

國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶引發
臺灣葉鼻蝠腦組織的神經損傷

MPTP-induced neural damage in the brain of an
echolocation bat, *Hipposideros terasensis*



研究生：

吳婉溱 (Wan-Jhen Wu)

指導教授：

吳忠信 博士 (Chung-Hsin Wu. Ph.D.)

中華民國 108 年 7 月

論文目錄 I

附圖清單 II

誌謝 III

中文摘要 IV

英文摘要 V

第一章 緒言 1-5

第二章 研究目的 6-7

第三章 材料方法 8-11

第四章 實驗結果 12-16

第五章 討論 17-21

第六章 結論 22-23

參考文獻 24-29

實驗圖表 30-48



附圖清單

圖 1 回聲定位蝙蝠位於中腦黑質體的多巴胺神經元藉由合成多巴胺投射作用到紋狀體，進而調節大腦運動相關神經核來協調運作飛行定位，達到追蹤並捕捉獵物的功能 31-32

圖 2 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元多巴胺合成相關的芳香族 L-胺基酸脫羧酶(AADC) 蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著降低 33-34

圖 3 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元發炎作用相關的腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著增加 35-36

圖 4 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 (SOD2)蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著降低 37-38

圖 5 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸 (3-NT)蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著增加 39-40

圖 6 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元細胞凋亡相關細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白(BAX)抗細胞凋亡相關細胞淋巴瘤蛋白-2 (Bcl-2)的表現比值較 Sham 正常控制組顯著增加 41-42

圖 7 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元細胞凋亡相關的半胱天冬酶原 3 (Caspase 3)蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著增加 43-44

圖 8 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組紋狀體神經元第一型多巴胺接受器 (D1R)的蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著降低 45-46

圖 9 MPTP 引發臺灣葉鼻蝠腦組織神經損傷的神經分子機制 47-48

誌謝

回首兩年來的碩士班生活，首先要感謝我的恩師吳忠信教授兩年來對我的諄諄教誨及給予許多寶貴的建議，他授予我的不只是專業上的知識與技術，更重要是老師給我的思維訓練，以及不間斷地提升自我的心，才是最為可貴且重要的，老師也教會我要應用現有的資源與器材創造更多的價值及跨領域的嘗試。如果沒有老師用心的指導，想必這篇論文將難以如期完成。

在碩士班修業期間，我要感謝實驗室的國棟學長、淳任學長、雪娥學姊、清隆學長、志翔學長、珍奴學姊、羽岑學姊、睿芝姊、雅淳、威承、代軒學弟及碩士班的同學們，還有教導我技術及細心回答我各種疑惑的劉宏文老師及妹涵學姊，感謝他們對我一直以來的支持與鼓勵，在我徬徨失意的時候，給予我適時的協助；另外，我要特別感謝王雪娥學姊對我的論文內容及實驗技術方面的全力協助與不厭其煩地細心指導，更對於我未來的計劃予與很多寶貴的建議，也同我分享了許多經驗。

再則，口試期間承蒙口試委員 國立台灣師範大學生命科學專業學院 林豐益教授、慈濟大學醫學系生理學科/生理暨解剖醫學碩士班 郭昶志教授的細心指正，提供諸多寶貴意見，使本論文更臻完備，在此致上深深地謝意。

最後我要感謝我最敬愛的家人們，在我最疲憊的時候給予我溫暖與關懷，並且同時給予我滿滿的支持、鼓勵、建議，以及生活上最大的協助。如果沒有大家對我的疼愛及指導，真的很難如期地呈現出本篇論文，因此對於他們的感謝實在無法以文字概括，僅以本篇論文致謝表達我維不足道的感謝，並以該篇論文獻給所有幫助過我的人事物。

中文摘要

帕金森氏症 (Parkinson's disease) 是一種影響運動的神經退行性疾病，臨床表現包括顫抖、肌肉僵直以及步態遲緩，病理特徵是中腦黑質組織內多巴胺神經細胞的退化及死亡。過去帕金森氏症動物模式常採用腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶 (MPTP)，導致帕金森氏症疾病模式。MPTP 是一種親脂性的原毒素，以腹腔注射後即迅速穿過血腦屏障。一旦進入大腦，MPTP 被星形膠質細胞攝取並通過單胺氧化酶-B (MAO-B) 轉化為中間體 1-甲基-4-苯基-2,3-二氫吡啶鎊 (MPDP)。然後再通過紋狀體神經元多巴胺 D₁ 接受器的蛋白將 MPDP 傳入紋狀體神經元。多巴胺神經元中的細胞質 MPP 抑制線粒體電子傳遞鏈的複合物 I⁺ 然後將⁺快速且自發地氧化成毒性部分 1-甲基-4-苯基吡啶鎊 (MPP⁺; Chiba, Trevor, & Castagnoli, 1984)。之後，MPP⁺⁺ 並導致 ATP 耗盡和氧化應激增加。出於這個原因，MPP⁺ 還選擇性地殺死多巴胺神經元 (Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders, 2007)。本論文選擇臺灣葉鼻蝠作為動物模式，腹腔連續注射 MPTP 一週後，利用免疫組織化學與西方墨點法分析蝙蝠中腦黑質與大腦基底核周邊的神經組織，檢視是否有類似帕金森氏症的表現。實驗結果顯示，中腦黑質神經細胞內合成多巴胺的相關酵素-芳香族 L-胺基酸脫羧酶 (AADC) 表達減少；而且黑質神經細胞內發炎作用相關蛋白腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、氧化壓力相關蛋白-3-硝基酪氨酸 (3-NT) 及細胞凋亡相關蛋白-細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白 (BAX)、半胱天冬酶原 3 (Caspase 3) 表達增強；而黑質神經細胞內抗氧化壓力相關蛋白-超氧化物歧化酶 2 (SOD 2) 與抗細胞凋亡相關蛋白-細胞淋巴瘤蛋白-2 (Bcl-2) 表達降低；此外，基底核內紋狀體神經細胞多巴胺 D₁ 接受器蛋白表達減少。綜合上述研究結果，本論文實驗初步證實 MPTP 處理的回聲定位，蝙蝠確實會因為 MPTP 誘發黑質神經細胞產生發炎反應、氧化壓力、以及細胞凋亡，進而導致腦內黑質神經細胞損傷。由於 MPTP 實驗處理會使得回聲定位蝙蝠產生運動失調，此現象類似帕金森氏症病徵，這結果說明利用 MPTP 處理回聲定位蝙蝠的動物模式，未來應該可以作為探討帕金森氏症相關研究的新穎實驗動物平台。

關鍵字：帕金森氏症、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫-吡啶、發炎作用、氧化壓力、細胞凋亡、黑質、紋狀體、回聲定位蝙蝠

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease that affects exercise. Clinical manifestations include tremors, muscle stiffness, and gait retardation. Pathological features are degeneration and death of dopaminergic neurons in the substantia nigra tissue. In the past, most animal models of Parkinson's disease were injected with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a neurotoxin that affects the electron transport chain of granulocytes and then makes dopamine cells die. MPTP is a lipophilic protoxin that rapidly crosses the blood-brain barrier after intraperitoneal injection. Once in the brain, MPTP is taken up by astrocytes and converted to the intermediate 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP) by monoamine oxidase-B (MAO-B). MPDP is then introduced into the striatum neurons through the protein of the striatal neuron dopamine D₁ receptor. Cytoplasmic MPP in dopamine neurons inhibits the mitochondrial electron transport chain complex I⁺ and then rapidly⁺ spontaneously oxidizes to the toxic moiety 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺; Chiba, Trevor, & Castagnoli, 1984). After that, MPP⁺⁺ causes an increase in ATP depletion and oxidative stress. For this reason, MPP⁺ also selectively kills dopamine neurons (Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders, 2007). In this thesis, an echolocation bat, *Hipposideros armiger terasensis* was selected as an animal model. After a week of continuous intraperitoneal injection of MPTP, we used immunochemistry and molecular biological technology to examine whether the substantia nigra and basal ganglia would be similar to other Parkinson's animal models. Our results showed that dopamine synthesis-related Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) expressions in the substantia nigra were decreased, and those related protein expressions of inflammation-related Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), oxidative stress-related 3-Nitrotyrosine (3-NT), and apoptosis-related Bcl-2-Associated X (BAX) and Caspase 3 in the substantia nigra were increased, while those related protein expressions of anti-oxidative stress-related superoxide dismutase 2 (SOD2) and anti-apoptosis-related B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) were decreased. In addition, dopamine D1 receptor protein expressions were decreased in the striatum. Based on our findings, the experiments in our thesis preliminary confirmed that the MPTP-treated echolocation bat may cause damage to the substantia nigra neurons in the brain due to the inflammation, oxidative stress, and apoptosis. Echolocation bats with MPTP treatment show ataxia that is similar to Parkinson's disease. Thus we suggested that MPTP-treated echolocation bats can be a novel experimental animal model to explore Parkinson's disease in the future.

Keywords: Parkinson's disease, MPTP, inflammation, oxidative stress, apoptosis, substantia nigra, striatum, echolocation bats



一、 帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD)

帕金森氏病 (PD)是一種主要影響運動的進行性發展的神經系統疾病。帕金森氏病是由於大腦內基底節結構內的神經細胞受到破壞引起的 (M.D.等人, 2000)。1817年英國醫師帕金森 (James Parkinson)首次透過病理解剖發現帕金森氏症患者腦部的黑質組織 (substantia nigra)明顯發生病變 (Shulman 等人, 2011), 目前已知帕金森氏症是由於大腦中稱為黑質中細胞大量死亡所引起的, 然而造成黑質中細胞死亡的原因包含了許多因素, 其可能涉及氧化損傷, 環境毒素, 遺傳因素和加速老化的理論, 可利用上述這些因素來檢視作為該疾病的潛在原因(Kalia 等人, 2015; de Lau LM 等人, 2006)帕金森氏症與失智症一樣是腦部的疾病, 它會影響病人的智能、社交和日常生活功能。

PD 病人罹患失智症是一個很常見的現象, 約有 30%的病人會發生, 而它的盛行率是一般人的六倍之多。澳洲雪梨研究中心發現, 帕金森氏症的病人追蹤 20 年後, 高達 83%的病人會產生失智症。因此它的重要性是不容小覷 (台北榮民總醫院神經內科, 帕金森氏症失智症 傅中玲, 2016-3-19)。

PD 在神經病理學方面有明顯的大腦變化; 從分子生物學的角度來看, 該病對黑質緻密部 (SNc) 特定亞核的損傷, 及嚴重阻塞其多巴胺的投射神經元, 通常被認為是 PD 最重要的標誌 (P. Damier 等人, 1999)。然而黑質神經細胞控制運動相關神經, 當這些神經細胞死亡或受損, 會失去產生一種稱為多巴胺重要神經傳遞化學物質的能力 (Sveinbjornsdottir 等人, 2016)。再則多巴胺亦會與其他神經傳遞化學物質相互作用, 其交互作用可以協調運動神經和肌肉正常收縮及舒張。假若黑質神經細胞沒有產生足夠的多巴胺, 會導致運動神經和肌肉收縮無法正常協調動作, 進而造成靜止性震顫、四肢僵硬、平衡和協調受損等症狀(Sveinbjornsdottir 等人, 2016)。

多巴胺於黑質神經元及紋狀體神經元的變性被認為是帕金森病運動損傷的主要神經病理學相關性 (Braak 等人, 2000), 但谷氨酸、膽鹼、GABA、去甲腎上腺素和腎上腺素神經細胞等在其細胞骨架中可能表現出相似的損傷 (Braak 等人, 2000)。現在正在從 PD 的病理生理學角度深入研究神經迴路的改變 (Obeso 等人, 2014), 期望能更深入地了解這種致 PD 的神經生物學, 並試著找到治療的新標靶目標。

二、 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶 (MPTP)

