

近五年之重要研究成果摘要

I. 雌二醇的神經保護機制

性別差異性神經內分泌學一直是個很有趣的研究領域。過去幾年，我們發現 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受器在雄性胚胎有高度表現，且對出生前後睪固酮的分泌高峰可能是必須的。活化 NMDA 受器也可以藉由調控 Bcl-2 蛋白的表現量，保護性別差異性神經核中的神經原免於自然發生的細胞死亡 (發表於 *Neuroendocrinology*, 71: 301-307, 2000)。性別分化過程，在睪固酮高峰分泌後轉變為雌二醇，可經由增加 NMDA 受器之次單元蛋白 NR₁ 表現，使雄鼠性別差異性神經核 (sex dimorphic nucleus) 中的神經細胞免於凋亡 (發表於 *J Neurophysiology*, 86: 2374-2380, 2001)。進一步的研究結果顯示，NMDA 受器活化所調控的下游基因可能參與神經細胞生長與抗凋亡，並支持 NFκB 活化的訊息傳遞路徑，及其目標基因 Bcl-2，在性別分化過程中，使雄鼠性別差異性神經核免於凋亡 (發表於 *J Mol Endocrinol*, 34: 433-445, 2005)。更進一步的，我們阻斷 NMDA 受器後發現會造成細胞內鈣離子不足，PGC-1 抑制作用及細胞色素氧化酶第二次單元 (Cytochrome c-II) 的表現，進而導致細胞凋亡 (發表於 *J Mol Endocrinol*, 39(1): 53-66, 2007)。

轉譯醫學的崛起，為使研究與臨床接軌，我們和華瑜教授 (高榮教研部) 合作研究延腦鼻端腹外測核中，NADPH 氧化酶或粒腺體過氧化酵素在心血管抑制作用時 (發表於 *Free Radical Biology & Medicine*, 42: 1610-1623, 2007) 及脊髓損傷時 (發表於 *Journal of Neurochemistry*, 101(6): 1552-66, 2007) 扮演的角色。另外，我們也和高醫腦神經外科林志隆醫生合作，解決在蜘蛛膜下腔出血後腦血管痙攣的問題。此問題已被知道超過半世紀，但仍然是蜘蛛膜下腔出血患者主要的併發症之一。無法有效治療腦血管痙攣導致血管功能退化的病生理機制仍需透徹的研究。雌二醇已被發現在心血管系統可透過基因與非基因的機制產生 NO, cGMP, cAMP, adenosine 與 prostacycline 或改變離子通道活性誘發血管舒張，對於腦血管是否也有相同的作用，則待進一步探討。因此，我們採用蜘蛛膜下腔出血動物模式，探討雌二醇對於在出血後造成血管痙攣的影響和可能的機制。我們研究結果顯示，持續給與生理濃度的雌二醇可預防蜘蛛膜下腔出血後的血管痙攣。雌二醇的保護效果可能和避免 iNOS 產生及維持正常 eNOS 表現有關 (發表於 *Journal of Neurosurgery*, 102: 1046-1054, 2006)。我們進一步發現，雌二醇藉由增加 P65 與雌二醇受器的作用，進而阻止 P65 和 iNOS DNA 結合，而抑制蜘蛛膜下腔出血導致的 iNOS 增加與血管痙攣 (發表於 *Stroke*, 37(12): 3025-3031, 2006)。

除了出血後嚴重的腦血管痙攣，顱內出血後血基質 (heme) 經代謝產生過量的亞鐵離子產物，導致自由基大量產生造成腦部氧化傷害。我們進一步與專精於神經科學與藥理學的闕壯卿教授合作，探討藉由前處理誘發存活蛋白產生是否有利於亞鐵離子所導致的腦損傷。我們的研究結果顯示，二價鐵離子對腦部損傷之嚴重程度在雌鼠較雄鼠輕微；給與外源性雌二醇可減輕雄鼠與雌鼠鐵劑引起之腦損傷。誘發具抗氧化與抗凋亡特性的 thioredoxin (Trx) 蛋白產生亦有性別差異，此性別差異也存在於基礎值和雌二醇處理後的影響。在雌鼠，卵巢切除本身可降低尾狀核核區 Trx 蛋白量，而外源性雌二醇前處理可明顯增加 Trx 蛋白量。而檸檬酸亞鐵溶劑注射後，尾狀核核區 Trx 蛋白量在雄鼠較雌鼠顯著增加且外源性雌二醇前處理對檸檬酸亞鐵溶劑注射雄鼠 Trx 蛋白量無顯著影響。這些結果顯示，Trx 蛋白可能參與雌二醇對亞鐵離子造成腦傷害的保護作用。目前已完成 Trx siRNA 實驗，此結果可以提供直接的證據證明 Trx 蛋白參與雌二醇的神經保護作用 (發

