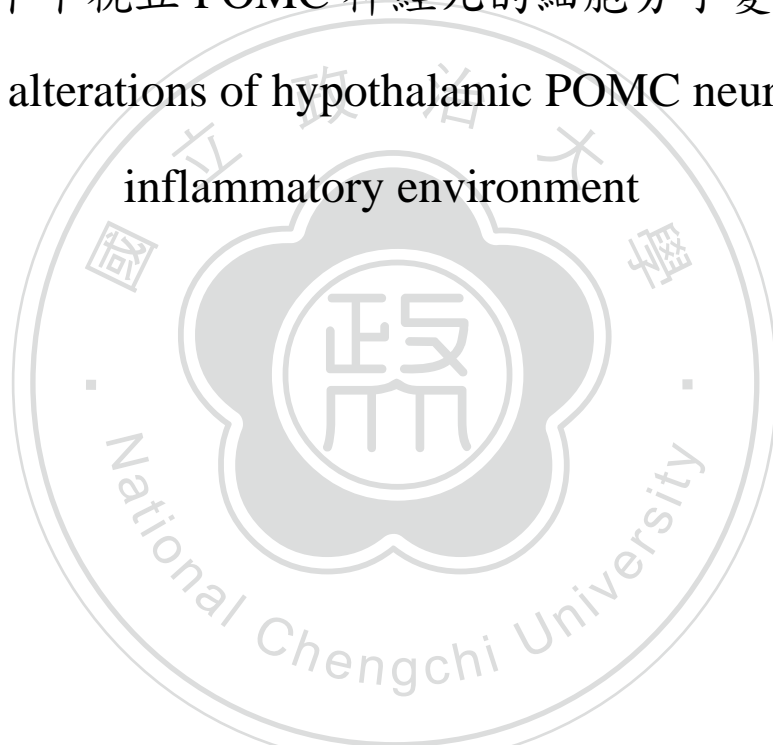


國立政治大學神經科學研究所

碩士論文

發炎環境下下視丘 POMC 神經元的細胞分子變化之研究

Molecular alterations of hypothalamic POMC neurons in the
inflammatory environment



研究生：廖翊妤 撰

指導教授：陳紹寬 博士

中華民國 109 年 12 月

謝誌

本論文得以順利完成,承蒙諸位師友的協助與鼓勵。首先感謝我的指導教授陳紹寬老師,在論文撰寫期間給予的教導與督促,讓我在學術知識以及個人發展都獲得許多充實與成長,並且從中學習到對於研究的執著與態度,謹此致上由衷的敬意。在論文口試期間承蒙口試委員趙之章所長及長庚大學生理暨藥理學所盧主欽老師給予的寶貴意見與指正,讓此篇碩士論文更臻於完善,在此表示深摯的謝忱。

接下來要感謝實驗室的全體,謝謝佩文師母、之皓學長、牧昀學姊、芊慧學姊、意苒學姊、誼穎學姊在實驗上的指導及鼓勵,謝謝同學凱傑陪我一起修課、一起讀書討論,並且使用激將法來提升我的鬥志力,也謝謝有上、依樺學姊在我碩班中互相關懷與幫助;另外還要特別感謝所辦溫暖又善解人意的于姐,除了行政事務上的協助之外,也是我心中的心靈導師。

再來要感謝我大學教授吳賜猛老師,謝謝老師當初鼓勵我讀研究所,並給予我實驗上的幫忙與生活上的關懷,還常常帶我去吃大餐,謝謝我大學的三位好友佩樺、郁閔、羿辰,雖然我們各自在不同地方讀書,但還是會定期聯絡並掛念彼此,也謝謝光勛常常與我互相交流分享碩班經歷。

隨著論文的完成,也為我的研究生涯劃下句點,在最後我想要謝謝家慶與我的家人,謝謝家慶這幾年的陪伴,無限的支持我想做的事,也常常包容我壓力大時的壞脾氣;最終,要感謝父母為我所做的犧牲及苦心栽培,您們總是默默的鼓勵與關心我,讓我在求學過程當中無後顧之憂,希望我沒有讓您們失望,在此分享這份喜悅給所有關心、愛護、協助及鼓勵我的你們,謝謝你們總是包容我的一切,給我的支持與鼓勵,感謝你們。

摘要

周邊或中樞系統的發炎已經被認為是許多神經系統疾病的重要成因。發炎對神經系統的影響可透免疫細胞分泌的細胞素影響神經細胞的功能。近年雖然有許多細胞素對神經細胞的研究,但神經細胞在發炎環境中產生的改變仍不完全清楚。大腦下視丘弓形核(arcuate nucleus,ARC)區域中會分泌 POMC/CART 神經元抑制食慾並提高能量消耗,是代謝調控中樞的重要成員。當下視丘長期發炎時,動物會出現食量增加以及代謝調控異常的現象,但其神經機制仍未完全清楚。本研究旨在探討發炎環境中 POMC 神經元中對代謝調控訊號的反應及粒線體的改變。這些改變在生理上會影響食物攝入調節、能量消耗、葡萄糖代謝與脂肪組織的分解或褐變(browning)。本研究主要分為四個部分,第一部分我們探討在 mHypo-POMC/GFP1 神經元中瘦素和胰島素信號傳導途徑,實驗顯示 POMC 神經元通過 PI3K/AKT/mTOR 路徑可整合來自瘦素和胰島素訊號,在刺激短時間內會激活 AKT-mTOR 路徑並利用 mTOR 來抑制 AMPK 路徑蛋白,也會提高 POMC 轉錄來維持代謝平衡,而長期則使負調節基因 *Socs3* 及 *Atg7* 表達上升,使細胞產生自噬作用來維持身體穩態。第二部分則探討在發炎因子的環境下是否會影響 mHypo-POMC/GFP1 神經元調控代謝的機制,實驗發現在長期發炎的環境下,POMC 基因表現被抑制。另外,瘦素和胰島素刺激引起 POMC 神經元的 PI3K-AKT 路徑活化與 AMPK 的抑制,會在含有細胞因子及趨化因子環境下受到干擾,因此在低度發炎的環境下會干擾瘦素與胰島素調節 POMC 神經元的傳遞訊號。第三部分是探討在發炎環境下 POMC 神經元的粒線體有何改變,在含有細胞因子及趨化因子的發炎環境下,POMC 神經元中的粒線體並未破壞,電子傳遞鏈基因表現及質子滲漏的結果並沒有差異,但細胞中 ROS 上升、呼吸速率下降、粒線體整體功能下降及解偶聯下降,粒線體的動力學變慢,裂變與融合下降,整體造成粒線體變大,粒線體變化會使 POMC 神經元的代謝調控能力受破壞。第四部分以高脂食物飼養小鼠做為肥胖及代謝疾病的模式,觀察肥胖下視丘中是否有發炎傾向,以及探討下視丘中的神經元粒線體調控,實驗餵食老鼠一個月的高脂肪飲食,使老鼠產生肥胖並引發全身性發炎,但血脂並未受影響,而在下視丘中也發現促發炎因子上升,這種體內環境會刺激 POMC 神經元的作用,並促進粒線體動力,包括生成、分裂與融合,試圖維持代謝的調控與平衡,但尚不了解更長時間的餵食對此代謝調控系統有何影響。總而言之我們的實驗結果顯示在發炎的環境下,對 POMC 神經元中的代謝調控與粒線體有所影響,至於對代謝調控的影響仍有待進一步研究。

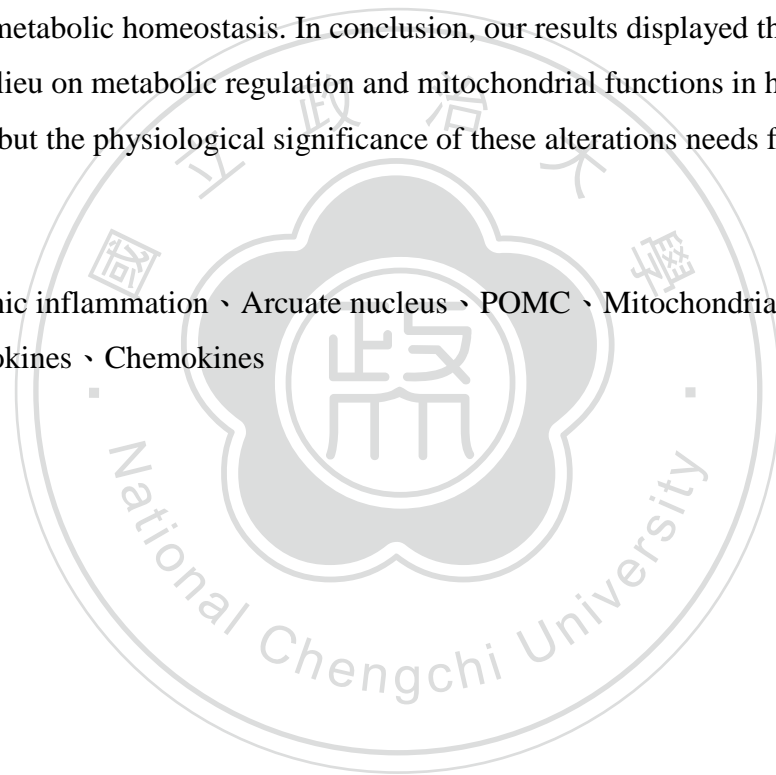
關鍵字:慢性發炎、弓形核、POMC 神經元、粒線體、代謝調控、細胞因子、趨化因子

Abstract

Accumulating evidences have revealed modulatory roles of immune activities on normal physiology of central nervous system. Also, inflammation in the periphery is associated with neurological diseases through the functions of cytokines. The studies of cytokine actions on neurons were mainly focused on single specific cytokines, such as TNF- α , IL-6, etc, the influence of inflammatory environment, which contained mixtures of numerous cytokines, chemokines, and pro-inflammatory molecules secreted by innate immune cells, are not fully understood. POMC/CART neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus play crucial roles of regulating appetite, energy expenditure, and central control of metabolism. Chronic inflammation in the hypothalamus induced food intake dysregulation and abnormal metabolism. This study aimed to investigate of neural alterations induced by the inflammatory milieu. We conducted cellular studies by culturing hypothalamic POMC neurons with conditioned medium from LPS stimulated bone marrow derived macrophages, whereas high fat diet-fed mice were chosen for examining physiological impacts. We first examine the leptin and insulin signaling in mHypo-POMC/GFP cells. Short-term stimulation of leptin or insulin activates the PI3K-AKT-mTOR pathway downregulating AMPK and increases the expression of POMC gene, while long-term incubation upregulates the expression of negative-regulatory gene SOCS3 and autophagy gene ATG7 to maintain body homeostasis. The leptin and insulin signaling in POMC neurons were altered under inflammatory conditions. POMC gene expression is inhibited after long-term incubation with pro-inflammation cytokines. Also, and the activation of AKT and mTOR is relatively weakened after leptin and insulin stimulation. Furthermore, the metabolism-related cellular responses, such as mitochondrial functions and dynamics in POMC neurons, against proinflammatory stimuli, will be elucidated. Although intracellular ROS/RNS levels were elevated, the results of expressions of the electron transport chain genes and proton leakage suggested that mitochondria in POMC neurons remained undamaged. In addition, respiratory rate and overall mitochondrial function revealed a trend of decrease in the inflammatory environment. Inflammatory milieu induced significant decrease of mitochondrial uncoupling and slowed down mitochondrial dynamics by downregulating the expression of both fission and fusion genes. The balance of mitochondrial fission and fusion was also changed resulting in the enlargement of overall mitochondrial size. In summary, the mitochondrial alterations induced by inflammatory environment suggested mitochondrial functions and metabolic regulation

abilities are disrupted in hypothalamic POMC neurons. Finally, we examined the metabolic regulations, inflammation status, arcuate functions and mitochondrial status in the high-fat diet-fed mice. Our data revealed that after feeding high-fat diet fed to C57BL/6 mice for four weeks, the testing developed obesity and systemic inflammation, but not metabolic dysregulation such as elevated blood triglycerides. The expression of metabolic regulating genes of arcuate POMC neurons indicated that the energy balance machinery in the arcuate nucleus remained functioning after 4-weeks of high fed diet feeding. Mitochondrial dynamics was promoted in the hypothalamus, suggesting the mitochondrial regulation in the calorie excessive conditions was not disrupted. These regulations could be altered in longer feeding of high fat diet for the development of further metabolic dysregulation, such as misbalance of glucose or lipid metabolic homeostasis. In conclusion, our results displayed the effects of inflammation milieu on metabolic regulation and mitochondrial functions in hypothalamic POMC neurons, but the physiological significance of these alterations needs further investigation.

Key word: Chronic inflammation 、 Arcuate nucleus 、 POMC 、 Mitochondrial 、 Metabolic regulation 、 Cytokines 、 Chemokines



目 錄

謝誌.....	I
摘要.....	II
ABSTRACT.....	III
縮寫對照表.....	IX
第一章 緒論.....	1
第一節 文獻回顧.....	1
1.1 身體的能量調節與中央代謝調控系統.....	1
1.2 免疫失調對神經系統造成的影響.....	2
1.3 發炎環境對神經系統功能的影響.....	3
1.4 下視丘發炎.....	5
1.5 POMC 神經元.....	5
1.6 大腦中 POMC 系統的輸出與輸入.....	8
1.7 POMC 神經元之功能與粒線體之關聯.....	9
第二節 論文目的及研究策略.....	13
2.1 研究目的及動機.....	13
2.2 實驗設計.....	13
第二章 材料方法.....	15
2.1 細胞培養.....	15
2.2 實驗動物.....	16
2.3 條件培養液(CONDUCTIONAL MEDIUM).....	16
2.4 西方墨點法(WESTERN BLOT).....	17
2.5 即時定量聚合酶連鎖反應(REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION, RT-QPCR).....	19

2.6	老鼠細胞激素分析(MOUSE CYTOKINE ARRAY).....	20
2.7	線粒體選擇性探針(MITOTRACKER-MITOCHONDRION-SELECTIVE PROBES).....	20
2.8	粒線體壓力測試(SEAHORSE XF CELL MITO STRESS TEST).....	20
2.9	體外 ROS/RNS 分析(IN VITRO ROS/RNS ASSAY KIT).....	21
2.10	酵素結合免疫吸附分析法(ELISA).....	21
2.11	統計分析.....	22
第三章 實驗結果		23
3.1	瘦素與胰島素對 mHYPOA-POMC/GFP1 神經元的反應路徑.....	23
3.2	以 LPS 誘導巨噬細胞條件培養液模擬下視丘慢性發炎的環境.....	24
3.3	發炎物質對 mHYPOA-POMC/GFP1 神經元的訊息路徑的改變.....	25
3.4	發炎物質干擾 POMC 神經元之粒線體功能.....	26
3.5	在 DIO 老鼠中神經元與細胞粒線體變化.....	28
第四章 討論		30
結果圖一:瘦素與胰島素對 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞株的分子傳遞路徑.....		33
結果圖二:長期(24 小時)低度發炎環境下對 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞株的粒線體影響		34
實驗圖表		35
圖一:瘦素刺激 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞株的信號反應.....		36
圖二:胰島素刺激 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞株的信號反應.....		38
圖三:LPS 誘導巨噬細胞條件培養液內的細胞因子及趨化因子.....		40
圖四:細胞培養液中含有 20%條件培養液刺激 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞株的信號反應		42
圖五:細胞培養液中含有 20%條件培養液刺激 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞株中瘦素、胰島 素信號變化.....		44
圖六:細胞培養液中含有 20%條件培養液刺激下使細胞內 DCF 上升.....		45

圖七：細胞培養液中含有 20%條件培養液對 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞中粒線體功能 RNA 表達量.....	46
圖八：細胞培養液中含有 20%條件培養液干擾 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞粒線體功能 .	49
圖九：細胞培養液中含有 20%條件培養液刺激 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞降低粒線體 UCP1 表達	50
圖十：細胞培養液中含有 20%條件培養液對 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞使粒線體分裂與融合表達量下降.....	52
圖十一：細胞培養液中含有 20%條件培養液刺激 mHYPOA-POMC/GFP1 細胞使粒線體體積變大.....	53
圖十二：實驗組(高脂肪飲食)小鼠較對照組小鼠食慾下降且體重上升並增加血液中發炎因子 TNF A.....	54
圖十三：實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 POMC 基因表達高於對照組.....	55
圖十四：實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 TNF A 基因表達高於對照組	56
圖十五：實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 ATG7、SCOS3 基因表達高於對照組	57
圖十六：實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘粒線體相關基因表達.....	59
圖十七：實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 DRP1 基因表達高於對照組.....	60
參考文獻：	61
附錄：	69
附錄一：裂解緩衝液(Lysis Buffer)配方.....	69
附錄二：Loading dye 配方	69
附錄三：Running Gel 配方	70
附錄四：Stacking Gel 配方	70
附錄五：Tank Buffer 配方	71
附錄六：10 X Transfer Buffer 配方	71
附錄七：RT 混合液	72

附錄八:cDNA 混合液 72
附錄九:實驗使用的引子序列及溫度..... 73



縮寫對照表

ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
AD	Alzheimer's Disease
AgRP	Agouti-Related Protein
AKT	Protein Kinase B (PKB)
ARC	Arcuate Nucleus
ATG7	Autophagy Related 7
BBB	Blood-Brain Barrier
BP	Blood Pressure.
CART	Cocaine Amphetamine-Regulated Transcript
CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2
CNS	Central Nervous System
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DMH	Dorsomedial Hypothalamic Nucleus
DRP1	Dynamin-1-Like Protein
EME	Endocrine Median Eminence
ETC	Electron Transport Chain
FAO	Fatty Acid Oxidation
FIS1	Mitochondrial Fission 1 Protein
GAD	Glutamic Acid Decarboxylase
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSSG	Oxidized Glutathione
HFD	High Fat Diet
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal
HR	Heart Rate
HVN	Hypothalamic Ventricular Zone
IL-1	Interleukin 1
LHA	Lateral Hypothalamic Area
LpRB	Leptin Receptor B
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MC3	Melanocortin-3

MC4	Melanocortin-4
MC4R	Melanocortin 4 Receptor
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MFN1	Mitofusin 1
MFN2	Mitofusin 2
MMPs	Matrix Metalloproteinases
MS	Multiple Sclerosis
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
NFκB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRs	NOD-Like Receptors
NOD	Nucleotide Binding Oligomerization Domain
NOS	Nitric oxide synthase
NPY	Neuropeptide Y
NRF1	Nuclear Respiratory Factor 1
NRF2	Nuclear Respiratory Factor 2
NSAb	Neuronal Surface-Mediated Antibody
OPA1	Optic Atrophy 1
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PC1	Proconvertase 1
PC2	Proconvertase 2
PD	Parkinson's Disease
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinases
PKB	Protein Kinase B
PNS	Peripheral Nervous System
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PRR	Pattern Recognition Receptors
PTP	Protein Tyrosine Kinase
PVN	Paraventricular Nucleus
ROS	Reactive oxygen species
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SNS	Sympathetic Nervous System

SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TLR	Toll-Like Receptors
TNF α	Tumor Necrosis Factor-A
UCP1	Uncoupling Protein 1
UCP2	Uncoupling Protein 2
VMH	Ventromedial Hypothalamus
α MSH	A-Melanocyte Stimulating Hormone
B-LPH	B-Lipotropin



第一章 緒論

第一節 文獻回顧

1.1 身體的能量調節與中央代謝調控系統

生物體維持體內代謝穩定性是生存的基本要求,人類會利用進食的行為取得體內生理反應所需的成分,早期在資源稀疏且糧食缺乏的時代下,大多數人類在飢餓中度過,而隨著科技發展與時代的變遷,提高了現代生活的便利性,越來越多人發現自己熱量供應過剩的問題,這些問題導致肥胖症、代謝性疾病和 II 型糖尿病,並與國人十大死因中大部分有關,例如腫瘤、癌症、心臟疾病、腦血管疾病、骨關節炎、腎衰竭等等(Calle et al., 2003; Martin-Rodriguez et al., 2015),肥胖除了增加多種疾病的風險之外,也是一個日益嚴重的公共衛生問題。

在健康意識上升的時代,許多文獻研究了身體的能量穩態與代謝調控。為了保持能量穩態,必須通過調節能量消耗的方法來平衡食物攝入,這些能量消耗包括體溫調節、基礎代謝和身體活動,而大腦中的下視丘(hypothalamus)由多個不同的核區所組成,這些核區會通過神經內分泌分子負責多種功能,包括睡眠、喚醒、疲勞、體溫調節、飢餓和口渴等,而中樞神經調節飲食及能量平衡最主要是在下視丘中的弓形核(Arcuate nucleus, ARC),弓形核中主要有兩群神經元分別為 Neuropeptide Y/Agouti-related protein (NPY/AgRP)和 Pro-opiomelanocortin (POMC)可通過採集如瘦素(Leptin)和胰島素(Insulin)等指標來感知全身肥胖。POMC 神經元的激活釋放 α -Melanocyte Stimulating Hormone (α MSH)及 Cocaine amphetamine-regulated transcript (CART)來減少食物攝入增加能量消耗,並可激活 Melanocortin 4 receptor (MC4R)。NPY/AgRP 神經元具有相反的作用,它通過釋放 AgRP (α MSH 的天然拮抗劑)來抑制 POMC 神經元並拮抗攜帶 MC4R 細胞的作用(Luquet et al., 2005; Xu et al., 2005; Aponte et al., 2011; Krashes et al., 2011; Zhan et al., 2013),POMC 和 AgRP 神經元將這些信息整合併傳遞到下游中樞神經系統感應器,這些感應器通過能量攝入和能量消耗的變化來平衡儲能(Xu et al., 2005)。除了調控進食之外,控制能量消耗同樣也會利用下視丘內神經細胞的連結與傳遞來協調,下視丘神經元會受外圍激素例如瘦素、胰島素和營養素的影響來控制能量平衡。

1.2 免疫失調對神經系統造成的影響

免疫系統是關鍵的身體防禦系統之一,並參與維持體內平衡,免疫系統包括防禦生物體侵略的結構和過程,傳統上 CNS 由於有血腦屏障(blood brain barrier, BBB),被認為是有免疫豁免(immune privileged)的特性,但近年來越來越多證據指向免疫系統會影響神經系統的運作。尤其是免疫過程和精神病之間的關聯,例如多發性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)、系統性紅斑狼瘡(Systemic lupus erythematosus, SLE)都與抑鬱和焦慮有關(Marrie et al., 2015; Tay and Mak, 2017),也在精神障礙患者中發現免疫反應失調和促發炎狀態,因此推測精神分裂症可能是一種自身免疫性疾病(Chen et al., 2012),而這些可能影響自身免疫性疾病與精神病之間關聯的因素很多,目前推測可能機制有抗體、免疫系統失調、感染、遺傳學、心理壓力等。在自身免疫性疾病與精神疾病之間潛在因素可能是神經表面抗原抗體(Neuronal Surface-Mediated Antibody, NSAb),像是 Glutamic Acid Decarboxylase (Machado et al.)抗體與多種神經系統疾病有關(Baizabal-Carvalho and Alonso-Juarez, 2017),大部分研究試圖評估精神病多個不同神經元表面抗體作用,但到目前為止還不太清楚,而免疫系統失調已知調節性 T 細胞和 Th17 細胞之間失衡會牽涉到幾種自身免疫性疾病(Diller et al., 2016),也常見在精神分裂症患者的血清中有促炎因子升高和抗炎細胞因子降低的現象(Miller et al., 2011),到目前為止認為感染是發展自身免疫性疾病的最重要誘因之一,當身體暴露於病毒或細菌感染會增加 BBB 的通透性(Profaci et al., 2020),從而使免疫細胞和促炎性細胞因子進入中樞神經系統,可能會導致腦部發炎,也可能使抗體進入增加精神疾病風險,另外心理壓力也會影響微生物組的組成對周圍發炎,並增加精神疾病的風險(Gur and Bailey, 2016),因此免疫系統與精神障礙兩者可能存在相互影響的作用。

免疫系統是如何穿過 BBB 與神經系統交流?目前的證據指向通過細胞間接觸和細胞因子信號傳遞作用所產生,免疫系統和中樞神經系統之間的雙向通訊路徑包括迷走神經、淋巴系統及其與其他神經激素軸(例如下丘腦-垂體-腎上腺軸(Hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA))的相互作用,而細胞因子的反應可分為促發炎症(神經小膠質細胞以細胞內抗原為靶標產生對組織有害的發炎)或抗炎性(星狀膠質細胞產生調節細胞外抗原的體液免疫),小膠質細胞不僅在發炎反應過程中調節神經元功能,還與大腦突觸發育過程中神經元可塑性和修剪的生理現象有關,利用吞噬作用消除突觸來影響神經元改變,為了因應有害刺激,小膠質細胞會發生一系列變化,像是細胞的數量、功能和形態改變。儘管血腦屏障(BBB)對大腦具有免疫保護作用,但嚴重精神障礙患者的通透性卻有所增加,這意味著在某些神經病情況下,促炎或抗炎因子可能會進入周圍或從大腦進入系統循環並產生發炎作用(Tarasov et al., 2019)。

1.3發炎環境對神經系統功能的影響

發炎(Inflammation)是一種動態的組織反應機制,由傷害性刺激如感染和組織損傷引發的適應性反應(Medzhitov, 2008)。發炎由多種因素引起,例如微生物感染、心肌梗塞引起組織損傷等,特徵為發紅、腫脹、發熱、疼痛和組織功能喪失,當微生物感染或組織損傷時,模式識別受體(Pattern recognition receptors, PRR)透過病原體相關分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)來感測微生物的存在(Franceschi and Campisi, 2014),利用類鐸受體(Toll-like receptors, TLRs)結合,並刺激先天性免疫反應(Innate immune response),當細胞受到壓力或受傷時模式識別受體(PRR)會利用損傷相關分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)來檢測從受損細胞或壞死細胞中釋放的內源性分子,通過促發炎細胞因子(Proinflammatory cytokine),例如腫瘤壞死因子(Tumor Necrosis Factor- α , TNF α)、白介素-1 (Interleukin 1, IL-1)和白介素-6(Interleukin 6, IL-6)的釋放和募集免疫細胞滲入組織來引發免疫反應(Rosin and Okusa, 2011),這些先天免疫系統的受體例如類鐸受體(TLR)和核苷酸結合寡聚域蛋白(nucleotide binding oligomerization domain, NOD)觸發受體(NOD-like receptors, NLRs)被活化後會參與發炎的調節,TLRs 會激活核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF κ B)並進入細胞核後快速的結合目標基因,而當 NLRs 偵測到 DAMPs 所辨識的毒物(Toxins)或是異物(Foreign particles)時會與胱天蛋白複合物激活胱天蛋白-1(Caspase-1)轉譯出促發炎細胞因子(Barton, 2008),使單核細胞與嗜中性球向感染部位聚集,然後利用血漿蛋白(Plasma proteins)如補體系統(complement system)清除受影響區域的碎片,再通過周圍組織液化成纖維細胞來解決發炎,最後釋放基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)進行組織重塑並產生細胞外基質和膠原蛋白(Rohani and Parks, 2015),一般而言,先天性免疫在幾分鐘之內就引發了急性發炎(Acute inflammation),並且數小時或最多三天之內就消失了,無論引起發炎反應的原因是什麼,其目的都是為了消除或隔離疾病的根源,使宿主適應異常情況,最終恢復組織的功能和體內平衡,相對於慢性發炎(Chronic inflammation)則持續數週、數月甚至數年較長時間。

