

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 探討 clenbuterol 對 DM1 疾病模式肌肉細胞異常的回復 *
* 名稱 : 作用 *
* ***** *

執行計畫學生： 吳佩蓁

學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-023-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： 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

106 年 03 月 31 日

摘要

第一型強直型肌肉萎縮症(Myotonic dystrophy type 1,DM1)是一種多系統性的遺傳疾病，在染色體 19q13.3 上的 dystrophia myotonica protein kinase (DMPK) 基因轉錄之 mRNA 3'UTR 上有 CUG 重複序列擴增，而 muscleblind (MBNL)會和 CUG 重複序列在細胞核內結合堆積形成 foci，使 MBNL 無法進行原本 pre-mRNA alternative splicing 的功能，導致下游基因剪輯異常而造成 DM 疾病症狀。而 DM1 疾病至今並無有效針對肌肉萎縮及肌肉無力的用藥。於本計畫中，我們證實 β 腎上腺素受體 agonist--clenbuterol 能經由 Akt/mTOR pathway，並能回復 DM1 所造成之肌肉異常。利用實驗室已建立兩種 DM1 之模式，分別在肌纖維母細胞 C2C12 與斑馬魚中表達擴增的 CUG 重複序列。C2C12-CUG200 細胞無法誘導分化形成 myotube。我們發現將細胞處理 clenbuterol 後，細胞即可在誘導分化後形成明顯的 myotube，而 pAk、pmTOR、myoD 蛋白表現量也增高，意指細胞透過 Akt/mTOR pathway 回復分化能力。此外，DM 斑馬魚模式中發現 CUG 重複序列可造成斑馬魚的肌肉結構的鬆散與游動行為下降。製作斑馬魚肌肉切片，H & E 染色結果發現 clenbuterol 可使肌肉組織變得緻密且緊實；行為分析軟體也顯示，clenbuterol 在斑馬魚模式上可有效提升行為能力。綜合以上結果，我們認為 clenbuterol 對於 DM1 症狀之改善為具有潛力的藥物。

序論

第一型強直肌肉萎縮症(DM1)是成人肌肉營養不良最常見的種類之一，其致病基因是由於染色體 19q13.3. DMPK 基因 3'UTR 上有 CTG 重複序列擴增，轉錄出帶有 CUG 重複序列的 RNA 在核內堆積並影響主要兩種 RNA binding proteins: muscleblind-like 1 (MBNL1) 及 CUG repeat binding protein 1 (CUGBP1)。DM2 則是 3q 上的 zinc finger9(ZNF9) gene 的第一個 intron 有 CCTG 四連核酸重複序列擴增所導致。兩者皆為體染色體顯性遺傳疾病且有多系統病徵，如白

內障、肌肉病變、心臟疾病。在 DM1 病人細胞中，MBNL1 與 CUG 重複序列結合形成 foci，使其 loss of function；CUGBP1 則會過度磷酸化，使其蛋白穩定性增加。兩者調節的失常造成下游 pre-mRNAs 剪接異常，包含 chloride channel (CLCN)、insulin 66 receptor (INSR)、cardiac troponin T (TNNT2)、sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1 (SERCA1)。研究顯示，CUG 擴增的長度直接影響疾病之嚴重程度。

肌肉萎縮為 DM1 的病徵之一。在肌肉萎縮時，蛋白質分解系統的活化造成收縮性蛋白及胞器的移除造成肌肉纖維縮小，最終萎縮，甚至細胞死亡。autophagic/lysosomal pathway 是調控骨骼肌蛋白質分解重要路徑。在肌肉萎縮中能發現 autophagy 路徑的活化。研究指出，autophagy 相關基因如 LC3，會結合在 autophagosome 的膜上幫助其形成，knockdown LC3 能減少肌肉的萎縮[1]。在 DM1 中，自噬作用與細胞凋亡的 marker (LC3、P62, Caspase3) 皆有較高的表現量[2, 3]。

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mTOR signaling pathway 在轉譯蛋白質、細胞生長代謝及存活都扮演重要角色。Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 結合在其接受器 receptor tyrosine kinases (RTKs) 上時，RTKs 會自我磷酸化並 recruit PI3K 及其他催化次單元以形成活化態的 PI3K complex。PI3K 複合體可磷酸化 PIP2，將之轉變為 PIP3。最後，PIP3 recruit Akt，幫助 Akt 完全活化，以進行下游反應，如 mTOR、Bad、caspase-9[4]。mTOR 可形成兩種複合體，分別為 mTOR Complexes 1 and 2 (mTORC1/2)，其中 mTORC1 主要調控蛋白質轉譯[5]。Akt 活化 mTORC1 的機制主要有三種：磷酸化 mTOR Ser-2448、抑制 mTORC1 activator 的 inhibitors、使 PRAS40 失活以減少其對 mTORC1 的抑制[6]。許多文獻指出，肌肉生長、蛋白質合成都涉及 PI3K/Akt/mTOR 途徑。如 Musaro et al.、Schulze et al. 指出 IGF1 overexpression 可促進肌肉 hypertrophy、減少肌肉老化所致的萎縮並增加肌肉再生及維持的能力[7]。Lai et al. 研究顯示 Akt knockout mice 有肌肉萎縮的現象；如持續活化則可抑制肌肉萎縮引發肌肉生長[8]。Bentzinger et

al.指出 Knockout mTORC1 則有肌肉營養不良的現象[9]。

Clenbuterol 是一種 β_2 adrenergic agonists，主要用於治療氣喘，可刺激蛋白質生成並抑制蛋白質分解而引發骨骼肌肥大並抑制肌肉萎縮(Dodd and Koesterer, 2002; Hinkle et al., 2002; Pellegrino et al., 2004)。文獻指出，活化 β 腎上腺素受體的物質可引發肌肉成長，能減少由老化、去神經、惡質病、DEX 治療等所引發的肌肉萎縮 [10-13]。而在處理 clenbuterol 的細胞當中，pAkt 及下游的表現量明顯上升[14-16]。PI3K / Akt / mTOR 途徑，在病理及生理上扮演重要的角色，如細胞增生、血管新生、代謝及分化。許多文獻指出，Akt / mTOR 對蛋白質合成有促進作用，Akt 促進 mTOR 磷酸化，pmTOR 活化其下游 p70S6K 進而促進蛋白質合成。在肌肉方面，促進蛋白質合成可引發肌肉纖維 hypertrophy；在肌肉萎縮也可發現 Akt/mTOR downregulation。持續活化 Akt 也可抑制肌肉萎縮[17]。在骨骼肌處理 clenbuterol 時，磷酸化的 Akt、S6 kinase 1 有較高表現量；意指肌肉生長可能是藉由啟動 PI3K/Akt/mTOR 路徑[16]。

