

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 動物與醫學科

第一名

052008

神經胜肽 Urocortin 對微膠細胞抗發炎、吞噬的
作用

學校名稱：慈濟學校財團法人慈濟大學附屬高級中學

作者： 高二 楊采霏	指導老師： 柯政宏
---------------	--------------

關鍵詞：腦溢血損傷、神經保護作用

得獎感言

致走過科展的我們

也許有人說努力不一定會成功，但我想試試看努力之後會是什麼結果。上台領獎的那刻，我慶幸自己沒有在研究和課業之間選擇放棄，更為那個在無數個徬徨無助的夜晚堅持下去的自己感到驕傲，覺得這些日子以來流下的汗水和淚水都是值得的。

科學探究的旅程中，在實驗室和學校之間來回奔波，躲在教室的角落和作品說明書、海報玩起「死亡追逐」，或者深夜時淚眼朦朧的看著「無顯著差異」的分析結果，都成了基本款的日常。說真的，這趟旅程並不是一路都風平浪靜且一帆風順，有時驚濤駭浪，有時被暴風圈狠掃而不知所措，雖然途中遭遇了許多挫折與考驗，也意識到自己的不足和渺小，也許就是這份對研究的興趣和無法抹滅的熱情才讓我堅持下去，最後終於雨過天晴，得到豐碩的果實。

一路上，因為有許多人的幫助，才能有這份成果。首先我想感謝花蓮慈院研究部廖學健教授指導我背景知識、數據解讀，更不厭其煩的一次又一次修改作品說明書及海報；感謝實驗室的姊姊們教我螢光染色、細胞繼代培養、抽RNA、RT-qPCR等實驗技巧，並細心的解釋每一個步驟和實驗背後的原理，即便我聽的一頭霧水仍舊耐心講解；感謝所有實驗室的夥伴在我遇到困難和瓶頸時即時伸出援手。同時感謝慈院研究部提供實驗室、設備及耗材，讓這份研究得以順利進行。

其次，我要感謝慈中教務處安排專題課程，讓我擁有參加科展、分享研究的機會。感謝校內的老師教我數據分析的方法及作品說明書的修改，也感謝所有曾經幫助過我老師及同學們，無論是在我需要時借我電動腳踏車前往實驗室，或是在我面對挫折時為我加油打氣，都使我在困難、無助間沒有選擇放棄。更感謝我的父母在背後給予我莫大的支持與挹注。

最後感謝主辦方與所有工作人員的辛勞與付出，也感謝評審教授的青睞與指教，使比賽能順利圓滿，同時使我受益良多。其中我想感謝幫我與作品及看板合照的工作人員，因為他們的熱心和貼心讓我即使獨自一人也能記錄下這個重要的時刻。

師公上人曾經說過：「有心就有福，有願就有力。」其實我並不覺得自己有

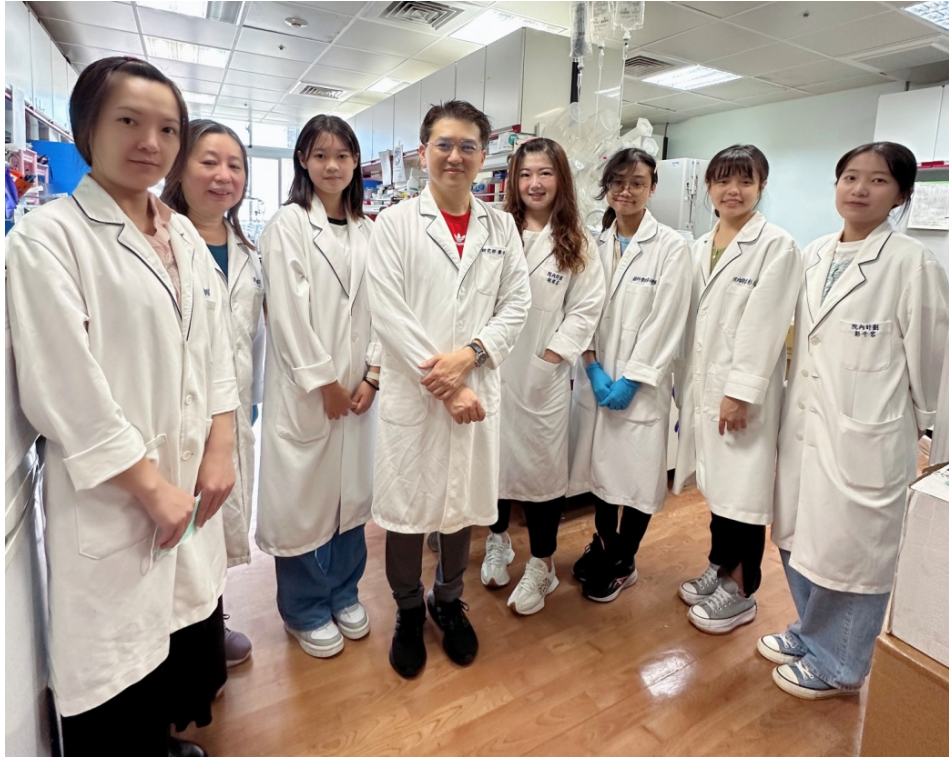
比別人還要厲害，只是幸運了一點。科學就像是探索未知的旅途，探索的不只是新的現象，或是絕症的解藥，更在旅途中追尋另外一個自己。回頭一看，只記得高一下學期剛進慈院研究部的我，就像是劉姥姥入大觀園一樣，什麼都不懂，什麼也都沒看過，卻透過科展擁有了這份特別而深刻的經歷，也看到了被絕境激發的自己，願未來能乘著這份熱情與衝勁走過每一個大大小小的考驗！



與獎盃、獎狀於典禮會場看板前合照。



與指導老師及導師於慈中校園合照。



與指導教授及姊姊們於花蓮慈院研究部實驗室合照。

摘要

本研究發現神經胜肽 Urocortin 能調控腦部的巨噬細胞——微膠細胞的發炎及吞噬作用，同時亦能降低發炎時產生的氧化壓力損傷。我們藉由紅血球與微膠細胞（BV-2 Cell Line）的離體實驗模擬腦溢血病患接受開顱手術後殘留於腦中的血塊與巨噬細胞在腦部的吞噬情形，並透過神經胜肽 Urocortin 的作用，促進其吞噬作用、調控發炎反應。首先以螢光標籤的方式確認微膠細胞的吞噬作用，再以測量其吞噬量值（Phagocytosis Index）、基因變化（RT-qPCR）分析，推論出當 Urocortin 濃度為 10^{-9} M，能有效的促進微膠細胞的吞噬作用、抗發炎功效。此研究結果有助於了解 Urocortin 加速清除腦血腫塊的作用，進而作為開發腦溢血新療法的參考依據。

壹、研究動機

腦是人體系統內的最高指揮官，它的重要性是不言而喻的，它控制著人體的各種功能，包括運動、感覺和意識等。儘管腦部只佔人體重量的 2%，但它所消耗的氧氣量卻佔全身耗氧量的 20%（洪蘭，2002a）。這說明了腦組織的能量需求非常高，需要大量的氧氣和養分來保持正常運作。因此，腦血管的作用是非常重要的，因為它們負責將血液、氧氣和養分運送到腦部的各個部位。

腦中風是一種嚴重的醫療事件，它通常是由腦血管的阻塞或破裂所導致。其中，大約 70% 的腦中風患者為缺血性腦中風，這是由於腦血管的阻塞造成的，導致腦部局部性的缺氧和功能喪失。這種類型的腦中風的致死率約為 10%。而另外 30% 的腦中風患者為出血性腦中風，也稱為腦溢血，是由於腦血管的破裂所導致，這會導致大量血液流入腦部，增加腦部壓力，進而引起腦部局部性的功能喪失。這種類型的腦中風的致死率高達 30% 以上（Qureshi et al., 2009）。因此，預防腦中風的風險因素以及提早發現症狀對於減少腦中風的發生和提高生存率是非常重要的。

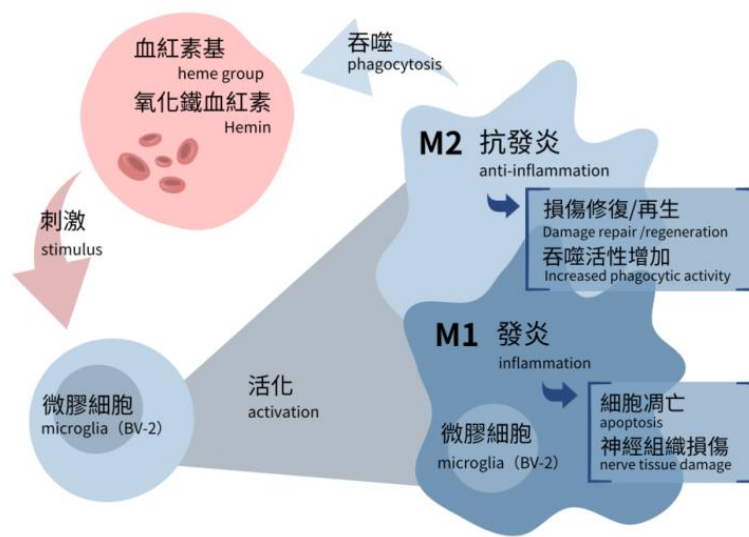
不同程度的腦出血患者需要不同的治療方法。對於輕度和中度的腦出血患者，其血塊體積通常小於 30 mL，且昏迷指數（glasgow coma scale, GCS）大於 8，這些患者通常可以接受內科療法，例如藥物治療來控制血壓和維持身體的正常功能。對於重度的腦出血患者，其血塊體積通常大於 30 mL，或 GCS 小於 8，或顱內壓升高，這些患者可能需要進一步接受外科手術治療，例如開顱減壓手術或清除血塊，以減少顱內壓和進一步損傷腦組織（Greenberg et al., 2022）。因此，治療方法的選擇取決於腦出血的嚴重程度和患者的身體狀況。

然而，開顱手術雖然可以減輕顱內壓、減少神經細胞的受壓程度，但開顱手術無法完全的清除血塊，殘留的血塊會釋放出有害的血液成分，如：血紅素基（heme group）、氯化鐵血紅素（hemin）等，進而對周圍神經細胞造成損傷。這些有毒性的血液成分會引發發炎反應、微膠細胞（microglia）的活化等危險機制，產生大量的自由基增加腦中的氧化壓力。而嚴重的神經發炎反應更導致腦水腫、和血腦屏障（blood-brain barrier, BBB）的破損，使更多的神經細胞死亡，

造成更嚴重的二次腦損傷傷害，此稱為繼發性腦損傷（secondary brain injury, SBI）（Madangarli et al., 2019）。因此，病人在接受手術治療後，醫生通常會密切監控病情，並進行相應的支持性治療，以幫助病人盡快康復。

微膠細胞是一種存在於腦和脊髓中的神經膠質細胞，也是中樞神經中的巨噬細胞。微膠細胞在中樞神經系統中扮演著重要的角色，除了免疫屏障外，還參與神經發育、神經修復等生理過程。當微膠細胞功能異常時，會導致神經元損傷和神經炎症反應，進而導致神經退化和神經疾病的發生。阿茲海默症和巴金森氏症等神經退行性疾病中，微膠細胞的異常激活和細胞激素的過度分泌，是疾病發展的一個重要因素（Ransohoff, 2010）。因此，了解微膠細胞的生理和病理過程，有助於研究和治療神經疾病。

在損傷的腦組織中，依據微膠細胞活化的功能分為經典活化（M1 Polarization, Classical Microglia Activation）和替代活化（M2 Polarization, Alternative Microglia Activation）兩種面向，如圖一。M1 是微膠細胞為了抵抗病原體而釋放促進發炎的物质，導致嚴重的發炎反應及神經細胞的死亡；而 M2 則分泌抗發炎及營養物质，促進吞噬作用及細胞、組織的修復，並支持神經細胞的存活（Benakis et al., 2014）。因此，要降低出血性腦中風的繼發性腦損傷，除了需要抑制 M1 的發炎反應，促進 M2 的抗發炎、吞噬的作用更為重要。



圖一、微膠細胞活化反應示意圖。

目前尚無特效藥物可以有效治療出血性腦中風。一些研究顯示，使用一些藥物可以減緩血塊的增加，減少腦損傷的程度，但仍需要進一步的研究和臨床實驗來確定這些藥物的有效性和安全性。因此，開發新一代的藥物治療出血性腦中風有其急迫性。

近年來，研究人員發現尿皮質素（Urocortin, UCN）對出血性腦中風具有潛在治療作用。UCN 是由 40 個氨基酸（amino acid, AA）所組成的神經勝肽。研究指出，UCN 可以減輕腦組織損傷，降低神經元死亡，減少腦出血面積，並且可以改善動物的神經功能缺陷。此外，UCN 還可以抑制腦內的發炎反應，減少氧化壓力和自由基的生成，並且可以促進神經細胞的再生和修復（Pan et al., 2008；Liew et al., 2012）。因此，UCN 可能成為治療出血性腦中風的一種新藥物。

因此，在本研究中，我們使用 BV-2 微膠細胞株，期望能探討 UCN 促進微膠細胞的吞噬作用，協助清除血塊，增加抗發炎反應作用，並降低發炎反應造成的傷害。

貳、研究目的

- 一、探討微膠細胞 BV-2 微膠細胞對紅血球的吞噬作用。
- 二、藉由吞噬指數測量，探討不同濃度的 UCN 對 BV-2 微膠細胞吞噬作用的影響。
- 三、藉由 RT-qPCR，探討 UCN 不同濃度的 UCN 對 BV-2 微膠細胞吞噬作用、M1 發炎反應、M2 抗發炎反應及粒線體能量運作的影響。

