

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

Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene  
College of Public Health

National Taiwan University  
Master Thesis

亞慢性大氣懸浮微粒暴露對

阿茲海默症三基因轉殖小鼠神經毒性之影響

Effects of sub-chronic exposure to ambient particles on  
CNS toxicity of Alzheimer's disease in 3×Tg-AD mice.

陳怡瑄

Yi-Hsuan Chen

指導教授：鄭尊仁 博士

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

中華民國 108 年 6 月

June, 2019



## 致謝

在就讀台灣大學碩士班的這兩年中，因為受到很多人的鼓勵以及幫忙，讓我能夠順利的完成學業以及完成一份研究並且撰寫成論文。

首先，要先感謝 TJC lab 這個大家庭，大家不分你我互相幫忙彼此的實驗、研究，同時也會關心彼此的生活情況。每年大家的生日、教師節、火雞節整個 Lab 都會聚在一起，讓人感受到溫暖。再來最要感謝的是鄭尊仁老師，謝謝老師願意讓我有這個機會進入 TJC lab 學習，並且不論在研究或是論文上都給予我很大的幫助。同時會適時的督促並擺正我們的軌道，真的很感謝老師！

感謝昇翰學長在研究上面給予我建議，並且替我聯絡中研院的大小事。感謝景洲、琬儒在研究的大小事務上的協助，讓我們一起順利運作實驗室。特別感謝我最親愛的夥伴晨歡，真的非常感謝你這兩年的陪伴。一起熬夜做實驗、一起苦惱實驗做不出來，但是我們秉持良好的心態偶而放假的時候出去走走，再一起督促彼此完成這兩年的碩士生涯並且完成論文。感謝柴哥以及 Royal 在畢業後還是會關心我們的狀況，並且在我們有困難的情況下給我們幫助。

感謝陳鑫昌老師教導許多有關 LC-MS/MS 的知識，並且在跑機遇到問題的時候給予幫忙。感謝邱振源老師在 western blot 上的指導與建議，並且在百忙之中還要跟我們討論結果。感謝莊校奇老師、林靖愉老師、陳達夫醫生、陳鑫昌老師以及鄭尊仁老師，在口試時給我許多寶貴的建議，讓我的論文可以更加完整。

最後感謝爸爸、媽媽對我的支持與鼓勵，讓我無後顧之憂的完成碩士班學業。謝謝你們給予我的一切。在此，謝謝曾經幫助過我的所有人，我未來會繼續保持熱情與努力繼續前進邁入下一段人生旅程。

怡瑄 謹記 108 年 7 月

## 中文摘要



空氣污染是現今頗受關注之問題，許多研究顯示暴露大氣懸浮微粒 (particulate matter, PM) 會對心血管及呼吸系統產生等不良健康效應。最近，有許多研究接連指出暴露 PM 可能會影響中樞神經系統 (central nervous system, CNS)，造成包括阿茲海默症 (alzheimer's disease, AD) 等之神經退化性疾病 (neuro-degenerative diseases)。AD 於病理學上主要有兩種病徵：(1) 由乙型類澱粉蛋白 (amyloid-beta, A $\beta$ ) 沉積所形成之類澱粉蛋白斑塊 (amyloid plaque)；(2) 由過度磷酸化 Tau 蛋白 (phosphorylated Tau protein, p-Tau) 聚集而成的神經纖維糾結 (neurofibrillary tangles, NFTs)，上述兩種病徵造成神經細胞功能異常以及壞死，且研究指出氧化壓力、微膠細胞 (microglia) 活化及自噬作用 (autophagy) 的增加也扮演一定的角色。

目前大氣 PM 之毒理研究多使用濃縮微粒暴露系統，雖能提供較高之暴露濃度，但無法反映出真實大氣環境之暴露實態，故本研究使用臺北空氣污染暴露系統 (Taipei Air Pollution Exposure System for Health, TAPES) 進行動物實驗。同時，本研究使用 6 個月大之阿茲海默症三基因轉殖小鼠 (triple-transgenic AD mice, 3xTg-AD mice) 做為實驗動物，此品系能夠發展出與人類相似之阿茲海默症病徵。因此，我們希望藉由上述實驗動物模型來瞭解暴露 PM 後是否會加速 AD 相關病理變化。

本研究利用 6 個月 3xTg-AD 母鼠進行 3 個月全身連續性呼吸暴露於臺北大氣微粒後，腦組織分為嗅球 (olfactory bulb)、小腦 (cerebellum)、海馬迴 (hippocampus) 及皮質 (cerebral cortex) 以西方墨點法 (western blot) 測定 AD 病徵相關蛋白含總 Tau、p-Tau、A $\beta$ <sub>42</sub>，及微膠細胞活化指標 Iba-1、自噬作用指標 LC3B 等蛋白。同時以 LC-MS/MS 量測丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 藉以評估氧化壓力。犧牲前，透過兩種行為實驗 (莫氏水迷津及滾輪式跑步機試驗) 以此探討空間記憶、學習能力以及運動



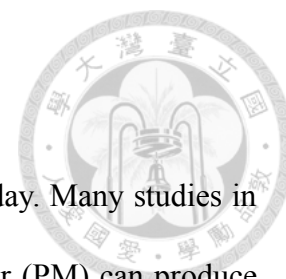
能力之改變。

本研究因小鼠之出生日期不同，而分為兩部分作為暴露。第一部分(108年10月1日至12月31日)暴露之PM<sub>2.5</sub>平均質量濃度為11.15µg/m<sup>3</sup>，第二部分(108年12月3日至109年3月3日)暴露之PM<sub>2.5</sub>平均質量濃度為11.60µg/m<sup>3</sup>。莫氏水迷津結果顯示在知識採集階段實驗，控制組和暴露組之間於皆無顯著差異。而在空間探索實驗的部分，在參數目標停留平臺象限時間(time spent in platform quadrant)於兩組中有差異( $p < 0.05$ )，然而暴露組停留時間高於控制組，其餘參數則皆無顯著差異。滾輪式跑步機結果顯示在第二天試驗時，掉落時轉速(speed at fall) ( $p < 0.05$ )及掉落時間(latency to fall) ( $p < 0.05$ )於控制組皆顯著低於暴露組。氧化壓力指標結果顯示MDA於嗅球( $p < 0.05$ )及海馬迴( $p < 0.05$ )在暴露3個月後有顯著的上升，其餘腦區皆有上升趨勢然而沒有達到顯著。在阿茲海默症蛋白質指標方面，Tau及LC3B蛋白，在四個腦區皆無顯著差異。p-Tau蛋白在嗅球暴露組顯著高於控制組( $p < 0.05$ )。Aβ<sub>42</sub>蛋白，在海馬迴暴露組顯著低於控制組( $p < 0.05$ )。Iba-1蛋白，在皮質暴露組顯著低於控制組( $p < 0.05$ )。

上述研究結果顯示亞慢性呼吸暴露大氣PM會誘導腦中的氧化壓力上升與p-Tau蛋白增加，且兩者在嗅球的部分具有顯著結果，顯見嗅球可能在PM暴露大腦之途徑扮演重要的角色。然而3個月大氣PM暴露並未對6個月3xTg-AD母鼠之空間學習、記憶能力及運動能力構成顯著影響。本研究發現呼吸暴露大氣PM對CNS有不一致的影響，然無法完整解釋誘發AD可能的機制及路徑，因此未來的研究需要透過延長暴露時間及使用老年小鼠來更進一步來釐清PM對CNS的影響。

關鍵字：大氣細懸浮微粒、神經毒性、阿茲海默症、氧化壓力、行為實驗

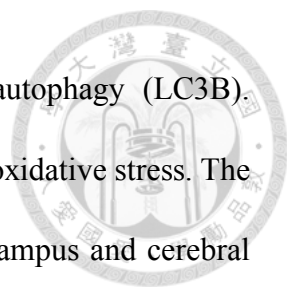
## Abstract



Air pollution is a problem that has received much attention today. Many studies in the past have shown that exposure to atmospheric particulate matter (PM) can produce adverse health effects such as cardiovascular disease and respiratory system. To date, numerous studies have repeatedly pointed out that exposure to PM may affect the central nervous system (CNS), which in turn causes neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD). There are two main pathological signs of AD: (1) amyloid plaque formed by deposition of amyloid-beta ( $A\beta$ ); (2) Neurofibrillary Tangles (NFTs) formed by the aggregation of phosphorylated Tau protein (p-Tau). These two changes cause neuronal dysfunction and necrosis, and studies have shown that the increase of oxidative stress, microglia activation, and autophagy in central nervous system also play a role.

At present, most toxicological studies use concentrated particle exposure systems to exposure atmospheric PM. Although it can provide a higher concentration, it does not reflect the actual exposure of the real world. Therefore, this study will use the Taipei Air Pollution Exposure System for Health (TAPES) as an exposure device. At the same time, this study used 6-month-old triple-transgenic AD mice (3xTg-AD mice) as experimental animals. This strain can develop similar pathology of human AD. Therefore, we hope to understand the neurotoxicity of the CNS after exposure to PM by the above experimental animal model.

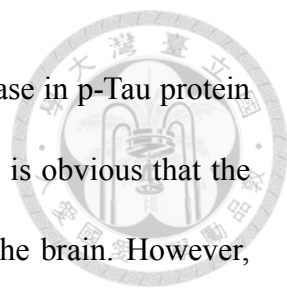
In this study, 6-month-old 3xTg-AD female mice were exposed for 3 months to atmospheric PM in Taipei. We measured the markers related to the pathology of AD (Tau,



p-Tau, and A $\beta$ <sub>42</sub>), the activation of microglia (Iba-1) and the autophagy (LC3B). Malondialdehyde (MDA) was also measured to assess the degree of oxidative stress. The above indicators were measured olfactory bulb, cerebellum, hippocampus and cerebral cortex. Before the sacrifice, the changes in spatial memory, learning ability and athletic ability were determined through two behavioral experiments (morris water maze and rotarod).

The average concentration of PM<sub>2.5</sub> in the first stage (108/10/01-108/12/31) was 11.15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , and the second stage (108/12/03-109/03/03) was 11.60  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . The results of morris water maze showed that there was no significant difference between the control group and the exposed group in the knowledge acquisition stage. In the space exploration experiment, the time spent in platform quadrant had significant difference in the two groups. However, the exposed group was higher than the control group. In the rotarod test, speed at fall ( $p<0.05$ ) and latency to fall ( $p<0.05$ ) on the second day were significantly different. However, the control group was lower than the exposed group. The results of oxidative stress index showed that MDA in the olfactory bulb ( $p<0.05$ ) and hippocampus ( $p<0.05$ ) increased significantly after 3 months of exposure, and the other brain regions showed an upward trend, but the trend was not significant. In protein analysis, there were no differences in the four brain regions for the Tau and LC3B proteins. The p-Tau protein in the exposure group was significantly higher in the olfactory bulb ( $p<0.05$ ). The A $\beta$ <sub>42</sub> of exposure group in the hippocampus was significantly lower than the control group ( $p<0.05$ ). The Iba-1 of exposure group in the cerebral cortex was significantly lower than the control group ( $p<0.05$ ).

The results of the above studies show that sub-chronic inhalation exposure to



atmospheric PM induces an increase in oxidative stress and an increase in p-Tau protein in the brain, both of which were significant in the olfactory bulb. It is obvious that the olfactory bulb may play a role in the translation of the PM into the brain. However, exposure to PM for 3 months did not significantly affect spatial learning, memory function, and exercise capacity of 6-month-old 3xTg-AD female mice. This study provides a supporting evidence linking the exposure to atmospheric PM and CNS toxicity. To further clarify the effects of PM on the CNS, future research is needed to extend the exposure time and use the aged mice.

Keywords: Atmospheric fine aerosols, neurotoxicity, Alzheimer's disease, oxidative stress, behavioral experiments

# 目錄



致謝.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
第一章 前言與研究目的.....	1
1.1. 前言.....	1
1.2. 研究目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2.1. 懸浮微粒之健康效應.....	3
2.2. 懸浮微粒暴露與中樞神經毒性.....	5
2.3. 阿茲海默症(Alzheimer's disease).....	8
2.3.1 神經纏結假說.....	9
2.3.2 類澱粉樣蛋白假說(The amyloid cascade hypothesis).....	10
2.4. 微粒暴露與氧化壓力.....	12
2.5. 微粒暴露與微膠細胞活化.....	15
2.6. 微粒暴露與自噬作用.....	17
2.7. 阿茲海默症三基因轉殖小鼠.....	19
第三章 材料與方法.....	20
3.1. 實驗流程與架構.....	20
3.2. 實驗動物.....	21
3.3. 大氣懸浮微粒暴露.....	22
3.3.1 臺北空氣污染暴露系統 (TAPES).....	23





3.3.2 大氣微粒及系統環境監測.....	24
3.3.3 成份分析.....	25
3.4. 動物行為試驗.....	26
3.4.1 莫氏水迷津 (morris water maze, MWM).....	26
3.4.2 滾輪式跑步機試驗.....	28
3.5. 動物犧牲(sacrifice)及取樣.....	29
3.6. 脂質過氧化(MDA)分析.....	30
3.6.1 腦組織內 MDA 萃取.....	30
3.6.2 檢量線前置-配製標準溶液.....	31
3.6.3 評估基質效應.....	31
3.6.4 LC-MS/MS 分析.....	33
3.7. 阿茲海默症病徵相關蛋白質之分析.....	35
3.7.1 樣本製備-蛋白質萃取.....	35
3.7.2 前置-蛋白質定量.....	36
3.7.3 西方點墨法流程.....	37
3.7.4 後續分析-半定量分析.....	40
3.8. 組織病理.....	40
3.9. 統計方法.....	40
第四章 結果.....	41
4.1. 實驗動物體重及死亡情形描述.....	41
4.2. 微粒濃度與元素組成.....	41
4.2.1 暴露期間微粒濃度.....	41
4.2.2 暴露期間微粒之元素組成.....	43



4.3. 動物行為實驗.....	44
4.3.1 莫氏水迷津.....	44
4.3.2 滾輪式跑步機試驗.....	44
4.4. 暴露微粒後腦部 MDA.....	45
4.4.1 基質效應之評估.....	45
4.4.2 各腦區之 MDA 濃度.....	45
4.5. 腦部阿茲海默症病徵相關蛋白表現.....	46
4.5.1 各腦區 t-Tau 蛋白表現量.....	46
4.5.2 各腦區 p-TTau 蛋白表現量.....	46
4.5.3 各腦區 p-Tau 蛋白與 t-Tau 蛋白表現量比值.....	46
4.5.4 各腦區 $A\beta_{1-42}$ (oligomer) 蛋白表現量.....	47
4.5.5 各腦區 LC3B 蛋白表現量.....	47
4.5.6 各腦區 Iba-1 蛋白表現量.....	47
4.6. 組織病理切片.....	48
第五章 討論.....	49
5.1. 全身性呼吸暴露.....	50
5.2. $PM_{2.5}$ 濃度及特性.....	52
5.3. 微粒對空間學習及記憶能力之影響.....	54
5.4. 微粒對運動能力之影響.....	56
5.5. 微粒對 MDA 之影響.....	58
5.6. 微粒對總 Tau 蛋白之影響.....	60
5.7. 微粒對阿茲海默症病徵蛋白質之影響.....	61
5.8. 微粒對微膠細胞活化之影響.....	64

5.9. 微粒對自噬作用之影響 .....	65
5.10. 組織病理之影響 .....	67
5.11. 微粒暴露與嗅球之相關 .....	68
5.12. 研究限制以及建議 .....	70
第六章 結論 .....	71
第七章 參考資料 .....	72



## 表格目錄



表 1、LC-MS/MS 移動相濃度梯度 .....	90
表 2、HESI 參數 .....	90
表 3、SRM 參數 .....	90
表 4、暴露期間(2018.10.01~2018.12.31)PM <sub>2.5</sub> 平均質量濃度(μg/m <sup>3</sup> ).....	91
表 5、暴露期間(2019.01.01~2019.03.03)PM <sub>2.5</sub> 平均質量濃度(μg/m <sup>3</sup> ).....	92
表 6、採樣期間(2018.10.03~2019.03.03)內，PM <sub>2.5</sub> 可溶性離子組成 .....	93
表 7、採樣期間(2018.10.03~2019.03.03)內，PM <sub>2.5</sub> 總金屬組成.....	94
表 8、採樣期間(2018.10.03~2019.03.03)內，PM <sub>2.5</sub> 水溶性金屬組成 .....	95
表 9、莫氏水迷津知識採集階段 .....	96
表 10、莫氏水迷津探索實驗 .....	97
表 11、莫氏水迷津知識採集階段之學習效應 .....	97
表 12、滾輪式跑步機試驗 .....	98
表 13、基質效應 .....	99
表 14、各腦區之 MDA 濃度.....	99
表 15、各腦區之 t-Tau 蛋白表現量(Fold of control) .....	100
表 16、各腦區之 p-Tau 蛋白表現量(Fold of control).....	100
表 17、各腦區之 p-Tau 蛋白與 t-Tau 蛋白表現量比值(Fold of control) .....	100
表 18、各腦區之 Aβ <sub>1-42</sub> 蛋白表現量(Fold of control).....	101
表 19、各腦區之 LC3B 蛋白表現量(Fold of control) .....	101
表 20、各腦區之 Iba-1 蛋白表現量(Fold of control) .....	101

## 圖片目錄



圖 1、亞慢性暴露大氣懸浮微粒對阿茲海默症三轉基因小鼠誘發神經毒性之影響 研究架構。.....	102
圖 2、亞慢性暴露大氣懸浮微粒對阿茲海默症三轉基因小鼠誘發神經毒性之影響 研究時間軸.....	102
圖 3、TAPES 結構圖。.....	103
圖 4、MWM 實驗設備構造圖.....	104
圖 5、滾輪式跑步機構造圖.....	105
圖 6、暴露三個月小鼠體重變化.....	106
圖 7、採樣期間(2018.10.01~2019.03.03)PM <sub>2.5</sub> 成份分析.....	107
圖 8、莫氏水迷津知識採集階段.....	109
圖 9、莫氏水迷津空間探索實驗.....	110
圖 10、滾輪式跑步機實驗.....	111
圖 11、MDA-DNPH 層析圖.....	112
圖 12、各腦區之 MDA 濃度 (A)皮質(cerebral cortex) (B)小腦(cerebellum).....	113
圖 13、各腦區之 MDA 濃度 (A)嗅球(olfactory) (B)海馬迴(hippocampus).....	114
圖 14、皮質之 t-Tau 蛋白表現量.....	115
圖 15、小腦之 t-Tau 蛋白表現量.....	116
圖 16、嗅球之 t-Tau 蛋白表現量.....	117
圖 17、海馬迴之 t-Tau 蛋白表現量.....	118
圖 18、皮質之 p-Tau 蛋白表現量.....	119
圖 19、小腦之 p-Tau 蛋白表現量.....	120



圖 20、嗅球之 p-Tau 蛋白表現量 .....	121
圖 21、海馬迴之 p-Tau 蛋白表現量 .....	122
圖 22、皮質之 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表現量 .....	123
圖 23、小腦之 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表現量 .....	124
圖 24、嗅球之 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表現量 .....	125
圖 25、海馬迴之 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表現量 .....	126
圖 26、皮質之 LC3B 蛋白表現量 .....	127
圖 27、小腦之 LC3B 蛋白表現量 .....	128
圖 28、嗅球之 LC3B 蛋白表現量 .....	129
圖 29、海馬迴之 LC3B 蛋白表現量 .....	130
圖 30、皮質之 Iba-1 蛋白表現量 .....	131
圖 31、小腦之 Iba-1 蛋白表現量 .....	132
圖 32、嗅球之 Iba-1 蛋白表現量 .....	133
圖 33、海馬迴之 Iba-1 蛋白表現量 .....	134
圖 34、暴露 3 個月小腦病理切片 .....	135
圖 35、暴露 3 個月皮質病理切片 .....	136
圖 36、暴露 3 個月海馬迴病理切片 .....	137
圖 37、暴露 3 個月嗅球病理切片 .....	138
圖 38、暴露 3 個月肺部病理切片 .....	139
圖 39、暴露 3 個月非特異性肺部病理切片 .....	140

# 第一章 前言與研究目的



## 1.1. 前言

空氣污染的議題隨著全球對健康及環保的意識提高，逐漸被大眾所關注。近年來，對於空氣污染的相關研究更是繁多。空氣污染物包含懸浮微粒(particulate matter, PM)、氣體(包含臭氧、一氧化碳、硫氧化物、及氮氧化物等)、有機化合物、以及金屬。其中，許多流行病學研究指出 PM 會經由呼吸進入生物體內並對生物體有負面健康效應。其毒性會隨著來源、組成成分以及粒徑大小而對人體有不同之健康效應。國際癌症研究署(International Agency for Research on Cancer, IARC)已於 2013 年將 PM 歸類於第一級致癌物。值得關注的是，PM 中主要涉及中樞神經系統(central nervous system, CNS)效應的是細懸浮微粒(fine particles, FPs)和超細微粒(ultrafine particles, UFPs)。前項為氣動粒徑小於 2.5  $\mu\text{m}$ ，後者為氣動粒徑則小於 0.1  $\mu\text{m}$ 。

PM 對心血管系統及呼吸道系統之相關疾病關係已經確立。然而，近年來多項研究指出 PM 可能對 CNS 構成危害。並有研究指出 PM 可能與神經退行性疾病(neurodegenerative disease)，如阿茲海默症(alzheimer's disease, AD)、帕金森氏症之病理學有關。根據國際失智症協會(alzheimer's disease International, ADI)之統計資料，目前全球約有五千萬人罹患 AD，且目前並沒有可以阻止或逆轉病程之治療方式。故 AD 是目前許多人關注並熱衷研究之疾病。雖然目前對於 PM 所驅動 CNS 病變機制尚未明確。然而，有研究表明可能肇因於神經發炎(inflammation)以及氧化壓力(oxidative stress)導致神經病變進而壞死。目前對於懸浮微粒暴露與 AD 之相關研究多為流行病學研究，雖能顯示 AD 的發生可能與空氣污染有關但較缺乏相關動物實驗佐證。少數關注於病理機制之研究則多使用一般實驗老鼠(如 C57BL/6 小鼠)，亦較難觀察出相關之行為及病徵變化。因此本研究將利用阿茲海默症三基因

轉殖動物模式(triple-transgenic model of Alzheimer's disease, 3xTg-AD)來探討大氣 PM 對 AD 之影響。



## 1.2. 研究目的

本研究目的為探討以呼吸方式亞慢性暴露大氣懸浮微粒 3 個月對 6 個月大 3xTg-AD 母鼠相關阿茲海默症病徵、空間學習與認知功能、及運動能力受損之影響。

因此本研究之研究假說為：

1. 探討暴露大氣微粒驅動 3xTg-AD 小鼠的 AD 病徵形成
2. 微粒暴露對空間學習具有改變，並且可能造成認知功能受損。
3. 微粒暴露對運動能力有負面影響。
4. 探討亞慢性呼吸暴露影響 AD 之可能機制。






## 第二章 文獻回顧

### 2.1. 懸浮微粒之健康效應

空氣污染對生物體的健康危害一直備受關注，因為即使是低濃度的污染也可能存在高度的風險。空氣污染為由空氣中氣態、液態物質、及固體顆粒等物質所組成之混合物。其成份通常包含 PM、氣體(如臭氧、一氧化碳、硫氧化物、氮氧化物等)、有機化合物(如多環芳烴和內毒素)、及金屬(如鈾、鎳、錳)。根據統計，全球有 200 萬人因為空氣污染所帶來的肺部等呼吸道疾病而死亡，在這之中約有 2.1 萬人是由於 PM 所引起(Chuang, Yan et al. 2011)。

PM 可以直接排放或是經過間接轉化後再排出，並且來源可以分為人為以及自然產生。前者包含固體燃料燃燒、工業及農業活動(Srimuruganandam and Nagendra 2012)，後者則是火山、沙塵暴、木材燃燒或海浪(Misra, Geller et al. 2001)。而 PM<sub>2.5</sub> 多是經由工業活動、農業粉塵、採礦、或交通運輸之燃燒過程中所產生的氣體與高溫蒸汽冷凝而成(Juda-Rezler, Reizer et al. 2011)。同時，PM<sub>2.5</sub> 因由有機和無機化合物組成，包括硫酸鹽、硝酸鹽、碳、銨、氫離子、脂多醣、金屬、及多環芳香烴(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)，而上述物質皆是可能潛在造成健康影響的毒性特徵(Craig, Brook et al. 2008)。

雖然 PM 暴露可能會受到呼吸模式、速率、人體體積的影響，但是影響健康效應的原因則是取決於微粒的粒徑大小(Brown, Gordon et al. 2013)。根據 PM 氣動粒徑大小，可以將 PM 分類為(1) PM<sub>10</sub>：指粒徑小於 10 $\mu$ m，可進入呼吸道的微粒；(2) PM<sub>2.5</sub>：指粒徑小於 2.5  $\mu$ m，可在呼吸時進入細支氣管並影響肺內的氣體交換的細粒徑微粒；(3) UFPs：指粒徑小於 0.1  $\mu$ m，又稱為超細微粒(Block and Calderón-



Garcidueñas 2009)。不像一般 PM<sub>10</sub> 僅滯留在人體的氣管或是支氣管中，並且可以經由打噴嚏和咳嗽等過程來清除這些粗微粒(Atkinson, Fuller et al. 2010)，粒徑小於 5 到 10 $\mu\text{m}$  的微粒可能沉積在氣管分枝中，而 1 到 5 $\mu\text{m}$  之間的顆粒則會沉積在呼吸小氣管和發生氣體交換的肺泡中(Löndahl, Pagels et al. 2006)。而小於 1 $\mu\text{m}$  的微粒甚至會滲透到肺泡內並且可以轉移到細胞組織或循環系統中(Valavanidis, Fiotakis et al. 2008)。因此，PM<sub>2.5</sub> 以及 UFPs 是最有可能造成健康風險的粒徑。

根據多項流行病學研究，暴露 PM 已經被確立與多種負面健康效應有關，包含增加住院率與急診室就診率、產生呼吸道症狀、慢性呼吸道疾病惡化、心血管疾病惡化、肺功能下降和過早死亡(Samoli, Peng et al. 2008, Halonen, Lanki et al. 2009, Guaita, Pichiule et al. 2011, Perez, Tobias et al. 2012)。此外，有研究亦表示暴露於高濃度的微粒也可能導致嬰兒出生體重低、早產甚至是胎兒和嬰兒死亡(Guaita, Pichiule et al. 2011)。且本實驗室先前研究亦顯示微粒可能引起肺部發炎及肺功能改變(Lei, Chen et al. 2004)，以及心跳血壓及自主神經功能改變(Cheng, Hwang et al. 2003, Chang, Hwang et al. 2005, Chang, Hwang et al. 2007)及心室收縮功能下降(Yan, Huang et al. 2008)。




## 2.2. 懸浮微粒暴露與中樞神經毒性

暴露微粒除了會對呼吸及心血管系統構成不良健康影響外，近期亦有多項流行病學或毒理學研究指出暴露微粒會對 CNS 產生毒性進而引發神經退化性疾病。

微粒造成神經毒性的機轉極為複雜，途徑更是眾說紛紜。目前主要最為人所接受之途徑有下述幾種(Madl 2012)。第一種途徑為當微粒的粒徑小於 100 奈米(nanometer, nm)時，微粒可以直接透過三叉神經傳遞到達腦部，對腦部造成影響(Calderon-Garciduenas, Solt et al. 2008, Wang, Xiong et al. 2017)；第二種途徑為微粒沉積在嗅上皮細胞並沿著嗅覺感覺神經(olfactory sensory neuron, OSN)軸突傳遞到達嗅球(olfactory bulb)，最後對腦部造成傷害(Oberdorster, Sharp et al. 2004, Ajmani, Suh et al. 2016, Wang, Xiong et al. 2017)；第三種途徑為微粒吸入後，微粒沉積在肺部，然後通過肺部血氣屏障(blood-air barrier)，透過血液循環再通過血腦屏障(blood brain barrier, BBB)到達腦部(Wang, Xiong et al. 2017)，使腦部產生發炎反應，氧化壓力上升，進而產生神經退化性疾病(Oberdorster, Oberdorster et al. 2005)；第四種途徑為微粒吸入後，微粒刺激自主神經系統引起心血管功能障礙，或是當微粒進入肺部之後引起全身性發炎反應。發炎反應所產出的細胞激素經由血液傳輸到心臟，再透過血液循環將細胞激素傳遞到腦部，對腦部造成影響(Wang, Xiong et al. 2017)。

各項研究都針對上述的途徑提出解釋，有研究就指出當 PM<sub>2.5</sub> 與 UFP 等細粒徑之微粒由肺部進入身體後會引發神經發炎(neuroinflammation)、活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的增加、及神經病變，而上述反應除會產生 ROS 外也會產生細胞激素(cytokines)並且可以經由血液循環進入 CNS 而導致中樞神經系統疾病發生(Block and Calderón-Garcidueñas 2009, Kim, Knight et al. 2012, Wu, Lin et al. 2015)。



另外，有研究提出當微粒被吸入後，通過鼻黏膜並藉由嗅覺神經元進到嗅球及嗅覺皮質區(Ajmani, Suh et al. 2016)並且通過細胞旁或神經周圍的途徑穿過嗅粘膜和篩骨進入腦脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中，因此微粒即可經過該途徑進入 CNS 引起神經病變(Calderon-Garciduenas, Azzarelli et al. 2002)。因此可能因為嗅球在微粒傳輸到 CNS 這條路徑上扮演重要的角色，故在 AD 及帕金森氏症(Parkinson's disease)等神經退化性疾病之早期病程可以觀察到有嗅覺功能障礙的情形發生。

有動物研究指出當微粒通過呼吸道後會進入中樞神經系統(Elder, Gelein et al. 2006)，在呼吸暴露濃縮微粒的研究發現腫瘤壞死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ )、白細胞介素 1 $\alpha$  (interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ )和核因子活化 B 細胞  $\kappa$  輕鏈增強子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)在腦中升高 (Campbell, Oldham et al. 2005)。在 Fonken 等人的呼吸暴露濃縮微粒研究也發現 TNF $\alpha$  和白細胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1  $\beta$ , IL-1 $\beta$ )在海馬迴中顯著增加(Fonken, Xu et al. 2011)，在呼吸暴露柴油引擎微粒的研究也表明 TNF $\alpha$  在前額葉皮層(prefrontal cortex)、顳葉皮質(temporal cortex)、紋狀體(striatum)和小腦(cerebellum)中顯著增加，並且也發現屬於抗氧化劑(antioxidant)的第一型血紅素氧化酶(heme oxygenase-1, HO-1)在這些腦區中上升(Kim, Kim et al. 2018)，在 van Berlo 等人呼吸暴露柴油引擎廢氣的研究也發現暴露後 4 小時 HO-1 在腦下垂體(pituitary)和嗅球上升(van Berlo, Albrecht et al. 2010)。

另外過去文獻也提出呼吸暴露柴油引擎廢氣後微膠細胞(microglial)在腦中被激活(Levesque, Taetzsch et al. 2011, Cole, Coburn et al. 2016)，不僅如此也有研究指出微粒的暴露導致阿茲海默症指標澱粉樣  $\beta$  蛋白(amyloid  $\beta$ -peptide, A $\beta$ )和 Tau 蛋白在腦中增加(Levesque, Surace et al. 2011)，甚至會導致行為的改變。其中包括活動力、空間學習、記憶能力以及辨別新物體能力下降(Zanchi, Venturini et al. 2008,

Zanchi, Fagundes et al. 2010, Fonken, Xu et al. 2011)。除了毒理學研究外，流行病學研究同時指出暴露於空氣污染會引起神經發炎反應(neuroinflammation)，並在腦中發現氧化壓力上升、BBB 引起損傷(Bos, De Boever et al. 2012)。

根據上述發現暴露微粒會導致 CNS 受到影響，進而引起神經退化性疾病。但是微粒與神經退化性疾病的致病機制仍尚未清楚，因此本研究藉由微粒暴露了解微粒與 CNS 毒性之間的關係。



## 2.3. 阿茲海默症(alzheimer's disease)

AD 是一種神經退化性疾病，其發病進程緩慢且會有隨著時間不斷惡化的持續性神經功能障礙。罹患 AD 後早期症狀，是開始難以記住近期發生的事情。隨著疾病的發展，症狀可能會包含：譫妄、易怒、具攻擊性、無法正常言語、容易迷路、情緒不穩定、喪失生存動力、喪失長期記憶、難以自理和行為異常等。到達晚期後，患者會逐漸喪失身體機能，最終導致死亡(Tabert, Liu et al. 2005, Waldemar, Dubois et al. 2007)。一般而言，女性之盛行率高於男性。

AD 可以分為偶發型以及家族型。家族性阿茲海默症主要是由於在三對染色體之基因變異而形成不正常的蛋白所引發，此三種基因分別是澱粉樣蛋白前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)、早老蛋白一號(presenilin 1, PSEN1)、及早老蛋白二號(presenilin 2, PSEN2)。而偶發型相較於家族型 AD，為一種多致病因、進展緩慢、常見於 65 歲以上老年人之腦部神經退化性疾病，一般而言大多數之 AD 皆屬於此型。目前已知的致病因子包含基因變異、營養失調、代謝異常或社經地位等，近來發現空氣污染、重金屬或農藥等環境危害之暴露，亦可能與 AD 的發生或惡化有關(Tyas, Manfreda et al. 2001, Lindsay, Laurin et al. 2002, Shi, Han et al. 2014, Jung, Lin et al. 2015, Wu, Lin et al. 2015, Uchoa, Moser et al. 2016)。AD 典型病理表現為大腦皮質萎縮而在神經方面則會出現兩類病理病變，分別是異常的神經原纖維纏結(neurofibrillary tangles, NFT)、及神經元周邊因異常 A $\beta$  堆積形成之斑塊(Selkoe 2001)，但其相關機轉仍有爭議。



### 2.3.1 神經纏結假說

神經纏結與過度磷酸化(phosphorylation)的 Tau 蛋白有關，故神經纏結假說又稱為 Tau 假說。神經纏結由成對螺旋絲(paired helical filaments, PHFs)所組成，而 PHFs 的成分即為過度磷酸化的 Tau 蛋白(Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986)。Tau 蛋白是一種高度可溶的微管(microtubule)相關蛋白(Weingarten, Lockwood et al. 1975)，當 Tau 蛋白與神經微管結合後會有兩種作用。一種是透過磷酸化 Tau 的過程與微管蛋白來穩定微管的組成，維持神經穩定及延伸(Drubin and Kirschner 1986, Caceres and Kosik 1990)。另一個作用，則是 Tau 會與運動驅動蛋白競爭與微管結合的機會，可能會減少軸突運輸(Ebneth, Godemann et al. 1998)。而當 Tau 蛋白過度磷酸化後，則會導致 Tau 與微管的結合減少。

Tau 蛋白的結構由 C 端到 N 端可以分為 4 個區域，(1)含有酸性和鹼性區域的 C 末端結構域，通過間接磷酸化來調節 Tau 與微管的結合，(2)具有 3 或 4 個能與微管結合的結構域，(3)帶正電荷的富含脯氨酸(proline)的結構域，其通過磷酸化間接控制 Tau 和微管之間的結合，(4) N 末端結構域包含 0、1 或 2 個帶負電荷的插入物(Rosenberg, Ross et al. 2008, Metcalfe and Figueiredo-Pereira 2010)。正常的 Tau 需要磷酸化來調節功能，在磷酸化及去磷酸化之間達成平衡(Johnson and Stoothoff 2004)。但是當 Tau 因為基因突變等影響造成過度磷酸化後，則會導致生物活性受損、抗降解、誘導構像變化和促進 PHF 形成，致使神經細胞死亡(Metcalfe and Figueiredo-Pereira 2010)。

因此，本研究透過量測 Tau 以及磷酸化 Tau 蛋白於腦中的表現量來探討亞慢性全身暴露大氣懸浮微粒後對 CNS 毒性的影響。




### 2.3.2 類澱粉樣蛋白假說(The amyloid cascade hypothesis)

類澱粉樣斑塊又稱為神經炎斑塊(neuritic plaques)，是在阿茲海默症患者當中被診斷出的兩種神經病理病變之一，在這些沈積物當中主要的蛋白質成分是分子量大約 4kDa 的  $A\beta$ 。而該蛋白來自 100~130kDa 的 APP 水解而成(Glenner and Wong 1984, Masters, Simms et al. 1985)。 $A\beta$  有兩種主要的形式依據氨基酸的長短來做區分，擁有 40 個氨基酸的  $A\beta_{40}$  以及有 42 個氨基酸的  $A\beta_{42}$ 。 $A\beta_{40}$  佔細胞內釋放的  $A\beta$  約 90%(Asami-Odaka, Ishibashi et al. 1995)，而  $A\beta_{42}$  則佔分泌型  $A\beta$  約 10% 但  $A\beta_{42}$  卻是  $A\beta$  斑塊中最主要的成分(Lippa, Nee et al. 1998)，並且比  $A\beta_{40}$  更容易聚合成原纖維(protofibrils)也就是斑塊的前身。因為這些特性  $A\beta_{42}$  被認為比  $A\beta_{40}$  更具有致病性(Hensley, Carney et al. 1994)。

當受到環境或是遺傳等影響，導致 APP 在水解的過程中由  $\beta$  及  $\gamma$  分泌酶(secretases)不正常切割後致使  $A\beta_{42}$  過量產生和累積，形成瀰漫性斑塊(diffuse plaques)沉積。這個階段的型態是無害的，但是等到瀰漫性斑塊重組成褶皺片並纖維化時，就會與其他蛋白質例如聚集的  $A\beta_{40}$  和補體(complement)一同形成神經炎斑塊。神經炎斑塊會導致微膠細胞(microglial)和星形細胞(astrocytic)激活、氧化壓力產生、Tau 聚集和磷酸化，使神經元死亡和突觸功能障礙最後導致癡呆(Robinson and Bishop 2002)。

$A\beta$  可以分為單體(monomer)、寡聚體(oligomer)、纖維(fiber)。雖然目前大多數人都還是相信  $A\beta$  以纖維型態並沈積成斑塊會對神經帶來毒性，但現在也越來越多研究開始關注  $A\beta$  oligomer (又可以稱為原纖維)(Lambert, Barlow et al. 1998, Walsh, Hartley et al. 1999)。有研究指出  $A\beta$  oligomer 與 APP 轉殖基因小鼠之行為異常發作有關(Westerman, Cooper-Blacketer et al. 2002)，更有研究將神經元細胞暴露於培養





的 A $\beta$  oligomer 並發現細胞會產生氧化壓力最終死亡(Walsh, Hartley et al. 1999)。且有研究利用 APP 小鼠發現當他們表現出神經功能障礙、突觸損害及炎症反應的同時並沒有形成 A $\beta$  沈積(Holcomb, Gordon et al. 1998)。這些研究表明 A $\beta$  相關的神經毒性和神經變化可能來自 A $\beta$  oligomer 等非纖維的型態，而懷疑斑塊堆積只是次要事件。

目前針對該假說還尚未定論，但針對 A $\beta$  oligomer 所帶來的神經毒性的研究日漸增多。因此，本研究探討亞慢性全身暴露大氣 PM 後在不同腦區中 A $\beta$  oligomer 的表現量。



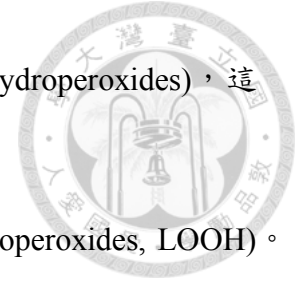
## 2.4. 微粒暴露與氧化壓力

根據上述研究指出，微粒不論經由任何途徑進入身體後會引發神經發炎並且增加 ROS 引起腦內 ROS 失衡進而使氧化壓力(oxidation stress) 上升。大腦的氧化壓力增加被指出在神經退化性疾病之病程中扮演著重要的因子，過去研究中指出阿茲海默症腦中氧化壓力異常增加(Smith, Rottkamp et al. 2000)，當腦中的 ROS 的產生大於清除造成失衡，導致氧化壓力上升，進而誘導 Tau 蛋白過度磷酸化、A $\beta$  沈積、線粒體功能障礙以及自噬功能障礙，最終引發阿茲海默症(Liu, Li et al. 2015)，

