

國立臺灣大學公共衛生學院
職業醫學與工業衛生研究所



碩士論文

Graduate Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene
College of Public Health
National Taiwan University
Master Thesis

3xTg-AD 小鼠大氣微粒暴露對阿茲海默症病程影響
先驅研究

Ambient particles exposure and progress of Alzheimer's
disease in 3xTg-AD mice: a pilot study

莊晴

Ching Chuang

指導教授：鄭尊仁 博士

Advisor: Tsun-Jen Cheng, M.D., Sc.D.

中華民國 106 年 7 月

July 2017

誌謝



這篇論文能夠完成，必須感謝在研究所這兩年來給予協助的所有人。首先感謝指導教授鄭尊仁老師，在研究期間提供許多資源使實驗得以完成，並且在每次討論中指導研究方向並帶領我思考問題，瞭解不足之處並加強。感謝口試委員林靖愉老師、吳焜裕老師以及陳達夫醫師在口試時給予寶貴的建議。

感謝 TJC Lab 的大家，真的是義不容辭地給予各種協助，有大家的幫忙才有辦法完成實驗及論文。感謝哲雯常在我茫然不知所措時給予寶貴的建議，並且時常鼓勵及照顧我，讓我碩一從零開始到碩二結束能夠完成論文。感謝致萱陪我去醫學院學習 IHC，提供實驗經驗與建議，還有分享生活上的趣事。感謝貞婷在各種方面的協助及教導，不只是學業與實驗上的照顧及陪伴，生活上的許多事情都還好有妳在一旁叮嚀，讓我得以順利活過這兩年。感謝培睿及洛堯作為實驗小幫手和處理瑣事，有你們協助輕鬆不少，還有不時提供搞笑影片真的能幫助緩解緊繃的情緒。感謝于葶、亦翎及書帆在我碩一時教導了許多實驗技巧，並且畢業後還不時收到求救的訊息，麻煩妳們協助解決。

感謝陳博教導許多儀器及實驗上的知識。感謝化萱及恩萱在儀器出問題時協助解決並討論及分享儀器的狀況。感謝謝松蒼醫師提供實驗室及藥品讓我完成 IHC，也感謝阿甘學長指導 IHC 實驗。感謝醫學院動物中心李先生及馬先生在預約各項設備時提供協助。感謝動物中心蔡獸醫師協助判讀病理切片。感謝陳醫師的助理許先生教導 3xTg-AD 小鼠、IHC 及 ELISA 的知識。感謝吳章甫老師實驗室協助分析微粒成分。感謝讓我借用實驗儀器及耗材的吳焜裕老師實驗室。感謝實驗動物的犧牲讓我獲得寶貴的經驗及知識。

感謝家人提供生活所需，並給於精神上的支持與鼓勵，讓我得以完成研究所學業。感謝這兩年來給予支持與協助的各位，才讓我能夠順利完成論文。

莊晴 謹致

106 年 8 月

中文摘要



過去研究顯示，PM 對人體會有不良健康效應，暴露微粒與心血管、肺部疾病的發生率及死亡率相關。空氣微粒可能直接進到腦部，或經由周邊組織發炎，再藉由神經發炎、氧化壓力等對中樞神經系統(central nervous system, CNS)造成影響，PM 可能影響的中樞神經系統疾病包括阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)及帕金森氏症(Parkinson's disease)等神經退化疾病。阿茲海默症為漸進式神經退化性疾病，是最常見的失智症。這種疾病在神經病理學有兩種主要的病徵：由乙型類澱粉蛋白(amyloid-beta, A β)沉積所形成的類澱粉蛋白斑塊(amyloid plaque)，以及由過度磷酸化滔蛋白(Tau protein)聚集而成的神經纖維糾結(Neurofibrillary Tangles, NFTs)。

現今暴露大氣微粒對阿茲海默症的影響較少毒理研究，因此本研究將利用動物實驗，並著重於小鼠暴露大氣微粒對於阿茲海默症病徵及認知障礙的影響。實驗動物為阿茲海默症基因轉殖動物模式—3xTg-AD 小鼠，為第一種能夠在阿茲海默症相關腦區同時發展出類澱粉蛋白斑塊及神經纖維纏結病徵之小鼠品系，此種小鼠形成之阿茲海默症病徵與人類相似。17 周大的 3xTg-AD 隨機分為控制組(n=5)及暴露組(n=6)進行 12 周的全身性呼吸暴露，使用臺北空氣污染暴露系統(Taipei Air Pollution Exposure System for Health, TAPES)系統進行暴露，此系統可將外界大氣及微粒抽進暴露腔並提供非濃縮大氣微粒，暴露後進行莫氏水迷津後測，並測試腦中 A β 、磷酸化 Tau 蛋白及氧化、硝化壓力指標 8-OHdG 及 8-NO₂Gua。

本研究小鼠暴露期間 PM_{2.5} 平均質量濃度為 7.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。行為實驗結果顯示亞慢性暴露大氣微粒沒有造成 3xTg-AD 小鼠空間學習及記憶功能受損。8-OHdG、8-NO₂Gua 及 A β ₄₂ 於海馬迴、小腦、大腦皮質各腦區皆無顯著差異，且多低於偵測極限。組織免疫染色結果顯示 A β ₁₋₁₆ 未偵測到訊號，磷酸化 Tau 蛋白則只有在暴露組其中一隻的大腦皮質偵測到訊號。肺與腦組織切片發現暴露沒有顯著發炎反應。大氣微粒影響阿茲海默症的實際機制與毒性可能需要用年紀較大的 3xTg-AD 小鼠進一步探討。

關鍵字：大氣細懸浮微粒、阿茲海默症、類澱粉蛋白斑塊、神經纖維纏結、中樞神經、莫氏水迷津、氧化壓力




Abstract



Many studies have shown that particulate matter (PM) may have adverse effects on the human body. PM has been associated with mortality and morbidity of cardiopulmonary diseases. PM may affect the CNS by two pathways, through the direct or peripheral way. In the peripheral way, systemic inflammation induced by PM and transfer inflammatory response to the brain by enhanced neuroinflammation and oxidative stress. PM might contribute to neurodegeneration diseases, such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease. Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease and the most common form of dementia, which is pathologically characterized by the amyloid plaque of amyloid-beta ($A\beta$), neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein.

However, few toxicology studies explored the association between PM exposure and the progress of AD. The objective of the study is to explore the ambient particulate matter induced pathological lesions and cognitive impairment of Alzheimer's disease by using 3xTg-AD mice. In the experiment, we use 3xTg-AD mice contain three mutations associated with Alzheimer's disease. This is the first transgenic model to develop both plaque and tangle pathology in AD- relevant brain regions. The pathology of Alzheimer's disease is closely mimics the distribution pattern that occurs in human AD brains.

Male 3xTg-AD mice (17 weeks old) were randomly divided into control (filtered air,



n=5) and exposure group (ambient PM, n=6) for about 12 weeks whole body inhalation exposure. The ambient air exposure was conducted by using Taipei Air Pollution Exposure System for Health (TAPES). The system can introduce the ambient air outside and provides non-concentrated ambient air. After exposure, Morris water maze post-test were conducted. A β , hyperphosphorylated tau protein and oxidative, nitrative stress marker of 8-OHdG and 8-NO₂Gua were determined.

The mean mass concentration for exposure ambient PM_{2.5} was 7.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ during the exposure duration. In Morris water maze test, sub-chronic exposure to ambient PM_{2.5} may not impair spatial learning and memory in 3xTg-AD mice. 8-OHdG, 8-NO₂Gua and A β ₄₂ were not significantly different between the control and the exposure group in hippocampus, cerebellum and cortex. Most of the 8-OHdG, 8-NO₂Gua and A β ₄₂ levels also below the LOD (Limit of Detection). In the immunohistochemistry stain, A β ₁₋₁₆ were not detected and one of the 3xTg-AD mice in the exposure group had more phosphorylated tau protein. We found no significant differences between the control and the exposure group in histopathology of lung and brain. Further study should be conducted to explore the mechanism and toxicity of Alzheimer's disease induced by PM in the older 3xTg-AD mice.

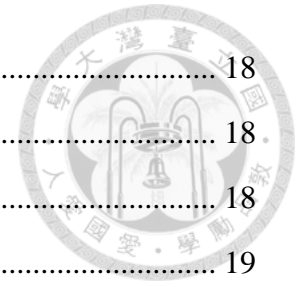
Keywords: ambient particles, Alzheimer's disease, amyloid plaque, neurofibrillary tangles (NFTs), CNS, Morris water maze, oxidative stress

目錄



中文大綱	I
Abstract	III
第一章 前言與研究目的	1
第二章 文獻回顧	2
2.1 空氣微粒健康效應	2
2.2 微粒暴露之中樞神經系統毒性	2
2.3 暴露微粒與阿茲海默症	3
2.4 3×Tg-AD 小鼠	4
第三章 材料與方法	6
3.1 實驗流程與架構	6
3.2 實驗動物	7
3.3 大氣懸浮微粒暴露	7
3.3.1 臺北空氣污染暴露系統	8
3.3.2 大氣微粒監測	8
3.4 莫氏水迷津	9
3.5 8-OHdG、8-NO ₂ Gua 分析	10
3.6 腦部 A β 及 Tau 蛋白	13
3.6.1 乙型類澱粉蛋白測定	13
3.6.2 類澱粉蛋白斑塊免疫組織化學染色	14
3.6.3 神經纖維纏結免疫組織化學染色	15
3.7 組織病理	16
3.8 統計分析	16
第四章 結果	17
4.1 實驗動物體重	17
4.2 PM _{2.5} 濃度及元素組成	17
4.3 莫氏水迷津	17

4.4	腦部 8-OHdG 及 8-NO ₂ Gua	18
4.5	腦部 A β 及 Tau 蛋白	18
4.6	組織病理切片	18
第五章	討論	19
5.1	PM _{2.5} 濃度及特性	19
5.2	3 \times Tg-AD 小鼠	19
5.3	微粒效應	21
5.3.1	空間學習及記憶能力	21
5.3.2	8-OHdG 及 8-NO ₂ Gua	22
5.3.3	腦中 A β 及 Tau 蛋白	23
5.4	結論與建議	24
第六章	參考文獻	26



表目錄



表 1、	大氣微粒對阿茲海默症影響之研究	35
表 2、	LC-MS/MS 移動相濃度梯度	36
表 3、	8-OHdG、8-NO ₂ Gua 母離子、子離子、碰撞能量、管徑電壓參數	36
表 4、	質譜儀游離源參數	37
表 5、	HPLC-UV 移動相濃度梯度	37
表 6、	採樣期間平均質量濃度 PM _{2.5} (μg/m ³)	38
表 7、	採樣期間 PM _{2.5} 化學元素組成	39
表 8、	莫氏水迷津前測知識採集階段	40
表 9、	莫氏水迷津前測探索實驗	41
表 10、	莫氏水迷津後測知識採集階段	42
表 11、	莫氏水迷津後測探索實驗	43

圖目錄



圖 1、	LC-MS/MS 檢量線	44
圖 2、	8-NO ₂ Gua、 ¹³ C ₂ ¹⁵ N-8-NO ₂ Gua、8-OHdG、 ¹⁵ N ₅ -8-OHdG 層析圖	45
圖 3、	HPLC-UV 檢量線	46
圖 4、	dG、Guanine 層析圖	47
圖 5、	暴露期間小鼠體重變化	48
圖 6、	採樣期間 PM _{2.5} 化學元素組成	49
圖 7、	莫氏水迷津前測知識採集階段逃避潛伏期及移動距離	50
圖 8、	莫氏水迷津前測空間探索實驗	51
圖 9、	莫氏水迷津後測知識採集階段逃避潛伏期及移動距離	52
圖 10、	莫氏水迷津後測空間探索實驗	53
圖 11、	海馬迴、小腦及大腦皮質 8-OHdG 及 8-NO ₂ Gua 濃度分布情形	54
圖 12、	海馬迴、小腦及大腦皮質 8-OHdG 及 8-NO ₂ Gua	55
圖 13、	Aβ ₄₂ 於海馬迴、小腦、大腦皮質各腦部區域分布	55
圖 14、	大氣微粒暴露後腦部切片免疫組織化學染色結果	56

第一章 前言與研究目的



已有許多研究顯示大氣懸浮微粒對人體的健康危害，會增加心血管及肺部等疾病罹病風險，世界衛生組織的國際癌症研究署(IARC)更於 2013 年將大氣懸浮微粒歸類於 IARC 第一級致癌物，其中細懸浮微粒(PM_{2.5})為大氣懸浮微粒的重要成分，因此 PM_{2.5} 對於人體之健康效應是不可忽視的議題。有研究指出微粒暴露導致失智症、神經退化性疾病等中樞神經系統影響，目前對於微粒影響中樞神經系統之機制尚不明確，可能是透過引起神經發炎及氧化壓力導致神經病變，另外微粒暴露也會造成動物空間學習與記憶受損，以及人類認知功能障礙等類似阿茲海默症之行為表現。而微粒暴露與阿茲海默症之研究多為流行病學研究，雖結果顯示 PM_{2.5} 會加速阿茲海默症病徵形成，像是乙型類澱粉蛋白及過度磷酸化蛋白濃度上升，甚至是類澱粉蛋白斑塊及神經纖維纏結之腦部病徵，但目前缺乏呼吸道暴露之動物實驗，且若使用一般 C57BL/6 小鼠可能無法直接觀察到與阿茲海默症相關之行為及病徵變化，因此本次研究將利用阿茲海默症基因轉殖動物模式—3xTg-AD 小鼠，進一步探討並著重於小鼠暴露大氣微粒對於阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)的影響。

本研究目的為：

1. 探討暴露大氣微粒影響 3xTg-AD 小鼠的阿茲海默症病徵形成，如腦中類澱粉蛋白斑塊及神經纖維纏結，以及造成空間學習及認知功能受損影響
2. 探討亞慢性呼吸暴露影響阿茲海默症之可能機制

第二章 文獻回顧



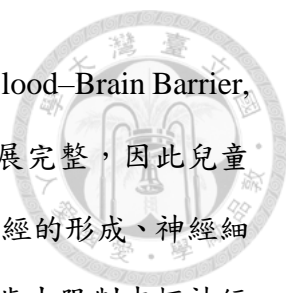
2.1 空氣微粒健康效應

空氣汙染為空氣中氣態、液態物質及固體顆粒之混合物，包含固態微粒、氮氧化物、臭氧、二氧化硫、一氧化碳等，不論氣態或是固態微粒(particulate matter, PM)皆會造成健康危害[1, 2]，其中影響最大的為微粒，微粒來源分為天然及人為產生，天然來源包含飛塵、沙塵暴、花粉、火山噴發、森林大火等，人為來源包含工業排放、汽車排放、焚化爐、建築工程、烹飪等。

過去研究顯示，微粒對人體有不良健康效應，暴露微粒與心血管、肺部疾病的發生率、住院率、死亡率相關[2-5]。長期暴露大氣微粒也會影響肺功能[3, 6]，隨著PM_{2.5}濃度增加，罹患哮喘的孩童數量也會增加[7]，阻礙孩童呼吸道發展進而影響肺功能表現。微粒會造成肺部發炎，並可能藉由氧化壓力、局部發炎造成全身性發炎，進而影響中樞神經系統。

2.2 微粒暴露之中樞神經系統毒性

空氣微粒進入中樞神經系統(Central Nervous System, CNS)途徑，研究顯示微粒可能經由嗅球進入中樞神經系統引發神經傷害[8]，微粒吸入後通過鼻黏膜，藉由嗅覺神經元進到嗅球及嗅覺皮質區[9]，嗅覺功能障礙或嗅球損傷等情形可能發生於阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)及帕金森氏症(Parkinson's disease)等神經退化性疾病早期病程[10]。此外，微粒也可能從肺部進入血液，藉由神經發炎、自由基等造成局部發炎，細胞激素進入系統性循環再作用於中樞神經系統，誘發中樞神經系統疾病的發生，包括血管性失智症(Vascular dementia, VaD)、阿茲海默症與帕金森氏症等[11-13]。目前已有研究指出暴露空氣微粒後，會使腦部細胞激素及氧化壓力增加[14, 15]，可能藉由神經膠細胞過度活化形成過多活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)，進而造成氧化壓力增加及發炎反應，使緊密結合蛋白(tight-




junction protein)受損、降低腦血管內皮細胞活性，造成血腦屏障(Blood-Brain Barrier, BBB)損傷、通透性增加[16-18]，兒童血腦屏障及神經元尚未發展完整，因此兒童對於外來物質更加敏感，若受到侵害會較難修復，微粒會影響神經的形成、神經細胞生長和增殖、神經生長因子的分泌、突觸和髓鞘的形成，進一步去限制中樞神經的生長發育[19]，此外微粒也會造成大腦皮質神經衰退、神經凋亡等神經病理現象[8, 20, 21]。暴露微粒也會導致小鼠活動力、空間學習、記憶能力及辨別新物體能力下降[21, 22]，可能機制為微粒造成神經發炎，干擾如麩胺酸鹽(glutamate)之興奮性神經傳遞物質與神經突觸蛋白相關之 NMDAR 受體，導致神經元喪失以及突觸功能障礙[23]。

2.3 暴露微粒與阿茲海默症

阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)為漸進式神經退化性疾病，是最常見的失智症。這種疾病在神經病理學有兩種主要的病徵：由乙型類澱粉蛋白(amyloid-beta, A β)沉積所形成的類澱粉蛋白斑塊(amyloid plaque)，以及由過度磷酸化滔蛋白(Tau protein)聚集而成的神經纖維糾結(Neurofibrillary Tangles, NFTs)[24]。過度堆積 A β ，會使神經中的微膠細胞(microglia)及星狀細胞(astrocyte)活化，引起過度發炎反應，最終使神經細胞凋亡(apoptosis)，且發炎反應會使與神經微管(microtubule)構造相關的 Tau 蛋白過度磷酸化，引發神經壞死及變形。阿茲海默症症狀包含認知功能障礙、喪失記憶，後期甚至連基本的日常生活能力都可能喪失。

目前微粒暴露對阿茲海默症影響之研究較少，其中有兩篇台灣流行病學研究 Wu 等人(2015)之個案來自三家教學型醫院，長期暴露在較高濃度 PM₁₀ 會使老年人的阿茲海默症及血管性失智症風險顯著增加[13]，另一篇 Jung 等人(2015)之個案來自健保資料庫，採用環保署的濃度資料進行分析，結果顯示隨著 PM_{2.5} 及臭氧濃度增加，老年人阿茲海默症風險顯著增加[25]。


