

東海大學化學系研究所碩士論文

指導教授：許員豪 博士

質譜分析神經生長與退化過程中
神經傳導物質之變化

Mass Spectrometry Analysis of the
Neurotransmitters Change during
Neurogenesis and Neurodegeneration

碩士班研究生：饒育寧

中華民國一零八年六月

誌謝

路思義教堂鐘聲再次響起歸家的訊號，眨眼間在東海大學就學五年，研究生涯已邁入尾聲，期間發生許多事情，回想起當時剛進入研究所的日子，雖然實驗失敗時會很挫折，但在壓力下成功應證假設時成就感更高，記憶裡彷彿就在昨日，突然就到了離開的時候。研究所讓我收穫頗多，謝謝這中間給予我幫助的人，謝謝這些人讓我的碩士生涯更加充實。

首先感謝指導老師許員豪教授在這兩年間的指導，不管是課業上還是生活上的指導與幫助，提供良好的實驗室環境，讓我們實驗能夠順利的進行，以及學業上的幫助，在實驗上的指導，讓我能夠知道方向繼續前進，老師豐富的專業知識與學術涵養，帶領我更熱愛研究並樂於貢獻科學發展，心中的感謝無以言表。

感謝趙昱任學長在實驗上的指導，讓我能快速掌握實驗與學習儀器。感謝不斷教導我的學長姐庭遠、冠霖、朱怡、映志、若蓁以及其他人，在我實驗和課業上的幫助。感謝文睿、明軒、佳儀、岱漪、景元、雅惠、瑀彤、明薇，與你們認識實在是令人開心的一件事。

最後感謝不斷支持著我的家人，讓我在求學階段無需為金錢擔憂，心靈總是能在回到家時療癒，給我勇氣再次面對挑戰。

碩士生活雖結束，但記憶會永存心中，漫步在文理大道，他仍然溫柔待我，時空膠囊神秘而凝結時空，願東海如此優美、雄偉純潔、至於無窮。

饒育寧 謹誌

中華民國 一零八年六月

目錄

摘要	
圖表索引	
第一章 緒論	1
1.1 帕金森氏症	1
1.2 神經傳導物種類與作用	2
第二章 神經傳導物鑑定	7
2.1 前言	7
2.1.1 偵測神經傳導物歷史演進	7
2.1.2 質譜儀檢測神經傳導物技術進程	10
2.1.3 神經傳導物對分化的影響	12
2.2 實驗材料與方法	13
2.2.1 藥品/材料	13
2.2.2 儀器	14
2.3 神經傳導物質譜儀鑑定平台	14
2.3.1 神經傳導物萃取	14
2.3.2 儀器分析	15
2.3.3 定量分析方法	15
2.3.4 數據統計分析方法	16
2.4 結果	17
2.4.1 小分子代謝物分析平台	17
2.4.2 神經傳導物鑑定平台	19
第三章 PC12 細胞分化改變	22
3.1 前言	22
3.1.1 神經傳導物調控幹細胞關係	22
3.1.2 神經細胞分化	23
3.2 實驗材料與方法	24
3.2.1 藥品/材料	24
3.2.2 神經細胞培養與分化	24
3.3 結果	25
3.3.1 神經細胞分化	25
3.3.2 質譜儀鑑定 PC12 細胞分化中細胞內神經傳導物變化	27
3.3.3 質譜儀鑑定 PC12 細胞分化過程釋放神經傳導物濃度變化	29
3.4 討論	32
第四章 魚藤酮與神經細胞分化	35
4.1 前言	35

4.1.1	粒線體損傷之帕金森氏症細胞模型.....	35
4.2	實驗材料與方法.....	36
4.2.1	藥品/材料.....	36
4.2.2	魚藤酮影響神經細胞分化生長細胞操作.....	36
4.3	結果.....	36
4.3.1	分化初期接觸魚藤酮對PC12細胞內神經傳導物影響.....	36
4.3.2	分化初期接觸魚藤酮對PC12細胞釋放神經傳導物影響.....	40
4.4	討論.....	42
第五章	神經細胞退化.....	43
5.1	實驗材料與方法.....	43
5.1.1	藥品/材料.....	43
5.1.2	魚藤酮影響神經細胞退化細胞操作.....	43
5.2	結果.....	43
5.2.1	各濃度魚藤酮對神經細胞退化細胞型態與生長影響.....	43
5.2.2	神經退化過程細胞內神經傳導物影響.....	44
5.2.3	神經退化過程細胞釋放神經傳導物影響.....	47
5.3	討論.....	51
第六章	結論.....	52
第七章	參考文獻.....	54
第八章	附錄.....	60

摘要

多巴胺缺乏雖然是目前帕金森氏症治療研究的目標物，但多巴胺並非唯一受帕金森氏症影響的神經傳導物質，這種疾病也會擾亂其他大腦化學物質，像是血清素、正腎上腺素和乙醯膽鹼，導致情緒、行為、認知等方面出現變化，為了全面有效掌握帕金森氏症，此篇論文將使用質譜儀開發神經傳導物分析平台，用此方法全面檢測神經細胞不同條件下神經傳導物代謝鏈物質與含量變化。

神經再生學目前研究應用在退化性神經疾病的治療，神經傳導物傳遞訊息功能直接影響神經再生分化路徑，並調控神經傳導物使細胞分化走向目標神經元細胞，因此確切的了解分化過程中神經傳導物調控勢在必行。研究發現 PC12 神經細胞在分化過程多巴胺能代謝鏈發展旺盛，且神經傳導物最終代謝成 3-methoxytyramine 釋放細胞外累積 3.1 倍，作為分化指標之一，而神經分化過程造成血清素能代謝鏈速率下降，甚至抑制的發生，檢測 adenosine 在胞內胞外濃度的調控，adenosine 在細胞內上升 5.9 倍，也說明神經分化過程需使用大量的能量。

分化初期細胞接觸魚藤酮，細胞初期會提升血清素能代謝鏈速率，血清素上升 2.9 倍，分化後期神經傳導物恢復正常，未分化細胞能對毒化物產生拯救機制。分化完神經細胞受魚藤酮影響劇烈，使用低濃度魚藤酮誘導分化完神經細胞產生類似帕金森氏症的退化現象，發現神經細胞在退化過程會造成多巴胺能代謝鏈上游胺基酸無法吸收，導致下游神經傳導物含量不足，且多巴胺回收機制受阻，無法回收細胞外多巴胺至胞內使用，此過程細胞無拯救機制發生，低濃度魚藤酮對神經細胞造成嚴重的傷害。

Abstract

Although dopamine deficiency is the target for the treatment of Parkinson's disease (PD), dopamine is not the only neurotransmitter affected by PD. PD can also disturb the concentrations of other neurotransmitters, such as serotonin, norepinephrine and acetylcholine, which may affect the mood, behavior and cognition of PD patients. In this thesis, we analyzed neurotransmitters by mass spectrometry, and quantified the neurotransmitters in neuronal cells during neurogenesis and neurodegeneration. Neurogenesis has been the focus for the treatment of neurological degenerative diseases. The neurotransmitters could regulate neurogenesis directly. Therefore, it is imperative to understand the regulation of neurotransmitters during differentiation. We found that the dopaminergic metabolism pathway of PC12 neuronal cells developed vigorously during differentiation, and the neurotransmitters were metabolized into 3-methoxytyramine and accumulated 3.1 folds in the cell medium. Adenosine also increased 5.9 folds in cytosol, indicating that high amount of energy was needed in the differentiation process of the neuronal cells.

Neuronal cells exposed to rotenone in the early stage of differentiation increased the serotonergic metabolic chain in the early stage, and the neurotransmitters returned to normal level in the late stage of differentiation. A rescue mechanism may be induced by the rotenone stimulation. Low concentrations of rotenone could induce the differentiation of the neuron cells, leading to the features of the PD model. While the differentiated neuron was exposed to rotenone, the precursors of the dopaminergic pathway could not be absorbed into the cell, which caused the lack of neurotransmitters, and affected the mechanism of dopamine reuptake. There was no rescue mechanism observed in this process, and even low concentration of rotenone could cause serious damage to the neuron.

圖表索引

圖一、神經傳導物代謝途徑。.....	4
圖二、各標準品於質譜儀二次裂解室中碎裂狀態。.....	20
圖三、腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤 PC12 從未分化狀態到分化九天細胞型態變化。	26
圖四、腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤 PC12 分化七天內細胞增生狀態。.....	26
圖五、PC12 神經細胞分化時期細胞內神經傳導物變化。.....	28
圖六、PC12 神經細胞分化過程釋放神經傳導物濃度變化。.....	31
圖七、PC12 神經細胞從未分化到分化七天神經傳導物吸收與釋放變化圖。.....	33
圖八、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響細胞分化型態。.....	38
圖九、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響後細胞生長狀態。.....	38
圖十、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響細胞內神經傳導物變異圖。....	39
圖十一、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響細胞釋放神經傳導物濃度變異 圖。.....	42
圖十二、分化完全的 PC12 神經細胞受不同濃度魚藤酮影響 48 小時後細胞型 態變化。.....	44
圖十三、PC12 神經細胞分化第六天時添加 10 nM、20 nM、100 nM 魚藤酮反 應 48 小時，細胞內神經傳導物變化圖。.....	47
圖十四、PC12 神經細胞分化第六天時添加 10 nM、20 nM、100 nM 魚藤酮反 應 48 小時，細胞釋放神經傳導物變化圖。.....	50
表一、精準質量小分子物質鑑定。.....	17
表二、質譜儀二次裂解法神經傳導物鑑定。.....	21

第一章 緒論

1.1 帕金森氏症

帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)是一種慢性中樞神經系統退化疾病，主要症狀為顫抖、肢體僵硬、運動功能減退，帕金森氏症首見於英國醫生詹姆士帕金森(*James Parkinson*)於 1817 年發表的一篇論文《震顫性麻痺》。目前研究顯示，致病原因是由於中腦中神經核團黑質(substantia nigra)和神經細胞退化，進一步造成負責分泌多巴胺至大腦基底核的黑質神經元損傷，導致多巴胺的分泌不足[1]。對於帕金森氏症患者來說，他們的腦內神經循環代謝路線無法正常運作，因此必須透過調控神經傳導物修正神經傳導的訊息。氧化壓力是造成神經核團黑質和神經細胞退化的主因之一 [2]。

帕金森氏症研究近年內發展更深入，除了最關切的腦內多巴胺含量甚低而造成晚期病患運動障礙，更多學者研討發生在帕金森氏症前期的非運動障礙[3]。非運動障礙發生在輕度帕金森氏症或早期帕金森氏症，病徵也出現在多巴胺的運動障礙發生之前，非運動障礙造成的影響不可忽略，常見症狀如抑鬱、冷漠、焦慮、認知障礙、癡呆、注意力缺陷等神經精神病學症狀，目前研究證明 cholinergic、serotonergic、glutamatergic、noradrenergic 有參與帕金森氏症的非運動障礙[4]，但確切神經傳導物的變異尚未被研究。

帕金森氏症的致病原因有許多層面，目前多歸咎於基因遺傳、飲食與環境暴露因子，經研究證實，大氣環境或飲食中若含有殘留的魚藤酮(rotenone)或巴拉刈(paraquat)等抑制粒線體複合體 I 化合物，會因為直接抑制細胞內粒線體呼吸鏈複合體 I 之功能，引起 NADH 脫氫酶無法將輔酶 Q 還原為 QH_2 ，質子累積於內膜中，導致下游粒線體呼吸鏈複合體速度減緩甚至停止，氧化壓力伴隨著上升，導致紋狀黑質多巴胺神經元選擇性變性與 α -突觸核蛋白(α -synuclein polyubiquitin)摺疊錯誤並累積，粒線體的受損對神經細胞造成功能性尚失與退化[5]。在近期的體外研究中發現，大鼠中腦水平切片與 100 nM 魚藤酮反應 30 分鐘，毒化物的衝擊損傷了背脊的 tyrosine hydroxylase-positive 近端的樹突

神經與腹部黑質區和腹側被蓋區[6]。魚藤酮的毒性已被視為生物體內或體外帕金森氏症之模型[7]。而巴拉刈進入人體後會大量累積於肺泡的 I 型細胞、II 型細胞和腎臟，影響氧化還原反應，會製造更多氧氣的衍生物(oxygen derivatives)，使得體內氧化壓力的上升，導致肺泡內和肺間質纖維化，稱為巴拉刈肺，導致 3 周內的急性呼吸衰竭，以及腎小管壞死，而形成帕金森氏症[8]。不飽和脂肪酸是組成神經元細胞膜的重要成分，具有保護神經細胞抗氧化和抗發炎功能，其中若帕金森氏症患者於飲食中攝取 Omega-3 脂肪酸，也有助於改善患者憂鬱的症狀[9]。

目前治療帕金森氏症藥物目標皆為補充腦中多巴胺含量，如左旋多巴製劑 levodopa (L-Dopa)與 carbidopa (Sinemet)，L-Dopa 是多巴胺的前驅物可經由 aromatic amino acid decarboxylase 催化而轉變成多巴胺，透過左旋多巴補充帕金森氏症病患缺乏的多巴胺而得到病情改善[10]，而 Sinemet 是 levodopa 與 carbidopa 的藥物複合物，carbidopa 比 levodopa 的效果更好，因可減少患者食用 levodopa 用量以減低 levodopa 的副作用，如噁心，嘔吐和心律不整，目前是帕金森氏症最常用的處方藥。多巴胺缺乏雖然是目前帕金森氏症疾病治療研究的目標物，但多巴胺並非唯一受帕金森氏症影響的神經傳導物質，這種疾病也會擾亂其他大腦化學物質，像是血清素、正腎上腺素和乙醯膽鹼，導致情緒、行為、認知等方面出現變化[11]。

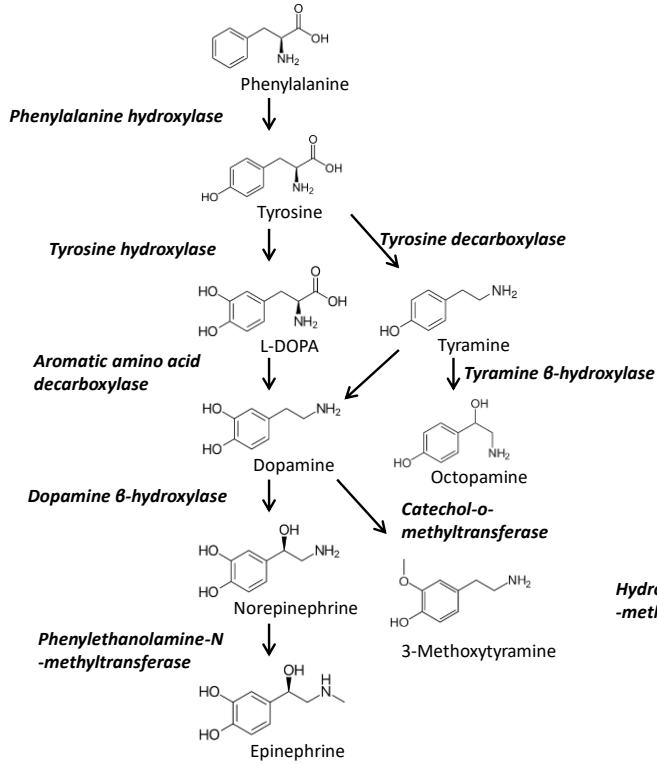
1.2 神經傳導物種類與作用

神經傳導物種類繁多，目前已知神經傳導物利用化學結構的不同，可將神經傳導物初步分為胺基酸類別的 glutamic acid、aspartic acid、 γ -aminobutyric acid (GABA)、glycine、serine 與氣體類別 carbon monoxide (CO)、hydrogen sulfide (H₂S)、nitric oxide (NO)與單胺類別 dopamine、epinephrine、histamine、norepinephrine、serotonin、adrenaline 胜肽類別 β -endorphin、amphetamines、somatostatin、enkephalin substance P、opioid peptide 嘌呤類別的 adenosine、adenosine triphosphate (ATP) 及痕量胺 (trace amines) 類別的

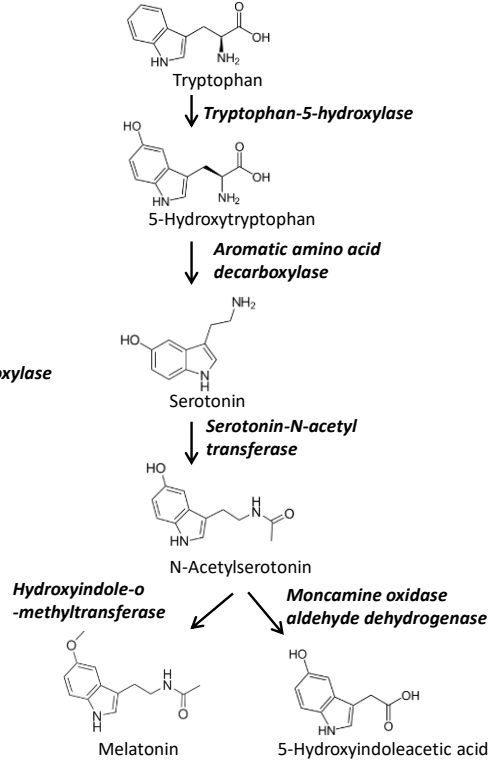
arylalkylamines、phenylethylamine、tyramine、tryptamine、octopamine、phenylethanolamine、
synephrine 其餘類別的 acetylcholine、anandamide。

比較代謝型神經傳導物可由神經傳導物代謝路徑不同分為四種，以 phenylalanine 起
始的代謝鏈 Dopaminergic metabolites、tryptophan 起始的代謝鏈 Serotonergic metabolites、
glutamine 起始的代謝鏈 Glutamatergic metabolites 與 choline 起始的代謝鏈 Cholinergic
metabolites(圖一)。

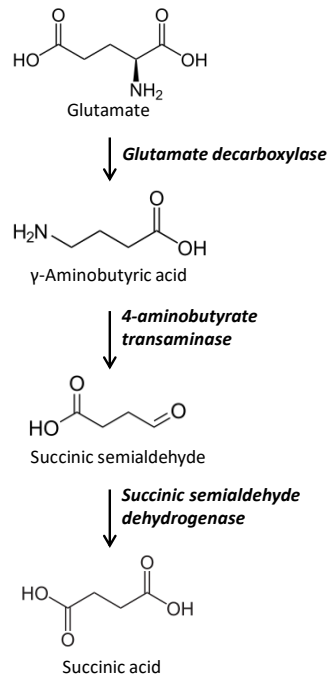
Dopaminergic metabolites



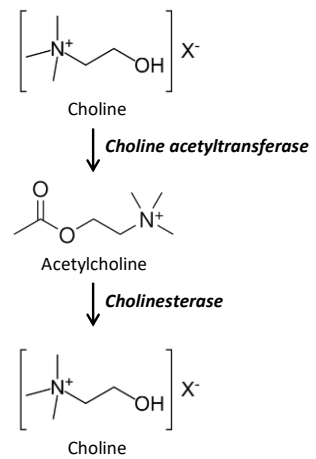
Serotonergic metabolites



Glutamatergic metabolites



Cholinergic metabolites



圖一、神經傳導物代謝途徑。

Dopaminergic、Serotonergic、Glutamatergic、Cholinergic 四種神經元代謝路徑。

神經傳導物結構彼此差異不大，但功能上有著不同的生理作用，glutamate 是人體中含量最多的神經傳導物，是中樞神經系統中主要的興奮性傳遞者，有助於記憶的形成[12]，特別的是 glutamate 對神經元有毒，過量的 glutamate 會導致神經元死亡[13]。Gamma-aminobutyric acid (GABA)是脊椎動物大腦中主要的抑制型神經傳導物，有助於控制焦慮[14]，GABA 缺乏可能導致癲癇的發作[15]。Glycine 也是脊椎動物脊髓中主要的抑制型神經傳導物[16]。Acetylcholine 能在自主神經系統和感覺神經元中傳遞訊息而刺激肌肉，並與快速動眼週期睡眠相關[17]，acetylcholine 的下降與阿茲海默症病也相關[18]。Norepinephrine 可以調控增加心率與血壓，是人體中戰鬥與逃跑反應的一部分[19]。Dopamine 在大腦中起著獎勵激勵行為的主要作用，獎勵機制可增加多巴胺在腦中的濃度[20]，大部分成癮藥物透過增加多巴胺調控神經元活動，多巴胺的分泌不足會導致帕金森氏症[21]，而分泌過量的多巴胺會導致精神分裂症[22]。Serotonin 是參與情緒和感知的抑制性神經傳導物，血清素分泌含量過低會誘發抑鬱、自殺傾向、憤怒管理問題、睡眠困難、偏頭痛[23]。

人體中神經傳導路徑多元而複雜，dopaminergic 為造成帕金森氏症後期嚴重非運動障礙主要變異神經途徑，影響最大的神經傳導物為 dopamine 的遞減，使生理上無法控制肌肉與注意力無法集中。發生在前期與輕度帕金森氏症的非運動障礙主要由 noradrenergic、serotonergic、glutamatergic、GABAergic、cholinergic、adenosine-mediated 控制[24]。

兒茶酚胺類別神經傳導物 dopamine 為 norepinephrine 代謝前驅物，而在中樞神經中 noradrenergic 以及 dopaminergic 系統具有強大的補償機制，可以調整損傷、環境壓力和抗抑鬱的反應，noradrenergic 的異常會使注意力功能有缺陷[25]。

Serotonergic(5-羥色胺)為最古老的神經訊號系統，血清素與許多不同類型的精神病理學症狀有關聯，serotonergic 系統在情緒障礙和自殺行為傾向有關，因此是許多抗抑鬱類型藥物設計基礎，在帕金森氏病患中體內血清素經氧化脫胺反應後的產物 5-

hydroxyindoleacetic acid 含量很低，因此會透過血清素治療[24]，但目前對帕金森氏症病患 serotonergic 異常原因尚未有結論，無論有無罹患憂鬱症血清素都會受影響。

