中華民國第57屆中小學科學展覽會作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

052003

缺氧幹細胞對高血壓心臟保護作用之探討

學校名稱:國立嘉義高級中學

作者: 指導老師:

高二 甘舜安 翁惠珍

高二 盧承偉 賴美杏

關鍵詞:高血壓、心臟肥大、脂肪幹細胞

摘要

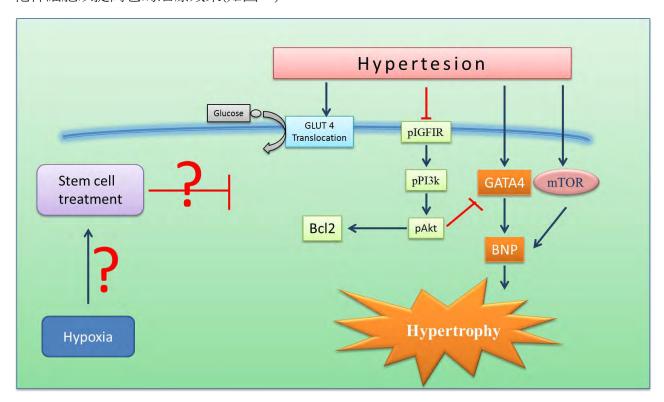
高血壓導致許多併發症,更造成心血管疾病。因此預防和治療高血壓是國際醫療關注的議題。研究指出幹細胞能促進身體機能修復但是治療的分子機轉尚未表明。發現短期缺氧(6 小時)可提高脂肪幹細胞(ADSC)的細胞生存蛋白 p-Akt 和歸巢效應蛋白 CXCR4 表現,接著利用 ADSC 和缺氧預處理的脂肪幹細胞(hADSC)治療原發性高血壓大鼠的心臟,發現 ADSC 和hADSC 能維持心臟功能,降低高血壓造成的心臟肥大蛋白 GATA4、BNP 表現,提高長壽基因訊息路徑來達到心臟保護的效果;更發現幹細胞透過改變心臟能量代謝途徑,降低 GLUT4 對葡萄糖的消耗而提高脂肪利用率來提高心臟細胞的能量獲取,且強化後的 hADSC 保護的效果更好。這些結果證明幹細胞能保護高血壓對心臟的傷害,也證明適當的缺氧能夠強化 ADSC。

壹、研究動機

成人高血壓(定義為收縮壓/舒張壓≥140/90 mmHg)在2014年約佔22%(世界衛生組織,2014年)。如果不加以控制,高血壓會導致中風,心肌梗塞,心臟衰竭,癡呆症,腎功能衰竭和失明,造成病患痛苦甚至死亡(世界衛生組織,2011年,2014年),因此被WHO稱為"沉默的殺手"(世界衛生組織,2011年,2014年)。高血壓也在2014年台灣的主要死因中排名第八,並和十大死因中第二位的心血管疾病息息相關,所以如何有效的預防及治療高血壓是目前急需探討的課題,也是所有專業醫療人員面臨的挑戰(Lin,2016)。

原發性高血壓的慢性病程及其造成的嚴重併發症對於醫療上帶來沉重的負擔,雖然目前臨床上有針對高血壓的藥物可使用但其治療仍無法讓人滿意。有研究指出藥物以外的治療可透過適度的運動來對抗像是糖尿病等慢性病會引發的心臟損害。但是體能訓練對於某些諸如高血壓等慢性病患和高齡老人並不可行。目前極受關注的幹細胞治療方面,科學家已經知道,幹細胞治療似乎可有效提供心臟保護,但過去還沒有研究完整地針對幹細胞對於慢性疾病,例如高血壓性疾病的心臟保護作用。在過去的實驗結果得知,短時間的缺氧狀態,能產生心臟保護的作用,類似於體能訓練對於心臟的保護效果。然而,幹細胞療法對於某些慢性疾病

例如高血壓的作用效果仍然不很清楚。因此,我們的研究希望探討幹細胞治療對於高血壓所 引起之心臟受損的保護效果,釐清其治療的分子機轉是否透過降低心臟肥大,以及提高生存 訊息途徑,或是否有其他途徑受幹細胞調控,此外更希望研究找出是否適度的缺氧是否能強 化幹細胞以提高它的治療效果(如圖一)。



圖一、研究概念圖:高血壓對心肌細胞的已知影響(橘色文字表心肌細胞肥大途徑,綠色文字為心肌細胞生存途徑,黑色箭頭表示促進,紅色 T 字形表示抑制),本研究欲釐清脂肪幹細胞(stem cell)治療的作用機轉與缺氧預處理脂肪幹細胞的成效

貳、研究目的

- 一、 多長時間的缺氧狀態預處理,最有效強化脂肪幹細胞,並釐清強化那些幹細胞的功能。
- 二、比較脂肪幹細胞和缺氧預處理幹細胞對高血壓造成心臟凋亡及長壽基因途徑的探討。
- 三、 比較脂肪幹細胞和缺氧預處理幹細胞對高血壓造成心臟肥大相關能量代謝變化的影響。

叁、研究設備及器材

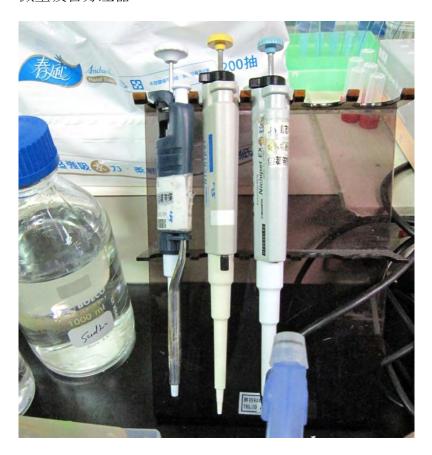
無菌操作台:



無菌培養箱:



微量吸管分注器:



高速離心機:



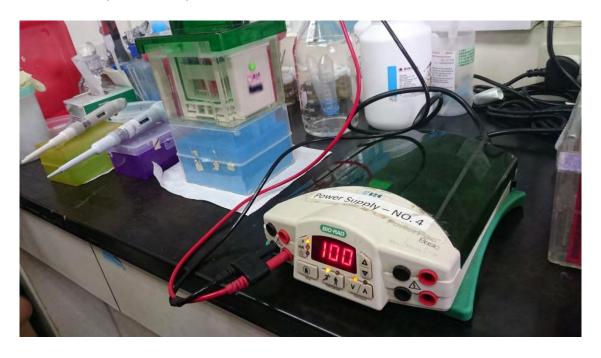
光學顯微鏡:



冷光影像分析儀:

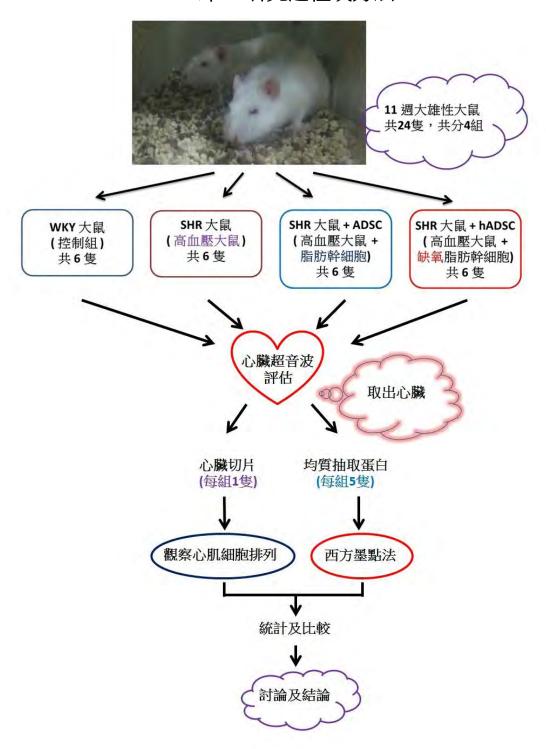


西方墨點法 (Western blot) 分析:電泳



組織均質機、動物手術器械、心臟超音波儀、流式細胞儀、、、等。

肆、研究過程或方法



圖二、研究流程圖:所有實驗步驟均由機構審查委員會(IRB)以及中華民國中國醫藥大學動物照護和使用委員會進行審查和批准,並且遵照實驗動物護理原則(Health,1984)。

一、脂肪幹細胞的萃取和缺氧預處理:

脂肪幹細胞藉由第二型膠原酶 (collagenase 2 enzyme) 從大鼠的體腔脂肪組織中分離,並且在加濕空氣(\mathbf{CO}_2 5%)、37°C、培養在加有 10%胎牛血清,2mM 谷氨酰胺 (glutamine),100 單位/ml 青黴素和 100 μ g/ml 鏈黴素的 DMEM 培養基中。至於缺氧治療,是將細胞置於加濕培養箱(Thermo,NY,USA)內部的缺氧箱(NexBiOxy,Hsinchu,Taiwan)中。該缺氧箱的培養條件為 37°C下用混合氣體(95% \mathbf{N}_2 和 5% \mathbf{CO}_2)填充 24 小時,並通過氣體微電腦控制儀(NexBioxy)將氧氣控制在 1%的濃度。



萃取幹細胞

二、脂肪幹細胞表面標誌蛋白分析 - 流式細胞術測定 (flow-cytometry assay):

將脂肪幹細胞培養至 80-90%,根據標準作業程序,每個樣品包含超過 10⁶ 個細胞,且在細胞繼代培養的第一代和第二代細胞表面標記顯示,CD90、CD44 對 ADSC 為陽性且 CD45 對 ADSC 為陰性。

三、心肌細胞蛋白來源:

十一週大的雄性 WKY 和 SHR 大鼠購自 BioLASCO 公司(台北,台灣),並隨機被分為四組。第一組大鼠是 WKY 控制組(n=6),第二組是 SHR 大鼠(n=6),它們是高血壓大鼠,第三組是用 ADSC 處理的 SHR 大鼠(n=6),第四組為用 hADSC 處理的 SHR 大鼠(n=6)。幹細胞治療方式是通過大鼠的尾靜脈注射 100μ L 內含有 10^4 個細胞的生理食鹽水。在實驗過程之前、後皆以心臟超音波測量及記錄。所有大鼠飲食給予一般飼料餵養(Lab Diet 5001; PMI Nutrition International,Brentwood,MO,USA)以及飲水無限制。所有實驗步驟均由機構審查委員會(IRB)以及中華民國中國醫藥大學動物照護和使用委員會進行審查和批准,並且本研究遵照實驗動物護理原則(Health,1984)。

