

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

口咽吸入柴油引擎微粒在阿茲海默症三基因轉殖
小鼠中對中樞神經系統毒性的影響

Effects of oropharyngeal aspiration to diesel exhaust
particles on central nervous system toxicity
in 3xTg-AD mice

傅晨歡

Chen-Huan Fu

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

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

口咽吸入柴油引擎微粒在阿茲海默症三基因轉殖小鼠中
對中樞神經系統毒性的影響

Effects of oropharyngeal aspiration to diesel exhaust particles on
central nervous system toxicity in 3xTg-AD mice

本論文係傅晨歡君 (R06841015) 在國立臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所完成之碩士學位論文，於民國 108 年 6 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

鄭榮

(簽名)

(指導教授)

陳鑫昌

莊棧奇

陳達夫


林靖愉

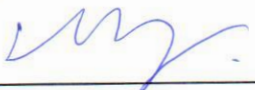
National Taiwan University


Thesis Verification Form

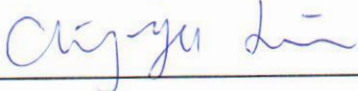
We hereby recommend that thesis submitted by Chen-Huan, Fu entitled "Effects of oropharyngeal aspiration to diesel exhaust particles on central nervous system toxicity in 3xTg-AD mice" be accepted as fulfilling the thesis requirement for the degree of Master of Science in the Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene.

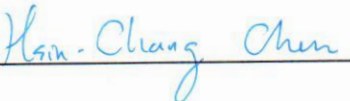
Thesis committee:











Date 06/25/2019 (mm/dd/yyyy)



致謝

首先感謝我的指導教授鄭尊仁老師，除了讓我進入 TJC Lab 這個大家庭外，也謝謝老師在每一次的討論中教導我們如何設計實驗、規劃時間，以及對於研究領域的獨立思考能力，最後撰寫論文或海報時也為我找出問題及提供精闢的建議。感謝兩位大貴人柴哥、Royal，在我們碩一的時候努力將我們拉拔長大，除了實驗技巧，還有實驗室所有需要注意的眉角，讓我們能夠獨立規劃、進行實驗，在你們畢業後仍然給予我們最大的協助。感謝景洲、琬儒兩位學弟妹在實驗室大小事務上的協助，讓趕實驗的我們減輕了不少負擔。最後一定要好好感謝我的實驗伙伴怡瑄（俗稱 MB），想當初碩一時，我們相敬如賓的樣子，中間經歷了一起做熬夜報告、戰戰兢兢地進老師辦公室、去各縣市玩耍、互相幫忙暴露實驗、熬夜上機睡在討論室凌晨還被冷醒、追韓劇、吃遍喝遍各種美食、笑聲傳遍整個公衛大樓，到現在我們都完成了碩班最大的挑戰，真是謝謝怡瑄才能讓我碩班兩年的身心靈狀態都很健康愉快！

感謝動物中心及獸醫師在動物飼育方面的建議，感謝陳鑫昌老師、邱振源老師在分析實驗上協助我們，就算我們什麼都不太了解，兩位老師還是不厭其煩地給予建議與幫忙，讓我們順利完成分析實驗。感謝莊校奇老師、林靖愉老師、陳達夫醫師及陳鑫昌老師在口試時的建議，讓論文能夠更加完整。

最後謝謝我的家人和小千在這段日子的支持與鼓勵，讓我能夠克服一路上的挑戰、並完成碩士學位。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。

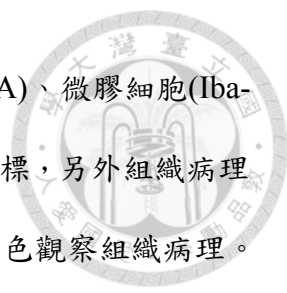
晨歡 謹記 108 年 7 月

中文摘要



許多空氣污染的流行病學研究已經證實大氣微粒會對人類造成健康危害，越來越多動物研究的結果也支持暴露微粒會引起中樞神經系統毒性，包括神經發炎、氧化壓力，進而引起神經退化性疾病，如阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)。而都市中最主要的污染來源是交通相關的空氣污染物，其中由柴油引擎燃燒所排放的柴油引擎微粒(diesel exhaust particles, DEPs)更是微粒的主要來源。先前我們實驗室已利用 C57BL/6 小鼠急性暴露柴油引擎微粒，發現腦中促發炎反應因子、脂質過氧化及 Tau 蛋白均有顯著地增加，但其中微粒的所引起的中樞神經毒理機制仍不清楚，且使用一般品系小鼠的結果並不一致，故本研究選用阿茲海默症模式動物—三基因轉殖小鼠(3xTg-AD mice)來進行實驗，這種小鼠是一種能夠同時發展出兩種阿茲海默症特定病理變化的小鼠，包括由乙型類澱粉蛋白(amyloid-beta, A β)累積所形成的類澱粉蛋白斑塊(amyloid plaque)，以及由過度磷酸化 Tau 蛋白(phosphorylated Tau protein)聚集而成的神經纖維纏結(Neurofibrillary Tangles, NFTs)。因此本研究利用 3xTg-AD 小鼠來探討暴露柴油引擎微粒是否會引起中樞神經系統毒性，包括氧化壓力、微膠細胞活化、自噬作用失調、阿茲海默症病理變化等現象。

本研究使用 6-8 週大的 34 隻 3xTg-AD 母鼠，以口咽吸入的方式在三週內重複暴露柴油引擎微粒 6 次，每次暴露 50 μ g 的微粒，每隻小鼠的總劑量為 300 μ g，並於最後一次暴露後 24 小時犧牲。柴油引擎微粒是由美國國家標準暨技術研究院購買的標準品，型號為 SRM1650b，代表重型柴油引擎燃燒所排放出的微粒。動物犧牲後會進行生化指標分析及組織病理分析，生化指標分析的部分會利用液相層析串聯質譜法(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)以及西方



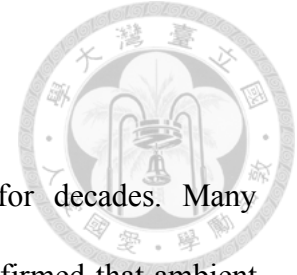
點墨法(Western Blot)分別測量脂質過氧化(malondialdehyde, MDA)、微膠細胞(Iba-1)、自噬作用(LC3b)、阿茲海默症特定病理變化(A β ₄₂, t-Tau)等指標，另外組織病理分析則是將灌流固定後的腦、肺部進行石蠟包埋，並以 H&E 染色觀察組織病理。

實驗結果顯示，在大腦皮質、小腦、海馬迴的脂質過氧化指標 MDA，暴露組均比控制組高，但僅在海馬迴中達顯著差異($p < 0.05$)，其餘中樞神經系統毒性指標在腦部均無顯著差異；在暴露組的肺部病理切片中觀察到輕微的發炎反應、碳粒沉積，部分控制組則是呈現最小程度的發炎反應，而暴露組和控制組的腦部病沒有顯著的病理變化。

根據本次的實驗結果發現，急性暴露柴油引擎微粒會誘導腦部的脂質過氧化，其中掌管記憶與學習的海馬迴是最易感的腦區，但其餘指標則是沒有顯著的變化，對於柴油引擎微粒是否會引起微膠細胞活化、自噬作用失調，甚至是阿茲海默症病徵的生成並不清楚。我們認為未來可以依照本次的研究設計進行修正，包括實驗動物的年齡、暴露後的實驗終點等，仰賴更進一步的研究以釐清柴油引擎微粒如何引起中樞神經系統毒性。

關鍵字：柴油引擎微粒、口咽吸入、中樞神經系統毒性、微膠細胞、氧化壓力、自噬作用

Abstract



Air pollution has been known as a major health threat for decades. Many epidemiological and toxicological studies of air pollution have confirmed that ambient particulate matter can cause adverse effects on the central nervous system (CNS), including neuroinflammation, oxidative stress, autophagy dysfunction and contribute to neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD).

In the modern city, the most important source of pollution is traffic-related air pollutants. Diesel exhaust particles (DEPs) emitted by diesel engine combustion is the most important component of near-road and urban air pollution. In our previous study, C57BL/6 mice were acutely exposed to DEPs and found that pro-inflammatory cytokines, lipid peroxidation, and tau tauopathies increased significantly in the brain. However, the mechanisms are still unclear. Therefore, the objective of this study was to investigate the central nervous system toxicity caused by DEPs in Alzheimer's disease mouse model.

6 to 8-week-old 3xTg-AD female mice were exposed to 300 μ g of DEPs SRM 1650b by oropharyngeal aspiration (50 μ g/time, 2 times/week and for 3 weeks). SRM 1650b was purchased from National Institute of Standards and Technology, and it represents particulate from the combustion of heavy-duty diesel engines. After the last exposure, all animals were sacrificed at 24 hours, and the brain tissue, including the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum regions, were collected. Brain region-specific malondialdehyde (MDA) level was measured by LC-MS/MS to assess lipid peroxidation. LC3b, Iba-1, A β ₄₂, and total tau protein were also evaluated using western blot. Brain and lung tissue were stained by hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological

examination.

The results showed that MDA concentration significantly increased in the hippocampus ($p < 0.05$), but not in cerebral cortex and cerebellum. Expression of LC3b, Iba-1, $A\beta_{42}$, and total tau protein was not significant between the control and the exposure group in 3 brain region. The DEPs exposure did not cause histopathological changes in the brain, but there was slight inflammation in the lungs.

In all, the data support that the hippocampus may be more sensitive to the oxidative stress from the exposure to DEPs. However, further studies should include the aged animals for prolonged period of time to elucidate the underlying mechanisms of DEPs induced neurotoxicity.

Keywords: diesel exhaust particulates, oropharyngeal aspiration, central nervous system toxicity, microglia activation, oxidative stress, autophagy

目錄



第一章 背景與研究目的	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 微粒暴露對健康的影響	2
2.1.1 微粒如何影響中樞神經系統.....	3
2.2 柴油引擎微粒與中樞神經系統毒性	4
2.2.1 氧化壓力	5
2.2.2 微膠細胞活化	7
2.2.3 自噬作用	9
2.3 阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)	11
2.3.1 脂質過氧化與阿茲海默症	13
2.3.2 微膠細胞與阿茲海默症.....	14
2.3.3 自噬作用與阿茲海默症.....	15
2.4 阿茲海默症三基因轉殖小鼠(3xTg-AD mice).....	17
2.5 口咽吸入(Oropharyngeal Aspiration, OA)	19
第三章 材料與方法.....	20
3.1 實驗動物.....	20
3.2 實驗流程與架構.....	21
3.3 柴油引擎微粒.....	22
3.4 口咽吸入法.....	23
3.5 脂質過氧化指標—MDA 分析	24
3.5.1 MDA 標準溶液與 DNPH 溶液配置	24



3.5.2 標準品檢量線及標準添加法檢量線.....	24
3.5.3 MDA 萃取.....	25
3.5.4 LC-MS/MS 分析方法	26
3.6 西方點墨法.....	28
3.6.1 蛋白質萃取及總蛋白質定量.....	28
3.6.2 西方點墨法步驟與流程.....	29
3.6.3 半定量分析.....	31
3.7 組織病理.....	32
3.8 統計方法.....	32
第四章 結果	33
4.1 腦部 MDA	33
4.1.1 基質效應.....	33
4.1.2 MDA 濃度.....	33
4.2 腦部蛋白質表現量	34
4.2.1 各腦區微膠細胞活化相關蛋白 Iba-1 表現量.....	34
4.2.2 各腦區自噬作用相關蛋白 LC3b 表現量.....	34
4.2.3 各腦區阿茲海默症病徵 A β ₄₂ 蛋白表現量.....	34
4.2.4 各腦區阿茲海默症病徵 t-Tau 蛋白表現量.....	34
4.3 組織病理切片.....	35
第五章 討論	36
5.1 柴油引擎微粒特性及暴露方法.....	36
5.2 3xTg-AD 小鼠	39
5.3 微粒對中樞神經系統毒性的影響.....	41

5.3.1 脂質過氧化.....	41
5.3.2 微膠細胞活化.....	43
5.3.3 自噬作用.....	45
5.3.4 阿茲海默症特定病理變化.....	47
5.3.5 組織病理.....	48
第六章 結論與建議.....	49
第七章 參考資料.....	50



表目錄



表 1、本實驗室柴油引擎微粒與中樞神經系統毒性之研究.....	66
表 2、柴油引擎微粒 SRM1650b 之 PAH 質量分數值(NIST 2013).....	67
表 3、LC-MS/MS 移動相濃度梯度.....	69
表 4、HESI 參數.....	69
表 5、SRM 參數.....	69
表 6、基質效應.....	70
表 7、各腦區之 MDA 濃度.....	71
表 8、各腦區之 Iba-1 蛋白表現量(Fold of control).....	72
表 9、各腦區之 LC3b 蛋白表現量(Fold of control).....	72
表 10、各腦區之 A β ₄₂ 蛋白表現量(Fold of control).....	73
表 11、各腦區之 t-Tau 蛋白表現量(Fold of control).....	73
表 12、肺及腦部病理變化評分.....	74

圖目錄



圖 1、研究架構圖.....	75
圖 2、MDA-DNPH 層析圖.....	76
圖 3、各腦區 MDA 濃度.....	77
圖 4、大腦皮質之 Iba-1 蛋白表現量.....	78
圖 5、小腦之 Iba-1 蛋白表現量.....	79
圖 6、海馬迴之 Iba-1 蛋白表現量.....	80
圖 7、大腦皮質之 LC3b 蛋白表現量.....	81
圖 8、小腦之 LC3b 蛋白表現量.....	82
圖 9、海馬迴之 LC3b 蛋白表現量.....	83
圖 10、大腦皮質之 A β ₄₂ 蛋白表現量.....	84
圖 11、小腦之 A β ₄₂ 蛋白表現量.....	85
圖 12、海馬迴之 A β ₄₂ 蛋白表現量.....	86
圖 13、大腦皮質之 t-Tau 蛋白表現量.....	87
圖 14、小腦之 t-Tau 蛋白表現量.....	88
圖 15、海馬迴之 t-Tau 蛋白表現量.....	89
圖 16、大腦皮質病理切片.....	90
圖 17、小腦病理切片.....	91
圖 18、海馬迴病理切片.....	92
圖 19、肺部病理切片.....	93



第一章 背景與研究目的

世界衛生組織所屬國際癌症研究署(International Agency for Research on Cancer, IARC)在 2013 年發布報告指出大氣懸浮微粒為第一級致癌物，其中 PM_{2.5} 更是主要關注的對象，且全球有多達 92%的人口平常呼吸的空氣污染已超過標準，造成咳嗽、呼吸急促，嚴重者甚至出現中風、心臟病、肺炎等疾病，此外，不少研究發現暴露微粒會引發中樞神經系統毒性，甚至造成實驗動物的記憶及學習能力受損，但微粒如何影響中樞神經系統的機制還不清楚。

在台灣近年來的大氣報導中，經常出現 PM_{2.5} 濃度預警的訊息，而大氣微粒當中，以移動排放源為主要來源，其中又以柴油車輛所排放之廢氣微粒為大宗，故經柴油引擎所排放出的微粒對人體之危害不容小覷。先前許多動物研究使用急性、亞慢性暴露柴油引擎微粒之中樞神經系統毒性，發現自噬作用失調，發炎反應、氧化壓力、微膠細胞活化等指標的上升，甚至是乙型類澱粉蛋白堆積、過度磷酸化 Tau 蛋白等病變出現，但並沒有一致的結果，且用健康大、小鼠可能難以明確觀察到中樞神經系統毒性和阿茲海默症病徵的變化，為更清楚地了解微粒是否引起中樞神經系統毒性，因此本研究使用阿茲海默症基因轉殖動物模式 3xTg-AD 小鼠，藉由口咽吸入的方式急性暴露柴油引擎微粒來探討微粒對中樞神經系統毒性的影響。

本研究假說為在小鼠腦部中，暴露柴油引擎微粒後對以下指標的影響：

1. 氧化壓力指標 MDA 濃度上升
2. 自噬作用指標 LC3b 表現量下降
3. 微膠細胞活化指標 Iba-1 表現量上升
4. 阿茲海默症病徵乙型類澱粉蛋白(amyloid- β , A β)、總 Tau 蛋白(total Tau protein, t-Tau)表現量上升

第二章 文獻回顧



2.1 微粒暴露對健康的影響

空氣污染對於公共衛生及人類健康造成不小的負擔，世界衛生組織估計，空氣污染會影響居住在都市地區的 90% 人們的健康(Kurt, Zhang et al. 2016)，全球有高達數百萬人口長期暴露於高於安全標準濃度的空氣污染物當中(Akimoto 2003)，因此不可輕忽空氣污染所造成的健康效應。空氣污染物包含固態微粒、氣狀污染物、和錳或鎳等等金屬(Akimoto 2003)，而這些物質都會對人體造成不同程度的發炎反應和氧化壓力(Craig, Brook et al. 2008)，進而引起體內不同組織及器官系統的病變。流行病學研究指出，居民罹患癌症(Cui, Huang et al. 2014)、肺部疾病(Kurt, Zhang et al. 2016)、心血管疾病(Kaufman, Adar et al. 2016)和當地的空氣污染有關，除此之外，也發現居住在高度空氣污染下的居民出現認知功能下降、神經病變、腦部發炎等中樞神經系統病變(CALDERon-GARCIDUEnas, Reed et al. 2004, Calderón-Garcidueñas, Mora-Tiscareño et al. 2008, Mateen and Brook 2011)，可能導致失智症(Dementia)、輕度認知障礙(MCI)、阿茲海默症(Alzheimer's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)等神經退化性疾病(Gatto, Henderson et al. 2014, Tonne, Elbaz et al. 2014, Zanobetti, Dominici et al. 2014, Tzivian, Dlugaj et al. 2016)。



2.1.1 微粒如何影響中樞神經系統

許多研究關注在空氣污染中的微粒與中樞神經系統病變的關聯，認為暴露微粒會引起中樞神經系統的發炎反應以及氧化壓力，進而對腦部造成損害(Fagundes, Fleck et al. 2015)，也可能引起血腦障壁的損傷(Blood-brain barrier, BBB)，使得有害物更容易影響腦部。


微粒如何引起神經毒性有以下幾種可能的直接途徑：第一是微粒經由嗅神經、三叉神經、或迷走神經直接地進入中樞神經系統(Heusinkveld, Wahle et al. 2016, Kreyling 2016)，第二是微粒表面的可溶性化學物質隨著微粒進入中樞神經系統而直接影響腦部，不過直接途徑僅限於微粒粒徑小於 100 奈米時才有可能發生 (Calderón-Garcidueñas, Solt et al. 2008, Wang, Xiong et al. 2017)。除了上述的直接途徑，還有幾種可能的間接途徑：第一種途徑是由鼻部吸入微粒時，鼻部上皮細胞的促發炎反應因子或細胞激素傳遞到腦部(Cheng, Saffari et al. 2016)；第二種是吸入微粒後，引起肺部的發炎反應，而促發炎反應的細胞激素(IL-1 β , IL-6, TNF- α)再藉由血液循環運送到腦部(Wang, Xiong et al. 2017)，造成神經發炎(Chiu, Von Hehn et al. 2012)，最終引起中樞神經系統毒性。



2.2 柴油引擎微粒與中樞神經系統毒性

柴油引擎燃燒所排放的廢氣是都市及道路附近空氣的主要污染物(Hesterberg, Long et al. 2012)，世界衛生組織所屬國際癌症研究署更於 2012 年正式將柴油引擎廢氣(diesel engine exhaust, DEE)列為第一級致癌物，而 DEE 中含有氣狀物如氮氧化物、一氧化碳、二氧化硫，和粒狀物等(Ris 2007)，但其成分或比例會隨著柴油品質、引擎燃燒狀況而有所不同，其中的粒狀物就稱為柴油引擎微粒(diesel exhaust particulates, DEPs)，粒徑約在 30~500 nm 之間。柴油引擎微粒中心為碳黑微粒，表面附著多環芳香烴(aromatic hydrocarbons)、金屬、硫化物等物質。根據台灣交通部的空氣污染排放清冊資料庫統計資料指出近五成的空氣微粒由車輛所產生，雖台灣柴油車的比例不高，但柴油銷售量佔全部油品之三成，另因柴油車大部分是大型客貨車，其排氣量遠大於一般自小客車及機車，且大型客貨車多用於大眾運輸或是長程載貨，故排放量及影響範圍相當可觀，另外工業中使用之重型機具也多利用柴油引擎作為動力來源(Taxell and Santonen 2017)，因此柴油引擎所排放之微粒對一般大眾及勞工所造成的健康議題是不容忽視的。

暴露交通相關空氣污染會改變小鼠大腦中血管的完整性(Suwannasual, Lucero et al. 2018)，使血腦障壁受損，能讓微粒更易穿透到腦部，導致微粒聚集的地方引起局部的發炎(Chuang, Wu et al. 2018)。許多短期暴露柴油引擎微粒之動物實驗顯示，DEP 會增加腦中的促發炎反應因子(Gerlofs-Nijland, van Berlo et al. 2010, van Berlo, Albrecht et al. 2010, Levesque, Taetzsch et al. 2011)、微膠細胞活化(Levesque, Taetzsch et al. 2011, Cole, Coburn et al. 2016, Costa, Cole et al. 2017)、脂質過氧化指標(Cole, Coburn et al. 2016, Costa, Cole et al. 2017)，而亞慢性呼吸暴露於 DEP 除了增加促發炎反應指標、微膠細胞病變指標外，在高濃度下也發現阿茲海默症特定病



理變化之形成(Levesque, Surace et al. 2011)。雖然許多文獻及本實驗室先前的研究(詳見表 1)都發現微粒能夠引起中樞神經系統的氧化壓力及發炎反應，但結果並不一致，且微粒如何在這之後引起阿茲海默症等神經退化性疾病的機制仍然不清楚，因此需要適當的中樞神經毒性生物指標來觀察微粒所造成的神經病變，本研究關注在氧化壓力、微膠細胞活化、自噬作用及阿茲海默症病理變化。

2.2.1 氧化壓力

氧氣是體內生化反應的重要能量來源，腦部所需的氧氣量佔全身耗氧量的 20%，以維持腦內複雜的神經網路運作。不過，因氧氣能夠在體內產生自由基與非自由基，包含超氧陰離子(superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基(hydroxyl radical, $\cdot OH$)、過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)等活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)，便會對生物體造成負面的影響(Cobley, Fiorello et al. 2018)。在粒線體的有氧代謝過程中，除了主要能量產物 ATP(adenosine triphosphate)外，還會產生如自由基、活性氧化物、活性氮化物(reactive nitrogen species, RNS)等副產物，在正常條件下，有氧代謝過程所產生的 ROS 會被抗氧化系統中和，中低量的 ROS 被視為能夠維持神經正常的發展和運作，但當 ROS 過量，超過抗氧化系統的清除能力時，就會形成氧化壓力(oxidative stress)，會導致蛋白質、脂質等大分子過氧化，甚至攻擊 DNA，引起氧化損傷、細胞變性(Salim 2017)，且氧化壓力一個持續性的狀態，會不斷造成體內的損害發生(Borza, Muntean et al. 2013)。因此，富含脂質、高耗能與耗氧性、弱抗氧化能力的腦部就成為了易受氧化壓力攻擊的目標(Hulbert, Pamplona et al. 2007)，其中掌管記憶、行為、認知的海馬迴、杏仁核被認為對氧化壓力最具易感性，且是首先被發現功能衰退的腦區(Wang and Michaelis 2010)。

中樞神經系統中的神經細胞膜含有大量的多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated



fatty acids, PUFAs), 因此腦部的脂質過氧化是氧化壓力的主要傷害之一(Sultana, Perluigi et al. 2006)。當神經細胞膜中的 PUFAs 受自由基攻擊時, 脂質中的碳碳雙鍵會被打斷, 使膜的流動性降低、鑲嵌在膜中的酶活性降低、並影響滲透性(Anzai, Ogawa et al. 1999, Yehuda, Rabinovitz et al. 2002)等, 這些都會影響細胞膜的完整性(Farooqui and Horrocks 1998)、破壞神經細胞的穩定狀態, 從而引起腦部功能障礙。PUFAs 受自由基攻擊後會形成高反應性的親電子醛類, 包括丙二醛(malondialdehyde, MDA)、4-羥基-2-壬烯醛(4-hydroxy-2-nonenal, HNE)和丙烯醛(acrolein), MDA 是脂質過氧化的次級產物, 近年來被廣泛運用在評估脂質過氧化的程度, 並認為是臨床上可靠的指標(Giera, Lingeman et al. 2012)。

環境中的外來物質入侵也會使腦部產生氧化壓力失衡, 如紫外線、病毒, 亦或是空氣污染中的微粒, 也有許多體外或是體內研究發現, 暴露大氣微粒、柴油引擎微粒會使氧化壓力的相關指標表現量上升(Block, Wu et al. 2004, van Berlo, Albrecht et al. 2010), 一篇呼吸暴露大氣超細微粒的研究中, 發現大鼠大腦的紋狀體、海馬迴的氧化壓力相關指標有顯著的上升(Guerra, Vera-Aguilar et al. 2013), 另一篇暴露呼吸柴油引擎微粒的研究發現, 小鼠的嗅球、海馬迴、大腦皮質等腦區的 MDA 濃度也有增加的情形(Cole, Coburn et al. 2016)。

因此, 氧化壓力是一個可以評估中樞神經系統毒性的因子, 許多研究也發現微粒能夠引起腦部的氧化壓力, 又脂質過氧化是腦部受氧化壓力影響下的主要產物之一, 故本研究將利用 MDA 來評估腦部受柴油引擎微粒暴露後的影響。