根據多年來研究,慢性和急性發炎被認為是由不同的原因、不同的細胞和發炎介質所驅動,使導致完全不同的結果,而慢性發炎具有急性發炎的許多特徵,但通常是低度且持續導致組織變性的反應,目前導致慢性發炎有幾種可能的機制:(i)白血球使周圍組織液化殺死病原體,並持續產生反應性分子,最終破壞組織的結構和細胞成分,(ii)受損的非免疫細胞和活化的免疫細胞產生細胞因子,從而放大調節發炎反應並改變附近細胞的表型,通常損害正常的組織功能,進而老化的組織可能處於慢性發炎狀態(Rodier and

Campisi, 2011), (iii) 對合成信號(anabolic signaling)的干擾,例如在進餐或運動後,IL-6 和 TNF α 下調胰島素(Insulin)、類胰島素生長因子-1(Insulin-like growth factor-1)和促紅細胞生成素(erythropoietin)的信號傳導和蛋白質合成(Franceschi and Campisi, 2014),而發炎細胞(如中性粒細胞、單核細胞和巨噬細胞)也會滲入脂肪和其他組織,並在暴飲暴食或肥胖時積聚,當發炎細胞過量的分泌促發炎因子,則會導致組織破壞像是動脈硬化、骨質疏鬆或癌症使健康產生負面影響,這些慢性發炎似乎與組織功能障礙有關。

目前已經有不少研究表示這些發炎細胞分泌的細胞因子(Cytokine)會參與中樞神經系統(Central Nervous System, CNS)和周圍神經系統(Peripheral Nervous System, PNS)發炎相關病理,其中備受注目的就是在中樞神經系統的發炎機制與相關疾病,中樞神經系統因有血腦屏障(BBB)的阻礙,限制大部分白血球遷移到中樞神經系統內。目前有些文獻提出不同原因引起中樞神經系統發炎反應,例如在感染性(細菌性和病毒性)腦炎疾病中,可能是入侵的免疫細胞引起的發炎(Ransohoff et al., 2003; Goverman, 2009),而在中樞神經系統的退化過程,慢性壓力(Chronic stress)會通過增加發炎反應,使 A β 積累、tau 過度磷酸化、氧化應激、線粒體損傷和葡萄糖代謝異常來加快阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)的人類和動物模型發病機理(Machado et al., 2014),病理性 α -突觸核蛋白(α -synuclein)過度激活小膠質細胞並轉錄 NF- κ B 和促發炎細胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、INF- γ 經誘導產生一氧化氮合成酶(Nitric oxide synthase, NOS)、活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和一氧化氮(NO),導致多巴胺能神經元的喪失和加速帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)變性(Zhang et al., 2017),除此之外,伴隨著壓力反應的神經內分泌和行為變化會影響體內代謝,例如損害神經元細胞代謝,可塑性和存活率等有害作用,應激誘導的激素和行為反應也可能部分通過巨大細胞(Mast cells)介導的血腦屏障分解,在這些發炎過程中可能涉及大量的細胞因子,然而目前對於中樞神經系統中發炎引發的細胞因子是有益還是有害尚不清楚,某些細胞因子會加劇組織損傷,某些細胞因子則會通過限制發炎來抵消組織損傷並促進組織重塑。

1.4 下視丘發炎

當下視丘中的 ARC 調控能量與代謝的神經群遭受到破壞,導致能量消耗與食物攝取不平衡時則會產生肥胖。有研究顯示在肥胖組織以及脂肪細胞本身中發現一系列發炎細胞因子,例如 IL-6、IL-1 β 、CCL2、TNF- α 等(Hotamisligil et al., 1995; Berg and Scherer, 2005),在肥胖狀態下胰腺、大腦下視丘也被研究出會產生低度發炎(De Souza et al., 2005; Ehses et al., 2007),這些發炎因子也會參與血管損傷和動脈粥樣硬化的變化機制(Berg and Scherer, 2005)。當身體處於營養缺乏和營養過剩的情況下,使血腦屏障(BBB)的通透性增加,讓多種發炎細胞因子能夠穿過血腦屏障(BBB)進入 ARC 影響神經元(Banks, 2001),這些生理變化促進了 ARC 神經元對周圍訊號(激素)的調節,像是有文獻使用低劑量 TNF- α 調節下視丘的胰島素和瘦素信號傳導,發現會部分抑制胰島素和瘦素的厭食作用,使食物攝取量上升(Romanatto et al., 2007),而 POMC 神經元的活性與全身葡萄糖和脂質代謝有關,當 POMC 神經元功能異常會產生進食與體重增加,使身體代謝產生負面影響(Banks, 2001)。回顧近期文獻中飲食誘導的肥胖症與 POMC 神經元功能障礙發生變化的相關機制,利用飲食誘導肥胖的動物中,因脂肪不斷分泌瘦素進而持續活化神經元的瘦素受體(Leptin receptor B, LpRB),這種長期激活受體會導致一些細胞內負反饋信號上調,例如 T 細胞蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine kinase, PTP)促進葡萄糖攝取與抑制脂解(Lipolysis)和 SOCS3 (Zhang et al., 2008),並與神經元發炎有關,而胰島素也可以通過調節 PTP 來影響 POMC 神經元的活性(Tiganis, 2013),此外,TNF- α 結合促進 TNF 受體的三聚化來損害胰島素作用(Aguirre et al., 2000),TNF 信號還會觸發 NF- κ B 的激活,使誘導細胞因子 SOCS3 的表達,從而抑制神經元胰島素信號傳導(Oh and Olefsky, 2012),TLR4 介導的信號通路也會激活了 MAPK 通路並觸發了 p38 和 JNK 依賴性信號傳導,最終導致中樞胰島素和瘦素抵抗的發展(Moraes et al., 2009)。有趣的是文獻指出在下視丘神經元系統中,高脂肪進食(High Fat Diet, HFD)引起應激反應可改變神經元突觸強度變化(Horvath, 2006; Chun and Jo, 2010),下視丘中的 POMC 和 AgRP 神經元與正常飲食的小鼠相比,其皮核周圍的神經元突觸減少(Horvath et al., 2010),若長時間處在發炎的狀況下會導致下視丘中神經元凋亡,並使 ARC 和下視丘外側的突觸輸入減少,最後導致能量控制失衡(Li et al., 2012; Thaler et al., 2012)。總體來說,在餵食 HFD 期間,多種炎症和應激反應途徑會迅速被激活,並促進神經元抵抗胰島素和瘦素,從而改變下視丘中神經元調節及突觸可塑性。

1.5 POMC 神經元

1.5.1 POMC 基因與衍生肽

POMC 神經元會表現 POMC 基因,編碼前 POMC 基因經過廣泛的翻譯後加工,並由原激酶轉化酶(proconvertase 1, PC1、proconvertase 2, PC2)切割和化學轉化,生成一系列較小的生物活性肽(Corander et al., 2009),主要為黑皮質素(Melanocortins)和 β -內啡肽(β -endorphins),它們具有激素(Hormones) 和神經肽(Neuropeptides)的多種功能(Smith and Funder, 1988; Cone, 2005)。PC1 在含 POMC 的組織中普遍表達,會切割 n 末端片段(N-terminal peptide)、連接肽 (Joining peptide)、腎上腺皮質激素(Adrenocorticotrophic hormone, ACTH)和 β -脂蛋白(β -lipotropin, β -LPH),而 PC2 在下視丘中選擇性表達,會將 ACTH 和 β -LPH 分別形成 γ -、 α -和 β -黑素細胞刺激激素,這些肽 α -、 β -和 γ -MSH 和 ACTH 統稱為黑皮質素(Melanocortin peptides)(Coll, 2007)。

POMC 的衍生肽 α -、 β -、 γ -MSH 和 ACTH 目前都有相關文獻探討 POMC 的衍生肽其功能,其中 α -MSH 影響皮膚色素沉著、能量穩態以及與大腦和周圍器官的發炎症狀有關(Capsoni et al., 2009; Singh and Mukhopadhyay, 2014; Anderson et al., 2016), α -MSH 通過作用於黑素皮質素受體 3 (Melanocortin-3 receptor, MC3R)和黑素皮質素受體 4(Melanocortin-4, MC4R)來調節食物攝入和能量穩態(Guan et al., 2017),突變的 β -MSH 作用於 MC4R 時與肥胖有關(Challis et al., 2002; Biebermann et al., 2006; Lee et al., 2006),而 γ -MSH 是 MC3R 的內源性激動劑(Endogenous agonist)(Eerola et al., 2018)。在黑皮質素受體中,MC4R 是與能量穩態最密切相關的一種,缺乏 MC4R 的人和小鼠會產生明顯肥胖和肥大,並且從年輕開始就顯示出線性增長和嚴重的高胰島素血症(Hyperinsulinaemia)(Farooqi et al., 2003),至於缺乏 MC3R 的小鼠會產生代謝綜合症,雖然體重沒有明顯增加,但身體組成也會稍微的異常,像是增加脂肪量、降低能量消耗(Butler et al., 2000),因此 MC3R 被認為對食物攝入控制的重要性較低,而最主要影響下視丘中 POMC 神經元作用為 α -MSH 或 β -MSH。POMC 的衍生肽 β -內啡肽則可刺激 μ 阿片受體,促進鎮痛並增加食物攝入量與其他內源釋放的 POMC 衍生肽之間存在互補的作用(Appleyard et al., 2003),POMC 的衍生肽 ACTH 會作用在下視丘-垂體-腎上腺軸(HPA)上,在緊張狀態下 ACTH 會增加血液中糖皮質激素的濃度,除此之外,其他壓力源如出血、感染、血糖過低、發炎反應、恐懼、情緒事件和特殊運動,都可以刺激 HPA 軸的反應,當 HPA 軸受到刺激時,ACTH 在數分鐘之內從垂體前葉釋放出來,到達腎上腺並增加糖皮質激素,ACTH 在循環中傳播並作用於腎上腺與 MC2R 結合,導致人類釋放皮質醇(Cortisol),而齧齒動物釋放皮質醇(Corticosterone),也因此 ACTH 的分泌會間接與調節晝夜節律有關(Chung et al., 2011)。

1.5.2 POMC 神經元受體

黑皮質素有五種亞型,即黑皮質素受體 1-5(MC1R-MC5R)(do Carmo et al., 2017),MC1R 主要位於皮膚和毛囊的黑素細胞中,也會在巨噬細胞和脂肪細胞中表達(Hoch et al., 2008),主要作用是調節皮膚和毛囊中的色素沉著(Turan et al., 2012)。MC2R 是 ACTH 受體,主要在腎上腺皮質上表達,需要輔助蛋白 MRAP 使其能夠轉運至細胞表面,以便其發揮功能。ACTH 與 MC2R 的結合激活了作為 HPA 軸一部分的糖皮質激素合成的級聯反應(Turan et al., 2012),MC3R 在下視丘和邊緣系統的區域以及胎盤中表達,而 MC4R 的表達主要限於大腦,其中下視丘的 PVN 中具有高表達(Mountjoy et al., 1994),MC3R 和 MC4R 是神經性黑皮質素受體,許多研究闡明了 MC4R 在調節食物攝入和能量消耗中的作用,缺乏 MC4R 則會導致老鼠肥胖(Roselli-Reh fuss et al., 1993),相對 MC5R 的功能了解不是很清楚,在胚胎髮生過程中高表達並且與外分泌腺功能有關,它的表達方式與其他 MCR 不同,因為它廣泛存在各式各樣的周圍組織中,但 MC5R 並未在中樞神經系統中表達(Cone, 2006)。

1.5.3 中樞代謝系統中 POMC 神經元的功能

在過去幾十年中,已經對 POMC 神經元有大部分的研究與了解,根據文獻可以得知 POMC 神經元在中樞神經系統中扮演重要角色並且有這些功能,像是食物攝取、能量消耗、受激素(瘦素、胰島素)傳遞、葡萄糖感測以及受解耦所調節。1997 年發表了幾項研究,提供了直接的證據來確立 MC4R 信號在調節能量穩態中的核心作用,下視丘的 POMC 神經元表達會通過激活 MC4R 靶神經元來釋放 α -MSH 以抑制進食(Fan et al., 1997),也發現 POMC 神經元和 α -MSH 抑制食物攝入和能量存儲有關,而 NPY/AgRP 神經元部分地通過 MC4R 信號會產生拮抗作用(Haskell-Luevano et al., 2001)。有文獻指出 POMC 神經元會受外圍信號(例如激素和營養素)來調節轉錄、加工以及神經元活性,POMC 神經元上表達各種受體,其中包括瘦素受體、胰島素受體、血清素 2C 受體(5HT2CR)、胰高血糖素樣肽 1 受體(GLP1R)和神經肽 Y 受體,通過這些受體接收信號並產生突觸和軸突投射(Kim et al., 2014),像是瘦素受體 Ob-Rb 有細胞內羧基末端結構域(Intracellular carboxyterminal domain),可以激活 JAK-STAT 信號轉導途徑,導致 POMC mRNA 升高和神經元去極化(Depolarization),從而減少食物攝入(Bjorbaek et al., 1997),目前已經清楚知道瘦素可以調節下視丘 POMC 神經元的細胞內信號傳導,使成熟 POMC 釋放衍生的神經肽(Kim et al., 2000)。瘦素除了通過受體對 POMC 神經元的直接作用外,也會減少 POMC 細胞上 GABA 能神經元輸入的數量,可能會改變下視丘神經元對其他刺激(例如一個或多個短期信號)的反應閾值(Pinto et al., 2004)。另外,下視丘中胰島素會對中樞神經系統的新陳代謝作用,它通過自主神經迴路影響周圍的器官,包括胰腺、肝臟、白色脂肪組織和棕色脂肪組織,以調節胰島素分

泌、內源性葡萄糖生成和葡萄糖攝取(Obici et al., 2002; Varela and Horvath, 2012; Vogt and Bruning, 2013; Dodd et al., 2015),胰島素也被發現能調節 POMC 神經元可塑性以控制葡萄糖代謝(Dodd et al., 2018),胰島素會與 tyrosine kinase receptor 結合,並通過 phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B,(PI3K/PKB, PI3K/AKT)信號傳遞信號,從而過極化(hyperpolarised)並抑制 AgRP/NPY 表達(Konner et al., 2007)。胰島素受體也在整個大腦中廣泛表達,若大腦中缺乏胰島素受體的小鼠則表現出全身胰島素抵抗,並增加食物攝入量產生肥胖(Havrankova et al., 1978)。

1.6 大腦中 POMC 系統的輸出與輸入

POMC 神經元在發育過程中會在許多大腦區域中表達 *pomc* 基因,但大多數表達不會持續到成年(Padilla et al., 2010; Padilla et al., 2012),在成年小鼠大腦中的 POMC 神經元被限制在 ARC 和 NTS 中,下視丘的 ARC 和腦幹的 NTS 都與大多器官相鄰,使 POMC 神經元分別感知和整合來自循環系統中脂肪抑制因子和飽腹感因子的信號(Cone, 2005)。在小鼠中,ARC 中大約有 3000 個 POMC 神經元,而在 NTS 中大約有 300 個 POMC 神經元(Cowley et al., 2001)。

ARC 中的 POMC 神經元接收來自 50 多個腦核的輸入,這些輸入分佈在皮質、中隔、紋狀體、杏仁核、蒼白球、下視丘、海馬、中腦、腦橋和髓質,其中下視丘核區和其他幾個前腦核為 ARC 中 POMC 神經元的主要輸入來源(Wang et al., 2015),且能夠整合來自周圍迷走神經傳入和中樞神經輸入的信號(van der Kooy et al., 1984; Schwartz, 2000),整合完訊息的 ARC POMC 神經元會向下視丘前部、視前內側區域、下丘腦外側、背體下丘腦、腹側丘腦、丘腦旁丘腦下核和後部投射,而 NTS 中 POMC 神經元的輸入和輸出都與 ARC POMC 神經元不太相同,NTS POMC 神經元主要從腦橋和延髓接收輸入,前腦區域僅發現少數的輸入(Wang et al., 2015),而主要投射區則是腦幹,NTS POMC 神經元會大量投射到腦幹區域,包括小細胞網狀核、髓質網狀核的背側和腹側部分、室旁核、橋腦網狀核的口腔、中間網狀核、三叉神經上核和臂外側旁核。儘管 ARC 和 NTS 中 POMC 神經的輸入模式不太一樣,但是仍有一些相同輸入到兩組 POMC 神經元的區域,這表示它們的活動可能受相同一上游調節劑的控制,而兩者神經元投射到不同腦區,可能在運作上負責執行的功能不同,例如瘦素不會在 NTS 的 POMC 神經元中誘導 c-Fos 表達(Huo et al., 2006)。

1.7 POMC 神經元之功能與粒線體之關聯

1.7.1 粒線體

線粒體利用跨電子傳遞鏈(electron transport chain ,ETC)形成內膜的電子質子梯度(electron-proton gradient)來產生 ATP 維持細胞的正常生理功能,也是脂肪酸氧化(fatty acid oxidation, FAO)的主要部位,當營養物質的過量攝入會引起細胞內代謝底物過多(例如脂肪酸和葡萄糖),導致乙酰輔酶 A 產量增加,通過 Krebs 循環產生過量的 NADH,促進電子的增加以及過量的活性氧(Reactive oxygen species,ROS)(Rosin and Okusa)和氧化壓力(Oxidative stress)(Bournat and Brown, 2010)從而引起細胞損傷、粒線體 DNA 突變和細胞凋亡。活性氧為自由基物質,例如超氧陰離子(O_2^-)、過氧化氫(H_2O_2)、一氧化氮(NO)等,ROS 會減少了脂肪細胞中的氧氣消耗,並阻止了脂肪酸氧化(FAO)導致脂質積聚(Wang et al., 2010)。為了保持健康,線粒體會進行多種動態行為,主要的動態活動為融合(兩個細胞器合為一體)、裂變(單個細胞器分裂為兩個)、轉運(細胞內定向運動)和粒線體通過自噬途徑的定向破壞。

1.7.2 粒線體融合

粒線體融合方式包括:(1)氧化壓力和高濃度的氧化型穀胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)促進了絲裂黴素的反式複合物(trans complexes of mitofusins)並通過二硫鍵促進外膜融合。(2)粒線體養化磷酸化刺激了膜的內部融合,從而增強了 Opa1 蛋白水解過程以激活內膜融合。(3)ATP 濃度增加也會使 Opa1 進行 GTP 加載和水解使內膜融合(4)膜電位損失會使膜內的代謝應激激活了內膜蛋白酶 Oma1,並導致 Opa1 的蛋白水解。然而粒線體融合是由三個動態家族糖蛋白介導,分別為線粒體蛋白 1(Mitofusin1, Mfn1)、線粒體蛋白 2 (Mitofusin2, Mfn2) 和視神經萎縮 1(Optic Atrophy1, Opa1) (Eisner et al., 2014; Song et al., 2007),在小鼠中,線粒体外膜融合蛋白 Mfn1/2 的 SM 特异性(SM-specific depletion)消耗會損害 mtDNA 完整性和代謝能力(Chen et al., 2010),而 OPA1 通過調節內膜動力學來保護細胞免於凋亡(Olichon et al., 2007)。在 POMC 神經元中,MFN1 會影響線粒體動力學,通過調節胰島素的釋放來調節全身性葡萄糖穩態的機制,若將 POMC 神經元中 MFN1 去除則會阻止與進食相關的線粒體融合,並影響葡萄糖感測(Ramirez et al., 2017),而在 POMC 神經元中將 MFN2 刪除,則會使細胞呼吸率下降、粒線體體積變大、也會影響解偶聯 UCP1 下降,減少 POMC 表達,產生瘦

素抵抗(Leptin resistance),也使身體產生高血糖(hyperglycemia)、高胰島素(hyperinsulinemia)以及肥胖。

1.7.3 粒線體裂變

粒線體的裂變對於細胞生理同樣重要,除了影響線粒體形態外,裂變還涉及多種功能,包括促進線粒體運輸,線粒體吞噬和凋亡。粒線體裂變的調節方式:(1)運動和氮飢餓(nitrogen starvation)導致 PKA 激活,使 Drp1 的 Ser637 磷酸化抑制了細胞裂變(2)鈣調神經磷酸酶會將 Drp1 的 S637 去磷酸化,使細胞器的代謝解偶聯(metabolic uncoupling)激活,導致 Drp1 的募集和裂變。(Pfluger et al., 2015)(3)寒冷(Cold exposure)和致癌性 Ras^{G12V}(oncogenic Ras)分別通過 PKA 或 MAPK 使 Ser616 磷酸化激活裂變。(4)嚴重的能量消耗可能會通過增加 ADP 和 AMP 濃度來激活裂變。線粒體的分裂主要由動力相關蛋白 1(Dynamin-1, Drp1)介導,Drp1 是一種 GTP 酶,會通過一系列受體蛋白聚集到線粒体外膜上,Drp1 會在小管周圍聚集並以 GTP 依賴性方式收縮使粒線體分裂。Drp1 激活和線粒體裂變已被證明也與生熱作用有關,在受凍的情況下導致解偶聯線粒體(uncoupled mitochondria)中的脂肪酸氧化並引發去甲腎上腺素(norepinephrine)的信號傳導,導致 PKA 激活和 Drp1 S616 處磷酸化從而激活線粒體裂變,通過不清楚的機制,裂變增強了脂肪酸敏感性與解偶聯使身體有助於產生熱量,因此,增強裂變的機制可能會降低氧化磷酸化(OXPHOS)效率,並在營養過量時發揮作用(Wikstrom et al., 2014)。有文獻指出 POMC 神經元中的動力相關蛋白 DRP1,在餵養情況下 pDRP1 的表達降低,與禁食動物的 POMC 神經元相比,在餵養情況下的 POMC 神經元線粒體大小增加,若 DRP1 缺失則會增強神經元中的 glucoprivic 激素刺激,使抑制作用增強以及增加對 PPAR 依賴性低血糖(hypoglycemia)的負調節反應(Santoro et al., 2017)。

1.7.4 粒線體解偶聯

粒線體解偶聯是一個生理調節的過程,通過該過程可以建立跨內膜的質子洩漏,使呼吸鏈的活性與 ATP 合成分離,並以熱量的形式釋放能量,像是哺乳動物包含人類都使用棕色(BAT)和白色脂肪組織中的解偶聯蛋白來產生熱量,以維持並維持核心體溫(Whittle et al., 2011; Lidell et al., 2013)。由於 POMC 及 AgRP 神經元都有表達解偶聯蛋白,解偶聯蛋白 UCP2 可通過破壞線粒體內膜質子梯度和氧化磷酸化來抑制 ATP 的產生,並介導 ROS 使 POMC 神經元的功能進行負調節作用(Parton et al., 2007),而另一篇文獻發現線粒體解偶聯蛋白也會調節 POMC 和 NPY 使神經元產生興奮性並驅動全身能量穩態的變化,從而增加能量消耗和減輕體重(Michael et al., 2017)。

1.7.5 線粒體運輸的代謝控制

線粒體是軸突內負責運輸的重要成員,不僅被遞送到軸突,而且還可以在軸突中被回收,平均移動速度介於快速移動的小囊泡和緩慢移動的細胞骨架蛋白之間(Vallee and Bloom, 1991)。大部分時間粒線體是呈現靜止狀態,可以通過生理局部能量需求和細胞內信號來調節粒線體的靜態與動態,例如在神經元的活躍突觸或生長的軸突中,線粒體會向 ATP 消耗量高的生長錐處移動並積累,然後在生長錐活性停止時分散(Morris and Hollenbeck, 1993),而細胞內信號像驅動蛋白(Kinesin motor proteins),特別是 kinesin-1 家族,會介導正向(或順行)方向的運輸,而動力蛋白介導向負(或逆行)方向的運輸(Pilling et al., 2006)。

1.7.6 粒線體自噬途徑

線粒體運輸與能量狀態也與自噬(Autophagy)調節相關,自噬是一種自我降解的過程,主要通過溶酶體(Lysosomal)途徑,將貨物隔離、密封和降解的過程,對於平衡發育中能量來源和對營養脅迫的響應至關重要(Glick et al., 2010)。調節自噬的主要過程為通過 Beclin-1 / VPS34 在 ER 和其他膜上控制吞噬細胞的形成,再與 Atg5-Atg12 的結合後與 Atg16L 相互作用於吞噬體處聚集,之後 LC3 加工並插入吞噬體中選擇降解目標使自噬體與溶酶體融合,最後被溶酶體蛋白酶蛋白水解降解。在細胞和生物體內,自噬是由飢餓所引起的,TOR 激酶主要在營養感測、調節細胞生長和自噬作用參與,當缺氧、ATP 濃度下降時,TOR 激酶被感知營養缺乏的信號所抑制,降低 TOR 活性會誘導自噬來適應變化的環境(Shaw, 2009)。缺氧時還會誘導因子(Hypoxia-inducible factor, HIF)誘導產生作用,這種作用與 AMPK 抑制 TOR 介導的和 TSC1 / TSC2 有關,也會通過未折疊的蛋白質反應誘導內質網應激使氧化磷酸化降低,因此誘導自噬可以使細胞消除部分內質網並在沒有氧氣的情況下減少線粒體質量、防止在 ER 浪費 ATP,增加的自噬作用還會使細胞從分解代謝中產生 ATP。除了缺氧狀態,當粒線體損傷時會導致膜電位的損失引起 Pink1 積聚,隨後帕金森蛋白(Parkin)募集和多種外膜蛋白的泛素化(ubiquitination),使激活外膜以通過蛋白酶體系統(UPS)走向自噬,若嚴重的能量消耗(能量壓力)則會導致 AMPK 激活,AMPK 磷酸化後並激活自噬調節,而使粒線體在無葡萄糖(氧化)條件下上調 OXPHOS 走向自噬調節。

1.7.7 粒線體調節 POMC 之輸出

由於線粒體是牽涉細胞營養和能量管理的主要細胞器,線粒體的呼吸狀態發生變化時,導致能量和氧化還原改變並整合了感知和信號傳導的過程,使細胞能適應不同的代

謝情況,而下視丘弓狀核(ARC)中的 POMC 神經元是食物攝入、能量消耗和葡萄糖代謝的關鍵調節劑(Schneeberger et al., 2014),POMC 神經元也能感知信號,告知生物體的能量狀態,然而在 POMC 神經元中進行營養感測的分子基礎仍然不完全清楚。目前有些文獻指出線粒體的信號對於 POMC 神經元功能影響重要,像是 POMC 神經元中凋亡誘導因子(apoptosis-inducing factor, AIF)缺失後,線粒體養化磷酸化(OXPHOS)的輕度損傷會增加脂肪酸利用率和 ROS 形成,可以預防肥胖引起 POMC 神經元沉默,並改善肥胖中全身葡萄糖代謝和瘦素敏感性,而 POMC 神經元中缺乏 MPC1 也可改善肥胖患者的葡萄糖代謝(Timper et al., 2018)。粒線體中氧化磷酸化的產物 ROS 會激活 POMC 神經元並減少進食,若抑制 ROS 會減少 POMC 神經元的活化並促進 NPY/AgRP 神經元和增加攝食行為(Diano et al., 2011),文獻也發現在高脂肪飲食導致肥胖的老鼠上發現下視丘的過氧化物酶體(Peroxisomes)增加和 PPAR γ mRNA 濃度上升,但 ROS 濃度下降使 POMC 神經元活性減少(Diano et al., 2011)。高脂飲食已被證明可顯著降低 POMC 神經中線粒體 ER 的型態,也會使 POMC 神經元釋放 α -MSH 的能力受損(Schneeberger et al., 2013),除了氧化磷酸化與 ROS 之外,線粒體分裂也可調節 POMC 神經元對葡萄糖和瘦素的反應能力(Santoro et al., 2017)。總而言之,線粒體是傳達細胞能量狀態的代謝產物的主要來源,生物體內的能量與代謝會引起的線粒體型態、活性變化並產生信號,使調節食物攝入、能量消耗和葡萄糖代謝的 POMC 神經元活性與功能改變。