在結構上 MPTP 類似於許多已知的環境化合物，包括除草劑如百草枯 (Di Monte D 等人, 1986)、魚藤酮 (McNaught KS 等人, 1996); 兩者均已顯示出其化合物可以誘導多巴胺 (DA)神經元變性 (Betarbet R 等人, 2000; Brooks AI 等人, 1999; Chun HS 等人, 2001; Thiruchelvam M 等人, 2000)。

MPTP 最初是由一位化學系學生於 1976 年發現的，他試圖合成 1-甲基-4-苯基-4-哌啶丙酸酯 (MPPP)之鴉片類止痛劑，錯誤的製程條件導致合成出來的 MPPP 含有大量雜質 MPTP。然而，研究發現 MPTP 可以殺死多巴胺 (DAergic)神經元 (Davis GC 等人, 1979)，而 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP⁺)是一種 MPTP 的代謝產物，在文獻中指出 MPP⁺能夠引起類似 PD 的不可逆急性症狀 (Langston JW 等人, 1984)。

MPTP 是高度親脂性的並且容易穿過血腦屏障，其主要結合在星形膠質細胞溶酶體中 (Marini AM 等人, 1992)，並且普遍認為星形膠質細胞將 MPTP 轉化為其毒性代謝物 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP⁺)離子 (Lau Y-S 等人, 1991)。MPP⁺的全身給藥不會損害中樞 DAergic 神經元，因為它的電荷不易穿過血腦屏障。然而，它直接注入大腦有效地破壞了大部分 DAergic 黑質紋狀體通路 (Yazdani U 等人, 2006)。MPP⁺會結合多巴胺轉運蛋白 (簡稱為 DAT)，可解釋其現象為 DAergic 神經元的選擇性。

雖然由 MPP⁺誘導的細胞死亡的機制尚未完全清楚，但已知的是，MPP⁺為分離的線粒體中複合物 I 呼吸的有效抑製劑 (Nicklas WJ 等人, 1985; Ramsay RR 等人, 1986; Sayre LM 等人, 1989; 等人, Przedborski S 等人, 1998)。因此，三磷酸腺苷 (ATP)含量的快速下降發生在紋狀體和黑質緻密部 (簡稱為 SNc)中，這是對 MPTP 誘導的神經毒性最敏感的腦區 (Chan P 等人, 1991)。最令人感興趣的是大量的 ATP 消耗可能是因為複合物 I 的抑制率低至 25% (Davey GP 等人, 1998)。DA 神經元的細胞死亡可能通過細胞凋亡和壞死發生 (Jackson-Lewis V 等人, 1995)，這些觀察結果提出 MPTP 誘發之其他事件的可能性，最終導致神經毒性。

三、 常見帕金森氏症動物模式

目前研究 PD 的方向包括尋找新的動物模式和神經保護性物質 (Obeso 等人, 2010)。於二十世紀蘭斯頓博士發現這種毒素可能會產生有效的動物疾病模式(Langston JW 等人, 1984)。他與當時專家們一起確定了 MPTP 給藥於非人類靈長類動物中的作用，並描述了類似於特發性 PD 的運動障礙的損傷 (Langston JW 等人, 1984)。1986 年 Sonsalla 和 Heikkila 指出 MPTP 在小鼠體內可能會誘發許多與人類 PD 相同的病徵 (Sonsalla PK, 1986)。

MPTP 成為用來誘發實驗動物產生 PD 的神經毒物 (Langston 等人, 1983)。此外，有些毒物如殺蟲劑、殺草劑、以及殺真菌的藥劑也會誘發實驗動物產生帕金森氏症 (Cicchetti 等人, 2009)。目前 MPTP 誘發 PD 病徵主要用於啮齒類模式動物實驗上 (Harvey 等人, 2008)。而 MPTP 致病機制在啮齒動物、豚鼠和貓中，可能是由於其腦中紋狀體多巴胺含量或活性降低，以及黑質緻密部神經元細胞遭到破壞，才導致嚴重 PD 症狀的發生 (Shulman 等人, 2011; Parker 等人, 2013)。

此外，亦有實驗發現從啮齒動物腦內黑質組織注射另一神經毒素—6-羥多巴胺 (6-OHDA)，其可專一地摧毀黑質-紋狀體路徑的多巴胺神經元 (Blum 等人, 2001)，其毒素與 MPTP 一樣都是屬於選擇性兒茶酚胺類神經毒素，6-OHDA 常用於大鼠，主要造成其黑質紋狀體 DA 神經元中的損傷 (Ungerstedt, 1968)。但是由於 6-OHDA 不能穿過血腦屏障，因此全身給藥並不能誘發 PD (Blandini 等人, 2008)。因此，這種誘導模式通常需要將 6-OHDA 直接注射 (通常作為單側注射) 進入 SNc、內側前腦束或紋狀體 (RodríguezDíaz 等人, 2001; Blandini 等人, 2008)。這些效果類似於急性 MPTP 致病模式中的表現，在短時間內 (12 小時至 2-3 天) 導致神經元死亡 (RodríguezDíaz 等人, 2001)。許多研究也發現 MPTP 誘發 PD 可應用在金魚模式動物實驗上，由金魚大腦中神經組織蛋白組成之化學變化和明顯的行為障礙損傷中判斷，在許多文獻中亦提及以 MPTP 誘發之 PD 病徵類似於相對高等的啮齒類與靈長類模式動物 (Poli 等人, 1990; Pollard 等人, 1992; Goping 等人, 1995)

四、 蝙蝠作為帕金森氏症動物模式的潛力

蝙蝠發出聲音並利用回聲定位在黑暗中導航，這現象和人類能在嘈雜的環境中不斷調整聲音以便在擁擠的地方聽到自己的聲音相似。有過去研究選擇蝙蝠來探討大腦是如何控制聲音的 (Jedediah Tressler 等人, 2011)，而得克薩斯大學生物學副教授邁克斯莫瑟曼亦說「除人類以外，蝙蝠是地球上最響亮，最具聲音的動物。所有其他動物，如貓和狗，以簡單靈活的方式相互溝通，對精細地聲音控制較不靈活。」然而在患有帕金森氏症中，「說出來」的能力逐漸地喪失，但是由於現今常用之 MPTP 模式動物都對聲音的控制較不靈敏，故很難找到幫助患者改善溝通技巧的有效療法，使研究人員望而卻步。

然而在過去文獻顯見 MPTP 作用於自發型回聲定位蝙蝠中，藉由增加紋狀體多巴胺濃度能使突觸顯著及可逆地改變了回聲定位脈衝的聲學結構和響度 (Jedediah Tressler 等人, 2011)。

檢視過去的文獻，有研究認為回聲定位蝙蝠大腦內多巴胺的表現量會影響蝙蝠的發聲結構，然而本篇研究參考文獻並考慮選用之回聲定位蝙蝠之體重後，採用單次腹腔注射低劑量的 MPTP(10mg / kg)一周 (Jedediah Tressler 等人, 2011)，探討第一型多巴胺接受器傳導的神經途徑，並比較文獻中所提及第二型多巴胺接受器傳導的神經途徑 (Tressler 等人, 2011)。由於帕金森氏症其他的病徵還包括說話與吞嚥異常，也可能伴隨著發聲困難 (Russell 等人, 2010)。

因此，我們選定回聲定位蝙蝠，想進一步探索 MPTP 作用引發腦內多巴胺變化、以及神經組織變化是否與帕金森氏症患者一致。我們假設如果 MPTP 在蝙蝠中有效，那麼紋狀體多巴胺的減少可以揭示多巴胺神經元路徑對自發性回聲定位有調節和變異性的貢獻。我們預測 MPTP 給藥會引起的多巴胺表現量的降低，會導致類似帕金森氏症構音障礙的聲音變化 (Jedediah Tressler 等人, 2011)，即腦內多巴胺變化及神經組織之變化。為了測試紋狀體多巴胺表現量的減少是否對發炎反應、氧化壓力、細胞凋亡產生影響，我們測量了蝙蝠在每日注射低劑量濃度 MPTP 持續一周後之神經組織變化。以進一步的研究來確定在哺乳動物發聲和蝙蝠自發性回聲定位相關性做出更精確的貢獻。

第二章



研究目的

本論文的研究目的主要探討 MPTP 處理的回聲定位蝙蝠如何開發成為帕金森氏症的動物模式。如同本論文之圖 1 所描述：回聲定位蝙蝠可以利用超聲波來定位並捕捉獵物，透過核磁共振掃描顯影技術，我們可以瞭解臺灣葉鼻蝠腦內各神經核的位置，位於蝙蝠中腦黑質體的多巴胺神經元藉由合成多巴胺投射作用到紋狀體，進而調節大腦運動相關神經核來協調運作飛行定位，可以達到追蹤並捕捉獵物的功能。

因此，我們選定回聲定位蝙蝠，並且希望進一步探索 MPTP 作用引發腦內多巴胺變化、以及神經組織變化是否與帕金森氏症患者一致。我們假設如果 MPTP 在蝙蝠中有效，那麼紋狀體多巴胺的減少可以揭示多巴胺神經元路徑對自發性回聲定位有調節和變異性的貢獻。並預測 MPTP 給藥會引起的多巴胺表現量的降低，會導致類似帕金森氏症構音障礙的聲音變化 (Jedediah Tressler 等人, 2011)，即腦內多巴胺變化及神經組織之變化。為了測試紋狀體多巴胺表現量的減少是否對發炎反應、氧化壓力、細胞凋亡產生影響，我們測量了蝙蝠在每日注射低劑量濃度 MPTP 持續一周後之神經組織變化。

為此，我們選擇臺灣常見的臺灣葉鼻蝠作為動物模式，檢視蝙蝠實驗處理 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶 (MPTP) 後，究竟透過哪些神經分子機制途徑來損害回聲定位蝙蝠的腦組織。本論文研究結果可以提供評估回聲定位蝙蝠作為帕金森氏症新穎動物模型的潛力。

第三章

材料方法

大

一、實驗動物

從臺北郊區山洞中捕獲 12 隻臺灣葉鼻蝠 (*Hipposideros armiger terasensis*) 並用於本次實驗。將所有蝙蝠飼養於僅有蝙蝠單一物種的室內籠中，並且室溫設為 25°C；相對濕度為 60%；黑暗/光照週期為 12 小時；所有蝙蝠都採任食、維生素水。在該實驗中，擇六隻臺灣葉鼻蝠經由腹腔注射低劑量 MPTP (10 mg / kg, Rich Country Chemical Corporation, Taoyuan, Taiwan) 來誘發 PD (Parkinson Disease) 相關症狀；其他六隻蝙蝠則進行假處理作為對照組。MPTP 處理組和對照組體重和身體數值都在夜間進行。我們的實驗程序皆符合 NTNU 動物研究委員會的指導方針。

二、免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

將臺灣葉鼻蝠麻醉後犧牲，利用生理食鹽水 (phosphate buffered solution；簡稱為 PBS) 進行灌流後取下其腦組織，再以 10% 中性福馬林 (formalin) 浸泡；其常用來做為固定液，目的在於防止腐敗並保持生前原來構造。固定完成後以石蠟 (paraffin) 包埋，並利用旋轉式精密切片機 (Leica RM2135) 切製成 4-6 μm 之組織切片，接著將組織切片貼於免疫染色專用玻片上並預備染色，染色前先進行脫蠟，再以 95-120°C 加熱進行抗原修復；其染色前處理之目的包括脫除組織中的蠟質、抗原再呈現、去除內生性還原酶等。分別加入適當濃度之一級抗體反應後，以 PBS 沖洗 10 分鐘，再加入標定 HRP (horseradish peroxidase；簡稱為 HRP) 之適當濃度二級抗體作用 30 分鐘，再以 PBS 沖洗 10 分鐘 {附註：使用 protein block (Leica, polymer detection system) 以及相對應抗體作為呈色系統}，再加入 No Volink polymer (Leica, polymer detection system) 呈色劑反應 30 分鐘，使酵素分解，再以 PBS 沖洗 10 分鐘，然後加入 3,3'-Diaminobenzidine (簡稱為 DAB) chromogen 作用 5 分鐘，接著以 PBS 沖洗 10 分鐘後加入 Hematoxylin solution (Leica, polymer detection system) 反應 8 分鐘做為對比染色，最後以流水沖洗載玻片背面 10 分鐘，以清除載玻片上多餘染劑，再進行脫水以及封片。因此由上述可知，有 DAB 呈色之位置，就是待偵測抗原的所在位置，而其染色強度會隨抗原表現的越多而呈色強度越強。

