

## 科技部補助專題研究計畫報告

探討miR302對於A $\beta$ 所誘發的神經胰島素阻抗及老化訊息相關作用之分子機轉(第3年)

報告類別：成果報告  
計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 106-2320-B-040-021-MY3  
執行期間：108年08月01日至109年12月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：林志立  
共同主持人：賴德仁、何應瑞、邱百誼

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：何筱莉  
碩士班研究生-兼任助理：李靜茹  
碩士班研究生-兼任助理：劉翔婷  
碩士班研究生-兼任助理：陳盈汝  
博士班研究生-兼任助理：郭千尹  
博士班研究生-兼任助理：白宜巧  
博士後研究-博士後研究：鄒欣樺  
博士後研究-博士後研究：李欣樺

報告附件：出席國際學術會議心得報告

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關  
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)  
本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

中華民國 110 年 03 月 04 日

中文摘要：阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是最常見的老年神經退化性疾病，其主要的病理特徵是患者腦部的神經細胞外會堆積一種由 $\beta$ 類澱粉蛋白( $A\beta$ )所構成的老年斑塊，而亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease, HD)是一種自體顯性遺傳神經退化性疾病，主要是因為亨丁頓蛋白的第一外顯子發生CAG三核苷酸重複序列的過度擴張，產生亨丁頓突變蛋白(mutant huntingtin, mHtt)，並累積在細胞內形成難以清除的聚集物或包涵體，進而引起細胞功能發生障礙致使神經凋亡。關於 $A\beta$ 及mHtt究竟如何誘發神經毒性的確切機轉目前仍不清楚，但有越來越多的證據顯示可能與腦部老化及相關的代謝異常所誘發之胰島素阻抗有關，然而到目前為止很少有針對神經胰島素阻抗的機制性保護策略被發展出來。而在本研究中，我們發現miR302這個與幹細胞高度相關的miRNA，在AD與HD的病程進展中似乎都扮演著重要的角色。神經細胞在 $A\beta$ 或mHtt所造成的神經毒性下其miR302的表現都有明顯的降低，並同時發生神經胰島素阻抗的現象。相反的，若此時再設法回復miR302的表現量，則神經胰島素阻抗的現象變得以緩解，並有效降低 $A\beta$ 或mHtt的毒性作用。我們認為miR302與胰島素阻抗之間的關聯性，除了可以解釋糖尿病與部分神經退化性疾病之間的共病機轉外，再配合據此計畫所開發出miR302快速且低成本的分析方法，於將來將miR302應用在診斷或治療的應用方面將十分具有前景。

中文關鍵詞：阿茲海默症、亨丁頓舞蹈症、miR302、神經胰島素阻抗、腦部老化。

英文摘要：Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of neurodegenerative disease with aging. The major pathological feature of AD is the extracellular accumulation of senile plaques composed by amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) in the brain. Huntington's disease (HD) is autosomal-dominant neurodegenerative disease, which is caused by CAG triplet repeat expansion in the exon 1 coding region of huntingtin protein. This mutation encodes the mutant Htt (mHtt) which accumulates within cells as abnormal aggregates or inclusions, and thereby leads to cellular function impairment that ultimately led to neuronal death. Although the exact mechanisms of  $A\beta$  or mHtt-mediated neurotoxicity remain unknown, increasing evidence supports the idea that may primarily be caused by a brain aging-associated metabolic disorder linked to insulin resistance. However, only few mechanism-based therapeutic strategies have been developed to protect against neuronal insulin resistance so far. In the present study, we found that miR302, a miRNA that is highly related to stem cells, seems to play an important role in the progression of AD and HD. The expression of miR302 in neuronal cells under the neurotoxicity caused by  $A\beta$  or mHtt is significantly suppressed, and neuronal insulin resistance occurs at the same time. On the contrary, the restoration of miR302

effectively alleviate neuronal insulin resistance and the toxic effect of  $A\beta$  or mHtt. This indicates the correction between miR302 and insulin resistance, and explains the comorbidity between diabetes and some neurodegenerative diseases. With the pattern for miR302 analysis based on this project, we suggest that the application of miR302 in diagnosis or treatment applications will be very promising in the future.

英文關鍵詞：Alzheimer's disease, AD, Huntington's disease, miR302, neuronal insulin resistance, brain aging.

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

探討 miR302 對於 A $\beta$  所誘發的神經胰島素阻抗及老化訊息

相關作用之分子機轉

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-040-021-MY3

執行期間：106 年 8 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學研究所

計畫主持人：林志立教授

共同主持人：賴德仁教授、何應瑞教授、邱百誼醫師

計畫參與人員：李欣樺研究員、鄒欣樺博士後研究員、張清碁醫師、王威傑醫師、林聖傑博士生、郭千尹博士生、白宜巧博士生、何筱莉碩士生、李靜茹碩士生、劉翔婷碩士生、陳盈汝碩士生

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 3 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現： 否  是

中 華 民 國 110 年 2 月 28 日

## 中文摘要

阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是最常見的老年神經退化性疾病，其主要的病理特徵是患者腦部的神經細胞外會堆積一種由  $\beta$  類澱粉蛋白(A $\beta$ )所構成的老年斑塊，而亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease, HD)是一種自體顯性遺傳神經退化性疾病，主要是因為亨丁頓蛋白的第一外顯子發生 CAG 三核苷酸重複序列的過度擴張，產生亨丁頓突變蛋白(mutant huntingtin, mHtt)，並累積在細胞內形成難以清除的聚集物或包涵體，進而引起細胞功能發生障礙致使神經凋亡。關於 A $\beta$  及 mHtt 究竟如何誘發神經毒性的確切機轉目前仍不清楚，但有越來越多的證據顯示可能與腦部老化及相關的代謝異常所誘發之胰島素阻抗有關，然而到目前為止很少有針對神經胰島素阻抗的機制性保護策略被發展出來。而在本研究中，我們發現 miR302 這個與幹細胞高度相關的 miRNA，在 AD 與 HD 的病程進展中似乎都扮演著重要的角色。神經細胞在 A $\beta$  或 mHtt 所造成的神經毒性下其 miR302 的表現都有明顯的降低，並同時發生神經胰島素阻抗的現象。相反的，若此時再設法回復 miR302 的表現量，則神經胰島素阻抗的現象變得以緩解，並有效降低 A $\beta$  或 mHtt 的毒性作用。我們認為 miR302 與胰島素阻抗之間的關聯性，除了可以解釋糖尿病與部分神經退化性疾病之間的共病機轉外，再配合據此計畫所開發出 miR302 快速且低成本的分析方法，於將來將 miR302 應用在診斷或治療的應用方面將十分具有前景。

關鍵詞: 阿茲海默症、亨丁頓舞蹈症、miR302、神經胰島素阻抗、腦部老化。

## Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of neurodegenerative disease with aging. The major pathological feature of AD is the extracellular accumulation of senile plaques composed by amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) in the brain. Huntington's disease (HD) is autosomal-dominant neurodegenerative disease, which is caused by CAG triplet repeat expansion in the exon 1 coding region of huntingtin protein. This mutation encodes the mutant Htt (mHtt) which accumulates within cells as abnormal aggregates or inclusions, and thereby leads to cellular function impairment that ultimately led to neuronal death. Although the exact mechanisms of A $\beta$  or mHtt-mediated neurotoxicity remain unknown, increasing evidence supports the idea that may primarily be caused by a brain aging-associated metabolic disorder linked to insulin resistance. However, only few mechanism-based therapeutic strategies have been developed to protect against neuronal insulin resistance so far. In the present study, we found that miR302, a miRNA that is highly related to stem cells, seems to play an important role in the progression of AD and HD. The expression of miR302 in neuronal cells under the neurotoxicity caused by A $\beta$  or mHtt is significantly suppressed, and neuronal insulin resistance occurs at the same time. On the contrary, the restoration of miR302 effectively alleviate neuronal insulin resistance and the toxic effect of A $\beta$  or mHtt. This indicates the correction between miR302 and insulin resistance, and explains the comorbidity between diabetes and some neurodegenerative diseases. With the pattern for miR302 analysis based on this project, we suggest that the application of miR302 in diagnosis or treatment applications will be very promising in the future.

Key words: Alzheimer's disease, AD, Huntington's disease, miR302, neuronal insulin resistance, brain aging.

## 報告內容

### 前言

老化是一種自然過程，是指生理狀態隨時間演進而退化的現象，其對腦部最明顯的影響便是記憶功能的衰退，是一般失智患者最早被發覺的症狀。但老化和失智還是有所不同的，一般因老化而記憶衰退的情況可能是突然忘記某事，但事後還是有機會可再回想起來；以阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)為例，其對於自己所說過的話及做過的事會到幾乎完全忘記的地步且無法回憶，而這種情況尤以短期記憶特別明顯。事實上 AD 早期病理上的破壞主要是影響腦部的海馬迴(hippocampus)區域，因此部位與短期記憶及空間概念的形成有關，故可解釋短期記憶障礙的現象。而就細胞層級而言，AD 神經退化的原因是因為神經元長期慢性的接受 A $\beta$  傷害，隨著老化加劇其自我修復的速度漸漸趕不上傷害累積的速度，最終造成細胞衰弱甚至死亡(Lardenoije *et al.* 2015)，是故老化與神經退化之間的關係實是密不可分。已知 AD 有許多風險因子，包括三高(高血壓、高膽固醇、高血糖)、頭部外傷、抽菸、憂鬱等，但高齡則具有最大的影響力。流行病學指出 65 歲以上的高齡者約有 5% 會罹患 AD，之後每增加 5 歲罹病率大致上會加倍，因此老化已被確認為 sporadic AD 的最大風險因子，而在亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease, HD)方面，雖然其是一種體染色體顯性遺傳的神經退化性疾病，主要的病因毫無疑問地是源自於突變的亨丁頓蛋白(Huntingtin, Htt)所造成的神經毒性，然而仔細思量 HD 的分子致病過程可以發現：polyQ 突變的 mHtt 基因大多是遺傳性的，代表患者自嬰幼兒時期起其實腦部便一直不斷發生 mHtt 蛋白變性、聚集和沈積，但此過程卻要累積數十年後才會發病。因此我們認為 Htt 的 polyQ 突變雖然是疾病的核心原因，但並不是唯一的影響因子，還有其他如老化的因素也會參與在其中，是故在分子層級上深入探討老化究竟如何影響 AD 或 HD 的病程進展，將有助於發展出有效的預防或治療策略。

