2018 年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　080002

參展科別　生物化學

作品名稱　創新自噬作用調節劑篩選平台與其在阿茲海默症上的應用

得獎獎項　大會獎：四等獎

就讀學校　臺北市私立復興實驗高級中學(附設國中)

指導教師　馬瑪宣

作者姓名　謝涵婕、謝涵淳

關鍵詞　自噬作用(Autophagy)、天然物(Natural Product)、阿茲海默症(Alzheimer's Disease)

作者簡介

我是謝涵婕，目前就讀於復興實中高二，從小我就很喜歡問各式各樣的問題。很高興上了高中之後，受到很多人的幫助，讓我能在實驗室動手做實驗。在實驗室的日子很令人難忘，像是第一次看見細胞時的感動，還有各種有趣的回憶等等。雖然做實驗常常失敗，但是每次的失敗都讓我有所成長。希望未來還可以繼續在科學的這條路上努力，探索大自然的奧妙。一路走來要感謝的人實在是太多了，謝謝您們用心的陪伴與指導。

我是謝涵淳，目前就讀於復興實中高二，從小我就是個好奇寶寶，喜愛探索大自然的奧妙。上了高中之後，我和雙胞胎姊姊一起在實驗室動手做實驗，從第一次讀 paper，到決定研究問題，每個過程都讓我印象深刻。在實驗室的日子很我得到了許多寶貴的經驗，還有各種酸甜酷辣的回憶。希望未來可以繼續在生物這條路上努力，謝謝這些日子老師同學還有實驗室的大家的幫忙，很高興能夠遇見您們。

摘要

腦部中的不正常蛋白質堆積常常是造成神經退化性疾病主要原因之一，細胞自噬作用能夠清除細胞內的不正常蛋白質堆積，幫助神經性退化疾病如阿茲海默症的治療。因此我們期望能找出能促進自噬作用的天然物，以其作為開發阿茲海默症的藥物的基礎。本研究 1.利用冷光酶接合自噬作用指標蛋白 P62，設計出創新的自噬作用調節劑篩選系統篩。此篩選系統能夠篩選促進自噬作用的天然物，大大提升了自噬作用調節劑的篩選效率。本實驗初步測試了 100 項天然物，並從中篩選出 19 項能夠促進自噬作用的天然物。2. 再以西方墨點法測試其中五項天然物在阿茲海默細胞模型上的表現，發現了天然物唐川丁與開普鹼，能夠藉由促進自噬作用降低細胞模型上影響阿茲海默症的蛋白質。未來我們希望能夠了解唐川丁與開普鹼在調控細胞自噬作用中所扮演的角色，幫助阿茲海默症的藥物開發。

Abstract

Abnormal protein aggregation has been proved to be one of the primary cause of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer’ s disease (AD). Autophagy is the metabolic process that takes place in the cell to clear the misfolded protein and damaged organelles. Previous researches have shown that activation of autophagy can be a potential solution to AD. Our research aims to find the autophagy inducers through the screening of a natural product library by using a p62-Renilla luciferase reporter assay system. Among 100 purified natural products examined, we have identified 19 natural products that can induce autophagy. We further demonstrate that natural products #241 and #248 can significantly promote the autophagy-mediated clearance of the 99-amino acid C-terminal fragment of amyloid precursor protein (APP-C99). Our findings pave the way for the development of novel therapeutics of AD.

壹、前言

（一）研究動機

神經性退化疾病如阿茲海默症至今仍未有有效的解決方案，然而每年患病的人數依然居高不下。腦部中異常的蛋白質堆積是造成神經性退化疾病主要原因（1），因此我們希望利用細胞自噬作用清除腦部中的異常堆積蛋白質，作為阿茲海默症藥物開發的基礎。近年來有許多中草藥都被證實能夠幫助促進自噬作用(3)，因此我們希望能夠從天然物著手，找尋能夠促進自噬作用的天然物，作為治療阿茲海默症的潛在藥物。然而以往自噬作用的調節劑皆需已西方墨點法篩選而來，耗時費力，因此我們希望透過設計創新的自噬作用篩選平台，提升自噬作用調節劑篩選效率，進一步幫助改善神經退化性疾病。

（二）研究目的及研究問題

1. 以自噬作用指標蛋白為基礎，設計自噬作用調節劑篩選平台
2. 以自噬作用調節劑篩選平台篩選出促進自噬作用的天然物
3. 透過噬作用調節劑篩選平台篩選而得促進自噬作用的天然物，清除細胞內的不正常蛋白質堆積，改善阿茲海默症

（三）研究背景介紹

1. 阿茲海默症

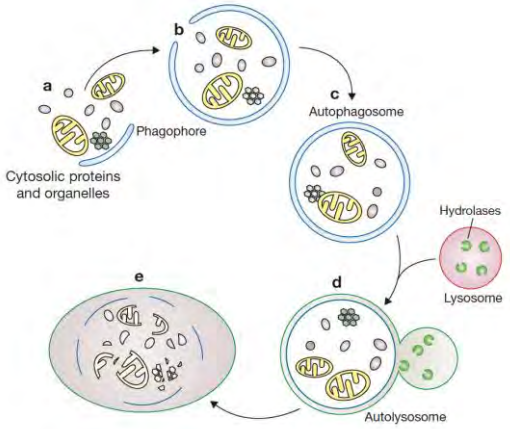
阿茲海默症是一種神經退化性疾病，因其常伴隨其他老化現象一同出現，又被稱作老年癡呆症，目前仍無法被根治。關於阿茲海默症的成因眾說紛紜，其中包含了先天遺傳的因素與後天環境的刺激。但多數的學者認為造成阿茲海默症的主要原因為蛋白質在腦部沈積，而造成腦部神經細胞的死亡，導致認知功能下降。 (1)

2. 阿茲海默症的病因

病理學家在阿茲海默症的患者的腦部可以看見類澱粉蛋白質沈積與神經糾結的現象。前類澱粉蛋白為一高度保守的細胞膜內嵌蛋白，常見於神經細胞的突觸周圍，但功能仍然不詳。經過前人的研究過度磷酸化的 tau 蛋白為導致神經糾結的原因，而類澱粉蛋白的蛋白質沈積則是由 Abeta 蛋白堆積而成。近二十五來，學界在阿茲海默症的研究導向由類澱粉蛋白假說所主導，因經實驗驗證 tau 為 Abeta 蛋白水解後的下游產物。此假說認為人類腦部中的類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein; APP)會被蛋白質水解酶如 beta-secretases 和 gamma-secretases 在細胞膜外側和內側中切除，釋放出長度為 40 個或 42 個胺基酸之胜肽（又稱 Aβ40 或 Aβ42），Aβ 單體進而糾結、聚集而形成類澱粉斑塊（amyloid plaques）(1)。

3. 自噬作用

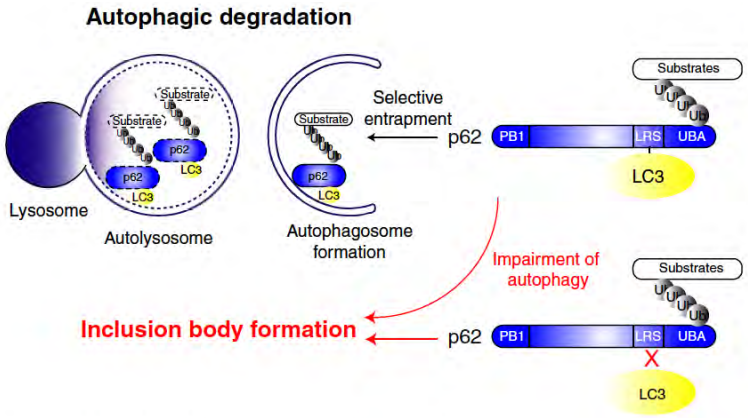
細胞自噬作用為細胞內一生理作用，主要功能為分解細胞內的老舊蛋白質，代謝失去作用的胞器與入侵的微生物。除了做為細胞一代謝途徑，當細胞感受到生存壓力如缺乏氧器或是養分不足等訊息時，也會表現細胞自噬作用，以確保細胞的功能正常運作。當細胞接受到促進自噬作用的訊息後：首先細胞內的脂質與蛋白質會形成彎月狀的雙層囊泡構造即吞噬泡(phagomore)。吞噬泡會一邊延長其膜，一邊包裹待分解物質，如：老廢胞器，最終閉合形成自噬體(autophagosome)。自噬體接著會與細胞內的另一含有多種水解酵素的胞器溶體結合，形成自噬溶小體(autolysosome)，並藉由溶體內的水解酵素將蛋白質分解成如胺基酸等小分子，以便回收再利用。(2)



圖（1）自噬體形成示意圖 (取自 Nat Cell Biol. 2007;9(10):1102-9.)

4. 自噬作用與 lc3 螢光標示機制

自噬作用的過程中有許多蛋白質參與在其調控機制。其中平常位於細胞質中的 Microtub μle-associated proteins 1A/1B light chain 3 (又稱 LC3)這個蛋白質常被作為自噬作用活化的螢光標記。當細胞自噬作用活化時，LC3 會與脂質 phosphatidyl-ethanolamine 結合形成 LC3-II。LC3-II 會進而鑲嵌於吞噬泡的膜上，幫助膜結構的延展(圖（2）)，因此 LC3-II 在細泡內的生成量可作為為自噬作用的活化指標。 (3)

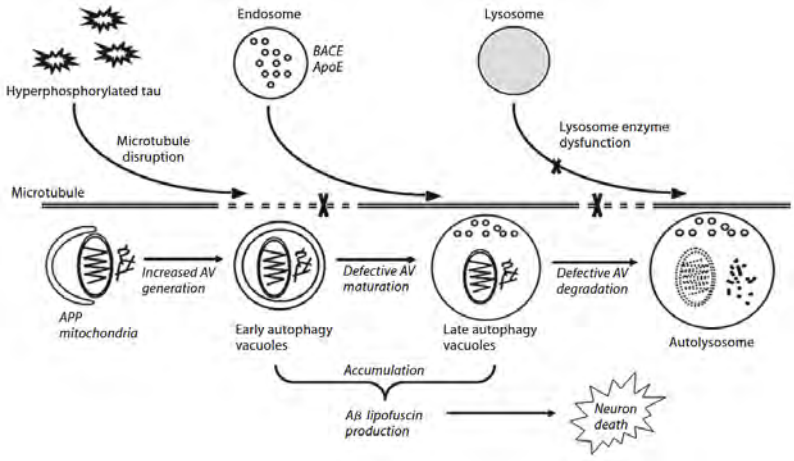


圖（2）自噬作用標記蛋白作用圖 (取自 J. Biol. Chem., 283: 22847-22857, 2008.)

