

## 以 amyloid- $\beta$ 聚集為目標的阿茲海默氏症治療策略

黃鈺翔<sup>1#</sup> 林志信<sup>1#</sup> 李承榆<sup>2</sup> 簡虹琪<sup>2</sup> 陳廷碩<sup>2</sup> 李琦玫<sup>1\*</sup> 李桂楨<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>國立臺灣師範大學生命科學系

<sup>2</sup>工業技術研究院生醫與醫材研究所

<sup>#</sup>這些作者對本文的貢獻相同

(收稿日期: 2013.5.22, 接受日期: 2013.5.30)

### 摘要

阿茲海默氏症是最常見的漸進性的認知能力下降和記憶力減退的失智症, 病理上此疾病的特點是細胞外 A $\beta$  肽的類澱粉斑塊沉積和細胞內神經纖維糾結。已知類澱粉沉積會增加氧化壓力、細胞興奮性毒性、能源消耗和細胞凋亡, 最後導致神經細胞死亡。先前 A $\beta$ 42-GFP 融合蛋白的研究顯示, A $\beta$ 42 肽的聚集可反應在相連的 GFP 蛋白之綠螢光亮度上。故本研究建立表現 A $\beta$ 42-GFP 融合蛋白的 Tet-On 293 細胞作為篩檢平台, 藉測定綠螢光亮度增加情形, 來檢測可延緩或抑制 A $\beta$  聚集的抑制物。首先檢測作為正控制組的薑黃素, 可顯著增加綠螢光亮度。進一步以工研院提供的植物藥前處理細胞 8 小時後誘導 A $\beta$ 42-GFP 表現三天, 發現 NTNU-043、057、059、071 等植物藥可顯著增加綠螢光亮度, 並伴隨著伴隨蛋白 HSPB1 表現的增加。我們的結果顯示上述植物藥可抑制 A $\beta$  聚集及其可能的機制, 此篩檢平台可用來篩檢更多有潛能治療阿茲海默氏症的植物藥。

**關鍵詞:** 阿茲海默氏病、類澱粉聚集、細胞模式、植物藥篩檢

### 緒言

阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, 簡稱 AD) 為一常見的神經退化性疾病, 於 1907 年首次被報導。阿茲海默氏症的主要病理特徵是神經細胞外出現  $\beta$ -澱粉樣蛋白斑塊(amyloid plaque)以及在神經細胞內出現神經元纖維糾結(neurofibrillary tangles) (Sennvik *et al.*, 2000)。罕見的 APP (Goate *et al.*, 1991)、PSEN1 (Sherrington *et al.*, 1995)及 PSEN2 (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1995)基因突變被確認與遺傳早發性阿茲海默氏症相關。

A $\beta$  是一段 39 到 43 個胺基酸的肽, 由澱粉樣蛋白前驅蛋白 APP 經由  $\beta$ -與  $\gamma$ -分泌酶(secretase)水解後形成。Amyloid plaque 中組成之 A $\beta$  最常見是 40-mer 和 42-mer, 其中 42-mer 較 40-mer 於 C 端增加 Ile41 及 Ala42 兩個胺基酸殘基。A $\beta$ 42 是 amyloid plaque 最主要的成分(Roher *et al.*, 1993), 在阿茲海默氏症患者腦中 A $\beta$ 42 濃度顯著高於正常人(Funato *et al.*, 1998)。

