

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 探討薑黃素(Curcumin)與白藜蘆醇 (Resveratrol) 在 *
* 名稱 : polyQ 疾病斑馬魚動物模式的作用 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 賴冠宇
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-026-B
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： 潘惠錦

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： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105年03月30日

中山醫學大學生物醫學科學學系

大專生專題研究

探討薑黃素(Curcumin)與白藜蘆醇
(Resveratrol) 在 polyQ 疾病斑馬魚動
物模式的作用

指導老師:潘惠錦教授

學生:賴冠宇

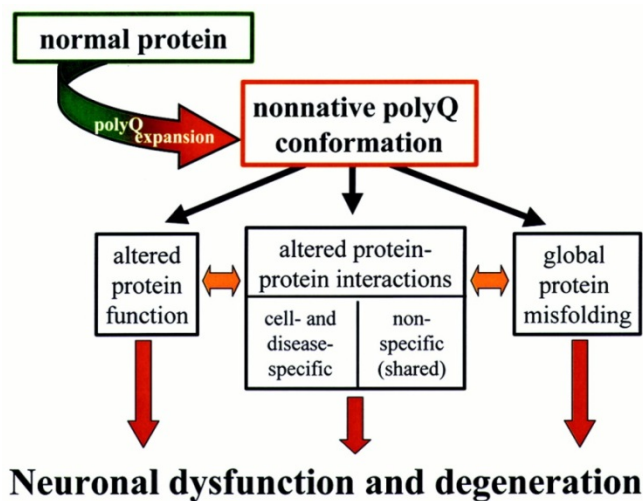
中華民國105年03月

➤ Abstract

polyglutamine (polyQ) diseases 為 CAG 三聯核酸重複序列於基因的轉譯區內異常擴增，會在蛋白質上形成長鏈的麩胺醯酸 (polyglutamine)。大量長鏈麩胺醯酸蛋白容易堆積在神經細胞內，導致神經肌肉與神經退化等疾病，患者隨著疾病過程的發展而產生中樞神經失調症狀(例如：亨丁頓氏舞蹈症)，先前實驗室建立了數個轉殖魚 Tg(HuC:EGFP)及 Tg(HuC:EGFP-Q110) 品系並且觀察到 polyQ 疾病的病徵包括 polyQ 蛋白不正常的聚集、發育遲緩、脫卵膜、體重過輕和游泳型態的異常以及在一些相關基因的表現量降低等，在此計畫中，我們想進一步使用此 polyQ 疾病的斑馬魚模式評估天然化合物是否有利於疾病病徵的改善及探討其作用的機轉。我們選用兩種天然化合物薑黃素(Curcumin)和白藜蘆醇(Resveratrol)作為加藥測試的藥品，選用 2 hpf 的斑馬魚胚胎作為加藥對象，測試其 50 hpf 的脫卵膜率和 Escape response 的分數，觀察結果顯示在浸泡了薑黃素之後，在 50 hpf 的時觀察其脫卵膜的情況可以明顯發現轉殖魚 Q110 的脫卵膜率有上升趨勢，接近於野生型斑馬魚的水準，在浸泡五天之後，我們測試其 Escape response 的分數，觀察結果顯示，浸泡薑黃素之後，Escape response 的分數有非常顯著的回升趨勢，接近於野生型斑馬魚的分數，另外浸泡白藜蘆醇後得到的結果也與薑黃素相同，因此我們推斷，薑黃素和白藜蘆醇能夠透過其保護神經系統、減輕 polyQ aggregation 影響神經細胞正常的功能，使得斑馬魚許多的外表型(脫卵膜、Escape response)都會出現回復的跡象，這也代表白藜蘆醇和薑黃素對於 polyQ disease 斑馬魚是有效的。

➤ Introduction

目前已知三聯核酸重複序列擴增疾病大致上可以分為兩類。第一類疾病是在非轉譯區 (untranslated region) 內的重複序列擴增，如肌強直型肌肉萎縮 (Dystrophia myotonia)、小腦脊髓幹運動失調症第八、十二 (Spinocerebellar ataxia type 8、12) 等疾病。第二類的疾病主要是重複序列在轉譯區裡擴增，並且又可分為兩種胺基酸擴增的疾病，第一類為“polyglutamine disease”主要有：亨丁頓氏舞蹈症 (Huntington’s disease)、小腦脊髓幹運動失調症第一、二、三、六、七、十七型 (Spinocerebellar ataxia type 1、2、3、6、7、17)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症 (Dentatorubral- pallidolusian atrophy) 及 Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) 等疾病，其特徵為轉譯區內的 CAG 重複序列擴增，並轉譯成 polyQ 蛋白在神經細胞堆積、聚集，進而影響神經肌肉細胞之生理機能 [1-3]。

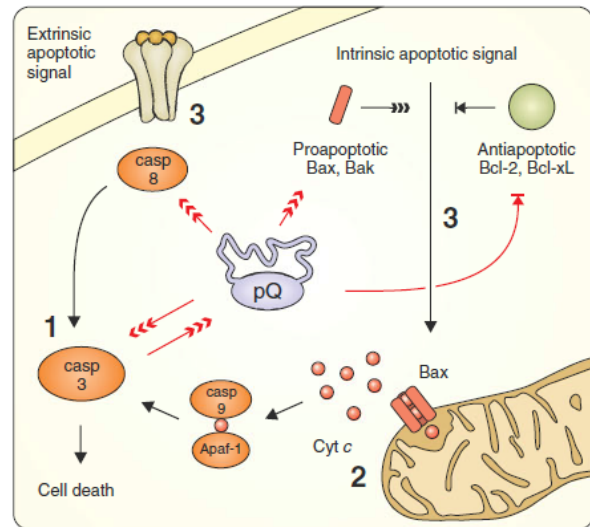


(from <http://www.pnas.org/content/97/24/12957/F1.expansion.html>)

臨床症狀大多出現在中年期並呈現漸進式的發展。若重複次數過高，將會使發病年齡提早以及症狀更為嚴重。在正常人體內的重複次數有高度的多型性 (polymorphism)，雖然每個人的次數皆不同，但都屬於正常範圍內。當重複次數過高時，會容易形成二級結構，而影響到 DNA 複製，使得重複序列長度產生擴增的現象。這也常導致疾病家族中年輕一代的子女，有越早發病或症狀越嚴重

的情形發生[4]。

有文獻指出，細胞凋亡主要可以分為兩個途徑，一類是 extrinsic apoptotic 另一類是 intrinsic apoptotic，而 polyQ 蛋白主要是走 intrinsic apoptotic 這條，polyQ 可以調控上游的蛋白表現，活化許多種 Caspase 蛋白，並且調控下游的 Anti-apoptosis factor 造成 cytochrome c



從粒線體中被釋放出來，而 cytochrome c 又可以去促進下游 caspase 蛋白的表現促使細胞走向凋亡的途徑[5]。polyQ 蛋白會透過抑制 neurotrophic factor 進而去抑制 AKT, PI3K, MAPK, ERK 下游基因，而降低神經細胞的生存[5]。神經系統疾病與提前衰老和神經退化有關，理想的治療神經疾病藥物必須具備神經保護與抗衰老等特性，因此我們選用了兩種天然化合物，第一種是薑黃素(Curcumin)，薑黃素有抗蛋白聚集活性，目前也應用 Parkinson's disease 和 Alzheimer's disease 的疾病模式中，在酵母菌的模式中，透過調控 Vps36 蛋白，可以有效得降低 polyQ 蛋白的聚集，促使其回復[11]，若是能夠減低 polyQ aggregation 的情形，對病徵的回復與治療上應該會出現效果，因此我使用薑黃素做為初步加藥測試。第二種選用的是白藜蘆醇(Resveratrol)，白藜蘆醇是一種非黃酮類的酚類物質，存在很多植物中。可以延長壽命、抗癌、抗心血管疾病、保護神經系統；調解新陳代謝；抗糖尿病，以及抗病毒等功效。有抗氧化、抗發炎功效，在 Parkinson's disease and Alzheimer's disease 的疾病模式中能透過抑制 β -Amyloid 誘導神經細胞凋亡這條途徑並且調控 SIRT1-ROCK1 傳訊路徑來達到減緩症狀的效果[8-10]。