5. 自噬作用與阿茲海默症

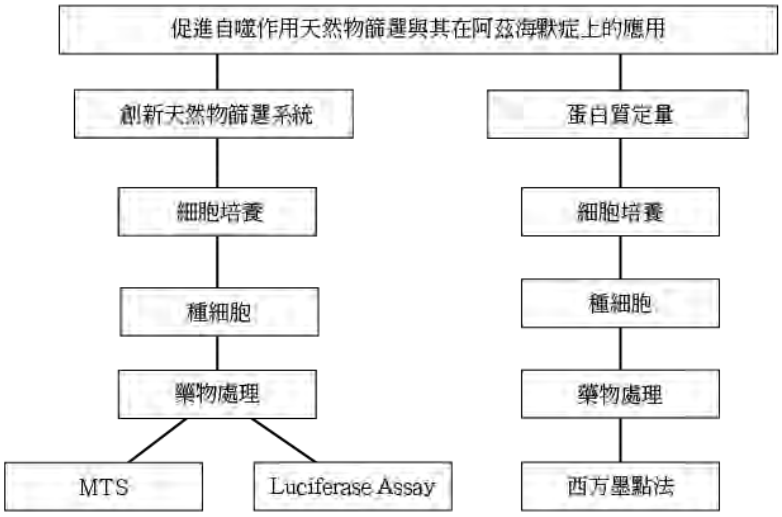
前人的研究指出自噬作用除了負責細胞的代謝作用外，也負責調控許多細胞的生理功

能，例如胚胎發育、癌症治療與神經退化等(7)。阿茲海默病患中腦袋中的斑塊是由 A-beta 蛋白質的不正常累積，而細胞自噬作用則能將細胞內異常與過多的蛋白質分解和再利用(圖（3）)，因此細胞自噬作用與阿茲海默症彼此之間可能有高度的關聯。有臨床研究報告指出，當小鼠腦部神經細胞的自噬作用功能被剔除後，細胞質會出現不正常的蛋白質累積，導致神經細胞退化，最終死亡。另有報告指出阿茲海默症的患者的腦袋中常有不正常的自噬體的累積，並且其會聚集在大腦神經元周圍。 (4)



圖（3）自噬作與阿茲海默症 (取自 Neurodegenerative Dis., 7: 265-271, 2010)

（四）總實驗流程圖



圖（4）總實驗流程圖

貳、研究設備及器材

（一）細胞株介紹

1. HEK293-p62：為 HEK293(人體腎臟胚胎細胞)，經質體表現處理後能表現 p62 蛋白質並接合 Renilla Luciferase(冷光酶)，作為自噬作用活化標記。細胞由實驗室提供，本實驗已繼代培養的方式維繫細胞株。
2. CCNY：為 HEK293 人體腎臟胚胎細胞，經質體表現處理後能表現阿茲海默症的前趨蛋白質 CFP-C99 和作為細胞生理作用觀測指標的的 YFP-NΔE (Notch)，能作為測試阿茲海默天然物的細胞模型。細胞由實驗室提供，本實驗已繼代培養的方式維繫細胞株。

（二）基本器材

培養皿、CO_2 培養箱、微量分注器(p1000, p200,p20,p1)、15 mL 離心管、50 mL 離心管、微量離心管、tip、96 孔透明細胞盤、96 孔白色細胞盤、玻璃管、顯微鏡、計數器、6 孔細胞盤、46°C、-206°C、-806°C 冰箱、八爪(不同體積)、PVDF membrane (pore size: 2.2mm)、烘箱

（三）化學天然物

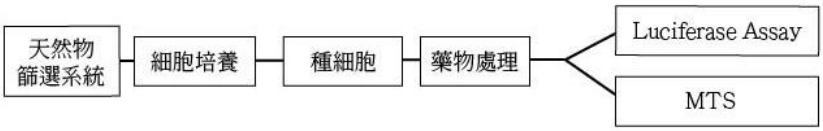
Selleckchem 公司天然物資源庫、MTS Buffer、luciferase Buffer、RIPA Buffer、DMEM FBS-Zeocin、BCA、Gel Chemical、甲醇、DMSO、3MA、Rapamysin、dye、ECL reagent、primary antibody、secondary antibody

（四）儀器與軟體

Bio-Rad Model 680 儀器、Microplate manager 軟體、Victor Light Luminescence Counter 儀器、Victor Light Luminescence user 軟體、離心機、Softmax Pro 7.0.2、UVP 儀器、UVP 軟體、ImageJ、Microsoft office Excel、Microsoft office word、Microsoft office Power Point、Adobe Illustrator、Adobe Photoshop

參、研究過程及方法

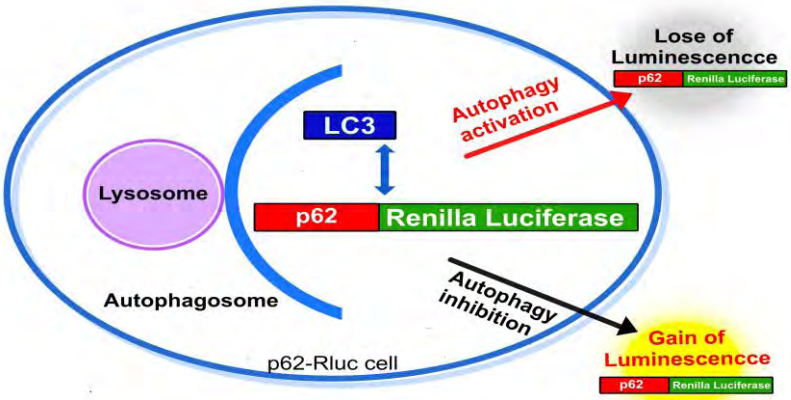
（一）自噬作用調節劑篩選研究流程



圖（5）p62 冷光篩選平台研究流程圖

首創 p62 冷光篩選平台原理說明

以往自噬作用的調節劑的篩選需使用西方墨點法，耗時費力。因此我們以自噬作用標記蛋白 p62 為基準，設計出一套新的自噬作用調節劑的篩選平台，提升自噬作用篩選效率，平均來說三天能篩選 20 種天然物。p62 蛋白是自噬作用的受體，在正常細胞內 p62 會被自噬作用所分解。將 p62 接上冷光酶 Renilla Luciferase，再利用 Victor Light Luminescence Counter 儀器讀取冷光值後，能偵測細胞內 p62 的含量，作為自噬作用活化與否的指標。若天然物能夠促進自噬作用則 p62 值下降，反之 p62 值則會上升。再將 p62 值除以細胞增殖量後，便能得出經天然物處理後，細胞內的 p62 值的變化，與自噬作用被活化的程度。



圖（6）P62 冷光篩選系統原理圖

（一）HEK- p62 細胞株培養

配置培養液：DMEM/10% FBS (含 Zeocin (100 mg/ mL))

A. 配置 DMEM

1. 2 L TC bottle 裝入 2L d_2H_2O 放到 stir machine 上。
2. 兩包 DMEM powder 加入 7.4 g $NaHCO_3$
3. DMEM powder 倒入 2 L TC bottle 混勻
4. 將配置溶液 pH 調整到 7.2~7.4
5. 分裝 450 mL DMEM 置 500 mL 滅菌血清瓶後備用

B. 配置 FBS

1. 500 mL FBS 於配置 DMEM/10% FBS 培養液兩天前解凍
2. 56 ℃ 水浴 30 mins，冰水浴 5 mins
3. 分裝後備用

C. 配置 DMEM/10% FBS

1. 450 mL DMEM 加入 FBS (50 mL) /PS (5 mL)
2. 配置完成的 DMEM/10% FBS 培養液於 4℃冰箱保存備用
3. Zeocin (100 mg/ mL)

細胞繼代培養程序

細胞培養液：500 mL of DMEM/10% FBS-Zeocin (100 mg/ mL)

（二）細胞繼代培養

因實驗室原先已有培養人類腎臟胚胎細胞 HEK- p62，因此本實驗變直接取該細胞株進行繼代培養。將人類腎臟胚胎細胞 HEK-P62 以 DMEM/10% FBS-Zeocin 細胞培養液培養於 10cm 培養皿中，並放入培養箱以 37 ˚C、5%二氧化碳培養。通常約為三天的時間後，細胞會長至八分滿時，此時便進行繼代培養。首先以真空幫浦吸除培養皿原先內

的 DMEM/10% FBS-Zeocin 培養液。再以 5 mL phosphate buffered saline (PBS) 清洗含有細胞的培養皿，接著吸去 PBS，加入 2 mL trypsin 以其分解附著於細胞與培養皿之間的蛋白，確認 trypsin 均勻覆蓋細胞後將其吸除。此時輕輕拍打培養皿使細胞與培養皿壁分離，待細胞脫離培養皿壁後，以微量分注器（micropipette）抽吸 2 mL 的 DMEM/10% FBS-Zeocin 細胞培養液將細胞打散，後放入 15 mL 試管。取一新的培養皿，加入 10 mL DMEM/10% FBS-Zeocin 細胞培養液與 700 μL 的細胞液，放入 37 °C、5 %二氧化碳培養箱中培養，三天後可滿盤，再重複上述繼代培養序，維繫細胞株