第二節 論文目的及研究策略

2.1 研究目的及動機

先前的文獻發現急性發炎所造成的食慾下降及代謝改變是因細胞素作用在下視丘所造成,而近年來臨床證據與動物模式中都顯現出肥胖或代謝疾病與慢性下視丘發炎有密切關係,在動物中有長期下視丘發炎、代謝調控異常的現象。但其神經機制及其對代謝疾病產生的重要性仍未完全清楚。本研究有兩個重點,第一是發炎環境對神經細胞產生什麼樣的影響,我們以 POMC 神經元細胞株進行研究,第二是這些細胞層次的變化在肥胖及代謝疾病的動物是否也會看到,我們以高脂食物飼養小鼠做為肥胖及代謝疾病的模式,比較在組織上看到的變化。希望進一步找到由解決 POMC 神經元功能障礙恢復代謝生理平衡,治療下視丘發炎與肥胖產生的代謝疾病的方法。

本研究主要是分為四個部分,第一部分為探討 POMC 神經元中瘦素和胰島素信號傳導途徑,第二部分為探討 POMC 神經元在發炎的環境下是否會影響上述代謝信號對神經元的調控代謝機制,第三部分則探討 POMC 神經元在發炎因子的環境下如何破壞粒線體的調控,最後一部分實驗探討在飲食引起肥胖老鼠是否有發炎傾向,以及探討下視丘中的神經元調控與粒線體變化,綜合上述,我們認為飲食引起的肥胖會使下視丘長期處於發炎的情況,在低度發炎的環境下會干擾 POMC 的代謝調控,也會影響粒線體改變。

2.2 實驗設計

本研究旨在探討發炎環境下免疫細胞所分泌的細胞素等促發炎物質對神經細胞會刺激產生何種細胞或分子層次的改變。我們選擇下視丘弓狀核中的 POMC 神經細胞作為研究目標。下視丘因屬於環腦室組織(Circumventricular organ),周邊血液中的蛋白在此腦區可不受血腦屏障的限制直接影響腦區中的神經生理(Buller, 2001)。當周邊發生發炎導致系統促發炎物質上升,也可直接影響神經功能,例如急性感染或發炎時促發炎細胞素作用在弓狀核中的 POMC 神經細胞造成食慾下降;近年發現慢性下視丘發炎可影響此細胞,與肥胖與代謝失衡有關。本實驗選用由 8 周大,可在 POMC 神經細胞表現 GFP 的雄性 POMC-GFP 轉基因小鼠下視丘分離出來的原代培養細胞,經不朽化(immortalization)後產生的 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株。經神經肽、酶標記和生物活性受體表現測試,及細胞對胰

島素刺激的反應測試表明,此細胞株保留了下視丘中 POMC 神經元的特性,應是進行本研究合適的細胞模式(Nazarians-Armavil et al., 2014)。

實驗首先要探討 POMC 神經元中瘦素和胰島素信號傳導途徑,我們將體外培養 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞,並加入瘦素和胰島素誘導後收集細胞蛋白及 RNA,實驗以西方墨點法跟即時定量聚合酶連鎖反應來探討參與信號傳導途徑的分子。

第二部分為了要模擬下視丘發炎狀態來探討在有發炎因子的環境下是否會影響 POMC 神經元調控代謝的機制,實驗將取出老鼠骨髓細胞分化誘導成巨噬細胞並收集培養液,再利用 ELISA 檢測免疫分析發炎因子濃度以及利用 Cytokine array 來了解條件培養液中的細胞因子成分。實驗將收取的培養液加入 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞來模擬環境中含有低度細胞因子與趨化因子的狀態,並加入瘦素與胰島素收取不同時間點的蛋白與 RNA,再利用西方墨點法跟即時定量聚合酶連鎖反應來探討參與信號傳導途徑是否有改變。

第三部分探討在發炎的情況下是否會干擾細胞內粒線體作用,實驗將收取的培養液加入 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞來模擬環境中低度發炎的狀態,利用即時定量聚合酶連鎖反應來測量與粒線體相關的引子,探討粒線體動態狀態,再來利用粒線體壓力測試來完整檢測粒線體功能。

最後一部分確認因飲食引起的肥胖老鼠的下視丘中是否有發炎傾向與下視丘中粒線體改變,我們將餵食兩個月大的公鼠含有 60% 高脂肪飲食持續一個月,在一個月期間測量公鼠體重與食物攝取量,實驗使用眼窩採血進行 ELISA 檢測血清發炎因子濃度與利用生化分析儀器檢測血清三酸甘油脂濃度,最後將公鼠犧牲取出下視丘核區做 RT-PCR 檢測下視丘發炎因子表達與粒線體動態功能的因子表達。

第二章 材料方法

2.1 細胞培養

2.1.1 mHypoA-POMC/GFP-1

mHypoA-POMC/GFP-1 為八週大的雄性 POMC-GFP 小鼠下視丘,該細胞株購買於 CELLuions Biosystems Inc,生長特性為貼附型,並具有神經肽(Neuropeptides)、酶標記(Enzymatic markers)、生物活性受體(Biologically active receptor)等特性(Anaies Nazarians-Armavill et al.,2014)。mHypoA-POMC/GFP-1 細胞使用含有 10%胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS , gibicol)的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ,Sigma D5796)培養液,培養於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中,每兩天更換一次培養液,培養期間使用倒立是顯微鏡觀察並記錄細胞生長。

2.1.2 L929

L929 為老鼠的纖維母細胞 (Fibroblast),該細胞株生長特性為貼附型,由文獻顯示在培養 L929 cells 的培養液中發現含有 M-CSF(Macrophage Colony-stimulating factors)及 GM-CSF(Granulocyte/Macrophage- Colony-stimulating factors),M-CSF 及 GM-CSF 均可誘導骨髓細胞變成巨噬細胞。本實驗將 L929 細胞使用含有 10%胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium , gibicol)培養液,培養於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中,每兩天更換一次培養液,培養期間使用倒立是顯微鏡觀察並記錄細胞生長。

2.1.3 細胞繼代培養

當細胞密度達八分滿時,則進行分盤與細胞繼代 ,細胞分盤前先用 1X PBS (Phosphate-Buffered Saline) 清洗三次,加入 1ml 0.05% Trypsin/EDTA (用 1X PBS 稀釋) 覆蓋細胞放置室溫一分鐘,使細胞自壁上脫落,再加入同等積 1ml 培養液停止 Trypsin/EDTA 作用,並細胞計數後進行繼代培養。

2.1.4 細胞計數

取 20 μ l Trypsin/EDTA 打下來的細胞液,與同等積的 Trypan-Blue (Sigma,T8154)均勻混合後,將 10 μ l 混合液滴入細胞計數盤中,並將細胞計數盤放置於顯微鏡下觀察並計數四個大方格之細胞總數,將總數除 4,乘以稀釋倍數,最後乘以 10⁴,即為每 ml 中細胞懸浮

液之細胞數。

細胞數計算公式: 4 大格細胞總數 x 2(稀釋倍數) x 10⁴ / 4 = 細胞數/ml

2.2 實驗動物

本實驗所採用的動物為 C57BL/6 兩個月大的小鼠,並依照國立政治大學動物實驗動物照護及使用委員會規定之飼養,飼養於國立政治大學小鼠動物房,飼養動物房溫度控制在 22-25°C、濕度為 50-70%和日夜 12 小時的光照週期,飼養期間給予充足的飼料與水。

2.2.1 骨髓細胞誘導成巨噬細胞(Bone marrow-derived macrophages, BMDM)

本實驗所採用 C57BL/6 約 8 個月大的小鼠,使用愛寧麻醉劑 Attane (Isoflurance) 將老鼠昏迷後犧牲取出大腿骨及小腿骨,並在無菌操作台上將骨頭兩端的軟骨撬開,使用 24G 針筒以 1X PBS 將骨腔中的骨髓細胞沖出並均勻打散,以 500 xg 離心五分鐘後去除上清液加入 2ml 紅血球裂解液(Ammonium-Chloride-Potassium lysis buffer, ACK lysis buffer)靜置兩分鐘後加入同體積 PBS 已終止作用,經由細胞過濾器(cell strainer 70µm)將細胞過濾後細胞計數,並以 500xg 離心五分鐘去除上清液,最後用培養液回溶,將細胞以 5x10⁶ 個種入 10 公分的培養盤中進行培養。骨髓細胞培養在 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, gibicol)且含有 10%胎牛血清 FBS(Fetal bovine serum, gibicol)、100U/ml 抗生素(penicillin/streptomycin),以及加入 20% L-929 conductional medium, 培養於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中,每兩天更換一次培養液,共培養五天,細胞培養期間使用倒立是顯微鏡觀察並記錄細胞生長。

2.3 條件培養液(Conductional medium):

2.3.1 L929 條件培養液:

將 1x10⁶ 顆 L929 細胞種入 10 公分培養皿中,並且加入 15ml 含有 10%胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, gibicol)培養液,培養於 37°C、5% CO₂ 的培養箱中五天,五天後收取培養基保存至-20 度冰箱。

2.3.2 LPS 誘導巨噬細胞條件培養液:

將實驗沖下來的骨髓細胞培養在 10 公分培養皿中,使用 DMEM (gibicol)且含有 10% 胎牛血清(gibicol)、100U/ml 抗生素(penicillin/streptomycin)再加入含 20% L-929 條件培養液使骨髓細胞分化五天為巨噬細胞後(每兩日更換一次培養基),將培養基更換為含有 10%胎牛血清的 DMEM 並加入最終濃度為的 1 μ g/ml 脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS),經 24 小時刺激後收取培養基作為 LPS 誘導巨噬細胞的條件培養液。

2.4 西方墨點法(Western Blot)

2.4.1 蛋白質萃取與濃度測定(Protein extraction and concentration determination)

將 6well 細胞用 PBS 沖洗三次後,加入含蛋白酶抑制劑(protease inhibitor, Calbiochem)以及磷酸酶抑制劑(phosphatase inhibitor, Calbiochem)的裂解緩衝液(Lysis Buffer)100 μ l/well (詳細配方請參照附錄一),並於冰上操作,利用細胞刮勺(cell scraper)將細胞刮下後,以保持在 4 度 14,000xg 離心 10 分鐘,收集上清液。利用 Bradford 測定法檢測蛋白質濃度,考馬斯亮藍 G-250 (Coomassie Brilliant Blue)是利用蛋白質與染劑結合,主要是與蛋白質中的鹼性胺基酸 (特別是精氨酸) 和芳香族胺基酸殘基相結合,使染劑溶液的顏色也由棕黑色變為藍色。樣品用滅菌二次水稀釋五倍後,將每個稀釋樣品抽取 10 μ l 並與 200 μ l 1X Bio-Red Protein Assay dye 混合後植入 96 孔盤,使用牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)做出標準曲線,抽取 10 μ l 並與 200 μ l 1X Bio-Red Protein Assay dye 混合後植入 96 孔盤,並透過分光光度計檢測樣品的 595 nm 吸光值,並依據曲線計算出蛋白實際濃度。

2.4.2 樣品配置(Prepare Sample)

將每個樣品中濃度含有 20 μ g 蛋白與 1X loading dye (詳細配方請參照附錄二)混合成電泳樣品,並放置在 95 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘,使蛋白質三級結構中的雙硫鍵打斷變成線性結構,樣品保存在-20 度。

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

實驗使用 Hoefer 設備,配置 10% Running Gel (詳細配方請參照附錄三)與 4% Stacking Gel (詳細配方請參照附錄四)的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠。將 SDS-PAGE 架置在電泳槽(Amersham Biosciences),加入 1x Tank buffer(25nM Tris-HCL、192mM Glycine、0.1%SDS) (詳細配方請參照附錄五),並將蛋白樣品及蛋白質分子標記

(EZColor II™ Prestained Protein Marker)注入在樣品槽中,設定每片膠電流為 30mA,電壓為 400V,時間為兩小時。

2.4.4 蛋白質轉漬(Transfer)

將 PVDF 膜(polyvinylidene fluoride)浸泡於 100% 甲醇(Methanol)一分鐘使膜活化;取出膠片,並用 1X Transfer buffer (詳細配方請參照附錄六)清洗五分鐘後,將膠片、PVDF 膜與濾紙組裝後放入轉漬槽中,電壓為 100V,電流為 700mA,轉漬一小時。

2.4.5 抗原檢測(Antigen detection)

將轉漬完成的 PVDF 膜(polyvinylidene fluoride)剪切成適當大小,並放入 Blocking buffer (配置 2%BSA 於 0.05%TBST 緩衝液),在室溫中以 40rpm 轉速搖一小時來降低非專一性蛋白與抗體的結合,再加入一抗的抗體做蛋白的標定。利用 0.05%TBST 緩衝液稀釋抗體後在四度下過夜約搖 16-18 小時。本實驗所是用一級抗體為:

- (1) Mouse anti-actin antibody (1:100000,Chemicon)
- (2) Rabbit anti-phospho-Stat3(Tyr705) antibody (1:2000 Cell Signaling)
- (3) Rabbit anti-phospho-Akt(Ser473) antibody (1:2000,Cell Signaling)
- (4) Rabbit Akt(pan) antibody (1:1000,Cell Signaling)
- (5) Rabbit anti-phospho-mtor(Ser2448) antibody (1:1000,Cell Signaling)
- (6) Rabbit anti-phospho-AMPK α (Thr172) antibody (1:1000,Cell Signaling)
- (7) Rabbit anti-AMPK α (Thr172) antibody (1:1000,Cell Signaling)

待一級抗體反應完後,用 0.1%TBST 緩衝液放置室溫並用搖盪器以 70rpm 搖晃,共清洗三次,每次十分鐘,加入以 0.05%TBST 緩衝液稀釋的二級抗體,放置室溫搖盪器以 40rpm 搖晃,約一小時,最後用 0.1%TBST 緩衝液放置室溫搖盪器以 70rpm 搖晃,清洗三次,每次十分鐘。本實驗所使用的二級抗體為:

- (1) Goat Anti-Mouse IgG Antibody,horseradish peroxidase conjugate antibody
(1:5000,Millipore)
- (2) Goat Anti-Rabbit IgG Antibody,horseradish peroxidase conjugate antibody
(1:5000,Millipore)

2.4.6 顯像分析:

因二級抗體上接有 HRP(horseradish peroxidase),與 ECL(Enhanced chemiluminescent)反應後即產生冷光,故將 PVDF 膜浸泡在 Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate(Millipore)中,再用 Kimtech 擦乾多餘的液體後放入電泳膠影像系統 (AVEGENE)進行訊號影像擷取,使用 NHI Image J 軟件分析圖像的譜帶強度,影像分析利用 Actin 為 semi-quantification。

2.5 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-Time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

2.5.1 RNA 萃取與濃度測定(RNA extraction and concentration determination)

使用 Molecular Research Center, Inc.的 RNAzol @RT(RN190)來萃取 RNA,每個加入 500ul RNAzol 後再加入 200ul nuclease-free water,靜等十五分鐘後 12000xg 離心十五分鐘,吸取上清液加入同體積異丙醇(isopropanol),靜等十五分鐘後 12000xg 離心十五分鐘,去除上清液後,加入 400ul 75%酒精,離心 4000xg 每次三分鐘,總共兩次,最後烘乾後加入 nuclease-free water 使 RNA 回溶。利用 Nanodrop 檢測 RNA 濃度。

2.5.2 逆轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse transcription-PCR, RT-PCR)

將抽取出的 RNA 濃度換算成 1ug,並加入 1ug 的 100μM oligo-dT primers,其餘補 RNase-free Water 使樣品體積為 10ul,並在 65°C 反應兩分鐘,破壞 RNA 二級結構,再放置冰上一分鐘終止作用。其後加入 10X RT-script buffer、RNase inhibitor (40U/ul)、dNTP solution MMLV(10mM)、RT-script enzyme、Nuclease-free water 均勻混合後放入聚合酶連鎖反應儀(詳細配方請參照附錄七),設置 37°C 反應一小時三十分鐘,85°C 反應五分鐘,即合成 cDNA,將 cDNA 樣品保存在-20 度。

2.5.3 即時定量聚合酶連鎖反應

以 SYBR Green 半定量方法 (semi-quantification) 進行分析,將 Primer、SYBR Green Master Mix 與 cDNA 加入反應管中(詳細配方請參照附錄八及附錄九),使得樣品體積為 20 μl,均勻混和後放入即時定量聚合酶連鎖反應儀器(Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR System),設定條件為:50°C 反應 2 分鐘,95°C 反應 2 分鐘:95°C 20 秒、60°C 20 秒(因引子序列而定)、72°C 30 秒,進行四十個循環。結果分析以 HPRT 為參考基因,以 Delta-delta CT 方法進行分析。

2.6 老鼠細胞激素分析(Mouse Cytokine Array)

本實驗所使用為 Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit (R&D systems),將 Array Buffer 6 加到 4 well multi-dish (2ml/well),用鑷子將膜放入 4 well 中並放入振盪器搖一小時,之後準備樣品配置,將 1ml 的培養液樣品加入 0.5 ml 的 Array Buffer 4,再加入 15 μ l Mouse Cytokine Array Panel A Deletion Antibody Cocktail,均勻混合後的樣品放入振盪器培養一小時,再將 4 well 中的 Array Buffer 6 吸除,加入培養一小時的混合後樣品並放置 4^oC 冰箱內的振盪器,培養 16-18 小時。用鑷子將膜取出,並放入含有 20 ml 1X Wash Buffer (0.05% Tween20)放置振盪器搖十分鐘後移除液體,共清洗三次,將膜放入含有 Array Buffer 6 稀釋的 Streptavidin-HRP 2000X (2ml/well),並放入振盪器是溫下搖半小時後,按照上步驟利用 1X Wash Buffer (0.05% Tween20)清洗膜三次,每次十分鐘。最後將膜上的液體輕微壓除,在膜上淋上 1ml Chemi reagent mix 並放入顯影器曝光拍取影像,使用 NHI Image J 軟件分析圖像的強度。

2.7 線粒體選擇性探針(MitoTracker-Mitochondrion-Selective Probes)

事先須將鑷子滅菌以夾取 Coverslip 進六孔盤中並於無菌操作台照 UV 一小時。將六孔盤每孔加入 1ml 0.1% Gelatin 並放置 37 度培養箱 20 分鐘,再吸除液體並烘乾後種入細胞。使用染劑前將細胞內培養液體吸除並用 1X PBS 清洗細胞,本實驗使用試劑 MitoTracker® Green FM (採購於 Invitrogen),將 MitoTracker® 產品溶於 74 μ l 的無水二甲基亞砜(dimethylsulfoxide,DMSO)中,使其染劑濃度為 1 mM,並抽取 1 μ l 加入 10ml 無血清培養液中使其染劑混合培養基最終濃度為 100 μ M,再將 100 μ M 的 MitoTracker® Green FM 染劑混合培養基加入六孔盤中,每格 2ml 並培養細胞在 37 度培養箱 35 分鐘,之後吸除培養液並用 1X PBS 清洗吸除再加入每格 1ml PBS 並用 DeltaVision Personal DV microscope system 觀察細胞。計算方式:CTCF = 集成密度 - (所選單元格的面積 X 背景讀數的平均螢光強度)

2.8 粒線體壓力測試(Seahorse XF Cell Mito Stress Test)

將細胞種入細胞培養盤中 (事先先以 96 well plate 進行測試,偵測時的細胞數建議為單層接近全滿約 95% 為最佳),將 Blank Well (A1,B4,C3,D6)空下來,不種細胞的 Well 只補培養基作為上機溫度背景校正,為了讓細胞分佈均勻,先將細胞含培養液約在 100 μ l 內種入孔盤,待細胞貼妥後再加入 150 μ l 培養基使細胞有足夠養份生長。準備上機用

的培養基,上機用培養基不可加入碳酸氫鈉(Sodium bicarbonate)及血清,並將上機用培養基 pH 調整至 7.4。上機前一晚將螢光探針浸泡在校正液內,置於 37°C 無 CO₂ 的環境內過夜活化(16 小時),避光並封上 parafilm 以免風乾。將 Utility plate 24 孔皆加入 1mL 校正液,中間放置粉紅色的 Hydro Booster 後再放上螢光探針。

待上機前一小時更換上機用培養基(事先將培養基回溫到 37°C),用每格 200 µl 上機用培養基清洗一次後吸除,再加入 675 µl/well 上機用培養基,將更換完上機用培養液的細胞放置於 37°C 無 CO₂ 的環境等待上機。配置上機用的藥物,使用上機培養基回溶,依據建議濃度所配置藥物,試劑盒中藥物 Oligomycin 建議最終濃度為 1 µM,藥物 FCCP 建議非癌症細胞最終濃度為 4, 2, 1, 0.5 & 0.25 µM,而藥物 Rotenone/Antimycin A 建議最終濃度為 0.5 µM。將藥物濃度計算後即可開始上機測試,並依據儀器操作方式設定加藥及分析。

2.9 體外 ROS/RNS 分析(In vitro ROS/RNS assay kit)

將細胞用 PBS 稀釋成 1×10^7 /ml 濃度,並使用超音波震盪器將細胞震碎,使用 10000g 離心五分鐘後收取細胞上清。將 96 孔盤每隔加入 50 µl 的序列稀釋樣品及待測細胞上清液,再加入 50 µl 1X Catalyst 並放室溫五分鐘,再加入 100 µl DCFH (利用 1:5 的 DCF-DiOxyQ 與 Priming Reagent 混合,再將混合液加入 1:40 的 Sabilization solution)避光放置室溫三十分鐘後,利用螢光檢測器讀取 485/535 nm 值統計分析。

2.10 酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)

將 1X Coating Buffer 與 1X Capture Antibody 混合後加入 96 孔盤中,每孔加入 100 µl 並保存在四度冰箱 16 小時,利用 300 µl/well wash buffer (PBS + 0.05% Tween 20)清洗三次後,加入每格 200 µl 1X Assay diluent A 放置室溫用轉速 500 rpm 搖一小時,再利用 300µl/well wash buffer(PBS+0.05%Tween 20)清洗四次後,每格加入 100 µl Diluted standard 與樣品放置室溫用轉速 500 rpm 搖 2 小時,再利用 300µl/well wash buffer(PBS+0.05%Tween 20)清洗四次後,每格加入 100 µl 1X Diluted detection antibody solution,用轉速 500 rpm 放置室溫搖 1 小時,用 300 µl/well wash buffer (PBS + 0.05% Tween 20)清洗四次後,每格加入 100 µl Avidin-HRP solution 放置室溫用轉速 500 rpm 搖 0.5 小時,再用 300ul/well wash buffer(PBS+0.05%Tween 20)清洗五次後,加入每格 100 µl Substrate solution D 避光放置室溫十五分鐘,最後加入每格 100 µl 的 Stop

solution(2N HCL),在十五分鐘內使用分光光度計檢測波長 450nm、570nm 讀值並統計分析數據。

2.11 統計分析

實驗結果數據以 GraphPad Prism 軟體進行分析,結果表示為平均值 \pm SEM,當僅有實驗組及對照組時,使用 Student's Test 統計分析,若實驗設計為三組或三組以上時,則使用 Ordinary one way ANOVA 統計分析,並使用 *post hoc* Tukey's multiple comparisons tset 事後比較。統計分析結果表示為:*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,****表示 $P<0.0001$ 。



第三章 實驗結果

3.1 瘦素與胰島素對 mHypoA-POMC/GFP-1 神經元的反應路徑

在 ARC 及 NTS 兩腦區中均有 POMC 神經元分佈,這兩群神經細胞均與食慾及代謝調控有關。NTS 中的 POMC 神經元作用是急性的抑制進食,作用並不持續,所以不會影響體重、身體組成、脂質和葡萄糖代謝;而 ARC 中的 POMC 神經元則是調控長期食物攝入、維持代謝平衡及調控。瘦素和胰島素是代謝調節及維持醣類代謝恆定重要的激素,弓狀核中的 POMC 神經元也是這些代謝調控分子主要的作用目標(Varela and Horvath, 2012),CNS 中瘦素和胰島素受體在弓狀核中的 POMC 神經元及 AgRP 神經元內高表達(Cowley et al., 2001; Lin et al., 2010)。本研究採用 mHypoA-POMC / GFP-1 細胞株來探討 ARC 中的 POMC 神經元的反應(Zhan et al., 2013),第一個部分的研究是瘦素或胰島素的環境下,探討 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞短期與長期調控代謝訊號的改變。

實驗將培養 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株,並參考文獻後給予 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞 200nM 瘦素(Zheng et al., 2018),經由刺激 0.5 小時、1 小時、2 小時、4 小時及 24 小時後收取蛋白進行西方墨點法分析,並將蛋白質電泳圖譜定量,由於過去文獻發現瘦素主要活化兩條路徑進行代謝調控,分別為 JAK-STAT 路徑、PI3K-AKT 路徑(Park and Ahima, 2014)。除此之外,AMPK 也是一個參與代謝調控且影響 POMC 神經元功能的重要分子(Claret et al., 2007),也有文獻表明 AMPK 的活性會受到 PI3K-AKT 路徑的調控(Pereira-Lancha et al., 2010),雖然其上下游作用分子還未被確認,本研究也會分析 AMPK 活性的改變。第一部分的實驗主要會探討這三條路徑下的相關蛋白活性改變。

實驗數據(圖一)顯示,短期的瘦素刺激後細胞內激活 AKT-mTOR 信號路徑,細胞內的 AKT 信號會被磷酸化,並激活下游 pmTOR,也會使 pSTAT3、AMPK 與 pAMPK 下降,連續瘦素刺激 2 小時後,pSTAT3 蛋白漸漸恢復原本水平,而連續刺激 4 小時後,AMPK 與 pAMPK 蛋白才回升到原本濃度。由於這些途徑蛋白會進一步影響基因表現,例如 *pomc* 與 *socs3* 基因的表現都會被瘦素激活,前人研究顯示這兩個基因的表現可由 STAT3 活化後刺激升高。我們在兩個不同的時間點觀察這些基因表現的改變,實驗將 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞加入 200nM 瘦素短期刺激 3 小時、長期刺激 24 小時後抽取細胞 RNA,並將 RNA 反轉錄成 cDNA,利用即時定量分子聚合酶連鎖反應實驗(Real-Time PCR)來檢測 POMC 細胞中的 RNA 表達量,根據實驗數據(圖一)顯示,在經過瘦素刺激 3 小時後,*pomc* 基因表達量會顯著上升,24 小時後會回到未刺激時的水平,此結果與瘦素刺激下 pSTAT3 活性變化並不相符。這可能是因為瘦素另一條激活的 PI3K-AKT 路徑中,AKT 除了調節 pmTOR 之外,也可阻止 FoxO1 抑制 *pomc* 的表達(Ma et al., 2015)。因