在臨床實驗中 glutamatergic 系統調節認知障礙和運動功能為主，且在帕金森氏症中也有影響，研究指出透過增強 AMPA 受體(AMPAKines)調節 glutamate 治療帕金森氏症中認知缺陷和抑鬱症[26]。

GABAergic 是中樞神經系統中主要抑制性神經傳導物，體內 GABA 濃度的上升會抑制多巴胺濃度的下降，目前藥理多透過給予人體 L-dopa 於生理代謝成多巴胺進而抑制 GABA 的合成，GABAergic 系統涉及人體功能的疼痛、睡眠障礙、抑鬱。

Cholinergic(膽鹼能系統)中主要物質乙醯膽鹼是一種重要的水解遞質，在神經突觸與肌肉之間傳遞信號，傳遞至突觸間後立即被乙醯膽鹼脂酶(acetylcholinesterase)水解，放出的膽鹼被吸收，因此具迅速滅活的特性，在帕金森氏症中膽鹼乙醯轉移酶(choline acetyltransferase, ChAT)活性較正常人低，cholinergic 系統的缺陷造成記憶的喪失與認知障礙，cholinergic 系統與 dopaminergic 系統不平衡也會造成生理幻覺的現象[24]。

Adenosine-mediated(腺苷調節劑)系統主要角色為調節劑，在腦組織細胞內外由 adenosine transporter 傳輸 adenosine、ATP、ADP、AMP、inosine 物質相互調節代謝細胞所需，腺苷調節劑對神經元活動具有普遍的抑制作用，如睡眠和清醒水平的調節、神經保護、運動效應、鎮痛、酒精效應的調節和慢性藥物使用[27]，又以睡眠調節最為重要。腺苷的積累由 ATP 提供，細胞外 ATP 為一種信號分子，在神經元和膠質細胞之間的傳遞溝通，細胞內 AMP/ ATP 比值控制著 AMP 活化蛋白激酶的活性，而活化蛋白激酶是一種強的能量調節器，在調節睡眠穩態中發揮作用[28]。

第二章 神經傳導物鑑定

2.1 前言

2.1.1. 偵測神經傳導物歷史演進

神經傳導物的發現最早可追溯至 1921 年，由 Otto Loewi 在青蛙心臟實驗中，將兩顆青蛙心臟置於連通溶液中，其中一號心臟與其迷走神經放置，當施以電流刺激迷走神經時一號心臟跳動速率變慢，接著二號心臟心跳也跟著減緩，發現帶有神經的心臟受刺激後會釋放化學物質，此化學分子影響另一顆去除神經的心臟使該心臟心跳受刺激，確定神經細胞會釋放物質傳遞訊息，並命名此物質為 Vagusstoff，透過化學性質的比對，即是現今神經傳導物乙醯膽鹼[6]，開啟了人們研究神經傳導物之路。

生物感測器檢測技術在 21 世紀蓬勃發展，應用廣泛領域包含藥物開發、蛋白交互作用、生物分子代謝偵測等。有別於傳統分析儀器，生物感測器有著高度特異性、高靈敏度、高選擇性及即時輸出(real-time output)特性。生物感測常用於偵測與治療阿茲海默症(Alzheimer's disease)[29]、帕金森氏症(Parkinson's disease)[30]、癲癇[31]等精神疾病，其電子系統即時偵測功能對於研究神經學是一強而有力的工具。檢測神經傳導體廣泛使用微透析分析技術 (microdialysis)，此技術使用類似人工血管方式，以不影響生物體方式取樣體內小分子溶液，直接連接高效液相層析分析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 線上濃縮與分離分析物，最終送入質譜儀 (MS) 檢測出目標物 [32]。研究實例如研究人類大腦清醒與睡眠之間腺苷 (adenosine)濃度的調節，證明睡眠能提升腺苷在大腦細胞外濃度[33]，以及透過微透析分析技術發現谷氨酸 (glutamate)在缺血期間會釋放成毒性階段，導致腦損傷與中風。而快速掃描循環伏安法 (Fast scan cyclic voltammetry, FSCV)為目前偵測神經傳導物最常見的技術，可快速檢測大腦鄰近電位隨時間變化造成電流的改變，進而追

蹤多巴胺、腎上腺素、血清素等神經傳導物[34]，但面對不帶電神經傳導物與相似的氧化還原電位分子，仍無法全面檢測體內神經傳導物。在生物感測探針廣泛使用以碳為基材的探針或聚合物分子，另外生物感測探針材料如適體 (aptamer) 與酵素，有專一性針對目標物的特性[35]。

至今科學界對神經傳導研究發展緩慢，主要原因歸咎於分析技術的瓶頸，目前定量神經傳導物主要檢測器為微電極測量、生物感測器和毛細管電泳(CE)，但這些儀器所能測得樣品條件有限，分析樣品必須要有適當的大小、樣品成分單純、低選擇性測量和空間分辨率以及電活性 [36]，質譜儀相對於傳統測量儀器有著最佳的靈敏度、選擇性與訊噪比，解決先前無法偵測低濃度與小分子量神經傳導物困境 [37]。以檢測混合神經傳導物樣品為例，只有少部分神經傳導物能透過電極上的氧化還原活性來檢測，如遇到高程度電活性物質抗壞血酸或電極結垢的干擾，微電極檢測方法將無法解決，目前檢測神經傳導技術極少能提供複雜樣品分析，誘發科學界將質譜儀用於分析神經傳導物，質譜儀在檢測上有許多優點，除了能精確測量物質質荷比(mass-to-charge ratio, m/z)，因其高靈敏度分析樣品量只需要 10-20 μL ，且能透過 MS/MS 絕對定性手性差異物質，透過高效液相層析分析儀 (HPLC) 的輔助更能提供比電滲流(Electroosmotic Flow, EOF)更穩定的表面化學性質以此分離樣品中混合物，質譜儀可以定義為最全面鑑定神經傳導物儀器，因此質譜儀在近 10 年內被廣泛應用在神經傳導學。2015 年，文獻指出已能建立一套自動化固相萃取液相層析質譜分析平台，分析血液中神經傳導物及神經胜肽，包含 γ -aminobutyric acid、phenethylamine、dopamine、serotonin、adrenaline、tryptophan、oxytocin、vasopressin[38]。2016 年，Oscar J. Pozo 研究團隊透過液相層析串聯式質譜儀 (liquid chromatograph tandem mass spectrometer)，掌握人體體液中以 tryptophan、tyrosine 胺基酸為主的神經傳導代謝鏈，其中最具代表性的有 kynurenine pathway、血清素、多巴胺等代謝鏈，這些神經傳導物的恆定攸關於亨丁頓舞蹈症、帕金森氏症等神經疾病，最終實

驗成功測定出布倫納綜合症(Brunner syndrome)患者異常的神經傳導物 5-hydroxytryptamine、5-hydroxyindoleacetic acid 與 tryptophan[39]。

神經傳導物質調節釋放，控制著大腦正常運作，反之喪失神經傳導物質平衡，不僅嚴重影響生理、心理健康，更是造成阿茲海默症、帕金森氏症、亨丁頓舞蹈症等疾病開端。目前已知神經傳導物約有 50 種，而其中以 acetylcholine、GABA、epinephrine、norepinephrine、dopamine、glutamate、serotonin 視為重要的神經傳導物，因此測定這些神經傳導物更能研究及提早治療疾病發生。

1901 年，日本科學家高峰讓吉，透過在腎上腺體滴加少量的弱酸或弱鹼，並在水浴中緩慢加熱，於表玻璃觀察微小晶體，最後利用真空汽化與 Vulpian reaction 確認腎上腺素晶體的存在，成功純化腎上腺並完成世界最初的腎上腺素結晶化[40,41]。1906 年，腎上腺素首先由 Hoechst 在實驗室合成製備[42]。

1910 年， γ -aminobutyric acid (GABA) 已被證實存在於生物組織中，但直到 40 年後才證實於中樞神經系統中存在，1950 年之後，當在哺乳動物大腦中正確鑑定出游離胺基酸時，科學家才產生對其潛在神經化學意義的興趣，直至 1967 年 Krnjevic & Schwartz 使用電流檢測器實驗 GABA 對大腦新皮質神經元膜電位和抑制的作用，GABA 才被確定為哺乳動物中樞神經系統中重要的抑制性神經遞質[43]。

1935 年 Krebs 研究表明谷氨酸能在大腦中代謝，而後 1961 年 Berl 與 Waelsch 首先注意到腦內谷氨酸代謝路徑，發現谷氨酸改善癲癇和精神發育遲緩等神經疾病，而後 1950 年 Weil-Malherbe 指出谷氨酸在腦內可減緩 ibotenic 酸和 N-甲基亞硝酸對中樞神經系統神經元的毒性作用，1961 年 Curtis 與 Watkins 電生理學研究早期關注谷氨酸對脊髓神經元的興奮作用，而後證實谷氨酸符合神經傳導物定義標準。

1936 年，Henry Dale 和 Otto Loewi 得到諾貝爾獎後，分享了他們在化學神經傳遞方面的開創性研究，Dale 認為乙酰膽鹼具有強烈的血管抑制作用[44]，Otto Loewi 在青蛙心臟實驗中，將兩顆青蛙心臟至於連通溶液中，其中一號心臟與其迷走神經放置，當施以電流刺激迷走神經時一號心臟跳動速率變慢，接著二號心臟心跳也跟

著減緩，發現帶有神經的心臟受刺激後會釋放化學物質，此化學分子影響另一顆去除神經的心臟使該心臟心跳受刺激，確定神經細胞會釋放物質傳遞訊息，並命名此物質為 Vagusstoff，透過實驗將迷走神經物質與水性心臟萃取物接觸時會失去作用，證實心臟迷走神經傳導物即為乙酰膽鹼[45, 46]。

1946 年，Ulf von Euler 發表了關於分離和鑑定去甲腎上腺素作為交感神經系統神經遞質的研究。Ulf von Euler 與 J. H. Gaddum 在大腦滲透液發現含有抗 Atropine 的物質，Ulf von Euler 將其命名為前列腺素，生物化學家 Sune Bergstrom 進一步進行化學分析後，定義前列腺素為不飽和、脂溶性、無氮有機酸，Ulf von Euler 認為前列腺素不是單一物質，而是一系列具有生物活性的化合物，並發現此液體會使腸道收縮並降低麻醉兔子的血壓，思索著升高與降低血壓的生化機制，想到在 1910 年 Barger 與 Dale 認為未甲基化的腎上腺素能刺激交感神經，證明有活性的物質確實是去甲腎上腺素，因此他提出此物質是交感神經傳導物，並命名為 novadrenine 即現今去甲腎上腺素，最終 Ulf von Euler、Julius Axelrod、Bernard Katz 三人於 1970 年獲得諾貝爾生理學或醫學獎[47]。

1957 年，Arvid Carlsson 認為利血平藥物耗盡大腦多巴胺，導致多重副作用，想透過增加左旋多巴恢復多巴胺缺失，Carlsson 開發了一種靈敏的螢光測量技術來測量多巴胺水平，並測定出動物腦中多巴胺的分佈在紋狀體中最高，Carlsson 假設多巴胺在運動功能中發揮重要作用，視多巴胺為腦內神經傳導物的想法遭受許多懷疑，但他堅持並繼續研究腦多巴胺，最終證實多巴胺在大腦中傳導的重要地位與發現左旋多巴胺可以減輕利血平藥物對動物的抑鬱症，並於 2000 年獲得諾貝爾醫學獎[48]。

2.1.2. 質譜儀檢測神經傳導物技術進程

1990 年利用高液相層析儀分離樣品，以氧化還原庫倫電化學檢測法分析單胺與腦髓液中神經傳導物，可精確定量 3 pg 至 5 pg，定性方式以標準品辨認峰比對，但分析時間

過長，分析 30 個樣品需耗時 24 小時。直到質譜儀的出現，科學家選擇更優異的儀器分析神經傳導物，氣相色譜質譜的普及應用在分析化學，1996 年使用當時最高端的氣相質譜儀研究哺乳動物組織中丁胺的生理機制，定量方式使用內部標準品添加於生物樣品，質譜儀檢測極限達 25 fmole，但生物樣品萃取製備需經過衍生化使檢測極限下修為 15 pmole，且衍生化需配合樣品特性篩選，因此後期選用固相萃取與液相萃取製備樣品再經氣相質譜儀分析樣品，其中固相萃取能有效分離腦萃取物中非共軛與硫酸化類固醇，使得檢測極限可到達 1 pg，近期氣相色譜質譜儀檢測方法開發完全，大多應用在精神疾病的提早徵狀發現，例如檢測兒童尿液中代謝物分析，統計出自閉症障礙疾病兒童尿液代謝物異於健康兒童的含量，但氣相色譜質譜仍受限於小分子分析物。1999 年首次利用另一種操作簡易且能快速分析大分子神經肽的雷射脫附離子化後離子源衰減質譜儀 (MALDI-PSD, matrix assisted laser desorption/ionization - post source decay)，對神經肽進行序列測定，並成功鑑定出質量 1392.7 u 的血管加壓素神經肽，並能透過後離子衰減裂解模式解讀各肽片段物質。

2000 年液相層析質譜儀問世後，使用液相層析質譜儀分析神經傳導物更蓬勃發展，在小分子檢測方面應用包括神經傳導物方面的兒茶酚胺類代謝物腎上腺素、正腎上腺素、多巴胺等，神經傳導物樣品製備也發展出固相萃取、凍乾濃縮樣品、過濾法等技術，質譜儀定性神經傳導物方法衍生出快速且方便的質譜二次裂解法，質譜儀收集相同分子量物質後，給予一碰撞能量將其裂解，不同的化合物裂解性質會不相同，因此擁有獨特的裂解片段可供辨認，定量方面大多數使用內部標準品校正，也有人使用乙醚標定神經傳導物與螢光檢測高效液相色譜分析使定量線性極限可達 2×10^4 nM，在質譜儀研究開發上也創新了使用高效能毛細管電泳質譜串聯系統與螢光檢測質譜儀，使質譜儀檢測神經傳導物系統健全。

隨著使用質譜儀偵測神經傳導物方法健全，科學家更著重於分析平台的快速、簡單及多種類物質鑑定，2006 年一篇文獻指出可利用液相層析串聯式質譜儀 LC/ESI-MS/MS 方法，使用多個反應監測 (MRM) 和中性損耗 (NL) 收集模式，開發篩選定性測定生物神經

傳導物最重要的家族 tyrosine、tryptophan 及 glutamic 代謝鏈中的 23 個相關代謝物，包括 Tryptophan (Trp)、5-hydroxy-DL-tryptophan (5-HTP)、5-hydroxytryptamine hydrochloride (5-HT)、5-hydroxyindole-3-acetic acid (HIAA)、 γ -aminobutyric acid (GABA)、DL-tyrosine(Tyr)、dopamine hydrochloride (DA)、norepinephrine hydrochloride (NE)、epinephrine(E)、3-methoxytyramine hydrochloride(3-MT)、3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)、homovanillic acid (HVA)、vanillomandelic acid (VMA)、glutamic acid (Glu)、succinic acid (SA)等物質，此分析法只需微量生物液體直接注入儀器分析，給予神經傳導物質所引起的疾病病患即時的診斷與治療[49]。

2.1.3 神經傳導物對分化的影響

哺乳動物中樞神經系統(CNS)在損傷後幾乎沒有自我修復的能力，因此目前研究結合神經幹細胞和祖細胞以治療受損神經的醫學方法，然而神經分化的過程就顯得十分重要，神經細胞分化過程的途徑，可由神經傳導物直接調節如增殖、分化、存活，目前研究聚焦於哺乳動物大腦主要神經源性區域，前腦側腦室的腦室下區(subventricular zone, SVZ)和海馬齒狀回(dentate gyrus, DG)的顆粒下區(subgranular zone, SGZ)[50]，探討神經傳導物如何影響未分化細胞的分化。

從中腦到新紋狀體和伏隔核的多巴胺能運作的位置與成人腦中最活躍的神經發生區域前側腦室的腦室下區重疊，多巴胺可能有助於調節成人神經發生的腦室下區位，研究使用小鼠帕金森氏症的 6-羥基多巴胺模型，破壞黑質和腹側被蓋區域中多巴胺能神經元，結果使前側腦室下區增殖神經前體的數量減少約 40%，證明多巴胺能對神經前體增殖的影響[51]。另一項研究中透過增加損傷腦中的多巴胺受體信號來挽救增殖減少，並且多巴胺 D₂ 受體激動劑的施用足以增加小鼠祖細胞的增殖[52]。多巴胺對神經影響目的不僅是增殖，可能對神經幹細胞和放大細胞產生相反的作用，多巴胺信號傳導可能抑制幹細胞增殖，但同時促進瞬時擴增細胞的增殖。

血清素除了作為神經傳導物具有抗抑鬱的作用外，血清素也被認為是發育調節信號，胚胎血清素的消耗會延遲血清素靶區域中神經發生發展，血清素會促進皮質和海馬神經元的分化[53]。抗抑鬱藥物中血清素再攝取抑制劑的 Fluoxetine，其細胞靶標會增加早期祖細胞類的對稱分裂並誘導新神經元的增加[54]。5-HT 受體信號傳導的急性和慢性藥理學操作均影響 SVZ 和 SGZ 中成體神經祖細胞的增殖，如 5-HT_{2C} 受體的激活使 SVZ 產生 56% 的增加，而 5-HT_{2A} 受體的阻斷使海馬齒狀回顆粒層中增殖細胞的數量減少 63%[55]。

去甲腎上腺素的消耗會減少增殖，但不影響成年大鼠海馬中顆粒細胞祖細胞的存活和分化[56]。祖細胞對去甲腎上腺素信號傳導的不同反應，取決於它們在腦中的位置，如 SGZ 與 SVZ 中祖細胞之間的固有差異，或者環境差異決定了對去甲腎上腺素信號傳導的反應性，但目前尚未廣泛研究成年大腦中去甲腎上腺素能控制祖細胞 (progenitors) 增殖的下游機制。

成人腦中膽鹼能神經元的消耗會導致 SGZ 中細胞的增殖減少以及空間記憶受損[57]。使用藥理學操作乙酰膽鹼介導的信號傳導 10 天的研究表明，毒蕈鹼 M1 受體的激活導致 SGZ 的增殖增加，而菸鹼受體的激活具有相反的作用[58]。

GABA 是成年脊椎動物大腦中的主要抑制性神經遞質，主要由中間神經元釋放，但也由星形膠質細胞釋放[59]，在成年 SVZ 中，GABA_A 受體的激活介導 GABA 對該區域中細胞週期的抑製作用，並在 GABA 介導的胚胎幹細胞增殖控制中觀察到相同的機制[60]，證明 GABA 在發育和成體神經發生過程中對神經祖細胞和未成熟神經元具有去極化作用。

2.2 實驗材料與方法

2.2.1 藥品/材料

Acetylcholine, (S)-2-amino-3-hydroxypropionic acid (L-serine), dopamine hydrochloride (DA), dopamine-d₄ (DA-d₄), 3,4-dihydroxy- α -(methylaminomethyl)benzyl alcohol

(epinephrine), γ -aminobutyric acid (GABA), glutamic acid-d₅ (Glu-d₅), histamine (HA), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (HIAA), 5-hydroxytryptamine hydrochloride (serotonin, 5-HT) , poly-L-lysine, L-tyrosine, melatonin, norepinephrine hydrochloride (NE) , norepinephrine-d₆ (NE-d₆) and nerve growth factor (NGF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Adenosine-2-d₁ was purchased from CDN Isotopes (Vaudreuil, Quebec, Canada). Levodopa was purchased from U.S. Pharmacopeia. Prostaglandin E₂ (PGE₂) was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). PC12 cells (rat adrenal medulla pheochromocytoma) cells were purchased from ATCC (CRL-1721) (Rockville, MD, USA). Rotenone was purchased from (Merck Millipore, Guyancourt, France)

2.2.2 儀器

UHPLC 使用(Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000, Dionex, Idstein, Germany)系統。ESI-Q-TOF (micrOTOF-Q III, Bruker Company, Germany)。

2.3 神經傳導物質譜儀鑑定平台

2.3.1 神經傳導物萃取

細胞萃取部分，萃取前將保存於-80°C 細胞樣品於冰上退冰，加入 300 μ L 0.3% Formic Acid 去離子水與 400 ng 氘化神經傳導物標準品，於冰上超音波震盪 60% Amp 10 秒，破細胞後於 4°C 下離心 15000 rpm 十分鐘，吸取上清液 250 μ L 至新微量離心管再次於 4°C 下離心 15000 rpm 十分鐘，最後取上清液 200 μ L 至 10 k 分子篩於 4°C 下離心 14000 xg 五分鐘，完成後將下層濾液轉移至小內管，完成進樣質譜儀前製備。

細胞培養液萃取部分，萃取前將保存於-80°C 細胞樣品於冰上退冰，吸取培養液 200 μ L 於微量離心管並添加 0.3% Formic Acid 酸化樣品，於 4°C 下離心 15000 rpm 十分鐘，吸取上清液 30 μ L 至新微量離心管使用含有 0.3% Formic Acid 去離子水稀釋十倍，最後

添加 400 ng 氘化神經傳導物標準品於溶液中，轉移樣品溶液 310 μL 至 10 k 分子篩於 4°C 下離心 14000 $\times g$ 五分鐘，完成後將下層濾液轉移至小內管，完成進樣質譜儀前製備。

2.3.2 儀器分析

超高液相層析儀 (UHPLC) 分析，每個樣品吸取 20 μL 樣品量於層析管柱 Acclaim RSLC120 C18(150mm \times 2.1mm, 填充顆粒 2.2 μm)，管柱於 30°C 下分析樣品。使用的移動相 A 為含有 0.3% formic acid 去離子水，移動相 B 為含有 0.3% formic acid 乙腈，移動相濃度梯度使用 0.075 ml/min 流速下，A 液維持 100% 四分鐘，接著在五分鐘內從 100% - 90%，再由 90% - 0% 於六分鐘內，最後維持 0% 七分鐘，在五分鐘內升回 0% - 100% 並維持 100% 13 分鐘，完成分析神經傳導物高液相層析濃度梯度架設。