三、西方墨點法 (Western blot assay)

將蝙蝠個體麻醉並取血犧牲後，取下待測之腦組織置入含有下列: (1)至(9)之混合液中，用剪刀將待測腦組織剪碎並加以均質化，然而溶液的容量則依據待測組織之重量而定 (混合液:組織= 1000 μ l:100 mg)。

(1) 0.05M 三羥甲基胺基甲烷 (Tris hydroxymethyl aminomethane, Tris, pH 8.0, Bionovas, Washington DC, USA)、(2) 0.15M 氯化鈉 (NaCl, Bionovas, Washington DC, USA)、(3) 0.02M 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, Bionovas, Washington DC, USA)、(4) 1.0%去氧膽酸 (Deoxycholic acid, Bionovas, Washington DC, USA)、(5) 1.0%乙基苯基聚乙二醇 P40 (Nonidet P40, Bionovas, Washington DC, USA)、(6) 0.1%十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS, Bionovas, Washington DC, USA)、(7) 1.0%蛋白酶抑制劑混合液 (Protease inhibitor cocktail for full range, Bionovas, Washington DC, USA)、(8) 1.0% 絲胺酸/羥丁胺酸磷酸酶抑制劑混合液 (Serine/threonine phosphate inhibitor cocktail, Bionovas, Washington DC, USA)、(9) 1.0%酪胺酸磷酸酶抑制劑混合液 (Tyrosine phosphate inhibitor cocktail, Bionovas, Washington DC, USA)。

均質化後之待測腦組織與均質液平放於冰上，並使用多功能震盪機以 50rpm 轉速震盪 3-4 小時，再於溫度 4°C 之環境下進行離心 (13,000 rpm) 歷時 10 分鐘，以吸量管 (pipette) 吸取上清液，放入試管中，即為蛋白質原液。蛋白質原液的定量分析則是使用 BCA 蛋白質定量試劑組 (BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 並以光電比色計 (Microplate Spectrophotometer, uQuant, Bio tek Instruments, Inc., Vermont, USA) 於 562 nm 處測定吸光值，得到其樣品蛋白質原液之蛋白質濃度。

吸取 20 mg 蛋白質體積之原液加入含有: (a)至(e)之混合液 5X dye 中，並於 95°C 溫度下作用五分鐘，使蛋白質發生變性。再將已變性之蛋白質置於 12.5%十二烷基硫酸鈉聚積膠體 (Discontinuons sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel, SDS-PAGE-polyacrylamide gel) 中進行蛋白質電泳分離。接著將分離的蛋白質 (蛋白質分離條件: 100 伏特; 150 分鐘) 從膠體轉移至 0.45 μ m 聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF, GE Healthcare Life Science, Barrington, Illinois, USA) 之膜上，然後置於室溫 (蛋白質轉漬條件: 100 伏特、300 毫安培; 90 分鐘) 條件下，以 PBS-T buffer (phosphate with 0.1% Tween-20 buffered solution; 簡稱為 PBS-T buffer) 配製 5% 之脫脂牛奶做為 Blocking

buffer 反應 2 小時，其作用原理是利用其他蛋白將膜上之孔洞填滿，避免沒有結合目標蛋白之抗體殘留再次轉漬於膜上。

(a) 0.25 M 三羥甲基胺基甲烷鹽酸 (Tris hydroxymethyl aminomethane hydrochloride, Tris-HCl,pH 6.8, Bionovas, Washington DC, USA) 、

(b) 10 %十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate,SDS, Bionovas, Washington DC, USA) 、

(c) 0.5%溴酚藍 (Bromophenol blue, Bionovas, Washington DC, USA) 、

(d) 50%甘油 (Glycerol, Bionovas, Washington DC, USA))

(e) 5% 2-巰基乙醇 (Beta-mercaptoethanol, Bionovas, Washington DC, USA)

配製相關抗體與相對應定量標準化之相關抗體，並與聚偏二氟乙烯膜於室溫反應 2 小時或 4°C 環境下過夜，再以 PBS-T buffer 沖洗 10 分鐘後進行震盪此步驟重覆三次。

然後將個別一級抗體對應之二級抗體 anti-rabbit IgG-HRP (1:10,000 dilution, PerkinElmer, Waltham, Massachuset, USA)或 anti-mouse IgG-HRP (1:10,000 dilution, PerkinElmer, Waltham, Massachuset, USA)於室溫下進行專一性結合反應歷時兩小時，同樣再以 PBS-T buffer 沖洗 10 分鐘後進行震盪此步驟重覆三循環。接著使用受質化學發光 ECL Western blotting detection reagents (GE Heathcare Life Science, Barrington, Illinois, USA)用來呈色，並以冷光影像分析系統 LAS-4000 (GE Heathcare Life Science, Barrington, Illinois, USA)進行檢測 (Detection)，最後利用 Image J 軟體 (Version 1.48t, Wayne Rasnabd, Washing DC, USA)進行定量分析(Quantitative Visualization)。

四、統計分析

所有的實驗數值都是用平均值±平均值標準誤差來表示。而統計方法則是用學生 t 檢定 (Student's t-test)來分析是否有顯著差異，*p*-values 只要 $p \leq 0.05$ 就算有顯著差異。



1. 臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元多巴胺合成相關蛋白質表現的影響

圖 2 顯示臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經神經元多巴胺合成相關之芳香族 L-胺基酸脫羧酶 (Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase, AADC) 蛋白質表現量的影響。圖 2A 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內多巴胺合成相關的芳香族 L-胺基酸脫羧酶 (AADC) 蛋白質表現量較正常控制組明顯減少。圖 2B 顯示臺灣葉鼻蝠腦內神經核的相對位置，除黑質 (SNc) 位置外，也標示黑質神經元內左-多巴 (L-dopa) 可以透過 AADC 催化合成多巴胺 (dopamine)。圖 2C 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 AADC 蛋白質表現量較正常控制組明顯減少；統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 AADC 蛋白質平均表現量較正常控制組 (Sham) 顯著降低 (MPTP 實驗處理組 \pm SE *v.s.* Sham 正常控制組 \pm SE, $p < 0.01$)。

2. 臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元發炎作用相關的腫瘤壞死因子 α (TNF- α) 蛋白質表現的影響

圖 3 顯示臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元發炎作用相關的腫瘤壞死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 蛋白質表現的影響。圖 3A 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質神經元內發炎作用相關的 TNF- α 蛋白質表現較正常控制組明顯增強。圖 3B 顯示臺灣葉鼻蝠腦內神經核的相對位置，除黑質 (SNc) 位置外，也標示黑質神經元內 TNF- α 之蛋白質表現增加代表發炎反應增加。圖 3C 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 TNF α 蛋白質表現量較正常控制組明顯增強；統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 TNF- α 蛋白質平均表現量較正常控制組 (Sham) 顯著增加 (MPTP 實驗處理組 \pm SE *v.s.* Sham 正常控制組 \pm SE, $p < 0.01$)。

3. 臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 (SOD2)蛋白質表現的影響

圖 4 顯示臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 (Superoxide dismutase 2, SOD2)蛋白質表現的影響。圖 4A 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內抗氧化壓力相關的 SOD2 表現較正常控制組明顯降低。圖 4B 顯示臺灣葉鼻蝠腦內神經核的相對位置，除黑質 (SNc)位置外，也標示黑質體神經元內黑質體神經元內 SOD2 表現會抑制活性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS)以及氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸 (3-Nitrotyrosine, 3-NT)表現，SOD2 表現降低代表氧化壓力增加。圖 4C 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 SOD2 蛋白質表現量較正常控制組明顯減少；統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 SOD2 蛋白質平均表現量較正常控制組 (Sham)顯著降低 (MPTP 實驗處理組±SE v.s. Sham 正常控制組±SE, $p < 0.01$)。

4. 臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸 (3-NT)表現的影響

圖 5 顯示臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸 (3-Nitrotyrosine, 3-NT)表現的影響。圖 5A 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內氧化壓力相關的 3-NT 表現較正常控制組明顯增加。圖 5B 顯示臺灣葉鼻蝠腦內神經核的相對位置，除 SNc 位置外，也標示活性氧化物 (ROS)會增強氧化壓力相關的 3-NT 表現，3-NT 表現增強則代表氧化壓力增加。圖 5C 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 3-NT 表現較正常控制組明顯增強；統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 3-NT 平均表現值較正常控制組 (Sham)顯著增加 (MPTP 實驗處理組±SE v.s. Sham 正常控制組±SE, $p < 0.01$)。

5. 臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元凋亡相關細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白 (BAX)/抗細胞凋亡相關細胞淋巴瘤蛋白-2 (Bcl-2)表現比值的影響

圖 6 顯示臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元凋亡相關細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白 (BAX- Associated X)/抗細胞凋亡相關細胞淋巴瘤蛋白-2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)的表現比值的影響。圖 6A 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內細胞凋亡相關 BAX- Associated X/ Bcl-2 表現較正常控制組明顯增加；而 Bcl-2 表現則較正常控制組減少。圖 6B 顯示臺灣葉鼻蝠腦內神經核的相對位置，除黑質 (SNc)位置外，也標示 Bcl-2 會抑制 BAX 表現，而 BAX 則是會促進半胱天冬酶原 3 (Caspase 3)蛋白表現，進而增強細胞凋亡 (Apoptosis)。圖 6C 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 BAX 蛋白表現較正常控制組明顯增強；而 Bcl-2 蛋白表現則較正常控制組明顯減弱。統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 BAX/Bcl-2 表現比值較正常控制組 (Sham)顯著增加 (MPTP 實驗處理組 \pm SE v.s. Sham 正常控制組 \pm SE, $p < 0.01$)。

6. 臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質神經元細胞凋亡相關的半胱天冬酶原 3 (Caspase 3)蛋白質表現的影響

圖 7 顯示臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於黑質體神經神經元細胞凋亡相關的半胱天冬酶原 3 (Caspase 3)蛋白質表現的影響。圖 7A 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質神經元內細胞凋亡相關的 Caspase 3 蛋白質表現量較正常控制組明顯增加。圖 7B 顯示臺灣葉鼻蝠腦內神經核的相對位置，除 SNc 位置外，也標示 Caspase 3 蛋白表現增強會促進細胞凋亡 (Apoptosis)。圖 7C 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 Caspase 3 蛋白質表現量較正常控制組明顯增強；(b) 統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 Caspase 3 蛋白質平均表現量較正常控制組 (Sham)顯著增加(MPTP 實驗處理組 \pm SE v.s. Sham 正常控制組 \pm SE, $p < 0.01$)。

7. 臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於紋狀體神經元第一型多巴胺接受器蛋白質表現的影響

圖 8 顯示臺灣葉鼻蝠實驗處理 MPTP 後對於紋狀體神經元第一型多巴胺接受器蛋白 (簡稱為 D_1R) 表現的影響。圖 8A 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內紋狀體神經元多巴胺 D_1R 的蛋白質表現較正常控制組明顯減少。圖 7B 顯示臺灣葉鼻蝠腦內神經核的相對位置，除紋狀體 (Str.) 位置外，也標示黑質體合成多巴胺 (dopamine) 會作用在紋狀體的 D_1R 。圖 8C 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 D_1R 蛋白質表現量較正常控制組明顯減少；統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 D_1R 蛋白質平均表現量較正常控制組 (Sham) 顯著降低 (MPTP 實驗處理組 \pm SE *v.s.* Sham 正常控制組 \pm SE, $p < 0.01$)。



