

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050003

參展科別 動物學

作品名稱 Super「鼠」跑

得獎獎項

就讀學校 高雄市立高雄女子高級中學

指導教師 許曉菁、施耀翔

作者姓名 劉羽婷、曾珽甄

關鍵詞 高血壓、腦發炎、腦功能障礙

作者簡介



我叫劉羽婷，現就讀高雄女中三年級。此次投稿國際科展的作品是我的第一份專題研究。因參加中山大學的生物培訓課程，發現自己對神經學有許多好奇，遂使我踏上專題研究的道路，並在尋找實驗室的過程遇到施耀翔教授與張瀛雙學姐，一同參與高血壓與腦發炎的相關實驗。

我是就讀高雄女中三年級的曾珽甄。生物科學和醫學一直是令我樂此不疲的研究領域，有幸進入施教授的實驗室，並接受眾人的指教，令我不勝感激。相信此經驗會成為我日後進行科學研究的一大裨益。

摘要

透過文獻探討已知高血壓會引起腦發炎，導致腦功能受損。研究結果也顯示運動能增進腦部功能。因此，在此實驗中，我們想要探討高血壓引起的腦發炎和功能退化等問題能否透過運動改善。將鼠分為 2K1C 手術誘發高血壓組(2K1C)及沒有高血壓(Sham)的對照組，並再各分為運動組(Sham-EX、2K1C-Ex)和不運動組(Sham、2K1C)。小鼠腦部切片中微小膠細胞數量顯示 2K1C 的小鼠組別腦發炎最為嚴重，且 HE 染色發現一樣為 2K1C 小鼠組別的神經細胞數目最少。接著我們以莫里斯水迷宮測試小鼠學習、記憶功能，結果 Sham-Ex 及 2K1C-Ex 尋獲平台時間皆有減少趨勢，而 2K1C 尋獲平台花費最長時間，顯示運動確實可以減緩高血壓造成的腦功能受損。

Abstract

Through the literature, it is known that high blood pressure can cause brain inflammation, leading to impaired brain function. Research results also show that exercise can improve brain function. Therefore, in this experiment, we want to explore whether brain inflammation and functional deterioration caused by high blood pressure can be improved by exercise. The rats were divided into 2K1C surgery-induced hypertension group (2K1C) and control group without hypertension (Sham), and divided into exercise group (Sham-EX, 2K1C-Ex) and non-exercise group (Sham, 2K1C). The number of microglia in mouse brain slices showed that the 2K1C mousegroup had the most severe brain inflammation, and HE staining showed that the same 2K1C mousegroup had the least number of nerve cells. Then we tested the learning and memory functions of mice with the Morris water maze. The results showed that the time for Sham-Ex and 2K1C-Ex to find the platform decreased, and 2K1C took the longest time to find the platform, showing that exercise can indeed slow down the high blood pressure and impaired brain function.

壹、前言

一、研究動機

(一) 文獻探討

高血壓已知與腦功能受損有關，動物實驗結果顯示自發性高血壓大鼠(the spontaneously hypertensive rat, SHR)的海馬迴相關記憶、專注力、活動量等方面均有減損(Togashi et al., 1982)。另外使用血管收縮素 II(angiotensin II, AngII) 誘發高血壓的大鼠也有類似結果(Duchemin, Belanger, Wu, Ferland, & Girouard, 2013)。然而，在史-道二氏大鼠(Sprague-Dawley rat, SD rat)透過窄化腹主動脈而誘發高血壓後，其海馬迴相關記憶並無受損(Kadish, van Groen, & Wyss, 2001)。這樣的差異可能是因為 SHR 是以威斯達老鼠(Wistar Kyoto, WKY) 透過繁殖篩選得到的高血壓動物模式，其本身的基因異質性(genetic heterogeneity)可能會導致不同批次間的差異 (Okamoto & Aoki, 1963)。

有關高血壓引起腦功能受損的機轉相當複雜。可能的機轉包括腦血管血流調節不良(Kazama et al., 2004; Girouard and Iadecola, 2006)和局部腦區微環境(micro-environment) 改變(Iadecola et al., 2009; Iadecola, 2014)。過去在高血壓小鼠實驗中也發現，高血壓會引發海馬迴微小膠細胞活化及神經發炎(Toth et al., 2013b)。而邊緣系統發炎也被認為與長期記憶受損有關(Hansen, N., 2019)。在腦發炎相關的動物研究中，多數都透過周邊(Wu, S.-Y., et al., 2016)或大腦注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)來引起腦部發炎。在這類的動物模式中，透過腹腔注射 LPS(intraperitoneal injection, 500-700 µg/kg)或者腦部注射 LPS(intra-cerebroventricular injection, 12 µg)皆可導致空間記憶障礙(Zhao, J., et al., 2019)，這樣的證據再次強化了腦發炎會導致腦功能受損。然而，這樣的證據再次強化了高血壓誘發的腦發炎會導致腦功能受損。然而，目前依然無法排除腦功能受損與高血壓之間可能僅是隨著年齡增加而好發的共病症(co-morbidity)。

目前也沒有有效的藥物能夠改善高血壓對大腦的影響，即使使用抗血壓藥物處理也僅降低 8%的失智風險(Haag MD, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM, Stricker BH, 2009)。而大量的研究指出，運動可以促進人體健康、增進認知功能及強化腦部功能(Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA, 2007, Rothman SM, Griffioen KJ, Wan R, Mattson MP, 2012, Voss MW, Vivar C, Kramer AF, van Praag H, 2013)。運動如何改變

