

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

Amyloid-beta 及其前驅物 APP 在離體及活體動物實驗中對
血小板活化產生不同作用的機轉探討(1/3)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2321-B-038-001-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：臺北醫學大學藥理學科

計畫主持人：許準榕

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

樣澱粉引發之腦血管疾病-Amyloid-beta及其前驅物APP在離體
及活體動物實驗中對血小板活化產生不同作用的機轉探討(1/3)

計劃類別：一般型研究計劃(整合型)

計畫編號: NSC 92-2321-B-038-001

執行期限： 92 年8 月1日至 93 年7月31日

主持人：許準榕教授

計劃參與人員：

成果報告類型：精簡報告

執行機構：台北醫學大學醫學研究所

中華民國九十三年五月二十八日星期五

一、中文摘要

老化是腦神經受損的主要危險因子，例如阿茲海默症(Alzheimer's disease)就是其中最典型的例子。病理學上發現，在阿茲海默症病人的腦組織中常發現有neurofibrillary tangles 和 senile plaques產生。Senile plaques主要是因 amyloid- β ($A\beta$)大量沉積所造成的； $A\beta$ 是一種存在於人類腦組織中且具神經毒性的蛋白。大量的 $A\beta$ 沉積在senile plaques、cortical以及leptomeningeal的血管壁上引起阿茲海默症的典型特徵。 $A\beta$ 是其前驅物 amyloid precursor protein (APP) 的代謝產物，研究發現APP會大量的表現在血小板的 α -granule內。 $A\beta$ 目前已知有兩種isoforms，一種為含40個胺基酸序列，主要存在於血管內；另一種為較長含42個胺基酸，較不具水溶性且毒性較強，主要存在於senile plaques中。因為神經元(neuron)本身可釋放適量的 $A\beta$ ，因此大腦組織內所沉積的 $A\beta$ 大多發生在局部組織；另一方面，腦血管內所沉積的 $A\beta$ 則有部分來自於循環中的 $A\beta$ 。由目前的證據顯示人類的血小板含有相當高濃度的APP 及 $A\beta$ ，這些APP有的是membrane-associated有的是soluble form，當血小板受到活化，則APP或 $A\beta$ 會釋放到血液中。一般而言，血液中有高達90 % 的APP是來自於血小板受活化而釋放出的APP；目前已知在血小板未活化之狀況下，APP在血漿中的濃度約低於60 pM(假設在正常生理情況下，每1 ml血液中約含有 3×10^8 血小板)；但當血小板受到活化則可釋放出約30 nM的APP至血液中，由此可知血小板是血液中APP的主要來源。再者，血小板中 $A\beta$ 的釋放亦如同APP一樣，皆是經由血小板活化而釋放至循環中。因此在受傷的血管處會有相當高濃度的 $A\beta$ 及APP產生，因為此處會有大量的血小板附著在受傷的血管壁上而使血小板活化繼而釋放大量的 $A\beta$ 及APP。

到目前為止，有關於 $A\beta$ 及APP對於血小板的作用不論在in vitro或in vivo中所知並不多，相關的研究文獻亦不多。本實驗室研究結果證實sAPP α (3-15 nM)可明顯抑制由對於collagen (1 μ g/ml), ADP (20 μ M) 及AA (60 μ M) 所引發的血小板凝集反應和ATP釋放，然而 $A\beta$ (0.5-2 μ M) 反而可加強collagen (0.5 μ g/ml)和ADP (4 μ)所引起的血小板凝集反應和ATP釋放反應，並且發現 $A\beta$ 有明顯加強collagen (0.5 μ g/ml)所促進的細胞內鈣離子移動之現象；因此 $A\beta$ 和sAPP α 對血小板的作用呈現完全相反 (opposite)的結果。因此在接下去的第二年度計劃中，我們擬進一步探討PTK (protein tyrosine kinase) (如pp72^{SYK}、pp125^{FAK}、pp60^{C-SRC}及JAK family kinase)的磷酸化、自由基及NO的產生等；並且利用毛細管電泳儀、掃描式電子顯微鏡和共軛聚焦顯微鏡進一步分析及比較 $A\beta$ 及APP在血小板內的表現及相對含量。透過這些實驗，我們將可進一步的分析 $A\beta$ 及APP引起血小板不同反應的機轉及活性，同時亦可深入瞭解 $A\beta$ 及APP兩者在生理及病理上所分別扮演的調控及制衡角色。

關鍵詞：阿茲海默症， β -amyloid，amyloid precursor protein，血小板

Abstract

Aging is a major risk factor for neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease (AD). The pathological hallmarks of AD brains include cortical atrophy, neurofibrillary tangles and senile plaques. The amyloid- β ($A\beta$) is the major constituent of senile plaques. The $A\beta$ is present in a soluble, non-toxic form in all human brains, mainly as a 39-43 amino acid sequence. Deposition of $A\beta$ in senile plaques and in the walls of cortical and leptomeningeal blood vessels is a hallmark of AD. $A\beta$ is derived from proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP). APP is abundantly expressed in the platelet α -granule. The $A\beta_{1-40}$ is the dominant form associated with blood vessel amyloid; whereas the longer species $A\beta_{1-42}$, which are less soluble and more cytotoxic, are the dominant forms found in senile plaques. Because neurons secrete substantial amounts of $A\beta$, intracerebral deposition of $A\beta$ may occur locally. However, cerebral vascular amyloid deposits may be derived in part from circulating $A\beta$. Indeed, human platelets contain high levels of membrane-associated and soluble forms of APP, which upon platelet activation, the cleaved APP is readily released by platelets and may contribute to more than 90% of circulating APP. The resting plasma concentration of APP is low (≈ 60 pM), assuming a physiological concentration of 3×10^8 platelet/ml of blood, degranulation is reported to contribute about 30 nM of APP in blood. In addition, platelets may also be a source of $A\beta$ detected in whole blood. The $A\beta$, like APP, is also released upon platelet activation. Therefore, much higher localized concentrations of APP and $A\beta$ could be achieved when platelets accumulate at the site of vascular injury. The platelet therefore represents an efficient means of targeting the release of high doses of APP and $A\beta$ into a generating thrombus. To date, little is known concerning the effect of APP and/or $A\beta$ in platelets in *in vitro* and *in vivo* studies. In our studies, we found that the sAPP α (3-15 nM) can effectively inhibit the platelet aggregation. sAPP α dose-dependently inhibited the aggregation induced by collagen, ADP, and AA. Contrariwise, $A\beta$ (0.5-2 μ M) potentiated platelet aggregation and ATP release by collagen (0.5 μ g/ml) and ADP (4 μ M) in human platelet suspensions. Furthermore, $A\beta$ also potentiated $[Ca^{2+}]_i$ mobilization in human platelet suspensions stimulated by collagen (0.5 μ g/ml). Our studies also consist with the previous results with sAPP α and $A\beta$ exhibit opposite effects in platelet activation.

