

# 阿茲海默症與奈米生物感測技術

## Alzheimer's Disease and Nano Biosensing Technology

隋安莉

An-Li Sui

阿茲海默症是一種神經退化性疾病，在失智症中佔了很大的比率，且在早期不易診斷出來。台灣的社會已面臨老化與少子化，此症對於家庭、社會、醫療機構勢必構成沉重的負擔。本文中將介紹阿茲海默症相關成因、分子機制以及目前的檢測方法，此外，亦將介紹兩種高靈敏度、高專一性的檢測方法：生物條碼檢測與光學生物感應器。此二種方法均以奈米科技為基礎，原理卻不相同。在發現阿茲海默症百年後的今天，尖端檢測科技將為人類早期診斷阿茲海默症提供新法，若加上新型藥物的開發，則可為此症的治療帶來希望的曙光。

Alzheimer's disease (AD) is difficult to correctly diagnose in the early stage. The enormous increase in the prevalence of AD over the coming decades definitely becomes a great burden for patient's family, society and medical institutes. The early and correct diagnosis, which is always the goal of scientists, shall greatly reduce healthcare costs in the future, it will also increase the quality of an esteemed life for patient. Here, I would like to briefly introduce the clinical symptoms, molecular mechanism and diagnosis of AD. Two novel and elegant designed assays, bio-barcode assay and optical biosensor, possible for future early detection of AD, will also be introduced. These two assays are recently developed, and are used to measure the concentration of protein marker for AD with great sensitivity and specificity.

### 一、前言

近年來失智症對於全球的威脅越來越受矚目，其中又以阿茲海默症佔較多數，這是一種無法治癒的腦部退化性疾病，亦稱為阿茲海默型失智症 (dementia of the Alzheimer's type, DAT)。根據統計全球正以每七秒增加一個病例的速度快速成長。2005 年全球的失智症患者人數幾乎與全台灣人口總數相當 (兩千四百萬)，其中一半集中在亞太地區<sup>(1)</sup>。台灣的失智症人口每年約增加 5800 位，2005

年台灣失智症患者共計 13 萬 8 千餘名，估計到了 2050 年將達 66 萬<sup>(2)</sup>。眾所週知的是，近來少子化亦威脅著台灣未來的社會，以後年輕人將面臨極大的負擔。

在 2004 年國際阿茲海默症協會 (ADI) 提出了京都宣言，成為失智症照護的基本行動綱領，宣言中依照低度、中度與高度三種不同等級資源列出十項綜合建議，給予全球各國一個較具體的方向<sup>(2)</sup>。在 2005 年五月 ADI 在新加坡召開會議，呼籲亞太各國應重視阿茲海默症的問題，因為它對於家庭、

社會、醫療機構都構成沉重的負擔。宣言文末提及，越來越多的證據顯示，早期診斷、早期治療等都屬於有效又省錢的好方法<sup>(2)</sup>。

阿茲海默症的早期很容易和一般的老年性健忘混淆，因此要研發出一種既靈敏、專一性又高、且能早期診斷阿茲海默症的方法一直是科學家努力的目標。本文中將介紹兩種未來可能為阿茲海默症提供早期診斷的新方法：生物條碼檢測 (bio-barcode assay, BCA) 與光學生物感應器。它們都以奈米科技為基礎，原理卻不相同。但在介紹之前，必須先了解阿茲海默症的一些相關成因與分子機制。

## 二、阿茲海默症

### 1. 阿茲海默症

阿茲海默症是一種漸進性神經退化疾病，在現今失智症中所佔比率相當高，以歐洲為例，它佔了所有失智案例中的六成。於 1906 年 11 月首度由一位德國的神經病理學家與心理醫師阿茲海默 (Alois Alzheimer) 所描述，患者為一名 51 歲的女性，她的徵狀為記憶喪失、失去方向感並伴有幻覺。自發現此案例至今已屆百年。長久以來我們對於此症仍了解有限。全球遭受此症威脅的人數正不斷攀升，但因其不易在早期診斷出來，即使症狀逐漸惡化，臨床上的正確診斷率仍僅介於 65—90% 之間<sup>(4)</sup>。

### 2. 臨床症狀與診斷

阿茲海默症一般可分為早發性與晚發性二種，通常是以 65 歲作為區分。在此年齡之前出現症狀為早發性，晚發性阿茲海默症則佔了九成。早期最明顯的症狀是記憶障礙，繼之有認知上的衰退、行為問題，如易怒、多疑、異常的收藏等，接著就有空間感與運動能力的喪失、日常行為能力的下降，到最後甚至無法自行進食、需安養照護等；從症狀顯現至死亡約 8—12 年 (如圖 1 所示)。

臨床診斷阿茲海默症時，通常會根據患者過去的病史詳細評估檢查，以便排除其他疾病的可能。常用的神經心理檢測步驟稱為「簡易智能狀態測驗」(mini-mental state examination, MMSE)，可測試患者在定向感、注意力、記憶、計算、語言等項

的退化程度。正常者滿分為 30 分，並根據得分將阿茲海默症分為輕度 (20 分)、中度 (14 分) 與重度 (5 分)。在某些狀況下必須將輕度認知障礙 (mild cognitive impairment, MCI；MMSE 25 分) 與阿茲海默症加以區分。MCI 最近漸受注意，它是介於正常認知能力與阿茲海默症間的過渡期<sup>(5)</sup>。MCI 的患者具有輕微的記憶障礙，不是失智症，但是有較高的機率發展成為阿茲海默症。到目前為止，臨床上沒有確切的診斷方式來斷定 MCI 是否會成為阿茲海默症，而阿茲海默症在發展成失智狀態之前也不易診斷出來。

### 3. 解剖學與神經生理的變化

阿茲海默症患者的腦部有明顯的萎縮，因此外觀上腦溝會擴大 (圖 2 上排)，這是因為在大腦顳葉與額葉內有大量神經元死亡和突觸萎縮所致。若以觀察生化代謝的正子斷層掃描 (PET scan) 檢測，可看出阿茲海默症患者腦部的代謝程度明顯地較同年齡正常腦部代謝為低 (圖 2 下排)，有如吹了熄燈號一般，腦內不再有旺盛的活動力<sup>(6)</sup>。

若透過顯微鏡詳細檢查，則可在阿茲海默症患者腦部發現兩種主要的異常：一是在神經細胞之外會出現塊狀的類澱粉堆積物，叫做老年性斑塊 (senile plaques)；另一是在神經細胞內會出現糾纏在一起的神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles) (圖 3)。

老年性斑塊是由於類澱粉前驅蛋白質 (amyloid precursor protein, APP) 依序經過  $\beta$  與  $\gamma$  分泌酵素 ( $\beta$ -secreasase,  $\gamma$ -secreasase) 的細胞外切割後，產生的一種