此猜測瘦素可能是激活 PI3K-AKT 路徑促進 *pomc* 基因轉錄,而受 STAT3 路徑影響的 *socs3* 基因表達量則是在刺激 3 小時後下降,24 小時後則顯現上升趨勢,與西方墨點法的結果相似。另外我們也檢測受 mTOR 與 AMPK 通過調節自噬作用的 *atg7* 基因,活化的 mTOR 會抑制 *atg7* 基因表達(Jung et al., 2010),而活化的 AMPK 則會促進自噬作用,並降低 POMC 基因表現(Oh et al., 2016),也如同實驗結果所顯示,在瘦素刺激短時間 pmTOR 蛋白上升而 pAMPK 蛋白受抑制,*atg7* 基因的表達會下降,當長時間刺激 24 小時後,pmTOR 蛋白與 pAMPK 蛋白則會回到原本濃度,相對應 *atg7* 基因的表達則顯著上升。由上面實驗結果我們可以得知, POMC 神經元中瘦素短時間內會激活 AKT-mTOR 路徑並利用 mTOR 來抑制 AMPK 路徑蛋白,也會使 *pomc* 基因含量提高,導致身體抑制食慾,長時間刺激後 *socs3* 與 *atg7* RNA 含量上升,使身體產生負調節與自噬作用來維持身體穩態。

除了瘦素之外,胰島素也會調控 POMC 神經元,對身體中的葡萄糖和能量代謝相當重要,許多文獻顯示瘦素和胰島素信號傳導在下視丘神經元中具有相似的細胞內途徑(Varela and Horvath, 2012),所以實驗探討與瘦素刺激後相關的路徑蛋白。實驗參考文獻給予 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞 10nM 胰島素(Nazarians-Armavil et al., 2014),經由刺激 0.5 小時、1 小時、2 小時、4 小時及 24 小時後收取蛋白進行西方墨點法並分析,根據實驗(圖二)結果顯示,在短時間 0.5 小時至 1 小時的胰島素刺激後,pSTAT3 蛋白顯著下降,並顯著增加 pAKT 的含量,而 pmTOR 也有上升的趨勢,相對於 AKT、AMPK 與 pAMPK 都有下降趨勢但未達顯著差異,而經由胰島素刺激兩小時後,pSTAT3、AKT、AMPK 與 pAMPK 蛋白都有漸漸回升的趨勢,實驗結果與加入瘦素的刺激後反應大致相同。另外,根據實驗數據(圖二)顯示,在經過瘦素刺激 3 小時後,*pomc* RNA 表達量會顯著上升,24 小時後則下降,*socs3* 與 *atg7* 的 RNA 表達量則明顯差別。因此我們可以得知,透過 PI3K/AKT/mTOR 路徑可整合來自瘦素和胰島素訊號,胰島素對 POMC 神經元刺激短時間內會激活 AKT-mTOR 路徑並利用 mTOR 來抑制 AMPK 路徑蛋白,短期內會使 POMC RNA 含量提高,利用調控 POMC 來維持代謝穩態。

3.2 以 LPS 誘導巨噬細胞條件培養液模擬下視丘慢性發炎的環境

發炎對神經元造成的影響,可透過免疫細胞(在腦中主要為為膠質細胞和巨噬細胞)和星狀細胞經由分泌促發炎細胞因子、一氧化氮等作用影響細胞功能。為了研究發炎環境,而非只是單一或幾種分子對 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞產生的影響,本實驗收集巨噬細胞受 LPS 刺激後含促發炎因子的條件培養液對神經細胞進行培養,參考文獻與實驗室之前的實驗結果,本實驗使用從小鼠腿骨取出的骨髓細胞進行體外培養,再利用 L929

細胞培養液中含有 M-CSF 及 GM-CSF 誘導骨髓細胞分化為巨噬細胞,最後以 LPS 刺激巨噬細胞,使細胞分泌促發炎因子做為條件培養液。將條件培養液利用老鼠細胞激素分析 Mouse Cytokine Array(Proteome Profiler)檢測培養液中的細胞因子成分並定量。根據實驗統計後顯示(圖三),在條件培養液中發現 CXCL10、CXCL1、TNF- α 、IL-6、CCL3、CCL5、IL1 β 在條件培養液中都有高表達,而 G-CSF、CCL2/MCP1、sICAM-1/CD54、MIP-1B/CCL4、MIP-2/CXCL2 也都有較明顯的表達,根據巨噬細胞的激活狀態和功能,可以將它們分為 M1 型(經典激活的巨噬細胞)和 M2 型(可選激活的巨噬細胞),M1 巨噬細胞的作用是分泌促發炎性細胞因子和趨化因子,引起發炎並清除病原體,像 IL-6、TNF- α 、CXCL10、CCL2、CCL3、CCL5、IL1b 在條件培養液中都有高表達,而 M2 巨噬細胞主要分泌抗發炎細胞因子,具有減輕發炎反應,促進腫瘤生長和免疫抑制,主要為在傷口癒合和組織修復中起重要作用,像 CXCL1、CXCL2 在條件培養液中也有表達,我們也將條件培養液利用 ELISA 檢測 TNF- α 及 IL1b 濃度,與乾淨的培養液(無加入任何細胞培養)相比,條件培養液中的 TNF- α 濃度比對照組(無加入任何細胞培養的乾淨培養液)相比高於 67 倍,而條件培養液中的 IL1b 濃度則高於對照組 3 倍,由於要實驗為模擬低度發炎的環境下,加上先前實驗得知,在細胞培養液中含有 5% conditioned medium 刺激與細胞培養液中含有 20% conditioned medium 刺激下的路徑蛋白變化並無明顯差異,所以我們將取細胞培養液中含有 20% 的條件培養液作為模擬下視丘中發炎的環境。

3.3 發炎物質對 mHypoA-POMC/GFP-1 神經元的訊息路徑的改變

在發炎的環境下,促發炎因子與趨化因子會與受體結合後觸發細胞內信號反應,改變 POMC 中的調節作用。因此我們觀察在發炎的環境下對 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞的訊息路徑產生的影響,主要是前述與代謝調節有關的訊息路徑,以推測前對生理產生的影響。實驗用 LPS 刺激巨噬細胞的條件培養液來模擬在下視丘中發炎的環境,實驗設計將 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞培養液中加入 20% 的 conditioned medium,經由刺激 0.5 小時、1 小時、2 小時、4 小時及 24 小時後收取蛋白進行西方墨點法分析,定量後實驗數據顯示(圖四)在短時間 0.5 小時至 1 小時內刺激細胞會使 pAKT 表達量上升,而 0.5 小時至 4 小時間 pmTOR 的含量也有達到顯著的上升,相對於 AKT、AMPK 與 pAMPK 的含量則無明顯改變,有趣的是在短時間瘦素或胰島素刺激下會下降的 pSTAT3 表達量在經由條件培養液刺激後也無明顯變化,有可能是 conditioned medium 內中的細胞因子與趨化因子對 POMC 神經元產生不同作用。如同前面實驗,利用檢測 RNA 表達量了解 POMC 細胞株短期與長期的代謝調控分子機制過程,將 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞培養液中加入含 20% conditioned medium 刺激 3 小時、24 小時後收取細胞抽 RNA 檢測表達

量(圖四),在低濃度細胞因子的環境下對 POMC 神經元刺激 3 小時後,POMC 基因會上調,細胞內除了利用 AKT-mTOR 路徑來傳遞訊息之外,有些細胞因子也會參與 *pomc* 基因轉錄作用,像是 IL-6、TNF- α 、IL-1 β (Katahira et al., 1998)、CXCL10 (Rashighi and Harris, 2015)等,每種細胞因子對 *pomc* 基因表達都有不同的影響,而特別的是在低濃度的細胞因子刺激後,pSTAT3 蛋白並沒有像激素(瘦素與胰島素)一樣被抑制,*socs3* 基因也有顯明上調,可能是細胞因子影響傳遞訊號所導致,例如 IL-6 會激活 JAK-STAT 路徑使轉錄出 *socs3* 基因進行負回饋調節,TNF α 會通過激活 MAPK 來調節 *socs3* 表達(Ehltling et al., 2007),而 *atg7* 也在長期刺激下高表達,使細胞進行自噬作用。

為了探討在下視丘慢性發炎的環境下,瘦素與胰島素傳遞路徑上的蛋白是否會受細胞因子與趨化因子而有所改變,從前面得實驗結果得知短時間瘦素或胰島素刺激 POMC 細胞後會激活 AKT/mTOR 訊號途徑,所以實驗設計分為六個培養條件(圖五),分別為不添加任何東西的對照組、0.5 小時短時間瘦素刺激、0.5 小時短時間胰島素刺激、另外以長時間添加 20% conditioned medium 刺激 24 小時來模擬慢性發炎環境、刺激 24 小時後再加入 0.5 小時短時間瘦素以及刺激 24 小時後再加入 0.5 小時短時間胰島素,將這些培養這些細胞後收取蛋白利用西方墨點法分析,根據實驗結果圖五得知,經由瘦素與胰島素短時間刺激下,pSTAT3 表達量顯著的下降,而在含有 20% conditioned medium 經由 24 小時刺激後再加入 0.5 小時激素,pSTAT3 蛋白也有明顯被抑制,相較起來,未含有 20% conditioned medium 處理過的細胞經激素刺激後,pSTAT3 蛋白較強烈被抑制,而在經由單獨激素刺激後 pAKT 表達量也有顯著的上升,在有 20% conditioned medium 環境中加入激素刺激的 pAKT 表達量也有上升,帶與單獨激素刺激相比,pAKT 上升的幅度較小,另外 pmTOR 在加入瘦素刺激後含量有上升的趨勢但未達到顯著差異,相對於 AMPK 與 pAMPK 則是沒有明顯差異。

總而言之,實驗檢測了在下視丘發炎的環境下,長時間會抑制 *pomc* RNA 的表達,而細胞因子與趨化因子介導會削弱瘦素與胰島素對 POMC 神經元激活的 AKT-mTOR 路徑(圖五),由此推論條件培養液中的細胞因子與趨化因子會干擾 POMC 神經元的激素(瘦素與胰島素)傳遞訊號,並產生相互且複雜的作用。

3.4 發炎物質干擾 POMC 神經元之粒線體功能

粒線體功能和型態對於細胞的生理調節機制相當重要,在 POMC 神經元中粒線體的狀態直接影響在其代謝調節的功能。而環境中發炎細胞因子的增加會使對線粒體產生改變,例如 ROS 的上升,OXPHOS 或粒線體動態的變化等等,導致線粒體機能失調或細胞功能障礙(Dela Cruz and Kang, 2018)。由於在圖一至圖五實驗中得知,細胞生長在發炎的環

境中,會干擾瘦素或胰島素的傳遞路徑導致訊號傳遞減弱,所以我們認為在發炎的情況下可能影響 POMC 神經元中粒線體的型態導致代謝調控改變,因此本實驗將探討 POMC 神經元在發炎環境下的粒線體變化。

首先實驗檢測粒線體中的 ROS 含量,由於巨噬細胞在 LPS 刺激下除產生細胞因子或趨化因子外,也會產生如一氧化氮(NO)等具高氧化電位的分子。因此 conditioned media 中的分子使細胞內因生化特性改變或氧化導致 ROS 釋放量上升,結果顯示 DCF 上升,代表在發炎環境中 POMC 神經細胞中的 ROS/RNS 含量上升。接下來測試細胞中呼吸作用或氧化磷酸化作用是否上升,我們以檢測 ND1 與 COX1 的基因表現量觀察粒線體電子傳遞鏈的運作(圖七),在條件培養液刺激下並沒有發現兩個基因特別的改變。除此之外實驗利用 Seahorse XFe 24 儀器與 Mito Stress Test 試劑盒來進行更完整的粒線體功能評估,實驗將每格以 6×10^3 個 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞種入海馬儀器檢測專用細胞盤中,在細胞因子刺激 24 小時後,我們發現長期在發炎環境下粒線體運作效能相對控制組減弱(圖 8G、圖 8H),長期發炎的環境下粒線體基礎耗氧效率(圖 8B)、最大呼吸率(圖 8C)、粒線體質子滲漏(proton leak)(圖 8D)、粒線體產生 ATP 參與的氧氣(圖 8E)都有下降的趨勢,而粒線體可調整的彈性也會下降(圖 8F)。由電子傳遞鏈基因表現及質子滲漏的結果顯示粒線體結構並未破壞,但粒線體整體功能下降。

從粒線體壓力測試得知在發炎環境下粒線體的質子滲漏下降,粒線體的質子滲漏上升可由兩個主要的原因造成,一個是雙膜結構完整性受到破壞,質子會不受內外膜限制直接進出,也可能受線粒體解偶聯(uncoupling)而改變(Demine et al., 2019)。質子滲漏下降表示雙膜結構完整性未受破壞,且可能代表解偶聯下降。因此我們進一步檢測了在發炎的環境下,粒線體解偶聯蛋白 UCP1 及 UCP2 的 RNA 表達(圖九)。根據實驗結果顯示,在下視丘發炎的環境下,短期與長期刺激使 UCP1 被抑制使降低表達率,而 UCP2 長期與短期也都有下降的趨勢,因此我們得知,在發炎的環境下細胞因子或趨化因子會造成 POMC 神經元粒線體中的解偶聯下降。

粒線體的動力學也是影響粒線體功能之一,實驗利用 OPA1、MFN2 來觀察粒線體融合,DRP1、FIS1 為粒線體裂變的蛋白,以及利用 NRF1 及 NRF2 檢測粒線體生成(biosynthesis)。從實驗數據(圖十)顯示,在短期刺激時 NRF1 及 NRF2 會有下降趨勢,而處於長期發炎環境下時,發現控制核中線粒體生成的主要推力 NRF2 在會提高 NRF2 的 RNA 含量來保護粒線體的結構和功能完整性,NRF2 影響線粒體膜電位和 ATP 合成,也會影響線粒體脂肪酸氧化,當線粒體功能受損時,NRF2 會激活產生保護的作用,另外,實驗也檢測線粒體動力學,在經由細胞因子刺激 3 小時後,參與粒線體裂變相關蛋白 Drp1、Fis1 與粒線體融合相關蛋白 Mfn2 都有顯著的下降,而刺激 24 小時後 Drp1、Mfn2 及 Opa1 都有稍微回升,但還是比控制組低。這些結果表示,整個粒線體動力學都有

下降的現象,但融合的下降低於裂解的下降低,兩者的平衡偏向融合。另外實驗利用 MitoTracker 染 POMC 神經元內的粒線體,並使用 DeltaVision Personal DV microscope system 觀察細胞粒線體狀態,長期處於發炎的環境下,細胞的粒線體總量(mitochondria mass)並未產生顯著的改變,且粒線體動能下降,總體傾向融合而體積較大。

綜合上述實驗結果,在長期發炎的環境下,因細胞因子與趨化因子會使 POMC 神經元細胞中 ROS 上升,粒線體功能或呼吸速率下降,但解偶聯下降,導致粒線體的動力學變慢,裂變與融合下降,最後不利於自噬作用。根據前人研究,這些粒線體變化會使 POMC 神經元的代謝調控能力受破壞。

3.5 在 DIO 老鼠中神經元與細胞粒線體變化

我們進一步希望在下視丘發炎的動物模式中檢驗在前述細胞實驗中看到發炎環境對神經細胞的影響,在體內更複雜的環境下是否有類似的改變?下視丘急性的發炎會激活 POMC 神經元使身體產生厭食反應,而在長期的慢性發炎中,則會使 POMC 神經元的調控代謝系統失去平衡(Burfeind et al., 2016),目前越來越多文獻指出肥胖引起慢性發炎使全身代謝功能產生障礙(Ouchi et al., 2011)。我們前人研究報導以高脂飲食餵食小鼠會產生慢性下視丘發炎,我們以此模式來進行檢驗。餵食兩個月大的公鼠(B57CL/6)高脂肪飲食持續一個月,實驗選用的高脂肪啮齒動物飼料中含有 60% 脂肪、20% 的蛋白以及 20% 的醣類,實驗期間每週測量體重一次,第四週進行每 24 小時小鼠進食量測試,一個月後將小鼠眼窩採血及犧牲取腦。根據實驗結果,餵食高脂肪飲食的小鼠與對照組相比,增加的體重大幅高於對照組老鼠(圖十二),而在第四個禮拜的進食量測試中,可發現餵食高脂肪飲食的小鼠進食量低於對照組,實驗利用 ELISA 檢測血清中 TNF α 濃度發現餵食高脂肪飲食的小鼠血液中的 TNF α 明顯高於對照組,因此可知餵食高脂肪飲食的小鼠體內產生發炎因子導致全身性發炎,實驗使用自動生化分儀器檢測血清中的三酸甘油酯濃度,對照組與餵食高脂肪飲食實驗組相比沒有明顯差異,為了要確定肥胖是否會引起下視丘發炎,實驗抽取小鼠大腦中下視丘核區內的 RNA,使用 qPCR 檢測發炎因子 *nos2* 及 *tnfa*(圖十三),在 DIO 老鼠中我們發現下視丘中的 *tnfa* RNA 表達量都有明顯高於對照組,而 *nos2* 則無明顯差異,由此可知,在持續一個月的高脂肪飲食,會使小鼠體重增加、血液中發炎因子上升,下視丘發炎。

從圖五結果得知,下視丘發炎會對 ARC 中的 POMC 產生干擾並削弱激素(瘦素與胰島素)的代謝傳遞訊號。我們接著檢視 DIO 老鼠 ARC 中的 POMC 疾 AGRP 神經元的功能產生影響,實驗檢測了 POMC 及 NPY RNA 表達量,根據數據(圖十四)發現實驗組 DIO 老

鼠的下視丘中 POMC 神經元表現量高於對照組老鼠,而 NPY 神經元則無明顯差異,而實驗也檢測了瘦素與胰島素傳遞訊號下游因子,實驗組 DIO 老鼠的下視丘中的 *atg7*、*socs3* RNA 表達量都有明顯高於對照組(圖十五),由此可知,餵食高脂肪飲食一個月的小鼠,下視丘中的 *pomc* RNA 表達上升,而瘦素與胰島素調控的下游因子 *socs3* 上升增加抑制作用,並提高了 *atg7* 表達使細胞產生自噬作用。

實驗已知在下視丘發炎的環境下,POMC 細胞中的粒線體會降低運作,為了確認在飲食引起肥胖導致下視丘發炎而干擾 POMC 細胞中粒線體作用,實驗將檢測老鼠下視丘核區中與粒線體相關的 RNA 表達,實驗結果發現,實驗組老鼠的下視丘中 *NRF2* 比對照組高,而解偶聯蛋白 *UCP1* 及 *UCP2* 也明顯高於對照老鼠(圖十六),除此之外,實驗也利用 *DRP1*、*FIS1*、*OPA1* 及 *MFN2* 來檢測粒線體動力,從結果圖發現實驗組中的 *DRP1* 明顯比對照組老鼠高,而 *FIS1*、*OPA1* 及 *MFN2* 在實驗組中的老鼠都有高於對照組老鼠趨勢(圖十七),由此可知,飲食引起肥胖的老鼠下視丘中 *NRF2* 上升使細胞氧化機應提高,而 *UCP1* 及 *UCP2* 上升控制能量和葡萄糖穩態,除此之外 *DRP1* 表達增加提高粒線體裂變。由於在 DIO 老鼠的下視丘中 *POMC* 表達仍然上升,而粒線體也提高效能。

總而言之,在我們的實驗中證明當 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞處於發炎的環境下(含有細胞因子及趨化因子),瘦素與胰島素路徑將受到干擾降低傳遞訊號,也會使 POMC 細胞中的粒線體功能下降、裂變與融合變慢、解偶聯蛋白下降、氧化氧及過氧化氫上升,導致 POMC 細胞調控代謝受干擾;而在高脂肪持續餵養一個月的老鼠中,老鼠產生肥胖及全發炎,但血脂的恆定並未受影響,這種體內環境會刺激 POMC 神經元的作用,並促進粒線體動力,包括生成、分裂與融合,是突為遲代謝的調控與平衡。

第四章 討論

大部分研究已經證實老鼠下視丘中的 POMC 會受激素所調節,瘦素和胰島素信號傳導是中樞神經系統控制體重和葡萄糖穩態中的關鍵作用,瘦素主要作用在下視丘 ARC 中的一級神經元,例如 POMC 和 AgRP 神經元調節食物攝入和能量消耗,在我們實驗中也觀察到瘦素與胰島素會激活 PI3K-AKT 途徑,mTOR 的提高使 *pomc* 基因表達,另外在大多文獻在小鼠實驗中發現瘦素會激活 POMC 神經元中的 STAT3,STAT3 也會參與 POMC 的表達(Xu et al., 2007),因此可知 FoxO1 和 STAT3 兩個信號通路之間可能存在相互作用,有趣的是本實驗在 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株下觀察,實驗發現瘦素與胰島素在短時間會抑制 pSTAT3,與大多文獻不符,因此需再進一步探討。

而我們也發現在瘦素或胰島素短時間內 *pomc* RNA 表達量會顯著上升,POMC 基因轉錄與能量平衡控制之間的關係目前已被廣泛研究,能量平衡的變化會影響敏感的 POMC 變化,像是在禁食情況下會導致大鼠 *pomc* RNA 表達下調(Brady et al., 1990),而在能量平衡中 *pomc* 基因表達的變化是不清楚的,因為有許多因素可以操縱參與誘導能量平衡,該 mRNA 形成單個蛋白質傳遞至高基氏體,信號肽將蛋白質引導到分泌顆粒中轉譯後連續加工修飾產生許多肽,其中衍生肽 α MSH 通過的黑皮質素受體(MC-Rs)抑制食慾來影響 POMC 和 AgRP 下游表達 MC3R / MC4R 的目標神經元;在長期瘦素刺激後 *socs3*、*atg7* RNA 表達上升,*socs3* 在 POMC 神經元中也參與調節體重(Wang et al., 2019),因此我們的數據與其他文獻表明瘦素通過 POMC 神經元來調節體重一致相同(Kievit et al., 2006),*atg7* RNA 的表達則會提高細胞自噬作用,POMC 神經元中的自噬可以調節周圍的交感神經輸出,並通過產生 α MSH 來維持能量平衡、葡萄糖穩態及脂解作用(Kaushik et al., 2012),另外我們也發現胰島素和瘦素信號傳導會影響 AMPK 路徑,AMPK 除了會受 PI3K-AKT 路徑的下游 mTOR 影響之外,AMPK 也會受細胞內能量調節及瘦素與胰島素直接的抑制作用(Minokoshi et al., 2004),總之,瘦素和胰島素是 POMC 的神經元中調節能量穩態的重要因素之一,在瘦素與胰島素短時間的刺激下,細胞表達 *pomc* RNA 能響應能量狀態的信號並在整個 CNS 中轉調製信號以維持能量平衡;而瘦素長時間的刺激則會使細胞內提高 *socs3*、*atg7* RNA,若小鼠細胞中缺乏 *socs3* 會導致瘦素敏感性增強,使體重減輕(Kievit et al., 2006),而 POMC 神經元中缺乏 *atg7* 則會促進肥胖(Kaushik et al., 2012),所以在脂肪細胞分泌瘦素後提高 *socs3*、*atg7* 有利於維持整體葡萄糖穩態與能量平衡,以預防肥胖和代謝綜合症。

由於早期的肥胖症在攝入高脂肪、高熱量飲食的幾天內,周圍會大量增加飽和脂肪酸(FAs)並穿過 BBB 在下視丘神經元中引起發炎反應(Thaler et al., 2012),除了引起調控代

謝的神經元之外,也涉及下視丘中小膠質細胞的激活,本實驗使用 conditioned medium 模擬下視丘發炎的環境,由於實驗設計為限定的條件下探討下視丘中的 POMC 神經元,雖然與實際在肥胖患者中比較,缺少脂肪酸、小膠質細胞和星形膠質細胞的募集以及衍生物之影響等,但我們預期 conditioned medium 中的細胞因子與趨化因子會干擾下視丘 POMC 神經元調節作用,目前細胞因子和其它多肽激素已被證明可穿過血腦屏障,在食物攝入和能量平衡的調控中發揮顯著作用,像是在肥胖狀態下,局部和全身促炎細胞因子 IL-1 β , IL-6 和 TNF α 升高,使削弱全身胰島素敏感(Vozarova et al., 2001),並導致葡萄糖和脂質代謝異常產生肥胖,然而這些與我們實驗所看到的一樣,在細胞因子及趨化因子干擾下, POMC 神經元的傳遞路徑會受影響,其中我們發現瘦素調節 POMC 神經元的傳遞路徑比胰島素調節 POMC 神經元的傳遞路徑承受要嚴重的干擾,在低度發炎的環境下,瘦素調節 POMC 神經元的 PI3K-AKT 路徑明顯降低,而直接受瘦素干擾而抑制的 AMPK,也在低度發炎的情況下干擾瘦素對 AMPK 的作用,使降低抑制 AMPK 含量,近年來越來越多文獻表明 AMPK 在下視丘神經元中似乎具有重要作用,在 AgRP 神經元中 AMPK 的喪失導致體重減輕,而 POMC 神經元中的 AMPK 喪失導致食慾和體重增加(Claret et al., 2007; Huynh et al., 2016; Lopez, 2018),因此實驗與我們預期相同,在低度發炎的環境下會干擾瘦素與胰島素調節 POMC 神經元的傳遞訊號。

