

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

| | |
|------|-------------------------------------|
| 作品編號 | 090013 |
| 參展科別 | 醫學與健康科學 |
| 作品名稱 | 維持粒線體功能的重要基因Rrm2b對於不同種類中樞神經細胞的調控與影響 |
| 得獎獎項 | 四等獎 |

| | |
|------|---------------|
| 就讀學校 | 臺北市私立復興實驗高級中學 |
| 指導教師 | 馬瑪宣、呂毓蘋 |
| 作者姓名 | 陳昱彤 |

關鍵詞 星狀膠細胞、老化、粒線體

作者簡介



我是陳昱彤，就讀於私立復興實驗高級中學高中一年級。我從小就對自然科學很感興趣，也很喜歡做實驗。國三開始有幸進入實驗室進行醫學的相關研究，感謝教授及學長姐的指導，讓我在實驗室中學會了生物和醫學的相關知識、操作實驗的技巧，以及面對挫折時的忍耐力。這段經驗使我更喜歡科學，也更熱衷於研究。

摘要

老化造成的神經退化性疾病，與細胞內粒線體機能異常有重要的關聯性。已知核醣核苷酸還原酶 M2B (Rrm2b) 的主要負責協助粒線體的基因合成、修復以及功能維持。本研究以核醣體核酸干擾技術，使 Rrm2b 表現量降低，探討其對不同種類中樞神經細胞粒線體 DNA 含量、細胞形態及功能的影響。結果顯示，Rrm2b 表現量降低並不會對粒線體 DNA 含量造成影響，但會使呼吸作用的效率降低，以及讓神經細胞更易分化，甚至反分化。同時，星狀膠細胞中的水通道蛋白表現量增加 165%，葡萄糖轉運蛋白表現量增加 27%，麩胺醯胺合成酶表現量則降低 22%。因此，Rrm2b 的低表現量，使星狀膠細胞運輸功能變強，而麩胺醯胺的合成變慢，則氨的代謝減緩。這些星狀膠細胞異常可能是造成腦部功能受損的原因之一。

Abstract

Age-related neurodegenerative diseases are closely associated with mitochondrial dysfunction. It is known that ribonucleotide reductase M2B (Rrm2b) plays a crucial role in assisting mitochondrial gene synthesis, repair, and maintenance. In this study, using ribonucleic acid interference technology, we reduced the expression of Rrm2b to investigate its effects on mitochondrial DNA content, cell morphology, and function in different types of central nervous system cells. The results show that decreased expression of Rrm2b does not affect mitochondrial DNA content but leads to a decrease in respiratory efficiency and an increased tendency for neural cells to differentiate or even de-differentiate. Additionally, the expression of Aquaporin-4 in astrocytes increased by 165%, Glucose transporter 1 expression increased by 27%, and Glutamate-ammonia ligase expression decreased by 22%. Therefore, the low expression of Rrm2b enhances the transport function of astrocytes, while slowing down the synthesis of glutamine, resulting in a slowed ammonia metabolism. These abnormalities in astrocytes may be one of the reasons for impaired brain function.

一、前言

一、研究動機

老化是所有生物無法避免的生命歷程，但老化同時也會給身體帶來諸多不便，如行動不便、記憶力衰退等(Hancock, Finkelstein, & Adlard, 2014)。老化所造成的諸多病症中，有很大一部份與粒線體代謝機能異常有關，而核醣核苷酸還原酶 M2B (Ribonucleotide reductase M2B;Rrm2b)的表現則會影響粒線體 DNA (mitochondrial DNA, 以下簡稱 mtDNA) 的生成與修復 (Chen et al., 2019)，因此，本實驗希望透過將神經細胞中的 Rrm2b 基因敲落 (Rrm2b Knockdown, 以下簡稱為 Rrm2b KD)，以及利用體外培養的方式模擬大腦內的微環境，觀察 Rrm2b 基因對於細胞生長的影響，探討 Rrm2b 基因在老化中所扮演的角色，並找出因應 Rrm2b 基因缺失所造成的粒線體功能異常所帶來的老化及病變的實際方法。

二、研究目的

- (一) 用基因敲落的方式將 Rrm2b 蛋白表現量降低，並觀察其對粒線體功能的影響。
- (二) 觀察不同中樞系統細胞中的 Rrm2b 表現降低後，其形態的改變。
- (三) 探討神經細胞及星狀膠細胞中 Rrm2b 表現降低後，其細胞功能之影響。

三、研究背景

(一) 大腦微環境

1. 中樞神經系統內的細胞種類

大腦中的細胞依照功能可分為神經細胞 (neuron) 與神經膠細胞 (glial cells)，神經細胞會透過放電進行神經傳導因子的接收與釋放，如麩胺酸、血清素、多巴胺，控制生物體的知覺、思考、運動等，而神經膠細胞則負責控制神經細胞的活性、養分供應、廢物代謝、炎症抑制等，神經膠細胞可以依外觀分為巨膠細胞 (macroglia) 與微膠細胞 (microglia)，巨膠細胞可再依功能區分為星狀膠細胞 (astrocyte)、寡突膠細胞 (oligodendrocytes)、室管膜細胞 (ependymal cell)。

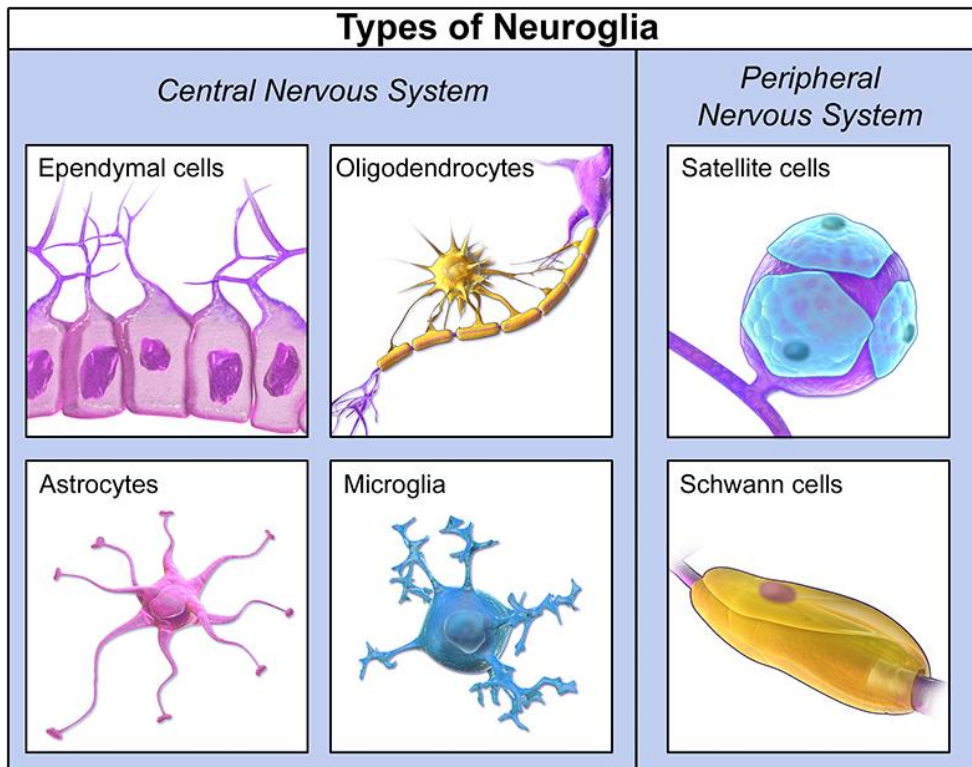


圖 1.神經膠細胞的種類: 神經膠細胞可分為星狀膠細胞 (astrocyte)、寡突膠細胞 (oligodendrocytes)、室管膜細胞 (ependymal cell)、微膠細胞 (microglia)等，外觀及功能各有不同 (Blausen.com staff,2014)。

2. 中樞神經系統內的細胞功能

(1) 神經細胞 (Neuron)

神經細胞的構造主要有軸突、細胞體、樹突，樹突上有突觸 (Synapse)，當神經細胞需要跟附近的其他神經細胞溝通時，會透過軸突傳遞動作電位，而細胞體是細胞核的所在位置，蛋白質會在細胞體被製造出來，並運送至樹突、軸突執行所需的機能 (Blausen.com staff,2014)。本實驗所使用的神經細胞為 N2a。

(2) 星形膠狀細胞 (Astrocyte)

星形膠狀細胞的主要功能是維持神經細胞的正常運作。他們可以控制突觸周圍神經傳導物質的平衡、調控鉀離子濃度、協助代謝作用，以及感知突觸中神經遞質的平衡，因此，星形膠狀細胞對於修飾及維護突觸有很重要的功能 (Blausen.com staff,2014)。本實驗所使用的星狀膠細胞為 C8-D1A。

(3) 微膠細胞 (Microglia)

微膠細胞的主要功能是保護大腦免於傷害和疾病，執行在中樞神經系統中的免疫反應。當微膠細胞感應到大腦中有損傷時，會清除有毒物質，以及移除死亡的細胞。但在患有神經退化性疾病的大腦中時，微膠細胞則會變得過度活躍，並產生細胞炎症，導致毒性蛋白質沉積。同時微膠細胞在發育中的大腦扮演了重要的角色，因為發育中的神經細胞時常會產生多於所需的突觸，而微膠細胞可以將被標記的多餘突觸修剪掉 (Blauen.com staff,2014)。

(二) Rrm2b 基因之於粒線體的重要性

Rrm2b 蛋白是核糖核苷酸還原酶 (Ribonucleotide reductase,RNR) 中的其中一個子單元，其主要的功能是控制粒線體中去氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 的數量，而 dNTP 是 DNA 複製與修復最重要的原料。Rrm2b 則主要是協助提供 dNTP 給粒線體 DNA 作複製與修復，此外也有研究指出，Rrm2b 會協助調控活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 的含量以及影響粒線體的代謝功能。粒線體是掌管細胞的能量供應、代謝等機能，是維持細胞，乃至於身體運作的重要胞器，因此 Rrm2b 基因的缺失可能會造成腦部、腎臟、腸胃等多種器官的發育遲緩、功能缺失，例如 Rrm2b 基因缺失所誘發的粒線體 DNA 缺乏症候群 (RRM2B-MDS, mtDNA depletion syndrome)，會造成從嬰兒時期開始的腎功能障礙、肌張力減退、發育遲緩、小頭畸形症、乳酸性酸中毒、消化及吞嚥困難、內耳神經損傷引起的癲癇及聽力損失等 (Fumagalli et al., 2022; Keshavan et al., 2020)。

