

國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

白藜蘆醇衍生物 SRT1720 在百草枯誘發帕金森氏症實驗  
模式的神經保護機制：針對粒線體功能之研究

Investigating the protective mechanism of SRT1720 in  
mediating paraquat-induced Parkinson's disease model:  
focusing on mitochondrial function

研究生：許庭凰 撰

指導教授：趙知章 博士

黃乃瑰 博士

中華民國一〇六年一月

## 謝 誌

在人生剛邁向第 25 個年頭的此刻，我終於完成了碩士的學業。從對於研究所的渴求、得知考上研究所的喜悅，到課程的艱辛以及研究過程中的辛酸，直到論文完成的這刻，雖然過程起伏不斷，但終於走向了碩士的終點。

此本論文的完成，首先要感謝指導教授 黃乃瑰老師對我不辭辛勞的教導，在研究生涯中一直不斷的指點我方向，並在實驗成功時分享喜悅、在失敗時給予教訓及鼓勵，並給予我非常多的知識，讓我的碩士生活不論是平日亦或是假日都過得非常的充實，這樣的鍛鍊也使我所吸收的知識更加的飽滿。此論文亦感謝指導教授 趙知章老師的教導，在精神上給予我非常大的鼓勵，使我在失落時不選擇放棄。感謝口試委員 楊澄臻老師對於論文精闢的建議，讓我的論文更加完整，楊老師對我的肯定也是讓我更能往前走的動力。

進入碩士班的我，從對一切的無知，成長到能夠拿到碩士學位，都是因為在碩士生涯中有幸遇到許多前輩給予我無私的教導及支持。

感謝衛福部中國醫藥研究所中所有幫助過我的學長姐們，尤其是實驗室的助理們：感謝郁敏、偉豪在我還是碩一新鮮人時不時抽空教導我實驗；感謝澤軒在動物實驗上給我許多的幫忙及建議，也常常在我失落的時候給予我鼓勵；感謝毓如、品淳及輔聲在實驗過程中對我的幫助及對於忙碌的我給予體諒及關心。

感謝政大神科所 R104 實驗室的所有人。特別謝謝焙棊學姊在自己碩二最忙的時候還抽空教我做實驗，謝謝鉉豐學長及光閔學弟在我碩二不在 104 的這段時間將實驗室維持得這麼好，不時給我關心和鼓勵。感謝政大神科所 103 級的同学，即使我在遙遠的中醫所做實驗，但你們從來不會忘記我。謝謝導師 陳紹寬老師，常常因為我實驗上的繁忙而不厭其煩地更改導生聚時間，對於我的未來規劃也給予我許多的建議及支持。謝謝玫汝在我失落的時候給予我建議，謝謝季樺常常關心我並帶來無限歡樂，謝謝碩甫不厭其煩的聽我抱怨實驗又失敗了，謝謝綺翊及暉傑，雖然已在不同道路上但依然給予我溫

暖及支持，能夠認識 103 的你們是我生命中最幸運的事情之一，希望在未來的我們還是能夠像現在這樣互相扶持。特別要感謝最美麗最溫暖的超級大正妹于姐，從進入碩士班的那刻，于姐待我就像對待自己的小孩一樣，總跟我說著所辦就是娘家，讓我在困難或是委屈時都有個歸宿。在我最低潮的時候，于姐總是給予我最溫暖的安慰及擁抱。在我成功的時刻，于姐總是第一個站出來替我開心。這段期間要不是有于姐的幫忙，我的碩士生涯一定走得比現在艱辛百倍。

感謝一路走來的大學同學，三年四班的所有人，沒有你們這些摯友們的支持，我一定不會放棄。感謝高中八人團的姊妹們，雖然因領域不同而不能理解我的哀號，卻依然給予我安慰與陪伴。感謝石牌小家庭，讓我在這段外宿生活有人陪伴我一起整理 data 寫論文，在太晚回家的時候為我留盞燈。

感謝一路陪伴我的男友，雖然常常需要接受我的負面情緒，卻還是給予我溫暖的鼓勵。也常常在我忙碌的時候給予陪伴，未來我們也一起加油！

感謝家人支持我從大學就離鄉在外地讀書，也願意讓我跟隨我興趣而繼續往上就讀。感謝已經回到天上的父親，並將此榮耀獻給父母。

雖然要畢業了，但是在這段時間所學到的事情以及所相遇的人情，絕對不會因此而畢業。終於要卸下學生身分的我，期盼未來能夠發揮生涯所學，以謙虛、負責的態度，並保有童心看待未來每項挑戰，發揮自己的專長，將所吸收的種種能量回饋給這個世界。

許庭凰 謹誌於

國立政治大學 神經科學研究所

2017.02.02

## 中文摘要

帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD) 為目前最普遍的神經退化性疾病之一，該病因主要是由於中腦黑質區的多巴胺細胞的死亡造成運動系統的失能。環境常用農藥百草枯 (Paraquat, PQ) 目前已知是導致帕金森氏症的環境因子之一。它主要作用在粒線體上，阻斷粒線體的功能、造成大量氧化自由基生成、並誘導細胞凋亡的發生。沉默調節因子蛋白 Sirtuin 家族 (Sirtuin Family, Sirt1-Sirt7) 是一群 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) 依賴性去乙酰化酶，具有抗衰老、以及預防神經退化性疾病等能力。SRT1720 是根據天然植物酚類白藜蘆醇製造出來的化學衍生物，具有活化 Sirtuin 的能力。先前研究也顯示 SRT1720 具有增加糖尿病小鼠的存活率、抗腫瘤、抗發炎等功能，但 SRT1720 對於神經退化性疾病的保護性並不清楚。為了解 SRT1720 是否具有對抗 PQ 的細胞毒性，用以評估 SRT1720 是否具有治療帕金森氏症的潛力，本研究使用人類神經瘤母細胞株 (SH-SY5Y) 作為帕金森氏症的離體外實驗模式，來探討 SRT1720 及 PQ 對於細胞的作用及影響。實驗結果顯示，PQ 造成細胞存活率呈劑量反應地下降，而 SRT1720 可以回復因 PQ 所造成細胞存活率的下降、細胞凋亡的產生、粒線體的型態變化，以及降低氧化自由基的生成等。這證明 SRT1720 對細胞具有神經保護的效果。本研究也利用西方點墨法證實了當細胞暴露在 PQ 下，SRT1720 會回復因 PQ 所導致 Sirt1-Sirt7 蛋白含量的下降。其中，大量表現 Sirt1 可以對抗 PQ 造成細胞的死亡。本研究也發現 SRT1720 可回復 PQ 自噬小體在細胞中的堆積情形，利用西方點墨法觀察 SRT1720 可以回復 LC3-I/II 的蛋白質再細胞間的堆積。此外，在對於 20 週大的 C57BL/6 小鼠注射 PQ (10 mg/kg) 及 SRT1720 (0.1mg/kg 或 1 mg/kg)，並利用滾輪及獨木橋試驗觀察其運動行為。結果顯示，SRT1720 可以回復 PQ 所造成運動能力上的下降，並且減緩 PQ 所造成中腦區多巴胺神經元的傷害。綜觀以上結果，在細胞暴露在 PQ 時，SRT1720

或許可以經由保護粒線體功能，使 ROS 生成量達到回復及降低細胞凋亡的發生。同時 SRT1720 也能保持自噬作用的平衡，降低自噬小體在細胞中的堆積。這些機轉也許與 SRT1720 可以保護多巴胺神經元有關。另一方面，由於 Peroxisomal proliferator-activated receptor-coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 與粒線體的生合成與神經保護有關，本實驗也發現 SRT1720 可改變 PGC-1 $\alpha$  去乙酰化的程度，但 SRT1720 對於 Sirtuin 蛋白以及 Sirt1 下游 PGC-1 $\alpha$  的活化與否還需做進一步的調查及研究。此研究顯示 SRT1720 對於保護細胞免於受到 PQ 所引發氧化壓力以及粒線體損傷之神經退化模型提供了一個具有潛力的治療方法。

關鍵字：帕金森氏症、百草枯、SRT1720、粒線體、氧化自由基、自噬作用、Sirtuin Family、PGC-1 $\alpha$



## 英文摘要

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative disorder and mainly affecting the motor system because of the dopamine neuronal death in the substantia nigra. The exposure to environmental neurotoxin paraquat (PQ) is a widely used herbicide. It induces the increase of ROS stress, leads to mitochondrial dysfunction, and results in apoptotic cell death. Epidemiologically, it could be the risk for PD incidence. Mammalian silent information regulator 2 Sirtuin Family (Sirt1-Sirt7) is a NAD<sup>+</sup> dependent deacetylase enzyme and it protects against such as anti-aging and neurodegenerative disease. SRT1720 which derives from resveratrol is able to activate Sirt1. SRT1720 has been reported to improve survival in obese mice, anti-tumor, and anti-inflammatory, but the effect in the neurodegenerative disease it still unknown. We thus proposed if SRT1720 could have neuron-protective effect in PQ-induced toxicity. We used SH-SY5Y cell to evaluate the effect of SRT1720 and PQ. First, we confirmed that PQ could dose- and time-dependently decrease SH-SY5Y cell viability, increase ROS formation, and induce mitochondrial dysfunction. However, SRT1720 pretreatment improved cell viability, decreased apoptosis and ROS formation, and prevented mitochondrial dysfunction in PQ-treated SH-SY5Y cells. By Western blot analysis, SRT1720 pretreatment could preserve Sirt1-Sirt7 protein contents during PQ intoxication. In autophagy studies, we also found that SRT1720 could reduce PQ-induced autophagic vacuoles accumulation. Furthermore, we also found that intraperitoneally injection of 10 mg/kg PQ once a week in mice can decrease the level of motor activity after 6 weeks

treatment. However, SRT1720 (0.1 mg/kg or 1mg/kg) treatment, reversed PQ-induced motor defect. Taken together, SRT1720 could protect mitochondrial function and improve cell survival during PQ intoxication. This work provided a promising therapeutic way for treating aging-related neurodegenerations, such as PD.

Keyword: Parkinson's disease · Paraquat · SRT1720 · Mitochondria · Reactive Oxygen Species · Autophagy · Sirtuin Family · PGC-1 $\alpha$



# 目 錄

謝 誌.....	II
中文摘要.....	IV
英文摘要.....	VI
目 錄.....	VIII
圖 次.....	XII
縮寫對照表.....	XIV
第一章 緒論.....	1
第一節 帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD).....	2
一、 帕金森氏症之介紹.....	2
二、 帕金森氏症之致病機轉.....	2
三、 帕金森氏症之病因.....	3
第二節 百草枯 (Paraquat, PQ).....	4
一、 百草枯之介紹.....	4
二、 百草枯之分子機轉.....	5
第三節 粒線體 (Mitochondria).....	6
一、 粒線體之構造.....	6
二、 粒線體之功能.....	6
三、 粒線體之型態.....	7
四、 粒線體與氧化壓力.....	8
五、 自由基與抗氧化系統.....	8



第四節	細胞凋亡 (Apoptosis)	9
一、	細胞凋亡之介紹	9
二、	細胞凋亡與自噬作用	11
第五節	自噬作用	11
一、	自噬作用之介紹	11
二、	自噬作用與百草枯的關係	12
第六節	沉默調節蛋白 Sirtuin	13
一、	Sirtuin Family	13
二、	SRT1720	16
第六節	論文目的及研究策略	17
第二章	材料與方法	18
第一節	化學藥品與儀器	19
一、	儀器設備	19
二、	化學藥品	20
三、	抗體	22
四、	質體 Plasmid	22
五、	藥品製備	23
第二節	實驗方法	25
一、	人類神經瘤母細胞株 SH-SY5Y 之培養	25
二、	藥物處理	26
三、	細胞存活率試驗	27
四、	細胞基因轉染技術 (Transfection)	28

五、	細胞固定 .....	28
六、	細胞貼片 .....	29
七、	螢光影像測定 .....	29
八、	大量質體 (Plasmid) 培養及抽取 .....	30
九、	菌種保存 (Banking) .....	31
十、	Caspase-3 活性測試 .....	31
十一、	西方點墨法 (Western Blot) .....	31
十二、	免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP) .....	35
十三、	實驗動物行為檢測 .....	35
十四、	小鼠灌流 (Perfusion) .....	37
十五、	冷凍切片 .....	37
十六、	免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry, IHC) .....	38
十七、	統計分析 .....	38
第三章	實驗結果 .....	40
第一節	PQ 對於 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響 .....	41
第二節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響 .....	42
第三節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞 caspase-3 活性變化 測定 .....	42
第四節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的粒線體型態變化 .....	43
第五節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 生成之影響 .....	43

第六節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 中粒線體膜電位變化之影響 .....	44
第七節	Sirt1 抑制劑 Sirtinol 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞存活率的影響 .....	44
第八節	Sirt1 轉染後前處理 SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響 .....	45
第九節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirtuin 蛋白質之影響.....	45
第十節	CHX (Cycloheximide) 及 Act. D (Actinomycin D) 前處理後，SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響.....	47
第十一節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 PGC-1 $\alpha$ 之影響 .....	48
第十二節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 mtTFA 之影響.....	48
第十三節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SOD1 及 SOD2 之影響 .....	49
第十四節	SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞的自噬作用影響 .....	49
第十五節	Chloroquine(CQ) 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響.....	50
第十六節	小鼠腹腔注射 PQ+SRT1720 對於其運動行為之變化.....	50
第十七節	小鼠腹腔注射 SRT1720 與 PQ 對於黑質緻密部 (Substantia nigra pars compacta, SNc) 中酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH) 含量之影響 .....	51
第四章	討論 .....	52
第五章	結論及未來展望 .....	59
	實驗圖表 .....	60
	參考文獻 .....	91

## 圖 次

圖 一、不同濃度及時間之 PQ 處理對於 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響.....	61
圖 二、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響.....	62
圖 三、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞 caspase-3 活性變化 測定 .....	63
圖 四、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的粒線體型態變化	64
圖 五、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞超氧化物(superoxide) 生成之影響 .....	65
圖 六、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞中過氧化物(peroxide) 生成之影響 .....	67
圖 七、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞粒線體中超氧化物 (Mitochondrial Superoxide)生成之影響.....	69
圖 八、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞粒線體膜電位變化之 影響 .....	71
圖 九、Sirt1 抑制劑 Sirtinol 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的細胞存 活率影響 .....	73
圖 十、轉染 hSirt1 對前處理 SRT1720 對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的細胞 存活率影響 .....	74
圖 十一、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt1-Sirt7 蛋白質之影響.....	75
圖 十二、Cycloheximide (CHX) 前處理後，測試 SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響 .....	77
圖 十三、Actinomycin D (Act. D) 前處理後，評估 SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響 .....	78

圖 十四、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 PGC-1 $\alpha$ 蛋白質之影響 .....	79
圖 十五、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 PGC-1 $\alpha$ 蛋白去乙酰化程度之影響 .....	80
圖 十六、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 mtTFA 蛋白質之影響.....	81
圖 十七、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SOD1 及 SOD2 蛋白質之影響.....	82
圖 十八、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的 Lamp1、LC3 及 粒線體型態變化 .....	83
圖 十九、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 LC3-II/I 之影響.....	84
圖 二十、前處理 Chloroquine (CQ) 對於 PQ 毒害所造成之 SH-SY5Y 細胞的細 胞存活率影響 .....	85
圖 二十一、以小鼠滾輪試驗 (Rotarod test) 測試 SRT1720 對於 PQ 所造成行為 之影響 .....	86
圖 二十二、以平衡木試驗 (Beam walk test) 測試 SRT1720 對於 PQ 之作用	87
圖 二十三、施打 SRT1720 及 PQ 對於小鼠體重變化的影響.....	88
圖二十四、SRT1720 與 PQ 對於小鼠中腦 SNc 區 Tyrosine hydroxylase (TH) 含 量之影響 .....	89
圖 二十五、SRT1720 與 PQ 關係圖.....	90

## 縮寫對照表

AD	Alzheimer's disease
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
APAF-1	Apoptosis protease activating factor-1
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosine 5'- triphosphate
BBB	Blood-brain barrier
DAT	Dopamine Transporter
ddH <sub>2</sub> O	Double-distilled water
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal bovine serum
GPe	External segment of globus pallidus
GPi	Internal segment of globus pallidus
GPx	Glutathione peroxidase
HD	Huntington's disease
HE	Dihydroethidium
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mtTFA	Mitochondrial transcription factor A
NTFs	Nuclear transcription factors
Omi/HtrA2	Omi stress-regulated endoprotease/high temperature

	requirement protein A2
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Parkinson's disease
PGC-1 $\alpha$	Peroxisomal proliferator-activated receptor-coactivator 1 $\alpha$
PI3K	Partner class III phosphoinositide 3-kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PQ	Paraquat
PVDF	Polyvinylidene difluoride
ROS	Reactive oxygen species
RSV	Resveratrol
Sirtuin	Silent information regulator 2
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI
SNc	Substantia nigra pars compacta
SOD	Superoxide dismutase
TCA	Tricarboxylic acid cycle
TEMED	Tetramethylethylenediamine
UPS system	Ubiquitin - Proteasome system





## 第一節 帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD)

### 一、 帕金森氏症之介紹

神經退化性疾病 (Neurodegenerative disease) 主要包含帕金森氏症 (Parkinson's disease, PD)、阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD)、亨丁頓氏症 (Huntington's disease, HD)、肌萎縮性脊髓側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等。神經退化性疾病特徵在於特定的神經細胞群喪失，導致認知或運動功能的喪失。

帕金森氏症為神經退化性疾病的一種，它是全球發生率第二高的神經退化性疾病，僅次於阿茲海默症，成為目前全球人口老化須重視的主要問題 (Wesseling et al., 2013)。帕金森氏症於 1817 年由英國醫師詹姆士·帕金森 (James Parkinson) 於其論文《Essay on the Shaking Palsy》中描述六位患者在臨床上表現有不隨意顫抖、肢體前彎、肌力萎縮且走路會越走越快像似跑步等徵兆，且智力及感官似乎無損傷 (Parkinson, 2002)，但當時並未受到大眾關注。直到 1861 年，法國科學家 Charcot 才將此疾病以帕金森命名之 (Goetz, 1986)，並受到越來越多人的關注。帕金森氏症的患者在臨床上的症狀包含的四大徵狀：靜止顫抖 (Tremor at rest)、肌肉僵硬 (Rigidity)、運動不能或運動遲緩 (Akinesia or bradykinesia) 以及平衡失調 (Postural instability) (Goetz, 1986; Jankovic, 2008)。

### 二、 帕金森氏症之致病機轉

帕金森氏症的病理特徵被認為是位於中腦基底核 (Basal ganglia) 黑質緻密部 (Substantia nigra pars compacta, SNc) 區中的多巴胺神經元 (dopa

minergic neuron) 的喪失所造成 (Bjorklund and Dunnett, 2007; Schultz, 2010; Feng et al., 2015)。在解剖學中，基底核的組合大致上被分為位於前區的紋狀體 (Striatum) 和後區的視丘下核 (Subthalamic nucleus) 及黑質區。基底核位於大腦皮質下方，主要功能為掌管自主運動的控制，且同時也參與情緒、記憶及獎勵學習等高級認知功能的運作。

當訊息從大腦皮質 (Cortex) 傳至基底核時，基底核區有兩條迴路共同參與自主運動功能的控制，一為從紋狀體直接傳至內蒼白球 (Internal segment of globus pallidus, GPi) 與網狀黑質的直接迴路 (Direct pathway)，另一為從紋狀體傳至外蒼白球 (External segment of globus pallidus, GPe)，經傳至視丘下核，再傳至內蒼白球與網狀黑質的間接迴路 (Indirect pathway)。此兩條迴路的訊息會經丘腦 (Thalamus) 整合後，再傳至大腦皮質區。而位於黑質緻密部的多巴胺神經元會通過黑質－紋狀體通路 (Nigrostriatal pathway) 投射到紋狀體，並分泌神經傳遞物質多巴胺 (Dopamine)，來調控此兩條迴路，進而調控個體運動表現。而帕金森氏症的病患因黑質緻密部的多巴胺神經元大量減少，無法分泌多巴胺，造成無法調控迴路，進而形成自主運動不能的現象。研究顯示，當病患出現帕金森氏症的病徵時，黑質緻密部的多巴胺細胞相較正常人幾乎喪失約 50-80%，而分布於紋狀體的多巴胺神經元末梢也喪失約 70-80% 的含量。

### 三、 帕金森氏症之病因

基因缺陷、環境因子、粒線體缺失、蛋白質過度堆積、氧化壓力及發炎反應等，都可能是造成帕金森氏症的原因 (de Lau and Breteler, 2006; Obeso et al., 2010; Exner et al., 2012)。除了上述的原因會造成帕金森氏症之外，環境因素也可能是致病的原因 (Obeso et al., 2010; Polito et al., 2016)。在 1980 年代，因一群毒癮者誤食了海洛英的副產物 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahy

dropyridine) ，產生了類似帕金森氏症的症狀 (PD-like symptoms) ，且在停止吸食後，症狀並未得到改善。隨後的研究證明 MPTP 可進入黑質區，造成多巴胺神經元不可逆性的死亡。此事件發生後，有越來越多的學者投入於環境因子造成帕金森氏症的相關研究。目前發現殺蟲劑 (例如：Rotenone)、除草劑 (例如：Paraquat)、多氯聯苯、有機溶劑及重金屬等都可能是增加罹患帕金森氏症的致病因子 (Feng et al., 2015; Polito et al., 2016) 。

## 第二節 百草枯 (Paraquat, PQ)

### 一、 百草枯之介紹

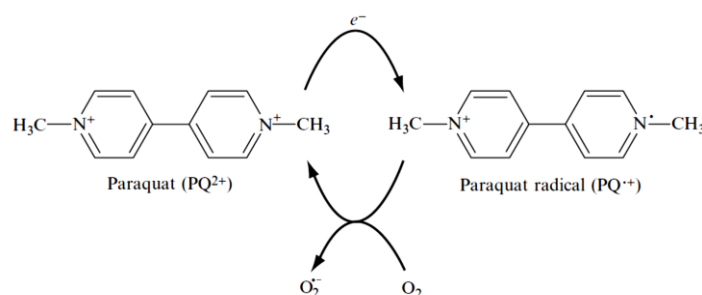
在流行病學的研究中發現，長期暴露在魚藤酮或百草枯等環境因子皆可能造成帕金森氏症 (Tanner et al., 2011) 。百草枯 (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, Paraquat, PQ) 又被稱為巴拉刈、克蕪蹤，為一種屬於速效型的雙吡啶基除草劑 (Bipyridyl herbicide) 。它的作用快速，具廣泛性。百草枯已當作除草劑已有五十年以上的歷史，且被近 130 個國家所使用。

百草枯對於人體及動物皆有強烈的毒性。研究顯示，因百草枯方便取得，所以常有自殺者會以口服的方式自殺，且致死率高於八至九成。雖然百草枯為台灣第三大常用之農藥 (Chang et al., 2012) ，但是目前已有近 20 個國家禁用此藥物。韓國於 2012 年禁用百草枯後，使用農藥自殺率隨之降低 (Myung et al., 2015) 。近年的公衛調查發現，台灣每年約有 546 人死於農藥中毒，其中，約 160 人死於百草枯中毒 (Chang et al., 2012) 。因此，台灣學界呼籲禁用百草枯的聲音也越來越高漲。

百草枯已被證實會引發氧化壓力，造成強烈毒性 (Dinis-Oliveira et al., 2008; Alural et al., 2015)。一直以來，百草枯的研究大多集中於肺、肝及腎的病變 (Gawarammana and Buckley, 2011)，而近年來也越來越多的研究發現百草枯對於神經系統有明顯傷害 (Prasad et al., 2007)，尤其是對於中腦的多巴胺神經元死亡，造成運動能力上的傷害 (Campos et al., 2013)，所以許多研究推論百草枯可能是造成帕金森氏症的原因之一。

## 二、 百草枯之分子機轉

百草枯的結構與 MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium) 相似，其能通過中性胺基酸轉運子 (Neutral amino acid transporter) 通過血腦屏障 (Shimizu et al., 2001)，經由多巴胺轉運子 (Dopamine Transporter, DAT) 進入多巴胺細胞內，經由 carrier 進入粒線體內膜後，抑制在電子傳遞鏈的 Complex I 的作用 (Moretto and Colosio, 2013)。因 Complex I 的功能為將 NADPH 氧化為 NADP<sup>+</sup>，而 PQ<sup>2+</sup> 會比 Complex I 更迅速的與 NADPH 結合，過程大量消耗 NADPH 產生 NADP<sup>+</sup>，形成帶有自由基的百草枯自由基 PQ<sup>•+</sup>，接著，不穩定的 PQ<sup>•+</sup> 會與 O<sub>2</sub> 進行氧化還原成較為穩定的 PQ<sup>2+</sup>，過程中會產生大量的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>，而毒性高且不穩定的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 會經氧化還原形成大量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 OH<sup>-</sup>。而這些毒性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 會造成細胞的 DNA 及蛋白質造成損傷，進而造成細胞的死亡。另外，百草枯已被證實其會經由粒線體來產生大量的 ROS，特別是對於大腦的傷害 (Castello et al., 2007)。



(Drechsel and Patel, 2009)

### 第三節 粒線體 (Mitochondria)

#### 一、 粒線體之構造

粒線體於 19 世紀末被細胞生物學家所發現，由於它具有多線狀 (mitos) 及顆粒狀 (chondros) 等特異形狀，所以被命名為粒線體 (Mitochondria)。粒線體廣泛存在於真核細胞中，是一個具多種重要功能的胞器。粒線體在構造上是一個具有雙層膜的胞器，其構造由外而內分別為：外膜 (Outer membrane)、膜間腔 (Intermembrane space)、內膜 (inner membrane) 及基質 (matrix)。平滑的外膜負責與細胞接觸，並且包裹著具高度皺褶的內膜。而內膜構成的嵴 (Cristae) 可以增加內膜與基質的接觸面積，以利合成更多的 ATP。在正常的狀態下，粒線體會平均分布在細胞質中。它具有方向性及移動性，必要時會聚集在需要 ATP 的胞器附近。

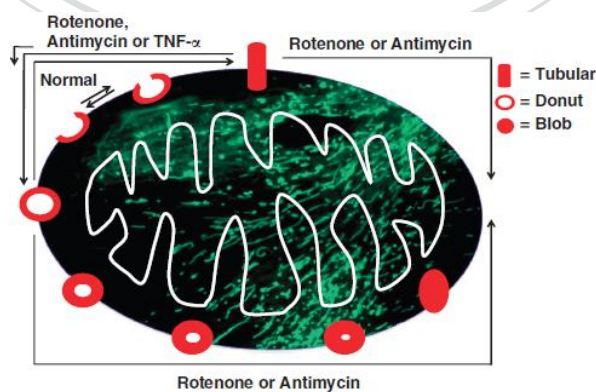
#### 二、 粒線體之功能

粒線體的主要功能為 ATP 的合成 (Perier and Vila, 2012)。細胞的 ATP 有 90% 以上由粒線體合成。在 ATP 的合成過程中，粒線體參與許多生化反應，包括電子傳遞鏈、氧化磷酸化、檸檬酸循環 (Citric acid cycle) 等。葡萄糖在細胞質中完成糖解作用 (Glycolysis)，並進入粒線體的基質中開始進行丙酮酸脫羧 (Pyruvate decarboxylation)，進而形成乙醯輔酶 A 後，開始進行檸檬酸循環。檸檬酸循環又稱克氏循環 (Krebs cycle) 或 TCA 循環 (Tricarboxylic acid cycle)，其中，乙醯輔酶 A 會經檸檬酸循環分解成  $\text{CO}_2$  及氫，氫又會與  $\text{NAD}^+$  和 FAD 結合成 NADH 和  $\text{FADH}_2$ 。而在進入內膜開始進行氧化磷酸化。氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation, OXPHOS) 是由內膜上的呼吸酵素複合體 (Complex) 所形成的電子傳遞鏈，分別為 Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase)、Complex II (Succinate-ubiquinone oxidoreductase)、Complex