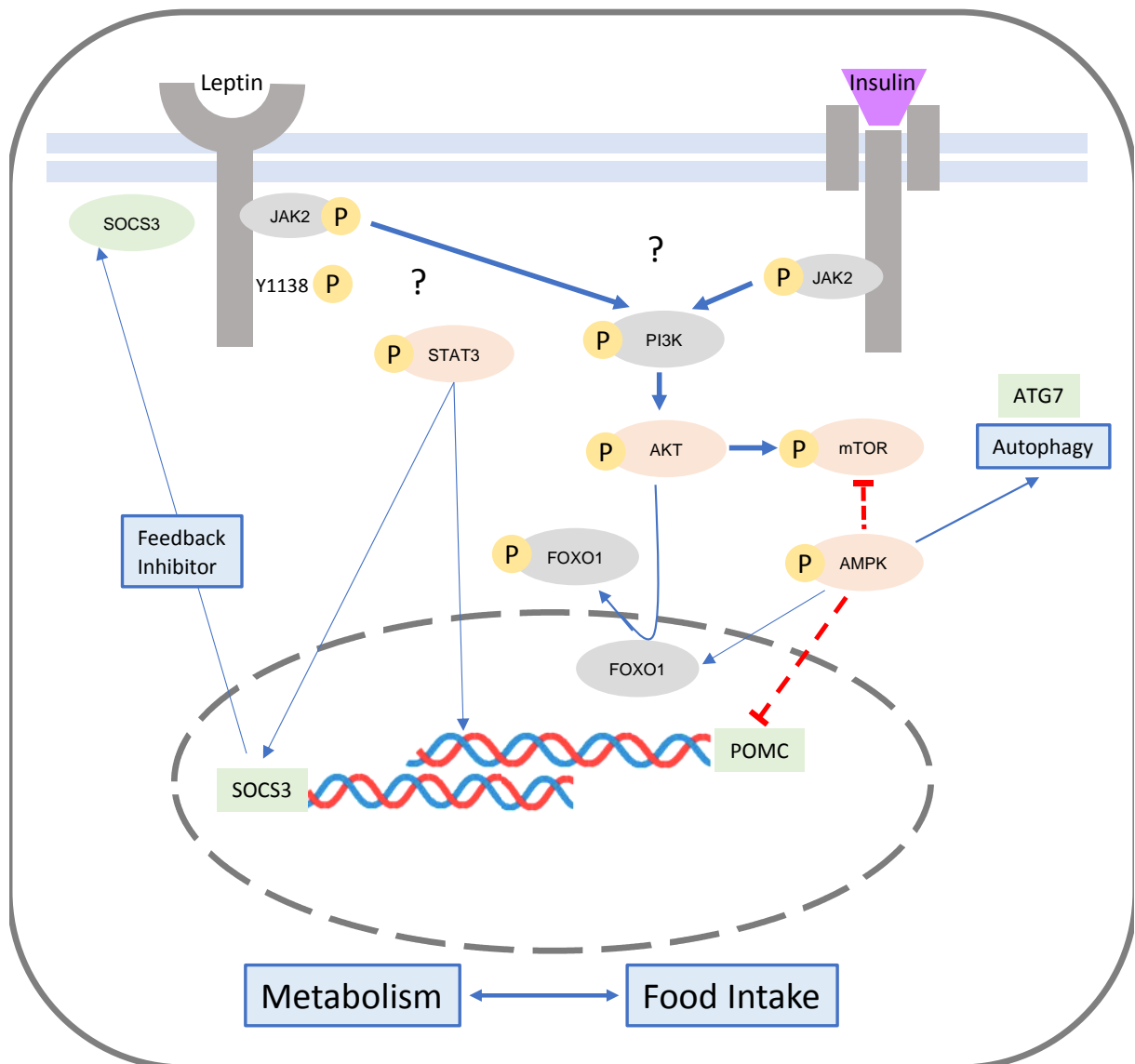
由於粒線體損傷與發炎是導致肥胖的原因,大部分文獻指出粒線體的功能障礙或損傷會產生大量 ROS,並使發炎因子上升導致下視丘慢性發炎,也會激活壞死或凋亡信號(Vaamonde-Garcia et al., 2012),而肥胖是由過多的脂肪所堆積而成,堆積的脂肪細胞會分泌脂肪酸、細胞因子與趨化因子引起下視丘發炎,導致神經元粒線體引起更多發炎反應,加劇粒線體損傷(Heo et al., 2017),粒線體與發炎兩者相互關聯並產生惡性循環。眾所皆知的線粒體是能量代謝最重要場所,調節細胞功能例如細胞呼吸,鈣穩態和 ROS 產生,我們在模擬低度發炎的環境下,短期刺激會使粒線體動力學裂變與融合的相關因子下降,均會使粒線體的體積變小並增加粒線體 ROS,ROS 的增加會減少了細胞的氧氣消耗,如同文獻結果相符,因此使 POMC 神經元活化(Schneeberger et al., 2013; Santoro et al., 2017),而在長期的刺激下發現粒線體呼吸作用降低、減少 ATP 產生,因此短期降低的生物效率可能是營養不足時所產生的保護機制(Liesa and Shirihai, 2013),除此之外也可能與粒線體雙層膜結構性有關,包含粒線体外膜與解聯偶蛋白都影響電子傳遞鍊(Stuart et al., 1999),而解聯偶蛋白 UCP1 的下降除了減少了大部分的電子傳遞之外,也會減少 POMC 的表達,使身體降低能量消耗,這些都會導致線粒體功能障礙,使身體產生輕度到重度疾病。

為了支持這一個觀點,我們參考一些相關文獻,研究顯示短期餵食 3 天 HFD 會使齧齒動物下視丘中的 POMC 神經元增加突觸及興奮性,短時間內有助於提升厭食症反應,以

恢復能量平衡(Benani et al., 2012),相反,長達 22 週餵養 HFD 的肥胖老鼠身上,發現 ARC POMC 表達降低(Huang et al., 2003),表明下視丘調節具有暫時的反應過程,在早期進行補償嘗試,在後期則因補償失敗導致肥胖。從我們實驗結果發現,長達四週高脂飲食誘導的肥胖的老鼠上,HFD 的老鼠下視丘中含有高濃度的發炎因子,且 POMC RNA 表達量相較於對照組高,相對受 POMC 控制的食慾也有所下降,有助於隨後的厭食症反應,因此我們可以知道實驗中的老鼠下視丘正進行代償反應(Bergen et al., 1999),另外實驗也發現餵食 HFD 老鼠的三酸甘油脂並沒有比照組高,我們猜測可能是與老鼠的年紀、餵食高脂肪飲食的時間等因素所影響(Ref?),使老鼠介於能量平衡遭受破壞與修補期間,利用升高 POMC 試圖恢復能量平衡,未來則需要再更進一步研究。

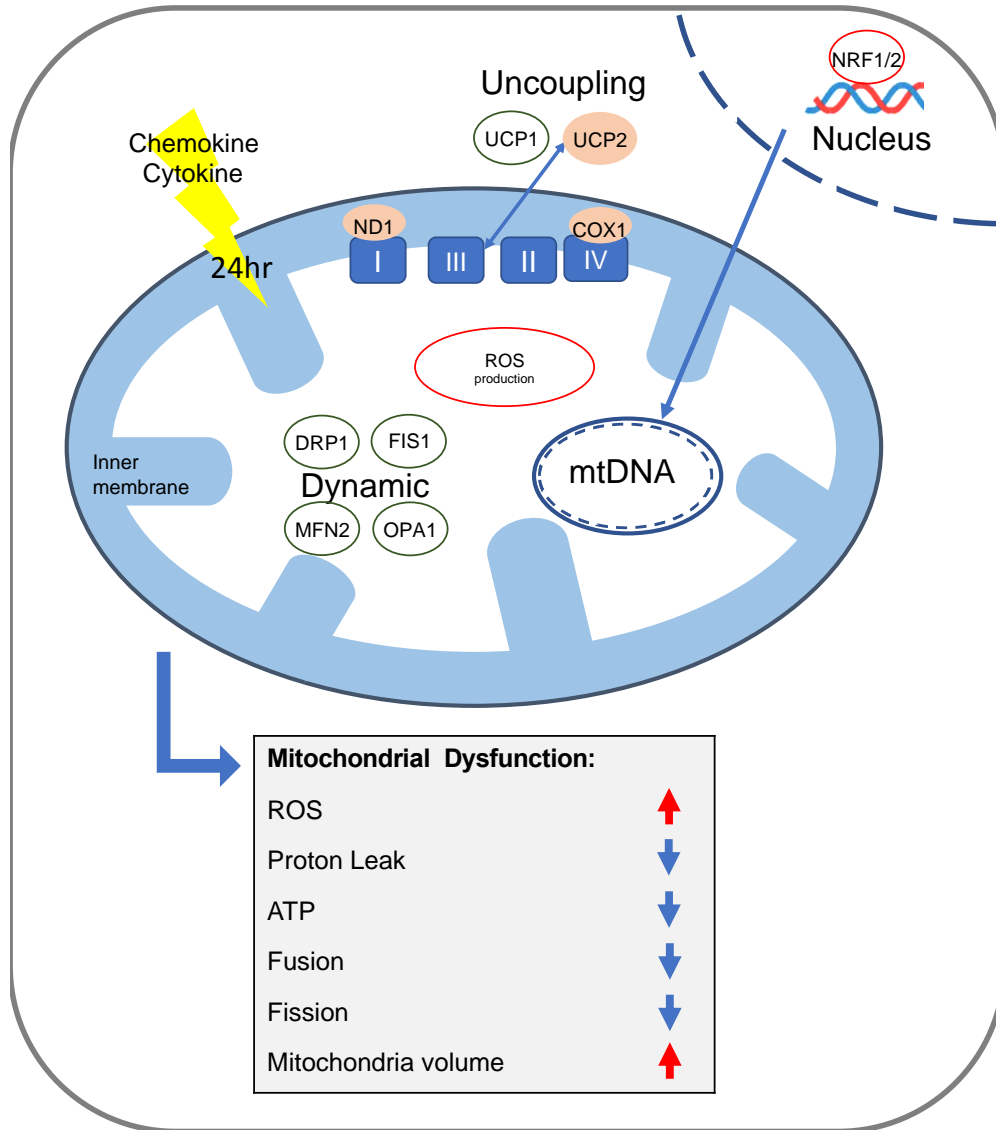
由於肥胖會損害粒線體,在我們的實驗中也觀察到粒線體的結構變動也有上升的趨勢,整體傾向於裂變,使細胞凋亡因子上升,導致粒線體失衡,如同文獻所說,肥胖使呼吸作用降低、線粒體 ROS 排放增加、線粒體融合和裂變的平衡發生了變化,使有利於裂變,最後誘導細胞凋亡(Bournat and Brown, 2010)。

總而言之,下視丘中的 POMC 神經元掌控了身體的能量消耗與食物攝取,能量消耗包含基本細胞和生理功能所需要的 ATP、飲食誘導的產熱及線粒體內膜的電化學梯度,線粒體是分解和合成代謝的信號中樞,整合了各種細胞信號來調節細胞的生長、分化、活力和死亡,無論是在急性還是慢性發炎損傷的情況下,會影響下視丘的 POMC 元粒線體協調生理和病理的代謝平衡,在我們的實驗中證明 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞處於低度發炎的環境下(含有細胞因子及趨化因子),短期瘦素與胰島素路徑將受到干擾降低傳遞訊號,長期會使細胞中粒線體運作效能減弱,使 POMC 神經元中的能量消耗降低、食物攝取不受抑制,因此在發炎環境下,下視丘 POMC 神經元的粒線體遭受到破壞,使 POMC 神經元削弱或喪失功能,最後導致身體的能量平衡與代謝系統失調。而實驗最後在高脂飲食誘導肥胖的老鼠上則觀察到 POMC 神經元表達上升、粒線體裂變及解聯偶的提高,這些動態提升了老鼠的能量消耗並減少食物攝取,使身體進入代償反應來修補身體平衡狀態。



結果圖一:瘦素與胰島素對 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株的分子傳遞路徑

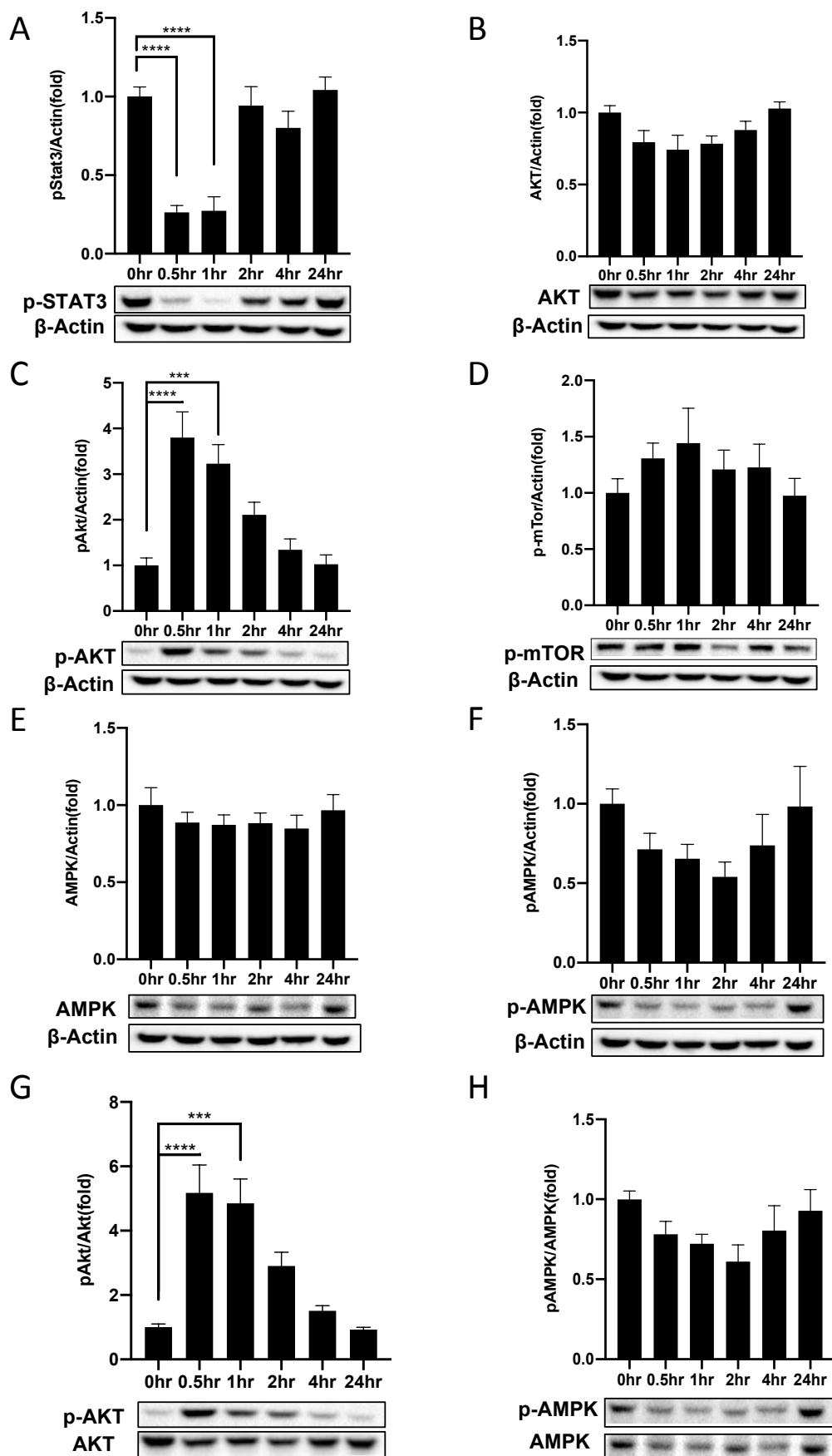
當 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞經由瘦素(200nM)刺激與胰島素(10nM)短時間(0.5-2 小時)刺激後,信號轉導和 AKT 與 mTOR 被激活並磷酸化,促進 *pomc* 表達影響身體代謝與食物攝取量,而 pmTOR 抑制 AMPK 磷酸化,並抑制 *atg7* 表達。瘦素與胰島素短時間刺激後會抑制 STAT3 激活與磷酸化,隨後恢復到原本濃度。

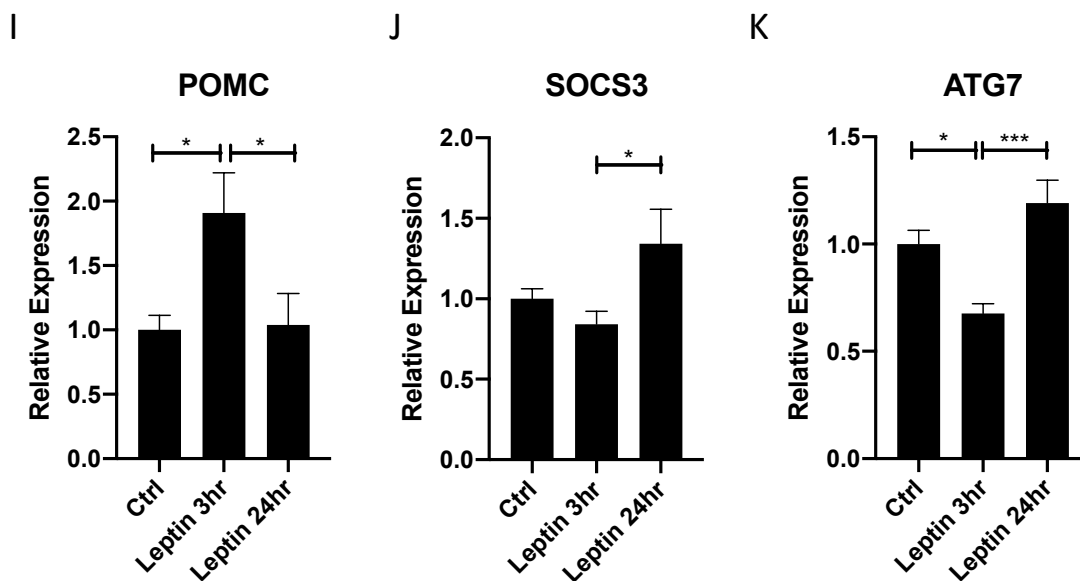


結果圖二:長期(24 小時)低度發炎環境下對 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞株的粒線體影響

當 mHypoA-POMC/GFP-1 細胞長期(24 小時)處於含有細胞因子及趨化因子的環境下,環境中的細胞因子及趨化因子會使 POMC 細胞中的氧化氧及過氧化氫上升、粒線體功能下降、裂變與融合變慢(*DRP1*、*FIS1*、*MFN2* 表達下降)、解偶聯蛋白下降(*UCP1* 表達下降),導致 POMC 細胞調控代謝受干擾。

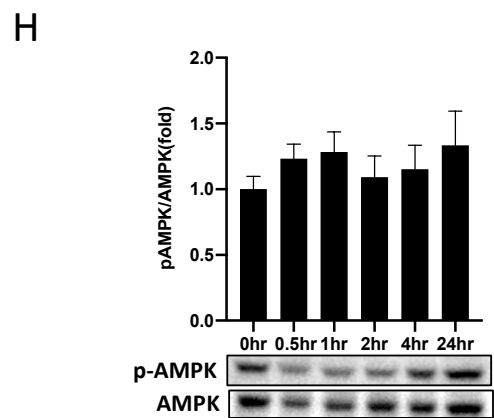
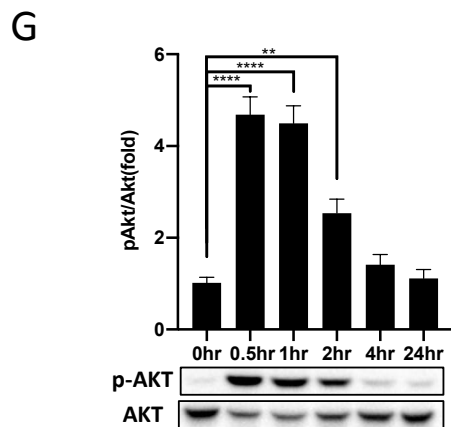
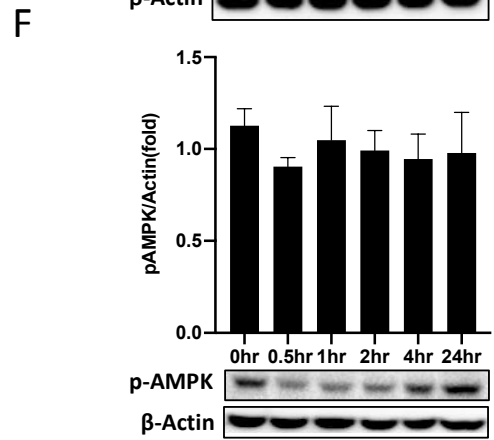
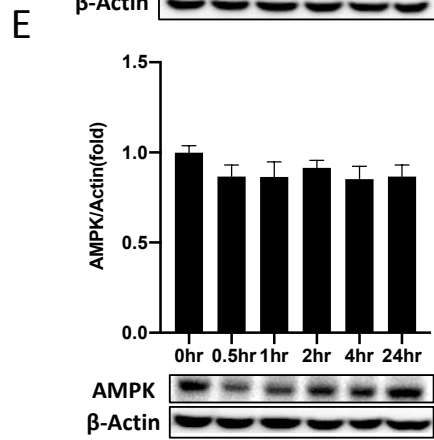
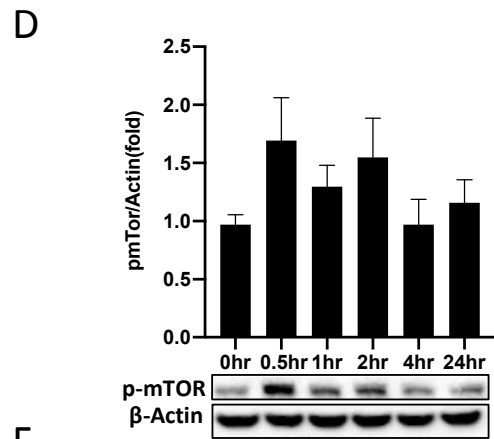
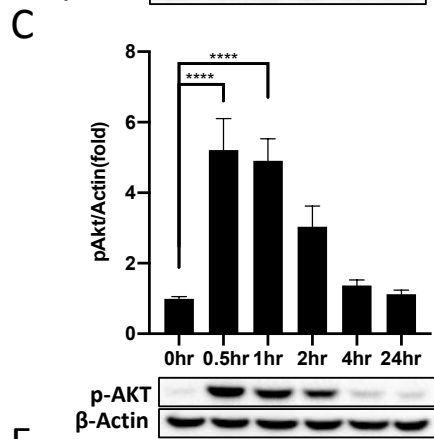
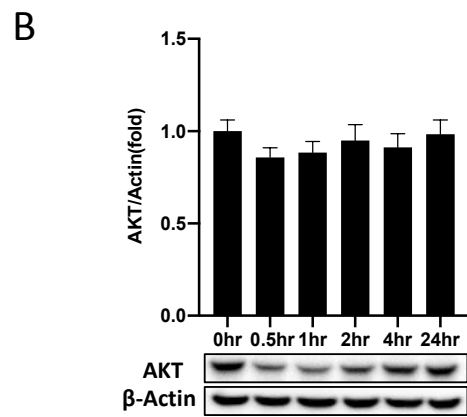
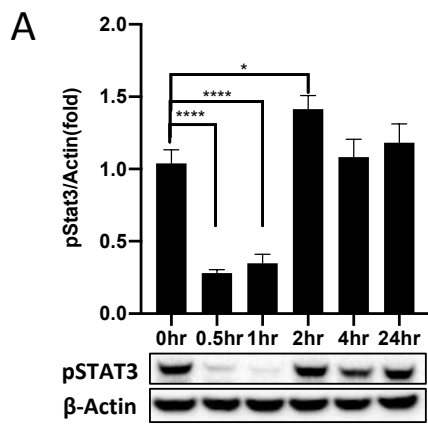
實驗圖表

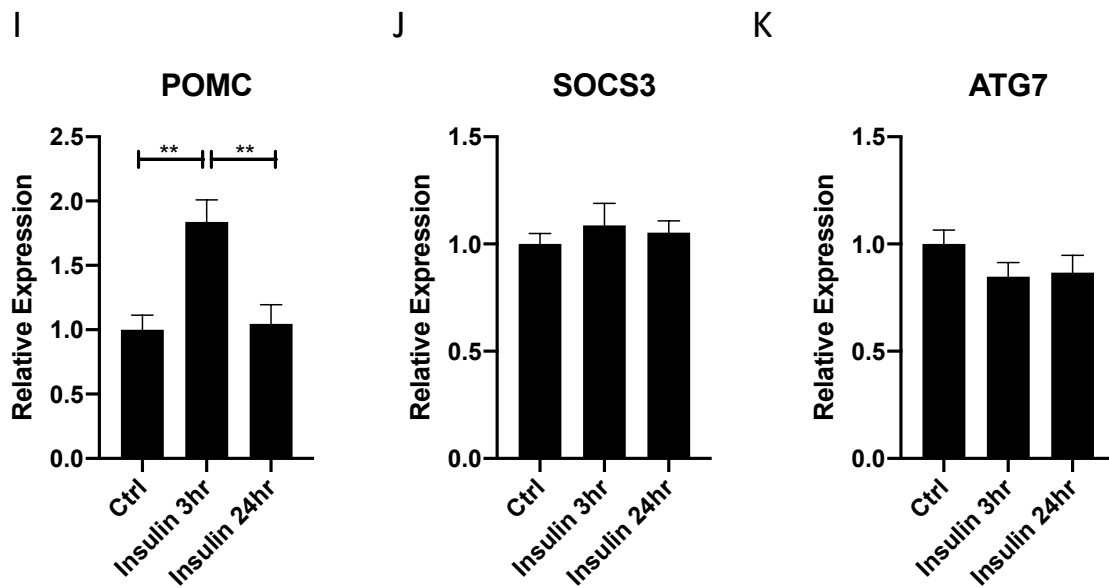




圖一:瘦素(200nM)刺激 mHypoA-POMC/GFP1 細胞株的信號反應

在六孔盤中每孔種入 1×10^5 個 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,分別加入瘦素(200nM)刺激短時間 0.5 小時、1 小時、2 小時、4 小時及長時間 24 小時後收取蛋白進行西方墨點法分析。(A)pSTAT3 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(B)AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(C)pAKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(D)pmTOR 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(E)AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(F)pAMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(G)pAKT/AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(H)pAMPK/AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6)。將十二孔盤種入 5×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,加入瘦素(200nM)刺激 3 小時及 24 小時後萃取 RNA,利用 RT-qPCR 進行 POMC mRNA 含量分析(N=8)(I) POMC mRNA 表現量,(J)Socs3 mRNA 表現量,(K)Atg7 mRNA 表現量。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 One way ANOVA 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析。*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$,****表示 $P < 0.0001$ 。

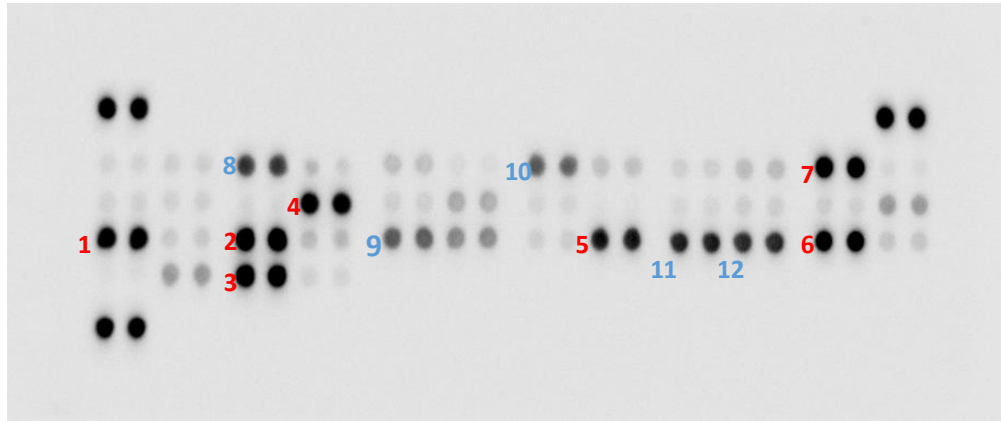




圖二:胰島素(10nM)刺激 mHypoA-POMC/GFP1 細胞株的信號反應

在六孔盤中每孔種入 1×10^5 個 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,分別加入胰島素(10nM)刺激短期 0.5 小時、1 小時、2 小時、4 小時及長期 24 小時後收取蛋白進行西方墨點法分析。(A)pSTAT3 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(B)AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(C)pAKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(D)pmTOR 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(E)AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(F)pAMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(G)pAKT/AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(H)pAMPK/AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6)。將十二孔盤種入 5×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,加入胰島素(10nM)刺激 3 小時及 24 小時後萃取 RNA,利用 RT-qPCR 進行 POMC mRNA 含量分析(N=8)(I) POMC mRNA 表現量,(J)Socs3 mRNA 表現量,(K)Atg7 mRNA 表現量。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 One way ANOVA 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析。*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$,****表示 $P < 0.0001$ 。

