

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

| | |
|------|--|
| 作品編號 | 050015 |
| 參展科別 | 動物學 |
| 作品名稱 | 探討內源性大麻素對果蠅細胞自噬與生理功能的影響及角色 |
| 得獎獎項 | 一等獎 美國國際科技展覽會 ISEF 青少年科學獎 青少年科學獎 |
| 就讀學校 | 臺北市立第一女子高級中學 |
| 指導教師 | 陳光超、李宏孝 |
| 作者姓名 | 張翊慈、張敏虹 |
| 關鍵詞 | <u>果蠅、內源性大麻素系統、細胞自噬</u> |

作者簡介



我們是北一女中數理資優班高二的張敏虹（左）和張翊慈（右）。目前在中研院生化所學習果蠅的相關知識和實驗技術，以及分析和討論實驗數據。很幸運能加入實驗室進行研究，謝謝陳光超教授，謝謝雅婷、佩璉、湘庭、宇亭、榮崑和所有實驗室學長姊，謝謝李宏孝老師，也謝謝所有支持我們的朋友與家人，讓我們可以進入國際科展！

摘要

內源性大麻素系統對人類體內平衡具重要影響，但尚未有以果蠅作為模式生物，探討內源性大麻素 2-AG 對果蠅細胞自噬與生理功能的關聯性研究。本研究中我們透過降解或過度表達 2-AG 的合成酶與分解酶，調控果蠅細胞內 2-AG 的含量，發現 2-AG 含量多寡對果蠅抗飢餓與抗壓力能力具正相關之影響。再進一步探討細胞自噬的表現與 2-AG 含量的關聯性，發現降解 2-AG 之分解酶，會使細胞自噬量顯著增加。我們將本研究推廣至以果蠅複眼為觀察標的，初步研究內源性大麻素含量對神經退化性疾病的影響，未來可應用於疾病治療並探討此機制與細胞自噬的關聯性。

Abstract

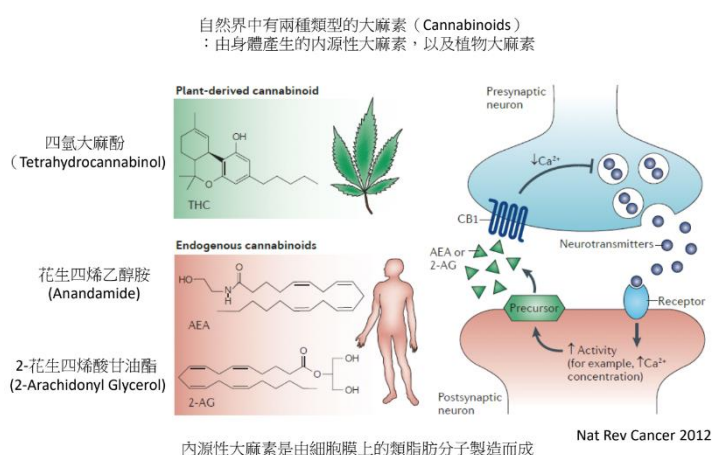
The endocannabinoid system (ECS) has an important impact on human homeostasis, but there has been no study on the association of endocannabinoid 2-AG on autophagy and physiological function using *Drosophila* as a model organism. In this study, we regulated the content of 2-AG in *Drosophila* cells by degrading or overexpressing synthetase and metabolic enzyme and found that the content of 2-AG had a positive effect on the ability of *Drosophila* to resist hunger and stress. The correlation between the performance of autophagy and the content of 2-AG was further explored, and it was found that the decomposition enzyme that degraded 2-AG significantly increased the amount of autophagy. We extended this study to the observation of *Drosophila* compound eyes, and preliminarily studied the effect of endocannabinoid content on neurodegenerative diseases, which can be applied to disease treatment in the future and explore the association between this mechanism and autophagy.

壹、前言

一、研究背景

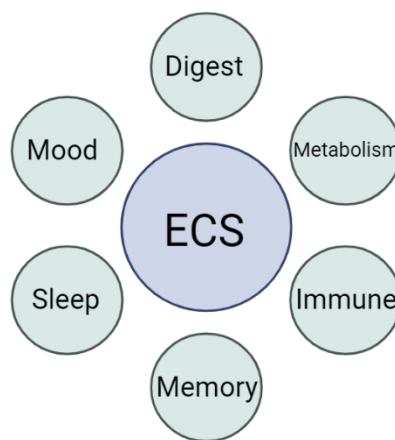
(一)內源性大麻素系統

大麻素是從大麻裡發現的一組萜酚類化合物，依其來源可分為植物性大麻素及由動物體產生的內源性大麻素，如圖一。1980 年代末期，內源性大麻素及其受體被發現以後，相關的醫學研究也就一直持續著。已知，動物體內的內源性大麻素系統包括大麻素受體 1 型(CB1)和大麻素受體 2 型(CB2)、內源性大麻素配體 (endocannabinoids)以及調節內源性大麻素生合成和降解的酵素，對於維持生物體內的動態平衡扮演著關鍵的角色(Lowe H et al., 2021)。



圖一、內源性大麻素與植物大麻素

(Guillermo Velasco et al., 2012)

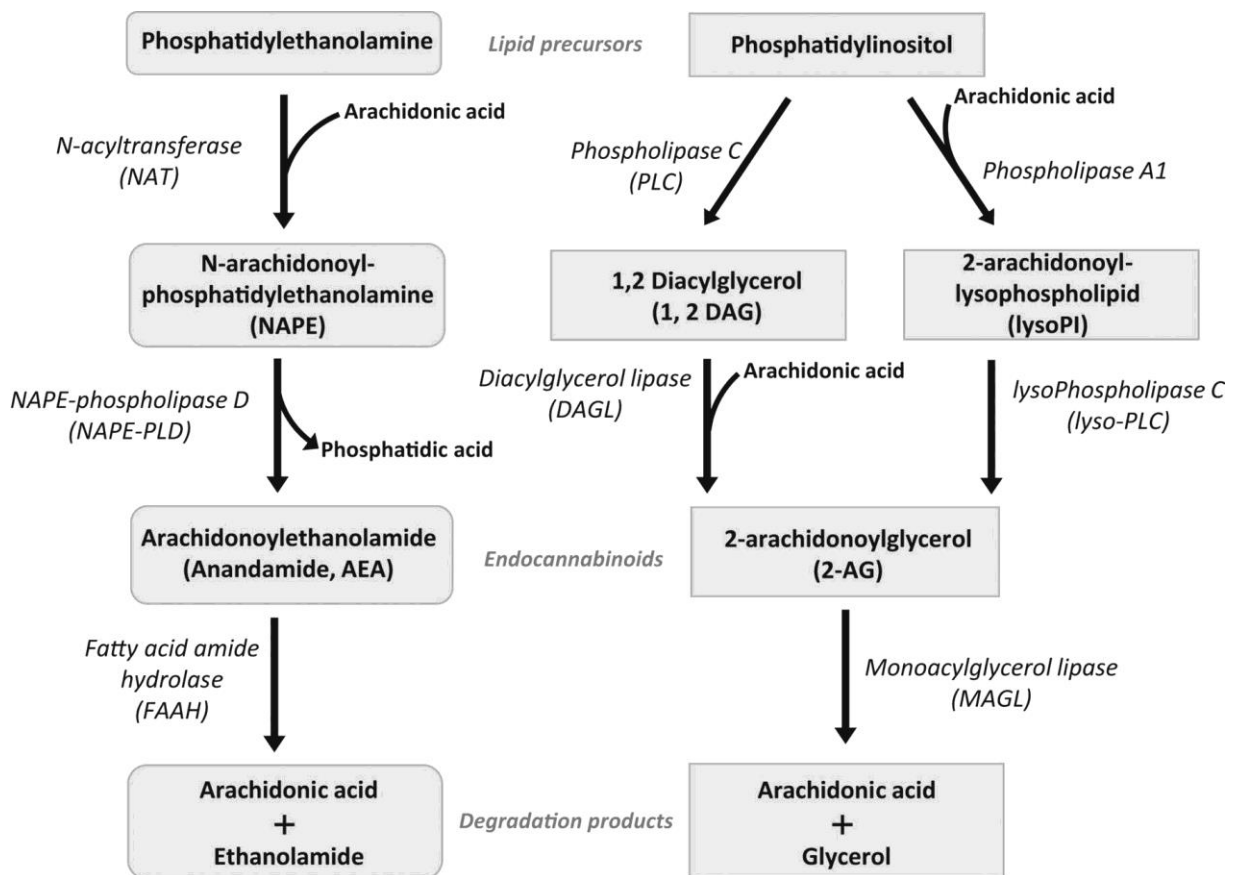


圖二、內源性大麻素功能

內源性大麻素系統 (endocannabinoid system, ECS) 對人類的體內平衡有重要影響，可維持體溫、睡眠、新陳代謝及能量的平衡，同時也參與調節大腦中神經傳遞物質的釋放、記憶與情緒、消化作用、免疫與發炎反應、壓力反應等(Lowe H et al., 2021)，影響神經退化性疾病 (Bedse G et al., 2015)，並具有神經保護的功能，如圖二。

內源性大麻素主要分為麻酚酸(N-Arachidonylethanolamine Anandamide,AEA)和 2-芳基乙酸醯胺(2-Arachidonoylglycerol,2-AG)兩種，其中二醯基甘油脂肪酶(Diacylglycerol lipase,

DAGL)負責合成 2-AG，而 2-AG 在發揮生理作用後會被單醯基甘油脂肪酶(Monoacylglycerol lipase, MAGL)水解代謝，其合成與分解過程如圖三。先前研究發現果蠅也具有內源性大麻素系統，並且與哺乳動物的內源性大麻素系統具一定程度的相似性 (McPartland JM et al., 2006)。果蠅的內源性大麻素主要包括 AEA 和 2-AG，同時也具有 FAAH 和 MAGL 等代謝酵素。這些內源性大麻素的相關酵素會直接影響內源性大麻素的濃度和生理效應，同時還參與其他多種代謝途徑的調節，因此在生物體內發揮重要的生理功能。

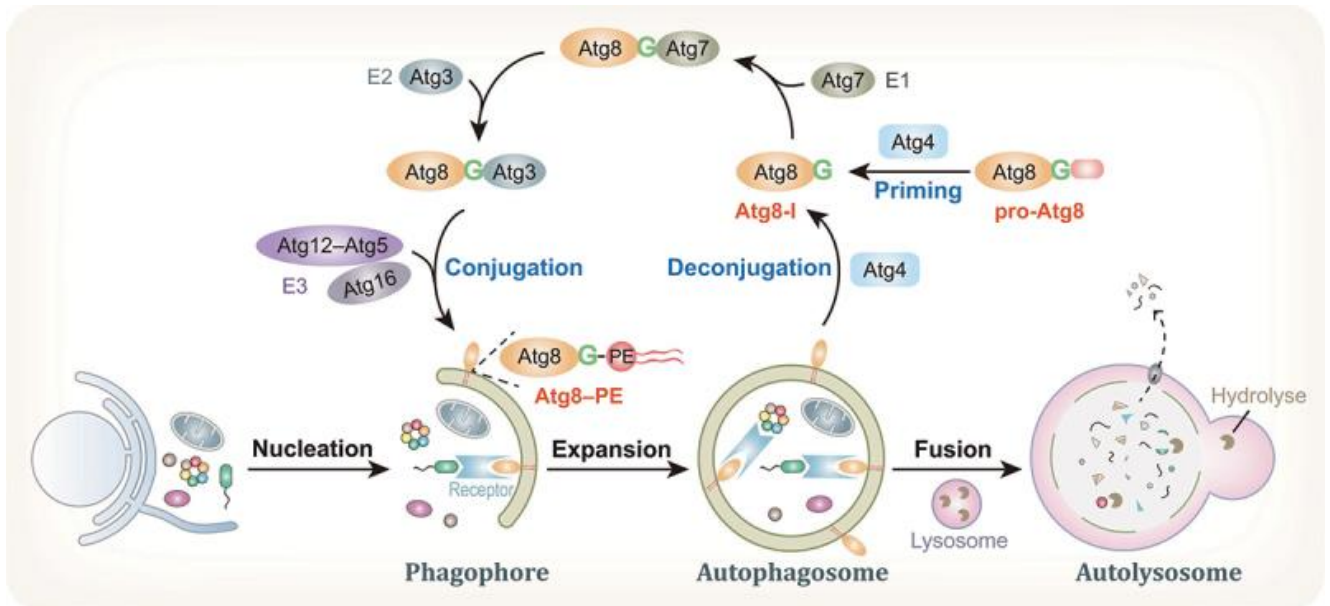


圖三、Different pathways involved in the biosynthesis and degradation of AEA and 2-AG