至今沒有有效治療阿茲海默氏症的藥。A $\beta$  聚集發生是在致病機制的早期, 因此找尋聚集抑

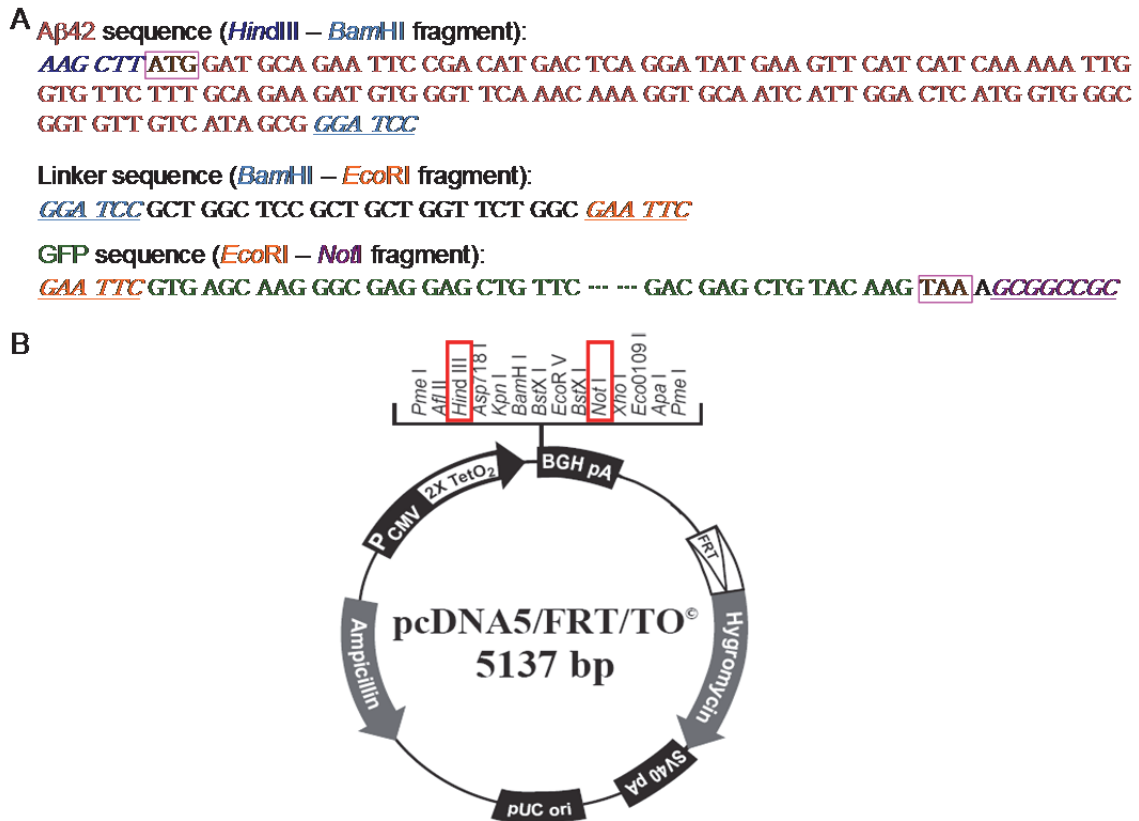
制物是一治療疾病的有效策略。前人的研究指出, GFP 綠螢光蛋白緩慢摺疊出自然的螢光結構(Cubitt *et al.*, 1995)。將 A $\beta$ 42 蛋白與 GFP 綠螢光蛋白間, 藉一段胺基酸連接子連接後, A $\beta$ 42 蛋白之摺疊會藉由連接子影響相連的 GFP 折疊, 導致螢光亮度降低(Waldo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006)。本研究即建立表現 A $\beta$ 42-GFP 融合蛋白的 Tet-On 293 細胞作為篩檢平台, 藉測定綠螢光亮度增加情形, 來檢測可延緩或抑制 A $\beta$  聚集的抑制物。

### 材料與方法

#### pcDNA5/FRT/TO/A $\beta$ 42-GFP 重組質體

以 APP cDNA (中研院廖永豐教授提供)為模板, 利用 PCR 增幅 A $\beta$ 42 序列, 於 5'端引入起始密碼(ATG), 並於兩端分別引入 *Hind*III (AAGCTT)、*Bam*HI (GGATCC)限制酶切位, 選殖入 pGEM-T Easy 質體並定序確認序列無誤。包含 12 個胺基酸的 linker 序列(GSAGSAAGSGEF)係直接合成, 並於兩端分別引入 *Bam*HI (GGATCC)、*Eco*RI (GAATTC)限制酶切位。GFP

\*通信作者: 李桂楨 (Guey-Jen Lee-Chen); FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43019@ntnu.edu.tw  
李琦玫 (Chi-Mei Lee); FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43003@ntnu.edu.tw



圖一、pcDNA5/FRT/TO/A $\beta$ 42-GFP 重組質體。(A) A $\beta$ 42 序列兩端包含 *Hind*III、*Bam*HI 限制酶切位，linker 序列兩端包含 *Bam*HI、*Eco*RI 限制酶切位，GFP 序列(部分)兩端包含 *Eco*RI、*Not*I 限制酶切位序列。(B) pcDNA5/FRT/TO 載體及供選殖置入的 *Hind*III、*Not*I 切位。

**Figure 1.** pcDNA5/FRT/TO/A $\beta$ 42-GFP recombinant plasmid. (A) Sequence of A $\beta$ 42 with *Hind*III, *Bam*HI restriction sites, sequence of linker with *Bam*HI, *Eco*RI restriction sites, and partial sequence of GFP with *Eco*RI、*Not*I restriction sites. (B) pcDNA5/FRT/TO vector with *Hind*III、*Not*I restriction sites marked for A $\beta$ 42-GFP insertion.

序列取自 pEGFP-N1 質體，利用 PCR 於 5'端引入 *Eco*RI (GAATTC)限制酶切位並移除起始密碼，增幅的 GFP 序列選殖入 pGEM-T Easy 質體並定序確認序列無誤。最後將 A $\beta$ 42 序列 (*Hind*III-*Bam*HI 片段)、linker 序列(*Bam*HI-*Eco*RI 片段)、GFP 序列(*Eco*RI-*Not*I 片段)一起置入真核表現載體 pcDNA5/FRT/TO 供選殖置入的 *Hind*III、*Not*I 切位間，即完成 pcDNA5/FRT/TO/A $\beta$ 42-GFP 重組質體的製備(圖一)，並另製備僅含 GFP 的重組質體作為對照。