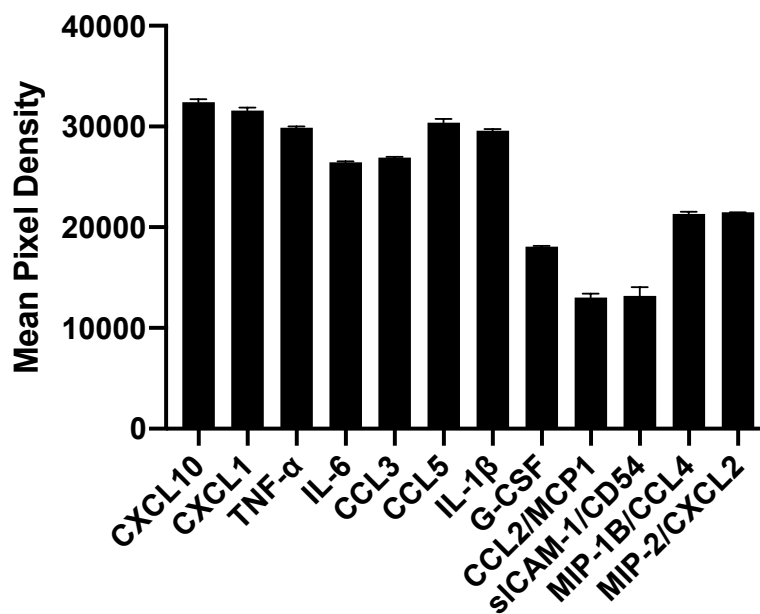
A



1	CXCL10	7	IL1 β
2	CXCL1	8	G-CSF
3	TNF α	9	CCL2/MCP1
4	IL6	10	sICAM-1/CD54
5	CCL3	11	MIP-1B/CCL4
6	CCL5	12	MIP-2/CXCL2

B

**Cytokine Compositions in the Conditioned Medium
(LPS)**

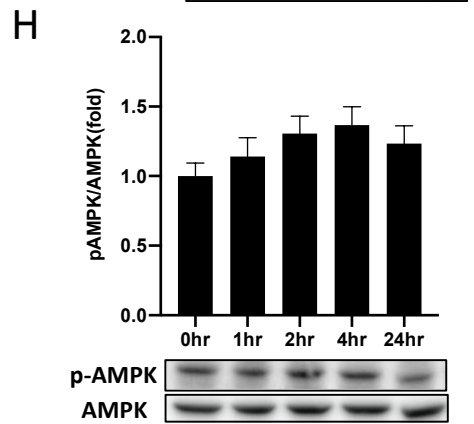
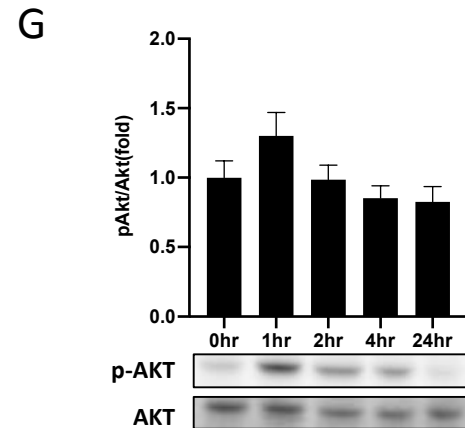
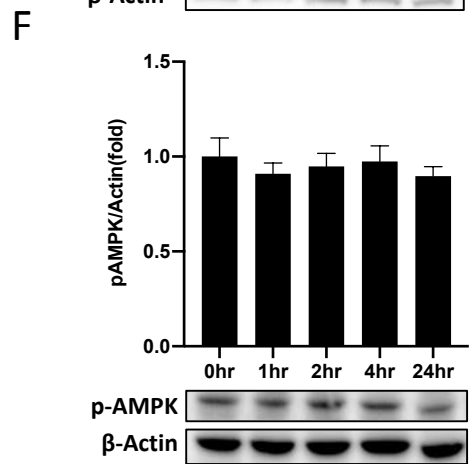
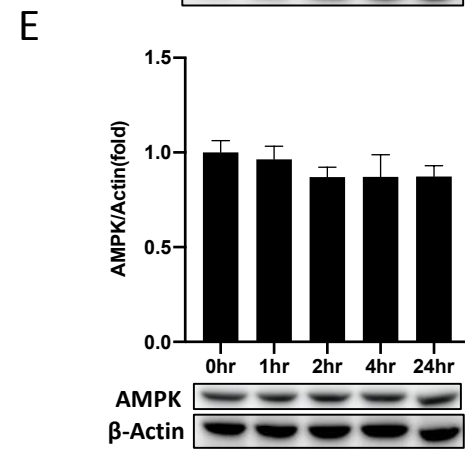
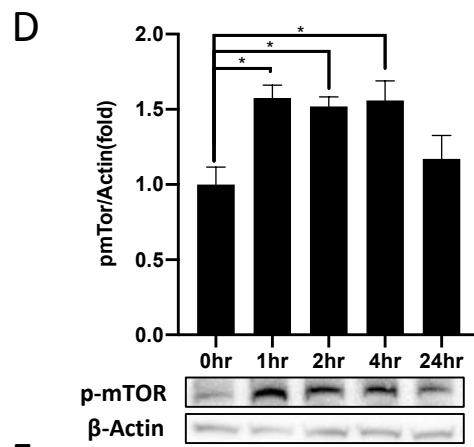
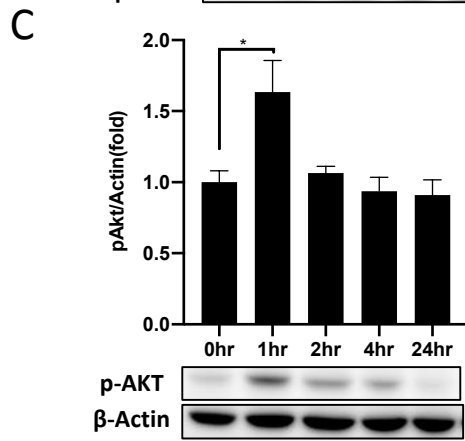
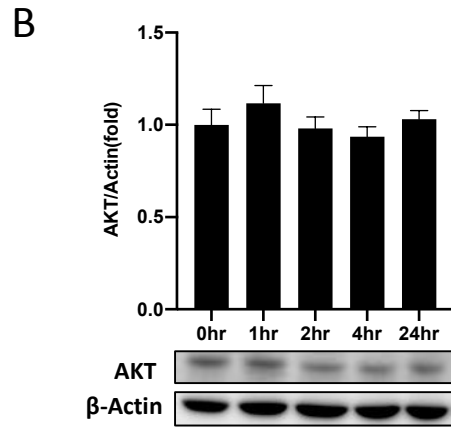
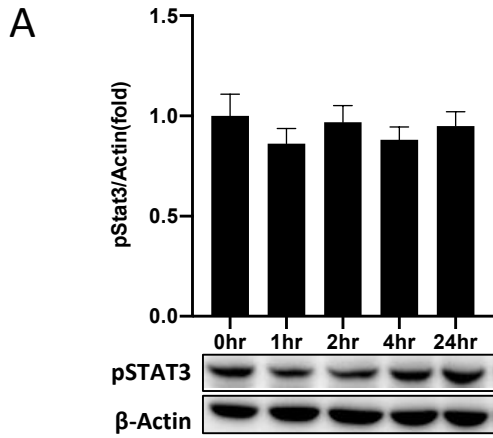


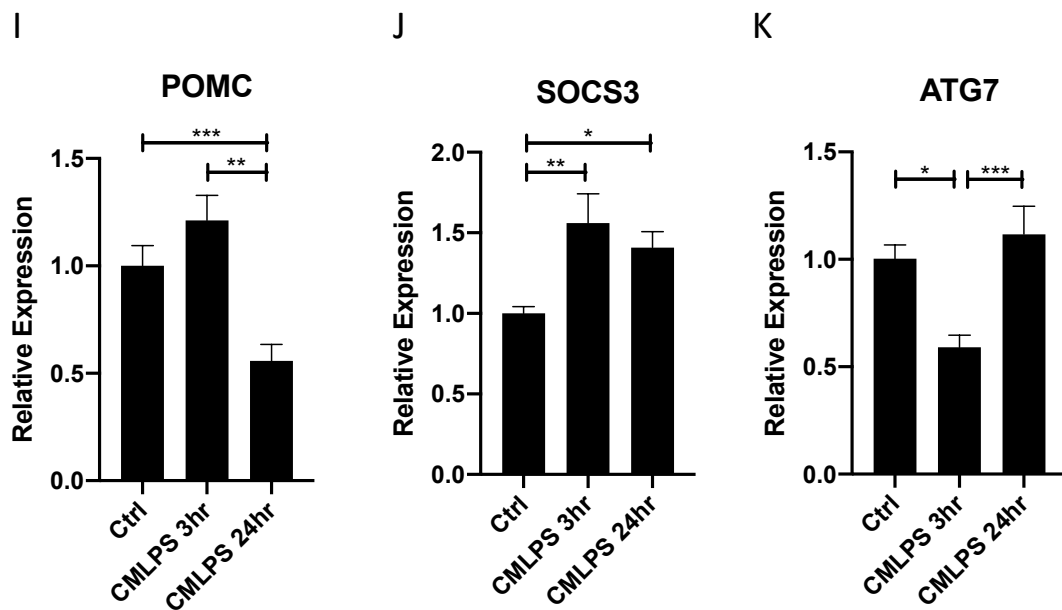
C

ELISA	IL1 β	TNF- α
DMEM	39.68 pg/ml	1.16 pg/ml
Conditioned Medium	125.48 pg/ml	77.49 pg/ml

圖三:LPS 誘導巨噬細胞條件培養液(Conditioned Medium)內的細胞因子及趨化因子

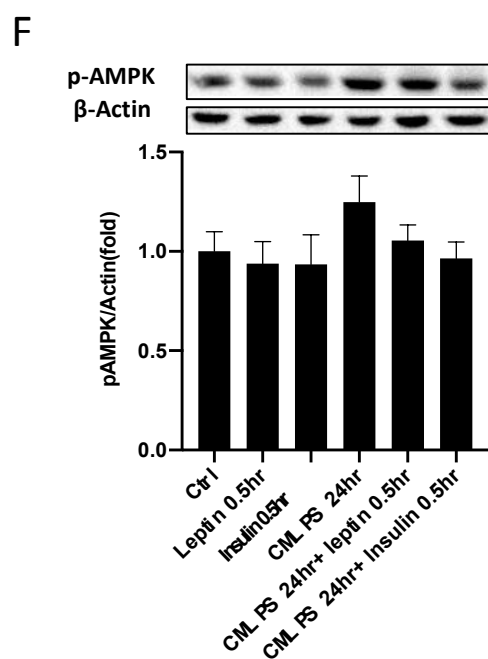
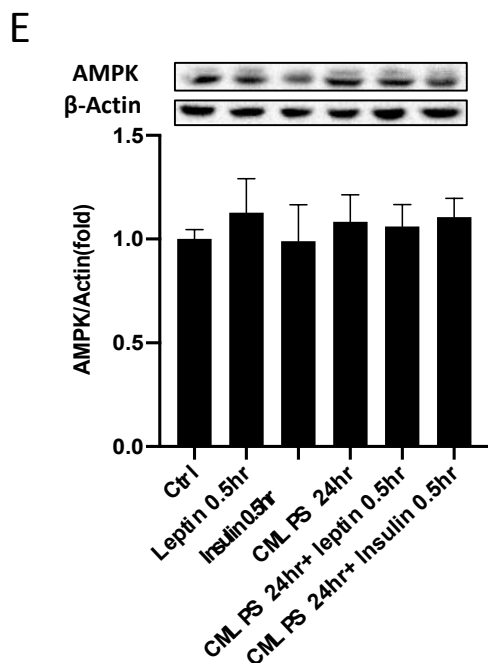
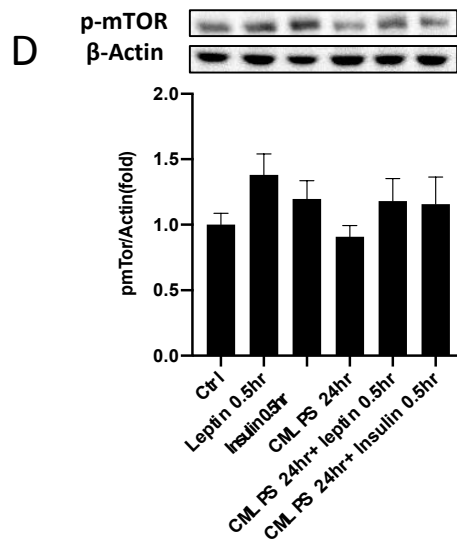
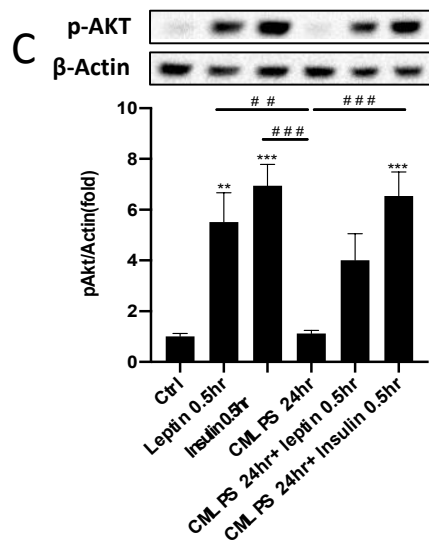
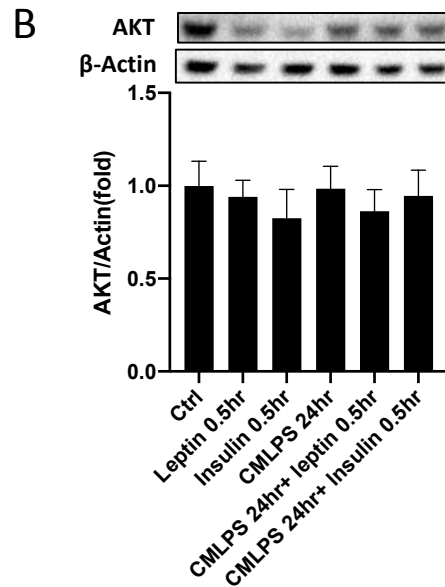
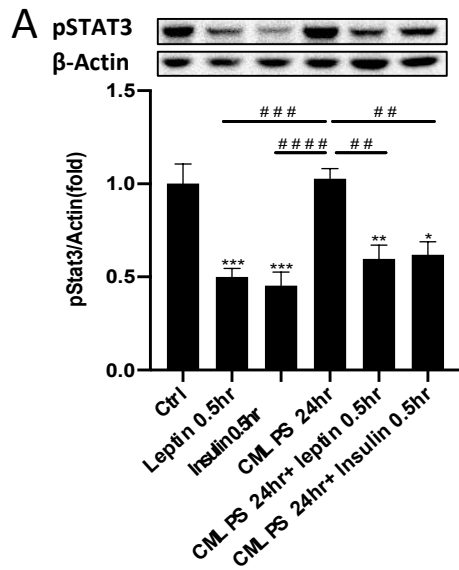
收取 LPS 誘導巨噬細胞的條件培養液,使用 Mouse Cytokine Array(Proteome Profiler)與 IL-1b、TNF α 的 ELISA 試劑盒,並與試劑盒內的檢測抗體混合物混合後,進行化學發光檢測。(A)該表顯示檢測到的分析物(細胞因子及趨化因子)及其在膜上的位置, Error bar 為 N=2 所統計出來。(B) 依據圖 A 並利用 Image J 蛋白質譜定量(直方圖),(C) DMEM(未加入細胞培養之乾淨培養液)與 Conditioned Medium(經由 LPS 刺激收取)的 IL-1b、TNF α 細胞因子酶聯免疫吸附測定圖。

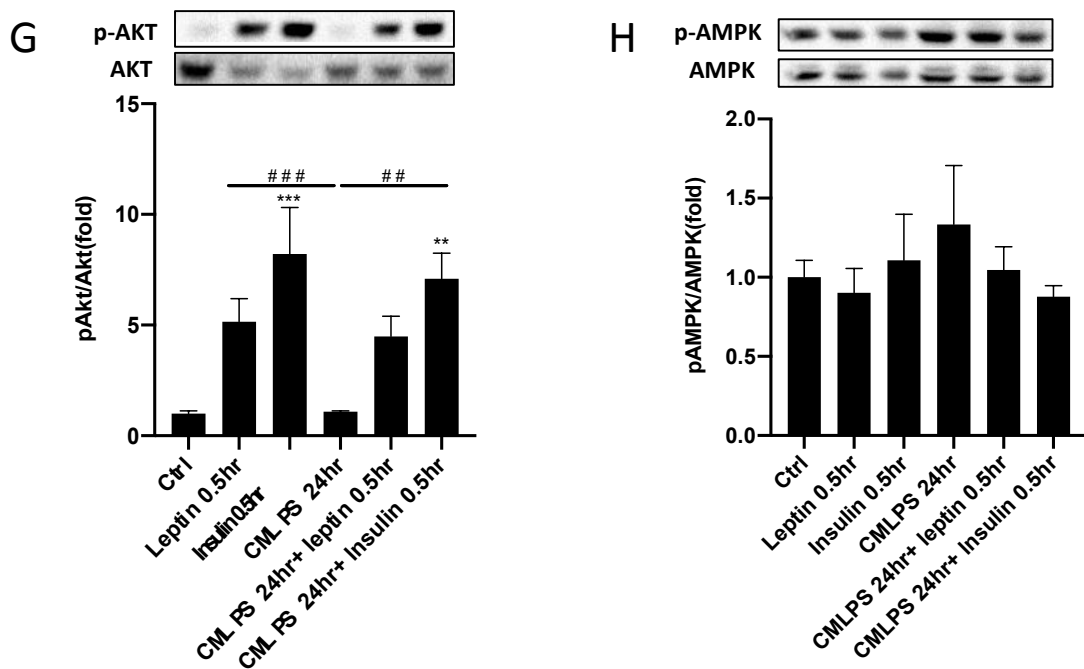




圖四:細胞培養液中含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)刺激 mHypoA-POMC/GFP1 細胞株的信號反應

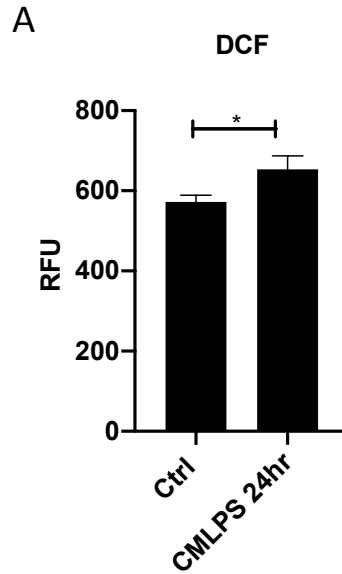
在六孔盤中每孔種入 1×10^5 個 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,培養液中分別加入含 20%LPS 誘導巨噬細胞條件培養液刺激 0.5 小時、1 小時、2 小時、4 小時及 24 小時後收取蛋白進行西方墨點法分析。(A)pSTAT3 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(B)AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(C)pAKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(D)pmTOR 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(E)AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(F)pAMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(G)pAKT/AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(H)pAMPK/AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6)。將十二孔盤種入 5×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,加入 20% 條件培養液(20% Conditioned Medium)刺激 3 小時及 24 小時後萃取 RNA,利用 RT-qPCR 進行 POMC mRNA 含量分析(N=8), 圖表中 CMLPS 為使用培養液中含有 20% 的 LPS 刺激巨噬細胞收集的條件培養液(I) POMC mRNA 表現量,(J)Socs3 mRNA 表現量,(K)Atg7 mRNA 表現量。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 One way ANOVA 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析。*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$,****表示 $P < 0.0001$ 。





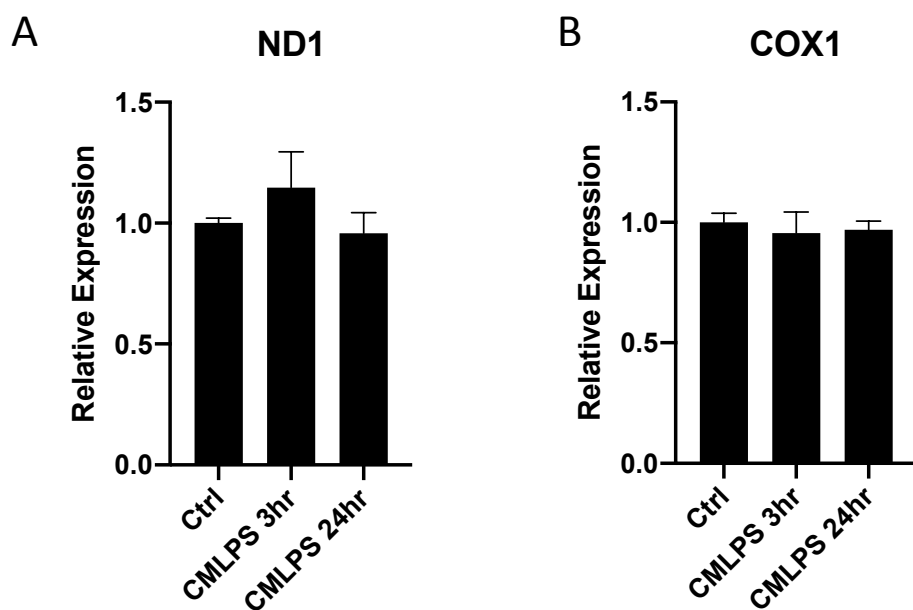
圖五：細胞培養液中含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)刺激 mHypoA-POMC/GFP1 細胞株中瘦素、胰島素信號變化

在六孔盤中每孔種入 1×10^5 個 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,分別加入瘦素(200nM)、胰島素(10nM)刺激 0.5 小時、細胞培養液中加入含 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)24 小時、細胞培養液中加入含 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)24 小時後加入後瘦素(200nM),圖表顯示 CMLPS 24hr+Leptin 0.5hr、細胞培養液中加入含 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)24 小時後加入胰島素(10nM)刺激 0.5 小時,圖表顯示 CMLPS 24hr+Insulin 0.5hr 收取蛋白進行西方墨點法分析。(A)pSTAT3 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(B)pAKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(C)AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(D)pmTOR 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(E)pAMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(F)AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(G)pAKT/AKT 蛋白質含量與電泳圖(N=6),(H)pAMPK/AMPK 蛋白質含量與電泳圖(N=6)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 One way ANOVA 進行統計分析,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$,****表示 $P < 0.0001$,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$,###表示 $P < 0.001$,####表示 $P < 0.0001$ 。



圖六：細胞培養液中含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)刺激下使細胞內 DCF 上升

將細胞用 PBS 稀釋成 1×10^7 /ml 濃度,並使用超音波震盪器將細胞震碎,使用 10000g 離心五分鐘後收取細胞上清並用 ROS/RNS 試劑檢測 (N=3),DCF(dichlorodihydrofluorescein)為 ROS 和 RNS 物質與 DCFH-DiOxyQ (dichlorodihydrofluorescein DiOxyQ)反應的產物,RFU 為 Relative fluorescence。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 Student's Test 進行統計分析,*表示 $P < 0.05$ 。

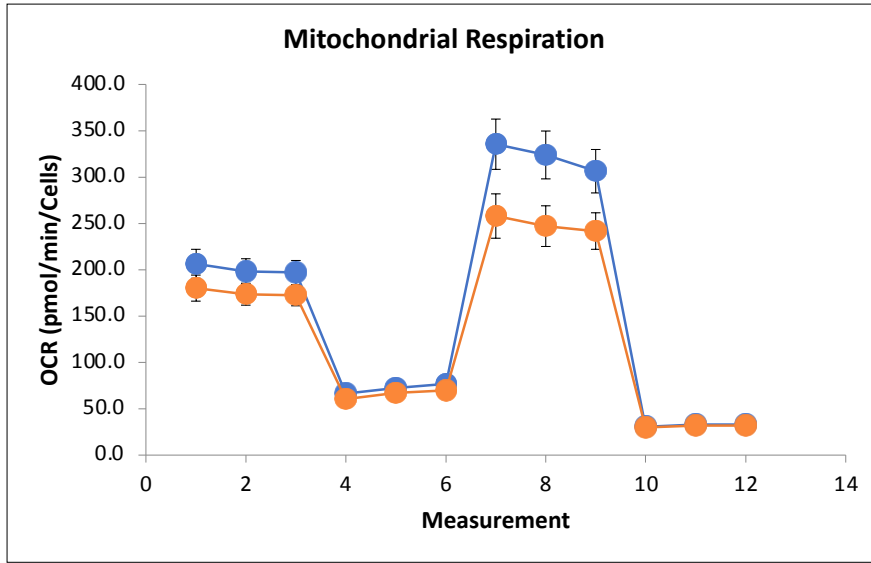


圖七：細胞培養液中含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)對

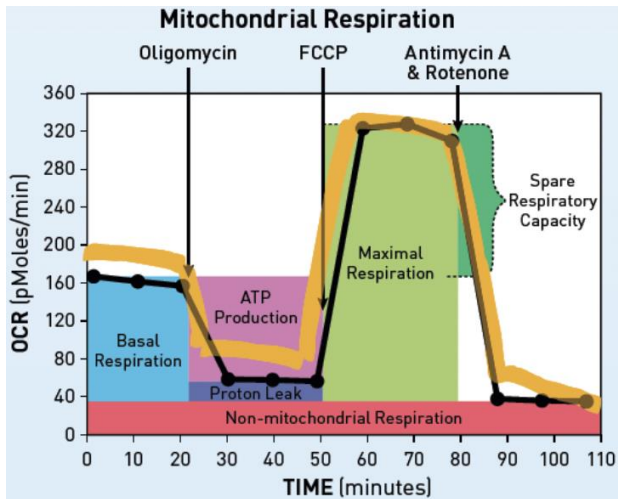
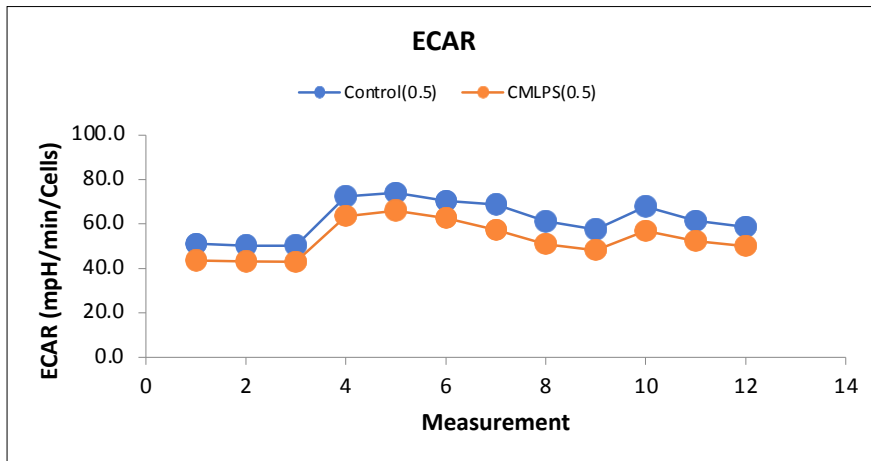
mHypoA-POMC/GFP1 細胞中粒線體功能 RNA 表達量

