

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

佳作

052010

丁香樹皮萃取物 Syringin 在巴金森氏症動物
模型效用之評估與機制探討

學校名稱：國立中科實驗高級中學

作者： 高二 張浩恩 高二 黃祈量 高二 江承恩	指導老師： 王郁茜 施絢懷
---	-----------------------------

關鍵詞：巴金森氏症、秀麗隱桿線蟲、Syringin

摘要

巴金森氏症是好發於老年人的退化性神經疾病，在高齡化的台灣社會，是未來急需重視的老年疾病。本實驗以秀麗隱桿線蟲為實驗對象，利用 6-OHDA 分別引發 BZ555、NL5901、DA2123 與 N2 品系之線蟲的神經退化，探討丁香樹皮萃取物 (Syringin) 作為治療巴金森氏症候選天然藥物的可能性。實驗結果顯示，Syringin 能修復退化的多巴胺神經元，降低 α -突觸核蛋白聚集、ROS 含量與提升存活率，且能促進細胞自噬並改善運動行為。另一方面，透過 *pdr-1* 與 *Sir2.1* 基因缺陷的線蟲探討 Syringin 參與的訊息傳遞路徑，我們認為 Syringin 透過激活 *Sir2.1*-*PINK1*-*Parkin* 通路來促進自噬，恢復退化的多巴胺神經元，保護細胞不受 6-OHDA 的破壞。此結果能對後續治療此疾病提供可能的替代方案，解決未來台灣高齡化社會所面臨之老年人健康問題。

壹、 前言

一、研究動機

巴金森氏症是好發於老年人的神經退化性疾病，根據健保署的統計，台灣約每一萬人中就有三人罹病。目前對於此疾病多以左多巴藥物或手術以緩解其症狀，然而這些方法不僅無法治癒患者，伴隨而來的藥物劑量增高與感染風險更是極需面對的問題。過去的研究指出巴金森氏症可能與細胞自噬的異常相關，此異常導致細胞無法將錯誤折疊的 α -突觸核蛋白與損壞的粒線體清除，若能找到治療細胞自噬異常的藥物，將可有效治療許多患者。

經過閱讀文獻後我們發現有許多藥物的開發是來自於天然植物的萃取，其中洋丁香樹皮所萃取之丁香苷(Syringin, SRG)被認為具有抗氧化及免疫調節的功能，並且已有實驗將其利用於治療阿茲海默症。因此本實驗利用秀麗隱桿線蟲作為實驗對象，探討 SRG 作為治療巴金森氏症候選天然藥物的可能性，並了解 SRG 與細胞自噬及神經發育與修復相關的生理代謝途徑，可望此實驗結果能對後續治療巴金森氏症提供其他可能的替代方案，並解決未來台灣高齡化社會所面臨之醫療與人體健康問題。

二、研究目的

- (一) 探討 SRG 對 6-OHDA 線蟲模型多巴胺神經退化影響
- (二) 探討 SRG 對 6-OHDA 線蟲模型體內 α -突觸核蛋白表現量影響
- (三) 探討 SRG 對 6-OHDA 線蟲模型細胞自噬量影響
- (四) 探討 SRG 對 6-OHDA 線蟲模型體內 ROS 含量影響
- (五) SRG 對 6-OHDA 線蟲模型作用的機制探討

三、文獻回顧

(一) 巴金森氏症的病理症狀

巴金森氏症 (Parkinson's Disease, PD) 是排名第二常見的神經退化性疾病，好發於高齡族群。主要的病徵包括肢體僵硬、四肢靜態顫抖、行動緩慢、身體不平衡等症狀。患者主要病徵為腦中黑質部位多巴胺神經細胞的退化，導致人體多巴胺分泌不足。而多巴胺是一神經傳導物質，其分泌量的不足可導致人體運動上的障礙；此外其他研究內容亦觀察到患者腦中出現路易體堆積（主要成分為 α -突觸核蛋白）的現象。

巴金森氏症發病可分為兩種類型，第一類型為後天因素導致，如環境、藥物或外傷的影響；第二類型為自發性因素，然而對於第二類型的發病機制目前尚不明瞭，可能涉及多種生理機制，如 α -突觸核蛋白的錯誤折疊與堆積、神經發炎、粒線體功能異常、細胞內的活氧物質增加 (Reactive oxygen species, ROS) 和細胞自噬 (Autophagy) 功能發生障礙等生理現象 (Antonina Kouli et al, 2018)。

(二) 細胞自噬與巴金森氏症相關的發病機制

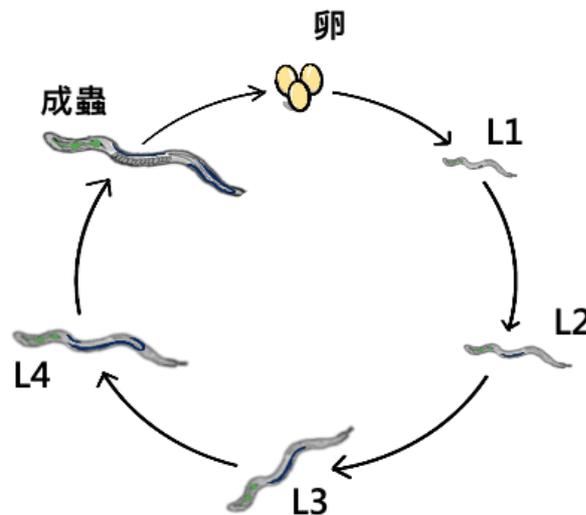
細胞可以藉由自噬作用降解錯誤折疊的蛋白質或分解損壞的胞器以保護自我，若自噬作用發生異常，將無法將錯誤折疊的 α -突觸核蛋白與異常的胞器（如粒線體）清除，此結果將促使 PD 的發病，因此細胞自噬與 PD 之間有著緊密的關聯。

細胞自噬可依照不同的機制分成四種類型，如巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy) 和受伴護蛋白調控的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA) (Parzych, K. R., & Klionsky, D. J., 2014) 以及特殊的粒線體自噬 (mitophagy)。而有研究指出巨自噬和粒線體自噬與 PD 的發生具有生理上因果關係 (Winslow, A. R. et al, 2010)，因此我們想針對研究巨自噬和粒線體自噬的生理代謝機制來探討 PD 的發病機制。

巨自噬大致上可分為三部分：(1) 形成吞噬泡 (phagophore)，吞噬泡包裹物體；(2) 形成自噬體 (autophagosome)；(3) 最後與內含水解酶的溶體 (lysosome) 結合，將物質降解。其中 Sirt1-PINK1-Parkin 被認為是自噬中一條重要的代謝通路，Sirt1 為調控自噬的上游蛋白，而 Parkin 則是下游蛋白，上游蛋白的 Sirt1 能夠影響 Parkin 的蛋白質表現，而 Parkin 可引發粒線體自噬 (Qiao, H. et al, 2018)。

(三) 選用秀麗隱桿線蟲 (*C. elegans*) 作為實驗動物

研究 PD 須建立動物模型進行實驗，而秀麗隱桿線蟲 (*C. elegans*) 是研究神經性疾病的一種常見模式生物。線蟲的生長週期大約 3 天，壽命約 20 天，胚胎發育約 16 小時。孵化後開始成長，幼蟲期可分為 4 個階段 (L1, L2, L3, L4) (圖一)：L1 耗時 16 小時，其餘階段耗時 12 小時。每一階段結束時就會脫皮並長出新表皮，當長至成蟲時，雌雄同體的秀麗隱桿線蟲能自行受精，若體內精子用盡時，則會與其他雄線蟲進行交配 (Corsi AK et al, 2005-2018)。

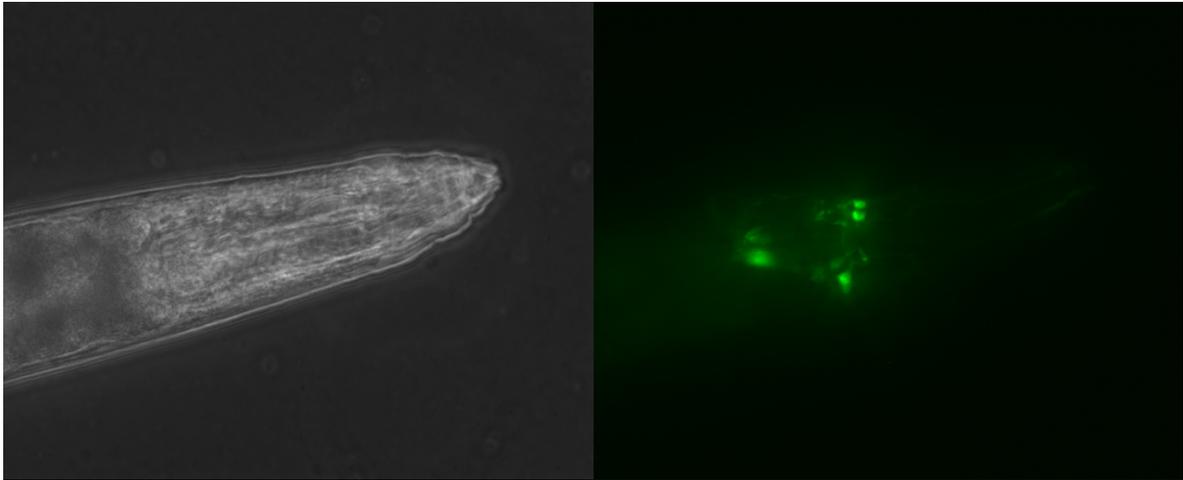


圖一、線蟲生長週期

短暫的生命週期意味著秀麗隱桿線蟲具備快速老化的生理速度，而其具有完整的神經系統 (具有 4 對多巴胺神經元，頭 3 對，尾 1 對)，且透明的身體也便於進行螢光的觀察實驗，如基因的表現等操作實驗。此外，相對於小鼠，線蟲是便宜又能大量培養的研究生物，而美國食品藥物管理局 (FDA) 已宣布藥物研發不必經由哺乳動物實驗，意味以線蟲作為藥物的不具研究倫理爭議，是一方便且可有效進行實驗的研究對象。

過去的研究已研究許多種品系之線蟲 (如 N2、BZ555、NL5901、DA2123)。N2 為野生種，可用於觀察其行為。BZ555、NL5901、DA2123 因經過基因轉殖可以表達出螢光蛋白，便於實驗者觀察相關基因的表現。BZ555 品系之線蟲具有帶螢光基因的多巴胺載體蛋白 (*dat-1p, GFP*)，其主要位於多巴胺神經元，可以透過螢光強度觀察神經狀況 (具有 4 對多巴胺神經元，頭 3 對，尾 1 對) (圖二) (Cooper, J. F., & Van Raamsdonk, J. M., 2018)。

而 NL5901 品系之線蟲可以觀察全身肌肉 α -突觸核蛋白 (α -突觸核蛋白, GFP) 表達的情形，(A., Nazir, A. et al, 2012)。DA2123 品系之線蟲則是具有能表達細胞自噬的螢光蛋白 (LGG-1, GFP)，通常是藉由接縫細胞 (seam cells) 測定線蟲的自噬活性 (Chen, Y. et al, 2017)，綜合上述，這些基因轉殖的線蟲使實驗者便於觀察實驗操作之結果。

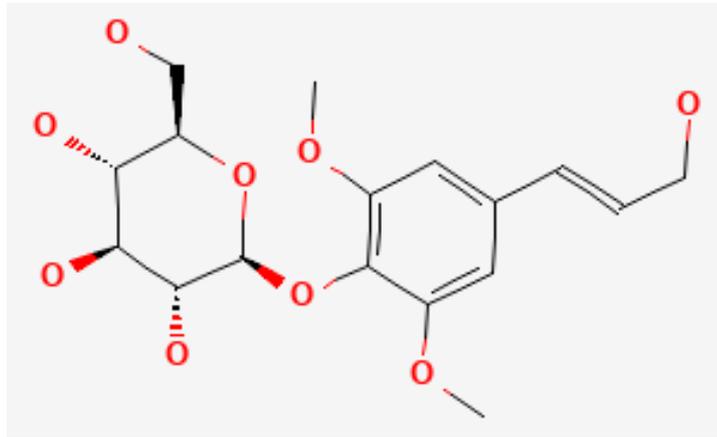


圖二、螢光顯微鏡下的 BZ555，能清楚看見發光的 3 對多巴胺神經元

(四) 丁香苷 (Syringin) 可望作為治療巴金森氏症之天然小分子藥物

6-OHDA 已被證實可用來促進 PD 的發病，其透過多巴胺神經元上特有的多巴胺載體蛋白進入多巴胺細胞，破壞細胞內粒線體電子傳遞鏈，導致細胞內具自由基的活性氧物質(ROS)增加，進而使細胞產生氧化應激 (oxidative stress) 反應，導致傷害細胞並加速退化 (Blum, D. et al, 2001)。

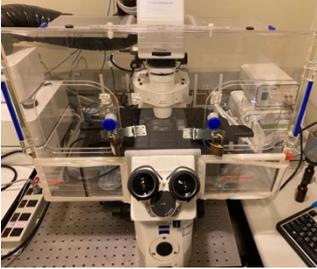
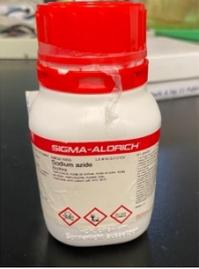
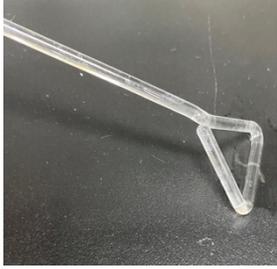
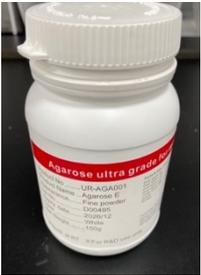
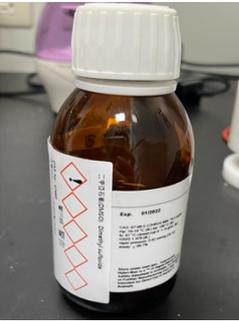
PD 目前的治療方式主要以藥物 (如左旋多巴藥物) 抑制其症狀，或使用深腦刺激術改善其症狀。這些治療方式多半以緩解症狀為主，並未完全治癒患者。而目前小分子藥物被認為具備治癒 PD 之潛能，可望作為未來藥物開發的候選分子。已有許多小分子藥物從植物中萃取出來，作為治療疾病的候選藥物，如小分子藥物—丁香苷 (Syringin, SRG)，SRG 最初是由木樨科丁香屬的植物—洋丁香 (*Syringa vulgaris*) 的樹皮中所分離出來的天然化合物，但之後也在其他種植物中發現。SRG 已有研究證實具有抗氧化及免疫調節的功能，能夠改善肥胖症、結腸炎，也能恢復阿茲海默症細胞模型氧化還原平衡 (Wang, C. Y. et al, 2020)，但目前並未有研究分析 SRG 與 PD 之間的關係。



圖三、SRG 結構 [National Center for Biotechnology Information (2023).]