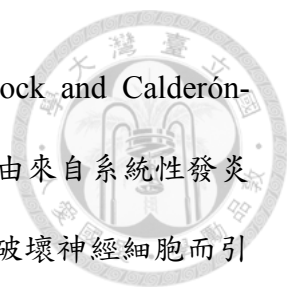


2.2.2 微膠細胞活化

微膠細胞是一種大腦內的免疫細胞，屬於神經膠細胞的一種，在齧齒類動物的腦中，佔神經膠細胞的 5~12%。微膠細胞會支持在一般神經元之間，使神經元正常連接，並調節中樞神經系統的發展。

如同體內一般的免疫細胞，若大腦遇到外來物質的刺激便會使微膠細胞活化。當中樞神經系統內有受傷的組織、細胞、異常蛋白，或是有微粒、細菌入侵時，就會引起發炎反應，而休息狀態(ramified)的微膠細胞會轉變為活化的型態(activated, amoeboid)，活化型態的微膠細胞會去尋找腦中導致發炎的物質，製造活性氧化物去攻擊這些物質，或是利用吞噬作用清除這些物質，之後微膠細胞再將這些物質的部分碎片表現在其細胞膜上，成為抗原呈現細胞，如此一來，就能吸引其他的免疫細胞來辨認這些抗原，加劇了發炎反應，且一篇體內研究發現，微膠細胞是小鼠腦部受微粒暴露後產生促發炎反應細胞激素的主要來源(Bolton, Smith et al. 2012)。總結來說，微膠細胞因發炎反應而活化，活化後的微膠細胞又加劇了發炎反應。

微膠細胞活化被分為 M1 和 M2 兩類，M1 活化是典型的活化型態，會分泌促發炎反應的細胞激素（如：IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α ）、氮氧化物 NO、活性氧化物 ROS 等來對抗異常物質，並降低神經滋養因子(neurotrophic factors)，若長期屬於此活化狀態，則會導致腦內呈現慢性發炎反應、破壞神經細胞的結構、使得神經細胞失去功能；M2 活化則會加強吞噬作用，並藉由分泌抗發炎反應的細胞激素（如：IL-10, TGF- β ），來調節、保護或修復腦內發炎反應所帶來的傷害(Cherry, Olschowka et al. 2014)。因此，若神經系統持續受到引起發炎物質的刺激，使得微膠細胞持續呈現活化狀態，則可能造成神經元的損傷，又神經元受損會後繼續刺激微膠細胞活化，形成惡性循環。



空氣污染經由以下三種可能的途徑來活化微膠細胞(Block and Calderón-Garcidueñas 2009)：空氣污染中的成分直接地活化微膠細胞、藉由來自系統性發炎反應的細胞激素來活化微膠細胞、空汙中的微粒或氣狀物直接破壞神經細胞而引起微膠細胞的活化，最終造成慢性發炎反應、氧化壓力、神經毒性、傷害腦血管等。Iba-1(Ionized calcium-binding adaptor protein-1)是一種位於微膠細胞的細胞質蛋白，當微膠細胞從休息狀態轉變成活化狀態時，細胞膜會產生皺摺，Iba-1 會增加肌動蛋白的活性，參與了細胞膜起皺折的過程，因此常被用來當作微膠細胞活化的指標。在細胞研究中發現，暴露柴油引擎微粒能使微膠細胞活化(Block, Wu et al. 2004)，而幾篇呼吸暴露柴油引擎微粒的體內研究發現，小鼠腦中的海馬迴、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, Win-Shwe, Fujimaki et al. 2012, Cole, Coburn et al. 2016)，並由影像分析發現微膠細胞的確有轉變成活化態的情形(Cole, Coburn et al. 2016)，另外以氣管灌注或口咽吸入法等急性暴露的方式暴露柴油引擎微粒也在實驗動物腦中看到相似的結果(Levesque, Taetzsch et al. 2011, Bolton, Marinero et al. 2017)。


因此暴露微粒能使腦部的微膠細胞活化，可能引起發炎反應，故本研究欲測量 Iba-1 在腦中的表現量以評估暴露微粒後的影響。



2.2.3 自噬作用

在生物體中，幾乎所有細胞種類都有自噬作用，自噬作用是一種維持細胞內恆定的機制，也參與了許多細胞生理的重要過程，包括：細胞分化、組織重組、生長控制等，使細胞擁有防禦功能，去適應周遭有害的環境(Cuervo 2004)，細胞在以下刺激時會啟動自噬作用：飢餓狀態(如：胺基酸和葡萄糖等養分不足時)(Mizushima, Yamamoto et al. 2004)、細胞內產生活性氧化物質(Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007)、缺氧損傷(Mazure and Pouyssegur 2010)、胞器受損(Song, Zhao et al. 2013)、蛋白質聚集(Liu, Gao et al. 2010)等。自噬作用分為三大類：巨大細胞自噬(Macroautophagy)、微小細胞自噬(Microautophagy)、分子伴侶媒介的細胞自噬(Chaperone-mediated autophagy, CMA)，其中巨大細胞自噬(macroautophagy)是生物體內自噬作用的主要途徑。當細胞接收到啟動自噬作用的訊號時，高基氏體或內質網會製造出稱為吞噬泡(phagophore)的雙層膜結構，它會去靠近錯誤折疊的蛋白或受損的胞器，吞噬泡延伸(elongation)後會將欲清除的物質包圍起來形成自噬體(autophagosome)，自噬體再和細胞內的溶酶體(lysosome)融合形成自噬溶酶體(autolysosome)，即可利用溶酶體中的蛋白質水解酵素將這些蛋白降解成胺基酸等物質，最後被回收再利用為細胞的養分(Zare-shahabadi, Masliah et al. 2015, Pellacani and Costa 2018)。相較於另外兩種自噬作用，巨大細胞自噬被認為和阿茲海默症最有關聯(Lee, Giordano et al. 2012, Tung, Wang et al. 2012)。

自噬作用從啟動到完成非常複雜，牽涉許多自噬相關蛋白(autophagy-related (ATG) proteins)的參與。LC3(microtubule-associated protein 1-light chain 3)是一和細胞微管有關的蛋白，與吞噬泡的延伸、自噬體和溶酶體的融合有關(Bernard and Klionsky 2014)。哺乳動物中，LC3 家族有三個亞型，分別為：LC3a, LC3b, LC3c，



LC3a 和 LC3b 在組織中的表現量較多，其中 LC3b 較均勻分布在細胞質及細胞核當中，因此被認為是適當的測量指標(Koukourakis, Kalamida et al. 2015)。在自噬作用開始之前，原始的 LC3 蛋白(Pro LC3)會被特定的蛋白酶切割成 LC3-I，自噬作用開始後，LC3-I 會和磷脂乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)共軛形成 LC3-II，隨後 LC3-II 會和自噬體的脂質膜特異地結合，這對後續自噬體和溶酶體的融合步驟非常重要，因此常用 LC3II/LC3I 來代表自噬作用的活性，是一個代表自噬作用成熟階段的指標。若自噬功能作用被抑制，可能使得腦部的異常蛋白無法被去除，甚至是細胞死亡(Orrenius, Kaminsky et al. 2013)。

空氣污染引起的氧化壓力可能會使自噬作用功能障礙，進而引起阿茲海默症、帕金森氏症等疾病(Numan, Brown et al. 2015)。而目前關注在微粒對中樞神經系統自噬作用之影響的動物體內研究較少，體外細胞實驗發現，柴油引擎微粒使自噬作用指標表現量降低(Bai, Chuang et al. 2018)，本實驗室先前研究也指出，以氣管灌注柴油引擎微粒三天後，在大腦皮質部分發現 LC3-II/LC3-I 的結果顯著較控制組低，說明微粒以某途徑破壞自噬作用，使得腦部的清除機制失調。因此本研究欲利用 LC3b 來探討微粒對自噬作用的影響。




2.3 阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)

阿茲海默症是常見的一種失智症，屬於一種漸進式的神經退化性疾病，全球已有超過百萬以上人口深受其害，症狀包括漸進式地喪失記憶、認知功能失調(Förstl and Kurz 1999)，最後失去生活自理能力，會造成這些症狀主要是因為腦部神經細胞受到破壞，為不可逆的過程，目前亦無有效的治療方法。

在神經病理學中，阿茲海默症典型的病理變化有二：一是當乙型類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)被特定酵素(β -secretase, γ -secretase)切割後形成乙型類澱粉蛋白(amyloid- β , A β)，其中由 42 個胺基酸所組成的 A β (A β ₄₂)被認為最具疏水性及黏性(Selkoe 2001)，較易聚集成沈積物，而切割出來的 A β 再由單體(monomers)、低聚物(oligomers)、原纖維(fibrils)等順序逐漸聚集沈澱成最後的乙型類澱粉蛋白斑塊(amyloid- β plaques)(Carvajal and Inestrosa 2011, Selkoe 2011)；二是當細胞中用來維持細胞微管(microtubule)結構的 Tau 蛋白過度磷酸化後，會使得微管功能異常，並聚集形成的神經纖維纏結(neurofibrillary tangles, NFTs)。這兩種蛋白聚集物對海馬迴、杏仁核和內皮層等腦區的傷害最為嚴重(Duyckaerts, Potier et al. 2008)，影響神經細胞間訊息的傳遞，造成突觸病變，進而導致神經細胞的凋亡(Braak and Braak 1991, Nelson, Alafuzoff et al. 2012)，並引起阿茲海默症等神經退化性疾病。

目前文獻已發現暴露微粒能夠引起中樞神經系統的發炎反應與氧化壓力，而有不少研究發現發炎反應與氧化壓力亦能觸發 A β 蛋白的病變(Zhao and Zhao 2013, Heneka, Carson et al. 2015)。亞慢性呼吸暴露柴油引擎廢氣的研究發現大鼠額葉的 A β ₄₂ 顯著增加(Levesque, Surace et al. 2011)，在小鼠腦內發現慢性呼吸暴露濃縮過的 PM_{2.5} 後會導致 A β ₄₀ 增加(Bhatt, Puig et al. 2015)，除此之外，一篇使用阿茲海默



症模式基因轉殖鼠急性呼吸暴露柴油引擎廢氣，發現微粒能夠加速腦中 A β 斑塊的形成(Hullmann, Albrecht et al. 2017)。不過空氣污染和 Tau 蛋白病變的文獻相對較少，一篇暴露高濃度(1 mg/m³)柴油引擎微粒的動物研究發現腦部的過度磷酸化 Tau(phosphorylated tau, p-Tau)蛋白有顯著增加(Levesque, Surace et al. 2011)。一般來說，阿茲海默症患者的腦中，p-Tau 的含量比正常的成年大腦還要高出 3 至 4 倍之多(Iqbal, Liu et al. 2010)，而總 tau(t-Tau)蛋白的過度表現也會引起其磷酸化(Liazoghli, Perreault et al. 2005, Chesser, Pritchard et al. 2013)，因此 t-Tau 和 p-Tau 都是適當的測量指標。



2.3.1 脂質過氧化與阿茲海默症

自由基所引起的氧化壓力已被認為和許多神經退化性疾病的發病機制有關，並且在其腦部發現脂質過氧化的生物指標較高，包含阿茲海默症(Butterfield, Lange et al. 2010)、帕金森氏症(Ruipérez, Darios et al. 2010)等神經退化性疾病。氧化壓力可能由發炎反應引起，也會導致發炎反應(Reuter, Gupta et al. 2010)，除此之外，還會造成粒線體功能障礙(Lee, Giordano et al. 2012)、自噬作用失調(Scherz-Shouval, Shvets et al. 2007, Mizushima, Levine et al. 2008)、A β 蛋白的形成(Behl 1997, Abramov and Duchon 2005, Shelat, Chalimoniuk et al. 2008)、Tau 蛋白的過度磷酸化及神經纖維纏結的產生(Mondragón-Rodríguez, Perry et al. 2013, Alavi Naini and Soussi-Yanicostas 2015)。其中脂質過氧化也被視為阿茲海默症的前期病程(Sultana, Perluigi et al. 2013)，許多研究發現，阿茲海默症患者大腦皮質及海馬迴的脂質過氧化較同年齡且未罹病者顯著較高(Montine, Reich et al. 1998, Calingasan, Uchida et al. 1999)，一篇研究在阿茲海默症模型小鼠中發現，脂質過氧化會引起 A β 斑塊的累積(Smith, Hirai et al. 1998, Praticò, Uryu et al. 2001)，而脂質過氧化也和神經纖維纏結的形成有關(Liu, Smith et al. 2005)。



2.3.2 微膠細胞與阿茲海默症

在阿茲海默症的病程當中，微膠細胞的活化態會從能夠保護神經的 M2 型態逐漸轉為引起慢性發炎的 M1 型態，此外，在阿茲海默症動物模式腦內發現，M1 和 M2 的數量顯著高於同年齡的野生型小鼠(Wang, Tan et al. 2015)。幾篇研究在阿茲海默症病人的腦內，發現活化的微膠細胞有增生的現象、發炎反應指標的表現增加(Olmos-Alonso, Schetters et al. 2016, Martin, Boucher et al. 2017)。

A β 斑塊、磷酸化 Tau 蛋白形成的神經纖維纏結對於中樞神經系統來說是一種異常的蛋白，能夠引起微膠細胞的活化，依照不同的活化型態，可能去清除異常蛋白或是因這些蛋白持續生成而引起慢性活化。一篇體內研究表示，在小鼠腦中的 A β 沈澱周圍發現超過 50% 的微膠細胞有增生的現象(Kamphuis, Kooijman et al. 2016)；特別的是，由於 A β 蛋白的刺激，微膠細胞還會透過吞噬作用去攻擊正常的神經元(Neniskyte, Neher et al. 2011)。

在阿茲海默症模型小鼠的腦中發現，微膠細胞的活化先於神經纖維纏結的產生(Yoshiyama, Higuchi et al. 2007)，能夠引起 Tau 蛋白的磷酸化(Gorlovoy, Larionov et al. 2009)，重要的是，微膠細胞還能利用胞吞和胞吐作用來擴散 Tau 蛋白聚集物，這說明活化後的微膠細胞可以加速 Tau 蛋白病變，幫助異常的 Tau 蛋白擴散到不同的腦區(Asai, Ikezu et al. 2015)。

總結來說，微膠細胞的活化能夠加速神經受損及阿茲海默症的病程。



2.3.3 自噬作用與阿茲海默症

自噬作用失調被視為是阿茲海默症前期的病程(Nixon, Wegiel et al. 2005, Nixon and Cataldo 2006)，使得腦中的異常蛋白無法正常地被清除，持續累積導致神經細胞受損(Wolfe, Lee et al. 2013, Chuang, Wu et al. 2018)。在神經元中，自噬體會從軸突的末端開始生成，再往細胞本體移動的過程中逐漸成熟(Maday, Wallace et al. 2012)，以清除的神經元中異常蛋白或受損的粒線體(Ashrafi, Schlehe et al. 2014)，所以當自噬體軸突運輸的功能有缺陷、溶酶體酸化不全時，就會造成許多不成熟的自噬小泡(autophagic vacuoles, AV)累積在軸突(Li, Liu et al. 2017)。一篇研究發現在阿茲海默症模型小鼠的海馬迴神經元中，發現大量的不成熟自噬小泡累積在軸突(Sanchez-Varo, Trujillo-Estrada et al. 2012)，造成神經細胞營養不良及過度腫脹。

自噬作用除了能夠清除 $A\beta$ 及過度磷酸化 Tau 等異常蛋白以外，還有其他的關聯性。在阿茲海默症模型小鼠的腦中，發現不成熟的自噬小泡可能是 $A\beta$ 的來源(Mizushima 2005, Nixon, Wegiel et al. 2005)。自噬溶酶體系統的異常也被認為和 Tau 蛋白寡聚體、不可溶聚集體的形成有關(Hamano, Gendron et al. 2008, Congdon, Wu et al. 2012)，在自噬作用失調的小鼠腦中發現過度磷酸化 tau 蛋白的累積，而當小鼠的自噬作用回復時，p-Tau 即大幅減少(Inoue, Rispoli et al. 2012)，事實上，自噬作用和 Tau 蛋白的病變是互相影響的，過度磷酸化的 Tau 蛋白會使得細胞骨架崩解，進而抑制自噬體的運輸及成熟，導致不成熟的自噬小泡累積在神經細胞的軸突，造成突觸功能異常，引起神經方面的疾病(Li, Liu et al. 2017)。

除了上述可能使自噬作用失調的原因外，年齡及氧化壓力也會對其造成影響。自噬作用在年輕的神經細胞當中較為活躍，研究顯示 Beclin-1 等自噬相關蛋白的表現量會隨著年齡下降(Boland, Kumar et al. 2008, Lipinski, Zheng et al. 2010)，除此

之外，氧化壓力也是一個會引起自噬作用或使自噬作用失調的因子(Mizushima, Levine et al. 2008, Moreno, Villar et al. 2018)。






2.4 阿茲海默症三基因轉殖小鼠(3xTg-AD mice)

本研究使用三基因轉殖小鼠(3xTg-AD mice)來探討柴油引擎微粒對小鼠腦部的影響，此種小鼠是以 C57BL/6 作為野生型的阿茲海默症模型的基因轉殖小鼠，是眾多阿茲海默症模型小鼠中，少數能夠隨著年齡增長表現出兩種阿茲海默症病理變化的品種，帶有 APP^{Swedish}、TauP301L 以及 PSEN1^{M146V} 三種突變基因(Oddo, Caccamo et al. 2003)。3xTg-AD 小鼠 3 個月大時能夠在腦部皮質細胞內觀察到 A β ；6 個月時在新皮質和海馬迴中觀察到 A β 斑塊，且能在海馬迴偵測到磷酸化 Tau 蛋白；到了 18 至 26 個月大時，觀察到磷酸化 Tau 蛋白已發展成神經纖維纏結(Billings, Oddo et al. 2005, Mastrangelo and Bowers 2008)。此外，此種小鼠隨著年齡的增長，腦內的自噬作用活性有顯著下降的趨勢(Villamil-Ortiz and Cardona-Gomez 2015)，可以解釋此種小鼠會隨著年齡增長，兩種病理變化的表現量會越來越高，且海馬迴是首先受影響的腦區。在性別方面，3xTg-AD 母鼠較公鼠具較嚴重之神經病理表現及行為異常(Giménez-Llort, Arranz et al. 2008, Sterniczuk, Antle et al. 2010, Stover, Campbell et al. 2015)。

除了阿茲海默症上典型的病理變化以外，此種疾病鼠和健康小鼠在中樞神經系統上也有不同之處。隨著年齡的增加，三基因轉殖小鼠腦內自噬作用指標 LC3 及 Beclin-1 的表現量較野生型的小鼠低(Villamil-Ortiz and Cardona-Gomez 2015)，星狀細胞指標(GFAP)、微膠細胞指標(Iba-1)等和神經發炎相關的蛋白比野生型小鼠顯著較高(Chen, Liang et al. 2013)。而三基因轉殖小鼠也被認為具有認知功能上的缺陷，一篇整合型研究指出，這種小鼠腦中的 Tau 蛋白病變和認知功能缺陷呈現正相關性，且相關性較 A β 病變還強(Huber, Yee et al. 2018)。一篇橫斷式研究運用八臂輻射迷宮(8-arm radial maze, RAM)評估 3xTg-AD 小鼠的記憶功能，發現在



2 個月大時就出現參考及工作記憶上的缺陷(Stevens and Brown 2015)，另外，許多研究使用莫氏水迷津(Morris water maze, MWM)來分析小鼠的空間參考記憶，結果在 6 個月大時出現參考記憶的損傷(Billings, Green et al. 2007, McKee, Carreras et al. 2008, Stover, Campbell et al. 2015)，而用來評估認知功能的新事物認知試驗(novel object recognition task, NOR)，也是在 6 個月大時發現小鼠出現認知方面的不足(Blanchard, Wanka et al. 2010, Chen, Liang et al. 2013)。

因此相較於健康小鼠，3xTg-AD 母鼠更適合用來探討中樞神經系統毒性方面的相關研究。



2.5 口咽吸入(Oropharyngeal Aspiration, OA)

在空氣微粒污染物的毒理研究中有許多不同的暴露方式，包括慢性的全身性呼吸暴露(whole-body inhalation)、鼻部吸入(nose-only inhalation)，或是急性的氣管灌注(intratracheal instillation)、鼻部灌注(nose instillation)、口咽吸入(oropharyngeal aspiration)等等。一般而言，氣管灌注和口咽吸入等暴露方式需要在輕度麻醉的情況下進行，並將欲暴露的微粒在無菌鹽水或磷酸鹽緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)中重新懸浮，再給予實驗動物(Shang and Sun 2018)。研究指出，氣管灌注及口咽吸入等方式能使微粒分佈於 60~80%的呼吸道中，相較於呼吸暴露僅佔肺部的 32%，此外，經呼吸暴露進入生物體內的微粒可能因鼻部內膜纖毛而被阻擋或清除，24 小時後僅保留約 57%的微粒在體內，而直接將微粒注入肺部的急性暴露方法能夠保留 80%的微粒(Foster, Walters et al. 2001)。

口咽吸入法是將實驗動物麻醉後，用鑷子將小鼠鼻子捏住、舌頭拉出來，再沿著舌頭根部注射溶液(De Vooght, Vanoirbeek et al. 2009)，這個方法迫使小鼠用嘴巴來呼吸、阻斷吞嚥反應，使得溶液能夠經由咽喉部嗆進呼吸道而非食道。而口咽吸入相較於氣管灌注技術簡單、麻醉程度較低、侵入性也較低，且口咽吸入的微粒能抵達肺部深處，並較均勻地分佈(Lakatos, Burgess et al. 2006)。另外，研究發現對於奈米物質而言，重複口咽吸入和短期呼吸暴露對小鼠肺部造成相似的發炎反應(Kinaret, Ilves et al. 2017)。

綜合上述，相較於呼吸暴露及氣管灌注，口咽吸入法更適合作為本次急性暴露微粒的暴露方法。

第三章 材料與方法



3.1 實驗動物

本實驗選用 3xTg-AD 母鼠作為實驗動物，由於此種小鼠屬於特殊品系，需要自行繁殖，原由邱銘章教授團隊繁殖及飼養，並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，後委託國立台灣大學醫學院實驗動物中心繁殖組代為進行體外受精(In vitro fertilization, IVF)，並使 IVF 所繁殖出的 3xTg-AD 小鼠持續進行自然配種，本研究即使用自然配種之 3xTg-AD 小鼠進行實驗。暴露實驗開始前一週將小鼠移回國立台灣大學公共衛生學院大樓 9 樓小動物房飼養。小動物房之環境溫度控制於 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、濕度維持於 $55\pm 10\%$ ，並設有日夜 12-12 小時光週期之循環，每週定期更換墊料、飼料及飲用水，並有國立台灣大學醫學院獸醫師進行每週例檢，確認實驗動物健康狀況。

本研究所有使用的實驗動物及操作之動物實驗皆在國立台灣大學醫學院暨公衛學院實驗動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)同意下進行(同意書編號：20160545)。



3.2 實驗流程與架構

本研究使用 6-8 週大之 3xTg-AD 母鼠，暴露組以口咽吸入的方式重複暴露 DEP，一週暴露兩次，總共暴露三週；控制組則是以相同方式及頻率暴露同體積之磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)。完成三週之暴露後再於 24 小時後進行犧牲。實驗架構如圖 1。

犧牲方式分為兩種，第一種為以 CO₂ 麻醉後快速斷頭，取出腦組織分為嗅球、大腦皮質、小腦、海馬迴及髓質等腦區，以及心臟、肺臟等器官，置於微量離心管中並以液態氮快速冷凍，犧牲結束後再轉移至 -80 °C 冰箱保存直至分析前。左半腦將用於 MDA 之分析，右半腦則用於 Western blot 實驗；第二種則是以 CO₂ 麻醉後進行灌流，麻醉後先以含有肝素抗凝血劑(Heparin)的乳酸林格氏乙注射液 (Lactated ringer's B injection) 從左心室慢慢注射，將全身血液灌洗出來後再注射 Bouin 氏固定液以固定全身的器官及組織，固定後取出腦、心、肺等器官浸泡於 10% 甲醇後並搖晃三日，隨後取出器官並修整，最後送至國立台灣大學醫學院動物中心進行包埋、切片及染色。



3.3 柴油引擎微粒

本研究使用之柴油引擎微粒是從美國國家標準暨技術研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST, USA)所購買的 Standard Reference Material® 1650b。根據美國國家標準暨技術研究院的資料，SRM1650b 是從運轉 200 小時後柴油引擎的稀釋管中收集，可以代表重型柴油引擎微粒，平均粒徑為 0.18 μm ，表面積為 108 m^2/g 。本研究會將 DEP 重新懸浮於磷酸鹽緩衝生理實驗水(Phosphate buffered saline, PBS)中再給予實驗動物，不過我們並沒有測量 DEP 在 PBS 中的粒徑，有文獻指出，SRM 1650b 的 DEP 以濃度 2 mg/mL 配置於 PBS 中後，平均粒徑約為 620nm (Bengalli, Zerboni et al. 2019)。此型號之柴油引擎微粒的 PAH 質量分數如表 2 所示，PAH 總含量約為 202.1 ng/mg ，其中以 phenanthrene、fluoranthene 及 pyrene 含量最多，重金屬總含量則為 2.011 $\text{ng}/\mu\text{g}$ ，鈣、鐵、鋅佔大部分比例 (Bengalli, Zerboni et al. 2019)。