III (ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase)、Complex IV (cytochrome c oxidase) 及 ATP 合成酶 (ATP synthase Complex V) 所組成。

### 三、 粒線體之型態

粒線體是一個具有高度動態平衡的胞器，其型態會根據細胞的生理狀態產生不同的形態 (Youle and van der Bliek, 2012)。粒線體在生合成 (biogenesis) 時，為增加粒線體的數量，進而增加 ATP 的產能，所以粒線體會產生分裂 (fission) 的現象，便於質量控制。而當粒線體產生傷害時，粒線體為維持自身平衡，會產生融合 (fusion) 的現象，保護自身不受傷害 (Youle and van der Bliek, 2012; Ni et al., 2015)。而因為粒線體的動態平衡現象表示著粒線體的功能程度，所以有越來越多的學者投入於粒線體型態之研究。在先前的研究中，發現粒線體在正常的情況下會呈現長條狀的 tubular 形狀 (Wasilewski and Scorrano, 2009)，而當細胞遭受氧化壓力進而走向細胞凋亡時，細線體的形狀會變得支離破碎，形成了小圓點 (blob) 的型態 (Youle, 2003)。而在細胞壞死期 (necrosis)，粒線體會呈現腫脹的型態 (Laporte et al., 2007)。之後，學者發現，粒線體除了這些型態外，當細胞遭受較小的壓力或是處於低氧的環境時，粒線體會形成中空形的似甜甜圈 (donut-like) 的形狀 (Liu and Hajnoczky, 2011)。此三種型態在粒線體遭受氧化壓力的傷害程度的位置利用下圖表示 (Ahmad et al., 2013)。



(Ahmad et al., 2013)

在正常的情況下，粒線體呈現 tubular 的形狀。而當細胞開始遭受氧化壓力時，粒線體的型態會漸漸變成 donut-like 的型態。當細胞的氧化壓力開始上升，粒線體的型態會變成 blob 的型態，而後開始產生不可逆性的細胞凋亡 (Ahmad et al., 2013)。

#### 四、 粒線體與氧化壓力

粒線體在製造 ATP 的過程中，即會製造出少量 ROS (Murphy, 2009)。當粒線體的電子傳遞鏈產生功能上的異常時，會產生過量的 ROS，這些 ROS 會去攻擊細胞內的胞器以及 DNA，就會誘發氧化壓力 (Oxidative stress) 的產生，進而對細胞產生氧化損傷 (Oxidative damage) (Gutterman, 2005)。而帕金森氏症的病因也跟粒線體功能異常以及 ROS 的大量生成有關 (Hwang, 2013)。

#### 五、 自由基與抗氧化系統

自由基 (Free radical) 是由化合物的共價鍵經均裂形成具不成對電子的原子或基團。正常的化合物須在成對的電子的情況下才會是安定的狀態，因此自由基會搶奪其他分子或原子的電子，進而達到安定狀態，而被攻擊的分子或原子也會形成自由基，攻擊他人，造成連鎖反應。體內所產生的自由基大多為活性氧，其是體內氧代謝而成的物質，氧化作用多在粒線體中產生，所以體內的 ROS 也大多由粒線體產生。一般的氧化作用中，會產生及少量的 ROS，但外來因子如精緻飲食、菸酒，甚至電磁波、殺蟲劑、除草劑等都會對生物體造成大量的自由基，而常見的自由基對人體的傷害有老化、心血管疾病及神經退化疾病等。ROS 又分為單一態氧  $^1\text{O}_2$ 、超氧化自由基  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、氫氧自由基  $\cdot\text{OH}$ 、過氧化氫  $\text{H}_2\text{O}_2$  等。

體內為防禦自由基的損傷，發展出許多內生性抗氧化酶 (Enzymatic antioxidant) 系統，當自由基產生過多時，這些抗氧化酶即會啟動，以維持動態平衡，減少自由基對人體的傷害。

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)：SOD 是體內的第一線自由基防禦系統，是一種可將超氧化物自由基經由歧化反應生成  $O_2$  及  $H_2O_2$  的酶，其根據所在位置及其所需輔因子的不同而分為 SOD1 及 SOD2。SOD1 存在細胞質中，其需要 Cu/Zn 輔助電子傳遞，SOD2 存在粒線體中，其需要 Mn 輔助電子傳遞。SOD 為體內重要的抗氧化酶，根據先前研究顯示，當小鼠缺失 SOD1 或 SOD2 都會導致體內的超氧化物大量堆積，進而導致癌症以及氧化壓力相關疾病。尤其 SOD2 的缺失更會造成生命期的縮短。先前研究也顯示，提升 SOD 的含量可以降低 PQ 對於大腦黑質區的毒性，進而降低 PD 的產生 (Mollace et al., 2003)。

谷胱甘肽過氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPx)：主要是將  $H_2O_2$  水解成水( $H_2O$ )。GPx 有 5 個 Subtype，而最主要的 Mitochondrial glutathione peroxidase (GPX1) 在大部分的組織都有表現。先前的研究顯示，當 GPx1 基因缺失的小鼠暴露在低氧 (Hyposia) 的狀態，其粒線體膜電位較低，且粒線體的呼吸作用也降低，證實 GPx1 在粒線體的重要性(Hwang, 2013)。

## 第四節 細胞凋亡 (Apoptosis)

### 一、細胞凋亡之介紹

為了維持生理機能的穩態，生物體內會不斷的更新細胞，同時也會將多餘以及功能不全的細胞清除。當生物體為因應發育或者是細胞受損等原因，為維持生



物體的細胞數量，所以需將多餘或是受傷的細胞淘汰。淘汰細胞的過程又分為被動式死亡以及主動式死亡。細胞被動的死亡方式稱為細胞壞死 (Necrosis)，細胞壞死的原因是因為物理性或是化學性的外在刺激，導致細胞惡性死亡，其細胞特徵為細胞膜破裂、粒線體腫脹等。而主動式的細胞死亡方式稱為細胞凋亡 (Apoptosis)，是由細胞內部產生的刺激訊號，使細胞有計畫性的走向死亡，因此細胞凋亡又被稱為計畫性死亡 (Programme cell death)。

細胞凋亡又分為外因性路徑 (Extrinsic pathway) 以及內生性路徑 (Intrinsic pathway)。外因性路徑又稱為死亡接受路徑 (Death receptor pathway)，因細胞膜上有死亡受體 (Death receptor)，當死亡配體 (Death ligand) 與死亡受體的結構區域結合，並產生訊號，使啟動下游訊息並形成死亡誘導訊號複合體 (Death-inducing signaling complex, DISC) 後，DISC 會促使下游的 precaspase-8 被剪切並活化成 caspase-8，並引發細胞凋亡反應。目前主要發現的外因性路徑有 TNF 以及 Fas 等。內因性路徑又稱粒線體路徑 (Mitochondrial pathway)，當細胞受到壓力或者刺激時，促細胞凋亡蛋白 BAX、BAK 會寡聚化 (Oligomerization)，並促使粒線体外膜的通透性增加，使得粒線體內的細胞色素 C (Cytochrome C)、Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI)、Omi/HtrA2 (Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2) 等釋出至細胞質，而 Cytochrome C 會與 APAF-1 (Apoptosis protease activating factor-1) 結合形成凋亡小體 (Apoptosome)，Apoptosome 會再與 precaspase-9 結合，並剪切 precaspase-9 形成具活性的 caspase-9，caspase-9 會再引發 caspase 家族例如 precaspase-3、precaspase-7 等，使其剪切形成 caspase-3、caspase-7，使得細胞進行有程序性的蛋白質裂解，最終完成細胞凋亡。而細胞為了防止 caspase 家族隨意引發細胞凋亡，細胞內的 IAPs

(Inhibitor of apoptosis proteins) 會去抑制 Apoptosome 活性。為防止 IAPs 抑制細胞凋亡，從粒線體釋放出來的 Smac/DIABLO 與 Omi/HtrA2 會去抑制 IAPs，使得細胞凋亡正常進行。

## 二、 細胞凋亡與自噬作用

細胞凋亡與自噬作用兩者之間存在著不可分割且複雜的調控方式，其兩者能被共同激活，並享有多個共同調節因子 (Thorburn, 2008)。先前研究指出，細胞凋亡與自噬作用的上游可能為相同的分子，例如 p53 可以激活細胞凋亡的產生，同時也誘導自噬作用的活化，而自噬作用的上游蛋白 Beclin 1 也對細胞凋亡蛋白 Bcl-2 有交互作用。先前研究顯示，PQ 阻斷 Autophagic flux 會促進細胞凋亡的產生 (Garcia-Garcia et al., 2013)，但目前為止，自噬作用及細胞凋亡的互相調控方式還須作進一步的釐清。自噬作用的詳細介紹參閱第五節之內容。

## 第五節 自噬作用

### 一、 自噬作用之介紹

在真核細胞中，分解細胞中多餘蛋白質以及老化胞器的系統主要有兩種，一種為由泛素 (Ubiquitin) 及蛋白酶 (Proteasome) 所組成的泛素-蛋白酶分解系統 (Ubiquitin - Proteasome system, UPS system)，而另一種是由溶酶體 (Lysosome) 內的酵素所降解的自噬作用系統 (Autophagy system)。

自噬作用 (Autophagy) 是一種藉由溶酶體將細胞內異常的蛋白質或是老化的胞器等細胞廢物清除，以維持細胞存活以及細胞內代謝平衡的過程。自噬作用主要分為四個階段，分別為：自噬膜 (Phagophore) 的產生、自噬體 (Autophagosome) 的形成、自噬體與溶酶體的融合、以及自噬體的降解

(Degradation)。當細胞發出養分不足等訊號後，在細胞質中的 Vps34 蛋白活化，Vps34 為 Partner class III phosphoinositide 3-kinase (PI3K)，其會與 Beclin1、Atg14L 等結合，形成 Class III PI3K Complex，並促使形成一個彎月狀的雙層膜 (Isolation membrane)，這個膜會逐漸擴大，並且將被 SQSTM1 所標定的待降解蛋白所包裹住。在形成膜的過程中，平常位於細胞質中的 LC3-I 會與 phosphatidyl-ethanolamine 結合形成 LC3-II，並嵌到膜上，以幫助膜的延展。當這個雙層膜漸漸地包裹住待降解的蛋白後，即形成自噬體。而自噬體會與溶酶體進行融合，形成自噬溶小體 (Autolysosome)，藉由溶酶體的水解酵素來分解老舊胞器或蛋白質，使其分解形成小分子。而這些小分子物質 (如胺基酸) 則可以再回收利用成為細胞運作所需的材料。

## 二、自噬作用與百草枯的關係

自噬作用是一種細胞的自我保護機制，其可抑制不正常蛋白質的堆積，也與細胞的生存與否有關。當自噬作用運作不正常，會導致細胞內老舊的廢物無法清除，造成蛋白質過度堆積。自噬作用的異常也與癌症、心肌疾病以及神經退化性疾病等有關 (Kondo and Kondo, 2006; Martinez-Vicente and Cuervo, 2007; Nakai et al., 2007)。先前研究顯示，在 SH-SY5Y 細胞中，PQ 會導致自噬體在細胞質中的堆積。在星狀細胞中，PQ 會抑制自噬體的產生，進而造成標定有 SQSTM1 的蛋白無法被降解。而同樣是神經毒害物的魚藤酮 (Rotenone)，在神經細胞中抑制自噬作用的原因是根據抑制了 Lysosome 的功能 (Mader et al., 2012)，使得細胞內蛋白質無法被降解，而形成  $\alpha$ -Synuclein 的堆積，甚至導致神經細胞的死亡。但是目前為止，PQ 在自噬作用的作用位置還不能確定，但已經有研究指出 PQ 所造成的自噬作用異常會導致細胞引起細胞凋亡的發生 (Niso-Santano et al., 2011)。

## 第六節 沉默調節蛋白 Sirtuin

### 一、 Sirtuin Family

Sirtuin (Silent information regulator 2) 是一種 NAD<sup>+</sup> dependent protein deacetylase，主要負責轉錄機制的調節蛋白 (Boutant and Canto, 2014)。Sirtuin 一開始是在 Yeast (*S. cerevisiae*) 中被發現，並發現其具有調控生命進程等功能，且隨後在較高等的動物及哺乳類中都有發現 Sirtuin 的同源基因 (homolog) (Schlicker et al., 2008)。在哺乳類動物中，目前已被發現 Sirtuin 共有七種 subtype，分別為 Sirt1~Sirt7，它們有各自的分布位置、功能以及標的蛋白。其中，Sirt1 表現於細胞核及細胞質中，Sirt2 表現於細胞質中，Sirt3、Sirt4、Sirt5 表現於粒線體中，Sirt6 與 Sirt7 表現於細胞核中 (Houtkooper et al., 2012)。目前已知 Sirt1-3 對受質 (Substrate) 的去乙酰化功能較為強大，而 Sirt4-6 對受質的去乙酰化功能較為微弱 (Takumida et al., 2016)，而 Sirt7 的功能目前還不清楚。目前，Sirtuin 被發現其與 Cell cycle、細胞質間的訊息傳遞、熱量限制、人體老化等有關。在臨床上也發現其與代謝疾病及癌症相關。它們的作用簡述如下：

#### Sirt1

Sirt1 可以經由去乙酰化(Deacetylation)的方式活化 PGC-1 $\alpha$  (peroxisomal proliferator-activated receptor- coactivator 1 $\alpha$ )，藉此來降低 ROS 及降低神經退化疾病的產生 (Karagiannis and Ververis, 2012)。PGC-1 $\alpha$  是調控粒線體生合成的重要分子，它是 PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 的共活化因子 (Coactivator)。Sirt1 將 PGC-1 $\alpha$  活化後，PGC-1 $\alpha$  會在細胞核中調控 mtTFA (Mitochondrial transcription factor A) 基因的啟動子 (Promoter) 核轉錄因子 NTFs (Nuclear transcription factors)，促進 mtTFA 蛋白的轉錄，而 mtTFA 會被送出細胞核，並進入粒線體中，調控粒線體的生合成 (Ventura-Clapier et al., 2008)。Sirt1 具有抗氧化的作用已被許多研究證實。當

增加 Sirt1 的表現可以促進 PGC-1 $\alpha$  及 FOXO3 的產生，並且增加抗氧化蛋白的表現 (Lavu et al., 2008)，使得 ROS 得以被清除。而不僅在神經退化性疾病，在哺乳類動物之研究中也發現 Sirt1 也可以經由抑制 NF- $\kappa$ B 來達到降低發炎反應的作用 (Busch et al., 2012)。而也有研究指出 Sirt1 可以經由抑制 p53 來抑制細胞凋亡，在細胞質中，Sirt1 以直接作用在 p53 蛋白的 lysine 382 位點，直接抑制 p53 蛋白的活性，進而達到抑制細胞凋亡的產生 (Jianyuan Luo, 2001)。而在細胞核中，Sirt1 作用在 histone 的 H3K9 上，促使該位點去乙醯化，使得 DNA 與 histone 纏繞得更緊，讓該位點的 DNA 無法被轉錄及轉譯成 p53 蛋白 (Feng et al., 2015)。

#### Sirt2

Sirt2 的表現主要出現在腦部，尤其是在大腦皮質、紋狀體、海馬迴以及脊髓中。根據研究顯示，Sirt2 在細胞質中的主要功能為調節微管 (Microtubule) 的乙醯化。

#### Sirt3

Sirt3 位於粒線體中，並且為粒線體中最主要的去乙醯化酶 (Sack and Finkel, 2012)。根據研究顯示，Sirt3 主要對粒線體蛋白質的賴氨酸 (lysine) 有去乙醯化的作用，且 Sirt3 可透過清除 ROS 的方式提升粒線體對於氧化壓力的適應能力 (Chen et al., 2014)。

#### Sirt4

Sirt4 是粒線體的 ADP-核糖基轉移酶 (ADP-ribosyltransferase)，其可抑制粒線體谷氨酸脫氫酶的活性，調節胰島素的分泌。先前研究顯示，在肝細胞及肌肉細胞中，Sirt4 可以調節粒線體的基因表現 (Nasrin et al., 2010)。

## Sirt5

Sirt5 位於粒線體中，先前研究顯示，Sirt5 可對 Cytochrome C 去乙醯化。研究發現，將老鼠的 Sirt5 基因剔除，發現小鼠的肝臟中 CPS1 (Carbamoyl-Phosphate Synthase 1) 的琥珀醯化 (Succinylation) 增加，表示 Sirt5 除了有去乙醯化的功能外，還具有琥珀醯化的功能 (Schlicker et al., 2008)。

## Sirt6

Sirt6 與細胞的壓力應激 (Cellular stress resistance)、基因組的穩定 (Genomic stability) 以及老化有關。Sirt6 位於細胞核中。Sirt6 被認為可以調節染色質的端粒，其可藉由清除 H3K9 的乙醯基的方式進而調節端粒。而端粒與基因組的穩定度有關，當端粒的功能不全，可能會造成腫瘤的發生 (LaGuire and Reaves, 2013)。研究顯示，Sirt6 也與細胞週期有關。

## Sirt7

Sirt7 位於細胞核中。目前對於 Sirt7 的研究還不清楚，只知道其參與了 RNA polymerase I 的 transcription (Ford et al., 2006)。

以下以 Villalba 在 2012 發表的論文中的圖表作為統整：

Localization, substrates, functions and enzyme activities of different sirtuins

Sirtuin	Subcellular localization	High tissue expression	Main substrates	Functions	Enzyme activity
SIRT1	Nuclear and cytosolic	Brain, skeletal muscle, heart, kidney and uterus	Histones H1, H3 and H4 Transcription factors p53, FOXO family, Ku70, p300, NF- $\kappa$ B, NAC-1a, PPAR- $\gamma$ , UCP2 Acetyl-CoA synthetase 1	Cell survival, lifespan regulation, metabolism regulation, inflammation, oxidative stress response	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase
SIRT2	Cytosolic and nuclear	Brain	$\alpha$ -tubulin	Cell cycle regulation, nervous system development	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase
SIRT3	Mitochondrial, nuclear and cytosolic	Brain, heart, liver, kidney and brown adipose tissue	Acetyl-CoA synthetase 2 Isocitrate dehydrogenase 2 Ku70, FOXO 3a, MnSOD, Mitochondrial ribosomal protein L10 Long-chain acyl-CoA deshydrogenase 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 Succinate dehydrogenase, NADH:quinone oxidoreductase	Regulation of mitochondrial metabolism	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase
SIRT4	Mitochondrial	Pancreatic $\beta$ -cells, brain, liver, kidney and heart	Glutamate dehydrogenase	Regulation of mitochondrial metabolism,	ADP-ribosyl transferase
SIRT5	Mitochondrial	Brain, testis, heart muscle and lymphoblast	Cytochrome c Carbamoyl phosphate synthetase 1,	Apoptosis	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase Desuccinylase Demalonylase
SIRT6	Nuclear, associated to heterochromatin	Muscle, brain, heart, ovary and bone cells (absent in bone marrow)	Histone H3 TNF- $\alpha$ PAPRI	Genome stability, DNA repair	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase ADP-ribosyl transferase
SIRT7	Nucleolar	Peripheral blood cells, CD33 <sup>+</sup> myeloid bone marrow precursor cells	RNA polymerase I p53	Regulation of rRNA transcription, cell cycle regulation	NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase

(Villalba and Alcain, 2012)

## 二、 SRT1720

SRT1720 為根據白藜蘆醇 (Resveratrol, RSV) 之結構所製造出來的化學衍生物，兩者皆具有活化 Sirt1 的特性 (Milne et al., 2007)。白藜蘆醇為天然植物酚類，具有活化 Sirt1 的特性，可提高胰島素的敏感性、增加粒線體的含量、延長高熱量飲食老鼠的生命等。RSV 具有神經保護作用，因為在大鼠的動物模式中發現可以減緩 MPP+ 對於大腦多巴胺細胞的氧化壓力及細胞凋亡 (Bournival et al., 2009)。先前研究發現，SRT1720 對於活化 Sirt1 活性的效率高於 RSV 及其他化學衍生物 (例：SRT1460、SRT2183) (Milne et al., 2007)。而 SRT1720 能增加高熱量飲食的老鼠的壽命，及降低脂肪肝的發生，SRT1720 也具有抗發炎的作用，可降低 NF- $\kappa$ B 的表現量。SRT1720 可透過活化 Sirt1 的方式藉此促進粒線體生合成 (Funk et al., 2010)，進而達到神經保護及延緩老化的作用。

## 第六節 論文目的及研究策略

由於帕金森氏症為全球第二多人罹患的神經退化性疾病，但截至目前為止，帕金森氏症在臨床上的治療效果有限，所以尋找新的治療方法仍有其急迫性。本研究的目的為建立以 PQ 誘導帕金森氏症的離體外模型，進而從探討 PQ 對於細胞中粒線體的作用機制，以及 PQ 在細胞凋亡及自噬作用的關聯。同時也探討 SRT1720 對於 PQ 毒性是否具有治療潛力，並研究 SRT1720 對於神經保護的機轉。本實驗使用人類神經瘤細胞株 SH-SY5Y 細胞作為檢測藥物反應的細胞模型。此外，本研究進一步將 PQ 及 SRT1720 利用腹腔注射之方式投予小鼠，並利用行為測量及大腦切片等方式檢視 SRT1720 是否能夠保護中腦多巴胺神經元不受 PQ 之毒害，進而評估 SRT1720 作為帕金森氏症治療藥物的潛力。

本研究的實驗設計如下列所述：

1. 針對PQ及SRT1720對於SH-SY5Y細胞株的存活率，以及其粒線體型態、功能及ROS生成量探討。
2. 針對PQ及SRT1720對於SH-SY5Y細胞株的Sirtuin Family蛋白質含量之探討
3. 針對SRT1720對於SH-SY5Y細胞株的生理作用位置之探討
4. 針對PQ及SRT1720對於SH-SY5Y細胞株中自噬作用的自噬泡滯留的探討
5. 針對PQ及SRT1720對於SH-SY5Y細胞株中Sirt1、PGC-1 $\alpha$ 等蛋白的表現量變化之探討
6. 利用小鼠動物模型探討PQ及SRT1720對於小鼠運動行為及中腦多巴胺神經元之影響





# 第二章 材料與方法

## 第一節 化學藥品與儀器

### 一、 儀器設備

儀器名稱	型號	製造廠商
離心機 (Centrifuge)	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Germany
離心機 (Centrifuge)	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Germany
倒立式顯微鏡 (Inverted Microscope)	Axiovert25	Zeiss, Germany
迴轉式恆溫震盪器	Model 905	Hotech, Taiwan
無菌操作台	BSC-3/ 4/ 5/ 6	Chih Chin, Taiwan
二氧化碳培養箱 (Incubator)	MCO-18AIC	Sanyo, Japan
恆溫水槽	BL-720D	Yihder, Taiwan
平面振盪器	IBI Scientific BWBA115S	Stovall Life Science, USA
酸鹼度計 (PH meter)	PB-11	Denver Instruments, USA
盤式分光光度計	PowerWave X 340	Bio-Tek Instrument, USA
多功能全光譜分析儀	SpectraMax M5	Molecular Devices, USA
雷射掃描共軛焦顯微鏡 (Confocal laser-scanning microscope)	Zeiss LSM 780	Zeiss, Germany
螢光顯微鏡 (Fluorescence microscope)	Leica Axiovert 200M	Leica, Germany
冷光偵測儀	GloMax® 96 Microplate Luminometer	Promega, USA
超微量核酸定量光譜儀 (NanoDrop)	ND-1000	Thermo, USA
感光底片	Fuji medical X-ray film	FujiFilm, Japan
洗片機	X-OMAT 2000	Kodak, Japan
小鼠滾輪測試儀 (Rota-rod)	47600	Ugo Basile, Italy
冷凍切片機	CM3050 M	Leica, Germany

## 二、 化學藥品

藥品名稱	Cat. No.	廠牌
2-Mercaptoethanol	M7154-250ML	Sigma
50x protease inhibitor cocktail	11873580001	Roche
Acetic acid	1.00063.2500	Merck
Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1	10681.01	Serva
Agar	J637-1KG	Amresco
Albumin	ALB001.100	BioShop
Ammonium persulfate 98+%	A9164-100G	Sigma
Annexin V-FITC	K101-400	BioVision
Aqua poly/Mount	18606	Polysciences, Inc
Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent kit	5000116	Bio-Rad
Caspase-3 Fluorometric Assay Kit	K105-100	Bio Vision
H <sub>2</sub> DCFDA	D399	Thermo Fisher
DharmaFECT	T-2001-01-02	Thermo Fisher
DME/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	SH30004 .02	Thermo Fisher
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	2650	Sigma
EMD Millipore Immobilon™ Western	WBLS0500	Millipore
Fetal bovine serum (FBS)	04-121-1A-US	biological industries
Glo lysis buffer	E266A	Promega
Glycerol, Ultra pure	800687	MP Biomedicals
Glycine	56-40-6	Bionovas
Goat Anti-Mouse	115514	Jackson
Goat anti-Rabbit IgG Antibody, Peroxidase	2062305	Millipore
Gradient Gel Buffer	FL0500-0500	GENESTAR
HEPES	UR-HEPES-500G	UR (UniRegion Bio-tech)
Dihydroethidium (HE)	D1168	Thermo Fisher
jetPRIME buffer	114-15	Poly plus
jetPRIME Reagent	114-15	Poly plus

MEM Nonessential Amino Acids	25025106R	Corning
Micro slide glass	Frc-13	Matsunami Glass
MitoSOX	M36008	Thermo Fisher
Neutral red	N4638-1G	Sigma
Penicillin G Sodium Salt	69-57-8	Amresco
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	P7626	Sigma
Prestain Protrin marker	APM067 1.250	Aprowtec
Pro-prep protein extraction solution	17081	Intron biotechnology
PureProteome™ Protein G Magnetic Bead System	LSKMAGG02	Millipore
PVDF membrane (polyvinylidene difluoride )	GB-PVDF045	Goal Bio
Skim milk	232100	BD Difco™
Sodium azide	S8032-25G	Sigma
Sodium Chloride	7647-14-5	UR (UniRegion Bio-tech)
Sodium hydrogen carbonate	1.06329.1000	Merck
SRT1720	A10862	AdooQ
Stacking Gel Buffer	FL0500-0500	Genestar
Streptomycin	3810-74-0	Amresco
Sucrose	57-50-1	Bionovas
TB DRY	12105-1	MO BIO Laboratories
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	161-0801	Bio-Rad
TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	ab113852	abcam
Tris-base (hydroxymethyl) aminomethane	77-86-1	Bionovas
Tris-HCl (hydroxymethyl) methylammonium chloride	441514A	BDH Chemicals, London
Trypan Blue Solution, 0.4%	15250061	Gibco
Tween 20	P-1379	Sigma
Urea, for electrophoresis	U6504-500G	Sigma
Xpress Plasmid Kit	AXP025	Arrowtec

### 三、 抗體

抗體名稱	抗體比例	Cat. No.	廠牌
Actin	1:500,000	MAB1501	Chemicon
Tubulin	1:5,000	Ab6046-200	Abcam
GAPDH	1:10,000	Ab9482-10	Abcam
Glutathione Peroxidase	1:1,000	Ab22604	Abcam
LC3	1:5,000	PA1-16930	Thermo Fisher
mtTFA	1:5,000	NBP-71648	Novus
PGC-1 $\alpha$	1:10,000	NBP1-04676	Novus
Sirt1	1:2,000	9475	Cell signaling
Sirt2	1:2,000	12650	Cell signaling
Sirt3	1:2,000	5490	Cell signaling
Sirt4	1:250	HPA029691	Sigma
Sirt5	1:2,000	8782	Cell signaling
Sirt6	1:2,000	12486	Cell signaling
Sirt7	1:2,000	5360	Cell signaling
SOD-1	1:5,000	Ab13498	Abcam
SOD-2	1:5,000	Ab13533	Abcam
AC-lysine	1:250	AKL5C1	Santa Cruz
Cleaved caspase-3	1:150	9661	Cell signaling
Tyrosine Hydroxylase	1:300	Mab318	Chemicon
Alexa Fluor® 488 dye	1:400	A11008	Thermo Fisher
Alexa Fluor® 594 dye	1:400	A11005	Thermo Fisher
Alexa Fluor® 633 dye	1:400	A21103	Thermo Fisher

### 四、 質體 Plasmid

Plasmid 名稱	Cat. No.	廠牌
pLAMP1-eGFP (target: lysosome)	16290	Addgene
pmRFP-LC3 (target: LC3)	21075	Addgene
pmTurquoise2-Mito (target: mitochondria)	36208	Addgene
pDsRed2-Mito (target: mitochondria)	632421	Clontech
pFlag-hSirt1 (h:Human)	1971	Addgene
pFlag-hSirt1 H363Y (h:Human)	1972	Addgene
pCruzHA-mSirt1 (m:mouse)	10962	Addgene
pCruzHA-mSirt1(G261A) (m:mouse)	10963	Addgene
pTet-on-Advanced	361069	Clontech

## 五、 藥品製備

### (一) 0.1% TBST (pH=7.6)

Tris-base	NaCl	Tween-20
20 mM	136 mM	0.1%

### (二) 6X sample dye (pH 6.8)

4X Tris-HCl/SDS	Glycerol	SDS	DTT	Bromophenol blue	Add H <sub>2</sub> O to 10 ml
7 ml	3 ml (30%)	1 g (1%)	0.93 ml (0.6M)	1.2 mg (0.012%)	

4X Tris-HCl/SDS: Tris base (0.5 M) in 40 ml H<sub>2</sub>O, Adjust pH to 6.8 with 1N HCl.