綜合以上所述，我們選取秀丽隱桿線蟲 (*C. elegans*) 作為實驗對象，並利用 6-OHDA 誘發線蟲產生 PD，並透過實驗進行研究，探討丁香苷對於線蟲的神經系統發育與修復的生理發病現象與特徵，此實驗可望對後續研究提供相關的數據，並作為未來丁香苷藥物開發與治療 PD 的相關實驗結果。

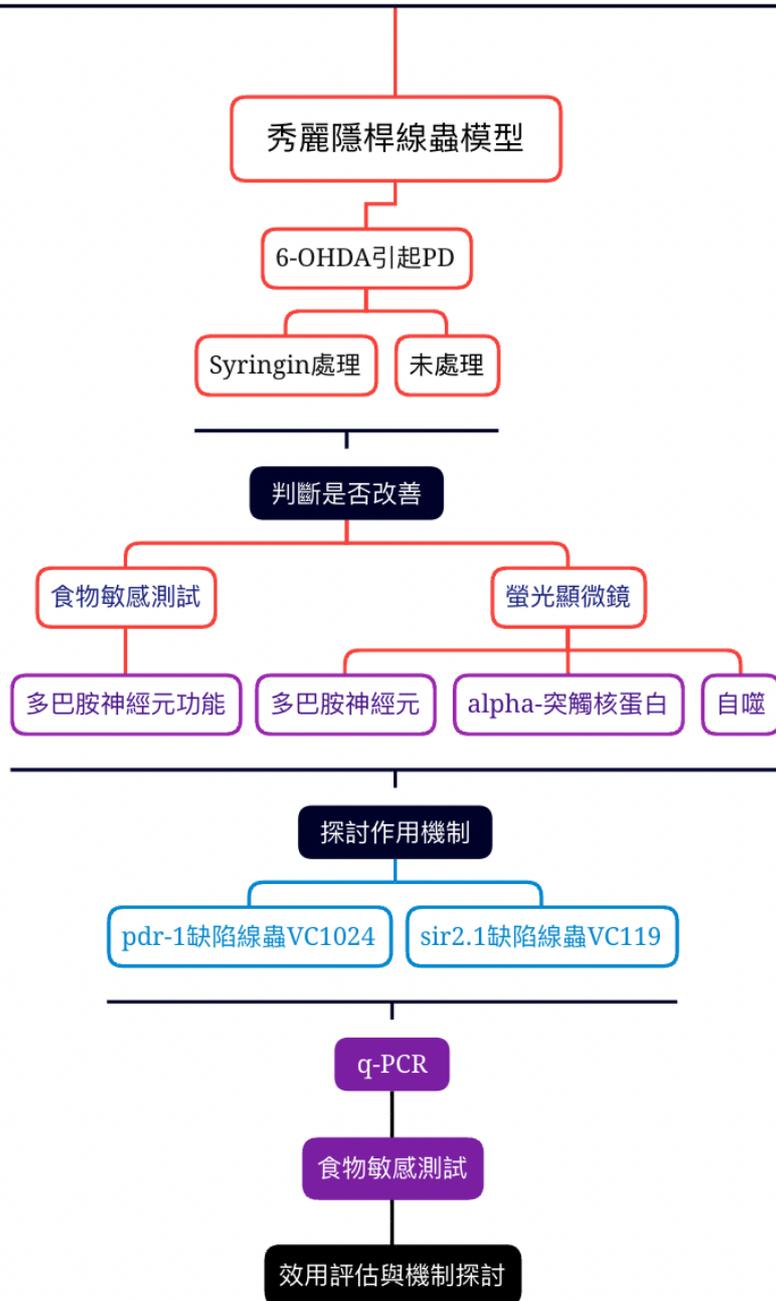
貳、 研究設備及材料

			
螢光顯微鏡	複式顯微鏡	高速離心機	SpectraMax 分光光度計
			
6-OHDA	sodium azide (麻藥)	巴特氏管 (挑線蟲用)	塗佈棒 (塗線蟲食物)
			
Agarouse 瓊脂膠體粉	DMSO (藥物溶劑)	StepOnePlus q-PCR 系統	

參、 研究過程及方法

一、 研究架構

丁香樹皮萃取物Syringin在巴金森氏症動物模型效用之評估及機制探討

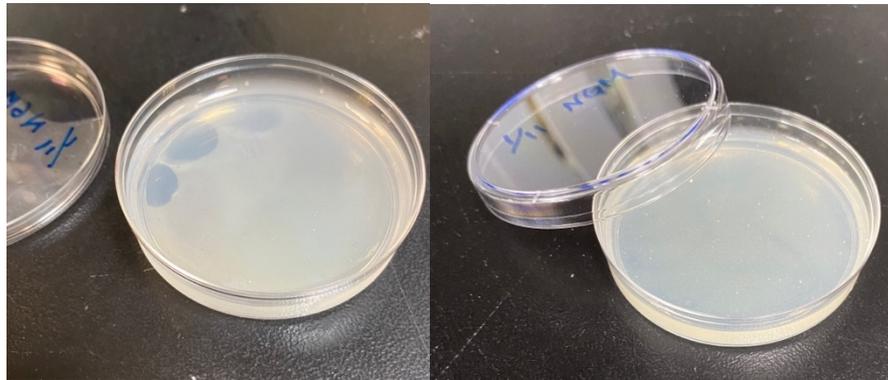


二、線蟲培養

培養 N2、BZ555、DA2123 與 NL5901 品系的線蟲，並以 OP50 品系大腸桿菌作為線蟲食物，置於 25°C 培養箱。

(一) 線蟲培養盤製作

第一步先製備 NGM (Nematode Growth Medium) 培養基，需要 1.5g NaCl+8.5g Agar +1.25g Peptone+487.5mL ddH₂O，加入磁石攪拌使溶質溶解，溶解後置於 121°C 滅菌鍋滅菌 1 小時，冷卻至約 55°C 左右加入 0.5mL CaCl₂+0.5mL MgSO₄ + 12.5mL KPO₄(1M PH6.0)+0.5mL Cholesterol(5mg/mL in EtOH)+0.5mL Streptomycin(50mg/mL) 0.625mL Nystatin，分裝至各盤中，在每盤加入約 2/3 滿的培養基，等待盤中培養基冷卻成型且表面乾燥不含水氣後將蓋闔上，存放於 4°C 冰箱保存，如要做實驗則加入 OP50 品系之大腸桿菌液 0.1mL，以培養皿塗佈棒塗勻，待其表面乾燥不含水氣後將蓋闔上，存放於室溫下 1 天後即可使用。



圖四、左：NGM 盤，右：塗 OP50 的 NGM 盤

(二) 繼代

在長滿線蟲的培養皿中，用經消毒的小刀切出一塊三角形，轉移至塗滿 OP50 的新 NGM 盤。確認線蟲有從三角形中爬出後放回 25°C 培養箱。



圖五、線蟲繼代

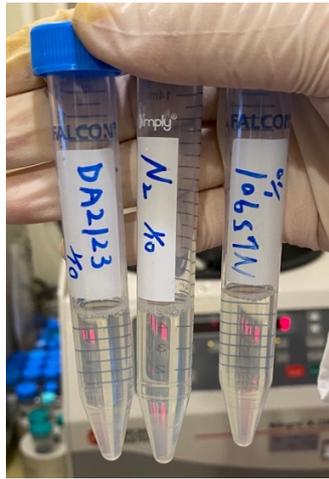
三、線蟲同步化

(一) 配製 M9 緩衝液

將 3g KH_2PO_4 +12.8g Na_2HPO_4 +5g NaCl 加入 900mL 的 ddH₂O 後把溶液體積加到 1L，將其配好的溶液置於 25°C 環境下攪拌 1 小時，取出體積 75mL 分裝於玻璃瓶中，置於 121°C 滅菌鍋滅菌，取出冷卻至約 25°C 左右，加入 0.075mL MgSO_4 (1M) 後，保存於 25°C 的環境。

(二) 同步化

取出長滿大量懷孕線蟲及蟲卵的 NGM 盤，以 2mL 無菌水沖洗盤面，將蟲卵吸取至 15mL 尖底離心管，加入無菌水至體積 3.5mL，配置 0.5mL NaOH (5M) 與 1mL 5% 漂白水混合後加入離心管，每兩分鐘 vortex 5 秒共五次，接下來以 1300g 離心 30 秒，吸掉上清液使管中約剩 0.1mL，準備 6mL M9 buffer 於 6cm 培養皿中，將管中 0.1mL 含有蟲卵之液體吸入培養皿中在室溫 25°C 以 50rpm 震盪培養 18 小時，使蟲卵孵化成第一期(L1)幼蟲。將含有孵化幼蟲的液體移至 15ml 尖底離心管，並以 1150g 離心 2 分鐘，去除上清液（吸去大部分 M9 buffer），將剩餘 L1 幼蟲液加入(NGM+OP50)培養皿置於 laminar flow 無菌操作臺中乾燥，最後置於 25°C 培養箱。



圖六、離心之後的蟲卵

四、食物清除測試決定 SRG 處理的濃度

Syringin(SRG)分子量 372.4，純度 > 98%，以二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液作為 SRG 溶劑（體積百分比 1%，溶劑為磷酸鹽緩衝生理食鹽水，phosphate buffered saline, PBS），配置 1M 以便之後配製各種濃度。為了確定特定濃度的 SRG 不會對線蟲造成危害，我們使用食物清除測試[Fu, R. H. et al, 2022]。我們將依序稀釋的 SRG 加到 S-Medium 中後加入過夜生長的 OP50，使光密度(optical density, OD)達到 6.6。接著將 SRG + S-Medium + OP50 的混合溶液取 50 μ l(OD=0.6)滴入 96 孔盤中，另外再取含 20 隻 L1 N2 線蟲的 10 μ l S-Medium。最後連續 6 天使用分光光度計(microplate reader)測量 OD 值(595nm)。

五、線蟲 SRG 與 6-OHDA 處理

先把 L1 的線蟲放入塗有(OP50+SRG+NGM)的盤中使它生長至 L3。接著將蟲用 M9 清洗並放入 50mM 6-OHDA + 10mM 抗壞血酸溶液 1 小時，最後經 M9 清洗放在(NGM + OP50 + SRG + 5'-fluorodeoxyuridine, FUdR 0.04mg/ml 氟尿苷，可以抑制線蟲生長)盤，三天後即可做實驗。

六、螢光顯微鏡分析

(一) 線蟲標本墊製作

配置 2% Agarous 水溶液，0.2g 溶於 10ml 水中，使用微波爐加熱至沸騰。在溶液為 50-70°C（未凝固）時，取 50 μ l 滴在載玻片上，接著蓋上另片載玻片把膠壓平（注意氣泡，並標記正反面）。等待數分鐘，膠凝固後，室溫下避免光照保存，隔天即可使用。



圖七、標本墊玻片

（二）觀察多巴胺神經元狀況

將製作完成的載玻片標本墊滴一滴麻醉劑（M9 + sodium azide），並從培養皿中挑出較大隻且健康的 BZ555 線蟲。輕輕的蓋上蓋玻片，接著放到螢光顯微鏡下觀察螢光蛋白的表達量以及多巴胺神經元的狀況。若多巴胺神經元的樹突消失、斷裂或周圍出現小泡，代表退化。

（三）線蟲體內自噬測定

將 DA2123 線蟲用 M9 清洗後，放到標本墊上，用螢光顯微鏡觀察其上表皮接縫細胞具綠螢光的蛋白 LGG-1，每隻線蟲至少測量 20 個上表皮接縫細胞，每組測量 50 隻線蟲。

七、食物敏感性測試

用 N2 線蟲對食物的敏感性來測試多巴胺神經元功能使否正常[Fu, R. H. et al, 2022]。首先，將 OP50 塗在 9cm NGM 盤上的部分地區，室溫放置一夜。之後，把經藥物處理的線蟲用 M9 清洗並放入盤中。5 分鐘內，每 20 秒測試線蟲在有菌之處與無菌之處的 S 型移動次數（在線蟲從無食物區進入有食物區時，要有 5 秒的緩衝期不計數），每隻測三次，並算出減速比率，公式：

$$\frac{\text{無食物區 S 型移動次數} - \text{有食物區 S 型移動次數}}{\text{無食物區 S 型移動次數}} \times \%$$

並以 50 隻為一組。

八、線蟲體內 ROS 含量測定

2',7'-二氯二氫螢光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H₂DCFDA)能以還原反應發出螢光，因此可用於測定細胞內的 ROS 含量。將 30 隻經處理的線蟲(N2)用 M9 清洗過後放入內含 150 μ l 的 96 孔盤中，接著加入 50 μ l 的 H₂DCFDA，使用分光光度計測量螢光。每 15 分鐘觀測一次吸光度(absorance)，共 10 次。

九、評估線蟲壽命

把 L3 的 BZ555 線蟲以每組 50 隻移到含有 NGM、OP50、FUDR 或有加 SRG 的盤上，線蟲每 3 天會移到新的盤上。在 L3 線蟲成長至 L4 期之後，每天用解剖顯微鏡觀察線蟲，使用 picker 觸碰線蟲，如果線蟲對細毛或鉑金接觸無反應，代表死亡，持續檢測直到該組的 50 隻線蟲全部死亡。最後用 Kaplan-meier 分析存活率並繪製曲線。

十、取 RNA 及 q-PCR 分析蛋白表現量

取出線蟲組織，加入 TRIzol 試劑和玻璃珠取出線蟲全部 RNA。用 SuperScript 一步式 RT-PCR kit 將 RNA 反轉錄成 cDNA 並用 SYBR Green I Master kit 標記，放入 q-PCR 機器中，使用 act-1 當做控制基因。最後使用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 分析法。

表一、PCR 引子基因序列

線蟲基因	引子基因序列
Pdr-1	正向：5'-CGGCGGTCTGCGAAGAATGC-3' 反向：5'-TCCTTCCCATCACAAACACAGCAC-3'
Sir-2.1	正向：5'-AGAACGCGCATTTCGCCATATTAAG-3' 反向：5'-ATACTGACACTCCAGCGCCAG-3'