另外也有動物實驗及組織病理研究，以 C57BL/6 公鼠暴露濃縮 7.7 倍的 PM_{2.5}，



於 8 週大開始暴露，每天 6 小時、一週 5 天，暴露 9 個月後小鼠顳葉皮質之 $A\beta_{1-40}$ 濃度顯著增加[26]，而墨西哥高汙染城市居民腦部組織病理結果顯示， $A\beta_{42}$ 濃度於額葉皮質、海馬迴有顯著差異[27]，可能較易發展出類澱粉蛋白斑塊之病徵，於長期暴露微粒之老年人腦中可觀察到 $A\beta_{1-42}$ 聚集及 Tau 蛋白過度磷酸化情形[15, 28, 29]。有研究指出微粒暴露形成氧化壓力是引起全身毒性的主要機制[30]，一般人體於正常情況下抗氧化物質與氧化物能維持平衡，若不平衡活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)過度累積無法清除，則會造成氧化壓力(oxidative stress)攻擊 DNA、脂質、蛋白質等[31, 32]，造成內質網壓力、粒線體損傷、破壞體內蛋白質平衡、脂質過氧化使受體和離子通道被破壞、DNA 損傷、訊號傳遞被干擾等，進而導致如阿茲海默症及帕金森氏症之神經退化性疾病[33, 34]。最常用於測量氧化壓力對 DNA 造成損傷的生物指標為 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)，是 DNA 的鳥嘌呤(guanine)受到氧化壓力攻擊形成的物質[35, 36]。 $A\beta$ 會刺激誘導型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)催化形成一氧化氮(nitric oxide, NO)[37]，活性氮物質(reactive nitrative species, RNS)與活性氧物質反應，在發炎的情況下造成硝化壓力(nitrative stress)，攻擊 DNA 上的 guanine 形成 8-NO₂Gua (8-nitroguanine)[38, 39]，與慢性發炎引起的神經退化性疾病有關。

2.4 3xTg-AD 小鼠

3 基因轉殖小鼠(Triple-transgenic AD mice, 3xTg-AD mice)為阿茲海默症基因轉殖動物模式，其野生型(wild type)為 C57BL/6 品系小鼠，具有 APP_{Swe}、PS1_{M146V}、tau_{P301L} 三種轉殖基因表現[40]，此三種基因作用不同，APP_{Swe} 基因突變增加 β 分泌酶(β -secretase)切割類澱粉蛋白前驅蛋白(Amyloid Precursor Protein)，使 $A\beta$ 濃度增加，特別是 $A\beta_{40}$ 及 $A\beta_{42}$ [41-47]；PS1_{M146V} 基因突變增加 γ 分泌酶(γ -secretase)活性，造成 $A\beta_{42}$ 與乙型類澱粉蛋白比值增加[48]；tau_{P301L} 基因使過度磷酸化 tau 蛋白堆疊成雙螺旋纖維(paired helical filaments, PHF)，進而導致神經纖維纏結[49]，此外

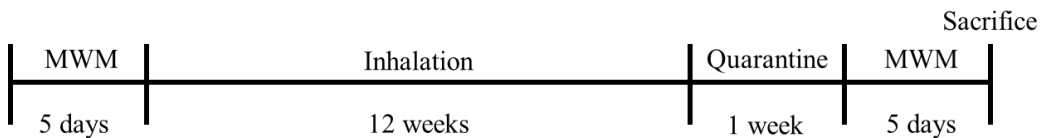
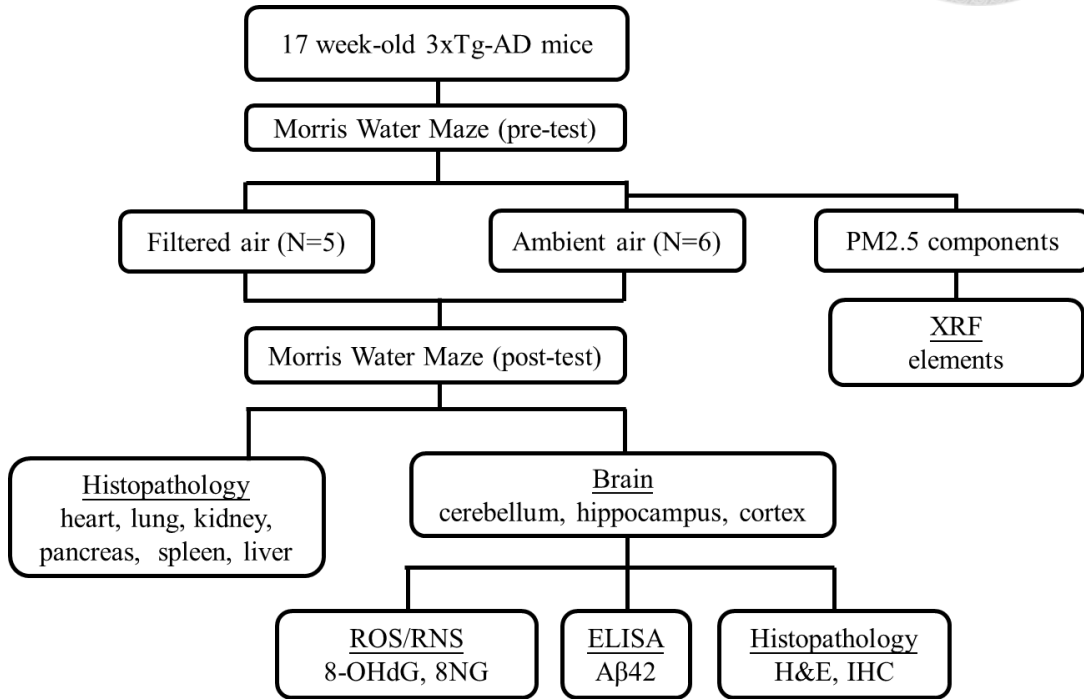


3xTg-AD 小鼠腦中也有微膠細胞及星狀細胞活化，引起發炎反應等如同人類阿茲海默症的現象[50-53]。目前已有多種阿茲海默症之基因轉殖動物模式，但此品系小鼠為第一種可在阿茲海默症相關腦區發展出類澱粉蛋白斑塊及神經纖維纏結病徵之小鼠模型。最早可於 3-4 個月大在新皮質(neocortex)觀察到細胞內 A β ，6 個月時可於海馬迴觀察到細胞內 A β 以及在新皮質 4-5 層可觀察到類澱粉蛋白斑塊，12 個月大可於海馬迴 CA1 區域觀察到類澱粉蛋白斑塊以及神經纖維纏結[40, 54]。而在認知記憶方面，4 個月大的 3xTg-AD 小鼠會有記憶暫存障礙(retention deficit)的現象，形成記憶會較快衰退[54]，6 個月大的 3xTg-AD 小鼠，則有空間學習和記憶的減損[55, 56]。此品系小鼠行為、認知及病徵與阿茲海默症患者相似，常用於研究人類阿茲海默症之機制及開發治療藥物，因此選擇 3xTg-AD 小鼠進行長期暴露大氣微粒，並觀察其阿茲海默症病徵之變化。

第三章 材料與方法



3.1 實驗流程與架構



3xTg-AD 小鼠於 17 週大時先進行為期 5 天的莫氏水迷津(Morris water maze, MWM)前測，再利用臺北空氣污染暴露系統(Taipei Air Pollution Exposure System for Health, TAPES)使實驗動物暴露大氣微粒，暴露組(N=6)呼吸外界導入之大氣及微粒，控制組(N=5)呼吸經由高效濾網過濾微粒之大氣，暴露時間為一天 24 小時，一週 7 天，共三個月連續暴露，結束暴露後進入動物中心檢疫，最後一週進行莫氏水迷津後測，隔天犧牲。犧牲方式分為兩種，麻醉後灌流及麻醉後斷頭，皆以二氧化碳(Carbon dioxide, CO₂)麻醉，麻醉斷頭組待實驗動物進入深度麻醉後快速斷頭，取出腦組織細分為大腦皮質、小腦、海馬迴等腦區，置於微量離心管並用液態

氣急速冷凍，後續進行類澱粉蛋白、氧化壓力及硝化壓力造成 DNA 損傷指標分析；麻醉灌流組待實驗動物進入深度麻醉後利用包氏液(Bouin's Solution)灌流固定組織，腦組織完整取出泡於 10% 福馬林進行病理組織切片。



3.2 實驗動物

本研究欲利用 3xTg-AD 小鼠作為實驗動物，此種基因轉植小鼠為邱銘章教授研究團隊合作繁殖及飼育，小鼠原飼育於財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心南部設施。本研究選用雄性 16 週大之 3xTg-AD 小鼠，飼養於國立臺灣大學公共衛生學院小動物房，維持 12-12 小時晝夜週期，環境溫度控制於 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，溼度控制於 $55\pm 10\%$ ，期間自由攝食標準飲食配方飼料 LabDiet® 5001 (PMI® Nutrition International, Brentwood, MO, USA) 及飲用去離子水 (ddH₂O)，每週更換墊料及量測體重，適應環境一週後，於 17 週大時移入臺北空氣污染暴露系統進行暴露。所有動物實驗皆經國立臺灣大學醫學院暨公衛學院實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 同意下進行。

3.3 大氣懸浮微粒暴露

目前呼吸毒理學研究中常用的暴露途徑為氣管灌注 (Intratracheal Instillation) 及呼吸暴露 (Inhalation)，其中呼吸暴露分為鼻腔暴露 (Nose-only) 與全身性呼吸暴露 (whole-body)。呼吸暴露較符合人體暴露的狀況，且比氣管灌注不具侵入性，其中全身性呼吸暴露可讓動物在暴露腔內自由活動，相較於鼻腔暴露，帶給動物的壓力較小，更適合長期暴露的呼吸毒理實驗。

許多研究的呼吸暴露常選用濃縮大氣微粒系統，將大氣微粒濃縮後使實驗動物暴露較短時間但濃度較高，雖經推估計算後，總暴露量與一周 7 天，一天 24 小時的暴露量相當，但短時間內暴露高濃度與長期低濃度暴露的真實暴露狀態仍有一定差距，因此本研究選用臺北空氣污染暴露系統 (Taipei Air Pollution Exposure

System for Health , TAPES)進行為期三個月的暴露。




3.3.1 臺北空氣污染暴露系統

小鼠飼養於臺北空氣污染暴露系統，此系統屬於獨立供氣飼養系統(Individual Ventilation System, IVC)，為非微粒濃縮暴露系統，可使小鼠暴露當下環境的大氣，模擬人類一般生活狀態暴露之濃度及時間，並免除利用濃縮微粒暴露系統導致與實際低濃度暴露的差異，臺北空氣污染暴露系統將臺北市中正區國立臺灣大學公共衛生學院九樓外的大氣及微粒抽入暴露腔，系統之上部抽氣單元可使大氣及微粒平均進入每個暴露腔，下部抽氣單元可將暴露腔內空氣抽出，控制組的進氣口(inlet air)加裝高效濾網(HEPA filter)，空氣經由高效濾網過濾微粒後進入暴露腔，控制組呼吸的空氣已去除微粒但不影響氣體成份。臺北空氣污染暴露系統引進之大氣微粒 PM_{10-2.5} 占 0.4%、PM_{2.5} 占 99.6%，故小鼠主要暴露之微粒為 PM_{2.5}[57]。

3.3.2 大氣微粒監測

於暴露組的兩個空暴露腔內放置氣膠監測儀(DustTrak™ II Aerosol Monitor 8530, TSI, Shoreview, Minnesota, USA)，以監測臺北空氣污染暴露系統之 PM_{2.5} 濃度，氣膠監測儀利用 90 度直角光散射原理即時監測暴露腔內 PM_{2.5} 濃度，同時在氣膠監測儀內放置 37 mm 鐵氟龍濾紙(Pall Corporation, Port Washington, New York, USA)，以流量 2 L/min、採樣期間 7 天蒐集微粒進行成份分析。鐵氟龍濾紙於空氣微粒採樣前後至少需調理 24 小時，調理後再秤重，以採樣前後之重量差異、採樣空氣體積計算微粒暴露量，鐵氟龍濾紙秤重後需保存於-20°C 冰箱，以利後續成分分析。計算手動採樣濾紙濃度及儀器直讀濃度時，濾紙濃度與直讀濃度比值應介於 0.2-0.3 之間，且與中山、古亭、萬華三處行政院環境保護署細懸浮微粒自動監測站之微粒濃度呈線性關係，若未符合上述條件則予以刪除。

為了解小鼠暴露微粒之特性，部分濾紙委託國立台灣大學職業醫學與工業衛



生研究所吳章甫教授實驗室，使用能量分散式 X 射線螢光分析儀(Energy-Dispersive X-ray fluorescence spectrometry, ED-XRF, Epsilon 5, PANalytical, Almelo, The Neverland)檢測各元素含量，包含鎂(Mg)、鋁(Al)、矽(Si)、硫(S)、鉀(K)、鈣(Ca)、鈦(Ti)、鈮(V)、鉻(Cr)、錳(Mn)、鐵(Fe)、鎳(Ni)、銅(Cu)、鋅(Zn)、鋇(Ba)、鉛(Pb)。

3.4 莫氏水迷津

本研究使用莫氏水迷津(Morris water maze, MWM)來探討大氣微粒對中樞神經的影響，此行為實驗廣泛應用於評估空間學習及記憶能力。

主要設備為直徑 100 公分、高度 30 公分圓形白色塑膠池子，共分為四個象限，第一象限在前四天知識採集階段實驗會放置一透明的圓形塑膠平台，並低於水面 1 公分，水中加入糯米粉均勻混合使水呈濁白色，避免小鼠直接觀察到平台本身，水池邊緣貼上四個可見的幾何圖案作為空間學習的視覺線索，水溫維持在 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。莫氏水迷津實驗分為兩階段共五天，四天知識採集階段(Acquisition phase)及一天空間探索實驗(Probe trial)，第一天至第四天為知識採集階段，平台與視覺線索的位置固定，一天會有四次試驗(trial)，每次試驗起點為不同象限邊緣中點，將小鼠面向池壁緩慢放入水中，讓其在水池內游泳 60 秒尋找隱形平台，並記錄小鼠自下水到爬上平台所需時間，此時間為逃避潛伏期(escape latency)，小鼠於 60 秒內尋找到平台後，讓小鼠在平台上停留 15 秒，若小鼠超過 60 秒仍未尋找到平台，則引導小鼠游向平台並在平台上停留 15 秒，每次試驗間隔 30 秒。每天四次試驗後將小鼠毛擦乾並烘乾，再放回鼠籠休息。第五天為空間探索實驗，條件與前四天知識採集階段相同，但水池並無放置平台，每次試驗隨機從不同象限放入小鼠，計時 60 秒，一天共四次試驗，每次試驗間隔 30 秒，記錄小鼠於目標平台象限所待時間及經過次數。莫氏水迷津透過動物行為/軌跡追蹤分析系統(Noldus EthoVision 3.1, The Netherlands)紀錄小鼠行為資料，包含逃避潛伏期(escape latency)、移動距離(Distance moved)、總移動距離(Cumulative distance)、游泳速度(Swim velocity)、目標平台象

限時間(Time spent in target quadrant)、目標平台象限次數(Cross numbers in target quadrant)等參數。



3.5 8-OHdG、8-NO₂Gua 分析

實驗動物於莫氏水迷津後測結束隔天犧牲，部分控制組(n=3)及暴露組(n=3)以二氧化碳氣體麻醉至第三期，待小鼠進入深度麻醉後以不銹鋼斷頭台快速斷頭，取出腦組織於冰磷酸緩衝溶液中將其分成左、右半腦，再細分為大腦皮質(Cortex)、小腦(Cerebellum)、海馬迴(Hippocampus)等腦區，置於微量離心管以液態氮急速冷凍，再儲存於-80 °C 冰箱。

DNA 萃取

秤取欲分析之 25 mg 腦組織，加入 200 μ L 細胞裂解液(Lysis buffer)打破細胞、20 μ L 10mg/mL 蛋白酶 K (Proteinase K)水解蛋白質、75 μ L 0.1mM 去鐵草醯胺(desferrioxamine, DFO)避免 DNA 持續氧化，以研磨棒均質化腦組織，於 65°C 反應 1 小時增加 DNA 產率，反應期間不時手動搖晃直到溶液轉為透明，再加入 4 μ L 20 mg/mL 核糖核酸酶 A (RNase A)水解 RNA，於 37°C 作用 1 小時，加入 200 μ L DNA 結合緩衝液(DNA binding buffer)及 200 μ L 100% 乙醇(ethanol)，將溶液全數轉移至 DNA spin column，以 16,100 g 4°C 離心 1 分鐘後丟棄離心流出的液體，加入 500 μ L 清洗緩衝液 1 (wash buffer 1) 以 16,100 g 4°C 離心 1 分鐘，再加 500 μ L 清洗緩衝液 2 (wash buffer 2) 以 16,100 g 4°C 離心 6 分鐘，將其餘雜質洗出，再把 spin column 放至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 40 μ L 不含核酸酶的水(nuclease-free water) 於 65°C 反應 5 分鐘，以 16,100 g 4°C 離心 1 分鐘沖提出 DNA，沖提的步驟共進行三次。接下來使用微量分光光譜儀(NanoVue Plus Spectrophotometer, Biochrom)測量萃取出 DNA 濃度及純度，於波長 260 nm 測量吸光值得知 DNA 濃度，以 A260/A280 比值得知 DNA 純度，並採用純度介於 1.6-2.0 的 DNA 樣本萃取 8-OHdG 及 8-NO₂Gua。



8-OHdG 萃取

萃取的 DNA 加入 20 μL $^{15}\text{N}_5$ -8-OHdG (25 ppb) 及 $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ -8-NO₂Gua (1 ppm) 作為同位素標記內標準品，加入 10 μL 濃度為 10 U/ μL 的核酸酶 S1 (nuclease S1) 於 37°C 反應 2 小時。再加 10 μL 10X 鹼性磷酸酶緩衝溶液(alkaline phosphatase buffer) 及 0.2 μL 鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)，於 37°C 反應 2 小時後，以 10 μL 0.1N 鹽酸(Hydrochloric acid, HCl)中和溶液、1 mL 去離子水(ddH₂O)稀釋樣品及加入 75 μL 1M 醋酸銨溶液(ammonium acetate buffer, pH 5.25)。[58-60]

