

淀粉样蛋白膜内片段的 AD 相关生物学特性研究 *

张松江¹ 郭力祥² 赵献敏¹

(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- β , 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- β Related with AD*ZHANG Song-jiang¹, WU Li-xiang², ZHAO Xian-min¹

(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 μ 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- β , $A\beta$) 斑块的形成^[1]。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^[2]。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^[3]。

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^[4,5], 但是由于这些小分子的作用机制缺乏特异性, 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- β , 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 μ mol/L IF- $A\beta$ 和 $A\beta_{42}$ (PBS, pH 7.3) 100 μ 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^[6]和 Sigurdsson 等^[7]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 μ 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-A β 对 A β 42 聚集作用的检测

750 μ M A β 42 (PBS, pH 7.3) 50 μ L 加入 750 μ M IF-A β (PBS, pH 7.3) 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 共同孵育一周。每组设 7 个样本。加入 1 mL 的硫磺素 T^[8](3 μ mol/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 $^{\circ}$ C 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(100 μ g/mL) 包被过的培养瓶、多孔培养板或皿中,置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱内培养。每 2~3 天换液一次。体外培养 10 d 后,用免疫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-A β 和 A β 42 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 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,弃上清,加入二甲基亚砜(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 $\times$ 100%。

1.6 IF-A β 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 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ mL。

② 钙离子荧光探针的负载:加入 0.25 mmol/L Fura-2/AM 50 μ L 于细胞悬液中,使其终浓度为 5 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 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 2×10^6 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-Ca²⁺ 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 50 μ L, 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: $[Ca^{2+}] = K_d (FD/FS) \times [(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$ K_d 为 Fura-2 与 Ca²⁺ 反应的解离常数, 为 224 nm R 为各测定点 F340/F380 荧光强度比值 R_{max} 为 Fura-2 全部为钙饱和时的荧光比值 R_{min} 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 $\pm$ 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-A β 的成纤维检测

硫磺素 T 的发光强度与溶液中的纤维性 A β 的量成正比相关。体外检测 IF-A β 、A β 42 的纤维形成, 每个样本重复检测三次(37 $^{\circ}$ C, 0-7 d)。图 1 结果显示, A β 42 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 A β 42 纤维形成。而 IF-A β 的发光强度最高不超过 1, 说明没有成纤维倾向。

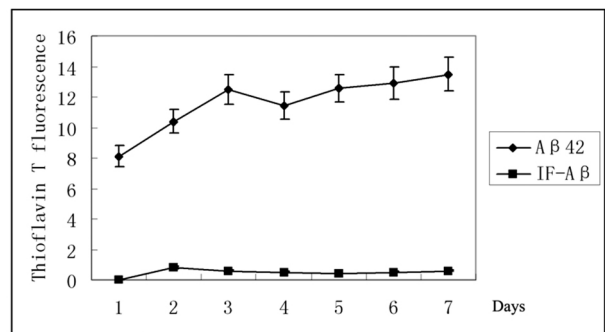


图 1 IF-A β 的硫磺素 T 成纤维性检测

Fig.1 Thioflavin T fluorometric assay on IF-A β

图 1 注释 为了检测 IF-A β 本身是否具有成纤维性, 分别配制 750 μ mol/L IF-A β 和 A β 42 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 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 A β 的量成正比相关。结果显示, A β 42 的发光强度为 8~14 之间, 说明具有非常强的成纤维性。而 IF-A β 的发光强度最高不超过 1, 说明没有成纤维倾向。

2.2 IF-A β 抑制 A β 42 聚集

用硫磺素 T 检测 IF-A β 对 A β 42 成纤维性的影响。在 1.2 检测的基础上, 把 IF-A β 加入 A β 42, 可使 A β 42 的硫磺素 T 发光强度下降 33%, 与 A β 42 组比较具有显著性差异, 说明 IF-A β 对 A β 42 具有解聚作用, 见图 2。

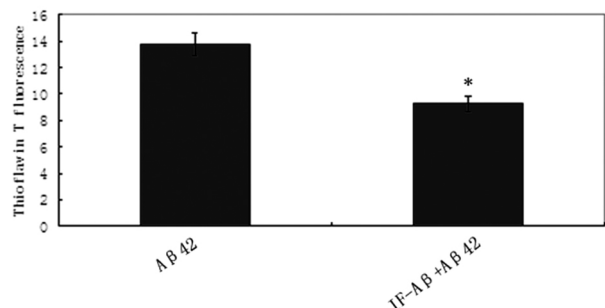


图 2 IF-A β 对 A β 42 的解聚作用 $n=7$ *, $P < 0.01$, 与 A β 42 组比较

Fig.2 The disaggregation of A β 42 by IF-A β $n=7$ *, $P < 0.01$, versus A β 42 group

图 2 注释 为了检测 IF-A β 对 A β 42 成纤维的影响, 750 μ M A β 42 50 μ L 加入 750 μ M IF-A β 50 μ L。37 $^{\circ}$ C 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-A β 和 A β 42 混合液的硫磺素 T 发光强度与 A β 42 组比较下降 33%, 说明 IF-A β 对 A β 42 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鉴定。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 皮层神经元 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层神经元的纯度,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 β 对神经元活力的影响

为了检测 IF-A β 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 β 、A β 42 以及 IF-A β 和 A β 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 β 42 2d 后,细胞活力为 77%,IF-A β 没有显示任何毒性作用。而 IF-A β 和 A β 42 的混合溶液组细胞活力为 88%,相对于 A β 42 组明显增高,说明 IF-A β 具有抑制 A β 42 毒性的作用,见图 4。