將十二孔盤種入 5×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,加入 LPS 刺激巨噬細胞條件培養液 3 小時及 24 小時後萃取 RNA,利用 RT-qPCR 進行粒線體功能引子含量分析 (N=8)。實驗數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示,以 One way ANOVA 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 $P < 0.05$ 。

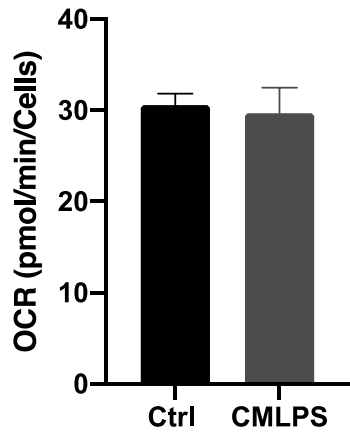
A



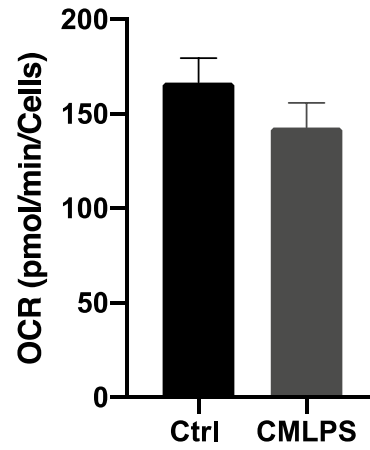
B



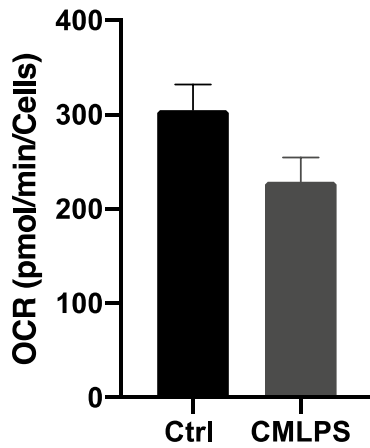
C Non-Mitochondrial Oxygen Consumption



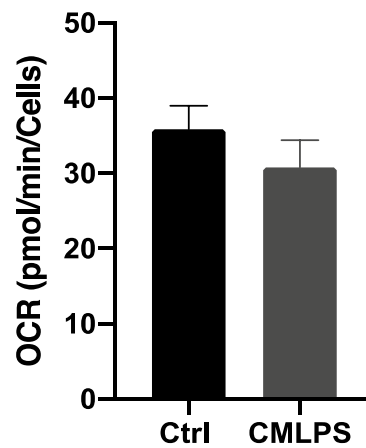
D Basal Respiration



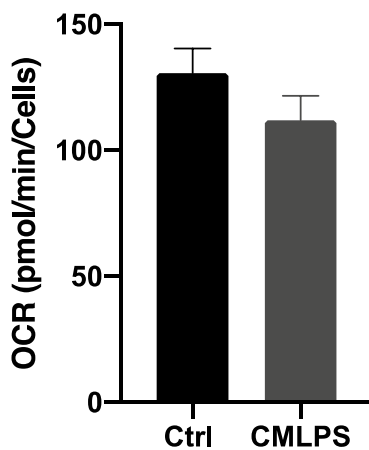
E Maximal Respiration



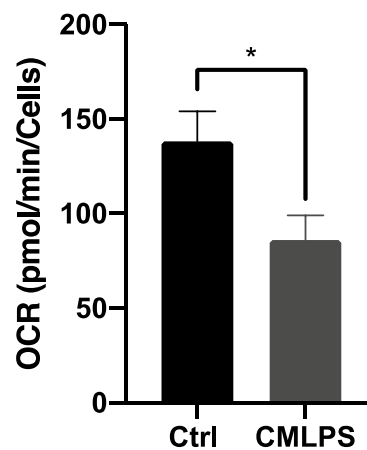
F Proton Leak



G ATP Production



H Spare Respiratory Capacity

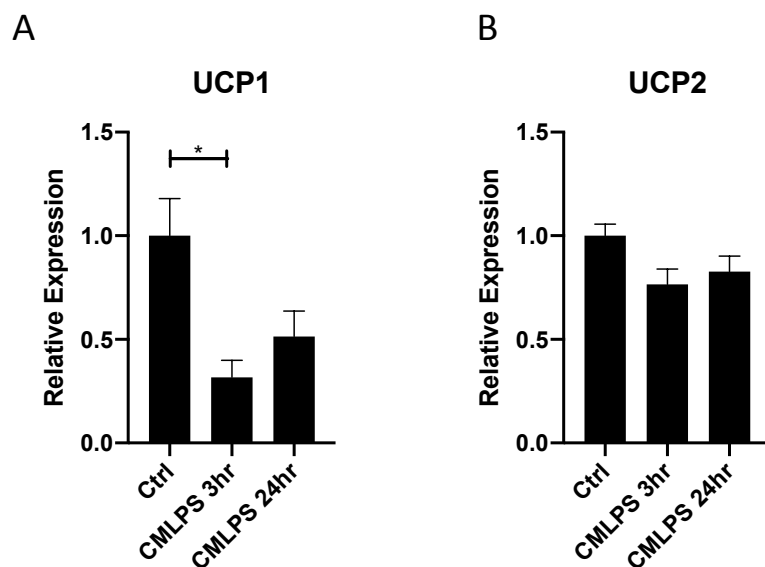


圖八：細胞培養液中含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)干擾

mHypoA-POMC/GFP1 細胞粒線體功能

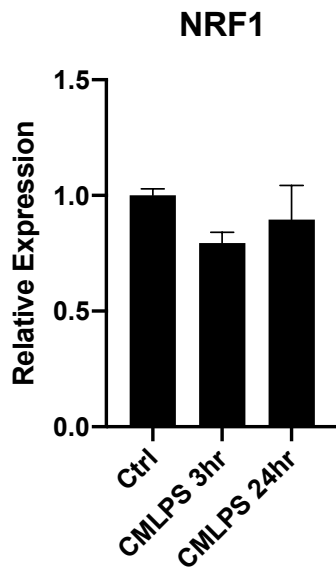
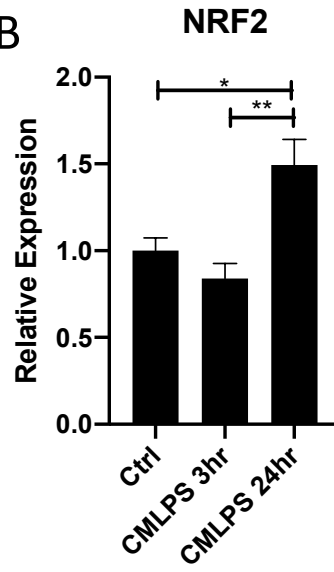
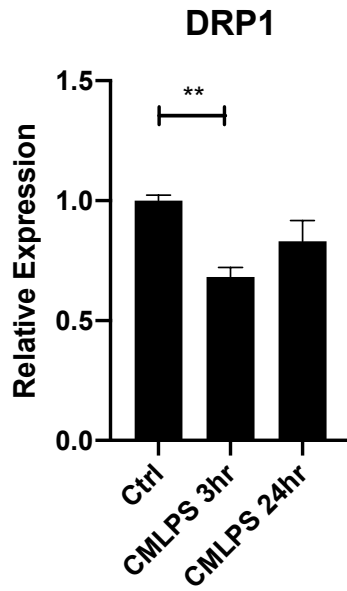
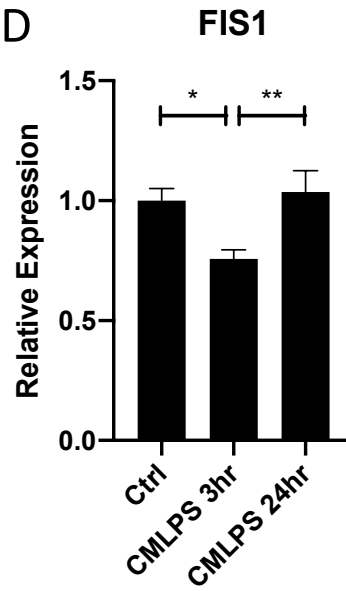
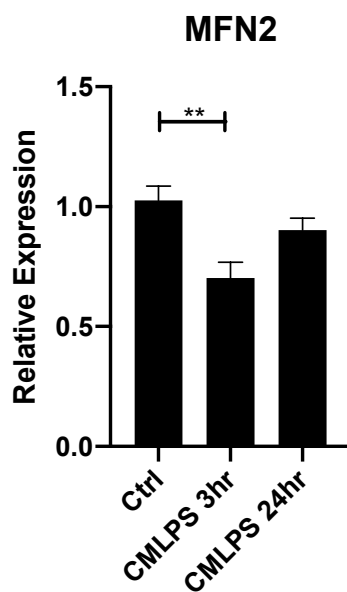
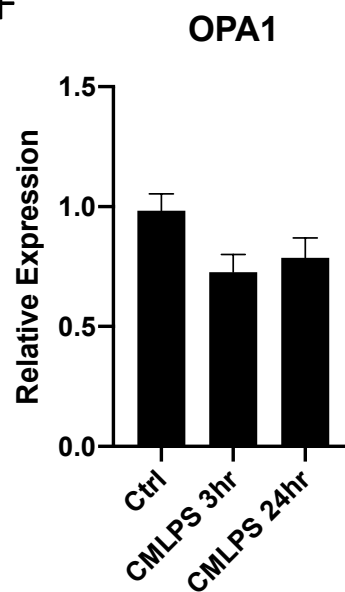
將海馬試劑細胞培養盤每孔種入 5×10^3 的 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,細胞培養液中加入含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)24 小時,再更換培養也為無血清無碳酸氫鈉上機用培養液,利用生物能量測定儀 (XFe24) 進行粒線體功能測試(Mito Stress Test)並依序加入藥物,藥物為 oligomycin、FCCP(0.5nM)、Rotenone & Antimycin A 使儀器檢測粒線體功能(N=3)。(A)粒線體呼吸率曲線圖,(B)細胞外產酸率曲線圖,(C)非粒線體呼吸率,(D)基礎呼吸率,(E)最大呼吸率,(F)電子傳遞,(G)ATP 產量,(H)備用呼吸容量。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 Student's Test 進行統計分析,*表示 $P < 0.05$ 。





圖九：細胞培養液中含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)刺激 mHypoA-POMC/GFP1 細胞降低粒線體 UCP1 表達

將十二孔盤種入 5×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP1 細胞，細胞培養液中加入含有 20% 條件培養液(20% Conditioned Medium)刺激 3 小時及 24 小時(CMLPS 3hr、CMLPS 24hr)後萃取 RNA,利用 RT-qPCR 進行粒線體功能引子含量分析(N=6)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 One way ANOVA 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 $P < 0.05$ 。

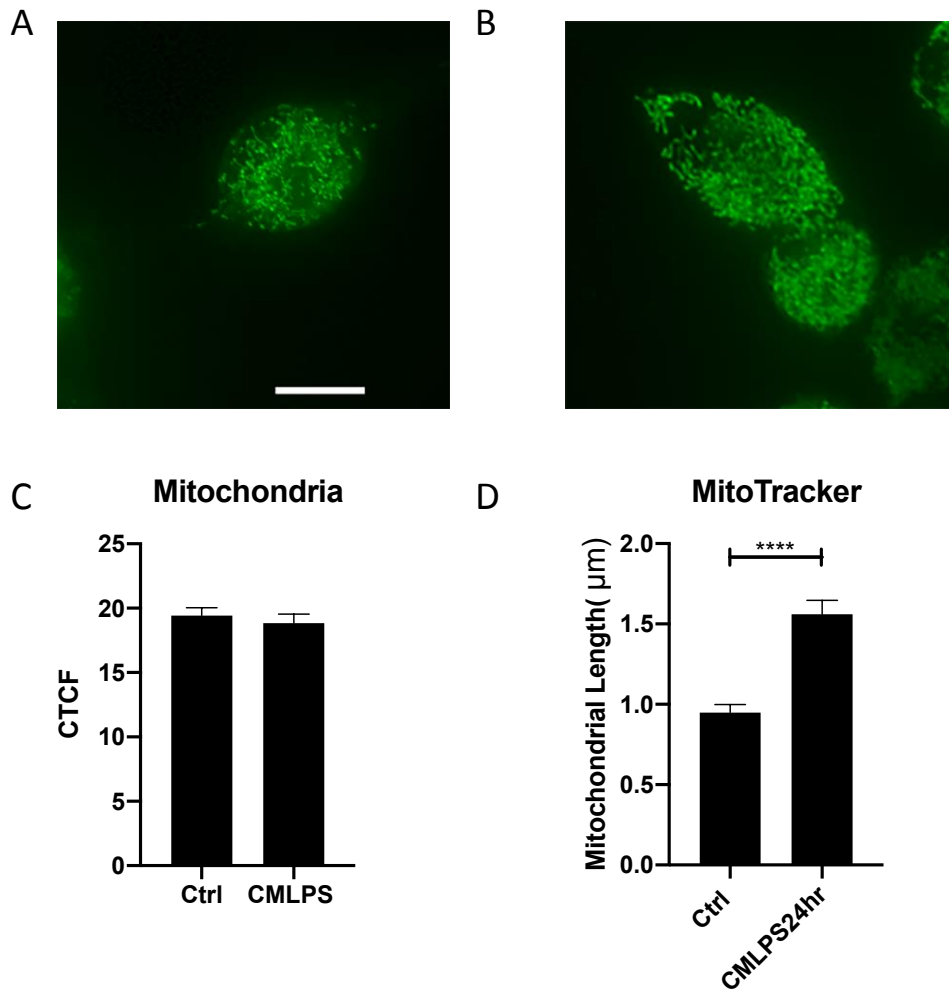
A**B****C****D****E****F**

圖十：細胞培養液中含有 20%條件培養液(20% Conditioned Medium)對

mHypoA-POMC/GFP1 細胞使粒線體分裂與融合表達量下降

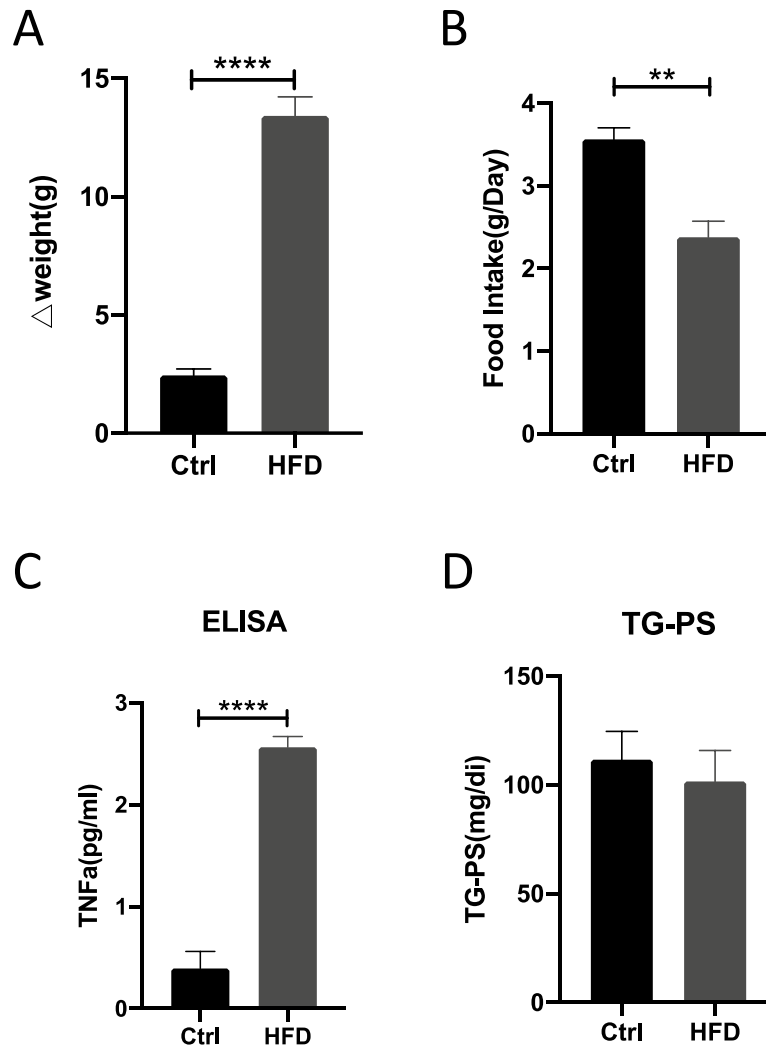
將十二孔盤種入 5×10^4 的 mHypoA-POMC/GFP1 細胞,加入 20%細胞條件培養液 3 小時及 24 小時後(CMLPS 3hr、CMLPS 24hr)萃取 RNA,利用 RT-qPCR 進行粒線體功能引子含量分析(N=8)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 One way ANOVA 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 $P < 0.05$ 。





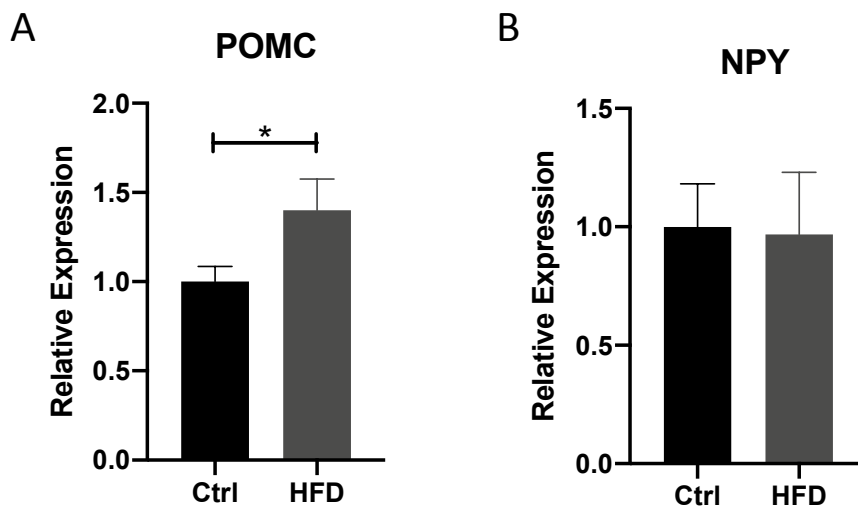
圖十一：細胞培養液中含有 20% 條件培養液 (20% Conditioned Medium) 刺激 mHypoA-POMC/GFP1 細胞使粒線體體積變大

將細胞種入事前利用 1ml 0.1% Gelatin 培養的 Coverslip 盤中, 並使用 100 uM 的 MitoTracker® Green FM 染細胞粒線體, 使用 DeltaVision Personal DV microscope system 觀察細胞 (N=3)。(A) mHypoA-POMC/GFP1 細胞 (Ctrl), (B) 24 小時條件培養液刺激 mHypoA-POMC/GFP1 細胞 (CMLPS 24hr), (C) 細胞內粒線體密度計算, (D) 依照圖 A 下方比例尺為 10µm 並以 Image J 軟體計算及統計分析, 實驗數據以 mean ± SEM 表示, 以 Student's Test 進行統計分析, **** 表示 P < 0.0001。



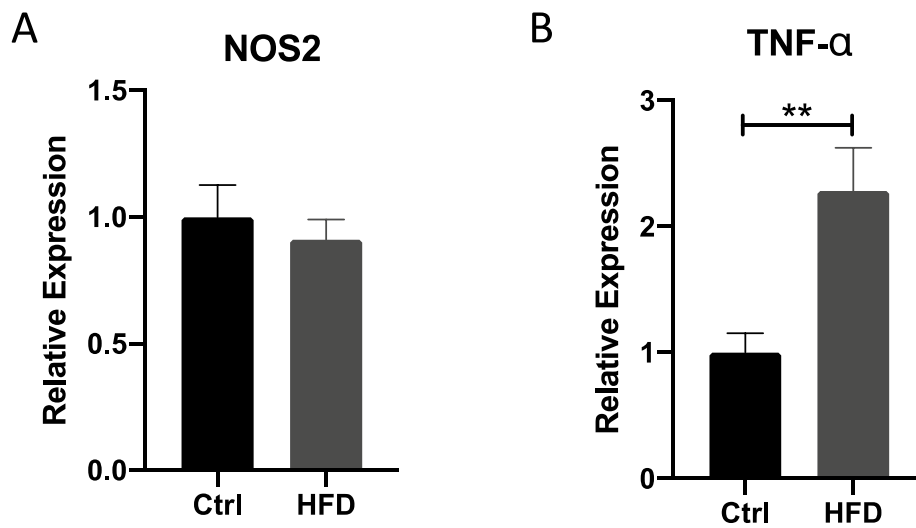
圖十二:實驗組(高脂肪飲食)小鼠較對照組小鼠食慾下降且體重上升並增加血液中發炎因子 $TNF\alpha$

將餵食一個月的對照組老鼠(N=5)與實驗組老鼠(高脂肪飲食)(N=10) 測量實驗前與實驗後體重(A),並每週測試一次 24 小時食物攝取量(B)。將餵食一個月的對照組老鼠與實驗組老鼠(高脂肪飲食)眼窩採血後離心抽取血清測量酵素結合免疫吸附分析法與三酸甘油酯 (C)血液中 $TNF\alpha$ 濃度,(對照組 N=5、實驗組 N=6)(D)血液中三酸甘油酯濃度,(對照組 N=7、實驗組 N=10)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 T-test 進行統計分析,,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$,****表示 $P < 0.0001$ 。



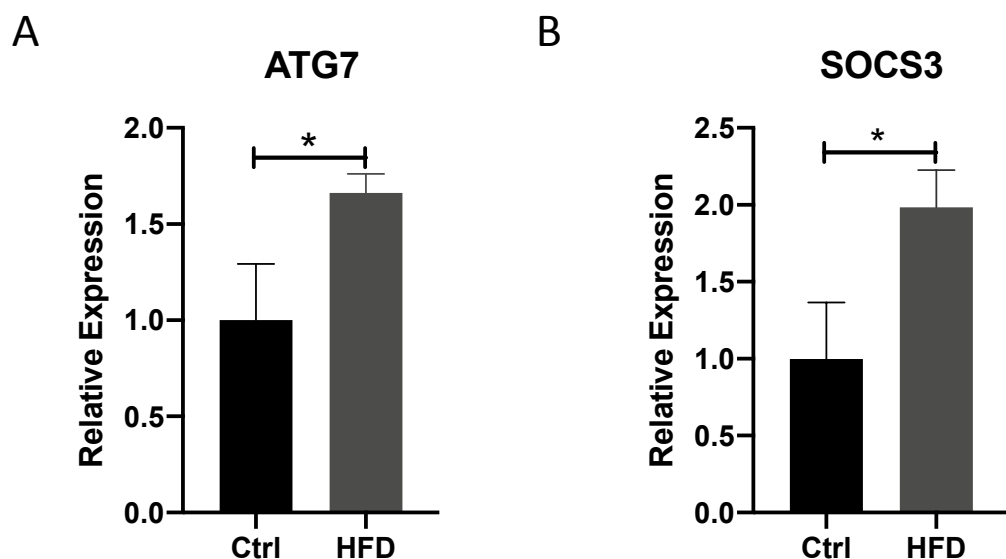
圖十三:實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 POMC 基因表達高於對照組

將餵食一個月的對照組老鼠(N=9)與實驗組老鼠(高脂肪飲食)(N=9)犧牲後取下視丘腦核區,並抽取 RNA 利用 RT-qPCR 進行 mRNA 含量分析。(A)POMC mRNA 表現量,(B)NPY mRNA 表現量。實驗數據以 mean ± SEM 表示,以 T-test 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。



圖十四:實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 TNF α 基因表達高於對照組

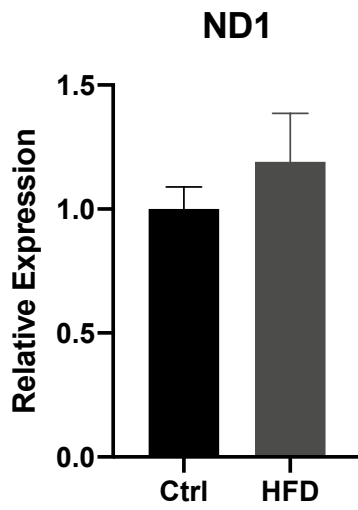
將餵食一個月的對照組老鼠(N=9)與實驗組老鼠(高脂肪飲食)(N=9)犧牲後取下視丘腦核區,並抽取 RNA 利用 RT-qPCR 進行 mRNA 含量分析。(A)NOS2 mRNA 表現量,(B)TNF α mRNA 表現量。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 T-test 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。



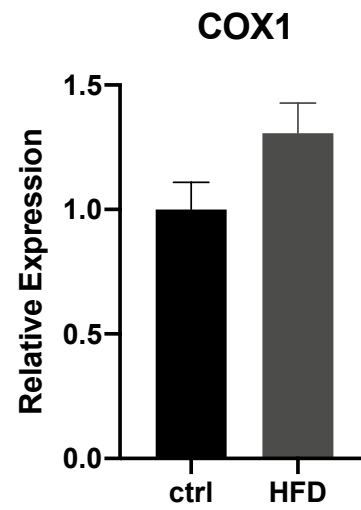
圖十五:實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 ATG7、SCOS3 基因表達高於對照組

將餵食一個月的對照組老鼠(N=9)與實驗組老鼠(高脂肪飲食)(N=9)犧牲後取下視丘腦核區,並抽取 RNA 利用 RT-qPCR 進行 mRNA 含量分析。(A)ATG7 mRNA 表現量,(B)SOCS3 mRNA 表現量。實驗數據以 mean ± SEM 表示,以 T-test 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。