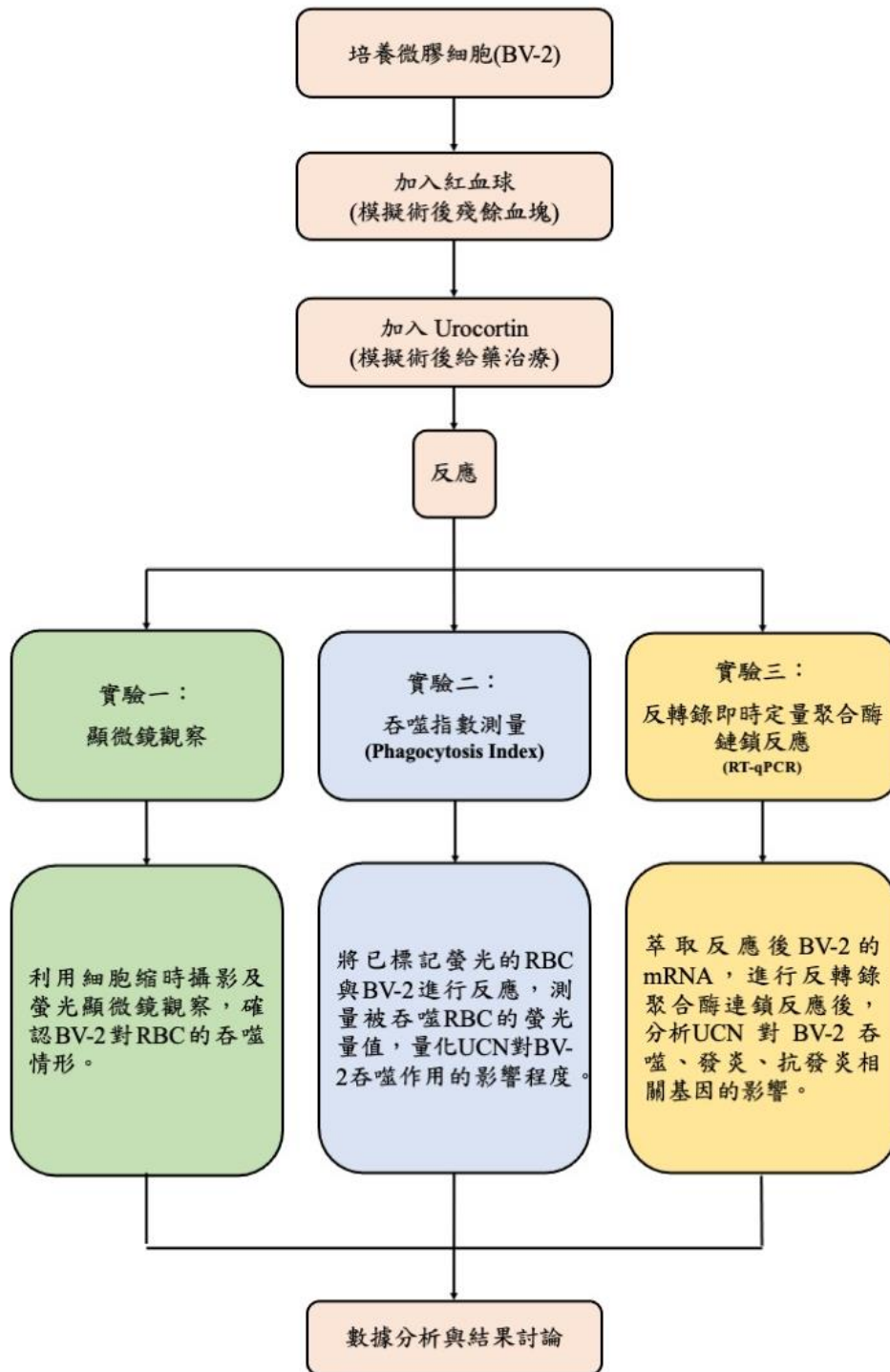
參、研究設備與器材

			
<p>離心機</p>	<p>血球計數儀</p>	<p>核糖核酸定量儀</p>	<p>多功能微量分析儀</p>
			
<p>螢光顯微鏡</p>	<p>倒置顯微鏡</p>	<p>細胞培養箱</p>	<p>無菌細胞操作台</p>
			
<p>Veriti 多槽溫控式聚合 酶連鎖反應器</p>	<p>QuantStudio 5 Real- Time PCR System 即時 螢光定量 PCR 系統</p>	<p>Zeiss Celldiscoverer 7 自動顯微鏡</p>	

圖二、研究設備與器材。

肆、研究過程與方法

一、實驗架構



圖三、研究架構圖。

二、實驗方法

(一) 細胞繼代培養 (Subculture of Cells)

本實驗以 BV-2 微膠細胞株 (BV-2 Cell Line) 進行研究。

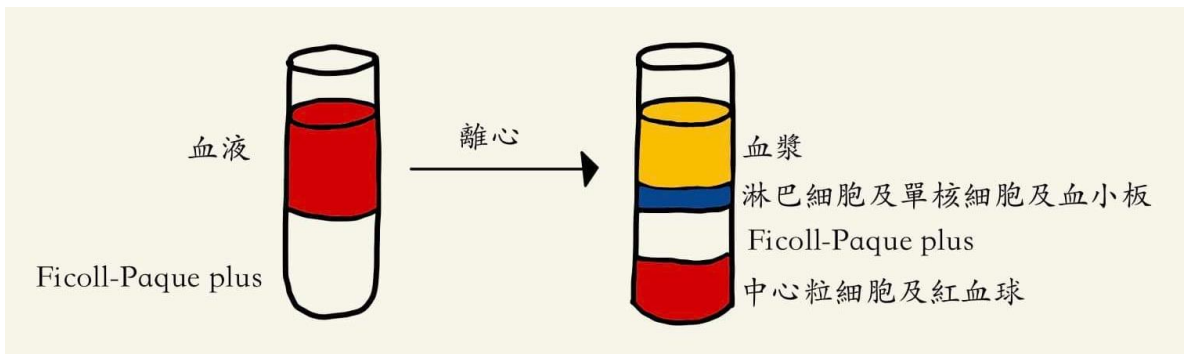
1. 將新的培養液至於 37°C 的水浴槽回溫。
2. 將細胞從含 5% 二氧化碳 (CO₂) 的 37 °C 培養箱 (incubator) 中拿出，並以顯微鏡確認其情形 (有無污染)。
3. 吸取培養盤中原來的培養液。
4. 加入 10 mL 磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 將殘餘的培養液移除。
5. 加入 5 mL 胰蛋白酶 (trypsin)，置放於含 5% CO₂ 的 37 °C 培養箱中反應 10 分鐘後取出。
6. 加入 20 mL 含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的培養液，並以移液器 (pipette) 將 BV-2 細胞混合均勻。
7. 將混合液共 25 mL 於常溫下、以 1200 rpm 離心 10 分鐘。
8. 移除上清液，加入 10 mL 含有 10% FBS 培養液，再以移液器將 BV-2 細胞混合均勻。
9. 再將混合液共 10 mL 於常溫下、以 1200 rpm 離心 10 分鐘。
10. 再次移除上清液，加入 10 mL 含有 10% FBS 培養液，以移液器將 BV-2 混合均勻。
11. 取少許混合液與染劑 Trypan Blue 以 1 : 1 的比例混合，放入血球細胞計數板 (Hemocytometer) 中計算活細胞數量。
12. 依所算得的細胞數量調配新的培養液 (取 3.6×10^6 個細胞)。
13. 取 20 mL 調配好的培養液放入新的培養盤，最後放入含 5% CO₂ 的 37 °C 培養箱中。



圖四、細胞繼代培養過程。

(二) RBC (Red blood cells) 純化

1. 從大鼠（來自實驗動物中心）尾靜脈抽取全血，取 0.2 mL 大鼠全血。
2. 加入 0.2 mL PBS、0.4 mL 胞器分離液（Ficoll-Paque），比例為血液：PBS：Ficoll = 1：1：2。
3. 將混合液於常溫下、以 RCF 300 g 離心 20 分鐘。
4. 取 0.2 mL 離心管中最下層的血液，重複步驟 2、步驟 3 一次。
5. 取 0.2 mL 離心管中最下層的血液（RBC），完成。

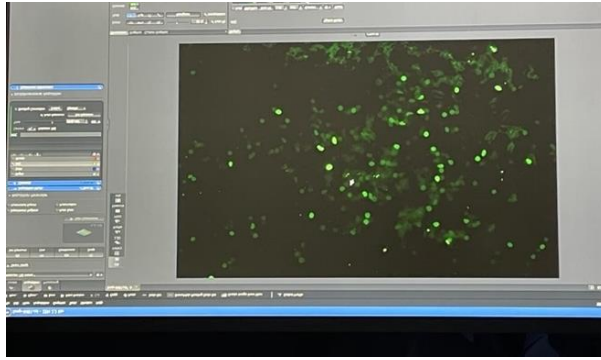


圖五、血液分離示意圖。

(三) 實驗一：螢光顯微鏡觀察

1. 螢光標記 RBC：

- (1) 將以純化的 RBC 與 1 mL PBS 混合均勻。
- (2) 放入細胞計數儀（CBC）後得出血球數據，並依數據取出 1×10^8 個 RBC。
- (3) 再加入 1 mL PBS，於常溫下、以 3000 rpm 離心 2 分鐘。
- (4) （避光）加入 5 μ L 濃度為 10 μ M 的 CFDA（Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFDA）。
- (5) 置於含 5 % CO₂ 的 37 °C Incubator 中反應 15 分鐘後取出。
- (6) 將混合液於常溫下、以 3000 rpm 離心 2 分鐘，移除上清液。
- (7) 加入 1 mL PBS 回溶，重複步驟(6)一次，完成。



圖六、綠色光點已標記上 CFDA 的 RBC（綠色光點）。

(四) 實驗二：吞噬量值檢測 (Phagocytosis Index)

1. 將新的培養液至於 37°C 的水浴槽回溫。
2. 拿出分裝好在 24 well 培養盤的 BV-2 細胞，並以顯微鏡確認其情形。
3. (以下步驟皆須避光) 移除原先的培養液，並加入 500 μL / well 的 PBS 清洗兩次。
4. 將不同濃度的 UCN、已標記上螢光的 RBC 及含有 10 % FBS 的培養液調配好後，將此混合液加入培養盤中 500 μL / well。
5. 置於含 5 % CO₂ 的 37 °C Incubator 中反應 6 h 後取出。
6. 移除原先的培養液，加入 500 μL / well PBS 清除殘餘培養液與未被吞噬的 RBC。
7. 以顯微鏡確認是否殘餘未被吞噬的 RBC，若有殘留再以 PBS 清洗一次，無則下一步。
8. 加入 250 μL / well 的 H₂O 將細胞脹破，使 RBC 中的 CFDA 螢光染劑溶於水中。
9. 將液體從培養皿移到微量 96 well 盤 20 μL / well，於新型微量盤分析儀檢測螢光數值。

(五) 實驗三：反轉錄定量聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR)

1. 加入 UCN 與 RBC 反應

- (1) 將新的培養液至於 37°C 的水浴槽回溫。
- (2) 拿出分裝好在 6 well 培養盤的 BV-2 細胞，並以顯微鏡確認其情形。
- (3) 移除原先的培養液，並加入 2 mL 的 PBS 清洗兩次。
- (4) 將不同濃度的 UCN、RBC (數量, BV-2 : RBC = 1 : 10) 及含有 10 % FBS 的培養液調配好後，將此混合液加入培養盤中 500 μL / well。
- (5) 放入含 5 % CO₂ 的 37 °C 培養箱中反應 3 h / 24 h。

2. RNA 純化（使用 RNeasy kit）：

- (1) 拿出反應後的 6 well 培養盤，並以顯微鏡確認細胞情形。
- (2) 移除培養盤中的培養液，並加入 2 mL / well 的 PBS 清洗兩次。
- (3) 加入 350 μ L / well Buffer RLT，破壞細胞組織。
- (4) 將細胞移至 1.5 mL 離心管中。
- (5) 加入 35 μ L / well β -ME，降低 Rnase 活性，保留完整 RNA。
- (5) 使用 21-23 G 口徑的針頭（21-23 G gauge needle），將 DNA（deoxyribonucleic acid）均質化（Homogenize）。
- (7) 加入 700 μ L 的 70 %酒精（Alcohol）並將其混合均勻後，抽出 700 μ L，放入 RNeasy mini column 與 2 mL 離心管中，於常溫下、12000 rpm 離心 30 秒。
- (8) 清除廢液後，加入 700 μ L 的 Buffer RW1，於常溫下、以 12000 rpm 離心 30 秒。
- (9) 清除廢液後，加入 500 μ L 的 Buffer RPE，於常溫下、以 12000 rpm 離心 30 秒。
- (10) 清除廢液後，加入 500 μ L 的 Buffer RPE，於常溫下、以 12000 rpm 離心 2 min。
- (11) 清除廢液後，換一個新的 2 mL 離心管後，於常溫下、以 12000 rpm 離心 1 min。
- (12) 換一個新的 1.5 mL 離心管，並詳細標註上日期、組別。
- (13) 加入 RNase free water 50 μ L，以常溫下、12000rpm 離心 1 分鐘，放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存，即完成。

3. RNA 檢測：

- (1) 將核糖核酸定量儀（Thermo NanoDrop OneC Spectrophotometer）開機。
- (2) 加入 2 μ L RNase free-water 進行清潔及校正，以確保數據的準確性。
- (3) 使用試鏡紙將表面擦拭乾淨後，取 RNA 樣本 2 μ L 檢測。
- (4) 重複步驟(3)至所有樣本檢測完畢。
- (5) 在檢測結束後再以水進行清潔及校正後，關機。

4. RT（mRNA 轉 cDNA）：

- (1) 利用所測得的濃度取 1000 ng 的 RNA，加入 ddH₂O 後得各樣本的總體積為 8 μ L。

- (2)加入 2 μL 的 5*gDNA Eraser，將殘留的 gDNA 清除，再以試管震盪器（vortex mixer）混和後，使用迷你離心機把管壁上殘留的液體轉下。
- (3)使用即時聚合酶鏈鎖反應儀（PCR machine）42 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分鐘後冷卻至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。
- (4)調配 Buffer（RM），比例為 10 x Fast RT Buffer：RT Enzyme Mix：RT Primer Mix：ddH₂O = 2：1：2：5（*樣本數）。
- (5)利用即時聚合酶鏈鎖反應儀（PCR machine），並將其設定為 42 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分鐘，95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分鐘冷卻至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。
- (6)取出後加入 180 μL H₂O 稀釋後，將樣本移至新的 1.5 mL 離心管，並詳細標註上日期、組別，放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，即完成。

5.qPCR（quantitative PCR）：

- (1)計算引子調配的量（RM），比例為 2x Master Mix：前置引子（forward primer）：反置引子（reverse primer）：ddH₂O = 10 μL ：0.2 μL ：0.2 μL ：7.6 μL （*樣本數）。
- (2)將 2 μL cDNA 依序加入 96 well 盤中。
- (3)加入調配好的 RM 18 μL / well。
- (4)進行封膜後放入迷你離心機（mini plate spinner）將管壁上殘餘的液體轉下。
- (5)在使用多槽溫控式聚合酶連鎖反應器（Quant Studio™5 System）SYBR Green Reagents、快速模式進行檢測。

（六）數據分析

1.RT-PCR：

CT 值是 PCR 將基因放大的倍數。假設 CT 值為 N，則該基因被放大的倍數為 2 的 N 次方。

公式：

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$RQ = 2^{-\Delta Ct / \text{對照組 (BV-2, untreat, 3 h)} 2^{-\Delta Ct} \text{的平均值}}$$

$$RQ = 2^{-[Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{內參基因})]} / 2^{-\Delta Ct \text{ 的平均值 (對照組 (BV-2, untreat, 3 h))}}$$

(目的基因：HO-1、CD36、CD206、IL-6、IL-1 β 、TNF α 、CD86、Arg 1、Nrf2，內參基因：GAPDH)

以上述公式計算 RQ 後，再得出每個組別的平均及平均值標準誤差 (SEM)，並以變異數分析 (ANOVA) 得出 p 值，再以 LSD 事後比較分析組別間的差異性後，做出圖表呈現實驗結果。