先前實驗室利用 Tol2: Multisite Gateway 系統製備不同長度 CAG 重複序列的質體，注射到斑馬魚胚胎中，由於 F0 是 mosaic，為了確保並非是由於注射時造

成的人為破壞，造成 polyQ 病徵，所以持續觀察F1以及F2的外表型，由於F1是由F0跟WT交配，使得F1是heterzyous的情形，在F1與F1交配所產生的F2 homozygous以及heterzygous的情形，我們能夠藉由F1的in-cross來得到F2做為藥物篩檢的胚胎。

實驗室建立出兩種品系Tg(HuC:EGFP)和Tg(HuC:EGFP-Q110)的基因轉殖魚〈Tg(HuC:EGFP)以下簡稱Q0，Tg(HuC:EGFP-Q110)以下簡稱Q110〉利用Huc Promotor專一性的表達在整個中樞神經上，整段的中樞神經可以看到螢光[supplementary Fig.1]。接著我們利用 western blot 確認polyQ和GFP的蛋白表現量是否有差異[supplementary Fig.2]，並且利用RT-PCR 抽取轉殖魚的RNA跑膠確認長度[supplementary Fig.3]，結果顯示我們成功建立polyQ disease 斑馬魚動物模式。

➤ Rational

在人類疾病中有越來越多的神經退化性疾病與三聯核酸重複序列之擴增有密切的相關性。由於CAG 重複序列多存在於表現序列(exon)上，因此在其基因表現出的蛋白質中便存在著長鏈的麩胺醯酸，此種突變的蛋白質會不正常的折疊聚集並堆積在神經細胞內，影響到正常細胞的功能甚至導致細胞的萎縮、凋亡，造成神經退化性疾病。CAG 三聯核酸重複序列擴增造成的疾病種類非常多，如亨丁頓氏舞蹈症、小腦脊髓運動失調症等，患者多出現四肢感覺異常、手部細緻運動不良以及步態不穩等症狀，如果對其致病機制和治療方式的研究有更好的進展，可讓更多患有此類疾病的病人得到幫助。

由於 polyQ disease 的整個疾病機制機轉目前還不是很清楚，因此目前這類神經退化性疾病的病人只能透過藥物控制其病情，減輕其惡化的速度無法有效的達到完全治癒的效果，polyQ disease 牽涉的致病機制非常廣泛，例如神經細胞的細胞凋亡、粒線體的代謝異常等，因此我們建立 polyQ disease 斑馬魚的模式，

大量的測試多種藥物和天然化合物，篩選出有療效的藥物和天然化合物去做更深入的研究，了解它是透過何種路徑達到治癒的效果以及其機轉，之後應用到人類身上。藥物的測試我們分成兩種測試，第一種是早期的預防，當人類被檢測出帶有過長的重複序列，可能的發病機率較一般人高時，即可服用藥物使其能夠降低發病機率或是當發病時能夠降低它病徵，第二種是發病後的治療，在發病後使用藥物達到治療全面治療的效果。

研究計畫目標

1. 探討 Resveratrol 和 Curcumin 在此斑馬魚模式是否能提高脫卵膜率和 Escapes responses 的分數，藉此達到治療的效果，探討在浸泡 Curcumin 和 Resveratrol 的行為分析，觀察其 Q110 的泳動的型態有沒有回復成 Q0 的型態。
2. 探討在浸泡 Curcumin 和 Resveratrol 後的腦內切片 polyQ 蛋白聚集是否有減少。
3. 探討 polyQ disease 斑馬魚相關病徵，神經病理現象及行為分析探討。

➤ Material and Method

1. 斑馬魚之飼養與胚胎操作

(1) 斑馬魚(Danio rerio)之飼養與維護

野生型斑馬魚(AB strain)，飼養於28.0°C恆溫系統中，日夜週期為光週期14小時與暗週期10小時，並以適量豐年蝦與人工飼料餵食。

(2) 胚胎之培養與收集

暗週期開始之前，將斑馬魚置於寵物箱中，並用網欄隔離公母魚，公母魚的比例為一比一，隔日光周期開始後，進行配種工作，待公母魚交配後收集濾網下之魚卵。將魚卵放入含有 egg water (60 g/ml sea salt) 之培養皿，置於 28.0°C 恆溫箱中培養。

2. 篩選藥物模式的建立：

(1) 研究對象的選擇：基因轉殖魚CAG重複序列0次、110次，以及野生型斑馬

魚。

(2) 斑馬魚魚齡的選擇：由於過早加藥會影響斑馬魚早期胚胎的發育，所以利用基因轉殖魚的F3選擇下蛋後2小時，分別進行藥物的浸泡。

(3) 給藥的方法：DMSO為一種無色液體，具有極易通過皮膚與腔腸吸收藥物的特性，也能與多種有機溶劑、水互溶，而斑馬魚對DMSO的耐受性高，故可將此做為加藥的溶劑、浸泡的基質。NaOH為一種無色液體，能和薑黃素互溶，斑馬魚耐受性高，可做為加藥的溶劑、浸泡的基質

(4) 欲測試的藥物：薑黃素(Curcumin)與白藜蘆醇 (Resveratrol)。

3. 藥物劑量的選擇：先做毒性測試，測出LD50 (lethal dose 50%, 半致死劑量)，然後在安全濃度範圍下，利用溶媒(例如DMSO、NaOH)溶解，配置成溶劑，一個濃度測試20個胚胎。

4. Genomic DNA 抽取

將5顆胚胎放入eppendorf中，加入150 μ l 50mM的NaOH到eppendorf，並將其磨碎放至在95°C煮15-30min。加入15 μ l 1M Tris-HCl(pH8.0)，放置在冰上5min，離心4 °C 13000rpm 10min，離心後取上清液到新的eppendorf中，得到genomic DNA。

5. 萃取斑馬魚胚胎 RNA

將約20顆胚胎放入eppendorf中，加入200ul tri-reagent，使用RNase free 研磨棒將其磨碎，磨完後再加入500ul tri-reagent補滿到1C.C.，再加入70 μ l BCP，vortex 15秒，靜置2-15分鐘(待分層)，離心4°C12000rpm 15分鐘，離心後取上清液(水層)，加入500ul isopropanol，vortex後靜置5-10分鐘，離心4°C 12000rpm 8分鐘後，倒掉上清液，再使用75%Ethanol清洗，離心4°C 13000rpm 5分鐘，去上清液之後，放置室溫下乾燥，加入17ul DEPC水回溶，回溶後進行 RNA純化。

6. 萃取斑馬魚胚胎蛋白質

將50顆胚胎放入eppendorf中，加入deyolking buffer(2ul deyolking/embryos)。使用200ul pipetman將yolk打散，在轉速1100rpm的shaker上搖5min。再將其置於300Xg 4°C 的離心機中離心 30秒，將上清液去除，使用1Xwashing buffer清洗胚胎(200ul per 100 embryos)並放置在水平震盪器上2min在 1100rpm，再將其置於300Xg 4°C 的離心機中離心 30sec。重複上述的清洗步驟，去除上清液。將胚胎加入RIPA buffer(2ul per embryos)，超音波震盪10秒，1200rpm離心10分鐘。取上清液，測定蛋白質濃度，配置成2ug/ul的蛋白質濃度，95°C for 5 mins。

7. 石蠟切片與Hematoxylin & Eosin染色

首先，將魚固定先放入4% paraformaldehyde 一天將魚體表面的皮膚固定，將欲切片組織小心自魚體中取出或切下與觀察之斷面，至於石蠟切片專用標本匣中，再放入脫鈣液於室溫中再脫鈣(EDTA)三天。第四天將已固定的組織取出，置於70%EtOH中脫水兩小時、80%EtOH與90%EtOH各一小時、100%EtOH隔夜，再取出浸潤Neo-Clear I一小時、Neo-Clear III一小時、軟蠟隔夜，隔天再浸潤硬蠟一小時即可包埋、切片(厚度:3mm)。

