

中華民國第 65 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

052002

鼻嗅鞘細胞 Olfactory Ensheathing Cells
(OEC) 對紅血球吞噬效能的影響

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 黃祺鈞 高二 許晉峯	指導老師： 柯政宏
---------------------------------	------------------

關鍵詞：腦溢血、鼻嗅鞘細胞、血腫塊吞噬清除

摘要

腦溢血為腦血管破裂出血，當紅血球破裂釋放神經毒性物質，將進一步導致繼發性腦損傷，免疫細胞活化、造成神經發炎、血腦屏障損壞等嚴重免疫風暴。

鼻嗅鞘細胞（OEC）的抗發炎及吞噬特性對血腫塊清除有極大潛力。本研究透過模擬紅血球受損狀態，以離體細胞實驗首次確認 OEC 對紅血球的吞噬作用。以 RT-qPCR 分析其在吞噬作用中的基因表現，發現促發炎基因表現量雖有上升趨勢，但會在短時間內下降，抗發炎基因則皆有上升趨勢，可能與 OEC 的免疫調節作用有關。此研究結果顯示，OEC 確實能直接吞噬紅血球，相較於 BV-2 有較不易引起發炎反應的優點，可進一步作為開發腦溢血新療法的參考依據。

壹、前言

一、研究動機

腦溢血（Intracerebral Hemorrhage, ICH）是由腦血管破裂引起的急性腦中風類型，血液外滲到腦中，並對腦部組織造成直接的壓迫和損傷。作為腦中風最致命的亞型，腦溢血的早期死亡率高達 30% 至 40%，倖存者也時常面臨持續的神經功能障礙，使其成為全球致死率和失能率極高的疾病之一（2023 台灣腦中風學會自發性腦出血處置指引）。根據衛生福利部民國 103 年到 112 年的統計，腦血管疾病是台灣成人死亡的第二至第四大死因，每年奪走超過 1 萬人的生命。而現行對急性腦溢血病患的治療方法針如下：病人出血量小於 30 cc 者使用藥物控制症狀，血塊大於 30 cc 或昏迷指數介於 7 ~ 10 分者則需手術清除血腫（Hematoma），但開刀治療對清除血腫塊的效果有限，僅能清除 50%~75 % 的血腫塊，手術本身也可能帶來額外的傷害，因此現行治療方式對患者的神經功能恢復效果有限，僅能增加存活率卻無助於預後復原（2023 台灣腦中風學會自發性腦出血處置指引）。由於目前尚無特效藥物及手術可以有效治療出血性腦中風，故尋找有效的治療或增進預後復原的方法有其急迫性。

腦溢血的病理過程涉及兩個主要階段：原發性腦損傷（Primary Brain Injury, PBI）與繼發性腦損傷（Secondary Brain Injury, SBI）。原發性腦損傷主要由出血引起的血腫塊對腦組織的直接壓迫所致；而繼發性腦損傷則由血腫塊溶解後釋放的神經毒性物質（如血紅素、鐵離子等）所致（Anwen Shao 等，2019），這些物質進一步引發強烈的免疫反應，特別是微膠細胞（Microglia）的過度活化，最後導致神經損傷、死亡。

微膠細胞是中樞神經系統的免疫細胞，負責清除受損細胞和維持腦內穩定。然而，在腦溢血後，這些微膠細胞會被過度激活，釋放大量促炎細胞因子（如 $\text{TNF } \alpha$ 、 $\text{IL-1 } \beta$ 、 $\text{IFN } \gamma$ 等），進一步引發「免疫風暴」。這些過度活化的免疫反應不僅對腦組織造成二次損傷，還可能加劇神經元死亡、促進神經發炎，並導致血腦屏障（Blood - brain barrier, BBB）破損（Jian Wang 等，2005）（Midori A. Yenari 等，2006）。免疫風暴被認為是繼發性腦損傷中的一個關鍵因素，並對患者的預後造成嚴重影響。

幹細胞療法透過分泌神經滋養因子（如 BDNF）有助於促進神經可塑性並保護神經，能使腦神經較不容易因缺血而壞死（Jieli Chen 等，2005）。其中鼻嗅鞘細胞（Olfactory

Ensheathing Cells, OEC) 位於鼻嗅黏膜的固有層，具有便於自體取得、細胞穩定安全性高的特性，引起了科研人員的關注。

近年研究發現，OEC 不但能釋放神經生長因子 (NGF)、腦源性神經滋養因子 (BDNF) 促進神經纖維的再生，更具獨特的吞噬能力，能夠清除因神經元凋亡而產生的死亡細胞、軸突碎片及腦內的神經毒性物質 (Zhida Su等, 2013)，有效調控免疫反應、減少氧化壓力，為神經修復、生長提供更有利的環境 (Yizhen Jiang等, 2022)。過去二十年來，OEC 主要被應用於脊髓損傷 (Spinal Cord Injury, SCI) 和缺血性腦中風 (Brain Ischemic Stroke) 的治療，鮮少探討在腦溢血臨床應用上的潛力。

我們認為 OEC 具備的吞噬、清除能力，可能在腦溢血後的免疫調節和神經修復中發揮重要作用，特別是在促進血腫塊方面。此外，腦溢血會造成血腦屏障損傷，使外界物質能夠進入大腦，也為 OEC 進入腦部並執行治療功能創造了條件。因此我們想探討 OEC 是否能有效的清除紅血球 (RBC)，以及是否具有調控免疫反應的能力，從而減少過度炎症反應對神經系統的損害。若本研究能證實鼻嗅鞘細胞 (OEC) 應用於腦溢血治療的可行性，將可望發展為臨床輔助治療的一環，為腦溢血的治療帶來新突破——減少患者的神經後遺症、加速腦部損傷修復，不僅有助於病患重返日常生活，更能減輕家庭照護與社會醫療成本。

在前期試驗中，已初步證實了 OEC 在減少大白鼠腦溢血後神經損傷的潛力，可以降低腦損傷體積、神經發炎及神經功能損傷，但其是否能直接吞噬、清除血腫塊，以及如何抑制免疫風暴的具體作用機制尚需進一步釐清。

所以我們透過離體細胞實驗，以 OEC 細胞作為主要分析對象，與微膠細胞 BV-2 做比較，分析兩者對紅血球的吞噬能力差異，並使用 RT-qPCR 分析細胞中與吞噬作用相關的 mRNA 變化，以具體了解吞噬作用中基因表現變化情形。

二、研究目的

- (一) 探討 OEC 是否對紅血球具吞噬作用。
- (二) 了解 OEC 進行吞噬作用時的免疫反應，包括促發炎、抗發炎及吞噬相關基因。
- (三) 比較 OEC 於早期時間點 (三小時與六小時) 的基因表現量變化。

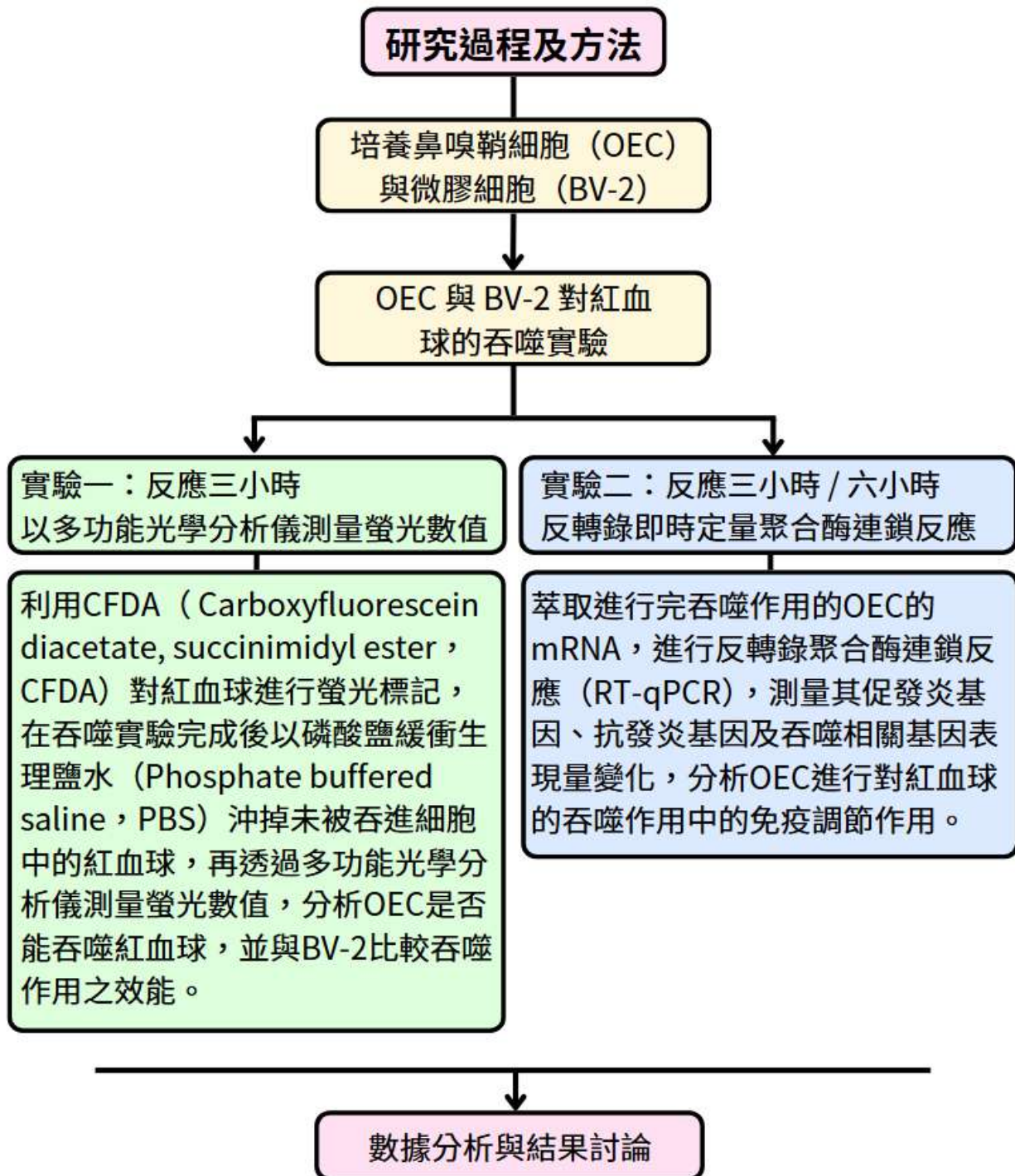
貳、研究設備及器材

			
離心機	細胞培養箱	無菌細胞操作台	血球計數儀
			
迷你離心機	多功能光學分析儀	核糖核酸定量儀	盤式離心機
			
平面搖擺式/迴轉式 振盪器	Veriti 多槽溫控式聚 合酶連鎖反應器	QuantStudio 5 Real- Time PCR System即時 螢光定量 PCR 系統	倒立螢光顯微鏡

圖一、研究設備與器材（作者自攝）

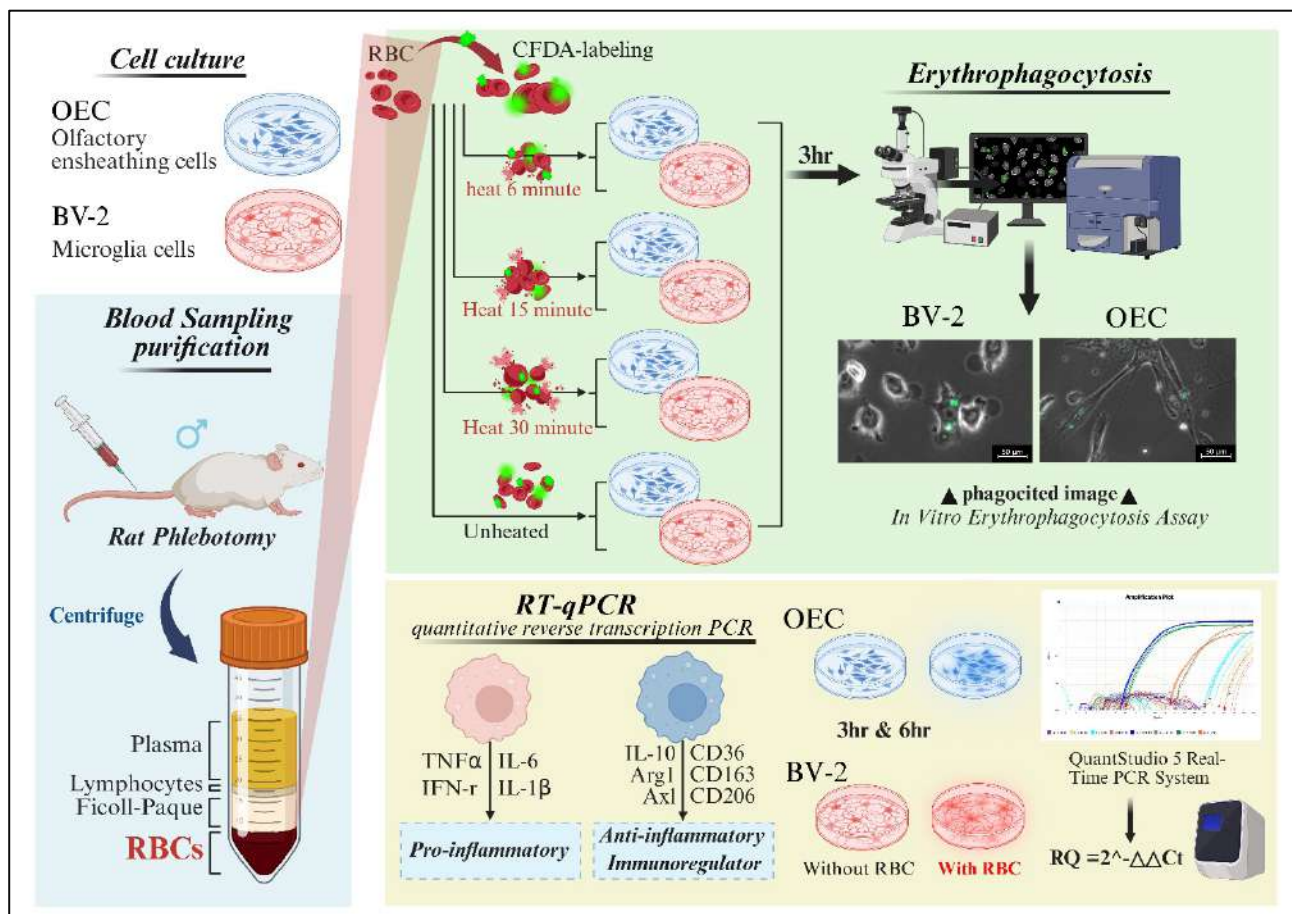
參、研究過程或方法

一、研究架構



圖二、實驗架構圖 (作者自製)

二、實驗分組圖示



圖三、實驗流程圖（作者自製）

三、實驗方法

（一）實驗分組

我們旨在探討 OEC 細胞對離體紅血球的吞噬作用與活化情形，並以微膠細胞 BV-2 作為比較對象。透過對紅血球進行不同時長加熱處理，以模擬腦溢血實際情形與紅血球破裂之神經毒性物質釋放狀況，後用螢光劑 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) 標記紅血球，將紅血球與細胞依 15:1 比例 (OEC and BV-2 in separate plate) 一同培養於 37°C、5% 二氧化碳環境中 3 小時。以螢光顯微鏡觀察兩種細胞對紅血球進行吞噬的情形，也透過以水漲破細胞溶出螢光物質，將吞噬 CFDA-RBC 的細胞吞噬指數以多功能光學分析儀量化，藉以得出 OEC 與 BV-2 的兩者的吞噬能力 (Phagocytosis Index) 的強弱。

我們的吞噬實驗反應時間分為 3 小時與 6 小時，將 OEC 與 BV-2 細胞各分為以下四組 (共八組)：無紅血球加入、加入未加熱紅血球、加入經 6 分鐘加熱處理的紅

血球、加入經 15 分鐘加熱處理的紅血球。後以螢光顯微鏡觀察細胞吞噬紅血球的實際作用情形與細胞型態，初步確認 OEC 細胞對腦中風血腫清除的效能。

欲更深入了解 OEC 吞噬作用過程中的發炎反應並探討其作用基因，我們透過即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR），分析 OEC 進行吞噬作用時的基因表現。我們選擇了文獻中常見與吞噬、發炎調控相關的代表性基因，包括促發炎基因：IL-1 β 、IL-6、TNF α 、IFN γ ；抗發炎基因：Arg1、Axl、IL-10；吞噬基因：CD36、CD163、CD206。進一步釐清 OEC 的吞噬作用及其抗發炎潛力。

（二）細胞繼代培養（Subculture of Cells）

本實驗以 OEC 嗅鞘細胞株（OEC Cell Line）進行研究，以 BV-2 作為對照組。

1. 將新的 OEC 培養液（不含 10% 胎牛血清（fetal bovine serum, FBS））與 BV-2 培養液移至 37°C 恆溫水浴槽中回溫。
2. 將細胞自含 5% CO₂ 的 37°C 培養箱中拿出，並以顯微鏡確認其生長情形，以及有無污染或異常。
3. 吸除培養盤中原先的培養液，此步驟細胞仍貼附於培養盤。
4. 加入 10 mL 磷酸鹽緩衝液（phosphate buffered saline, PBS）洗淨殘餘培養液。
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，使附著培養盤之細胞脫落。
6. 加入 10 mL 培養液使胰蛋白酶停止作用，並混合均勻，把細胞沖散。
7. 將混合液共 25 mL 移至 50 mL 離心管，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，並混合均勻。
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，並混合均勻。
11. 放入血球細胞計數儀（Hemocytometer）中計算細胞數量。

12. 依所算得的細胞數量調配新的培養液（取 3.6×10^8 個細胞）。
13. 取 20 mL 調配好的培養液放入新的培養盤，放入含 5% CO_2 的 37°C 培養箱中。

（三）RBC（Red blood cells）純化

採血行為由本實驗室專任研究助理協助進行抽取，我們僅進行見習學習，並且所抽取血液為整個實驗平台共同使用，我們僅取用該管血液中的微量紅血球。

1. 從大鼠（來自實驗動物中心）尾靜脈抽取 0.2 mL 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。
5. 加入 0.2 mL PBS 沖洗，比例為血液：PBS = 1：1。
6. 將混合液於常溫下、以 1200 rpm 離心 5 分鐘。
7. 吸去上清液後，重複步驟 5、步驟 6 一次。
8. 放入血球計數儀（CBC）後得出血球數據，完成。