2. Phagocytosis Index :

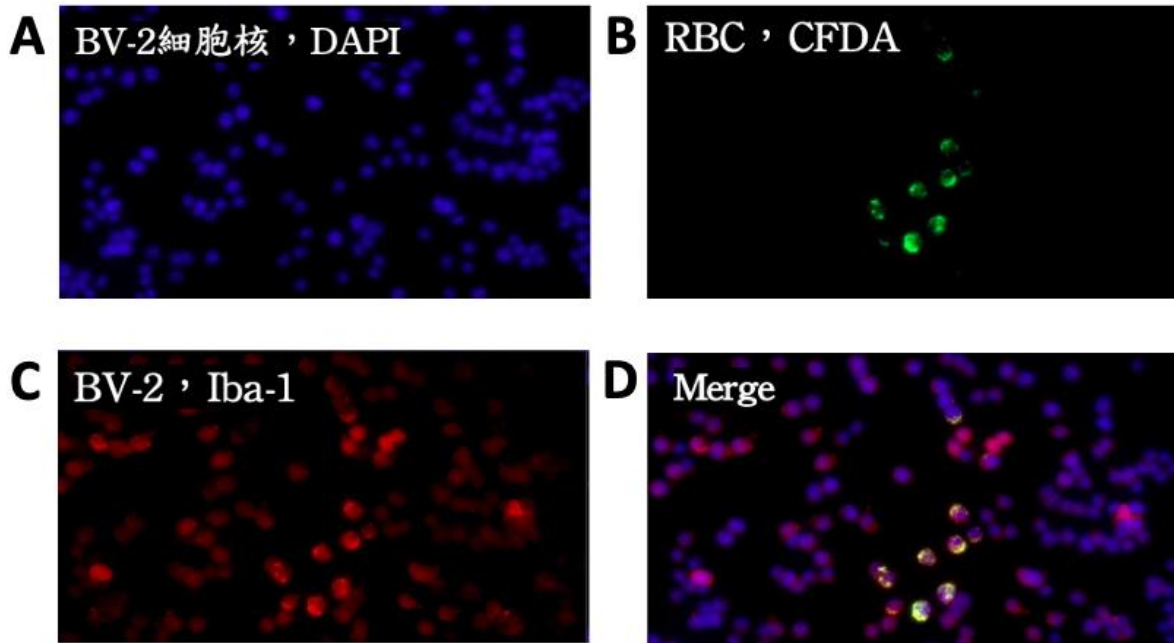
將測量後得出的螢光量值數據整理後，以實驗組數據減去對照組 (BV-2, untreat, 6 h) 的平均值並得出僅加入 RBC 組別 (BV-2, +RBC, 6 h) 的平均值。為了分析不同濃度的 UCN 對 BV-2 吞噬 RBC 的影響，我們將僅加入 RBC 的組別視為 1，並把其他加入 UCN 的組別減去對照組所得的數據除僅加入 RBC 組別的平均值，得出其他加入 UCN 組別相對於僅加入 RBC 組別的平均值與平均值標準誤差 (SEM) 並以變異數分析 (ANOVA) 得出 p 值，再以 LSD 事後比較分析組別間的差異性後，做出圖表呈現實驗結果。

伍、研究結果

一、探討 BV-2 對 RBC 的吞噬作用

(一) 以螢光影像確認 BV-2 是否對 RBC 有吞噬作用

本實驗的主軸為 UCN 對 BV-2 抗發炎吞噬作用的影響，因此先分別以螢光標記 BV-2 (使用 Iba-1 抗體標記)、BV-2 的細胞核 (使用 DAPI 標記) 與 RBC (使用 CFDA 標記) 後，使其反應 6 h 後，藉由螢光顯微鏡觀察其是否對紅血球進行吞噬。如圖七。



圖七、BV-2 吞噬作用在螢光顯微鏡下示意圖。

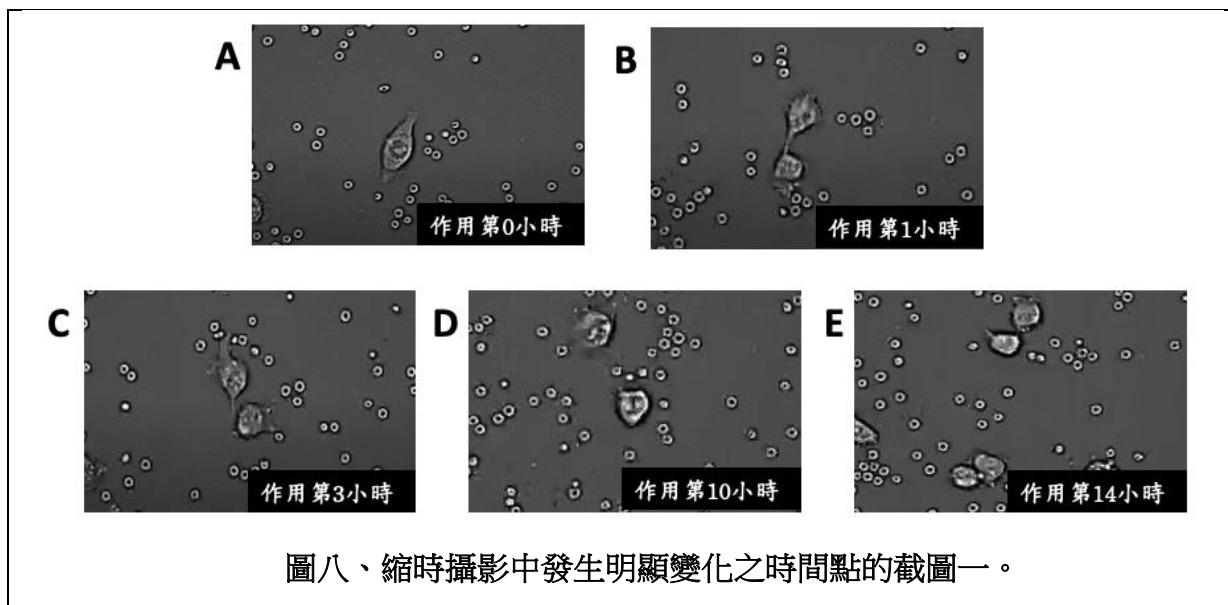
圖七 (A) 為以 DAPI 標籤 BV-2 細胞核的影像 (藍色螢光)；(B) 為以 CFDA 標籤 RBC 的影像 (綠色螢光)；(C) 為以 Iba-1 標籤 BV-2 的影像 (紅色螢光)。(D) 為將 (A)、(B)、(C) 合併，可以在中間偏下的區域發現 RBC 與 BV-2 有明顯的重疊 (藍色、紅色、綠色部分)，且可明顯觀察出 RBC (綠色光點) 是為 BV-2 (藍色、紅色光點) 所吞噬，由此可知，BV-2 會對 RBC 進行吞噬作用。

註：DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)：一種能與 DNA 結合的螢光染料，由於可以透過完整的細胞膜，因此常被用於活細胞以及固定細胞的染色。CFDA：是一種被動擴散至細胞的螢光染劑，能到細胞內部標記蛋白質。Iba1：一種鈣結合蛋白，由於能專門在為膠細胞中表現，因此使用 Iba1 標記 BV-2 方便觀察。

(二) 在顯微鏡下縮時觀察 BV-2 對 RBC 吞噬的過程

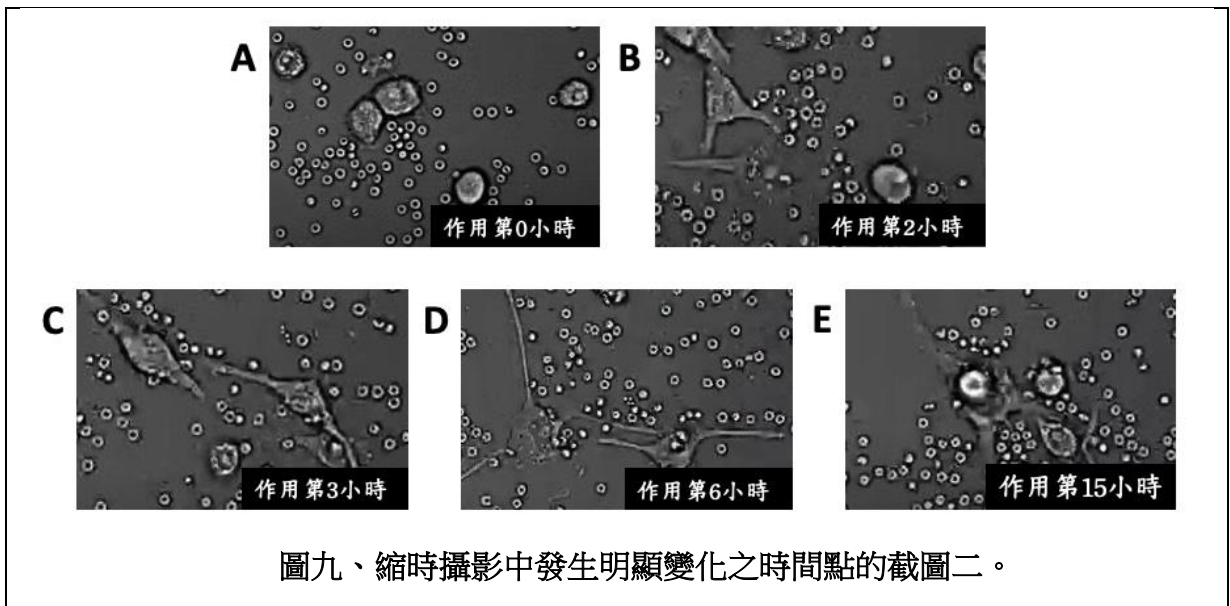
確認 BV-2 會對 RBC 發生吞噬作用後，接下來的實驗藉由活細胞自動成像系統 (celldiscoverer 7)，透過維持二氧化碳氣體濃度跟溫度來長時間觀察細胞變化，在固定的時間點 (每 15 分鐘一次) 拍出當下 BV-2 與 RBC 的位置，藉由大量的影像組成縮時

的影片，觀察 BV-2 移動的軌跡、細胞分裂 (cell division) 的過程及對 RBC 的吞噬作用 (phagocytosis)。但由於格式限制，我們將有發生明顯變化之時間點截圖並以照片表示，如圖八、九。



圖八、縮時攝影中發生明顯變化之時間點的截圖一。

由圖八中可看到中間有較大且不規則狀的細胞為 BV-2，其餘較小且呈雙凹圓盤狀的圓形細胞為 RBC。另外，在圖五中，可以依時間推進注意到 BV-2 的細胞分裂，反應為第 0 小時的圖 (A) 只有一個 BV-2，有些微活化的狀態 (細胞從圓形變化為不規則的形狀)；到反應第 1 小時，圖 (A) 中單一個的 BV-2 已在圖 (B) 中分化成兩個，可看出在第 0 到 1 小時有分裂增生的情況；圖 (D) 在第 10 小時的照片中，可見細胞開始分散移動的現象；圖 (E) 作用第 14 小時，圖中可見中間上方及中間下方，有各兩個 BV-2 已有絲分裂完成的影像。由此可證，BV-2 在進行吞噬時，同時進行細胞增生。



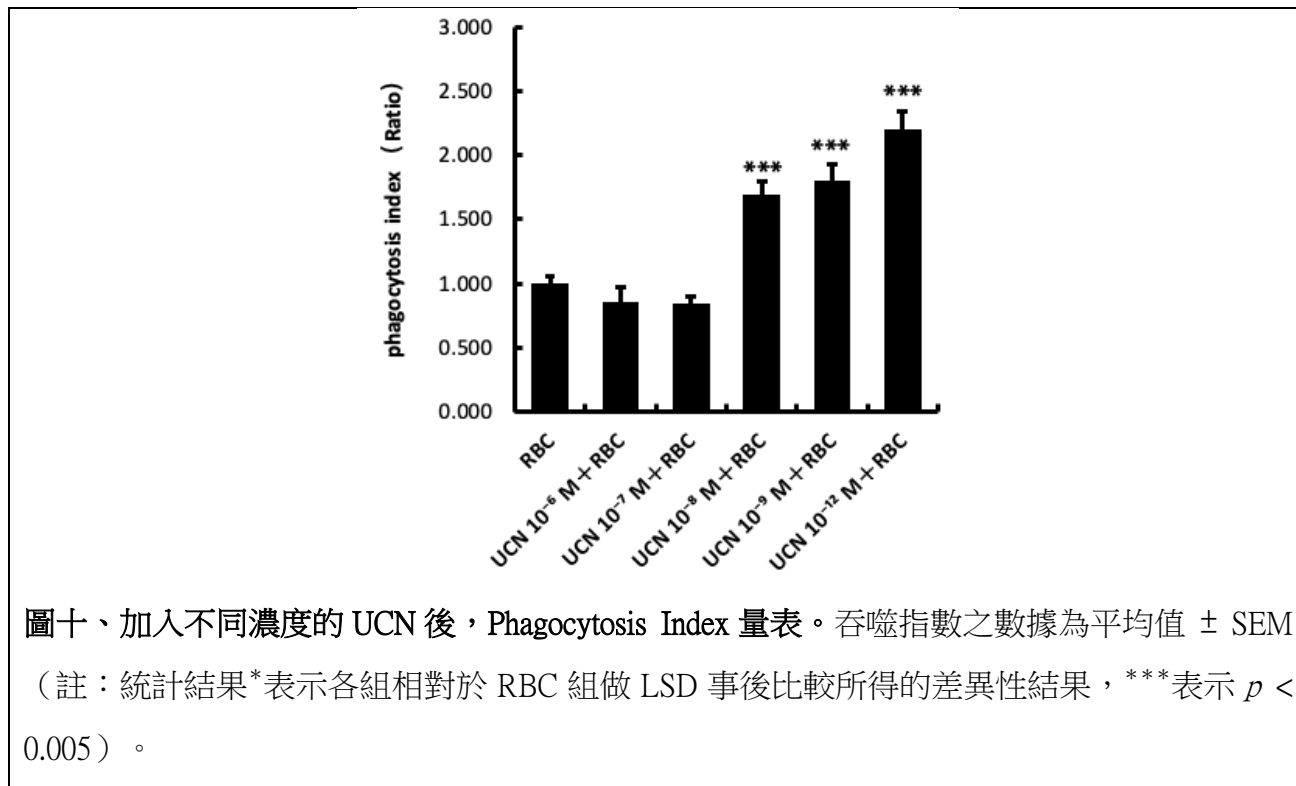
由圖九的圖（A）到圖（E）中可以觀察出 BV-2 隨著時間推進細胞進行活化的情形。圖（A）為尚未活化的 BV-2；圖（B）為反應第二小時，BV-2 開始活化的影像；自反應第三小時開始，圖（C）至圖（E）BV-2 的因變形而產生有如觸手般突出的構造開始爬行靠近並接觸 RBC，再將其吞噬。由此可知，BV-2 約在反應第 2-3 小時開始活化、變形，進行吞噬作用。

