

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：超音波對星狀細胞產生神經營養因子的影響

得獎獎項：佳作

學校 / 作者：臺北市立建國高級中學

楊宗翰

作者簡介



本名楊宗翰，生日 1989 年 11 月 1 日，就讀於建國中學。從小就在健康的環境長大，閱讀過不少科普書籍，時常吸收不同管道的新知，後來也愛上了大自然的美景和奇妙現象。曾學過素描、珠心算、打擊樂等才藝，因為母親是音樂系出身，偶爾也會在家彈鋼琴。

今年是我高中的最後一年，在高二成發後以這題目參賽，希望能為高中三年的生涯畫下完美句點。

目錄：

摘要.....	2
壹、 前言.....	4
貳、 研究設備及器材.....	5
參、 研究過程或方法.....	6
肆、 研究結果.....	10
伍、 討論.....	15
陸、 結論與應用.....	16
柒、 參考文獻.....	17

Abstract

The ultrasound technology has been widely applied in the clinical practice for many years, such as monitoring of fetus, lithotripsy, rehabilitation after fracture, as well as the ultrasound stimulation of brain tissue, etc. The purpose of this study is to investigate the therapeutic effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on the injured brain. In this study, we adopted the in vitro model of astrocyte cultures. The tumor necrosis factor- α (TNF- α) was used to simulate the condition of ischemic stroke. We used LIPUS to stimulate the cultured astrocytes, then we assessed the concentration of nitric oxide (NO) in the culture medium. We also assessed the expression of messenger RNA (mRNA) of both brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF).

The results showed that NO increased after the addition of TNF- α . In addition, treatment of LIPUS increased the expression of NO, as well as the mRNA of both BDNF and GDNF. The BDNF is able to support the survival of neuron, as well as stimulate differentiation of neurons and synapses. GDNF can also increase the survival of various kinds of neurons. Furthermore, NO may regulate the secretion of neurotransmitters, increase the blood flow in the brain, as well as enhance the processing of memory. Our preliminary results also demonstrated that both BDNF and GDNF protein increased in response to LIPUS in the presence of TNF- α . Therefore, treatment with LIPUS implicated an environment favoring the protection of neurons.

摘要

超音波應用於臨床已行之有年，而以穿透式超音波打入腦部的想法也已提出，本實驗目的即為測試低強度間歇性超音波達到腦部受傷後治療的可能。本實驗採用星狀細胞培養模式來探討，首先以腫瘤壞死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 模擬中風缺氧的狀態，並利用低強度間歇性超音波刺激星狀細胞，然後檢測其培養液中一氧化氮(nitric oxide, NO)的濃度變化，以及大腦衍生神經營養因子(Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF)、神經膠質衍生神經營養因子(Glial-derived Neurotrophic Factor, GDNF)之 mRNA 表現的情形。

由實驗結果顯示，在 TNF- α 存在狀況下則能使 NO 濃度上升，施打低強度間歇性超音波可促使 NO 增加，並提升上述 BDNF、GDNF 兩種蛋白質之 mRNA 表現，BDNF 可幫助支持神經元生存，促使新神經元和突觸的發展及分化；GDNF 可有效提昇許多類型神經元生存率；而適當之 NO 濃度可以調節神經傳遞物質釋放和腦血流，乃至於影響到記憶的產生。我們初步的結果也顯示在 TNF- α 存在下，超音波可以增加 BDNF 及 GDNF 蛋白之產生，因此本研究結果顯示低強度間歇性超音波可提供有利於神經元的環境。

壹、前言

長久以來，人們對於神經系統的認知都聚焦於神經元細胞，然而神經膠細胞數目是神經元細胞的數十倍，可是與其相關的研究卻遠遠不及後者，但越來越多的證據顯示，神經膠細胞除了保護、清除外，還有更多重要的功能。

神經膠細胞，包括星狀細胞、寡突細胞及微膠細胞，其中星狀細胞負責中樞神經系統之營養與支持，並與微血管形成血腦障壁，提供中樞神經系統中穩定而不受干擾之微環境。除此之外，星狀細胞可分泌大腦衍生神經營養因子(Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF)、神經膠質衍生神經營養因子(Glial-derived Neurotrophic Factor, GDNF)等。

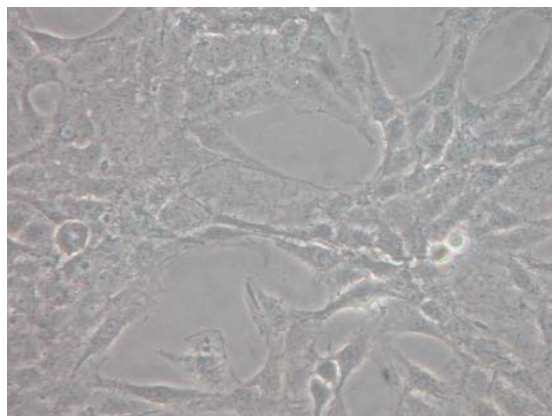
BDNF 是在中樞神經系統的某些神經元和周邊神經系統上具有活性的蛋白質，大小約為 28 kDa。BDNF 可幫助神經元生存，促使新神經元和突觸的發展及分化，抑制神經元細胞的老化與凋亡。在治療退化型神經疾病的動物實驗中發現，用基因療法使細胞直接製造 BDNF，可有效改善神經退化的情形。研究顯示：缺乏 BDNF 將造成阿茲海默症(Alzheimer's Disease)、帕金森氏症(Parkinson's Disease)、亨廷頓舞蹈症(Huntington's Disease)、雷特氏症候群(Rett's disorder)。