第五章



探討 MPTP 引發哺乳類動物腦組織的神經損傷

從過去文獻報告中發現，由於黑質神經細胞死亡或受損而失去了多巴胺神經傳遞化學物質的合成與分泌的能力，進而導致運動功能失調 (Sveinbjornsdottir, 2016)。多巴胺會與其他神經傳遞化學物質相互作用，並協調運動神經和肌肉收縮，假若黑質神經細胞沒有產生足夠的多巴胺，則會導致運動神經和肌肉收縮無法協調，造成靜止性震顫、四肢僵硬、平衡和協調受損等症狀 (Sveinbjornsdottir, 2016)。圖 2 利用免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元多巴胺合成相關的芳香族 L-胺基酸脫羧酶 (AADC) 蛋白質表現量較正常控制組顯著降低。此一結果支持上述的論述，其結果為黑質神經元合成多巴胺的酵素蛋白表現量降低，進而合理推斷黑質神經元合成多巴胺降低。

此外，由於黑質體合成多巴胺會作用於基底核紋狀體的多巴胺接受器上，圖 8 利用免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組紋狀體神經元多巴胺的第一型多巴胺接受器的蛋白質表現量較 Sham 正常控制組顯著降低。這結果進而說明了黑質神經細胞沒有產生足夠的多巴胺，而且紋狀體神經元對於多巴胺的接收敏感度也大幅降低。這些結果都可以支持為何回聲定位蝙蝠 MPTP 實驗處理後會導致運動神經和肌肉收縮無法協調的情形。

當黑質神經細胞沒有能力產生足夠的多巴胺以及紋狀體神經元對多巴胺感受能力的降低，最有可能的情形就是黑質與紋狀體的神經元都發生了損傷情形。從本論文研究結果，我們證實 MPTP 處理的回聲定位蝙蝠確實會因為 MPTP 誘發黑質神經細胞產生發炎、氧化壓力、以及細胞凋亡作用，造成腦內黑質體以及紋狀體內神經元損傷。

圖 3 利用免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元發炎作用相關的腫瘤壞死因子- α (TNF- α) 蛋白質表現量較 Sham 正常控制組顯著增加。腫瘤壞死因子 (TNF) 是一類能直接造成腫瘤細胞死亡的細胞因子，而 TNF- α 是一種多功能細胞因子，是一種促進發炎反應的細胞素，主要由單核球合成，當生物體受到致病菌的攻擊或其他傷害，便會刺激吞噬細胞產生腫瘤壞死因子 (TNF)，調節局部或全身的發炎反應。

圖 4 利用免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 (SOD2) 蛋白質表現

量較 Sham 正常控制組顯著降低；圖 5 顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸(3-NT)表現量較 Sham 正常控制組顯著增加。SOD2 是氧化壓力的重要抗氧化酶，而 3-NT 是氧化損傷的標誌物 (Chong 等人，2005)，因此，氧化壓力被認為是 MPTP 誘導的神經毒性發病機制的關鍵因素。此外，MPTP 誘導的氧化壓力可能導致粒線體的通透性發生轉變，導致多巴胺神經元細胞死亡 (Tatton 等人，2003)。

在本研究中，我們描述了與蝙蝠腦組織中 MPTP 誘導的帕金森氏症相關的凋亡機制，圖 6 利用免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元細胞凋亡相關細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白 (BAX)/抗細胞凋亡相關細胞淋巴瘤蛋白-2 (Bcl-2)的表現比值較 Sham 正常控制組顯著增加。

我們觀察到 MPTP 實驗處理組會改變 Bcl-2 家族蛋白的平衡，並促進黑質神經元的細胞凋亡。免疫組織化學染色與西方墨點法分析顯示 MPTP 實驗處理導致抗凋亡 Bcl-2 蛋白減少，但黑質中促凋亡 BAX 蛋白增加。此外，BAX / Bcl-2 比率也顯著增加。為了確定粒線體功能障礙是否會激活 Caspase，我們測定 MPTP 實驗處理對蝙蝠腦組織中的 Caspase 3 活性。圖 7 顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元細胞凋亡相關的 Caspase 3 蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著增加。

過去報導曾經提及在帕金森氏症患者的多巴胺神經元中觀察到 Caspase 3 蛋白的過度表現 (Hartmann 等人，2000)。綜合上述結果，利用 MPTP 誘發回聲定位蝙蝠神經細胞產生發炎、氧化壓力、以及細胞凋亡等作用，而使得腦內黑質以及基底核紋狀體神經元發生損傷都與帕金森氏症患者一致。

MPTP 引發蝙蝠腦組織的神經損傷模式之探討

到目前為止，MPTP 在靈長類動物，如貓、大鼠、小鼠和豬中都被證明是一種有效的兒茶酚胺能神經毒素，但其功效和行為效應因代謝和 MPTP 及其神經元攝取的物種特異性及代謝物差異而有所不同 (Riachi 等人，1988)。

然而，過去文獻表示給予蝙蝠低劑量的 MPTP，會導致類似於帕金森氏病的暫時性病徵。蝙蝠失去了提高聲音的能力，並調整為微小而唧喳的聲音或是更大聲地進行溝通，但是蝙蝠與人類不同，其在一周內即恢復正常 (Tressler 等人，2011)。處理 MPTP 之蝙蝠的聲音變化與帕金森氏症患者的聲音變化類似，然而，帕金森氏症經常發生語言障礙。

MPTP 的劑量和給藥基於帕金森氏症小鼠模式的綜述 (Sedelis 等人，2001)。在小鼠中，據文獻報告表示劑量和給藥方案都可能產生可變結果，部分取決於 MPTP 本身純度或實驗動物年齡、性別和不同實驗室等等 (Jedediah Tressler 等人，2011)。我們選擇劑量和時間表的關鍵因素在於：(1) 我們無法承受高死亡率，因為我們正與野生動物一起工作 (2) 使臺灣葉鼻蝠仍然能夠移動並積極探索其環境、自由地回聲，並且同時擁有近似於帕金森氏症病徵。因此，我們設計了一種預計會產生輕微慢性影響的給藥實驗設計。

據報告提及帕金森氏症小鼠模式腹腔注射 MPTP (30 mg / kg 甚至更高) 1 小時後，發生急性效應，產生嚴重的靜止性震顫、四肢僵硬、平衡和協調受損等症狀 (Sedelis 等人，2001)，顯著的行為缺陷以及黑質多巴胺神經元的損失在 24 小時後變得明顯，並在 4 至 7 天內達到平穩期 (Jackson-Lewis 等，1995)。另外也有報告顯示，在劑量高於 30 mg / kg 的情況下，一天後死亡率高達 60 (Sikiric 等人，1999)，亦有報告以四隻蝙蝠中使用單次 20 mg / kg 劑量進行初步試驗。在持續超過 48 小時的兩隻存活的蝙蝠中，50% 的死亡率和嚴重的運動不能，並且排除了進行任何發聲研究 (Jedediah Tressler 等人，2011)。因此，我們以低劑量 10mg / kg 之 MPTP 進行實驗每天一次 0.02ml MPTP 腹腔注射，持續 1 週。

MPTP 引發蝙蝠腦組織的神經損傷模式之優點和未來展望

得克薩斯大學生物學副教授邁克斯莫瑟曼亦說「除人類以外，蝙蝠是地球上最響亮，最具聲音的動物。所有其他動物，如貓和狗，大都已簡單靈活的方式相互溝通，對精細地聲音控制較不靈活。」由於帕金森氏症其他的病徵還包括說話與吞嚥異常，並且常伴隨著發聲困難 (Russell 等人，2010)。

然而在患有帕金森氏症中，「說出來」的能力逐漸地喪失，但是由於現今常用之 MPTP 模式動物都對聲音的控制都較不靈敏，故很難找到幫助患者改善溝通技巧的有效療法，然而在過去文獻顯見 MPTP 作用於自發型回聲定位蝙蝠中，藉由增加紋狀體多巴胺濃度能使突觸顯著改變了回聲定位脈衝的聲學結構和響度 (Jedediah Tressler 等人，2011)。

「帕金森氏症會對一個人的談話能力產生負面影響，這可能是這種疾病最令人沮喪的方面之一」事實上，大多數患有這種疾病的人說，無法與家人溝通是這種疾病應對最難的部分。故我們以對於聲音及聽覺控制都較為靈敏之回聲定位蝙蝠作為帕金森氏症模式動物評估與測試，發現利用 MPTP 誘發回聲定位蝙蝠腦內黑質以及基底核紋狀體神經元發生損傷，以及神經細胞產生發炎、氧化壓力、以及細胞凋亡等現象，都與帕金森氏症患者腦中發生的變化一致 (Jedediah Tressler 等人，2011)。

然而，至目前對 PD 病理學的理解大大受益於動物模式的使用。儘管取得這些神經分子機制途徑、相關蛋白與功能等等，但是目前的 PD 動物模式仍需要進行大量的改進。單個動物模式似乎很難在短期內完全概括人類 PD 的複雜性。由於迄今為止尚未有完美的動物模式，因此在本論文中我們利用 MPTP 處理回聲定位所特有的蝙蝠物種作為動物模式之建立，可望作為探討帕金森氏症相關研究的新穎實驗動物平台。

第六章



本論文檢視台灣葉鼻蝠處理 MPTP 後，腦組織是否受到影響或損害？圖 1 提及回聲定位蝙蝠位於中腦黑質的多巴胺神經元藉由合成多巴胺投射作用到紋狀體，進而調節大腦運動相關神經核來協調運作飛行定位，達到追蹤並捕捉獵物的功能。利用免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示：臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元多巴胺合成相關的芳香族 L-胺基酸脫羧酶 (AADC) 以及抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 (SOD2)、以及抗細胞凋亡相關細胞淋巴瘤蛋白-2 (Bcl-2) 蛋白表現均較 Sham 正常控制組顯著降低(圖 2、圖 4、圖 6)；黑質神經元發炎作用相關的腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸 (3-NT)、細胞凋亡相關細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白 (BAX)、以及半胱天冬酶原 3 (Caspase 3) 蛋白表現均較 Sham 正常控制組顯著增加(圖 3、圖 5、圖 6、圖 7)，而紋狀體神經元第一型多巴胺接受器的蛋白質表現量較 Sham 正常控制組顯著降低(圖 8)。根據上述結果，圖 9 綜合整理 MPTP 引發臺灣葉鼻蝠腦組織神經損傷的神經分子機制：回聲定位蝙蝠會因為 MPTP 實驗處理造成腦組織產生發炎作用 (inflammation)、氧化壓力 (oxidative stress)、以及細胞凋亡 (apoptosis)，這結果可能導致黑質 (substantia nigra) 神經元損傷，使得神經元合成多巴胺減少；以及紋狀體 (striatum) 神經元第一型多巴胺接受器的蛋白質表現量變差，這情形與帕金森氏症患者的病徵非常類似。

由於 MPTP 實驗處理會使得回聲定位蝙蝠產生運動失調，此現象亦類似於帕金森氏症患者，這結果說明利用 MPTP 處理回聲定位蝙蝠的動物模式，未來有望作為探討帕金森氏症相關研究的新穎實驗動物平台。

最終選擇以 PD 患者測試少數之候選藥物時，候選藥物的增加可能帶來更多的疑慮而不是益處。雖然從本質上講，在患者測試藥物之前不可能消除所有疑問 (參見書籍: 臨床均衡的概念 112)，故我們的責任是在人體測試之前建立起最健全、與臨床相關的臨床前驗證之動物模式。在這種情況下，我們認為沒有「PD 的最佳模型」，因為沒有完全相同的人類真實病理狀況；這些模式只是近似值，每個模型都可能具有一定的相關性。因此，為了增加富有成效的臨床前研究的機會，我們試著提供回聲定位蝙蝠作為帕金森氏症新穎動物模式的潛力評估。

參考文獻



- Blum, D; Torch, S; Lambeng, N; Nissou, M; Benabid, AL; Sadoul, R; Verna, JM. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology.*, 65 (2): 135–172.
- Chong ZZ, Li F, Maiese K. (2005) Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol.*,75(3):207–246.
- Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, Gross RE. (2009) Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30 (9): 475–83.
- Davie CA. (2008) A review of Parkinson's disease. *Br. Med. Bull.*, 86 (1): 109–27.
- De Lau LM, Breteler MM. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 5 (6): 525–35.
- Goping G, Pollard HB, Adeyemo OM, Kuijpers GA. (1995) Effect of MPTP on dopaminergic neurons in the goldfish brain: a light and electron microscope study. *Brain Res.* 687(1-2):35-52.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, et al. (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,97(6):2875–2880.
- Harvey BK, Wang Y, Hoffer BJ. (2008) Transgenic rodent models of Parkinson's disease. *Acta Neurochir. Suppl. Acta Neurochirurgica Supplementum.*, 101: 89–92.
- Kalia, LV; Lang, AE. (2015) Parkinson's disease. *Lancet.*, 386 (9996): 896–912.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* -02, 219 (4587): 979–80.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G. (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat. Med.*,16 (6): 653–61.
- Parker KL, Lamichhane D, Caetano MS, Narayanan NS. (2013) Executive dysfunction in Parkinson's disease and timing deficits. *Front. Integr. Neurosci.* -10, 7: 75.