人體與腦功能目前尚未有定論，研究認為透過運動刺激以後，身體會改變基因表現及產生許多作用包括：製造養分、能量代謝以及抗發炎（Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim JH, et al., 2019, Mee-Inta O, Zhao ZW, Kuo YM, 2019, Yoo SZ, No MH, Heo JW, Chang E, Park DH, Kang JH, et al., 2019），上述生理機制的改變都能強化內源性保護與修復的能力。而腦部也可藉由強化神經可塑性(neuroplasticity)、增加新陳代謝效率、促進抗氧化能力與抗發炎，這些改變也被相信與腦功能強化有關（Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim SH, et al., 2018, Nagamatsu LS, Flicker L, Kramer AF, Voss MW, Erickson KI, Hsu CL, et al., 2014）。再者，運動可維持大腦的內環境恆定(homeostasis)，且藉由調節神經膠細胞、促炎性細胞因子(pro-inflammatory cytokines)和神經發炎，以防止腦部病變，因此運動與預防神經退化性疾病有關，如阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, AD)、帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)、肌萎縮側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)和多發性硬化症(Multiple sclerosis, MS) (Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim JH, et al., 2019, Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J, 2008, Ferreira GD, Costa AC, Plentz RD, Coronel CC, Sbruzzi G, 2016, Braga ACM, Pinto A, Pinto S, de Carvalho M, 2018)。

（二）實驗動機

透過文獻內容可知，高血壓可引起腦發炎，腦發炎可能影響腦功能，而運動可透過調節微環境，減少神經膠細胞與促炎性細胞因子(pro-inflammatory cytokines)的活化，來減緩腦部病變。因此我們假設可以透過運動降低高血壓引起的腦發炎，進而改善高血壓引起的腦功能下降。本研究將探討（1）運動能否改善高血壓引起的腦功能下降。（2）運動能否降低高血壓引起的腦部發炎現象。我們透過手術誘發小鼠的高血壓，並將小鼠分為高血壓組與對照組，再個別分成運動組與坐式生活不運動組。透過莫里斯水迷宮測試各組老鼠空間記憶能力，隨後收集腦組織透過免疫染色，觀察海馬迴中的 CA1 與齒狀回(dentate gyrus, DG)微小膠細胞數量，以得知其腦發炎情形。最後使用蘇木精-伊紅常規染色判斷上述腦區神經細胞數量。

二、研究目的

- （一）運動是否能改善高血壓引起的腦功能障礙。
- （二）運動是否能改善高血壓引起的腦發炎狀況。

貳、研究設備及器材

一、石蠟切片(Paraffin sections)

(一) 藥品及試劑

1. 70%、90%、100%乙醇(70%、90%、100% Ethanol)

因其能和水與透明劑互相混合，作為脫水劑使用。

2. 二甲苯(Xylene)

純酒精不能和石蠟相溶，因此需要能與純酒精和石蠟相溶的媒介液，替換出組織內的酒精。

3. 石蠟(Paraffin)

將組織浸入其中，達到支持、固定組織形狀的功能。

4. 蛋白甘油

避免將組織在脫蠟、水合及染色等步驟時從載玻片上脫落。

(二) 設備及器具

1. 石蠟包埋機
2. 石蠟切片機
3. 烘箱將貼片後的載玻片烘乾。
4. 鋼刀刀片

二、蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin and Eosin stain)

(一) 藥品及試劑

1. 二甲苯(Xylene)

(1)用於脫蠟。脫蠟後方可在水溶性染劑中染色。

(2)二甲苯是封片膠與乙醇的媒介，藉由二甲苯把水置換掉，使封片膠完整浸滿組織，才能把玻片封好。否則封片膠遇水會乳化，組織上會出現白色顆粒。

2. 70%、90%、100%乙醇

用於脫蠟時的水合及染色後的脫水。

3. 蘇木精(Hematoxylin, C.I. 75290)

可將嗜鹼性結構染成藍紫色，如細胞核、核糖體等。

4. 伊紅(Eosin)

一種酸性染料，能將嗜酸性結構染成紫紅色，如細胞質、蛋白質。

5. 封片膠(Mounting medium)

三、冷凍切片

(一) 藥品及試劑

1. 冷凍包埋劑 (OCT)

在冷凍切片時可將組織包埋並支撐組織，並可使其和載臺黏合以進行冷凍切片。

2. 抗凍液 (Antifreeze)

融化組織切片上的冷凍包埋劑。

(二) 設備及器具

1. 包埋盒

將組織和冷凍包埋劑加入包埋盒後急速冷凍，使其定型。

2. 24孔孔盤 (內裝有抗凍液)

3. 載臺

載臺和組織黏合後，可裝在切片機上冷凍切片。

4. 切片機

可將包埋組織切成 0~60um 厚度的薄片。

5. 鋼刀刀片

四、免疫組織化學染色(Immunohistochemistry, IHC)

(一) 藥品及試劑

1. 緩衝溶液

(1)檸檬酸 (citric acid)

(2)二次水 (Distillation-Distillation H₂O, ddH₂O)

(3)聚山梨醇酯 20 (Polysorbate 20, Tween 20)

2. 2% 過氧化氫磷酸鹽水溶液

(4)30% 過氧化氫 (H₂O₂)

(5)磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)

3. 阻斷液 (blocking buffer)

(6)3%牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA)