(三) 粒線體與人類疾病的關係

粒線體主要功能為細胞能量生產及代謝，因此粒線體的缺失或功能異常會造成疾病，但在某些與老化相關的疾病中，卻可以發現粒線體 DNA 的合成，並沒有變化，甚至有不減反增的趨勢，因此粒線體與老化病徵之間尚未有絕對的關係。在大部分的疾病中，可以觀察到粒線體 DNA 的減少，或是維持不變，但也有少部分的疾病發生時，粒線體 DNA 的表現量呈現增長，因此疾病與粒線體 DNA 之間的關係尚無完全的定論 (Filigrana, Mennuni, Alsina, & Larsson, 2021)。目前已知測量粒線體 DNA 表現量多寡的方法是測量細胞色素 c 氧化酶 2 號亞基 (cytochrome c oxidaseII,COXII) 及 18s 核糖體 RNA (18s ribosomal RNA,18s rRNA) 之間表現量的比值 (Filigrana et al., 2021)，COXII 是粒線體電子傳遞鏈中的呼吸複合物 IV (Complex IV) 其中一段 DNA，因此將 COXII 作為粒線體 DNA 含量的指標，產出

18s rRNA 的 DNA 為細胞核 DNA，為恆定存在在細胞中，兩者在細胞中的含量筆直，即可作為理想的測量標準 (Hayashi, 2019)。此外，粒線體 DNA 表現量的下降，可能會造成 COXII 基因高甲基化，使 DNA 修補基因的啟動子—CpG 活性降低，提高致癌風險 (Xu et al., 2021)。

表 1. 疾病及粒線體 DNA 表現量的關係 (Filograna et al., 2021)

| Disease | Sample type | mtDNA levels | Quantification method | References |
|-------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|------------|
| Ageing | Lymphocytes | Down | WGS | [112] |
| | Blood | Down | qPCR; qPCR; WGS; qPCR; qPCR | [113–117] |
| | Heart | Unchanged | qPCR; SB | [118,119] |
| | Skeletal muscle | Unchanged | qPCR; SB | [118,119] |
| | Skeletal muscle | Down | NGS and ddPCR | [120] |
| | Liver | Up | NGS and ddPCR | [120] |
| | Caudate nucleus | Unchanged | SB | [118] |
| | Frontal lobe cortex | Unchanged | SB | [118] |
| | Cerebellar cortex | Unchanged | SB | [118] |
| | SN ^a | Up | qPCR | [121] |
| | PD | SN ^a | Down | qPCR; qPCR |
| Cerebellum | | Unchanged | WES | [124] |
| Cerebellar cortex | | Unchanged | WES | [124] |
| Frontal cortex | | Unchanged | qPCR | [123] |
| SN | | Down | qPCR | [123] |
| Blood | | Down | qPCR; qPCR | [123,127] |
| CSF | | Down | qPCR | [130] |
| AD | Frontal cortex | Down | qPCR | [109] |
| | Cerebellum | Unchanged | qPCR | [125] |
| | Cerebellum | Down | WES | [124] |
| | Hippocampus | Unchanged | qPCR | [125] |
| | Hippocampus ^a | Down | qPCR | [126] |
| | Cerebellar cortex | Down | WES | [124] |
| | Blood | Unchanged | qPCR | [125,128] |
| | CSF | Down | qPCR | [129] |

^aAnalyses were performed on microdissected neurons from these specific brain regions.

(四) 神經細胞的發炎與老化

星形膠質細胞作為影響神經系統中能量供應、代謝的細胞，是細胞炎症的重要參與者。神經細胞的功能是連接神經系統，主要透過電傳導的方式達成訊息傳遞，但傳導過程中可能會發生接觸不良，此時就需要星狀膠細胞的調控來緩解。星狀膠細胞連接神經細胞和血管，可以幫助神經細胞吸收養分和代謝老舊廢物，除此之外，當神經細胞發炎時，星狀膠細胞也可以透過釋放細胞激素來抵抗發炎反應，但在老化的神經系統中，星狀膠細胞有可能攻擊神經細胞，造成更嚴重的發炎與老化。

(五) 神經膠細胞的活化與神經細胞的修復

已知在神經細胞受到損傷時，星狀膠細胞及微膠細胞等細胞會啟動修復神經細胞的功能，其中可依照其作用的程度、觸發條件等，分為 Type 1 及 Type 2 兩個途徑。當神經細胞受到嚴重的損傷時，如受到發炎因子刺激或是在神經退化性疾病

中，星狀膠細胞及微膠細胞會傾向往 Type 1 的方向被活化，並釋放細胞激素如腫瘤壞死因子 (TNF- α)，這些細胞激素會導致神經毒殺效果，而使得神經細胞受損或凋亡；而 Type 2 途徑則是在神經細胞出現缺血時觸發，修復的過程較為溫和，比較不會為細胞帶來更多的損失。

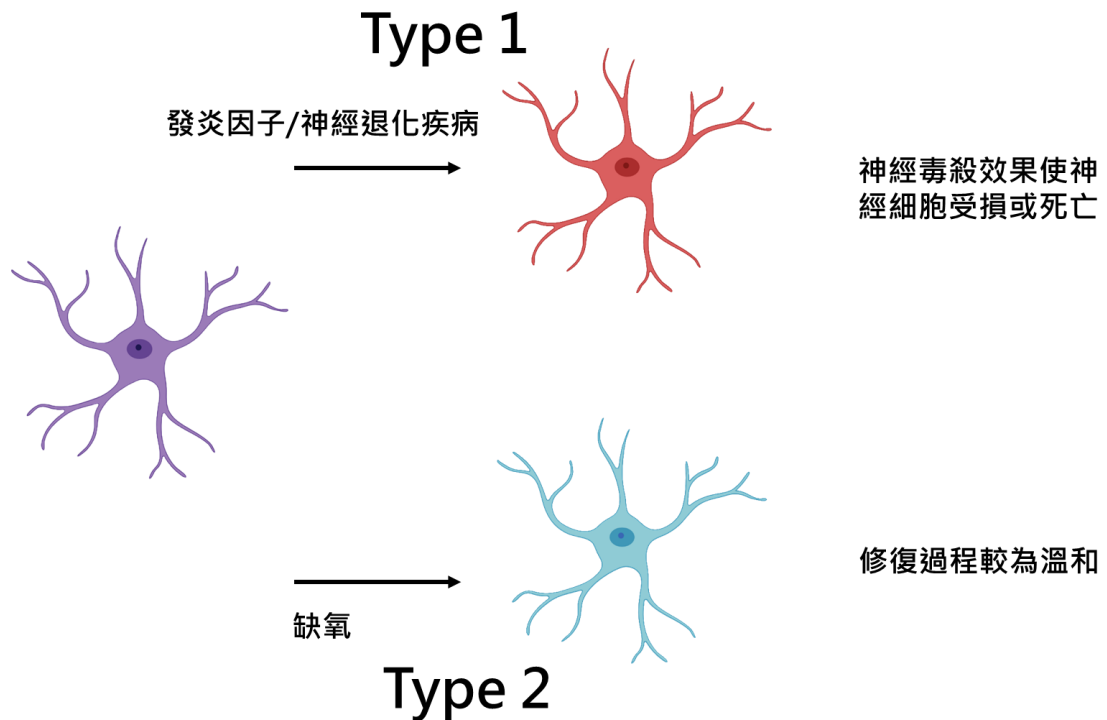


圖 2. 星狀膠細胞活化示意圖

(六) RNA 干擾

核醣體核酸干擾 (RNA interference, 以下簡稱為 RNAi) 可做為基因敲落 (knockdown) 的方法，其原理為往細胞中送長鏈雙股 RNA (double stranded RNA)，當細胞偵測到長鏈雙股 RNA 的存在後，就會由切丁酶 (dicer) 將雙股 RNA 由長鏈變成小分子的狀態，接著，RNA 沉默誘導複合體 (RNA-induced silencing complex, 以下簡稱為 DISC) 會將雙股 RNA 分成兩個單股 RNA，並將其與 mRNA 相互接合，待找到可以互補的 mRNA 後，會將 mRNA 降解，使其無法轉譯成對應的蛋白，達到基因敲落的效果 (Pushparaj, Aarthi, Manikandan, & Kumar, 2008)。

RNAi 的方法主要可分為三種：小干擾核糖核酸 (small interference RNA, 以下簡稱為 siRNA)、小髮夾核糖核酸 (short hairpin RNA, 以下簡稱為 shRNA)、小分子核糖核酸 (micro RNA, 以下簡稱為 miRNA)。

1. 小干擾核糖核酸 (siRNA)

主要為外源性的 RNA，可以透過轉染或電穿孔的方式進入細胞。SiRNA 只能對細胞進行短時間的 knock-down，也無法透過遺傳使子代也具有 siRNA (Pushparaj et al., 2008)。

2. 小髮夾核糖核酸 (shRNA)

主要為外源性的 RNA，透過轉染或電穿孔進入細胞後，會在細胞核中不斷複製 shRNA，再透過核孔到細胞質，由切丁酶 (dicer) 將 shRNA 切割為 siRNA。由於 shRNA 可以整合到細胞組內，因此可以透過遺傳使子代也具有 shRNA。其中 shRNA 和 siRNA 都可與目標 mRNA 完全配對 (Pushparaj et al., 2008)。

3. 小分子核糖核酸 (miRNA)

主要為內源性的 RNA，在細胞核內轉錄出 pri-miRNA，再由切丁酶剪成成熟的 miRNA，miRNA 與目標 mRNA 的接合方式為不完全配對 (Pushparaj et al., 2008)。

