

國立臺灣大學醫學院分子醫學研究所



碩士論文

Institute of Molecular Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討 AADC 缺乏症之基因治療的細胞機轉

The cellular mechanism of gene therapy in AADC deficiency

陳怡潔

Yi-Jye Chen

指導教授：

李妮鍾 醫師

Advisor:

Ni-Chung Lee M.D., Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

誌謝



在分醫所在職進修的這兩年，由衷地感謝李妮鍾醫師在論文實驗設計和修業課程上的指點，並在我陷入低潮時給予我心理上的全力支持，並協助我獲得獎學金，亦師亦友的相處使我雖處在龐大壓力下仍能完成學業。也感謝胡務亮醫師給予我機會在實驗室學習各領域的實驗，並讓我參與實驗室的專題討論及指點我論文的正確方向，學習的過程獲益匪淺。此外本論文的完成更要感謝李玉梅博士在論文寫作及實驗方法上的教導與協助，並在我受挫折時帶領我閱讀聖經，安撫我不安的情緒，鼓勵我成為有自信的人。

感謝旻秀學長在細胞培養實驗中給予我最大的協助，細心的指導讓沒有做過小鼠解剖的我也能獨立完成細胞實驗。感謝文心辛苦地幫我做小鼠配種，雖然母鼠們很難懷孕。感謝孟凱學長教我免疫染色，感謝韋樺和品蚊姐陪我度過漫長的HPLC實驗。另外也感謝實驗室的慧英姐及雅芬姐對我很友善，讓我有實驗室一份子的感覺，還有感謝雅雅學姊在實驗數據統計上給予的專業建議。

感謝繼承醫事檢驗所的楊蘭平教授全力支持我進修，並給予工作調度上最大的包容，同事們默默幫我分擔工作，永茹指導我每一次的專題討論，這些都讓我分非常感激，也希望可以將所學分享給同事們。

感謝我的家人在我面臨工作及課業壓力時，寬容我的晚歸及關心的叮嚀。最後感謝同學盈宏陪伴我每個在206自習夜讀到深夜的日子，並抽空用心的幫我一字一句的檢視論文初稿，給予我莫大的幫助，討論課業的過程也讓我們感情更穩定，而我們也將一起攜手度過未來的每一個日子，感謝有你在。

陳怡潔

謹誌於2014年8月於臺北

中文摘要



AADC 缺乏症為一種罕見的體染色體隱性疾病，其致病原因是由於負責產生 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 與 5- hydroxytryptophan (5-HTP) 的 AADC 酵素缺乏，因而造成身體多巴胺 (dopamine) 與血清素 (serotonin) 的不足，症狀有嚴重的發展遲緩、肌肉張力低下、轉眼危象以及自律神經系統功能失調。在臺灣的 AADC 缺乏症常常是由一種創造者變異(founder mutation) 引起，所以患者特別多。2007 年首次 AADC 缺乏症的基因治療人道救援在臺灣進行，基因治療的方法是以腺相關病毒第二型 (AAV2) 作為病毒載體，將 AADC 基因利用立體定位手術送入患者的紋狀體殼核 (putamen)，治療後所有的患者皆有很大的改善。但是基因治療如何能改善此突觸後神經元的活性，並維持長時間的效應，及 AADC 在細胞中的作用為何目前還不清楚。因此我們分別培養神經母細胞瘤細胞 (N2a) 和體外培養中型棘神經細胞 (medium spiny neurons) 及多巴胺能細胞 (dopaminergic neurons) 進行三個階段的實驗，以探討 AADC 在細胞中生成後是否會釋放到細胞外。我們將細胞轉染 AADC 基因後，透過免疫染色法觀察 AADC 的表現，再以高效液相層析儀 HPLC (偵測 L-DOPA 轉換成多巴胺的量) 分析 AADC 酵素的活性。

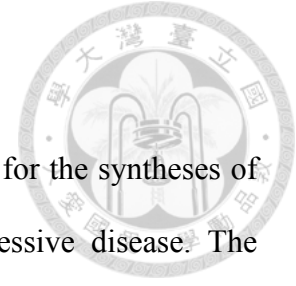
在 N2a 細胞的實驗中，N2a 細胞經轉染 AADC 後可以被表現，而在其細胞培養液及細胞中皆可測得 AADC 活性，其值分別為 0.264 ± 0.05 nmol/min/ml 及 3.12 ± 0.53 nmol/min/mg，顯示細胞內外皆有 AADC 酵素的的存在；我們想進一步確認在培養液中測得的 AADC 活性是由細胞所釋放，而非細胞死亡造成的，因此以 LDH 的釋放百分比來估算細胞受損率，結論是釋出細胞外的 AADC 活性 25% (培養液測得之 AADC 活性/培養液及細胞測得之 AADC 活性的總和) 遠大於細胞死亡率 12%；且我們另外針對轉染 AADC 的細胞進行細胞內外測得之 AADC 活性與其細胞受損率關係的比較，結果顯示隨著細胞受損率上昇，其細胞內測得之 AADC 活性減少，但其對應培養液所測得的 AADC 活性並沒有跟隨細胞受損率的增加而改變，因此我們認為培養液中測得的 AADC 活性應是由細胞所釋放出去的。而在探討 AADC 釋放機制的實驗中，我們分別加上 BFA (Brefeldin A) 阻斷阻斷蛋白質從內質網傳送到高基氏體的路徑，或使用顯性失活 Rab11 阻斷蛋白質及囊泡運輸及核內體回收，結果兩種阻斷蛋白質運送的方式皆無法使釋放到 AADC 的活性減少，顯示 AADC

的釋放路徑可能非一般的分泌路徑。在中型棘神經細胞實驗與多巴胺能神經細胞實驗中，皆僅得到小於 1% 的中型棘神經細胞或多巴胺能神經細胞。我們轉染 AADC 至中型棘神經細胞，但其細胞內外的 AADC 活性因太低皆無法被 HPLC 測得。

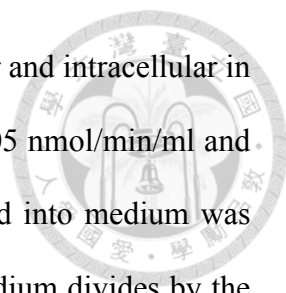
本研究成功轉染 AADC 至 N2a 細胞內表現，並證實 AADC 可以被細胞釋放出來，但其釋放機制尚未釐清。體外培養中型棘神經細胞及多巴胺能細胞雖然未能得到足夠的細胞數目，但本研究建立培養技術與實驗流程提供了未來研究的基礎，並經由了解 AADC 的釋放機制以幫助基因治療的研究與執行。

關鍵字：芳香族 L-胺基酸類脫羧基酵素、AADC 缺乏症、基因治療、AADC 活性分析、中型棘神經細胞、多巴胺能神經細胞

ABSTRACT



Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) is responsible for the syntheses of dopamine and serotonin. AADC deficiency is an autosomal recessive disease. The metabolic abnormalities at birth, caused by mutations in the *AADC* gene, lead to severely reduced AADC activity. Hypotonia and oculogyric crises are the two most common symptoms of AADC deficiency. In addition, other common symptoms include developmental delay, hypokinesia, choreoathetosis, dystonia, limb hypertonia, insomnia, irritability, feeding and speech difficulties. AADC deficiency has an increased prevalence in the Taiwanese population due to the founder mutation IVS6+4A>T. Currently, treatment options are limited; only patients with relatively mild forms of the disease respond to drugs, and patients obtain relief from only a limited subset of symptoms. Drug therapy provides little or no benefit for many patients who often die during childhood. The gene therapy trial using the human AADC gene is currently underway in Taiwan. The gene therapy is achieved by using an adeno-associated virus (AAV) type 2 vector to deliver the *AADC* gene into a brain area called the putamen in the patients with AADC deficiency. All patients showed improved motor function after treatment. However intracellular storage of dopamine requires expression of monoamine vesicular transporter, how could this gene therapy enhance the activity of the post-synaptic neuron in the putamen of striatum and persisted for long time is unclear. So we cultured neuroblastoma (N2a cells), primary medium spiny neurons and dopaminergic neurons *in vitro*, to investigate whether AADC produced by AADC-transfected cell could be secreted into medium (extracellular). 24hr post-transfection, culture medium and cell lysate was harvested for AADC activity analysis. HPLC analysis was used to detect AADC activity by converting L-dopa to dopamine.



The results reveal that AADC can be detected both extracellular and intracellular in AADC-transfected N2a cell, and the AADC activity were 0.264 ± 0.05 nmol/min/ml and 3.12 ± 0.53 nmol/min/mg (n=8) respectively. AADC activity released into medium was expressed by the ratio of AADC activity obtaining from culture medium divides by the combined AADC activity from cell lysate and culture medium. Our result showed that AADC can be secreted into medium (ratio= $25 \pm 5\%$, n=8) while the cytotoxicity index (LDH release) is $12 \pm 2\%$ (n=8). To investigate the underlining mechanism of AADC secretion, we treated N2a cell with Brefeldin A for inhibition of protein secretion and synthesis or transfected dominant negative Rab11 for blocking the traffick of proteins or vesicles between the *trans*-Golgi network (TGN) and recycling endosome. Neither treated BFA nor transfected dominant negative Rab11 can reduce AADC secretion.

In conclusion, we transfected *AADC* gene into N2a cells and proved AADC can be secreted into extracellular space, although the cellular mechanism of secretion was still unclear. This study also established the primary culture experiment and provided valuable insight into cellular mechanism of gene therapy in AADC deficiency.


Keywords: Aromatic L-amino Acid Decarboxylase; AADC deficiency; gene therapy; AADC activity analysis; Medium spiny neurons; dopaminergic neurons

目錄



口試委員會審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
ABSTRACT	v
目錄	vii
圖目錄	x
Chapter 1 緒論	1
1.1 單胺類代謝路徑	1
1.2 單胺類神經傳導物質	2
1.3 芳香族 L-胺基酸類脫羧基酵素 (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC)	3
1.4 AADC 酵素存在位置	4
1.5 AADC 缺乏症	4
1.6 AADC 缺乏症的診斷	5
1.7 AADC 缺乏症的藥物治療	5
1.8 巴金森氏症的基因治療	6
1.9 AADC 缺乏症的基因治療	8
1.10 研究假說	9
Chapter 2 材料與方法	11
2.1 實驗設計	11
2.1.1 N2a 細胞實驗	11
2.1.2 中型棘神經細胞實驗	12
2.1.3 多巴胺能神經細胞實驗	13
2.2 細胞培養	13
2.2.1 N2a 細胞培養	13
2.2.2 神經膠質細胞培養	14

2.2.3	中型棘神經細胞培養 (medium spiny neurons)	14
2.2.4	多巴胺能神經細胞培養	15
2.3	DNA	16
2.4	細胞轉染技術 (transfection)	16
2.5	探討 AADC 釋放機制的細胞處理	16
2.5.1	BFA (brefeldin A)	16
2.5.2	DN-Rab11 (顯性失活 Rab11)	17
2.6	免疫螢光染色	17
2.7	AADC 酵素活性分析	18
2.7.1	培養液 (extracellular) 之樣品處理	18
2.7.2	細胞 (intracellular) 之樣品處理	18
2.7.3	HPLC 分析	18
2.7.4	AADC 酵素活性計算方式	19
2.8	乳酸脫氫酶 (LDH) 活性分析	20
2.9	統計分析	20
2.10	蛋白質定量	21
Chapter 3	結果	22
3.1	N2a 細胞實驗	22
3.1.1	轉染 AADC 基因後可以表現 AADC	22
3.1.2	表現 AADC 之 N2a 細胞培養液中 AADC 酵素活性	22
3.1.3	LDH 活性分析評估細胞受損率	23
3.1.4	AADC 酵素活性與細胞受損率的關係	23
3.1.5	以 BFA 處理細胞探討 AADC 釋放機制	24
3.1.6	轉染顯性失活的 Rab11 探討 AADC 釋放機制	25
3.2	中型棘神經細胞之實驗	26
3.2.1	初代培養中型棘神經細胞的免疫染色	26
3.2.2	轉染 AADC 及 AADC 活性分析的結果	27
3.3	多巴胺能神經細胞之實驗	27
Chapter 4	討論	28



4.1	基因治療與細胞實驗.....	28
4.2	AADC 可被釋放到細胞外	29
4.3	影響 AADC 活性分析的因素	30
4.4	探討 AADC 釋放機制	31
4.5	初代神經細胞培養實驗.....	31
	REFERENCE	33

圖目錄



圖一、探討 AADC 缺乏症之基因治療的細胞機轉假說示意圖	37
圖二、N2a 細胞實驗流程	38
圖三、中型棘神經細胞實驗流程	39
圖四、體外培養中型棘神經元 (medium spiny neurons <i>in vitro</i>) -紋狀體解剖圖	40
圖五、N2a 細胞在轉染 AADC 基因後可以表現 AADC	41
圖六、AADC-transfected N2a 細胞及細胞培養液之 AADC 活性及 LDH 活性分析(方法一，med/cell)	42
圖七、AADC-transfected N2a 細胞及細胞培養液之 AADC 活性及 LDH 活性分析(方法二，med/ total)	43
圖八、AADC 酵素活性與細胞受損率的關係	44
圖九、以 BFA 處理 AADC-transfected N2a 細胞無法阻斷 AADC 的釋出	45
圖十、轉染顯性失活的 Rab11 (dominant-negative Rab11, DN-Rab11) 探討 AADC 釋放機制	46
圖十一、中型棘神經細胞初代培養及免疫染色	47
圖十二、初代培養之神經細胞轉染 AADC 及免疫染色	48
圖十三、多巴胺能神經細胞初代培養	49

Chapter 1 緒論

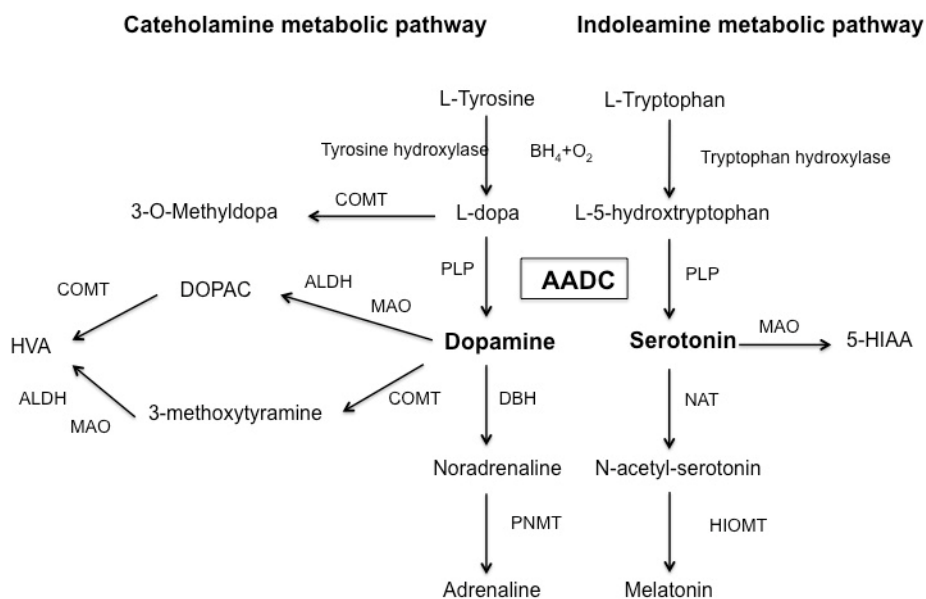


1.1 單胺類代謝路徑

芳香族 L-胺基酸類脫羧基酵素 (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) 可以催化 L-DOPA 和 5-hydroxytryptophan (5-HTP) 進行脫羧反應，並分別合成神經傳導物質多巴胺 (dopamine) 及血清素 (serotonin)。

兒茶酚胺代謝路徑 (catecholamine metabolic pathway)，L-酪胺酸 (L-tyrosine) 經由酪胺酸羥化酶催化成 L-DOPA，此步驟需要四氫基喋呤 (BH₄) 及氧的協助，此步驟為多巴胺合成中的速率決定步驟。L-DOPA 再經由 AADC 酵素及輔酶 pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 進行脫羧作用，形成多巴胺。而在去甲基腎上腺素能細胞中，多巴胺可被多巴胺β-hydroxylase 羥化成去甲基腎上腺素；在腎上腺素能細胞中去甲基腎上腺素被 phenylethanolamine N-methyl-transferase 甲基化形成腎上腺素。

吲哚胺代謝路徑 (Indoleamine metabolic pathway)，由 L-色氨酸被色氨酸羥化酶羥化成 5-HTP，此步驟還需要四氫基喋呤 (BH₄) 及氧的協助；接著 5-HTP 經由 AADC 酵素和輔酶 PLP 進行脫羧作用，合成血清素。在血清素的合成中，L-色氨酸的可用性雖然也會影響合成速率，但其速率決定步驟為 L-色氨酸的羥化。血清素可再經乙酰化為 N-acetylserotonin，最後甲基化成褪黑激素 (melatonin)[1]。





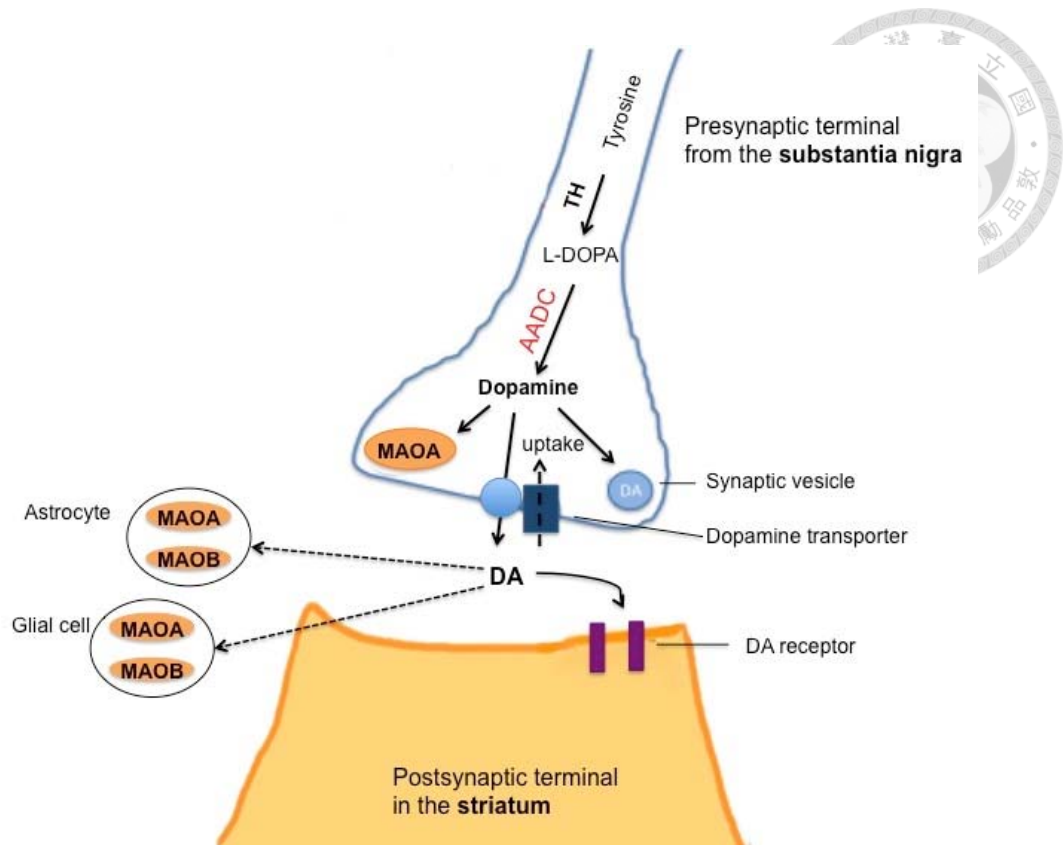
1.2 單胺類神經傳導物質

AADC 缺乏症患者在出生時即產生代謝異常，致病原因是負責 L-DOPA 與 5-HTP 代謝的 AADC 酵素缺乏，造成身體多巴胺與血清素缺乏，造成嚴重的發展遲緩、轉眼危象以及自律神經系統功能失調。多巴胺和血清素皆為單胺類的神經傳導物質，乃由芳香族胺基酸衍生而來，而這兩種胺類為神經系統內及週邊組織細胞外的分子訊號，且皆被證實參與了各種生理和行為過程。