### 研究目的

以動態的角度來看老化是指細胞退化的速度逐漸大於修復的速度，是故若能讓已衰弱的細胞在凋亡前能有機會重新復原便可達到延緩老化的目的，因此幹細胞(stem cell)的再生與修復機制被認為深具抗老化的潛在應用價值。在定義上幹細胞是指一群未完全分化(undifferentiated)、具有自我更新能力(self-renewal)、以及可分化成各種成熟組織能力(multi-lineage differentiation)的細胞，其可藉由分泌複雜的調控因子來調節自身與周邊細胞的分生長、修復及分化作用。已知有數種因子參與在幹細胞的調控機制中，其中一個是由英國 University of Edinburgh 的 Silva 等人所發現的 Nanog (Silva *et al.* 2006)，此蛋白的命名乃源自於古愛爾蘭的地名 Tir Na Nog，因傳說當地人長年皆可保持健康長壽故命名之。Nanog 是一種在幹細胞表現豐富的轉錄因子，Mitsui 等人發現若人工誘發老鼠胚胎細胞大量表現 Nanog，便可促使其長期維持在幹細胞狀態 (Mitsui *et al.* 2003)，而著名 iPSC 學者 Yamanaka 則指出當神經幹細胞失去 Nanog 後，便會失去多能(pluripotent)及分化成神經元的能力 (Silva *et al.* 2009)，由此可知 Nanog 對於神經幹細胞的活性維持非常重要。有趣的是 Nanog 維持細胞幹性(stemness)的作用機制似乎與胰島素訊息的調控有關，研究曾指出在 endometrial mesenchymal stem-like cells 表現高量的 Nanog 時會增加細胞分泌胰島素的能力，並因此減少氧化壓力傷害及抑制凋亡 (Li *et al.* 2010)；此外 Nanog 也被證實可以透過活化 insulin receptor substrate-1 (IRS-1) 的 tyrosine 磷酸化來增強胰島素訊息，促使

embryonic stem cells 持續保持自我更新的能力(Chen & Khillan 2010)；而我們實驗室最近的研究結果也顯示，當神經細胞的 Nanog 表現量提高時，會抑制由 A $\beta$  所導致之 IRS-1 serine 磷酸化而減緩神經胰島素阻抗，並因此發揮其神經保護的效果(Li *et al.* 2016)；此外我們也發現 Nanog 可協同 Sox2、Oct3/4 與 Klf4 等幹細胞相關基因一起作用，使神經細胞具備幹性並具有促進細胞再生的傾向，同時可減少神經膠細胞受 A $\beta$  刺激過度活化的不良反應。而在 HD 方面，我們也發現透過抗糖尿病藥物 glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide 提昇受 mHtt 影響神經細胞之胰島素訊息，確實可有效的增加細胞對抗氧化壓力傷害的能力，並同時活化自噬來減輕 mHtt 在細胞內的聚集累積(Chang *et al.* 2018)，因此我們認為可應用此機制發展治療或減緩 HD 病成進展的策略。進一步追尋細胞內調控 Nanog 的內生性機制，可發現其表現量似乎與一個名為 miR302 的 miRNA 有關，miR302 被認為主要與細胞的 reprogramming 有關，若誘導已分化的細胞產生大量的 miR302 時，其會透過 Nanog 來活化 Oct3/4 或 Sox2 等訊息提升細胞 self-renewal 與 pluripotency 的能力，使細胞獲得類幹細胞(stem cell-like)的活性，因此被認為可用來誘發誘導性多功能幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)之生成(Zhou *et al.* 2015)。由於我們先前的研究曾指出當神經細胞受 miR302 誘導分化為類幹細胞時，其會增加細胞的自我修復及更新速率，並對於減緩 A $\beta$  或 mHtt 所造成的神經老化具有顯著的功效，然而 miR302 與 A $\beta$  或 mHtt 神經毒性之間尚有許多未知之處，仍待深入探討以釐清詳細的調控機轉。

## 文獻探討

早期的觀念認為中樞神經系統並不會製造及分泌胰島素/類胰島(insulin/insulin-like growth factor, IGF)，但 80 年代中期時發現中樞神經元不僅會表現豐富的胰島素/類胰島素受體，本身竟也有能力製造胰島素/類胰島素(Duarte *et al.* 2012)。事實上中樞神經系統內的胰島素/類胰島素除了可以藉由腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)循環進入，或由周邊直接通透血腦障壁(blood-brain barrier, BBB)滲入外，還可以 autocrine 或 paracrine 的方式來局部分泌並發揮其生理活性(Gray *et al.* 2014)。研究已證實神經胰島素訊息與人類大腦的認知功能有關，特別是對於學習能力和記憶形成非常重要(Grizzanti *et al.* 2016)，相對的在 AD 中則發現腦內胰島素訊息傳遞經常有發生阻抗(resistance)的現象，且阻抗程度與病情的嚴重度呈現正相關性(Biessels & Reagan 2015)。探究各種造成神經胰島素阻抗的可能原因，可發現老化扮演著相當程度的影響力，研究指出人類海馬迴胰島素訊息的強度會隨著年齡增長而下降，代表老化確實會減低神經胰島素訊息活性(Schuh *et al.* 2011)。而在各種誘發神經胰島素阻抗的原因中以 A $\beta$  最為矚目，研究顯示其會透過抑制神經細胞膜上胰島素接受體，致使胰島素訊息傳遞受到阻礙，因此降低了神經傳導物質乙醯膽鹼(acetylcholine)的生合成及分泌的效率(Kroner 2009)；此外 A $\beta$  也能損傷粒腺體導致氧化壓力增加(Jiang *et al.* 2016)，並壓制細胞內自我清除機制的運作(ubiquitin proteasome/autophagy pathway)，致使神經退化的情況更加惡化(Goloubinoff 2016)，以上這些恰巧也都是腦部老化的典型特徵。胰島素訊息影響 AD 最典型的範例則是 tau 蛋白的過度磷酸化，當神經胰島素訊息發生阻抗時，因 Akt 無法活化致使 glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 活性不受其抑制，此時 GSK3 $\beta$  會直接過度磷酸化並因此誘發神經纖維纏結產生，是故適度的維持神經胰島素訊息活性被認為可降低神經凋亡。由於腦中胰島素訊息最為豐富的地方被發現是在海馬迴與額前葉皮質(Kleinridders *et al.* 2014)，而這些區域正是 AD 中最易受影響的腦區，因此

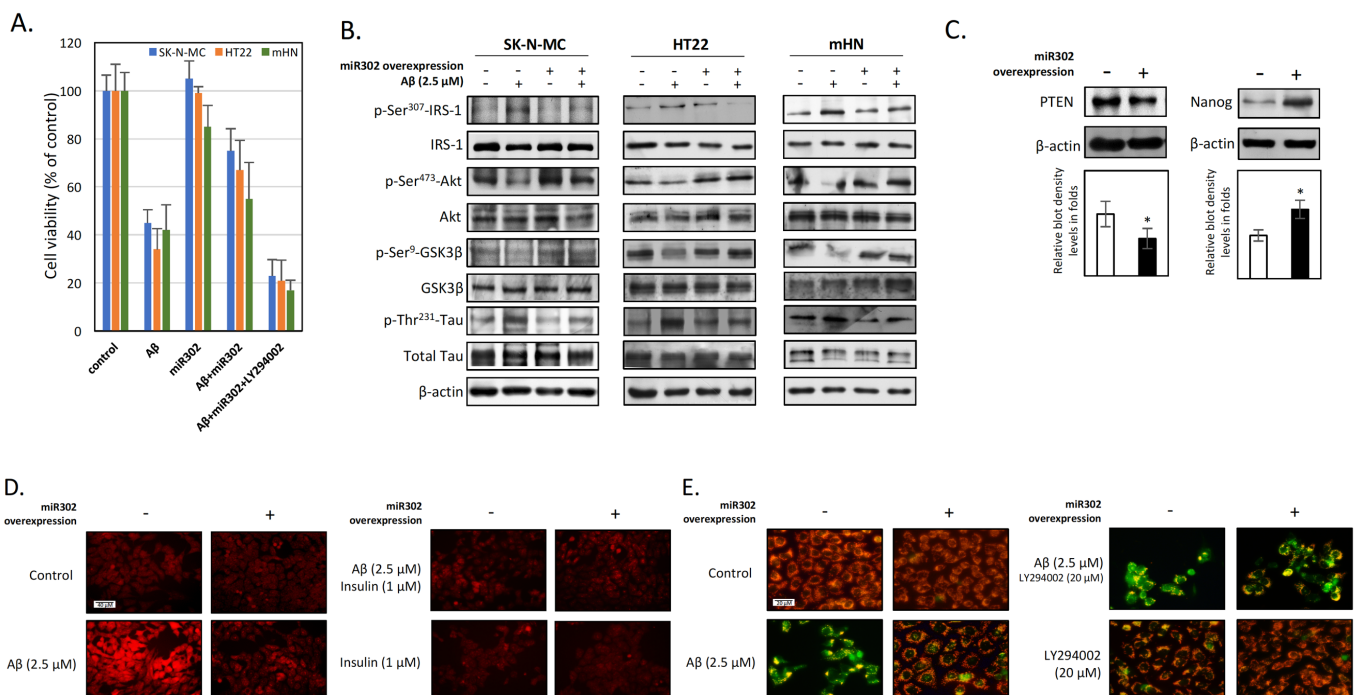
我們認為 AD 的核心病因可能與腦內胰島素訊息阻礙有關，過多的 A $\beta$  則會經由上述機制加快神經老化，而此時神經退化的情況亦會隨之加重，因此若要設法阻止或減緩 AD 的病程進展，改善神經胰島素訊息阻抗應是一個值得嘗試的途徑。而在 HD 方面，有趣的是在 2008 年 Lalić 等人曾報告，HD 患者與正常人相比其胰島素敏感性顯著較差，且嚴重程度與 CAG repeats 的數目呈正相關性(Lalic *et al.* 2008)。事實上流行病學研究亦指出 HD 患者除神經學症狀外，也常發生醣類代謝異常的現象，其中 HD 患者罹患糖尿病的機率可達正常對照組的 7 倍之多(Farrer 1985)。同樣的許多動物實驗也發現 R6/2 mice (一種 Htt 會表現 140 個 CAG repeats 的 HD transgenic mice)相較於野生型背景鼠(wildtype mice)，其在 HD 發病後也常伴隨著糖尿病相關的症狀發生，包括多吃、多喝、多尿及體重消瘦等典型糖尿病的現象(Hurlbert *et al.* 1999)。雖然可解釋 HD 與糖尿病之間連結的詳細機制目前仍無法確定，有人猜測部分原因或許與  $\beta$ -cell 製造及分泌胰島素發生障礙有關，此外 HD 的動物實驗則指出其腦部有發生胰島素及 leptin 訊息阻抗的現象，並因此造成神經在功能上及代謝上發生異常(Hult *et al.* 2011)。總合來說，研究證實神經胰島素訊息與大認知功能有高度相關，特別是對於學習能力和記憶形成非常重要[30]，相對的在失智症患者中則發現腦內胰島素訊息經常發生阻抗的現象，且其阻抗程度與往往病情嚴重度呈現高度正相關(Biessels & Reagan 2015)，因此近年來已有學者指出，提昇 insulin/IGF signaling 對於改善中樞神經退化的症狀可能有所助益(Bryan & Bowman 2017)。