（四）實驗一：以多功能光學分析儀測量螢光數值

1. 螢光標定RBC

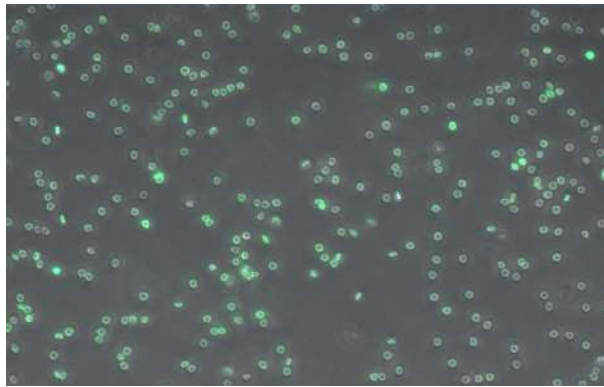
- （1）將已純化的 RBC 與 1 mL PBS 混合均勻。
- （2）放入血球計數儀（CBC）後得出血球數據，並依數據取出 1×10^8 個 RBC。
- （3）需加熱的組別於此步驟加入 0.2 mL PBS 後進行加熱。
- （4）有加熱的組別加入 0.8 mL PBS；未加熱組加入 1 mL PBS（使 PBS 總體積為 1 mL），於常溫下、以 3000 rpm 離心 2 分鐘後吸去上清液。
- （5）（避光）加入 1 mL 濃度為 $10 \mu\text{M}$ /mL 的 CFDA（Carboxyfluorescein

diacetate, succinimidyl ester ,CFDA) 。

(6) 置於含 5 % CO₂ 的 37 °C 細胞培養箱中反應 15 分鐘後取出。

(7) 將混合液於常溫下、以 3000 rpm 離心 2 分鐘後吸除上清液。

(8) 加入 1 mL PBS 回溶，重複步驟(7)一次，即完成。



圖四、以螢光顯微鏡確認紅血球已被 CFDA (綠色光點) 標記 (作者自攝)

2. 吞噬量值檢測 (Phagocytosis Index)

(1) 將新的培養基至於 37°C 的水浴槽回溫。

(2) 將已標記上螢光的 RBC 放入血球計數儀 (CBC) 後得出血球數據，並依數據取出所需細胞數(7.5×10^5 個 RBC / well，RBC數：細胞數=15：1)。

(3) 拿出分裝在 24 well 培養盤的 OEC 與 BV-2 細胞，以顯微鏡確認其情形。

(4) (以下步驟皆須避光) 移除原先的培養液，並加入 500 μ L / well 的 PBS 清洗兩次。

(5) 將 RBC 與培養液調配好後，將此混合液加入培養盤中 250 μ L / well。

(6) 置於含 5 % CO₂ 的 37 °C 細胞培養箱中反應 3 小時後取出。

(7) 移除原先的培養液，加入 500 μ L / well PBS 清除殘餘培養液與未被吞噬的 RBC，此步驟操作兩次。

(8) 加入 250 μ L / well 水將細胞脹破，使 RBC 中的 CFDA 螢光染劑溶於水。

- (9) 將液體從培養皿移到微量 96 well 黑盤 200 μL / well，以多功能光學分析儀檢測螢光數值，Excitation：485，Emission：528。

(五) 實驗二：反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR)

1. RNA 提取

- (1) 取出進行完 3h、6h 吞噬實驗的細胞盤，抽出原本的培養液，加入 2 mL 的 PBS 清洗一次。
- (2) 使用 20 G 口徑的針頭，將 DNA (Deoxyribonucleic Acid) 均質化 (Homogenize)。
- (3) 加入 600 μL / 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 600 μL 70% 酒精 (Alcohol)，並混和均勻，抽出 600 μL ，放入 RNeasy mini column 與 2 mL 離心管中，於常溫下，以 12000 rpm 離心 30 秒。
- (6) 將剩餘樣本重複步驟(5)。
- (7) 清除廢液後，加入 700 μL Buffer RW1，於常溫下以 12000 rpm 離心 30 秒。
- (8) 清除廢液後，加入 500 μL Buffer RPE，於常溫下以 12000 rpm 離心 30 秒。
- (9) 清除廢液後，加入 500 μL Buffer RPE，於常溫以 12000 rpm 離心 2 分鐘。
- (10) 清除廢液後，換新的 2 mL 離心管，於常溫下以 13200 rpm 離心 1 分鐘。
- (11) 換新的 1.5 mL 離心管，並詳細標註上日期、組別。
- (12) 加入 RNase free water 30 μL ，於常溫下，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，放入 -80°C 冰箱保存，即完成。

3. RT (mRNA轉cDNA)

- (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校正與清潔後，即可關機。

4. RNA 檢測

- (1) 取 1000 ng 的 RNA樣本，加入 ddH₂O 後使各樣本總體積為 8 μ L。
- (2) 加入 2 μ L的 5*g DNA 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) 使用聚合酶鏈鎖反應器（PCR machine）42 °C、3 分鐘後冷卻至 4 °C。
- (4) 調配 Buffer（RM），比例為 10x Fast RT Buffer : RT Enzyme Mix : RT Primer Mix : ddH₂O = 2 : 1 : 2 : 5（*樣本數）。
- (5) 利用聚合酶鏈鎖反應器（PCR machine）42 °C、15分鐘，再 95 °C、3 分鐘後冷卻至 4 °C。
- (6) 取出後加入 180 μ L 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 °C保存，即完成。

5. qPCR（quantitative PCR）

- (1) 計算引子調配量（RM），比例為 2x Master Mix：前置引子（forward primer）：反置引子（reverse primer）：ddH₂O= 10 μ L：0.2 μ L：0.2 μ L：7.6 μ L（*樣本數）。
- (2) 將 cDNA依序加入 96 well盤中 2 μ L / well。
- (3) 加入調配好的 RM 18 μ L / well。
- (4) 進行封膜後放入盤式離心機（Micro Plate Centrifuge）將管壁上殘餘的液體轉下。

(5) 使用多槽溫控式聚合酶連鎖反應器 (Quant Studio™5 System) 以 SYBR Green Reagents、快速模式進行檢測。

6. RT-qPCR數據分析

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：

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

$$RQ = 2^{-\Delta Ct} / \text{對照組 (未加入紅血球)} 2^{-\Delta Ct} \text{的平均值}$$

$$RQ = 2^{-[Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{內參基因})]} / 2^{-\Delta Ct} \text{的平均值} [\text{對照組 (未加入紅血球)}]$$

(內參基因：GAPDH，目的基因：IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF α 、IFN γ 、Arg1、Axl、CD36、CD163、CD206)

分析：利用上述公式計算 RQ 後，再得出每個組別的平均及平均值標準誤差 (SEM)，分析組別間的差異性後，做出圖表呈現實驗結果。

注釋：此分析中 RQ 代表相對定量的程度，即目的基因與內參基因的表現量之比，反映該基因的表達量。若 $RQ > 1$ 則該基因的表達量比內參基因高，反之亦然。SEM代表各組間 RQ 值的變異程度，用來衡量不同樣本間的平均差異。

肆、研究結果

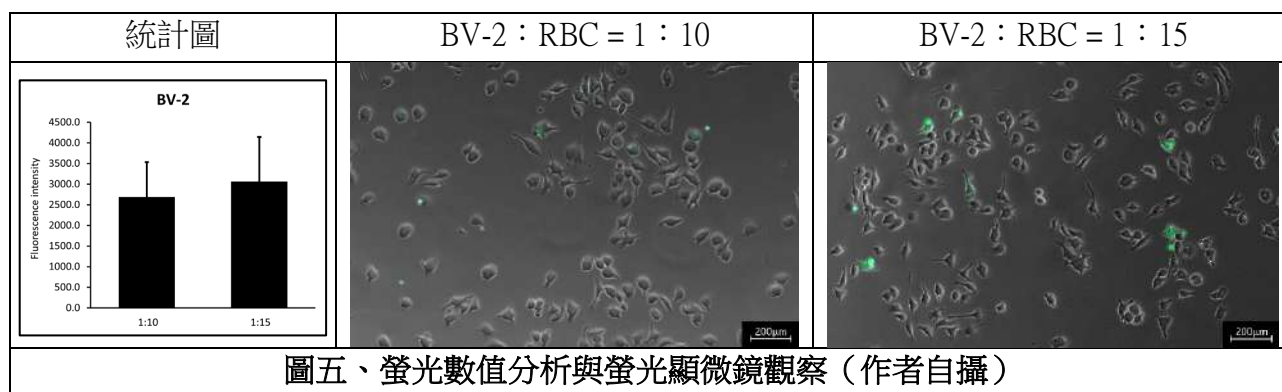
一、探討 OEC 與 BV-2 對紅血球的吞噬作用比較

(一) 優化反應條件——細胞對不同比例紅血球的吞噬效果比較

為了瞭解細胞在給予多少比例紅血球的情況下吞噬作用的效果較佳，我們先使用 BV-2 測試其對於 1:10 及 1:15 比例的紅血球的吞噬效果，在給予紅血球三小時後使用多功能光學分析儀分析螢光數值。由圖五得知 BV-2:RBC 在 1:15 的情況下

所測得的螢光數值平均較 1：10 高，因此、往後的實驗及皆採用細胞：RBC = 1：15 的比例進行實驗。

圖五為經三小時實驗反應後，以多功能光學分析儀所測得螢光強度與 BV-2 分別在 BV-2：RBC = 1：10 與 1：15 情況下，使用螢光顯微鏡觀察的畫面。由圖可觀察到在 1：15 的情況下，帶有螢光的 BV-2 細胞數量較 1：10 的情況下多，亦與多光能光學分析儀所測得螢光數值符合。



（二）OEC 與 BV-2 對不同損傷程度紅血球的吞噬效果比較

本實驗的主軸為確認 OEC 對紅血球是否能直接行吞噬作用，因此我們提供受損的 RBC 細胞，模擬腦溢血發生一段時間後，逐漸受損、發生溶血的血塊。用於實驗的紅血球為實驗前一天由本實驗室專任研究助理抽取大鼠尾部靜脈血，於 4°C 冰箱中保存一晚後，隔日進行操作。因為紅血球離開身體後會缺乏養分，所以細胞皆為輕微受損的狀態，然後我們會對其進行不同加熱時長的 56°C 處理，進一步模擬不同受損程度的紅血球。

圖六由左至右依序為加熱 10 分鐘、15 分鐘、20 分鐘、25 分鐘的紅血球，可觀察到加熱時間較長的組別，離心後的上清液顏色明顯較紅，底部沉澱物量也隨加熱時長逐漸減少，到了加熱 25 分鐘時幾乎已無紅血球存在，僅些許紅血球碎片沉於底部。故可透過加熱模擬腦溢血的血腫塊逐漸破裂釋放多種神經毒性物質，進而引發神經發炎反應、微膠細胞活化、氧化物和自由基累積（氧化壓力）等繼發性腦損傷的情形。



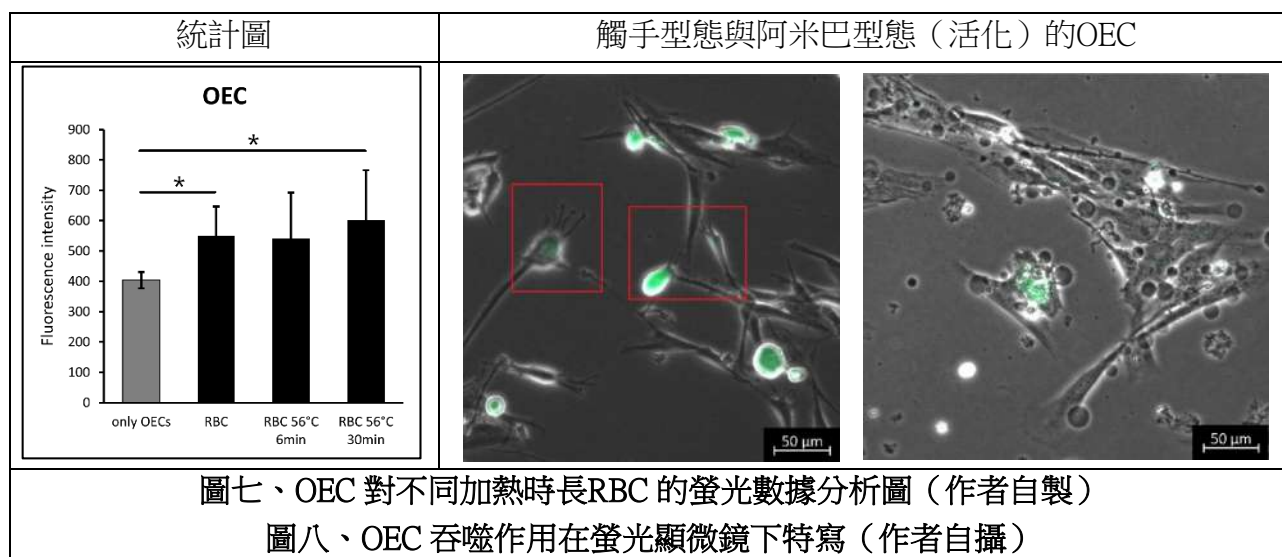
圖六、紅血球在不同加熱時長下的溶血情況與沉澱物的量（作者自攝）

我們先提供 OEC 未加熱的紅血球、56°C 加熱 6 分鐘的紅血球、56°C 加熱 30 分鐘的紅血球，進行 3 小時的吞噬實驗，以觀察 OEC 對紅血球及其殘渣是否會進行吞噬作用。

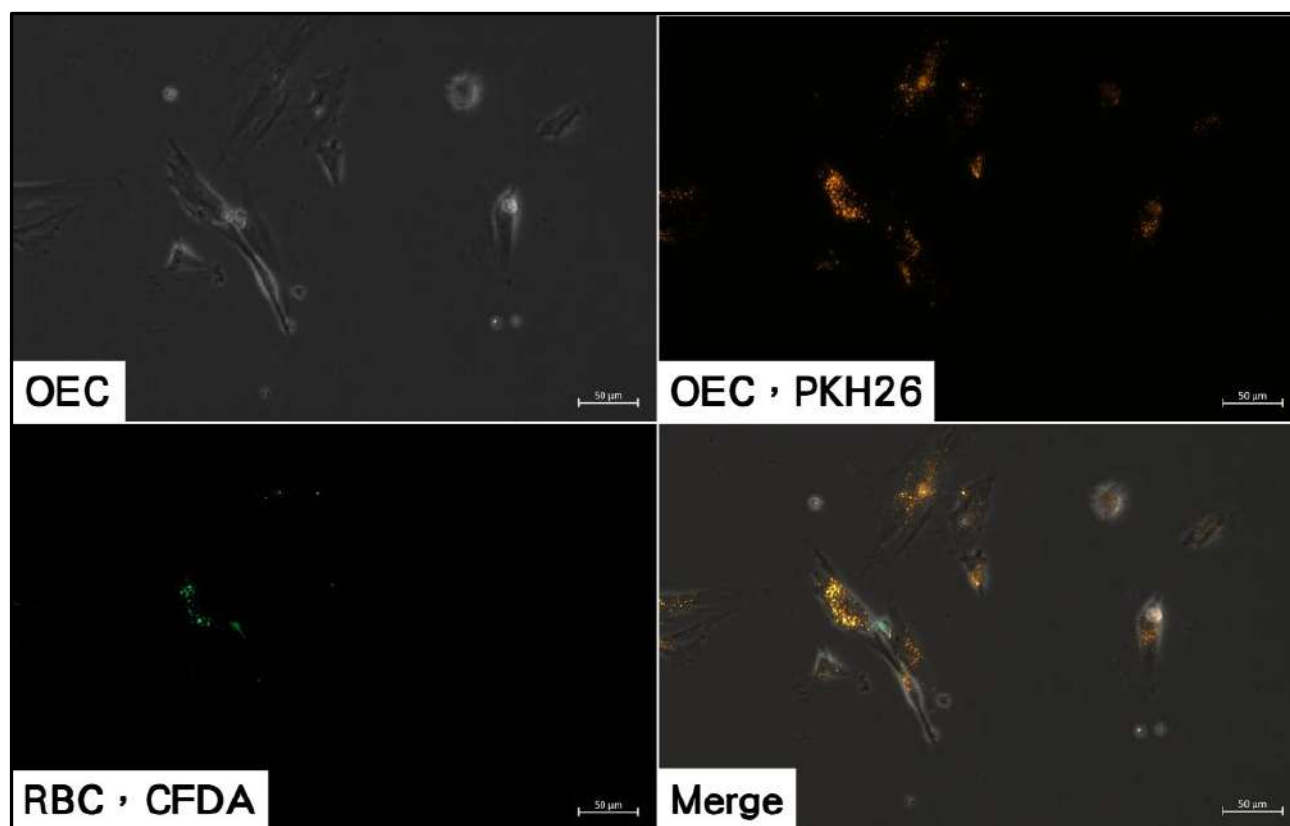
根據圖八，透過螢光顯微鏡觀察，在 OEC 細胞中及細胞附近可見帶有螢光的紅血球，多數 OEC 細胞也由正常的紡錘狀，變為呈現具觸手樣態或阿米巴型態的活化型態，表現出 OEC 細胞可能有向紅血球遷移並進行吞噬。

由螢光分析數據（圖七）可觀察到不論加熱與否，有加紅血球的 OEC 其螢光數值皆較基準值（only OECs）高，此初步結果表示 OEC 確實具有吞噬紅血球（未加熱與加熱 6 分鐘）與紅血球殘渣（加熱 30 分鐘）的能力，並且在未加熱的紅血球與加熱 30 分鐘的紅血球的組別中顯著提高。