表於 *Stroke*, 41(1): 160-5, 2010)。

顱內出血後常誘發過多亞鐵及自噬(*autophagy*)象，而停經前女性存活率較男性為高。我們探討自噬與雌激素受器(*ER α*)是否參與雌二醇(*E₂*)對亞鐵神經毒性的保護機制，並利用條件式剔除多巴胺神經元自噬相關基因*Atg7*，印證自噬在尾狀核亞鐵引起損傷的角色。結果顯示，*ER α* *siRNA*可消除*E₂*抑制自噬的作用，抑制自噬模擬*E₂*對亞鐵神經毒性的保護作用；加強自噬則加遽細胞死亡且消滅*E₂*的保護作用。活體實驗結果則顯示亞鐵引起雌鼠自噬性細胞死亡及腦損傷嚴重度皆較雄鼠輕微。*E₂*前處理可減低亞鐵引起的自噬及腦損傷。且剔除*Atg7*後，亞鐵引起損傷之性別差異亦被減弱。可知*E₂*經由*ER α* 抑制亞鐵誘發的自噬，而使雌鼠腦損傷較雄屬輕微。因此，預測以抑制自噬為標的之策略應可治療顱內出血引起亞鐵過量導致的腦損傷(發表於*Autophagy* 8: 10, 1510-20)。

II. 敗血症的生理機制探討

敗血症一直是加護中心病人的主要死因，由於不論內毒素或細菌引起的敗血症，其致命的主因在於多重器官的功能衰竭(*multiple organs functional failure*)，尤其是肝臟、心臟、肺臟、腎臟的功能失調。因此，敗血症病理機制的探討與治療方法的研發乃當務之急。敗血症的動物模式中以盲腸結紮穿孔術(*Cecal ligation and Puncture; CLP*)引起腹膜炎造成的敗血症，會引起與人類敗血症臨床症狀相同的早期心臟動力過高(*hyperdynamic*)及肝臟糖類代謝失調而引起高血糖(*hyperglycemia*)；晚期則是心臟動力過低(*hypodynamic*)導致心臟衰竭(*cardiac failure*)及無法補救的血糖過低(*hypoglycemia*)現象。近五年內，申請單位延續敗血症時心臟與肝臟蛋白激酶每(*PKC α*)變化與病理機制的相關性進行了一系列的探討。其中有關肝臟的部分，我們已有的研究結果顯示：敗血症時特殊的 *PKC α* isoform 可能與肝細胞凋亡或肝功能衰竭最為相關；且抑制 *PKC α* 可能經由調控 *Bcl-xL* 而引起 *caspase*-依賴性的細胞凋亡。此外，*PKC α* 對於熱休克蛋白保護 *TNF α* 誘發肝細胞凋亡的保護作用扮演著必要性的角色。且 *PKC α* 受抑制時導致 *CREB* 磷酸化減少及 *Bcl-xL* 下降可能是肝細胞凋亡的原因(*Shock* 24(4): 357-363, 2005)。由於 *transcriptional factors* 與 *DNA* 之結合活性改變，我們認為敗血症時細胞核內基因調控似乎有重新調整優先順序(*reprioritize*)的現象，所以，進一步以 *suppressive subtractive hybridization (SSH)* 的方法找出敗血症時受後所影響的差異性基因表現。再針對這些差異性表現基因探討其參與生理機制的角色，以提供將來以訊息傳遞分子或修飾特殊基因為標的之方法來作為治療多菌性敗血症的嶄新策略。