切片完後烘片隔夜即可進行H&E染色，Xylene、100%EtOH各浸泡10分鐘，75%EtOH、50%EtOH、30%EtOH各依序浸泡10分鐘，d2H2O、Hematoxylin、80%EtOH浸泡5分鐘，Eosin浸泡10分鐘，95%EtOH浸泡5分鐘，100%EtOH浸泡10分鐘，Xylene浸泡10分鐘，即可封片觀察。

8. Immuno stain

將玻片脫蠟腹水後清洗乾淨，使用 casein blocking 在將配製好的一抗(GFP)滴至玻片上的 sample, 冰箱靜置一個晚上，再來利用 PBS 將多餘的一抗(GFP)洗掉，接著加入二抗(anti-mouse-FITC)，接下來再利用 PBS 洗去多餘二抗。為了方便觀察 polyQ 蛋白在細胞核聚集的情形，最後再使用 DAPI 直接滴在玻片上將細胞核染色。等整個染色步驟完成就可以利用正立螢光顯微鏡來觀

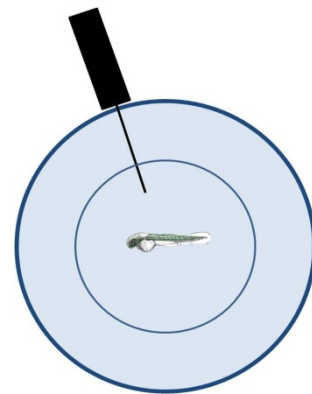
察。

9. 斑馬魚刺激分析

Escape response

利用此方法來量化胚胎時期斑馬魚其神經肌肉對於外界刺激之反應，首先將受精後 48 小時之斑馬魚胚胎在 10 公分的 dish，接著使用針頭輕戳胚胎背部模擬外界刺激，在顯微鏡視野下觀察胚胎反應做給分，標準如下：

score	reponse
0	無反應
1	只有輕微抖動、未游出視野半徑
2	游出視野半徑，未游出視野
3	游出視野

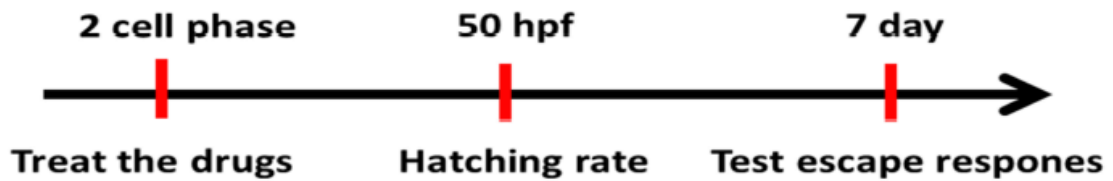


10. 行為分析

架設攝影機利用錄影方式觀察可以避免人工觀察造成對魚的干擾。分 Wild Type 斑馬魚與基因轉殖魚其游動方式或覓食方式是否有差異。將成魚放入白色保麗龍箱(17x22cm, 2L)中，開始錄影50分鐘，錄完之後分析第30-45分鐘的影片，得到其行為路徑圖和距離，最後彙整所有影片來繪製成表格進行分析。

11. 脫卵膜率觀察

魚下蛋 48hr 後，胚胎會開始脫去卵膜，計算 WT、HuC Q0、HucQ110 三種魚脫卵膜率(脫去卵膜的胚胎/卵總數)，進而探討 PolyQ 蛋白在胚胎時期如何影響魚的發育。



➤ Result

polyQ disease 斑馬魚體重減輕

PolyQ疾病當中較為著名的例子為Huntington Disease，是一種顯性遺傳疾病，一般在三十至五十歲之間發病，其病徵包含：焦躁不安的動作、不自主的臉部抽動、走路時搖搖晃晃、記憶力消失及體重減輕等症狀。因此我設計各種實驗來檢驗我的基因轉殖魚是否也有類似的表現型，而這些表現型是否能夠用來模擬人類的病徵。在polyQ disease病人中，幾乎在晚年都會出現體重減輕的現象，因此我測量較老年斑馬魚(飼養超過20個月)之體重是否有減輕的趨勢。而在測量過後發現Q110品系的斑馬魚較Q0比較其體重分布有下降趨勢，老年Q0斑馬魚其體重分布大略是在700毫克左右，而Q110斑馬魚體重其分布則大部分落在200至500毫克，在老年時期較Q0斑馬魚還要來得瘦弱，顯示其體重減輕之現象[Fig. 1]。

polyQ disease 斑馬魚生存率和脫卵膜率的降低

觀察胚胎早期的發育，野生型的斑馬魚在24hpf時，生存率為97.5%，而在Q0的轉殖魚生存率也是97.5%，但是觀察Q110的轉殖魚，可以明顯的觀察到生存率有非常明顯的下降趨勢，生存率為57.5%，因此我們推論polyQ 蛋白在早期就對斑馬魚的正常發育造成阻礙，因此使得Q110轉殖魚在早期就造成高死亡率的現象[Fig. 2]。

接著觀察斑馬魚的脫卵膜率，野生型的斑馬魚會在48hpf開始脫卵膜而到50hpf時，脫卵膜率為100%，而轉殖魚Q0在50hpf時，脫卵膜率為86%，然而轉殖魚Q110在50hpf的脫卵膜只有9%，和野生型的比較是有非常明顯的差異，我們

推論因為polyQ aggregation 而造成運動神經的損傷，由於在脫卵膜的過程中，需要尾部的肌肉快速收縮而去掙脫卵膜，因此運動神經扮演重要的角色 [Fig. 3]。

polyQ disease斑馬魚泳動行為異常

在人類polyQ disease中，由於神經病變會出現抽蓄、怪異姿勢或行為異常等症狀，因此利用錄影機紀錄成魚斑馬魚以及7 dpf斑馬魚游動路徑後用exthon vision 分析游動型態以及平均速度，比較三種品系的斑馬魚野生型、Q0和Q110，可以從游動軌跡圖上明顯的發現差異，在野生型和Q0的斑馬魚中，其游動路徑會遍佈在整個缸子中平均的遊動，不會只待在同一個區域，但是在轉殖魚Q110，觀察可以發現他只會固定在同一個區域來回游動，並且會在原地自轉，表現得非常焦慮，且游動的距離差異也非常大[Fig. 4][Fig. 5]。

polyQ aggregation

為了觀察轉殖基因魚其腦部組織的型態是否有因為受polyQ蛋白的影響而造成生理構造的改變，將PFA處理過後的斑馬魚做包埋與切片，再利用H&E stain 和Immunostain染色。5 dpf的斑馬魚胚胎在H&E stain處理後，可以顯示細胞核與細胞質的位置，能夠觀察腦組織的型態，但在比較Q0與Q110的斑馬魚腦部切片後，並無法發現其腦部形態有明顯差異[Fig. 6]。另一方面由於無法確認Q0與Q110的腦部切片位置是否一致，可能造成比較上的誤差與困難。另外 polyQ disease 的主要phenotype就是polyQ aggregation，這些聚集的蛋白會造成細胞內胞器生理功能的異常，造成細胞毒性。這類蛋白若是堆積在神經細胞可能造成細胞凋亡，導致神經功能退化，進而引發中樞神經失調而造成polyQ疾病各種的病徵。於是我將6個月成魚腦部組織取出，經過切片後再利用anti-GFP來做免疫螢光染色，發現在Q110的腦部切片中發現，有polyQ蛋白點狀聚集在細胞和周圍的現象，確認Q110轉殖魚的病理特徵[Fig. 7]。

ACO2、CAP1 mRNA 表現量降低

先前有文獻指出，在polyQ disease中，ACO2、OXCT1、CAP1的表現有下降的趨勢，因此我們以這些基因作為研究目標，我利用24mpf斑馬魚腦部組織分析其相關基因mRNA表現量，目前已經初步完成ACO2、OXCT1、CAP1表現量分析，在ACO2、CAP1中，可以發現轉殖魚Q110的mRNA表現量和野生型、轉殖魚Q0斑馬魚相比較下表現量是相對較低的，此現象和人類以及老鼠一致，然而在OXCT1的分析結果顯示，三種品系的斑馬魚表現量是沒有差異的[Fig. 8]。

