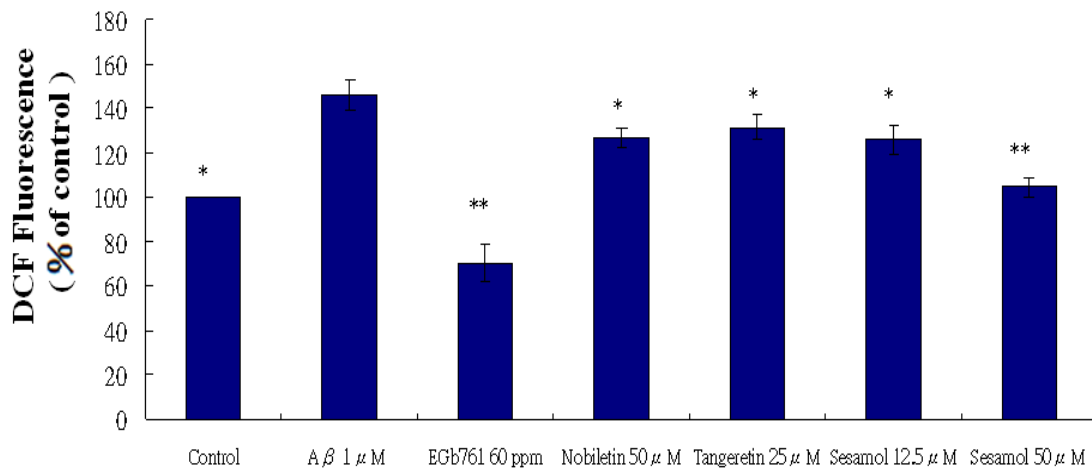



圖 三十二、有效樣品對初代神經細胞抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘導產生胞內自由基測定

Fig. 32. Protective effect of effective compounds on $A\beta_{1-42}$ oligomers -induced intracellular free radicals accumulation. Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus $A\beta_{1-42}$ group.

表 十、有效樣品抑制 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物誘導初代神經細胞產生胞內自由基之能力
 Table 10. Protective effect of effective compounds on A β ₁₋₄₂ oligomers -induced intracellular free radicals accumulation



Sample	Conc. of samples		DCF Fluorescence (% of control)
	μ M	ppm(μ g/ml)	
Control	-	-	100.0*
A β ₁₋₄₂ oligomers	1	-	146.3 \pm 6.7
A β ₁₋₄₂ with EGb761	-	60	75.0 \pm 3.4**
A β ₁₋₄₂ with sesamol	25	3.5	125.9 \pm 6.7*
-	50	7	104.6 \pm 4.1**
A β ₁₋₄₂ with nobiletin	50	20	126.5 \pm 4.7*
A β ₁₋₄₂ with tangeretin	25	10	131.4 \pm 1.2*

Groups were analyzed by one-way ANOVA. All data present as mean \pm S. D. (n=3, each with 3-4 replicates) and significant difference were compared by student's t test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus A β 1 μ M group. All data present as mean \pm S.D.(n=3) *P<0.01,**P<0.001,versus A β 1 μ M group.

(二) $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物電泳分析以及樣品抑制其聚集之探討

本實驗之目的是為了瞭解 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物聚集後的構形以及將 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物加入具有效保護神經細胞的樣品，觀察樣品是否以抑制 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物之聚集或解集達到降低 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物對於細胞的毒性，保護神經細胞。

實驗將聚集 0、6、12、24 個小時的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物，以 15 % Tricine SDS PAGE 分析，並以能辨認 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物第 1-17 個胺基酸的 6E10 抗體偵測。從結果顯示 (圖三十三 (A))，不同聚集時間的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物具有不同分子量大小的寡聚合物分佈。從結果可以看到未聚集的 $A\beta_{1-42}$ (MW=4514.2) (Lane 1) 大部分的 $A\beta_{1-42}$ 分佈在 4.5 kDa 單體的狀態 (monomer)，而在單體的上方出現了三條模糊的條帶，分別是 9 kDa 雙聚體 (dimer)、13.5 kDa 三聚體 (trimer) 及 18 kDa 四聚體 (tetramer)。這個結果顯示了 $A\beta_{1-42}$ 單體態是很容易進行聚集成雙聚體、三聚體和四聚體的構型。而在 4 °C，100 rpm 震盪的條件下聚集 6 小時 (Lane 2)，雙聚體到四聚體的條帶有明顯變深，寡聚合物的濃度增加且條帶與條帶間有暈染的情形 (smear)；隨著聚集時間的增加，聚集 12 小時 (Lane 3) 上方大分子量處 63~180kDa 出現了暈染的現象，而 25~63 之間卻沒有出現暈染的情形，表示 $A\beta_{1-42}$ 形成雙聚體到四聚體寡聚合物以後會再快速的形成更大分子量的聚合物且可能是由寡聚合物間的吸引聚集而不是由單體態的 $A\beta$ 一個一個吸引在小分子量的寡聚合物上形成大分子量的聚合物，而聚集 24 小時後 (Lane 4) 的 $A\beta$ ，大分子的聚合物又較聚集 12 小時的組別明顯增加許多。因此可以推測 $A\beta$ 很容易形成小分子量的雙聚體、三聚體和四聚體，而隨著時間的增加，小分子量的寡聚合物會進一步的形成較大分子量的聚合物。