稀釋後的 DNA 樣品以 Sep-Pak C18 Vac Cartridge (100 mg/1 mL Waters; Milford, MA) 進行固相萃取，管柱加入 100% 的甲醇(Methanol)及 1 mL ddH₂O 預處理，再將樣品加到管柱，待樣品過濾後使用 1 mL ddH₂O 去除雜質，接著在管柱下方放置玻璃收集管，從管柱上端添加 1.5 mL 40% (v/v) 甲醇流洗待測物，使用真空濃縮機將樣品離心濃縮 3-4 小時直到乾燥後，加入 100 μL 5% 乙腈(Acetonitrile, ACN)回溶，並將回溶完的液體轉移至微量離心管以 17,310 g 4°C 離心 15 分鐘去除雜質。回溶液 50 μL 用於 8-OHdG 分析、40 μL 用於 8-NO₂Gua 萃取及分析、10 μL 回溶液加入 190 μL ddH₂O 稀釋 20 倍分析 deoxyguanosine (dG)。

8-NO₂Gua 萃取

將 40 μL 回溶液加入 500 μL 1N HCl 於 100°C 反應 30 分鐘水解 DNA，使用真空濃縮機離心濃縮 4 小時移除 HCl，加入 100 μL 5% 乙腈回溶[61-63]，用於 8-NO₂Gua 及 guanine 分析。


LC-MS/MS 分析方法

本研究使用液相層析串聯質譜儀(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析 8-OHdG 及 8-NO₂Gua，液相層析儀利用分析物分離管柱間非共價性質交互作用力的不同，在移動相(mobile phase)流過靜相(stationary phase)時，樣品中不同物質移動速率與滯留時間(Retention time)的差異將物質分離，液相層析儀流出的樣本即送入質譜儀，樣品經過離子源(ion source)被離

子化，轉為帶電荷的離子與惰性氣體碰撞斷裂成碎片，再依照荷質比不同進行分離，進入第二個串聯質譜，偵測器會根據特定破碎的模式解讀推知碎裂前結構，二次質譜串聯可以降低干擾並提升偵測靈敏度。液相層析使用 Synchronis C18 管柱(150×4.6 mm, Thermo Fisher Scientific)，有機相為甲醇含 0.01 % 甲酸、水相為水含 0.01 % 甲酸，流速為 500 μL/min，每次分析需要 10 μL 樣品，分析時間為 10 分鐘，以表 2 的移動相濃度梯度將物質分離，0 分鐘時有機相比例設為 10%、第 0-1 分鐘有機相比例維持 10%、第 1-3 分鐘時有機相比例從 10% 提升到 50%、第 3-5 分鐘有機相提升為 98%、5-7.2 分鐘有機相比例維持 98%、7.2-7.5 分鐘有機相降為 10%，第 7.5-10 分鐘有機相維持 10%。質譜儀的游離源使用加熱式電噴灑游離法(Heated Electrospray Ionization, HESI)，並以選擇反應監測(selected reaction monitoring, SRM) 模式進行質譜分析，LC-MS/MS 的 8-OHdG、8-NO₂Gua 母離子 (Precursor ion)、子離子 (Product ion)、碰撞能量(Collision energy)、管徑電壓(Tube lens)及游離源參數如表 3、表 4。將 8-OHdG、8-NO₂Gua 檢量線配製為 10 個濃度：0.02 ppb, 0.03 ppb, 0.05 ppb, 0.1 ppb, 0.5 ppb, 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb (圖 1)，LC-MS/MS 圖譜顯示標準品 8-NO₂Gua、8-OHdG 及內標準品 ¹³C₂¹⁵N-8-NO₂Gua、¹⁵N₅-8-OHdG 的滯留時間、荷質比與相對強度(圖 2)，8-NO₂Gua、¹³C₂¹⁵N-8-NO₂Gua 滯留時間為 6.78、6.77 分鐘，8-OHdG、¹⁵N₅-8-OHdG 為 6.33、6.32 分鐘。得結果圖譜後計算樣品待測物質與內標準品的比值進行定量，軟體使用 Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 進行分析。8-OHdG 定量極限(Limit of Quantification, LOQ)與偵測極限(Limit of Detection, LOD)分別為 0.1 ppb 及 0.03 ppb，8-NO₂Gua 定量極限及偵測極限為 0.5 ppb 及 0.2 ppb，若濃度介於 LOQ 與 LOD 之間，數值以 1/2 LOQ 代入計算進行統計分析，濃度低於 LOD，數值則以 1/2 LOD 代入。

HPLC-UV 分析方法

本研究使用高效液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)、Hypersil BDS C18 管柱(150×4.6 mm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific)，以及紫外光/



可見光(UV/VIS)偵測器(Jasco UV-975, Japan)於波長 254 nm 分析去氧鳥苷(deoxyguanosine, dG)和鳥嘌呤(guanine)，有機相為乙腈、水相為 50 Mm 甲酸銨水溶液，使用流速為 1 mL/min，每次分析需 10 μ L 的樣品，分析時間為 20 分鐘，第 0-7 分鐘有機相比例從 0 提升至 3%、第 7-9 分鐘有機相提升為 50%、第 9-9.1 分鐘有機相降至 1%，第 9.1-20 分鐘有機相維持在 1% (表 5)。將 dG 及 guanine 檢量線配製為 8 個濃度：10 ppb, 50 ppb, 500 ppb, 1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm (圖 3)，dG 及 guanine 滯留時間分別為 11.2 及 5.7 分鐘(圖 4)。最後根據樣品滯留時間下之波峰面積計算濃度，軟體使用訊華 SISC 數據處理系統進行數據處理。

3.6 腦部 A β 及 Tau 蛋白

為評估微粒暴露對 3xTg-AD 小鼠腦中阿茲海默症病徵形成之影響，本研究利用酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)測定腦中乙型類澱粉蛋白濃度，並利用免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry, IHC)檢測腦中類澱粉蛋白斑塊及神經纖維纏結現象。

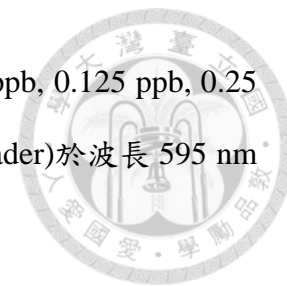
3.6.1 乙型類澱粉蛋白測定

因小鼠腦組織量不足，酵素免疫分析法僅分析腦中 A β ₄₂，其為較早形成之阿茲海默症病徵。分析前，加入腦組織質量 8 倍之均質緩衝液(homogenization buffer)，成分為 5 M 鹽酸胍(Guanidine-HCl, SIGMA)、50 mM 三羥基氨基甲烷(Tris-base, pH 8.0)及蛋白酶抑制劑(Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche)，使用研磨棒將腦組織均質化，於 16,000 g 離心 20 分鐘，取出上清液置於微量離心管儲存於-80°C 冰箱。

總蛋白質(Total Protein)

將 1 μ l 上清液加入 999 μ l 稀釋 5 倍之染劑(Bio-rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BIO-RAD)且均勻混合，再取 150 μ l 稀釋後上清液至 96 孔盤(96-well plate)，並以牛血清蛋白標準品(Bovine Serum Albumin Standards, Thermo Fisher

Scientific)序列稀釋，將檢量線配製為 7 個濃度：0 ppb, 0.0625 ppb, 0.125 ppb, 0.25 ppb, 0.5 ppb, 1 ppb, 2 ppb，使用酵素免疫分析測讀儀(ELISA reader)於波長 595 nm 測量吸光值，計算樣品總蛋白質濃度。



酵素免疫分析法原理及流程

本實驗原理為酵素免疫分析法之三明治型免疫分析法(sandwich ELISA)，特定抗體固定於 96 孔盤，此特定抗體上重鏈和輕鏈形成的結合點，能與待測抗原表位(antigenic epitope) 專一性鍵結，加入之待測樣品內若有待測抗原即可與待測抗體鍵結，反應後加入初級抗體，加完抗體後皆需以清洗緩衝液(Wash buffer)洗滌未鍵結物質，因三明治型免疫分析法為兩種抗體對抗原專一性鍵結，能精準鍵結待測抗原，再加入連結酵素之二級抗體，最後加入四甲基聯苯胺(Tetramethylbenzidine, TMB)呈色。本實驗使用 Amyloid beta 42 Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) 測定小鼠大腦皮質、小腦、海馬迴 A β ₄₂ 濃度，依原廠操作手冊進行測定步驟，並使用酵素免疫分析測讀儀於波長 450 nm 測量吸光值，計算 A β ₄₂ 濃度。若 A β ₄₂ 濃度低於 LOD，數值以 1/2 LOD 代入統計分析。

3.6.2 類澱粉蛋白斑塊免疫組織化學染色

小鼠於莫氏水迷津結束隔天犧牲，部分控制組(n=2)及暴露組(n=3)以二氧化碳氣體麻醉至第三期，小鼠進入深度麻醉後利用含有 10 IU 肝素(heparin)之林格氏液(Ringer's solution)與包氏液(bouin's Solution, Muto pure chemicals)灌流固定組織，全腦完整取出後泡於至少組織體積 5 倍的 10% 中性福馬林緩衝溶液，常溫下搖晃固定至少 24 小時，組織修整後委託國立臺灣大學醫學院實驗動物中心進行脫水、石蠟包埋及切片等步驟。

分析原理

針對組織切片上的待測抗原，先加入初級抗體與抗原專一性鍵結，之後利用二級抗體和初級抗體鍵結，而因為 polymer 二級抗體上可和受質連結的點較多，能夠




放大訊號，即使待測抗原較少仍然能使用免疫組織化學染色測定及定位待測抗原位置。

分析流程

石蠟切片浸入二甲苯(Xylene) 5 分鐘三次脫蠟，以梯度酒精方式復水，浸泡 100% 酒精 3 分鐘兩次、95% 酒精 3 分鐘、85% 酒精 3 分鐘、75% 酒精 3 分鐘，浸泡三羥甲基氨基甲烷(Tris buffer saline, TBS)溶液 5 分鐘維持 pH 值，浸泡檸檬酸(Citrate)溶液並置於組織脫水機(Microwave Vacuum Histoprocessor) 130°C 加熱 10 分鐘，放入 TBS 室溫 10 分鐘，切片固定於細胞抹片覆蓋板(shandon coverplate, Thermo Fisher Scientific)，以 TBS 清洗 5 分鐘三次，切片滴 150 μ l 1% 過氧化氫(H₂O₂)，降低內源性過氧化酶(endogenous peroxidase)活性造成之背景值干擾，TBS 清洗 10 分鐘三次，加入 150 μ l 0.1% Triton-Milk 於室溫反應 1 小時，加 150 μ l 1:100 稀釋之 6E10 初級抗體(Anti- β -Amyloid, 1-16 Antibody, 6E10, BioLegend)，置於 4°C 冰箱內反應 18-24 小時，TBS 清洗 10 分鐘三次，加 150 μ l 1:100 稀釋之二級抗體(Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), Vector Laboratories)室溫反應 1 小時，TBS 清洗 10 分鐘三次，加 150 μ l 卵白素-生物素複合體(Avidin-biotin complex, Vector Laboratories)室溫反應 40 分鐘，TBS 清洗 10 分鐘三次，切片浸泡於聯苯四胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB, Sigma)溶液染色 30 秒，再浸泡於自來水停止繼續呈色，以蘇木精(hematoxylin)進行對照染色(counter stain) 1 分鐘，流水洗 5 分鐘，取出後以梯度酒精脫水，75% 酒精 1 分鐘、85% 酒精 1 分鐘、95% 酒精 1 分鐘兩次、100% 酒精 1 分鐘三次，浸泡二甲苯 1 分鐘三次，最後以封片膠封片。

3.6.3 神經纖維纏結免疫組織化學染色

此部分利用免疫組織化學染色檢測總 Tau 蛋白及磷酸化 Tau 蛋白，總 Tau 蛋白使用 1:100 稀釋之 Anti- τ 初級抗體(Anti- τ (Tau) antibody produced in rabbit, Sigma) 以及 1:100 稀釋之二級抗體 (Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L), Vector



Laboratories)，而檢測磷酸化 Tau 蛋白則使用 AT8 初級抗體(Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody, AT8, Thermo Fisher Scientific)以及 1:100 稀釋之二級抗體(Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), Vector Laboratories)，其餘步驟與類澱粉蛋白斑塊免疫組織化學染色相同。玻片使用國立臺灣大學醫學院附設醫院醫學研究部第二共同研究室之正立共軛焦顯微鏡觀察並拍照判讀。

3.7 組織病理

莫氏水迷津結束後取得控制組 2 隻及暴露組 3 隻的腦、心、肺、腎、肝、胰、脾進行病理切片，本實驗委託國立臺灣大學醫學院動物中心，以蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain, H&E stain)將石蠟切片常規染色，方便觀察正常及病變組織的型態結構，並委託國立臺灣大學醫學院動物中心獸醫師對各腦區及其他器官進行病理組織判讀。

3.8 統計分析

本研究使用 SAS 9.2 版統計軟體進行數據分析，因樣本數較小故使用無母數統計檢定，以威爾卡森等級和檢定(Wilcoxon rank sum test)比較兩組間差異，數據以中位數(Median)表示，顯著水準設在 0.05。

第四章 結果



4.1 實驗動物體重

暴露期間實驗動物之體重如圖 5，兩組體重無顯著差異。

4.2 PM_{2.5} 濃度及元素組成

3×Tg-AD 小鼠暴露非濃縮大氣微粒三個月，期間小鼠暴露 PM_{2.5} 平均質量濃度為 7.6 μg/m³，濃度範圍為 3.8 μg/m³ 至 11.5 μg/m³ (表 6)。

以 XRF 分析之化學元素組成結果如表 7 及圖 6，硫(S)的平均質量濃度為 1101.37 ng/m³，占 PM_{2.5} 平均質量濃度的 13.19 %；鉀(K)及鐵(Fe)的平均質量濃度分別為 73.37 及 40.01 ng/m³，占 PM_{2.5} 平均質量濃度的 0.88 及 0.18 %。

4.3 莫氏水迷津

圖 7 為小鼠暴露大氣微粒前進行莫氏水迷津前測知識採集階段第一天至第四天的結果，圖 8 為前測空間探索實驗的結果，前測知識採集階段的逃避潛伏期、移動距離、總移動距離、游泳速度的結果顯示兩組無顯著差異(表 8)，前測第五天空間探索實驗結果分別描述目標平台象限時間、目標平台象限次數、游泳速度，結果顯示兩組間目標平台象限時間有顯著差異(P=0.0466<0.05)，目標平台象限次數、游泳速度則無顯著差異(表 9)。

小鼠暴露大氣微粒三個月後進行為期一星期的檢疫，圖 9 為檢疫結束後第一天到第四天進行莫氏水迷津後測知識採集階段的結果，圖 10 為後測第五天空間探索實驗的結果，結果顯示後測莫氏水迷津參數在兩組間皆無顯著差異(表 10、表 11)。



4.4 腦部 8-OHdG 及 8-NO₂Gua

本研究以 8-OHdG 及 8-NO₂Gua 探討大氣微粒對於腦部 DNA 形成的損傷，兩組 8-OHdG 濃度在海馬迴各有一筆數值介於偵測極限及定量極限，大腦皮質則是在控制組有一筆濃度介於偵測極限及定量極限，其餘 8-OHdG 皆低於偵測極限，暴露組 8-NO₂Gua 濃度在海馬迴有一筆介於偵測極限及定量極限(圖 11)。8-OHdG 及 8-NO₂Gua 在海馬迴、小腦、大腦皮質等腦區，兩組 8-OHdG/dG 及 8-NO₂Gua/Gua 比例皆無顯著差異(圖 12)。

4.5 腦部 A β 及 Tau 蛋白

本研究使用酵素免疫分析法分析海馬迴、小腦、大腦皮質 A β ₄₂ 濃度，並利用免疫組織化學染色法檢測 A β ₁₋₁₆、總 Tau 蛋白及磷酸化 Tau 蛋白。以酵素免疫分析法分析 A β ₄₂ 皆低於偵測極限(圖 13)，兩組並無差異。圖 14A 為未加入初級抗體之陰性對照組，未偵測到任何訊號，A β ₁₋₁₆ 於兩組腦組織切片皆無偵測到訊號，總 Tau 蛋白在控制組及暴露組皆有一隻偵測到總 Tau 蛋白形成(圖 14B-C)，而磷酸化 Tau 蛋白則只有在暴露組其中一隻偵測到訊號(圖 14D-F)。

4.6 組織病理切片

腦部病理切片於顯微鏡下觀察病理結果，分為嗅球、海馬迴、大腦皮質、小腦等腦部區域進行觀察，兩組腦部皆無神經元壞死，無明顯病理變化。肺部的病理切片顯示兩組接有些微發炎，但無明顯差異。

第五章 討論



5.1 PM_{2.5} 濃度及特性

暴露期間 PM_{2.5} 平均質量濃度為 7.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，低於國家環境空氣品質標準 (National Ambient Air Quality Standards, NAAQS) 規範之 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 及世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 規範之 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，本研究也使用了兩台氣膠監測儀測量國立臺灣大學公共衛生學院一樓與九樓室外 PM_{2.5} 濃度，結果顯示臺北空氣污染暴露系統內 PM_{2.5} 濃度較九樓室外低 26%，與先前研究顯示臺北空氣污染暴露系統之 PM_{2.5} 濃度較室外濃度低 21% 相似[57]，另外九樓室外 PM_{2.5} 濃度較一樓室外 PM_{2.5} 濃度低 17%，顯示微粒濃度會隨著建築物高度增加而降低[64]。

以 XPF 分析濾紙結果得知 PM_{2.5} 元素組成主要為硫(S)、鉀(K)、鐵(Fe)，硫可能來自移動污染源排放(汽油、柴油車)，鉀可能來自道路揚塵、營建粉塵、生質燃燒，矽可能來自道路揚塵、營建粉塵、工廠活動排放。其他成分可能為含碳(C)、氮(N)之化合物或離子，對於微粒之成分分析可再使用離子層析儀 (ion Chromatography, IC) 及氣相層析質譜儀 (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, GC-MS) 等儀器分析其餘成分。

