

## 淀粉样蛋白膜内片段的 AD 相关生物学特性研究\*

张松江<sup>1</sup> 邬力祥<sup>2</sup> 赵献敏<sup>1</sup>

(1 河南中医学院基础医学院生理学科 河南 郑州 450008 ; 2 中南大学湘雅医学院生理学科 湖南 长沙 410078)

**摘要** 目的: 体外条件下研究淀粉样蛋白膜内片段(intramembranous fragments of amyloid- $\beta$ , IF-A $\beta$ )对 A $\beta$ 42 成纤维和神经毒性的影响。方法: (1) 硫磺素 T 法检测 IF-A $\beta$  对 A $\beta$ 42 成纤维性的影响; (2) MTT 法和荧光分光光度计检测 IF-A $\beta$  对经过 A $\beta$ 42 预处理的体外培养神经元的活性和胞浆钙离子浓度影响。结果: (1) IF-A $\beta$  本身无成纤维性, 而且可以抑制或解聚 A $\beta$ 42 成纤维; (2) 相对于单独经 A $\beta$ 42 预处理的体外培养神经元, IF-A $\beta$  的加入可以提高神经元的活性和降低胞浆钙离子的浓度。结论: IF-A $\beta$  具有保护体外培养神经元免受 A $\beta$ 42 毒性作用的功能, 为阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的在体治疗研究奠定了基础。

**关键词** 淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病; 生物学特性

**中图分类号** Q75 R749.16 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)21-4023-04

Research on the Biological Characteristics of Intramembranous Fragments of Amyloid- $\beta$  Related with AD\*ZHANG Song-jiang<sup>1</sup>, WU Li-xiang<sup>2</sup>, ZHAO Xian-min<sup>1</sup>

(1 Department of Physiology, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, 450008, China;

2 Department of Physiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of intramembranous fragments of amyloid- (IF-A) on fibroplastic and neurotoxic activities of A $\beta$ 42 *in vitro*. **Methods:** Thioflavin T was applied to detect IF-A effect on A $\beta$ 42 assembly. The biological activity of the IF-A was assessed by the CellTiter 96 Cell Proliferation Assay (MTT assay). The calcium ion concentration in cell were also detected, as well as the mixtures of A $\beta$ 42: IF-A. **Results:** (1) IF-A showed no aggregation at concentrations up to 750  $\mu$ M but substantial inhibition to A $\beta$ 42 fibril growth; (2) Compared with the *in vitro* cultured neuron which were treated only by A $\beta$ 42, that treated by IF-A $\beta$  and A $\beta$ 42 (at a 1:1 concentration ratio) showed an increased activities and a decreased calcium ion concentration. **Conclusion:** IF-A could protect neuron viability from toxic damage by A $\beta$ 42 *in vitro*. It provides a foundation for the clinical treatment of Alzheimer's disease *in vivo*.

**Key words:** Amyloid; Alzheimer's disease; Biology characteristics

**Chinese Library Classification (CLC):** Q75 R749.16 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2012)21-4023-04

## 前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种与年龄相关的神经退行性疾病, 它的一个重要病理特征是大脑内淀粉样蛋白(amyloid- $\beta$ , A $\beta$ )斑块的形成<sup>[1]</sup>。大脑内 A $\beta$  的聚集是 AD 进程中一系列病理级联反应的触发点<sup>[2]</sup>。所以, 目前对于 AD 治疗的研究策略主要是从多渠道减少大脑内 A $\beta$  的聚集, 包括抑制 APP 代谢成 A $\beta$ 、干扰 A $\beta$  的聚集以及增加 A $\beta$  的清除等方面<sup>[3]</sup>。

国内外学者在抑制 A $\beta$  肽的聚集方面做了很多工作, 许多研究小组报道了抑制 A $\beta$  寡聚化的小分子物质<sup>[4,5]</sup>, 但是由于这些小分子的作用机制缺乏特异性, 从而造成一些副作用的发生, 使其不适宜作为与 A $\beta$  相关疾病的治疗药物。本研究依据 A $\beta$ 42 成纤维的机制, 选择淀粉样蛋白膜内片段(intramembranous fragments of amyloid- $\beta$ , IF-A $\beta$ )作为研究对象, 探讨其在体外对 A $\beta$ 42 成纤维和神经毒性的影响。