（三）HEK-P62 細胞株 P62 冷光天然物篩選平台

A. <第一天>種細胞

以真空幫浦吸除培養皿原先內的 DMEM/10% FBS-Zeocin 培養液。再以 5 mL PBS 清洗含有細胞的培養皿，接著吸去 PBS，加入 2 mL trypsin 以其分解附著於細胞與培養皿之間的蛋白，確認 trypsin 均勻覆蓋細胞後將其吸除。此時輕輕拍打培養皿使細胞與培養皿壁分離，待細胞脫離培養皿壁後，以微量分注器（micropipette）抽吸 2 mL 的 DMEM/10% FBS-Zeocin 細胞培養液將細胞打散，後放入 15 mL 試管。在 96 孔細胞盤中，外圍 36 格加入 100 μL PBS 防止蒸發，扣除外圍一圈，每個孔加入 100 μL (3*104 個細胞)的細胞液體，在 CO_2 培養中培養約 24 小時。共需準備兩個 96 孔細胞盤，一個是給用冷光偵測 P62 值的白盤，另一個是給 MTS 細胞增殖與毒性檢測的透明盤。

B. <第二天>天然物測試

96 孔細胞盤中，含有細胞的 72 格，進行三重複的天然物處理。控制組中分別加入模擬未處理情況時的 DMSO，促進自噬作用的 Rapamysin 與抑制自噬作用的 3MA，其餘格子則以三格為一組加入待側天然物，進行 24 小時反應。天然物配置方法與操作步驟如下：

1. 將各樣本按照下列比例配製成 1000 μl 的溶液，至於微量離心管中

I. Rapamycin: 1000 μl DMEM-FBS-Z+ 2 μl 1/10x of STOCK (2 mg/mL).

II. 3-MA: 900 μl DMEM-FBS-Z+ 100 μl 3-MA (50 mM).

III. 一般天然物: 1000 μl DMEM-FBS-Zeozin Medius+ 2 μl compounds (10 mM).

2. 將微量離心管中的樣本轉移至一新的 96 孔透明盤中，每種天然物至於三格，每格分別抽取 250 μl 的樣本

3. 取已含細胞的 96 孔細胞白盤與 96 孔細胞透明盤，以三重複的方式，從天然物盤中每格加入 100 μl 天然物樣本，進行 24 小時的反應

C. <第三天>MTS 細胞增殖與毒性檢測測試與冷光檢測

1. MTS 細胞存活率測試

MTS 為一化學藥劑，其與粒線體內的 NADPH 去氫酶反應後，會被還原生成可溶於細胞培養液中的紫色 formazan 染劑。且因只有存活的細胞含有此酵素能與其反應，因此透過讀取 490 nm 吸收光定量 formazan 染劑，以比色的方式，可以知道細胞的數量以觀察細胞增生(proliferation)的情況。實驗操作步驟如下：

I. 96 孔透明盤每個培養格內加入 10 μL cell tilter 96 溶液

II. 於 37℃反應 1 小時，至細胞培養液變色

III. 以 Bio-Rad 儀器於 490 nm 的波長測吸光值

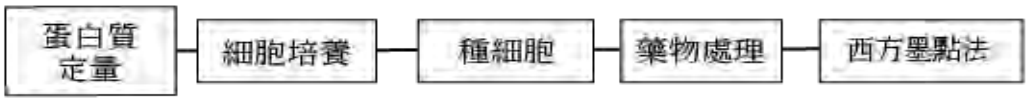
2. P62 冷光檢測測試

I. 從培養想中取出 24 小時天然物反應後的 96 孔白盤

II. 將 24 小時天然物反應後的 96 孔白盤內的液體倒出

III. 將此白盤中每個培養格加入 100 μl 的 Renilla luciferase reagent

IV. 以 Victor Light Luminescence Counter 儀器於 490 nm 的波長測吸光值



圖（7）西方墨點法天然物測試流程圖

（四）CCNY 細胞株培養

配置培養液：DMEM/10% FBS (含 Zeocin (100 mg/ mL))

A. 依先前步驟配置 DMEM

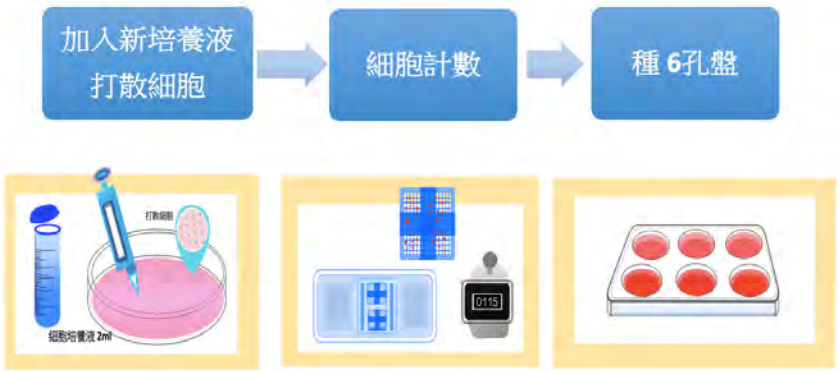
B. 依先前步驟配置 FBS

C. 依先前步驟配置 DMEM/10% FBS

細胞繼代培養程序

細胞培養液：500 mL of DMEM/10% FBS-Zeocin (100 mg/ mL)

以真空幫浦吸除培養皿原先內的 DMEM/10% FBS-Zeocin 培養液。再以 5 mL PBS 清洗含有細胞的培養皿，接著吸去 PBS，加入 2 mL trypsin 以其分解附著於細胞與培養皿之間的蛋白，確認 trypsin 均勻覆蓋細胞後將其吸除。此時輕輕拍打培養皿使細胞與培養皿壁分離，待細胞脫離培養皿壁後，以微量分注器（micropipette）抽吸 2 mL 的 DMEM/10% FBS-Zeocin 細胞培養液將細胞打散，後放入 15 mL 試管。在 96 孔細胞盤中，外圍 36 格加入 100 μL PBS 防止蒸發，扣除外圍一圈，每個孔加入 100 μL (3*104 個細胞)的細胞液體，在 CO_2 培養中培養約 24 小時。共需準備兩個 96 孔細胞盤，一個是給 Luciferase Assay 的白盤，另一個是給 MTS 細胞增殖與毒性檢測的透明盤。



（五）CCNY 細胞西方墨點法

1. 細胞蛋白質取樣(Protein Extraction)

將且已經以天然物處理過後且含有細胞的 6 孔細胞盤，以真空幫浦移除培養液，並在每格培養格中加 1 mL 的 1X PBS，以微量分注器用抽吸的方式打散細胞。並分別吸取將每格培養皿中的液體，收集至 1.5 mL 的微量離心管(eppendorf) 中。各微量離心管以 6,000 rpm, 4℃,離心 5 分鐘。離心後再以真空幫浦抽走管內的上清液，再加入 70 μl 的 RIPA lysis buffer。各微量離心管再以 13,200 rpm, 4℃,離心 15 分鐘。離心後，收集各微量離心管內的上清液，至另外新準備 1.5 mL 的微量離心管中放入-80℃的冰箱中備用。

2. 蛋白質定量(Protein Quantification)

BCA (Bicinchoninic Acid)試劑使蛋白質對銅離子進行還原反應，並生成紫色產物。其產物的量與顏色深淺可以吸光值測定，並可顯現待測蛋白質的濃度。 吸光值越高則蛋白質濃度越高。取一 BCA 專用的 96 孔盤，每格有 10 μl 的樣本(sample)以二重複法計算樣本蛋白質濃度，且以不同濃度牛血清蛋白(BSA)溶液作為標準尺標。 由於蛋白質樣本濃度同常會高於尺標，因此以 d2H_2O 先將樣本十倍稀釋(1 μl protein lysate: 9 μl d_2H_2O)。每格再加入 200 μl BCA 反應劑(體積比為 Reagent A：Reagent B=50：1)。置於 37℃烘箱反應 30 分鐘後，以 Bio-Rad 測量 562nm 吸光質，依據標準尺標計算樣本的蛋白質濃度，並配置蛋白質電泳樣本。

3. 蛋白質電泳膠體配置

蛋白質電泳膠體分為上層膠體(stacking gel)與下層膠體 separating gel。首先先配置下層膠體，下層膠體依樣本蛋白質分子大小不同，而會需要不同的濃度。本實驗需使用 10%與 15%的下層膠體，配方如下:

製備 10 mL 的 15%下層膠體一片需混合 2.5 mL 的 d_2H_2O、2.5 mL 的 Tris-Cl/SDS pH8.8、5 mL 的 acrylamide、50 μl 的 10%ammonium pers μlfate、 10 μl 的 TEMED。

製備 10 mL 的 10%下層膠體一片需混合 4.17 mL 的 d_2H_2O、2.5 mL 的 Tris-Cl/SDS pH8.8、3.33 mL 的 acrylamide、50 μl 的 10%ammonium pers μlfate、 10 μl 的 TEMED。

下層膠體配置完成後，注入玻璃模板，上方以 95%的酒精壓制，是表面平坦，並放置一小時等待膠體凝固。同時配置 4%上層膠體，配方如下:

製備 5 mL 的 4%上層膠體一片需混合 3.05 mL 的 d_2H_2O、1,25 mL 的 Tris-Cl/SDS pH6.8、650 μL 的 acrylamide、25 μl 的 10%ammonium pers μlfate、5 μl 的 TEMED。