## 研究結果

我們分別以 AD 及 HD 的神經毒性模式對 miR302 進行分析，結果顯示 miR302 確實可能在 AD 或 HD 的病程進展中扮演重要的角色：

### AD 模式：A $\beta$ neurotoxicity

在細胞中提昇 miR302 的表現可減緩 A $\beta$  導致的胰島素抵抗及神經毒性

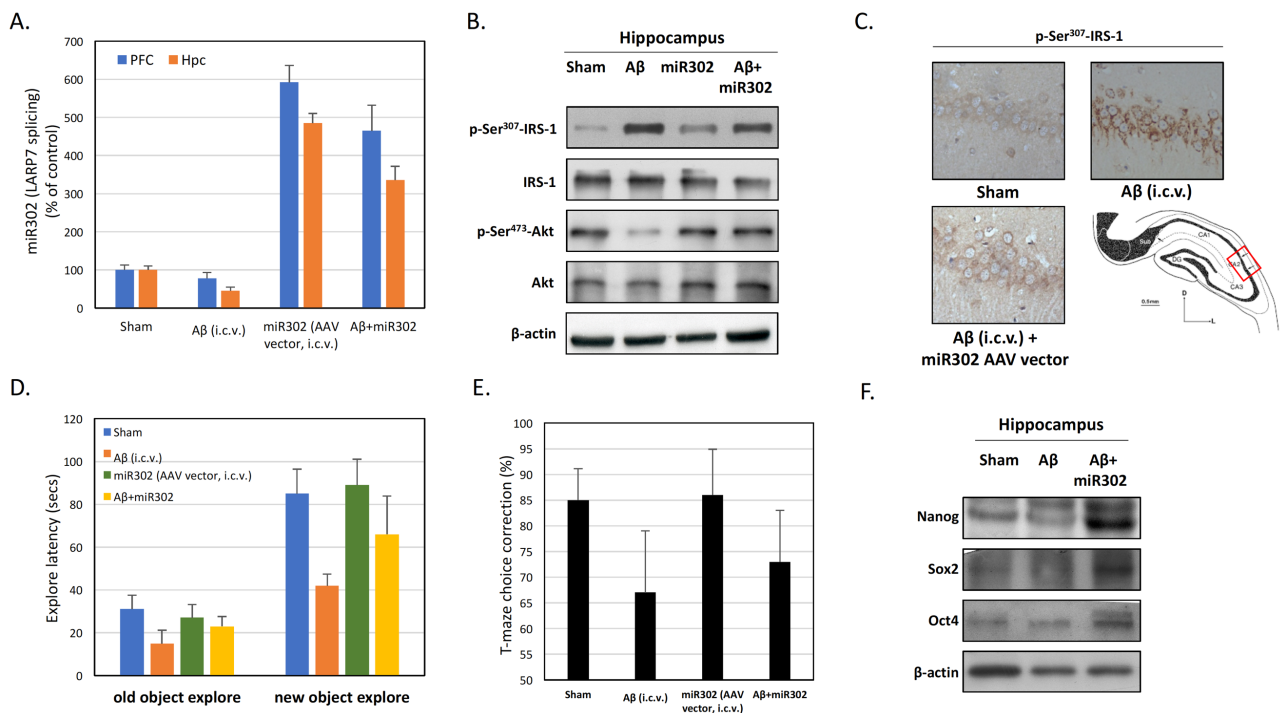


(A)為了瞭解 miR302 對抗 A $\beta$  的神經保護作用，我們同時使用了三個細胞：SK-N-MC(人類神經母細胞瘤)、HT22(小鼠海馬迴細胞株)、mHN(C57BL/6 小鼠海馬迴初代培養細胞)，MTT 的



結果可發現外加 2.5  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  24 小時後，所有細胞的存活率都大幅的下降，然而若此時轉染 miR302 overexpression vector，則可有效的回復細胞的存活率，有趣的是 miR302 的保護效果似乎會被胰島素訊息阻斷劑 LY294002 所抑制。(B)為了瞭解 miR302 是否能緩解  $\text{A}\beta$  所造成的胰島素訊息阻抗，我們以 western blotting 的方式對胰島素訊息相關的蛋白分子進行偵測，結果發現  $\text{A}\beta$  可使包括 SK-N-MC、HT22 及 mHN 等神經細胞的 pSer<sup>307</sup>-IRS-1 的表現量增加，代表有誘發胰島素阻抗的情形，同樣的其下游的 pSer<sup>473</sup>-Akt、pSer<sup>9</sup>-GSK3 $\beta$  的表現量也因此受到抑制，並造成 pThr<sup>231</sup>-tau 增加；相對的若此時再將 miR302 進行過度表現，則可以逆轉上述各種胰島素阻抗所造成的結果。(C)SK-N-MC 的實驗顯示，過度表現 miR302 可以有效的抑制 PTEN 的表現，並同時誘發 Nanog 的表現量上升。(D)以 DHE (dihydroethidium)對 SK-N-MC 細胞內的 ROS 進行標定，可以發現  $\text{A}\beta$  會誘發大量的 ROS 累積，但此時若給予 1  $\mu\text{M}$  的胰島素或過量表現 miR302，則 ROS 累積量會顯著下降。(E)以 JC-1 對粒線體進行染色，觀察膜電位的變化，結果可發現  $\text{A}\beta$  會降低膜電位造成粒線體功能失調，相反地若過量表現 miR302，則可以顯著的回復粒線體的膜電位，但 miR302 會因加入 LY294002 而失去其神經保護效果。

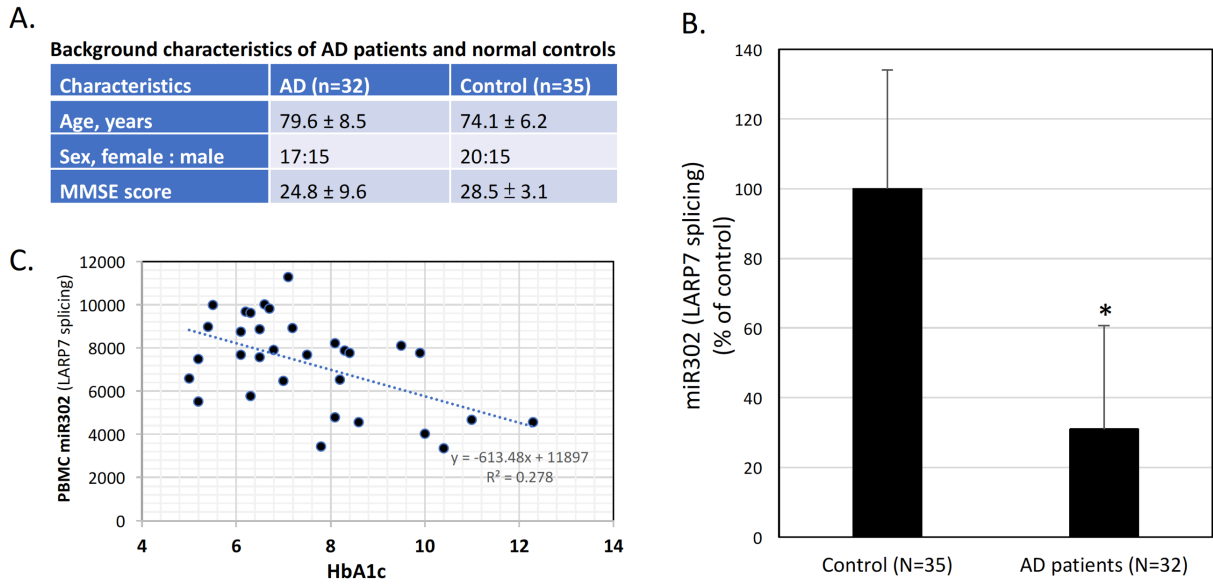
### 在動物中提昇 miR302 的表現可減低 $\text{A}\beta$ 相關的病理及行為缺損



