

國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

半乳糖凝集素-3 促進乙型類澱粉蛋白寡聚合作用

Galectin-3 Facilitates Amyloid-Beta Oligomerization

研究生：鄭光閔 撰

指導教授：李小媛 博士

趙知章 博士

中華民國一〇六年七月二十日

謝誌

時光飛逝，兩年的碩班生涯終於順利告一個段落，在這之中經歷了許多不管是正向或負向的人事物，這些都讓我受益匪淺，直教人想貼出一張長輩感恩圖，可惜謝誌不能貼。首先要感謝的人絕對是于姊，因為有她才有我現在的這本論文，甚至要說于姊影響了我的未來都不為過。幫我回復因為從軍四年導致腦袋空空的恩師—趙知章老師，在課業或是學習觀念上給了我許多的建議與幫助，還有犧牲時間不斷的聽我預報，讓我對您的敬仰如滔滔江水連綿不絕，又如黃河氾濫一發不可收拾。非常感謝在我的學術旅程中，現在也是未來的導師—李小媛老師，不遺餘力地給予指導與支持並且容忍我的犯錯，讓我在學術一途能更有信心地走下去。感謝飛飛學姊給予了極大的支持與鼓勵，到現在還記得第一次 seminar 之前的某天晚上九點在電話中聽我對某恩師的崩潰。也很感謝中研院實驗室的眾位學長，彥呈學長、治傑學長、彥竹學長、大倫學長、紹宇學長以及馬哥，諸位在我的實驗技術與觀念中給予了極大的幫助。另外也很感謝天衡的陪伴，每天晚上聽我倒垃圾並給了我許多正向的鼓勵與支持。最後也最重要的就是感謝我的父母，持續支持我所做的任何決定。然而要謝的人事物太多了，剩下的就謝天吧。

中文摘要

阿茲海默症是一種隨著年齡老化有關的神經退化性疾病，其特徵主要為記憶喪失及認知功能失調。阿茲海默症有兩個主要的病理指標，包含了因為澱粉蛋白造成的神經纖維糾結以及乙型類澱粉蛋白堆積而成的老化斑塊。乙型類澱粉蛋白是由類澱粉前驅蛋白經 β -分泌酶及 γ -分泌酶連續裁切生成大小約 4-kDa 的胜肽。乙型類澱粉蛋白會相互堆積形成寡聚體，並且高分子量寡聚體進一步再堆積成不可溶性的乙型類澱粉蛋白纖維及老化斑塊。半乳糖凝集素-3 是半乳糖凝集素家族的一員，目前已知半乳糖凝集素-3 調節各種細胞的功能，例如發炎、腫瘤生長以及細胞間的黏附，而在癌症中則有促使癌細胞積聚的能力，然而在大腦中的作用仍尚不清楚。在本研究中，我們使用 APP/PS1 基因轉殖小鼠作為阿茲海默症的動物模型，並且在其大腦中研究半乳糖凝集素-3 對於乙型類澱粉蛋白堆積的作用與機制。結果顯示在野生型小鼠的海馬迴中過度表現半乳糖凝集素-3 會促進乙型類澱粉蛋白的堆積，而將乙型類澱粉蛋白注射在半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的海馬迴，則會觀察到乙型類澱粉蛋白寡聚合作用的減少。乙型類澱粉蛋白的注射也會增加海馬迴中半乳糖凝集素-3 的表現。在 APP/PS1 小鼠的海馬迴可以觀察到半乳糖凝集素-3 的表現量會隨著年齡增長

而增加，而具有抑制發炎及免疫反應的 PIAS1 在 APP/PS1 小鼠海馬迴中的表現量則會隨著年齡增長而減少。在探討半乳糖凝集素-3 調節乙型類澱粉蛋白寡具體作用的過程中，我們發現半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的海馬迴中能夠代謝乙型類澱粉蛋白的腦啡肽酶表現量是野生型小鼠的兩倍多。研究結果顯示半乳糖凝集素-3 對於乙型類澱粉蛋白的堆積扮演了重要的角色以及可能在阿茲海默症的病理機制中具有重要的作用。

關鍵字：半乳糖凝集素-3，乙型類澱粉蛋白，寡聚合作用，腦啡肽酶，PIAS1，APP/PS1 基因轉殖小鼠

英文摘要

Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disorder which is characterized by progressive loss of memory and other cognitive functions. The two pathological hallmarks of AD are extracellular amyloid plaque and flame-shaped neurofibrillary tangles of the tau protein. A β is a 4-kDa protein that is resulted from sequential cleavage of the amyloid precursor protein by beta-secretase and gamma-secretase. Once A β is produced, it will aggregate to form oligomers and high molecular weight (HMW) oligomers will further assemble to form large insoluble fibrils and plaque. Galectin-3 (Gal-3) is a member of the β -galactoside-binding galectin protein family. Gal-3 is known to regulate various cellular functions, such as inflammation, tumor progression and cell-cell adhesion. In cancer cell, Gal-3 enhances homotypic aggregation, but its role in the brain is much less known. In the present study, we examined the role and mechanism of Gal-3 in A β aggregation in the brain by adopting the APP/PS1 mice as an animal model of AD. Results revealed that overexpression of Gal-3 enhanced A β

oligomerization, whereas A β injection into hippocampus of Gal-3 KO mice reduced A β oligomerization. A β injection also increased Gal-3 expression in the hippocampus. Gal-3 expression is also increased in APP/PS1 mice and this effect is more significant along with ageing. Meanwhile, the expression of protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) that suppresses inflammation and immune response was decreased with ageing in APP/PS1 mice. We further found that the expression level of neprilysin, an enzyme that degrades A β , was increased for approximately two-folds in Gal-3 KO mice compared with WT mice. These results suggest that Gal-3 plays an important role in A β aggregation and possibly in the pathology of AD.

Key words: Galectin-3; A β ; Oligomerization; Neprilysin; PIAS1;

APP/PS1 transgenic mice

目錄

謝誌	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
目錄	VI
圖次	IX
縮寫全名對照表	X
緒論	1
一、阿茲海默症	1
二、類澱粉前驅蛋白	3
三、乙型類澱粉蛋白	4
四、半乳糖凝集素	7
五、半乳糖凝集素-3	9
六、Protein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1)	12
七、實驗目的	13
材料與方法	14
一、動物實驗與飼養	14
二、實驗動物基因型鑑定	15
三、海馬迴及前額葉皮質組織分離	16
四、蛋白質均質液置備	16
五、蛋白質濃度測定	17
六、西方墨點法	17
七、免疫共沉澱法	20

八、 質體建構.....	20
九、 轉型作用.....	21
十、 大量質體 DNA 製備.....	22
十一、 藥物與質體 DNA 製備及動物海馬迴內注射.....	23
十二、 免疫螢光染色.....	24
十三、 統計分析.....	25
結果.....	26
一、 乙型類澱粉蛋白急性刺激後 48 小時為最適宜觀察其寡聚合作用的時間點.....	26
二、 不表現半乳糖凝集素-3 減緩乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用.....	29
三、 過度表現半乳糖凝集素-3 促進乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用.....	33
四、 海馬迴中乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用隨著年齡增長而增加.....	36
五、 大腦皮質前葉中的乙型類澱粉蛋白寡聚合作用也會隨著年齡增長而增加.....	39
六、 隨著 APP/PS1 小鼠的年齡增加，半乳糖凝集素-3 的表現也隨之增加，但 PIAS1 的表現則減少.....	42
七、 半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 在正常生理狀態下其表現量不因年齡增長而改變.....	46
八、 半乳糖凝集素-3 與類澱粉前驅蛋白及乙型類澱粉蛋白會交互作用.....	48
九、 半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠其海馬迴中使代謝乙型類澱粉蛋白的腦啡肽酶表現量增加.....	50

十、 在小鼠海馬迴中半乳糖凝集素-3 的表現位置與 Iba-1 相同	53
討論	55
結論	63
參考文獻	64



圖次

圖 1、乙型類澱粉蛋白急性刺激後 48 小時為最適宜觀察其寡聚合作用的時間點.....	27
圖 2、不表現半乳糖凝集素-3 減緩乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用	31
圖 3、過度表現半乳糖凝集素-3 促進乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用	34
圖 4、海馬迴中乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用隨著年齡增長而增加	37
圖 5、大腦皮質前葉中的乙型類澱粉蛋白寡聚合作用也會隨著年齡增長而增加.....	40
圖 6、隨著 APP/PS1 小鼠的年齡增加，半乳糖凝集素-3 的表現也隨之增加，但 PIAS1 的表現則減少	44
圖 7、半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 在正常生理狀態下其表現量不因年齡增長而改變	47
圖 8、半乳糖凝集素-3 與類澱粉前驅蛋白及乙型類澱粉蛋白會交互作用	49
圖 9、半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠其海馬迴中使代謝乙型類澱粉蛋白的腦啡肽酶表現量增加	51
圖 10、在小鼠海馬迴中半乳糖凝集素-3 的表現位置與 Iba-1 相同	54

縮寫全名對照表

AD	Alzheimer's disease
AICD	Amyloid precursor protein intracellular domain
ANOVA	Analysis of variance
APP	Amyloid precursor protein
APP/PS1	APP ^{swe} /PS1 ^{dE9}
A β	Amyloid- β
CA1	Cornu Ammonis area 1
CRD	Carbohydrate-recognition domain
CSF	Cerebrospinal fluid
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
DNA	Deoxyribonucleic acid
ER	Endoplasmic reticulum
FDA	US Food and Drug Administration
FzR	Frizzled receptor
Gal-3	Galectin-3
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase-3 β
HCl	Hydrochloric acid
HMW	High molecular weight
HRP	Horseradish peroxidase
IB	Immunoblot
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IDE	Insulin-degrading enzyme
IHC	Immunohistochemistry
IP	Immunoprecipitation
JAK-2	Janus kinase-2
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny broth
LMW	Low molecular weight
LTP	Long-term potentiation

M	Molar
mGluR5	Metabotropic glutamate receptor 5
MMSE	Mini-mental state examination
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple sclerosis
NaOAc	Sodium Acetate
NEP	Neprilysin
NH ₄ OH	Ammonium hydroxide
NMDAR	N-methyl-d-aspartate receptor
NTF	Neurofibrillary tangles
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
PrP ^C	Cellular prion protein
PRRs	Pattern recognition receptors
PS1	Presenilin 1
PVDF	Poly-vinylidene difluoride
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
sAPP α	Soluble APP- α
sAPP β	Soluble APP- β
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SF	Straight filament
STAT1	Signal transducers and activator of transcription 1
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TTR	Transthyretin
WT	Wild-type

緒論

一、阿茲海默症

台灣人口老化的速度持續攀升，至民國 105 年底 65 歲以上老年人口已達 12.87%，預估 107 年台灣將進入「高齡化社會」，至 115 年老年人口則可能佔總人口的 20%，達到世界衛生組織所定義的「超高齡化社會」。隨著老化人口增加，失智症的盛行率也隨之增加，依 103 年衛生福利部全國失智症盛行率調查結果，推估 65 歲以上之失智症患者人數約達 13 萬人，預估失智症的疾病負擔在未來將造成龐大的社會成本壓力。而阿茲海默症為失智症中最常見的一種，因此探討阿茲海默症的病理機制並提出可能的預防策略是目前極重要的課題。

阿茲海默症 (Alzheimer's Disease, AD) 於 1907 年由德國的 Alois Alzheimer 醫師所發現，為一種不可逆的神經退化性疾病。可能造成罹患阿茲海默症的風險因子除了年齡以及基因變異外，其他例如肥胖、糖尿病、高血壓、吸菸酗酒、身體處於長期慢性發炎狀態等，都可能誘發阿茲海默症。早期病徵為記憶力衰退，對時間、地點及人物的辨識出現異常以及行為或性格的改變。隨著疾病的發展，則可能會出現妄想、易怒、具攻擊性、溝通能力下降、喪失記憶、推理及學習能力出現障礙等，臨床病程約 8-10 年

(Maurer et al., 1997)。患者的腦部結構則會因神經退化而導致腦室增大，在腦部組織切片中則可以觀察到神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NTF) 及老年斑塊 (senile plaques)，為阿茲海默症兩種主要的病理特徵 (Graeber et al., 1998)。

神經纖維糾結與濤蛋白 (tau protein) 的功能異常有關，濤蛋白在神經細胞中是最主要的微管相關蛋白 (microtubule-associated protein)，磷酸化的濤蛋白會促使微管蛋白聚合成微小管 (microtubule) 並穩固其結構 (Weingarten et al., 1975)，但當濤蛋白過度磷酸化時，則會造濤蛋白脫離微小管並自行聚合成直鏈纖維 (straight filaments, SF)，進而在細胞中堆積形成神經纖維糾結並導致神經細胞失去功能與死亡 (Gong et al., 1995)。

另一項阿茲海默症的病理特徵則是在腦部組織切片中可觀察到在神經細胞周圍有不正常的物質堆積，這種異常的堆積團塊被稱為老年斑塊，主要由乙型類澱粉蛋白 (amyloid- β , A β) 所組成，而乙型類澱粉蛋白則是類澱粉前驅蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 代謝後之產物 (Ehehalt et al., 2003)，相關機制將於下文敘述。

二、類澱粉前驅蛋白

類澱粉前驅蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 是一種位於細胞膜上的穿膜蛋白 (transmembrane protein)，為單次穿膜結構 (single transmembrane domain) 與大型胞外結構 (large extracellular domain) 所組成，其中有一區段被稱為乙型類澱粉區段 ($A\beta$ region)，類澱粉前驅蛋白分子量約為 110-kDa，目前尚不知其明確的生理功能為何。過去的研究指出，類澱粉前驅蛋白與調節神經細胞生長、軸突的延伸生長 (outgrowth) 以及神經發育時的神經細胞遷移 (migration) 有關，且過度表現類澱粉前驅蛋白對神經細胞的生長及發育有正向的效果 (Roch et al., 1994)。

類澱粉前驅蛋白的代謝途徑有兩種，第一種被稱為非類澱粉蛋白生成途徑 (non-amyloidogenic pathway)，另一種則為造成阿茲海默症病理現象的類澱粉蛋白生成途徑 (amyloidogenic pathway)，兩者的差異來自於一開始被不同的酵素於不同的位置做切割所導致 (Haass et al., 2012)。非類澱粉蛋白生成途徑是指類澱粉前驅蛋白被 α -分泌酶 (α -secretase) 於乙型類澱粉區段的中段作裁切，生成游離於胞外的水溶性蛋白質衍生物 (soluble APP- α , sAPP α) 以及殘留於細胞膜上的 C83 片段，C83 再經由 γ -分泌酶 (γ -secretase) 切割後生成 p3 及類澱粉前驅蛋白胞內片段 (amyloid precursor protein intracellular domain, AICD)。類澱粉蛋白生成途徑則是類

澱粉前驅蛋白非由 α -分泌酶而是 β -分泌酶 (β -secretase) 做裁切，生成水溶性蛋白質衍生物 (soluble APP- β , sAPP β) 以及 C99，C99 再經由 γ -分泌酶切割生成乙型類澱粉蛋白與類澱粉前驅蛋白胞內片段。當乙型類澱粉蛋白大量產生時，則會相互堆積 (self-aggregation) 以及傷害神經細胞，進而使神經細胞死亡 (Esch et al., 1990; Koo et al., 1990)。