(7)(phosphate buffer saline & Tween-20, PBST)

4. Iba1 初級抗體 (primary anti-body)[1:500]

(8)anti-rabbit Iba1(GeneTex, GTX100042)

(9)3%牛血清蛋白/PBST

5. 二級抗體 (secondary antibody) [1:500]

(10) biotinylated anti-rabbit (BA-1000)

(11) 3% 牛血清蛋白/PBST

(12) 辣根過氧化物酶聚合物 (Polymer Horseradish peroxidase; Polymer-HRP) 能將很多的二抗串在一起，增加訊號強度。

(13) 可見光呈色劑 (chromagen, DAB) 能和二抗上的 HRP 發生氧化還原，呈棕色。

(14) 75%, 95%, 100%乙醇

(15) 封片膠

(二)設備及器具

1. 移液器(pipette)

2. 載玻片

3. 蓋玻片

參、研究過程及方法

一、組織處理 (Tissue Processing)

(一) 冷凍切片 (Frozen Section)

1. 固定 (Fixation)

為了避免大腦組織在離開小鼠後因下列四個原因受損：

- (1) 缺乏血液、氧氣供
- (2) 大量堆積代謝廢物
- (3) 自溶酵素 (autolytic enzyme) 作用而引起細胞自噬 (Autophagy)
- (4) 受細菌分解而腐敗

而固定有助於組織硬化，有利於切片的進行；固定也助於組織染色。且為了保存組織抗原性，故右半腦使用 4% 福馬林 (Formalin) 於 4 °C 下固定。

2. 脫水 (Dehydration)

將組織以磷酸鹽緩衝生理鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS) 浸洗三次/每次 10 分鐘。將組織塊逐次置入較高濃度的蔗糖緩衝液 (Sucrose-PBS solution)，利用濃度差使組織脫水，以避免冷凍切片時因組織中的水分凍結形成冰晶，成硬度前後不一，影響切片結果。脫水的順序為：10% (2 小時)、20% (2 小時)、30% (16 小時以上) sucrose-PBS solution。

3. 包埋 (Embedding)

為了提供組織適當的支撐性，將冷凍包埋劑 (Optional cutting temperature compound, O.C.T) 擠入包埋盒 (錫箔製)，再將組織放入。並置於切片機中快速降溫。

4. 切片 (Section cutting)

組織塊以冠狀面 (Coronal section) 切割，並平均收取 130 片/每片厚度 30 μm 浸泡於抗凍液 (Cryoprotectant solution, 20% 乙二醇, 20% 甘油, 50mM 磷酸二氫鈉緩衝液, pH=7.4)。

(二) 石蠟切片 (Paraffin section)

1. 固定 (Fixation)

為了避免腦組織在取出後因下列原因影響實驗結果：

缺乏血液與氧氣供給造成組織蛋白表現改變

(1)離體後細胞持續代謝造成代謝物堆積而影響結果

(2)離體後細胞產生自溶酵素 (autolytic enzyme) 並進入細胞自噬作用

(Autophagy) 使組織受損

(3)受到其他外在因素使組織受損，例如微生物分解。

另外組織固定有利於保存組織上的抗原，是免疫組織染色重要的前處理步驟。

我們本次實驗在腦組織取出後，使用了 4%福馬林 (Formalin) 於 4 °C 下進行後固定。

2. 脫水(Dehydration)

石蠟切片由於需要對組織進行滲蠟才能進行後續包埋，目前一般的作法是將組織內的水分置換成可與石蠟互溶的二甲苯。確切作法是先使用乙醇 (Ethanol) 將組織內的水替換出來。而為了避免組織急遽收縮，使用濃度低至高的乙醇 進行脫水。組織的脫水順序為 70%乙醇 (15 分鐘)、90%乙醇 (15 分鐘)、100%乙醇 (15 分鐘)、100%乙醇 (15 分鐘)、100%乙醇 (20 分鐘)、100 %乙醇 (30 分鐘)。由於酒精和石蠟相溶的二甲苯，因此最後將組織浸在二甲苯中過夜(16 小時以上)以替換掉組織內的酒精。

3. 滲蠟浸潤(Infiltration)

脫水步驟結束後，組織將進行滲蠟浸潤步驟，目的在於以石蠟取代二甲苯，使石蠟進入組織達到固定與支撐組織的目的。作法是將組織浸在石蠟與二甲苯等量混合液中 1-2 小時，接著將組織塊移入裝有蠟液的容器中浸漬三小時(65°C)，使石蠟進入組織內。

4. 包埋(Embedding)

組織包埋的目的在於使組織形狀與位置固定，避免在切片過程中使組織型態受到破壞。首先我們石蠟包埋機將石蠟溶解並固定在 65°C 保持液態。然後在鐵製包埋盒中注入少量的蠟後，將組織塊裝入並繼續注入蠟至組織被完全覆蓋為止。隨後將包埋盒置於冷凍台上使石蠟降溫凝結固化。將完成固化的組織塊(block)放置於室溫，避免快速低溫造成石蠟裂開。石蠟組織

塊取出後可以放在-20 °C保存備用。

5. 切片(Sectioning)

將多餘蠟塊切除，並溶化底部的蠟使其與載臺接合。使用石蠟切片機將組織依冠狀切面 (Coronal section) 切成 3-5 μ m 的厚度。

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

本研究使用免疫組織染色觀察老鼠海馬迴中微小膠細胞的數量。免疫組織化學染色法是指透過抗體上接合的辣根過氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 與可見光呈色劑 (Chromogen) 二氨基聯苯氨 (Diaminobenzidine, DAB)發生氧化還原而呈色，並利用免疫學原理中抗原與抗體專一性的結合反應，檢測組織中是否有目標蛋白的存在。此方式不僅可定量抗原之表現量，亦可觀察抗原的表現位置。

