

中國醫藥大學
臨床醫學研究所
碩士學位論文

Resistin 能抵抗 6-hydroxydopamine
引起的細胞死亡

Resistin Protects Against 6-hydroxydopamine-induced Cell Death
In A Model of Parkinson's Disease

指導教授：許弘昌 博士

共同指導教授：盧大宇 博士

研究生：陳家鴻

中華民國一〇〇年七月

中文摘要

研究目的

抵抗素 (Resistin) 是一種脂肪激素，同時它也是一種與食物攝取和能量平衡有關的蛋白質，稱為 ingestive peptides，最初它被認為與第二型糖尿病有關，在老鼠主要由白色脂肪組織產生，但在人類的主要來源是巨噬細胞。一般來說脂肪激素都與能量平衡有關，但 resistin 在人體的功能目前還不是很清楚。其他 ingestive peptides，例如 ghrelin，adiponectin 及 leptin，已被證明具神經保護作用，但 resistin 是否一樣有神經保護的作用，至今仍無相關的研究提出證明。本實驗的目的主要是觀察 resistin 是否也具有神經保護的作用。

研究方法

我們選擇 dopaminergic 神經元細胞株(MES23.5)作為本實驗的材料，以神經毒素 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 用來引發細胞毒性。我們用 MTT，SRB 和 LDH 的細胞存活率分析法來確認 6-OHDA 的細胞毒性，然後利用 Hoechst 染色法觀察細胞的形態變化，接著利用流式細胞儀雙染分析法 (PI 及 annexin V) 檢測細胞死亡的模式。下一步我們利用 DCFH-DA 分析法檢測活性氧化物 (ROS) 的產生量，並利用 Rhodamine 123(Rh123)染色觀察線粒體膜電位的變化。接著我們測量細胞在加入 6-OHDA 後，參與細胞凋亡作用的蛋白質之表現

量。最後我們觀察細胞保護蛋白質 HSP73，HO-1 和 Bcl-2 在加入 resistin 之後的表現量，並對其與細胞存活的關係進行了研究。

研究結果

MTT, SRB 和 LDH 分析法證實了 6-OHDA 的細胞毒性，而 Hoechst 染色法及流式細胞儀雙染分析法皆顯示出，加入 6-OHDA 後會引發細胞凋亡，而 resistin 的前處理則會抑制這一現象。DCFH-DA 分析法觀察到，細胞在加入 6-OHDA 後 ROS 的生成量會增加，而 resistin 的前處理則會抑制這一現象。Rh123 染色法則顯示，細胞在加入 6-OHDA 後粒線體膜電位會下降，而 resistin 的前處理則會抑制這一現象。在與細胞凋亡相關的蛋白質表現量方面，加入 6-OHDA 後 Bcl-2 會下降，而 resistin 的前處理則會抑制這一現象。另一方面，Bax 和 PARP-1/2 和 cleaved caspase-3 則顯示相反的結果。HSP73，HO-1 和 Bcl-2 的表現量在加入 resistin 呈現增加的結果，但如果經過 HSP73 和 HO-1 抑制劑的處理，細胞存活率在加入 resistin 後並沒有增加。

研究結論

根據上述結果，我們可以得到實驗的結論。Resistin 對於 6-OHDA 所引起的細胞毒性有神經保護的作用，而且是經由對抗細胞凋亡的機制。將細胞經過 resistin 前處理，能降低 ROS 的產生和恢復粒線體膜

電位。本實驗結果也發現，HSP73 和 HO-1 為 resistin 的神經保護作用所必需的蛋白質，由此推論此兩種內生性蛋白質具有神經保護的作用，而其潛在的作用機制和臨床應用則需要進一步的研究。

關鍵字：抵抗素，神經保護，抗細胞凋亡，抗氧化



Abstract

Introduction

Resistin is one of the adipokines families, and it is also one of the peptides responsible for food intake and energy balance called ingestive peptides. Initially it was thought to be associated with type 2 DM. In rodent it was produced mainly by white adipose tissue, but in human the major source is from macrophage. Generally adipokines are related to energy balance, but the function of resistin in human is not fully elucidated. Other ingestive peptides, e.g. ghrelin, adiponectin and leptin, had been proved to be neuroprotective, but so far there is no convincing evidence about resistin being neuroprotective. This study was set to investigate whether resistin also exert neuroprotective effect.