三、乙型類澱粉蛋白

大部分的乙型類澱粉蛋白 (amyloid- β , A β) 為 40 個胺基酸所組成的肽 (A β 40)，少部分約 10%則為 42 個胺基酸所組成 (A β 42)，而 A β 42 要比 A β 40 具有疏水性且更難被降解也更易堆積成斑塊 (Selkoe, 2001)。乙型類澱粉蛋白的代謝主要由鋅金屬內肽酶 (zinc-metalloendopeptidase) 所參與，包含了胰島素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE) 及腦啡肽酶 (neprilysin, NEP)。胰島素降解酶的分子量約為 110-kDa，可同時存在於細胞內例如細胞質液 (cytosol) 與溶小體 (lysosome) 以及細胞外，並且對於 A β 40 與 A β 42 皆有降解的作用。腦啡肽酶位在細胞膜上，分子量為 86-kDa，主要對於胞外的 A β 42 有降解作用 (Evin and Weidemann, 2002)。

當乙型類澱粉蛋白的生成量過度增加或是降解效果異常時就會導致堆積現象。其胺基酸結構中的 β -sheet 會堆疊形成水溶性的低分子量寡聚體

(low molecular weight oligomer, LMW oligomer)，如雙聚體 (dimer)、三聚體 (trimer)、四聚體 (Tetramer)、五聚體 (pentamer)，進而形成高分子量寡聚體 (high molecular weight oligomer, HMW oligomer) (Ehehalt et al., 2003)。隨著病情推展，水溶性寡聚體 (soluble oligomer) 會彼此疊合形成不可溶性的乙型類澱粉纖維 (fibrils)，最後再堆疊成斑塊 (plaque) (Lee et al., 2007)。

細胞外的低分子量乙型類澱粉蛋白寡聚體會與 N-甲基-D-天門冬氨酸受體 (N-methyl-d-aspartate receptor, NMDAR) 結合導致細胞內鈣離子濃度異常 (Shankar et al., 2007)，或是與細胞普恩蛋白 (cellular prion protein, PrP^C) 結合，並影響代謝型麩胺酸受體 5 (metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5) 使細胞內鈣離子濃度增加 (Lauren et al., 2009)。另外寡聚體除了反覆摺疊成鏈狀外也會環繞成環形的孔狀寡聚體 (pore-like oligomer) 並鑲嵌進細胞膜，同樣也會使膜內外金屬離子濃度失衡 (Lashuel et al., 2002)。鈣離子濃度異常會使細胞內氧化壓力增加，造成抑制長期增益現象 (long-term potentiation, LTP) 以及突觸與神經細胞受損 (Walsh et al., 2002)。乙型類澱粉蛋白也會與捲曲受體 (Frizzled receptor, FzR) 結合，抑制下游的 Wnt 蛋白訊息傳遞。Wnt 訊息路徑主要調控前驅細胞 (progenitor cell) 增生以及在腦部發育時使細胞正確發育成為神經細胞，並且使肝糖合

成酶激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 不活化，如果 Wnt 蛋白訊息傳遞遭到抑制，使肝醣合成酶激酶-3 β 的活化無法被抑制，進而過度磷酸化濤蛋白，使濤蛋白失去功能並影響神經功能 (Magdesian et al., 2008)。另外也有研究指出，乙型類澱粉蛋白會與帕金森氏症發病機制的主要蛋白質 α -synuclein 交互作用，加速 α -synuclein 的堆積，因此解釋阿茲海默症與帕金森氏症往往容易出現共病現象 (Spencer et al., 2016)。

乙型類澱粉蛋白除了會在細胞膜上由類澱粉前驅蛋白代謝生成並存在於細胞外，也會在內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 及高基氏體 (Golgi apparatus) 的膜上藉 β -分泌酶裁切而生成，此時生成的乙型類澱粉蛋白存在於細胞內，胞外的乙型類澱粉蛋白也會藉由胞吞作用 (endocytosis) 進入細胞內，細胞會再將這些錯誤堆積的寡聚體送到溶小體降解或是在 cytosol 中被蛋白酶體 (proteasome) 降解 (Sakono and Zako, 2010)，但在細胞內堆積而成的低分子量乙型類澱粉蛋白寡聚體會抑制蛋白酶體的降解功能，使得細胞內蛋白酶體失去正常功能，進而導致細胞無法代謝胞內其他蛋白質使細胞死亡 (Almeida et al., 2006)。

乙型類澱粉蛋白不止造成上述的神經毒性 (neuronal toxicity)，也會誘發先天免疫反應 (innate immune response)。乙型類澱粉蛋白在大腦中可

做為損害相關分子模式 (danger-associated molecular patterns, DAMPs) 的其中一種危害訊息，損害相關分子會結合在星狀細胞 (astrocyte) 及微膠細胞 (microglia) 上的模式識別受體 (pattern recognition receptors, PRRs) 上，進而活化免疫細胞產生免疫反應 (Danilova, 2006)。微膠細胞與存在於身體周邊組織的巨噬細胞 (macrophage) 相似，會經由先天性免疫反應 (innate immune response) 來引發吞噬作用 (phagocytosis) 與細胞毒性機制來吞噬並清除外來物質 (foreign substance) (Cai et al., 2014)。微膠細胞活化的同時伴隨對神經細胞有益及有害的發炎反應，例如釋放與發炎相關的細胞激素 (inflammatory cytokine)、趨化因子 (chemokine)、活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 以及在神經發炎研究中較鮮為人知的半乳糖凝集素 (galectin)。

四、半乳糖凝集素

半乳糖凝集素 (galectin) 是一種乙型半乳糖苷結合動物凝集素 (β -galactoside-binding animal lectins)，主要結構為羧端 (C-terminal) 的碳水化合物辨識基團 (carbohydrate-recognition domain, CRD) 及胺端 (N-terminal) 的乙型半乳糖苷所組成。半乳糖凝集素家族目前已知有 15 種，一種為僅具有單一碳水化合物辨識基團的半乳糖凝集素-1、2、5、7、10、11、13、14 及 15，通常分子量約為 15-kDa，同種半乳糖凝集素可相互聚

合成雙聚體；另一種為具有兩個碳水化合物辨識基團的半乳糖凝集素-4、6、8、9 及 12，通常分子量約為 30-kDa；以及具有單一碳水化合物辨識基團但不具有凝集素片段且於胺端帶有脯氨酸 (proline) 與甘氨酸 (glycine) 多重複短片段的半乳糖凝集素-3 (galectin-3, Gal-3)，其分子量約為 30-kDa，可以相互聚合成五聚體 (Liu and Rabinovich, 2010)。

半乳糖凝集素除了會在免疫細胞中表現之外，也存在於其他種類的細胞，這些蛋白質主要存在於細胞質內以及會被釋出細胞外。所有的半乳糖凝集素皆會辨識以及會與半乳糖 (galactose) 結合，但不同的半乳糖凝集素還會辨識其他特定寡糖 (oligosaccharide) 而具有不同的功能 (Liu and Rabinovich, 2010)。部分半乳糖凝集素如 1、3、7 以及 12 會結合細胞內的蛋白質，進而影響細胞內的訊息路徑。例如半乳糖凝集素-1 會調節細胞型態改變，可以做為胞核中 pre-mRNA 的裁切拼接因子 (splicing factor)；半乳糖凝集素-3 則會調節細胞週期且也同半乳糖凝集素-1 在細胞核中具有對 pre-mRNA 剪接的能力；半乳糖凝集素-7 藉由促凋亡作用 (pro-apoptotic effect) 來調節細胞生長；半乳糖凝集素-12 也會藉由促凋亡作用來調節細胞生長同時也會調節細胞週期 (Liu et al., 2002)。此外，過去有研究指出，在阿茲海默症病患的血液中發現半乳糖凝集素-3 的含量明顯要比控制組來的多 (Wang et al., 2015)，但未見其他相關報導，而半乳糖凝集素-3 在阿

茲海默症中扮演什麼樣的角色仍是未知的，這也是本篇論文擬探討的主題。

五、半乳糖凝集素-3

半乳糖凝集素-3 在廣泛的分佈在身體中，例如泌尿道、血液、肺臟、腎臟、心臟及中樞神經系統，其中在骨髓細胞以及免疫細胞中被大量表現。半乳糖凝集素-3 在細胞中的位置同樣也相當廣泛，可存在於細胞核、細胞質、細胞膜上以及被釋出細胞外 (Fortuna-Costa et al., 2014)。半乳糖凝集素-3 在細胞內的作用包含了抗細胞凋亡 (anti-apoptotic activity) 以及 mRNA splicing，在細胞外以及在細胞膜上的作用則為誘發免疫反應包括急性及慢性發炎 (Liu and Rabinovich, 2010)。一旦半乳糖凝集素-3 被釋出細胞外，可以當作危害模式識別受體來成為免疫細胞的活化者或調節者，同時也可被視為危害相關分子模式中的一員 (Sato et al., 2009)。

半乳糖凝集素-3 除了在免疫反應中扮演了重要角色外，在癌症的病程中也具有關鍵性的影響。半乳糖凝集素-3 在癌症細胞內可促使細胞的生長並抑制細胞凋亡，在細胞外則影響癌症細胞的微環境，使癌細胞附近的血管增生，細胞的移動能力，細胞的附著以及癌細胞對正常細胞的侵略 (Fortuna-Costa et al., 2014)。當癌細胞脫離病灶進到循環系統後會引發巢凋亡 (anoikis)，即癌細胞缺乏癌細胞間訊息傳遞或胞外基質

(extracellular matrix) 組合蛋白所調控的細胞附著信號機制 (integrin-mediated cell adhesion signal)，使得單顆癌細胞本身會誘發自我凋亡機制 (Frisch and Screaton, 2001)。過去研究則指出半乳糖凝集素-3 除了可以抵抗凋亡機制外，還會促使同種的癌細胞積聚 (aggregation) 以避免因離開病灶所導致的失巢凋亡 (Zhao et al., 2010)。

另外有研究指出，在高血壓病患的血液中偵測到半乳糖凝集素-3 的濃度較一般人來的高，在急性與慢性心臟衰竭也有同樣的現象，被認為心血管疾病所導致的發炎現象會促使半乳糖凝集素-3 的表現 (Maiolino et al., 2015)，因此在 2010 年時美國食品藥物監督管理局 (US Food and Drug Administration, FDA) 通過半乳糖凝集素-3 在心臟衰竭疾病中可被視為一種有效的生物指標 (Wang et al., 2017)。

然而半乳糖凝集素-3 在中樞神經系統的相關研究不太多。在正常的大腦中，半乳糖凝集素-3 的表現量極少，目前被認為主要在微膠細胞、星狀細胞以及寡突細胞 (oligodendrocyte) 表現 (Shin, 2013)，目前尚未有研究指出半乳糖凝集素-3 會在神經細胞中表現。過去研究指出，若是對神經膠細胞給予干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 會促使其表現及釋出半乳糖凝集素-3，而半乳糖凝集素-3 會促進詹納斯氏激酶-2 (janus kinase-2, JAK-2) 上

的酪氨酸 (tyrosine) 被磷酸化，以及作為 signal transducers and activator of transcription 1 (STAT1)、STAT3 以及 STAT5 的訊息傳遞者 (signal transducers) 與活化者 (activator) (Jeon et al., 2010)。也有報導顯示半乳糖凝集素-3 在在微膠細胞中可以啟動其吞噬作用的功能。表示在中樞神經系統中半乳糖凝集素-3 是扮演促發炎調節者 (pro-inflammatory mediator) 的角色 (Rotshenker, 2009)。

半乳糖凝集素-3 目前被發現在一些神經發炎相關疾病中扮演了重要角色，例如多發性硬化症 (multiple sclerosis, MS)、創傷性腦損傷 (traumatic brain injury)、局部缺血後再灌流損傷 (ischemia-reperfusion injury) 以及病毒性腦炎 (viral encephalitis) (Shin, 2013)。多發性硬化症是一種自體神經免疫疾病，主要是因為微膠細胞侵犯正常細胞所導致 (Calabresi, 2004)，目前發現半乳糖凝集素-3 會導致微膠細胞以及巨噬細胞活化並對髓鞘 (myelin sheath) 的髓磷脂 (myelin) 進行吞噬作用，導致正常神經細胞的死亡 (Hoyos et al., 2014)。然而在腦部損傷中例如創傷性腦損傷及局部缺血後再灌流損傷，同樣可觀察到半乳糖凝集素-3 的表現增加，並使微膠細胞活化，但此機制反而是有益處的，因為腦部損傷中所造成的髓鞘殘骸 (myelin debris) 會阻止神經的再生 (regeneration)，而對髓鞘殘骸的吞噬作用可以避免此現象發生 (Yan et al., 2009)。病毒性腦炎則是因為病毒侵入

腦部後使得身體周邊的免疫細胞穿過血腦障壁並活化微膠細胞，且腦部微膠細胞及星狀細胞增生的發炎現象，半乳糖凝集素-3 會被活化的微膠細胞或是巨噬細胞所分泌，同時具有自分泌 (autocrine) 及旁分泌 (paracrine) 的機制，除了作為促發炎因子外，也包含了在發炎的早期階段中影響免疫細胞的黏附能力 (adhesion) (Shin, 2013)。以上證明半乳糖凝集素-3 在神經發炎相關疾病中具有多面向的功能，但半乳糖凝集素-3 在阿茲海默症的大腦中扮演的角色仍是未知的，前文提到乙型類澱粉蛋白在大腦中可作為一種危害相關分子來誘發自體神經免疫反應，在臨床上也觀察到阿茲海默症病患血液中半乳糖凝集素-3 濃度增加，然而目前尚無相關或更深入的報導，因此在本篇研究中我們擬探討此一機制。

六、 Protein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1)

前文提到半乳糖凝集素-3 會活化 JAK-STAT 路徑導致發炎反應 (Jeon et al., 2010)，而 protein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1) 則會抑制 STAT 家族中 STAT1 與去氧核糖核酸結合的能力，進而降低 STAT1 路徑的後續轉錄反應，具有抑制發炎反應的功能 (Liu et al., 1998)。先前本實驗室發現大鼠經過空間學習訓練後會增加其海馬迴 CA1 區域中的 PIAS1 表現，若是在大鼠海馬迴 CA1 區域中轉染 PIAS1 使其大量表現則會促進大鼠的空間學習與記憶能力。反之，如果抑制 PIAS1 表現則會使大鼠的學習能

力下降 (Tai et al., 2011)。此外 PIAS1 透過類小泛素化修飾 (SUMOylation) Hes-1 具有保護神經細胞的能力，藉以對抗過氧化氫所引起的細胞死亡 (Chiou et al., 2014)，顯示 PIAS1 具有抵抗細胞凋亡以及促進學習記憶的能力。

七、實驗目的

由先前的研究結果得知，阿茲海默症病患血液中的半乳糖凝集素-3 濃度增加，且半乳糖凝集素-3 能夠促使癌症細胞堆積，而乙型類澱粉蛋白在大腦中會堆積與造成神經毒性並引發神經免疫反應，半乳糖凝集素-3 在其中所扮演的角色仍是未知的。因此本篇論文中將探討半乳糖凝集素-3 是否會促使乙型類澱粉蛋白的堆積及其機制為何。

材料與方法

一、動物實驗與飼養

本論文使用野生型 C57BL/6 品系小鼠 (strain name: C57BL/6JNarl, stock number: RMRC11005, National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan)、阿茲海默症動物模式中的 APP/PS1 基因轉殖小鼠 (strain name: B6.Cg-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/Mmjax, stock number: 005864)，以及半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠 (strain name: B6.Cg-Lgals3^{tm1Poi}/J, stock number: 006338)，基改小鼠均購自 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)。動物飼養在於中央研究院生物醫學研究所動物房 (Animal Facility of the Institute of Biomedical Sciences (IBMS), Academia Sinica, Taipei, Taiwan)，維持每日各 12 小時的光暗周期，早上 8:00 至下午 8:00 為光週期，下午 8:00 至隔天早上 8:00 為暗週期，環境溫度維持在 22±1 °C 及固定濕度，飼養期間給予充足的飼料與飲水。動物照顧與實驗處理主要依據美國國家衛生研究院的動物使用與照顧指南 (The Guidelines of Animal Use and Care of the National Institute of Health, USA) 以及中央研究院生物醫學科學研究所動物中心實驗飼養指南 (The Guidelines of Animal Feed, Animal Facility of the Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taiwan)，並經生醫所動物委員會核可。