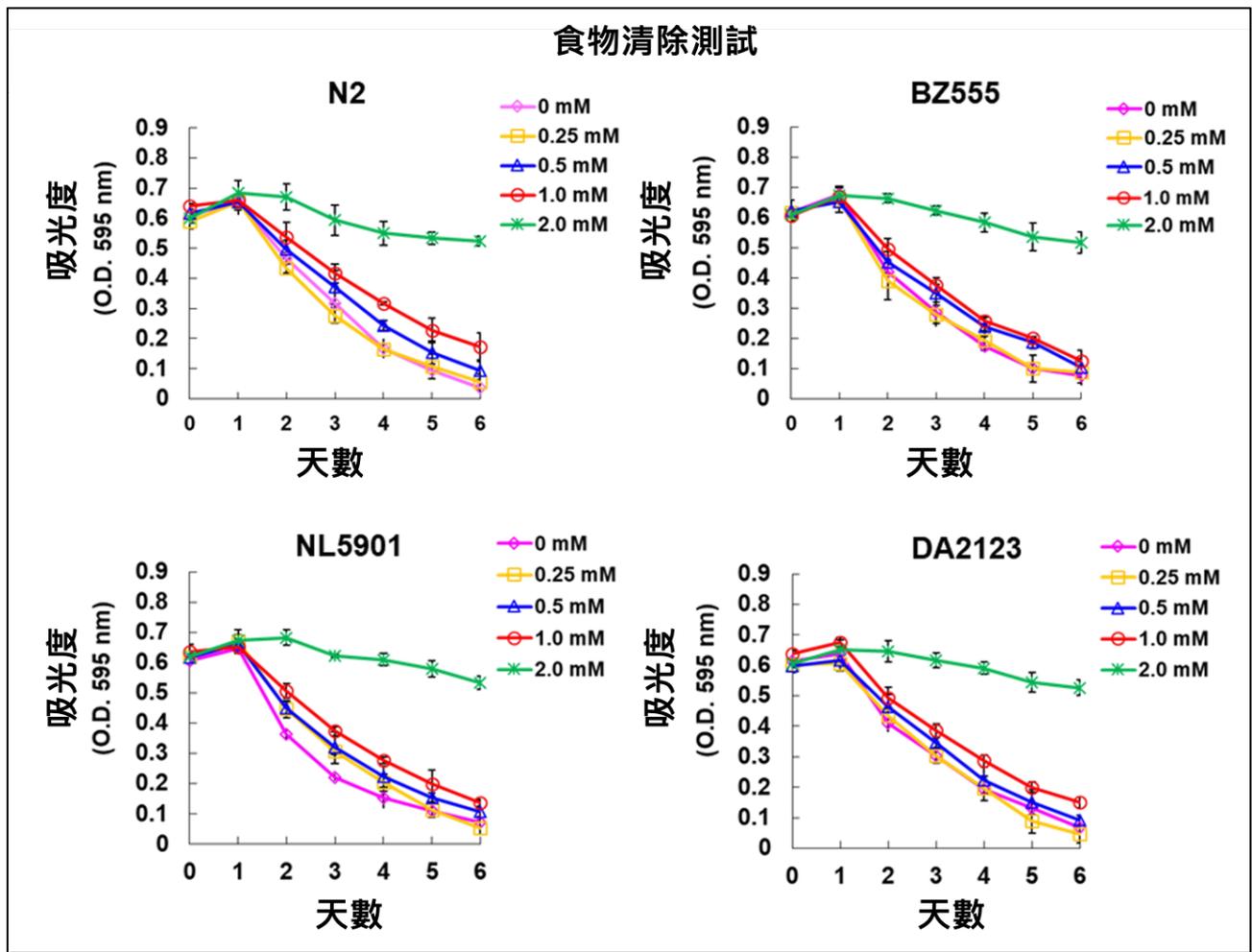
act-1 (控制)	正向：5'-CGCCATCCTCCGTCTTGA CTTG-3' 反向：5'- GCTCAGCGGTGGTGGTGA AAG-3'
------------	--

十一、圖表繪製與軟體分析

用 imageJ 量化並用 Graphpad prism9 製作圖表。

肆、研究結果

一、食物清除測試



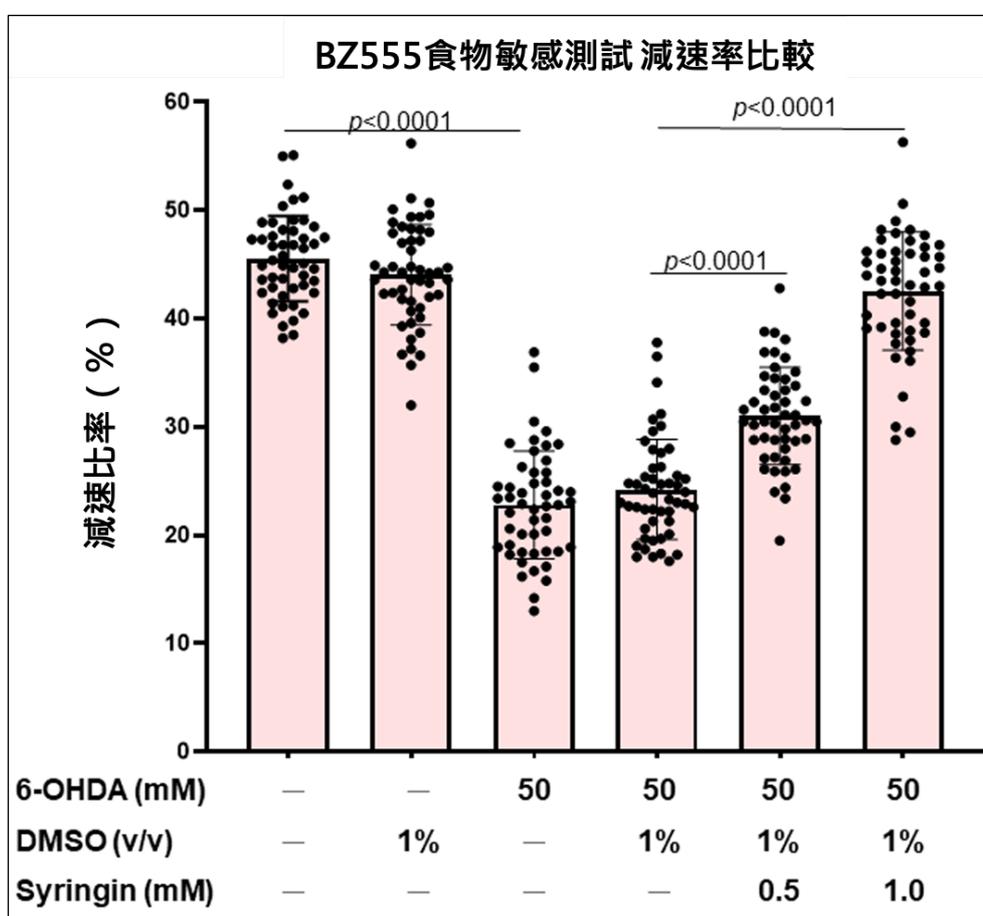
圖七、連 6 天 OP50 的吸光值

為了找出適合的 SRG 濃度，我們利用食物清除測試，評估不同濃度的 SRG 對線蟲生長情況的影響。線蟲經不同濃度的 SRG 處理後，置入含 S-Medium + OP50 的 96 孔盤中，

連續 6 天用分光光度計測量其吸光度 (OD 值);OD 值越大，表示 OP50 的剩餘含量越多，意味著線蟲可能受到 SRG 的影響而未進食，表示該濃度對線蟲的生長是有害的。

根據圖七，在四種線蟲品系中，SRG 濃度為 2.0mM 時，OD 值明顯高於其他濃度的數值；當 SRG 濃度為 1.0mM 時，其數據下降曲線與其他更低濃度及未處理組別間的下降曲線無明顯差異，此結果顯示 SRG 濃度為 1.0mM 時對線蟲並無影響，而當 SRG 的濃度大於 1.0mM 時，則顯著性的影響其生長，因此後續我們將以最高達 1.0mM 的 SRG 進行實驗。

二、食物敏感測試



圖八、BZ555 食物清除測試減速率比較圖

為了檢測線蟲的多巴胺神經元功能是否正常，我們選用 BZ555 品系的線蟲進行食物敏感測試，並觀察線蟲在進入塗有 OP50 的區域後為了吃食物而減慢 S 型移動速度的情形，公式如下：

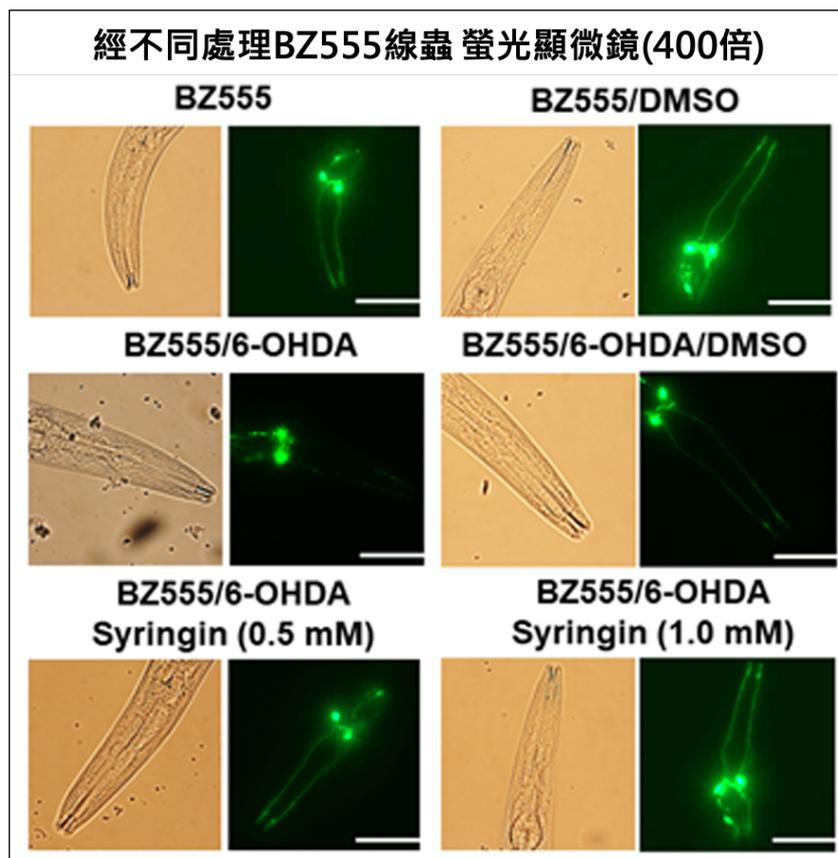
$$\frac{\text{無菌處 S 型移動次數} - \text{有菌處 S 型移動次數}}{\text{無菌處 S 型移動次數}} \times \%$$

根據圖八的實驗結果，控制組與 DMSO (1%) 間無顯著差異，此結果確保 DMSO 作為溶劑並無影響。而在控制組與添加 6-OHDA (50mM) 兩組別間線蟲減速比率具有顯著性的下降 ($p < 0.0001$)，約降低 23%，此結果顯示 6-OHDA 確實造成線蟲多巴胺神經元功能的異常。而分別比較添加 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%) 與 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (0.5mM) 及 OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (1.0mM) 三組別後，可明顯觀察到 SRG 與線蟲減速比率存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 濃度的上升，線蟲減速比率具有顯著性的上升趨勢，此結果顯示，SRG 具有修復因 6-OHDA 引發的多巴胺神經元功能的異常。

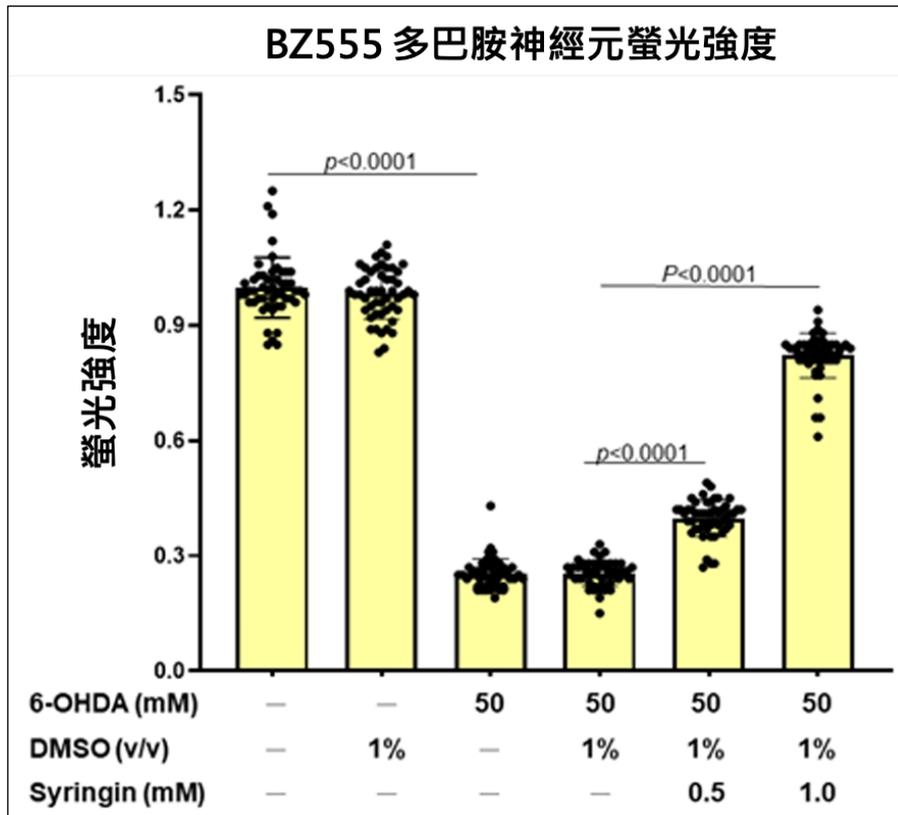
三、利用螢光顯微鏡觀察與量化螢光強度

(一) 多巴胺神經元的結構與功能分析

1. dat-1p 蛋白的螢光強度分析



圖九、螢光顯微鏡下的 BZ555 線蟲 (X 400) 左：明視野 右：綠螢光

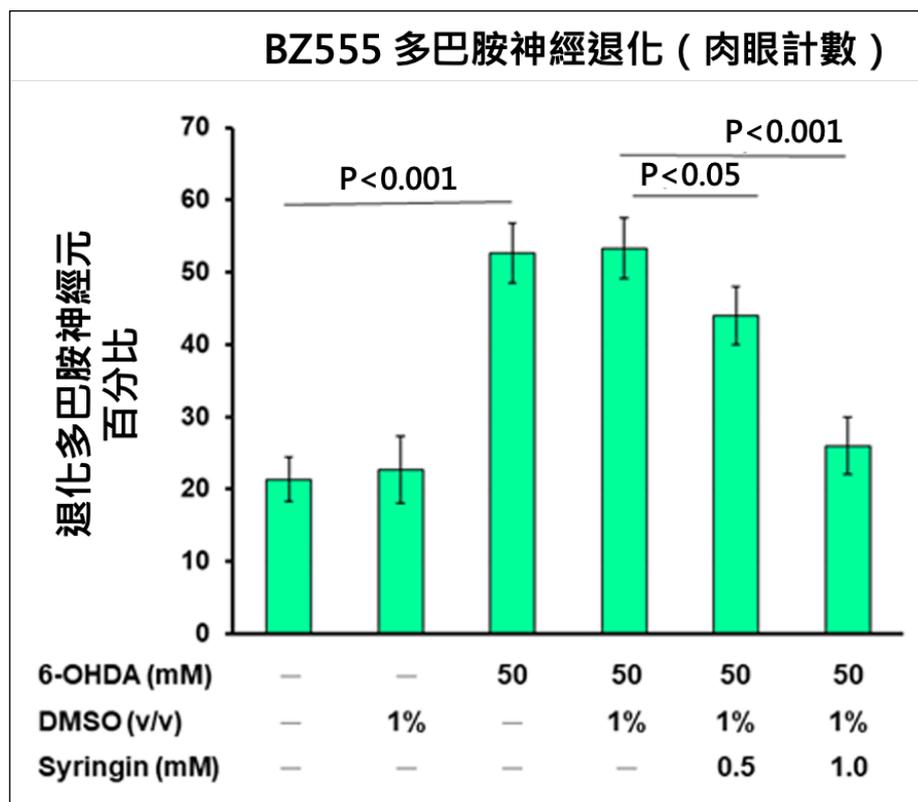


圖十、螢光蛋白螢光強度 dat-1p 蛋白

根據圖九的實驗結果，中右邊螢光照片可以觀察到線蟲頭部具有兩個較亮的綠點（四顆聚集），即為線蟲的多巴胺神經元中的螢光蛋白—dat-1p，而延伸出去的細線，是多巴胺神經元的軸突，當軸突的螢光減弱消失或斷裂，可視為多巴胺神經元退化。