由 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘發初代神經細胞產生毒性的結果來看 (圖十九)，聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物對於神經細胞毒性最強 (細胞存活率 68.4 ± 0.6)，可以推測可能的原因在於將聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物以 1 μ M 加入細胞培養基中，在 37°C 培養 24 小時，大部分的 $A\beta_{1-42}$ 還處於單體狀態繼續形成二到四聚體的構型，而這些構形狀態下的寡聚合物是對於神經細胞傷害最大的階段，導

致神經細胞的存活率最低；而隨著聚集時間增加的 $A\beta_{1-42}$ 其二至四聚體的寡聚合物會快速的形成毒性較低的大分子量的聚合物構形，所以對於細胞的傷害程度下降。

為了探討有效樣品保護初代神經細胞的機制，使用西方墨點法觀察樣品對於 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物是否有抑制或有解集 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的效果。將最有效濃度的 EGb761、nobiletin、tangeretin 三個樣品於其最有效濃度下分別處理聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物，在 37 °C 靜置培養 4 小時。結果顯示 (圖三十三 (B))，控制組 (Lane 1) 聚集 6 小時 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物經過 37 °C 靜置培養 4 小時後， $A\beta$ 的二聚體，三聚體和四聚體的條帶變淺 (與圖三十三 (A) 相較)，在大分子量處 63~180kDa 出現了暈染的現象，表示 $A\beta$ 可能形成大分子量的聚合物；而正控制組 EGb761 (Lane 2)，可以發現二到四聚體寡聚合物的條帶有明顯較控制組的顏色為淺，表示 EGb761 可以減少 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的產生，文獻報告中提到 EGb761 在 100 μ g/ml 可以抑制 $82 \pm 6\%$ 的 $A\beta$ 聚集成纖維狀 (fibrils) 而 IC_{50} 在 20 μ g/ml-100 μ g/ml 之間 (Luo et al., 2002)。有效樣品 nobiletin 50 μ M 在神經細胞保護功效的實驗中效果顯著大於正控制組，以此濃度處理聚集 6 小時 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物並在 37 °C 靜置培養 4 小時 (Lane 3)，結果顯示 nobiletin 的組別與控制組的組別沒有明顯的差異，可見 nobiletin 對於 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的聚集沒有明顯的影響，表示 nobiletin 保護神經細胞的路徑不是經由抑制或解集 $A\beta$ 寡聚合物的路徑，可能經由別種保護神經細胞的未知路徑。Tangeretin 25 μ M 是本實驗保護神經細胞最有效的一個樣品，由圖三十三 (B) 結果可以看到 tangeretin 的組別小分子量寡聚合物的條帶皆明顯的消失，表示 $A\beta$ 寡聚合物的數量減少了，但是也發現了單體的 $A\beta$ 條帶也變得較其他組別減少，推測 tangeretin 也許具有快速促進 $A\beta$ 聚集成大分子量 (大於 180 kDa) 的聚合物的能力 (Lane 4)，也許因為這樣的性質，推測在細胞實驗中，tangeretin 將 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物快速的聚集成毒性較低的大分子量纖維狀態的 $A\beta$ ，使得細胞接觸小分子量的寡聚合物的時間很短，降低了小分子量 $A\beta$ 寡聚合物誘發神經細胞的毒

性，因而保護了神經細胞，這也許是 tangeretin 保護神經細胞的一個路徑。但由於此實驗的結果僅看的到 0~180 kDa 大小的分子量，所以無法觀察到是否在這樣條件下的 A β 有聚集成更大的聚合物，因此需要以不同條件下的實驗來證實其結果。

由於電泳無法分離出大分子量的 A β_{1-42} 纖維構形，所以無法判斷有效樣品是否促進 A β_{1-42} 聚集成纖維的效果，因此使用了 ThT 染劑和 β 摺板 (β -sheet) 結合產生螢光的方法，偵測 A β_{1-42} 纖維構形之含量，結果如圖三十四 EGb761 具有解集 A β_{1-42} 纖維構形的效果，該組 A β_{1-42} 纖維構形的含量為控制組的 67.2%；nobiletin 則具有促進 A β_{1-42} oligomer 進一步形成纖維構形的作用，其含量為控制組的 153.8%；而 tangeretin 為解集的效果，該組含量為控制組的 79.4%。由電泳的結果和 ThT assay 的結果可以明確看出，tangeretin 和 EGb761 對於 A β_{1-42} 聚集的影響具相似的效果，皆是將纖維狀的 A β 解集，而 nobiletin 對於 A β_{1-42} 寡聚合物的聚集可能有快速促進其形成大分子量的纖維態聚合物，降低 A β_{1-42} 寡聚合物濃度，減低其對神經細胞產生毒性，因此達到保護神經細胞的效果。