### 細胞培養及基因轉染

培養 293 Flp-In 宿主細胞(Invitrogen)於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱，DMEM 培養液包含 10% FBS、1 mM sodium pyruvate、1.5 g/L sodium bicarbonate、100 U/ml penicillin、100 U/ml streptomycin、5  $\mu$ g/ml blasticidin S、100  $\mu$ g/ml zeocin。第一天接種宿主細胞於培養盤；第二天以 T-Pro (Invitrogen)

試劑，將 pcDNA5/FRT/TO/A $\beta$ 42-GFP 或 pcDNA5/FRT/TO/GFP 與 pOG44 質體共轉染入 293 宿主細胞。之後使用含 100  $\mu$ g/ml hygromycin B、5  $\mu$ g/ml blasticidin S 培養液，培養所篩選之細胞株。

### Tet-On 293 細胞記述

上述細胞使用 10  $\mu$ g/ml doxycycline 誘導 GFP 或 A $\beta$ 42-GFP 表現。二天後加入 100 ng/ml hochest 33342 (Molecular Probes)，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中反應 30 分鐘，以活細胞影像儀觀察 GFP 或 A $\beta$ 42-GFP 螢光的表現情況，並以高通量(high content)影像儀(ImageXpressMICRO, Molecular Devices)定量之。

上述細胞誘導 GFP 或 A $\beta$ 42-GFP 表現 2 天後，收集細胞，以 TRIzol 萃取 RNA，定量後利用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)進行反轉錄反應，再使用 EGFP 的螢光探針 PN4331348 (Applied Biosystems)，以即時

定量 PCR 偵測誘導表現的 A $\beta$ 42-GFP 表現量，並使用 HuHPRT 的螢光探針 4326321E (Applied Biosystems)作為控制組。

上述細胞誘導 GFP 或 A $\beta$ 42-GFP 表現 2 天後，收集細胞，加入 RIPA 緩衝液萃取蛋白質，定量後進行 SDS-聚丙烯醯胺電泳(SDS-PAGE)，並轉漬至硝化纖維膜，於室溫下以 GFP 抗體(1:500 稀釋, Santa cruz)、GAPDH 抗體(1:1000 稀釋, MDBio) 雜合 2 小時。清洗之後加入 horseradish peroxidase (HRP)共軛之羊抗兔或羊抗鼠 IgG (1:5000 稀釋, Gene Tex)二級抗體，於室溫作用 1.5 小時後再清洗。最後加入冷光呈色試劑(Millipore)呈色，並使用 ImagerReader LAS-4000 機器與軟體偵測蛋白表現。

### 植物藥處理及細胞影像分析

培養上述細胞於 96 孔盤中加入  $0.8 \times 10^4$  的細胞。第二天加薑黃素或植物藥前處理 8 小時。之後加入 doxycycline (2  $\mu$ g/ml)誘導 A $\beta$ 42-GFP 表現。3 天後，加入 100 ng/ml hocheest 33342 於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中反應 30 分鐘，再利用高通量影像儀進行拍照分析。另培養加入植物藥處理但不誘導 A $\beta$ 42-GFP 表現的細胞，作為植物藥自發性螢光的背景檢測。

### 西方轉漬分析植物藥作用標的

收集上述植物藥前處理 8 小時、誘導 A $\beta$ 42-GFP 表現 3 天的細胞液蛋白質(20  $\mu$ g)，SDS-聚丙烯醯胺電泳、轉漬後，硝化纖維膜於室溫下進行 GFP 抗體(1:500 稀釋, Santa cruz)、 $\beta$ -actin 抗體(1:5000 稀釋, Novus)、HSPB1 抗體(1:200 稀釋, Santa cruz)雜合。2 小時後清洗，加入 HRP 共軛之羊抗兔或羊抗鼠 IgG 二級抗體，於室溫作用 1.5 小時後再清洗。之後的冷光呈色試劑呈色及蛋白質表現定量如上述。

## 結 果

### Tet-On A $\beta$ 42-GFP 細胞株

以包含 GFP、A $\beta$ 42-GFP 的 pcDNA5/FRT/TO 重組質體，建立 Flp-In 細胞株，加入 doxycycline (Dox)誘導 GFP、A $\beta$ 42-GFP 表現 2 天後，進行活細胞影像系統觀察。圖二 A 顯示 A $\beta$ 42-GFP 細胞在加入 Dox 後，可觀察到微弱的螢光訊號。螢光定量後，A $\beta$ 42-GFP 細胞誘導後螢光量僅為 GFP 細胞螢光量之 5.1% ( $P = 0.001$ ) (圖二 B)。西方轉

漬分析之結果可看出 A $\beta$ 42-GFP 蛋白表現量遠相較於 GFP 低(圖二 C)。進一步以即時 PCR 定量檢測 GFP 細胞、A $\beta$ 42-GFP 細胞的 RNA 表現量，結果分別誘導表現 26.6 倍、28.2 倍，即兩細胞間 RNA 誘導表現相差不遠(圖二 D)。