(Simon V, Cota D, 2017)

(二)細胞自噬的運作

自噬作用是細胞重要的蛋白質降解途徑，能夠因應壓力情況，分解自身不必要或功能異常的蛋白質或胞器，幫助清除受損，與老化、癌症、心血管疾病、神經退化性疾病(Hou X et al., 2020)、代謝、感染、肌肉骨骼和眼部疾病等皆相關(Klionsky DJ et al., 2021)。當細胞遭受到環境脅迫或接收到養分、氧氣不足的訊息時，其訊號受體會將其回傳至細胞內，使得細胞內多種脂質及蛋白質形成彎月狀的分隔膜，分隔膜會持續產生新的膜並逐漸增大，形成自噬小泡，並裹住受損的胞器或蛋白質，自噬小泡最後會關閉成自噬體，並把待分解的物質運送至溶酶體處理。自噬體外層膜會與溶酶體的膜融合形成自噬溶酶體，然而微酸性溶酶體內存有許多水解酵素，因此可藉由這些酵素把老舊的胞器或蛋白質分解為胺基酸，銷毀或回收再利用成為細胞的營養(張志鵬, 2017)，如圖四。日本科學家大隅良典發現細胞自噬機制，獲得2016年度的諾貝爾獎，並發現飢餓及壓力狀況下，細胞可以透過自噬作用分解蛋白質和非必需的胞器以產生能量，使細胞免於因養分缺乏而造成損傷並能幫助清除受損(Ohsumi Y, 2014)。



圖四、細胞自噬作用示意圖(Huang X et al., 2022)

(三) FAAH 與細胞自噬之相關性

FAAH 是內源性大麻素 AEA 的分解酶，直接參與 AEA 的分解途徑，調控 AEA 含量。

NLRP3 發炎體為免疫調控系統之一，NLRP3 發炎體過度活化會促進心血管疾病、第二型糖尿病、癌症、腎臟病、神經退化性疾病等發炎相關疾病的產生。近期文獻(Zhu Y, 2023)提及 FAAH 對 NLRP3 的膜錨定和穩定作用扮演重要角色。FAAH 異型合子基因敲除導致 FAAH 和 NLRP3 表現減少約 50%，足以顯著抑制 NLRP3-R258W 敲入小鼠的自體發炎表型，而 FAAH 同型合子基因缺失則幾乎完全消除這些表型。同時，FAAH 抑制劑會破壞 NLRP3-FAAH 的相互作用並誘導自噬性 NLRP3 降解。

二、研究動機

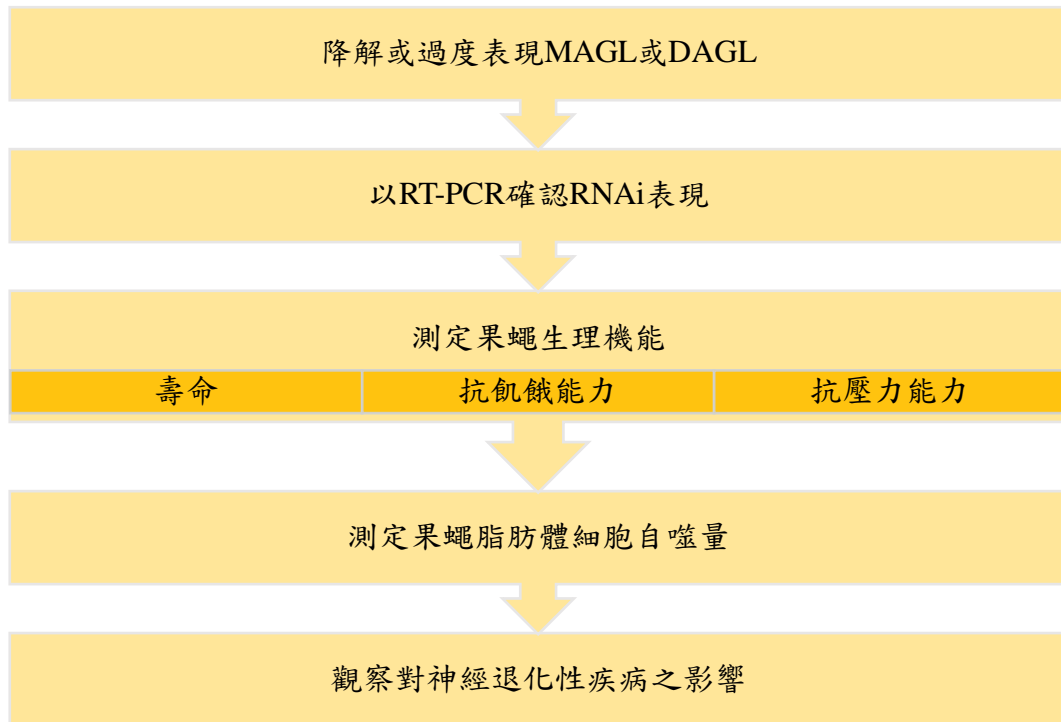
內源性大麻素系統和細胞自噬皆是細胞內重要的生理機制，且內源性大麻素 AEA 的分解酶 FAAH 已被證實與自噬機制相關(Zhu Y, 2023)，但在內源性大麻素的生成途徑上，尚未有以 2-AG 的合成、分解路徑探討內源性大麻素與細胞自噬關聯性的研究。我們透過使用不同 RNAi 片段的果蠅調控 2-AG 的合成酶 DAGL 與分解酶 MAGL，觀察果蠅生理功能的差異。由於細胞自噬是因應飢餓與壓力狀況而產生的生理作用，因此在生理功能的實驗中，我們選擇壽命、抗飢餓及抗壓力能力作為實驗設計方向。接著再觀察內源性大麻素與細胞自噬量及神經退化性疾病的關係，希望對內源性大麻素透過細胞自噬影響果蠅生理機能的推測，提出初步研究成果。

三、研究目的

- (一) 內源性大麻素 2-AG 對果蠅生理機能的影響。
- (二) 內源性大麻素 2-AG 與果蠅細胞自噬的關聯及其可能的作用機轉。
- (三) 內源性大麻素 2-AG 對神經退化性疾病的影響。

貳、研究方法與過程

一、研究流程圖



圖五、研究流程圖

二、實驗設備與器材

(一) 設備

1. 解剖顯微鏡
2. 電子顯微鏡
3. 共軛焦顯微鏡
4. 二氧化碳氣瓶
5. 果蠅培養管
6. 恆溫箱
7. 定時照明設備

(二) 藥品

1. Perfluoroalkoxy alkane ,PFA
2. 磷酸鹽緩衝生理鹽(Phosphate buffered saline ,PBS)
3. 4',6- diamidino-2-phenylindole ,DAPI
4. 20% sucrose
5. mounting solution
6. 2% H₂O₂
7. PCR Master Mix(含有 dNTPs , MgCl₂ , Taq 聚合酶 , pH 緩沖劑的混合物)
8. EtOH

三、研究方法

(一)選用不同 RNAi strain

以降解 MAGL 為例，*puml-RNAi^{HMS}*、*kraken-RNAi^{KK}* 兩基因是我們在果蠅基因中，找到和哺乳動物的 MAGL 相似的基因序列，雖然尚未證實有與 MAGL 相同的蛋白功能，但因為序列相似，被選為候選基因的不同 RNAi strain，由於 knockdown 效率可能不同，所以通常會測試兩株以上的 RNAi 果蠅(表一)。

1.降解 MAGL

puml-RNAi^{HMS} (Stock#42957)、*kraken-RNAi^{KK}* (Stock#105604)，此兩種基因型果蠅會降解內源性大麻素分解酶 MAGL，推測在這些細胞內的 2-AG 不易被分解而在細胞內累積，使內源性大麻素系統的作用更加顯著。

2.降解 DAGL

inaE-RNAi^{GD} (Stock#64885)、*inaE-RNAi^{KK}* (Stock#103713)，此兩種基因型果蠅會降解內源性大麻素合成酶 DAGL，推測在這些細胞內的 2-AG 生成量下降，使內源性大麻素系統作用減弱。

3.過度表現 DAGL

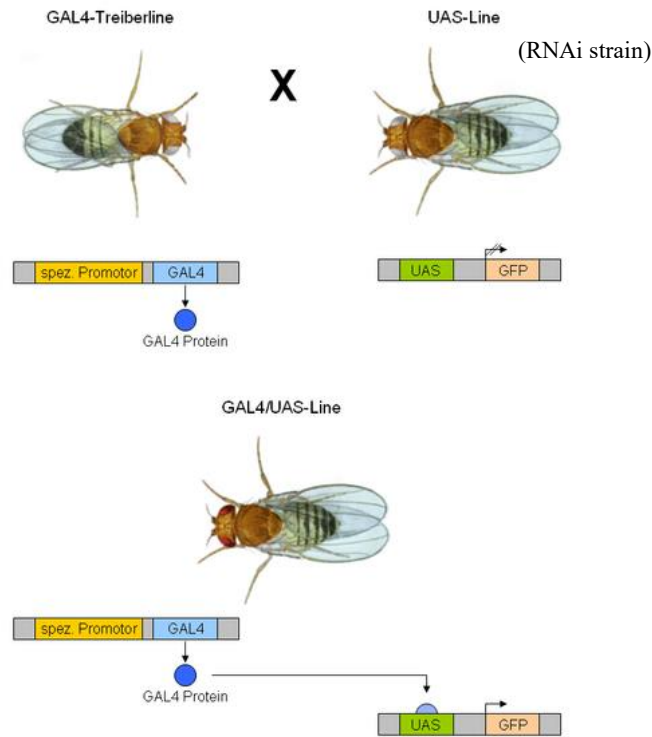
UAS-inaE^{L46}(Stock#33174)，此基因型果蠅會過度表現內源性大麻素合成酶 DAGL，推測在這些細胞內的 2-AG 生成量增加，使內源性大麻素系統的作用更加顯著。

表一、RNAi strain 及其作用

| RNAi strain | 作用 | RNAi strain | 作用 |
|---------------------------|---------|-------------------------|-----------|
| puml-RNAi ^{HMS} | 降解 MAGL | inaE-RNAi ^{GD} | 降解 DAGL |
| kraken-RNAi ^{KK} | 降解 MAGL | inaE-RNAi ^{KK} | 降解 DAGL |
| Luc-RNAi ^{JF} | 對照組 | UAS-inaE ^{L46} | 過度表現 DAGL |

(二)GAL4-UAS system

GAL4 是從酵母菌而來的一種轉錄因子，科學家把 GAL4 的基因植入果蠅體內，並藉由改變 GAL4 基因的上游 DNA 序列，讓 GAL4 能在果蠅不同的細胞中表現。這樣所產生的基因轉殖果蠅株，稱為 GAL4 line。UAS 則是一種特殊基因序列，當 GAL4 和 UAS 結合之後，可以驅動 UAS 下游基因的綠色螢光蛋白 (GFP)，即 RNAi 果蠅與 Gal4 果蠅交配後，子代果蠅的細胞將表現 Gal4 flippase 中 UAS 下游的蛋白，降解 MAGL 或 DAGL，如圖六。



圖六、GAL4-UAS system

(圖片來自維基百科: GAL4/UAS system)

1.tub-Gal4/Tm6B

RNAi 果蠅與 tub-Gal4/Tm6B 果蠅交配後，子代果蠅將分為兩種基因型果蠅，一為與 tub-Gal4 結合，一為與 Tm6B 結合。RNAi 果蠅與 tub-Gal4 結合者，會使子代果蠅全身細胞中合成或分解內源性大麻素的酶降解或過度表現，改變內源性大麻素含量，進而影響果蠅全身生理機能。我們可以透過果蠅外型特徵、胸側毛的生長型態，區別兩基因型的果蠅，挑選出與 tub-Gal4 結合者進行生理機能的實驗。