在大腦中多巴胺的路徑被認為參與了一連串的行為及認知功能，其路徑起源自於黑質緻密部 (substantia nigra pars compacta) 終止於紋狀體 (corpus striatum)，已知在基底核的運動迴路中扮演了重要的角色，參與自主運動的策劃及執行 [2]。帕金森氏症患者的黑質受到破壞而無法正常生產多巴胺時，輸送到紋狀體的多巴胺將逐漸減少，當多巴胺及乙醯膽鹼兩種神經傳導物質無法維持平衡，其運動障礙的症狀因此出現，此為一種神經退化性疾病；而 AADC 缺乏症則為一種罕見的天性多巴胺缺乏疾病。另外多巴胺亦參與了獎勵學習、工作記憶及睡眠—覺醒的調控。

血清素廣泛存在於大腦皮層及神經突觸，為一種抑制性的神經傳導物質，可以調節複雜的行為功能，中樞神經的血清素與睡眠—覺醒週期有密切相關 [3]，且有增強記憶的功能，可以保護神經元免於受到興奮神經毒素的損害。此外血清素亦可調節體溫、運動及記憶。

多巴胺生成後被儲存在細胞的囊泡 (vesicles) 中，以免被分解。多巴胺能神經末梢主要有兩種儲存池，液泡儲存池及細胞質儲存池。細胞內的多巴胺可藉由主動運輸進入突觸小泡，突觸小泡運送至突觸前神經細胞的末端時，以胞吐作用 (exocytosis) 將多巴胺釋出至突觸間隙，而部分多巴胺是在胞漿中經轉運子釋出。釋出的多巴胺會結合到突觸後神經細胞的多巴胺接受器上開始進行訊息傳遞反應。而胞漿中的多巴胺有些是新合成的，有些是釋放後再回收的，兩種有可能一起被釋放。多巴胺可以被神經元內的單胺氧化酶 (monoamine oxidase A, MAOA)、膠質細胞 (glial cell) 和星狀膠細胞 (astrocyte) 內的 MAOA、MAOB 代謝，以控制多巴胺在細胞內及突觸間隙的濃度。



多巴胺的運送及代謝

1.3 芳香族 L-胺基酸類脫羧基酵素 (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC)

AADC 酵素為一種同源二聚體 (homodimer)，由兩個含 480 個胺基酸的單體所組成，而其單體的分子量約為 54kD[4]。分析其晶體結構，每個單體包含三個功能區塊 (domain)，其大的中心功能區塊為一個 β -sheet 及八個 α -helices；而其 C 端小的功能區塊為一個 β -sheet 及三個 α -helices；N 端的功能區塊則包含兩個 α -helices[5]。PLP 為 AADC 酵素活化所需的輔因子 (co-factor)，參與了神經傳導物質多巴胺、血清素及去甲基腎上腺素 (nor-adrenaline) 的合成及降解，因此維持神經系統最佳功能需要充足的 PLP，以確保神經傳導物質的代謝正常[6]。而芳香族 L-胺基酸類脫羧基酵素的命名是由於 Lovenberg *et al* (1962) 發現 AADC 酵素除了可以使 L-DOPA 和 5-HTP 脫羧外，亦可使所有的 L-芳香族類的胺基酸進行脫羧反應，如：L-tryptophan、L-p-tyrosine 及 L-phenylalanine[7]。AADC 基因的蛋白質序列在各種生物體都非常的類似，顯示其基因之重要性。AADC 基因如果被剔除時，轉殖小鼠會胎死腹中。



1.4 AADC 酵素存在位置


AADC 酵素在大腦中存在於兒茶酚胺能 (catecholaminergic) 及血清素能 (serotonergic) 神經元[8]。屬兒茶酚胺能神經元的多巴胺能神經元 (dopaminergic neuron) 投射的位置起點從黑質緻密部 (substantia nigra pars compacta, SNc) 和中腦腹側被蓋區 (ventral tegmental area, VTA) 終點到背側紋狀體 (caudate putamen)，形成一基底核動作迴路，巴金森氏症的患者即是此路徑退化所導致。而在哺乳動物的大腦中，主要的血清素能神經元細胞體存在縫核及腦幹網狀結構；縫核位在腦幹的中線，一般分成兩群頭端及尾端，血清素會投射在基底核、海馬、丘腦、下視丘及皮層[9]。AADC 酵素也存在中央的去甲基腎上腺素能神經元，其細胞體集中在橋腦，許多在藍斑核 (locus coeruleus)、髓質、大部分在網狀結構。

AADC 酵素除了存在單胺能神經元外，亦表現在非單胺能神經元，稱為 D-細胞，人類的 D-細胞可以在下視丘、紋狀體、前腦及皮質發現[10]；另外這些神經元有可能儲存胞外物質，如 L-DOPA 和 5-HTP，並將他們轉換成多巴胺和血清素，這些神經元也已經被證實可以對外源的 L-DOPA 進行脫羧反應[11]。AADC 酵素也廣泛表現在腎、肝、肺、腸胃道及血漿中，但存在週邊的 AADC 酵素的機能尚未完全確認，其可能為多巴胺及血清素的次要來源。

1.5 AADC 缺乏症

AADC 缺乏症 (AADC deficiency) 首次被確認是在 1990 年，一對同卵雙胞胎患有不明原因的神經系統疾病，有張力低下、發展遲緩、間歇性轉眼危象及舞蹈症的肢體動作，對其進行腦脊髓液 (CSF) 檢查而發現，其生物胺 (biogenic amines) 及其代謝產物的濃度有減少的現象，但其腦脊髓液、血漿及尿液中 L-DOPA 和 3-O-methyldopa 的濃度卻上升，另外其血漿中亦有大量 AADC 酵素活性降低的現象 [12]。

AADC 缺乏症患者在出生 6 個月時即出現運動障礙 (movement disorder) 的症狀，大多數患者會經歷一早期發病的嚴重漸進式腦病變並合併有肌肉張力不全的過程，肌肉張力低下 (extreme hypotonia) 及轉眼危象 (oculogyric crises) 是 AADC 缺乏症最常見的症狀 [13]，此外常見的症狀有發展遲緩 (developmental delay)、動作徐緩、舞



蹈手足徐動 (choreoathetosis)、肌張力障礙、肢體張力亢進、失眠、煩躁、易怒 (irritability)、餵食及言語困難。轉眼危象的表現為眼睛持續向上或橫向偏離，向後或側向屈曲的脖子，舌頭吐出，下顎痙攣；發作時通常持續好幾個小時，2~5 天又復發。其患者也伴隨自律神經功能失調，調節血壓和心跳速度的交感神經受損，常見有鼻塞、體溫不穩定、過度流汗、情緒不穩及睡眠障礙等症狀。有些患者亦有低血糖現象，可能與腎上腺素及去甲腎上腺素的缺乏有關 [10, 14]；其中某些嚴重運動障礙和因為缺乏多巴胺引起的巴金森氏症非常類似。

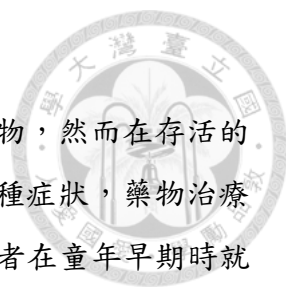
AADC 缺乏症為一體染色體隱性疾病，患者可能為同型合子或複合異型合子 (compound heterozygous)，人類的 AADC 基因由 15 個 exon 及 14 個 intron 組成，位在第七對染色體的短臂 p12.1-p12.3 上，共編碼了 480 個胺基酸。其變異點橫跨了許多 exon，突變群集在 exon2、3 和 14，而在台灣及有中國血統的患者常見於在 intron 處有 ISV6+4A>T 的變異 [15]。

1.6 AADC 缺乏症的診斷

AADC 缺乏症的診斷可檢驗患者血漿的 AADC 酵素活性，加入 PLP 及 L-DOPA 與之反應，再以 HPLC 測得多巴胺量，AADC 缺乏症患者的血漿 AADC 酵素活性很低 (患者： $<1-5$ pmol/min/mL, 正常： $36-129$ pmol/min/mL)。另外也可透過 AADC 基因的分子檢測找出致病的突變點。此罕見疾病也於已納入臺灣臺大醫院的新生兒篩檢項目內，希望可以對此症及早進行診斷及治療。

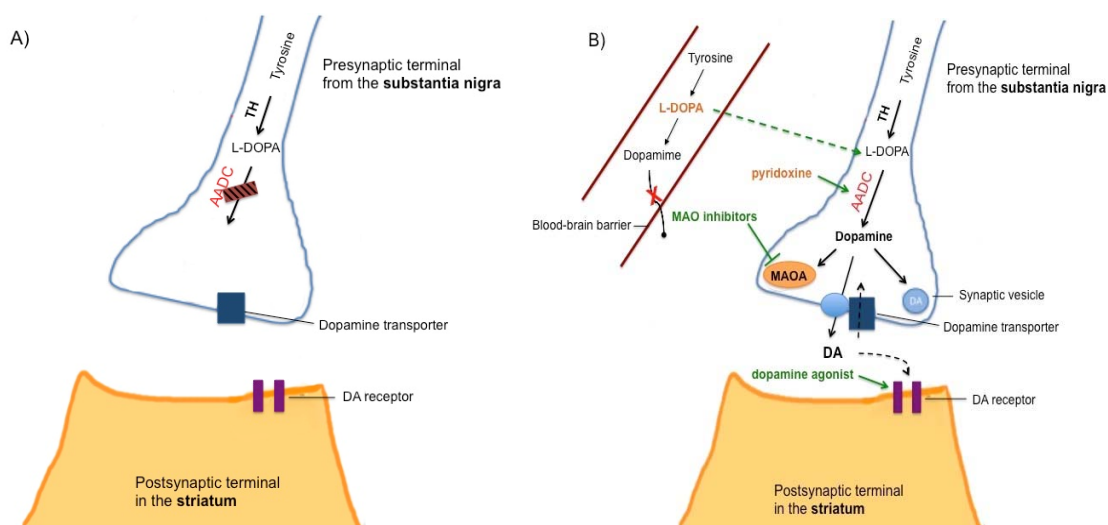
1.7 AADC 缺乏症的藥物治療

AADC 缺乏症的患者無法合成功能正常的 AADC 酵素，也因此無法正常的合成多巴胺、血清素、腎上腺素和正腎上腺素 (下圖 A)。其症狀中某些嚴重運動障礙和因為缺乏多巴胺引起的巴金森氏症非常類似。巴金森氏症是好發於老年人的神經退化性疾病，其致病機轉是因為中腦部分的神經細胞退化導致紋狀體缺乏神經傳導物質多巴胺。多巴胺無法通過血腦障壁，因此多以口服單胺氧化酵素抑制劑 (MAO inhibitors)，如：parnate (tranylcypromine)；多巴胺促進劑，如：溴隱亭 (bromocriptine) 或 pergolid；及 PLP 的前驅物維生素 B6 (pyridoxine) 治療，前述的



藥物可以改善某方面的工作記憶。

目前 AADC 缺乏症的治療通常是給予治療巴金森氏症的藥物，然而在存活的患者中僅有 19% 對此種治療方法有反應，且通常也只有緩解一種症狀，藥物治療對很多 AADC 缺乏症的患者僅有些微或毫無改善，因此許多患者在童年早期時就會死亡[13]。以多巴胺促進劑治療 AADC 缺乏症，是以直接刺激多巴胺接受器的方式，進而取代多巴胺的神經物質傳遞。而給予 MAO 抑制劑則可防止 AADC 缺乏症的患者有限的多巴胺及血清素被分解。此外維生素 B6 為 AADC 酵素的輔酶，以此治療還有部分殘餘 AADC 酵素活性的患者身上可能會有效（下圖 B）。



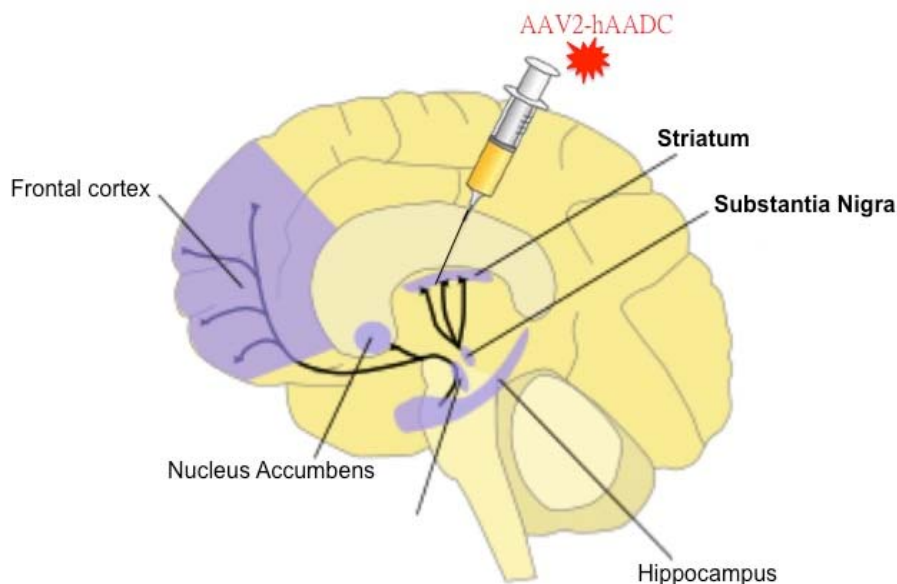
在多巴胺能及血清素能神經元中，負回饋機制控制了 AADC 酵素的活性，也控制了單胺類的代謝；所以在 AADC 缺乏症主要的兩種藥物治療中，給予多巴胺促進劑及單胺氧化酵素抑制劑，可觀察到 AADC 酵素活性降低。然而在有正常 AADC 酵素活性的動物身上所發現 AADC 酵素的調控和患者 AADC 酵素活性的關係尚未明瞭是否有關，因為原本患者的 AADC 酵素活性就已經很低[16]。

1.8 巴金森氏症的基因治療

與 AADC 缺乏症有類似嚴重運動障礙的巴金森氏症，其藥物治療常以口服 L-DOPA 來改善症狀，但隨著時間越久神經退化更加嚴重，越來越多的神經細胞壞死，此時服用再多的 L-DOPA 也無法改善症狀，甚至會有藥物的副作用出現。而隨著近年遺傳工程技術的發展快速，以及我們對於疾病的逐漸認知，開始有人嘗

試將類病毒作為一個載體，將外來的基因送入特定的細胞內，藉此替換缺失或功能異常的基因，以期能達到治療或延緩病程的效果，並改善患者的缺陷及生活品質。

這種基因治療法在 1990 年進行第一次的人體測試，目前在治療巴金森氏症上已有良好的成效。巴金森氏症的基因治療，是透過將 AADC 基因送入腦部，希望能提高 AADC 酵素的活性，再配合口服適量的 L-DOPA，以增加多巴胺的生成，且降低 L-DOPA 的使用劑量。此研究在活體 (*in vivo*) 實驗中已經證實，利用 AAV 為載體將 AADC 基因送入巴金森氏症猴 (MPTP monkey) 紋狀體中的殼核並服用 L-DOPA，可觀察到長期有效的改善症狀[17]。

