

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫：紅血球生成素對於路易氏體失智症的神經新生效用：以 \*  
\* 名稱：大鼠為動物模型 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生：曾敬婷  
學生計畫編號：MOST 104-2815-C-040-065-H  
研究期間：104年07月01日至105年02月28日止，計8個月  
指導教授：何應瑞

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學心理學系（所）（臨床組）

中華民國 105年03月31日

## (一) 摘要

台灣近年來逐漸邁入高齡化社會，失智人口大量增加，路易氏體失智症 (dementia with Lewy bodies, DLB) 在失智症中佔了相當可觀的比例，其病理特徵為路易氏體的堆疊導致神經退化死亡。研究顯示 EPX 除了可以促進紅血球增生，也可以提升神經新生的功能，此功能在新生兒、腦部創傷、帕金森氏症等都已經被證實有效，但是臨床上尚無運用 EPX 治療 DLB 之報告。本研究測量 EPX 在 DLB 大鼠腦部神經新生之效果，利用免疫組織化學染色標定海馬迴齒狀回 (dentate gyrus) 內含溴化去氧尿苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 之新生神經細胞，以測量其神經新生之功能。結果顯示，DLB 動物模型的新生神經細胞數顯著低於控制組，而經過 EPX 治療後，神經細胞數顯著高於 DLB 動物模型。本研究結果推論 EPX 可能有利於治療 DLB。

## (二) 研究背景

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 與國際阿茲罕默症協會 (Alzheimer's Disease International) 於 2012 年共同發布 Dementia: a public health priority。文章中指出 2010 年失智人口達到 3,560 萬，並以每年 770 萬人數增長，凸顯全球失智疾病的嚴重性與急迫性。

常見的失智症如阿茲罕默症、帕金森氏症以及路易氏體失智症 (dementia with Lewy bodies, DLB)，在臨床上只能以藥物減緩症狀卻不能根治。其中 DLB 為一種僅次於阿茲罕默症的常見神經退化性失智症，因其腦組織中出現路易氏體的堆積，造成細胞死亡，使病患產生認知功能障礙、運動功能障礙及精神症狀，最後導致繼發性死亡。路易氏體主要蛋白質為  $\alpha$ -synuclein 以及  $\beta$  類澱粉蛋白 (amyloid  $\beta$  protein, A $\beta$ )。 $\alpha$ -synuclein 是一種由 140 個胺基酸所組成的可彎曲單鍊蛋白，且不具二級性結構，此種蛋白在氧化壓力增加下，會使正常狀態下的  $\alpha$ -helix 轉變為  $\beta$ -sheet，進而在腦組織中產生堆積；A $\beta$  會抑制神經細胞內碳鍊端特定位置磷酸化而使  $\alpha$ -synuclein 加速堆積 [1]，引發神經細胞的凋亡機制 [2, 3]，造成神經退化性疾病。

EPX 具有促進造血作用、抗氧化、抗發炎的作用，許多文獻已指出 EPX 可以增進神經新生之功能 [1, 4-7]，並且可以改善腦部創傷或神經疾病。其中 EPX 的神經新生作用已經在新生兒神經祖細胞 [8] 以及帕金森氏症的動物模型上得到了證實 [7]。另外也有文獻指出 EPX 可以促進癲癇與精神分裂症的神經新生功用，也可以改善後者的認知功能 [4, 6]。許多非造血細胞，包括腦組織，也具有 EPX 的受體，因此即使 EPX 為一種醣蛋白，依然可以藉由腦部微血管的受器進入神經系統，因此透過周邊注射 EPX，可以對腦部組織產生效用。但是目前尚無文獻報導 EPX 對 DLB 之效果。因此本研究欲探討 EPX 對於 DLB 的神經新生之效果。本研究檢測 EPX 對 DLB 大鼠之海馬迴的齒狀回 (dentate gyrus, DG) 腦區之神經新生功能 [7, 9]。神經新生的過程需要合成 DNA，研究上可藉由溴化去氧尿苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 標定新生成的細胞，可以呈現新生成的神經細胞 [10, 11]。