斑馬魚研究興起，由於其飼養方便、操作簡單、胚胎呈現透明利於觀察，且跟人類都屬於脊椎動物，比線蟲和果蠅較為高等，尤其斑馬魚子代數目遠多於小鼠，有利於做大量且快速的藥物篩檢。藉由觀察斑馬魚型態上的改變、螢光分析、病理切片等方法，發現含 181 次 CUG 重複序列的魚在胚胎時期就出現了發育遲緩的現象，一個月大的幼魚也出現游動時身體會顫抖、捲曲的發病情形，另外在病理切片中的肌肉束也出現和 DM 病人相同的核內化現象因此。

實驗室已在 C2C12 細胞中表現 CUG200 重複序列擴增的質體，作為 DM 疾病的細胞模式，並以 EGFP-N3 作為控制組。將細胞處理含有 horse serum 的 medium 引誘分化，分化後，CUG 重複序列會抑制 myotube 的形成(Fig.1)。另外，實驗室也建構 DM1 模式斑馬魚，利用一組 mylz2 promoter，在報導基因 EGFP 的 3'UTR 中接上不同長度的 CUG 重複序列 mylz2 promoter，會驅使 EGFP 專一性表達在肌肉組織。在斑馬魚的模式中，CUG 重複序列擴增 181 次，會造成斑馬魚的肌肉結構異常(Fig.2.A)，並且活動能力下降(Fig.2.B)。我將利用實驗室建立

之 DM1 疾病模式斑馬魚，檢測 clenbuterol，是否對於肌肉功能有改善作用。先前實驗室已發現，在 CUG200 分化後第 5 天，Akt、pAkt、mTOR、pmTOR 及 MyoD 的表現量有降低(Fig.3.)。此外，將 CUG200 細胞處理 1 μ M 與 5 μ M clenbuterol，隨著濃度增加 myotube 的形成也增加(Fig.4.)。我們推測在 CUG200 中，clenbuterol 可能藉由活化 Akt/mTOR pathway 促進蛋白生長並形成 myotube。在本研究中我將探討 clenbuterol 對於 DM1 模式異常的回復作用。

材料與方法

1.細胞培養及藥物處理

培養 C2C12 EGFP-N3、C2C12 CUG200 之細胞。培養基為 90%Dulbecco's modifie Eagle's medium (DMEM, GIBCO)、1.5gNaHCO₃、10%Fetal bovine serum (FBS, GIBCO)、4mM L-glutamine(GIBCO)、1mM sodium pyruvate(GIBCO)、1% penicillin-streptomycin；分化用培養基為將 10%FBS 換為 1%horse serum。培養於 5%CO₂、37°C培養箱。

將 3x10⁵ 細胞種入 6 well 中，前處理一天 0、1、5 μ M clenbuterol，於隔天將培養基換為分化用 medium，2~3 天更換一次藥物及分化 medium。在分化第五天以倒立螢光顯微鏡拍照、並收集蛋白進行分析。

2.斑馬魚飼養及加藥

野生型及基轉(CUG0、CUG92、CUG181)斑馬魚，飼養於 28°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。

在胚胎 2 顆細胞的時期，選取完整胚胎，處理 0、1、5 μ M 之 clenbuterol，於第五天將胚胎吸入至 24well，觀測行為。

3.Functional assay (Ethovision)

利用 Ethovision 分析斑馬魚之活動能力，測試程序設定：為時 3 分鐘、tapping

30 秒、振幅為 8。

4. Western blot

將 transfection 後的細胞移除 medium，用 PBS 清洗三次、3 分鐘。加入 RIPA Buffer 80 μ l，放置冰上 10 分鐘，將細胞刮下收至新的離心管。以超音波震碎細胞，離心 12000rpm、4°C 10 分鐘，將上清液移至新的離心管。經由 SDS-PAGE 電泳膠體，將蛋白質轉到 PVDF 膜上，用 7%的脫脂牛奶溶於 TBST 室溫一小時，TTBS 清洗三次、10 分鐘。一抗抗體以 1X casine 稀釋，4°C 隔夜，MyoD 1:1000，MHC 1:2000，actin 1:5000，4°C 處理隔夜。隔日，TTBS 清洗 3 次、10 分鐘。加入二抗抗體，濃度為 1:5000 溶於 1X casine 裡，室溫處理 1 小時後，TTBS 清洗三次、10 分鐘。利用 Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate Kit 呈色，以冷光螢光數位分析系統進行冷光測定。

5. 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(4 μ m)。

切片完後烘片隔夜即可進行 H&E 染色，Xylene、100%EtOH 各浸泡 20 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 20 分鐘，即可封片觀察。

結果

DM1 疾病模式之肌肉異常

在實驗室所建立之 DM1 疾病模式中，實驗室學長姐發現許多因重複序列擴增所引起的肌肉異常現象。首先在 C2C12 細胞株中，處理分化培養基 7 天的 CUG200 細胞並不會像控制組一樣分化並形成 myotube(Fig.1.)。另外在斑馬魚疾病模式中，5 天大之胚胎切顯示，肌肉結構鬆散且有空洞(Fig.2.A)。利用 Ethovision 分析其游動能力也發現 5 天大之胚胎，相較於控制組，游動 3 分鐘內總距離下降亦即行為能力下降(Fig.2.B)。

Clenbuterol 可回復 DM1 細胞之分化能力

Clenbuterol 具有引發骨骼肌肥大的作用；能減少由老化、去神經、惡質病、DEX 治療等所引發的肌肉萎縮[10-13] (Agbenyega and Wareham, 1992; Costelli et al., 1995; Ryall et al., 2004; Zeman et al., 1987)。但 clenbuterol 對於 DM1 疾病所引起的肌肉異常仍舊未知。在此研究我們以 C2C12 肌母細胞為模式及斑馬魚模式探討 clenbuterol 對 DM1 肌肉異常的回復作用，為決定適當藥物使用濃度，起初我們將細胞處理 0、1、5、10、20、30 μM 之 CLENBUTEROL 並加入分化培養基。於 7 天後發現，濃度 1、5、10 的組別相較於濃度 0，生成明顯的 myotube；反觀 20 及 30 μM 則無此現象。因此在接下來的實驗中我選擇 0、1、5、10、20 μM 來做為實驗加藥濃度(Fig.4.)。同時也檢驗肌肉分化所需的轉錄因子 myoD，也發現加藥後 myoD 表現上量上升，顯示確實有肌肉分化的現象(Fig.5.)。

Clenbuterol 可回復 DM1 斑馬魚模式之肌肉異常

接下來我將 DM1 斑馬魚模式處理上述濃度之 clenbuterol，驗證此藥物是否也能在 DM1 之個體上有相同或類似效果。我將孵化兩小時的正常與含有 CUG 重複序列擴增的斑馬魚同時處理不同濃度的 clenbuterol(0、1、5、10 μM)，並於第