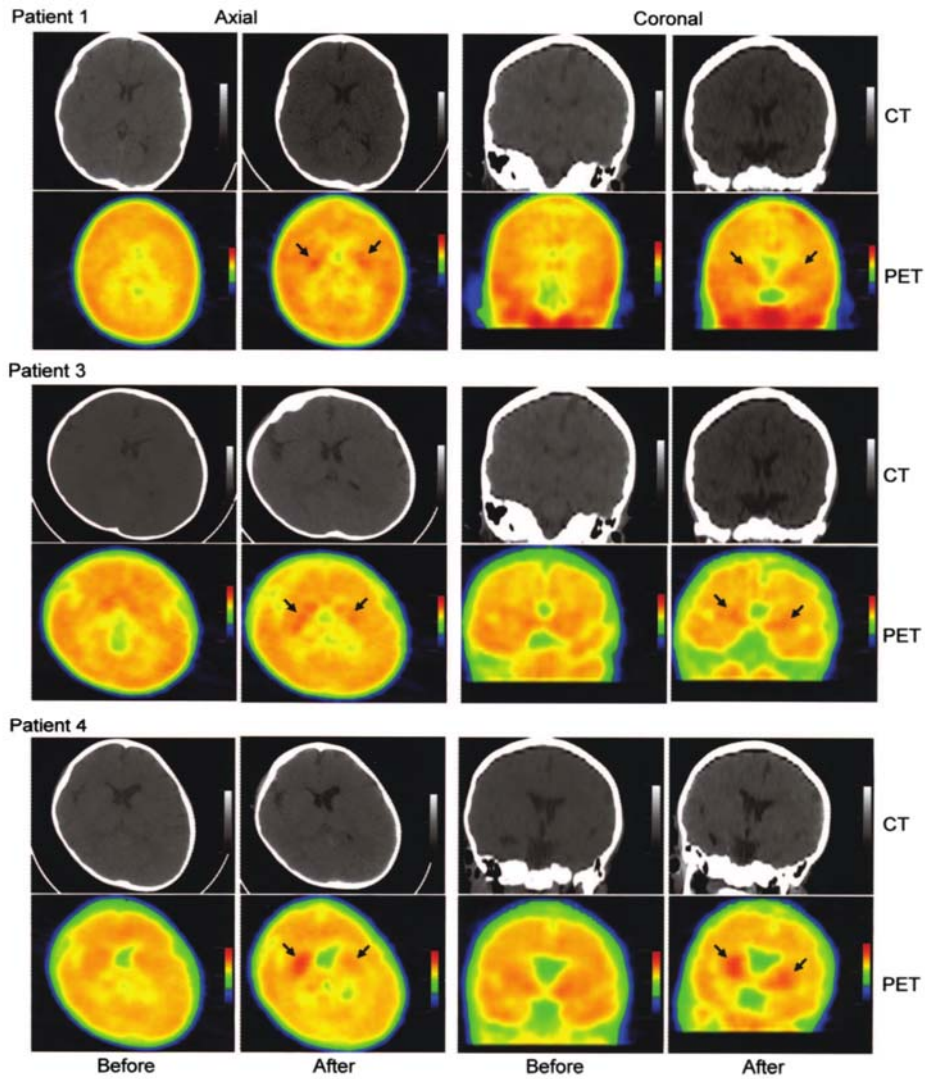


AAV 載體是動物實驗中最常使用的載體，安全性非常高，許多神經性疾病都是以 AAV-2 病毒作為載體進行基因治療，因為神經細胞不分裂，治療安全性高。而 AAV- hAADC 的安全性及效力也已經由人類的巴金森氏症治療得到證實[18]，透過立體定位手術（腦部手術），利用電腦定位決定要到達的腦部位置（殼核），儀器組裝好後會自動將長針送入設定好的位置注射病毒載體。再以正子掃描 (Positron Emission Tomography, PET) 追蹤殼核 AADC 酵素的活性，可以觀察到 6-[¹⁸F]fluoro-L-m-tyrosine (FMT, a tracer for AADC) 的活性增加了 56%，且持續了 96 週[19]。雖然在巴金森氏症患者 PET 分析顯示，AAV2-hAADC 在基因治療上有助於功能恢復，可能與殼核紋狀體內生性多巴胺的功能池重建有關，但如何能維持這種持續長時間效應的機制，目前還沒有完全瞭解。

而在初代培養紋狀體神經細胞的實驗中 (*in vitro*) 可發現，當細胞暴露在高濃度 L-DOPA 的環境下，會導致黑質處及紋狀體神經元的細胞死亡、神經細絲的聚集、局部軸突腫脹及誘導不正常的 DARPP-32 表現，並會活化星形膠質細胞和微小膠質細胞。而在細胞送入 AAV-hAADC 後則可以有效且持續的表現 AADC 蛋白，並防止 L-DOPA 誘導產生毒性。這種保護的效應是由於 AADC 酵素可將 L-DOPA 轉變成多巴胺，並增加囊泡單胺轉運子的運作，使多巴胺被儲存在細胞中[20]。

1.9 AADC 缺乏症的基因治療

而 2007 年在台灣也開始進行 AADC 缺乏症的基因治療人道救援，由臺大醫院胡務亮醫師及曾勝弘醫師所率領之醫療及研究團隊成功的完成了四例 AADC 缺乏症患者的基因治療，且所有接受治療的患者皆有很大的改善。基因治療的方法如同巴金森氏症，以 AAV2 為病毒載體將 AADC 基因送入患者的大腦殼核 (putamen)，其成果也於 2012 年在 *Science Translational Medicine* 上發表，手術後患者的電腦斷層造影 (computered tomography, CT) 及磁振造影 (Magnetic resonance imaging, MRI) 皆顯示無明顯出血跡象，四名患者也在一周內出院。在基因治療六個月後，所有患者的體重皆增加，以 PET 追蹤其中三名患者殼核 6-[¹⁸F] fluorodopa (FDOPA) 的吸收量分別增加為 86%、45%及 52%，從 PET 影像可看到治療前及治療六個月後吸收量的明顯改變 (如下圖)。而進行患者的腦脊髓液 (CSF) 分析可看到多巴胺的代謝產物 HVA (homovanillic acid) 及血清素的代謝產物 HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid) 的濃度皆增加，但 L-DOPA 及 3-O-methyldopa 的濃度仍然升高 (如下表)。在治療前這些患者都有運動障礙 (dyskinesias)，且幾乎沒有自主運動，但在治療幾個月後患者的運動功能皆有改善，一名患者甚至能夠站立，另外三名患者亦能在沒有支撐的情況下坐直，其他症狀包括情緒及轉眼危象也有所改善。經過嬰兒綜合發展測驗 (CDIIT) 和運動量表的評估分數都有明顯的上升，也證實了其動作及認知功能的改善[21]。




	HVA		HIAA		L-DOPA		3-O-Methyl dopa	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Patient 1	<5	33	<5	7	43	69	NA	529
Patient 2	<5	NA	<5	NA	54	NA	NA	NA
Patient 3	<5	24	<5	<5	NA	45	NA	640
Patient 4	<5	24	<5	5	129	41	278	449

Hwu, W.L., et al. *Sci Transl Med*, 2012. 4(134): p. 134ra61.

1.10 研究假說

AADC 缺乏症的基因治療是將基因送入紋狀體殼核的位置（多巴胺投射的突觸後神經元, postsynaptic neuron）；而位於紋狀體的中型棘神經元應無法將異位性合成的多巴胺儲存在囊泡中，是如何能改善此突觸後神經元 (postsynaptic neuron)



的活性，其細胞機轉目前還不清楚。因此本論文將透過轉染 AADC 基因到非多巴胺能的神經細胞如神經母細胞瘤 (N2a) 或紋狀體的中型棘神經元 (medium spiny neurons)後，分別收集細胞及其細胞培養液與 L-DOPA 做反應，再以高效能液相層析儀 (HPLC) 分析 AADC 酵素的活性，以探討其細胞機制。

我們假設在收集的培養液與 L-DOPA 反應後，若從中可以測得 AADC 酵素活性，則可以證明細胞在被轉入 AADC 基因後，生成的 AADC 酵素可以被釋放出來，因此可與胞外的 L-DOPA 反應生成多巴胺 (圖一，藍色箭頭)，進而維持長時間效應。反之，如果我們無法從其培養液中測得 AADC 酵素活性，表示 AADC 酵素不會被釋放到細胞外；而其反應路徑可推測為 AADC 會被儲存在細胞內，而 L-DOPA 將進入細胞與之反應合成多巴胺，再釋放到細胞外 (如圖一，咖啡色箭頭)。如果細胞內的 AADC 酵素真的可以釋放到細胞外，我們也希望探討其釋放之機轉。

Chapter 2 材料與方法



2.1 實驗設計

我們分別培養神經母細胞瘤 (N2a) 和體外培養中型棘神經細胞 (Medium spiny neurons) 及多巴胺能細胞 (dopaminergic neuron) 以進行三個階段的實驗。細胞轉染方法以脂質體 (liposome) 法取代基因治療的病毒法將 AADC 基因送入細胞內，再於轉染後進行 AADC 酵素活性分析。而在進行 AADC 酵素活性分析時，為了避免培養中的細胞將在細胞內合成的多巴胺釋放到細胞外所造成干擾，我們不直接給予培養中的細胞 L-DOPA，而是在 AADC 基因被表現後，單獨收集其細胞培養液和細胞分別與 L-DOPA 作反應，以進行 HPLC 之 AADC 酵素活性分析。

2.1.1 N2a 細胞實驗

紋狀體的中型棘神經細胞為非多巴胺能的神經細胞，因為初代培養神經細胞 (primary neuronal cell culture) 較為困難，所以我們先以 N2a 細胞進行預備實驗。Neuro-2a (N2a) 為一種從小鼠腫瘤 (neuroblastoma) 分離出來的細胞株，為一種非多巴胺能的神經模式細胞，常用於研究神經元分化、軸突生長及訊息傳遞路徑。有文獻指出 N2a 細胞經由血清移除和其他環境中的刺激可快速表現訊息的分子造成神經分化和神經突的生長，且其培養液可用 HPLC 測得多巴胺的表現[25]；但在我們的 N2a 細胞預備實驗中移除血清培養後，在其培養液中並無測得多巴胺，因此不會影響到 AADC 活性分析。本實驗的研究假說為 N2a 細胞內的 AADC 蛋白，可以釋放到細胞外。如果可以，我們也希望能探討其釋放之機轉，方法如下(圖二)：

(1) 確認細胞無 AADC 抗原：N2a 細胞經培養後，將細胞固定並透過免疫染色法檢測此細胞是否有目標抗原 AADC，而其反應結果應為陰性。(2) 細胞轉染 AADC 基因：以脂質體法使細胞轉染至 AADC 基因。實驗組設置二組，一組為 AADC-transfected N2a 細胞；另一組細胞轉染綠色螢光蛋白基因 (green fluorescent protein, GFP) 作為轉染報導基因，使可直接於直立式顯微鏡下觀察轉染成功率。對照組為 mock-transfection，意即轉染一個沒有構造基因 (construct) 的載體，以證明在進行轉染後所看到的效應是送入的 AADC 基因所造成，而不是載體造成的。(3) 細胞表

現 AADC：AADC-transfected N2a 細胞，在培養 48 小時後固定，以免疫染色法觀察其細胞轉染效率。(4) 細胞及細胞培養液的 AADC 活性分析：實驗組為 AADC-transfected N2a，對照組為 mock-transfection。分開收集其細胞培養液及細胞，並分別與 L-DOPA 反應，再以 HPLC 進行 AADC 酵素活性的分析。理論上我們如果在細胞培養液中測得 AADC 的活性，則可證明 AADC-transfected N2a 細胞生成 AADC 後可釋放出細胞外，使 L-DOPA 被轉換成多巴胺。(5) 試圖阻斷 AADC 釋出細胞外，以探討其釋放機制：假設 AADC 可以釋放到細胞外，我們將對 AADC 的傳送進行干擾試驗，給予培養中的細胞依賴內質網/高基氏體的蛋白質分泌途徑的抑制劑，如 BFA (brefeldin A)；若細胞經處理後 AADC 的分泌受到抑制，則可說明 AADC 蛋白為一個走典型分泌路徑的蛋白。又若使細胞囊泡運輸分子開關蛋白顯性失活（轉染 AADC-DNRab11 基因至 N2a 細胞），而後 AADC 酵素活性若受到抑制，則證明 AADC 酵素的運送與 Rab11 有關。

2.1.2 中型棘神經細胞實驗

中型棘神經元 (Medium spiny neurons, MSNs) 為紋狀體內主要的信息整合和傳出神經元，為一種 GABAergic neuron，因此被歸類為抑制性神經元，佔所有神經元的 95%；其細胞體大小中等，有複雜的樹突結構及高密度的樹突棘，可以接收 glutamatergic 和 dopaminergic 的傳入。本實驗假說為經轉染 AADC 的中型棘神經細胞，亦可釋放 AADC 到細胞外與 L-DOPA 合成多巴胺，方法如下（圖三）：

(1) 神經膠質細胞 (glial cells) 培養：培養中型棘神經細胞須先培養“餵養細胞”神經膠質細胞，再收集其條件培養液供給中型棘神經元。(2) 中型棘神經細胞初代培養及免疫染色：培養中型棘神經細胞，首先進行 NeuN (neuronal marker) 及 DARPP-32 的抗體—抗原免疫染色反應。NeuN 又稱為 FOX3 和 RBFOX3，是一種神經元細胞核抗原 (neuronal nuclear antigen)，常用作神經元的生物標記，在此我們用來確認培養的細胞為神經細胞。DARPP-32 (anti-dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein 32) 為中型棘神經細胞中富含的一種胞漿蛋白 (cytosolic protein)，位在具有多巴胺接受器的神經元上，為一種 protein phosphatase I 的強效抑制劑，在中樞的 dopaminergic 及 glutamatergic 的訊息傳遞扮演重要角色，亦可整合兩種路徑間的活性，在此我們用來辨識中型棘神經細胞所占的比例。



2.1.3 多巴胺能神經細胞實驗

中腦的多巴胺能神經元是哺乳動物中樞神經系統中多巴胺的主要來源，此細胞的退化則與巴金森氏症有關。多巴胺能神經元存在於大腦的黑質緻密部，此處含有大量的多巴胺。雖然多巴胺能神經元的數量不多，但其在許多大腦功能中扮演很重要的角色。因此我們希望透過培養 AADC 缺乏症小鼠的初代多巴胺能神經細胞，以進行 AADC 基因的轉染，探討 AADC 釋放機制，多巴胺能神經元僅是黑質總神經元的 3-5%，因此本研究先使用正常小鼠的多巴胺能神經細胞以建立實驗流程，方法如下：

培養多巴胺能神經細胞：培養正常小鼠的多巴胺能神經元，並進行細胞免疫染色。(1) NeuN：用來確認培養的細胞為神經細胞 (neuronal marker)；(2) tyrosine hydroxylase (TH)：多巴胺標記 (dopaminergic and noradrenergic neurons marker)，TH 在由 tyrosine 生成多巴胺的合成路徑中為限速酶 (rate-limiting enzyme)；(3) 膠細胞微纖維酸蛋白 (glial fibrillary acid protein, GFAP)：僅存在於星形膠質細胞的胞體中 (astrocyte marker)，GFAP 是星形膠質細胞中間絲的主要成分，並可作為一種特异性標記以區分已分化的星形膠質細胞與其他的神經膠質細胞，因此我們利用 GFAP 抗體來檢測培養的細胞是否為星形膠質細胞。

2.2 細胞培養

2.2.1 N2a 細胞培養

將 N2a 細胞以 1×10^5 細胞/毫升的濃度培養在 6well (9.61cm^2) 孔盤，培養液為 DMEM (Dulbecco 's Modified Eagle Medium SigmaeAldrich, USA) 及補充 10% FBS (fetal bovine serum, SigmaeAldrich, USA) 和 1% 抗生素 (antibiotic antimycotic solution, SigmaeAldrich, USA)，培養在 37 度 CO_2 培養箱 (5% CO_2 及 90% 濕度)。經培養的細胞用於 N2a 細胞實驗的 AADC 基因轉染、免疫螢光染色 (孔盤內需放置無菌玻片)、AADC 活性分析及 LDH 活性分析。培養液及細胞的收集，將細胞培養液以 membrane filter $0.22 \mu\text{m}$ (Millex[®]GS, Millipore) 過濾後收集在 1.5ml 的離心管保存在液態氮中，待做 AADC 酵素活性分析時再取出；移除培養液後的細胞

以 PBS 沖洗後，加入 1ml PBS 以細胞刮勺收集細胞，再以微量吸管吸取至離心管中，以 1000g 離心五分鐘，移除上清液留下細胞沈澱物 (pellet) 冷凍於-70 度冰箱保存。



2.2.2 神經膠質細胞培養

出生後一到二天的老鼠 (P1~2)，取出大腦皮質，加入 0.25% 胰蛋白酶，37°C 水浴槽 30 分鐘，加入神經膠質細胞培養液 (10mM HEPES, 1mM sodium pyruvate, 0.2mM glutamine, 10% FCS, 1x penicillin/streptomycin, 0.6% Glucose in MEM) 離心 1000g 兩分鐘，移除上清液後，再重新懸浮在 3ml 的神經膠質細胞培養液中，將巴斯德吸管 (Pasteur pipette) 的開口燒至圓滑，抽吸細胞 10 次，以 70 um filter 過濾細胞，培養在 10cm 培養皿中，隔天更換新鮮培養液，之後每七天更換一次，七至十天後神經膠質細胞會長滿，再換液成神經細胞生長培養液 (1x B-27, 0.5mM glutamine 溶於 neurobasal medium, NPM)，培養 24~48 小時後，即可收集用於培養中型棘神經元的條件培養液 (Glia-conditioned growth media, GCM) 如圖三。

2.2.3 中型棘神經細胞培養 (medium spiny neurons)

取懷孕 16 天的母鼠 (E16)，用 Avertin 麻醉母鼠，以無菌鑷子將子宮取出，放至 10ml CMF-HBSS (HBSS + 10mM HEPES) 在 10cm 培養皿於室溫下，稍微搖晃洗去血液，移至另一個乾淨的 10cm 培養皿 (10ml CMF-HBSS)。將子宮剪開，個別將胚胎放至 3ml CMF-HBSS 在 6cm 培養皿於冰上，將培養皿移至解剖顯微鏡下，除去羊膜，由眼睛至腦幹連成一線將腦部切下 (如圖四 A)。

小心將腦殼、腦膜移除，之後將中腦及小腦切除；大腦半球分兩半後 (如圖四 B)，由側腦室切開，掀開前額葉皮層 (圖四 C)，露出紋狀體 (深色的部位，圖四 D) 並將之夾起，陸續收集於 10ml CMF-HBSS 在 15ml 離心管中於冰上。上下倒置 2~3，待組織沉降後小心將上清液吸去，加入 37°C 預熱之 0.25% 胰蛋白酶 (trypsin)，放至 37°C 水浴槽 30 分鐘 (每隔分鐘搖晃一下)，離心 1000g 4 分鐘，以 3ml 神經細胞生長培養液 (NPM) 重新懸浮細胞，以燒至圓滑的巴斯德吸管將細胞抽吸 10 次。以細胞計數盤計數細胞，存活率應大於 9 成，將 BioCoat™ Poly-D-Lysine/

Laminin 玻片放入 24 孔盤，以細胞密度 2×10^5 細胞/每孔，每孔加 0.5ml NPM，於 37°C 、5% CO_2 培養箱培養 2~3 小時後，再將培養液換成 GCM，之後每隔 7 天換一半新鮮的 GCM，培養 7~14 天後即可進行免疫染色及轉染後的 AADC 活性分析。