電噴灑離子化 (ESI) 參數選擇上使用流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 條件，電流 500 nA，電壓 3500 V，氮氣壓力 1 bar (15 psi)，氮氣流速 9 L/min，溫度為 200 °C，氮氣霧化針尖長度為 0.25 mm。

四極柱暨飛行時間質譜儀 (Q-TOF)，因需要精準的質量分析，每兩個禮拜需使用 tunemix electrospray calibrant solution 校正液校正質譜儀使比對分數大於 90 分，偵測參數為低分子量條件，使用正電模式測定樣品，質量範圍選擇 80-300 m/z。另外，質譜儀於多重反應監測掃描模式 (MRM, multi reaction monitoring) 下裂解目標質量物質，MRM 參數依照不同物質有不同條件，神經傳導物分析區間分為三區間，第一區間 0-14 分鐘為質譜二次裂解模式 (MS/MS) 共有十個分子量輪流裂解收取，第二區間 15-25 分鐘為質譜二次裂解模式 (MS/MS) 共有十二個分子量輪替裂解收取，第三區間為 25-40 分鐘進行 MS 確認質譜背景值符合下一樣品偵測。

2.3.3 定量分析方法

生物樣品定量分析方式透過內部標準品的添加，於質譜儀分析後，Glutamate、Dopamine、Norepinephrine、Adenosine 四種神經傳導物質的絕對定量比對氘化標準品面積等比例換算，而得絕對定量濃度(公式一)。計算細胞內神經傳導物含量方式，透過質

譜鑑定出的原始訊號面積除以細胞數後，再除以控制組的平均面積得到相對含量，最後以百分比呈現相對定量結果(公式二)。計算細胞外神經傳導物濃度變化，透過質譜鑑定出的原始訊號面積除以控制組的平均面積得到相對含量，最後以百分比呈現相對濃度變化含量結果(公式三)。

Equation 1:

$$\frac{AIS}{ANT} = \frac{CIS}{CNT}$$

(AIS 為內部標準品質譜訊號面積，ANT 為神經傳導物質譜訊號面積，CIS 為內部標準品莫耳濃度，CNT 為神經傳導物莫耳濃度， \bar{A}_{ctrl} 為控制組於質譜訊號面積平均值。)

Equation 2 :

$$\frac{\text{Area NT}}{\text{cell number}} \div \frac{\text{Area average ctrl}}{\text{ctrl cell number}} \times 100\% = \text{NT relative quantification}$$

Equation 3 :

$$\frac{\text{Area NT}}{\text{NT 20 } \mu\text{L media}} \div \frac{\text{Area average ctrl}}{\text{ctrl 20 } \mu\text{L media}} \times 100\% = \text{NT relative quantification}$$

2.3.4 數據統計分析方法

實驗時間與數據資料符合迴歸分析的基本統計假設，因此使用迴歸統計分析方法運算，使用運算後 T 檢定值做為評估趨勢判斷，迴歸分析統計檢定標示法為* $t > 1.96$ ；** $t > 2.58$ ；*** $t > 3.29$ 。

學生 T 檢定(Student's t-test)用於比較小樣本的兩個平均值差異程度的檢驗方法，用此分佈理論推斷差異發生的機率，從而判定兩個平均數的差異是否顯著，在此篇論文皆使用單尾分配原則計算，學生 T 檢定統計檢定標示法為* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。

2.4 結果

2.4.1 小分子代謝物分析平台

因 q-tof 質譜儀有精準質量的優勢，利用此特性尋找生物代謝類小分子物質，判別方式為從生物樣品中選擇訊號優且質量符合 Human Metabolome Database (HMDB) 資料庫中代謝物質譜資訊的物質，以此判定物質外透過理論質量與實際質量相比得質譜儀誤差值，如表一所示，共可建檔 51 種物質，物質質譜儀中訊號高者，可使用質譜儀二次碰撞裂解法偵測，得訊號辨認峰資訊與準確滯留時間。

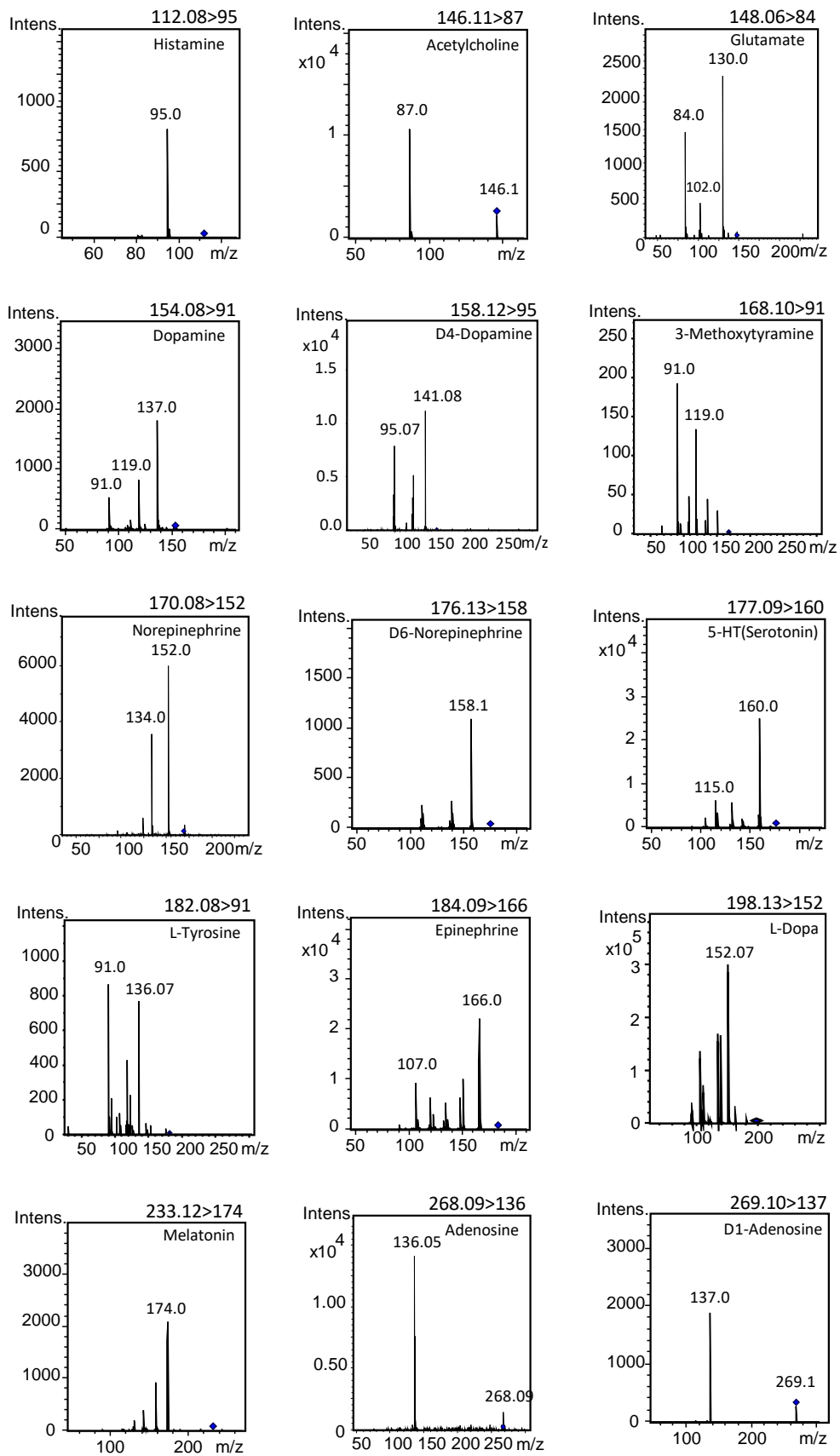
表一、精準質量小分子物質鑑定。

No.	Metabolites	Observed mass (m/z)	Theoretical mass (m/z)	Error (ppm)	MRM RT(min)
1	glycine	76.0448	76.03985	65.1	
2	alanine	90.053	90.0555	-27.8	
3	GABA	104.0737	104.07115	24.5	3.2-4.8
4	choline	104.1051	104.10754	-23.4	
5	serine	106.0496	106.05042	-7.7	
6	histamine	112.0877	112.0796473	71.8	3.7-4.8
7	L-pyrroline-5-carboxylic acid	114.0544	114.0555	-9.6	
8	proline	116.0708	116.07115	-3.0	
9	L-valine	118.0857	118.0868	-9.3	
10	threonine	120.0661	120.06607	0.2	none
11	L-cysteine	120.986	121.0197492	-278.9	
12	5-oxo-proline	130.05	130.05042	-3.2	12.2-12.9
13	L-isoleucine	131.0886	131.0946287	-46.0	
14	leucine	132.1016	132.10245	-6.4	15-17.1
15	aspartic acid	134.0446	134.04533	-5.4	4.7-5.3
16	tyramine	138.0547	138.084064	-212.7	19.7-20.1
17	2-propyl-2,4-pentadienoic acid	141.0848	141.09156	-47.9	10-10.9
18	L-lysine	146.1368	146.1055277	214.0	
19	acetylcholine	146.1182	146.1181	0.7	5.9-9.0
20	glutamine	147.0758	147.07697	-8.0	
21	glutamate	148.0601	148.06098	-5.9	4.7-5.9

22	D5-glutamate	153.0905	153.104305	-90.2	4.7-5.9
23	dopamine	154.0854	154.0868	-9.1	9.4-12.0
24	L-histidine	156.0733	156.0773	-25.6	
25	D4-dopamine	158.1106	158.12146	-68.7	9.4-12.1
26	succinylacetone	159.0619	159.06573	-24.1	none
27	2-amino-4-methylenepentanedioic acid	160.0761	160.06098	94.5	none
28	3-methyldioxyindole	164.068	164.07115	-19.2	
29	phenylalanine	166.0864	166.0868	-2.4	19.4-20.3
30	3-methoxytyramine	168.1002	168.10245	-13.4	17.7-19.0
31	norepinephrine	170.0794	170.08172	-13.6	4.8-5.6
32	L-arginine	174.11	174.1116757	-9.6	
33	suberic acid	175.0929	175.09704	-23.6	5.2-5.9
34	D6-norepinephrine	176.1172	176.13371	-93.7	4.8-5.6
35	n-carboxyethyl-g-aminobutyric acid	176.0899	176.09228	-13.5	
36	serotonin	177.101	177.094963	34.1	18.1-19.0
37	adrenochrome	180.0709	180.06607	26.8	21.3-21.8
38	tyrosine	182.0793	182.08172	-13.3	16.1-17.0
39	epinephrine	184.0955	184.09737	-10.2	5.9-8.0
40	L-dopa	198.0767	198.0688078	39.8	12.6-15.0
41	L-acetylcarnitine	204.1196	204.12358	-19.5	
42	tryptophan	205.0823	205.0898776	-36.9	20.5-21.2
43	n-acetylgalactosamine	222.0943	222.09776	-15.6	
44	4,5-dihydrovomifoliol	227.1605	227.16472	-18.6	none
45	suberylglycine	232.1176	232.1185	-3.9	
46	butyrylcarnitine	232.1681	232.15448	58.7	none
47	melatonin	233.1259	233.1211778	20.3	22.1-23.5
48	hexanoylcarnitine	260.1906	260.18618	17.0	none
49	adenosine	268.0993	268.0967539	9.5	16.5-17.3
50	D1-adenosine	269.1057	269.1054189	1.0	16.5-17.3
51	hydroxyhexanoycarnitine	276.1905	276.1811	34.0	none

2.4.2 神經傳導物鑑定平台

將表一中小分子清單裡的神經傳導物質另外分析，鑑定方式先使用購買的各式神經傳導物標準品與氘化標準品，測試各物質在二次裂解碰撞室的適合碰撞能量，能量如果太低會導致物質無法碎裂，能量太高物質會碎裂成許多質譜無法辨認的小分子，因此須優先測試。選擇適合碰撞能量後，由標準品質譜儀二次裂解圖譜中的質量可知物質的裂解位置，了解各物質在質譜裂解室的碎片小分子有助於定性，在裂解的小分子中大部分選擇訊號高的物質作為辨認峰，有助於定性與定量的穩定度，而部分兒茶酚胺(catecholamine)物質因隸屬相同代謝鏈因而有相同的苯酚(phenol)裂解分子，選擇 91 m/z 的苯酚做為辨認峰在相似結構物質上能精準定量(圖一)，例如多巴胺定性方法為使用置換四個氘的多巴胺標準品與生物樣品混和後，在相同高壓液相層析儀條件下會在 10 分鐘出現，而進質譜儀分析，會先看到 154.08 m/z 與 158.11 m/z 訊號峰，再經質譜儀二次裂解室給予 25 eV 的能量，154.08 m/z 裂解出 137.0 m/z、119.0 m/z、91.0 m/z，158.11 m/z 裂解出 141.08 m/z、123.08 m/z、95.07 m/z，兩者皆差距 4 m/z 為四個氘原子質荷比，可定性出多巴胺於質譜儀訊號峰，而定量方面，因質譜二次裂解法有效分離相同原始質荷比物質，選定多巴胺裂解辨認峰 91 m/z 後，積分 91 m/z 訊號峰面積做為定量計算依據。統整各神經傳導物與氘化標準品在質譜儀中的質荷比、二次裂解辨認峰、滯留時間、碰撞能量，共鑑定 20 個物質於神經傳導物分析平台(表二)。



圖二、各標準品於質譜儀二次裂解室中碎裂狀態。

神經傳導物標準品於質譜儀二次裂解下圖譜，各圖右上方數字代表此物質於質譜儀中原始質荷比，接續為選擇作為定性定量的質譜儀二次裂解辨認峰質荷比。

表二、質譜儀二次裂解法神經傳導物鑑定。

No.	Observed Mass m/z	Identified Mass m/z	Neurotransmitter	Retention Time(min)	Section (min)	Collision (eV)
1	104.07	87	γ -Aminobutyric acid	4.0-4.8	I (0-14)	30
2	112.08	95	Histamine	3.7-4.8	I (0-14)	30
3	146.11	87	Acetylcholine	5.9-9.0	I (0-14)	20
4	148.06	84	Glutamate	4.7-5.9	I (0-14)	25
5	153.09	88	Glutamate-D5	4.7-5.9	I (0-14)	25
6	154.08	91	Dopamine	9.4-12.0	I (0-14)	25
7	158.11	95	Dopamine-D4	9.4-12.0	I (0-14)	25
8	170.08	152	Norepinephrine	4.8-5.6	I (0-14)	25
9	176.11	158	Norepinephrine-D6	4.8-5.6	I (0-14)	25
10	184.09	166	Epinephrine	5.9-8.0	I (0-14)	25
11	138.05	121	Tyramine	19.7-20.1	II (15-25)	30
12	166.08	120	Phenylalanine	19.4-20.3	II (15-25)	25
13	168.10	91	3-Methoxytyramine	17.7-18.7	II (15-25)	30
14	177.09	160	Serotonin	18.1-19.0	II (15-25)	25
15	182.08	91	Tyrosine	16.1-17.0	II (15-25)	30
16	192.05	146	5-Hydroxyindoleacetic acid	21.3-21.9	II (15-25)	30
17	198.13	152	L-dopa	12.6-15.0	II (15-25)	30
18	205.08	188	Tryptophan	20.6-21.0	II (15-25)	30
19	233.12	174	Melatonin	22.1-23.5	II (15-25)	30
20	268.09	136	Adenosine	16.5-17.3	II (15-25)	20
21	269.10	137	Adenosine-D1	16.5-17.3	II (15-25)	20

第三章 PC12 細胞分化改變

3.1 前言

3.1.1 神經傳導物調控幹細胞關係

神經細胞除了存在於發育的哺乳動物中也存在哺乳類成體動物神經系統，以人類為例，在成人腦神經幹細胞分化為功能性神經細胞的調控指向神經的損傷與再生，幹細胞在修復過程中目標為移植修復損傷的神經細胞與激活內源細胞自我修復[61]，目前科學界對於成體的幹細胞增生及分化遷移的研究甚少。2002 年有研究針對胚胎幹細胞分化成多巴胺神經元後，移植至大鼠損傷的腦部紋狀體，成功存活並起作用，但是在齧齒動物和靈長類動物系統中需要進一步研究以解決這些細胞的長期安全性和功效，最終目標是應用胚胎幹細胞治療神經和精神疾病[62]。

現今分化神經幹細胞方式多使用蛋白調控分化訊號，如 High-mobility group AT-hook 2(HMGA2)是一轉錄因子，透過改變染色質結構增強轉錄因子作用達到分化，Hmga2 作用機制為抑制 p16^{Ink4a} 和 p19^{Arf} 促進神經幹細胞(NSCs)的自我更新，Hmga2 的過表達會提高造血幹細胞的自我更新活性與減緩間質幹細胞衰老過程，因此 Hmga2 在胎兒神經幹細胞中也高度表達，但隨著年齡的增長其表達量逐漸下降，此外，HMGA2 對於神經前體細胞(NPCs)在早期發育階段的開放染色質狀態非常重要，並有助於後期的 NPC 成為具有早期階段特異性能力的細胞[63]。另一常見分化因子 SOX2(sex determining region Y-box 2)是維持未分化胚胎幹細胞自我更新或分化為多能性的轉錄因子蛋白，SOX2 可將誘導性神經幹細胞(Induced neural stem cells, iNSCs)分化。

在大腦中，透過神經傳導物傳遞的訊號主要與功能有關，然而，一些研究指出神經傳導物在中樞神經系統(CNS)中具有重大的意義。神經傳導物能決定幹細胞分化選擇的途徑，調控新功能神經元的形成，並與其他信號途徑相互作用[50]。在 2008 年文獻表明，GABA 神經傳導物在哺乳動物胚胎的發育過程中，GABA_A 受體的激活導致細胞過極化，

細胞體積增大，幹細胞在 S 期積累，從而導致細胞增殖迅速下降，達到控制幹細胞的增殖[64]。多巴胺通過影響側神經節隆起(lateral ganglionic eminence, LGE)的祖細胞週期而影響新紋狀體神經上皮前體，從而影響新紋狀體神經新生，此文獻顯示多巴胺新的發育作用，並強調多巴胺能信號在大腦發育中的相關性[65]。

綜觀以上研究，細胞週期和細胞分化的調控是神經傳導物古老的功能，它們可在分化過程中間接參與神經元間訊息傳遞，因此，神經傳導物的功能不僅在突觸中傳遞訊息，另一重要的功能是控制神經分化成完整功能的成熟神經元細胞。

3.1.2 神經細胞分化

神經細胞又稱神經元結構主要由細胞本體(cell body)、軸突(axon)、樹突(dendrites)組成。細胞本體是細胞核所在，並由此發出突起(processes)。軸突為一條單一細長的管狀突起，將細胞本體的神經訊息傳至末端的突觸(synapse)，在脊椎動物門中，神經元的軸突被髓鞘包裹，髓鞘的成分是許旺細胞(schwann cell)，相鄰的許旺細胞之間的裸露部分叫做蘭氏結(Ranvier's node)。神經軸突的生長發育是一個複雜的過程，幹細胞產生的多巴胺神經元顯示出中腦神經元的電生理和行為特性，並且與諸多神經疾病的起源密切相關[66]，所以是當前神經科學界的主要研究對象之一。樹突是一群由細胞本體發出的樹狀突起，樹突可與其他神經元的軸突連接，再整合這些突觸所接收到的信號[67]。

腎上腺嗜鉻細胞瘤(Pheochromocytoma cells, PC12)細胞在神經生物學研究中應用包括神經分泌學(neurosecretory studies)的研究。嗜鉻細胞來自大鼠、小鼠或牛等實驗動物，增加了數據的多樣性，PC12 細胞的優點有易於藥物操作、多功能性、易於培養、增殖和分化，因此 PC12 細胞在研究上常被用於模型細胞使用[68]。PC12 細胞系最初是在 1976 年 Greene 與 Tischler 從大鼠腎上腺髓質中的腫瘤中分離出來[69]，具有來自神經嵴的胚胎來源，也是成神經細胞和嗜酸性細胞的混合物，與腎上腺嗜鉻細胞一樣，PC12 細胞合成並儲存多巴胺與去甲腎上腺素，並以 Ca^{2+} 依賴性方式去極化後釋放，未分化 PC12 神經細胞可經由神經成長因子 (nerve growth factor, NGF) 誘導 TrkA 受體[70]作用進行分

化，並啟動 Raf/MEK/MAP 激酶反應[71, 72]與 PLCg/PKC 反應[73-75]，造成細胞產生抑制生長、神經細胞本體增大、神經突觸外生漸漸形成網絡等分化狀態，分化後 PC12 細胞，可以代謝(metabolism)、儲存(storage)、回收(uptake)及分泌兒茶酚胺類(catecholamine)神經傳導物質，其中包含多巴胺及正腎上腺素[76]，表現出成熟交感神經細胞特性，由於 PC12 細胞易於培養、增殖與分化，對藥理學上也有諸多研究功能性，使得 PC12 細胞被視為神經生物學和神經化學研究的有用模型系統。

腎上腺嗜鉻細胞瘤受神經生長因子調控分化後，細胞釋放神經傳導物關鍵在於高濃度 Ca^{2+} 及被過量的 Mg^{2+} 抑制，使腎上腺嗜鉻細胞瘤擁有表達交感神經元和腎上腺嗜鉻細胞特有的分化特性，文獻表示腎上腺嗜鉻細胞瘤能將大部分內生性兒茶酚胺儲存在囊泡中，且利用胞吐分泌機制釋放兒茶酚胺類物質[76]，因此腎上腺嗜鉻細胞瘤培養液常用於研究兒茶酚胺代謝的模型。

3.2 實驗材料與方法

3.2.1 藥品/材料

Nerve growth factor (NGF) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). RPMI media 1640, fetal Bovine Serum (FBS) and horse serum (HS) were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA).