二、藉由吞噬指數量測，探討不同濃度的 UCN 對 BV-2 吞噬作用的影響

為了探討 UCN 效果最佳的濃度，除了確認 BV-2 對 RBC 吞噬的過程後，我們以吞噬指數（Phagocytosis Index）探究 UCN 對 BV-2 吞噬作用的影響。

本實驗透過將 BV-2 與以標籤上螢光的紅血球並加入不同濃度的 UCN 反應 6 h，後觀察 UCN 是否會影響 BV-2 攝入紅血球數量，計算實驗組與對照組螢光量值的變化。以加入各濃度的 UCN 所測得的螢光量值、沒有加入 UCN 所測得的螢光量值，相除所得的相對值，並分析其發生的變化。

本次實驗的反應時間為 6 h，各組重複 12 次。本次實驗的組別，對照組：BV-2+RBC。實驗組：BV-2+UCN 10^{-6} M+RBC、BV-2+UCN 10^{-7} M+RBC、BV-2+UCN 10^{-8} M+RBC、BV-2+UCN 10^{-9} M+RBC、BV-2+UCN 10^{-12} M+RBC。



由圖十可見，UCN 濃度為 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-12} M 的螢光量值相對於沒有加入 UCN 的組別 (+RBC) 皆有顯著上升 (***) $p < 0.005$ ，以 LSD 事後比較所得的 p 值而言， 10^{-9} M 的上升最為顯著。UCN 濃度為 10^{-7} M 相較於沒有加入 UCN 的組別 (+RBC) 有顯著的下降 (* $p < 0.05$)，UCN 濃度為 10^{-6} M 則沒有顯著的差異。

三、藉由 RT-qPCR，探討 UCN 不同濃度的 UCN 對 BV-2 微膠細胞吞噬作用、M1 發炎反應、M2 抗發炎反應及粒線體能量運作的影響。

實驗結果觀察到在第六個小時 UCN 能增加微膠細胞吞噬紅血球的能力，說明 UCN 對微膠細胞的作用已經在第六個小時體現出來了，而這個作用可能涉及到基因的表達和活化。基因活化時間大約需要幾分鐘到數小時不等的時間來進行基因表達和調節，而且

基因活化的時間也會因不同基因和不同刺激的類型而有所不同。本實驗以對各種與 BV-2 吞噬作用、M1 發炎反應、M2 抗發炎反應及粒線體能量運作相關的基因加入 UCN、RBC 反應後，進行 RT-qPCR，得出數據，將對照組 CT 值的平均數值視為 1，再得出實驗組對於對照組的相對 CT 值（RQ 值），並分析其發生的變化。表一為本次實驗中檢測的 BV-2 中相關基因的引子與其所對應的功能。

本次實驗的反應時間為 3 h、24 h，各組重複 3 次。本次實驗組別，對照組：BV-2 Untreat 3 h、BV-2 Untreat 24 h；實驗組：BV-2+RBC、BV-2+UCN 10^{-9} M+RBC、BV-2+UCN 10^{-12} M+RBC、BV-2+UCN 10^{-9} M、BV-2+UCN 10^{-12} M（分別反應 3 h、24 h）。

表一、BV-2 抗發炎吞噬作用相關的基因序列與功能。

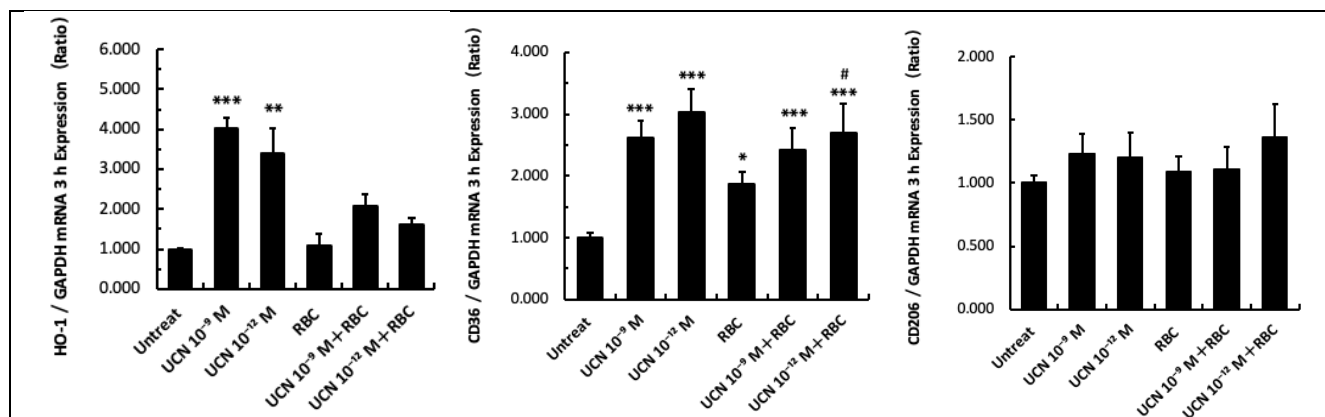
功能	名稱	前置引子 (Forward Primer)	反置引子 (Reverse Primer)
吞噬作用	HO-1	AGAGTTTCCGCCTCCAACCA	CGGGACTGGGCTAGTTCAGG
	CD36	CCAGAACCCAGACAACCACT	CACAGGCTTTCCTTCTTTGC
	CD206	GGGACTCTGGATTGGACTCA	GCTCTTCCAGGCTCTGATG
M1 發炎反應	TNF α	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTC	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
	IL-6	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
	IL-1 β	GCTGAAAGCTCTCCACCTCA	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
M2 抗發炎反應	Arg 1	GACCTGGCCTTTGTTGATGT	CCATTCTTCTGGACCTCTGC
	CD86	GCACGTCTAAGCAAGGTCAC	CATATGCCACACACCATCCG
粒線體運作	NRF2	GGGAGGTGGATGTAATGTGG	TGGGCCTGGA ACTACA ACTC

(一) 探討 UCN 對 BV-2 微膠細胞吞噬作用相關基因的影響 (HO-1、CD36、CD206)。

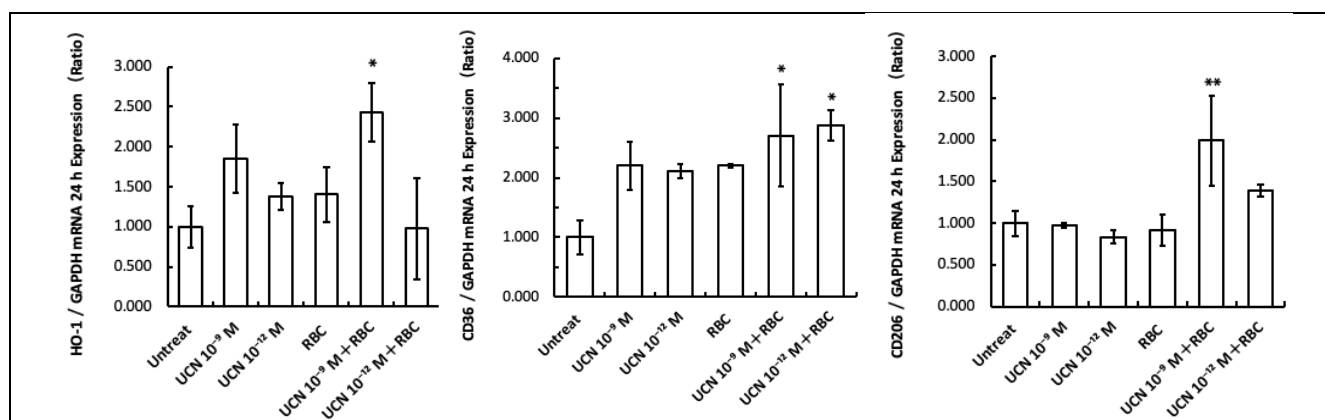
HO-1 (heme oxygenase-1)，血紅素加氧酶；CD36 (cluster of differentiation 36)，脂肪酸轉位酶；CD206 (cluster of differentiation 206)。

圖十一中，反應時間為 3 h 且 UCN 濃度為 10^{-9} M 時，HO-1、CD36 的表現量皆有顯著提升，而 UCN 濃度為 10^{-12} M 時，CD36 在有加入 RBC 的組別中也有顯著提升，

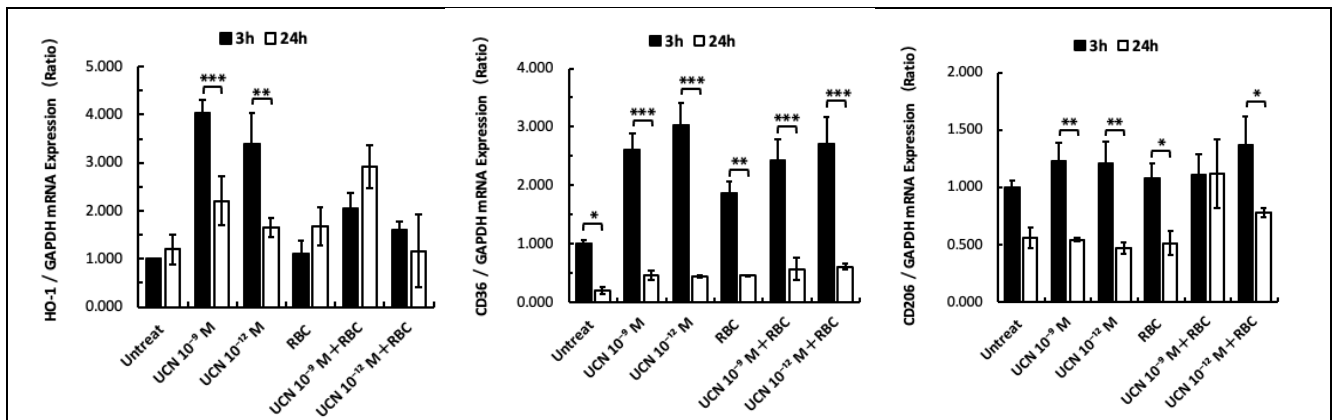
CD206 則沒有明顯變化。圖十二中，反應時間為 24 h 且 UCN 濃度為 10^{-9} M 時，三個基因的表現量也有顯著提升。圖十三中，三個基因中多組表現量顯示，反應時間 3 h 表現量明顯高於反應時間 24 h。有此可知，UCN 反應時間為 3 h 且濃度為 10^{-9} M 時能提高 BV-2 微膠細胞中吞噬作用相關基因的表現量。



圖十一、HO-1、CD36、CD206 反應 3 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。(統計結果*表示各組相對於 Untreat 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.005$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ ；#表示有加入 RBC 的各組相對 RBC 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，###表示 $p < 0.005$ ，##表示 $p < 0.01$ ，#表示 $p < 0.05$ 。)



圖十二、HO-1、CD36、CD206 反應 24 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。(統計結果*表示各組相對於 Untreat 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.005$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ 。)

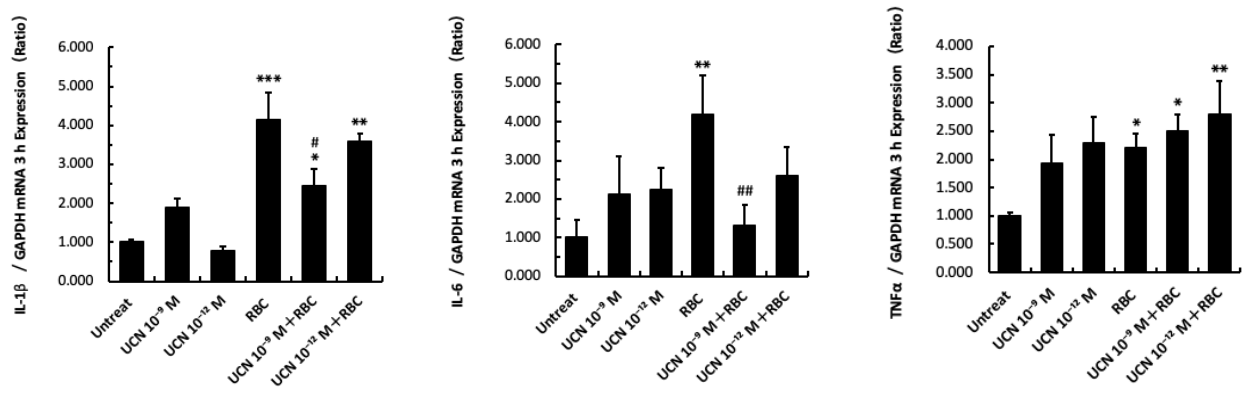


圖十三、HO-1、CD36、CD206 反應 3 h/24 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。(統計結果*表示反應時間 24 h 相對於反應時間 3 h 做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.005$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ 。)

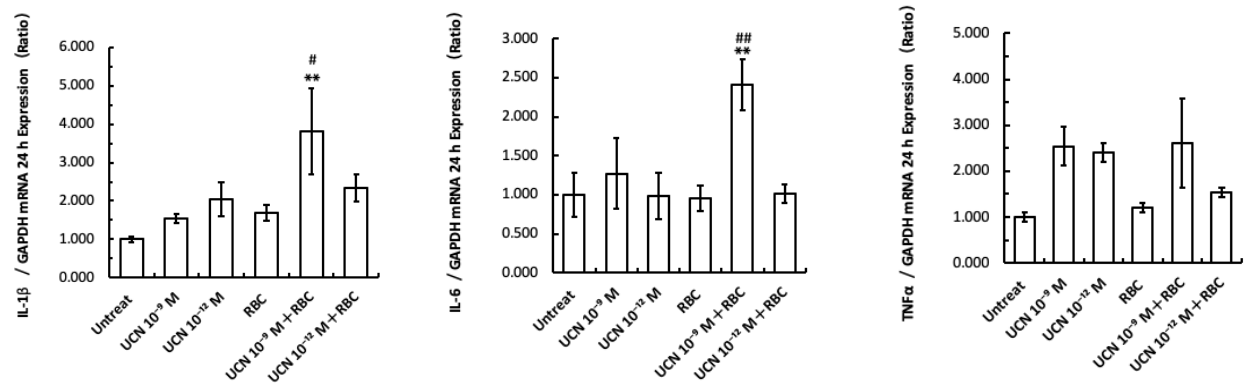
(二) 探討 UCN 對 BV-2 微膠細胞 M1 發炎反應相關基因的影響 (IL-1 β 、IL-6、TNF α)。

IL-1 β (interleukin-1 β)，白血球介素-1 β ；IL-6 (interleukin-6)，白血球介素-6；TNF α (Tumor Necrosis Factor- α)，腫瘤壞死因子 α 。

