

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 紅血球生成素對路易氏體失智症大鼠黑質體之細胞凋 *
* 名稱 : 亡的影響 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳毓勵
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-066-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05月17日

科技部補助
大專學生研究計畫研究成
果報告

* 計畫 *
* : 紅血球生成素對路易氏體失智症大鼠海馬迴細胞凋亡之影響 *
* 名稱 *

執行計畫學生： 陳毓勳

學生計畫編號： 104-2815-C-040-066-H

研究期間： 104年7月1日至 105年2月底止，計8個

指導教授： 何應瑞

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學

中華民國 105 年 05 月 03 日

摘要

路易氏體失智症(dementia with Lewy bodies, DLB)為僅次於阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, AD)最常見的退化型失智症，患者會出現運動功能障礙及認知功能下降等症狀。另有文獻指出 EPX(因智慧財產考量，將關鍵詞以代碼表示)除了可以治療腎臟性貧血外，也可以透過抗氧化和神經保護之效果以改善帕金森氏症等神經退化性疾病。本研究團隊在先前建立的 DLB 大鼠疾病模型上發現 EPX 可以改善認知功能缺陷。由於海馬迴在認知功能扮演著重要角色，因此本實驗之目的在於探討 EPX 對 DLB 大鼠海馬迴細胞凋亡現象之影響。為達到本研究之目的，本實驗以 TUNEL 試劑分別測定控制組(sham+saline)、疾病組(α -synuclein+A β +saline)及治療組(α -synuclein+A β +EPX)之海馬迴齒狀回區域的細胞凋亡現象。根據結果顯示，DLB 大鼠海馬迴之細胞凋亡程度明顯高於正常組；經 EPX 治療之 DLB 大鼠，其海馬迴之細胞凋亡現象有改善之趨勢。綜合上述結果，EPX 對於 DLB 大鼠海馬迴細胞凋亡現象之影響值得更進一步探討。

介紹

本計畫最初之目的在於探討 EPX(因智慧財產考量，將關鍵詞以代碼表示)是否改變路易氏體型失智症(dementia with Lewy bodies, DLB)

大鼠疾病模型黑質緻密部之 bcl-2、bcl-xl 表現量。有鑑於先前本研究團隊所建立的 DLB 大鼠疾病模型行為數據顯示：加重疾病組表現之運動功能，其組內差異大，導致數據結果無法有力支持此疾病模型出現運動功能障礙。反之，分別在物件辨識能力試驗及開放空間試驗結果呈現：該組大鼠有認知功能障礙及適應困難現象，並且經 EPX 治療後獲得改善，此點更是值得探討之處。根據文獻指出，海馬迴對於認知功能及適應能力扮演重要角色。後續與指導教授討論後決議，將本計畫研究方向轉移至探討 DLB 大鼠疾病模型之海馬迴細胞凋亡現象。

路易氏體型失智症(dementia with Lewy bodies, DLB)患者人數約佔各類型神經退化性失智症患者人數之 15-25%，是僅次於阿茲海默氏症最常見的退化型失智症之一，其患者會出現認知能力下降的現象，且在行動上會出現緩慢、顫抖、僵硬等類似帕金森氏症的運動功能缺陷。路易氏體沉積是此疾病的主要病理特徵，路易氏體的主要成分是 α -synuclein 與 β 類澱粉蛋白 (amyloid β protein, A β) 的不正常折疊沈積所致。路易氏體可能進一步造成氧化壓力及干擾自噬作用等清除機制，因此產生神經毒性。

EPX 是一種由腎臟皮質的間質細胞所製造的醣蛋白(glycoprotein) 賀爾蒙，為骨髓內紅血球生成之前驅因子，主要具有促進紅血球的分

化、成熟以及合成血色素的作用；亦能促進血管及平滑肌增生、傷口癒合，更具有神經保護之效果。研究發現除了腎臟外，腦部微血管也具有 EPX 之受體，可將 EPX 送至中樞神經系統，達到神經保護的功効。許多文獻更指出 EPX 對於許多神經退化疾病的大鼠模型(包括 AD 及 PD)相當具有治療的前瞻性。

本研究團隊在先前建立之 DLB 疾病模型的物件辨識能力試驗中，發現加重疾病組(α -synuclein+A β +saline)之大鼠無法區分新舊物件，出現物件辨識能力缺陷(見圖 1)。