## 1 材料和方法

## 1.1 主要试剂和仪器

酶标仪(美国 Bio Tek 公司); 荧光分光光度计(日本 TECHNE 公司); IF-A $\beta$  (A $\beta$ 30-42, 北京中科亚光生物公司); A $\beta$ 42(北京博奥森生物公司); Neurobasal 培养基、B-27、谷氨酰胺(Gibco 公司, USA); 多聚-D-赖氨酸(Sigma 公司, USA); 胰蛋白酶、MTT(Amresco 公司, USA); 胎牛血清(杭州四季青); 兔抗 NSE 多克隆抗体(Chemicon 公司, USA); 硫磺素 T(EMD biosciences, Germany); Fura-2/AM(Biotium 公司, USA)。

1.2 体外检测 IF-A $\beta$  的成纤维性

分别配制 750  $\mu$ mol/L IF-A $\beta$  和 A $\beta$ 42 (PBS, pH 7.3) 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 分别孵育 1、2、3、4、5、6、7 天。每组设 7 个样本。参考 Soto 等<sup>[6]</sup>和 Sigurdsson 等<sup>[7]</sup>的方法, 用硫磺素 T 体外分别检测 IF-A $\beta$  和 A $\beta$ 42 的成纤维性。加入 1mL 的硫磺素 T (3  $\mu$ mol/L in 50 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6.0)后, 用荧光分光

\* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)课题(2007AA021901); 湖南省自然科学基金(08JJ3073);

河南省重点科技攻关项目(102102310327)

作者简介: 张松江(1966-), 女, 博士, 讲师。主要研究方向: 神经生物学。电话: 13526688294, E-mail: zsj216111@sina.com

(收稿日期: 2012-01-15 接受日期: 2012-02-20)

光度计检测其荧光强度(excitation: 450 nm; emission: 482 nm)。

### 1.3 IF-Aβ 对 Aβ42 聚集作用的检测

750 μM Aβ42 (PBS, pH 7.3)50 μL 加入 750 μM IF-Aβ (PBS, pH 7.3) 50 μL。37℃ 共同孵育一周。每组设 7 个样本。加入 1 mL 的硫磺素 T<sup>®</sup>(3 μmol/L in 50 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6.0)后用荧光分光光度计检测其荧光强度(excitation: 450 nm; emission: 482 nm)。

### 1.4 大脑皮层神经元的分离培养

取孕 18d 左右的昆明小鼠胎鼠,购自中南大学湘雅医学院动物学部[SCXK(湘)2006-0002]。无菌条件下分离出大脑皮层组织,0.125%胰酶 37℃ 消化 10 min,分离所得细胞重悬于添加 2% B-27 和 0.5 mmol/L 谷氨酰胺的 neurobasal 培养基中,种植在预先用多聚-D-赖氨酸(100μg/mL)包被过的培养瓶、多孔培养板或皿中,置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。每 2~3 天换液一次。体外培养 10 d 后,用兔抗神经元特异性烯醇化酶(Neuron Specific Enolase, NSE)多克隆抗体进行免疫细胞化学染色,进行神经元鉴定。

### 1.5 MTT 比色法检测 IF-Aβ 和 Aβ42 对细胞活力的影响

原代神经元培养的第 8 天,在 96 孔培养板中分别加入 10 mol/L IF-A、10 mol/L A42、10 mol/L A 42+10 mol/L IF-A,对照孔不加任何干扰因素。每组 8 个复孔。继续培养 48 小时后,加入 MTT(终浓度为 0.5mg/mL),于 37℃ 孵育 1 h,弃上清,加入二甲亚砜(dimethyl silfoxide, DMSO),置酶标仪 540 nm 处测定 OD 值。以正常组细胞活力为 100%,实验组按以下公式计算 细胞活力(%)= 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 × 100%。

### 1.6 IF-Aβ 对细胞内游离钙离子浓度的影响

具体过程如下:

① 细胞悬液制备 细胞干扰处理及分组同 1.5。继续培养 48 小时后,胰蛋白酶消化、1000 rpm 离心 10 min 收集细胞, D-hanks 洗两遍。将细胞悬浮于 1 mL D-hanks 平衡盐液中,细胞计数后使其终浓度为 1 × 10<sup>6</sup>~1 × 10<sup>7</sup> ml。

② 钙离子荧光探针的负载:加入 0.25 mmol/L Fura-2/AM 50 μL 于细胞悬液中,使其终浓度为 5 mmol/L,37℃ 培养箱内孵育 30 min。1000 rpm 离心 10 min, D-hanks 洗两遍,以充分洗去细胞外未负载的残余荧光染料。细胞计数,使其终浓度为 2 × 10<sup>6</sup>/mL。

③ 上机检测:Fura-2 的最大发射波长为 510 nm,最大激发波长为 380 nm,Fura-2-Ca<sup>2+</sup> 的最大发射波长为 510 nm,最大激发波长为 340 nm,故需检测 340、380 nm 两个波长处的值。

a.样品上机检测。

b.加入 10% TritonX-100 100 mL,使终浓度为 0.1%,30 min 后检测 340、380nm 两个波长处的最大值。

c.加入 EDTA 50μL,使终浓度为 5 mmol/L,30 min 后检测 340、380 nm 两个波长处的最小值。

④ 细胞内钙浓度的计算:Fura-2/AM 检测细胞内游离钙离子浓度计算公式为:[Ca<sup>2+</sup>]=Kd (FD/FS) × [(R-Rmin)/(Rmax-R)] Kd 为 Fura-2 与 Ca<sup>2+</sup> 反应的解离常数,为 224 nm R 为各测定点 F340/F380 荧光强度比值,Rmax 为 Fura-2 全部为钙饱和时的荧光比值,Rmin 是 Fura-2 完全未结合钙时的荧光比值,FD 和 FS 分别代表无钙和钙饱和状态下 380nm 处的荧光强度。

### 1.7 统计分析

用 SPSS 统计软件分析实验数据,结果以均数± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用方差分析,以 P<0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IF-Aβ 的成纤维检测

硫磺素 T 的发光强度与溶液中的纤维性 Aβ 的量成正比相关。体外检测 IF-Aβ、Aβ42 的纤维形成,每个样本重复检测三次(37℃,0-7 d)。图 1 结果显示,Aβ42 的发光强度为 8~14 之间,说明具有非常强的成纤维性,尤其重要的是在第一天时已有大量的 Aβ42 纤维形成。而 IF-Aβ 的发光强度最高不超过 1,说明没有成纤维倾向。

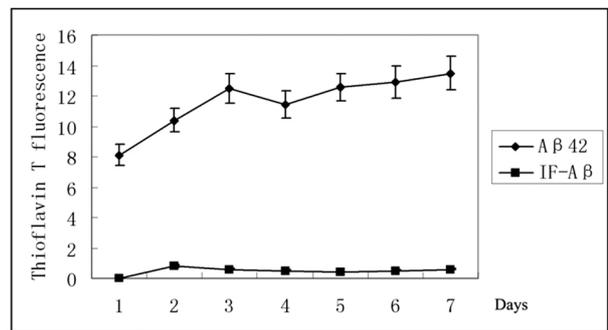


图 1 IF-Aβ 的硫磺素 T 成纤维性检测

Fig.1 Thioflavin T fluorometric assay on IF-Aβ

图 1 注释:为了检测 IF-Aβ 本身是否具有成纤维性,分别配制 750 μmol/L IF-Aβ 和 Aβ42 100μL,37℃ 分别孵育 1、2、3、4、5、6、7 天。加入 1mL 的硫磺素 T 后,用荧光分光光度计检测其荧光强度。硫磺素 T 的发光强度与溶液中的纤维性 Aβ 的量成正比相关。结果显示,Aβ42 的发光强度为 8~14 之间,说明具有非常强的成纤维性。而 IF-Aβ 的发光强度最高不超过 1,说明没有成纤维倾向。