Methods

A dopaminergic neuron cell line called MES 23.5 was used for this *in vitro* study. The neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was used to induce cytotoxicity. We used MTT, SRB and LDH assays to confirm the cytotoxicity of 6-OHDA, then Hoechst stain of nuclear extract was applied to observe the morphological change. Flow cytometry with propidium iodide (PI) and annexin V was performed to evaluate the pattern of cell death. Next reactive oxygen species (ROS) production was measured by 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) assay, and mitochondrial membrane potential was observed by rhodamine 123 (Rh123) staining. Various proteins involved in apoptosis were checked for their expression after addition of 6-OHDA to neuron cell. Finally

HSP73, HO-1 and Bcl-2 expression and their relationship to cell survival were examined.

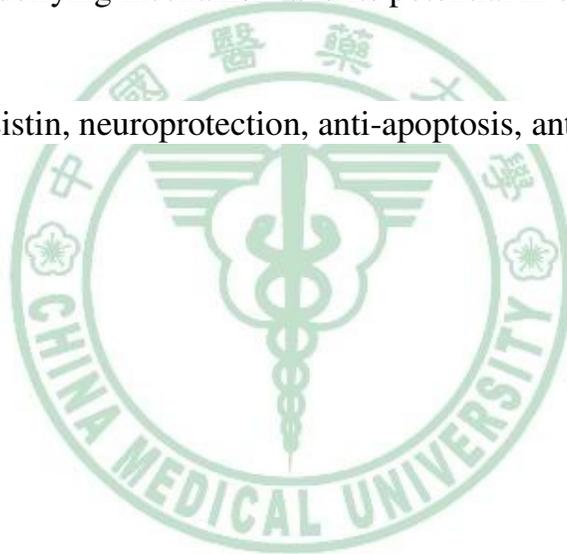
Results

MTT, SRB and LDH assays confirmed the cytotoxicity of 6-OHDA and found that it had a dose-dependent cytotoxic effect. Under phase contrast microscopy, most of the 6-OHDA-treated neurons cell lost their neurites, but the number decreased after resistin treatment. Hoechst stain of nuclear extract revealed that 6-OHDA-treated nucleus became condensed and fragmented, which are features compatible with apoptosis. Flow cytometry with propidium iodide (PI) and annexin V revealed that after 6-OHDA treatment the distribution of cells shifted to late apoptosis. Pretreatment of resistin reversed this phenomenon. DCFH-DA assay disclosed that addition of 6-OHDA to neuron cell increased ROS production, but resistin pretreatment reversed this result. Rh123 staining revealed treatment of 6-OHDA decreased mitochondrial membrane potential, but resistin pretreatment reversed this phenomenon. The amount of Bcl-2 decreased after 6-OHDA treatment, but resistin treatment reversed this phenomenon. On the other hand, Bax, PARP-1/2 and cleaved caspase-3 showed opposite results compared with Bcl-2. HSP73, HO-1 and Bcl-2 actually increased in amount after addition of resistin, but after addition of HSP73 and HO-1 inhibitors, the level of cell viability did not return in the condition of resistin treatment after 6-OHDA addition.

Conclusion

According to above findings, some preliminary conclusions can be made. Resistin exerts neuroprotective effect on dopaminergic neuronal cell via anti-apoptosis mechanism. Pretreatment of resistin decreases ROS production and restored mitochondrial membrane potential, which were resulted from 6-OHDA addition. HSP73 and HO-1(HSP32), two well known neuroprotective proteins, are necessary for this neuroprotective effect of resistin. Further investigation is needed to fully discover the underlying mechanism and its potential in clinical practice.

Key words: resistin, neuroprotection, anti-apoptosis, anti-oxidation



誌謝

仲夏濡暑的一個夜晚，終於完成論文的寫作，畫下句點。學海無涯，雖然離開校園多年，再重拾書本略顯生疏，但經過兩年的淬鍊，總算有些許成果出來。當初因為家庭因素的考量，離開待了 13 年的花蓮，來到中台灣落腳後，有感於現代醫學的進步及個人學識的不足，因而起念報考碩士班。如今畢業在即，回想兩年前的此刻，還在為能考進碩士班興奮不已，殊不知此後兩年將辛苦度過，在臨床工作與學校及實驗室間奔波。

能夠完成碩士班的學業，首先我要感謝盧大宇老師及許弘昌老師，在學習過程遇到瓶頸時，傳授本身所知，解決我的問題。我還要感謝黃思銘學長，在我剛踏入中國還對未來茫茫然時，適時給我忠告。我也要感謝臨醫所的藍先元所長及所上的諸位老師，在論文討論時不吝給我卓見。最後我要感謝賢妻雅雯，有妳的支持，我才能無後顧之憂的專心在學業及工作上。