5.2 3×Tg-AD 小鼠


海馬迴被認為主要負責空間學習和記憶的功能，本研究透過莫氏水迷津行為實驗了解 3×Tg-AD 小鼠未暴露大氣微粒前學習與記憶狀況，將本研究結果和先前的研究進行比較，顯示部分結果相似之處。認知記憶方面，4 個月大的 3×Tg-AD 小鼠會有記憶暫存障礙 (retention deficit) 的現象，形成記憶會較快衰退[54]，6 個月大的 3×Tg-AD 小鼠，則有空間學習和記憶的減損[55, 56]。而以未暴露微粒的小鼠而言，Lani 等人(2007)比較 C57BL/6 及 3×Tg-AD 小鼠在 2、6、9、15 個月等不同年齡時莫氏水迷津結果之差異，隨著年齡增加逃避潛伏期增加、目標平台象限次數降

低[65]，比對 2 個月、6 個月及 9 個月大 3xTg-AD 小鼠逃避潛伏期、目標平台象限次數與本研究相似，且都有隨著訓練天數增加逃避潛伏期下降的趨勢。

氧化壓力與硝化壓力結果部分，腦部細胞因不飽和脂肪酸含量豐富，容易受到 ROS 攻擊造成脂質過氧化，且因抗氧化酵素含量較低、腦部細胞氧化代謝率過高，較容易因氧化壓力造成損傷而造成神經退化性的病變[66, 67]。ROS 與氧化壓力與阿茲海默症、帕金森氏症等年齡相關的退化性疾病相關[68, 69]，先前研究顯示阿茲海默症腦部 DNA 斷裂數量較多[70]，且阿茲海默症患者腦中 8-OHdG 含量較對照組高[71-73]，阿茲海默症腦中累積的 A β 可能造成氧化壓力增加[74, 75]，且氧化壓力增加也會導致 A β 累積[76, 77]。而 Cardozo-Pelaez 等人(1999)使用 3 個月、18 個月、34 個月大 C57BL/6 小鼠，每個腦區以 150 mg 分析不同年齡、腦區中 8-OHdG 含量，結果顯示中腦、基底核、小腦等腦區隨著年齡增加，對於氧化壓力造成的 DNA 損傷越嚴重，尤其是在 18 個月大及 34 個月大之間大幅增加[78]。

本研究結果大多低於偵測極限，可能是因為使用較少組織量萃取 DNA，本研究不同腦區使用 25 mg 腦組織萃取 DNA，比起 Pelaez 等人(1999)使用 150 mg 腦組織去萃取 DNA，其萃取出來的 DNA 含量較少，再經過後續步驟萃取 8-OHdG 及 8-NO₂Gua，導致氧化壓力及硝化壓力指標含量降低，且 8-NO₂Gua 半衰期大約 4 小時[62]，可能會在萃取的過程中減少。未來探討腦中氧化壓力及硝化壓力可能需要增加萃取的腦組織量或是利用其他方式萃取指標物質。

根據先前文獻指出，3xTg-AD 小鼠最早可於 3-4 個月大在新皮質(neocortex)觀察到細胞內 A β ，6 個月時可於海馬迴觀察到細胞內 A β 以及在新皮質可觀察到類澱粉蛋白斑塊[40]，隨著年齡增加，大腦中細胞內 A β 濃度降低、細胞外 A β 濃度上升[79]，而本研究小鼠犧牲時約 8 個月大，依照文獻結果顯示應開始在新皮質及海馬迴測到細胞內 A β ，也能夠在新皮質測到細胞外 A β ，但研究結果顯示與文獻不同。實驗結果與文獻不同原因可能為小鼠間個體差異，此批小鼠可能需要到較大年齡才會有 A β 相關之阿茲海默症病徵。導致未能觀察到 3xTg-AD 小鼠腦中病徵之



原因也可能是基因漂變(gene drift)，此批小鼠部分於出生後進行基因型鑑定(genotyping)，但部分為親代進行過基因型鑑定但子代並無進行，雖有可能發生基因漂變，但親代為同型合子(homozygous)，其子代應為同型合子，發生基因漂變的機率不大。未來若欲繼續使用此 3xTg-AD 小鼠進行實驗，每隻都可進行基因型鑑定，確保實驗小鼠皆含有三種轉殖基因。另外測定腦區取樣方式可能會造成差異，因細胞外 A β 會先在新皮質 4-5 層以及海馬迴 CA1 區域累積，本研究未再特別細分大腦皮質及海馬迴，可能因此變相稀釋細胞外 A β 濃度，而細胞內 A β_{1-16} 免疫組織染色結果可能也會因切片位置而造成差異。


此實驗未偵測到與阿茲海默症相關之蛋白質表現，也可能與腦組織量較少有關，未來實驗可將同組別小鼠之腦組織匯集後再萃取進行後續分析，以提高待測物質濃度，也可以嘗試西方墨點法(Western blot)，使用較少組織即可比較兩組間蛋白質表現的差異。另外也可以測定與 A β 、磷酸化 Tau 蛋白相關的 RNA 表現，例如 BACE1 mRNA[80]，藉此得知是否在轉譯為蛋白質前即產生差異。

5.3 微粒效應

5.3.1 空間學習及記憶能力

本研究透過莫氏水迷津行為實驗探討非濃縮的大氣微粒對空間學習與記憶功能的效應，實驗結果顯示大氣微粒暴露前後兩組並無顯著差別，本研究顯示大氣微粒暴露可能並未對海馬迴產生明顯的影響使學習功能受損。將本研究結果和先前的研究進行比較，顯示部分結果上的不同。

比較微粒暴露後行為實驗的結果發現，Fronken 等人(2011)使用 4 周大 C57BL/6 小鼠暴露濃縮大氣微粒，利用巴恩斯迷宮評估學習及記憶能力，結果顯示知識採集階段的逃避潛伏期增加、空間探索實驗時尋找到正確目標的次數下降[81]，相較於本研究利用 17 周大 3xTg-AD 小鼠暴露非濃縮大氣微粒，PM_{2.5} 平均質量濃度為 7.6



$\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，一天暴露 24 小時、一周 7 天，共暴露 12 周而言，Fronken 等人(2011)研究之 $\text{PM}_{2.5}$ 平均質量濃度為 $16.85 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，一天暴露 6 小時、一周 5 天，暴露 10 個月，暴露微粒總量較高，顯示除了品系不同造成結果差異，暴露微粒的濃度與總量也可能造成動物空間學習記憶損傷有不一致的情形。


本研究兩組莫氏水迷津結果並無差異也可能與未偵測到細胞內 $\text{A}\beta$ 有關，細胞內 $\text{A}\beta$ 累積可能導致短期、長期記憶減損及認知功能障礙[54]，利用抗 $\text{A}\beta$ 療法去除細胞內 $\text{A}\beta$ ，可以使海馬迴相關的早期認知障礙情形恢復，且不會影響類澱粉蛋白斑塊累積[82-84]，另外研究表示隨著老鼠年齡增加，即使細胞內 $\text{A}\beta$ 減少，但類澱粉蛋白斑塊及神經纖維纏結數量增加，且認知功能會持續惡化[79]。顯示細胞內 $\text{A}\beta$ 累積與記憶減損發生有關，但若認知功能減損要持續惡化則需細胞外 $\text{A}\beta$ 累積。

另外有研究使用 6.5 個月 3xTg-AD 小鼠，進行了 Y-maze、新奇事物認知測試 (Novel object recognition task, NOR)、巴恩斯迷宮 (Barnes maze test)、情境極限所制約懼怕行為 (Contextual and cued fear memory test)，探討 3xTg-AD 小鼠對於行為實驗的敏感度，以這 4 種行為實驗而言巴恩斯迷宮對於測試 3xTg-AD 小鼠的認知缺陷來說比較敏感[55]。對於小鼠暴露大氣微粒造成學習記憶減損可以利用更敏感的行為實驗去探討。

5.3.2 8-OHdG 及 8-NO₂Gua

本研究探討大氣微粒對於腦部 DNA 形成的損傷，以 8-OHdG 及 8-NO₂Gua 兩種物質作為氧化壓力及硝化壓力指標，結果顯示 8-OHdG 及 8-NO₂Gua 濃度多低於偵測極限，兩組 8-OHdG/dG 及 8-NO₂Gua/Gua 比例皆無顯著差異。

目前針對微粒暴露造成腦部氧化壓力探討的文獻不多，Fagundes 等人(2015)透過體外實驗評估 $\text{PM}_{2.5}$ 對大鼠嗅球、大腦皮質、紋狀體、海馬迴及小腦等腦區造成氧化壓力的情形，測量腦區脂質過氧化造成的損傷，並測量酵素抗氧化系統中對 ROS 作用之超氧化歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (Catalase, CAT)




活性，PM_{2.5} 對能夠使小腦及海馬迴損傷，增強其脂質過氧化作用，也降低了小腦、海馬迴、紋狀體及嗅球的 CAT 活性。海馬迴氧化壓力若有增加的情形可能造成記憶力衰退，雖然本研究小鼠在空間學習和空間記憶沒有減損的情形，但提高暴露濃度或暴露時間增長，持續產生氧化壓力可能就會對中樞神經產生毒性，造成空間學習與記憶損傷。另外小鼠暴露砷(Arsenic, As)後，腦組織中 8-NO₂Gua 表現量增加 [85]，RNS 通常於發炎反應細胞激素增加時會生成，進而產生硝化壓力損傷 DNA 形成 8-NO₂Gua，慢性發炎也是造成神經毒性的途徑之一。

本研究結果大多低於偵測極限，可能的原因已於前面探討，未來探討腦中氧化壓力及硝化壓力可能需要增加萃取的腦組織量或是利用其他方式萃取指標物質。

5.3.3 腦中 A β 及 Tau 蛋白

本研究針對大氣微粒對腦部產生阿茲海默症病徵之 A β 及磷酸化 Tau 蛋白累積進行探討，3xTg-AD 小鼠暴露非濃縮大氣微粒 12 周並結束莫氏水迷津後測，於 8 個月大左右犧牲，海馬迴、小腦、大腦皮質等腦部區域使用酵素免疫分析法分析 A β ₄₂ 濃度，結果顯示兩組各腦區 A β ₄₂ 皆低於偵測極限，另外利用免疫組織化學染色法檢測 A β ₁₋₁₆，兩組腦組織切片皆無偵測到訊號。墨西哥高污染城市居民腦部組織病理結果顯示，A β ₄₂ 及環氧化酶-2 (COX-2) 及於額葉皮質、海馬迴比起低污染地區顯著較高，這兩種物質為阿茲海默症病程及發炎的指標 [27]，於長期暴露微粒之老年人腦中可觀察到 A β ₁₋₄₂ 聚集及 Tau 蛋白過度磷酸化情形 [15, 28, 29]。而 Bhatt 等人 (2015) 以 C57BL/6 小鼠暴露濃縮 7.7 倍的 PM_{2.5} ($65.7 \pm 34.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$)，於 8 週大開始暴露，每天 6 小時、一週 5 天，暴露 9 個月後小鼠顳葉皮質之 A β ₁₋₄₀、 β 分泌酵素 (β -secretase)、COX-1 及 COX-2 顯著增加 [26]，顯示暴露濃度及暴露時間可能會造成腦中 A β 濃度的差異。



另外利用免疫組織化學染色法檢測總 Tau 蛋白及磷酸化 Tau 蛋白，總 Tau 蛋白在控制組及暴露組皆有一隻的腦組織切片偵測到總 Tau 蛋白形成，而磷酸化 Tau 蛋白則只有在暴露組其中一隻偵測到訊號，此結果可能為暴露大氣微粒造成的結果，與先前文獻結果相似[15, 28, 29]，Tau 蛋白過度磷酸化且無法和微管結合可能是神經元 Ca^{2+} 不恆定誘導，這會進而導致神經元凋亡[13-15]，形成阿茲海默症的神經纖維纏結病徵。

而 $A\beta$ 與 Tau 蛋白之間的關聯有下列可能機制， $A\beta$ 活化磷酸化 Tau 蛋白的激酶(kinase)，改變了 Tau 蛋白和微管結合的能力[86, 87]，也可能使 Tau 蛋白的蛋白酶體(proteasomal)降解，增加自由狀態的 Tau 蛋白濃度[88]，另外細胞內聚集的 $A\beta$ 對 Tau 蛋白也有成核作用[89]，以上文獻顯示 $A\beta$ 累積會導致磷酸化 Tau 蛋白累積。本研究免疫組織化學染色未偵測到 $A\beta$ ，以酵素免疫分析法量測 $A\beta$ 也都低於偵測極限，但磷酸化 Tau 蛋白卻在暴露組偵測到結果，有可能是 $A\beta$ 誘導磷酸化 Tau 蛋白形成後經由微膠細胞(microglia)吞噬 $A\beta$ [90-92]，或是透過腦啡肽酶(NEP)、胰島素降解酶(IDE)、血內皮素轉換酶(ECE)、血管收縮素轉化酶(ACE)等蛋白酶、肽酶切割後清除[93-96]。對於造成此現象的實際原因則需要更多研究去探討。

5.4 結論與建議

本研究為探討微粒暴露對於阿茲海默症影響之先驅研究，以平均質量濃度為 $7.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 之大氣細懸浮微粒暴露 12 周可能無法導致 3xTg-AD 小鼠空間學習及記憶功能損傷，而在氧化壓力、硝化壓力及 $A\beta_{42}$ 的部分皆低於偵測極限，過去研究顯示微粒暴露可能會導致阿茲海默症相關病徵及腦中氧化壓力增加，此先驅研究無顯著結果之原因可能為大氣細懸浮微粒濃度較低及腦組織量較少導致，若要分析相關指標可以增加分析的組織量，使相關指標數值高於偵測極限。

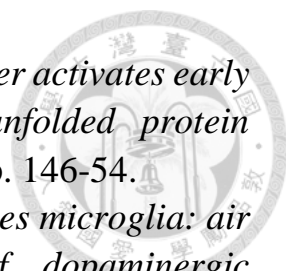
未來若要進一步了解非濃縮大氣微粒對於阿茲海默症的效應，可能需要使用年紀較大之 3xTg-AD 小鼠暴露，或是加長暴露的時間，也可以嘗試使用濃縮大氣

微粒的方式，使小鼠暴露到較高濃度但減少暴露時間，並於暴露結束後繼續飼養小鼠，使阿茲海默病徵有足夠時間形成再進行犧牲，但改變以上暴露條件須考慮到 3xTg-AD 小鼠因年紀增加而增高的死亡率，避免造成動物死亡或是行為實驗無法進行。

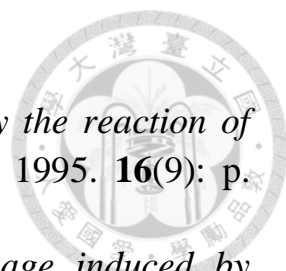
第六章 參考文獻




1. Brook, R.D., et al., *Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association*. *Circulation*, 2004. **109**(21): p. 2655-71.
2. Brook, R.D., et al., *Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2010. **121**(21): p. 2331-78.
3. Sin, D.D., L.L. Wu, and S.F.P. Man, *The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality - A population-based study and a systematic review of the literature*. *Chest*, 2005. **127**(6): p. 1952-1959.
4. Samet, J.M., et al., *Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(24): p. 1742-9.
5. Colais, P., et al., *Particulate air pollution and hospital admissions for cardiac diseases in potentially sensitive subgroups*. *Epidemiology*, 2012. **23**(3): p. 473-81.
6. Gauderman, W.J., et al., *The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(11): p. 1057-67.
7. Gehring, U., et al., *Particulate matter composition and respiratory health: the PIAMA Birth Cohort study*. *Epidemiology*, 2015. **26**(3): p. 300-9.
8. Calderón-Garcidueña, L., et al., *Air Pollution and Brain Damage*. *Toxicologic Pathology*, 2002. **30**(3): p. 373-389.
9. Ajmani, G.S., H.H. Suh, and J.M. Pinto, *Effects of Ambient Air Pollution Exposure on Olfaction: A Review*. *Environ Health Perspect*, 2016. **124**(11): p. 1683-1693.
10. Doty, R.L., *The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable?* *Ann Neurol*, 2008. **63**(1): p. 7-15.
11. Kim, S.H., et al., *Rapid doubling of Alzheimer's amyloid-beta40 and 42 levels in brains of mice exposed to a nickel nanoparticle model of air pollution*. *F1000Res*, 2012. **1**: p. 70.
12. Block, M.L. and L. Calderon-Garciduenas, *Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease*. *Trends Neurosci*, 2009. **32**(9): p. 506-16.
13. Wu, Y.C., et al., *Association between air pollutants and dementia risk in the elderly*. *Alzheimers Dement (Amst)*, 2015. **1**(2): p. 220-8.

