

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : Glucagon-like peptide-1 對 amyloid β 所誘發神經 *
* 名稱 : 傷害之保護作用機制研究 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 王婷彥

學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-033-B

研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月

指導教授： 林志立

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學研究所

中華民國 106年04月06日

一、研究背景與動機：

(一)背景：

隨著全球高齡化社會的來臨，失智症患者將會逐年增加，而阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是神經退化性疾病中最常見的疾病，影響阿茲海默症的原因有很多，其中胰島素阻抗(Insulin resistance)被認為也是其中一個重要的因子。胰島素雖然是控制週邊代謝的重要的賀爾蒙，但其也被發現可調控中樞神經系統中神經修復、生存、學習記憶等功能(De Felice)，因此由神經發展觀點來看，胰島素訊息傳遞可能控制著神經退化的關鍵因子。在阿茲海默症患者的腦部主要產生的變化是突觸和神經元的喪失，在其大腦中的病理切片可以發現老化斑塊的存在，而斑塊最主要的成分就是類澱粉胜肽(β -amyloid peptide, $A\beta$)。 $A\beta$ 不正確的折疊與堆積正是老化斑塊形成的主要原因，因此探究 $A\beta$ 的形成過程與細胞神經的毒性機制便成為阿茲海默症研究的重要課題。 $A\beta$ 會先因為某種不正常的原因產生不當的折疊，進而纖維化病沉澱在神經元周邊，最後造成神經退化的現象(Oh, Steffener, Razlighi, Habeck, & Stern)。近年來，逐漸增加的證據顯示，阿茲海默症和代謝性疾病如：第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)之間在致病機轉方面可能有相似的背景機制如神經胰島素阻抗。因此，由第二型糖尿病所發展出的新型抗糖尿病藥物 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)可能可以用來對抗 amyloid β ($A\beta$)所造成的神經傷害，並因此減緩阿茲海默症的病程發展。GLP-1 為一種短胜肽鍊的藥物，可在高血糖狀態時分泌並促使胰島素釋放以及抑制胃排空等作用，加上它也被證實可以抑制中樞神經食慾調控，所以比其他藥物在神經系統上更具有優勢(Ji C Fau - Xue, Xue Gf Fau - Li, Li G Fau - Li, Li D Fau - Holscher, & Holscher)。像是有研究指出 Exendin-4 (GLP-1 agonist)不僅會減低頭部外傷(head injury)對神經細胞的傷害，也可改善外傷後的認知功能；動物實驗也發現若給予 Vildagliptin (DPP-4 inhibitor)於長期高脂肪飲食的老鼠，除了會透過提高腦部 GLP-1 的濃度來增進神經元粒腺體的活性外，也會改善其認知功能及 neuronal insulin resistance 的現象。此外也有研究證明活化 GLP-1 receptor 後，對 hippocampal neurons 具有降低 advanced glycation end products (AGEs)及 tau hyperphosphorylation 的情況。這些證據都指出 GLP-1 signaling 確實具有對抗 AD 的潛力。此外因為其能根據葡萄糖的濃度進行胰島素的調節，因此不易產生血糖過低的現象，所以他已經被廣泛地運用在第二型糖尿病的治療。在先前的研究中曾發現，GLP-1 非常容易穿越血腦屏障，顯示出許多令人印象深刻的神經保護作用，因此我們推測活化 GLP-1 訊息可減低神經胰島素阻抗的情況並抑制神經退化，因此非常可能具有對抗 AD 的效果。為了證實這個推測，所以我們在本計畫書內利用細胞實驗模式來評估 GLP-1 與神經胰島素的訊息傳遞的關係，並測試是否能經由增強 GLP-1 訊息來減緩 $A\beta$ 所導致之神經毒性。