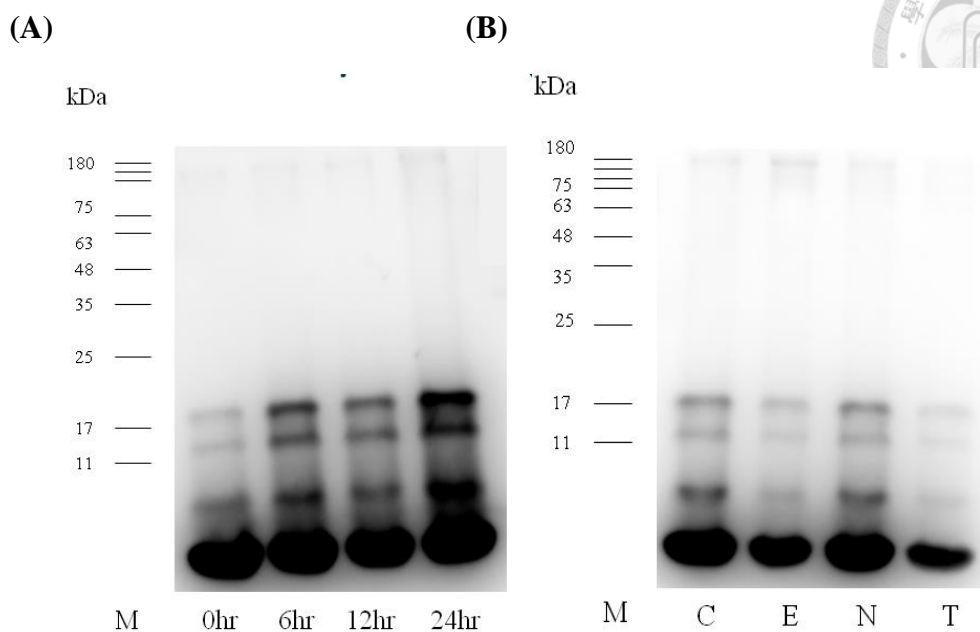


圖 三十三、 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物之 Tricine SDS-PAGE 電泳與有效樣品抑制聚集和
解集 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物之測定

Fig. 33. Tricine SDS-PAGE of $A\beta_{1-42}$ oligomers.

(A) $A\beta_{1-42}$ (American peptide, Lot: T124030185) was monomerized with HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol) followed by dissolution with DMSO and diluted with PBS and incubated at 4°C with shaking (100rpm) for 0, 6, 12, 24hr. Sample of $A\beta_{1-42}$ oligomers were mixed with sample buffer and loaded 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ onto 15% (w/v) tricine polyacrylamide gels, electrophoresed and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked for 1 hr at room temperature and loaded Anti- $A\beta$ mouse monoclonal antibody 6E10 (1:500) overnight at 4°C and anti-mouse IgG (1:20000) at room temperature for 1hr. Blots were developed with ECL and detected by UVP system. Lane 1: unaggregated $A\beta$; Lane 2: aggregated for 6hr; Lane 3: aggregated for 12hr; Lane 4: aggregated for 24hr. (B) Sample of aggregated 6 hr $A\beta_{1-42}$ oligomers were treated effective sample: EGb761, nobiletin, tangeretin. Incubated at 37°C for 4hr and analyzed by western blot.

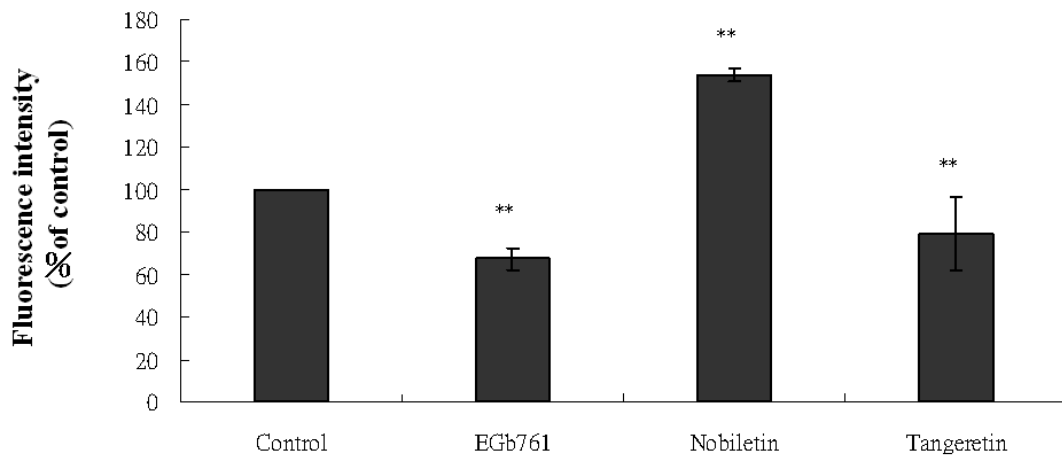


圖 三十四、 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物 ThT 分析

Fig. 34. Thioflavin T assay of $A\beta_{1-42}$ oligomers.

Data represent mean \pm S.D. (n=3) * P <0.05,** P <0.01 versus control.

Control : $A\beta_{1-42}$ oligomers (10 μ M) aggregated for 6 hr at 4°C , polymerized at 37°C for 4 hr.