待下層膠體凝固後，倒出酒精，並將上層膠體注入玻璃模板，放入尺梳等待至膠體凝固即可取出。

4. 蛋白質電泳

架設電泳裝置，將電永膠片固定於電泳槽中，並注入電泳緩衝液(running buffer)。電泳緩衝液配置如下：

每公升水溶液中含有, 14.4g 的 Glysine、 2.9g 的 Tris base 和 1g 的 SDS

取定量的蛋白質樣本（視實驗不同通常為 30 μg/15 μl 的蛋白質樣本），注入膠片的凹槽中，且最左與最右的兩槽中需注入 marker，以 300mA，120V 進行電泳約兩小時。

5. 膠片轉印 (Transferring)

將 PVDF Membrane 以甲醇活化後浸於 1x transfer buffer 中。

1xTransfer buffer 配置如下：

將 10 mL 的 25xTransfer buffer (每公升水溶液中含有 190 mL 的 d_2H_2O、 36.4g 的 Tris base 與 180g 的 Glysine) 與 200 mL 的甲醇混合備用，加水至 1000 mL。

另外每跑一片膠需準備六片海綿與三張濾紙，將其浸濕在 1xTransfer buffer，確定無氣泡後，以「海綿-濾紙-電泳膠片-PVDF Membrane-濾紙兩張-海綿五片」的順序放置在轉印槽中。轉印槽中以 1xTransfer buffer 填滿，置於一水桶中。水桶中需填滿冰塊和水，避免實驗裝置過熱，以 300mA，120V 進行電泳約一個半小時，使膠片上的蛋白質轉印至 PVDF Membrane 上。

6. 免疫轉漬

將完成轉印的 PVDF Membrane 放入小盒子中注入 5% blocking buffer 搖晃與浸泡 30 分鐘。5%blocking buffer 方法如下：50 mL 的 Blocking Buffer 需要將 50 mL 的 TBST 與 2.5g 的脫脂奶粉混勻備用再以 1：5000 的比例加入適當的一級抗體，放入 4℃的冰箱中，搖晃置過夜。本實驗所需的一級抗體染 GAPDH、 LC3、P62、GFP 隔日從冰箱中取出放有 PVDF Membrane 的容器倒掉內有的 blocking buffer 以 10 mL 的 TBST 清洗 10 分鍾，倒掉 TBST 在重複上述步驟，直到清洗三次完畢。再加入所需的二級抗體：以小鼠之抗體染 GAPDH、LC3、GFP 以兔子之抗體染 P62。以 40rpm 搖晃 30 分鐘後，再以 10 mL 的 TBST 以上述步驟清洗 PVDF Membrane 三次，即可準備以 ECL (Enhanced Chemiluminesceense)呈色。1：1 混合 ECL Reagent buffer A 與 ECL Reagent buffer B 後，均勻地將此混合試劑噴灑於 PVDF Membrane，使用 UVP 儀器偵測冷光，即可照像存檔。 最後以 Image J 軟體定量照片上的蛋白質帶，以便後續分析與繪製圖表。

肆、研究結果與討論

（一）p62 冷光篩選系統前言

1. 冷光篩選數值處理方式與意義說明

A. p62 冷光篩選-初步自噬作用活化指標

- Luciferase p62 數值意義:

p62 為自噬作用活化反應的指標。當自噬作用被促進時，細胞內的 p62 應被自噬作用分解，導致 p62 的值下降，反之 p62 的值上升，則代表自噬作用有被抑制的可能。但此數值的表現量受天然物處理後細胞生長量變化的影響。

- Luciferase p62 數值分析方式:

我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過冷光篩選系統定量 p62 表現量。再將經待測天然物處理細胞的 p62 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 p62 值原始數據進行比較。經 DMSO 處理的細胞的 p62 值數據應為 1.00。

$$Normalized\ \ p62\ \ Value = \frac{\text{經待測天然物處理的細胞的}p62\text{ 值}}{\text{經}DMSO\text{處理的細胞的}p62\text{ 值}}$$

B. MTS-細胞增殖與毒性檢測

- MTS 數值意義:

MTS 數值為活細胞的數量，用以觀察細胞增生(proliferation)的情況。當細胞增生時，活細胞數量上升，MTS 數值也會跟著上升。反之當細胞死亡時，則活細胞數量下降，MTS 數值也會跟著下降。MTS 數值可受天然物處理後細胞生長量變化的影響，以顯示細胞對此天然物的耐受性。

- MTS 數值分析方式:

我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過 MTS Assay 觀測活細胞數量。再將經待測天然物處理的細胞的 MTS Assay 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 MTS Assay 值原始數據進行比較。經 DMSO 處理的細胞的 MTS Assay 值數據應為

1.00。

$$Normalized\ \ \text{MTS}\ Value = \frac{\text{經待測天然物處理的細胞的 MTS 值}}{\text{經}DMSO\text{處理的細胞的 MTS 值}}$$

C. p62 數值/MTS -自噬作用活化指標

- p62 數值/MTS 數值:

因 p62 數值的表現量受天然物處理後細胞生長量變化的影響。換言之 p62 數值上升有可能是因為單純細胞增生，所以整體表現量增加，而非代表細胞自噬作用被促進。因此須將 p62 數值與 MTS 數值相除，才能觀察待測天然物對細胞自噬作用的影響。

- p62 數值/MTS 數值:

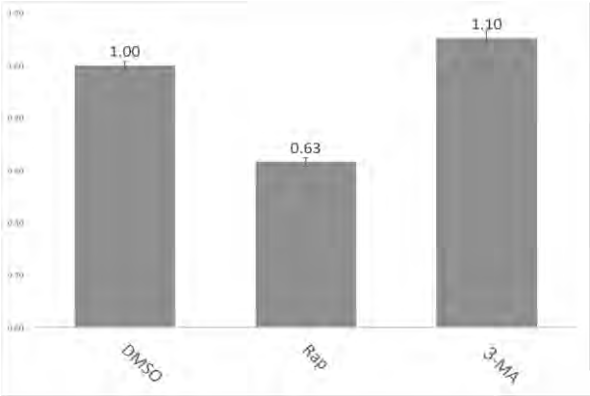
我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過 Normalized p62 數值/Normalized MTS 數值觀測觀察待測天然物對細胞自噬作用的影響。將經待測天然物處理的細胞的 Normalized p62 /Normalized MTS 數值進行比較。DMSO 處理的細胞的 Normalized p62 /Normalized MTS 數值數值數據應為 1.00。

$$Normalized\ \ \text{p62}\ /Normalized\text{MTS 數值} = \frac{\text{p62 Value}\ Normalized\ \text{With Control}}{\text{MTS Value}\ Normalized\ \text{With Control}}$$

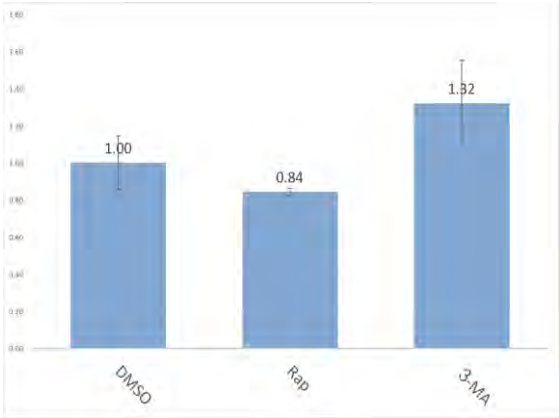
2. p62 冷光篩選平台控制組數值意義說明

A. p62 冷光篩選平台控制組數值

表（1）控制組 24hr 藥物處理 p62 數值



表（2）控制組 24hr 藥物處理 p62/MTS 數值



B.　P62 冷光篩選平台控制組意義說明

對照組處理天然物	代表意義	數值表現意義
DMSO	正常細胞	控制組
Rapamycin	自噬作用被促進的細胞	處理後的 p62 數值低於與代表正常細胞 DMSO 數值，代表示自噬作用有被活化
3MA	自噬作用被抑制的細胞	處理後的 p62 數值高於與代表正常細胞 DMSO 數值，代表自噬作用被抑制。

數據觀測意義整理：

前提：p62 的變化量為自噬作用反應被活化與抑制的指標

- 若天然物**促進**自噬作用則：P62 值**下降**
- 若天然物**抑制**自噬作用則：P62 值**上升**

（二）p62 冷光篩選系統結果

1.　p62 冷光篩選系統自噬作用促進劑篩選結果

經過篩選我們從天然物資源庫中的 100 種天然物內篩選出 19 種天然物是有使細胞內的 p62 數值下降的。結果如下，並且我們針對各天然物進行了下列的的討論。

2.　天然物篩選平台結果討論

註：本研究藥物因涉及專利申請問題，皆以代號稱之

表（3）天然物篩選平台促進自噬作用天然物結果

軟質素是一種天然脂溶性醌類化合物，可以幫助光合作用的電子傳遞鍊傳遞電子。單看 Luciferase Assay 中的數據來看，軟質素與 DMSO 對照組來看，Luciferase p62 的冷光訊號值為 0.81，其 MTS 值下降至 0.83。整體來說 p62 和 MTS 兩數值相除 p62/MTS 的值為 0.97，平均來說細胞內的 p62 量有稍微下降。自噬作用沒有明顯的被促進，因為 p62 表現量與細胞存活率兩者下降比率接近。

德賓素為中草藥清黛中的一成分，且具有抑制 cyclin-dependent kinase(CDKs)的作用。在我們的實驗中看到，在 Luciferase p62 Assay 中，德賓素 與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.74，且其 MTS 值下降至 0.79，細胞有死亡趨勢，顯現此 德賓素濃度下不利於細胞生長。整體來說 Luciferase 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.96，因為 p62 表現量與細胞存活率兩者下降比率接近。 以我們的篩選機制初步來說德賓素對於促進細胞自噬作用並不明顯，但其已被證實具有促進細胞自噬作用的效果，我們認為這是因為德賓素對細胞自噬作用的影響會受濃度的影響。