3.2.2 神經細胞培養與分化

培養神經細胞(腎上腺嗜鉻細胞瘤，PC12)須事先處理盤面，以利神經細胞貼附。首先，配置 0.1 mg/ml 的 polylysine，取 800 μl polylysine 均勻平鋪在 6 cm 培養盤，開蓋風乾十分鐘後，以 1ml 滅菌水輕緩沖洗過多的 polylysine 並抽乾，開蓋照紫外光殺菌 24 小時，用石蠟膜封住開口並包裝在夾鏈袋再照紫外光 30 分鐘，保存於 4°C 冰箱。

配置細胞培養液，配置比例為佔全部體積的 85 % RPMI、10% HS(須先在 56 °C 水浴槽內加熱 30 min，每 10 分鐘上下搖晃)、5 % FBS、1% PS 混合均勻。

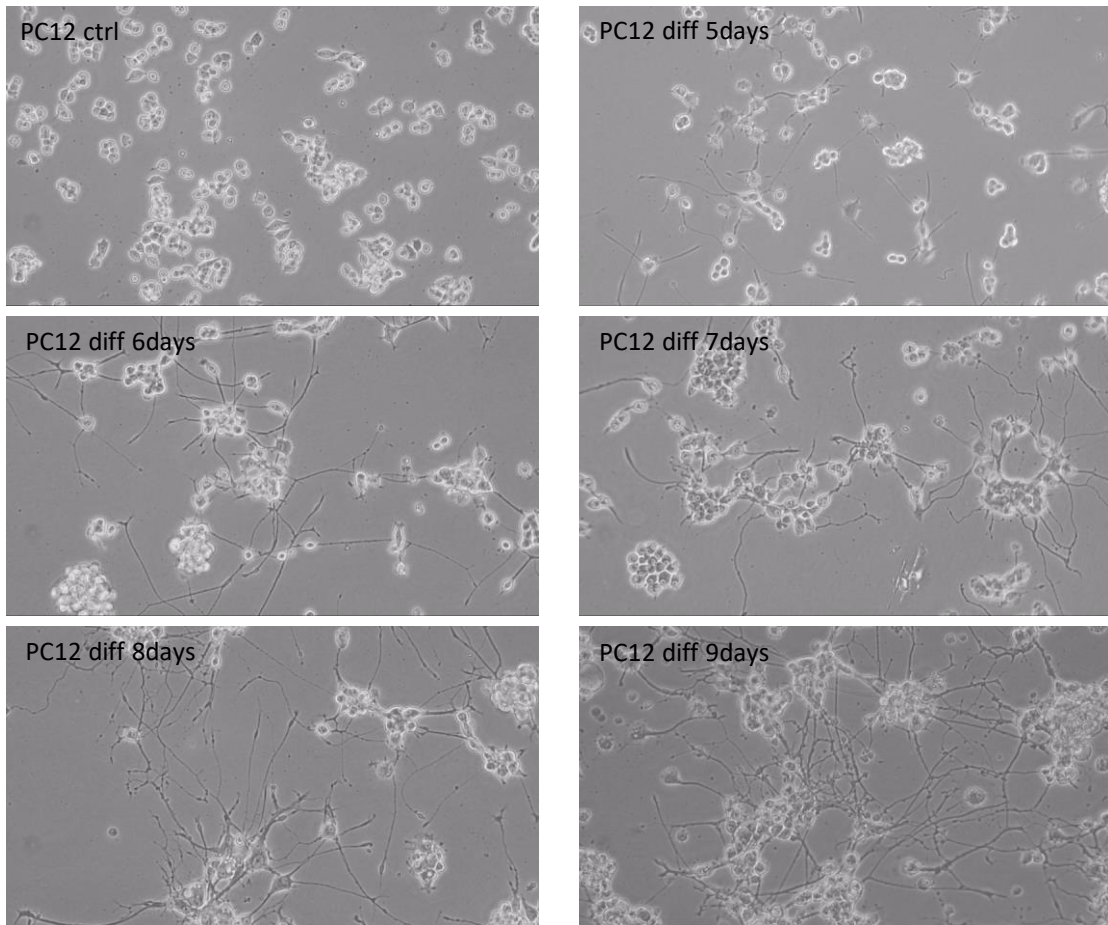
細胞培養前將 medium 在 37 °C 恆溫水槽中預熱 20 分鐘。將盤面細胞密度約 70% 的細胞培養皿置於無菌操作台，去除培養液，加入 2 ml medium 後，用 medium 從培養皿上將細胞沖下，並於離心管中將細胞沖散，最後取 1 ml 細胞溶液及 3.5 ml medium 至 6 cm 培養皿中，搖晃均勻，控制盤面細胞量在 30 %，並放置於 37 °C、5% CO₂ 培養箱中培養，約三天後滿盤。

神經細胞分化條件，配置分化低血清細胞培養液，配置比例為佔全部體積的 98 % RPMI、1% HS(須先在 56 °C 水浴槽內加熱 30 min)、1 % FBS、1% PS 混合均勻。操作細胞分化前將低血清培養液在 37 °C 恆溫水槽中預熱 20 分鐘，將盤面細胞密度約 70% 的細胞培養皿置於無菌操作台，去除培養液，加入 2 ml 低血清培養液後從培養皿上將細胞沖下，並於離心管中將細胞沖散，數細胞後取 1×10^6 個細胞置於 6 cm 培養盤，並用低血清補體積至 4 ml 及加入 4 μ L 100 ng/ml NGF。48 hr 後，更換低血清培養液加 4 μ L 100 ng/ml NGF，約七天神經細胞分化完全。

3.3 結果

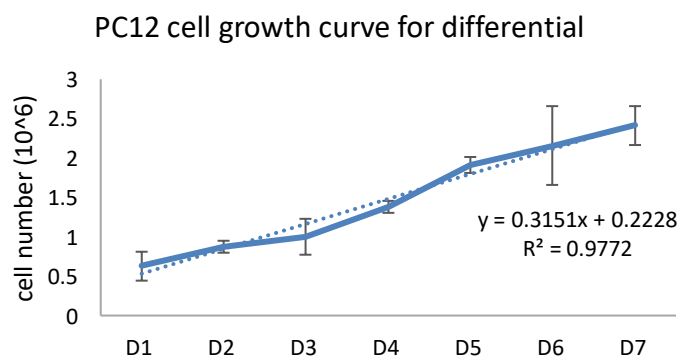
3.3.1 神經細胞分化

PC 12 神經細胞分化方式為了避免血清本身富有的生長因子與細胞激素干擾實驗，因此我們使用低血清培養與外部添加神經生長因子(NGF)刺激下分化神經細胞，觀察出正常繼代培養下的 PC 12 細胞型態成圓形且與新生的細胞成團聚集，然而受細胞分化調控的 PC 12 細胞型態，一天後發現細胞明顯降低複製生長速度，三天後細胞開始分化出具有交感神經元的特徵，細胞邊緣長出突觸且細胞核越趨明顯，培養七天後神經細胞大多形成具有完整交感神經元特徵的型態，不僅是突觸網絡的健全與細胞體的增大，其中神經元須具備的細胞體(cell body)、細胞核、軸突(axon)、樹突(dendrites)、蘭氏結(nodes of ranvier)特徵可透過細胞顯微照相技術觀察(圖三)。在分化過程因實驗條件需要，培養液中存在有 2% 血清，血清影響神經細胞緩慢生長(圖四)，PC12 細胞以每天 $y = 0.3151x + 0.2228$ 速率生長，以此分化進程作為之後實驗組比較模型。



圖三、腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤 PC12 從未分化狀態到分化九天細胞型態變化。

PC12 細胞培養於低濃度血清並添加神經生長因子，使未分化細胞有效分化成神經細胞，分化第七天時細胞具備神經細胞型態，此分化條件共可供應細胞分化九天。

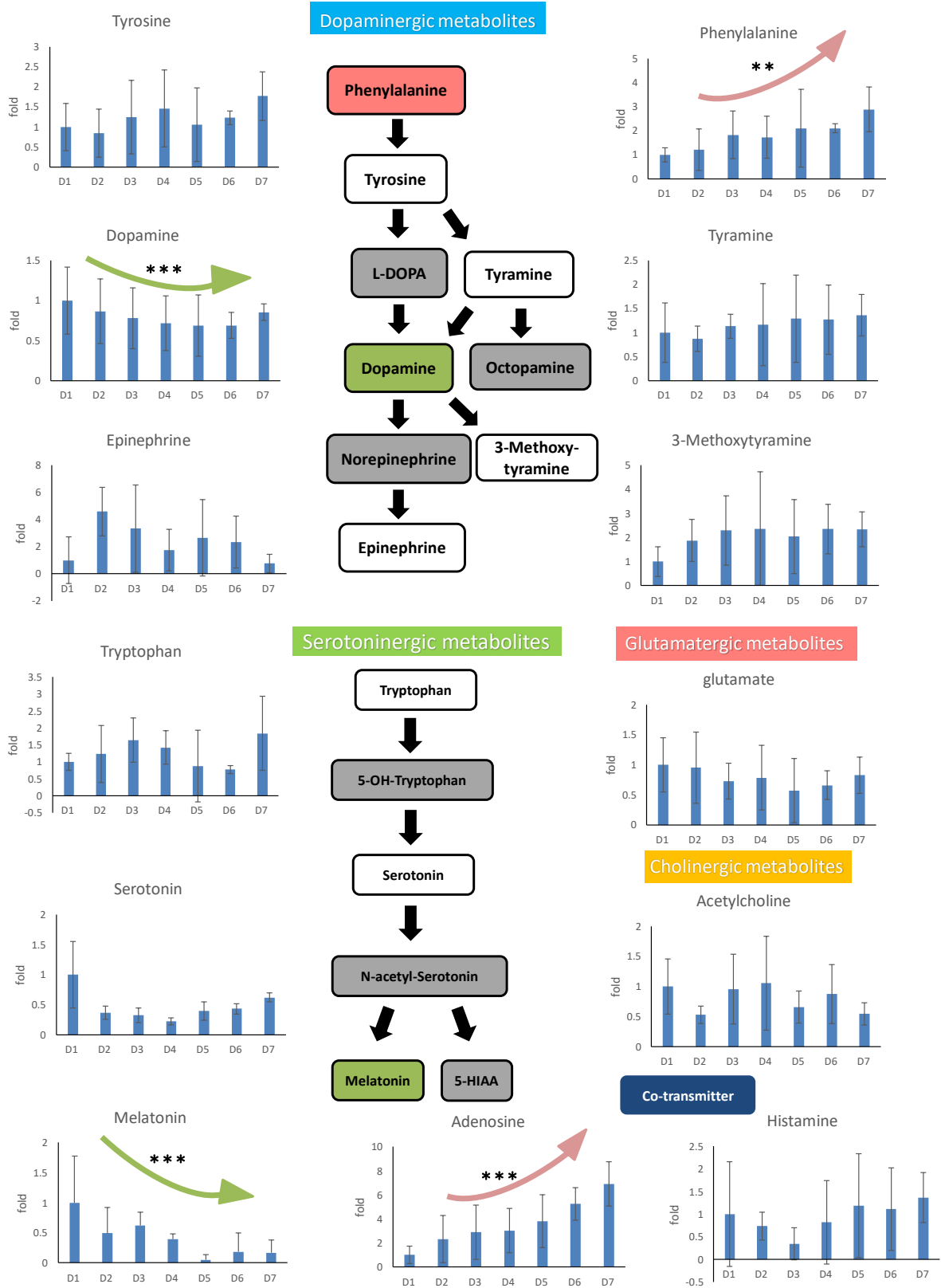


圖四、腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤 PC12 分化七天內細胞增生狀態。

神經細胞分化過程中，因培養液尚含有低濃度血清，因此會讓神經細胞在分化過程中緩慢生長。

3.3.2 質譜儀鑑定 PC12 細胞分化中細胞內神經傳導物變化

在 PC12 神經細胞內，未分化神經細胞可被偵測到 13 種神經傳導物，分別為 phenylalanine、tyrosine、tyramine、dopamine、3-methoxytyramine、epinephrine、tryptophan、serotonin、melatonin、glutamate、acetylcholine、adenosine、histamine，隨著分化時間的增長，神經傳導物種類無太大的變化，但在神經傳導物含量上有著明顯的趨勢變化(圖五)，透過迴歸分析計算後，在 Dopaminergic metabolites 路徑中視為提供營養來源的上游物質 phenylalanine、tyrosine、tyramine 隨著分化天數上升，phenylalanine 細胞內含量顯著上升 1.8 倍，tyrosine 與 tyramine 則有些微上升趨勢，因細胞分化過程更需原料的攝取，有趣的是中間產物 dopamine 含量在分化過程中呈現顯著下降 15%，因胞內多巴胺快速被代謝成 3-methoxytyramine，易受藥物而快速變化的 epinephrine 在分化初期有劇烈變化，隨分化時間增加趨於平緩，終端產物 3-methoxytyramine 在分化過程細胞內濃度維持恆定的表現。Serotonergic metabolites 路徑中可測得 tryptophan、serotonin、melatonin，功能性為提供營養來源的 tryptophan 在分化過程中細胞內濃度無明顯趨勢，而 serotonin 濃度在分化第二天開始顯著下降 64%，melatonin 細胞內濃度變化與分化天數經迴歸分析計算表現出顯著下降 84%，因在多巴胺能與血清素能代謝鏈共同酵素 aromatic amino acid decarboxylase 有競爭性關係。Glutamatergic metabolites 中 glutamate 濃度無明顯趨勢。Cholinergic metabolites 路徑的 acetylcholine 濃度變化與分化進程無趨勢變化。Co-transmitters 類別多伴隨著其他神經傳導物質一起被釋放，其中與 ATP 息息相關的 adenosine 濃度變化伴隨神經細胞分化程度提升而急遽上升 5.9 倍，說明細胞分化過程 ATP 需求量的上升與 adenosine 能抑制神經膠質細胞祖細胞增殖，並刺激分化促進髓鞘的生成[77]，histamine 在分化過程濃度無太大變異(圖五)。因確保各神經傳導物在細胞內的效應來自分化，也分析未分化細胞與低血清培養細胞內神經傳導物(附錄一)。



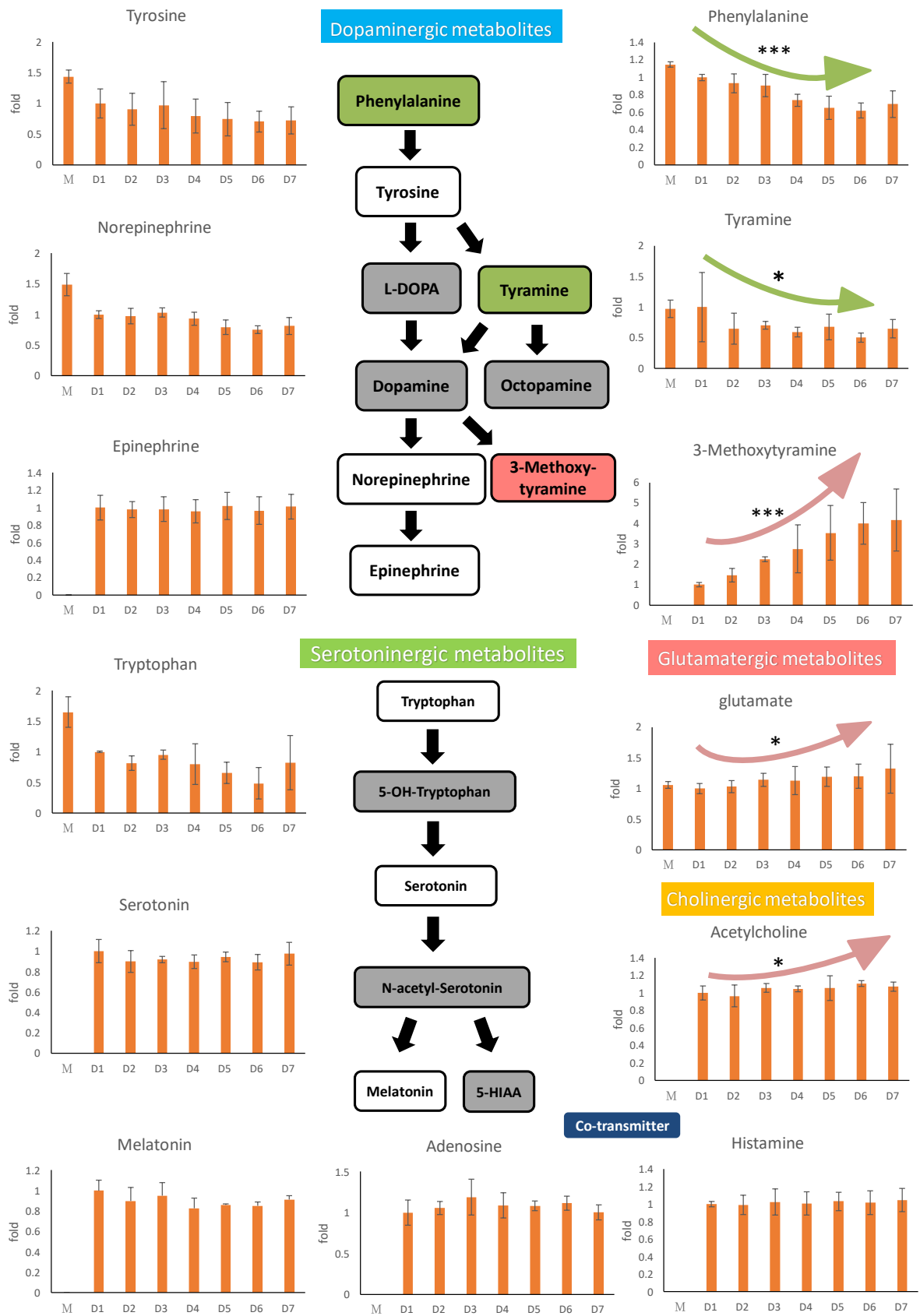
圖五、PC12 神經細胞分化時期細胞內神經傳導物變化。

神經細胞經神經傳導物萃取後，以質譜儀神經傳導物平台分析，分化第一天至第七天經迴歸分析運算，phenylalanine、adenosine 有顯著上升趨勢，而 dopamine、melatonin 有顯著下降趨勢，* $t > 1.96$ ；** $t > 2.58$ ；*** $t > 3.29$ 。縱軸為以分化第一天為分母的倍率關係，橫軸 Dn 為分化天數。代謝路徑方框中綠色色塊代表下降趨勢，紅色色塊代表上升趨勢。

3.3.3 質譜儀鑑定 PC12 細胞分化過程釋放神經傳導物濃度變化

分化神經細胞所使用的培養液與低濃度血清皆含有部分胺基酸類物質，因此在檢測神經細胞釋放神經傳導物前，需先使用質譜儀測定出空白培養液中胺基酸成分，接著每天收集與更換 2 ml 的培養液作為分析使用，總共檢測神經細胞分化七天之間神經傳導物濃度變化。Dopaminergic metabolites 路徑中，以提供營養為主的上游物質 phenylalanine、tyrosine、tyramine，在空白培養液存有高含量營養成分，而隨分化天數上升細胞攝取胺基酸物質越多 phenylalanine、tyramine 濃度變化顯著下降，tyrosine 濃度則是輕微下降 28%，而中間物質 L-dopa 與 dopamine 在細胞培養液中無法偵測，norepinephrine 在空白培養液中含有高濃度，當加入細胞後因細胞的攝入濃度會些微降低 50%，而在分化過程濃度維持恆定，說明細胞會吸收 norepinephrine 並調控外部濃度，epinephrine 在原始培養液中不存在，但在加入細胞不管分化時間長短 epinephrine 濃度皆一致，細胞也會調控 epinephrine 在細胞外濃度，最終代謝產物 3-methoxytyramine 是整個 dopaminergic 代謝鏈分化改變最劇烈的神經傳導物，3-methoxytyramine 濃度隨著神經細胞分化的程度急遽上升 316%，3-MT 不僅是多巴胺的非活性代謝物，而是一種新型的神經調節劑[78]並具有神經分化指標意義。Serotonergic metabolites 途徑裡，視為原料的 tryptophan 在原始培養液中含有高含量，當與細胞培養後因細胞的攝取即會有下降 64% 趨勢，而中游 serotonin 與下游 melatonin 物質在分化過程濃度變化都是穩定的。Glutamatergic metabolites 中 glutamate 在起始培養液中存在一濃度，隨著神經分化發展，glutamate 細胞外濃度也小幅度提升。Cholinergic metabolites 路徑的 acetylcholine 由神經細胞釋放，伴隨分化程度提升 acetylcholine 細胞外濃度也升高。Co-transmitters 部分 adenosine 在細胞外濃度與細胞內相反，反而調控的非常恆定，而 histamine 在細胞外濃度一致穩定。因

