

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052010

利用斑馬魚生物模式探討多巴胺神經元再生機
轉

學校名稱：臺北市立中山女子高級中學

作者： 高二 黃翌庭 高二 劉于瑄	指導老師： 陳美蘭
---------------------------------	------------------

關鍵詞：斑馬魚、多巴胺神經、Notch

摘要

研究發現帕金森氏症與多巴胺神經元死亡有高度相關，因此我們利用有多巴胺神經元再生能力的斑馬魚探討多巴胺神經元再生過程機制。我們利用 MPTP 處理斑馬魚，以運動分析以及原位雜交的結果來協助建立多巴胺神經元死亡的類帕金森氏症生物模式，並用免疫螢光染色標定 *th1* 以及 BrdU 分析多巴胺神經元再生過程，建立斑馬魚再生新多巴胺神經元的時間軸，並以相對定量的 qPCR 分析可能參與再生過程的 Notch Signaling Pathway。我們以 2mM 濃度的 MPTP 處理斑馬魚 3 天建立多巴胺神經元凋亡的生物模式，由結果顯示，透過抑制劑 DAPT 抑制 Notch 訊息傳遞路徑可促進多巴胺神經元再生速度，運動能力恢復期由原本的停藥後 15 天縮短為停藥後 7 天，因此未來可望利用 Notch 的抑制劑促進人類多巴胺神經元的再生。

壹、研究動機

一、 帕金森氏症與多巴胺神經元

帕金森氏症在全球影響了超過 1000 萬人，在美國每年這個疾病造成的經濟負擔達 250 億美元(包括醫療費用、社會保障金及收入的損失) (Parkinson' s Disease foundation)。到目前為止還無法確定發病的原因，但基因及環境兩個共同的影響是目前認為最有可能的原因(Godoy, Noble, Yoon, Anisman, & Ekker, 2015 ; McKinley et al., 2005 ; Kalia, Lorraine, Lang, & Anthony, 2015)，帕金森氏症屬於一種慢性中樞神經退化疾病，主因是多巴胺神經元死亡導致的多巴胺分泌不足(Lam et al., 2005 ; Vernier et al., 2004 ; Kageyama, Ohtsuka, & Kobayashi, 2008) 多巴胺是一種由多巴胺神經元分泌的神經傳遞物質，在中腦黑質中主要負責運動控制。如果黑質中多巴胺分泌不足則會失去控制肌肉的能力，嚴重時會導致手腳不自主地顫動、乃至罹患帕金森氏症。初期會在放鬆時不自主顫抖，延伸運動能力退化、肢體僵硬等，在某些病例會發現到動作不會減慢，甚至是不自主增快的。在非動作的方面也可能有認知及行為問題，病情嚴重者還有失智症、憂鬱、焦慮的風險(Koch,

Lehal, & Radtke, 2013 ; Kageyama & Ohtsuka, 1999 ; Kalia et al., 2015 ; Jankovic, 2007) 。

目前對於帕金森氏症主要的治療方法為口服多巴胺的前驅物質左旋多巴，但伴隨副作用，其他的藥物僅能代替或延長左旋多巴的效用，不是一個能夠長期使用且有效的方法。如何有效根本治療帕金森氏症為臨床上迫切的問題(Jankovic & Aguilar, 2008 ; Vernier et al., 2004) 。

二、 建立帕金森氏症生物模式

為了研究多巴胺神經元再生的機轉，我們利用化合物 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)來造成多巴胺神經元細胞的凋亡。MPTP 最初是在合成 MPPP(一種毒品)時產生的雜質，吸食者使用這種含有 MPTP 污染的 MPPP 導致多巴胺神經元的死亡並出現了類似帕金森氏症的症狀。在先前的研究顯示 MPTP 的體內代謝物 MPP⁺能造成老鼠與斑馬魚的多巴胺神經元的凋亡，並產生帕金森氏症之症狀(McKinley et al., 2005 ; Lam, Korzh, & Strahle, 2005)。因此我們利用斑馬魚胚胎處理 MPTP 來建立多巴胺神經元凋亡之帕金森氏症模式。

三、 Notch signaling 在帕金森氏症及神經再生中的角色

Notch signaling pathway 是生物體中重要的信號傳遞，在眾多的發育作用中扮演著重要角色，尤其是在神經調控方面(Koch et al, 2013)。Notch protein 是在訊息接收細胞上的跨膜蛋白，在接收訊息傳遞細胞的訊後，可以被細胞內不同酵素作用，最後被 γ -secretase 作用成 Notch intercellular domain(NICD)進入細胞中控制下游基因 *Hes*(在哺乳類中) /*her*(在斑馬魚中)可以控制細胞核中基因的表現(Koch et al, 2013 ; Kageyama & Ohtsuka, 1999)，Notch 在生物體中可調節神經幹細胞維持的功能(Koch et al, 2013)，抑制 Notch 作用在神經幹細胞上可以使之分化。因此為了探討抑制 Notch signaling pathway 是否能促使或加速斑馬魚多巴胺神經再生，我們利用

N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenyl]glycine-1,1-dimethylethyl

ester(DAPT) ，一種 γ -secretase inhibitor 藥物)抑制 γ -secretase，使 NICD 無法進入細胞核中調節基因表現，進而抑制 Notch 訊息傳遞路徑，並促進神經幹細胞分化(Crawford, Quinn, & Roelink, 2007)。

四、神經再生及斑馬魚生物模式

目前缺乏在人體內促使多巴胺神經元再生的方法，我們於是利用具有神經再生能力的斑馬魚作為模式生物。斑馬魚有容易飼養且成本較低、操作容易、胚胎透明，數量多，有利於操作觀察的優點。斑馬魚與人類都是脊椎動物，與人類的基因有高度相似，加上先前的文獻證明斑馬魚多巴胺神經元在死亡後仍有再生能力，因此我們使用斑馬魚來研究多巴胺神經元再生機制。

貳、研究目的

一、利用 MPTP 處理建立斑馬魚多巴胺神經元死亡的類帕金森氏症生物模式

(一)觀察斑馬魚運動情形之改變

(二)觀察斑馬魚多巴胺神經元死亡

二、探討斑馬魚多巴胺神經元再生機制

(一)建立斑馬魚再生新多巴胺神經元的時間軸

(二)調控 Notch 訊息傳遞路徑觀察多巴胺神經元再生速度的改變

參、研究設備及器材

一、斑馬魚

斑馬魚幼魚在受精後 24 小時(hpf, hours-post-fertilization)分裝在 12 孔盤中，每孔 12 個胚胎，分為對照組(0uM)與不同濃度 MPTP 的實驗組，125uM、500uM、1mM、2mM，每日重新更換含藥物水溶液，共處理三天，經過實驗之後決定以 2mM 進行接下來的實驗。

決定使用濃度後，斑馬魚幼魚在受精後 24 小時分裝在兩個 6 孔盤中，用其中 10 孔，每孔 15 個胚胎，分為對照組(0uM)與 2mM MPTP 的實驗組。

二、MPTP

把 MPTP stock 50mM 600ml，用 E3 buffer 稀釋到 125uM、250uM、500uM、1mM、2mM 15c. c.，每孔加 3c. c. 每日重新更換含藥物水溶液，共處理三天。

三、藥品

MPTP stock, PTU buffer, 4% PFA reagent, PBST buffer, 漂白水, H₂O₂ 溶液, KOH 溶液, ddH₂O, Methanol, acetone, triton X-100, glycine, DMSO, goat serum, anti-TH, anti-mouse, sheep serum, plasmid, DH5 α , LB broth, Mini-prep plasmid extraction kit, agarose, Ethidium Bromide, TAE, TBE, NcoI(enzyme), Cutsmart buffer, template(TH/NcoI), 10x SP6 buffer, NTP mix sp6 RNAP, RNase inhibitor DNAas1, DEPC-PBST buffer, Proteinase K, Formamide, 20x saline-sodium citrate, tRNA, Heparin, Tween 20, (DIG)-labeled probes, anti-DIG-AP, Tris-Hcl (pH9.5), MgCl₂. 6H₂O, NaCl, nitro-blue, tetrazolium, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Tricaine, E3 buffer. cDNA, SYBR Green, Forward Primer Reverse Primer, Optimal cutting temperature compound(OCT), Sudan Black B, Bromodeoxyuridine(BrdU)。

四、器材

6-well plate, Eppendorf, pipette, shaker, suction, 螢光顯微鏡, 玻片, 毛細管, 玻璃針, 酒精, 酒精燈, 塗盤用具, 離心機, incubator, 37°C 水浴場, column, 24-well plate, QPCR 分析儀, 96-well late, superfrost plus 玻片, 冷凍切片機, 包埋盒。

肆、研究過程及方法

一、研究過程

- (一) 測量合適 MPTP 濃度建立斑馬魚的帕金森氏症生物模式
- (二) 利用擺尾實驗分析運動情形
- (三) 利用原位雜交法確認 MPTP 引起的動作異常是由於多巴胺神經元細胞的缺失
- (四) qPCR 及冷凍切片和免疫螢光染色技術分析 *th1* 表現量及多巴胺神經元細胞數量
- (五) qPCR 的技術分析 Neuron marker 和 Notch marker
- (六) 以 DAPT 處理斑馬魚並分析運動距離
- (七) 利用 BrdU 及冷凍切片和免疫螢光染色辨認再生細胞

二、實驗方法

(一) 擺尾實驗

1. 實驗組：4 天(停藥後 1 天)。對照組：4 天。
2. 魚用麻醉劑麻醉後，放在培養皿上，盡量把魚上的水抽乾，滴上 3%的膠(Agarose)，等膠乾後，把魚尾部和胸部的膠切除(在解剖顯微鏡下操作)，使魚的頭部固定，滴 E3buffer 等魚尾巴恢復自由擺動。
3. 接著以 30s 為間隔用毛細管玻璃針戳魚的 Yolk 和 Yolk extension，並錄影分析。

(二)原位雜交(in situ hybridization)

Whole-mount RNA in situ hybridization 的原理是利用完全互補的 RNA 序列來辨認目標序列。為了觀察多巴胺神經元有無減少/死亡，我們利用先前實驗室分離出來的 tyrosine hydroxylase 1(th1)合成 DIG-labeled *th1* 的探針，利用此探針與內生性 *th1* mRNA 結合。接著利用 anti-DIG-AP 進行免疫染色後，透過 AP 催化 substrate 產生色素沈澱來標定 *th1* mRNA 的表現位置與表現量，藉此分析在 MPTP 處理後多巴胺神經細胞的數目。

th1 是合成 tyrosine hydroxylase 的基因，tyrosine hydroxylase 是一個催化 L-dopa 形成的速率決定步驟之酵素，會大量表現在多巴胺神經元細胞中，因此用作為觀察多巴胺神經元數量的標誌，觀察多巴胺神經元是否有減少，我們利用了免疫螢光染色與 Whole-mount RNA in situ hybridization 與 qPCR 三種技術來進行分析 Th1 及 *th1*。

(三) qPCR

qPCR 的原理是複製特定的序列，在 qPCR 過程中雙股 DNA 會與非專一性的 SYBR Green 結合發出螢光，因此藉由每個循環所放出的螢光亮即可回推樣本的含量。qPCR 的優點是可以直接定量，不用經過跑膠的步驟因此可以縮短時間。

我們利用測量不同天數大損傷後斑馬魚體內 *th1*，Neuron maker (*gfap* 標定星形膠質細胞與其他神經膠質細胞、*sox2* 標定多潛能性幹細胞、*neurogl1* 標定神經幹細胞、*th1* 標定多巴胺神經細胞)、Notch maker(*notch1a*, *notch1b*, *her2*)的表現量，與對照組比較，觀察多巴胺神經元是否有再生的情形，並找出修復期。