2.da-Gal4

我們發現 RNAi 果蠅中其中兩種基因型(*pum1*-RNAi^{HMS}、*kraken*-RNAi^{KK})與 tub-Gal4/Tm6B 果蠅交配後，子代果蠅中與 tub-Gal4 結合者在幼蟲階段均死亡，所以改以 da-Gal4 進行交配。*pum1*-RNAi^{HMS}、*kraken*-RNAi^{KK} 兩種基因型與 da-Gal4 結合後，會使子代果蠅全身細胞中分解內源性大麻素的酶降解，改變內源性大麻素含量，進而影響果蠅全身生理機能。

(三)RT-PCR

反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) 技術，是將一段待測的 RNA 序列經反轉錄酶作用從 mRNA 轉錄成互補 DNA(cDNA)，之後以 cDNA 作為 qPCR 的模板，將基因片段放大數十萬倍，形成的 PCR 基因產物經染劑 EtBr 作用，在紫外燈照射時會發出螢光，電泳膠片上會呈現具有特定分子量的 PCR 基因片段的產物(施木青,2003)。我們設計 Forward primer 與 Reverse primer 夾出待測的 RNA 序列，其 primer 設計如表二。

表二、RT-PCR primer

| | Forward primer | Reverse primer |
|--------|-----------------------|----------------------|
| inaE | CACAAGGGAATGGTGCAAGC | CGCTCCTCCTGGTACTGATT |
| kraken | GGAACCGTTGAGGCCAAGTG | TCCCCTGTTCATGAGCACAC |
| puml | ATGGACCTAGAGGATCCCCGG | TAGCTGGAGGCAATGAAGCC |

(四)內源性大麻素對果蠅生理機能的影響

1.測定果蠅壽命

將剛羽化的實驗組 (tub-Gal4 與 RNAi 果蠅交配) 及對照組 (tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配、da-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配) 果蠅，以公母果蠅各 20 隻為一紀錄單位，共五組 100 隻，養殖於果蠅培養管內，放置於有日夜變化之照明設備的恆溫箱內，以二至三天為單位記錄每次死亡的果蠅數目並更換食物。

2.測定果蠅抗飢餓能力

將羽化後十天大的實驗組及對照組果蠅，以公母各 20 隻為一紀錄單位，轉移果蠅至只添加水的果蠅管中，在每天 7:00 及 19:00 補充 50 微升的水，並在每天的 7:00、10:00、13:00、16:00、19:00 和 22:00 紀錄死亡的果蠅數目。

3.測定果蠅抗壓力能力

將羽化後十天大的實驗組及對照組果蠅，以公母各 20 隻為一紀錄單位，在飢餓 6 小時後，轉移果蠅至添加 50 微升 2% H₂O₂ 的果蠅管中，在每天 7:00 及 19:00 補充 50 微升的 2% H₂O₂，並在每天的 7:00、10:00、13:00、16:00、19:00 和 22:00 紀錄死亡的果蠅數目。

(五)內源性大麻素與果蠅細胞自噬的關聯

1.研究方法

同上述之 GAL4-UAS system，當 RNAi 果蠅與 R4-Gal4(hsflp; r4-mCherry-Atg8a Act>CD2>GAL4 UAS- GFP nls)果蠅交配後，子代果蠅幼蟲中的脂肪體將表現 R4 flippase 中，UAS 下游的 GFP 蛋白，使我們能觀測各細胞是否成功降解或過度表現 MAGL 或 DAGL。我們推測內源性大麻素會影響細胞自噬的效率，透過綠色螢光蛋白(Green fluorescent protein ,GFP)可以確認有 RNAi 作用的特定細胞，而 R4 (hsflp; r4-mCherry-Atg8a Act>CD2>GAL4 UAS-GFP nls)中的紅色螢光蛋白 mCherry 可標定自噬體膜形成時所需的泛素樣蛋白 Autophagy-related protein 8 (Atg8)，用以觀察細胞自噬效率在有無降解 MAGL 下的差異。

2.進行步驟

選取特定基因型(puml-RNAi^{HMS}、kraken-RNAi^{KK}、inaE-RNAi^{GD}、inaE-RNAi^{KK}、UAS-inaE^{L46})的果蠅與 R4 處女蠅進行交配，因 R4-GAL4 使 RNAi 作用在脂肪體上，故觀察對象為果蠅幼蟲中的脂肪體。細胞自噬作用在飢餓狀態下較為顯著，實驗組之二齡幼蟲會以 20% sucrose 進行飢餓處理四小時，同時也準備未進行飢餓處理的 fed 果蠅做為對照，確認 RNAi 造成的細胞自噬效果。使用固定液(PFA)固定果蠅幼蟲體內的器官，再以 DAPI 將細胞染色，期間以緩衝生理鹽水(PBS)沖洗。解剖並收集幼蟲體內脂肪體，製成玻片。以共軛焦顯微鏡觀察，紀錄不同雷射下的細胞螢光情況。

三、內源性大麻素對神經退化性疾病的影響

1.研究方法

GMR-Gal4 與 RNAi 果蠅交配產生的子代，會使果蠅複眼細胞中調控內源性大麻素的酶降解或過度表現，改變內源性大麻素含量，進而影響複眼表徵。(楊嶧樺, 2016)

GMR-Tau Z/cyo 是我們在果蠅基因中，找到和哺乳動物的阿茲海默症相似的基因序列，GMR-Gal4;UAS-hSNCA A30P、GMR-Gal4;UAS-hSNCA A53T 則是和帕金森氏症相似的基因序列，將以上三種基因型與 RNAi 果蠅交配，透過觀察其複眼表徵，以推斷內源性大麻素對神經退化性疾病有無影響。

2.進行步驟

將 GMR-Tau Z/cyo、GMR-Gal4;UAS-hSNCA A30P、GMR-Gal4;UAS-hSNCA A53T 分別與 RNAi 果蠅交配，子代羽化成蟲後，將成蟲以公、母分類，置於顯微鏡下拍攝複眼，觀察實驗組（與 RNAi 果蠅交配）及對照組（與 Luc-RNAi^{JF} 交配）果蠅複眼型態是否有顯著差異。

參、研究結果與討論

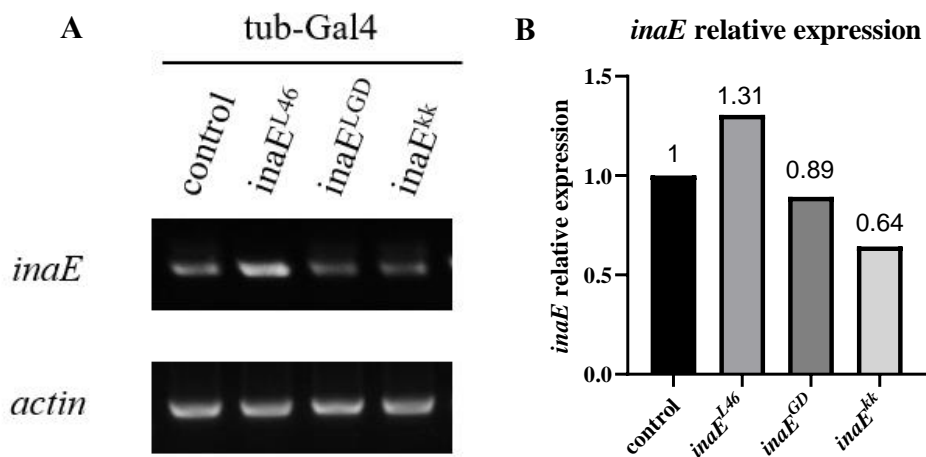
一、RT-PCR

以 RT-PCR 確認 RNA 表現量，確認所選用之 RNAi strain 皆有成功降解或過度表現 MAGL、DAGL，可調控內源性大麻素 2-AG 之含量，為後續研究奠定基礎。

(一) *inaE*

Forward primer: CACAAGGGAATGGTGCAAGC

Reverse primer: CGCTCCTCCTGGTACTGATT



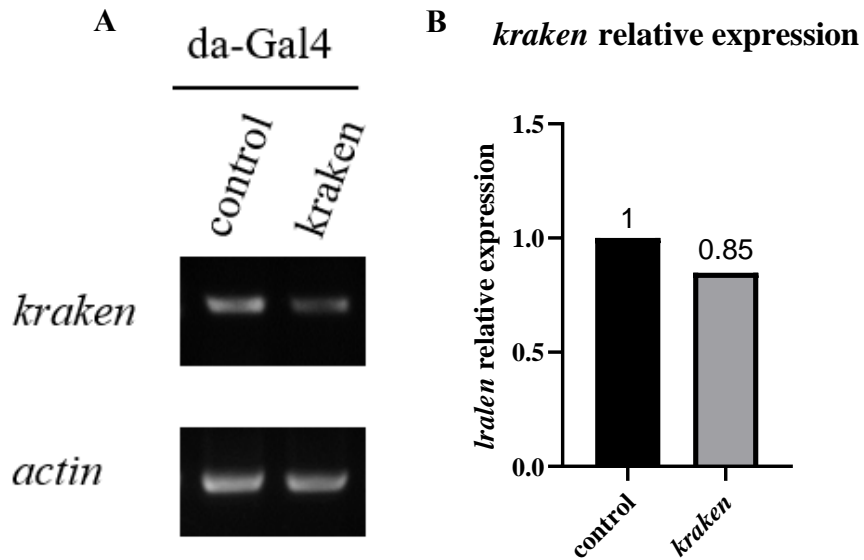
圖七、*inaE*-RNAi^{GD}、*inaE*-RNAi^{KK}、UAS-*inaE*^{L46}之 RNA 表現量

圖七中以對照組 RNA 表現量為 1，測得 *inaE*-RNAi^{KK} 之 RNA 表現量為 0.64，*inaE*-RNAi^{GD} 之 RNA 表現量為 0.89，降解 DAGL 的基因型皆比對照組 RNA 表現量低，其中以 *inaE*-RNAi^{KK} 降解效率較佳。*UAS-inaE^{L46}* 之 RNA 表現量為 1.31，比對照組 RNA 表現量高。推測皆有成功降解或過度表現 DAGL。

(二)kraken

Forward primer: GGAACCGTTGAGGCCAAGTG

Reverse primer: TCCCCTGTTTCATGAGCACAC



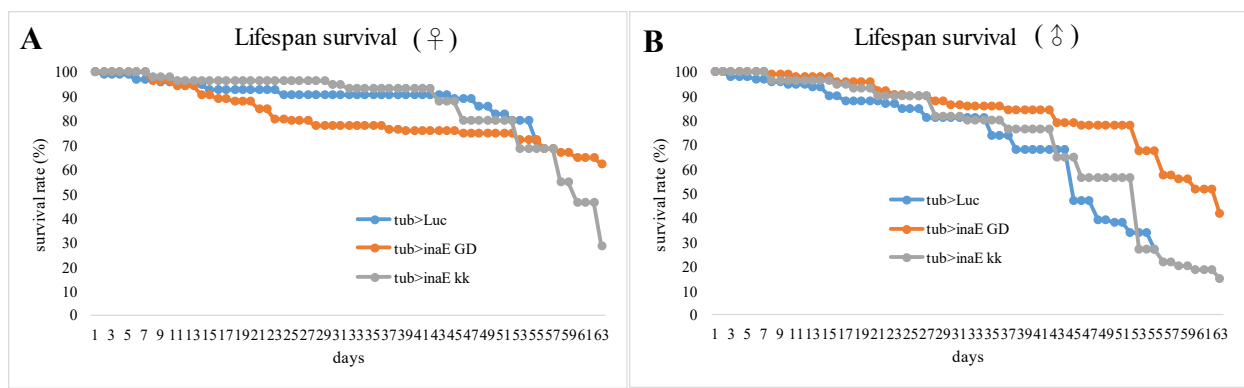
圖八、kraken-RNAi^{KK}之 RNA 表現量

圖九中以對照組 RNA 表現量為 1，測得 kraken-RNAi^{KK}之 RNA 表現量為 0.85，降解 MAGL 的 kraken-RNAi^{KK} 基因型比對照組 RNA 表現量低，推測有成功降解 MAGL。