實驗方法如先前文獻所述[1]。簡短來說，我們先組織切片浸入 85°C~90°C 的檸檬酸溶液 (Citric acid, pH=6.0)，透過高溫與酸性環境進行抗原修復 (Antigen retrieval)。磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)浸洗 5 分鐘。隨後加入 2 %過氧化氫 (H₂O₂) 在室溫作用 30 分鐘，以破壞內源性的過氧化物酶 (Peroxidase)，降低染色背景雜訊。之後再以 PBS 浸洗五分鐘後，在室溫下使用含有 3%牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 與 0.1%Triton X-100 的 PBS (PBS-T)，覆蓋在組織上 30 分鐘，在室溫作用 30 分鐘以減少抗體與非特異性抗原的接合 (Blocking)。Blocking 結束後，以一級抗體(Ionized calcium-binding adaptor molecule 1, Iba-1, GTX100042, 1:500, GeneTex, Irvine, CA, USA)覆蓋，並於室溫靜置 16 小時以上。

一級抗體接合結束後，以 PBS-T 清洗三次/每次 3 分鐘。洗掉多餘的一級抗體後，使用訊號強化劑 (Enhancer treatment) 在室溫下作用 20 分鐘，隨後以 PBS-T 清洗三次 / 每次 3 分鐘。然後再加入接有 HRP 的二級抗體 (Polymer-HRP treatment)以辨認一級抗體的訊號。於室溫下作用 30 分鐘後，以 PBS-T 清洗五次/每次 3 分鐘以移除多餘的二級抗體。之後加入 DAB 10 ul 與其緩衝液 (DAB buffer) 100 ul 和 PBS-T 400 ul 作用 2 分鐘 30 秒。以 PBS 清洗並浸泡組織切片以停止 DAB 反應。接著以 75%、95%、100%、100%、100%的乙醇 (Ethanol, ETOH) 和鄰二甲苯 (1,2-dim dimethylbenzene, ortho- xylene)浸洗、脫水。最後將封片膠 (Mounting medium) 滴加於蓋玻片上，再緩緩蓋上載玻片。

三、蘇木精-伊紅染色 (Hematoxylin And Eosin Stain, H&E stain)

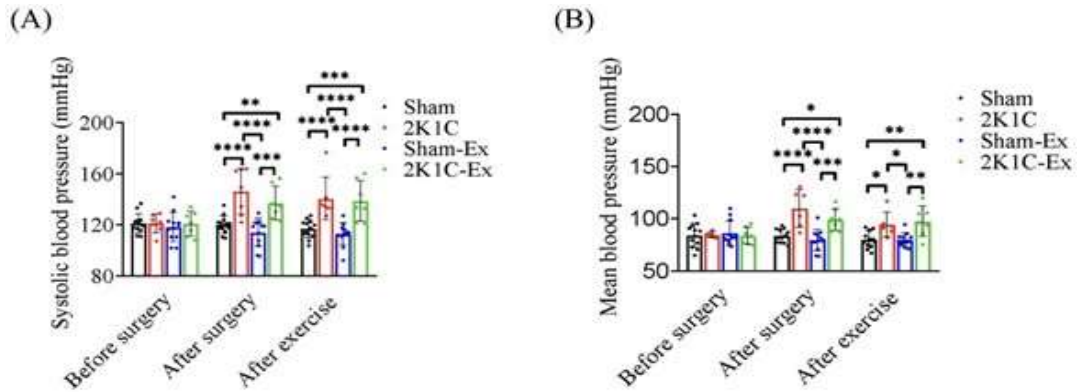
蘇木精-伊紅染色的原理為組織對染料的結合度不同，其中蘇木精帶陽離子，染色後嗜鹼性處成藍紫色；而伊紅帶陰離子，染劑呈酸性，染色後嗜酸性處成桃紅色。用二甲苯將石蠟切片玻片脫蠟，並用 70%、90%、100%酒精溶液去除二甲苯，使含水染劑易於滲透組織。用蘇木精染劑將組織染色1分鐘，接著用流動的自來水清洗 5 分鐘，再用伊紅複染1分鐘。再使用酒精使玻片脫水，並在二甲苯中浸洗，以讓二甲苯可以和封片膠互融。最後用封片膠將蓋玻片和玻片固定。