將圖九的實驗結果量化後可得圖十，綜合兩張圖的結果顯示經過 6-OHDA (50mM) 處理後的線蟲不僅降低了多巴胺神經元的亮度，還使軸突消失；而在經 SRG 處理後能恢復神經元的亮度，並保持軸突的完整性。而比較 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%) 與 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (0.5mM) 及 OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (1.0mM) 三組別後，可明顯觀察到 SRG 與螢光蛋白的螢光強度存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 濃度的上升，螢光強度具有顯著性的上升趨勢。

2. 肉眼判斷多巴胺神經元缺陷的線蟲百分比

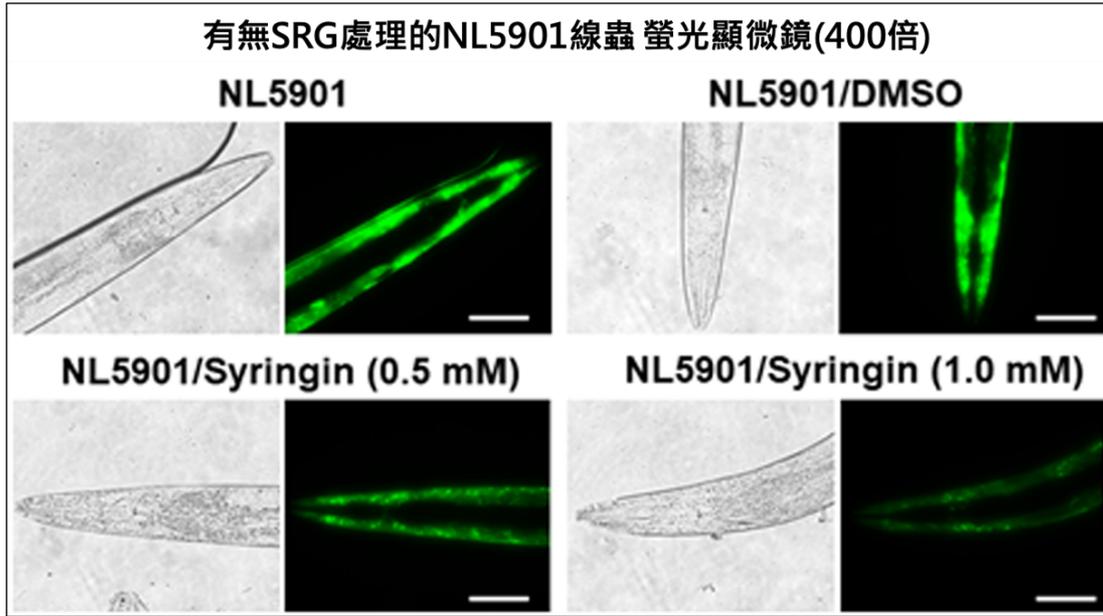


圖十一、肉眼判斷多巴胺神經元缺陷線蟲百分比

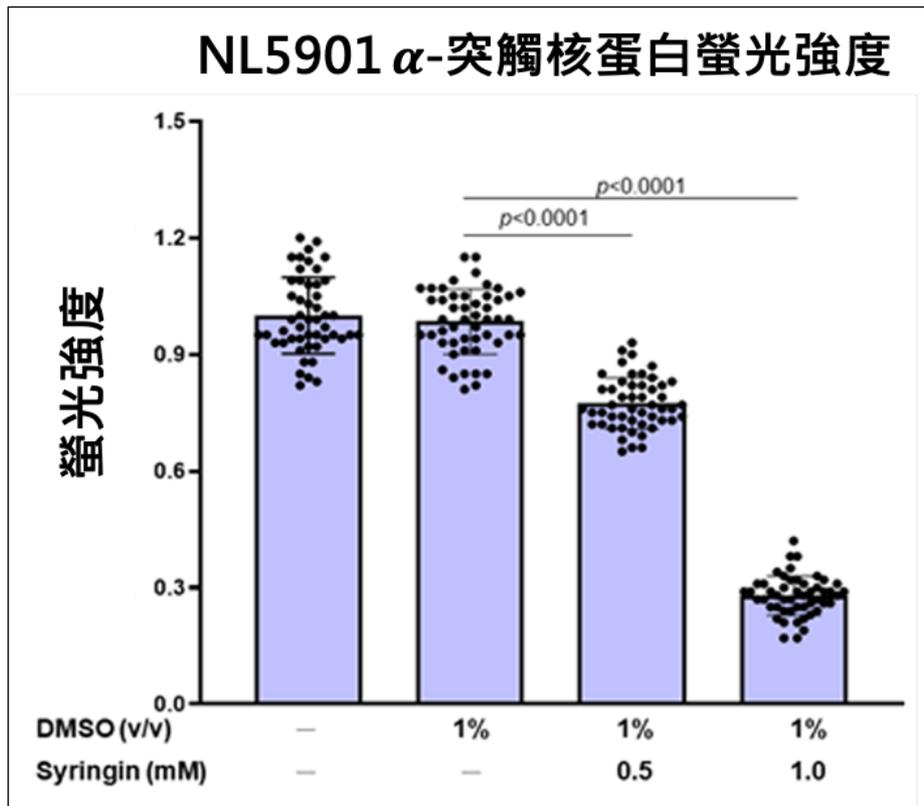
雖然上述數據顯示在螢光蛋白強度上，SRG 能修復 6-OHDA 引發的多巴胺神經元結構與功能的異常，但我們更進一步透過肉眼觀察線蟲的軸突是否具有起泡、斷裂或消失，以作為判斷其神經元是否退化 (每組 50 隻) 的證據，並計算每組多巴胺神經元有缺陷的線蟲百分比。

根據圖十一的實驗結果，控制組與加入 DMSO (1%) 的組別間無顯著差異。再由比較控制組與加入 6-OHDA (50mM) 的組別，顯示加入 6-OHDA 可使多巴胺神經退化 ($p < 0.0001$)。而比較 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%) 與 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (0.5mM) 及 OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (1.0mM) 三組別後，可明顯觀察到 SRG 與多巴胺神經元缺陷線蟲百分比存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 濃度的上升，多巴胺神經元缺陷線蟲百分比有顯著性的下降趨勢。綜合圖九、十與十一，實驗結果顯示 SRG 具有修復因 6-OHDA 引發的多巴胺神經元結構與功能異常。

(二) α -突觸核蛋白螢光強度分析



圖十二、螢光顯微鏡下的 NL5901 線蟲(400 倍) 左：明視野 右：綠螢光

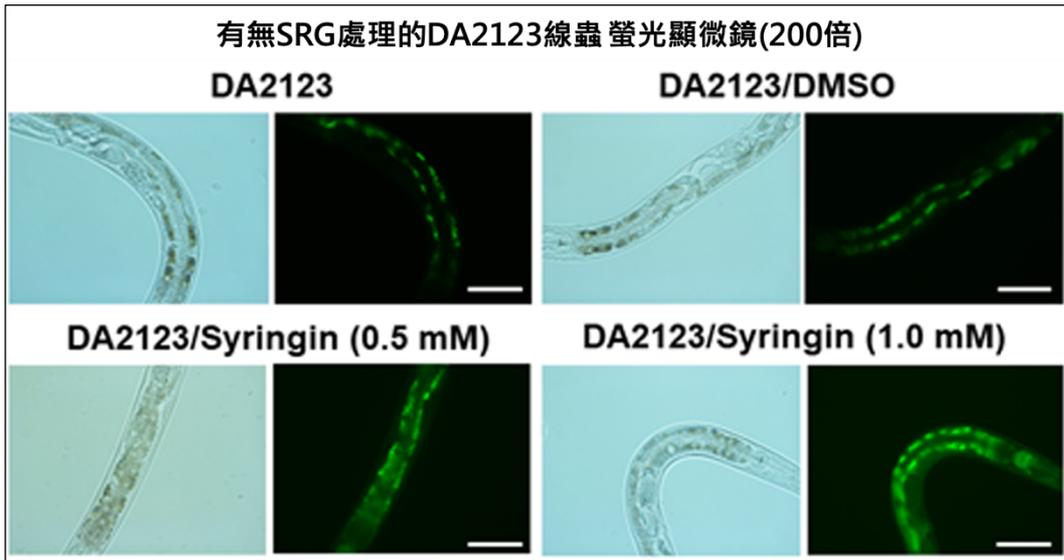


圖十三、螢光蛋白 α -突觸核蛋白螢光強度

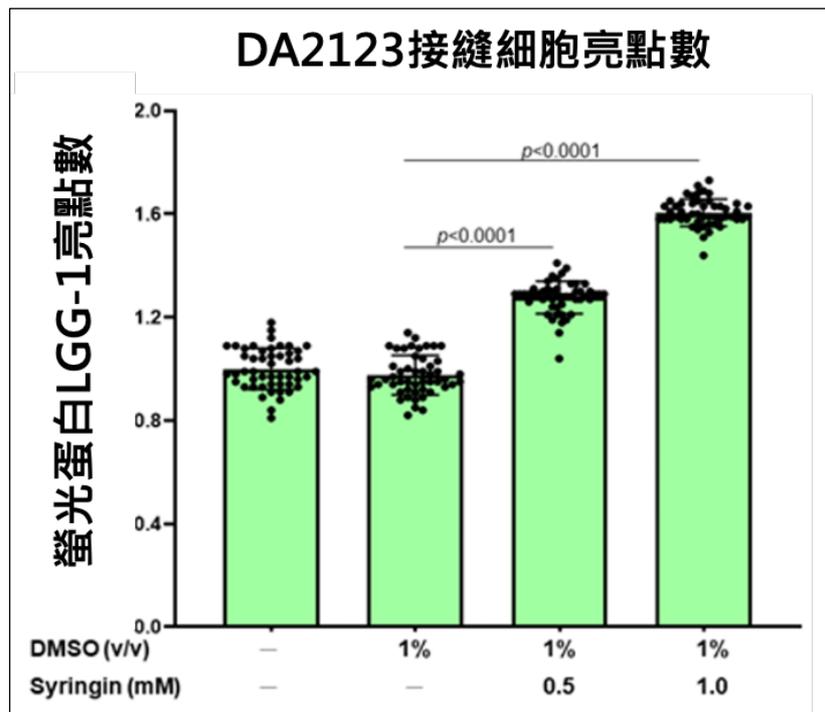
在圖十二中可看到 NL5901 品系之線蟲在螢光顯微鏡下身體周遭圍繞著帶綠螢光的 α -突觸核蛋白， α -突觸核蛋白的聚集體具神經毒性，會破壞細胞，是 PD 的發病機制之一，螢光亮度愈高表示 α -突觸核蛋白聚集愈多。

根據圖十三顯示，控制組與 DMSO (1%) 之間並未無明顯的差異。而比較控制組與 DMSO (1%)、SRG (0.5mM) 及 DMSO (1%)、SRG (1.0mM) 三組別後，可明顯觀察到 SRG 與 α -突觸核蛋白螢光強度存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 濃度的上升， α -突觸核蛋白螢光強度具有顯著性的下降趨勢，此結果顯示 SRG 具有分解 α -突觸核蛋白聚集的功能。

(三) 線蟲自噬量分析



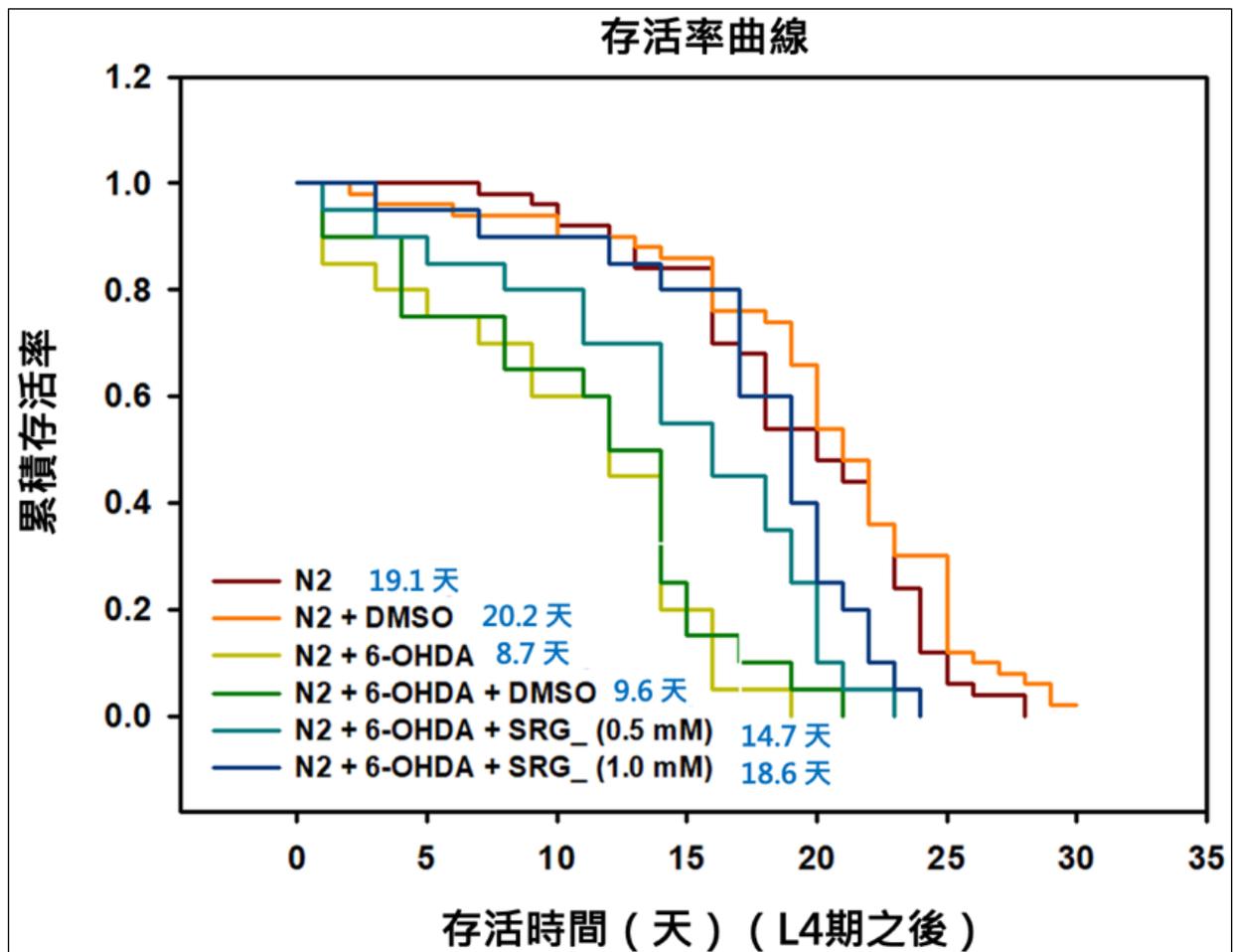
圖十四、螢光顯微鏡下的 DA2123 線蟲(200 倍) 左：明視野 右：綠螢光