但在未加熱、加熱 6 分鐘、加熱 30 分鐘組別間螢光數值未有明顯差異，且數據標準差稍大，因此 OEC 對何種狀態的紅血球吞噬效果較佳尚需進一步實驗確認。



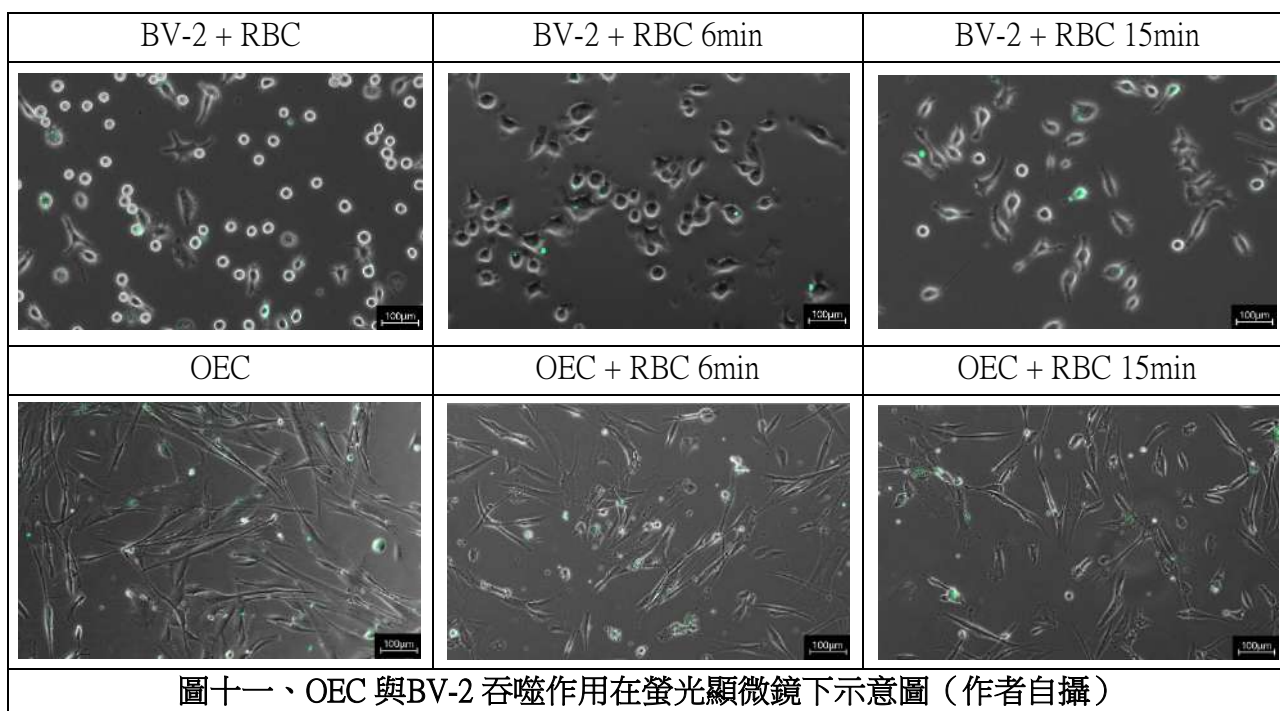
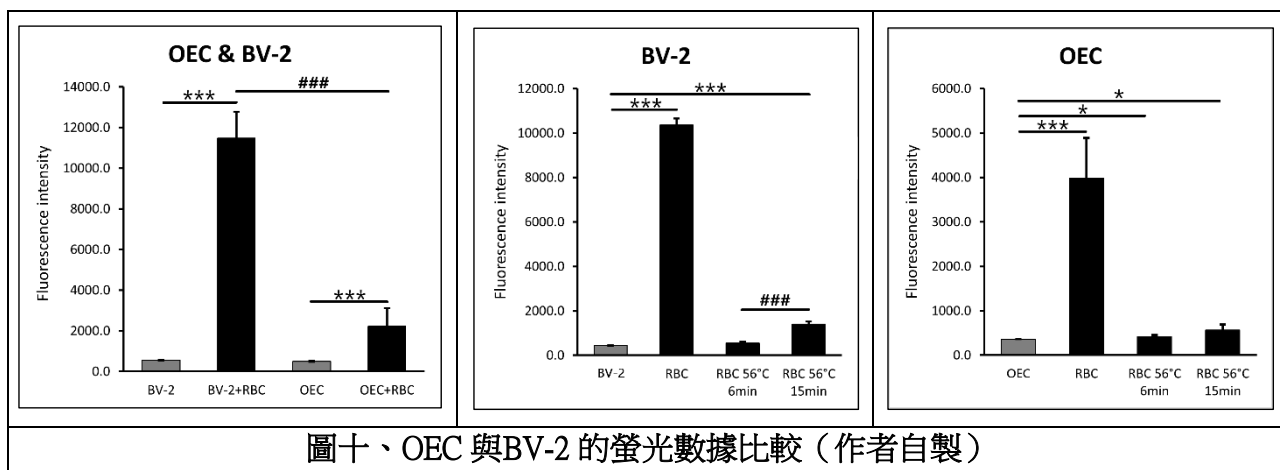
圖九為以 PKH26 標記 OEC 的影像（橘色螢光），亦可清楚看見 OEC 與紅血球有明顯的重疊，觀察出 RBC（綠色光點）是為 OEC（橘色光點）所吞噬。



圖九、OEC 吞噬作用在螢光顯微鏡下示意圖（作者自攝）

因為本實驗旨在分析 OEC 對紅血球的吞噬，因此後續實驗刪除了加熱 30 分鐘的組別（僅剩紅血球殘渣），分析細胞對加熱與未加熱 RBC 的吞噬效果。

由圖十可見，OEC 與 BV-2 對於未加熱的紅血球的螢光數值皆顯著較有加熱的組別高。在有加熱的組別中，BV-2 的 15 分鐘組、OEC 的 6 分鐘組與 15 分鐘組皆較基準值（only OEC）顯著提高。而 BV-2 的螢光數值皆顯著較 OEC 的螢光數值高，約高出 2~4 倍不等。此結果顯示 OEC 確實會吞噬紅血球，但吞噬能力較 BV-2 弱，而且兩者對於吞噬未加熱紅血球的能力較吞噬經加熱處理的紅血球的能力好。



二、藉由 RT-qPCR，探討 OEC 與 BV-2 的促發炎、抗發炎及吞噬相關基因表現量變化

實驗結果觀察到經過三小時的作用，OEC 已表現出對紅血球的吞噬作用，而這個作用可能涉及基因的表達和活化。本實驗在 OEC 與 BV-2 進行完三小時吞噬實驗後，取其培養基，以 RT-qPCR 測量 OEC 的各種與促發炎、抗發炎、吞噬作用相關的基因是否有表現，並與 BV-2 做比較。另外，我們也測量反應時間為 6h 的基因表現量變化，與反應時間 3 小時的基因表現量變化做比較。

在得出 RT-qPCR 數據後，將對照組（未加入RBC） $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的平均數值視為 1，再得出實驗組對於對照組的相對 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值（RQ 值），分析其發生的變化。

功能	名稱	前置引子 (Forward Primer)	反置引子 (Reverse Primer)
促發炎	IL-1 β	GCTGAAAGCTCTCCACCTCA	AGGCCACAGGTATTTTGTCTG
	IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGAC C	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
	TNF α	AGACCCTCACACTCAGATCATC TTC	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
	IFN γ	TGATTACTACCTTCTTCAGCAAC AG	CTGGTGGACCACTCGGATG
抗發炎	Arg1	GACCTGGCCTTTGTTGATGT	CCATTCTTCTGGACCTCTGC
	Axl	GGTGTTTGAGCCAACCGTGGAA	GCCACCTTATGCCGATCTACCA
	IL-10	CCAGTTTTACCTGGTAGAAGTG ATG	TGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAG ACTCAA
吞噬	CD163	TGGGTGGGGAAAGCATAACT	AAGTTGTCGTCACACACCGT
	CD36	GATGACGTGGCAAAGAACAG	TCCTCGGGGTCCTGAGTTAT
	CD206	GGGACTCTGGATTGGACTCA	GCTCTTCCAGGCTCTGATG

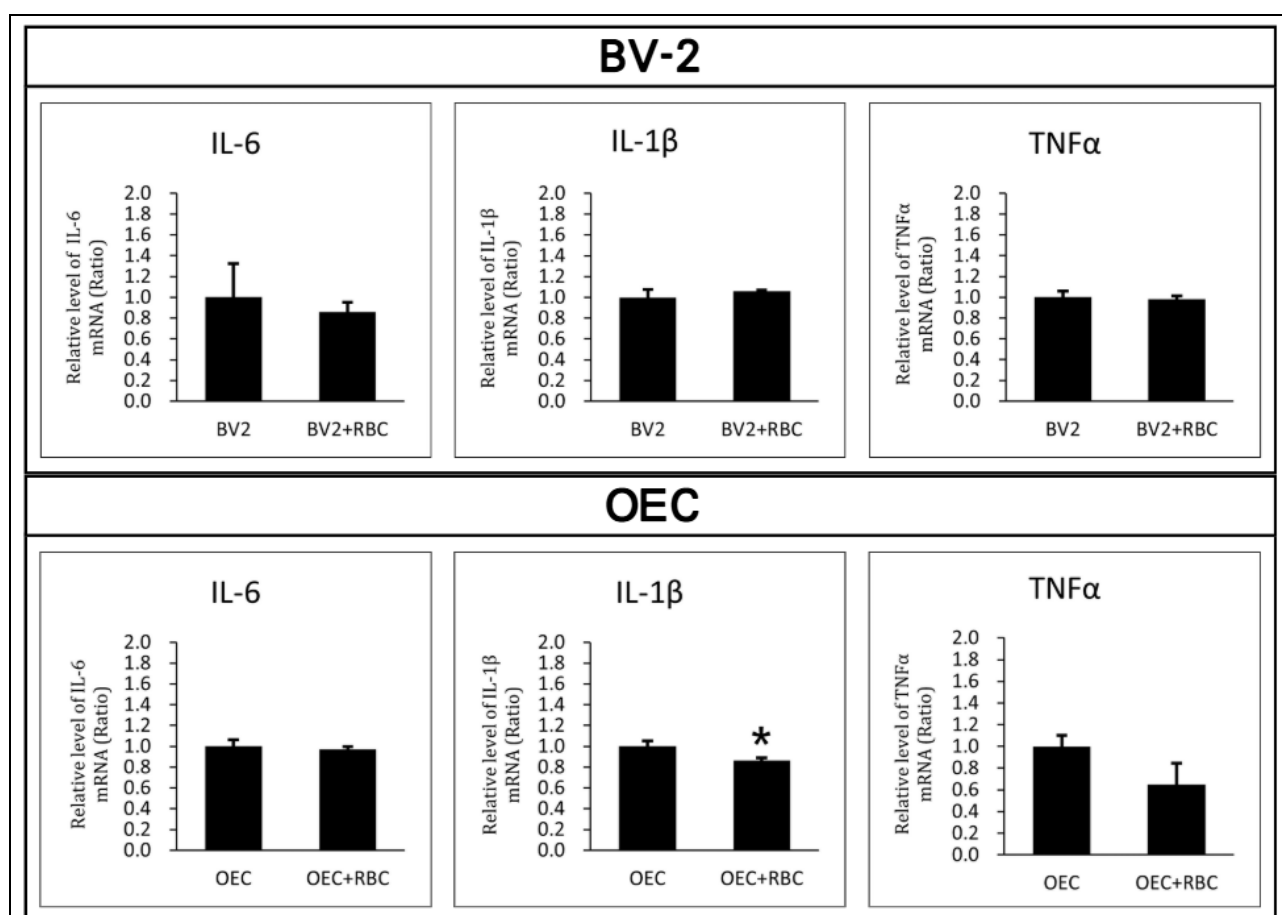
表一、小鼠 BV-2 促發炎與抗發炎/吞噬作用相關基因的引子序列 (作者自製)

功能	名稱	前置引子 (Forward Primer)	反置引子 (Reverse Primer)
促發炎	IL-1 β	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTCGAAGAA
	IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
	TNF α	TGGAGCTGGCCGAGGAG	AGCAGGCAGAAGAGCGTGG
	IFN γ	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC
抗發炎	Arg1	GTGGAAACTTGCATGGACAAC	AATCCTGGCACATCGGGAATC
	Axl	GCAACCTTCACCTACCGAGTTC	GGCCAACATGGTGAAACCCT
	IL-10	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	TCACATGCGCCTTGATGTCTG

吞噬	CD163	CAGGAAACCAGTCCCAAACA	AGCGACCTCCTCCATTACC
	CD36	GCCAAGGAAAATGTAACCCAGG	GCCTCTGTTCCAAGTATAGTGA
	CD206	TTCGGACACCCATCGGAATTT	CACAAGCGCTGCGTGGAT

表二、人類 OEC 促發炎與抗發炎/吞噬作用相關基因的引子序列（作者自製）

（一）探討吞噬作用中 OEC 與 BV-2 的促發炎基因表現量變化趨勢比較



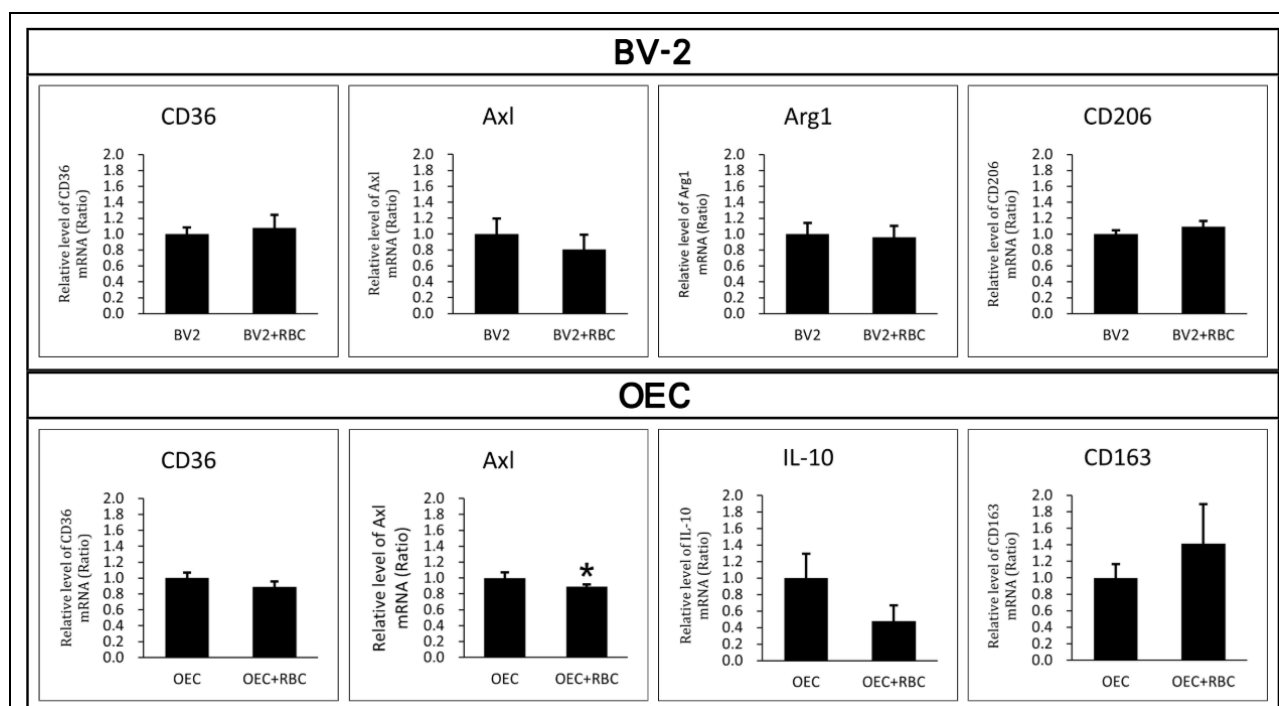
圖十三、IL-1 β 、IL-6、TNF α 、IFN γ 反應3小時的RQ值相對表現量（作者自製）

表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入 RBC 組作為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的平均數值視為 1。（統計結果 * 表示反應時間三小時下的 OEC 或 BV-2 相對於未經任何處理的 OEC / BV-2 做雙尾 t 檢定進行組間分析所得的差異性結果，* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，*** 表示 $p < 0.001$ 。）

促發炎：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 ；IFN γ （Interferon gamma），干擾素- γ 。

圖十三中，經三小時反應後，IL-1 β 、IL-6、TNF α 在 BV-2 上的表現量皆未有明顯變化，IFN γ 則是在 OEC 與 BV-2 間皆未表現。值得注意的是，OEC 的 IL-1 β 在經三小時反應後的表現量顯著下降，TNF α 的表現趨勢下降。這些結果初步排除了在 OEC 進行吞噬 RBC 的實驗中，這些基因的表現量會增加而造成發炎反應。我們將嘗試增加反應時長或 cDNA 濃度以達到最佳反應，進一步確定實驗結果。

(二) 探討吞噬作用中 OEC 與 BV-2 的抗發炎與吞噬相關基因表現量變化趨勢比較



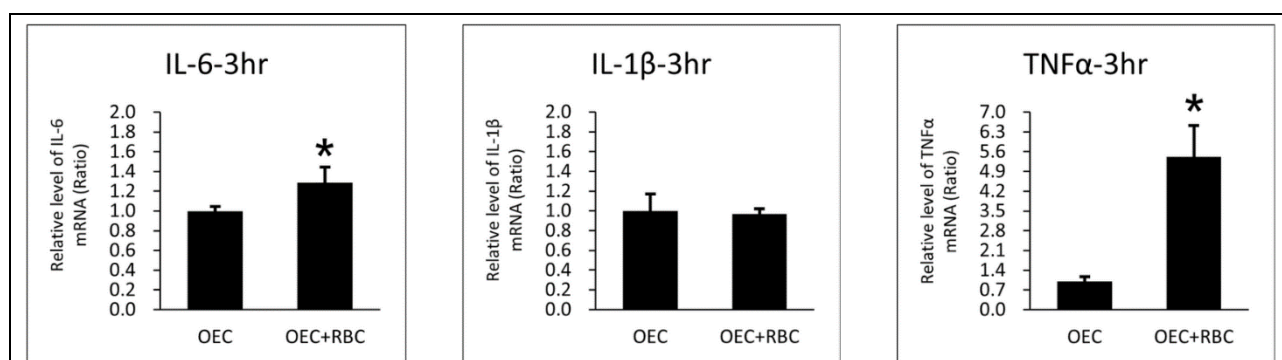
圖十四、Arg1、Axl、IL-10、CD36、CD163、CD206 反應 3 小時的 RQ 值相對表現量（作者自製）表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入 RBC 組作為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的平均數值視為 1。（統計結果 * 表示反應時間三小時下的 OEC 或 BV-2 相對於未經任何處理的 OEC / BV-2 做雙尾 t 檢定進行組間分析所得的差異性結果，* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，*** 表示 $p < 0.001$ 。）

抗發炎：Axl（Receptor tyrosine kinase），酪胺酸激酶受體；Arg1（Arginase 1），精氨酸酶 1；IL-10（Interleukin 10），介白素 10。