- 
14. Guerra, R., et al., *Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum*. *Toxicol Lett*, 2013. **222**(2): p. 146-54.
 15. Levesque, S., et al., *Diesel exhaust activates and primes microglia: air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity*. *Environ Health Perspect*, 2011. **119**(8): p. 1149-55.
 16. Hartz, A.M., et al., *Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier*. *FASEB J*, 2008. **22**(8): p. 2723-33.
 17. Mumaw, C.L., et al., *Microglial priming through the lung-brain axis: the role of air pollution-induced circulating factors*. *FASEB J*, 2016. **30**(5): p. 1880-91.
 18. Choi, Y.S., et al., *Fucoidan Extracted from Hijiki Protects Brain Microvessel Endothelial Cells Against Diesel Exhaust Particle Exposure-Induced Disruption*. *J Med Food*, 2016. **19**(5): p. 466-71.
 19. Cheng, H., et al., *Urban traffic-derived nanoparticulate matter reduces neurite outgrowth via TNFalpha in vitro*. *J Neuroinflammation*, 2016. **13**: p. 19.
 20. Wang, Y., L. Xiong, and M. Tang, *Toxicity of inhaled particulate matter on the central nervous system: neuroinflammation, neuropsychological effects and neurodegenerative disease*. *J Appl Toxicol*, 2017. **37**(6): p. 644-667.
 21. Calderon-Garciduenas, L., et al., *Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults*. *Toxicol Pathol*, 2008. **36**(2): p. 289-310.
 22. Yokota, S., et al., *Nasal instillation of nanoparticle-rich diesel exhaust particles slightly affects emotional behavior and learning capability in rats*. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2011. **36**(3): p. 267-276.
 23. Win-Shwe, T.T., et al., *Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust*. *Neurotoxicology*, 2008. **29**(6): p. 940-7.
 24. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy*. *Physiological Reviews*, 2001. **81**(2): p. 741-766.
 25. Jung, C.R., Y.T. Lin, and B.F. Hwang, *Ozone, particulate matter, and newly diagnosed Alzheimer's disease: a population-based cohort study*

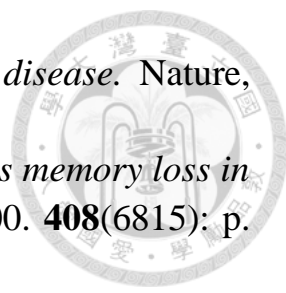
- in Taiwan*. J Alzheimers Dis, 2015. **44**(2): p. 573-84.
26. Bhatt, D.P., et al., *A pilot study to assess effects of long-term inhalation of airborne particulate matter on early Alzheimer-like changes in the mouse brain*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0127102.
27. Calderon-Garciduenas, L., et al., *Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution*. Toxicol Pathol, 2004. **32**(6): p. 650-8.
28. Calderon-Garciduenas, L., et al., *Early Alzheimer's and Parkinson's disease pathology in urban children: Friend versus Foe responses--it is time to face the evidence*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 161687.
29. Calderon-Garciduenas, L., et al., *Neuroinflammation, hyperphosphorylated tau, diffuse amyloid plaques, and down-regulation of the cellular prion protein in air pollution exposed children and young adults*. J Alzheimers Dis, 2012. **28**(1): p. 93-107.
30. Fagundes, L.S., et al., *Direct contact with particulate matter increases oxidative stress in different brain structures*. Inhal Toxicol, 2015. **27**(10): p. 462-7.
31. Moulton, P.V. and W. Yang, *Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease*. J Environ Public Health, 2012. **2012**: p. 472751.
32. Poon, H.F., et al., *Free radicals and brain aging*. Clin Geriatr Med, 2004. **20**(2): p. 329-59.
33. Veronesi, B., et al., *Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles. VII. Degeneration of dopaminergic neurons in Apo E-/- mice*. Inhal Toxicol, 2005. **17**(4-5): p. 235-41.
34. Wang, J., et al., *Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2005. **93**(4): p. 953-62.
35. Floyd, R.A., et al., *Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation*. Free Radic Res Commun, 1986. **1**(3): p. 163-72.
36. Toyokuni, S., et al., *Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model*. Lab Invest, 1997. **76**(3): p. 365-74.
37. Tran, M.H., et al., *Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors*. Faseb

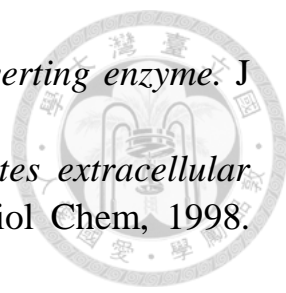
- 
- Journal, 2001. **15**(6): p. 1407-+.
38. Yermilov, V., et al., *Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxyxynitrite in vitro*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(9): p. 2045-50.
 39. Inoue, S. and S. Kawanishi, *Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide*. *FEBS Lett*, 1995. **371**(1): p. 86-8.
 40. Oddo, S., et al., *Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles*. *Neuron*, 2003. **39**(3): p. 409-421.
 41. Nilsberth, C., et al., *The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation*. *Nat Neurosci*, 2001. **4**(9): p. 887-93.
 42. Ancolio, K., et al., *Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(7): p. 4119-24.
 43. Scheuner, D., et al., *Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease*. *Nature Medicine*, 1996. **2**(8): p. 864-870.
 44. Johnston, J.A., et al., *Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation*. *FEBS Lett*, 1994. **354**(3): p. 274-8.
 45. Citron, M., et al., *Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(25): p. 11993-7.
 46. Cai, X.D., T.E. Golde, and S.G. Younkin, *Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor*. *Science*, 1993. **259**(5094): p. 514-6.
 47. Citron, M., et al., *Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production*. *Nature*, 1992. **360**(6405): p. 672-4.
 48. Murayama, O., et al., *Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease*.

- 
- Neurosci Lett, 1999. **265**(1): p. 61-3.
49. Barghorn, S., et al., *Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias*. Biochemistry, 2000. **39**(38): p. 11714-21.
 50. Janelsins, M.C., et al., *Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice*. Journal of Neuroinflammation, 2005. **2**.
 51. Kitazawa, M., et al., *Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2005. **25**(39): p. 8843-53.
 52. Janelsins, M.C., et al., *Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1768-82.
 53. Olabarria, M., et al., *Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease*. Glia, 2010. **58**(7): p. 831-8.
 54. Billings, L.M., et al., *Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice*. Neuron, 2005. **45**(5): p. 675-88.
 55. Stover, K.R., et al., *Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease*. Behav Brain Res, 2015. **289**: p. 29-38.
 56. Gimenez-Llort, L., et al., *Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid*. Neurosci Biobehav Rev, 2007. **31**(1): p. 125-47.
 57. Yan, Y.H., et al., *Subchronic effects of inhaled ambient particulate matter on glucose homeostasis and target organ damage in a type 1 diabetic rat model*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **281**(2): p. 211-20.
 58. Li, C.S., et al., *Analysis of oxidative DNA damage 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of exposures to persistent pollutants for marine mammals*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(8): p. 2455-2460.
 59. Guindon, K.A., L.L. Bedard, and T.E. Massey, *Elevation of 8-*

- hydroxydeoxyguanosine in DNA from isolated mouse lung cells following in vivo treatment with aflatoxin B1*. Toxicol Sci, 2007. **98**(1): p. 57-62.
60. European Standards Committee on Oxidative, D.N.A.D., *Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(8): p. 1089-99.
61. Wu, K.Y., et al., *A gas chromatography/electron capture/negative chemical ionization high-resolution mass spectrometry method for analysis of endogenous and exogenous N7-(2-hydroxyethyl)guanine in rodents and its potential for human biological monitoring*. Chem Res Toxicol, 1999. **12**(8): p. 722-9.
62. Yermilov, V., J. Rubio, and H. Ohshima, *Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination*. FEBS Lett, 1995. **376**(3): p. 207-10.
63. Hsieh, Y.S., et al., *Formation of 8-nitroguanine in tobacco cigarette smokers and in tobacco smoke-exposed Wistar rats*. Chem Biol Interact, 2002. **140**(1): p. 67-80.
64. Quang, T.N., et al., *Vertical particle concentration profiles around urban office buildings*. Atmospheric Chemistry and Physics, 2012. **12**(11): p. 5017-5030.
65. Clinton, L.K., et al., *Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice*. Neurobiol Dis, 2007. **28**(1): p. 76-82.
66. Floyd, R.A. and J.M. Carney, *Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress*. Ann Neurol, 1992. **32 Suppl**: p. S22-7.
67. Floyd, R.A., *Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders*. Proc Soc Exp Biol Med, 1999. **222**(3): p. 236-45.
68. Stadtman, E.R. and B.S. Berlett, *Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(5): p. 485-94.
69. Sohal, R.S., R.J. Mockett, and W.C. Orr, *Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis* 1,2 *This article is part of a series of reviews on "Oxidative Stress and Aging." The full list of papers may be found on the homepage of the journal.* 2 *Guest Editor: Rajindar S. Sohal*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(5): p.

- 575-586.
70. Zhang, J., et al., *Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity*. Science, 1994. **263**(5147): p. 687-9.
71. Wang, J., W.R. Markesbery, and M.A. Lovell, *Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment*. J Neurochem, 2006. **96**(3): p. 825-32.
72. Mecocci, P., U. MacGarvey, and M.F. Beal, *Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1994. **36**(5): p. 747-51.
73. Butterfield, D.A., et al., *Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(5): p. 658-77.
74. Behl, C., et al., *Hydrogen-Peroxide Mediates Amyloid-Beta Protein Toxicity*. Cell, 1994. **77**(6): p. 817-827.
75. Hensley, K., et al., *A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(8): p. 3270-4.
76. Yan, S.D., et al., *Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 693-9.
77. Misonou, H., M. Morishima-Kawashima, and Y. Ihara, *Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A β) in human neuroblastoma cells*. Biochemistry, 2000. **39**(23): p. 6951-6959.
78. Cardozo-Pelaez, F., et al., *Oxidative DNA damage in the aging mouse brain*. Mov Disord, 1999. **14**(6): p. 972-80.
79. Oddo, S., et al., *A Dynamic Relationship between Intracellular and Extracellular Pools of A β* . The American Journal of Pathology, 2006. **168**(1): p. 184-194.
80. Faghihi, M.A., et al., *Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase*. Nat Med, 2008. **14**(7): p. 723-30.
81. Fonken, L.K., et al., *Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(10): p. 987-95, 973.
82. Janus, C., et al., *A beta peptide immunization reduces behavioural*

- 
- impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease.* Nature, 2000. **408**(6815): p. 979-82.
83. Morgan, D., et al., *A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease.* Nature, 2000. **408**(6815): p. 982-5.
84. Dodart, J.C., et al., *Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model.* Nat Neurosci, 2002. **5**(5): p. 452-7.
85. Piao, F., et al., *Abnormal expression of 8-nitroguanine in the brain of mice exposed to arsenic subchronically.* Ind Health, 2011. **49**(2): p. 151-7.
86. Hernandez, F. and J. Avila, *Intra- and extracellular protein interactions with tau.* Curr Alzheimer Res, 2010. **7**(8): p. 670-6.
87. Llorens-Martin, M., et al., *GSK-3beta, a pivotal kinase in Alzheimer disease.* Front Mol Neurosci, 2014. **7**: p. 46.
88. Oddo, S., et al., *Genetically altering Abeta distribution from the brain to the vasculature ameliorates tau pathology.* Brain Pathol, 2009. **19**(3): p. 421-30.
89. Guo, J.P., et al., *Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1953-8.
90. Bolmont, T., et al., *Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance.* J Neurosci, 2008. **28**(16): p. 4283-92.
91. Simard, A.R., et al., *Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease.* Neuron, 2006. **49**(4): p. 489-502.
92. Malm, T.M., et al., *Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice.* Neurobiol Dis, 2005. **18**(1): p. 134-42.
93. Iwata, N., et al., *Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition.* Nat Med, 2000. **6**(2): p. 143-50.
94. Eckman, E.A., D.K. Reed, and C.B. Eckman, *Degradation of the*

- 
- Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme.* J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24540-8.
95. Qiu, W.Q., et al., *Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation.* J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32730-8.
96. Hu, J., et al., *Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity.* J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47863-8.

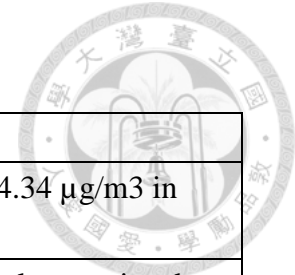


表1、大氣微粒對阿茲海默症影響之研究

References	Species	Exposure	CNS effects
Chau-Ren Jung et al.,2015 [25]	Human (age≥65 years)	2001-2010 air pollution	138% risk of increase of AD per increase of 4.34 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in $\text{PM}_{2.5}$.
Yun-Chun Wu et al.,2015 [13]	Human (age≥60 years)	1993-2006 air pollution	Elevated long-term PM_{10} level was significantly associated with an increased risk of AD and VaD in the elderly.
Dhaval P. Bhatt et al.,2015 [26]	C57BL/6 mice (8 weeks)	Concentrated ambient $\text{PM}_{2.5}$ by inhalation for 3 months and 9 months	(1)The $\text{A}\beta_{1-40}$ levels were significantly higher in 9 months exposure groups. (2)no changes in tau protein or its hyper-phosphorylated form (PHF-1)
LILIAN CALDERON-GARCIDUEÑAS et al.,2004[27]	Human	air pollution	Significant accumulation of $\text{A}\beta_{42}$ in both frontal cortex and hippocampus.

表2、 LC-MS/MS 移動相濃度梯度

Total time (min)	Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Solvent A (%) 0.01% FA in MeOH	Solvent B (%) 0.01% FA in water
0.0	500	10	90
1.0	500	10	90
3.0	500	50	50
5.0	500	98	2
7.2	500	98	2
7.5	500	10	90
10.0	500	10	90

表3、 8-OHdG、8-NO₂Gua 母離子、子離子、碰撞能量、管徑電壓參數

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision Energy (V)	Tube Lens (V)
8-OHdG	284	140.2	13.0	85
		168.1	30.0	85
¹⁵ N ₅ -8-OHdG	289.1	173.2	12.0	85
8-NO ₂ Gua	194.9	153.1	18.0	-55
		178.1	20.0	-55
¹³ C ₂ ¹⁵ N-8-NO ₂ Gua	197.9	181.1	20.0	-55

表4、質譜儀游離源參數

Ion source	HESI
Spray voltage (V)	3000
Vaporizer temperature (°C)	100
Capillary temperature (°C)	250
Sheath gas pressure (psi)	60
Auxiliary gas pressure (arb)	5



表5、HPLC-UV 移動相濃度梯度

Total time (min)	Flow rate (mL/min)	Solvent A (%) 100% ACN	Solvent B (%) 50 mM ammonium formate
0.0	1	0	100
7.0	1	3	97
9.0	1	50	50
9.1	1	0	100
20.0	1	0	100



表6、 採樣期間平均質量濃度 PM_{2.5} (μg/m³)

(μg/m ³)	Sampling duration	10.03	10.11	10.17	10.24	10.31	11.07	11.14	11.21	11.28	12.05
		10.11	10.17	10.24	10.31	11.07	11.14	11.21	11.28	12.05	12.12
Manual sampling	PM _{2.5}	4.4	4	4.9	11.5	6.1	7.8	8.2	3.8	6.6	8.2
Dust monitor		18.9	14.7	20.7	53	24	34.6	37.2	18.6	26.7	36.9

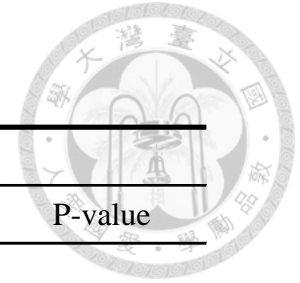
(μg/m ³)	Sampling duration	12.12	12.19	12.26	1.03	1.09	1.16	1.23	1.31	2.06	2.13	Mean
		12.19	12.26	1.03	1.09	1.16	1.23	1.31	2.06	2.13	2.2	
Manual sampling	PM _{2.5}	8.2	8.4	6.2	11.3	8.6	7.5	7.6	8.6	9.4	11.1	7.6
Dust monitor		18.9	14.7	20.7	53	24	34.6	37.2	18.6	26.7	36.9	32.9

表7、 採樣期間 PM_{2.5} 化學元素組成



	Mean (ng/m ³)	Median (ng/m ³)	Min (ng/m ³)	Max (ng/m ³)	BDL or BBK (%)	Percentage of mean PM _{2.5} (%)
Manual sampling PM _{2.5}	8349.66	8034.17	4776.35	12861.40		100.00%
XRF analysis						
Mg	12.36	BDL or BBK	BDL or BBK	15.10	90%	0.15%
Al	19.13	BDL or BBK	BDL or BBK	53.57	60%	0.23%
Si	35.31	27.21	BDL or BBK	67.22	10%	0.42%
S	1101.37	1185.38	519.10	1971.13	0%	13.19%
K	73.37	70.09	26.11	158.04	0%	0.88%
Ca	5.63	BDL or BBK	BDL or BBK	17.35	60%	0.07%
Ti	1.78	1.86	0.70	2.89	0%	0.02%
V	3.92	3.27	1.33	8.45	0%	0.05%
Cr	0.09	BDL or BBK	BDL or BBK	0.90	90%	0.00%
Mn	3.68	3.63	1.54	5.94	0%	0.04%
Fe	40.01	41.53	21.89	55.39	0%	0.48%
Ni	1.10	1.18	BDL or BBK	3.35	40%	0.01%
Cu	BDL or BBK	BDL or BBK	BDL or BBK	BDL or BBK	100%	0.00%
Zn	17.75	18.28	7.56	25.98	0%	0.21%
Ba	1.52	BDL or BBK	BDL or BBK	15.22	90%	0.02%
Pb	5.57	4.75	BDL or BBK	24.73	40%	0.07%

表8、莫氏水迷津前測知識採集階段



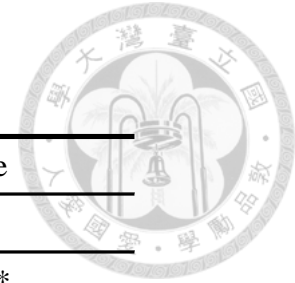
	Day1			Day2		
	control	exposure	P-value	control	exposure	P-value
N	5	6		5	6	
Escape latency(sec)	60.00	60.00	0.1751	50.46	46.82	0.9994
Distance moved(cm)	879.63	958.22	0.2211	846.23	771.23	0.9143
Cumulative distance(m)	35.19	38.33	0.2211	33.85	30.85	0.9143
Swimming velocity(cm/s)	18.30	16.90	0.7712	20.00	18.41	0.7073

	Day3			Day4		
	control	exposure	P-value	control	exposure	P-value
N	5	6		4	6	
Escape latency(sec)	57.90	35.19	0.7236	39.58	24.84	0.9080
Distance moved(cm)	601.37	803.14	0.7092	479.79	618.79	0.5673
Cumulative distance(m)	24.05	32.13	0.7092	19.19	24.75	0.5673
Swimming velocity(cm/s)	17.97	22.35	0.4423	13.22	21.97	0.2042

表9、莫氏水迷津前測探索實驗

N	control	exposure	P-value
	5	6	
Time spent in platform quadrant(%)	35.80	23.63	0.0446*
Quadrant area crossing(times)	4.50	5.88	0.9781
Swimming velocity(cm/s)	19.73	21.78	0.8947

(*p<0.05,significantly different from the control group, Wilcoxon rank sum test)



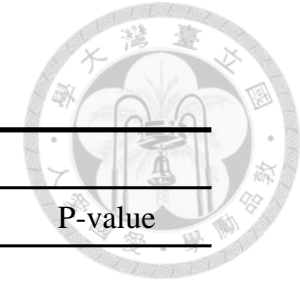


表10、莫氏水迷津後測知識採集階段

	Day1			Day2		
	control	exposure	P-value	control	exposure	P-value
N	5	6		5	6	
Escape latency(sec)	51.35	39.96	0.4102	33.39	26.87	0.9273
Distance moved(cm)	603.96	665.85	0.9273	672.15	517.1	0.9273
Cumulative distance(m)	24.16	26.63	0.9273	26.89	20.68	0.9273
Swimming velocity(cm/s)	17.34	16.92	0.6481	16.29	15.75	0.9273