(四)冷凍切片和免疫螢光染色

冷凍切片和免疫螢光染色(slides immunofluorescence)是利用 Optimal cutting temperature compound(OCT)把組織包埋後冷凍，使組織較為堅固，再利用冷凍切片機切成薄片。切成薄片後的組織，在免疫螢光染色時，抗體較能容易進入組織中，在顯微鏡下也較容易觀察多巴胺細胞。

實驗方法：

斑馬魚浸泡在 OCT 中在乾冰上冷凍，等 OCT 變白色固體時，放入冷凍切片機 (OT:-25 度、CT:-10 度) 切成 10um 的薄片後貼在 superfrost plus 玻片上，烘乾 1hr，放-20 度冰箱。

處理完的玻片在 2% Triton X-100/PBS 中處理 1hr 後，在 5%GS/0.2%Triton X-100/1%DMSO/PBS 中，blocking 1hr，下一抗放 4 度 O/N，用 PBS 洗掉一抗後加入 Sudan Black B/70% ethanol 在室溫下放 30min，用 PBS 洗掉後下二抗(in 2%GS/0.2%Triton X-100/1%DMSO/PBS)，2hr 後用 PBS 洗掉抗體。

(五)利用 DAPT 處理斑馬魚

Notch 機制啟動後，會被 γ -secretase 作用成 Notch intercellular domain(NICD)，進入細胞核中，DAPT 是 γ -secretase inhibitor，會在 Notch 機制啟動後抑制 γ -secretase，使 NICD 無法產生，進而抑制 Notch signaling。DMSO 為 DAPT 的溶劑。

(六)利用 BrdU 辨認再生細胞

BrdU 是核苷的類似物，在 DNA 複製(細胞週期的 S 期)進入細胞內，因此複製的細胞內即含有 BrdU。先讓斑馬魚浸泡在 2N HCL，使 DNA 變成單股讓對 BrdU 有專一性的抗體容易辨認，再加入有螢光訊號的二抗，即可以辨認增生細胞。

實驗方法：

BrdU stock : 0.154g 的 BrdU 加入 ddH₂O 50 c. c. 配成 10 mol 溶液。實驗組在停藥後第 3 天開始同時處理 DAPT 加 BrdU 到停藥後第 5 天，共處理兩孔，一孔為 3c. c. BrdU stock 加 DAPT 25mM 12ul；對照組在停藥後第 3 天開始同時處理 DMSO 加 BrdU 到停藥後第 5 天，共處理兩孔，一孔為 3c. c. BrdU stock 加 DMSO 25mM 12ul。

(七)運動距離分析

實驗方法把斑馬魚放入 96 孔盤中，錄影 5min 紀錄斑馬魚的運動情形，接著用程式分析斑馬魚的運動距離。

伍、研究結果

一、 建立斑馬魚的帕金森氏症生物模式

為了要建立帕金森氏症生物模式，我們參考了先前文獻利用藥物 MPTP 處理斑馬魚，造成多巴胺神經細胞的死亡以建立帕金森氏症的模式(McKinley et al., 2005 ; Lam, Korzh, & Strahle, 2005)。之後，測試不同濃度的 MPTP 對斑馬魚胚胎發育的影響。我們將受精後 24 小時(hours-post fertilization, hpf)的斑馬魚胚胎以 125 μ M、 250 μ M、 500 μ M、1mM、2mM 的 MPTP 處理至 96hpf，進行斑馬魚的型態分析。結果顯示，斑馬魚的外觀在不同的濃度處理過後跟控制組沒有明顯差異(圖 1)，這表示我們測試的 MPTP 濃度不會造成斑馬魚胚胎的發育異常。

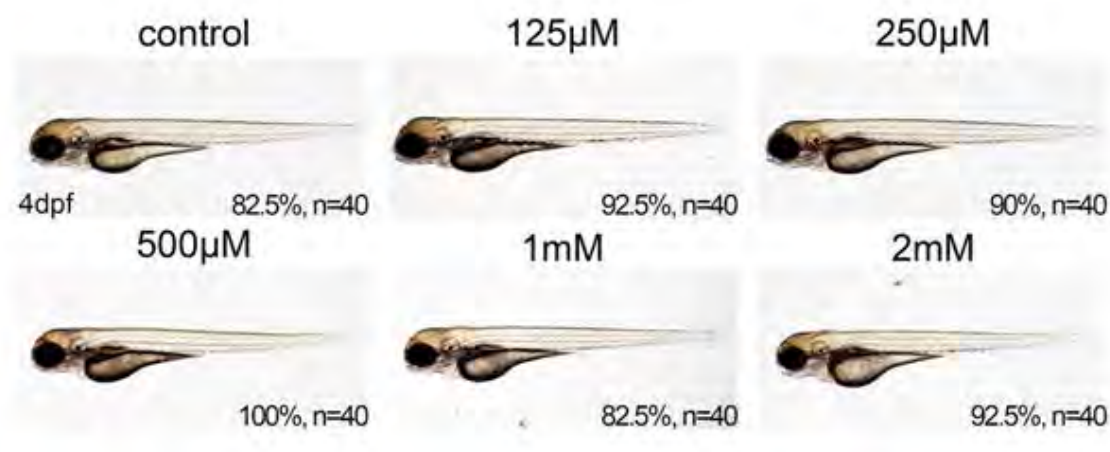


圖 1. 斑馬魚幼魚在受精後 24 小時，分為對照組(0 μ M)與不同濃度 MPTP 的實驗組(control、125 μ M、250 μ M、 500 μ M、1mM、2mM)，每日重新更換含藥物水溶液，共處理三天後(四天大)。(註：Days Post Fertilization (dpf)為受精後天數，%為存活率，n 為樣本數。)

多巴胺神經元的缺失會導致運動產生障礙，因此我們接下來利用自主性擺尾實驗分析 MPTP 處理後斑馬魚胚胎的運動情形。結果顯示以 MPTP 處理的斑馬魚產生小角度的擺動(圖

2)，這與帕金森氏症患者的震顫類似。也確認了 MPTP 的處理可以使斑馬魚產生類似帕金森氏症的症狀。

我們也分析了刺激後斑馬魚擺尾的情況，其結果顯示在有刺激的條件下，斑馬魚尾部的擺動角度較控制組來的大(圖 3)。

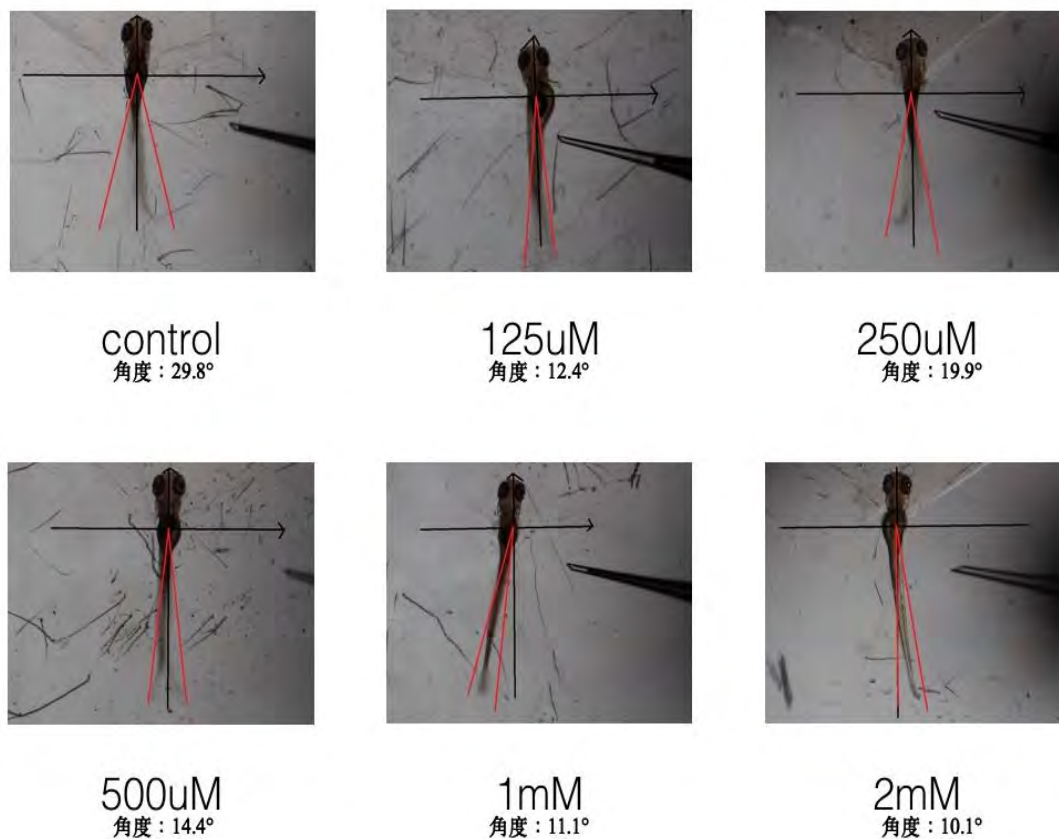


圖 2. 斑馬魚未受刺激時的泳動情形，圖中所標的角度為斑馬魚尾巴擺動的角度

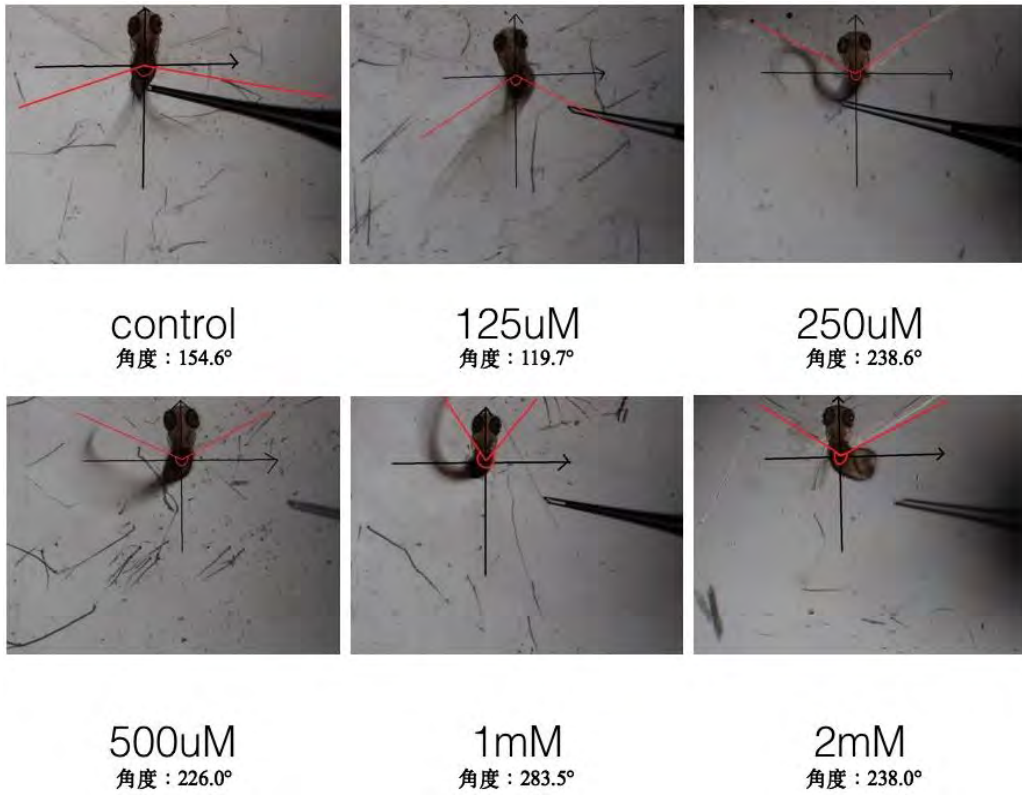


圖 3. 斑馬魚受刺激時的泳動情形，圖中所標的角度為斑馬魚尾巴擺動的角度

由斑馬魚受刺激時的連續分鏡圖(圖 4~9，時間間隔為 1/50 秒，時間總共為 0.96 秒)我們可以發現斑馬魚會突然大幅度擺動，而且在未受刺激的情況下有時也會有此情形，因此透過上述實驗我們可以得知 MPTP 的確會造成斑馬魚的運動異常。