動物犧牲後採取心臟組織,並將左心室游離出來,再將組織等比例分成 0.1g 並置於裂解緩衝液中 (lysis buffer)(100mg / mL)並使用組織均質機將組織均質後,將組織液在 12,000g 下離心 40 分鐘。收集表層的上清液並儲存在- 80° C,用於接下來的實驗。

四、西方墨點法 (Western blot) 分析:

通過 Lowry's 蛋白質測定方法測定組織萃取物中的蛋白質濃度。通過 12%SDS 聚丙烯西胺凝膠電泳(SDS-PAGE)以 75 伏特、70-120 分鐘的恆定電壓來分離蛋白質樣品。分離後再經過 50 伏特的電壓三小時後,蛋白質將轉移到聚偏氟乙烯膜上 (Polyvinylidene fluoride)(PVDF,GE Healthcare Live Sciences, Pittsburgh, PA, USA)。將 PVDF 膜在 TBS 緩衝液中以 3%牛血清白蛋白(BSA)洗滌,然後與專一一級抗體一起培養 8-12 小時(Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA, USA)。之後用 TBS 洗滌三次之後使用含有 HRP 標記的二級抗體培養 1 小時後使用富士冷光儀 LAS-4000(GE Healthcare Life Sciences)拍攝照片。

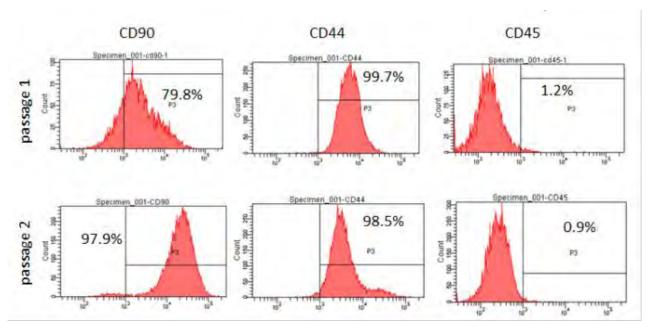
五、統計分析:

統計所顯示的結果顯示為平均值±標準差。通過單因子變異數分析 (one-way analysis of variants) 進行統計分析。對於配對的樣本,則應用 Student's t-test 方法檢驗。

伍、研究結果

一、鑑定萃取出的脂肪幹細胞純度:

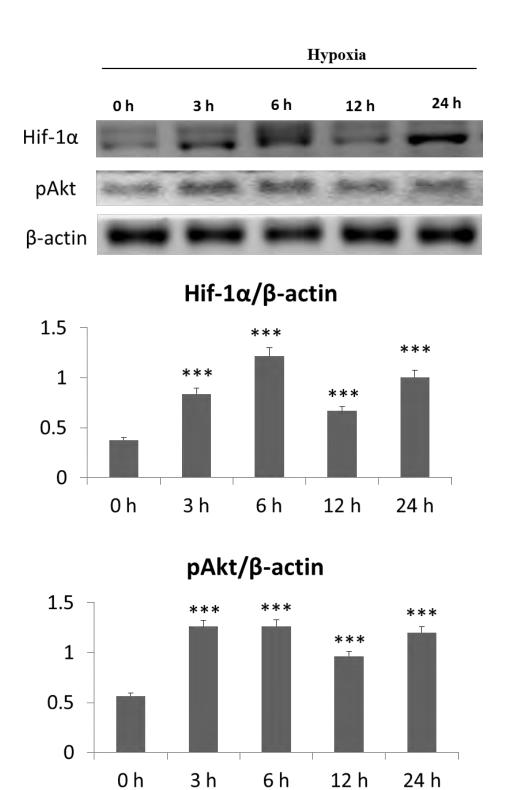
將我們所分離出來之後繼代培養的脂肪幹細胞,使用流式細胞儀 (flow cytometric assay)分析。結果顯示,無論在第一代或第二代的實驗中,確認含有幹細胞特有的標誌蛋白 (positive marker) CD90 及 CD44 的細胞族群比率較高;而非幹細胞標誌蛋白 (negative marker) CD45 細胞族群的比例極少,可證明研究中所使用的脂肪幹細胞群體的純度極高,而在第二代的細胞中幹細胞的純度更高(圖三)。



圖三、所分離出來脂肪幹細胞的特徵表現。CD90、CD44 和 CD45 是最常用來確認脂肪幹細胞特徵的三種標記蛋白 (marker)。

二、最適當的缺氧(hypoxia) 的時間點選擇:

將所培養及分離出來的脂肪幹細胞,用不同的時間點進行長短期缺氧處理,並藉由測定與主要生存訊息基因 pAkt 和缺氧相關基因 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1α) 之含量的上升程度,來比較脂肪幹細胞對於缺氧處理的效果 (圖四)。結果顯示 HIF-1α 的表現隨著缺氧的時間增加而上升,表示我們缺氧的處理是有成功的,而在 6 小時的缺氧之後,發現了生存基因 pAkt 的表現量達到最高,代表著短期缺氧 6 小時可以提高幹細胞的生存能力,因此選擇 6 小時的缺氧預處理用於本研究的缺氧預處理脂肪幹細胞 (hADSC)。

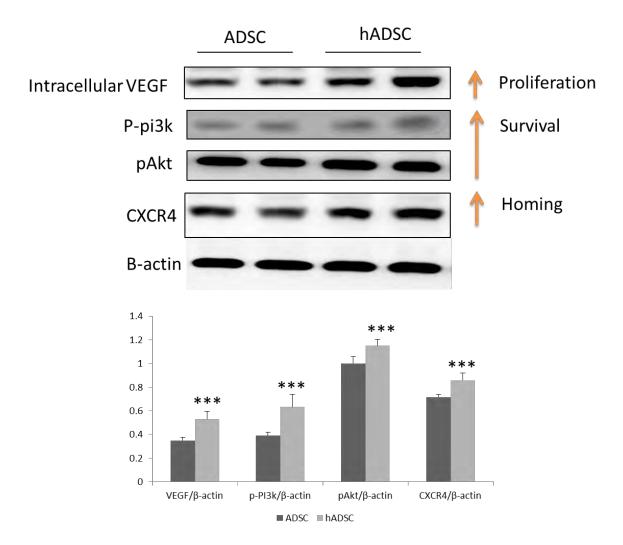


圖四、以西方墨點法測定在不同時間的缺氧預處裡後,脂肪幹細胞的 $Hif-1\alpha$ 蛋白和生存訊息因子 pAkt 蛋白的表現量有所不同。結果顯示缺氧預處理 6 小時的脂肪幹細胞,最適合有效地提升細胞生存基因 pAkt 的表現量。***= P<0.001 是相較於對照組 (0 h)

(β -actin 為細胞內恆定蛋白質,在此作為對照基準來比較)

三、6 小時缺氧預處理強化脂肪幹細胞生存訊息歸巢功能的影響:

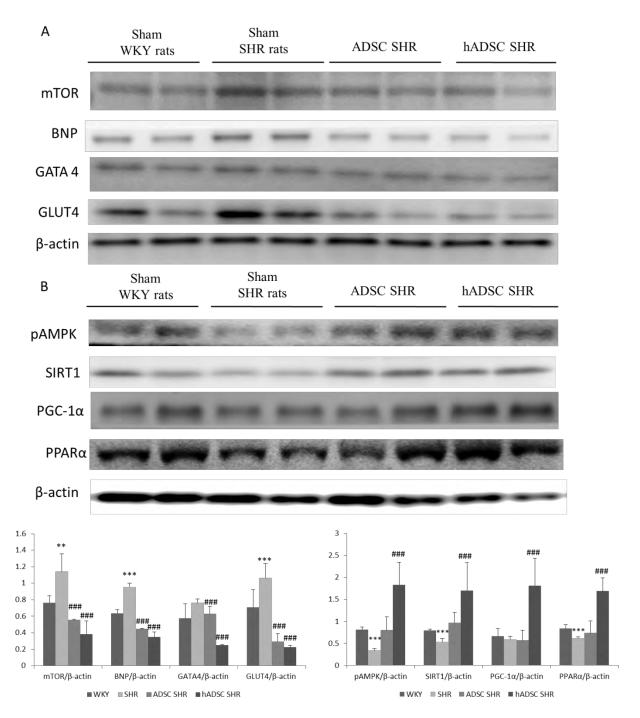
在缺氧預處理的 hADSC 細胞後可以發現幹細胞內細胞增生指標蛋白-血管生成因子(VEGF)、生存訊息蛋白 p-PI3k 和 pAkt 以及幹細胞歸巢因子(homing factor)CXCR4 的表現皆高於一般 ADSC。因此,實驗結果顯示適當的短期缺氧(6 小時)預處理賦予脂肪幹細胞更佳的細胞保護 效果(圖五)。



圖五、以西方墨點法測定,經過 6 小時缺氧預處理後,脂肪幹細胞在生存訊息途徑和歸巢功能的影響。圖中可以發現,缺氧預處理過的脂肪幹細胞,VEGF,P-PI3k,pAkt,CXCR4的表現量,都高於正常的脂肪幹細胞。***= P<0.001 是相較於脂肪幹細胞。 (β -actin 為細胞內恆定蛋白質,在此作為對照基準來比較)

四、ADSC 和 hADSC 對心臟肥大和細胞能量代謝變化的影響:

通過 ADSC 和 hADSC 影響 GLUT4 的表現量可以顯示出高血壓老鼠的肥大心臟是否改善了對於葡萄糖的攝取量,進而影響其能量代謝的調節。結果顯示在 SHR 組中,與肥大相關的 mTOR 表現(mTOR expression)標誌物和心臟肥大指標蛋白 BNP 和 GATA4 的濃度明顯升高。然而,SHR 接受了 ADSC 和 hADSC 的治療後,減少了由高血壓引發的心臟肥大指標蛋白的濃度。有趣的是,在我們的實驗結果中也看到了 SHR 大鼠中 GLUT4 的表現量增加,而在 ADSC 和 hADSC 的治療組降低了 GLUT4 的表現,暗示著可能轉向利用脂肪酸。這些結果顯示 ADSC 和 hADSC 對於降低高血壓誘發的心臟肥大和能量代謝轉換有著很好的效果,而 hADSC 有更好的保護作用(圖六 A)。