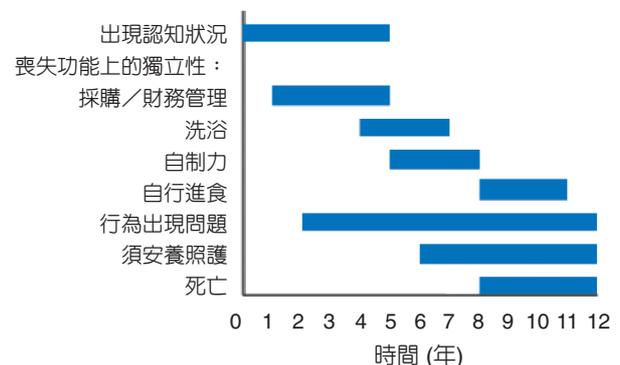


圖 1. 阿茲海默症發病後，出現日常生活與各種行動失能的時間表。

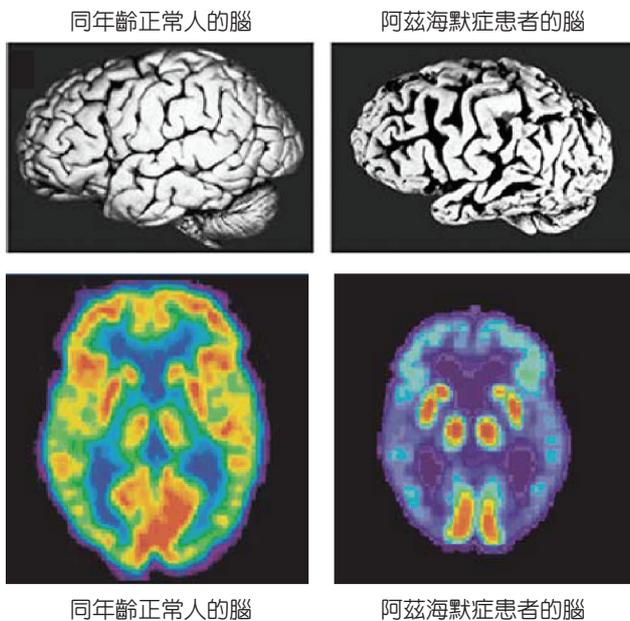


圖 2. PET 腦部掃描圖<sup>(10)</sup>。上半部二圖為 MRI 腦部結構圖；下半部二圖為正子掃描圖，為腦部代謝功能性圖。

小型蛋白質產物  $\beta$ -類澱粉肽 (amyloid  $\beta$ -peptide,  $A\beta$ ) 所堆積而成。神經纖維糾結則是由於神經細胞內一種稱為  $\tau$  蛋白 (tau protein) 的物質，在過度磷酸化後，會使得細胞內微小管聚集而形成絲狀糾結。這兩種主要的異常都會導致神經細胞間所形成的突觸與神經細胞本身的破壞與死亡，大量的神經細胞死亡造成了大腦的萎縮，進而影響許多大腦皮質功能，最後演變成記憶、語言、空間辨識、甚至自我認知的能力喪失。

#### 4. 罹患阿茲海默症的危險因子

已知罹患阿茲海默症的確定危險因子有年齡、

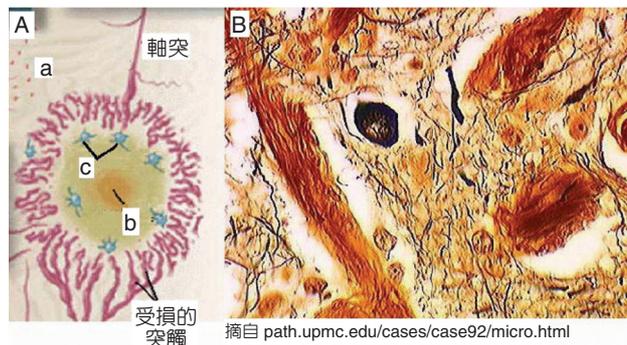


圖 3. 阿茲海默症腦部的兩大病理特徵：(A) 老年性斑塊與 (B) 神經纖維糾結。(A) 在神經細胞外的組織間會出現類澱粉堆積，稱作老年性斑塊 (圖 A 中 b 淡黃色與橘色區域)。並可見到受損的突觸與左上角堆積的類澱粉 (圖 A 中 a 附近的紅色點狀物)。c 為微小神經膠細胞。(B) 腦部神經細胞內則會出現神經纖維性糾結 (黑色細絲狀線條)。

家族性失智症病史、老化相關的疾病 (心血管疾病與糖尿病) 與遺傳特定的某些基因，此外，環境污染、腦部感染或外傷也可能造成此症。當年齡高於 65 歲時，罹患阿茲海默症的機率約為 10%，往後每增加五歲，罹患率會倍增；當年紀高於 70 歲時，其罹患率即大增，85 歲以上時幾乎高達 50%<sup>(7)</sup>。據估計在未來 50 年間，全世界罹患此症的人數將增為三倍<sup>(8)</sup>。

絕大多數的阿茲海默症屬於原發性，少數則源自家族性或遺傳。目前已知與阿茲海默症有關的基因位於第 1、14、17、19 與 21 對染色體上，分別有不同的影響 (表 1)，其中較為熟知的是位於第 19 對染色體上的 ApoE  $\epsilon$ 4 基因<sup>(9)</sup>。位於第 21 對染色

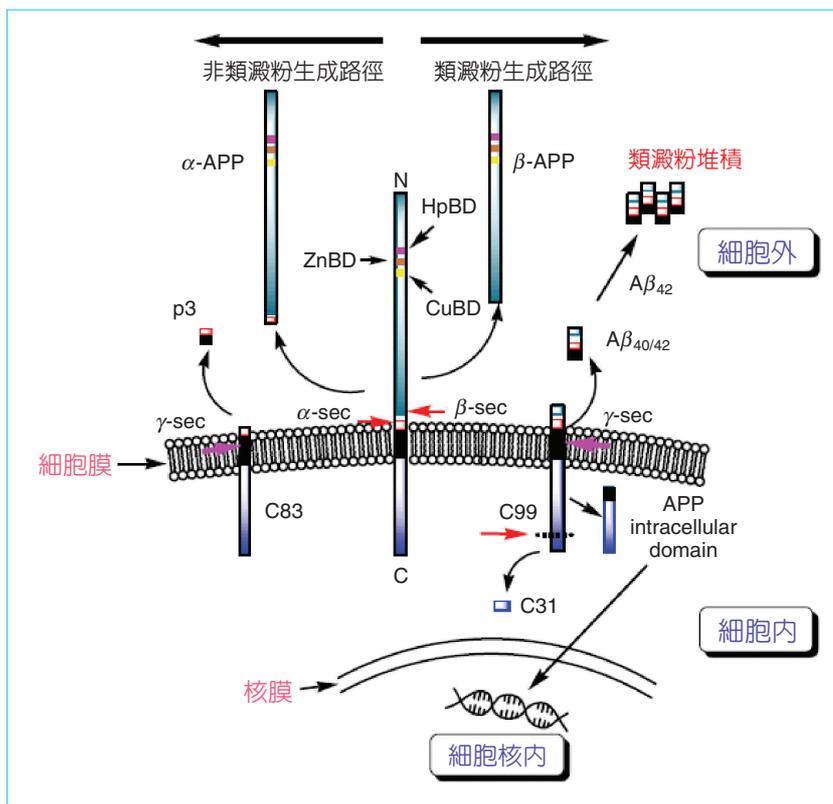
基因名稱	人類染色體位置	產生的影響
早衰蛋白質 2 (presenilin 2)	第 1 對染色體	當基因發生突變時會產生較多量的 $A\beta_{42}$
早衰蛋白質 1 (presenilin 1)	第 14 對染色體	
$\tau$ 蛋白 (Tau protein)	第 17 對染色體	當過度磷酸化時會造成細胞內的神經纖維糾結
阿波脂蛋白 E (ApoE $\epsilon$ 4)	第 19 對染色體	此基因型會增加阿茲海默症的罹患率
類澱粉前驅蛋白質 (APP)	第 21 對染色體	當基因異常或重複時會產生較多量的 $A\beta_{42}$

表 1.

已知與阿茲海默症有關的基因及其異常後的影響。

圖 4.