圖 4. control 組受刺激後的運動狀況，左上角為第一張，時間順序為由左至右由上至下

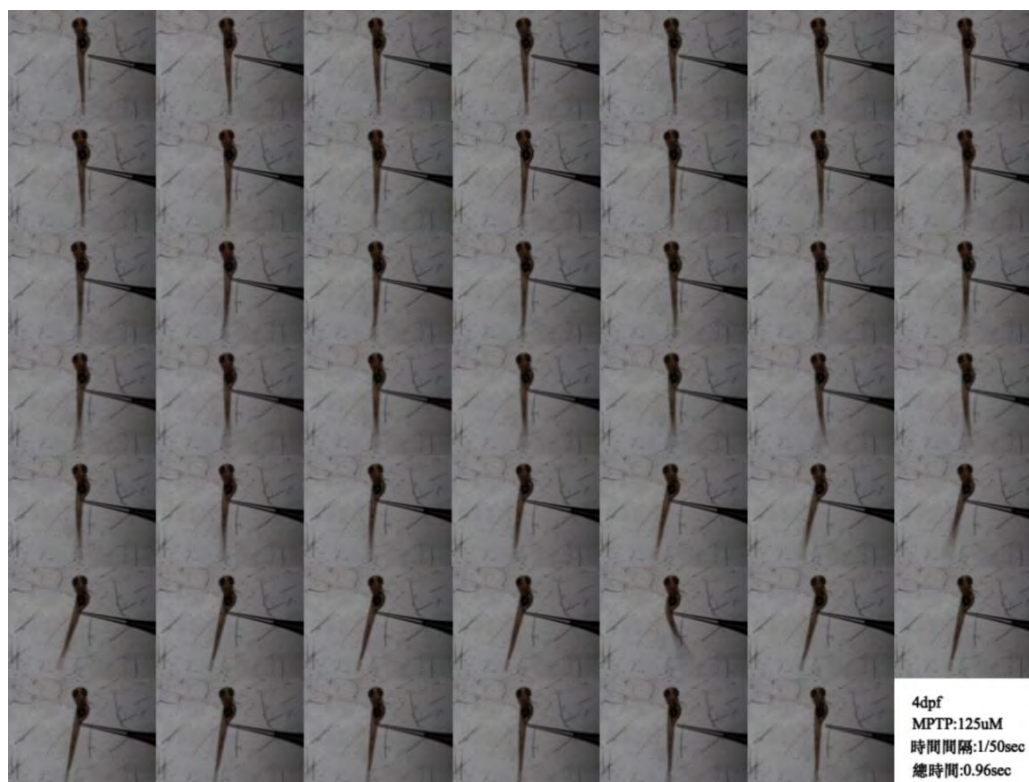


圖 5. 125uM 組受刺激後的運動狀況，左上角為第一張，時間順序為由左至右由上至下



圖 6. 250uM 組受刺激後的運動狀況，左上角為第一張，時間順序為由左至右由上至下



圖 7. 500uM 組受刺激後的運動狀況，左上角為第一張，時間順序為由左至右由上至下



圖 8. 為 1mM 組受刺激後的運動狀況，左上角為第一張，時間順序為由左至右由上至下



圖 9. 為 2mM 組受刺激後的運動狀況，左上角為第一張，時間順序為由左至右由上至下

為確認 MPTP 所引起的動作異常是由於多巴胺神經元細胞的缺失，我們利用原位雜交法分析多巴胺神經元中會產生的酵素 *tyrosine hydroxylase 1 (th1)* 其基因的表現。結果顯示 MPTP 的處理能減少多巴胺神經元的數量(圖 10)，表示 MPTP 確實能造成多巴胺神經元的缺失。

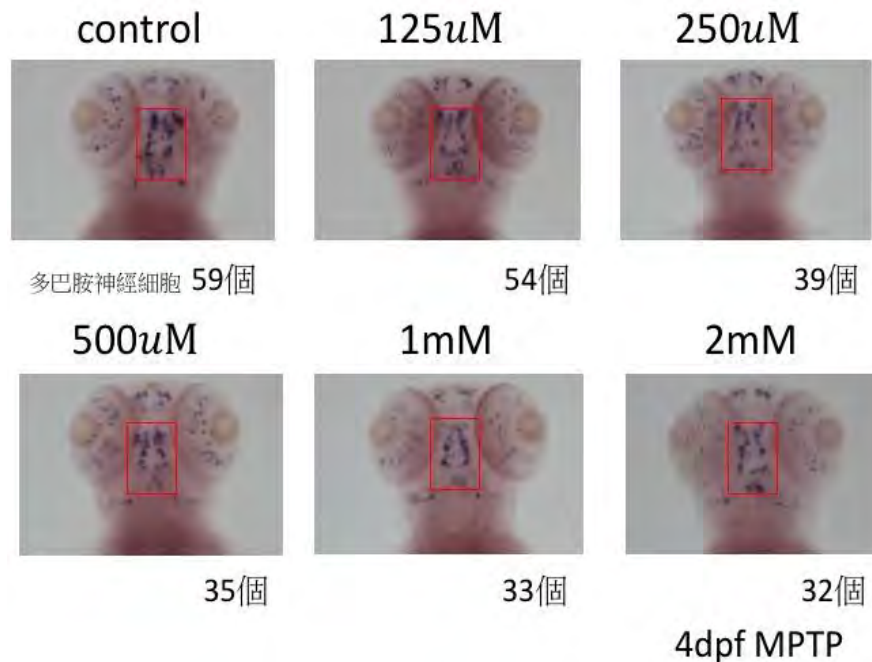


圖 10. 利用經不同濃度 MPTP 處理過後的斑馬魚進行 in situ hybridization 的結果，深紫色處為多巴胺神經元的訊號，control 的細胞數為 59 個，125um:54 個，250um:39 個，500um:35 個，1mM:33 個，2mM:32 個。

以上的結果顯示利用 MPTP 處理斑馬魚胚胎確實能產生帕金森氏症的現象，由於 2mM 能明顯降低多巴胺神經元的數量，也有帕金森氏症的症狀，因此後續實驗將以 2mM 的 MPTP 作為處理斑馬魚的濃度。

二、 觀察神經再生

(一) *th1* 表現

為了確定斑馬魚體內的多巴胺神經是否真的會再生，因此我們利用 qPCR 技術去分析 *th1* 表現量，發現儘管在 in situ hybridization 實驗當中發現多巴胺神經元量減少，但經過 MPTP(2mM)處理的斑馬魚，其 *th1* 基因的表現相較未經 MPTP 處理的 control 組卻來得高，且停藥後越多天 control 與 MPTP 組的表現量越相近。推測可能是實驗組

的斑馬魚欲補足體內多巴胺的減少而啟動回饋的機制，而待多巴胺神經再生後的 *th1* 基因的表現量即與對照組相差不多。(圖 11)

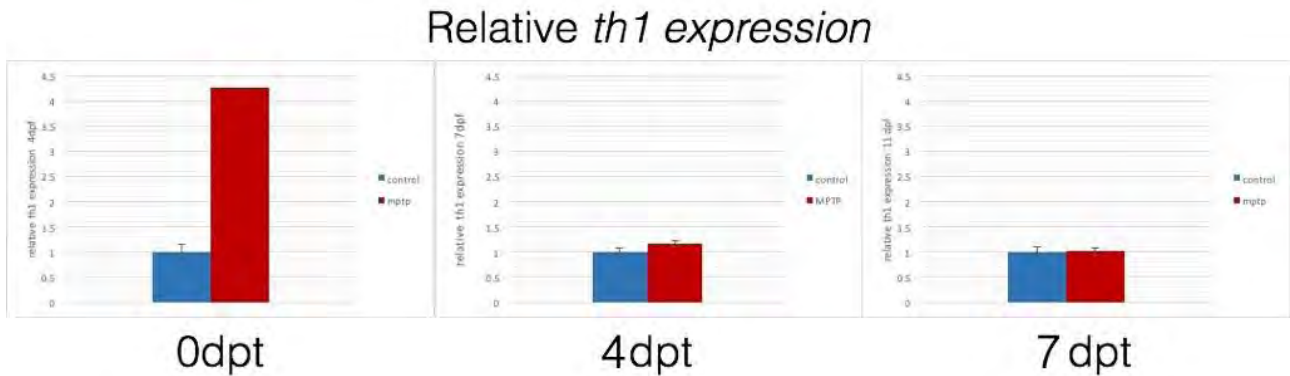


圖 11. 停藥後 0, 4, 7 天的斑馬魚體內 *th1* 表現

(二) 冷凍切片和免疫螢光染色

在切片免疫螢光實驗中可看出，停藥後第零天時實驗組的細胞數為對照組的 44.4%，到了停藥後第七天時實驗組細胞數增為對照組的 52.7%，停藥後第十五天更增為對照組的 70.5%，因此推論斑馬魚的多巴胺神經元確實有再生情形。

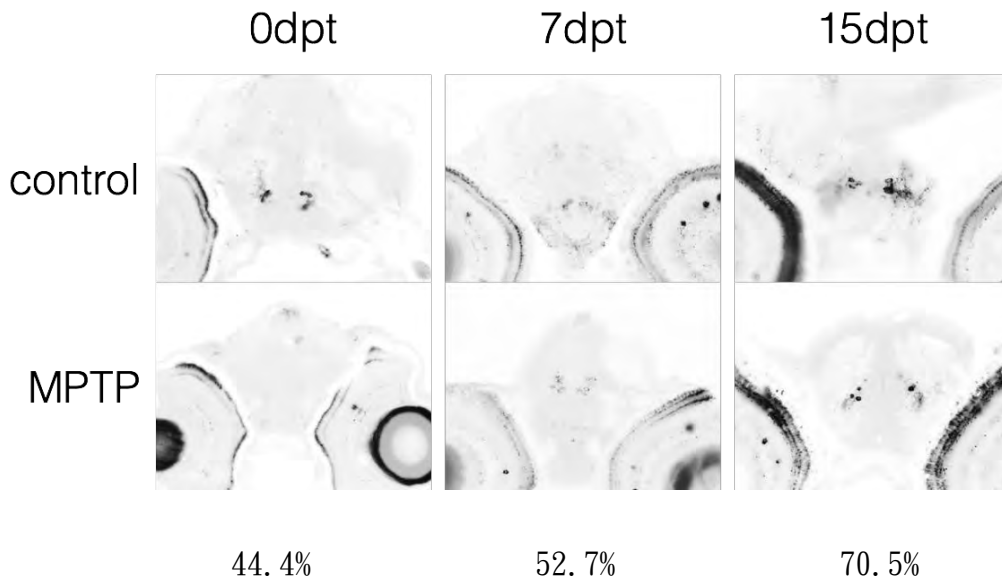


圖 12. 多巴胺細胞在停藥後 15 天內的細胞數上升。表示停藥後 15 天時斑馬魚體內的神經有再生的情形。

(三)運動分析:

藉由運動分析的方式，並與對照組比較，我們可以得知斑馬魚是否可以利用神經再生的方式恢復運動能力。透過此實驗我們發現在經過 MPTP 處理三天的斑馬魚，在停藥 15 天的運動情形已經和對照組無統計上的差異。因此斑馬魚確實有自我修復能力。

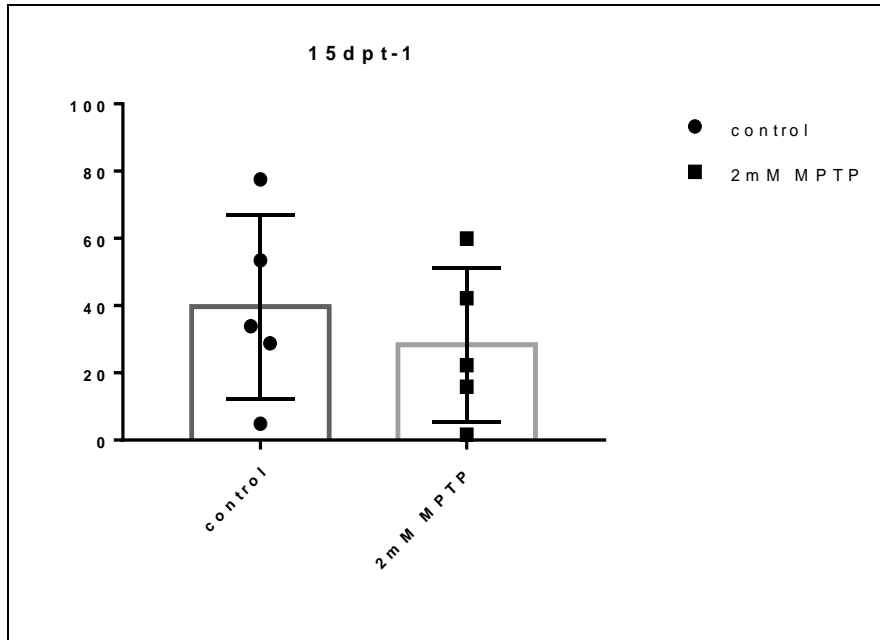


圖 13. 實驗組(用 MPTT 處理停藥後 3 天)與對照組進行運動分析比較差異，縱軸為移動距離。

(四)Neuron marker

為找出斑馬魚在多巴胺神經死亡後的再生高峰期，我們利用 qPCR 的技術去分析 Neuron marker 在 0dpt(停藥後一天)到 7dpt(停藥後七天)的表現。我們利用不同的 Neuron marker 去辨認斑馬魚自我修復時體內不同細胞的表現量(*gfap* 標定放射狀膠質細胞、*sox2* 標定神經幹細胞、*neurog1* 標定神經元前驅細胞、*th1* 標定多巴胺神經細胞)，發現停藥後第 0 天，第 1 天表現量比對照組低，表示在藥物處理後神經細胞逐漸死亡，而從停藥後第 3 天開始表現量開始上升到停藥後第 5 天達到最高峰，表示停藥後 3 到 5 天斑馬魚體內的神經細胞開始有增生的現象，推論停藥後 3 到 5 天斑馬魚體

內的大多數幹細胞可能先複製，再進行分化，而斑馬魚神經元的增殖大約在停藥後 3~5 天(圖 14)。

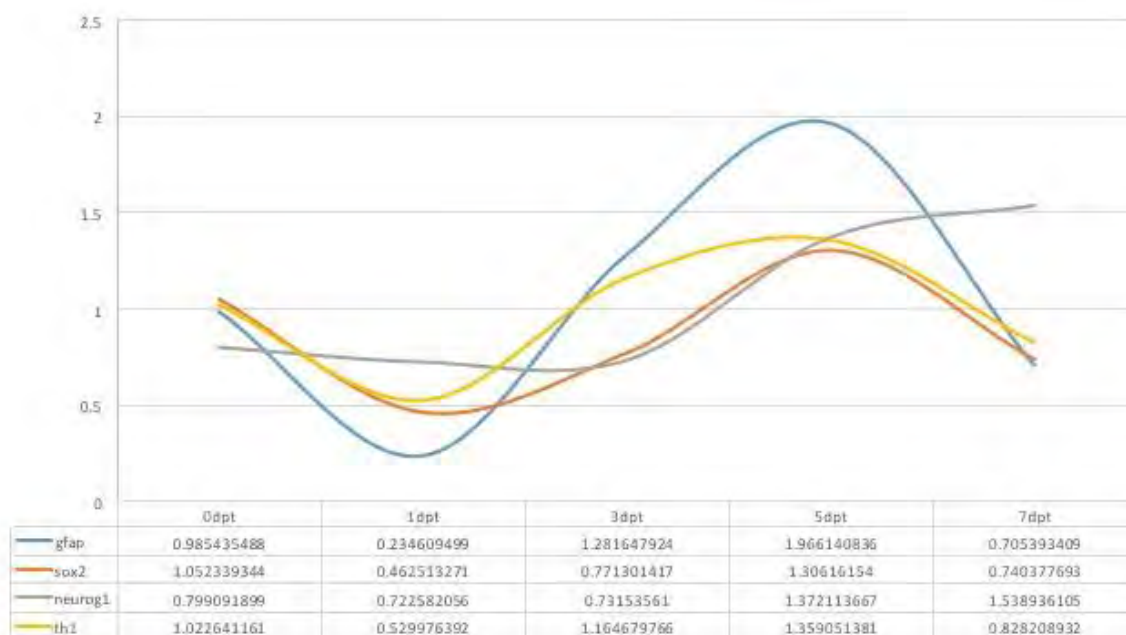


圖 14. 幹細胞在 3 到 5 天時的表現量有上升的趨勢。表示停藥後 3 到 5 天時斑馬魚體內的神經有再生的情形，推測可能為斑馬魚主要神經再生期。縱軸為與對照組相比的表現量

(五)Notch

Notch 在細胞表現上是調控基因表現的一個很重要的機制，如果表現，根據先前的文獻(Koch et al, 2013 ; Kageyama & Ohtsuka, 1999)得知 Notch 會維持細胞原本的狀態。因此我們想知道 Notch 在多巴胺神經的再生方面，扮演著什麼樣的角色，於是在實驗證明多巴胺神經表現量大約在停藥後 8 天時回復到與對照組無統計上誤差，及神經幹細胞在 3~5 天時有增生的現象後，我們用 *notch1a*、*notch1b*、*her2* 去辨認斑馬魚體內 notch 的變化(圖 15)，我們發現 notch 表現的趨勢與神經細胞大致相同，由於 notch 的表現會使幹細胞維持原本狀態，因此停藥後 3 到 5 天斑馬魚體內的幹細胞大多數可能先複製，再進行分化，但仍須進一步利用 BrdU 去辨認再生細胞來探討

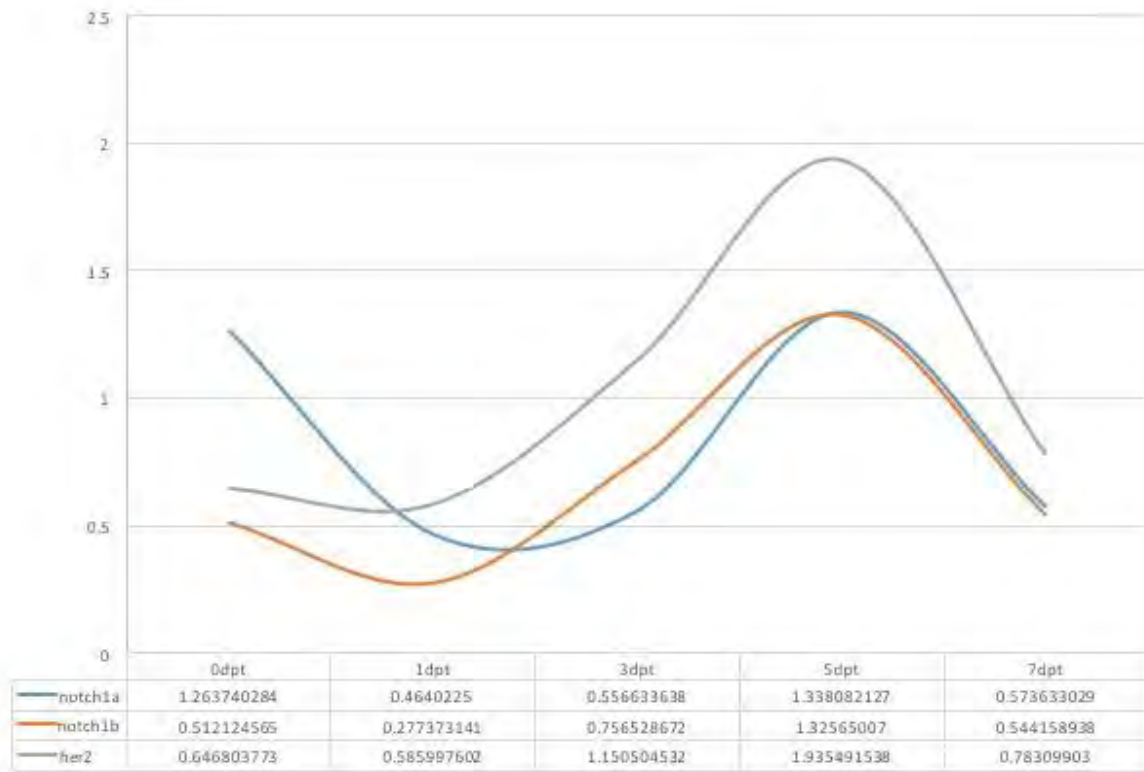


圖 15. Notch 在 3 到 5 天時的表現量有上升的趨勢，表示 Notch 可能在維持幹細胞不分化。縱軸為與對照組相比的表現量。

三、 利用 DAPT 抑制 Notch

為了證明 DAPT 真的能透過抑制 Notch 來使細胞分化，實驗組(用 DAPT 處理停藥後 3~5 天)與對照組(用 DMSO 處理停藥後 3~5 天)進行運動分析比較差異，我們發現在停藥後第七天時發現經過 DAPT 處理與對照組的運動情形並無統計上差異。表示 DAPT 抑制 Notch 後可以使幹細胞增加分化，導致斑馬魚運動能力恢復。(圖 16)

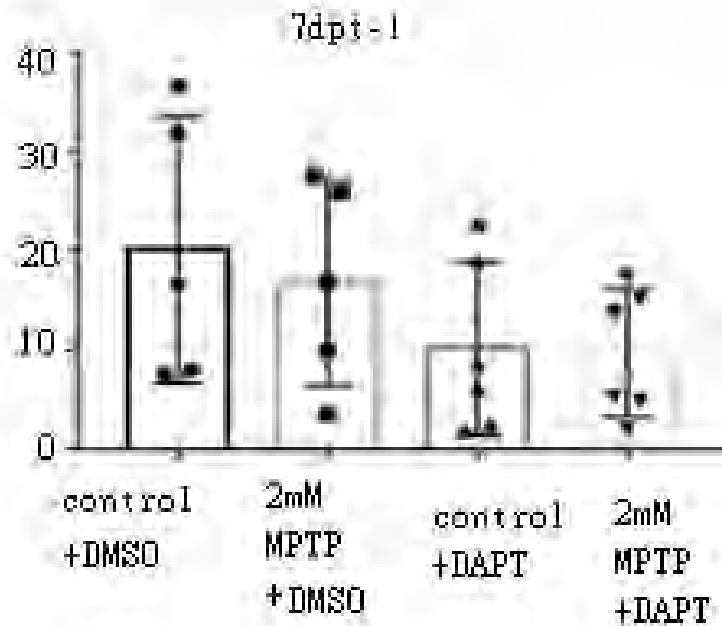


圖 16. 實驗組(用 DAPT 處理停藥後 3~5 天)與對照組(用 DMSO 處理停藥後 3~5 天)進行運動分析比較差異，縱軸為移動距離，從左邊數來第一個為 control 加 DMSO，第二個為 MPTP 加 DMSO，第三個為 control 加 DAPT，第四個為 MPTP 加 DAPT)