四、數據分析

所有的細胞計數都使用 Image J 進行半自動計數分析，分析的結果使用 Excel 進行 Student t-test 統計差異。

肆、研究結果

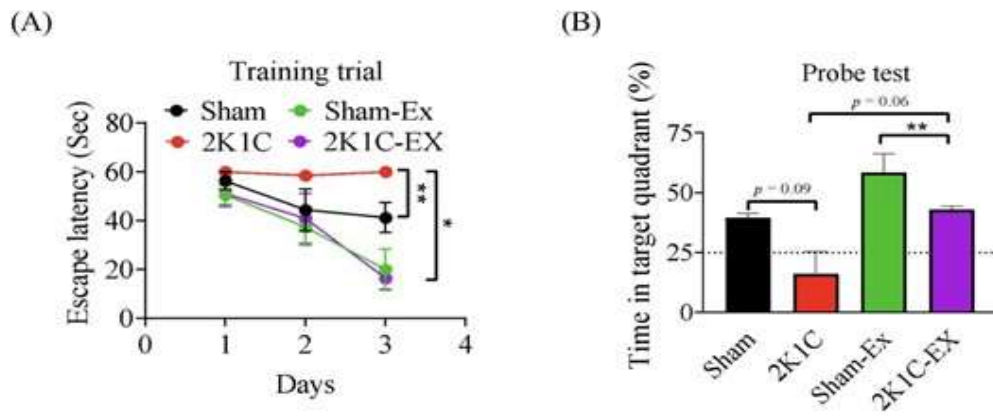
一、運動對 2K1C 高血壓小鼠血壓的影響



圖一、不同時期(手術前、手術後、運動後)小鼠的(A)心臟收縮壓(B)平均動脈壓

本研究以 2K1C 誘發小鼠高血壓。並於術前 3 天、術後 21 天與術後 61 天測血壓。於術後 28 天至 63 天進行跑步運動。為了避免基因異質性影響血壓，正式進行實驗前，使用小鼠尾壓測量系統 (BP-2000 system, visitech system)，並透過統計(司徒頓 t 檢定, Student's t-test)確認小鼠之間的收縮壓及平均動脈壓無顯著差異。手術後，凡施以 2K1C 的組別之收縮壓及平均動脈壓皆高於 Sham 的組別。其中，2K1C 與 Sham、Sham-Ex 有顯著差異；2K1C-Ex 與 Sham、Sham-Ex 有顯著差異。運動後，在收縮壓及平均動脈壓中，2K1C 與 Sham、Sham-Ex 仍舊有顯著差異；2K1C-Ex 與 Sham、Sham-Ex 仍舊有顯著差異。高血壓並不會因時間流逝而恢復，且運動無法使血壓恢復到與 Sham 組相同的水準。

二、運動對 2K1C 高血壓小鼠學習與記憶的影響

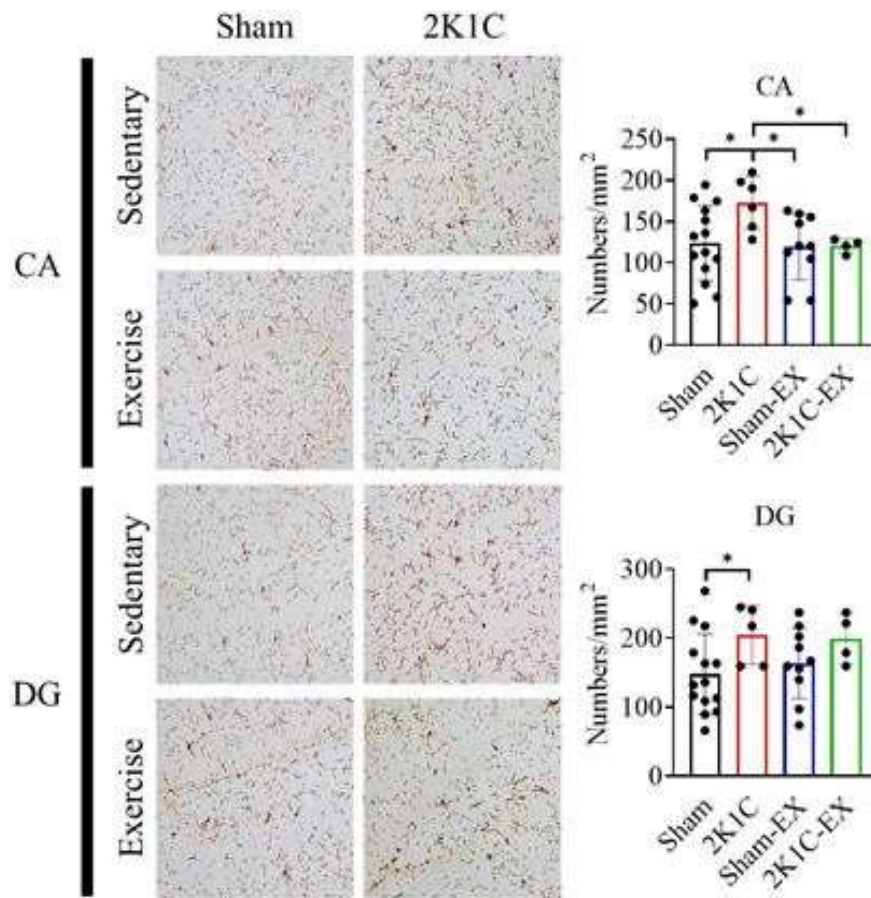


圖二、(A) 不同日期小鼠尋獲平台所花的時間 (B) 移除平台後小鼠待在目標象限(有平台)的時間比例

本研究使用莫里斯水迷宮來測定與海馬迴相關的空間記憶能力。2K1C-Ex 與 Sham-Ex 尋獲平台的時間有減少的趨勢。尋獲平台花費時間最長的為 2K1C，其與 Sham 有顯著差異 ($p \leq 0.01$)；其也與 2K1C-Ex 有顯著差異 ($p \leq 0.05$)。

移除平台後，小鼠待在目標象限(有平台的象限)的時間比例，以 Sham-Ex 最高，其與 2K1C-Ex 有顯著差異 ($p \leq 0.01$)。但 2K1C 與 Sham ($p > 0.05$)、2K1C-Ex ($p > 0.05$) 並無顯著差異。