圖十五、DA2123 接縫細胞螢光亮點數

經基因轉殖的 DA2123 品系之線蟲，能在表皮接縫細胞中表現出具綠螢光的 LGG-1，與人類的 LC3 蛋白具同源關係 (Fu, R. H. et al 2022)，LC3 是自噬體 (autophagosome) 的一部分 (Palmisano, N. J., & Meléndez, A., 2016)，可做為自噬作用是否發生的判斷依據。根據圖十四的螢光照片中，能看見表皮下方的綠螢光斑點，即為接縫細胞中的 LGG-1 蛋白。將其放大到 400 倍之後計算線蟲體內的亮點數。將圖十四的結果量化後進行比較 (圖十五)。控制組與 DMSO (1%) 之間並未無明顯的差異。而比較控制組與 DMSO (1%)、SRG (0.5mM) 及 DMSO (1%)、SRG (1.0mM) 三組別後，可明顯觀察到 SRG 與接縫細胞螢光亮點數存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 濃度的上升，接縫細胞螢光亮點數具有顯著性的上升趨勢，此結果顯示 SRG 具有促進細胞發生細胞自噬的功能。

四、線蟲存活率分析

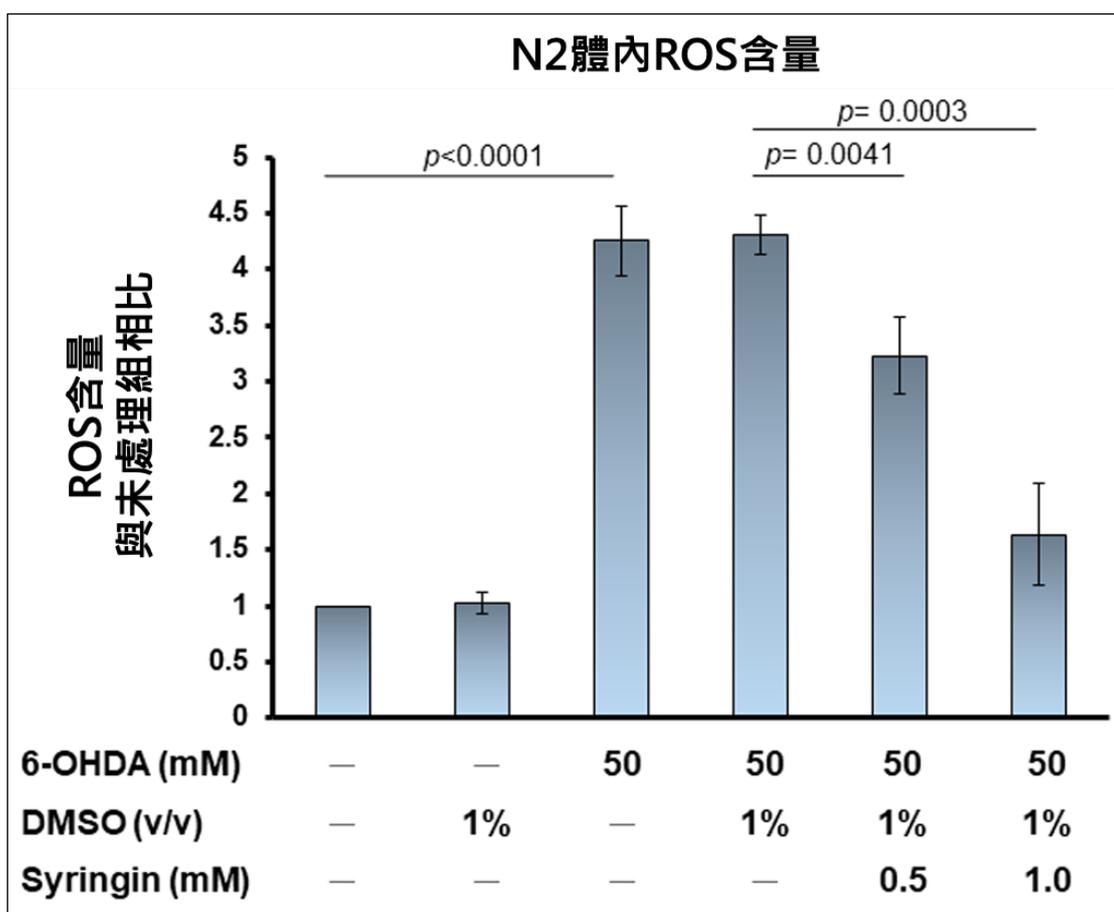


圖十六、N2 線蟲 L4 期之後的存活率曲線

根據文獻指出罹患 PD 可造成壽命的縮短 (Silver D., 2006)，因此我們想了解線蟲經 6-OHDA 和 SRG 處理後與壽命長短的關係，我們將不同處理方式的 6 種線蟲，培養至 L4 期後，每日進行存活確認 (每組 50 隻)，直到線蟲死光。最後用 Kaplan-meier 分析法算出累加的存活率並算出平均存活天數。

圖十六顯示，控制組與 DMSO (1%) 間並無顯著差異，但在線蟲經 6-OHDA (50mM) 處理後，壽命有明顯縮短。而比較 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%) 與 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (0.5mM) 及 6-OHDA (50mM)、DMSO (1%)、SRG (1.0mM) 三組別後，可明顯觀察到 SRG 與線蟲生存天數存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 濃度的上升，線蟲生存天數有顯著性的上升趨勢。而當濃度為 SRG (1.0mM) 時其生存天數 (18.6 天) 與控制組天數 (19.1 天) 間並無顯著差異。

五、線蟲體內 ROS 含量分析

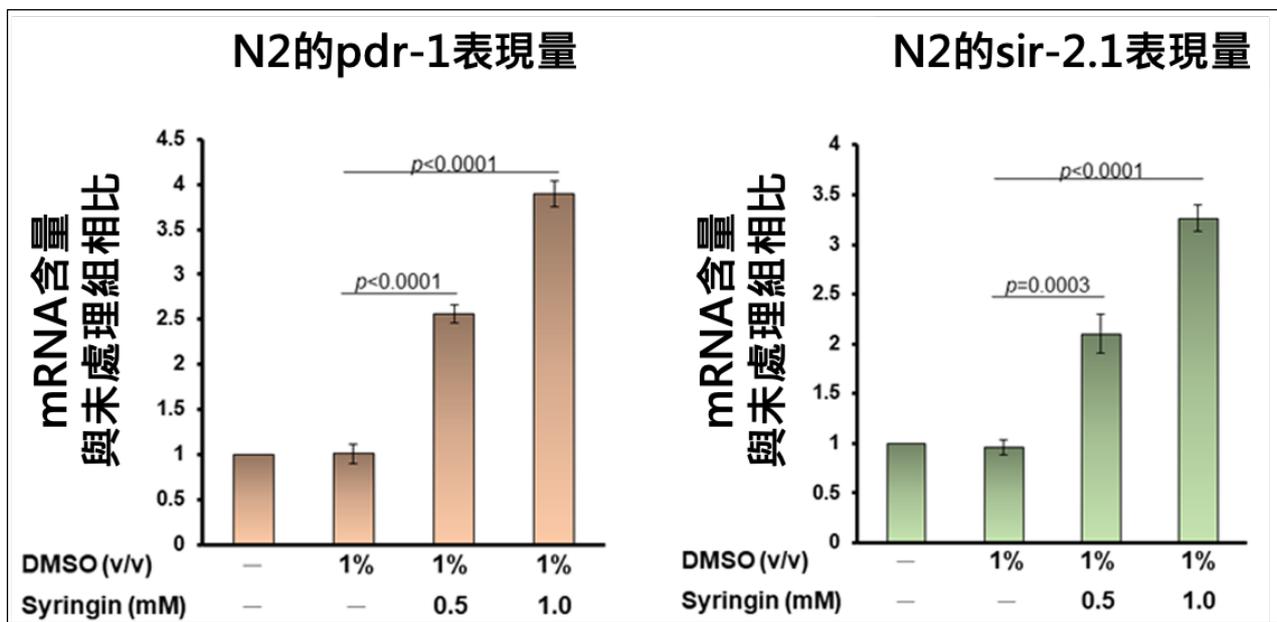


圖十七、線蟲體內 ROS 含量

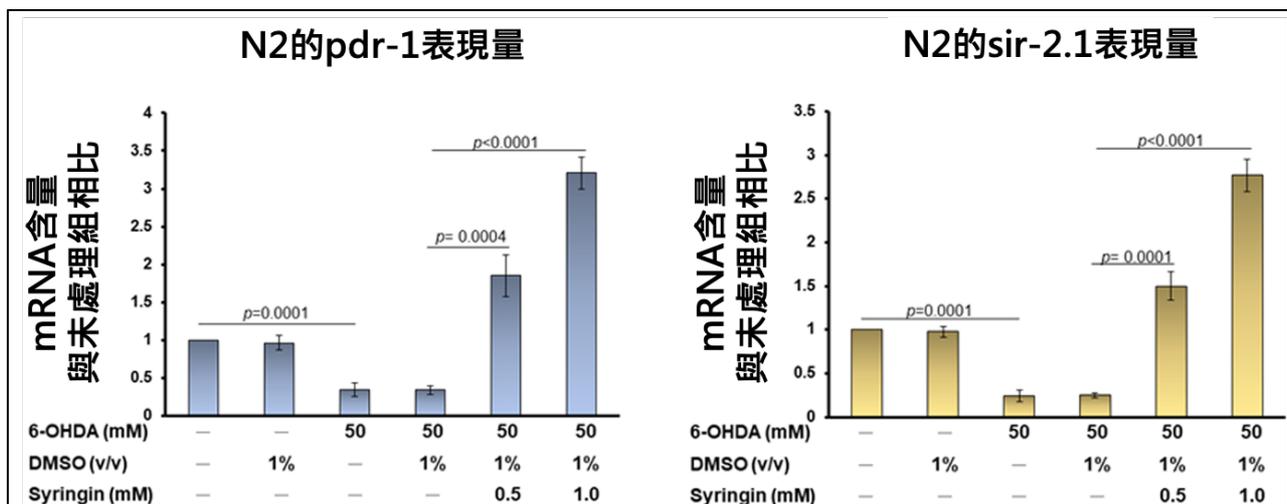
6-OHDA 誘導 PD 的原理是透過破壞粒線體電子傳遞鏈導致細胞內活性氧物質(ROS)的增加,加速細胞退化、凋亡。因此我們檢測了線蟲體內的 ROS 含量。可明顯觀察到 SRG 與線蟲體內 ROS 含量存在濃度依賴性的關係,隨著 SRG 濃度的上升,線蟲體內 ROS 含量有顯著性的下降趨勢。

六、q-PCR 蛋白表現量分析

我們進一步對探討 SRG 對細胞自噬的影響,以及分析可能的作用機制。初步對 Sirt1-PINK-Parkin 通路做檢測。為了測定 Parkin 下游蛋白與上游蛋白 Sir2.1 (與 Sirt1 同源) 的表現量,我們用 q-PCR 檢測 mRNA (sir2.1/pdr-1) 含量。



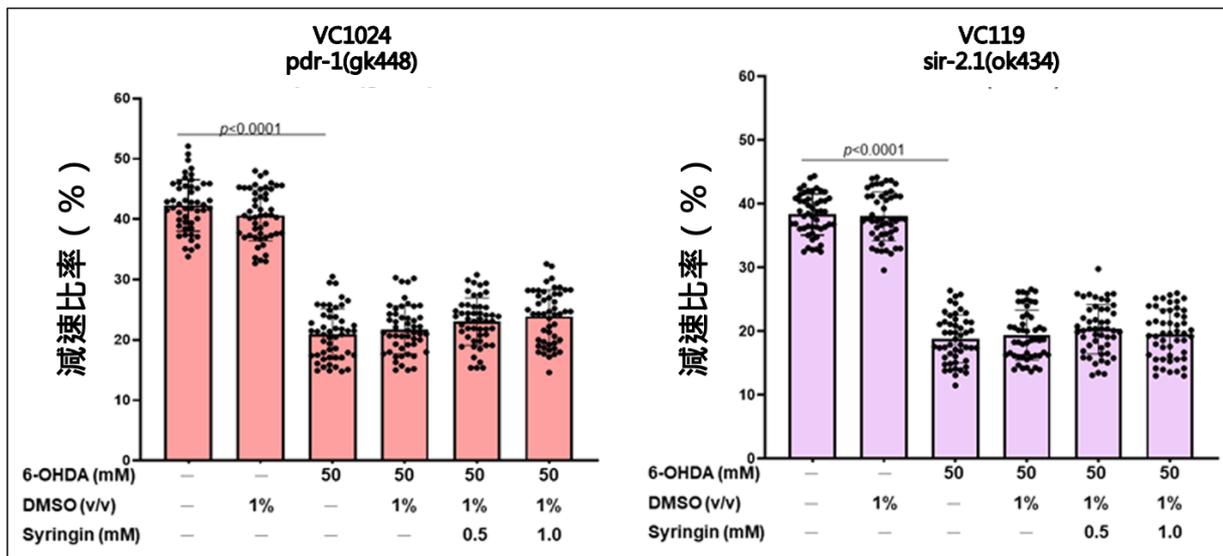
圖十八、線蟲體內 mRNA 含量 (無添加 6-OHDA)