GDNF 可有效提昇許多類型神經元生存率，大小介於 33 到 45 kDa，屬於轉型性生長因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)系列，同時調節腎的發展。臨床上，GDNF 對帕金森氏症的治療有顯著效果，於癲癇症狀、破壞神經的病症亦有明顯的療效(2)。

在正常狀態下，一氧化氮(NO)是一種神經傳訊分子，參與腦內許多生理功能和病理生理過程。NO 調節神經遞質釋放和腦血流，參與神經發育和基因表達調控。過多的 NO 有神經毒性，與許多神經系統疾病有關。然而最近的研究指出，當腦部缺乏氧氣時，將促使 NO 濃度增加，而後透過一連串作用產生神經保護機制(1、6)。

超音波應用於人體已行之有年，廣泛應用於治療、手術與診斷等方面，例如新生兒胎檢、震碎結石、骨折後之復健。結合穿透式超音波的發明，已可將超音波打進腦部，日後或許會出現應用於腦部疾病的超音波療法。

本實驗利用低強度間歇性超音波以及腫瘤壞死因子 α (TNF- α)處理癌化星狀細胞(astrocyte, C6)，檢測其培養液中一氧化氮的濃度變化，以及 BDNF、GDNF 之 mRNA 表現、蛋白質的情形。



圖一 星狀細胞(200 x)

貳、 研究設備及器材

- 一、生物：癌化星狀細胞(C6)
- 二、細胞培養：培養皿(中型)、培養用培養液(D-MEM、血清 10%、抗生素 1%)、PBS、Trypsin、細胞培養機(Incubator)、顯微鏡
- 三、實驗設備：培養皿(6 孔型)、Exogen Ultrasound(Smith & Nephew Co., 6 channel)、離心設備、96 孔微量平盤、吸量管、恆溫水槽、電子天秤、乾浴加熱器、ELISA 微量盤分析儀、核酸增殖機、電泳設備、冰箱(-30°C、-80°C)、蛋白質電泳槽、鑄膠器、超音波震盪機、西方墨點法轉印器、轉印膜、Kodak X-OMAT LS film
- 四、使用藥品：TNF- α (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、Griess I、Griess II、Trizol、chloroform、isopropanol、alcohol(75%)、Oligo (dT) 15、M-MLV 5 \times Reaction Buffer、Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor、M-MLV RT、10 \times PCR Buffer、25 mM MgCl₂、10m M dNTP mix、Taq DNA Polymerase、10 μM sense primer、10 μM antisense primer(GAPDH、BDNF、GDNF)、dd water、DEPC water、TAE buffer、agarose、EtBr、DNA loading buffer、DNA ladder、SDS Running Buffer、Tris 1.5M (pH8.8)、Tris 1.0M (pH6.8)、30% SDS、10% SDS、10% APS、TEMED、Antibodies(α -tubulin、BDNF、GDNF)、Prestained protein ladder、Transfer Buffer、BSA、10 \times PBS、10 \times PBST



圖二 Exogen Ultrasound(Smith & Nephew Co., 6 channel)

參、 研究過程或方法

一、培養細胞

- (一) 將星狀細胞(C6)細胞分盤放置於培養皿(中型)，加入培養液 10 ml。
- (二) 置入細胞培養機，等待數日。
- (三) 將星狀細胞分裝於培養皿(6 孔型)，加入培養液 1 ml。
- (四) 置入細胞培養機，等待二日。

二、施打超音波(ultrasound, US)

- (一) 將裝有星狀細胞的 6 孔培養皿(A~F)從細胞培養機取出。
- (二) 更換培養液，每格重新盛裝 900 μ l 的培養液。
- (三) 裝置 Exogen Ultrasound(Smith & Nephew Co., 6 channel)於培養皿，分別施打超音波，AD 組為 0 分鐘、BE 組為 5 分鐘、CF 組為 10 分鐘。
- (四) 打完超音波，靜待 30 分鐘。
- (五) 於 D、E、F 添加 TNF- α (500 ng / μ l)100 μ l。
- (六) 於 A、B、C 添加 100 μ l 的培養液。
- (七) 置入細胞培養機。

表一 細胞培養皿之實驗設計示意圖(A*為控制組)