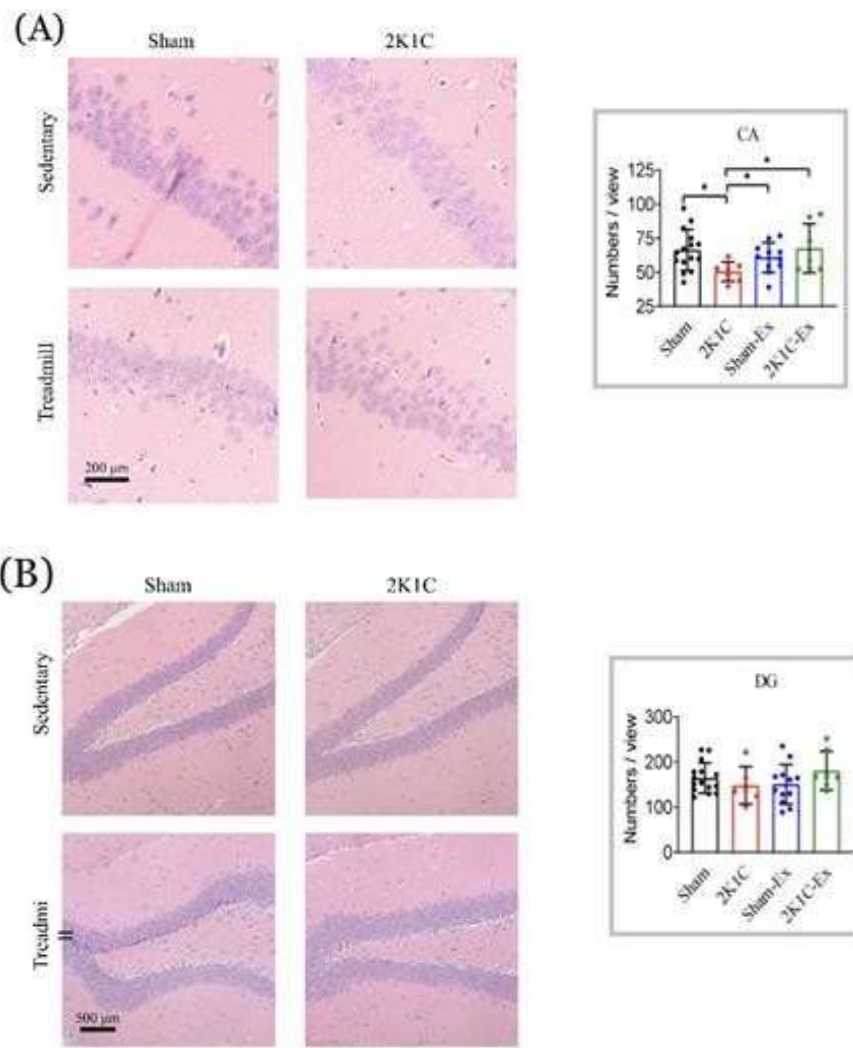
三、微膠細胞密度



圖三、不同腦區微膠細胞密度

本研究使用 IHC 來染微膠細胞，並計算單位面積的細胞數量。以 Student's t-test 分析的結果顯示，在 CA1 中，2K1C 之微膠細胞數目最多，與 Sham、Sham-Ex、2K1C-Ex 皆有顯著差異 ($p \leq 0.05$)。在 DG 中，僅 2K1C 與 Sham 有顯著差異 ($p \leq 0.05$)，剩下的組別之間均未達統計上的顯著性。

四、神經細胞數量



圖四、(A) CA1 區域中神經細胞數量(B) DG 區域中神經細胞數量

本研究使用 HE Stain 來染 CA1 與 DG 的神經細胞，並計算單位面積的神經細胞數量。以 Student's t-test 分析的結果顯示，在 CA1 中，2K1C 之神經細胞數目最少，與 Sham、Sham-Ex、2K1C-Ex 皆有顯著差異 ($p \leq 0.05$)。但在 DG 中，沒有顯示任何配對有統計上的意義。

伍、討論與展望

本研究已經證實運動可以改善腦發炎及腦發炎所造成的損傷情形，但無法從中得知運動減輕腦發炎的機制為何。運動會產生組織蛋白酶 B (Cathepsin B) (Adrián De la Rosa et al., 2019))、鳶尾素 (Irisin) (為 Fibronectin type III domain-containing protein 5, FNDC5 的前驅物 (precursor)) (Harold P Erickson, 2013) 及白細胞介素-6 (Interleukin-6) (B K Pedersen, A Steensberg, C Fischer, C Keller, K Ostrowski, P Schjerling, 2001) 等物質。其中鳶尾素是一種 112 個氨基酸的糖基化蛋白質激素，是透過 FNDC5 的蛋白水解切割形成的，被發現可以促進海馬迴裡腦源性神經營養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的表現 (Christiane D. Wrann et al., 2013)，也可以增加海馬迴中的神經突觸 (Se Hoon Choi et al., 2018)。其中腦源性神經營養因子可以抑制神經元的胞毒作用，及減少類澱粉樣蛋白的毒性，因此可以改善認知功能，被認為有益於減緩腦發炎造成的病徵及增強突觸功能。在阿茲海默症 (Alzheimer's disease, AD) 小鼠模型中也發現腦內 FNDC5/irisin 的數值下降，而將小鼠腦中 FNDC5/irisin 敲掉後會使小鼠長期增強能力 (long-term potentiation)，突觸可塑性 (synaptic plasticity) 及記憶力下降。反之，將 FNDC5/irisin 體內水平提高後，可以增強小鼠長期增強能力、突觸可塑性及記憶力，因此推測運動後產生鳶尾素，為有助於改善腦損傷後功能的原因之一 (Mychael V. Lourenco et al., 2019)。