實驗開始前，將 DEP 以 PBS 泡製成濃度為 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的懸浮溶液，搖晃均勻後以 parafilm 密封並暫存於 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱，每次暴露前會將 DEP 懸浮溶液以超音波振盪槽持續震盪一小時，以降低微粒在溶液中產生膠結的情形(Jiang, Oberdörster et al. 2009)。依據實驗架構，每次暴露時以口咽吸入法注射 50 μL 之 DEP 懸浮溶液給予暴露組動物，控制組則每次注射 50 μL 的 PBS，每週暴露兩次，共暴露三週，故每隻小鼠總劑量為 300 μg DEP。



3.4 口咽吸入法

本實驗利用 4% 的愛氟寧(isoflurane)對動物進行吸入性麻醉。首先，先將小鼠放入充滿 isoflurane 的麻醉腔中麻醉約一分鐘，接著將小鼠取出，用鑷子夾住鼻孔阻斷呼吸道、同時將舌頭夾出防止小鼠的吞嚥反應，此時再用微量吸管將 50 μ L 的液體沿著舌頭根部緩緩注入咽喉，此時因為小鼠被迫用口呼吸、且無法進行吞嚥的動作，故溶液會沿著咽喉滲入呼吸道及肺部，待小鼠口中的液體皆滲入肺部後即把鼻子與舌頭放開，將小鼠維持直立的姿勢並等待小鼠恢復意識，確認無痛苦或不適反應再將小鼠放回籠中休息，即完成一次暴露。



3.5 脂質過氧化指標—MDA 分析

當微粒進入體內會產生大量活性氧物質，造成氧化壓力去攻擊蛋白質、脂質，甚至是 DNA，影響神經元細胞訊息傳遞障礙，進而導致神經退化性疾病。氧化壓力攻擊脂質時會產生脂質過氧化的現象，大腦又是一個富含脂質的器官，因此非常容易受到傷害。一般常用的脂質過氧化指標是丙二醛(malondialdehyde, MDA)，它是脂質過氧化反應中二次代謝物(Kesavulu, Rao et al. 2001)，本研究使用 LC-MS/MS 測定腦組織中的 MDA 濃度，來評估腦中脂質過氧化的嚴重度。

3.5.1 MDA 標準溶液與 DNPH 溶液配置

將 2 μ L 的 TEP(1,1,3,3 tetraethoxypropane)與 8 mL 的去離子水混合，配製成 1mM 的 MDA stocking solution，接著再取 100 μ L 的 MDA stocking solution 與 5 mL 的 1%稀硫酸混合均勻，並於室溫下反應 2 小時，即完成 20nmol/ml 的 MDA working solution，供後續配置檢量線之用。

以電子天秤秤取 0.016 g 的 DNPH(2,4-Dinitrophenylhydrazine, $C_6H_3(NO_2)_2NHNH_2$)粉末(含水量 33%)後，加入 12 mL 的 2 M 鹽酸溶液中，以震盪槽在 25 $^{\circ}$ C下震盪 2 小時，確認粉末完全溶解後即完成 5 mM pH0.09 的 DNPH 溶液。MDA working solution 與 DNPH 溶液使用前均須震盪均勻再使用。

3.5.2 標準品檢量線及標準添加法

由於本實驗利用分析 DNPH 與 MDA 之結合物來測定樣本中 MDA 之濃度，但樣品中的基質效應可能會影響 MDA-DNPH 之含量，故分別配置標準品檢量線及利用腦組織作為基質之標準添加法檢量線，來計算基質效應的影響。

標準品檢量線(Standard calibration curve, SCC)：

使用 1%稀硫酸稀釋前述的 MDA working solution，再利用 100%的乙腈

(Acetonitrile, ACN)配置成分析用的六個標準品濃度點，作為標準品檢量線，濃度分別為：2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 nmol/mL。配置完成後均加入 25 μL 的 DNPH 溶液，並在 25 °C 下、遮光處進行衍生反應 10 分鐘後再上機分析。檢量線的決定係數 R² 須大於 0.995 才可以被使用。

標準添加法之基質匹配檢量線(Matrix matched calibration curve, MCC)：

使用和樣本同品系、未經處理之小鼠皮質、小腦、海馬迴等腦部組織作為此檢量線的基質。分別取皮質 8 mg、小腦 6 mg、海馬迴 6 mg，混合成 20 mg 的混合樣本，進行 MDA 萃取後，取混合腦組織之上清液和 MDA 標準品配製成標準添加法檢量線，濃度分別為：2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0 nmol/mL。最終均加入 25 μL 的 DNPH 溶液，並在 25 °C 下、遮光處進行衍生反應 10 分鐘後再上機分析。檢量線的決定係數 R² 同樣須大於 0.995 才可以被使用。

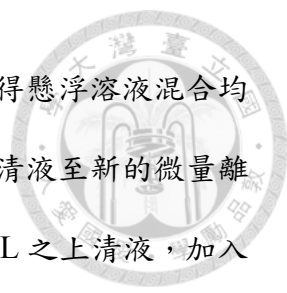
為評估腦組織所造成的基質效應，將利用以下公式計算：

$$\text{基質效應(\%)} = \frac{\text{MCC 之斜率} - \text{SCC 之斜率}}{\text{SCC 之斜率}} \times 100\%$$

若基質效應介於±15%時，代表可以忽略基質對濃度結果的干擾，可使用標準品檢量線來計算後續樣本濃度。若基質效應大於±15%時，則需使用標準添加法檢量線來計算。

3.5.3 MDA 萃取

本研究參考 Tukozkan 等人研究的萃取方法(Tukozkan, Erdamar et al. 2006)，將小腦、大腦皮質及海馬迴等欲分析的腦區以電子天秤秤取 10 mg，加入 250 μL 的 1.15% 氯化鉀(Potassium chloride, KCl)溶液，以研磨棒來磨碎組織，使組織均質化，接著再加入 100 μL 的 6M 氫氧化鈉(Sodium hydroxide, NaOH)溶液，以鹼性溶液來水解與蛋白質結合的 MDA，隨後放置於乾浴器中在 60 °C 下加熱 45 分鐘，完成反



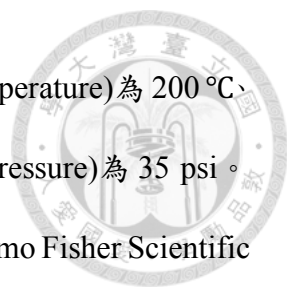
應後，加入 250 μL 的 100%ACN 來稀釋已沈澱的蛋白質，將所得懸浮溶液混合均勻後，在室溫下以 12200 rpm 離心 10 分鐘，離心後小心吸取上清液至新的微量離心管之中，即完成 MDA 之萃取。欲進行上機分析時，吸取 25 μL 之上清液，加入前述配置好的 DNPH 溶液 25 μL ，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、遮光處進行衍生反應 10 分鐘，反應完成後即可以 LC-MS/MS 進行 MDA-DNPH 分析。

3.5.4 LC-MS/MS 分析方法

本研究使用液相層析串聯質譜儀(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)來分析 MDA-DNPH。

液相層析的部分包括自動進樣系統(Autosampler, San Joes, CA, USA)、四移動相梯度幫浦(Thermo Scientific Accela 1250 quaternary pump)，而層析管柱選用內徑 4.6 mm、長度 15 cm、填充粒徑 5 μm 的 Synchronis C18 管柱(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, WA, USA)。有機相為含有 0.1%乙酸(Acetic acid, AA)的 ACN，水相為含有 0.1% AA 的去離子水，每個樣本之分析進樣量為 25 μL ，分析時間為 15 分鐘。分析時的移動相濃度梯度及流速如下：在第 0 分鐘時有機相比例為 50%、流速為 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，第 5 分鐘時將有機相比例增加至 95%、流速為 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，第 11 分鐘時有機相比例降至 50%、流速為 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，在第 11.10 分鐘時有機相比例為 50%、流速增加至 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，在第 14.10 分鐘時有機相比例為 50%、流速降至 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。詳見表 3。

質譜儀的游離源使用加熱式電噴灑游離法(Heated Electrospray Ionization, HESI)，將樣本液滴氣化形成帶電荷的離子，再用三段四極矩式串連質譜儀(Triple-quadrupole mass analyzer)、搭配選擇反應監測(Selected reaction monitoring, SRM)模式來進行質譜分析。HESI 參數設定如下：噴灑電壓(Spray voltage)為 +3000 V、毛



細管溫度(Capillary temperature)為 200 °C、氣化溫度(Vaporizer temperature)為 200 °C、
輔助氣壓力(Aux gas pressure)為 5 arb、鞘氣體壓力(Sheath gas pressure)為 35 psi。
SRM 及 HESI 參數如表 4 及表 5 所示。最後利用 Xcalibur 2.2(Thermo Fisher Scientific
Inc.)將結果圖譜的波峰下面積進行積分與分析。



3.6 西方點墨法


本研究使用西方點墨法來分析小鼠腦中微膠細胞活化指標 Iba-1、自噬作用指標 LC3b、阿茲海默症病徵 t-Tau 蛋白及 A β ₄₂ 蛋白。

西方點墨法是一種半定量的分析方法，利用蛋白質的分子量、抗體對特定蛋白質的專一性來分析目標蛋白在組織或細胞中的表現量。一般而言，西方點墨法分為樣品前處理、凝膠電泳(running)、轉漬(transfer)、阻攔(blocking)、上抗體、顯影分析等部分，步驟如下：先將樣品中的蛋白質萃取出來並且破壞其結構，利用凝膠電泳將不同分子量的蛋白質在膠體中分開，接著轉移到固相載體上，再利用特定的溶液阻攔固相載體上可能的蛋白非特異結合位，使得後續結果更清晰，接下來依序使目標蛋白接上一級抗體與二級抗體，最後利用顯影試劑及照膠系統來顯示目標蛋白的位置與含量。

3.6.1 蛋白質萃取及總蛋白質定量

秤取欲分析之腦區各 15 mg 的組織，加入 60 μ L 的蛋白裂解液後利用研磨棒來均質化腦組織。蛋白裂解液由蛋白酶抑制劑(Protease inhibitor cocktail, EDTA-Free, 100X in DMSO, MCE)、磷酸酶抑制劑(Phosphatase inhibitor Cocktail I, 100X in DMSO, MCE)、乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 0.5M, pH8.0)及 RIPA 裂解液(Radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA Buffer, PH7.4, 2X concentrate, BIO BASIC)所配置而成。將腦組織研磨後，vortex 20 秒使其混合均勻，再放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱內進行組織裂解，隔日以 12200 rpm、4 $^{\circ}$ C 下離心 20 分鐘，吸取上清液置於微量離心管中保存於-80 $^{\circ}$ C 冰箱，待後續進行總蛋白質定量及西方點墨法分析。

本實驗使用 Bradford protein assay 來定量腦組織萃取出來的蛋白質濃度。先以牛




血清蛋白標準品(Bovine Serum Albumin Standards, BSA, Thermo Fisher Scientific)來配置檢量線，濃度點分別為：1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0 mg/mL，再將配置好的每個濃度點各取 20 μ L，分別加入 980 μ L 之已稀釋成一倍的 Bradford 染劑(Bio-rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BIO-RAD)當中混合均勻，同時，欲定量之蛋白質樣本也取 1 μ L 與 999 μ L 之已稀釋成一倍的 Bradford 染劑混合均勻。將上述與染劑配置好的檢量線及蛋白質樣本吸取 150 μ L 至 96 孔盤當中，並做三重複，最後利用酵素免疫分析測讀儀(BioTek™ Epoch™ Microplate Spectrophotometer)於波長 595 nm 下來測量吸光值，標準品檢量線之 R^2 應高於 0.995 以上才可被用來計算樣本蛋白質濃度。

依據前述的定量結果，每個樣本均加入去離子水及蛋白質樣本緩衝液(T-Pro Laemmli SDS sample Reagent reducing 4X)混合均勻，於 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘以打斷蛋白質的雙硫鍵，最後樣品中的蛋白質濃度均調整為 4 μ g/ μ L，暫存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中，當天便會進行後續西方點墨法之分析步驟。

3.6.2 西方點墨法步驟與流程

本實驗以十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)來進行跑膠，依據欲分析之蛋白分子量來選定 SDS-PAGE 分離膠的濃度，t-Tau(55 kDa)使用 10% 的分離膠，LC3b(14, 16 kDa)、Iba1(17 kDa)、 $A\beta_{42}$ oligomer(37 kDa)使用 15% 的分離膠，而濃縮膠則均為 4%。另外，所有目標蛋白皆以 β -actin 作為 internal control，確保該次樣本蛋白質的一致性與實驗品質的穩定性。


利用去離子水、30% Acrylamide (30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1, BIO-RAD)、1.5 M Tris-HCl (Resolving Buffer, 1.5 M Tris-HCl pH8.8, BIO-RAD)、10% SDS



(10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) solution, BIO-RAD)、10% APS (Ammonium persulfate solution)及 TEMED (Tetramethylethylenediamine)配置分離膠，分離膠灌入玻璃後，緩慢加入 75%酒精壓膠，待分離膠凝固後便倒掉酒精再灌入濃縮膠，並插入尺梳，使濃縮膠分隔成 10 個 Well，以便後續加入樣本進行跑膠。待 SDS-PAGE 凝固完成後，凝膠的最左右兩側的 well 加入蛋白質標記(Prestained Protein Ladders)，中間依序加入上述處理好的蛋白質樣本各 5 μ L，使得每一個 Well 都有 20 μ g 的蛋白質，接著將電泳槽注滿 running buffer 即可開始跑膠，第一階段以電壓 60 V 跑 30 分鐘，第二階段以電壓 100 V 跑 120 分鐘，將蛋白質在分離膠內分開。

電泳跑膠完畢後，需將已在凝膠中分離完成的蛋白質轉漬到固相載體上。本實驗使用孔徑為 0.45 或 0.2 μ m 的聚偏二氟乙烯轉漬膜(Polyvinylidene fluoride membranes, PVDF transfer membrane)來進行轉漬。轉漬前，先用 100%的甲醇浸泡、搖晃 PVDF 膜，以活化 PVDF 膜上的正電基團後才可使用。將膠小心地從玻璃上取下，與海綿、濾紙、PVDF 膜依序放入三明治夾中夾好後放入轉漬槽，在轉漬槽中注滿含有 20%(v/v)甲醇的 transfer buffer，以電壓 100V 轉漬 60 分鐘。

轉漬完成後，依照不同目標蛋白的位置將膜切開，以含有 0.1% Tween-20 的 TBS(tris-buffered saline)緩衝液(以下簡稱 TBS-T)洗淨。接著使用 5%的脫脂奶粉在室溫下搖晃一小時，此步驟稱為阻攔(blocking)，目的是阻斷膜上沒有蛋白質的地方，以免黏上非專一性的抗體造成背景值過高。阻攔完成後用 TBS-T 漂洗 3 次，每次 5 分鐘，接著將一級抗體配置於 TBS-T 中，與膜一同在 4°C下搖晃一晚。本實驗使用之一級抗體如下：t-Tau (Anti-Tau antibody, GTX112981, GeneTex)、LC3B (LC3B (D11) XP® Rabbit mAb, #3868, Cell Signaling TECHNOLOGY)、Iba1 (Anti-Iba1 antibody, GTX100042, GeneTex)、A β ₄₂ (Anti-beta Amyloid 1-42 antibody [mOC64], ab201060, abcam)、 β -actin (Anti-beta Actin antibody, GTX629630, GeneTex)，除了 β -



actin 以 1:10000 的比例稀釋於 TBS-T 中以外，其餘皆以 1:1000 稀釋於 TBS-T 中。隔日，同樣用 TBS-T 將一級抗體洗淨後，再換上相對應之二級抗體於室溫下搖晃 90 分鐘。本實驗使用之二級抗體如下：Rabbit IgG antibody (HRP)(GTX213110-01, GeneTex)、Mouse IgG antibody (HRP)(GTX213111-01, GeneTex)，皆以 1:10000 稀釋配置於 TBS-T 中。最後用 TBS-T 將二級抗體洗淨後，將 PVDF 膜泡在呈色劑 ECL(Clarify Western ECL Substrate, BIO-RAD)中數秒，使用冷光螢光影像分析系統 (UVP BioSpectrum 810 Imaging System)進行照膠。

在分析 t-Tau 蛋白時，因其分子量與 β -actin 相近，難在切膜的步驟將兩者分開，需要在同一片膜上分析 t-Tau 蛋白與 β -actin 蛋白，因此在 t-Tau 蛋白照膠完成後，使用抗體去除試劑 (RapidStrip Western Blot Stripping Buffer, Omics Bio)在室溫下搖晃 20 分鐘，將抗體結合物去除後，在依上述步驟進行浸泡一級抗體、TBS-T 洗淨、浸泡二級抗體、TBS-T 洗淨、浸泡 ECL、照膠等步驟完成 β -actin 蛋白的分析。

3.6.3 半定量分析

照膠完成後，使用圖像分析軟體 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)來分析蛋白質條帶的密度，最後數據以目標蛋白表現量相對於 β -actin 蛋白表現量來表示半定量的結果，而 LC3b 蛋白則以 LC3b-II/ LC3b-I 來表示。



3.7 組織病理

將灌流後且修整完畢之腦組織、肺交由國立臺灣大學醫學院實驗動物中心進行石蠟包埋、切片及蘇木精-伊紅染色(hematoxylin and eosin stain, H&E stain)，以觀察正常或病變之組織型態，並委託實驗動物中心蔡伊婷獸醫師對染色之腦部及肺臟切片進行病理組織判讀，依照病變嚴重程度給予分數。

3.8 統計方法

本研究使用 SAS 9.4 統計軟體來進行結果數據之統計分析。因樣本數目小，故選用無母數分析方法之 Wilcoxon rank sum test 來比較控制組與暴露組的差異，並將顯著水準設為 0.05。結果數據均以平均值±標準誤及中位數來表示。

第四章 結果



4.1 腦部 MDA

本研究以脂質過氧化指標 MDA 來探討急性暴露柴油引擎微粒後對不同腦區的氧化損傷，測定的腦區包括皮質、小腦、海馬迴。

4.1.1 基質效應

基質效應之影響結果如表 6 所示，標準品檢量線(SCC)與基質匹配檢量線(MCC)兩者之 R^2 皆大於 0.995，經過計算後發現基質效應為-4.83%，而當基質效應小於 $\pm 15\%$ 時，代表本次實驗無明顯之基質效應，因此以標準品之檢量線(SCC)來計算各腦區之 MDA 含量。

4.1.2 MDA 濃度

MDA-DNPH 之層析圖(Chromatogram)如圖 2 所示，而滯留時間(Retention time)為 10.02 分鐘。結果發現暴露組之 MDA 濃度均高於暴露組，但僅在海馬迴中兩組間達顯著差異($p=0.0051$)，皮質($p=0.1282$)、小腦($p=0.0927$)則無顯著差異，詳細各腦區的濃度如表 7 及圖 3 所示。



4.2 腦部蛋白質表現量

本研究欲探討暴露急性暴露柴油引擎微粒對不同腦區的中樞神經系統毒性指標表現量的影響，測定的腦區包括皮質、小腦、海馬迴。半定量結果利用目標蛋白之表現量除以 internal control 蛋白之表現量來計算，而 LC3b 蛋白則以 LC3b-II/LC3b-I 來表示，所有數據再除以控制組表現量的平均來做統計及圖表呈現。

4.2.1 各腦區微膠細胞活化相關蛋白 Iba-1 表現量

各腦區之 Iba-1 蛋白表現量如圖 4、5、6 所示，急性暴露柴油引擎微粒後，控制組及暴露組之間均沒有顯著差異(皮質： $p=0.4712$ ；小腦： $p=0.0927$ ；海馬迴： $p=0.2980$)，詳細數據如表 8 所示。

4.2.2 各腦區自噬作用相關蛋白 LC3b 表現量

此指標以 LC3b-II/LC3b-I 來進行半定量，各腦區之 LC3b 蛋白表現量如圖 7、8、9 所示，急性暴露柴油引擎微粒後，控制組及暴露組之間均沒有顯著差異(皮質： $p=0.2298$ ；小腦： $p=0.4712$ ；海馬迴： $p=0.2298$)，詳細數據如表 9 所示。

4.2.3 各腦區阿茲海默症病徵 $A\beta_{42}$ 蛋白表現量

各腦區之 $A\beta_{42}$ 蛋白表現量如圖 10、11、12 所示，急性暴露柴油引擎微粒後，控制組及暴露組之間均沒有顯著差異(皮質： $p=0.0927$ ；小腦： $p=0.9362$ ；海馬迴： $p=0.8102$)，詳細數據如表 10 所示。

4.2.4 各腦區阿茲海默症病徵 t-Tau 蛋白表現量

各腦區之 t-Tau 蛋白表現量如圖 13、14、15 所示，急性暴露柴油引擎微粒後，控制組及暴露組之間均沒有顯著差異(皮質： $p=0.2980$ ；小腦： $p=0.9362$ ；海馬迴： $p=0.9362$)，詳細數據如表 11 所示。



4.3 組織病理切片

病理切片根據不同項目之嚴重性分為五級來進行評分(Shackelford, Long et al. 2002)。結果發現暴露組之肺部病理切片發現輕微(slight)的發炎反應、碳粒沈積，評分皆為兩分，而部分控制組肺部有最小程度(minimal)之發炎反應，其餘皆無明顯的病理變化；腦部的病理切片分為大腦皮質、小腦、海馬迴等腦區進行觀察與判讀，切片結果顯示控制組與暴露組在各腦區皆無明顯的病理變化，詳細結果如表 12 和圖 16、17、18、19 所示。




第五章 討論

本研究使用阿茲海默症三基因轉殖小鼠急性暴露柴油引擎微粒，暴露結束 24 小時後犧牲並收集小鼠的腦部檢體，測量大腦皮質、小腦、海馬迴中脂質過氧化指標 MDA、微膠細胞活化指標 Iba-1、自噬作用指標 LC3b、乙型類澱粉蛋白 A β ₄₂ 和總 Tau 蛋白的表現量，以及觀察腦及肺部的組織病理。實驗結果發現，與控制組相比，暴露組之大腦皮質、小腦、海馬迴的脂質過氧化指標 MDA 含量有較高的情形，但只有海馬迴有顯著差異，其餘指標在兩組之間則是均沒有顯著差異。在肺部的組織病理切片中，每隻暴露組均有輕微的發炎反應及色素沈著，部分控制組則有最小程度的發炎反應，而腦部的病理切片中，兩組均沒有明顯的病理變化。

5.1 柴油引擎微粒特性及暴露方法

在暴露微粒的呼吸毒理研究當中，暴露方式可分為慢性與急性暴露，慢性暴露包含全身性呼吸暴露及鼻部呼吸暴露，此類方法可以選擇暴露濃縮後的微粒濃度或真實狀況的微粒濃度，使實驗動物在暴露系統中自由呼吸，相對地，呼吸暴露便需要較長的實驗時間才能觀察其毒性反應；而急性暴露包含氣管灌注及口咽吸入，上述兩種方式是將欲暴露之微粒重新懸浮於液體當中，確保混合均勻後再給予實驗動物，此種方法較能確認動物的暴露劑量或濃度，且微粒在肺部分布的範圍廣、清除率低，能在短時間觀察微粒在生物體內所引發的效應。本實驗室先前多使用氣管灌注法來對動物進行暴露，不過我們發現，由於此種方法是直接將微粒懸浮溶液注入氣管，對實驗動物的侵入性較高、技術困難，且較易因技術問題導致實驗動物不適甚至死亡，而口咽吸入是將微粒懸浮溶液注入口咽部，使動物自然嗆進呼吸道，是一個能夠遵從實驗動物本能的方式，又不需像呼吸暴露般耗費人力及時間，因此是相對適合的暴露方法。



柴油引擎微粒以粒徑為 15-30 nm 的元素碳粒為中心，外層由有機碳化合物、硫酸鹽、硝酸鹽、金屬及多環芳香烴等物質所組成，柴油引擎微粒可以直接購買標準品，或是由柴油引擎燃燒的尾氣中蒐集。幾篇呼吸暴露柴油引擎尾氣的動物暴露實驗中，微粒濃度大約在 300 至 2000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 之間，粒徑約為超細微粒的等級，不過架設柴油引擎尾氣暴露系統相對困難且耗時，從引擎的型號、燃燒參數、暴露腔建置都需謹慎設計，因此也有研究直接購買柴油引擎微粒標準品來進行急性暴露。

目前相關研究所使用的標準品大多來自美國國家標準暨技術研究院，型號包括 SRM 2975、SRM 1650。不同型號的柴油引擎微粒來源也不同，SRM 2975 從以柴油為動力的工業用車的過濾系統當中收集，代表輕型柴油引擎所排放的微粒，而 SRM 1650 則是從重型柴油引擎燃燒後的稀釋管線中所搜集，能夠代表重型柴油引擎微粒。油品、引擎和排放技術的差異可能會導致 DEP 粒徑、表面化學物濃度和成分的不同，SRM 2975 的多環芳香烴含量為 81.69 ng/mg、金屬濃度為 9454 ng/ μg ，而 SRM 1650b 的多環芳香烴較 SRM 2975 高出 2~3 倍(202.1 ng/mg)、金屬濃度則較低(2011 ng/ μg)(Bengalli, Zerboni et al. 2019)。許多體外實驗利用肺部細胞來研究 SRM 2975 和 SRM 1650b 的毒性反應，發現會引起 ROS、RNS、促發炎反應因子的增加，雖然碳微粒和金屬都會造成微粒的毒性，但幾篇研究指出，微粒表面的多環芳香烴對於引起呼吸道的發炎反應更為重要(Bonvallot, Baeza-Squiban et al. 2001, Totlandsdal, Herseth et al. 2012, Totlandsdal, Låg et al. 2015)，因此 PAH 含量較高的 SRM 1650b 更適合本次的研究。