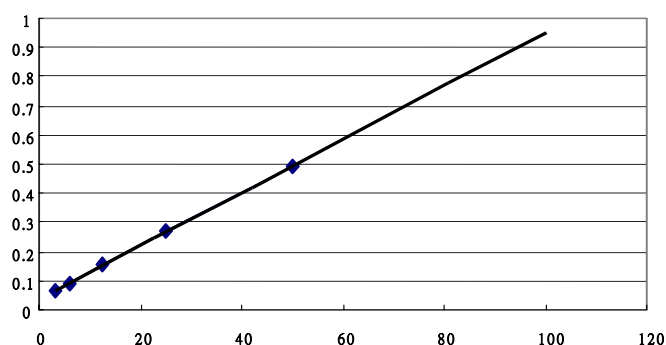
A* UltraSound 0 min TNF- α (-)	B UltraSound 5 min TNF- α (-)	C UltraSound 10 min TNF- α (-)
D UltraSound 0 min TNF- α (+)	E UltraSound 5 min TNF- α (+)	F UltraSound 10 min TNF- α (+)

三、測量 NO 濃度

- (一) 6 小時後，A~F 各取 100 μl 的培養液，放入 96 孔微量平盤
- (二) 為減少誤差，A~F 再各取 100 μl 的培養液，放入 96 孔微量平盤
- (三) 每格添加 Griess I、Griess II 各 100 μl ，避光 5 分鐘
- (四) 置入測光機，測量透光值
- (五) 利用 NO 濃度與吸光值之標準曲線(表二、圖二)得知 NO 濃度

表二 NO 吸光值與濃度換算表

NO conc.	透光值
50	0.493
25	0.272
12.5	0.158
6.25	0.093
3.125	0.066



圖三 NO 吸光值與濃度之標準曲線
(standard curve)

四、抽取 RNA sample

- (一) 靜待 6 小時後，自細胞培養機取出 6 孔培養皿。
- (二) 將培養皿中的培養液吸除，添加 Trizol 0.5 ml，潤洗數回(10 至 20 次)。
- (三) 將每一格中的溶液吸至離心管，置於室溫 15 分鐘。
- (四) 添加 chloroform 100 μl ，劇烈搖晃 30 秒至外觀呈牛奶狀，置於室溫 15 分鐘。
- (五) 離心(14300 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$)15 分鐘。
- (六) 小心取其上清液(約 200-300 μl)至離心管。
- (七) 添加 isopropanol 250 μl ，倒轉數回，置於室溫 10 分鐘。
- (八) 重複步驟(五)。
- (九) 吸除上清液，添加 75%酒精 1 ml，倒轉數回。
- (十) 重複步驟(五)(離心時間縮短為 10 分鐘)。
- (十一) 吸除酒精，使其乾燥。
- (十二) 加入 30 μl DEPC Water，均勻混合。
- (十三) 加溫至 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘。
- (十四) 置於冰上 30 分鐘。
- (十五) 每管取 1 μl 跑電泳，取適量作以下實驗，剩餘的保存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

五、反轉錄技術 M-MLV RT(Reverse Transcription)

反轉錄技術，一種利用 mRNA 反轉錄酶將 mRNA 反轉錄為 cDNA 的技術。本實驗用的酵素為 M-MLV 系統，一次可轉錄約 1 μg 的 cDNA。

六、聚合酶鏈鎖反應 PCR(Polymerase Chain Reaction)

聚合酶鏈鎖反應，利用 Taq DNA Polymerase 在高溫下不會失去活性的性質來增殖 cDNA，不同的 primer 針對不同的片段進行複製。本實驗主要觀測三個訊息片段：GAPDH、BDNF、GDNF。GAPDH 為呼吸作用之一重要酵素，其 mRNA 於細胞核內之表現量不受外界影響，可拿來作為定量的基準；BDNF、GDNF 之 mRNA 則是本實驗的主要觀察對象。

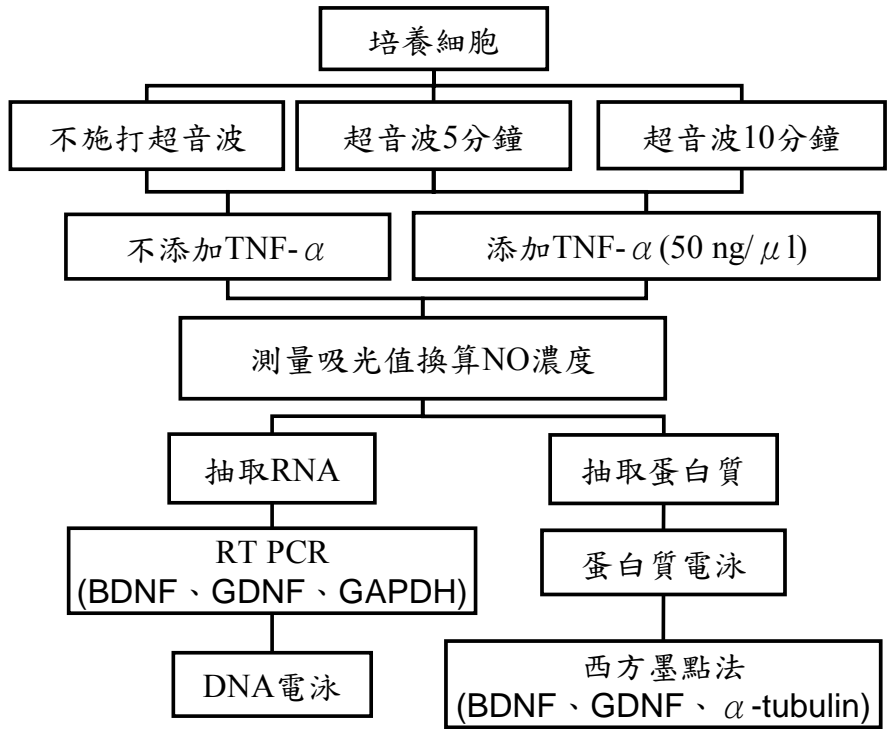
GAPDH 需經 28 循環數，BDNF、GDNF 皆須 34 循環數，且最低溫 GAPDH、BDNF 為 55°C，GDNF 為 58°C。