薑黃素浸泡使脫卵膜率以及Escape response 分數提升及回復泳動型態

斑馬魚的基因型、外表型確認後，接下來就要進行初步藥物測試，先使用一些已知藥物來做處理，觀察病徵是否有回復的情形。第一種我選用的藥物為薑黃素(Curcumin)，將薑黃素稀釋成多種不同濃度進行測試，在經過加藥處理後，觀察其50hpf的脫卵膜率和Escape response 分數是否能夠回復成野生型斑馬魚的型態，在未加藥情況下，野生型和轉殖魚Q0在50hpf的脫卵膜率有95%以上，而轉殖魚Q110只有32%，在經過薑黃素的加藥浸泡五天後，觀察其脫卵膜率可以明顯發現，在各個濃度下轉殖魚Q110的脫卵膜率有明顯的提升趨勢，並且可以回復接近野生型的斑馬魚的水準[Fig. 9]。

另一種檢測方法為Escape response，未加藥情況下，野生型和轉殖魚Q0的分數為2.8分，而轉殖魚Q110只有2.35分，在經過加藥浸泡處理後，轉殖魚Q110的Escape response 分數有明顯的提升趨勢，大致回復接近野生型斑馬魚的分數[Fig. 10]。

先前已經觀察過7 hpf 斑馬魚的泳動型態，並且初步驗證薑黃素具有回復一些疾病的表現型，因此進一步去測試能否回復泳游型態，經過加藥7天後，測試其游泳型態，可以顯著地觀察到原先未加藥的疾病斑馬魚泳動距離大約只有

40cm，經過加藥之後，Q110 的泳動距離可以回復到 55cm 相當於 WT 的距離，再次驗證薑黃素對於 polyQ disease 的功效[Fig. 11]。

我們推斷薑黃素能夠減低 polyQ 蛋白在細胞堆積，細胞的生理功能也能夠因此回復，運動神經細胞能夠維持正常運作，肌肉控制的問題減輕，斑馬魚許多的外表型(脫卵膜、Escape response)都會出現回復的跡象，這也代表薑黃素對於 polyQ disease 斑馬魚是有效的。

白藜蘆醇浸泡使生存率和脫卵膜率以及Escape response 分數提升

第二種藥物選用的是白藜蘆醇(Resveratrol)，將白藜蘆醇稀釋成多種不同濃度後，在經過加藥處理後，觀察其 24hpf 生存率 50hpf 的脫卵膜率和 Escape response 分數是否能夠回復成野生型斑馬魚的型態，在生存率方面，未加藥的疾病斑馬魚，野生型斑馬魚生存率大約 40%，在加藥的 4 種濃度生存率明顯的提升回復，並且在 10 μ M 有最顯著的效果[Fig. 12]。脫卵膜率的觀察，在未加藥情況下，野生型斑馬魚 50hpf 脫卵膜率接近百分之百，而在轉殖魚 Q110 只有 35%，經過加藥浸泡後，可以明顯觀察到在各個濃度下都有明顯回升的趨勢，接近野生型的脫卵膜率[Fig. 13]。另外檢測 Escape response，未加藥情況下，野生型有 2.5 分，轉殖魚 Q110 只有 1.65 分，在經過加藥處理後，在濃度 1 μ M 和 10 μ M 下，Escape response 的分數有顯著回升接近野生型，然而在濃度 10 μ M、25 μ M、50 μ M 下，Escape response 分數反而是下降，因此我們推測在此濃度下對於斑馬魚是有毒性的[Fig. 14]。

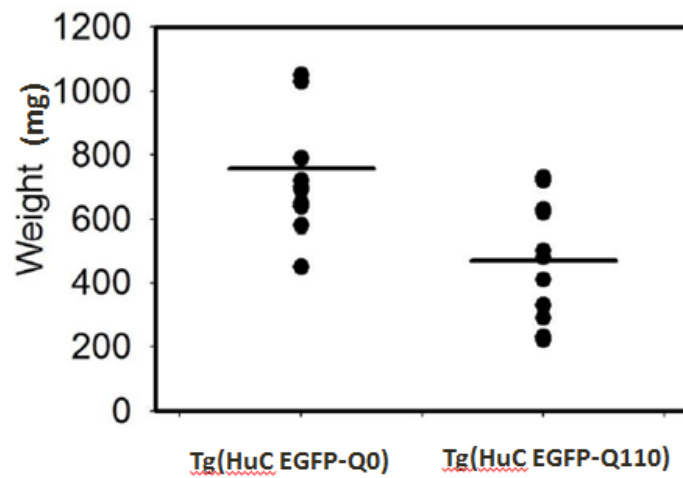
➤ Discussion

人類三聯核酸異常擴增的神經退化性疾病裡，擴增的 polyQ 序列導致蛋白不正常的堆疊，形成蛋白聚集，導致細胞生理機能失調。斑馬魚表現出擴增 polyQ 蛋白，都有蛋白聚集產生。在過去 cell culture 的實驗中也發現有大量擴增的 polyQ 蛋白聚集的情形。而在這些實驗當中，發現到表達擴增重複序列 polyQ 之蛋白，大部份會產生蛋白質聚集，並且伴隨著 phenotype 的產生。因此我們利用 HuC promoter 驅動含 polyQ 序列之轉殖基因蛋白表現在斑馬魚中樞神經細胞，來觀察此種擴增胺基酸是否會造成蛋白聚集，並且了解到 CAG 重複序列擴增長度與蛋白聚集現象的相關性，並分析此種擴增胺基酸之轉殖基因蛋白對於斑馬魚中樞神經之影響。

我們選用了薑黃素和白藜蘆醇作為實驗的浸泡藥品，透過以上實驗結果我們可以推論白藜蘆醇能夠透過其保護神經系統的功能，而薑黃素可以減少神經細胞的凋亡，減輕 polyQ aggregation 影響神經細胞正常的功能，使得斑馬魚許多的外表型(脫卵膜、Escape response)都會出現回復的跡象，這也代表白藜蘆醇對於 polyQ disease 斑馬魚是有效的，未來會利用紅螢光染劑 DHE 觀察氧化壓力 (ROS) 是否有差異，由於文獻有指出在 polyQ disease 中 ROS 會有明顯的提高，因此我們也想探討是否在我們疾病斑馬魚模式是否也有一樣的現象，並且由於我們選用的藥物是薑黃素和白藜蘆醇都有抗氧化壓力的效果，若是 ROS 的提高，我們期望能在浸泡藥物之後，能夠看到 ROS 有明顯的下降，證實我們所用的藥物是有降低 ROS 的療效。

目前我們浸泡藥物的模式是在 2hpf 的時期連續浸泡五天後，再進行測試脫卵膜率和 Escape response 的實驗，未來我們期望能在後期進行加藥，在成魚的時期利用腹腔注射的方式將藥物打入，由於幼魚的泳動型態較難觀察，因此我們希望成魚在注射完藥物之後，異常的泳動型態能夠回復，而腦部 polyQ aggregation 的現象能夠得到緩解，使斑馬魚能夠回復。

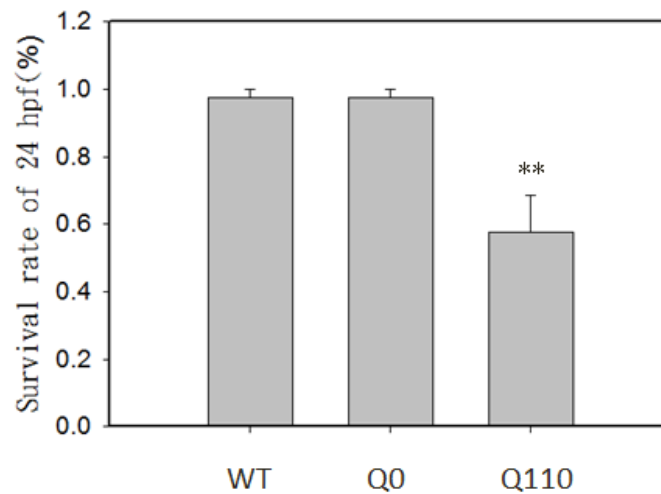
Weight measurement



[Fig. 1] 成魚體重測量

比較 Q110 和 Q0 的成魚體重，可以發現 Q110 的成魚體重和 Q0 比明顯偏輕，根據 paper 指出，可能原因為因為大腦的神經退化而造成腦部的萎縮，在老鼠的模式中有看到此一現象。