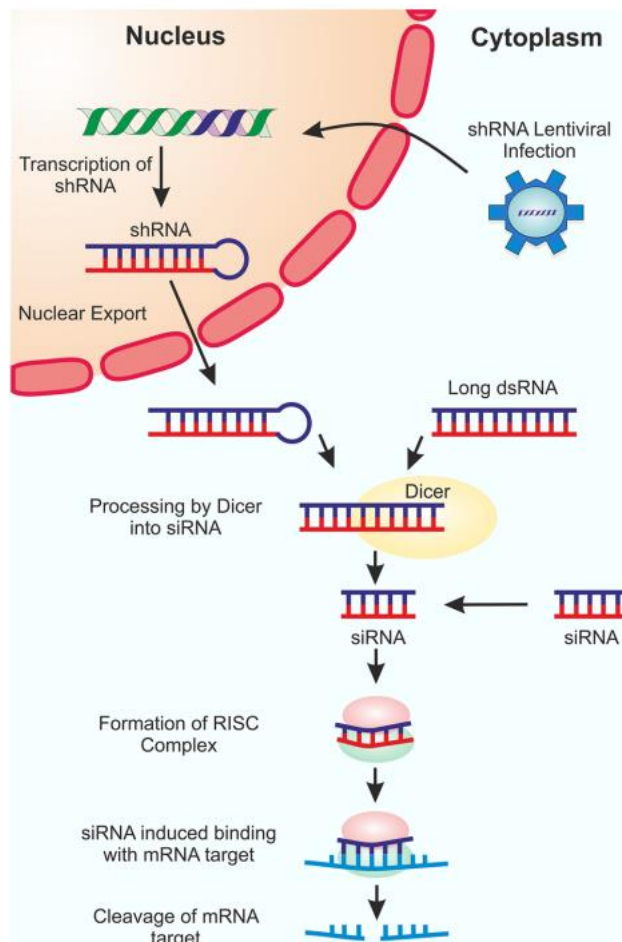


圖 3. 核糖體核酸干擾示意圖 (Barrass & Butcher, 2020)

(七) 共培養原理

腦中有許多不同的細胞叢生，但在培養細胞進行觀察時，不將所有的細胞混雜在一起，以期可以更好的觀察單一種細胞的生長情形及變化，因此使用共培養的方式培養細胞，可以兼具模擬大腦微環境，以及方便觀察細胞兩種優點。共培養是在培養細胞的培養槽上放置一個底部有許多小孔的架子，這些小孔的直徑約0.4um，遠比細胞來的小，因此上下兩層的細胞並不會混在一起，但是可以讓上下兩層的由細胞所釋放出來的物質互相交換，達到使兩種細胞能養在同一個環境中，但不會讓細胞本體混在一起的效果（圖4）。

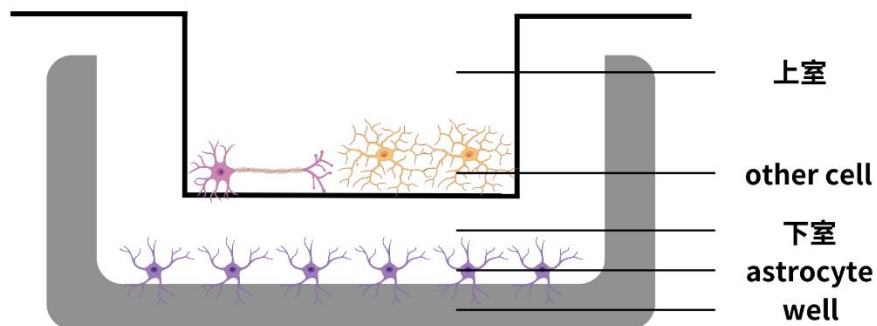


圖4. 細胞遷移實驗 (Transwell) 示意圖

二、研究過程與方法

一、實驗流程圖

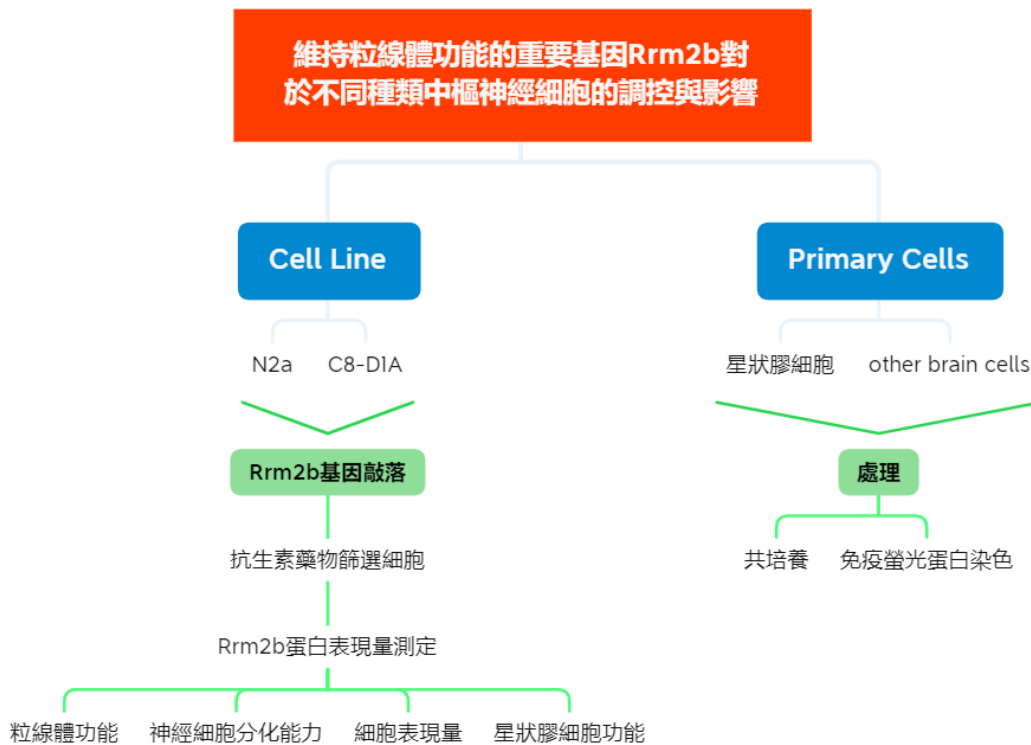


圖 5.本研究實驗總流程圖

實驗設計利用小髮夾核糖核酸 (shRNA) 將細胞中的 Rrm2b 基因進行敲落，再使用 Rrm2b 基因敲落的細胞對 puromycin 的抗藥性篩選細胞。挑選出 Rrm2b 基因敲落細胞株後，將萃取細胞之蛋白及 RNA，進行細胞功能性 (functional marker) 及特定標定物 (specific marker) 分析。

二、研究設備及器材

表 2. 本實驗所使用之實驗材料

| | | | | |
|-------------|----------------------------------|-------------|----------|-------------------------------|
| 細胞 | C8-D1A: 小鼠星狀膠細胞 N2a: 小鼠神經元細胞株 | | | |
| 實驗材料 及藥品 | DMEM Medium | NTES Buffer | NTES 緩衝液 | phenol |
| | Proteinase K | isopropanol | phenol | TRIzol |
| | NAOAC(乙酸鈉) | Chloroform | ethanol | Anti-ACSA-2 microbeads kit |

| | | | | |
|------|------------------------|-------------------|--------------------------|---|
| | FSK 促神經生長因子 | GDNF 促神經生長因子 | PBS | Antibody GFAP、iba1、 MAP2、Rrm2b、 Compex I~V |
| | DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚) | Plasmid 質體 | Lipofectamine 3000 | Opti-MEM |
| | DD H2O | 30% Acrylamide | 1.5 M Tris-HCL pH=8.8 | TEMED |
| | 10% SDS | 10% APS | Tris-Base | Glycine |
| | Methanol | 5% BSA | TBST Buffer | 1% Agarose |
| | SYBR(核酸凝膠染液) | Primer F | Primer R | |
| 實驗器材 | Pipette 離心機 | 6 孔培養盤 電子精秤 | | Eppendorf Nanodrop |

三、研究方法與步驟

(一) DNA、RNA 採集

1. 萃取 DNA

- (1) 在樣品中加入 NTES buffer 300 μ L。
- (2) 加入 5~7 μ L proteinase K。混勻後在 55 $^{\circ}$ C 烘箱中反應 24 小時。
- (3) 加入 phenol 300 μ L 後上下混勻，以 12000rpm 轉速進行離心 10 分鐘。
- (4) 取 300 μ L 上清液至新的管子中，加入 300 μ L phenol 後混勻，再加入 300 μ L chloroform 混勻。
- (5) 以 12000rpm 轉速進行離心 10 分鐘。
- (6) 取 300 μ L 上清液至新的管子中，加入 300 μ L chloroform 後混勻。
- (7) 以 12000rpm 轉速進行離心 5 分鐘。
- (8) 取 300 μ L 上清液至新的管子中，加入 100% 乙醇 1000 μ L 後混勻，並觀察是否出現白色絲狀物。
- (9) 以 7500rpm 轉速進行離心 5 分鐘。
- (10) 移除上清液。加入 75% 乙醇 600 μ L。

- (11) 以 7500rpm 轉速進行離心 5 分鐘。
- (12) 移除上清液。
- (13) 依照管底沉段物之大小回溶適量之滅菌去離子水。
- (14) 保存在 4°C。

2. 萃取 RNA

- (1) 在樣品中加入 TRIzol 1000 μ L。
- (2) 加入 200 μ L chloroform 混勻，於室溫靜置 3 分鐘。
- (3) 以 12000rpm 轉速進行離心 5 分鐘。
- (4) 取 500 μ L 上清液至新的管子中，加入異丙醇 isopropanol 550 μ L。混勻後於室溫靜置 10 分鐘。
- (5) 以 12000rpm 轉速進行離心 10 分鐘。
- (6) 移除上清液。
- (7) 加入 400 μ L 滅菌水進行回溶。
- (8) 加入 phenol 400 μ L，混勻後以 12000rpm 轉速進行離心 10 分鐘。
- (9) 取 400 μ L 上清液至新的管子中，加入 400 μ L phenol 後混勻，再加入 400 μ L chloroform 混勻。
- (10) 以 12000rpm 轉速進行離心 10 分鐘。
- (11) 取上清液，重複步驟 9。
- (12) 取 400 μ L 上清液至新的管子中，加入 40 μ L 3M NaOAc 及 880 μ L 100% 乙醇。
- (13) 於 -20°C 靜置沉澱 24hr。
- (14) 以 12000rpm 轉速進行離心 45 分鐘。移除上清液。
- (15) 依照管底沉段物之大小回溶適量之滅菌去離子水。
- (16) 保存於 -80°C。

(二) Rrm2b 基因敲落

1. 細胞繼代。
2. 將細胞培養液替換成無營養成份之 DMEM，靜置 1 小時。
3. 質體 (plasmid)
 - (1) ShRNA # 1: 97.8 ng/ μ l
 - (2) ShRNA # 2: 93.1 ng/ μ l

有兩組 shRNA 質體，各做三重複，找到敲落效率最好的組別。

4. 配置溶液

- (1) 稀釋 lipofectamine 3000。

在 125 μ l 的 opti-MEM 中加入 7.5 μ l lipofectamine 3000，總共做八份。

- (2) 稀釋 DNA

在 125 μ l 的 opti-MEM 中加入 2.5 μ g 的 DNA 的 DNA 和 5 μ l 的 p3000。

- a. ShRNA # 1: 25.56 μ l (四份)
- b. ShRNA # 2: 26.8 μ l (四份)