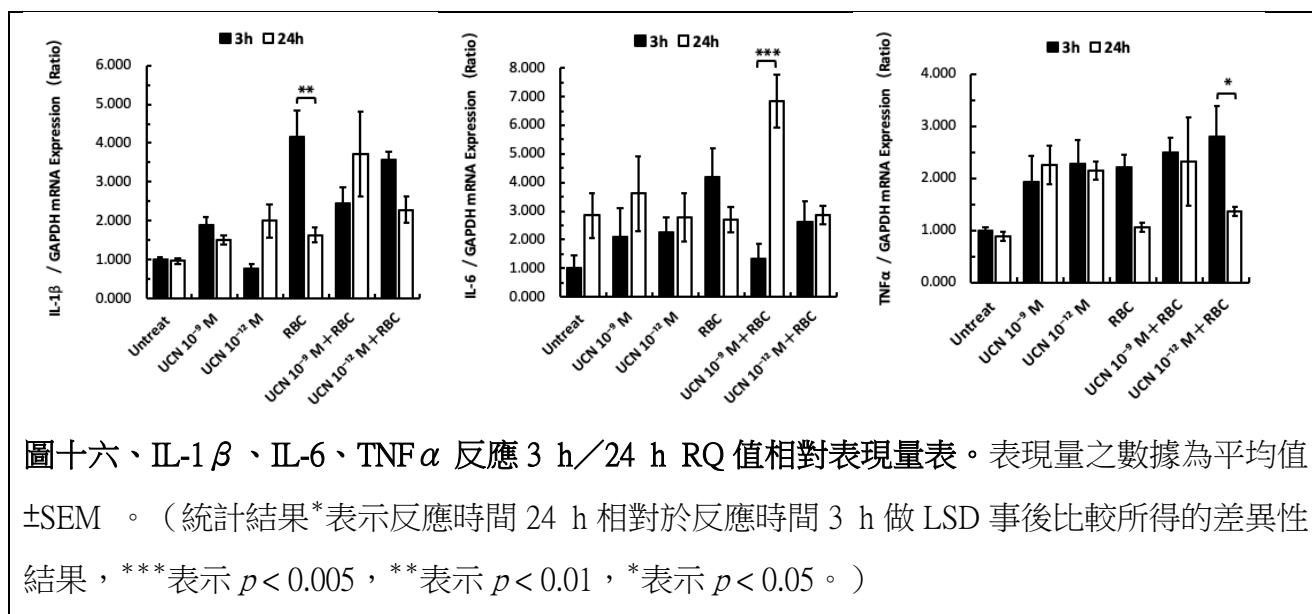
圖十四中，反應時間為 3 h 時，加入 RBC 使 IL-1 β 、IL-6、TNF α 的表現量顯著增加，而加入 UCN 濃度為 10^{-9} M 後，IL-1 β 、IL-6 的表現量則相較於沒有加入 UCN 的組別顯著的下降。圖十五中，反應時間為 24 h 且 UCN 濃度為 10^{-9} M 時，IL-1 β 、IL-6 的表現量則相較於沒有加入 UCN 的組別顯著上升。由此可知，反應時間為 3 h 且 UCN 濃度為 10^{-9} M 時能降低 BV-2 微膠細胞 M1 發炎反應相關基因的表現量，反應至 24 h 時則隨之增加。



圖十四、IL-1 β 、IL-6、TNF α 反應 3 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。 (統計結果*表示各組相對於 Untreat 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.005$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ ；#表示有加入 RBC 的各組相對 RBC 組做 T 檢定所得的差異性結果，###表示 $p < 0.005$ ，##表示 $p < 0.01$ ，#表示 $p < 0.05$ 。)



圖十五、IL-1 β 、IL-6、TNF α 反應 24 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。 (統計結果*表示各組相對於 Untreat 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.005$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ ；#表示有加入 RBC 的各組相對 RBC 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，###表示 $p < 0.005$ ，##表示 $p < 0.01$ ，#表示 $p < 0.05$ 。)

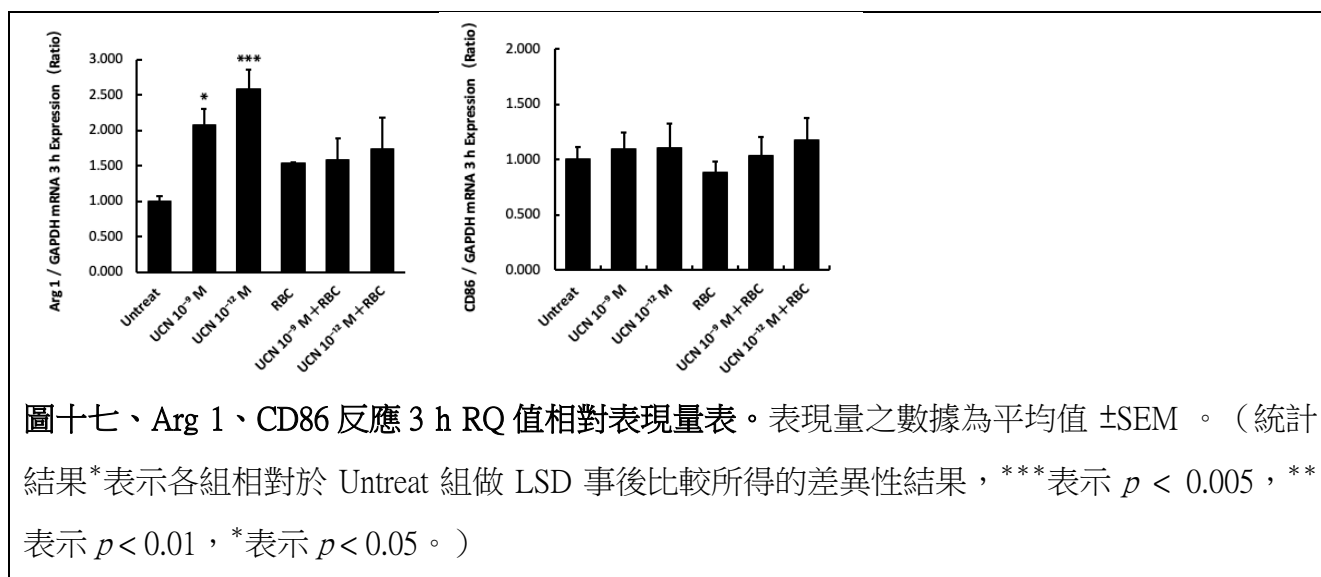


圖十六、IL-1 β 、IL-6、TNF α 反應 3 h/24 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。 (統計結果*表示反應時間 24 h 相對於反應時間 3 h 做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.005$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ 。)

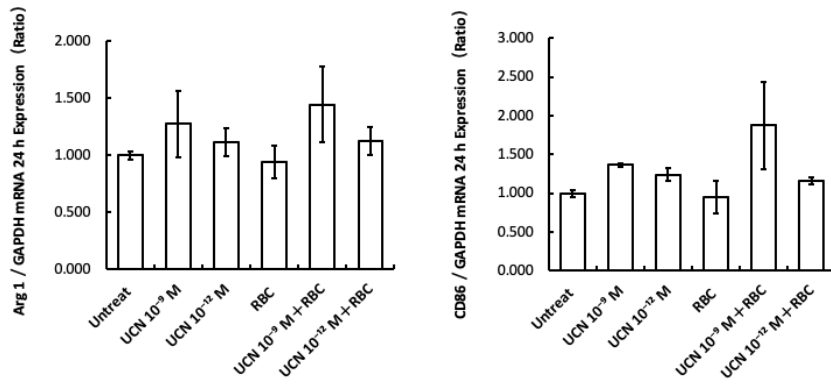
(三) 探討 UCN 對 BV-2 微膠細胞 M2 抗發炎反應相關基因的影響 (Arg 1、CD86)。

Arg 1 (Arginase 1)：精氨酸酶 1；CD86 (Cluster of Differentiation 86)：分化簇 86，也稱為 B 淋巴細胞活化抗原 B7-2 (B-lymphocyte activation antigen)。

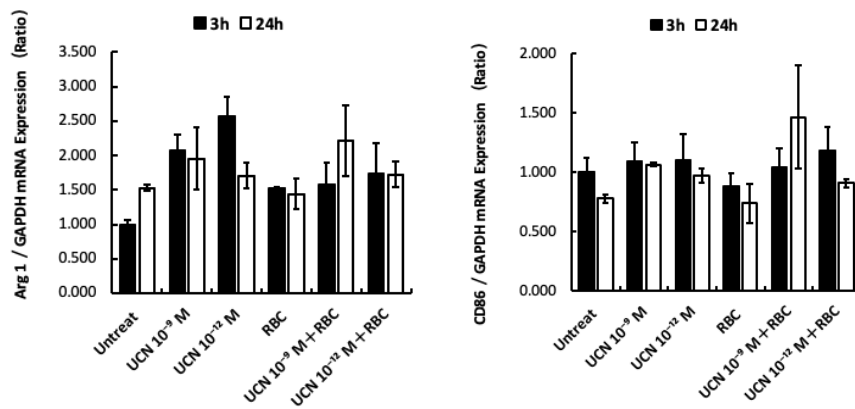
圖十七中，反應時間為 3 h 且 UCN 濃度為 10⁻¹² M 及 UCN 濃度為 10⁻⁹ M 時，皆能使 Arg 1 的表現量顯著的提升，CD86 則沒有顯著變化。圖十八中，反應時間為 24 h 時，兩基因之表現量則沒有顯著變化。



圖十七、Arg 1、CD86 反應 3 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。 (統計結果*表示各組相對於 Untreat 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.005$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ 。)



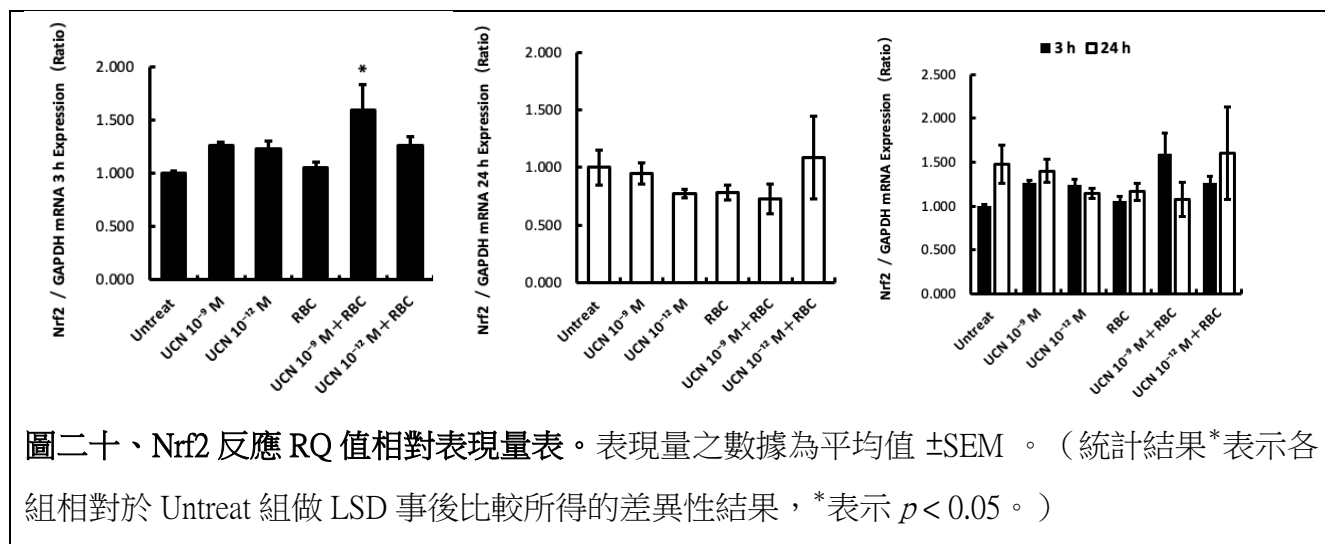
圖十八、Arg 1、CD86 反應 24 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。



圖十九、Arg 1、CD86 反應 3 h/24 h RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。

(四) 探討 UCN 對 BV-2 微膠細胞粒線體運作相關基因的影響 (Nrf2)。

Nrf2：核因子紅細胞 2 相關因子 2。由圖二十中，反應時間為 3 h 且加入 RBC 及 UCN 濃度為 10^{-9} M 時，Nrf2 的表現量有顯著上升，反應時間為 24 h 時則沒有顯著差異。



圖二十、Nrf2 反應 RQ 值相對表現量表。表現量之數據為平均值 \pm SEM。 (統計結果*表示各組相對於 Untreat 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，*表示 $p < 0.05$ 。)

陸、研究討論

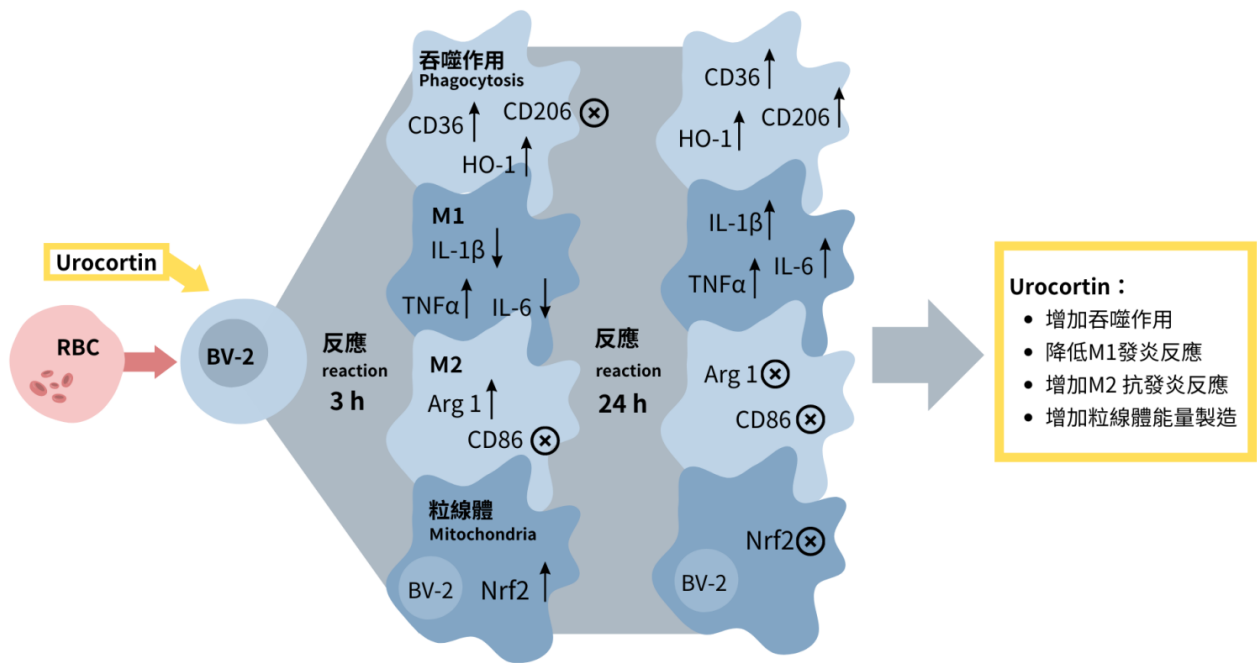
本研究旨在探討 UCN 對 BV-2 微膠細胞於腦溢血後腦部殘餘血塊的清除作用。我們藉由將 BV-2、RBC 反應，模擬術後殘餘的血塊對 BV-2 的影響，並透過加入 UCN 模擬術後的給藥治療。我們發現，無論是藉由螢光顯微鏡或是縮時攝影中觀察其 16 h 內的變化，都能觀察到 BV-2 對 RBC 的吞噬作用。比較特別的是，在 16 h 的縮時攝影中，除了觀察到 BV-2 會對 RBC 的吞噬作用，也完整地看到 BV-2 的分裂、活化、變形、吞噬、RBC 在細胞內被分解的情形，並掌握微膠細胞活化的時間點大致上落在反應第 2 小時及第 3 小時之間，作為後續實驗的時間點參考。(但由於無法將 BV-2 作用 16 h 中的縮時攝影的完整變化於本文中呈現，因此我們將其中有發生重大改變的時間點做截圖表示。)