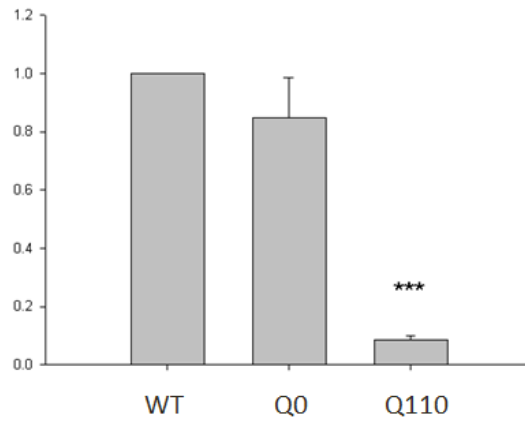
Survival rate of 24 hpf



[Fig. 2] 24hpf 生存率

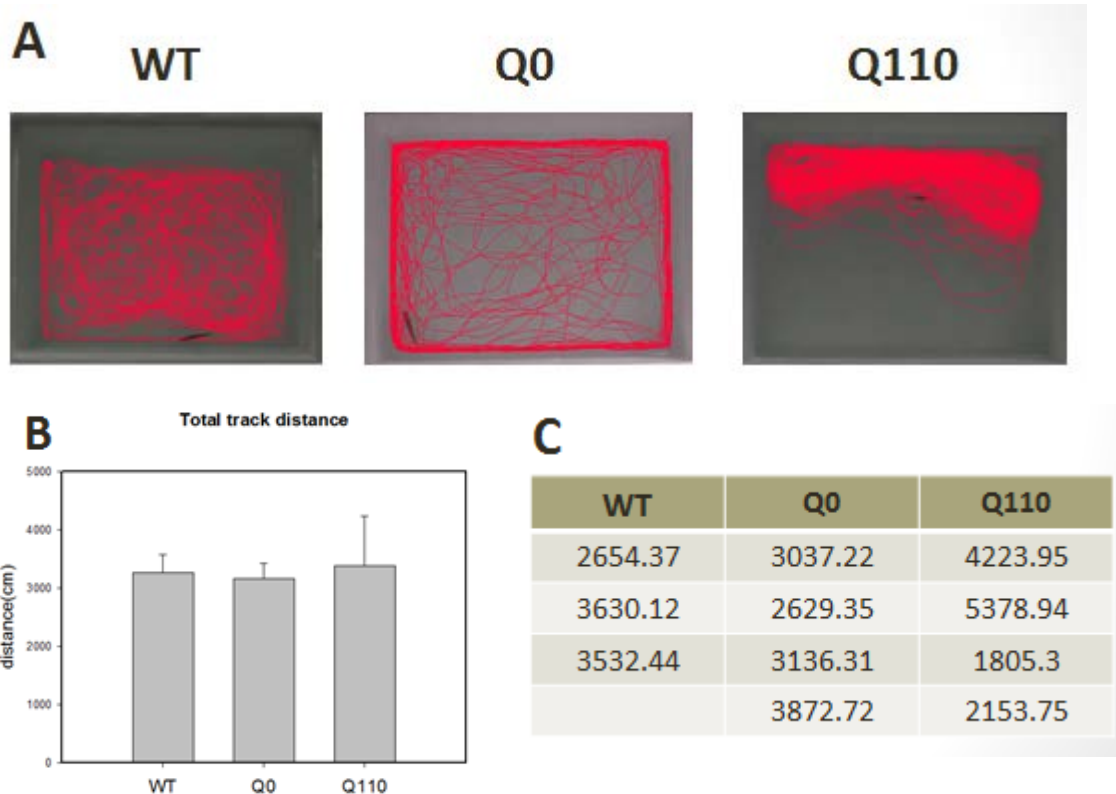
比較三種品系的斑馬魚 WT、Q0、Q110 生存率，轉殖魚 Q110 的生存率有明顯下降的趨勢。

50hpf Hatching rate



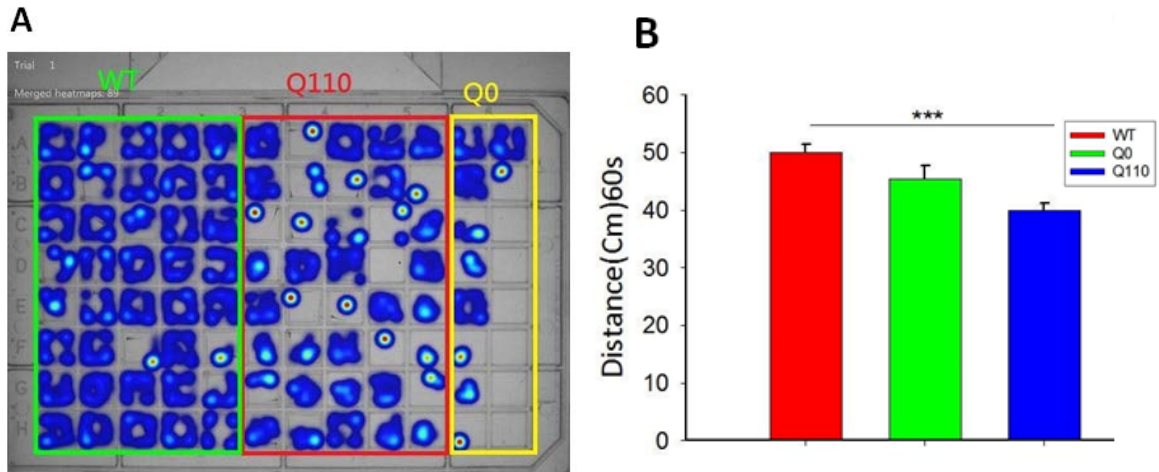
[Fig. 3]50hpf 脫卵膜率

48 小時觀察胚胎脫卵膜的狀況，在 Q110 因為腦內 polyQ 堆積造成神經退化而影響中樞神經，也造成運動神經的缺失而影響 Q110 脫卵膜的速度。



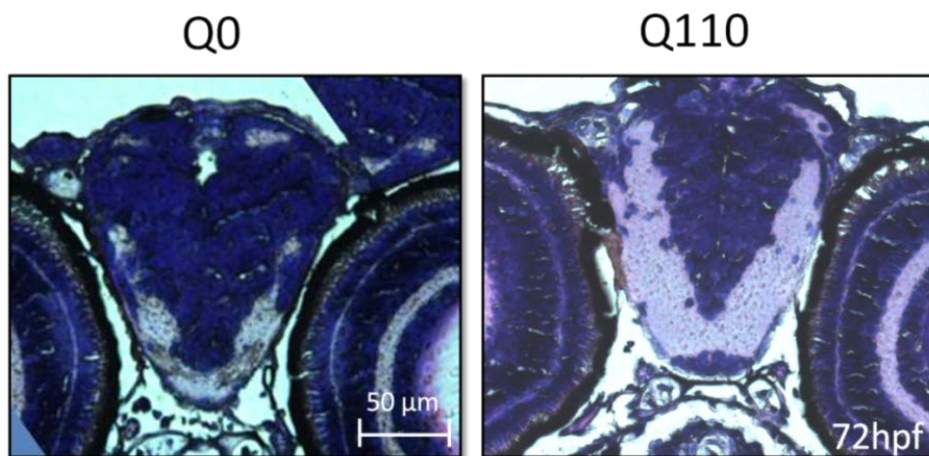
[Fig. 4] 成魚斑馬魚泳動型態和距離

(A) 從斑馬魚泳動的軌跡圖可以發現 WT、Q0 其游泳模式較穩定、平均，而 Q110 斑馬魚其游泳模式則較混亂，會出現原地自轉、沿著魚缸壁來回游動或只在角落打轉等情況。(BC) 分析三種品系斑馬魚的 15 分鐘的游動距離，總移動路徑沒有明顯的差別，但是在轉殖魚 Q110 每一隻的游動路徑差異非常大。



