

中華民國第 60 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

探究精神獎

052004

細辛改善腦創傷引發失智症之潛力評估

學校名稱：國立臺南女子高級中學

作者： 高二 劉芊孜 高二 沈庭妤	指導老師： 桑于雯
-------------------------	--------------

關鍵詞：細辛、腦創傷、失智症

摘要

腦創傷(TBI)為阿茲海默症(AD)高風險群，其病理機制尚待闡明。已知中藥細辛具抗炎效用，是否具神經保護效果仍未知。本研究目的是探討細辛對 TBI 療效及其作用機制。以氣壓誘導神經元損傷，給予不同濃度細辛以評估神經元存活率，以酵素免疫吸附法評估發炎激素(甲型腫瘤壞死因子；TNF- α)及抗炎激素(介白質素-6；IL-6)；西方墨點法分析 AD 相關分子，包括類澱粉樣蛋白(A β)、類澱粉樣前驅蛋白(APP)、切割酵素(BACE1)及細胞死亡蛋白(MLKL)表現，以流式細胞儀分析神經元死亡型式。結果發現，細辛能增加神經元存活率，降低 TNF- α 、A β 、BACE1、MLKL 表達及壞死性凋亡，提升 IL-6 及維持 APP 表現。因此推測，細辛可有效降低神經發炎反應、促進抗炎激素表現，改善 AD 相關風險分子表現，以達到神經保護作用。

壹、研究動機及背景

一、研究動機

根據世界衛生組織估計，每年約有一千萬人遭受腦創傷，其死亡率及罹病率對社會造成極大負擔，使得腦創傷成為緊迫的公共衛生和醫療問題。在台灣，估計腦創傷年平均數為 52,000 人，其中 25%是致命的。腦創傷誘導身體的殘疾包括多種神經併發症，例如：學習和記憶障礙、癲癇、阿茲海默症和帕金森氏症。過去研究結果也顯示即便是中等程度腦創傷也是日後發生失智症的高風險群。而目前並沒有任何一種美國食品藥品管理局批准的藥物治療方式得以預防神經細胞死亡或促進修復。

而源自家人的專業，以及對中醫藥學的興趣及探索，選擇了「細辛(細莘)」(*Asarum sieboldii*)作為研究對象。細辛對於神經細胞的保護作用目前仍是未知，因此本專題研究將以神經元合併牽張壓力 (stretch stress)以模擬腦創傷模式，探討細辛的神經保護作用。

二、研究背景

(一)、細辛

細辛屬 (*Aristolochiaceae*) 是分佈於北美、歐洲及亞洲常見的草本植物。其根部在傳統醫學中用於鎮咳 (antitussive)、抗過敏 (anti-allergic)、抗高血脂 (antihyperlipidemic)、祛痰

(expectorant)、抗發炎 (anti-inflammation)(Jing et al., 2017) 、麻醉 (anesthetic)和抗真菌 (antifungal)。生物學和藥理學研究也表明，細辛可以消炎、抗過敏、和抗氧化活性。回顧文獻，細辛植物的不同部位發現了各種毒素，如：馬兜鈴酸(aristolochic acids)，黃樟素 (safrole)，萜品油烯 (terpinolene)，甲基丁香酚 (methyleugenol)，木脂素 (lignans)、酮 (ketone)、乙烯基 (vinyl)、以及苯衍生物 (benzene derivatives)等(Li et al., 2018)。其目前對於神經發炎性反應及神經元退化是否具有保護作用，仍是未知。

(二)、腦創傷與失智症之相關性

創傷性腦損傷 (traumatic brain injury; TBI)常見於交通意外、暴力事件、高處墜落及運動傷害等，是年輕人殘疾的主因之一，也被認為造成日後阿茲海默症 (Alzheimer's disease; AD)的高危險群。近期研究顯示，TBI 與 AD 擁有相同的病理特徵，包括：細神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles)、細胞外類澱粉樣蛋白質 (amyloid beta; A β)堆積及斑塊 (A β plaque)、細胞骨架 tau 蛋白的過度磷酸化 (tau hyperphosphorylation)及神經發炎性反應 (neuroinflammation) (O'Brien & Wong, 2011)。來自人類研究和實驗動物數據顯示，約三分之一的致死性 TBI 患者中發現腦中大量 A β 斑塊和軸突內 A β 沉積，這些患者過去並沒有 AD、唐氏綜合症或臨床癡呆症的病史(X. H. Chen, V. E. Johnson, K. Uryu, J. Q. Trojanowski, & D. H. Smith, 2009)。2016 年英國倫敦皇家學院的學者 David Sharp 等人對於經歷過創傷性腦損傷的中年人大腦進行了深入研究(Scott et al., 2016)。他們使用兩種類型的影像學檢查技術：PET 和 MRI。比較 TBI 組、AD 組及健康的老人組之腦部影像。PET 掃描可以檢出腦內澱粉樣蛋白斑塊，MRI 則是用於尋找創傷引起細胞損傷的證據。結果顯示，TBI 組別 A β 斑塊堆積的大腦區域與阿茲海默症組的區域相同，包括後扣帶回皮質(posterior cingulate cortex)及小腦 (cerebellum)。究竟腦創傷後引發A β 堆積的分子機制為何目前尚未有共識，目前推測神經元因為剪切應力(shear stress)，容易造成其負責神經傳導的軸突結構發生斷裂，而形成創傷性白質損傷(traumatic white matter injury)，這可能是啟動 A β 堆積的誘因之一 (Johnson, Stewart, & Smith, 2010)。這些現象，無論是在人或動物的腦創傷，經過長時間觀察，伴隨著建構出白質的髓鞘區域(由神經元的軸突與寡樹突膠細胞所組成的解剖結構，主要功能是讓神經電位以跳躍式傳導方式進行，以增加傳導速度)損害其合併周圍 A β 沉積是顯而易見的 (X.-H. Chen, V. E. Johnson, K. Uryu, J. Q. Trojanowski, & D. H. Smith, 2009)。上述結果說明腦創傷史與日後發展 AD 風險增加是高度相關的。

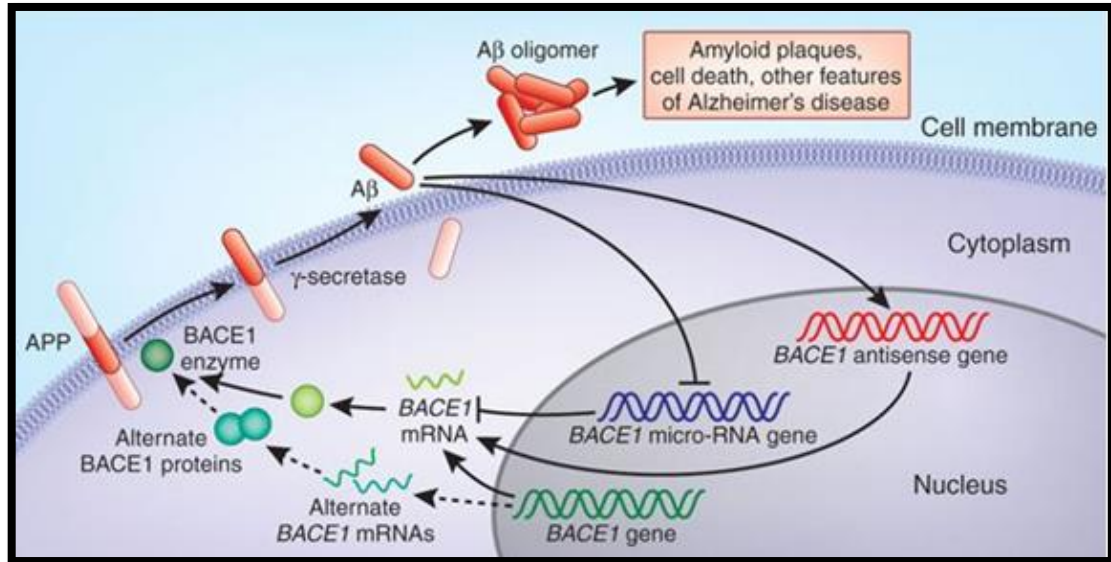
(三)、腦創傷與神經發炎性反應之相關性

神經發炎性反應症在神經退化性疾病（包含 AD）的病理生理學中相當受到關注。已知 TBI 在急性損傷後階段會誘導一系列複雜的發炎性反應，最初的血腦屏障受損與血液中的多形核白血球 (polymorphonuclear leukocytes)、T 細胞 (T cells)、巨噬細胞 (macrophages) 和自然殺手細胞 (natural killer cells) 的浸潤有關 (Stahel et al., 2000)。緊接著微小膠細胞 (microglia) 的活化，釋放出各種細胞激素 (cytokines) 及趨化因子 (chemokines) (Nagamoto-Combs, McNeal, Morecraft, & Combs, 2007; Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010)，引起神經元的損傷。細胞激素，主要分為五種，interleukins (ILs)、interferons (IFNs)、tumor necrosis factors (TNFs)、transforming growth factors (TGFs) 以及 colony-stimulating factors (CSFs)，是一種低分子量的醣蛋白，通常只有單鏈的結構。對於生物性的調節作用，包括細胞生長、細胞活化、發炎反應、免疫能力、組織修復、纖維化及形態發育過程等相關 (Hibi, Nakajima, & Hirano, 1996)。促炎性細胞激素 (proinflammatory cytokines) 中的甲型腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) 及介白質素-1 β (interleukin-1 β ; IL-1 β) 表達目前認為與創傷引發急性腦水腫、血腦屏障破壞及細胞凋亡有關。採用 TNF- α 拮抗劑可以有效降低微小膠細胞活化、改善血腦屏障破壞、白血球浸潤及腦水腫現象，進一步促進神經功能恢復 (Cheong et al., 2013; Chio et al., 2013; Chio et al., 2010)。另外，抗炎性細胞激素 (anti-inflammatory cytokines) 中的介白質素-6 (interleukin-6; IL-6) 被稱為 B 細胞分化因子或肝臟細胞刺激因子 (hepatic stimulating factor)，在急性發炎過程中會刺激 IL-1 β 受體拮抗劑的產生，同時可維持神經軸突可塑性，減輕微小膠細胞的活化，緩解急性神經發炎並減少細胞死亡 (Chio et al., 2017)。

在人類的驗屍報告發現，重複腦創傷的運動員，其大腦白質區尤其是胼胝體嚴重受損，且在這些區域中伴隨著隨微小膠細胞聚集且呈現活化狀態，因此推翻了發炎性反應不僅止於 TBI 急性期出現，長期的慢性神經發炎性反應更是需要密切注意的現象 (Loane & Byrnes, 2010)。因此調節神經發炎性反應將是治療 TBI 的重要目標之一 (Ziebell & Morganti-Kossmann, 2010)。

(四)、阿茲海默症與類澱粉樣前驅蛋白質及類澱粉樣蛋白

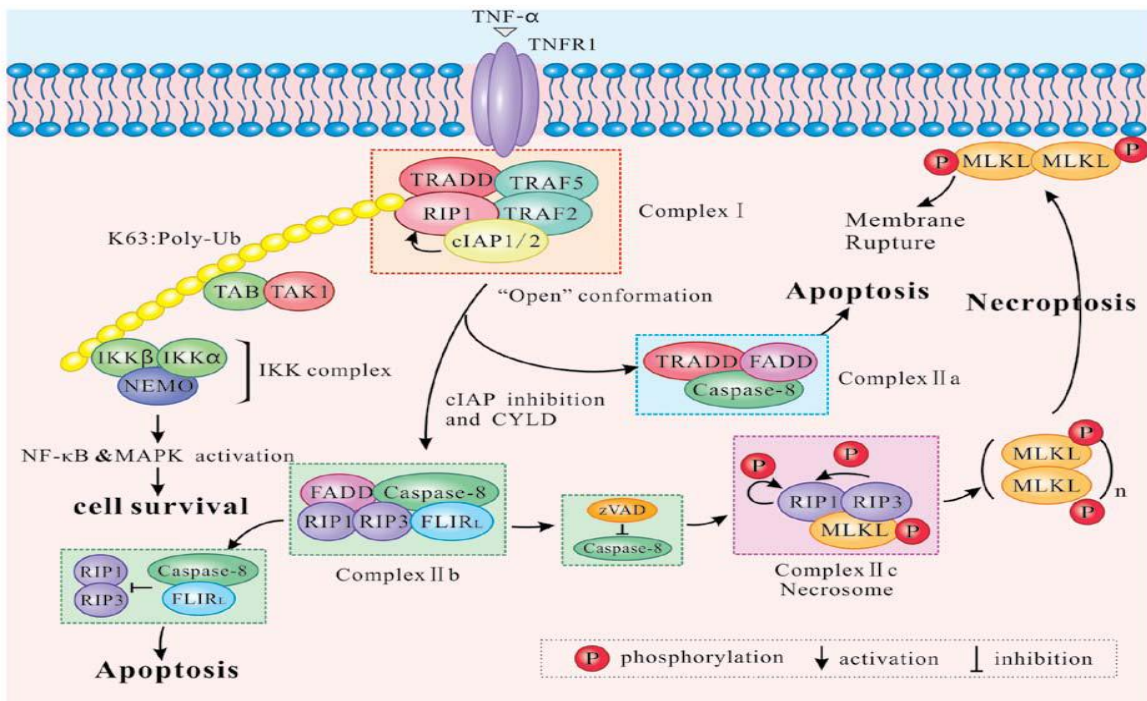
類澱粉樣前驅蛋白質(amyloid precursor protein ; APP)可在許多組織細胞中表達，神經系統中神經元可製造 APP 存放於細胞質或神經元突觸結構中形成膜蛋白。APP 經蛋白水解產生類澱粉樣蛋白質(amyloid beta; A β)，是阿茲海默症患者的腦中發現的澱粉樣斑塊(amyloid plaque)的主要成分之一(Charlier-Harlin et al., 1991; Murrell, Farlow, Ghetti, & Benson, 1991)。A β 是由類澱粉樣前驅蛋白質 (amyloid precursor protein ; APP)經由兩種酵素切割而成，包括： β -site APP cleaving enzyme-1 (BACE1) 及 presenilin-1 (PS-1)(X. H. Chen et al., 2004; Zhang, Thompson, Zhang, & Xu, 2011)，尤其是 BACE1 負責 APP 的蛋白水解反應，在 APP 的第 671 和 672 的氨基酸殘基之間的 A β 胜肽序列的 N 端裂解，導致 β 裂解，及可溶性 APP 的產生(圖一)(Das & Yan, 2017; Kim et al., 2007)。科學家推測受損的神經元軸突會加速 APP 被切割並將 A β 釋出細胞外並沉積在髓鞘區域造成斑塊產生 (plaque formation)，阻止了神經動作電位傳遞(Stokin et al., 2005)。如果受損的軸突提供有利於 A β 形成和積累的環境，則隨後這些軸突的裂解或變性可導致 A β 排出到實質組織中堆積糾結形成更多的斑塊，造成神經元之間的溝通受到阻礙，引發運動、記憶及認知功能障礙 (Hamley, 2012; Sadigh-Eteghad et al., 2015)。



圖(一)、A β 蛋白質斑塊產生之過程(source:APExBio)

(五)、細胞壞死性凋亡(necroptosis)

已知細胞死亡型式相當多元，常見壞死(necrosis)或程序性細胞死亡(programmed cell death; PCD)，PCD 又可區分為凋亡(apoptosis)、壞死性凋亡(necroptosis)、細胞焦亡(pyroptosis)及自噬作用(autophagy)等(Galluzzi et al., 2018)。Necrosis 常見於細胞感染或損傷，直接造成細胞膜脹破、DNA 及細胞質液外流等細胞死亡型態。Necroptosis 是一系列蛋白質引發的細胞由內而外的壞死過程，已知可受到細胞外 TNF- α 作用於細胞膜上接受體 tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)的訊息傳遞路徑調控，活化細胞質中 receptor-interactive protein kinases (RIPK) 1 與 RIPK 3 形成絲狀蛋白複合體(necrosome)，啟動 mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL)蛋白質磷酸化作用，影響粒線體功能及造成細胞膜破損，進一步導致細胞壞死性凋亡 (necroptosis)(圖二) (W. Chen et al., 2013; Liu et al., 2019; Sun et al., 2012; Zhao et al., 2012)。2017 年 Antonella Caccamo 等人提出在 AD 患者腦中有大範圍的腦組織呈現 necroptosis，且與認知功能障礙、大腦萎縮相關(Caccamo et al., 2017)。該團隊對於已經發生 necroptosis 患者以簡易精神狀態檢查表(MMSE)評估認知功能，發現 RIPK1 與 MLKL 高度表達者，其 MMSE 分數越低(也就是認知功能障礙越嚴重)。如何終止細胞程序性死亡的過程是一重要的課題，已知細辛可以降低發炎反應，是否可以藉由抑制腦傷引發的細胞激素(尤其是 TNF- α)表達與其相關的 MLKL 磷酸化作用，進而減少細胞壞死性凋亡則須進一步的探討。