另外，本研究的暴露方式是將柴油引擎微粒粉末重新懸浮於 PBS 溶液當中，並以微量吸管給予實驗動物，雖於每次暴露前都以震盪槽持續震盪以混合均勻，但並沒有針對在溶液中的微粒粒徑、化學物質組成做更詳細的分析，除了在液體中微粒可能聚集成塊、懸浮溶液給予實驗動物時可能殘留於微量離心管壁外，微粒上的

物質是否析出、甚至是 PBS 溶液均有可能對生物體造成毒性反應，這些都是需要考慮的影響因素。

綜合上述，本研究選用較能引起發炎反應的柴油引擎微粒 SRM 1650b，並以相對適當的急性暴露方法來進行暴露。






5.2 3xTg-AD 小鼠

本研究使用 6-8 週大的三基因轉殖母鼠作為實驗動物，此種小鼠是一種能夠隨著年齡增加而發展出兩種阿茲海默症病徵的疾病鼠，其野生型為 C57BL/6 小鼠。空氣微粒的毒理學研究中，多數研究均使用一般品種的實驗動物，如：C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠、Sprague Dawley 大鼠等等，但在探討毒理機制時若能選擇適當的基因轉殖鼠或許較容易觀察到體內的毒性反應。在微粒與中樞神經系統毒性的相關研究中，幾乎沒有使用特定的基因轉殖鼠來進行實驗，一篇 Maja Hullmann 等人的研究利用同樣為阿茲海默症動物模式的 5XFAD 基因轉殖小鼠，使其呼吸暴露微粒濃度為 0.95 mg/m^3 的柴油引擎尾氣，發現柴油引擎微粒能夠加速小鼠腦部的 $A\beta_{42}$ 斑塊生成及小鼠的運動功能損傷(Hullmann, Albrecht et al. 2017)。先前使用一般實驗鼠所觀察到的微粒毒性反應多為發炎反應及氧化壓力等現象，若使用合適的疾病模式鼠也許能觀察到特定疾病指標的變化，並探討其中可能的毒理機轉，本研究則是首次利用 3xTg-AD 小鼠來探討急性暴露柴油引擎微粒對中樞神經系統毒性的影響。

然而，本研究僅在 3xTg-AD 小鼠腦部發現急性暴露柴油引擎微粒會導致海馬迴的脂質過氧化，其餘中樞神經毒性指標並無顯著變化，與先前我們利用 C57BL/6 小鼠進行同樣實驗設計之結果相比，微粒效應更不明顯。總結來說此次結果並不符合預期，我們認為可能的原因為年輕的三基因轉殖小鼠神經保護機制較佳。一篇研究比較 6 個月大、12 個月大、18 個月大的三基因轉殖小鼠及其野生型小鼠腦部的自噬作用指標，發現雖然 3xTg-AD 小鼠腦中的自噬作用會隨著年齡增加而顯著下降，但在 6 個月大時，3xTg-AD 小鼠腦中的自噬作用指標反而比野生型小鼠顯著較高(Villamil-Ortiz and Cardona-Gomez 2015)，表示年輕的 3xTg-AD 小鼠腦部自噬



作用較活躍，可能較能夠抵抗中樞神經系統所受到的刺激、清除異常蛋白或外來物質，使得本研究所量測之毒性指標無顯著變化。而神經發炎的部分，雖然 3xTg-AD 小鼠腦中的微膠細胞也會隨著年齡增長而越來越活化，但在 2 個月大時和野生型小鼠並無差異(Belfiore, Rodin et al. 2019)，也就是說使用太過年輕的 3xTg-AD 小鼠未必能觀察到明顯的毒性反應。

未來可以選用年齡較長的 3xTg-AD 小鼠來進行實驗，大約需要 12 個月大以上，此時小鼠腦部的自噬作用受損、神經發炎也較嚴重，於此種小鼠自然發展的病程而言，也是屬於阿茲海默症晚期，或許較易觀察微粒所引起的神經毒性，但需要注意的 3xTg-AD 小鼠相較於其野生型小鼠的存活日數顯著較短，且公母鼠之間也有顯著差異，母鼠約為 744 天而公鼠為 450 天，因此使用年齡較長之 3xTg-AD 小鼠時須另外考慮其死亡率的問題(Rae and Brown 2015)。




5.3 微粒對中樞神經系統毒性的影響

5.3.1 脂質過氧化

本研究探討柴油引擎微粒對於中樞神經系統中氧化壓力的影響，因為腦部是富含脂質的器官，且抗氧化酶相較體內其他器官也較為不足，因此是自由基主要攻擊的目標，並產生 MDA、HNE 等二次代謝物，其中 MDA 被廣泛用於評估腦中的脂質過氧化程度，故本研究以 MDA 作為生物指標進行氧化壓力的量測，結果發現，暴露組海馬迴的 MDA 濃度顯著較高，大腦皮質及小腦則沒有顯著差異。

目前已有許多動物研究證實大氣微粒會引起腦部的氧化壓力，而關注在柴油引擎微粒的研究也有相似的結果。氧化壓力在 Cole 等人研究使 C57BL/6 小鼠呼吸暴露於濃度 250-300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 的柴油引擎廢氣暴露 6 小時，結果發現小鼠的 MDA 在嗅球、海馬迴、小腦、大腦皮質、紋狀體皆有顯著上升(Cole, Coburn et al. 2016)，而先前本實驗室以同樣方式及頻率暴露柴油引擎微粒發現，MDA 在 C57BL/6 小鼠的海馬迴及小腦有顯著上升，與本研究結果相似。

測量 MDA 的方法有許多種，最常用的是硫代巴比妥酸反應試驗(2-thiobarbituric acid reacting substances test, TBARS assay)，多被用做測量血液中的脂質過氧化程度，此試驗會在檢體中加入硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)，使其和 MDA 反應生成 MDA-TBA 的複合物，再以分光光度測定法(Spectrophotometric assay)來進行量測，不過這種方法被指出不具專一性，因為生物檢體內可能有其他結構相似的醛類會和 TBA 結合，且反應生成的化合物吸光度和 MDA-TBA 相似，使得脂質過氧化程度會被高估(Meagher and FitzGerald 2000)，為了克服 TBARS 試驗的限制，後續的研究發展出利用 MDA 和 DNPH 的衍生反應，其衍生物再利用高效液相層析法 high-performance liquid chromatography (HPLC)分離，可以更準確



地測量生物檢體中的 MDA(Cordis, Das et al. 1998, Pilz, Meineke et al. 2000)。有許多研究比較 TBA 與 DNPH 兩種量測組織中 MDA 濃度的結果差異，發現 TBA 法的確有高估的情形(Ceconi, Cargnoni et al. 1991, Pilz, Meineke et al. 2000, Tukozkan, Erdamar et al. 2006)，因此本研究利用 HPLC-MS/MS 來分析 DNPH 與 MDA 的衍生物 MDA-DNPH。

通常在進行質譜分析時，會利用與待測物質相似性質、不同荷質比、不干擾待測物滯留時間且能被相同分析條件測得的化學物當作內部標準，經過計算校正出正確濃度，然本研究並未使用內部標準品，期許未來能利用合適的內部標準品(如：Dideuterated MDA, D₂-MDA)進行較準確的 MDA 濃度測量(Mendonça, Gning et al. 2017)。




5.3.2 微膠細胞活化

微膠細胞是大腦中重要的神經膠細胞之一，協助神經元的連接及傳遞，使神經系統能夠正常地發展。而當腦部受到微粒、經血液運輸來的細胞激素刺激時，微膠細胞會活化並釋放促發炎反應物質去因應腦部的狀態，且微膠細胞被認為是小鼠腦部暴露柴油引擎微粒後促發炎反應細胞激素的主要來源，因此本研究利用微膠細胞活化指標 Iba-1 來評估急性暴露柴油引擎微粒後腦部的神經發炎反應。然而，研究結果並未在任何腦區發現 Iba-1 的表現量有顯著變化。

神經發炎是一種非特異性的反應，當生物體受到外來刺激就會啟動的保護機制，急性的神經發炎反應可以保護神經，但當神經呈現慢性發炎狀態，就被認為會引起神經退化性疾病。許多體內研究中發現，暴露微粒會使動物腦部的 IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-6 等促發炎反應因子上升，這些結果說明發炎反應可能是空氣微粒污染物影響中樞神經系統的主要途徑，在暴露柴油引擎微粒方面的研究也發現，吸入 DEPs 小鼠的嗅球及海馬迴 Iba-1 表現量顯著較高，不過以上的研究多為呼吸暴露，暴露微粒濃度高且時間長，可能無法與本次的口咽吸入急性暴露結果相比。而本實驗室先前的研究利用氣管灌注法暴露柴油引擎微粒，發現每次暴露 50 μg 、總劑量 100 μg 的低濃度組，小鼠腦部的發炎反應相關的細胞激素並沒有顯著增加，而將劑量提高至每次暴露 150 μg 、總劑量 300 μg 時，才能在皮質的 IL-1 β , TNF α , IL-6 觀察到顯著增加，因此推測本實驗每次暴露 50 μg 的劑量可能無法引起腦部顯著的發炎反應。

微膠細胞的活化分為具神經毒性的 M1 型態，及具神經修護功能的 M2 型態，M1 的微膠細胞對最初的感染或損傷有反應，能分泌促發炎的細胞激素(如：IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) 引起神經發炎以抵抗神經受損，但當腦部持續受到刺激，會使得神經呈現慢性發炎，因而誘發神經毒性。M1 和 M2 並不是一種明確的分類，它



會根據刺激訊號的強度、組織的位置、環境的條件使得微膠細胞的活化會偏向 M1 型態或 M2 型態，研究指出，小鼠腦中的微膠細胞會隨著年齡、阿茲海默症的發展逐漸由 M2 活化轉變為 M1 活化(Jimenez, Baglietto-Vargas et al. 2008)。Iba-1 雖是一個常用於表示微膠細胞活化的指標，但無法指出是哪一類型的活化，未來可以針對具神經毒性的 M1 微膠細胞進行量測（如：CD36, CD14, CD11c, MHC-II），直接分析 M1 微膠細胞分泌特定之具神經毒性物質（如：iNOS, TNF α , NADPH 氧化酶），亦或是測量代表微膠細胞慢性活化的指標 MHC-II 等，觀察上述物質是否因微粒而有變化；除此之外，還能利用微膠細胞的型態變化來分辨其是否活化，例如利用免疫組織染色法(IHC)共定位 Iba-1 與 CD68 這兩個指標的位置，或是計算微膠細胞密度、細胞體的面積和圓度來評估其活化的狀態，綜合以上分析方法，或許能更清楚評估微粒對微膠細胞引起的神經系統毒性。



5.3.3 自噬作用

自噬作用是一種維持生物體內恆定的機制，若神經系統中的自噬作用發生改變，則會影響神經發育、代謝，自噬作用不論過量或缺乏都是有害的，而自噬作用失調可能導致錯誤折疊蛋白的累積，因此被認為在神經退化性疾病中扮演重要的角色。

在本研究中，小鼠經過三週的急性暴露柴油引擎微粒後，並沒有對腦部自噬作用指標 LC3b 的表現量造成顯著差異，我們認為可能的原因是急性暴露微粒的時間不足以讓自噬作用受損。一篇研究利用脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)溶液引起小鼠腦部急性及慢性的神經發炎，研究結果發現，當腦部因發炎反應引起自噬作用改變時，海馬迴的自噬指標反應比大腦皮質還來得快，且腦部需要在持續發炎三個月才可能使得腦中的自噬作用受損(François, Terro et al. 2014)，然而本次急性暴露的時程僅維持三週，還不足以觀察到自噬作用指標的變化，此外，許多研究發現自噬體和溶酶體的活性會隨著年齡增加而下降，然而本研究使用的卻是正值健康時的剛成年小鼠，故可能因腦部的自噬作用完善，難以觀察到微粒對自噬作用的影響。

LC3 是一種和吞噬泡的延伸、自噬體和溶酶體的融合有關的蛋白，常被用來代表自噬作用的活性，屬於自噬作用過程中成熟階段的指標。在利用西方點墨法分析 LC3 時，會有兩個不同分子量的蛋白條帶出現，分別是 16 kDa 的 LC3-I 及 14 kDa 的 LC3-II，根據本研究的定量結果，可以看到小鼠腦中 LC3b-1 比 LC3b-11 的表現量高出許多，這與前人的研究結果相符(Mizushima 2004)。

一般多利用 LC3-II/LC3-I 來表示 LC3 的表現量，LC3-II 會和自噬體膜結合，而它的表現量和自噬體的數量有關。在兩種情況下可以看到 LC3 的累積，第一種為自噬作用活化，第二種為自噬流(autophagic flux)被阻斷造成囊泡堆積(Klionsky, Abdelmohsen et al. 2016)，換句話說，當 LC3 表現量增加時，可能代表自噬作用正

在進行，也可能代表自噬作用中途被阻礙無法完成，因此需要其他的自噬作用相關指標，如 Beclin-1 或 p62，才能夠一起判斷自噬作用是否功能受損。

即便以 Western blot 來檢測 LC3-II 和 LC3-I，並以 LC3-II 和 LC3-I 的比值來代表 LC3 的表現量已經是很常用的方法，但仍有一些注意事項：第一，腦中的 LC3-I 表現量遠大於 LC3-II，而且這兩者的蛋白分子量相近，因此在組織均漿中可能難以測得 LC3-II(Chu, Plowey et al. 2009)；第二，LC3-I 比 LC3-II 更容易在 SDS 緩衝液、反覆凍融的過程中降解，且抗體對於 LC3-I 和 LC3-II 的親和力不盡相同(Mizushima and Yoshimori 2007)，因此近年來的相關文獻認為不應以 LC3-I 作為定量的分母，應以 LC3-II 除以其他更穩定的內部對照蛋白(如：tubulin 或 β -actin)來表示 LC3 的表現量(Klionsky, Abdelmohsen et al. 2016, Yoshii and Mizushima 2017)。



5.3.4 阿茲海默症特定病理變化

類澱粉蛋白堆積而成的斑塊和神經纖維纏結是阿茲海默症的主要病徵，類澱粉蛋白斑塊會阻擋神經元之間的傳遞，而神經纖維纏結則會使神經元崩解、無法傳遞訊息進而壞死，且自噬作用受損及微膠細胞活化都能夠加速這兩種病徵的嚴重程度及影響範圍。具 42 個胺基酸的類澱粉蛋白 A β ₄₂ 會從單體(monomers)、低聚物(oligomers)、原纖維(fibrils)等順序逐漸聚集沈澱成最後的類澱粉蛋白斑塊(plaques)，雖然最終的斑塊型態才能夠阻擋神經訊息傳遞，但許多研究發現，中間型態的可溶性低聚物 A β 更具神經毒性，因其可以誘導早期的 A β 病變(Walsh, Klyubin et al. 2002, Kaye, Head et al. 2003)，故本研究以低聚物 A β ₄₂ 作為指標；神經纖維纏結是因細胞微管上的 Tau 蛋白過度磷酸化後(p-tau)聚集成不可溶的聚合物，而在阿茲海默症中，Tau 蛋白的增加會引起自身磷酸化(Liazoghli, Perreault et al. 2005)，且會導致 Tau 蛋白的聚集(Chesser, Pritchard et al. 2013)，也就是說總 Tau 蛋白上升先於磷酸化 Tau 蛋白上升，因此本研究以總 Tau 蛋白作為指標。然而，根據本次的研究結果發現，急性暴露柴油引擎微粒並沒有讓腦部的低聚物 A β 及總 Tau 蛋白的表現量有顯著的改變。

目前空氣污染微粒的毒理研究中，較少研究探討微粒對 A β 及 Tau 蛋白的影響，因為這兩個蛋白相較於發炎反應、氧化壓力等，屬於較後端的指標，需要適當的暴露條件及實驗動物才能看到反應，例如慢性呼吸暴露濃度約為 1000 μ g/m³ 的柴油引擎微粒，發現大鼠腦部的 A β ₄₂ 及過度磷酸化 Tau 有顯著地上升，或是利用阿茲海默症動物模式中的 5XFAD 基因轉殖鼠，發現呼吸暴露柴油引擎微粒後，小鼠腦部 A β 斑塊有顯著增加的情形。除此之外，本實驗室先前研究利用 C57BL6 小鼠，以同於本研究之暴露條件進行暴露，發現小鼠大腦皮質的 t-Tau 和 p-Tau 都有顯著上升的情形，然這次的研究結果並非如此，我們認為是因為 3xTg-AD 小鼠的

在年輕時期的神經保護機制健全，且暴露條件可能不足以影響至如此後端的特定疾病指標所致。



5.3.5 組織病理

本研究對海馬迴、大腦皮質、小腦及肺部進行了組織病理切片，並以 H&E 染色觀察病理變化，結果發現在暴露組肺部的支氣管及血管周圍發現輕微的單核球浸潤，以及含有碳粒的巨噬細胞，判讀結果為輕微的發炎反應及碳粒沈積，腦部則沒有明顯的病理變化。

本次組織病理結果與先前我們的研究結果相似，在急性暴露柴油引擎微粒後造成肺部的發炎反應及微粒堆積(吳亦翎 2016, 趙貞婷 2017, 李洛堯 2018)，也代表口咽吸入法確實使微粒滲進呼吸道中並在體內造成反應。研究指出暴露於大氣微粒可能會導致呼吸道、肺部疾病增加也會導致發炎反應的產生(Kim, Kabir et al. 2015)，因微粒所產生的促發炎因子可能會隨著體內循環造成腦部發炎反應、增加氧化壓力，最終影響到中樞神經的運作、結構(Levesque, Surace et al. 2011)，在柴油引擎微粒的相關體內研究中也有相似的結果(Hartz, Bauer et al. 2008, Levesque, Taetzsch et al. 2011)，並在小鼠的肺泡灌洗液中發現顯著地發炎反應(Kim, Lee et al. 2016)。儘管我們發現柴油引擎微粒會使海馬迴發生氧化壓力的現象，但是本研究並沒有發現腦部有任何病理變化，表示本次的微粒暴露不足以讓中樞神經系統產生組織或結構上明顯地改變。

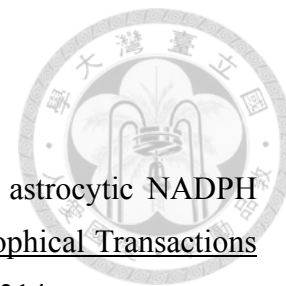
第六章 結論與建議



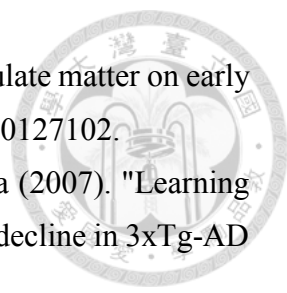
以口咽吸入法暴露柴油引擎微粒會使小鼠肺部產生發炎反應，並造成腦部的氧化壓力，而掌管記憶與學習的海馬迴是首先受到影響的腦區，造成中樞神經系統的氧化壓力可能是因為當微粒進入肺部後引起發炎反應，促發炎反應因子等細胞激素經由血液循環運送至腦部並引起氧化壓力。然而，本次的實驗設計並無法觀察到腦部神經發炎、自噬作用、A β 及 Tau 蛋白的變化，我們認為可能的原因是本次使用之年輕 3xTg-AD 小鼠腦中的神經保護機制健全，甚至優於先前研究常使用的 C57BL/6 小鼠，此外，本次雖為重複暴露，相較於一次性暴露更易觀察到生物體的毒性反應，但每次暴露的濃度可能過低，導致腦部的氧化壓力不足以引起神經發炎反應及後續的中樞神經系統毒性指標變化。

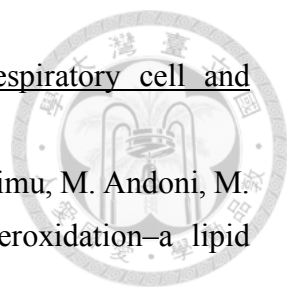
未來研究可以根據本次的實驗設計進行修改，首先是提高每次的暴露劑量，並使用 12 個月大以上的年老 3xTg-AD 小鼠，除此之外，應拉長整個暴露的時程，或是考慮最後一次暴露後的犧牲時間點，24 小時後犧牲可能不足以引起某些中樞神經毒性反應。若仍採用口咽吸入法等急性暴露方法，可以於含有微粒的懸浮溶液中加入特定物質，如牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)、吐溫 20 (Tween-20) 等界面活性劑，減少溶液殘留於微量吸管的管壁，確保每次暴露的劑量。雖然本次實驗以急性暴露觀察微粒對中樞神經系統的影響，但長期暴露微粒對生物體的毒性仍需要更多研究，除了本研究所關注的指標外，粒線體缺陷、磷酸化 Tau 蛋白也是常見的中樞神經系統毒性指標，另外也可利用不同染色方法觀察神經病變，如免疫化學染色法(Immunohistochemistry, IHC)、剛果紅染色(Congo Red)等，以期未來能夠找到微粒引起中樞神經系統毒性的可能途徑。

第七章 參考資料

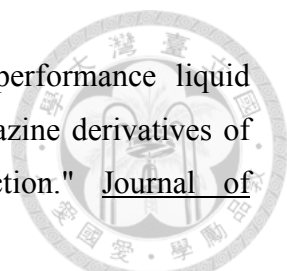


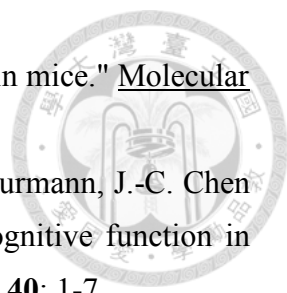
1. Abramov, A. Y. and M. R. Duchen (2005). "The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **360**(1464): 2309-2314.
2. Akimoto, H. (2003). "Global air quality and pollution." Science **302**(5651): 1716-1719.
3. Alavi Naini, S. M. and N. Soussi-Yanicostas (2015). "Tau hyperphosphorylation and oxidative stress, a critical vicious circle in neurodegenerative tauopathies?" Oxidative medicine and cellular longevity **2015**.
4. Anzai, K., K. Ogawa, Y. Goto, Y. Senzaki, T. Ozawa and H. Yamamoto (1999). "Oxidation-dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers." Antioxidants & redox signaling **1**(3): 339-347.
5. Asai, H., S. Ikezu, S. Tsunoda, M. Medalla, J. Luebke, T. Haydar, B. Wolozin, O. Butovsky, S. Kügler and T. Ikezu (2015). "Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation." Nature neuroscience **18**(11): 1584.
6. Ashrafi, G., J. S. Schlehe, M. J. LaVoie and T. L. Schwarz (2014). "Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin." J Cell Biol **206**(5): 655-670.
7. Bai, K.-J., K.-J. Chuang, S.-M. Wu, L.-T. Chang, T.-Y. Chang, K.-F. Ho and H.-C. Chuang (2018). "Effects of diesel exhaust particles on the expression of tau and autophagy proteins in human neuroblastoma cells." Environmental toxicology and pharmacology **62**: 54-59.
8. Behl, C. (1997). "Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease." Cell and tissue research **290**(3): 471-480.
9. Belfiore, R., A. Rodin, E. Ferreira, R. Velazquez, C. Branca, A. Caccamo and S. Oddo (2019). "Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice." Aging cell **18**(1): e12873.
10. Bengalli, R., A. Zerboni, S. Marchetti, E. Longhin, M. Priola, M. Camatini and P. Mantecchia (2019). "In vitro pulmonary and vascular effects induced by different diesel exhaust particles." Toxicology letters **306**: 13-24.
11. Bernard, A. and D. J. Klionsky (2014). *Defining the membrane precursor supporting the nucleation of the phagophore*, Taylor & Francis.
12. Bhatt, D. P., K. L. Puig, M. W. Gorr, L. E. Wold and C. K. Combs (2015). "A pilot

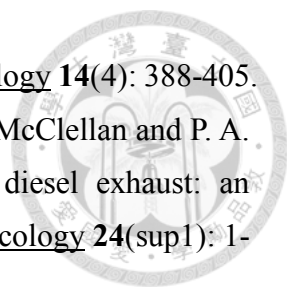
- 
- study to assess effects of long-term inhalation of airborne particulate matter on early Alzheimer-like changes in the mouse brain." PLoS One **10**(5): e0127102.
13. Billings, L. M., K. N. Green, J. L. McGaugh and F. M. LaFerla (2007). "Learning decreases A β * 56 and tau pathology and ameliorates behavioral decline in 3xTg-AD mice." Journal of Neuroscience **27**(4): 751-761.
 14. Billings, L. M., S. Oddo, K. N. Green, J. L. McGaugh and F. M. LaFerla (2005). "Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice." Neuron **45**(5): 675-688.
 15. Blanchard, J., L. Wanka, Y.-C. Tung, M. del Carmen Cárdenas-Aguayo, F. M. LaFerla, K. Iqbal and I. Grundke-Iqbal (2010). "Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice." Acta neuropathologica **120**(5): 605-621.
 16. Block, M., X. Wu, Z. Pei, G. Li, T. Wang, L. Qin, B. Wilson, J. Yang, J. Hong and B. Veronesi (2004). "Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase." The FASEB Journal **18**(13): 1618-1620.
 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. Boland, B., A. Kumar, S. Lee, F. M. Platt, J. Wegiel, W. H. Yu and R. A. Nixon (2008). "Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease." Journal of Neuroscience **28**(27): 6926-6937.
 19. Bolton, J. L., S. Marinero, T. Hassanzadeh, D. Natesan, D. Le, C. Belliveau, S. Mason, R. L. Auten and S. D. Bilbo (2017). "Gestational exposure to air pollution alters cortical volume, microglial morphology, and microglia-neuron interactions in a sex-specific manner." Frontiers in synaptic neuroscience **9**: 10.
 20. 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.
 21. Bonvallet, V., A. Baeza-Squiban, A. Baulig, S. Brulant, S. Boland, F. Muzeau, R. Barouki and F. Marano (2001). "Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce

- 
- cytochrome p450 1A1 expression." American journal of respiratory cell and molecular biology **25**(4): 515-521.
22. Borza, C., D. Muntean, C. Dehelean, G. Săvoiu, C. Șerban, G. Simu, M. Andoni, M. Butur and S. Drăgan (2013). Oxidative stress and lipid peroxidation—a lipid metabolism dysfunction. Lipid metabolism, IntechOpen.
 23. Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta neuropathologica **82**(4): 239-259.
 24. Butterfield, D. A., M. L. B. Lange and R. Sultana (2010). "Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids **1801**(8): 924-929.
 25. Calderón-Garcidueñas, L., A. C. Solt, C. Henríquez-Roldán, R. Torres-Jardón, B. Nuse, L. Herritt, R. Villarreal-Calderón, N. Osnaya, I. Stone and R. García (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 β -42 and α -synuclein in children and young adults." Toxicologic pathology **36**(2): 289-310.
 26. Calderón-Garcidueñas, L., A. Mora-Tiscareño, E. Ontiveros, G. Gómez-Garza, G. Barragán-Mejía, J. Broadway, S. Chapman, G. Valencia-Salazar, V. Jewells and R. R. Maronpot (2008). "Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs." Brain and cognition **68**(2): 117-127.
 27. CALDERon-GARCIDUEnas, L., W. Reed, R. R. Maronpot, C. Henriquez-Roldán, R. Delgado-Chavez, A. CALDERon-GARCIDUEnas, I. Dragustinovis, M. Franco-Lira, M. Aragon-Flores and A. C. Solt (2004). "Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution." Toxicologic pathology **32**(6): 650-658.
 28. Calingasan, N. Y., K. Uchida and G. E. Gibson (1999). "Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease." Journal of neurochemistry **72**(2): 751-756.
 29. Carvajal, F. J. and N. C. Inestrosa (2011). "Interactions of AChE with A β aggregates in Alzheimer's brain: therapeutic relevance of IDN 5706." Frontiers in molecular neuroscience **4**: 19.
 30. 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." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **260**(4): H1057-H1061.
31. Chen, Y., Z. Liang, J. Blanchard, C.-L. Dai, S. Sun, M. H. Lee, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, F. Liu and C.-X. Gong (2013). "A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse)." Molecular neurobiology **47**(2): 711-725.
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. Cherry, J. D., J. A. Olschowka and M. K. O'Banion (2014). "Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed." Journal of neuroinflammation **11**(1): 98.
34. Chesser, A., S. Pritchard and G. V. Johnson (2013). "Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease." Frontiers in neurology **4**: 122.
35. Chiu, I. M., C. A. Von Hehn and C. J. Woolf (2012). "Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology." Nature neuroscience **15**(8): 1063.
36. Chu, C. T., E. D. Plowey, R. K. Dagda, R. W. Hickey, S. J. Cherra III and R. S. Clark (2009). "Autophagy in neurite injury and neurodegeneration: in vitro and in vivo models." Methods in enzymology **453**: 217-249.
37. Chuang, H.-C., D. Wu and J.-H. Kang (2018). "Particulate air pollution and neurological diseases: The role of tauopathies." Environmental Disease **3**(1): 4.
38. Cogley, J. N., M. L. Fiorello and D. M. Bailey (2018). "13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress." Redox biology **15**: 490-503.
39. 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.
40. Congdon, E. E., J. W. Wu, N. Myeku, Y. H. Figueroa, M. Herman, P. S. Marinec, J. E. Gestwicki, C. A. Dickey, W. H. Yu and K. E. Duff (2012). "Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo." Autophagy **8**(4): 609-622.