柏橋素是一種可在多種植物如黃豆、花生等等中被發現的植物化學成分。單看 Luciferase Assay 中的數據來看，三基芬 與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 1.22，其 MTS 值上升至 1.27，細胞有明顯增長的趨勢。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.96，平均來說細胞內的 p62 量有下降。細胞生長有明顯的被柏橋素促進，但自噬作用卻沒有明顯的被促進。

斯拉德物是一個從中草藥植物黃耆中純化的小分子，從被用於與骨頭發育不良相關的疾病。從我們的實驗數據可以看到， 斯拉德物在 Luciferase Assay 中與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.75，且其 MTS 值下降至 0.78，細胞有死亡趨勢，一方面是可能是因為自噬作用本身連帶導致細胞死亡，另一方面也可能是此次篩選所用的 斯拉德物濃度不利於細胞生長。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的斯拉德物值為 0.95，並沒有非常明顯的促進自噬作用，因為 p62 表現量與細胞存活率兩者下降比率接近。

宇比楊素是一種可幫助代謝與減肥的化合物。單看 Luciferase Assay 中的數據來看，宇比楊素與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.97 有下降，其 MTS 值上升至 1.11，細胞有增長的趨勢。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.88，平均來說細胞內的 p62 量有下降。以初步篩選結果來說我們推測自噬作用與細胞生長皆有被促進，但這還待更進一步的討論。

蓁尼拉素是一種帶有氣味的化學物，常被添加於辛香料中，製造辣味。單看 Luciferase Assay 中的數據來看，蓁尼拉素與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.99 沒有明顯下降，但其 MTS 值上升至 1.16，細胞有增長的趨勢。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.88，平均來說細胞內的 p62 量有下降。以初步篩選結果來說我們推測自噬作用與細胞生長皆有被促進，但這還待更進一步的討論。

璠尼素 是一種帶有氣味的酚醛，常被添加於飲料中。單看 Luciferase Assay 中的數據來看，璠尼素與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.94 沒有明顯下降，但其 MTS 值上升至 1.10，細胞有增長的趨勢。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.86，平均來說細胞內 p62 量有下降。以初步篩選結果璠尼素能夠促進自噬作用與細胞生長。

梅芬素是天然的抗氧化劑。單看 Luciferase Assay 中的數據來看，梅芬素與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.79 有下降情形，其 MTS 值為 0.92，細胞有增長的趨勢。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase P62/MTS 的值為 0.85，平均來說細胞內的 p62 量有下降。以初步篩選結果梅芬素 能夠促進自噬作用但會造成細胞死亡。

古吧物是從 *Streptomyces cinnamonensis* 中所分離的天然抗生素。從我們的實驗數據可以看到， 古吧物在 Luciferase p62 Assay 中與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.60，且其 MTS 值下降至 0.71，細胞有死亡現象，一方面是可能是因為自噬作用促進了細胞死亡的信號傳導路徑，另一方面也可能是此次篩選所用的 古吧物的濃度不利於細胞

生長。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的古吧物值為 0.84，平均來說細胞內的 p62 量有下降，有促進自噬作用的情形。

英昕物是一個核苷類的化合物，因為其和基因複製有關，常被作為治療自體免疫疾病的天然物。從我們的實驗數據可以看到， 英昕物在 Luciferase Assay 中與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.94，且其 MTS 值上升至 1.15，細胞有增殖現象。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的 英昕物 值為 0.82，平均來說細胞內的 p62 量有下降，有促進自噬作用的情形。是否有成為近一步篩選目標

樹桐物是一有機化合物，可從加熱水楊酸苯酯製備(7)。在我們的實驗中看到樹桐物的 Luciferase p62 的冷光訊號值為 1.01，MTS 值上升至 1.25，細胞有增長的趨勢，顯示此天然物對細胞不具毒性。整體來說 Luciferase 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.82，與對照組相比明顯的有下降，且可看到自噬作用與細胞生長皆有被促進符合文獻中，樹桐物可促進自噬作用的研究結果。

三基芬是胺基酸的前導物質，也是製造神經傳導物質 5-羥色胺的合成前體。單看 Luciferase Assay 中的數據來看，三基芬 與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 1.02，其 MTS 值上升至 1.34，細胞有明顯增長的趨勢。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.76，平均來說細胞內的 p62 量有下降。以初步篩選結果來說我們推測自噬作用與細胞生長皆有被促進，但這還待更進一步的討論。

古辛物是核苷的一種。單看 Luciferase p62 Assay 中的數據來看，三基芬 與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 1.00，其 MTS 值上升至 1.31，細胞有明顯增長的趨勢。整體來說 Luciferase 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.76，平均來說細胞內的 p62 量有下降。以初步篩選結果來說我們推測自噬作用與細胞生長皆有被促進，但這還待更進一步的討論。

天宇儂是由丹蔘中萃取出的天然物。在中草藥學中常被用於去瘀止痛，具有活血的效

果，有多重藥理用途。在我們的實驗中可以看到 天宇儂 的 Luciferase p62 的冷光訊號值為 0.74，與以 DMSO 進行天然物處理的對照組來看 p62 的冷光訊號值有下降，代表自噬作用被活化。且其 MTS 值上升至 1.15，細胞有增長的趨勢，顯示此天然物對細胞不具毒性。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.64，與對照組相比明顯的有下降，因此我們推測自噬作用與細胞生長皆有被促進。

得奧昕是一種由植物湖北黃精中所被提煉出的皂素。文。從我們的數據顯示， 在 Luciferase Assay 中，得奧昕與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.38，其 MTS 值下降至 0.69，細胞有死亡趨勢，顯現此得奧昕濃度下 利於細胞生長。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的值為 0.69，細胞內的 p62 量有明顯下降。初步來說得奧昕能夠顯著的促進細胞自噬作用，但對細胞生長卻也有不良的影響。

唐川丁是一中藥成分，其為鈣離子通道的阻斷劑，主要被作為抗高血壓的天然物。在我們的實驗中也看到，在 Luciferase p62 Assay 中，唐川丁 與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.16，且其 MTS 值下降至 0.61，細胞有死亡趨勢，一方面是因為自噬作用本身連帶導致細胞死亡此，另一方面也可能是此次篩選所用的 唐川丁濃度不利於細胞生長。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62 /MTS 的 唐川丁 值為 0.30，明顯促進自噬作用。

開普鹼是個 DNA topoisomerase I 的抑制劑，能夠有效的抗腫瘤。從我們的實驗數據可以看到，開普鹼 在 Luciferase Assay 中與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.11，且其 MTS 值下降至 0.36，細胞有明顯死亡趨勢，一方面是可能是因為自噬作用本身連帶導致細胞死亡，另一方面也可能是此次篩選所用的 開普鹼 濃度不利於細胞生長。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的開普鹼 值為 0.29，明顯的促進自噬作用。

傳三角物是從中草藥植物中萃取出的天然物。而在我們的實驗中也看到，在 Luciferase Assay 中，傳三角物 與 DMSO 對照組來看， p62 的冷光訊號值為 0.05，且其 MTS 值下降至 0.75，細胞有死亡趨勢，一方面是因為自噬作用本身連帶導致細胞死亡，另一方面也可能是傳三角物已被文獻證實具有抗細胞增殖與誘導細胞凋亡的作用。整體來說 Luciferase p62 和 MTS 兩數值相除後 Luciferase p62/MTS 的傳三角物值為 0.07，明顯促進自噬作用。

（三）西方墨點法分析前言

已有文獻指出自噬作用在阿茲海默症上的應用（4），因此我們將利用 p62 冷光系統篩選到的天然物，放到能表現阿茲海默的上游產物 CCNY 細胞上進行藥物處理。一方面驗證我們篩選平台的結果，另一方面我們希望能找到有助於清除阿茲海默症相關蛋白質的自噬作用促進劑。我們以三種藥物作為其他天然物藥物處理的對照組。經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞。Rapamycin 為一個促進自噬作用的天然物，經 Rapamycin 處理的細胞代表自噬作用被促進的細胞。3MA 為一個抑制自噬作用的藥物，經 3MA 處理的細胞代表自噬作用被抑制的細胞。而我們主要觀測的數據有待測天然物對細胞 Notch 值、C99 值、AICD 值、p62 值、LC3II/LC3I 值、GAPDH 值。最終我們對在 P62 冷光天然物篩選平台中 p62/MTS 數值最低的五項天然物傳三角物、開普鹼、唐川丁、得奧昕、天宇儂做進一步的測試。

1. 觀測數據與意義和數值處理方式對照表

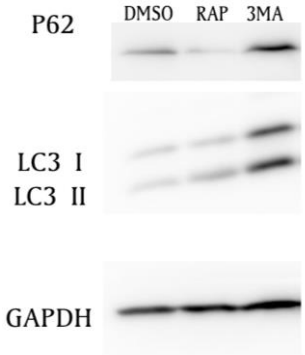
Notch	Notch 是的一個影響細胞生理作用的信號傳導路徑。許多阿茲海默的天然物縱然有效，卻會影響細胞的代謝作用，導致強烈的副作用，造	我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過西方墨點法定量蛋白質表現量。再將待測天然物對細胞的 Notch 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 Notch 值原始數據進行比較。因此經 DMSO 處理的細胞的 Notch 值