七、cDNA 電泳

利用電壓迫使 cDNA 在膠體上移動，根據不同分子量會有不同運動速率的特性，分離出欲觀察的片段。本實驗使用 EtBr 內染法，膠體成分為 1g agarose + 500 ml TAE buffer，電泳條件：100 V，20 分鐘

八、蛋白質電泳

- (一) 製膠，架膠。
- (二) 配置蛋白質緩衝液、蛋白酶抑制劑和還原劑溶液
- (三) 24 小時後，自細胞培養機取出 6 孔培養皿，抽除培養液。
- (四) 每格添加步驟一配置之溶液 150 μl ，用刮刀刮約 50 次。
- (五) 抽起至離心管，用超音波震盪機震盪至起泡，置於冰上。
- (六) 測定每管蛋白質濃度，用染劑稀釋至相同濃度，加溫至 100°C。
- (七) 取相同量注入電泳槽膠格內，開始電泳。
- (八) 電泳結束後，用轉印機轉印至轉印膜。
- (九) 浸泡 BSA(4%)，保持 4°C 過夜。
- (十) PBST 潤洗三回，浸泡一級抗體稀釋液(1:1000)BDNF、GDNF。
- (十一) PBST 潤洗三回，浸泡二級抗體稀釋液。
- (十二) PBST 潤洗三回，加入呈色劑，至暗房曝光、洗片。



圖四 實驗流程

*添加 TNF- α (50 ng / μ l) 六小時後有最好的促進效果(4)。

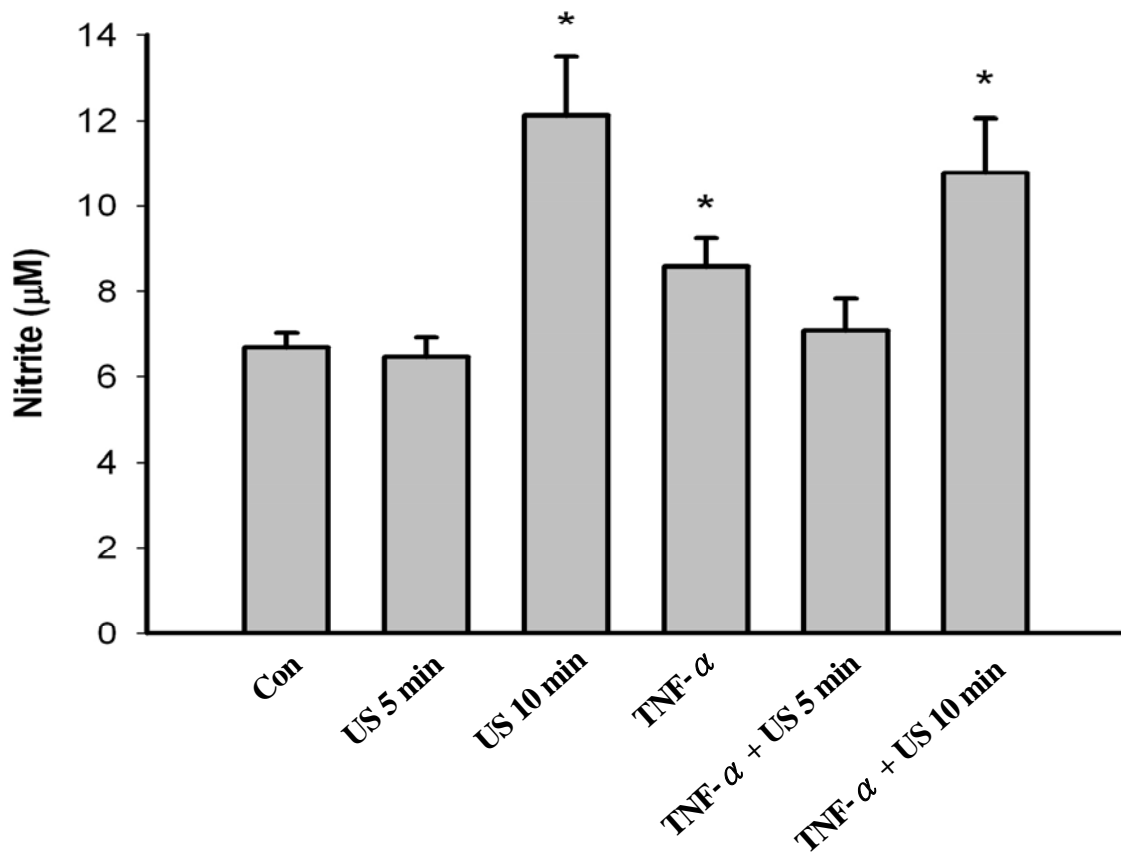
肆、 研究結果

一、培養液中 NO 濃度的變化(n=7)(圖五)