確保各神經傳導物在細胞外的效應來自分化，也分析空白未分化培養液與未分化細胞培養液中神經傳導物(附錄二)。

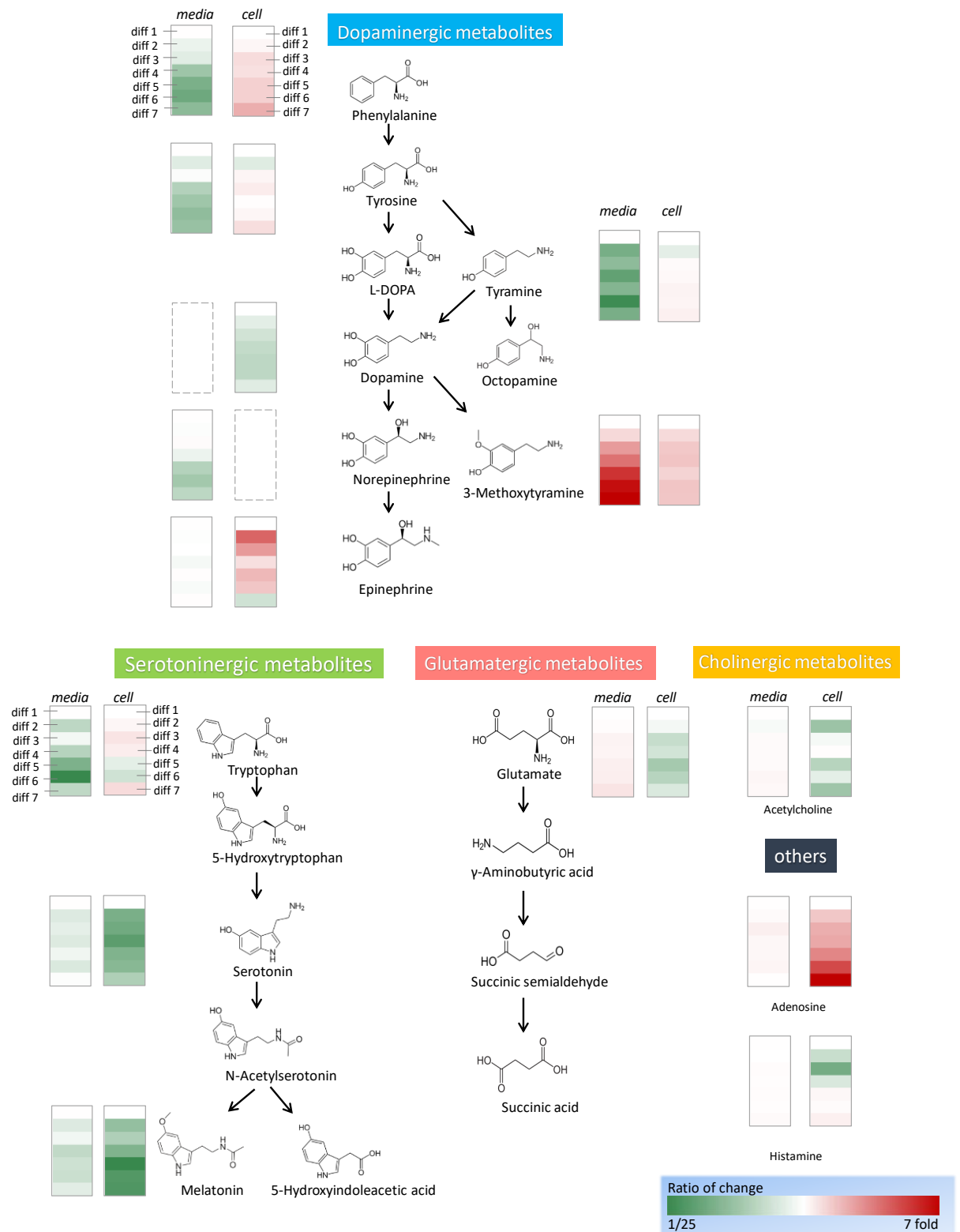


圖六、PC12 神經細胞分化過程釋放神經傳導物濃度變化。

神經細胞培養液經神經傳導物萃取後，以質譜儀神經傳導物平台分析，分化第一天至第七天經迴歸分析運算，3-methoxytyramine、glutamate、acetylcholine 有顯著上升趨勢，而 phenylalanine、tyramine 有顯著下降趨勢。 $* t > 1.96$ ； $** t > 2.58$ ； $*** t > 3.29$ 。縱軸為以分化第一天為分母的倍率關係，橫軸 M 為空白培養液，Dn 為分化天數。代謝路徑方框中綠色色塊代表下降趨勢，紅色色塊代表上升趨勢。

3.4 討論

神經傳導物穿梭在神經元細胞中溝通，神經傳導物功能性被研究廣泛，但神經傳導物具有另一重要功能，神經傳導物能控制幹細胞的自我更新與分化成目標神經元的途徑，但神經傳導物如何在分化過程調控目前尚未被定義，透過追蹤神經傳導物的種類與含量變化，明確定義神經細胞分化過程神經傳導物調控勢在必行。多巴胺代謝鏈在神經細胞分化過程，此路徑代謝旺盛，從上游物質胺基酸的大幅度吸收至細胞內，再到最終產物 3-methoxytyramine 在細胞外的堆積，證實多巴胺能路徑的活躍，細胞從未分化狀態轉化為神經細胞時釋放高濃度的 3-methoxytyramine，視為神經分化的指標之一(圖七)。血清素能代謝鏈與多巴胺能神經元代謝鏈有共同調節酶 Aromatic amino acid decarboxylase，此酶會選擇一種路徑反應，因此限制代謝鏈速度，血清素能代謝鏈受分化環境影響，代謝速率減緩，此路徑中越下游產物越稀少，分化進程對此路徑有抑制的作用(圖七)。神經細胞分化過程 adenosine 的調控具有能量轉換的意義，adenosine 為合成細胞能量 ATP 的原料，兩者皆能穿梭在細胞內外作調控，adenosine 隨著分化程度的提升，神經細胞內累積高含量的 adenosine，細胞外 adenosine 濃度恆定(圖七)，推測在神經細胞分化過程需使用大量 ATP，細胞應對大量耗能的機制為累積 adenosine 於細胞內供應 adenosine kinase(AK)合成 ATP。



圖七、PC12 神經細胞從未分化到分化七天神經傳導物吸收與釋放變化圖。

神經細胞分化七天過程中神經傳導物經統整後，培養液中神經傳導物變化圖由空白培養液視為分母，其餘天數神經傳導物變化量除以空白對照組，得到分化過程中培養液神經傳導物倍率關係變化圖。細胞內

神經傳導物變化圖以分化第一天細胞含量視為分母，其餘天數神經傳導物變化量除以分化第一天數據，得到分化過程中細胞內神經傳導物倍率關係變化圖。

第四章 魚藤酮與神經細胞分化

4.1 前言

4.1.1 粒線體損傷之帕金森氏症細胞模型

魚藤酮(Rotenone)別名 Tubatoxin、Paraderil，化學式 $C_{23}H_{22}O_6$ ，IUPAC 命名 (2*R*,6*aS*,12*aS*)-1,2,6,6*a*,12,12*a*-hexahydro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromeno[3,4-*b*]furo(2,3-*h*)chromen-6-one，主要用於農藥或毒魚劑，粒線體功能障礙和氧化壓力被認為是帕金森氏症的致病原因[79, 80]，低濃度的魚藤酮影響目前也被研究學者用於模擬帕金森氏症的模型實驗因子，實驗模型中引發氧化壓力的殺蟲劑百草枯和抑制粒線體複合物 I 的魚藤酮，都會誘導黑質多巴胺能神經元變異與人類帕金森氏症相關的行為失常[81]。魚藤酮的生化作用機制已被廣泛研究，魚藤酮具有極高的脂溶性質，能輕易跨越血腦屏障並穿透細胞膜進入細胞內，魚藤酮主要抑制粒線體內模中電子傳遞鏈 complex I，導致 NADH 脫氫酶無法將 NADH 轉化成 FMN (flavin mononucleotide)與電子，因此終止下游電子傳遞鏈反應，導致粒線體 ATP 能量缺乏，產生過多活性氧物質(ROS)，受活性氧物質氧化的心磷脂(cardiolipin)釋放細胞色素 *c* (cytochrome *c*, cyt *c*)，細胞色素 *c* 與 Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1)上 WD40 結合活化 caspase-9 形成 apoptosome，接著活化 caspase-3、caspase-6、caspase-7 使細胞凋亡[5]。魚藤酮也能通過細胞核中 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 氧化壓力損傷 DNA 轉錄蛋白複合體，促進 α -突觸核蛋白(alpha-synuclein)的堆積和活化遺傳的過程，魚藤酮造成活性氧物質的增加也直接影響細胞內 α -突觸核蛋白、A30P α -突觸核蛋白與 A53T α -突觸核蛋白的過度表達，過度表達造成 α -突觸核蛋白由原始單體(monomer)與低聚合體(oligomer)型態形成原纖維(fibril)構型，再堆疊成巨大球狀且中心密集的路易氏體(lewy body)，造成神經元細胞的死亡[82]。 α -突觸核蛋白的單體和低聚合體可溶於細胞質，但纖維態與路易氏體結構無法溶於神經元細胞質， α -突觸核蛋白原纖維的毒性機制於 2002

年由 Lansbury 團隊發現， α -突觸核蛋白原纖維可以形成橢圓形或圓形的澱粉樣蛋白孔，蛋白孔洞類似可刺穿細胞膜的細菌毒素，導致細胞釋放物質和細胞死亡[83, 84]。在帕金森氏症病患中腦部黑質體(substantia nigra)被發現皆有 lewy body 的堆積，而 α -突觸核蛋白也被發現會降低 Tyrosine hydroxylase (TH) 的磷酸化比例，TH 為多巴胺生物合成中的限速酶，被 α -突觸核蛋白抑制，間接導致下游多巴胺的合成減少[85]。魚藤酮也會讓轉換 tryptophan 成為 5-hydroxytryptophan 的作用酵素 tryptophan-5-hydroxylase 活性上升。

4.2 實驗材料與方法

4.2.1 藥品/材料

Rotenone was purchased from (Merck Millipore, Guyancourt, France)

4.2.2 魚藤酮影響神經細胞分化生長細胞操作

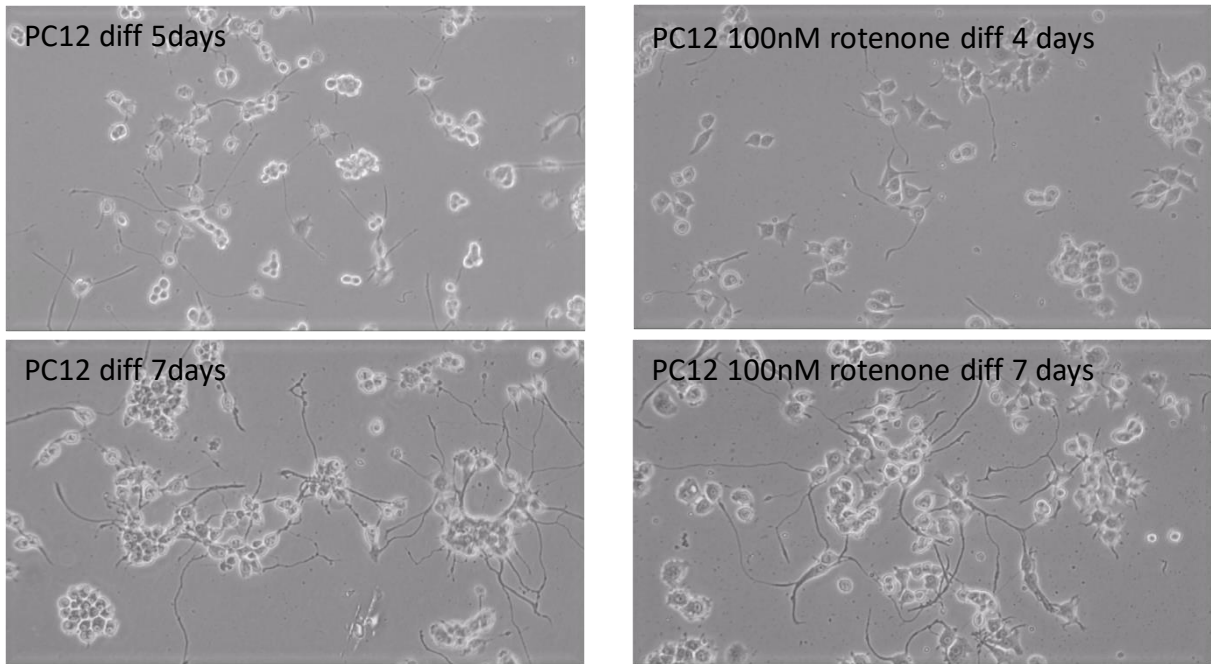
神經細胞分化條件，配置分化低血清細胞培養液，配置比例為佔全部體積的 98% RPMI、1% HS(須先在 56 °C 水浴槽內加熱 30 min)、1% FBS、1% PS 混合均勻。操作細胞分化前將低血清培養液在 37 °C 恆溫水槽中預熱 20 分鐘，將盤面細胞密度約 70% 的細胞培養皿置於無菌操作台，去除培養液，加入 2 ml 低血清培養液後從培養皿上將細胞沖下，並於離心管中將細胞沖散，數細胞後取 6.3×10^5 個細胞置於 10 cm 培養盤，並用低血清補體積至 5 ml 及添加 100 nM NGF，於實驗組添加 100 nM 魚藤酮，控制組添加與實驗組等體積 DMSO，並每 24 小時更換 2 ml 低血清培養液並維持 100 nM NGF 濃度，在分化時期第一天、第四天、第七天，使用細胞顯微照相儀記錄型態，收取培養液與細胞株作為後續神經傳導物鑑定。

4.3 結果

4.3.1 分化初期接觸魚藤酮對 PC12 細胞內神經傳導物影響

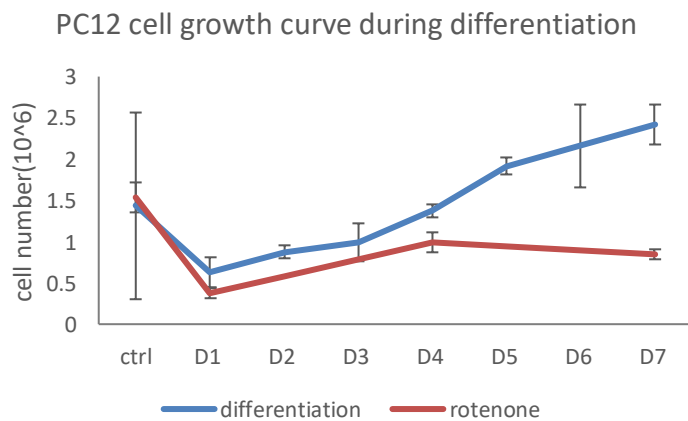
PC12 神經細胞在分化初期受低濃度魚藤酮刺激後，在神經細胞分化過程中神經傳導物影響劇烈，由細胞型態上觀察發現於未分化階段細胞加入 100 nM 魚藤酮的神經細

胞，在分化初期控制組細胞有明顯分化生長遲緩現象(圖八、圖九)，且在第四天開始實驗組培養液中酚紅指示劑由粉紅色轉為鵝黃色，而控制組酚紅指示劑維持一致粉紅色調。在神經細胞未分化狀態接觸魚藤酮並生長分化，細胞生長狀態受藥物影響的細胞在第四天前生長遲緩，第四天到第八天受魚藤酮影響的細胞完全停止生長複製，甚至些微死亡(圖九)。藉由質譜儀神經傳導物鑑定平台分析神經細胞內中神經傳導物，在神經細胞內發現 dopaminergic 代謝鏈路徑裡的物質與正常分化細胞相比有明顯變異，上游以提供營養為目的物質 phenylalanine、tyrosine、tyramine 三種物質相較於控制組有明顯上升趨勢，尤其在分化第四天時累積最為明顯，分別相較控制組 phenylalanine 增加 100%，tyrosine 增加 145%，tyramine 增加 33%，而在第七天降為正常值，中間物 dopamine 在受藥物影響有降低趨勢，尤其在第四天時降低最為明顯相較控制組減少 30%，第七天時些微恢復含量 14%但相較控制組含量仍偏低，因魚藤酮抑制代謝 tyrosine 成為 L-dopa 的酵素 Tyrosine hydroxylase 活性，此酵素也是多巴胺能神經元限速酵素，導致多巴胺能代謝鏈的累積與降低[86]，而 epinephrine 的含量第一天變化顯著上升 3.6 倍，發生在與藥物反應 24 小時，被視為神經細胞立即對魚藤酮藥物所形成的應急反應，終端產物 3-methoxytyramine 受魚藤酮影響含量變化與 dopamine 相似，在分化第四天含量下降最多，而在分化第七天些微上升。Serotonergic 代謝路徑中 tryptophan、serotonin、melatonin 在分化初期受魚藤酮影響後含量皆比控制組高許多倍分別為 tryptophan 2.3 倍，serotonin 2.9 倍，melatonin 2.7 倍，尤其在受藥物影響的第一天含量急劇上升累積，而在分化第四天與第七天些微下降，但含量還是高於控制組。Glutamatergic metabolites 中 glutamate 含量在第一天受藥物影響累積，而後含量恢復正常。Cholinergic metabolites 路徑的 acetylcholine 含量變化在藥物影響下，分化第一天高於控制組四倍之多，因 acetylcholine 能介導帕金森氏症神經的保護作用[87]，在分化第四天之後含量即恢復正常值。Co-transmitters 部分的 adenosine 含量受魚藤酮抑制電子傳遞鏈 complex I 影響 ATP 生成，因此 adenosine 含量變化相較正常細胞上升緩慢，histamine 變化量在分化第一天上升四倍之多，但分化第四天之後即轉為正常值(圖十)。



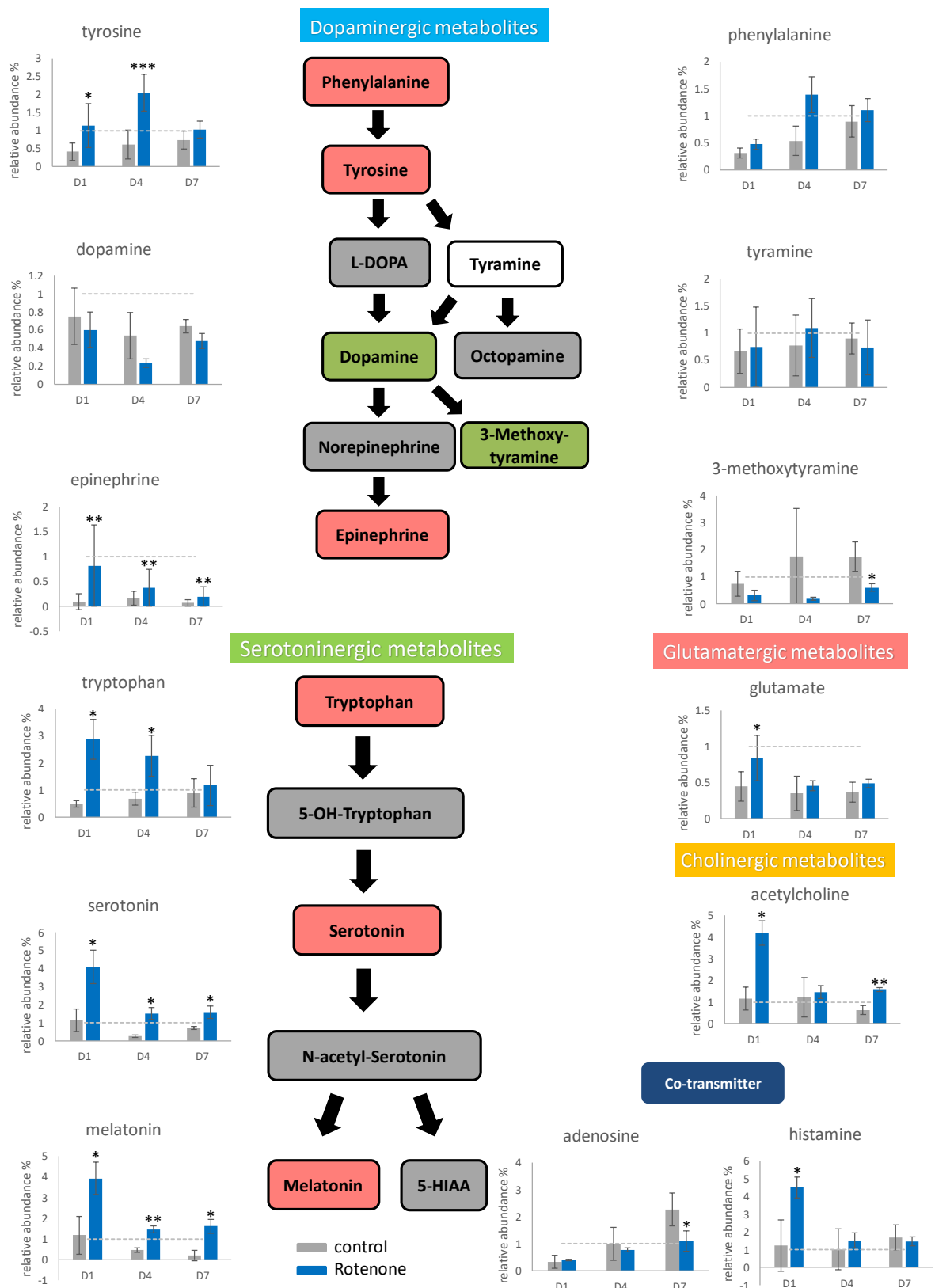
圖八、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響細胞分化型態。

PC12 diff 5 days 與 PC12 diff 7 days 為神經細胞分化第五天與第七天細胞型態，PC12 100nM rotenone diff 4 days 與 PC12 100nM rotenone diff 7 days 為神經細胞分化初期受 100 nM 魚藤酮影響後第四天與第七天的細胞型態。