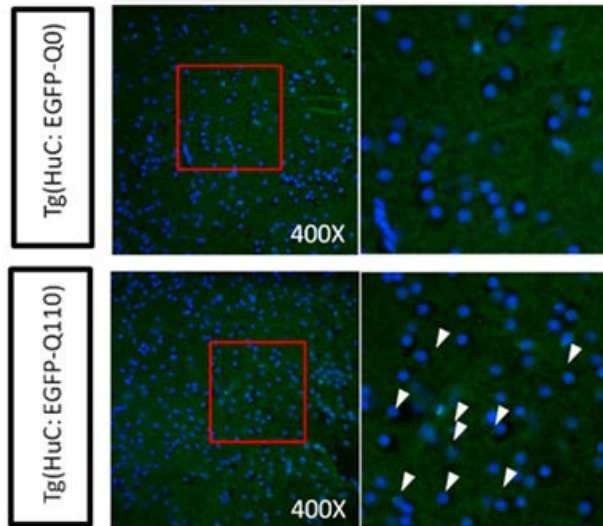
[Fig. 5] 7 hpf 斑馬魚泳動型態和距離

(A) 觀察 7 hpf 斑馬魚泳動軌跡圖可以發現 WT、Q0 其游泳模式較穩定、平均，而 Q110 斑馬魚其游泳模式則緩慢，會出現原地自轉或是幾乎停止不動。(B) 分析三種品系斑馬魚的 1 分鐘的游動距離，Q110 斑馬魚在游泳的距離是明顯的少於 WT 非常多。



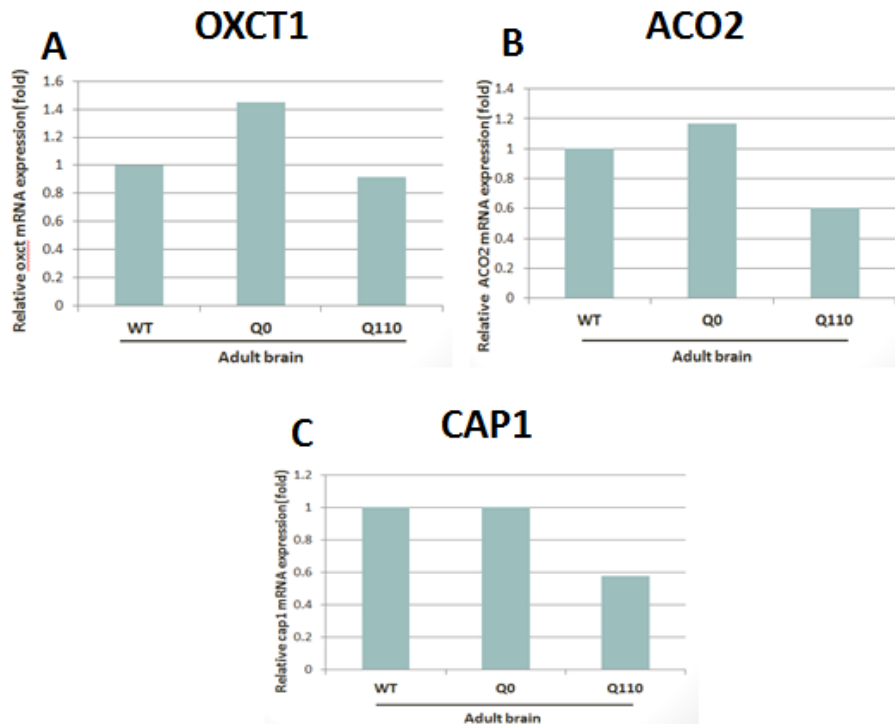
[Fig. 6] 腦部病理切片

5 dpf 斑馬魚胚胎腦部切片，再利用 H&E stain 染色處理，可以觀察到大量細胞聚集在腦部，但比較 Q0 和 Q110 轉殖魚腦部切片，並無法確認有明顯差異。[from 謝季翰]



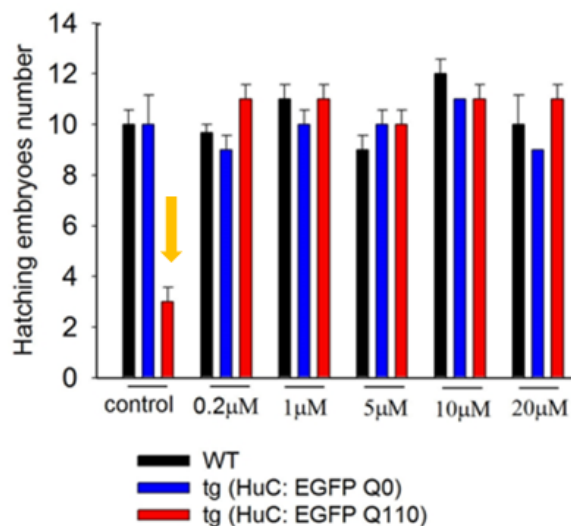
[Fig. 7] 腦部 polyQ aggregation

HuC EGFP Q110 的腦細胞中有類似 polyQ 蛋白 aggregation 的情形，綠色螢光的小點(polyQ protein)聚集在細胞核（藍色）外圍，經由疊合的圖可以清楚看到。aggregation 是 polyQ 疾病重要 phenotype, polyQ 蛋白聚集在神經細胞上，造成神經病變，而導致肌肉控制問題。[from 謝季翰]



[Fig. 8] OXCT1、ACO2、CAP1 mRNA 表現量

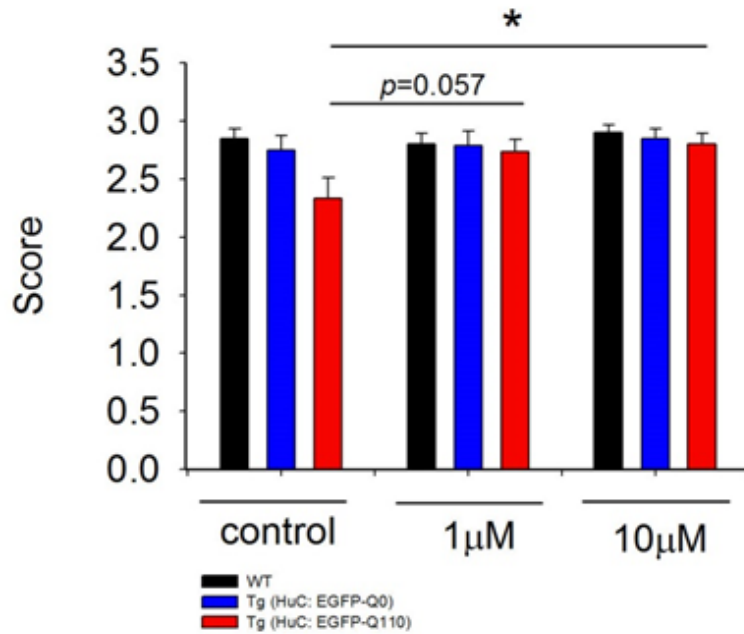
(A) 利用三種品系 WT、Q0、Q110 斑馬魚，取 24mf 的腦抽取 RNA 跑 Real-time PCR 分析 *OXCT1* mRNA 表現量，比較結果並沒有顯著差異 (B) *ACO2*、*Cap1* mRNA 表現量，Q110 的表現量和 WT、Q0 比較後有明顯下降的趨勢，和文獻相符合。