圖(二)、細胞壞死性凋亡(necroptosis)路徑(Liu et al., 2019)

綜合上述文獻回顧，我們將聚焦於神經元損傷後的相關風險因子評估，包括神經發炎性反應，包括促炎因子(proinflammatory cytokine)與抗炎因子(anti-inflammatory cytokine)及日後可能造成 AD 產生的相關蛋白，包括類澱粉樣前驅蛋白(APP)及其分解後產物類澱粉樣蛋白(A β)、分解蛋白酶(BACE1)，同時對於神經元的死亡型式是否與壞死性凋亡相關。此外，我們也同時評估細辛的神經保護作用，是否可以透過調節神經發炎性反應的細胞激素表現，尤其是促炎因子的甲型腫瘤壞死因子(TNF- α)與抗炎因子的介白質素-6 (IL-6)，並同時減少 BACE1 分解酶的表達，降低 A β 堆積並維持 APP 表現，以減輕神經元的死亡。

貳、研究目的

- 一、 分析細辛對健康神經元之存活率的影響。
- 二、 採氣壓撞擊模擬神經元牽張壓力造成神經元損傷，並施以細辛治療，探討細辛對於損傷後神經元存活率的影響。
- 三、 探討氣壓撞擊後神經元死亡的型式及細辛是否可以有效降低神經元死亡。
- 四、 探討細辛對於神經元損傷引發阿茲海默症相關風險蛋白質表達之影響作用。
- 五、 探討細辛對於神經元損傷引發促炎細胞激素與抗炎細胞激素表達之影響。

參、研究設備及器材

一、細胞培養(Cell culture)

(一)、細胞株(cell line)

本實驗採用 PC12 神經細胞，是源自大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤的細胞系(pheochromocytoma of the rat adrenal medulla)，購自於美國 American Type Culture Collection。

(二)、細胞試劑

RPMI 培養液(Gibco, USA)中含 10 % heat-inactivated horse serum (56°C, 30 min) (Cat No:SH30074.03, Hyclone, USA), 5 % Fetal bovine serum (Cat No:10437, Gibco, USA), 1X Penicillin / Streptomycin (Cat No:15140, Gibco, USA)。

(三)、其他

Nerve Growth Factor(Corning Incorporated Life Science)、Trypsin(Gibco, USA)、PBS(含 NaCl 16 克, KCl 0.4 克, NaHPO₄ 2.88 克, KH₂PO₄ 0.48 克, J.T. Baker)、細胞培養箱 (37°C, 5 % CO₂) (Forma Scientific, Inc.)。

二、細辛水萃 (water extraction method)

試劑：細辛藥材(細辛根，產地中國)、RO 逆滲透水。

設備：中藥精煉電子鍋(新圖成企業有限公司 STC-901,台灣)、抽濾裝置(Rocker, Rocker-610, USA)、全自動濃縮離心機 (EZ2 personal solvent evaporator, SP Scientific, USA)

三、存活率實驗(cell viability assay)

試劑：MTT Solution、DMSO

設備：ELISA reader (波長 540 nm)(Thermo Scientific, Multiskan GO, USA)

四、細胞損傷控制器(cell injury controller)

本實驗採用 Cell Injury Controller II (Custom Design and Fabrication; Virginia Commonwealth University, USA) , 以氣壓式誘導細胞牽張壓力造成細胞損傷。



圖(三)、細胞損傷控制器



圖(四)、細胞培養皿

五、流式細胞儀分析(flow cytometry assay)

試劑：PBS、Trypsin、binding buffer、Annexin V、PI(雙染：Invitrogen, Lot:2051233)(PI 單染：Invitrogen, Lot:1801183)

設備：流式細胞儀(ACEA Biosciences, Inc. , NovoCyte, USA)

六、西方墨點法(Western blotting)

(一)製膠

試劑：H₂O、stacking buffer (4 %, pH 6.8, 含 Tris 6.05 克, Amresco life science, 77-86-1、SDS 0.4 克, Amresco life science, 151-21-3)、Acrylamide (30 %, Bio-Rad Cat No:1610156)、APS (10 %, Amresco life science)、TEMED(SIGMA)、separating buffer (12.5 %, pH8.8, 含 Tris 36.2 克、SDS 1.6 克)、正丁醇(J.T. Baker, 9045-03)

(二)、電泳

試劑：running buffer(含 Tris 3.028 克, Glycine 14.412 克, SDS 1 克, 溶於 1L 水中)、marker(Bio-Rad Cat No:161-0374)

設備：電泳槽(Hoefler SE 600 Ruby)、電源供應器(WEALTEC, ELITE 300 Plus)

(三)、transfer、blocking

試劑：甲醇(Honeywell Burdick&Jackson, AH230-4)、MQ 水、transfer buffer(Glycine 14.4 克, Tris 3 克, 甲醇 230 ml, Total:1000 ml)、washing buffer (TBS:含 NaCl 29.22 克, Tris 2.42 克, 溶於 1L 水中+0.05 % Tween-20, Amresco Life Science, 9005-64-5)、blocking buffer (5 % non-fat milk:安佳脫脂奶粉 5 克, TTBS 100 ml)、一級抗體 (β -actin、APP、 $A\beta$ 、BACE1、MLKL)、二級抗體 (anti-mouse IgG、anti-rabbit IgG)

Incubating with 1° antibody	1° antibody	β -actin	Amyloid precursor Protein(APP)
	Factory / Cat. No.	Santa Cruz Sc-4778	abcam #32136
	Source	Mouse	rabbit
	Ratio	1/5000	1/30000
Incubating with 2° antibody	2° antibody	anti-mouse IgG	anti-Rabbit IgG
	Factory / Cat. No.	cell signaling 7076S	cell signaling 7074
	Ratio	1/5000	1/100000
Incubating with 1° antibody	BACE1	$A\beta$	p-MLKL(Ser358)
	abcam #2077	abcam #62658	cell signaling #91689
	Rabbit	Rabbit	rabbit
	1/4000	1/8000	1/2000
Incubating with 2° antibody	anti-Rabbit IgG	anti-Rabbit IgG	anti-Rabbit IgG
	cell signaling 7074	cell signaling 7074	cell signaling 7074
	1/40000	1/20000	1/20000

(四)、壓片、顯影

試劑：Enhanced Luminol Reagent、Enhanced Oxidizing Reagent(PerkinElmer)、Developer、Fixer(Carestream 4980488)

設備：塑膠袋

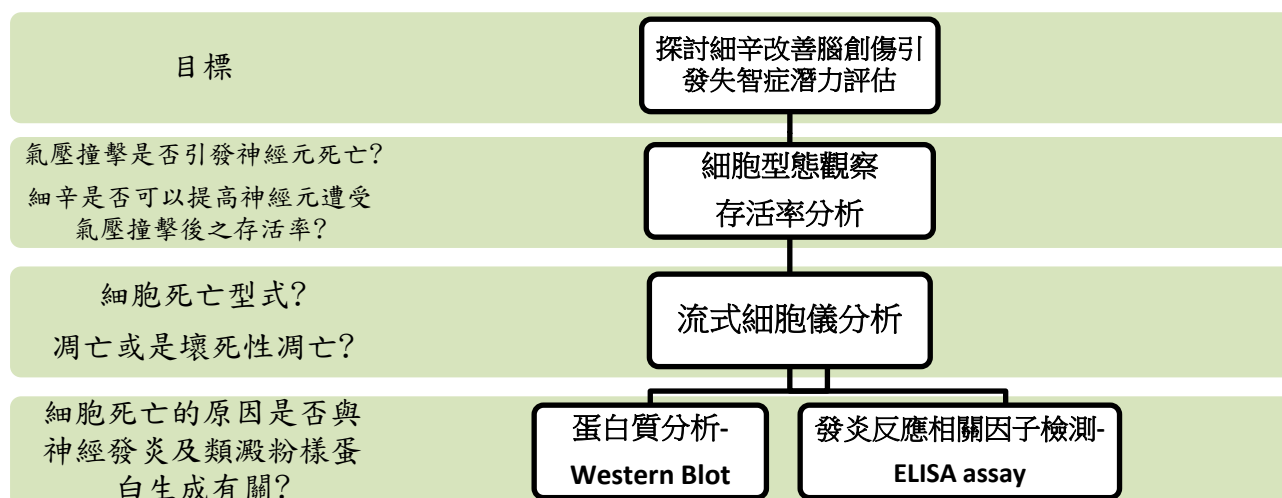
七、 酵素連結免疫吸附法(enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)

試劑：Coating buffer、Washing buffer (1L PBS+ 0.5 ml Tween-20)、Assay Diluent solution (PBS + 10 %FBS)、Enzyme-reagent (SAV-HRP)、Stop solution(2N H_2SO_4 , J.T. Baker, 9681-01)、TMB(Science Products Inc.)、Detection antibody (TNF- α 、IL-6)(BD Biosciences, IL-6 : Cat No:550319, TNF- α :558535)

設備：ELISA reader

肆、研究過程及方法

一、研究架構圖



二、實驗組別

實驗將分為以下四組:

- (一) 正常控制組(control):PC12 神經元於常溫常氧下培養 72 小時。
- (二) Asarum sieboldii 細辛組(AS):PC12 神經元加入細辛(1500 $\mu\text{g/ml}$)培養 72 小時。
- (三) 細胞損傷組(TBI):以氣壓撞擊造成 PC12 神經元損傷後 72 小時，收集細胞進行分析。
- (四) 細胞損傷合併 Asarum sieboldii 細辛治療組(TBI+AS)：給予細辛(1500 $\mu\text{g/ml}$)並以氣壓撞擊造成 PC12 神經元損傷，於第 72 小時收集細胞進行分析。

三、細胞培養

(一)、細胞培養

在每個 well 中加入 1.5 ml 含有 NGF 的培養基 (5 %馬血清+ 100 ng/ml NGF)。放置於恆溫 37°C, 5 % CO₂之細胞培養箱內培養。每三天更換一次含有 NGF 的新鮮培養液，直至 12 天，PC-12 細胞轉為神經細胞型態。將 2 ml/well 的 Collagen IV (16.7 $\mu\text{g/ml}$)加入每個 well 內，並且置於細胞培養箱內至隔天。移除掉 Collagen IV，用 3 ml/well PBS 去 rinse wells，再去除 PBS。將細胞培養盒內的舊有培養基收集至 50 ml 的離心管。加入 10 ml PBS 去 wash 細胞。加入 2.5 ml Trypsin，並且放置於細胞培養箱內 5 分鐘。加入 7.5 ml 的培養基，後將全部細胞懸浮液取出並放入 50 ml 離心管。以 300 g 離心 10 分鐘，然後去除上清液。後加入 5 ml 培養基並將細胞打散均勻。取少量 (200~500 μl)的細胞懸浮液來計數細胞。依計算結果取 8×10^5 個/well 細胞加入 6-well 盤的每個 well 內。放置於恆溫 37°C, 5 % CO₂之細胞培養箱內培養。

(二)、細胞繼代培養

在原本 flask 中滴入 10 ml PBS 清洗細胞。加入 2.5 ml Trypsin 並放入細胞培養箱 5 分鐘。5 分鐘後加入 medium 中和。將中和後的液體吸出，一起放入 50 ml 離心管。以 300 g/ 10min 之條件離心。去上清液，先後加入 5 ml 培養基並將細胞打散均勻。將所有細胞懸浮液放入新的 flask 中，標註資訊並放回恆溫 37°C, 5 % CO₂ 之細胞培養箱培養。

四、 細辛水萃

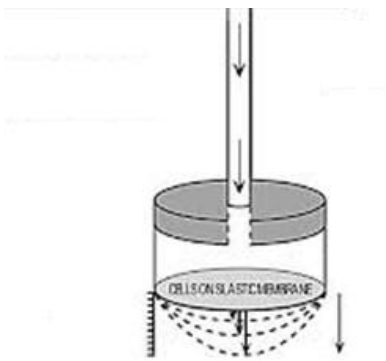
取乾燥細辛根部 300 克，加入 3500 ml RO 水，利用精煉中藥電子鍋水萃 180 分鐘。放涼後進行抽濾。抽取 40 ml 細辛水萃液至每管中。使用全自動離心機離心 (模式: 3, Aqueous/ 溫度: 30°C/ 時間 18 小時) 離心完成後放入 4°C 冰箱保存。

五、 氣壓撞擊導致神經元損傷與存活率測試

(一)、存活率實驗

將每個 well 的細胞加入 5 ng/ml 的 MTT Solution 後進行離心 (10000 rpm, 5 分鐘)，去上清液後加入 1ml DMSO (1 分鐘)。在每一個 sample 取 100 μ l (n=2) 放入 96-well 盤中，使用 ELISA Reader 讀取 O.D. 值，波長為 540 nm，來觀察細胞的存活率。

(二)、氣壓式撞擊導致神經元損傷模式



圖(五)、細胞損傷控制器作用示意圖



圖(六)、細胞損傷控制器介紹

將細胞損傷控制器接上空氣鋼瓶，開啟機器，將氣體接口對準細胞培養皿並確認銜接平穩，按下撞擊按鈕，記錄壓力顯示屏上該實驗之氣壓值，重複操作。

六、細胞死亡分析

(一)、細胞凋亡分析

收集舊有的培養基並放入 5 ml 離心管內離心 (600g/ 5 分鐘)後, 去除上清液, 加入 2 ml / well PBS wash 細胞並收集於同樣離心管內。加入 1 ml / well Trypsin , 並放置於細胞培養箱 5~10 分鐘, 後放入同樣的離心管中。以 600 g 離心 5 分鐘後去除上清液。再加入 1 ml PBS 重新懸浮細胞, 將溶液在離心管中染色, 再以同樣條件離心, 去除上清液後加入 500 μ l binding buffer 重新懸浮細胞。將 1×10^5 個細胞吸出至 flow tube 中, 加入 5 μ l FITC Annexinc 和 PI。將溶液混合後避光至於細胞培養箱內 15 分鐘。在一小時內加入 400 μ l bindind buffer 利用流式細胞儀分析。

(二)、DNA 斷裂分析

收集舊有的培養基並放入 5 ml 離心管內離心 (600g/ 5 分鐘)後, 去除上清液, 加入 2 ml / well PBS wash 細胞並收集於同樣離心管內。加入 1 ml / well Trypsin , 並放置於細胞培養箱 5~10 分鐘, 後放入同樣的離心管中。以 600 g 離心 5 分鐘後去除上清液。利用管內剩餘的上清液敲擊 1.5 ml tube rack 或輕彈以打散細胞。在震盪器上 (3 - 4 轉)一邊震盪一邊逐一滴入 3 ml 70%冰冷的酒精。置於-20°C 冰箱中至少一小時至隔夜。以 600 g 離心 5 分鐘後去除上清液。利用管內剩餘的上清液敲擊 1.5 ml tube rack 或輕彈以打散細胞。加入 4 ml PBS 靜置 3 分鐘後離心, 去除上清液。加入 1 ml PI / Triton X-100 混合液, 均勻打散細胞, 室溫避光染色 30 分鐘。利用流式細胞儀測 FL3。

七、 蛋白質測定實驗(西方墨點法)

(一)、製膠

將配好的 separating gel (12.5 %)平均滴入間距為 0.75 mm 的製膠玻璃間，直到先前作記號由上往下約 2.2 公分處，等待 10 至 15 分鐘後下膠凝固，再將 stacking gel (4 %)加入製膠玻璃間，插入齒梳，等待 10 至 15 分鐘後，拿起齒梳，在中間的 well 中加入 sample，外側加入 marker，在兩片玻璃間加入少量 running buffer 確認是否有漏膠情況。

(二)、電泳

將電泳槽接上電源供應器，並在電泳槽底部加入使用過一次的 running buffer，而在要實驗的兩片玻璃之間加入新鮮 running buffer，放入電泳槽，並在下方放入磁石轉子，以大約 300 轉的速度進行，使用 100 伏特作為起始伏特數，經過一個小時後，再決定是否要調整伏特數，為了因應每次觀察的蛋白質大小不同，可調整電泳時間。

(三)、transfer

將 PVDF 膜裁剪成適當大小，此大小須滿足準備裁切的膠體大小，放入甲醇內一分鐘覆水，再用 MQ 水浸泡五分鐘，最後再浸入 transfer buffer 內 10 到 15 分鐘，transfer buffer 需先放在-3 度冰箱。將玻璃從電泳槽中拿出，移除玻璃，切除上膠以及不需要的 sample buffer 膠位置，再將膠體放入 transfer buffer 內浸泡 10 到 15 分鐘。將 transfer 用夾由上而下夾入海綿、三張濾紙、PVDF 膜、膠、三張濾紙及海綿，用夾上方為紅色(正極)，下方為黑色(負極)，放入蛋白質轉漬槽中，接上電源供應器，加入 transfer buffer，並放入冰塊，保持低溫，並在下方放入磁石轉子，以約每分鐘 300 轉、100 伏特 transfer 一小時。