四、利用 BrdU 去辨認再生細胞:

由於運動情形個體差異，因此利用 BrdU 去辨認再生細胞並與切片免疫螢光染色與 th1 相互對照觀察斑馬魚體內神經再生情形。目前初步結果還沒出來，已進入泡藥處理階段，以 BrdU 處理停藥後不同天數斑馬魚。

陸、討論

先前的研究證明斑馬魚幼魚在受精後 24 小時用 MPTP $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 處理三天是可以造成多巴胺神經死亡(McKinley et al., 2005)，也有文獻是以 $800 \mu\text{M}$ 作為最後實驗濃度(Lam et al., 2005)，我們最後決定使用的濃度為 2 mM，實驗證明確實會造成帕金森氏症的症狀，但不會造成斑馬魚的外觀或其他畸形，表示 2 mM 的濃度可能也為 MPTP 處理斑馬魚濃度。

透過上述實驗我們得知，幹細胞在停藥後 3 到 5 天時的表現量有上升的趨勢。表示停藥後 3 到 5 天時可能為斑馬魚主要幹神經增殖期。接著由 Notch 的表現看來，幹細胞是先複製增加數量後再進行分化。最後透過 DAPT 去抑制 Notch 的表現，我們即可以確認抑制 Notch 後可以使幹細胞增加分化，導致斑馬魚運動能力恢復。

透過實驗我們發現 2mM 的 MPTP 處理斑馬魚所產生的不自主顫抖，及突然的抽動這跟帕金森氏症患者運動時十分類似。可為造成斑馬魚產生類似帕金森氏症的有效濃度，經過 MPTP 處理的斑馬魚在停藥後 3~5 天會有細胞增生及再生的現象，在停藥後 15 天運動情形已經與對照組無統計上的差異，可經由 DAPT 抑制 Notch 使損傷後的斑馬魚讓修復期縮短。但因為活體有個體差異，我們仍然希望能夠透過 BrdU 處理來更清楚的了解 Notch Signaling Pathway 對多巴胺神經元再生的影響。

柒、結論

- 一、定出 MPTP 於斑馬魚中可造成巴金森氏症之有效時期及劑量。
- 二、停藥後 3 到 5 天時可能為斑馬魚主要幹神經增生期，之後可能是斑馬魚多巴胺神經元分化的主要時期。
- 三、斑馬魚多巴胺神經元在破壞後，可於 15 天內再生，並恢復運動能力。
- 四、抑制 NOTCH 的活性可將多巴胺神經元在破壞後之運動能力恢復期縮短為 7 天。

捌、參考資料

一、文獻

- (一) Crawford, T. Quinn., Roelink H. (2007). The Notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling *Developmental Dynamics*.
- (二) Godoy, R., Noble, S., Yoon, K., Anisman, H., Ekker, M.(2015). Chemogenetic ablation of dopaminergic neurons leads to transient locomotor impairments in zebrafish larvae.

Journal of Neurochemistry, 249-260

- (三) Jankovic, J., (2007). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.
- (四) Jankovic J, Aguilar L. G. (2008). Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 4(4): 743–757.
- (五) Kageyama R., Ohtsuka T.(1999). The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res; Sep;9(3):179-188.*
- (六) Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T.(2008). Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ.* 10.1111/j.1440-169X.2008.00993.x.
- (七) Kalia, Lorraine V., Lang, Anthony E. (2015). Parkinson's disease. *THE LANCET*; 29 August–4 September 2015, Pages 896-912
- (八) Koch, U., Lehal, R., Radtke, F. (2013). Stem cells living with a Notch.
- (九) Lam, C.S., Korzh, V., Strahle, U.(2005). Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP.; *Eur J Neurosci.* 21(6):1758-62.
- (十) McKinley, Enid T., Baranowski, Timothy C., Blavo, Delali O., Cato, C., Doan, Thanh N., Rubinstein, Amy L.(2005). Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Molecular Brain Research,* 128-137
- (十一) Vernier, P., Moret, F., Callier, S., Snapyan, M., Wersinger, C., Sidhu, A.(2004). The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system; *Ann N Y Acad Sci.* 1035:231-49

二、網站

- (一) Parkinson's Disease Foundation。 2017年1月，取自
<http://parkinson.org/>

【評語】 052010

目前 Parkinson 症與多巴胺神經死亡有關，本計畫以 2mM 之 MPTP 處理斑馬魚 3 天，以運動分析，以及原位雜交建立多巴胺神經元死亡之類帕金森氏生物模式，並以螢光染色標定 th1 以及 Brdu 分析多巴胺神經元再生過程，以及以 q-PCR 分析參與再生過程之 Notch Signal Pathway。研究發現帕金森氏症與多巴胺神經元死亡有高度相關，因此利用有多巴胺神經元再生能力的斑馬魚探討多巴胺神經元再生過程機制。結果顯示，透過抑制 Notch 訊息傳遞路徑可促進多巴胺神經元再生速度。

1. DAPT 抑制 Notch 可以使幹細胞增加分化，導致斑馬魚運動能力恢復(圖 16)這結果並不能讓人家相信。運動能力之恢復，可能和很多原因相關。
2. 在論文的撰寫上有待加強，像是研究動機的部分並未提及重點，通篇有過多的篇幅在講述實驗過程，結論及思考部分偏弱，仍有進步空間。
3. 探討議題重要，撰寫流暢，與過往研究之間的關係交不清楚，意即此研究的創新之處何在，其結果又如何與其他類似研究作對照，在文中並未清楚描述。

摘要

帕金森氏症為慢性中樞神經退化疾病，會導致運動能力退化。多巴胺神經元在腦中黑質部，調控自主運動。目前研究發現多巴胺神經元的死亡與帕金森氏症有高度相關。人類的多巴胺神經元死亡便無法再生，因此我們利用有神經再生能力的斑馬魚進行研究，透過MPTP使多巴胺神經元死亡，並利用DAPT調控Notch，促進神經幹細胞分化成多巴胺神經元。我們發現神經損傷後的斑馬魚，經過DAPT處理後運動情形修復期的確比未處理的斑馬魚的修復期短，未來希望觀察其他物質對Notch與多巴胺神經元的影響。

壹、研究動機與目的

目前帕金森氏症是無法根治的，而多巴胺神經元位於腦中黑質部，而多巴胺神經元死亡導致多巴胺分泌不足則與帕金森氏症有密切相關。在先前的研究顯示MPTP的體內代謝物MPP+會造成老鼠與斑馬魚的多巴胺神經元的凋亡，並產生帕金森氏症之症狀。因此我們利用MPTP處理斑馬魚胚胎來建立多巴胺神經元凋亡之帕金森氏症模式。Notch是生物體中重要的信號傳遞，若抑制Notch作用在神經幹細胞上，則可以使之分化。斑馬魚與人類都是脊椎動物，與人類的基因有高度相似，加上斑馬魚多巴胺神經元有再生能力，目前缺乏在人體內促使多巴胺神經元再生的方法，故我們利用具有神經再生能力的斑馬魚作為模式生物，藉由DAPT調控Notch，以觀察對神經幹細胞分化的影響。透過qPCR、原位雜交和免疫螢光染色等方法去觀察斑馬魚多巴胺神經死亡情形及再生機制，並探討Notch與斑馬魚多巴胺神經元再生的關係。藉由抑制Notch，比較多巴胺神經再生的差異，及是否會影響多巴胺神經元的再生的時間。

貳、研究設備及器材

- 一、斑馬魚: 斑馬魚幼魚在受精後24小時分裝在12孔盤中，每孔12個胚胎，分為對照組與不同濃度MPTP的實驗組，經過實驗之後決定以2mM進行接下來的實驗。決定使用濃度後，斑馬魚幼魚在受精後24小時分裝在兩個6孔盤中，用其中10孔，每孔15個胚胎，分為對照組與2mM MPTP的實驗組。
- 二、MPTP: 把MPTP stock稀釋到目標濃度，每孔3c.c.每日重新更換，共處理三天。
- 三、藥品: MPTP stock, DMSO, anti-TH, Bromodeoxyuridine(BrdU), etc.
- 四、器材: 螢光顯微鏡, 24-well plate, QPCR分析儀, 冷凍切片機, etc.

參、研究過程或方法

利用MPTP處理斑馬魚

MPTP定量

分別用0uM, 125uM, 250uM, 500uM, 1mM, 2mM的MPTP處理24hpf的斑馬魚胚胎

進行擺尾實驗(自主、及經刺激)

確認無明顯發育異常

進行原位雜交(in situ hybridization)