- (3) 靜置 15 分鐘待其充分反應
- (4) 配置溶液

表 3. ShRNA 溶液配置表

| | Opti-MEM | DNA | P3000 |
|-----------|-------------|---------------|------------|
| ShRNA # 1 | 500 μ l | 103.8 μ l | 20 μ l |
| ShRNA # 2 | 500 μ l | 107.2 μ l | 20 μ l |

(三) 定量方法

1. 及時定量鏈鎖反應 (qPCR)
 - (1) 配置溶液

表 4.qPCR 藥品配方

| | | |
|--------|-----|----------|
| Sample | 樣本數 | 7 (多估一份) |
|--------|-----|----------|

| | | |
|-------------------------|------|--------------|
| 2X Buffer | 反應試劑 | 35 μ L |
| 10 μ M primer F | 引子 | 1.4 μ L |
| 10 μ M primer R | | 1.4 μ L |
| H ₂ O | | 17.5 μ L |
| Probe | 基因探針 | 0.7 μ L |
| DNA/RNA (10ng/ μ L) | | 14.0 μ L |

- (2) 使用 96 孔盤，每個 well 加 2 μ L DNA 和 8 μ L 混和溶液。
- (3) 放入即是定量系統機器中 (quan studio) 進行反應。
- (4) 計算 ct 值及 copy number。

2. 西方墨點法 (Western blotting)

- (1) 架膠。
- (2) 製備上膠與下膠。

a. 下膠

表 5. 西方墨點法下膠溶液配置表

| | |
|-----------------------|---------|
| ddH ₂ O | 8.09 ml |
| 30% acrylamide | 6.6 ml |
| 1.5M Tris-HCL pH=8.8 | 5 ml |
| 10% SDS | 0.2 ml |
| 10% APS | 0.1 ml |
| TEMED(使膠凝固的成分，一定要最後加) | 0.01 ml |

- b. 加入少許酒精在下膠上進行壓膠，待下膠凝固後將酒精移除，開始製作上膠。
- c. 上膠

表 6. 西方墨點法上膠溶液配置表

| | |
|------------------------|---------|
| ddH ₂ O | 8.09 ml |
| 30% acrylamide | 6.6 ml |
| 1.5M Tris-HCL pH=8.8 | 5 ml |
| 10% SDS | 0.2 ml |
| 10% APS | 0.1 ml |
| TEMED (使膠凝固的成分，一定要最後加) | 0.01 ml |

(3) 電泳

- a. 將電壓調至 80 伏特，電泳 20~30 分鐘。
- b. 將電壓調至 120 伏特，跑到目標標誌物到最底下即停止電泳。

(4) 轉漬

- a. 配置 transfer buffer

表 7. Transfer buffer 溶液配置表

| | |
|--------------------|----------|
| Tris-Base | 3g |
| Glycine | 14.4g |
| Methenol | 200ml |
| DDH ₂ O | 加到 800ml |

- b. 將膠與膜等按照順序夾好。
- c. 電泳:將電流調至 330 毫安培，電泳 70 分鐘 (由於在電泳的過程中，會釋放大
量熱能，所以要將電泳槽置於冰塊中，以達到降溫的效果，避免電泳槽過熱)。

(5) 阻斷 (Blocking)：將轉漬膜正面朝上，置於 5% BSA 內 1 小時。

(6) 一級抗體

- a. 將樣本密封放在震盪器上 24 小時，震盪器速度為 40rpm。
- b. 使用 TBST 清洗樣本，將震盪器速度調至 60rpm，一次 10 分鐘，重複三次。

(7) 二級抗體

- a. 在樣本中加入二級抗體，震盪器速度調至 40rpm，作用 1 小時。
- b. 使用 TBST 清洗樣本，將震盪器速度調至 60rpm，一次 10 分鐘，重複三次。

(8) 顯影

- a. 將樣本泡入顯影劑中（正面朝下）。
- b. 將樣本放在玻璃片上（上面朝上）。
- c. 放入機器顯影拍照。

(四) 初級細胞培養

1. 取得細胞:感謝大學實驗室提供 Rrm2b NeKO (基因剔除) 之小鼠初代培養細胞。
2. 篩選星狀膠細胞
 - (1) 利用 Anti-ACSA-2 Microbeads Kit 篩選從腦中分離的初代細胞。篩選下來的細胞分成兩群，一群為 ASCA-2 positive，即為 Astrocyte；另一群為 ASCA-2 negative，即為除了 Astrocyte 外的其他神經細胞（簡稱 Other cells）。
 - (2) 將細胞分為四組，一半組別使用正常培養液，另一半組別在培養液中加入細胞生長因子 FSK 及 GDNF。

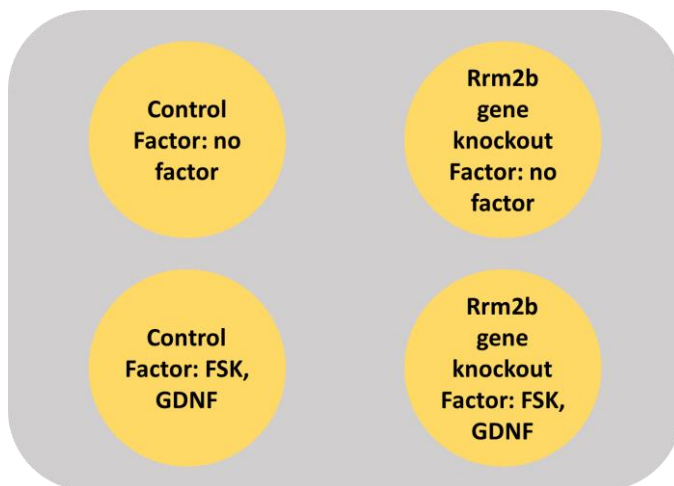


圖 6. 細胞配置示意圖

(五) 免疫螢光蛋白染色

1. 已知特定種類細胞會表現出特定的蛋白，稱為標誌物蛋白，透過測定特定的標誌物蛋白，可以辨認出特定的細胞，以及計算細胞的表現量等。

2. 實驗步驟

(1) 撈片，以 37°C，30 min，烘片（使片上的液體被烘乾，以免樣本脫落）

(2) 浸泡 PBS 5min 復水

(3) 通透處理 (Permeabilization)

(4) 阻斷 (blocking)

將樣本浸泡在 FBS 溶液中，FBS 溶液中的蛋白質會填滿樣品表面的坑洞，避免抗體不正確的接合在坑洞中，已增加實驗的準確度

(5) 一級抗體：1Ab° + 2% serum in PBST

選定抗體後將其稀釋至適當濃度後，以 40 rpm 轉速搖晃 16-18 小時

a. Anti-GFAP：Astrocyte

b. Anti-Iba1：Microglia

c. Anti-MAP-2：Neuron

(6) PBS wash，5min，三次

(7) 二級抗體：2Ab° + 2% serum in PBST

a. GIAP，Astrocyte，波長 588nm (紅色)

b. Iba1，Microglia，波長 488nm (綠色)

c. MAP-2，Neuron，以 40 rpm 轉速搖晃 1 小時

(8) 使用 PBS 清洗細胞，作用 5 分鐘，重複三次

(9) 使用 DAPI 將細胞核染色 (藍色)

(10) 封片與拍照

(六) 共培養

1. 利用體外培養的方式模擬大腦微環境時，使用共培養 (transwell) 的方式，將實驗組 (Rrm2b KO) 及對照組 (Control) 的 astrocyte 和實驗組 (Rrm2b KO) 及對照組 (Control) 的其他神經細胞，以不同的組合養在同一個 well，藉此觀察當環境改變時，不同細胞的 Rrm2b 基因被踢除時對自身及其他細胞的影響。

三、研究結果與討論

一、建立 Rrm2b 基因敲落細胞株

利用轉染技術將小髮夾核糖核酸 (shRNA) 送入細胞內，再使用 Rrm2b 基因敲落的細胞對 puromycin 的抗藥性篩選細胞。挑選出 Rrm2b 基因敲落單一細胞株後，萃取細胞之蛋白，使用西方墨點法進行 Rrm2b 蛋白表現量測定。

1. 神經細胞株：N2a

總共挑選六株 Rrm2b 基因敲落神經細胞株，編號分別為#22, #30, #41, #56, #57 及 #64，並透過西方墨點法確認 N2a 細胞內之 Rrm2b 蛋白表現量顯著降低。後續將利用此六株細胞株進行實驗。

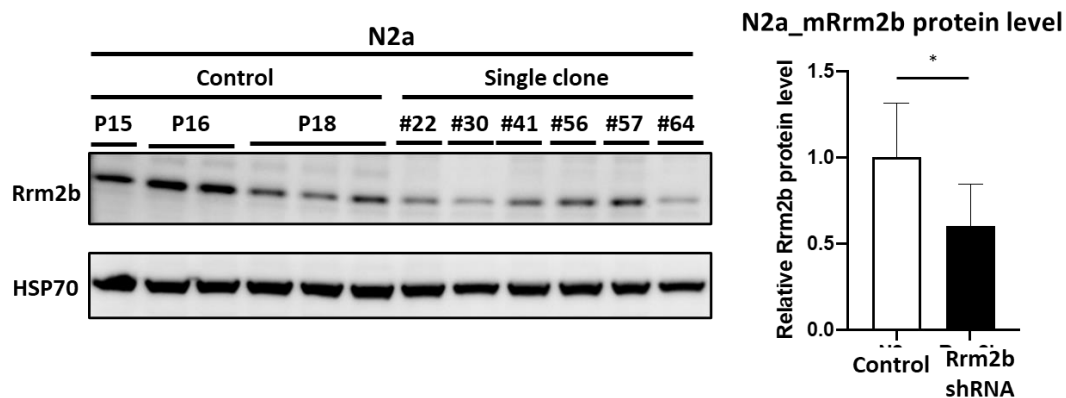


圖 7. 神經細胞內之 Rrm2b 蛋白表現量測定

使用 student t test 計算控制組與 Rrm2b 基因敲落組別間的 Rrm2b 蛋白表現量差異，以 p value 值顯示，當 p value 數值小於 0.05 表示有明顯差異。

2. 星狀膠細胞株：C8-D1A

總共挑選六株 Rrm2b 基因敲落的星狀膠細胞株，編號分別為#1-1, #1-2, #1-3, #2-1, #2-2 及 #2-3，並透過西方墨點法確認 C8-D1A 細胞內之 Rrm2b 蛋白表現量顯著降低。後續將利用此六株細胞株進行實驗。