二、實驗動物基因型鑑定

小鼠出生4周後依公母分籠並剪下尾巴約2 mm並裝進1.5 ml離心管，使用 KAPA Mouse Genotyping Kit (Catalog No. KR0385-v2.13 Kapabiosystems, Boston, USA) 進行實驗動物基因型鑑定。在裝有小鼠尾巴的離心管中加入二次水 44 μ l、10X KAPA Express Extract Buffer 5 μ l、1 U/ μ l KAPA Express Extract Enzyme 1 μ l，將離心管置於加熱器上，溫度設定為 75 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，95 $^{\circ}$ C 破壞酵素活性 5 分鐘，並且設定搖晃頻率 100 rpm 使溶液在加熱過程中得以均勻反應。於 PCR tube 中加入 3 μ l 的 DNA 萃取液、2X KAPA2G Fast (HotStart) Genotyping Mix 12.5 μ l、primer 各 1 μ l 及補二次水至 25 μ l 然後進行 PCR (polymerase chain reaction) 反應，反應條件為先進行 95 $^{\circ}$ C 3 分鐘，然後進行 37 次重複的 95 $^{\circ}$ C 30 秒、59 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 12 秒，最後 72 $^{\circ}$ C 3 分鐘後保存於 4 $^{\circ}$ C。反應完畢以 2% 洋菜膠體電泳進行確認。Primer 的序列及名稱均參考 Jackson Laboratory 所提供之動物基因型鑑定資訊，APP/PS1 基因轉殖小鼠的 primer 分別為 oIMR1644: 5'-AATAGAGAACGGCAGGAGCA-3'、oIMR1645: 5'-GCCATGAGGGCACTAATCAT-3'、oIMR7338: 5'-C TAGGCCACAG AATTGAAAGATCT-3'、oIMR7339: 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCA TCC-3'，PCR 產物為 internal positive control (324 bp) 以及 PSEN1 transgene (~608 bp)。半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的 primer 分別為

oIMR7107: 5'-GAGGAGGGTCAAAGGGAAAG-3'、 oIMR7399: 5'-GACT
GGAATTGCCCATGAAC-3'、 oIMR8439: 5'-TCGCCTTCTTGACGAGTT
CT-3'，PCR 產物為 wild type gene (~220 bp) 以及 mutant Lgals3^{tm1Poi}
(~150 bp) (Protech Technology Enterprise, Taipei, Taiwan)。

三、海馬迴及前額葉皮質組織分離

過去研究指出，背側海馬迴 (dorsal hippocampus) 主要與認知能力有關，而腹側海馬迴 (ventral hippocampus) 則多與壓力、情緒的處理有關 (Fanselow and Dong, 2010)，因此本論文的實驗中以背側海馬迴及前額葉皮質 (prefrontal cortex) 做為主要研究區域。小鼠皆以斷頭方式取腦後，將全腦放入 4 °C 磷酸緩衝生理食鹽水 (phosphate buffered saline, PBS) 三至五分鐘，然後置於低溫平台上以 free-hand 技術分離出背側海馬迴及前額葉皮質組織，取下組織後立即置於乾冰上，待其冷凍硬化後裝到 1.5 ml 離心管並儲存於 -80 °C 冰箱中。

四、蛋白質均質液置備

腦組織置入 200 µl 溶解緩衝液 (lysis buffer) 中，經由 4 °C 超音波震盪兩次，每次 7 分鐘，以 14000 rpm 離心 10 分鐘後取上清液，上清液儲存於 -80 °C 冰箱中。溶解緩衝液中含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM

NaCl、2 mM EDTA 以及 1% IGEPAL CA-630，每 10 ml 溶解緩衝液中加入各一顆 protease inhibitor cocktail (Catalog No. 05892791001, Complete ULTRA Tables, Mini, EDTA-free, EASYpack, Roche, Mannheim, Germany) 及 phosphatase inhibitor (Catalog No. 04906837001, PhosSTOP, Roche)。

五、蛋白質濃度測定

利用酸性染劑 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, California, USA) 與蛋白質結合時析光值會從 465 nm 轉移到 595 nm 的特性來測定蛋白質濃度。取 2 μ l 的蛋白質均質液加入 5 倍稀釋的酸性染劑 998 μ l，以分光光度計 595 nm 波長測定吸光值。標準濃度曲線設定為利用濃度 2、4、6、8、10 μ g/ μ l 之胎牛血清蛋白測定吸光值，用以測定樣本中蛋白質濃度。

六、西方墨點法

蛋白質樣本經定量後，加入 5 倍 Protein Loading Buffer (Catalog No. GM47-b, 5X Protein Loading Buffer, GMbiolab, Taipei, Taiwan) 以及二次水，配成濃度 2 μ g/ μ l 的蛋白質溶液，置於 95 $^{\circ}$ C 加熱板上 10 分鐘，加熱完畢置於冰上。樣本配置完畢後進行電泳分析，電泳分為兩種，一種為 Glycine-

SDS-PAGE，另一種為 Tricine-SDS-PAGE，其中 Tricine-SDS-PAGE 主要用於觀察 10-kDa 以下蛋白質，其餘皆使用 Glycine-SDS-PAGE。Glycine-SDS-PAGE 所需的電泳緩衝液 (running buffer) 成分為 25 mM Tris、192 mM glycine、0.1 % SDS，膠體分為兩種，分別為上層的堆聚膠體 (stacking gel) 以及下層的分離膠體 (separating gel)，堆聚膠體的緩衝液為 0.5 M Tris-HCl 且 pH 值為 6.8，分離膠體的緩衝液為 1.5 M Tris-HCl，pH 值為 8.8。Tricine-SDS-PAGE 的電泳緩衝液分為兩種，分別為正極緩衝液 (anode buffer) 及負極緩衝液 (cathode buffer)，正極緩衝液成分為 0.1 M Tris、22.5 mM HCl，pH 值為 8.9，負極緩衝液成分為 0.1 M Tris、0.1 M tricine、0.1 % SDS，配製膠體所需的緩衝液 (gel buffer) 則只有一種，成份為 3 M Tris、1M HCl、0.3 % SDS，pH 值為 8.45。Glycine-SDS-PAGE 以固定電流每片 25 mA 分離不同分子量的蛋白質，Tricine-SDS-PAGE 則是先以固定電壓 30 V 且進行 30 分鐘使樣本從膠槽移動到堆聚膠體內，再以固定電流每片 25 mA 分離蛋白質。進行完電泳後，膠體取出疊合到已經預先浸泡甲醇的 PVDF 膜上 (poly-vinylidene difluoride membrane, Millipore, Massachusetts, USA)，然後置入濕式轉漬槽，加入轉漬緩衝液 (transfer buffer)，其成分為 25 mM Tris、192 mM glycine、15 % methanol，然後設定固定電壓 100 V 轉漬 1 小時。轉漬完畢後將 PVDF 膜置於含有 5 % skim milk (Catalog No. DIFCO 232100, Becton Dickinson, East

Rutherford, New Jersey, USA) 的 0.1 % TBST 溶液中，於室溫下以 40 rpm 搖晃 1 小時，避免非專一性結合，然後再以 0.1% TBST 以 70 rpm 搖晃清洗三次，每次 5 分鐘，清洗後加入以 0.1 % TBST 稀釋過的初級抗體，並於 4 °C 下以 40 rpm 搖晃反應 16 至 18 小時，反應完畢後再以 0.1% TBST 清洗三次，每次 10 分鐘，再加入接有 HRP 之二級抗體於室溫下搖晃反應 1 小時，以 0.1 % TBST 清洗三次，每次 10 分鐘，最後加入化學冷光試劑 (chemiluminescence HRP substrate, Millipore) 反應，置於 LAS-3000 影像系統 (Fujifilm, Tokyo, Japan) 進行曝光擷取成像，存取之影像以 NIH Image J Software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) 量化分析。使用的初級抗體有 rabbit anti-PIAS1 (1 : 5000, Catalog No. 2474-1, Epitomics, Burlingame, USA)、mouse anti-Actin (1 : 200000, Catalog No. MAB1501, Millipore)、goat anti-Gal-3 (1 : 5000, Catalog No. AF1197, R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、mouse anti- β -Amyloid (1 : 1000, Catalog No. 803001, Biologend, San Diego, CA)、mouse anti-CD-10 (1 : 500, Catalog No. sc-46656, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA)、rabbit anti IDE (1 : 5000, Catalog No. ab32216, Abcam, Cambridge, UK)、rabbit anti-Prealbumin (1 : 1000, Catalog No. sc-13098, Santa Cruz Biotechnology)、二級抗體分別有 goat-anti-rabbit IgG、goat-anti-mouse IgG、goat-anti-rat IgG、donkey-anti-goat IgG (1 : 8000, Catalog No. 111-005-

003、005-005-003、112-005-003、705-005-003, Jackson Immuno-Research, PA, USA)。

七、免疫共沉澱法

進行半乳糖凝集素-3、乙型類澱粉蛋白及 Flag 標誌蛋白的免疫共沉澱法時，將樣本均質液取出 500 μg 並加入 3 μl 的抗體，抗體主要為 goat anti-Gal-3 (Catalog No. AF1197, R&D systems) 以及 mouse anti-Flag M2 antibody (Catalog No. F1804, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)，控制組則加入 3 μl 的 rat 或 mouse IgG 抗體，置於 4 °C 反應 16 至 18 小時。反應完畢後加入帶有 protein A 或 protein G 的磁珠 (30 μl , 50% slurry, GE Healthcare, Barrington, IL, USA) 並於 4 °C 反應 3 個小時，然後以磁座吸附磁珠，此時磁珠已形成免疫聚合體，使用 1 倍磷酸鹽緩衝液 (PBS buffer) 清洗磁珠，加入 300 μl 磷酸鹽緩衝液後上下倒置 8 至 10 次，再次置於磁座吸附磁珠並丟棄上清液，反覆清洗 3 次，清洗完畢後加入 2 倍 Protein Loading Buffer 以 95 °C 反應 10 分鐘，反應完畢置於磁座收取上清液進行西方墨點法。

八、質體建構

建構帶有 Flag 標示的半乳糖凝集素-3 質體 (Flag-tagged *Gal-3*)

plasmid) 時，首先從大白鼠的海馬迴中萃取 mRNA (messenger RNA) 後反轉錄成 cDNA (complementary DNA)，以此作為模板，大量複製 *Gal-3* 的 cDNA，使用的 primer 為 5'-GGCGGATCCATGGCAGACGGCTTCTC ACTTAATGATG-3' (forward) 以及 5'-ATCAAGCTTTT TAGATCATGGCGT GGGAAGCGCTGGTG-3' (reverse) (Protech Technology Enterprise)，大小為 348 bp。將 PCR 產物使用 BamHI 及 HindIII 限制酶與 T4 接合酶，接合在哺乳類表現載體 pCMV-Tag2B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。

九、轉型作用

取 1 至 10 ng 質體 DNA 加入 100 μ l 勝任細胞中混和 (competent cell, strain: DH5 α , Catalog No. FYE678-80VL, Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan)，置於冰上 5 分鐘，然後於 42 $^{\circ}$ C 水浴 45 秒進行 heat shock，取出後放置於冰上 2 分鐘，取 10 μ l 菌液加入 LB 培養液稀釋至 100 μ l，均勻塗佈於含有篩選性抗生素 kanamycin 的 LB 培養基上，於 37 $^{\circ}$ C 培養 16 至 18 小時使單一菌落生成，挑選獨立且顆粒較大的單一菌落，萃取其質體 DNA 後置入 PCR tube 並加入含有 T4 promoter primer 及 T7 promoter primer 進行核酸定序分析。

十、大量質體 DNA 製備

大量質體 DNA 製備使用 TOOLS Plasmid Mini kit (Catalog No. TT-A03-3, TOOLS Biotechnology, Taipei, Taiwan), 取 1 至 4 ml 含有質體 DNA 之大腸桿菌菌液加入 1.5 ml 的離心管中以 12000 rpm 離心 2 分鐘並去除上清液, 加入 200 μ l 的 Buffer P1 並震盪混和均勻直到看不見沉澱的菌體, 加入 200 μ l 的 Buffer P2 上下倒置 10 次, 加入 300 μ l 的 Buffer P3 再次上下倒置 10 次並觀察到液體內有雲霧狀析出物, 以 12000 rpm 離心 10 分鐘並將上清液移至 Spin Column CP3, 以 12000 rpm 離心 1 分鐘, 去除濾液後於 column 中沿管壁環繞加入 400 μ l 的 Buffer PD 然後以 12000 rpm 離心 1 分鐘以除去殘餘核酸水解酶, 倒掉濾液同樣沿管壁環繞加入 700 μ l 的 Buffer PW 並以 12000 rpm 離心 1 分鐘以除去鹽類, 倒出濾液後再次離心 3 分鐘並將 column 移至新的 1.5 ml 離心管, 加入 50 μ l 的 Buffer EB 後室溫靜置 5 分鐘並以 12000 rpm 離心 2 分鐘溶出質體 DNA, 所得之 DNA 溶液以核酸分析儀 (Product Model: Nano-200, Hangzhou Allsheng Instruments, Hangzhou City, China) 測量濃度。

濃縮質體 DNA 需加入 DNA 溶液十分之一體積的 3M NaOAc (pH 5.2), 混和後可觀察到絲狀懸浮物於溶液中, 再加入 DNA 溶液兩倍體積之 100% 酒精混和均勻, 置於 -80°C 中 2 小時以上, 以 14000 rpm 於 4°C 中離心 20

分鐘，去除上清液後加入同樣體積之 70% 酒精上下倒置 8-10 次，再次離心 1 分鐘後去除上清液，以真空抽氣乾燥 DNA 沉澱物，加入 10mM Tris-HCl (pH 8.5) 配成濃度 2.77 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 DNA 溶液。

十一、藥物與質體 DNA 製備及動物海馬迴內注射

$\text{A}\beta$ (amino acid 1-42) 經由 Anaspec (Catalog No. AS-20276, Fremont, CA, USA) 所購入，注射前溶於 1% NH_4OH ，配製成濃度 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。Branched PEI (Catalog No. 408727, Sigma-Aldrich) 加入 5% glucose 稀釋至 0.1 M 後與濃度 2.77 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的質體 DNA 混和，依 PEI 氮原子比 DNA 磷酸根等於 10 比 1 的比例做為混和基準，混和物震盪 30 秒後於室溫下靜置 15 分鐘即可使用。

小鼠以 pentobarbital (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉後以立體定位儀進行手術 (stereotaxic surgery)。固定老鼠頭部後剃掉老鼠頭部細毛露出皮膚，於皮膚表面塗抹 70% 酒精與碘液消毒，然後以手術刀劃開頭皮露出頭蓋骨，以棉花進行止血並用酒精消毒，以橡膠吹塵球吹乾頭蓋骨表面並露出囟門 (bregma)，進行背側海馬迴 CA1 區域的定位，定位座標為囟門後 2.3 mm，兩側 1.8 mm，深度為頭骨下方 1.8 mm，以鉛筆於兩個定位點標誌記號，使用牙科鑽於此兩位置鑽出小洞，待穿過頭蓋骨並以針尖挑破硬腦膜後，置