Egb761: Control + 60 ppm EGb761

Nobiletin: Control + 50 μ M Nobiletin

Tangeretin: Control + 25 μ M Tangeretin

陸、結論



1. $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物在不同的聚集條件下，對於初代神經細胞的毒性也不一樣，結果為 4°C，100 rpm 搖晃震盪，聚集 6 小時的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性最強，並選擇 1 μ M (存活率約在 60-70%) 作為細胞實驗誘發神經細胞毒性的適當劑量。
2. 樣品保護神經細胞對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的實驗，正控制組銀杏萃出物 (EGb761) 對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的最佳濃度是 60ppm (存活率 74.0%)。樣品保護神經細胞的比較: **tangeretin (25 μ M, 9.3ppm) > nobiletin (50 μ M, 20.1ppm) > EGb761 (60 ppm) > TMF (15 μ M, 5.1ppm)** (表十一)。
3. 芝麻酚、芝麻素、茶胺酸、TMF 和 四氫薑黃素在初代神經細胞模式中，對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物毒性沒有顯著的保護效果。
4. 樣品保護神經細胞對抗 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的機制探討中，以 DCF-DA 測定胞內的自由基濃度，發現 EGb761 具有很強的自由基清除能力，而 nobiletin 和 tangeretin 清除自由基的能力效果並不顯著，表示其保護神經細胞的機制並不是完全經由此路徑。另外，芝麻酚是一個具有很強的抗氧化能力的化合物，在此實驗也有胞內的自由基清除效果，但在神經細胞保護實驗中並沒有顯著的保護效果，表示 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物誘發神經細胞產生毒性的途徑並非僅有增加胞內自由基濃度單一種路徑而已，尚有其他路徑造成神經細胞的死亡。
5. $A\beta_{1-42}$ 隨著聚集的時間增加，形成的小分子量的寡聚合物也會增加，而小分子的寡聚合物會進一步形成較大分子量的寡聚合物。在樣品抑制或解集 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的實驗中，EGb761 具有抑制 $A\beta_{1-42}$ 聚集的效果；tangeretin 是本研究

最有效保護神經細胞的樣品，其對於 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的聚集可能與 EGb761 舉有相似的效果，降低 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物濃度，減低其對神經細胞產生毒性，因此達到保護神經細胞的效果； nobiletin 則對於 $A\beta_{1-42}$ 寡聚合物的聚集可能有快速促進其形成大分子量的纖維態聚合物，減低其對神經細胞產生毒性，因此達到保護神經細胞的效果。本研究推測樣品的保護功效路徑皆不只一種，可能是多方向，因此 EGB761、 tangeretin 、 nobiletin 可能還有其他路徑保護神經細胞，必須進一步的探討。

表 十一、樣品抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之神經細胞保護功效整理

Table 11. Effects of test compounds on A β ₁₋₄₂ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons

Samples	Most effective dose		Cell survival(% of MTT reduction)		Inhibition ratio (%)
	(ppm)	(μ M)	A β ₁₋₄₂ oligomers	A β ₁₋₄₂ with samples	
EGb761 (positive control)	60	-	66.3 \pm 4.3	74.0 \pm 0.3	30.5 \pm 5.5
Tangeretin	9.30	25	72.2 \pm 4.2	88.9 \pm 7.2	60.0
Nobiletin	20.1	50	68.5 \pm 3.1	81.4 \pm 6.1	41.0
TMF	5.13	15	71.0 \pm 4.3	79.2 \pm 5.1	28.3
Tetrahydro-curcumin	0.19	0.5	73.3 \pm 2.9	78.0 \pm 7.0	17.7
L-Theanine	34.8	200	71.2 \pm 2.8	75.1 \pm 7.5	13.9
Sesamin	0.35	1	70.0 \pm 1.6	73.6 \pm 6.8	12.1
Sesamol	0.07	0.5	74.0 \pm 4.4	76.4 \pm 6.4	9.4

表 十二、相同濃度樣品抗 A β ₁₋₄₂ 寡聚合物毒性之神經細胞保護功效整理

Table 12. Effects of test compounds on A β ₁₋₄₂ oligomers induced cytotoxicity in cultured cortical neurons

Samples	Most effective dose		Cell survival(% of MTT reduction)		Inhibition ratio (%)
	(ppm)	(μ M)	A β ₁₋₄₂ oligomers	A β ₁₋₄₂ with samples	
EGb761 (positive control)	60	-	66.3 \pm 4.3	74.0 \pm 0.3	30.5 \pm 5.5
Tangeretin	2.0	5	72.2 \pm 4.2	78.4 \pm 5.6	22.4
Nobiletin	2.0	5	68.5 \pm 3.1	80.2 \pm 4.6	37.2
TMF	1.7	5	71.0 \pm 4.3	77.0 \pm 5.6	20.7
Tetrahydro-curcumin	1.9	5	73.3 \pm 2.9	73.6 \pm 3.8	0.2
L-Theanine	0.87	5	71.2 \pm 2.8	-	-
Sesamin	1.75	5	70.0 \pm 1.6	70.4 \pm 5.3	1.3
Sesamol	0.7	5	74.0 \pm 4.4	75.6 \pm 8.6	6.1