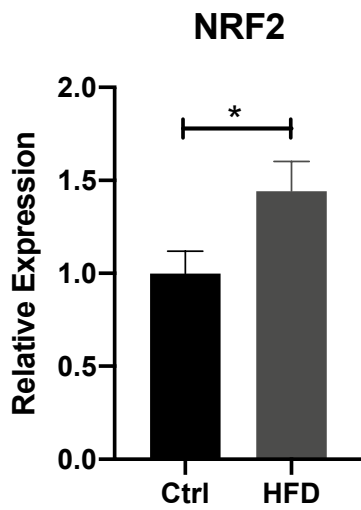
A



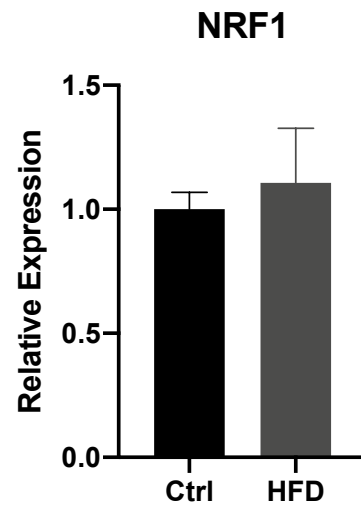
B



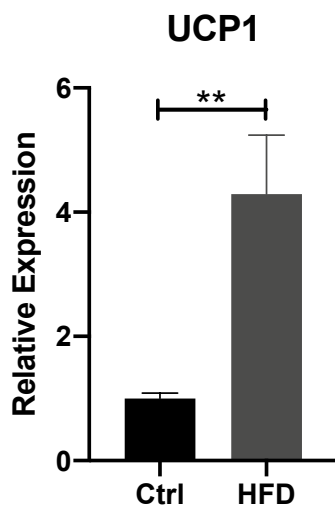
C



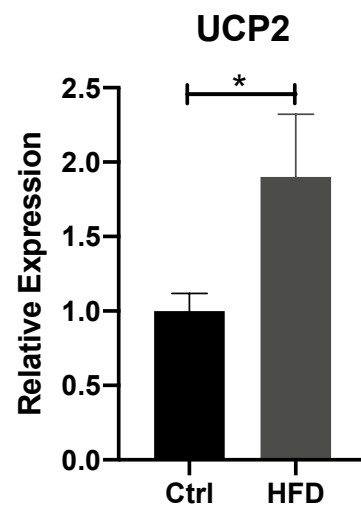
D



E



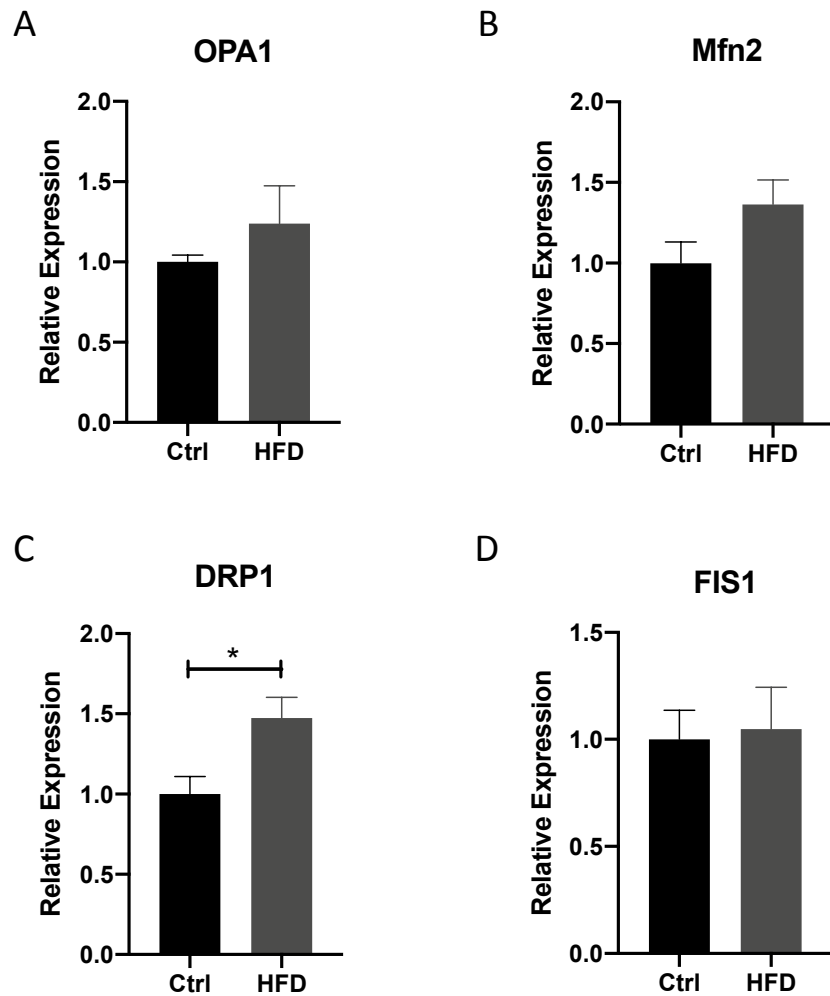
F



圖十六:實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘粒線體相關基因表達

將餵食一個月的對照組老鼠(N=6)與實驗組老鼠(N=6)犧牲後取下視丘腦核區,並抽取 RNA 利用 RT-qPCR 進行 mRNA 含量分析。(A)ND1 mRNA 表現量,(B)COX1 mRNA 表現量,(C)NRF2 mRNA 表現量,(D)NRF1 mRNA 表現量,(E)UCP1 mRNA 表現量(對照組 N=6, 實驗組 N=3), (F)UCP2 mRNA 表現量(對照組 N=6, 實驗組 N=3)。實驗數據以 mean \pm SEM 表示,以 T-test 進行統計分析,以 Delta-delta CT 方法進行分析,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。





圖十七：實驗組(高脂肪飲食)老鼠下視丘 DRP1 基因表達高於對照組

將餵食一個月的對照組老鼠與實驗組老鼠犧牲後取下視丘腦核區,並抽取 RNA 利用 RT-qPCR 進行 mRNA 含量分析。(A)OPA1 mRNA 表現量(對照組 N=6, 實驗組 N=6),(B)MFN2 mRNA 表現量(對照組 N=6, 實驗組 N=3),(C)DRP1 mRNA 表現量(對照組 N=6, 實驗組 N=6), (D)FIS1 mRNA 表現量(對照組 N=6, 實驗組 N=3)。實驗數據以 mean ± SEM 表示,以 Delta-delta CT 方法進行分析,以 T-test 進行統計分析,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。

參考文獻:

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF (2000) The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275:9047-9054.
- Anderson EJ, Cakir I, Carrington SJ, Cone RD, Ghamari-Langroudi M, Gillyard T, Gimenez LE, Litt MJ (2016) 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by alpha-MSH. *J Mol Endocrinol* 56:T157-174.
- Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* 14:351-355.
- Appleyard SM, Hayward M, Young JI, Butler AA, Cone RD, Rubinstein M, Low MJ (2003) A role for the endogenous opioid beta-endorphin in energy homeostasis. *Endocrinology* 144:1753-1760.
- Baizabal-Carvalho JF, Alonso-Juarez M (2017) Cerebellar disease associated with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies: review. *J Neural Transm (Vienna)* 124:1171-1182.
- Banks WA (2001) Anorectic effects of circulating cytokines: role of the vascular blood-brain barrier. *Nutrition* 17:434-437.
- Barton GM (2008) A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* 118:413-420.
- Benani A, Hryhorczuk C, Gouaze A, Fioramonti X, Brenachot X, Guissard C, Krezymon A, Duparc T, Colom A, Nedelec E, Rigault C, Lemoine A, Gascuel J, Gerardy-Schahn R, Valet P, Knauf C, Lorsignol A, Penicaud L (2012) Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J Neurosci* 32:11970-11979.
- Berg AH, Scherer PE (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96:939-949.
- Bergen HT, Mizuno T, Taylor J, Mobbs CV (1999) Resistance to diet-induced obesity is associated with increased proopiomelanocortin mRNA and decreased neuropeptide Y mRNA in the hypothalamus. *Brain Research* 851:198-203.
- Biebermann H, Castaneda TR, van Landeghem F, von Deimling A, Escher F, Brabant G, Hebebrand J, Hinney A, Tschop MH, Gruters A, Krude H (2006) A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. *Cell Metab* 3:141-146.
- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272:32686-32695.
- Bournat JC, Brown CW (2010) Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:446-452.
- Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M (1990) Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52:441-447.
- Buller KM (2001) Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:581-589.
- Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL (2016) The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Semin Cell Dev Biol* 54:42-52.
- Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD (2000) A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141:3518-3521.

- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348:1625-1638.
- Capsoni F, Ongari AM, Reali E, Catania A (2009) Melanocortin peptides inhibit urate crystal-induced activation of phagocytic cells. *Arthritis Res Ther* 11:R151.
- Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, Wareham NJ, Yeo GS, Bhattacharyya S, Froguel P, White A, Farooqi IS, O'Rahilly S (2002) A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 11:1997-2004.
- Chen SJ, Chao YL, Chen CY, Chang CM, Wu EC, Wu CS, Yeh HH, Chen CH, Tsai HJ (2012) Prevalence of autoimmune diseases in in-patients with schizophrenia: nationwide population-based study. *Br J Psychiatry* 200:374-380.
- Chun SK, Jo YH (2010) Loss of leptin receptors on hypothalamic POMC neurons alters synaptic inhibition. *J Neurophysiol* 104:2321-2328.
- Chung S, Son GH, Kim K (2011) Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 1812:581-591.
- Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, Clements M, Al-Qassab H, Heffron H, Xu AW, Speakman JR, Barsh GS, Viollet B, Vaulont S, Ashford ML, Carling D, Withers DJ (2007) AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 117:2325-2336.
- Coll AP (2007) Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential? *Clin Sci (Lond)* 113:171-182.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571-578.
- Cone RD (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 27:736-749.
- Corander MP, Fenech M, Coll AP (2009) Science of self-preservation: how melanocortin action in the brain modulates body weight, blood pressure, and ischemic damage. *Circulation* 120:2260-2268.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146:4192-4199.
- Dela Cruz CS, Kang MJ (2018) Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. *Mitochondrion* 41:37-44.
- Demine S, Renard P, Arnould T (2019) Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells* 8.
- Diano S, Liu ZW, Jeong JK, Dietrich MO, Ruan HB, Kim E, Suyama S, Kelly K, Gyengesi E, Arbiser JL, Belsham DD, Sarruf DA, Schwartz MW, Bennett AM, Shanabrough M, Mobbs CV, Yang X, Gao XB, Horvath TL (2011) Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med* 17:1121-1127.
- Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, Ford ML (2016) Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells. *Mediators Inflamm* 2016:6309219.

- do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Fang T, Aberdein N, Perez de Lara CE, Hall JE (2017) Role of the brain melanocortins in blood pressure regulation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863:2508-2514.
- Dodd GT, Michael NJ, Lee-Young RS, Mangiafico SP, Pryor JT, Munder AC, Simonds SE, Bruning JC, Zhang ZY, Cowley MA, Andrikopoulos S, Horvath TL, Spanswick D, Tiganis T (2018) Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism. *Elife* 7.
- Dodd GT, Decherf S, Loh K, Simonds SE, Wiede F, Balland E, Merry TL, Munzberg H, Zhang ZY, Kahn BB, Neel BG, Bence KK, Andrews ZB, Cowley MA, Tiganis T (2015) Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 160:88-104.
- Eerola K, Virtanen S, Vahatalo L, Ailanen L, Cai M, Hruby V, Savontaus M, Savontaus E (2018) Hypothalamic gamma-melanocyte stimulating hormone gene delivery reduces fat mass in male mice. *J Endocrinol* 239:19-31.
- Ehltling C, Lai WS, Schaper F, Brenndorfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Ludwig S, Blackshear PJ, Gaestel M, Haussinger D, Bode JG (2007) Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol* 178:2813-2826.
- Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY (2007) Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2356-2370.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165-168.
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 348:1085-1095.
- Franceschi C, Campisi J (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1:S4-9.
- Glick D, Barth S, Macleod KF (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221:3-12.
- Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9:393-407.
- Guan HZ, Dong J, Jiang ZY, Chen X (2017) alpha-MSH Influences the Excitability of Feeding-Related Neurons in the Hypothalamus and Dorsal Vagal Complex of Rats. *Biomed Res Int* 2017:2034691.
- Gur TL, Bailey MT (2016) Effects of Stress on Commensal Microbes and Immune System Activity. *Adv Exp Med Biol* 874:289-300.
- Haskell-Luevano C, Cone RD, Monck EK, Wan YP (2001) Structure activity studies of the melanocortin-4 receptor by in vitro mutagenesis: identification of agouti-related protein (AGRP), melanocortin agonist and synthetic peptide antagonist interaction determinants. *Biochemistry* 40:6164-6179.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272:827-829.
- Heo JW, No MH, Park DH, Kang JH, Seo DY, Han J, Neuffer PD, Kwak HB (2017) Effects of exercise on obesity-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Korean J Physiol Pharmacol* 21:567-577.
- Hoch M, Hirzel E, Lindinger P, Eberle AN, Linscheid P, Martin I, Peters T, Peterli R (2008) Weak functional coupling of the melanocortin-1 receptor expressed in human adipocytes. *J Recept Signal Transduct Res* 28:485-504.
- Horvath TL (2006) Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:228S-233S.

- Horvath TL, Sarman B, Garcia-Caceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Bronneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschop MH (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14875-14880.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415.
- Huang XF, Han M, South T, Storlien L (2003) Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res* 992:9-19.
- Huo L, Grill HJ, Bjorbaek C (2006) Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus. *Diabetes* 55:567-573.
- Huynh MK, Kinyua AW, Yang DJ, Kim KW (2016) Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plast* 2016:2754078.
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584:1287-1295.
- Katahira M, Iwasaki Y, Aoki Y, Oiso Y, Saito H (1998) Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. *Endocrinology* 139:2414-2422.
- Kaushik S, Arias E, Kwon H, Lopez NM, Athonvarangkul D, Sahu S, Schwartz GJ, Pessin JE, Singh R (2012) Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO Rep* 13:258-265.
- Kievit P, Howard JK, Badman MK, Balthasar N, Coppari R, Mori H, Lee CE, Elmquist JK, Yoshimura A, Flier JS (2006) Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab* 4:123-132.
- Kim JD, Leyva S, Diano S (2014) Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front Physiol* 5:480.
- Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Ghatei MA, Bloom SR (2000) The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest* 105:1005-1011.
- Konner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Bruning JC (2007) Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5:438-449.
- Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB (2011) Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* 121:1424-1428.
- Lee YS et al. (2006) A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab* 3:135-140.
- Li J, Tang Y, Cai D (2012) IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol* 14:999-1012.
- Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, Heglund M, Elander L, Slawik M, Mussack T, Nilsson D, Romu T, Nuutila P (2013) Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature medicine* 19:631-634.
- Liesa M, Shirihai OS (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17:491-506.

- Lin HV, Plum L, Ono H, Gutierrez-Juarez R, Shanabrough M, Borok E, Horvath TL, Rossetti L, Accili D (2010) Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes* 59:337-346.
- Lopez M (2018) Hypothalamic AMPK and energy balance. *Eur J Clin Invest* 48:e12996.
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD (2005) NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310:683-685.
- Ma W, Fuentes G, Shi X, Verma C, Radda GK, Han W (2015) FoxO1 negatively regulates leptin-induced POMC transcription through its direct interaction with STAT3. *Biochem J* 466:291-298.
- Machado A, Herrera AJ, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Ayala A, Venero JL, Santiago M, Villaran RF, Delgado-Cortes MJ, Arguelles S, Cano J (2014) Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 25:785-804.
- Marrie RA, Fisk JD, Tremlett H, Wolfson C, Warren S, Tennakoon A, Leung S, Patten SB, Epidemiology CTit, Impact of Comorbidity on Multiple S (2015) Differences in the burden of psychiatric comorbidity in MS vs the general population. *Neurology* 85:1972-1979.
- Martin-Rodriguez E, Guillen-Grima F, Marti A, Brugos-Larumbe A (2015) Comorbidity associated with obesity in a large population: The APNA study. *Obes Res Clin Pract* 9:435-447.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.
- Michael NJ, Simonds SE, van den Top M, Cowley MA, Spanswick D (2017) Mitochondrial uncoupling in the melanocortin system differentially regulates NPY and POMC neurons to promote weight-loss. *Mol Metab* 6:1103-1112.
- Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B (2011) Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry* 70:663-671.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fougelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428:569-574.
- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carnevali JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA (2009) High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 4:e5045.
- Morris RL, Hollenbeck PJ (1993) The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* 104 (Pt 3):917-927.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8:1298-1308.
- Nazarians-Armavil A, Chalmers JA, Lee CB, Ye W, Belsham DD (2014) Cellular insulin resistance disrupts hypothalamic mHypoA-POMC/GFP neuronal signaling pathways. *J Endocrinol* 220:13-24.
- Obici S, Zhang BB, Karkani G, Rossetti L (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8:1376-1382.
- Oh DY, Olefsky JM (2012) Omega 3 fatty acids and GPR120. *Cell Metab* 15:564-565.
- Oh TS, Cho H, Cho JH, Yu SW, Kim EK (2016) Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy* 12:2009-2025.

- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11:85-97.
- Padilla SL, Carmody JS, Zeltser LM (2010) Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nat Med* 16:403-405.
- Padilla SL, Reef D, Zeltser LM (2012) Defining POMC neurons using transgenic reagents: impact of transient Pomc expression in diverse immature neuronal populations. *Endocrinology* 153:1219-1231.
- Park HK, Ahima RS (2014) Leptin signaling. *F1000Prime Rep* 6:73.
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB (2007) Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449:228-232.
- Pereira-Lancha LO, Coelho DF, de Campos-Ferraz PL, Lancha AH, Jr. (2010) Body fat regulation: is it a result of a simple energy balance or a high fat intake? *J Am Coll Nutr* 29:343-351.
- Pfluger PT et al. (2015) Calcineurin Links Mitochondrial Elongation with Energy Metabolism. *Cell Metab* 22:838-850.
- Pilling AD, Horiuchi D, Lively CM, Saxton WM (2006) Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol Biol Cell* 17:2057-2068.
- Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304:110-115.
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R (2020) The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med* 217.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3:569-581.
- Rashighi M, Harris JE (2015) Interfering with the IFN-gamma/CXCL10 pathway to develop new targeted treatments for vitiligo. *Ann Transl Med* 3:343.
- Rodier F, Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192:547-556.
- Rohani MG, Parks WC (2015) Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol* 44-46:113-121.
- Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA (2007) TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 28:1050-1058.
- Roselli-Reh fuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB, Cone RD (1993) Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8856-8860.
- Rosin DL, Okusa MD (2011) Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22:416-425.
- Santoro A, Campolo M, Liu C, Sesaki H, Meli R, Liu ZW, Kim JD, Diano S (2017) DRP1 Suppresses Leptin and Glucose Sensing of POMC Neurons. *Cell Metab* 25:647-660.
- Schneeberger M, Gomis R, Claret M (2014) Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol* 220:T25-46.

- Schneeberger M, Dietrich MO, Sebastian D, Imbernon M, Castano C, Garcia A, Esteban Y, Gonzalez-Franquesa A, Rodriguez IC, Bortolozzi A, Garcia-Roves PM, Gomis R, Nogueiras R, Horvath TL, Zorzano A, Claret M (2013) Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155:172-187.
- Schwartz GJ (2000) The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 16:866-873.
- Shaw RJ (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 196:65-80.
- Singh M, Mukhopadhyay K (2014) Alpha-melanocyte stimulating hormone: an emerging anti-inflammatory antimicrobial peptide. *Biomed Res Int* 2014:874610.
- Smith AI, Funder JW (1988) Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* 9:159-179.
- Stuart JA, Brindle KM, Harper JA, Brand MD (1999) Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr* 31:517-525.
- Tarasov VV, Svistunov AA, Chubarev VN, Sologova SS, Mukhortova P, Levushkin D, Somasundaram SG, Kirkland CE, Bachurin SO, Aliev G (2019) Alterations of Astrocytes in the Context of Schizophrenic Dementia. *Front Pharmacol* 10:1612.
- Tay SH, Mak A (2017) Diagnosing and attributing neuropsychiatric events to systemic lupus erythematosus: time to untie the Gordian knot? *Rheumatology (Oxford)* 56:i14-i23.
- Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschop MH, Schwartz MW (2012) Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 122:153-162.
- Tiganis T (2013) PTP1B and TCPTP--nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis. *FEBS J* 280:445-458.
- Timper K, Paeger L, Sanchez-Lasheras C, Varela L, Jais A, Nolte H, Vogt MC, Hausen AC, Heilinger C, Evers N, Pospisilik JA, Penninger JM, Taylor EB, Horvath TL, Kloppenburg P, Bruning JC (2018) Mild Impairment of Mitochondrial OXPHOS Promotes Fatty Acid Utilization in POMC Neurons and Improves Glucose Homeostasis in Obesity. *Cell Rep* 25:383-397 e310.
- Turan S, Hughes C, Atay Z, Guran T, Haliloglu B, Clark AJ, Bereket A, Metherell LA (2012) An atypical case of familial glucocorticoid deficiency without pigmentation caused by coexistent homozygous mutations in MC2R (T152K) and MC1R (R160W). *J Clin Endocrinol Metab* 97:E771-774.
- Vaamonde-Garcia C, Riveiro-Naveira RR, Valcarcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ (2012) Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 64:2927-2936.
- Vallee RB, Bloom GS (1991) Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Annu Rev Neurosci* 14:59-92.
- van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE (1984) The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* 224:1-24.
- Varela L, Horvath TL (2012) Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 13:1079-1086.

- Vogt MC, Bruning JC (2013) CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol Metab* 24:76-84.
- Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE (2001) Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9:414-417.
- Wang D, He X, Zhao Z, Feng Q, Lin R, Sun Y, Ding T, Xu F, Luo M, Zhan C (2015) Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front Neuroanat* 9:40.
- Wang T, Si Y, Shirihai OS, Si H, Schultz V, Corkey RF, Hu L, Deeney JT, Guo W, Corkey BE (2010) Respiration in adipocytes is inhibited by reactive oxygen species. *Obesity (Silver Spring)* 18:1493-1502.
- Wang Z, do Carmo JM, da Silva AA, Bailey KC, Aberdein N, Moak SP, Hall JE (2019) Role of SOCS3 in POMC neurons in metabolic and cardiovascular regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 316:R338-R351.
- Whittle AJ, Lopez M, Vidal-Puig A (2011) Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* 17:405-411.
- Wikstrom JD, Mahdavi K, Liesa M, Sereda SB, Si Y, Las G, Twig G, Petrovic N, Zingaretti C, Graham A, Cinti S, Corkey BE, Cannon B, Nedergaard J, Shirihai OS (2014) Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J* 33:418-436.
- Xu AW, Ste-Marie L, Kaelin CB, Barsh GS (2007) Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. *Endocrinology* 148:72-80.
- Xu AW, Kaelin CB, Morton GJ, Ogimoto K, Stanhope K, Graham J, Baskin DG, Havel P, Schwartz MW, Barsh GS (2005) Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. *PLoS Biol* 3:e415.
- Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang JE, Lin S, Bao J, Wu P, Luo M (2013) Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J Neurosci* 33:3624-3632.
- Zhang QS, Heng Y, Yuan YH, Chen NH (2017) Pathological alpha-synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicol Lett* 265:30-37.
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135:61-73.
- Zheng H, Wu D, Wu X, Zhang X, Zhou Q, Luo Y, Yang X, Chock CJ, Liu M, Yang XO (2018) Leptin Promotes Allergic Airway Inflammation through Targeting the Unfolded Protein Response Pathway. *Sci Rep* 8:8905.

附錄：

附錄一：裂解緩衝液(Lysis Buffer)配方

Lysis Buffer Component	Volume
0.5M Tris-HCL pH=8	1.214g
1.5M NaCl	1.7532g
EDTA	0.1488g
NP40	2 ml
Distilled water pH=8	Final to 200ml
Total	200ml

附錄二：loading dye 配方

5X Loading Dye Component	Volume
0.25M Tris-HCL pH=6.8	1.25ml
0.5M DTT	0.38g
10% (w/w) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	0.5g
0.5% Bromophenol Blue	0.025g
50% Glycerol	2.5ml
Distilled water	1.25ml
Total	5ml

附錄三:Running Gel 配方

10% Running Gel	Volume
Distilled water	3.97ml
30% Acrylamide	3.33ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5ml
10% (w/w) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	100 μ l
10% (w/v) Ammonium Persulfate	100 μ l
TEMED	8 μ l
Total	10ml

附錄四:Stacking Gel 配方

4% Stacking Gel	Volume
Distilled water	2.1ml
30% Acrylamide	0.48ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	0.9ml
10% (w/w) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	36 μ l
10% (w/v) Ammonium Persulfate	36 μ l
TEMED	4.8 μ l
Total	3.6ml

附錄五:Tank Buffer 配方

10X Tank Buffer (1L)	Volume
Tris	30.28g
Glycine	144.13g
SDS	10g
Distilled water	Final to 1L

附錄六:10 X Transfer Buffer 配方

10X Transfer Buffer (1L)	Volume
Tris	30.3g
Glycine	144g
Distilled water	Final to 1L

1X Transfer Buffer 配方

1X Transfer Buffer (1L)	Volume
10X Transfer Buffer	100ml
Methanol	150ml
Distilled water	750ml

附錄七:RT 混合液

Component	Volume
10X RT-script buffer	2 μ l
RNase inhibitor (40U/ μ l)	0.5 μ l
dNTP solution MMLV(10mM)	1 μ l
RT-script enzyme	0.5 μ l
Nuclease-free water	6 μ l
Total	20 μ l

附錄八:cDNA 混合液

Component	Volume
cDNA	1 μ l
Primer F(10nM)	1 μ l
Primer R(10nM)	1 μ l
Nuclease-free water	7 μ l
SYBR Green Master Mix (Thermo)	10 μ l
Total	20 μ l

附錄九:實驗使用的引子序列及溫度

Gene	Sequence	Temperature
TNFa	Forward: CCCTCACACTCAGATCATCTTCA	56°C
	Reverse: GCTACGACGTGGGCTACAG	
NOS2	Forward: CTTTGCCACGGACGAGAC	56°C
	Reverse: TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC	
POMC	Forward: CCATAGATGTGTGGAGCTGGTG	56°C
	Reverse: CATCTCCGTTGCCAGGAAACAC	
NPY	Forward: TACTCCGCTCTGCGACACTA	56°C
	Reverse: GATGAGGGTGGAAACTTGA	
ATG7	Forward: CCTGTGAGCTTGGATCAAAGGC	56°C
	Reverse: GAGCAAGGAGACCAGAACAGTG	
SOCS3	Forward: ATGGTCACCCACAGCAAGTTT	56°C
	Reverse: TCCAGTAGAATCCGCTCTCCT	
GAPDH	Forward: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	56°C
	Reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
COX1	Forward: TTTCAGGCTTCACCCTAGATGA	56°C
	Reverse: AAGAATGTTATGTTTACTCCTACGAATATG	
ND1	Forward: TCACCTGACAGAAGGAGAATCA	56°C
	Reverse: GGGCCGGCTGCGTATT	
NRF1	Forward: ACAGCAGTGGCAAGATCTCA	56°C
	Reverse: GCAAGGCTGTAGTTGGTGCT	
NRF2	Forward: CAAGACTTGGGCCACTTAAAAGAC	56°C
	Reverse: AGTAAGGCTTTCATCCTCATCAC	
MFN2	Forward: CGAGGCTCTGGATTCACTTCA	56°C
	Reverse: CCAACCAGCCAGCTTTATTCC	
FIS1	Forward: TGGTGTCTGTGGAGGATCTG	56°C
	Reverse: ATTGCGTGCTCTTGGACAC	
OPA1	Forward: CCTTTGTCGCAGAGGTTTTTATTAC	56°C
	Reverse: CATTGCATTAGCTCAGAATC	

DRP1	Forward: TTAGTGGCAATTGAGCTAGCGTAT	56°C
	Reverse: CCCACAGGCATCAGCAAAGT	
UCP1	Forward: AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	53°C
	Reverse: CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT	
UCP2	Forward: ATGGTTGGTTTCAAGGCCACA	53°C
	Reverse: CGGTATCCAGAGGGAAAGTGAT	