	Day3			Day4		
	control	exposure	P-value	control	exposure	P-value
N	5	6		5	6	
Escape latency(sec)	23.29	32.72	0.7898	21.42	26.27	0.9273
Distance moved(cm)	347.96	566.67	0.7842	268.19	492.15	0.6481
Cumulative distance(m)	13.92	22.67	0.7842	10.73	19.69	0.6481
Swimming velocity(cm/s)	17.28	17.77	0.6481	16.27	17.37	0.4113

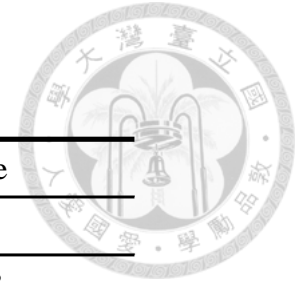
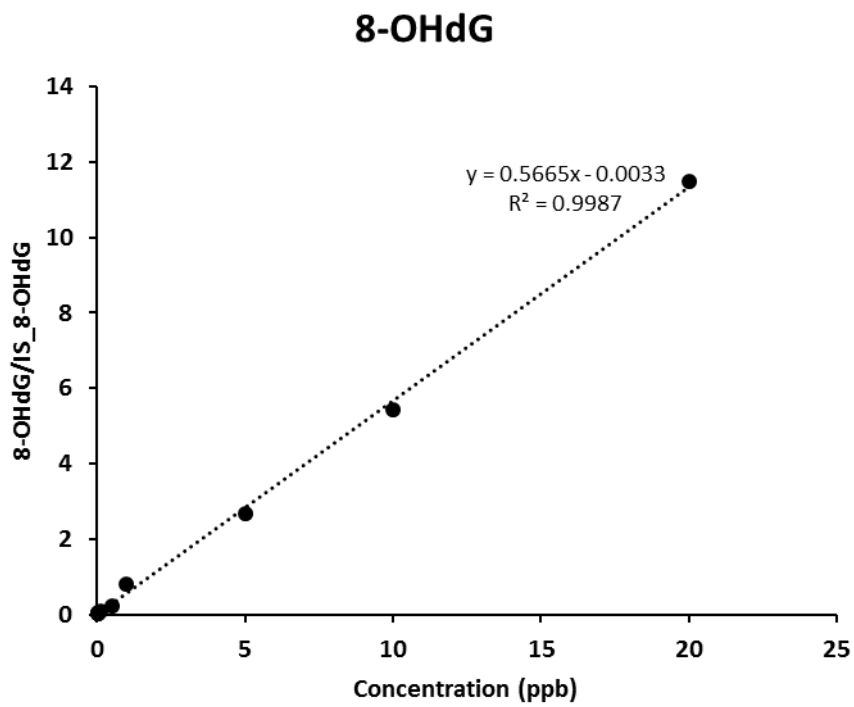


表11、莫氏水迷津後測探索實驗

N	control	exposure	P-value
	5	6	
Time spent in platform quadrant(%)	32.04	40.91	0.5228
Quadrant area crossing(times)	7.5	8.13	0.4070
Swimming velocity(cm/s)	16.33	18.69	0.6481

(A)



(B)

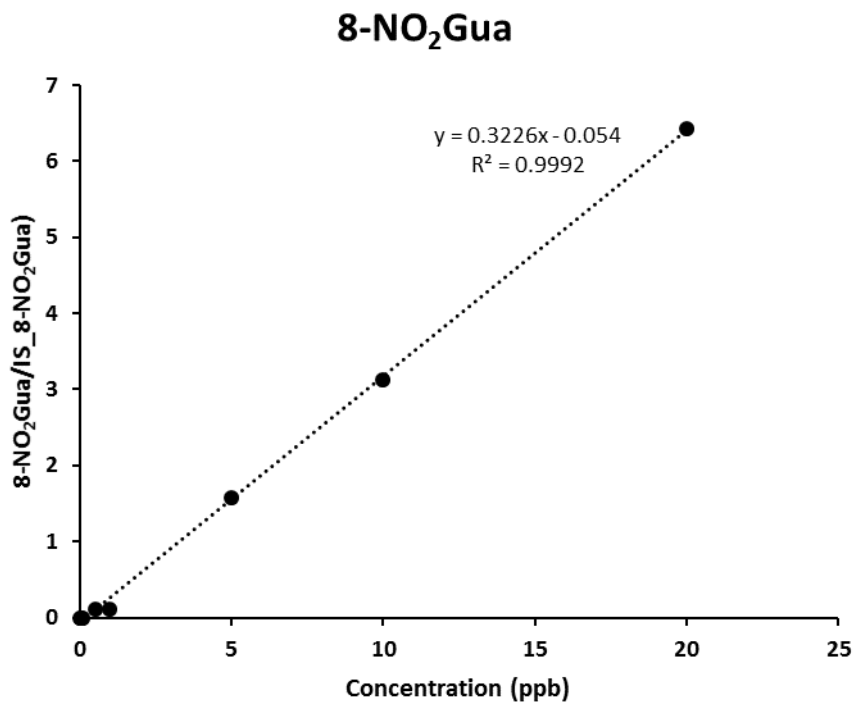


圖1、 LC-MS/MS 檢量線(A) 8-OHdG (B) 8-NO₂Gua

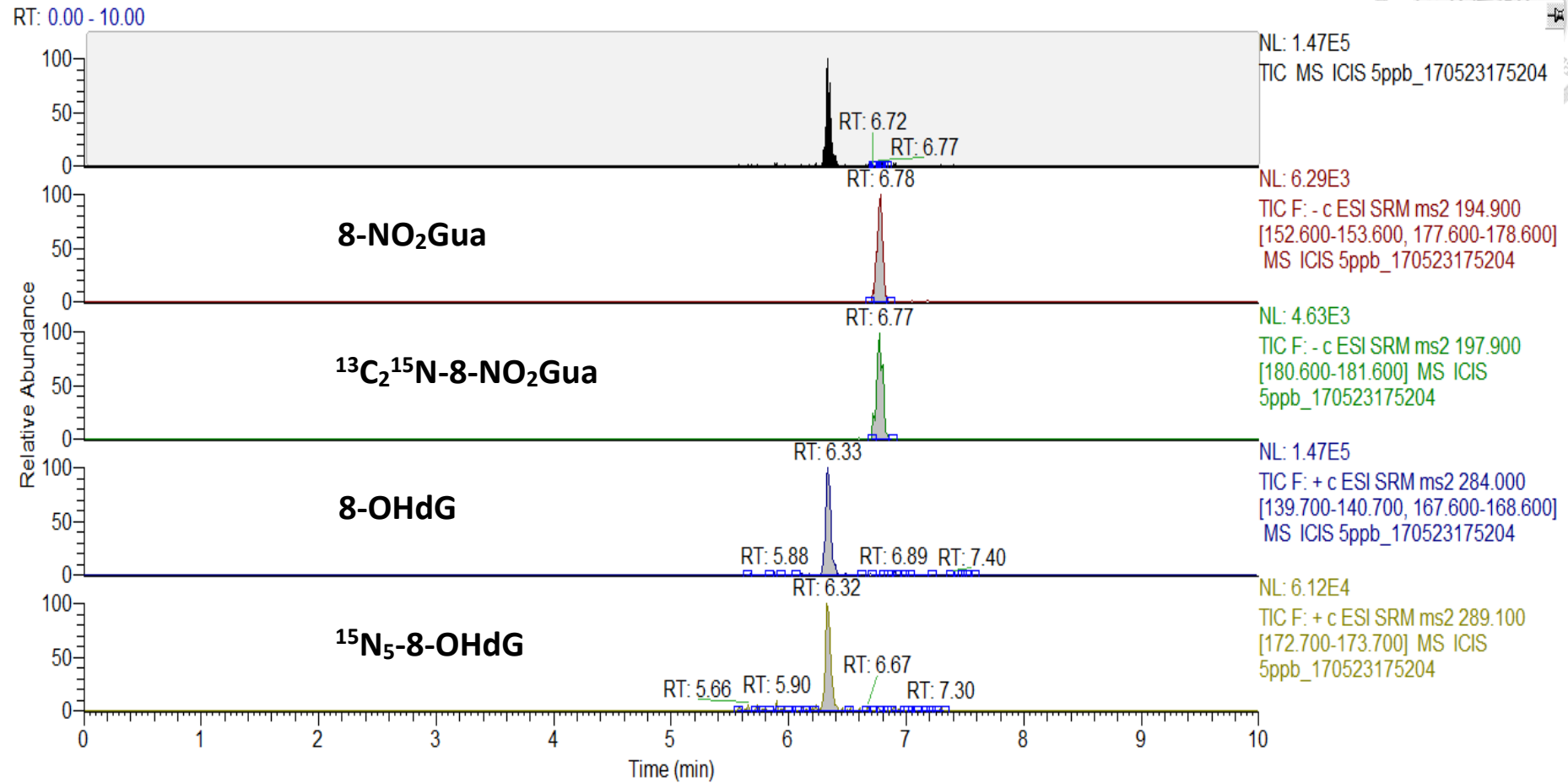
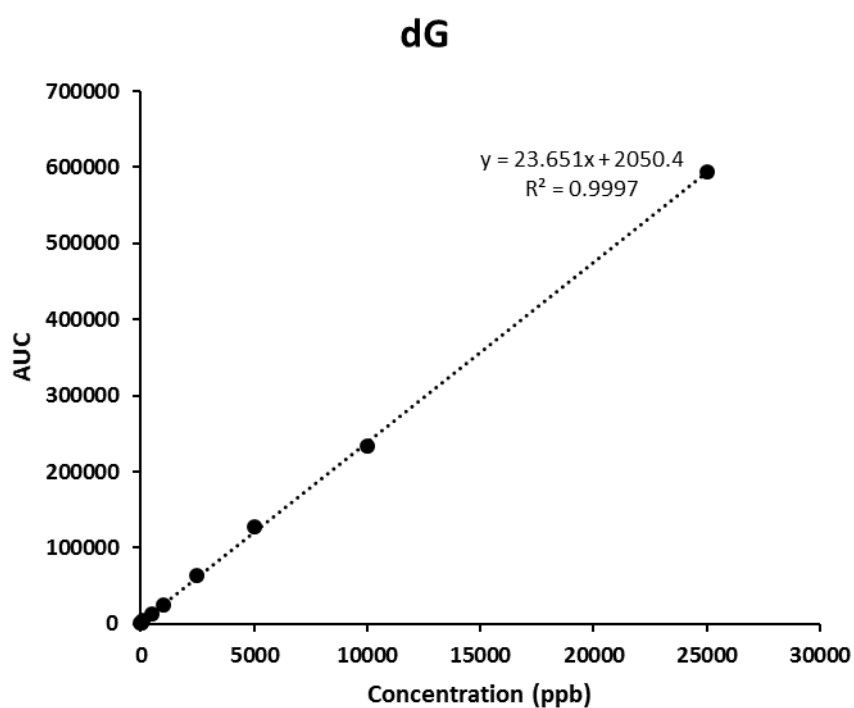


圖2、 8-NO₂Gua、¹³C₂¹⁵N-8-NO₂Gua、8-OHdG、¹⁵N₅-8-OHdG 層析圖



(A)



(B)

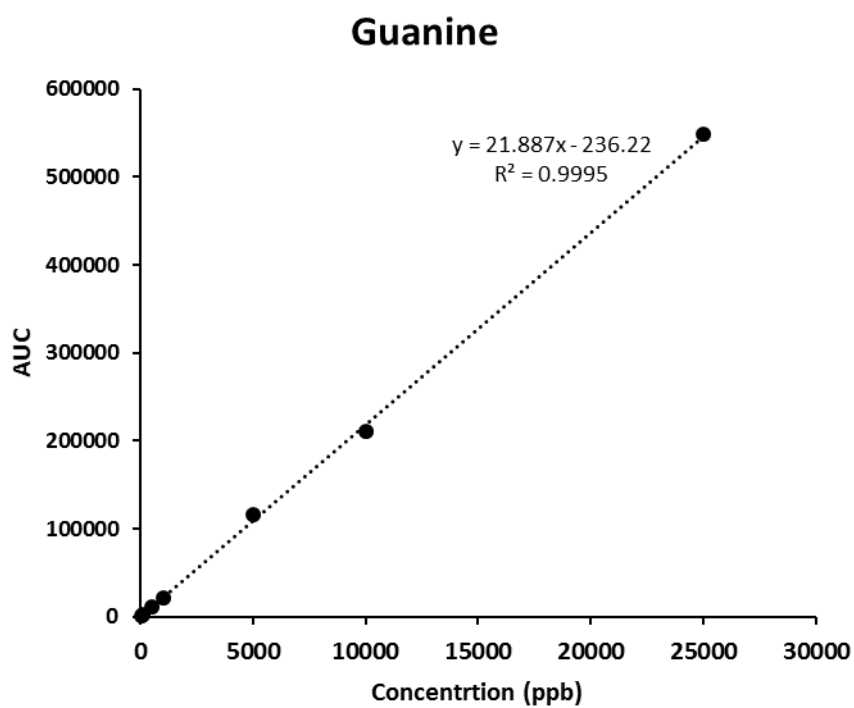


圖3、 HPLC-UV 檢量線(A) dG (B) Guanine

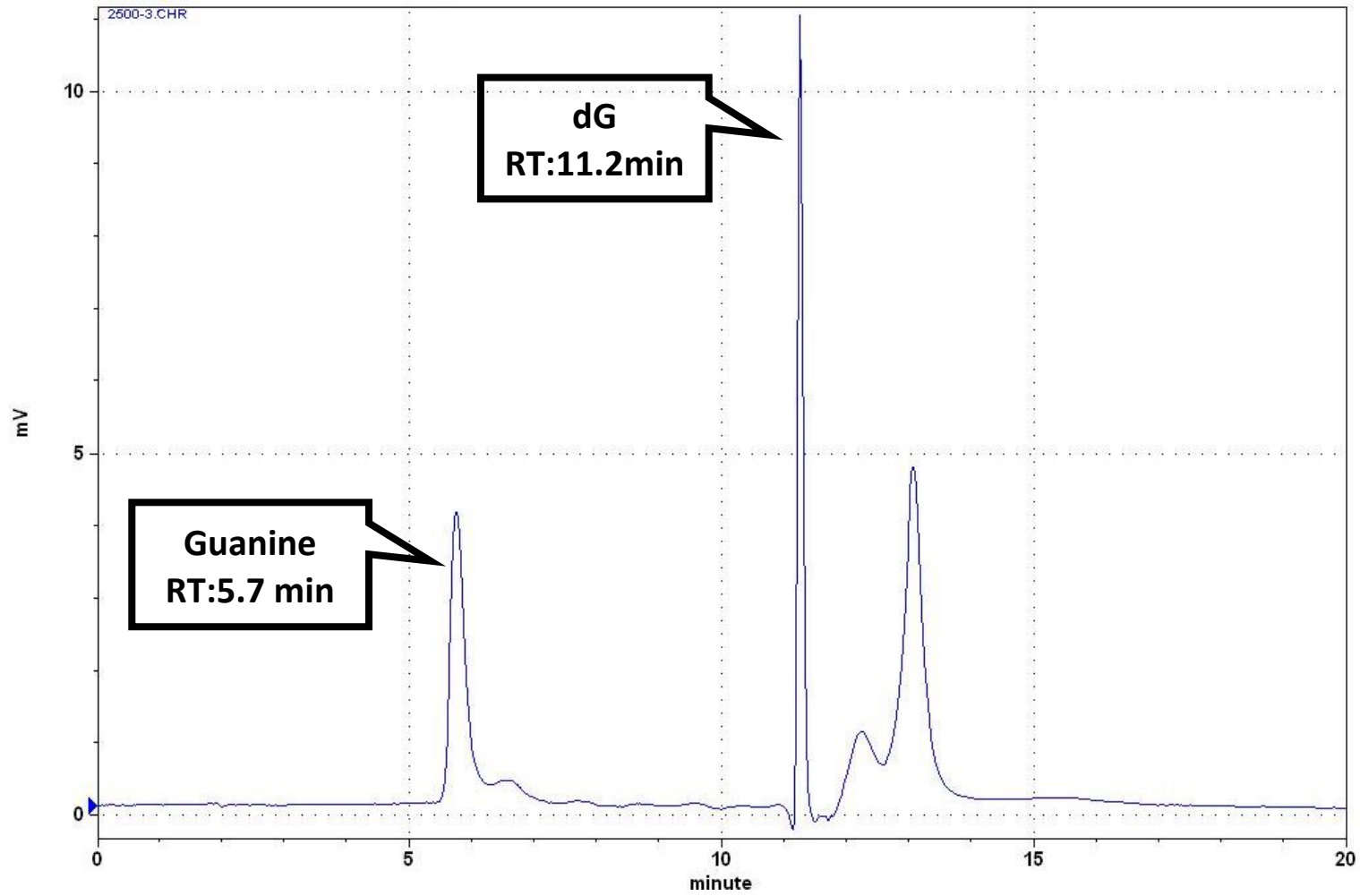
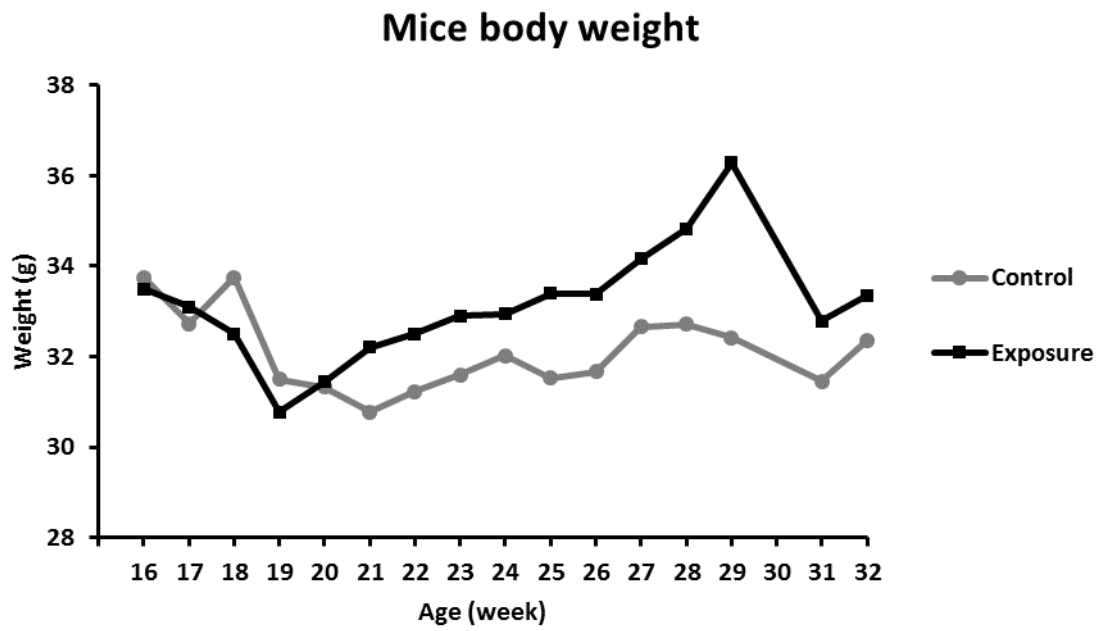