圖九、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響後細胞生長狀態。

藍線為正常 PC12 神經細胞分化生長速率，紅線為分化初期受魚藤酮影響的細胞分化生長速率。縱軸為細胞數，橫軸為分化天數。

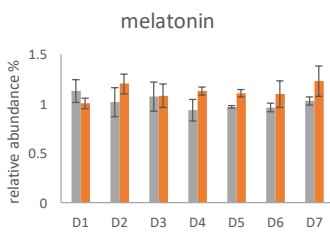
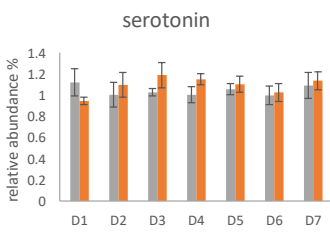
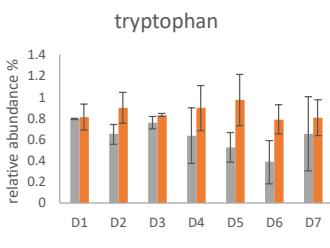
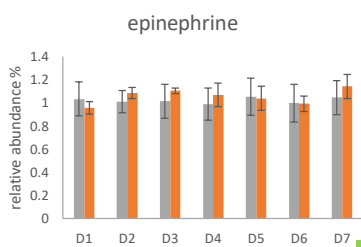
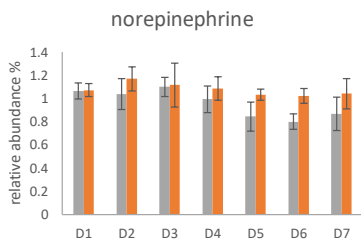
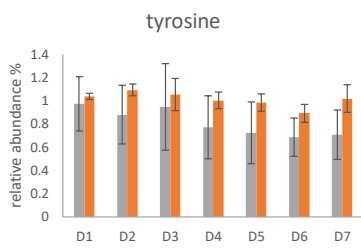


圖十、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響細胞內神經傳導物變異圖。

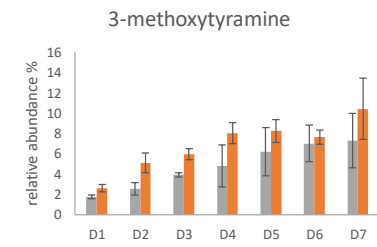
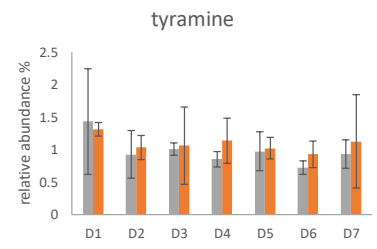
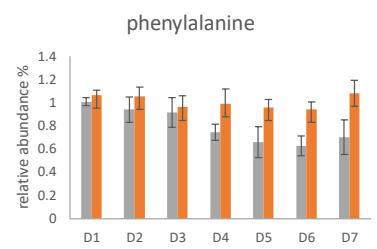
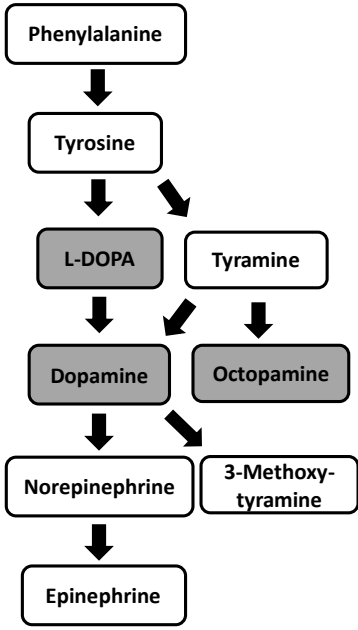
神經細胞於未分化時期添加 100 nM 魚藤酮並分化，於分化第一天、第四天、第七天收取細胞，神經細胞經神經傳導物萃取後，以質譜儀神經傳導物分析平台測定。數據圖中灰色條狀圖為正常分化細胞控制組，藍色條狀圖為實驗組。代謝路徑方框中綠色色塊代表下降趨勢，紅色色塊代表上升趨勢。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。

4.3.2 分化初期接觸魚藤酮對 PC12 細胞釋放神經傳導物影響

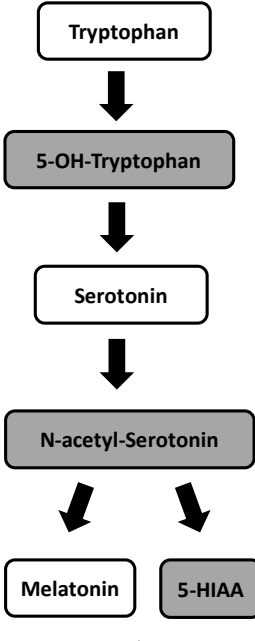
神經突觸釋放神經傳導物的濃度平衡對生理產生極大的影響，透過細胞模型模擬神經細胞在分化初期接觸魚藤酮後，如何影響神經細胞釋放調節神經傳導物，培養液的採樣為每隔 24 小時採集一次，經質譜儀神經傳導物分析平台的測量，在 dopaminergic 代謝路徑上，受分化初期魚藤酮影響的神經細胞釋放神經傳導物變化不大，在上游代謝鏈中 phenylalanine 與 tyrosine 受魚藤酮影響細胞外濃度比控制組高約 30%，魚藤酮影響細胞攝取胺基酸物質的含量，而中下游 tyramine、norepinephrine、epinephrine 在分化初期受魚藤酮影響細胞外濃度不變，特別的是下游物質 3-methoxytyramine 在魚藤酮影響神經生長的過程中，細胞釋放濃度提升 49%。Serotonergic 代謝鏈中，最上游的 tryptophan 也被魚藤酮影響細胞攝取胺基酸物質的含量，導致細胞外含量高於控制組 43%，而 serotonin 與 melatonin 在細胞外濃度無明顯變化。Glutamatergic metabolites 中 glutamate 細胞外含量不變。Cholinergic metabolites 路徑的 acetylcholine 含量在細胞釋放方面也不變。其餘的 adenosine 濃度在魚藤酮影響下細胞外累積濃度高，可能與 ATP 敏感性鉀通道在多巴胺能神經細胞系中對魚藤酮誘導的神經毒性的保護作用有關[88]，histamine 實驗組在細胞外含量則是降低(圖十一)。



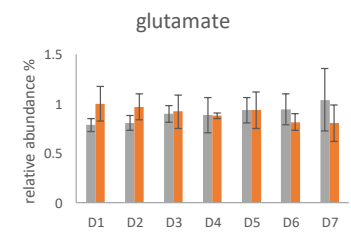
Dopaminergic metabolites



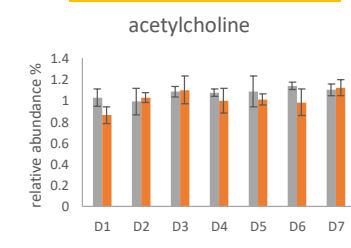
Serotonergic metabolites



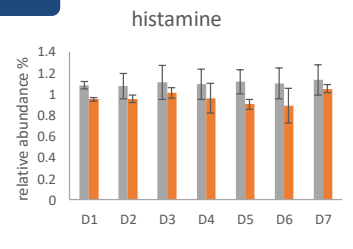
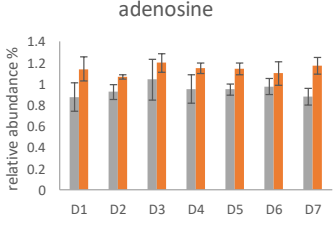
Glutamatergic metabolites



Cholinergic metabolites



Co-transmitter



— control
— Rotenone

圖十一、PC12 神經細胞分化初期受魚藤酮影響細胞釋放神經傳導物濃度變異圖。

神經細胞於未分化時期添加 100 nM 魚藤酮並分化，於分化第七天內收取細胞培養液，神經細胞培養液經神經傳導物萃取後，以質譜儀神經傳導物分析平台測定。數據圖中灰色條狀圖為正常分化細胞培養液控制組，橘色條狀圖為實驗組。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。

4.4 討論

神經細胞在未分化初期接觸魚藤酮後再分化，對神經生長初期影響較大，後期經過分化指令與每天更新 1/5 的培養液逐漸有恢復正常的趨勢。先前文獻研究表示魚藤酮會抑制轉化 tyrosine 變 L-dopa 的酵素 tyrosine hydroxylase[86]，這可能導致 dopaminergic 合成路徑堆積在上游 phenylalanine、tyrosine 的原因。正常分化對 dopaminergic 路徑終點走向 3-methoxytyramine，而受魚藤酮的影響下，神經細胞分化此途徑代謝偏向 epinephrine。神經細胞分化初期受魚藤酮影響對 Serotonergic 代謝鏈有極端的反應，正常分化的指令會使此路徑抑制，而在分化初期受魚藤酮影響 serotonergic 在分化初期旺盛，多巴胺代謝鏈與血清素代謝鏈共同調節酶 aromatic amino acid decarboxylase 選擇血清素代謝鏈代謝，tryptophan、serotonin、melatonin 濃度上升最明顯，而隨著分化天數越長物質濃度含量逐漸下降，推測神經細胞在分化初期對魚藤酮傷害有應對的拯救機制，抑或血清素在胞內濃度的提升能使細胞持續走向分化路徑。正常分化過程 adenosine 會在細胞內大量累積，且濃度上升劇烈，而細胞未分化時期受魚藤酮傷害後，再將細胞分化，神經細胞因分化程度降低影響 adenosine 在細胞內累積速度趨緩。

第五章 神經細胞退化

5.1 實驗材料與方法

5.1.1 藥品/材料

Nerve growth factor (NGF) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Opti-MEM media , fetal Bovine Serum (FBS) were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Rotenone was purchased from (Merck Millipore, Guyancourt, France)

5.1.2 魚藤酮影響神經細胞退化細胞操作

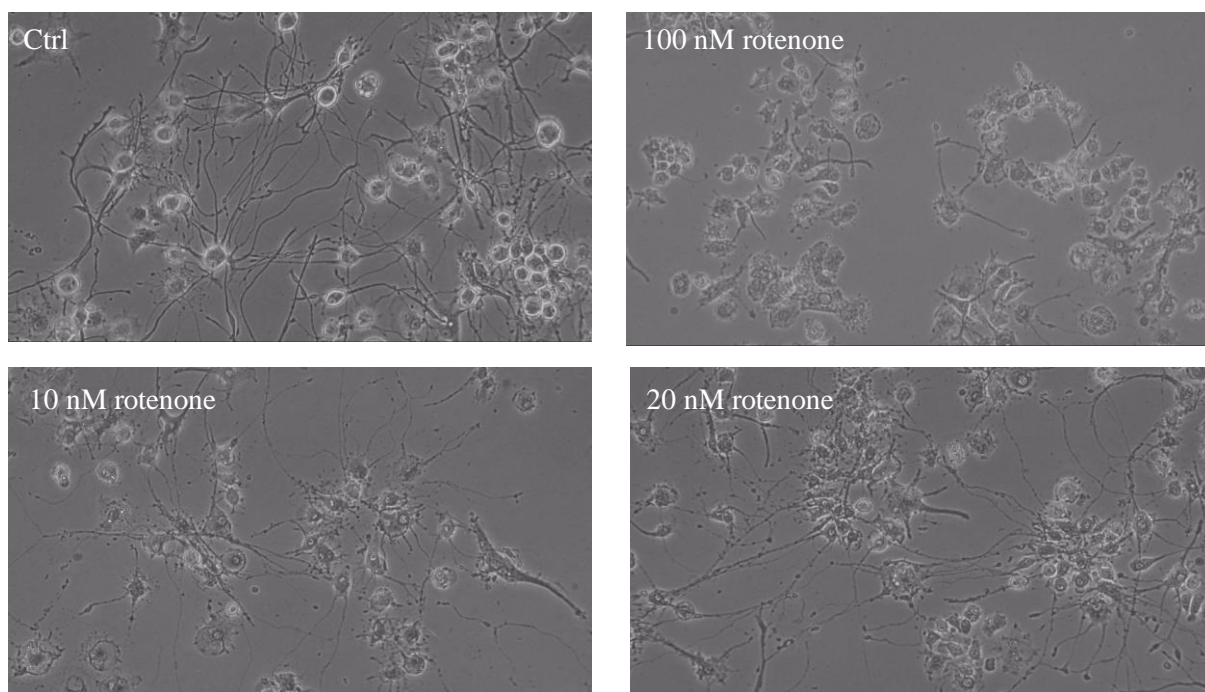
此部分分化與先前實驗不同，為優化後神經分化條件，配置分化低血清細胞培養液，配置比例為佔全部體積的 99% Opti-MEM、0.5% FBS、1% PS 混合均勻。操作細胞分化前將低血清培養液在 37°C 恆溫水槽中預熱 20 分鐘，將盤面細胞密度約 70% 的細胞培養皿置於無菌操作台，去除培養液，加入 2 ml 低血清培養液後從培養皿上將細胞沖下，並於離心管中將細胞沖散，數細胞後取 6.3×10^5 個細胞置於 10 cm 培養盤，並用低血清補體積至 5 ml 及加入 50 nM NGF，每 48 hr 更換低血清培養液並加 50 nM NGF，在細胞分化第六天時控制組添加 0.1 μ L DMSO，實驗組添加 10 nM 與 20 nM 的魚藤酮，反應 48 小時後，使用細胞顯微照相儀記錄型態，收取培養液與細胞株作為後續神經傳導物鑑定。

5.2 結果

5.2.1 各濃度魚藤酮對神經細胞退化細胞型態與生長影響

PC12 神經細胞使用 Opti-MEM 緩衝液與更低濃度血清分化效果卓越，神經細胞分化第八天時，產生神經突觸能力增加，神經網絡明顯且未分化神經細胞數量減少許多(圖十二)，因此更適合做為神經退化情形研究，分化後神經細胞對魚藤酮反應敏感，在低濃度 10 nM 魚藤酮反應 48 小時，就能使神經突觸萎縮且傷害細胞本體，細胞由平滑狀態變成破裂型態，將魚藤酮濃度提升兩倍 20 nM 反應 48 小時後，細胞萎縮情形與 10 nM

相當，魚藤酮濃度提升十倍到 100 nM 反應 48 小時後，細胞呈現幾乎無突觸型態且細胞核無法清晰可見，但細胞還能貼著盤面活著，因此不管魚藤酮濃度多低對分化後神經細胞型態影響都比未分化細胞來的嚴重。



圖十二、分化完全的 PC12 神經細胞受不同濃度魚藤酮影響 48 小時後細胞型態變化。

Ctrl 為 PC12 神經細胞分化八天型態，100 nM rotenone、10 nM rotenone、20 nM rotenone 為各濃度魚藤酮添加於分化第六天時神經細胞並反應 48 小時後型態變化，添加魚藤酮的神經細胞實驗組，神經突觸明顯萎縮，萎縮程度又以高濃度魚藤酮實驗組最為嚴重。

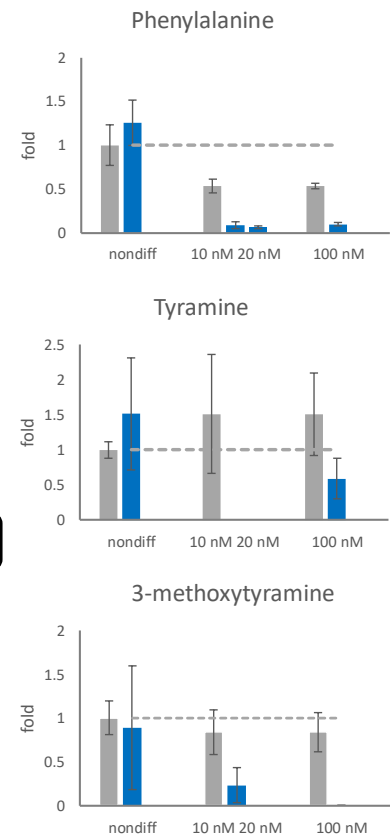
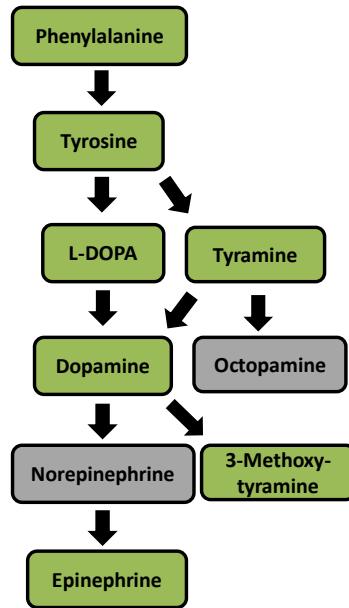
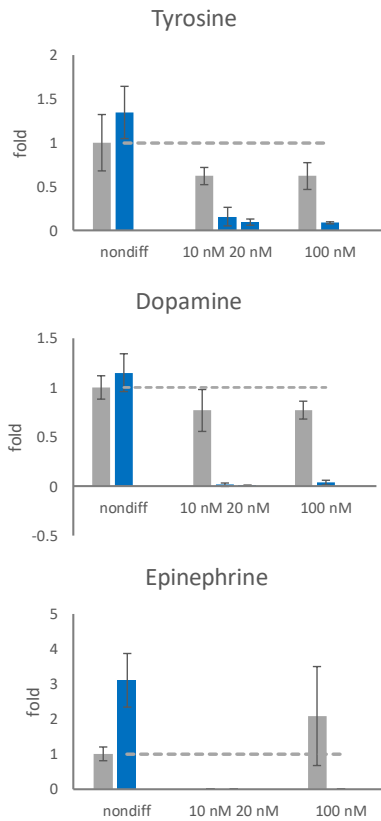
5.2.2 神經退化過程細胞內神經傳導物影響

此實驗部分與先前實驗使用不同分化培養液，因此初步測試未分化細胞株受 100 nM 魚藤酮反應 48 小時對細胞神經傳導物影響，另一組實驗組使用 100 nM 魚藤酮添加於分化第六天，一樣反應 48 小時，控制組使用魚藤酮溶劑 DMSO 添加，未分化實驗組在此部分實驗結果與第四章相符，未分化細胞受 100 nM 魚藤酮影響神經傳導物變化不大，其中 serotonin 含量上升約 184%，而分化第六天再添加 100 nM 魚藤酮反應兩天，使神

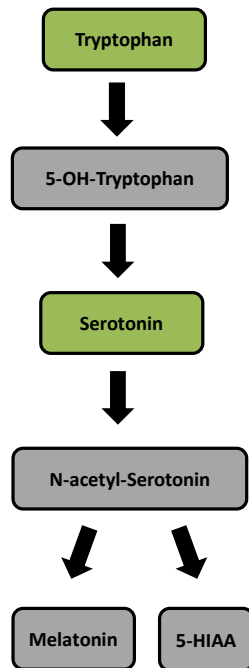
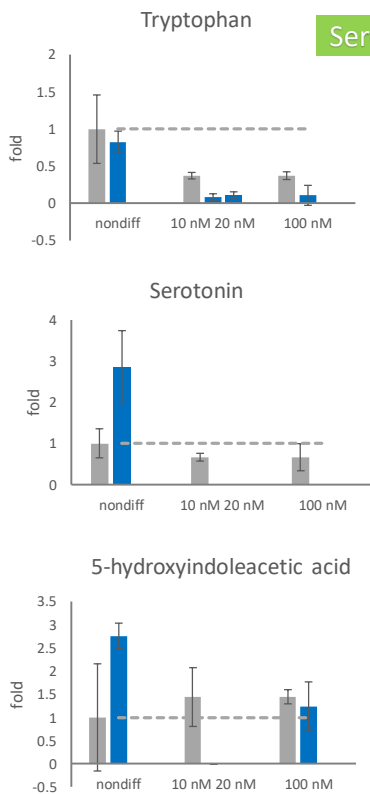
經突觸萎縮嚴重，檢測其神經傳導物變化發現，任何的神經傳導物都因藥物粒線體複合物I抑制劑影響，所有生理機制終止代謝神經傳導物(圖十三)。

100 nM 魚藤酮在實驗上反應過度，無法看出神經萎縮對神經傳導物影響，因此選擇 10 nM 與 20 nM 低濃度的魚藤酮作為實驗條件，從細胞型態上來看低濃度魚藤酮也嚴重影響到神經細胞的突觸退化，而細胞內神經傳導物濃度變化與高濃度魚藤酮影響狀態一樣，幾乎所有神經傳導物都在細胞內消失，包括 dopaminergic、serotonergic 代謝路徑與 adenosine 皆因低濃度魚藤酮影響停止細胞內代謝。特別的是 glutamatergic 途徑在 10 nM 與 20 nM 魚藤酮刺激下，glutamate 含量幾乎歸零但細胞內 GABA 卻累積，又以 10 nM 濃度魚藤酮實驗組累積高 90%。cholinergic 代謝轉換在細胞內 20 nM 濃度魚藤酮實驗組完全無看到 acetylcholine 濃度，但在 10 nM 濃度魚藤酮實驗組可以看到少於控制組 31% 含量變化(圖十三)。

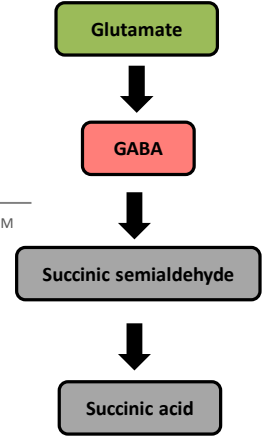
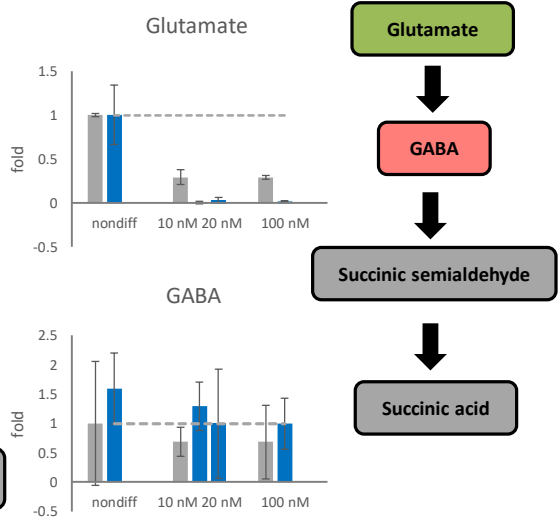
Dopaminergic metabolites