先前的文獻顯示，由癸酸南諾龍 (nandrolone decanoate) 誘發大鼠的腦部損傷後，給予大鼠 EPX 治療，腦部損傷組 CA1 區域神經密度顯著低於控制組，而經過 EPX 治療後的腦部損傷組神經密度獲得明顯改善 [12]。給予皮質創傷之大鼠經 EPX 治療後，大鼠 CA1 區的神經密度比沒有接受治療的疾病組明顯增高 [13]。此外，EPX 可促使健康老鼠的神經新生功能 [8]。

本研究使用中山醫學大學附設醫院院內合作計畫中 (編號 CSH - 2015 - C - 005) DLB 大鼠做為模型。在該研究中給予大鼠腦室施打  $\alpha$ -synuclein 載體，並於前額葉皮

質施打 A $\beta$ ，使其過分表現  $\alpha$ -synuclein，並且與 A $\beta$  作用以增加路易氏體堆積，藉此建立 DLB 動物模型，再以腹腔注射的方式給予 EPX (250 IU/kg) 治療持續 35 天。透過分析神經新生細胞數檢測 EPX 應用在 DLB 的動物模型上之效果。

### (三) 研究方法及步驟

動物：

本研究使用中山醫學大學附設醫院院內專題研究計畫(編號CSH-2015-C-005)中所建立的DLB動物模型之腦組織。在該研究中，以12周齡的Wistar公鼠進行實驗。利用立體定位手術在大鼠的腦室(座標：AP: -0.8 mm; ML:  $\pm$  1.6 mm; DV: -3.6 mm; from Bregma)注入 $\alpha$ -synuclein載體(1  $\mu$ g in 10  $\mu$ l)，並且在兩側前額葉皮質(座標：AP: +1.6 mm; ML:  $\pm$  2.0 mm; DV: -2.0 mm; from Bregma)，注入A $\beta$  2.5  $\mu$ l (2  $\mu$ g/ $\mu$ l, 5 $\mu$ g each side)。而後對其進行EPX (250 IU/kg) 投藥35天。此研究將大鼠分為四組(表一)，並於犧牲前一天投以BrdU (150 mg/kg, i.p.)，而後於隔天進行犧牲，摘取大腦。

(表一)

	腦室注射	前額葉皮質注射	腹腔注射 (35 天)
控制組	saline	saline	saline
疾病組	$\alpha$ -synuclein	saline	saline
加重疾病組	$\alpha$ -synuclein	A $\beta$	saline
治療組	$\alpha$ -synuclein	A $\beta$	EPX

冷凍切片：

腦組織以4%聚甲醛磷酸鹽水溶液固定，以常規的方法進行30微米的冠狀冷凍切片，並挑片收集DG區域的組織切片，分別進行染色。

免疫組織化學染色與神經新生分析：

以0.005M的三羥甲基氨基甲烷(Tris-buffer)在室溫下以每次5 min進行共三次的wash，再以4%的聚甲醛水溶液進行20 min的後固定，再以0.005M的Tris-buffer兩次PBS一次進行各5 min的wash。再以0.5% Triton-X 100於室溫下浸潤15 min，將細胞膜打破。再依第二次的方式進行wash後，加入2N的氯化鈉浸潤30 min，使DNA變性。再次wash後，加入阻斷液200微升浸潤1 h，將細胞膜打洞減低表面張力，同時溶解Fc受體，減少非特異性結合。加入BrdU的一級抗體(monoclonal mouse IgG anti-BrdU)4微升並在4 $^{\circ}$ C下孵育18 h。孵育完成後，再次wash洗掉抗體，在室溫下接上二級抗體(horse anti-mouse IgG)孵育1 h。wash後加入streptavidin的horseradish過氧化酶(HRP)在37 $^{\circ}$ C下孵育30 min，再次wash後加入3,3-diaminobenzidine tetrachloride (Sigma)放置室溫下反映10 min，之後利用酒精與二甲苯使切片脫水後，用阿拉伯膠進行封片。

組織切片透過附有高解析度照影機(Optronics, 美國)的共軛焦顯微鏡(Zeiss LSM 510 META, 美國)，與影像分析系統Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, 美國)對DG進行細胞計數與定量，分析此區域新生神經細胞數。