決定使用的MPTP濃度

以2mM(進行定量後決定的濃度)的MPTP處理24hpf的斑馬魚胚胎

探討多巴胺神經元再生

以qPCR分析th1表現量

以冷凍切片及IHC分析多巴胺神經元生長情形

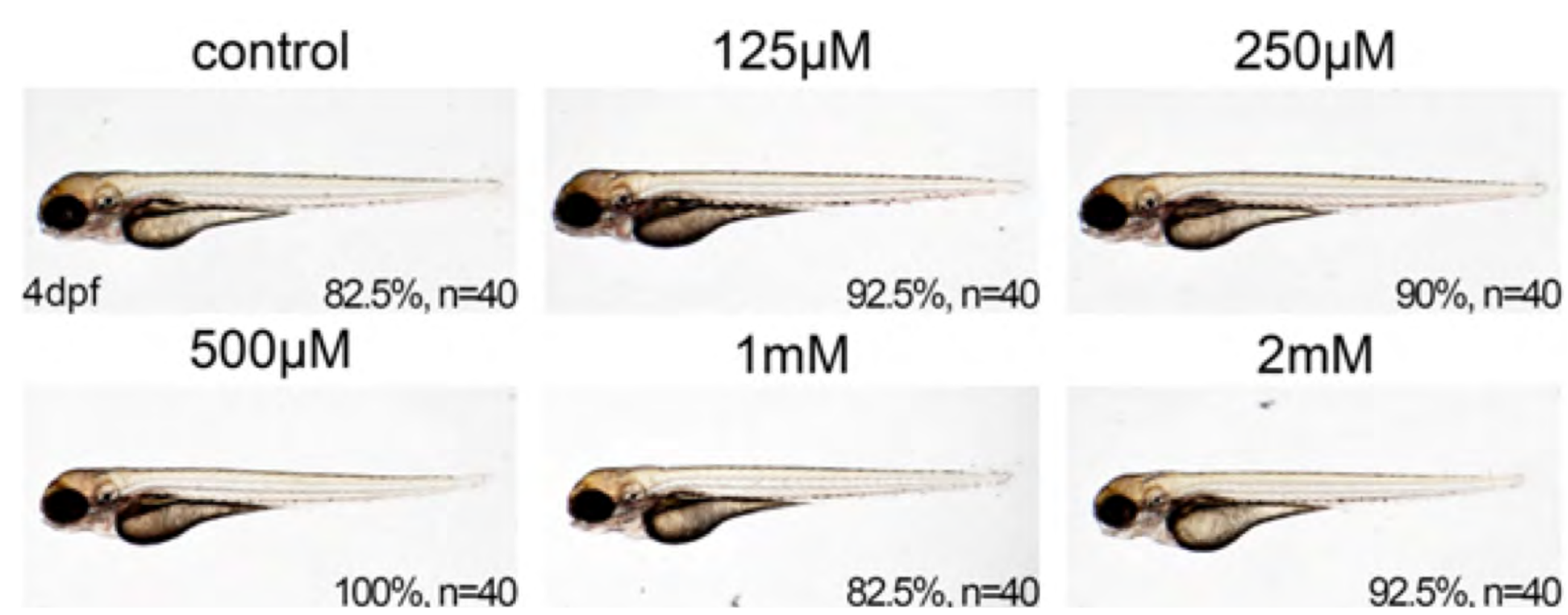
分析notch未經抑制以及經抑制的行為

以qPCR分析細胞(*gfap*, *sox2*, *neurog1*)、*th1*、*notch*表現

以MPTP、DAPT及BrdU處理斑馬魚

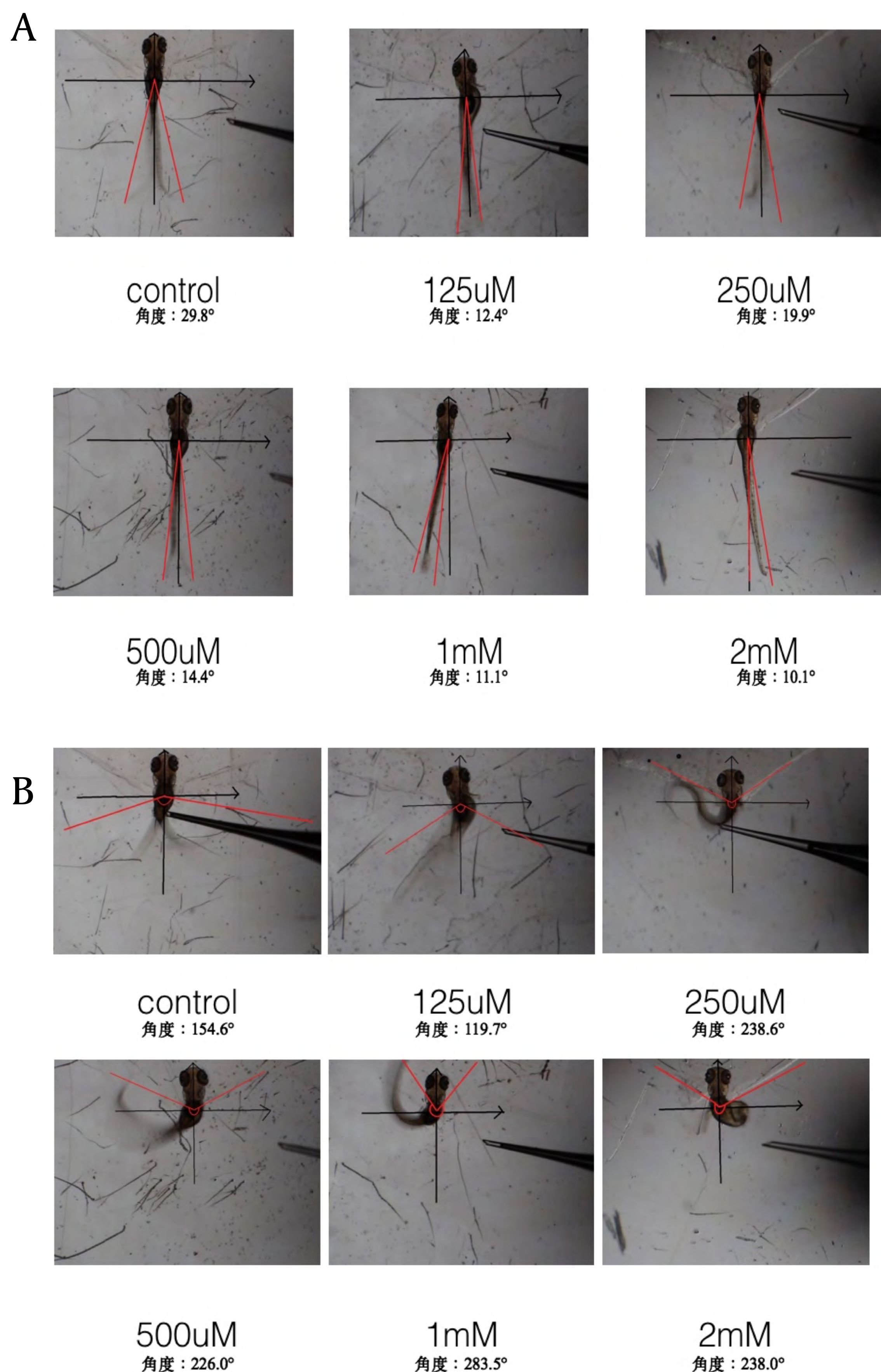
以冷凍切片及IHC分析*th1*及BrdU表現量

肆、研究結果



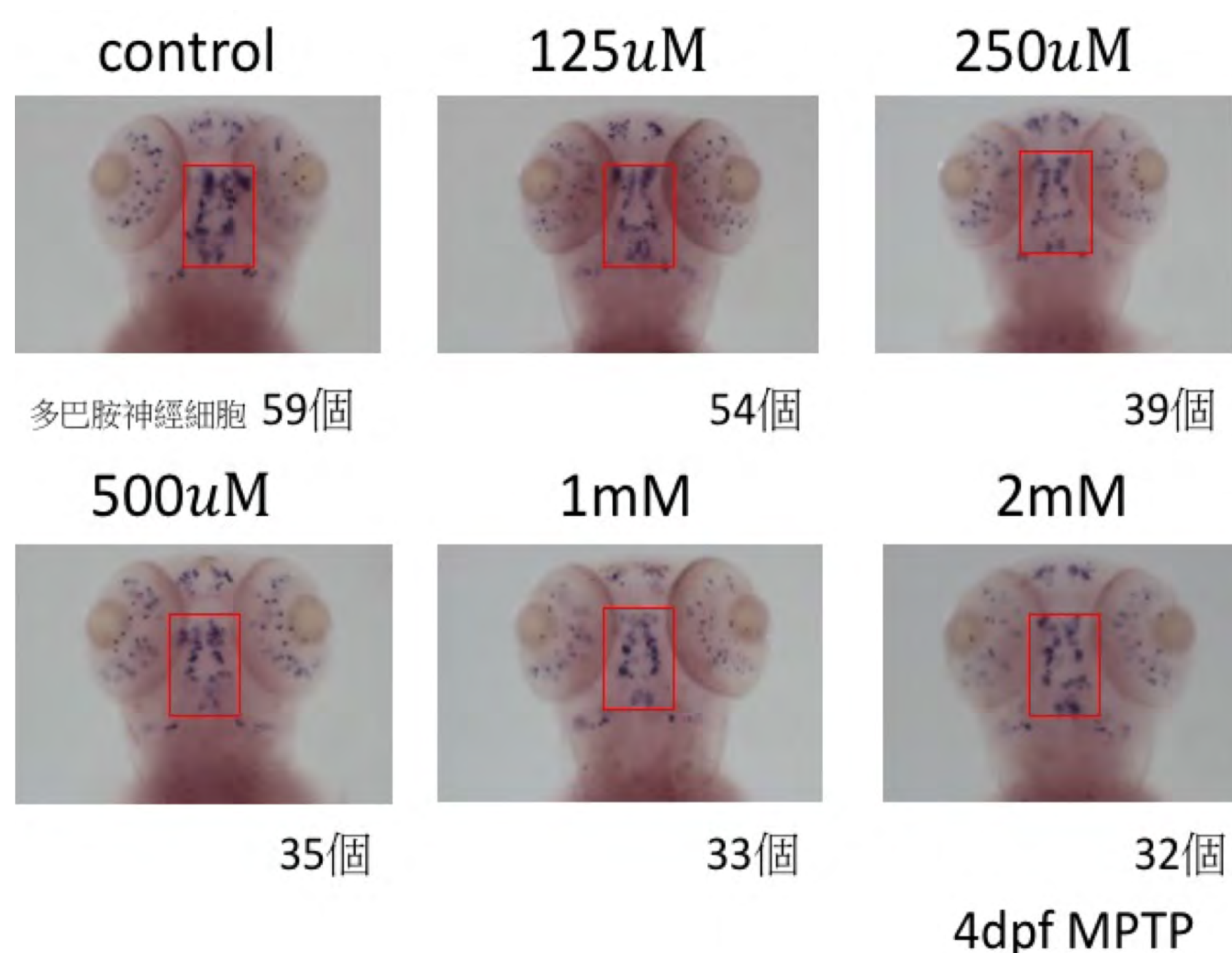
圖一:不同濃度的MPTP處理對於斑馬魚發育無明顯影響

我們將受精後24小時的斑馬魚胚胎以125uM、250uM、500uM、1mM、2mM的MPTP處理至96hpf，進行斑馬魚的型態分析。結果顯示，斑馬魚的外觀在不同的濃度處理過後跟控制組沒有明顯差異(圖一)



圖二: 圖二MPTP造成斑馬魚運動異常

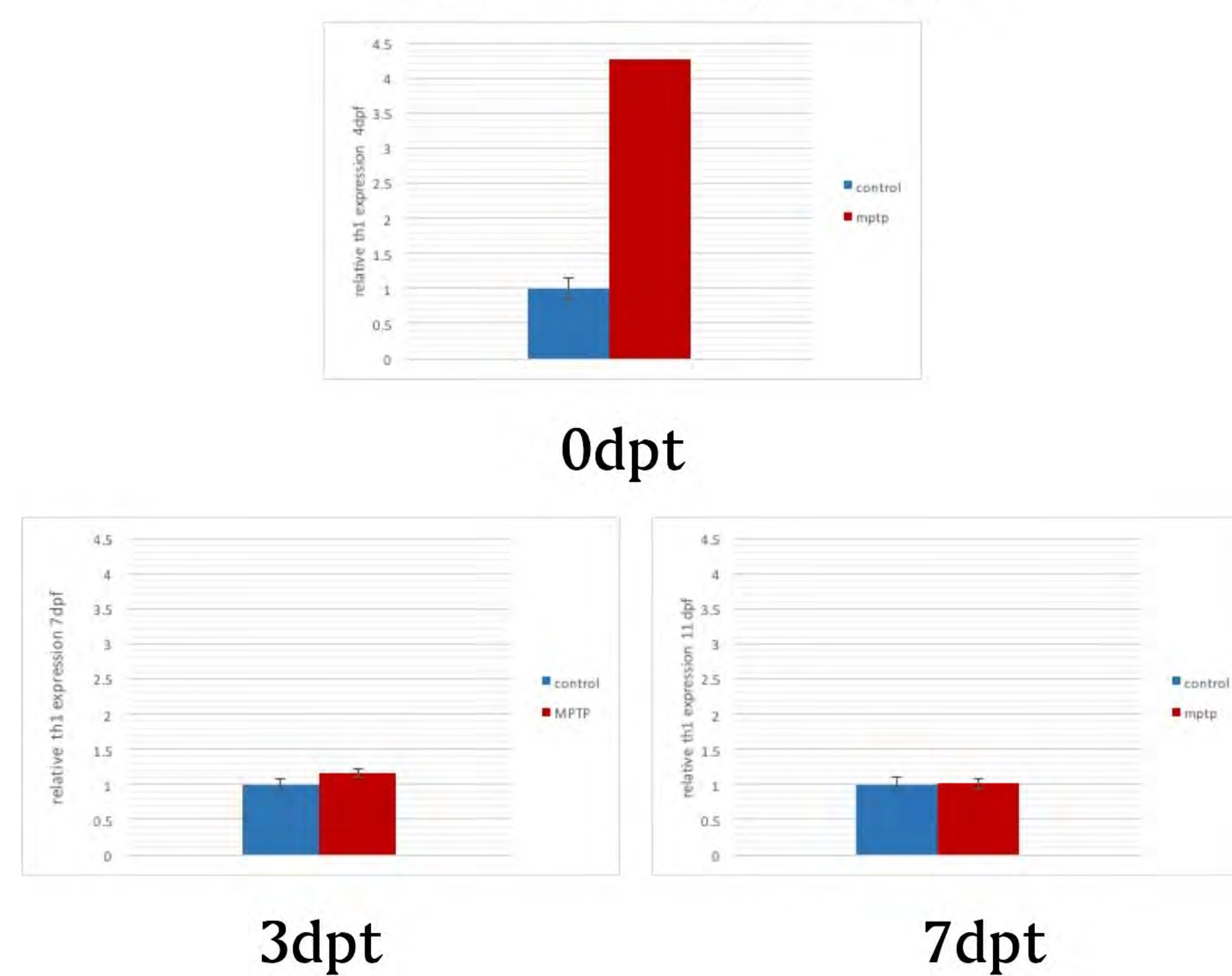
以MPTP處理的斑馬魚產生小角度的擺動、顫抖的情形(A)，刺激後斑馬魚擺尾的情況，結果顯示斑馬魚尾部的角度較控制組來的大、抽動的情形(B)。