2.2.4 多巴胺能神經細胞培養

取懷孕 13 天的母鼠 (E13)，用 Avertin 麻醉母鼠，以無菌鑷子將子宮取出，放至在 10cm 培養皿的 10ml HBSS 中，稍微搖晃洗去血液，再移至另一個乾淨的 10cm 培養皿 (10ml HBSS)。將子宮剪開，個別將胚胎放至在 6cm 培養皿中 (置於冰上)，加入 3ml 的解剖溶液 (100ml 中含 HBSS 99ml, D-Glucose 360.3 mg, Penicillin 1ml, Ascorbic acid solution 0.1ml)，將培養皿移至解剖顯微鏡下，除去羊膜，切下胚胎頭部，去除頭皮組織，分離出大腦，切下前腦吻端和腦部後端，沿管樣 (tube-like) 構造中線剪開，修剪成蝴蝶形結構 (每側留下 2/3)，再集中置入解剖溶液中。將其上下倒置 3-5 次，組織自然沉澱後，將上清液移除，加入 1ml 細胞分離劑 (Accutase[®] cell dissociation reagent) 置於 37°C 水浴槽中 20 分鐘 (每 5 分鐘搖晃一次)。接著加入解剖溶液 (室溫) 中和反應，用 $1000 \mu\text{l}$ 微量滴管抽吸 20-40 次，再以 $200 \mu\text{l}$ 微量吸管抽吸 20-40 次，使之均質 (過程中儘量避免氣泡產生)，再用 $70 \mu\text{m}$ filter 過濾細胞，室溫離心 1000g 4 分鐘，移除上清液加入 1ml 分化培養液 (100ml 中含 Neurobasal[®] medium 98ml, L-Glutamine 1ml, B-27[®] supplement 2ml)，移至新的離心管，室溫離心 300g 3 分鐘，再移除上清液加入 $200 \mu\text{l}$ 分化培養液 (室溫)，並以細胞計數盤計數細胞，濃度以 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5 \text{cell/ml}$ 為適當。取 $50 \sim 65 \mu\text{l}$ 滴在已 coating 的玻片上 (Poly-L-Ornithine $20 \mu\text{g/ml}$ 置於 37°C 、5% CO_2 培養箱兩小時，移除後以無菌水洗潤後，再加入 Laminin $10 \mu\text{g/ml}$ 置入培養箱兩小時，保存於 4°C ，使用前再移除 laminin 並以無菌水潤洗三次，在 laminar flow hood 中自然風乾，約半小時)，於 37°C 、5% CO_2 培養箱中培養 30 分鐘，每孔再加入 2.5ml 分化培養液 (室溫) 在培養箱中繼續培養，每隔兩天換液一次，七天後可以將細胞固定進行後續細胞免疫染色。



2.3 DNA

AADC 的 cDNA (NM_000790) 臺大醫院生化遺傳實驗室來自胡務亮醫師

2.4 細胞轉染技術 (transfection)

脂質體法是利用不同的載體物質攜帶質體通過直接穿膜或者膜融合的方法使得外源基因進入細胞；而病毒法是利用包裝了外源基因的病毒感染細胞的方法使其進入細胞。但是由於病毒法的前期準備較複雜、而且可能對於細胞有較大影響；所以本實驗採以脂質體法將 AADC 基因送入細胞內，需注意要防止其毒性，因此脂質體與質體的比例，細胞密度以及轉染的時間長短和培養基中血清的含量都是影響轉染效率的重要問題。在進行轉染前，細胞須先換液（新鮮的培養液），取 75 μ l Opti MEM[®]與 1.5 μ l lipofectamine[®]2000 震盪後靜置 5 分鐘；再另取 75 μ l Opti MEM[®]與 1 μ g DNA 震盪後，將上述兩者混合均勻直立靜置 15 分鐘，以微量吸管吸取後”逐滴“加入每個孔盤，於培養箱轉染 24 或 40 小時，移除舊的培養液並以 PBS 洗潤後換成 serum free 培養液 (DMEM)，再培養隔夜 (over night) 後便可進行後續酵素活性分析及免疫螢光染色實驗。

2.5 探討 AADC 釋放機制的細胞處理

2.5.1 BFA (brefeldin A)

Brefeldin A 是一種真菌代謝產物，最初曾被用作抗病毒試劑，現在主要用於研究蛋白質的傳送，是一種常用的蛋白質傳送抑制劑，可逆地阻斷蛋白質從內質網傳送到高基氏體（分泌路徑中早期的步驟）。以 BFA 處理後高基氏體很快會被破壞，並融合到內質網上。因此我們將其加入培養液中試圖干擾 AADC 的分泌，以 AADC 酵素活性測試觀察 AADC 的分泌是否遭到阻斷或減少。在細胞處理前須先更換新的培養液（DMEM, 不含牛血清），再將 BFA (2 μ g/ml) 加入經轉染 AADC 基因並培養 40 小時後的 N2a 細胞培養液中，處理後的細胞繼續在 37 度 CO₂ 培養箱（5% CO₂）培養四小時後，分別收取細胞培養液及細胞。

2.5.2 DN-Rab11 (顯性失活 Rab11)

哺乳類細胞中主要有兩種運輸方式分別為胞飲作用 (endocytosis) 和胞吐作用 (exocytosis)，而胞飲作用在維持細胞內恆定佔很重要地位，主要功能為取得胞外營養物質、促進細胞間的訊息傳遞、調控細胞表面受器、抗原的顯現，及維持細胞極性。在胞飲作用路徑中，囊泡運送的過程主要是受到 Ras 超家族 (superfamily) 中的一個大家族 Rab 家族所調控，細胞內的囊泡運送是一個多步驟的工作 (multi-step process)，而 Rab 蛋白是主要的 “Key protein”，有多種 Rab 蛋白參與這多步驟的蛋白質運輸，其主要功能是調控細胞內攜帶蛋白質、脂質的液泡及相關酵素的液泡在不同胞器間的運輸 (trafficking) 和融合 (fusion)。目前在人類 (Homo sapiens) 至少發現有 60 種 Rab 家族成員蛋白，而 Rab11 參與了反式高爾基體網絡 (trans-Golgi network, TGN) 的蛋白質及囊泡運輸、核內體的回收，同時在細胞膜的肌動蛋白重塑、細胞分裂及脫離中扮演重要角色。因此我們同時轉染 AADC 與 DN-Rab11 (dominant negative-Rab11)，以 AADC 酵素活性測試，觀察 AADC 的活性是否受到影響。細胞轉染方法如前述，唯因 DNA 量加倍 (AADC/ DN-Rab11)，需調整 lipofectamine®2000 的量為原先的兩倍 (3 μ l)，在轉染 24 小時後更換培養液為 DMEM (不含牛血清)，再培養至隔夜後分別收集培養液及細胞冷凍保存，以待後續分析。

2.6 免疫螢光染色

在轉染完全的 24 小時後，細胞先以 PBS 緩衝液潤洗，再以 4% 的多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定細胞 20 分鐘，移除上清液後接續以 PBS 緩衝液潤洗二次；配製 0.1% TritonX100 溶於 PBS 緩衝溶液中加入細胞 10 分鐘後再以 PBS 緩衝液潤洗二次。加入阻斷液 (blocking solution)：2.5% 馬血清 (horse serum) 以震盪器震盪一小時。分別以馬血清配製一級抗體 AADC (1:800), TH (1:200), NeuN (1:300)，移除阻斷液後加入一級抗體，並以震盪器盪兩小時後以 PBST 沖洗三次 (每次五分鐘)；配製二級抗體，綠色螢光 FITC (Fluorescein, JACKSON, 1:200)，紅色螢光 (Rhododendron, JACKSON, 1:200)，移除 PBST 後加入二級抗體，此步驟需避光，並以震盪器震盪 40 分鐘。移除二級抗體後以 PBST 沖洗三次，再配製 Hoechst

(1:500)，於移除 PBST 後加入細胞中震盪（藍色螢光標示 DNA），加入五分鐘後即可移除，並以 PBST 沖洗二次。挑出細胞附著的玻片直立於紙巾上吸乾水分，滴一滴 Vectashield® mounting medium 在載玻片上，將有細胞的那面迅速倒蓋在 mounting medium 上（不可有氣泡），封片後於螢光顯微鏡下觀察染色結果。

2.7 AADC 酵素活性分析

2.7.1 培養液 (extracellular) 之樣品處理

取 200 μ l 的細胞培養液至反應溶劑中混合均勻，反應溶劑的配製：取 6mg DTT (dithiothreitol) 到 450 μ l 的 0.334M (2X) sodium-phosphate buffer 及 350 μ l 無菌二次水，再加入 150 μ l 0.7mM P-5-P (pyridoxal-5-phosphate)，放到 37°C 水浴，靜置兩小時後加入 300 μ l 10mM L-DOPA，混合均勻後放回 37°C 水浴，再反應兩小時。最後加入 120 μ l 70% HClO₄ 停止反應（要在抽氣櫃中進行）。在 4°C 下，以 12'000 rpm 離心 5min，取出上清液至新管，放置冰上。準備 Sephadex G10 管柱，在短管玻璃管下方以玻璃棉塞住，加入 Sephadex G10（以無菌水清洗浸泡隔夜後使用）約三公分，先用 2ml 水清洗，再用 2ml 的 0.03% Formic acid 清洗，再加入反應完成後的上清液，待完全流完後，在下方放乾淨的棕色離心管，加 1.4ml 的 0.03% Formic acid 入管柱開始收集反應液，收集完後于 -70°C 冰箱冷凍保存。

2.7.2 細胞 (intracellular) 之樣品處理

收集之細胞沈澱物 (pellet) 加入 200 μ l 的 3mM Tris buffer，以均質機均質化（每次不可超過 3 秒）後進行蛋白質定量，再取其中 100 μ l 細胞溶解物至反應溶劑中混合均勻。反應溶劑的配製：取 6mg DTT (dithiothreitol) 到 900 μ l 的 0.167M sodium-phosphate buffer，再加入 150 μ l 0.7mM P-5-P (pyridoxal-5-phosphate)，放到 37°C 水浴，靜置兩小時再與 L-DOPA 反應兩小時，接續前述步驟。

2.7.3 HPLC 分析

細胞培養液及溶解物分別與 L-DOPA 反應後，收集的反應產物以高效液相層

析儀 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 測得多巴胺濃度，並換算為 AADC 活性。HPLC 使用管柱為親水性反相 C18 管柱 (4.6x150mm；particle Sz. 5 μ l；Hypersil GOLD,；Thermo)，移動相為 20mM KH₂PO₄ buffer (pH3.0)：甲醇=99:1，流速為 0.8 ml/min，KH₂PO₄ buffer 配製完成後需以 0.45 μ m 的 filter 過濾。配製標準品並測試已知濃度的多巴胺來繪製標準品曲線，標準品內標為 50 μ M DHBA 10 μ l 及 20 μ g/ml 的多巴胺 2 μ l、5 μ l、10 μ l、15 μ l，分別與 0.03% formic acid 68 μ l、65 μ l、60 μ l、55 μ l 混合均勻，再各取 20 μ l 注入 HPLC，完成標準曲線後始可注入樣品。樣品為反應後的產物，取 50 μ M DHBA 10 μ l、樣品、0.03% formic acid 調整適當濃度，總體積為 80 μ l，混合均勻後取 20 μ l 注入 HPLC。再由先前的標準曲線，以內插法帶入，計算出多巴胺的濃度。

2.7.4 AADC 酵素活性計算方式

我們參照 M.M. Verbeek 等所發表的 AADC 酵素活性分析方法進行酵素活性測試，將與 L-DOPA 反應所生成的產物經過 Sephadex G10 管柱進行初步分離並收集，再注入 HPLC 依據多巴胺的標準曲線進行多巴胺的濃度測定，再換算成總 AADC 活性，其換算公式如下：

$$\text{培養液之 AADC activity} = \frac{\text{測得之多巴胺總量(nmol)}}{\text{反應時間 (120 mins) x 樣品體積(200 ml)}} \quad (\text{nmol/min/ml})$$

$$\text{細胞之 AADC activity} = \frac{\text{測得之多巴胺總量(nmol)}}{\text{反應時間 (120 mins) x 蛋白質含量(mg)}} \quad (\text{nmol/min/mg})$$

若在培養液中有測得 AADC 酵素活性，則我們用兩種方法去計算有多少比例的 AADC 被細胞釋放出來，其方法如下：

方法一：以細胞測得的多巴胺總量定為 100%，再計算細胞釋出培養液的 AADC 活性比值。

$$\text{AADC activity 比值 1} = \frac{\text{培養液中多巴胺的總量 (nmol)}}{\text{細胞中多巴胺的總量 (nmol)}}$$

方法二：以細胞和培養液測得的多巴胺加總量定為 100%，再計算細胞釋出培養液的 AADC 活性比值。



$$\text{AADC activity 比值 2} = \frac{\text{培養液中多巴胺的總量 (nmol)}}{\text{細胞和培養液中多巴胺的總量 (nmol)}}$$

2.8 乳酸脫氫酶 (LDH) 活性分析

細胞轉染 AADC 基因後，假如可使細胞生成 AADC 酵素並分泌出細胞外，經由 HPLC 測得，則仍需排除在轉染時或細胞處理時可能造成細胞裂解，因此藉由測試其細胞裂解時才會釋放的乳酸脫氫酶 (Lactate dehydrogenase)，觀察其是否對胞外的 AADC 活性有影響。LDH 活性分析由聯合醫事檢驗所完成檢驗，細胞培養液中取 300 μ l 送檢，而取 30 μ l 細胞經 Tris-buffer 裂解的產物與 270 μ l PBS 混合後離心再取之上清液送檢，所得的 LDH 活性須再換算回原始樣品總體積之總活性。LDH 釋放到培養液百分比的分析方法以兩種計算公式來估算，其公式如下：

方法一：以細胞測得的 LDH 活性定為 100%，再計算因細胞死亡所造成 LDH 釋放到培養液中佔細胞 LDH 活性的百分比，所得數值可視為細胞受損率 (%)

$$\text{LDH 釋放(\%)} 1 = \frac{\text{培養液中 LDH 活性 (U/L)}}{\text{細胞中 LDH 活性 (U/L)}}$$

方法二：以細胞和培養液測得的總 LDH 活性定為 100%，再計算因細胞死亡所造成 LDH 釋放到培養液中佔總 LDH 活性的百分比，所得數值可視為細胞受損率 (%)

$$\text{LDH 釋放(\%)} 2 = \frac{\text{培養液中 LDH 活性 (U/L)}}{\text{細胞中 LDH 活性 (U/L)}}$$

2.9 統計分析

每筆數據皆以平均值表示並加上標準差，統計上組內及組間的顯著性差異比較以 one-way ANOVA 及 T.TEST 計算。每筆重複實驗數據經變異數同質性檢定

$p > 0.05$ ，表示在 95% 的信心水準下，ANOVA 同質性沒有差異，故為同質，所以 ANOVA 有其意義性，ANOVA 是成立且數據可使用；而在單因子變異數分析， $p > 0.05$ 故組內數據無顯著差異，結果為可信；但若組間 p 值 < 0.05 ，則被視為有顯著差異。



2.10 蛋白質定量

以 Bradford protein - binding assay 的方法進行蛋白質定量，偵測 595 nm 波長下的吸光值。取 800 μ l 二次水和 200 μ l Bradford dye 混合均勻，再加入待測樣品（細胞溶解物）2 μ l 混合，靜置反應 5 分鐘，接著移至石英管中，使用分光光度計測量在 595nm 波長下的吸光值，蛋白質定量計算 1 O.D. 為 20 μ g 的蛋白質。



Chapter 3 結果

3.1 N2a 細胞實驗

3.1.1 轉染 AADC 基因後可以表現 AADC

首先為了確認 N2a 細胞原本沒有 AADC 的表現，進行細胞免疫染色 AADC 抗體反應呈陰性 (圖未顯示)。N2a 細胞轉染綠色螢光蛋白基因 (報導基因) 這組實驗組，直接於直立式顯微鏡觀察其轉染效率約有五成 (圖五 A, 綠色螢光)；而轉染 AADC 基因這組 N2a 細胞，在進行 AADC 抗體的細胞免疫染色後可觀察到同樣約有五成的轉染效率 (圖五 C, 紅色螢光)。圖五之 B 和 D 為圖 A 和 C 分別以 Hoechst 抗體標示細胞核，以便估算轉染效率。而 mock-transfection 的 N2a 細胞對照組其 AADC 抗體反應亦呈陰性 (圖未顯示)。結果顯示此脂質體轉染法可以成功地將 AADC 基因送入細胞內，並可有 AADC 抗原的表現。

3.1.2 表現 AADC 之 N2a 細胞培養液中 AADC 酵素活性

N2a 細胞在轉染 AADC 基因或不含結構基因的 cDNA (mock transfection) 24 或 40 小時後，更換成無牛血清之培養液繼續培養隔夜。根據前述的實驗結果，這些經轉染的 N2a 細胞可以表現 AADC，而我們想知道這些細胞是否會將生成的 AADC 分泌到細胞外。因此我們將細胞培養液及細胞分開收集，以進行 AADC 酵素活性分析。此酵素活性分析，分別加入 L-DOPA 兩小時使其轉換成多巴胺，再將產物注入 HPLC 分析。理論上如果我們能在細胞培養液中測得 AADC 的活性，則可證明在細胞生成 AADC 後可被分泌出細胞外，與外加的 L-DOPA 反應並生成多巴胺。

圖六顯示的 AADC 酵素活性分析結果中，AADC-transfected N2a 的細胞培養液 (圖六 A, n=8) 及細胞 (圖六 B, n=8) 中皆可測得 AADC 活性，分別為 0.264 ± 0.05 nmol/min/ml 及 3.12 ± 0.53 nmol/min/mg，顯示無論是在細胞外或細胞內皆有 AADC 酵素存在，而在細胞內測得 AADC 的活性與先前免疫染色實驗中細胞轉染後有 AADC 表現的結果符合。

圖六 C 結果顯示，以方法一 (med/cell) 計算 AADC 的釋放比值時，細胞外的

AADC 活性佔細胞內總 AADC 活性的 $34\pm 9\%$ ($n=8$)。而 mock-transfection N2a 細胞，因本身並沒有 AADC 酵素，所以如預期地並沒有在細胞內或外測得 AADC 的活性，顯示表現 AADC 的 N2a 細胞可能會將部分的 AADC 釋放至細胞外，但大部分的 AADC 酵素仍會被儲存在細胞中。圖七 A 結果顯示，以方法二 (med/ total) 計算 AADC 的釋放比值時，細胞外的 AADC 活性佔細胞內及細胞外總 AADC 活性的 $25\pm 5\%$ ($n=8$)，以兩種計算方式都可以得到顯著的 AADC 活性。

3.1.3 LDH 活性分析評估細胞受損率

乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 在細胞內含量很多，為一種很穩定的細胞質酶，正常情況下不能通過細胞膜，但當細胞受損或死亡時即會釋放到細胞外，所以細胞死亡數會和細胞培養液中 LDH 的活性成正比。測量 LDH 的活性可分析細胞膜的完整性或細胞的裂解，以評估細胞受損率。為了確認在 AADC 活性分析中培養液測得的 AADC 活性是由細胞釋放，而非細胞死亡造成的，所以再分別對 AADC-transfected N2a 細胞及 mock-transfected N2a 細胞進行 LDH 釋放分析以評估細胞受損率。(培養細胞所用的培養溶液其 LDH 活性並未被測得)

圖六 D 結果顯示，以方法一 (med/ cell) 計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞受損率為 $14\pm 2\%$ ($n=8$)，和對照組 (mock-transfection) $15\pm 2\%$ ($n=8$) 兩者間並無顯著差異 ($p=0.289$, by T.TEST)。圖七 B 結果顯示，以方法二 (med/total) 計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞受損率為 $13\pm 1\%$ ($n=8$)，和對照組 (mock-transfection) $12\pm 2\%$ ($n=8$) 亦無顯著差異 ($p=0.286$, by T.Test)。