### 2.2 IF-Aβ 抑制 Aβ42 聚集

用硫磺素 T 检测 IF-Aβ 对 Aβ42 成纤维性的影响。在 1.2 检测的基础上,把 IF-Aβ 加入 Aβ42,可使 Aβ42 的硫磺素 T 发光强度下降 33%,与 Aβ42 组比较具有显著性差异,说明 IF-Aβ 对 Aβ42 具有解聚作用,见图 2。

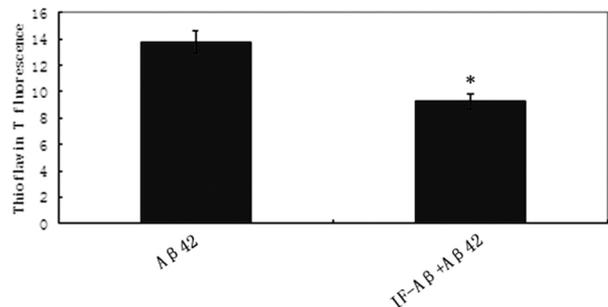


图 2 IF-Aβ 对 Aβ42 的解聚作用 n=7\*, P<0.01,与 Aβ42 组比较 Fig.2 The disaggregation of Aβ42 by IF-Aβ n=7\*,P<0.01,versus Aβ42 group

图 2 注释:为了检测 IF-Aβ 对 Aβ42 成纤维性的影响,750 μM Aβ42 50 μL 加入 750 μM IF-Aβ 50 μL。37℃ 共同孵育一周。加入 1ml 的硫磺素 T 后用荧光分光光度计检测其荧光强度。结果显示,同摩尔浓度 IF-Aβ 和 Aβ42 混合液的硫磺素 T 发光强度与 Aβ42 组比较下降 33%,说明 IF-Aβ 对 Aβ42 具有解聚作用。

2.3 神经元的鉴定

NSE 是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶,在脑组织细胞的活性最高,可用于体外培养原代神经元的是否成功的鉴别指标。体外培养 10d 的神经元,用兔抗 NSE 多克隆抗体进行免疫细胞化学染色,显示培养神经元纯度达 98% 以上(图 3),可用于后续对神经元各项功能的检测研究。



图 3 皮质神经元 NSE 免疫细胞化学染色

Fig.3 NSE immunocytochemistry stain in cortical neurons( $\times 400$ )

图 3 注释:为了检测体外原代培养皮质神经元的纯度,用兔抗 NSE 多克隆抗体对体外培养 10 天的神经元进行免疫细胞化学染色,显示培养神经元纯度达 98% 以上,可用于后续对神经元各项功能的检测研究

2.4 IF-A $\beta$  对神经元活力的影响

为了检测 IF-A $\beta$  是否对细胞具有保护作用,在原代培养的神经元中分别加入 IF-A $\beta$ 、A $\beta$ 42 以及 IF-A $\beta$  和 A $\beta$ 42 的混合溶液。以正常培养基为对照。结果显示,在培养神经元中加入 A $\beta$ 42 2d 后,细胞活力为 77%,IF-A $\beta$  没有显示任何毒性作用。而 IF-A $\beta$  和 A $\beta$ 42 的混合溶液组细胞活力为 88%,相对于 A $\beta$ 42 组明显增高,说明 IF-A $\beta$  具有抑制 A $\beta$ 42 毒性的作用,见图 4。

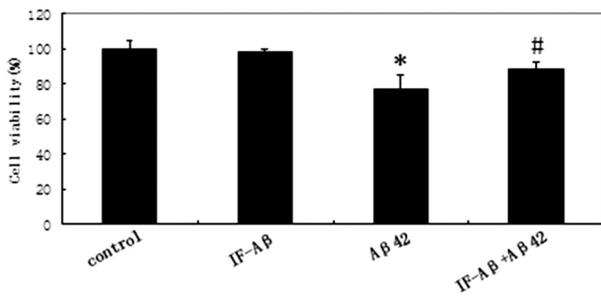


图 4 IF-A $\beta$  对细胞活力的影响

Fig.4 Neurotoxicity of A $\beta$ 42 and protective effect of IF-A $\beta$  n=8, mean $\pm$  S.D. \*,与 control 对照组比较,  $P < 0.05$  #,与 A $\beta$ 42 组比较  $P < 0.05$

n=8, Data are presented as mean $\pm$  S.D. \*,  $P < 0.05$  versus control culture; #,  $P < 0.05$  versus A $\beta$ 42 group