為了探討 UCN 對 BV-2 吞噬作用的影響，我們進行吞噬指數 (Phagocytosis Index) 的實驗，並測試了五種不同濃度的 UCN，並加入標籤上螢光的 RBC 反應 6 h 後，計算其所測得的螢光量

值得出吞噬指數的變化。由研究結果中發現 UCN 濃度為 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-12} M 都能為 BV-2 的吞噬作用帶來顯著提升的效果。有趣的是，UCN 濃度較低的組別反應卻較濃度較高的組別來的差，與常理不符，因此我們推測 UCN 濃度過高時，可能導致細胞其他的生理反應進而影響吞噬作用的進行。

在過去的許多研究中表示 UCN 能有效的降低出血性腦中風發炎所致的神經損傷，但卻沒有文獻是關於探討 UCN 對其降低發炎傷害的潛在機制，因此我們藉由反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR) 觀察 BV-2 吞噬作用、M1 (發炎反應)、M2 (抗發炎反應)、粒線體能量運作等相關基因表現量的變化，進一步探討 UCN 對 BV-2 作用的機制。我們發現 UCN 濃度為 10^{-9} M 時能增加吞噬作用相關基因的表現量 (HO-1、CD36、CD206) 且反應時間為 3 h 的表現量高於反應 24 h 的表現量，能在 BV-2 快速的反應，這與 Phagocytosis Index 中所得的結果相同，UCN 能有效且快速地促進吞噬作用。

在 M1 及 M2 的表現量中，反應時間為 3 h 時，UCN 濃度為 10^{-9} M 時能降低 M1 中基因 IL- 1β 、IL-6 的表現量，且提高 M2 中基因 Arg 1 的表現量，與過去的研究結果相符，短時間內，UCN 能快速且有效的抑制 M1 發炎反應且促進 M2 抗發炎反應進行。但在反應時間為 24 h 時，UCN 濃度為 10^{-9} M 時卻增加 M1 中基因 IL- 1β 、IL-6 的表現量，M2 中基因表現則沒有明顯的差異，抗發炎的功效不如反應時間為 3 h 的表現，造成此結果的原因仍需要更進一步的探討。而 UCN 對 BV-2 粒線體中基因 Nrf2，反應時間為 3 h 且 UCN 濃度為 10^{-9} M 時能增加其表量，促進粒線體能量的製造。



圖二一、UCN 對 BV-2 細胞中各功能基因影響示意圖。

在 RT-PCR 的實驗中，就整體表現量而言，我們發現給藥時間（作用時間）為 3 h 且 UCN 濃度為 10^{-9} M 時，UCN 能快速且有效地促進其吞噬作用、M1、M2 反應及其粒線體能量的運作。

然而，本實驗僅用 RBC 作為腦部出血的模擬，RBC 的成分也與血紅素的成分有所落差，可能影響微膠細胞的運作及其基因上的表現。另外，雖然本實驗大致上了解了 UCN 對 BV-2 作用的機制，但仍有許多有相同功能的其他基因尚未被探討，本次的研究只能說是冰山一角。因此，UCN 在 BV-2 中的運作仍需要被深究，觸及更多 BV-2 作用相關的基因也是我們未來努力的目標。

UCN，在過去的許多研究中顯示，能有效的降低出血性腦中風發炎所致的神經受損，同時也能減緩腦水腫及血腦屏障（Blood-brain Barrier, BBB）破損，促進神經保護機制進行，更有研究表示 UCN 能通過血腦屏障在腦中作用。而在本研究中亦發現，UCN 濃度為 10^{-9} M 時，能有效的促進吞噬作用的進行，降低 M1 發炎反應的傷害更促進 M2 的抗發炎反應的修護，提升細胞中能量的製造，都表示 UCN 能為 BV-2 微膠細胞帶來正面的功效。

柒、研究結論

神經胜肽 UCN 能調控腦部的巨噬細胞——微膠細胞的發炎及吞噬作用，快速且有效的促進吞噬作用及抗發炎功效，降低發炎時產生的氧化壓力損傷，且於 UCN 濃度為 10^{-9} M 具有最佳成效。期望此研究的初步結果能有助於了解 UCN 加速清除腦血腫塊的作用，進而作為開發出血性腦中風新療法的參考依據。

捌、參考文獻

- 1.洪蘭（譯）（2002a）。腦，在演化中。台北市：遠流。（Allman,J.M.,1999）。(書)
- 2.Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF (2009). Intracerebral haemorrhage. *Lancet*, 373, 1632-1644.
- 3.Greenberg SM, Ziai WC, Cordonnier C, Dowlatshahi D, Francis B, Goldstein JN, et al.(2022). 2022 guideline for the management of patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: A guideline from the american heart association/american stroke association. *Stroke*, 53, 282-361.
- 4.Madangarli N, Bonsack F, Dasari R, Sukumari-Ramesh S.(2019).Intracerebral hemorrhage: Blood components and neurotoxicity. *Brain Sci*, 9.
- 5.Ransohoff, R.M. and A.E. Cardona.(2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321), 253-62.
6. Corinne Benakis , Lidia Garcia-Bonilla, Costantino Iadecola, Josef Anrather.(2014). The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci*, 8, 461.
- 7.Pan W, Kastin AJ. Urocortin and the brain. (2008). *Progress in neurobiology*, 84, 148-156.
- 8.Liew HK, Pang CY, Hsu CW, Wang MJ, Li TY, Peng HF, et al.(2012). Systemic administration of urocortin after intracerebral hemorrhage reduces neurological deficits and neuroinflammation in rats. *J Neuroinflammation*, 9, 13.

【評語】 052008

1. 該研究主要使用離體紅血球和微膠細胞的實驗模型來模擬腦溢血病患情境。然而，離體實驗無法完全模擬人體複雜的生理環境和腦部組織中的交互作用。因此，研究結果在臨床應用前仍需要進行更進一步的研究，包括動物模型和臨床試驗。
2. 該研究提到神經胜肽 Urocortin 能促進微膠細胞的吞噬作用和抗發炎功效，但並未提供充分的機制解釋和相關的信號通路分析。更詳細的研究仍需進一步探索 Urocortin 在調節巨噬細胞功能和抗發炎反應中的確切作用機制。
3. 雖然作者所設計的實驗很全面，但背景介紹和討論不夠深入，或許是超出高中生能力所致。測試結果 UCN 越稀效果越好，但為何沒有再做更稀的濃度測試？
4. UCN 對 BV-2 細胞對 M1、M2 相關基因之影響，宜再確認。
5. 尿皮質素 UCN 是很新的材料，在醫學上有很大的研究潛力，對科學社會應該有很好的貢獻。
6. 實驗記錄詳實完整。

作品海報

神經胜肽Urocortin對微膠細胞抗發炎、吞噬的作用

壹、研究摘要



腦溢血 (ICH) 是一種致命的臨床急重症，少部分的患者接受開顱手術，並清除50%~75%的**血腫塊**，增加病人的存活率。然而手術對患者癒後無顯著的幫助，無法完全清除的血腫塊更釋放出有毒的血液成分，使神經免疫細胞（微膠細胞）過度活化、發炎反應，破壞周邊神經細胞，導致更嚴重的繼發性腦損傷（如左圖）。因此開發新藥物協助**清除血腫塊**及**降低發炎所產生的傷害**有其急迫性。

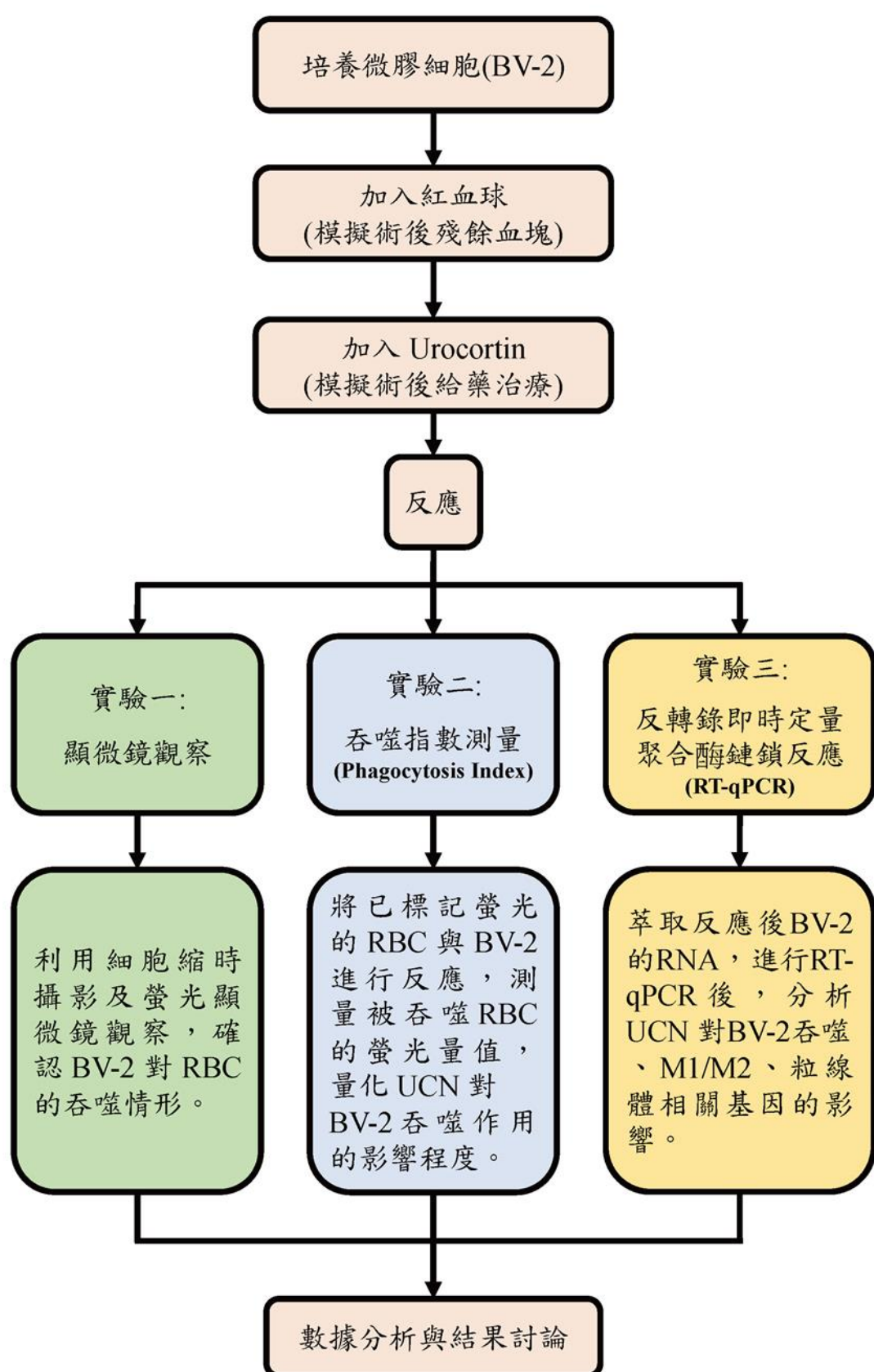
本研究發現**神經胜肽——尿皮質素 (Urocortin, UCN)** 能调控腦部的巨噬細胞——**微膠細胞的發炎及吞噬作用**，同時亦能降低發炎時產生的組織損傷。我們藉由**紅血球 (RBC)** 與微膠細胞 (BV-2 Cell Line) 的**離體實驗**模擬出血性腦中風病患接受開顱手術後殘留於腦中的血塊與巨噬細胞在腦中的吞噬情形，並透過 UCN 作用，促進其吞噬作用、调控發炎反應。首先以顯微鏡觀察 BV-2 的吞噬作用，再以測量其吞噬量值 (Phagocytosis Index)、反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR) 分析，推論出 UCN 濃度為 10^{-9} M，能有效的促進 BV-2 的吞噬作用、抗發炎功效。

貳、研究目的

促進微膠細胞的吞噬作用有助於 ICH 開顱手術癒後的治療，因此我們藉由觀察 BV-2 活化的時間，並透過不同的給藥濃度探討最有效治療處理：

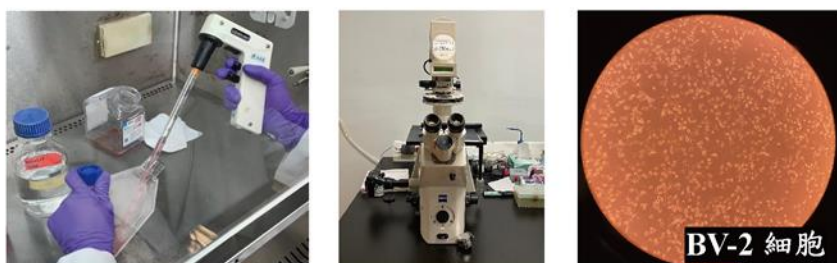
- 一、探討 BV-2 對紅血球 (RBC) 的吞噬作用。
- 二、藉由吞噬指數，探討不同濃度 UCN 對 BV-2 吞噬作用的影響。
- 三、使用 RT-qPCR，探討不同濃度 UCN 對 BV-2 吞噬作用、M1發炎 / M2抗發炎反應及粒線體運作的影響。

參、研究架構

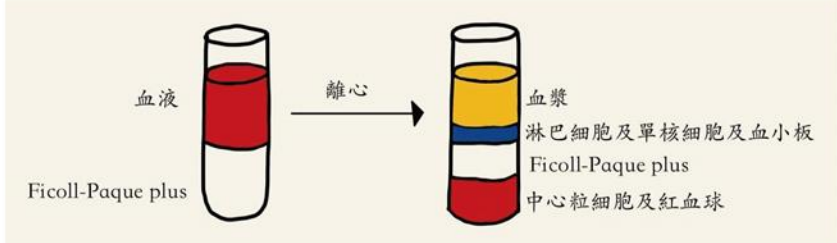
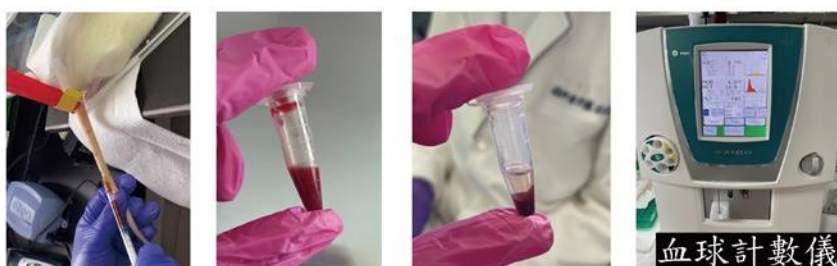