	成病患不適。我們以 Notch 值觀察待測天然物對細胞的代謝作用，其數值越接近經 DMSO 處理的細胞，可能造成的副作用變越小。	數據應為 1.00。
C99	C99 是不正常堆積在阿茲海默症病患中腦部的 a-beta 蛋白質的前趨蛋白質。已有文獻證實若能有效的使 C99 的量下降，則能改善阿茲海默症的症狀(5)。我們以 C99 值作為預測待測天然物在阿茲海默症疾病機轉上的影響。	我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過西方墨點法定量蛋白質表現量。再將待測天然物對細胞的 C99 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 C99 值原始數據進行比較。因此經 DMSO 處理的細胞的 C99 值數據應為 1.00。
AICD	AICD 是 C99 蛋白質經 Gamma secretase 所切除後的產物。 我們以 AICD 值作為預測待測天然物在阿茲海默症疾病機轉上的影響。若 AICD 值下降則代表 1. Gamma secretase 活性被抑制或 2. Gamma secretase 的受質 C99 的量減少，兩者皆有利於阿茲海默的治療。	我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過西方墨點法定量蛋白質表現量。再將待測天然物對細胞的 AICD 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 AICD 值原始數據進行比較。因此經 DMSO 處理的細胞的 AICD 值數據應為 1.00。

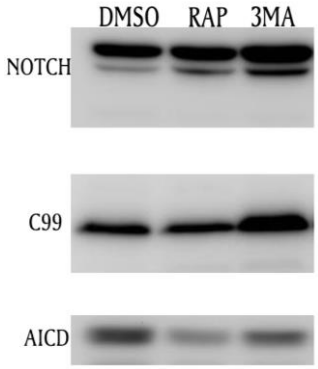
p62	p62 為自噬作用活化反應的指標。當自噬作用被促進時，細胞內的 p62 應被自噬作用分解，導致 p62 的值下降，反之 p62 的值上升，則代表自噬作用有被抑制的可能。此數值也為我們在 p62 冷光篩選系統中所依據的指標。	我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過西方墨點法定量蛋白質表現量。再將待測天然物對細胞的 p62 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 p62 值原始數據進行比較。因此經 DMSO 處理的細胞的 p62 值數據應為 1.00。
LC3II/LC3I	當自噬作用被促進時，LC3I 這種蛋白質會被轉換成 LC3II。因此 LC3II 除以 LC3I 的轉換比率可被視為自噬作用活化反應的指標。	我們以經 DMSO 處理的細胞代表正常細胞，透過西方墨點法定量蛋白質表現量。再將待測天然物對細胞的 LC3II/LC3I 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 LC3II/LC3I 值原始數據進行比較。因此經 DMSO 處理的細胞的 LC3II/LC3I 值數據應為 1.00。
GAPDH	GAPDH 值可表現蛋白值量的 control，可表現每個 well 裡面的蛋白質量。實驗操作上每個 well 的 GAPDH 值需要是相差不多的，才能確保比較的結果是公平的。	我們以經 GAPDH 處理的細胞代表正常細胞，透過西方墨點法定量蛋白質表現量。再將待測天然物對細胞的 GAPDH 值原始數據除以經 DMSO 處理的細胞的 GAPDH 值原始數據進行比較。因此經 DMSO 處理的細胞的 GAPDH 值數據應為 1.00。

2. 西方墨點法控制組數值與意義說明

A. 西方墨點法控制組的結果

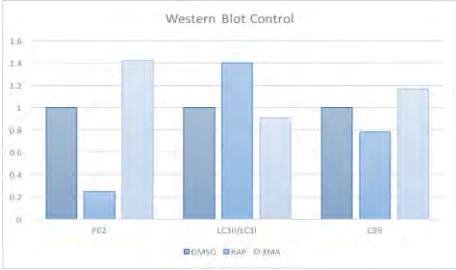


圖（9）控制組西方墨點法結果



圖（10）控制組西方墨點法結果

表（4）控制組西方墨點法結果



B. 西方墨點法控制組的結果討論

對照組處理天然物	代表意義	數值表現意義
DMSO	正常細胞	
Rapamycin	自噬作用被促進的細胞	處理後的 p62 數值低於與代表正常細胞 DMSO 數值，處理後的 LC3II/LC3I 數值高於

數據觀測意義整理：
前提：天然物促進細胞自噬作用，進而改善阿茲海默症中不正常蛋白質堆積

- 若天然物促進細胞自噬作用且降低蛋白質堆積則：、p62 值下降、LC3II/LC3I 值上升、C99 值下降。
- 若天然物抑制細胞自噬作用且造成蛋白質堆積則：、p62 值上升、LC3II/LC3I 值下降、C99 值上升。

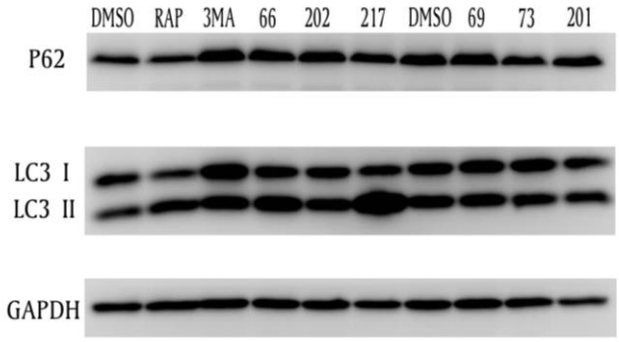
		代表正常細胞 DMSO，兩者皆表示自噬作用有被活化。C99 數值則是低於與代表正常細胞 DMSO 數值，代表不正常堆積在阿茲海默症病患中腦部的 a-beta 蛋白質的前趨蛋白質的量有下降。有機會作為改善阿茲海默症的治療機轉。
3MA	自噬作用被抑制的細胞	處理後的 p62 數值高於與代表正常細胞 DMSO 數值，處理後的 LC3II/LC3I 數值低於代表正常細胞 DMSO，兩者皆表示自噬作用有被抑制。C99 數值則是高於與代表正常細胞 DMSO 數值，代表不正常堆積在阿茲海默症病患中腦部的 a-beta 蛋白質的前趨蛋白質的量有上升。

（四）目標天然物西方墨點法結果

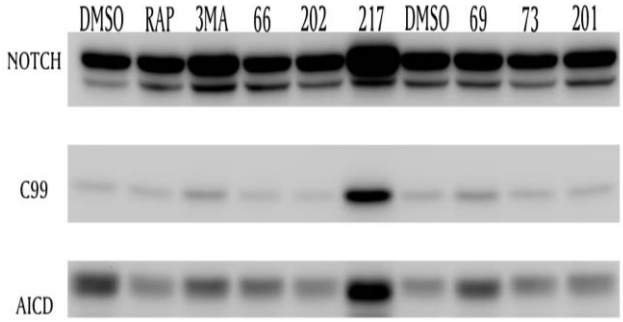
目標藥物為 p62 冷光天然物篩選平台中 p62/MTS 數值最低的五項天然物傳三角物、開普鹼、唐川丁、得奧昕、天宇儂

註：[天然物 66]、[天然物 69]、[天然物 73]、[天然物 201]在 p62 冷光篩選系統中及為自噬作用抑制劑，在西方墨點法亦是如此，但本報告專注於討論自噬作用促進劑，因此不在針對上列三項藥物做進一步分析與討論

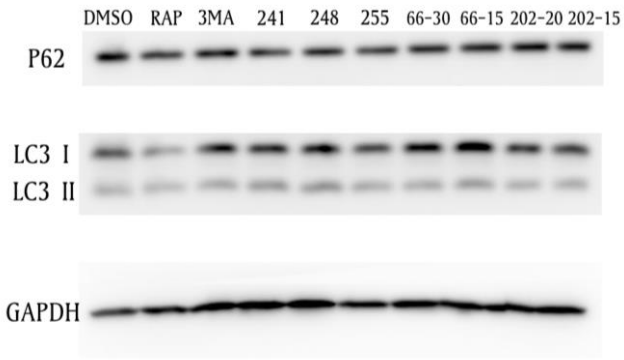
（五）西方墨點法第一階段藥物篩選結果分析與討論



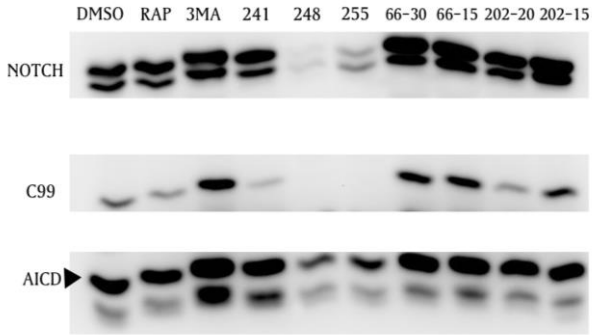
圖（11）西方墨點法結果



圖（12）西方墨點法結果



圖（13）西方墨點法結果



圖（14）西方墨點法結果

天宇儂(#202)是由丹蔘中萃取出的天然物丹蔘酮。在我們的冷光篩選系統中，天宇儂的自噬作用與細胞生長皆有被促進。因此我們進一步對其做了不同濃度(10 uM、15 uM、20 uM)的天然物處理，再以西方墨點法定量蛋白質。天宇儂的各項數值表現依濃度雅有所不同。天宇儂的濃度對其藥理作用的影響還待進一步討論，但目前我們有下列發現與推論。