統計分析：

新生神經細胞以one-way ANOVA分析後進行LSD事後比較。

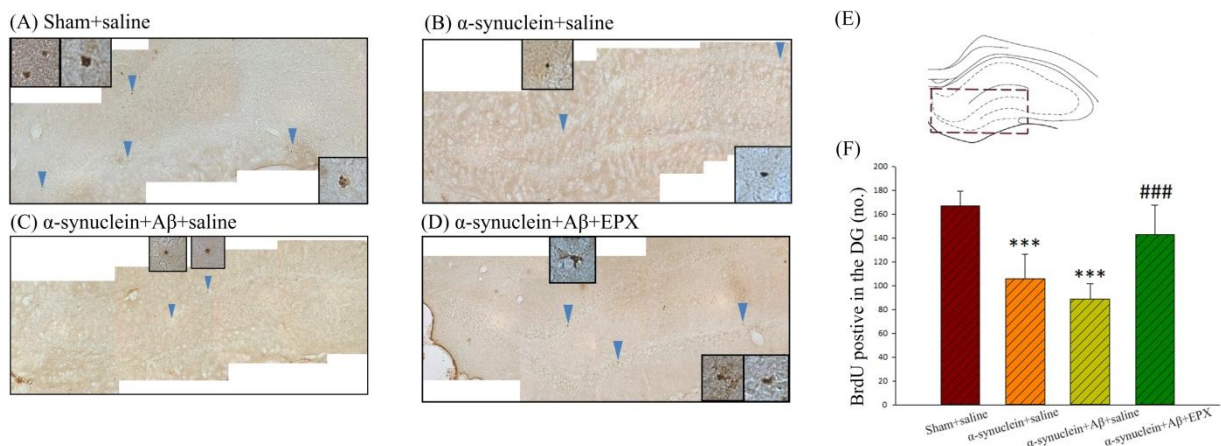
實驗流程：

七月	八月	九月	十月	十一月	十二月	一月	二月
閱讀文獻			閱讀文獻			閱讀文獻	撰寫報告書
組織處理			組織處理				
	數據分析	判讀數據		數據分析	判讀數據		

研究經費：

編碼	器材/藥品性質	器材/藥品名稱	數量	單位	單價	總金額
1	消耗性藥品	goat anti-mouse IgG	1	罐	5,000	5,000
2	消耗性藥品	donkey anti-rabbit IgG	1	罐	5,000	5,000
3	消耗性藥品	mouse IgG anti-BrdU	1	罐	15,000	15,000
4	消耗性藥品	rabbit anti-DCX	1	罐	15,000	15,000
5	消耗性藥品	EPXetin beta	1	盒	7,000	7,000
6	其他(使用貴儀支出、廢棄物處理支出)					1,000
共計						48,000

#### (四) 結果



圖一：EPX 在 DLB 動物模型的海馬迴齒狀回促進神經新生效用。(A-D) 在冠狀切面的新生的神經細胞被 BrdU 標記。放大倍率 200x，插圖為高倍率 (1000x) 的帶有 BrdU 的神經細胞。(E) 示意圖中的矩形表示在海馬迴齒狀回計量 BrdU 神經細胞數的 A-D 的區域。(F) 定量結果。圖顯示平均值±標準誤差，\*\*\* $p$ <0.001，與 Sham+saline 組比較，### $p$ <0.001，與  $\alpha$ -synuclein+A $\beta$ +saline 組表比較。

在齒狀回上的 BrdU 陽性細胞代表新生的神經細胞 (圖一)。計數各組齒狀回上新生神經細胞數，並利用立體計數推估其齒狀回上所有新生神經細胞數，再透過單一變異數分析 (one-way ANOVA) 後以 LSD 事後分析處理、分析各組數據，其結果顯示新生神經細胞數在各組間有顯著差異 ( $F(3, 15)=14.866, P=0.001$ )。疾病組 (圖 B) 以及加重疾病組 (圖 C) ( $P=0.001$ ) 的新生神經細胞數顯著低於控制組 (圖 A)，

然而加重疾病組經過 EPX (250 IU/kg/ day) 的治療 35 天後 (圖 D) 則顯著高於加重疾病組 ( $P=0.001$ )。

## (五) 討論

在海馬迴中 CA1、CA3 與齒狀回皆與工作記憶與認知功能有關[14]，其中有神經新生功能的齒狀回[15]同時也與空間學習有關[16]。齒狀回會將軸突投射到 CA3 區域，參與認知功能[17]，並且參與 DLB 的病理性失智[18]。這現象與我們近期研究符合，先前的研究顯示在物件辨識測試中，經過同樣處理的加重疾病組大鼠無法辨識相異兩物件，但投予 EPX 的治療後，其物件辨識能力與控制組相當；在本實驗中，加重疾病組大鼠的齒狀回中的神經新生細胞數量顯著低於正常組，但經過 EPX 治療後得到改善。