Add H<sub>2</sub>O to 100 ml total volume. Filter solution through a 0.45 μm filter, add 0.4 g SDS [0.4% (w/v)],

### (三) Anode buffer I

Tris-base	Methanol
300 mM	10 %

### (四) Anode buffer II

Tris-base	Methanol
25 mM	10 %

### (五) Banking buffer (pH 7.4)

Glycerol	MgCl <sub>2</sub>	Tris-HCl
65%	100 mM	25 mM

(六) Cathode Buffer

Tris-base	Glycine	Methanol
25 mM	40 mM,	10 %

(七) Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4)

NaCl	KCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
137 mM	2.7 mM	10 mM	1.8 mM

(八) Retineval Buffer (pH=9.5)

Tris-HCl	Urea
100 mM	0.5%

(九) Running buffer

Glycine	Tris-base	SDS
192 mM	25 mM	0.1 %

(十) SDS-PAGE

	Grandient gel	Upper stacking gel
Acrylamide/bis-acrylamide solution 40% 37.5:1 (ml)	2.237	0.408
Grandient gel buffer (ml)	6.368	2.6
TEMED (μl)	8.6	2.4
10% APS (μl)	86	24
Final volume (ml)	8.7	3.03

(十一) TE buffer (pH 8.0)

Tris-HCl	EDTA
10 mM	1 mM

## 第二節 實驗方法

### 一、 人類神經瘤母細胞株 SH-SY5Y 之培養

本研究使用 SH-SY5Y 細胞做為研究模型，因 SH-SY5Y 為人類神經纖維母細胞瘤 (Neuroblastoma)，其有經誘導分化可表現多巴胺β氫化酶 (Dopamine-β hydroxylase)，以合成多巴胺 (Dopamine) 及多巴胺轉運子 (Dopamine transporter, DAT) 等多巴胺神經元 (DAergic neurons) 的特性 (Oyarce and Fleming, 1991)，所以本實驗將以 SH-SY5Y 細胞作為研究帕金森症疾病之離體外 (*in vitro*) 模型。

SH-SY5Y 細胞購自美國模式培養物集存庫 (American type culture collection, ATCC)。將 SH-SY5Y 細胞培養於 15 cm 的培養皿中，並加入含 10% Fetal bovine serum (FBS)、0.5% Non-essential amino acid (NEAA) 及 0.1% 抗生素 Penicillin/Streptomycin (P/S) 之 pH 7.3 Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) 的培養液 (Medium) 中，並置於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培養箱中進行培養。於每週一及週五進行細胞分盤 (sub-culture)。分盤前，先將 Medium、1X PBS 及 Trypsin 放入 37°C 水浴槽中進行回溫。將 SH-SY5Y 細胞從細胞培養箱中拿出，利用倒立式顯微鏡觀察細胞狀態後，放置於無菌操作台中，進行分盤。首先，將舊的 Medium 抽取出來後，利用 5ml 1X PBS wash 兩次後，加入 7 ml Trypsin。將細胞放入細胞培養箱培養約 3 分鐘後，即加入等量的 Medium，並將細胞打散蒐集至 50 ml 離心管中，進行離心 (1000 rpm for 5 min at 4°C)。離心完成後，移除離心管中之上清液，利用 10 ml Medium 將細胞打散後，取 100 μl 之細胞液及等體積的 Trypan blue，均勻打散後放置於細胞計數器中，蓋上蓋玻片使細胞均勻分布後放置於顯微鏡底下，進行細胞計數。細胞計數方式為選取計數盤中上下兩個九宮格之正中間格，將兩格相



加之總和乘以  $10^4$ ，即可回推母盤 1 ml medium 中之細胞數目。再依照實驗需求，種植不同密度之細胞至 6、12、24、96 孔培養盤或 10cm 及 15cm 培養盤中（常用密度例如：96wells:  $1 \times 10^4$  cells/well，24 wells:  $6 \times 10^4$  cells/well，12 wells:  $1 \times 10^5$  cells/well，6 wells:  $4 \times 10^5$  cells/well 等），以進行後續實驗。

## 二、藥物處理

(一) SRT1720：依據細胞模式以及小鼠模式而有不同的配法。細胞處理：

將粉末狀之 SRT1720 以 DMSO 配置成 20 mM 及 2 mM 之稀釋液，並放置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。當進行細胞實驗藥物處理時，再以培養液將之配置成實驗所需之最終濃度。小鼠腹腔注射：將粉末狀之 SRT1720 以 DMSO 配置成 100 mM 之稀釋液，並放置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。當進行小鼠腹腔注射時，再以 PBS 將之配置成實驗所需之最終濃度。

(二) Paraquat：將粉末狀之 PQ 以 ddH<sub>2</sub>O (Double-distilled water) 配置成 1M 之濃度，並放置於  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。當進行細胞實驗藥物處理時，以培養液將之配置成實驗所需之最終濃度。而進行小鼠腹腔注射時，則以 PBS 將之配置成實驗所需之最終濃度。

(三) Sirtinol：將粉末狀之 Sirtinol 以 DMSO 配置成 2 mM 之稀釋液，並放置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。當進行細胞實驗之藥物處理時，再以培養液將之配置成實驗所需之最終濃度。

(四) CHX：將粉末狀之 CHX 以 DMSO 配置成 2 mM 之稀釋液，並放置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。當進行細胞實驗之藥物處理時，再以培養液將之配置成實驗所需之最終濃度。

(五) Act. D：將粉末狀之 Act. D 以 DMSO 配置成 2 mM 之稀釋液，並放置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。當進行細胞實驗之藥物處理時，再以培養液將之配置成實驗所需之最終濃度。

細胞實驗之藥物濃度測試皆以前處理抗氧化劑及抑制劑的方式為主，根據不同藥物的特性，培養在細胞盤 1-3 小時後，再加入 PQ，培養 24 小時後再進行後續的實驗分析。

### 三、 細胞存活率試驗

#### (一) Neutral red survival assay

本論文實驗使用 Neutral red assay (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) 來進行細胞存活率的測量。利用 Neutral red 染料可經由胞飲作用 (Endocytosis) 之方式進入活細胞之溶酶體 (Lysosome) 中 (Vian et al., 1995)，用以對於 SH-SY5Y 細胞進行死亡之評估。本實驗使用 96 孔盤進行測定，為防止 96 孔盤最外圍會有水分蒸發現象，造成實驗的差異，所以在種細胞前會先利用不需要的 Medium 注入在 96 孔盤最外圍 (200  $\mu$ l/well)。將細胞 (96 wells,  $1 \times 10^4$  cells/well) 放置兩天，使細胞貼附完整後，再換置成含有待測定之藥品的培養液。反應 24 小時後，將培養液吸去 100  $\mu$ l，並在每個 well 加入 100  $\mu$ l 的 Neutral Red (100  $\mu$ g/well) 稀釋液後，將 96 孔盤放置細胞培養箱中，反應 2 小時。之後，將稀釋液抽乾，以 200  $\mu$ l 的 1X PBS 清洗一次後，加入 Lysis buffer (49% EtOH、50% ddH<sub>2</sub>O 以及 1% Glacial Acetic Acid)，利用 Shaker 快速搖晃均勻後，以 ELISA Reader 在 540 nm 之吸光值下進行測量。

#### (二) Trypan blue survival assay

將細胞 (6 wells,  $4 \times 10^5$  cells/well) 放置兩天，使細胞貼附完整後，再換置成含有待測定之藥品的培養液。培養時間結束後，利用 500  $\mu$ l Trypsin 將細胞與培養盤分離，加入等量的 Medium，並將細胞打散蒐集至 1.5 ml 離心管中，進行離心 (1000 rpm for 5 min at 4°C)。離心完成後，移除離心管中之上清液，利用 1 ml Medium 將細胞打散後，取 100  $\mu$ l 之細胞液及等體積的 Trypan blue，均勻打散後放置於細胞計數器中，蓋上蓋玻片使細胞均勻分布後放置於顯微鏡底下，

進行細胞計數。細胞計數方式為選取計數盤中上下兩個九宮格之正中間格，將兩格相加之總和乘以  $10^4$ ，即可回推總細胞數目。

#### 四、 細胞基因轉染技術 (Transfection)

本論文實驗使用 jetPRIME® DNA/siRNA transfection reagent 之轉染試劑，用於對 SH-SY5Y 細胞進行轉染 plasmid DNA。根據不同的孔盤大小，轉染試劑等所使用的用量於下列表格表示：

Culture vessel	jetPRIME buffer	DNA concentration	jetPRIME reagent
24 well	50 $\mu$ l	0.5 $\mu$ g	1 $\mu$ l
6 well / 35 mm	200 $\mu$ l	2 $\mu$ g	4 $\mu$ l
100 mm	500 $\mu$ l	10 $\mu$ g	20 $\mu$ l

將 SH-SY5Y 細胞依照實驗需求種植於不同的孔盤培養盤中，培養兩天後，置換培養液，並再度培養 30 分鐘。將 jetPRIME buffer 分裝至 1.5 ml 之離心管中，再加入以計算好體積之 plasmid DNA，均勻混合後，再加入 jetPRIME reagent。均勻混合後，在室溫下靜置 10 分鐘。將混合物以漩渦式均勻且緩和滴入培養液中，將孔盤輕晃均勻後，再放入細胞培養箱中進行培養。待 24 小時後置換培養液。

#### 五、 細胞固定

在種植細胞前，先在 24 孔盤中放入圓形的蓋玻片（直徑 1.2 cm），之後種植細胞（24 wells,  $6 \times 10^4$  cells/well）並培養兩天。之後利用細胞轉染法，轉染不同帶有螢光基因的 Plasmid。待加藥程序結束後，將 Medium 抽乾，各加入 500  $\mu$ l 的 4% Paraformaldehyde，在室溫下放置 15 分鐘，將 4% Paraformaldehyde 倒至廢液桶，並將殘餘液體吸乾，再各加入 500  $\mu$ l/well 含有 0.1% Sodium azide

的 1X PBS，蓋上上蓋，並放入夾鏈袋中，放入 4°C 冰箱保存。

## 六、 細胞貼片

將固定好的細胞從 4°C 冰箱中拿出，並將蓋玻片從 24 孔盤中拿出，放在拭鏡紙上，將殘餘之液體吸乾。載玻片以酒精及拭鏡紙擦拭乾淨後，滴上約米粒大小的 Mounting media (Aqua poly/Mount)。將蓋玻片的細胞面向載玻片蓋上，並利用細針將氣泡壓出。之後放入冷凍盒中避光，在室溫下風乾後，放入 4°C 冰箱保存。

## 七、 螢光影像測定

在 12 孔盤中種入  $1 \times 10^5$  cell/well 兩日後，將培養液置換成含欲觀察之藥物的培養液，培養 24 小時後，分別加入不同的螢光染色劑：

- (一) MitoSOX: 偵測粒線體中的超氧化物 (Mitochondrial Superoxide)。以 5  $\mu$ M 濃度，在 HBSS medium 中培養 10 分鐘。
- (二) Dihydroethidium (HE): 偵測細胞間的超氧化物 (superoxide)。以 10  $\mu$ M 濃度，培養 15 分鐘。
- (三) Benzoic acid, 2-[3,6-bis(acetyloxy)-2,7-dichloro-9H-xanthen-9-yl]-4091-99-0 (DCFDA): 偵測細胞中的過氧化物 (peroxide)。以 20  $\mu$ M 濃度，培養 30 分鐘。
- (四) Tetramethylrhodamine (TMRE): 偵測細胞粒線體膜電位變化。以 100 nM 濃度，培養 10 分鐘。

待時間到後，利用 HBSS medium 清洗一次，再利用螢光顯微鏡觀察細胞染色的螢光強度。實驗共重複 3 次，每次實驗的組別樣品數  $N=1$ 。在螢光顯微鏡的視野下，每個組別拍攝 2-4 張照片，並取其中一張，利用 Image J 軟體，在每張圖中框出約 8-10 顆細胞作為定量。另取 2-3 個背景值，平均背景值後，將細

胞的數值扣除背景值後，作為該細胞的螢光強度。

## 八、 大量質體 (Plasmid) 培養及抽取

本實驗利用 Xpress Plasmid Kit 抽取細菌中之質體。將質體菌分別加入含有 0.1% 特定抗生素之 2 ml TB dry 中，並培養在 37°C、200 rpm 的培養箱約 15-16 小時。小量培養完成後，將菌液倒入含有 0.1% 特定抗生素之 200 ml TB dry 中，並培養在 37°C、200rpm 的培養箱約 15-16 小時。大量培養完成後，將菌液倒入離心用的塑膠瓶中離心 (6000xg for 20 min at 4°C)，20 分鐘後，去除上清液，加入 10 ml 的 PX1 buffer，利用超音波震盪機將 pellet 震盪後，加入 10 ml PX2 buffer，輕輕地滾動塑膠瓶，直到看見瓶中出现黏稠物後，在室溫下靜置五分鐘。在等待的時間，拿出 column，架在試管架上，下方放置廢液桶，利用 20 ml PEQ buffer 清洗 column。五分鐘後，加入 10 ml PX3 buffer，輕輕地滾動塑膠瓶後，在室溫下靜置五分鐘。五分鐘後離心 (15000xg for 20min at 4°C)。將上清液和緩的倒入 column 中，DNA 會留在 column 的 filter 上。再加入 10 ml PEQ buffer，等待液體滴完後，加入 10 ml PWA buffer，待液體滴完後，將下方廢液桶換置成小的離心用離心管。在 column 中加入 10 ml PEL buffer，待液體滴完後，在離心管中加入 7.5 ml isopropanol，搖晃 15 下後在室溫下靜置兩分鐘。靜置完後拿去離心 (20000xg for 30 min at 4°C)，離心完成後，倒掉上清液，再加入 5 ml Ethanol，和緩地將壁邊的 isopropanol 洗下來。完成後拿去離心 (20000xg for 10 min at RT)，離心完成後，將上清液清除，並在室溫下風乾，再加入 400-500  $\mu$ l 的 TE buffer，將 pellet 溶於 TE buffer 後，將之移至 1.5 ml 離心管中，放入 -20°C 冰箱保存。並取 2  $\mu$ l 的量，利用超微量核酸定量光譜儀(NanoDrop)測定 DNA 之濃度。

## 九、 菌種保存 (Banking)

在小量培養結束後，將 500  $\mu$ l 的菌液加入至 500  $\mu$ l 已滅菌的 Banking buffer 中，混合均勻後，放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

## 十、 Caspase-3 活性測試

本實驗使用 Caspase-3 Fluorometric Assay Kit 來進行實驗分析。將 50  $\mu$ g 的蛋白質與 50  $\mu$ l 的 2X Reaction buffer (含 10 mM DTT stock) 混合後，加入 5  $\mu$ l DEVD-AFC substrate，在 37 $^{\circ}$ C 烘箱中培養 90 分鐘，利用螢光偵測儀，以激發光譜 (excitation) 400 nm 與發射光譜 (emission) 505 nm 測定之。

## 十一、 西方點墨法 (Western Blot)

### (一) 蛋白質萃取 (Protein lysis)

萃取細胞中的蛋白質前，需先準備預冷之 1X PBS 及冰盒，以終止細胞內的訊息傳導。SH-SY5Y 細胞經藥物或是細胞轉染處理後，將細胞從培養箱中拿出，立即放置於冰上，並將 medium 收集至 50 ml 離心管中。利用 10 ml 之 1X PBS 沖洗培養盤，並用刮勺將細胞刮下後一併收集至 50 ml 離心管中，將離心管插至冰上保冰。待所有實驗組別之細胞收集至不同離心管後，將細胞離心 (1000 rpm for 5 min at 4 $^{\circ}$ C)，離心後，清除離心管中的上清液，為將殘存之 medium 清洗乾淨，在離心管中加入 10 ml 1X PBS 均勻搖晃後，再將細胞離心 (1000 rpm for 5 min at 4 $^{\circ}$ C)。離心完成後，利用 1 ml 1X PBS 將細胞 pellet 移至 1.5 ml 離心管中，再將細胞離心 (1000 rpm for 5 min at 4 $^{\circ}$ C)。清除離心管中之上清液後，即可將細胞移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

將 200~400  $\mu$ l Pro-prep (視細胞數量而定)、2  $\mu$ l 絲氨酸蛋白酶抑制劑

(PMSF) 及 8  $\mu$ l 蛋白酶抑制劑 (50x protease inhibitor cocktail) 加入保存之細胞中，再將組織以超音波震盪器 (Sonicator) 震盪，震碎後將之離心，取上清液作蛋白質定量。

## (二) 蛋白質定量 (Protein quantification)

本實驗使用 BCA protein assay kit 作為定量方式。首先，以濃度梯度稀釋 20  $\mu$ g/ml albumin 之標準溶液，共六種稀釋濃度。將六種稀釋標準溶液及待測蛋白質分別取 5  $\mu$ l 放置於 96 孔盤後，將 Protein Assay Reagent A 與 Protein Assay Reagent S 以 50:1 的比例混和均勻，並在每個孔盤中各加入 25  $\mu$ l 之混合液，搖晃均勻後，再各加入 200  $\mu$ l 之 Protein Assay Reagent B，於室溫反應約 10 分鐘後，利用 ELISA reader，在 740 nm 之吸光值下進行測量。

## (三) 樣品配製 (Sample preparation)

蛋白質濃度檢測完後，計算出 25  $\mu$ g 蛋白質樣品所需之體積，加入 6X sample dye，並用 Pro-prep 調整至相同體積。均勻混合後，放置於沸水中加熱 5 分鐘，使蛋白質成為一級線性結構。待蛋白質冷卻後，即可往下進行後續實驗。

## (四) 鑄膠 (Gel preparation)

以 ddH<sub>2</sub>O 洗滌鑄膠用之儀器，利用酒精擦拭，確認儀器上無髒污及棉絮後，將儀器架設完整。利用 ddH<sub>2</sub>O 或是酒精確認儀器是否有外露現象，若無外露現象，即可將液體倒乾，並利用濾紙將內部水分清除乾淨。於冰盒上配置 Gradient gel，輕晃混勻後，在玻璃板中加入約 7.5 ml 之 Gradient gel 混合液，並利用 2-butanol 進行壓膠，置於 37°C 恆溫箱，等待約 30 分鐘。膠體凝結後，將 2-butanol 倒掉，並用 ddH<sub>2</sub>O 洗滌乾淨後，利用濾紙將內部水分清除乾淨。加入約 3 ml

之以配置好的 Upper stacking gel 混合液，插上齒梳並注意是否有空氣殘留後，置於 37°C 恆溫箱，等待約 30 分鐘。待膠體完全凝結後，即可開始電泳。

## (五) 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

將配置好的膠體拿出，將邊緣的多餘膠體以清水清除，並拔起齒梳後，裝置在電泳槽 (Running Tank) 上，並倒入 1X Running buffer 至槽滿 (可加入冰保盒增加體積) 後，再將蛋白質樣品注入膠體孔中，並在左右兩邊加入蛋白質分子量標誌 (Protein marker)，設定  $V=50$ ，使蛋白質一起轉移到 Upper stacking gel 及 Gradient gel 之中線後，即設定  $V=100$ ，使蛋白質加速分離。

## (六) 轉漬 (Transfer)

當蛋白質已分離至理想位置，即將膠體從膠架中拿出，測量其寬度及高度後，放入 Cathode Buffer，置於 shaker 上，以 75 rpm 搖晃 10 分鐘。取大於膠體長寬約 0.5 公分之 PVDF membrane 及六片 3 MM filter paper，將 PVDF membrane 放置於 methanol 中搖晃約 15 秒，使 PVDF membrane 活化後，將多餘 methanol 清洗掉，再將 PVDF membrane 移至 ddH<sub>2</sub>O 中，並置於 Shaker 上，以 75 rpm 搖晃 2 分鐘。清洗完成後，將 PVDF membrane 浸入 anode buffer II 中，置於 shaker 上，以 75 rpm 搖晃數分鐘。將 filter paper 其中隻三片浸入 Cathode Buffer、兩片浸入 anode buffer I 及一片浸入 anode buffer II 中，然後置於 shaker 上，以 75 rpm 搖晃數分鐘。將半乾式電泳轉漬槽 (Trans-blot SD semi-dry transfer cell) 利用 ddH<sub>2</sub>O 稍作擦拭乾淨後，在正極板疊上兩片浸潤於 anode buffer I 之 filter paper，再疊上一片浸潤於 anode buffer II 之 filter paper，並將 PVDF membrane 疊上，然後疊上膠體，最後，疊上三片浸潤於 Cathode Buffer



之 filter paper。在此過程中，每疊上一片，即使用小滾棒將氣泡趕走，以避免轉漬不均。待所有片子疊好後，將陰極版以均勻受力的方式蓋上，並將轉漬槽放置於 4°C 冰箱中，插上電源供應器，並以 PVDF membrane 之面積(公分<sup>2</sup>)乘以 2 來換算對應之毫安培數，之後反應 90 分鐘。

### (七) 免疫反應 (Immunoblotting)

轉漬完成後，將 PVDF membrane 取出，利用 marker 的位置座標定，在適當位置上裁切出欲觀測蛋白質分子量之位置，並浸於 1X TBST buffer 中，置於 shaker 上，以 75 rpm 搖晃 5 分鐘，並重複三次。為避免後續實驗之免疫反應會有非專一性抗體結合，所以將裁減後的 PVDF membrane 浸於含 3% BSA 或是 5% Skim Milk 之 1X TBST buffer 中，置於 shaker 上，以 45 rpm 搖晃一個小時，藉此降低背景質雜訊。一小時後，將 PVDF membrane 取出，浸於 1X TBST buffer 中，置於 Shaker 上，以 75 rpm 搖晃 5 分鐘並重複三次。將 PVDF membrane 取出後，浸於含有可與目標蛋白專一性結合的一級抗體及 0.1% Sodium azide 之 1X TBST buffer 中，封膜後，放置於 4°C 冰箱的 Shaker 上，以 50 rpm 搖晃至隔夜 (約 16-18 小時)。將 PVDF membrane 取出後，浸於 1X TBST buffer 中，置於 Shaker 上，以 75 rpm 搖晃 5 分鐘並重複三次。將 PVDF membrane 浸置於含有二級抗體之 1X TBST buffer 中，置於 Shaker 上，以 45 rpm 搖晃一個小時。而二級抗體須對應一級抗體之來源做選擇。一小時後，將 PVDF membrane 取出，並浸於 1X TBST buffer 中，置於 Shaker 上，以 75 rpm 搖晃 5 分鐘並重複三次，即可進行下步實驗。

### (八) 成像 (Visualization)

因二級抗體上接有 HRP (Horseradish peroxidase)，透過 HRP 可與 ECL 結合產生冷光之原理，將 PVDF membrane 浸置於冷光感應試劑 enhanced

chemiluminescence (ECL)中，搖晃約 75 秒後，將 PVDF membrane 放置於底片匣 (Hypercassette) 中，並關上燈，在底片匣中放置底片，藉由底片匣壓片，使底片曝光感光，之後可分析的蛋白位置後，進行數據分析。

## 十二、 免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP)

將細胞內的蛋白質萃取並定量後，取 300  $\mu\text{g}$  蛋白質至 1.5 ml 微量離心管中，加入適量抗體，並利用 pro-prep 補體積至 500  $\mu\text{l}$ ，置於 3D 旋轉器，利用 40rpm 在 4°C 冰箱中旋轉至隔夜 (約 15-18 小時)，再加入 50  $\mu\text{l}$  的 protein G beads，並利用 3D 旋轉器，在 4°C 冰箱中旋轉 2 小時 (40 rpm)，再將離心管放置於磁座上，此時磁珠會受磁力吸引而貼附到管壁。取出上清液，再加入 500  $\mu\text{l}$  1X PBS，將離心管輕晃後放回磁座，再取出 1X PBS，如此重複三次。加入 60  $\mu\text{l}$  1X sample dye，放置於煮沸之滾水中加熱 5 分鐘，再將離心管放置於磁座上，取出 1X sample dye，取 30  $\mu\text{l}$  進行西方點墨法。