肆、研究方法

一、BV-2 繼代培養

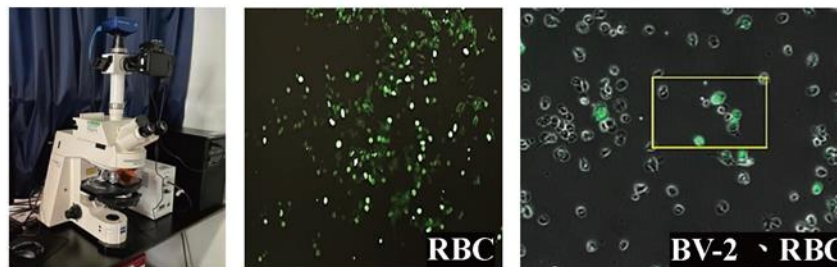


二、RBC 純化

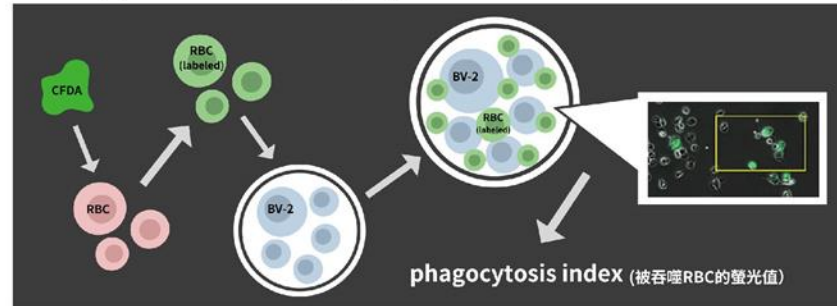


三、實驗一：顯微鏡觀察

- CFDA 螢光標記 RBC：



四、實驗二：Phagocytosis Index



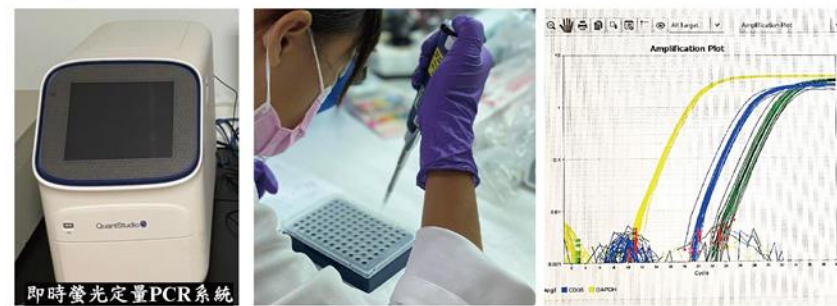
五、實驗三：RT-qPCR

1. RNA 純化、檢測：(使用 RNeasy Kits)



2. RT：將 mRNA 反轉錄為 cDNA。

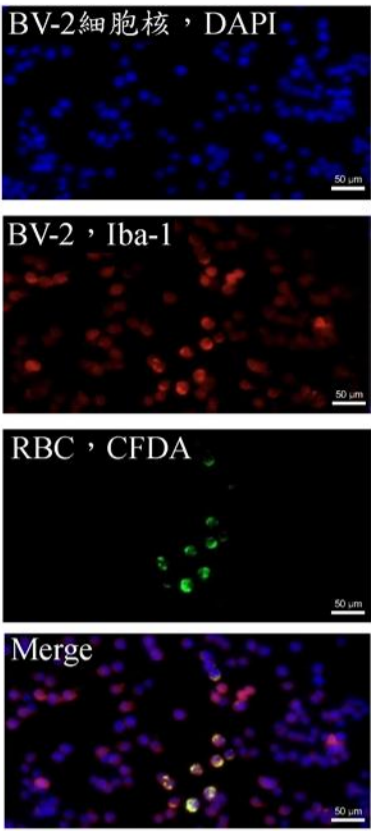
3. qPCR：



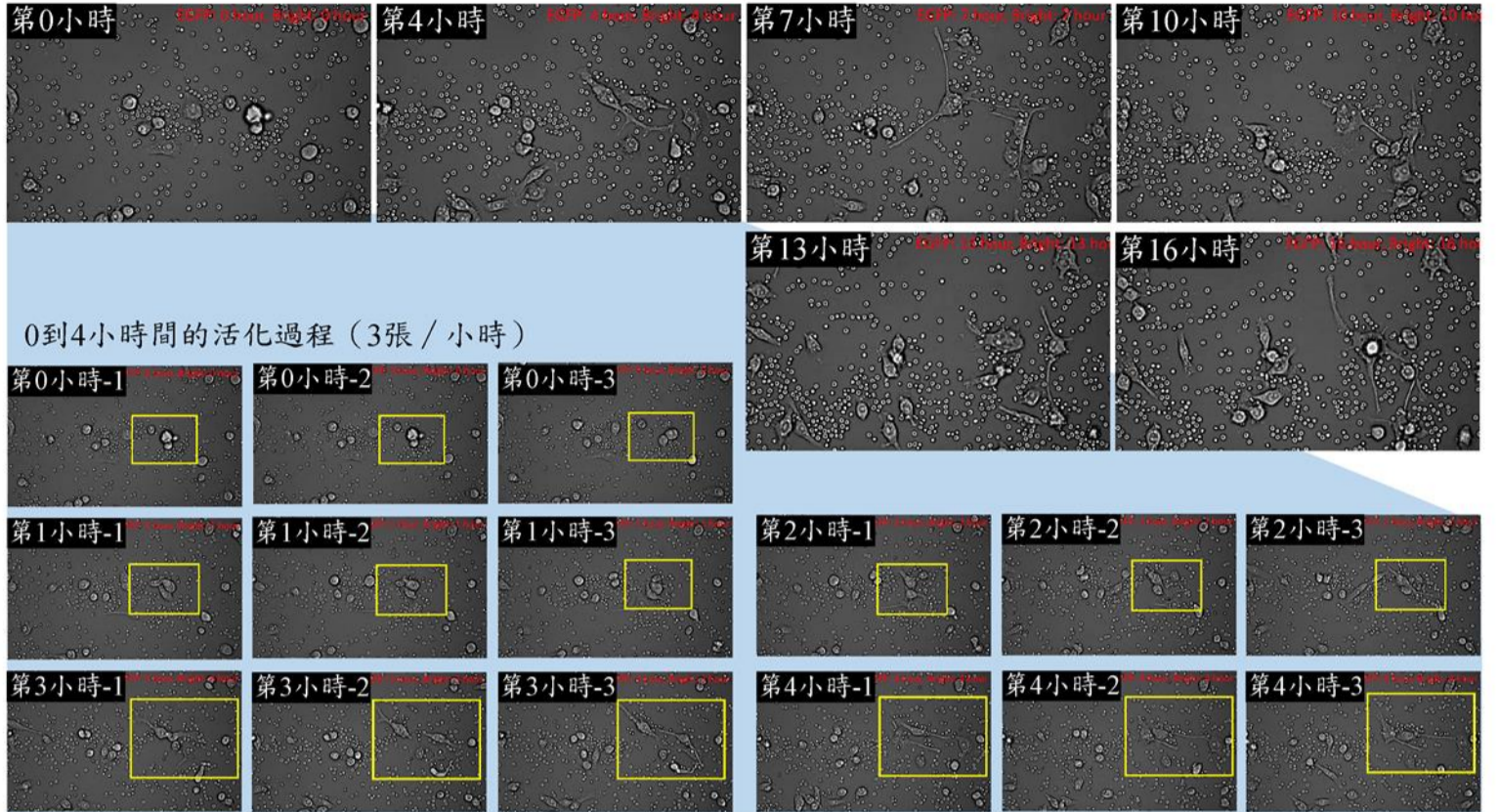
伍、研究結果

一、探討 BV-2 對 RBC 的吞嚥作用

(一) 螢光影像觀察

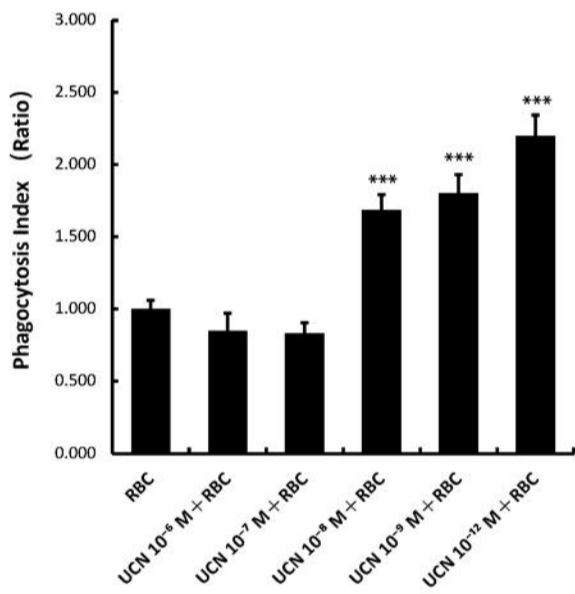


(二) 縮時影像觀察(截圖)



二、Phagocytosis Index

(註：吞嚥指數之數據為平均值 ± SEM，統計結果*表示各組對於 RBC 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.001$ 。)



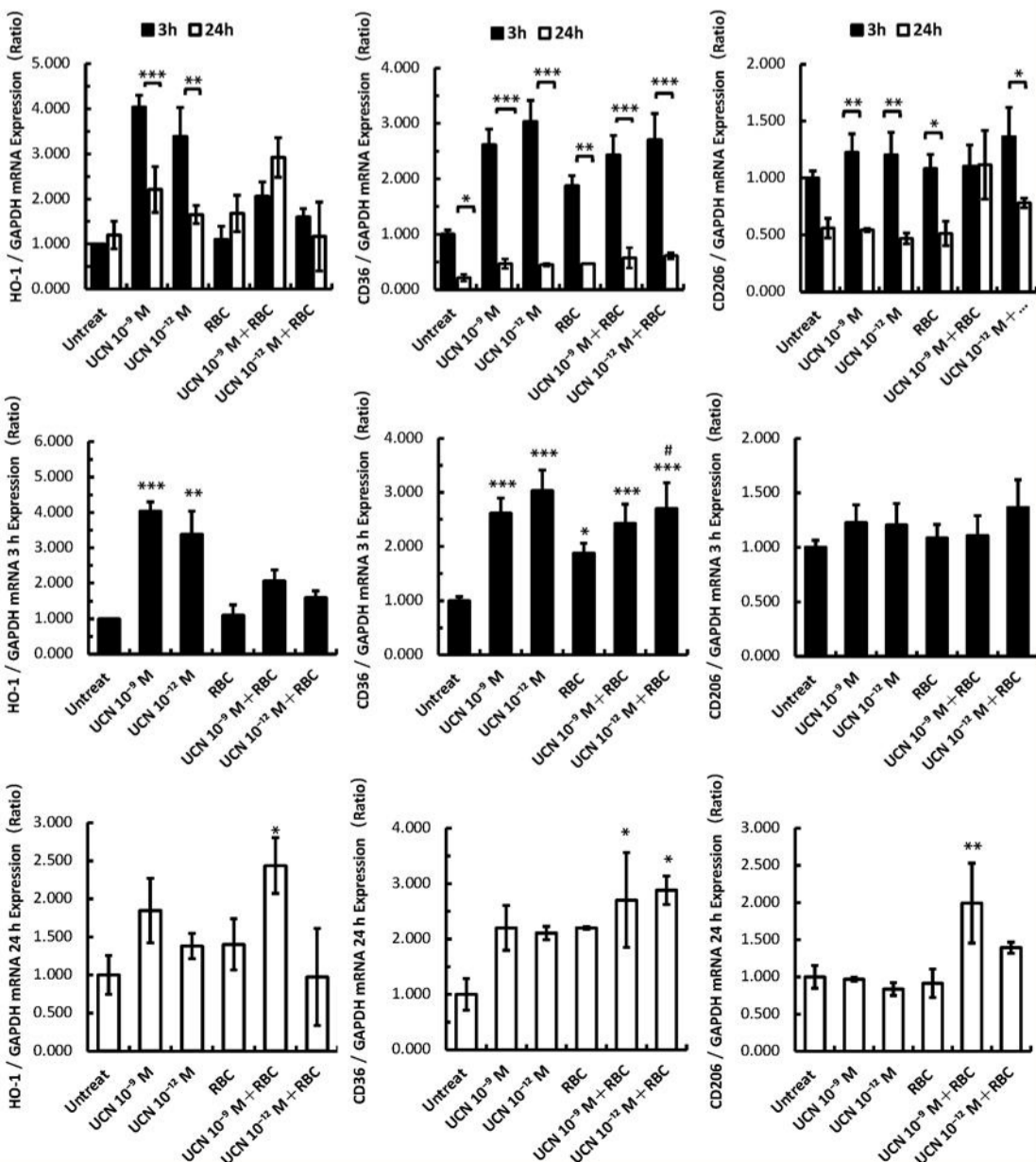
三、RT-qPCR

由先前實驗得知 UCN 能增加 BV-2 吞嚥 RBC 的能力，而這可能會影響基因的表達及活化，因此進行 BV-2 吞嚥、M1、M2、粒線體運作等相關的基因分析。