圖六、ADSC 和 hADSC 治療對於心臟代謝相關蛋白的改善作用的影響。 A) 正常 WKY 大鼠,SHR 大鼠,用 ADSC 處理的 SHR 大鼠和用 hADSC 處理的 SHR 大鼠的左心室中 mTOR,BNP,GATA4,GLUT4 的蛋白表現量。 B) 正常 WKY 大鼠,SHR 大鼠,用 ADSC 處理的 SHR 大鼠和用 hADSC 處理的 SHR 大鼠的左心室中 pAMPK,SIRT1,PGC-1α,PPARα的蛋白表現量。

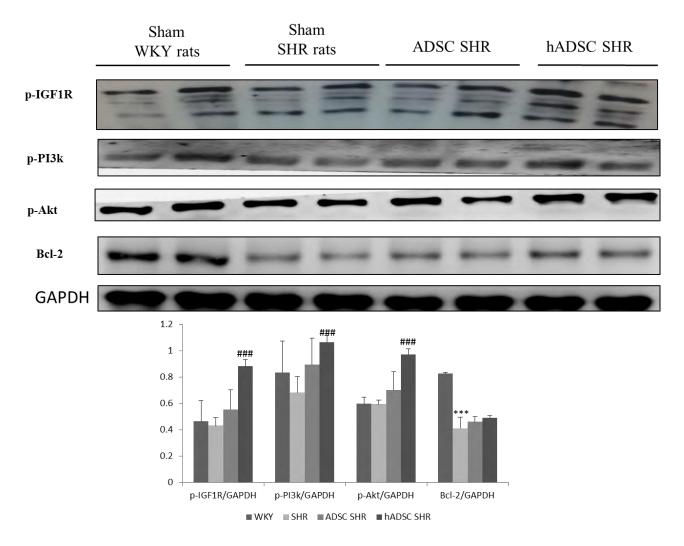
= <0.01 表示與 WKY 組比較,*= P<0.001 表示與 WKY 組比較,###=P<0.001 表示與 SHR 組比較。

五、ADSC和hADSC提高長壽基因(SIRT1)訊息途徑和轉換脂肪酸攝取的影響:

我們的實驗也探討了脂肪酸吸收和長壽基因相關的分子訊息途徑,如 pAMPK,SIRT1,PGC-1α 和 PPARα(圖六 B)。 SHR 組的 pAMPK,SIRT1 和 PGC-1α 等長壽訊息途徑蛋白表現量顯著降低,而 SHR 大鼠接受了 ADSCs 和 hADSCs 的回輸治療後顯著的增加了 SIRT1 途徑的蛋白表現。此外,我們的結果表明在 ADSC 治療的高血壓大鼠中,心肌細胞的正常脂肪酸攝取已經恢復(pAMPK 表現量上升,GLUT4 表現量下降)。接著再比較用 ADSC 和用 hADSC 處理的 SHR,長壽基因訊息途徑的下游蛋白 PGC-1α 和 PPARα 的表現量顯示 hADSC 在延長細胞壽命和對高血壓誘導心臟肥大的保護方面更有效。

六、ADSC 和 hADSC 對高血壓大鼠心肌細胞生存訊息途徑的影響:

為釐清在 ADSC 和 hADSC 在高血壓大鼠所提供的心臟保護作用的分子機轉和生存訊息途徑之間的關聯性;我們檢測了生存訊息途徑當中的 pIGF1R, pPI3K, pAKT 和 Bcl-2 指標蛋白。觀察到在 SHR 組的左心室中,與控制組相比,pIGF1R, pPI3k 和 pAKT 的蛋白質表現量降低。有趣的是,用 hADSC 處理之 SHR 大鼠的生存訊息途徑蛋白含量被高度誘導,並且顯著優於ADSC 處理組(圖七)。因此得知,hADSC 治療有效地提升了高血壓老鼠心肌細胞的生存途徑表現。



圖七、ADSC 和 hADSC 的注射可以提高 SHR 心肌細胞的生存訊息機制。在正常 WKY 大鼠,SHR 大鼠,用 ADSC 處理的 SHR 大鼠和用 hADSC 處理的 SHR 大鼠的左心室中 p-IGFIR,p-PI3K,p-Akt,Bcl-2 的蛋白表現。***= <0.001 表示與 WKY 組比較,###=P<0.001 表示與 SHR 組比較。

陸、討論

心臟是一個極為需要能量的器官,為了滿足相當龐大的能量需求心臟細胞能夠代謝多種能量來源。因此,心臟的功能與能量來源的攝取和利用非常緊密相關。在休息狀況下,心臟能從脂質的氧化得到其所需約 70%的能量,其餘的部分則主要來自於糖解作用(glycolysis)和葡萄糖氧化(Taegtmeyer,1994)。在健康的心臟,即使在發揮接近最大心臟功率時,仍是會消耗乳酸作為能量。只有在糖解作用因丙酮酸氧化不良而加速時,心肌組織才變成會製造乳

酸(類似在心肌缺血狀態(Depre,1998; Stanley,1997a)或控制不佳的糖尿病患者(Stanley,1997b)身上所發生的)。糖解作用的原料源自從體外攝取的葡萄糖或體內儲存的肝糖。通過細胞膜兩側葡萄糖濃度差異(transmembrane glucose gradient)和肌膜(sarcolemma)中葡萄糖轉運蛋白的表現量(主要是 GLUT-4)來調節葡萄糖向心肌細胞的轉運。在特定的生理條件如運動(Gertz,1988)和某些疾病如甲狀腺機能亢進(Seymour,1990)、組織缺血(Owen,1990)和心臟肥大(Nascimben,1995)時,心臟會更加依賴葡萄糖來滿足其能量代謝需求(Shao和Tian,2016)。葡萄糖可透過促進葡萄糖轉運蛋白 GLUT1和 GLUT4進人心臟(Mueckler,1990),而心臟中的葡萄糖轉運蛋白表現會在各種病理狀態下改變。在我們的實驗中,從西方墨點法分析 GLUT4的量,顯示 SHR 大鼠組的 GLUT4表現量有相當大程度的增加就有可能是病理性心臟肥大的發展特徵。同時,脂肪酸轉位酶 36(translocase cluster of differentiation 36, CD36)促進心肌的脂肪酸攝取,並且由胰島素和 AMP 依賴性蛋白激酶(AMPK)誘發心肌細胞表面的脂肪酸吸收。

在過去的動物實驗中,AMPK 異常的小鼠其心臟攝取葡萄糖的速率會被抑制(Xing,2003),表示 AMPK 在調節心臟中葡萄糖的攝取具有關鍵角色。然而,被激活的 AMPK 也會影響 CD36 和 GLUT4 的轉換(Dolinsky 和 Dyck,2006; Samovski,2012)。AMPK 介導的 sirtuin 1(SIRT1)同時也會促進過氧化物酶體增殖物激活受體 γ 共激活因子 1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α ,PGC1 α)的去乙醯化(deacetylation)(Bogachus 和 Turcotte,2010; Chau,2010)。因此,對於功能失調的心臟中,pAMPK 含量的調控是必要的。我們的西方墨點法結果顯示,在 SHR 組磷酸化的 AMPK 含量有顯著降低,從而表現心臟中能量代謝的變化。這也反映在與 AMPK 的活化密切相關的 mTOR 的含量。

用 ADSC 和 hADSC 的進一步治療逆轉了在肥大心臟中所產生能量代謝的轉換,並且脂肪酸的攝取狀況被悄悄地恢復。心臟基因的表現和心肌細胞的生長需要藉由配合基(ligand)與PPARs 的結合而激活,尤其是 PPARα 和 PPARβ (Huss 和 Kelly, 2004)。這些轉錄因子通過與類視黃醇 X 受體(retinoid X receptors)形成異源二聚體(heterodimer),然後結合位於編碼代謝酶(encoding metabolic enzymes)的許多基因的啟動子區域(promoter regions)內的特異性 PPAR應答元件 (PPAR response elements, PPRE)來控制基因表現。此外,PPAR/RXR複合體需要

輔因子 PPAR γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)。我們的研究結果顯示 PGC-1 α 和 PPAR α 的含量明顯降低,反映出病理性心臟肥大以及脂肪酸氧化作用的增強。實驗結果進一步顯示 SIRT1,PGC-1 α 和 PPAR α 的升高,表示在用 hADSC 處理時心臟肥大的狀況減少,脂肪酸的攝取量接近正常心肌細胞的水準。

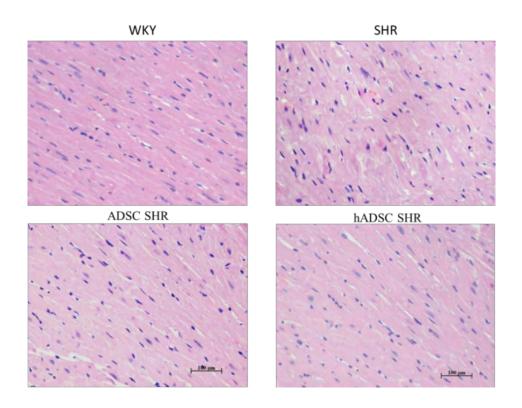
在過去二十年的大量研究已經證明,在病理性心臟肥大和心臟衰竭的發展進程,參與粒線體氧化代謝的基因的轉錄調節已經顯著改變(Tian,2003)。在心臟肥大和心臟衰竭的囓齒動物模型中已經觀察到,參與脂肪酸氧化的主要調控者:過氧化物酶體增殖物激活受體α(PPARα)和過氧化物酶體增殖物激活受體γ共活化因子-1(PGC-1),表現量會有向下調整的情形(Arany et al。2006; Kolwicz 和 Tian,2011)。此外,IGF-1/PI3K/Akt 生存徑路的訊息增強也提高心肌細胞的增生,並顯示出抗凋亡的能力(Bishopric,2001; Liao,2016; Tsai。2015)。在我們的研究中,hADSC治療有效地增強了SHR心臟中的生存機制,也證明可以增強藉由幹細胞治療獲得的細胞保護作用。hADSC治療所造成的改變,在分子機轉方面包括(1)提升生存徑路表現,(2)維持正常能量代謝途徑,(3)有效維持心臟收縮功能,三個面向的治療效果都優於ADSC治療。

除此之外,實驗室中的其他成員統計了不同組別的下列參數來分析老鼠的心臟功能:心臟的射出分率 (ejection fraction, EF),收縮分率 (fraction shorting, FS),左心室舒張末期質量 (LVd Mass) 和左心室收縮末期質量 (LVs Mass),發現到高血壓造成心臟功能 EF 和 FS 能力下降以及心臟重量增加代表著心臟組織受損和可能有肥大的現象。 但以 ADSC 或 hADSC 治療後發現高血壓老鼠的心臟超音波數值有顯著的恢復。特別是在心臟的射出分率 (ejection fraction, EF)和縮短分率(fraction shorting, FS)上,以 ADSC 或 hADSC 治療後的高血壓老鼠心臟功能有顯著的恢復(表一)。他們的結果也顯示,hADSC 的治療效果明顯優於 ADSC,這樣的結果顯示短期缺氧預處理幹細胞的確可以強化幹細胞的功能之外,更可以提高幹細胞對心臟的保護作用。