由於 NO 的存在時間很短即轉變成 nitrite，因此我們測量培養液中的 nitrite 濃度來反應釋出的 NO 量，我們測出各組吸光值換算濃度。表三為 A~F 組的吸光值與對應 nitrite 濃度，圖五為 A~F 組的濃度變化圖。

表三 NO 濃度

	超音波(min)	TNF- α	Nitrite 濃度(μ M)
A	0	-	6.702
B	5	-	6.466
C	10	-	12.113
D	0	+	8.578
E	5	+	7.080
F	10	+	10.784

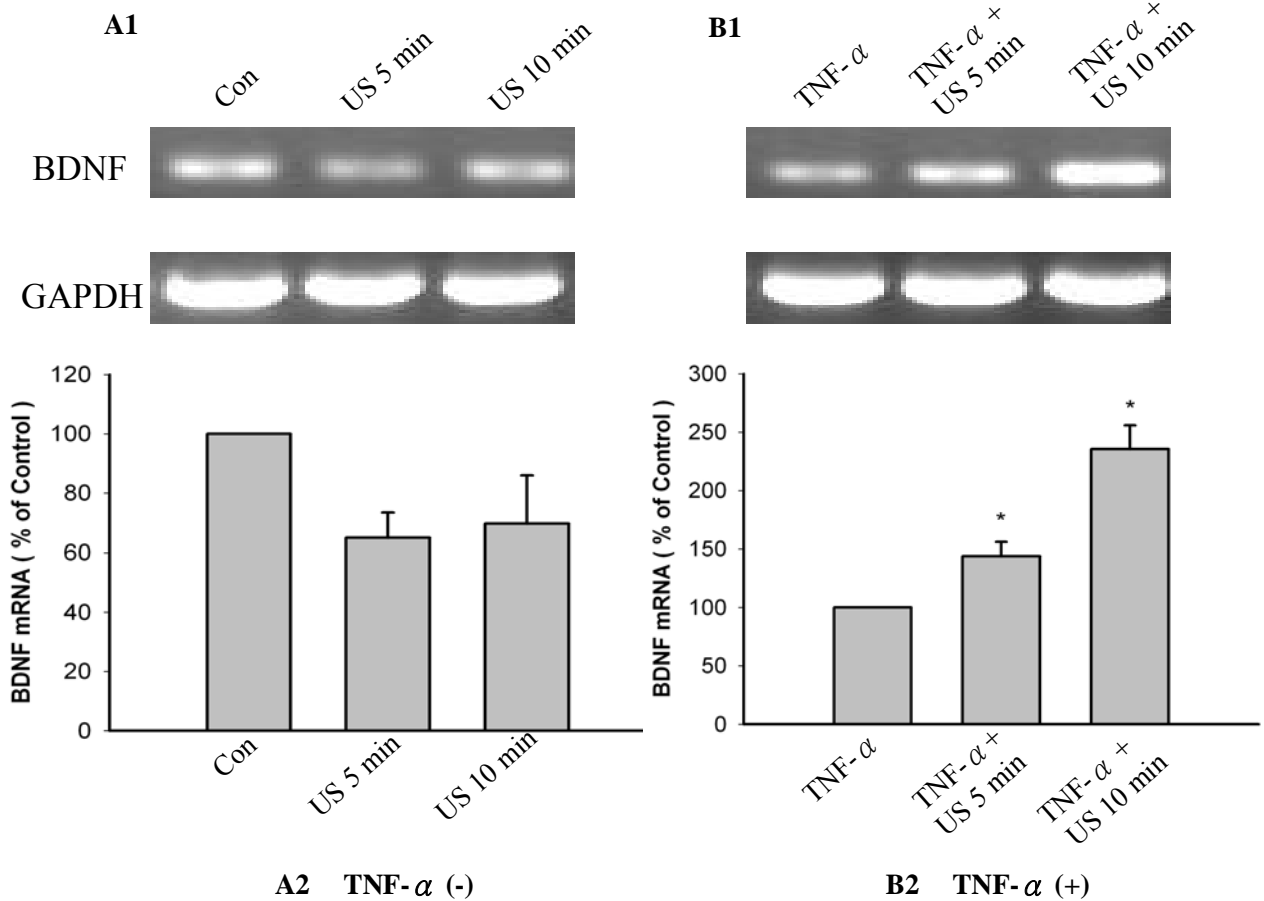


圖五 Nitrite 濃度變化圖

(1)與對照組相較下，施打超音波十分鐘組 NO 濃度顯著上升。(2)添加 TNF- α 時，NO 濃度上升。(3)添加 TNF- α 且施打超音波十分鐘組，NO 濃度上升，但沒有加成的效果。數據以平均值 \pm 標準誤差(SEM)表示。(*表示與 Con 比較，其 p value<0.05)

二、BDNF 之 mRNA 表現量(n=6) (圖六)