## 十三、 實驗動物行為檢測

### (一) 實驗動物

本實驗所使用的 C57BL/6 小鼠購自國家實驗動物中心，並於衛生福利部國家中國醫藥研究所的動物中心進行飼養，其環境每日維持各 12 小時的光暗週期，溫度維持在  $22\pm 2^\circ\text{C}$ ，相對溼度維持在  $50\pm 10\%$ ，並給予充足的飲水及飼料，且於每週更換兩次墊料。小鼠的年齡約 18-22 週，體重介於 35-50g 之間。

### (二) 滾輪測試 (Rotarod test)

滾輪測試主要是測試動物的運動協調能力及對於疲勞的耐受性之試驗，該測試方法是將實驗動物放置在等加速的電動滾輪測試儀上，觀察實驗動物在輪軸上

滯留的時間。實驗則將動物放置於滾輪上，設定滾輪在五分鐘內從 10 rpm 加速至 28 rpm，並記錄小鼠從滾輪上掉落的時間，以反應老鼠維持在滾輪上的時間。實驗於第六週做測定，本實驗每回測定兩次，並以兩次的數值的平均值作為老鼠在滾輪測試的表現值。

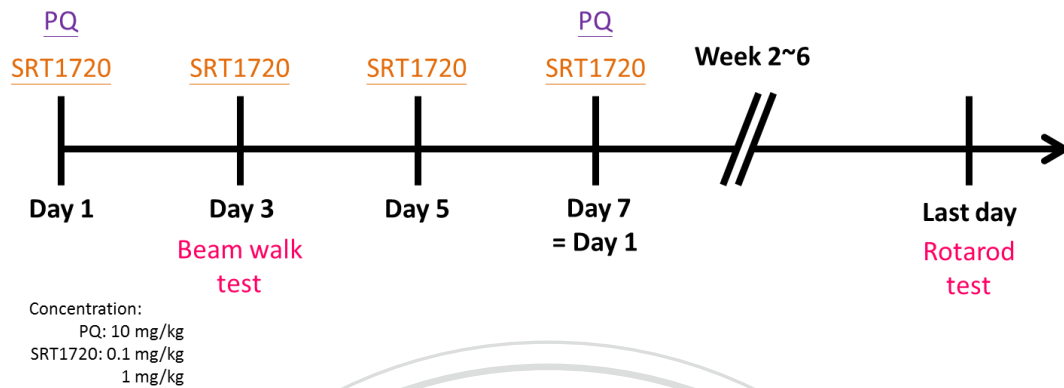
### **(三) 獨木橋試驗 (Beam walk test)**

獨木橋試驗是在測試實驗動物的平衡感及運動協調能力。本實驗使用自製的獨木橋，其長度約 100 cm，寬約 1 cm，斜度 20 度，且在獨木橋的終點設置黑箱，而在整個設施的下方鋪置白色的軟布。測試方法是將實驗動物放在獨木橋上，並記錄動物從橋的起點走到黑箱所花費的時間及在行走過程中其後肢滑落的次數。本實驗於每週測試一天，一天測試兩次，並以兩次之平均作為一天的表現值，共測試六週。

### **(四) 實驗設計 (Experimental design)**

實驗流程如下圖所示。本實驗共進行六週，於每週的第一天施打 PQ (10 mg/kg) (Huang et al., 2016) 及 PBS，每週的第一天、第三天、第五天施打 SRT1720 (0.1 mg/kg, 1 mg/kg)。PQ+SRT1720 的組別會先施打 SRT1720，一個小時後再施打 PQ。行為測試部分，於每週的第三天進行獨木橋試驗，並於每週第五天測量體重。所有實驗都是先進行行為測試後才施打藥物。並在在第六週的最後一天進行滾論測試。

## Week 1



## 十四、小鼠灌流 (Perfusion)

為確認藥物對於小鼠大腦中 SNc 區的影響，需先將小鼠麻醉後灌流取腦。先將小鼠紀錄體重後，注射 Chlorohydrate (40 mg/kg)，待小鼠麻醉完成後，將小鼠固定於灌流台上，使小鼠仰躺。將小鼠的左胸骨剪開，並露出心臟，再利用灌流幫浦，將針孔插入左心室並注射 PBS，然後在右心房剪開一個小洞，使血液流出，並持續約五分鐘，使 PBS 將小鼠體內的血液洗淨，過程中可輕壓小鼠腹部使血液置換得更乾淨。待血液洗淨後，再將 PBS 置換成 4% Paraformaldehyde，持續五分鐘。待組織固定完畢後，將鼠腦取下，放置在 4% Paraformaldehyde 溶液中，浸泡 48 小時後再將鼠腦置換至含 30% sucrose 的液體中，待 30% sucrose 將鼠腦內的液體置換出來(可見鼠腦從浮在水面上至沉降，期間約需等待一至兩日) 後，即可將鼠腦取出，將周圍液體吸乾後，即可放入 -80°C 冰箱保存。

## 十五、冷凍切片

將冷凍切片機暖機，並使工作區保持在 -22°C 的低溫環境中。將鼠腦從 -80°C

冰箱取出，並用冷凍包埋劑 (OCT) 將鼠腦固定在鋁合金組織標本台上，待固定後，即可固定在工作台上，並用 20  $\mu\text{m}$  的厚度切片。再將組織放入 PBS 中，進行後續實驗。

## 十六、 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry, IHC)

將鼠腦切片從 PBS 取出，並放置於含 Retrieval buffer 的 6 孔盤中，在 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽中培養 10 分鐘，再將 6 孔盤拿出並使之冷卻至室溫。將鼠腦切片至換至新的 6 孔盤中 (盤底可貼 Parafilm 增加內聚力)，加入 30  $\mu\text{l}$  含 2% Triton-100, 0.02% BSA, 10% Goat serum, 0.02% Sodium azide 的 1X PBS 中，於 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中培養一小時。利用 1X PBS wash 三次 (45 rpm for 5 min at RT)，再將腦切片至換至 30  $\mu\text{l}$  含 0.25% Triton-100, 0.02% BSA, 10% Goat serum, 0.02% Sodium azide 的 1X PBS 中，並加入一級抗體，放置 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中培養至隔夜 (約 15-18 小時)。隔日將鼠腦切片取出，利用 0.1% PBST wash 三次 (45 rpm for 5 min at RT)，再將鼠腦切片換至 30  $\mu\text{l}$  含 0.3% Triton-100, 1% BSA, 0.04% Sodium azide 的 1X PBS 中，並加入二級抗體，於 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中培養 90 分鐘 (需避光，下面步驟也皆需在避光環境下完成)，再加入 0.1% DAPI，培養 10 分鐘後，以 0.1% PBST wash 三次 (45 rpm for 5 min at RT)，即可將鼠腦切片貼在具有特殊的 MAS 塗層 (MAS-coating) 的載玻片上，等片子乾後，滴上約米粒大小的 mounting media (Aqua poly/Mount)。將蓋玻片蓋上，並利用細針將氣泡壓出。放入冷凍盒中避光，在室溫下風乾後，放入 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

## 十七、 統計分析

本論文實驗數據皆以平均值 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ SEM) 來表示，實驗數據皆以 Sigma-Plot 10.0 進行圖表製作。本論文實驗數據之統計方法以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 或是 Two way ANOVA 以及重複測量和 Tukey test 統

計方法進行分析，統計分析所得之實驗數據以\*： $p < 0.05$ ；\*\*： $p < 0.01$ ；#： $p < 0.05$ ；##： $p < 0.01$ ；\$\$： $p < 0.01$  來標記做為具統計意義之符號。數據皆使用 GraphPad Prism 5.0 進行統計分析。





## 第一節 PQ 對於 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響

隨著 PQ 處理濃度的增加，細胞存活率會隨之降低 ( $F_{9, 170} = 437.7, p < 0.01$ )。當 PQ 處理濃度至 0.1 mM 時的細胞存活率相較於控制組即達到統計之顯著差異 ( $tD=6.98, p < 0.01$  by Dunnett's t-test)，PQ 濃度增加至 3 mM 時的細胞存活率相較於控制組降低至 22.9% ( $tD=37.5, p < 0.01$  by Dunnett's t-test) (圖一(A))。隨著 PQ 處理的時間的增加，細胞存活率會隨之降低 ( $F_{4, 29} = 53.20, p < 0.01$ )，當 PQ 培養 8 個小時的細胞存活率相較於控制組即達到統計顯著之差異 ( $tD=4.555, p < 0.01$  by Dunnett's t-test)，PQ 培養 24 個小時的細胞存活率相較於控制組達到統計顯著之差異 ( $tD=13.33, p < 0.01$  by Dunnett's t-test) (圖一(B))。

PQ 對於 SH-SY5Y 細胞毒害性之不可逆時間點之實驗於 PQ 處理 3h + 置換正常培養液 21h 時，細胞存活率相較於控制組即達到統計之顯著差異 ( $F_{4, 157} = 712.3, p < 0.01$ ) ( $tD=3.398, p < 0.01$  by Dunnett's t-test)。且隨著 PQ 處理時間增加，細胞存活率隨之降低 (圖一(C))。

針對 PQ 300  $\mu$ M 培養 24 小時之組別對於 SH-SY5Y 細胞存活率達半數致死量 (Median Lethal Dose,  $LD_{50}$ )，所以後續實驗將以 300  $\mu$ M 培養 24 小時的操弄作為 PQ 毒性的基準。



## 第二節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響

細胞單處理 PQ 300  $\mu\text{M}$  的組別存活率相較於控制組即達到統計顯著差異 ( $F_{9, 98} = 63.72$ ,  $tD=17.92$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)。預處理 0.1  $\mu\text{M}$  之 SRT1720 再加入 PQ 300  $\mu\text{M}$  的組別，相較於單加入 PQ 300  $\mu\text{M}$  的組別，細胞存活率上升 ( $tD=6.986$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)，且在 SRT1720 1  $\mu\text{M}$  時達到最大有效濃度 ( $tD=9.040$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)。而當 SRT1720 在 3  $\mu\text{M}$  之濃度，細胞存活率較控制組有顯著下降 ( $tD=7.142$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)，且 SRT1720 3  $\mu\text{M}$  + PQ 300  $\mu\text{M}$  組雖較單加入 PQ 300  $\mu\text{M}$  的組別有顯著上升 ( $tD=3.443$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)，但相較於 SRT1720 1  $\mu\text{M}$  之組別，SH-SY5Y 細胞的細胞存活率有下降的情形 (圖二)。

針對 SRT1720 1  $\mu\text{M}$  之組別對於 SH-SY5Y 細胞存活率達到保護性的最大值，所以後續實驗將以 SRT1720 1  $\mu\text{M}$  之操弄作為 SRT1720 藥物保護的基準。

## 第三節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞 caspase-3 活性變化測定

SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 caspase-3 活性的變化具有顯著性之差異 ( $F_{3, 32} = 13.18$ )。PQ 組的 Caspase-3 活性相較於控制組顯著上升 ( $tD=5.336$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)，SRT1720+PQ 組所偵測到的 Caspase-3 活性相較於 PQ 組顯著下降 ( $tD=3.459$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test) (圖三)。

#### 第四節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的粒線體型態變化

根據 Ahmad 在 2013 年的研究報導作為對粒線體型態判斷的標準，粒線體在控制組中呈現不斷裂的長條狀 (Tubular)，判斷粒線體處於融合狀態。PQ 組粒線體呈現斷裂狀，且小片段的粒線體縮小成實心的圓球狀 (Blob) (箭頭處)。SRT1720 組的粒線體呈現不斷裂的長條狀 (Tubular)，且粒線體的質量相較於控制組多。在 SRT1720+PQ 組，可見粒線體長度較短，且呈現類似空心的圓圈狀 (Donut-like) (箭頭處) (圖四)。

#### 第五節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 生成之影響

##### HE

SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 HE 螢光強度具有顯著性之差異 ( $F_{3, 113} = 27.34$ )。PQ 組所偵測到的 HE 螢光強度相較控制組顯著增加 ( $tD=8.144, p<0.01$  by Dunnett's t-test)。SRT1720+PQ 組相較於控制組顯著上升 ( $tD=2.96, p<0.05$  by Dunnett's t-test)。SRT1720+PQ 組相較於 PQ 組顯著下降 ( $tD=5.235, p<0.01$  by Dunnett's t-test) (圖五)。

##### DCFDA

SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 DCFDA 螢光強度具有顯著性之差異 ( $F_{3, 109} = 3.715$ )。PQ 組所偵測到的 DCFDA 螢光強度相較於控制組顯著增加 ( $tD=2.97, p<0.05$  by Dunnett's t-test)。SRT1720+PQ 組相較於 PQ 組未達顯著差異，但有下降的趨勢(圖六)。

## MitoSOX

SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 DCFDA 螢光強度具有顯著性之差異 ( $F_{3,27} = 30.53$ )。PQ 組所偵測到的 MitoSOX 螢光亮度顯著增加 ( $tD=8.412, p<0.01$  by Dunnett's t-test)，SRT1720+PQ 組相較於控制組所偵測到的 MitoSOX 螢光亮度顯著上升 ( $tD=6.578, p<0.01$  by Dunnett's t-test)。SRT1720+PQ 組相較於 PQ 組，所偵測到的 MitoSOX 螢光亮度雖未達顯著差異，但有下降的趨勢。(圖七)。

## 第六節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 中粒線體膜電位變化之影響

SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 TMRE 螢光強度具有顯著性之差異 ( $F_{3,102} = 22.30$ )。PQ 組所偵測到的 TMRE 螢光亮度相較控制組並無顯著性之差異。SRT1720 組所偵測到的螢光亮度相較於控制組及 PQ 組皆具顯著差異 (con v.s. SRT1720:  $tD=4.001, p<0.01$ ; PQ v.s. SRT1720:  $tD=4.454, p<0.01$  by Dunnett's t-test)。SRT1720+PQ 組相較於控制組及 PQ 組皆具顯著差異 (con v.s. SRT1720+PQ:  $tD=6.63, p<0.01$ ; PQ v.s. SRT1720+PQ:  $tD=6.6973, p<0.01$  by Dunnett's t-test) (圖八)。

## 第七節 Sirt1 抑制劑 Sirtinol 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞存活率的影響

Sirtinol 在處理 1, 3, 10  $\mu\text{M}$  的濃度之下對於細胞的存活率相較於控制組並無影響，且在不同濃度的 Sirtinol + PQ 300  $\mu\text{M}$  等組別，相較於 PQ 300  $\mu\text{M}$  組皆

無影響，在 Sirtinol 30  $\mu\text{M}$  之濃度會造成細胞存活率之下降，並相較於控制組達顯著差異 ( $F_{9, 80} = 123.0$ ,  $tD=6.401$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test) (圖九(A))。在 Sirtinol 10  $\mu\text{M}$  + SRT1720 1  $\mu\text{M}$  + PQ 300  $\mu\text{M}$  的組別，其細胞存活率相較於 SRT1720 1  $\mu\text{M}$  + PQ 300  $\mu\text{M}$  組別，細胞存活率有顯著的下降 ( $F_{5, 48} = 94.20$ ,  $tD=6.951$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test) (圖九(B))。

## 第八節 Sirt1 轉染後前處理 SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響

SH-SY5Y 在轉染 hSirt1、mSirt1、mSirt1-mutant 後，Sirt1 蛋白質含量增加 (圖十)。PQ 組轉染 hSirt1 相較於 Tet-on Adv，細胞存活率顯著上升 ( $F_{11, 94} = 102.8$ ,  $tD= 15.79$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)。SRT1720+PQ 組，hSirt1 相較於 Tet-on Adv 細胞存活率上升( $tD= 6.395$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test) (圖十(C))。

## 第九節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirtuin 蛋白質之影響

Sirtuin 各類蛋白質含量改變為以下敘述 (圖十一(A))。

PQ 處理時間的不同以及 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt1 蛋白質表現量具有顯著性之差異 ( $F_{5, 30} = 2.6070$ )。Sirt1 蛋白隨著 PQ 處理的時間增加，表現量隨之降低，並且在 PQ 24h 達到顯著差異 ( $tD=3.044$ ,  $p<0.05$  by Dunnett's t-test)。SRT1720 24h 組相較於控制組 Sirt1 蛋白質表現量並未上升。SRT1720 +PQ 24h 組 Sirt1 蛋白質表現量相較於 PQ 24h 組雖未達顯著差異，但有上升的趨勢 (圖十一(B))。

PQ 處理時間的不同以及 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt2 蛋白質表現量無顯著性之差異。PQ 3h 組 Sirt2 蛋白質表現量上升。PQ 8h 時開始降低，並在 PQ 24h 時 Sirt2 蛋白質表現量在達到最低。SRT1720 24h 組 Sirt2 蛋白含量相較控制組並未上升。SRT1720+PQ 24h 組 Sirt2 蛋白含量相較於 PQ 24h 組雖未達顯著差異，但有上升的趨勢。

PQ 處理時間的不同以及 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt3 蛋白質表現量無顯著性之差異。Sirt3 蛋白的表現量在 PQ 8h 達到最低。SRT1720 24h 組 Sirt3 蛋白含量並未上升。SRT1720+PQ 24h 組 Sirt3 蛋白含量相較於 PQ 24h 組雖未達顯著差異，但有上升的趨勢(圖十一(D))。

PQ 處理時間的不同以及 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt4 蛋白質表現量無顯著性之差異。Sirt4 蛋白在 PQ 3h 時表現量相較控制組上升。PQ 8h Sirt4 蛋白質表現量開始降低，並在 PQ 24h 時 Sirt2 蛋白的表現量在達到最低。SRT1720 24h 組，Sirt4 蛋白含量並未上升。SRT1720+PQ 24h 組，Sirt4 蛋白含量並未上升 (圖十一(E))。

PQ 處理時間的不同以及 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt5 蛋白質表現量具有顯著性之差異 ( $F_{5,6}=4.599$ )。Sirt5 蛋白的表現量在 PQ 8h 時相較控制組即達顯著差異 ( $tD= 3.502, p<0.05$  by Dunnett's t-test)，PQ 24 達到最低 ( $tD=4.158, p<0.05$  by Dunnett's t-test)。SRT1720 24h 組相較於控制組 Sirt5 蛋白含量並未上升。SRT1720+PQ 24h 組 Sirt5 蛋白含量相較於 PQ 24h 組雖未達顯著差異 ( $tD=1.05$ )，但有上升的趨勢 (圖十一(F))。

PQ 處理時間的不同以及 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt6 蛋白質表現

量具有顯著性之差異 ( $F_{5,6} = 4.794$ )。Sirt6 蛋白的表現量在 PQ 24 小時組別達到最低。SRT1720 24h 組相較於控制組 Sirt6 蛋白含量並未上升。SRT1720+PQ 24h Sirt6 蛋白含量相較於 PQ 24h 組顯著上升 ( $tD=4.117$ ,  $p<0.05$  by Dunnett's t-test) (圖十一(G))。

PQ 處理時間的不同以及 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 Sirt6 蛋白質表現量具有顯著性之差異 ( $F_{5,6} = 4.004$ )。Sirt7 蛋白的表現量在 PQ 24h 與控制組相比達到統計差異 ( $tD= 3.592$ ,  $p<0.05$  by Dunnett's t-test)。SRT1720 24h 組相較於控制組 Sirt7 蛋白含量並未上升。SRT1720+PQ 24h 組 Sirt1 蛋白含量相較於 PQ 24h 組雖未達顯著差異，但有上升的趨勢 (圖十一(H))。

## 第十節 CHX (Cycloheximide) 及 Act. D (Actinomycin D) 前處理後，SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響

CHX 在前處理不同濃度對於細胞的存活率相較於控制組並無統計差異 ( $F_{11,96} = 87.62$ )。不同濃度的 CHX + PQ 300  $\mu$ M 等組別相較於 PQ 300  $\mu$ M 組並無統計差異 (圖十二(A))。不同濃度的 CHX + SRT1720 + PQ 其細胞存活率相較於 PQ 300  $\mu$ M 依然具顯著差異 ( $F_{11,96} = 34.84$ ,  $tD= 5.360$ 、 $5.408$ 、 $6.030$ 、 $6.785$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)。且不同濃度的 CHX + SRT1720 + PQ，與 SRT1720 +PQ 組並無統計差異 (圖十二(B))。

Act. D 在前處理不同濃度對於細胞的存活率相較於控制組並無統計差異 ( $F_{11,96} = 140.6$ )，不同濃度的 Act. D + PQ 300  $\mu$ M 等組別相較於 PQ 300  $\mu$ M 組並無統計差異，但 Act. D 在處理 0.3 nM 的濃度之下對於細胞的存活率相較於控制組有顯著下降 ( $F_{11,96} = 140.6$ ,  $tD=4.137$ ,  $p<0.01$  by Dunnett's t-test)，所以不

列入後續實驗之考慮 (圖十三(A))。不同濃度的 Act. D + SRT1720 + PQ 其細胞存活率相較於 PQ 300  $\mu$ M 組別,細胞存活率依然有顯著上升 ( $F_{9,80} = 74.39$ ,  $tD = 5.098$ 、 $4.608$ 、 $6.464$ ,  $p < 0.01$  by Dunnett's t-test)。且不同濃度的 Act. D + SRT1720 + PQ, 與 SRT1720 + PQ 組並無統計差異 (圖十三(B))。

### 第十一節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 PGC-1 $\alpha$ 之影響

隨著 PQ 處理時間上升,PGC-1 $\alpha$  蛋白質含量也隨之增高,但未達顯著差異。SRT1720 25h 及 SRT1720+PQ 24h 組,相對控制組或 PQ 24h 組皆無差異 (圖十四(A) & (B))。

PQ 處理下的 PGC-1 $\alpha$  乙醯化程度下降, SRT1720+PQ 組相較 PQ 組乙醯化程度回復(圖十五)。

### 第十二節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 mtTFA 之影響

PQ 3h 組 mtTFA 蛋白的表現量上升,但到 PQ 8h 時開始降低,並在 PQ 24h 時 mtTFA 蛋白的表現量達到最低 ( $F_{5,6} = 7.927$ )。SRT1720 24h 組, mtTFA 蛋白含量並未上升,且在 SRT1720+PQ 24h 組, mtTFA 蛋白含量相較於 PQ 24h 組未有改變。但 PQ 3h 組與 PQ 24h 組相比,達顯著差異 ( $tD = 4.024$ ,  $p < 0.05$  by Dunnett's t-test) (圖十六(B))。

### 第十三節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SOD1 及 SOD2 之影響

PQ 3h 時 SOD1 蛋白表現量上升，PQ 8h、PQ24h 時 SOD1 蛋白表現量下降。SRT1720 24h 組相較控制組 SOD1 蛋白表現量下降，且 SRT1720+PQ 24h SOD1 蛋白表現量相較控制組達顯著下降 ( $F_{5,6} = 7.197$ ,  $tD=4.065$ ,  $p<0.05$  by Dunnett's t-test) (圖十七(B))。

PQ 3h 時 SOD2 蛋白表現量上升，而 PQ 8h、PQ24h 時 SOD2 蛋白表現量下降。SRT1720 24h 組相較控制組 SOD2 蛋白表現量無差異 ( $F_{5,6} = 3.601$ )，但在 SRT1720+PQ 24h 組，SOD2 蛋白含量相較於 PQ 24h 組雖未達顯著差異 ( $tD=0.8423$ )，但有上升的趨勢。PQ 3h 組與 PQ 24h 組相比，達顯著差異 ( $tD=3.592$ ,  $p<0.05$  by Dunnett's t-test) (圖十七(C))。

### 第十四節 SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞的自噬作用影響

在 PQ 組，我們發現 Lamp1 與 LC3 在細胞中的位置有重疊的現象，而 SRT+PQ 組的細胞未看到此現象 (圖十八)。利用西方點墨法來對各組進行 LC3-I 及 LC3-II 蛋白質含量的分析 (圖十九(A))。PQ 24h 時 LC3-II 的蛋白質表現量提升，SRT1720+PQ 組相較於 PQ 組 LC3-II 的蛋白質表現量降低 (圖十九(B))。



## 第十五節 Chloroquine(CQ) 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y

### 細胞的細胞存活率影響

CQ 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響具有顯著之差異  $F(9, 26) = 132.4$ 。隨著 CQ 處理濃度增加，相較於單處理 PQ 組具顯著性之差異 ( $tD=11.31, 14.28, 7.088, p<0.01$  by Dunnett's t-test)。單處理 CQ 100  $\mu\text{M}$  組別對於 SH-SY5Y 細胞即具有毒性 ( $tD=18.23, p<0.01$  by Dunnett's t-test)，因此不列入考慮。

## 第十六節 小鼠腹腔注射 PQ+SRT1720 對於其運動行為之變化

Rotarod 行為測試，注射 PQ (10 mg/kg) 小鼠相較於控制組停留在滾輪上的時間較短，SRT1720 (0.1 mg/kg) + PQ 組及 SRT1720 (1 mg/kg) + PQ 組的小鼠，停留在滾輪上的時間相較於 PQ 組的小鼠較長 (圖二十)。

平衡木橋試驗小鼠在行走的時間上，注射 SRT1720 (0.1 mg/kg) + PQ 組及 PQ 組及 SRT1720 (1 mg/kg) + PQ 組的小鼠相較 PQ 組似乎有行走時間的縮短 (圖二十一(A))，且小鼠後肢滑落次數的測定上具有統計之意義 ( $F_{3,36} = 8.028$ )，其中，W6 PQ 10 mg/kg 與 W1 控制組相比顯著上升 ( $tD=6.149$ )，W6 PQ 10 mg/kg 與 W6 控制組相比顯著上升 ( $tD=11.59$ )，W6 SRT1720 (0.1 mg/kg) + PQ 組與 W6 PQ 10 mg/kg 相比顯著上升 ( $tD=5.703$ )，W6 SRT1720 (1 mg/kg) + PQ 組與 W6 PQ 10 mg/kg 相比顯著上升 ( $tD=6.62$ ) (圖二十一(B))。另外，在六週間的小鼠體重監測無統計差別 (圖二十二)。

**第十七節 小鼠腹腔注射 SRT1720 與 PQ 對於黑質緻密部 (Substantia nigra pars compacta, SNc) 中酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH) 含量之影響**

PQ 組的 SNc 區 TH 含量大幅降低。SRT1720 (0.1 mg/kg) + PQ 組及 PQ 組及 SRT1720 (1 mg/kg) + PQ 組的 TH 含量相較於 PQ 組有回復的情形 (圖二十三)。





本研究的目的是為了解 SRT1720 是否能夠做為 PQ 毒害所造成的神經細胞損傷的治療方針，並且找尋其作用機轉，進而給予帕金森氏症等退化性疾病有潛力的治療方式。

## 粒線體型態、功能及 ROS 生成

長期暴露在環境因子 PQ 下，可能是造成帕金森氏症的原因之一 (Tanner et al., 2011)。尤其 PQ 對於神經系統上有劇烈的傷害 (Castello et al., 2007)。PQ 的毒害與粒線體有著不可分割的關係。先前研究顯示，PQ 會攻擊粒線體電子傳遞鏈的 Complex I (Moretto and Colosio, 2013)，證實了 PQ 對於粒線體的傷害。根據本研究的敘述，PQ 會造成粒線體的型態從長條狀變成萎縮狀 (圖四)、也更造成了 ROS 大量的生成 (圖五-圖七)。前人的研究指出，當細胞處在不健康 (例如低氧環境或是遭受氧化壓力) 的環境中，粒線體的型態會改變成萎縮狀 (Youle, 2003; Ahmad et al., 2013)，與本研究的發現相符。而在 TMRE 螢光染色的研究中發現 SRT1720 會使得粒線體膜電位大量上升，表示 SRT1720 對於 PQ 的保護性可能是來自於對粒線體的保護。