五天時利用 EthoVision® XT 測量胚胎於三分鐘內之游動總距離。我發現無論是重複序列 0、92 或 181 次，1、5 μ M 的 clenbuterol 都能讓游度距離有效提升；然而 10 μ M 的效果卻沒有這麼顯著。顯示 clenbuterol 在較低劑量時，便能使斑馬魚的行為能力改善(Fig.6)。

另外，我將重複序列 92 及 181 次的斑馬魚胚胎處理 5 μ M 的藥物 7 天後，製作肌肉切片，並利用 Hematoxylin & Eosin 染色來觀察肌肉結構。可以發現，有處理 clenbuterol 的肌肉束明顯較沒有處理的緻密、空洞較少(Fig.7)。由上述結果得知，在 DM1 模式中，clenbuterol 可有效改善肌肉異常使肌肉較為緊實，進而促進行為能力。

Clenbuterol 可引發 Akt / mTOR pathway

肌肉生長、蛋白質合成都涉及 Akt / mTOR 途徑。Lai et al.研究顯示 Akt knockout mice 有肌肉萎縮的現象；如持續活化則可抑制肌肉萎縮引發肌肉生長[8]。Bentzinger et al.指出 Knockout mTORC1 則有肌肉營養不良的現象[9]。研究也顯示多數 clenbuterol 的效應是透過活化 Akt / mTor 的訊息傳遞路徑[16]。先前實驗室發現將 DM1 細胞模式處理此藥物後，可促進 myotube 生長。同時，在 CUG200 分化後第 5 天，Akt、pAkt、mTOR、pmTOR 及 MyoD 的表現量有降低(Fig.3)。因此我們推測在 CUG200 的細胞中，clenbuterol 可能透過 Akt/ mTOR pathway 使細胞回復分化能力。首先，為了解 CUG200 在處理 clenbuterol 後，細胞中的 Akt 及 mTOR 是否有差異。我利用西方點墨法檢測在不同的 clenbuterol 濃度下(0、1、5、10 μ M)，pAkt、Akt、pmTOR 及 mTOR 的蛋白表現量。結果顯示，相較於控制組，pAkt/Akt 比值在濃度為 1 μ M 時有明顯上升；而 pmTOR / mTOR 比值則在 1 與 5 μ M 有顯著上升(Fig.8)。這顯示了在 DM1 細胞模式中，clenbuterol 可促進 Akt / mTor 的訊息傳遞路徑。

DM1 模式中自噬作用(autophagy)與凋亡作用(apoptosis)

接著我想探討 DM1 肌母細胞的異常狀況是否受到自噬作用(autophagy)與凋亡作用(apoptosis)的影響，並研究 clenbuterol 是否能改善上述作用造成的異常。透過西方點墨法的結果得知，CUG200 的 autophagy marker (LC3AB)表現量相對於控制組 WT 及 N3，數值有明顯提高。可得知自噬作用在 DM1 細胞中造成一定影響。然而加藥後，雖然 LC3AB 表現量普遍下降，但並沒有統計顯著差異，推測 clenbuterol 對於自噬作用的改善程度較小(Fig.9.A)。另外也檢測凋亡作用對 DM1 細胞模式的影響，我發現在 caspase3 在正常細胞和疾病模式細胞中皆無顯著差異(Fig.9.B)。

討論

於此研究中，我們透過 C2C12 細胞及斑馬魚的疾病模式，我們得知 clenbuterol 可活化 Akt / mTor pathway 的來達到 DM1 模式肌肉異常的回復作用(Fig.10)。DM1 疾病除了會引發肌強直外，同時也合併有漸進肌肉無力及萎縮。而目前的 DM1 臨床用藥主要針對肌強直的治療，包含 mexiletine、carbamazepine 等離子通道阻斷劑[18, 19]。但對於肌肉萎縮並無有效治療藥物。我們發現 clenbuterol 能促使含有重複序列的 C2C12 細胞恢復分化能力；也能改善重複序列所造成的斑馬魚行為能力異常。此藥物對於肌肉結構也有影響，在斑馬魚胚胎的肌肉切片中可觀察到處理 clenbuterol 後肌肉結構從鬆散空洞變得較為緻密緊實。

接下來我們探討 clenbuterol 可能引發的下游路徑。許多文獻指出 Akt / mTor 路徑在蛋白質合成的重要性。Akt / mTOR 對蛋白質合成有促進作用，Akt 促進 mTOR 磷酸化，pmTOR 活化其下游 p70S6K 進而促進蛋白質合成。在肌肉方面，促進蛋白質合成可引發肌肉纖維 hypertrophy；在肌肉萎縮也可發現 Akt/mTOR downregulation。持續活化 Akt 也可抑制肌肉萎縮[17]。我們證實了 clenbuterol

確實會活化 Akt / mTor pathway。同時有研究證實，在人類骨骼肌細胞中抑制 Akt / mTor pathway，myotube 之分化和 hypertrophy 也會被抑制[20]。由此可知此條路徑在肌肉分化扮演重要角色。

而肌肉萎縮與自噬作用及凋亡作用的提高有關，而在 DM1 當中也發現參與兩者的蛋白(LC3AB、caspase 3)有較高表現量[2, 3]。因此我們假設 Akt / mTOR 可能透過抑制自噬作用及凋亡作用來減緩蛋白質的分解。我在實驗室的細胞模式中也測試了 LC3AB、caspase 3 兩種蛋白。令人意外的是，根據實驗結果，在含有重複序列的細胞中，LC3AB 表現量明顯提高，證實相對於控制組 CUG200 細胞中有較多的自噬作用產生；但加藥後雖然表現量普遍下降卻沒有統計差異；且在測試 apoptosis pathway 的實驗中發現，正常細胞與重複序列之細胞間 caspase 3 表現量並無明顯差異。甚至在高濃度藥物的處理下，caspase 3 表現量反而上升。可能細胞凋亡作用並不導致 DM1 細胞模式中的異常，然而過高的 clenbuterol 反而引起細胞毒性。因此我們推測 Akt / mTOR 不能影響凋亡及自噬作用來改善 DM1 之肌肉異常，而是透過別種途徑。

70 kDa ribosomal protein S6 kinase(RPS6KB1、P70S6K)是由 mTOR 所調控的下游重要分子之一。P70S6K 是一種 serine/threonine kinase，在細胞週期、成長機存活的控制扮演重要角色 PMC2496917。有文獻指出，活化 P70S6K 可(1)透過 p70S6K-Egr-1-Cdk5 signaling 促進 L6 myoblast 分化 [21]；(2) P70S6K 可磷酸化其下游之 ribosomal protein S6，進而促進蛋白質的製造，在小鼠中此路徑有造成心肌肥大的效果[22]。綜合上述，我推測 clenbuterol 活化 Akt / mTOR pathway 後，可能透過此兩條路徑來達到改善 DM1 肌肉異常現象，而對於自噬及凋亡作用的影響較小。