二、內源性大麻素 2-AG 含量對果蠅壽命之影響

(一)降解 DAGL 對果蠅壽命之影響

由於壽命實驗所需時間較長，此實驗尚未完成，僅呈現截至十月二十八號之結果，並以目前果蠅存活趨勢討論。由圖九(A)可知，以 $\text{inaE-RNAi}^{\text{GD}}$ 或 $\text{inaE-RNAi}^{\text{KK}}$ 降解果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，對母果蠅的壽命有減少的趨勢。由圖九(B)可知，以 $\text{inaE-RNAi}^{\text{GD}}$ 降解 DAGL，對公果蠅的壽命有提升的趨勢，而以 $\text{inaE-RNAi}^{\text{KK}}$ 降解 DAGL，對公果蠅的壽命有減少的趨勢。

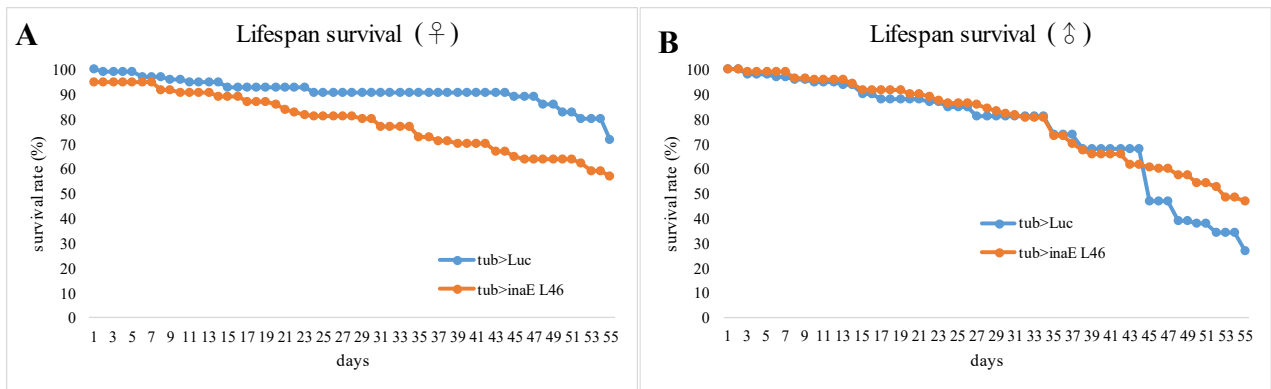


圖九、降解 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

圖九(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表天數，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖九(A)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 100。tub-Gal4 與 $\text{inaE-RNAi}^{\text{GD}}$ 交配之實驗組 N 值為 140。tub-Gal4 與 $\text{inaE-RNAi}^{\text{KK}}$ 交配之實驗組 N 值為 60。圖九(B)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 100。tub-Gal4 與 $\text{inaE-RNAi}^{\text{GD}}$ 交配之實驗組 N 值為 140。tub-Gal4 與 $\text{inaE-RNAi}^{\text{KK}}$ 交配之實驗組 N 值為 80。

(二)過度表現 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

由於壽命實驗所需時間較長，此實驗尚未完成，僅呈現截至十月二十八號之結果，並以目前果蠅存活趨勢討論。由圖十(A)可知，以 UAS-inaE^{L46} 過度表現果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，對母果蠅的壽命有減少的趨勢。由圖十(B)可知，以 UAS-inaE^{L46} 過度表現 DAGL，對公果蠅的壽命有提升的趨勢。



圖十、過度表現 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

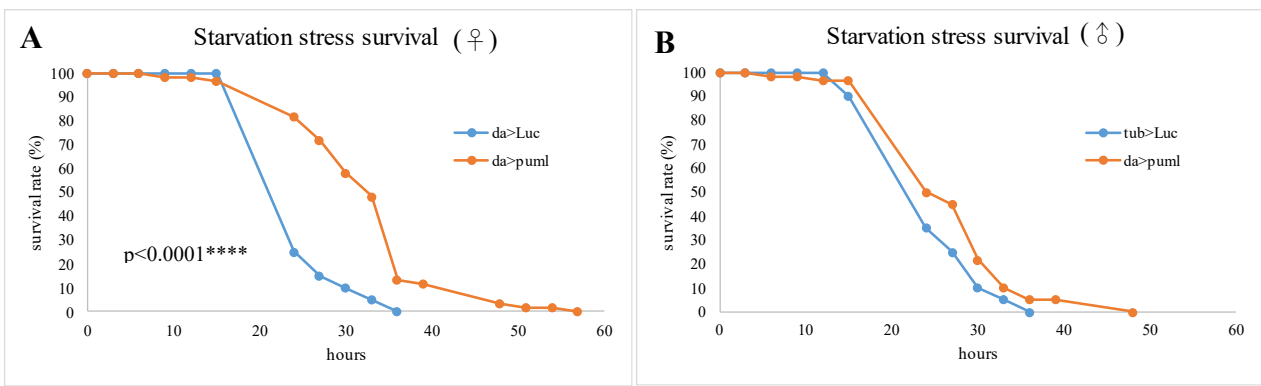
圖十(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表天數，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖十(A)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 100。tub-Gal4 與 UAS-inaE^{L46} 交配之實驗組 N 值為 100。圖十(B)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 100。tub-Gal4 與 UAS-inaE^{L46} 交配之實驗組 N 值為 100。

三、內源性大麻素 2-AG 含量對果蠅抗飢餓能力之影響

(一)降解 MAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

1. *puml*-RNAi^{HMS} 對果蠅抗飢餓能力之影響

由圖十一(A)可知，以 *puml*-RNAi^{HMS} 降解果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的分解酶 MAGL，對母果蠅的抗飢餓能力有顯著影響(P value<0.0001****)，降解 MAGL 之實驗組抗飢餓能力較對照組佳。由圖十一(B)可知，以 *puml*-RNAi^{HMS} 降解 MAGL，對公果蠅的抗飢餓能力無顯著影響(ns)。

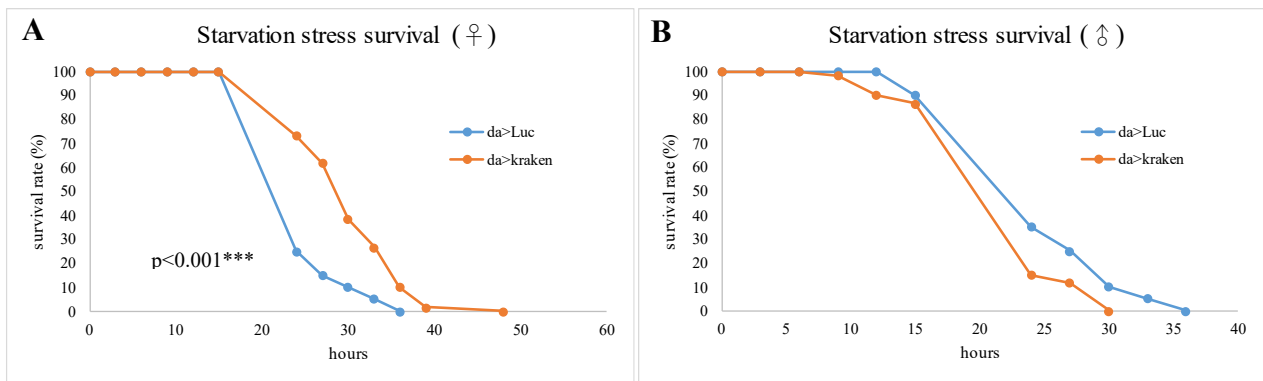


圖十一、降解 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

圖十一(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表小時，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖十一(A)中 da-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 25.65。da-Gal4 與 *puml*-RNAi^{HMS} 交配之實驗組 N 值為 60，平均存活小時數為 33.05，與對照組比較 P 值為 0.0000014(P value<0.0001****)，有顯著差異。圖十一(B)中 da-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 25.35。da-Gal4 與 *puml*-RNAi^{HMS} 交配之實驗組 N 值為 60，平均存活小時數為 27.9，與對照組比較 P 值為 0.0817，無顯著差異(ns)。(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, **** p<0.0001)

2. kraken-RNAi^{KK} 對果蠅抗飢餓能力之影響

由圖十二(A)可知，以 kraken-RNAi^{KK} 降解果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的分解酶 MAGL，對母果蠅的抗飢餓能力有顯著影響(P value<0.001***)，降解 MAGL 之實驗組抗飢餓能力較對照組佳。由圖十二(B)可知，以 kraken-RNAi^{KK} 降解 MAGL，對公果蠅的抗飢餓能力無顯著影響(ns)。

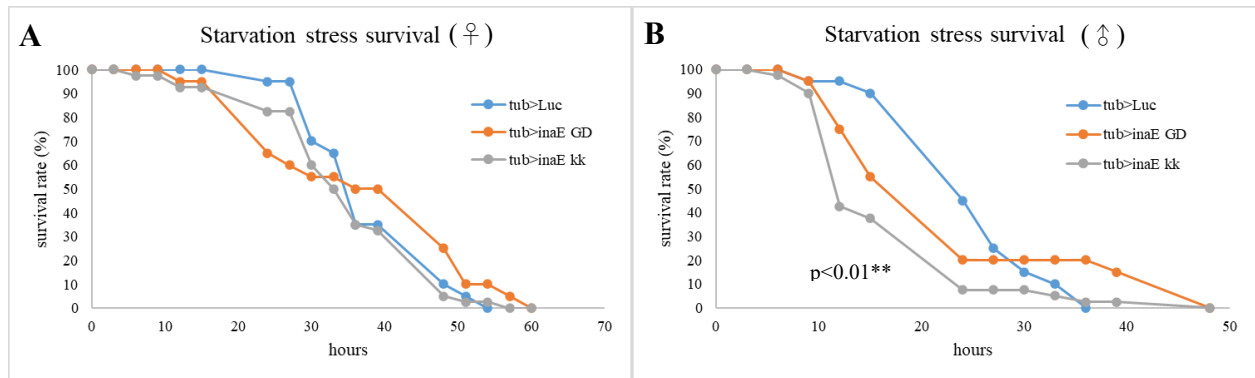


圖十二、降解 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

圖十二(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表小時，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖十二(A)中 da-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 25.65。da-Gal4 與 kraken-RNAi^{KK} 交配之實驗組 N 值為 60，平均存活小時數為 30.45，與對照組比較 P 值為 0.0002(P value<0.001***)，有顯著差異。圖十二(B)中 da-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 25.35。da-Gal4 與 kraken-RNAi^{KK} 交配之實驗組 N 值為 60，平均存活小時數為 23.25，與對照組比較 P 值為 0.0598，無顯著差異(ns)。(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, **** p<0.0001)

(二)降解 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

由圖十三(A)可知，以 $inaE-RNAi^{GD}$ 或 $inaE-RNAi^{KK}$ 降解果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，對母果蠅的抗飢餓能力皆無顯著影響(ns)。由圖十三(B)可知，以 $inaE-RNAi^{GD}$ 降解 DAGL，對公果蠅的抗飢餓能力無顯著影響(ns)，而以 $inaE-RNAi^{KK}$ 降解 DAGL，對公果蠅的抗飢餓能力有顯著影響(P value <0.01**)，降解 DAGL 之實驗組抗飢餓能力較對照組差。