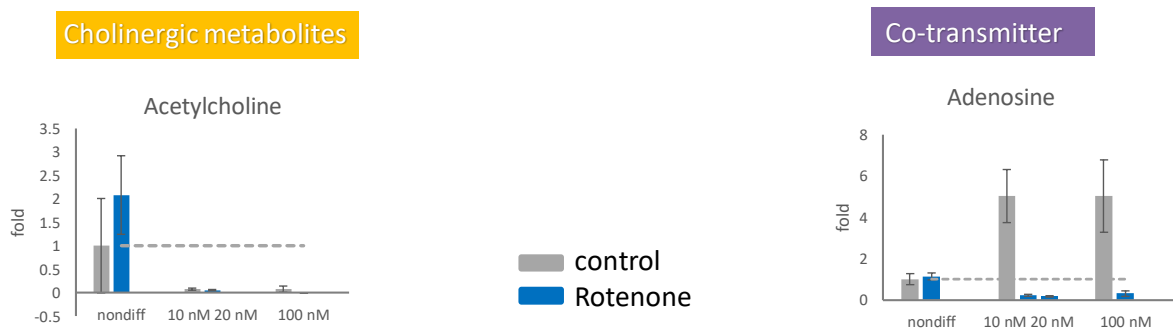


Serotonergic metabolites



Glutamatergic metabolites





圖十三、PC12 神經細胞分化第六天時添加 10 nM、20 nM、100 nM 魚藤酮反應 48 小時，細胞內神經傳導物變化圖。

神經細胞於分化後添加低濃度與高濃度魚藤酮，於細胞分化第八天收取細胞，神經細胞經神經傳導物萃取後，以質譜儀神經傳導物分析平台測定。數據圖中灰線代表正常細胞添加等量 DMSO 的控制組細胞，藍線代表添加各濃度魚藤酮實驗組細胞，nondiff 代表未分化細胞受 100 nM 魚藤酮影響 48 小時，其餘為分化第六天添加 10 nM、20 nM、100 nM 魚藤酮反應 48 小時。代謝路徑方框中綠色色塊代表下降趨勢，紅色色塊代表上升趨勢。

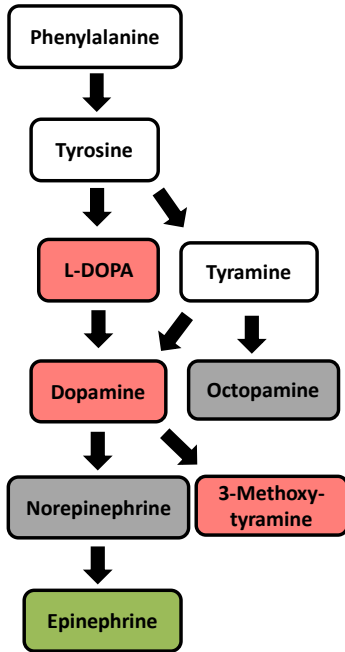
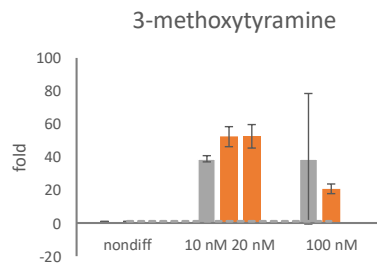
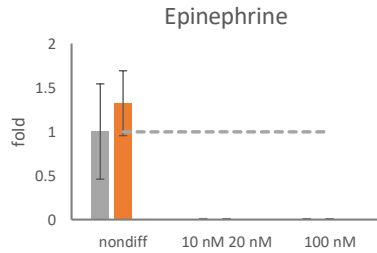
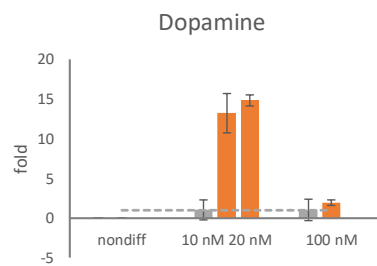
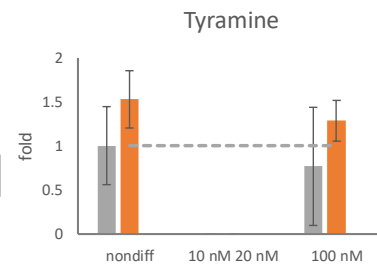
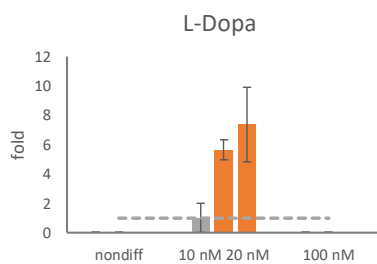
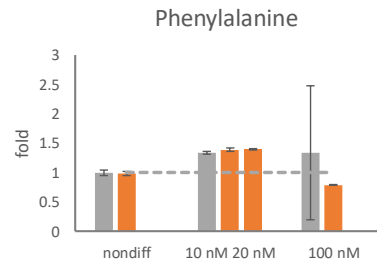
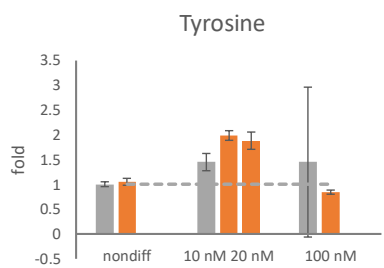
5.2.3 神經退化過程細胞釋放神經傳導物影響

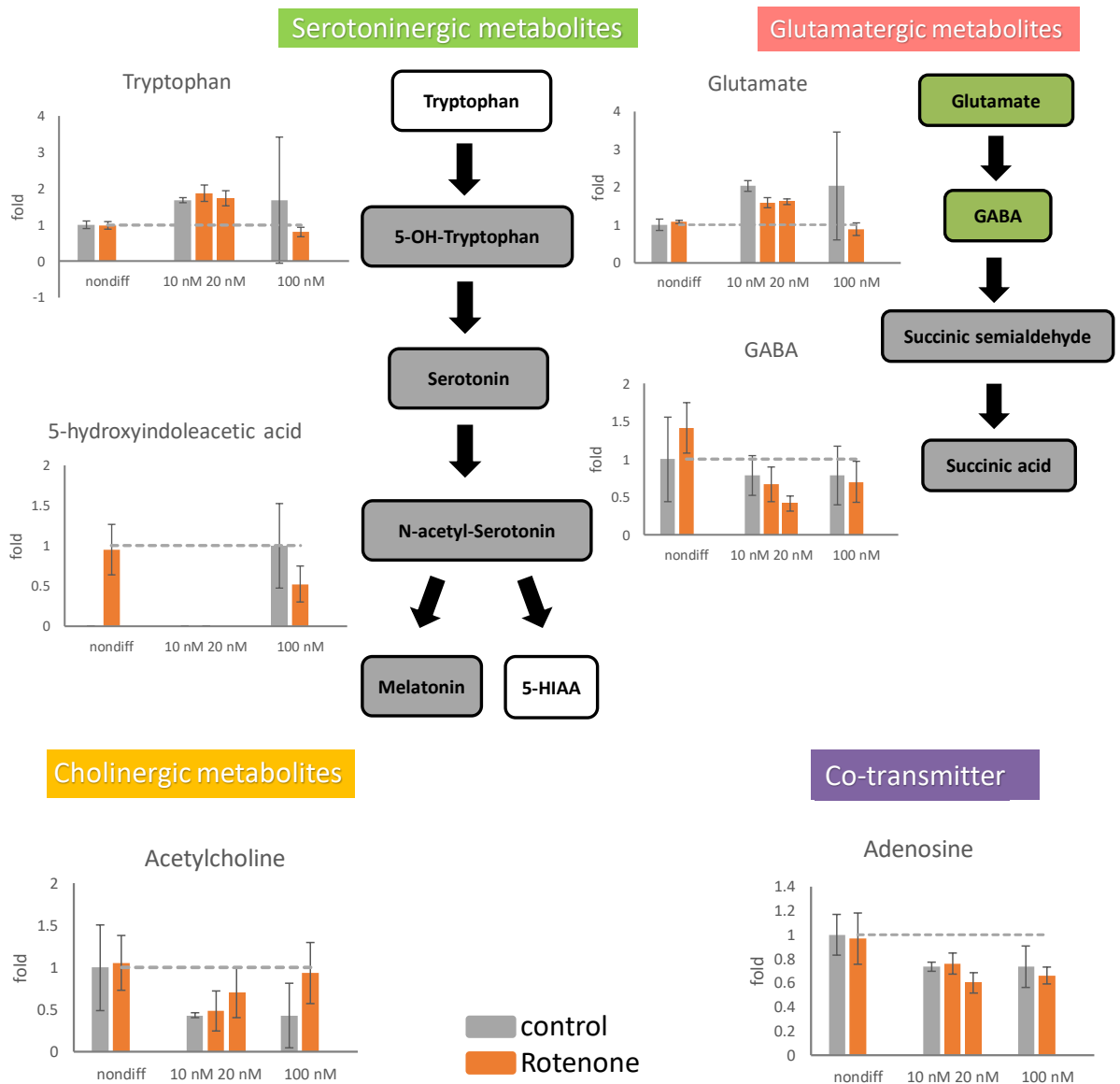
魚藤酮的作用使所有神經細胞內神經傳導物代謝路徑幾乎停滯，因此細胞外釋放的神經傳導物更直接說明神經細胞退化時，細胞如何透過神經傳導物調控應對。實驗先測試未分化神經細胞與分化六天神經細胞受 100 nM 魚藤酮作用 48 小時神經傳導物釋放影響，控制組為與實驗組相同狀態的神經細胞添加 DMSO，未分化細胞受 100 nM 魚藤酮影響神經傳導物釋放變化不大，與細胞內含量變化相同，只有 5-HIAA 在受魚藤酮影響下細胞外釋放。分化六天再添加 100 nM 魚藤酮反應 48 小時，神經傳導物釋放受影響，dopaminergic 代謝路徑的上游營養物 phenylalanine、tyrosine 實驗組細胞外含量 phenylalanine 低於控制組 40%，tyrosine 低於控制組 42%，而 tyramine 實驗組高於控制組 66%，中游的 dopamine 細胞釋放量受 100 nM 魚藤酮影響約高於控制組 100%，而下游產物 3-methoxytyramine 實驗組細胞釋放量下降 46%。Serotonergic 途徑中分化細胞受 100 nM 魚藤酮作用，tryptophan 與 5-HIAA 細胞外含量皆下降 50%。Glutamatergic 途

徑中 100 nM 魚藤酮實驗組 glutamate 細胞外濃度下降 56%。Cholinergic 代謝中 100 nM 魚藤酮作用下 acetylcholine 細胞外濃度升高 116%。Adenosine 含量不管在細胞內或細胞外濃度皆受 100 nM 魚藤酮影響降低(圖十四)。

因 100 nM 魚藤酮影響分化神經細胞過於劇烈，使用更低濃度的魚藤酮作用於分化後細胞，欲得神經細胞退化過程神經傳導物釋放的影響，實驗組使用 10 nM 與 20 nM 兩種魚藤酮作用濃度，控制組為添加等量 DMSO 溶劑，皆在神經分化第六天時添加藥物，並反應 48 小時，使用質譜儀觀測其神經傳導物。在 dopaminergic 代謝路徑中，實驗組中上游物質 phenylalanine 含量在細胞外濃度不變，tyrosine 在細胞外濃度升高，而中游物質 L-dopa 與 dopamine 受低濃度魚藤酮影響釋放高含量至細胞外，L-dopa 上升約 4 至 6 倍，dopamine 上升約 14 倍，此路徑的最終產物 3-methoxytyramine 在分化過程相較控制組會高度累積在細胞外 33%，而受低濃度魚藤酮影響後胞外累積程度更高於正常值。低濃度魚藤酮對於 Serotonergic 途徑無明顯差異，tryptophan 含量與控制組相當。Glutamatergic 代謝路徑中，glutamate 受低濃度魚藤酮影響細胞外含量下降 25%，10 nM 魚藤酮實驗組在細胞外 GABA 含量較控制組低 15%，20 nM 魚藤酮實驗組細胞外 GABA 含量又更低 47%。Cholinergic 路徑受低濃度魚藤酮影響，acetylcholine 在細胞外濃度升高，又以 20 nM 魚藤酮實驗組上升幅度最高 62%。Adenosine 細胞外濃度受低濃度魚藤酮影響不大，10 nM 魚藤酮實驗組在細胞外 adenosine 濃度與控制組相當，20 nM 魚藤酮實驗組受影響 adenosine 些微下降 18%(圖十四)。

Dopaminergic metabolites





圖十四、PC12 神經細胞分化第六天時添加 10 nM、20 nM、100 nM 魚藤酮反應 48 小時，細胞釋放神經傳導物變化圖。

神經細胞於分化後添加低濃度與高濃度魚藤酮，於細胞分化第八天收取細胞培養液，神經細胞培養液經神經傳導物萃取後，以質譜儀神經傳導物分析平台測定。數據圖中灰線代表正常細胞添加等量 DMSO 的控制組細胞培養液，橘線代表添加各濃度魚藤酮實驗組細胞培養液，nondiff 代表未分化細胞受 100 nM 魚藤酮影響 48 小時培養液，其餘為分化第六天添加 10 nM、20 nM、100 nM 魚藤酮反應 48 小時培養液。代謝路徑方框中綠色色塊代表下降趨勢，紅色色塊代表上升趨勢。

5.3 討論

探討神經細胞退化過程中神經傳導物變化，有助於了解退化型神經疾病如帕金森氏症、阿茲海默症等，神經細胞元最大的功能即是正確的調控各神經傳導物的釋放。使用 100 nM 魚藤酮濃度作用於未分化細胞與分化六天細胞並反應 48 小時，未分化細胞添加魚藤酮實驗組在細胞內與細胞釋放神經傳導物方面並無明顯差異，推測未分化神經細胞的修復能使細胞抵抗外部環境高濃度魚藤酮傷害，而分化後神經細胞在受高濃度魚藤酮作用下神經細胞內部神經傳導物代謝途徑全部停滯，細胞釋放神經傳導物含量也下降，唯有 acetylcholine 細胞外濃度上升，推測此狀態的神經細胞正走向細胞凋亡，導致 acetylcholine 在細胞外濃度提升[89]，100 nM 魚藤酮對未分化神經細胞影響較小，但卻造成分化後神經細胞無法製造神經傳導物甚至凋亡。

100 nM 魚藤酮添加導致分化後細胞走向凋亡路徑，因此無法探討細胞退化神經傳導物影響。當使用低濃度魚藤酮作用於已分化神經細胞，10 nM 與 20 nM 魚藤酮對分化後神經細胞釋放神經傳導物影響相近，發現低濃度魚藤酮影響神經細胞 dopaminergic 路徑上游營養物質無法吸收至細胞內部，造成神經傳導物原料短缺。細胞外 dopamine 高濃度的堆積，推測魚藤酮影響 dopamine 受體的回收機制[90]。低濃度魚藤酮影響細胞內 dopamine 全代謝成 3-methoxytyramine，且釋放到細胞外，使培養液中 3-methoxytyramine 濃度提升。在低濃度魚藤酮影響分化後神經細胞時，Serotonergic 代謝路徑對於分化完整的神經細胞無拯救機制，推測 serotonergic 的拯救機制只發生在受魚藤酮影響的分化初期，因此魚藤酮對未分化神經細胞釋放神經傳導物較無影響。神經退化過程時期，細胞內 adenosine 濃度大幅降低且趨近於零，形成與分化過程 adenosine 在細胞內堆積狀態相反。

第六章 結論

神經細胞從未分化階段經過七天的神經生長因子刺激分化成完整神經細胞，神經傳導物代謝途徑轉換明顯，dopaminergic 代謝鏈在神經細胞分化過程代謝旺盛且具有指標性，細胞不斷從培養液中吸收上游營養物胺基酸，終端產物多代謝成 3-methoxytyramine 且高濃度累積在細胞外，3-methoxytyramine 濃度可視為神經細胞分化程度的指標之一。Serotonergic 代謝鏈受神經細胞分化程度的上升代謝速率減緩，越下游神經傳導物含量越稀少，神經細胞分化對此路徑有抑制作用。神經分化過程除了影響多巴胺能路徑上升與血清素能路徑下降，其中具有細胞能量調控意義的 adenosine 在細胞內部濃度快速升高，細胞外 adenosine 濃度恆定，在神經細胞分化過程需使用大量 ATP，而神經細胞應對分化大量耗能的機制為累積 adenosine 於細胞內供應酶原料合成 ATP。透過了解神經細胞分化時神經傳導物的調控，明確定義細胞內部生化機制，也有助於誘導幹細胞分化成多巴胺能神經元細胞研究。

日常生活中不可避免接觸環境毒化物，如蔬果殘留的農藥魚藤酮，透過添加魚藤酮在神經細胞分化初期實驗，檢測神經細胞分化生長過程的神經傳導物影響，魚藤酮對神經分化初期神經傳導物影響較大，後期經過分化指令與每天更新 1/5 的培養液逐漸有恢復正常的趨勢，神經細胞拯救的機制為提升 serotonergic 路徑在細胞內部的代謝，維持分化初期胞內高濃度血清素與褪黑激素，在後期分化階段神經傳導物逐漸恢復正常值。而隨著分化天數越長物質濃度含量逐漸下降，推測神經細胞在分化初期對魚藤酮傷害有應對的拯救機制。在魚藤酮傷害未分化細胞階段實驗中，adenosine 細胞內上升幅度相較正常分化神經細胞上升幅度為緩慢，推測分化程度與 adenosine 細胞內累積程度呈正相關。

伴隨人口老化，神經退化性疾病發生率也越高，病情影響病患正常的生活作息，如失智、自主神經失調、睡眠障礙，透過檢測神經傳導物的異常，提早有效治療。分化後神經細胞只能承受低濃度魚藤酮傷害，而形成神經退化狀態的細胞模型，在此模型下定

義神經退化造成神經傳導的影響，低濃度魚藤酮影響神經細胞 dopaminergic 路徑上游營養物質無法吸收至細胞內部，造成神經傳導物原料短缺，間接影響下游神經傳導物合成，細胞內部神經傳導物含量大幅減少，抑制粒線體 complex I所造成的神經退化也影響 dopamine 受體的回收機制，使神經細胞多巴胺累積在細胞外[91]，分化後神經細胞受魚藤酮影響傷害大於分化初期神經細胞接觸魚藤酮，而分化後神經細胞應對魚藤酮的傷害並無拯救機制。

第七章 參考文獻

參考文獻：

1. Agid, Y., et al., *Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease*. Histology and histopathology, 1997.
2. Fahn, S. and G. Cohen, *The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it*. Annals of neurology, 1992. **32**(6): p. 804-812.
3. Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, and A.H.J.T.L.N. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. 2006. **5**(3): p. 235-245.
4. Kalia, L.V., J.M. Brotchie, and S.H.J.M.D. Fox, *Novel nondopaminergic targets for motor features of Parkinson's disease: review of recent trials*. 2013. **28**(2): p. 131-144.
5. Cabezas, R., et al., *Astrocytes role in Parkinson: a double-edged sword*, in *Neurodegenerative Diseases*. 2013, IntechOpen.
6. Munhall, A.C., et al., *NMDA alters rotenone toxicity in rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental area dopamine neurons*. 2012. **33**(3): p. 429-435.
7. Xiong, N., et al., *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models*. 2012. **42**(7): p. 613-632.
8. Sherer, T.B., et al., *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. Journal of Neuroscience, 2003. **23**(34): p. 10756-10764.
9. da Silva, T.M., et al., *Depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation*. Journal of affective disorders, 2008. **111**(2): p. 351-359.
10. Marsden, C. and J. Parkes, *Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease*. The Lancet, 1977. **309**(8007): p. 345-349.
11. Barone, P.J.E.J.o.N., *Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine*. 2010. **17**(3): p. 364-376.
12. Riedel, G., B. Platt, and J.J.B.b.r. Micheau, *Glutamate receptor function in learning and memory*. 2003. **140**(1-2): p. 1-47.
13. Choi, D.W.J.N., *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*. 1988. **1**(8): p. 623-634.
14. Möhler, H.J.N., *The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential*. 2012. **62**(1): p. 42-53.
15. Wallace, R.H., et al., *Mutant GABA A receptor γ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures*. 2001. **28**(1): p. 49.

16. Spencer, R.F., R.J. Wenthold, and R.J.J.o.N. Baker, *Evidence for glycine as an inhibitory neurotransmitter of vestibular, reticular, and prepositus hypoglossi neurons that project to the cat abducens nucleus*. 1989. **9**(8): p. 2718-2736.
17. Jasper, H.H. and J.J.S. Tessier, *Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep*. 1971. **172**(3983): p. 601-602.
18. Wang, H.-Y., et al., *β -Amyloid1-42 binds to α 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity implications for Alzheimer's disease pathology*. 2000. **275**(8): p. 5626-5632.
19. Grossman, E. and F.H.J.T.A.j.o.c. Messerli, *Effect of calcium antagonists on plasma norepinephrine levels, heart rate, and blood pressure*. 1997. **80**(11): p. 1453-1458.
20. Di Chiara, G. and V.J.C.o.i.p. Bassareo, *Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do*. 2007. **7**(1): p. 69-76.
21. Chaudhuri, K.R. and A.H.J.T.L.N. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment*. 2009. **8**(5): p. 464-474.
22. Howes, O.D., et al., *Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia*. 2009. **66**(1): p. 13-20.
23. Brown, G.L., et al., *Aggression, suicide, and serotonin: Relationships of CSF amine metabolites*. 1982.
24. Francis, P.T. and E.K.J.M.d.o.j.o.t.M.D.S. Perry, *Cholinergic and other neurotransmitter mechanisms in Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia, and dementia with Lewy bodies*. 2007. **22**(S17): p. S351-S357.
25. Berridge, C.W.J.B.r.r., *Noradrenergic modulation of arousal*. 2008. **58**(1): p. 1-17.
26. O'Neill, M.J., et al., *Neurotrophic actions of the novel AMPA receptor potentiator, LY404187, in rodent models of Parkinson's disease*. 2004. **486**(2): p. 163-174.
27. Dunwiddie, T.V. and S.A.J.A.r.o.n. Masino, *The role and regulation of adenosine in the central nervous system*. 2001. **24**(1): p. 31-55.
28. Chikahisa, S. and H.J.F.i.n. Séi, *The role of ATP in sleep regulation*. 2011. **2**: p. 87.
29. Haes, A.J., et al., *Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(7): p. 2264-2271.
30. Klucken, J., et al., *Unbiased and mobile gait analysis detects motor impairment in Parkinson's disease*. *PloS one*, 2013. **8**(2): p. e56956.
31. Cogan, D., et al. *Epileptic seizure detection using wristworn biosensors*. in *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2015 37th Annual International Conference of the IEEE*. 2015. IEEE.
32. Kennedy, R.T., et al., *In vivo neurochemical monitoring by microdialysis and capillary separations*. *Current opinion in chemical biology*, 2002. **6**(5): p. 659-665.