3.1.4 AADC 酵素活性與細胞受損率的關係

前述的 LDH 活性分析實驗中為了確認在 AADC 活性分析中培養液測得的 AADC 活性是由細胞釋放，而非細胞死亡造成的，所以對 AADC-transfected N2a 細胞進行細胞受損率分析。結果顯示無論是否有轉染 AADC 基因至細胞，其細胞死亡率皆無差異。但在細胞免疫染色實驗中顯示未轉染 AADC 基因的 N2a 細胞並沒有 AADC 酵素活性，這結果也在 AADC 酵素活性分析實驗中再次印證，我們無法以兩者去比較培養液所測得的 AADC 酵素活性是否來自細胞裂解所釋出。因此我

們針對轉染 AADC 基因的細胞進行細胞內外測得之 AADC 酵素活性與其細胞受損率關係的比較 (n=12)，圖八 A 為以方法一計算 LDH 釋放率 (細胞受損率) 並和其 AADC 酵素活性做比較，結果顯示隨著細胞受損率上昇時，其細胞內測得之 AADC 活性減少 (三角形標示)，但對應其培養液所測得的 AADC 酵素活性並沒有跟隨細胞受損率的增加而改變 (圓形)；而以方法二計算 LDH 釋放率 (圖八 B)，也可觀察到相同的結果，這表示培養液中測得的 AADC 酵素活性應是由細胞所釋放出去的。

3.1.5 以 BFA 處理細胞探討 AADC 釋放機制

Brefeldin A (BFA) 為一種可阻斷蛋白質運送的抑制劑，細胞經 BFA 處理後會改變其高基氏體及核內體的形態，藉以達到阻斷蛋白質在高基氏體與內質網之間的運送，使蛋白質的分泌在早期的分泌路徑中被抑制。因此我們將其加入培養液中試圖干擾 AADC 蛋白的分泌，以 AADC 酵素活性測試觀察 AADC 蛋白的分泌是否受到阻斷或減少。在培養液的 AADC 酵素活性分析結果中可見未經 BFA 處理的細胞之 AADC 活性為 0.32 ± 0.06 nmol/min/ml (n=3, 未附圖表)，而經 BFA 處理後的細胞之 AADC 活性為 0.3 ± 0.03 nmol/min/ml (n=3, 未附圖表)，並沒有顯著的減少 (p=0.752, n=3, by T.TEST)。而在細胞的 AADC 活性分析結果中也可見未經 BFA 處理的 AADC 活性為 1.23 ± 0.1 及經 BFA 處理後的細胞之 AADC 活性為 1.18 ± 0.6 nmol/min/mg (n=3, 未附圖表)，亦無顯著差異。

圖九 A 以方法一 (med/cell) 計算釋放到細胞外的 AADC 酵素活性占細胞內總 AADC 酵素活性的百分比分別為 $76 \pm 8\%$ (未處理) 和 $77 \pm 4\%$ (經 BFA 處理)，兩者無顯著差異 (p=0.88)。圖九 B 以方法一 (med/cell) 計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞受損率分別為 $52 \pm 10\%$ (未處理) 和 $63 \pm 4\%$ (經 BFA 處理)，經 BFA 處理的細胞受損率雖有小幅增加但亦無顯著差異 (p=0.13)。圖九 C 以方法二 (med/totoal) 計算釋放到細胞外的 AADC 活性占總 AADC 活性的百分比分別為 $43 \pm 2\%$ (未處理) 和 $43 \pm 1\%$ (經 BFA 處理)，兩者仍無顯著差異 (p=0.859)。圖九 D 以方法二 (med/total) 計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞受損率分別為 $34 \pm 4\%$ (未處理) 和 $39 \pm 1\%$ (經 BFA 處理)，兩者細胞受損率亦無顯著差異 (p=0.128)。

以上數據結果顯示在細胞受損率皆沒有顯著差異的情況下，經 BFA 處理與未

經處理的細胞釋放出細胞外的 AADC 活性兩者間並未有統計上的顯著差異，因此我們認為 BFA 並沒有如預期的去抑制 AADC 蛋白的分泌，可能是因為 AADC 蛋白並非依循傳統的蛋白分泌路徑釋放出細胞外。



3.1.6 轉染顯性失活的 Rab11 探討 AADC 釋放機制

Rab 11 在神經元中可以調節神經傳導物質的釋放，將蛋白質從回收的核內體運送到細胞膜，因此本實驗將 Rab11 顯性失活的突變體 (dominant-negative Rab11, DN-Rab11) 和 AADC 基因一同轉染至 N2a 細胞內，藉此探討 AADC 酵素的釋放機轉。實驗中將 N2a 細胞單獨轉染 AADC 基因或同時轉染 AADC 及 DN-Rab11 (AADC-DNRab11) 基因，在轉染 24 小時後更換為無牛血清之培養液繼續培養至隔夜，分別收集其細胞及培養液進行 AADC 活性分析，以 HPLC 分析的 AADC 活性。實驗結果在細胞培養液的 AADC 活性分別為 0.3 nmol/min/ml (單獨轉染 AADC 基因) 或 0.31 ± 0.09 nmol/min/ml (轉染 AADC-DNRab11 基因) 兩組間亦無顯著差異(未附圖表， $p=0.978$, $n=3$, by T.TEST)。在細胞內的 AADC 活性分別為 3.44 ± 0.71 nmol/min/mg (僅轉染 AADC 基因) 及 4.19 ± 0.51 nmol/min/mg (轉染 AADC-DNRab11 基因)，兩組間無顯著差異 (未附圖表， $p=0.212$, $n=3$, by T.TEST)；

圖十 A 以方法一 (med/cell) 計算釋放到細胞外的 AADC 活性占細胞內總 AADC 活性的百分比分別為 $38 \pm 10\%$ (僅轉染 AADC 基因) 和 $29 \pm 8\%$ (轉染 AADC-DNRab11 基因)，因其組內差異太大，兩組間仍無顯著差異($p=0.25$, by T.TEST)。圖十 B 以方法一 (med/cell) 計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞受損率分別為 16% (僅轉染 AADC 基因) 和 $18 \pm 4\%$ (轉染 AADC-DNRab11 基因)，經轉染 AADC-DNRab11 基因的細胞受損率雖有小幅增加但亦無顯著差異 ($p=0.38$, by T.TEST)。圖十 C 以方法二 (med/totoal) 計算釋放到細胞外的 AADC 活性占細胞內總 AADC 活性的百分比分別為 $27 \pm 5\%$ (僅轉染 AADC 基因) 和 $22 \pm 5\%$ (轉染 AADC-DNRab11 基因)，兩者仍無顯著差異 ($p=0.25$, by T.TEST)。圖十 D 以方法二 (med/total) 計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞受損率分別為 13% (僅轉染 AADC 基因) 和 $15 \pm 3\%$ (轉染 AADC-DNRab11 基因)，兩者細胞受損率亦無顯著差異 ($p=0.38$, by T.TEST)。

以上數據結果顯示在細胞受損率沒有顯著差異的情況下，經轉染

AADC-DNRab11 基因與僅轉染 *AADC* 基因的細胞釋放出細胞外的 *AADC* 活性比相差約 9% (方法一)或 5%(方法二) , 但在本實驗中有些樣品數值差異較大且樣本數少, 在統計上兩者間並未有顯著差異, 因此就以上數據轉染 *DN-Rab11* 基因在統計上並沒有減少 *AADC* 蛋白的釋放, 可能是因為 *AADC* 蛋白的分泌並非由 *Rab11* 所調控。

3.2 中型棘神經細胞之實驗

在前述的 N2a 細胞實驗中, 我們成功地將人類的 *AADC* 基因送入 N2a 細胞中且被表現, 並在 *AADC*-transfected 的 N2a 細胞培養液中可測得顯著的 *AADC* 活性, 顯示在 *AADC* 基因被轉入非多巴胺能神經細胞 (N2a 細胞) 後, 生成的 *AADC* 可以被分泌出來, 與胞外的 L-DOPA 反應進而生成多巴胺。我們接著嘗試於體外培養小鼠胚胎的中型棘神經細胞, 以探討基因治療中位在紋狀體的非多巴胺能神經細胞是否也如 *AADC*-transfected 的 N2a 細胞可將 *AADC* 釋放到突觸間隙, 且於細胞外合成多巴胺。

3.2.1 初代培養中型棘神經細胞的免疫染色

我們解剖懷孕 16 天之母鼠, 取出胎鼠由眼睛至腦幹連成一線 (如圖四 A 之紅線) 將腦部切下, 掀起前額葉皮層 (左側顏色較淺處), 夾起紋狀體 (圖四 D 紅色箭頭顏色較深色處), 以 trypsin 消化後離心並重新懸浮, 以細胞計數盤觀察細胞存活率大於 90%, coating 的玻片上, 於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養 2~3 小時後細胞已貼附, 之後繼續培養並觀察。

胚胎的皮層及紋狀體有高密度的神經膠細胞, 這些細胞會分泌增強神經細胞存活及發展的因子, 這種現象在體外培養中型棘神經細胞時亦可見。在以非條件培養液 (非 Glia-conditioned growth media, GCM) 培養細胞時, 大多細胞無法貼附 (圖十一 A); 而以 GCM 培養七天後的中型棘神經細胞存活率明顯增加, 且形態也較完整 (如圖十一 D), 此時便可進行後續的免疫染色及轉染 *AADC* 基因後的 *AADC* 活性分析。

在培養中型棘神經細胞七天後固定細胞, 首先進行 NeuN 及 DARPP-32 的抗

體—抗原免疫染色反應。本實驗以 N2a 細胞作為 NeuN 抗體的陽性對照組 (positive control)，圖十一 B 可見其細胞免疫反應 NeuN 呈陽性 (紅色螢光)；而初代培養的中型棘神經細胞呈 NeuN 陽性反應的占 50% 以上 (圖十一 E)，顯示初代培養的細胞有一半以上為神經細胞。DARPP-32 抗體的陽性對照組為小鼠大腦 caudate putamen (CP) 切片呈綠色螢光陽性反應 (圖十一 C)，而初代培養的中型棘神經細胞呈陽性反應的僅有 1~2% (圖十一 F, 綠色螢光)。

3.2.2 轉染 AADC 及 AADC 活性分析的結果

我們將 AADC 基因轉染至培養中的中型棘神經細胞 (培養第七天)，於轉染 48 小時後固定細胞，並進行 AADC 抗體免疫染色，圖十二 A 顯示轉染效率不到 1% (圖十二 B 為以 Hoechst 染細胞核)。同時我們將轉染 AADC 後的細胞分別收集培養液及細胞進行 AADC 活性分析，結果皆無法被 HPLC 測得。

3.3 多巴胺能神經細胞之實驗

培養野生型小鼠的多巴胺能神經元，並進行細胞免疫染色。先以 NeuN 抗體確認培養的細胞為神經細胞，圖十三 A 為以 N2a 細胞作為 NeuN 抗體反應的陽性對照組 (化學免疫染色)，圖十三 B 為培養的初代神經細胞其 NeuN 抗體反應呈陽性的細胞占五成 (化學免疫染色)。圖十三 D 為一個 TH 抗體反應呈陽性 (紅色螢光) 的培養細胞，陽性比率小於一成，顯示僅有少數為多巴胺能神經細胞。圖十三 C 為培養初代神經細胞之 GFAP 抗體反應呈陽性的亦佔五成 (紅色螢光)，結果顯示仍有多數細胞為星形膠質細胞。

Chapter 4 討論

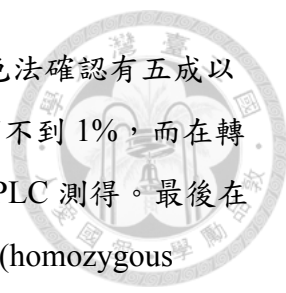


4.1 基因治療與細胞實驗

AADC 缺乏症的基因治療是以 AAV2 為病毒載體，將 AADC 基因利用立體定位手術送入患者的紋狀體殼核，已證實有良好的成效；在有相似運動失調症狀的巴金森氏症患者的基因治療中追蹤患者殼核 AADC 酵素的活性，可以觀察到 FMT 的活性增加了 56%，且持續了 96 週。而將 AAV2-AADC 送入動物的紋狀體 12 周後其多巴胺的合成可達到正常值的 50%，透過微透析實驗證實此基因治療可增強 L-DOPA 轉換成多巴胺的效率，但並沒有能力將被釋放到細胞外的多巴胺儲存[22]。且細胞內的多巴胺儲存需要有單胺囊泡轉運子 (monoamine vesicular transporter) 的表現[23]，因此紋狀體的中型棘神經元應無法將異位性合成的多巴胺儲存在囊泡中。此外有研究證實可表現 AADC 蛋白的細胞會增加 VMAT2 (vesicular monoamine transporter) 的表現，但僅在細胞暴露在 L-DOPA 的情況下[20]。而對於 AADC 蛋白在細胞中的作用機轉目前還不清楚，因此我們分別培養神經母細胞瘤 (N2a) 和體外培養中型棘神經細胞及多巴胺能細胞以進行三個階段的實驗，以探討 AADC 蛋白在細胞中生成後是否會釋放到細胞外。

有研究指出培養初代紋狀體神經細胞並使其表現 AADC 蛋白後，將細胞直接暴露在 L-DOPA 培養後進行細胞內、外的 AADC 活性分析，結果在細胞培養液中的多巴胺含量並沒有明顯的增加，而其細胞內的多巴胺含量高於在培養液中許多，因此認為多巴胺被儲存在這些細胞中[20]。但此實驗在進行 AADC 酵素活性分析時，將無法避免直接在培養的細胞中加入 L-DOPA 可能會使在細胞內合成的多巴胺釋放到細胞外造成干擾，且 L-DOPA 對細胞會產生毒性；因此我們不直接給予培養中的細胞 L-DOPA，而是在 AADC 基因被表現後，單獨收集其細胞培養液和細胞分別與 L-DOPA 作反應，以進行 HPLC 之 AADC 酵素活性分析。


首先在 N2a 細胞實驗中，我們將細胞轉染 AADC 基因後，透過免疫染色法可以觀察到 AADC 的表現，而在其細胞培養液中也可以測得明顯的 AADC 活性被釋放 (0.264 ± 0.05 nmol/min/ml, n=8)，而以兩種計算方式所得 AADC 蛋白釋出細胞的百分比分別為 34% (方法一) 和 25% (方法二)，顯示 AADC - transfected N2a 細胞生成 AADC 蛋白後可能會釋放出細胞外，使 L-DOPA 被轉換成多巴胺。接著



在中型棘神經細胞實驗中，我們培養的初代神經細胞經免疫染色法確認有五成以上為神經細胞 (NeuN positive)，但其中為中型棘神經細胞的比例不到 1%，而在轉染 AADC 基因後其細胞內、外的 AADC 活性因太低皆無法被 HPLC 測得。最後在多巴胺能神經細胞的實驗中，我們想知道在 AADC 缺乏症小鼠 (homozygous knock-in (KI) mice^(Ddc^{IVS6/IVS6}))[15] 的多巴胺能神經細胞在轉染 AADC 基因後，是否生成的 AADC 蛋白亦會被釋放出細胞外，而其多巴胺能神經元的形態與野生型是否有差異，因此我們先進行野生型小鼠的多巴胺能神經細胞培養；在初代培養神經細胞後經免疫染色法確認有約五成細胞為神經細胞 (NeuN positive)，五成為星形膠質細胞 (GFAP positive)，而多巴胺能神經細胞 (DARPP-32 positive) 則不到 1%。

4.2 AADC 可被釋放到細胞外

雖然在 N2a 細胞轉染 AADC 基因後，可以在培養液中測得 AADC 活性，但我們想確認在培養液中測得的 AADC 活性是由細胞所釋放，而非細胞死亡造成的，因此分別對 AADC-transfected N2a 細胞及 mock-transfected N2a 細胞以 LDH 的釋放百分比來評估細胞受損率。LDH 正常情況下不會通過細胞膜，但當細胞受損或死亡時即會釋放到細胞外，所以細胞死亡數會和細胞培養液中 LDH 的活性成正比。因為我們實驗中的細胞及培養液為分開收集，所以 LDH 的釋放百分比的計算公式為，方法一：單獨收集的培養液測得之 LDH 活性/單獨收集的細胞經 Tris-buffer 裂解後測得之 LDH 活性。在其他文獻研究多巴胺對 GSH 釋放的影響中，為了確認細胞裂解 (LDH 的釋放) 不會影響 GSH 的釋放，因此進行 LDH 的釋放分析；此實驗並沒有單獨收集細胞和培養液，而其 LDH 的釋放百分比計算公式為：培養液中測得的 LDH 活性/經 Triton X-100 細胞裂解後培養液的 LDH 活性 (LDH activity in medium / Total LDH in medium after cell lysis with Triton X-100)[24]。因此我們增加一種計算方式，方法二：單獨收集的培養液測得之 LDH 活性/單獨收集的細胞經 Tris-buffer 裂解後測得之 LDH 活性及單獨收集的培養液測得之 LDH 活性的總和。而我們的實驗結果以方法一計算細胞受損率分別為 14% (AADC) 和 15% (mock)，以方法二計算細胞受損率分別為 12% (AADC) 和 13% (mock)，轉染 AADC 與未轉染的細胞死亡率並沒有顯著差異 (方法一 $p=0.289$ ，方法二 $p=0.286$)。結論是不論以何種方式計算釋出細胞外的 AADC 活性，其活性 34% 或 25% 都遠大於細胞死亡率



14%或 12%，因此我們認為 AADC 酵素是有可能被釋放到細胞外的，但我們也不能否認測得的 AADC 活性可能有部分來自於細胞死亡所釋出的，且收集細胞進行 LDH 分析時不能排除其過程造成有低估的可能。此外我們針對轉染 AADC 基因的細胞進行細胞內外測得之 AADC 活性與其細胞受損率關係的比較，結果顯示隨著細胞受損率上昇時，其細胞內測得之 AADC 活性減少，但對應其培養液所測得的 AADC 活性並沒有跟隨細胞受損率的增加而改變，因此培養液中測得的 AADC 活性應是由細胞所釋放出去的。