圖十九、線蟲體內 mRNA 含量 (添加 6-OHDA)

從圖十八可觀察到，隨著 SRG 濃度的上升， pdr-1 與 sir2.1 的 mRNA 含量有顯著性的上升趨勢。根據圖十九的實驗結果，比較控制組與添加 6-OHDA (50mM) 可觀察到添加 6-OHDA 使 pdr-1 與 sir2.1 的 mRNA 表現量顯著性的下降；而添加 SRG 後，可明顯觀察到 SRG 與 pdr-1 與 sir2.1 的 mRNA 表現量存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 濃度的上升，pdr-1 與 sir2.1 的 mRNA 表現量有顯著性的上升趨勢。此結果顯示，SRG 藉由參與 Sirt1-PINK-Parkin 通路影響著線蟲的細胞自噬。

七、pdr-1、Sir2.1 基因缺陷之線蟲食物敏感測試



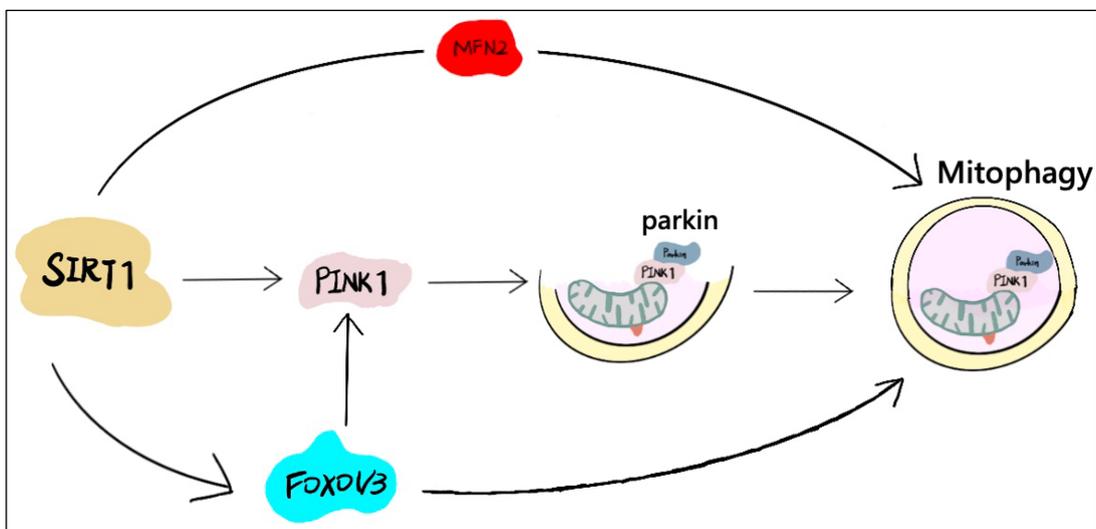
圖二十、基因缺陷線蟲食物敏感測試

我們分別對 pdr-1 與 Sir2.1 基因缺陷的線蟲 vc1024 與 vc119 進行食物敏感測試，以驗證圖十九的實驗結果。根據圖二十的結果顯示，與控制組相比，經 6-OHDA (50mM) 處理後的組別其減速率具顯著性的下降 ($p < 0.0001$)。而分別添加 SRG (0.5mM) 及 SRG (1.0mM) 的組別，並未觀察到與圖十九相同的濃度依賴性關係。意味著 VC1024 與 VC119 的 Sirt1-PINK-Parkin 通路受到破壞，即使添加 SRG 也無法影響任何反應。綜合圖十九與圖二十，SRG 透過調節 Sirt1-PINK-Parkin 影響線蟲的自噬作用，進而影響線蟲的運動表現、神經元結構與功能及生存率。

伍、 討論

巴金森氏症中導致多巴胺神經元退化的兩大主因為 α -突觸核蛋白的堆積與細胞內 ROS 量的增加，而自噬作用與兩者間存在著交互作用， α -突觸核蛋白會導致粒線體功能障礙與溶體損傷 (Gómez-Benito et al, 2020)。伴隨而來的 ROS 含量增加會破壞細胞內的蛋白質、DNA、RNA 與脂質，導致細胞內各種酵素的活性受到影響，進而加速細胞凋亡 (Ray, P. D. et al, 2012)。

Sirt1 參與許多細胞內的反應，包括細胞自噬與粒線體自噬，Sirt1 能以多種途徑活化這兩種反應 (Wan, W. et al, 2022)。而 Parkin 是種泛素連接酶，能泛素化粒線體外膜蛋白促使粒線體自噬，PINK1 則是調控 Parkin 的上游蛋白 (Jin, S. M., & Youle, R. J., 2012) (圖二十一)。



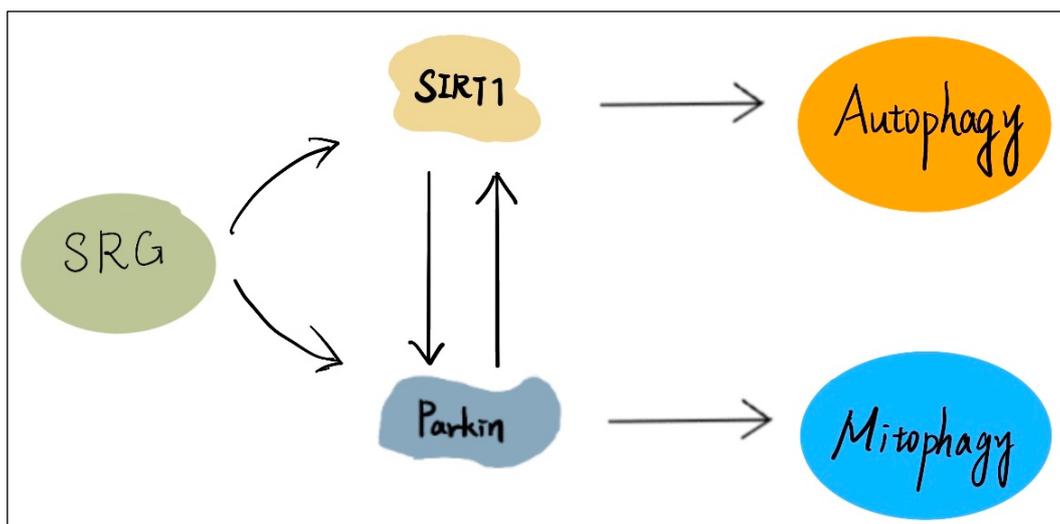
圖二十一、Sirt1 影響粒線體自噬

在我們的實驗結果中，我們觀察到 SRG 與 dat-1p 蛋白的螢光強度、 α -突觸核蛋白的聚集與 ROS 的含量間存在濃度依賴性的關係，隨著 SRG 的濃度上升，多巴胺神經元的結構與功能出現修復與維持的現象，而在 α -突觸核蛋白的聚集與 ROS 的含量也出現顯著性的下降趨勢，這些結果伴隨著線蟲的運動行為改善與生存率的上升。

我們利用基因缺陷的線蟲 (VC1024 與 VC119) 探討 SRG 可能參與的訊息傳遞路徑，根據 q-PCR、基因缺陷線蟲的實驗結果，發現 SRG 的主要作用途徑是 Sirt1-PINK1-Parkin 通路，SRG 能分別增加 Sirt1 與 Parkin 的表現量，Sirt1 增加後，能促進細胞自噬並以 Sirt1-PINK1-Parkin 激活粒線體自噬。Parkin 增加後，能選擇性的對損傷的粒線體進行自噬 (Narendra, D. et al, 2008)，大量將粒線體外膜的蛋白泛素化並引起粒線體自噬 (Jin, S. M., & Youle, R. J., 2012)。

在自噬作用增加後，能將錯誤 α -突觸核蛋白與其他異常的蛋白降解，粒線體自噬將異常的粒線體分解，能降低細胞內的 ROS，降低氧化應激反應，保護多巴胺神經元與維持功能，進而改善巴金森氏症的發生。

SRG 對 Sirt1 與 Parkin 的作用 (圖二十二)，因為這兩種蛋白的關係複雜，在此作用下尚不清楚何者為上游何者為下游，或是兩者具有複雜的交互作用關係，需要後續建立細胞模型以便分析 SRG 對細胞自噬所影響的訊息傳遞途徑進行更深入的探討。



圖二十二、SRG 可能的作用途徑

陸、 結論與應用

- 一、SRG 在 1mM 以下對線蟲較無影響
- 二、SRG 能減緩因 6-OHDA 所引起之減速比率下降趨勢
- 三、SRG 能修復與維持因 6-OHDA 所引起之多巴胺神經元的結構與功能的破壞
- 四、SRG 能減緩因 6-OHDA 所引起之 α -突觸核蛋白的聚集
- 五、SRG 能減緩因 6-OHDA 所引起之生存率下降趨勢
- 六、SRG 能降低因 6-OHDA 所引起之 ROS 含量上升趨勢
- 七、SRG 透過激活 SIR2.1-PINK-Parkin 通路促進細胞自噬
- 八、SRG 可做為治療巴金森氏症的天然小分子候選藥物

巴金森氏症目前沒有針對發病機制的療法，大部分都是症狀表面的改善，治標不治本。SRG 此種從植物萃取的小分子化合物能從機制部分進行改善，擁有治療巴金森氏症的潛力。而 SRG 具有促進自噬的特性，除了可用來治療退化性神經疾病，也希望在未來可用於治療跟自噬相關的疾病上。

柒、 參考文獻資料

1. A., Nazir, A., Brady, D., Vere, K., Richens, J., O'Shea, P., Bell, D. R., & de Pomerai, D. (2012). Effects of α -synuclein overexpression in transgenic *Caenorhabditis elegans* strains. *CNS & neurological disorders drug targets*, 11(8), 965–975.
2. Antonina Kouli, Kelli M. Torsney, and Wei-Li Kuan. (2018) Brisbane (AU): Codon Publications
3. Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 65(2), 135–172.
4. Chen, Y., Scarcelli, V., & Legouis, R. (2017). Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Cells*, 6(3), 27.
5. Cooper, J. F., & Van Raamsdonk, J. M. (2018). Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *Journal of Parkinson's disease*, 8(1), 17–32. <https://doi.org/10.3233/JPD-171258>
6. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. In: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. Pasadena (CA): WormBook; 2005-2018.
7. Fu, R. H., Tsai, C. W., Liu, S. P., Chiu, S. C., Chen, Y. C., Chiang, Y. T., Kuo, Y. H., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2022). Neuroprotective Capability of Narcissoside in 6-OHDA-Exposed Parkinson's Disease Models through Enhancing the MiR200a/Nrf-2/GSH Axis and Mediating MAPK/Akt Associated Signaling Pathway. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(11), 2089.
8. Gómez-Benito, M., Granada, N., García-Sanz, P., Michel, A., Dumoulin, M., & Moratalla, R. (2020). Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Frontiers in pharmacology*, 11, 356.
9. Jin, S. M., & Youle, R. J. (2012). PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *Journal of cell science*, 125(Pt 4), 795–799.

10. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*, *183*(5), 795–803.
11. Palmisano, N. J., & Meléndez, A. (2016). Detection of Autophagy in *Caenorhabditis elegans* Using GFP::LGG-1 as an Autophagy Marker. *Cold Spring Harbor protocols*, *2016*(1), pdb.prot086496.
12. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, *20*(3), 460–473.
13. Qiao, H., Ren, H., Du, H., Zhang, M., Xiong, X., & Lv, R. (2018). Liraglutide repairs the infarcted heart: The role of the SIRT1/Parkin/mitophagy pathway. *Molecular medicine reports*, *17*(3), 3722–3734.
14. Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, *24*(5), 981–990.
15. Silver D. Impact of functional age on the use of dopamine agonists in patients with Parkinson disease. *Neurologist*. 2006;12:214–223. doi: 10.1097
16. Wan, W., Hua, F., Fang, P., Li, C., Deng, F., Chen, S., Ying, J., & Wang, X. (2022). Regulation of Mitophagy by Sirtuin Family Proteins: A Vital Role in Aging and Age-Related Diseases. *Frontiers in aging neuroscience*, *14*, 845330.
17. Wang, C. Y., Zhang, Q., Xun, Z., Yuan, L., Li, R., Li, X., Tian, S. Y., Xin, N., & Xu, Y. (2020). Increases of iASPP-Keap1 interaction mediated by syringin enhance synaptic plasticity and rescue cognitive impairments via stabilizing Nrf2 in Alzheimer's models. *Redox biology*, *36*, 101672.
18. Winslow, A. R., Chen, C. W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., Lichtenberg, M., Menzies, F. M., Ravikumar, B., Imarisio, S., Brown, S., O'Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2010). α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *The Journal of cell biology*, *190*(6), 1023–1037.
19. Zhang H, Gu H, Jia Q, Zhao Y, Li H, Shen S, Liu X, Wang G, Shi Q. Syringin protects against colitis by ameliorating inflammation. *Arch Biochem Biophys*. 2020 Feb 15;680:108242. doi: 10.1016/j.abb.2019.108242. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31899146.