SRT1720 是根據天然植物酚類白藜蘆醇而製造出來的化學衍生物，其由 Sirtris Pharmaceuticals 公司所製造 (Milne et al., 2007)。至今為止，SRT1720 對於粒線體的保護性研究尚未透徹，目前只有 Funk 在 2010 年的研究中初步發現 SRT1720 可以增進粒線體的生合成 (Funk et al., 2010)。針對 SRT1720 對於 PQ 的作用，我們發現不論在細胞存活率 (圖二) 以及粒線體的型態 (圖四) 等研究中都可以確定 SRT1720 的前處理皆可降低 PQ 的毒害。我們也進一步證實了 SRT1720 對於細胞存活率的保護性是來自於降低 PQ 對於細胞凋亡的反應 (圖三)。

PQ 造成電子傳遞鏈的失能，進而促使 ROS 的大量生成。ROS 為不穩定態，會到處攻擊細胞內的蛋白質、DNA，造成細胞的死亡。根據實驗室先前的研究發現 PQ 會造成細胞的大量 ROS 生成 (Huang et al., 2016)。根據 2012 年 He 等人的研究，發現白藜蘆醇能夠降低 PQ 所造成細胞中超氧化物的形成 (He et al., 2012)。在本研究中，SRT1720 不僅能顯著降低 PQ 所造成細胞質中的超氧化物的形成，也能降低細胞中的過氧化物及粒線體中的超氧化物的形成 (圖五-圖七)。而 PQ 主要大量生成的 ROS 為  $O_2^-$  (Drechsel and Patel, 2009; Janda et al., 2015)，其為超氧化物的一種，更證明了 SRT1720 對於 PQ 毒害下的保護性。

## Sirtuin Family

Sirtuin 是一種 NAD<sup>+</sup> dependent protein deacetylase，研究顯示其能使目標蛋白去乙酰化，使得目標蛋白有不同的作用。Sirtuin 蛋白在一開始是在 Yeast 中被發現其能調控壽命長短，隨後在哺乳類動物中才發現有同源基因 (homologs gene)，並稱之為基因沉默調節者 (Silent information regulator 2) (Kaeberlein et al., 1999)。Sirt1 蛋白能參與 histone 的去乙酰化，使 DNA 與 histone 纏繞得更緊，進而使基因無法表現。SRT1720 及 RSV 在研究初期，以能夠有效活化 Sirtuin 蛋白做為一大論點，但至今 SRT1720 及白藜蘆醇是否主要標的在 Sirtuin 蛋白依然眾說紛紛 (Pacholec et al., 2010)。雖然 SRT1720 在細胞中的作用位置並未透徹，但依然有不少研究表示 SRT1720 不僅在老化、糖尿病、免疫系統以及神經系統都具有強烈的保護性。先前的研究也發現 SRT1720 可以增加粒線體的合成 (Funk et al., 2010)。

SRT1720 為具有強烈保護性的藥物，但至今鮮少有人將 SRT1720 測試在對於 PQ 毒性的緩解上的研究上。前人的研究利用 PQ 所發展出的肺部傷害之研究中，發現 SIRT1/NRF2/ARE 之訊息傳遞訊息路徑非常重要 (Li et al., 2016)。

所以本研究將探測 SIRT1720 及其對應的 Sirtuin 蛋白在神經元中是否能夠做為 PQ 毒性緩解的目標，以了解 SIRT1720 對於神經退化性疾病的治療潛力。根據我們的研究結果，我們推測 Sirt1 對於細胞遭受 PQ 毒害時具有一定的保護性 (圖九、圖十)，且 SIRT1720 增強了 Sirtuin 的蛋白表現量來對 PQ 的毒害有所緩解 (圖十一)。根據圖十二及圖十三的結果，即使我們依然不能確定 SIRT1720 在細胞中的正確作用位置，但是我們可以推測 SIRT1720 不僅在轉錄或是轉譯作用之外，可能在轉譯後修飾 (Post-translation modification) 等其他調控方式上可能具有作用。SIRT1720 也許增強了細胞本身製造的 Sirtuin 的蛋白的作用，已達毒害之緩解。但是 SIRT1720 對於 Sirtuin 蛋白的活化是根據甚麼樣的作用，還需做更進一步的探究。

### 細胞凋亡與自噬作用

根據先前實驗室的研究，PQ 會誘導細胞產生細胞凋亡 (Huang et al., 2012)，而本研究證實了 SIRT1720 可緩解 PQ 誘導的細胞凋亡 (圖三)。前人研究指出，PQ 不僅參與細胞凋亡，且大量的使細胞自噬體停滯在細胞中，造成待降解之蛋白大量堆積在細胞間 (Janda et al., 2015)。而如果將 PQ 所產生的自噬作用停滯更能誘導細胞走向細胞凋亡 (Gonzalez-Polo et al., 2007)。根據 Janda 在 2015 年的研究，發現 PQ 會抑制 mTOR 的活性，活化 mTOR 的上游，且增加 BECN1 的表現 (Janda et al., 2015)。而前人也發現低劑量極短時間的 PQ 會造成 LC3-II 的蛋白表現量下降。根據本文的研究發現，PQ 處理 3h 及 8h，LC3-II 的蛋白表現量下降，而 24h LC3-II 的蛋白表現量大幅上升。而 SIRT1720 前處理可以緩解 PQ 所造成的自噬作用停滯。另外，根據 2016 的文獻調查 (Xu and Wang, 2016)，發現 CQ 會使得 PQ 所造成的細胞存活率下降回復，與本文的研究相符。雖然 PQ 與自噬作用有著不可分割的關係，但目前為止，關於 PQ 與自噬作用的研究尚少，本研究目前初步判斷 SIRT1720 對於自噬作用的緩解與否，而尚未探究 PQ

及 SRT1720 的作用位置，而至今為止 PQ 作用在自噬作用的位置還尚未透徹，需做進一步的釐清。

## 粒線體相關蛋白

PGC-1 $\alpha$  是主要調控粒線體生合成的蛋白。先前的研究即發現 PGC-1 $\alpha$  可以誘導抗氧化酶的生成，增加清除內源性 ROS 的效率 (St-Pierre et al., 2006)，PGC-1 $\alpha$  受磷酸化 (Phosphorylation)、去乙醯化、甲基化 (Methylation) 及泛素化 (Ubiquitination) 等四種方式調控，前人的研究也發現 RSV 可以促使 PGC-1 $\alpha$  去乙醯化，並活化 PGC-1 $\alpha$  的作用 (Lagouge et al., 2006)。在我們的研究中，PGC-1 $\alpha$  的總蛋白表現量未因 PQ 的處理時間增加或是 SRT1720 的前處理而有所改變 (圖十四)，在 PGC-1 $\alpha$  去乙醯化的程度，PQ 組 PGC-1 $\alpha$  去乙醯化的程度下降，SRT1720+PQ 組 PGC-1 $\alpha$  去乙醯化程度回復。在 2010 年 Funk 的研究中發現 SRT1720 雖增加了 PGC-1 $\alpha$  的總蛋白表現量，但單看 PGC-1 $\alpha$  的乙醯化程度不變，綜觀以上結果可見整體 PGC-1 $\alpha$  去乙醯化程度下降 (Funk et al., 2010)。SRT1720 是否能透過對於 PGC-1 $\alpha$  去乙醯化程度達到對粒線體的保護，亦或是 PGC-1 $\alpha$  是否還需其他調控造成活化，還需做進一步的釐清。

PGC-1 $\alpha$  會經由活化下游蛋白 mtTFA 增加粒線體的生合成 (Xu et al., 2014)。根據 Peng 在 2016 年的研究指出，當細胞暴露在 Rotenone 下，RSV 可以經由回復 mtTFA 的蛋白質表現量已達到粒線體的保護性 (Peng et al., 2016)。而在我們的研究中，當 PQ 的處理時間增加，mtTFA 的蛋白表現量隨之減少，但前處理 SRT1720 尚未使 mtTFA 的蛋白表現量回復。而相對的，單處理 SRT1720 也未使 mtTFA 的蛋白質表現量增加。所以 SRT1720 是否能透過增加 mtTFA 的表現量或是功能來達到對粒線體的保護，還需做進一步的釐清。

在我們的研究中，SOD1 及 SOD2 蛋白表現量隨著 PQ 的處理時間增加而下降，與 Julie St-Pierre 發表的論文比較 (St-Pierre et al., 2006)，對 Striatum cells 以 PQ 150  $\mu$ M 處理 12 及 24 小時，SOD1 表現量上升，SOD2 表現量下降，與我們的結果不一致。原因可能是不同的作用濃度所致，也有可能因為細胞質間還有其他的抗氧化基因在調控自由基的生成。SOD2 因前處理 SRT1720 而有蛋白質表現量回復的情形。這更進一步確認了 SRT1720 會在細胞受毒害下對粒線體的功能有所保護。

### 小鼠運動行為

在組織學以及行為學的研究都已經證實 PQ 確實會經由毒害中腦 SNc 區的多巴胺神經元而降低小鼠活動行為 (Campos et al., 2013)。實驗室先前的研究也證實 PQ 會使得 Sprague-Dawley 公鼠的中腦 SNc 區的多巴胺神經元死亡，導致運動能力的降低 (Huang et al., 2016)。而在行為實驗的研究上，先前即有研究發現對於 SOD1<sup>G93A</sup> 的 ALS model Mice 每日施打 RSV 可以減緩其運動行為上的傷害 (Mancuso et al., 2014)。本研究對於注射 SRT1720+PQ 做運動行為及組織上的檢測，發現不論是施打較低濃度 (0.1 mg/kg) 或是較高濃度的 SRT1720 (1 mg/kg) 的 SRT1720 都能夠保護 C57BL/6 小鼠的中腦 SNc 區的 DAergic neuron 受到較低的 PQ 毒害，並在運動行為上看到些微的改變：SRT1720 低濃度+PQ 組及 SRT1720 高濃度+PQ 組的小鼠，停留在滾輪上的時間相較於 PQ 組的小鼠較長，且獨木橋試驗中，注射 SRT1720 低濃度+PQ 組及 SRT1720 高濃度+PQ 組的小鼠似乎有行走時間的縮短，但兩者皆無達統計之差異。我們的推測有二：各組間小鼠對於學習力之差異，以及因帕金森氏症的運動行為能力受到改變時，多巴胺細胞已失去 75-90%，雖然我們在後續對於小鼠大腦切片的結果證實 PQ 對於多巴胺細胞有所傷害 (圖二十三)，但我們所施打的次數及時間可能還不及讓小鼠的運動行為產生的巨變。在獨木橋試驗中小鼠後肢滑



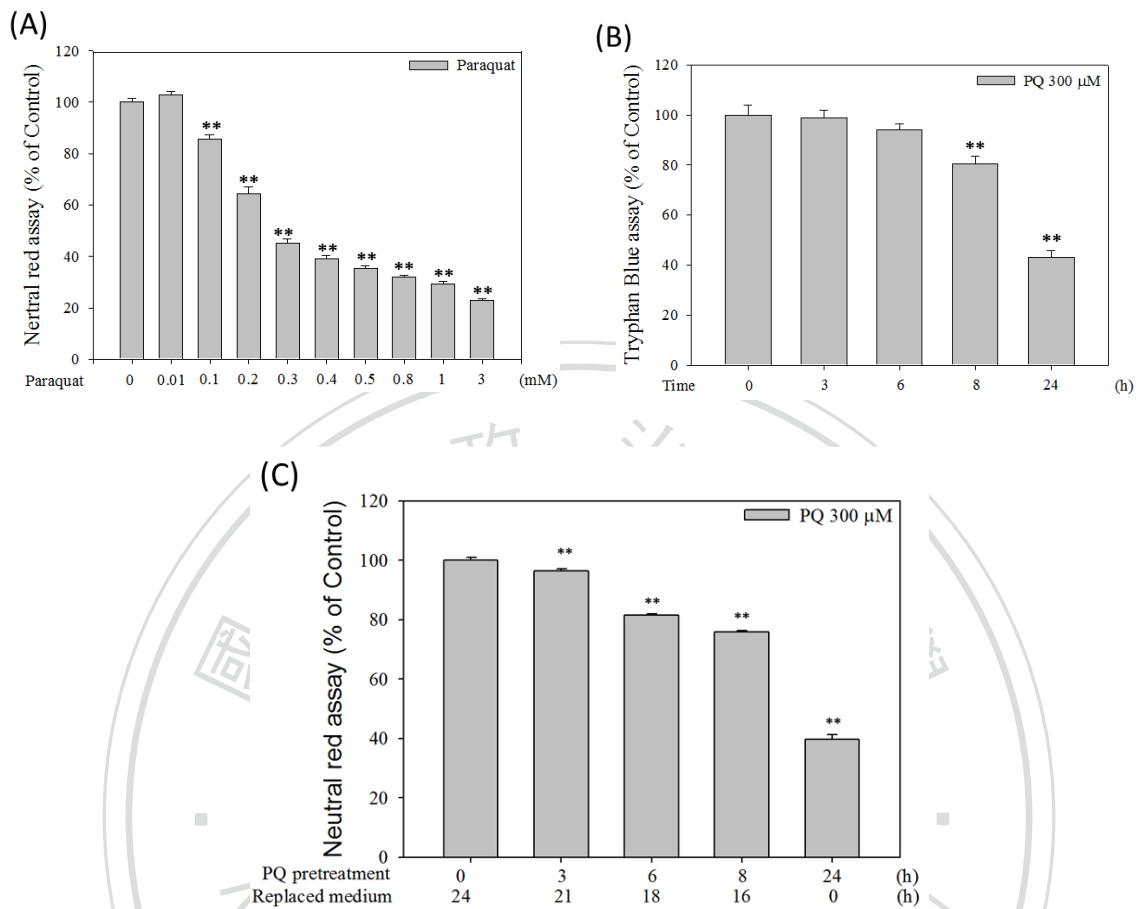
落次數的測定上，SRT1720 低濃度+PQ 組及 SRT1720 高濃度+PQ 組的小鼠後肢滑落次數相較於 PQ 組較少，表示 SRT1720 在因 PQ 所毒害的小鼠身上可能具有運動協調上的保護能力。另外，在六週間的小鼠體重監測結果發現，我們注射的 SRT1720 及 PQ 劑量並不會造成小鼠體重的差異。



## 第五章 結論及未來展望

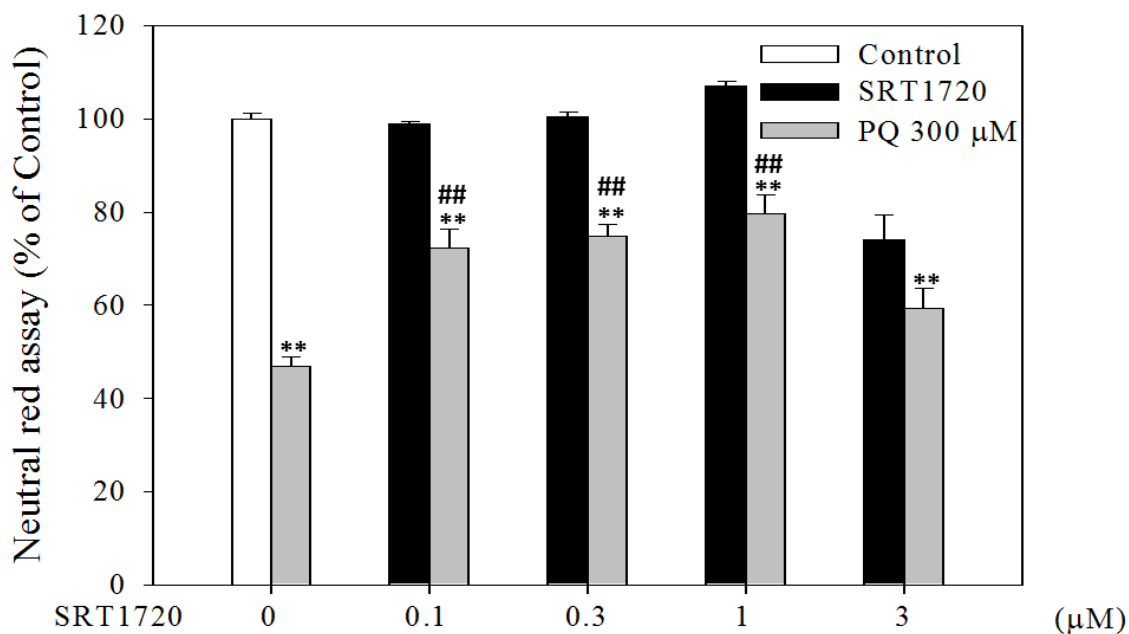
PQ 會經由攻擊粒線體，造成中腦 SNc 區的多巴胺神經元損傷，因此 PQ 作為帕金森氏症的誘因之一已是眾所皆知，但至今為止尚未有適當的藥物來對 PQ 的毒性做緩解。又由於流行病學的研究指出，在台灣因 PQ 中毒而死亡的患者並不在少數，所以尋找針對 PQ 毒害的緩解方式有一定的急迫性。本研究經由多方面向來針對白藜蘆醇衍生物 SRT1720 對於 PQ 毒性的影響作為測試，皆發現不僅在細胞凋亡、自噬作用、抑或是個體行為檢測上都能確定 SRT1720 具有相當的保護性。另外，在影像觀測、自由基含量以及粒線體膜電位檢測上，我們皆可發現 SRT1720 對於粒線體有高度的保護性。而 SRT1720 對 PQ 毒性的緩解的分子機制上，我們也確認其對於 Sirtuin 蛋白的作用有關，但 SRT1720 對 PQ 毒性的緩解是否通過 Sirtuin 蛋白而增加 PGC-1 $\alpha$ 、mtTFA 等蛋白的活性來達到對粒線體的保護，還需要做進一步的檢測與分析。本研究針對白藜蘆醇衍生物 SRT1720 對於治療 PQ 所致帕金森氏症的治療藥物提供一個有效潛力的治療方式。





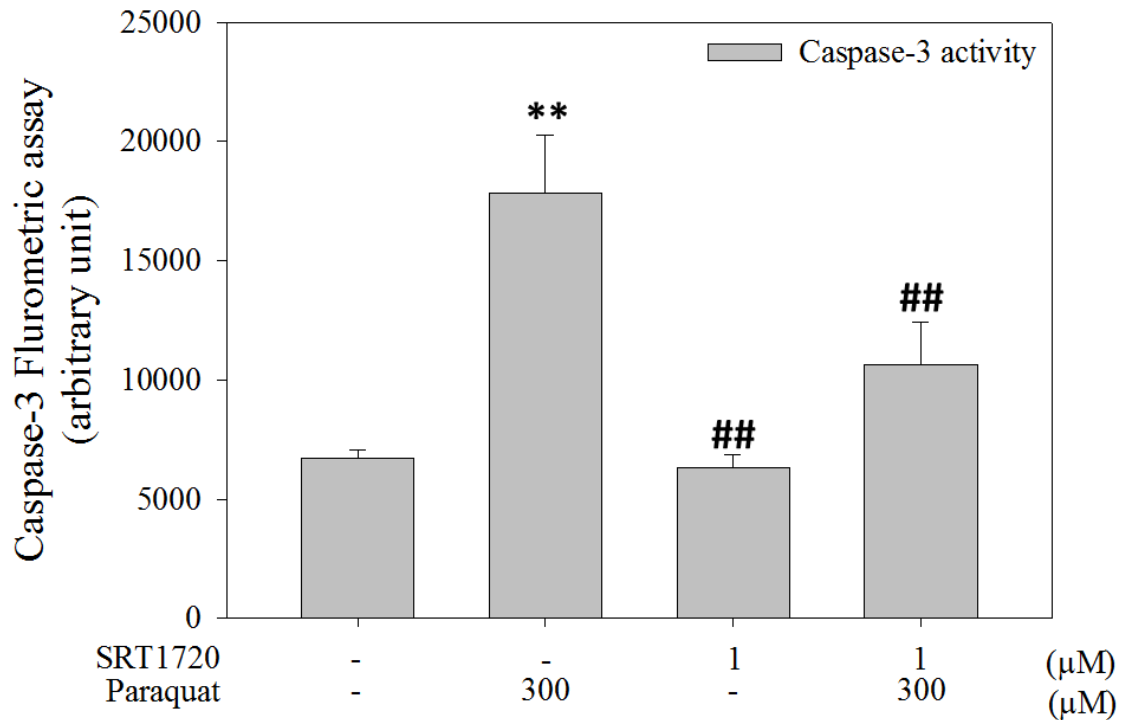
圖一、不同濃度及時間之 PQ 處理對於 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響

將 SH-SY5Y 細胞 (A) 分別給予不同濃度之 PQ 培養 24 小時 (n=18 in each group), (B) 給予 300 μM PQ, 分別培養 0, 3, 6, 8, 24 小時 (n=6-10 in each group), (C) 給予 300 μM PQ, 培養 3, 6, 8 小時時, 分別置換成正常培養液, 總時間培養 24 小時, 再以 Neutral red assay 及 Trypan blue assay 進行細胞存活率之分析。實驗數據以 mean±SEM 表示, 並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析, 其中\*\*表示 p<0.01。



圖二、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響

將 SH-SY5Y 細胞分別給予不同濃度之 SRT1720 培養一個小時後，給予 300 μM PQ。培養 24 小時，再以 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析 (n=9-18 in each group)。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*\*表示與 control 組相比 p<0.01，##表示與 PQ 300 μM 相比 p<0.01。



圖三、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞 caspase-3 活性變化測定

將 SH-SY5Y 細胞給予 1 μM SRT1720 培養一個小時後，給予 300 μM PQ，培養 24 小時後，利用 Caspase-3 Fluorometric Assay Kit 測定各組 Caspase-3 活性變化 (n= 9 in each group)。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析。其中\*\*表示與 control 組相比 p<0.01，##表示與 PQ 300 μM 組相比 p<0.01。

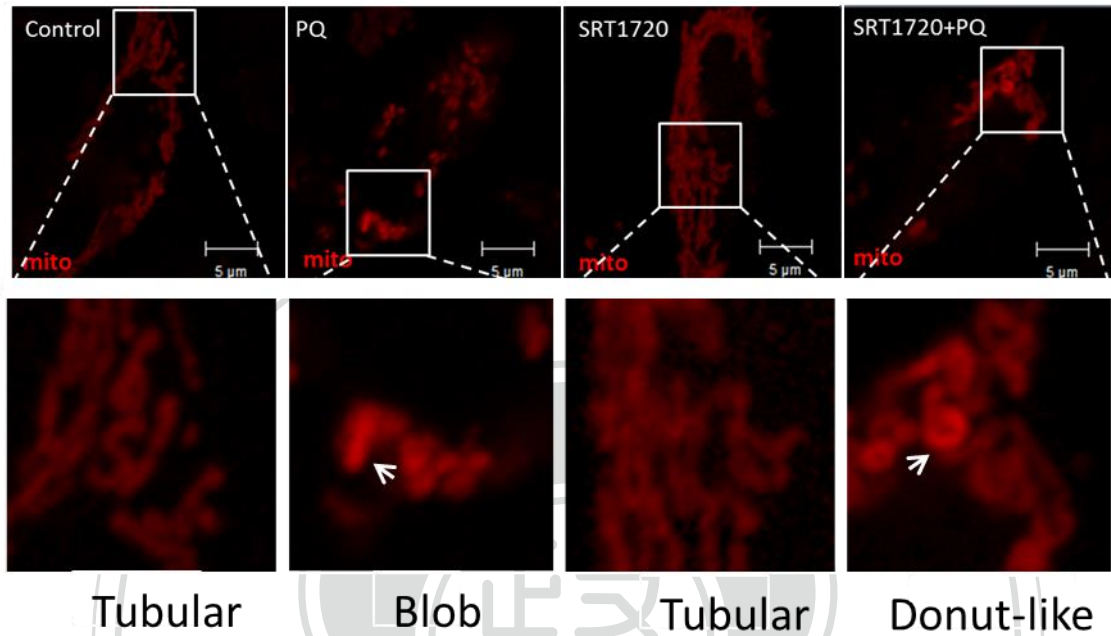


圖 四、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的粒線體型態變化

將 SH-SY5Y 細胞利用轉殖 pDsRed2-Mito 將粒線體染色，24 小時後，給予 1 μM 之 SRT1720，培養一個小時後，再給予 300 μM PQ 培養 24 小時後，以共軛焦顯微鏡觀察粒線體形態變化。