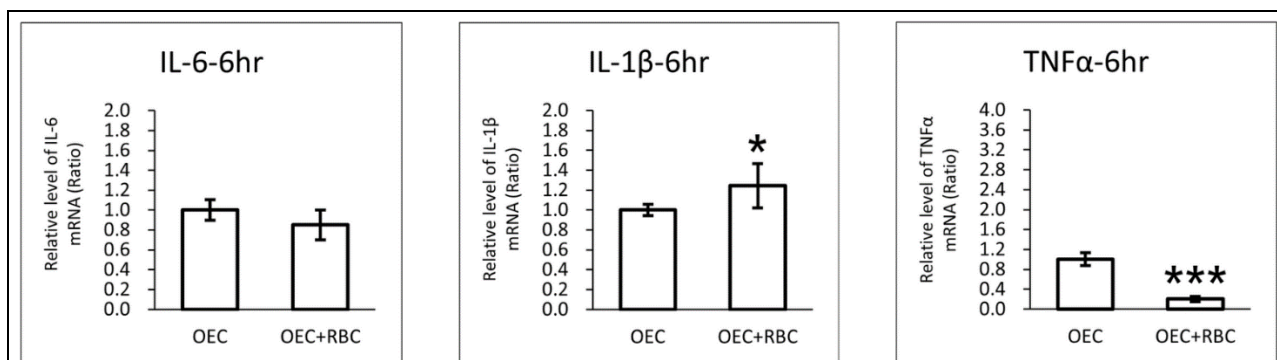
吞噬：CD206（Cluster of differentiation 206），甘露糖受體 1 型；CD36（Cluster of differentiation 36），脂肪酸轉位酶；CD163（Cluster of differentiation 163），可溶性血紅蛋白清道夫受體 163。

圖十四中，OEC 的 IL-10、CD36、CD163 與 BV-2 的 Arg1、Axl、CD36、CD206 在經三小時的反應後表現量未有顯著差異，OEC 的 Arg1、CD206 與 BV-2 的 IL-10、CD163 則未表現。這些結果顯示在進行吞噬反應的前期，這些基因尚未參與執行吞噬 RBC 的反應。值得注意的是，OEC 的 CD163 在經三小時反應後的表現量有上升的趨勢，而 IL-10 雖然表現趨勢下降，由於實驗的反應誤差較大，需進一步確認。我們將會增加反應時長或 cDNA 濃度以達到最佳反應，進一步確定實驗結果，分析 OEC 在吞噬作用中抗發炎基因表現量是否有變化以進行免疫調控作用。

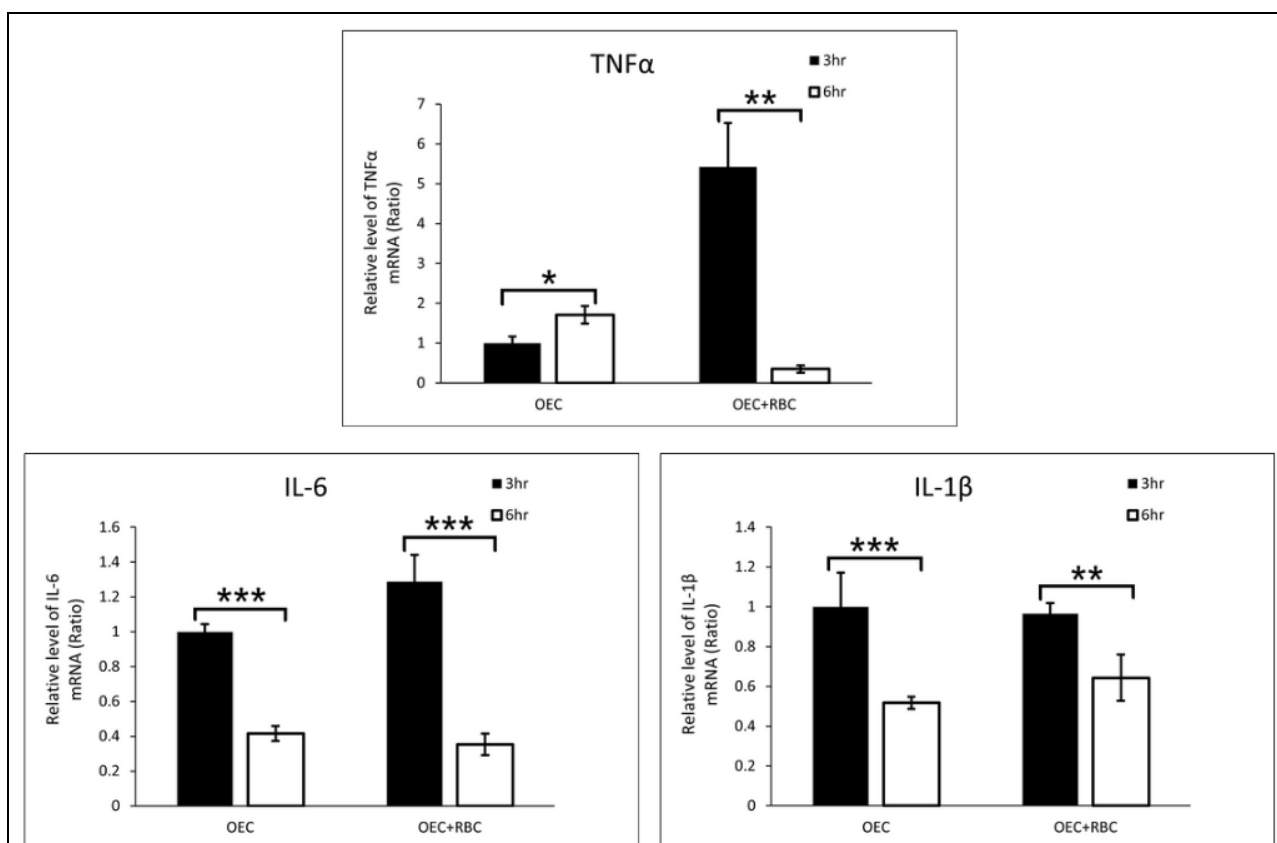
(三) 探討吞噬作用中 OEC 在反應時長 3 小時與 6 小時的基因表現量變化趨勢



圖十五、促發炎基因：TNF α 、IL-1 β 與 IL-6 反應時間 3 小時的 RQ 值相對表現量表。（作者自製）表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入 RBC 組為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的平均數值視為 1。（統計結果 * 表示反應時間三小時下的 OEC 或 BV-2 相對於未經任何處理的 OEC /BV-2 做雙尾 t 檢定進行組間分析所得的差異性結果，* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，*** 表示 $p < 0.001$ 。）

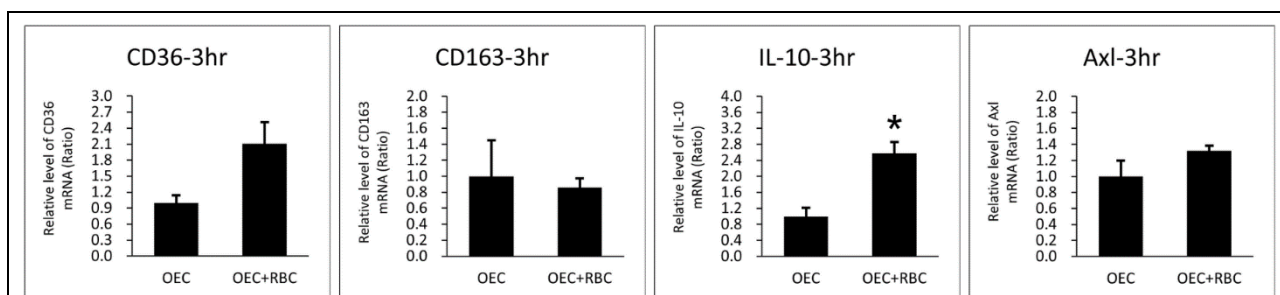


圖十六、促發炎基因：TNF α 、IL-1 β 與IL-6反應時間6小時的RQ值相對表現量表。（作者自製）表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入RBC組為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的平均數值視為1。（統計結果*表示反應時間三小時下的OEC或BV-2相對於未經任何處理的OEC/BV-2做雙尾t檢定進行組間分析所得的差異性結果，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ 。）

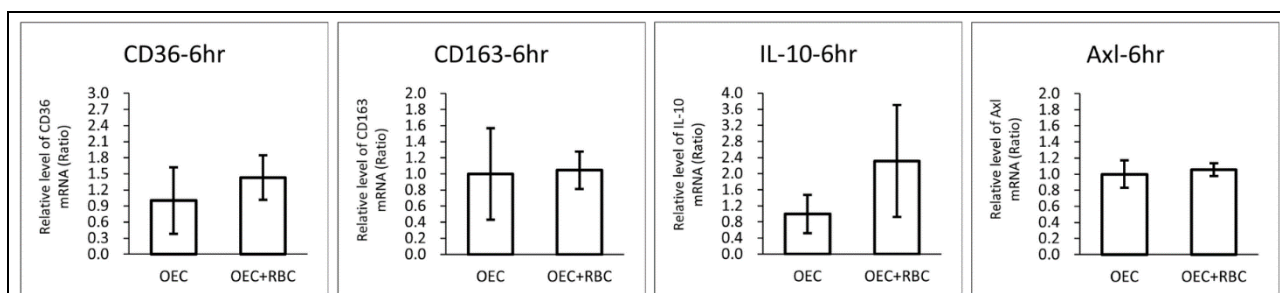


圖十七、促發炎基因：TNF α 、IL-1 β 與IL-6反應時間3小時與6小時的RQ值相對表現量比較。（作者自製）表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入RBC組為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的平均數值視為1。（統計結果*表示反應時間三小時下的OEC或BV-2相對於未經任何處理的OEC/BV-2做雙尾t檢定進行組間分析所得的差異性結果，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ，***表示 $p < 0.001$ 。）

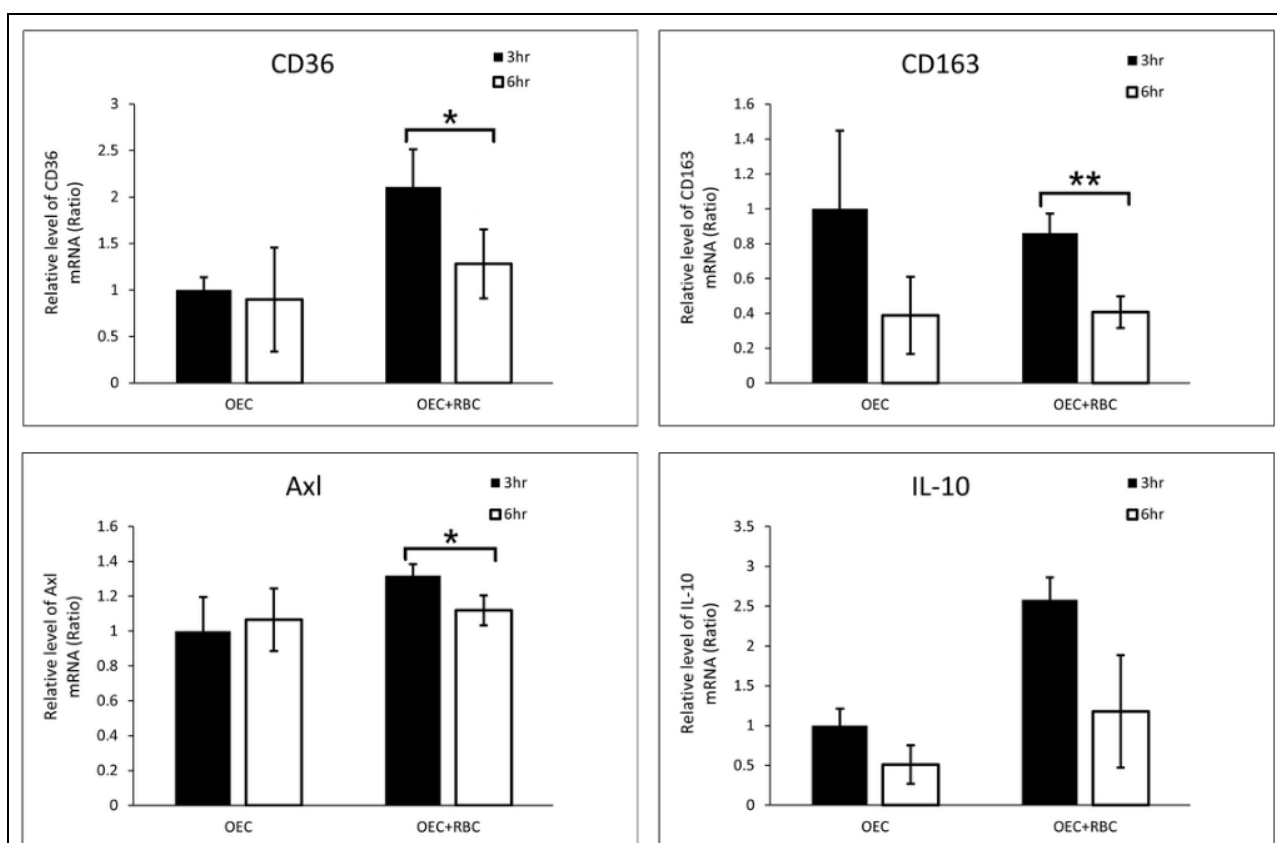
在促發炎基因的表現中，反應時間為 3 小時時，有紅血球組別的 $\text{TNF } \alpha$ 與 IL-6 的表現量顯著上升， $\text{IL-1 } \beta$ 的表現量則未有顯著差異。反應時間為 6 小時時，有紅血球組別的 $\text{TNF } \alpha$ 表現量顯著下降，而 $\text{IL-1 } \beta$ 的表現量顯著上升。而將反應時間 3 小時與反應時間 6 小時的基因表現量做比較，可見反應時間 6 小時的基因表現量皆較反應時間為 3 小時時顯著下降。由此可知，OEC 的促發炎基因在較早的時間點表現以促進對紅血球的吞噬，並在往後幾小時快速下降。



圖十八、抗發炎/吞噬基因：CD36、CD163、IL-10 與 Axl 反應時間 3 小時的 RQ 值相對表現量表。（作者自製）表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入 RBC 組為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值的平均數值視為 1。（統計結果 * 表示反應時間三小時下的 OEC 或 BV-2 相對於未經任何處理的 OEC /BV-2 做雙尾 t 檢定進行組間分析所得的差異性結果，* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，*** 表示 $p < 0.001$ 。）



圖十九、抗發炎/吞噬基因：CD36、CD163、IL-10 與 Axl 反應時間 6 小時的 RQ 值相對表現量表。（作者自製）表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入 RBC 組為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值的平均數值視為 1。（統計結果 * 表示反應時間三小時下的 OEC 或 BV-2 相對於未經任何處理的 OEC /BV-2 做雙尾 t 檢定進行組間分析所得的差異性結果，* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，*** 表示 $p < 0.001$ 。）



圖二十、抗發炎/吞噬基因：CD36、CD163、IL-10 與 Axl 反應時間 6 小時的 RQ 值相對表現量表。（作者自製）表現量之數據為平均值 \pm SEM，以未加入 RBC 組為對照組，將 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值的平均數值視為 1。（統計結果 * 表示反應時間三小時下的 OEC 或 BV-2 相對於未經任何處理的 OEC /BV-2 做雙尾 t 檢定進行組間分析所得的差異性結果，* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ ，*** 表示 $p < 0.001$ 。）

在抗發炎基因的表現中，反應時間為 3 小時時，有紅血球組別的 IL-10 的表現量顯著上升，CD36 與 Axl 的表現量有上升趨勢。反應時間為 6 小時時，有紅血球組別的 CD36、Axl、CD163 與 IL-10 的表現量皆有上升趨勢。並且反應時間 6 小時的基因表現量皆較反應時間 3 小時低。由此可知，在 OEC 吞噬紅血球的過程中，抗發炎基因的表現量會提高，並且也都在較早的時間點表現。

（四）原始數據 Ct 值分析

Ct值	促發炎基因	抗發炎/吞噬基因
22	無	Axl
約 28 ~ 29	IL-6、IL-1 β	無
30以上	TNF α	CD36、CD163、IL-10

IL-6 與 IL-1 β 兩個常在發炎急性期表現的基因，Ct 值約落在 28，進一步證明 OEC 具有一定的吞噬能力。而負責抑制先天免疫反應、促進吞噬與組織修復的 Ax1，Ct 值高達 22，顯示其不錯的免疫調節能力。

伍、研究討論

本研究旨在探討鼻嗅鞘細胞（Olfactory ensheathing cells, OEC）對腦出血所造成血腫的吞噬能力，以及其在促發炎、抗發炎與吞噬相關基因表現上的變化。藉由與微膠細胞株 BV-2 進行比較，我們期望評估 OEC 在腦出血治療上的潛在優勢與臨床應用可能。

為模擬腦溢血後紅血球破裂並釋放多種神經毒性物質的病理環境，我們以不同時間加熱處理紅血球，建立繼發性腦損傷的體外模型。透過進行 OEC 與紅血球三小時的共培養實驗，並結合螢光顯微鏡觀察及螢光訊號定量分析，我們確認 OEC 具備吞噬紅血球的能力。無論紅血球是否經加熱處理，OEC 與 BV-2 均展現吞噬行為，其中 OEC 對經長時間加熱（30 分鐘）產生之紅血球殘渣具良好吞噬能力，此結果與相關文獻中 OEC 可吞噬死亡神經元「碎片」的報導一致。

然而，針對經加熱 6 分鐘與 15 分鐘處理的紅血球，OEC 的吞噬效果相對不佳。理論上，受損紅血球細胞膜上的磷脂醯絲胺酸（Phosphatidylserine, PS）會外翻，並釋放促發炎因子，引發免疫細胞遷移與吞噬反應，但我們觀察到這兩組紅血球的螢光分析數值顯著低於未加熱組，顯示其反應與預期相悖。我們推測，紅血球受損後釋放的神經毒性物質可能對 OEC 本身亦具毒性作用，持續釋放的毒素可能造成 OEC 細胞受損，進而抑制其吞噬功能。為驗證此假設，我們將進一步進行乳酸去氫酶（Lactate Dehydrogenase, LDH）細胞毒性分析，以評估 OEC 在暴露於經加熱紅血球後的細胞損傷情形。

鑒於先前研究指出 OEC 具備免疫調節能力，並可減緩神經發炎與神經損傷，我們也進一步分析其免疫基因表現。透過反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）技術，我們針對 OEC 的促發炎基因、抗發炎基因及吞噬相關基因進行表現量分析，並以 BV-2 為對照，比較兩者在不同基因的表現趨勢，以進一步釐清其在免疫調控機制上的差異。