各組 BDNF 之 mRNA 的電泳圖(A1、B1)與結果量化相對圖(A2、B2)。

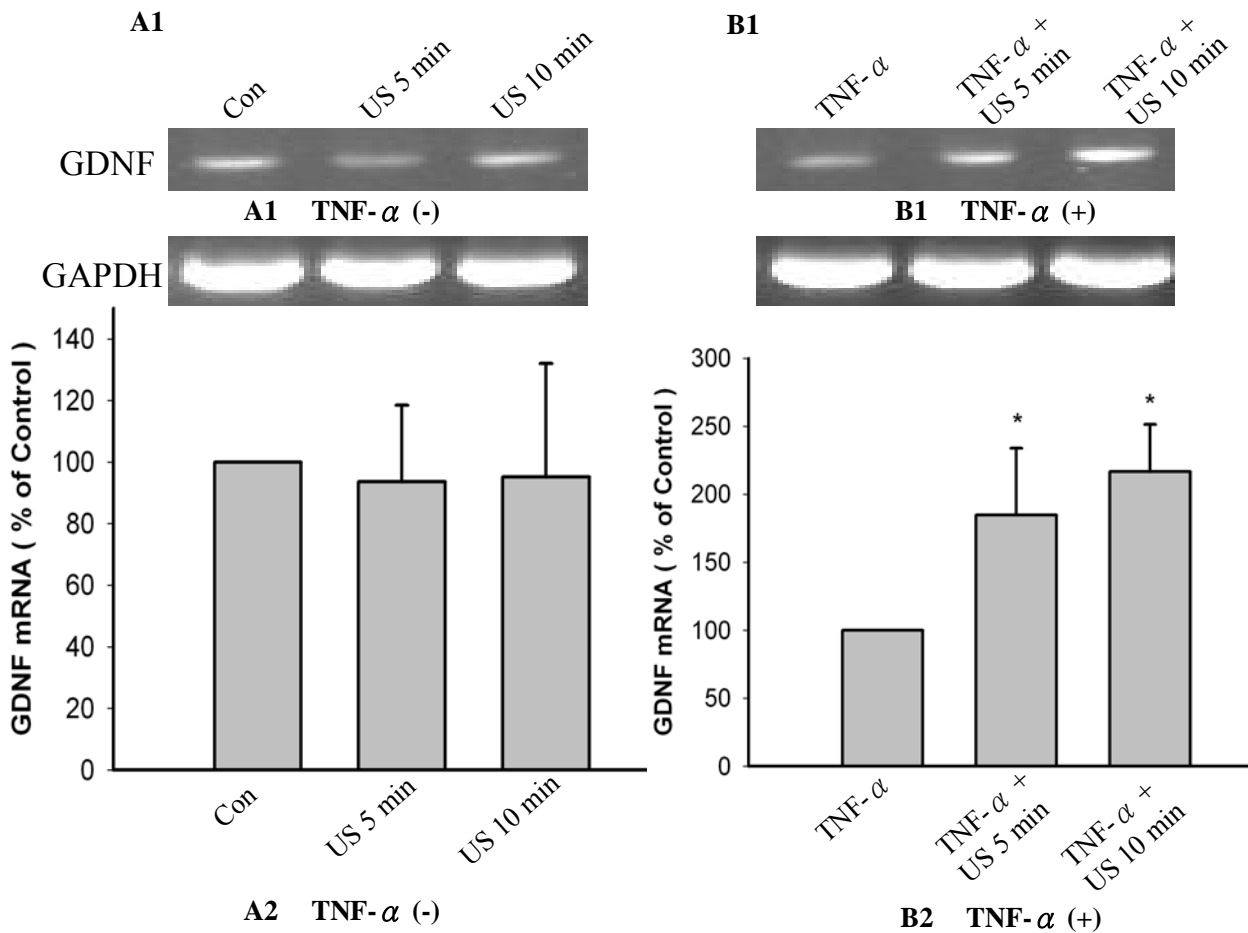


圖六 A1、B1 為 BDNF 電泳結果圖，A2、B2 為 BDNF 電泳結果量化圖

(1)沒有 TNF- α 時，施打超音波 BDNF 之 mRNA 表現量無明顯變化。(2)TNF- α 存在時，施打超音波則 **BDNF** 表現量比對照組有顯著的提升，表現量之比大約為 1：1.5：2.5。數據以平均值 \pm 標準誤差(SEM)表示。(以當組未施打超音波之值為基準)(*表示與未施打超音波之組比較，其 p value<0.05)

三、GDNF 之 mRNA 表現量(n=5)(圖七)