(四)、blocking

將 transfer 完成的 PVDF 膜放入 TTBS 中 10 到 15 分鐘，並在搖台上以一分鐘 70 到 100 轉速度清洗，將清洗完成後的 PVDF 膜放入 5% blocking buffer，並放置在搖台上以大約 40 轉的速度浸泡一個小時至一個半小時。

(五)、一級抗體/二級抗體

將 PVDF 膜從 blocking buffer 中拿出，並相同的使用 TTBS 清洗，再放入一級抗體溶液中，反應經過 24 小時，4 度，42 轉。使用 TTBS 清洗，110 轉，總共四次，每次 15 分鐘，再放入二級抗體溶液中，反應 1.5 小時，搖台 50 到 75 轉。

(六)、壓片、顯影

使用 TTBS 清洗，110 轉，總共四次，前兩次 15 分鐘，後兩次 30 分鐘，總共 1.5 小時。清除 washing buffer，加入 Enhanced Luminol Reagent 和 Enhanced Oxidizing Reagent，比例為一比一，清洗一分鐘，先用拭鏡紙沾乾 PVDF 膜上的溶液，再放入 Hyper cassette (要先鋪塑膠袋)，膠帶固定，用滾輪滾出多餘的水分。

分別在兩個盒子中倒入已稀釋 Developer 以及 Fixer，在無光 (暗房) 狀態下拿出 High performance chemiluminescence film (感光片)，放在準備好的 Hyper cassette 中，蓋上 Hyper cassette，一定時間後，拿出底片，放入 Developer 中一分鐘，從 Developer 拿出後用自來水清洗，再放入 Fixer 一分鐘，便可拿至燈光下確認。

八、發炎性反應相關性細胞激素分析 (酵素連結免疫吸附法)

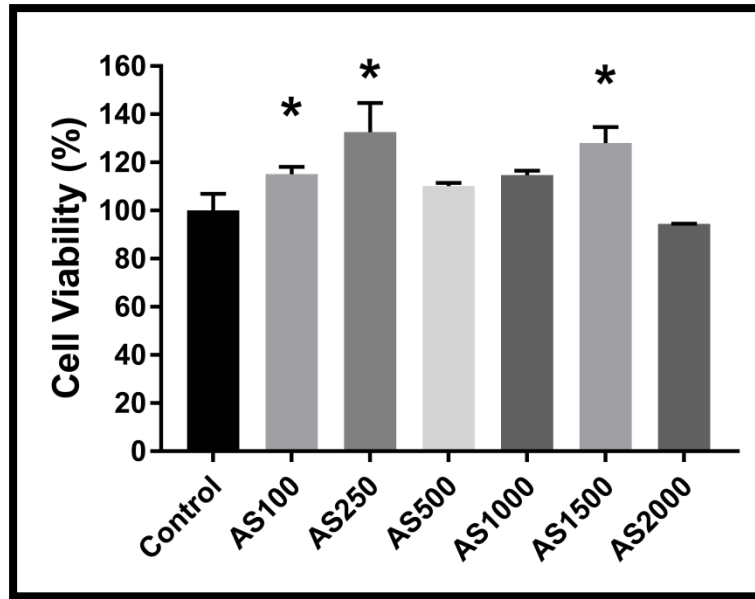
分別將 TNF- α 及 IL-6 Capture antibody 以 1:250 比例稀釋於 coating buffer，將已稀釋的抗體溶液以 100 μ l / well 加入 96-well 盤中，置於 4°C 至隔天。移除掉抗體溶液，每 well 用 300 μ l 的 wash buffer (1L PBS + 0.5 ml Tween-20) 清洗 5 次，再加入 200 μ l Assay Diluent solution (PBS + 10 % FBS) 且置於室溫下反應 1 小時後移除，以同樣條件清洗 5 次。加入 100 μ l / well 不同濃度的標準液及 sample 至 well 中並置於室溫下反應 2 小時後移除，以同樣條件清洗 5 次。將 TNF 及 IL-6 Detection antibody 分別以 1:250 及 1:125 的比例稀釋於 Assay Diluent solution。將稀釋後的 Detection antibody 以 100 μ l / well 加入 well 內，放置室溫反應 1 小時後移除，以同樣條件清洗 5 次。將 enzyme-reagent (SAV-HRP) 以 1:250 的比例同樣稀釋於 Assay Diluent solution。將稀釋後的 enzyme-reagent (SAV-HRP) 以 100 μ l / well 加入 well 內，放置室溫反應 30 分鐘後移除，以同樣條件清洗 7 次。加入 100 μ l / well 的 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)，避光置於室溫下反應 30 分鐘。加入 50 μ l / well Stop solution。使用 ELISA Reader (波長 450 nm / 570 nm) 偵測每個 well 內之吸光值。

九、統計方法

各組數據均以平均 \pm 標準誤差表示，以成對樣本 t 檢定 (Paired sample t-test) 檢測並分析兩組間的平均數差異，相關性檢定後 $p < 0.05$ 為顯著差異，用「*」表示， $p < 0.01$ 為極顯著差異，用「**」表示。

伍、研究結果

一、 分析細辛對健康神經元之存活率的影響

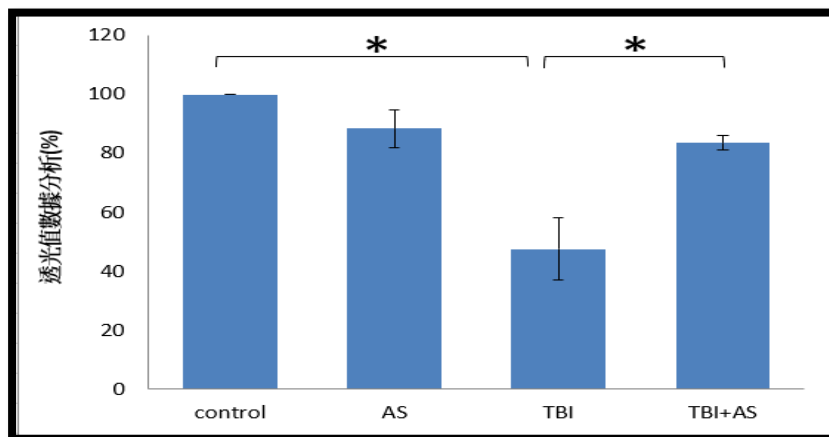


圖(七)、不同濃度細辛之細胞存活率

結果顯示，細辛會促進 PC-12 細胞的生長，而當細辛濃度在 2000 $\mu\text{g/ml}$ 時，則開始具有細胞毒性，存活率較 control 組降低，因此，後續實驗將以擁有保護效果的最大劑量 1500 $\mu\text{g/ml}$ 作為細辛的實驗劑量進行實驗。

二、 採氣壓撞擊模擬神經元牽張壓力造成神經元損傷，並施以細辛治療，探討細辛對於損傷後神經元存活率的影響。

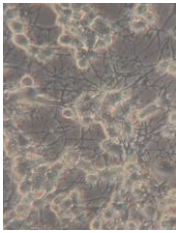
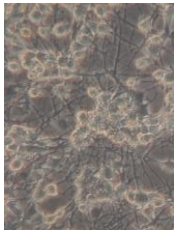
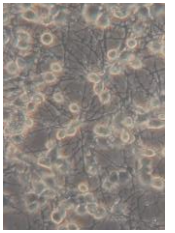

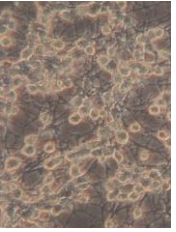
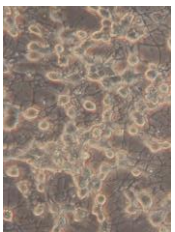
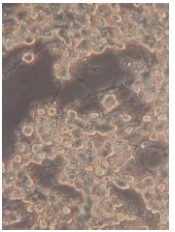
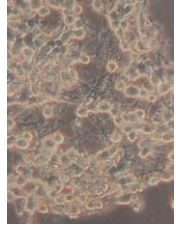
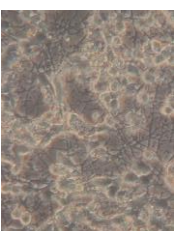
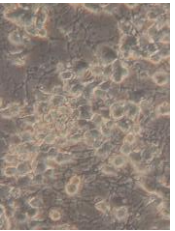
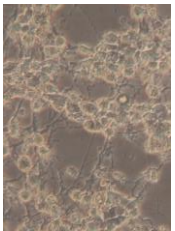
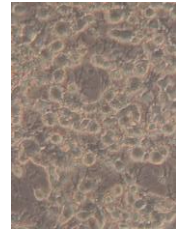
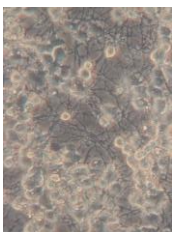
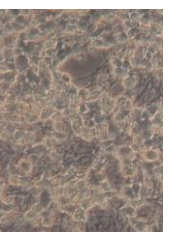
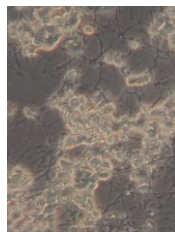


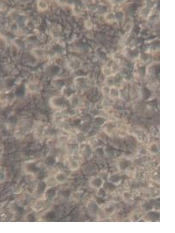
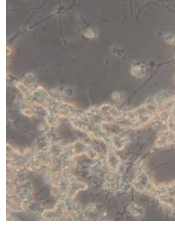
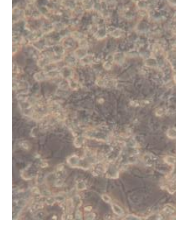
(一)、存活率分析



圖(八)、存活率細胞之存活率分析(n=3)

圖(八)顯示，與 control 組比較，氣壓撞擊組(TBI 組)存活率明顯降低(100% vs. 47.5%)，而加入細辛治療組(TBI+AS 組)的存活率則顯著增加 (83.6%)。

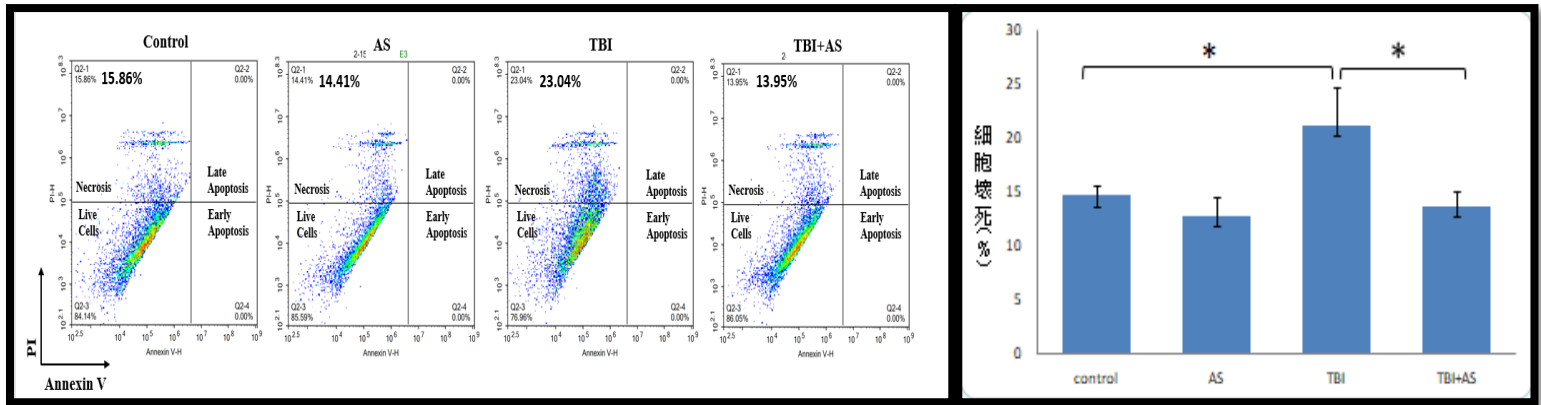
(二)、細胞型態觀察

	Control	AS	TBI	TBI+AS
未加細辛或 施行撞擊之細胞 型態				
加入細辛(AS)及 施行撞擊(TBI) 後 0 小時				
加細辛(AS)及 施行撞擊(TBI) 後 24 小時				
加細辛(AS)及 施行撞擊(TBI) 後 48 小時				
加細辛(AS)及 施行撞擊(TBI) 後 72 小時				

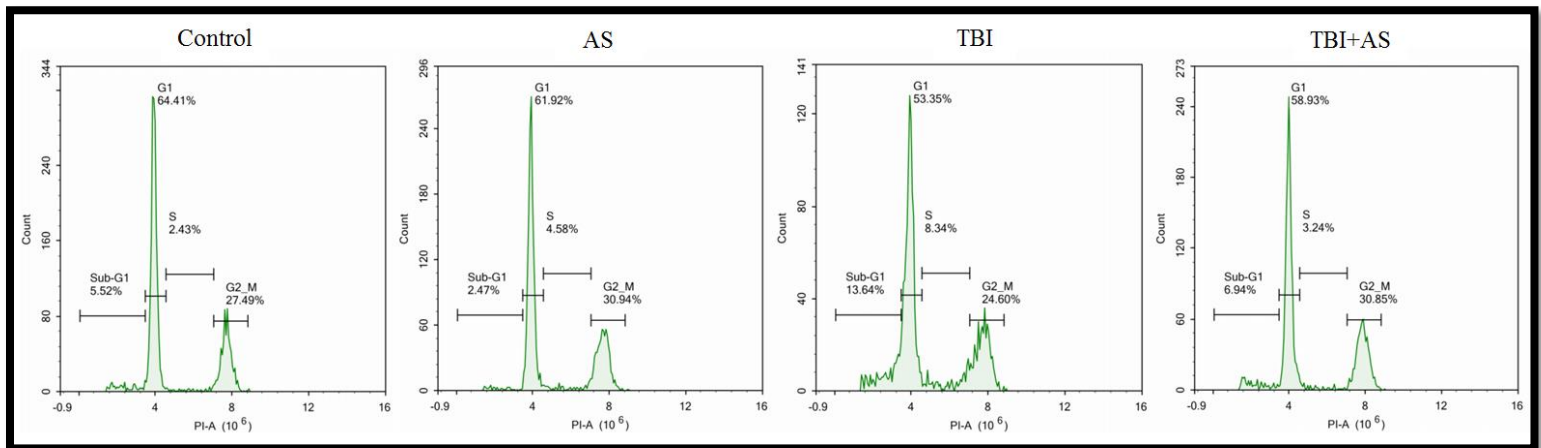
表(一)、觀察各組經撞擊(TBI)或細辛(AS)處理後不同時間點之細胞型態變化

從上表(一)可知，TBI 組，在撞擊後 72 小時可明顯觀察到其細胞型態明顯變異（軸突斷裂、細胞懸浮），給予 1500 $\mu\text{g/ml}$ 的細辛治療(TBI+AS)其軸突完整性與細胞貼附生長型態則有顯著提升。觀察 control 組以及 AS 組，可以發現加 AS 組的細胞數及軸突生長狀態略高於 control 組，表示細辛對於正常 PC12 具有促進其細胞增生作用。

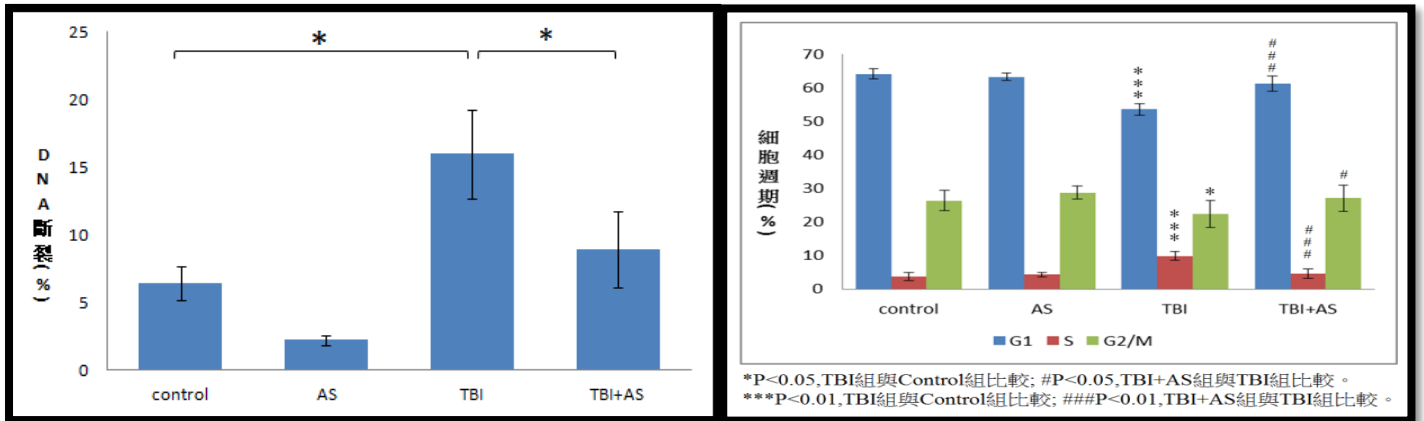
三、 探討細辛對於氣壓撞擊誘導神經元損傷之細胞死亡型態及 DNA 斷裂之影響



圖(九)、透過流式細胞儀技術觀察實驗各組細胞凋亡與壞死之情形與實驗數據分析(n=3)