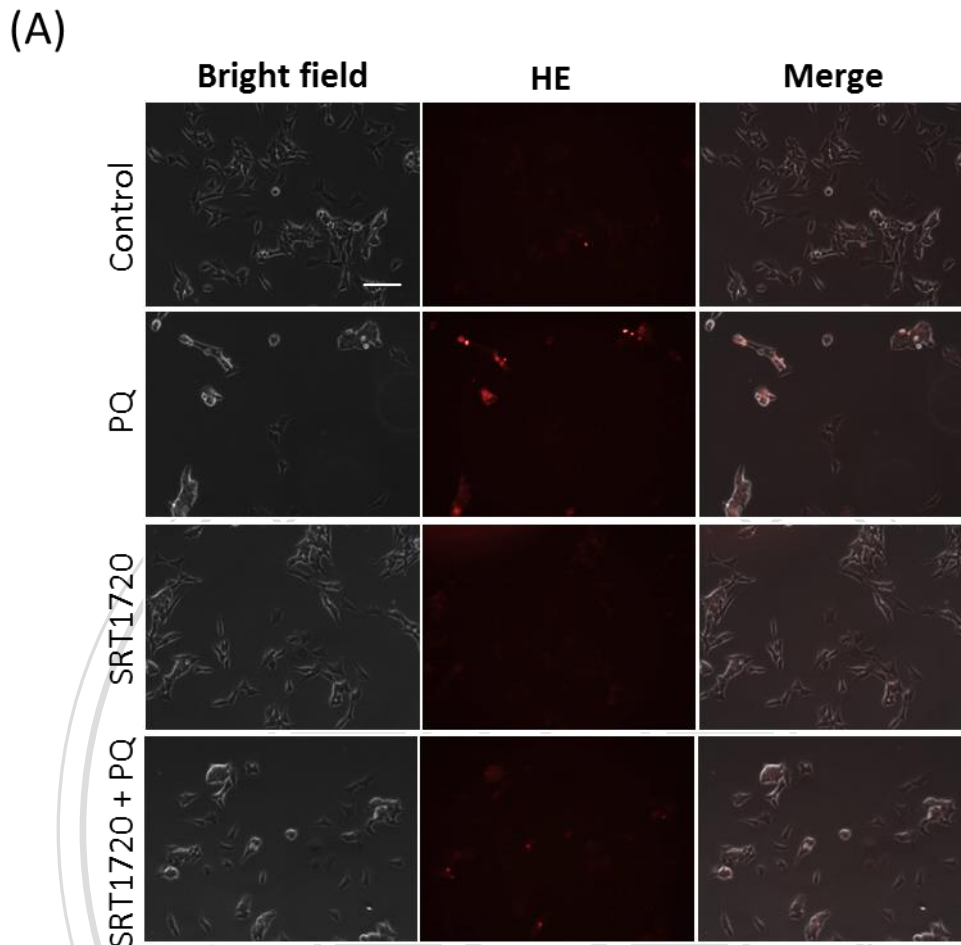


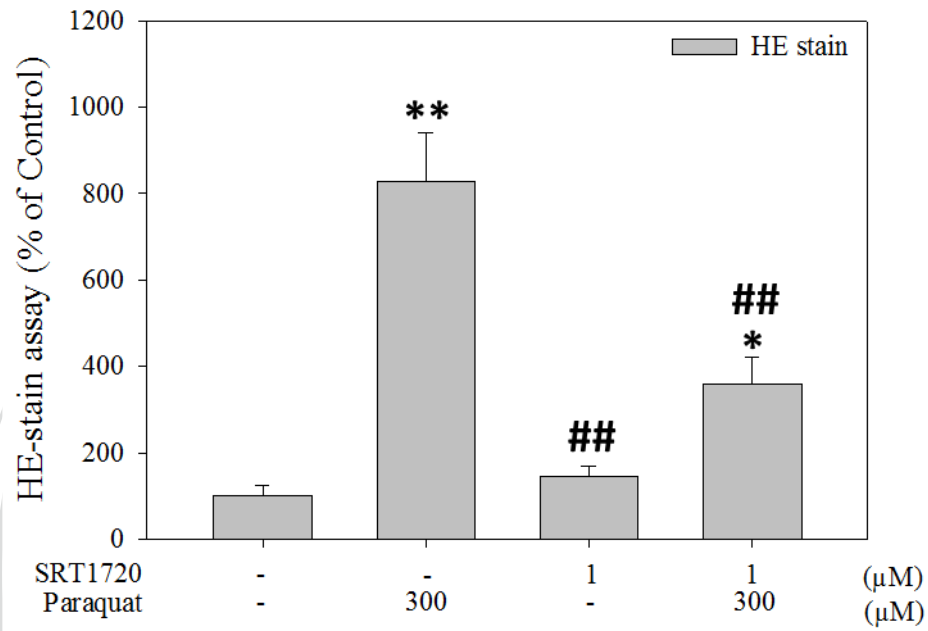
圖 五、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞超氧化物(superoxide) 生成之影響

將 SH-SY5Y 細胞給予 1  $\mu\text{M}$  SRT1720，培養一個小時後，給予 300  $\mu\text{M}$  PQ，培養 24 小時之後加入 Dihydroethidium (HE) 10  $\mu\text{M}$  染色，培養 10 分鐘後，以螢光顯微鏡觀察螢光的變化 (total n=28-30，每個視野下擷取 8-10 個細胞作為定量，每次實驗每組各擷取一張圖，共三次實驗)。(A) 螢光顯微鏡下之明視野成像圖 (左)、螢光視野圖 (中) 以及疊合圖 (右)，(B) 螢光定量圖。實驗數據以  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析。其中 \* 表示與 control 組相比  $p < 0.05$ ，\*\* 表示與 control 組相比  $p < 0.01$ ，## 表示與 PQ 300  $\mu\text{M}$  組相比  $p < 0.01$ 。



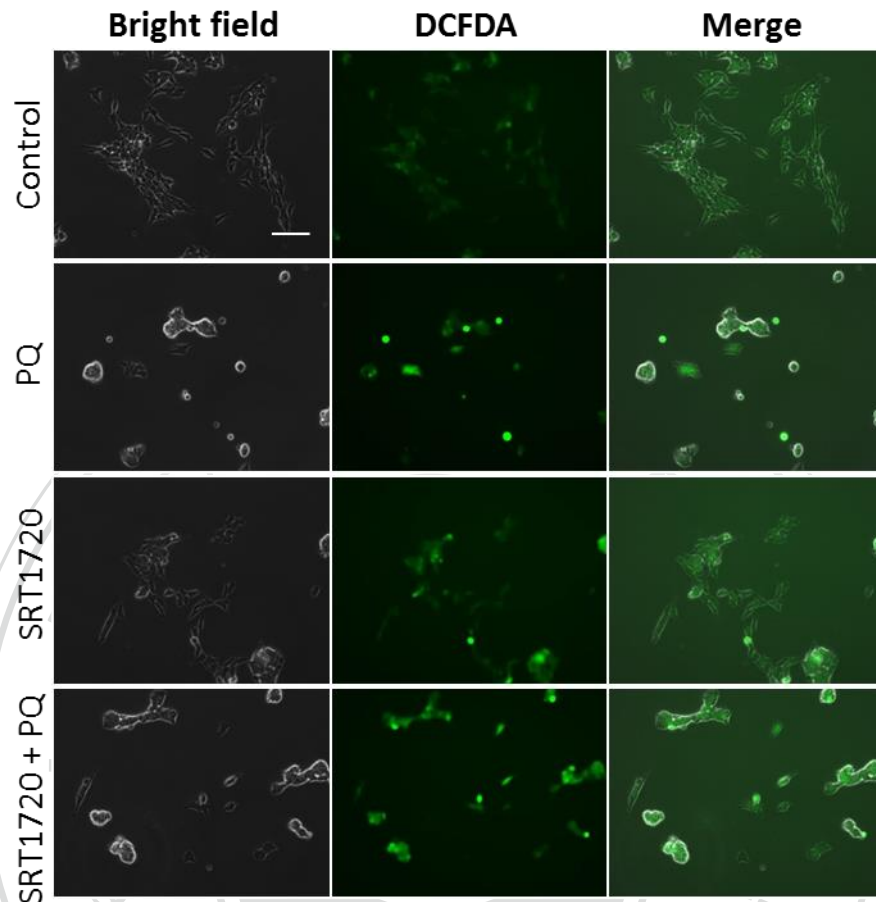
續前頁

(B)



National Chengchi University

(A)

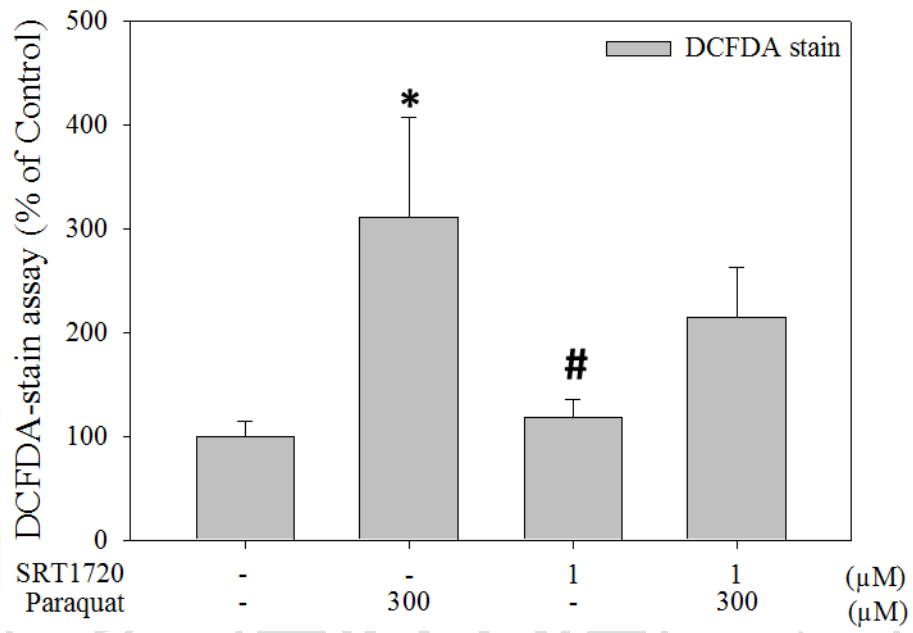


圖六、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞中過氧化物(peroxide) 生成之影響

將 SH-SY5Y 細胞給予 1  $\mu\text{M}$  SRT1720，培養一個小時後，給予 300  $\mu\text{M}$  PQ，培養 24 小時之後加入 DCFDA 20  $\mu\text{M}$  染色，培養 30 分鐘後以螢光顯微鏡觀察螢光的變化 (total n=25-30，每個視野下擷取 8-10 個細胞作為定量，每次實驗每組各擷取一張圖，共三次實驗)。(A) 螢光顯微鏡下之明視野成像圖 (左)、螢光視野圖 (中) 以及疊合圖 (右)，(B) 螢光定量圖。實驗數據以  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*表示與 control 組相比  $p < 0.05$ ，#表示與 PQ 300  $\mu\text{M}$  組相比  $p < 0.05$ 。

續前頁

(B)



National Chengchi University

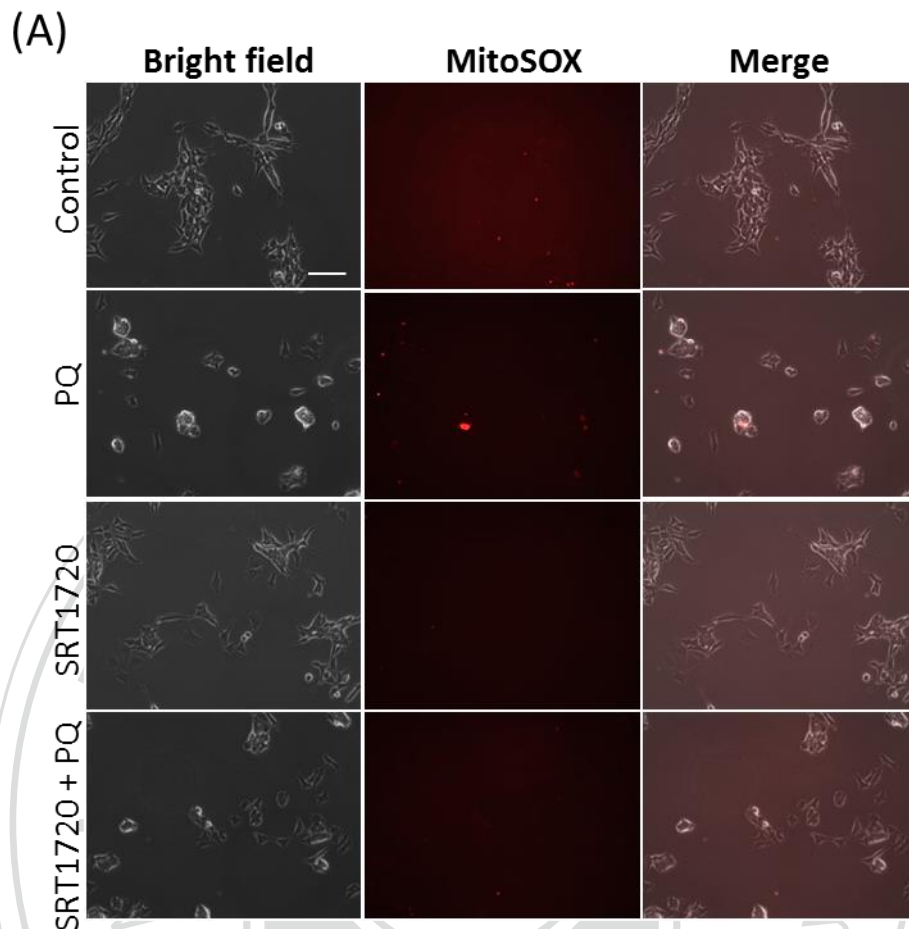
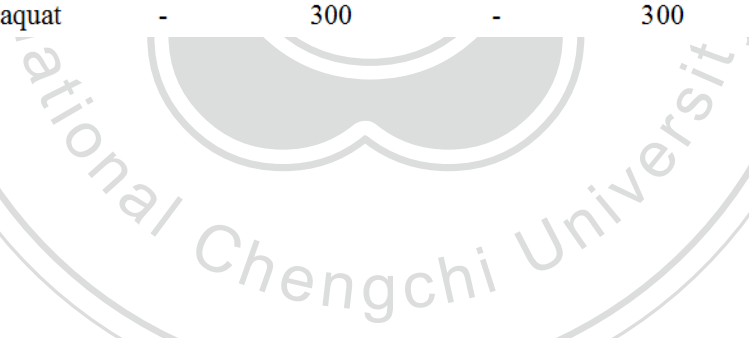
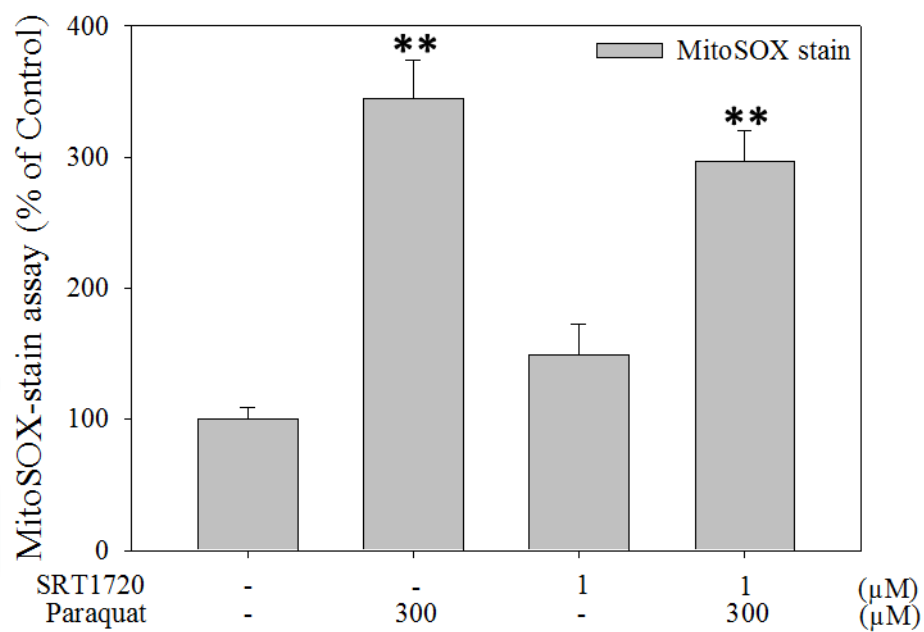


圖 七、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞粒線體中超氧化物 (Mitochondrial Superoxide) 生成之影響

將 SH-SY5Y 細胞給予 1  $\mu$ M SRT1720，培養一個小時後，給予 300  $\mu$ M PQ，培養 24 小時之後加入 MitoSOX 5  $\mu$ M 染色，培養 15 分鐘後以螢光顯微鏡觀察粒線體中的螢光變化 (total n=8-10，每個視野下擷取 8-10 個細胞作為定量，每次實驗每組各擷取一張圖，三次中實驗擷取一次實驗結果作為定量)。(A) 螢光顯微鏡下之明視野成像圖 (左)、螢光視野圖 (中) 以及疊合圖 (右)，(B) 螢光定量圖。實驗數據以 mean $\pm$ SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*\*表示與 control 組相比 p<0.01。

續前頁

(B)



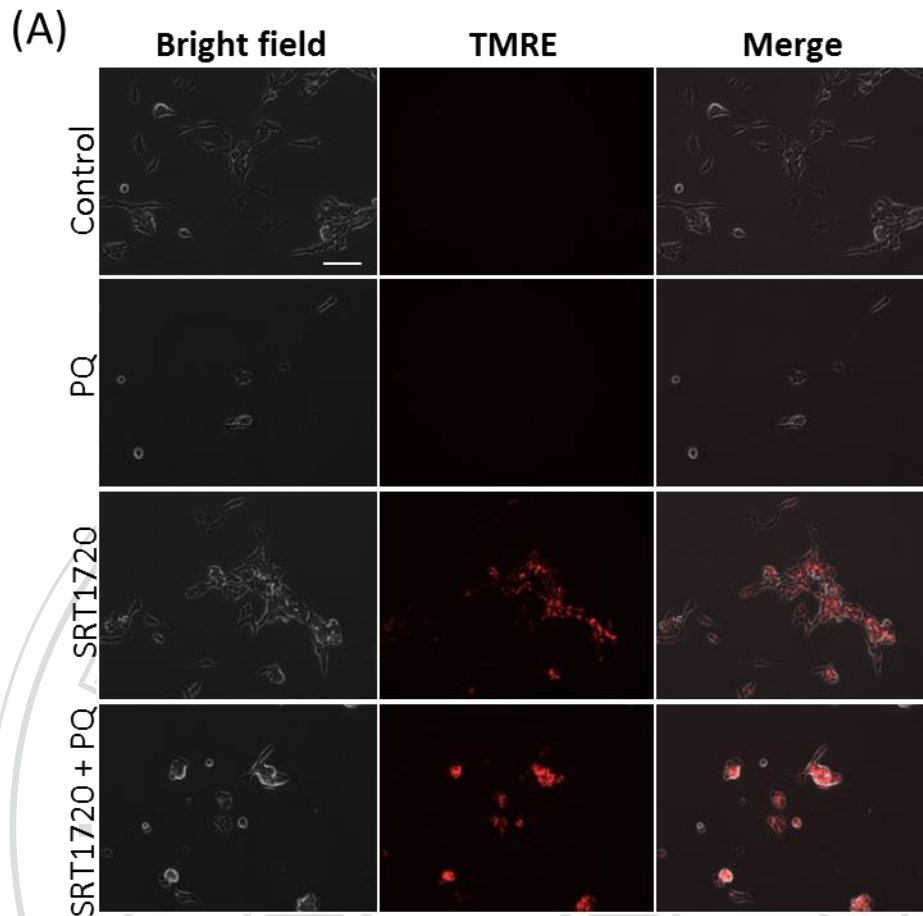
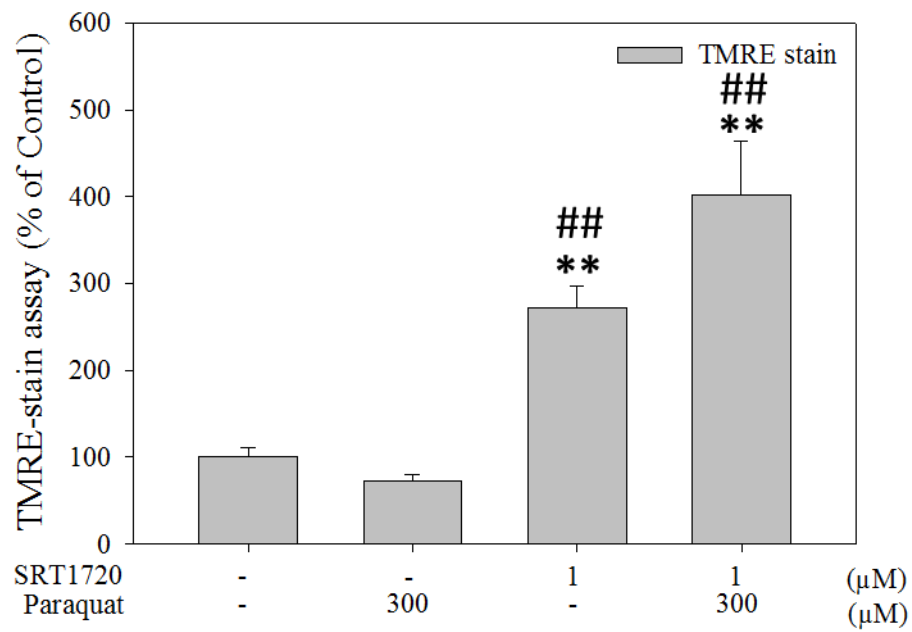


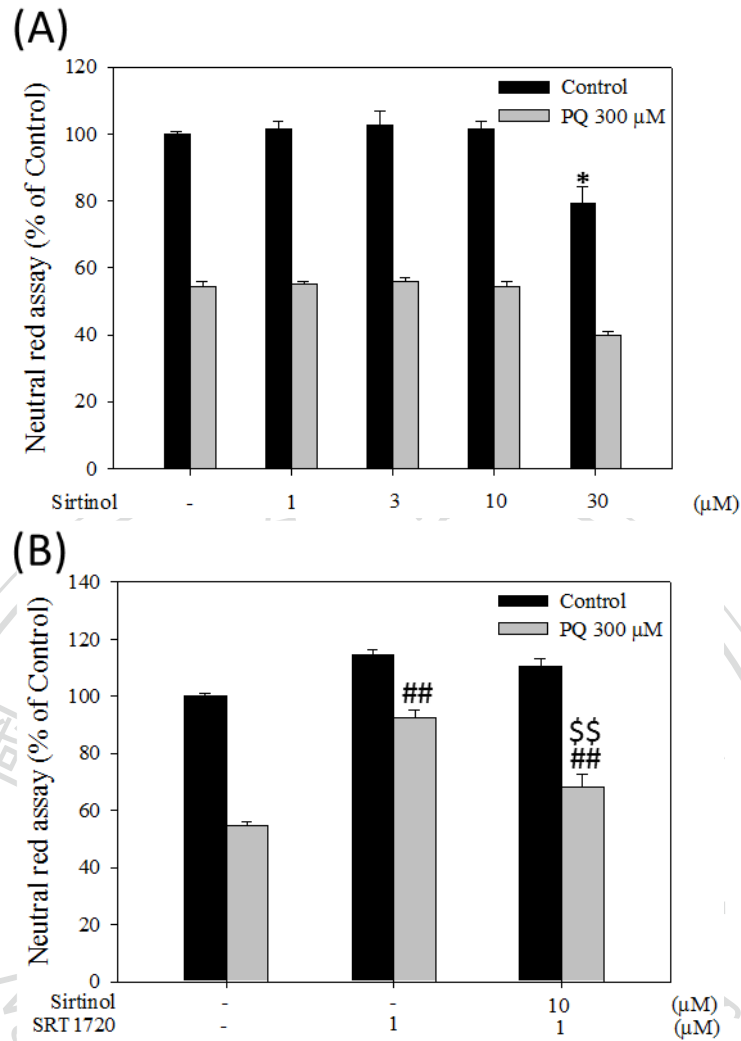
圖 八、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞粒線體膜電位變化之影響

將 SH-SY5Y 細胞給予 1  $\mu$ M SRT1720，培養一個小時後，給予 300  $\mu$ M PQ，培養 24 小時之後加入 TMRE 100 nM 染色，培養 10 分鐘後以螢光顯微鏡觀察螢光的變化 (total n=24-30，每個視野下擷取 8-10 個細胞作為定量，每次實驗每組各擷取一張圖，共三次實驗)。(A)螢光顯微鏡下之明視野成像圖 (左)、螢光視野圖 (中) 以及疊合圖 (右)，(B)螢光定量圖。實驗數據以 mean $\pm$ SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*\*表示與 control 組相比 p<0.01，##表示與 PQ 300  $\mu$ M 組相比 p<0.01。

續前頁

(B)

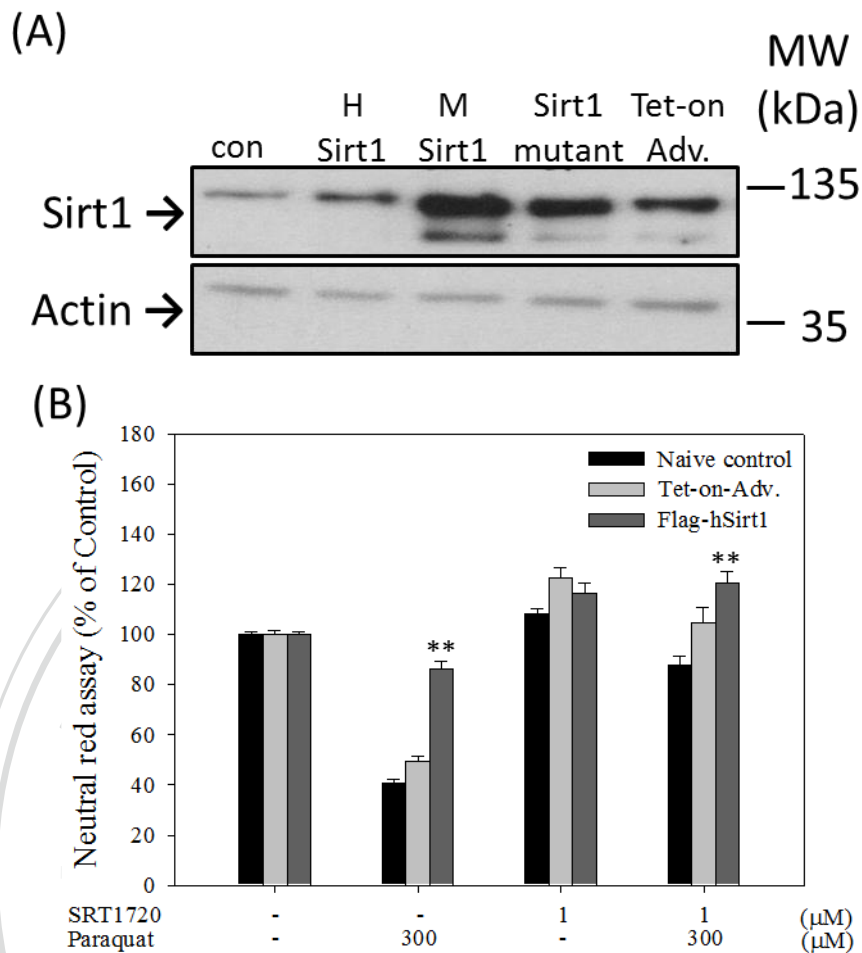




圖九、Sirt1 抑制劑 Sirtinol 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響

將 SH-SY5Y 細胞分別給予不同濃度之 Sirtinol，培養一個小時後，加入 1 μM SRT1720，培養一個小時之後給予 300 μM PQ，培養 24 小時並以 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析 (n=9)。(A)測試 Sirtinol 對 SH-SY5Y 細胞是否具毒殺效果，(B)測試 Sirtinol 是否阻擋 SRT1720 對於 SH-SY5Y 細胞的保護效果。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*\*表示與 control 組相比 p<0.01，##表示與 PQ 300 μM 組相比 p<0.01，\$\$表示與 SRT1720 1 μM + PQ 300 μM 組相比 p<0.01。





圖十、轉染 hSirt1 對前處理 SRT1720 對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響

(A)將 SH-SY5Y 細胞分別轉染 Tet-on Advanced 及 hSirt1，利用西方點墨法確認 Sirt1 蛋白質含量變化，(B)分別轉染 Tet-on Advanced 及 hSirt1 後，利用 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析。實驗數據以  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*\*表示與 Tet-on Advanced 相比  $p < 0.01$ 。