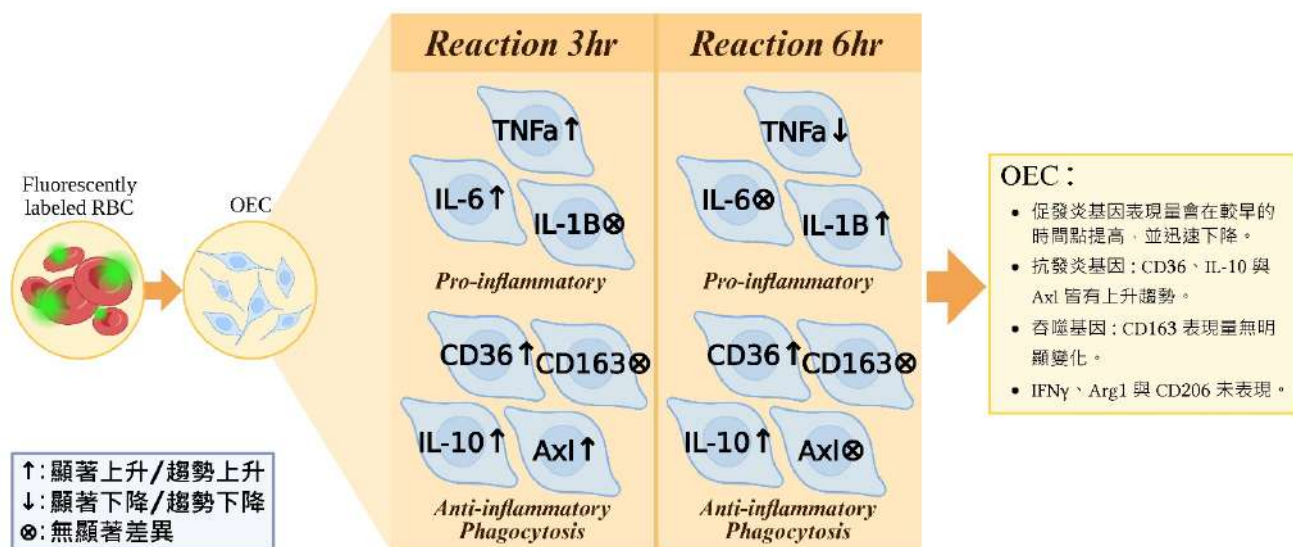
反應時間為三小時時，在促發炎基因的表現方面，IFN γ 在 OEC 與 BV-2 細胞中皆未偵測到表現。BV-2 細胞的 IL-1 β 、IL-6 與 TNF α 在經過三小時反應後，其表現量未出現顯著變化。相較之下，OEC 的 IL-1 β 表現量在三小時後顯著下降，TNF α 則呈現下降趨勢，顯

示其促發炎反應可能受到抑制。在抗發炎基因的部分，Axl 與 CD36 在 OEC 與 BV-2 細胞中皆未觀察到明確表現量變化。值得注意的是，IL-10 與 CD163 僅在 OEC 中表現，其中 IL-10 呈現下降趨勢，而 CD163 則有上升趨勢，但由於其表現變異較大，仍需進一步驗證。另一方面，Arg1 與 CD206 僅於 BV-2 中表現，反映兩種細胞在抗發炎機制上的差異。

由於在三小時反應條件下，大多數基因的表現變化並不顯著，我們推測可能與取樣時間點偏早有關，導致某些基因尚未充分表現。此外，促發炎基因通常在初期反應階段較為活躍，以促進炎症與清除受損細胞，因此可能導致早期表現量偏高。

為進一步釐清時間因素對 OEC 基因表現的影響，我們將反應時間延長至六小時，並比較其與三小時的基因表現變化趨勢。在促發炎基因方面，三小時時 TNF α 與 IL-6 表現量顯著上升，而到了反應時間六小時，IL-1 β 表現顯著上升，反之 TNF α 與 IL-6 則顯著下降。整體來看，六小時的促發炎基因表現皆低於三小時，顯示 OEC 在吞噬紅血球過程中，促發炎反應多於早期啟動，並於後期迅速下降。

抗發炎基因方面，IL-10 在三小時時顯著上升，CD36 與 Axl 則呈現上升趨勢；至六小時時，IL-10 與 CD36 的表現仍維持上升趨勢。這些結果顯示，OEC 在紅血球吞噬過程中，不僅早期啟動促發炎反應，也同步誘導抗發炎基因的表現，可能具備一定的自我調節與炎症平衡能力。



圖二一、OEC 各基因表現量變化整理示意圖（作者自製）

本實驗初步證實 OEC 具備吞噬紅血球的能力，且在短時間內能誘導抗發炎基因的表現，以參與免疫調控。然而，本研究所分析的基因僅限於十種，尚有許多功能相近或具潛在關聯

性的基因未被納入探討，OEC 在吞噬紅血球過程中的完整分子機制仍不明確。未來研究將著重於擴大基因表現分析範圍，以更全面地揭示 OEC 在腦出血後血腫清除與神經保護中的作用，並進一步評估其在腦出血治療上的應用潛力，期望為臨床帶來新的治療契機。

陸、結論

- 一、本研究首次證實鼻嗅鞘細胞（OEC）具備吞噬紅血球的能力。透過螢光顯微鏡觀察，我們發現 OEC 在吞噬過程中會被活化，改變其細胞形態，進而包圍並吞噬紅血球。
- 二、無論紅血球是否經過加熱處理，OEC 皆展現出吞噬能力，其中對未加熱組與加熱 30 分鐘（已接近殘渣狀態）組的吞噬量相對較高，顯示 OEC 對完整與嚴重損傷紅血球皆具清除潛力。
- 三、基因表現分析顯示，IFN γ 、Arg1 與 CD206 可能與 OEC 吞噬紅血球的機制無明顯相關。然而，我們發現 OEC 可能透過調控特定發炎與免疫相關基因來參與吞噬功能的調節。具體而言，促發炎基因在初期表現量上升，隨後快速下降；抗發炎基因如 CD36、IL-10 與 Axl 則呈現上升趨勢，尤其在反應時間為 3 小時時，IL-10 表現顯著提升。此結果顯示 OEC 可能藉由調節基因表現，達到吞噬紅血球、清除損傷與調控免疫反應的功能。

柒、參考資料及其他

1. 2023台灣腦中風學會自發性腦出血處置指引(2023)。台灣中風醫誌。5(4)，259 – 306。
<https://www.airitilibrary.com/Article/Detail/P20190722001-N202311210012-00001>
2. Anwen Shao , Zhiyuan Zhu , Lingfei Li , Shizhong Zhang , Jianmin Zhang (2019).Emerging Therapeutic Targets Associated with the Immune System in Patients with Intracerebral Haemorrhage (ICH): From Mechanisms to Translation.EbioMedicine .45, 615 – 623.
- 3 .Jian Wang , Stella E Tsirka . (2005). Tuftsin Fragment 1-3 Is Beneficial When Delivered after the Induction of Intracerebral Hemorrhage.Stroke,36(3), 613 – 618.
- 4.Midori A Yenari , Lijun Xu, Xian Nan Tang, Yanli Qiao, Rona G Giffard .(2006) .Microglia Potentiate Damage to Blood – Brain Barrier Constituents: Improvement by Minocycline In Vivo and In Vitro ,37 (4), 1087 – 1093.
5. Jieli Chen, Chunling Zhang, Hao Jiang, Yi Li, Lijie Zhang, Adam Robin, Mark Katakowski, Mei Lu, Michael Chopp .(2005) . Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. J Cereb Blood Flow Metab , 2005 Feb;25(2) , 281 - 290 .
6. Zhida Su , Jingjing Chen, Yang Qiu, Yimin Yuan, Feng Zhu, Yanling Zhu, Xiujie Liu, Yingyan Pu, Cheng He .(2013). Olfactory ensheathing cells: the primary innate immunocytes in the olfactory pathway to engulf apoptotic olfactory nerve debris . Glia ,61(4) ,490 – 503.
- 7.Yizhen Jiang , Jianbin Guo , Xiangwen Tang , Xiaohui Wang , Dingjun Hao , Hao Yang .(2022). The Immunological Roles of Olfactory Ensheathing Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury .Frontiers in Immunology ,13 , 1 – 14.
- 8.Meng Liy Pan ,Nur Nabilah Ahmad Puzi,Yin Yin Ooi,Rajesh Ramasamy,Sharmili Vidyadaran .(2023). Response Profiles of BV2 Microglia to IFN- γ and LPS Co-Stimulation and Priming . Biomedicine2023 , 11(10).

【評語】 052002

本研究探討鼻嗅鞘細胞（OEC）在腦溢血後吞噬紅血球的能力及其抗發炎特性，並與微膠細胞（BV-2）進行比較，為中樞神經系統損傷後的免疫調控與神經再生提供新思路。研究結果顯示，OEC 具備一定的吞噬能力，且誘導發炎反應較低，展現潛在臨床應用價值。然而，整體實驗設計仍有多項改進空間。

優點方面，本研究鎖定腦溢血後的重要免疫反應，切入點具臨床價值。OEC 相較於傳統免疫細胞，具備免疫調節與神經修復雙重潛力，若能應用於腦出血後的治療，將是一大突破。實驗亦初步驗證 OEC 具有吞噬紅血球的功能，並在表現炎症相關基因時顯示出較低的反應，突顯其可能在減輕繼發性腦損傷中扮演有利角色。

然而，本研究亦存在幾項需強化之處：首先，紅血球損傷僅以加熱模擬，過於單一，未涵蓋腦出血後多樣化的病理環境，建議未來應引入如氧化損傷、免疫攻擊等其他模式，以提高模型的臨床代表性。其次，雖然研究證實 OEC 具有吞噬與抗發炎能力，但僅分析少數基因（如 CD36、CD163、IL-10 等），缺乏對吞噬機制相關路徑（如受體調控、吞噬體內途徑）的深入探討，限制了

對 OEC 功能的全面理解。若能輔以轉錄體分析或特定路徑抑制試驗，將有助於揭示其精確機制。

基因表達實驗方面，OEC 與 BV-2 所選分析基因不一致，難以進行公平比較，建議統一基因範圍。時間點的設計亦有待斟酌，3 與 6 小時表現趨勢不同，但未清楚說明數據標準化與比較方法，亦未對時間性變化提供合理生物學解釋，增加了對結果的疑慮。

總結而言，本研究為 OEC 在腦溢血後免疫調控中的潛力提供了重要線索，尤其在吞噬紅血球與抗發炎方面展現出可取之處。然而，若欲推進臨床應用，仍須擴展損傷模型、深入探討分子機制、補強樣本數與對照設計，並優化基因表達分析策略。唯有如此，方能更穩健地支持 OEC 在神經修復領域的應用潛力。

作品海報



鼻嗅鞘細胞

Olfactory Ensheathing Cells (OEC)

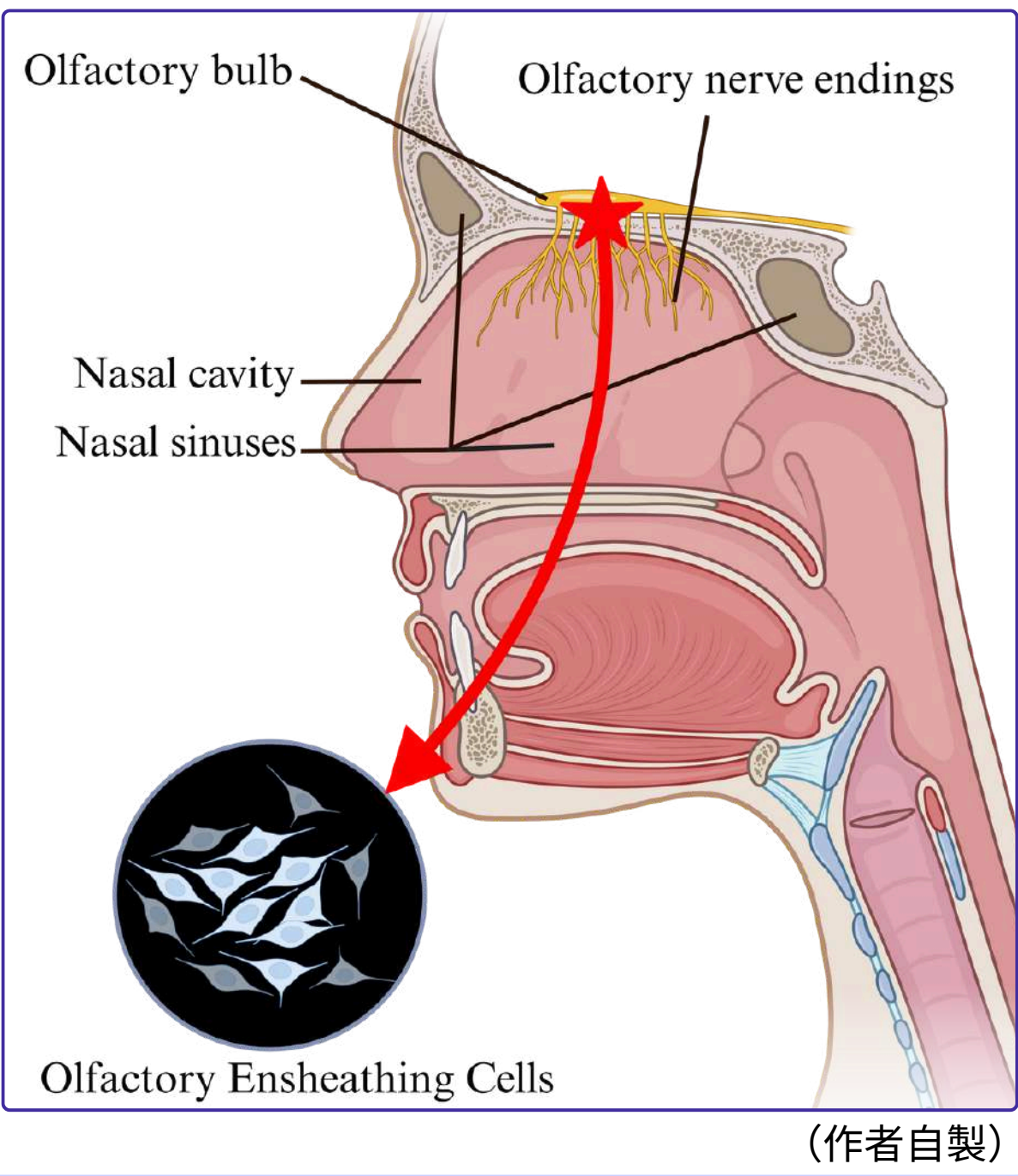
對紅血球吞噬效能的影響

壹、研究摘要

腦溢血為腦血管破裂出血，當紅血球破裂釋放神經毒性物質，將進一步導致繼發性腦損傷，免疫細胞活化、造成神經發炎、血腦屏障損壞等嚴重免疫風暴。

鼻嗅鞘細胞（OEC）的抗發炎及吞噬特性對血腫塊清除有極大潛力。本研究透過模擬紅血球受損狀態，以離體細胞實驗首次確認 OEC 對紅血球的吞噬作用。以 RT-qPCR 分析其在吞噬作用中的基因表現，發現促發炎基因表現量雖有上升趨勢，但會在短時間內下降，抗發炎基因則皆有上升趨勢，可能與 OEC 的免疫調節作用有關。此研究結果顯示，OEC 確實能直接吞噬紅血球，相較於 BV-2 有較不易引起發炎反應的優點，可進一步作為開發腦溢血新療法的參考依據。