ROS 的產生可以依來源可分為體內代謝(內源性)與環境刺激(外源性)，在一般情況下，ROS 是在體內的粒線體、內質網等有氧代謝過程中所產生的副產物，其中包括超氧陰離子(superoxide anion, O $_2^-$ )、過氧化氫(hydrogen peroxide, H $_2$ O $_2$ )以及自由基(free radical)，然而當受到外界環境刺激時，包括電離輻射、紫外線、病原體感染或是大氣懸浮微粒等，體內就會產生 ROS，當 ROS 的產生和清除之間產生失衡時，就會導致氧化壓力的上升，進而攻擊蛋白質、脂質和 DNA 引起氧化損傷，進而使細胞結構和功能受到破壞，最終導致細胞死亡。

其中，因為大腦是一個需要高耗氧以及含有豐富的多不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids)的器官，並且在抗氧化酶方面也相對不足，因此多不飽和脂肪酸的碳碳雙鍵容易成為 ROS 的主要攻擊的目標。也因此當遭受刺激時，大腦可以能會因為上述特性而遭受 ROS 攻擊造成氧化壓力上升，進而引發脂質過氧化(lipid peroxidation)。

同時有研究指出隨著自由基產生增加，大腦中多不飽和脂肪酸含量逐漸下降(Soderberg, Edlund et al. 1991)，當 ROS 攻擊多不飽和脂肪酸形成脂質自由基(lipid free radical)，脂質自由基會再氧化產生脂質過氧自由基(lipid peroxy radical)，此時



脂質過氧自由基再攻擊不飽和脂肪酸形成脂質過氧化物(lipid hydroperoxides)，這個不斷循環之過程稱為脂質過氧化作用的連鎖反應。

脂質過氧化後所形成的主要產物是脂質過氧化物(lipid hydroperoxides, LOOH)。但因為 LOOH 較不穩定，因此會再形成二次產物丙二醛(malondialdehyde, MDA)、丙醛(propanal)、己醛(hexanal)及 4-羥基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)(Benedetti, Comporti et al. 1980, Esterbauer, Cheeseman et al. 1982, Ayala, Muñoz et al. 2014)。其中，有研究指出 MDA 似乎是脂質過氧化最具致突變性的產物，而 4-HNE 則是毒性最大的(Esterbauer, Eckl et al. 1990)。同時，因為 MDA 的高毒性以及反應性因此被認為是測定脂質過氧化最流行和最可靠的指標之一(Giera, Lingeman et al. 2012)。

過去有許多研究指出大氣微粒、柴油引擎微粒(diesel exhaust particles, DEP)和柴油引擎廢氣(diesel engine exhaust, DEE)，會引起中樞神經產生發炎反應和氧化壓力上升(Levesque, Taetzsch et al. 2011, Costa, Cole et al. 2017)。許多動物研究結果表明在暴露微粒後腦中 MDA 會上升，在 Costa 等人的研究發現 MDA 在雄性小鼠海馬迴中增加 2.8 倍，而在雌性小鼠海馬迴中增加 1.9 倍(Costa, Cole et al. 2014)。在毒理研究中，直接將微粒和不同腦區作用，結果發現微粒暴露後 MDA 會在海馬迴以及小腦上升，以及屬於抗氧化酶的超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)會在海馬迴中上升(Fagundes, Fleck Ada et al. 2015)，另外在另一篇呼吸暴露研究中也發現 MDA 在海馬迴、紋狀體、皮質(cerebral cortex)、小腦和嗅球中增加，在海馬迴和嗅球中也引起發炎反應指標上升以及微膠細胞活化(Cole, Coburn et al. 2016)。

除了微粒暴露研究之外，在以氣管灌注方式暴露殘油飛灰(Residual Oil Fly Ash, ROFA)的研究發現 MDA 在海馬迴、紋狀體和小腦中上升(Zanchi, Venturini et al. 2008, Zanchi, Saiki et al. 2010)，不僅如此，在 Chen 等人的急性呼吸暴露於燃燒煙霧研究中，結果指出在暴露後 6 小時以及 24 小時後 MDA 在腦中上升(Chen, Lee et

al. 2007)。

總而言之，腦中氧化壓力增加被認為是神經退化性疾病病程上重要的因子，因此本研究欲探討亞慢性全身暴露大氣懸浮微粒後在不同腦區中 MDA 的濃度。





## 2.5. 微粒暴露與微膠細胞活化

神經退化性疾病的病理改變除了氧化壓力變化外，許多研究也表明微膠細胞的數目以及型態的變化也與神經毒性有關(J. 1932)。有研究在 AD 的大腦中發現微膠細胞所衍生的細胞因子(cytokines)及其他免疫介質有增多的現象。此現象代表 AD 的腦中呈現慢性炎症(inflammatory)的環境。這種促炎症環境具有神經毒性，可以加速和加劇疾病的進展。更有研究指出，微膠細胞會聚集在 A $\beta$  的位點並且穿透神經斑塊，透過 A $\beta$  的促炎性激活微膠細胞。由此可以表明微膠細胞在 AD 中至關重要(McGeer, Itagaki et al. 1987, Veerhuis, Janssen et al. 1999)。

微膠細胞存於中樞神經系統中，屬於神經膠細胞的一種。微膠細胞大約佔大腦的 12%，當中樞神經受到損傷或攻擊時提供類似於巨噬細胞及淋巴細胞在外周的免疫抵禦。空氣污染可以通過三種機制激活具神經毒性之微膠細胞，(1)空氣污染成分可能直接激活微膠細胞；(2)來自全身炎症反應的細胞因子可激活微膠細胞；(3)來自外圍的顆粒、吸附化合物或細胞因子可能直接損傷神經元，最終會發生慢性發炎反應、神經毒性甚至傷害腦血管(Block and Calderón-Garcidueñas 2009)。此時被激活的微膠細胞會發生形態上的顯著變化，由原本靜止的、微小的型態轉變成活化的變形蟲型態。這樣的變化被認為有利於微膠細胞的吞噬作用和活動性(Streit, Graeber et al. 1988, Kreutzberg 1996, Streit, Walter et al. 1999, Blennow and Hampel 2003, Liu and Hong 2003)。

越來越多證據顯示，神經炎症被認為對神經元是一種雙面刃(Hanisch and Kettenmann 2007, Tang and Le 2014)，而中樞神經系統中的微膠細胞的活化也被認為是異質的(heterogeneous)，可以分為兩個表型：促炎 M1 表型及免疫 M2 表型。根據刺激的環境以及因素的不同微膠細胞可以分為三種活化路徑，經典激活



(classical activation)、替代激活(alternative activation)、及獲得性去活化(acquired deactivation)(Colton 2009, Colton and Wilcock 2010)。經典活化狀態的微膠細胞也被稱為 M1 微膠細胞，他透過誘導 iNOS 和 NF- $\kappa$ B 途徑產生各種促炎細胞因子，例如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6，及超氧化物、ROS 和 NO(Le, Rowe et al. 2001, Li, Huang et al. 2004, Block, Zecca et al. 2007)。而 M2 微膠細胞則包含替代激活和獲得性去活化兩種路徑，前項由 IL-4 / IL-13 誘導(Ponomarev, Maresz et al. 2007, Colton 2009)，後項則透過 IL-10 / 轉化生長因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )路徑(Sawada, Suzumura et al. 1999, Colton 2009, Colton and Wilcock 2010)誘發。M2 路徑會促進細胞碎片和錯誤折疊蛋白的吞噬作用，促進組織修復，並拮抗 M1 的促炎反應，最終導致免疫抑制和神經元保護。

鈣離子銜接分子-1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1)是微膠細胞的標記物，先前有免疫細胞化學研究利用 Iba-1 特異性抗體證明微膠細胞的形態特徵(Ito, Imai et al. 1998, Okere and Kaba 2000)。在一些微粒暴露研究中，發現暴露柴油引擎微粒使微膠細胞活化，且在多篇呼吸暴露柴油引擎微粒研究亦發現小鼠腦中之海馬迴、嗅球等腦區，其 Iba-1 的表現量較控制組顯著較高(Bolton, Smith et al. 2012, Cole, Coburn et al. 2016)。

因此本研究測量 Iba-1 於腦中之表現量，以評估暴露微粒之後腦部微膠細胞受到活化並誘發發炎反應的變化。



## 2.6. 微粒暴露與自噬作用

自噬作用 (autophagy) 是細胞處組成自我降解的過程，其中雙膜自噬體 (autophagosomes) 隔離細胞器或細胞溶質的一部分並與溶酶體或液泡融合以通過常駐水解酶進行分解。當細胞外或細胞內受到刺激時，例如飢餓、生長因子剝奪 (deprivation)、內質網應激或病原體感染時，自噬作用就會被驅動。而當自噬作用受到損害或是有缺陷時，可能導致癌症、神經性退化疾病和傳染病的發生。對於人類及生物體至關重要 (He and Klionsky 2009)。

透過蛋白質和細胞器的形成和降解之間的動態，可以維持正常的細胞生長和發育。而蛋白質降解的途徑可以分為非溶酶體及溶酶體兩種。前項是在基礎代謝條件下細胞的高選擇性降解，後項則是在應激反應下導致細胞外蛋白質降解 (內吞作用或胞飲作用) 和細胞內蛋白質與細胞器下的大量降解 (巨自噬)，同時也存在溶酶體螯合 (sequestration) 和一些特定胞質蛋白質的降解 (微自噬和分子伴侶介導的自噬) (Larsen and Sulzer 2002)。因此自噬作用可以分為三種類型：巨自噬 (macroautophagy)、微自噬 (microautophagy)、及分子伴侶介導的自噬 (chaperone mediated autophagy)。一般所稱的自噬作用，都是泛指巨自噬。而相較於微自噬與分子伴侶介導的自噬，巨自噬被認為與 AD 是最有關聯的 (Hesterberg, Long et al. 2012, Lee, Giordano et al. 2012)。

巨自噬一般都是在飢餓或是遭受應激時大量蛋白質降解的主要途徑，並且是一個多步驟的過程。首先，蛋白質、脂質和受損或功能失調的細胞器如線粒體被源自內質網的自噬體 (具雙膜的囊泡結構) 吞噬。隨後，自噬體與初級溶酶體融合，自噬體的外膜在融合後成為溶酶體膜的一部分。融合後，複合物酸化並成熟形成自噬溶酶體。最後，當自噬溶酶體內的內容物被消化時，其內膜結構就會解體，釋出的

內容物被循環以提供細胞所需的氨基酸和能量(Dunn 1990, Dunn Jr 1994, Stromhaug and Klionsky 2001)。

微管相關蛋白 1A / 1B 輕鏈 3(light chain 3, LC3)是一種可溶性蛋白質，分子量約為 17kDa，普遍存在於哺乳動物組織和培養細胞中。通常可以分為三種亞型，LC3A、LC3B、及 LC3C。相比其餘兩種亞型而言 LC3B 表現量較多且比較均勻分散於細胞質與細胞核中。因此，多數研究會使用 LC3B 作為量測自噬作用的適當指標(Koukourakis, Kalamida et al. 2015)。

在自噬過程中，自噬體吞噬細胞質成分，包括細胞溶質蛋白和細胞器。同時，細胞溶質形式的 LC3 (LC3-I)與磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)綴合形成 LC3-磷脂酰乙醇胺綴合物(LC3-II)，其被招收到自噬體膜中。自噬體與溶酶體融合形成自噬溶酶體，之後透過胞吞及胞飲吞噬體內物質並以水解酶降解。同時，自噬體溶酶體腔中的 LC3-II 降解。因此，自噬體標記物 LC3-II 的溶酶體轉換反映了飢餓或應激誘導的自噬活性，並且以免疫印跡(immunoblotting) 或免疫熒光(immunofluorescence)檢測 LC3 已成為測定自噬和自噬相關過程的可靠方法(Tanida, Ueno et al. 2008)。因此本研究量測 LC3B 於腦中之表現量，藉以評估暴露大氣 PM 後對自噬作用的變化以及影響。





## 2.7. 阿茲海默症三基因轉殖小鼠

根據研究可以發現，人類 AD 的致病蛋白質為 A $\beta$  和 Tau 蛋白(Giménez-Llort, Arranz et al. 2008)。於是擁有 APP<sup>swe</sup>、PS1M146V、TauP301L 三種轉殖基因之小鼠，又稱為三基因轉殖小鼠(triple-transgenic model of AD, 3xTg-AD)是目前可以同時模擬人類 A $\beta$  和 Tau 蛋白病理變化及病程的動物模式(Sterniczuk, Antle et al. 2010, Sterniczuk, Dyck et al. 2010, Giménez-Llort, Maté et al. 2012)。此品系之小鼠源自 C57BL/6 (Oddo, Caccamo et al. 2003)。

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 $\beta$ ，6 個月時可於海馬迴觀察到細胞內 A $\beta$  以及在新皮質 4-5 層可觀察到類澱粉蛋白斑塊，12 個月大可於海馬迴觀察到類澱粉蛋白斑塊以及神經纖維纏結。同時，在其他病理方面也表現出年齡及病理之間的相關性例如星狀細胞的增多以及微膠細胞的活化(Billings, Oddo et al. 2005)。

在行為認知方面，在 2 個月大時可開始出現記憶力失調現象、逐漸且明顯退化之前肢握力減退及減少之肢端活動(Becker, Dailey et al. 2005, García-Mesa, Pareja-Galeano et al. 2014)。因此，此種小鼠在目前被認為是模擬人類 AD 發生之最佳實驗動物模式。同時，研究亦發現 3xTg-AD 母鼠較同齡公鼠有較為明顯的 A $\beta$  蛋白沉澱及行為異常(Clinton, Billings et al. 2007, Giménez-Llort, Arranz et al. 2008, Sterniczuk, Antle et al. 2010, Sterniczuk, Dyck et al. 2010, Stevens and Brown 2015, Stover, Campbell et al. 2015)。然而，目前對於性別所造成之差異還具有爭議。

## 第三章 材料與方法



### 3.1. 實驗流程與架構

本實驗共暴露 36 隻 3xTg-AD 母鼠，26 隻供本研究使用其餘 10 隻則供本實驗室其他研究所用。據本研究假說，將使用 6 個月大之 3xTg-AD 母鼠(因暴露過程中死亡 3 隻，共 23 隻)，以控制組及暴露組分別為 12 隻及 11 隻。本實驗之暴露系統為臺北空氣污染暴露系統(Taipei Air Pollution Exposure System for Health, TAPES)，將實驗動物依照控制組及暴露組放置於全身暴露籠內。控制組呼吸經高效能空氣微粒濾網(high-Efficiency Particulate Air Filter, HEPA filter) 過濾後之空氣；暴露組則呼吸直接抽取於外界大氣之微粒。暴露時間為一天 24 小時，一週 7 天，共 3 個月之連續全身亞慢性暴露。期間將會進行濾紙採樣，每兩週收取樣本資料再進行後續成分分析。

當完成 3 個月暴露後，進入臺灣大學動物中心進行檢疫，待檢疫完成過後則進行動物行為實驗( $N_{\text{control}} = 17$ ;  $N_{\text{exposure}} = 15$ )。本行為實驗分為兩階段，先進行為期 5 天的莫氏水迷津(morris water maze, MWM)令其休息一天過後再實行滾筒式跑步機試驗(rotarod)。前項為觀察其認知及空間記憶能力，後者為測試其平衡及肌耐力。

完成行為實驗後，將小鼠帶回臺灣大學公共衛生學院小動物房，於 24 小時後進行犧牲。犧牲方式分為兩種，分別為斷頭取腦( $N_{\text{control}} = 7$ ;  $N_{\text{exposure}} = 6$ )及灌流( $N_{\text{control}} = 5$ ;  $N_{\text{exposure}} = 5$ )。此兩種皆是以二氧化碳進行麻醉。斷頭取腦的組別待小鼠進入深度麻醉期後，放上斷頭臺(guillotine)快速進行斷頭。隨後取出腦組織再將腦部依據左右半腦細分為嗅球(olfactory bulb, OB)、小腦(cerebellum, CE)、海馬迴(hippocampus, HI)以及皮質(cerebral cortex, CO)四個腦區。後續分析方面，左半腦將進行氧化壓力指標，右半腦則於阿茲海默症病徵指標分析上使用。灌流的組別將

使用固定液固定小鼠腦部、肺部、及心臟組織，隨後將樣本委託臺灣大學動物中心進行病理分析。詳細的實驗架構(圖 1)與暴露時間軸(圖 2)如圖所示。



### 3.2. 實驗動物

本實驗欲利用 3xTg-AD 小鼠作為實驗動物，原與邱銘章教授研究團隊合作繁殖及飼育。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，現行由臺灣大學醫學院動物中心繁殖及飼育。本研究將使用 6 個月大 3xTg-AD 母鼠。待其成長至 3-4 週大後，帶回臺灣大學公共衛生學院小動物房飼育。在 6 個月大時將 3xTg-AD 小鼠放置於 TAPES 內開始進行暴露，此系統位於國立臺灣大學公共衛生學院九樓 901 小動物飼養房內，此環境溫度控制於  $22 \pm 2$  °C 且溼度控制於  $50 \pm 5$  %，並設有 12 小時光暗週期。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(deionized water, ddH<sub>2</sub>O)，每週更換墊料及量測體重。此實驗的所有動物實驗皆由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)同意所進行(同意書編號：20160545)。



### 3.3. 大氣懸浮微粒暴露

本研究選用呼吸暴露(inhalation)作為大氣懸浮微粒之暴露途徑。於現今呼吸毒理研究學中，氣管灌注(intratracheal Instillation)、口咽吸入(oropharyngeal aspiration, OA)、及呼吸暴露為較常使用之暴露方式。而呼吸暴露又可以暴露範疇區分為鼻腔暴露(nose-only)與全身性呼吸暴露(whole-body)。而本研究基於以下優點選用全身性暴露：(1) 相較於氣管灌注及口咽吸入，呼吸暴露是較不具侵入性之方法可以降低實驗動物在實驗過程中不適或是死亡；(2) 縱然實驗動物於人體有差距，但在途徑方面呼吸暴露較能符合人體暴露的狀況；(3) 相比鼻腔暴露而言全身性暴露帶給實驗動物的壓力較小，因其可以使動物在暴露腔內自主活動。因本研究需要進行3個月亞慢性的暴露。故此選用全身性呼吸暴露是能夠在符合研究假說的前提下，帶給實驗動物最小的壓力。

而在微粒性質方面，相較於多數研究選用經濃縮過之微粒，本研究讓實驗動物暴露臺北大氣微粒且經過驗證主要暴露微粒為 PM<sub>2.5</sub>。前項研究多數是以短時間內使實驗動物暴露高濃度，但其暴露狀態與真實暴露實態存有一定差距，本研究為縮短此差異故選用 TAPES 進行暴露。



### 3.3.1 臺北空氣污染暴露系統 (TAPES)

本研究使用 TAPES 對實驗動物進行暴露，此系統位於臺北市中正區國立臺灣大學公共衛生學院九樓。此系統之標的是為了使實驗動物能夠暴露於當下外界環境的大氣實態，藉此能夠模擬人類在此環境中的暴露狀態。故此系統使用非濃縮微粒而並非較高濃度的濃縮微粒，希冀可以排除使用濃縮微粒暴露系統導致與實際人類暴露情況的差異。

本暴露系統是屬於獨立供氣飼養系統(individual Ventilation System, IVC)，各個飼養籠都是獨立供氣並且進行主動式的換氣。系統由國立臺灣大學公共衛生學院九樓外部抽取外部大氣微粒，經過主機裝置內之粗過濾網可以濾過大粒徑之微粒。本系統所引進之大氣微粒中  $PM_{10-2.5}$  占 0.4%、 $PM_{2.5}$  占 99.6%，故本研究之實驗動物多暴露於  $PM_{2.5}$  中。外界大氣微粒經過主機後，由系統上部之抽氣單位將氣體平均輸送入各個飼育籠內，再經過下部抽氣單位將籠內空氣抽出、排出。而根據 HEPA filter 的位置可將各飼育籠分為控制及暴露籠，控制籠的進氣口(inlet air) 會裝置 HEPA filter，讓控制組之實驗動物吸入與暴露組相同氣體成分但無氣體微粒之外界大氣。而暴露籠則於出氣口(outlet air)處安裝 HEPA filter。詳細 TAPES 之構造圖如圖 3 所示。本研究於開始暴露前會進行系統效能評估及流量校正後開始實驗。



### 3.3.2 大氣微粒及系統環境監測

本研究為了解暴露籠內之暴露情況，將針對氣體微粒濃度以及籠內環境溫度、濕度做監測。於暴露組的空腔內放置氣膠監測儀(DustTrak™ II Aerosol Monitor 8530, TSI, Shoreview, Minnesota, USA)，用以監測 TAPES 內之 PM<sub>2.5</sub> 濃度，以質量濃度作為表示。本監測儀利用 90 度直角光散射原理以每分鐘一筆資料即時監測暴露腔內 PM<sub>2.5</sub> 濃度，同時放入溫濕度計以每五分鐘一筆資料監測籠內溫度及濕度的狀況。

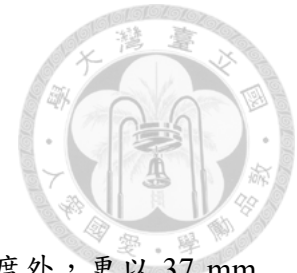
因儀器直讀值可能與真實濃度有一定程度之差異，因此除了以氣膠監測儀 PM<sub>2.5</sub> 濃度外，本研究同時進行手動濾紙採樣，37 mm 之鐵氟龍濾紙(Pall Corporation, Port Washington, New York, USA)於採樣前需至少調理 24 小時後再進行濾紙採樣前秤重。秤重後之濾紙以膠條密封置於防潮箱做保存，待開始採樣後再將其拿出置入監測儀內以流量 1 L/min、平均採樣期間為 14 天的情況下蒐集微粒。蒐集完成後，亦需至少調理 24 小時後再進行濾紙採樣後秤重。將以採樣前後之重量差異及採樣空氣體積計算微粒暴露濃度，公式如下。

$$\text{微粒濃度}(\mu\text{g}/\text{m}^3) = \frac{(\text{後測濾紙重量} - \text{前測濾紙重量}) - \text{環境空白背景值}}{\frac{\text{總採樣流量(L)}}{1000(\text{m}^3)}}$$

隨後，將鐵氟龍濾紙保存於-20°C 冰箱，以利後續成分分析。

因本研究於暴露期間 12 月 13 日至 26 日因監測儀故障送修導致無法進行濾紙採樣，故使用環境保護署之測站微粒資料推估濾紙採樣數據。推估方式為先利用前期直讀儀器數據與三距離臺灣大學公共衛生學院較近之測站(中山、古亭、萬華)進行回歸分析，選擇相關性較高之測站當作推估測站進行推算，得到直讀-測站回歸方程式。同樣，針對直讀儀器與手動採樣數據同樣進行回歸分析，得直讀-手動回歸方程式。將故障期間之測站資料代入直讀-測站回歸方程式得到推估直讀儀器數

值再代入直讀-手動回歸方程式得出推估濾紙採樣數據。



### 3.3.3 成份分析

本研究於暴露期間以氣膠監測儀即時量測暴露 PM 質量濃度外，更以 37 mm 之鐵氟龍濾紙進行手動採樣。待採樣完成後，將濾紙以膠條密封並且保存於防潮箱內。隨後，再送至中央研究院以進行成份分析。主要分析重金屬、水溶性金屬以及水溶性離子成分的含量，並且由上述含量可以推估暴露微粒的可能來源。

送樣後，首先將濾紙分為兩個部分進行分析。1/2 張濾紙首先以酸進行消化後，利用電感耦合電漿體質譜儀(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)做重金屬含量分析。而剩餘 1/2 張濾紙以 10ml 純水萃取後，其中 5ml 利用離子層析儀(ion chromatography, IC)做水溶性離子分析，另外 5ml 再以 ICP-MS 分析水溶性金屬。上述重金屬以及離子皆使用標的分析，意即先行挑選出欲分析的項目，再進行定量分析。故選擇多數研究大氣微粒會分析之 23 個金屬，以及 8 種成分分析常見離子，藉此推估本研究大氣微粒可能之來源。



### 3.4. 動物行為試驗

本研究除了以脂質過氧化指標及阿茲海默症相關蛋白分析外，將同時針對動物行為做探討，以期能夠觀察出相關表觀行為學的改變。本動物行為試驗分為 MWM 及 rotarod 試驗，前項廣泛應用於探討記憶及空間學習能力，後者則用於評估運動能力及運動神經協調性。

#### 3.4.1 莫氏水迷津 (Morris water maze, MWM)

MWM 主要設備為水池以及動物行為/軌跡追蹤分析系統(Noldus EthoVision 3.1, The Netherlands)。實驗動物於直徑 100 公分、高度 30 公分圓形白色塑膠水池內進行實驗，水池共分為四個象限。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臺，此平臺會低於水面 1 公分，並在水中加入糯米粉或太白粉均勻混合使水呈濁白色避免小鼠直接觀察到平臺本身，水溫則維持在  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。水池邊緣將貼上四個可見的幾何圖案作為空間學習的視覺線索，提供小鼠記憶平臺的依據。詳細設備構造圖見圖 4。

MWM 實驗分為兩個階段共計五天，前四天為知識採集階段(acquisition phase)最後一天則為空間探索實驗(probe trial)。知識採集階段(第一至四天)，平臺與視覺線索的位置固定，一天會有四次試驗(trial)每次試驗將從不同起點(不同象限之邊緣中點)開始。首先將實驗動物面向池壁緩慢放入水中，讓其在水池內游泳 60 秒尋找平臺，並記錄小鼠自下水到爬上平臺所需時間，此時間為逃避潛伏期(escape latency)。小鼠於 60 秒內尋找到平臺後，讓小鼠在平臺上停留 15 秒，若小鼠超過 60 秒仍未尋找到平臺，則引導小鼠游向平臺並在平臺上停留 15 秒，每次試驗間隔 30 秒讓小鼠休息過後始開始下次試驗。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，唯一不同是水池內並無放置平臺，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。

本行為實驗結束後，透過分析逃避潛伏期(escape latency)、移動距離(distance moved)、總移動距離(cumulative distance)、游泳速度(swim velocity)、目標停留平臺象限時間(time spent in target quadrant)、目標停留平臺象限次數(cross numbers in target quadrant)等參數，來評估其記憶能力是否因暴露大氣微粒而發生改變或是造成影響。



### 3.4.2 滾輪式跑步機試驗

本試驗主要是以強迫實驗動物跑步的方式，觀察其運動能力、平衡感以及運動神經協調性。實驗主要設備為旋轉平衡測定儀(Rotarod treadmills UGO47600, Ugo Basile Biological research apparatus, Gemonio (VA), ITALY)，能夠經由控制面板調整滾輪轉速。本測定儀共有五個跑道，每道寬度為 6 公分、長度為 25 公分、落下高度為 26 公分。滾輪下方設有掉落感應器，當小鼠由滾輪掉落將會觸發感應器自動紀錄掉落秒數及掉落轉速於顯示面板上，見圖 5。

實驗共分為兩個階段，分別為適應期及實驗期，前項是為了讓小鼠熟悉設備並且訓練其正確跑步方式。在適應期間，將測定儀設定在固定轉速 4 rpm。令其空轉數秒以待滾輪轉速穩定後，抓住小鼠尾巴將其以前腳先抓住滾輪上的方式平穩放置，並且要使滾輪之轉動方向與小鼠行徑方向相反，才能避免小鼠直接跳落。適應期為期一天每隻小鼠需要進行 3 次試驗而每次試驗為 6 分鐘，若在此期間小鼠沒有掉落則將其放置於專用鼠籠內，令其休息 1 分鐘後再進行下一個試驗。若小鼠於 10 秒內掉落則代表放置位置或跑步方式不當必須重新進行。每次進行下一次試驗前，因為小鼠對於氣味較為敏感為防止其自行跳落需要將滾輪及掉落板以酒精消毒並且通風後再開始。

實驗期為期三天，每天需要進行 3 個試驗。與適應期之不同為，滾輪會以 1 rpm/10sec 的加速度由初始轉速 4 rpm 加速至最大轉速 40rpm。中途若小鼠掉落至下方感應器上則會自動紀錄掉落的秒數及當下的轉速。



### 3.5. 動物犧牲(sacrifice)及取樣

行為實驗結束後，將小鼠帶回臺灣大學公共衛生學院 9 樓小動物房待 24 小時後進行犧牲。實驗動物以兩種方式犧牲，皆以二氧化碳氣體(carbon dioxide, CO<sub>2</sub>)麻醉後再分別進行灌流及斷頭。

麻醉斷頭組(N<sub>control</sub>= 7; N<sub>exposure</sub>= 6) 部分，待實驗動物深度麻醉後以斷頭台快速斷頭。分別取出腦組織及器官(腎臟、心臟、肝臟)。腦組織方面，於承裝 10% 磷酸鹽緩衝生理鹽水(phosphate buffered saline, PBS)之培養皿進行腦部分區。先將腦部分為左、右半部，再細分為 OB、CE、HI、CO 四個腦區，待完成後將腦組織承裝於微量離心管內再以液態氮進行急速冷凍。器官方面，腎臟、心臟承裝於微量離心管而肝臟以鋁箔紙包裹內，之後再以液態氮進行急速冷凍。樣本保存方面，將其放入抗凍紙盒並保存於-80°C 冰箱。

麻醉灌流組(N<sub>control</sub>= 5; N<sub>exposure</sub>= 5) 方面，小鼠進入深度麻醉後利用包氏液(bouin's solution)進行灌流進而固定組織。腦組織完整取出後，承裝於 50 毫升離心管並浸泡於 10% 甲醛製成之福馬林進行保存。於送樣前進行腦組織分區再委託臺灣大學動物中心進行病理組織分析。



### 3.6. 脂質過氧化(MDA)分析


本研究參照 TÜ KÖ ZKAN (Tukozkan et al., 2006) 等人之研究，發現使用此方法相比多數使用之硫代巴比妥酸方法(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 能夠較具有特異性與丙二醛(malondialdehyde, MDA) 結合，降低高估之問題 (Tukozkan et al., 2006)。

本實驗將使用液相層析串聯質譜儀(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 來分析腦組織內脂質過氧化之程度。其原理是利用 2,4-二硝基苯肼(2,4- Dinitrophenylhydrazine, DNPH, Sigma)與 MDA 結合形成 MDA-DNPH 衍生物，再透過 LC-MS/MS 來進行分析。本實驗共分為三大步驟：(1) 將 MDA 由腦組織中萃取而出，並加入 DNPH 溶液使之形成 MDA-DNPH 衍生物。(2) 配置標準品之檢量線以及標準品添加之檢量線，同時藉此評估基質效應。(3) 待上述檢量線及基質效應皆通過後，進行質譜儀分析。

#### 3.6.1 腦組織內 MDA 萃取

本研究參考 Tukozkan 等人研究(Tukozkan et al., 2006)進行 MDA 萃取。將欲分析之四個腦區(CE, CO, HI, OB)以電子天秤各秤取 10 mg 之腦組織承裝於微量離心管中，同時加入 250  $\mu$ L 1.15%之氯化鉀(potassium chloride, KCl) 並以研磨棒來使其充分混合藉以均質化腦組織。為使結合在 MDA 上之蛋白質鹼性水解，需加入 100  $\mu$ L 6 M 氫氧化鈉(sodium hydroxide, NaOH) 至已均勻化之組織再放置於乾浴器中於 60°C 下反應 45 分鐘。待反應完成後，再加入 250  $\mu$ L 100%乙腈(acetonitrile, ACN)來沈澱蛋白質。將上述試劑均勻混合後，以 15000 rpm, 25°C 離心 10 分鐘。

離心完成後，取出上清液並轉移至新的微量離心管中，使其與 5 mM 之



DNPH 溶液混合，並放置於乾浴器中於 25 °C 下進行衍生反應 10 分鐘，衍生反應完成後待後續 MDA-DNPH 分析。進行上述步驟前，需要先配置 DNPH 操作溶液。以秤藥紙承裝 DNPH (含水量 33%) 粉末並以電子天秤量取 0.016 g。將粉末倒入 50ml 離心管中，並加入 12 mL 2M 的鹽酸(hydrochloric acid, HCl)即配置完 DNPH 溶液(pH = 0.09)。將此溶液以試管震盪器(vortex) 與震盪槽確保混合均勻無 DNPH 顆粒析出、沈澱等現象，以鋁箔紙包裹避免光線接觸並貯存於室溫當中。

### 3.6.2 檢量線前置-配製標準溶液

進行檢量線量測前，需先配置儲備原液(stock solution)及標準使用溶液(working standard solution)。將 2  $\mu$ L 1,1,3,3-四乙氧基丙烷(1,1,3,3 tetraethoxypropane, TEP)溶解於 8 mL ddH<sub>2</sub>O 中配製成 1mM 之儲備溶液，再取 0.1 mL 之 1 mM 儲備原液加入 5 mL 1% (v/v) 硫酸溶液中並在室溫下反應 2 小時，即配製成 20 nmol/mL MDA 標準使用溶液，待後續配置標準品之檢量線以及腦組織萃取後標準品添加法之基質匹配檢量線使用。MDA 標準品配製完成後將用鋁箔紙包裹減少光線接觸並貯存於 4°C 冰箱當中。

### 3.6.3 評估基質效應

本研究使用 LC-MS/MS 來分析腦組織內 MDA 之含量，其原理是利用電子游離將待測物質離子化。在此過程中，若有其餘物質同時進入質譜儀中造成離子化受到影響進而影響定量的結果，即狀況乃為基質效應(matrix effect)。目前研究常用於評估基質效應之方法主要有兩種(陳家揚 2007)：管柱後灌流(post-column infusion)或將基質萃取物加入已知量之待測物標準品(post-extraction spike)比較其和等量純待測物標準品的訊號，又稱為標準添加法。本研究使用上述後者來評估樣本內沒有顯著的或是擁有可忽略的基質效應。將分別配製標準品之檢量線



(standard calibration curve, SCC)以及腦組織萃取後標準品添加法之基質匹配檢量線(matrix matched calibration curve, MCC)，藉以比較兩者其斜率得出基質效應。

#### 配置標準品之檢量線(SCC)：

本檢量線以 6 個濃度點製成，先行將 1% 稀硫酸取 300  $\mu\text{l}$  自一微量離心管中，其餘 5 管皆加入 250  $\mu\text{l}$ 。將前述所配置完成之 20 nmol/ml MDA 標準使用溶液取出 200  $\mu\text{l}$  加入有 300  $\mu\text{l}$  稀硫酸之離心管中。再各取 250  $\mu\text{l}$  以序列稀釋的方式配置成下面濃度：8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 nmol/ml。稀釋後之標準使用溶液取 20  $\mu\text{l}$  再各別加入 60  $\mu\text{l}$  之 100% ACN，配製成 LC-MS/MS 分析用之濃度分別為：2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 nmol/mL。於上機前，將上述分析用溶液各別加入 25  $\mu\text{L}$  5 mM pH=0.09 之 DNPH 溶液混合，並放置於乾浴器中於 25°C 下衍生反應 10 分鐘以上。

#### 配置標準品添加法之基質匹配檢量線(MCC)：

因本檢量線需要添加樣本萃取物，故將欲分析之四個腦區各以電子秤取 5 mg 混合成 20 mg 之混合樣本(pooled sample)，並以上述之萃取方法取出腦組織萃取液。而上述所用之腦組織來自於相同品系、性別、無藥物處理之健康 3xTg-AD 小鼠。

本檢量線以 7 個濃度點製成，先行將 1% 稀硫酸取 250  $\mu\text{l}$  自 6 個微量離心管中。將前述所配置完成之 20 nmol/ml MDA 標準使用溶液取出 250  $\mu\text{l}$  加入一 250  $\mu\text{l}$  稀硫酸之離心管中。再各取 250  $\mu\text{l}$  以序列稀釋的方式配置成下面濃度：10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 nmol/ml。稀釋後之標準使用溶液 10  $\mu\text{l}$  再各別加入 40  $\mu\text{l}$  之腦組織萃取液，配製成 LC-MS/MS 分析用之濃度分別為：2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 nmol/mL。然最後一個濃度點為 0 nmol/mL，以 10  $\mu\text{l}$  之稀硫酸及 40  $\mu\text{l}$  之腦組織萃取液配置而成。同樣於上機前，將上述分析用溶液各字加入 25  $\mu\text{L}$  5 mM



pH=0.09 之 DNPH 溶液混合，並放置於乾浴器中於 25°C 下衍生反應 10 分鐘以上。

#### 基質效應計算：


上述 MCC 及 SCC 之決定係數(coefficient of determination,  $R^2$ ) 需大於 0.995 以上方可被使用。而基質效應計算公式如下：基質效應 (%) =  $\frac{\text{MCC 之斜率} - \text{SCC 之斜率}}{\text{SCC 之斜率}} \times 100\%$ 。當基質效應介於 ±15 % 時，代表本樣本無明顯或具可忽略之基質效應此時可以使用 SCC 作後續之定量分析依據。

### 3.6.4 LC-MS/MS 分析

本實驗使用 LC-MS/MS 分析腦組織之 MDA-DNPH 濃度，此液相層析系統 (liquid Chromatography) 設備包含有自動進樣機 (autosampler, San Joes, CA, USA)、四移動相梯度幫浦 (Thermo Scientific Accela 1250 quaternary pump) 以及液相層析管柱。此管柱為 Synchronis C18 管柱 (內徑 4.6 mm × 15 cm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, WA, USA)，而液相層析系統透過六項閥 (six port divert valve) 連接到質譜儀 (mass spectrometer)。

液相層析系統所使用之有機相為 ACN 含 0.1 % 乙酸 (acetic acid, AA)、水相為去離子水含 0.1 % AA，流速為 300-500 μL/min，每個樣本之分析進樣量為 25 μL，移動相梯度如表 1 所示，在第 0 分鐘時有機相比例為 50 %、流速為 300 μL/min，在第 5 分鐘時將有機相比例提升為 95 %、流速為 300 μL/min，在第 11 分鐘時有機相比例降至起初的 50 %、流速為 300 μL/min，在第 11.10 分鐘時有機相比例為 50 %、流速提升為 500 μL/min，在第 14.10 分鐘時有機相比例為 50 %、流速降至起初的 300 μL/min，分析時間總共為 15 分鐘。

本研究使用質譜儀分析此物質，質譜儀的游離源使用加熱式電噴灑游離法



(heated Electrospray Ionization, HESI)，再利用三段四極矩式串連質譜儀(triple-quadrupole mass analyzer)進行碰撞誘導裂解(collision-induced dissociation, CID)，再配合選擇反應監測(selected reaction monitoring, SRM)模式進行質譜分析，而 HESI 參數設定為噴灑電壓(spray voltage) 3000 V、毛細管溫度(capillary temperature) 200°C、蒸發溫度(vaporizer temperature) 200 °C、鞘氣體壓力(sheath gas pressure)35 psi、輔助氣壓力(aux gas pressure) 5 arb，如表 2 所示，另外 SRM 參數如表 3 所示，結果圖譜之波峰面積計算進行定量，圖譜計算軟體使用 Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc.)進行分析。