- Poli, A., Guarnieri, T., Facchinetti, F. and Villani, L. (1990) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in goldfish brain, *Brain Res.*, 534 45-50.
- Pollard, H.B., Dhariwal, K., Adeyemo, O.M., Markey, C.J., Caohuy, H., Levine, M., Markey, S. and Youdim, M.B.H. (1992) A parkinsonian syndrome induced in the goldfish by the neurotoxin MPTP, *FASEB J.*, 6 3108-3116.
- Russell JA, Ciucci MR, Connor NP, Schallert T. (2010) Targeted exercise therapy for voice and swallow in persons with Parkinson's disease. *Brain Research*. 1341: 3–11.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR. (2004) Parkinson's disease. *Lancet*, 363 (9423): 1783–1193.
- Schrag A. Epidemiology of movement disorders. (edit.) Tolosa E, Jankovic JJ. (2007) *Parkinson's disease and movement disorders*. Hagerstown, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins.: 50–66.
- Shulman JM, De Jager PL, Feany MB (2011) Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology*. 6: 193–222.
- Sveinbjornsdottir, S (2016) The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. 139: 318–324.
- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol.*; 53(Suppl 3):S61–S70.
- Tressler J, Schwartz C, Wellman P, Hughes S, Smotherman M (2011) Regulation of bat echolocation pulse acoustics by striatal dopamine. *J Exp Biol*. 214(19): 3238-3247.
- M.D., and C. David Marsden, M.D. (2000) *Parkinson's Disease: A Self-Help Guide*, Marjan Jahanshahi, Demos Medical Publishing, 386 Park Avenue South, Suite 201, New York, NY 10016, (212) 683-0072.
- Heiko Braak, Estifanos Ghebremedhin, Udo Rüb, Hansjürgen Bratzke, Kelly Del Tredici (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, October 2004 318: 121–134.
- P. Damier, E.C. Hirsch, Y. Agid, A.M. Graybiel (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Brain*, 122 pp. 1437-1448

- Morin N., Jourdain V. A., Di Paolo T. (2014) Modeling dyskinesia in animal models of Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 256 105–116 10.1016/j.expneurol.2013.01.024
- Di Monte D, Sandy MS, Ekström G, Smith MT. (1986) Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Comm.*;137:303–309.
- McNaught KS, Thull U, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD. (1996) Effects of isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on mitochondrial respiration. *Biochem Pharmacol.*;51:1503–1511.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.*;3:1301–1306.
- Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. (1999) Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.*;823:1–10.
- Chun HS, Gibson GE, DeGiorgio LA, Zhang H, Kidd VJ, Son JH. (2001) Dopaminergic cell death induced by MPP⁺, oxidant and specific neurotoxins shares the common molecular mechanism. *J Neurochem.*;76:1010–1021.
- Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. (2000) The nigrostriatal dopamine system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci.*;20:9207–9214.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.*;1:249–254.
- Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.*;292:390–394.
- Sonsalla PK, Heikkila RE. (1986) The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol.* ;129:339–345.
- Andres-Mateos E., Mejias R., Sasaki M., Li X., Lin B. M., Biskup S., et al. (2009) Unexpected lack of hypersensitivity in LRRK2 knock-out mice to MPTP (1-

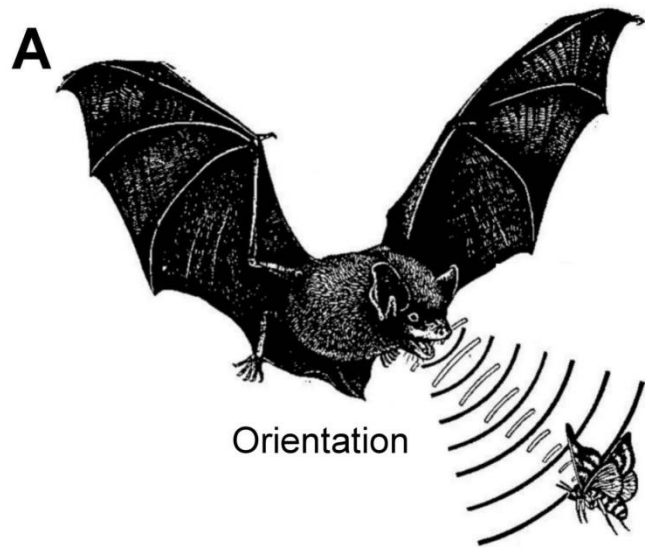
methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). *J. Neurosci.* 29 15846–15850
10.1523/JNEUROSCI.4357-09.2009

- Ungerstedt U. (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5 107–110 10.1016/0014-2999(68)90164-7
- Marini AM, Lipsky RH, Schwartz JP, Kopin IJ. (1992) Accumulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultured cerebellar astrocytes. *J Neurochem.*58:1250–1258.
- Yazdani U, German DC, Liang CL, Manzano L, Sonsalla PK, Zeevalk GD. (2006) Rat model of Parkinson's disease: Chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) *Exp Neurol.*;200:172–183.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 1985;36:2503–2508.
- Ramsay RR, Dadgar J, Trevor A, Singer TP.(1986) Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the toxicity of MPTP. *Life Sci.* 1986;39:581–588.
- Sayre LM, Wang F, Hoppel CL. (1989) Tetraphenylborate potentiates the respiratory inhibition by the dopaminergic neurotoxin MPP⁺ in both electron transport particles and intact mitochondria. *Biochem Biophys Res Comm.*;161:809–818.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V. (1998) Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord.*;13:35–38.
- Jedediah Tressler,Christine Schwartz,Paul Wellman,Samuel Hughes,Michael (2011) *Smotherman Journal of Experimental Biology*,214 : 3238-3247; doi : 10.1242 / jeb.058149
- Blandini F., Armentero M.-T., Martignoni E. (2008) The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat. Disord.* 14(Suppl. 2), S124–S129
10.1016/j.parkreldis.2008.04.015
- Rodríguez Díaz M., Abdala P., Barroso-Chinea P., Obeso J., Gonzalez-Hernandez T. (2001) Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 122 79–92 10.1016/S0166-4328(01)00168-1

- Lau Y-S, Fung YK, Trobough KL, Cashman JR, Wilson JA. (1991) Depletion of striatal dopamine by the N-oxide of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Neurotoxicology*;12:189–199.
- Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monti D. (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem*;57:348–351.
- Davey GP, Peuchen S, Clark JB. (1998) Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration. *J Biol Chem*;273:12753–12757.
- Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. (1995) Time course and morphology of dopaminergic neuronal cell death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*;4:257–269.
- Sedelis M., Schwarting R. K. W., Huston J. P. (2001) Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 125, 109-122.
- Jackson-Lewis V., Jakowec M., Burke R. E., Przedborski S. (1995) Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4, 257-269.
- Schwartz C., Tressler J., Keller H., Vanzant M., Ezell S., Smotherman M. (2007) The tiny difference between foraging and communication buzzes uttered by the Mexican free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*. *J. Comp. Physiol. A* 193, 853-863.



圖 1



B

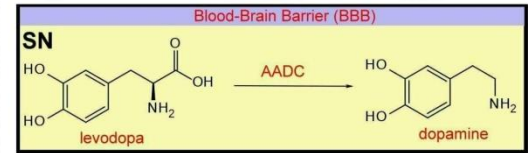
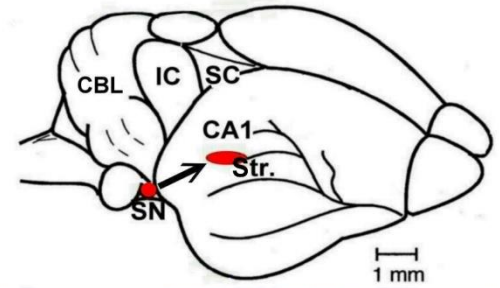
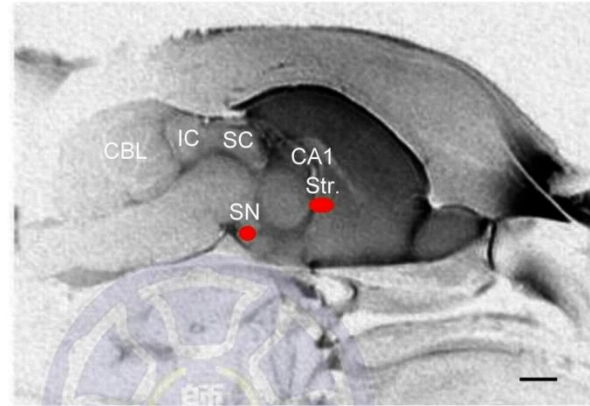


圖 1 | 回聲定位蝙蝠位於中腦黑質體的多巴胺神經元藉由合成多巴胺投射作用到紋狀體，進而調節大腦運動相關神經核來協調運作飛行定位，達到追蹤並捕捉獵物的功能。

(A) 回聲定位蝙蝠可以利用超聲波來定位並捕捉獵物。(B) 臺灣葉鼻蝠腦部的核磁共振掃描顯影與腦構造示意圖。右下圖顯示黑質體的神經元內左-多巴 (L-dopa) 透過芳香族 L-胺基酸脫羧酵素 (Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase, AADC) 催化合成多巴胺 (dopamine)，黑質體中的多巴胺神經元軸突會向紋狀體投射形成黑質-紋狀體路徑，進而調節大腦運動相關神經核而引起各肌肉之間協調運作。刻度線長度=10 mm。