图 4 注释:为了检测 IF-A $\beta$  是否对细胞具有保护作用,在原代培养的神经元中分别加入 IF-A $\beta$ 、A $\beta$ 42 以及 IF-A $\beta$  和 A $\beta$ 42 的混合溶液。以正常培养基为对照。MTT 检测结果显示,与对照组相比, A $\beta$ 42 组细胞活力下降为 77%,IF-A $\beta$  没有显示任何毒性作用。而 IF-A $\beta$  和 A $\beta$ 42 的混合溶液组相对于 A $\beta$ 42 组细胞活力明显增高到 88%。说明,IF-A $\beta$  具有抑制 A $\beta$ 42 毒性的作用

2.5 细胞内钙离子浓度的变化

如图 5 所示,经荧光双波长分光光度计检测已负载 Fura-2 的细胞内钙离子荧光值,经过公式换算,与对照组相比, A $\beta$ 42 组的钙离子浓度明显升高,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。IF-A $\beta$  组对细胞内钙离子浓度无影响。而 IF-A $\beta$  与 A $\beta$ 42 混合组与单纯 A $\beta$ 42 处理的细胞相比,胞内钙离子浓度下降 27.1%,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

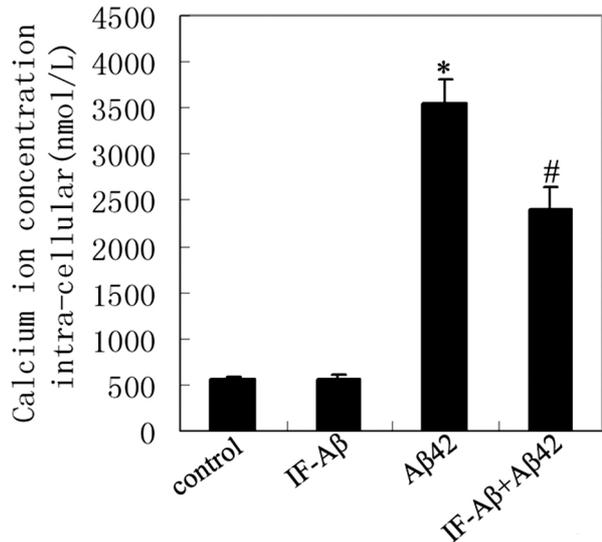


图 5 IF-A $\beta$ 、A $\beta$ 42 对细胞钙离子浓度的影响

Fig.5 Effects of IF-A $\beta$  and A $\beta$ 42 on calcium ion concentration intracellular

n=8, mean $\pm$  S.D. \*,与 control 比较,  $P < 0.01$ ; #,与 A $\beta$ 42 组比较  $P < 0.05$  n=8, mean $\pm$  S.D. \*,  $P < 0.01$  versus control culture; #,  $P < 0.05$  versus A $\beta$ 42 group

图 5 注释:为了检测 IF-A $\beta$  是否对细胞具有保护作用,在原代培养的神经元中分别加入 IF-A $\beta$ 、A $\beta$ 42 以及 IF-A $\beta$  和 A $\beta$ 42 的混合溶液,以正常培养基为对照。分别检测每组细胞中游离钙离子的浓度。结果显示,与对照组相比, A $\beta$ 42 组的钙离子浓度明显升高 ( $P < 0.01$ )。IF-A $\beta$  组对细胞内钙离子浓度无影响。IF-A $\beta$  混合 A $\beta$ 42 组细胞内钙离子浓度与 A $\beta$ 42 组细胞相比下降 27.1% ( $P < 0.05$ )。