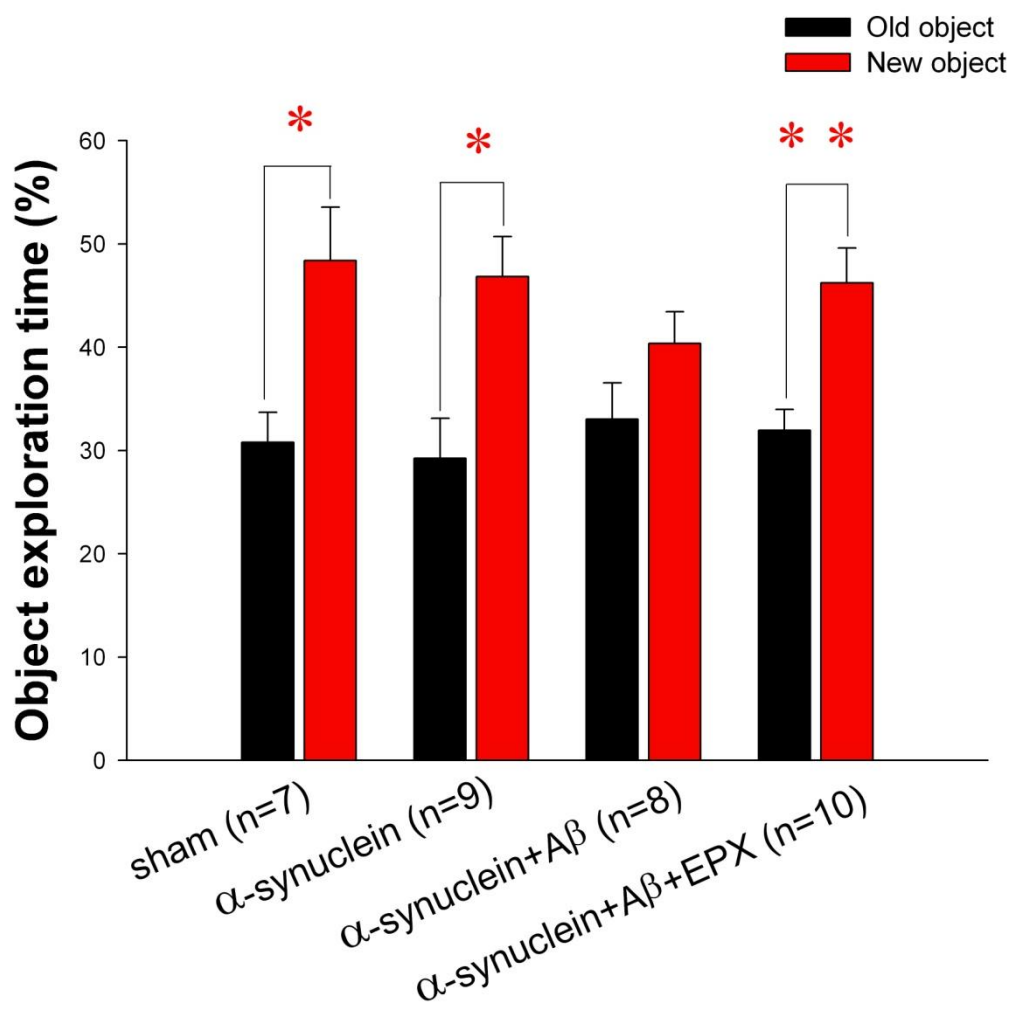


圖 1、DLB 大鼠疾病模型之物件辨識能力試驗的結果。

實驗材料及方法

實驗動物

本實驗使用 12 周齡的雄性 Wistar 大鼠(購自樂斯科公司)為實驗動物。

將大鼠分為三組：

1. sham+saline (n=6) (控制組)
2. α -synuclein+A β +saline (n=6) (疾病組)
3. α -synuclein+A β +EPX (n=7) (治療組)

運用腦部立體定位手術(on day 0)將 α -synuclein 的基因載體(10 μ g/10 μ l/rat, i.c.v.) 和 A β (10 μ g/5 μ l/rat) 分別注入到大鼠的腦室和雙側大腦皮質，使腦內產生自發性的路易氏體堆積，以建立路易氏體型失智症大鼠的疾病模式。立體定位手術隔天，我們以腹腔注射的方式每天投予 EPX (250 IU/kg/day) 治療，共 36 天(day 1~ day 36)。

冷凍組織切片

本校貴儀中心之冷凍切片機(型號為 LEICA CM3050 S)進行腦組織切片。以 25 微米的厚度進行冠狀切片，並取鼠腦之海馬迴區域進行後續細胞凋亡檢測。

細胞凋亡檢測試劑

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)
(購自 Roche 公司)。

操作步驟如下：

1. Wash: PBS, 5 min X3
2. Blocking: 3% H₂O₂ in methanol, 30 min, RT
3. Wash: PBS, 5 min
4. Permeabilisation: 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate, 2 min, on ice
5. Wash: PBS, 5 min X2
6. Reaction: 50 µl TUNEL reaction mixture, 1 h, 37 °C
7. Wash: PBS, 5 min X3
8. 50 µl Converter-POD, 30 min, 37 °C
9. Wash: PBS, 5 min X5
10. DAB Substrate, 10 min, RT
11. Wash: PBS, 5 min X3
12. Counterstain: Hematoxylin, 10 sec

資料分析

為測量 EPX 是否能改善 DLB 大鼠之海馬迴凋亡現象，本實驗選擇以“凋亡細胞/所有錐狀細胞”之百分比作為凋亡程度的參考指標。其中，以立體定量的方式計算凋亡細胞所佔之百分比，定量方式如下：