圖(十)、透過流式細胞儀技術觀察實驗各組細胞 DNA 斷裂之情形

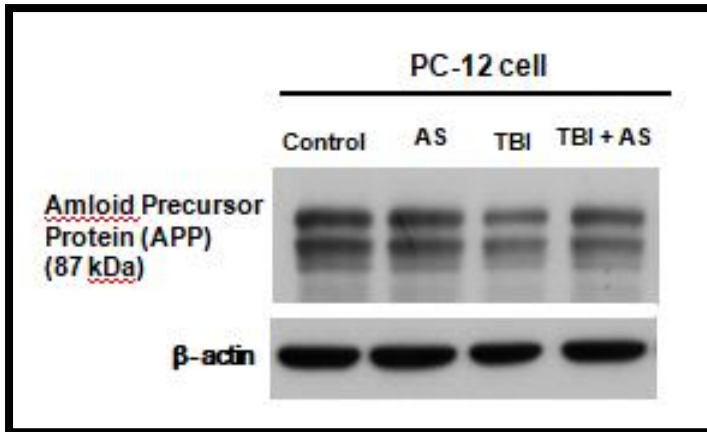


圖(十一)、分析各組細胞 DNA 斷裂情形(n=4)

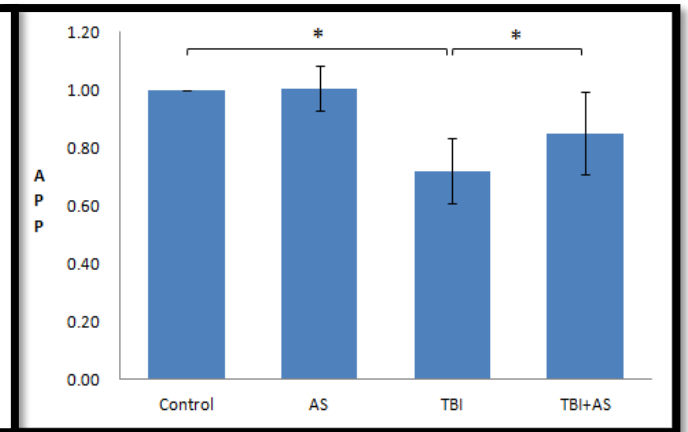
圖(十二)、分析各組細胞在各細胞週期死亡情形

由以上的實驗結果可知，與 control 組比較，TBI 會造成細胞壞死，其細胞死亡比例明顯增加 (15.86% vs. 23.04%)(圖九)，而經過 AS 處理的組別則死亡比例顯著降低(13.95%)，由細胞 DNA 斷裂實驗的結果可以得到相同的結果(6.43% vs. 15.97%)，另外，透過 p value 值分析，可知細胞受到 TBI 後有顯著壞死與 DNA 斷裂，DNA 斷裂為細胞程序性死亡(programmed cell death)的典型特徵，因此推測 TBI 後細胞呈現壞死性凋亡(necroptosis)，而加入細辛治療可以顯著降低上述現象產生(圖九、圖十一)，而在細胞週期的分析上(圖十二)，我們發現細胞停滯於 S 期，相關機制仍待闡明。

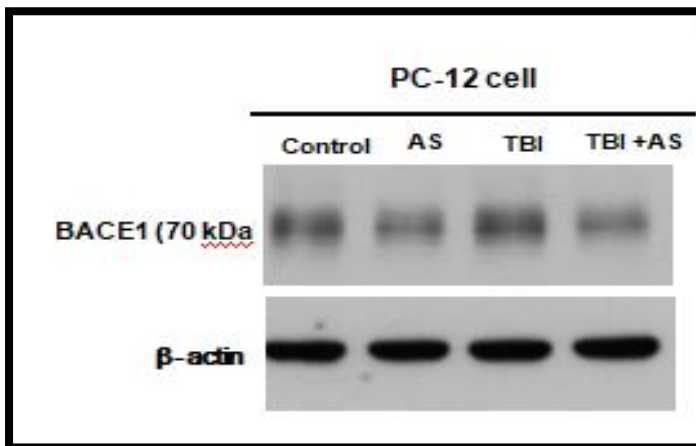
四、 細辛對於氣壓撞擊誘導阿茲海默症相關蛋白質與壞死性凋亡蛋白表達之影響



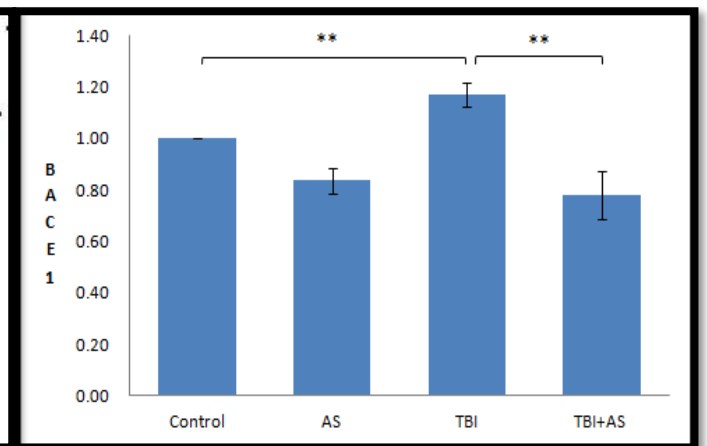
圖(十三)、APP 蛋白質表現



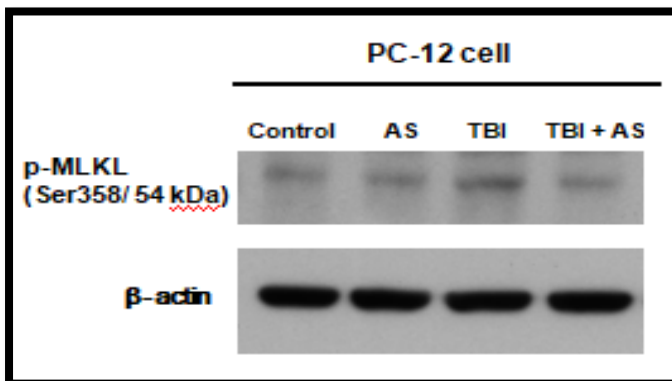
圖(十四)、APP 蛋白質實驗數據分析(n=3)



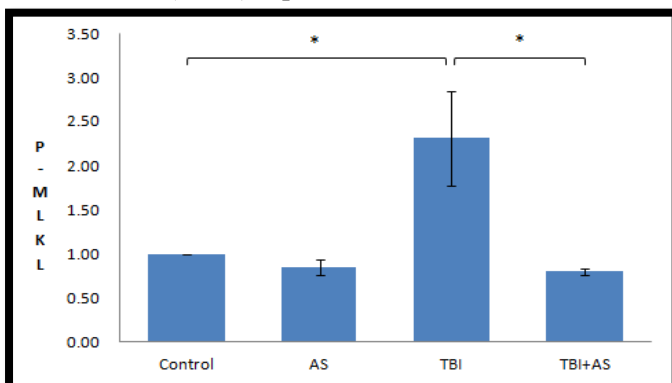
圖(十五)、BACE1 蛋白質表現



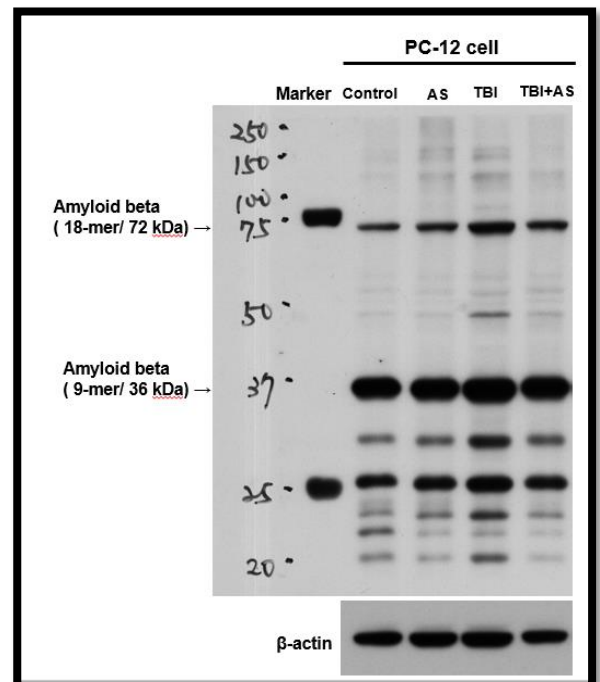
圖(十六)、BACE1 蛋白質實驗數據分析(n=3)



圖(十七)、p-MLKL 蛋白質表現



圖(十八)、p-MLKL 蛋白質實驗數據分析(n=3)



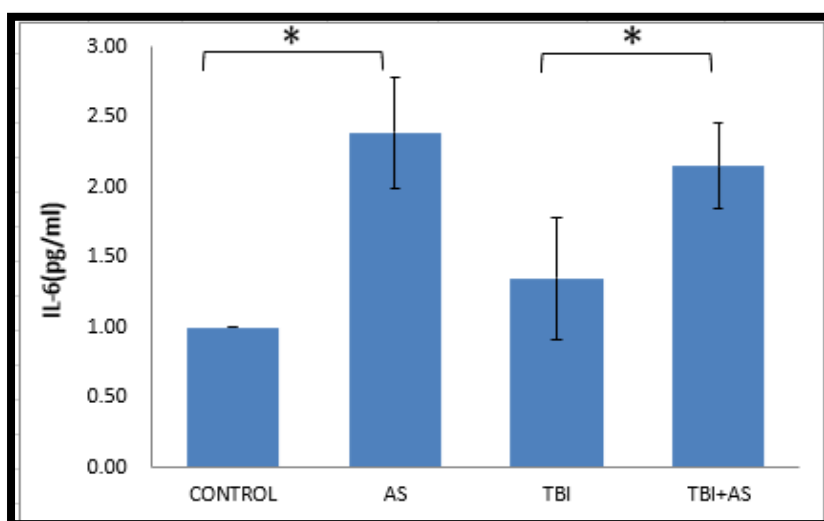
圖(十九)、A β 蛋白質表現(n=3)

從圖(十三)中定量值比較 TBI 組以及 TBI+AS 組，可以知道加細辛組的值較低，表示細辛可有效降低 BACE1 的產生，以減低 APP 被切割成 A β (圖十四)。

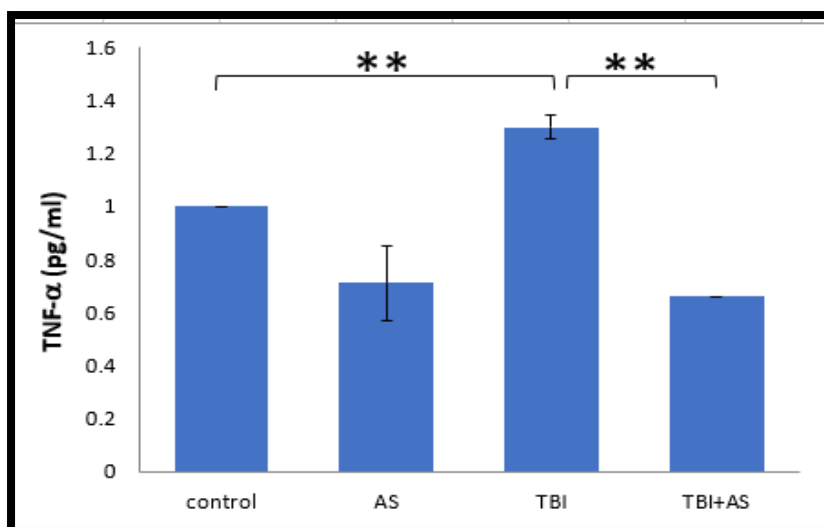
從圖(十四)結果中可以發現在 TBI 組有顯著不同片段聚合體的 A β 表達，給予細辛治療(TBI+AS 組)，不同 A β 聚合體之表達明顯下降，同時對比於圖十二及圖十三，給予細辛治療(TBI+AS 組)可以有效防止 APP 蛋白質被 BACE1 切割成 A β 蛋白質，因此 A β 蛋白質質量較少。

從圖(十六)中可以發現參與壞死性凋亡關鍵蛋白 MLKL 磷酸化(pMLKL)的表現在 TBI 組別顯著提升，給予細辛治療(TBI+AS 組)，則可顯著降低 MLKL 磷酸化。可以推測細辛可以降低 MLKL 蛋白質磷酸化，減少細胞壞死性凋亡(necroptosis)。

五、 探討細辛對於發炎性反應有關的細胞激素與細胞趨化因子的影響



圖(二十)、使用酵素免疫吸附法檢測 IL-6 (n=3)

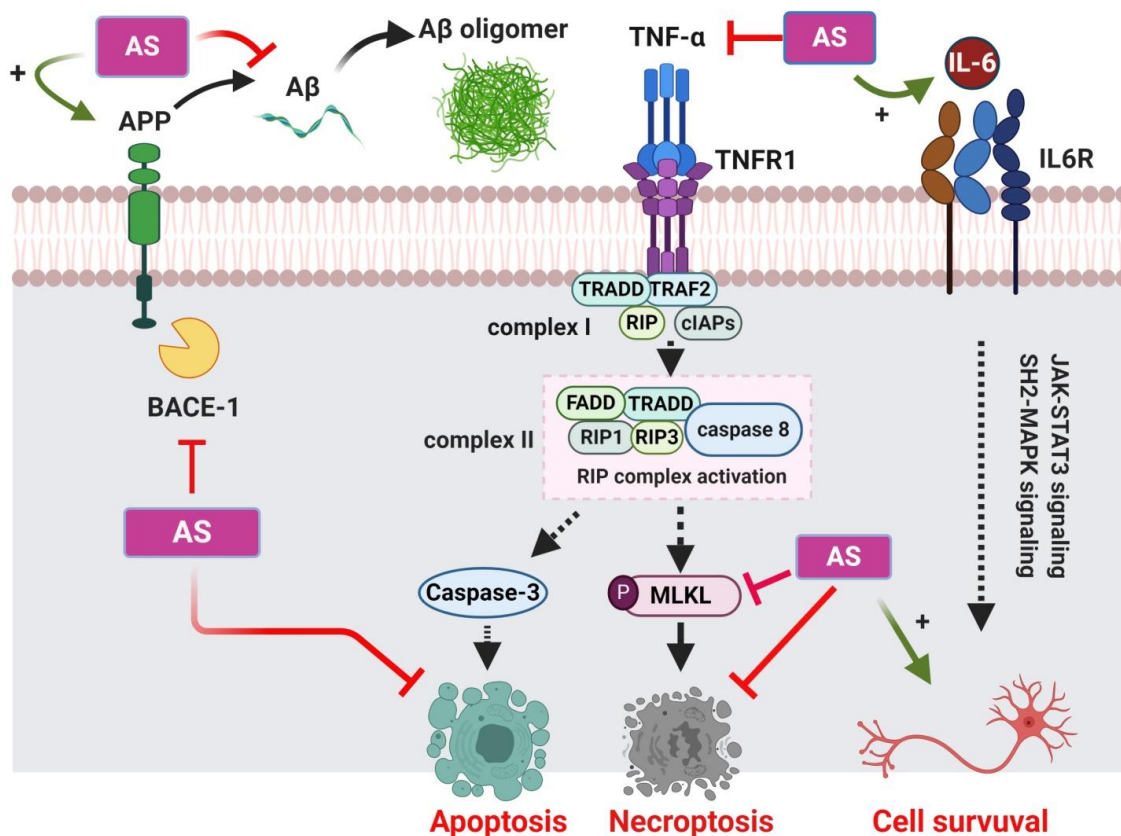


圖(二十一)、使用酵素免疫吸附法檢測 TNF- α (n=3)

可從上圖(十七)中得知在加細辛組(AS 組)以及 TBI 加細辛治療(TBI+AS 組)組中，IL-6 明顯比 control 組或 TBI 組增加。對比 control 組，細胞進行 TBI 撞擊後 IL-6 表現顯著降低，但是加入細辛治療後(TBI+AS)則顯著上升，可知細辛可顯著改善抗炎性細胞激素 IL-6 表現量。從上圖(十八)中可以發現，與 control 組比較，TBI 組別大量產生促炎性細胞激素 TNF- α ，加入細辛治療(TBI+AS 組)則可以顯著降低 TNF- α 的表現量。上述結果顯示，神經元遭受氣壓誘導牽張壓力後(TBI 組)，顯著提升促炎性細胞激素 TNF- α 表達，降低抗炎性細胞激素 IL-6 的表達，給予細辛治療(TBI+AS 組)則可顯著降低 TNF- α 表現，提升 IL-6 表現，顯示細辛的確具有調節神經發炎性反應之作用。