DM 疾病除了有肌肉萎縮症狀，肌強直也是一個重要病徵。肌強直為肌肉纖維過度興奮造成肌肉不自主收縮的重複性動作電位[23]。引起 DM1 病人的肌強直主要原因為 muscle-specific chloride channel (ClC-1)失去功能；然而也有部分的肌強直是由於 muscle-specific sodium channel (SCN4A)基因突變所引起。最近的

研究顯示，clenbuterol 除了對於蛋白質增生、肌肉成長有效果外；同時也能作為 sodium channel blocker 的作用。大鼠的骨骼肌的鈉離子通道可被 clenbuterol 抑制，藉此降低不正常的動作電位，可能為治療肌強直的另一種選擇[24]。

雖然在我的實驗結果中顯示，clenbuterol 在高劑量時肌肉的異常不會改善，反而會對細胞造成毒性。有研究指出，在小鼠心肌細胞注射高劑量的 clenbuterol (100 μ M)，可抑制鈉離子電流[25]。這些研究顯示 clenbuterol 在肌肉治療方面可能有更多的可能性。

未來展望

在此研究中我們證實 clenbuterol 可活化 Akt / mTOR pathway，並促使含有重複序列擴增之 C2C12 回復分化能力。同時也能改善 DM1 斑馬魚的肌肉結構及行為能力。然而對於 Akt / mTOR 的下游所影響的分子仍然未知，還需要更進一步的測試。於研究中所使用之模式生物為細胞及斑馬魚，接下來希望能將 DM1 小鼠給予藥物，了解 clenbuterol 於哺乳類個體上的是否也能起到回復肌肉功能之作用。除此之外，有研究顯示 clenbuterol 的功能並不局限於蛋白質合成、促進肌肉生成；也有抑制鈉離子的作用，對於肌肉強直有緩解效果。因此對於 DM1 疾病，clenbuterol 可能是未來非常有潛力的藥物

圖表

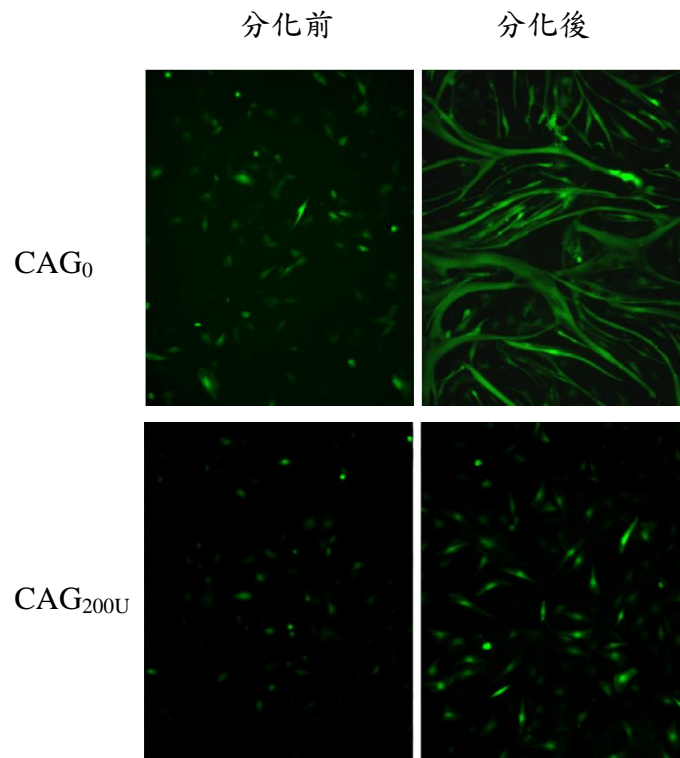


Fig.1. 重複序列對C2C12細胞分化型態的影響

以倒立螢光顯微鏡觀察C2C12在分化growth medium培養(分化前)與在 differentiation medium培養7天(分化後)，細胞型態的比較。在含有重複序列的C2C12細胞中，不會分化並融合形成myotube。(From林炯志)

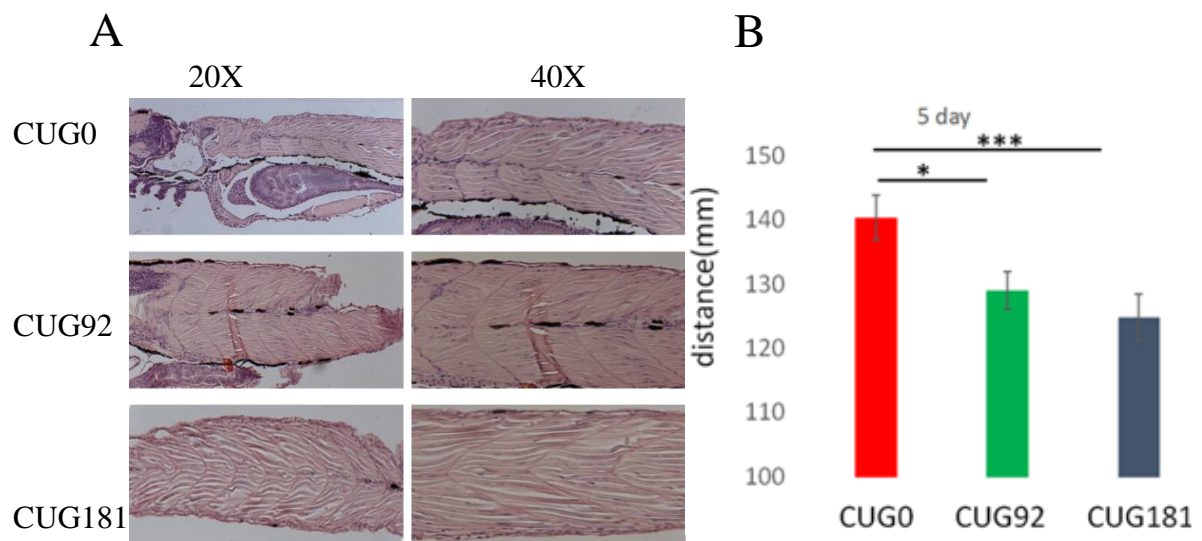


Fig.2. DM1斑馬魚模式之異常現象

(A)在DM1模式斑馬魚第五天切片中可發現，CUG重複次數愈多，肌肉結構愈鬆散。(B)實驗室建立不同CUG重複次數之斑馬魚模式，分為0、92、181次。上右圖表為斑馬魚在5天大時，游動距離之統計，重複次數愈多之斑馬魚游動行為能力愈差。(From陳皓年)