柒、參考文獻



- 何承璋。2009。以 A β 聚集導致 PC-12 細胞氧化損傷之抑制與線蟲壽命延長為模式開發抗氧化與抗老化產品。國立台灣大學食品科技研究所。博士論文。台北市。
- 侯怡卉。2010。數種天然物對於 A β ₁₋₄₀ 引起 PC12 及分化後 PC12 細胞死亡的保護效果。國立台灣大學食品科技研究所。碩士論文。台北市。
- 蔡依潔。2011。數種天然物對大鼠初代皮質神經細胞的保護功效。國立台灣大學食品科技研究所。博士論文。台北市。
- 陳逸婷。2012。探討當歸甲醇萃出物及其活性成分對大鼠腦皮質神經細胞之保護功效。國立台灣大學食品科技研究所。博士論文。台北市。
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J. I., Van Nostrand, W. E., and Smith, S. O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 561-7.
- Allan Butterfield, D. (2002). Amyloid β -peptide (1-42)-induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain. A Review. *Free Radical Research* **36**, 1307-1313.
- Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., Jalali Nadoushan, M. R., Vaez Mahdavi, M. R., Kalalian-Moghaddam, H., Roghani-Dehkordi, F., Dariani, S., and Raoufi, S. (2013). The sesame lignan sesamin attenuates vascular dysfunction in streptozotocin diabetic rats: involvement of nitric oxide and oxidative stress. *Eur J Pharmacol* **698**, 316-21.
- Barger, S. W., Horster, D., Furukawa, T., Goodman, Y., Krieglsteint, J., and Mattson, M. P. (1995). Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: Evidence for involvement of a κ B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Neurobiology* **92**, 9328-9332.
- Bastianetto, S. (2000). The *Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta amyloid. *Journal of Neuroscience* **12**, 1882-1890.
- Bastianetto, S., Ramassamy, C., Dore, S., Christen, Y., Poirier, J., and Quirion, R. (2000a). The *Ginkgo biloba* extract (EGb761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta amyloid *European journal of Neuroscience* **12**, 1882-12890.
- Bastianetto, S., Zheng, W. H., and Quirion, R. (2000b). The *Ginkgo biloba* Extract (EGb 761) Protects and Rescues Hippocampal Cells Against Nitric Oxide-Induced Toxicity. *Neurochemistry* **47**, 2268-2277.

- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., and Schubert, D. Hydrogen Peroxide Mediates Amyloid p Protein Toxicity.
- Blessed, G., Tomlinson, B. E., and Roth, M. (1968). The Association Between Quantitative Measures of Dementia and of Senile Change in the Cerebral Grey Matter of Elderly Subjects. *The British Journal of Psychiatry* **114**, 797-811.
- Butterfield, D. A., and Bush, A. I. (2004). Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity
- Carter, M., Shieh, J., (2010). Cell Culture Techniques. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. 281-298.properties of this peptide. *Neurobiol Aging* **25**, 563-8.
- Cho, H. S., Kim, S., Lee, S. Y., Park, J. A., Kim, S. J., and Chun, H. S. (2008). Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death. *Neurotoxicology* **29**, 656-62.
- Chu, Y.-F., Chen, Y., Brown, P. H., Lyle, B. J., Black, R. M., Cheng, I. H., Ou, B., and Prior, R. L. (2012). Bioactivities of crude caffeine: Antioxidant activity, cyclooxygenase-2 inhibition, and enhanced glucose uptake. *Food Chemistry* **131**, 564-568.
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Jr., Baker, L. K., Krafft, G. A., and LaDu, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* **277**, 32046-53.
- Datla, K. P., Christidou, M., Widmer, W. W., Rooprai, H. K., and Dexter, D. T. (2001a). Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of parkinson's disease. *neuropharmacology and neurotoxicology*, 3871-3875.
- Datla, K. P., Christidou, M., Widmer, W. W., Rooprail, H. K., and Dexter, D. T. (2001b). Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus favonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology and neurotoxicology* **12**, 3871-3875.
- Dongen, M. (2003). Ginkgo for elderly people with dementia and age-associated memory impairment: a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Epidemiology* **56**, 367-376.
- Eruslanov, E., and Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol* **594**, 57-72.
- Fifre, A., Sponne, I., Koziel, V., Kriem, B., Yen Potin, F. T., Bihain, B. E., Olivier, J. L., Oster, T., and Pillot, T. (2006). Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. *J Biol*

Chem **281**, 229-40.