### 誘導表現 A $\beta$ 42-GFP 細胞株之藥物篩檢

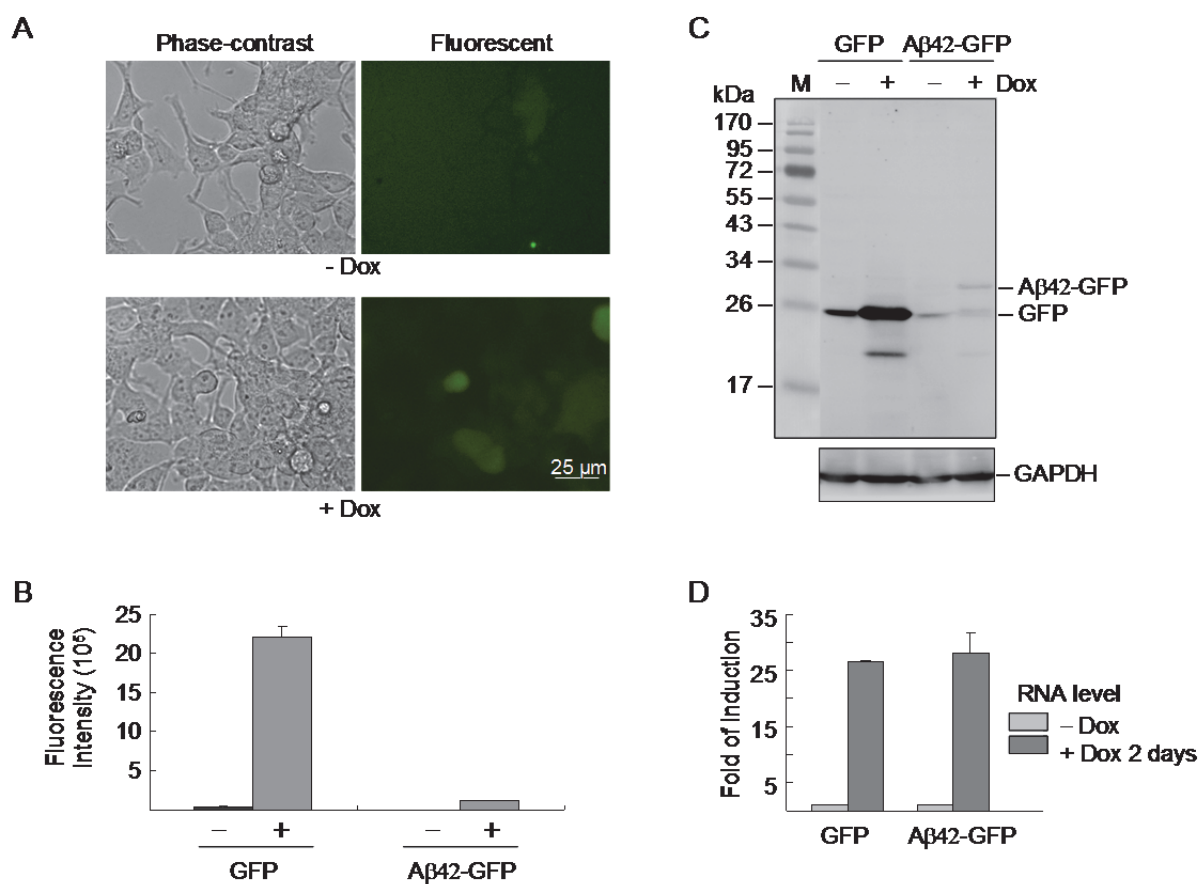
以上述建立之 Tet-On A $\beta$ 42-GFP 細胞株，作為藥物篩檢平台。圖三 A 顯示藥物篩檢流程。A $\beta$ 42-GFP 細胞以待檢測植物藥前處理 8 小時後，加入 Dox 誘導 A $\beta$ 42-GFP 蛋白的表現，3 天後染細胞核，以高通量影像儀分析細胞螢光亮度。如圖三 B 所示，與未處理者(Untr.)相較，作為正控制組的 Curcumin 於 1  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、5  $\mu$ M 處理後分別可提升 A $\beta$ 42-GFP 蛋白之螢光亮度至 109% ( $P = 0.022$ )、114% ( $P = 0.007$ )、122% ( $P = 0.005$ )。所檢測的植物藥扣除自發性螢光背景後，在不影響細胞存活情況下，可分別顯著提升螢光量至 119~135% ( $P = 0.046\sim 0.031$ , 0.1 ~10  $\mu$ g/ml NTNU-043)、121~134% ( $P = 0.038\sim 0.017$ , 1 ~10  $\mu$ g/ml NTNU-057)、121~132% ( $P = 0.030\sim 0.008$ , 0.1 ~10  $\mu$ g/ml NTNU-059)、128~137% ( $P = 0.025\sim 0.001$ , 0.1 ~10  $\mu$ g/ml NTNU-071)。