入注射針頭。兩側藥物或質體 DNA 的注射皆以 0.35 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度進行，每次注射量皆為 0.3 μl 。

十二、免疫螢光染色

小鼠以 pentobarbital (100 mg/kg) 麻醉，以 4 °C PBS 灌流 15 至 20 分鐘，再以 4% paraformaldehyde 灌流 15 分鐘進行組織固定。取腦後將腦置於 30% sucrose/4% paraformaldehyde 溶液中 20 至 48 小時進行後固定與脫水。將大腦冷凍後以 30 μm 的厚度進行冷凍切片並置於 gelatin-coated 的載玻片上，切片完畢後存放於 4 °C 冰箱中。進行免疫螢光染色時，將腦切片以 1 倍 PBS 浸潤 10 分鐘後放入 95 °C 的 0.1 M citric acid/0.1 M sodium citrate buffer 中 45 分鐘進行 antigen retrieval。完畢後以 1 倍 PBS 清洗 3 次，每次均浸泡並搖晃 10 分鐘。配置含有 2% BSA 及 0.5% Triton X-100 的 1 倍 PBS 溶液，並將清洗完畢的腦切片置入溶液中反應 1 小時以避免非專一性結合。反應完畢後將腦切片以 goat anti-Gal-3 (1 : 200, Catalog No. AF1197, R&D systems) 與 rabbit anti-Iba-1 (1 : 200, Catalog No. 10904-1-AP, Proteintech Group, IL, USA) 在 4°C 環境下反應 16 至 18 小時，然後以 1 倍 PBS 清洗 3 次，每次均浸泡並搖晃 10 分鐘。清洗完畢後先以 donkey anti-goat secondary antibody conjugated with Alexa Fluoro 488 (1 : 500, Catalog No. 705-545-003, Jackson ImmunoResearch) 室溫

反應 1 小時，再以 PBS 清洗 3 次，每次 10 分鐘，然後再以 goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa Fluoro 594 (1 : 500, Catalog No. 111-585-003, Jackson ImmunoResearch) 室溫反應 1 小時，再以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，然後加入 20 μ l 的 DAPI Fluoromount-G mounting medium (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 進行封片。最後使用 Zeiss LSM700 Stageconfocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 以雷射激發螢光成像後擷取圖片。

十三、統計分析

生化分析若僅有兩組比較時使用 Student' *t*-test，三組以上比較則使用單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做事後檢定分析比較任意兩組間的差異。 $P < 0.05$ 即認為統計上有顯著差異 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.001$)。

結果

一、乙型類澱粉蛋白急性刺激後 48 小時為最適宜觀察其寡聚合作用的時間點

實驗首先須確認在小鼠的背側海馬迴 CA1 區域給予乙型類澱粉蛋白急性刺激後是否可以觀察到寡聚現象以及給予藥物後多久是最適宜的觀察時間。將實驗分成五組，第一組為給予溶劑 NH_4OH 的控制組，另外四組則給予乙型類澱粉蛋白，分別為給藥後 6 小時、48 小時、8 天及 14 天。結果如圖 1，藥物經過 6 小時即可觀察到寡聚合作用的發生，並隨著時間增加，其作用越明顯，在給藥後 48 小時的乙型類澱粉蛋白高分子量寡聚物 (HMW) 比 6 小時要來的多，給藥後 8 天與 48 小時相比，其寡聚合作用的強度雖有增加，但其增加程度僅與 48 小時相比 6 小時的增加程度相當，而給藥後 14 天的寡聚合作用最為明顯。然而為了方便實驗操作及觀察，我們認為給藥後 48 小時是最為適宜觀察的時間點，在後續的相關實驗也將選用這時間點。

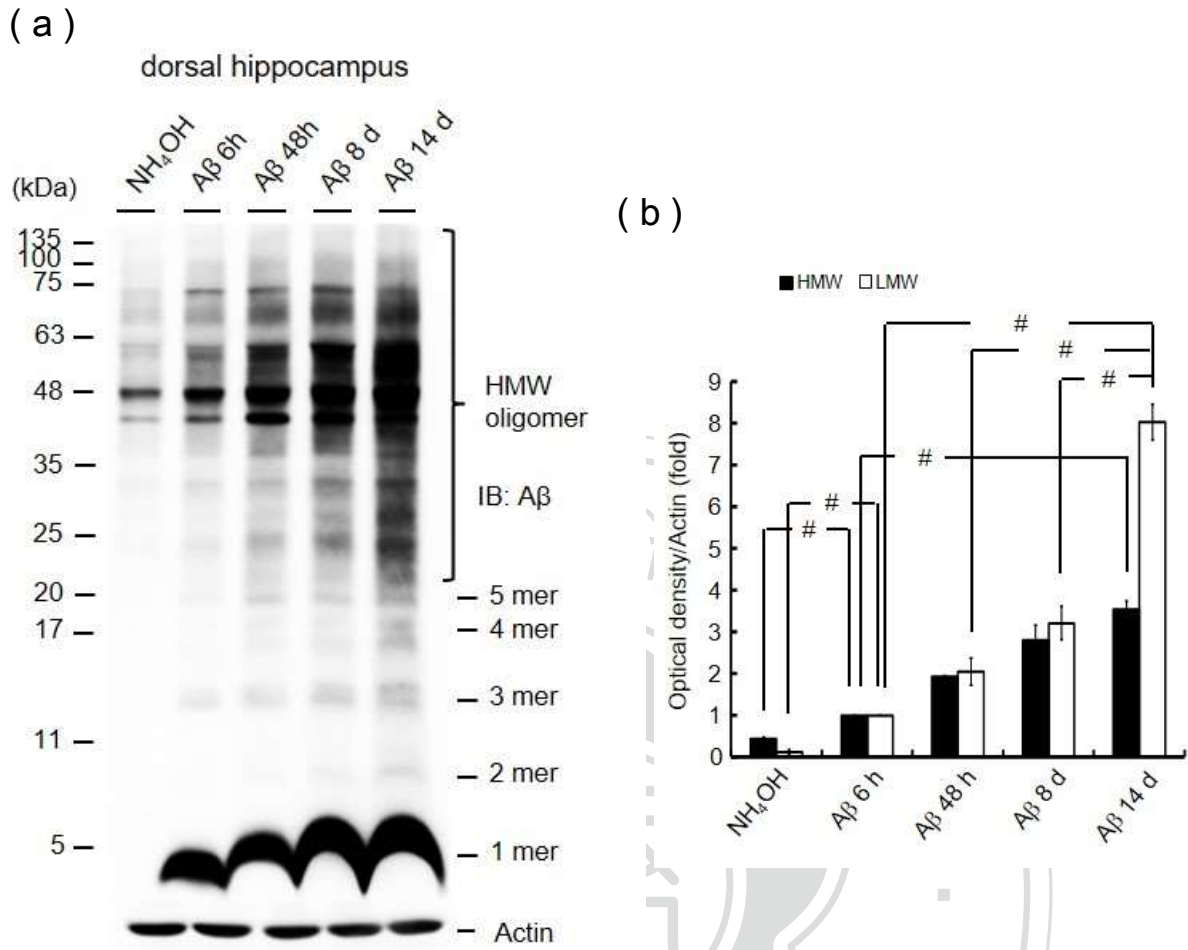


圖 1、乙型類澱粉蛋白急性刺激後 48 小時為最適宜觀察其寡聚合作用的時間點

測試給予乙型類澱粉蛋白急性刺激後的寡聚合效果，我們認為刺激 48 小時後的結果最為合適後續的實驗設計。(a)為寡聚合作用表現結果。(b)為寡聚合作用量化圖。在高分子量寡聚合作用 (HMW, > 20 kDa)，隨著給予乙型類澱粉蛋白刺激的時間增加，其作用也會越嚴重 ($F_{4,10} = 47.006$, $P < 0.001$)。而在低分子量寡聚合作用 (LMW, < 20 kDa) 也有同樣的現象($F_{4,10}$

= 107.26, $P < 0.001$)。數據以 mean \pm s.e.m.表示，利用 one-way analysis of variance (ANOVA) 統計分析並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做後檢定分析。 $\#P < 0.001$ ， $**P < 0.01$ ， $*P < 0.05$ 。



二、不表現半乳糖凝集素-3 減緩乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用

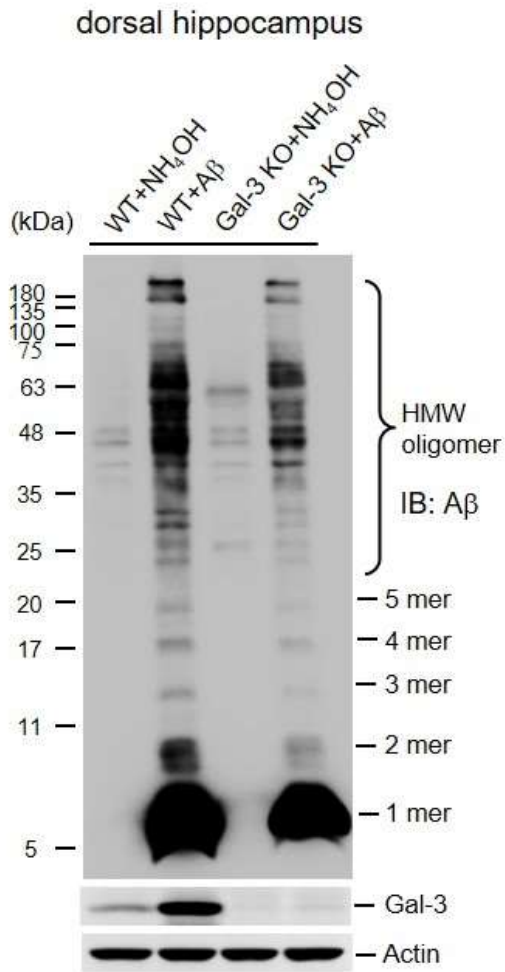
為了解半乳糖凝集素-3 對於乙型類澱粉蛋白的堆積是否有影響，因此在本實驗中選用兩種 3 個月大的小鼠，分別為野生型小鼠，另外一種為半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠，欲觀察缺乏半乳糖凝集素-3 對於乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用有何影響。結果如圖 2 所示，實驗分成四組，第一組及第二組分別為野生型小鼠給予溶劑 NH_4OH 及乙型類澱粉蛋白，第三組及第四組則為半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠給予 NH_4OH 及乙型類澱粉蛋白，在給藥後 48 小時犧牲取腦並分離出背側海馬迴進行西方墨點法，每組皆為 4 個樣本數。寡聚合作用的觀察方式區分高分子量 (HMW) 寡聚合作用以及包含雙聚體至五聚體的低分子量 (LMW) 寡聚合作用。從圖 2b 的量化圖可得知，缺乏半乳糖凝集素-3 的小鼠在給予乙型類澱粉蛋白後的高分子量寡聚合作用相較於野生型小鼠要顯著減緩許多，且在低分子量寡聚合作用也有同樣的結果，因此可以得知乳糖凝集素-3 的不表現可能可以減緩乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用。

另外為了驗證實驗分組是否確實，我們也針對這四組樣本觀察了半乳糖凝集素-3 的表現情形。結果如圖 2c，半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠確實不會表現半乳糖凝集素-3，然而我們發現野生型小鼠在給予了乙型類澱粉蛋白急性刺激 48 小時後，其半乳糖凝集素-3 的表現明顯增加許多，表示除了

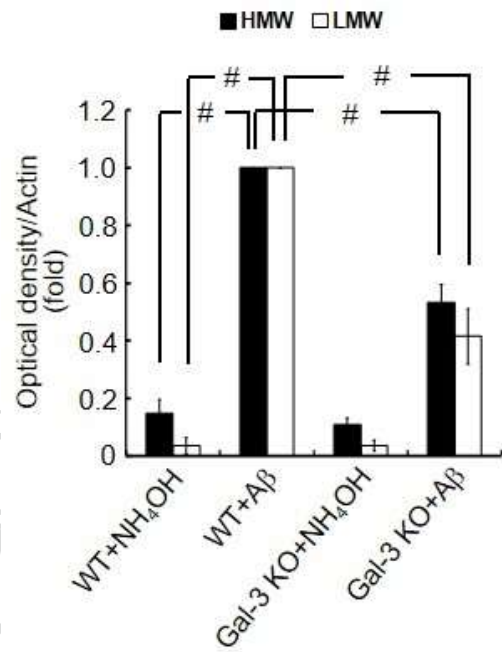
半乳糖凝集素-3 缺乏會影響乙型類澱粉蛋白的堆積外，乙型類澱粉蛋白也
可能會影響半乳糖凝集素-3 的表現。



(a)



(b)



(c)

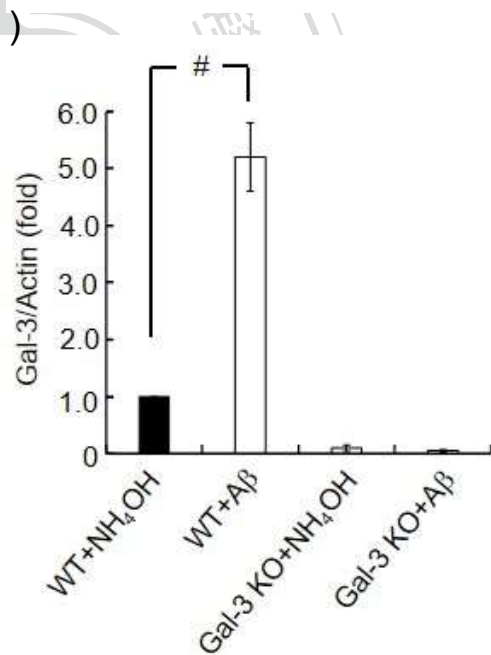
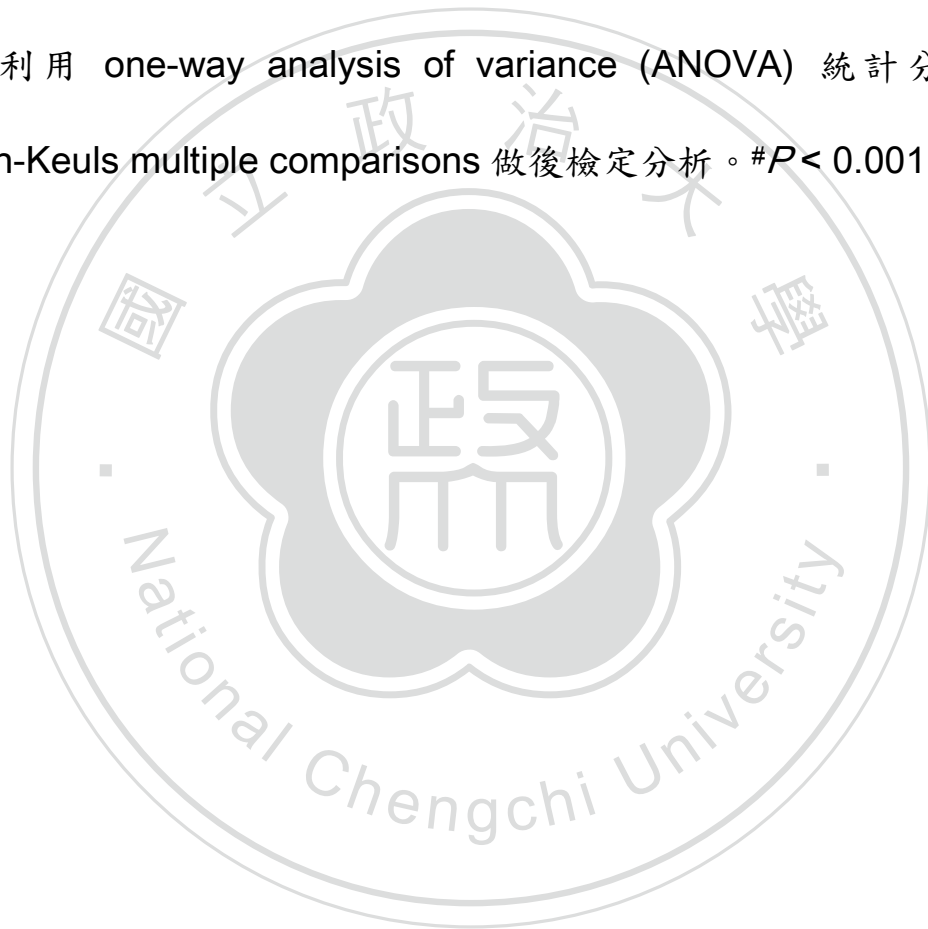