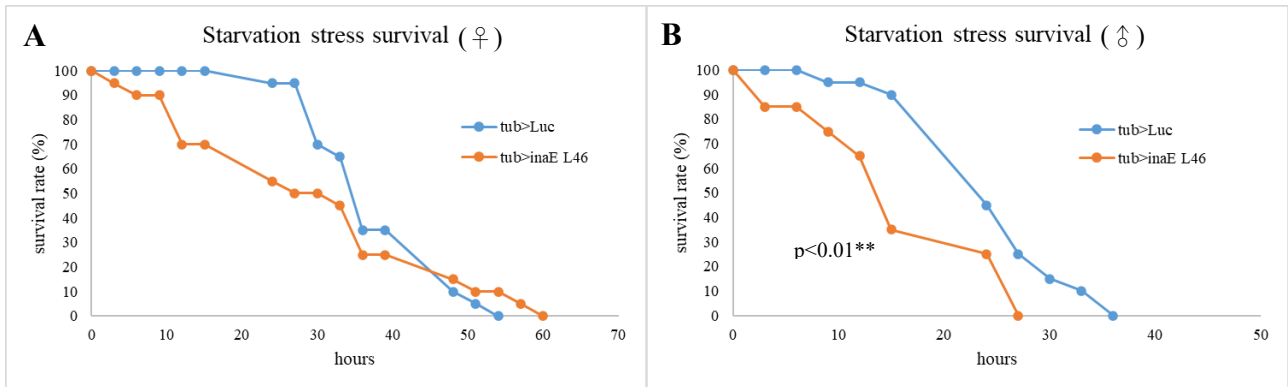


圖十三、降解 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

圖十三(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表小時，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖十三(A)中 tub-Gal4 與 $Luc-RNAi^{JF}$ 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 38.4。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{GD}$ 交配之實驗組 N 值為 20，平均存活小時數為 37.95，與對照組比較 P 值為 0.5022，無顯著差異(ns)。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{KK}$ 交配之實驗組 N 值為 40，平均存活小時數為 35.48，與對照組比較 P 值為 0.5213，無顯著差異(ns)。圖十三(B)中 tub-Gal4 與 $Luc-RNAi^{JF}$ 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 25.65。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{GD}$ 交配之實驗組 N 值為 20，平均存活小時數為 23.4，與對照組比較 P 值為 0.7732，無顯著差異(ns)。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{KK}$ 交配之實驗組 N 值為 40，平均存活小時數為 17.4，與對照組比較 P 值為 0.005 (P value <0.01**)，有顯著差異。(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

(三)過度表現 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

由圖十四(A)可知，以 UAS-inaE^{L46} 過度表現果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，對母果蠅的抗飢餓能力無顯著影響(ns)。由圖十四(B)可知，以 UAS-inaE^{L46} 過度表現 DAGL，對公果蠅的抗飢餓能力有顯著影響 (P value<0.01**)，過度表現 DAGL 之實驗組抗飢餓能力較對照組差。



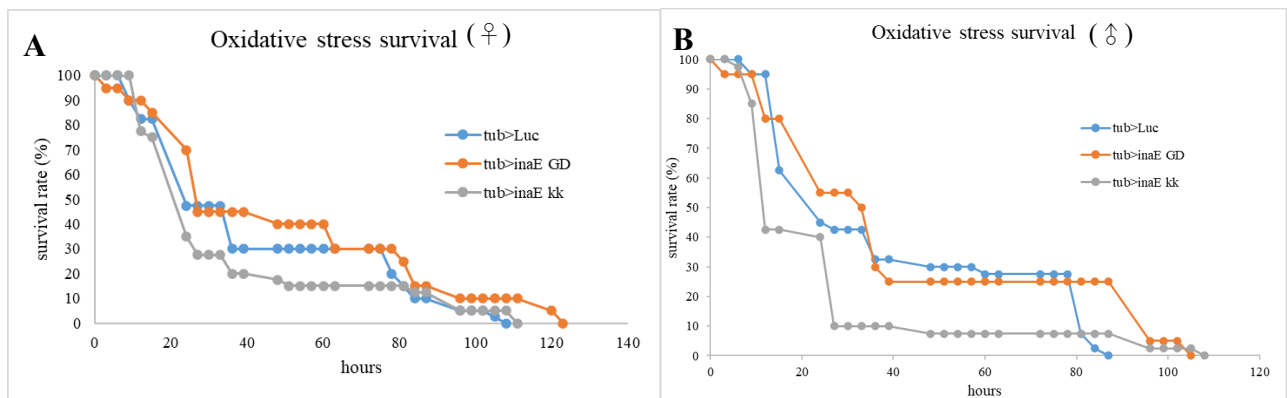
圖十四、過度表現 DAGL 對果蠅抗飢餓能力之影響

圖十四(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表小時，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖十四(A)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 38.4。tub-Gal4 與 UAS-inaE^{L46} 交配之實驗組 N 值為 20，平均存活小時數為 29.85，與對照組比較 P 值為 0.5181，無顯著差異(ns)。圖十四(B)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 20，平均存活小時數為 25.65。tub-Gal4 與 UAS-inaE^{L46} 交配之實驗組 N 值為 20，平均存活小時數為 16.2，與對照組比較 P 值為 0.0021 (P value < 0.01**)，有顯著差異。(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, **** p<0.0001)

四、內源性大麻素 2-AG 含量對果蠅抗壓力能力之影響

(一)降解 DAGL 對果蠅抗壓力能力之影響

由圖十五(A)可知，以 $inaE-RNAi^{GD}$ 或 $inaE-RNAi^{KK}$ 降解果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，對母果蠅的抗壓力能力皆無顯著影響(ns)。由圖十五(B)可知，以 $inaE-RNAi^{GD}$ 或 $inaE-RNAi^{KK}$ 降解 DAGL，對公果蠅的抗壓力能力皆無顯著影響(ns)。

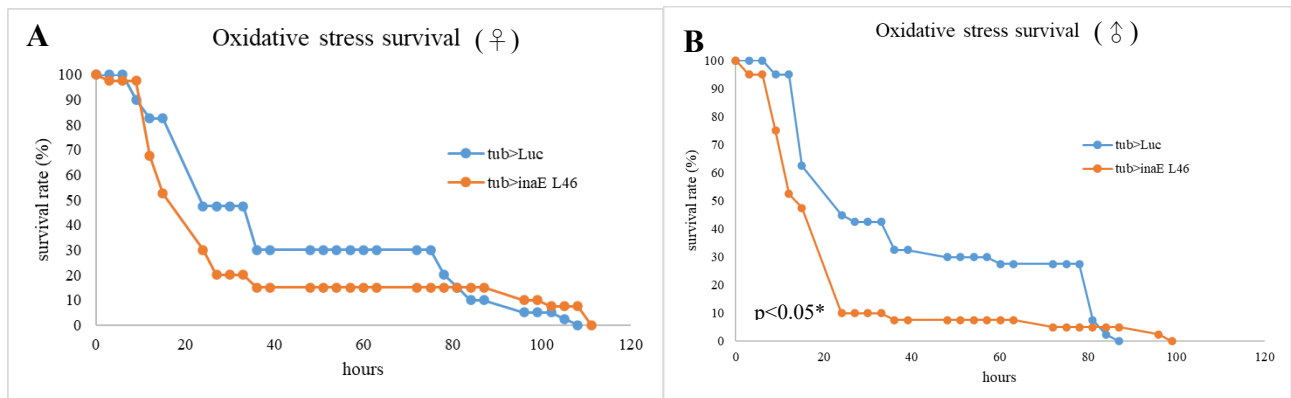


圖十五、降解 DAGL 對果蠅抗壓力能力之影響

圖十五(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表小時，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖十五(A)中 tub-Gal4 與 $Luc-RNAi^{JF}$ 交配之對照組 N 值為 40，平均存活小時數為 42.68。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{GD}$ 交配之實驗組 N 值為 20，平均存活小時數為 49.8，與對照組比較 P 值為 0.2744，無顯著差異(ns)。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{KK}$ 交配之實驗組 N 值為 40，平均存活小時數為 35.18，與對照組比較 P 值為 0.6677，無顯著差異(ns)。圖十五(B)中 tub-Gal4 與 $Luc-RNAi^{JF}$ 交配之對照組 N 值為 40，平均存活小時數為 39.08。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{GD}$ 交配之實驗組 N 值為 20，平均存活小時數為 43.2，與對照組比較 P 值為 0.1234，無顯著差異(ns)。tub-Gal4 與 $inaE-RNAi^{KK}$ 交配之實驗組 N 值為 40，平均存活小時數為 23.78，與對照組比較 P 值為 0.0633，無顯著差異(ns)。

(二)過度表現 DAGL 對果蠅抗壓力能力之影響

由圖十六(A)可知，以 UAS-inaE^{L46} 過度表現果蠅體內內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，對母果蠅的抗壓力能力無顯著影響(ns)。由圖十六(B)可知，以 UAS-inaE^{L46} 過度表現 DAGL，對公果蠅的抗壓力能力有顯著影響 (P value<0.05*)，過度表現 DAGL 之實驗組抗壓力能力較對照組差。



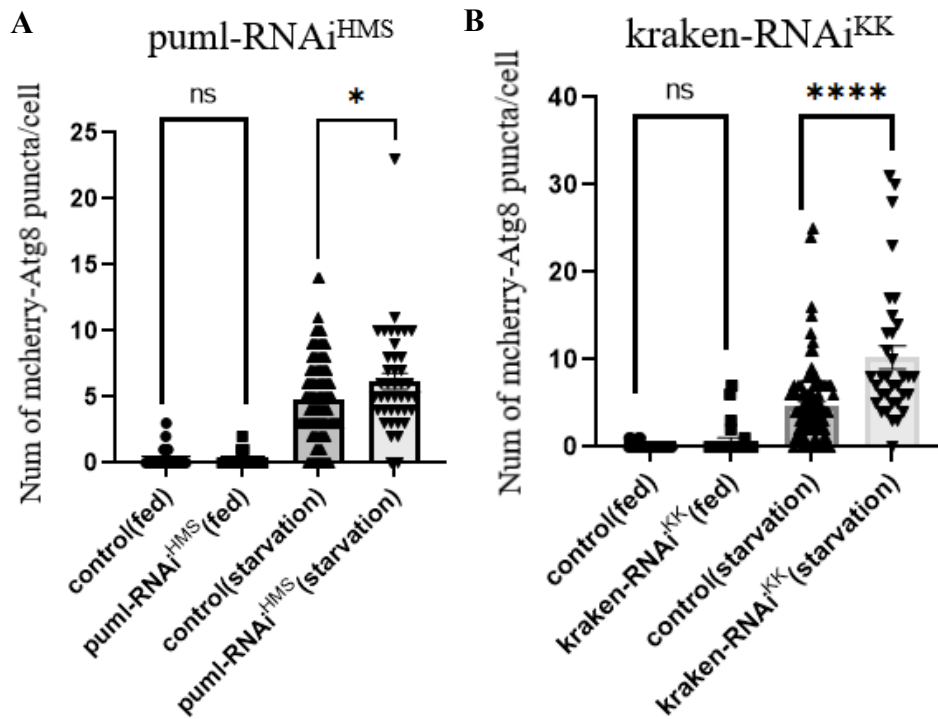
圖十六、過度表現 DAGL 對果蠅抗壓力能力之影響

圖十六(A)為母果蠅，(B)為公果蠅，x 軸代表小時，y 軸代表存活果蠅隻數的百分比。圖十六(A)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 40，平均存活小時數為 42.68。tub-Gal4 與 UAS-inaE^{L46} 交配之實驗組 N 值為 40，平均存活小時數為 37.1，與對照組比較 P 值為 0.3818，無顯著差異(ns)。圖十六(B)中 tub-Gal4 與 Luc-RNAi^{JF} 交配之對照組 N 值為 40，平均存活小時數為 39.08。tub-Gal4 與 UAS-inaE^{L46} 交配之實驗組 N 值為 40，平均存活小時數為 21.98，與對照組比較 P 值為 0.0112(P value <0.05*)，有顯著差異。(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, **** p<0.0001)

五、內源性大麻素 2-AG 含量對果蠅體內細胞自噬量之影響

(一)降解 MAGL 果蠅體內細胞自噬量之影響

由圖十七可知，以 RNAi 技術降解果蠅脂肪體中內源性大麻素 2-AG 的分解酶 MAGL，使 2-AG 累積，對在飢餓狀態下的細胞自噬量有顯著影響，其中 kraken-RNAi^{KK} 效率較 puml-RNAi^{HMS} 佳。