針對敗血症時肝臟中被 *up-regulation* 或 *down-regulation* 的基因，我們逐一探討其生理角色。被 *down-regulated* 的 *genes* 中，*rat bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase (rBAT)* 與膽汁代謝密切相關，根據目前我們已有的結果顯示 *rBAT* 被 *down regulation* 可能導因於敗血症早期肝細胞核內 *RXR α* 的表現減少所致(*Shock* 28(1): 65-70, 2007)。至於細胞核內 *RXR α* 的減少是由於 *translocation* 出問題或是 *degradation* 增加，目前正在深入探討當中。另外，我們為了檢測 *Dexamethasone* 治療乃經由增加 *retinoic acid X receptor α (RXR α)* 而恢復敗血症大鼠肝臟膽酸輔酶 *A-amino acid N-acyltransferase (rBAT)* 的表達的假設，我們評估並比較治療組與對照組的存活率、膽汁及膽鹽濃度。結果顯示，*Dexamethasone* (0.01 毫克/公斤) 可顯著提高存活率和增加敗血症大鼠在膽道的膽汁和膽鹽濃度 ($P < 0.05$)。在我們的評估的膽鹽相關基因，在敗血症時，*rBAT* 和 *cholesterol 7 alpha-hydroxylase(CYP7A1)* 顯著減少。*Dexamethasone* 治療後可恢復 *rBAT* 和 *RXR α* 的表達，但不影響 *CYP7A1*、*bile salt export pump*，或 *multidrug*

resistance associated protein 2 (MRP2). Na⁺-taurocholate cotransport protein 及 organic anion transporting polypeptide 1。此外，Dexamethasone 治療也可恢復 rBAT 啟動子基因上 RXR/farnesoid-X receptor 的 inverted repeat 1 (IR-1) 序列與 DNA 的結合活性。為進一步確認我們的研究結果，我們發現 siRNA 大大阻斷了 Dexamethasone 治療引起的敗血症大鼠 rBAT 基因表達增加的作用。因此，我們認為 Dexamethasone 治療敗血症大鼠，可以經由促進 RXR α 的表現而恢復 rBAT 的表現，而此過程，可以解釋 Dexamethasone 對於減少膽汁鬱積的作用機制(Shock. 32(2): 164-171, 2009)。

我們也發現inhibitory factor 1 (IF₁) gene的被down-regulation可能是造成肝臟細胞中粒線體在敗血症時complex V無效水解ATP的原因之一 (Biochimica et Biophysica Acta 1767(7): 888-896, 2007)。至於，其中被up-regulation的heme oxygenase -1 (HO-1) gene，我們發現除了在肝臟外血球中也有表現，且敗血症早期白血球中HO-1的表現可反映敗血症時的氧化壓力，且與敗血症晚期肝臟及腎臟的損傷程度呈現有意義的負相關，因此，早期白血球中HO-1的表現似乎可以預測晚期肝臟與腎臟衰竭的嚴重度(Shock 23(5):464-469., 2005)。最近我們的結果更顯示白血球中HO-1的表現增加可經由抑制p38 MAPK的活化而減少血液中之中性球轉移並穿透至組織中。此對於 HO-1可以削減中性球組織浸潤的分子機制有助於未來預防敗血症時的肝臟衰竭(Shock 34 (6): 615-621, 2010)。

由於敗血症早期 cytokines 大量釋放造成氧化壓力，常導致組織的粒線體受損如，特別是能量需求較多的組織(如心臟、肝臟或腎臟)，我們的實驗結果亦顯示敗血症會引起組織(如肝臟、腎臟與心臟)粒線體受損(Shock 35(5): 506-511, 2011 及 Shock 2012 Mar; 37(3):289-96,2012)，而已知熱休克前處置可預防心臟粒線體失去功能。粒線體受損時通常會引起細胞內進行自我吞噬 (autophagy)的現象，我們的初步結果也已觀察到肝臟與腎臟腎小管上皮細胞在敗血症早期的確有發生 autophagy 的現象。但 autophagy 的發生在敗血症的病程中所扮演的角色及 HO-1 或其他熱休克蛋白是否直接或間接調控 autophagy 的進行則仍屬未知。因此，擬進一步探討 autophagy 在敗血症時的病生理角色，期望將來可藉由調控 autophagy 來減低器官受損，進而預防敗血症時的多重器官衰竭。