各組 GDNF 之 mRNA 的電泳圖(A1、B1)與結果量化相對圖(A2、B2)。

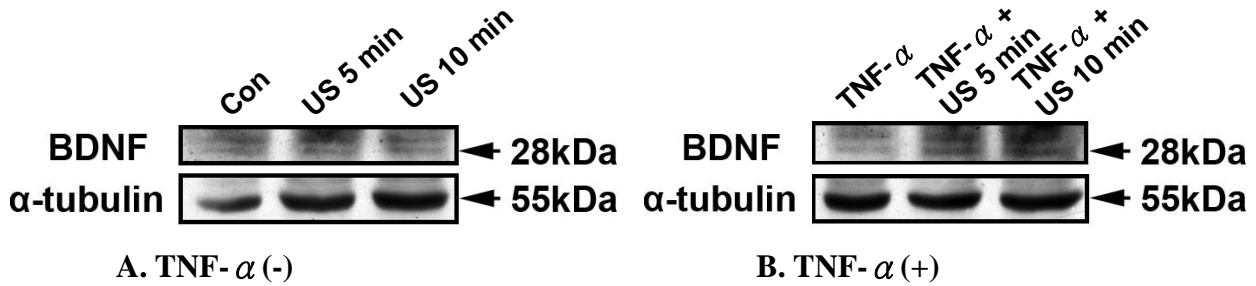


圖七 A1、B1 為 GDNF 電泳結果圖，A2、B2 為 GDNF 電泳結果量化圖

(1)沒有 TNF- α 時，施打超音波 GDNF 之 mRNA 表現量無明顯變化。(2)TNF- α 存在時，施打超音波則 GDNF 表現量有顯著的提升，三者之比大約為 1 : 2 : 2。數據以平均值 \pm 標準誤差(SEM)表示。(以當組未施打超音波之值為基準)(*表示與未施打超音波之組比較，其 p value<0.05)

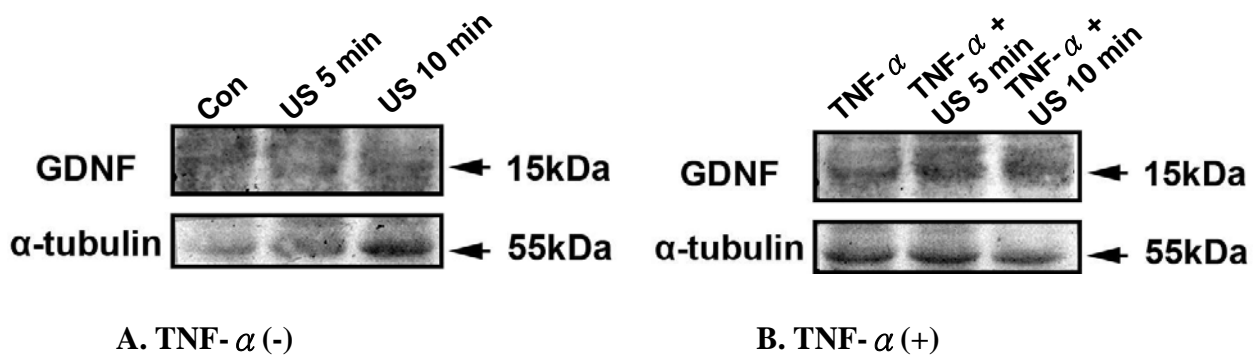
四、BDNF、GDNF 之蛋白質表現量(圖八、圖九)

此部分結果因樣本數不足，未能量化，僅提出作現象之探討。(BDNF 為 pro form)



圖八 BDNF 電泳結果圖

從此二圖發現(1)沒有 TNF- α 時，施打超音波 BDNF 表現量變化不大
(2)有 TNF- α 時，施打超音波 BDNF 表現量增加

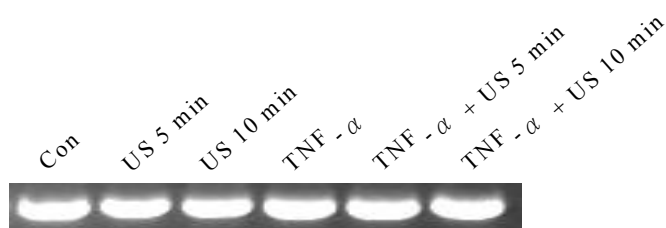


圖九 GDNF 電泳結果圖

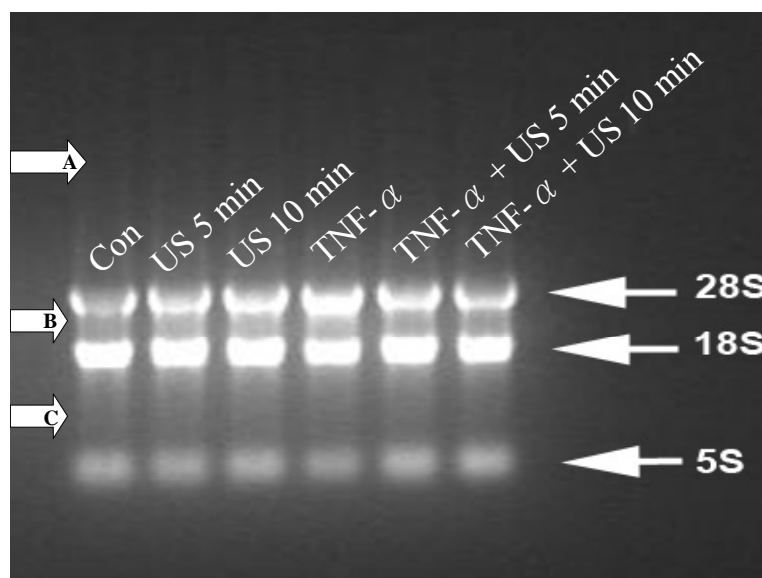
從此二圖發現(1)沒有 TNF- α 時，施打超音波 GDNF 相對於 α -tubulin 表現量
變化不大
(2)有 TNF- α 時，施打超音波 GDNF 表現量增加