### 候選植物藥活化 HSPB1 來抑制 A $\beta$ 聚集

利用西方轉漬法，分析 A $\beta$ 42-GFP 細胞經 Curcumin 及植物藥 NTNU-043、NTNU-057、NTNU-059、NTNU-071 處理後，HSPB1 蛋白表現量情形。如圖四 A 所示，誘導 A $\beta$ 42-GFP 蛋白表現後，HSPB1 蛋白表現量下降至 64% ( $P = 0.012$ )，Curcumin 處理後 HSPB1 表現量稍提升至 69% ( $P = 0.390$ )，NTNU-043、NTNU-057、NTNU-059、NTNU-071 處理後 HSPB1 表現量則顯著提升至 91% ( $P = 0.027$ )、99% ( $P = 0.015$ )、82% ( $P = 0.026$ )、83% ( $P = 0.028$ )。若以 GFP 抗體檢視所誘導的 A $\beta$ 42-GFP 蛋白，相較於僅誘導表現者，植物藥 NTNU-043、NTNU-057、NTNU-059、NTNU-071 處理後檢測到的 A $\beta$ 42-GFP 蛋白，分別顯著提升至 158%、178%、186%、174% ( $P = 0.046\sim 0.012$ ) (圖四 B)。

## 討 論

本研究建立表現 A $\beta$ 42-GFP 融合蛋白的細胞作為平台，來篩檢可延緩或抑制 A $\beta$  聚集的植物藥。A $\beta$ 42-GFP 經誘導表現 2 天後其螢光亮度僅



圖二、Aβ42-GFP 細胞株之記述。(A) Aβ42-GFP 細胞，未誘導(-Dox)或誘導(+Dox) Aβ42-GFP 表現 2 天後的相位差(phase-contrast)及螢光(fluorescent)顯微鏡影像圖。(B) GFP、Aβ42-GFP 細胞的高通量螢光分析。(C) 西方墨點法分析 GFP、Aβ42-GFP 蛋白表現。(D) Real-time 定量分析 GFP、Aβ42-GFP RNA 表現。

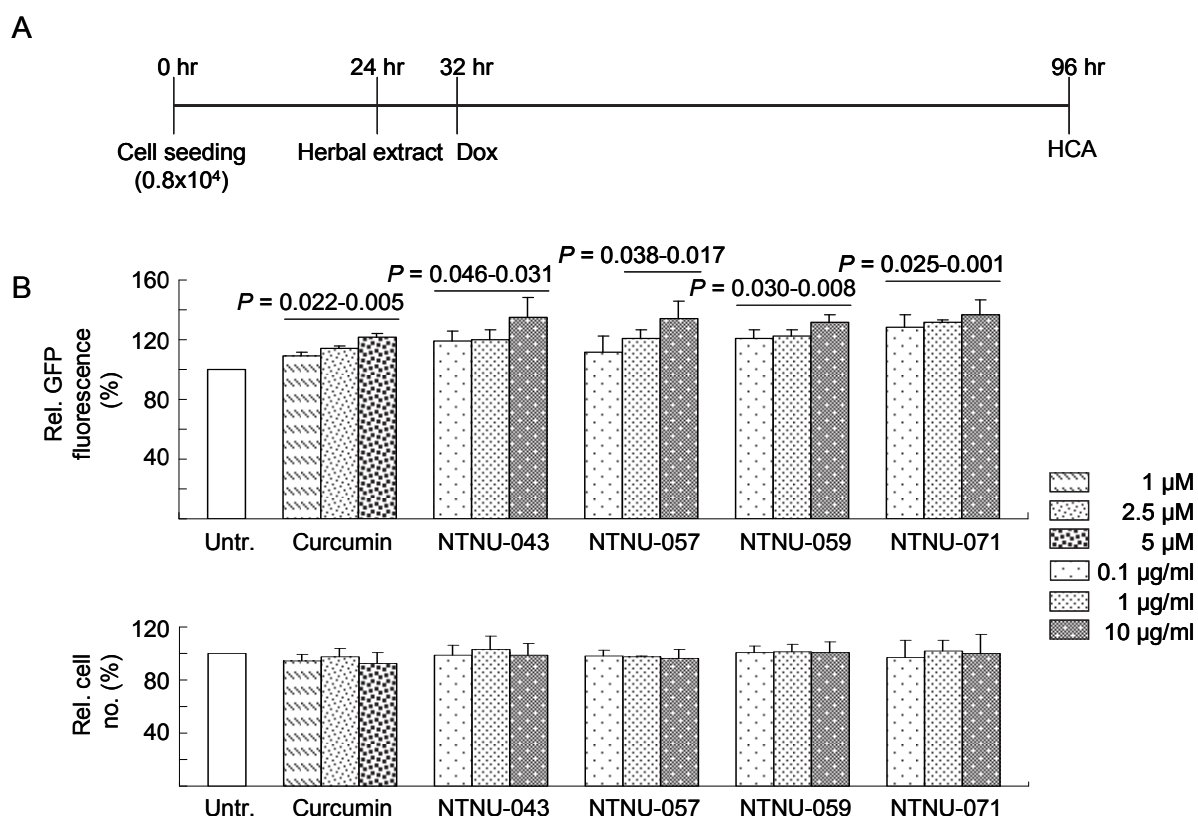
**Figure 2.** Characterization of Aβ42-GFP cell clone. (A) Phase-contrast or fluorescent images of cells with un-induced (-Dox) or induced (+Dox) Aβ-GFP expression for two days. (B) High-content analysis of GFP and Aβ42-GFP fluorescence. (C) Western blot analysis of induced GFP and Aβ42-GFP proteins. (D) Real-time PCR quantification of induced GFP and Aβ42-GFP RNA.