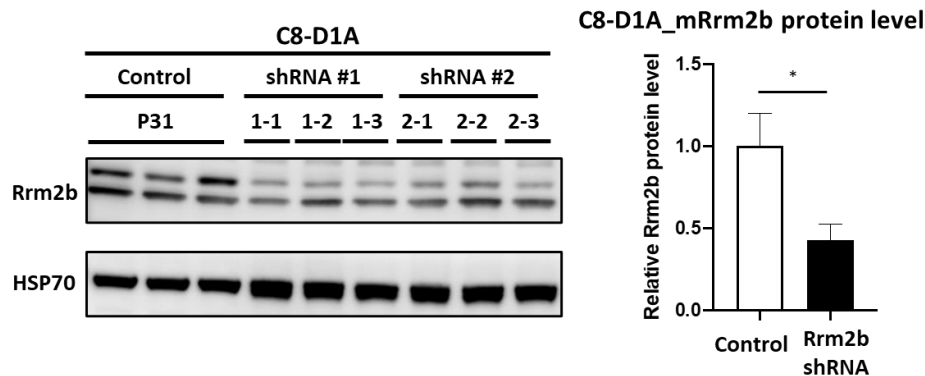


圖 8. 星狀膠細胞內之 Rrm2b 蛋白表現量測定

二、粒線體相關功能之分析

1. 不同種類之中樞神經細胞內粒線體 DNA 含量之比較

N2a vs C8D1A_mt DNA baseline

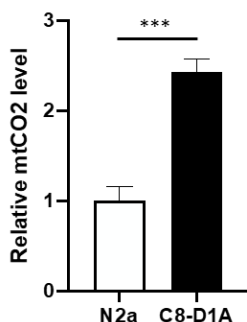


圖 9. 神經細胞 (N2a) 與星狀膠細胞 (C8-D1A) 內粒線體 DNA 含量之比較

➤ 結果分析：

正常情況下，星狀膠細胞內之粒線體 DNA 表現量比神經細胞高了 140%。

2. 先前文獻指出，Rrm2b 基因表現缺失或異常時，會造成粒線體 DNA 缺乏症候群 (RRM2B-MDS, mtDNA depletion syndrome)，並嚴重影響粒線體之功能 (Keshavan et al., 2020)。因此，為了解 Rrm2b 基因敲落細胞株之粒線體功能是否正常，利用及時定量鏈鎖反應 (QPCR) 針對粒線體 DNA 之含量進行檢測。

i. 神經細胞株：N2a

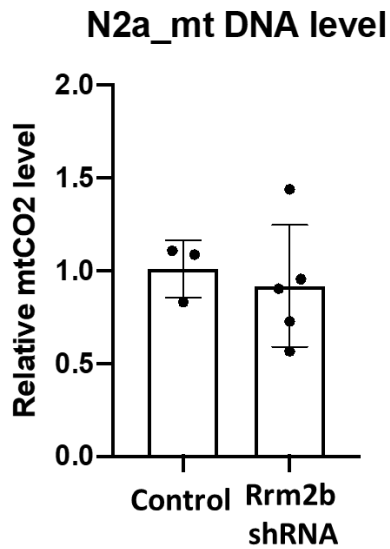


圖 10. Rrm2b 基因敲落神經細胞株之粒線體 DNA 表現量測定

ii. 星狀膠細胞株：C8-D1A

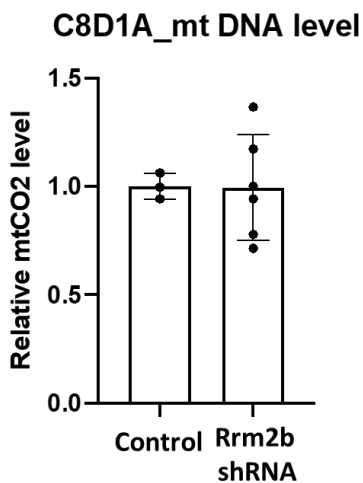


圖 11. Rrm2b 基因敲落星狀膠細胞內之粒線體 DNA 表現量測定

➤ 結果分析：

根據及時定量連鎖反應結果顯示，當細胞內 Rrm2b 蛋白表現量降低時，並不會顯著影響粒線體 DNA 的含量。

3. 粒線體是細胞中生產能量的重要胞器，其中以呼吸作用作為最重要的能量來源。在呼吸作用進行過程，有許多不同的蛋白參與，其中，電子傳遞鏈裡的呼吸作用複合物 I-V (complex I-V) 被視為重要的參與蛋白。因此，為了解在 Rrm2b 蛋白

表現下降的情況下，是否會影響粒線體進行呼吸作用之功能，利用西方墨點法針對呼吸作用複合物I-V之蛋白表現量進行分析。

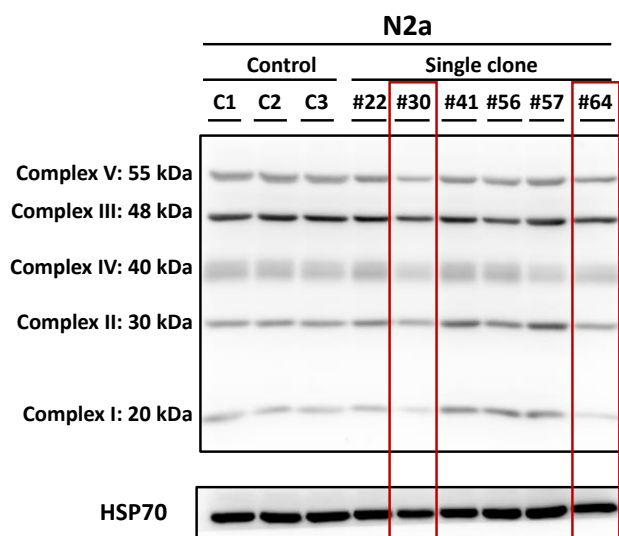


圖 12. Rrm2b 基因敲落神經細胞株之呼吸作用複合物I-V (complex I-V) 表現量測定

➤ 結果分析：

相對於 control 組，#30, #64 之 complex 蛋白表現量較低，對應到前面 Rrm2b 蛋白的西方墨點法結果，#30 和 #64 兩組細胞的 Rrm2b 基因表現量是 Rrm2b 基因敲落的組別中最低的，但對應到 mtCO2 基因的即時定量連鎖反應結果，粒線體的表現量並無顯著差異，因此可以推測 Rrm2b 對於粒線體數量並無顯著影響，但會影響粒線體的工作效率，尤其是呼吸作用的部分。

三、神經細胞分化 (Differentiation) 能力之分析

1. N2a 是快速生長的小鼠神經母細胞瘤細胞株，常用於用於神經突觸生長、神經毒性及神經退化性疾病之研究。其中，神經細胞分化能力 (Differentiation ability) 是檢測細胞生理功能的重要指標之一。因此，為了解 Rrm2b 蛋白表現下降是否會影響神經細胞的分化能力，將利用改變細胞培養條件，建立適合神經細胞分化之環境，並逐日觀察細胞生長型態並進行分析。

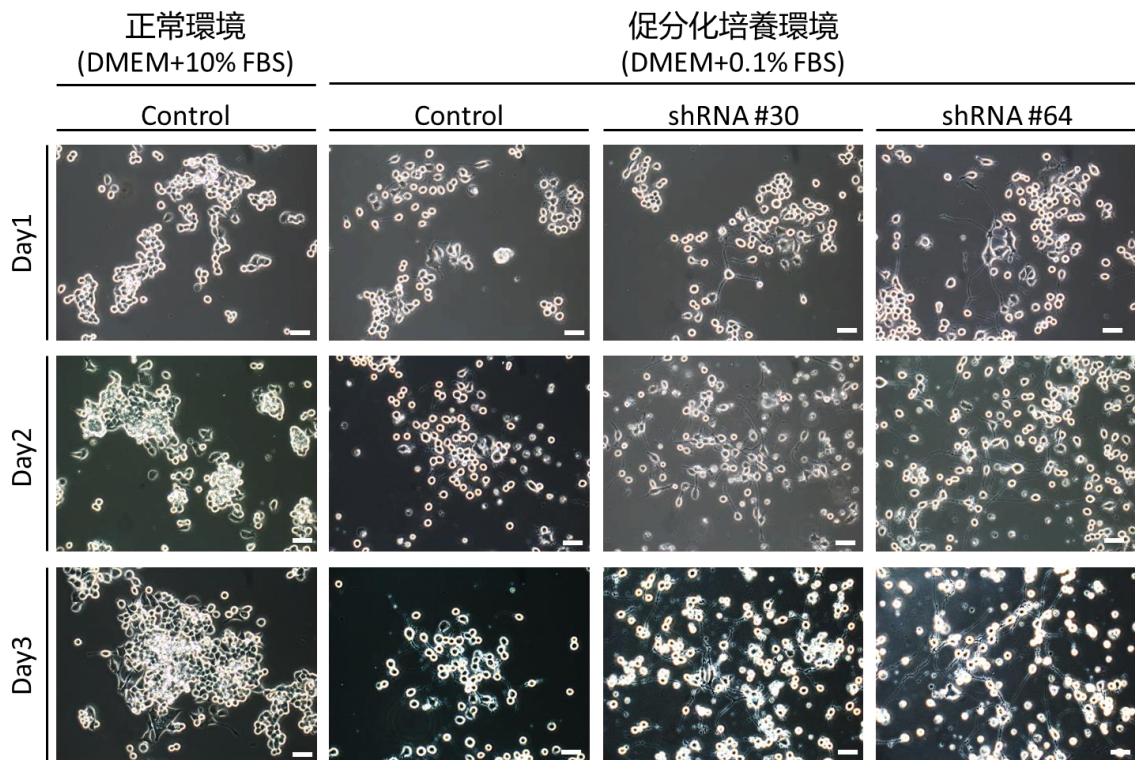


圖 13. Rrm2b 基因敲落神經細胞株之分化情形 (比例尺長度為 200 μ l)

➤ 結果分析：

根據型態觀察結果發現，Rrm2b 基因敲落之神經細胞株，編號#30 及#64，再促分化環境下，相對於控制組，Rrm2b 基因敲落細胞株能夠長出較細長且多分支的突觸型態，表示 Rrm2b 蛋白的下降能夠有效提升神經細胞進行分化的能力，目前推測可能的原因有下列兩種：