[Fig. 9] 浸泡薑黃素 50hpf 脫卵膜率

觀察 50 小時的脫卵膜率，可以觀察到經過浸泡 Curcumin 的胚胎 WT 和 Q0 沒有

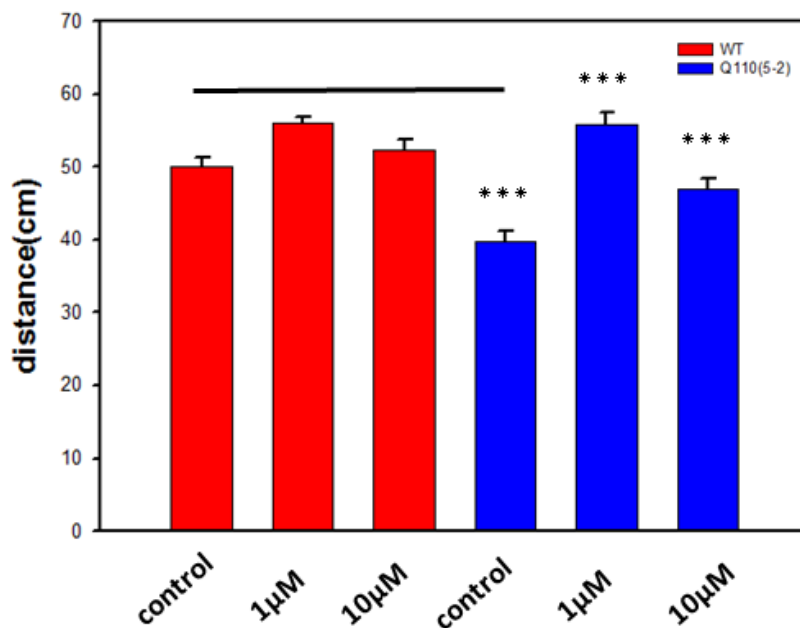
太大的改變，Q110 的脫卵膜率經過 Curcumin 浸泡則有明顯的回復。



[Fig. 10] 浸泡薑黃素 Escape response

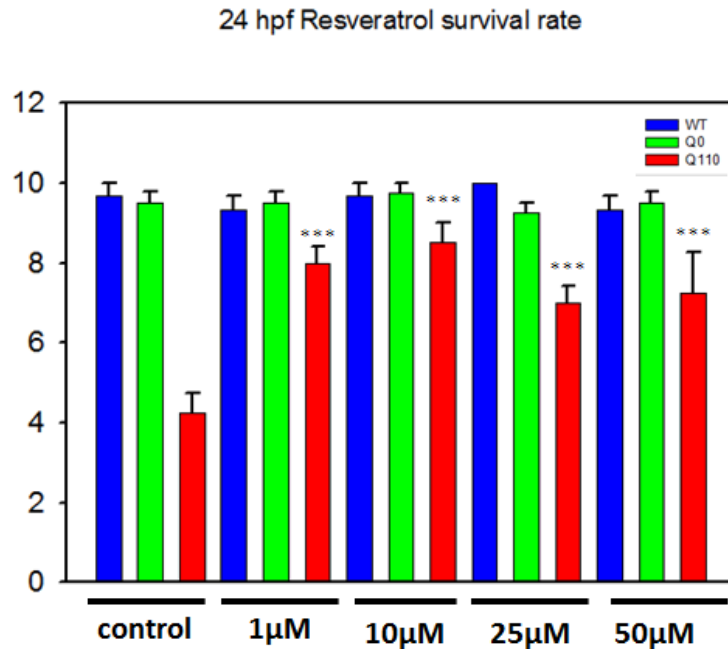
在 Escape Response 可以觀察出經過浸泡 Curcumin 過後，在劑量 1µM 與 10µM 下，Escape Response 的分數都有顯著的提高，可以說明在 Curcumin 的作用下，神經的退化有明顯的改善，接受刺激的強度比未浸泡前更佳提升。

Curcumin swimming distance



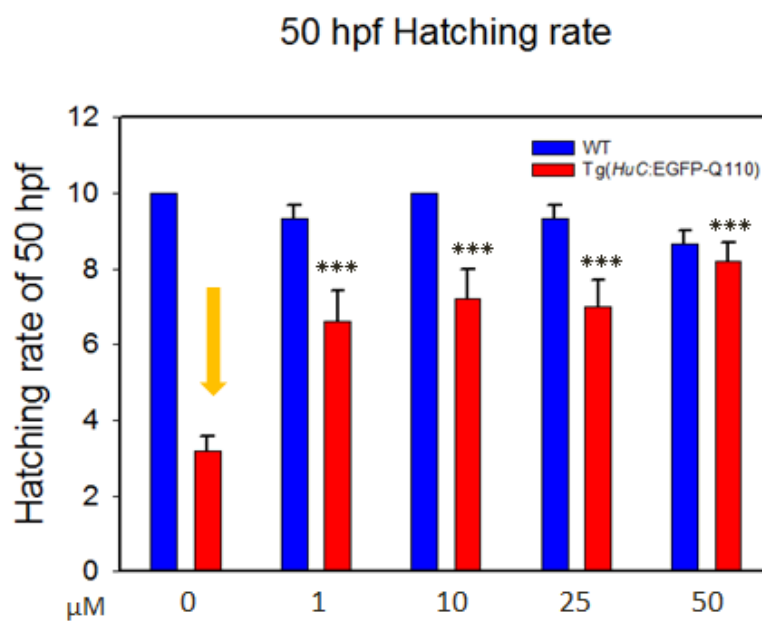
[Fig.11] 浸泡薑黃素回復游泳型態

經過 7 天的薑黃素浸泡後，觀察其游泳型態可以顯著發現在經過濃度 $1\mu\text{M}$ 和 $10\mu\text{M}$ 處理後，泳動的距離有明顯的回復，接近 WT 的泳動距離。



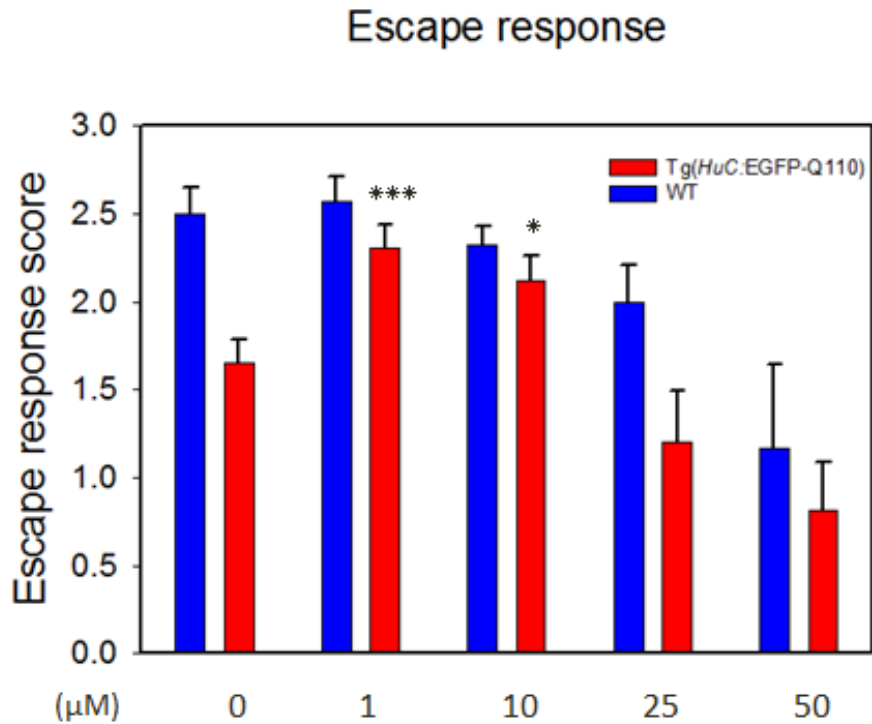
[Fig.12] 浸泡白藜蘆醇 24 hpf 脫卵膜率

觀察 24hpf 生存率，Q110 斑馬魚在未加藥情況生存率大約 40%，在經過 4 種濃度加藥後，有了顯著的回復。



[Fig.13] 浸泡白藜蘆醇 50hpf 脫卵膜率

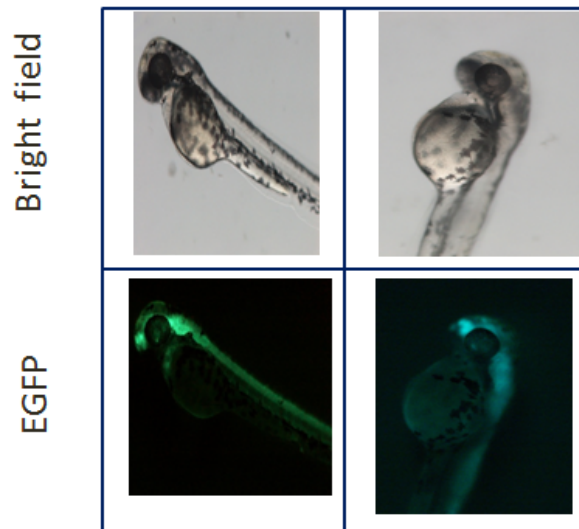
觀察 50 小時的脫卵膜率，可以觀察到經過浸泡 Resveratrol 的胚胎 WT 沒有太大的改變，Q110 的脫卵膜率經過 Resveratrol 浸泡則有明顯的回復。