陸、結論

綜合以上結果，以氣壓誘導牽張壓力造成神經元死亡，其中相關機制包括了：促炎性細胞激素 TNF- α 表達增加、抗炎性細胞激素 IL-6 表達減少、阿茲海默症相關風險蛋白質表達改變(包括 APP 表現減少，其分解酵素 BACE1 活性增加，其產物 A β 表達增加)、促進壞死性凋亡關鍵蛋白 MLKL 磷酸化作用，最終導致細胞死亡，存活率顯著下降。給予傳統中藥細辛水萃物治療，可以有效調節神經發炎性反應、減少類澱粉樣蛋白質表現及其切割酵素活化作用、降低 MLKL 蛋白質磷酸化作用，有效降低神經元壞死性凋亡及促進細胞生長，提升細胞存活率。(詳如附圖(二十二))



圖(二十二)、實驗結論圖

柒、討論與展望

本研究從細辛對於正常神經元是否有毒性作用開始著手，我們採取不同濃度(100~2000 $\mu\text{g/ml}$)添加於細胞培養基中，觀察發現細辛對於 PC12 神經元細胞株具有刺激其細胞生長作用，尤其是 1500 $\mu\text{g/ml}$ 具有最佳效果，然而一旦濃度提升至 2000 $\mu\text{g/ml}$ 時將會造成細胞毒性作用，因此後續的神經損傷實驗，即採用 1500 $\mu\text{g/ml}$ 為治療濃度。然而，高劑量的細辛為何會造成神經元毒性作用，以及未來面對不同疾病採取何種濃度細辛治療及其相關毒理學研究，仍有待證明。本研究採取細辛水萃物作為治療試劑，然而這些水萃物中含有那些化學成分及其相關藥物動力學分析，本研究計畫並未進行相關實驗，因此未來針對細辛的藥理學研究仍需繼續努力。

目前針對細辛改善神經元壞死性凋亡的關鍵蛋白 **MLKL** 磷酸化具有顯著的抑制作用，同時對於其上游機制中的 **TNF- α** 訊息也有顯著的抑制效果，回顧前言所提，**Antonella Caccamo** 等人觀察阿茲海默症患者腦中有大範圍的腦組織呈現壞死性凋亡，且與認知功能障礙、大腦萎縮相關 (**Caccamo et al., 2017**)，因此我們推測，細辛可以有效抑制 **TNF- α** 傳遞路徑，除了可降低神經發炎性反應，還可以降低壞死性凋亡蛋白 **MLKL** 磷酸化，未來將可擴大應用於防治阿茲海默症的生成。另外，細辛同時對於神經元損傷引發的類澱粉樣蛋白質的堆積也具有顯著調降效果，其相關機制與透過抑制前驅蛋白質水解酶 **BACE1** 的表達相關，究竟是否同樣透過抑制 **TNF- α** 傳遞路徑仍須進一步探討。值得注意的是，此外，抗發炎細胞激素 **IL-6** 的表現在細辛處理下顯著表現增加，過去文獻指出，有效的維持熱休克蛋白質 72 (**heat shock protein 72; HSP72**) 的表達對於維持 **IL-6** 具有關鍵性作用 (**Chio et al., 2017**)，已知 **HSP72** 對於各種組織細胞遭受缺血缺氧壓力都具有保護作用，細辛是否對於 **HSP72** 有影響效果，非常值得探討。

本研究是細辛用於神經保護作用的初步研究結果，還有相當多的機制仍有待闡明。在進入臨床實驗之前，必須要完成基礎研究工作，尤其是應用於動物實驗模式的功效、毒性及藥理作用評估是相當重要的，因此，我們期許未來進入大學或研究所，能繼續深化此研究案，並朝向動物腦創傷及阿茲海默症模式，進行細辛的療效評估，同時針對細辛之有效化學成分做深入分析，將傳統中藥藥理作用科學化，建立一個神經保護作用評估平台，未來將可推廣至其他中藥，也可協同其他中藥材，應用君臣佐使觀念，用以提升細辛之效用。

附錄：縮寫

- A β** = amyloid beta 類澱粉樣蛋白質
- AD** = Alzheimer's disease 阿茲海默症
- APP** = amyloid precursor protein 類澱粉樣前驅蛋白質
- APS** = Ammonium persulfate 過硫酸銨
- BACE1** = β -site APP cleaving enzyme 1 β -分泌酶
- CSFs** = Colony-stimulating factors 集落刺激因子
- DMSO** = Dimethyl sulfoxide 二甲基亞砜
- ELISA** = enzyme-linked immunosorbent assay 酵素免疫吸附法
- FBS** = Fetal bovine serum 胎牛血清
- FITC** = Fluorescein isothiocyanate 螢光異硫氰酸鹽
- IBD** = Inflammatory Bowel Disease 發炎性腸病
- IFNs** = Interferons 干擾素
- ILs** = Interleukins 白細胞介素或介白素
- IL-6** = interleukin-6 介白質素-6
- MLKL** = Mixed lineage kinase domain like pseudokinase 混合譜系激酶結構域
- MTT** = (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 細胞存活率分析
- NGF** = Nerve growth factor 神經生長因子
- O.D.** = optical density 光密度
- PBS** = Phosphate buffered saline 磷酸鹽緩衝生理鹽水
- PC12** = pheochromocytoma 12 大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤
- PI** = Propidium Iodide 碘化丙啶
- PVDF membrane** = polyvinylidene fluoride 聚偏氟乙烯膜
- RPMI** = Roswell Park Memorial Institute 1640 medium RPMI 培養液
- SDS** = Sodium dodecyl sulfate 十二烷基硫酸鈉
- TBI** = traumatic brain injury 創傷性腦損傷
- TEMED** = Tetramethylethylenediamine 四甲基乙二胺
- TGFs** = Transforming growth factors 轉化生長因子
- TNF- α** = Tumor necrosis factor alpha 甲型腫瘤壞死因子
- TNFs** = Tumor necrosis factors 腫瘤壞死因子
- TTBS** = Tris-buffered saline+Tween-20 三乙醇胺緩衝生理鹽水+聚山梨醇酯 20

捌、參考資料

- Caccamo, A., Branca, C., Piras, I. S., Ferreira, E., Huentelman, M. J., Liang, W. S., . . . Oddo, S. (2017). Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 20(9), 1236-1246. doi:10.1038/nn.4608
- Chartier-Harlin, M. C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., . . . et al. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*, 353(6347), 844-846. doi:10.1038/353844a0
- Chen, W., Zhou, Z., Li, L., Zhong, C.-Q., Zheng, X., Wu, X., . . . Han, J. (2013). Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *The Journal of biological chemistry*, 288(23), 16247-16261. doi:10.1074/jbc.M112.435545
- Chen, X.-H., Johnson, V. E., Uryu, K., Trojanowski, J. Q., & Smith, D. H. (2009). A lack of amyloid beta plaques despite persistent accumulation of amyloid beta in axons of long-term survivors of traumatic brain injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(2), 214-223. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00176.x
- Chen, X. H., Johnson, V. E., Uryu, K., Trojanowski, J. Q., & Smith, D. H. (2009). A lack of amyloid beta plaques despite persistent accumulation of amyloid beta in axons of long-term survivors of traumatic brain injury. *Brain Pathol*, 19(2), 214-223. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00176.x
- Chen, X. H., Siman, R., Iwata, A., Meaney, D. F., Trojanowski, J. Q., & Smith, D. H. (2004). Long-term accumulation of amyloid-beta, beta-secretase, presenilin-1, and caspase-3 in damaged axons following brain trauma. *Am J Pathol*, 165(2), 357-371. doi:10.1016/s0002-9440(10)63303-2
- Cheong, C. U., Chang, C. P., Chao, C. M., Cheng, B. C., Yang, C. Z., & Chio, C. C. (2013). Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing brain TNF- alpha contents and by stimulating newly formed neurogenesis. *Mediators Inflamm*, 2013, 620837. doi:10.1155/2013/620837

- Chio, C. C., Chang, C. H., Wang, C. C., Cheong, C. U., Chao, C. M., Cheng, B. C., . . . Chang, C. P. (2013). Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing early microglial expression of tumor necrosis factor-alpha. *BMC Neurosci*, *14*, 33. doi:10.1186/1471-2202-14-33
- Chio, C. C., Lin, H. J., Tian, Y. F., Chen, Y. C., Lin, M. T., Lin, C. H., . . . Hsu, C. C. (2017). Exercise attenuates neurological deficits by stimulating a critical HSP70/NF-kappaB/IL-6/synapsin I axis in traumatic brain injury rats. *J Neuroinflammation*, *14*(1), 90. doi:10.1186/s12974-017-0867-9
- Chio, C. C., Lin, J. W., Chang, M. W., Wang, C. C., Kuo, J. R., Yang, C. Z., & Chang, C. P. (2010). Therapeutic evaluation of etanercept in a model of traumatic brain injury. *J Neurochem*, *115*(4), 921-929. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06969.x
- Das, B., & Yan, R. (2017). Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Translational neurodegeneration*, *6*, 23-23. doi:10.1186/s40035-017-0093-5
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, *25*(3), 486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- Hamley, I. W. (2012). The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem Rev*, *112*(10), 5147-5192. doi:10.1021/cr3000994
- Hibi, M., Nakajima, K., & Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med (Berl)*, *74*(1), 1-12. doi:10.1007/bf00202068
- Jing, Y., Zhang, Y. F., Shang, M. Y., Liu, G. X., Li, Y. L., Wang, X., & Cai, S. Q. (2017). Chemical Constituents from the Roots and Rhizomes of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* and the In Vitro Anti-Inflammatory Activity. *Molecules*, *22*(1). doi:10.3390/molecules22010125
- Johnson, V. E., Stewart, W., & Smith, D. H. (2010). Traumatic brain injury and amyloid-beta pathology: a

link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci*, 11(5), 361-370. doi:10.1038/nrn2808

Kim, D. Y., Carey, B. W., Wang, H., Ingano, L. A., Binshtok, A. M., Wertz, M. H., . . . Kovacs, D. M. (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol*, 9(7), 755-764. doi:10.1038/ncb1602

Li, Y., Han, L., Huang, C., Dai, W., Tian, G., Huang, F., . . . Zhou, Z. (2018). New Contributions to Asarum Powder on Immunology Related Toxicity Effects in Lung. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 1054032. doi:10.1155/2018/1054032

Liu, Y., Liu, T., Lei, T., Zhang, D., Du, S., Girani, L., . . . Wang, Y. (2019). RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *Int J Mol Med*, 44(3), 771-786. doi:10.3892/ijmm.2019.4244

Loane, D. J., & Byrnes, K. R. (2010). Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 7(4), 366-377. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.002

Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., & Benson, M. D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science*, 254(5028), 97-99. doi:10.1126/science.1925564

Nagamoto-Combs, K., McNeal, D. W., Morecraft, R. J., & Combs, C. K. (2007). Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central nervous system after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 24(11), 1719-1742. doi:10.1089/neu.2007.0377

O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 185-204. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613

Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., Talebi, M., Farhoudi, M., & Mahmoudi, J. (2015). Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract*, 24(1), 1-10. doi:10.1159/000369101

- Scott, G., Ramlackhansingh, A. F., Edison, P., Hellyer, P., Cole, J., Veronese, M., . . . Sharp, D. J. (2016). Amyloid pathology and axonal injury after brain trauma. *Neurology*, *86*(9), 821-828.
doi:10.1212/wnl.0000000000002413
- Stahel, P. F., Shohami, E., Younis, F. M., Kariya, K., Otto, V. I., Lenzlinger, P. M., . . . Morganti-Kossmann, M. C. (2000). Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab*, *20*(2), 369-380.
doi:10.1097/00004647-200002000-00019
- Stokin, G. B., Lillo, C., Falzone, T. L., Brusch, R. G., Rockenstein, E., Mount, S. L., . . . Goldstein, L. S. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*, *307*(5713), 1282-1288. doi:10.1126/science.1105681
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., . . . Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, *148*(1-2), 213-227.
doi:10.1016/j.cell.2011.11.031
- Zhang, Y.-w., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, *4*(1), 3. doi:10.1186/1756-6606-4-3
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., & Liu, Z. G. (2012). Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(14), 5322-5327. doi:10.1073/pnas.1200012109
- Ziebell, J. M., & Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, *7*(1), 22-30. doi:10.1016/j.nurt.2009.10.016

【評語】 052004

本研究目的是探討細辛對腦創傷療效及其作用機制，以氣壓誘導細胞牽張壓力造成細胞損傷，探討單一療法或合併療法對於損傷後神經元存活率的影響，給予不同濃度細辛以評估神經元存活率。結果發現，細辛能增加神經元存活率，降低 TNF- α 、A β 、BACE1、MLKL 表達及壞死性凋亡，提升 IL-6 及維持 APP 表現。因此推測，細辛可有效降低神經發炎反應、促進抗炎激素表現，改善 AD 相關風險分子表現，以達到神經保護作用，本計畫開啟了細辛對腦創傷治療的可能性。建議細胞凋亡相關的蛋白質及細胞生長相關的蛋白，可以用西方墨點來測試，另外用兩種不同的神經細胞來做實驗比較具說服力。實驗記錄本應詳實撰寫，以原始記載為佳，避免錯誤。

壹、摘要

腦創傷(TBI)為阿茲海默症(AD)高風險群，其病理機制尚待闡明。已知中藥細辛具抗炎效用，是否具神經保護效果仍未知。本研究目的是探討細辛對TBI療效及其作用機制。以氣壓誘導神經元損傷，給予不同濃度細辛以評估神經元存活率，以酵素免疫吸附法評估發炎激素(甲型腫瘤壞死因子；TNF- α)及抗炎激素(介白質素-6；IL-6)；西方墨點法分析AD相關分子，包括類澱粉樣蛋白(A β)、類澱粉樣前驅蛋白(APP)、切割酵素(BACE1)及細胞死亡蛋白(MLKL)表現，以流式細胞儀分析神經元死亡型式。結果發現，細辛能增加神經元存活率，降低TNF- α 、A β 、BACE1、MLKL表達及壞死性凋亡，提升IL-6及維持APP表現。因此推測細辛可有效降低神經發炎反應、促進抗炎激素表現，改善AD相關風險分子表現，以達到神經保護作用。

貳、研究背景

一、腦創傷與神經發炎性反應之相關性

神經發炎性反應症在神經退化性疾病(包含AD)的病理生理學中受到關注。已知TBI在急性損傷後階段會誘導一系列複雜的發炎性反應，最初的血腦屏障受損與血液中的多形核白血球、T細胞、巨噬細胞和自然殺手細胞的浸潤有關。接著微小膠細胞的活化，釋放出各種細胞激素及趨化因子，引起神經元的損傷。