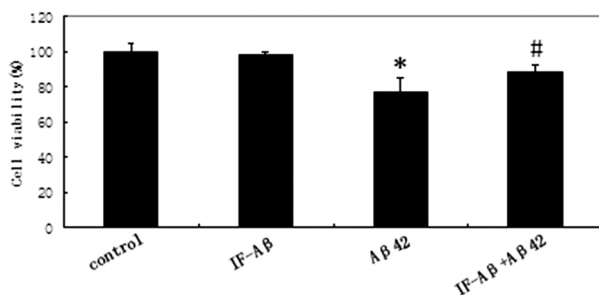


图 4 IF-A β 对细胞活力的影响

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

图 4 注释 为了检测 IF-A β 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 β 、A β 42 以及 IF-A β 和 A β 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 β 42 组细胞活力下降为 77%,IF-A β 没有显示任何毒性作用。而 IF-A β 和 A β 42 的混合溶液组相对于 A β 42 组细胞活力明显增高到 88%。说明,IF-A β 具有抑制 A β 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 β 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 β 组对细胞内钙离子浓度无影响。而 IF-A β 与 A β 42 混合组与单纯 A β 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 ($P < 0.05$)。

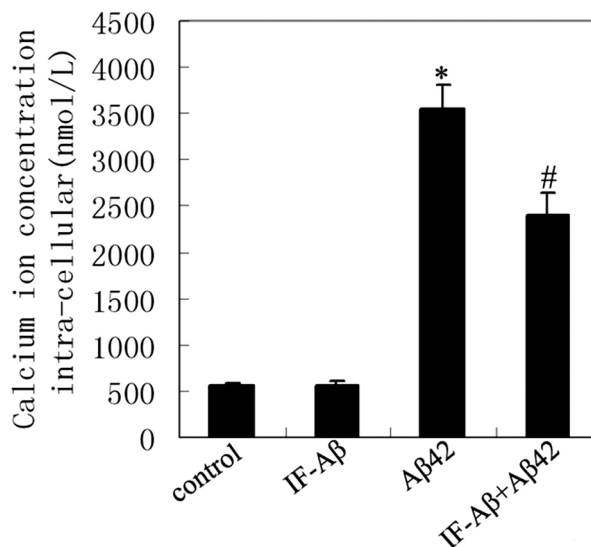


图 5 IF-A β 、A β 42 对细胞钙离子浓度的影响

Fig.5 Effects of IF-A β and A β 42 on calcium ion concentration intracellular

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

图 5 注释 为了检测 IF-A β 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 β 、A β 42 以及 IF-A β 和 A β 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 β 42 组的钙离子浓度明显升高 ($P < 0.01$)。IF-A β 组对细胞内钙离子浓度无影响。IF-A β 混合 A β 42 组细胞内钙离子浓度与 A β 42 组细胞相比下降 27.1% ($P < 0.05$)。

3 讨论

A β 肽聚集物在脑组织中的形成与沉积是 AD 发病的原因之一^[2]。因此,若能够:(1)抑制 A β 肽的形成;(2)抑制 A β 肽的聚集;(3)抑制 A β 多肽的神经毒性;(4)加速 A β 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^[9]。人们在抑制 A β 肽的聚集方面已经做了许多工作。例如,将 A β 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^[10]。但该 A β 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 β 片段只有 13 个氨基酸(氨基酸序列 A β 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 β 结合。这种结合改变了它的发射光谱。发

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

文献^[11]的研究表明 A β 溶液在 37℃ 孵育 24 小时就是寡聚体和纤维的混合物了,经 0.45 μ m 微孔滤过后就是纯的低聚体。文献^[12]也描述 A β 溶解后,在 37℃ 过夜就成纤维。本研究在检测 A β 42、IF-A β 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℃ 与细胞的共孵育,A β 经历了单体、低聚体和成熟纤维三个过程。即细胞受到 A β 三个状态的依次刺激。大量研究证实 A β 相关的退行性疾病中可溶性低聚 A β 较成熟的 A β 纤维的毒性更大^[13,14]。

A β 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^[15,16]。当线粒体和内质网的膜结构氧化损伤后,将使大量 Ca²⁺ 进入胞质。同时,A β 还可以刺激神经细胞使大量 Ca²⁺ 内流,细胞将发生 Ca²⁺ 超载,使线粒体发生肿胀^[17]。线粒体不仅是 A β 损伤的目标,而且也介导了 A β 对神经元的毒性,启动了神经元的凋亡过程^[18,19]。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 β 、A β 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 β 之所以可以影响 A β 的成纤维,抵抗 A β 的神经毒性,可能与 A β 的成纤维机制有关。很多实验证实,C 末端是控制 A β 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 β 原纤维的形成,继而形成寡聚体和成熟的纤维^[20,21]。根据这些数据,我们推测,能和 A β 42 C 端结合的分子可以打破 A β 42 的寡聚形式,从而抑制其毒性。IF-A β 正是位于 A β 的 C 末端片段,其与 A β 的 C 末端片段结合占据了 A β 同型分子间的结合位点,从而妨碍了 A β 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 β 没有成纤维倾向且可以抑制 A β 42 聚集;
- (2) IF-A β 对体外培养神经元有保护作用。

这些结果为将来 IF-A β 用于在体的 AD 治疗提供了坚实的实验依据。IF-A β 是 A β 42 的自身组成部分,相信其可以克服外源性小分子抑制物特异性较差的弊端,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 β 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 β 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 β 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 β -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. β -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- β 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 A β fragment inhibit aggregation and toxicity of A β 42 [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 β): oligomeric A β 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 β [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 Ca²⁺ influx through L-type voltagesensitive Ca²⁺ 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- β 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 β 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 β -protein monomer folding [J]. Protein Sci, 2005, 14 (6): 1581-1596