圖4、 dG、Guanine 層析圖



(A)



(B)

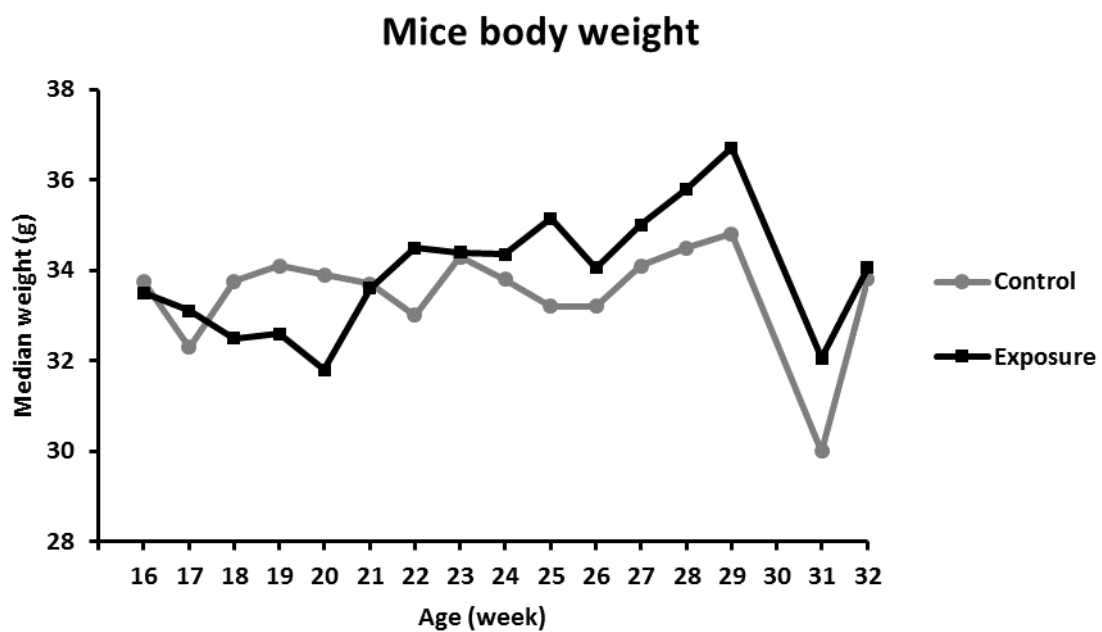


圖5、 暴露期間小鼠體重變化

(A)體重以中位數(Median)表示 (B)體重以平均值(Mean)表示



XRF analysis

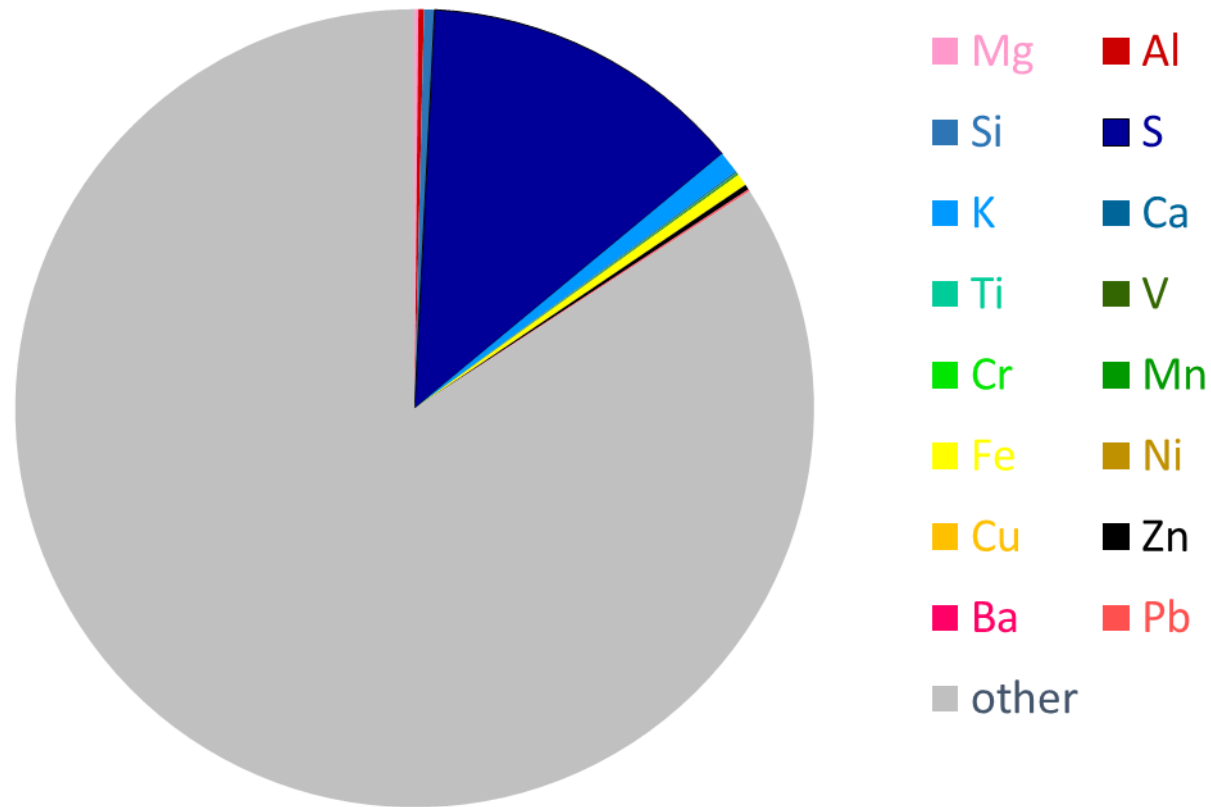
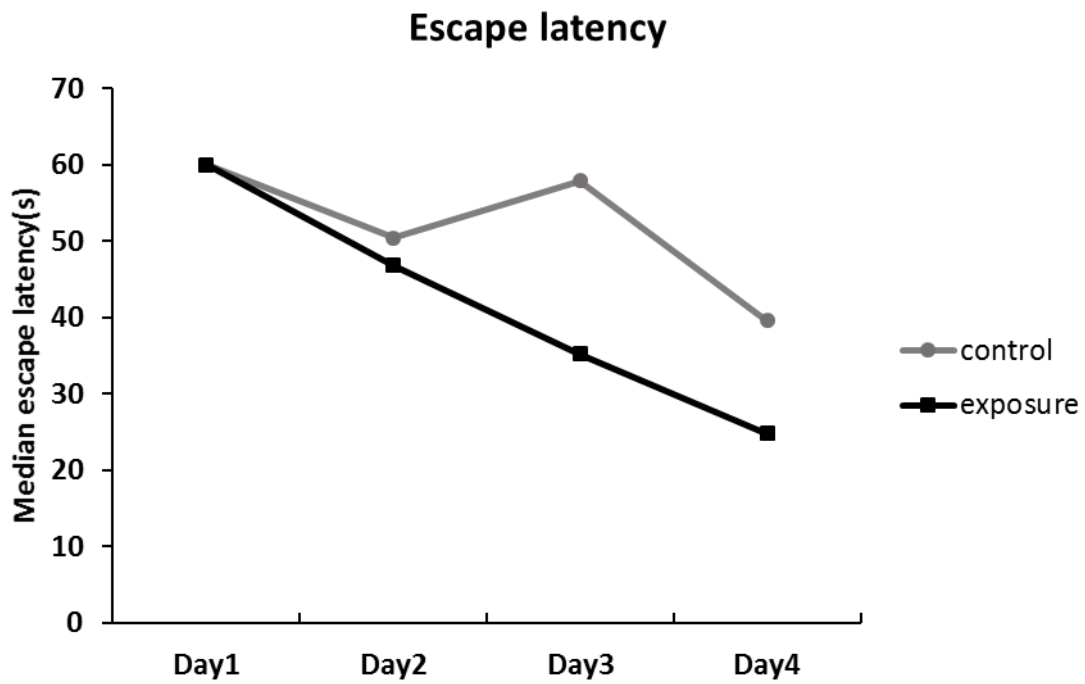


圖6、 採樣期間 PM_{2.5} 化學元素組成



(A)



(B)

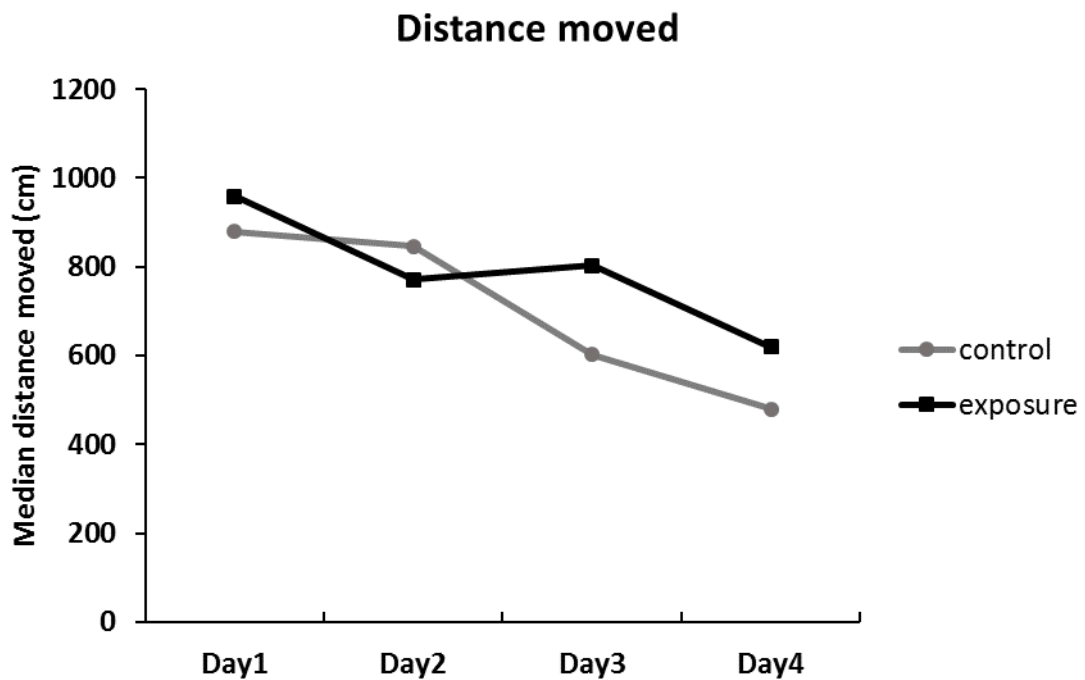
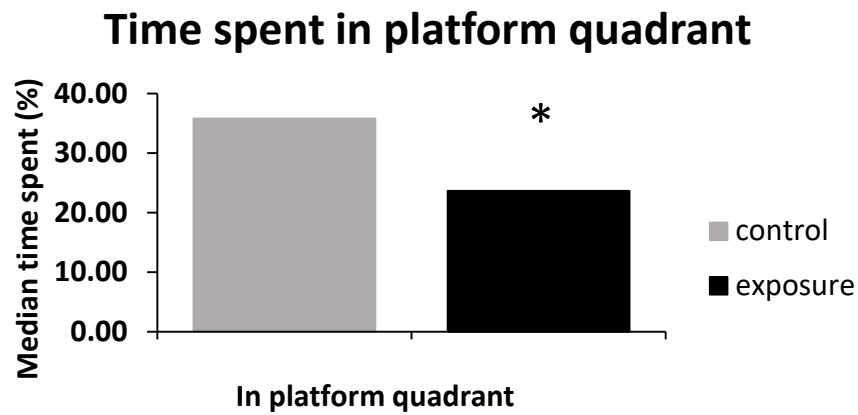


圖7、莫氏水迷津前測知識採集階段逃避潛伏期及移動距離

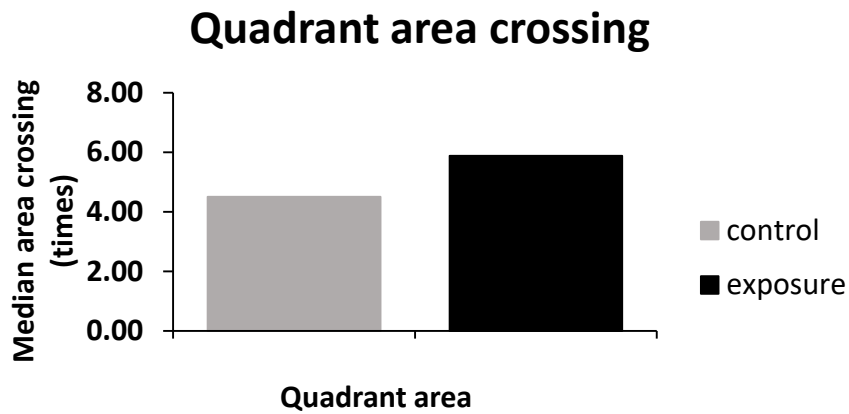
(A)逃避潛伏期 (B)移動距離



(A)



(B)



(C)

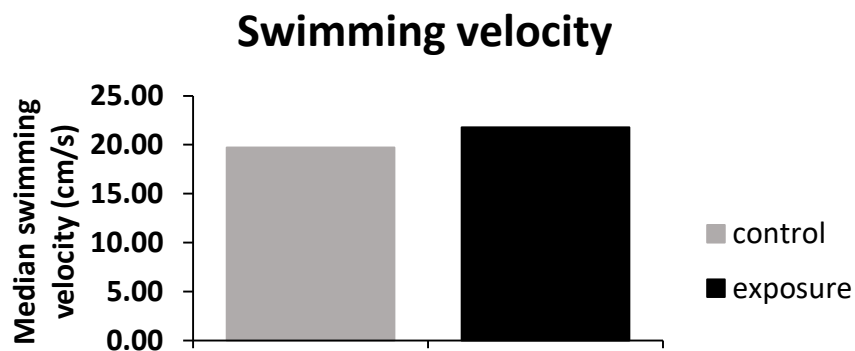


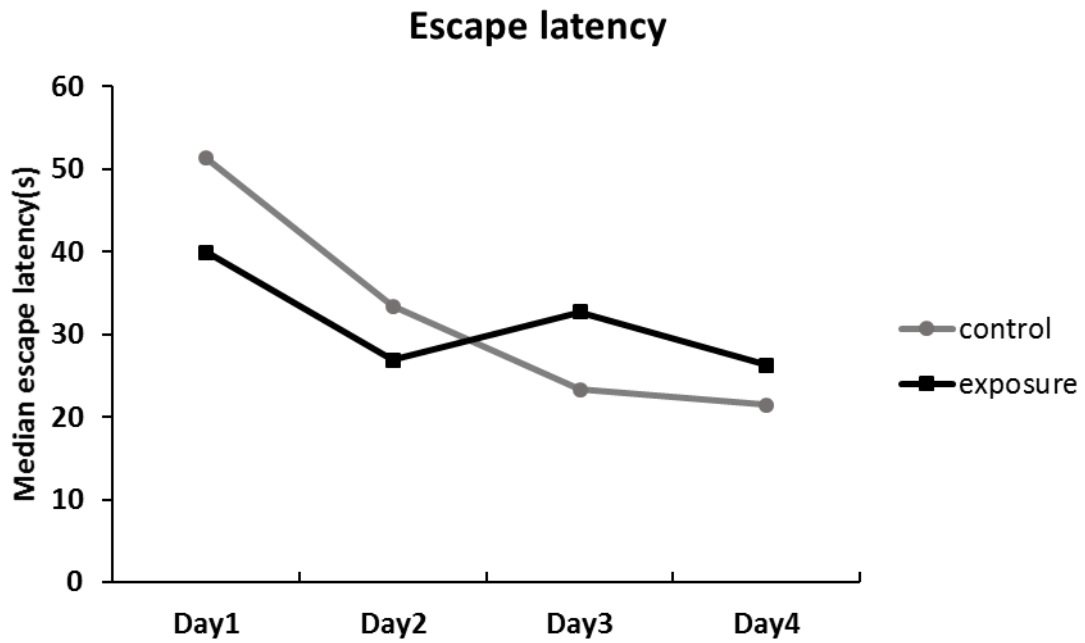
圖8、莫氏水迷津前測空間探索實驗

(A)目標平台象限時間 (B)目標平台象限次數 (C)游泳速度

(* $p < 0.05$, significantly different from the control group, Wilcoxon rank sum test)



(A)



(B)