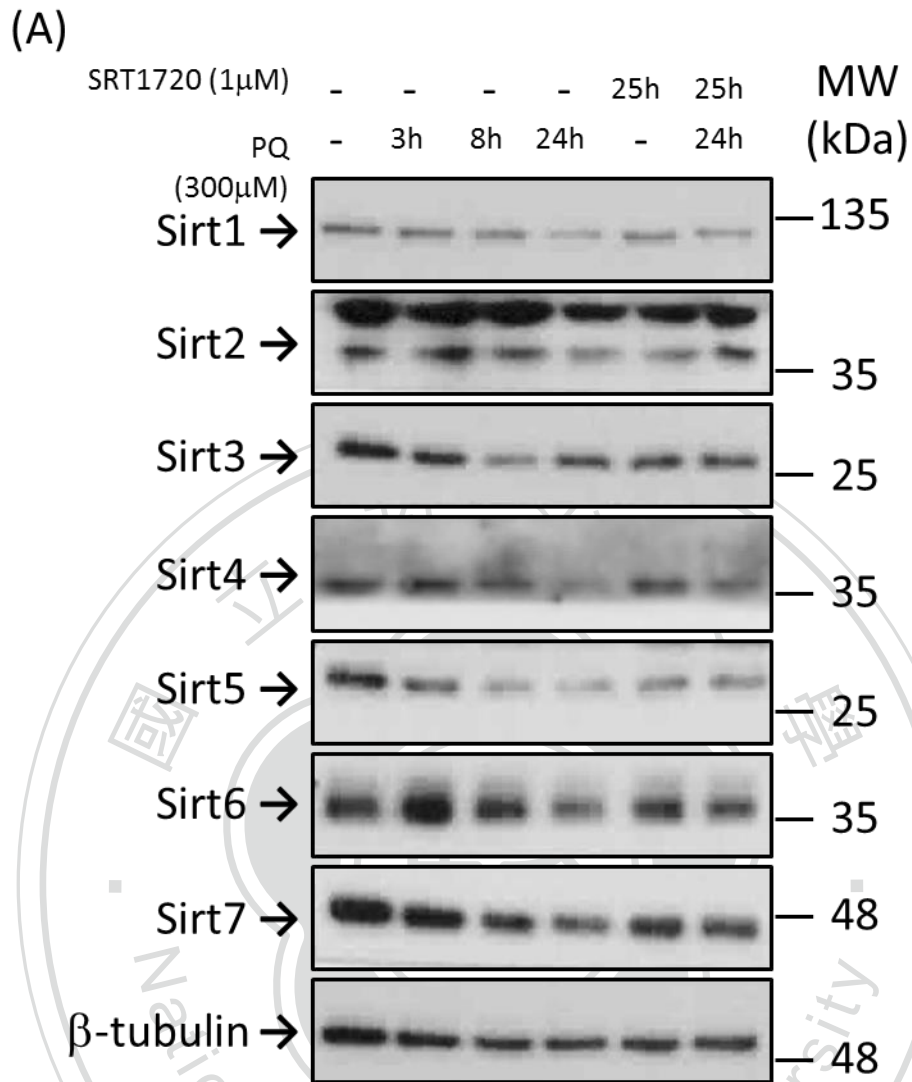
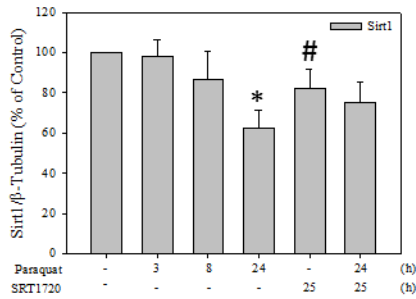


圖 十一、SRT17202 前處理對於 PQ 所造成 Sirt1-Sirt7 蛋白質之影響

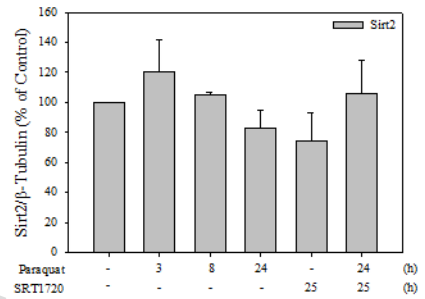
(A) SH-SY5Y 細胞以 1  $\mu$ M SRT1720 前處理一小時後，加入 300  $\mu$ M PQ 處理 24 小時，或著以 300  $\mu$ M PQ 處理不同時間後，利用西方點墨法進行 Sirt1-Sirt7 蛋白質含量分析。(B)Sirt1 定量圖，(C)Sirt2 定量圖，(D)Sirt3 定量圖，(E)Sirt4 定量圖，(F)Sirt5 定量圖，(G)Sirt6 定量圖，(H)Sirt7 定量圖。

續前頁

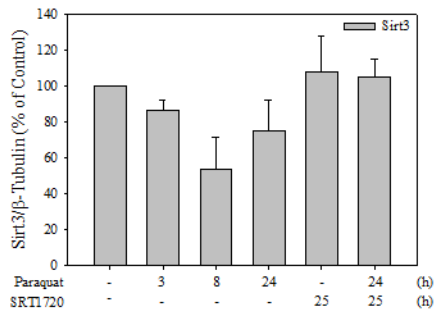
(B)



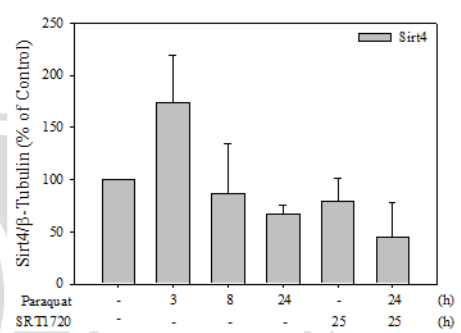
(C)



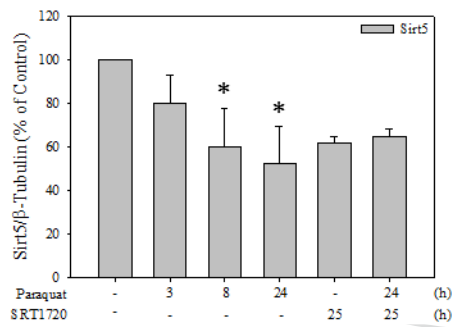
(D)



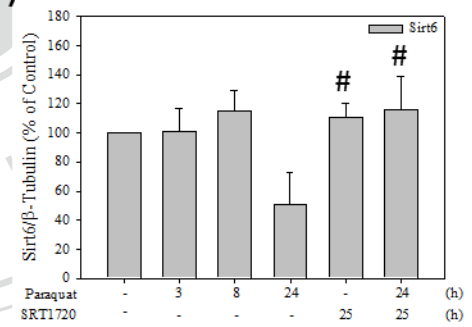
(E)



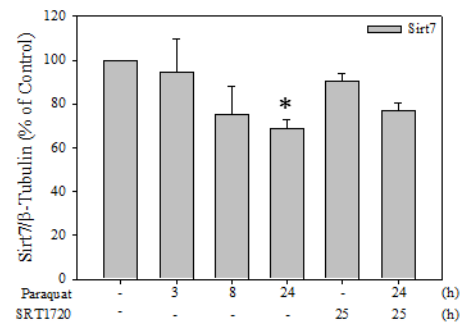
(F)



(G)



(H)



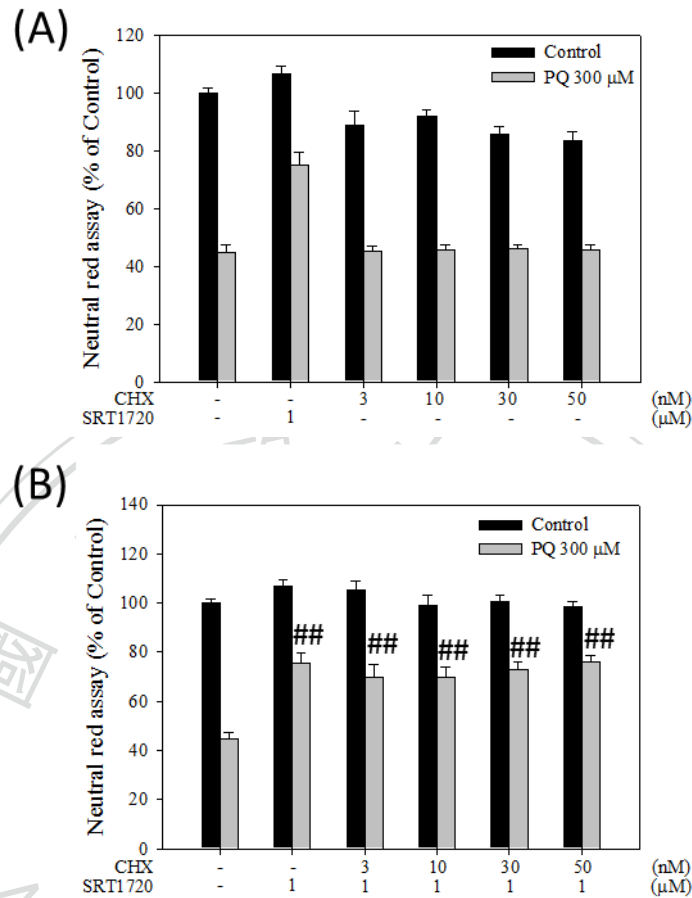


圖 十二、Cycloheximide (CHX) 前處理後，測試 SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響

(A)將 SH-SY5Y 細胞分別給予不同濃度之 CHX，培養 4 個小時後，再給予 300 μM PQ，培養 24 小時後，以 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析 (n=9 in each group)。 (B)將 SH-SY5Y 細胞分別給予不同濃度之 CHX，培養 3 個小時後，加入 1 μM SRT1720，培養一個小時後給予 300 μM PQ，再培養 24 小時，另以 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析 (n=9)。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中##表示與 PQ 300 μM 組相比 p<0.01。

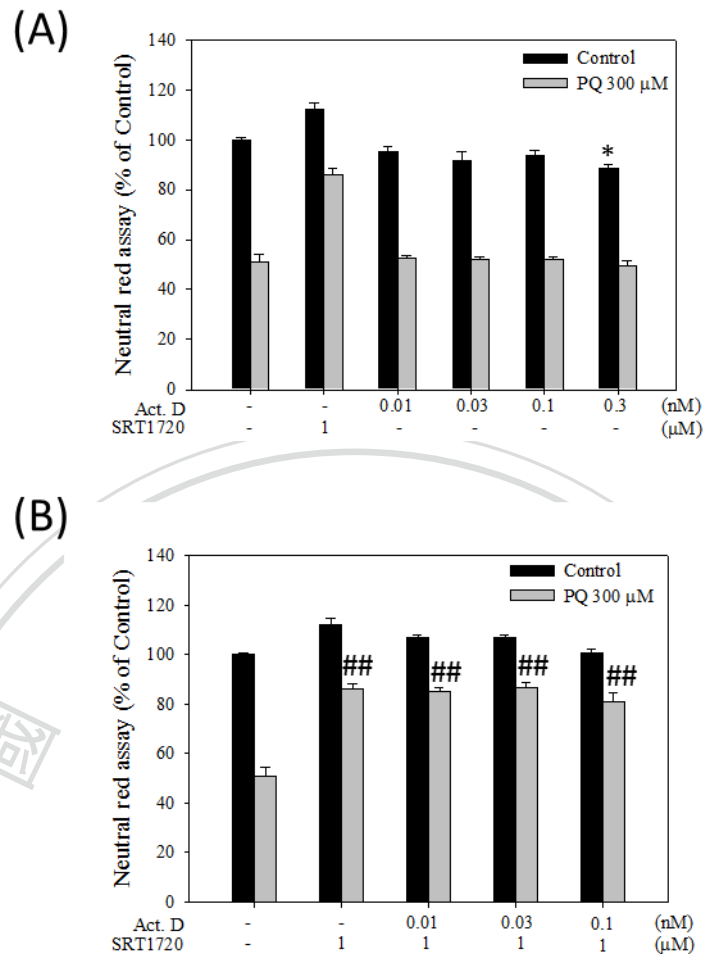
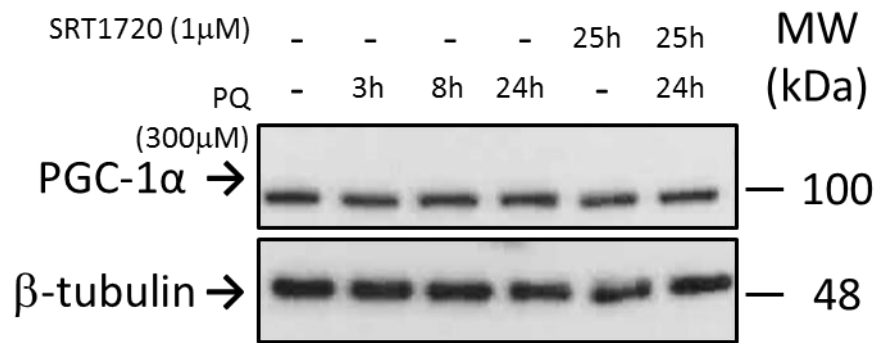


圖 十三、Actinomycin D (Act. D) 前處理後，評估 SRT1720 對於 PQ 所造成 SH-SY5Y 細胞存活率的影響

(A)將 SH-SY5Y 細胞分別給予不同濃度之 act. D 培養 3 個小時，再給予 300 μM PQ 培養 24 小時，以 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析 (n=9)。(B) 將 SH-SY5Y 細胞分別給予不同濃度之 Act. D 培養 3 個小時後，加入 1 μM SRT1720，培養一個小時，再給予 300 μM PQ，培養 24 小時，另以 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析 (n=9) 實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*表示與 control 組相比 p<0.05，##表示與 PQ 300 μM 組相比 p<0.01。

(A)



(B)

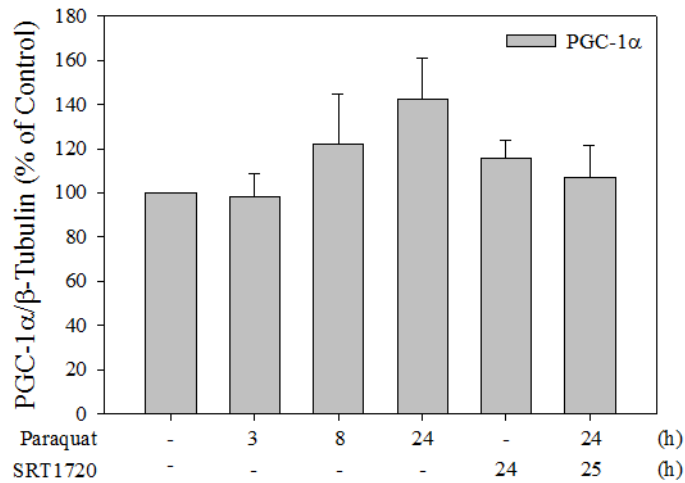


圖 十四、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 PGC-1 $\alpha$  蛋白質之影響

(A)SH-SY5Y 細胞以 1  $\mu$ M SRT1720 前處理一小時後，加入 300  $\mu$ M PQ 處理 24 小時，或著以 300  $\mu$ M PQ 處理不同時間後分別將細胞收下，再利用西方點墨法進行 PGC-1 $\alpha$  蛋白質含量分析。(B)將西方點墨法分析 PGC-1 $\alpha$  的結果進行定量圖。

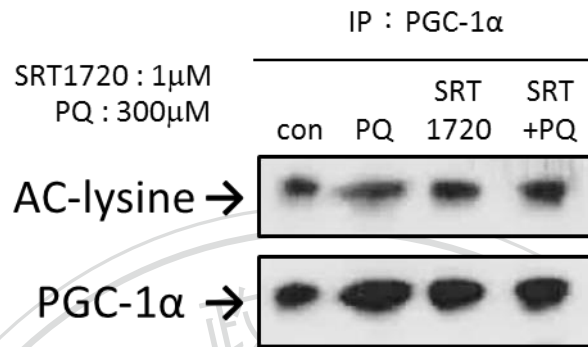
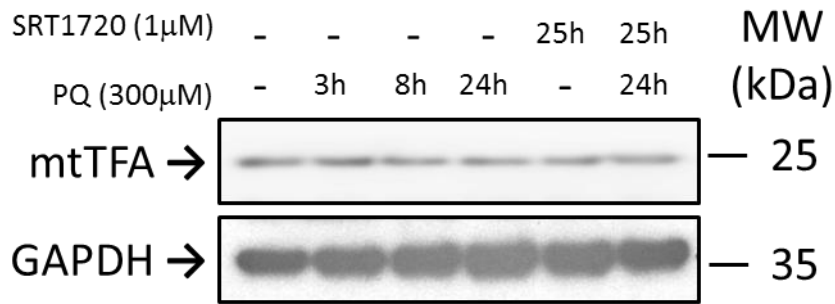


圖 十五、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 PGC-1 $\alpha$  蛋白去乙酰化程度之影響

利用免疫沉澱法將 PGC-1 $\alpha$  蛋白分離出來，再利用西方點墨法進行 ac-lysine 及 PGC-1 $\alpha$  蛋白質含量分析。(A) Ac-lysine 及 PGC-1 $\alpha$  蛋白質電泳圖譜，(B) Ac-lysine 及 PGC-1 $\alpha$  定量圖。

(A)



(B)

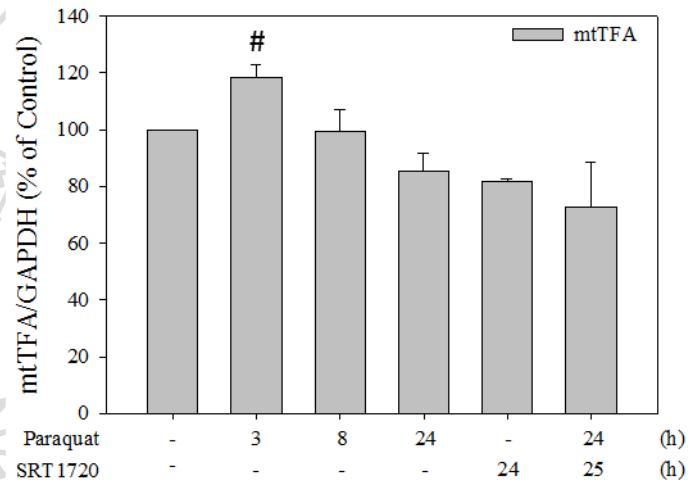
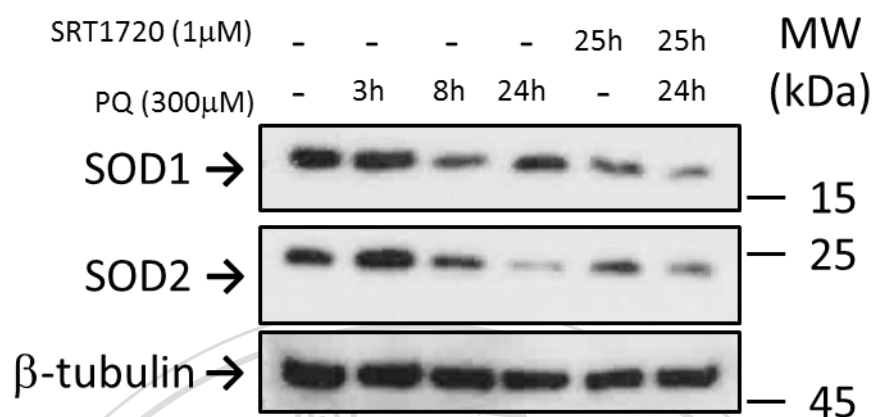


圖 十六、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 mtTFA 蛋白質之影響

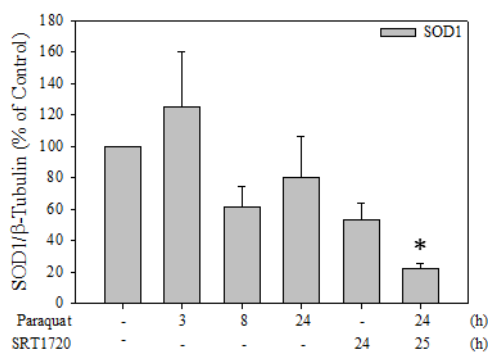
(A) 將 SH-SY5Y 細胞給予 1  $\mu$ M SRT1720 培養一個小時後，給予 300  $\mu$ M PQ。培養 24 小時，或著分別以 300  $\mu$ M PQ 處理不同時間後將細胞收下。利用西方點墨法進行 mtTFA 蛋白質含量分析，(B)將西方點墨法分析 mtTFA 的結果進行定量。



(A)



(B)



(C)

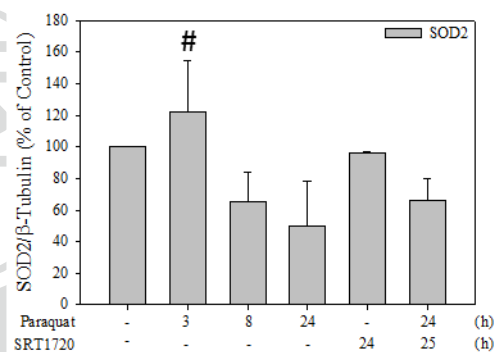


圖 十七、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 SOD1 及 SOD2 蛋白質之影響

(A) 將 SH-SY5Y 細胞給予 1  $\mu$ M SRT1720 培養一個小時後，給予 300  $\mu$ M PQ 培養 24 小時，或著分別以 300  $\mu$ M PQ 處理不同時間後將細胞收下。利用西方點墨法進行 SOD1 及 SOD2 蛋白質含量分析。(B) 將西方點墨法分析 SOD1 及 SOD2 的結果進行定量。

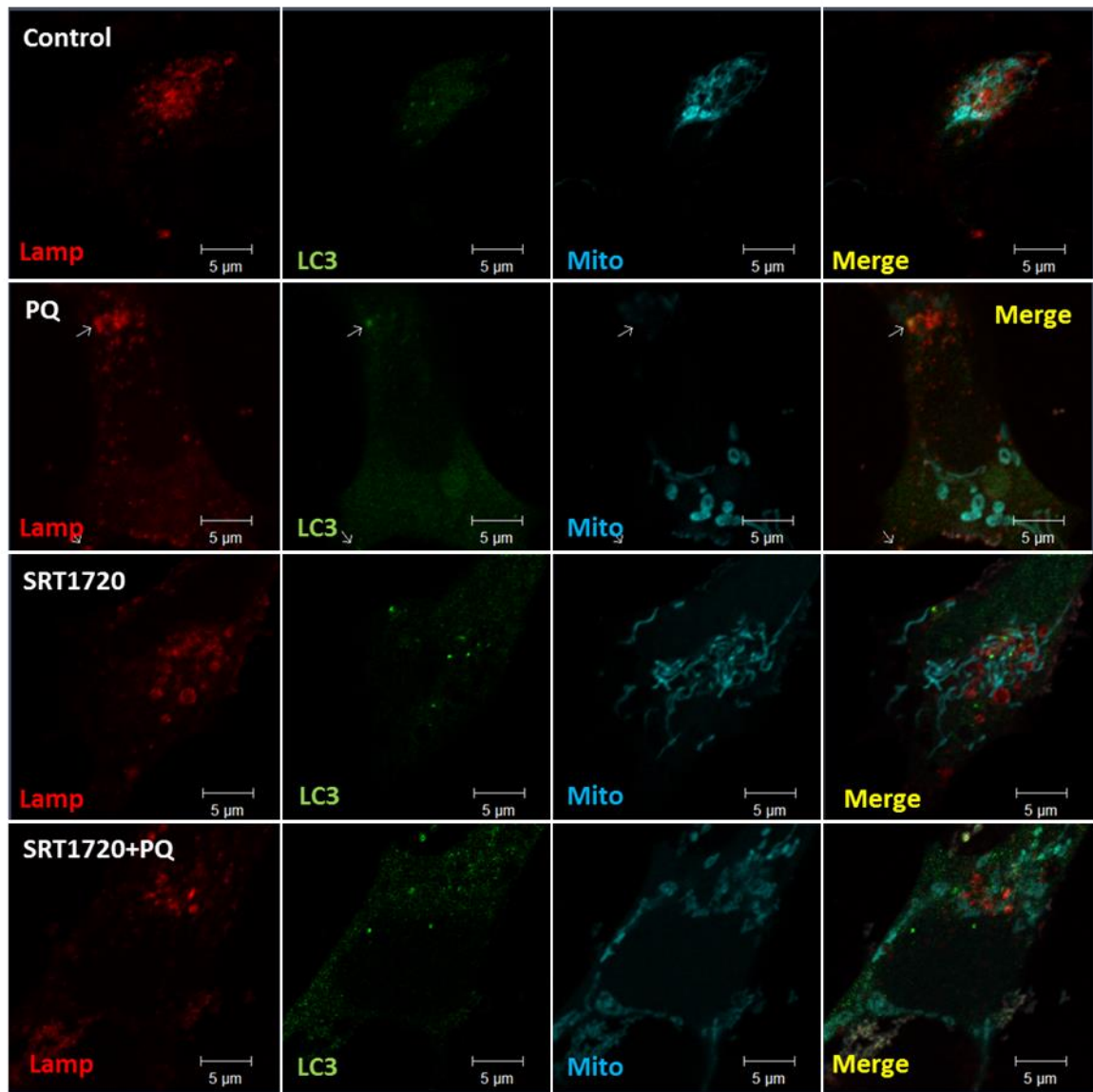
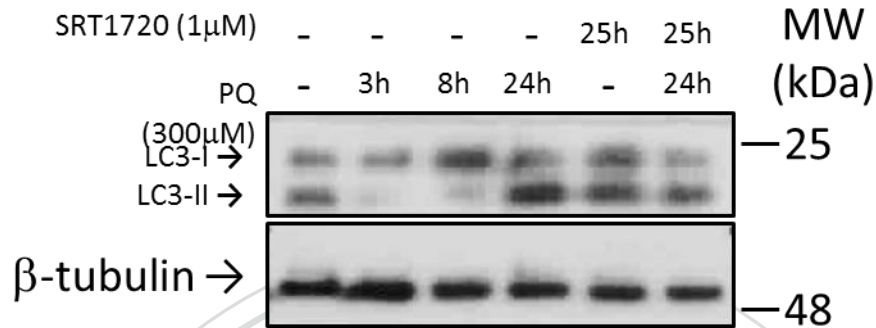


圖 十八、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成之 SH-SY5Y 細胞的 Lamp1、LC3 及粒線體型態變化

將利用轉殖 Lamp1-RFP、pEGFP-LC3 及 pmTurquoise2-Mito 將細胞轉染，24 小時後，給予 1  $\mu$ M SRT1720 培養一個小時後，再給予 300  $\mu$ M PQ 培養 24 小時，再以共軛焦顯微鏡觀察 Lamp1、LC3 及粒線體形態變化。

(A)



(B)