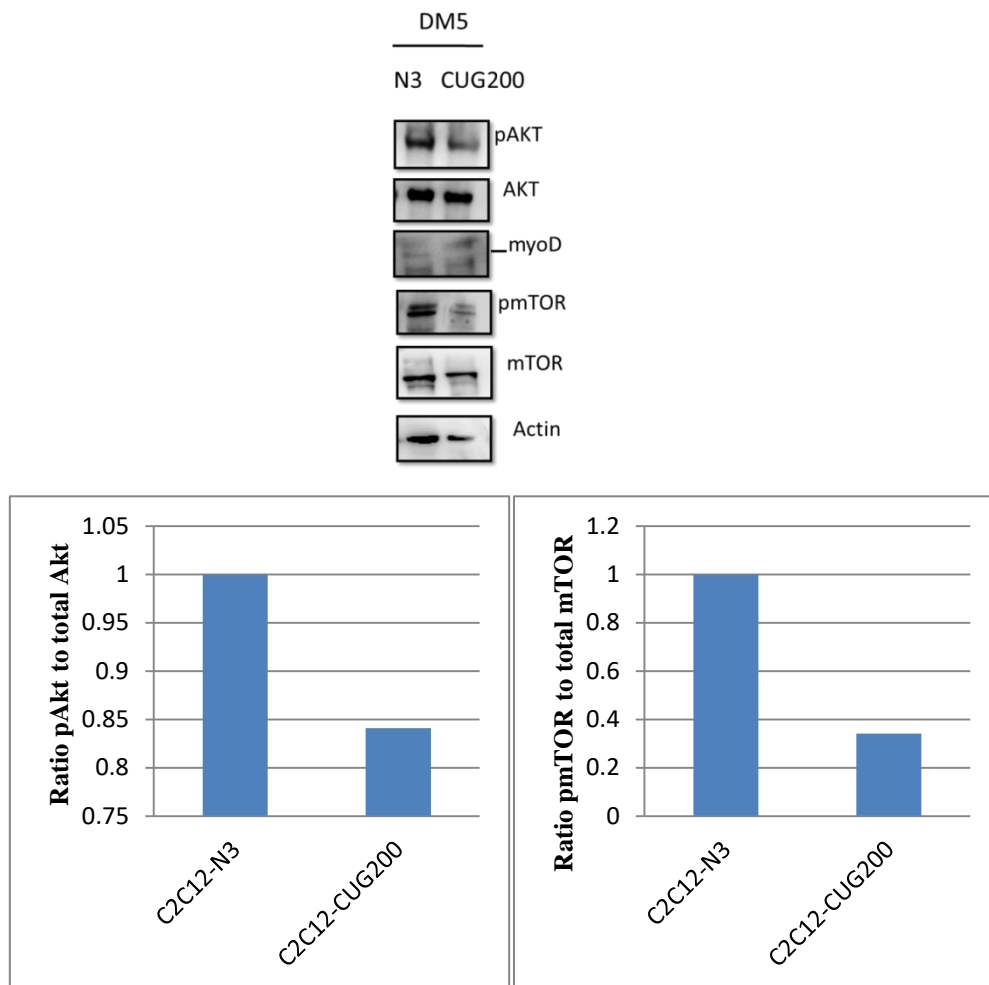


Fig.3. 透過weatern blot檢驗Akt/mTOR在CUG200之表現

N3、CUG200放分化5天後，萃取whole cell protein做weatern blot分析。可發現，表中分化後CUG200的pAkt/Akt、pmTOR/ Akt比值下降，圖中MyoD表現量也降低。Actin為internal control。(From 莊函霓)

Clenbuterol-HCl (μM)

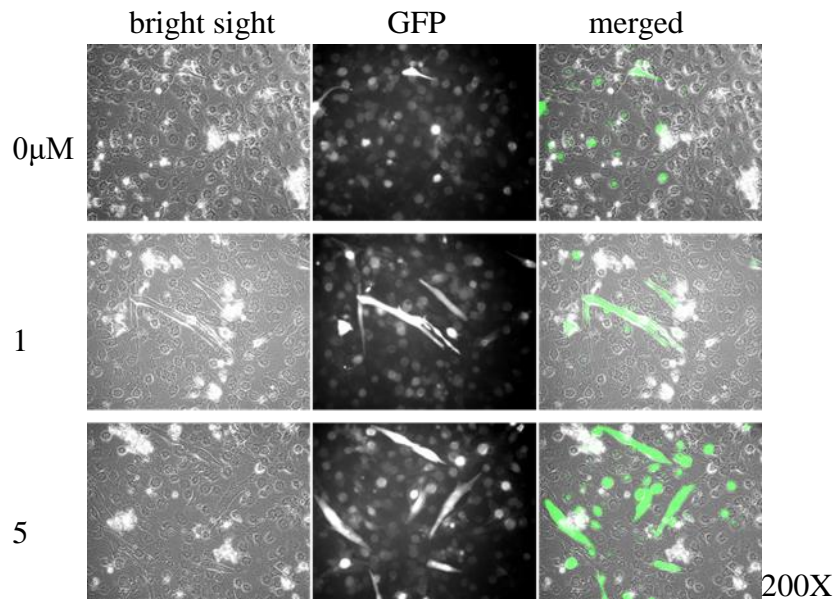


Fig.4. 倒立顯微鏡拍攝處理clenbuterol 之C2C12 CUG200細胞。

C2C12先處理一天的clenbuterol，於第二天加入differentiation medium，在第7天以倒立螢光顯微鏡觀察。可以發現，相較於沒有處理clenbuterol 的細胞，1和5 μM 的瘦肉精使CUG200融合並形成明顯的myotube。

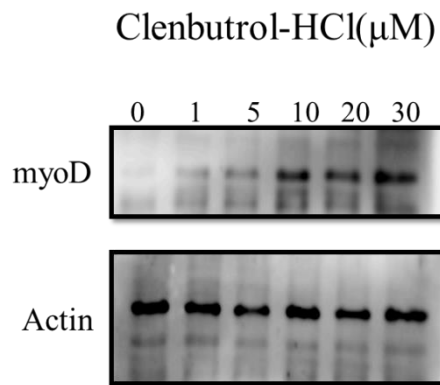


Fig.5. C2C12 CUG200 細胞處理 clenbuterol 後 myoD 蛋白質表現

將細胞種於含一般培養基的 6 孔培養盤中，待細胞達 70%~80% 滿度時，預先處理一天的 clenbuterol(0、1、5、10、20、30 μ M)。於隔天換成含有相同藥物濃度的分化培養基。在 37°C 培養二天後，萃取蛋白。利用 western blot 分析 myoD 表現量。(From 莊函霓)