陳家鴻 謹誌於 中國醫藥大學 臨床醫學研究所

中華民國一百年七月

目錄

	頁次
中文摘要	I
Abstract	IV
誌謝	VII
目錄	VIII
圖表目錄	XII
第一章 前言	1
第一節 研究背景	1
一、神經退化疾病之簡介	1
二、6-hydroxydopamine 神經毒性模型	1
三、肥胖與脂肪激素	2
四、脂肪激素與神經保護之關係	3
五、Resistin之簡介及其作用	3
六、細胞凋亡之簡介	4
七、Poly (ADP-ribose) polymerase-1 和細胞凋亡	5
八、與細胞保護有關之蛋白質	6
1. Bcl-2	6
2. Heat shock protein 73	6
3. Heme oxygenase-1	6

第二節 研究目的	7
第二章 研究方法	13
第一節 研究材料	13
一、細胞株	13
二、藥品試劑	13
第二節 研究設計	14
一、實驗架構	14
(一) 以細胞存活分析法觀察 Resistin 是否具神經 保護之效果	14
(二) 探討 Resistin 神經保護作用的可能機轉	14
二、實驗方法	14
(一) 細胞培養	14
(二) 細胞存活率分析	15
MTT 分析法	15
SRB 分析法	16
LDH 分析法	16
(三) DNA 螢光染色顯微鏡觀察	17
(四) 流式細胞儀分析	18
PI 與 Annexin V-FITC 雙染分析	18

(五) 活性氧化物生成量分析	19
(六) 粒線體膜電位分析	20
(七) 西方墨點法	20
第三節 統計方法	21
第三章 研究結果	22
第一節 描述性統計分析	22
(一) 6-OHDA造成細胞死亡及存活率下降	22
(二) Resistin可減少6-OHDA所引起的細胞存活率下降	22
(三) Resistin可減少6-OHDA的細胞凋亡現象所引發	23
(四) Resistin可降低6-OHDA所引起的活性氧化物生成 量增加	24
(五) Resistin可回復6-OHDA所引起的粒線體膜電位下 降	24
(六) Resistin與細胞凋亡蛋白質的關係	24
(七) Resistin與細胞保護蛋白質的關係	25
第二節 推論性統計分析	26
第四章 討論	40
第一節 結果討論	40
一、 Ingestive peptides與脂肪激素的神經保護作用文獻	40

回顧	
二、 Resistin與細胞凋亡的結果討論	41
三、 Resistin 與細胞保護蛋白質的討論	43
四、 Resistin神經保護作用的可能機轉	45
第二節 其他相關性討論	45
第三節 研究限制	46
第五章 結論與建議	47
第一節 結論	47
第二節 建議	47
參考文獻	48



圖表目錄

	頁次
圖 1 Dopamine 與 6-OHDA 的化學結構式	8
圖 2 6-OHDA 藉著其與 dopamine 結構上的相似性經由 dopamine transporter 進入細胞	9
圖 3 人體的能量平衡與攝食行為與許多蛋白質有關	10
圖 4 Resistin 在老鼠體內的作用	11
圖 5 細胞凋亡的啟動機制	12
圖 6-1 6-OHDA 引起細胞死亡及形態上的破壞	27
圖 6-2 MES23.5 細胞經過 resistin 及 6-OHDA 處理後在 phase-contrast 顯微鏡下觀察到的變化	28
圖 6-3 Resistin 減少 6-OHDA 引起的細胞死亡	29
圖 7-1 在螢光顯微鏡下利用 Hoechst 染色觀察到的細胞外觀變化	30
圖 7-2 Annexin V 及 PI 的流式細胞儀雙染分析	31
圖 8 6-OHDA 會增加 MES23.5 細胞株的活性氧化物生成量，而將細胞前處理 resistin 會抑制此現象	32
圖 9 6-OHDA 會減少 MES23.5 細胞株的粒線體膜電位，而將細胞前處理 resistin 會抑制此現象	33

圖 10	以Western blot分析6-OHDA與resistin對於apoptosis 相關蛋白質表現量的影響	34
圖 11-1	以Western blot分析不同濃度的 resistin對於三種 細胞保護蛋白質表現量的影響	35
圖 11-2	以Western blot分析resistin 經過不同時間後對於三種 細胞保護蛋白質表現量的影響	36
圖 12-1	以 MTT 分析法分析 resistin經由heat shock protein的 表現而抑制6-OHDA所引起的細胞死亡現象	37
圖 12-2	以 SRB 分析法分析 resistin經由heat shock protein的 表現而抑制6-OHDA所引起的細胞死亡現象	38
圖 12-3	以 LDH 分析法分析 resistin經由heat shock protein的 表現而抑制6-OHDA所引起的細胞死亡現象	39