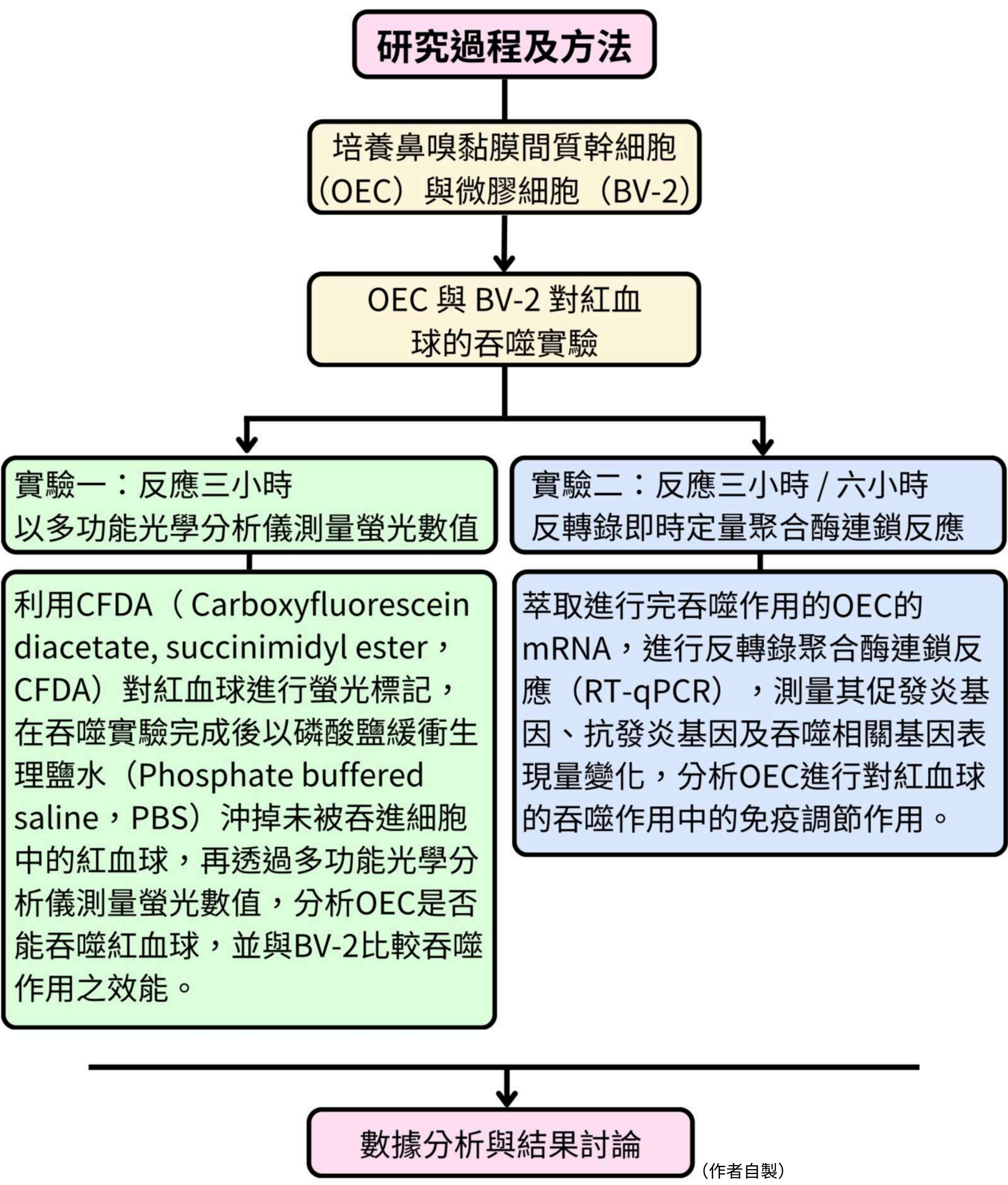
OEC位置示意圖



貳、研究目的

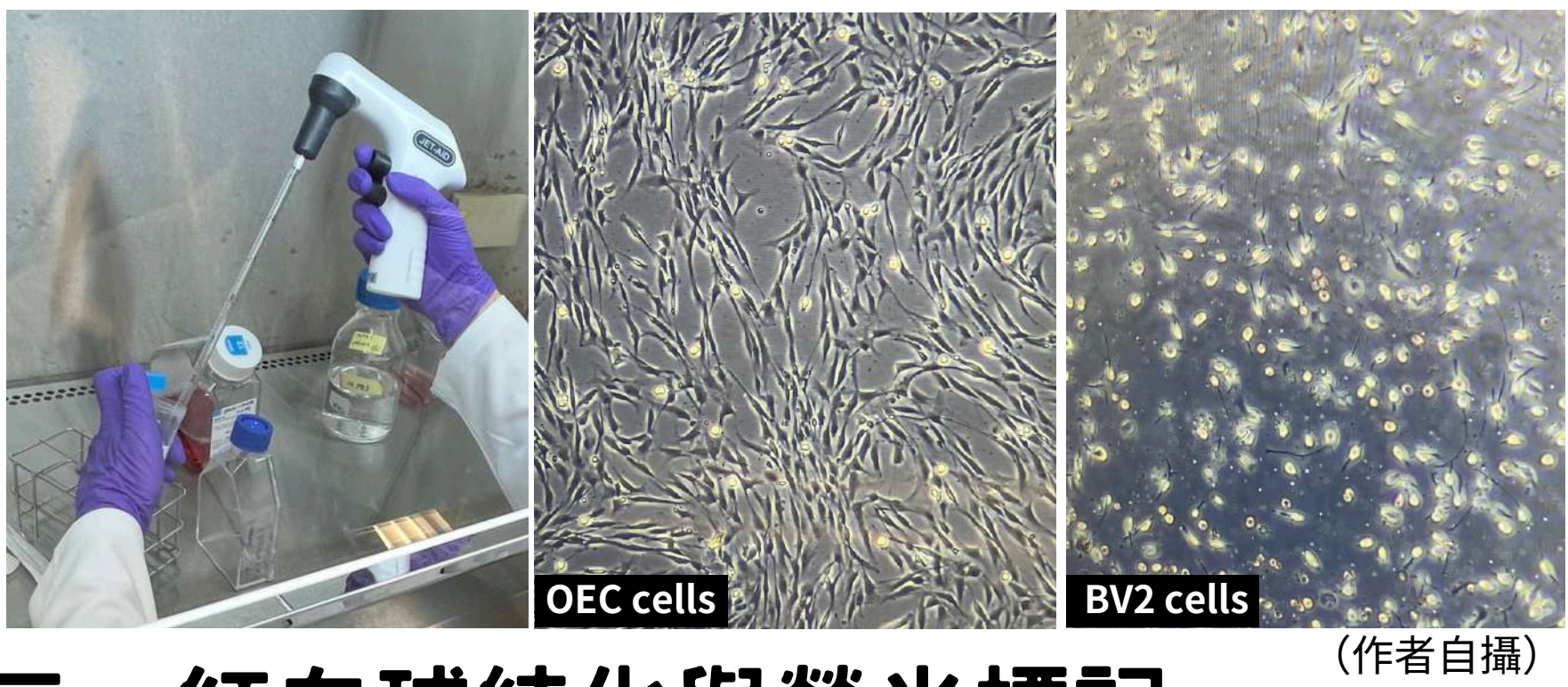
- 一、探討 OEC 對紅血球的吞噬作用
- 二、了解 OEC 對腦溢血引起之損傷的免疫神經調節作用
- 三、透過 RT-qPCR，分析 OEC 進行吞噬作用時的基因表現，包括促發炎基因、抗發炎基因以及吞噬相關基因

參、研究架構

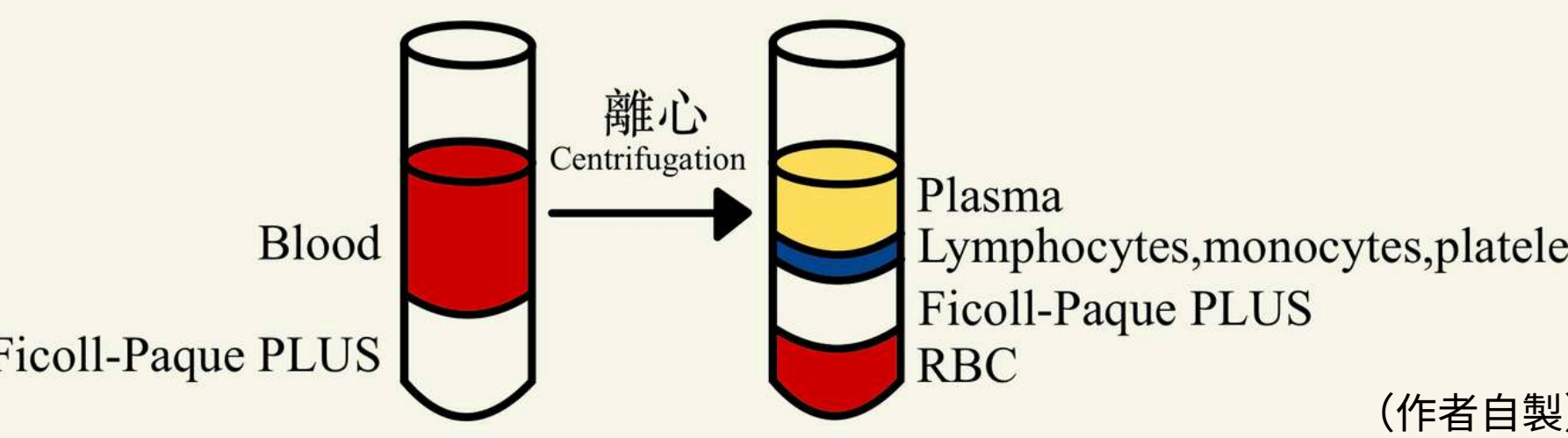
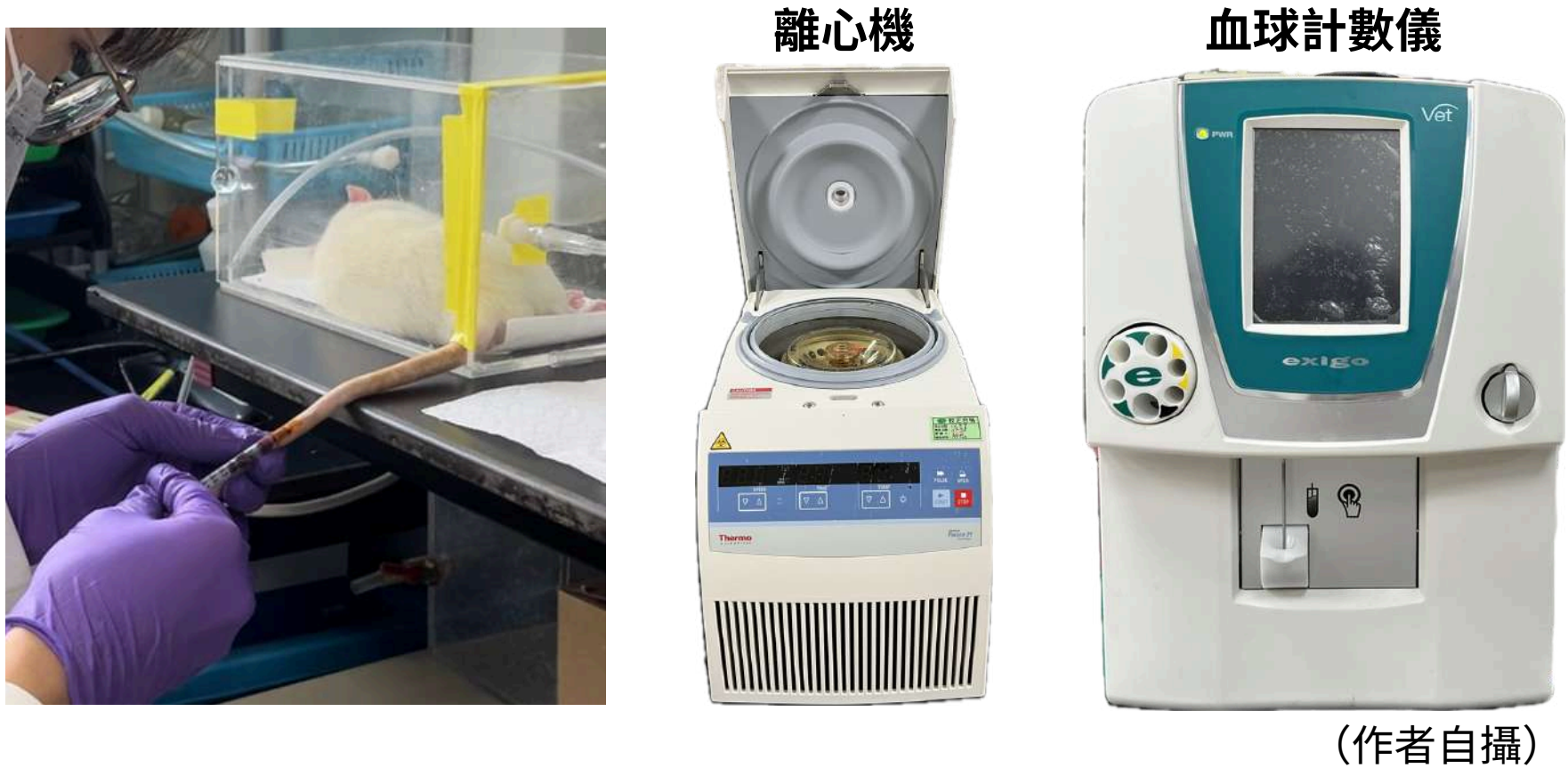


肆、研究方法

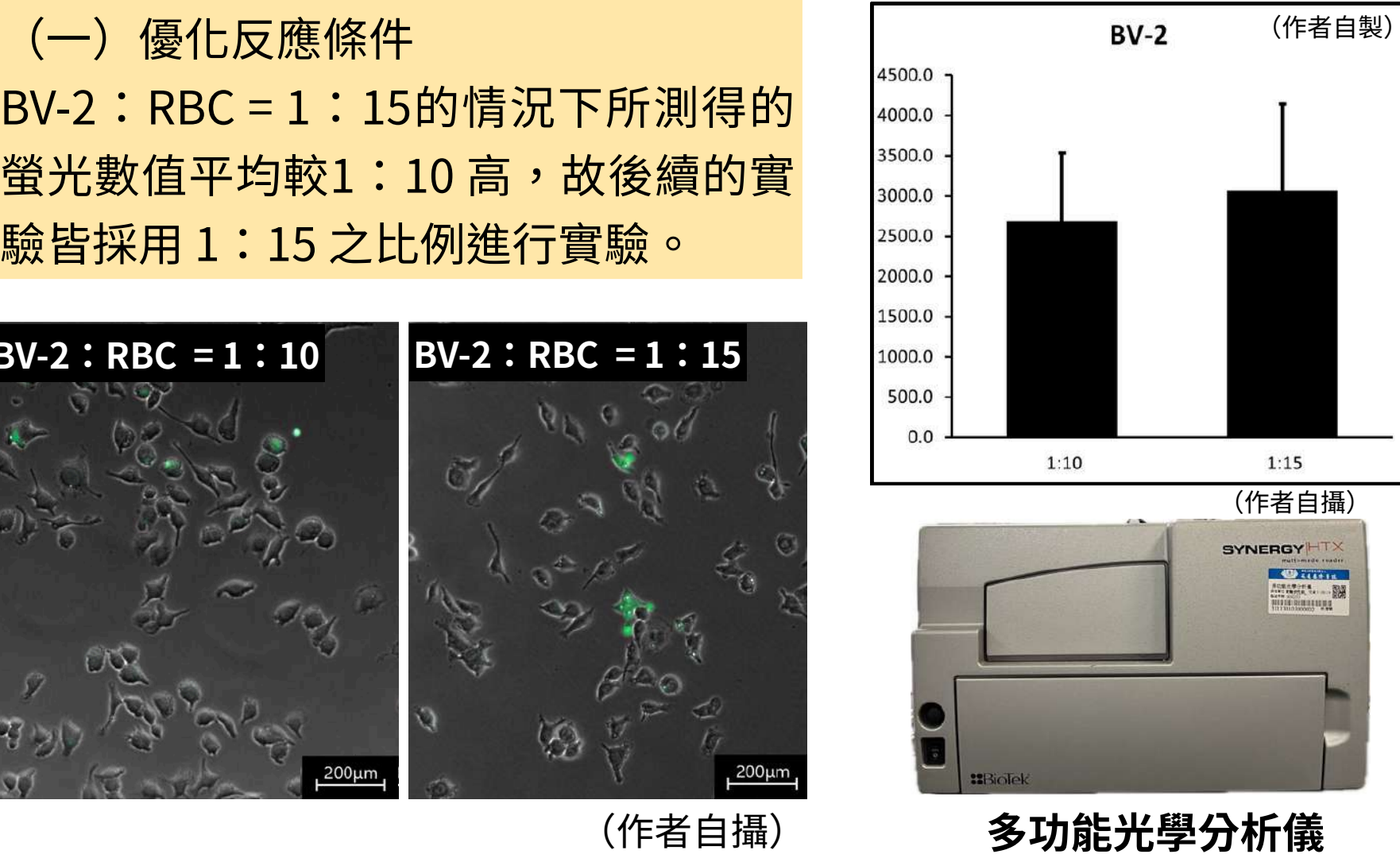
一、繼代培養



二、紅血球純化與螢光標記



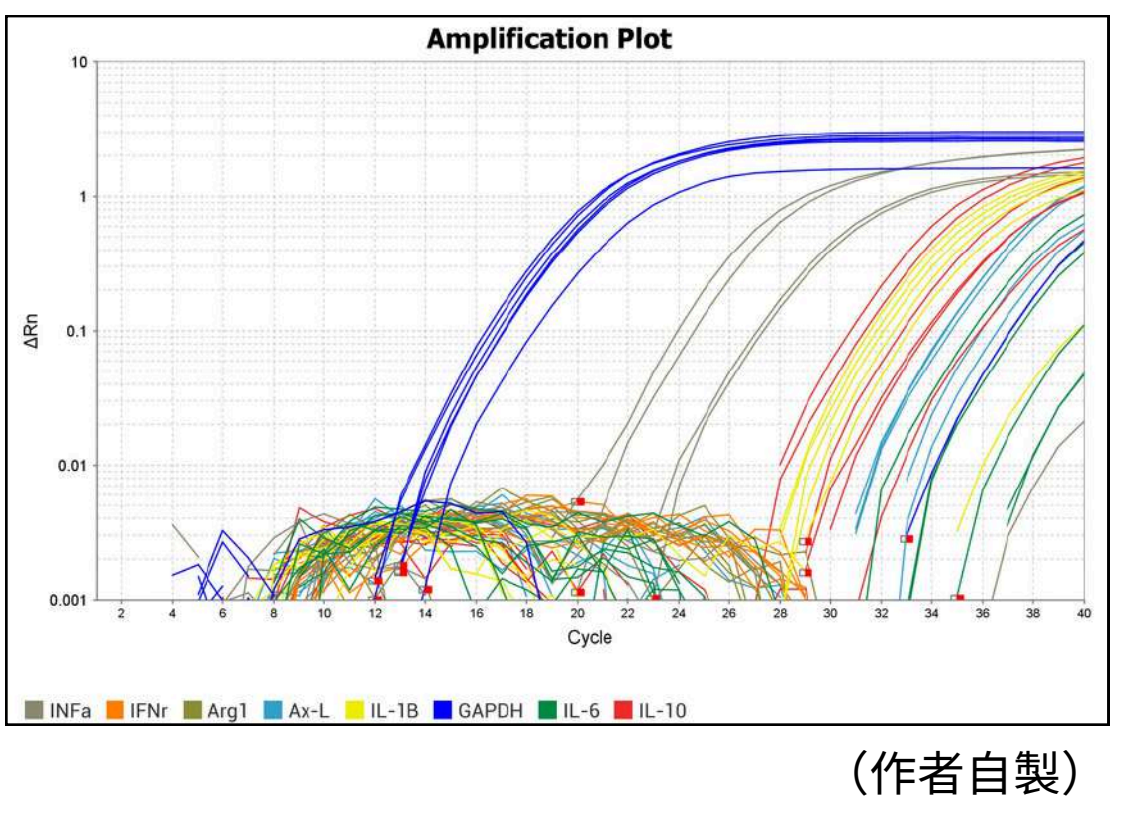
三、實驗一：以多功能光學分析儀測量螢光數值 (Phagocytosis Index)



四、實驗二：反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR)