(A)在我們先期的實驗中，是利用顱內注射  $\text{A}\beta$  到 Wistar 大鼠雙側海馬迴及 miR302 AAV vector 到右腦室的方式，誘發出 AD-like 的病理及行為缺損(6 weeks after i.c.v. injection)。我們首先檢驗 miR302 AAV vector 轉染的效率，由 RT-PCR 結果可發現 miR302 AAV vector 的轉染效率頗佳，與 Sham 組比較不管在前額葉(PFC, prefrontal cortex)或海馬迴(Hpc, hippocampus)都可增加約 5 倍左右的表現量，即使同時處理  $\text{A}\beta$  其表現量仍不會降低太多。(B)此時偵測海馬迴中與胰島素訊息傳遞有關的蛋白表現量可發現，處理  $\text{A}\beta$  會顯著誘發胰島素阻抗的標誌蛋白 pSer<sup>307</sup>-IRS-1，且 pSer<sup>473</sup>-Akt 的表現量也明顯的下降，然而若同時增加 miR302 的表現，則會顯著的恢復胰島素阻抗的現象。(C)病理組織切片也發現， $\text{A}\beta$  會顯著誘發 pSer<sup>307</sup>-IRS-1 的表現，而轉染 miR302 則可有效的抑制這個現象。(D)以 new object recognition test 來評估動物的物件辨識和空間記憶能力，可發現處理  $\text{A}\beta$  會降低大鼠對新舊物件的探索時間，然而再轉染 miR302 可回復其探索新物件的時間比率，代表動物的物件辨識和空間記憶能力有因 miR302 而改善。(E)以 T

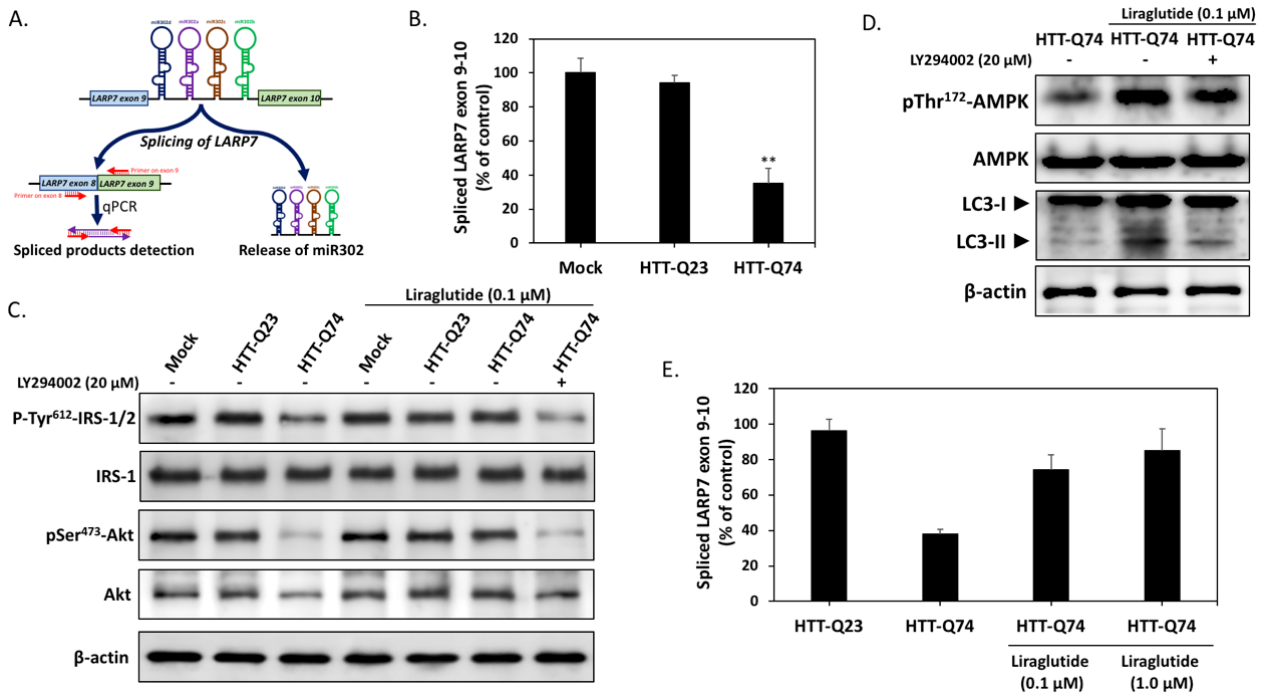
迷宮來測試大鼠的學習記憶能力，可發現處理 Aβ 會降低大鼠在迷宮裡選擇的正確率，此時再轉染 miR302 則可提高其正確率。(F)以 western blotting 來偵測數個與幹細胞有關的因子，可發現 miR302 可有效的提高包括 Nanog、Sox2、Oct4 等蛋白在海馬迴的表現量。

### AD 患者與健康對照組其周邊血液 miR302 表現量及與 HbA1c 之間的關係

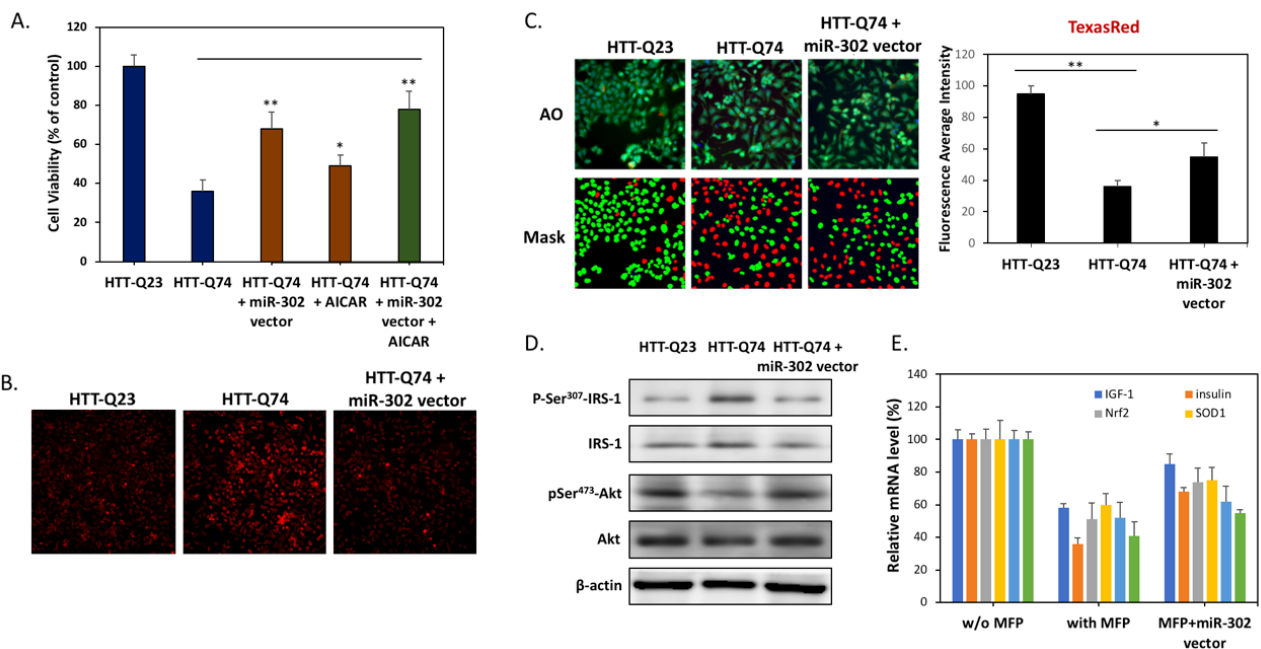


(A)AD 患者 vs 非 AD 對照組的背景資料。(B)由周邊血液分離 PBMC 萃取出 mRNA 轉成 cDNA library 後，偵測其 miR302 表現量的差異，結果顯示 AD 患者的 miR302 表現量顯著的較非 AD 對照組來得低。(C)將 AD 患者的 PBMC miR302 與 HbA1c 值製作成 XY 散布圖並計算回歸斜率與截距，可發現 miR302 的表現量與 HbA1c 值呈現負相關，代表胰島素阻抗與 miR302 的表現量之間可能有負向的交互關係。

### HD 模式：mutant huntingtin neurotoxicity



**mHtt-Q74 過度表現的細胞其 miR302 的表現量有下降的趨勢。**(A) 為了偵測 miR302 的表現量，傳統方式是以 commercial primer 透過 RT-PCR 來直接夾取目標 miRNA 進行偵測，然而這個方法有兩個缺點：第一是 miR302 有 a/b/c/d 等 4 種子型，所以需要 4 組 primers 同時偵測才能評估，第二是 miR302 具有較難以解開的 hairpin 結構使偵測精準度不穩定。為了改進以上的缺點，我們發展了一種新的策略，由 miR302 的生合成過程可知必須經過 LARP7 exon 8 與 exon 9 的 splicing 後其才能被釋放出來，因此只要分別在這兩個 exon 的適當位置設計一組 primer，便可以 RT-PCR 偵測的方式來得知這兩段 exons 有沒有被成功接起來的比率，以間接推估 miR302 a/b/c/d 所有子型被釋放出來的量，目前本法已在實驗室內常規進行並獲得台灣專利。(B)使用上述的方法偵測過度表現 mHtt-Q74 的神經細胞，發現 miR302 的表現量受到明顯抑制。(C)Liraglutide 為一種抗糖尿病藥物，我們發現在過度表現 mHtt-Q74 細胞中若處理 0.1 μM liraglutide，可有效的緩解神經胰島素發生阻抗的現象。(D)在過度表現 mHtt-Q74 細胞中處理 liraglutide 也具有活化 AMPK 的能力，同時也因此回復了部分細胞自噬活性。(E)Liraglutide 對抗 mHtt-Q74 神經毒性的機制，有可能是透過提昇 miR302 的內生性表現量來發揮作用。