【評語】 052010

本研究以秀麗隱桿線蟲作為實驗對象，並且模擬了巴金森氏症的神經退化特徵，因線蟲身體透明易觀察，且品系很多可因應各種實驗需求，是很好進行實驗分析的模式物種。

本研究整體設計完成度相當高，仍有一些建議：

1. 該研究提到 Syringin 通過激活 Sir2.1-PINK1-Parkin 路徑來促進自噬，恢復退化的多巴胺神經元，但未提供足夠的實驗結果和機制解釋來支持這一假設。缺乏對 Syringin 與該訊息傳遞路徑之間關係的詳細研究，限制了對其作用機制的全面了解；
2. 該研究僅使用秀麗隱桿線蟲作為實驗對象，並且只模擬了巴金森氏症的神經退化特徵。秀麗隱桿線蟲與人類之間存在很大的生物學差異，因此研究結果不能直接應用於人類身上，並且可能無法全面解釋巴金森氏症的複雜病理機制；
3. 有些重要分子或機制解釋不夠完整，也沒有提供說明，如：6-OHDA 全名是什麼、用它的原因與理由為何。

作品海報

丁香樹皮萃取物Syringin在巴金森氏症動物模型
效用之評估與機制探討

研究背景

巴金森氏症 (Parkinson's Disease, PD) 是一種退化性神經疾病。此疾病是由於黑質部退化而導致多巴胺分泌不足，進一步造成運動障礙。巴金森氏症發病涉及多種機制，包含 α -突觸核蛋白的錯誤折疊與堆積、粒線體功能異常、細胞內的活氧物質增加(reactive oxygen species, ROS)增加和自噬 (autophagy) 功能發生障礙。



細胞自噬與PD之間有著緊密的關聯，若自噬發生障礙，可能引發PD。我們想針對自噬與PD之間進行探討，而Sirt1-Parkin通路是自噬中非常重要的通路。Sirt1能夠促進Parkin表現，而Parkin能引發細胞自噬。

小分子藥物被看好能夠治癒PD，有許多小分子藥物能從植物中被萃取出來。小分子藥物 - 丁香苷(Syringin, SRG)。SRG已被證實具有抗氧化及免疫調節的功能等。但目前還未出現SRG與PD的研究。

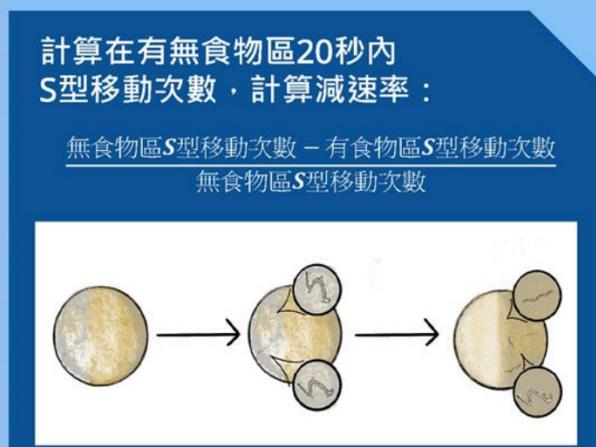
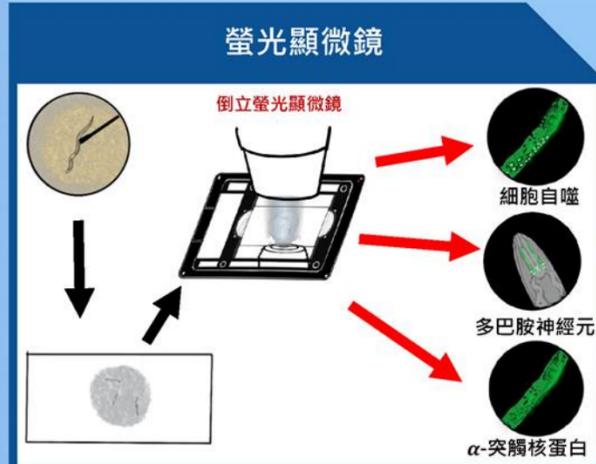
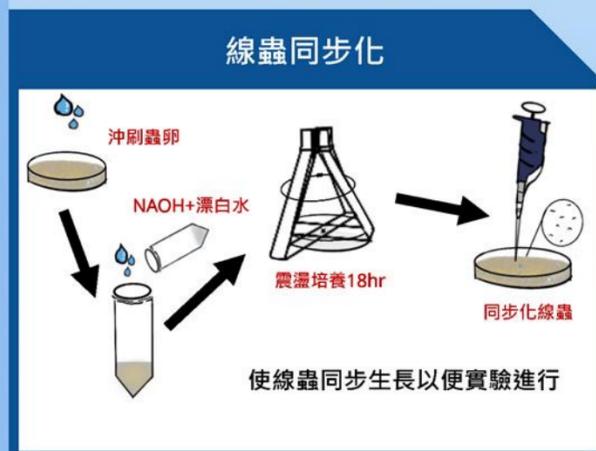


秀麗隱桿線蟲(C. elegans) 因具有一套完整的神經系統、短暫生命週期及易於調控的基因，使其適合研究老化，並且透明的身體也便於觀察螢光。此外，線蟲已被證實可以用6-OHDA 來促進 PD 的發病

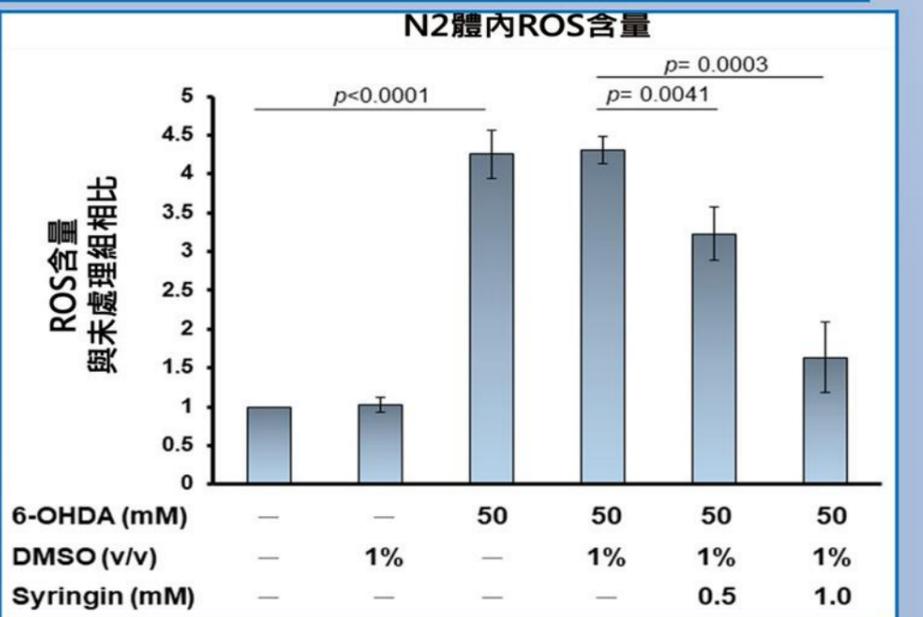
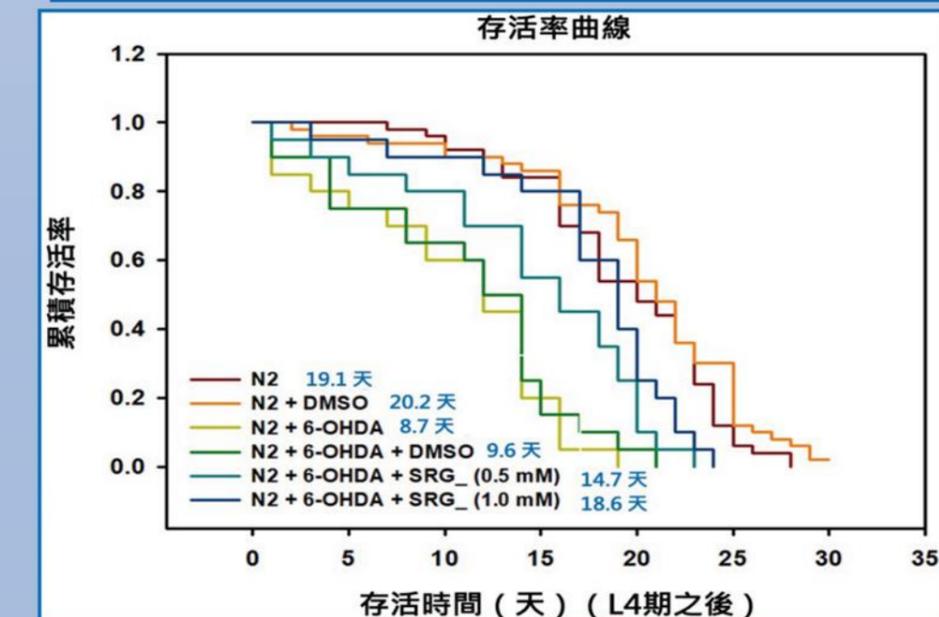
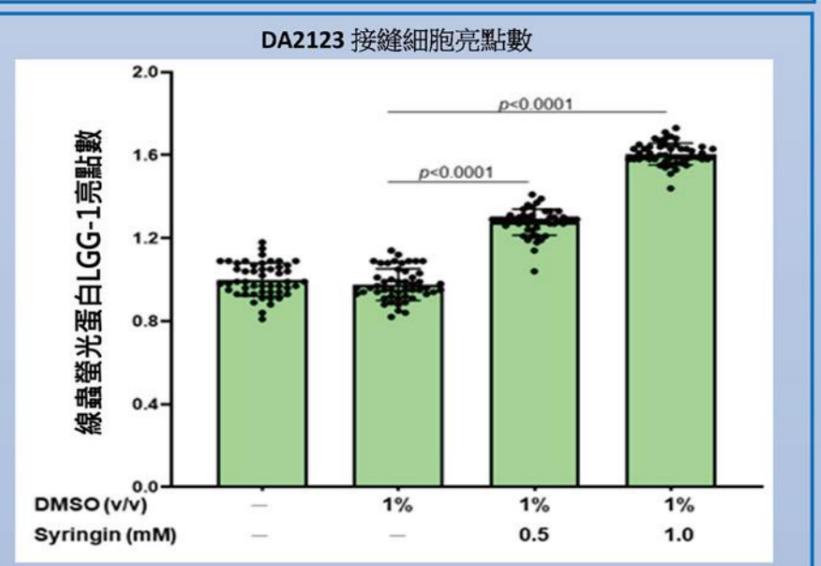
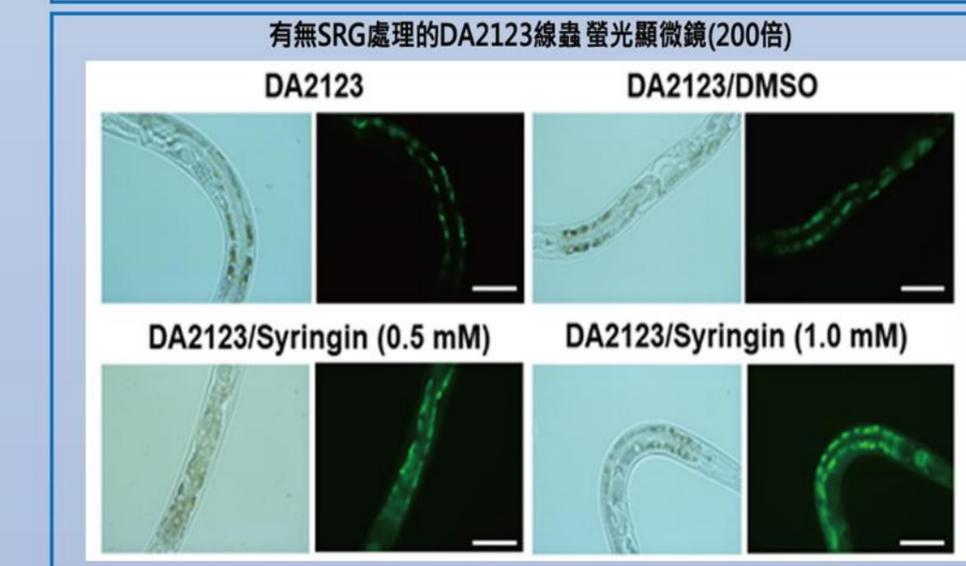
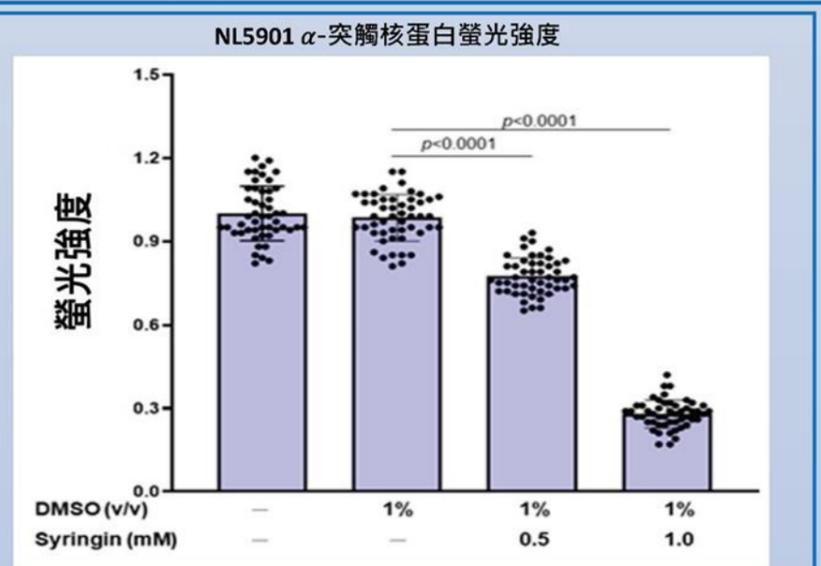
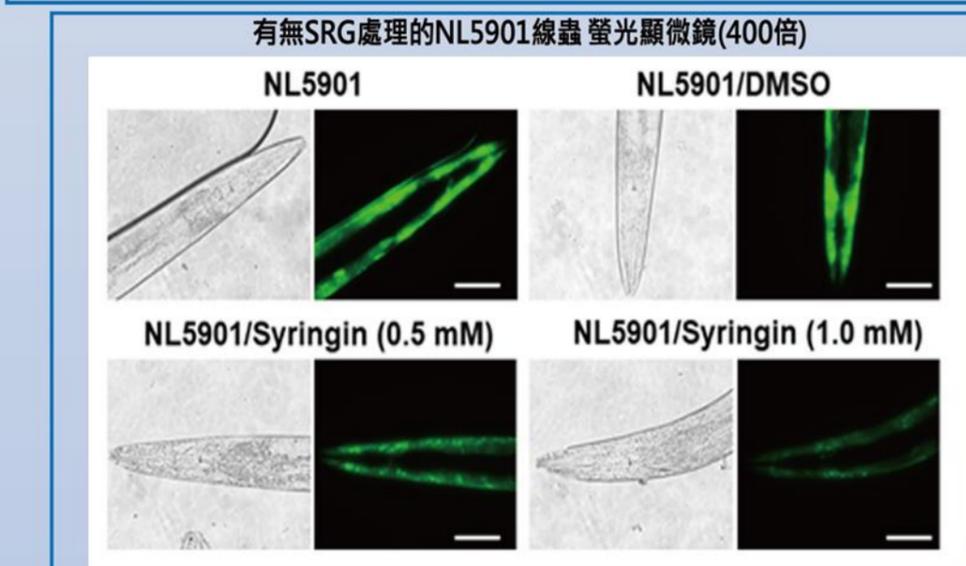
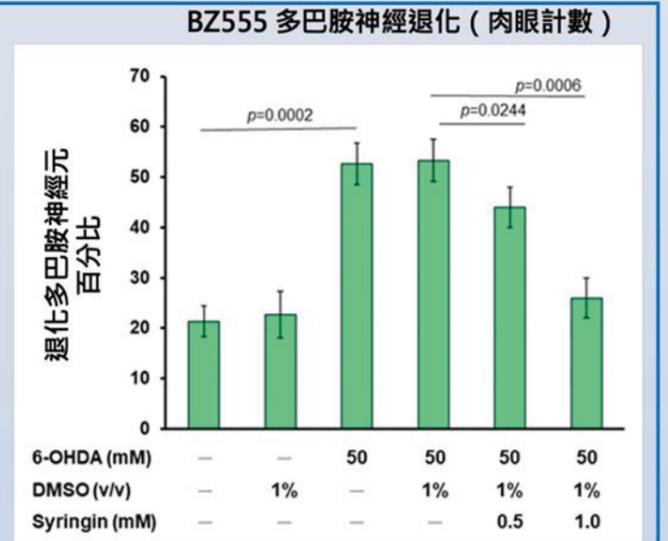
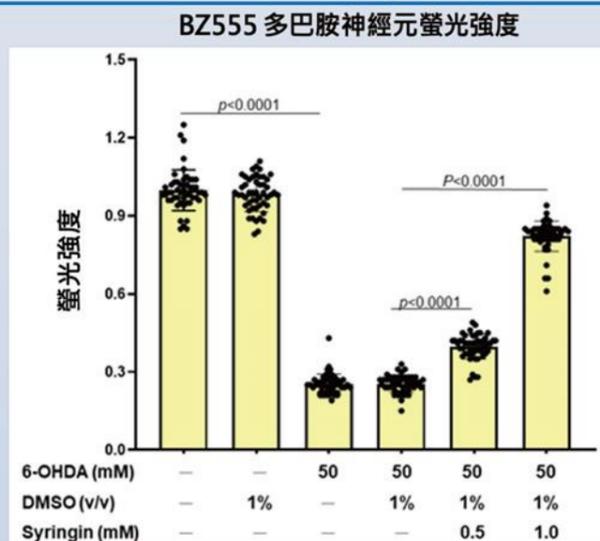
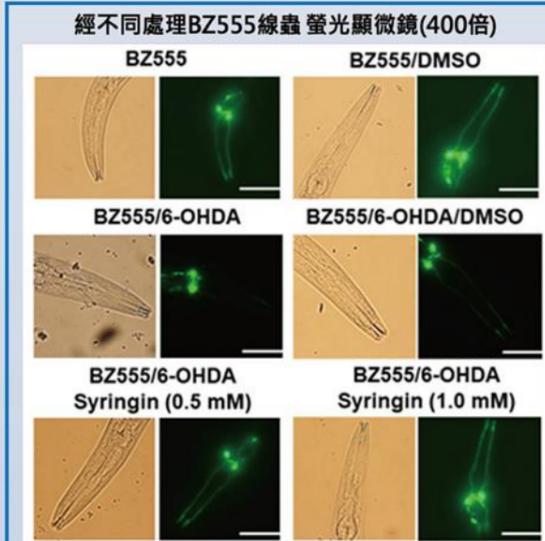
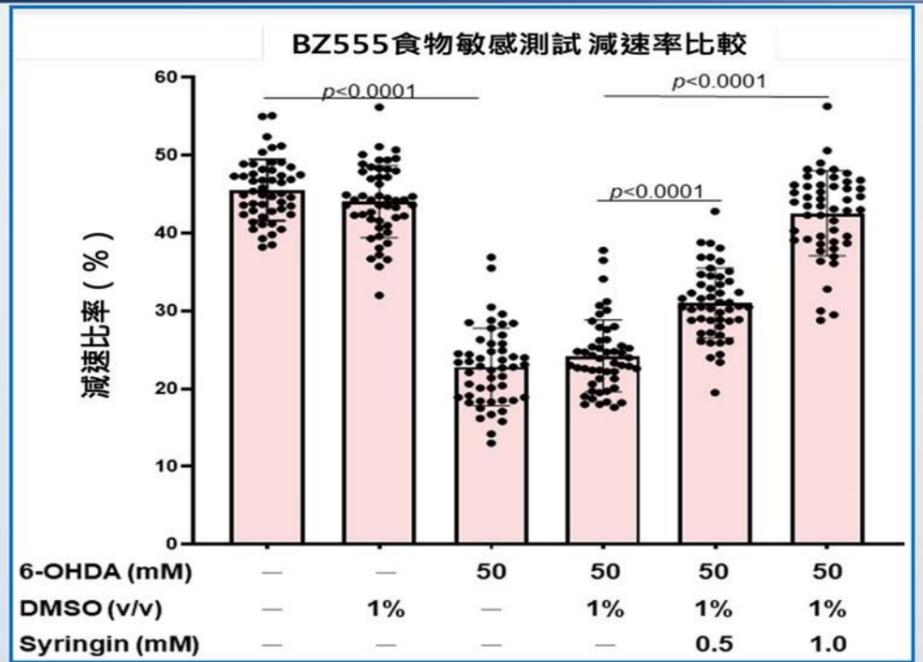
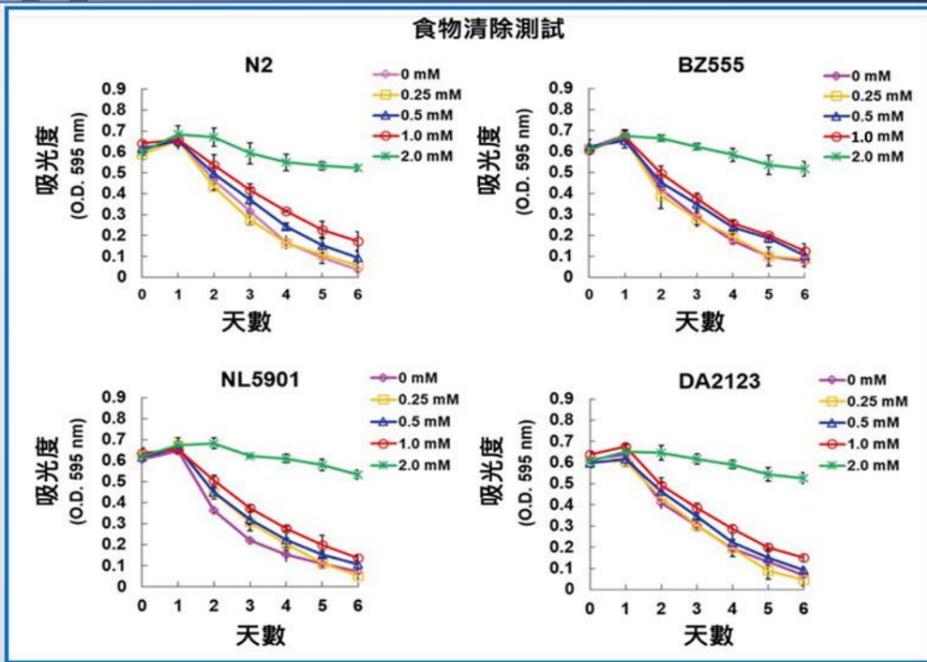
研究動機