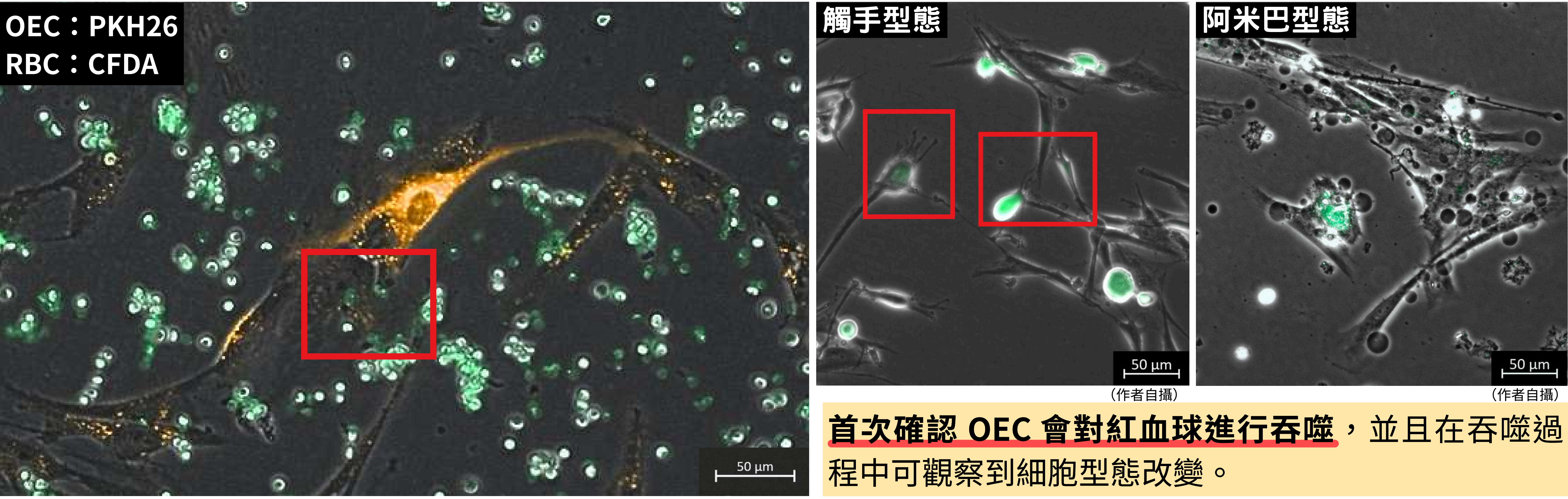
- (一) RNA純化
- (二) RT
- (三) qPCR
- (四) 2-ΔΔCt



伍、研究結果

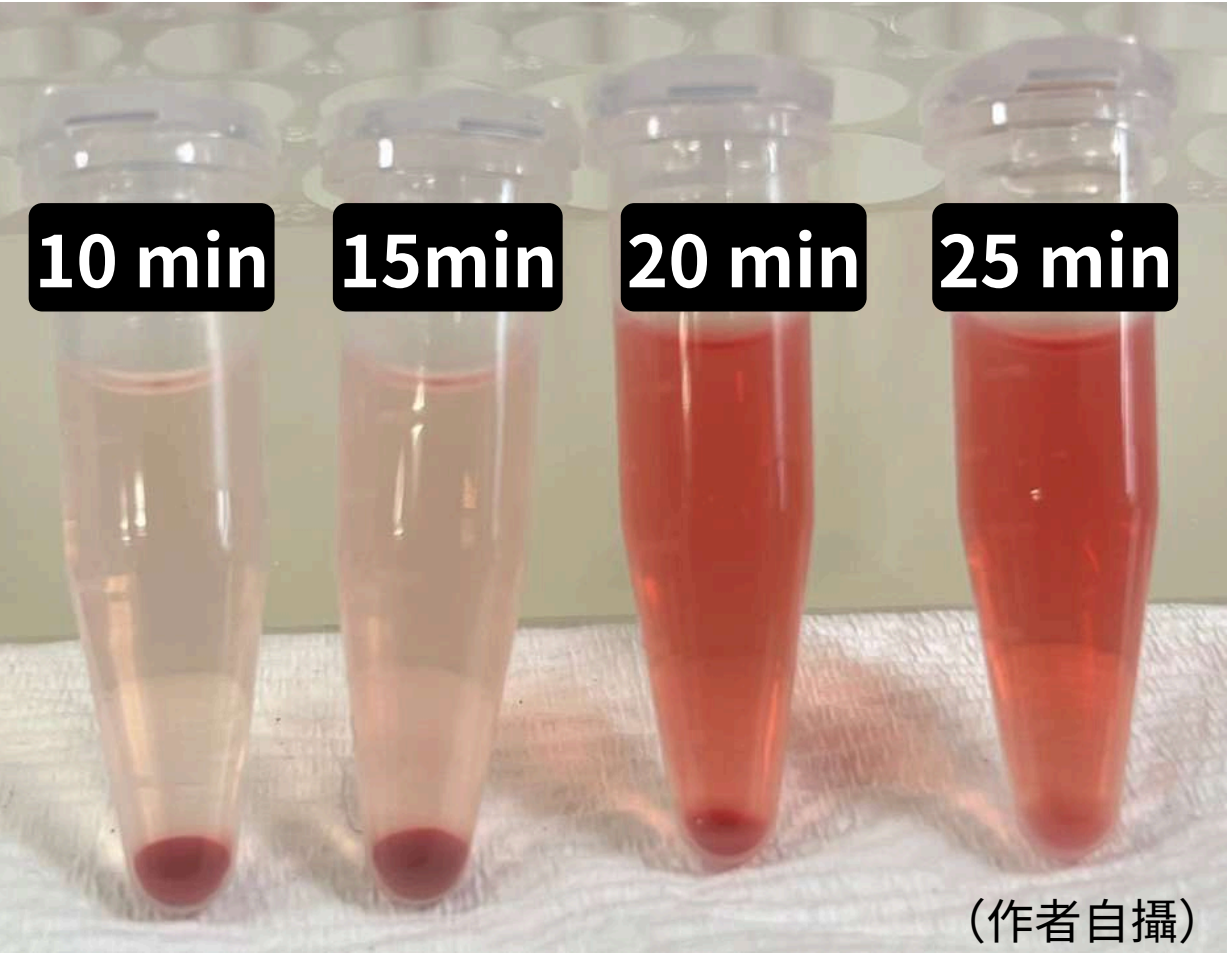
一、OEC 與 BV-2 對不同損傷程度紅血球的吞噬效果比較

（一）螢光影像觀察——OEC 吞噬畫面與細胞樣態



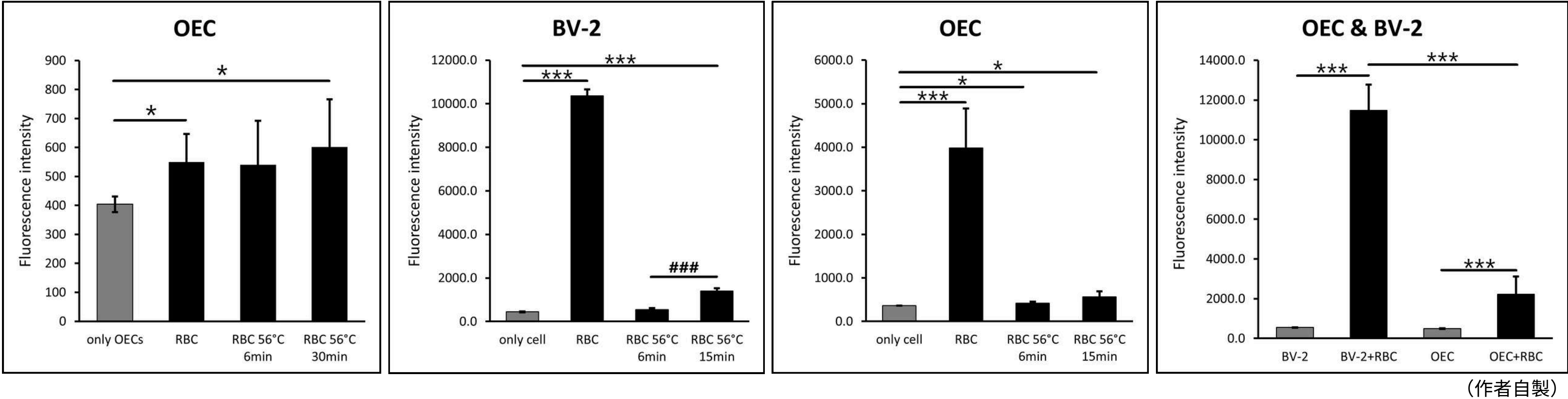
首次確認 OEC 會對紅血球進行吞噬，並且在吞噬過程中可觀察到細胞型態改變。

（二）56℃加熱紅血球



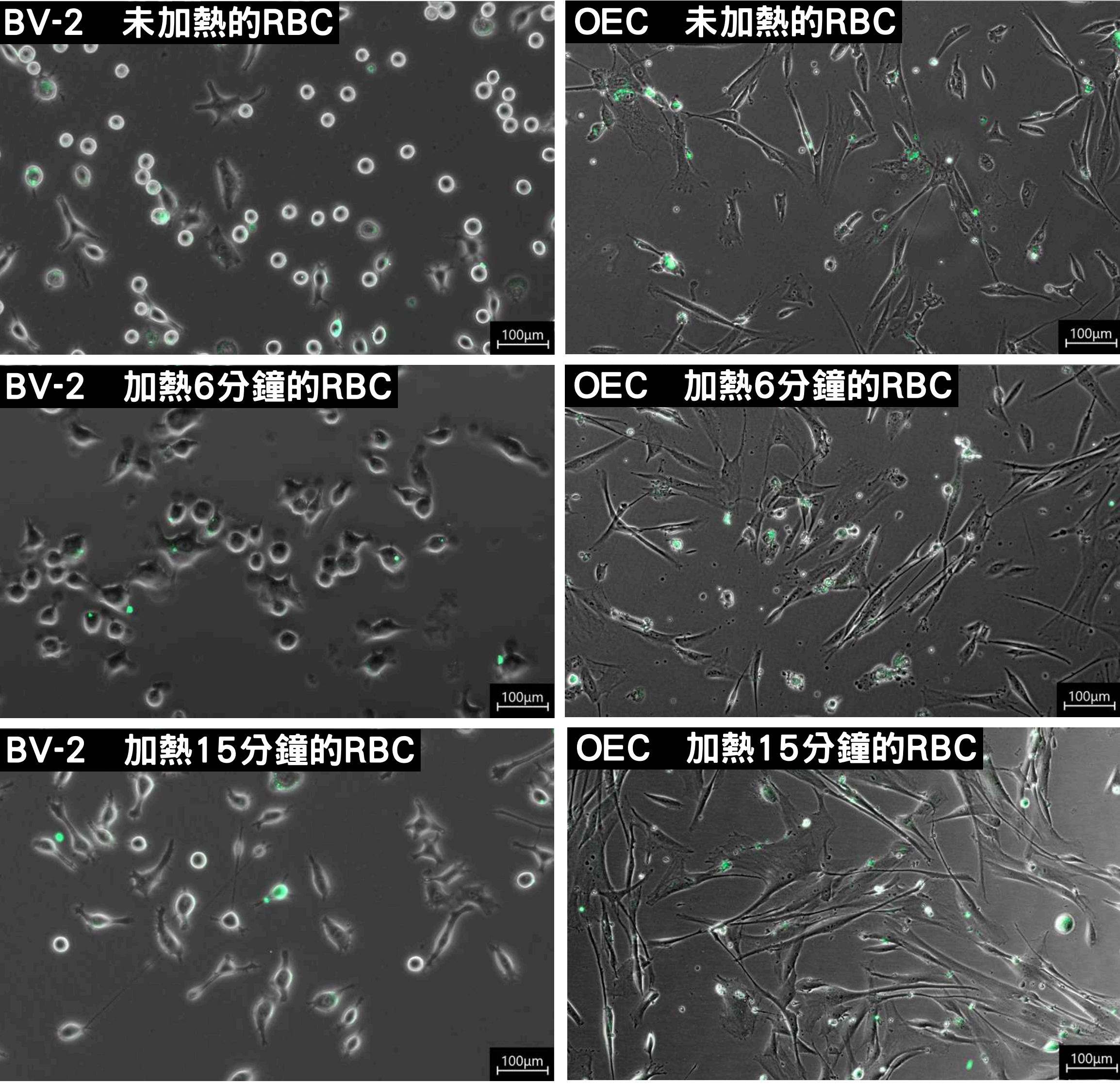
加熱25分鐘以上，幾乎無完好紅血球，僅紅血球殘渣。

（三）螢光數值比較



多功能光學分析儀結果顯示，OEC 與 BV-2 對未經加熱處理的隔夜紅血球吞噬表現最佳，對經加熱處理的紅血球相對較差，不便觀測，故後續實驗僅分析細胞對未加熱紅血球的吞噬效能。

（四）螢光影像觀察——不同加熱時長



二、以 RT-qPCR 探討吞噬過程中的基因表現量變化

（一）基因引子序列

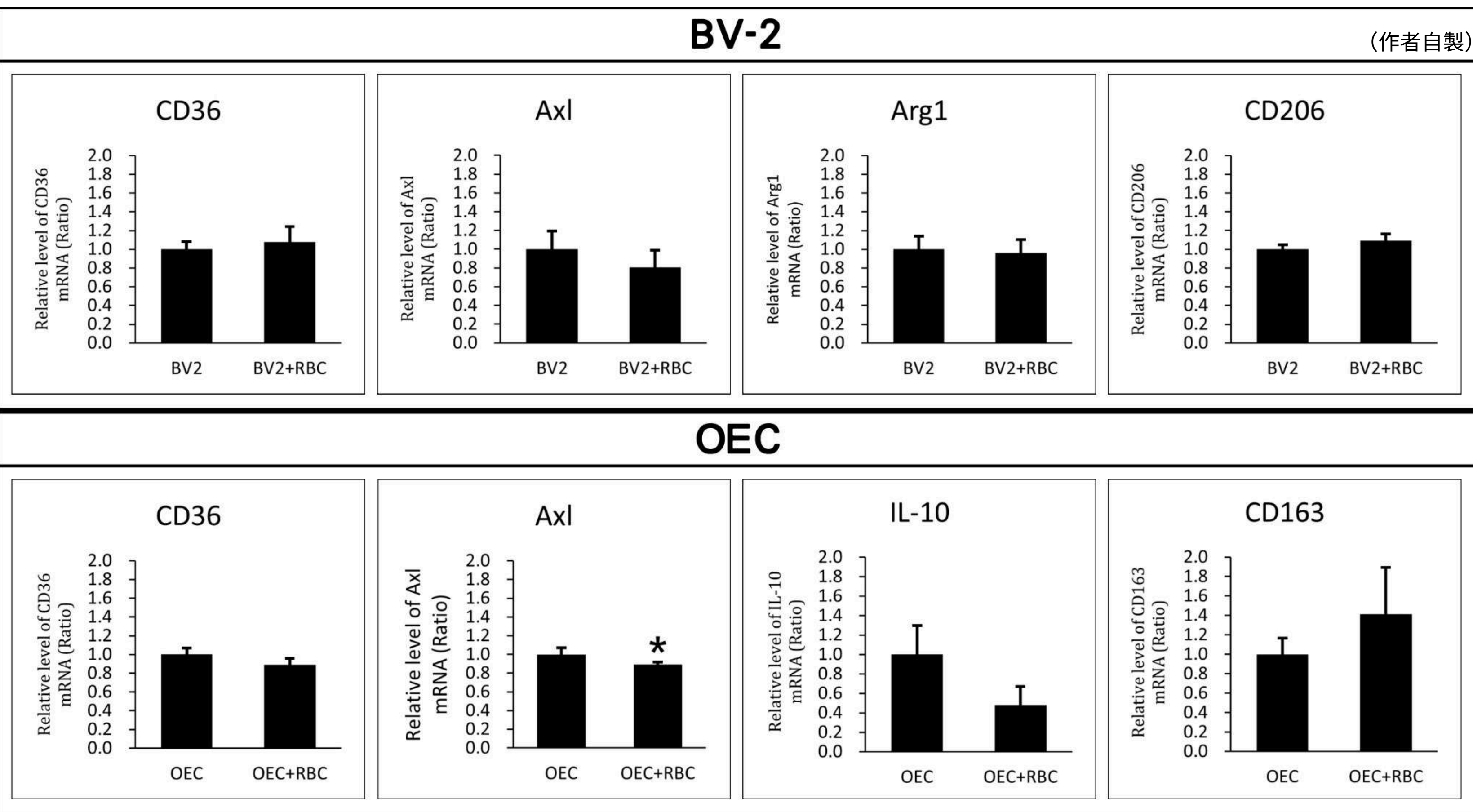
人類 OEC 細胞				小鼠 BV-2 細胞			
	名稱	前置引子 (Forward Primer)	反置引子 (Reverse Primer)		名稱	前置引子 (Forward Primer)	反置引子 (Reverse Primer)
促發炎	IL-1 β	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTCAAGAA	促發炎	IL-1 β	GCTGAAAGCTCTCCACCTCA	AGGCCACAGTATTTTGTG
	IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTCAGGTGTG		IL-6	GAGGATACCACCTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
	TNF α	TGGAGCTGGCCGAGGAG	AGCAGGCAGAAGAGCGTGG		TNF α	AGACCTTCACACTCAGATCATCTTC	CCACTTGGTGGTTTGCTACGA
	IFN γ	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA	TCGCTTCCCTGTTTATAGTCGC		IFN γ	TGATTACTACCTTCTTCAGCAACAG	CTGTGGGACCACTCGGATG
抗發炎	Arg1	GTGGAAACTTGCATGGACAAC	AATCTGGGCATCTGGGAATC	抗發炎	Arg1	GACCTGGCCTTTGTGATGT	CCATCTCTTGGACCTCTGCG
	Axl	GCAACCTTCACCTACCGAGTTC	GGCCAACATGGTGAACCCCT		Axl	GGTGTTTGAGGCCAACCGTGGAA	GCCACCTTATGCCGATCTACCA
	IL-10	GACTTTAAGGGTTTACCTGGGTTTG	TCACATGCGCCTTGATGTCTGT		IL-10	CCAGTTTACTCTGGTGAAGATGATG	TGTTCTAGGCTCTGGAGTCCAGCACTCAA
吞噬	CD163	CAGGAAACCACTGCCAAACA	AGCGACCTCTCCATTTACC	吞噬	CD163	TGGGTGGGGAAAGCATAACT	AAGTTGTGCTCACACCCGT
	CD36	GCCAAGGAAAATGTAAACCCAGG	GCCTCTGTTCACATGATAGTGA		CD36	GATGACGTGGCAAGAACAAG	TCTCTGGGTCTCTGAGTTAT
	CD206	TTCCGACACCACTCGGAATT	CACAAGCGCTGCGTGGAT		CD206	GGGACTCTGGATTGGACTCA	GCTCTTCCAGGCTCTGATG