SN：黑質 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦 (cerebellum)。



圖 2

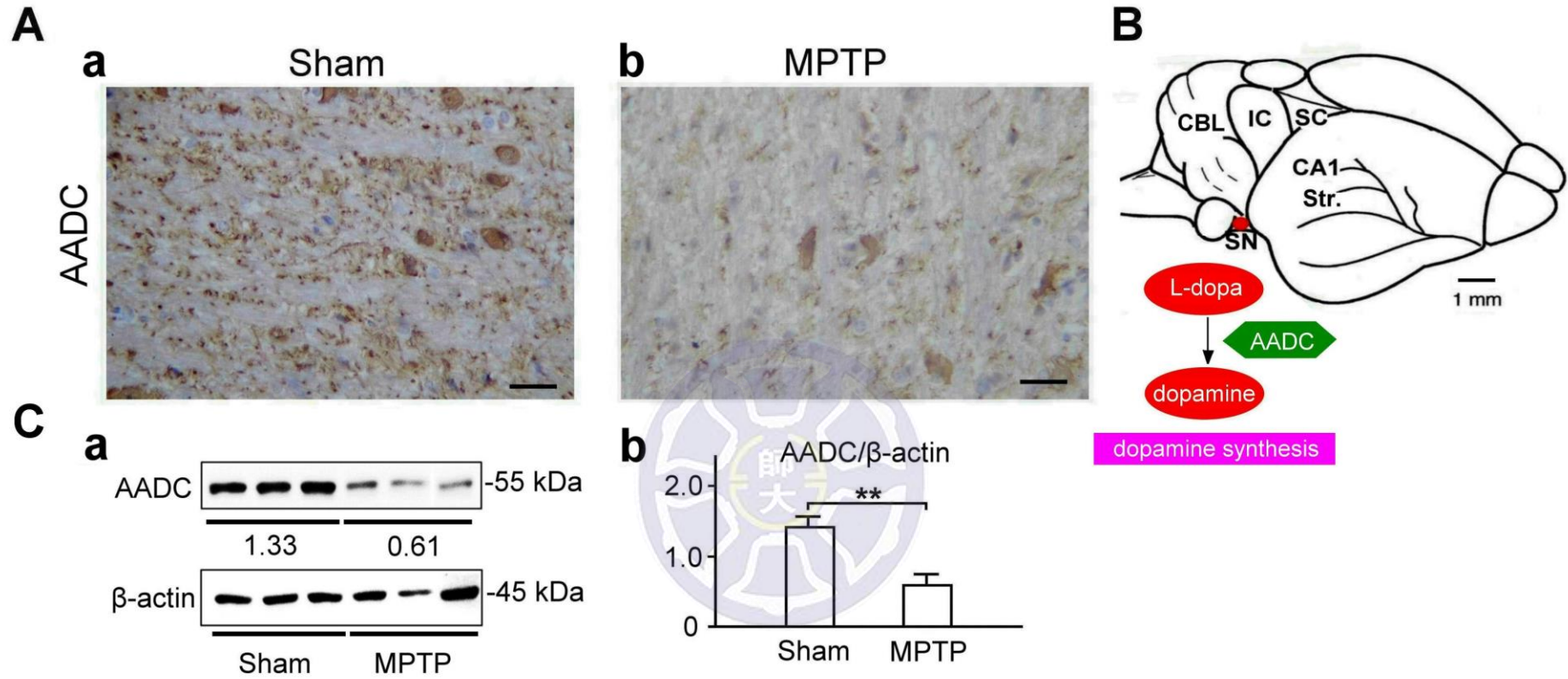


圖 2 | 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元多巴胺合成相關的芳香族 L-胺基酸脫羧酶(AADC)蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著降低。

(A)利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內多巴胺合成相關的芳香族 L-胺基酸脫羧酶 (Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase, AADC)蛋白表現較正常控制組明顯減少 (a：Sham 正常控制組，b：MPTP 實驗處理組)。刻度線長度=10 μ m。(B) 臺灣葉鼻蝠的腦示意圖，紅色部分則表示黑質 (SN)的位置。下圖顯示黑質體的神經元內左多巴 (L-dopa)透過 AADC 催化合成多巴胺 (dopamine)。SN：黑質 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦 (cerebellum)。刻度線長度=10 mm。(C) (a) 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 AADC 蛋白表現較正常控制組明顯減少；(b) 統計分析結果顯示： MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 AADC 蛋白平均表現值較正常控制組 (Sham)顯著降低 ($p<0.01$)。MPTP 實驗處理組和 Sham 正常控制組的蝙蝠數量各為 3 隻，平均數值以平均值 \pm 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM)表示，且用學生 t 檢定 (Student's t-test)來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $p<0.01$ 。

圖 3

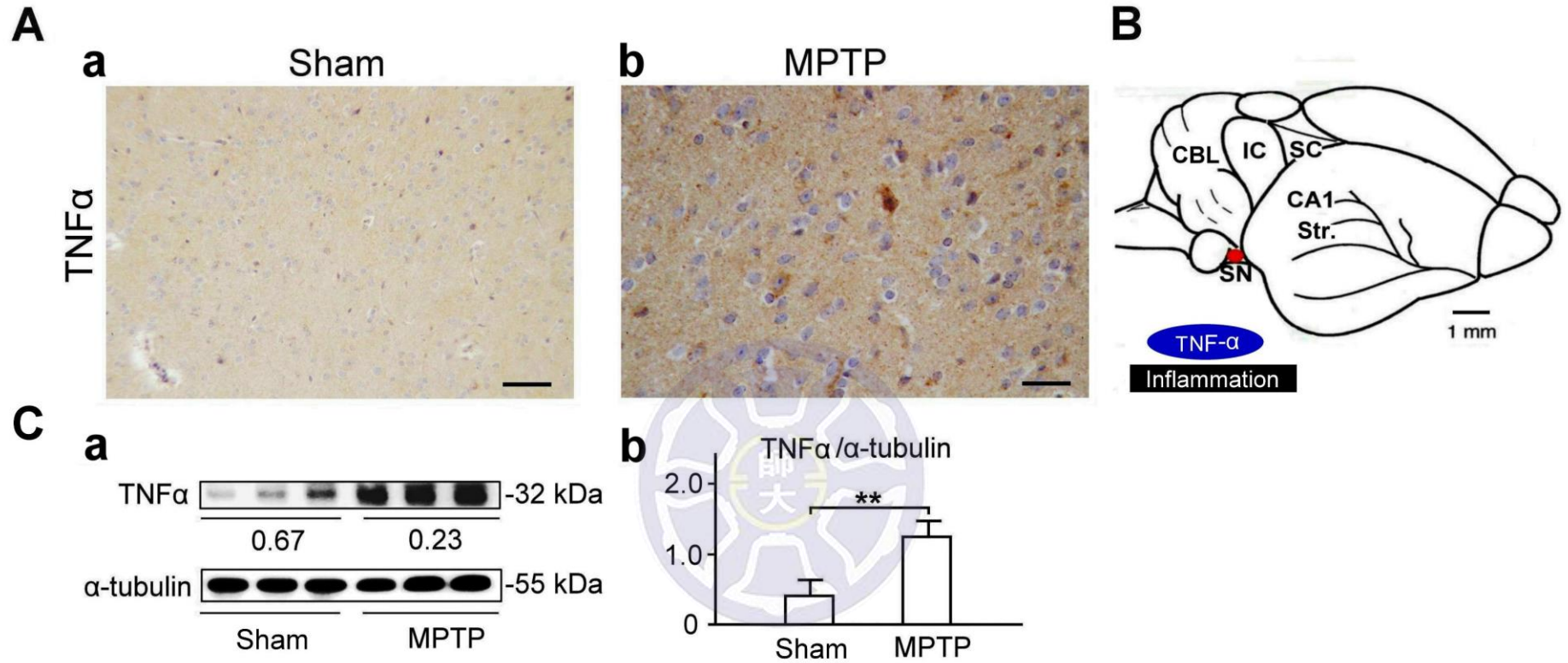


圖 3 | 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元發炎作用相關的腫瘤壞死因子 α (TNF α)蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著增加。

(A)利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內發炎作用相關的腫瘤壞死因子 α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α)蛋白表現較正常控制組明顯增強 (a：Sham 正常控制組，b：MPTP 實驗處理組)。 刻度線長度=10 μ m。(B) 臺灣葉鼻蝠的腦示意圖，紅色部分則表示黑質 (SN)的位置。下圖顯示黑質體神經元內 TNF- α 表現增加代表發炎反應增加。SN：黑質 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦 (cerebellum)。刻度線長度=10 mm。(C) (a) 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 TNF α 蛋白表現較正常控制組明顯增強；(b) 統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 TNF α 蛋白平均表現值較正常控制組(Sham)顯著增加 ($p<0.01$)。MPTP 實驗處理組和正常控制組的蝙蝠數量各為 3 隻，平均數值以平均值 \pm 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM)表示，且用學生 t 檢定 (Student's t-test)來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $p<0.01$ 。

圖 4

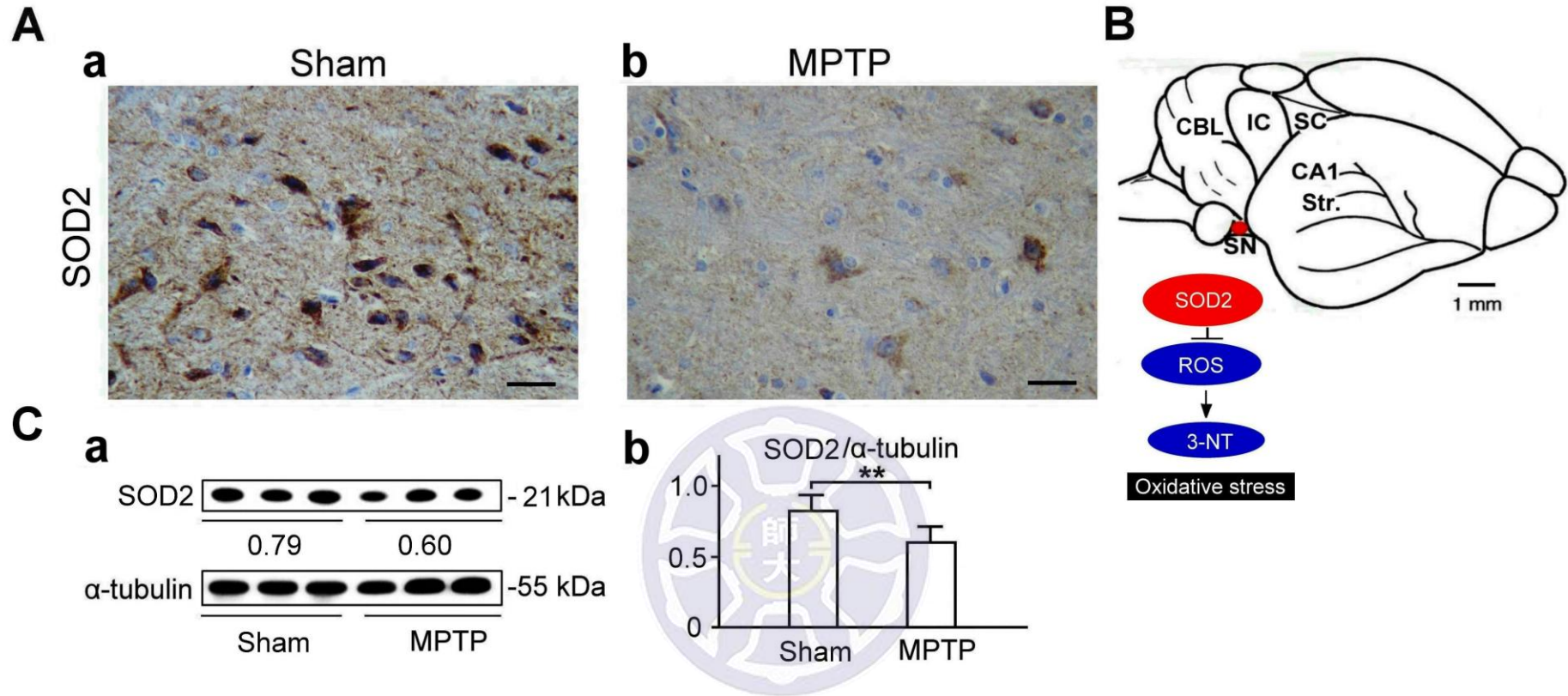


圖 4 | 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2(SOD2)蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著降低。

(A)利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內抗氧化壓力相關的超氧化物歧化酶-2 蛋白 (Superoxide dismutase 2, SOD2)表現較正常控制組明顯降低 (a：Sham 正常控制組，b：MPTP 實驗處理組)。刻度線長度=10 μ m。(B) 臺灣葉鼻蝠的腦示意圖，紅色部分則表示黑質 (SN)的位置。下圖顯示黑質體神經元內 SOD2 表現會抑制活性氧化物(Reactive oxygen species, ROS)以及氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸(3-NT)蛋白表現，SOD2 表現降低代表氧化壓力增加。SN：黑質 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦 (cerebellum)。刻度線長度=10 mm。(C) (a) 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 SOD2 蛋白表現較正常控制組明顯減少；(b) 統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 SOD2 蛋白平均表現值較正常控制組 (Sham)顯著降低 ($p<0.01$)。MPTP 實驗處理組和 Sham 正常控制組的蝙蝠數量各為 3 隻，平均數值以平均值 \pm 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM)表示，且用學生 t 檢定 (Student's t-test)來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $p<0.01$ 。