些微的增加，為誘導表現 GFP 細胞的 5.1%。當以 GFP 抗體檢測蛋白表現量時，所偵測到 Aβ42-GFP 融合蛋白的表現量亦遠低於 GFP 蛋白，但兩者 RNA 誘導表現量相似(圖二)。故推測 Aβ42-GFP 融合蛋白因相連 Aβ42 胜肽構形的影響，不僅螢光亮度大幅減弱，亦導致 GFP 抗體辨識能力降低，故雜合到的訊號大幅減弱。

在藥物篩檢實驗中所用的正控制組 Curcumin 是一種具有抗氧化、抗發炎的多酚類 (Motterlini *et al.*, 2000)。Curcumin (1~5 μM) 前處理表現 Aβ42-GFP 的細胞後，可顯著提升 Aβ42-GFP 蛋白之螢光亮度 109~122% ( $P = 0.022\sim 0.005$ ) (圖三)。在阿茲海默氏症模式研究中，Curcumin 可以減少或抑制 Aβ 胜肽之聚集 (Frautschy *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005)，故我們的研究結果與前人相似。在相同情況下，植物藥

NTNU-043 等亦顯著提升 Aβ42-GFP 的螢光量至 119~137% ( $P = 0.046\sim 0.001$ ) (圖三)，顯示植物藥使 Aβ42 構形變化，因而降低對 GFP 構形的影響。未來辨識 Aβ 胜肽構形之 A11 或是 6E10 抗體染色，將可更直接證明此點。所檢測的四種植物藥中，NTNU-071 是大葉桃花心木 (*Swietenia macrophylla* King) 的莖萃取物，大葉桃花心木之樹皮含有數種具抗氧化能力的兒茶素 (catechin) 及其衍生物 (Falah S *et al.*, 2008)。本實驗中大葉桃花心木的莖萃取物是否可提升 Aβ42-GFP 細胞抗氧化能力，有待進一步的研究。

在伴隨蛋白對於 Aβ 的聚集的影響方面，前人研究指出小分子的伴隨蛋白如 HSPB6 (Hsp20)、HSPB1 (Hsp27)、CRYAB (αB-crystallin) 等會與 Aβ40、Aβ42 結合，來抑制 Aβ 的聚集及減低其



圖三、Aβ42-GFP 細胞株植物藥篩選。(A)實驗流程圖。接種  $0.8 \times 10^4$  個細胞於 96 孔盤，24 小時後加入植物藥前處理，8 小時後加入 Dox 誘導 Aβ42-GFP 表現，最後於第 96 小時進行高通量螢光分析。(B)植物藥篩選。以 Curcumin (1~5 μM)、植物藥 NTNU-043~071 (0.1~10 μg/ml) 前處理的高通量螢光及細胞數分析，未處理者(Untr.) 設為 100%。

**Figure 3.** Herbal medicine screen using Aβ42-GFP cells. (A) Experiment flow chart. Aβ42-GFP cells were plated into 96-well dishes ( $0.8 \times 10^4$ /well), grown for 24 hr and treated with herbal medicine for 8 hr. Then doxycycline was added to the medium for 3 days and GFP fluorescence was assessed by HCA system. (B) Herbal medicine screen. Cells were treated with curcumin (1~5 μM) or herbal medicine NTNU-043~071 (0.1~10 μg/ml) and fluorescence cell number assessed by HCA. To normalize, the relative fluorescence level and cell number in untreated cells is set as 100%.

毒性(Wilhelmus *et al.*, 2006)。HSPB1 可與 Aβ oligomer 構形專一的抗體 A11 結合，暗示 HSPB1 具 Aβ oligomer 構形，可防止 Aβ 聚集(Yoshiike *et al.*, 2008)。本研究以植物藥前處理表現 Aβ42-GFP 的細胞後，發現 HSPB1 表現量顯著增加(圖四)。故推測增加的 HSPB1 可防止 Aβ 聚集，來顯著提升 Aβ42-GFP 的螢光亮度。