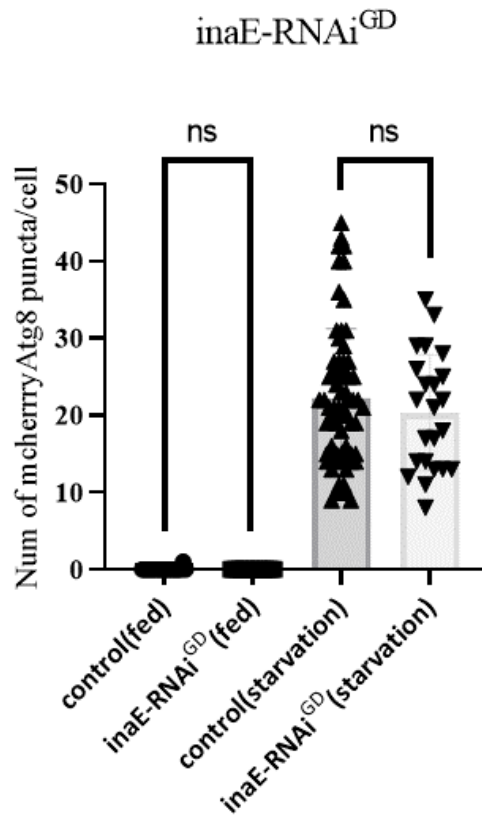


圖十七、降解 MAGL 果蠅體內細胞自噬量之影響

圖十七(A)為以 puml-RNAi^{HMS} 降解 MAGL 之實驗結果圖，其中 x 軸代表有無飢餓處理之對照組及實驗組，y 軸代表每一細胞中 Atg8 puncta 的數量。無飢餓處理狀況下，未降解 MAGL 之對照組(N 為 79)平均 puncta 數量為 0.23，降解 MAGL 之實驗組(N 為 37)平均 puncta 數量為 0.14，兩者比較無顯著差異(ns)。有飢餓處理狀況下，未降解 MAGL 之對照組(N 為 145)平均 puncta 數量為 4.81，降解 MAGL 之實驗組(N 為 41)平均 puncta 數量為 6.17，兩者比較:P value<0.05*。圖十七(B) 為以 kraken-RNAi^{KK} 降解 MAGL 之實驗結果圖，其中 x 軸代表有無飢餓處理之對照組及實驗組，y 軸代表每一細胞中 Atg8 puncta 的數量。無飢餓處理狀況下，未降解 MAGL 之對照組(N 為 68)平均 puncta 數量為 0.06，降解 MAGL 之實驗組(N 為 27)平均 puncta 數量為 0.70，兩者比較無顯著差異(ns)。有飢餓處理狀況下，未降解 MAGL 之對照組(N 為 102)平均 puncta 數量為 4.76，降解 MAGL 之實驗組(N 為 34)平均 puncta 數量為 10.24，兩者比較:P value<0.0001****，有顯著差異。(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001,**** p<0.0001)

(二)降解 DAGL 果蠅體內細胞自噬量之影響

由圖十八可知，以 RNAi 技術降解果蠅脂肪體中內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，使 2-AG 含量減少。以 *inaE-RNAi^{GD}* 降解 DAGL 不論是否在飢餓狀態下，果蠅脂肪體之細胞自噬量皆無顯著影響(ns)。後續將以 RT-PCR 中降解效果較佳之 RNAi 果蠅株:*inaE-RNAi^{KK}* 降解 DAGL 進行實驗。

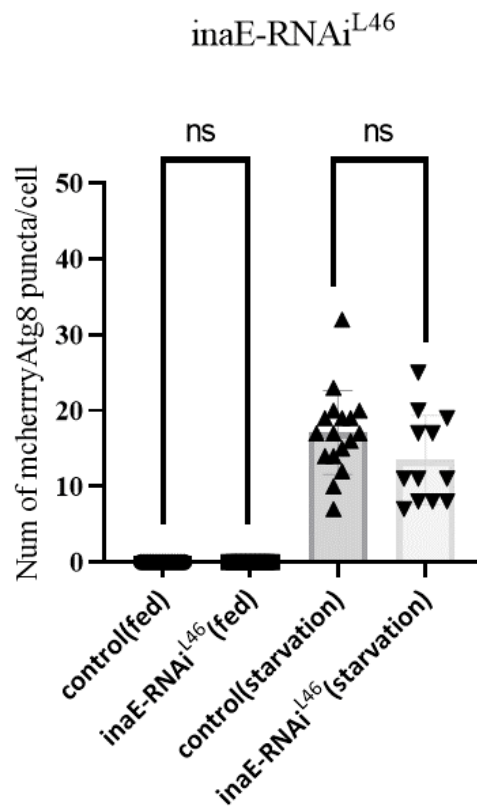


圖十八、降解 DAGL 果蠅體內細胞自噬量之影響

圖十八中 x 軸代表有無飢餓處理之對照組及實驗組，y 軸代表每一細胞中 Atg8 puncta 的數量。無飢餓處理狀況下，未降解 DAGL 之對照組(N 為 21)平均 puncta 數量為 0.05，降解 DAGL 之實驗組(N 為 18)平均 puncta 數量為 0，兩者比較無顯著差異(ns)。有飢餓處理狀況下，未降解 DAGL 之對照組(N 為 66)平均 puncta 數量為 22.26，降解 DAGL 之實驗組(N 為 24)平均 puncta 數量為 20.35，兩者比較無顯著差異(ns)。

(三)過度表現 DAGL 果蠅體內細胞自噬量之影響

由圖十九可知，以 UAS-*inaE*^{L46} 過度表現果蠅脂肪體中內源性大麻素 2-AG 的合成酶 DAGL，使 2-AG 累積，對在飢餓狀態下的細胞自噬量雖無顯著影響(ns)，但若以平均值討論，可以發現未過度表現 DAGL 之對照組(N 為 17)平均 puncta 數量為 17.12，過度表現 DAGL 之實驗組(N 為 13)平均 puncta 數量為 13.5，兩者平均值並不相近。因此推測過度表現 DAGL 對細胞自噬量可能具影響，但因本研究實驗組數尚不足，故未取得具顯著差異的結果。



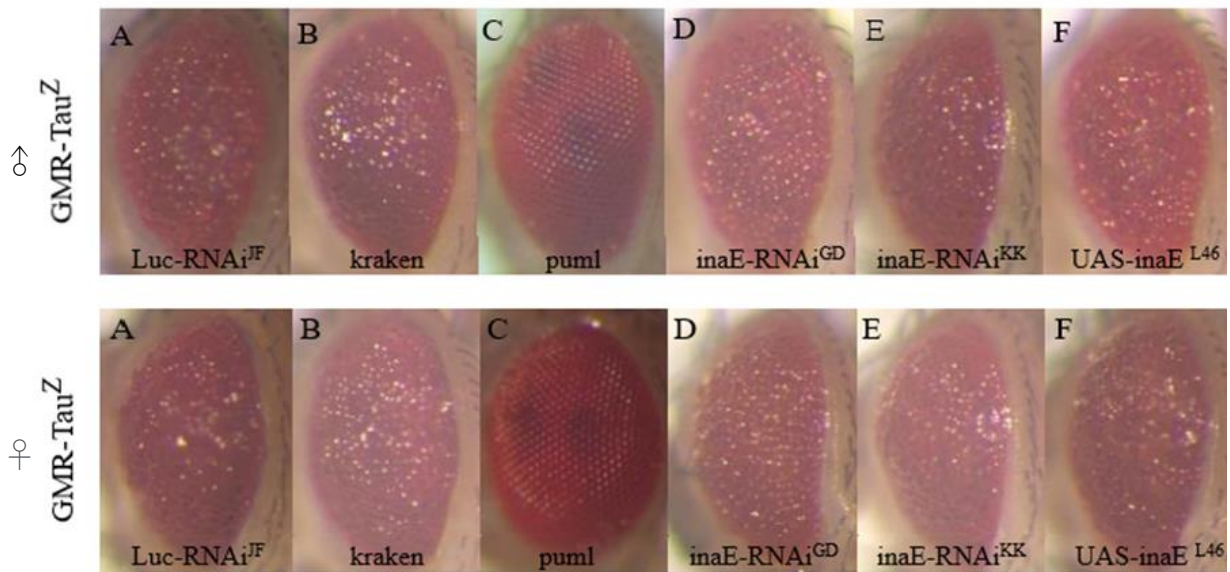
圖十九、過度表現 DAGL 果蠅體內細胞自噬量之影響

圖十九中 x 軸代表有無飢餓處理之對照組及實驗組，y 軸代表每一細胞中 Atg8 puncta 的數量。無飢餓處理狀況下，未過度表現 DAGL 之對照組(N 為 15)平均 puncta 數量為 0，過度表現 DAGL 之實驗組(N 為 10)平均 puncta 數量為 0，兩者比較無顯著差異(ns)。有飢餓處理狀況下，未過度表現 DAGL 之對照組(N 為 17)平均 puncta 數量為 17.12，過度表現 DAGL 之實驗組(N 為 13)平均 puncta 數量為 13.5，兩者比較無顯著差異(ns)。

六、內源性大麻素 2-AG 含量對神經退化性疾病之影響

(一)阿茲海默症

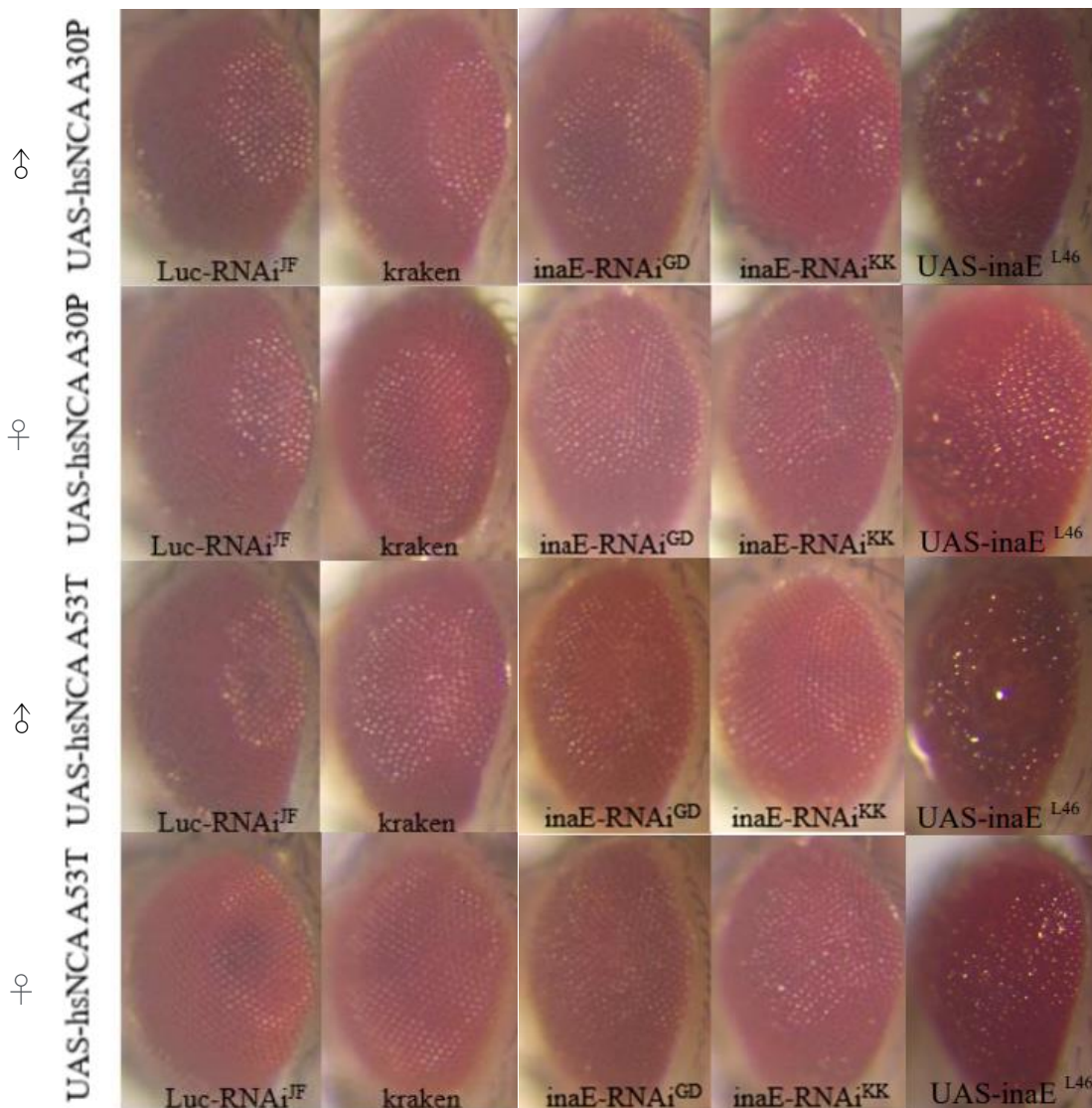
1. GMR-Tau Z/cyo 是我們在果蠅基因中，找到和哺乳動物的阿茲海默症相似的基因序列。由圖二十可知，GMR-TauZ 的對照組果蠅複眼呈現凹凸不平、具坑洞狀，稱為 rough eye。實驗組中降解 DAGL 與過度表現 DAGL 皆未對果蠅複眼表徵造成顯著影響，仍呈現凹凸不平之 rough eye。而 GMR-TauZ 與 *puml-RNAi^{HMS}* 交配之子代，其複眼型態恢復正常，呈平滑無坑洞狀，但同具降解 MAGL 功能的 *kraken-RNAi^{KK}* 之子代複眼型態並未改善，為避免人為操作失誤，後續將重複進行此實驗，內源性大麻素 2-AG 的累積對阿茲海默症之影響仍有待釐清。