### 3.7. 阿茲海默症病徵相關蛋白質之分析

本研究以西方點墨法(western blot)進行阿茲海默症病徵相關蛋白質分析，上述指標包含 total Tau、p-Tau、A $\beta$ 、LC3B、Iba-1。western blot 之原理為利用特異性的抗體與具專一抗原之蛋白質的原理經過呈色後，通過影像來分析著色的位置以及密度來定量特定蛋白質的表現情況。western blot 主要分為三大步驟：(1) 將蛋白質混合物載入膠體上進行電泳跑膠，使蛋白質依據分子量大小不同來進行分離。隨後，再將膠體上之蛋白質轉漬(transfer)至轉漬膜(transfer membrane)上。(2) 為避免 transfer membrane 上非結合目標蛋白的抗體殘留，故先進行阻擋(blocking)。再將 membrane 浸潤到目標抗體(先一級抗體再二級抗體)溶液內，結合而成抗體-抗原複合物。(3) 加入與二級抗體結合之發光或呈色物質，最後進行偵測。

#### 3.7.1 樣本製備-蛋白質萃取

於實驗前需要先進行蛋白質萃取，將先前取樣之四個腦區(OB, HI, CE, CO)各自秤取 15 $\pm$ 1 mg 腦組織於微量離心管中並加入 60 $\mu$ l 蛋白質裂解液(lysis solution)以研磨棒攪碎組織使其均勻混合。此裂解液包含放射免疫沉澱法緩衝液(radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA Buffer, PH7.4, 2X concentrate)、蛋白酶抑制劑(protease inhibitor cocktail, EDTA-Free, 100X in DMSO)、磷酸酶抑制劑(phosphatase inhibitor)以及乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 0.5M, pH8.0)。

均質化完成後，將樣本放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱內以待組織裂解。待隔日以 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 離心 20 分鐘。隨後，取出上清液分裝置於微量離心管中並保存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱，待後續進行蛋白質定量以及西方墨點法分析蛋白表現量。



### 3.7.2 前置-蛋白質定量

本實驗使用布拉德福蛋白質定量法(bradford protein assay)於電泳前先定量樣本內蛋白質之濃度。本法是利用比色法原理來進行測定，當 bradford 與蛋白質穩定結合後將呈現藍色型態。且其吸收光譜在 595nm 處具有一個波峰，此時可以利用光譜儀來測定蛋白質濃度。本法詳細之步驟如下所述。

首先須先建立檢量線，共配製 6 個濃度範圍分別為 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0 mg/mL。配製方法是將各微量離心管加入 25 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O，隨後加入 25  $\mu$ l 的 2 mg/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)配置成檢量線濃度最高點，再以序列稀釋的方式完成檢量線。上述剛配好的檢量線每管取 20ul 加入含有 980ul 已稀釋五倍之 bradford (protein assay dye reagent concentrate, BIO-RAD)的離心管內。樣本蛋白質部分，加入先前萃取出之上清液 1  $\mu$ L 並加入 999  $\mu$ L bradford 中。

將上述加入 bradford 之減量線與樣本蛋白質各取 150  $\mu$ L 載入至 96 孔盤 (96-well plate) 中並進行三重複試驗。最終使用酵素免疫分析測讀儀(elisa reader) (BioTek™ Epoch™ Microplate Spectrophotometer) 於波長 595 nm 來測量各吸光值，利用檢量線來計算樣本內蛋白質濃度。上述檢量線之決定係數( $R^2$ )需大於 0.99 以上方可使用。

經過定量後，每個樣本之蛋白質濃度經過蛋白質樣本緩衝液(laemmli SDS sample Reagent reducing 4X, T-Pro) 及 ddH<sub>2</sub>O 的調整後皆為 4  $\mu$ g/ $\mu$ L。將樣本以迷你微量離心機快速離心，隨後將其以 95°C 加熱 5 分鐘來打斷樣本內蛋白質上的雙硫鍵使之充分變性，再以 12000 rpm, 4°C 情況下離心 10 分鐘，最後則將製備好之樣本保存於-20 °C 冰箱。



### 3.7.3 西方點墨法流程


樣本前置完成後，則要進行電泳跑膠。先以 75%酒精及拭鏡紙清潔玻璃片，並把製膠模組裝備完成。同時，以 ddH<sub>2</sub>O 灌入兩玻璃片間進行測漏。

本實驗之膠體是使用十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)來進行電泳跑膠，此膠體配方由 ddH<sub>2</sub>O、30%丙烯醯氨預混液(acrylamide/bis solution)、1.5M 三羥甲基氨基甲烷鹽酸鹽(tris-HCL, pH8.8)、10%十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate, SDS)、10% 過硫酸銨溶液(ammonium persulfate solution, APS)、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)。分為上膠-壓縮膠(stack gel)及下膠-分離膠(resolving gel)，每片膠體約 5 ml 將其灌入兩玻璃之間。同時，膠體(下膠部分)根據不同目標蛋白質因有不同分子量而具有不同之濃度：total Tau (10%)、p-Tau (10%)、A $\beta$ <sub>42</sub> (15%)、Iba-1 (15%)、LC3B (15%)。

待 SDS-PAGE 膠體配置且凝固完全過後，將開始進行樣本裝載。每片膠體共有 10 個孔洞(well)，將處理好之樣本各注入 5  $\mu$ l 到中央 well 中，每個 well 內的樣品蛋白量為 20  $\mu$ g/well。而左右兩方之 well 則會根據樣本多寡注入蛋白質標記(RGB prestained protein ladders)及蛋白質樣本緩衝液。

完成樣本裝載後，即可進行電泳跑膠。此步驟分為兩個階段，第一階段為電壓 60 伏特(V)，時間為 30 分鐘，此階段是使樣本進入分離膠之前被壓縮成相當形狀，以讓後續進入分離膠後有更好的分離效果。第二階段跑膠則為電壓為 100 V，時間為 100 分鐘，提供主要的電場分離及分子篩作用讓蛋白質中分子量做分離。

電泳跑膠完成後，將膠體由玻璃片中取下後依據蛋白質標記將多餘(非目標蛋




白質區域)切除，隨後將要進行 transfer 之步驟。先將聚偏氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membranes, PVDF transfer membrane)浸入 100% 甲醇(methanol)中進行激活。total Tau、p-Tau、A $\beta$ <sub>42</sub> 使用 0.45  $\mu$ m 孔徑的 PVDF 膜，Iba-1、LC3B 則使用 0.2  $\mu$ m。PVDF 膜激活過後，以 transfer buffer (ddH<sub>2</sub>O, 100% methanol, 10x transfer buffer solution)進行洗淨。將三明治夾攤平以濾紙、PVDF 膜、膠體、濾紙、海綿的順序依序放置，上述過程需在承裝 transfer buffer 並淹過三明治夾的容器中進行。最後將轉漬槽連同冰包以及轉子放入冰浴中，三明治夾裝置完全後放入轉漬槽，以電壓為 100 V，時間為 60 分鐘進行 transfer。

transfer 完成後，將三明治夾從電泳槽取出並將 PVDF 膜以鑷子夾出。依據各目標蛋白之分子量進行切膜：t-Tau、p-Tau 皆切在 35-75 kDa；A $\beta$ <sub>42</sub> 切在 25-75 kDa；Iba-1、LC3B 切在 25-75 kDa。以 5%脫脂奶粉每個膜給予 10c.c 進行 blocking，並在室溫下均勻搖晃 60 分鐘，再以三羥甲基氨基甲烷和聚山梨醇酯 20(亦稱為吐溫 20)混合物(tris basewith tween, TBST)緩衝液進行每次 5 分鐘共 3 次的漂洗。

接下來將一級抗體配置於 TBST 後與 PVDF 膜在 4°C 冰箱中均勻搖晃，本實驗使用之一級抗體：anti-Tau antibody (predicted target size: 55 kDa, GTX112981, GeneTex)、anti-p-Tau (predicted target size: 55 kDa, phospho Ser199/Ser202 antibody, GTX24864, GeneTex)、anti-beta amyloid 1-42 antibody [mOC64] (predicted target size: 37 kDa, ab201060, abcam)、anti-LC3B(predicted target size: 14, 16 kDa, LC2B (D11) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb, #3868, Cell signaling TECHNOLOGY)、anti Iba-1(predicted target size: 17kDa, GTX100042, GeneTex)皆以 1:1000 稀釋配置於 TBST 中；anti-beta Actin antibody(predicted target size: 42 kDa, GTX629630, GeneTex) 以 1:10000 稀釋配置於 TBST 中。

待隔日再從冰箱中取出，以 TBST 同樣漂洗 3 次、1 次為 5 分鐘，再浸入二



級抗體於室溫下均勻搖晃 80 分鐘。本實驗使用之二級抗體為 rabbit IgG antibody (HRP)(GTX213110-01, GeneTex) 及 mouse IgG antibody (HRP)(GTX213111-01, GeneTex)以 1:10000 稀釋配置於 TBST 中，再以 TBST 漂洗 3 次、1 次為 5 分鐘，完成抗體-抗原複合物。接著使用蛋白質呈色試劑(electrochemiluminescence, ECL) (T-pro ECL kit)，將 PVDF 膜泡在 ECL 中數秒來進行呈色發光，最後使用冷光螢光影像分析系統(UVP BioSpectrum 810 Imaging System)來進行造影分析。

除 Iba-1 能夠直接於同一張 PVDF 膜上同時呈現肌動蛋白( $\beta$ -actin)外，其餘指標需要再進行接續步驟來獲得  $\beta$ -actin。首先，將造影分析後之 PVDF 膜以 TBST 漂洗 3 次、1 次為 5 分鐘，再浸入抗體去除試劑(rapidstrip western blot stripping buffer)於室溫下搖晃 10-20 分鐘。接下來步驟如上述之轉漬後步驟，不同之處為將一級抗體與 PVDF 膜於室溫下均勻搖晃 90 分鐘，使用以 1:10000 稀釋且配置於 TBST 中  $\beta$ -actin 之一級抗體，接著再換上以 1:10000 稀釋且配置於 TBST 中之二級抗體 mouse IgG antibody (HRP)(GTX213111-01, GeneTex)，最後以 ECL 來進行發光並使用 UVP 進行造影分析。



### 3.7.4 後續分析-半定量分析

造影分析後，需要將所獲得之圖檔進行半定量(semi-quantitation)分析，其所使用軟體為 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)。利用此軟體框選所需要之目標區域，並得出其亮度光強度曲線圖再以內建之直線工具 (straight) 分隔各波峰再據此得出該區域之光密度值。此光密度值即與目標蛋白質濃度呈現正相關。而數據呈現方式將下述方式表示之：t-Tau 蛋白表現量(t-Tau protein/ $\beta$ -actin)、p-Tau 蛋白表現量(p-Tau protein/ $\beta$ -actin)、 $A\beta_{42}$  蛋白表現量( $A\beta_{42}$  protein/ $\beta$ -actin)、LC3B (LC3B-II/ LC3B-I)、Iba-1(Iba-1 protein/ $\beta$ -actin)以及 p-Tau 蛋白相對 p-Tau 蛋白表現量(p-Tau/t-Tau)來表示之。

### 3.8. 組織病理

莫氏水迷津結束後取得控制組及暴露組各 5 隻的腦、心、肺進行病理切片，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。

### 3.9. 統計方法

本研究使用 SAS 9.4 版統計軟體進行數據分析，因樣本數較少，因此使用無母數統計檢定進行統計分析，以威爾卡森等級和檢定(wilcoxon rank sum test)比較控制組與暴露組之間差異，數據以平均數與標準誤(mean  $\pm$  Standard error)來表示，顯著水準設在 0.05。

## 第四章 結果



### 4.1. 實驗動物體重及死亡情形描述

本研究暴露期間實驗動物之體重如圖 6 所示，分別就平均體重及中位數體重做描述。暴露前小鼠控制組之平均體重約為 25.47 g，暴露組則約為 25.53g，之後兩組於於一開始暴露時有下降之趨勢之後則呈現相對較穩定成長。暴露結束時，控制組之平均體重約為 27.55g，暴露組則約為 27.84g。


本研究原本預計有 36 隻小鼠(暴露組與控制組各 18 隻)進行研究，然於暴露大氣微粒期間共有 4 隻小鼠死亡。控制組於暴露開始第 68 天死亡 1 隻，其餘 3 隻皆為暴露組且分別於暴露開始第 11、45、88 天死亡。控制組之死亡率為 6%暴露組則為 20%。剩餘 32 隻存活小鼠，23 隻( $N_{\text{暴露}}=11$ ； $N_{\text{控制}}=12$ )供本研究後續分析，9 隻供本實驗室其餘研究使用。

### 4.2. 微粒濃度與元素組成

#### 4.2.1 暴露期間微粒濃度

本研究將 3xTg-AD 母鼠暴露於非濃縮大氣微粒 3 個月，因小鼠出生日期不同之緣故。需先等待各自成長至 6 個月大後，再分為兩組以不同時間(第一組：2018/10/01~2018/12/31；第二組：2019/12/03~2019/03/03)進行暴露。待小鼠於 TAPES 暴露三個月後，經過台灣大學動物中心檢疫完成即帶入進行 5 天的 MWM 及 3 天的 rotarod，共計 8 天的行為實驗。

暴露微粒濃度以手動濾紙採樣後，並以微量天平進行採樣後秤重。經過計算後，第一組暴露之  $PM_{2.5}$  平均質量濃度為  $11.15\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，濃度範圍為  $6.14\mu\text{g}/\text{m}^3$  至  $17.39\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。其中 2018/12/13 氣膠監測儀發生故障，進行檢修後於 2018/12/26 送回開始



採樣。故此期間暴露之PM<sub>2.5</sub>濃度以推估方式進行。推估過程如下：(1) 將2018/12/13前氣膠監測儀所紀錄之即時PM<sub>2.5</sub>質量濃度讀值與三座距離台灣大學公共衛生學院較近之測站做迴歸分析。此三座測站為中山、古亭、萬華測站，三者分別距公衛大樓2.35、2.37、1.42公里。由此三者以迴歸係數選出與本研究採樣地點採樣數據最相關之測站。經過測量分析後，最佳測站為古亭測站( $y=0.5757x-1.8035$ ， $R^2=0.5021$ )。(2)紀錄2018/12/13至2018/12/26之古亭測站所測得之PM<sub>2.5</sub>平均質量濃度( $28.42\mu\text{g}/\text{m}^3$ )，將其帶入上述迴歸式中得出推估之濾紙濃度( $14.56\mu\text{g}/\text{m}^3$ )。而第二組暴露之平均質量濃度PM<sub>2.5</sub>為 $11.60\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，濃度範圍為 $6.14\mu\text{g}/\text{m}^3$ 至 $17.49\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。詳細濃度資料如表4、5所示。





#### 4.2.2 暴露期間微粒之元素組成

本研究委託中央研究院利用 ICP-MS 做重金屬含量分析。同時，分別利用 IC 及 ICP-MS 分析可溶性的離子及可溶性重金屬之含量。上述微粒組成結果如表 6、7、8 以及圖 7 所示。

首先是水溶性離子之分析結果，硫酸根離子的平均質量濃度為 4672.019( $\text{ng}/\text{m}^3$ )，約佔  $\text{PM}_{2.5}$  中水溶性離子含量之 65.99%。另外，銨根離子及硝酸根離子之平均質量濃度分別為 1531.560、558.619( $\text{ng}/\text{m}^3$ )，分別約佔  $\text{PM}_{2.5}$  中水溶性離子含量之 21.63%及 7.89%。總金屬的部分，鈣(Ca)之平均質量濃度為 282.851( $\text{ng}/\text{m}^3$ )，約佔  $\text{PM}_{2.5}$  中總金屬含量之 32.13%。另外，鈉(Na)以及鉀(K)之平均質量濃度分別為 165.765、159.536( $\text{ng}/\text{m}^3$ )，分別約佔  $\text{PM}_{2.5}$  中總金屬含量之 18.83%及 18.12%。除總金屬含量外，本研究更深入分析水溶性金屬之含量以期探討成分與 PM 毒性之相關。分析結果指出，鉀(K)之平均質量濃度為 124.303( $\text{ng}/\text{m}^3$ )，約佔  $\text{PM}_{2.5}$  中水溶性金屬含量之 34.93%。另外，鈉(Na)以及鈣(Ca)之平均質量濃度分別為 107.827、31.321( $\text{ng}/\text{m}^3$ )，分別約佔  $\text{PM}_{2.5}$  中水溶性金屬含量之 30.30%及 8.80%。



## 4.3. 動物行為實驗

### 4.3.1 莫氏水迷津

在暴露三個月後，實驗動物將進行為期五天的 MWM，莫氏水迷津知識採集階段(第一至四天)結果如圖 8 所示，在逃避潛伏期(escape latency)的時間(Day 1:  $p=0.5972$  ; Day 2:  $p=0.3213$  ; Day 3:  $p=0.1984$  ; Day 4:  $p=0.4887$ )或是移動距離(distance moved)方面(Day 1:  $p=0.2766$  ; Day 2:  $p=0.2485$  ; Day 3:  $p=0.7169$  ; Day 4:  $p=0.2485$ )在暴露組與控制組之間皆無顯著差異；空間探索實驗(第五天)的結果如圖 9 所示，在目標平台象限時間 ( $p=0.0272$ )在暴露組與控制組之間呈現顯著差異。然而在目標平台象限次數( $p=0.0914$ )和游泳速度( $p=0.6209$ )則在兩組間皆無顯著差異，詳細結果如表 9、10 所示。

另外在莫氏水迷津知識採集階段結果如圖 8 所示，不管是控制組還是暴露組的逃避潛伏期時間皆有隨著天數增加而有減少(Control group: Day1 vs. Day2:  $p=0.1634$  ; Day 1 vs. Day 3:  $p<0.05$  ; Day 1 vs. Day 4:  $p<0.05$ ; Exposure group: Day1 vs. Day2:  $p=0.1077$  ; Day 1 vs. Day 3:  $p<0.05$  ; Day 1 vs. Day 4:  $p<0.05$ )，控制組及暴露組皆在第 3 天、及第 4 天達到統計顯著，並且由圖可知兩組皆有著一條合理的學習曲線，詳細結果如表 11 所示。

### 4.3.2 滾輪式跑步機試驗

行為實驗除 MWM 外，滾輪式跑步機試驗亦於暴露完成後進行，共為期三天。將以掉落時滾輪轉速(speed at fall) 及掉落時間(latency to fall) 來做表示，結果如圖 10。在適應期間、第一天及第三天，兩組於此兩數據皆無顯著差異。然而於第二天時，掉落時滾輪轉速( $p=0.03181$ ) 及掉落時間( $p=0.0350$ )皆有顯著差異。詳細結果如表 12 所示。



## 4.4. 暴露微粒後腦部 MDA

本研究以脂質過氧化指標 MDA 來探討暴露大氣微粒三個月後對不同腦區的氧化壓力損傷之影響，測定的腦區包括嗅球、小腦、海馬迴以及皮質。

### 4.4.1 基質效應之評估

本研究以 LC-MS/MS 進行 MDA 定量，在基質效應之影響結果如表 13 所示，標準品之檢量線與標準品添加法之檢量線兩者之  $R^2$  皆大於 0.995，比較兩者之斜率可以得到基質效應為-4.83%，當基質效應小於 $\pm 15\%$ 時，代表其結果無明顯之基質效應且可降低分析時的基質干擾，因此本研究以標準品之檢量線來計算各腦區之 MDA 含量。

### 4.4.2 各腦區之 MDA 濃度

MDA-DNPH 之層析圖(chromatogram)如圖 11 所示，而滯留時間(retention time)為 10.07 分鐘，MDA 在各腦區的濃度如圖 12、13 所示。暴露三個月後之嗅球( $p < 0.05$ )及海馬迴( $p < 0.05$ )呈現顯著差異，嗅球暴露組平均濃度相比控制組約高出 9 倍，海馬迴暴露組平均濃度相比控制組則約高出 2.1 倍。然而在小腦及皮質則於暴露組與控制組之間皆無統計上顯著差異，但可由圖中觀察出暴露組之濃度皆高於控制組。小腦暴露組平均濃度相比控制組約高出 8.2 倍，皮質暴露組平均濃度相比控制組則約高出 2 倍。詳細各腦區的濃度如表 14 所示。



## 4.5. 腦部阿茲海默症病徵相關蛋白表現

本研究欲討論暴露大氣微粒三個月對不同腦區的 t-Tau、p-Tau、 $A\beta_{1-42}$ 、LC3B、Iba-1 表現量之影響，測定的腦區包括嗅球、小腦、海馬迴及皮質。

### 4.5.1 各腦區 t-Tau 蛋白表現量

各腦區之 t-Tau 蛋白表現量如圖 14、15、16、17 所示；暴露三個月於嗅球 ( $p=0.6171$ )、小腦 ( $p=0.7210$ )、海馬迴 ( $p=0.8303$ ) 及皮質 ( $p=0.5203$ ) 在暴露組與控制組之間皆無顯著差異。然而可以發現相較其他腦區而言，嗅球有明顯的上升趨勢，暴露組的平均表現量約比控制組高出 2 倍。詳細各腦區之 t-Tau 蛋白表現量如表 15 所示。

### 4.5.2 各腦區 p-Tau 蛋白表現量

各腦區之 p-Tau 蛋白表現量如圖 18、19、20、21 所示；暴露三個月的嗅球 ( $p=0.0383$ ) 在暴露組與控制組之間有顯著差異，且暴露組平均表現量約比控制組高出 1.98 倍。而小腦 ( $p=0.0538$ )、海馬迴 ( $p=0.9431$ ) 及皮質 ( $p=0.3531$ ) 在暴露組與控制組之間皆無顯著差異。詳細各腦區之 p-Tau 蛋白表現量如表 16 所示。

### 4.5.3 各腦區 p-Tau 蛋白與 t-Tau 蛋白表現量比值

暴露三個月的嗅球 ( $p=0.1747$ )、小腦 ( $p=0.2840$ )、海馬迴 ( $p=0.6171$ ) 及皮質 ( $p=0.3531$ ) 在暴露組與控制組之間皆無顯著差異，但可以發現暴露組之比值相比控制組皆來的較高。詳細各腦區之 p-Tau 蛋白與 t-Tau 蛋白表現量比值如表 17 所示。



#### 4.5.4 各腦區 $A\beta_{1-42}$ (oligomer) 蛋白表現量

各腦區之  $A\beta_{42}$  (oligomer) 蛋白表現量如圖 22、23、24、25 所示；暴露三個月之海馬迴( $p=0.0268$ ) 在暴露組與控制組之間有顯著差異，然而控制組相比暴露組有較高的趨勢。而小腦( $p=0.8303$ )、嗅球( $p=0.3531$ )及皮質( $p=0.0538$ )在暴露組與控制組之間皆無顯著差異。詳細各腦區之  $A\beta_{42}$  (oligomer) 蛋白表現量如表 18 所示。

#### 4.5.5 各腦區 LC3B 蛋白表現量

各腦區之 LC3B 蛋白表現量如圖 26、27、28、29 所示；暴露三個月之小腦( $p=0.0538$ )、嗅球( $p=0.1747$ )、海馬迴( $p=0.9431$ )及皮質( $p=0.9431$ )在暴露組與控制組之間皆無顯著差異。然而可以由數據發現，在四個腦區中除海馬迴外暴露組之平均表現量皆比控制組來的高。詳細各腦區之 LC3B 蛋白表現量如表 19 所示。

#### 4.5.6 各腦區 Iba-1 蛋白表現量

各腦區之 Iba-1 蛋白表現量如圖 30、31、32、33 所示；暴露三個月之皮質( $p=0.0184$ )在暴露組與控制組之間有顯著差異，然而控制組相比暴露組有較高的趨勢。而小腦( $p=0.6171$ )、海馬迴( $p=1$ )及嗅球( $p=0.8303$ )在暴露組與控制組之間皆無顯著差異。詳細各腦區之 Iba-1 蛋白表現量如表 20 所示。

## 4.6. 組織病理切片

腦部的病理切片分為海馬迴、小腦、大腦皮質等腦區進行觀察病理變化，切片結果顯示暴露 3 個月的控制組與暴露組在各腦區皆無明顯的病理變化，結果如圖 34、35、36、37、38。病理切片根據影響範圍以及嚴重性分為五級進行評估 (Shackelford et al., 2002)，肺部的病理切片結果顯示暴露三個月的暴露組其中有一隻有非特異性的發炎情形，詳細結果如圖 39 所示。



## 第五章 討論

本研究使用 6 個月大之 3xTg-AD 母鼠並以 TAPES 進行 3 個月的全身性連續呼吸暴露。在暴露結束後進行 MWM 及 rotarod，待為期八天的行為實驗結束後再於 24 小時後進行犧牲。除了取出腦組織並進行後續蛋白質及氧化壓力分析外，同時以灌流的方式固定組織藉以取出肺部及腦部進行病理切片及染色分析。MWM 結果顯示：在知識採集階段實驗在控制組和暴露組之間於皆無顯著差異，而在空間探索實驗的部分在指標目標停留平臺象限時間(time spent in platform quadrant)於兩組中有差異( $p<0.05$ )，暴露組停留時間高於控制組。其餘指標則皆無顯著差異；rotarod 部分則顯示：在第二天試驗時，掉落時轉速(speed at fall) ( $p<0.05$ )及掉落時間(latency to fall) ( $p<0.050$ )於控制組皆顯著低於暴露組。氧化壓力指標結果顯示：MDA 於嗅球( $p<0.05$ )及海馬迴( $p<0.05$ )在暴露 3 個月後有顯著的上升，其餘腦區皆有上升趨勢然而沒有統計顯著；在阿茲海默症相關蛋白質指標方面：Tau 及 LC3B 蛋白的部分，在四個腦區皆無顯著差異。p-Tau 蛋白的部分在嗅球暴露組顯著高於控制組( $p<0.05$ )。A $\beta$ <sub>42</sub> 蛋白部分，在海馬迴暴露組顯著低於控制組( $p<0.05$ )。Iba-1 蛋白部分，在皮質暴露組顯著低於控制組( $p<0.05$ )。




## 5.1. 全身性呼吸暴露

毒理學領域中，以呼吸方式暴露微粒或其他觀察物質時，採用之暴露方法可以暴露時間長短概略分為急性及慢性暴露。在暴露微粒之研究中，氣管灌注及口咽吸入為急性暴露兩種常見的方式，而慢性暴露則以使用全身性微粒暴露系統或是局部性鼻腔暴露為經常使用之方式。氣管灌注是指先將微粒溶於溶液中形成懸浮溶液後，再使用針筒將針經由嘴部插入麻醉後之實驗動物氣管。而口咽吸入亦是先製備懸浮溶液，並將實驗動物麻醉，迫使其僅能使用口部來進行肺部換氣。於實驗動物開口換氣時將舌頭以鑷子固定防止吞嚥反射，並在此時使用微量吸管將溶液緊貼舌根注入咽喉部。上述這兩種急性方法之優點為微粒之濃度以及注入之劑量相對較好掌握及固定。然而，無法得知長期暴露的結果並類比實際人體暴露情況。

而在長期暴露之方法中，較多研究使用濃縮微粒暴露系統。此法是將外界抽取進來之微粒，透過過飽和等機制將微粒由原本之低濃度濃縮為目標濃度，再將其排至暴露腔中使實驗動物吸入。雖然此法能夠提供短時間高濃度之暴露情形，然而於人類生活中多數是長時間低濃度之暴露情況。使用濃縮微粒暴露系統並無法符合現今暴露實態，故本研究所選擇之暴露方式為直接抽取於真實外界之大氣懸浮微粒。而暴露方式又可以依據暴露部位分為全身性及局部性鼻腔方式，全身性暴露較符合人體暴露實況並且相對鼻腔暴露比較不會限制動物活動並免於干擾。鼻腔暴露的方式需將實驗動物固定在暴露腔中，僅露出鼻腔來暴露微粒，相對全身性暴露會使實驗動物產生較大的壓力。

本研究以 TAPES 作為暴露系統，過去研究曾使用此系統亞慢性暴露大氣微粒共 16 週，探討對第一型糖尿病大鼠模式的影響。經測量後發現，平均微粒濃度為  $13.30 \pm 8.65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，研究結果發現微粒暴露後，可能透過慢性高血糖症(chronic





hyperglycemia)與全身性發炎反應，進而誘導第一型糖尿病大鼠產生血管併發症(vascular complication)，在病理結果發現微粒暴露後產生心肌炎(myocarditis)、主動脈厚度增加以及腎臟損傷(Yan, C et al. 2014)。同樣，有研究使用 8 周大的自發性高血壓大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)並使其以 TAPES 進行 3 個月與 6 個月的全身性呼吸暴露，欲探討此動物模式亞慢性暴露大氣懸浮微粒後，氧化壓力指標和阿茲海默症病徵在腦中的變化。大鼠暴露前 3 個月 PM<sub>2.5</sub> 之平均質量濃度為 8.6 μg/m<sup>3</sup>，暴露後 3 個月 PM<sub>2.5</sub> 之平均質量濃度為 10.8 μg/m<sup>3</sup>。研究結果顯示亞慢性呼吸暴露大氣懸浮微粒會誘導腦中的氧化壓力上升與 Tau 蛋白增加，然而三個月大氣懸浮微粒暴露並未對 SHR 的空間學習及記憶功能造成影響。

另外，本實驗室先前亦利用此系統對 17 週大之 3xTg-AD 小鼠進行為期 12 週之暴露，並藉以探討微粒暴露對阿茲海默症病程影響之先驅研究。此研究之平均微粒濃度為 7.6 μg/m<sup>3</sup>，研究結果顯示磷酸化 Tau 蛋白於一隻暴露組小鼠之大腦皮質偵測到訊號(Chuang 2017)。因此本研究欲使用此暴露系統，並以年齡較老之 3xTg-AD 母鼠更進一步了解微粒暴露對中樞神經的影響。




## 5.2. PM<sub>2.5</sub> 濃度及特性

本研究之微粒平均質量濃度第一組(2018.10.01~2018.12.31)為 11.15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，而第二組(2019.12.03~2018.03.03)微粒濃度為 11.60  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。先前有研究結果指出 TAPES 內之 PM<sub>2.5</sub> 濃度較同樓層室外濃度低 21%(Yan, C et al. 2014)，本研究於暴露起始前亦以氣膠監測儀測量國立臺灣大學公共衛生學院大樓外之 PM<sub>2.5</sub> 濃度，結果顯示 TAPES 內 PM<sub>2.5</sub> 濃度較九樓室外平均約低 19%，此結果與先前研究是相似的。故可以表示當微粒經過管路運輸至暴露腔體內時，約有 19% 之損失。

另外本研究暴露之濃度是低於中華民國行政院環境保護署所制定空氣品質標準規範之 15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  以及低於美國國家環境空氣品質標準(National Ambient Air Quality Standards)規範之 12  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，另外和世界衛生組織(World Health Organization, WHO)之空氣品質準則規範之 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  接近的。由此可以證明本研究屬於低劑量呼吸暴露研究，透過長時間低濃度暴露來探討對中樞神經的影響。

根據成分分析結果顯示，在水溶性離子組成以硫酸根離子( $\text{SO}_4^{2-}$ )、銨根離子( $\text{NH}_4^+$ )及硝酸根離子( $\text{NO}_3^-$ )為主。在城市以及工業化程度高的大氣中，懸浮微粒大部分是無機成分。根據研究指出，PM<sub>2.5</sub> 主要的水溶性離子成分為  $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NH}_4^+$  及  $\text{NO}_3^-$  約佔 PM<sub>2.5</sub> 的 20-45%(Malm, Sisler et al. 1994, Chan, Simpson et al. 1997, Turnbull and Harrison 2000)。硫酸鹽(sulfate)、硝酸鹽(nitrate)和銨鹽(ammonium)是大氣中二次粒子最常見的成分，這些顆粒在大氣中分別由二氧化硫( $\text{SO}_2$ )，氮氧化物( $\text{NO}_x$ )和氨( $\text{NH}_3$ )氣體的直接排放形成。根據研究，這三種水溶性離子主要來自煤炭燃燒及交通廢氣(Sun, Zhuang et al. 2004)。

總金屬以及水溶性金屬皆以以鈣(calcium, Ca)、鈉(sodium, Na)以及鉀(potassium, K)為主。研究指出，汽油操作車輛以及發動機油所排放的成分硼、Ca、



鈦、鉻、錳、鐵、鈷、鎳、銅、鋅、鎘、鋇和鉛等元素為主(Ristovski, Agranovski et al. 1999)。而交通是 PM 的主要來源，例如製動器和輪胎等車輛部件的磨損以及道路揚塵的懸浮(De Kok, Driecce et al. 2006)。來自殼材料因路面磨損而來的通常富含含有矽(Si)、鋁(Al)、鉀(K)、鈉(Na)和鈣(Ca)(Lindbom, Gustafsson et al. 2006)，而制動和輪胎磨損顆粒可能含有金屬，如銅(Cu)、銻(Sb)、鉛(Pb)、鎘(Cd)和鋅(Zn)(Hjortenkrans, Bergbäck et al. 2006)。




### 5.3. 微粒對空間學習及記憶能力之影響

本研究使用 MWM 探討非濃縮大氣微粒對空間學習與記憶功能的影響，MWM 是廣泛的應用於評估動物空間學習及記憶功能，本實驗結果顯示 6 個月大之 3xTg-AD 母鼠暴露大氣微粒三個月後，在知識採集階段控制組和暴露組之間於逃脫潛伏期、游泳速度、及移動距離並無顯著差異。在空間探索實驗結果顯示兩組間於目標平台象限時間有顯著差異( $p < 0.05$ )，而目標平台象限次數、游泳速度則無顯著差異。

過去本實驗室曾利用 17 週大之 3xTg-AD 母鼠進行為期 12 週之全身性呼吸暴露，暴露結束後 MWM 結果顯示兩組於知識採集階段及間探索實驗中之所有參數皆沒有顯著差異。同時，本實驗另有研究使用 8 周大的之 SHR 並使其以 TAPES 進行 3 個月全身性呼吸暴露，MWM 結果顯示在逃避潛伏期的時間或是移動距離於暴露組與控制組之間皆無顯著差異；空間探索實驗則在目標平台象限時間、目標平台象限次數、及游泳速度在暴露組與控制組之間皆無顯著差異。

呼吸暴露濃縮大氣微粒的研究有些使用巴恩斯迷宮作為評估學習及記憶能力的行為實驗，研究結果指出在知識採集階段時逃避潛伏期時間增加且進入錯誤洞口之次數增加，另外空間探索實驗時第一次進入目標洞口的逃避潛伏期時間增加且進入正確目標的次數下降(Fonken, Xu et al. 2011)，在 Fonken 等人的研究是使用 C57BL/6 小鼠暴露於濃縮微粒，平均質量濃度為  $16.85 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，暴露時間為一天暴露 6 小時、一週 5 天共暴露 10 個月，此外，在呼吸暴露於柴油引擎廢氣的研究，在 MWM 結果指出知識採集階段時逃避潛伏期的時間在高劑量組顯著增加，但是在空間探索實驗時並沒有顯著差異(Win-Shwe, Yamamoto et al. 2012)，在 Win-Shwe 等人的研究是暴露於富含奈米微粒的柴油引擎廢氣(nanoparticle-rich diesel exhaust, NRDE)，而暴露濃度為  $122.08 \mu\text{g}/\text{m}^3$  且微粒粒徑為 25.52 nm 共暴露三個月，先前



研究皆發現微粒暴露會影響空間學習的結果，甚至發現暴露時間較長會影響記憶能力損傷。然本研究是使用暴露於非濃縮大氣微粒三個月，平均質量濃度約為  $11 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，而先前各項研究所暴露之微粒總量比本研究高，因此暴露微粒的濃度、總量、時間以及粒徑大小皆會是造成動物空間學習記憶損傷產生差異的原因。且行為實驗干擾因子較多，且比較容易受到個體差異之影響。

本研究結果說明以平均質量濃度為  $11.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  及  $11.60 \mu\text{g}/\text{m}^3$  之大氣細懸浮微粒暴露三個月可能無法導致 3xTg-AD 母鼠有明顯之空間學習及記憶功能損傷。




## 5.4. 微粒對運動能力之影響

本研究使用 rotarod 來評估暴露微粒對運動能力或肌力的影響，實驗結果顯示 6 個月大之 3xTg-AD 母鼠暴露大氣微粒三個月後，掉落時滾輪轉速及掉落時間除了第二天外都沒有統計上面的顯著效應，並且在第二天則是呈現暴露組較高的情況。

之前利用 AD 患者的初級運動皮層的神經病理學分析，發現在疾病發生的晚期出現運動功能障礙(Suva, Favre et al. 1999)。然而近年來，有越來越多的證據表明運動障礙可能也是 AD 早期病理學的一個特徵。在一項探討 AD 過程中運動症狀變化(motor signs, MOSIs)的研究發現，13%的患者在第一次檢查時至少有一個 MOSI，在最後一次檢查中進展到 36%的患者。這些運動症狀包括言語、面部表情僵硬、運動遲緩和震顫，然而這些症狀卻在疾病後期的頻率降低(Scarmeas, Hadjigeorgiou et al. 2004)。

關於上述的爭論目前還沒有確切的答案，因此許多探討 AD 的研究會利用實驗動物並以行為實驗來觀察運動能力與 AD 的相關性。有許多研究指出 AD 基因轉殖小鼠及野生型態小鼠具有運動能力上的差異，然後目前的研究結果並沒有一致的定論。在 APP<sub>751</sub> / PS1<sub>K1</sub>(雙轉殖基因)和 5xFAD 小鼠模型中，發現其運動表現能力隨著年齡增加而漸差，可能歸因於 A $\beta$  沉積物增加引起的軸突病變(Wittnam, Portelius et al. 2012)。但是另外一篇研究顯示，相比控制組 Tau<sub>JNPL3</sub> 小鼠模型在 rotarod、平行木試驗(balance beam)及衣架試驗(coat hanger tests)等運動能力評估測試中都有比較好的表現，他們因此推論可能是由於 Tau 蛋白的原因(Morgan, Munireddy et al. 2008)。而在 3xTg-AD 研究中，發現此基因型小鼠比對照組在 rotarod 試驗中有更好的表現，同時在 MWM 的泳速也相比控制組更快



(Filali, Lalonde et al. 2012, Stover 2019)。有研究利用 rotarod 來探討在不同年齡 (2、6、9、12 和 15 個月) 以及不同性別的 3xTg-AD 上運動能力和運動學習的變化，研究結果發現除了 2 個月大之外的所有年齡相比控制組而言轉基因小鼠運動能力表現的更好並且具有比對照更陡峭的運動學習曲線，而雄性小鼠的運動能力則比雌性小鼠來的好(Oore, Fraser et al. 2013)。

由上述研究可以知道，3xTg-AD 模型的運動能力相比一般野生型小鼠可能較好，因此本研究給予的微粒刺激不足無法觀察到兩組在運動能力有顯著的差別。



## 5.5. 微粒對 MDA 之影響

本研究使用 MDA 作為評估腦中因暴露大氣微粒所誘發氧化壓力之指標。因腦部是一個高耗氧並含有豐富的多不飽和脂肪酸的器官，然而相較於體內其他器官而言抗氧化酶卻相對不足。有研究指出，因為有研究指出隨著自由基產生增加，腦中多不飽和脂肪酸含量逐漸下降(Soderberg, Edlund et al. 1991)，因此多不飽和脂肪酸容易受到自由基攻擊而產生 MDA，進而誘導 Tau 蛋白過度磷酸化、乙型類澱粉蛋白沈積、線粒體功能障礙以及自噬功能障礙，最終引發阿茲海默症(Liu, Li et al. 2015)，因此中樞神經系統的氧化壓力增加被指出在神經退化性疾病之病程中扮演著重要的角色。

本研究在暴露大氣微粒 3 月後，測定不同腦區的脂質過氧化指標 MDA 的濃度，測定的腦區包括嗅球、小腦、海馬迴以及皮質，研究結果顯示暴露三個月後 MDA 在海馬迴以及嗅球有統計上顯著的差異( $p < 0.05$ )。其餘腦區有明顯的上升趨勢，然而並未到達統計上的顯著差異。