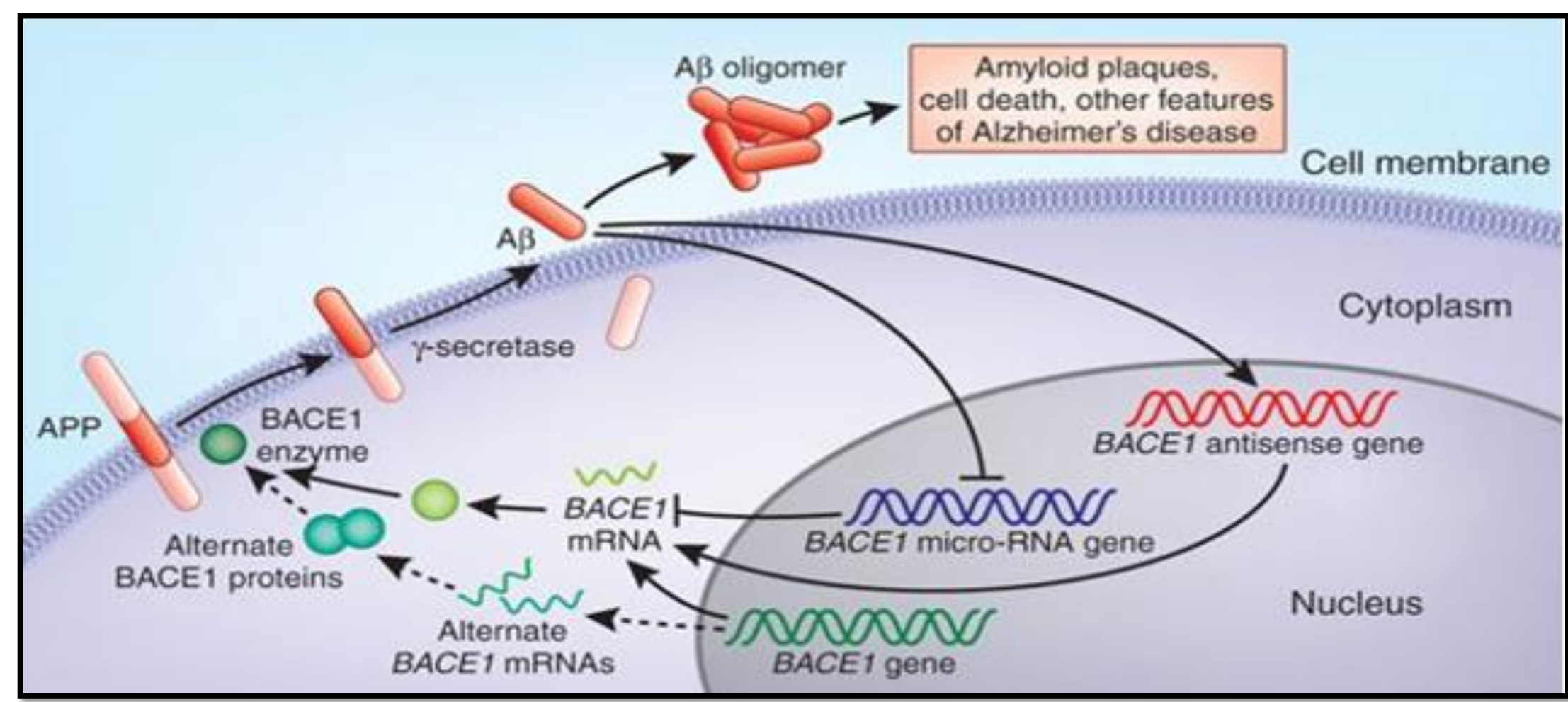
二、腦創傷與失智症之關聯

研究顯示，TBI與阿茲海默症擁有相同的病理特徵，來自人類研究和實驗動物數據，約三分之一的致死性TBI患者發現腦中大量A β 斑塊和軸突內A β 沉積，這些患者過去並沒有AD、唐氏綜合症或臨床癡呆症病史。腦創傷後引發A β 堆積的分子機制為何目前尚未有共識，推測神經元因為剪切應力，容易造成負責神經傳導的軸突結構發生斷裂，而形成創傷性白質損傷，這可能是啟動A β 堆積的誘因之一。

三、細辛

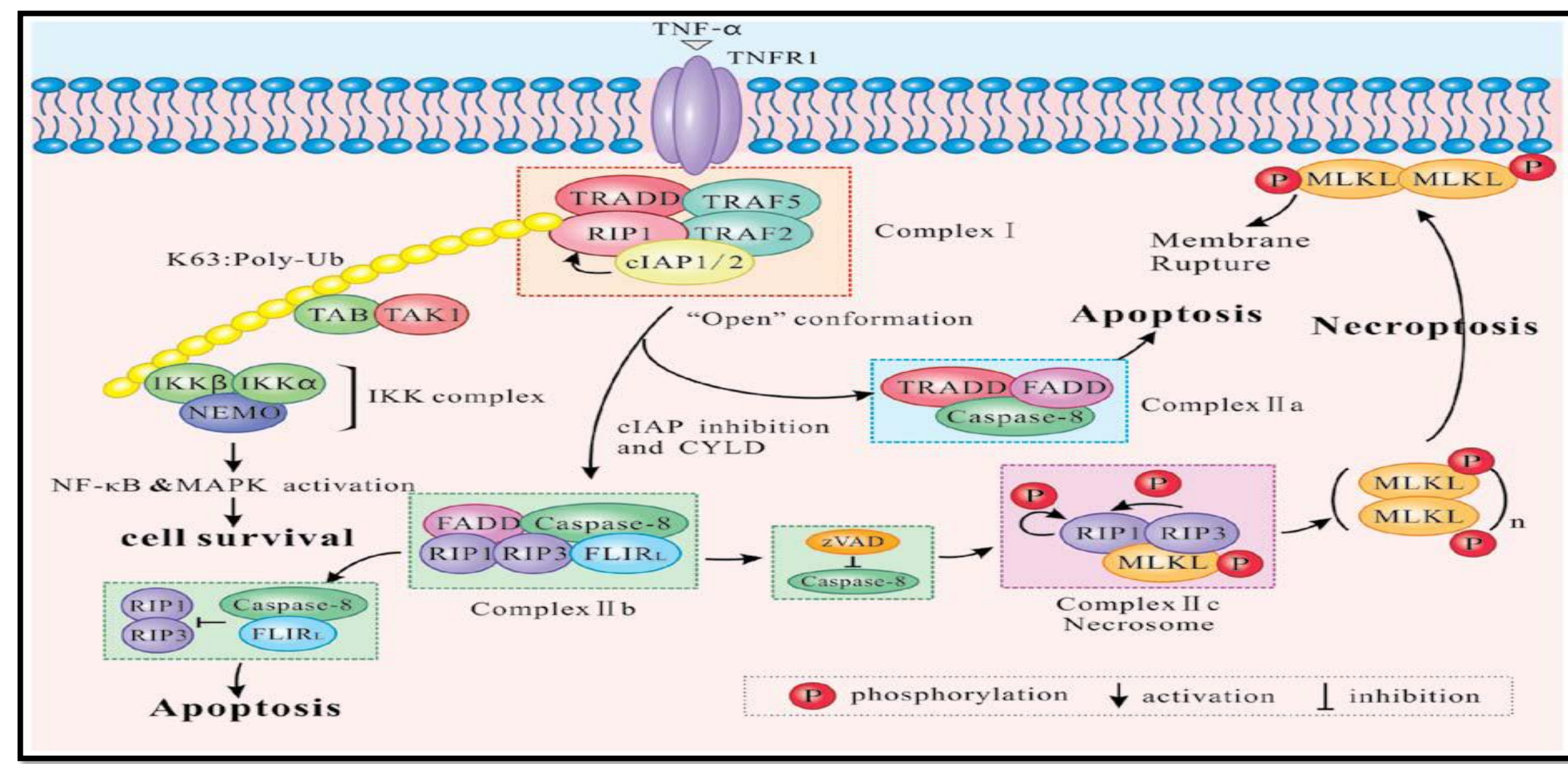
細辛屬(Aristolochiaceae)是分佈於北美、歐洲及亞洲常見的草本植物。其根部在傳統醫學中用於鎮咳、抗過敏、抗高血脂、祛痰、抗發炎、麻醉和抗真菌。生物學和藥理學研究也表明，細辛可以消炎、抗過敏、和抗氧化活性。

四、阿茲海默症與類澱粉樣前驅蛋白質及類澱粉樣蛋白



(source:APExBio)

五、細胞壞死性凋亡(necroptosis)

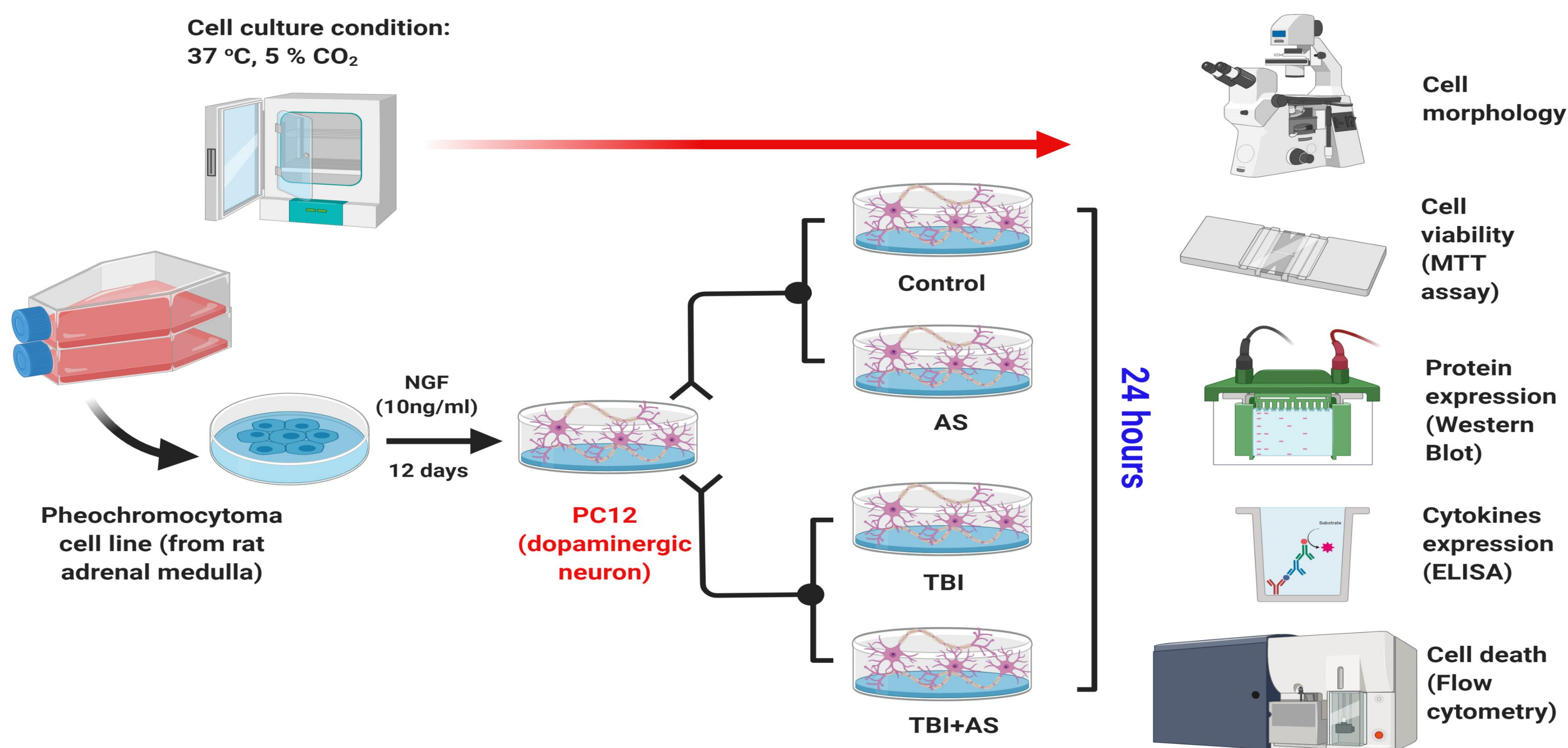


(參考資料2)

參、研究目的

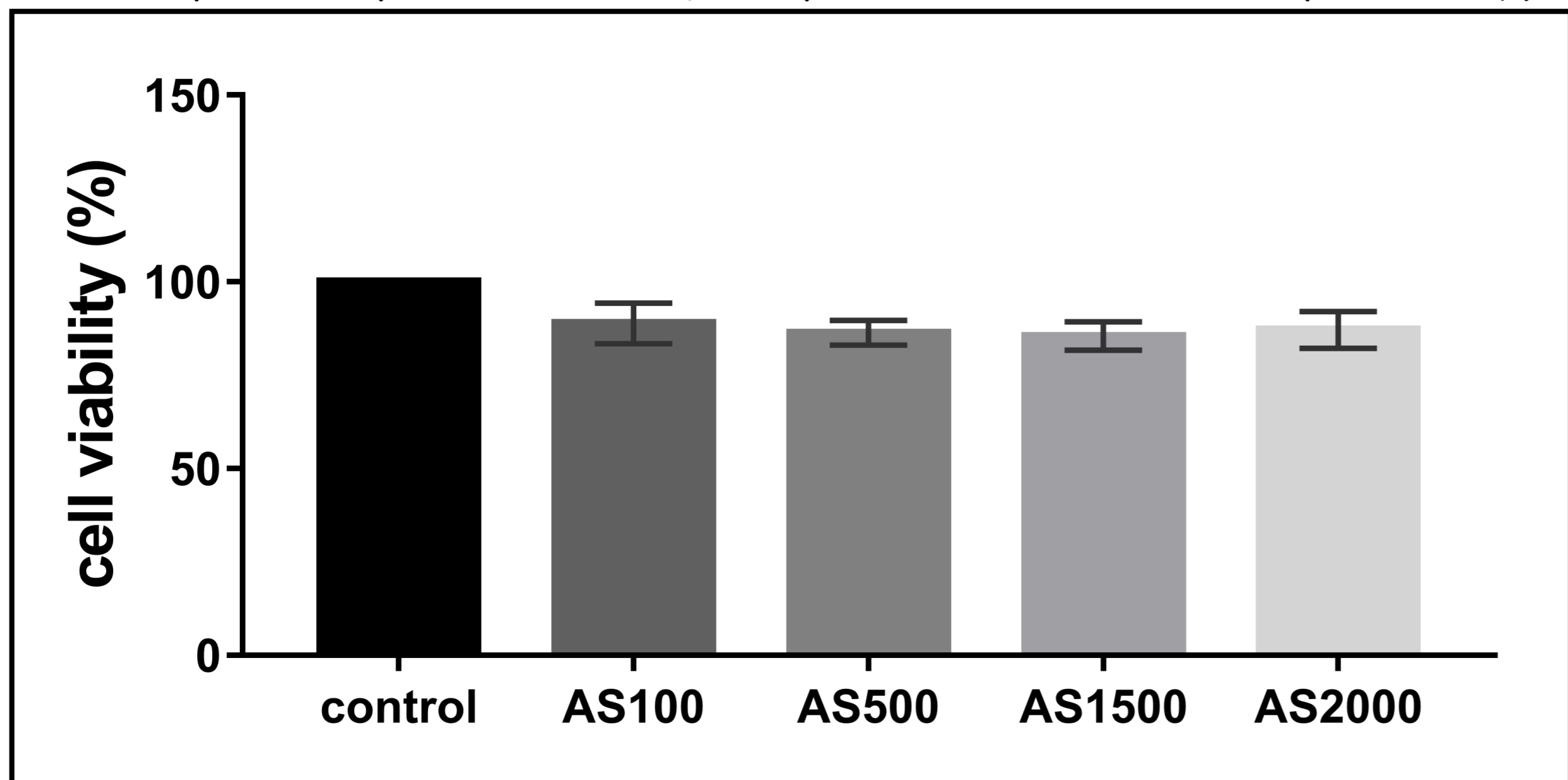
- 一、分析細辛對健康神經元之存活率的影響。
- 二、採氣壓撞擊模擬神經元牽張壓力造成神經元損傷，並施以細辛治療，探討細辛對於損傷後神經元存活率的影響。
- 三、探討細辛對於神經元損傷引發促炎細胞激素與抗炎細胞激素表達之影響。
- 四、探討氣壓撞擊後神經元死亡的型式及細辛是否可以有效降低神經元死亡。
- 五、探討細辛對於神經元損傷引發阿茲海默症相關風險蛋白質表達之影響作用。