圖三:處理MPTP造成斑馬魚的多巴胺神經元減少

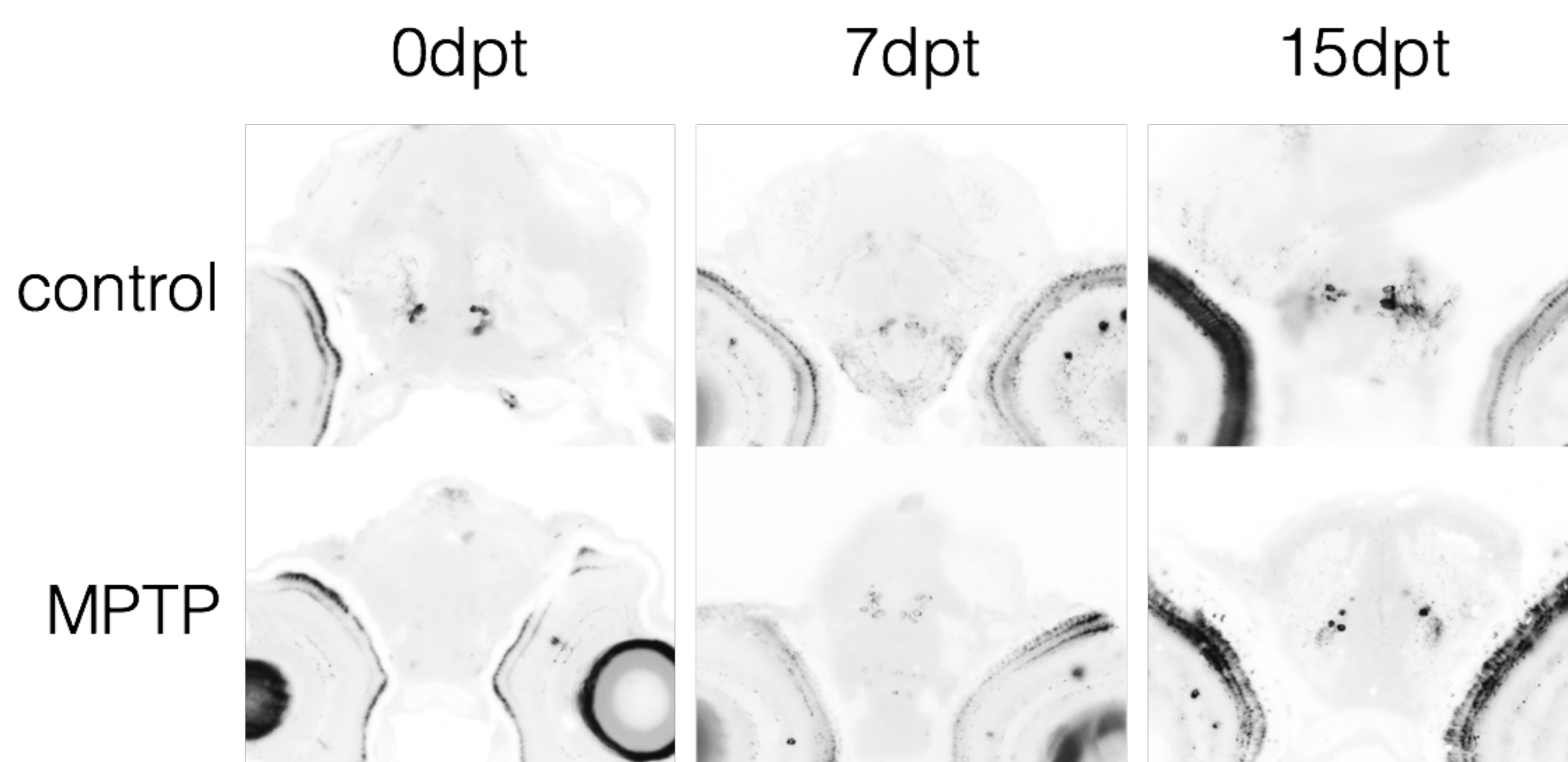
利用原位雜交法分析多巴胺神經元中會產生的酵素 *tyrosine hydroxylase 1 (th1)* 其基因的表現。結果顯示MPTP的處理能減少多巴胺神經元的數量，且濃度越告減少量越大。

Relative *th1* Expression



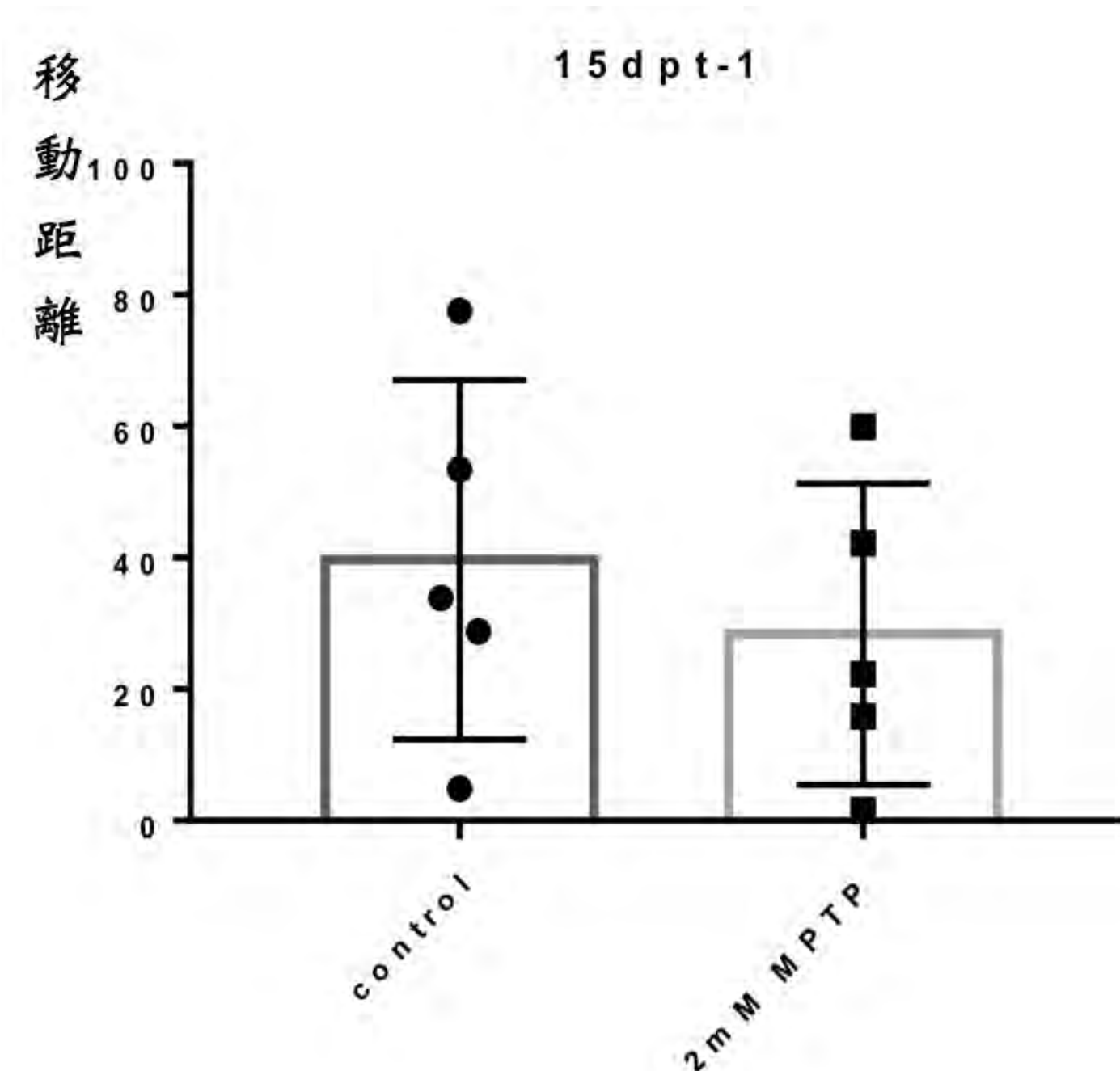
圖四: 圖四th1表現量在停藥後3天已無明顯差異

為了確定斑馬魚體內的多巴胺神經是否真的會再生，我們利用qPCR技術去分析斑馬魚體內的 *th1* 表現量，發現儘管我們在 *in situ hybridization* 實驗當中發現多巴胺神經元量減少，但經過MPTP(2mM)處理的斑馬魚，其 *th1* 基因的表現相較未經MPTP處理的 control 組卻來得高，MPTP組是 control 組的4.5倍左右，且停藥後越多天 control 與 MPTP 組的表現量越相近，到了11dpt MPTP 組和 control 組的 *th1* 表現量相近。推測可能是MPTP組的斑馬魚欲補足體內多巴胺的減少而啟動回饋的機制，而待多巴胺神經再生後的 *th1* 基因的表現量即與對照組相差不多。(圖四)