- Giunta, B., Fernandez, F., Nikolic, W. V., Obregon, D., Rrapo, E., Town, T., and Tan, J. (2008). Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **5**, 51.
- Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-12.
- Harper, J. D., and Lansbury, P. T. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev biochem.* **66**, 385-407.
- Henry W. Querfurth, M. D., and LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 329-344.
- Hou, R. C., Chen, H. L., Tzen, J. T., and Jeng, K. C. (2003a). Effect of sesame antioxidants on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. *Neuroreport* **14**, 1815-9.
- Hou, R. C., Huang, H. M., Tzen, J. T. C., and Jeng, K. C. (2003b). Protective Effects of Sesamin and Sesamol on Hypoxic Neuronal and PC12 Cells. *Journal of Neuroscience Research* **74**, 123-133.
- Hsieh, P. F., Hou, C. W., Yao, P. W., Wu, S. P., Peng, Y. F., Shen, M. L., Lin, C. H., Chao, Y. Y., Chang, M. H., and Jeng, K. C. (2011). Sesamin ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid-induced status epilepticus by inhibition of MAPK and COX-2 activation. *J Neuroinflammation* **8**, 57.
- Hu, X., Crick, S. L., Bu, G., Frieden, C., Pappu, R. V., and Lee, J. M. (2009). Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 20324-9.
- Huang, T. H. J., Yang, D. S., Plaskos, N. P., Go, S., Yip, C. M., Fraser, P. E., and Chakrabarty, A. (2000). Structural Studies of Soluble Oligomers of the Alzheimer b-Amyloid Peptide. *Journal of Molecular Biology* **297**, 73-87.
- Huang, Y.S., and Ho, S.C. (2010). Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry* **119**, 868-873.
- Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M., and Walsh, D. M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* **14**, 451-64.
- Ismail, N., Ismail, M., Latiff, L. A., Mazlan, M., and Mariod, A. A. (2008). Black cumin seed (*nigellasativa* linn.) oil and its fraction protect against beta amyloid peptide-induced toxicity in pprimary cerebellar granule neurons. *Journal of Food Lipids* **15**, 519-533.

- Iversen, L. L., Russell, J. M., and Scott, J. (1995). The toxicity in vitro of beta amyloid protein. *Biochem* **311**, 1-16.
- Jager, A. K., and Saaby, L. (2011). Flavonoids and the CNS. *Molecules* **16**, 1471-85.
- Jan, K. C., HO, C. T., and Hwang, L. S. (2008). Bioavailability and tissue distribution of sesamol in rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7032-7037.
- Joshi, R., kumar, M. S., Satyamoorthy, K., Unnikrisnan, M. K., and Mukherjee, T. (2005). Free radical reactions and antioxidant activities of sesamol: pulse radiolytic and biochemical studies. *Agriculture and food chemistry* **53**, 2696-2703.
- Kaech, S., and Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* **1**, 2406-15.
- Kakuda, T. (2002). Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **25**, 1513-1518.
- Kakuda, T. (2011). Neuroprotective effects of theanine and its preventive effects on cognitive dysfunction. *Pharmacol Res* **64**, 162-8.
- Kandaswami, c., perkins, E., Soloniuk, D. S., Drzewiecki, G., and Middleton, E. (1991). Antitproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Letters* **56**, 147-152.
- Kanu, P. J., Bahsoon, J. Z., Kanu, J. B., and Kandeh, J. B. (2010). Nutraceutical importance of sesame seed and oil: a review of the contribution of their lignans. *Sierra Leone Journal of Biomedical Research* **2**, 4-16.
- Karthikesan, K., Pari, L., and Menon, V. P. (2010a). Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chem Biol Interact* **188**, 643-50.
- Karthikesan, K., Pari, L., and Menon, V. P. (2010b). Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin–nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *Journal of Functional Foods* **2**, 134-142.
- Kato, M. J., Chu, A., Davin, L. B., and Lewist, N. G. (1998). Biosynthesis of antioxidant lignans in sesamum indicum seeds. *Institute of Biological Chemistry* **47**, 583-591.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M. (1999). Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 896–9.
- Kawahara, M., and Kato-Negishi, M. (2011). Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *Int J Alzheimers Dis*, 276393.
- Kawahara, M., Kato, M. N., and Sadakane, Y. (2009). calcium dyshomeostasis and

- neurotoxicity of Alzheimer's beta - amyloid protein. *Expert Rev* **9**, 681-693.
- Kim, T. I., Lee, Y. K., Park, S. G., Choi, I. S., Ban, J. O., Park, H. K., Nam, S. Y., Yun, Y. W., Han, S. B., Oh, K. W., and Hong, J. T. (2009). l-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates beta-amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF-kappaB pathways. *Free Radic Biol Med* **47**, 1601-10.
- Kobuchi, H., Droy-Lefaix, M. T., Christen, Y., and Packer, L. (1997). Ginkgo biloba Extract (EGb 761): Inhibitory Effect on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264.7 *Biochem Pharmacology* **53**, 897-903.
- LaFerla, F. M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **3**, 862-72.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **8**, 499-509.
- Lee, E. J., Chen, H. Y., Wu, T. S., Chen, T. Y., Ayoub, I. A., and Maynard, K. I. (2002). Acute administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761) affords neuroprotection against permanent and transient focal cerebral ischemia in Sprague-Dawley rats. *J Neurosci Res* **68**, 636-45.
- Lee, Y. S., Cha, B. Y., Saito, K., Yamakawa, H., Choi, S. S., Yamaguchi, K., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K., and Woo, J. T. (2010). Nobiletin improves hyperglycemia and insulin resistance in obese diabetic ob/ob mice. *Biochem Pharmacol* **79**, 1674-83.
- Li, Y. P., Bushnell, A. F., Lee, C. M., Perlmutter, L. S., and Wong, S. K. F. (1996). Beta Amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Research* **738**, 196-204.
- Liang, J. H., Du, J., Xu, L. D., Jiang, T., Hao, S., Bi, J., and Jiang, B. (2009). Catalpol protects primary cultured cortical neurons induced by Abeta(1-42) through a mitochondrial-dependent caspase pathway. *Neurochem Int* **55**, 741-6.
- Liu, A., Lou, H., Zhao, L., and Fan, P. (2006). Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *J Pharm Biomed Anal* **40**, 720-7.
- Liu, Q., Raina, A. K., Smith, M. A., Sayre, L. M., and Perry, G. (2003). Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 305-313.
- Longpre, F., Garneau, P., Christen, Y., and Ramassamy, C. (2006). Protection by EGb 761 against beta-amyloid-induced neurotoxicity: involvement of NF-kappaB, SIRT1, and MAPKs pathways and inhibition of amyloid fibril formation. *Free Radic Biol Med* **41**, 1781-94.