	Normal	SHR	SHR + MSC	SHR + HypMSC
EF(%)	83.12±3.93	72.48±3.18	75.82±3.25	79.34±1.63 ^{###}
FS (%)	46.71±4.50	37.05±2.41 ***	39.74±2.71	42.85±1.58 ^{###}
LVd Mass(g)	0.90±0.075	1.06±0.07 ***		0.97 ###
LVs Mass(g)	0.9±0.03	1.14±0.09***		1.023±0.02 ^{###}

表一、以心臟超音波檢查,比較四個組別 (正常老鼠、高血壓老鼠、高血壓老鼠+脂肪幹細胞、高血壓老鼠+缺氧預處理脂肪幹細胞)的心臟的射出分率 (ejection fraction, EF),縮短分率 (fraction shorting, FS),左心室舒張末期質量 (LVd Mass) 和左心室收縮末期質量 (LVs Mass)。 ***=P<0.001 表示與正常老鼠比較, $^{##}=P$ <0.001 表示與高血壓老鼠比較。

他們也將心臟組織以蘇木素-伊紅染色(H&E stain)作組織學檢查,顯示高血壓老鼠的心肌細胞通常大於正常老鼠的心肌細胞,而且心肌細胞的排列不整、紊亂且細胞間隙變多變大。而接受 ADSC 治療的高血壓老鼠,其心肌細胞的排列較為整齊和細胞的大小有恢復的情形,細胞間隙也變少,表示對高血壓引發的心臟肥大有減緩的效果、更顯示出可以保護心臟細胞降低細胞凋亡的產生。他們也發現了用 hADSC 處理的 SHR 比 ADSC 處理的 SHR 得到更好地保護(圖八)。



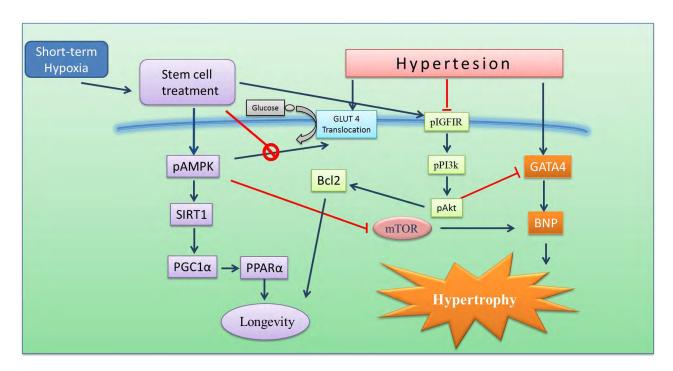
圖八、以 400 倍的顯微鏡觀察,在蘇木素-伊紅染色(H&E stain)下,脂肪幹細胞治療降低心臟細胞肥大、細胞排列不整和細胞間隙。不論有無缺氧預處裡的脂肪幹細胞皆能有效降低 SHR大鼠心臟的肥大效應和心肌細胞的不規則排列,而 hADSC 的治療效果更優於 ADSC。

因此,我們的實驗結果可以統整出,經由缺氧預處理的方法,可提升 ADSC 的治療效果,在 高血壓大鼠心臟之心肌細胞中,經由能量代謝轉換途徑的逆轉,增強了高血壓誘導肥厚心臟 中的生存機制。

柒、結論

從我們的實驗結果得知:(圖九)

- 一、ADSC 及 hADSC 自體回輸治療保護了高血壓造成的心臟肥大(mTOR, BNP),並且能提高 心臟細胞生存訊息途徑(pIGF1R, pPI3K, pAkt, Bcl2)以及改變能量代謝途徑(GLUT4)。
- 二、ADSC 及 hADSC 能提升長壽基因(SIRT1)途徑,使心臟細胞更能對抗高血壓帶來的傷害。
- 三、短期的缺氧預處理,更能增加脂肪幹細胞的生存訊息途徑(pPI3K, pAkt)和歸巢能力 (CXCR4),以及提高增生能力(VEGF)。hADSC 的治療以及保護效果比 ADSC 來的顯著,表明短期缺氧除了能增強幹細胞之外,更能提高其治療效果。



圖九、我們的實驗證據顯示:脂肪幹細胞治療有效的促進了心肌細胞的生存途徑(綠色)及長壽途徑(紫色),且抑制了肥大途徑(橘色)及葡萄糖代謝(水藍色)。而缺氧的處理則使療效更佳的提升。

捌、參考資料及其他

Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. 2006. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator lalpha. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(26):10086-10091.

Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA. 2001. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. Current opinion in pharmacology 1(2):141-150.

Bogachus LD, Turcotte LP. 2010. Genetic downregulation of AMPK-alpha isoforms uncovers the mechanism by which metformin decreases FA uptake and oxidation in skeletal muscle cells.

- Am J Physiol-Cell Ph 299(6):C1549-C1561.
- Chau MD, Gao J, Yang Q, Wu Z, Gromada J. 2010. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1alpha pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(28):12553-12558.
- Depre C, Rider MH, Hue L. 1998. Mechanisms of control of heart glycolysis. Eur J Biochem 258(2):277-290.
- Dolinsky VW, Dyck JRB. 2006. Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts. Am J Physiol-Heart C 291(6):H2557-H2569.
- Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA. 1988. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. The Journal of clinical investigation 82(6):2017-2025.
- Huss JM, Kelly DP. 2004. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. Circulation research 95(6):568-578.
- Kolwicz SC, Jr., Tian R. 2011. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res 90(2):194-201.
- Liao HE, Shibu MA, Kuo WW, Pai PY, Ho TJ, Kuo CH, Lin JY, Wen SY, Viswanadha VP, Huang CY. 2016. Deep sea minerals prolong life span of streptozotocin-induced diabetic rats by compensatory augmentation of the IGF-I-survival signaling and inhibition of apoptosis.

 Environmental toxicology 31(7):769-781.

- Lin GH, Chang WC, Chen KJ, Tsai CC, Hu SY, Chen LL. 2016. Effectiveness of Acupressure on the Taichong Acupoint in Lowering Blood Pressure in Patients with Hypertension: A Randomized Clinical Trial. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM 2016:1549658.
- Mueckler M. 1990. Family of Glucose-Transporter Genes Implications for Glucose-Homeostasis and Diabetes. Diabetes 39(1):6-11.
- Nascimben L, Tian R, Lorell BH, Reis I, Weinberg EO, Ingwall JS. 1995. Rates of Insulin-Independent Glucose Entry and Glycolysis Are Increased in Hypertrophied Hearts. Circulation 92(8):3705-3705.
- Owen P, Dennis S, Opie LH. 1990. Glucose flux rate regulates onset of ischemic contracture in globally underperfused rat hearts. Circulation research 66(2):344-354.
- R.Brooks Robey, Nissim Hay. (2009). Akt-energy metobolism interactions and oncogenesis. Seminar in Cancer Biology, 25-31
- Samovski D, Su X, Xu YC, Abumrad NA, Stahl PD. 2012. Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GTPase. J Lipid Res 53(4):709-717.
- Seymour AM, Eldar H, Radda GK. 1990. Hyperthyroidism results in increased glycolytic capacity in the rat heart. A 31P-NMR study. Biochimica et biophysica acta 1055(2):107-116.
- Shao D, Tian R. 2016. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. Compr

- Physiol 6(1):331-351.
- Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. 1997a. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions Potential for pharmacological interventions. Cardiovasc Res 33(2):243-257.
- Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. 1997b. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. Cardiovasc Res 34(1):25-33.
- Taegtmeyer H. 1994. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications.

 Current problems in cardiology 19(2):59-113.
- Tian R. 2003. Transcriptional regulation of energy substrate metabolism in normal and hypertrophied heart. Current hypertension reports 5(6):454-458.
- Tsai CY, Wen SY, Shibu MA, Yang YC, Peng H, Wang B, Wei YM, Chang HY, Lee CY, Huang CY, Kuo WW. 2015. Diallyl trisulfide protects against high glucose-induced cardiac apoptosis by stimulating the production of cystathionine gamma-lyase-derived hydrogen sulfide.

 International journal of cardiology 195:300-310.
- World Health Organization. 2011. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. 2014. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization.
- Xing Y, Musi N, Fujii N, Zou L, Luptak I, Hirshman MF, Goodyear LJ, Tian R. 2003. Glucose

metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. J Biol Chem 278(31):28372-28377.

付晶晶、段君凱、李紅(1990) • 細胞自噬與凋亡的交互作用 • 生命的化學, 34(5), 649-653。 張哲明(2014) • 心臟肥大是什麼? • 新光醫訊 10 月

李露(2016) • 微泡聯合超聲上調 SDF-1/CXCR4 促 MSCs 歸巢修復缺血心肌的實驗研究 • 取自中國博士學位論文全文數據網, R642.22

劉世奇、曾春典(2004) • 以幹細胞修復心肌梗塞之現況 • 台灣醫界, 47(10)。

黃柏勳(2009) • 幹細胞治療在急性心肌梗塞之角色 • 台灣心臟學會會訊 98 年 9 月號 陳幸一(2014) • 高血壓動物模式的發展 • 台灣心臟學會會訊 103 年 9 月號

【評語】052003

此參賽作品以高血壓大鼠模式對缺氧脂肪幹細胞的保護心臟能力作探討,研究報告撰寫完整。然而有幾點需要說明,以增強實驗邏輯性,例如:(1)有多種幹細胞,為何選取脂肪幹細胞為研究材料,並未說明;(2)在缺氧處理後,發現 pAKT 表現量達到最高,代表短期缺氧可以提高幹細胞生存能力,此論點並無實驗佐證,無法從論文中看到該項結論;(3)多數 Western blotting 分析蛋白之差異很小;(4)注入多少脂肪幹細胞幹細胞數目,應說明;(5)須提供IRB及IACUC等文件