過去研究以 SD 大鼠暴露濃縮微粒，研究結果發現在微粒暴露後 HO-1 在嗅球、海馬迴和皮質中顯著上升，並提出微粒通過呼吸道後，吸附在微粒上的成分，包括金屬和礦物質，這些成分可以透過嗅神經直接影響嗅球和海馬迴，再透過跨神經傳導進入皮質，進而引起發炎反應和氧化壓力(Guerra, Vera-Aguilar et al. 2013)。另外，Cole 等人的研究以呼吸暴露於濃度 250-300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  的柴油引擎廢氣暴露 6 小時，研究結果顯示 MDA 和促發炎細胞激素在嗅球和海馬迴顯著上升(Cole, Coburn et al. 2016)。

上述結果皆能夠與本研究結果相互呼應。本研究結果顯示暴露 3 個月後，MDA 在各腦區皆有增加的趨勢並且在嗅球和海馬迴具有統計上顯著，因此本研究顯示經



過 3 個月大氣微粒暴露，嗅球、海馬迴相比其他腦區更容易受到氧化壓力攻擊的腦區。

目前大部分研究在測量脂質過氧化指標 MDA 時，最常使用的測量方式為硫代巴比妥酸反應測試(2-thiobarbituric acid reacting substances test, TBARS assay)，此種方法為分光光度測定法(Spectrophotometric assay)，MDA 加入硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)作用產生 MDA-TBA 的加合物，此方法雖然簡單且再現性高，但是不具有專一性，TBA 會與其它含有羰基化合物反應，先前有研究發現在 TBA 會與非脂質相關類似丙二醛的物質結合，進而導致高估脂質過氧化程度(Ceconi, Cargnoni et al. 1991)。為了克服高估脂質過氧化程度，因此有研究開發出使用高效液相色譜法(high performance liquid chromatography, HPLC)來測量血液和組織中 MDA 的方法(Young and Trimble 1991, Tukozkan, Erdamar et al. 2006)。由於 TBA 不僅與 MDA 反應，也還與許多其他化合物反應，因此有研究發現使用 DNPH 與 MDA 進行衍生反應，其衍生物在 HPLC 的分析中可以更準確被估計(Cordis, Das et al. 1998)。

先前研究比較 TBA 與 DNPH 兩種方法之間的差異，結果發現使用 TBA 所偵測出來的濃度顯著高於使用 DNPH 所偵測出來的濃度(Tukozkan, Erdamar et al. 2006)，在 Ceconi 等人的研究也發現相同結果，結果指出使用 TBA 所偵測出來的心臟中 MDA 濃度也是高於使用 DNPH 所偵測出來的濃度(Ceconi, Cargnoni et al. 1991)，此外在 Pilz 等人的研究也發現兩種方法之間 MDA 濃度有 100 倍的差異(Pilz, Meineke et al. 2000)，會有這樣的差異可能由於 TBA 與 MDA 結合時缺乏特異性或 TBA 會和結構類似 MDA 物質結合，因此本實驗使用 HPLC-MS/MS 來分析 DNPH 與 MDA 的衍生物 MDA-DNPH。



## 5.6. 微粒對總 Tau 蛋白之影響

Tau 蛋白是一種微管相關蛋白，能夠在大腦中調控微管蛋白(tubulin)組成微管(Weingarten, Lockwood et al. 1975)，在正常情況下，Tau 蛋白的功能為穩定微管、調控軸突延伸和穩定軸突，當 Tau 蛋白異常表現時，Tau 蛋白可能與驅動蛋白(Motor protein kinesin)競爭來跟微管結合，進而導致軸突運輸減少(Ebneth, Godemann et al. 1998)，因此 t-Tau 蛋白被視為一個軸突損傷的標記(Hampel, Blennow et al. 2010)。

本研究在暴露大氣微粒 3 個月後，測定不同腦區的 t-Tau 蛋白表現量，測定的腦區包括嗅球、小腦、海馬迴以及皮質，本研究結果顯示暴露三個月 t-Tau 蛋白表現量在嗅球中顯著上升然而並沒有達到統計上顯著差異。另外，其他腦區之 t-Tau 蛋白則沒有明顯變化。但是先前暴露於 7.7 倍濃縮微粒的研究結果發現腦中 t-Tau 蛋白無顯著差異(Bhatt, Puig et al. 2015)，在 Bhatt 等人的研究暴露濃度為  $65.7\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，每天暴露 6 小時，一週暴露 5 天，共暴露 9 個月，另外在以 SD 大鼠呼吸暴露於香菸煙霧的研究結果顯示暴露後 t-Tau 蛋白在海馬迴中也沒有顯著差異(Ho, Yang et al. 2012)。因此，本研究發現嗅球可能是暴露 PM 後較敏感的腦區。




## 5.7. 微粒對阿茲海默症病徵蛋白質之影響

本研究測量之阿茲海默症病徵相關蛋白質有 p-Tau 以及  $A\beta_{42}$ 。研究指出在阿茲海默症腦中所測定 t-Tau 蛋白濃度比控制組高出 4-5 倍(Hu, He et al. 2002)，但是阿茲海默症腦中的 t-Tau 蛋白濃度與其他神經退行性疾病進行比較時，其特異性會下降，使 t-Tau 蛋白無法用來準確區分阿茲海默症與其他神經退行性疾病(Blennow and Hampel 2003)，故本實驗也針對 p-Tau 蛋白進行探討。

許多研究指出 Tau 蛋白過度磷酸化聚集成 PHF，最終形成 NFTs (Verwilst, Kim et al. 2018)。Tau 蛋白中已經被發現多個磷酸化位點，在不同磷酸化位點的磷酸化對其功能及其致病作用具有不同的影響，有研究指出在磷酸化位點 Ser199/Ser202/Thr205、Thr212、Thr231/Ser235、Ser262/Ser356 和 Ser422 的 p-Tau 蛋白會抑制微管相關蛋白正常的聚合(Alonso Adel, Mederlyova et al. 2004)，在磷酸化位點 Thr231、Ser396 和 Ser422 的 p-Tau 蛋白則會促進 p-Tau 蛋白的聚集而形成絲狀物。本研究測定之磷酸化位點位於 Ser199/Ser202 的 p-Tau 蛋白表現量，有研究指出磷酸化位點 Ser199、Ser202 和 Ser409 主要在神經纖維纏結前期被發現(Kimura, Ono et al. 1996)，在 Maurage 等人的研究也指出磷酸化位點 Ser199 是神經纖維纏結的早期磷酸化位點，並認為磷酸化位點 Ser199 可以作為 Tau 蛋白正常磷酸化和病理磷酸化的指標(Maurage, Sergeant et al. 2003)。

本研究結果顯示暴露 3 個月之 p-Tau 蛋白表現量在嗅球中有統計上顯著上升( $p < 0.05$ )。然而有研究指出 Tau 蛋白的起出生成位置是位於內嗅皮質(Entorhinal cortex)隨後再擴散到其他腦區(Hu, Wu et al. 2017)，但本研究卻僅有在嗅球發現 p-Tau 蛋白表現量增加。而造成差異的原因可能為微粒通過呼吸道進入大腦，嗅球是最先接觸微粒的腦區(Calderon-Garciduenas, Azzarelli et al. 2002, Wang, Xiong et al.



2017)，因此許多研究提出嗅球是在微粒暴露後容易產生神經發炎反應的腦區 (Levesque, Surace et al. 2011, Levesque, Taetzsch et al. 2011)。並且有研究提出，嗅球可能是微粒轉移至大腦之重要途徑。而神經發炎反應與誘導 Tau 蛋白過度磷酸化有關(Metcalf and Figueiredo-Pereira 2010)，另外近年也有許多流行病學和動物實驗研究證實在阿茲海默症嗅球中觀察到神經病理學和分子上的改變(Zelaya, Perez-Valderrama et al. 2015, Lachen-Montes, Gonzalez-Morales et al. 2016)，在 Attems 等人的研究提出嗅球組織可以當作阿茲海默症早期診斷組織，因為 A $\beta$  沈積與磷酸 p-Tau 蛋白聚集在嗅球和其他腦區的嚴重程度之間具有相關性(Attems, Walker et al. 2014)，因此本研究結果說明嗅球可能是呼吸暴露大氣微粒最先攻擊的腦區，進而誘導 p-Tau 蛋白表現量增加。

先前研究以 F344 公鼠慢性呼吸暴露於柴油引擎廢氣的研究發現磷酸化位點 Ser199 的 p-Tau 蛋白在皮質增加(Levesque, Surace et al. 2011)，在 Levesque 等人的研究暴露濃度為 991.8  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，暴露時間為 6 個月，本研究結果顯示 p-Tau 蛋白在暴露六個月的四個腦區皆無顯著差異，本研究結果不顯著之原因可能為暴露濃度較低不足以使 p-Tau 蛋白表現量在暴露 3 個月後增加，或本研究所測定 p-Tau 蛋白表現量的磷酸化位點為 Ser199/Ser202，並無發法得知其他磷酸化位點的磷酸化程度，因此未來研究可以測定不同磷酸化的位點進行探討，進而了解氧化壓力對 p-Tau 蛋白的影響。

Tau 蛋白磷酸化是透過 Tau 蛋白激酶和 Tau 蛋白磷酸酶調節，有研究提出 Tau 蛋白激酶和 Tau 蛋白磷酸酶的失調是導致 Tau 蛋白過度磷酸化的重要原因(Hanger, Anderton et al. 2009)，因此先前研究在阿茲海默症腦中發現 Tau 蛋白激酶活性增加和 Tau 蛋白磷酸酶活性降低(Trojanowski and Lee 1995)，除此之外有研究指出自噬作用對 Tau 蛋白的清除有著重要作用，自噬作用的功能受損會導致 Tau 蛋白聚集

而形成 PHF(Hamano, Gendron et al. 2008, Wang and Mandelkow 2012)，甚至有研究指出自噬作用的功能受損會早於或是同時與 Tau 蛋白過度磷酸化發生(Peric and Annaert 2015)。

在  $A\beta_{42}$  部分，根據本研究沒有看出微粒對其生成構成顯著的影響。可能因為本研究所提供的刺激不足以觸發對  $A\beta_{42}$  生成的影響。同時，本研究所關注之  $A\beta_{42}$  是屬於寡聚物(oligomer)。A $\beta$ 可以因為不同的長度、分子量、尺寸被分為低聚物(monomer)、寡聚體、擴散型配體(diffusible ligands)、原纖維(fibril)及斑塊(Plaques)。A $\beta$ 寡聚體稱為 A $\beta$ 的二聚體和六聚體形式。A $\beta$ 衍生的可擴散配體是由寡聚體所構成，其分子量範圍從 17 到 42 kDa。最後經由這些寡聚體不對斷堆疊後形成原纖維，而該型態是在成熟澱粉樣原纖維形成之前出現的暫時性結構。而有研究指出，在形成纖維或斑塊之前 A $\beta$ 的型態會呈現動態的變動(Rangachari, Moore et al. 2007)。因此，僅測量寡聚物可能較難關注到真正微粒對  $A\beta_{42}$  生成的貢獻，後續研究可以嘗試關注微粒對纖維或斑塊型態之影響。



## 5.8. 微粒對微膠細胞活化之影響

微膠細胞存於中樞神經系統中，屬於神經膠細胞的一種。微膠細胞大約佔大腦的 12%，當中樞神經受到損傷或攻擊時會活化並且提供類似於巨噬細胞及淋巴細胞在外周的免疫抵禦釋出促炎因子。本研究透過量測 Iba-1 來探討小鼠受到微粒暴露後，對腦部不同腦區微膠細胞活化的影響。研究結果發現，除了在皮質有顯著差異且控制組高於暴露組外，其他腦區則沒有顯著的差異。

過去有多項研究指出，暴露交通相關空氣污染(traffic-related air pollution, TRAP)會致使微膠細胞活化(Block, Zecca et al. 2007, Block and Calderón-Garcidueñas 2009, Cheng, Saffari et al. 2016)。曾有研究結果顯示，暴露 TRAP 的 C57BL / 6J 小鼠會隨著年齡而增加的大腦皮質微膠細胞的反應性(Mumaw, Levesque et al. 2016)。有研究利用 3 個月及 18 個月的 C57BL / 6J 母鼠暴露奈米級(粒徑小於  $0.2\mu\text{m}$ )的微粒(濃度為  $342\pm 49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )10 個禮拜，結果發現年輕小鼠在海馬迴得 CA1 區域神經突萎縮約 25%、Iba-1 增加 50%、髓鞘鹼性蛋白(myelin basic protein, MBP)減少 50%(Woodward, Pakbin et al. 2017)。同時，也研究將 C57BL / 6 小鼠急性暴露於柴油引擎微粒(diesel exhaust, DE) (濃度  $250\text{-}300\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，持續 6 小時)發現脂質過氧化和促炎細胞因子(IL- $1\alpha$ ，IL- $1\beta$ ，IL-3，IL-6，TNF- $\alpha$ )顯著增加在各種大腦區域(特別是嗅球和海馬迴)。同時，也發現 Iba-1 及易位蛋白(translocator protein, TSPO)表現量的增加兩項指標皆顯示 DE 微粒暴露引起微膠細胞活化(Cole, Coburn et al. 2016)。

因此根據上述研究可以發現，本研究之微粒濃度還無法觸發足夠的刺激致使微膠細胞活化無法從本研究所使用的實驗動物模型顯著的觀察到。另外，除了使用 western blot 量測 Iba-1 的表現量，多項研究也使用免疫組織化學染色法



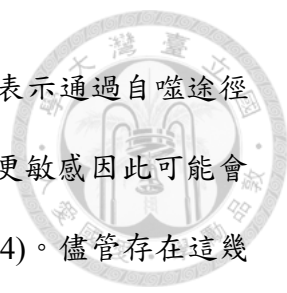
(immunohistochemistry, IHC)作為觀察 Iba-1 的方式。

## 5.9. 微粒對自噬作用之影響

而自噬作用則是細胞組分自我降解的過程。當細胞外或細胞內受到刺激時，自噬作用就會被驅動。而當自噬作用受到損害或是有缺陷時，可能導致癌症、神經性退化疾病和傳染病的發生。本研究透過量測 LC3B 來探討小鼠受到微粒暴露後，對腦部不同腦區自噬作用的影響。研究結果發現，在不同腦區都沒有顯著的差異。我們推論應當是暴露時間以及濃度還不足以致使自噬作用受損。

LC3 是一種可溶性蛋白質，分子量約為 17kDa，普遍存在於哺乳動物組織和培養細胞中。在自噬過程中，自噬體吞噬細胞質成分，包括細胞溶質蛋白和細胞器。同時，細胞溶質形式的 LC3(LC3-I)與磷脂酰乙醇胺綴合形成 LC3-磷脂酰乙醇胺綴合物(LC3-II)，其被聚集到自噬體膜中。自噬體與溶酶體融合形成自溶酶體，並且自噬體內組分被溶酶體水解酶降解。同時，自體溶酶腔中的 LC3-II 降解。因此，自噬體標記物 LC3-II 的溶酶體轉換反映了自噬作用的活性，並且通過免疫印跡或免疫熒光檢測 LC3 已成為測量自噬和自噬相關過程的可靠方法(Tanida, Ueno et al. 2008)。本研究以免疫印跡法 western blot 來量測 LC3B 的表現量，但根據研究這兩者的分子量非常相近因此從組織中提取的這個步驟就非常重要且因 LC3-I 的表現量通常大於 LC3-II 因此在定量上較為困難(Mizushima and Komatsu 2011)，這點也在本研究的實驗過程及結果中發現。

western blot 過程中在 SDS-PAGE 上，LC3-II 比 LC3-I 遷移得更快。因此，LC3 的免疫印跡通常產生兩個條帶：LC3-I(18kDa)和 LC3-II (16kDa)。根據研究發現 LC3-II 或 LC3-II / LC3-I 比例的量與自噬體的數量相關(Kabeya, Mizushima et al. 2000)。但主要需要注意的是由於自噬體是瞬態結構，LC3-II 存在的時間相



對較短。因此，LC3-II 表現量僅能代表當時的自噬活動而不能表示通過自噬途徑的通量的大小。另外，LC3-II 在免疫印跡分析中可能比 LC3-I 更敏感因此可能會有 LC3-II 的數量相對高估的情況(Kabeya, Mizushima et al. 2004)。儘管存在這幾種可能的限制，但通過免疫印跡測量 LC3-II 用於確定哺乳動物細胞的自噬作用活性還是現今簡單且定量的方法。

除了以免疫印跡法量測 LC3 來探討自噬作用外，還可以電子顯微鏡觀察自噬體型態學的變化(Ashford and Porter 1962)。或是利用熒光化合物單丹磺酰屍胺(monodansylcadaverine, MDC)染色來觀察自噬泡的型態變化(Biederbick, Kern et al. 1995)。而在生物指標方面，還可以量測哺乳動物雷帕黴素靶標(mammalian target of rapamycin, mTOR)、Becline-1 及自噬作用接受器自噬受體(autophagy receptor, p62)等自噬相關蛋白才能更完整的探討自噬作用。mTOR 通過自噬機制上游的信號傳導途徑調節自噬(Kim and Guan 2015)，而 Becline-1 和 LC3 調節自噬體形成(Sahni, Merlot et al. 2014, Lee and Lee 2016)，另外 p62 與自噬體的降解有關(Katsuragi, Ichimura et al. 2015)。





## 5.10. 組織病理之影響

本研究腦部病理切片結果顯示暴露3個月的控制組與暴露組之間無明顯的病理變化，而先前使用 TAPES 進行暴露的研究也有相同的結果(Wu 2016, Chuang 2017)。但是在多項呼吸暴露於濃縮微粒之研究提出暴露後在海馬迴中 CA1 和 CA3 區發現構造上的改變，在海馬迴 CA1 區頂樹突棘(Apical dendritic spine)密度降低以及 CA3 區樹突分支減少。這樣的神經元的構造變化應該使用尼氏染色(nissl stain)，而無法單以本研究所使用之 H&E 染色下觀察到。並且若需要更進一步了解  $A\beta$  斑塊沉積之情況，可使用剛果紅染色(congo red stain)。

本研究肺部病理切片結果顯示在3個月控制組與暴露組有些微發炎產生，但是並沒有病理上顯著的差別。與先前使用 TAPES 進行暴露研究有相同的結果(Wu 2016, Chuang 2017)。

根據多項利用濃縮微粒進行呼吸暴露之研究，結果發現暴露組的肺部在 H&E 染色下觀察到嗜中性球和巨噬細胞增加，而控制組沒有觀察到炎症或其他細胞的變化(Saldiva, Clarke et al. 2002)，在 Saldiva 等人所暴露濃縮微粒的平均質量濃度為  $262.21 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，造成結果上差異的原因可能為本研究之暴露濃度相對較低，因此無法在肺部看到明顯的病理結果。



## 5.11. 微粒暴露與嗅球之相關

在阿茲海默症的病程中，有研究提出嗅覺系統失調是早期的指標(Gloor and Guberman 1997)，甚至比認知障礙來的還早。並且發現嗅球可能是主要首先受到外來傷害的腦區。其中主要的原因是嗅覺系統並沒有受到沒有血腦屏障的保護，所以很容易成為外來物入侵的窗口像是微粒以及病毒。因此，目前很多研究認為嗅覺系統可能是診斷和治療應用的一個突破點。同時，本研究之研究結果在暴露大氣微粒組之氧化壓力以及 p-Tau 皆在嗅球相對控制組較高。因此，本節將針對微粒暴露與嗅球做討論。

根據鼻部的解剖構造可以發現，一些外源性的物質非常容易透過顱內神經轉移至大腦，其中嗅神經被認為是穿透性最強的。鼻腔後背區域的嗅上皮(olfactory epithelium)包含原發性嗅覺受體神經元(olfactory receptor neurons, ORN)，他們會將軸突延伸經由篩板進入嗅球(Halász 1990)。並且有研究在 AD 患者的 ORN 中發現過度磷酸化 Tau 的細絲(Tabaton, Cammarata et al. 1991)。除此之外，有研究觀察到在 71% 的 AD 患者中發現嗅上皮有 A $\beta$  的沉積，而在正常病例則為 22%(Arnold, Lee et al. 2010)。除了上述的病理特徵外，在 AD 中亦有型態學上面的改變，載脂蛋白 E(Apolipoprotein E, ApoE)在嗅神經束被發現且具有 ApoE 免疫反應性的 ORN 數量在 AD 中想比對照組高出 3.5 倍(Yamagishi, Takami et al. 1998)。

在本研究中，發現暴露大氣微粒後嗅球氧化壓力有增加的情況。而在其他研究也發現氧化過程的活性增加，例如在 ORN 的 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine)免疫反應性增加，而在對照組僅在血管內皮細胞中發生免疫反應。同時，巨噬細胞浸潤也在 AD 嗅上皮細胞發生氧化壓力增加的情況。同樣

因為氧化壓力所誘導之金屬硫蛋白也在 AD 中有增加的情況(Chuah and Getchell 1999)。

另外，有研究利用元素碳 13 (CMD = 36nm; GSD = 1.66)使大鼠暴露 6 小時，並在暴露 1,3,5 和 7 天取出肺、大腦、小腦和嗅球。之後通過同位素比質譜法測定碳 13 濃度，並與對照(第 0 天)的碳 13 背景值水平比較。在暴露後 7 天，濃度從  $1.39 \mu\text{g/g}$  (第 1 天)降至  $0.59 \mu\text{g/g}$ 。而在嗅球，在第 1 天中添加的碳 13 濃度顯著且持續增加至  $0.35 \mu\text{g/g}$ ，到第 7 天增加至  $0.43 \mu\text{g/g}$ 。因此，此項研究提出 UFP 沈積在嗅粘膜上並沿著嗅神經轉移至嗅球(Oberdorster, Sharp et al. 2004)。

綜合本研究以及上述研究結果，可以發現嗅球是觀察暴露大氣微粒與中樞神經系統毒性重要的角色。



## 5.12. 研究限制以及建議

本研究使用 TAPES 進行 3 個月之全身性呼吸暴露，此系統是直接抽取外界空氣進行暴露，可能由於暴露濃度較低不足以使中樞神經產生嚴重的不良反應，並且微粒進入體內之劑量較不容易掌控，未來若要進一步探討真實大氣微粒對於中樞神經的效應，可能需要延長暴露的時間以增加暴露總劑量或是有較長的反應時間則可能會有更明顯的效果產生。

另外過去研究也指出暴露微粒使腦中氧化壓力上升，進而誘導 A $\beta$  斑塊沈積、線粒體功能障礙以及自噬功能障礙，最終引起阿茲海默症。未來若要進一步了解真實大氣微粒對阿茲海默症的影響，可以再針對上述提及的這些阿茲海默症相關指標進行探討。本研究主要分析 A $\beta$  寡聚體，因此建議未來研究可以斑塊型態為主。同時，本研究於病理方面僅以 H&E 染色做探討，未來可以發展其他染色方法以觀察更多型態學之變化。

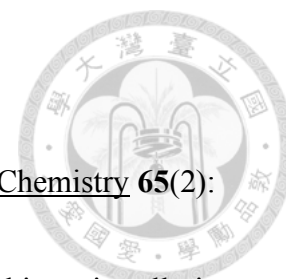
而在本研究中有小鼠的死亡情形發生，因此不能排除存活下來的小鼠是否個體本身對暴露微粒所構成的影響耐受度較高，所以可能存有選樣偏差(selection bias)。除此之外，因本研究使用三基因轉殖阿茲海默症小鼠(3xTg-AD mice)進行暴露，此品系小鼠會隨著年齡發展而形成類澱粉蛋白斑塊和神經纖維纏結，並且行為、認知與阿茲海默症患者相似，而本研究所使用之小鼠屬於中年因此未來研究可以使用年齡較老之小鼠進行暴露可能觀察到較為顯著之變化。

## 第六章 結論

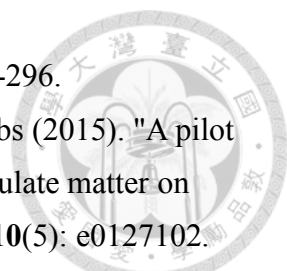
本研究為探討真實環境中大氣懸浮微粒對中樞神經造成的影響，並使 6 個月 3xTg-AD 母鼠以 TAPES 暴露於大氣懸浮微粒 3 個月。研究結果顯示亞慢性低濃度之全身連續性大氣懸浮微粒暴露，會誘導腦中之氧化壓力上升與 p-Tau 蛋白增加。氧化壓力是於海馬迴及嗅球有顯著上升，p-Tau 蛋白則是於嗅球有顯著。因此本研究推論，嗅球可能是微粒運輸至腦中之重要途徑。然而 3 個月之大氣懸浮微粒暴露則並未對 3xTg-AD 母鼠之空間學習、記憶功能以及運動能力構成顯著之影響。

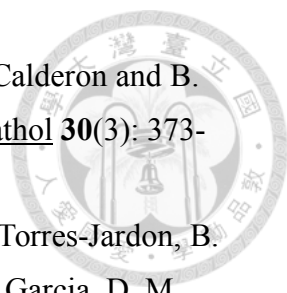
本研究提出呼吸暴露大氣懸浮微粒造成中樞神經產生可能的影響，但本實驗所探討與中樞神經毒性相關的指標仍不足。並且根據上述研究結果建議未來可使用年齡較老小鼠或是延長暴露期間，藉以進一步來釐清大氣懸浮微粒對中樞神經的影響。

## 第七章 參考資料

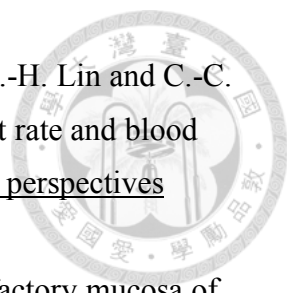


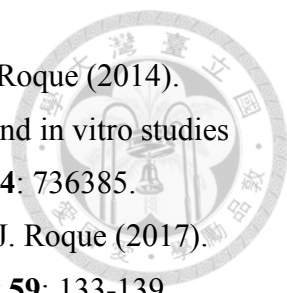
1. 陳家揚 (2007). "液相層析/質譜儀的基質效應與因應之道." Chemistry **65**(2): 151-155.
2. Ajmani, G. S., H. H. Suh and J. M. Pinto (2016). "Effects of ambient air pollution exposure on olfaction: a review." Environmental health perspectives **124**(11): 1683-1693.
3. Ajmani, G. S., H. H. Suh and J. M. Pinto (2016). "Effects of Ambient Air Pollution Exposure on Olfaction: A Review." Environ Health Perspect **124**(11): 1683-1693.
4. Alonso Adel, C., A. Mederlyova, M. Novak, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2004). "Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations." J Biol Chem **279**(33): 34873-34881.
5. Arnold, S. E., E. B. Lee, P. J. Moberg, L. Stutzbach, H. Kazi, L. Y. Han, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2010). "Olfactory epithelium amyloid- $\beta$  and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease." Annals of neurology **67**(4): 462-469.
6. Asami-Odaka, A., Y. Ishibashi, T. Kikuchi, C. Kitada and N. Suzuki (1995). "Long amyloid. beta.-protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells." Biochemistry **34**(32): 10272-10278.
7. Ashford, T. P. and K. R. Porter (1962). "Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes." The Journal of Cell Biology **12**(1): 198.
8. Atkinson, R. W., G. W. Fuller, H. R. Anderson, R. M. Harrison and B. Armstrong (2010). "Urban ambient particle metrics and health: a time-series analysis." Epidemiology **21**: 501-511.
9. Attems, J., L. Walker and K. A. Jellinger (2014). "Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases." Acta Neuropathol **127**(4): 459-475.
10. Ayala, A., M. F. Muñoz and S. Argüelles (2014). "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal." Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2014**: 31.
11. Becker, S., L. A. Dailey, J. M. Soukup, S. C. Grambow, R. B. Devlin and Y.-C. T. Huang (2005). "Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress." Environmental health perspectives **113**(8): 1032-1038.
12. Benedetti, A., M. Comporti and H. Esterbauer (1980). "Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver

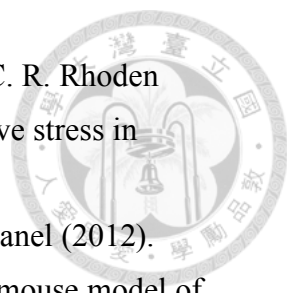
- 
- microsomal lipids." Biochimica et Biophysica Acta **620**(2): 281-296.
13. Bhatt, D. P., K. L. Puig, M. W. Gorr, L. E. Wold and C. K. Combs (2015). "A pilot study to assess effects of long-term inhalation of airborne particulate matter on early Alzheimer-like changes in the mouse brain." PLOS ONE **10**(5): e0127102.
  14. Biederbick, A., H. F. Kern and H. Elsässer (1995). "Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles." European journal of cell biology **66**(1): 3-14.
  15. Billings, L. M., S. Oddo, K. N. Green, J. L. McLaugh and F. M. LaFerla (2005). "Intraneuronal A $\beta$  Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice." Neuron **45**(5): 675-688.
  16. Blennow, K. and H. Hampel (2003). "CSF markers for incipient Alzheimer's disease." Lancet Neurol **2**(10): 605-613.
  17. Block, M. L. and L. Calderón-Garcidueñas (2009). "Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease." Trends in neurosciences **32**(9): 506-516.
  18. Block, M. L., L. Zecca and J.-S. Hong (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." Nature Reviews Neuroscience **8**(1): 57.
  19. Bolton, J. L., S. H. Smith, N. C. Huff, M. I. Gilmour, W. M. Foster, R. L. Auten and S. D. Bilbo (2012). "Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner." The FASEB Journal **26**(11): 4743-4754.
  20. Bos, I., P. De Boever, J. Emmerechts, J. Buekers, J. Vanoirbeek, R. Meeusen, M. Van Poppel, B. Nemery, T. Nawrot and L. I. Panis (2012). "Changed gene expression in brains of mice exposed to traffic in a highway tunnel." Inhal Toxicol **24**(10): 676-686.
  21. Brown, J. S., T. Gordon, O. Price and B. Asgharian (2013). "Thoracic and respirable particle definitions for human health risk assessment." Particle and Fibre Toxicology **10**(1): 12.
  22. Caceres, A. and K. S. Kosik (1990). "Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons." Nature **343**(6257): 461.
  23. Calderon-Garciduenas, L., B. Azzarelli, H. Acuna, R. Garcia, T. M. Gambling, N. Osnaya, S. Monroy, M. Del Rosario Tizapantzi, J. L. Carson and A. Villarreal-Calderon (2002). "Air pollution and brain damage." Toxicologic pathology **30**(3): 373-389.
  24. Calderon-Garciduenas, L., B. Azzarelli, H. Acuna, R. Garcia, T. M. Gambling, N.

- 
- Osnaya, S. Monroy, D. E. L. T. MR, J. L. Carson, A. Villarreal-Calderon and B. Rewcastle (2002). "Air pollution and brain damage." Toxicol Pathol **30**(3): 373-389.
25. Calderon-Garciduenas, L., A. C. Solt, C. Henriquez-Roldan, R. Torres-Jardon, B. Nuse, L. Herritt, R. Villarreal-Calderon, N. Osnaya, I. Stone, R. Garcia, D. M. Brooks, A. Gonzalez-Maciel, R. Reynoso-Robles, R. Delgado-Chavez and W. Reed (2008). "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 **36**(2): 289-310.
26. Campbell, A., M. Oldham, A. Becaria, S. C. Bondy, D. Meacher, C. Sioutas, C. Misra, L. B. Mendez and M. Kleinman (2005). "Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain." Neurotoxicology **26**(1): 133-140.
27. Ceconi, C., A. Cargnoni, E. Pasini, E. Condorelli, S. Curello and R. Ferrari (1991). "Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury." Am J Physiol **260**(4 Pt 2): H1057-1061.
28. Chan, Y., R. Simpson, G. McTainsh, P. Vowles, D. Cohen and G. Bailey (1997). "Characterisation of chemical species in PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> aerosols in Brisbane, Australia." Atmospheric Environment **31**(22): 3773-3785.
29. Chang, C.-C., J.-S. Hwang, C.-C. Chan and T.-J. Cheng (2007). "Interaction effects of ultrafine carbon black with iron and nickel on heart rate variability in spontaneously hypertensive rats." Environmental health perspectives **115**(7): 1012-1017.
30. Chang, C.-C., J.-S. Hwang, C.-C. Chan, P.-Y. Wang, T.-H. Hu and T.-J. Cheng (2005). "Effects of concentrated ambient particles on heart rate variability in spontaneously hypertensive rats." Journal of occupational health **47**(6): 471-480.
31. Chen, L., H. M. Lee, G. H. Greeley, Jr. and E. W. Englander (2007). "Accumulation of oxidatively generated DNA damage in the brain: a mechanism of neurotoxicity." Free Radic Biol Med **42**(3): 385-393.
32. Cheng, H., A. Saffari, C. Sioutas, H. J. Forman, T. E. Morgan and C. E. Finch (2016). "Nanoscale particulate matter from urban traffic rapidly induces oxidative stress and inflammation in olfactory epithelium with concomitant effects on brain." Environmental health perspectives **124**(10): 1537-1546.

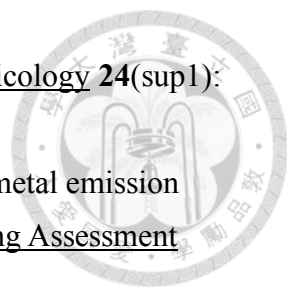


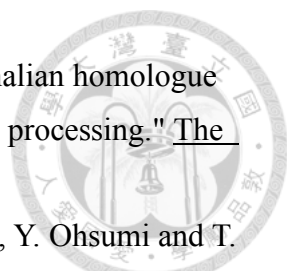
- 
33. Cheng, T.-J., J.-S. Hwang, P.-Y. Wang, C.-F. Tsai, C.-Y. Chen, S.-H. Lin and C.-C. Chan (2003). "Effects of concentrated ambient particles on heart rate and blood pressure in pulmonary hypertensive rats." Environmental health perspectives **111**(2): 147-150.
34. Chuah, M. I. and M. L. Getchell (1999). "Metallothionein in olfactory mucosa of Alzheimer's disease patients and apoE-deficient mice." Neuroreport **10**(9): 1919-1924.
35. Chuang, C. (2017). "Ambient particles exposure and progress of Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice: a pilot study."
36. Chuang, K.-J., Y.-H. Yan, S.-Y. Chiu and T.-J. Cheng (2011). "Long-term air pollution exposure and risk factors for cardiovascular diseases among the elderly in Taiwan." Occupational environmental medicine **68**(1): 64-68.
37. Clinton, L. K., L. M. Billings, K. N. Green, A. Caccamo, J. Ngo, S. Oddo, J. L. McGaugh and F. M. LaFerla (2007). "Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice." Neurobiology of disease **28**(1): 76-82.
38. Cole, T. B., J. Coburn, K. Dao, P. Roqué, Y.-C. Chang, V. Kalia, T. R. Guilarte, J. Dziedzic and L. G. Costa (2016). "Sex and genetic differences in the effects of acute diesel exhaust exposure on inflammation and oxidative stress in mouse brain." Toxicology **374**: 1-9.
39. Cole, T. B., J. Coburn, K. Dao, P. Roque, Y. C. Chang, V. Kalia, T. R. Guilarte, J. Dziedzic and L. G. Costa (2016). "Sex and genetic differences in the effects of acute diesel exhaust exposure on inflammation and oxidative stress in mouse brain." Toxicology **374**: 1-9.
40. Colton, C. A. (2009). "Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain." Journal of neuroimmune pharmacology **4**(4): 399-418.
41. Colton, C. A. and D. M. Wilcock (2010). "Assessing activation states in microglia." CNS Neurological Disorders-Drug Targets **9**(2): 174-191.
42. Colton, C. A. and D. M. Wilcock (2010). "Assessing activation states in microglia." CNS Neurological Disorders-Drug Targets **9**(2): 174-191.
43. Cordis, G. A., D. K. Das and W. Riedel (1998). "High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection." J Chromatogr A **798**(1-2): 117-123.

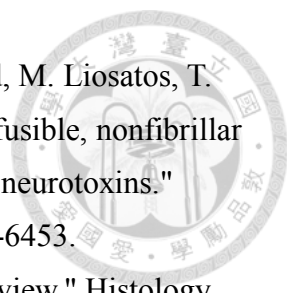
- 
44. Costa, L. G., T. B. Cole, J. Coburn, Y. C. Chang, K. Dao and P. Roque (2014). "Neurotoxicants are in the air: convergence of human, animal, and in vitro studies on the effects of air pollution on the brain." Biomed Res Int **2014**: 736385.
45. Costa, L. G., T. B. Cole, J. Coburn, Y. C. Chang, K. Dao and P. J. Roque (2017). "Neurotoxicity of traffic-related air pollution." Neurotoxicology **59**: 133-139.
46. Craig, L., J. R. Brook, Q. Chiotti, B. Croes, S. Gower, A. Hedley, D. Krewski, A. Krupnick, M. Krzyzanowski and M. D. Moran (2008). "Air pollution and public health: a guidance document for risk managers." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A **71**(9-10): 588-698.
47. De Kok, T. M., H. A. Driee, J. G. Hogervorst and J. J. Briedé (2006). "Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies." Mutation Research/Reviews in Mutation Research **613**(2-3): 103-122.
48. Drubin, D. G. and M. W. Kirschner (1986). "Tau protein function in living cells." The Journal of Cell Biology **103**(6): 2739-2746.
49. Dunn Jr, W. A. (1994). "Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation." Trends in cell biology **4**(4): 139-143.
50. Dunn, W. (1990). "Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole." The Journal of Cell Biology **110**(6): 1923-1933.
51. Ebnet, A., R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek and E. Mandelkow (1998). "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease." J Cell Biol **143**(3): 777-794.
52. Elder, A., R. Gelein, V. Silva, T. Feikert, L. Opanashuk, J. Carter, R. Potter, A. Maynard, Y. Ito, J. Finkelstein and G. Oberdorster (2006). "Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system." Environ Health Perspect **114**(8): 1172-1178.
53. Esterbauer, H., K. Cheeseman, M. Dianzani, G. Poli and T. Slater (1982). "Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes." Biochemical Journal **208**(1): 129-140.
54. Esterbauer, H., P. Eckl and A. Ortner (1990). "Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors." Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology **238**(3): 223-233.