(二)研究動機：

隨著高齡化社會的來臨，失智症患者的數目將會逐年增加，根據內政部統計臺灣失智人口約 23 萬人，約每百人即有 1 人是失智症患者，而隨著高齡化的社會到來，這些患者的數目將會持續的增加，而其中人數最為眾多即為阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)。AD 是神經退化性疾病中最常見的疾病，在病理學上顯示出腦組織萎縮、大腦皮質出現老化斑塊等現象，是一個由膽鹼神經元逐漸喪失功能，而導致記憶力衰減的神經疾病。此症若沒有經過適合的治療，將會逐漸產生記憶力衰退，認知功能障礙，言語表達困難，漸漸地無法獨立生活，嚴重的情況往往無法理解會話內容，無法獨立照顧自己生活起居，最終癱瘓在床，而需要長期照護，往往伴隨著其他疾病而死亡(De Felice)。目前的研究則是顯示 AD 的主要是因為神經細胞的損失，以及腦中出現類澱粉斑以及神經纖維糾結。而 A β (類澱粉狀蛋白)的堆積和不正確的折疊正是老化斑塊形成的主要原因。第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一種常見的代謝性疾病，約佔所有糖尿病患者的 90%，已知 T2DM 患者併發 AD 的機率較一般人要高出許多，但是關於 T2DM 和 AD 之間致病機轉的關聯性尚未有明確的定論。而近年來的研究顯示 brain insulin resistance 與 AD 的病程發展有高度的相依性，而且許多用於糖尿病治療的藥也具有減緩 AD 的功效，因此有些學者認為阿茲海默症和第二型糖尿病之間可能有相似的機制，皆是由胰島素阻抗(Insulin resistance)因為某些原因發生阻礙而導致神經退化(Talbot & Wang)。由於 AD 最主要的病癥是當腦內神經細胞受到過量 A β 蛋白累積時，會發生胰島素訊息傳遞不良的現象，因此其被認為可能也會參與在誘導 brain insulin resistance 的過程裡(Medhi & Chakrabarty)，然而 A β 神經毒性與 insulin signaling 之間的詳細機轉目前仍不明，然而這種情況恰巧與糖尿病患者體內所發生的狀況十分吻合，因此我們假設 T2DM 與 AD 不僅在致病機轉上有關聯性，且核心連結正是 brain insulin signaling 及 A β 之間的交互影響。而 AD 的根本治療策略應該是盡可能的防止神經元退化的現象持續惡化，然而 T2DM 的 insulin resistance 有可能會和腦部的 A β 神經毒性一起加速神經的退化，因此若給予增加 insulin signaling 的藥物 GLP-1，可以藉由提升這兩個組織的 insulin signaling 強度，來對抗 diabetes-related AD(Chen, Deng Y Fau - Zhang, Zhang B Fau - Gong, & Gong)。雖然 A β 是通過凋亡信號來導致神經元細胞死亡，不過也有研究顯示，神經微膠細胞會通過誘導神經發炎，來促進 AD 發展，因為神經微膠細胞 (microglia) 過度活化會引發神經發炎反應，並造成大量的 A β 堆積，進而導致大腦功能失調，是許多研究認為造成 AD 的主因之一(Gold & El Khoury, 2015)，並且研究顯示神經微膠細胞會因為增加的 A β 而產生凋亡信號，刺激發炎反應。這些研究也表明如果能藉由降低神經微膠細胞引發之神經發炎反應合併加強清除 A β 的方式，來呈現新化合物發揮結合的效果，以阻斷或預防阿茲海默症的發展，將會是非常具有潛力的治療藥物。而在我們先前的研究中也發現，腸泌素能夠對 A β 所誘導的神經毒性產生保護作用。不過 GLP-1 對於 A β 在神經微膠細胞中的影響及作用機轉，目前尚未能完全瞭解，所以我們決定探討 GLP-1 對於 A β 所誘發的神經毒性對於神經微膠細胞的影響，以及是否能透過 insulin resistance 的應用來對抗 A β 的神經毒性並減緩 diabetes-related AD 的病程。