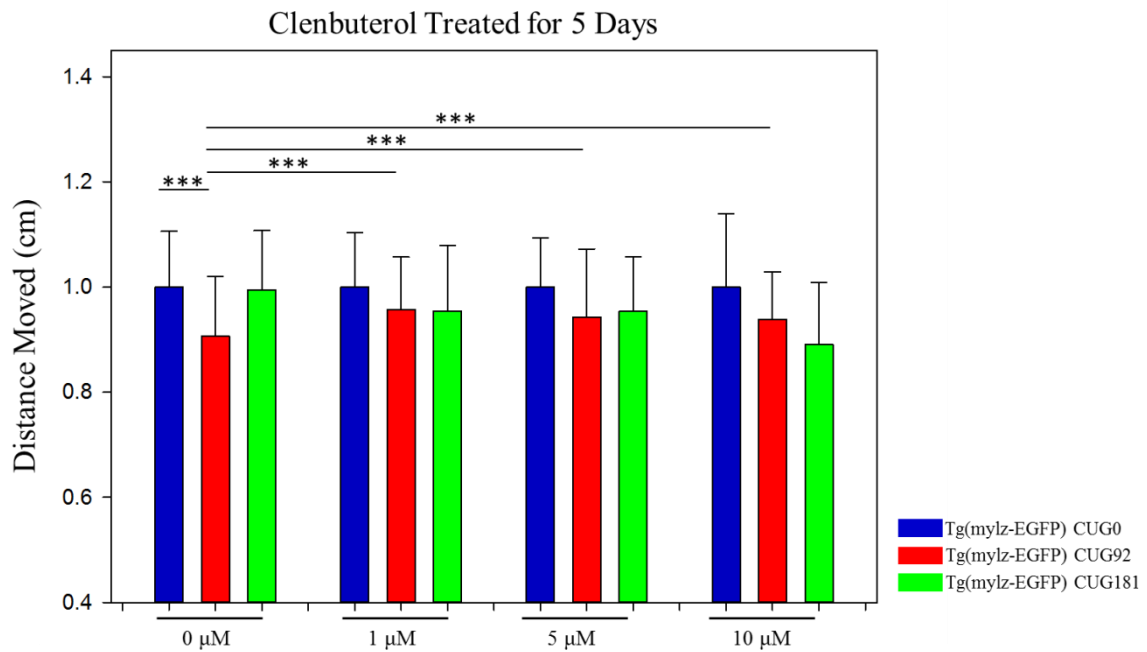


Fig.6. Clenbuterol 對 DM1 動物模式之行為影響

將出生兩小時之斑馬魚胚胎(CUG0、CUG92、CUG181)飼養於含有 clenbuterol(0、1、5、10μM)的 egg water 中，兩天更換一次。五天後利用 Ethovision 分析斑馬魚之活動能力，測試程序設定：為時 3 分鐘、tapping 30 秒、振幅為 8。表為斑馬魚於不同濃度的 clenbuterol 下分成四組，以 CUG0 為 1，CUG92 及 CUG181 的游動情形。之統計結果。以 student t -test 進行統計分析，數據以三重複的平均值±SE 呈現。***p < 0.001 vs.control. **p < 0.01 vs.control.

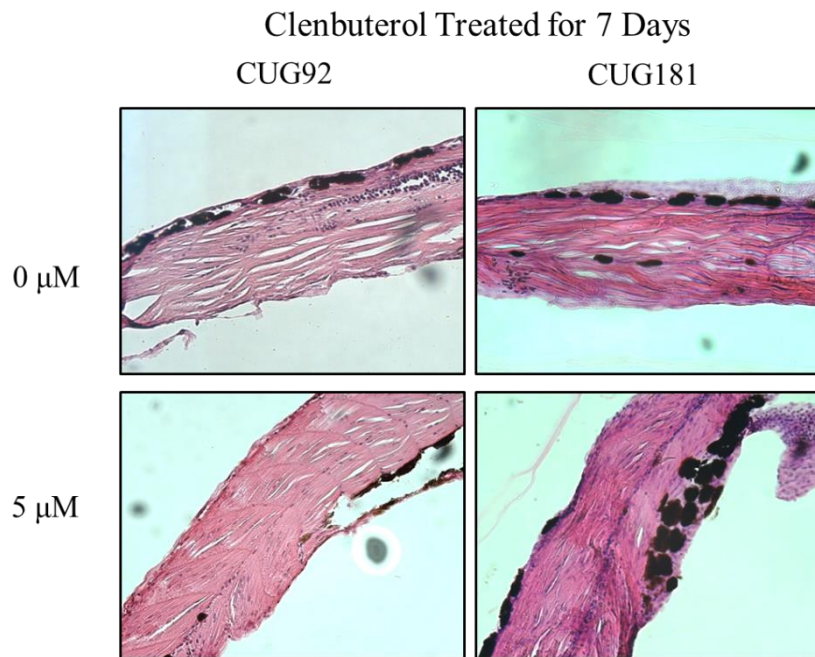


Fig.7. Clenbuterol 對 DM1 動物模式之肌肉結構影響

將出生兩小時之斑馬魚胚胎(CUG0、CUG92、CUG181)飼養於含有 clenbuterol(0、1、5、10 μM)的 egg water 中，兩天更換一次。七天後將胚胎固定並切片(4 μm)，進行 Hematoxylin & Eosin 染色。