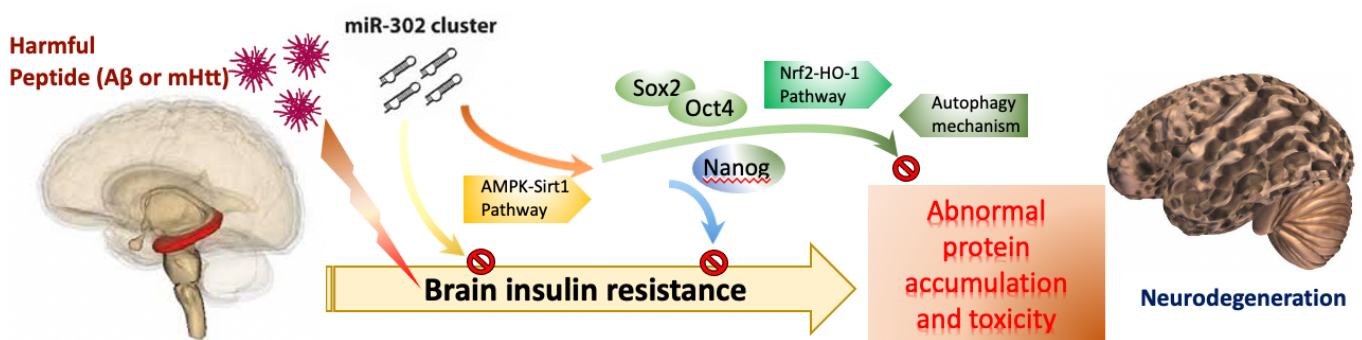


**提高神經細胞內 miR302 的表現量可緩解 mHtt-Q74 所導致的神經毒性。**(A) 在過度表現 mHtt-Q74 的細胞中若透過 AICAR 提高 AMPK 的活性，或直接轉染 miR302 overexpression vector，兩者都可回復細胞生存率，且同時並用時的保護效果會更佳。(B)以 Dihydroethidium (DHE) 進行染色，發現提高 miR302 的表現量可減緩 mHtt-Q74 所誘發之細胞內 superoxide 上升的現象。(C)以 ImageXpress Nano Automated Imaging System 對細胞進行高通量分析，計算各個細胞內自噬小體含量(TexasRed signaling)的變化(Mask: Green cells indicate AVO positive, and Red cells indicate AVO negative)，結果發現提高 miR302 的表現量可顯著回復細胞內自噬小體的數量。(D) Western blotting 結果顯示提高 miR302 可緩解 mHtt-Q74 所導致的神經胰島素阻抗(pSer<sup>307</sup>-IRS-1: insulin resistance marker)。(E)以 real-time PCR 的方式分析細胞內 insulin、IGF-1、Nrf2 及 SOD1/2 等 vitagenes mRNA 含量，結果發現提高 miR302 可回復這些基因的 mRNA 表現量。



## 討論

在我們的研究結果中，發現包括 AD 及 HD 的神經毒性似乎都與 miR302 的表現量有關。已知 miR302 源自於人類 La ribonucleoprotein domain family member 7 (LARP7) 基因 exon 8 與 exon 9 中間的 intron 序列上面，當 LARP7 premature mRNA 的 exon 8 與 exon 9 進行轉錄後修飾時，會透過 splicing 將此 intron 釋出，而此 intron 片段經過再修飾後便會產生成熟的 miR302 (Gao *et al.* 2015)。事實上 LARP7 本身也被發現與對抗細胞衰老有關，若其發生突變會造成一種稱為 Alazami syndrome 的發育不全症 (Dateki *et al.* 2018)，致病原因是透過不明機制使染色體端粒 (telomere) 的長度無法維持，因而誘發與細胞衰老訊息相關途徑活化 (Holohan *et al.* 2016)，詳細的機制雖然目前仍然不明，但很可能與 miR302 的生成量受到抑制有關。此外 miR302 也被認為與幹細胞的 reprogramming 有關，若誘導已分化的細胞產生大量的 miR302，會提升 self-renewal 與 pluripotency 的能力，因此可用來誘發誘導性多功能幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 的產生 (Zhou *et al.* 2015)。而我們先前也曾發表當神經細胞受 miR302 誘導分化為類幹細胞時，會回復受抑制的胰島素敏感性及自噬活性，增加細胞的自我修復及更新速率，因此可減緩神經退化的病程進展 (Li *et al.* 2016)。相對的在大量表現細胞內錯誤折疊蛋白 ( $A\beta$ 、mutant huntingtin) 的神經細胞中則發現，其 miR302 的表現有被明顯的抑制現象，且與胰島素訊息活化相關的蛋白包括 pThr<sup>172</sup>-AMPK、pTyr-IRS-1 及 pSer<sup>473</sup>-Akt 之磷酸化程度也都大幅減低，代表這些錯誤折疊蛋白對於神經細胞的 miR302 表現量及胰島素訊息活性均具有相當程度的影響；而若於此情況下回復 miR302 在細胞內的表現量，則錯誤折疊蛋白所誘發的神經毒性便可獲得有效緩解，且胰島素訊息被抑制的情況也大幅降低。是故我們認為活化 miR302 可有效減緩 AD 及 HD 所造成的神經毒性及氧化壓力傷害，然 miR302 與神經毒性之間的調控機轉仍有許多未知之處，仍待更深入研究來釐清此機制應用於治療的可能性。



## 參考文獻

- Biessels GJ, Reagan LP (2015). Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nature reviews. Neuroscience.* **16**, 660-671.
- Bryan MR, Bowman AB (2017). Manganese and the Insulin-IGF Signaling Network in Huntington's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Advances in neurobiology.* **18**, 113-142.
- Chang CC, Lin TC, Ho HL, Kuo CY, Li HH, Korolenko TA, Chen WJ, Lai TJ, Ho YJ, Lin CL (2018). GLP-1 Analogue Liraglutide Attenuates Mutant Huntingtin-Induced Neurotoxicity by Restoration of Neuronal Insulin Signaling. *International journal of molecular sciences.* **19**.
- Chen L, Khillan JS (2010). A novel signaling by vitamin A/retinol promotes self renewal of mouse embryonic stem cells by activating PI3K/Akt signaling pathway via insulin-like growth factor-1 receptor. *Stem cells (Dayton, Ohio).* **28**, 57-63.

- Dateki S, Kitajima T, Kihara T, Watanabe S, Yoshiura KI, Moriuchi H (2018). Novel compound heterozygous variants in the LARP7 gene in a patient with Alzami syndrome. *Human genome variation*. **5**, 18014.
- Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR (2012). Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *Journal of aging research*. **2012**, 384017.
- Farrer LA (1985). Diabetes mellitus in Huntington disease. *Clinical genetics*. **27**, 62-67.
- Gao Z, Zhu X, Dou Y (2015). The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions. *Open biology*. **5**, 150138.
- Goloubinoff P (2016). Mechanisms of protein homeostasis in health, aging and disease. *Swiss medical weekly*. **146**, w14306.
- Gray SM, Meijer RI, Barrett EJ (2014). Insulin regulates brain function, but how does it get there? *Diabetes*. **63**, 3992-3997.
- Grizzanti J, Lee HG, Camins A, Pallas M, Casadesus G (2016). The therapeutic potential of metabolic hormones in the treatment of age-related cognitive decline and Alzheimer disease. *Nutrition research (New York, N.Y.)*.
- Holohan B, Kim W, Lai TP, Hoshiyama H, Zhang N, Alazami AM, Wright WE, Meyn MS, Alkuraya FS, Shay JW (2016). Impaired telomere maintenance in Alzami syndrome patients with LARP7 deficiency. *BMC genomics*. **17**, 749.
- Hult S, Soylyu R, Bjorklund T, Belgardt BF, Mauer J, Bruning JC, Kirik D, Petersen A (2011). Mutant huntingtin causes metabolic imbalance by disruption of hypothalamic neurocircuits. *Cell metabolism*. **13**, 428-439.
- Hurlbert MS, Zhou W, Wasmeier C, Kaddis FG, Hutton JC, Freed CR (1999). Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene develop diabetes. *Diabetes*. **48**, 649-651.
- Jiang T, Sun Q, Chen S (2016). Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*. **147**, 1-19.
- Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR (2014). Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*. **63**, 2232-2243.
- Kroner Z (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. **14**, 373-379.
- Lalic NM, Maric J, Svetel M, Jotic A, Stefanova E, Lalic K, Dragasevic N, Milicic T, Lukic L, Kostic VS (2008). Glucose homeostasis in Huntington disease: abnormalities in insulin sensitivity and early-phase insulin secretion. *Archives of neurology*. **65**, 476-480.
- Lardenoije R, Iatrou A, Kenis G, Kompotis K, Steinbusch HW, Mastroeni D, Coleman P, Lemere CA, Hof PR, van den Hove DL, Rutten BP (2015). The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Progress in neurobiology*. **131**, 21-64.
- Li HH, Lin SL, Huang CN, Lu FJ, Chiu PY, Huang WN, Lai TJ, Lin CL (2016). miR-302 Attenuates Amyloid-beta-Induced Neurotoxicity through Activation of Akt Signaling. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. **50**, 1083-1098.
- Li HY, Chen YJ, Chen SJ, Kao CL, Tseng LM, Lo WL, Chang CM, Yang DM, Ku HH, Twu NF, Liao CY, Chiou SH, Chang YL (2010). Induction of insulin-producing cells derived from endometrial mesenchymal stem-like cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **335**, 817-829.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. **113**, 631-642.
- Schuh AF, Rieder CM, Rizzi L, Chaves M, Roriz-Cruz M (2011). Mechanisms of brain aging regulation by insulin: implications for neurodegeneration in late-onset Alzheimer's disease. *ISRN neurology*. **2011**, 306905.
- Silva J, Chambers I, Pollard S, Smith A (2006). Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*. **441**, 997-1001.
- Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*. **138**,

Zhou C, Gu H, Fan R, Wang B, Lou J (2015). MicroRNA 302/367 Cluster Effectively Facilitates Direct Reprogramming from Human Fibroblasts into Functional Neurons. *Stem cells and development*. **24**, 2746-2755.