Therefore, we want to further evaluate the tyrosine phosphorylation (pp72^{SYK}, pp125^{FAK}, pp60^{C-SRC} and JAK family kinase), free radical and NO formations; (2) quantitative and qualitative analysis of APP and $A\beta$ in platelets by HPCE, TEM, and confocal microscope. Through these studies, we will obtain a better insight into the detailed different mechanisms and activities of APP and $A\beta$ in platelets, and further understand physiologically and pathologically relevant functions for APP and $A\beta$ as feedback regulator during platelet activation.

Keywords : Alzheimer's disease, β -amyloid, amyloid precursor protein, platelets.

二、報告內容

(一) 緣由與目的

當人口的平均年齡不斷上升的同時，這顯示著我們已逐漸步入老年化的社會，因此老年人相關的疾病將更受到一般大眾及醫藥界人士的關心與重視。阿滋海默症 (Alzheimer's disease) 就是一種常見的老年疾病，且為老年失智症的首要原因，若家中老人常出現遺忘最近發生的事、無法做好日常生活簡單的事務、說話辭不達意、失去方向感、失去判斷力(如把褲子穿反)、改變原來的人格(變的迷糊、喪智或膽怯) 等等，就該懷疑是否患了阿滋海默症，因此需進一步做診斷與治療。老化可說是腦神經損害的主因，而腦神經損害的結果便會造成阿滋海默症；阿滋海默症主要發生在腦部的大腦皮質 (cerebral cortex)、海馬迴 (hippocampus) 及杏仁核 (amygdala) 處形成神經纖維節 (neurofibrillary tangles) 和老年斑塊 (senile plaques) (Chartier-Harlin et al., 1991)；神經纖維節與一種稱為tau的蛋白質不正常堆積有關；老年斑塊主要因 amyloid- β ($A\beta$) 大量的沉積所構成，而 $A\beta$ 是一種存在於人類腦中可溶於腦脊髓液且具有神經毒性的胺基酸 (Glennner and Wong, 1984)。

近幾年來對於阿滋海默症形成的原因有兩個主要的假說：一個是 amyloid假說，這個假說認為神經的傷害 (即阿滋海默症的發生) 主要來自於 amyloid precursor protein (APP) 不正常的代謝，而造成 $A\beta$ 的量上升，並且導致 $A\beta$ 大量沉積於腦中而形成 senile plaques，進而促使阿滋海默症的發生 (Hardy and Higgins, 1992)；另一種是神經細胞骨架傷害假說，這假說認為阿滋海默症的發生來自於神經細胞骨架的改變 (Braak and Braak, 1991)。由病理學觀點而言，阿滋海默症在神經病理學上具有特殊的變化，由肉眼外觀上可見到大腦皮質的萎縮、腦的溝迴也變寬且腦室擴大；在組織切片上亦可見到神經細胞數目明顯減少，尤其在顳葉和額葉。診斷阿滋海默症的最重要病理指標一為老年斑 (senile plaques, SP) 一為神經纖維纏結 (neurofibrillary tangles, NFT)；此外尚有顆粒空泡變性 (granulovacuolar degeneration) 等變化 (Suh and Checler, 2002)。

Senile plaques 主要是 $A\beta$ 的沉澱所造成，SP的數目愈多表示該病患更可能是阿滋海默症的患者，但SP在某些正常的老人或一些腦傷後的病人腦部中亦會看到，因此現在更進一步將SP區分為瀰漫性的老年斑 (diffuse plaques) 和神經炎性老年斑 (neuritic plaques)；神經炎性老年斑指的是以 amyloid 為中心，周圍有一些萎縮性的神經軸突變化，而瀰漫性的老年斑則只有單純的 amyloid 沉積。現在認為神經炎性老年斑和阿滋海默症比較有相關性，在正常老人中所見到的大都是瀰漫性老年斑 (Hardy and Higgins, 1992)。

Neurofibrillary tangles (NFT) 是一種位於神經細胞內的纖維沉積，NFT的成份主要是過度磷酸化的tau 蛋白 (hyperphosphorylated tau protein) 以雙股結構聚合而成 (paired helical filaments)，NFT本身對神經細胞具有毒性且會進一步造成神經細胞死亡。tau 蛋白是一種穩定細胞內微細小管 (microtubule) 的重要蛋白，微細小管則與細胞內養份的運輸有關，當tau被磷酸化後即喪失穩定微細小管的能力，因而使得微細小管受到破壞，進而影響細胞的正常功能。有些學者認為阿滋海默症的病變主要是由NFT在顳葉系統先開始之後再擴展到其他腦區，並以此來做為阿滋海默症的分期，可是有些阿滋海默症病人的病理變化中，NFT並不明顯，而單純以SP為主 (Braak and Braak, 1991)。