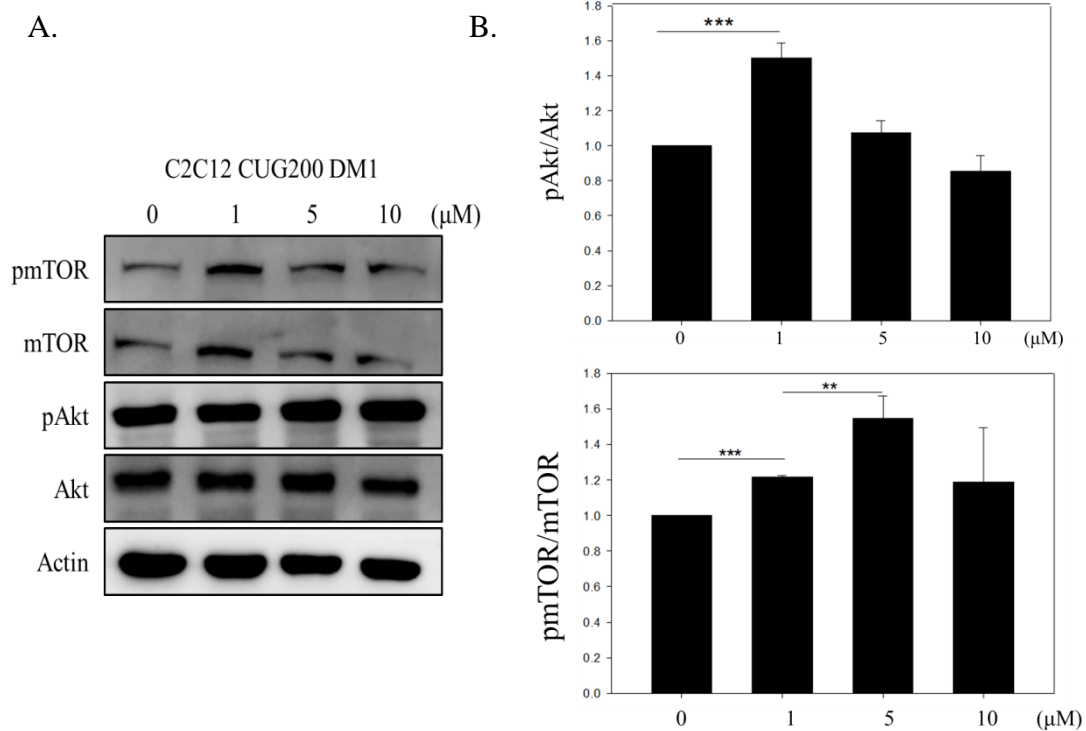


Fig.8. C2C12 CUG200 細胞處理 CLENBUTEROL 後 Akt/mTor 蛋白質表現

將細胞種於含一般培養基的 6 孔培養盤中，待細胞達 70%~80% 滿度時，預先處理一天的 clenbuterol(0、1、5、10 μ M)。於隔天換成含有相同藥物濃度的分化培養基。在 37°C 培養一天後，萃取蛋白。利用 western blot 分析 Akt/mTor 表現量。(A) 為 western blot 膠圖。(B) 長條圖為利用定量軟體定量後，磷酸化與未磷酸化比值的統計分析結果。以 student t-test 進行統計分析，數據以三重複的平均值 \pm SE 呈現。***p < 0.001 vs.control. **p < 0.01 vs. control.

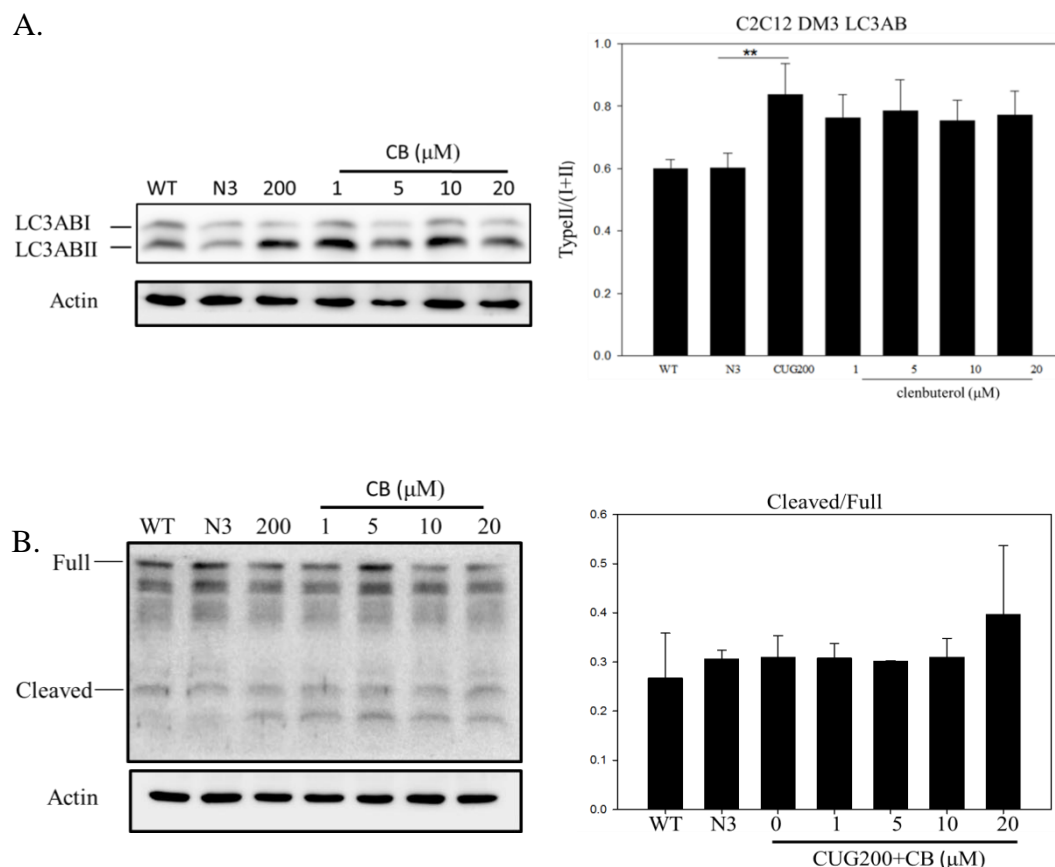


Fig.9. C2C12 細胞處理 clenbuterol 後 LC3AB 及 Caspase3 蛋白質表現

將細胞種於含一般培養基的 6 孔培養盤中，待細胞達 70%~80% 滿度時，預先處理一天的 CLENBUTEROL (0、1、5、10 μ M)。於隔天換成含有相同藥物濃度的分化培養基。在 37 $^{\circ}$ C 培養三天後，萃取蛋白。利用 western blot 分析 LC3AB 及 Caspase3 表現量。(A) 為 LC3AB 之 western blot 膠圖及其定量統計結果。表中數值為 LC3ABII 與 LC3ABI 之比值。(B) 為 Caspase3 之 western blot 膠圖及其定量統計結果。表中數值為 cleaved form 與 full form 之比值。以 student t-test 進行統計分析，數據以三重複的平均值 \pm SE 呈現。