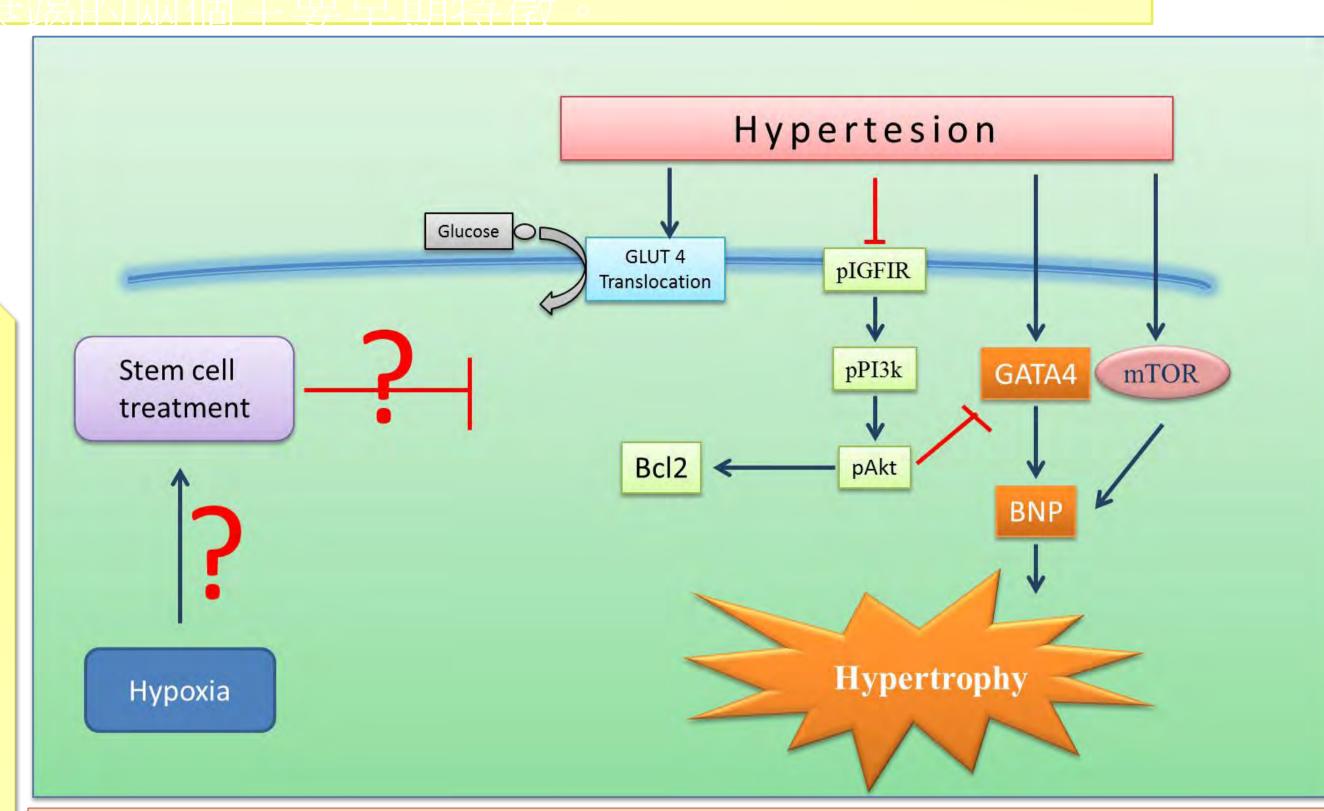
作品海報

研究動機

高血壓被世界衛生組織稱為"沉默的殺手",也在台灣的主要死因中排名第八。心臟肥大和心肌細胞凋亡是高血壓引發心臟衰竭的主要早期特徵。我們的研究希望探討幹細胞治療對於高血壓所引起之心臟受損的保護效果,並找出適度的短暫缺氧是否能強化幹細胞治療成效。

研究目的

- 一、多長時間的缺氧狀態預處理,可以強化脂肪幹細胞?強化那些幹細胞的功能?
- 二、比較脂肪幹細胞/短暫缺氧預處理幹細胞對高血壓所造成心臟凋亡及長壽基因途徑的探討。
- 三、比較脂肪幹細胞/短暫缺氧預處理幹細胞對高血壓造成心臟肥大相關能量代謝變化的影響。
- 四、比較脂肪幹細胞/短暫缺氧預處理幹細胞對高血壓造成心臟功能受損的修復情況。



研究概念圖:高血壓對心肌細胞的已知影響(橘色文字表心肌細胞肥大途徑,綠色文字為心肌細胞生存途徑,黑色箭頭表示促進,紅色T字形表示抑制),本研究欲釐清脂肪幹細胞(stem cell)治療的作用機轉與短暫缺氧預處理脂肪幹細胞的治療成效。

研究設備及器材

無菌操作臺、無菌培養箱、光學顯微鏡、高速離心機、實驗手套、微量吸管分注器 (Pipette)、細胞培養皿、無菌離心管、冷光影像分析儀、動物手術器械、心臟超音波儀、流式細胞儀等。