圖 5

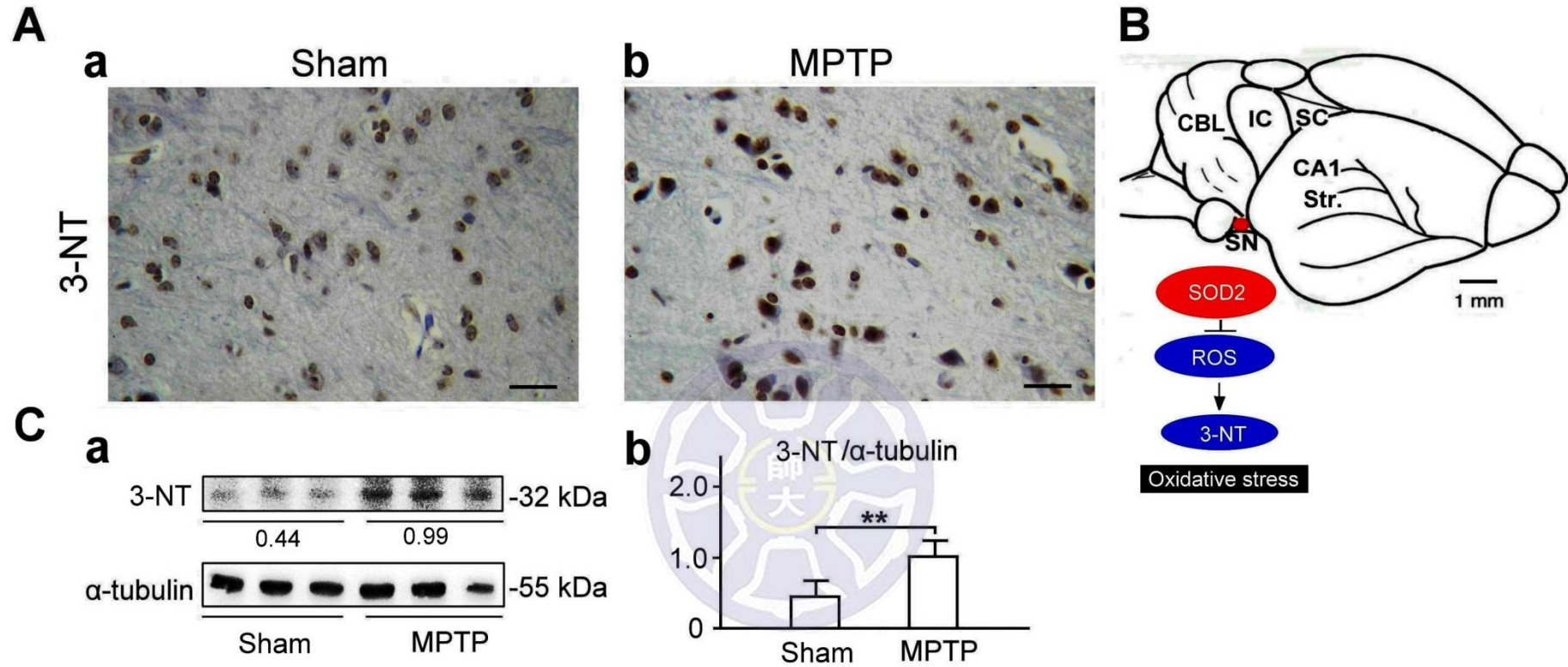


圖 5 | 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸(3-NT)蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著增加。

(A)利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內氧化壓力相關的 3-硝基酪氨酸 (3-Nitrotyrosine, 3-NT)蛋白表現較正常控制組明顯增加 (a：Sham 正常控制組，b：MPTP 實驗處理組)。 刻度線長度=10 μ m。(B) 臺灣葉鼻蝠的腦示意圖，紅色部分則表示黑質 (SN)的位置。下圖顯示活性氧化物(ROS)會增強氧化壓力相關的 3-NT 蛋白表現，3-NT 蛋白表現增強則代表氧化壓力增加。SN：黑質 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦 (cerebellum)。刻度線長度=10 mm。(C) (a)利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 3-NT 蛋白表現較正常控制組明顯增強；(b) 統計分析結果顯示： MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 3-NT 蛋白平均表現值較正常控制組 (Sham)顯著增加 ($p<0.01$)。MPTP 實驗處理組和正常控制組的蝙蝠數量各為 3 隻，平均數值以平均值 \pm 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM)表示，且用學生 t 檢定 (Student's t-test)來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $p<0.01$ 。

圖 6

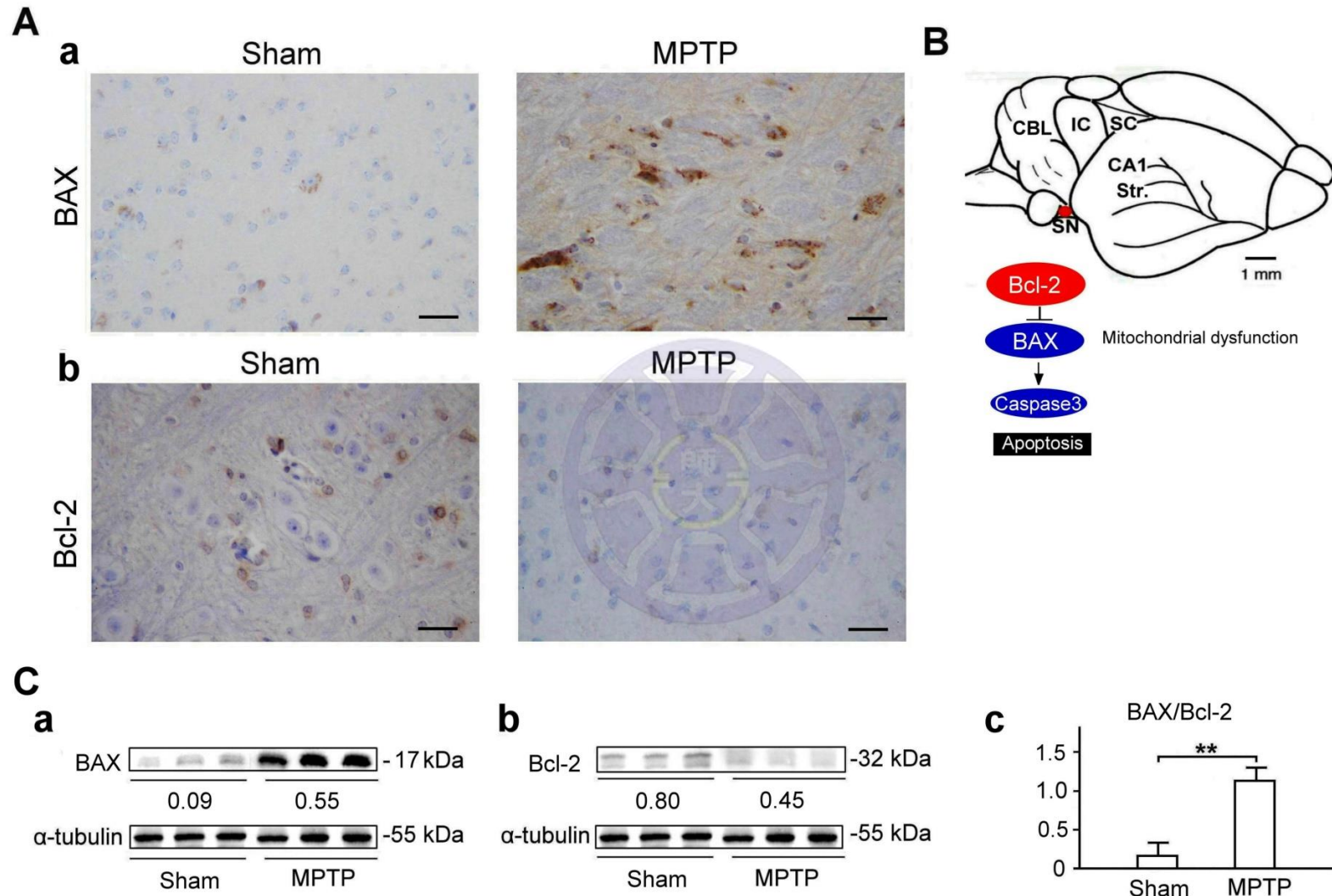


圖 6 | 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元細胞凋亡相關細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白(BAX)/抗細胞凋亡相關細胞淋巴瘤蛋白-2(Bcl-2)的表現比值較 Sham 正常控制組顯著增加。

(A)利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內細胞凋亡相關細胞淋巴瘤聯結 X 蛋白 (Bcl-2- Associated X, BAX) 表現較正常控制組明顯增加；而抗細胞凋亡相關細胞淋巴瘤蛋白-2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 表現較正常控制組明顯減少 (a：Sham 正常控制組，b：MPTP 實驗處理組)。刻度線長度=10 μ m。(B) 臺灣葉鼻蝠的腦示意圖，紅色部分則表示黑質 (SN)的位置。下圖顯示 Bcl-2 會抑制 BAX 表現，而 BAX 則是會促進半胱天冬酶原 3 (Caspase 3)蛋白表現，進而增強細胞凋亡 (Apoptosis)。SN：黑質 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦 (cerebellum)。刻度線長度=10 mm。(C) (a) 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 BAX 蛋白表現較正常控制組明顯增強；而 (b) Bcl-2 蛋白表現則較正常控制組明顯減弱。(c) 統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 BAX/Bcl-2 表現比值較正常控制組 (Sham)顯著增加 ($p<0.01$)。MPTP 實驗處理組和正常控制組的蝙蝠數量各為 3 隻，平均數值以平均值 \pm 平均值標準誤差(standard error of the mean, SEM)表示，且用學生 t 檢定 (Student's t-test)來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $p<0.01$ 。

圖 7

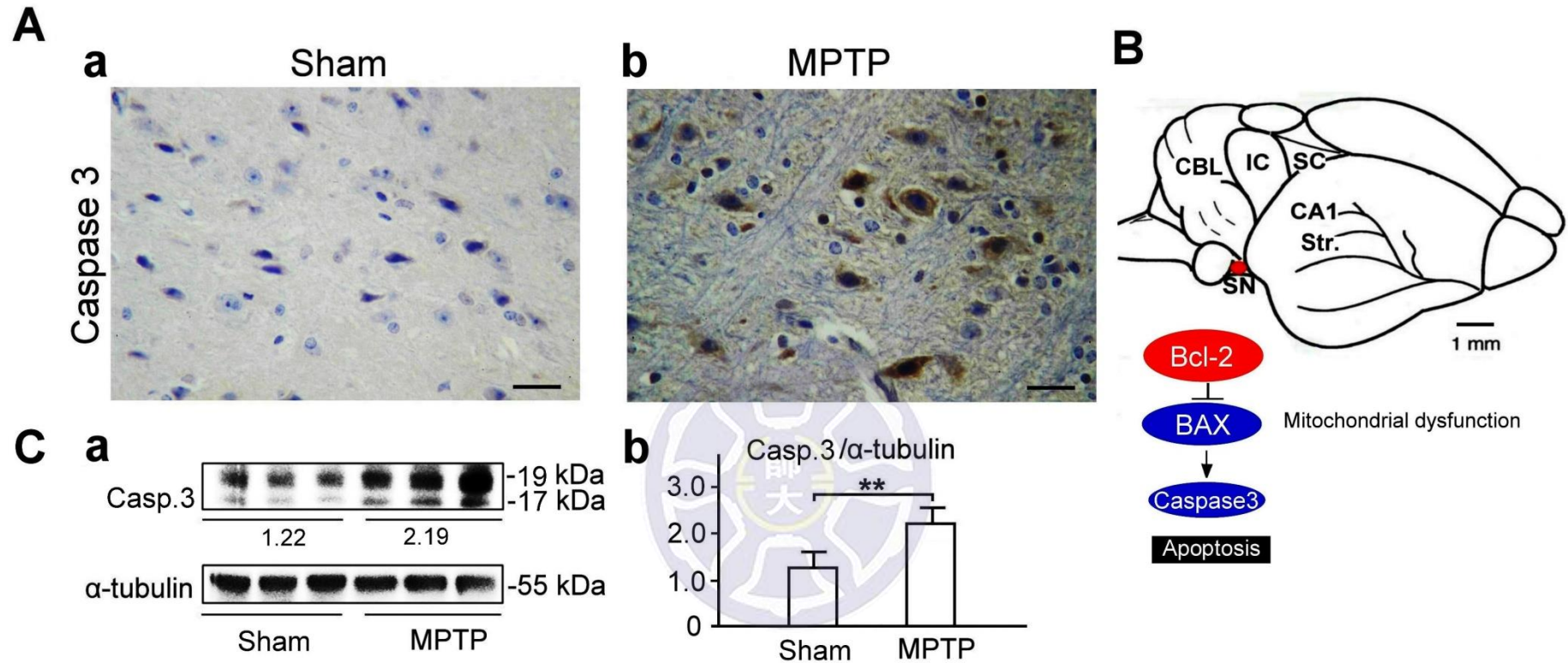


圖 7 | 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組黑質神經元細胞凋亡相關的半胱天冬酶原 3 (Caspase 3) 蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著增加。