估計所取海馬迴之厚度為 3(腦切片)*12(玻片數)*25(厚度)=900 μm ，隨後在將第 1、7 玻片計算出齒狀回區域凋亡細胞所佔百分比數值除以 2 作為此大鼠的海馬迴齒狀回凋亡細胞百分比。

以 One-way analysis of variance (ANOVA) 進行統計分析；以 least significance difference test (LSD) 進行事後比較。所有數據皆以 mean \pm SEM 呈現，顯著差異之定義為 $p < 0.05$ 。

結果

經過 One-way ANOVA 進行統計，並以 LSD 做為判斷差異的檢定方法之結果，顯示疾病組(n=4；圖 2B)與治療組(n=6；圖 2C)大鼠之海馬迴齒狀回細胞凋亡程度高於正常組(n=6；圖 2A)之大鼠。治療組與疾病組大鼠之海馬迴齒狀回細胞凋亡程度沒有差異(圖 2C 與 2A 比較；2E)。

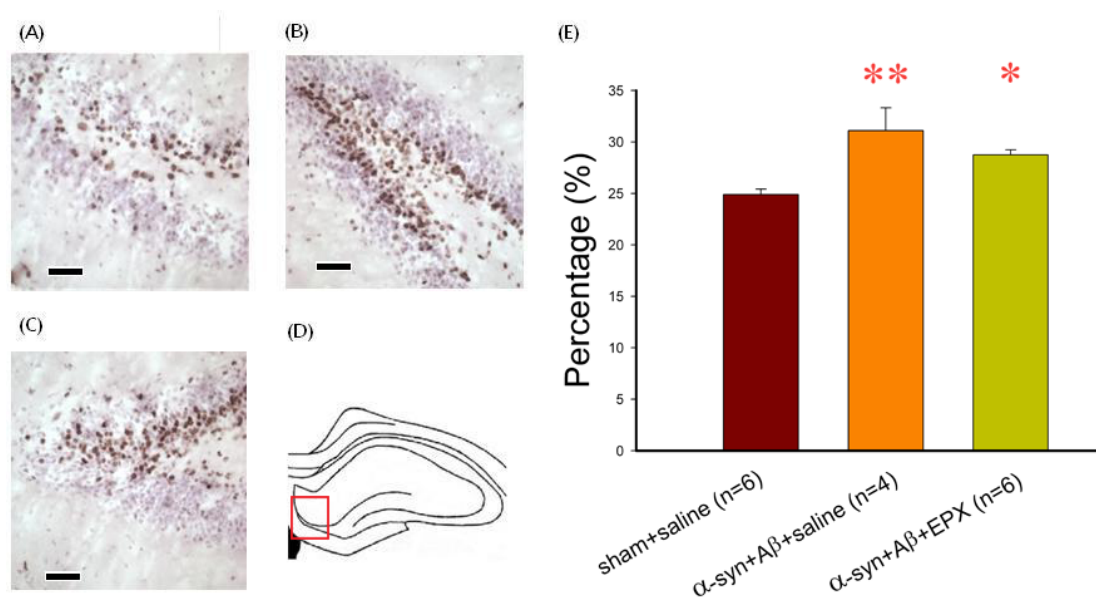


圖 2、EPX 對 DLB 大鼠海馬迴齒狀回區域細胞凋亡之影響

(A-C)分別為 400 倍放大視野下，控制組，疾病組及治療組，以 TUNEL 試劑染大鼠之海馬迴齒狀回細胞凋亡現象；黑色尺標為 50 μm 之比例尺。(D)為齒狀回在海馬迴中之相對位置。(E)各組齒狀回凋亡細胞佔所有細胞百分比之量化圖(* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 與控制組比較)

討論

本實驗目的在於探討 EPX 是否改善 DLB 大鼠海馬迴之細胞凋亡現象，因此首要要件為確認 DLB 大鼠海馬迴確實有出現細胞凋亡現象。由圖 2E 即可發現疾病組大鼠海馬迴細胞凋亡程度明顯高於正常組，顯示 DLB 大鼠之認知功能缺陷可能與海馬迴受損有關。此外，經 EPX 治療之大鼠雖改善臨床上之認知功能，但其海馬迴細胞凋亡程度與疾病組並無顯著差異，其中可能原因有二：1. 本實驗之樣本數略顯不足，以致無法有效呈現實際改善凋亡現象之徵狀。2. 在先前之實驗結果 EPX 改善 DLB 大鼠之認知功能缺陷可能不是透過抑制海馬迴細胞凋亡現象，其中詳細機制值得更進一步探討。

結論

綜合上述結果與討論，實驗所建立之 DLB 大鼠海馬迴齒狀回區域有細胞凋亡現象。此外，經 EPX 治療後之 DLB 大鼠，其海馬迴齒狀回區域凋亡細胞雖未達顯著但有下降之趨勢，顯示 EPX 具有治療

DLB 的潛力，在未來實驗值得透過增加樣本數更進一步探討 EPX 對於 DLB 大鼠海馬迴之影響。