- (a) Rrm2b 基因表現量的減少造成末端成熟神經細胞的數量不斷減少，或是功能受到影響，迫使幹細胞不斷分化出新的成熟神經細胞，以彌補 Rrm2b 基因表現量所造成的神經細胞的空缺。
- (b) 本實驗是使用 N2a 的細胞株，由於只有單一種細胞，因此並沒辦法最真實的模擬和呈現細胞在大腦中最真實的樣子，可能會造成實驗結果與大腦中的實際情況有一定的落差。

為了改善這個狀況，未來也可以在神經細胞的培養基中加入其他細胞，例如星狀膠細胞進行實驗，未來也可以善用共培養的技術，使細胞間能進行交互作用，讓實驗結果更接近大腦中的實際狀況

四、星狀膠細胞 (Astrocyte) 與非星狀膠細胞 (others cell) 之初代細胞培養

1. 細胞型態與生長情形

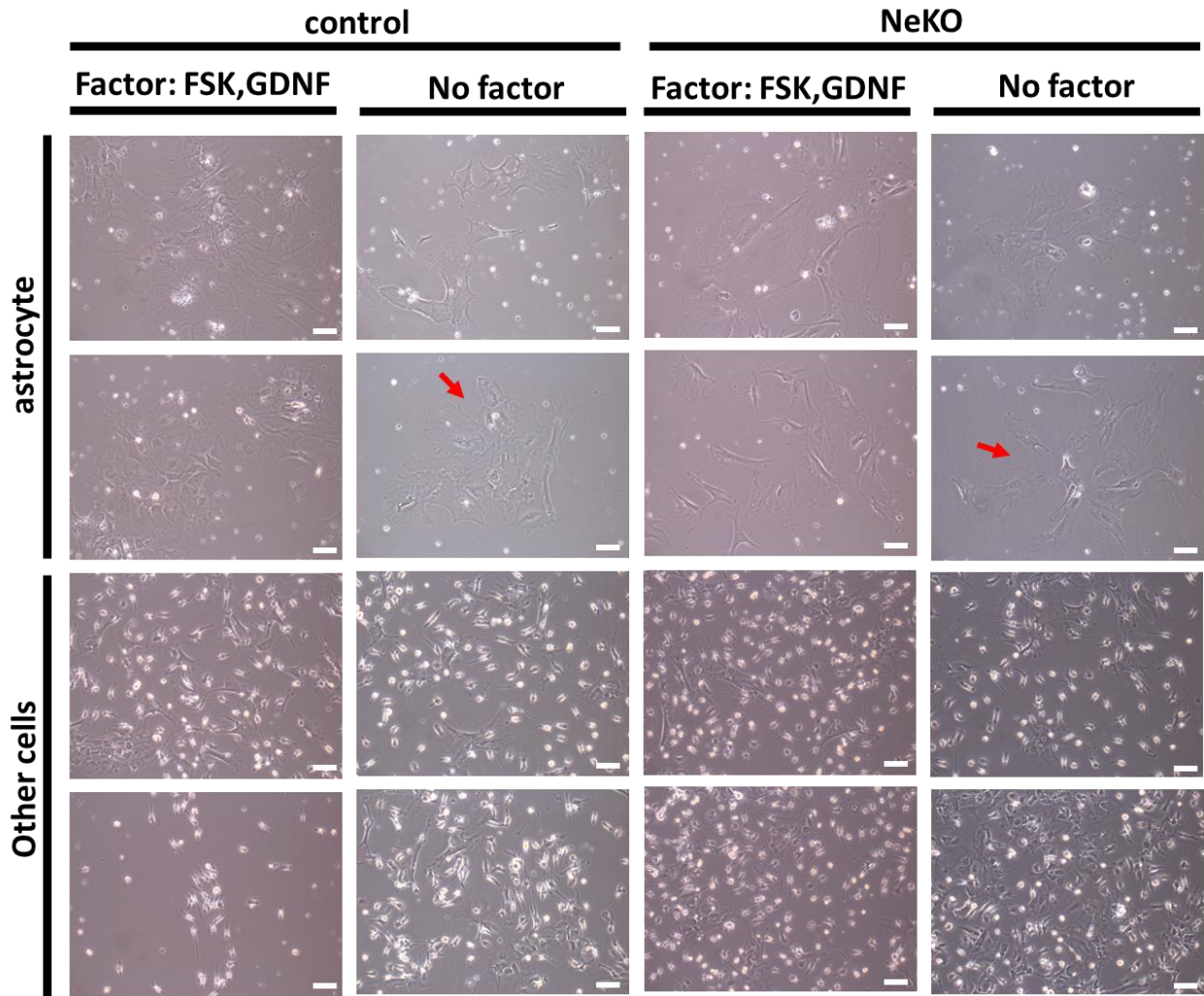


圖 14. 初代細胞生長情形 (比例尺長度為 200 μ l)

➤ 結果分析：

比起只有星狀膠細胞生長的組別，當所有神經細胞混在一起時，星狀膠細胞的型態較完整，且生長情況較佳。此外，添加兩種細胞生長因子 FSK 及 GDFP 後，星狀膠細胞生長的數量較多。當星狀膠細胞的 Rrm2b 基因被剔除時，可以明顯的發現細胞的外觀及數量與控制組的細胞有顯著的差別。同時，控制組的細胞比起 Rrm2b 基因剔除組貼盤貼得更平。

五、免疫螢光染色法進行初代神經細胞種類區別與確認

- 為了確認初代細胞分離後，經過篩選的細胞種類，利用不同種類的標記蛋白 (cell marker) 進行免疫螢光染色，以 GFAP 蛋白辨識星狀膠細胞、Iba1 蛋白辨識微膠細胞、MAP2 蛋白辨識神經細胞，並利用 DAPI 染劑進行細胞核定位及染色。

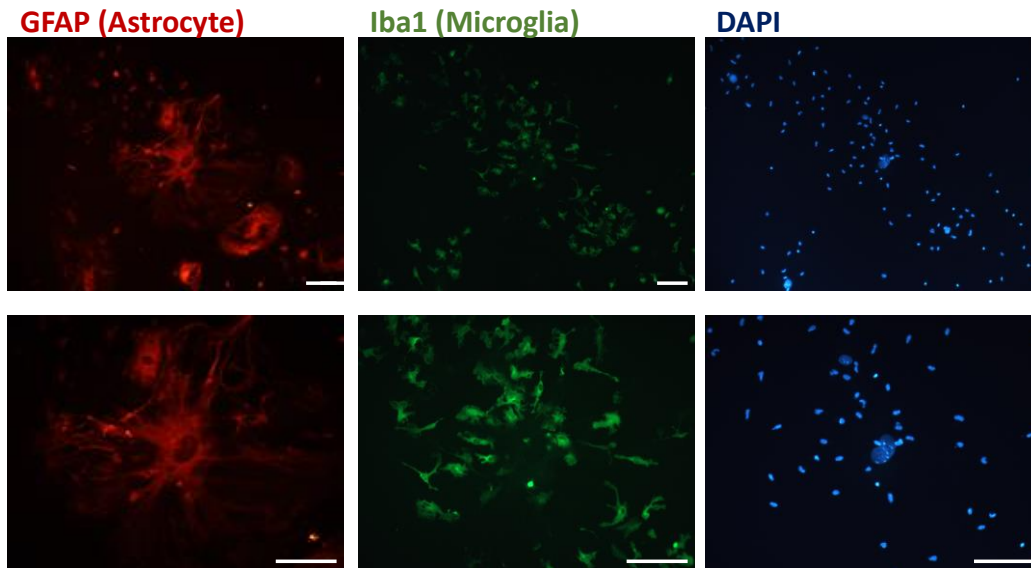


圖 15. 免疫螢光染色法結果 (比例尺長度為 200 μ l)

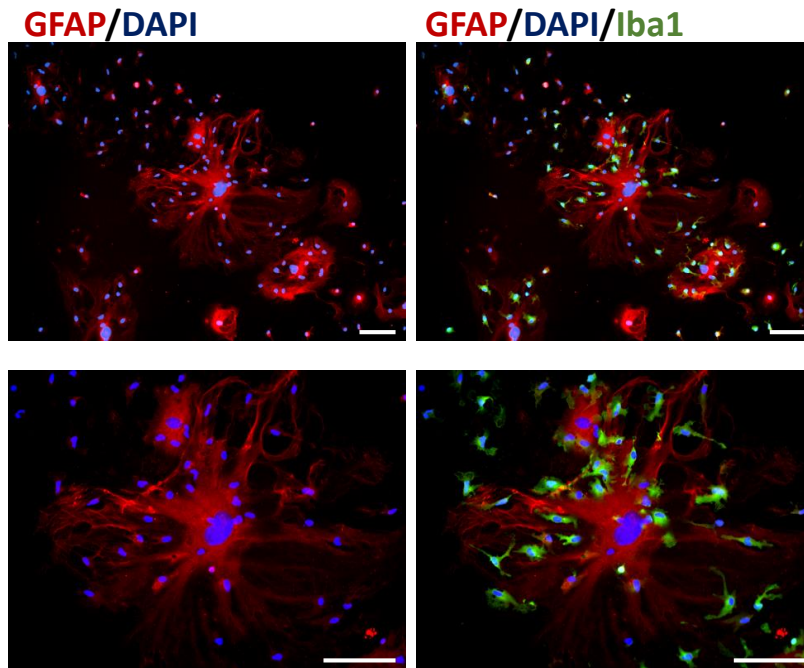


圖 16. 免疫螢光染色法結果

圖 15 及圖 16 中，紅色螢光染上的抗體是 GFAP，標定之細胞為星狀膠細胞；綠色螢光為 Iba1，標定之細胞為微膠細胞；藍色螢光為 DAPI，目標為細胞核。比例尺長度為 100 μ M