*** $p < 0.001$ vs.control. ** $p < 0.01$ vs.control.

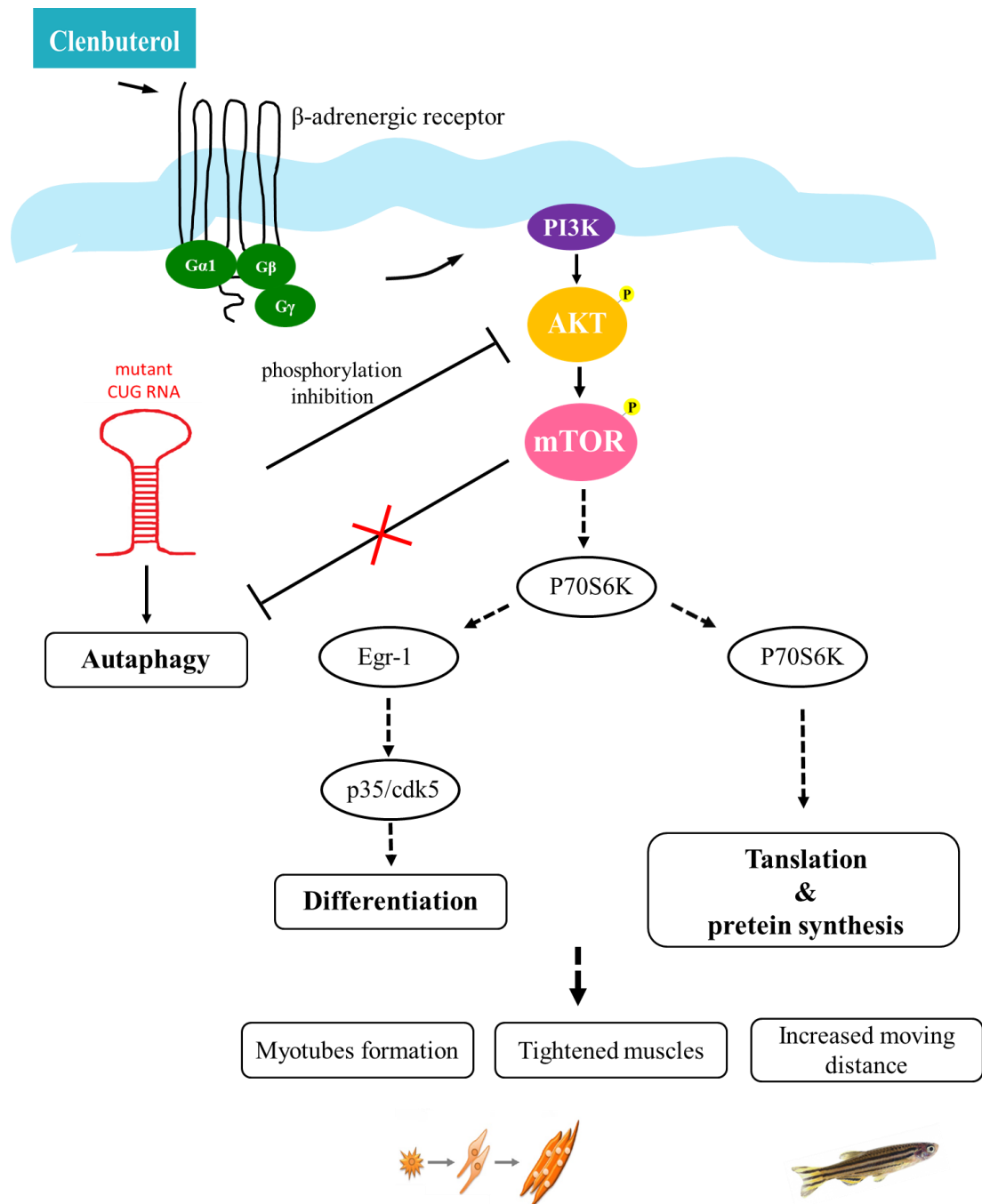


Fig.10. Clenbuterol 透過 Akt/mTOR pathway 回復 DM1 肌肉異常

DM1 根據目前實驗結果，我們發現 CUG 的擴增會造成細胞自噬作用提升，並抑制 Akt 及 mTOR 的磷酸化。而處理 clenbuterol 後能回復磷酸化之 Akt 及 mTOR 表現量；而 DM1 之肌肉異常也有回復現象。另外我們發現 clenbuterol 並不能減低重複序列所引起的自噬現象。其中參與的機制推測可能為活化 P70S6K 及其下游分子，進而促進肌肉的分化及蛋白合成。

參考文獻

1. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 458-71.
2. Bargiela, A., et al., *Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 Drosophila model*. Dis Model Mech, 2015. **8**(7): p. 679-90.
3. Loro, E., et al., *Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells*. Cell Death Differ, 2010. **17**(8): p. 1315-24.
4. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
5. Proud, C.G., *Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery*. Biochem J, 2007. **403**(2): p. 217-34.
6. Kendall, R.T., et al., *Arrestin-dependent angiotensin AT1 receptor signaling regulates Akt and mTor-mediated protein synthesis*. J Biol Chem, 2014. **289**(38): p. 26155-66.
7. Musaro, A., et al., *Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle*. Nat Genet, 2001. **27**(2): p. 195-200.
8. Lai, K.M., et al., *Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9295-304.
9. Bentzinger, C.F., et al., *Differential response of skeletal muscles to mTORC1 signaling during atrophy and hypertrophy*. Skelet Muscle, 2013. **3**(1): p. 6.
10. Costelli, P., et al., *Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p.

2367-72.

11. Agbenyega, E.T. and A.C. Wareham, *Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone*. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 1992. **102**(1): p. 141-5.
12. Zeman, R.J., R. Ludemann, and J.D. Etlinger, *Clenbuterol, a beta 2-agonist, retards atrophy in denervated muscles*. *Am J Physiol*, 1987. **252**(1 Pt 1): p. E152-5.
13. Ryall, J.G., et al., *Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats*. *J Physiol*, 2004. **555**(Pt 1): p. 175-88.
14. Emery, P.W., et al., *Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat*. *Biosci Rep*, 1984. **4**(1): p. 83-91.
15. Yimlamai, T., et al., *2.Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway*. *J Appl Physiol* (1985), 2005. **99**(1): p. 71-80.
16. Kline, W.O., et al., *3.Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol*. *J Appl Physiol* (1985), 2007. **102**(2): p. 740-7.
17. Bodine, S.C., et al., *4.Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(11): p. 1014-9.
18. Logigian, E.L., et al., *Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1*. *Neurology*, 2010. **74**(18): p. 1441-8.
19. Sechi, G.P., et al., *Carbamazepine versus diphenylhydantoin in the treatment of myotonia*. *Eur Neurol*, 1983. **22**(2): p. 113-8.
20. Trendelenburg, A.U., et al., *Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(6): p. C1258-70.

21. Sarker, K.P. and K.Y. Lee, *L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway*. *Oncogene*, 2004. **23**(36): p. 6064-70.
22. Zhang, W., et al., *beta-Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e26581.
23. Lehmann-Horn, F. and K. Jurkat-Rott, *Voltage-gated ion channels and hereditary disease*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1317-72.
24. Desaphy, J.F., et al., *Different ability of clenbuterol and salbutamol to block sodium channels predicts their therapeutic use in muscle excitability disorders*. *Mol Pharmacol*, 2003. **63**(3): p. 659-70.
25. Fischer, W., et al., *Anticonvulsant and sodium channel blocking activity of higher doses of clenbuterol*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2001. **363**(2): p. 182-92.