4.3 影響 AADC 活性分析的因素

AADC 活性分析可能會受到培養液內含血清比、細胞存活數量、轉染效率及樣品分析的時效性所影響。在預備實驗中，我們進行了培養液中的血清含量對 AADC 活性分析影響的探討，N2a 細胞轉染 AADC 基因後分別使用不含血清之培養液 (SFM) 及含血清的培養液 (10% FBS) 培養，接著進行 AADC 酵素活性分析，結果在以不含血清的培養液培養的細胞可以測得 AADC 活性，但在以含血清的培養液培養的細胞之 AADC 活性則無法測得。有研究顯示 N2a 細胞在以多種因子 (如 TGF β 1, BMP4, GDNF, dbcAMP 及 RA) 誘導分化下可以表現 TH，將該細胞分別培養於含有 10% FBS、0.5% FBS 及 0.5% FBS + dbcAMP 的培養液中，根據 TH 抗體螢光染色反應的結果可看到隨著血清濃度的減少其 TH 抗體陽性的表現越顯著，觀察其細胞形態發現減少培養液中血清的比例可以增加神經突的生長；再對該細胞進行多巴胺的 HPLC 分析，其結果在以 0.5% FBS + dbcAMP 培養三天的 N2a 細胞中多巴胺的含量為以 10% FBS 培養的兩倍，這可能是因為血清中含有某些因子如 α 1-、 α 4- 及 β -globulin 會抑制神經元的分化和神經突的生長[25]。至於細胞存活數量及轉染效率等影響因素，則可建立穩定帶有 AADC 基因的 N2a 細胞系 (stable line)，以維持 AADC 的穩定表現，避免在每次實驗中細胞生長狀態及轉染率效率的差異造成 AADC 活性分析的誤差。而樣品的時效性對 AADC 活性分析也很重要，在實驗中若樣品僅在-70 度冰箱保存，兩周後再進行 AADC 活性分析則無法測得，因此樣品收集後應於液態氮中保存，並儘速完成後續分析。

4.4 探討 AADC 釋放機制


而在阻斷蛋白運送以探討 AADC 釋放機制的實驗中，以 BFA 處理並沒有如預期的可以抑制 AADC 的分泌 (BFA 處理及未處理的 AADC 活性皆為 43%，方法二計算)，可能是因為 AADC 酵素並非依循傳統蛋白分泌路徑釋放出細胞外，但此實驗的樣本數少，且無論是有 BFA 處理或沒有處理的細胞受損率皆高達 39% 和 34% (方法二計算)，為先前實驗的兩倍以上，是否因細胞狀態較差造成結果沒有顯著差異 ($p=0.128$)，還需要再進行驗證。此外有研究指出即使在以很低濃度的 BFA (10 ng/ml) 處理下，處理八小時後便會造成細胞凋亡 (apoptosis)，且會隨著暴露在 BFA 的時間增加。而 BFA 誘導的細胞凋亡需要活化 caspase，其中主要是活化 caspase-3，其將會被過度表現的 Bcl-2 所抑制[26]。因此未來在進行以 BFA 處理探討 AADC 釋放機制時，為了避免 BFA 造成的細胞凋亡影響 AADC 活性的分析，抑制其細胞凋亡也可以作為實驗修正的方法。

在以轉染顯性失活的 Rab11 探討 AADC 釋放機制的實驗中，結果顯示在細胞受損率沒有顯著差異 (15% 或 13%， $p=0.38$) 的情況下，經轉染 *AADC-DNRab11* 與僅轉染 AADC 的細胞釋放出細胞外的 AADC 活性比兩者間並未有顯著差異 (22% 和 27%，方法二計算， $p=0.38$)，因此就以上結果顯示使 Rab11 顯性失活不能減少 AADC 的釋放，這可能是因為 AADC 蛋白的分泌並不經由 Rab11 所調控。

蛋白質的傳送路徑可以由常見的膜和膜之間的運輸 (內質網到高基氏體) 或由囊泡運輸，另外還有一種運送方式為外排體 (exosomes)，外排體是一種由細胞衍生的膜性小囊泡，可由多囊體 (multivesicular body) 與細胞膜融合並分泌到細胞外，或可直接由細胞膜釋放[27, 28]，這也可作為之後探討 AADC 蛋白釋放機制的新方向。

4.5 初代神經細胞培養實驗

在神經細胞初代培養的實驗中，我們嘗試初代培養小鼠胚胎的中型棘神經細胞及多巴胺能神經細胞，選擇胚胎期的小鼠主要是因為在出生前神經的發育並不完全，經解剖分離出來的多為細胞本體 (soma)，其樹突、軸突還未生成，而在細胞貼附後才開始長樹突、軸突，因此以此時期的胚鼠作培養其細胞的形態會較完整 (神經在出生後僅能修復不能生成)，但培養結果是令人失望的，皆僅有不到 1%




的成功率，除了解剖技術不夠純熟，還有一些培養的方法待未來再做改進。有文獻指出將中型棘神經細胞與皮層細胞 (cortical cells) 以比例 2:3 共培養至 21 天，相較於單一培養，共培養下的中型棘神經細胞形態成熟度較佳且 DARPP-32 的表現量亦較高，其樹突棘的密度也較高並較長[29]，此可作為之後修正培養方式的參考。另外該文獻中提到關於常被引用對中型棘神經細胞的描述，“成人的紋狀體中型棘神經細胞佔 95%”，但作者認為這是因為其富含神經膠質細胞 (glia cell)，而實際上在成人紋狀體中的真實含量僅佔總細胞數的 20~55%。如此一來，如何取得足夠的細胞量來進行 AADC 活性分析，是一大必須克服的難題。

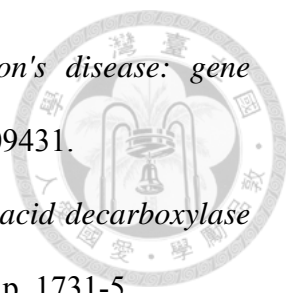
本研究成功轉染 AADC 至 N2a 細胞內並表現，且證實 AADC 可以被細胞釋放出來，但其釋放機制尚未釐清。體外培養中型棘神經細胞及多巴胺能神經細胞未能得到足夠的細胞數目進行 AADC 活性分析，但本研究建立的培養技術與實驗流程提供了未來研究的基礎，並經由了解 AADC 的釋放機制以幫助基因治療的研究與執行。

REFERENCE

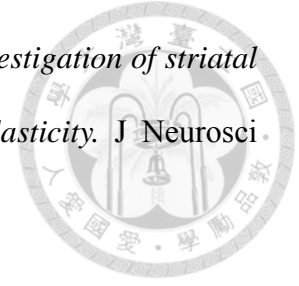


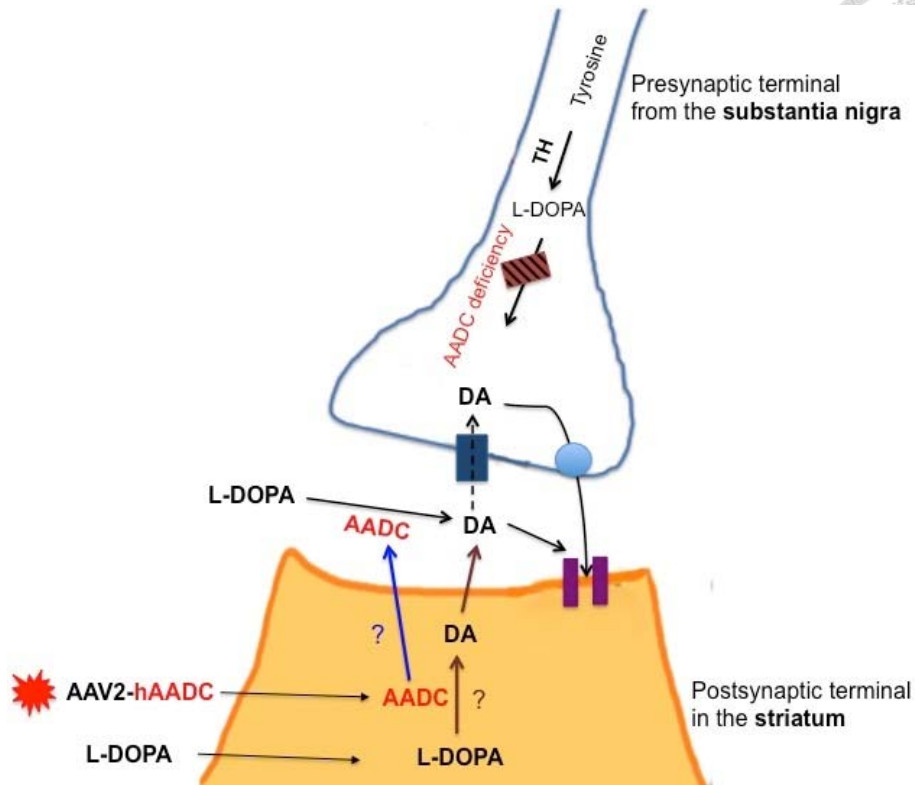
1. Weissbach, H., B.G. Redfield, and J. Axelrod, *Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin*. *Biochim Biophys Acta*, 1960. **43**: p. 352-3.
2. Mink, J.W. and W.T. Thach, *Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior*. *Curr Opin Neurobiol*, 1993. **3**(6): p. 950-7.
3. Koella, W.P., A. Feldstein, and J.S. Czikman, *The effect of para-chlorophenylalanine on the sleep of cats*. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1968. **25**(5): p. 481-90.
4. Ichinose, H., et al., *Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **164**(3): p. 1024-30.
5. Burkhard, P., et al., *Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase*. *Nat Struct Biol*, 2001. **8**(11): p. 963-7.
6. Clayton, P.T., *B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency*. *J Inherit Metab Dis*, 2006. **29**(2-3): p. 317-26.
7. Lovenberg, W., H. Weissbach, and S. Udenfriend, *Aromatic L-amino acid decarboxylase*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 89-93.
8. Hokfelt, T., K. Fuxe, and M. Goldstein, *Immunohistochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase (DOPA decarboxylase) in central dopamine and 5-hydroxytryptamine nerve cell bodies of the rat*. *Brain Res*, 1973. **53**(1): p. 175-80.
9. Azmitia, E.C. and M. Segal, *An autoradiographic analysis of the differential*

- 
- ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat.* J Comp Neurol, 1978. **179**(3): p. 641-67.
10. Kitahama, K., et al., *Aromatic L-amino acid decarboxylase-immunoreactive structures in human midbrain, pons, and medulla.* J Chem Neuroanat, 2009. **38**(2): p. 130-40.
 11. Tison, F., et al., *The metabolism of exogenous L-dopa in the brain: an immunohistochemical study of its conversion to dopamine in non-catecholaminergic cells of the rat brain.* J Neural Transm Park Dis Dement Sect, 1991. **3**(1): p. 27-39.
 12. Hyland, K. and P.T. Clayton, *Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins.* J Inherit Metab Dis, 1990. **13**(3): p. 301-4.
 13. Brun, L., et al., *Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency.* Neurology, 2010. **75**(1): p. 64-71.
 14. Nonogaki, K., *New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism.* Diabetologia, 2000. **43**(5): p. 533-49.
 15. Lee, N.C., et al., *Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency.* Neurobiol Dis, 2013. **52**: p. 177-90.
 16. Allen, G.F.G., *The neurochemical consequences of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency.* . Doctoral thesis, UCL (University College London). 2011.
 17. Bankiewicz, K.S., et al., *Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach.* Exp Neurol, 2000. **164**(1): p. 2-14.

- 
18. Coune, P.G., B.L. Schneider, and P. Aebischer, *Parkinson's disease: gene therapies*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a009431.
 19. Muramatsu, S., et al., *A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease*. Mol Ther, 2010. **18**(9): p. 1731-5.
 20. Doroudchi, M.M., et al., *Adeno-associated virus-mediated gene transfer of human aromatic L-amino acid decarboxylase protects mixed striatal primary cultures from L-DOPA toxicity*. J Neurochem, 2005. **93**(3): p. 634-40.
 21. Hwu, W.L., et al., *Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency*. Sci Transl Med, 2012. **4**(134): p. 134ra61.
 22. Sanchez-Pernaute, R., et al., *Functional effect of adeno-associated virus mediated gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase into the striatum of 6-OHDA-lesioned rats*. Mol Ther, 2001. **4**(4): p. 324-30.
 23. Peter, D., et al., *Differential expression of two vesicular monoamine transporters*. J Neurosci, 1995. **15**(9): p. 6179-88.
 24. Frade, J., et al., *Glutamate induces release of glutathione from cultured rat astrocytes--a possible neuroprotective mechanism?* J Neurochem, 2008. **105**(4): p. 1144-52.
 25. Tremblay, R.G., et al., *Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons*. J Neurosci Methods, 2010. **186**(1): p. 60-7.
 26. Guo, H., et al., *Brefeldin A-mediated apoptosis requires the activation of caspases and is inhibited by Bcl-2*. Exp Cell Res, 1998. **245**(1): p. 57-68.
 27. Booth, A.M., et al., *Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane*. J Cell Biol, 2006. **172**(6): p. 923-35.
 28. Bobrie, A., et al., *Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1659-68.

29. Penrod, R.D., et al., *An embryonic culture system for the investigation of striatal medium spiny neuron dendritic spine development and plasticity*. *J Neurosci Methods*, 2011. **200**(1): p. 1-13.



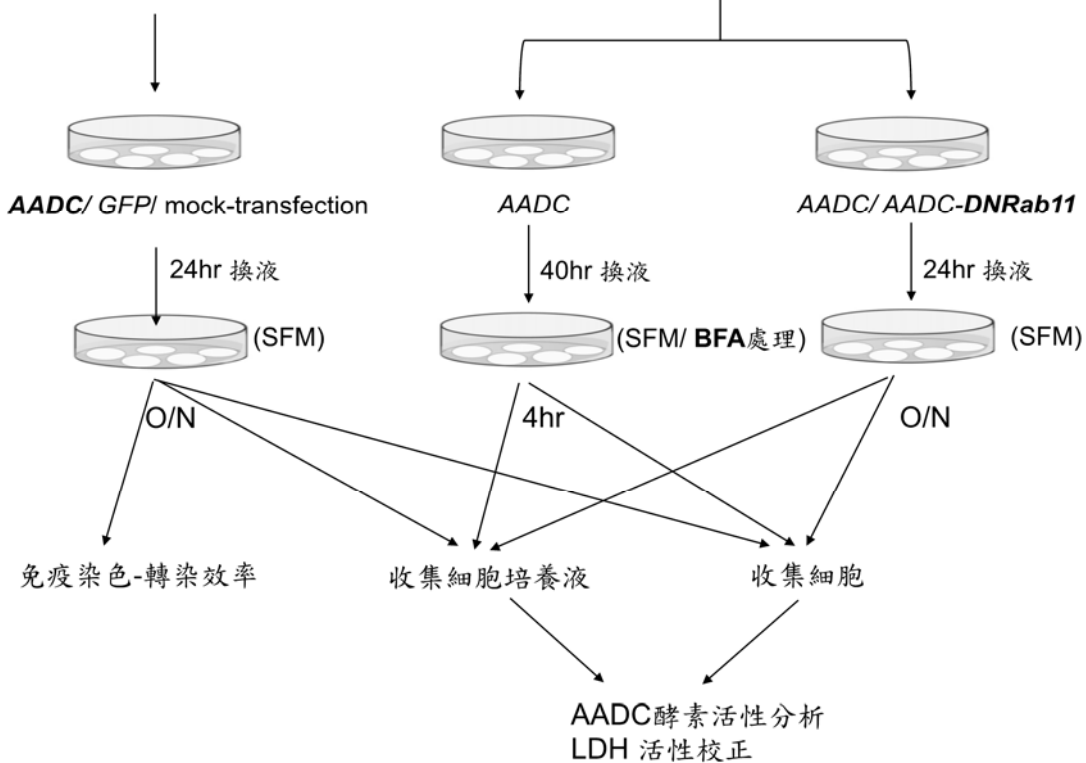


圖一、探討 AADC 缺乏症之基因治療的細胞機轉假說示意圖

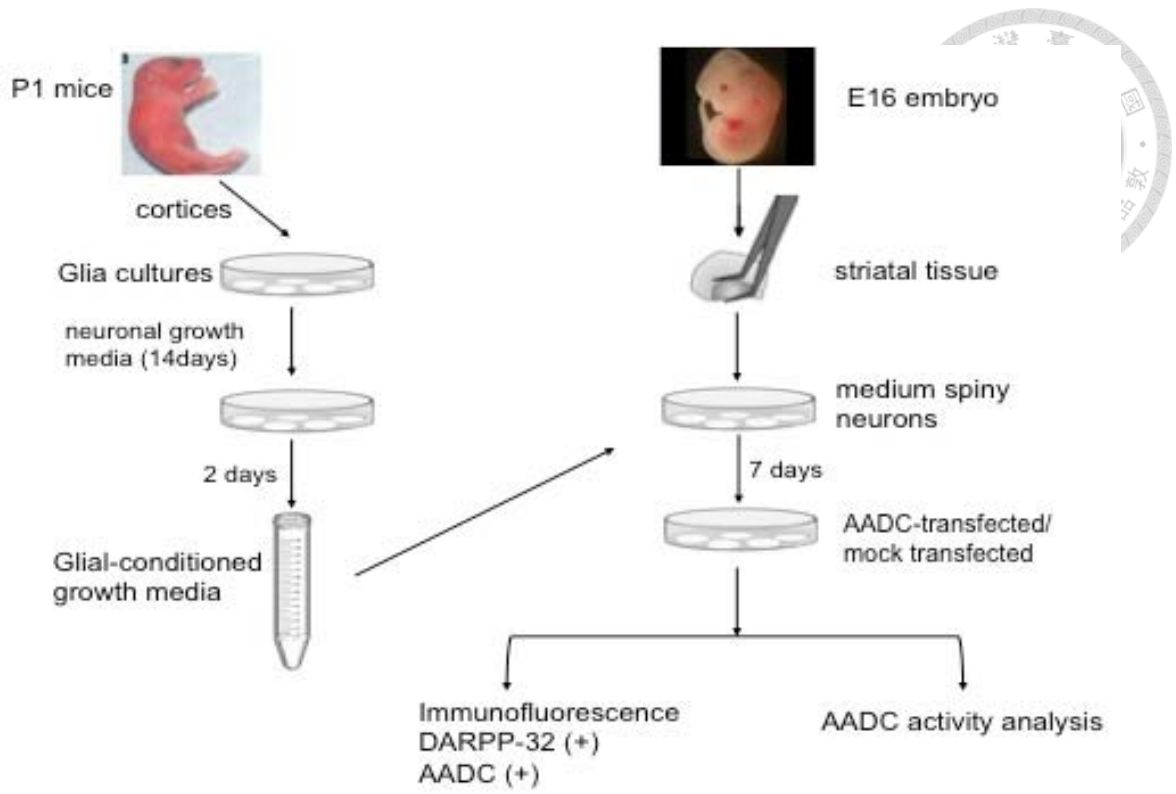
AADC 缺乏症的基因治療是將基因送入紋狀體殼核的位置（突觸後神經元，postsynaptic neuron）；而位於紋狀體的中型棘神經元應無法將異位性合成的多巴胺儲存在囊泡中，是如何能改善此突觸後神經元 (postsynaptic neuron) 的活性，其細胞機轉目前還不清楚。因此我們分別培養神經母細胞瘤 (N2a) 和體外培養中型棘神經細胞 (Medium spiny neurons) 及多巴胺能細胞 (dopaminergic neuron) 以進行三個階段的實驗，想藉此探討此基因治療的細胞機轉，假設細胞在轉入 AADC 基因後，生成的 AADC 酵素可以被釋放出來（藍色箭頭），則可與胞外的 L-DOPA 反應生成多巴胺進而維持長時間效應；若此假說成立，則在收集的細胞培養液中便可以測得 AADC 酵素的活性。反之，假設 AADC 會被儲存在細胞內（咖啡色箭頭），則可推測 L-DOPA 將進入細胞與之反應合成多巴胺，再釋放到細胞外；若此假說成立，我們將無法從其細胞培養液中測得 AADC 酵素活性，因為 AADC 酵素不會被釋放到細胞外。