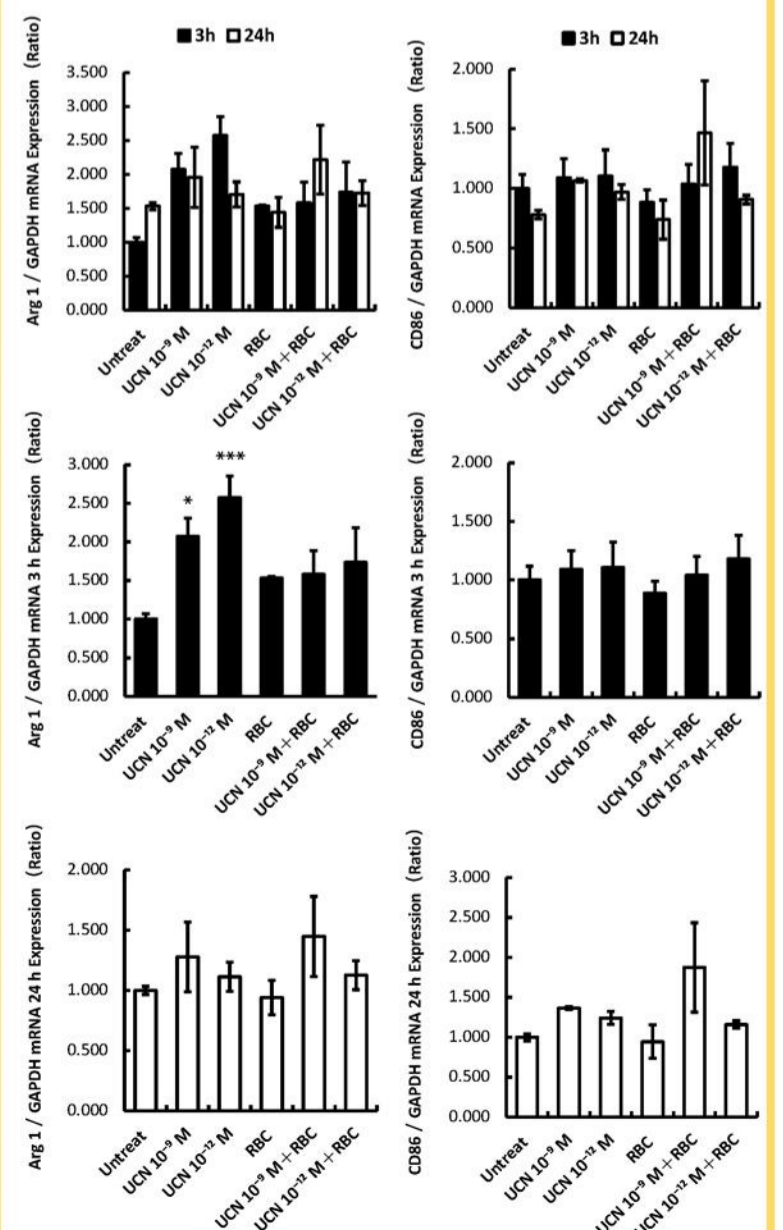
功能	名稱	前置引子 (Forward Primer)	反置引子 (Reverse Primer)
吞嚥作用	HO-1	AGAGTTTCCGCTCCAACCA	CGGGACTGGGCTAGTTCAGG
	CD36	CCAGAACCCAGACAACCACT	CACAGGCTTTCCTTCTTTGC
	CD206	GGGACTCTGGATTGGACTCA	GCTCTTCCAGGCTCTGATG
M2 抗發炎反應	Arg 1	GACCTGGCCTTGTGATGT	CCATTCTTCTGGACCTCTGC
	CD86	GCACGTCTAAGCAAGGTCAC	CATATGCCACACACCATCCG
M1 發炎反應	TNF α	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTC	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
	IL-6	TCCTACCCCAACTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
	IL-1 β	GCTGAAAGCTCTCCACCTCA	AGGCCACAGGTATTTTGTCG
粒線體運作	NRF2	GGGAGGTGGATG TAATGTGG	TGGGCTGGA ACTACA ACTC

(表現量之數據為平均值 ± SEM。統計結果*表示各組相對於 Untreat 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，***表示 $p < 0.001$ ，**表示 $p < 0.01$ ，*表示 $p < 0.05$ ；#表示有加入 RBC 的各組相對 RBC 組做 LSD 事後比較所得的差異性結果，###表示 $p < 0.001$ ，##表示 $p < 0.01$ ，#表示 $p < 0.05$ ，LSD：Least-Significant difference。)

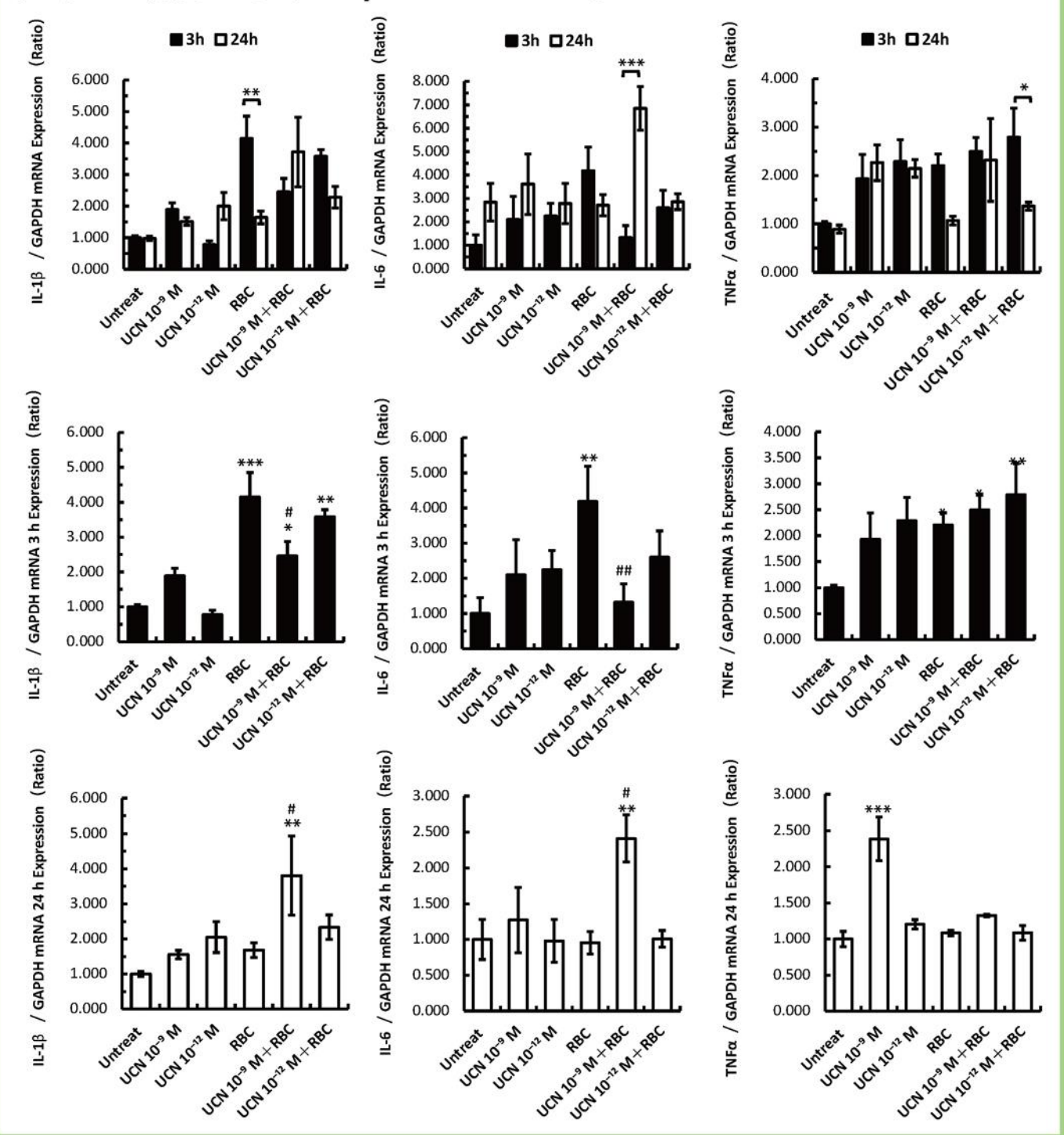
(一) 吞嚥作用 (HO-1、CD36、CD206)



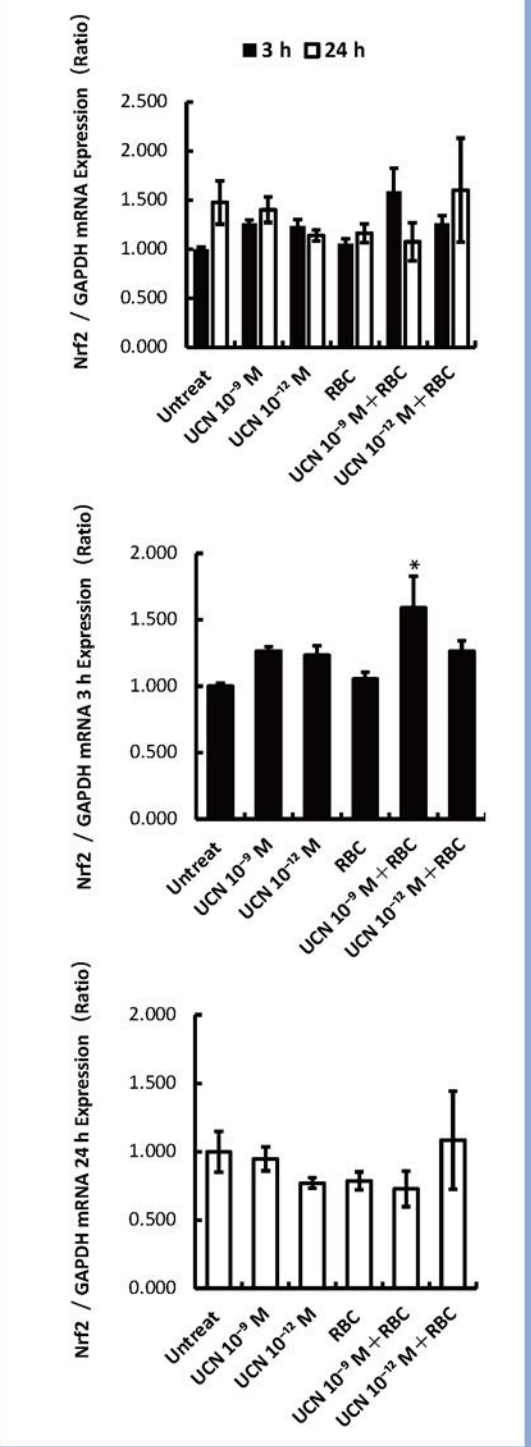
(二) M2 抗發炎反應 (Arg 1、CD86)



(三) M1發炎反應 (IL-1 β 、IL-6、TNF α)

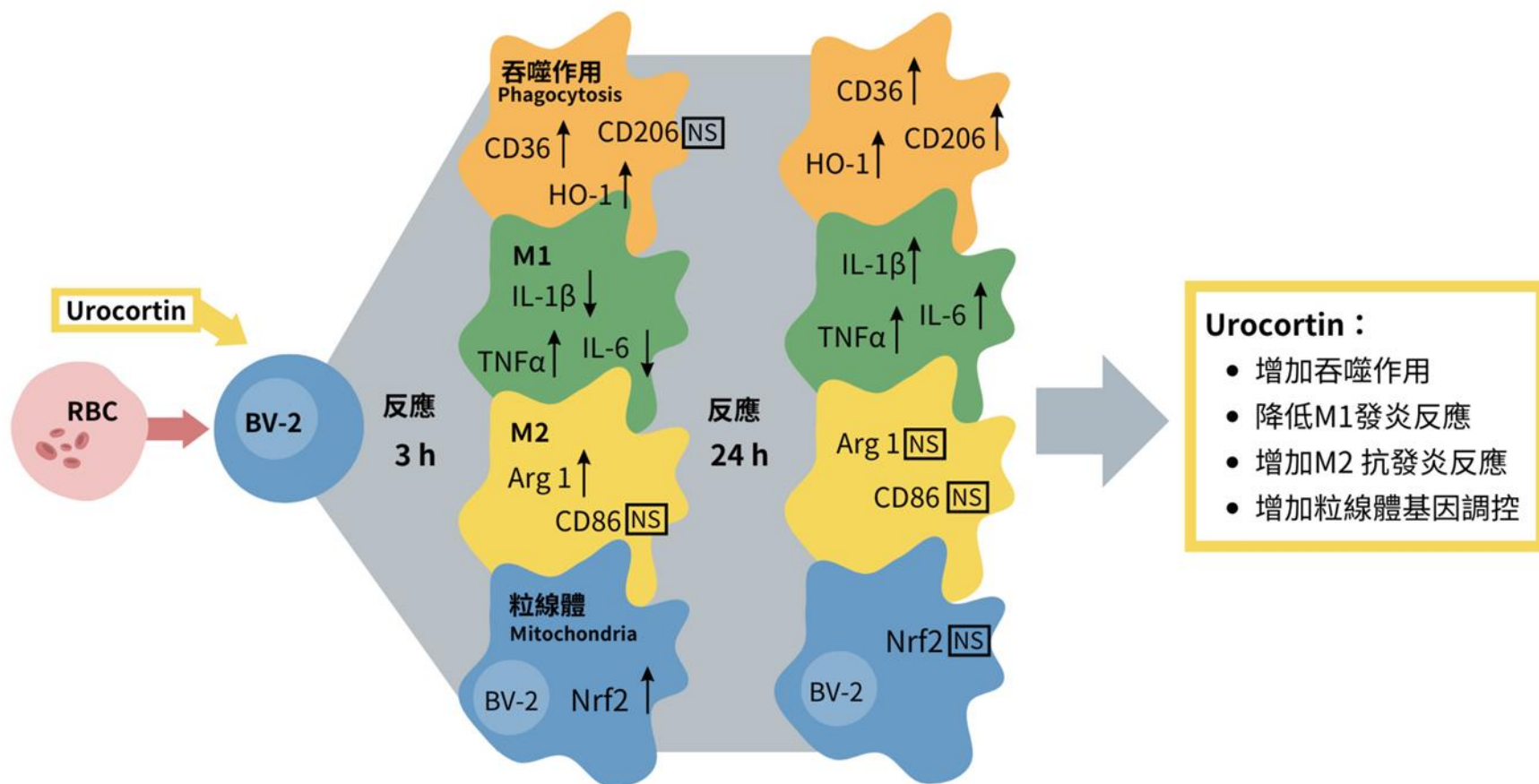


(四) 粒線體調控 (Nrf2)



陸、結果討論

- 一、在顯微鏡觀察中，觀察 BV-2 的分裂、活化、變形、吞噬、RBC在細胞內被分解的情形，並發現微膠細胞活化的時間點大致上落在加入 RBC 反應第2小時及第4小時之間，作為後續實驗的時間點參考。
- 二、在 phagocytosis index 中，發現 UCN 濃度為 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-12} M皆能為 BV-2 的吞噬作用帶來顯著提升的效果，並推測若 UCN 濃度過高，可能導致細胞其他的反應進而影響吞噬作用的進行。
- 三、在 RT-qPCR 中，就整體基因表現而言，我們發現 UCN 濃度為 10^{-9} M時，能快速且有效地促進其吞噬作用、降低M1發炎反應、增加M2抗發炎反應及其粒線體基因的調控。



柒、研究結論

神經胜肽 Urocortin 能調控腦部的巨噬細胞——微膠細胞的發炎及吞噬作用，快速且有效的促進吞噬作用及抗發炎功效，降低發炎時產生的氧化壓力損傷及紅血球分解釋放的毒性物質，且於 UCN 濃度為 10^{-9} M 具有最佳成效。

捌、未來展望

期望此研究的初步結果能有助於了解 UCN 加速清除血腫塊的作用，進而作為開發出血性腦中風新療法的參考依據。