APP 在細胞中被酵素切割的方式。左方先由  $\alpha$ -sec 切割 (紅色箭頭) 後, 再由  $\gamma$ -sec 切割 (粉紅色箭頭), 並不會產生  $A\beta$ 。右方若先由  $\beta$ -sec 切割, 再由  $\gamma$ -sec 切割後, 就會產生不同大小的  $A\beta$  單體。其中  $A\beta_{42}$  過多即會形成類澱粉堆積。位於細胞內的部分可經由其他酵素切割產生 C31 與 APP 細胞內區域 (APP intracellular domain), 前者具細胞毒性, 後者則可進入細胞核中調控基因。HpBD: 肝素結合區, ZnBD: 鋅離子結合區, CuBD: 銅離子結合區。



體上的則是類澱粉前驅蛋白質 (amyloid precursor protein, APP) 的基因。此二者將在後面敘述。此外, 尚有位在第 14 號染色體上的早衰蛋白 1 (presenilin 1, PS1) 與第 1 號染色體上的早衰蛋白 2 (presenilin 2, PS2) 基因。其產物是嵌插在細胞膜中的蛋白質, 屬於  $\gamma$ -分泌酵素四種組成蛋白質中的一部分。早衰蛋白負責  $\gamma$ -分泌酵素的主要蛋白質切割功能, 在生理上可以參與早期的胚胎發育控制及信息傳導過程。在腦部神經細胞中都有此蛋白質的表現。若 PS 基因發生突變, 就會影響  $\gamma$ -分泌酵素的功能 (詳見下述), 產生過量的類澱粉, 而導致阿茲海默症的提早出現。

在第 17 對染色體上則有  $\tau$  蛋白 (Tau protein), 屬於單一基因但有六種同型異構物。此種蛋白質被過度磷酸化後, 就會在神經細胞內造成以微小管為主的纖維糾結沉積, 成為阿茲海默症的病理特徵之一。其他相關的因素尚有低教育程度、曾有頭部創傷與嗜食高熱量、高脂肪食物等, 都可能增加罹患阿茲海默症的機率<sup>(10)</sup>。

## 5. 阿茲海默症的分子機制

### (1) 類澱粉前驅蛋白質 (APP)

APP 在身體各部位的細胞內都可發現, 是一種嵌插在細胞膜上的糖蛋白, 依照其不同的異構型 (isoform), 胺基酸的個數介於 695–770 之間。腦中的 APP 含有 695 個胺基酸 (APP695), 埋在細胞膜的部分約有 23 個胺基酸長度, 具胺基且較長的一端位於細胞外, 上面具有能和銅離子與鋅離子結合的區域各一, 具羧基較短的一部分位於細胞內 (圖 4)。APP 確實的功能至今不是很清楚, 但有研究顯示可能與調控銅離子的恆定有關<sup>(11)</sup>。

APP 的基因位在第 21 號染色體上, 這也是唐氏症患者所多出來的染色體。因此唐氏症患者在 50 歲左右時就可能出現阿茲海默症。有研究顯示, 他們甚至從十幾歲開始, 在腦部即出現類澱粉的堆積<sup>(12)</sup>。

### (2) 類澱粉堆積的產生

細胞膜上的 APP 可經由細胞內三種不同的酵

素切割，分別為  $\alpha$ -、 $\beta$ - 與  $\gamma$ -分泌酵素 ( $\alpha$ -,  $\beta$  and  $\gamma$ -secrease)，各自形成不同的胞外與胞內產物。在此過程中若有酵素異常，不正常的切割 APP 後，便會產生一段小型胜肽，稱為  $\beta$ -類澱粉胜肽 ( $A\beta$ )。 $A\beta$  會聚集成無法分解的聚合體，繼而沉積在腦部神經細胞外，形成類澱粉堆積，導致神經元與突觸的破壞。其過程簡述如下。

#### ① 非類澱粉生成路徑

$\alpha$ -分泌酵素可切割 APP 位於胞外的部分，形成一段可自由釋出的多胜肽，稱為 (s)APP $\alpha$ ，剩餘的部分為具有 83 個氨基酸的羧基端，稱為 C83，若經此途徑，細胞外並不會產生有害的  $A\beta$  聚合體 (圖 4，非類澱粉生成路徑)。研究發現當神經細胞的電性活動增加，或是其草毒鹼受器被刺激時，(s)APP $\alpha$  的產量就會增加，因此神經活動會促進 (s)APP $\alpha$  的產生<sup>(13)</sup>。

#### ② 類澱粉產生路徑

當 APP 依序接受  $\beta$ -與  $\gamma$ -分泌酵素切割時，就可能產生類澱粉的堆積。首先， $\beta$ -分泌酵素將 APP 切下一段，叫做  $\beta$ -APP，剩餘的部分為具有 99 個氨基酸的羧基端，稱為 C99。接著  $\gamma$ -分泌酵素會將 C99 從埋在細胞膜內的地方作切割，而產生一短小型胜肽，即為  $\beta$ -類澱粉胜肽 ( $A\beta$ )。因  $\gamma$ -分泌酵素的切割點不止一處，故可分別產生含 40 個或 42 個氨基酸的  $A\beta$  ( $A\beta_{40/42}$ )，其中  $A\beta_{40}$  佔多數，此種單體較不會發生聚集現象。但是  $A\beta_{42}$  就不同了，阿茲海默症的老年性斑塊就是由  $A\beta_{42}$  聚集而成的。位於細胞內的 C99 會由另一種酵素切下一小段胜肽，稱為 C31，C31 具有神經毒性<sup>(14)</sup>。經切除  $\beta$ -APP、 $A\beta$  與 C31 後的 APP 剩餘部分即自細胞膜上脫落，進入細胞質，稱為 APP 細胞內區域 (APP intracellular domain)。它會進入細胞核調控基因的表現，咸信與活化細胞凋亡相關之基因有關<sup>(15)</sup> (圖 4，類澱粉生成路徑)。

#### (3) $\beta$ -類澱粉胜肽 ( $A\beta$ )

有關阿茲海默症的研究在過去 20 年間有了明顯的突破，最主要的是在 1984 年首度自患者腦部

分離出  $A\beta$ <sup>(16)</sup>。正常人的腦脊髓液 (CSF) 中會出現  $A\beta$ ，但在腦組織中無法測得，說明了應有一機制能有效地將  $A\beta$  自腦中去除<sup>(17)</sup>，若無法去除而令其聚集沉積在腦中，即會增加罹患阿茲海默症的風險。

研究發現會導致  $A\beta$  的增加有下列諸項因素，例如：基因突變、高膽固醇、雌激素的下降、外傷和缺氧<sup>(19,20)</sup>。利用酵素免疫聯結法 (ELISA) 測量發現在阿茲海默症患者的額葉腦組織中，水溶性  $A\beta$  的含量要比正常腦組織高約 750 倍<sup>(22)</sup>。由於 ELISA 的測量極限約為 5 奈克/每克腦組織，因此正常人腦中的  $A\beta$  不易得到正確的數字<sup>(22)</sup>。

#### (4) $\beta$ -類澱粉衍生之可擴散性配位基

單體  $A\beta_{42}$  有自行聚集組合的能力，當多個  $A\beta_{42}$  聚集後，會形成寡聚體 (oligomer)，稱為  $\beta$ -類澱粉衍生之具擴散性配位基 (amyloid- $\beta$ -derived diffusible ligand, ADDL)。ADDL 無法被組織分解而形成沉澱，最後就成為老年性斑塊。真正對神經具有破壞性的，不是水溶性的  $A\beta$  單體，而是其聚合物 ADDL<sup>(18)</sup>。

在斑塊沉積的區域會活化微小膠細胞 (圖 2) 與星狀細胞，它們都屬於神經膠細胞，前者負責免疫反應，後者除了支持、結構與營養之外，也具有免疫活性。因此  $A\beta$  的堆積會啟動腦部本身的先天性免疫 (innate immunity)，進而造成腦部發炎。發炎會誘發產生一些細胞激素及相關蛋白質，它們又會加速  $A\beta$  的堆積，如此一來，成為惡性循環。因此過去曾有觀察發現，若長期服用抗發炎藥物，如埃布普洛芬 (ibuprofen)，對於阿茲海默症的發展可提供部分保護作用<sup>(21)</sup>，其原理可能肇因於此。