二、研究方法及步驟：

【細胞實驗模式評估 GLP-1 與 insulin 的訊息傳遞的關係，並測試是否能經由增強 GLP-1 signaling 來減緩 A β 所導致之神經毒性】

實驗設計與方法

近年來在許多證據皆指出 T2DM 與 AD 之間的關聯性，神經微膠細胞 (microglia) 過度活化會引發神經發炎反應，並造成大量的 A β 堆積，進而導致大腦功能失調，是許多研究認為造 AD 的主因之一。有許多學者認為某些在 T2DM 中用來改善 insulin signaling 的藥物可能也對於 AD 具有療效。因此我們希望能夠藉由降低神經微膠細胞引發之神經發炎反應以及清除 A β 的方式，呈現 GLP-1 發揮結合的效果，以阻斷或預防阿茲海默症的發展。所以本實驗主要著重在當神經微膠細胞處理 GLP-1 agonist 時，A β 所導致的神經毒性是否能受到緩解，希望藉此能釐清其中的分子機轉。

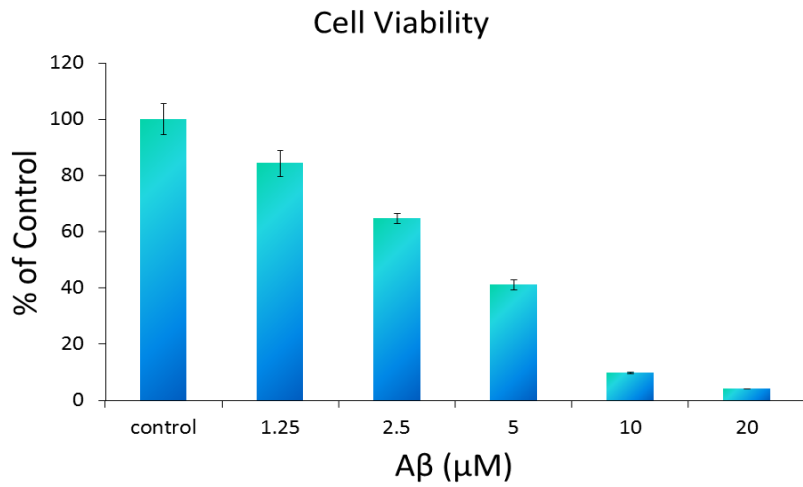
實驗一：以外加 A β 至神經細胞株方式，分析 A β 是否會產生神經毒性及是否造成神經微膠細胞的凋亡反應。

細胞株模式方面，我們選擇以神經微膠細胞 BV2 作為實驗材料。BV2 是屬於一種腦部的吞噬細胞(brain macrophages)，對於調節免疫、外來微生物及腫瘤細胞的防禦作用和組織修復皆扮演著很重要的腳色。在健康的大腦中，神經微膠細胞處於休息狀態，但是當發生創傷或微生物入侵時，神經微膠細胞會被活化，此時細胞型態將會產生具有突觸的活化狀態，此種活化狀態的神經微膠細胞可以直接移動到腦部受傷的部位，以進行一連串反應來做處理，且易於進行細胞培養，因此常被用來模擬健康人類腦部中的神經微膠細胞。在本實驗中，我們將觀察細胞在處理 A β 之後，其所誘發的神經毒性及細胞內 oxidative stress、ROS 含量以及 caspases 等細胞凋亡相關之訊息途徑。

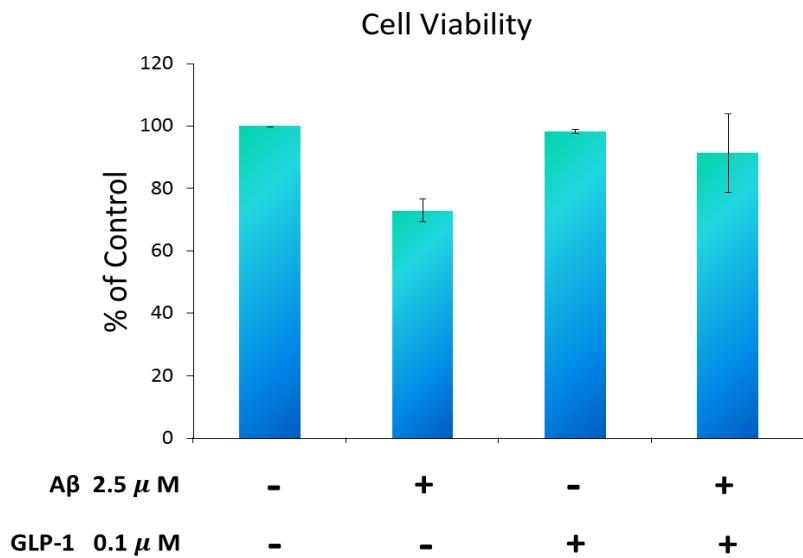
實驗二：分析是否能透過活化神經細胞的 GLP-1 訊息來減緩 A β 神經毒性。