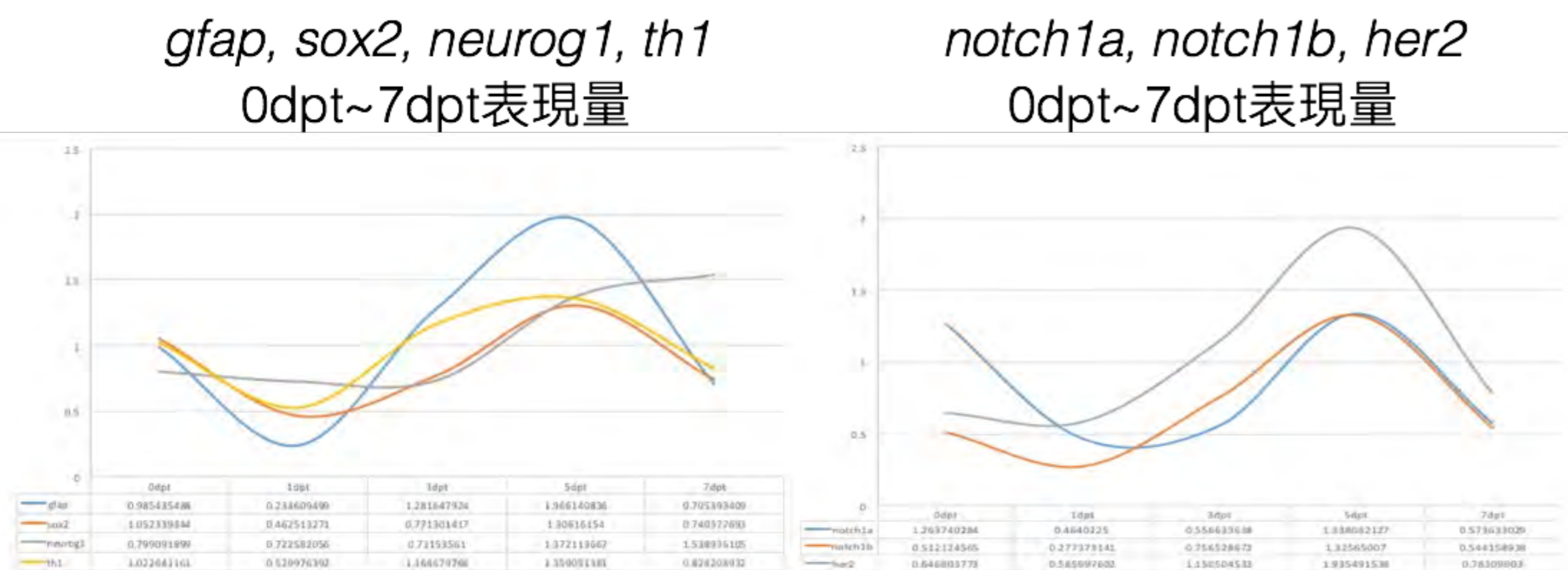


圖五: 圖五多巴胺神經元能在受損後進行再生

利用冷凍切片及免疫螢光染色的技術標定Th1去分析多巴胺神經元在MPTP處理結束後的再生情形。我們發現在0dpt的斑馬魚當中，實驗組的多巴胺神經元數量約是 control 組的44.4%，而在7dpt約是 control 組的52.7%，15dpt約是 control 組的70.5%，表示多巴胺神經元會再生。

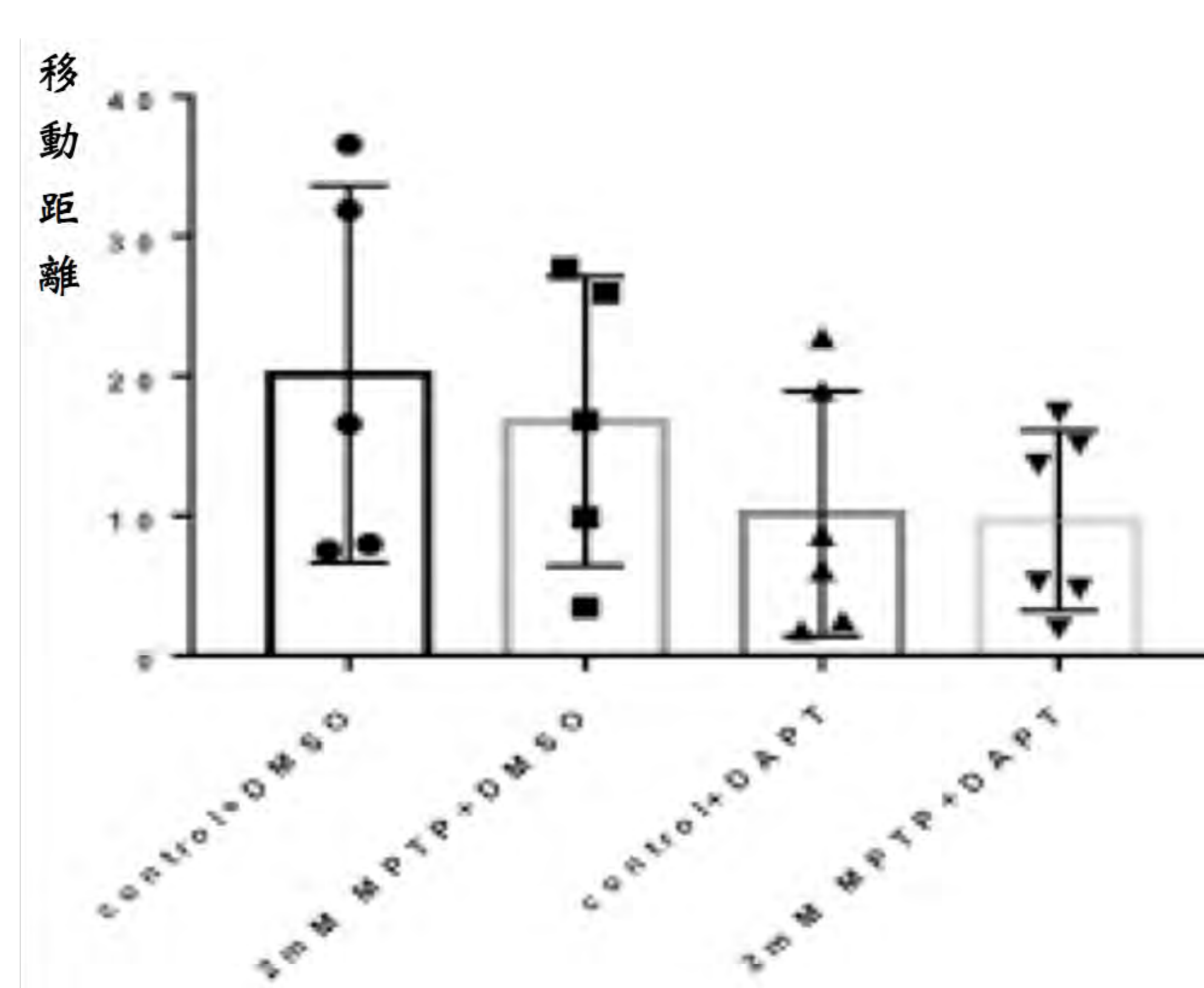


圖六:斑馬魚的運動異常能在受損後15天回復以錄影及電腦程式計算的方式探討斑馬魚運動情形，發現15dpt運動狀況已無明顯差別。



圖七: Notch訊息路徑成員可能參與多巴胺神經元再生過程

我們利用qPCR去分析Neuron marker在0dpt到7dpt的表現，發現0dpt表現量比對照組低，而從停藥後第3天開始表現量開始上升到5dpt達到最高峰。我們辨認斑馬魚體內notch的變化，我們發現notch表現的趨勢與神經細胞大致相同，由於notch的表現會使幹細胞維持原本狀態，因此3dpt~5dpt斑馬魚體內的幹細胞大多數可能先複製，再進行分化，但仍須進一步探討。



圖八: 抑制Notch訊息傳遞路徑能加速運動異常的回復

以DAPT處理的方式抑制notch，並以錄影及電腦程式計算的方式探討斑馬魚運動情形，發現7dpt運動狀況已無明顯別。

伍、討論

前人的研究證明斑馬魚幼魚在受精後24小時用MPTP 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理3天是可以造成多巴胺神經死亡，也有文獻是以800 μM 作為最後實驗濃度，我們最後決定使用的濃度為2mM，實驗證明確實會造成帕金森氏症的症狀，但不會造成斑馬魚的外觀或其他畸形。

透過上述實驗我們得知，幹細胞在停藥後3到5天時的表現量有上升的趨勢。表示停藥後3到5天時可能為斑馬魚主要幹神經增殖期。接著由Notch的表現看來，幹細胞是先複製增加數量後再進行分化。最後透過DAPT去抑制Notch的表現，我們即可以確認抑制Notch後可以促使幹細胞增加分化，導致斑馬魚運動能力恢復。

在文獻中我們得知哺乳類HES基因和斑馬魚的her基因皆為Notch的下游基因，負責在細胞核中控制基因的表現，先前的研究證明哺乳類中HES基因的表現會抑制細胞分化並讓幹細胞維持原本的狀態，相反的抑制HES基因的表現會促進細胞分化，斑馬魚her基因的功能主要為抑制神經分化，及斑馬魚體節的形成，表示HES基因和her基因都有抑制細胞分化的功能，說明斑馬魚此機制與哺乳類的相似性。

透過實驗我們發現2mM的MPTP處理斑馬魚所產生的不自願顫抖，及突然的抽動這跟帕金森氏症患者運動時十分類似。可為造成斑馬魚產生類似帕金森氏症的有效濃度，經過MPTP處理的斑馬魚在停藥後3~5天會有細胞增生及再生的現象，在停藥後15天運動情形已經與對照組無統計上的差異，可經由DAPT抑制Notch使損傷後的斑馬魚讓修復期縮短。但因為活體有個體差異，我們仍然希望能夠透過BrdU處理來更清楚的了解Notch Signaling Pathway對多巴胺神經元再生的影響。

陸、結論

- 一、我們的實驗結果顯示經過2 mM MPTP處理的斑馬魚多巴胺神經元減少明顯，行為上的異常也較明顯，所以2mM為我們處理斑馬魚的MPTP濃度。
- 二、qPCR的結果可能表示，停藥後3到5天時可能為斑馬魚主要幹神經增生期，之後可能是斑馬魚多巴胺神經元分化的主要時期。
- 三、經由DAPT抑制Notch使損傷後的斑馬魚讓修復期縮短，依結過推測抑制Notch後可以使幹細胞增加分化，增快斑馬魚運動能力恢復。推測Notch的抑制可以促多巴胺神經元的再生。

柒、參考資料及其他

- 一、文獻
 - (一) Crawford, T. Quinn., Roelink H. (2007). The Notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling *Developmental Dynamics*.
 - (二) Godoy, R., Noble, S., Yoon, K., Anisman, H., Ekker, M.(2015). Chemogenetic ablation of dopaminergic neurons leads to transient locomotor impairments in zebrafish larvae. *Journal of Neurochemistry*, 249-260
 - (三) Jankovic, J., (2007). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis.
 - (四) Jankovic J, Aguilar L. G. (2008). Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 4(4): 743-757.
 - (五) Kageyama R., Ohtsuka T.(1999). The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res*; Sep;9(3):179-188.
 - (六) Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T.(2008). Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ*. 10.1111/j.1440-169X.2008.00993.x.
 - (七) Kalia, Lorraine V., Lang, Anthony E. (2015). Parkinson's disease. *THE LANCET*; 29 August-4 September 2015, Pages 896-912
 - (八) Koch, U., Lehal, R., Radtke, F. (2013). Stem cells living with a Notch.
 - (九) Lam, C.S., Korzh, V., Strahle, U.(2005). Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP.; *Eur J Neurosci*. 21(6):1758-62.
 - (十) McKinley, Enid T., Baranowski, Timothy C., Blavo, Delali O., Cato, C., Doan, Thanh N., Rubinstein, Amy L.(2005). Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Molecular Brain Research*, 128-137
 - (十一) Vernier, P., Moret, F., Callier, S., Snappyan, M., Wersinger, C., Sidhu, A.(2004). The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system; *Ann N Y Acad Sci*. 1035:231-49

- 二、網站
 - (一) Parkinson's Disease Foundation。 2017年1月，取自 <http://parkinson.org/>