## 附錄

誠摯的感謝科技部支持本研究的進行，並附上與本計畫相關的發表論文。

1. Tikhonova MA, Ho SC, Akopyan AA, Kolosova NC, Weng JC, Meng WY, Lin CL, Amstislavskaya TG. Neuroprotective effects of ceftriaxone treatment on cognitive and neuronal deficits in a rat model of accelerated senescence. *Behav. Brain Res.* **330**:8-16, 2017. (SCI) (IF=2.977, R/C=16/53; 26.9% of BEHAVIORAL SCIENCES)
2. Hsieh MH, Meng WY, Liao WC, Weng JC, Li HH, Su HL, Lin CL\*, Hung CS\*, Ho YJ\*. Ceftriaxone reverses deficits of behavior and neurogenesis in an MPTP-induced rat model of Parkinson's disease dementia. *Brain Res. Bull.* **132**:129-138, 2017. (SCI) (IF=3.370, R/C=110/271; 40.6% of NEUROSCIENCES)
3. Chiu PY, Wang CW, Tsai CT, Li HH, Lin CL, Lai TJ. Depression in dementia with Lewy bodies: A comparison with Alzheimer's disease. *PLoS One.* **12**:e0179399, 2017. (SCI) (IF=2.740, R/C=27/71; 38.0% of MULTIDISCIPLINARY SCIENCES)
4. Kornelius E, Li HH, Peng CH, Hsiao HW, Yang YS, Huang CN, Lin CL\*. Mevastatin promotes neuronal survival against A $\beta$ -induced neurotoxicity through AMPK activation. *Metab. Brain Dis.* **32**:1999-2007, 2017. (SCI) (IF=2.726, R/C=157/271; 57.9% of NEUROSCIENCES)
5. Huang CN, Wang CJ, Lin CL, Lin HT, Peng CH. The nutraceutical benefits of subfractions of *Abelmoschus esculentus* in treating type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* **12**:e0189065, 2017. (SCI) (IF=2.740, R/C=27/71; 38.0% of MULTIDISCIPLINARY SCIENCES)
6. Chang CC, Li HH, Chang YT, Ho YJ, Hsieh JL, Chiu PY, Cheng YS, Lin CL\*, Lai TJ\*. A $\beta$  exacerbates  $\alpha$ -synuclein-induced neurotoxicity through impaired insulin signaling in  $\alpha$ -synuclein-overexpressed human SK-N-MC neuronal cells. *CNS Neurosci. Ther.* **24**:47-57, 2018. (SCI) (IF=4.074, R/C=59/270; 21.9% of PHARMACOLOGY & PHARMACY)
7. Li HH, Lin CL, Huang CN. Neuroprotective effects of statins against amyloid  $\beta$ -induced neurotoxicity. (Invited review) *Neural. Regen. Res.* **13**:198-206, 2018. (SCI) (IF=3.171, R/C=121/271; 44.6% of NEUROSCIENCES)
8. Ho YJ, Weng JC, Lin CL, Shen MS, Li HH, Liao WC, Tsai NM, Hung CS, Lai TJ, Lee YI. Ceftriaxone treatment for neuronal deficits: a histological and MEMRI study in a rat model of dementia with Lewy bodies. *Behav. Neurol.* **2018**:4618716, 2018. (SCI) (IF=2.093, R/C=138/204; 67.6% of CLINICAL NEUROLOGY)
9. Peng CH, Lin HC, Lin CL, Wang CJ, Huang CN. *Abelmoschus esculentus* subfractions improved nephropathy with regulating dipeptidyl peptidase-4 and type 1 glucagon-like peptide receptor in type 2 diabetic rats. *J. Food Drug Anal.* **27**:135-144, 2019. (SCI) (IF=4.727, R/C=13/139; 9.4% of FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)
10. Chang CC, Lin TC, Ho HL, Kuo CY, Li HH, Korolenko TA, Chen WJ, Lai TJ, Ho YJ, Lin CL\*. GLP-1 analogue liraglutide attenuates mutant huntingtin-induced neurotoxicity by restoration of neuronal insulin signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **19**:2505, 2018. (SCI) (IF=4.556, R/C=74/297; 24.9% of BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY)
11. Kornelius E, Li HH, Peng CH, Yang YS, Chen WJ, Chang YZ, Bai YC, Liu S, Huang CN, Lin CL\*. Liraglutide protects against glucolipotoxicity-induced RINm5F  $\beta$ -cell apoptosis through restoration of PDX1 expression. *J. Cell. Mol. Med.* **23**:619-629, 2019. (SCI) (IF=4.486, R/C=35/138; 25.4% of MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL)
12. Cheng YW, Chang CC, Chang TS, Li HH, Hung HC, Liu GY, Lin CL\*. A $\beta$  stimulates microglial activation through antizyme-dependent downregulation of ornithine decarboxylase. *J. Cell. Physiol.* **234**:9733-9745, 2019. (SCI) (IF=5.546, R/C=7/81; 8.6% of PHYSIOLOGY)
13. Tai CH, Bellesi M, Chen AC, Lin CL, Li HH, Lin PJ, Liao WC, Hung CS, Schwarting RK, Ho YJ. A new avenue for treating neuronal diseases: ceftriaxone, an old antibiotic demonstrating behavioral neuronal effects. *Behav. Brain Res.* **364**:149-156, 2019. (SCI) (IF=2.977, R/C=16/53;

26.9% of BEHAVIORAL SCIENCES)

14. Ho YJ, Shen MS, Tai CH, Li HH, Chen JH, Liao WC, Chiu PY, Lee IY, Lin CL\*, Hung CS. Use of ceftriaxone in treating cognitive and neuronal deficits associated with dementia with Lewy bodies. *Front. Neurosci.* **13**:507, 2019. (SCI) (IF=3.707, R/C=96/271; 35.4% of NEUROSCIENCES)
15. Huang CN, Wang CJ, Lin CL, Yen AT, Li HH, Peng CH. Abelmoschus esculentus subfractions attenuate beta amyloid-induced neuron apoptosis by regulating DPP-4 with improving insulin resistance signals. *PLoS One.* **14**:e0217400, 2019. (SCI) (IF=2.740, R/C=27/71; 38.0% of MULTIDISCIPLINARY SCIENCES)
16. Chang CC, Li HH, Tsou SH, Hung HC, Liu GY, Korolenko TA, Lai TJ, Ho YJ, Lin CL\*. The pluripotency factor Nanog protects against neuronal amyloid  $\beta$ -induced toxicity and oxidative stress through insulin sensitivity restoration. *Cells* **9**:1339, 2020. (SCI) (IF=4.366, R/C=70/195; 35.9% of CELL BIOLOGY)
17. Huang CN, Wang CJ, Lin CL, Li HH, Yen AT, Peng CH. Abelmoschus esculentus subfractions attenuate A $\beta$  and tau by regulating DPP-4 and insulin resistance signals. *BMC Complement. Med. Ther.* **20**:370, 2020. (SCI) (IF=2.833, R/C=6/28; 21.4% of INTEGRATIVE & COMPLEMENTARY MEDICINE)

# 科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：108 年 7 月 30 日

計畫編號	MOST 106-2320-B-040-021-MY3		
計畫名稱	探討 miR302 對於 A $\beta$ 所誘發的神經胰島素阻抗及老化訊息相關作用之分子機轉		
出國人員姓名	林志立	服務機構及職稱	中山醫學大學醫學研究所 副教授
會議時間	107 年 7 月 6 日至 107 年 7 月 11 日	會議地點	波蘭科拉克夫
會議名稱	(中文) 第 44 屆歐洲生化年會 (英文) 44th Congress of the Federation of the European Biochemical (FEBS)		
發表題目	(中文)miR-302 透過回復胰島素訊息活性減緩亨丁頓突變蛋白所產生的神經毒性 (英文) miR-302 protects against mutant huntingtin-induced neurotoxicity through restoration of insulin signaling		

## 一、參加會議經過

FEBS (The Federation of European Biochemical Societies) 為歐洲地區歷史悠久的生化學相關定期會議，也是全球最具影響力之一的生化學主要會議，此會議每年舉辦一次，今年選擇在波蘭的古都科拉克夫(Krakow)舉辦。根據大會公告的資料今年有超過 800 篇的海報被發表，2000 位以上註冊的會員參與本次會議。今年的大會主題標語為”From molecules to living systems”，開場演講請來史丹佛大學的 Prof. Andrew Z. Fire，講題是關於細胞內的基因表現與環境變化之間互動的機制，Prof. Fire 以 RNAs 的多



樣性作為起點，說明細胞內的基因是透過多元的 RNAs 表現，幫助細胞面對並適應快速變動的環境。個人的海報論文被大會安排至 7 月 9 號下午於編號 P24-001 的位置展示，並訂於同日 14:45 PM - 16:15 PM 擔任解說與答辯。

## 二、 與會心得

本研討會的會場在 ICE Congress Center 舉行，其位於科拉克夫市區南側緊鄰維斯瓦河畔，有多線公車及電車可快速抵達會場，河岸正對面正是科拉克夫最有名的景點瓦維爾城堡，為一座修建於卡齊米日三世時期的哥德式建築，曾經長時間作為歷代波蘭國王居住地，因此被認為是波蘭的國家重要象徵。會場裡除了一個大型的演講廳 (Auditorium Hall) 外還有 4 個口頭發表場地及兩大區海報發表場地。在每日 Plenary Lecture 大型場地至少有數百個以上的座位容納與會人士，而在其他的 Symposia、Special Lecture、及 Oral presentation 中則每場次平均有約 100-200 人的專家學者參與。今年廠商參與的狀態與往年持平，相比十餘年前來說仍是較為冷清，看來歐洲的經濟復甦速度似乎仍不如想像中的快。比較特別的是，今年在參加會議過程中有幸與波蘭當地的學者 Dr. Bartosz Pomierny 相互結識，Dr. Pomierny 為 Jagiellonian University Medical College 的助理教授，其專長為研究缺血性中風中相關之神經保護機制。Dr. Pomierny 對我們在神經退化過程中 miR-302 所扮演的保護作用的分子機轉十分有興趣，認為在其中風模式過程中或許也扮演著某種程度的角色，他非常有興趣與我們進行研究合作，同時並邀請我至其單位參觀相關設施並與他的同仁進行簡單的交流。談話過程中我才知道 Jagiellonian University 為波蘭首屈一指的研究型大學，尤其是醫學院的學術地位絕對不在首都華沙大學之下，因此十分榮幸能有機會能