3 讨论

A $\beta$  肽聚集物在脑组织中的形成和沉积是 AD 发病的原因之一<sup>[2]</sup>。因此,若能够 (1)抑制 A $\beta$  肽的形成 (2)抑制 A $\beta$  肽的聚集 (3)抑制 A $\beta$  多肽的神经毒性 (4)加速 A $\beta$  肽的降解与清除,便能够减轻 AD 病人的症状,甚至达到治疗 AD 病的目的<sup>[9]</sup>。人们在抑制 A $\beta$  肽的聚集方面已经做了许多工作。例如,将 A $\beta$  疏水区中第 19-20 位的苯丙酰胺-苯丙酰胺二肽残基被甘氨酸-异亮氨酸或苏氨酸-苏氨酸取代后,其溶解性增加,因而降低了聚集的可能性<sup>[10]</sup>。但该 A $\beta$  类似物的氨基酸残基较多 (42~43 个氨基酸残基),合成步骤多,成本高;另外其生物稳定性也不好,因而限制了其应用。

IF-A $\beta$  片段只有 13 个氨基酸 (氨基酸序列 A $\beta$ 30-42 :AI-IGLMVGGVVIA),人工合成难度和成本都大为减低。硫磺素 T 可以特异性地与 A $\beta$  结合。这种结合改变了它的发射光谱。发

出的荧光强度和 A $\beta$  的量成正比。本研究通过硫磺素 T 结合实验,证实 IF-A $\beta$  片段本身没有成纤维性。同时它可以抑制 A $\beta$ 42 成纤维。

文献<sup>[11]</sup>的研究表明 A $\beta$  溶液在 37 °C 孵育 24 小时就是寡聚体和纤维的混合体了,经 0.45  $\mu$ m 微孔滤过后就是纯的低聚体。文献<sup>[12]</sup>也描述 A $\beta$  溶解后,在 37 °C 过夜就成纤维。本研究在检测 A $\beta$ 42、IF-A $\beta$  对细胞活力的影响时,虽然是新鲜配置加入到培养基中,但是经过 2 天 37 °C 与细胞的共孵育, A $\beta$  经历了单体、低聚体和成熟纤维三个过程。即细胞受到 A $\beta$  三个状态的依次刺激。大量研究证实 A $\beta$  相关的退行性疾病中可溶性低聚 A $\beta$  较成熟的 A $\beta$  纤维的毒性更大<sup>[13,14]</sup>。

A $\beta$  本身可以产生活性氧,也可以通过多种途径诱导活性氧的产生<sup>[15,16]</sup>。当线粒体和内质网的膜结构氧化损伤后,将使大量 Ca<sup>2+</sup> 进入胞质。同时, A $\beta$  还可以刺激神经细胞使大量 Ca<sup>2+</sup> 内流,细胞将发生 Ca<sup>2+</sup> 超载,使线粒体发生肿胀<sup>[17]</sup>。线粒体不仅是 A $\beta$  损伤的目标,而且也介导了 A $\beta$  对神经元的毒性,启动了神经元的凋亡过程<sup>[18,19]</sup>。本研究结果显示,体外培养的小鼠皮层神经元,经过同样的 IF-A $\beta$ 、A $\beta$ 42 的干扰处理后,细胞生存率和细胞内钙离子浓度呈负相关,和理论及预期结果一致。

IF-A $\beta$  之所以可以影响 A $\beta$  的成纤维,抵抗 A $\beta$  的神经毒性,可能与 A $\beta$  的成纤维机制有关。很多实验证实, C 末端是控制 A $\beta$ 42 形成寡聚体的关键区域,同型分子间 C 端的相互作用导致 A $\beta$  原纤维的形成,继而形成寡聚体和成熟的纤维<sup>[20,21]</sup>。根据这些数据,我们推测,能和 A $\beta$ 42 C 端结合的分子可以打破 A $\beta$ 42 的寡聚形式,从而抑制其毒性。IF-A $\beta$  正是位于 A $\beta$  的 C 末端片段,其与 A $\beta$  的 C 末端片段结合占据了 A $\beta$  同型分子间的结合位点,从而妨碍了 A $\beta$  的纤维形成,抑制其神经毒性。

通过以上实验结果可以得出以下结论:

- (1) IF-A $\beta$  没有成纤维倾向且可以抑制 A $\beta$ 42 聚集;
- (2) IF-A $\beta$  对体外培养神经元有保护作用。