假說一、AADC可分泌到細胞外？

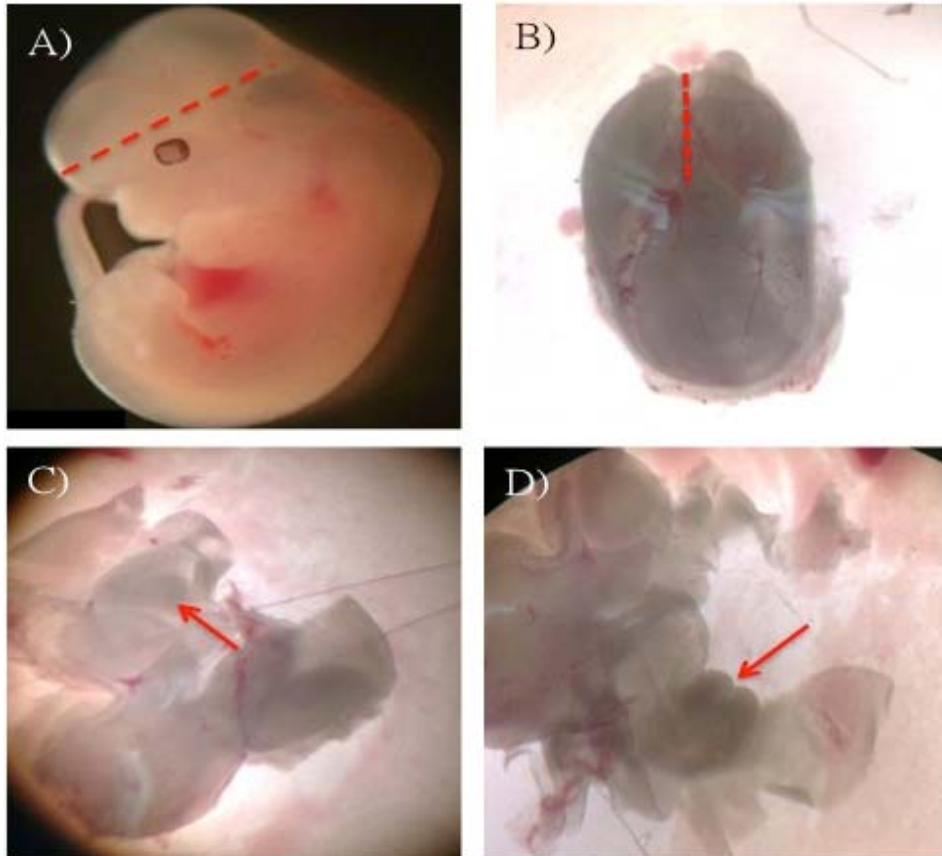
假說二、探討AADC的釋放機制？



圖二、N2a 細胞實驗流程

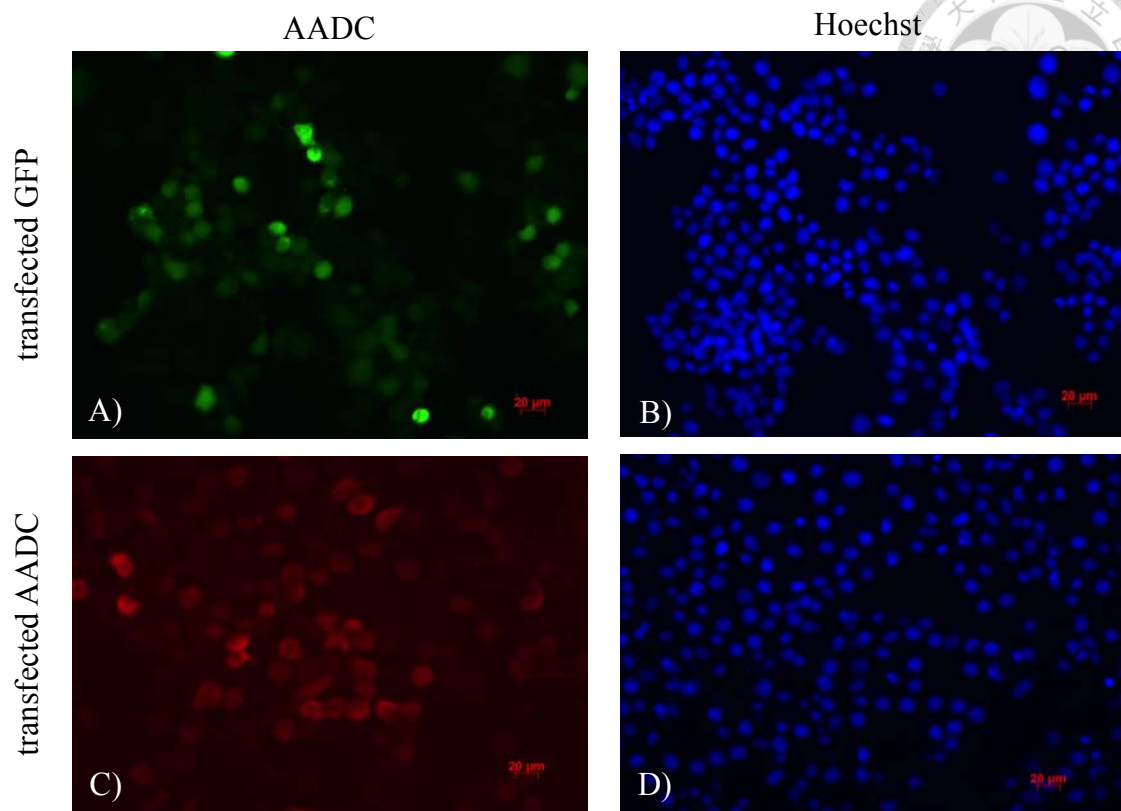


圖三、中型棘神經細胞實驗流程



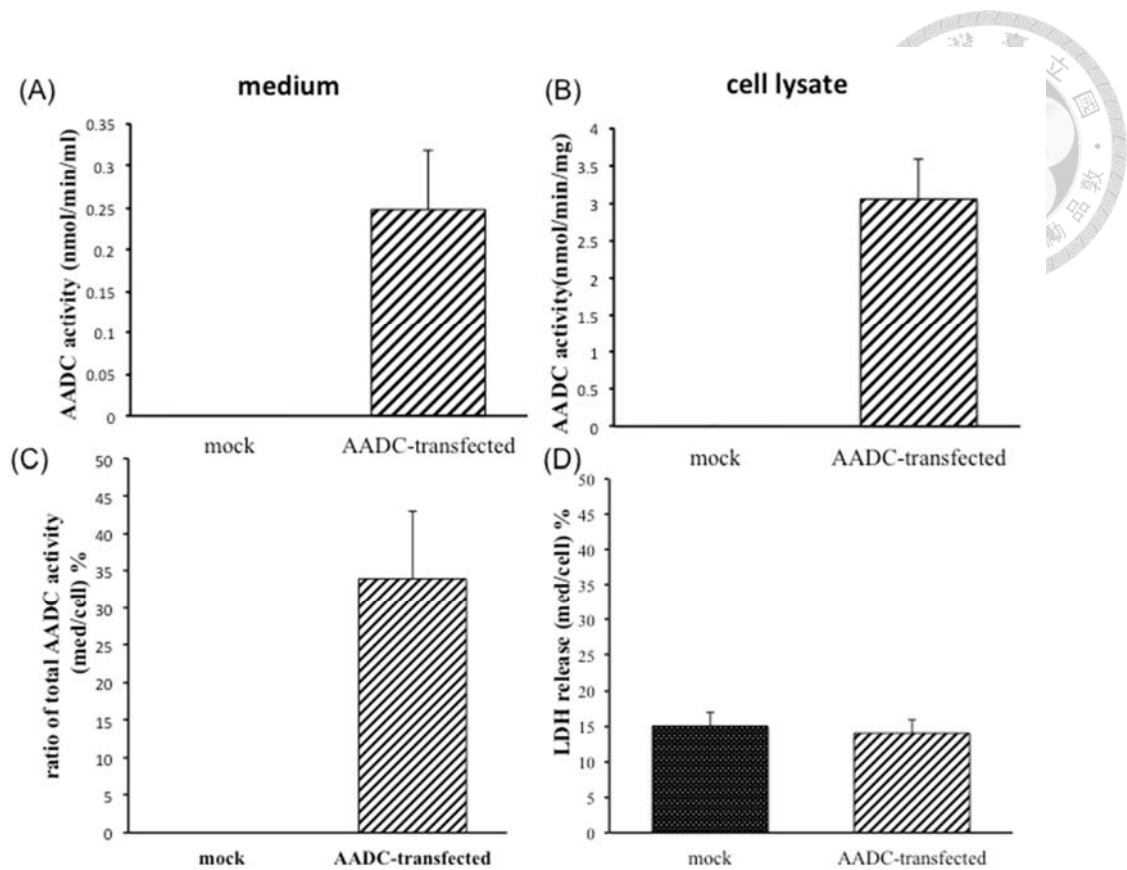
圖四、體外培養中型棘神經元 (medium spiny neurons *in vitro*)-紋狀體解剖圖

中型棘神經元(MSNs)是紋狀體內主要的信息整合和傳出神經元，佔所有神經元的 95%；其細胞體大小中等，有複雜的樹突結構及高密度的樹突棘，可以接收 glutamatergic 和 dopaminergic 的傳入。我們嘗試於體外培養 MSN 以進行 AADC 轉染及後續 AADC 活性分析實驗。從懷孕 16 天之小鼠子宮內取出胎鼠 (E16)，以 CMF-HBSS 洗淨後，在解剖顯微鏡下，由胎鼠眼睛至腦幹連成一線 (如圖 A 之紅線)，將腦部切下。小心將腦殼、腦膜移除，解剖大腦半球。用一支鑷子抵住大腦中央線 (圖 B)，另一支鑷子將前額葉皮層 (圖 C 左側顏色較淺處) 往外側掀起，可見較深色的紋狀體 (圖 C 紅色箭頭)，再將剩下的皮層攤開以暴露出紋狀體，小心地以鑷子夾起 (圖 D 紅色箭頭處) 收集至裝有 CMF-HBSS 的離心管中待其沈降 (冰上) 後，以 0.25% trypsin 消化。



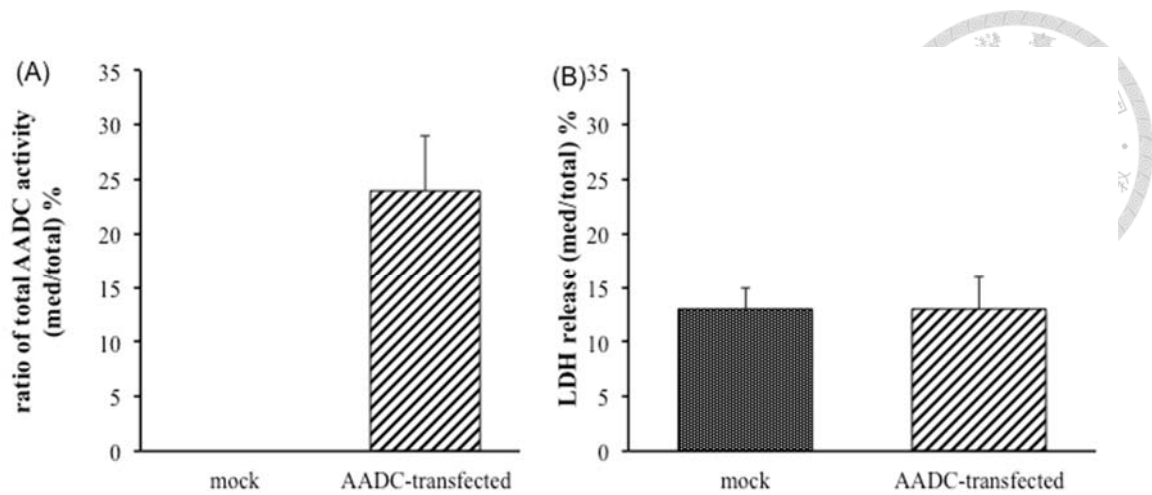
圖五、N2a 細胞在轉染 AADC 基因後可以表現 AADC

N2a 細胞分別轉染 *GFP* (圖 A 和 B) 和 *AADC* 基因 (圖 C 和 D)，並於轉染 24 小時後更換為無血清之培養液，繼續培養至隔夜後固定細胞，進行轉染效率的分析。轉染綠色螢光蛋白基因的 N2a 細胞直接在直立式顯微鏡下觀察其轉染效率約有五成 (圖 A, 綠色螢光)；而轉染 *AADC* 基因這組 N2a 細胞，經細胞免疫染色後同樣可以觀察到約有五成的轉染效率 (圖 C, 紅色螢光)。圖 B 和 D 為圖 A 和 C 分別以 Hoechst 抗體標示細胞核，以便估算轉染效率。而 mock-transfection 的 N2a 細胞對照組其 AADC 抗原—抗體反應亦呈陰性 (圖未顯示)。結果顯示此脂質體轉染法可以成功地將 *AADC* 基因送入細胞內，並可有 AADC 抗原的表現。(圖 A~D 拍攝倍率為 200 倍)。



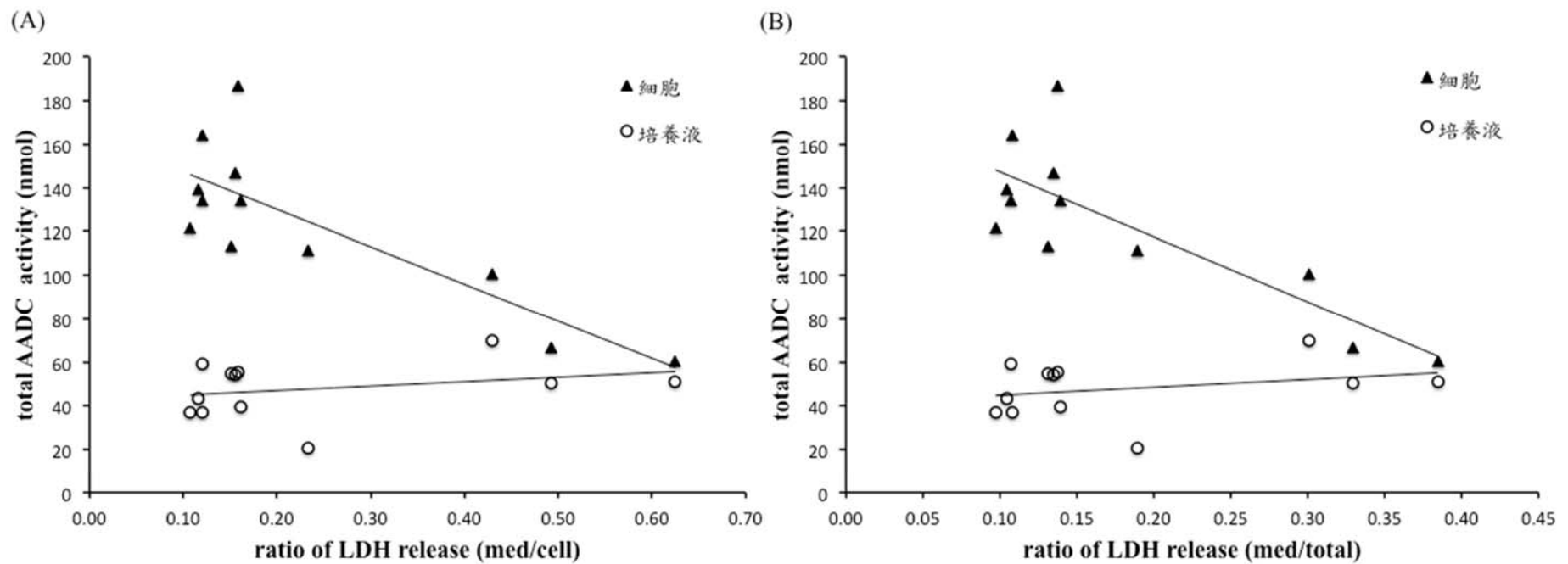
圖六、AADC-transfected N2a 細胞及細胞培養液之 AADC 活性及 LDH 活性分析(方法一，med/cell)

在 AADC 酵素活性分析結果中，AADC—transfected N2a 的細胞培養液(圖 A, n=8)及細胞(圖 B, n=8)中皆可測得顯著的 AADC 活性，其活性分別為培養液 0.264 ± 0.05 nmol/min/ml 及細胞 3.12 ± 0.53 nmol/min/mg，結果顯示無論是在細胞外或內皆有 AADC 酵素存在。圖 C 為以方法一計算釋出的 AADC 活性百分比(培養液的 AADC 活性/細胞的 AADC 活性)，細胞外(培養液)的 AADC 活性佔細胞內(細胞)總 AADC 活性的 $34 \pm 9\%$ (n=8)。而 mock-transfected N2a 細胞，如預期地並沒有測得 AADC 活性，顯示表現 AADC 的 N2a 細胞可能會將部分的 AADC 釋放至細胞外，但大部分的 AADC 酵素仍會被儲存在細胞中。圖 D 為以方法一計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞之 LDH 釋放百分比為 $14 \pm 2\%$ (n=8)，和對照組(mock-transfected) $15 \pm 2\%$ (n=8)兩者間並無顯著差異(p=0.289, by T.Test)。