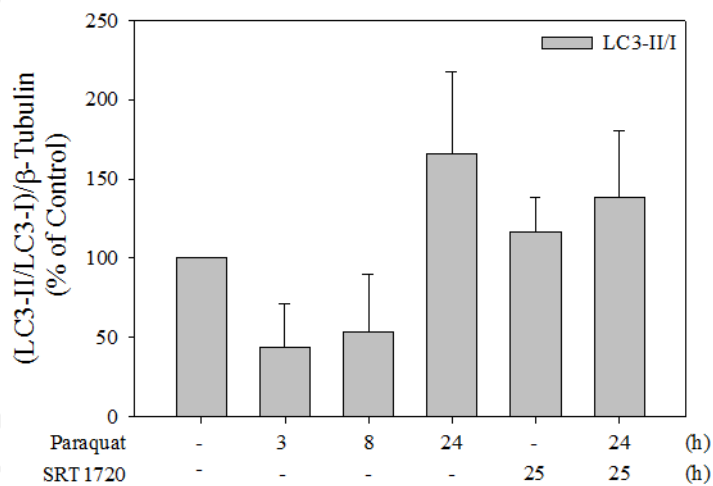
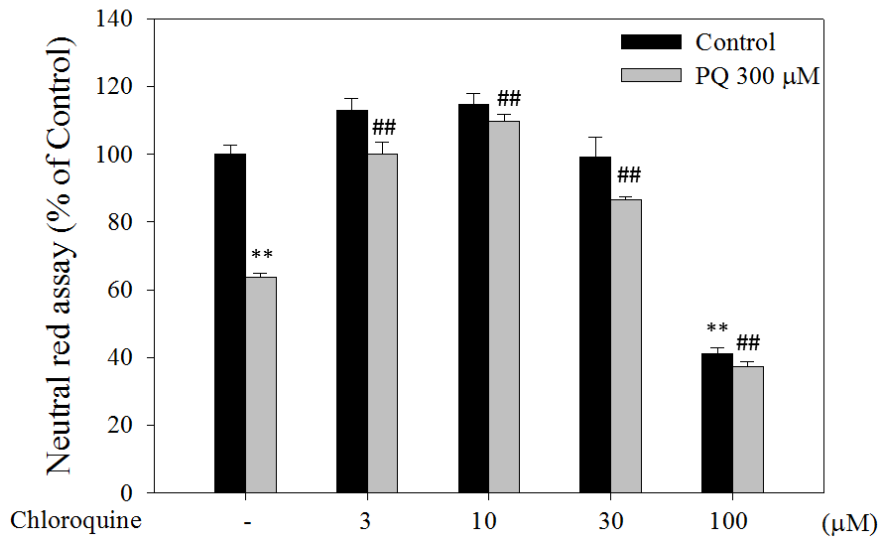


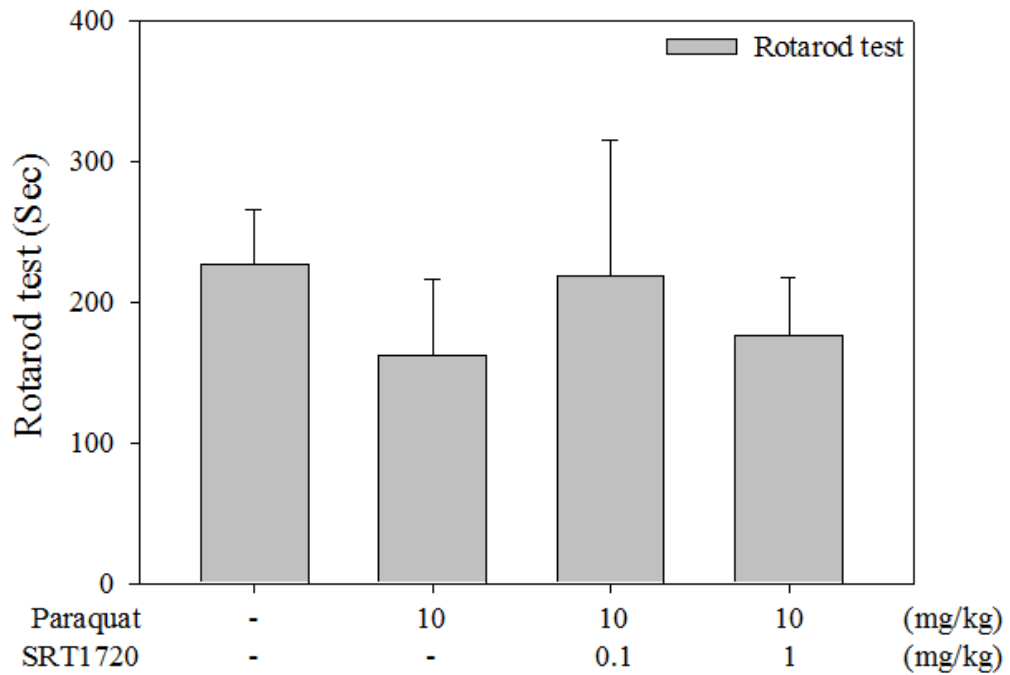
圖 十九、SRT1720 前處理對於 PQ 所造成 LC3-II/I 之影響

(A) 將 SH-SY5Y 細胞給予 1  $\mu$ M SRT1720 培養一個小時後，給予 300  $\mu$ M PQ 培養 24 小時，或著分別以 300  $\mu$ M PQ 處理不同時間後將細胞收下。利用西方點墨法進行 LC3 I/II 蛋白質含量分析。(B)將西方點墨法分析 LC3 I/II 的結果進行定量。



圖二十、前處理 Chloroquine (CQ) 對於 PQ 毒害所造成之 SH-SY5Y 細胞的細胞存活率影響

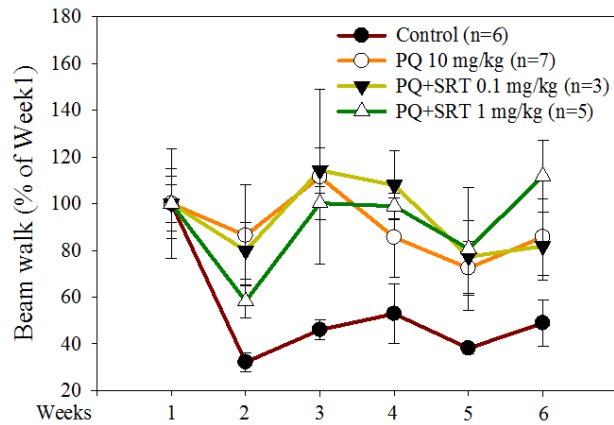
將 SH-SY5Y 細胞分別給予 3, 10, 30 及 100 μM 之 Chloroquine，培養一個小時後，給予 300 μM 濃度之 PQ，培養 24 小時，再以 Neutral red assay 進行細胞存活率之分析(n=3-6 in each group)。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析，其中\*\*表示與 control 組相比 p<0.01，##表示與 PQ 300 μM 相比 p<0.01



圖二十一、以小鼠滾輪試驗 (Rotarod test) 測試 SRT1720 對於 PQ 所造成行為之影響

每週一、三、五分別施打 SRT1720 (0.1 mg/kg 或 1 mg/kg)，並於每週一施打 PQ (10 mg/kg) 或 PBS，共持續六週，並於第六週實行 Rotarod test。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析。

(A)



(B)

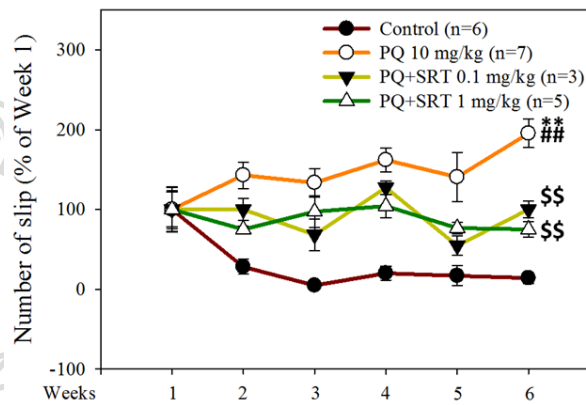
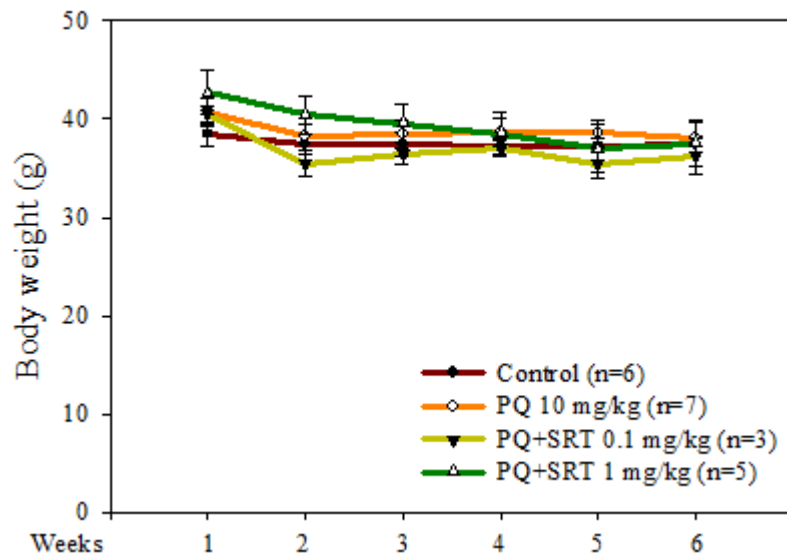


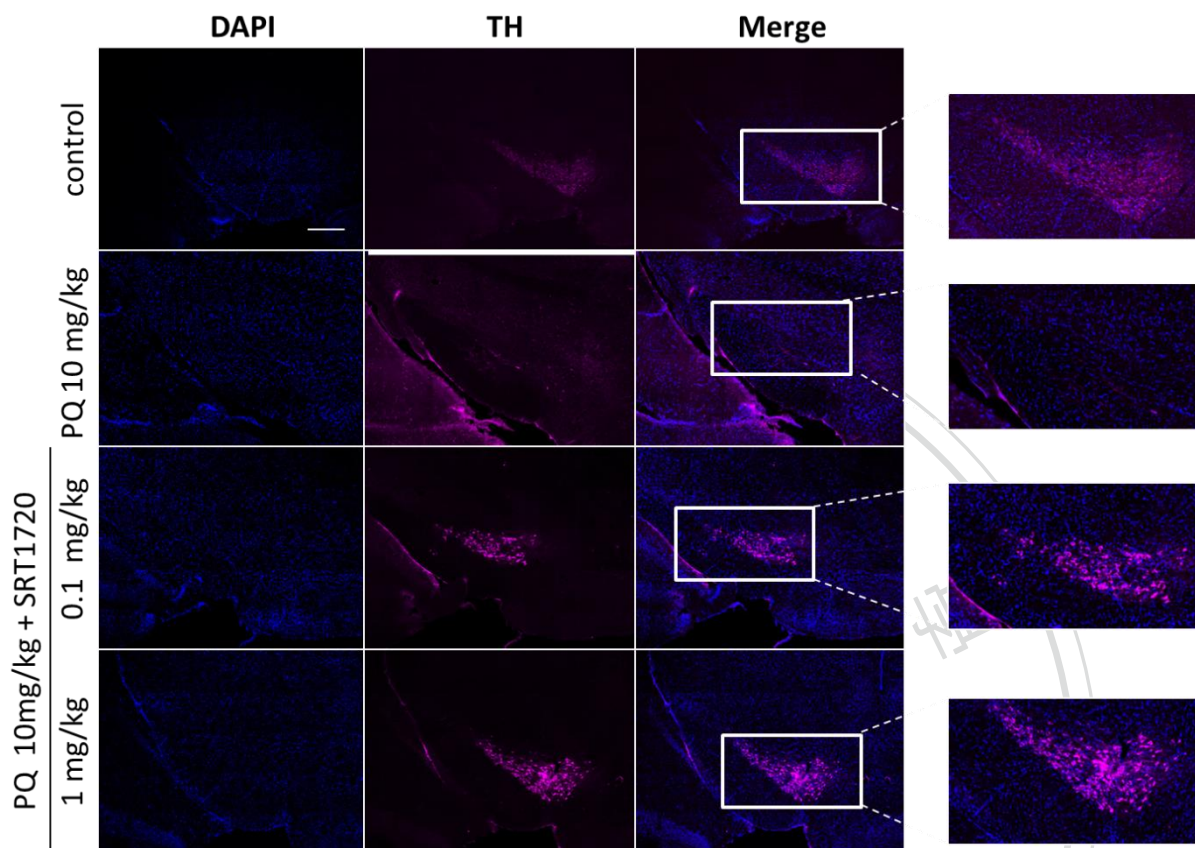
圖 二十二、以平衡木試驗 (Beam walk test) 測試 SRT1720 對於 PQ 之作用

每週一、三、五分別施打 SRT1720 (0.1 mg/kg 或 1 mg/kg)，並於每週一施打 PQ (10 mg/kg) 或 PBS，一共持續六週，並於每週三進行平衡木試驗。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 Two way ANOVA 以及重複測量和 Tukey test 統計方法進行分析。其中\*\*表示與 Week 1 控制組相比 p<0.01，##表示與 Week 6 控制組相比 p<0.01，\$\$表示與 Week 6 PQ 10mg/kg 組相比 p<0.01。



圖二十三、施打 SRT1720 及 PQ 對於小鼠體重變化的影響

每週一、三、五分別施打 SRT1720 (0.1 mg/kg 或 1 mg/kg)，並於每週一施打 PQ (10 mg/kg) 或 PBS，一共持續六週，並於每週五進行體重測量。實驗數據以 mean±SEM 表示，並以 One way ANOVA 和 Dunnett's test 統計方法進行分析。



圖二十四、SRT1720 與 PQ 對於小鼠中腦 SNc 區 Tyrosine hydroxylase (TH) 含量之影響

每週一、三、五分別施打 SRT1720 (0.1 mg/kg 或 1 mg/kg)，並於每週一施打 PQ (10 mg/kg) 或 PBS，一共持續六週，並於第六週後對小鼠犧牲取腦。利用免疫組織化學染色法觀察 SNc 區的 TH 表現，並利用 DAPI 表示細胞核位置。



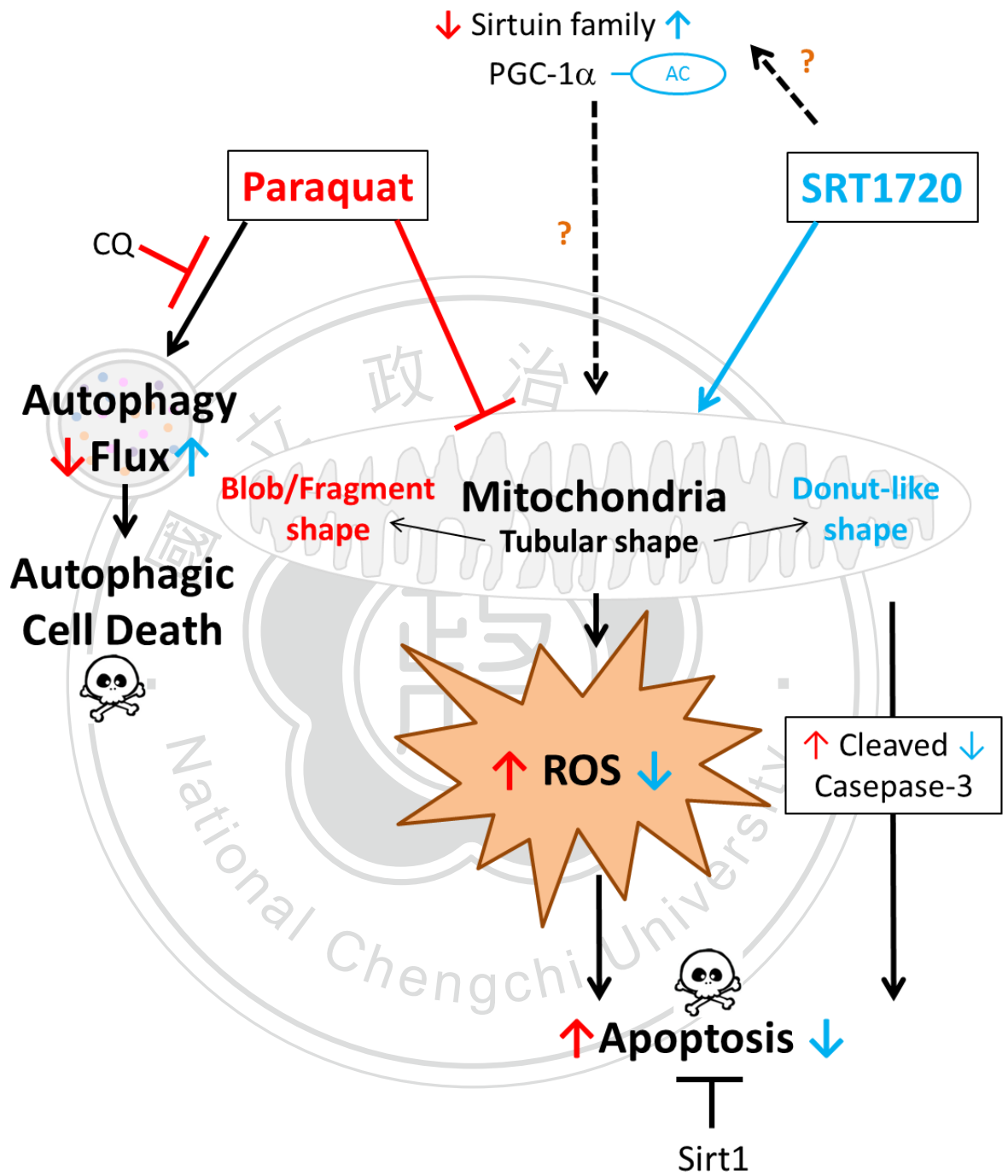


圖 二十五、SRT1720 與 PQ 關係圖

## 參考文獻

- Ahmad T, Aggarwal K, Pattnaik B, Mukherjee S, Sethi T, Tiwari BK, Kumar M, Micheal A, Mabalirajan U, Ghosh B, Sinha Roy S, Agrawal A (2013) Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell death & disease* 4:e461.
- Alural B, Ozerdem A, Allmer J, Genc K, Genc S (2015) Lithium protects against paraquat neurotoxicity by NRF2 activation and miR-34a inhibition in SH-SY5Y cells. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:209.
- Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences* 30:194-202.
- Bournival J, Quessy P, Martinoli MG (2009) Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cellular and molecular neurobiology* 29:1169-1180.
- Boutant M, Canto C (2014) SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models. *Molecular metabolism* 3:5-18.
- Busch F, Mobasher A, Shayan P, Stahlmann R, Shakibaei M (2012) Sirt-1 is required for the inhibition of apoptosis and inflammatory responses in human tenocytes. *The Journal of biological chemistry* 287:25770-25781.
- Campos FL, Carvalho MM, Cristovao AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N (2013) Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Frontiers in behavioral neuroscience* 7:175.
- Castello PR, Drechsel DA, Patel M (2007) Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *The Journal of biological chemistry* 282:14186-14193.

- Chang SS, Lu TH, Eddleston M, Konradsen F, Sterne JA, Lin JJ, Gunnell D (2012) Factors associated with the decline in suicide by pesticide poisoning in Taiwan: a time trend analysis, 1987-2010. *Clinical toxicology* 50:471-480.
- Chen Y, Fu LL, Wen X, Wang XY, Liu J, Cheng Y, Huang J (2014) Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell death & disease* 5:e1047.
- de Lau LML, Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 5:525-535.
- Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sanchez-Navarro A, Remiao F, Bastos ML, Carvalho F (2008) Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Critical reviews in toxicology* 38:13-71.
- Drechsel DA, Patel M (2009) Chapter 21 Paraquat-Induced Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria. 456:381-393.
- Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF (2012) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal* 31:3038-3062.
- Feng Y, Liu T, Dong SY, Guo YJ, Jankovic J, Xu H, Wu YC (2015) Rotenone affects p53 transcriptional activity and apoptosis via targeting SIRT1 and H3K9 acetylation in SH-SY5Y cells. *Journal of neurochemistry* 134:668-676.
- Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L (2006) Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & development* 20:1075-1080.
- Funk JA, Odejinmi S, Schnellmann RG (2010) SRT1720 induces mitochondrial biogenesis and rescues mitochondrial function after oxidant injury in renal proximal tubule cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 333:593-601.

- Garcia-Garcia A, Anandhan A, Burns M, Chen H, Zhou Y, Franco R (2013) Impairment of Atg5-dependent autophagic flux promotes paraquat- and MPP(+)-induced apoptosis but not rotenone or 6-hydroxydopamine toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 136:166-182.
- Gawarammana IB, Buckley NA (2011) Medical management of paraquat ingestion. *British journal of clinical pharmacology* 72:745-757.
- Goetz CG (1986) Charcot on Parkinson's disease. *Movement Disorders* 1:27-32.
- Gonzalez-Polo RA, Niso-Santano M, Ortiz-Ortiz MA, Gomez-Martin A, Moran JM, Garcia-Rubio L, Francisco-Morcillo J, Zaragoza C, Soler G, Fuentes JM (2007) Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 97:448-458.
- Gutterman DD (2005) Mitochondria and reactive oxygen species: an evolution in function. *Circulation research* 97:302-304.
- He X, Wang L, Szklarz G, Bi Y, Ma Q (2012) Resveratrol inhibits paraquat-induced oxidative stress and fibrogenic response by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 342:81-90.
- Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology* 13:225-238.
- Huang CL, Lee YC, Yang YC, Kuo TY, Huang NK (2012) Minocycline prevents paraquat-induced cell death through attenuating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Toxicology letters* 209:203-210.
- Huang CL, Chao CC, Lee YC, Lu MK, Cheng JJ, Yang YC, Wang VC, Chang WC, Huang NK (2016) Paraquat Induces Cell Death Through Impairing Mitochondrial Membrane Permeability. *Molecular neurobiology* 53:2169-2188.

- Hwang O (2013) Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Experimental neurobiology* 22:11-17.
- Janda E, Lascala A, Carresi C, Parafati M, Aprigliano S, Russo V, Savoia C, Ziviani E, Musolino V, Morani F, Isidoro C, Mollace V (2015) Parkinsonian toxin-induced oxidative stress inhibits basal autophagy in astrocytes via NQO2/quinone oxidoreductase 2: Implications for neuroprotection. *Autophagy* 11:1063-1080.
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79:368-376.
- Jianyuan Luo AYN, Shin-ichiro Imai, Delin Chen, Fei Su, Ariel Shiloh, Leonard Guarente, Wei Gu (2001) Negative Control of p53 by Sir2 $\alpha$  Promotes Cell Survival under Stress. *cell*:p137–148.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development*:13: 2570-2580.
- Karagiannis TC, Ververis K (2012) Potential of chromatin modifying compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Pathobiology of aging & age related diseases* 2.
- Kondo Y, Kondo S (2006) Autophagy and Cancer Therapy. [*Autophagy* 2:2, 85-90, April/May/June 2006]; .
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127:1109-1122.
- LaGuire TC, Reaves SK (2013) The Sirtuins in Aging and Metabolic Regulation. *Food and Nutrition Sciences* 04:668-677.

- Laporte C, Kosta A, Klein G, Aubry L, Lam D, Tresse E, Luciani MF, Golstein P (2007) A necrotic cell death model in a protist. *Cell death and differentiation* 14:266-274.
- Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD (2008) Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nature reviews Drug discovery* 7:841-853.
- Li S, Zhao G, Chen L, Ding Y, Lian J, Hong G, Lu Z (2016) Resveratrol protects mice from paraquat-induced lung injury: The important role of SIRT1 and NRF2 antioxidant pathways. *Molecular medicine reports* 13:1833-1838.
- Liu X, Hajnoczky G (2011) Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell death and differentiation* 18:1561-1572.
- Mader BJ, Pivtoraiko VN, Flippo HM, Klocke BJ, Roth KA, Mangieri LR, Shacka JJ (2012) Rotenone inhibits autophagic flux prior to inducing cell death. *ACS chemical neuroscience* 3:1063-1072.
- Mancuso R, del Valle J, Modol L, Martinez A, Granado-Serrano AB, Ramirez-Nunez O, Pallas M, Portero-Otin M, Osta R, Navarro X (2014) Resveratrol improves motoneuron function and extends survival in SOD1(G93A) ALS mice. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11:419-432.
- Martinez-Vicente M, Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *The Lancet Neurology* 6:352-361.
- Milne JC et al. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450:712-716.
- Mollace V, Muscolia MIC, Palmaa E, Granatob T, Rispolia V, a RN, Rotirotia D, Salvemini D (2003) The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase

mimetic. *Neuroscience Letters*.

Moretto A, Colosio C (2013) The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data.

*Toxicology* 307:24-34.

Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The*

*Biochemical journal* 417:1-13.

Myung W, Lee GH, Won HH, Fava M, Mischoulon D, Nyer M, Kim DK, Heo JY, Jeon HJ

(2015) Paraquat prohibition and change in the suicide rate and methods in South Korea. *PloS one* 10:e0128980.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I,

Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature medicine* 13:619-624.

Nasrin N, Wu X, Fortier E, Feng Y, Bare OC, Chen S, Ren X, Wu Z, Streeper RS, Bordone

L (2010) SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 285:31995-32002.

Ni HM, Williams JA, Ding WX (2015) Mitochondrial dynamics and mitochondrial

quality control. *Redox biology* 4:6-13.

Niso-Santano M, Bravo-San Pedro JM, Gomez-Sanchez R, Climent V, Soler G, Fuentes

JM, Gonzalez-Polo RA (2011) ASK1 overexpression accelerates paraquat-induced autophagy via endoplasmic reticulum stress. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 119:156-168.

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. *Nature medicine* 16:653-661.

- Oyarce AM, Fleming PJ (1991) Multiple forms of human dopamine  $\beta$ -hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 290:503-510.
- Pacholec M, Bleasdale JE, Chrunyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *The Journal of biological chemistry* 285:8340-8351.
- Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 14:223-236; discussion 222.
- Peng K, Tao Y, Zhang J, Wang J, Ye F, Dan G, Zhao Y, Cai Y, Zhao J, Wu Q, Zou Z, Cao J, Sai Y (2016) Resveratrol Regulates Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion to Attenuate Rotenone-Induced Neurotoxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016:6705621.
- Perier C, Vila M (2012) Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a009332.
- Polito L, Greco A, Seripa D (2016) Genetic Profile, Environmental Exposure, and Their Interaction in Parkinson's Disease. *Parkinson's disease* 2016:6465793.
- Prasad K, Winnik B, Thiruchelvam MJ, Buckley B, Mirochnitchenko O, Richfield EK (2007) Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. *Environmental health perspectives* 115:1448-1453.
- Sack MN, Finkel T (2012) Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CF, Steegborn C (2008) Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *Journal of molecular biology* 382:790-801.



- Schultz W (2010) Multiple functions of dopamine neurons. *F1000 biology reports* 2.
- Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H (2001) Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain research* 906:135-142.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127:397-408.
- Takumida M, Takumida H, Katagiri Y, Anniko M (2016) Localization of sirtuins (SIRT1-7) in the aged mouse inner ear. *Acta oto-laryngologica* 136:120-131.
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives* 119:866-872.
- Thorburn A (2008) Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 13:1-9.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular research* 79:208-217.
- Vian L, Vincent J, Maurin J, Fabre I, Giroux J, Cano J (1995) Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. *Toxicology in Vitro* 9:185-190.
- Villalba JM, Alcain FJ (2012) Sirtuin activators and inhibitors. *BioFactors* 38:349-359.

- Wasilewski M, Scorrano L (2009) The changing shape of mitochondrial apoptosis. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 20:287-294.
- Wesseling C, Roman N, Quiros I, Paez L, Garcia V, Mora AM, Juncos JL, Steenland KN (2013) Parkinson's and Alzheimer's diseases in Costa Rica: a feasibility study toward a national screening program. Global health action 6:23061.
- Xu L, Wang Z (2016) Chloroquine rescues A549 cells from paraquat-induced death. Drug and chemical toxicology 39:167-173.
- Xu R, Hu Q, Ma Q, Liu C, Wang G (2014) The protease Omi regulates mitochondrial biogenesis through the GSK3beta/PGC-1alpha pathway. Cell death & disease 5:e1373.
- Youle MKaR (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. Cell death and differentiation.
- Youle RJ, van der Bliek AM (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. Science 337:1062-1065.