由分子生物學的觀點而言，阿滋海默症的分子生物學研究主要是由一些具有遺傳性家族的阿滋海默症病人中研究而來；目前較清楚的包括 amyloid precursor protein (APP) 基因，位於第21對染色體；presenilin 1 (PS1)，位於第14對染色體；presenilin 2 (PS2)，

位於第一對染色體。前面提到的SP中的amyloid即是由APP分解而來，APP有兩種可能的代謝途徑，一是被 α -secretase分解，則不會產生具有神經毒性的amyloid；一是被 β -secretase分解，再由 γ -secretase進一步分解成致病的A β 。APP基因上的某些突變會增加APP往 β -secretase代謝而增加A β 沉積，而PS1與PS2則被認為與 γ -secretase較有關係。APP是一種細胞膜蛋白可被三種不同的蛋白酵素 α -、 β -、 γ -secretase所分解，亦是間接造成阿滋海默症的主因；就蛋白結構而言，APP包括cystein-rich, heparin binding domain, Zn binding domain, acidic domain, KPI domain (Kunitz-type serine protease inhibitor), RERNS trophic domain, glycosylation 及 A β 、CT₂₆、CT₃₁等。APP可被 β -secretase切割成兩個部分，NH₂端為一個可溶性的游離APP (β -APPs)，而COOH端則是一個由99個胺基酸所組成的蛋白質片段(CT₉₉)；切割後的CT₉₉仍留在細胞膜上，是一個不游離的蛋白，若CT₉₉繼續被 γ -secretase分解則會進一步形成一種4 kDa的A β (造成阿滋海默症的主要蛋白)。此外，APP若被 α -secretase分解，由於其分解的部分剛好位在APP結構上的A β region (β region位在APP₆₉₅上第597到639的胺基酸上)，因此會分解產生兩個蛋白，一個為APP α s另一個為含83個胺基酸的蛋白質片段(CT₈₃)，CT₈₃若繼續被 γ -secretase分解則會形成一個不會引起阿滋海默症的蛋白質片段CT₅₇₋₅₉ (Suh and Checler, 2002)。

近年來對於阿滋海默症的研究重心皆放在A β 和A β 所產生之相關神經毒性上，且認為APP的基因突變是造成A β 在腦中增加的主要原因 (Suzuki et al., 1994)；A β 本身是APP正常生理下所產生的代謝產物 (β region位在APP₆₉₅上第597到639的胺基酸上) (Golde et al., 1992)且大多數所產生的A β 可溶於血漿或腦脊髓液中 (Seubert et al., 1992)；研究發現90%以上的A β 是由40個胺基酸所組成的蛋白片段(A β ₄₀)，只有少於10%是由42-43個胺基酸所組成的蛋白片段(A β ₄₂)；A β ₄₂比A β ₄₀較具疏水性因此A β ₄₂較易在腦中形成cerebral plaques (Iwatsubo et al., 1994)。

Amyloid蛋白中被認為與形成阿滋海默症較有關係的蛋白包括A β 和CT (APP的C端蛋白)，傳統上A β 之所以被認為與阿滋海默症有較深層的關聯性主要是因A β 的累積會造成神經傷害 (Sisodia et al., 1990)。A β 的凝集過程中主要透過cross- β pleated-sheet而組成一個被認為是造成阿滋海默症的病理結構 (Dumery et al., 2001)。事實上研究發現A β 在未凝集前對於神經細胞便已具有毒性，因此解決阿滋海默症的問題需先從減少A β 的形成著手 (McLean et al., 1999)。此外amyloid所造成的神經毒性其詳細機轉至今仍是個謎，但大致上可產生下列幾項反應包括：促使自由基大量累積、鈣離子不正常釋放、發炎反應及增加細胞內不正常的訊息傳遞作用等。自由基大量累積一直以來被認為是造成腦神經傷害導致阿滋海默症形成的重要原因之一 (Markesbery, 1997)；自由基的形成主要是透過A β 和細胞膜之間的交互作用而成，至今機轉仍不清楚。一般認為A β 可插入neuronal和glial雙層膜中，並且經由脂質過氧化(lipid peroxidation)和蛋白質氧化(protein oxidation)作用促使氧相關性的自由基生成釋放 (Varadarajan et al., 2000)；A β 所引發的自由基傷害會導致細胞的一些功能尚失，包括抑制ATPase、失去鈣離子調控能力、抑制glial細胞neuronal excitatory NMDA受體的Na⁺-dependent glutamate uptake、喪失蛋白質運輸能力、終止細胞內某些訊息傳遞作用的發生並且可以活化核轉錄因子 (nuclear transcription factor) 和引起細胞凋亡(apoptotic) 路徑。最近研究發現，A β 可透過(1) voltage-gate鈣離子通道(N和L-型通道)增加鈣離子的釋放；(2) A β 和一個選擇性的陽離子通道結合，促使鈣離子進入細胞膜；(3) 降低鎂離子與NMDA受體結合，促使鈣離子的進入；(4) 抑制鉀離子通道和Na⁺/Ca²⁺交換，增加鈣離子濃度，導致神經細胞死亡 (Suh and Checler, 2002)。此外，A β 促使神經細胞死亡的同時亦會促使其他細胞喪失原有之

功能而加速阿滋海默症病情惡化。

另外，活化microglia 和astrocytes以及引起發炎反應亦被認為和形成早期的阿滋海默症有關(Chong et al., 2001)；引起免疫和發炎反應更被認為可影響阿滋海默症的病情(Dumery et al., 2001)。因此神經性發炎的過程在阿滋海默症的病理上佔有重要地位(Calingasan et al., 2002)。有研究指出在阿滋海默症病人腦中的microglia會表現出A β 並分泌一些發炎物質包含cytokines、chemokines、growth factors、complements和其他發炎相關性物質(Lue et al., 2001)；進一步研究更發現，在A β 未凝集前已發現有prointerleukin-1 β 、interleukin-6、tumor necrosis factor- β 、monocyte chemoattractant protein-1、macrophage inflammatory peptide-1 β 、interleukin-8 和 macrophage colony-stimulating factor (Lue et al., 2001)等發炎相關物質產生；由此可知發炎反應對於神經傷害導致阿滋海默症有十分密切的關係。此外，A β 亦可活化其他訊息傳遞路徑，例如MAPK pathway (mitogen-activated protein kinase)，如A β 在海馬回神經 (hippocampal neurons) 在促使tau磷酸化時便會引發MAPK pathway (Rapoport and Ferreira, 2000)。