圖 2、不表現半乳糖凝集素-3 減緩乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用

野生型小鼠及半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠分別在 CA1 給予 NH₄OH 及乙型類澱粉蛋白急性刺激。(a)為寡聚合作用及半乳糖凝集素-3 表現結果。

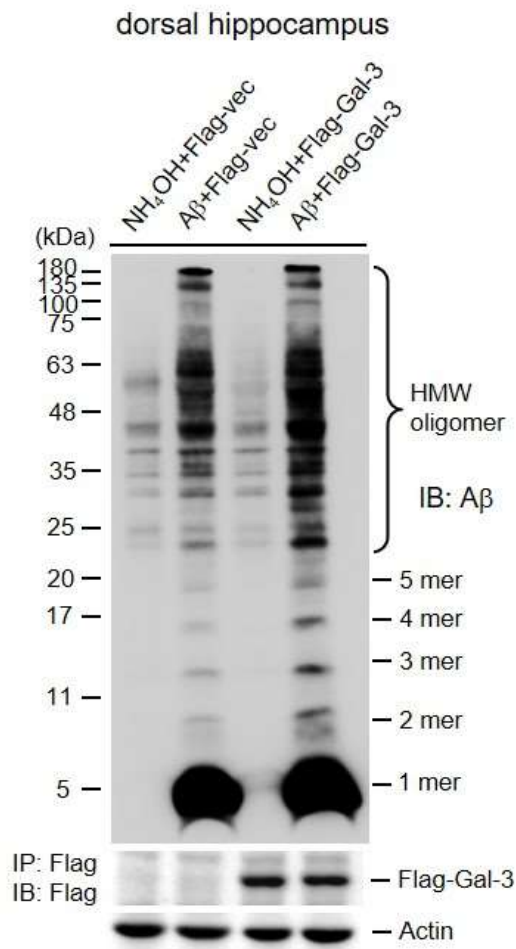
(b)為寡聚合作用量化圖。在高分子量寡聚合作用中，半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠與野生型小鼠相比顯著減緩 ($F_{3,12} = 79.9, P < 0.001$)，且在低分子量寡聚體中也有同樣的現象 ($F_{3,12} = 103.58, P < 0.001$) (c)為半乳糖凝集素-3 表現量化圖。野生型小鼠給予乙型類澱粉蛋白後，其半乳糖凝集素-3 的表現量明顯多於控制組 ($F_{3,12} = 66.76, P < 0.001$)。數據以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示，利用 one-way analysis of variance (ANOVA) 統計分析並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做後檢定分析。# $P < 0.001$ 。



三、過度表現半乳糖凝集素-3 促進乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用

先前的實驗已證明半乳糖凝集素-3 的缺乏能減緩乙型類澱粉蛋白的堆積，依據此結果我們推測若過度表現半乳糖凝集素-3 應該會增加乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用。因此在本實驗中將 3 個月大的野生型小鼠分為四組，第一組及第二組分別在背側海馬迴 CA1 區域注射 Flag-vector+NH₄OH 及 Flag-vector+乙型類澱粉蛋白，第三組及第四組則在背側海馬迴 CA1 區域注射 Flag-Gal-3+NH₄OH 及 Flag-Gal-3+乙型類澱粉蛋白，在注射後 48 小時犧牲取腦並分離出背側海馬迴進行西方墨點法，每組皆為 4 個樣本數。結果如圖 3 所示，在過量表現半乳糖凝集素-3 的情況下會促進乙型類澱粉蛋白的高分子量寡聚合作用，且在低分子量寡聚合作用也有同樣的結果。為了驗證背側海馬迴 CA1 區域是否確實過量表現半乳糖凝集素-3，對這四組樣本進行免疫共沉澱法後以西方墨點法觀察於半乳糖凝集素-3 的分子量位置是否正確顯現標記蛋白 Flag 的訊號。實驗結果證明額外給予半乳糖凝集素-3 的質體 DNA 有確實表現，且會促使乙型類澱粉蛋白的堆積。

(a)



(b)

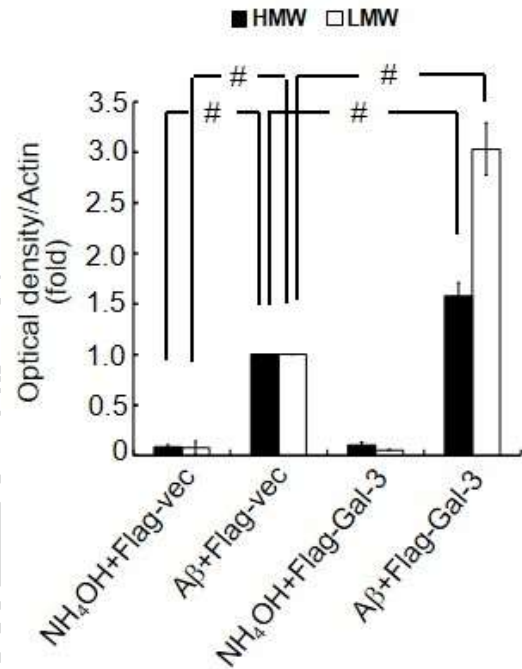


圖 3、過度表現半乳糖凝集素-3 促進乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用

野生型小鼠於 CA1 分別注射 Flag-Vector 及 Flag-Gal-3，再區分兩組立即分別給予 NH₄OH 與乙型類澱粉蛋白急性刺激。(a)為寡聚合作用及經免疫共沉澱法驗證半乳糖凝集素-3 是否過度表現的結果。(b)為寡聚合作用量化圖。過度表現半乳糖凝集素-3 使乙型類澱粉蛋白在高分子量寡聚合情形顯著更為嚴重 ($F_{3,12} = 115.33$, $P < 0.001$)，在低分子量寡聚體中也有同

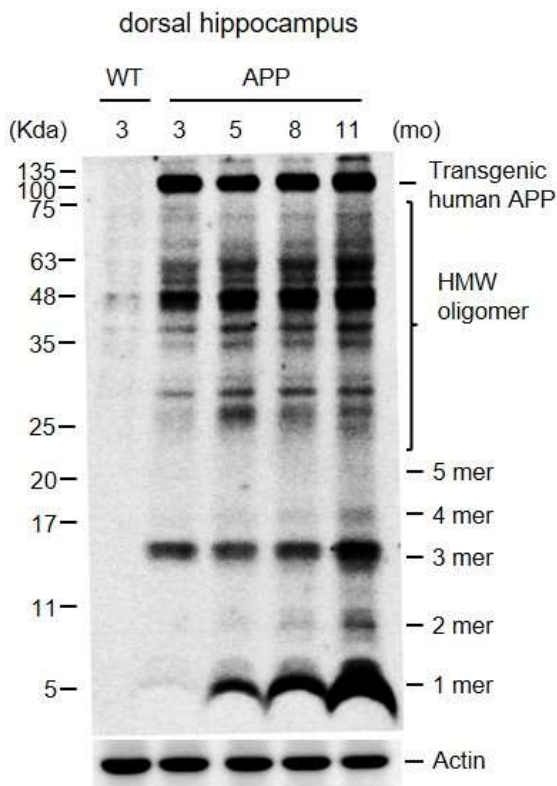
樣的現象 ($F_{3,12} = 108.65, P < 0.001$)。數據以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示，利用 one-way ANOVA 統計分析並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做後檢定分析。# $P < 0.001$ 。



四、海馬迴中乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用隨著年齡增長而增加

前述實驗皆是人為給予乙型類澱粉蛋白以觀察其寡聚合作用，接下來欲進一步觀察內生性的乙型類澱粉蛋白在不同年齡的 APP/PS1 小鼠其寡聚合作用的現象為何。實驗中控制組選用 3 個月大野生型小鼠，APP/PS1 小鼠則區分 3 個月大、5 個月大、8 個月大以及 11 個月大，每組皆為 4 個樣本數，同樣將其犧牲後取腦並分離出背側海馬迴並進行西方墨點法觀察乙型類澱粉蛋白寡聚合作用。結果如圖 4a 所示，做為控制組的野生型小鼠沒有寡聚合作用的現象，實驗組則可以觀察到乙型類澱粉蛋白單聚體的表現量隨著 APP/PS1 小鼠年齡增長而增加，在高分子量寡聚體的聚合情形也有隨著年齡增加而越來越嚴重的趨勢，但直到第 11 個月與第 3 個月相比才有顯著的差異，另外在低分子量寡聚合的作用也有觀察到隨著年齡增長而增加，而在 11 個月大相比 3 個月、5 個月及 8 個月大時增加的強度顯著較多。另外 APP/PS1 各組都可以在 100-kDa 的位置觀察到明顯的訊號，該訊號為經基因轉殖而表現的人類類澱粉前驅蛋白。

(a)



(b)

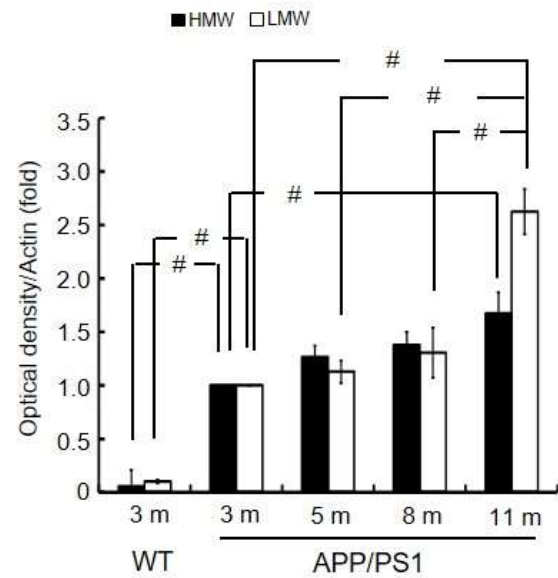


圖 4、海馬迴中乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用隨著年齡增長而增加

APP/PS1 小鼠於不同年齡犧牲並取出背側海馬迴進行西方墨點法，觀察乙型類澱粉蛋白寡聚合作用。(a)為寡聚合作用結果。(b)為寡聚合作用量化圖。高分子量寡聚體的聚合情形有隨著年齡增長而增加，到第 11 個月與第 3 個月相比有顯著的差異 ($F_{4,15} = 19.45$, $P < 0.001$)，低分子量也有同樣的結果，11 個月大相比 3 個月、5 個月及 8 個月大時增加的強度顯著較多

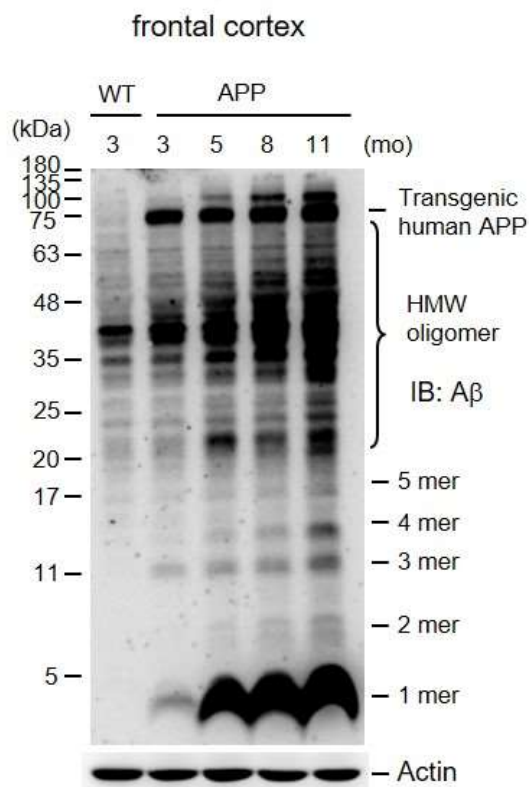
($F_{4,15} = 37.39, P < 0.001$)。數據以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示，利用 one-way ANOVA 統計分析並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做後檢定分析。# $P < 0.001$ 。



五、 大腦皮質前葉中的乙型類澱粉蛋白寡聚合作用也會隨著年齡增長而增加

在過去的研究指出，老年斑塊在腦組織中主要於兩個位置被發現，除了海馬迴外，另一個被觀察到的組織為大腦皮質前葉 (Cras et al., 1991)，因此我們也針對不同年齡 APP/PS1 小鼠的前額葉皮質觀察乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用。同樣選用 3 個月大野生型小鼠，APP/PS1 小鼠也是區分為 3 個月大、5 個月大、8 個月大以及 11 個月大，每組樣本數為 3 個，結果如圖 5a 所示，與在背側海馬迴所觀察到的結果相仿，高分子量的寡聚合作用隨著年齡增加而有變嚴重的趨勢，但與海馬迴不同的是 8 個月大以及 11 個月大時強度就有顯著的增加，且在低分子量的寡聚合作用也有同樣的現象。

(a)



(b)

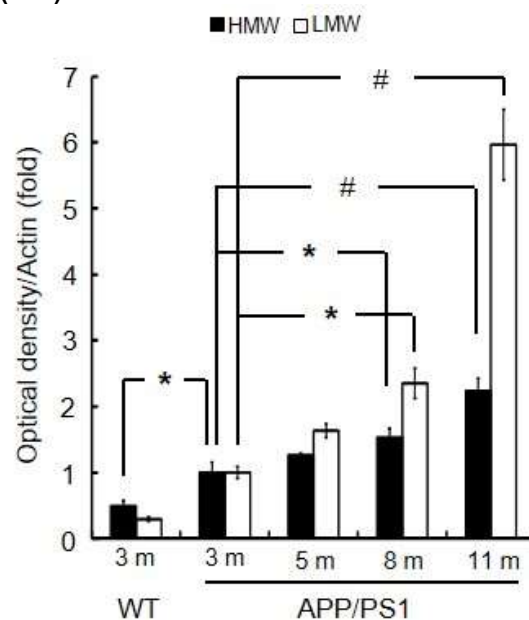


圖 5、大腦皮質前葉中的乙型類澱粉蛋白寡聚合作用也會隨著年齡增長而增加

針對不同年齡 APP/PS1 小鼠的大腦皮質前葉進行西方墨點法，觀察乙型類澱粉蛋白寡聚合作用。(a)為寡聚合作用結果。(b)為寡聚合作用量化圖。高分子量寡聚體的聚合情形有也會隨著年齡增長而增加，8 個月及 11 個月大時與 3 個月大相比有顯著的增加 ($F_{4,10} = 23.34, P < 0.001$)，低分子量寡

聚體也有同樣的結果 ($F_{4,10} = 67.8, P < 0.001$)。數據以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示，利用 one-way ANOVA 統計分析並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做後檢定分析。* $P < 0.05$ ，# $P < 0.001$ 。