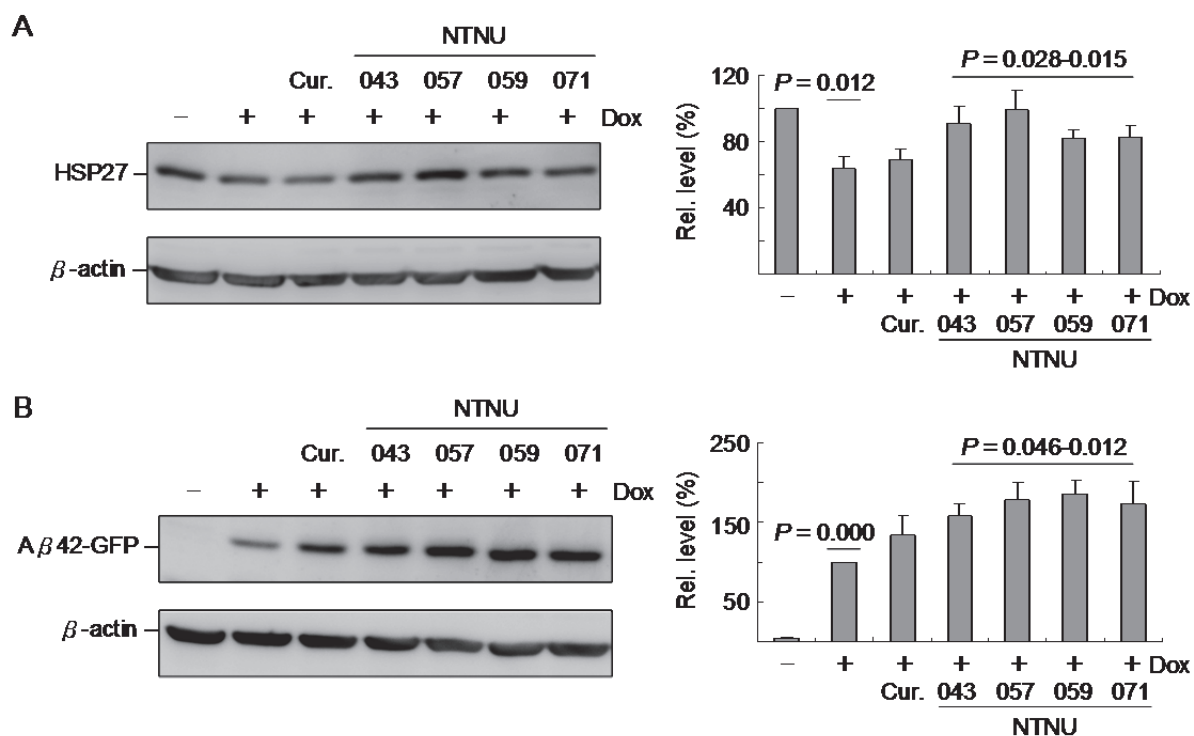
植物藥與神經保護性的研究已被廣泛的重視(Kumar and Khanum, 2012)。阿茲海默氏症的致病機轉至今未完全明瞭，目前亦沒有有效治療阿茲海默氏症的藥。阿茲海默氏症大鼠模式研究顯示，中草藥 Naoerkang 可增加 MMP-9 的表現，來降低 Aβ42 的量及改善大鼠學習及記憶能力(Li *et al.*, 2011)。阿茲海默氏症小鼠模式研究亦顯示，漸進式的給予抗中風的植物藥 TongLuoJiuNao，可減緩 Aβ 的生成(He *et al.*, 2013)。由於阿茲海默

氏症有多重的致病路徑，傳統植物藥的多重功能、多重目標特性，具備發展治療阿茲海默氏症的潛能(Kim and Oh, 2012)。

綜言之，本研究建立 Aβ42-GFP 細胞平台，篩檢出工研院提供的植物藥 NTNU-043 等，可延緩 Aβ 聚集及活化伴隨蛋白 HSPB1 表現。未來可進一步分析候選植物藥的活性成份，及探討其作用標的。

## 致 謝

本研究經費來自國立臺灣師範大學 100 年度補助學術研究及新興發展計畫「阿茲海默氏症之潛力化合物篩選—從基因到行為」(NTNU100-D-02)。影像攝取感謝國立臺灣師範大學生命科學系分子影像核心實驗室的協助。



圖四、西方轉漬分析植物藥處理之 Aβ42-GFP 細胞。以薑黃素(5 μM)及植物藥(10 μg/ml)前處理細胞、誘導 Aβ42-GFP 表現 3 天後，再以 HSPB1 (A)、GFP (B)及 β-actin 抗體分析 HSPB1 蛋白、Aβ42-GFP 蛋白表現之代表性影像，其中 β-actin 作為 loading 控制組。定量數據為三次實驗的平均值。

**Figure 4.** Western blot analysis of Aβ42-GFP cells treated with herbal medicine. Representative images of curcumin (5 μM) and herbal medicine (10 μg/ml)-treated cells using HSPB1 (A), GFP (B) and β-actin antibodies. Levels of HSPB1 and Aβ42-GFP were normalized with a loading control (β-actin). Data are expressed as the mean ± SEM values from three independent experiments.