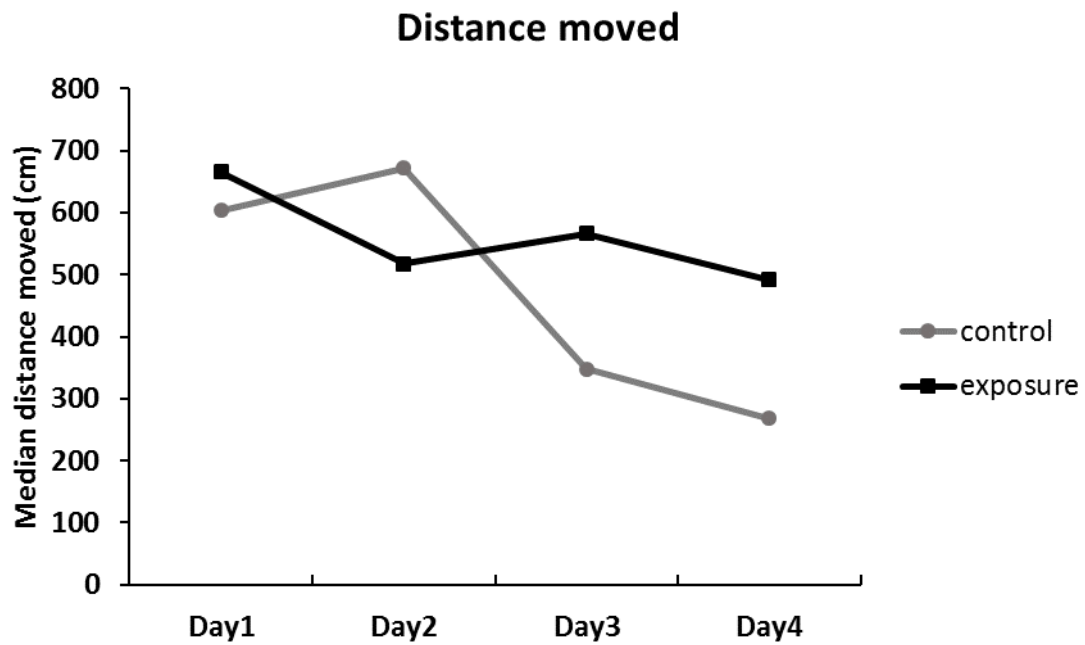
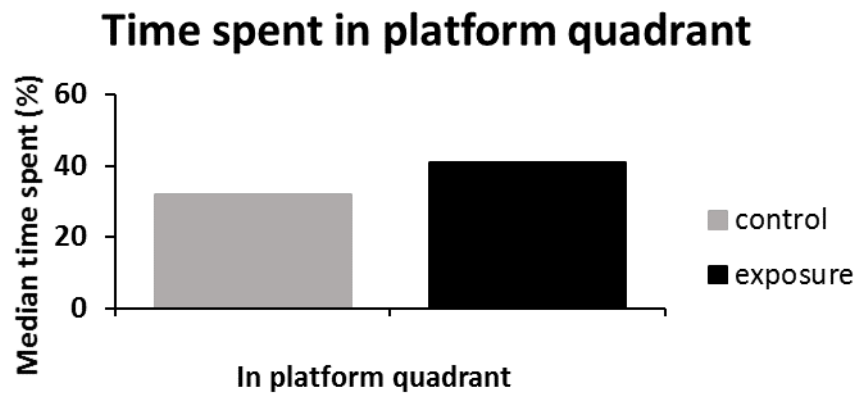


圖9、莫氏水迷津後測知識採集階段逃避潛伏期及移動距離

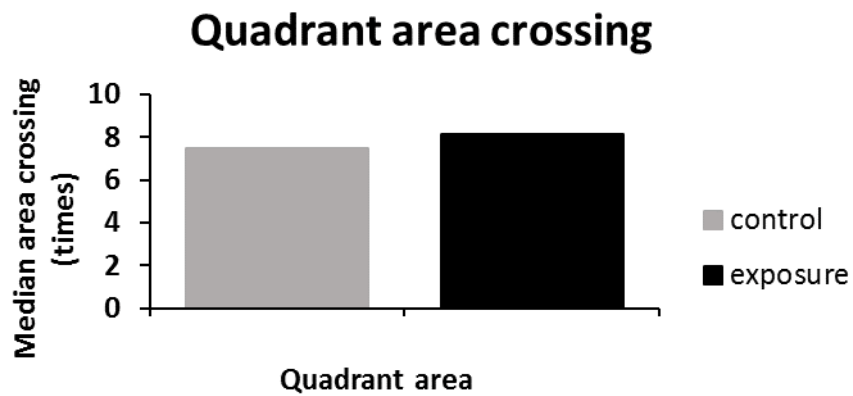
(A)逃避潛伏期 (B)移動距離



(A)



(B)



(C)

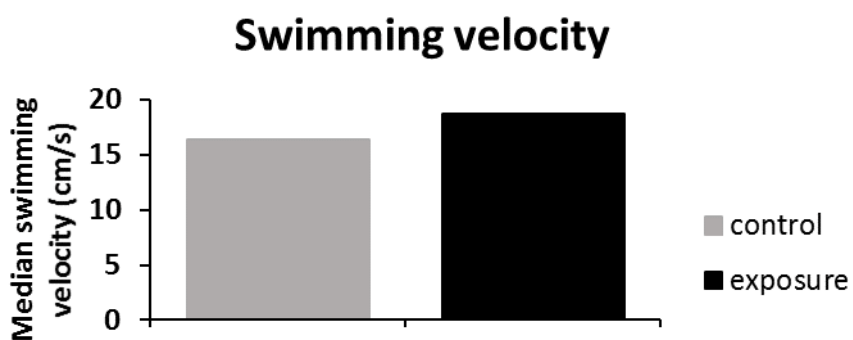
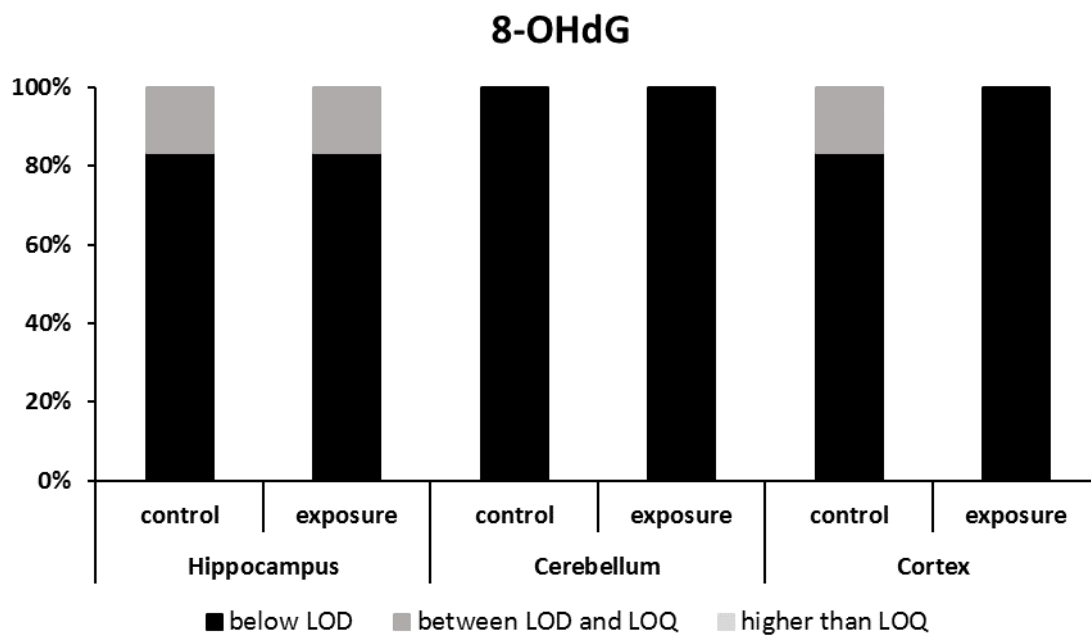


圖10、莫氏水迷津後測空間探索實驗

(A)目標平台象限時間 (B)目標平台象限次數 (C)游泳速度



(A)



(B)

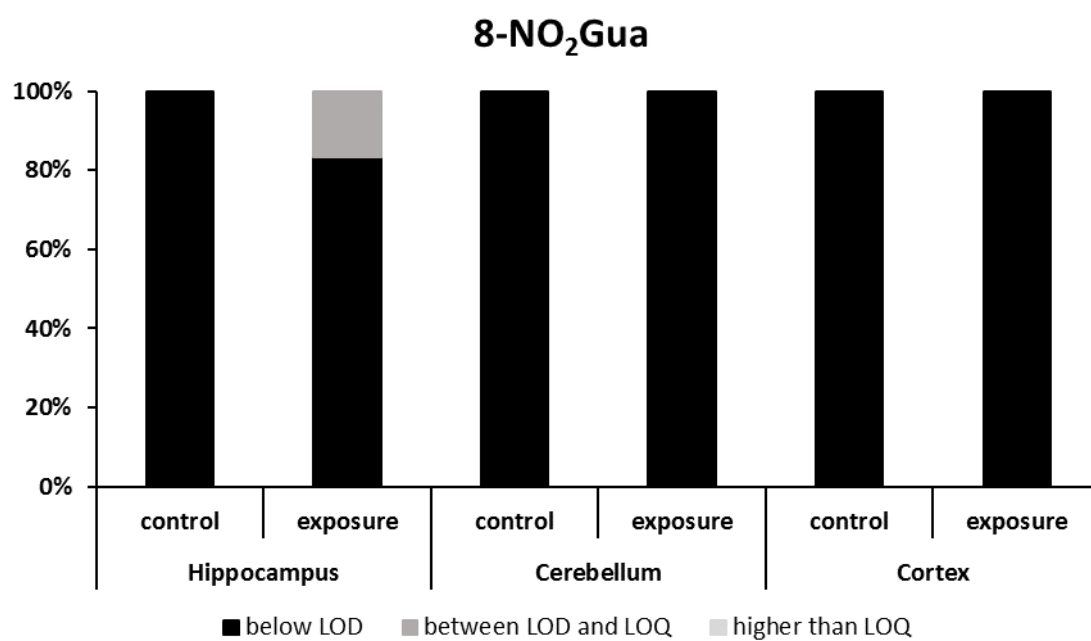
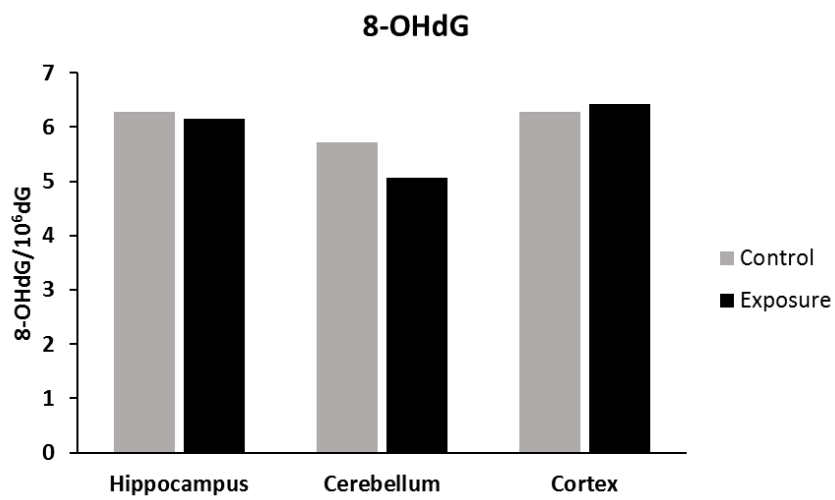


圖11、海馬迴、小腦及大腦皮質(A) 8-OHdG 及(B) 8-NO₂Gua 濃度分布情形



(A)



(B)

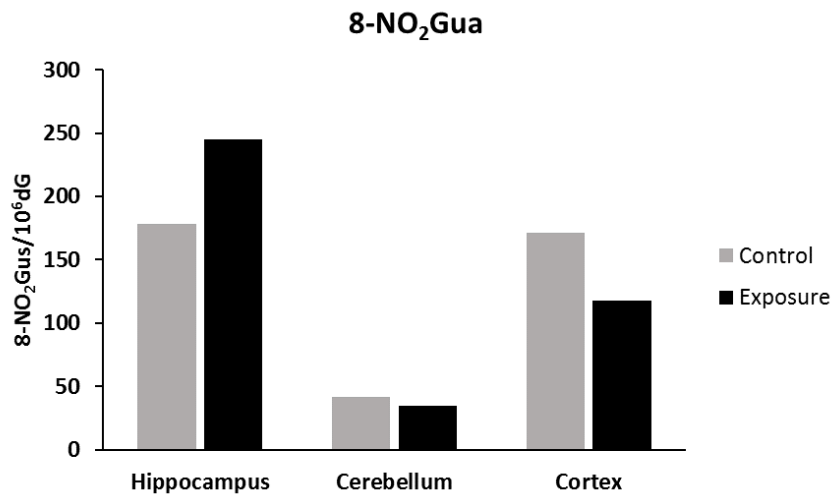


圖 12、海馬迴、小腦及大腦皮質(A) 8-OHdG 及(B) 8-NO₂Gua

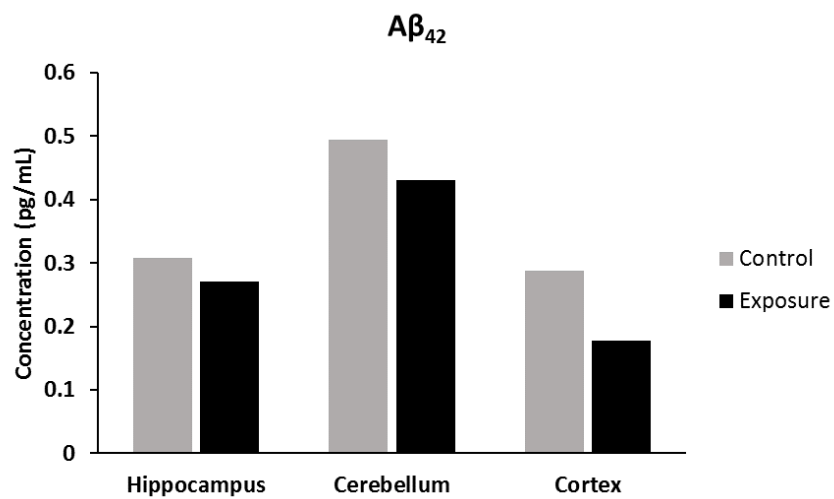


圖 13、Aβ₄₂ 於海馬迴、小腦、大腦皮質各腦部區域分布

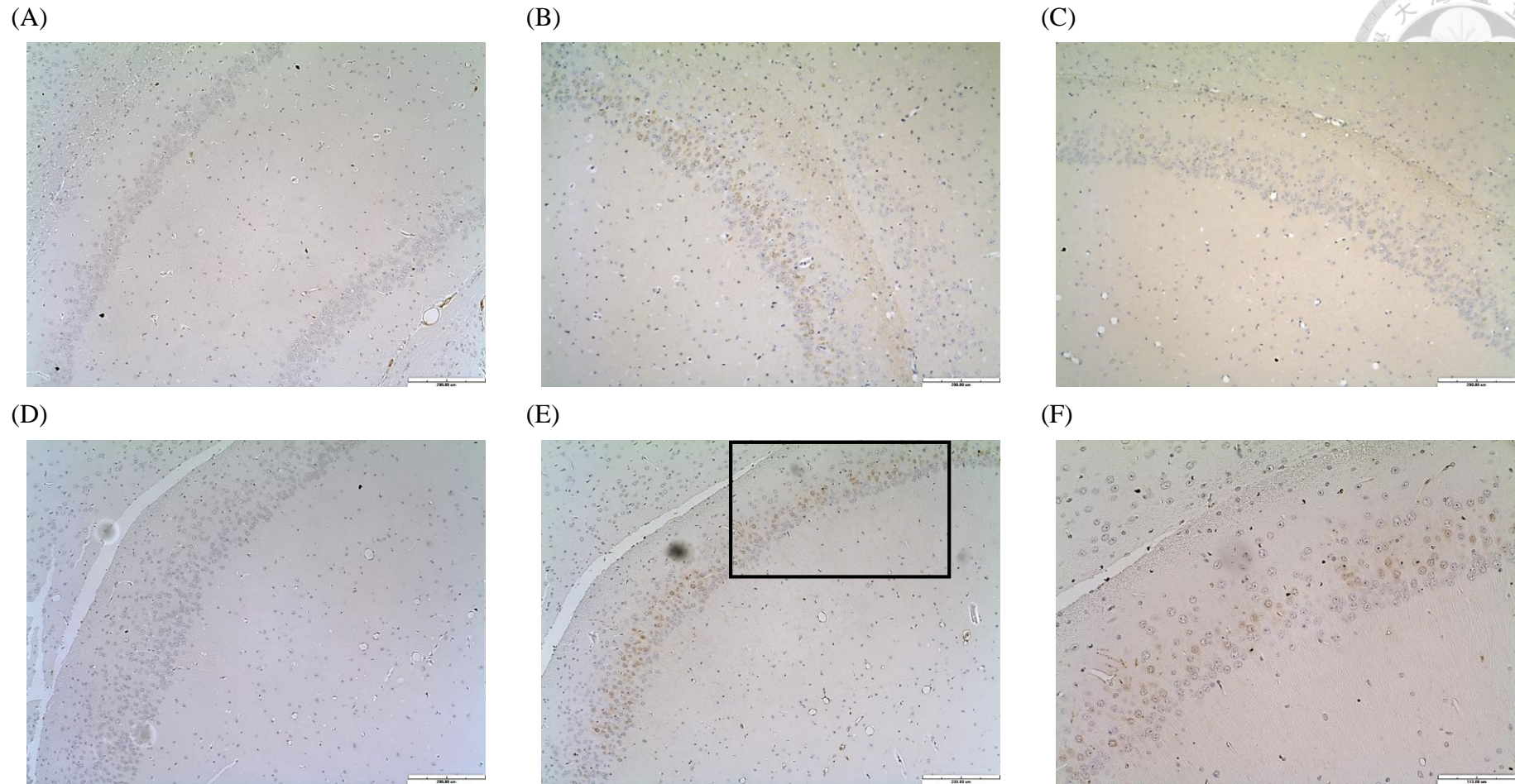
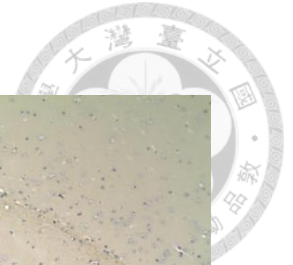


圖14、大氣微粒暴露後腦部切片免疫組織化學染色結果(A)未加入初級抗體之陰性對照組 (B)控制組總 Tau 蛋白 (C)控制組總 Tau 蛋白 (D)控制組磷酸化 Tau 蛋白 (E&F) 暴露組磷酸化 Tau 蛋白 (A-E:100X and F:200X)