肆、研究方法

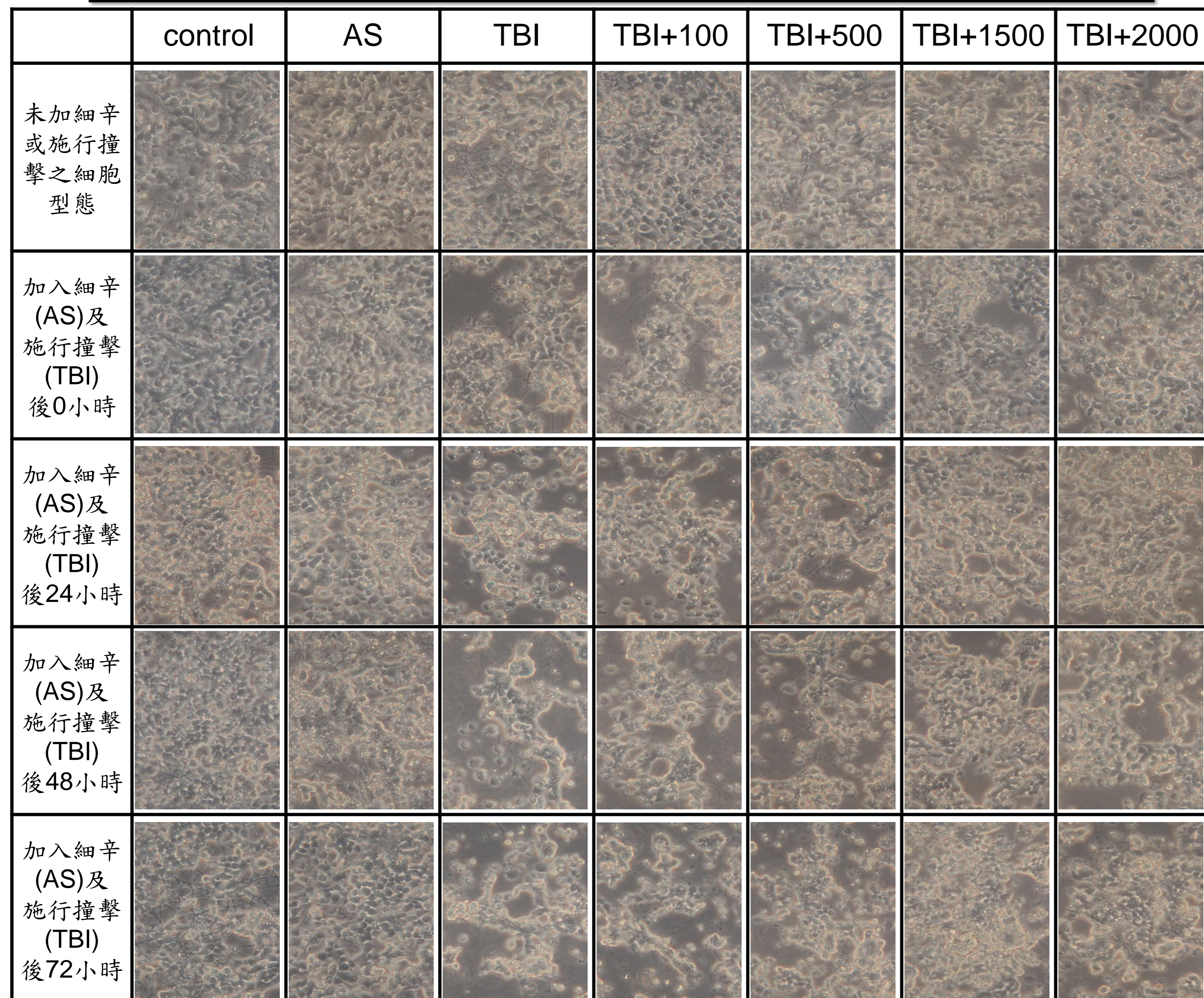
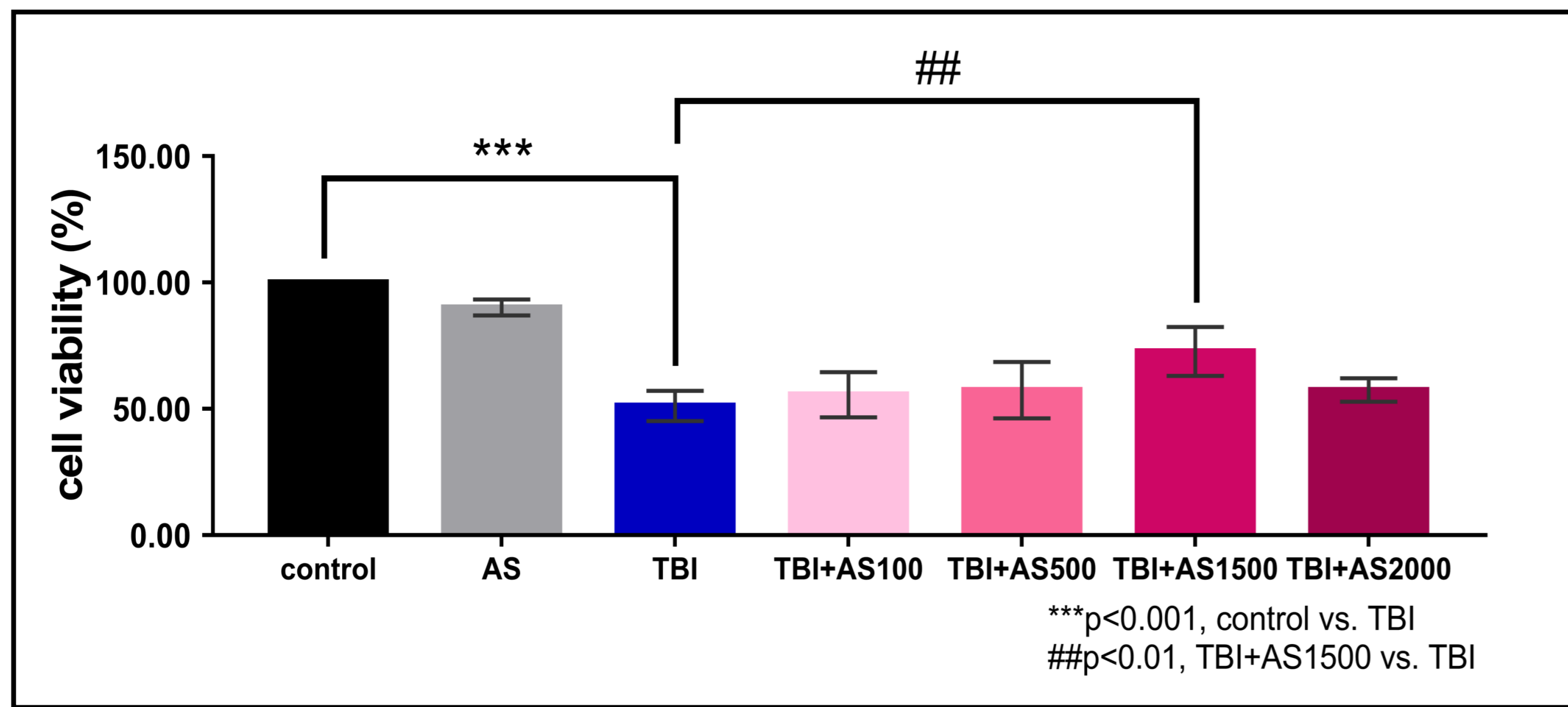