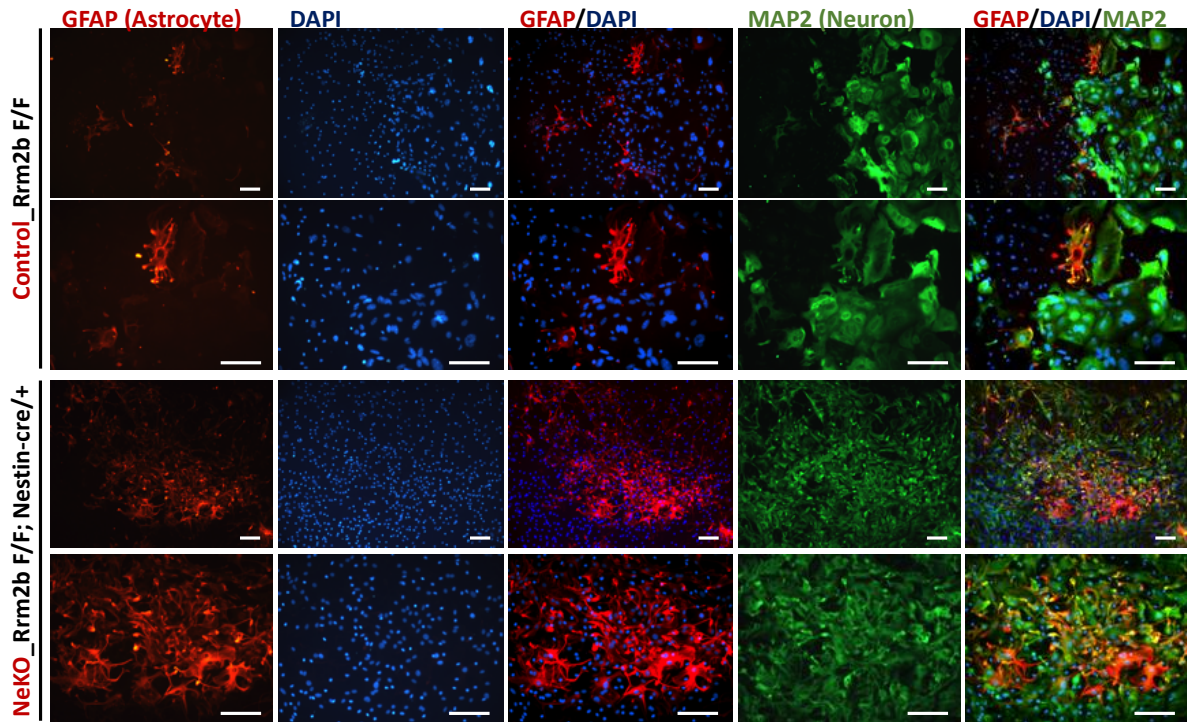


圖 17. 免疫螢光染色法結果

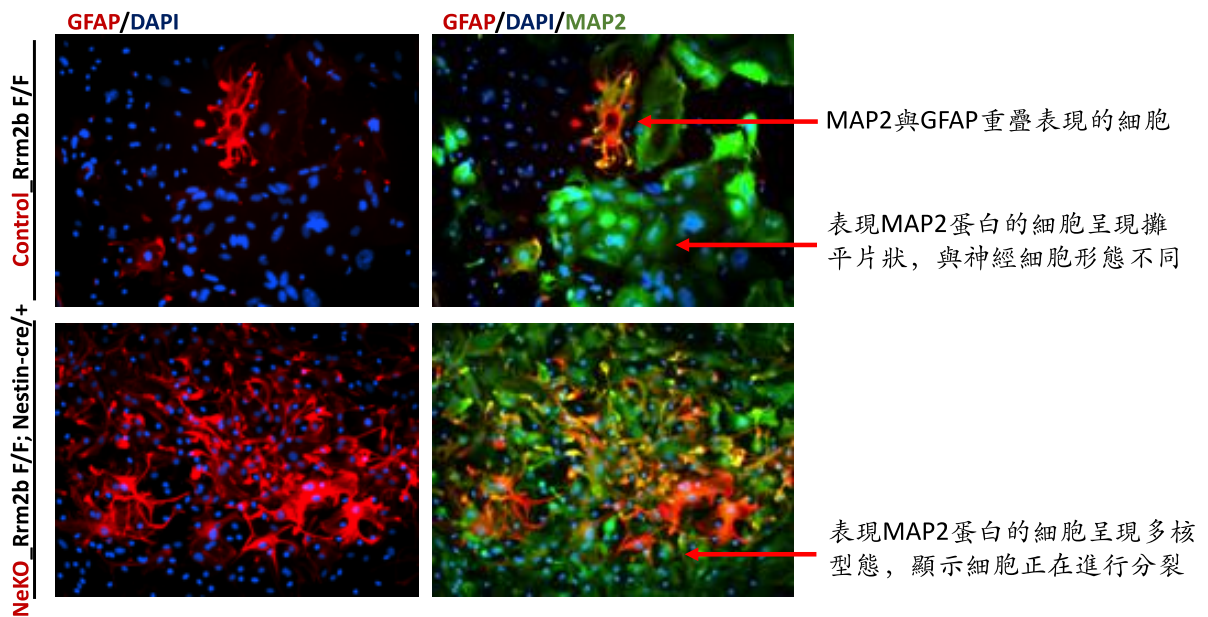


圖 18. 免疫螢光染色法結果

圖 17 及圖 18 中，紅色螢光染上的抗體是 GFAP，標定之細胞為星狀膠細胞；綠色螢光為 MAP2，標定之細胞為神經細胞；藍色螢光為 DAPI，目標為細胞核。比例尺長度為 100 μ M

➤ 結果分析：

在免疫螢光染色法的結果中，可以看到染 MAP2 的綠色螢光染出來的細胞呈現攤平片狀，理論上可以表現出 MAP2 的細胞只有神經細胞，但由於染色結果所呈現

的細胞型態與一般的神經細胞相差很大，且這些細胞大多處於正在進行細胞分裂的狀態，同時也發現有 MAP2 與 GFAP 重疊表現的細胞；已知細胞在成熟狀態無法大量分裂增生，可能透過反分化這個途徑變成更初級的細胞後，再大量分裂增生，因此推測有可能是星狀膠細胞反分化後，再分化為神經細胞。

目前推測造成這個現象的原因可能有下列幾種：

- a. 環境中的細胞數量偏少，因此透過反分化並大量增生來彌補空缺。
- b. 由於 Rrm2b 基因突除後會造成細胞損傷，因此透過反分化來修復損傷的細胞。

六、神經細胞之特定蛋白標誌物 (specific marker) 分析

1. 目前已知有多種特定蛋白標誌物，如 NeuN, MAP2, Tuj1 等，被認為是神經細胞特有，為了檢測 Rrm2b 蛋白是否會影響神經細胞之特定蛋白標誌物的表現，本研究利用西方墨點法檢測神經細胞特异性標誌物 (MAP2) 蛋白的表現量。

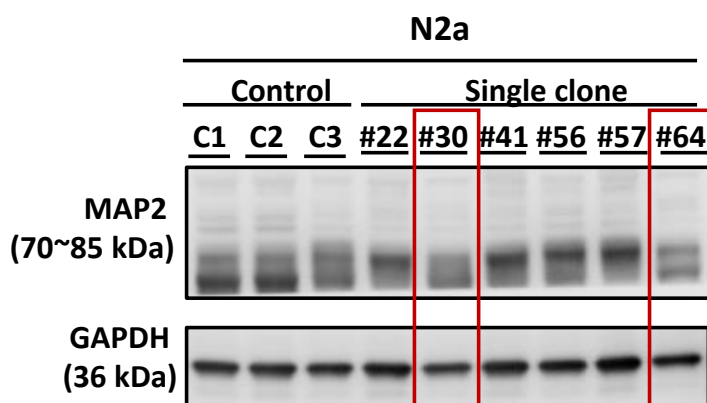


圖 19. Rrm2b 基因敲落神經細胞株之特定蛋白標誌物分析

➤ 結果分析：

#30, #64 之 MAP2 表現量較低，對應回前面 Rrm2b 蛋白表現量的測定結果，可以推測 Rrm2b 表現量下降時，神經細胞的數量會變多，且當 Rrm2b 表現量下降的越多時，神經細胞數量的改變也會更明顯。

七、星狀膠細胞之特定蛋白標誌物 (specific marker) 分析

1. 目前已知有多種特定蛋白標誌物，如 GFAP, S100B, Aldh111 等，被認為是星狀膠細胞特有，為了檢測 Rrm2b 蛋白是否會影響星狀膠細胞之特定蛋白標誌物的表現，利用及時定量鏈鎖反應 (qPCR) 針對上述標誌物之蛋白進行分析。

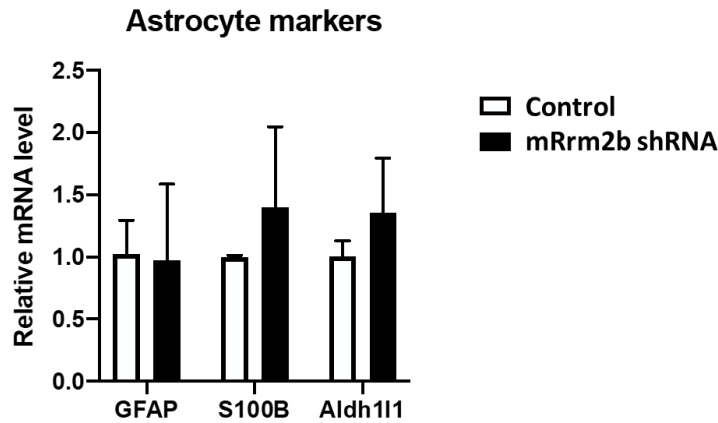


圖 20. Rrm2b 基因敲落星狀膠細胞株之特定蛋白標誌物分析

➤ 結果分析：

各蛋白的表現量均沒有顯著差異，推測 Rrm2b 表現量與星狀膠細胞表現量之間較無關聯。

八、星狀膠細胞之功能性蛋白分析

1. 星狀膠細胞的功能包括運送水離子、鉀離子、葡萄糖、興奮性胺基酸，以及協助新陳代謝等，因此利用測試對應不同功能的蛋白的表現量，了解 Rrm2b 基因敲落後，對星狀膠細胞功能的影響，其中 Aqp4 (Aquaporin-4) 對應到水離子通道蛋白，Kir4.1 對應到鉀離子通道蛋白，EAAT1 及 EAAT2 對應到興奮性胺基酸通道蛋白，Glut1 對應到葡萄糖通道蛋白，GluL 是麩胺醯胺合成酶，可控制氮的代謝，CX43 則負責細胞間的訊息傳遞，調節細胞的增殖、分化與死亡。