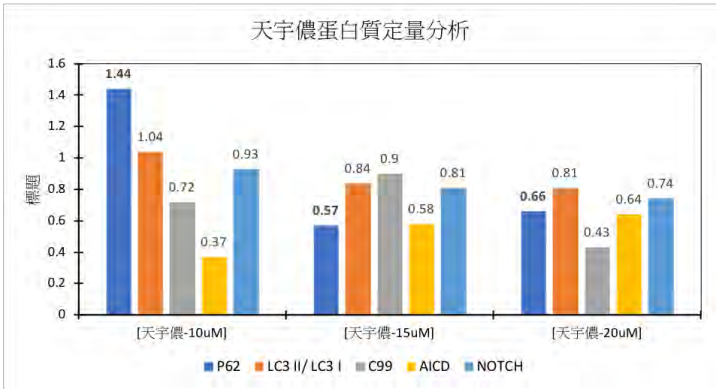
[天宇儂-10 uM]對於促進自噬作用的表現有些不穩定。在此濃度下 p62 數值沒有下降，但是從 LC3II / LC3I 的轉換比率上來說，卻有促進自噬作用的現象。在阿茲海默的疾病機轉應用上，[天宇儂-10 uM]有效的使 C99 與 AICD 的數值下降，可作為潛在天然物。

[天宇儂-10 uM] Notch 值維持在 0.93 對細胞生理的影響較小。

[天宇儂-15 uM]有促進自噬作用的表現，且從 p62 數值與 LC3II / LC3I 的轉換比率上，都可看出此現象。在此濃度下 p62 數值明顯的有下降，且 LC3II / LC3I 的轉換比率上有比對照組上升。在阿茲海默的疾病機轉應用上，[天宇儂-15 uM]有效的使 C99 與 AICD 的數值下降，可作為潛在天然物。但[天宇儂-15 uM]對 Notch 值幾乎的影響介於[天宇儂-10 uM]與[天宇儂-20 uM]兩濃度之間，因此[天宇儂-15 uM]此濃度對細胞生理的影響和副作用應會較[天宇儂-10 uM]嚴重。

[天宇儂-20 uM]對於促進自噬作用的表現也是有些不穩定。在此濃度下 p62 數值明顯的有下降，但是從 LC3II / LC3I 的轉換比率上來說，卻沒有促進自噬作用的現象。在阿茲海默的疾病機轉應用上，[天宇儂-20 uM]有效的使 C99 與 AICD 的數值下降，可作為潛在天然物。而且從[天宇儂-20 uM]對 Notch 值下降至 0.73，代表 20 uM 的濃度對細胞生理的較有機會造成影響，有較高的機會造成副作用。

總結來說我們觀察到天宇儂能夠促進自噬作用，並使細胞內與阿茲海默症相關的不正常堆積蛋白質下降。若能夠對其濃度對藥理作用的影響進行進一步討論，可望成為治療阿茲海默的天然物。



表（5）天宇儂西方墨點法結果

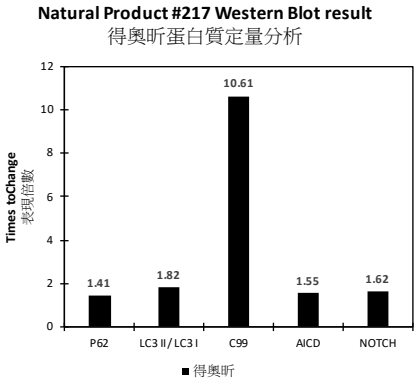
得奧昕(#217)是一種由植物湖北黃精中所被提煉出的皂素。在我們的冷光篩選系統中，得奧昕能夠顯著的促進細胞自噬作用，但對細胞生長卻也有不良的影響。

因此我們進一步對其以西方墨點法定量細胞內各蛋白質的變化。得奧昕 （10 μM）對於促進自噬作用的表現有些不穩定。雖然在 p62 冷光初步篩選的數據中得奧昕能使 HEK-

293T 細胞中的 p62 數值低於正常細胞，但是在 CCNY 上經得奧昕天然物組理後，細胞的 p62 數值卻上升了。我們推測可能是因為細胞種類的不同，造成結果的不同。但是在 CCNY 上經得奧昕天然物處理後，細胞的 LC3 II/ LC3 I 數值明顯上升 1.82 倍，顯示自噬作用依然有被促進。

而且雖然得奧昕能夠促進自噬作用，但是經得奧昕天然物處理後的 CCNY 細胞，C99 與 AICD 的數值卻上升了，對於阿茲海默的疾病機轉上並沒有幫助。我們推測是因為雖然得奧昕能夠促進自噬作用，且理論上若自噬作用被促進應該能使 C99 蛋白質量下降，但同時得奧昕可能也促進其他訊號傳導途徑導致 C99 與 AICD 的數值上升。

且從經得奧昕天然物處理後的 CCNY 細胞的 Notch 值的上升來說，得奧昕對細胞生理的影響較大，可能會造成強烈的副作用。因此我們認為得奧昕對於阿茲海默的疾病治療來說並不是適合的天然物。



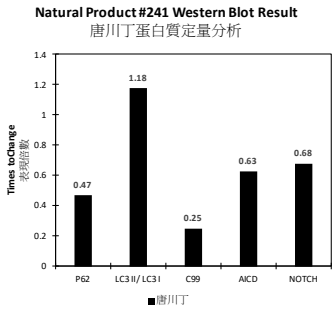
表（6）得奧昕西方墨點法結果

唐川丁(#241) 是一中藥成分，其為鈣離子通道的阻斷劑，主要被作為抗高血壓的天然物。在我們的冷光篩選系統中，唐川丁能夠顯著的促進細胞自噬作用，但對細胞生長卻也有不良的影響。因此我們進一步對其以西方墨點法定量細胞內各蛋白質的變化。

從西方墨點法來看，唐川丁（1 μM）能夠促進自噬作用，經唐川丁天然物處理後的 CCNY 細胞的 p62 數值會至原先的 0.25 倍，而且 LC3II / LC3I 的轉換比率上會上升至原先的 1.18 倍，兩項數據的表現都符合促進自噬作用的要求。

在阿茲海默的疾病機轉應用上，唐川丁能夠有效的使 C99 與 AICD 的數值下降，但唐川丁

對 Notch 值也有較大的影響，可能會造成副作用。整體來說唐川丁能夠促進自噬作用，並使細胞內與阿茲海默症相關的不正常堆積蛋白質下降。若能夠對其藥理療效再進一步的討論，可望成為治療阿茲海默的天然物。

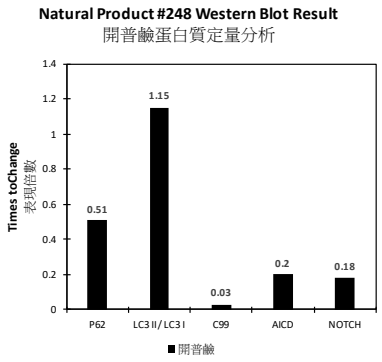


表（7）唐川丁西方墨點法結果

開普鹼(#248)是 DNA topoisomerase I 的抑制劑。在我們的冷光篩選系統中，開普鹼 （1 μM）能夠顯著的促進細胞自噬作用，但卻會造成細胞死亡。我們進一步對其以西方墨點法定量細胞內各蛋白質的變化。

從西方墨點法來看，開普鹼能夠促進自噬作用，且不管是從 p62 數值或是 LC3II / LC3I 的轉換比率來說都能夠支持這個現象。經開普鹼天然物處理後的 CCNY 細胞，P62 數值會下降至原先的 0.51 倍，LC3II / LC3I 的轉換比率上則是會上升至原先的 1.15 倍。

而在阿茲海默的疾病機轉應用上，開普鹼能夠有效的使 C99 與 AICD 的數值下降至至原先的 0.03 倍與 0.2 倍，但開普鹼對 Notch 值也有較大的影響，可能會造成副作用。整體來說開普鹼能夠有效的促進自噬作用，且還能夠使細胞內與阿茲海默症相關的不正常堆積蛋白質下降。若能夠對其藥理療效再進一步的討論，可望成為治療阿茲海默的天然物。



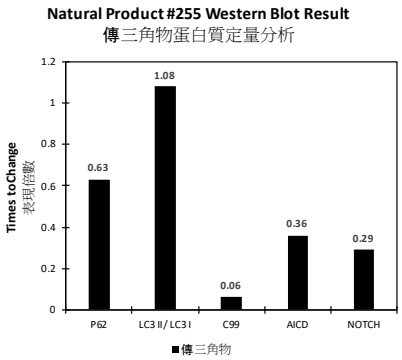
表（8）開普鹼西方墨點法結果

傳三角物(#255)在我們的冷光篩選系統中，能夠顯著的促進細胞自噬作用，但卻會造成細胞死亡。我們進一步對其以西方墨點法定量細胞內各蛋白質的變化。

從西方墨點法來看，傳三角物 （1 μM）能夠促進自噬作用，且不管是從 p62 數值或是 LC3II / LC3I 的轉換比率來說都能夠支持這個現象。經傳三角物天然物處理後的 CCNY 細胞，P62 數值會下降至原先的 0.63 倍，LC3II / LC3I 的轉換比率上則是會上升至原先的 1.08 倍。

而在阿茲海默的疾病機轉應用上，傳三角物能夠有效的使 C99 與 AICD 的數值明顯下降。C99 與對照組相比，下降了超過九成左右，至原先的 0.06 倍。但是傳三角物對 Notch 值影響較大，代表傳三角物對細胞生理的影響較大，要較高的機率造成副作用。

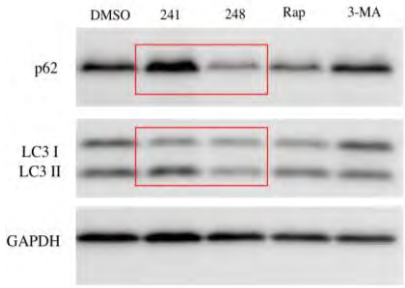
整體來說傳三角物能夠有效的促進自噬作用，且還能夠使細胞內與阿茲海默症相關的不正常堆積蛋白質下降。但是它對細胞生理的影響較大，若能夠對其藥理療效和化學結構再進一步的討論，可望成為治療阿茲海默的天然物。