#### (5) APP 與 $A\beta$ 的生理功能

APP 的生理功能除了前述與調控銅離子的恆定有關<sup>(11)</sup> 之外，未切割前的 APP 可能參與調控神經細胞內利用軸突運輸與細胞膜相關的物質<sup>(23)</sup>。切割後的 APP 細胞內羧基端片段 (APP intracellular domain) 則會進入細胞核作為轉錄因子調控基因的表現<sup>(15)</sup>。較令人好奇的則是  $A\beta$ ，已知  $A\beta$  的聚合體是造成阿茲海默症的成因。可是在正常狀態下， $A\beta$  單體不具細胞毒性。

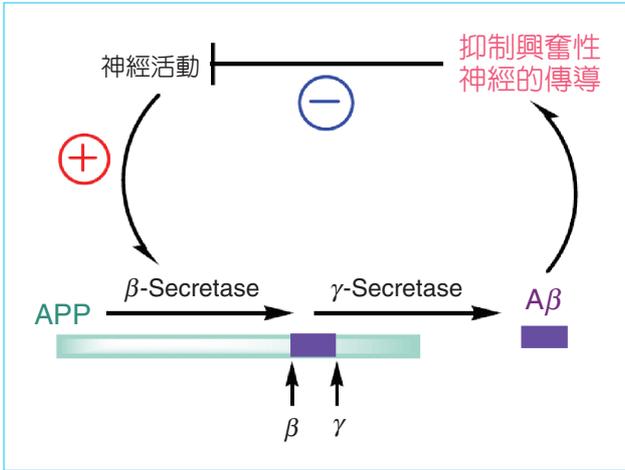


圖 5. Aβ 單體在生理上的功能。

在過去的研究中發現，這種具水溶性、非聚合狀的 Aβ 單體能促進細胞膜上鈣離子與鉀離子通道的活性，因此會改變突觸的功能<sup>(24,25)</sup>。也有許多的研究證實，Aβ 單體可以抑制一種由腦內麩胺酸受器 (包括 AMPA 與 NMDA 兩種亞型的受器) 所引發的興奮性突觸傳導，但對於抑制型突觸 (如含 GABA 受器) 就沒有作用<sup>(5)</sup>。因此，Aβ 單體在生理上的作用可能是參與興奮性神經活動的調節 (圖 5)。

## (6) 阿波脂蛋白 E (ApoE)

ApoE 是一種參與運送脂肪與膽固醇的微脂粒上的蛋白質，它的基因位在人類第 19 號色體。ApoE 在神經生理功能是參與修復機制，可以保護或修復受傷的神經細胞。在神經膠細胞中，如寡突膠細胞、星狀細胞與微小膠細胞，都有 ApoE。正常的 ApoE 會與 APP 或 Aβ 結合。當 Aβ 與 ApoE 結合後，便不會聚集成聚合體<sup>(26)</sup>。

研究發現 ApoE 具有三種，分別是 ε2、ε3 與 ε4。大多數人的 ApoE 為 ε3 (77%)，若為 ε2 (8%) 則較幸運，因為此型罹患阿茲海默症的機率較 ε3 低。但若不幸遺傳到 ApoE ε4 (15%) 的基因型，罹患阿茲海默症的危機會增為四倍，若是此對基因均為 ε4，那麼危機會更高<sup>(27)</sup>。

## (7) τ 蛋白

τ 蛋白是一種調節微小管組合的蛋白質，可在

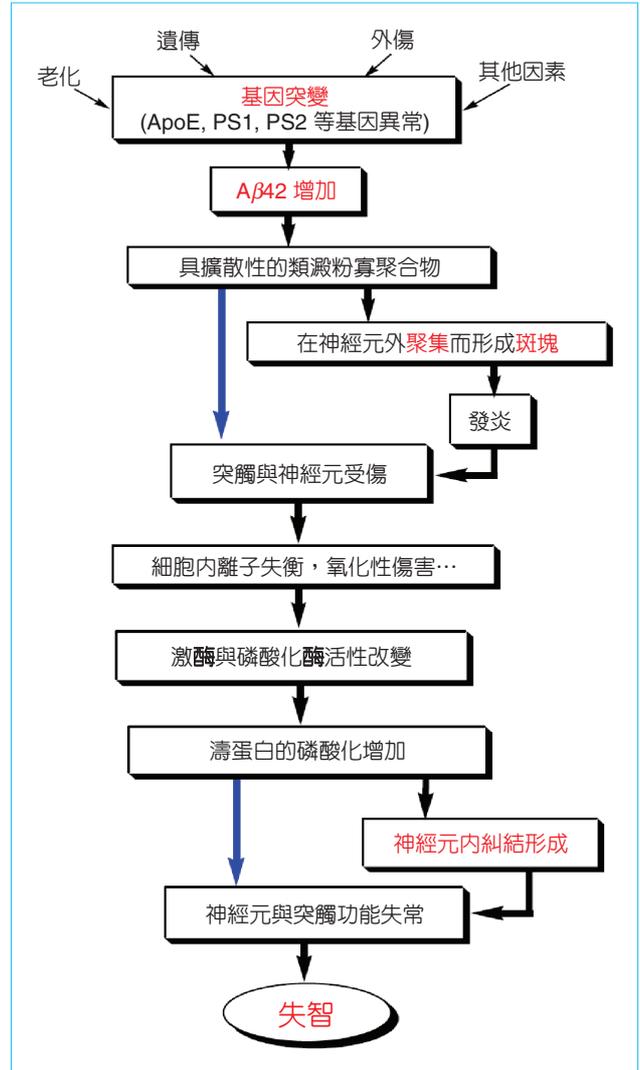


圖 6. 阿茲海默症導致失智可能的過程。

神經元的軸突中發現，在神經突觸發育上扮演著重要的角色。神經組織間因類澱粉的堆積，會傷害神經元，影響其內部的離子平衡，造成細胞質中鈣離子增加，進而活化許多酵素<sup>(10)</sup>。這些酵素中包括磷酸酶與激酶，將 τ 蛋白 (tau protein) 過度磷酸化。磷酸化的 τ 蛋白便無法正常調控微小管的組成，因而促使神經細胞內的微小管糾結而形成神經纖維糾結。在阿茲海默症患者的腦脊髓液中也會出現磷酸化的 τ 蛋白。由於其他的腦部疾病，如中風、庫賈氏症腦部的磷酸化 τ 蛋白量均無明顯改變，因此在腦脊髓液中增加的磷酸化 τ 蛋白量可視為阿茲海默症的指標之一<sup>(28)</sup>。

## 6. 總結

阿茲海默症型失智的成因可能不只一項因素(圖 6)，除了年齡老化之外，其他如遺傳到特定的基因、受過腦部感染、外傷、暴露於污染的環境與不健康的飲食等，都有可能促使相關酵素的基因異常而增加產生  $A\beta$ 。過多的  $A\beta$  會聚合形成斑塊，引起發炎，造成神經元與突觸的傷害。而上述的  $A\beta$  聚合物堆積也可能直接引起神經元與突觸的傷害(圖 6 中藍色箭頭)。受傷的腦部組織會造成離子失衡、引發較多自由基產生。失衡的離子中，過多的鈣離子進入細胞質後，會過度活化酵素，而造成  $\tau$  蛋白磷酸化的激增。接著，過度磷酸化的  $\tau$  蛋白會造成細胞內微小管聚集無法分解而形成神經纖維糾結。過度磷酸化的  $\tau$  蛋白和神經纖維糾結都可能引致神經元與突觸失常，最後全面性擴大傷害而導致失智。