除此之外，之前研究結果也顯示鳶尾素治療可以抑制促炎細胞因子 (inflammatory cytokine) 如腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白細胞介素-6，減少脂肪細胞中單核細胞趨化蛋白-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) 的表達，隨後減弱巨噬細胞的遷移並誘導表型轉換，因而引導巨噬細胞從 M1 (促炎性) 到 M2 (消炎性) 的狀態。這也被認為是鳶尾素可以減緩腦發炎情況的原因 (LeBris S Quinn, Barbara G Anderson, Jennifer D Conner, Tami Wolden-Hanson, 2015)。

但從上述實驗結果，並無法確認鳶尾素是否對所有類型的腦發炎、改善腦發炎所造成的疾病及神經突觸可塑性皆適用，例如失智症 (dementia) 中就包含退化失智症及血管型失智症 (或稱多發性腦梗塞失智症 (Multi-infarct dementia, MID)) 或是同時發生的混和型失智症 (mixed dementia) 等。而其中阿茲海默症和路易氏體失智症 (Dementia with Lewy Bodies) 屬於退化性失智症，其成因和血管型失智症並不

進相同，因此不能從上述實驗發現推斷鳶尾素有助於改善失智症，而需要更多的實驗比較鳶尾素在不同類型失智症中所扮演的角色及功能。

而究竟是因為運動產生鳶尾素，導致阿茲海默症小鼠模型腦功能改善，或是有其他因子的交互作用影響不得而知，其中的關連可能還需要更精密的實驗，才能釐清。本研究證實運動有助於改善腦功能，期許能本研究證實運動有助於改善腦功能，期許能作為研究其機轉的參考。而本實驗室也正在研究、探討運動改善腦發炎情況及腦功能下降其中的轉機，希望能利用未來研究成果找出減緩腦發炎的因子，使臥病在床或不方便運動的患者也能達到運動的效果，藉此降低失智症惡化速度，甚至改善其腦部狀況。

已知高血壓會造成腦的記憶功能受損(Togashi et al., 1982)及發炎(Toth et al., 2013b)。在我們的實驗中，透過 2K1C 手術誘導小鼠高血壓後，微小膠細胞數量統計上顯著多於無運動的對照組小鼠，因此 2K1C 的小鼠腦部有發炎現象。同時，2K1C 小鼠運動過後，其海馬迴CA1 的微小膠細胞數量顯著低於無運動的 2K1C 小鼠，可推論出運動可以降低 2K1C 造成的腦部發炎。但運動無法改變 2K1C 小鼠齒狀迴 (Dentate gyrus, DG) 的腦部發炎現象。另外，我們透過蘇木精-伊紅染色確認海馬迴 CA1 與 DG 的神經細胞數量，我們觀察到運動可以顯著性的避免 2K1C 小鼠 CA1 神經細胞的減少，對 DG 一樣沒有影響。綜合上述結果，可以知道運動能夠減緩 2K1C 造成的腦部發炎與海馬迴 CA1 神經細胞數量減少。

陸、參考資料

- CASE PRESS/台大科學教育發展中心 --駱宛琳 (2015)。【醫學研究】捲土重來的鳶尾素 (Irisin)。檢自 <https://case.ntu.edu.tw/blog/?p=23113> (Feb 12,2021)
- PanSci 泛科學 (2017)。脂肪有三種？找對顏色讓你科學瘦——《脂肪的祕密生命》。檢自 <https://pansci.asia/archives/117140> (Feb 12,2021)
- 國研院生醫科技小組。工作細胞：大腦的細胞們。檢自 <https://www.narlabs.org.tw/xcscience/cont?sid=0J136639774040531953&xsmsid=0I148638629329404252> (Aug 11,2020)
- Adrián De la Rosa, Elisabeth Solana, Rubén Corpas, David Bartrés-Faz, Mercè Pallàs, Jose Vina, Coral Sanfeliu & Mari Carmen Gomez-Cabrera(2019). Long-term exercise training improves memory in middle-aged men and modulates peripheral levels of BDNF and Cathepsin B. *SciRep* 9, 3337.
- Braga ACM, Pinto A, Pinto S, de Carvalho M(2018). The role of moderate aerobic exercise as determined by cardiopulmonary exercise testing in ALS. *Neurol Res Int*. 2018:8218697.
- Choi, S. H., Bylykbashi, E., Chatila, Z. K., Lee, S. W., Pulli, B., Clemenson, G. D., Kim, E., Rompala, A., Oram, M. K., Asselin, C., Aronson, J., Zhang, C., Miller, S. J., Lesinski, A., Chen, J. W., Kim, D. Y., van Praag, H., Spiegelman, B. M., Gage, F. H., & Tanzi, R. E. (2018). Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6406), eaan8821. <https://doi.org/10.1126/science.aan8821>
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA(2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*. 2007;30:464–72.
- Duchemin, S., Belanger, E., Wu, R., Ferland, G., & Girouard, H. (2013). Chronic perfusion of angiotensin II causes cognitive dysfunctions and anxiety in mice. *Physiol Behav*, 109, 63-68. doi:10.1016/j.physbeh.2012.10.005
- Erickson H. P. (2013). Irisin and FNDC5 in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor?. *Adipocyte*, 2(4), 289–293. <https://doi.org/10.4161/adip.26082>
- Ferreira GD, Costa AC, Plentz RD, Coronel CC, Sbruzzi G. (2016). Respiratory training improved ventilatory function and respiratory muscle strength in patients with multiple sclerosis and lateral amyotrophic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Physiotherapy*. 2016;102:221–8.