### 參考文獻

- Cubitt A, Heim R, Adams S, Boyd A, Gross L and Tsien R. 1995. Understanding improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455.
- Falah S, Suzuki T and Katayama T. 2008. Chemical constituents from Swietenia macrophylla bark and their antioxidant activity. *Pak. J. Biol. Sci.* 11:2007-2012.
- Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME and Cole GM. 2001. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol. Aging* 22:993-1005.
- Funato H, Yoshimura M, Kusui K, Tamaoka A, Ishikawa K, Ohkoshi N, Namekata K, Okeda R and Ihara Y. 1998. Quantitation of amyloid β-protein in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 152:1633-1640.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance<sup>§</sup>, Alien Roses M, Williamson R, Rossor M, Owen M and Hardy J. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- He P, Li P, Hua Q, Liu Y, Staufenbiel M, Li R and Shen Y. 2013. Chronic administration of anti-stroke herbal medicine TongLuoJiuNao reduces amyloidogenic processing of amyloid precursor protein in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8:e58181.
- Kim HG and Oh MS. 2012. Herbal medicines for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 18:57-75.
- Kim W, Kim Y, Min J, Kim DJ, Chang YT and Hecht MH. 2006. A high throughput screen for compounds that inhibit aggregation of the

- Alzheimer's peptide. ACS Chem. Biol. 1:461-469.
- Kumar GP and Khanum F. 2012. Neuroprotective potential of phytochemicals. Pharmacogn. Rev. 6:81-90.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, *et al.* 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science 269:973-977.
- Li X, Yuan HF, Quan QK, Wang JJ, Wang NN and Li M. 2011. Scavenging effect of Naoerkang on amyloid beta-peptide deposition in the hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease. Chin. J. Integr. Med. 17:847-853.
- Motterlini R, Foresti R, Bassi R and Green CJ. 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 28:1303-1312.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM and St George-Hyslop PH. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. Nature 376:775-778.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E and Ball MJ. 1993.  $\beta$ -Amyloid (1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:10836-10840.
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B and Benedikz E. 2000. Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. Neurosci. Lett. 278:169-172.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM and St George-Hyslop PH. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375:754-760.
- Waldo GS, Standish BM, Berendzen J and Terwilliger TC. 1999. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. Nature Biotechnol. 17:691-695.
- Wilhelmus MM, Boelens WC, Otte-Höller I, Kamps B, de Waal RM and Verbeek MM. 2006. Small heat shock proteins inhibit amyloid-beta protein aggregation and cerebrovascular amyloid-beta protein toxicity. Brain Res. 1089:67-78.
- Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA and Cole GM. 2005. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*. J. Biol. Chem. 280:5892-5901.
- Yoshiike Y, Minai R, Matsuo Y, Chen YR, Kimura T and Takashima A. 2008. Amyloid oligomer conformation in a group of natively folded proteins. PLoS ONE 3:e3235.

## Therapeutic Strategy Targeting Amyloid- $\beta$ Aggregation for Alzheimer's Disease

Chen-Hsiang Huang<sup>1#</sup>, Chih-Hsin Lin<sup>1#</sup>, Cheng-Yu Lee<sup>2</sup>, Hong-Chi Chien<sup>2</sup>, Ting-Shou Chen<sup>2</sup>,  
Chi-Mei Lee<sup>1\*</sup>, Guey-Jen Lee-Chen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Life Science, National Taiwan Normal University  
Taipei, Taiwan

<sup>2</sup> Biomedical Technology and Device Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute  
Hsinchu, Taiwan

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

(Received: 22 May 2013, accepted: 30 May 2013)

### ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia associated with progressive cognitive decline and memory loss. Molecular hallmarks of the disease are characterized by extracellular A $\beta$  plaques and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs). A $\beta$  deposition causes neuronal death via a number of possible mechanisms including oxidative stress, excitotoxicity, energy depletion and apoptosis. Previously A $\beta$ 42 was fused to the N-terminus of GFP to couple the aggregation state with the fluorescence of GFP. In the present study, A $\beta$ 42-GFP are used to generate Tet-On 293 cell clone as screening platforms. Inhibitors that retard or block A $\beta$  aggregation can be distinguished by increasing fluorescence on Tet-On 293 cells. As a positive control, curcumin increased green fluorescence significantly. Treatment of herbal medicines NTNU-043, 057, 059 and 071 (provided by Industrial Technology Research Institute of Taiwan) resulted in significant increased fluorescence on Tet-On A $\beta$ -GFP cells, accompanying with enhanced HSPB1 chaperone expression. Our results demonstrate how these herbal medicines are likely to work on A $\beta$ -aggregation reduction, and provide insight into the possible working mechanism in AD. We anticipate our assay to be a starting point for screening more potential herbs for the treatment of AD.

**Key words:** Alzheimer's disease, A $\beta$  aggregation, cell model, herbal medicine screen

---

\*Corresponding author: Guey-Jen Lee-Chen; FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43019@ntnu.edu.tw  
Chi-Mei Lee; FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43003@ntnu.edu.tw