五、抽取 RNA 的一致性 (圖八)

為確保實驗起始值一致，將表現量固定不變的 GAPDH 以及總 RNA 跑電泳所得結果。



A GAPDH 電泳結果



B RNA 電泳圖 (A：沒有 DNA 殘留)
(B：mRNA 散佈區)
(C：RNA 沒有被水解)

圖十 A 為 GAPDH 電泳圖，B 為 RNA 電泳圖。

A 圖：GAPDH 為呼吸作用之一重要酵素，其 mRNA 於細胞核內之表現量不受外界影響，故從亮度一致可說明 RT 轉為 cDNA 後之總量一致；B 圖：將 RNA 直接跑電泳可得 B 圖，其中三條亮帶皆為 rRNA，mRNA 因為大小不一散佈在 28S 與 18S 兩條亮帶之間，tRNA 因為量很少，於此處是看不到的。圖十 A、B 皆可說明抽取 RNA 總量的高一致性。

伍、 討論

一、施打超音波十分鐘或添加 TNF- α 模擬中風缺氧的狀況，皆造成 NO 的濃度上升(表三，圖五)。

(一) 單純施打超音波十分鐘(C 組)NO 濃度顯著上升，表示施打超音波會刺激星狀細胞產生 NO，達到神經保護的功能。

(二) 只加 TNF- α 模擬中風缺氧的 D 組，NO 濃度也明顯上升，此為其生理反應變化；而在 TNF- α 存在時，施打超音波十分鐘(F 組)，與 A 組比較後，NO 濃度也有顯著的差異。

(三) 由 A、C、D、F 組可觀察到，施打超音波十分鐘與有無 TNF- α 的存在並無顯著差異(無加成作用)，推測可能是因為兩者藉由相似的途徑(例如 eNOS)促進 NO 產生。

二、在沒有 TNF- α 存在的情況下，施打超音波不會影響 BDNF、GDNF 的 mRNA 的表現(圖六，圖七)。

單就 A、B、C 三者比較，差異未達統計意義，因此推論在正常情況下，超音波並不會促進 BDNF、GDNF 的生成。

三、當有 TNF- α 存在時，施打超音波可明顯提升 BDNF、GDNF 的 mRNA 的表現(圖六，圖七)。

比較 D、E、F 組，BDNF、GDNF 之 mRNA 表現皆有顯著提升，推測在中風缺氧時，施打超音波可以達到神經保護的作用。

四、mRNA 表現量增加與實際上有作用的蛋白質之關係。

目前蛋白質定量數據資料不足，無法直接證明 mRNA 表現量增加與蛋白質釋出量的確切關係，但初步實驗顯示 BDNF 及 GDNF 之蛋白亦隨著施打超音波而增加，日後或可將實驗組的培養液置入正常的神經元細胞培養皿，添加神經毒物，觀察有無保護作用。

陸、 結論與應用

- 一、施打超音波十分鐘，不論有無 TNF- α ，NO 濃度皆顯著上升，但仍遠低於可傷害細胞的濃度範圍，推測當中風缺氧後，星狀細胞會釋放 NO，可以啓動神經保護機制，進而保護細胞。
- 二、施打超音波十分鐘，與施打超音波十分鐘且添加 TNF- α 組比較，提升濃度無明顯差異，表示兩者可能透過相似的路徑促進產生 NO 的量。
- 三、沒有 TNF- α 時，有無施打超音波對於 BDNF、GDNF 的 mRNA 表現量沒有影響。
- 四、當環境中有 TNF- α 時，施打低強度間歇性超音波可使 BDNF、GDNF 的 mRNA 表現量顯著提升，推論超音波可能具有治療的應用價值。

柒、 參考文獻

1. Akassoglou K.(2005)Nerve Growth Factor-Independent Neuronal Survival: A Role for NO Donors.Mol Pharmacol, 68: 952–955
2. Connor B., Dragunow M.(1998)The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. Brain Res Rev, 27: 1-39
3. Heales S. J. R., Lam A. A. J., Duncan A. J., Land J. M. (2004)Neurodegeneration or Neuroprotection: The Pivotal Role of Astrocytes. Neurochemical Research, 29: 513–519
4. Kuno R., Yoshida Y., Nitta A., Nabeshima T., Wang J., Sonobe Y., Kawanokuchi J., Takeuchi H., Mizuno T., Suzumura A.(2006)The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. Brain Res, 1116: 12-18
5. Lin K. Y., Lin S.-C. (2004)A Tale of Two Molecules: Nitric Oxide and Asymmetric Dimethylarginine. Acta Cardiol Sin, 20:201-211
6. Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL. (2001)Critical Role for Nitric Oxide Signaling in Cardiac and Neuronal Ischemic Preconditioning and Tolerance. J Pharmacol Exp Ther, 297: 474-478

評語

- 1) 本研究架構良好，作者有一定的能力以及優良的求知態度。
- 2) 作品本身漏洞仍多，尤其是”超音波”能量之注解不明。
- 3) 評等：佳作。