血小板活化是體內血管維持正常凝血生理功能的必要反應；血管受傷的結果會造成內皮細胞下層基質蛋白(如collagen)的暴露，使存在於血液中的血小板附著上去，而這是引起血小板活化的開端。與血小板活化相關的物質(如強刺激劑thrombin, collagen, von Willebrand factor和較弱的刺激劑ADP與adrenaline) 在血管受傷後會被大量的釋放出來以加速血小板活化，血小板的活化會產生一個可逆的一級結構改變並伴隨著一個藉由fibrinogen連接不同血小板且產生的不可逆二級反應，這一連串的血小板活化反應涉及arachidonic acid (AA)之代謝產物的形成並加速血小板dense granules, α -granules和lysosomes內的物質釋放(Siess, 1989)。血小板的活化反應透過AA代謝物thromboxane A₂的合成與存在於血小板顆粒中的ADP大量釋放而被正回饋的放大；調節血小板活化的這個過程是非常重要的，若調節失衡則將促使血管內大量血栓形成。APP是一種會引起阿滋海默症的transmembrane 蛋白，它被發現大量存在於血小板的 α -granule中(Li et al., 1994)；APP已被證實與阿滋海默症形成有關聯，而APP被蛋白酵素分解所釋放的A β 如前述已被認為是形成senile plaques造成阿滋海默症的主因。一個APP基因透過轉錄、轉譯的差異性可能會產生10種不同型態的APPs 蛋白 (Sandbrink et al., 1996)，如APP₆₉₅是最早在腦組織中被發現 (Tanzi et al., 1988)，而APP₇₅₁和APP₇₇₀，這兩個蛋白質的組成比APP₆₉₅多包含了一個由56個胺基酸所組成的 Kunitz-type serine protease inhibitor (KPI)，這兩種APP主要存在於血小板及其他周邊組織中 (Tanzi et al., 1988)。

血小板中的APP主要存在於 α -granule及血小板細胞膜表面，在血小板未被活化前，血液中APP濃度約低於60 pM，此暗示著在正常生理環境下APP在血漿中的濃度極低(Whyte et al., 1997)；在血小板活化後，測得血液中及血小板細胞膜表面之APP增加為原來的三倍之多 (Li et al., 1994)，同時發現血小板 α -granule中原本所儲存的大量APP明顯減少，推測應是在血小板活化同時藉由細胞骨架改變，而由 α -granule中被釋放出來(Cole et al., 1990)。在正常血小板生理濃度下(3×10^8 platelets/ml)，血小板因受到活化則可釋放出大約30 nM的APP (Van Nostrand et al., 1991)；因此在受傷的血管處會有相當高濃度的A β 及APP產生，因為此處會有大量的血小板附著在受傷的血管壁上而使血小板活化繼而釋放大量的A β 及APP。

目前對APP在血小板上的作用活性所知並不多，僅有少許的研究被提及；如在*in vivo* 和*in vitro* 實驗中發現，APP可明顯的抑制血小板凝集反應 (Henry et al., 1998)，並且認為APP之N端含cystein-rich (APP 18-194)的domain是APP抑制血小板凝集反應的主要活性位置，但是到目前為止，APP抑制血小板凝集反應的機轉仍不清楚；根據之前的研究發現，APP不會影響血小板cAMP的形成，但在高濃度下可以促進血小板內cGMP的形成

(Henry et al., 1998)；另有研究發現APP對於抑制ADP及 adrenaline所引起的血小板凝集反應具有濃度相關的依賴性。因此綜合目前的研究認為，APP抑制血小板凝集反應之機轉可能與抑制phospholipase A₂有關，以致於影響到血小板內Ca²⁺的量而抑制血小板活化(Clark et al., 1991)。由此可知，APP的釋放對於血小板凝集反應而言是一種負性回饋(negative feedback)的機制，透過此機制可抑制血小板凝集反應因而避免血栓的形成。

另一方面，如前所述Aβ主要由APP代謝而來，其中Aβ (1-39/40)被認為與血管中的amyloid較具關聯性 (Masters et al., 1985)且認為腦血管中的amyloid主要來自於血小板和周邊組織 (Chen et al., 1995)。血小板除了含有APP外亦包含有Aβ (Li et al., 1994)；如前述所述，APP儲存在血小板的α-granule中，當血小板受到刺激而被活化後，會將原本儲存於血小板α-granule中的APP釋放出來；最近的研究更進一步指出，這些被釋放出來的APP具有抑制凝血因子IXa 和XIa的功能並且可被蛋白水解酵素代謝成Aβ (Thomas et al., 1996)；另一項研究亦證實Aβ和APP可同時並存於血小板的α-granule中(Li et al., 1994)且當血小板受到如thrombin、collagen、PMA 和鈣離子通道促進劑A23187等不同刺激劑的刺激下可使Aβ於血液中的釋放量增加1.6倍，同時亦使APP釋放之量增加2.4倍 (Li et al., 1998)。此證實血小板是循環系統中Aβ和APP的主要來源，也就是說血液中90% 以上的Aβ 和APP來自於血小板，而從其他來源者只佔6%，甚至更低 (Smith and Broze, 1992; Chen et al., 1995)。另一方面，根據研究發現，Aβ 會明顯的活化或加強血小板凝集反應，而此作用剛好與APP的作用相反；Aβ在2 μM濃度下可加強ADP對血小板的凝集反應，而此作用可能與血小板細胞膜上的受體，integrin GPIa/IIa有關 (Kowalska and Badellino, 1994)；另外研究亦發現，Aβ 在血管中亦會破壞血管內膜，因而造成血管內皮細胞的傷害並產生許多自由基 (Thomas et al., 1996)。