伍、研究結果

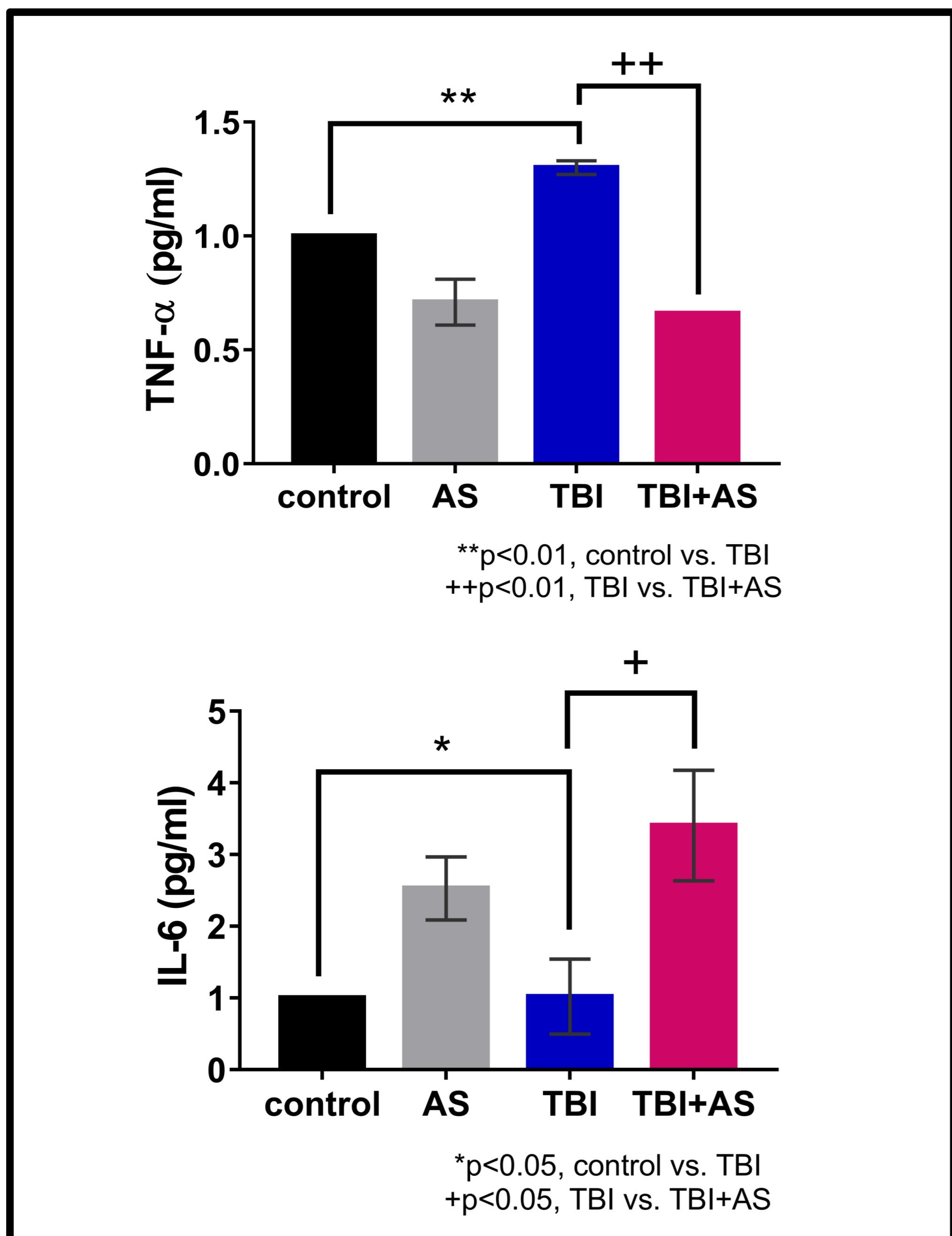
一、分析細辛對健康神經元存活率影響



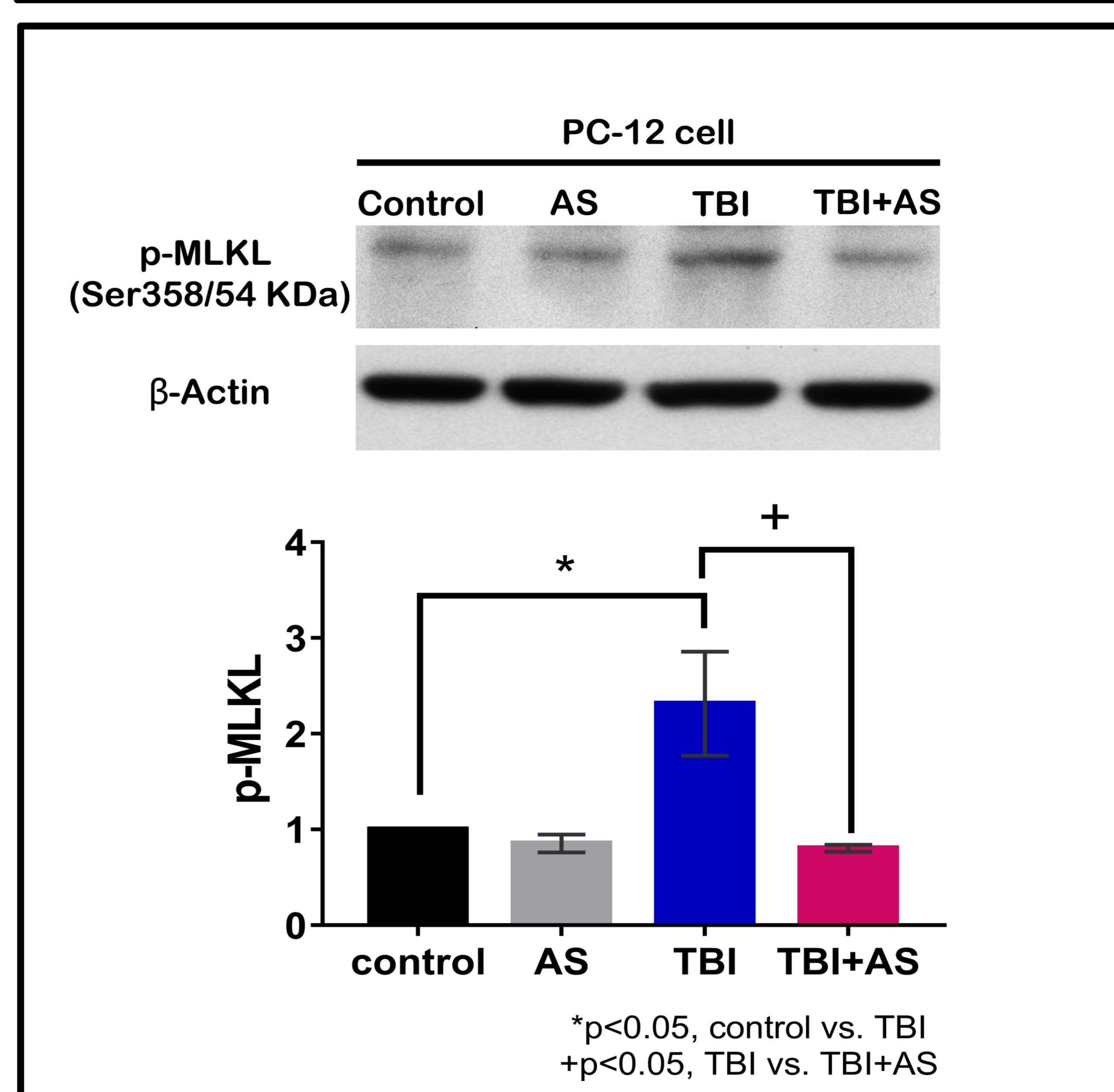
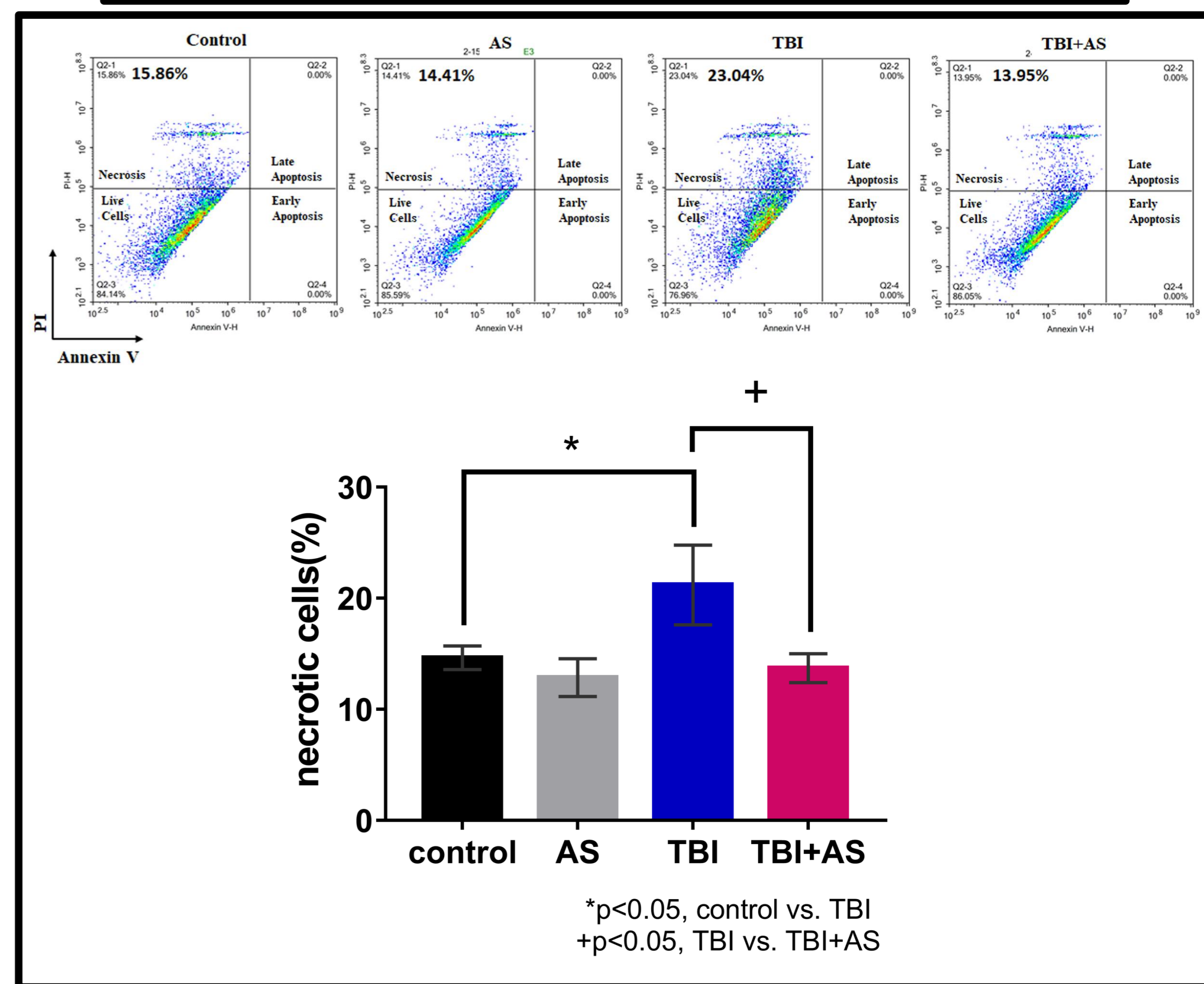
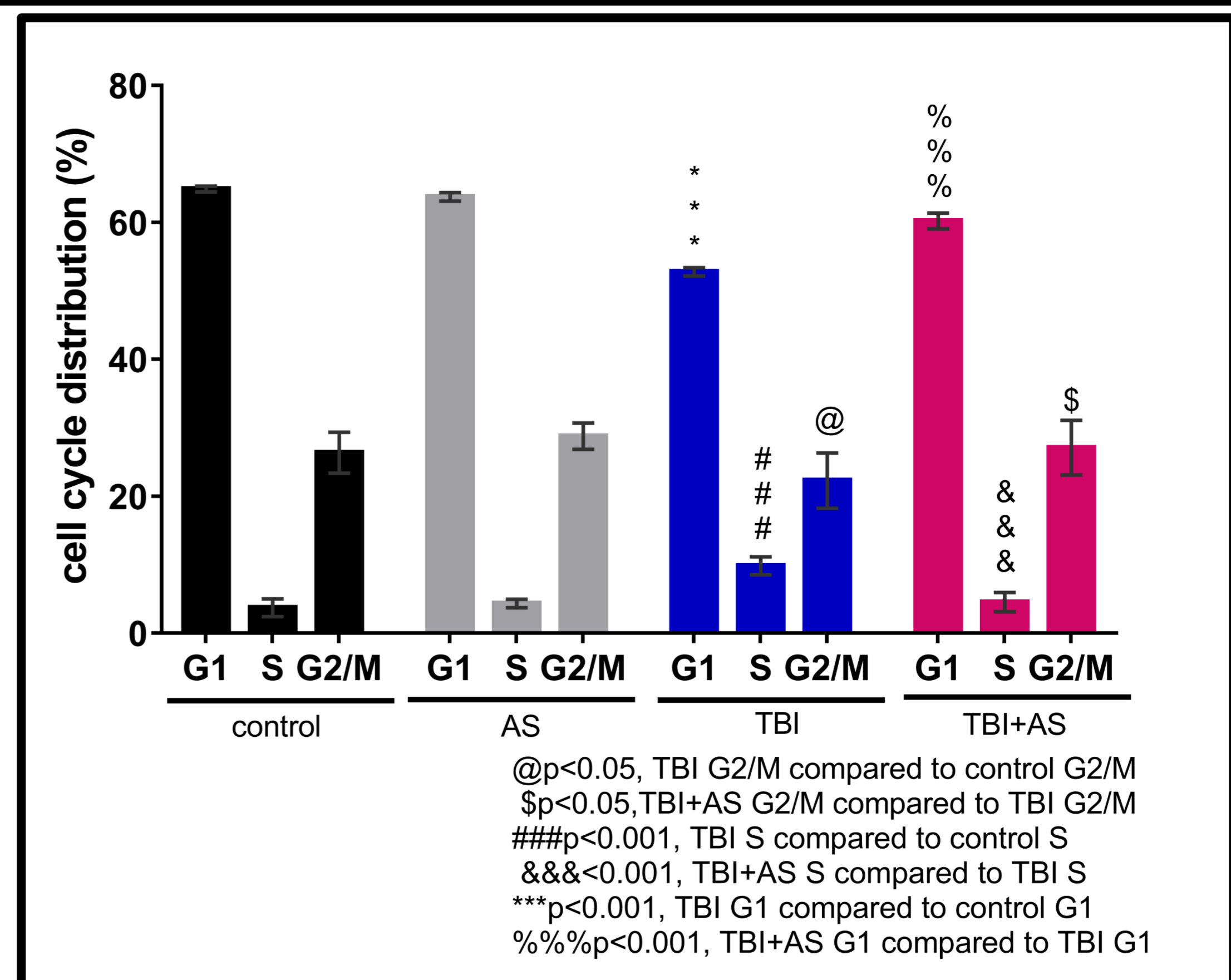
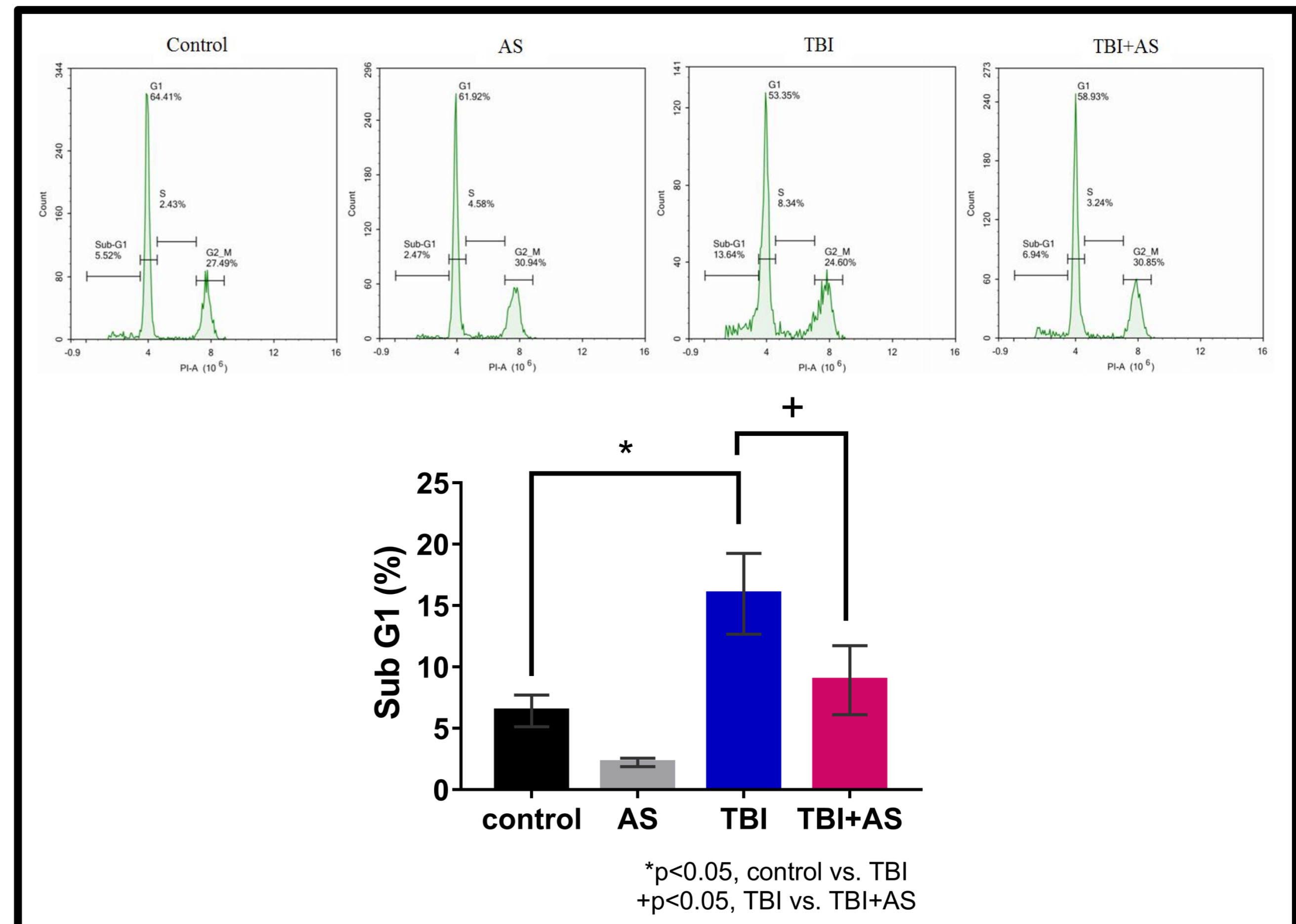
二、採氣壓撞擊模擬神經元牽張壓力造成神經元損傷，並施以細辛治療，探討細辛對於損傷後神經元存活率的影響



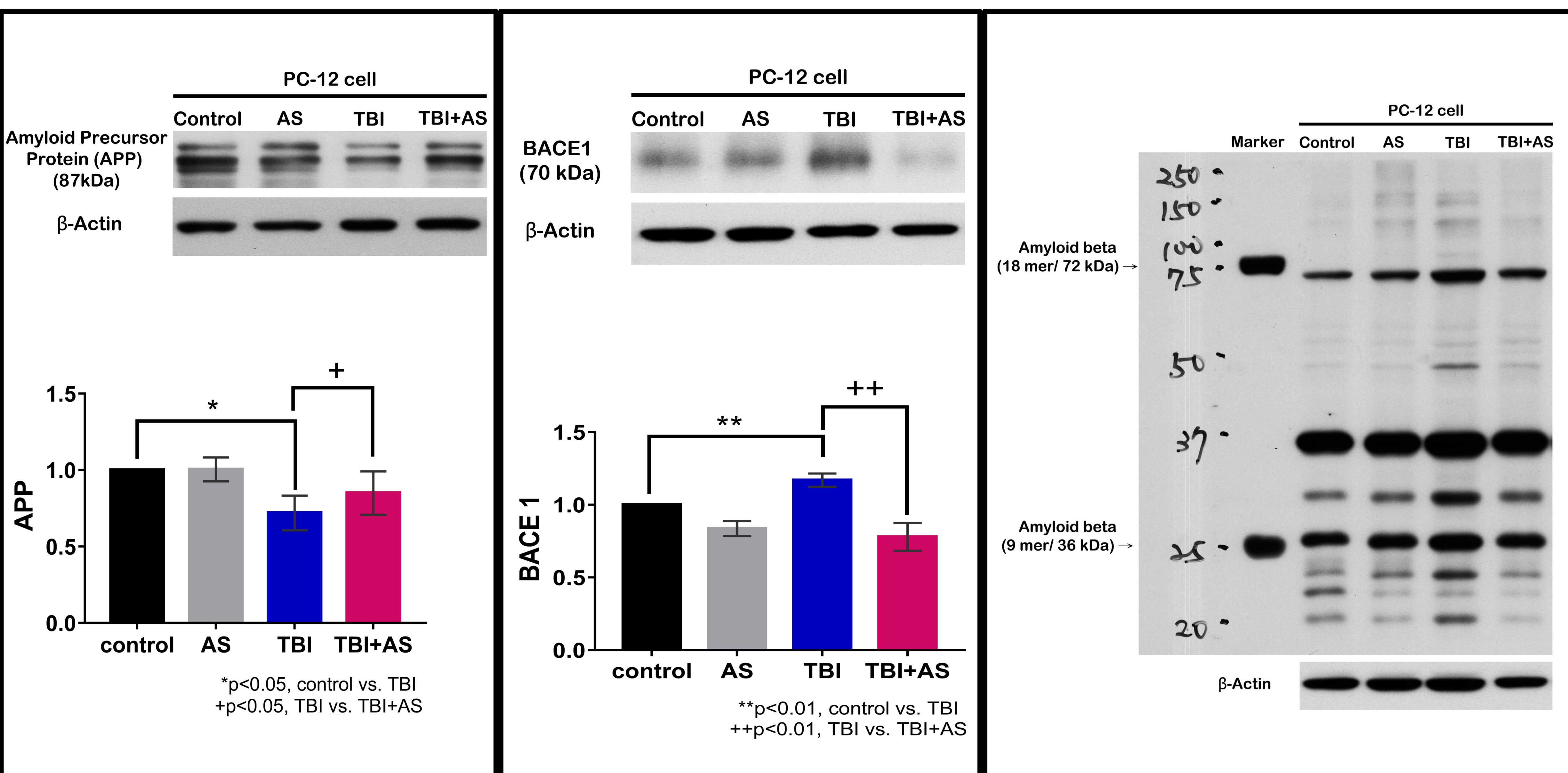
三、探討細辛對於神經元損傷引發促炎細胞激素與抗炎細胞激素表達之影響



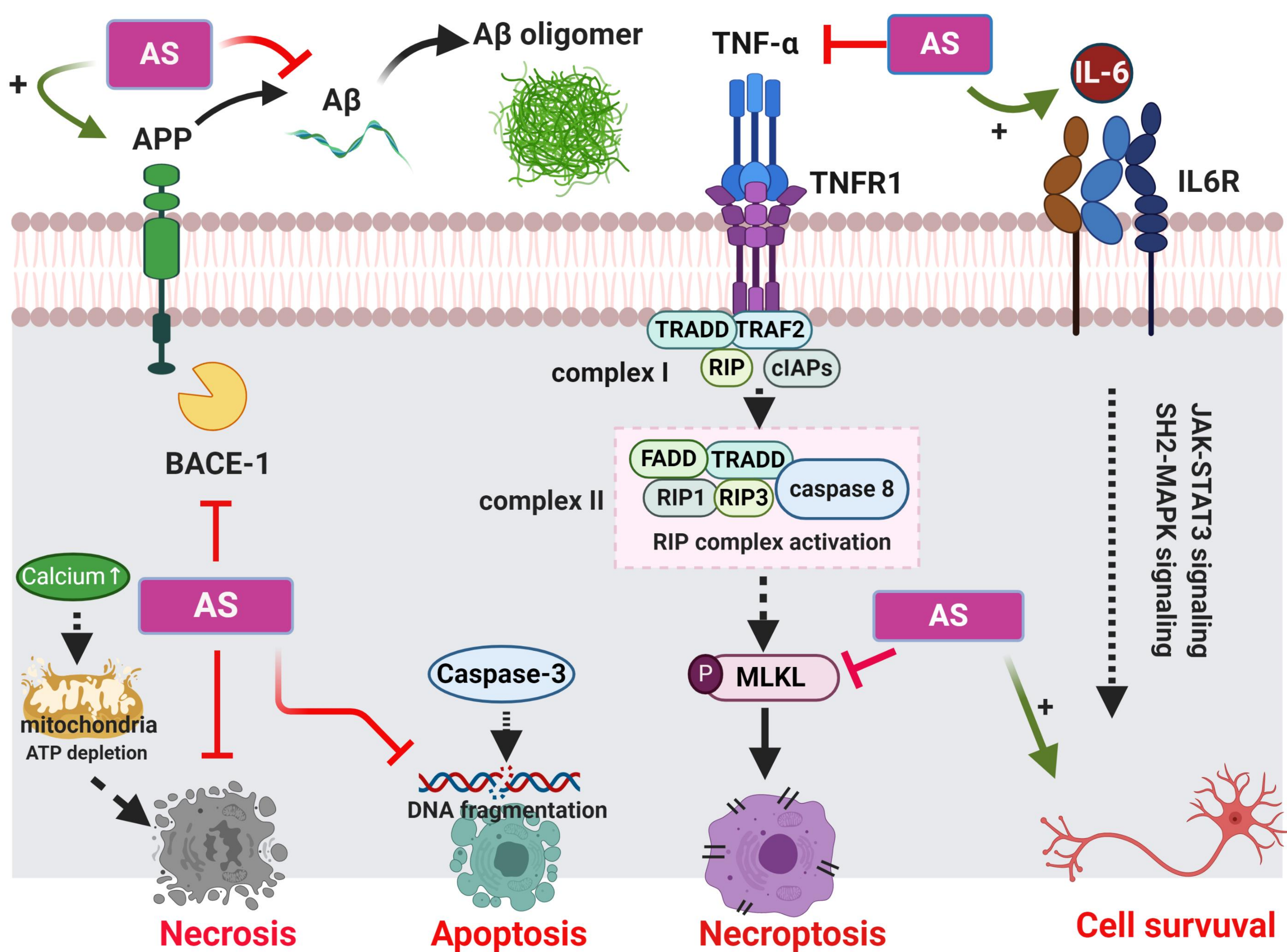
四、探討氣壓撞擊後神經元死亡型式及細辛是否可以有效降低神經元死亡



五、探討細辛對於神經元損傷引發阿茲海默症相關風險蛋白質表達之影響作用



陸、結論



柒、討論與展望

1. 高劑量的細辛為何會造成神經元毒性作用，以及未來面對不同疾病採取何種濃度細辛治療及其相關毒理學研究，仍有待證明。
2. 細辛水萃物中含有那些化學成分及其相關藥物動力學分析。
3. 細辛對於神經元損傷引發的類澱粉樣蛋白質的堆積具有顯著調降效果，其相關機制與透過抑制前驅蛋白質水解酶BACE1的表達相關，究竟是否同樣透過抑制TNF-α傳遞路徑仍須進一步探討。
4. 本研究是細辛用於神經保護作用的初步研究結果，還有相當多的機制有待闡明。在進入臨床實驗前，必須要完成基礎研究工作，尤其是應用於動物實驗模式的功效、毒性及藥理作用的評估。
5. 未來將可推廣至其他中藥，也可協同其他中藥材，應用君臣佐使觀念，用以提升細辛之效用。

捌、參考資料

1. Liu, Y., Liu, T., Lei, T., Zhang, D., Du, S., Girani, L., . . . Wang, Y. (2019). RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *Int J Mol Med*, 44(3), 771-786. doi:10.3892/ijmm.2019.4244