近距離觀察到波蘭一流大學的研究設備並與之交流，此行收穫甚為豐碩。由於過程中與幾位研究人員相談甚歡，因此相約下年度一起申請科技部的台波國際合作加值研究計畫，敝人也希望透過這次的交流，能夠讓台灣的研究在國際上的能見度更為顯著，有助於提升本地研究人員(如碩博士生)的研究能量及國際視野。

### 三、 發表論文之摘要

## **miR-302 protects against mutant huntingtin-induced neurotoxicity through restoration of insulin signaling**

C. Lin<sup>I</sup>, H. Ho<sup>I</sup>, H. Li<sup>I</sup>, Y. Bai<sup>I</sup>, C. Kuo<sup>I</sup>, C. Huang<sup>II</sup>

<sup>I</sup>Institute of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan, <sup>II</sup>Division of Endocrinology and Metabolism, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan

Huntington's disease (HD) is autosomal-dominant neurodegenerative disease, resulting in motor, cognitive, psychiatric impairments and eventually death. HD is caused by CAG triplet repeat expansion in the exon 1 coding region of huntingtin (Htt) protein. This mutation encodes the mutant Htt (mHtt) which accumulates within cells as abnormal aggregates or inclusions, thereby causing cellular function impairments that ultimately lead to neuronal death. Interestingly, some epidemiologic studies have revealed that defective insulin signaling may be associated with HD patients. This indicates the blockade of brain insulin signaling may initiate or exacerbate mHTT-induced neurotoxicity. In this study, we used an in vitro HD model to investigate whether the microRNA miR-302 is involved in mHTT-mediated neurotoxicity. Our results demonstrated that mHTT overexpression significantly downregulates miR-302 intracellular expression levels and causes apoptosis. However, restoration of miR-302 markedly upregulates insulin sensitivity and enhances cell viability. In addition, miR-302 also stimulated autophagy through AMPK activation, which attenuates the accumulation of mHTT aggregates within neuronal cells. In conclusion, our results suggested that miR-302 can reduce mHTT-induced neurotoxicity through restoration of insulin signaling. Accordingly, attenuation neurodegeneration by regulating miR-302 may lead to novel diagnostic or therapeutic methods against HD in future.

### 四、 建議

本次會議無論在硬體的設備上及討論的議題方面皆極有水準，與國內大型會議比較起來絲毫不為遜色甚至更有勝過之處，包括：

- (1) 雖然參加人數十分眾多，但報到流程、會場動線、各處標幟等皆十分醒目，報到櫃檯有十數個同時開啟並以英文字母順序排列，註冊等待時間非常短暫。
- (2) 會議場址交通十分便捷，有數十線公車或電車可參與轉運，對於疏散參加會議的龐大群眾非常有助益。
- (3) 大會有提供現場印製海報的服務，只要繳交些許費用便能現場立即印製，對遠

道的參加者尤其友善。

(4) 持會議參加識別證便可無限制搭乘成區內的各種大眾運輸系統，亦是參與會議者另一個實用的福利。

以上各點為我觀察到國內大型研討會相異之處。最後，本人由衷地感謝科技部能補助敝人參加本次論文發表的費用，此行的收穫豐盛，尤其是能與 Jagiellonian University 的同行進行相互交流更是意外的收穫，對個人及學校未來的國際合作及研究視野有極大的影響與助益。

## 五、 攜回資料名稱及內容

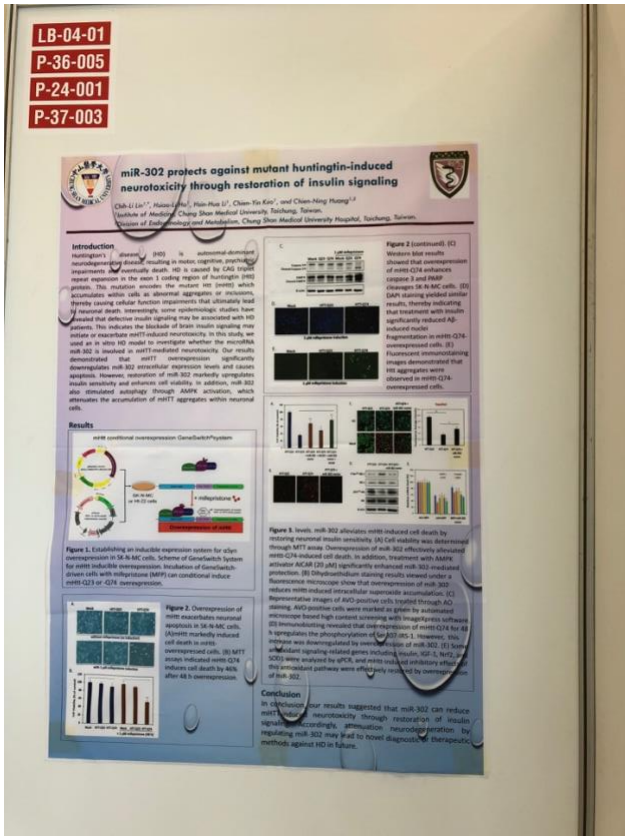
1. 大會會議手冊
2. 儀器商所提供之相關資料
3. 參訪 Jagiellonian University 之相關交換資料

## 六、 其他

參加會議之相關照片：

FEBS 2018 大會入口





個人張貼之海報



與 Dr. Pomierny 在 Jagiellonian University 入口之合照





與 Jagiellonian University 研究人員進行實驗技術交流(動物腦部手術)



與 Dr. Pomierny 就實驗數據進行討論(腦部切片之免疫螢光染色)

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：林志立		計畫編號：106-2320-B-040-021-MY3	
計畫名稱：探討miR302對於A $\beta$ 所誘發的神經胰島素阻抗及老化訊息相關作用之分子機轉			
成果項目		量化	單位 質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)
國內	期刊論文	0	
	學術性論文 研討會論文	10	<p>1. Lai TJ, Hsieh JL, Li HH, Huang WN, Chang CC, Kuo CY, Lin CL. Glucagon-like peptide 1 attenuates dementia with Lewy bodies (DLB) associated neurotoxicity through regulation of insulin resistance. 12th Annual Conference of Taiwanese Society of Geriatric Psychiatry. G15, Taichung, Taiwan, March 2017. (1st class reward)</p> <p>2. Wang TY, Huang WN, Meng C, Li HH, Hsieh CL, Kuo CY, Lin CL. Glucagon-like peptide 1 attenuates apoptotic signaling in amyloid <math>\beta</math>-treated BV2 microglia. 32th Joint Annual Conference of Biomedical Science. BC164, Taipei, Taiwan, March 2017.</p> <p>3. Kuo CY, Li HH, Hsieh CL, Ho SL, Bai YC, Huang CN, Lin CL. An investigation of neuroprotective effects and molecular mechanisms of Piracetam in patients with intracranial hemorrhage. 33th Joint Annual Conference of Biomedical Science. BC065, Taipei, Taiwan, March 2018.</p> <p>4. Cheng TL, Chang YT, Chen YJ, Rao ST, Ho YJ, Lin CL. Repurpose of an antidepressant on rat model of dementia with Lewy bodies. 33th Joint Annual Conference of Biomedical Science. PY083, Taipei, Taiwan, March 2018.</p> <p>5. Lin CL, Li HH, Hsieh JL, Ho HL, Kuo CY, Bai YC, Ho CC, Lai TJ. Insulin signaling may be involved in <math>\alpha</math>-synuclein-induced neurotoxicity. Neuroscience Society of Taiwan 2018 Annual Meeting, Oral 27/Poster 27, Tainan, Taiwan, September 2018.</p> <p>6. Bai YC, Huang CN, Li HH, Ho HL,</p>

				<p>Kuo CY, Lin CL. Mechanisms of glucagon-like peptide-1(GLP-1) signaling protect against lipid accumulation of retinal pigment epithelial (RPE) cells in diabetic retinopathy. 34th Joint Annual Conference of Biomedical Science. BC020, Taipei, Taiwan, March 2019.</p> <p>7.Li HH, Huang CN, Lin CL. miR-302 cluster: implication for age-related diseases. 10th Annual Institutes of Clinical Medicine Joint Research and Teaching Workshop. Invited speaker, Taichung, Taiwan, July 2019.</p> <p>8.Ho HL, Li HH, Lin SL, Lai TJ, Huang CN, Lin CL. The Investigation of glycyglycerin-bound miR-302 attenuates A<math>\beta</math>-induced neurotoxicity through restoration of neuronal insulin signaling and autophagy activity. 10th Annual Institutes of Clinical Medicine Joint Research and Teaching Workshop. C8, Taichung, Taiwan, July 2019.</p> <p>9.Lin CL. Applications of high-content images analysis in glucolipototoxicity models of diabetic research. 2020 High Content Screening User Meeting by Molecular Device, Invited speaker, Taipei, Taiwan, October 2020.</p> <p>10.Lin CL, Lai TJ, Chiu PY, Li HH. Interaction of amyloid <math>\beta</math> (A<math>\beta</math>) and <math>\alpha</math>-synuclein in the brain. Taiwan dementia society 2020 Annual Meeting, Invited speaker, Taoyuan, Taiwan, October 2020.</p>
		專書	0	本
		專書論文	0	章
		技術報告	0	篇
		其他	0	篇
國外	學術性論文	期刊論文	17	篇
				<p>1.Tikhonova MA, Ho SC, Akopyan AA, Kolosova NC, Weng JC, Meng WY, Lin CL, Amstislavskaya TG. Neuroprotective effects of ceftriaxone treatment on cognitive and neuronal deficits in a rat model of accelerated senescence. Behav. Brain Res. 330:8-16, 2017.</p>