1. 探討活化 GLP-1 訊息是否具有對抗 A β 神經毒性的效果，這部分的實驗將包括細胞存活率實驗，凋亡相關蛋白質表現及活性分析：caspases、PARP 以及細胞內氧化壓力、ROS 含量。
2. 驗證 GLP-1 的神經保護效應是否與胰島素訊息傳遞相關，這部分的實驗將包括細胞存活率實驗，細胞內氧化壓力傷害、ROS 含量的分析以及凋亡相關蛋白質表現及活性分析：caspases、PARP。

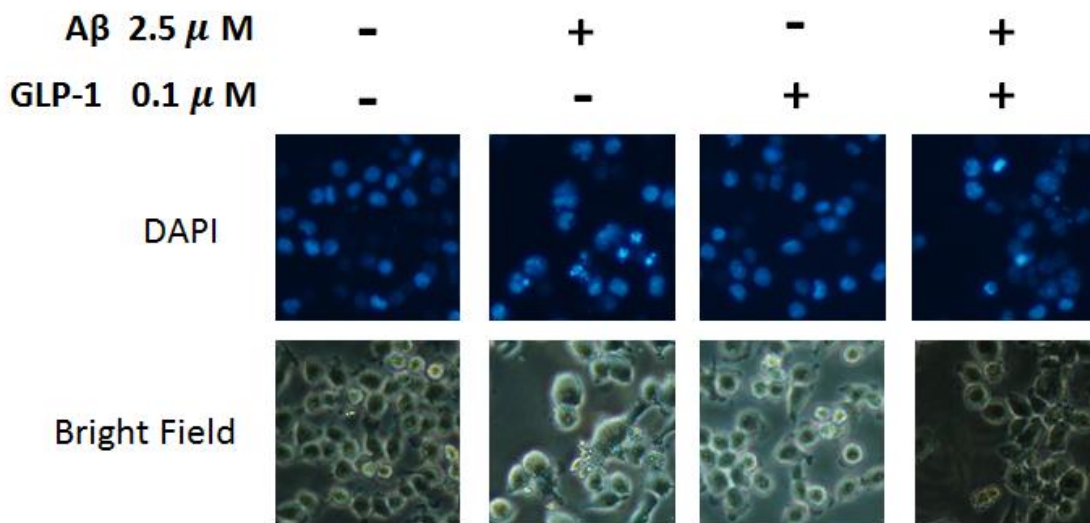
二、研究結果：



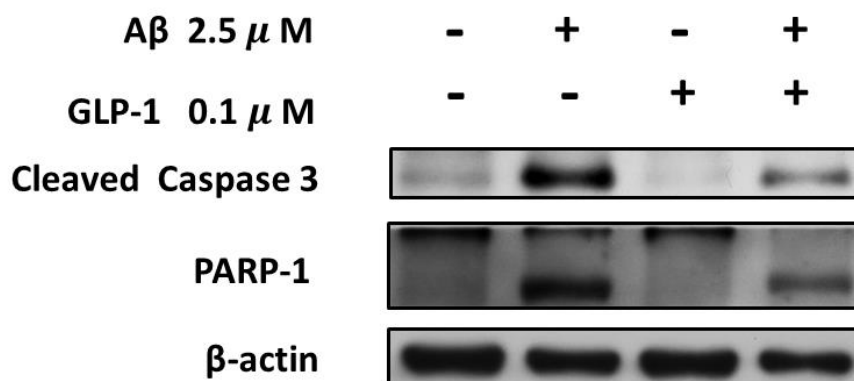
圖一：處理 BV2 神經微膠細胞，於加入不同濃度的 Aβ 後，進行細胞培養 24 小時，使用細胞存活率測定(MTT assay)，可以明顯觀察到 Aβ 所導致的細胞凋亡現象，會因為所加入的 Aβ 濃度越來越高，造成其存活率的降低。