## 三、阿茲海默症的早期診斷

阿茲海默症患者的診斷方式最常是以上述的認知測試加以評估。但是記憶衰退、認知障礙的失智症有許多成因，除了阿茲海默症外，還包括中風、帕金森氏症與多發性腦梗塞等。對於患者而言，如何正確、早期地診斷出來，而施與即時且適當的治療就很重要。

隨著科技進步，目前有些方法可以區分上述部分的差別。例如，正子斷層掃描 (positron emission tomography, PET) 就是一種可以針對腦部狀況以影像方式呈現的診斷工具。PET 最常用來診斷癌症。它使用一種具放射性氟化去氧葡萄糖 (18 fluorine deoxyglucose,  $^{18}\text{F}$ FDG) 作為追蹤工具，顯示的不是結構而是以代謝機能為主。可針對癌症作早期、復發及轉移上的追蹤，其敏感度與特異性均極為優越。若變換其追蹤劑，甚至可以觀察到分子層次。例如以標定之多巴胺可以診斷帕金森氏症。

近來有一種新型的 PET 追蹤劑，它是 Thioflavin T 的衍生物，以放射性碳作為標記物，稱為  $^{11}\text{C}$ -PIB (Pittsburg compound-B)。研究發現， $^{11}\text{C}$ -PIB 可以非常專一地與類澱粉纖維聚合物結合，但不會與神經纖維糾結起反應，因此可用來診斷阿茲海默症<sup>(29)</sup>。由於帕金森氏症、前額葉失智症

均無類澱粉纖維沉積，因此可以和阿茲海默症有所區分。問題是在輕度認知障礙及路易氏小體失智症的腦部影像中亦會顯示出訊號。

對於疑似阿茲海默症患者而言，要進行 PET 可能會有不同程度的困難。因為在作 PET 掃描前須先靜脈注射追蹤劑，並盡量停止軀體活動以待追蹤劑達到平衡。掃描時需靜躺至少 30 分鐘至一個半小時。這些對阿茲海默症患者而言不容易做到。同時進行 PET 檢查的患者也必須暴露在放射線 ( $\gamma$  射線) 之下。雖然一次 PET 所接受的劑量低於一年輻射背景值之總和，但要比 X 光與電腦斷層掃描為高。再加上其儀器設備、消耗藥品成本均十分高昂，在經濟上也相當不利。以上種種原因使得 PET 的接受度仍有限。

以下將介紹兩種利用奈米科技的檢測方法，其具有高敏感度、快速、經濟、操作方便、容易攜帶、不需暴露於放射線下而且可以正確地診斷出阿茲海默症等優點，其中一種是利用金奈米粒與磁性微粒的生物條碼檢測，另一種則是利用銀奈米粒的光學生物感應器。

## 四、新式奈米科技診斷技術

### 1. 生物條碼檢測

生物條碼檢測 (bio-barcode assay, BCA) 是由美國西北大學 Chad Mirkin 教授與研究團隊利用其近十年來的研究成果整合開發出來的方法。

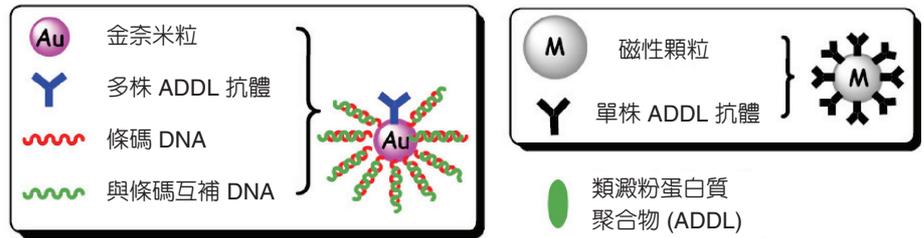
#### (1) 前驅研究

有關 Mirkin 醫療檢測的奈米研究是以黃金奈米顆粒 (Au nanoparticle, NP) 為主，早期最重要的創新是將 DNA 結合在 NP 上，利用 DNA 可以互相配對結合的特性，依次研發出掃描式、彩色與電子式的 DNA 感應器<sup>(30)</sup>。

在即將介紹的生物條碼檢測中，除了應用前述的基礎原理外，也會用到上述的掃描式 DNA 感應器(圖 8-2)，其作用是不需經過聚合酶連鎖反應 (PCR) 來擴增就可顯示少量的 DNA。此處所用的 DNA 稱為條碼 DNA，其目的僅作為訊息的顯示，並非主要的受測物，因此為整個檢測中的最後一環。

圖 7.

黃金奈米顆粒與磁性微粒的處理與欲偵測的蛋白質 ADDL。



### (2) 原理與偵測方式<sup>(31)</sup>

BCA 的檢測是利用兩種微型顆粒，一種是直徑為 13 奈米的黃金奈米顆粒 (NP)，另一種則是粒徑為 100 微米的磁性顆粒 (M) (圖 7)。其原理為先將 ADDL 的單株抗體接在具磁性的微粒 (M) 上，另外，在接有 ADDL 多株抗體的 NP 上，接上稱為互補對的 DNA；接著，再將預先合成的、可和前述的互補對 DNA 配對結合的 DNA 結合上去，這種 DNA 叫做條碼 DNA。而 ADDL 的單株與多株抗體是分別針對 ADDL 不同部位所製造的抗體，因此這兩種抗體並不會彼此競爭，而是會各自結合在 ADDL 上。

將上述處理過的 M、NP 與來自患者的脊髓液 (內含 ADDL) 混合，ADDL 就會如同橋樑一般，利用與單株與多株抗體的結合能力，將 M 與 NP 拉在一起。然後以磁場將 M 吸住並將未結合的洗去。被留下來的 M-NP 經加熱就可將條碼 DNA 和連接在 NP 上的互補對 DNA 分離 (圖 8 之 1)。這些存在溶液中的條碼 DNA 可以利用先前的掃描式 DNA 感應器方式偵測出來 (圖 8 之 2)。

### (3) 檢測樣本與結果<sup>(31)</sup>

在此實驗中所用的樣本是來自 15 名死後經檢驗確認為阿茲海默症的患者在生前經腰椎穿刺取出的腦脊髓液。而另外的 15 名對照組則未罹患此症。所測得的兩組數據顯示，阿茲海默症患者組的 ADDL 濃度其中位數為 1.7 fM ( $1.7 \times 10^{-12}$  M)，而對照組則為 200 aM ( $2 \times 10^{-13}$  M)。15 名中多數的阿茲海默症患者測得的 ADDL 濃度都在 0.5 fM 以上，僅有兩名 (圖 9 中紅線下方) 與對照組近似 (圖 9)。其中一人臨床診斷為阿茲海默症患者，但是其 MMSE 測得分數極高，而且在患者後期發展中證實其病理檢查結果與阿茲海默症並不相符；另一名

其病理徵狀除了阿茲海默症之外亦伴有梗塞的現象<sup>(32)</sup>。

### (4) 優點

BCA 是現今阿茲海默症在實驗室的檢驗方式中極靈敏的一種，根據此法偵測蛋白質的濃度可達  $10^{-15}$  M 的範圍。若以男性的攝護腺癌指標蛋白質 (PSA) 為例，發現 BCA 測得的蛋白質濃度最低可達  $3 \times 10^{-15}$  M，相當於在 10 微升的樣品中約有 18-20 個蛋白質分子，這要比現今存在的蛋白質檢測方法靈敏百萬倍，因此 BCA 可視為檢測蛋白質的聚合酶連鎖反應 (PCR)<sup>(32-33)</sup>。