圖二十、不同基因型果蠅與 GMR-Tau Z/cyo 交配之子代複眼型態(上為公果蠅，下為母果蠅)

(二) 帕金森氏症

1. GMR-Gal4;UAS-hsNCA A30P、GMR-Gal4;UAS-hsNCA A53T 是我們在果蠅基因中，找到和哺乳動物的帕金森氏症相似的基因序列。由圖二十一可知，GMR-Gal4;UAS-hsNCA A30P 及 GMR-Gal4;UAS-hsNCA A53T 的對照組果蠅複眼皆呈平滑無坑洞狀，與降解 DAGL、降解 MAGL 的 RNAi 果蠅交配產生之子代，其複眼型態仍正常。而在過度表現 DAGL 的 GMR-TauZ/cyo 與 UAS-inaE^{L46} 交配之實驗組，其子代中公果蠅複眼呈現凹凸不平之 rough eye，初步推測過度表現 DAGL 對帕金森氏症具影響，後續可延伸探討公母果蠅差異及其與細胞自噬的關聯性。



圖二十一、不同基因型果蠅與 GMR-Gal4;UAS-hsNCA A30P 或 GMR-Gal4;UAS-hsNCA A53T 交配之子代複眼型態

七、結果討論

(一)

內源性大麻素系統調節神經傳遞物質的釋放、免疫與發炎反應、壓力反應等(Lowe H et al., 2021)，且影響神經退化性疾病(Bedse G et al., 2015)。在以老鼠或癌細胞的實驗模式中已被廣泛研究，尤其發展 MAGL 抑制劑更是具有治療的潛力，但卻少有以果蠅為模式的相關研究。內源性大麻素 AEA 的分解酶 FAAH 已被證實與自噬作用相關(Zhu Y, 2023)，但尚未有以 2-AG 探討內源性大麻素與細胞自噬關聯性的研究。為了釐清果蠅體內內源性大麻素的運作及與自噬作用的關聯性，本研究利用 RNAi 果蠅降解或過度表達 2-AG 的合成酶與分解酶，調控果蠅細胞內 2-AG 的含量，觀察其對果蠅多項生理功能的影響。

在目前的實驗中，我們以 $\text{pum1-RNAi}^{\text{HMS}}$ 、 $\text{kraken-RNAi}^{\text{KK}}$ 降解內源性大麻素 2-AG 之分解酶 MAGL，發現對母果蠅的抗飢餓能力有顯著提升，但對公果蠅的抗飢餓能力皆沒有顯著影響。先前文獻(He J et al., 2021)提及內源性大麻素 AEA 和 2-AG 皆能抑制食物攝取，而 AEA 及其代謝物可能是透過減少脂質代謝來抑制食物攝取，並促進對飢餓的抵抗力，但 2-AG 並不影響脂質代謝，且 AEA 在脂質代謝中的作用機制有待進一步研究。此文獻與本研究在「內源性大麻素對果蠅抗飢餓能力具影響」之結論一致，但在 2-AG 如何調節果蠅生理功能的途徑，我們推測可能與細胞自噬相關，因此進行後續探討內源性大麻素對果蠅細胞自噬量的研究。在探討 2-AG 對果蠅細胞自噬量的影響之實驗中，我們發現以 $\text{pum1-RNAi}^{\text{HMS}}$ 或 $\text{kraken-RNAi}^{\text{KK}}$ 降解果蠅脂肪體中 2-AG 的分解酶 MAGL，使 2-AG 累積，對在飢餓狀態下的細胞自噬量皆有顯著影響。另外，以 $\text{pum1-RNAi}^{\text{HMS}}$ 降解 MAGL 後，能表現 Tau 蛋白的 $\text{GMR-Tau}^{\text{Z}}$ 果蠅會從 rough eye 回復成正常的複眼型態。我們推測降解 MAGL 會使 2-AG 含量增加，且透過促進細胞自噬作用而提高果蠅的抗飢餓能力及改善阿茲海默症病徵。符合先前在許多小鼠或癌細胞為模式的研究，MAGL 的抑制導致 2-AG 的累積和大麻素受體的活化，同時也減少發炎物質花生四烯酸及其代謝物前列腺素等的產生，因此能達到抗發炎、減低疼痛及對神經退化性疾病具有神經保護的效果。

(二)

在 RT-PCR 的實驗中，我們發現 *inaE*-RNAi^{KK} 降解 DAGL 的效率較 *inaE*-RNAi^{GD} 佳，兩者 *inaE* RNA 表現量分別為 0.64 及 0.89。而在後續生理功能的實驗中，以 *inaE*-RNAi^{KK} 降解 2-AG 的合成酶 DAGL 使 2-AG 含量減少，對公果蠅的抗飢餓能力有顯著下降，對母果蠅則無顯著差異。而以 *inaE*-RNAi^{GD} 降解 DAGL 則對果蠅抗飢餓與抗壓力能力不論公母皆無顯著影響，此結果可能與 *inaE*-RNAi^{KK} 及 *inaE*-RNAi^{GD} 降解 DAGL 的效率有關。若以圖表趨勢討論，以 *inaE*-RNAi^{KK} 降解 DAGL 的存活率，皆有存活趨勢較對照組差、平均存活小時數較對照組少的結果，我們推測是由於實驗組數較少，N 值為 20 或 40，故帶入公式計算無法得到顯著差異的結論，後續將持續增加實驗組數。在探討 2-AG 對果蠅細胞自噬量的影響之實驗中，我們發現以 *inaE*-RNAi^{GD} 降解 DAGL 使 2-AG 含量減少，並未對果蠅細胞自噬量有顯著差異。本研究中降解 MAGL 的各項實驗結果，皆較降解 DAGL 明顯，從先前文獻 (Murataeva N et al., 2014) 可以推測是因 MAGL 對調控 2-AG 的影響較 DAGL 顯著。

(三)

我們發現以 UAS-*inaE*^{L46} 過度表現 2-AG 的合成酶 DAGL 使內源性大麻素 2-AG 累積，對公果蠅的抗飢餓與抗壓力能力皆有顯著下降的影響，且若以圖表趨勢討論，抗飢餓與抗壓力能力不論公母，皆有存活趨勢較對照組差、平均存活小時數較對照組少的結果。而在探討 2-AG 對果蠅細胞自噬量的影響之實驗中，以 UAS-*inaE*^{L46} 過度表現 DAGL 對果蠅細胞自噬量並無顯著影響，但若以平均值討論，可以發現對照組平均 puncta 數量為 17.12，實驗組平均 puncta 數量為 13.5，兩者平均值並不相近。我們推測過度表現 DAGL 對母果蠅的生理功能及果蠅細胞自噬量可能具影響，但因本研究實驗組數尚不足，故未取得具顯著差異的結果。

過度表現 2-AG 的合成酶 DAGL，與降解 2-AG 的分解酶 MAGL，皆使內源性大麻素 2-AG 累積，但兩者在生理功能、細胞自噬量與神經退化性疾病的實驗結果皆相反，推測其原因為 2-AG 代謝產物的含量差異。2-AG 的代謝產物為花生四烯酸 arachidonic acid(AA)和甘油，AA 具有多種生理功能：作為細胞膜磷脂雙層的成分、作為類二十烷酸的前驅物、作為發炎介質，而過度表現 DAGL 將使 AA 含量增加，而降解 MAGL 則會使 AA 含量減少。

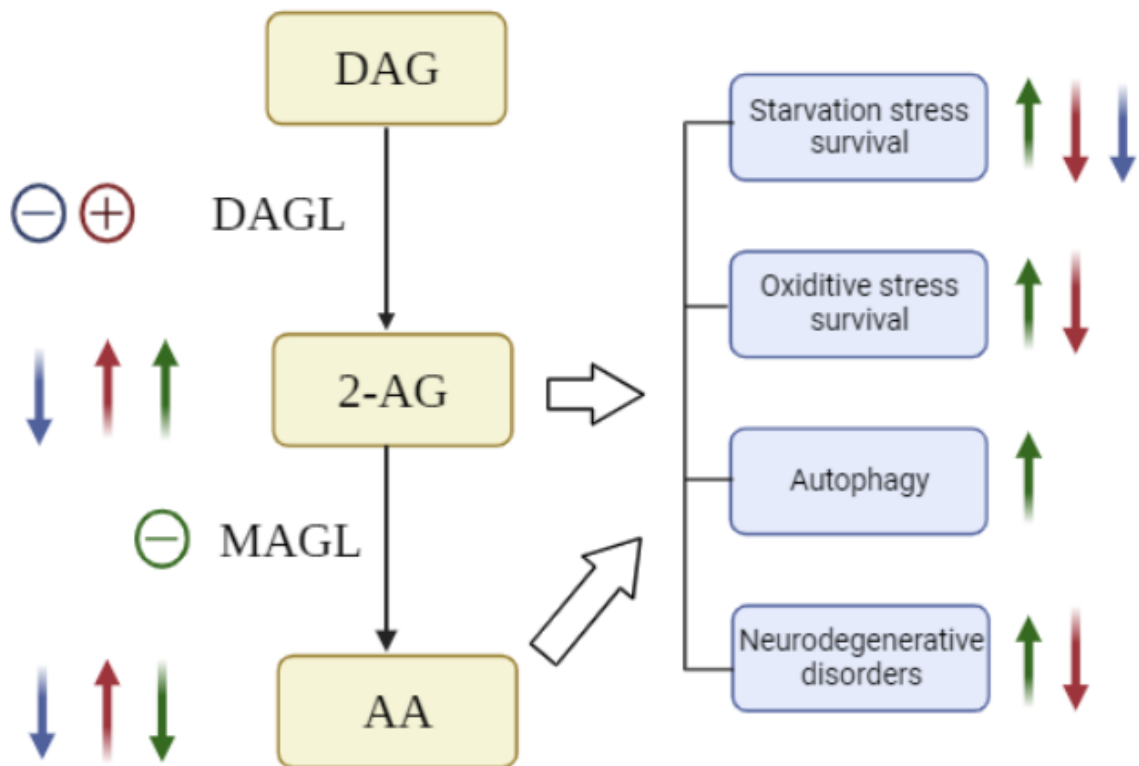
發炎是身體對組織損傷的反應，會引起細胞變化和免疫反應，導致受損組織的修復和受損部位的細胞生長。但如果發炎的原因持續存在或負責關閉該過程的控制機制失效，發炎可能會變成慢性，當發炎變成慢性或持續時間過長時，它可能是有害的，會導致細胞突變和增殖，並可能介導多種疾病，包括心血管疾病、癌症、糖尿病、關節炎、阿茲海默症、肺部疾病和自體免疫疾病(Singh N et al., 2019)。在 AA 的多種代謝途徑中，COX-1 和 COX-2 將 AA 轉化為前列腺素(PG)G₂ 和 PGH₂，進一步代謝為各種 PG(包括 PGD₂、PGE₂ 和 PGF₂α，以下稱 PGs)，而先前文獻(Zhou Y et al., 2021)指出，COX-2 介導產生的 PGs 通過調節先天性和適應性免疫細胞，顯著參與慢性炎症，並在慢性發炎性疾病中發揮作用。以上文獻可以解釋本研究中過度表現 DAGL 與降解 MAGL 在生理功能的實驗結果差異，我們推測過度表現 DAGL 會使 2-AG 增加，而 MAGL 會將累積的 2-AG 代謝，使 AA 含量增加，進而導致 PGs 含量增加，使過度表現 DAGL 的實驗組果蠅產生慢性發炎的徵狀，生理功能下降與細胞自噬量減少。而降解 MAGL 則使 2-AG 增加，且使 AA 含量減少，故果蠅生理功能提升與細胞自噬量增加。