- Lu, W. C., Sheen, J. F., Hwang, L. S., and Wei, G. J. (2012). Identification of 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone metabolites in rat urine by the isotope-labeling method and ultrahigh-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **60**, 8123-8.
- Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D., and Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17342-7.
- Luo, Y., Smith, J. V., Paramasivam, V., Burdick, A., Curry, K. J., Buford, J. P., Khan, I., Netzer, W. J., Xu, H., and Butko, P. (2002). Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12197-202.
- Mahiuddin Ahmed¹, J. D., Darryl Aucoin¹, Takeshi Sato³, Shivani Ahuja⁴, Saburo, and Aimoto³, J. I. E., William E. Van Nostrand² and Steven O. Smith¹ (2010). <NIHMS223271-supplement-1.pdf>.
- Majo, D. D., Giammanco, M., Guardia, M. L., Tripoli, E., Giammanco, S., and Finotti, E. (2005). Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidant activity relationships. *Food Research International* **38**, 1161-1166.
- Matsuzaki, K., Yamakuni, T., Hashimoto, M., Haque, A. M., Shido, O., Mimaki, Y., Sashida, Y., and Ohizumi, Y. (2006). Nobiletin restoring beta-amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci Lett* **400**, 230-4.
- Mattson, M. P. (2004a). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *nature* **430**, 631-639.
- Mattson, M. P. (2004b). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *nature* **430**, 631-639.
- Moon, H. I., Cho, S. B., Lee, J. H., Lee, Y. C., Lee, J. H., Lee, C. H., and Kim, S. K. (2011). Protective effects of methoxyflavone derivatives from black galingale against glutamate induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells. *Phytother Res* **25**, 1215-7.
- Murugan, P., and Pari, L. (2006). Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* **79**, 1720-8.
- Nagasawa, K., Aoki, H., Yasuda, E., Nagai, K., Shimohama, S., and Fujimoto, S. (2004). Possible involvement of group I mGluRs in neuroprotective effect of theanine. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 116-22.
- Naito, M., Wu, X., Nomura, H., Kodama, M., Kato, Y., Kato, Y., and Osawa, T. (2002). The protective effect of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *journal of Atherosclerosis and thrombosis* **9**, 243-250.
- Nakajima, A., Yamakuni, T., Haraguchi, M., Omae, N., Song, S.-Y., Kato, C.,

- Nakagawasai, O., Tadano, T., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Sashida, Y., and Ohizumi, Y. (2007). Nobiletin, a Citrus Flavonoid That Improves Memory Impairment, Rescues Bulbectomy-Induced Cholinergic Neurodegeneration in Mice. *Journal of Pharmacological Sciences* **105**, 122-126.
- Necula, M., Kayed, R., Milton, S., and Glabe, C. G. (2007). Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J Biol Chem* **282**, 10311-24.
- Ofengeim, D., Shi, P., Miao, B., Fan, J., Xia, X., Fan, Y., Lipinski, M. M., Hashimoto, T., Polydoro, M., Yuan, J., Wong, S. T., and Degterev, A. (2012). Identification of small molecule inhibitors of neurite loss induced by Abeta peptide using high content screening. *J Biol Chem* **287**, 8714-23.
- Ohnishi, M., Monda, A., Takemoto, R., Matsuoka, Y., Kitamura, C., Ohashi, K., Shibuya, H., and Inoue, A. (2012). Sesamin suppresses activation of microglia and p44/42 MAPK pathway, which confers neuroprotection in rat intracerebral hemorrhage. *Neuroscience* **232C**, 45-52.
- Onozuka, H., Nakajima, A., Matsuzaki, K., Shin, R. W., Ogino, K., Saigusa, D., Tetsu, N., Yokosuka, A., Sashida, Y., Mimaki, Y., Yamakuni, T., and Ohizumi, Y. (2008). Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and Abeta pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 739-44.
- Pari, L., and Murugan, P. (2004). Protective role of tetrahydrocurcumin against erythromycin estolate-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res* **49**, 481-6.
- Pari, L., and Murugan, P. (2007). Tetrahydrocurcumin prevents brain lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* **10**, 323-9.
- Phitak, T., Pothacharoen, P., Settakorn, J., Poompimol, W., Caterson, B., and Kongtawelert, P. (2012). Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry* **80**, 77-88.
- Poetsch, M., Dittberner, T., and Woenckhaus, C. (2003). Can different genetic changes characterize histogenetic subtypes and biologic behavior in sporadic malignant melanoma of the skin? *Cell Mol Life Sci* **60**, 1923-32.
- Porat, Y., Abramowitz, A., and Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* **67**, 27-37.
- Prasad, N. R., Menon, V. P., Vasudev, V., and Pugalendi, K. V. (2005). Radioprotective effect of sesamol on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidants levels in cultured human lymphocytes. *Toxicology* **209**, 225-35.
- Prasanthi, J. R., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., Geiger, J. D., and