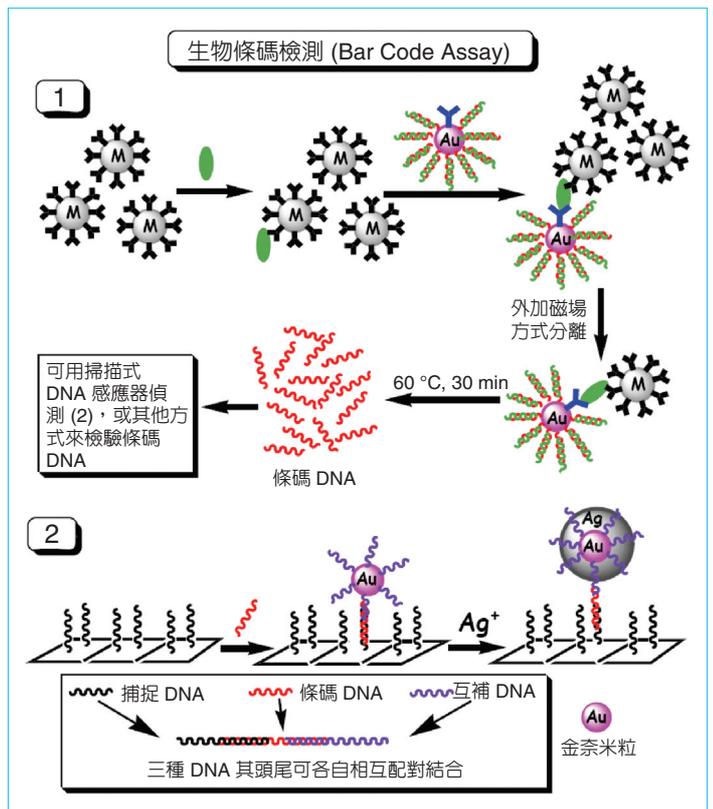


圖 8. 生物條碼檢測法。

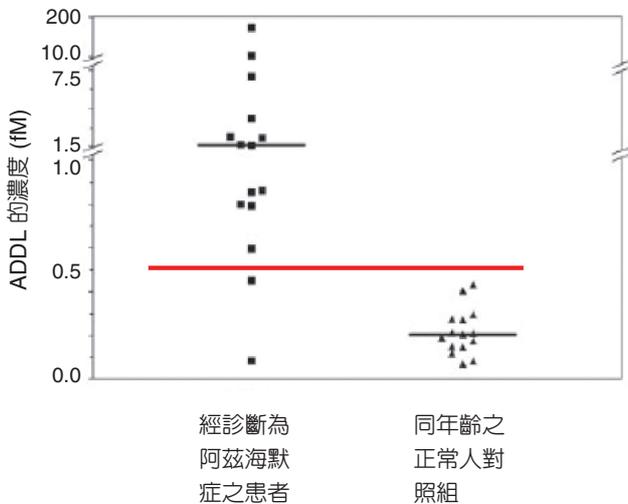


圖 9. BCA 檢測結果<sup>(32)</sup>。黑線為各組之中位數，紅線以下為對照組 CSF 中之 ADDL 濃度，介於 0.5 fM 以下。

此法不僅靈敏，同時專一性亦高，因為在 15 名以現今檢測方法被認為是阿茲海默症患者中，檢測出兩名與對照組的濃度相近，說明了此二患者可能是偽陽性。因此今日常用的檢驗方法需要重新評估，避免將其他失智症誤判為阿茲海默症。此外，由於所需樣品少、檢測過程快速、其成本也比上述的核醫影像低廉。檢驗亦不需傷害腦部，因此可在患者生前即進行檢查以確認病因，甚至可在早期懷疑是否為阿茲海默症時即進行檢測。若可以早期確認，便可施以適當藥物，除了延緩其惡化的速度外，甚至可以防止阿茲海默症徵狀顯現或延遲出現。除了減少患者本身的苦痛，對於患者的親屬、家庭負擔與社會成本等都可因而大幅降低。

## 2. 光學生物感應器

物質奈米化後，其許多化學與物理性質，如磁性、導電性、光學性質與反應性，都會和原來不

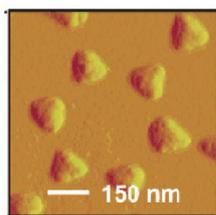


圖 10. 三角錐形銀奈米粒子<sup>(54)</sup>。

同。此處介紹的第二種檢測方法也是以奈米顆粒為主，就是銀奈米粒子。有別於 BCA 所用的球型金奈米粒子，後者除了組成原子為銀之外，其形狀是一種較特殊的三角錐形，是在 2001 年所研製出來的<sup>(34)</sup>。

### (1) 前驅研究

奈米級顆粒較常見的形狀多為球形、短棒狀或棒狀。而三角錐形的銀奈米粒子較特殊，它具有極敏銳的光學特性 (圖 10)。經研究發現，當三角錐形的高度僅增加 4 奈米左右時，其吸收光譜即會改變<sup>(34)</sup>，因此，若其表面附著某些物質，例如抗體或是連結著抗原的抗體，都會改變其吸收光譜。

### (2) 原理與偵測方式

光學生物感應器是利用表面電漿子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 的原理 (圖 11)。SPR 是近十年來所發現的一種極具威力的光學測量方法。由一片薄薄的黃金膜貼在玻片上，此玻片再與三稜鏡貼附一起。當光經過三稜鏡打在金膜上，其反射的光會有部分被吸收。當金膜上附著生物性分子時，如抗體、DNA、生物大型分子或是細胞膜等，其吸收光譜便會改變。

現以抗體為例，當樣本內含有可與抗體結合的抗原時 (圖 11 中紅色小球)，抗原流經時便會與抗體結合。當連接物分別為抗體或是抗原-抗體聚合物時，二者的吸收光譜會不相同，因此可作為一種靈敏度極高的感測器。光學生物感應器<sup>(35)</sup> 就是利用 SPR 原理，將阿茲海默症中的 ADDL 多株抗體

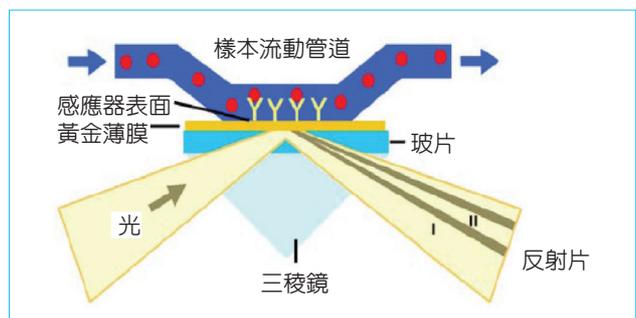
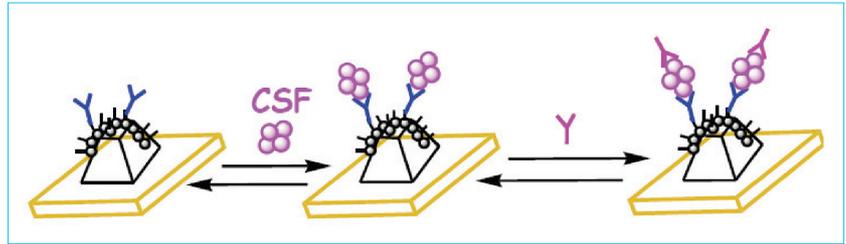


圖 11. 表面電漿共振。經照光後會出現不同的吸收光 (I, II) 光譜。

圖 12.