这些结果为将来 IF-A $\beta$  用于在体的 AD 治疗提供了坚实的实验依据。IF-A $\beta$  是 A $\beta$ 42 的自身组成部分,相信其可以克服外源性小分子抑制剂特异性较差的弊端,从而为 AD 的治疗找到有效而且特异性强的良好的治疗药物。

#### 参考文献(References)

- [1] Price DL, Sisodia SS. Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models[J]. Annu Rev Med, 1994, 45: 435-446
- [2] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356
- [3] Salloway S, Mintzer J, Weiner MF, et al. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2008, 4(2): 65-79
- [4] 马志红, 徐淑梅. H102 对 A $\beta$ 42 致神经元毒性的保护作用[J]. 天津医药, 2008, 36(3): 198-200  
Ma Zhi-hong, Xu Shu-mei. The Protective Effect of H102 on Neurotoxicity Induced by A $\beta$ 42 [J]. Tianjin Med J Mar, 2008, 36 (3): 198-200
- [5] 李光武, 汪华侨, 姚志彬. FT-IR 光谱法研究 TA9902 抑制 A $\beta$ 1-42 聚集的分子机制[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(1): 84-87  
Li Guang-wu, Wang Hua-qiao, Yao Zhi-bin. Inhibitory effect of TA9902 on amyloid  $\beta$ -peptide 1-42 aggregation by Fourier-transform infrared spectroscopy study [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2006, 22(1): 84-87
- [6] Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, et al.  $\beta$ -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy[J]. Nat Med, 1998, 4(7): 822-826
- [7] Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, et al. Immunization with a non-toxic/non-fibrillar amyloid- $\beta$  homologous peptide reduces Alzheimer's disease associated pathology in transgenic mice[J]. Am J Pathol, 2001, 159(2): 439-447
- [8] Zameer A, Schulz P, Wang MS, et al. Single chain Fv antibodies against the 25-35 Abeta fragment inhibit aggregation and toxicity of Abeta42 [J]. Biochemistry, 2006, 45(38): 11532-11539
- [9] Lansbury Jr P T. Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 1997, 1(2): 260-267
- [10] Hilbich C, Kisters-woike B, Reed J, et al. Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides[J]. J Mol Biol, 1992, 228(2): 460-473
- [11] Michikawa M, Gong JS, Fan QW, et al. A novel action of Alzheimer's amyloid beta-protein (A $\beta$ ): oligomeric A $\beta$  promotes lipid release[J]. The Journal of Neuroscience, 2001, 21(18): 7226-7235
- [12] Berman DE, Dall'Armi C, Voronov SV. Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism [J]. Nat Neurosci, 2008, 11(5): 547-554
- [13] Glabe CC. Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar A $\beta$ [J]. Subcell Biochem, 2005, 38(7): 167-177
- [14] Rahimi F, Shanmugam A, Bitan G. Structure-function relationships of pre-fibrillar protein assemblies in Alzheimer's disease and related disorders[J]. Curr Alzheimer Res, 2008, 5(3): 319-341
- [15] Smith MA, Harris PL, Sayre LM, et al. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 94(18): 9866-9868
- [16] Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, et al. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci, 1997, 17 (8): 2653-2657
- [17] Ueda K, Shinohara S, Yagami T, et al. Amyloid beta protein potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltagesensitive Ca<sup>2+</sup> channels: a possible involvement of free radicals [J]. J Neurochem, 1997, 68(1): 265-271
- [18] Eckert A, Keil U, Marques CA, et al. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(8): 1627-1634
- [19] Yin KJ, Lee JM, Chen SD, et al. Amyloid- $\beta$  induces Smac release via AP-1/Bim activation in cerebral endothelial cells [J]. J Neurosci, 2002, 22(22): 9764-9770
- [20] Sgourakis NG, Yan Y, McCallum SA, et al. The Alzheimer's peptides A $\beta$ 40 and 42 adopt distinct conformations in water: A combined MD/NMR study[J]. J mol Biol, 2007, 368(5): 1448-1457
- [21] Lazo ND, Grant MA, Condrum MC, et al. On the nucleation of amyloid  $\beta$ -protein monomer folding [J]. Protein Sci, 2005, 14 (6): 1581-1596