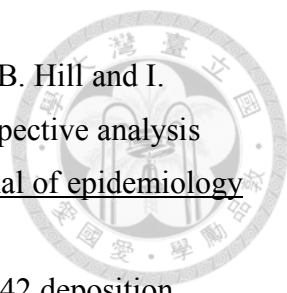
- 
55. Fagundes, L. S., S. Fleck Ada, A. C. Zanchi, P. H. Saldiva and C. R. Rhoden (2015). "Direct contact with particulate matter increases oxidative stress in different brain structures." Inhal Toxicol **27**(10): 462-467.
56. Filali, M., R. Lalonde, P. Theriault, C. Julien, F. Calon and E. Planel (2012). "Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD)." Behavioural brain research **234**(2): 334-342.
57. Fonken, L. K., X. Xu, Z. M. Weil, G. Chen, Q. Sun, S. Rajagopalan and R. J. Nelson (2011). "Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology." Mol Psychiatry **16**(10): 987-995, 973.
58. García-Mesa, Y., H. Pareja-Galeano, V. Bonet-Costa, S. Revilla, M. C. Gómez-Cabrera, J. Gambini, L. Giménez-Llort, R. Cristòfol, J. Viña and C. Sanfeliu (2014). "Physical exercise neuroprotects ovariectomized 3xTg-AD mice through BDNF mechanisms." Psychoneuroendocrinology **45**: 154-166.
59. Giera, M., H. Lingeman and W. M. Niessen (2012). "Recent advancements in the LC-and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview." Chromatographia **75**(9-10): 433-440.
60. Giménez-Llort, L., L. Arranz, I. Maté and M. De la Fuente (2008). "Gender-specific neuroimmunoendocrine aging in a triple-transgenic 3× Tg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity." Neuroimmunomodulation **15**(4-6): 331-343.
61. Giménez-Llort, L., I. Maté, R. Manassra, C. Vida and M. De la Fuente (2012). "Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease." Annals of the New York Academy of Sciences **1262**(1): 74-84.
62. Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochemical biophysical research communications **120**(3): 885-890.
63. Gloor, P. and A. H. Guberman (1997). "The temporal lobe & limbic system." Canadian Medical Association. Journal **157**(11): 1597.
64. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y.-C. Tung, M. S. Zaidi and H. M. Wisniewski (1986). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." Journal of Biological Chemistry **261**(13):

- 6084-6089.
65. Guaita, R., M. Pichiule, T. Maté, C. Linares and J. Díaz (2011). "Short-term impact of particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) on respiratory mortality in Madrid." International journal of environmental health research **21**(4): 260-274.
66. Guerra, R., E. Vera-Aguilar, M. Uribe-Ramirez, G. Gookin, J. Camacho, A. Osornio-Vargas, V. Mugica-Alvarez, R. Angulo-Olais, A. Campbell, J. Froines, T. Kleinman and A. De Vizcaya-Ruiz (2013). "Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum." Toxicol Lett **222**(2): 146-154.
67. Halász, N. (1990). Vertebrate olfactory system, Akadémiai Kiadó.
68. Halonen, J. I., T. Lanki, T. Yli-Tuomi, P. Tiittanen, M. Kulmala and J. Pekkanen (2009). "Particulate air pollution and acute cardiorespiratory hospital admissions and mortality among the elderly." Epidemiology: 143-153.
69. Hamano, T., T. F. Gendron, E. Causevic, S. H. Yen, W. L. Lin, C. Isidoro, M. Deture and L. W. Ko (2008). "Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression." Eur J Neurosci **27**(5): 1119-1130.
70. Hampel, H., K. Blennow, L. M. Shaw, Y. C. Hoessler, H. Zetterberg and J. Q. Trojanowski (2010). "Total and Phosphorylated Tau Protein as Biological Markers of Alzheimer's Disease." Exp Gerontol **45**(1): 30.
71. Hanger, D. P., B. H. Anderton and W. Noble (2009). "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." Trends Mol Med **15**(3): 112-119.
72. Hanisch, U.-K. and H. Kettenmann (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." Nature neuroscience **10**(11): 1387.
73. He, C. and D. J. Klionsky (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." Annual review of genetics **43**.
74. Hensley, K., J. Carney, M. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J. Wu, R. Floyd and D. Butterfield (1994). "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(8): 3270-3274.
75. Hesterberg, T. W., C. M. Long, W. B. Bunn, C. A. Lapin, R. O. McClellan and P. A. Valberg (2012). "Health effects research and regulation of diesel exhaust: an


- 
- historical overview focused on lung cancer risk." Inhalation toxicology **24**(sup1): 1-45.
76. Hjortenkrans, D., B. Bergbäck and A. Häggerud (2006). "New metal emission patterns in road traffic environments." Environmental Monitoring Assessment **117**(1-3): 85-98.
77. Ho, Y. S., X. Yang, S. C. Yeung, K. Chiu, C. F. Lau, A. W. Tsang, J. C. Mak and R. C. Chang (2012). "Cigarette smoking accelerated brain aging and induced pre-Alzheimer-like neuropathology in rats." PLOS ONE **7**(5): e36752.
78. Holcomb, L., M. N. Gordon, E. McGowan, X. Yu, S. Benkovic, P. Jantzen, K. Wright, I. Saad, R. Mueller and D. Morgan (1998). "Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes." Nature medicine **4**(1): 97.
79. Hu, W., F. Wu, Y. Zhang, C. X. Gong, K. Iqbal and F. Liu (2017). "Expression of Tau Pathology-Related Proteins in Different Brain Regions: A Molecular Basis of Tau Pathogenesis." Front Aging Neurosci **9**.
80. Hu, Y. Y., S. S. He, X. Wang, Q. H. Duan, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal and J. Wang (2002). "Levels of Nonphosphorylated and Phosphorylated Tau in Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients : An Ultrasensitive Bienzyme-Substrate-Recycle Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." Am J Pathol **160**(4): 1269-1278.
81. Ito, D., Y. Imai, K. Ohsawa, K. Nakajima, Y. Fukuuchi and S. Kohsaka (1998). "Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1." Molecular brain research **57**(1): 1-9.
82. J., C. M. A. (1932). "Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System." Canadian Medical Association Journal **27**(5): 576-576.
83. Johnson, G. V. and W. H. Stoothoff (2004). "Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction." Journal of cell science **117**(24): 5721-5729.
84. Juda-Rezler, K., M. Reizer and J.-P. Oudinet (2011). "Determination and analysis of PM10 source apportionment during episodes of air pollution in Central Eastern European urban areas: The case of wintertime 2006." Atmospheric Environment **45**(36): 6557-6566.
85. Jung, C.-R., Y.-T. Lin and B.-F. Hwang (2015). "Ozone, particulate matter, and newly diagnosed Alzheimer's disease: a population-based cohort study in Taiwan." Journal of Alzheimer's Disease **44**(2): 573-584.
86. Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E.

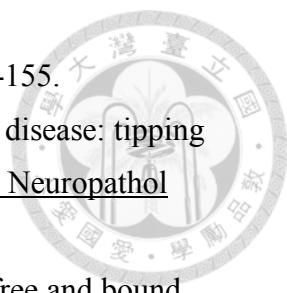
- 
- Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." The EMBO journal **19**(21): 5720-5728.
87. Kabeya, Y., N. Mizushima, A. Yamamoto, S. Oshitani-Okamoto, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2004). "LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation." Journal of cell science **117**(13): 2805-2812.
88. Katsuragi, Y., Y. Ichimura and M. Komatsu (2015). "p62/SQSTM 1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor." The FEBS journal **282**(24): 4672-4678.
89. Kim, S. H., E. M. Knight, E. L. Saunders, A. K. Cuevas, M. Popovech, L.-C. Chen and S. Gandy (2012). "Rapid doubling of Alzheimer's amyloid- $\beta$ 40 and 42 levels in brains of mice exposed to a nickel nanoparticle model of air pollution." F1000Research **1**: 70.
90. Kim, S. Y., J. K. Kim, S. H. Park, B. G. Kim, A. S. Jang, S. H. Oh, J. H. Lee, M. W. Suh and M. K. Park (2018). "Effects of inhaled particulate matter on the central nervous system in mice." Neurotoxicology **67**: 169-177.
91. Kim, Y. C. and K.-L. Guan (2015). "mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation." The Journal of clinical investigation **125**(1): 25-32.
92. Kimura, T., T. Ono, J. Takamatsu, H. Yamamoto, K. Ikegami, A. Kondo, M. Hasegawa, Y. Ihara, E. Miyamoto and T. Miyakawa (1996). "Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments." Dementia **7**(4): 177-181.
93. Koukourakis, M. I., D. Kalamida, A. Giatromanolaki, C. E. Zois, E. Sivridis, S. Pouliliou, A. Mitrakas, K. C. Gatter and A. L. Harris (2015). "Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines." PLOS ONE **10**(9): e0137675.
94. Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends in neurosciences **19**(8): 312-318.
95. Lachen-Montes, M., A. Gonzalez-Morales, X. M. de Morentin, E. Perez-Valderrama, K. Ausin, M. V. Zelaya, A. Serna, E. Aso, I. Ferrer, J. Fernandez-Irigoyen and E. Santamaria (2016). "An early dysregulation of FAK and MEK/ERK signaling pathways precedes the beta-amyloid deposition in the olfactory bulb of APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease." J Proteomics **148**: 149-158.

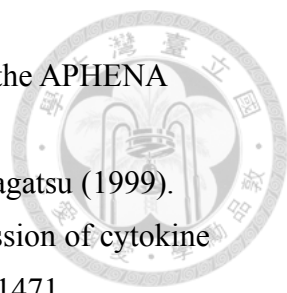
- 
96. Lambert, M. P., A. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer and K. L. Viola (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1–42 are potent central nervous system neurotoxins." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(11): 6448-6453.
97. Larsen, K. E. and D. Sulzer (2002). "Autophagy in neurons a review." Histology and histopathology.
98. Le, W.-d., D. Rowe, W. Xie, I. Ortiz, Y. He and S. H. Appel (2001). "Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease." Journal of Neuroscience **21**(21): 8447-8455.
99. Lee, J., S. Giordano and J. Zhang (2012). "Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling." Biochemical Journal **441**(2): 523-540.
100. Lee, Y.-K. and J.-A. Lee (2016). "Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy." BMB reports **49**(8): 424.
101. Lei, Y.-C., M.-C. Chen, C.-C. Chan, P.-Y. Wang, C.-T. Lee and T.-J. Cheng (2004). "Effects of concentrated ambient particles on airway responsiveness and pulmonary inflammation in pulmonary hypertensive rats." Inhalation toxicology **16**(11-12): 785-792.
102. Levesque, S., M. J. Surace, J. McDonald and M. L. Block (2011). "Air pollution & the brain: Subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease." J Neuroinflammation **8**: 105.
103. Levesque, S., T. Taetzsch, M. E. Lull, U. Kodavanti, K. Stadler, A. Wagner, J. A. Johnson, L. Duke, P. Kodavanti, M. J. Surace and M. L. Block (2011). "Diesel exhaust activates and primes microglia: air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity." Environ Health Perspect **119**(8): 1149-1155.
104. Li, R., Y. G. Huang, D. Fang and W. D. Le (2004). "(–)-Epigallocatechin gallate inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation and protects against inflammation-mediated dopaminergic neuronal injury." Journal of neuroscience research **78**(5): 723-731.
105. Lindbom, J., M. Gustafsson, G. Blomqvist, A. Dahl, A. Gudmundsson, E. Swietlicki and A. G. Ljungman (2006). "Exposure to wear particles generated from studded tires and pavement induces inflammatory cytokine release from human macrophages." Chemical research in toxicology **19**(4): 521-530.

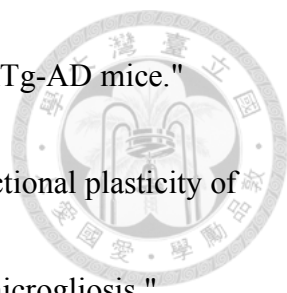
- 
106. Lindsay, J., D. Laurin, R. Verreault, R. Hébert, B. Helliwell, G. B. Hill and I. McDowell (2002). "Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging." American journal of epidemiology **156**(5): 445-453.
107. Lippa, C., L. Nee, H. Mori and P. George-Hyslop (1998). "A $\beta$ -42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease." The Lancet **352**(9134): 1117-1118.
108. Liu, B. and J.-S. Hong (2003). "Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **304**(1): 1-7.
109. Liu, Z., T. Li, P. Li, N. Wei, Z. Zhao, H. Liang, X. Ji, W. Chen, M. Xue and J. Wei (2015). "The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease." Oxid Med Cell Longev **2015**: 352723.
110. Löndahl, J., J. Pagels, E. Swietlicki, J. Zhou, M. Ketzler, A. Massling and M. Bohgard (2006). "A set-up for field studies of respiratory tract deposition of fine and ultrafine particles in humans." Journal of Aerosol Science **37**(9): 1152-1163.
111. Madl, P. (2012). Exposure to Nano-Sized Particles and the Emergence of Contemporary Diseases with a Focus on Epigenetics. Air Pollution-Monitoring, Modelling and Health, IntechOpen.
112. Malm, W. C., J. F. Sisler, D. Huffman, R. A. Eldred and T. A. Cahill (1994). "Spatial and seasonal trends in particle concentration and optical extinction in the United States." Journal of Geophysical Research: Atmospheres **99**(D1): 1347-1370.
113. Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(12): 4245-4249.
114. Maurage, C. A., N. Sergeant, M. M. Ruchoux, J. J. Hauw and A. Delacourte (2003). "Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology." Acta Neuropathol **105**(2): 89-97.
115. McGeer, P. L., S. Itagaki, H. Tago and E. G. McGeer (1987). "Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR." Neuroscience letters **79**(1-2): 195-200.



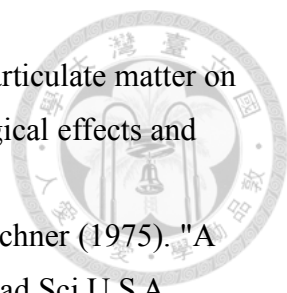
- 
116. Metcalfe, M. J. and M. E. Figueiredo-Pereira (2010). "Relationship between tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease." Mt Sinai J Med **77**(1): 50-58.
117. Misra, C., M. D. Geller, P. Shah, C. Sioutas and P. A. Solomon (2001). "Development and Evaluation of a Continuous Coarse (PM10–PM25) Particle Monitor." Journal of the Air Waste Management Association **51**(9): 1309-1317.
118. Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." Cell **147**(4): 728-741.
119. Morgan, D., S. Munireddy, J. Alamed, J. DeLeon, D. M. Diamond, P. Bickford, M. Hutton, J. Lewis, E. McGowan and M. N. Gordon (2008). "Apparent behavioral benefits of tau overexpression in P301L tau transgenic mice." Journal of Alzheimer's Disease **15**(4): 605-614.
120. Mumaw, C. L., S. Levesque, C. McGraw, S. Robertson, S. Lucas, J. E. Stafflinger, M. J. Campen, P. Hall, J. P. Norenberg and T. Anderson (2016). "Microglial priming through the lung–brain axis: the role of air pollution–induced circulating factors." The FASEB Journal **30**(5): 1880-1891.
121. Oberdorster, G., E. Oberdorster and J. Oberdorster (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." Environ Health Perspect **113**(7): 823-839.
122. Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling and C. Cox (2004). "Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain." Inhal Toxicol **16**(6-7): 437-445.
123. Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng and F. M. LaFerla (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." Neurobiology of aging **24**(8): 1063-1070.
124. Okere, C. O. and H. Kaba (2000). "Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein (Iba1) in the mouse olfactory bulb." Brain research **877**(1): 85-90.
125. Oore, J. J., L. M. Fraser and R. E. Brown (2013). "Age-Related Changes in Motor Ability and Motor Learning in Triple Transgenic (3× TG-AD) and Control (B6129SF1/J) Mice on the Accelerating Rotarod." Proceedings of the Nova Scotian Institute of Science **47**(2).
126. Perez, L., A. Tobías, X. Querol, J. Pey, A. Alastuey, J. Díaz and J. Sunyer (2012). "Saharan dust, particulate matter and cause-specific mortality: a case–crossover

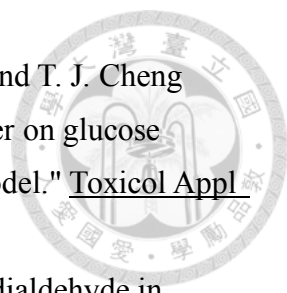
- 
- study in Barcelona (Spain)." Environment international **48**: 150-155.
127. Peric, A. and W. Annaert (2015). "Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction?" Acta Neuropathol **129**(3): 363-381.
128. Pilz, J., I. Meineke and C. H. Gleiter (2000). "Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **742**(2): 315-325.
129. Ponomarev, E. D., K. Maresz, Y. Tan and B. N. Dittel (2007). "CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells." Journal of Neuroscience **27**(40): 10714-10721.
130. Rangachari, V., B. D. Moore, D. K. Reed, L. K. Sonoda, A. W. Bridges, E. Conboy, D. Hartigan and T. L. Rosenberry (2007). "Amyloid- $\beta$  (1– 42) rapidly forms protofibrils and oligomers by distinct pathways in low concentrations of sodium dodecylsulfate." Biochemistry **46**(43): 12451-12462.
131. Ristovski, Z., V. Agranovski, T. E. Bostrom, S. B. Thomas, J. Hitchins and L. Morawska (1999). "Elemental composition of combustion emissions from spark ignition vehicles." Journal of Aerosol Science **30**(Supplement 1): 845-846.
132. Robinson, S. R. and G. M. Bishop (2002). "A $\beta$  as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease." Neurobiology of aging **23**(6): 1051-1072.
133. Rosenberg, K. J., J. L. Ross, H. E. Feinstein, S. C. Feinstein and J. Israelachvili (2008). "Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(21): 7445-7450.
134. Sahni, S., A. M. Merlot, S. Krishan, P. J. Jansson and D. R. Richardson (2014). "Gene of the month: BECN1." Journal of Clinical Pathology **67**(8): 656-660.
135. Saldiva, P. H., R. W. Clarke, B. A. Coull, R. C. Stearns, J. Lawrence, G. G. Murthy, E. Diaz, P. Koutrakis, H. Suh, A. Tsuda and J. J. Godleski (2002). "Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition." Am J Respir Crit Care Med **165**(12): 1610-1617.
136. Samoli, E., R. Peng, T. Ramsay, M. Pipikou, G. Touloumi, F. Dominici, R. Burnett, A. Cohen, D. Krewski and J. Samet (2008). "Acute effects of ambient particulate

- 
- matter on mortality in Europe and North America: results from the APHENA study." Environmental health perspectives **116**(11): 1480-1486.
137. Sawada, M., A. Suzumura, H. Hosoya, T. Marunouchi and T. Nagatsu (1999). "Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia." Journal of neurochemistry **72**(4): 1466-1471.
138. Scarmeas, N., G. Hadjigeorgiou, A. Papadimitriou, B. Dubois, M. Sarazin, J. Brandt, M. Albert, K. Marder, K. Bell and L. S. Honig (2004). "Motor signs during the course of Alzheimer disease." Neurology **63**(6): 975-982.
139. Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiological reviews **81**(2): 741-766.
140. Shi, J., P. Han and S. M. Kuniyoshi (2014). "Cognitive impairment in neurological diseases: lessons from apolipoprotein E." Journal of Alzheimer's Disease **38**(1): 1-9.
141. Smith, M. A., C. A. Rottkamp, A. Nunomura, A. K. Raina and G. Perry (2000). "Oxidative stress in Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1502**(1): 139-144.
142. Soderberg, M., C. Edlund, K. Kristensson and G. Dallner (1991). "Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease." Lipids **26**(6): 421-425.
143. Srimuruganandam, B. and S. S. Nagendra (2012). "Source characterization of PM10 and PM2.5 mass using a chemical mass balance model at urban roadside." Science of the total environment **433**: 8-19.
144. Sterniczuk, R., M. C. Antle, F. M. LaFerla and R. H. Dyck (2010). "Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes." Brain research **1348**: 149-155.
145. Sterniczuk, R., R. H. Dyck, F. M. LaFerla and M. C. Antle (2010). "Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes." Brain research **1348**: 139-148.
146. Stevens, L. M. and R. E. Brown (2015). "Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: A cross-sectional study." Behavioural brain research **278**: 496-505.
147. Stover, K. (2019). Effects of Maternal Environment on Behavioural Development in Young Adult 3xTg-AD and B6129S/F2 Mice.
148. Stover, K. R., M. A. Campbell, C. M. Van Winssen and R. E. Brown (2015).

- 
- "Analysis of motor function in 6-month-old male and female 3xTg-AD mice." Behavioural brain research **281**: 16-23.
149. Streit, W. J., M. B. Graeber and G. W. Kreutzberg (1988). "Functional plasticity of microglia: a review." Glia **1**(5): 301-307.
150. Streit, W. J., S. A. Walter and N. A. Pennell (1999). "Reactive microgliosis." Progress in neurobiology **57**(6): 563-581.
151. Stromhaug, P. E. and D. J. Klionsky (2001). "Approaching the molecular mechanism of autophagy." Traffic **2**(8): 524-531.
152. Sun, Y., G. Zhuang, Y. Wang, L. Han, J. Guo, M. Dan, W. Zhang, Z. Wang and Z. Hao (2004). "The air-borne particulate pollution in Beijing—concentration, composition, distribution and sources." Atmospheric Environment **38**(35): 5991-6004.
153. Suva, D., I. Favre, R. Kraftsik, M. Esteban, A. Lobrinus and J. Miklossy (1999). "Primary Motor Cortex Involvement in Alzheimer Disease." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **58**(11): 1125-1134.
154. Tabaton, M., S. Cammarata, G. Mancardi, G. Cordone, G. Perry and C. Loeb (1991). "Abnormal tau-reactive filaments in olfactory mucosa in biopsy specimens of patients with probable Alzheimer's disease." Neurology **41**(3): 391-391.
155. Tabert, M. H., X. Liu, R. L. Doty, M. Serby, D. Zamora, G. H. Pelton, K. Marder, M. W. Albers, Y. Stern and D. Devanand (2005). "A 10-item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease." Annals of neurology **58**(1): 155-160.
156. Tang, Y. and W. Le (2014). "Good" and "Bad" microglia in parkinson's disease: an understanding of homeostatic mechanisms in immunomodulation. Inflammation in Parkinson's Disease, Springer: 105-126.
157. Tanida, I., T. Ueno and E. Kominami (2008). LC3 and Autophagy. Autophagosome and Phagosome, Springer: 77-88.
158. Trojanowski, J. Q. and V. M. Lee (1995). "Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases." Faseb j **9**(15): 1570-1576.
159. Tukožkan, N., H. Erdamar and I. Seven (2006). "Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay." Firat Tip Dergisi **11**(2): 88-92.
160. Turnbull, A. B. and R. M. Harrison (2000). "Major component contributions to PM10 composition in the UK atmosphere." Atmospheric Environment **34**(19):

- 3129-3137.
161. Tyas, S. L., J. Manfreda, L. A. Strain and P. R. Montgomery (2001). "Risk factors for Alzheimer's disease: a population-based, longitudinal study in Manitoba, Canada." International journal of epidemiology **30**(3): 590-597.
162. Uchoa, M. F., V. A. Moser and C. J. Pike (2016). "Interactions between inflammation, sex steroids, and Alzheimer's disease risk factors." Frontiers in neuroendocrinology **43**: 60-82.
163. Valavanidis, A., K. Fiotakis and T. Vlachogianni (2008). "Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms." Journal of Environmental Science Health **26**(4): 339-362.
164. van Berlo, D., C. Albrecht, A. M. Knaapen, F. R. Cassee, M. E. Gerlofs-Nijland, I. M. Kooter, N. Palomero-Gallagher, H. J. Bidmon, F. J. van Schooten, J. Krutmann and R. P. Schins (2010). "Comparative evaluation of the effects of short-term inhalation exposure to diesel engine exhaust on rat lung and brain." Arch Toxicol **84**(7): 553-562.
165. Veerhuis, R., I. Janssen, C. J. De Groot, F. L. Van Muiswinkel, C. E. Hack and P. Eikelenboom (1999). "Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor." Experimental neurology **160**(1): 289-299.
166. Verwilt, P., H. S. Kim, S. Kim, C. Kang and J. S. Kim (2018). "Shedding light on tau protein aggregation: the progress in developing highly selective fluorophores." Chem Soc Rev **47**(7): 2249-2265.
167. Waldemar, G., B. Dubois, M. Emre, J. Georges, I. McKeith, M. Rossor, P. Scheltens, P. Tariska and B. Winblad (2007). "Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline." European Journal of Neurology **14**(1): e1-e26.
168. Walsh, D. M., D. M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M. M. Condron, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe and D. B. Teplow (1999). "Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis Structure and biological activity of protofibrillar intermediates." Journal of Biological Chemistry **274**(36): 25945-25952.
169. Wang, Y. and E. Mandelkow (2012). "Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways." Biochem Soc Trans **40**(4): 644-652.

- 
170. Wang, Y., L. Xiong and M. Tang (2017). "Toxicity of inhaled particulate matter on the central nervous system: neuroinflammation, neuropsychological effects and neurodegenerative disease." J Appl Toxicol **37**(6): 644-667.
171. Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1858-1862.
172. Westerman, M. A., D. Cooper-Blacketer, A. Mariash, L. Kotilinek, T. Kawarabayashi, L. H. Younkin, G. A. Carlson, S. G. Younkin and K. H. Ashe (2002). "The relationship between A $\beta$  and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." Journal of Neuroscience **22**(5): 1858-1867.
173. Win-Shwe, T. T., S. Yamamoto, Y. Fujitani, S. Hirano and H. Fujimaki (2012). "Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice." Nanotoxicology **6**(5): 543-553.
174. Wittnam, J. L., E. Portelius, H. Zetterberg, M. K. Gustavsson, S. Schilling, B. Koch, H.-U. Demuth, K. Blennow, O. Wirths and T. A. Bayer (2012). "Pyroglutamate amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease." Journal of Biological Chemistry **287**(11): 8154-8162.
175. Woodward, N. C., P. Pakbin, A. Saffari, F. Shirmohammadi, A. Haghani, C. Sioutas, M. Cacciottolo, T. E. Morgan and C. E. Finch (2017). "Traffic-related air pollution impact on mouse brain accelerates myelin and neuritic aging changes with specificity for CA1 neurons." Neurobiology of aging **53**: 48-58.
176. Wu, Y.-C., Y.-C. Lin, H.-L. Yu, J.-H. Chen, T.-F. Chen, Y. Sun, L.-L. Wen, P.-K. Yip, Y.-M. Chu and Y.-C. Chen (2015). "Association between air pollutants and dementia risk in the elderly." Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring **1**(2): 220-228.
177. Wu, Y.-L. (2016). "CNS toxicity induced by DEPs and ambient particles."
178. Yamagishi, M., S. Takami, M. L. Getchell and T. V. Getchell (1998). "Increased density of olfactory receptor neurons immunoreactive for apolipoprotein E in patients with Alzheimer's disease." Ann Otol Rhinol Laryngol **107**(5): 421-426.
179. Yan, Y.-H., C.-H. Huang, W.-J. Chen, M.-F. Wu and T.-J. Cheng (2008). "Effects of diesel exhaust particles on left ventricular function in isoproterenol-induced myocardial injury and healthy rats." Inhalation toxicology **20**(2): 199-203.

- 
180. Yan, Y. H., C. K. C. C, J. S. Wang, C. L. Tung, Y. R. Li, K. Lo and T. J. Cheng (2014). "Subchronic effects of inhaled ambient particulate matter on glucose homeostasis and target organ damage in a type 1 diabetic rat model." Toxicol Appl Pharmacol **281**(2): 211-220.
181. Young, I. S. and E. R. Trimble (1991). "Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection." Ann Clin Biochem **28 ( Pt 5)**: 504-508.
182. Zanchi, A. C., L. S. Fagundes, F. Barbosa, Jr., R. Bernardi, C. R. Rhoden, P. H. Saldiva and A. C. do Valle (2010). "Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress." Inhal Toxicol **22**(11): 910-918.
183. Zanchi, A. C., M. Saiki, P. H. Saldiva, H. M. Barros and C. R. Rhoden (2010). "Hippocampus lipid peroxidation induced by residual oil fly ash intranasal instillation versus habituation to the open field." Inhal Toxicol **22**(1): 84-88.
184. Zanchi, A. C., C. D. Venturini, M. Saiki, P. H. Nascimento Saldiva, H. M. Tannhauser Barros and C. R. Rhoden (2008). "Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats." Inhal Toxicol **20**(9): 795-800.
185. Zelaya, M. V., E. Perez-Valderrama, X. M. de Morentin, T. Tunon, I. Ferrer, M. R. Luquin, J. Fernandez-Irigoyen and E. Santamaria (2015). "Olfactory bulb proteome dynamics during the progression of sporadic Alzheimer's disease: identification of common and distinct olfactory targets across Alzheimer-related co-pathologies." Oncotarget **6**(37): 39437-39456.

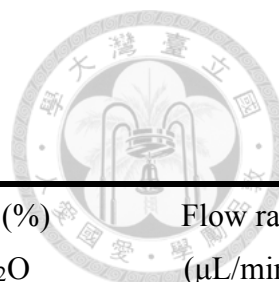


表 1、LC-MS/MS 移動相濃度梯度

Time (min)	Mobile phase A (%) 0.1 % AA in ACN	Mobile phase B (%) 0.1% AA in H <sub>2</sub> O	Flow rate (μL/min)
0.00	50	50	300
1.00	50	50	300
5.00	95	5	300
10.50	95	5	300
11.00	50	50	300
11.10	50	50	500
14.00	50	50	500
14.10	50	50	300
15.00	50	50	300

表 2、HESI 參數

Device	Value
Spray voltage (V)	3000
Vaporizer temperature (°C)	200
Sheath gas pressure (psi)	35
Auxiliary gas pressure (arb)	5
Capillary temperature (°C)	200

表 3、SRM 參數

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collison Energy (V)	Tube Lens (V)
MDA-DNPH	[M+H] <sup>+</sup> 235.0	116.2	32	46
		131.2	28	46





表 4、暴露期間(2018.10.01~2018.12.31)PM<sub>2.5</sub> 平均質量濃度(μg/m<sup>3</sup>)

μg/m <sup>3</sup>	Sampling duration	2018.10.01 2018.10.15	2018.10.15 2018.10.29	2018.10.29 2018.11.12	2018.11.12 2018.11.26	2018.11.26 2018.12.03	2018.12.03 2018.12.13
Manual sampling (Teflon filters)	PM <sub>2.5</sub>	12.41	7.44	13.91	9.28	17.39	6.14
Dust monitor (DustTrak)		21.13	13.97	28.85	20.48	27.00	22.09

μg/m <sup>3</sup>	Sampling duration	2018.12.13 2018.12.26	2018.12.26 2018.12.31	Mean±SE (Median)
Manual sampling (Teflon filters)	PM <sub>2.5</sub>	14.56	8.10	11.15±3.73 (12.41)
Dust monitor (DustTrak)		NA	NA	22.25±4.82 (21.61)

註：NA 為當週採樣因儀器異常，因此此筆數據不採用。

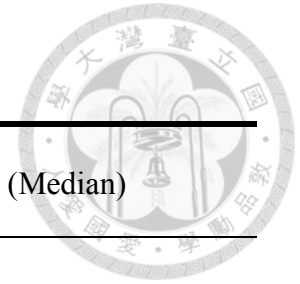


表 5、暴露期間(2019.01.01~2019.03.03)PM<sub>2.5</sub> 平均質量濃度(μg/m<sup>3</sup>)

μg/m <sup>3</sup>	Sampling duration	2019.12.31 2019.01.21	2019.01.21 2019.02.02	2019.02.02 2019.02.18	2019.02.18 2019.03.04	Mean±SE (Median)
Manual sampling (Teflon filters)	PM <sub>2.5</sub>	9.35	17.49	11.49	14.10	13.11±3.04 (12.79)
Dust monitor (DustTrak)		11.15	13.86	12.80	15.67	13.39±1.66 (13.35)

表 6、採樣期間(2018.10.03~2019.03.03)內，PM<sub>2.5</sub> 可溶性離子組成

	Mean (ng/m <sup>3</sup> )	Median (ng/m <sup>3</sup> )	SD (ng/m <sup>3</sup> )	Min (ng/m <sup>3</sup> )	Max (ng/m <sup>3</sup> )
Na <sup>+</sup>	118.756	122.427	19.377	76.067	143.938
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1531.560	1461.005	524.992	691.103	2275.551
K <sup>+</sup>	122.041	106.543	69.766	49.756	258.000
Mg <sup>2+</sup>	17.923	17.017	10.273	9.787	41.825
Ca <sup>2+</sup>	27.446	12.132	35.958	7.276	115.018
Cl <sup>-</sup>	31.917	17.229	21.418	9.953	76.779
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	558.619	397.636	473.991	189.465	1440.941
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	4672.019	4632.348	1520.488	2012.873	6476.064

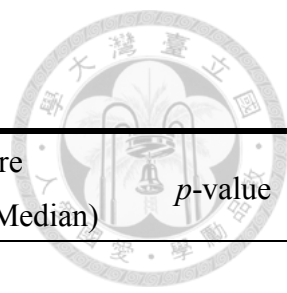
表 7、採樣期間(2018.10.03~2019.03.03)內，PM<sub>2.5</sub> 總金屬組成

	Mean (ng/m <sup>3</sup> )	Median (ng/m <sup>3</sup> )	SD (ng/m <sup>3</sup> )	Min (ng/m <sup>3</sup> )	Max (ng/m <sup>3</sup> )
Al	66.437	72.612	27.419	28.712	110.664
Fe	94.476	91.291	30.342	64.478	152.478
Na	165.765	168.533	32.559	119.415	229.598
Mg	38.938	37.658	12.237	22.830	59.574
K	159.536	154.795	101.930	53.215	368.256
Ca	282.851	254.045	101.792	170.876	511.445
Sr	1.315	0.834	2.169	0.398	6.902
Ba	3.049	2.126	4.429	1.040	14.509
Ti	5.796	5.756	2.003	3.992	10.448
Mn	8.553	8.256	2.904	4.610	13.173
Co	0.092	0.098	0.022	0.066	0.139
Ni	3.959	3.583	1.686	2.356	7.330
Cu	5.677	4.282	2.898	4.158	12.601
Zn	20.182	18.021	5.909	13.275	31.714
Mo	0.486	0.422	0.210	0.282	0.976
Cd	0.203	0.163	0.123	0.073	0.456
Sn	2.138	1.979	0.886	0.999	3.373
Sb	0.913	0.720	0.549	0.351	2.152
Tl	0.064	0.048	0.033	0.027	0.127
Pb	10.163	7.071	5.716	3.612	21.284
V	5.934	5.726	1.731	3.598	8.652
Cr	2.962	2.740	1.174	2.238	5.843
As	0.882	0.803	0.348	0.390	1.545

表 8、採樣期間(2018.10.03~2019.03.03)內，PM<sub>2.5</sub> 水溶性金屬組成

	Mean (ng/m <sup>3</sup> )	Median (ng/m <sup>3</sup> )	SD (ng/m <sup>3</sup> )	Min (ng/m <sup>3</sup> )	Max (ng/m <sup>3</sup> )
Al	10.544	10.501	7.035	4.120	25.289
Fe	17.345	19.952	8.337	6.760	27.656
Na	107.827	116.026	15.624	77.818	130.834
Mg	16.468	16.550	6.961	9.439	33.720
K	124.303	138.819	72.487	45.728	278.878
Ca	31.321	23.096	19.314	17.652	74.286
Sr	0.928	0.361	2.126	0.166	6.413
Ba	2.316	1.242	3.901	0.842	12.456
Ti	0.466	0.433	0.203	0.275	0.827
Mn	4.582	4.841	1.895	2.292	7.632
Co	0.033	0.036	0.010	0.016	0.047
Ni	1.234	1.162	0.408	0.669	1.962
Cu	3.065	2.570	2.267	1.492	8.643
Zn	23.654	22.879	7.058	15.364	37.518
Mo	0.241	0.248	0.075	0.115	0.360
Cd	0.176	0.146	0.103	0.056	0.351
Sn	0.337	0.330	0.163	0.097	0.611
Sb	0.452	0.401	0.258	0.145	1.003
Tl	0.044	0.035	0.020	0.017	0.073
Pb	5.720	4.020	3.605	1.496	13.419
V	3.670	3.630	1.346	1.749	5.803
Cr	0.423	0.448	0.128	0.241	0.678
As	0.708	0.689	0.257	0.271	1.087

表 9、莫氏水迷津知識採集階段



Parameters	Control	Exposure	<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)	Mean ± SE (Median)	
<b>Escape latency (sec)</b>			
Day 1	51.63 ± 10.85 (55.85)	47.94 ± 14.20 (53.24)	0.5972
Day 2	43.50 ± 15.08 (48.09)	37.23 ± 16.65 (34.45)	0.3213
Day 3	25.95 ± 19.44 (17.47)	29.04 ± 12.95 (24.68)	0.1984
Day 4	25.43 ± 14.67 (22.07)	28.26 ± 12.52 (28.54)	0.4887
<b>Distance moved (cm)</b>			
Day 1	829.28 ± 180.86 (876.36)	746.49 ± 235.62 (711.44)	0.2766
Day 2	763.29 ± 274.59 (794.38)	623.34 ± 313.85 (549.04)	0.2485
Day 3	409.64 ± 275.66 (261.79)	459.12 ± 185.39 (508.41)	0.7169
Day 4	414.02 ± 229.68 (352.13)	477.87 ± 179.57 (457.51)	0.2485
<b>Swimming velocity (cm/s)</b>			
Day 1	16.25 ± 2.77 (16.11)	16.53 ± 3.04 (17.26)	0.9212
Day 2	17.46 ± 3.08 (17.79)	17.83 ± 4.10 (18.78)	0.7667
Day 3	17.50 ± 3.71 (16.81)	17.33 ± 3.04 (16.71)	0.9737
Day 4	16.49 ± 2.41 (16.70)	17.50 ± 3.19 (16.98)	0.4483

結果以 mean ± SE 做表示( $N_{\text{control}}=17$ ;  $N_{\text{exposure}}=15$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組\*  $p < 0.05$ 。

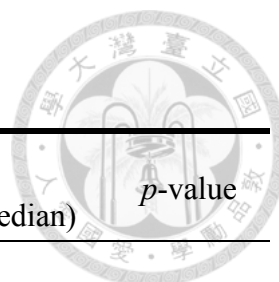


表 10、莫氏水迷津探索實驗

Parameters	Control	Exposure	<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)	Mean ± SE (Median)	
Time spent in platform quadrant (%)	27.52 ± 9.44 (27.18)	37.29 ± 9.26 (35.03)	0.0272*
Quadrant area crossing (times)	6.42 ± 1.90 (7.13)	7.78 ± 0.95 (7.88)	0.0914
Swimming velocity (cm/s)	19.54 ± 3.67 (19.27)	18.32 ± 3.38 (17.56)	0.6209

結果以 mean ± SE 做表示(N<sub>control</sub>=17；N<sub>exposure</sub>=15)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組\* *p* < 0.05。

表 11、莫氏水迷津知識採集階段之學習效應

Escape latency(sec)	Day 1	Day 2-4	<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)	Mean ± SE (Median)	
Control			
Day 1 vs. Day 2		43.50 ± 15.08 (48.09)	0.1634
Day 1 vs. Day 3	51.63 ± 10.85 (55.85)	25.95 ± 19.44 (17.47)	0.0036*
Day 1 vs. Day 4		25.43 ± 14.67 (22.07)	0.0008*
Exposure			
Day 1 vs. Day 2		37.23 ± 16.65 (34.45)	0.1077
Day 1 vs. Day 3	47.94 ± 14.20 (53.24)	29.04 ± 12.95 (24.68)	0.0246*
Day 1 vs. Day 4		28.26 ± 12.52 (28.54)	0.0086*

結果以 mean ± SE 做表示(N<sub>control</sub>=17；N<sub>exposure</sub>=15)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組。第二至第四天之逃避潛伏期學習曲線是與第一天相比，\* *p* < 0.05。

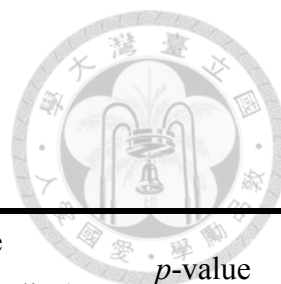


表 12、滾輪式跑步機試驗

Parameters	Control	Exposure	<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)	Mean ± SE (Median)	
<b>Latency(s) to fall</b>			
Day 0 (Adaptation period)	336.81 ± 70.01 (360.00)	331.43 ± 78.47 (360.00)	0.6042
Day 1	299.22 ± 56.49 (305.50)	297.23 ± 7.06 (360.00)	0.5308
Day 2	326.44 ± 68.31 (360.00)	358.10 ± 7.70 (360.00)	0.0350*
Day 3	349.00 ± 39.60 (360.00)	359.27 ± 3.95 (360.00)	0.1104
<b>Speed at fall (rpm)</b>			
Day 0 (Adaptation period)	4.00 ± 0.00 (4.00)	4.00 ± 0.00 (4.00)	1
Day 1	33.50 ± 5.82 (34.00)	33.43 ± 8.96 (40.00)	0.5307
Day 2	36.44 ± 7.25 (40.00)	39.80 ± 0.79 (40.00)	0.0318*
Day 3	38.81 ± 4.03 (40.00)	39.90 ± 0.54 (40.00)	0.1200