綜合上述結果可知，Aβ 和APP對血小板凝集反應呈現完全相反的作用結果，Aβ 可加強或引發血小板凝集反應，而APP卻可以抑制此反應。雖然如此，醫學界對Aβ 及APP 如何來調控血小板的生理功能以及Aβ 及APP 對血小板的詳細作用機轉，目前尚不清楚；因此本計劃擬利用三年的時間從in vitro 到 in vivo來詳細分析及探究Aβ 及APP 對血小板的作用機轉，並利用此結果進一步分析在in vivo模式下，Aβ 及APP 在活體動物上相互調控的角色及分別所扮演的生理功能。

(二) 研究方法與實驗數據統計分析：

(1) Aβ 強化血小板凝集反應以及APP抑制血小板凝集反應的劑量-反應曲線

(a) 製備人類血小板懸浮液

將抗凝血劑acid/citrate/glucose (ACD)與志願健康者的全血以1:9 (v/v)混合，以120 g離心10分鐘。取出上層富含血小板血漿 (PRP)，加入 heparin (6.4 U/ml)，PGE₁ (0.5 μM) 於37 °C下溫浴10分鐘，再以500 g離心10分鐘，去上層液，用 Tyrode 溶液打散；最後用 Tyrode 溶液將血小板濃度調整為4.5 x 10⁸ platelets/ml。

(b) 血小板凝集反應

根據混濁度測定法，以 Lumi-aggregometer (Payton) 測定之，將已製備好之血小板懸浮液0.4 ml放入有silicone包衣的小玻璃管中，再加入適當的Tyrode溶液在37 °C小磁棒攪拌(1,200 rpm)下，加入不同濃度的Aβ 及sAPPα，反應2分鐘後再加入血小板凝集劑 (collagen, ADP, thrombin 等) 觀察並記錄加入後6分鐘血小板凝集反應之變化。由此實驗可計算出Aβ 強化血小板凝集反應以及sAPPα抑制血小板凝集反應的劑量-反應曲線

圖；再由此劑量-反應曲線圖計算出A β 強化血小板凝集反應之EC₅₀值以及sAPP α 抑制血小板凝集反應的IC₅₀值；利用這些值再進一步分析以下一系列相關的實驗。

(2) 血小板內鈣離子之測定

以3.8 % sodium citrate為抗凝血劑與健康人血1 : 9 (v/v)之比例混和，在室溫下立即以120 g離心10分鐘，所得上層液加入fura-2/AM (5 μ M) 和PGE₁ (10 μ M)，於37 °C下避光溫浴1個小時，再加入EDTA (2 mM)，並一併溫浴10分鐘，再依照製備血小板懸浮液的方法製備懸浮液；經fura-2/AM處理過之血小板懸浮液在加入不同濃度之A β 後與Ca²⁺作用產生的螢光(Ex.339 nm, Em.550 nm)以Fluorescence spectrophotometer記錄之；由此可知A β 及APP分別與血小板細胞內Ca²⁺的關係。

(3) 實驗數據統計分析：

實驗數據以實驗結果之平均值 (Mean) \pm 標準誤差 (S.E.M.) 來表示，控制組與sAPP α 或A β 組之間的比較以Student t-test作統計分析。若P < 0.05則表示有意義的差別。

(三) 結果與討論

在人類的血小板懸浮液中，sAPP α (3-15 nM)與血小板懸浮液溫浴3分鐘後，對於collagen (1 μ g/ml), ADP (20 μ M) 及AA (60 μ M) 所引發的血小板凝集反應和ATP釋放反應，均呈濃度相關的方式產生抑制作用 (Fig.s 1 & 2)。由以上結果可知：sAPP α 能以濃度相關的方式抑制由不同活化劑所引起的人類血小板凝集作用。

此外，研究又發現A β (0.5-2 μ M)與血小板懸浮液溫浴3分鐘後可加強collagen (0.5 μ g/ml)和ADP (4 μ M)所引起的血小板凝集反應和ATP釋放反應，且呈濃度相關的方式產生加強作用(Fig.s 3 & 4)。再者，當血小板受到活化劑刺激後，可藉由鈣離子內流 (influx) 或是移動 (mobilization) 而使得細胞內鈣離子濃度增加，collagen是一種很強的血小板凝集劑，具有上述的能力，進而明顯地增加細胞內鈣離子的濃度。因此本實驗以 collagen (0.5 μ g/ml) 作為血小板活化劑，當A β 以0.5-2 μ M不同濃度加入經由Fura 2-AM處理過後的人類血小板懸浮液中，均能察見明顯的加強細胞內鈣離子的移動 (Fig. 5)，其加強程度分別為34.56 \pm 20.24 %，71.9 \pm 30.33 %及 45.98 \pm 19.18 %。由此可知，A β 會加強collagen所引起的血小板細胞內鈣離子的增加。

綜合以上結果，證實在人類的血小板懸浮液中，sAPP α 能依濃度的差異來抑制由不同凝集引發劑如：collagen (1 μ g/ml)、ADP (20 μ M)及AA (60 μ M) 所引起的血小板凝集及ATP釋放反應 (Fig.s 1 & 2)。然而A β 反而可加強collagen (0.5 μ g/ml)和ADP (4 μ M)所引起的血小板凝集及ATP釋放反應；接著在外加A β 對血小板細胞內鈣離子濃度影響實驗中(Fig. 5)可清楚看出，血小板細胞內由collagen所引起鈣離子濃度的增加，亦會受到外加A β 濃度 (0.5-2 μ M) 的差異而增加；由此可知A β 和sAPP α 對血小板的作用呈現完全相反(opposite)的結果。

三、參考文獻

Braak H, and Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239–259.