六、 隨著 APP/PS1 小鼠的年齡增加，半乳糖凝集素-3 的表現也隨之增加，
但 PIAS1 的表現則減少

前述的實驗中發現乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用會隨著年齡增加而變得嚴重，另外也有發現到在野生型小鼠的背側海馬迴 CA1 區域給予乙型類澱粉蛋白可以觀察到半乳糖凝集素-3 的表現量增加，因此我們觀察半乳糖凝集素-3 在不同年齡 APP/PS1 小鼠中的表現情形。實驗分組同樣區分 3 個月大的野生型小鼠以及 3 個月大、5 個月大、8 個月大以及 11 個月大的 APP/PS1 小鼠，針對其背側海馬迴含 CA1 區域觀察其半乳糖凝集素-3 的表現情形。結果如圖 6b 所示，同樣 3 個月大的 APP/PS1 小鼠與野生型小鼠相比，半乳糖凝集素-3 的表現量顯著增加，而隨著 APP/PS1 小鼠年齡增加，半乳糖凝集素-3 的表現量也隨之增加，在 11 個月大時達到最高峰且顯著大於 3 個月、5 個月以及 8 個月大。

此外，我們還觀察了 PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1) 在不同年齡 APP/PS1 小鼠中表現量的改變。PIAS1 是類小泛素化 (SUMOylation) 的 E3 ligase，參與許多蛋白質的類小泛素修飾 PIAS1，具有抑制 STAT1 蛋白以及 NF- κ B 蛋白與基因啟動子 (promoter) 結合的能力，使得發炎相關基因的表現被抑制，因此被認為有抑制發炎反應的能力 (Liu et al., 2007)。由於半乳糖凝集素-3 在免疫反應中扮演的是促發炎因子

的角色，而 PIAS1 是抑制發炎反應的因子，所以我們也想了解 PIAS1 的表現情形在 APP/PS1 小鼠中是否也會隨著年齡而改變。結果如圖 6c 所示，PIAS1 的表現量在同樣 3 個月大的 APP/PS1 小鼠與野生型小鼠中相比雖有下降的趨勢，但沒有顯著的差異，而隨著年齡增加且病情加重，在 5 個月、8 個月以及 11 個月大時的表現量顯著比 3 個月大時下降許多。



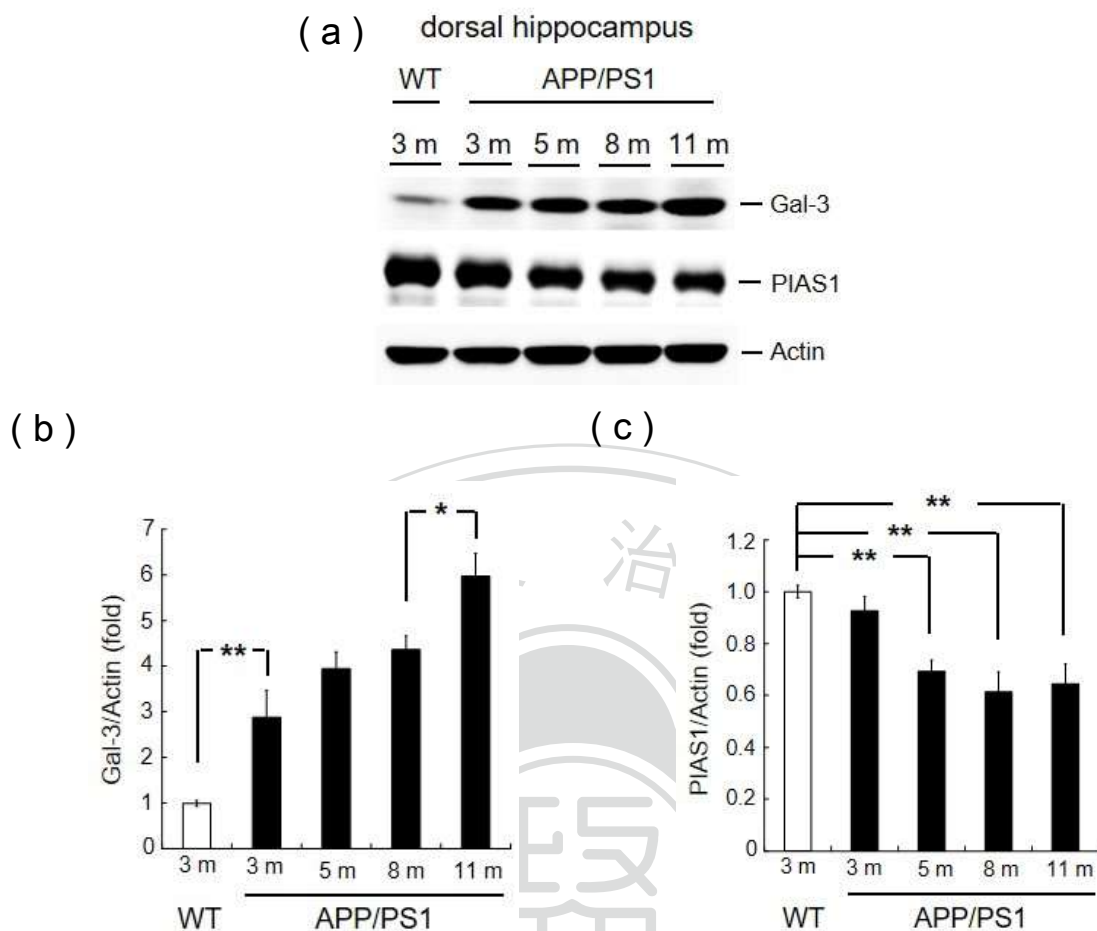


圖 6、隨著 APP/PS1 小鼠的年齡增加，半乳糖凝集素-3 的表現也隨之增加，但 PIAS1 的表現則減少

針對不同年齡的 APP/PS1 小鼠分析其背側海馬迴的半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 表現量。(a)為西方墨點法結果。(b)為半乳糖凝集素-3 表現結果量化圖。3 個月大的 APP/PS1 小鼠與同齡野生型小鼠相比，半乳糖凝集素-3 的表現量顯著增加，而隨著 APP/PS1 小鼠年齡增加，半乳糖凝集素-3 的表現量也隨之增加，在 11 個月大時達到最高峰且顯著大於 3 個月、5 個月以

及 8 個月大 ($F_{4,15} = 19.68, P < 0.001$)。 (c) 為 PIAS1 表現結果量化圖。 同樣 3 個月大的 APP/PS1 小鼠與野生型小鼠中相比雖有下降的趨勢，在 5 個月、8 個月以及 11 個月大時的表現量顯著比 3 個月大時下降許多 ($F_{4,15} = 8.82, P < 0.001$)。 數據以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示，利用 one-way ANOVA 統計分析並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做後檢定分析。 * $P < 0.05$ ， ** $P < 0.01$ 。



七、 半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 在正常生理狀態下其表現量不因年齡增長而改變

前述實驗發現半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 的表現在 APP/PS1 小鼠中會受到年齡的因素而改變其表現量，然而這意味的是在病理狀態下隨著年齡增加且病情加重而造成的影響，因此我們試圖區分這兩項因子的改變是受到阿茲海默症的病理現象影響或是單一隨著年齡增長而被影響。此實驗分為 4 組，我們將 3 個月、5 個月、8 個月以及 11 個月大的野生型小鼠犧牲取腦且分離出背側海馬迴後，以西方墨點法觀察半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 的表現量，各組均為 4 個樣本。結果如圖 7 所示，半乳糖凝集素-3 在不同年齡組別中的表現量沒有顯著的改變，PIAS1 的表現量也沒有顯著的變化，表示這兩個因子在正常生理狀態下不受到年齡的因素而改變。

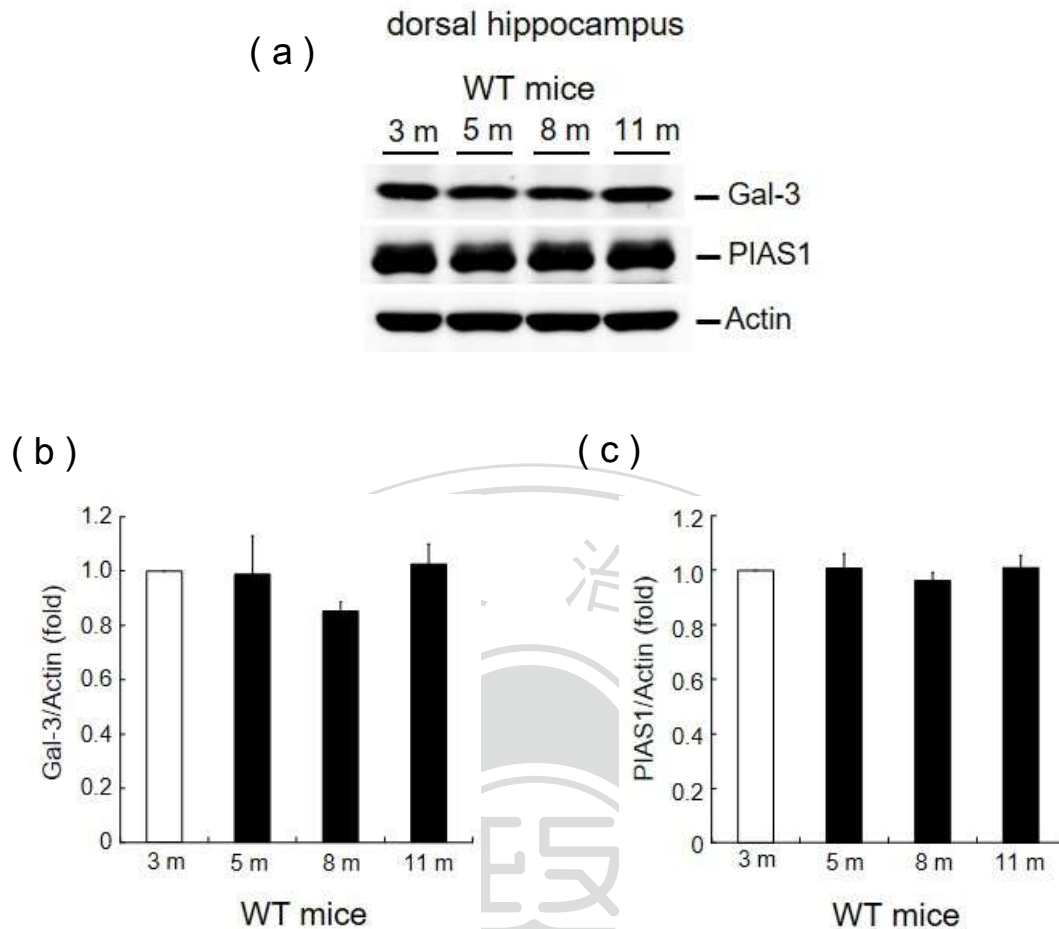


圖 7、半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 在正常生理狀態下其表現量不因年齡增長而改變

不同年齡的野生型小鼠犧牲取腦並分離出背側海馬迴以分析半乳糖凝集素-3 及 PIAS1 的表現量。(a)為西方墨點法結果。(b)為半乳糖凝集素-3 表現結果量化圖，各組間均無顯著差異 ($F_{3,12} = 0.87, P > 0.05$)。(c)為 PIAS1 表現結果量化圖，各組間均無顯著差異 ($F_{3,12} = 0.34, P > 0.05$)。數據以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示，利用 one-way ANOVA 統計分析並以 Newman-Keuls multiple comparisons 做後檢定分析。

八、半乳糖凝集素-3 與類澱粉前驅蛋白及乙型類澱粉蛋白會交互作用

先前的實驗結果顯示半乳糖凝集素-3 促進乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用，然而其中的機制仍然不清楚，在此我們想要探討其機制。我們首先探討半乳糖凝集素-3 與乙型類澱粉蛋白在海馬迴中是否有交互作用。實驗區分兩種樣本，一組為野生型小鼠，一組為 APP/PS1 小鼠，於 11 個月大時犧牲取腦，並分離出海馬迴以 anti-Gal-3 抗體進行免疫共沉澱法，再以西方墨點法觀察乙型類澱粉蛋白的表現情形。結果如圖 8 所示，在 APP/PS1 小鼠的腦中半乳糖凝集素-3 確實會與乙型類澱粉蛋白交互作用，而且只與單聚體有交互作用。此外，半乳糖凝集素-3 也與類澱粉前驅蛋白有交互作用 ($n = 2$)。此外以西方墨點法觀察半乳糖凝集素-3 的表現情形也如前述實驗相同，在 APP/PS1 小鼠中，半乳糖凝集素-3 的表現是較多的。

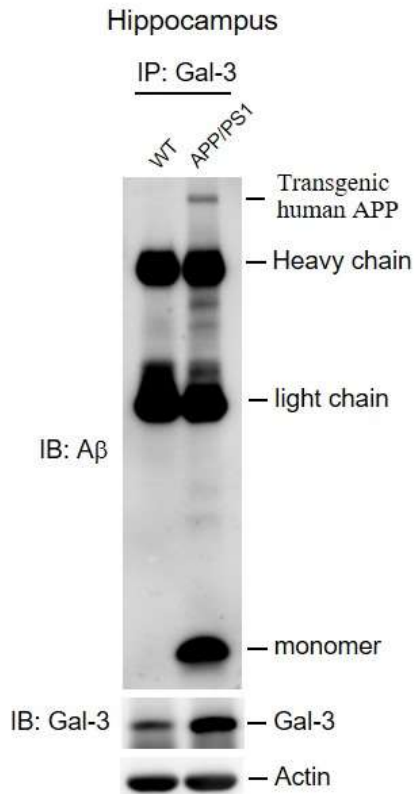


圖 8、半乳糖凝集素-3 與類澱粉前驅蛋白及乙型類澱粉蛋白會交互作用

針對野生型小鼠及 APP/PS1 小鼠的海馬迴以 anti-Gal-3 抗體進行免疫共沉澱法，並以西方墨點法觀察乙型類澱粉蛋白及半乳糖凝集素-3，觀察兩者交互作用結果。

九、半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠其海馬迴中使代謝乙型類澱粉蛋白的腦啡肽酶表現量增加

經過確認半乳糖凝集素-3 會與乙型類澱粉蛋白交互作用後，我們想進一步了解為何半乳糖凝集素-3 會促進乙型類澱粉蛋白的聚集。我們有興趣的是腦中三個與乙型類澱粉蛋白降解有關的酵素，因此我們分別觀察了野生型小鼠以及半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的腦啡肽酶 (neprilysin, NEP)、胰島素降解酶 (insulin-degrading enzyme, IDE) 以及甲狀腺素結合蛋白 (transthyretin, TTR) 的表現。其中前兩者與乙型類澱粉蛋白的降解有關，甲狀腺素結合蛋白則是會與乙型類澱粉蛋白的單聚體及低分子量寡聚體結合，阻止乙型類澱粉蛋白朝向高分子量寡聚體型態堆積，且進一步降解已堆積的乙型類澱粉蛋白 (Li et al., 2013)。實驗結果如圖 9 所示，兩組的樣本數皆為 5。圖 9b 中顯示，腦啡肽酶在半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠背側海馬迴中的表現量約是野生型小鼠的兩倍，但是圖 9c 的胰島素降解酶及圖 9d 的甲狀腺素結合蛋白的表現量則沒有顯著的改變。