- Girouard H, Iadecola C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* 2006;100:328–335.
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:126–31.
- Haag MD, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM, Stricker BH (2009) Duration of antihypertensive drug use and risk of dementia: A prospective cohort study. *Neurology*72:1727-1734.
- Hansen, N. (2019). Long-Term Memory Dysfunction in Limbic Encephalitis. *Frontiers in neurology*, 2019. 10: p. 330-330.
- Iadecola C. (2014). Hypertension and dementia. *Hypertension.* 2014;64:3–5. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03040.
- Iadecola C, Park L, Capone C. (2009). Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension. *Stroke.* 2009;40:S40–S44.
- Kadish, I., van Groen, T., & Wyss, J. M. (2001). Chronic, severe hypertension does not impair spatial learning and memory in Sprague-Dawley rats. *Learn Mem*, 8(2), 104–111. doi:10.1101/lm.37301
- Kazama K, Anrather J, Zhou P, Girouard H, Frys K, Milner TA, Iadecola C. (2004). Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circ Res.*2004;95:1019–1026.
- Mee-Inta O, Zhao ZW, Kuo YM. (2019). Physical exercise inhibits inflammation and microglial activation. 2019;8(7) doi: 10.3390/cells8070691. pii: E691.
- Lourenco, M. V., Frozza, R. L., de Freitas, G. B., Zhang, H., Kincheski, G. C., Ribeiro, F. C., Gonçalves, R. A., Clarke, J. R., Beckman, D., Staniszewski, A., Berman, H., Guerra, L. A., Forny-Germano, L., Meier, S., Wilcock, D. M., de Souza, J. M., Alves-Leon, S., Prado, V. F., Prado, M., Abisambra, J. F., ... De Felice, F. G. (2019). Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nature medicine*, 25(1), 165–175. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0275-4>
- Nagamatsu LS, Flicker L, Kramer AF, Voss MW, Erickson KI, Hsu CL, et al. (2014). Exercise is medicine, for the body and the brain. *Br J Sports Med.* 2014;48:943–4.
- Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 27, 282-293.
- Park SS, Park HS, Jeong H, Kwak HB, No MH, Heo JW, et al. (2019). Treadmill exercise ameliorates chemotherapy-induced muscle weakness and central fatigue

- by enhancing mitochondrial function and inhibiting apoptosis. *Int Neurol J.* 2019;23:S32–9.
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Ostrowski, K., & Schjerling, P. (2001). Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. *Exercise immunology review*, 7, 18–31.
- Quinn, L. S., Anderson, B. G., Conner, J. D., & Wolden-Hanson, T. (2015). Circulating irisin levels and muscle FNDC5 mRNA expression are independent of IL-15 levels in mice. *Endocrine*, 50(2), 368–377. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0607-9>
- Rothman SM, Griffioen KJ, Wan R, Mattson MP. (2012). Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1264:49–63.
- Togashi, H., Minami, M., Bando, Y., Koike, Y., Shimamura, K., & Saito, H. (1982). Effects of clonidine and guanfacine on drinking and ambulation in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 17(3), 519–522.
- Voss MW, Vivar C, Kramer AF, van Praag H. (2013). Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends Cogn Sci.* 2013;17:525–44.
- Wrann, C. D., White, J. P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., Lin, J. D., Greenberg, M. E., & Spiegelman, B. M. (2013). Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. *Cell metabolism*, 18(5), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.008>
- Wu, S.-Y., et al. (2016). Estrogen ameliorates microglial activation by inhibiting the Kir2.1 inward-rectifier K(+) channel. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 22864–22864.
- Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim JH, et al. (2019). Effects of acute exercise on mitochondrial function, dynamics, and mitophagy in rat cardiac and skeletal muscles. *Int Neurol J.* 2019;23:S22–31.
- Yoo SZ, No MH, Heo JW, Chang E, Park DH, Kang JH, et al. (2019). Effects of a single bout of exercise on mitochondria-mediated apoptotic signaling in rat cardiac and skeletal muscles. *J Exerc Rehabil.* 2019;15:512–7.
- Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim SH, et al. (2018). Role of exercise in age-related sarcopenia. *J Exerc Rehabil.* 2018;14:551–8.
- Zhao, J., et al. (2019). Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Scientific Reports*, 2019. 9(1): p. 5790.

【評語】 050003

1. 本研究透過運動降低高血壓引起的腦發炎，進而改善高血壓引起的腦功能下降，試驗主題實用，結果也很漂亮，顯示學生受到良好的訓練。
2. 但來源主要來自原有合作實驗室，創意非來自學生。學生主要是操作後段分析，雖然研究具有實驗性，但是學生對樣品的數量及圖表代表意義不清楚，整體實驗背景知識不足。
3. 試驗是否有意義，最主要是動物試驗設計，材料方法卻未見動物試驗設計，老鼠種類、隻數，如何讓動物跑步、跑步時間，因受限法規限制，皆由他人完成，較無法評估試驗結果的合理性。
4. 學生以英文報告。