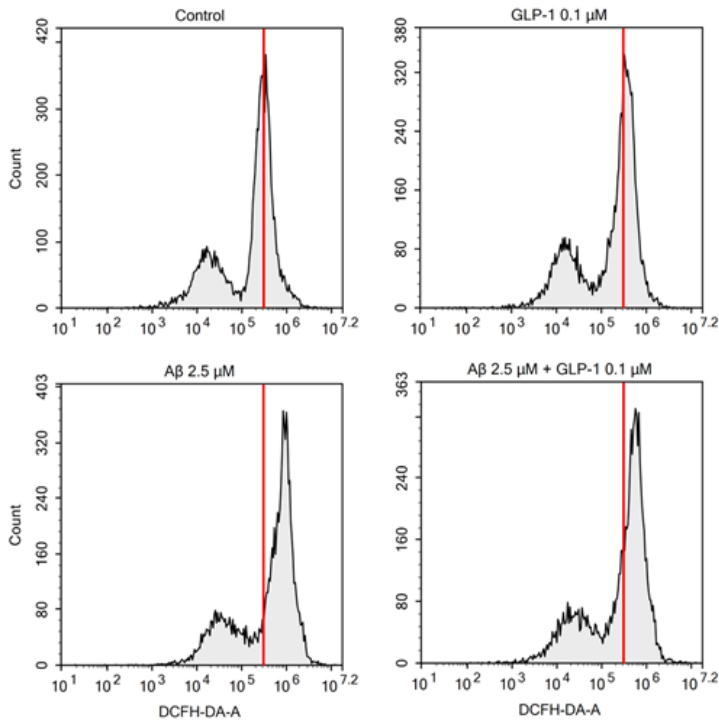
圖二：處理 BV2神經微膠細胞 2.5μM Aβ 以及 0.1 μM GLP-1，進行細胞培養24小時，使用細胞存活率測定(MTT assay)，可以發現GLP-1可以減少Aβ 所導致的細胞死亡。



圖三：處理 BV2神經微膠細胞 2.5 μ M A β 以及 0.1 μ M GLP-1，進行細胞培養24小時，可明顯減少A β 所導致的細胞凋亡現象(細胞核分裂的情形)，顯示出GLP-1 的訊息傳遞或許與神經細胞內的細胞自噬情況有所關連。

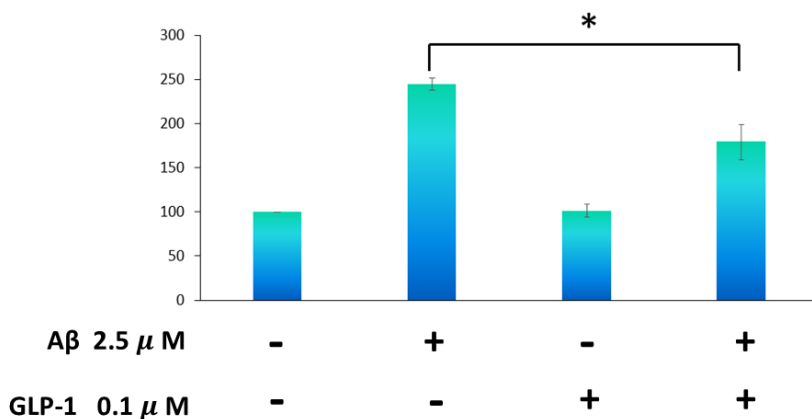


圖四：處理 BV2神經微膠細胞 2.5 μ M A β 以及 0.1 μ M GLP-1，進行細胞培養24小時，可以觀察到其凋亡相關蛋白質表現，cleaved caspases 3 在單獨加入A β 時，其蛋白表現量明顯增加，當加入A β 及GLP-1時，可以明顯觀察到其蛋白表現量的減少；PARP-1 在單獨加入A β 時，其蛋白表現量明顯增加，當加入A β 及GLP-1時，可以明顯觀察到其蛋白表現量的減少，這也顯示GLP-1可以減緩由A β 所誘發的細胞凋亡。