				<p>(SCI) (IF=2.977, R/C=16/53; 26.9% of BEHAVIORAL SCIENCES)</p> <p>2. Hsieh MH, Meng WY, Liao WC, Weng JC, Li HH, Su HL, Lin CL*, Hung CS*, Ho YJ*. Ceftriaxone reverses deficits of behavior and neurogenesis in an MPTP-induced rat model of Parkinson's disease dementia. <i>Brain Res. Bull.</i> 132:129-138, 2017. (SCI) (IF=3.370, R/C=110/271; 40.6% of NEUROSCIENCES)</p> <p>3. Chiu PY, Wang CW, Tsai CT, Li HH, Lin CL, Lai TJ. Depression in dementia with Lewy bodies: A comparison with Alzheimer's disease. <i>PLoS One.</i> 12:e0179399, 2017. (SCI) (IF=2.740, R/C=27/71; 38.0% of MULTIDISCIPLINARY SCIENCES)</p> <p>4. Kornelius E, Li HH, Peng CH, Hsiao HW, Yang YS, Huang CN, Lin CL*. Mevastatin promotes neuronal survival against A<math>\beta</math>-induced neurotoxicity through AMPK activation. <i>Metab. Brain Dis.</i> 32:1999-2007, 2017. (SCI) (IF=2.726, R/C=157/271; 57.9% of NEUROSCIENCES)</p> <p>5. Huang CN, Wang CJ, Lin CL, Lin HT, Peng CH. The nutraceutical benefits of subfractions of <i>Abelmoschus esculentus</i> in treating type 2 diabetes mellitus. <i>PLoS One.</i> 12:e0189065, 2017. (SCI) (IF=2.740, R/C=27/71; 38.0% of MULTIDISCIPLINARY SCIENCES)</p> <p>6. Chang CC, Li HH, Chang YT, Ho YJ, Hsieh JL, Chiu PY, Cheng YS, Lin CL*, Lai TJ*. A<math>\beta</math> exacerbates <math>\alpha</math>-synuclein-induced neurotoxicity through impaired insulin signaling in <math>\alpha</math>-synuclein-overexpressed human SK-N-MC neuronal cells. <i>CNS Neurosci. Ther.</i> 24:47-57, 2018. (SCI) (IF=4.074, R/C=59/270; 21.9% of PHARMACOLOGY &amp; PHARMACY)</p> <p>7. Li HH, Lin CL, Huang CN. Neuroprotective effects of statins against amyloid <math>\beta</math>-induced neurotoxicity. (Invited review) <i>Neural. Regen. Res.</i> 13:198-206,</p>
--	--	--	--	--



				<p>2018. (SCI) (IF=3.171, R/C=121/271; 44.6% of NEUROSCIENCES)</p> <p>8. Ho YJ, Weng JC, Lin CL, Shen MS, Li HH, Liao WC, Tsai NM, Hung CS, Lai TJ, Lee YI. Ceftriaxone treatment for neuronal deficits: a histological and MEMRI study in a rat model of dementia with Lewy bodies. <i>Behav. Neurol.</i> 2018:4618716, 2018. (SCI) (IF=2.093, R/C=138/204; 67.6% of CLINICAL NEUROLOGY)</p> <p>9. Peng CH, Lin HC, Lin CL, Wang CJ, Huang CN. Abelmoschus esculentus subfractions improved nephropathy with regulating dipeptidyl peptidase-4 and type 1 glucagon-like peptide receptor in type 2 diabetic rats. <i>J. Food Drug Anal.</i> 27:135-144, 2019. (SCI) (IF=4.727, R/C=13/139; 9.4% of FOOD SCIENCE &amp; TECHNOLOGY)</p> <p>10. Chang CC, Lin TC, Ho HL, Kuo CY, Li HH, Korolenko TA, Chen WJ, Lai TJ, Ho YJ, Lin CL*. GLP-1 analogue liraglutide attenuates mutant huntingtin-induced neurotoxicity by restoration of neuronal insulin signaling. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 19:2505, 2018. (SCI) (IF=4.556, R/C=74/297; 24.9% of BIOCHEMISTRY &amp; MOLECULAR BIOLOGY)</p> <p>11. Kornelius E, Li HH, Peng CH, Yang YS, Chen WJ, Chang YZ, Bai YC, Liu S, Huang CN, Lin CL*. Liraglutide protects against glucolipotoxicity-induced RINm5F <math>\beta</math>-cell apoptosis through restoration of PDX1 expression. <i>J. Cell. Mol. Med.</i> 23:619-629, 2019. (SCI) (IF=4.486, R/C=35/138; 25.4% of MEDICINE, RESEARCH &amp; EXPERIMENTAL)</p> <p>12. Cheng YW, Chang CC, Chang TS, Li HH, Hung HC, Liu GY, Lin CL*. A<math>\beta</math> stimulates microglial activation through antizyme-dependent downregulation of ornithine decarboxylase. <i>J. Cell. Physiol.</i> 234:9733-9745, 2019. (SCI) (IF=5.546, R/C=7/81; 8.6% of PHYSIOLOGY)</p>
--	--	--	--	---

				<p>13. Tai CH, Bellesi M, Chen AC, Lin CL, Li HH, Lin PJ, Liao WC, Hung CS, Schwarting RK, Ho YJ. A new avenue for treating neuronal diseases: ceftriaxone, an old antibiotic demonstrating behavioral neuronal effects. <i>Behav. Brain Res.</i> 364:149–156, 2019. (SCI) (IF=2.977, R/C=16/53; 26.9% of BEHAVIORAL SCIENCES)</p> <p>14. Ho YJ, Shen MS, Tai CH, Li HH, Chen JH, Liao WC, Chiu PY, Lee IY, Lin CL*, Hung CS. Use of ceftriaxone in treating cognitive and neuronal deficits associated with dementia with Lewy bodies. <i>Front. Neurosci.</i> 13:507, 2019. (SCI) (IF=3.707, R/C=96/271; 35.4% of NEUROSCIENCES)</p>
		研討會論文	12	<p>1. Lin CL, Huang CN, Li HH, Liu GY, Hung HC, Lai TJ. Roles of ornithine Decarboxylase (ODC) in regulation of amyloid <math>\beta</math>-induced microglial neuroinflammation. Alzheimer's Association International Conference 2017. P3-05, London, England, July 2017.</p> <p>2. Lin CL, Li HH, Kim HG, Chang CC, Chiu PY, Ho YJ, Lai TJ. Co-expression of Oct4, Sox2, Klf4 and Nanog (KOSN) transcription factors protects against amyloid <math>\beta</math>-induced neurotoxicity by improving insulin signaling sensitivity. Belyaev Conference 2017, Invited speaker, Novosibirsk, Russia, August, 2017.</p> <p>3. Lin CL, Li HH, Huang CN, Yang YS, Kornelius E. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) signaling plays a neuroprotective role against diabetes-related A<math>\beta</math>-induced neurotoxicity via gut-brain axis. 43th FEBS Congress. P09-079-Mon, Prague, Czech, July 2018.</p> <p>4. Spiridonov VK, Tolochko ZS, Lin CL, Korolenko TA. The therapeutic effects of evodiamine in fructose-induced metabolic syndrome in rats. 23rd World Congress on Heart Disease. P505, Boston, USA, July 2018.</p> <p>5. Lai TJ, Hsieh JL, Li HH, Chang</p>

				<p>YT, Lin CL. Improved insulin signaling displays neuroprotective effects against <math>A\beta</math>-mediated <math>\alpha</math>-synuclein neurotoxicity. 33rd International Conference of Alzheimer's Disease International (ADI). P17-002, Chicago, USA, July 2018.</p> <p>6. Lin CL. miR-302 improves cognitive impairment induced by beta-amyloid in rats. 2018 Asia-Pacific International Geriatric Conference (APIGC), Invited speaker, Seoul, South Korea, November, 2018.</p> <p>7. Huang CN, Li HH, Kornelius E, Yang YS, Ho HL, Bai YC, Kuo CY, Peng CH, Lin CL. miR-302 protects against glucolipotoxicity-induced <math>\beta</math>-cell dysfunction and apoptosis through the regulation of MST1 and PDX1. 79th Scientific sessions of American Diabetes Association. 2500-PUB, San Francisco, USA, June 2019.</p> <p>8. Lin CL, Ho HL, Li HH, Kuo CY, Huang CN. miR-302 protects against mutant huntingtin-induced neurotoxicity through restoration of insulin signaling. 44th FEBS Congress. P24-001, Krakow, Poland, July 2019.</p> <p>9. Lai TJ, Li HH, Chang CC, Chiu PY, Lin CL. Neuronal insulin signaling protects against <math>A\beta</math> and <math>\alpha</math>-synuclein-induced neurotoxicity and behavioral deficits in dementia with Lewy bodies. 2019 IPA/SEPG Joint International Congress, Santiago de Compostela, Spain, August 2019.</p> <p>10. Lin CL. Investigating protein aggregation and associated cellular toxicity in neurodegenerative disease models by Nano high-content imaging system. 2019 High Content Screening User Meeting by Molecular Device, Invited speaker, Beijing, PR China, October, 2019.</p> <p>11. Huang CN, Li HH, Peng CH, Kornelius E, Yang YS, Lin CL. Induction of Sirt1-AMPK pathway by</p>
--	--	--	--	--

					GLP-1RA Liraglutide reduces hepatic lipid accumulation and insulin resistance. 80th Scientific sessions of American Diabetes Association. 1751-P, Chicago, USA, June 2020. (Virtual conference due to COVID-19) 12. Lin CL, Huang CN, Li HH, Chang CC, Ho YJ, Chiu PY. Stimulation of GLP-1 signaling enhances protein clearance and reduces A $\beta$ -mediated toxicity in neuronal cells. Alzheimer's Association International Conference 2020. P3-06, Amsterdam, Netherlands, July 2020. (Virtual conference due to COVID-19)
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
參與計畫人力	本國籍	大專生	2	人次	楊聿荃、李祐維
		碩士生	4		何筱莉碩士生、李靜茹碩士生、劉翔婷碩士生、陳盈汝碩士生
		博士生	4		王威傑博士生、林聖傑博士生、郭千尹博士生、白宜巧博士生
		博士級研究人員	3		李欣樺研究員、鄒欣樺博士後研究員、張清基醫師
		專任人員	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)			本計畫結果產生一個國內專利，其研究結果並獲得國內外邀請發表多次會議演講。		