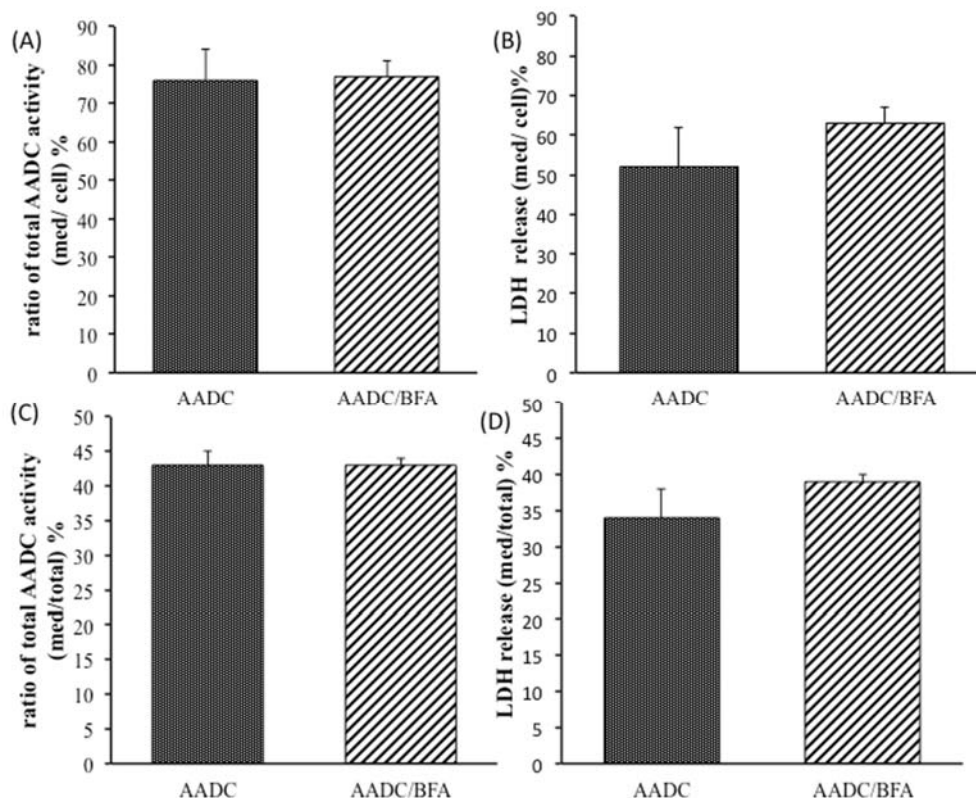
圖七、AADC-transfected N2a 細胞及細胞培養液之 AADC 活性及 LDH 活性分析(方法二，med/ total)

圖 A 為以方法二計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞釋出的 AADC 活性百分比(培養液的 AADC 活性/總 AADC 活性)，細胞外(培養液)的 AADC 活性佔總 AADC 活性(細胞和培養液)的 $25 \pm 5\%$ ($n=8$)。圖 B 為以方法二計算 AADC-transfected 的 N2a 細胞之 LDH 釋放百分比為 $13 \pm 1\%$ ($n=8$)，和對照組(mock-transfected) $12 \pm 2\%$ ($n=8$) 兩者間並無顯著差異($p=0.286$, by T.Test)。兩種計算方式 AADC-transfected 的 N2a 細胞釋出細胞外的 AADC 活性，測得結果之活性 34% (圖 C) 或 25% (圖 A) 都遠大於細胞死亡率 14% (圖 D) 或 12% (圖 B)，因此我們認為 AADC 酵素是有可能被釋放到細胞外的，但大部分的 AADC 酵素仍會被儲存在細胞中。



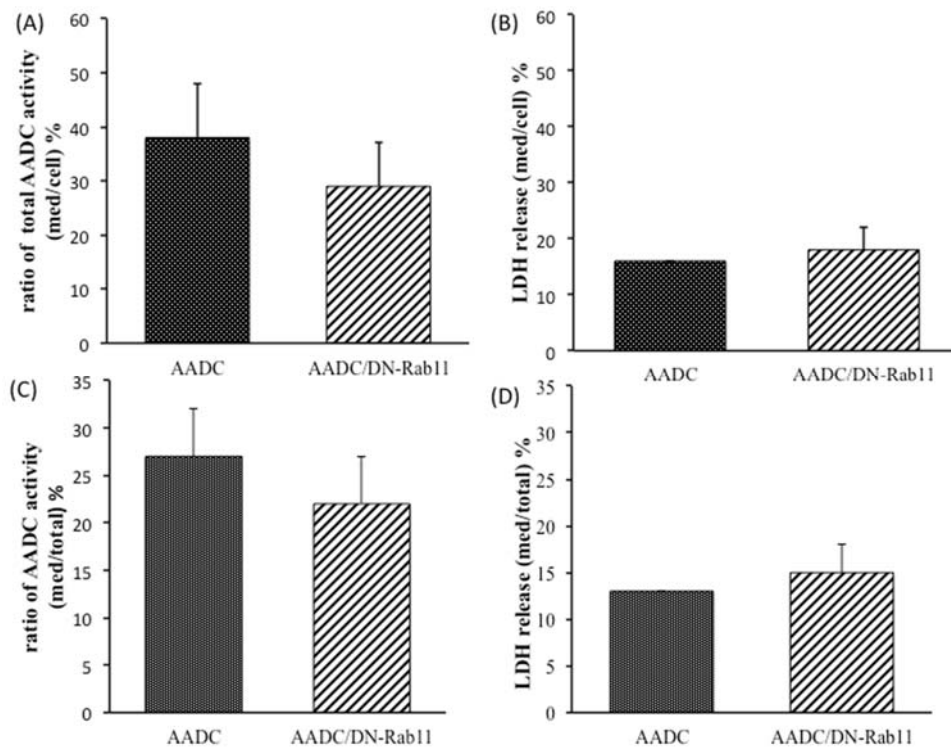
圖八、AADC 酵素活性與細胞受損率的關係

針對轉染 AADC 的細胞進行細胞內外測得之 AADC 活性與其細胞受損率關係的比較 (n=12)，圖 A 為以方法一計算 LDH 釋放率 (細胞受損率) 並和其 AADC 活性做比較，結果顯示當細胞受損率上昇時，其細胞內測得之 AADC 活性減少 (三角形標示)，但對應其培養液所測得的 AADC 活性並沒有減少 (圓形)；而以方法二計算 LDH 釋放率 (圖 B)，也可觀察到相同的結果，這表示培養液中測得的 AADC 活性應是由細胞所釋放出去的。



圖九、以 BFA 處理 AADC-transfected N2a 細胞無法阻斷 AADC 的釋出

Brefeldin A (BFA) 為一種可阻斷蛋白質運送的抑制劑，使蛋白質的分泌在早期的分泌路徑中被抑制。若細胞經處理後 AADC 的分泌受到抑制，則可說明 AADC 為一個走典型分泌路徑的蛋白。分別以方法一 (med/cell, 圖 A) 及方法二 (med/total, 圖 C) 計算未經處理組釋放到細胞外 AADC 活性的百分比分別為 $76 \pm 8\%$ 或 $43 \pm 2\%$ ，經 BFA 處理組為 $77 \pm 4\%$ 或 $43 \pm 1\%$ ，兩種計算方式對其結果皆無顯著差異 ($p=0.88$ ； $p=0.859$ ， $n=3$)。分別以方法一 (med/cell, 圖 B) 及方法二 (med/total, 圖 D) 計算未處理組之 AADC-transfected 的 N2a 細胞 LDH 釋放百分比分別為 $52 \pm 10\%$ 或 $34 \pm 4\%$ 和經 BFA 處理組 $63 \pm 4\%$ 或 $39 \pm 1\%$ ，經 BFA 處理的 LDH 釋放百分比雖有小幅增加但亦無顯著差異 ($p=0.13$ ； $p=0.128$ ； $n=3$)。以上數據顯示在細胞受損率情況相似下，經 BFA 處理與未經處理的細胞釋放出細胞外的 AADC 活性在兩者間並未有顯著差異，因此推測 BFA 沒有如預期的去抑制 AADC 的分泌，可能是因為 AADC 酵素並非依循傳統的蛋白分泌路徑釋放出細胞外。



圖十、轉染顯性失活的 Rab11 (dominant-negative Rab11, DN-Rab11) 探討 AADC 釋放機制

Rab 11 在神經元中可以調節神經傳導物質的釋放，將蛋白質從回收的核內體運送到細胞膜，因此將 Rab11 顯性失活的突變體 (*DN-Rab11*) 和 *AADC* 基因一同轉染至 N2a 細胞內，若釋出的 AADC 酵素活性受到抑制，則證明 AADC 酵素的運送與 Rab11 有關。分別以方法一 (med/cell, 圖 A) 和方法二 (med/total, 圖 C) 計算釋放到細胞外的 AADC 活性百分比，僅轉染 *AADC* 組為 38±10% 或 27±5%，轉染 *AADC-DNRab11* 組為 29±8% 或 22±5%，兩種計算法下兩組間皆無顯著差異 ($p=0.25$; $p=0.25$, by T.TEST)。分別以方法一 (med/cell, 圖 B) 及方法二 (med/total, 圖 D) 計算 *AADC-transfected* 的 N2a 細胞 LDH 釋放百分比，僅轉染 *AADC* 組為 16% 或 13%，轉染 *AADC-DNRab11* 組為 18±4% 或 15±3%。經轉染 *AADC-DNRab11* 的細胞受損率雖有小幅增加但亦無顯著差異 ($p=0.38$; $p=0.38$ by T.TEST)。以上數據顯示在細胞受損率沒有顯著差異的情況下，經轉染 *AADC-DNRab11* 組與僅轉染 *AADC* 組細胞釋放出細胞外的 AADC 活性比相差約 9% (方法一) 或 5% (方法二)，但在本實驗中有些樣品數值差異較大且樣本數少，在統計上兩者間並未有顯著差異，因此就以上數據轉染 *DN-Rab11* 在統計上並沒有減少 AADC 的釋放，可能是因為 AADC 的分泌並非由 Rab11 所調控。

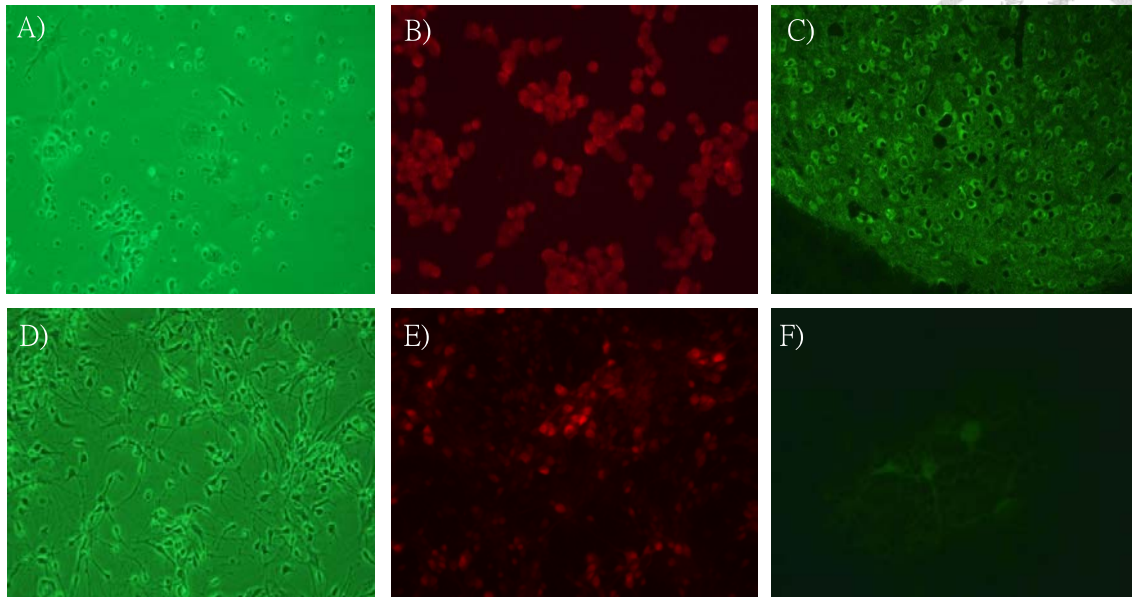


圖 十一、中型棘神經細胞初代培養及免疫染色

先以神經細胞生長培養液培養神經膠質細胞 (glia cell)，這些細胞會分泌增強神經細胞存活及發展的因子，培養 48 小時後收集其條件培養液 (GCM) 供給中型棘神經元。圖 A 可見在以非條件培養液培養細胞時，大多數細胞無法貼附，且細胞形態不完整；而以 GCM 培養七天後的細胞存活率明顯增加，且形態也較完整（如圖 D）。培養七天後進行細胞免疫染色，NeuN 是一種神經元細胞核抗原，其表現的位置主要是在細胞核為主，但在少數也會在細胞質中表現；圖 B 為 N2a 細胞呈 NeuN 陽性（陽性對照組，紅色螢光，200X）；圖 E 為初代培養的細胞，其 NeuN 抗體呈陽性反應的占 50% 以上（紅色螢光，200X）。DARPP-32 為 MSN 細胞中富含的一種胞漿蛋白，故在此用來計算 MSN 細胞所占的比例；圖 C 為小鼠大腦 caudate putamen 切片，作為 DARPP-32 的陽性對照組（綠色螢光，200X），圖 F 為初代培養的 MSN 細胞，其呈陽性反應的僅有 1~2%（綠色螢光，400X）。

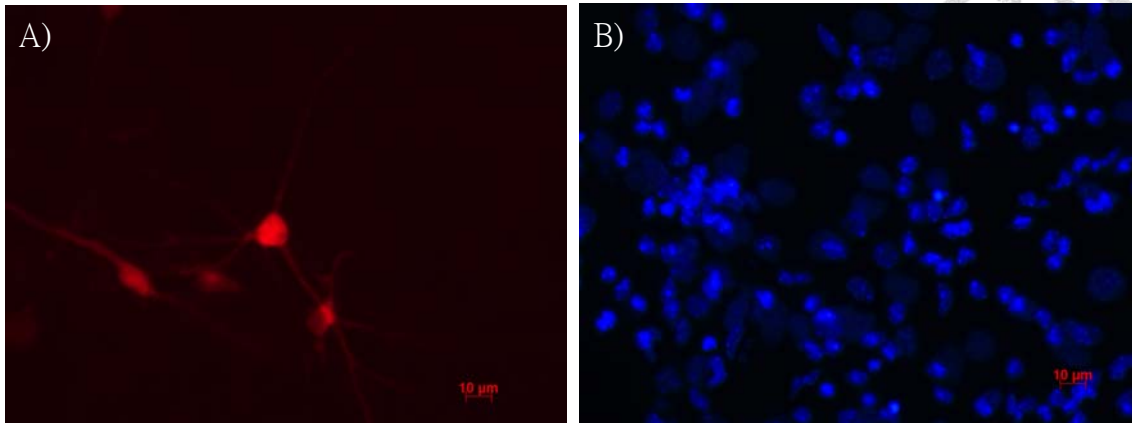
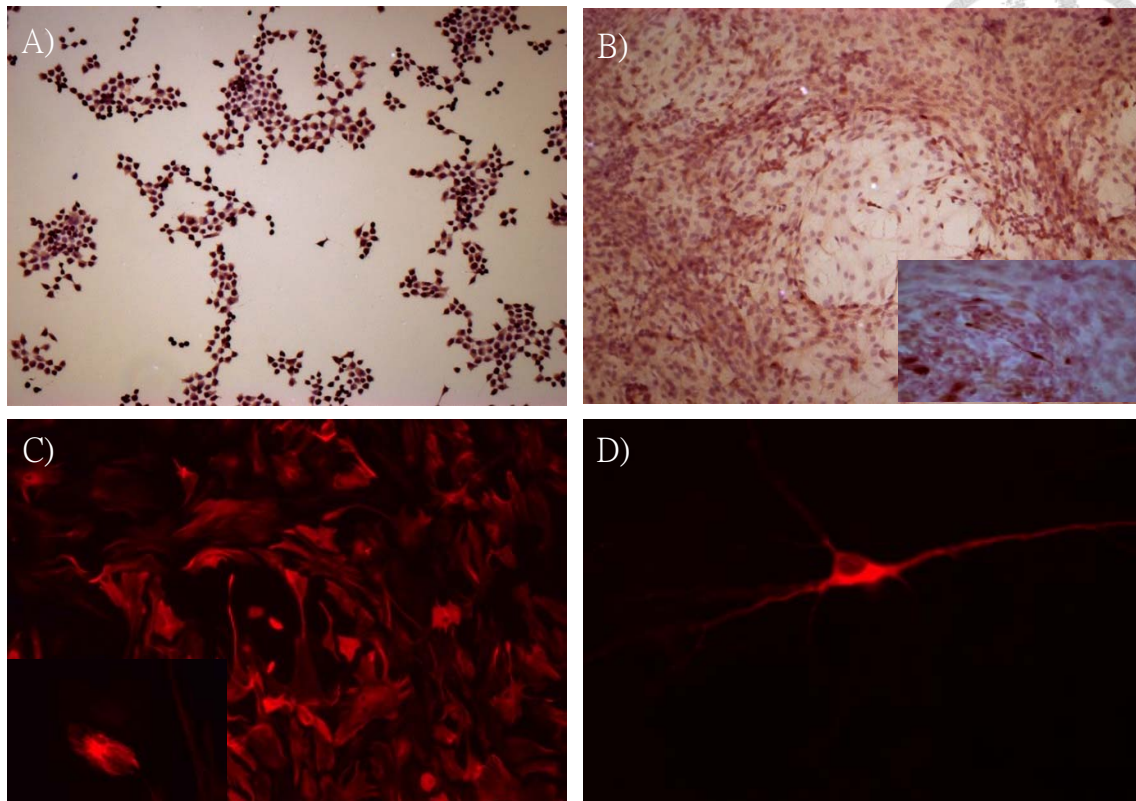


圖 十二、初代培養之神經細胞轉染 AADC 及免疫染色

對培養第七天的 MSN 細胞進行轉染 AADC，48 小時後固定細胞進行 AADC 抗體免疫染色，圖 B 為以 Hoechst 染細胞核（藍色螢光, 400X）用來估算轉染率，圖 A 顯示轉染效率不到 1%（紅色螢光, 400X）。同時我們也分別收集 AADC-transfected 之細胞培養液及細胞，以 HPLC 進行 AADC 活性分析，結果其 AADC 活性皆無法被 HPLC 測得。



圖十三、多巴胺能神經細胞初代培養

培養野生型小鼠的多巴胺能神經元，並進行細胞免疫染色。圖 A 為以 N2a 細胞作為 NeuN 抗體反應的陽性對照組（化學免疫染色，100X），圖 B 為培養的初代神經細胞其 NeuN 抗體反應呈陽性的細胞約占五成（化學免疫染色，100X），右下方縮圖為以 200X 拍攝。圖 D 為一個 TH 抗體反應呈陽性的初代培養細胞（紅色螢光，400X），陽性比率小於一成，顯示僅有少數為多巴胺能神經細胞。圖 C 為培養初代神經細胞之 GFAP 抗體反應結果陽性大於五成（紅色螢光，200X），左下方縮圖為以 400X 拍攝，結果顯示培養的細胞仍有多數細胞為星形膠質細胞。