加強神經新生可能有利於治療神經退化性疾病。在成人腦的齒狀回與側腦下室中，神經新生可以分化前趨細胞產生新的神經細胞。本實驗發現，在  $\alpha$ -synuclein 以及  $\beta$  類澱粉蛋白誘導的 DLB 大鼠模型上，齒狀回中新生神經細胞數較正常大鼠少，此結果與先前文獻報導一致，在人類 DLB 患者齒狀回新生神經細胞低於正常人[19]，經過 EPX 治療後可以改善齒狀回內的神經新生。

## (六) 參考文獻

1. Swirski, M., et al., *Evaluating the relationship between amyloid-beta and alpha-synuclein phosphorylated at Ser129 in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease*. *Alzheimers Res Ther*, 2014. **6**(5-8): p. 77.
2. Cookson, M.R. and M. van der Brug, *Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein*. *Exp Neurol*, 2008. **209**(1): p. 5-11.
3. Merelli, A., L. Czornyj, and A. Lazarowski, *Erythropoietin as a new therapeutic opportunity in brain inflammation and neurodegenerative diseases*. *Int J Neurosci*, 2015.
4. Castaneda-Arellano, R., et al., *From neurogenesis to neuroprotection in the epilepsy: signalling by erythropoietin*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014. **19**: p. 1445-55.
5. Kadota, T., et al., *Continuous intraventricular infusion of erythropoietin exerts neuroprotective/rescue effects upon Parkinson's disease model of rats with enhanced neurogenesis*. *Brain Res*, 2009. **1254**: p. 120-7.
6. Fond, G., et al., *Treating patients with schizophrenia deficit with erythropoietin?* *Psychiatry Clin Neurosci*, 2012. **66**(5): p. 375-82.
7. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
8. Wang, Y., et al., *Erythropoietin promotes spinal cord-derived neural progenitor cell proliferation by regulating cell cycle*. *Neuroscience*, 2010. **167**(3): p. 750-7.
9. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(19): p. 10409-14.
10. Barr, J.L. and E.M. Unterwald, *Activity-regulated gene expression in immature neurons in the dentate gyrus following re-exposure to a cocaine-paired environment*. *Hippocampus*, 2014.
11. Rodriguez-Grande, B., et al., *Pentraxin 3 mediates neurogenesis and angiogenesis after cerebral ischaemia*. *J Neuroinflammation*, 2015. **12**(1): p. 15.
12. Tugyan, K., et al., *Neuroprotective effect of erythropoietin on nandrolone decanoate-induced brain injury in rats*. *Neurosci Lett*, 2013. **533**: p. 28-33.
13. Cherian, L., J.C. Goodman, and C. Robertson, *Neuroprotection with erythropoietin*

- administration following controlled cortical impact injury in rats. J Pharmacol Exp Ther, 2007. 322(2): p. 789-94.*
14. Hunsaker, M.R., et al., *The role of CA3 and CA1 in the acquisition of an object-trace-place paired-associate task. Behav Neurosci, 2006. 120(6): p. 1252-6.*
  15. Christie, B.R. and H.A. Cameron, *Neurogenesis in the adult hippocampus. Hippocampus, 2006. 16(3): p. 199-207.*
  16. Yang, J., et al., *Prenatal stress modifies hippocampal synaptic plasticity and spatial learning in young rat offspring. Hippocampus, 2006. 16(5): p. 431-6.*
  17. Markakis, E.A. and F.H. Gage, *Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. J Comp Neurol, 1999. 406(4): p. 449-60.*
  18. Overk, C.R., et al., *Hippocampal neuronal cells that accumulate alpha-synuclein fragments are more vulnerable to Abeta oligomer toxicity via mGluR5--implications for dementia with Lewy bodies. Mol Neurodegener, 2014. 9: p. 18.*
  19. Johnson, M., et al., *Neurogenic marker abnormalities in the hippocampus in dementia with Lewy bodies. Hippocampus, 2011. 21(10): p. 1126-36.*