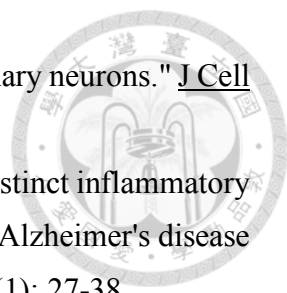
- 
41. Cordis, G. A., D. K. Das and W. Riedel (1998). "High-performance liquid chromatographic peak identification of 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection." Journal of Chromatography A **798**(1-2): 117-123.
42. Costa, L. G., T. B. Cole, J. Coburn, Y.-C. Chang, K. Dao and P. J. Roqué (2017). "Neurotoxicity of traffic-related air pollution." Neurotoxicology **59**: 133-139.
43. 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.
44. Cuervo, A. M. (2004). "Autophagy: in sickness and in health." Trends in cell biology **14**(2): 70-77.
45. Cui, P., Y. Huang, J. Han, F. Song and K. Chen (2014). "Ambient particulate matter and lung cancer incidence and mortality: a meta-analysis of prospective studies." The European Journal of Public Health **25**(2): 324-329.
46. De Vooght, V., J. A. Vanoirbeek, S. Haenen, E. Verbeken, B. Nemery and P. H. Hoet (2009). "Oropharyngeal aspiration: an alternative route for challenging in a mouse model of chemical-induced asthma." Toxicology **259**(1-2): 84-89.
47. Duyckaerts, C., M.-C. Potier and B. Delatour (2008). "Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences." Acta neuropathologica **115**(1): 5-38.
48. Förstl, H. and A. Kurz (1999). "Clinical features of Alzheimer's disease." European archives of psychiatry and clinical neuroscience **249**(6): 288-290.
49. Fagundes, L. S., A. d. S. Fleck, A. C. Zanchi, P. H. N. Saldiva and C. R. Rhoden (2015). "Direct contact with particulate matter increases oxidative stress in different brain structures." Inhalation toxicology **27**(10): 462-467.
50. Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (1998). "Lipid peroxides in the free radical pathophysiology of brain diseases." Cellular and molecular neurobiology **18**(6): 599-608.
51. Foster, W. M., D. M. Walters, M. Longphre, K. Macri and L. M. Miller (2001). "Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy." Journal of applied physiology **90**(3): 1111-1118.
52. François, A., F. Terro, N. Quellard, B. Fernandez, D. Chassaing, T. Janet, A. R. Bilan, M. Paccalin and G. Page (2014). "Impairment of autophagy in the central nervous

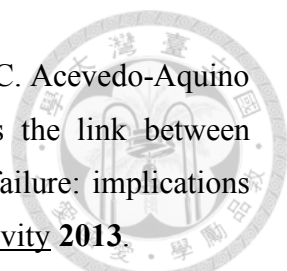
- 
- system during lipopolysaccharide-induced inflammatory stress in mice." Molecular brain **7**(1): 56.
53. Gatto, N. M., V. W. Henderson, H. N. Hodis, J. A. S. John, F. Lurmann, J.-C. Chen and W. J. Mack (2014). "Components of air pollution and cognitive function in middle-aged and older adults in Los Angeles." Neurotoxicology **40**: 1-7.
 54. Gerlofs-Nijland, M. E., D. van Berlo, F. R. Cassee, R. P. Schins, K. Wang and A. Campbell (2010). "Effect of prolonged exposure to diesel engine exhaust on proinflammatory markers in different regions of the rat brain." Particle and fibre toxicology **7**(1): 12.
 55. 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.
 56. 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.
 57. Gorlovoy, P., S. Larionov, T. T. H. Pham and H. Neumann (2009). "Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators." The FASEB Journal **23**(8): 2502-2513.
 58. Guerra, R., E. Vera-Aguilar, M. Uribe-Ramirez, G. Gookin, J. Camacho, A. Osornio-Vargas, V. Mugica-Alvarez, R. Angulo-Olais, A. Campbell and J. Froines (2013). "Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum." Toxicology letters **222**(2): 146-154.
 59. 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." European Journal of Neuroscience **27**(5): 1119-1130.
 60. Hartz, A. M., B. r. Bauer, M. L. Block, J.-S. Hong and D. S. Miller (2008). "Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier." The FASEB Journal **22**(8): 2723-2733.
 61. Heneka, M. T., M. J. Carson, J. El Khoury, G. E. Landreth, F. Brosseron, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica and R. M. Ransohoff (2015).

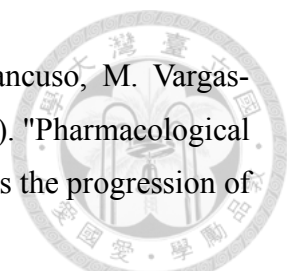
- 
- "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." The Lancet Neurology **14**(4): 388-405.
62. Hesterberg, T. W., C. M. Long, W. B. Bunn, C. A. Lapin, R. O. McClellan and P. A. Valberg (2012). "Health effects research and regulation of diesel exhaust: an historical overview focused on lung cancer risk." Inhalation toxicology **24**(sup1): 1-45.
63. Heusinkveld, H. J., T. Wahle, A. Campbell, R. H. Westerink, L. Tran, H. Johnston, V. Stone, F. R. Cassee and R. P. Schins (2016). "Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles." Neurotoxicology **56**: 94-106.
64. Huber, C. M., C. Yee, T. May, A. Dhanala and C. S. Mitchell (2018). "Cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease: amyloid-beta versus tauopathy." Journal of Alzheimer's Disease **61**(1): 265-281.
65. Hulbert, A., R. Pamplona, R. Buffenstein and W. Buttemer (2007). "Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals." Physiological reviews **87**(4): 1175-1213.
66. Hullmann, M., C. Albrecht, D. van Berlo, M. E. Gerlofs-Nijland, T. Wahle, A. W. Boots, J. Krutmann, F. R. Cassee, T. A. Bayer and R. P. Schins (2017). "Diesel engine exhaust accelerates plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease." Particle and fibre toxicology **14**(1): 35.
67. Inoue, K., J. Rispoli, H. Kaphzan, E. Klann, E. I. Chen, J. Kim, M. Komatsu and A. Abeliovich (2012). "Macroautophagy deficiency mediates age-dependent neurodegeneration through a phospho-tau pathway." Molecular neurodegeneration **7**(1): 48.
68. Iqbal, K., F. Liu, C.-X. Gong and I. Grundke-Iqbal (2010). "Tau in Alzheimer disease and related tauopathies." Current Alzheimer Research **7**(8): 656-664.
69. Jiang, J., G. Oberdörster and P. Biswas (2009). "Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies." Journal of Nanoparticle Research **11**(1): 77-89.
70. Jimenez, S., D. Baglietto-Vargas, C. Caballero, I. Moreno-Gonzalez, M. Torres, R. Sanchez-Varo, D. Ruano, M. Vizueté, A. Gutierrez and J. Vitorica (2008). "Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic." Journal of Neuroscience **28**(45): 11650-11661.
71. Kamphuis, W., L. Kooijman, S. Schetters, M. Orre and E. M. Hol (2016). "Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around

- amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease **1862**(10): 1847-1860.
72. Kaufman, J. D., S. D. Adar, R. G. Barr, M. Budoff, G. L. Burke, C. L. Curl, M. L. Daviglius, A. V. D. Roux, A. J. Gasset and D. R. Jacobs Jr (2016). "Association between air pollution and coronary artery calcification within six metropolitan areas in the USA (the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Air Pollution): a longitudinal cohort study." The Lancet **388**(10045): 696-704.
73. Kaye, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman and C. G. Glabe (2003). "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis." Science **300**(5618): 486-489.
74. Kesavulu, M., B. K. Rao, R. Giri, J. Vijaya, G. Subramanyam and C. Apparao (2001). "Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease." Diabetes research and clinical practice **53**(1): 33-39.
75. Kim, B.-G., P.-H. Lee, S.-H. Lee, Y.-E. Kim, M.-Y. Shin, Y. Kang, S.-H. Bae, M.-J. Kim, T. Rhim and C.-S. Park (2016). "Long-term effects of diesel exhaust particles on airway inflammation and remodeling in a mouse model." Allergy, asthma & immunology research **8**(3): 246-256.
76. Kim, K.-H., E. Kabir and S. Kabir (2015). "A review on the human health impact of airborne particulate matter." Environment international **74**: 136-143.
77. Kinaret, P., M. Ilves, V. Fortino, E. Rydman, P. Karisola, A. Lähde, J. Koivisto, J. Jokiniemi, H. Wolff and K. Savolainen (2017). "Inhalation and oropharyngeal aspiration exposure to rod-like carbon nanotubes induce similar airway inflammation and biological responses in mouse lungs." ACS nano **11**(1): 291-303.
78. Klionsky, D. J., K. Abdelmohsen, A. Abe, M. J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo Arozena, H. Adachi, C. M. Adams, P. D. Adams and K. Adeli (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." Autophagy **12**(1): 1-222.
79. 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.
80. Kreyling, W. G. (2016). "Discovery of unique and ENM—specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats." Toxicology

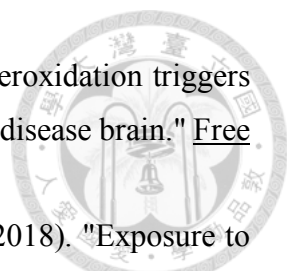
- 
- and applied pharmacology **299**: 41-46.
81. Kurt, O. K., J. Zhang and K. E. Pinkerton (2016). "Pulmonary health effects of air pollution." Current opinion in pulmonary medicine **22**(2): 138.
 82. Lakatos, H. F., H. A. Burgess, T. H. Thatcher, M. R. Redonnet, E. Hernady, J. P. Williams and P. J. Sime (2006). "Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation." Experimental lung research **32**(5): 181-199.
 83. Lee, J., S. Giordano and J. Zhang (2012). "Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling." Biochemical Journal **441**(2): 523-540.
 84. 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." Journal of neuroinflammation **8**(1): 105.
 85. Levesque, S., T. Taetsch, M. E. Lull, U. Kodavanti, K. Stadler, A. Wagner, J. A. Johnson, L. Duke, P. Kodavanti and M. J. Surace (2011). "Diesel exhaust activates and primes microglia: air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity." Environmental health perspectives **119**(8): 1149-1155.
 86. Li, Q., Y. Liu and M. Sun (2017). "Autophagy and Alzheimer's disease." Cellular and molecular neurobiology **37**(3): 377-388.
 87. Liazoghli, D., S. Perreault, K. D. Micheva, M. Desjardins and N. Leclerc (2005). "Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons." The American journal of pathology **166**(5): 1499-1514.
 88. Lipinski, M. M., B. Zheng, T. Lu, Z. Yan, B. F. Py, A. Ng, R. J. Xavier, C. Li, B. A. Yankner and C. R. Scherzer (2010). "Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(32): 14164-14169.
 89. Liu, C., Y. Gao, J. Barrett and B. Hu (2010). "Autophagy and protein aggregation after brain ischemia." Journal of neurochemistry **115**(1): 68-78.
 90. Liu, Q., M. A. Smith, J. Avilá, J. DeBernardis, M. Kansal, A. Takeda, X. Zhu, A. Nunomura, K. Honda and P. I. Moreira (2005). "Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations." Free Radical Biology and Medicine **38**(6): 746-754.
 91. Maday, S., K. E. Wallace and E. L. Holzbaur (2012). "Autophagosomes initiate

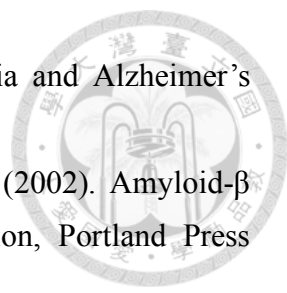
- 
- distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons." J Cell Biol **196**(4): 407-417.
92. Martin, E., C. Boucher, B. Fontaine and C. Delarasse (2017). "Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease models: effects of aging and amyloid pathology." Aging cell **16**(1): 27-38.
 93. Mastrangelo, M. A. and W. J. Bowers (2008). "Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice." BMC neuroscience **9**(1): 81.
 94. Mateen, F. J. and R. D. Brook (2011). "Air pollution as an emerging global risk factor for stroke." Jama **305**(12): 1240-1241.
 95. Mazure, N. M. and J. Pouyssegur (2010). "Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?" Current opinion in cell biology **22**(2): 177-180.
 96. McKee, A. C., I. Carreras, L. Hossain, H. Ryu, W. L. Klein, S. Oddo, F. M. LaFerla, B. G. Jenkins, N. W. Kowall and A. Dedeoglu (2008). "Ibuprofen reduces A β , hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice." Brain research **1207**: 225-236.
 97. Meagher, E. A. and G. A. FitzGerald (2000). "Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations." Free Radical Biology and Medicine **28**(12): 1745-1750.
 98. Mendonça, R., O. Gning, C. Di Cesaré, L. Lachat, N. C. Bennett, F. Helfenstein and G. Glauser (2017). "Sensitive and selective quantification of free and total malondialdehyde in plasma using UHPLC-HRMS." Journal of lipid research **58**(9): 1924-1931.
 99. Mizushima, N. (2004). "Methods for monitoring autophagy." The international journal of biochemistry & cell biology **36**(12): 2491-2502.
 100. Mizushima, N. (2005). "A β generation in autophagic vacuoles." J Cell Biol **171**(1): 15-17.
 101. Mizushima, N., B. Levine, A. M. Cuervo and D. J. Klionsky (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." nature **451**(7182): 1069.
 102. Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." Molecular biology of the cell **15**(3): 1101-1111.
 103. Mizushima, N. and T. Yoshimori (2007). "How to interpret LC3 immunoblotting." Autophagy **3**(6): 542-545.

- 
104. Mondragón-Rodríguez, S., G. Perry, X. Zhu, P. I. Moreira, M. C. Acevedo-Aquino and S. Williams (2013). "Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease." Oxidative medicine and cellular longevity **2013**.
105. Montine, K. S., E. Reich, M. D. Neely, K. R. Sidell, S. J. Olson, W. R. Markesbery and T. J. Montine (1998). "Distribution of reducible 4-hydroxynonenal adduct immunoreactivity in Alzheimer disease is associated with APOE genotype." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **57**(5): 415-425.
106. Moreno, M. L., V. M. Villar, S. Mérida, F. Bosch Morell and M. Miranda (2018). "Autophagy dysfunction and oxidative stress, two related mechanisms implicated in retinitis pigmentosa." Frontiers in physiology **9**: 1008.
107. Nelson, P. T., I. Alafuzoff, E. H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N. J. Cairns, R. J. Castellani, B. J. Crain, P. Davies and K. D. Tredici (2012). "Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **71**(5): 362-381.
108. Neniskyte, U., J. J. Neher and G. C. Brown (2011). "Neuronal death induced by nanomolar amyloid β is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia." Journal of Biological Chemistry **286**(46): 39904-39913.
109. NIST (2013). SRM 1650b Diesel Particulate Matter, US Department of Commerce Gaithersburg, MD.
110. Nixon, R. A. and A. M. Cataldo (2006). "Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease." Journal of Alzheimer's Disease **9**(s3): 277-289.
111. Nixon, R. A., J. Wegiel, A. Kumar, W. H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo and A. M. Cuervo (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **64**(2): 113-122.
112. Numan, M., J. Brown and L. Michou (2015). "Impact of air pollutants on oxidative stress in common autophagy-mediated aging diseases." International journal of environmental research and public health **12**(2): 2289-2305.
113. Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari and F. M. LaFerla (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-421.

- 
114. Olmos-Alonso, A., S. T. Schettters, S. Sri, K. Askew, R. Mancuso, M. Vargas-Caballero, C. Holscher, V. H. Perry and D. Gomez-Nicola (2016). "Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology." Brain **139**(3): 891-907.
115. Orrenius, S., V. O. Kaminsky and B. Zhivotovsky (2013). "Autophagy in Toxicology: Cause or Consequence?" Annual Review of Pharmacology and Toxicology **53**(1): 275-297.
116. Pellacani, C. and L. Costa (2018). "Role of autophagy in environmental neurotoxicity." Environmental pollution **235**: 791-805.
117. 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.
118. Praticò, D., K. Uryu, S. Leight, J. Q. Trojanowski and V. M.-Y. Lee (2001). "Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis." Journal of Neuroscience **21**(12): 4183-4187.
119. Rae, E. A. and R. E. Brown (2015). "The problem of genotype and sex differences in life expectancy in transgenic AD mice." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **57**: 238-251.
120. Reuter, S., S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?" Free Radical Biology and Medicine **49**(11): 1603-1616.
121. Ris, C. (2007). "US EPA health assessment for diesel engine exhaust: a review." Inhalation toxicology **19**(sup1): 229-239.
122. Ruipérez, V., F. Darios and B. Davletov (2010). "Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease." Progress in lipid research **49**(4): 420-428.
123. Salim, S. (2017). "Oxidative stress and the central nervous system." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **360**(1): 201-205.
124. Sanchez-Varo, R., L. Trujillo-Estrada, E. Sanchez-Mejias, M. Torres, D. Baglietto-Vargas, I. Moreno-Gonzalez, V. De Castro, S. Jimenez, D. Ruano and M. Vizuete (2012). "Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus." Acta neuropathologica **123**(1): 53-70.
125. Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2007).

- "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." The EMBO journal **26**(7): 1749-1760.
126. Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiological reviews **81**(2): 741-766.
127. Selkoe, D. J. (2011). "Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics." Nature medicine **17**(9): 1060.
128. Shackelford, C., G. Long, J. Wolf, C. Okerberg and R. Herbert (2002). "Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies." Toxicologic pathology **30**(1): 93-96.
129. Shang, Y. and Q. Sun (2018). "Particulate air pollution: Major research methods and applications in animal models." Environmental Disease **3**(3): 57.
130. Shelat, P. B., M. Chalimoniuk, J. H. Wang, J. B. Strosznajder, J. C. Lee, A. Y. Sun, A. Simonyi and G. Y. Sun (2008). "Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons." Journal of neurochemistry **106**(1): 45-55.
131. Smith, M. A., K. Hirai, K. Hsiao, M. A. Pappolla, P. L. Harris, S. L. Siedlak, M. Tabaton and G. Perry (1998). "Amyloid- β deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress." Journal of neurochemistry **70**(5): 2212-2215.
132. Song, Z., D. Zhao and L. Yang (2013). "Molecular mechanisms of neurodegeneration mediated by dysfunctional subcellular organelles in transmissible spongiform encephalopathies." Acta Biochim Biophys Sin **45**(6): 452-464.
133. 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.
134. 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.
135. Stover, K. R., M. A. Campbell, C. M. Van Winssen and R. E. Brown (2015). "Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease." Behavioural brain research **289**: 29-38.
136. Sultana, R., M. Perluigi and D. A. Butterfield (2006). "Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics." Antioxidants & redox signaling **8**(11-12): 2021-2037.

- 
137. Sultana, R., M. Perluigi and D. A. Butterfield (2013). "Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain." Free Radical Biology and Medicine **62**: 157-169.
138. Suwannasual, U., J. Lucero, J. D. McDonald and A. K. Lund (2018). "Exposure to traffic-generated air pollutants mediates alterations in brain microvascular integrity in wildtype mice on a high-fat diet." Environmental research **160**: 449-461.
139. Taxell, P. and T. Santonen (2017). "Diesel engine exhaust: basis for occupational exposure limit value." Toxicological Sciences **158**(2): 243-251.
140. Tonne, C., A. Elbaz, S. Beevers and A. Singh-Manoux (2014). "Traffic-related air pollution in relation to cognitive function in older adults." Epidemiology (Cambridge, Mass.) **25**(5): 674.
141. Totlandsdal, A. I., J. I. Herseth, A. K. Bølling, A. Kubátová, A. Braun, R. E. Cochran, M. Refsnes, J. Øvrevik and M. Låg (2012). "Differential effects of the particle core and organic extract of diesel exhaust particles." Toxicology letters **208**(3): 262-268.
142. Totlandsdal, A. I., M. Låg, E. Lilleaas, F. Cassee and P. Schwarze (2015). "Differential proinflammatory responses induced by diesel exhaust particles with contrasting PAH and metal content." Environmental toxicology **30**(2): 188-196.
143. Tukozkan, 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.
144. Tung, Y.-T., B.-J. Wang, M.-K. Hu, W.-M. Hsu, H. Lee, W.-P. Huang and Y.-F. Liao (2012). "Autophagy: a double-edged sword in Alzheimer's disease." Journal of biosciences **37**(1): 157-165.
145. Tzivian, L., M. Dlugaj, A. Winkler, G. Weinmayr, F. Hennig, K. B. Fuks, M. Vossoughi, T. Schikowski, C. Weimar and R. Erbel (2016). "Long-term air pollution and traffic noise exposures and mild cognitive impairment in older adults: a cross-sectional analysis of the Heinz Nixdorf recall study." Environmental health perspectives **124**(9): 1361-1368.
146. 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 and J. Krutmann (2010). "Comparative evaluation of the effects of short-term inhalation exposure to diesel engine exhaust on rat lung and brain." Archives of toxicology **84**(7): 553-562.
147. Villamil-Ortiz, J. G. and G. P. Cardona-Gomez (2015). "Comparative analysis of

- 
- autophagy and tauopathy related markers in cerebral ischemia and Alzheimer's disease animal models." Frontiers in aging neuroscience **7**: 84.
148. Walsh, D., I. Klyubin, J. Fadeeva, M. Rowan and D. Selkoe (2002). Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition, Portland Press Limited.
149. Wang, W.-Y., M.-S. Tan, J.-T. Yu and L. Tan (2015). "Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease." Annals of translational medicine **3**(10).
150. Wang, X. and E. K. Michaelis (2010). "Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain." Frontiers in aging neuroscience **2**: 12.
151. Wang, Y., L. Xiong and M. Tang (2017). "Toxicity of inhaled particulate matter on the central nervous system: neuroinflammation, neuropsychological effects and neurodegenerative disease." Journal of Applied Toxicology **37**(6): 644-667.
152. Win-Shwe, T.-T., H. Fujimaki, Y. Fujitani and S. Hirano (2012). "Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust." Toxicology and applied pharmacology **262**(3): 355-362.
153. Wolfe, D. M., J. h. Lee, A. Kumar, S. Lee, S. J. Orenstein and R. A. Nixon (2013). "Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification." European Journal of Neuroscience **37**(12): 1949-1961.
154. Yehuda, S., S. Rabinovitz, R. L. Carasso and D. I. Mostofsky (2002). "The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane." Neurobiology of aging **23**(5): 843-853.
155. Yoshii, S. R. and N. Mizushima (2017). "Monitoring and measuring autophagy." International journal of molecular sciences **18**(9): 1865.
156. Yoshiyama, Y., M. Higuchi, B. Zhang, S.-M. Huang, N. Iwata, T. C. Saido, J. Maeda, T. Suhara, J. Q. Trojanowski and V. M.-Y. Lee (2007). "Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model." Neuron **53**(3): 337-351.
157. Zanobetti, A., F. Dominici, Y. Wang and J. D. Schwartz (2014). "A national case-crossover analysis of the short-term effect of PM 2.5 on hospitalizations and mortality in subjects with diabetes and neurological disorders." Environmental Health **13**(1): 38.
158. Zare-shahabadi, A., E. Masliah, G. V. Johnson and N. Rezaei (2015). "Autophagy in Alzheimer's disease." Reviews in the Neurosciences **26**(4): 385-395.