光學生物感應器的原理<sup>(36)</sup>。黃色為金薄膜，黑色椎狀構造為銀奈米粒子，其上連結 ADDL 多株抗體 (藍色)，加入抗原 (例如：CSF 中的 ADDL，紫色) 後再加 ADDL 單株抗體 (紫色 Y 型)。



先附著在上述各邊寬 90 奈米、高 25 奈米的三角錐形銀奈米粒子上，接著加入欲測試的樣本，如腦脊髓液 (圖 12 與圖 13(a))。若其中含有 ADDL，就會形成抗原-抗體複合物；接著再加上 ADDL 的單株抗體以放大效應，便可用光照射測量其吸收光譜。

### (3) 檢測樣本與結果

檢驗的樣本來自以腰椎穿刺取得阿茲海默症患者的腦脊髓液與死後患者的大腦皮質萃取液。以腦脊髓液作為檢測樣本測出的光譜偏移結果，要比大腦皮質萃取液為明顯。圖 13 即為以腦脊髓液作為檢測樣本，其中黑色曲線代表僅有抗體，藍色曲線代表抗體加 CSF，紅色曲線代表再加入第二種抗體。13(a) 代表同年紀對照組的光譜，13(b) 則為阿茲海默症患者組。當加入患者的 CSF 後在吸光光譜上出現 18.5 nm 的偏移，若再加入第二種抗體則會出現 15.4 nm 的偏移，因此總共出現的偏移達 33.9 nm，可看出 (a) 與 (b) 之間有明顯的光譜差異<sup>(35)</sup>。

### (4) 優點

其部分優點與 BCA 類似：所需偵測的樣品不多，靈敏度很高。與 BCA 不同的是，其檢測過程僅需照光，因此十分快速。檢驗可抽取 CSF 而不需傷害腦部，因此可在患者生前即進行檢查，以確認病因，甚至可在早期懷疑是否為阿茲海默症時即進行檢測。此外，由於利用抗原抗體結合，因此不需要繁複的檢驗前試劑的準備。在判定結果時，亦不需要利用其他生化方法，僅用吸收光譜偏移判定即可。

## 五、BCA 與微流晶片儀器發展

BCA 的檢測方法看似複雜，但卻可加以微型化

並整合之。Mirkin 與伊利諾大學香檳分校的團隊合作，研發出一種微流晶片，將整個檢測過程巧妙的設計在一張晶片上<sup>(36)</sup>。在此晶片上具有控制閥門、輸送幫浦、混合器與其他樣品清洗或蒐集管道等功能。不同區域負責整個 BCA 中各自的步驟 (圖 14)。晶片一次可進行兩組相同流程的實驗，一為對照組，另一為實驗組 (圖 14 上半部與下半部)。

晶片的前半段執行 BCA 步驟，經抗原、NP 與 M 混合、結合與磁性分離，最後加熱釋出的條碼 DNA 經特定管線 (紫色管路) 流至晶片的後半段，進行掃描式 DNA 感應器中的反應，亦即將由條碼

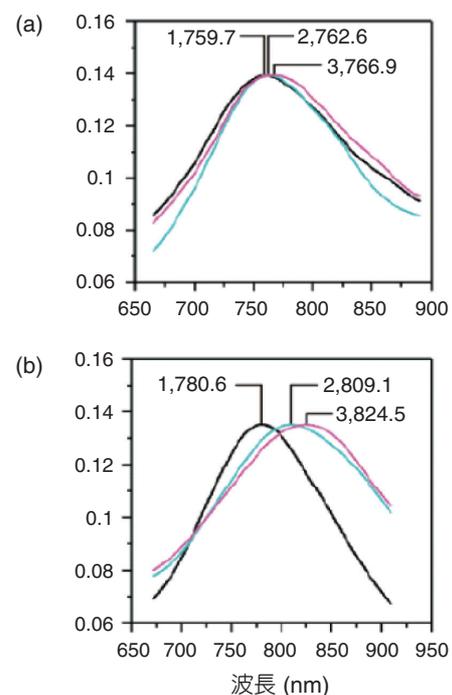


圖 13. 光學生物感應器偵測之吸收光譜。(a) 為對照組，(b) 為阿茲海默症組，光譜有明顯位移。紅色與藍色曲線代表加入 ADDL 不同之抗體<sup>(36)</sup>。

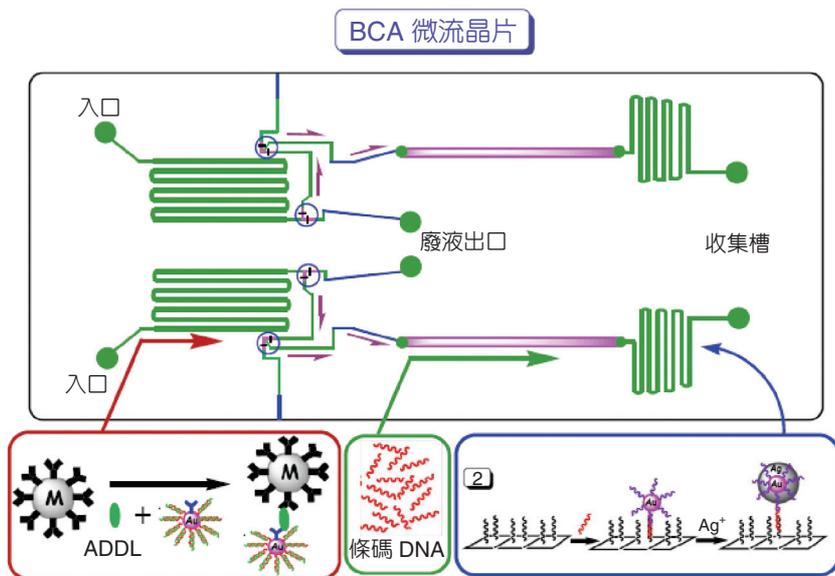


圖 14 .

BCA 與微流晶片。晶片左方為進行 BCA 檢測區，藍色圓圈中有不同活閥 (黑色短線) 控制流向。所得條碼 DNA 會經管線 (紫色) 流到達右側，右方為掃描式感應器的反應檢測區。晶片上下兩部分可同時進行相同的兩組實驗<sup>(37)</sup>。

DNA 所抓住的奈米金粒子外加上銀 (Ag)，增加判讀時的敏感度。最後的結果，可以利用 Mirkin 所組成的公司產品，一種掃描系統—Verigene ID 系統加以判讀。此即為將一座實驗室內建在晶片上，也就是所謂的微流晶片實驗室系統 (microfluidic laboratory-on-a-chip system, LOC system)。

## 六、未來展望

BCA 提供檢驗阿茲海默症的新方法，不但大幅增加其靈敏度、減少樣本所需的量，且可提供患者早期檢測的可能性。加上微流晶片的設計，未來可成為攜帶式，而檢測試劑亦可減量進而降低成本。但是此法仍有一些問題尚待釐清。亦即未來需確認在 BCA 中所用的兩種抗體是否會和 A $\beta$  單體結合。由於在其實驗中抗體與 CSF 的結合步驟需在 37 °C 下劇烈震盪，此可能會造成原本為單體的 A $\beta$  自形組合成為纖維狀。此外，BCA 能否確實區分真正的阿茲海默症與其他的失智症？甚至能否在臨床症狀尚未顯現時即可發現？

光學生物感應器可以提供異常簡便、快速又靈敏的檢測方法，利用吸光光譜偏移可以作為阿茲海默症患者的早期診斷。但是此法牽涉到抗原抗體三明治式的結合，並且兩種抗體雖均為 ADDL 抗體，但是其結合常數不同，因此在計算患者 CSF

中 ADDL 的濃度判定不易。筆者在本文並未計算 CSF 中 ADDL 的濃度，僅列出腦部萃取液中 ADDL 的濃度 (患者約為 1 pM，但對照組測不出)，其定量的能力不及 BCA，仍需改進。