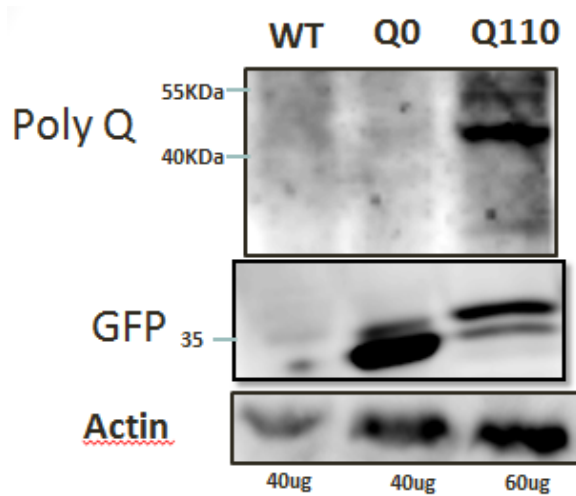
[Fig.14] 浸泡白藜蘆醇 Escape response

在 Escape Response 可以觀察出經過浸泡 Resveratrol 過後，在劑量 1μM 與 10μM 下，Escape Response 的分數都有顯著的提高，可以說明在 Resveratrol 的作用下，神經的退化有明顯的改善，接受刺激的強度比未浸泡前更佳提升，然而在劑量 25μM、50μM 下，分數反而下降，說明在此濃度下已經對斑馬魚造成損傷。

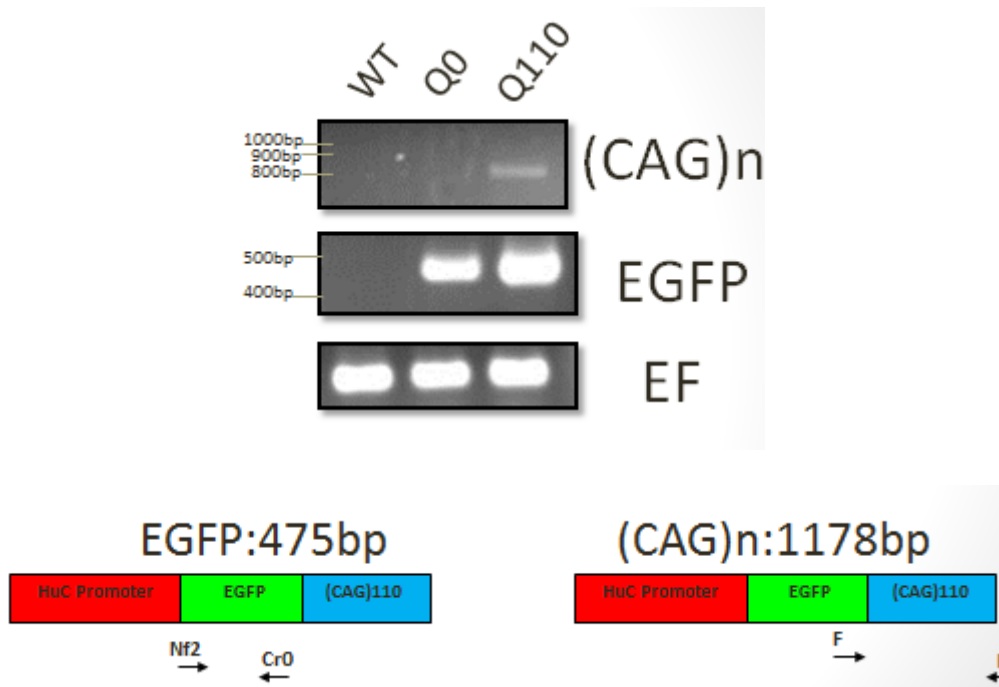
Tg(HuC:EGFP) Tg(HuC:EGFP-Q110)



[Supplementary Fig. 1] HuC-EGFP、HuC-EGFP-CAG110 二種品系轉殖基因魚(上圖)明視野(下圖)螢光視野，可以觀察到綠螢光專一性表達在中樞神經細胞。



[Supplementary Fig. 2] 確認 Q0、Q110 二種魚都有 EGFP 蛋白，而 Q110 之 EGFP 蛋白位置較略高。polyQ 的部分也有偵測到訊號，Q110 斑馬魚體內確實有轉譯出 polyQ 蛋白，WT 與 Q0 則沒有。



[Supplementary Fig. 3] 利用 RT-PCR 的方式來確認轉殖基因 RNA 層次。在 Q0 以及 Q110 轉殖魚身上都確認有 EGFP 基因的表達。而重複序列的部分 Q0 的魚沒有訊號符合預期，但是在 Q110 轉殖魚體內的 CAG 重複序列跟建構之質體比較有些微縮短的現象。

Future work

- ◇ 繼續探討相關基因的 mRNA 表現量趨勢，增加 N 值確認其差異，並且透過加入藥物觀察其表現量是否有回復。
- ◇ 未來會注射藥物在成魚上觀察其行為模式是否有恢復，並且觀察幼魚的行為是否有差異，若是有差異則可以在早期即進行藥物浸泡，觀察其形態是否有回復。
- ◇ 探討在經過藥物的浸泡之後，是否能夠使得 polyQ aggregation 的產生減少。
- ◇ 根據文獻，在 polyQ disease 中，會因為 polyQ aggregation 的關係使氧化壓力(ROS)的上升，未來利用螢光 probe(DHE)作為染劑，探討在斑馬魚上是否有差異，若是有差異，利用 Curcumin 和 Resveratrol 作為治療藥物，觀察是否能夠使斑馬魚回復。
- ◇ 根據文獻，polyQ disease 中會造成神經細胞的 apoptosis，未來利用 TUNEL Assay 和 Acridine organ 觀察斑馬魚是否有 apoptosis，若是有則利用 Resveratrol 和 Curcumin 探討其保護神經的療效是否能使其回復。

Reference

1. Satyal SH, Schmidt E, Kitagawa K, Sondheimer N, Lindquist S, et al. (2000) Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5750-5755.
2. Parker JA, Connolly JB, Wellington C, Hayden M, Dausset J, et al. (2001) Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13318-13323.
3. Morley JF, Brignull HR, Weyers JJ, Morimoto RI (2002) The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10417-10422.
4. Stern HM, Zon LI (2003) Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer* 3: 533-539.
5. Switonski PM, Szlachcic WJ, Gabka A, Krzyzosiak WJ, Figiel M (2012) Mouse models of polyglutamine diseases in therapeutic approaches: review and data table. Part II. *Mol Neurobiol* 46: 430-466.
6. Nagahara AH, Tuszynski MH (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10: 209-219.
7. Quesseveur G, David DJ, Gaillard MC, Pla P, Wu MV, et al. (2013) BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl Psychiatry* 3: e253.
8. Cole GM, Teter B, Frautschy SA (2007) Neuroprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595: 197-212.
9. Pallas M, Casadesus G, Smith MA, Coto-Montes A, Pelegri C, et al. (2009) Resveratrol and neurodegenerative diseases: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection. *Curr Neurovasc Res* 6: 70-81.
10. Feng X, Liang N, Zhu D, Gao Q, Peng L, et al. (2013) Resveratrol inhibits beta-amyloid-induced neuronal apoptosis through regulation of SIRT1-ROCK1 signaling pathway. *PLoS One* 8: e59888.
11. Verma M, Sharma A, Naidu S, Bhadra AK, Kukreti R, et al. (2012) Curcumin prevents formation of polyglutamine aggregates by inhibiting Vps36, a component of the ESCRT-II complex. *PLoS One* 7: e42923.