Calingasan NY, Erdely HA, and Anthony AC. (2002) Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury.

- Neurobiol Aging* **23**: 31–39.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlihan H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, and Hardy J. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**: 844–846.
- Chen M, Inestrosa NC, Ross GS, and Fernandez HL. (1995) Platelets are the primary source of amyloid β -peptide in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 96–103.
- Chong YH, Sung JH, Shin SA, Chung JH, and Suh YH. (2001) Effects of the β -amyloid and carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein on the production of the tumor necrosis factor- β and matrix metalloproteinase-9 by human monocytic THP-1. *J Biol Chem* **276**: 23511–23517.
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, and Knopf JN. (1991) A novel arachidonic acid selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* **65**: 1043–1051.
- Cole GM, Galasko D, Shapiro P, and Saitoh T. (1990) Stimulated platelets release amyloid β -protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 288–295.
- Dumery L, Bourdel F, Soussan Y, Fialkowsky A, Viale S, Nicolas P, and Reboud-Ravaux M. (2001) beta-Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathol Biol* **49**: 72–85.
- Glennner GC, and Wong CW. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**: 885–890.
- Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, and Younkin SG. (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* **255**: 728–730.
- Hardy JA, and Higgins GA. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184–185.
- Henry A, Li QX, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, and Beyreuther K. (1998) Inhibition of platelet activation by the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Br J Haematol* **103**: 402–415.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, and Ihara Y. (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonal: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **13**: 45–53.
- Kowalska MA, and Badellino K. (1994) Beta-amyloid protein induces platelet aggregation and supports platelet adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1829–1835.
- Li QX, Berndt MC, Bush AI, Rumble B, Mackenzie I, Friedhuber A, Beyreuther K, and Master CL. (1994) Membrane-associated form of the β A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the human platelet and brain: surface expression on the activated human platelet. *Blood* **84**: 133–142.
- Li QX, Whyte S, Tanner JE, Evin G, Beyreuther K, and Masters CL (1998) Secretion of Alzheimer's Disease A β amyloid peptide by activated human platelets. *Lab Invest* **78**: 461–469.
- Lue LF, Rydel R, Brigham EF, Yang LB, Hampel H, Murphy GM Jr, Brachova L, Yan SD, Walker DG, Shen Y. (2001) Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* **35**: 72–79.
- Markesbery WR. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* **23**: 134–147.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald, BL, and Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4245–4249.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, and

- Masters CL. (1999) Soluble pool of A beta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annu Neurol* **46**: 860–866.
- Rapoport M, and Ferreira A. (2000) PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J Neurochem* **74**: 125–133.
- Sandbrink R, Masters CL, and Beyreuther K. (1996) APP family: alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann NY Acad Sci* **777**: 281–287.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* **359**: 325–327.
- Siess W. (1989) Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* **69**: 158–178.
- Siffert W, Siffert G, Scheid P, and Akkerman JWN. (1990) Na⁺/H⁺ exchange modulates Ca⁺² mobilization in human platelets stimulated by ADP and the thromboxane mimetic U46619. *J Biol Chem* **264**: 719–725.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, and Price DL. (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* **248**: 492–495.
- Smith RP, and Broze GT Jr. (1992) Characterization of platelet releasable forms of β-amyloid precursor proteins: The effect of thrombin. *Blood* **80**: 2252–2260.
- Suh YH, and Checler F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and α-synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* **54**: 469–525.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, and Younkin SG. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**: 1336–1340.
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa KL, Gusella JF, and Neve RL. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* **331**: 528–530.
- Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, and Mullan M. (1996) β-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* **380**: 168–171.
- Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cines DB, and Cunningham DD. (1991) Protease nexin-2/amyloid β-protein precursor in blood is a platelet-specific protein. *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 15–21.
- Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, and Butterfield AD. (2000) Alzheimer's amyloid beta peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* **130**: 184–208.
- Whyte S, Wilson N, Currie J, Malone V, Shafiq-Antonacci R, Tyler P, Derry KL, Underwood J, Li QX, and Master CL. (1997) Collection and normal levels of the amyloid precursor protein in plasma. *Ann Neurol* **41**: 121–124.

四、圖形

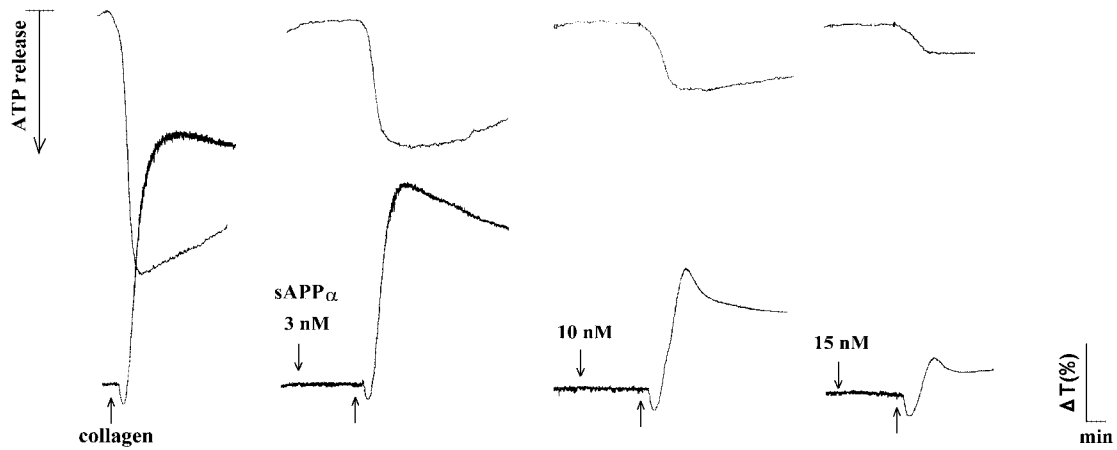


Figure1. Effect of sAPP α on collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)-induced aggregation on human platelet suspensions. Platelets were preincubated with sAPP α (3-15 nM) and stirred for 3 min, then collagen was added to trigger the aggregation (lower tracings) and ATP release (upper tracing). Luciferin-luciferase mixture (20 μl) was added 1 min before the agonist in order to measure the ATP release.