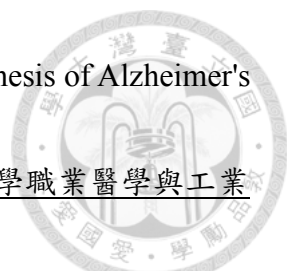
- 
159. Zhao, Y. and B. Zhao (2013). "Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease." Oxidative medicine and cellular longevity **2013**.
160. 吳亦翎 (2016). "細懸浮微粒之中樞神經系統毒性." 臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所學位論文: 1-99.
161. 李洛堯 (2018). "以口咽吸入多次暴露柴油引擎微粒對小鼠誘發神經毒性之研究." 臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所學位論文: 1-90.
162. 趙貞婷 (2017). "柴油引擎微粒對中樞神經系統影響之時間軸研究." 臺灣大學職業醫學與工業衛生研究所學位論文(2017 年): 1-79.



表 1、本實驗室柴油引擎微粒與中樞神經系統毒性之研究

	李洛堯, 2018	趙貞婷, 2017	吳亦翎, 2016
實驗動物	C57BL/6 小鼠	C57BL/6 小鼠	C57BL/6 小鼠
暴露物質	DEPs (SRM1650b)	DEPs (SRM2975)	DEPs (SRM2975)
暴露方法	口咽吸入法(OA)	氣管灌注法(IT)	氣管灌注法(IT)
暴露劑量與頻率	50ug/次, 2 次/週	150ug/次, 1 次/週	50ug/次, 1 次/週
	共三週	共兩週	共兩週
結果 (相較於控制組)	小腦、海馬迴之 脂質過氧化指標 MDA 顯著增加； 皮質之阿茲海默症病徵 t-Tau、 p-Tau 顯著增加	完成暴露三天後皮質之 自噬作用指標 LC3b 顯著下降	皮質之促發炎反應因子 IL-6 顯著增加 皮質之促發炎反應因子 IL-1 β , TNF- α , IL-6 顯著增加； 小腦之 IL-1 β 顯著增加

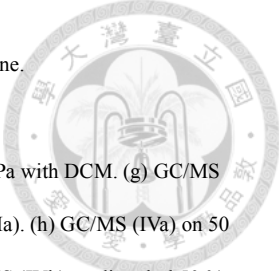
表 2、柴油引擎微粒 SRM1650b 之 PAH 質量分數值(NIST 2013)

PAH	Mass Fraction ^(a) (mg/kg)
Phenanthrene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)	65.6 ± 3.6
1-Methylphenanthrene ^(b,c,d,e,k,l,m)	32.1 ± 1.4
2-Methylphenanthrene ^(b,c,d,e,k,l,m)	72.3 ± 1.2
3-Methylphenanthrene ^(b,c,d,e,k,l,m)	56.7 ± 1.9
9-Methylphenanthrene ^(b,c,d,e,k,l,m)	36.6 ± 1.6
Fluoranthene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)	48.1 ± 1.1 ⁽ⁿ⁾
Pyrene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)	44.1 ± 1.2
Benzo[ghi]fluoranthene ^(c,e,f,g,h,i,j,k)	11.1 ± 0.7
Benzo[c]phenanthrene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,k)	2.65 ± 0.24
Benz[a]anthracene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)	6.45 ± 0.39
Chrysene ^(b,d,g,o)	13.4 ± 0.6
Triphenylene ^(b,d,g,o)	9.49 ± 0.63
Benzo[a]fluoranthene ^(b,c,d,e,f,h,k)	0.384 ± 0.023
Benzo[b]fluoranthene ^(c,e,f,g,h,i)	6.77 ± 0.92
Benzo[j]fluoranthene ^(c,e,f,h)	3.24 ± 0.50 ⁽ⁿ⁾
Benzo[k]fluoranthene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)	2.30 ± 0.18 ⁽ⁿ⁾
Benzo[e]pyrene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)	6.36 ± 0.37
Benzo[a]pyrene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k)	1.25 ± 0.12
Perylene ^(c,d,e,k)	0.167 ± 0.019 ⁽ⁿ⁾
Indeno[1,2,3-cd]pyrene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,o)	4.48 ± 0.21
Benzo[ghi]perylene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,o)	6.04 ± 0.30
Dibenz[a,c]anthracene ^(c,e,f,g,h,i)	0.439 ± 0.048
Dibenz[a,h]anthracene ^(c,e,g,i)	0.365 ± 0.082
Dibenz[a,j]anthracene ^(c,e,g,i)	0.387 ± 0.068 ⁽ⁿ⁾
Benzo[b]chrysene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,k)	0.301 ± 0.019 ⁽ⁿ⁾
Picene ^(b,c,d,e,f,g,h,i,k)	0.506 ± 0.058 ⁽ⁿ⁾

(a) The certified mass fraction values, unless otherwise footnoted, are weighted means of the mass fractions from multiple analytical methods. The uncertainty listed with each value is an expanded uncertainty about the mean with coverage factor, $k = 2$, calculated by combining within method variances with a between method variance following the ISO/JCGM Guide.

(b) GC/MS (Ia) on a proprietary relatively nonpolar phase after PFE at 100 °C and 13.8 MPa with toluene.

(c) GC/MS (Ib) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase, same extract as GC/MS (Ia).

- 
- (d) GC/MS (IIa) on a proprietary relatively nonpolar phase after PFE at 200 °C and 13.8 MPa with toluene.
- (e) GC/MS (IIb) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase same extract as GC/MS (IIa).
- (f) GC/MS (IIIa) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE at 100 °C and 13.8 MPa with DCM. (g) GC/MS (IIIb) on dimethyl 50 % polysiloxane liquid crystalline stationary phase with same extract as GC/MS (IIIa). (h) GC/MS (IVa) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE at 200 °C and 13.8 MPa with DCM. (i) GC/MS (IVb) on dimethyl 50 % polysiloxane liquid crystalline stationary phase with same extract as GC/MS (IVa). (j) GC/MS (Environment Canada) on a proprietary relatively nonpolar phase.
- (k) GC/MS (VIII) on non-polar extra low bleed proprietary phase after PFE with toluene at 100 °C with 13.8 MPa; 100 °C with 20.7 MPa; 200 °C with 13.8 MPa; and 200 °C with 20.7 MPa.
- (l) GC/MS (Va) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE at 100 °C and 13.8 MPa with DCM.
- (m) GC/MS (VIa) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE at 200 °C and 13.8 MPa with DCM.
- (n) The certified value is a weighted mean of average mass fractions, with one average from each of two or more analytical methods. The expanded uncertainty is the half width of a symmetric 95 % parametric bootstrap confidence interval which is consistent with the ISO/JCGM Guide with an effective coverage factor, k , equals 2.
- (o) GC/MS (VII) on 50 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase after PFE at 100 °C with DCM.

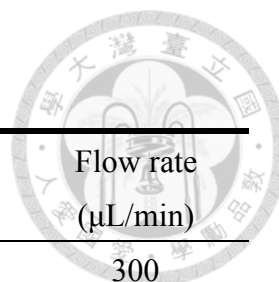


表 3、LC-MS/MS 移動相濃度梯度

Time (min)	Mobile phase A (%) 0.1% AA in ACN	Mobile phase B (%) 0.1% AA in H ₂ 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 4、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 5、SRM 參數

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

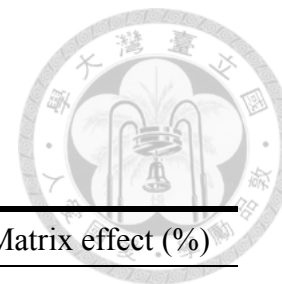


表 6、基質效應

Analyte	Standard calibration curve	r^2	Matrix matched calibration curve	r^2	Matrix effect (%)
MDA-DNPH	$y=5884086x+39606$	$r^2=0.9991$	$y=5599679x+1185836$	$r^2=0.9972$	-4.83 %

表 7、各腦區之 MDA 濃度

Brain region	Control (nmol/mL)	Exposure (nmol/mL)	<i>p</i> -value
	Mean ± SE(Median)	Mean ± SE (Median)	
Cerebral cortex	0.013 ± 0.002 (0.012)	0.025 ± 0.007 (0.020)	0.1282
Cerebellum	0.013 ± 0.001 (0.013)	0.020 ± 0.004 (0.018)	0.0927
Hippocampus	0.014 ± 0.002 (0.016)	0.058 ± 0.011 (0.060)	0.0051*

Data are represented as mean ± SE for cerebral cortex, cerebellum and hippocampus ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p < 0.05$ compare to control group.

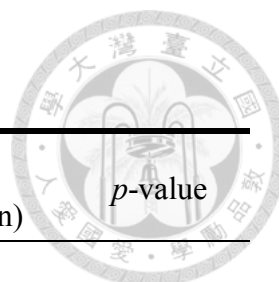


表 8、各腦區之 Iba-1 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control	Exposure	<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)	Mean ± SE (Median)	
Cerebral cortex	1.00 ± 0.22 (0.99)	0.73 ± 0.15 (0.77)	0.4712
Cerebellum	1.00 ± 0.20 (0.86)	1.54 ± 0.15 (1.48)	0.0927
Hippocampus	1.00 ± 0.13 (0.93)	0.79 ± 0.17 (0.70)	0.2980

Data are represented as mean ± SE for cerebral cortex, cerebellum and hippocampus ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.

表 9、各腦區之 LC3b 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control	Exposure	<i>p</i> -value
	Mean ± SE (Median)	Mean ± SE (Median)	
Cerebral cortex	1.00 ± 0.21 (0.79)	0.68 ± 0.09 (0.71)	0.2298
Cerebellum	1.00 ± 0.17 (0.97)	0.76 ± 0.08 (0.79)	0.4712
Hippocampus	1.00 ± 0.15 (0.88)	1.27 ± 0.26 (1.16)	0.2298

Data are represented as mean ± SE for cerebral cortex, cerebellum and hippocampus ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.

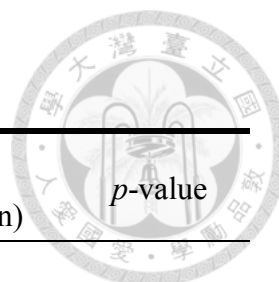


表 10、各腦區之 A β ₄₂ 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control	Exposure	<i>p</i> -value
	Mean \pm SE (Median)	Mean \pm SE (Median)	
Cerebral cortex	1.00 \pm 0.10 (1.00)	0.68 \pm 0.09 (0.71)	0.0927
Cerebellum	1.00 \pm 0.07 (1.03)	0.99 \pm 0.09 (0.97)	0.9362
Hippocampus	1.00 \pm 0.08 (1.02)	1.08 \pm 0.06 (1.05)	0.8102

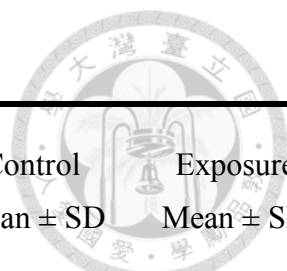
Data are represented as mean \pm SE for cerebral cortex, cerebellum and hippocampus ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

表 11、各腦區之 t-Tau 蛋白表現量(Fold of control)

Brain region	Control	Exposure	<i>p</i> -value
	Mean \pm SE (Median)	Mean \pm SE (Median)	
Cerebral cortex	1.00 \pm 0.12 (1.03)	0.99 \pm 0.10 (0.90)	0.2980
Cerebellum	1.00 \pm 0.11 (0.93)	0.99 \pm 0.08 (0.99)	0.9362
Hippocampus	1.00 \pm 0.12 (1.00)	1.06 \pm 0.10 (1.15)	0.9362

Data are represented as mean \pm SE for cerebral cortex, cerebellum and hippocampus ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

表 12、肺及腦部病理變化評分



Organ	Histopathological lesions	Control Mean ± SD	Exposure Mean ± SD
Lung	Inflammation, mononuclear cells, bronchioles, alveoli and blood vessels	5/8 1.0 ± 0.0	8/8 2.0 ± 0.0
	Pigmentation, carbonaceous materials, bronchioles and alveoli	0/8 -	8/8 2.0 ± 0.0
Brain	-	0/8 -	0/8 -

(-): No significant lesions.

Severity of lesions was graded according to the methods described by Shackelford et al. (2002)

(Toxicologic Pathology 30: 93-96, 2002). Degree of lesions stained with HE was graded from one to five

depending on severity: 1=minimal (<1 %); 2=slight (1-25 %); 3=moderate (26-50 %); 4=moderate/severe (51-

75 %); 5=severe/high (76-100 %).

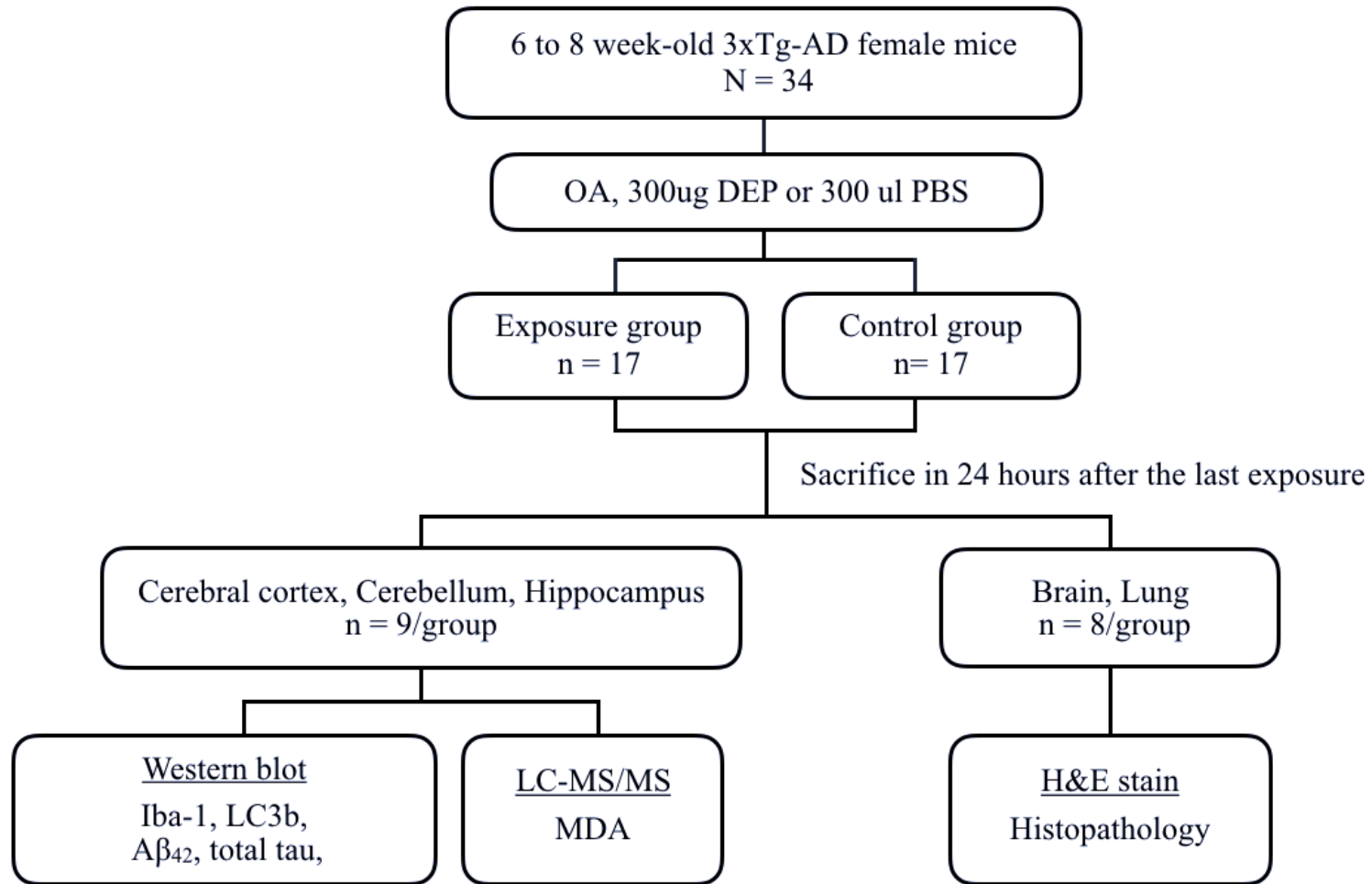


圖 1、研究架構圖



RT: 0.00 - 15.00 SM: 15B

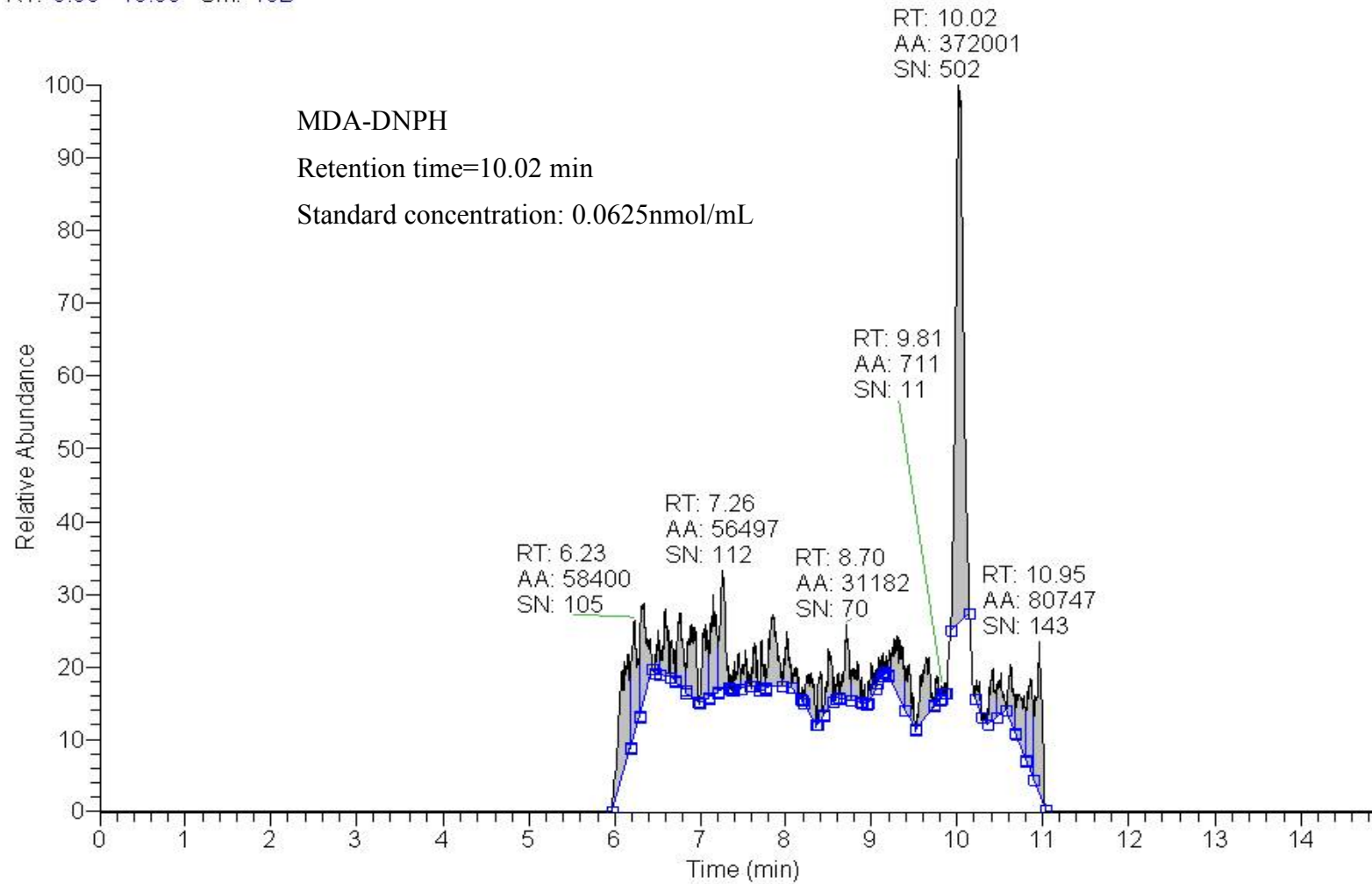


圖 2、MDA-DNPH 層析圖

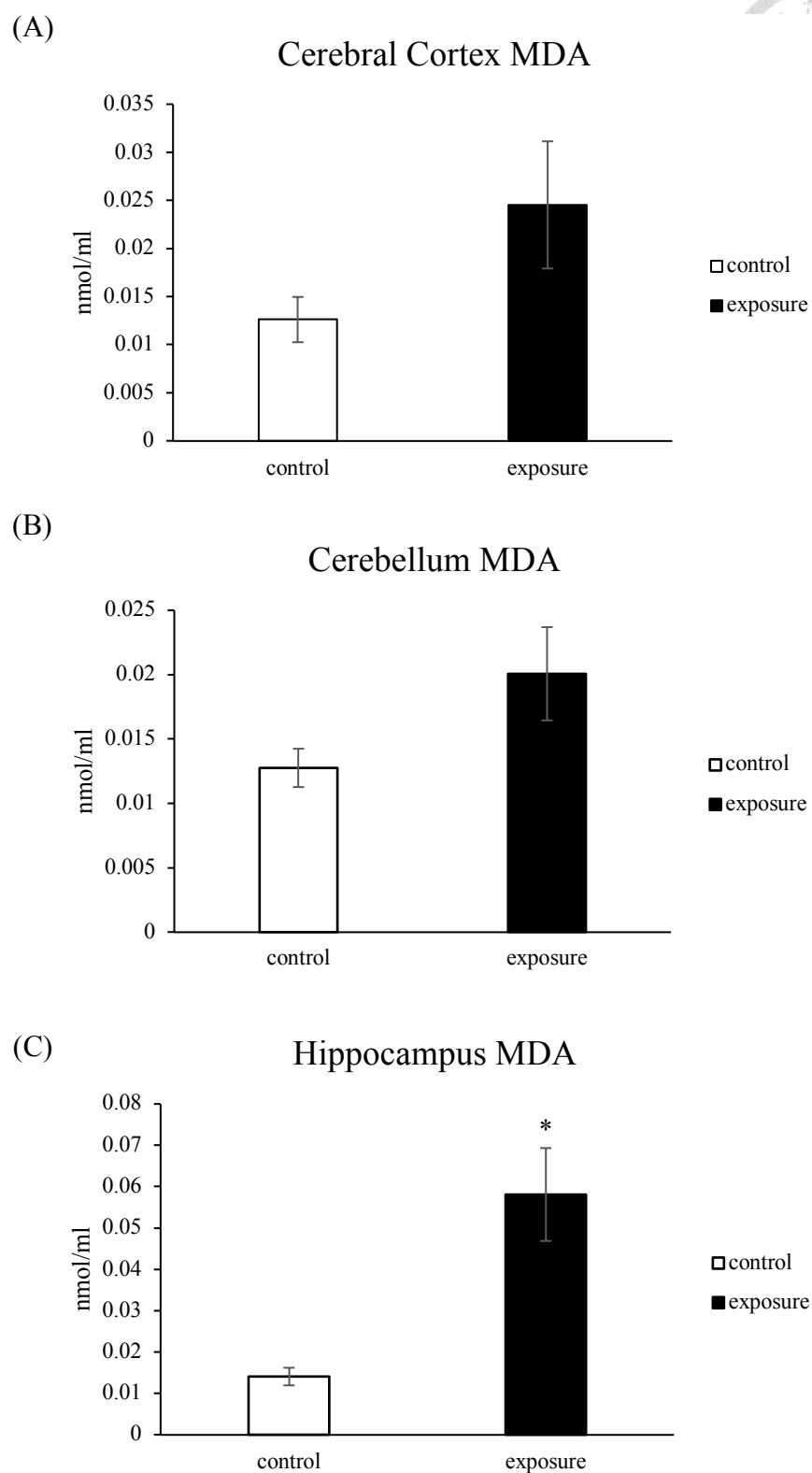


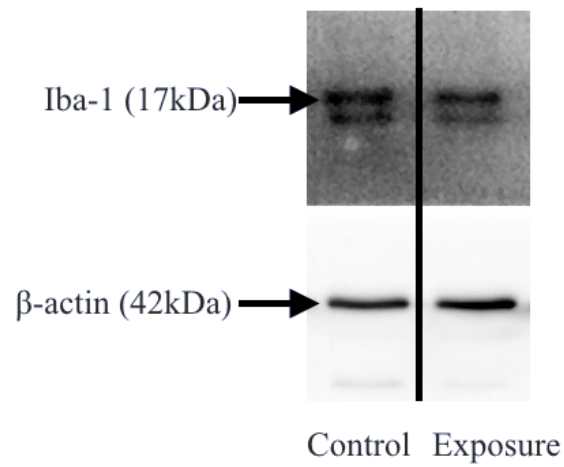
圖 3、各腦區 MDA 濃度 (A)大腦皮質 (B)小腦 (C)海馬迴

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test

was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.