(A) 利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內細胞凋亡相關的半胱天冬酶原 3 (Caspase 3) 蛋白表現較正常控制組明顯增加 (a：Sham 正常控制組，b：MPTP 實驗處理組)。刻度線長度 = 10 μ m。(B) 臺灣葉鼻蝠的腦示意圖，紅色部分則表示黑質 (SN) 的位置。下圖顯半胱天冬酶原 3 (Caspase 3) 蛋白表現增強會促進細胞凋亡 (Apoptosis)。SN：黑質 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦 (cerebellum)。刻度線長度 = 10 mm。(C) (a) 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的 Caspase 3 蛋白表現較正常控制組明顯增強；(b) 統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的 Caspase 3 蛋白平均表現值較正常控制組 (Sham) 顯著增加 ($p < 0.01$)。MPTP 實驗處理組和正常控制組的蝙蝠數量各為 3 隻，平均數值以平均值 \pm 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM) 表示，且用學生 t 檢定 (Student's t-test) 來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $p < 0.01$ 。

圖 8

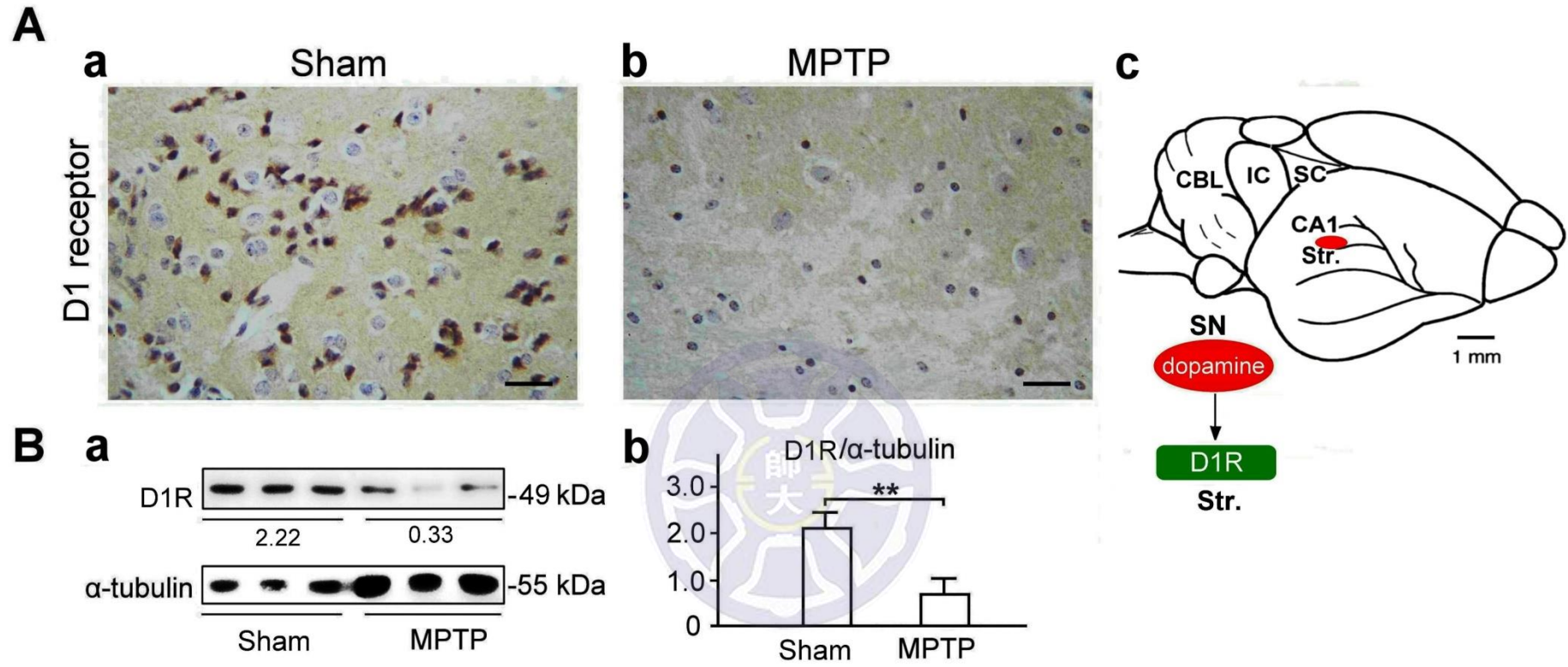


圖 8| 免疫組織化學染色與西方墨點法分析結果顯示臺灣葉鼻蝠 MPTP 實驗處理組紋狀體神經元多巴胺 D1 接受器的蛋白表現較 Sham 正常控制組顯著降低。

(A)利用免疫組織化學染色實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠中腦黑質體神經元內紋狀體神經元多巴胺 D1 接受器的蛋白表現較正常控制組明顯減少 (a：Sham 正常控制組，b：MPTP 實驗處理組)。刻度線長度=10 μ m。(B) 臺灣葉鼻蝠的腦示意圖，紅色部分則表示紋狀體 (Str.)的位置。下圖顯示黑質體合成多巴胺 (dopamine)會作用在紋狀體的多巴胺接受器 (D1R)。SN：黑質體 (substantia nigra)、Str.：紋狀體 (striatum)、CA1：海馬迴第一區 (hippocampus 1 area)、IC：下丘 (inferior colliculus)、SC：上丘 (superior colliculus)、CBL：小腦(cerebellum)。刻度線長度=10 mm。(C) (a) 利用西方墨點法分析實驗結果顯示：MPTP 實驗處理組腦組織的多巴胺接受器(D1R) 蛋白表現較正常控制組明顯減少；(b) 統計分析結果顯示：MPTP 實驗處理組蝙蝠腦組織的多巴胺接受器(D1R)蛋白平均表現值較正常控制組(Sham)顯著降低 ($p<0.01$)。MPTP 實驗處理組和 Sham 正常控制組的蝙蝠數量各為 3 隻，平均數值以平均值 \pm 平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM)表示，且用學生 t 檢定 (Student's t-test)來分析是否有顯著誤差，**代表顯著誤差 $p<0.01$ 。

圖 9

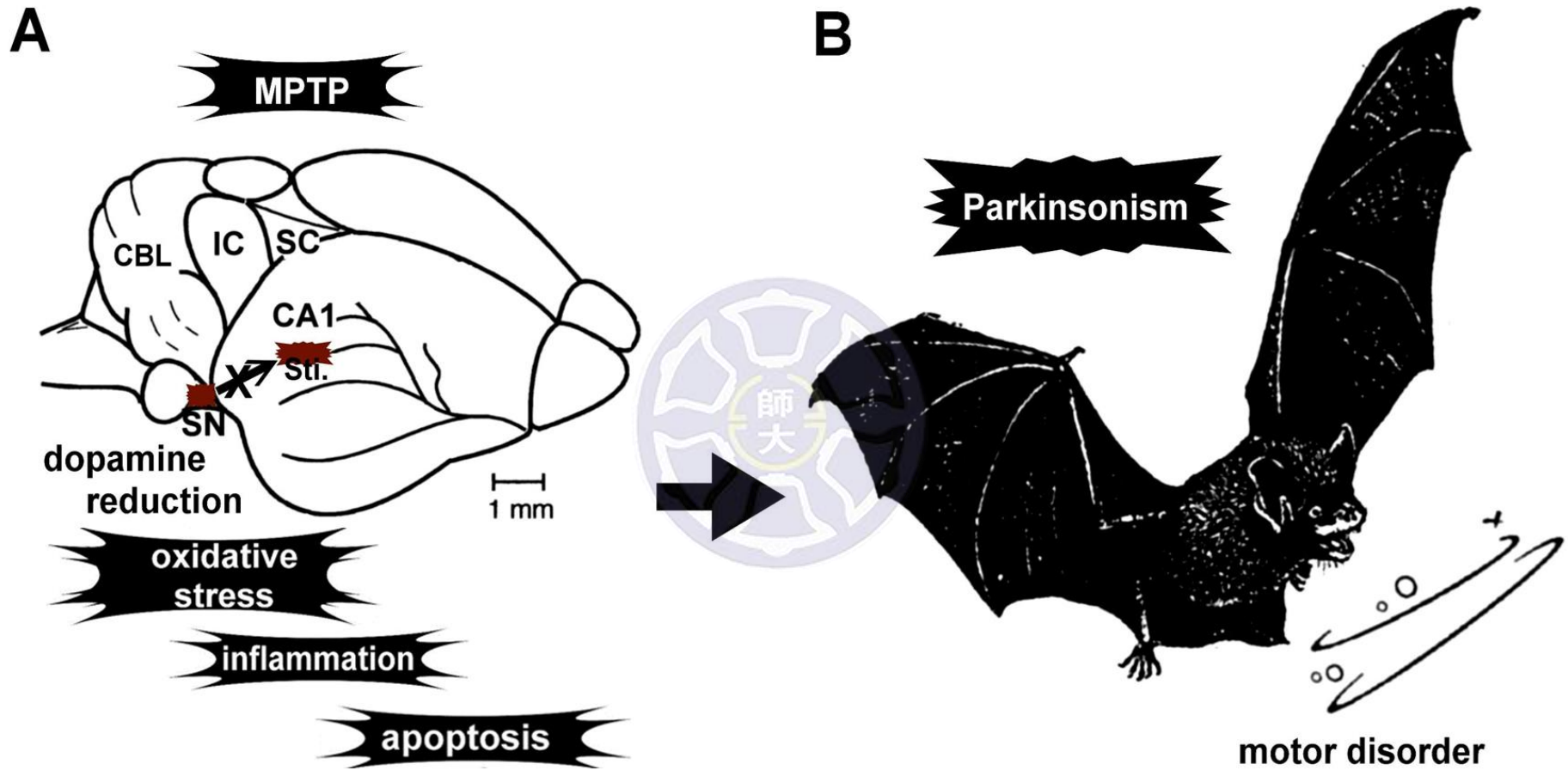


圖 9 | MPTP 引發臺灣葉鼻蝠腦組織神經損傷的神經分子機制。

(A)回聲定位蝙蝠會因為 MPTP 實驗處理造成腦組織產生發炎作用 (inflammation)、氧化壓力 (oxidative stress)、以及細胞凋亡 (apoptosis)，這結果可能導致黑質體 (substantia nigra)神經元損傷，使得神經元合成多巴胺減少，以及紋狀體 (striatum)神經元多巴胺接受器的表現變差，這情形與帕金森氏症病人的病徵非常類似。B：由於 MPTP 實驗處理會使得回聲定位蝙蝠產生運動失調，此現象類似帕金森氏症，這結果說明利用 MPTP 處理回聲定位蝙蝠的動物模式，未來應該可以作為探討帕金森氏症相關研究的新穎實驗動物平台。