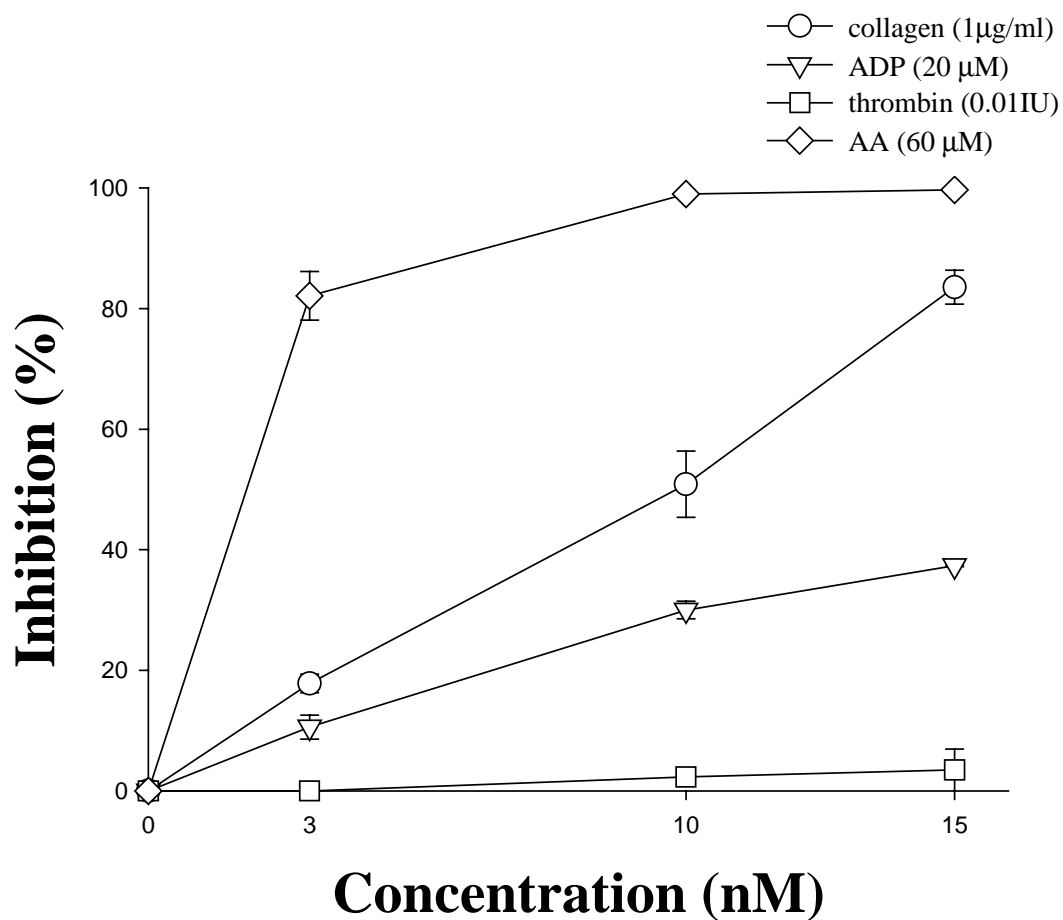


Figure 2. Concentration-inhibition curves of sAPP α on collagen (1 μ g/ml, \circ), ADP (20 μ M, ∇), thrombin (0.01 U/ml, \square), AA (60 μ M, \diamond)-induced platelet aggregation of human platelet suspension. Human Platelet suspensions were preincubated with various concentration of sAPP α (3-15 nM) at 37 $^{\circ}$ C for 3 min, and agonists were then added to trigger aggregation. Data are presented as percentage of the control (means \pm S.E.M., n=4).

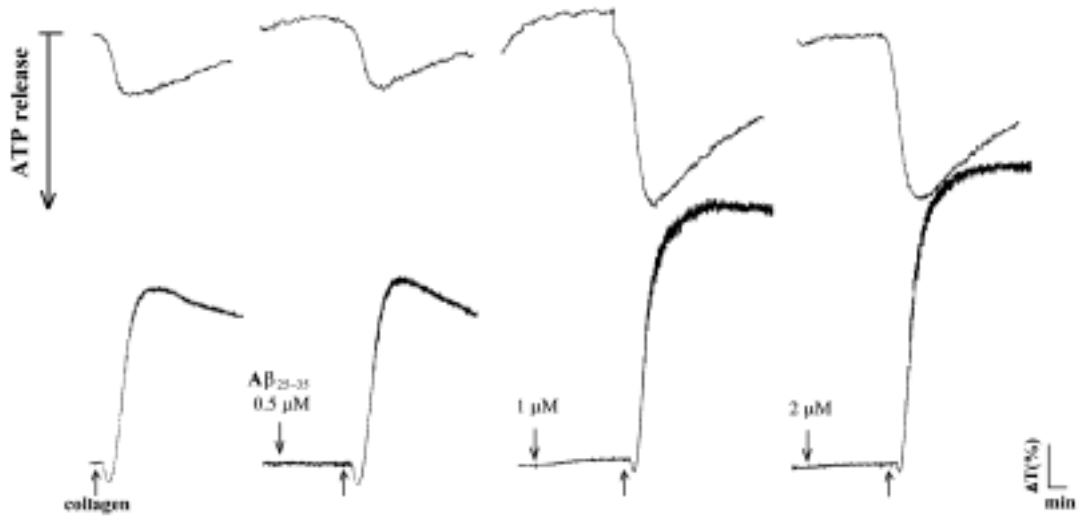


Figure 3. Effect of A β on collagen (0.5 μ g/ml)-induced aggregation on human platelet suspensions. Platelets were preincubated with A β (0.5-2 μ M) and stirred for 3 min, then collagen was added to trigger the aggregation (lower tracings) and ATP release (upper tracing). Luciferin-luciferase mixture (20 μ l) was added 1 min before the agonist in order to measure the ATP release reaction.