結果以 mean ± SE 做表示 ( $N_{\text{control}}=17$ ;  $N_{\text{exposure}}=15$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



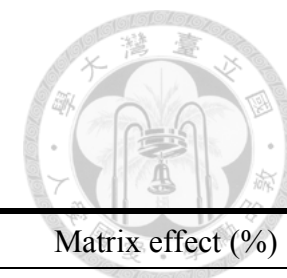


表 13、基質效應

Analyte	Standard calibration curve	r <sup>2</sup>	Matrix matched calibration curve	r <sup>2</sup>	Matrix effect (%)
MDA-DNPH	y=5884086x+39606	r <sup>2</sup> =0.99909	y=5599679x+1185836	r <sup>2</sup> =0.99718	-4.83 %

表 14、各腦區之 MDA 濃度

Brain region	Control (nmol/mL)	Exposure (nmol/mL)	p-value
	Mean ± SE (Median)	Mean ± SE (Median)	
Olfactory bulb	0.027 ± 0.020 (0.019)	0.243 ± 0.301 (0.129)	0.0124*
Cerebellum	0.013 ± 0.003 (0.012)	0.107 ± 0.130 (0.019)	0.1282
Hippocampus	0.021 ± 0.015 (0.018)	0.044 ± 0.009 (0.045)	0.0453*
Cerebral cortex	0.019 ± 0.021 (0.012)	0.038 ± 0.017 (0.039)	0.0927

結果以 mean ± SE 做表示(N<sub>control</sub>=7；N<sub>exposure</sub>=6)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\* p < 0.05。

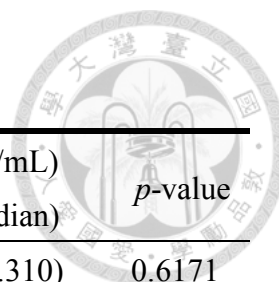


表 15、各腦區之 t-Tau 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control (nmol/mL)		Exposure (nmol/mL)		<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)		Mean ± SE (Median)		
Olfactory bulb	0.275 ± 0.097 (0.276)		0.546 ± 0.401 (0.310)		0.6171
Cerebellum	0.910 ± 0.158 (0.952)		0.944 ± 0.194 (0.982)		0.7210
Hippocampus	0.780 ± 0.191 (0.715)		0.765 ± 0.231 (0.833)		0.8303
Cerebral cortex	0.923 ± 0.101 (0.966)		0.865 ± 0.108 (0.902)		0.5203

結果以 mean ± SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$  ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

表 16、各腦區之 p-Tau 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control (nmol/mL)		Exposure (nmol/mL)		<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)		Mean ± SE (Median)		
Olfactory bulb	0.353 ± 0.166 (0.300)		0.698 ± 0.256 (0.612)		0.0383*
Cerebellum	0.730 ± 0.192 (0.771)		0.936 ± 0.159 (0.992)		0.0538
Hippocampus	0.989 ± 0.298 (0.980)		0.943 ± 0.168 (0.946)		0.9431
Cerebral cortex	0.812 ± 0.154 (0.873)		0.879 ± 0.183 (0.929)		0.3531

結果以 mean ± SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$  ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

表 17、各腦區之 p-Tau 蛋白與 t-Tau 蛋白表現量比值(Fold of control)

	Control		Exposure		<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)		Mean ± SE (Median)		
Olfactory bulb	1.243 ± 0.330 (1.310)		1.650 ± 0.546 (1.751)		0.1747
Cerebellum	0.815 ± 0.217 (0.854)		1.048 ± 0.366 (0.933)		0.2840
Hippocampus	1.313 ± 0.486 (1.059)		1.366 ± 0.493 (1.197)		0.6171
Cerebral cortex	0.893 ± 0.198 (0.950)		1.015 ± 0.153 (1.014)		0.3531

結果以 mean ± SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$  ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

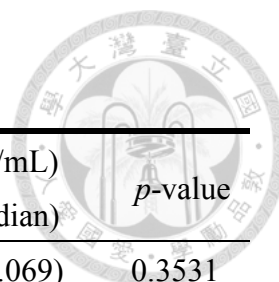


表 18、各腦區之 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control (nmol/mL)	Exposure (nmol/mL)	<i>p</i> -value
	Mean $\pm$ SE (Median)	Mean $\pm$ SE (Median)	
Olfactory bulb	0.801 $\pm$ 0.320 (0.849)	1.031 $\pm$ 0.103 (1.069)	0.3531
Cerebellum	1.063 $\pm$ 0.256 (0.944)	1.053 $\pm$ 0.098 (1.018)	0.8303
Hippocampus	1.107 $\pm$ 0.160 (1.131)	0.853 $\pm$ 0.162 (0.865)	0.0268*
Cerebral cortex	0.947 $\pm$ 0.098 (0.936)	1.145 $\pm$ 0.166 (1.123)	0.0538

結果以 mean  $\pm$  SE 做表示(N<sub>control</sub>=7；N<sub>exposure</sub>=6)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\* *p* < 0.05。

表 19、各腦區之 LC3B 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control (nmol/mL)	Exposure (nmol/mL)	<i>p</i> -value
	Mean $\pm$ SE (Median)	Mean $\pm$ SE (Median)	
Olfactory bulb	0.522 $\pm$ 0.176 (0.587)	0.722 $\pm$ 0.188 (0.767)	0.1747
Cerebellum	0.523 $\pm$ 0.223 (0.431)	0.818 $\pm$ 0.163 (0.880)	0.0538
Hippocampus	0.649 $\pm$ 0.170 (0.718)	0.678 $\pm$ 0.189 (0.637)	0.9431
Cerebral cortex	0.638 $\pm$ 0.182 (0.708)	0.685 $\pm$ 0.117 (0.711)	0.9431

結果以 mean  $\pm$  SE 做表示(N<sub>control</sub>=7；N<sub>exposure</sub>=6)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\* *p* < 0.05。

表 20、各腦區之 Iba-1 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control (nmol/mL)	Exposure (nmol/mL)	<i>p</i> -value
	Mean $\pm$ SE (Median)	Mean $\pm$ SE (Median)	
Olfactory bulb	0.609 $\pm$ 0.241 (0.665)	0.613 $\pm$ 0.174 (0.603)	0.8303
Cerebellum	0.658 $\pm$ 0.220 (0.715)	0.606 $\pm$ 0.205 (0.614)	0.6171
Hippocampus	0.644 $\pm$ 0.141 (0.721)	0.696 $\pm$ 0.272 (0.717)	1
Cerebral cortex	0.933 $\pm$ 0.257 (1.007)	0.452 $\pm$ 0.276 (0.368)	0.0184*

結果以 mean  $\pm$  SE 做表示(N<sub>control</sub>=7；N<sub>exposure</sub>=6)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\* *p* < 0.05。

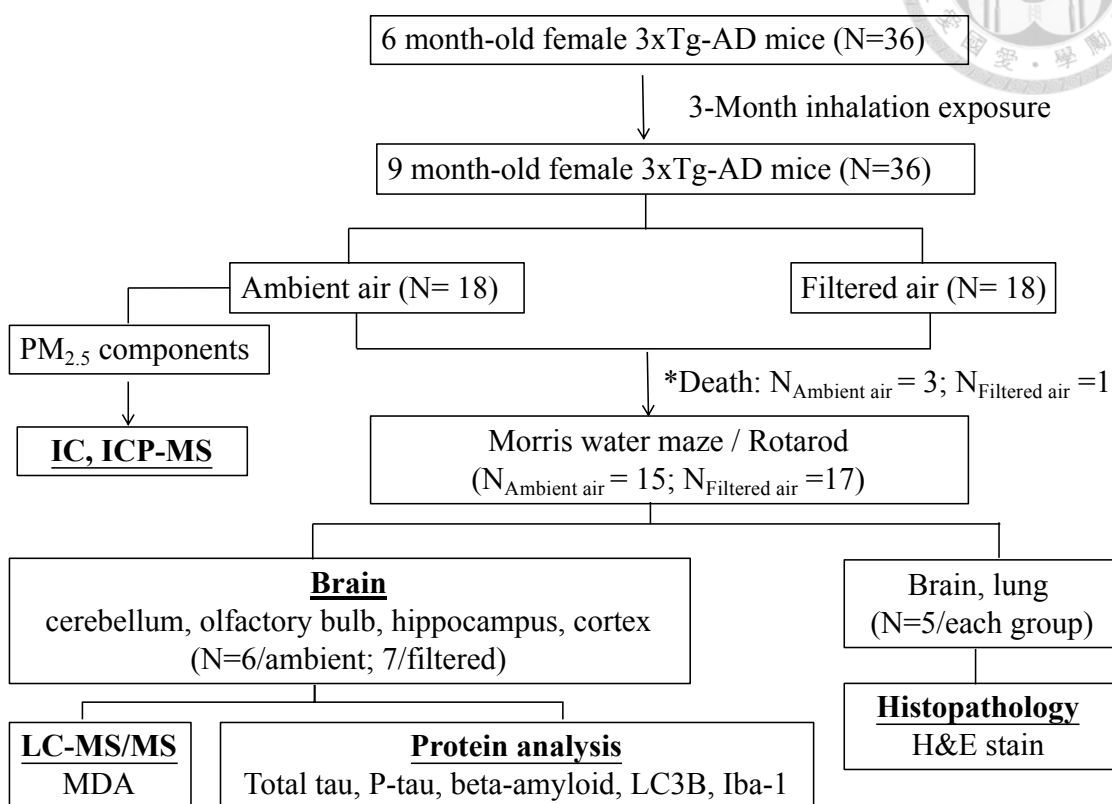


圖 1、亞慢性暴露大氣懸浮微粒對阿茲海默症三轉基因小鼠誘發神經毒性之影響研究架構。

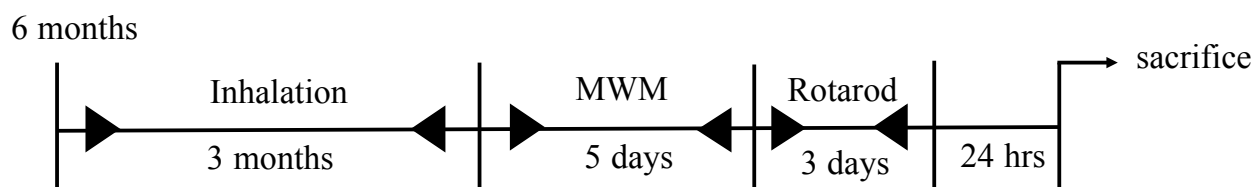


圖 2、亞慢性暴露大氣懸浮微粒對阿茲海默症三轉基因小鼠誘發神經毒性之影響研究時間軸

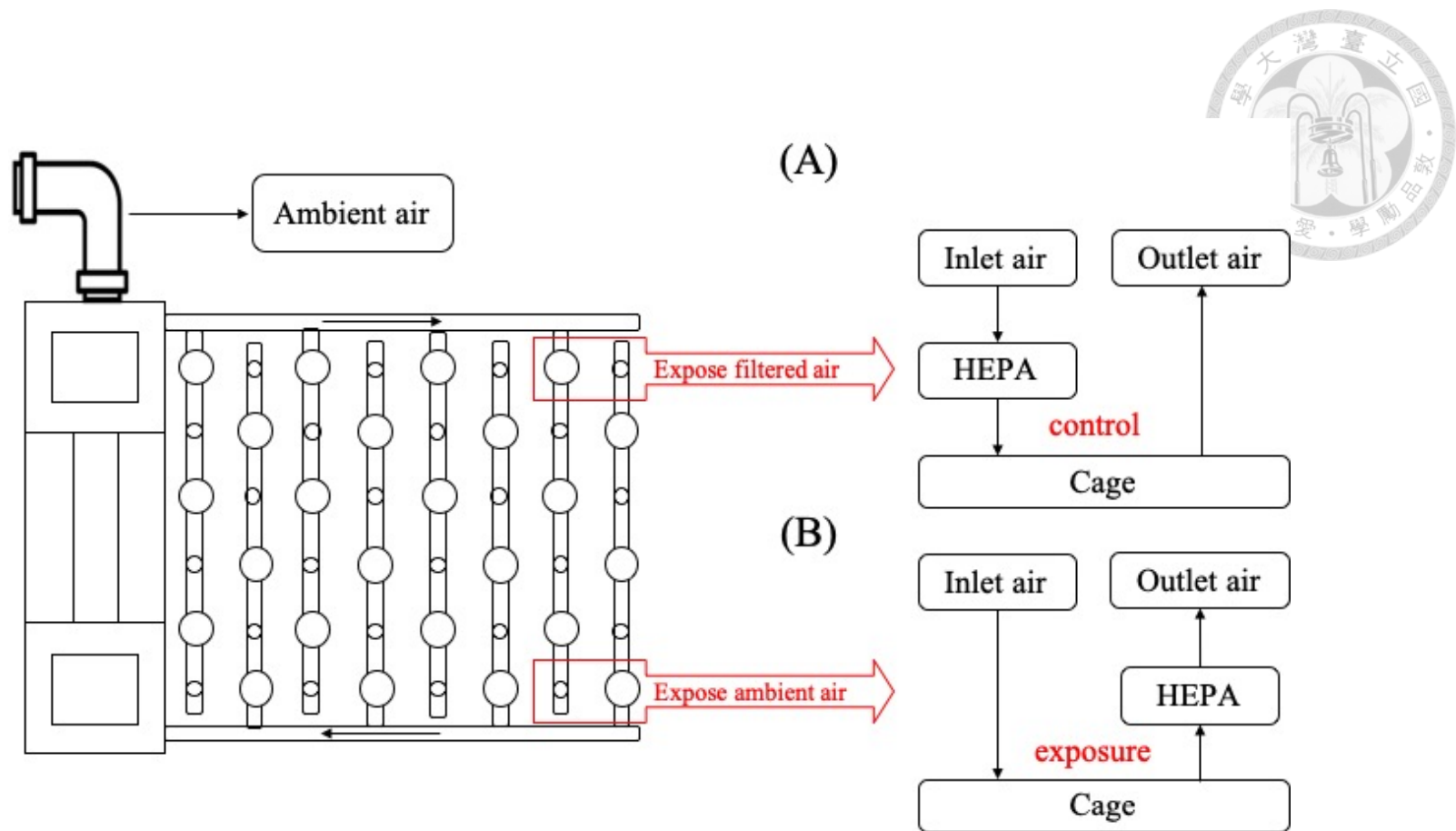
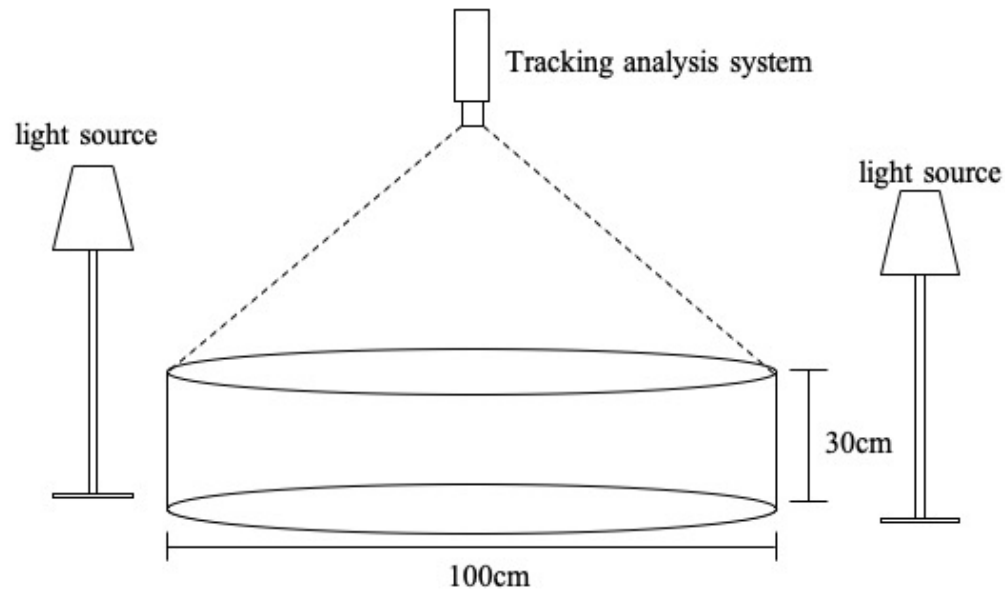


圖 3、TAPES 結構圖。(A)控制組：大氣 PM 在進入籠內前先經過 HEPA 過濾。(B)暴露組：大氣 PM 直接進入籠內，排出時再經過 HEPA。



(A)



(B)

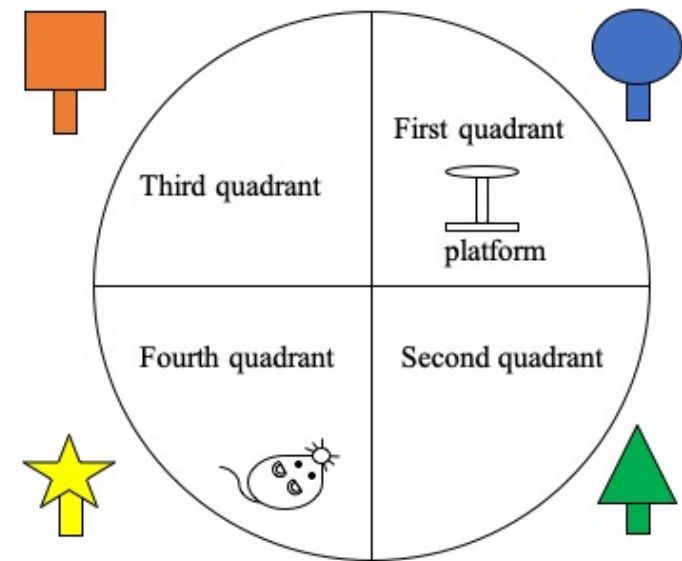


圖 4、MWM 實驗設備構造圖：(A) 側面設備構造圖 (B) 水池分為四個象限，每個象限將於池邊貼上各幾何象限。第一象限於第一至四天放置透明平臺。

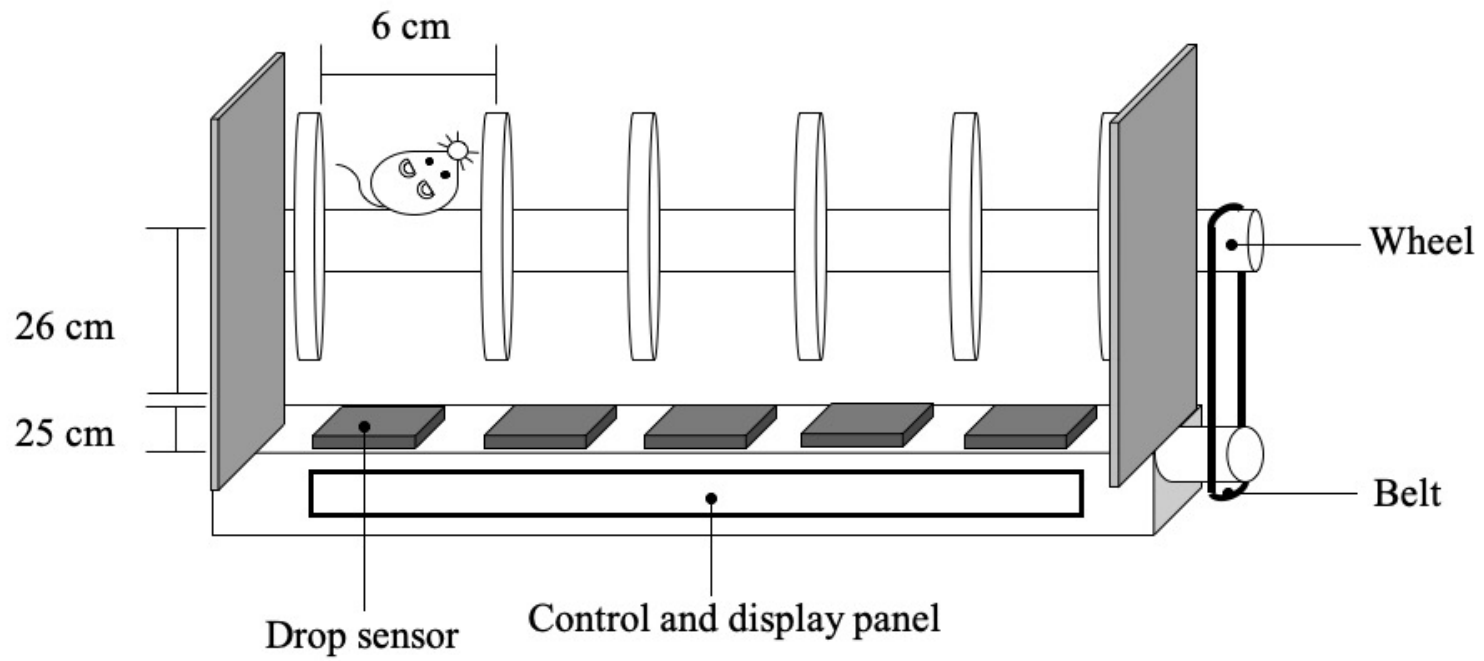
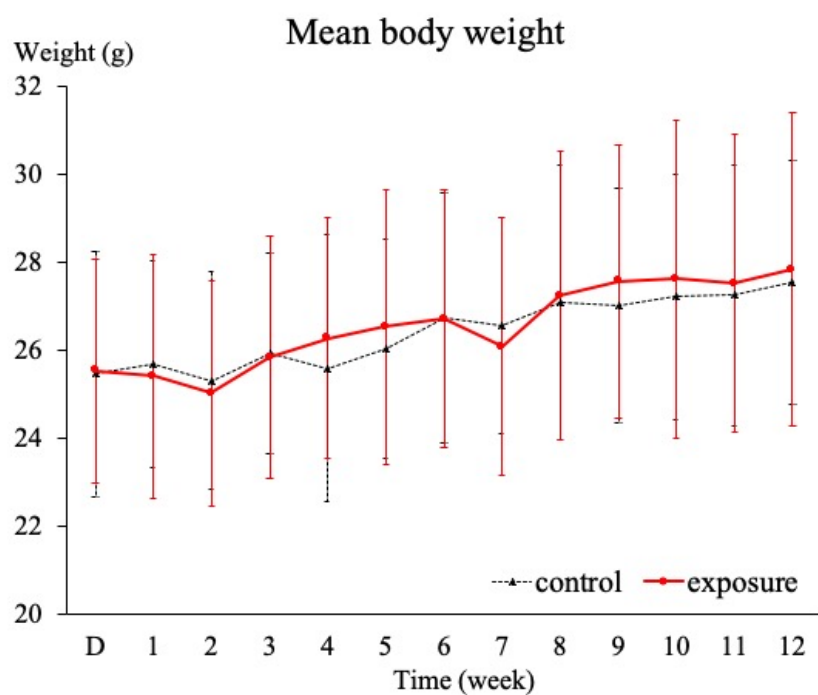


圖 5、滾輪式跑步機構造圖



(A)



(B)

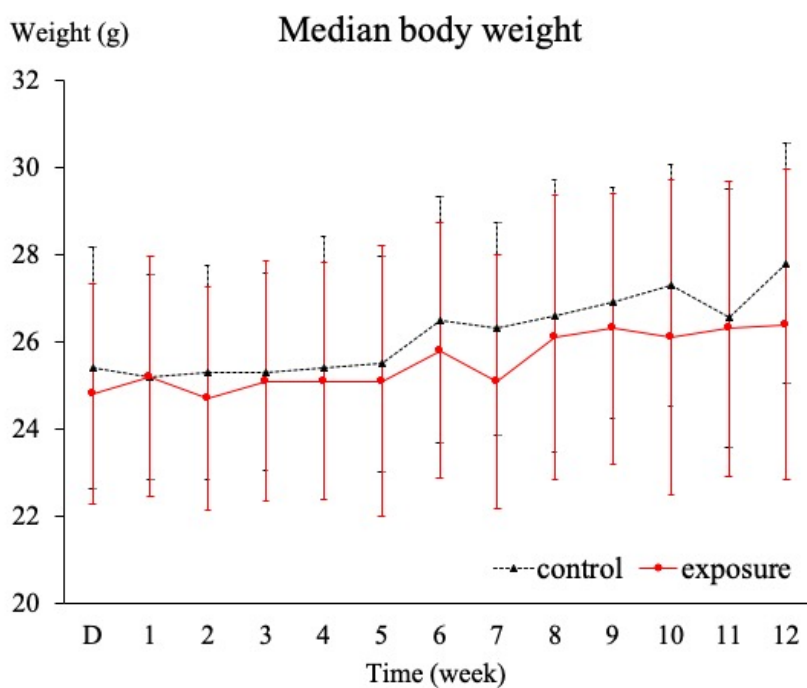


圖 6、暴露三個月小鼠體重變化(D 表示暴露前一週)：(A)體重以平均值(Mean)表示 (B)體重以中位數(Median)表示。N<sub>control</sub>=17; N<sub>exposure</sub>=15，以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組。



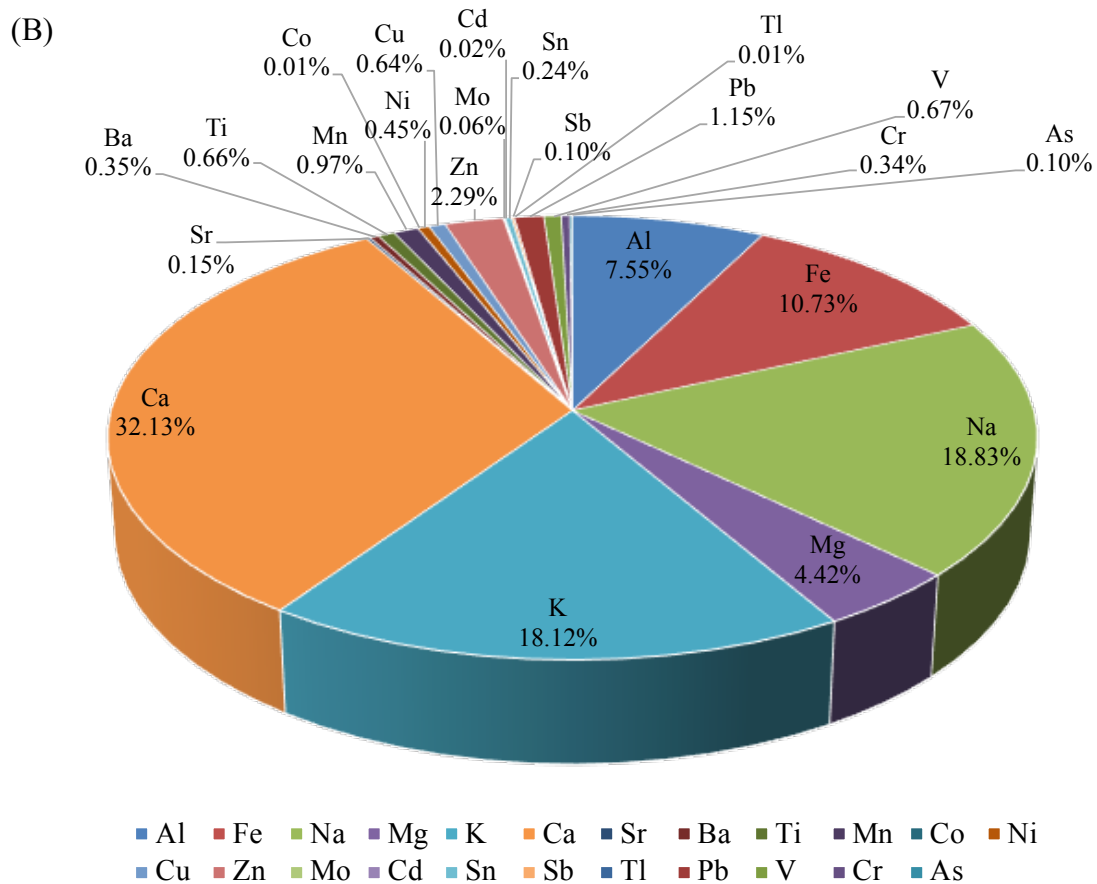
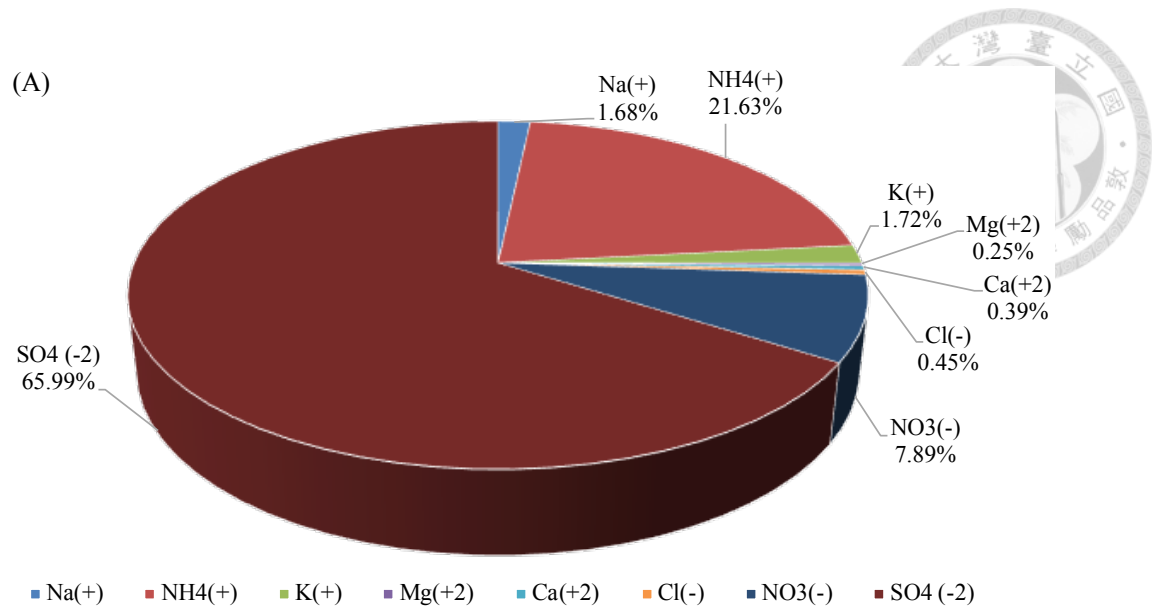


圖 7、採樣期間(2018.10.01~2019.03.03)PM<sub>2.5</sub> 成份分析：(A) 水溶性離子 (B) 總金屬 (C) 水溶性金屬。2018.12.13~2018.12.26 因儀器送修故沒有該期間數據。

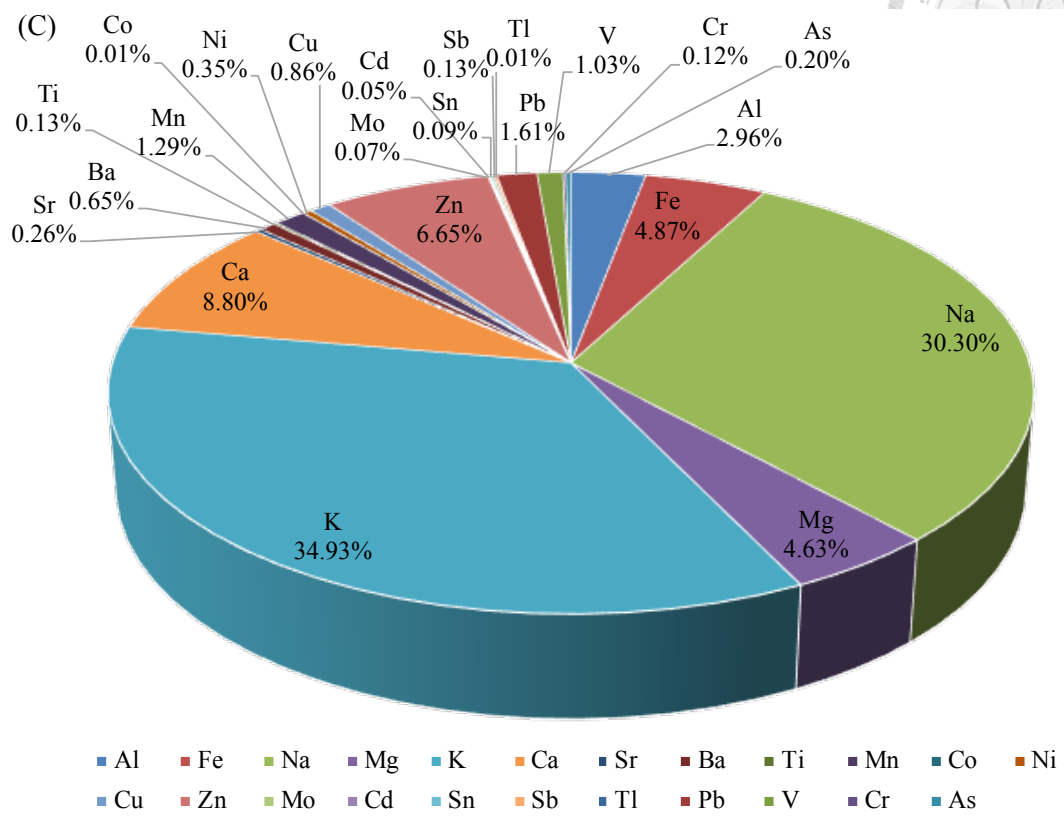


圖 7、採樣期間(2018.10.01~2019.03.03)PM2.5 成份分析：(A) 水溶性離子 (B) 總金屬 (C) 水溶性金屬。2018.12.13~2018.12.26 因儀器送修故沒有該期間數據。

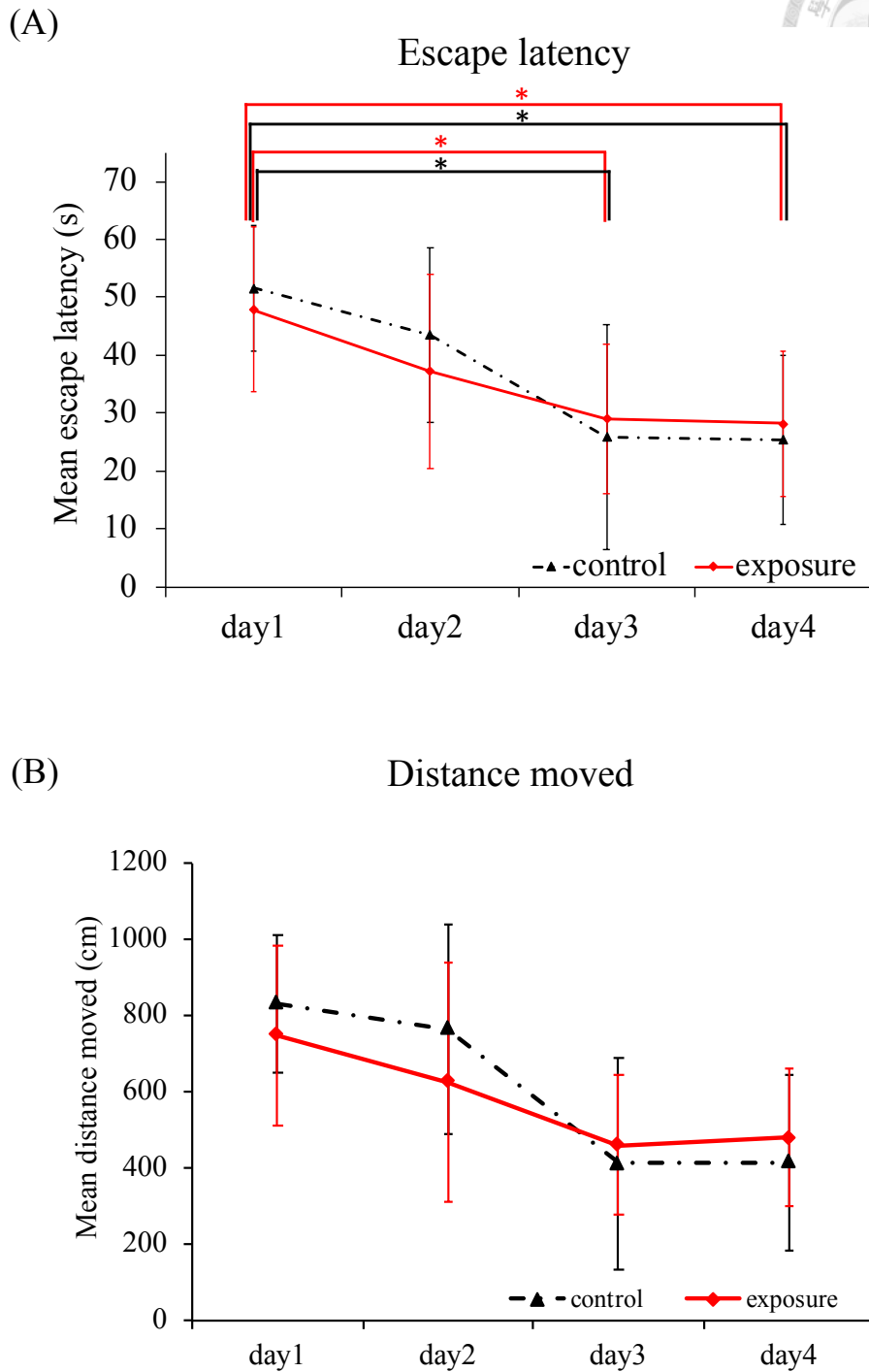
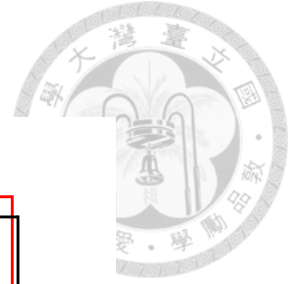


圖 8、莫氏水迷津知識採集階段 (A)逃避潛伏期(Escape latency) (B)移動距離 (Distance moved)。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示 ( $N_{\text{control}}=17$ ;  $N_{\text{exposure}}=15$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組。第二至第四天之逃避潛伏期學習曲線是與第一天相比, \*  $p < 0.05$ 。