33. Porkka-Heiskanen, T., et al., *Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness*. *Science*, 1997. **276**(5316): p. 1265-8.
34. Robinson, D.L., et al., *Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo*. *Clinical chemistry*, 2003. **49**(10): p. 1763-1773.
35. Si, B. and E. Song, *Recent Advances in the Detection of Neurotransmitters*. *Chemosensors*, 2018. **6**(1): p. 1.
36. Perry, M., Q. Li, and R.T. Kennedy, *Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters*. *Anal Chim Acta*, 2009. **653**(1): p. 1-22.
37. Sugiura, Y., et al., *Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **403**(7): p. 1851-1861.
38. Johnsen, E., et al., *Liquid chromatography-mass spectrometry platform for both small neurotransmitters and neuropeptides in blood, with automatic and robust solid phase extraction*. *Scientific Reports*, 2015. **5**: p. 9308.
39. Marcos, J., et al., *Targeting tryptophan and tyrosine metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2016. **1434**: p. 91-101.
40. Yamashima, T., *Jokichi Takamine (1854–1922), the samurai chemist, and his work on adrenalin*. *Journal of medical biography*, 2003. **11**(2): p. 95-102.
41. Ball, C., *The early history of adrenaline*. *Anaesthesia and intensive care*, 2017. **45**(3): p. 279.
42. Sneader, W., *The discovery and synthesis of epinephrine*. *Drug News Perspect*, 2001. **14**(8): p. 491-494.
43. Bowery, N. and T. Smart, *GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history*. *British journal of pharmacology*, 2006. **147**(S1): p. S109-S119.
44. Dale, H.H., *The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1914. **6**(2): p. 147-190.
45. Loewi, O., *Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung*. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 1921. **189**(1): p. 239-242.
46. Hurst, J.W., W.B. Fye, and H.G. Zimmer, *Otto Loewi and the chemical transmission of vagus stimulation in the heart*. *Clinical Cardiology: An International Indexed and Peer-Reviewed Journal for Advances in the Treatment of Cardiovascular Disease*, 2006. **29**(3): p. 135-136.
47. Shampo, M.A. and R.A. Kyle. *Ulf von Euler—norepinephrine and the Nobel Prize*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 1995. Elsevier.

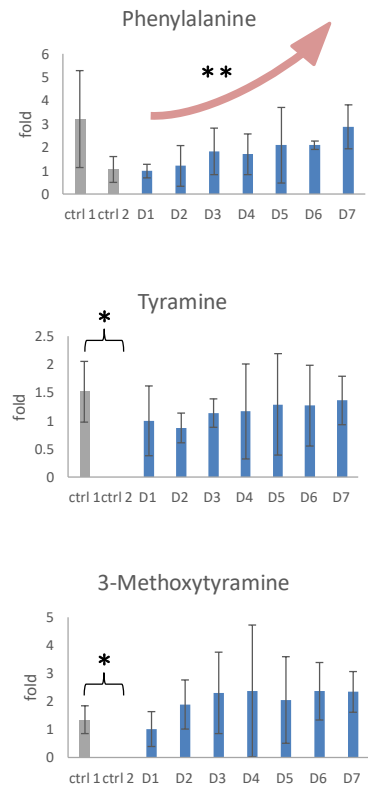
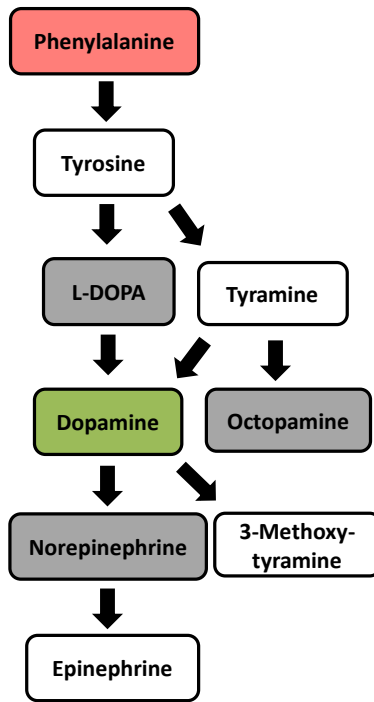
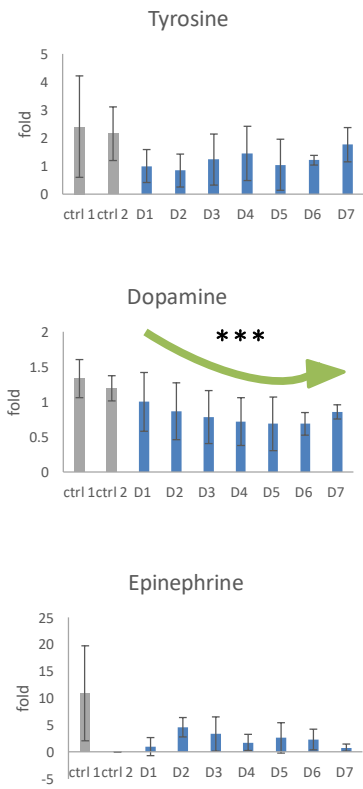
48. Lees, A.J., E. Tolosa, and C.W. Olanow, *Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr*. *Mov Disord*, 2015. **30**(1): p. 19-36.
49. Bourcier, S., et al., *Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. 2006. **20**(9): p. 1405-1421.
50. Berg, D.A., et al., *Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain*. 2013. **140**(12): p. 2548-2561.
51. Baker, S.A., K.A. Baker, and T.J.E.J.o.N. Hagg, *Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone*. 2004. **20**(2): p. 575-579.
52. Yang, P., et al., *Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice*. 2008. **28**(9): p. 2231-2241.
53. Brezun, J. and A.J.N. Daszuta, *Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats*. 1999. **89**(4): p. 999-1002.
54. Encinas, J.M., A. Vaahtokari, and G.J.P.o.t.N.A.o.S. Enikolopov, *Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain*. 2006. **103**(21): p. 8233-8238.
55. Banasr, M., et al., *Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone*. 2004. **29**(3): p. 450.
56. Kulkarni, V.A., S. Jha, and V.A.J.E.J.o.N. Vaidya, *Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus*. 2002. **16**(10): p. 2008-2012.
57. Van Kampen, J.M. and C.B.J.N. Eckman, *Agonist-induced restoration of hippocampal neurogenesis and cognitive improvement in a model of cholinergic denervation*. 2010. **58**(6): p. 921-929.
58. Jang, M.-H., et al., *Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus*. 2002. **13**(12): p. 1509-1513.
59. LoTurco, J.J., et al., *GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis*. 1995. **15**(6): p. 1287-1298.
60. Fernando, R.N., et al., *Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells*. 2011. **108**(14): p. 5837-5842.
61. Gage, F.H.J.S., *Mammalian neural stem cells*. 2000. **287**(5457): p. 1433-1438.
62. Kim, J.-H., et al., *Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease*. 2002. **418**(6893): p. 50.
63. Yu, K.-R., et al., *Rapid and efficient direct conversion of human adult somatic cells into neural stem cells by HMGA2/let-7b*. 2015. **10**(3): p. 441-452.

64. Andäng, M., et al., *Histone H2AX-dependent GABA A receptor regulation of stem cell proliferation*. 2008. **451**(7177): p. 460.
65. Ohtani, N., et al., *Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence*. 2003. **23**(7): p. 2840-2850.
66. Kim, J.-H., et al., *Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease*. Nature, 2002. **418**: p. 50.
67. Kandel, E.R., et al., *Principles of neural science*. Vol. 4. 2000: McGraw-hill New York.
68. Westerink, R. and A.J.A.P. Ewing, *The PC12 cell as model for neurosecretion*. 2008. **192**(2): p. 273-285.
69. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
70. Kaplan, D.R. and R.M. Stephens, *Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor*. Journal of Neurobiology, 1994. **25**(11): p. 1404-1417.
71. Kao, S.-c., et al., *Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the MAP kinase cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells*. Journal of Biological Chemistry, 2001.
72. Traverse, S., et al., *Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor*. Biochemical Journal, 1992. **288**(2): p. 351-355.
73. Kim, U.-H., et al., *Nerve growth factor stimulates phosphorylation of phospholipase C-gamma in PC12 cells*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(3): p. 1359-1362.
74. Loeb, D.M., et al., *A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(12): p. 8901-8910.
75. Ohmichi, M., G. Zhu, and A.R. Saltiel, *Nerve growth factor activates calcium-insensitive protein kinase C-ε in PC-12 rat pheochromocytoma cells*. Biochemical Journal, 1993. **295**(3): p. 767-772.
76. Greene, L.A. and G. Rein, *Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells*. Brain Research, 1977. **129**(2): p. 247-263.
77. Stevens, B., et al., *Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials*. 2002. **36**(5): p. 855-868.

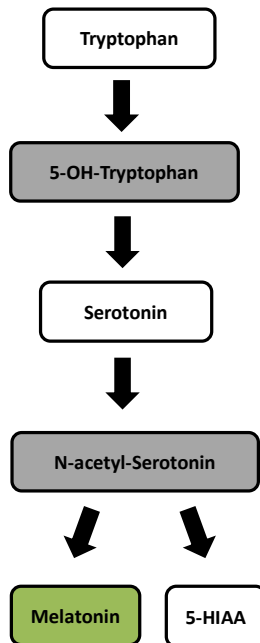
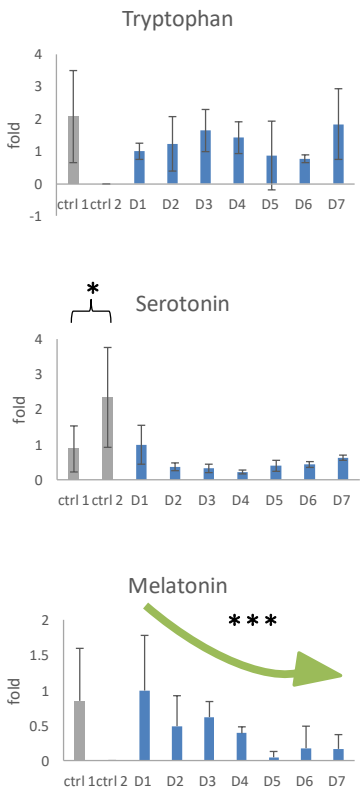
78. Sotnikova, T.D., et al., *The dopamine metabolite 3-methoxytyramine is a neuromodulator*. 2010. **5**(10): p. e13452.
79. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. 2000. **3**(12): p. 1301.
80. Di Monte, D.A., M. Lavasani, and A.B.J.N. Manning-Bog, *Environmental factors in Parkinson's disease*. 2002. **23**(4-5): p. 487-502.
81. Henchcliffe, C. and M.F.J.N.R.N. Beal, *Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis*. 2008. **4**(11): p. 600.
82. Maries, E., et al., *The role of α -synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models*. 2003. **4**(9): p. 727.
83. Volles, M.J. and P.T.J.B. Lansbury, *Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism*. 2002. **41**(14): p. 4595-4602.
84. Lashuel, H.A., et al., *Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations*. 2002. **418**(6895): p. 291.
85. Perez, R.G., et al., *A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis*. 2002. **22**(8): p. 3090-3099.
86. Hirata, Y. and T.J.T. Nagatsu, *Rotenone and CCCP inhibit tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices*. 2005. **216**(1): p. 9-14.
87. Kawamata, J., S. Suzuki, and S.J.C.d.t. Shimohama, *$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor mediated neuroprotection in Parkinson's disease*. 2012. **13**(5): p. 623-630.
88. Tai, K.K. and D.D.J.J.o.n.r. Truong, *Activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels confers protection against rotenone-induced cell death: Therapeutic implications for Parkinson's disease*. 2002. **69**(4): p. 559-566.
89. Zhang, X.-J. and D.S.J.F.i.m.n. Greenberg, *Acetylcholinesterase involvement in apoptosis*. 2012. **5**: p. 40.
90. Goldstein, D.S., et al., *Rotenone decreases intracellular aldehyde dehydrogenase activity: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease*. 2015. **133**(1): p. 14-25.
91. Gao, H.-M., B. Liu, and J.-S.J.J.o.N. Hong, *Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons*. 2003. **23**(15): p. 6181-6187.

第八章 附錄

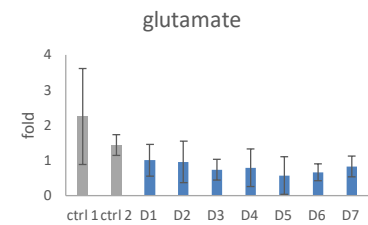
Dopaminergic metabolites



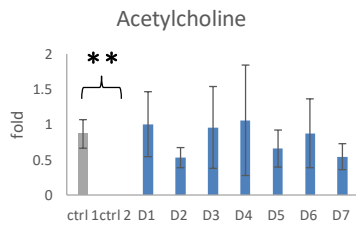
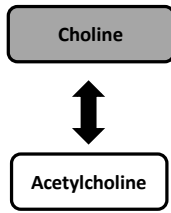
Serotonergic metabolites



Glutamatergic metabolites

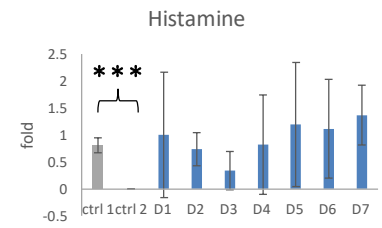
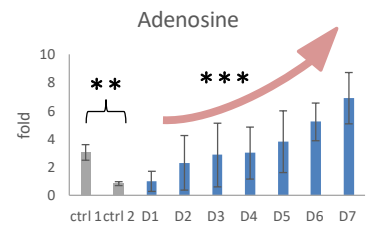


Cholinergic metabolites



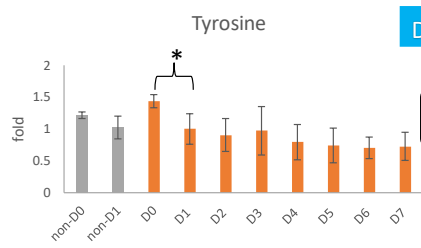
control
 differentiation

Co-transmitter

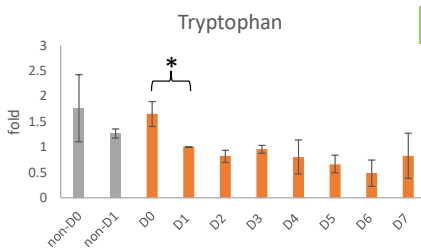
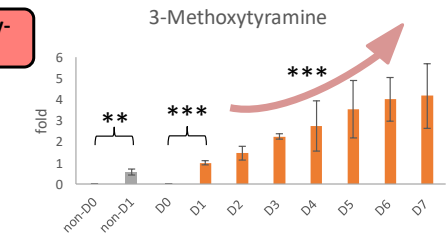
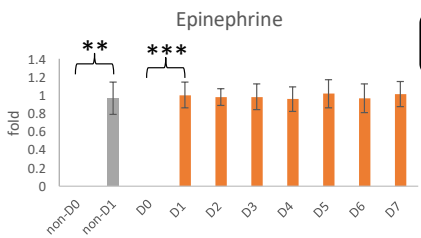
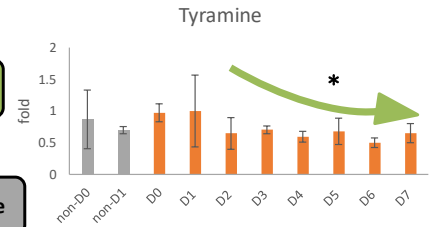
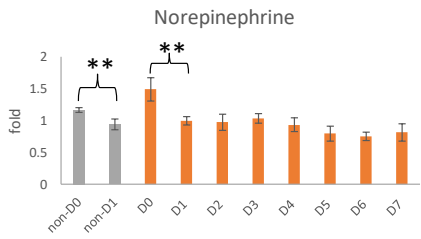
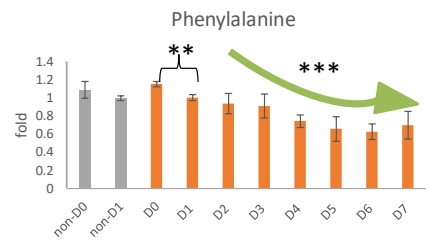
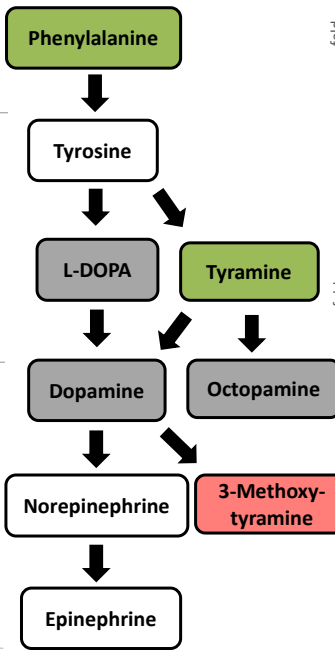


附錄 一、PC12 神經細胞分化時期細胞內神經傳導物變化。

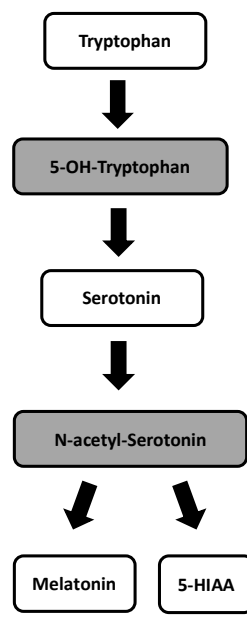
ctrl 1 為未分化狀態細胞，ctrl 2 為於低濃度血清 48 小時狀態細胞，Dn 為不同分化天數狀態細胞。迴歸統計計算* $t > 1.96$ ；** $t > 2.58$ ；*** $t > 3.29$ 。學生檢定計算* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。



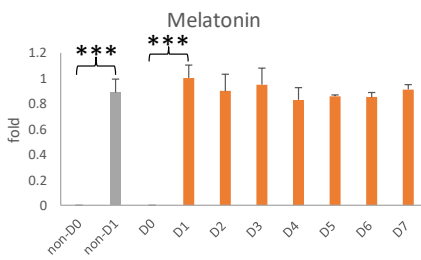
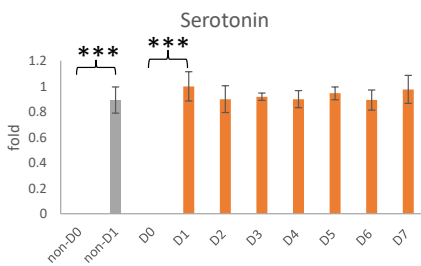
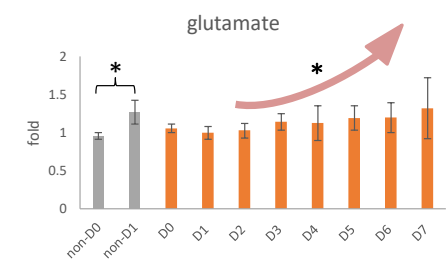
Dopaminergic metabolites



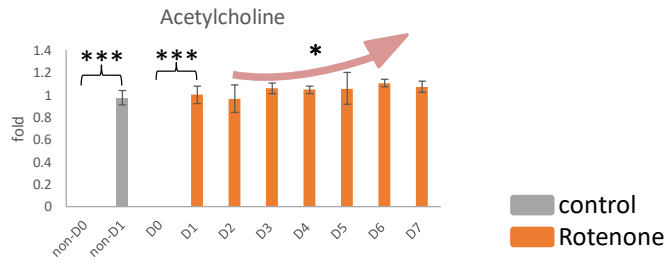
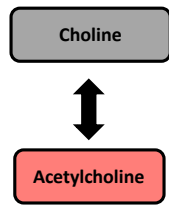
Serotonergic metabolites



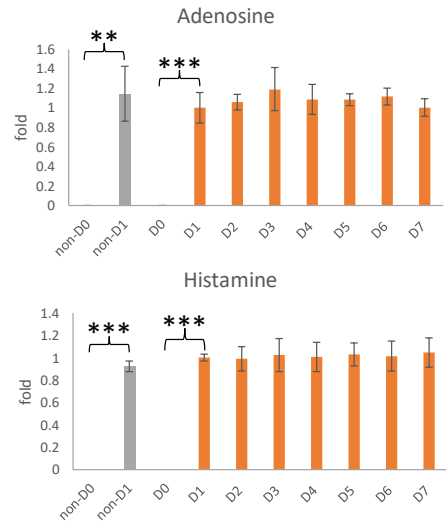
Glutamatergic metabolites



Cholinergic metabolites



Co-transmitter



附錄 二、PC12 神經細胞分化時期培養液中神經傳導物變化。

non-D0 為空白未分化培養液，non-D1 為未分化細胞培養液，D0 為細胞於低濃度血清下 48 小時培養液，Dn 為不同分化天數下培養液。迴歸統計計算* $t > 1.96$ ；** $t > 2.58$ ；*** $t > 3.29$ 。學生檢定計算* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。