綜合以上所述，我們選取秀麗隱桿線蟲 (C. elegans) 作為實驗對象，並利用 6-OHDA 誘發線蟲產生 PD，並透過實驗進行研究，探討丁香苷對於線蟲的神經系統發育與修復的生理發病現象與特徵，此實驗可望對後續研究提供相關的數據，並作為未來丁香苷藥物開發與治療 PD 的相關實驗結果。

實驗流程與方法

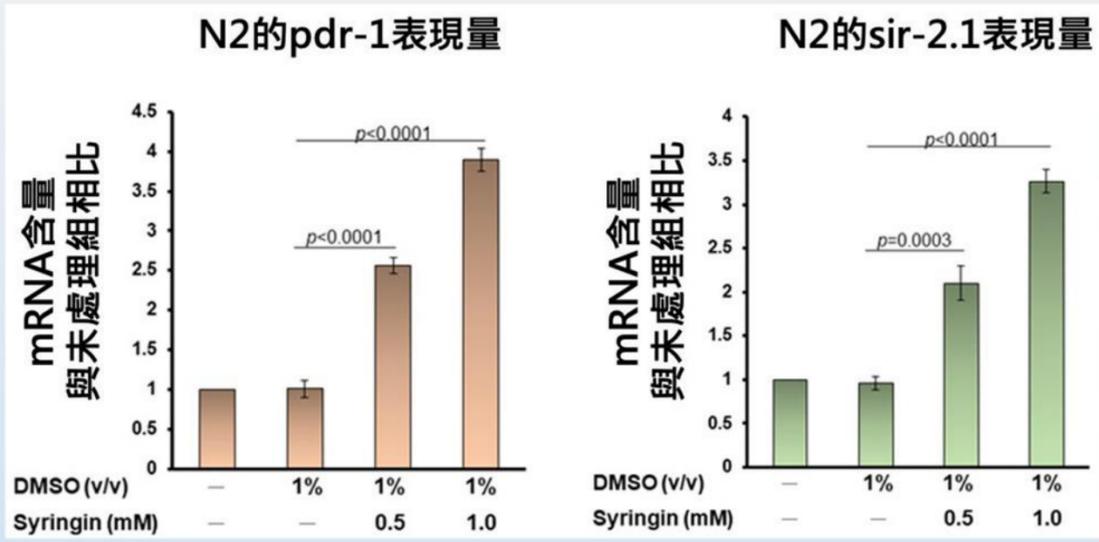


研究結果

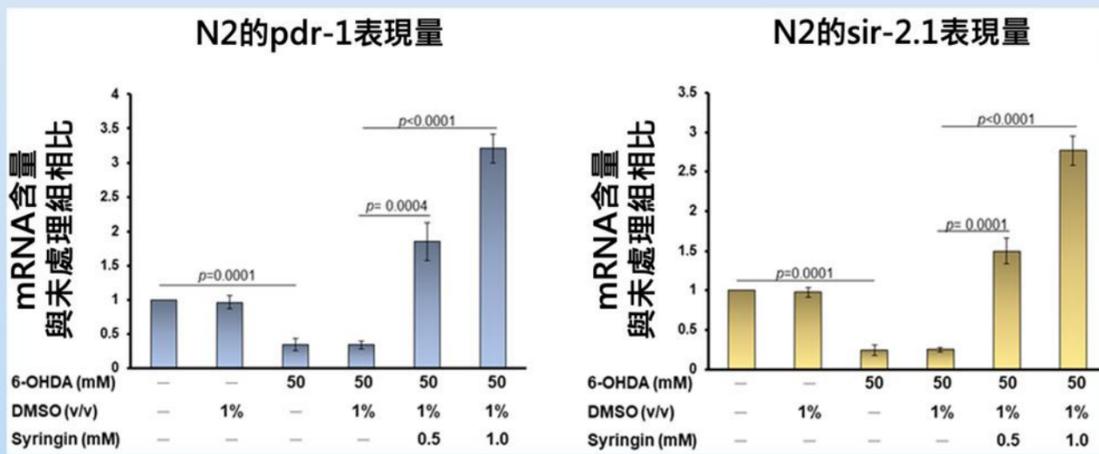


討論

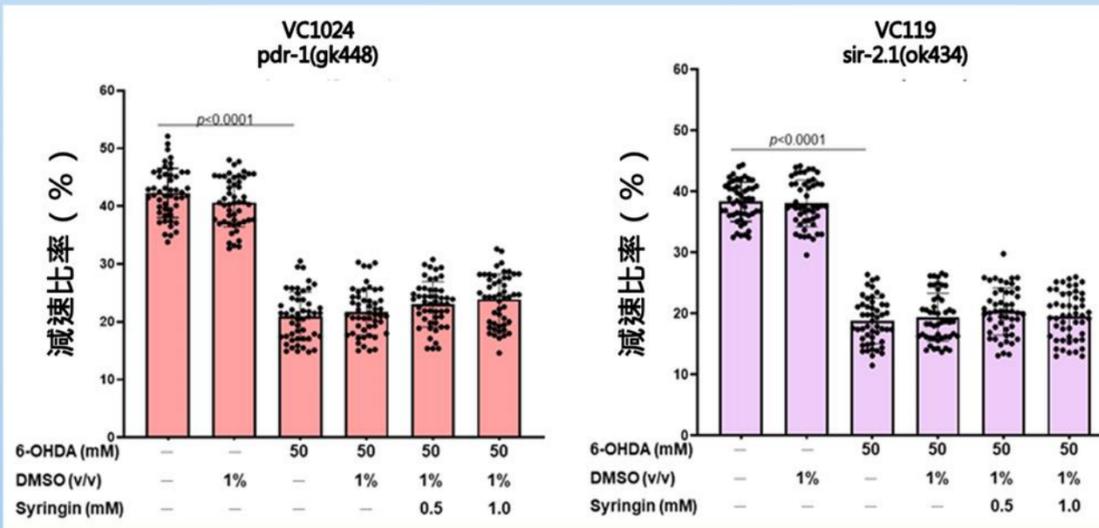
SRG能以促進自噬改善PD。SIR2.1-PINK-Parkin通路為自噬的重要通路，因此針對此通路進行實驗，以探討SRG作用機制。



對各種處理的N2線蟲做q-PCR，測量SRG是否影響Sir-2.1、pdr-1的表現量。



對各種處理的N2線蟲做q-PCR，測量6-OHDA及SRG是否影響Sir-2.1、pdr-1的表現量。



針對Sir-2.1、pdr-1缺陷品系線蟲VC1024、VC119做減速率探討。檢測在Sir-2.1、pdr-1表現量低下時，SRG是否能發揮作用。

VC1024、VC119的食物清除測試顯示，SRG無改善效果。代表SRG對自噬的主要影響通路SIR2.1-PINK-Parkin。

結論

- SRG在1mM以下對線蟲無害
- SRG能減緩因6-OHDA造成的減壽幅度
- SRG透過激活SIR2.1-PINK-Parkin通路促進自噬
- SRG對多巴胺神經元具有修復及保護作用
- SRG促進自噬並減少 α -突觸核蛋白的聚集

未來展望

PD目前沒有針對機制的療法，大多都是對症狀的改善。SRG這種從植物萃取的小分子化合物能從機制進行改善，在未來有治癒PD的潛力。SRG促進自噬的特性，除了PD，也有許多疾病與自噬有關，希望也能應用於其他疾病的治療。

參考文獻

- Antonina Kouli, Kelli M. Torsney, and Wei-Li Kuan. (2018) Brisbane (AU): Codon Publications
- Fu, R. H., Tsai, C. W., Liu, S. P., Chiu, S. C., Chen, Y. C., Chiang, Y. T., Kuo, Y. H., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2022). Neuroprotective Capability of Narcissoside in 6-OHDA-Exposed Parkinson's Disease Models through Enhancing the MiR200a/Nrf-2/GSH Axis and Mediating MAPK/Akt Associated Signaling Pathway. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(11), 2089.
- Cooper, J. F., & Van Raamsdonk, J. M. (2018). Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *Journal of Parkinson's disease*, 8(1), 17-32.
- Qiao H, Ren H, Du H, Zhang M, Xiong X, Lv R. Liraglutide repairs the infarcted heart: The role of the SIRT1/Parkin/mitophagy pathway. *Mol Med Rep*. 2018 Mar;17(3):3722-3734. doi: 10.3892/mmr.2018.8371. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29328405; PMCID: PMC5802177.