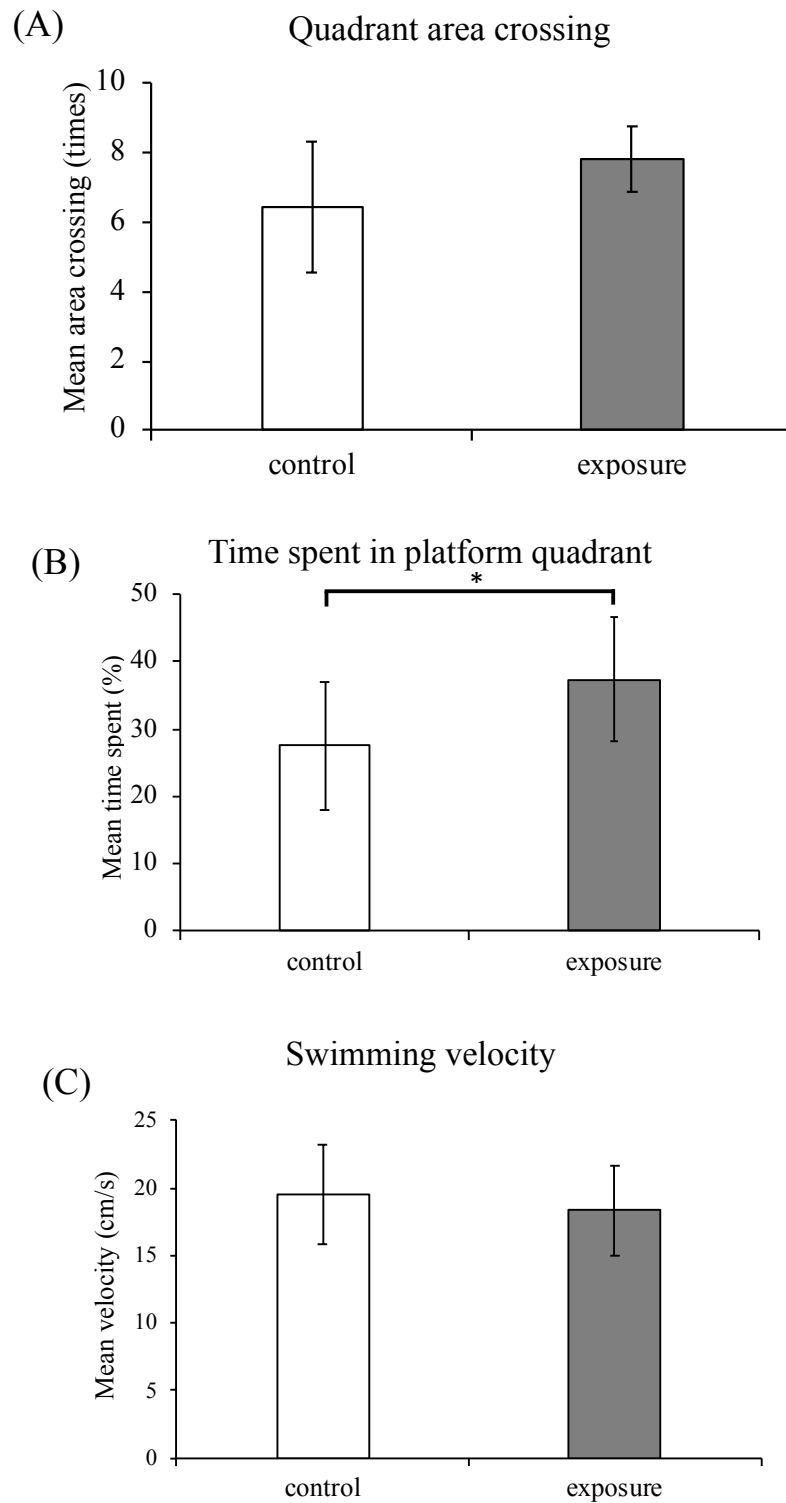


圖 9、莫氏水迷津空間探索實驗 (A) 目標平台象限次數(Quadrant area crossing) (B) 目標平台象限時間(Time spent in platform quadrant) (C)游泳速度(Swimming velocity)。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=17$ ;  $N_{\text{exposure}}=15$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

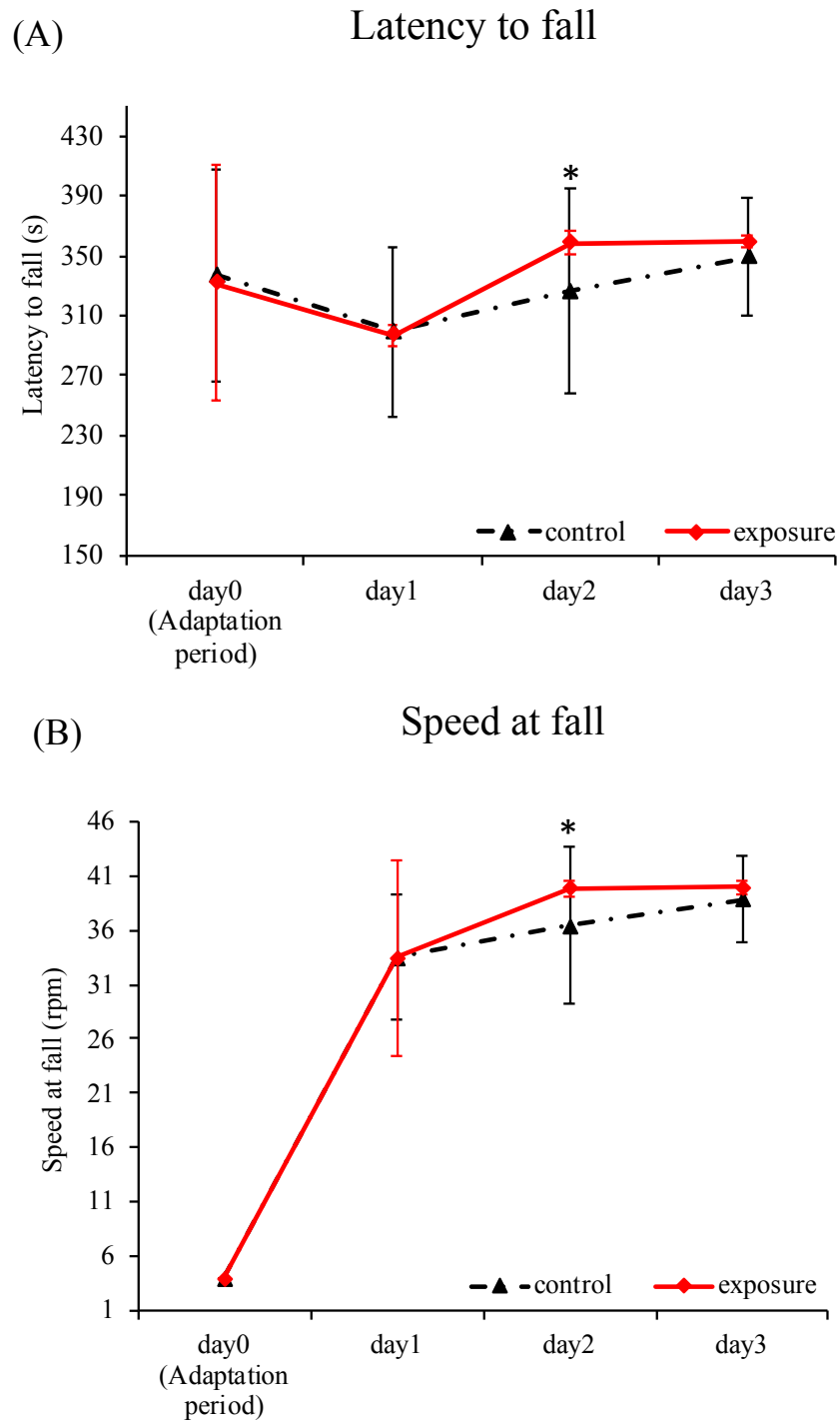


圖 10、滾輪式跑步機實驗 (A)掉落時間(Latency to fall) (B)掉落時滾輪轉速(Speed at fall)。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=17$ ;  $N_{\text{exposure}}=15$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。



RT: 0.00 - 15.00 SM: 15B

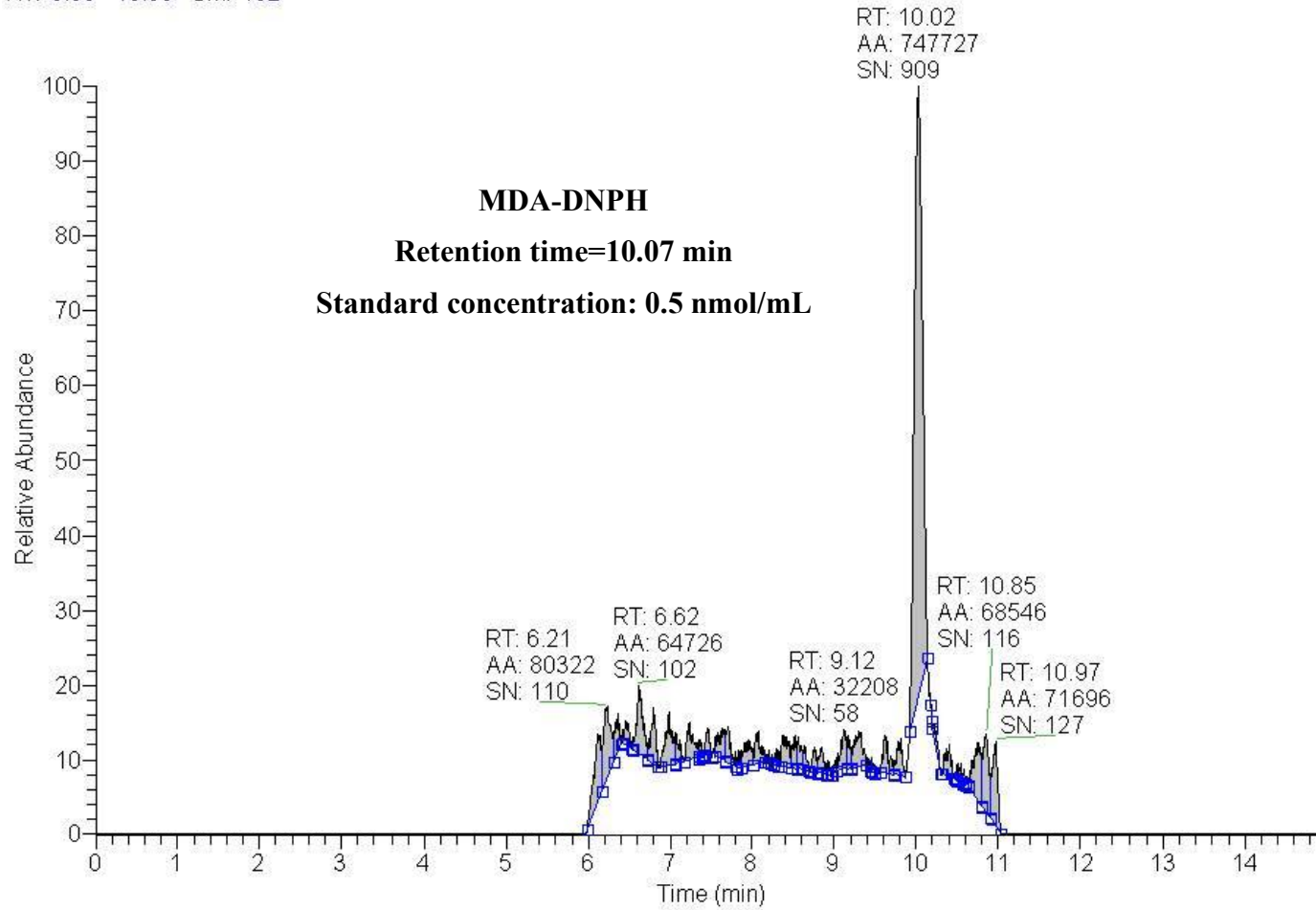
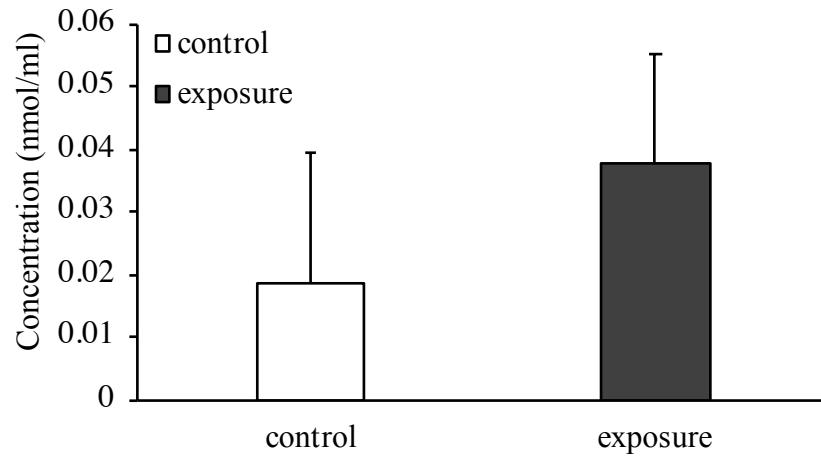


圖 11、MDA-DNPH 層析圖



(A) MDA in cerebral cortex



(B) MDA in cerebellum

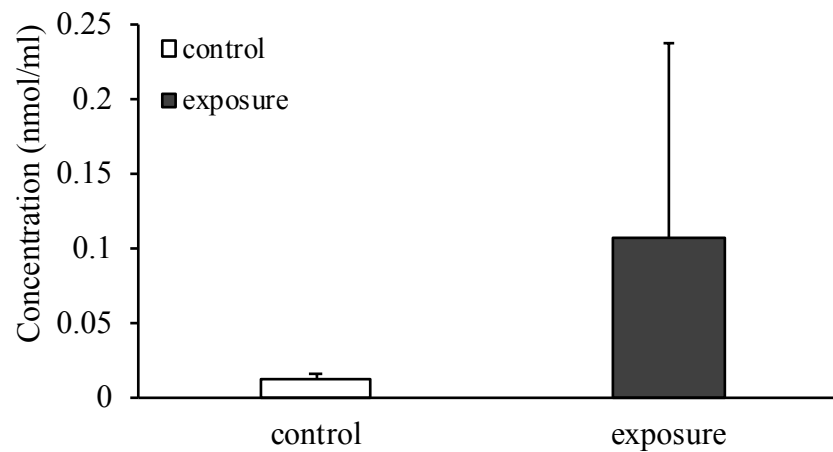


圖 12、各腦區之 MDA 濃度 (A)皮質(cerebral cortex) (B)小腦(cerebellum)。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。

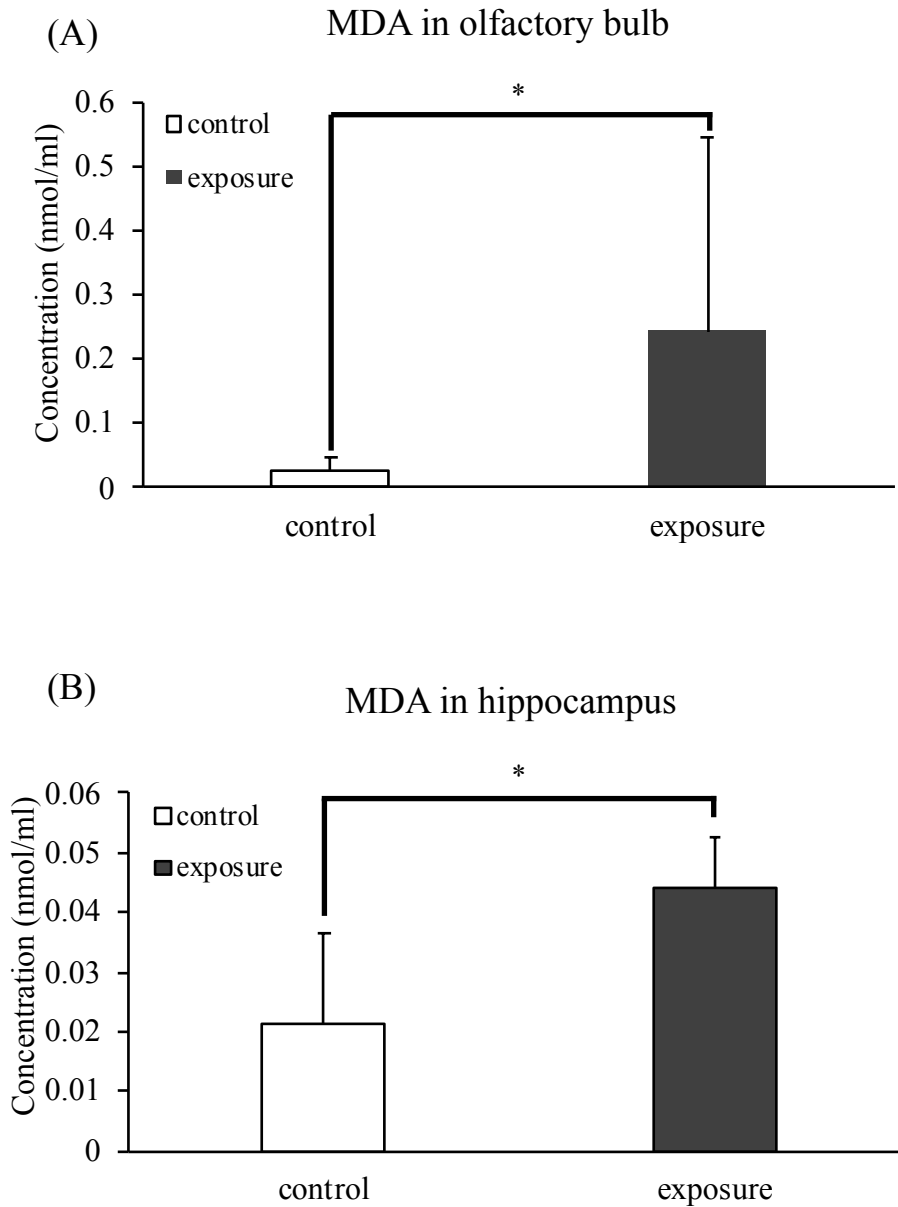


圖 13、各腦區之 MDA 濃度 (A)嗅球(olfactory) (B)海馬迴(hippocampus)。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ； $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



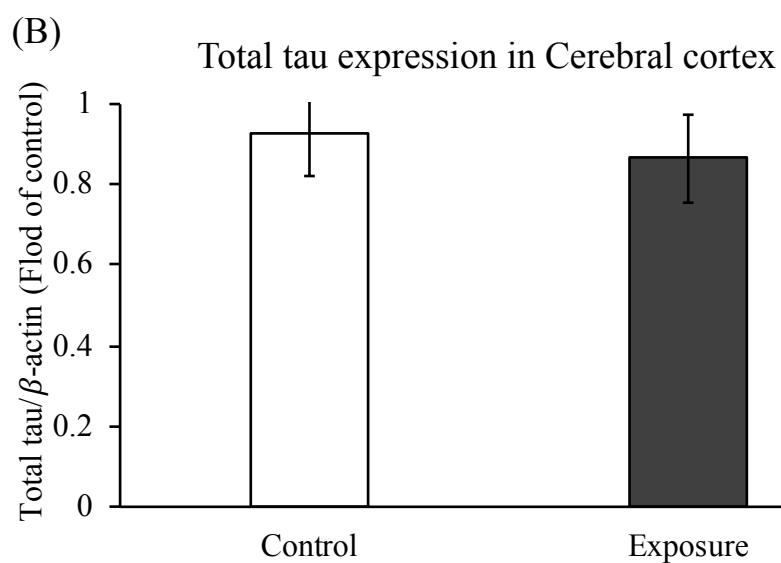
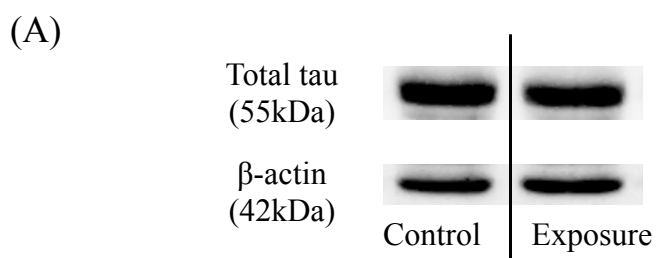
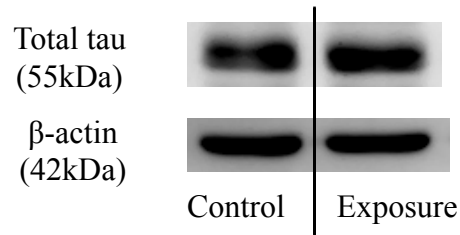


圖 14、皮質之 t-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

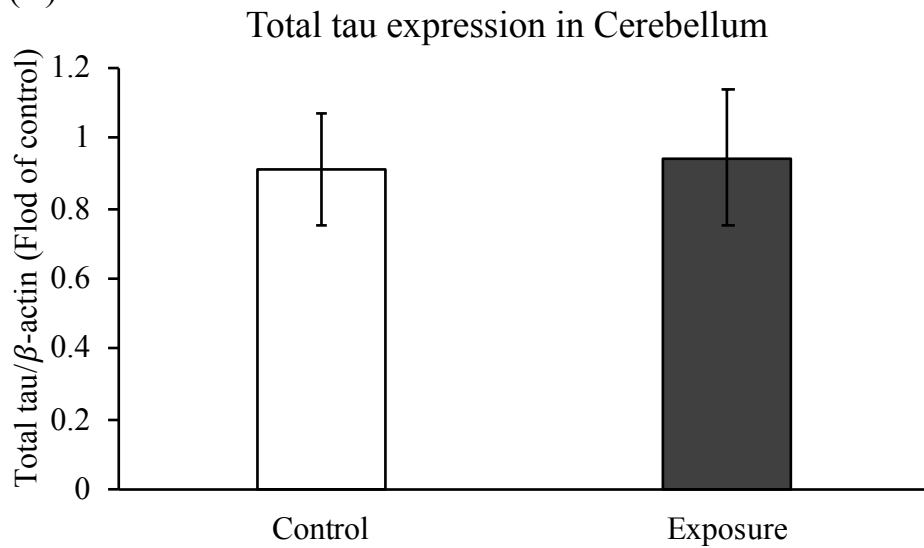
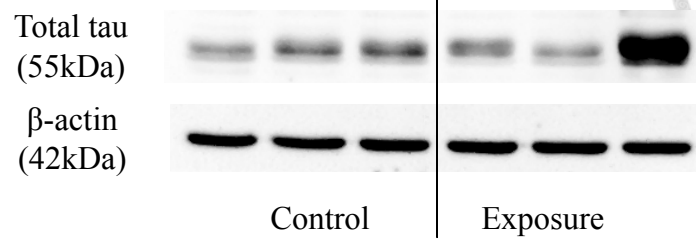


圖 15、小腦之 t-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$  ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

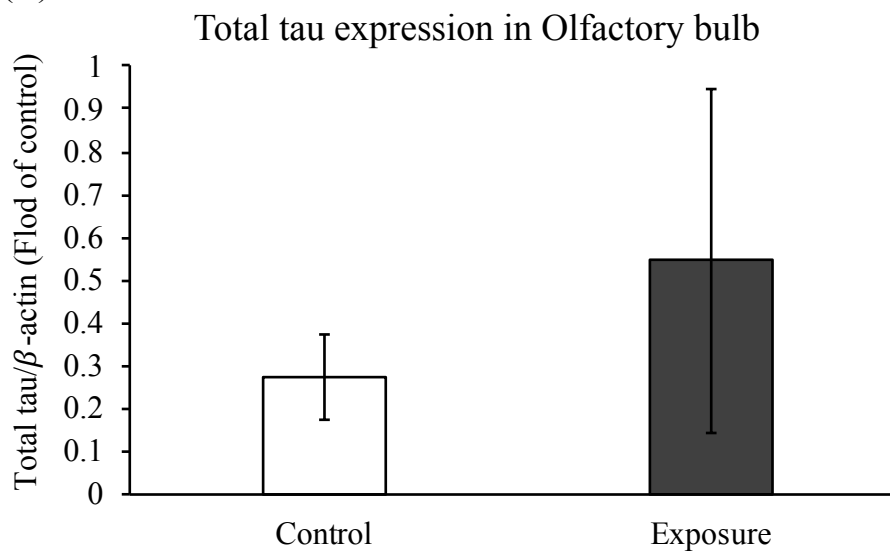
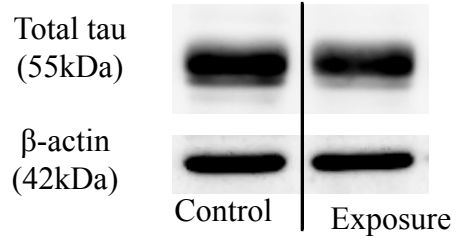


圖 16、嗅球之 t-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

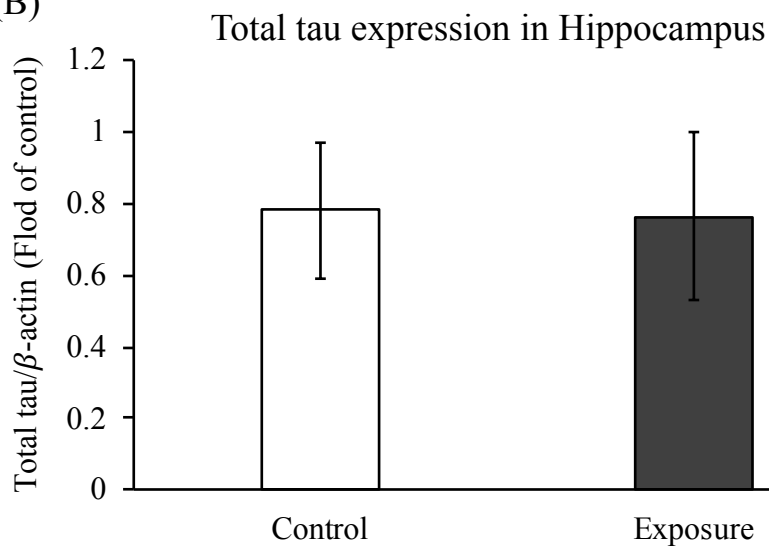
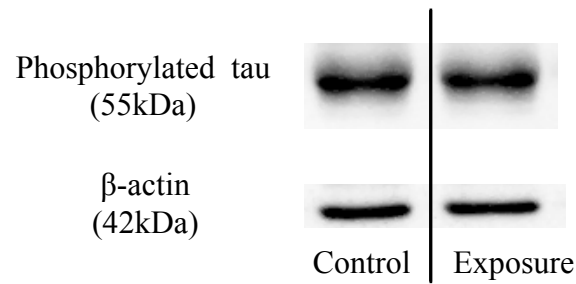


圖 17、海馬迴之 t-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

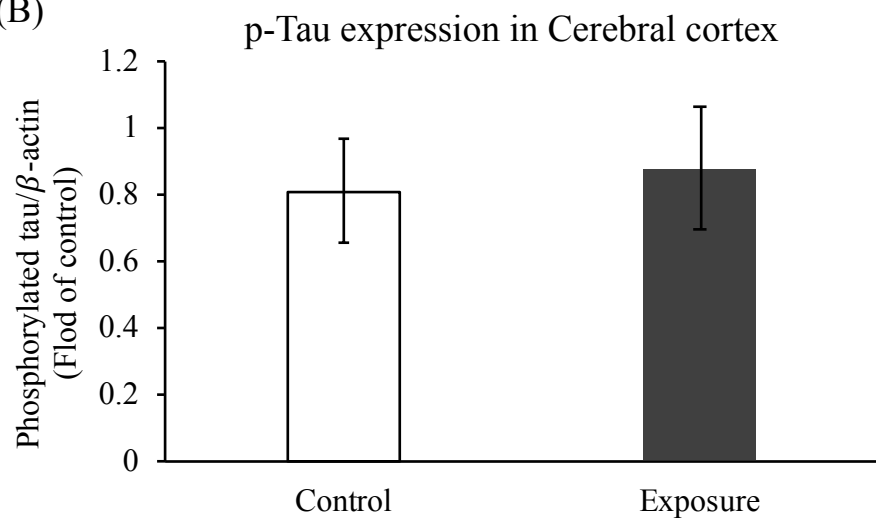
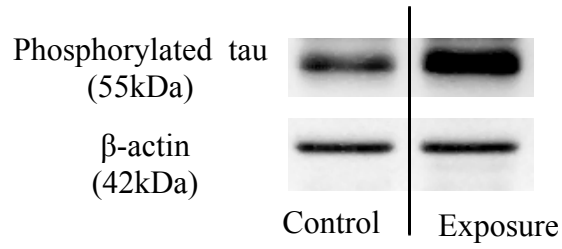


圖 18、皮質之 p-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

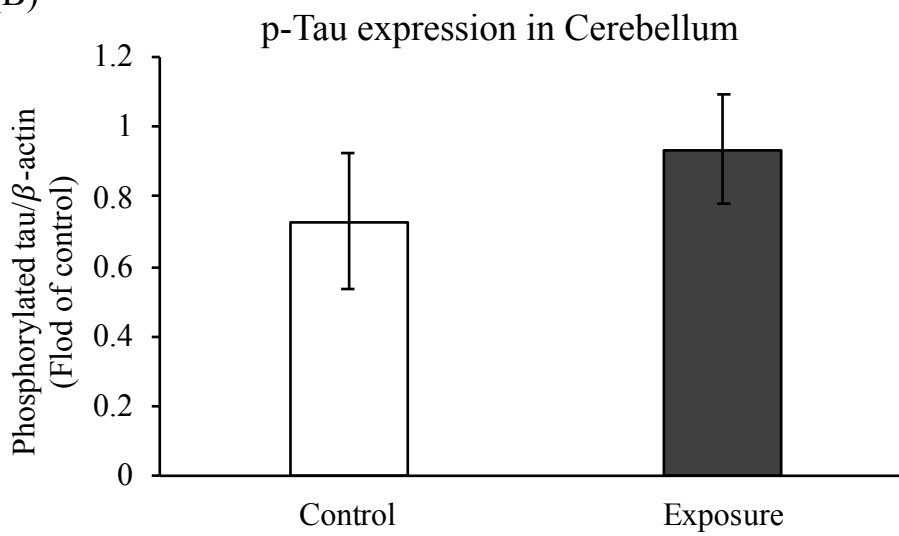
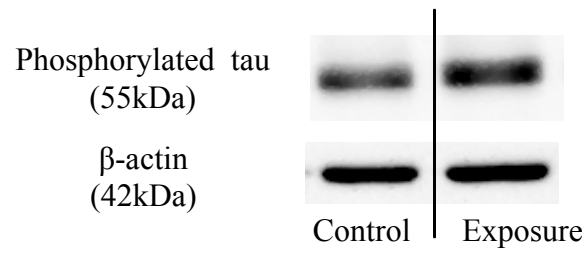


圖 19、小腦之 p-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

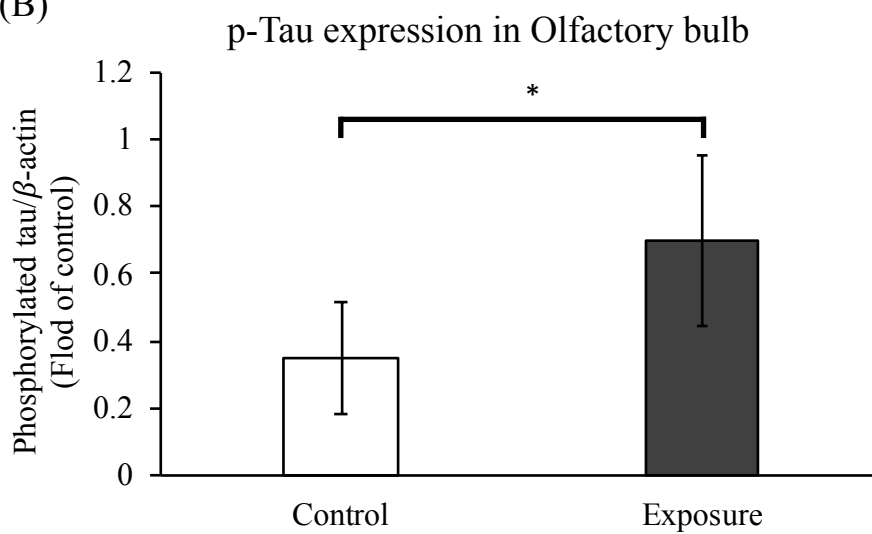
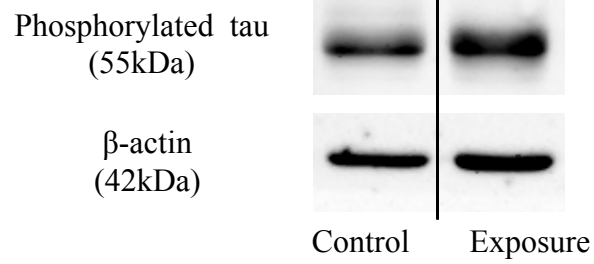


圖 20、嗅球之 p-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

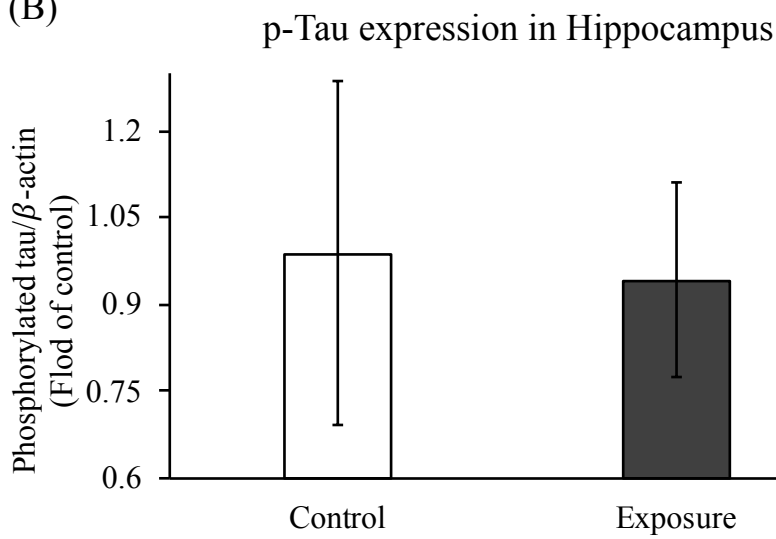
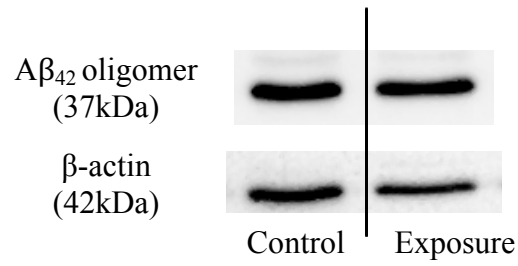


圖 21、海馬迴之 p-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$  ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。





(A)



(B)

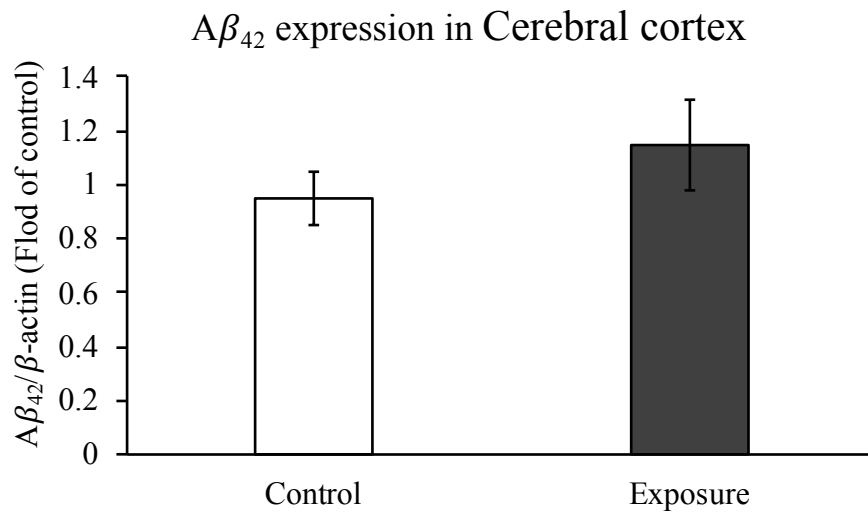
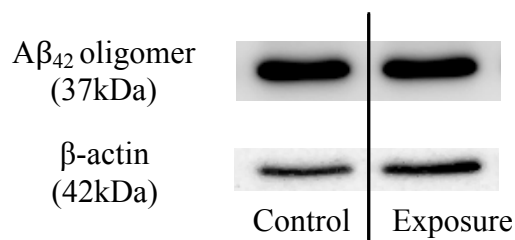


圖 22、皮質之 Aβ<sub>1-42</sub> 蛋白表現量 (A) 西方點墨法分析 (B) 半定量分析。結果以 mean ± SE 做表示 (N<sub>control</sub>=7; N<sub>exposure</sub>=6)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\* p < 0.05。

(A)



(B)

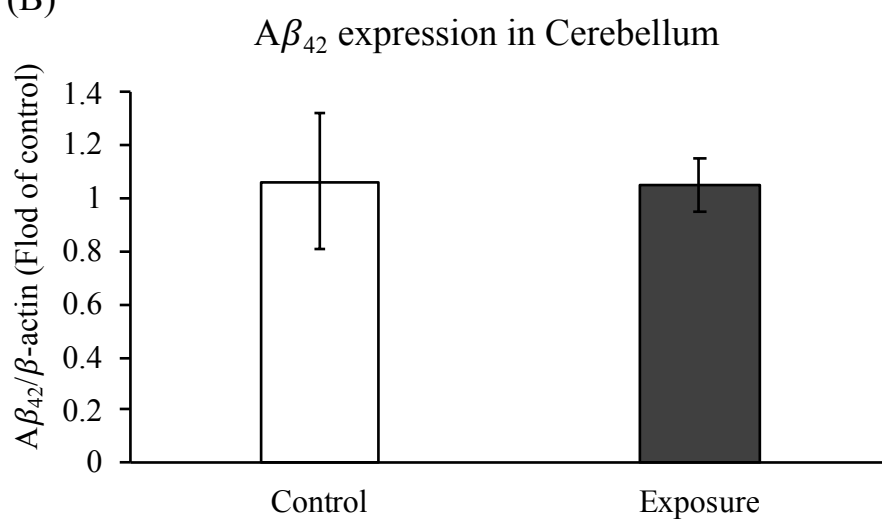
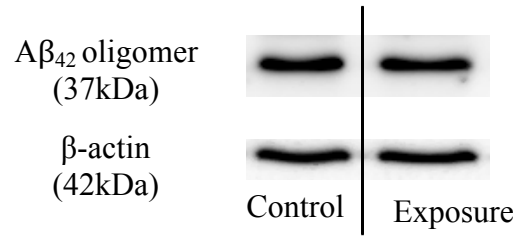


圖 23、小腦之 A $\beta_{1-42}$  蛋白表現量 (A) 西方點墨法分析 (B) 半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示 ( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

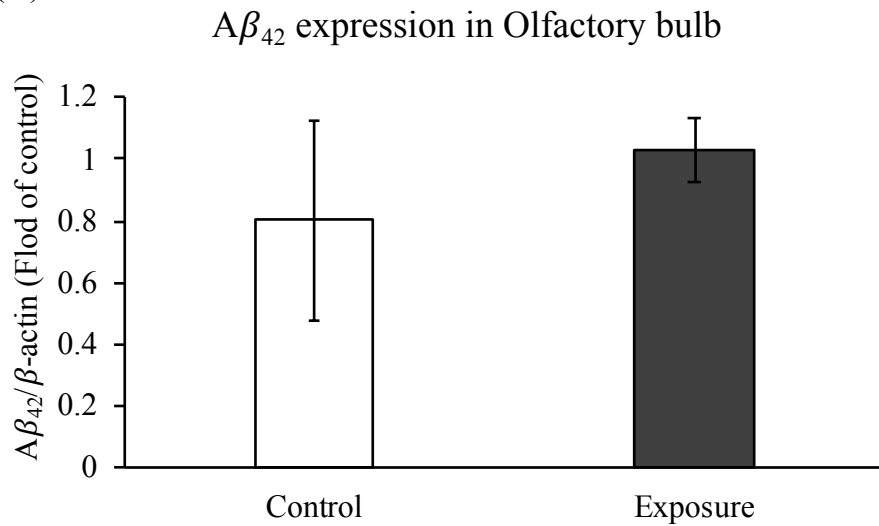
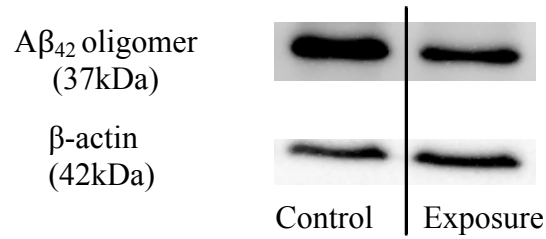


圖 24、嗅球之 Aβ<sub>1-42</sub> 蛋白表現量 (A) 西方點墨法分析 (B) 半定量分析。結果以 mean ± SE 做表示 (N<sub>control</sub>=7; N<sub>exposure</sub>=6)。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\* p < 0.05。



(A)



(B)