無菌培養箱

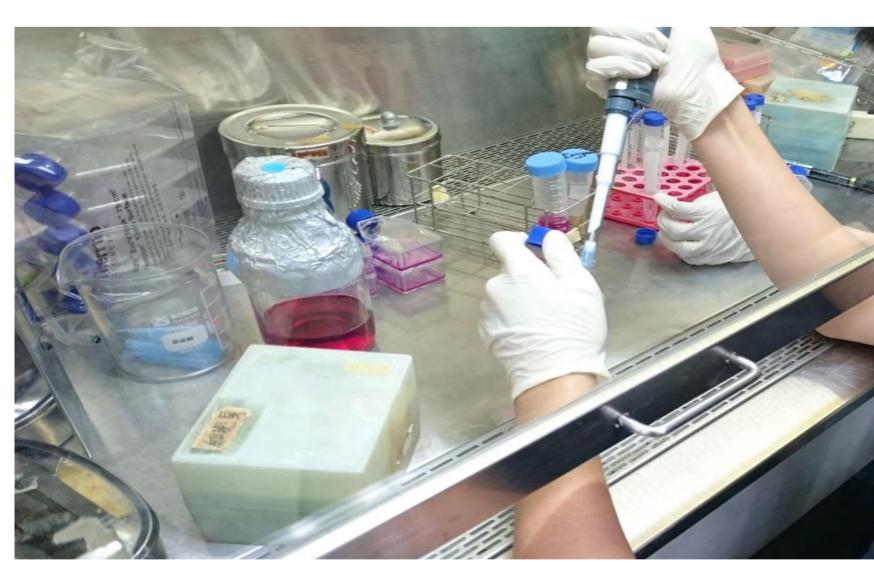


冷光影像分析儀



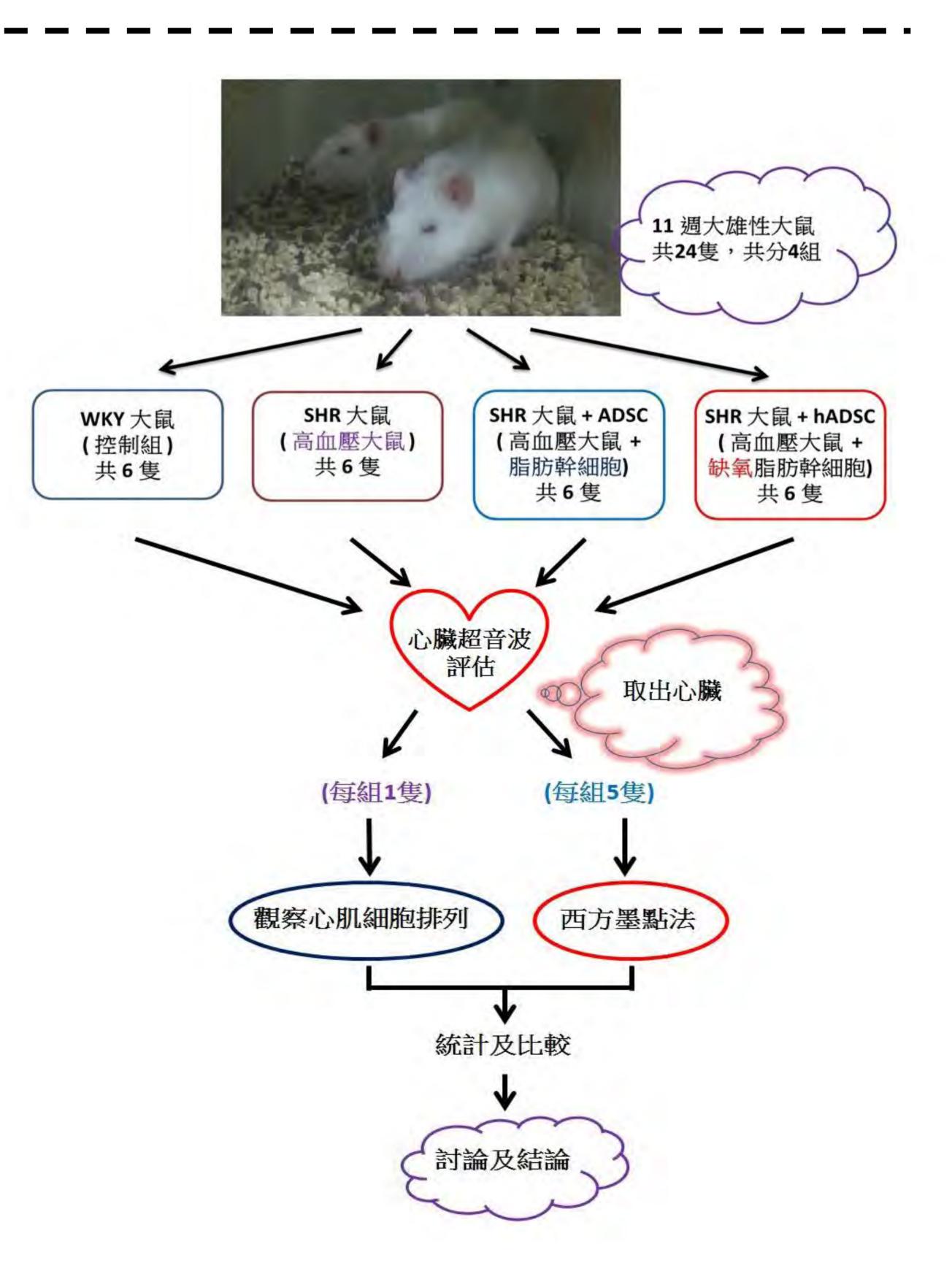
光學顯微鏡

研究過程與方法



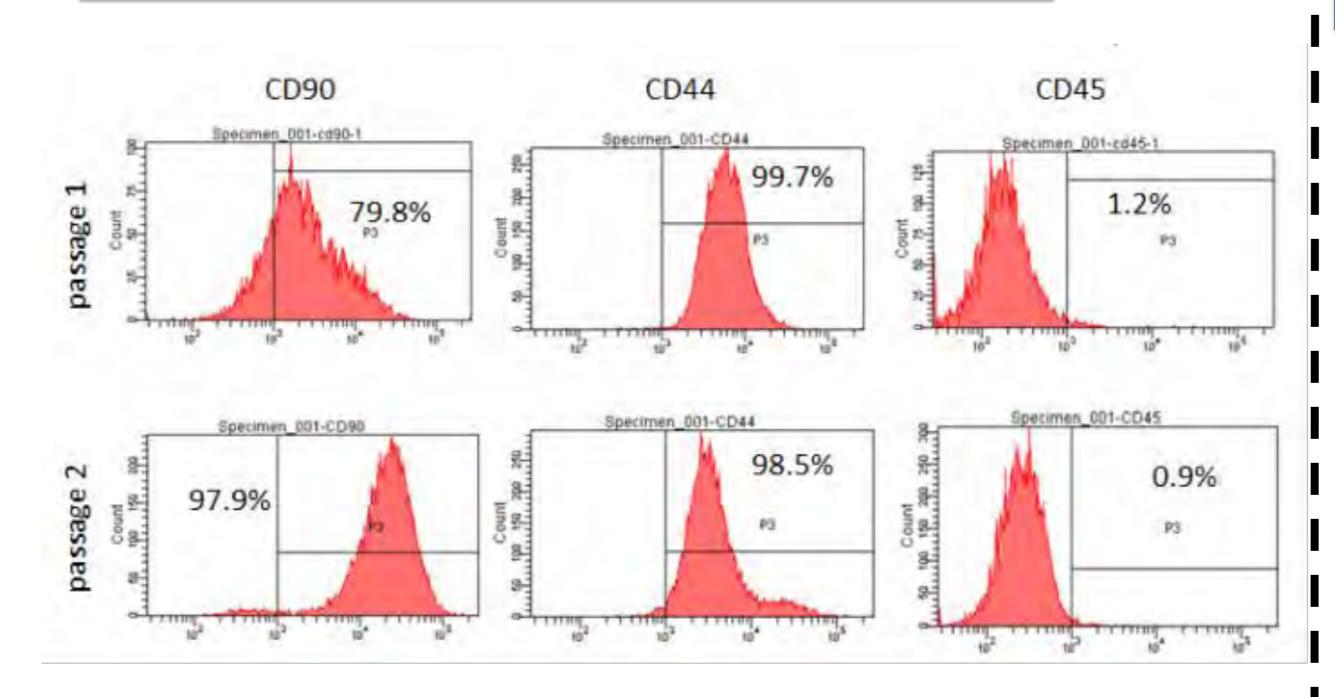




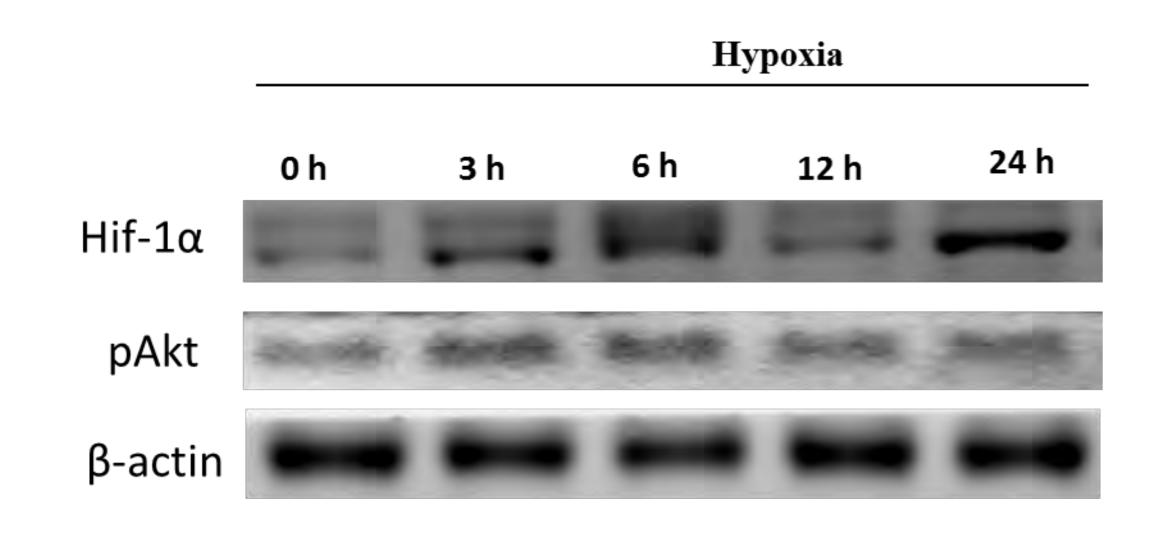


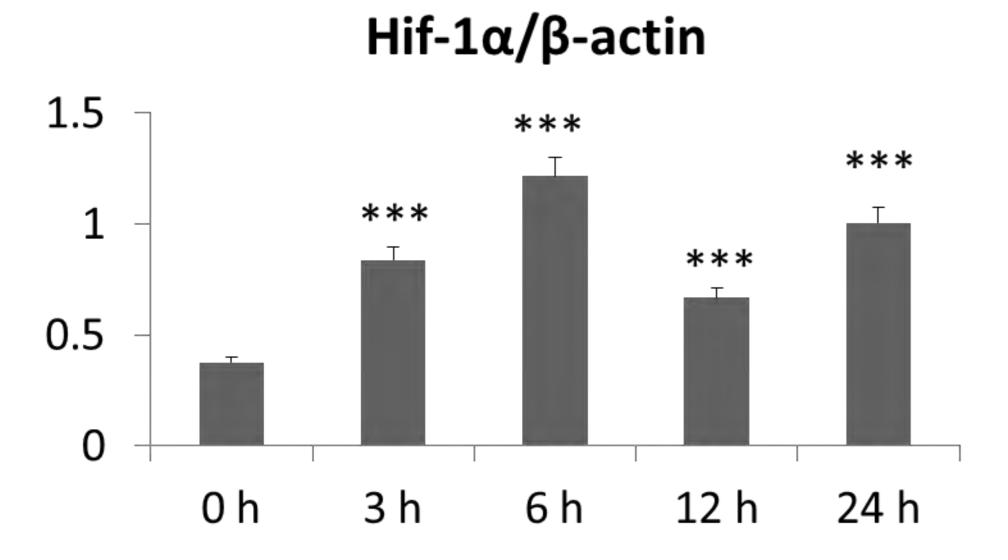
研究結果

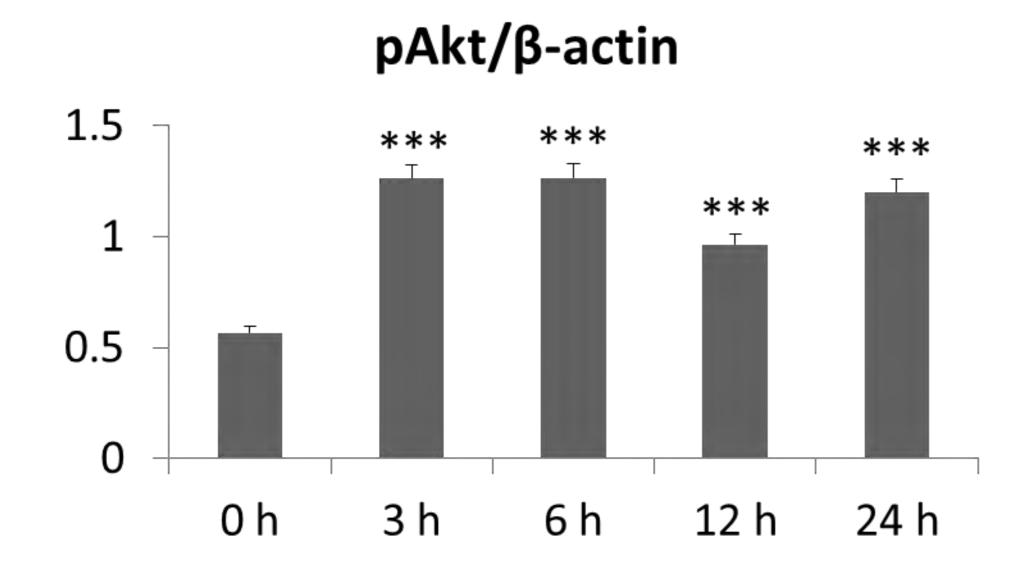
、鑑定萃取出的脂肪幹細胞純度:



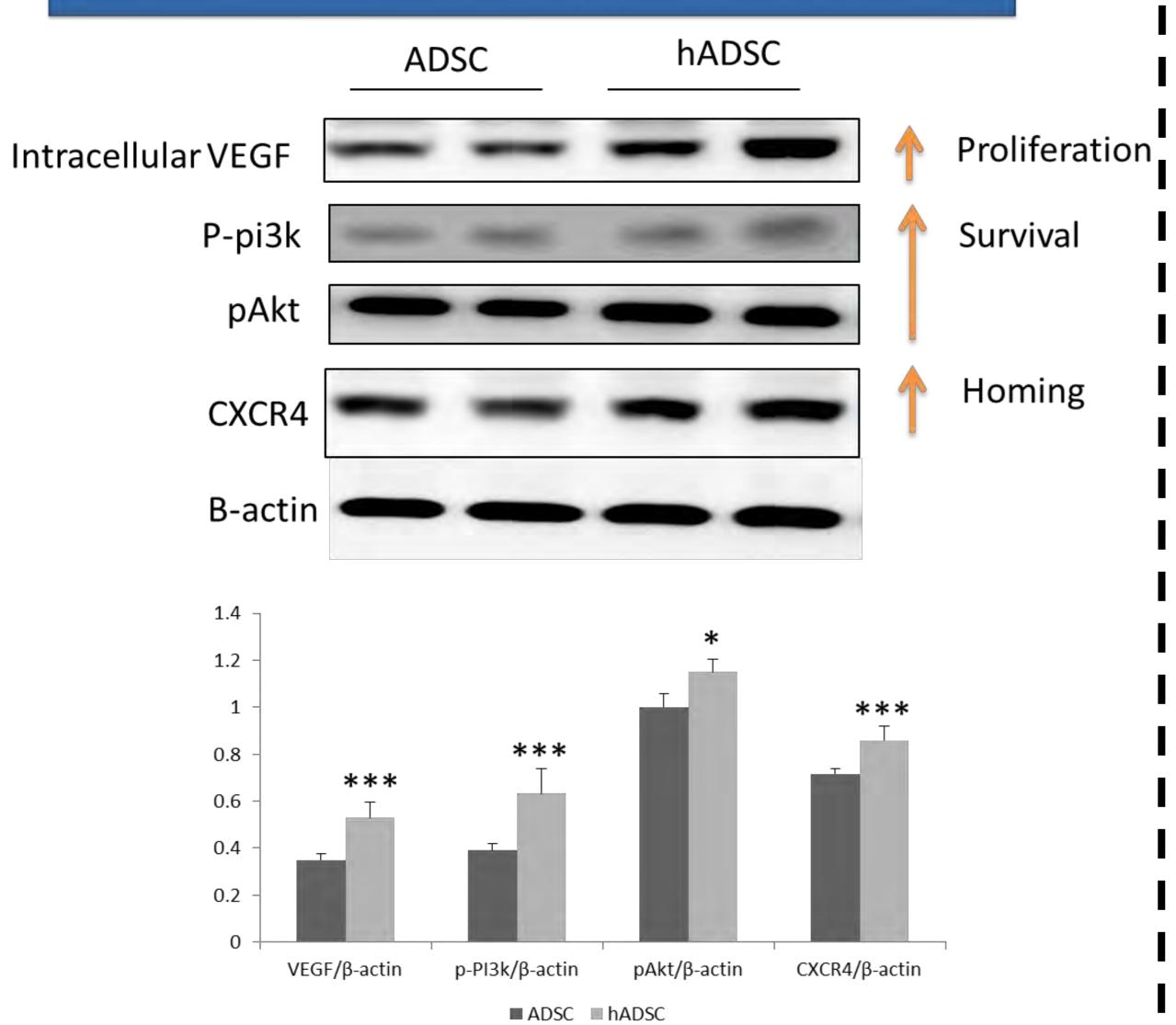
二、最適當的缺氧(hypoxia) 時間點選擇:



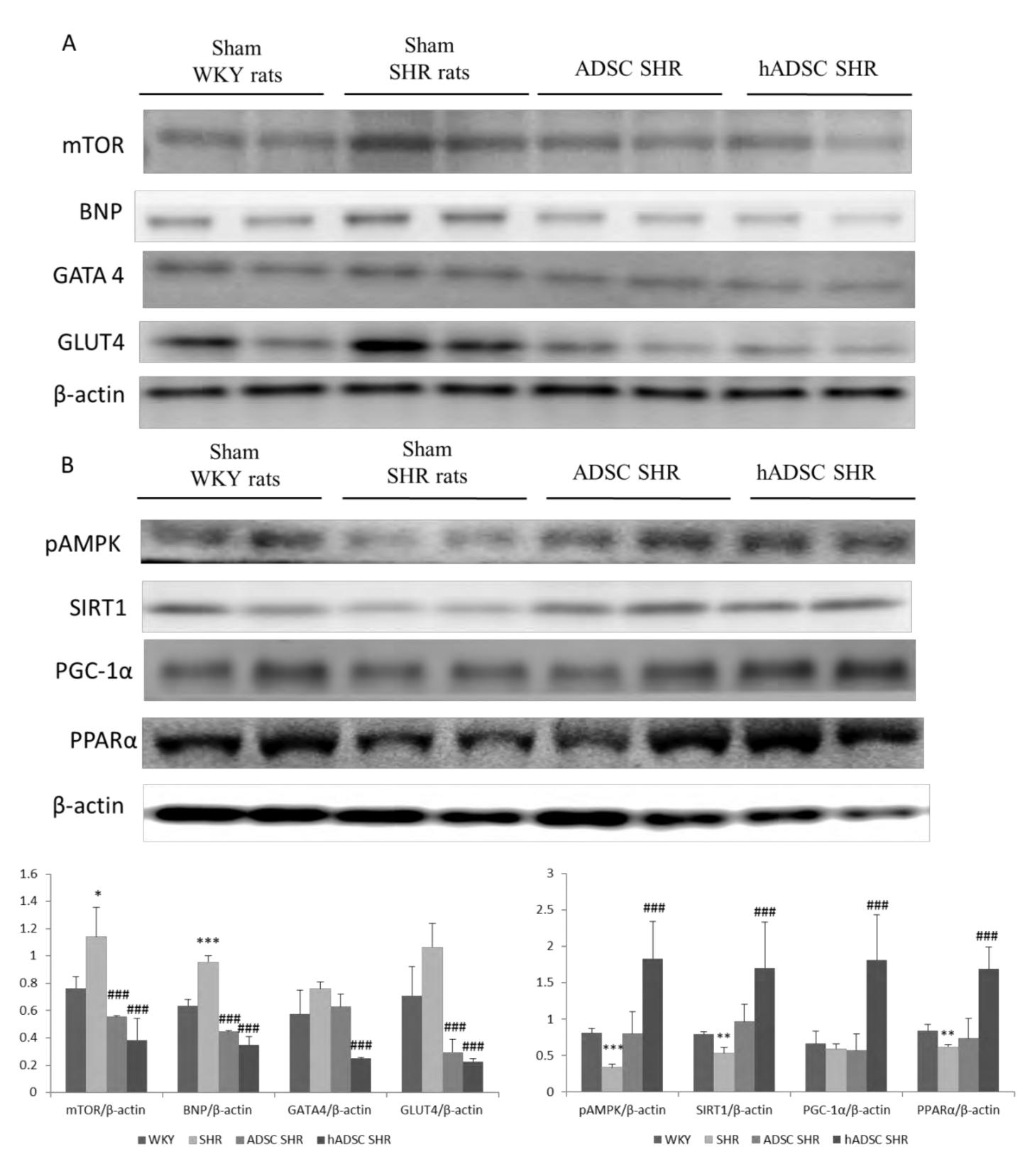




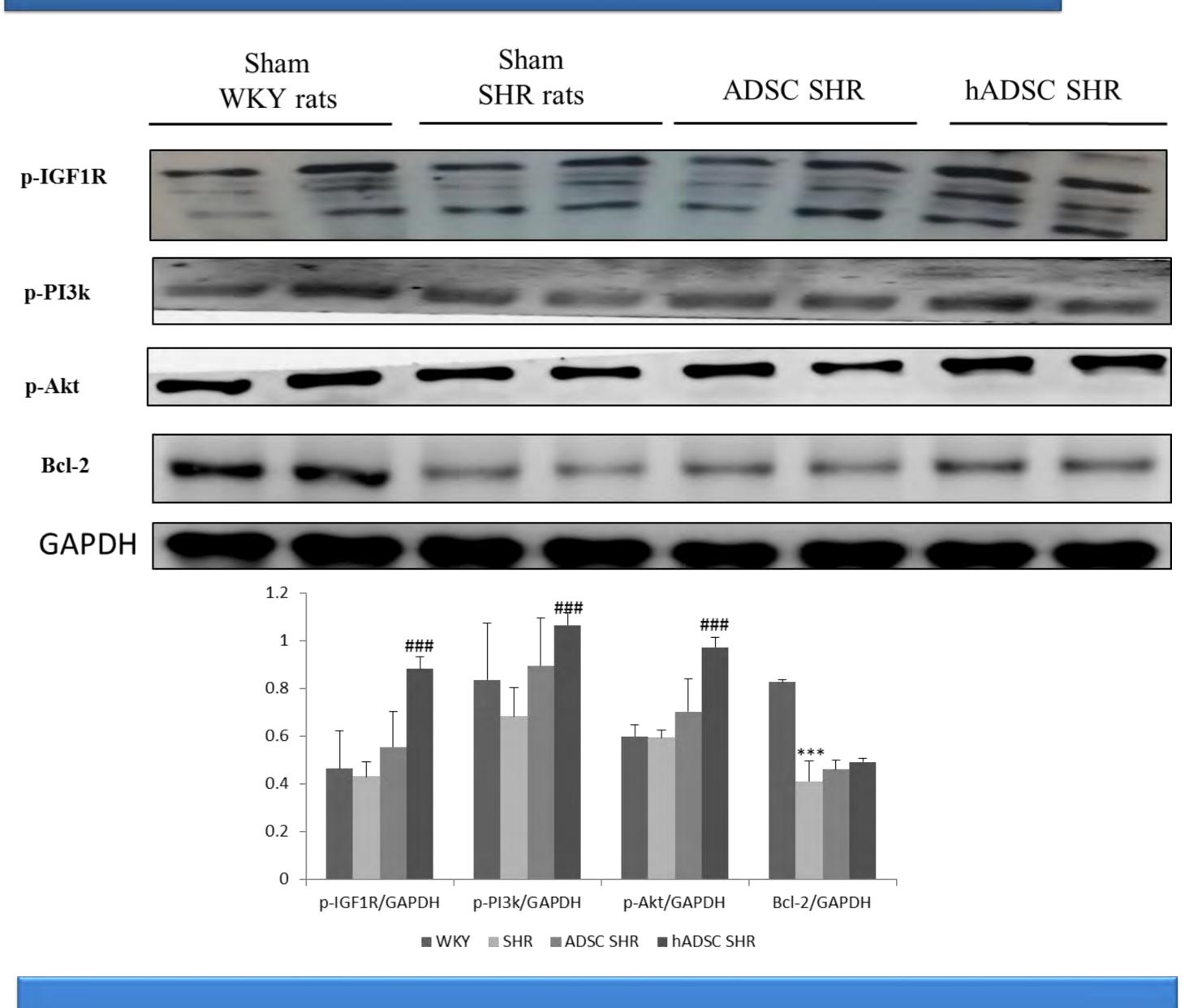
三、6小時缺氧預處理強化脂肪幹細胞生存訊息及歸巢功能的影響:



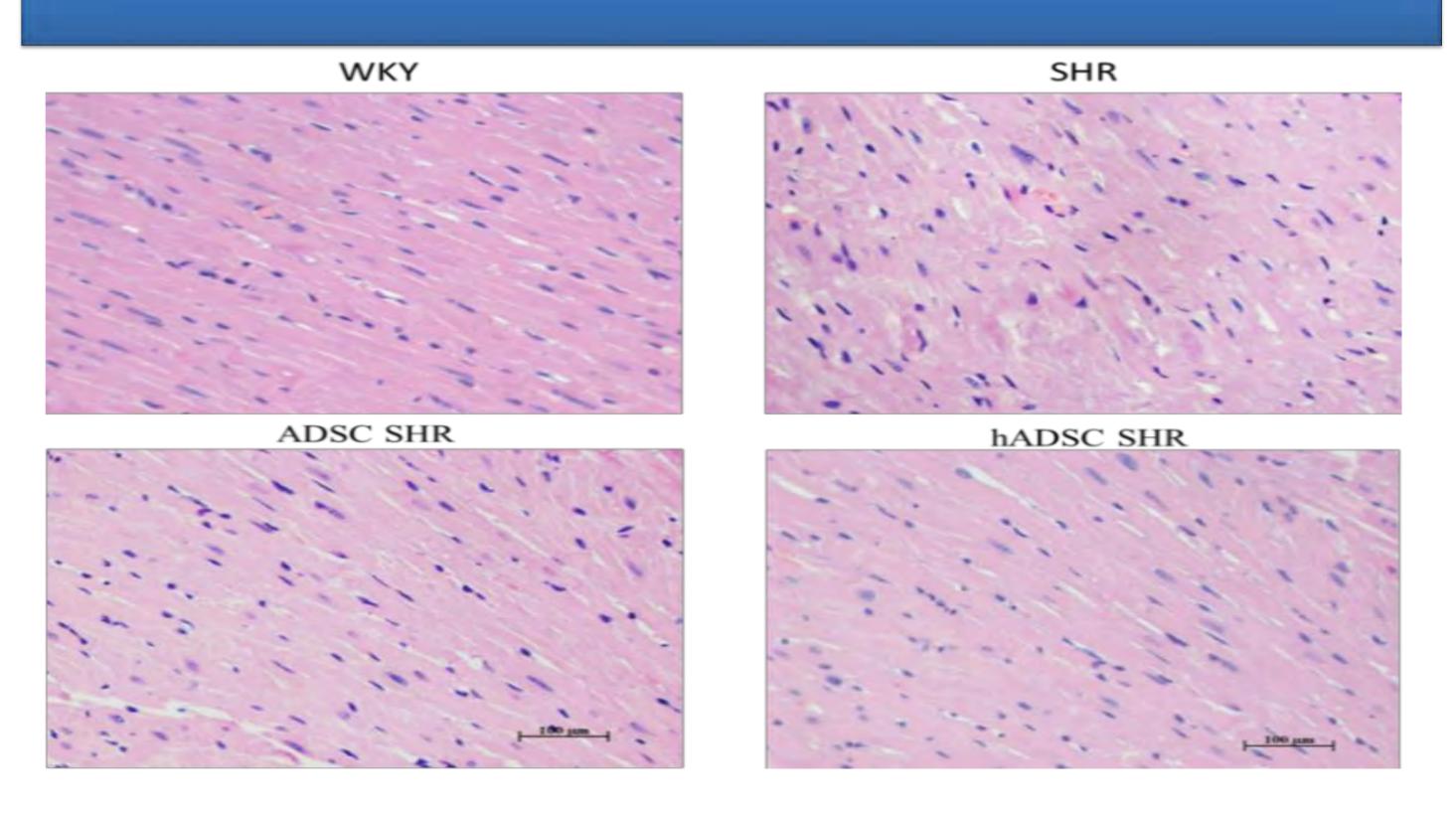
四、ADSC和hADSC對心臟肥大和細胞能量代謝變化, 提高長壽基因(SIRT1)訊息途徑和轉換脂肪酸攝取影響:



五、ADSC和hADSC對生存訊息途徑的影響:



六、ADSC和hADSC對改善高血壓老鼠心臟肥大的作用:



- 一、在休息狀況下,心臟能從**脂質**的氧化得到其所需約70%的能量,其餘的部分則主要來自於糖解作用(glycolysis)和葡萄糖氧化。在**心臟肥大**等異常狀況時,心臟會轉變為更加依賴**葡萄糖**來滿足其能量代謝需求。葡萄糖可透過促進性葡萄糖轉運蛋白**GLUT4**進入心臟。
- 二、AMPK在調節心臟中葡萄糖的攝取 具有關鍵角色。AMPK異常,心臟攝取 葡萄糖的速率會被抑制。
- 三、ADSC和hADSC的治療逆轉了在肥大心臟中所產生能量代謝的轉換,並且**脂**肪酸的利用狀況被悄悄地恢復。

四、實驗室其他成員紀錄的心臟超音波 紀錄顯示,幹細胞的治療有效修復了心 臟機能,而經短暫缺氧預處理的幹細胞, 其修復效果更好。

	Normal	SHR	SHR + MSC	SHR + HypMSC
EF(%)	83.12±3.93	72.48±3.18	75.82±3.25	79.34±1.63 ^{###}
FS (%)	46.71±4.50	37.05±2.41***	39.74±2.71	42.85±1.58 ^{###}
LVd Mass(g)	0.90±0.075	1.06±0.07 ***		0.97 ###
LVs Mass(g)	0.9±0.03	1.14±0.09		1.023±0.02 ^{###}

五、IGF1R/PI3K/Akt生存徑路的訊息增強可提高心肌細胞的增生,並顯示出抗凋亡的能力,藉此提升心肌細胞的生存能力。

六、pAMPK/SIRT1/PGC1α/PPARα 長壽途徑的增強可有效減少體 內自由基以及促進脂肪酸代謝。

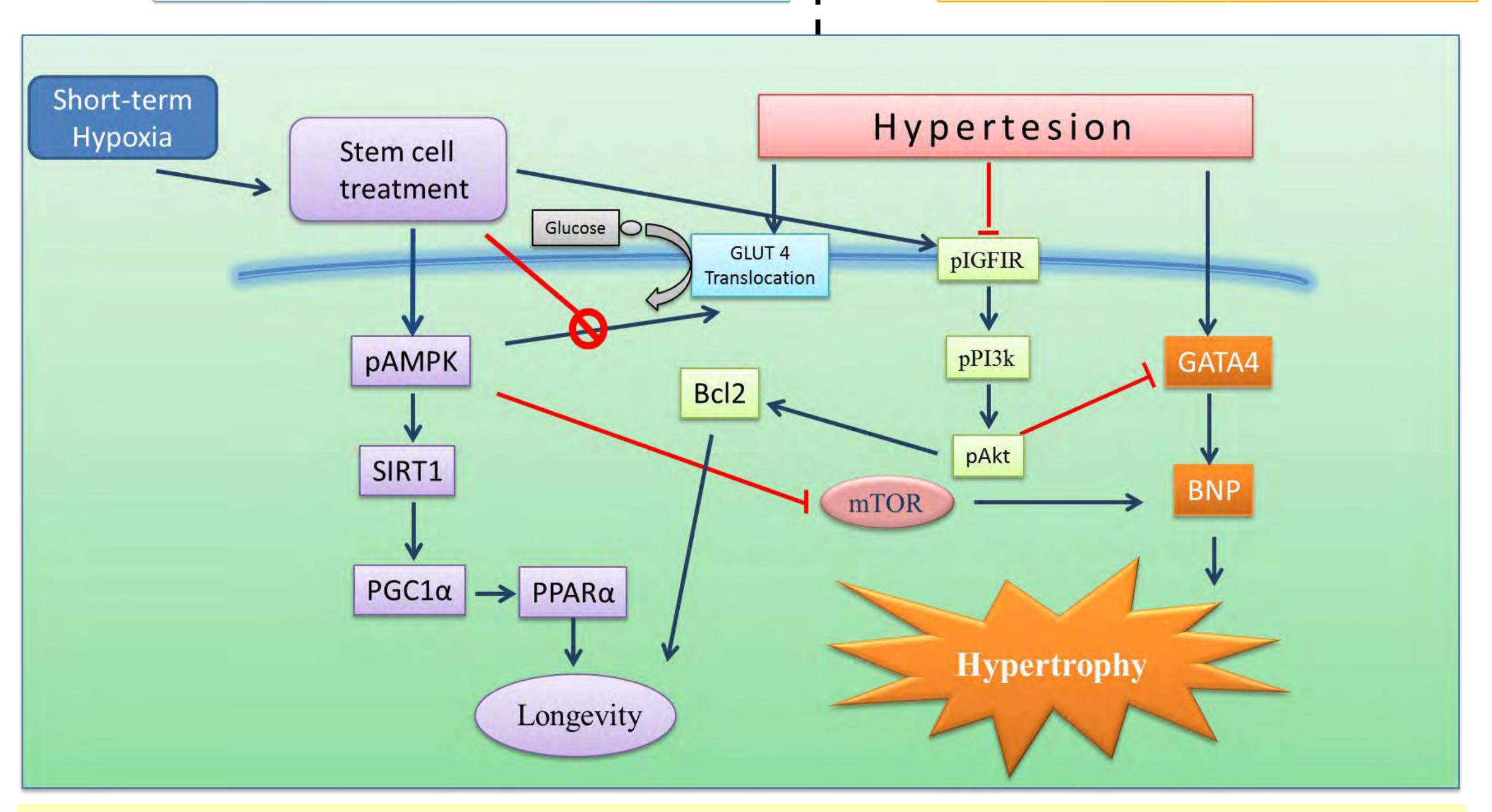
七、hADSC治療有效增強SHR大鼠心臟的生存機制,其分子機轉包括:(1)提升生存徑路表現, (2)維持正常能量代謝途徑, (3)有效維持心臟收縮功能。

八、ADSC/hADSC治療後,高血壓老鼠的心臟超音波數值有顯著的恢復;組織學檢查中,心肌細胞的排列較為整齊、細胞的大小有恢復的情形,細胞間隙也變少。hADSC處理的SHR比

ADSC處理者得到更好地保護。

結論

- 一、ADSC和hADSC回輸治療保護了高血壓所造成的心臟肥大(mTOR, BNP),並且能提高心臟細胞生存訊息途徑(pIGF1R, pPI3K, pAkt, Bcl2)以及改變能量代謝途徑(GLUT4)。
- 二、ADSC和hADSC能提高長壽基因(SIRT1)途徑,使心臟細胞更能對抗高血壓帶來的傷害。
- 三、短期的缺氧預處理,更能增加脂肪幹細胞的生存訊息途徑 (pPI3K, pAkt)和歸巢能力 (CXCR4),以及提高增生能力(VEGF)。hADSC的治療以及保護效果比ADSC顯著,表明短期缺氧除了能增強幹細胞之外,更能提高其治療效果。



我們的實驗證據顯示:脂肪幹細胞治療有效的促進了心肌細胞的生存途徑(綠色)及長壽途徑(紫色),且抑制了肥大途徑(橘色)及葡萄糖代謝(水藍色)。而缺氧的處理則使療效更加提升。