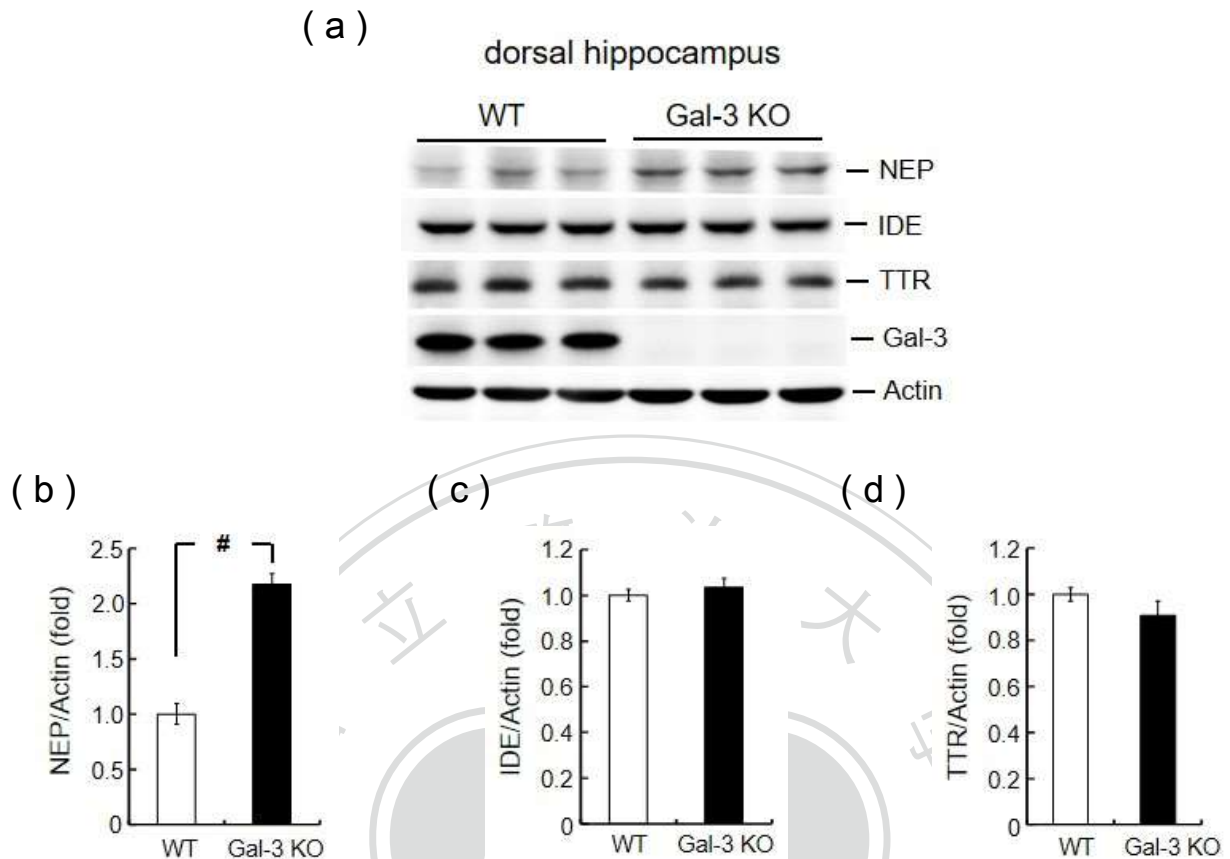


圖 9、半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠其海馬迴中使代謝乙型類澱粉蛋白的腦啡肽酶表現量增加

針對野生型小鼠及半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的背側海馬迴分析腦啡肽酶、胰島素降解酶以及甲狀腺素結合蛋白的表現量是否有差異。(a)為經西方墨點法分析後結果。(b)為腦啡肽酶表現的量化圖。半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的腦啡肽酶表現顯著比野生型小鼠還要多 ($t_{1,8} = 8.61$, $P < 0.001$)。(c)為胰島素降解酶表現的量化圖。兩組間均無顯著差異 ($t_{1,8} = 0.72$,

$P > 0.05$)。(d)為甲狀腺素結合蛋白表現的量化圖。兩組間均無顯著差異 ($t_{1,8} = 1.325, P > 0.05$)。數據以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示，利用 Student' t -test 統計分析。# $P < 0.001$ 。



十、在小鼠海馬迴中半乳糖凝集素-3 的表現位置與 Iba-1 相同

前文討論到乙型類澱粉蛋白會活化免疫細胞誘發先天免疫反應且半乳糖凝集素-3 也會調控發炎反應，但我們不清楚半乳糖凝集素-3 是否會參與乙型類澱粉蛋白所引發的免疫反應。因此，我們進一步以免疫螢光染色的方式觀察半乳糖凝集素-3 及代表微膠細胞的 Iba-1。半乳糖凝集素-3 的訊號為紅色，綠色則為 Iba-1 的訊號，疊合在一起後呈現黃色代表兩者有 co-localized。結果顯示，11 個月大 APP/PS1 小鼠海馬迴中的半乳糖凝集素-3 及 Iba-1 訊號明顯增加，且兩者有 co-localized 的現象，表示 APP/PS1 小鼠海馬迴中發炎現象確實較同年齡的野生型小鼠嚴重，且半乳糖凝集素-3 主要表現於微膠細胞。

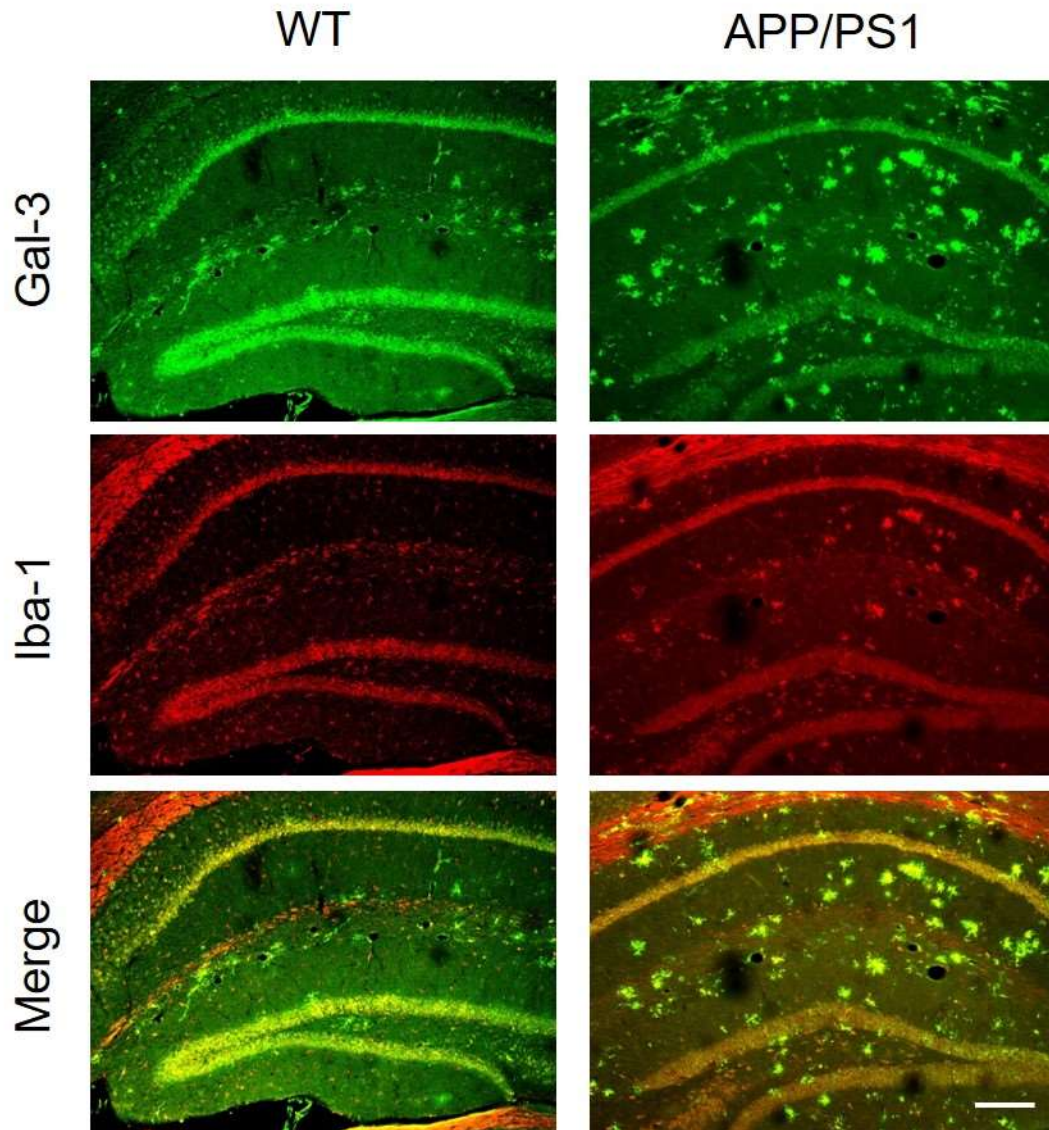


圖 10、在小鼠海馬迴中半乳糖凝集素-3 的表現位置與 Iba-1 相同

對野生型小鼠及 APP/PS1 小鼠的海馬迴以免疫螢光染色觀察半乳糖凝集素-3 及 Iba-1，顯示 APP/PS1 小鼠的海馬迴大量表現半乳糖凝集素-3 及 Iba-1，且兩者有 co-localized 的現象。比例尺為 150 μ m。

討論

過去判斷阿茲海默症的方式主要靠簡易心智量表 (mini-mental state examination, MMSE) 或是疾病後期由腦部影像檢查發現腦部萎縮而確診。在 2015 年 2 月時，美國食品藥品監督管理局 (FDA) 通過將腦脊隨液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中的乙型類澱粉蛋白 1-42 ($A\beta_{1-42}$) 以及濤蛋白作為判斷阿茲海默症的生物標誌，進一步提升對阿茲海默症的診斷能力甚至是預測疾病的發生，而越早確診疾病原因就能及早進行治療並提升投藥的準確度。目前對於阿茲海默症的藥物治療多以減輕病情、減緩病程的發展為主，而不能達到治癒的目標。而現今對致病的機轉較為明瞭，因此近期在藥物的研發有較明確的四個方向。第一種是 γ -分泌酶抑制劑，用以抑制乙型類澱粉蛋白的生成 (Golde et al., 2013)；第二種是抗聚合化合物 (anti-aggregating compound)，減少乙型類澱粉蛋白的堆積 (Luo et al., 2013)；第三種是針對乙型類澱粉蛋白導致發炎現象使神經細胞死亡的抗發炎藥品 (Wyss-Coray and Rogers, 2012)；第四種則是抗氧化藥品，由於神經細胞發炎的過程中會釋放出活性氧化物導致細胞凋亡，而抗氧化藥品則能減少細胞的損傷及死亡 (Butterfield, 2014)。顯示現今的治療取向已經逐漸從減輕病情的被動治療趨於針對病因的主動治療方式 (Karran et al., 2011)，因此提出可預防及治療的藥物策略是目前首重的課題。

本篇論文一開始先針對野生型小鼠的背側海馬迴 CA1 區域給予乙型類澱粉蛋白，然後以西方墨點法觀察其寡聚合作用。另外我們也觀察了給予乙型類澱粉蛋白後，不同時間點的寡聚合作用，結果顯示隨著刺激時間越長，寡聚合作用確實越強烈，由於實驗的實際需要，因此我們最終挑選刺激後 48 小時進行觀察。在轉染 Flag-vector 及 Flag-Gal-3 質體基因的實驗中，主要採用將質體基因溶於 polyethylenimine (PEI) 中的方式進行，PEI 會將質體基因包裹起來且表面帶有正電荷，而細胞表面的蛋白質片段多為負電荷，兩者接觸後可藉由胞吞作用將質體基因送進細胞內 (Abdallah et al., 1996)。過去的研究指出 PEI 對細胞的傷害低於病毒轉染，但缺點為持續時間較短，PEI 轉染技術的最佳效率為注入動物體內 48 小時至 72 小時間 (Boletta et al., 1997)，然而受限於小鼠頭骨過於薄脆無法埋管，因此在轉染質體基因並給予乙型類澱粉蛋白刺激的實驗中，兩者為同時給予，並且同樣選擇注入後 48 小時犧牲取腦。

在野生型小鼠及半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的背側海馬迴 CA1 區域人工給予乙型類澱粉蛋白，發現缺乏半乳糖凝集素-3 的情況下乙型類澱粉蛋白的寡聚合現象明顯減緩許多。而若是在野生型小鼠的背側海馬迴 CA1 區域過度表現半乳糖凝集素-3 並同樣給予乙型類澱粉蛋白，則會觀察到寡聚合的現象趨於嚴重，實驗結果顯示半乳糖凝集素-3 會促進乙型類澱粉蛋

白的寡聚合作用，此研究結果與阿茲海默症病人血液中的半乳糖凝集素-3 濃度增加是一致的 (Wang et al., 2015)，我們接下來將進行正常人與阿茲海默症病人腦部半乳糖凝集素-3 濃度的分析以進一步確認半乳糖凝集素-3 與阿茲海默症間的關係。而乙型類澱粉蛋白經寡聚合作用形成寡聚體後，意味著對細胞的毒性大增。在早期的研究中認為不可溶性的乙型類澱粉蛋白纖維互相堆積形成老年斑塊導致了神經細胞的死亡，進而在臨床上可以觀察到腦部萎縮、腦室增大的現象以及出現認知缺損的問題 (Graeber et al., 1998)。然而近期的研究則認為在形成不可溶性乙型類澱粉蛋白纖維前的可溶性乙型類澱粉蛋白寡聚體才是造成早期癡呆的真正元兇 (Reiman, 2016)。這些單聚體在細胞外相互疊合形成雙聚體、三聚體甚至更高分子量的寡聚體型態，而不同型態寡聚體對細胞的毒害又不同 (Larson and Lesne, 2012)。我們目前免疫共沉澱的實驗結果顯示半乳糖凝集素-3 會和乙型類澱粉蛋白的單聚體結合在一起，雖然免疫共沉澱的結果不能顯示半乳糖凝集素-3 與乙型類澱粉蛋白是否有直接的交互作用，但此結果暗示著半乳糖凝集素-3 或許會使單聚體聚集，而此一想法與我們在半乳糖凝集素-3 會促進乙型類澱粉蛋白寡聚合作的實驗結果是一致的。在實驗結果中可以發現除了單聚體有強烈的訊號外，在 100-kDa 部分轉殖人類類澱粉前驅蛋白的訊號也相當清晰，表示半乳糖凝集素-3 也會與類澱粉前驅蛋白交互作用，那麼半乳糖凝集素-3 是否可能參與類澱粉前驅蛋白代謝成乙型類澱粉蛋白的過程

可能還需要更深入的探討。此外，乙型類澱粉蛋白寡聚體在細胞外可以被當作一種信號分子，能夠結合到受器上，例如 N-甲基-D-天門冬胺酸受體 (NMDA receptor) 或是細胞普恩蛋白 (cellular prion protein)，這兩者皆會導致細胞內的鈣離子濃度異常而影響長期增益現象 (long-term potentiation, LTP) (Lashuel et al., 2002)；或是結合到捲曲受體 (Frizzled receptor) 導致 Wnt 訊息傳遞路徑受阻，導致肝醣合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 無法被抑制而過度將濤蛋白磷酸化，使得濤蛋白脫離微管導致神經軸突中的微管受損而影響神經功能並形成神經纖維糾結 (Magdesian et al., 2008)。此外，乙型類澱粉蛋白會在膜上形成穿膜的環形結構，使細胞內外的鈣離子濃度異常，同樣影響長期增益現象。而乙型類澱粉蛋白若是經過胞吞作用進到細胞內，或是由內質網上的類澱粉前驅蛋白生成而存在於細胞內，則都會在細胞內互相堆積，此時細胞會試圖將這些錯誤堆積的乙型類澱粉蛋白經由溶小體或是細胞質中的蛋白酶體 (proteasome) 進行降解，然而卻反而抑制蛋白酶體的降解功能，進而使蛋白酶體也無法降解其他蛋白質，導致細胞死亡 (Almeida et al., 2006)。因此實驗中觀察到半乳糖凝集素-3 促進乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用，綜合前述討論顯示乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用增加會導致毒性的增加，但後續對神經細胞是否造成更嚴重的影響有待進一步探討。