(A)



(B)

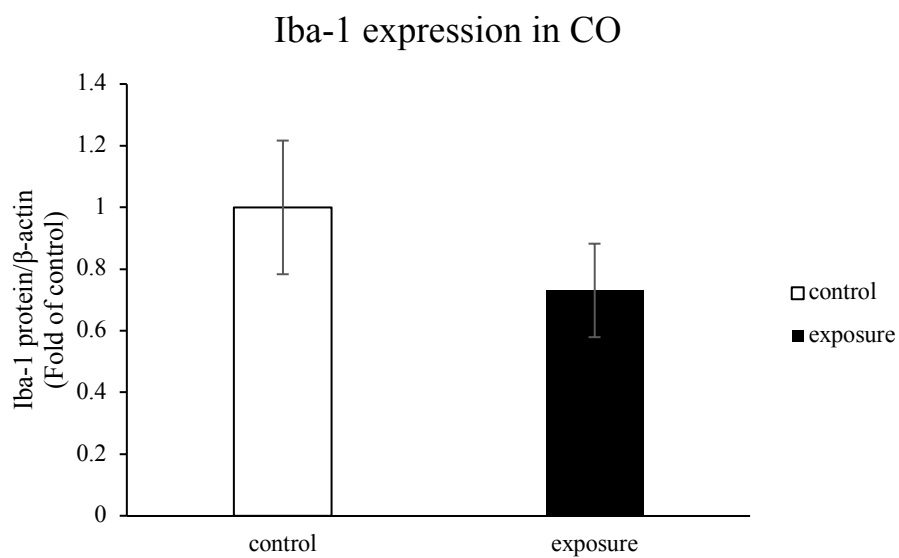


圖 4、大腦皮質之 Iba-1 蛋白表現量 (A) 西方點墨法分析 Iba-1 蛋白 (B) Iba-1 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.

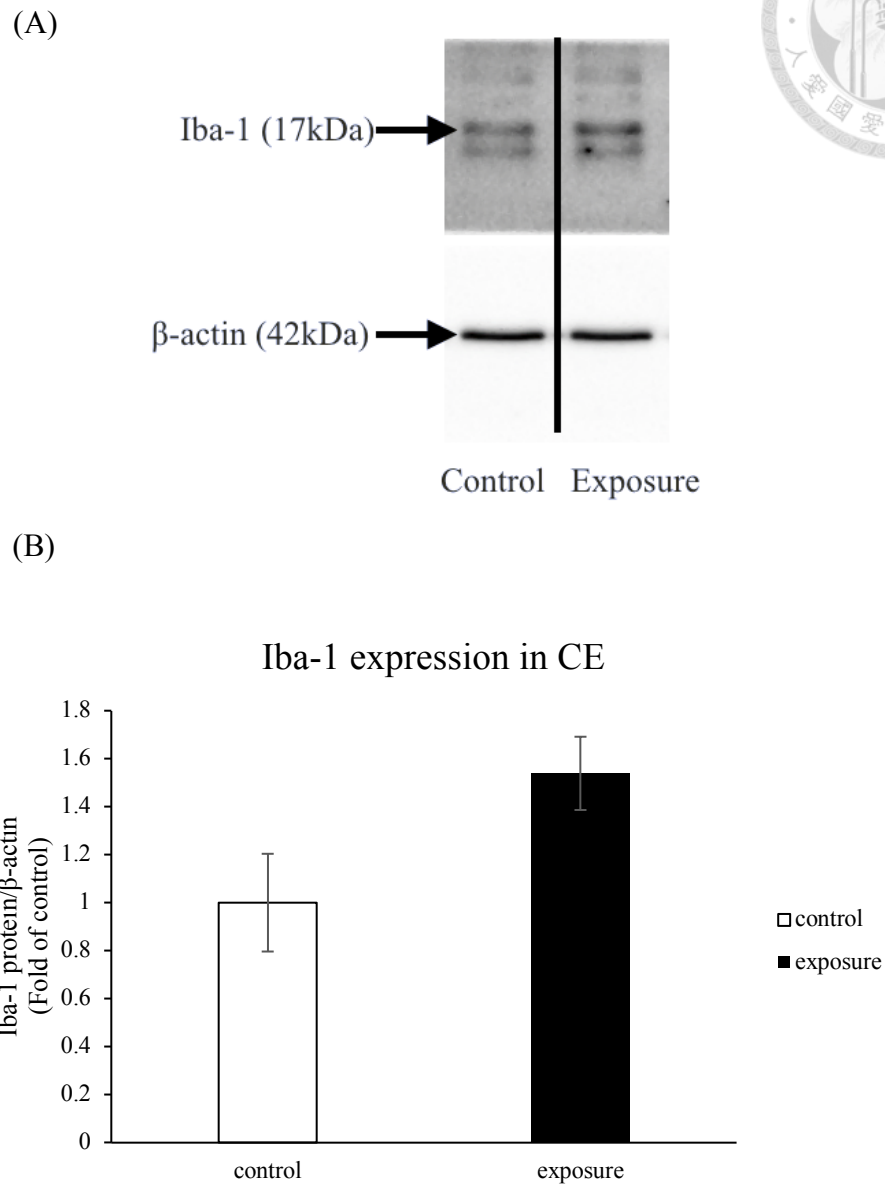


圖 5、小腦之 Iba-1 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 Iba-1 蛋白 (B) Iba-1 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

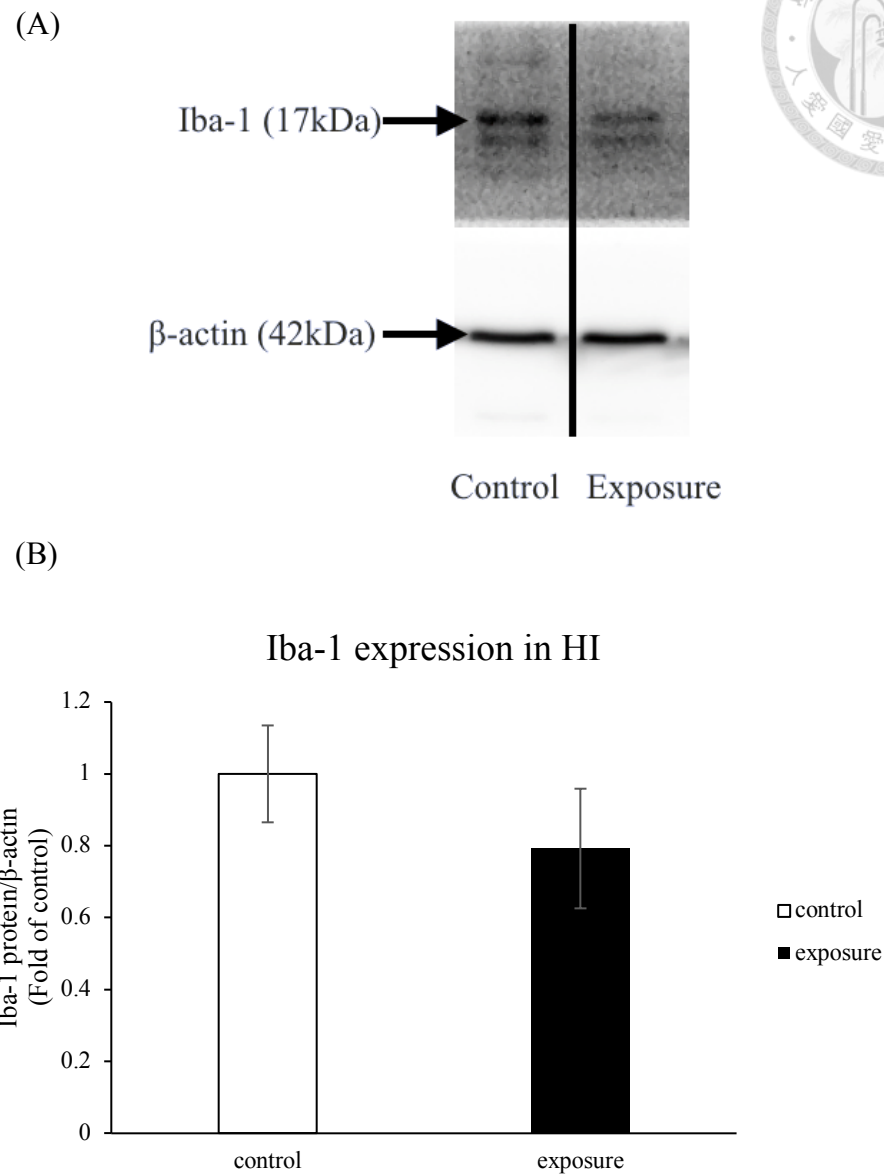


圖 6、海馬迴之 Iba-1 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 Iba-1 蛋白 (B) Iba-1 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

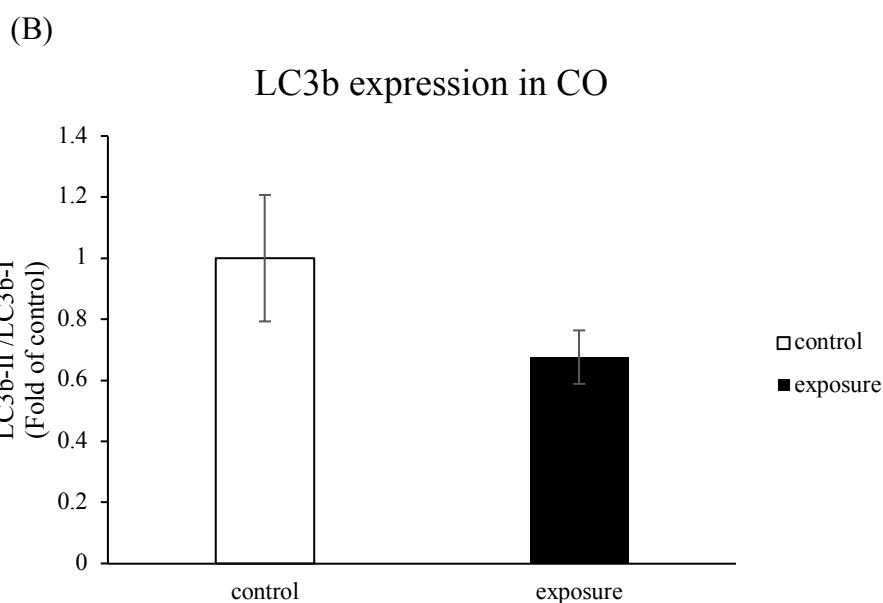
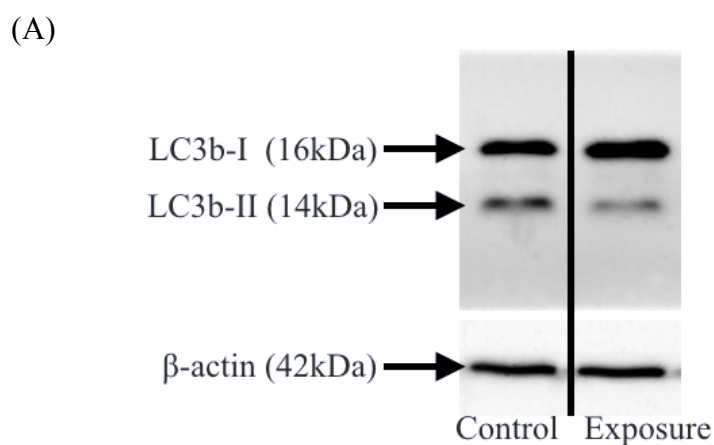
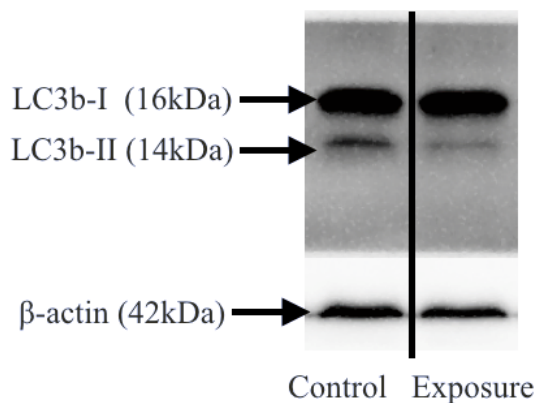


圖 7、大腦皮質之 LC3b 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 LC3b 蛋白 (B) LC3b 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.



(A)



(B)

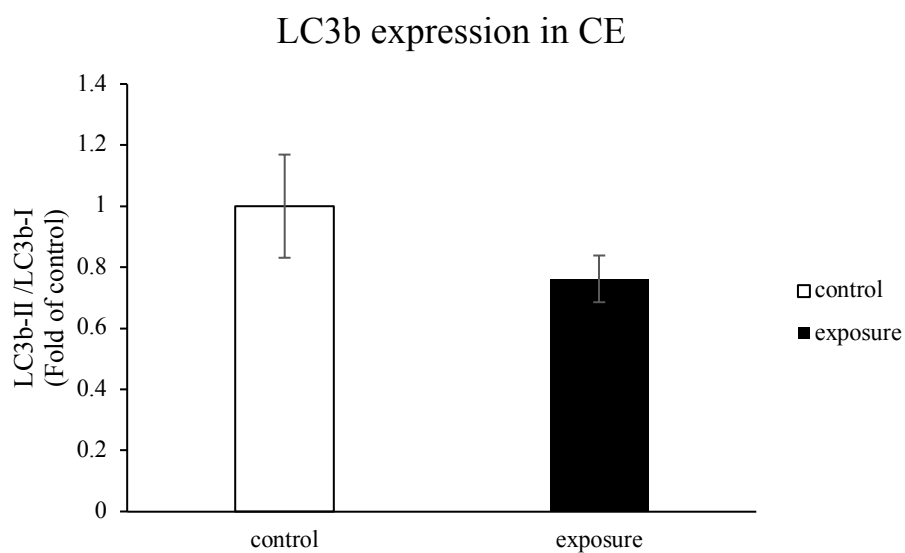


圖 8、小腦之 LC3b 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 LC3b 蛋白 (B) LC3b 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.

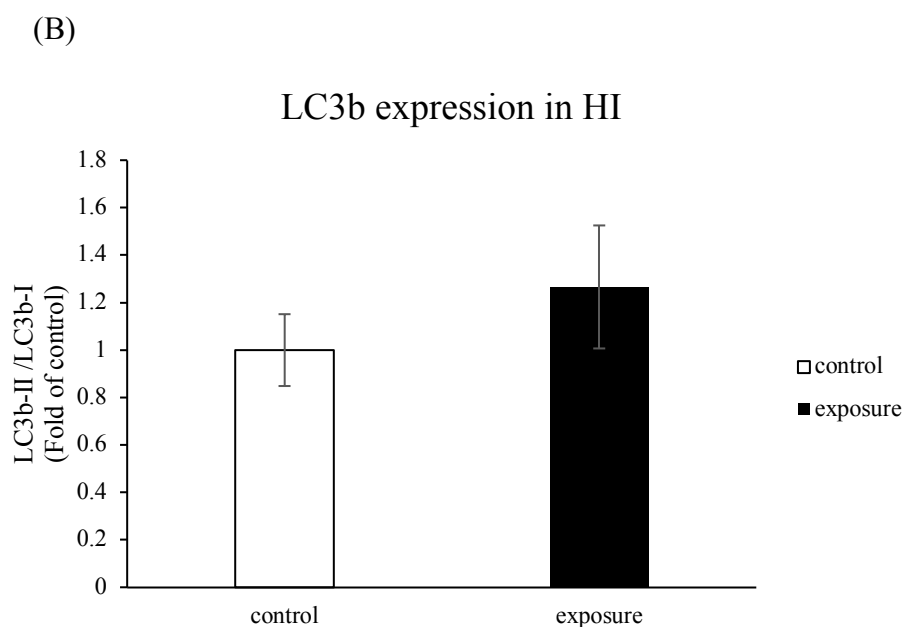
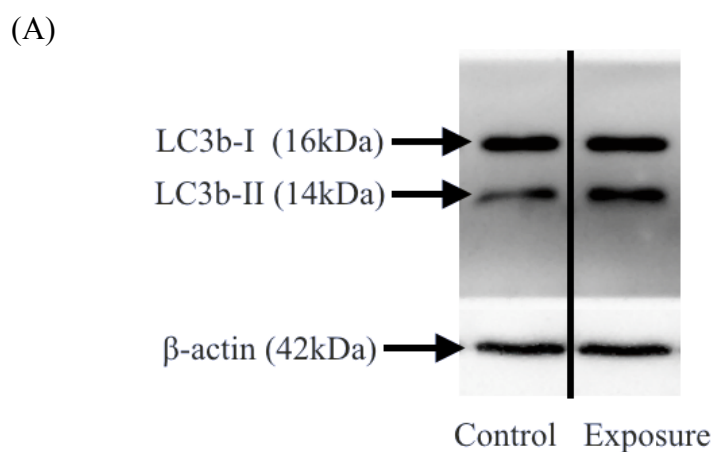


圖 9、海馬迴之 LC3b 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 LC3b 蛋白 (B) LC3b 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.

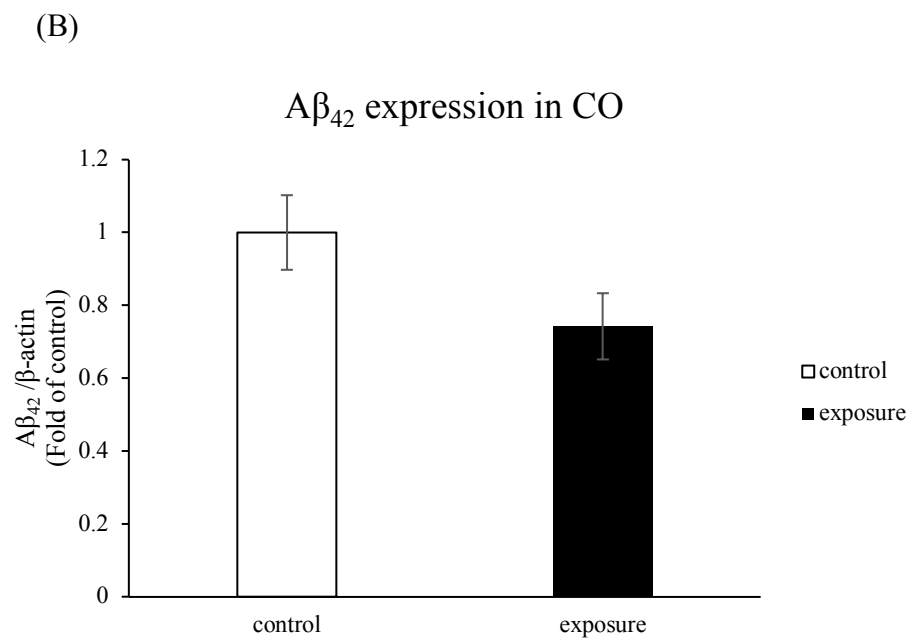
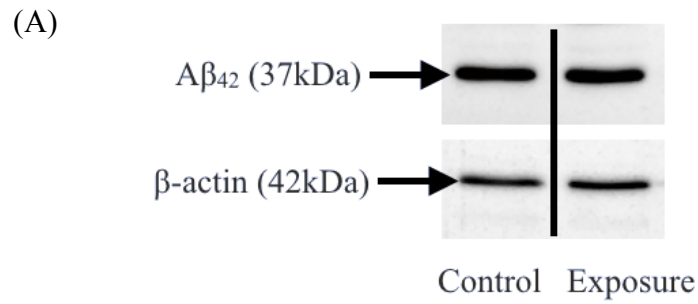


圖 10、大腦皮質之 Aβ₄₂ 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 Aβ₄₂ 蛋白 (B) Aβ₄₂ 蛋白半定量分析

Results are represented as mean ± SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

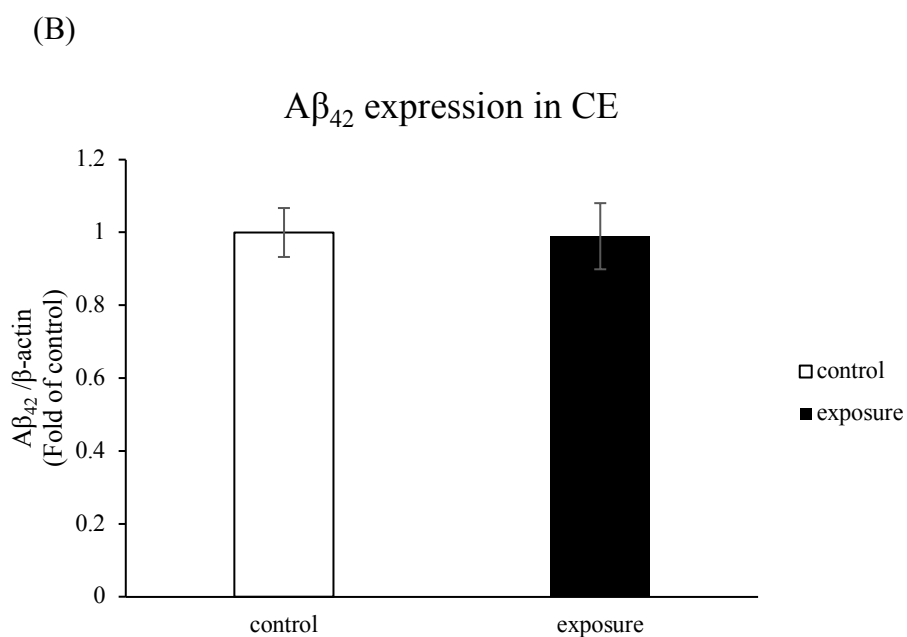
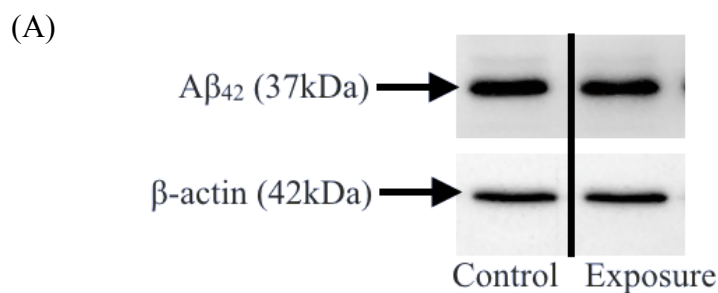


圖 11、小腦之 Aβ₄₂ 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 Aβ₄₂ 蛋白 (B) Aβ₄₂ 蛋白半定量分析

Results are represented as mean ± SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

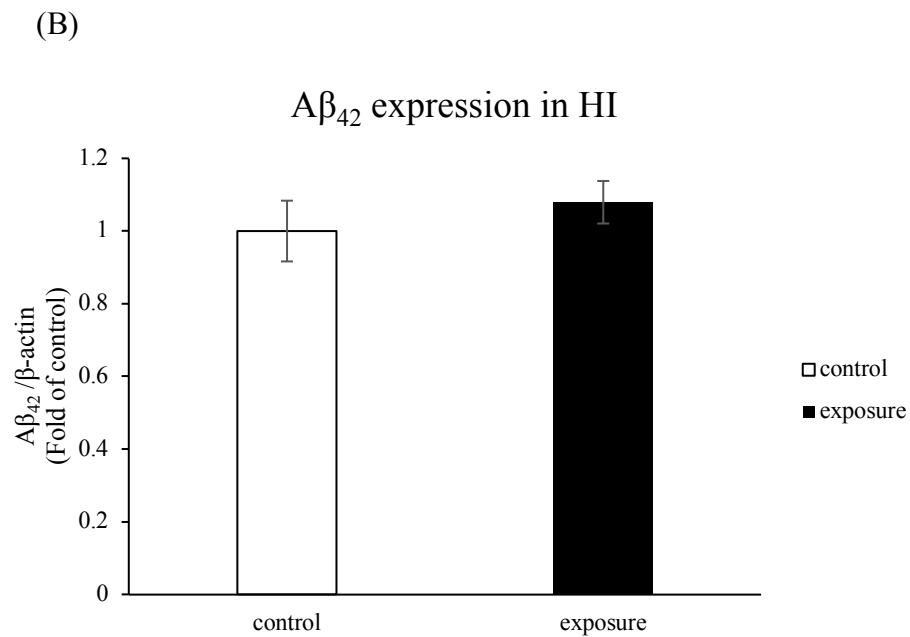
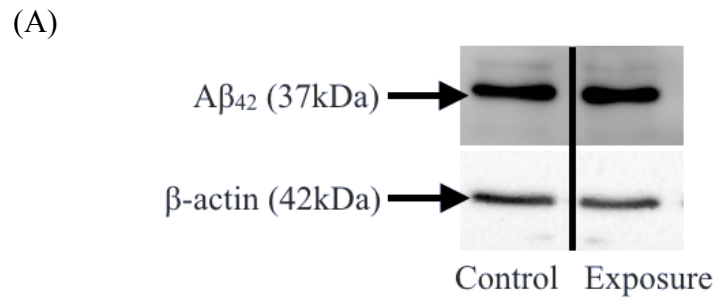


圖 12、海馬迴之 A β ₄₂ 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 A β ₄₂ 蛋白 (B) A β ₄₂ 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

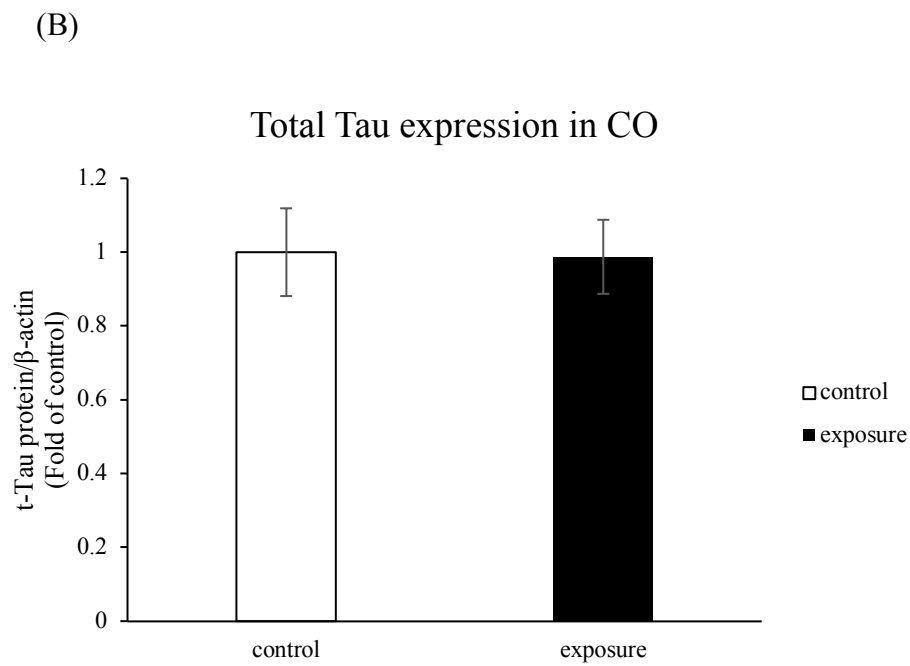
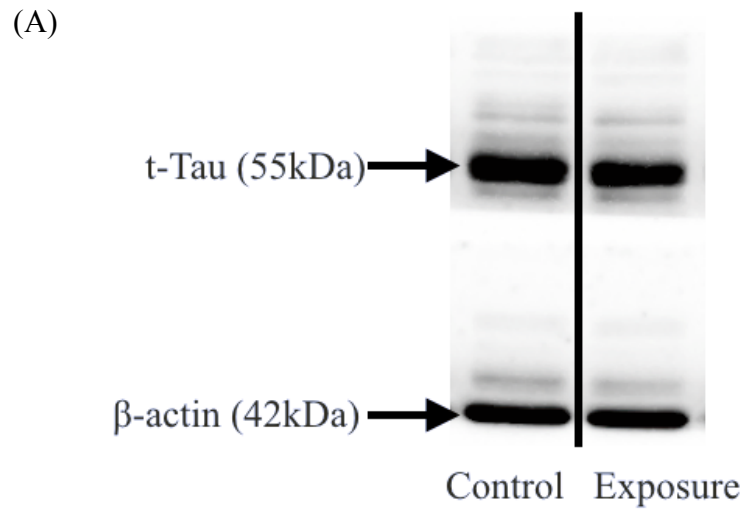


圖 13、大腦皮質之 t-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 t-Tau 蛋白 (B) t-Tau 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. * $p<0.05$ compare to control group.