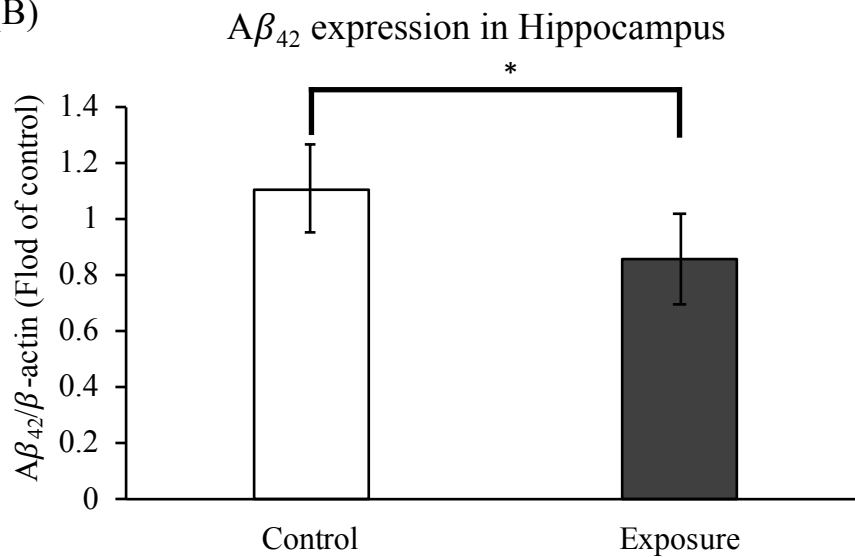
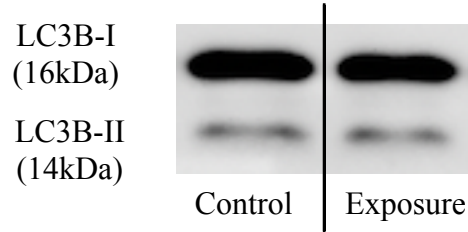


圖 25、海馬迴之  $A\beta_{1-42}$  蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以  $\text{mean} \pm \text{SE}$  做表示 ( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

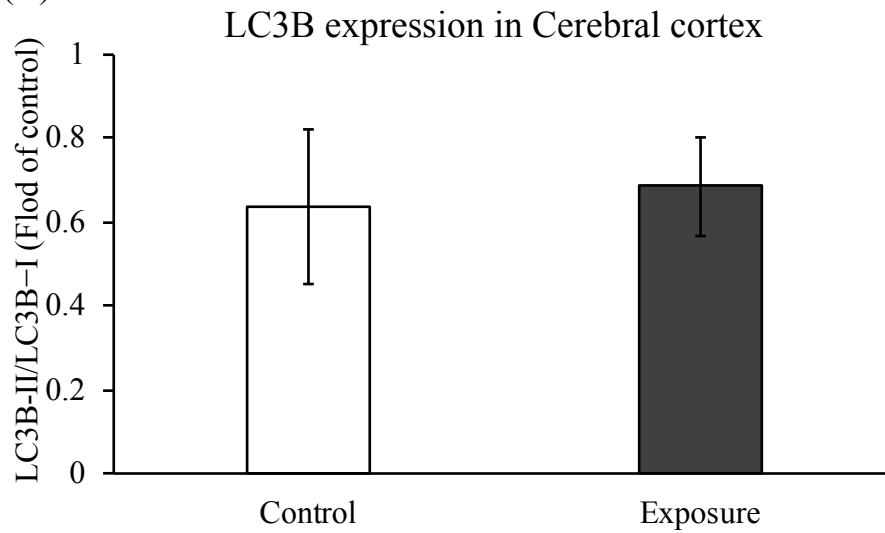
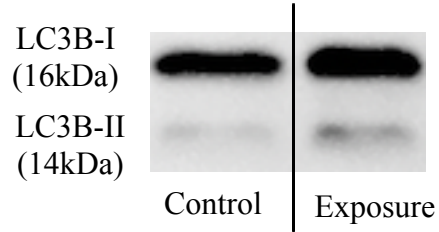


圖 26、皮質之 LC3B 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

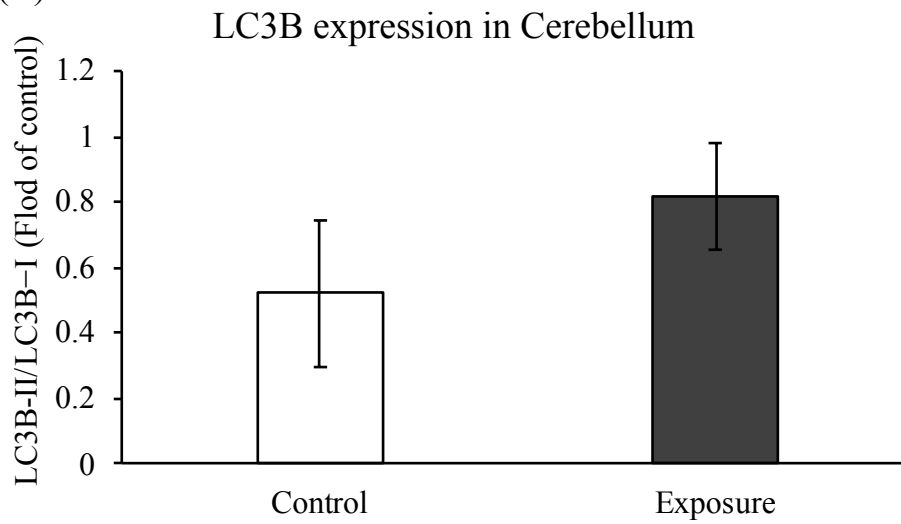
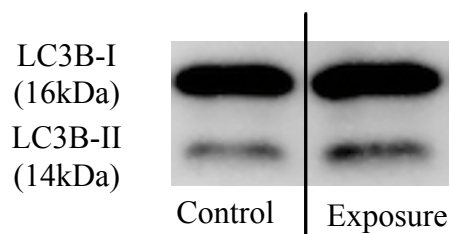


圖 27、小腦之 LC3B 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

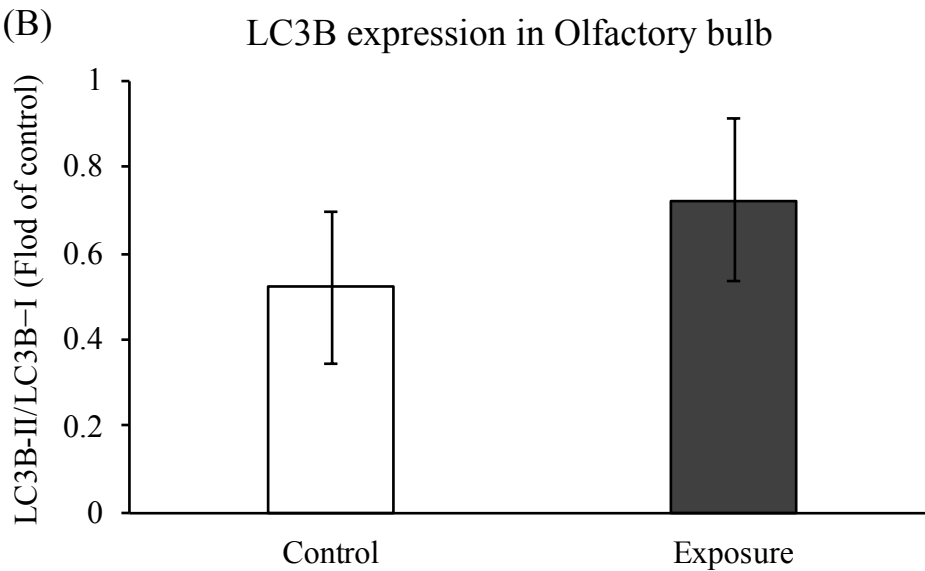
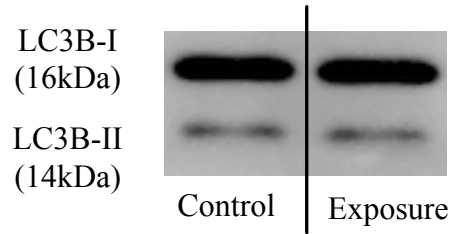


圖 28、嗅球之 LC3B 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組, \*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

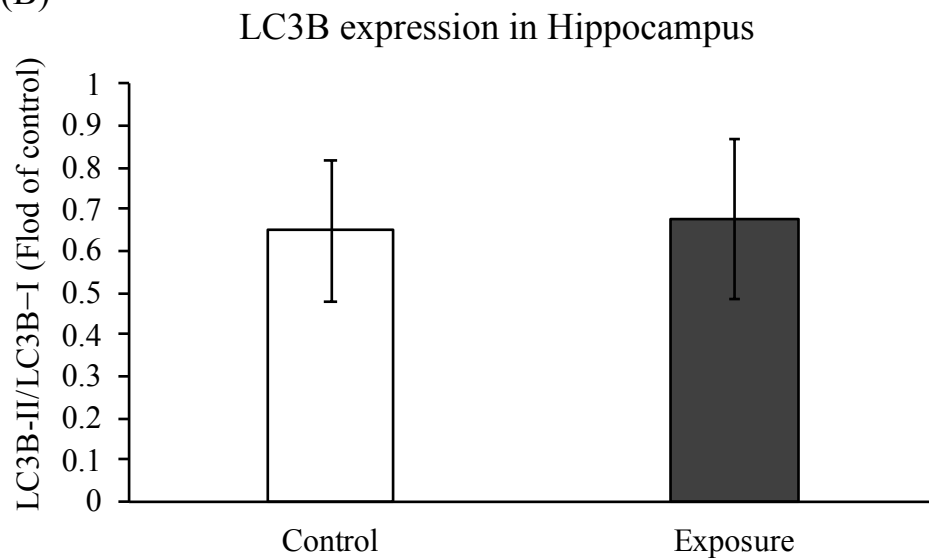
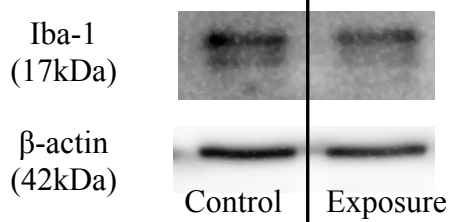


圖 29、海馬迴之 LC3B 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。





(A)



(B)

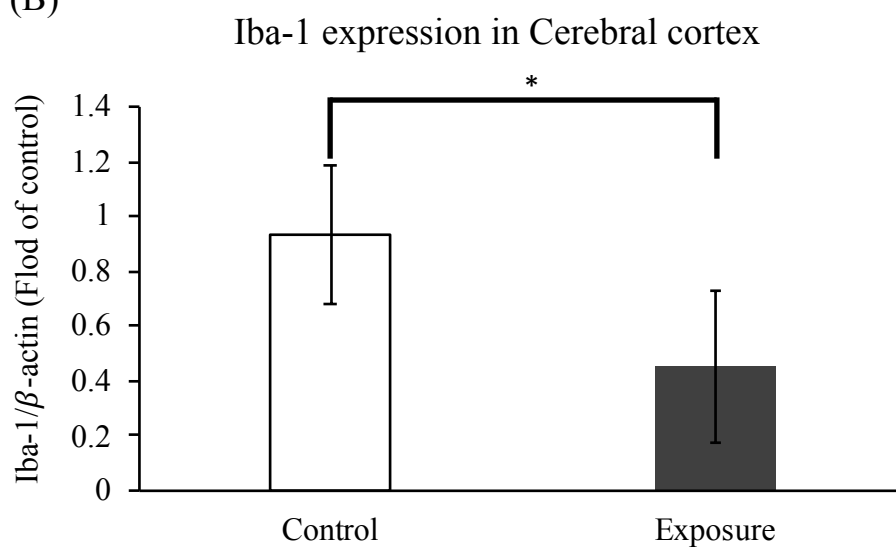
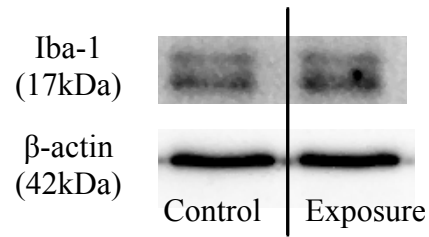


圖 30、皮質之 Iba-1 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

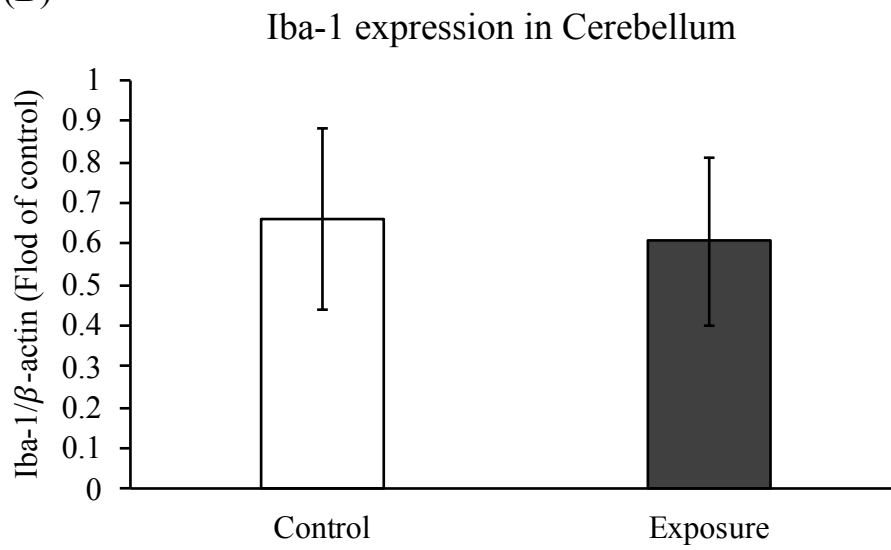
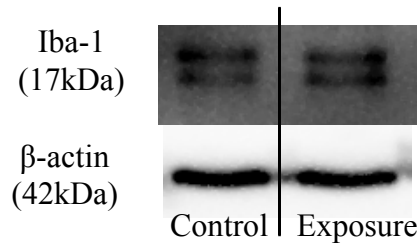


圖 31、小腦之 Iba-1 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

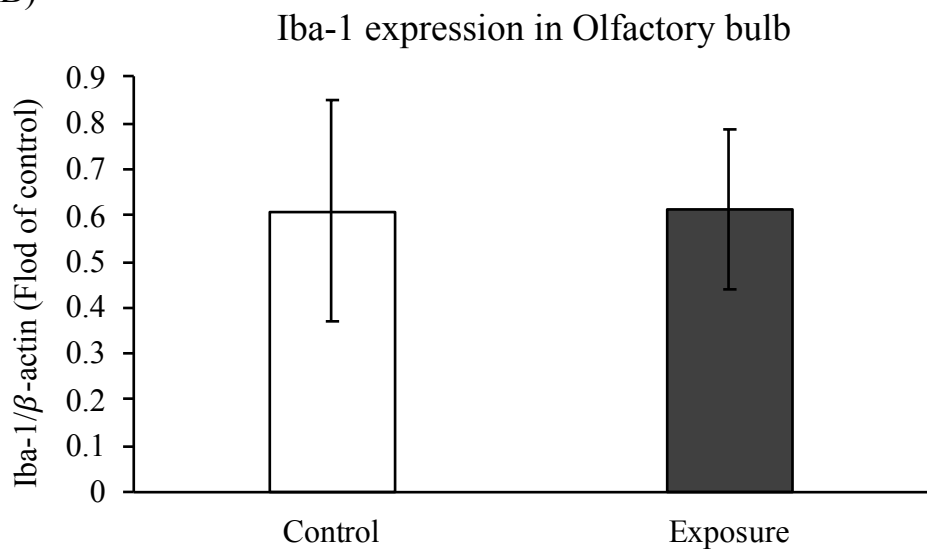
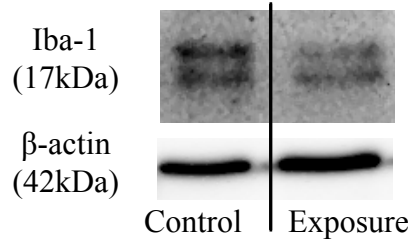


圖 32、嗅球之 Iba-1 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。



(A)



(B)

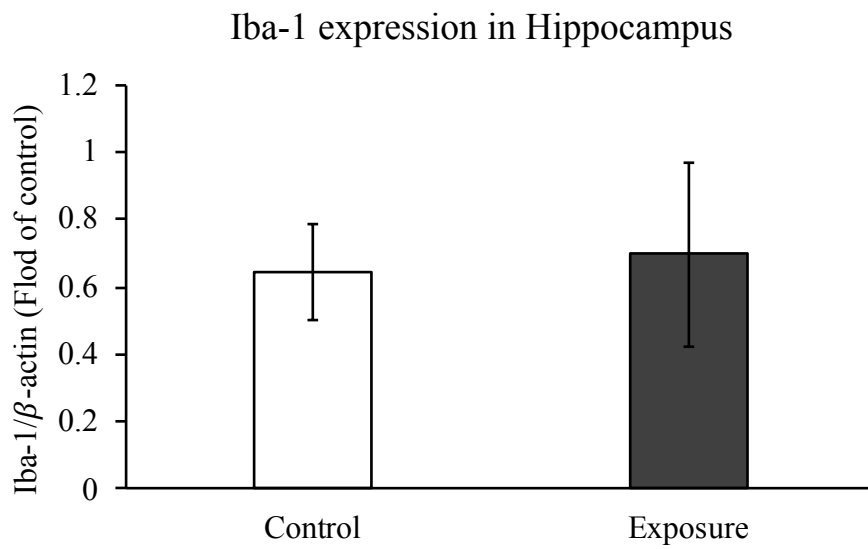


圖 33、海馬迴之 Iba-1 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 (B)半定量分析。結果以 mean  $\pm$  SE 做表示 ( $N_{\text{control}}=7$ ;  $N_{\text{exposure}}=6$ )。以 Wilcoxon rank sum test 比較暴露組及控制組，\*  $p < 0.05$ 。

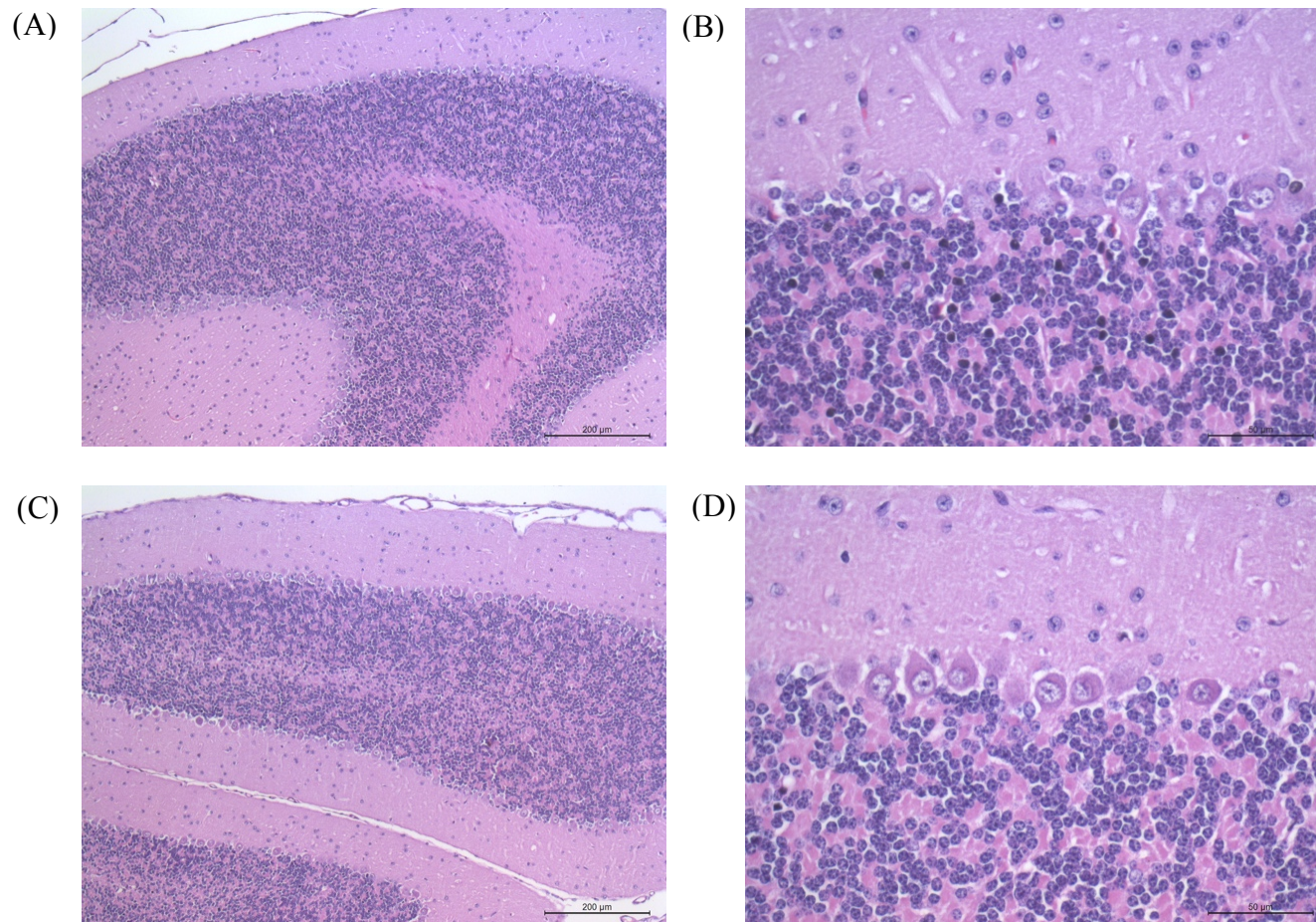


圖 34、暴露 3 個月小腦病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200  $\mu\text{m}$ , B and D: scale bars measure 50  $\mu\text{m}$ .

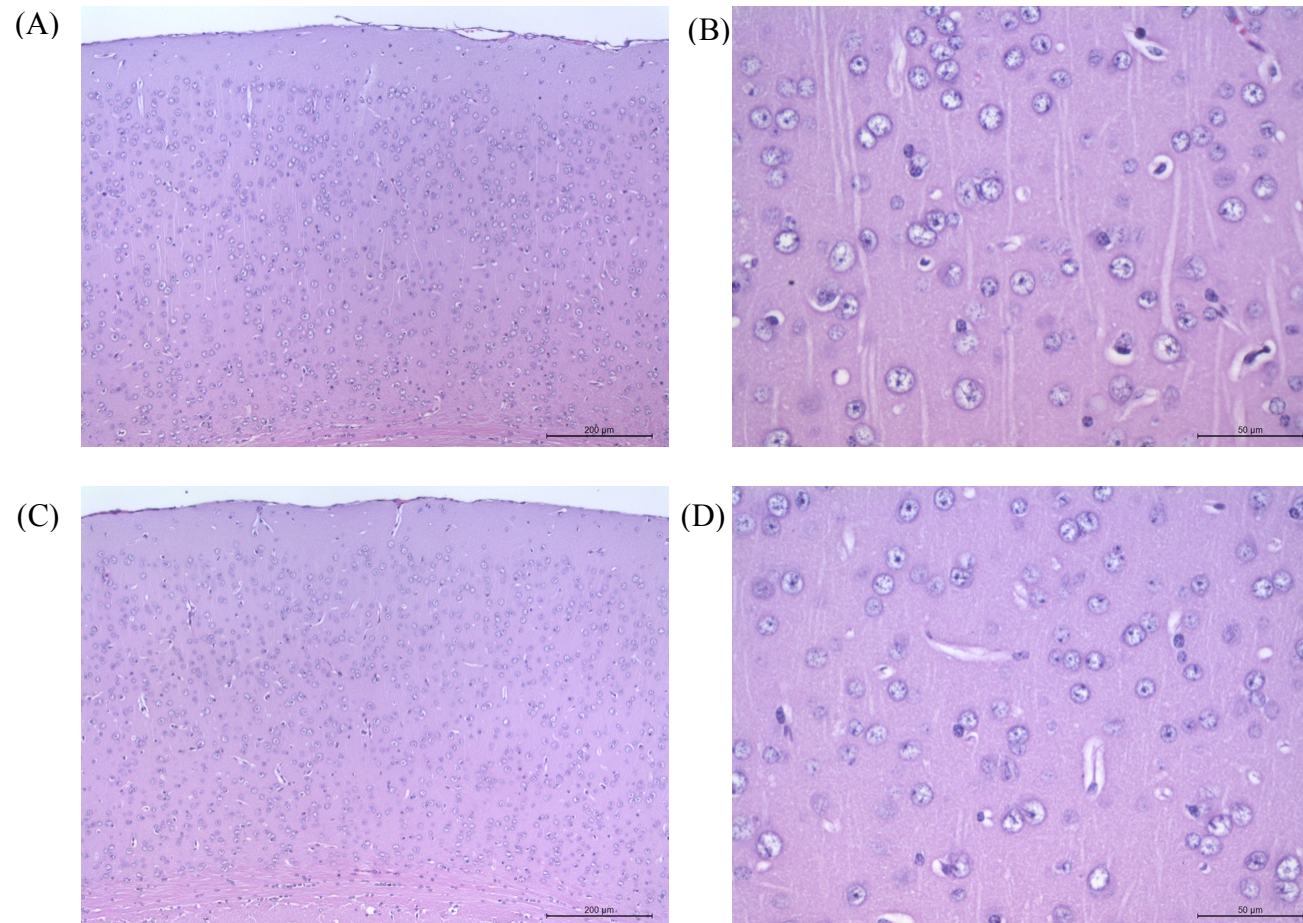


圖 35、暴露 3 個月皮質病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200  $\mu\text{m}$ , B and D: scale bars measure 50  $\mu\text{m}$ .

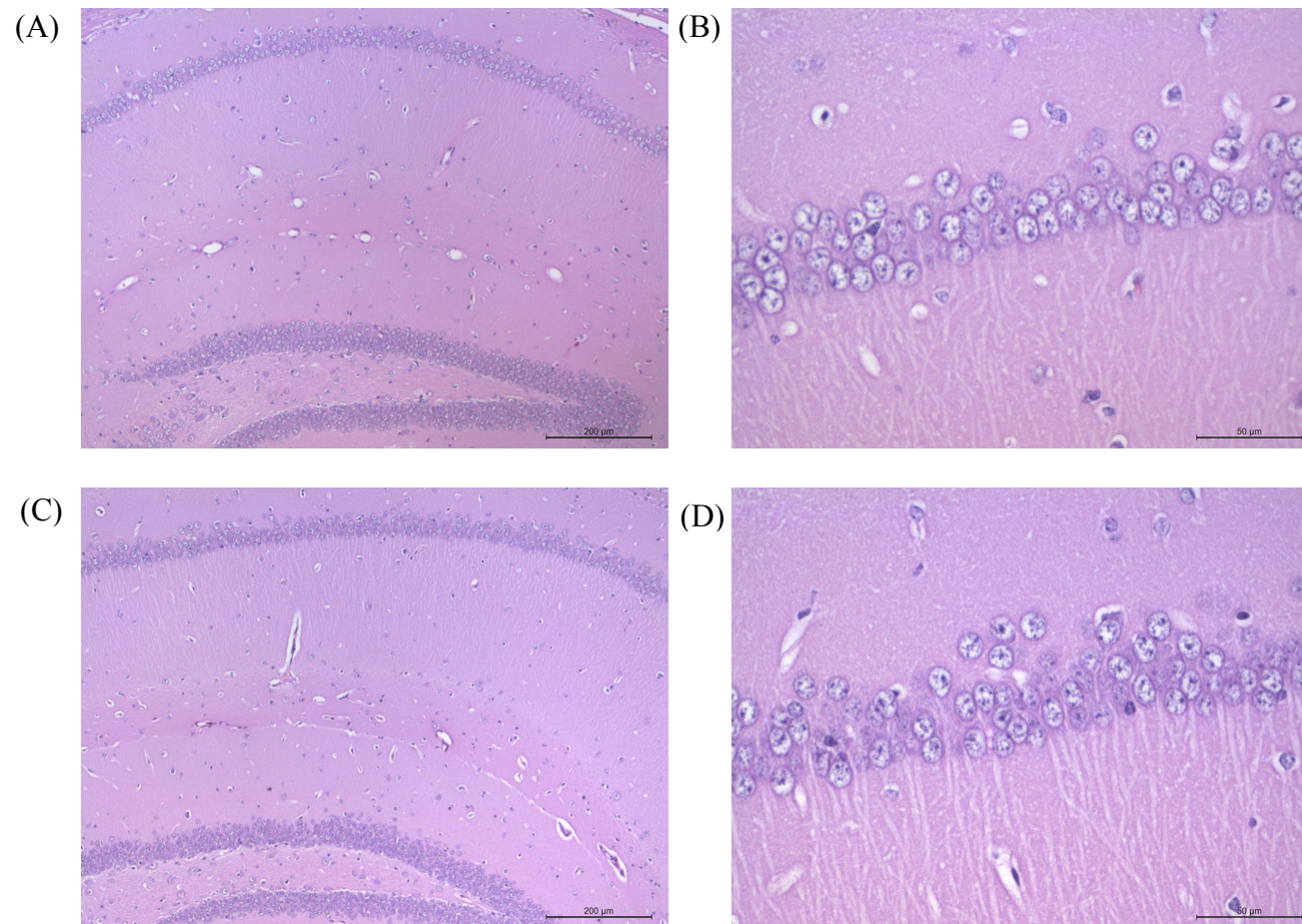


圖 36、暴露 3 個月海馬迴病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200  $\mu\text{m}$ , B and D: scale bars measure 50  $\mu\text{m}$ .

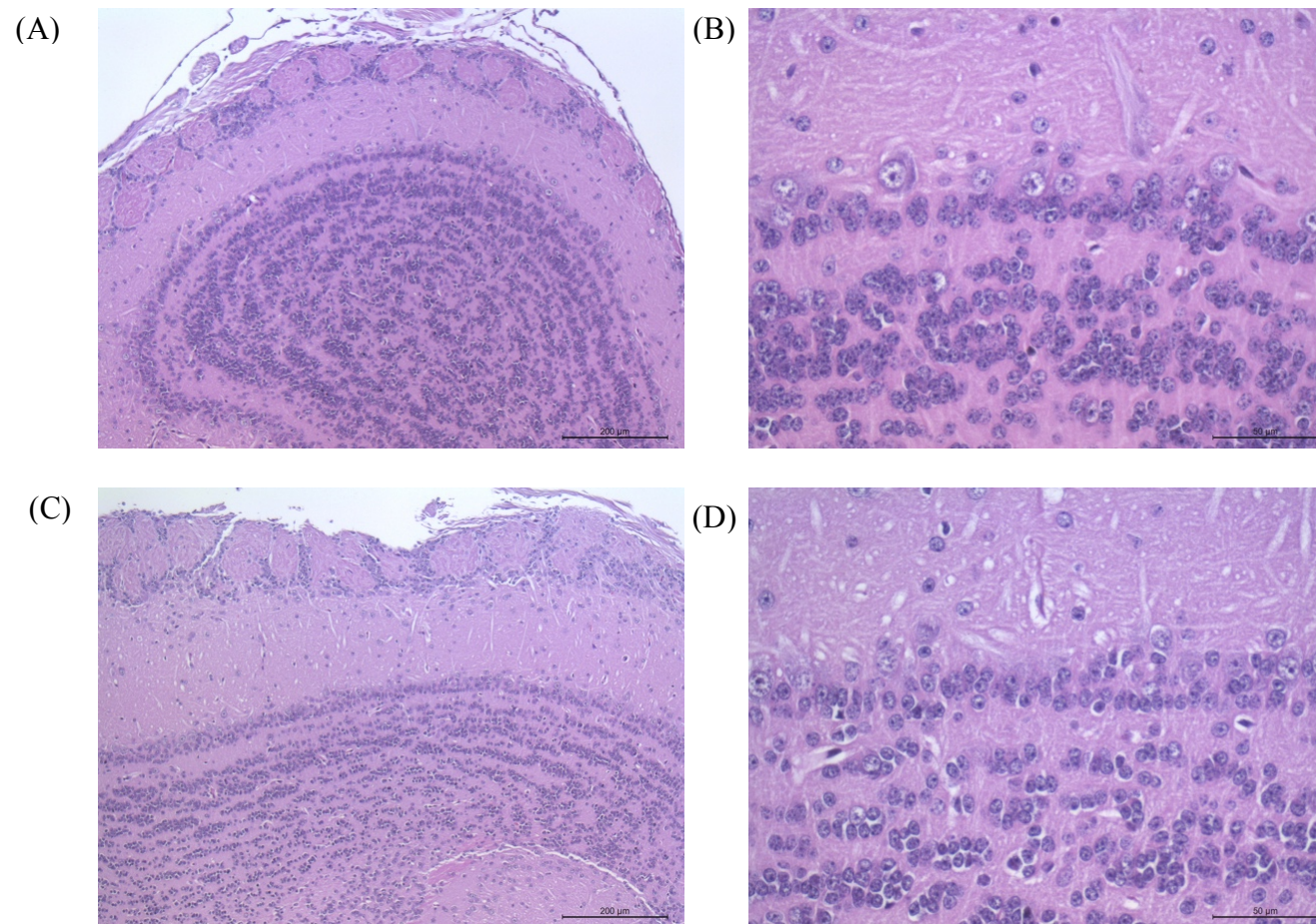


圖 37、暴露 3 個月嗅球病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200  $\mu\text{m}$ , B and D: scale bars measure 50  $\mu\text{m}$ .



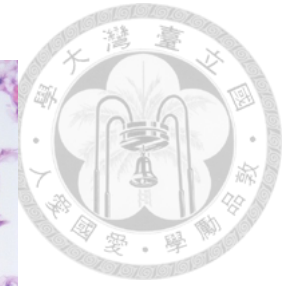
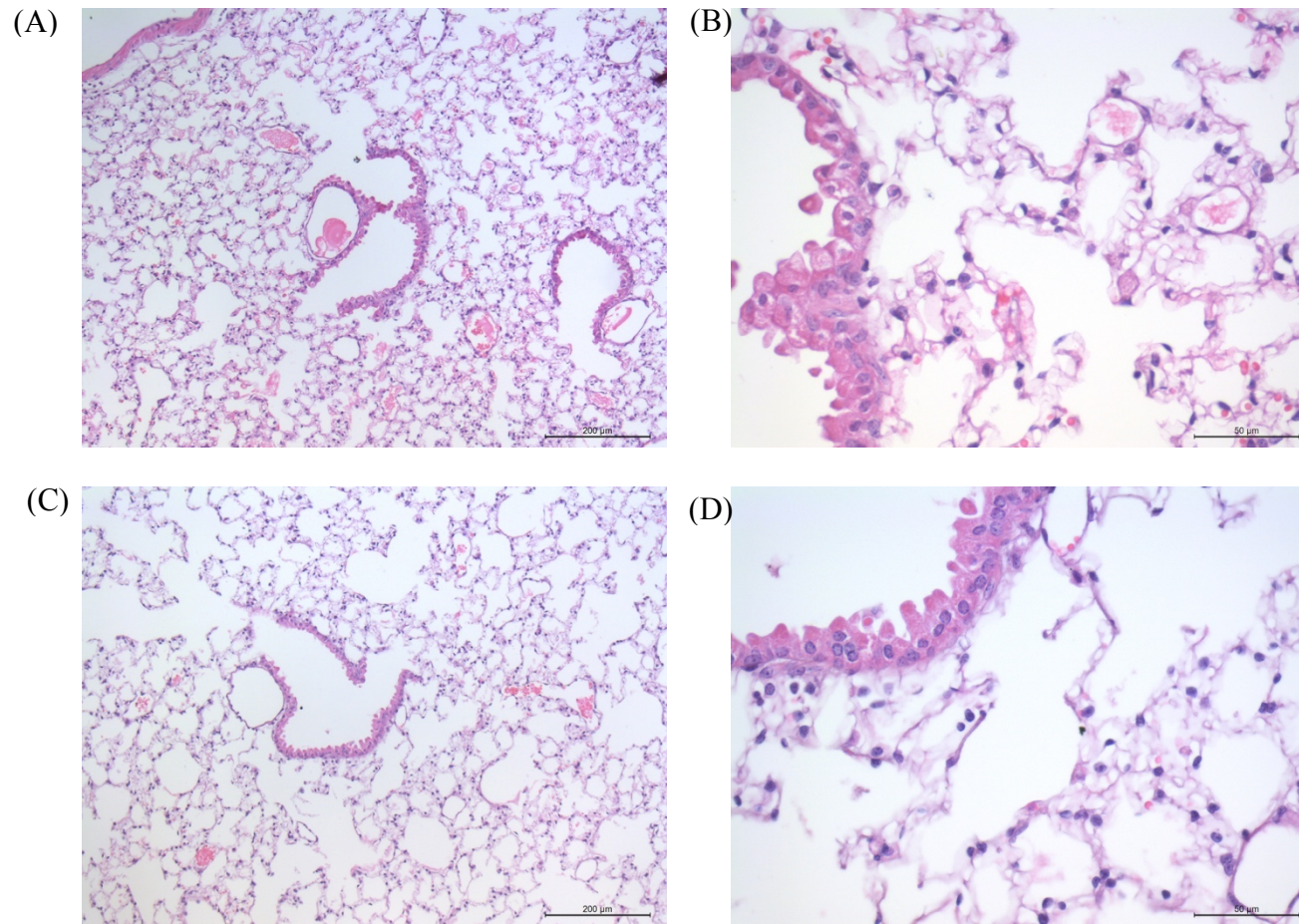


圖 38、暴露 3 個月肺部病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200  $\mu\text{m}$ , B and D: scale bars measure 50  $\mu\text{m}$ .

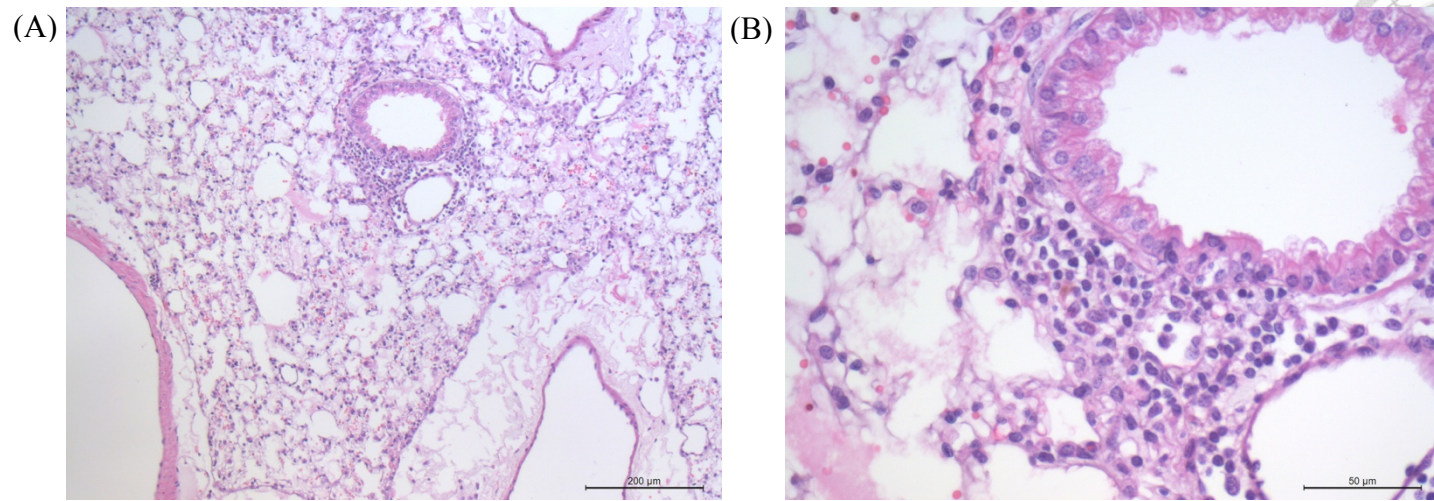


圖 39、暴露 3 個月非特異性肺部病理切片 (A) scale bars measure 200  $\mu\text{m}$  (B) scale bars measure 50  $\mu\text{m}$ .