我們發現在野生型小鼠背側海馬迴 CA1 區域給予乙型類澱粉蛋白 48 小時的急性刺激會導致半乳糖凝集素-3 的表現量顯著增加。3 個月大的 APP/PS1 小鼠相比同年齡野生型小鼠的半乳糖凝集素-3 表現量也明顯加，此結果與先前指出半乳糖凝集素-3 會負向調控由海馬迴所負責之記憶形成的報導是一致的 (Chen et al., 2017)。而隨著年齡增加，內生性的乙型類澱粉蛋白無論在單聚體或是寡聚體的表現量均明顯增加，同時半乳糖凝集素-3 表現量也隨之增加。我們進一步的探討發現半乳糖凝集素-3 在不同年齡野生型小鼠中的表現量並不會改變，表示半乳糖凝集素-3 在 APP/PS1 小鼠中隨著年齡增長而表現量增加是與阿茲海默症有專一性的相關。然而半乳糖凝集素-3 在阿茲海默症中目前僅看到一篇報導 (Wang et al., 2015)。半乳糖凝集素-3 在神經退化性疾病中較少被討論，在帕金森氏症中目前也僅有一篇報導，該研究指出半乳糖凝集素-3 在因 α -synuclein 堆積而導致微膠細胞活化中扮演了重要的角色，在細胞實驗中若是在微膠細胞的細胞株 (BV2) 給予 α -synuclein 同時加入半乳糖凝集素-3 的 siRNA 可以降低其促發炎因子 (proinflammatory mediator) 的表現，例如 nitric oxide synthase (iNOS)、interleukin 1 beta (IL-1 β) 以及 Interleukin-12 (IL-12) (Boza-Serrano et al., 2014)。多發性硬化症與半乳糖凝集素-3 討論也相當少，在過去研究中則是指出半乳糖凝集素-3 會促使微膠細胞活化進而侵蝕正常神經細胞的髓鞘，過度表現半乳糖凝集素-3 在由 cuprizone 誘發多發性硬化

症的疾病動物模式中會促使微膠細胞活化並使病情惡化 (Hoyos et al., 2014)。半乳糖凝集素-3 在其他領域例如免疫、癌症或是心血管疾病有較多的探討。前面曾討論到半乳糖凝集素-3 調控發炎反應，有一個可能性是 APP/PS1 小鼠腦部有發炎現象，且隨著年齡的增加導致發炎愈趨於嚴重，而此發炎現象是透過半乳糖凝集素-3 所調控，我們進一步的實驗結果是支持此一假說的，因為在半乳糖凝集素-3 隨著年齡增長表現量增加的同時，APP/PS1 小鼠海馬迴中抑制發炎的 PIAS1 表現量卻是隨著年齡增長而逐漸減少。此一解釋方式也與目前認為當腦部因物理現象損傷時會導致半乳糖凝集素-3 的表現，而半乳糖凝集素-3 又會活化腦部的微膠細胞的說法是一致的 (Diaz-Alvarez and Ortega, 2017)。而微膠細胞在腦中目前已知主要負責中樞神經系統的免疫反應。如果病毒入侵腦部，導致發生病毒性腦炎，則也會觀察到半乳糖凝集素-3 的大量表現，此時半乳糖凝集素-3 不只會活化微膠細胞，更會活化由周邊組織穿越血腦障壁而來的巨噬細胞 (Shin, 2013)。我們的免疫組織化學染色結果也進一步證實了半乳糖凝集素-3 與微膠細胞的關係，因為我們的初步實驗結果顯示在 APP/PS1 小鼠的海馬迴區域比起正常小鼠確實表現了較多的半乳糖凝集素-3，而這些半乳糖凝集素-3 主要是表現在微膠細胞中 (圖 10)。然而這些免疫細胞的活化不見得對神經細胞是有益處的，例如在多發性硬化症中主要是免疫細胞侵蝕正常神經細胞的髓鞘所導致 (Calabresi, 2004)，不過在物理性腦損傷中，免疫細胞對

髓鞘殘骸的吞噬卻對神經細胞的再生具有正向效果 (Yan et al., 2009)。而在本篇研究中我們發現半乳糖凝集素-3 在微膠細胞的表現增加會促進乙型類澱粉蛋白的寡聚合作，這也會導致阿茲海默症的進程，然而我們尚不清楚半乳糖凝集素-3 與乙型類澱粉蛋白之間的關係，從之前的實驗結果中，我們推測可能是細胞外的半乳糖凝集素-3 促使了人工給予乙型類澱粉蛋白的堆積，而乙型類澱粉蛋白的堆積進一步導致微膠細胞內的半乳糖凝集素-3 大量表現，但如果細胞先天不表現半乳糖凝集素-3 且大量生成乙型類澱粉蛋白，乙型類澱粉蛋白的堆積以及由半乳糖凝集素-3 所調控的發炎反應是否受到影響仍需進一步討論，因此接下來我們將會產生半乳糖凝集素-3 基因剔除且帶有人類 APP/PS1 基因型的小鼠來觀察其乙型類澱粉蛋白寡聚合作用是否比 APP/PS1 小鼠來的少。

我們的實驗結果顯示半乳糖凝集素-3 會促進乙型類澱粉的寡聚合作用，那麼其機制為何呢？乙型類澱粉蛋白寡聚合作用除了可能是因為乙型類澱粉蛋白單聚體生成過多或是寡聚合作用的效率增加外，另一種可能性是乙型類澱粉蛋白的代謝出了問題，在本研究中我們針對後者做探討。我們針對野生型小鼠以及半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的背側海馬迴來分析與代謝乙型類澱粉蛋白有關的三種酵素的表現，分別為腦啡肽酶 (NEP)、胰島素降解酶 (IDE) 及甲狀腺素結合蛋白 (TTR)。實驗結果顯示在半乳糖凝集素

-3 基因剔除小鼠的腦啡肽酶的表現約是野生型小鼠的兩倍，而胰島素降解酶及甲狀腺素結合蛋白的表現量則沒有明顯的不同。腦啡肽酶在全腦中的表現情形以海馬迴為最多，大腦皮質次之，主要分布在神經突觸前或突觸後的細胞膜表面，結構為一種鋅離子金屬肽酶的穿膜蛋白，在腦中的功能主要為代謝突觸間隙的神經肽包含了乙型類澱粉蛋白 (Nalivaeva et al., 2012)，而腦啡肽酶可以藉由代謝乙型類澱粉蛋白而對於長期增益現象、突觸可塑性有正向的效果 (Ma and Klann, 2012)，因此可以推論減少半乳糖凝集素-3 的表現可以使腦啡肽酶的表現量增多，增加其對乙型類澱粉蛋白的代謝進而減少寡聚體作用，但我們的實驗結果並不排除其他的可能機制。我們目前正進一步分析半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠與野生型小鼠海馬迴中的 β -分泌酶活性是否也有差異。我們也將進一步探討帶有單股半乳糖凝集素-3 剔除基因型的 APP/PS1 小鼠其老年斑塊的生成是否比 APP/PS1 小鼠少以及其認知功能的缺陷是否比 APP/PS1 小鼠輕微。我們同時也有興趣知道乙型類澱粉蛋白是否影響半乳糖凝集素-3 以外的發炎因子的表現，進而影響乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用及其毒性。

結論

本論文中發現半乳糖凝集素-3 會促進小鼠背側海馬迴中乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用。乙型類澱粉蛋白則又會促使半乳糖凝集素-3 的表現量增加。而 APP/PS1 基因轉殖小鼠隨著年齡增長，乙型類澱粉蛋白的表現量也增加且寡聚合作用也趨於嚴重，而半乳糖凝集素-3 的表現量也同時增加，顯示半乳糖凝集素-3 是阿茲海默症病理機制中的重要因子。半乳糖凝集素-3 在 APP/PS1 小鼠腦中主要表現於微膠細胞，而被認為可以抑制發炎的 PIAS1 則是隨著 APP/PS1 小鼠的老化而表現量逐漸減少。但半乳糖凝集素-3 與 PIAS1 的表現量在野生型小鼠中並不受老化所影響。這些結果顯示在 APP/PS1 小鼠中的半乳糖凝集素-3 的表現造成了發炎反應，而此發炎反應又進一步促進了乙型類澱粉蛋白的寡聚合作用及阿茲海默症病程的惡化。此外，在半乳糖凝集素-3 基因剔除小鼠的海馬迴中觀察到腦啡肽酶表現量的增加，顯示半乳糖凝集素-3 可能經由減少乙型類澱粉蛋白的代謝而增加其寡聚合作用。此外，在三個月大 APP/PS1 小鼠的半乳糖凝集素-3 表現量即比同齡野生型小鼠增加許多，顯示在阿茲海默症病情尚未嚴重發展前即可偵測到半乳糖凝集素-3 的表現異常，這或許可以做為未來對於初期阿茲海默症診斷的一個指標。

參考文獻

- Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, Demeneix BA (1996) A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Human gene therapy* 7:1947-1954.
- Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK (2006) Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:4277-4288.
- Boletta A, Benigni A, Lutz J, Remuzzi G, Soria MR, Monaco L (1997) Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Human gene therapy* 8:1243-1251.
- Boza-Serrano A, Reyes JF, Rey NL, Leffler H, Bousset L, Nilsson U, Brundin P, Venero JL, Burguillos MA, Deierborg T (2014) The role of Galectin-3 in α -synuclein-induced microglial activation. *Acta Neuropathologica Communications* 2:156
- Butterfield DA (2014) The 2013 discovery award from the society for free radical biology and medicine: selected discoveries from the butterfield laboratory of oxidative stress and its sequelae in brain in cognitive disorders exemplified by alzheimer disease and chemotherapy induced cognitive impairment. *Free radical biology & medicine* 0:157-174.
- Cai Z, Hussain MD, Yan LJ (2014) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *The International journal of neuroscience* 124:307-321.
- Calabresi PA (2004) Diagnosis and management of multiple sclerosis. *American family physician* 70:1935-1944.
- Chen YC, Hsu WL, Ma YL, Tai DJ, Lee EH (2014) CREB SUMOylation by the E3 ligase Pias1 enhances spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:9574-9589.
- Chiou HY, Liu SY, Lin CH, Lee EH (2014) Hes-1 SUMOylation by protein inhibitor of activated STAT1 enhances the suppressing effect of Hes-1 on GADD45 α

- expression to increase cell survival. *Journal of biomedical science* 21:53.
- Cras P, Kawai M, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G (1991) Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7552-7556.
- Danilova N (2006) The evolution of immune mechanisms. *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution* 306:496-520.
- Diaz-Alvarez L, Ortega E (2017) The many roles of galectin-3, a multifaceted molecule, in innate immune responses against pathogens. *Mediators of inflammation* 2017:9247574.
- Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of cell biology* 160:113-123.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124.
- Evin G, Weidemann A (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23:1285-1297.
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7.
- Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozlowski EO, Stelling MP, Pavao MS (2014) Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Frontiers in oncology* 4:138.
- Frisch SM, Screaton RA (2001) Anoikis mechanisms. *Current opinion in cell biology* 13:555-562.
- Golde TE, Koo EH, Felsenstein KM, Osborne BA, Miele L (2013) γ -Secretase Inhibitors and Modulators. *Biochimica et biophysica acta* 1828.
- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *Journal of neurochemistry* 65:732-738.
- Graeber MB, Kosel S, Grasbon-Frodl E, Moller HJ, Mehraein P (1998) Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1:223-228.

- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(5):a006270.
- Hoyos HC, Rinaldi M, Mendez-Huergo SP, Marder M, Rabinovich GA, Pasquini JM, Pasquini LA (2014) Galectin-3 controls the response of microglial cells to limit cuprizone-induced demyelination. *Neurobiology of disease* 62:441-455.
- Jeon SB, Yoon HJ, Chang CY, Koh HS, Jeon SH, Park EJ (2010) Galectin-3 exerts cytokine-like regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 185:7037-7046.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 10:698-712.
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL (1990) Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:1561-1565.
- Larson ME, Lesne SE (2012) Soluble Aβ oligomer production and toxicity. *Journal of neurochemistry* 120 Suppl 1:125-139.
- Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT, Jr. (2002) Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418:291.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457:1128-1132.
- Lee S, Fernandez EJ, Good TA (2007) Role of aggregation conditions in structure, stability, and toxicity of intermediates in the Aβ fibril formation pathway. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 16:723-732.
- Li X, Zhang X, Ladiwala ARA, Du D, Yadav JK, Tessier PM, Wright PE, Kelly JW, Buxbaum JN (2013) Mechanisms of Transthyretin Inhibition of β-Amyloid Aggregation In Vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:19423-19433.
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America 95:10626-10631.
- Liu B, Yang Y, Chernishof V, Loo RR, Jang H, Tahk S, Yang R, Mink S, Shultz D, Bellone CJ, Loo JA, Shuai K (2007) Proinflammatory stimuli induce IKK α -mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell* 129:903-914.
- Liu FT, Rabinovich GA (2010) Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183:158-182.
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochimica et biophysica acta* 1572:263-273.
- Luo Y, Vali S, Sun S, Chen X, Liang X, Drozhzhina T (2013) A β 42-Binding Peptoids as Amyloid Aggregation. 4:952-962.
- Ma T, Klann E (2012) Amyloid beta: linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 120 Suppl 1:140-148.
- Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST (2008) Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *The Journal of biological chemistry* 283:9359-9368.
- Maiolino G, Rossitto G, Pedon L, Cesari M, Frigo AC, Azzolini M, Plebani M, Rossi GP (2015) Galectin-3 predicts long-term cardiovascular death in high-risk patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35:725-732.
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349:1546-1549.
- Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ (2012) The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *International journal of Alzheimer's disease* 2012:383796.
- Reiman EM (2016) Alzheimer's disease: Attack on amyloid-beta protein. *Nature* 537:36-37.
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T (1994) Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America 91:7450-7454.

- Rotshenker S (2009) The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *Journal of molecular neuroscience* : MN 39:99-103.
- Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J (2009) Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological reviews* 230:172-187.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* 81:741-766.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:2866-2875.
- Shin T (2013) The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: a review. *Acta histochemica* 115:407-411.
- Spencer B, Desplats PA, Overk CR, Valera-Martin E, Rissman RA, Wu C, Mante M, Adame A, Florio J, Rockenstein E, Masliah E (2016) Reducing endogenous α -synuclein mitigates the degeneration of selective neuronal populations in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:7971-7984.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Tai DJ, Hsu WL, Lin YC, Ma YL, Lee EH (2011) Novel role and mechanism of protein inhibitor of activated STAT1 in spatial learning. *EMBO J* 30(1):205-220
- Wang J, Tan GJ, Han LN, Bai YY, He M, Liu HB (2017) Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction. *Journal of geriatric cardiology : JGC* 14:135-150.
- Wang X, Zhang S, Lin F, Chu W, Yue S (2015) Elevated galectin-3 levels in the serum of patients with Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's*

disease and other dementias 30:729-732.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72:1858-1862.

Wyss-Coray T, Rogers J (2012) Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2(1):a006346.

Yan YP, Lang BT, Vemuganti R, Dempsey RJ (2009) Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling. Brain research 1288:116-124.

Zhao Q, Barclay M, Hilkens J, Guo X, Barrow H, Rhodes JM, Yu LG (2010) Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. Molecular cancer 9:154.