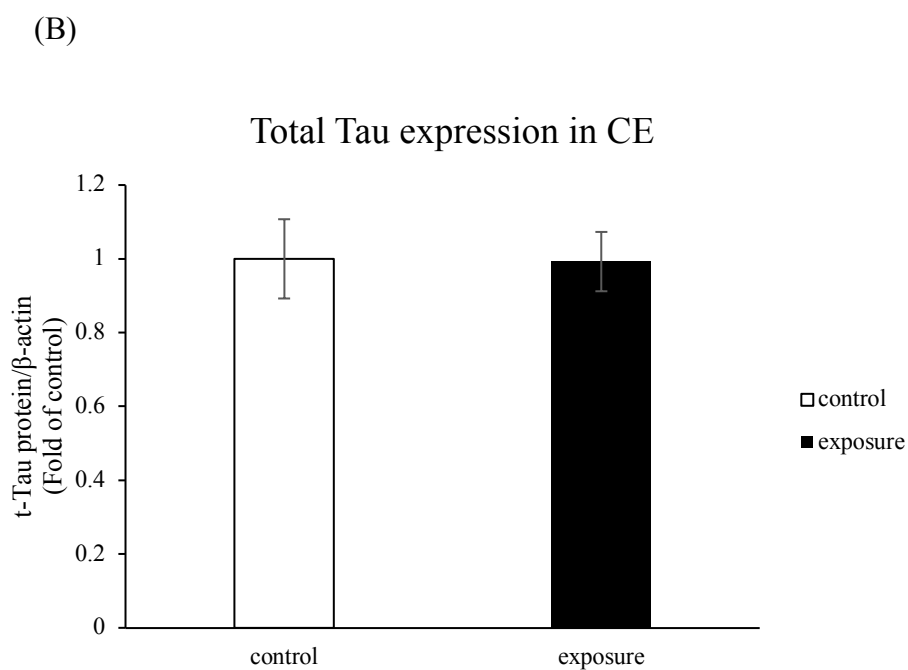
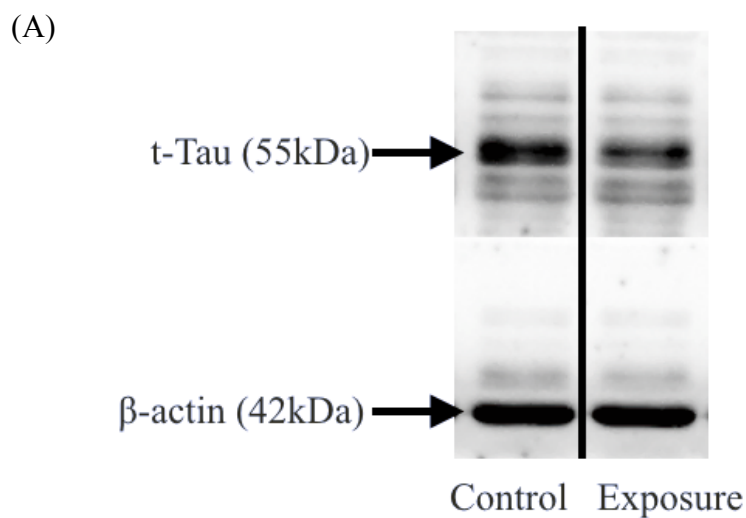


圖 14、小腦之 t-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 t-Tau 蛋白 (B) t-Tau 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.

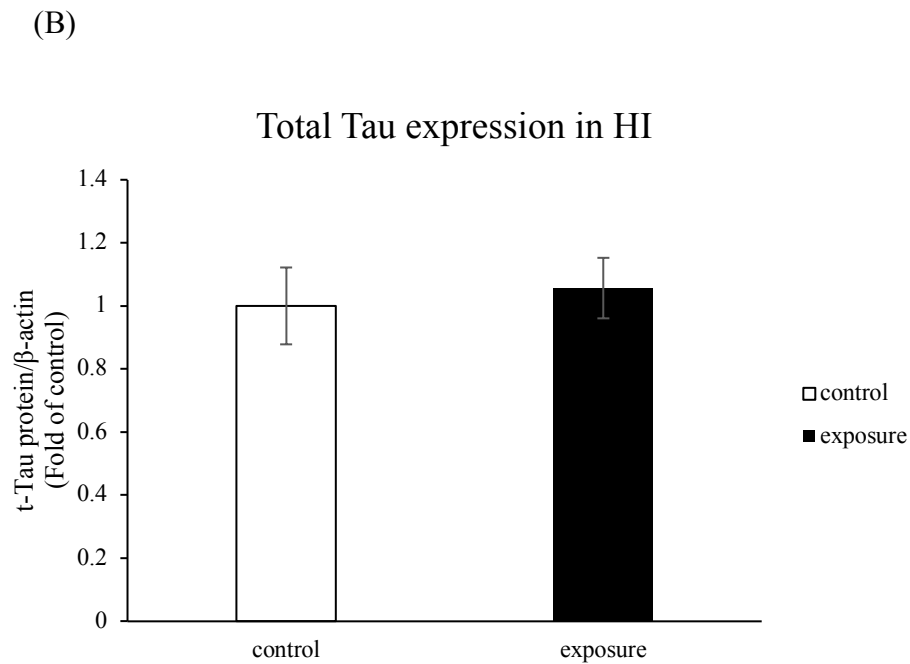
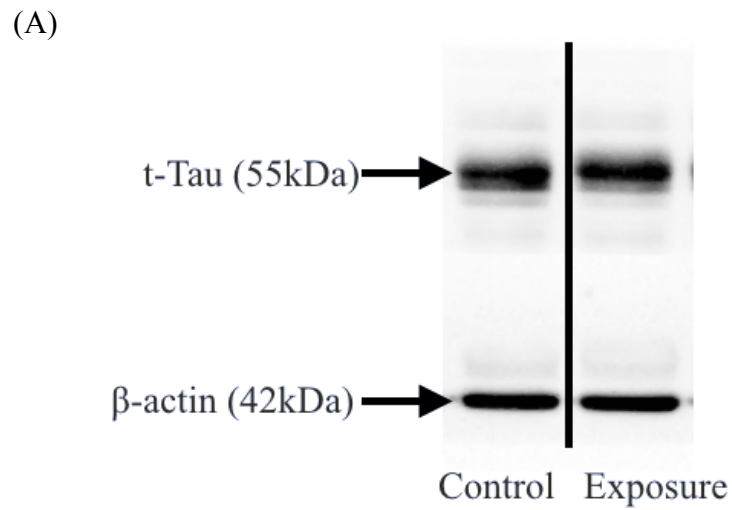


圖 15、海馬迴之 t-Tau 蛋白表現量 (A)西方點墨法分析 t-Tau 蛋白 (B) t-Tau 蛋白半定量分析

Results are represented as mean \pm SE ($n_{\text{control}}=6$; $n_{\text{exposure}}=6$). Wilcoxon rank sum test was used to compare control and exposure group. $*p<0.05$ compare to control group.

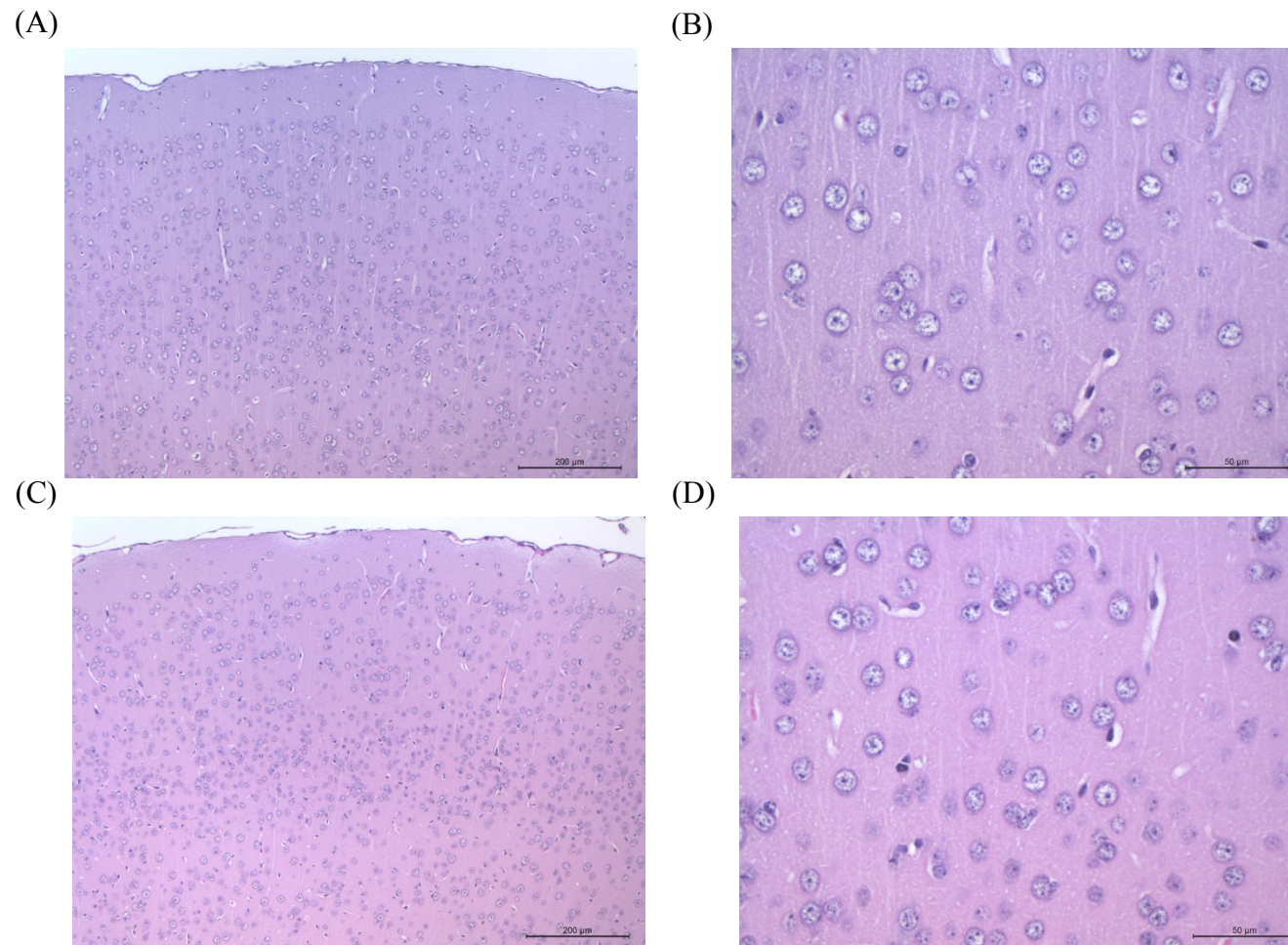


圖 16、大腦皮質病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200 μm , B and D: scale bars measure 50 μm .

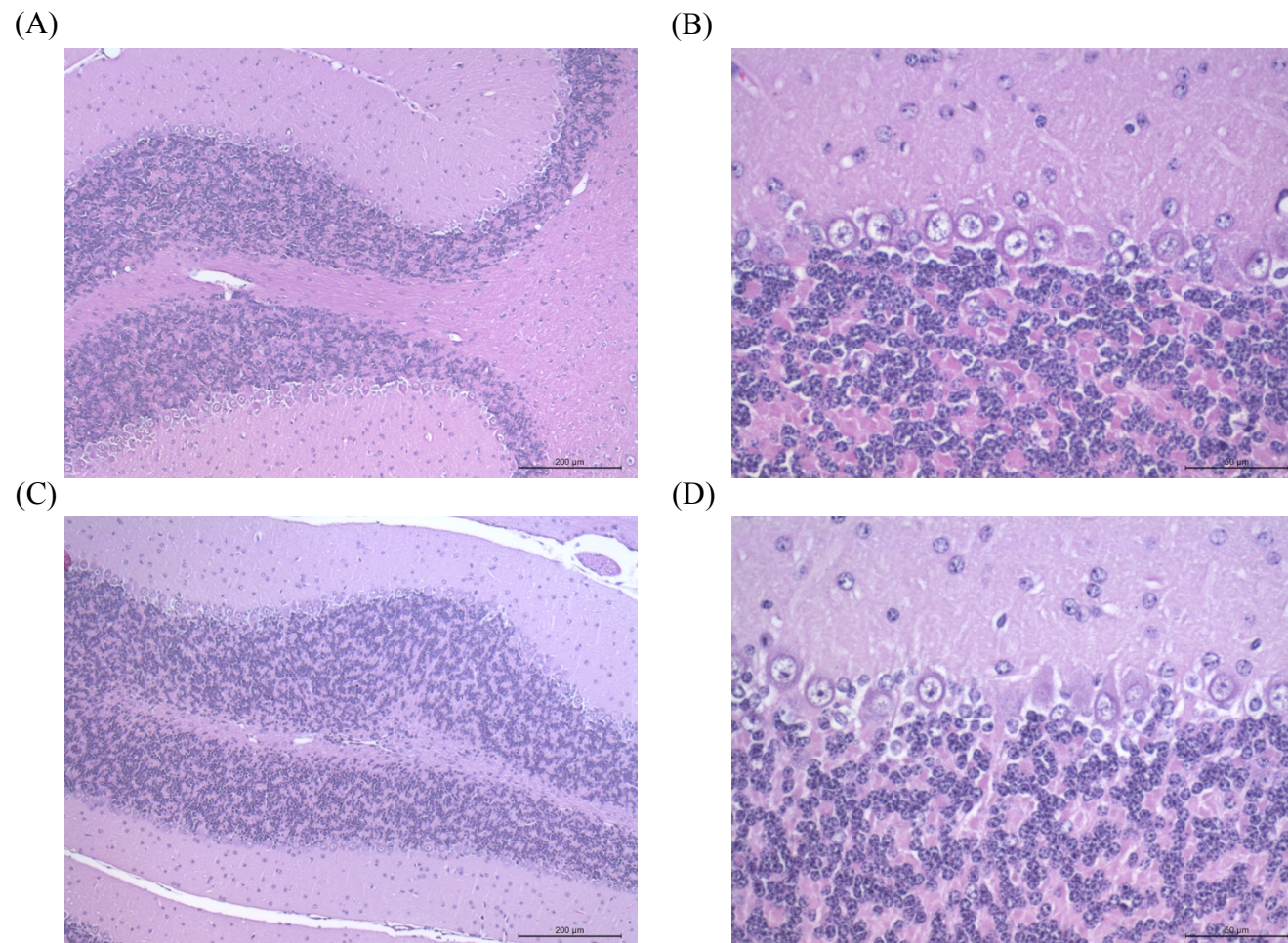


圖 17、小腦病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200 μm, B and D: scale bars measure 50 μm.

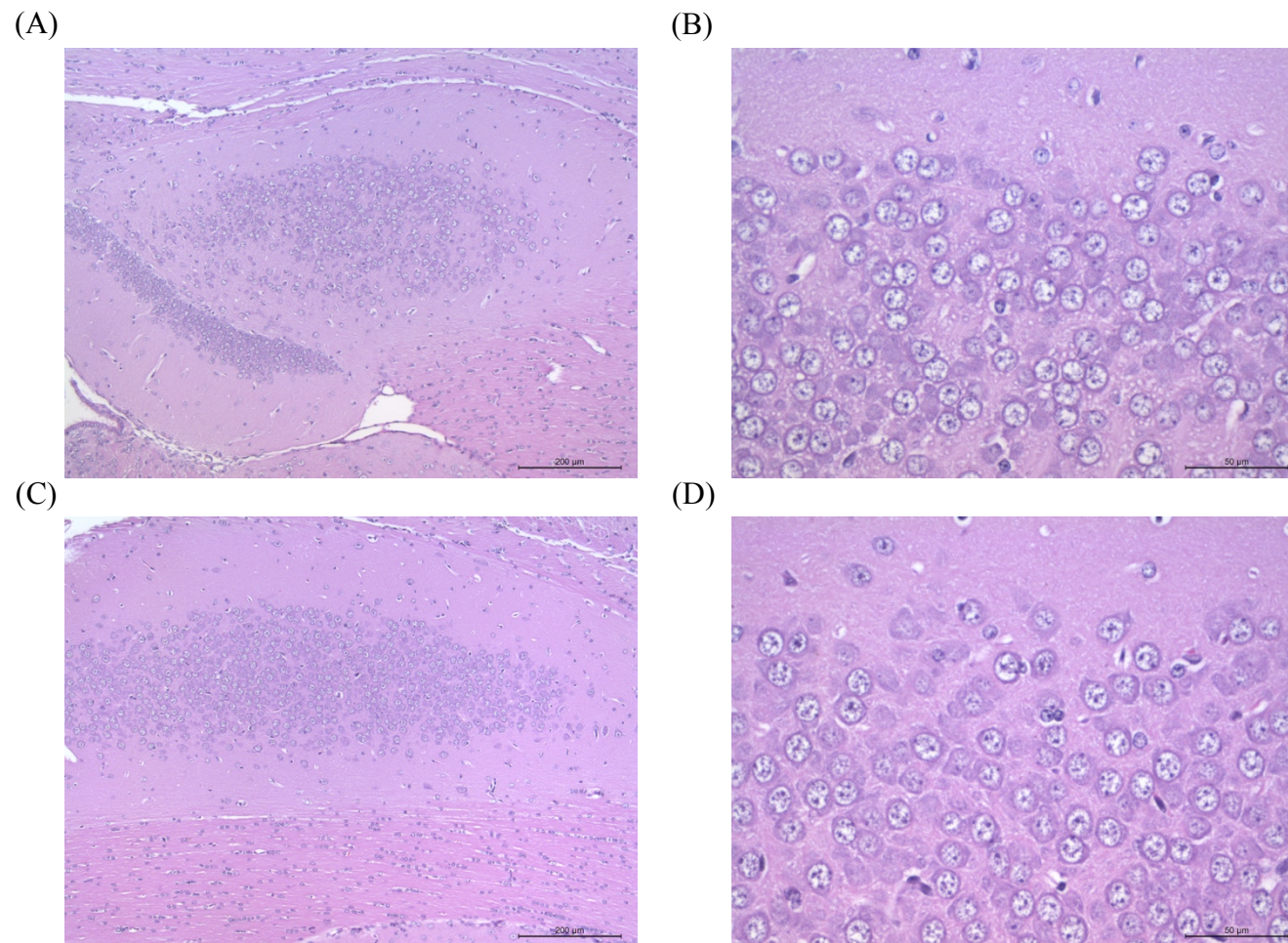


圖 18、海馬迴病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200 μm , B and D: scale bars measure 50 μm .

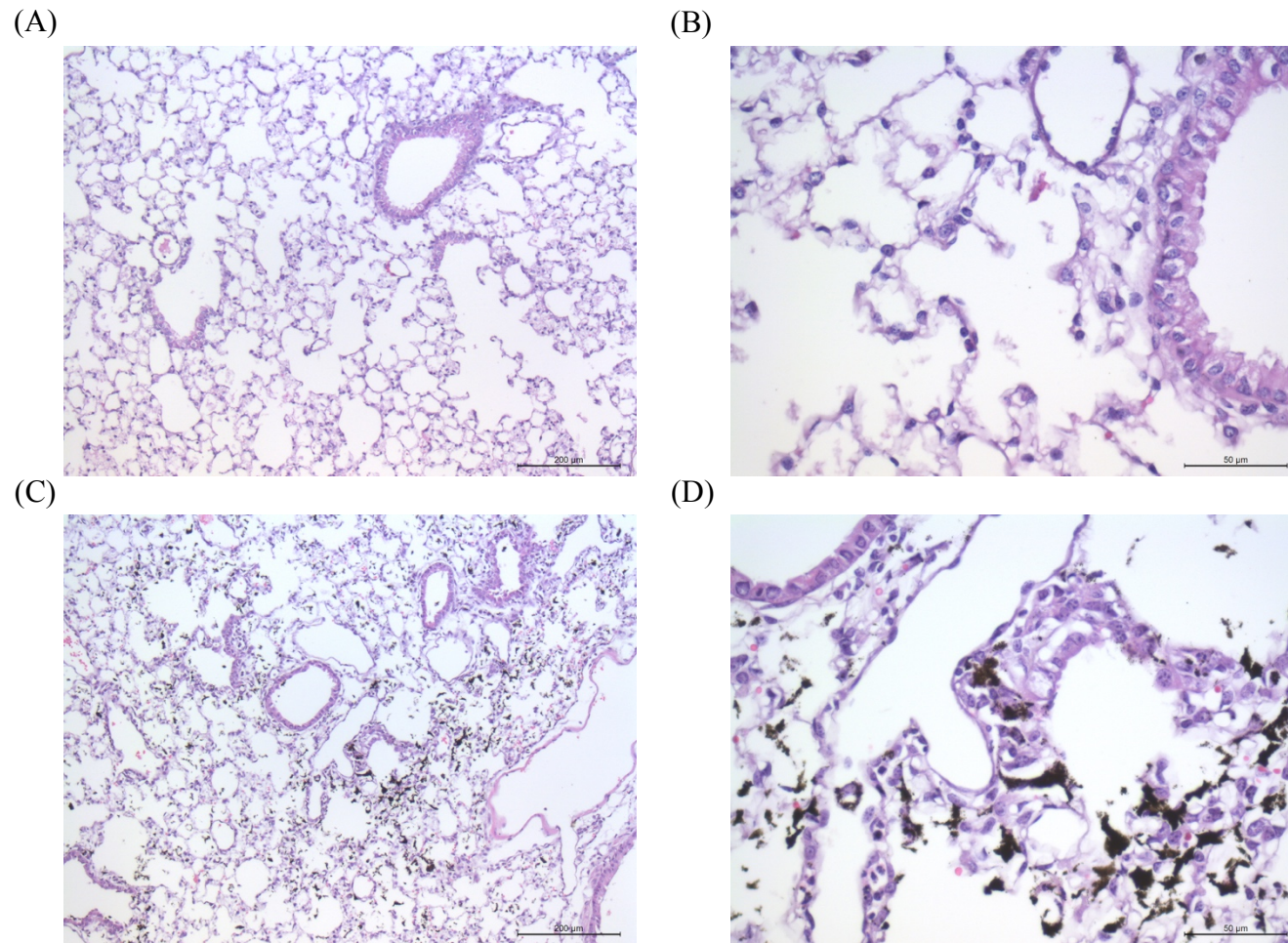


圖 19、肺部病理切片 (A.B)控制組 (C.D)暴露組 H&E stain; A and C: scale bars measure 200 μm , B and D: scale bars measure 50 μm .