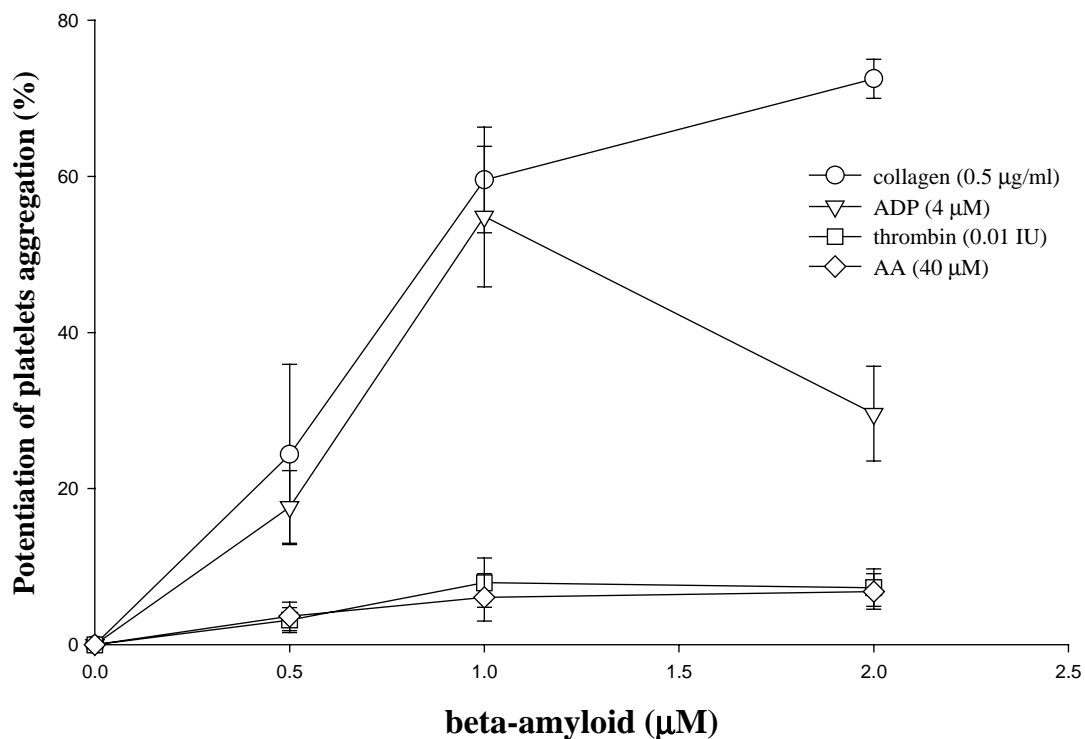


Figure 4. Concentration-inhibition curves of A β on collagen (0.5 μ g/ml, \circ), ADP (4 μ M, ∇), thrombin (0.01 U/ml, \square), AA (40 μ M, \diamond)-induced platelet aggregation of human platelet suspension. Human Platelet suspensions were preincubated with various concentration of A β (0.5- 2 μ M) at 37 $^{\circ}$ C for 3 min, and agonists were then added to trigger aggregation. Data are presented as percentage of the control (means \pm S.E.M., n=4).

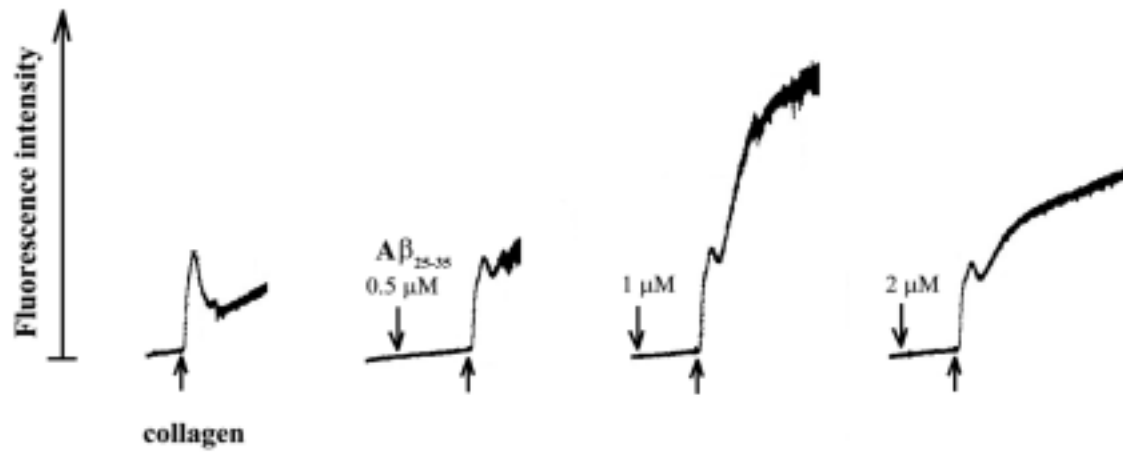


Figure 5. Effect of A β on collagen-induced intracellular Ca²⁺ mobilization of Fura 2-AM loaded human platelets. Platelet suspensions were incubated with Fura 2-AM (5 μ M) at 37 for 60 min, followed by the addition of collagen (0.5 μ g/ml) in the absence or presence of A β (0.5-2 μ M), which was added 3 min prior to the addition of collagen (0.5 μ g/ml).