（二）各基因 Ct 值 (cycle threshold) 比較

Ct值	促發炎基因	抗發炎/吞噬基因
22	無	Axl
約 28~29	IL-6、IL-1β	無
30 以上	TNFα	CD36、CD163、IL-10

Axl、IL-6 與 IL-1B 較高的CT值，進一步證明OEC 具有一定的吞噬能力，也顯示其不錯的免疫調節能力。

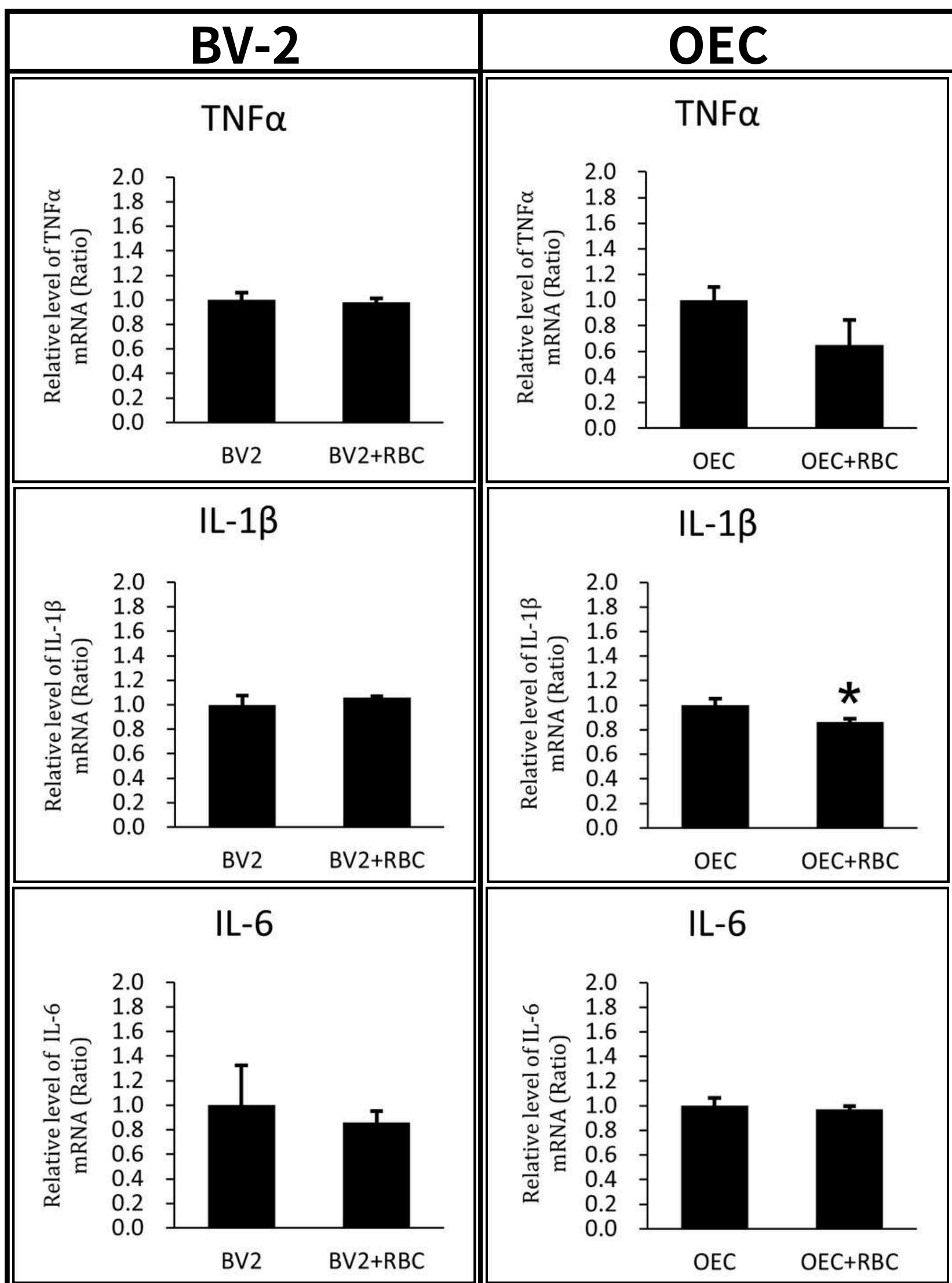
（三）抗發炎與吞噬基因表現量(3hr)



數據圖皆為平均值±SEM（統計結果*表示數據做雙尾t檢定所得的差異性結果，*表示p<0.05，**表示p<0.01，***表示p<0.001）

OEC 對紅血球進行吞噬的過程中 IL-1β、及 TNFα 這兩個促發炎基因的表現趨勢下降；在抗發炎基因中 CD163 則有上升的趨勢，且這個基因僅在 OEC 上表現。

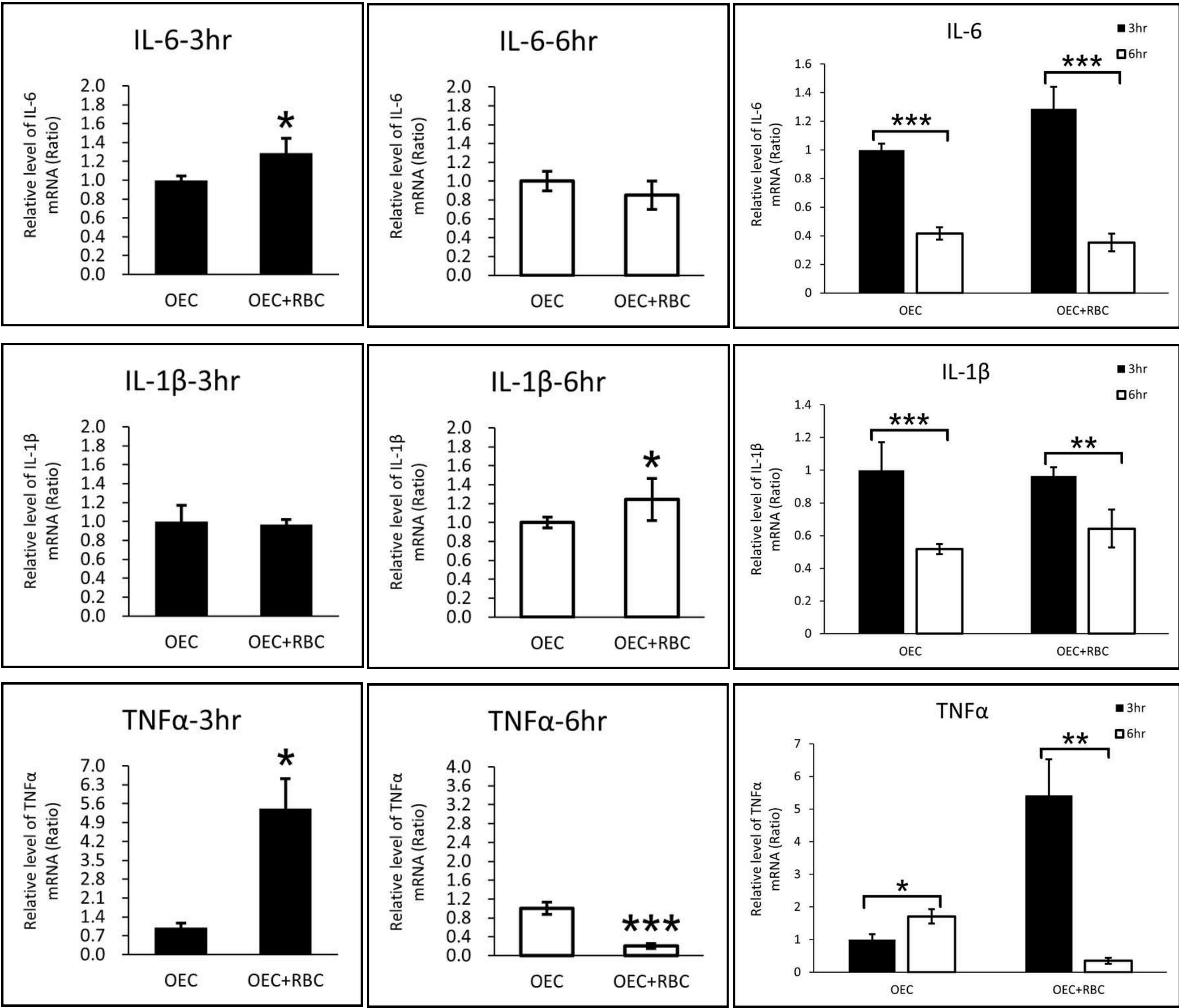
（四）促發炎基因表現量(3hr)



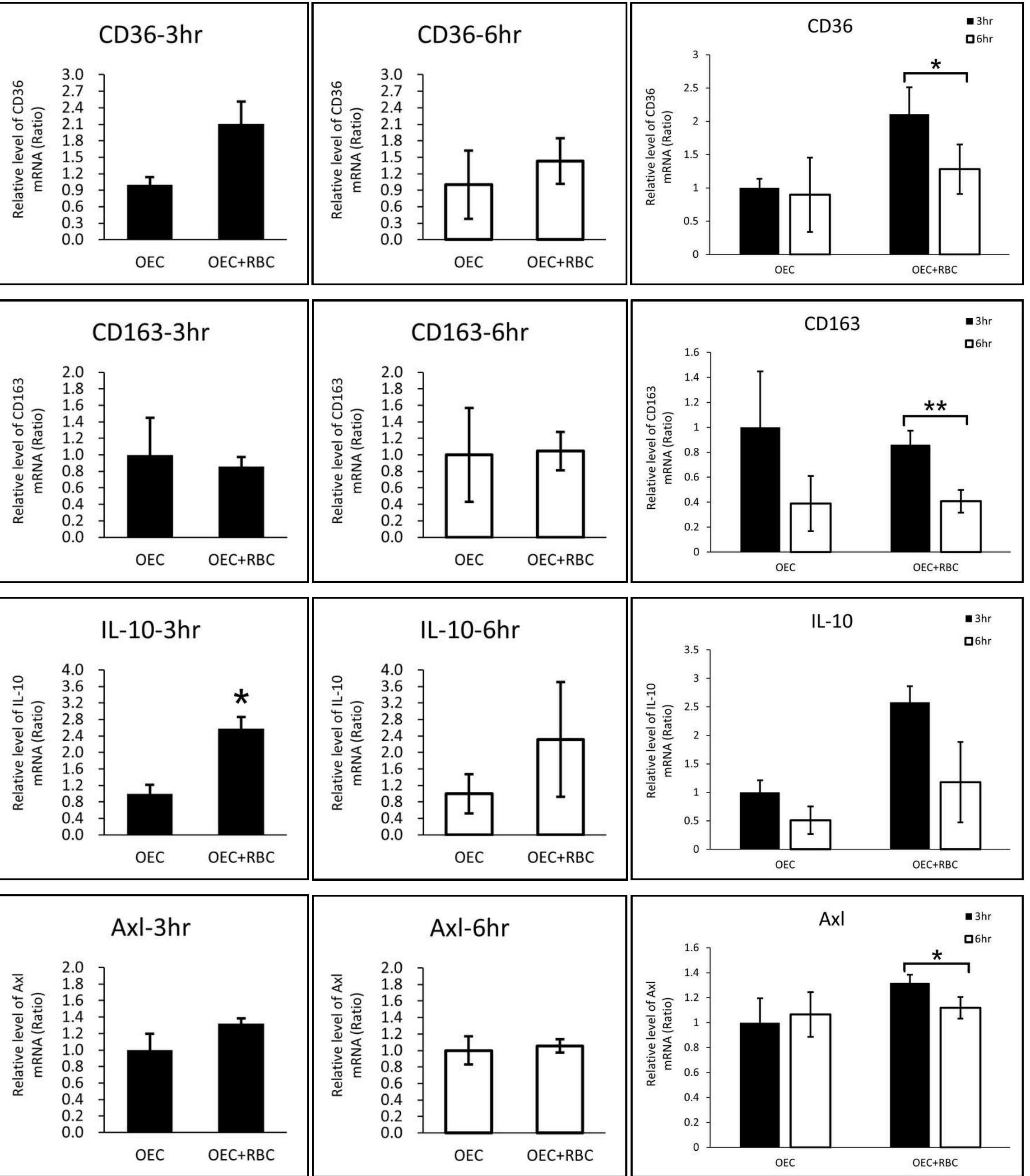
(作者自製)

(五) OEC 在反應時長 3 小時與 6 小時的基因表現量變化趨勢比較

1、促發炎基因



2、抗發炎與吞噬基因



各基因在反應時間 6 小時的表現量皆較反應時間 3 小時低，顯示在 OEC 吞噬紅血球的過程中，促發炎基因與抗發炎基因的表現量皆在較早的時間點提高。

注：數據圖皆為平均值±SEM（統計結果*表示數據做雙尾t檢定所得的差異性結果，*表示p < 0.05，**表示 p < 0.01，***表示 p < 0.001）

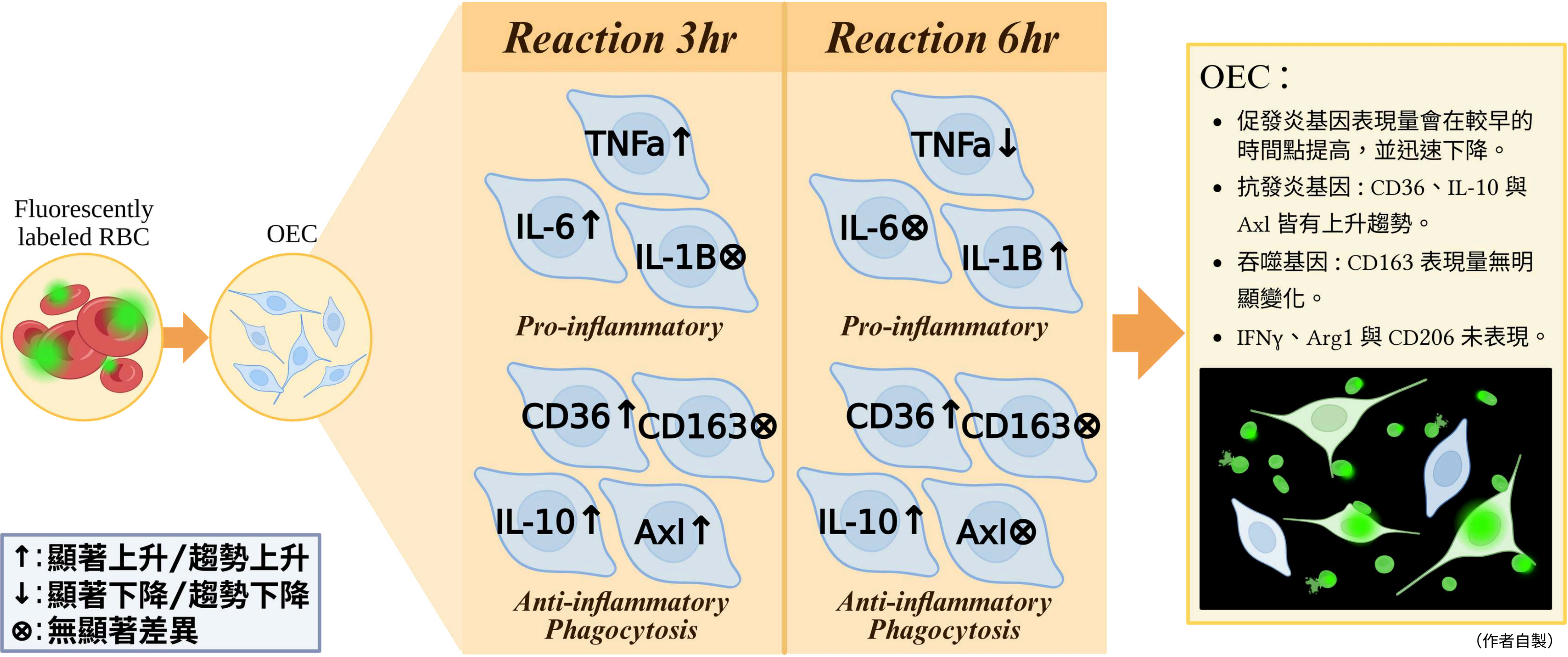
陸、研究討論

一、OEC 對不同加熱時長紅血球展現不同吞噬能力

無論紅血球是否經加熱處理，OEC 與 BV-2 均展現吞噬行為，其中 OEC 對經長時間加熱（30分鐘）之紅血球殘渣具良好吞噬能力，此結果與相關文獻中 OEC 可吞噬死亡神經元碎片之現象一致。而針對經加熱 6 分鐘與 15 分鐘處理的紅血球，OEC 的吞噬效果相對不佳，與預期相悖。理論上，受損紅血球會釋放促發炎因子，引發免疫細胞遷移與吞噬反應，因此我們推測，紅血球受損後釋放的神經毒性物質可能對 OEC 本身亦具毒性，持續釋放的毒素可能造成 OEC 細胞受損，進而抑制其吞噬功能。如需驗證此假設，可進一步進行乳酸去氫酶細胞毒性分析，以評估 OEC 在暴露於經加熱紅血球後的細胞損傷情形。

二、OEC 進行吞噬作用時促發炎、抗發炎與吞噬基因表現量變化趨勢

整體來看，六小時的促發炎基因表現皆低於三小時，顯示 OEC 在吞噬紅血球過程中，促發炎反應多於早期啟動，並於後期迅速下降。抗發炎基因方面，IL-10 在三小時時顯著上升，CD36 與 Axl 則呈現上升趨勢；至六小時的時候，IL-10 與 CD36 的表現仍維持上升趨勢。這些結果顯示，OEC 在紅血球吞噬過程中，不僅早期啟動促發炎反應，也同步誘導抗發炎基因的表現，可能具備一定的自我調節與炎症平衡能力。



柒、研究結論

透過離體細胞實驗，我們首次確認 OEC 對完整與嚴重損傷紅血球皆具清除能力，螢光顯微鏡也可觀察到OEC 會活化、改變型態，並包圍、吞噬紅血球。

RT-qPCR 結果顯示在 OEC 對紅血球進行吞噬作用中，IFNγ、Arg1 與 CD206 可能與 OEC 吞噬紅血球的機制無明顯相關。我們也發現促發炎基因在初期表現量上升，隨後快速下降；而抗發炎基因如 IL-10 及 Axl 與吞噬基因 CD36 則呈現上升趨勢，尤其在反應時間為 3 小時時，IL-10 表現顯著提升。

此結果顯示 OEC 可能藉由調節特定基因表現，達到吞噬紅血球、清除損傷與調控免疫反應的功能。

捌、未來展望

本研究所分析的基因僅限於十種，尚有許多功能相近或具潛在關聯性的基因未被納入探討，OEC 在吞噬紅血球過程中的完整分子機制仍不明確。未來研究將著重於擴大基因表現分析範圍，以更全面地揭示 OEC 在腦出血後血腫清除與神經保護中的作用，期望為臨床帶來新的治療契機。