先前文獻(Deng H, Li W, 2020)提及 AA 為環氧合酶 COX-1 和 COX-2 的受質，會進一步轉化為發炎性前列腺素 (PG) 和血栓素，前列腺素與帕金森氏症中的神經元退化有關(Reisenberg M et al., 2012)，而給予 MAGL 抑制劑可減少促發炎性前列腺素和細胞激素的形成。且指出，MAGL 抑制在帕金森氏症和多發性硬化症 (MS) 的動物模型中產生了神經保護作用，MAGL 抑制使 2-AG 累積並活化大麻素受體，但這些神經保護反應可能並非透過大麻素受體途徑驅動，而是透過降低促發炎類二十烷酸來驅動的。另外，亦有文獻(Piro JR et al., 2013) 探討內源性大麻素對阿茲海默症的發病機制，並支持此假設，該文獻提及 MAGL 貢獻了大腦中的大部分 AA，抑制 MAGL 可以顯著減少阿茲海默症發病機制中的神經炎症，並減輕澱粉樣變性，可能是透過抑制促發炎類二十烷酸的產生來實現的。此假設與本研究中 2-AG 對神經退化性疾病的實驗結果相符，推測以 UAS-inaE^{L46} 過度表現 DAGL，將導致 2-AG 下游之促發炎類二十烷酸含量增加，導致帕金森氏症的病徵，而以 puml-RNAi^{HMS} 降解 MAGL，將導致促發炎類二十烷酸含量減少，減緩阿茲海默症的徵狀。

肆、結論與應用

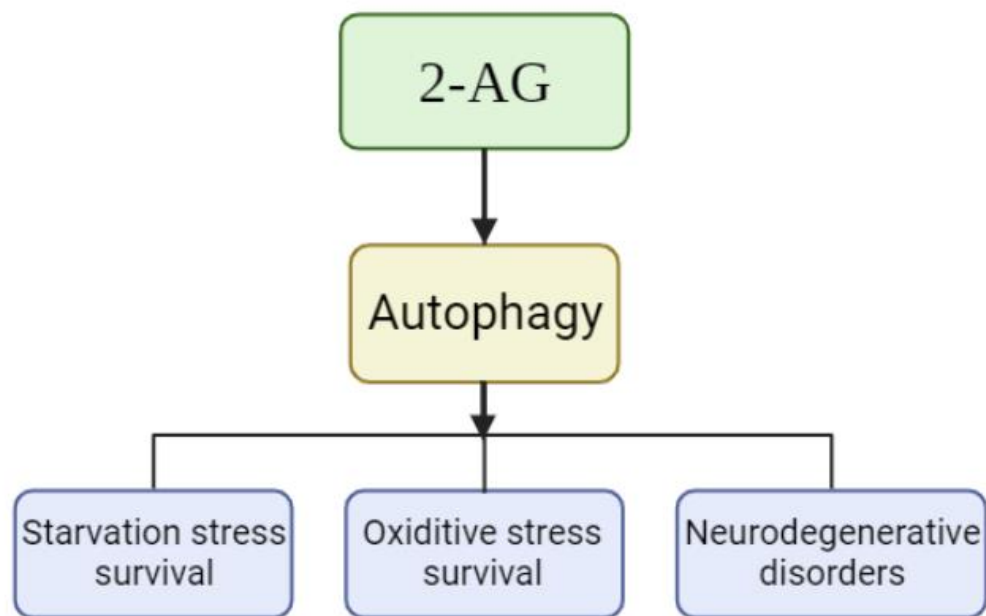
一、結論

本研究以果蠅作為模式生物，從 2-AG 的合成、分解路徑探討內源性大麻素 2-AG 與細胞自噬及生理功能的關聯性，並發現 2-AG 含量會影響果蠅抗飢餓能力、抗壓力能力、細胞自噬量及神經退化性疾病，如圖二十四。由於細胞自噬在飢餓與壓力環境下易被觸發，因此我們推測 2-AG 是透過細胞自噬影響果蠅的抗飢餓與抗壓力能力。



圖二十四、研究結果圖

後續研究設計，可以透過相同實驗步驟使 2-AG 含量改變，並加入自噬抑制劑，如抑制自噬溶小體(autophagolysosomes)形成之藥物氯化奎寧(chloroquine)，若在抑制自噬的背景下，增加 2-AG 含量，並未增進果蠅的抗飢餓能力及抗壓力能力，便可確認內源性大麻素是透過細胞自噬影響果蠅生理功能的路徑，如圖二十五。



圖二十五、內源性大麻素透過細胞自噬影響果蠅生理功能示意圖

二、應用

自噬作用是維持細胞穩定的核心分子途徑，與老化、癌症、心血管疾病、神經退化性疾病、代謝、感染、肌肉骨骼和眼部疾病等皆相關(Klionsky DJ et al., 2021)，期許能延伸本研究，探討內源性大麻素和細胞自噬的相關性與路徑，以及內源性大麻素在人體內的調控機制，在自噬作用異常導致疾病時，即可透過調節內源性大麻素系統調節自噬作用、生理恢復平衡，提供多種病症新的治療可能性。

伍、參考文獻

- 一、楊嶧樺(2016)。在果蠅複眼中研究阿爾茲海默症與帕金森氏症候選基因的交互作用。國立清華大學系統神經科學研究所碩士論文。 <https://hdl.handle.net/11296/36p556>
- 二、張志鵬(2017)。2016 年諾貝爾生理醫學獎—細胞的飢餓遊戲。國內學術電子期刊科學發展 535 期，42-47。 <https://ejournal.stpi.narl.org.tw/sd/download?source=10607-08.pdf&vId=60e049686c0845b0a5e09d769b8d5ba6&nd=1&ds=1>
- 三、施木青(2003)。抗 SARS 戰役中獨領風騷的分生檢驗技術。台灣醫檢會報第 18 卷第 2 期。 <https://www.labmed.org.tw/bjournal04.asp?IsAno=7&IsBno=16&IsCno=54&IsDno=143>
- 四、Lowe H, Toyang N, Steele B, Bryant J, Ngwa W(2021). The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 31;22(17):9472. <https://doi.org/10.3390/ijms22179472>
- 五、Bedse G, Romano A, Lavecchia AM, Cassano T, Gaetani S(2015). The role of endocannabinoid signaling in the molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;43(4):1115-36. <https://doi.org/10.3233/JAD-141635>
- 六、Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W(2020). Autophagy in Parkinson's Disease. *J Mol Biol.* 2020 Apr 3;432(8):2651-2672. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.037>
- 七、Guillermo Velasco, Cristina Sánchez & Manuel Guzmán (2012). Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews Cancer volume 12*, pages436–444 (2012). <https://www.nature.com/articles/nrc3247>
- 八、McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M(2006). Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene.* 2006 Mar 29;370:64-74. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.11.004>
- 九、Simon V, Cota D(2017). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Endocannabinoids and metabolism: past, present and future. *Eur J Endocrinol.* 2017 Jun;176(6):R309-R324. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-1044>

- 十、Ohsumi Y(2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014 Jan;24(1):9-23.
<https://doi.org/10.1038/cr.2013.169>
- 十一、Zhu Y, Zhang H, Mao H, Zhong S, Huang Y, Chen S, Yan K, Zhao Z, Hao X, Zhang Y, Yao H, Huang X, Wang M, Zhang W, Li J, Meng G, Qin X, Ye Z, Shen J, Song Y, Xu Y, Yang Z, Wang L, Zhang Y, Wen L(2023). FAAH served a key membrane-anchoring and stabilizing role for NLRP3 protein independently of the endocannabinoid system. *Cell Death & Differentiation* volume 30, pages168–183. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01054-4>
- 十二、He J, Tan AMX, Ng SY, Rui M, Yu F(2021). Cannabinoids modulate food preference and consumption in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep.* 2021 Feb 25;11(1):4709.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84180-2>
- 十三、Deng H, Li W(2020). Monoacylglycerol lipase inhibitors: modulators for lipid metabolism in cancer malignancy, neurological and metabolic disorders. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Apr;10(4):582-602. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.10.006>
- 十四、Piro JR, Benjamin DI, Duerr JM, Pi Y, Gonzales C, Wood KM, Schwartz JW, Nomura DK, Samad TA(2013). A dysregulated endocannabinoid-eicosanoid network supports pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 2012 Jun 28;1(6):617-23.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.001>
- 十五、Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB(2019). Inflammation and cancer. *Ann Afr Med.* 2019 Jul-Sep;18(3):121-126. https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18
- 十六、Zhou Y, Khan H, Xiao J, Cheang WS(2021). Effects of Arachidonic Acid Metabolites on Cardiovascular Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 6;22(21):12029.
<https://doi.org/10.3390/ijms222112029>
- 十七、Reisenberg M, Singh PK, Williams G, Doherty P(2012). The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012 Dec 5;367(1607):3264-75. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0387>

- 十八、Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cadwell K, Cecconi F, Choi AMK, Choi ME, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Deretic V, Dikic I, Elazar Z, Eskelinen EL, Fimia GM, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Jäättelä M, Johansen T, Juhász G, Karantza V, Kraft C, Kroemer G, Ktistakis NT, Kumar S, Lopez-Otin C, Macleod KF, Madeo F, Martinez J, Meléndez A, Mizushima N, Münz C, Penninger JM, Perera RM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Santambrogio L, Scorrano L, Simon HU, Simon AK, Simonsen A, Stolz A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Galluzzi L, Pietrocola F(2021). Autophagy in major human diseases. *EMBO J.* 2021 Oct 1;40(19):e108863. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108863>
- 十九、Maroof N, Pardon MC, Kendall DA(2013). Endocannabinoid signalling in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 2013 Dec;41(6):1583-7. <https://doi.org/10.1042/BST20130140>
- 二十、White E, Mehnert JM, Chan CS(2015). Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 15;21(22):5037-46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0490>
- 二十一、Gu C, Chen M, Li X, Geng D, Wang C(2023). MAGL regulates synovial macrophage polarization vis inhibition of mitophagy in osteoarthritic pain. *Mol Med Rep.* 2023 Jun;27(6):117. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13004>
- 二十二、Murataeva N, Straiker A, Mackie K(2014). Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol.* 2014 Mar;171(6):1379-91. <https://doi.org/10.1111/bph.12411>
- 二十三、Huang X, Yao J, Liu L, Luo Y, Yang A(2022). Atg8-PE protein-based in vitro biochemical approaches to autophagy studies. *Autophagy.* 2022 Sep;18(9):2020-2035. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2025572>

【評語】 050015

這項研究利用果蠅作為模型生物來探討內源性大麻素 2-AG 對細胞自噬及生理功能的影響，尤其是在抗飢餓、抗壓力和神經退化性疾病方面。

1. 新穎的研究模型：使用果蠅作為研究內源性大麻素 2-AG 的模型生物是創新的，擴展了對內源性大麻素系統研究的範疇。
2. 內源性大麻素與細胞自噬的聯繫：探索 2-AG 含量與細胞自噬之間的關係，為理解內源性大麻素在細胞生理過程中的作用提供了新的視角。
3. 神經退化性疾病的潛在應用：初步研究 2-AG 對神經退化性疾病的影響，為未來的疾病治療提供了新的可能性。
4. 深入了解內源性大麻素系統：這項研究有助於深入理解內源性大麻素系統在生理和病理過程中的角色。
5. 提供新的疾病治療策略：對於疾病治療，特別是神經退化性疾病，提供了新的治療目標和策略。
6. 模型生物的限制性：果蠅作為模型生物，其生理機制可能與人類有所不同，因此研究結果的直接適用性需要謹慎評估。

7. 機制的複雜性：內源性大麻素系統的作用機制相當複雜，可能涉及多個途徑和互動，因此解釋和驗證這些機制可能具有挑戰性。
8. 長期效果和安全性未知：對於 2-AG 含量調節在長期對生物體的影響和安全性方面的研究還不充分。

總體而言，這項研究在瞭解內源性大麻素系統對細胞自噬和生理功能影響方面顯示出創新性和潛力。它不僅提供了對內源性大麻素在生物體中作用的新見解，也為神經退化性疾病的未來治療提供了新的研究方向。然而，這項研究的應用和推廣需要考慮到模型生物的局限性。