- Ghribi, O. (2010). Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic Biol Med* **49**, 1212-20.
- Rojas, P., Montes, P., Rojas, C., Serrano-Garcia, N., and Rojas-Castaneda, J. C. (2012). Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginkgo biloba extract 761, in an animal model of Parkinson's disease: therapeutic perspectives. *Nutrition* **28**, 1081-8.
- Rubio-Perez, J. M., and Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* **2012**, 756357.
- Sawasdee, P., Sabphon, C., Sitthiwongwanit, D., and Kokpol, U. (2009). Anticholinesterase activity of 7-methoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytother Res* **23**, 1792-4.
- Selkoe, D., Mandelkow, E., and Holtzman, D. (2012). Deciphering Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a011460.
- Shi, C., Zhao, L., Zhu, B., Li, Q., Yew, D. T., Yao, Z., and Xu, J. (2009). Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chem Biol Interact* **181**, 115-23.
- Singh, S. P., Wahajuddin, Tewari, D., Patel, K., and Jain, G. K. (2011). Permeability determination and pharmacokinetic study of nobiletin in rat plasma and brain by validated high-performance liquid chromatography method. *Fitoterapia* **82**, 1206-14.
- Sloley, B. D., Urichuk, L. J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J. J., Pang, P. K. T., and Coutts, R. T. (2000). Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and Potential Neuroprotectant in Extracts of Ginkgo Biloba Leaves. *Pharm. Pharmacol* **52**, 451-459.
- Sondag, C. M., Dhawan, G., and Combs, C. K. (2009). Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation* **6**, 1.
- Tabner, B. J., Mayes, J., and Allsop, D. (2010). Hypothesis: soluble abeta oligomers in association with redox-active metal ions are the optimal generators of reactive oxygen species in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, 546380.
- Terashima, T., Takido, J., and Yokogoshi, H. (1999). Time-dependent changes of amino acids in the serum, liver, brain and urine of rats administered with theanine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 615-618.
- Uchida, M., Nakajin, S., Toyoshima, S., and Shinoda, M. (1996). Antioxidative effect of sesamol and related compounds on lipid peroxidation. *Biological and*

Pharmaceutical Bulletin **19**, 623-626.

- Unno, T., Suzuki, Y., Kakuda, T., Hayakawa, T., and Tsuge, H. (1999). Metabolism of Theanine, γ -Glutamylethylamide, in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1593-1596.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rice-Evans, C., Williams, R. J., and Spencer, J. P. (2007). Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem* **103**, 1355-67.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., and Spencer, J. P. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr* **3**, 115-26.
- Venkitaramani, D. V., Chin, J., Netzer, W. J., Gouras, G. K., Lesne, S., Malinow, R., and Lombroso, P. J. (2007). Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci* **27**, 11832-7.
- Weiner, M. W., Veitch, D. P., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Cairns, N. J., Green, R. C., Harvey, D., Jack, C. R., Jagust, W., Liu, E., Morris, J. C., Petersen, R. C., Saykin, A. J., Schmidt, M. E., Shaw, L., Siuciak, J. A., Soares, H., Toga, A. W., Trojanowski, J. Q., and Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2012). The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement* **8**, S1-68.
- Whitman, S. C., Kurowska, E. M., Manthey, J. A., and Daugherty, A. (2005). Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages. *Atherosclerosis* **178**, 25-32.
- Winter, E. (1991). Effects of an extract of Ginkgo biloba on learning and memory in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **38**.
- Xin, W., Wei, T., Chen, C., Ni, Y., Zhao, B., and Hou, J. (2000). Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb761 and its constituents. *Toxicology* **148**, 103-110.
- Yang, E. J., Lim, S. H., Song, K. S., Han, H. S., and Lee, J. (2013). Identification of active compounds from Aurantii Immatri Pericarpium attenuating brain injury in a rat model of ischemia-reperfusion. *Food Chem* **138**, 663-70.
- Yao, X., Zhu, X., Pan, S., Fang, Y., Jiang, F., Phillips, G. O., and Xu, X. (2012). Antimicrobial activity of nobiletin and tangeretin against Pseudomonas. *Food Chemistry* **132**, 1883-1890.
- Yeh, S. H., Hung, J. J., Gean, P. W., and Chang, W. C. (2008). Hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured cortical neurons from lipopolysaccharide-induced cell death via regulation of NR1 expression. *J*

Neurosci **28**, 14259-70.

Yu, M. W., Lou, S. N., Chiu, E. M., and Ho, C. T. (2013). Antioxidant activity and effective compounds of immature calamondin peel. *Food Chem* **136**, 1130-5.

Zhang, L., Zhao, H., Zhang, X., Chen, L., Zhao, X., Bai, X., and Zhang, J. (2013). Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. *Brain Res Bull.*