圖五：處理 BV2神經微膠細胞 2.5 μ M A β 以及 0.1 μ M GLP-1，進行細胞培養24小後，加入 DCFH-DA，使用流式細胞儀測量細胞內ROS的含量，可以發現單獨加入A β 時，其細胞內ROS的含量增加（波峰往右移動），當同時加入A β 及GLP-1時，可以觀察到其細胞內ROS的含量減少（波峰往左移動），這也顯示GLP-1可以減緩由A β 所誘導所產生的ROS。

ROS level



圖六：處理 BV2神經微膠細胞 2.5 μ M A β 以及 0.1 μ M GLP-1，進行細胞培養24小後，加入 DCFH-DA，使用流式細胞儀測量細胞內ROS的含量，可以發現單獨加入A β 時，其細胞內ROS的含量增加，當同時加入A β 及GLP-1時，可以觀察到其細胞內ROS的含量明顯減少，這也顯示GLP-1可以減緩由A β 所誘導所產生的ROS。

三、 結論：

由於目前關於 T2DM 與 AD 之間致病機轉的關聯性尚無明確結論，但流行病學研究顯示出 T2DM 罹患 AD 的風險確實要比正常人高出許多，再加上最近研究發現神經胰島素抵抗與 AD 的病徵發展有高度相依性，因此我們認為 T2DM 與 AD 不僅在分子機轉上有關聯性，且核心連結正是胰島素訊息傳遞及 A β 之間的交互影響。因此根據以上實驗的結果顯示，我們推論出 GLP-1 能減少 A β 所誘發的細胞死亡，以及抑制 A β 所誘發出的細胞凋亡訊號，藉由減少 ROS 的生成，但是其詳細的機轉仍然需要進一步探討。

四、 參考文獻

- Chen, Y., Deng Y Fau - Zhang, B., Zhang B Fau - Gong, C.-X., & Gong, C. X. Deregulation of brain insulin signaling in Alzheimer's disease. (1995-8218 (Electronic)).
- De Felice, F. G. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. (1558-8238 (Electronic)). doi: D - NLM: PMC3561831 EDAT- 2013/03/15 06:00 MHDA- 2013/05/15 06:00 CRDT- 2013/03/15 06:00 PHST- 2013/02/01 [aheadofprint] PHST- 2013/02/01 [epublish] AID - 64595 [pii] AID - 10.1172/JCI64595 [doi] PST - ppublish
- Gold, M., & El Khoury, J. (2015). beta-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol*, 37(6), 607-611. doi: 10.1007/s00281-015-0518-0
- Ji C Fau - Xue, G.-F., Xue Gf Fau - Li, G., Li G Fau - Li, D., Li D Fau - Holscher, C., & Holscher, C. Neuroprotective effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in Alzheimer's disease. (0334-1763 (Print)).
- Medhi, B., & Chakrabarty, M. Insulin resistance: an emerging link in Alzheimer's disease. (1590-3478 (Electronic)).
- Oh, H., Steffener, J., Razlighi, Q. R., Habeck, C., & Stern, Y. beta-Amyloid Deposition Is Associated with Decreased Right Prefrontal Activation during Task Switching among Cognitively Normal Elderly. (1529-2401 (Electronic)).
- Talbot, K., & Wang, H. Y. The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease. (1552-5279 (Electronic)). doi: D - NLM: NIHMS555983 D - NLM: PMC4018451 OTO - NOTNLM