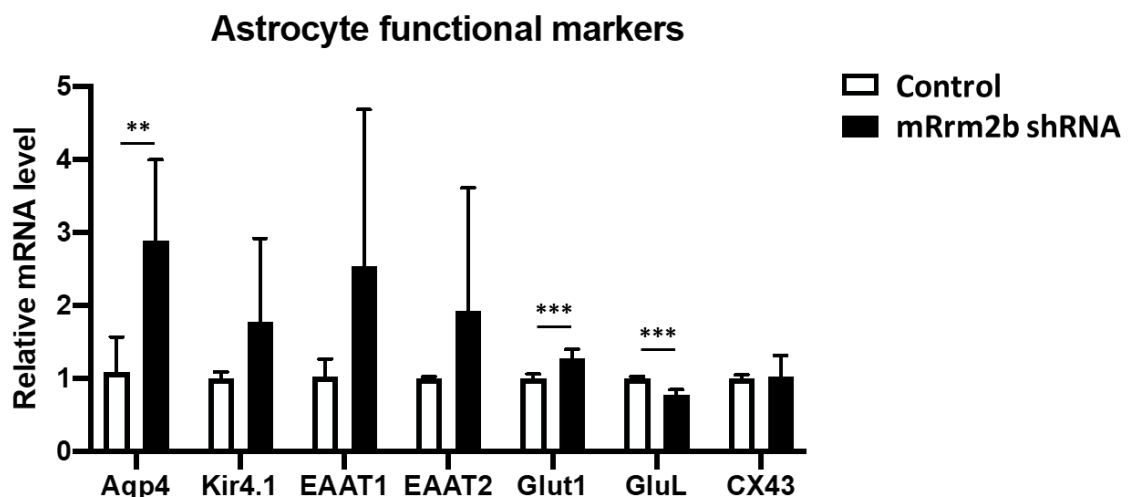


圖 21. Rrm2b 基因敲落星狀膠細胞株之功能性蛋白分析

➤ 結果分析：

由圖 23 中可以看到，在 Rrm2b 表現量下降後，水通道蛋白表現亮提高 164%，葡萄糖轉運蛋白表現量提高 27%，麩胺醯胺合成酶的表現量則是降低 22%，顯示

Rrm2b 表現量降低的星狀膠細胞，其運輸功能會變強，而麩胺醯胺的合成則會變慢，使氮的代謝效率變低，但目前無法得知這些改變對細胞是好的影響還是壞的影響，因此未來可以進行星狀膠細胞及神經細胞的共培養，釐清星狀膠細胞功能性蛋白表現量的改變對大腦環境的影響。

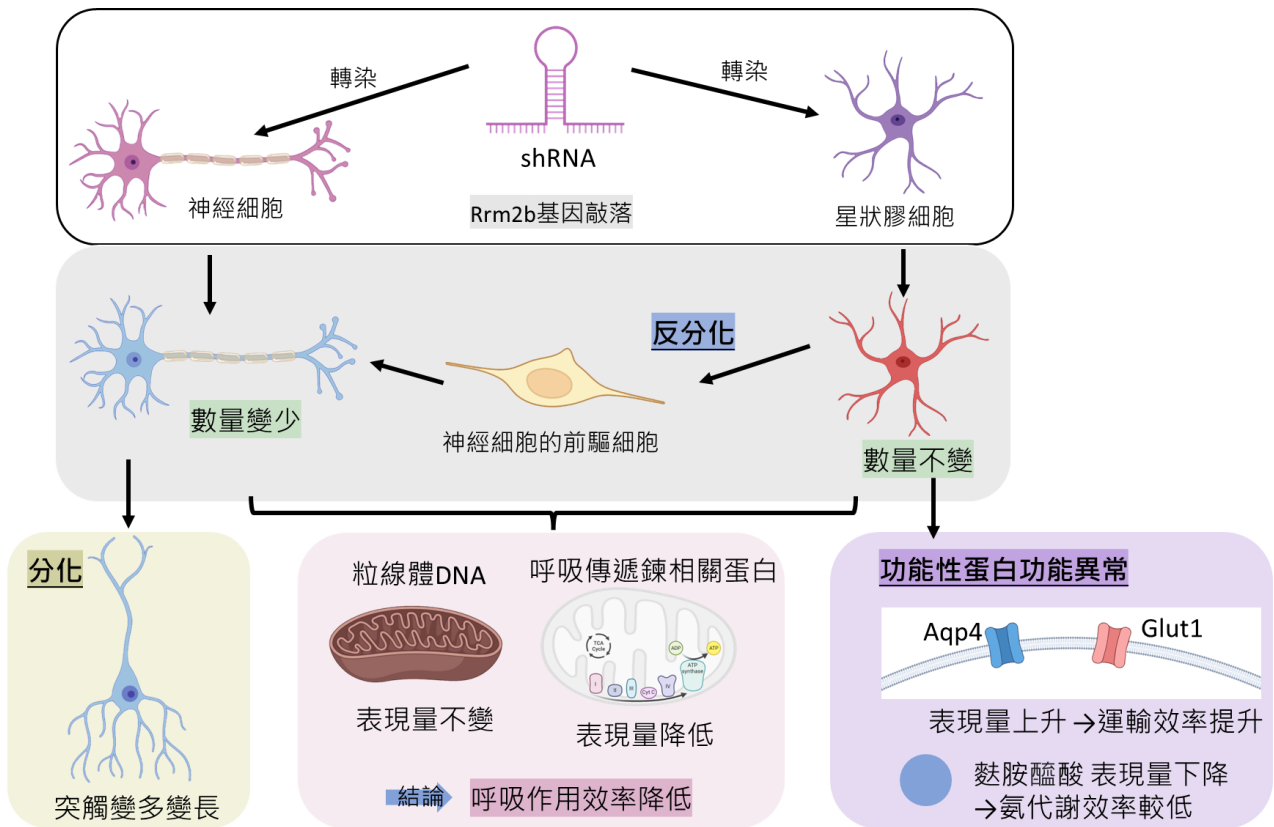


圖 22. 研究結果圖

本實驗以核糖核酸干擾的方式將神經細胞及星狀膠細胞中的 Rrm2b 基因敲落。Rrm2b 基因敲落後，神經細胞的數量會減少，星狀膠細胞的數量則不變。在形態方面，在 Rrm2b 基因表現量降低的星狀膠細胞中可以發現疑似反分化的情況，神經細胞的分化速度變快，突觸會變的更多更長。在功能方面，星狀膠細胞的部分功能性蛋白會出現異常，水通道蛋白及葡萄糖轉運蛋白表現量上升，代表星狀膠細胞的運輸效率提高，麩胺醯胺表現量下降，代表星狀膠細胞的氮代謝效率變低，同時，神經細胞和星狀膠細胞中的粒腺體 DNA 表現量不變，呼吸傳遞鍊相關蛋白表現量卻下降，代表細胞的呼吸作用效率降低。

四、 結論與應用

1. Rrm2b 不會影響粒線體的數量，但會影響粒線體的功能，尤其是呼吸作用。
2. Rrm2b 蛋白的缺失對神經細胞生長型態之影響
 - (1) Rrm2b 基因表現量下降會使神經細胞分化能力變強。
 - (2) 神經細胞在共培養的環境中的生長情形更好。
 - (3) Rrm2b 基因剔除的初代培養細胞有反分化的傾向。
3. Rrm2b 表現量影響會影響星狀膠細胞的部分功能性蛋白之表現量。
4. 應用

基因的表現多寡會因為不同人以及不同影響而有差異。疾病發生中很多主要是因為基因的突變或是基因表現量改變而引發的。因此在提倡精準醫療的今日，明確了解特定基因在細胞內造成的影響是相當重要的。本研究針對特定基因於中樞神經系統的神經細胞與星狀膠細胞的影響，則能提供相關的結果，對於之後與此特定基因的疾病研究能有多一份貢獻。

伍、參考文獻

- Barrass, S. V., & Butcher, S. J. (2020). Advances in high-throughput methods for the identification of virus receptors. *Med Microbiol Immunol*, 209(3), 309-323. doi:10.1007/s00430-019-00653-2
- Chen, Y. F., Lin, I. H., Guo, Y. R., Chiu, W. J., Wu, M. S., Jia, W., & Yen, Y. (2019). Rrm2b deletion causes mitochondrial metabolic defects in renal tubules. *Sci Rep*, 9(1), 13238. doi:10.1038/s41598-019-49663-3
- Filograna, R., Mennuni, M., Alsina, D., & Larsson, N. G. (2021). Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett*, 595(8), 976-1002. doi:10.1002/1873-3468.14021
- Fumagalli, M., Ronchi, D., Bedeschi, M. F., Manini, A., Cristofori, G., Mosca, F., . . . Salviati, L. (2022). A novel RRM2B mutation associated with mitochondrial DNA depletion syndrome. *Mol Genet Metab Rep*, 32, 100887. doi:10.1016/j.ymgmr.2022.100887
- Hancock, S. M., Finkelstein, D. I., & Adlard, P. A. (2014). Glia and zinc in ageing and Alzheimer's disease: a mechanism for cognitive decline? *Front Aging Neurosci*, 6, 137. doi:10.3389/fnagi.2014.00137
- Hayashi, R. (2019). 33 - *Gene Expression and the Impact of an Antioxidant Supplement in the Cataractous Lens* (V. R. Preedy & R. R. Watson Eds. Second Edition ed.).
- Keshavan, N., Abdenur, J., Anderson, G., Assouline, Z., Barcia, G., Bouhikbar, L., . . . Rahman, S. (2020). The natural history of infantile mitochondrial DNA depletion syndrome due to RRM2B deficiency. *Genet Med*, 22(1), 199-209. doi:10.1038/s41436-019-0613-z
- Pushparaj, P. N., Aarthi, J. J., Manikandan, J., & Kumar, S. D. (2008). siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications. *J Dent Res*, 87(11), 992-1003. doi:10.1177/154405910808701109
- Xu, Y., Cheng, L., Sun, J., Li, F., Liu, X., Wei, Y., . . . Wang, Y. (2021). Hypermethylation of Mitochondrial Cytochrome b and Cytochrome c Oxidase II Genes with Decreased Mitochondrial DNA Copy Numbers in the APP/PS1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*, 46(3), 564-572. doi:10.1007/s11064-020-03192-y
- Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". *WikiJournal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010.

【評語】 090013

本作品以 shRNA 抑制 ribonucleotide reductase Rrm2b 表現後，觀察神經細胞及星狀膠細胞粒線體相關蛋白與功能的變化，影響到神經細胞及星狀膠細胞的分化。Rrm2B 影響神經細胞及星狀膠細胞分化與功能的角色未明，本作品 knockdown Rrm2B 的效率應可再提升以獲得更具顯著差異之結果，影像類結果建議進行量化以彰顯其差異性。另外，所觀察之現象是否與 Rrm2B 的酵素活性相關，可用抑制劑或是 enzyme-dead mutant 進一步驗證。本研究對中樞神經系統相關細胞的存活與功能具有學術參考價值，可進一步討論所衍生之臨床應用可能性。