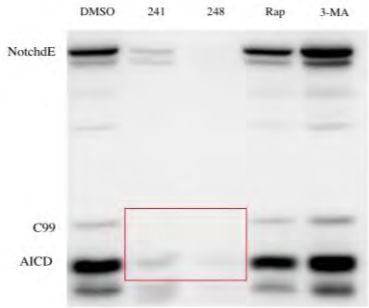
表（9）傳三角物西方墨點法結果

（六）西方墨點法第二階段藥物篩選結果分析與討論

我們針對唐川丁、開普鹼再做了進一步的西方點墨法的測試，因為我們想要再確認其的效用。這一次我們將要務處理時間增長為 24 小時，第一階段的處理時我們的藥物處理時間為 6 小時。結果如下：



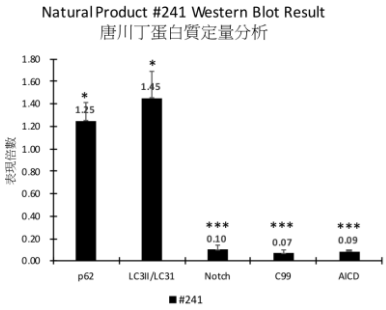
圖（13）西方墨點法結果



圖（13）西方墨點法結果

唐川丁(#241) （10 μM）延長藥物處理時間至 24 小時，對於自噬作用的影響可以從 LC3II / LC3I 的轉換比率上升至原先的 1.45 倍看見，但是 p62 的數值卻也上升至原先的 1.25 倍看見，我們推測是因為我們加長了藥物處理時間，導致細胞生理反應出現了副作用。

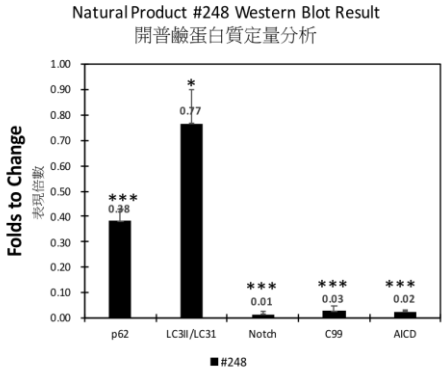
在阿茲海默的疾病機轉應用上，唐川丁能夠顯著的使 C99 與 AICD 的數值下降（p value< 0.00），但唐川丁對 Notch 值也有較大的影響，可能會造成副作用。整體來說唐川丁能夠促進自噬作用，並使細胞內與阿茲海默症相關的不正常堆積蛋白質下降。若能夠對其藥理療效再進一步的討論，可望成為治療阿茲海默的天然物。



表（10）唐川丁西方墨點法結果

開普鹼(#248)（10 μM）延長藥物處理時間至 24 小時，對於自噬作用的影響可以從 p62 的轉換比率下降至原先的 0.38 倍看見，但是 LC3II / LC3I 的數值卻也下降至原先的 0.77 倍看見，我們推測是因為我們加長了藥物處理時間，導致細胞生理反應出現了副作用，這個部分的探討還需要進行更多的測試。另一個推測是因是 DNA topoisomerase I 的抑制劑，因此藥物本身可能影響了細胞轉錄或轉譯的因子，進而影響了蛋白質的表現量。

在阿茲海默的疾病機轉應用上，開普鹼能夠顯著的使 C99 與 AICD 的數值下降（p value< 0.00），但是開普鹼對 Notch 值也有較大的影響，可能會造成副作用。整體來說開普鹼能夠促進自噬作用，並使細胞內與阿茲海默症相關的不正常堆積蛋白質下降。若能夠對其藥理療效再進一步的討論，可望成為治療阿茲海默的天然物。



表（11）開普鹼西方墨點法結果

唐川丁(#241)與開普鹼(#248)對於降低阿茲海默症的病理蛋白質（C99 和 AICD），有顯著影響。但是在不同藥物處理時間下對於自噬作用指標蛋白的影響，表現有些不穩定，我們推測這可能是藥物處理時間過長或處理濃度過高，因此這方面的探討，還需要進行更多的實驗來檢測。

伍、結論與應用

1. P62 冷光篩選平台能夠利用 P62 蛋白接合冷光酶能作為指標物，篩選自噬作用調節劑，有效提升自噬作用調節劑篩選效率，有別於以往傳統透過西方墨點法的篩選方式。
2. 當 P62/MTS 數值低於 DMSO，待測物極可能是自噬作用促進劑。當 P62/MTS 數值高於 DMSO，待測物極可能是自噬作用抑制劑。
3. 非所有自噬作用的促進劑皆能幫助清除阿茲海默症的前趨蛋白質，藥物本身對細胞製造阿茲海默症的前趨蛋白質轉錄或轉譯的因子的影響，需要透過西方墨點法進行驗證。
4. 從細胞模型中驗證促進自噬作用的天然物可以幫助清除阿茲海默症的病理蛋白質。
5. 天然物唐川丁與開普鹼能夠透過促進自噬作用顯著的清除阿茲海默症的病理蛋白質，有望成為治療阿茲海默的天然物。

陸、未來展望與應用

1. 我們希望對天然物唐川丁與開普鹼做更多藥物處理在不同濃度與不同時間上的測試，了解其的藥理效用，以找出最適合細胞的藥物處理方式。
2. 目前我們已針對 C99 （a-beta 的前驅蛋白）和 AICD（和 a-beta 一起被 gamma secretase 切下的產物）進行西方點墨法。在找出唐川丁與開普鹼適當的藥物處理濃度與藥物處理時間後，我們希望進一步透過 ELISA 檢測其對於造成阿茲海默最主要的蛋白質 a-beta 表現的影響。
3. 若唐川丁與開普鹼對於清除阿茲海默的病理蛋白表現良好，我們希望對天然物唐川丁與開普鹼在動物模型上測試其對清除模式動物腦中阿茲海默症的前趨蛋白質的表現，以及其對認知功能修復的幫助。

4. 針對唐川丁、開普鹼對清除阿茲海默症的病理蛋白質的表現良好，但是卻會影響細胞的生理作用，若有機會我們希望對其進行化學結構上的修飾，進一步的發展成為藥物。
5. 我們期望了解唐川丁與開普鹼影響自噬作用與清除阿茲海默症的病理蛋白質的詳細路徑，以便對自噬作用的機制有更完善的了解，幫助改善與不正常蛋白質累積相關的神經疾病。
6. P62 冷光篩選平台能夠篩選自噬作用調節劑，因此未來我們也希望對自噬作用的抑制劑多做些測試，因自噬作用的抑制劑也可被應用在癌症藥物的相關開發上。

柒、參考資料

1. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25years. EMBO Mol Med. 2016;8:595-608.
2. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nat Cell Biol. 2007;9(10):1102-9.
3. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. J Biol Chem. 2008;283(33):22847-57.
4. Li L, Zhang X, Le W. Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease. Neurodegener Dis. 2010;7(4):265-71.
5. Karran E,MerckenM, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer’s disease: An appraisal for the development of therapeutics. Nat Rev Drug Discov 10:698 – 712.
6. Klionsky DJ, et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12:1 – 222.
7. Tung YT, et al. (2012) Autophagy: A double-edged sword in Alzheimer’s disease. J Biosci 37:157 – 165.

8. Kounnas MZ, et al. (2010) Mod μlation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. Neuron 67:769－780.

9. He G, et al. (2010) Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for

10. Alzheimer’s disease. Nature 467:95－98.

11. Wang BJ, Her GM, Hu MK, et al. ErbB2 regμlates autophagic flux to modμlate the proteostasis of APP-CTFs in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(15):E3129-E3138.

12. De strooper B, Chávez gutiérrez L. Learning by failing: ideas and concepts to tackle γ-secretases in Alzheimer's disease and beyond. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2015;55:419-37.

註：本研究藥物因涉及專利申請問題，皆以代號稱之

【評語】080002

1. 本研究主題利用兩個重要的細胞株，作為篩選影響自噬作用的天然物的篩選平台，以及作為驗證在愛滋海默症上的應用平台。這個研究主題明確及聚焦，也有它的創意及重要意義。

2. 但是，這個研究所利用的兩個關鍵細胞株(HEK293-P62 及 CCNY)均為前人所建立，本研究只是利用此等細胞株，進行篩選具促進自噬作用的天然物及驗證其等天然物在阿茲海默症治療上的應用潛力！並非此篩選平台的原始建立者。

3. 相關研究及分析方法有相當完整的介紹，且研究方法具有一定的深度，值得肯定。但是，資料的呈現，顯得有些複雜及缺乏有系統的整理。建議能更精簡且有系統的將結果列表整理。

4. 另外，在圖表的呈現上及參考文獻的引用方式，不符合一般科學論文的呈現方式。如參考文獻用號碼的呈現，與在內文中圖跟表的號碼，非常的相似，容易混淆。建議內文中的文獻引用，以作者及發表年(Author/Date)的方式呈現。另外，文中有很多的表，實際上是圖，建議更正。

5. 本研究發展自噬作用調節劑篩選平台並用此平台篩選抗阿茲海默症的天然物，研究構想很好，研究成果可能有應用價值，令人鼓舞。

6. 所篩選出的天然物(#241、#248 與#255)雖然有促進自噬作用，但也會毒殺細胞，這性質讓這些天然物在應用上，受到限制。

7. 所篩選出的天然物(#241、#248 與#255)是促進自噬作用、還是影響蛋白質的表達讓目標蛋白量下降?

8. Minor errors：

   (1) tau 不是 Abeta 蛋白水解後的下游產物 (in page 5)。

   (2) In page 5: Abeta 是 APP 經由 beta-secretase 與 gama-secretase 所切割後的產物，不是經 alpha-secretase 與 beta-secretase 所切割後的產物。