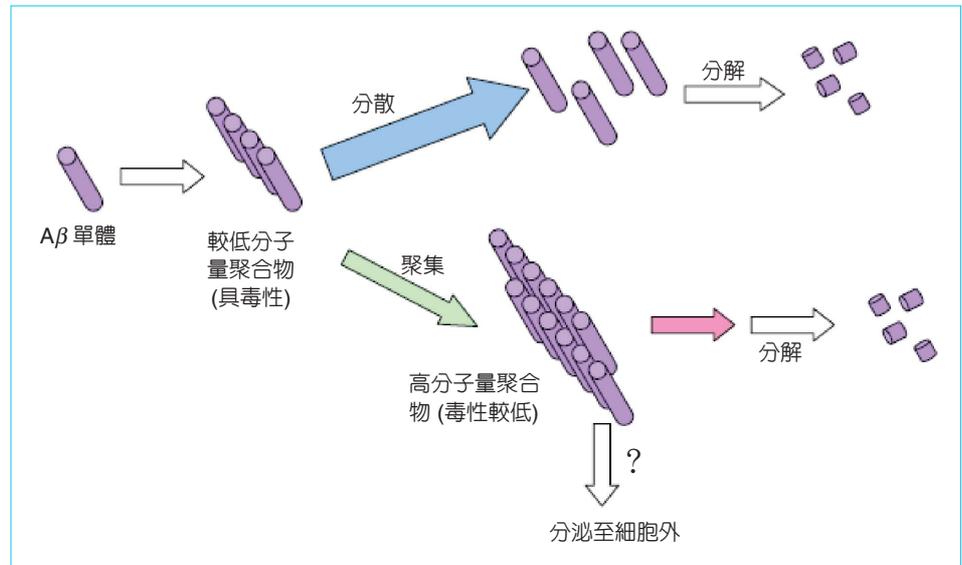
最近以線蟲及 RNA 干擾術 (interference RNA) 作為動物研究模式與方法的研究中發現，單體 A $\beta$  自行聚合成毒性較高的低分子量聚合物時，有兩種減少其毒性的調控方式<sup>(37)</sup>：主要的一種是進入蛋白質分解途徑；另一種則是促使聚合體聚集成分子量更高，但毒性較低的沉積物，待以後再進行分解 (圖 15)。圖 15 中藍色、綠色與粉紅色的箭頭所代表的步驟，分別可經不同基因調控。研究人員發現若能適當調控線蟲的此二步驟，不但可以增加存活時間，並能降低因蛋白質堆積造成的毒性。此發現不但有助於了解類澱粉堆積的基因調控過程，對於未來阿茲海默症的治療亦提供了精準的分子標靶。

## 七、結論

本文中介紹了阿茲海默症的成因、分子機制、以及兩種以奈米科技為基礎的檢測方法、BCA 與光學生物感應器。BCA 採用黃金奈米顆粒，磁性微粒，利用 DNA 自行組合的特性與抗原—抗體反應，以阿茲海默症特定的異常蛋白 ADDL 為偵測對象；而光學生物感應器則是利用 SPR 與特殊的

圖 15.

組織中抗蛋白質毒性的調控作用模式。 $A\beta$  單體所形成的低分子量聚合物可經由兩種不同的方式分解，主要的是上方的過程，可以較快速進入分解步驟。下方則是繼續聚集成高分子量，但毒性較低的沉積物，其分解速度較慢，亦有可能分泌至胞外。其中藍色、綠色與粉紅色箭頭所代表的步驟都有特定基因可參與調控。



三角錐形銀奈米粒，及抗原—抗體反應，針對相同的蛋白質作檢測。此兩種方法雖然原理互異，但均屬於具高靈敏度、高專一性、微量化、方便、快速的尖端檢測科技，為人類在早期診斷阿茲海默症時新添利器。

一般民眾對阿茲海默症的了解不足，因此在「京都宣言」中曾提出，應加強對民眾的教育，認識此疾病，勿使患者與其家屬被污名化。當然相關單位亦應按照不同資源條件，投注經費，提升在阿茲海默症的研究、醫療人員訓練、社會福利、社區教育等各方面的準備，如此若能佐以上述新型診斷技術、不斷開發出來的新型藥物，才能真正達到「早期發現、早期治療」的目的。

## 參考文獻

1. <http://www.tada2002.org.tw/index.html>
2. [http://www.tada2002.org.tw/main's file/dementia in the asia pacific region.pdf](http://www.tada2002.org.tw/main's%20file/dementia%20in%20the%20asia%20pacific%20region.pdf), 失智症亞太地區盛行報告 (2006).
3. R. L. Buckner, *Neuron*, **44**, 195 (2004).
4. C. D. Keating, *P.N.A.S.*, **102** (7), 2263 (2005).
5. Petersen et al., *Arch Neurol.*, **56**, 303 (1999).
6. M. P. Mattson, *Nature*, **430**, 631 (2004).
7. J. Esteban, *TRENDS in Neurosci.*, **27** (1), 1 (2004).
8. <http://www.alz.org>
9. A. D. Roses, *Neurogenetics*, **1**, 3 (1997).
10. R. Mayeux, *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 81 (2003).
11. A. R. White, *Brain Res.*, **842**, 439 (1999).
12. C. A. Lemere et al., *Neurobiol. Dis.*, **3**, 16 (1996).
13. M. P. Mattson, *Physiol. Rev.*, **77**, 1081 (1997).

14. D. C. Lu et al., *Nature Med.*, **6**, 397 (2000).
15. M. A. Leissring, *P.N.A.S.*, **99**, 4697 (2002).
16. G. G. Glenner and C. W. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 885 (1984).
17. M. Tabaton et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 1598 (1994).
18. R. Kaye et al., *Science*, **300**, 486 (2003).
19. A. B. Jaffe et al., *J. Biol. Chem.*, **269**, 13056 (1994).
20. B. Wolozin, *P.N.A.S.*, **98**, 5371 (2001).
21. D. J. Selkoe, *Nature Cell Biology*, **6** (11), 1054 (2004).
22. M. Tabaton and A. Piccini, *Int. J. Exp. Pathol.*, **86**, 139 (2005).
23. A. Kamal et al., *Nature*, **414**, 643 (2001).
24. M. Ramsden et al., *Brain Res.*, **956**, 254 (2002).
25. M. Ramsden et al., *J. Neurochem.*, **79**, 699 (2001).
26. U. Beffert and J. Poirier, *Neuroreport*, **9**, 3321 (1998).
27. C. L. Masters et al., *J. of Neurochem.*, **97**, 1700 (2006).
28. K. Blennow and H. Hampel, *Lancet Neurol.*, **2**, 605 (2003).
29. A. Lockhart et al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 7677 (2005).
30. 隋安莉, *科學發展*, **359**, 62 (2002).
31. D. G. Georganopoulou et al., *P.N.A.S.*, **102** (7), 2273 (2005).
32. C. D. Keating, *P.N.A.S.*, **102** (7), 2263 (2005).
33. R. F. Service, *Science*, **301**, 1827 (2003).
34. M. D. Malinsky et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1471 (2001).
35. A. J. Haes et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12264 (2005).
36. K. A. Shaikh et al., *P.N.A.S.*, **102** (28), 9745 (2005).
37. E. Cohen et al., *Science*, **313**, 1604 (2006).

• 隋安莉小姐為國立陽明大學生物化學博士，現任嘉南藥理科技大學醫務管理系副教授。

• An-Li Sui received her Ph.D. in biochemistry from National Yang Ming University. She is currently an associate professor in the Department of Hospital and Health Care Administration at Chia Nan University of Pharmacy and Science.