第一章 前言

第一節 研究背景

一、神經退化之簡介

隨著年齡老化，人體內許多細胞會逐漸死亡，包括神經細胞在內，而引起許多退化性疾病。在神經系統的疾病裏，神經退化疾病佔了很重要的角色，例如：Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease 等 (Ross et al. 2004)。這些神經退化疾病的特徵在於漸進式的病程以及選擇性的神經元死亡 (Lin et al. 2006)，以 PD 為例，PD 是僅次於 AD 第二常見的神經退化疾病，盛行率約為 0.3% (60 歲以上老年人盛行率為 1%)，典型的臨床表徵為震顫 (tremor)，僵硬 (rigidity) 及動作不能 (akinesia) (Lang et al. 1998)。其致病機轉為選擇性的 dopaminergic 神經細胞的死亡，主要是在黑質 (substantia nigra) (de Lau et al. 2006)，在形態學上可觀察到細胞內的蛋白質沉澱物稱為 Lewy body (Abou-Sleiman et al. 2006)。後續的研究也發現某些基因的缺損會造成 mitochondrial dysfunction 和 oxidative stress，跟 dopaminergic 神經細胞的死亡有關 (Schapira 2006)。

二、6-hydroxydopamine 神經毒性模型

6-hydroxydopamine (6-OHDA) 是一種 dopamine 的衍生物，在結構

上比 dopamine 多了一個 hydroxyl group，能夠經由 dopamine transporter 而進入神經細胞內(圖 1)。6-OHDA 被廣泛地應用在 PD 的 *in vitro* 的 dopaminergic 細胞株及 *in vivo* 的動物實驗，一旦進入細胞，6-OHDA 會促進活性氧化物的生成，並抑制粒線體的電子傳遞鏈活性(圖 2) (Schober 2004)。

三、 肥胖與脂肪激素

肥胖是已開發國家日趨嚴重的健康問題，主要特徵為脂肪組織囤積過多的脂肪酸，其引起的臨床症狀統稱為代謝症候群，包括第二型糖尿病，心血管疾病與脂肪肝等，其中第二型糖尿病與肥胖都與胰島素抗性有關 (Galic et al. 2010)。成年人的脂肪組織是白色脂肪組織，其組成包括脂肪細胞 (adipocyte)，巨噬細胞 (macrophage)，內皮細胞 (endothelial cell) 和纖維母細胞 (fibroblast) (Wozniak et al. 2009)。在 1950 年代即有學者認為在血液中存在著一種能夠調節能量平衡及食物攝取的物質 (Kennedy 1953)，但直到 1994 年，這個物質才被找到，命名為 leptin (Zhang et al. 1994)，後來發現此激素為脂肪組織所釋放，之後也陸續發現其它由脂肪組織釋放的蛋白質，故此群蛋白質統稱為脂肪激素 (adipokines) (圖 3)。目前已知的脂肪激素除了 leptin 外，還包括：adiponectin、visfatin、apelin、chemerin、tumor necrosis factor α (TNF α) 等 (Wozniak et al. 2009)。

四、 脂肪激素與神經保護之關係

脂肪激素的作用大多為調節體內能量平衡，過量的脂肪激素被認為是肥胖的成因之一 (Stryjecki et al. 2011)；然而除了能量平衡之外，目前也發現有些脂肪激素與神經系統可能有關，如 leptin 及 adiponectin 和其接受器除了由脂肪組織分泌外，也可以在大腦中發現 (Chalidakov et al. 2010)。leptin 已被證實具有神經保護的作用 (Weng et al. 2007; Tang 2008)，而 adiponectin 也在 *in vitro* 及 *in vivo* 的實驗中發現具有保護神經細胞的效果 (Jung et al. 2006; Chen et al. 2009)，此結論令許多學者更加投入關於脂肪激素和神經保護的研究。

五、 Resistin 之簡介及其作用

如我們所知，第二型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) 主要病因為胰島素抗性。長久以來肥胖與 T2DM 一直被認為有直接關係，但其中的機轉並不為人所詳知。直到 2001 年有三個不同的實驗室於老鼠體內發現同一種蛋白質，其中一個利用治療糖尿病的藥物 rosiglitazone，於老鼠的脂肪組織發現一種被 down-regulated 的蛋白質，由於當時認為此蛋白質會造成胰島素抗性，取其作用而命名為 resistin (*resistance to insulin*) (圖 4) (Steppan et al. 2001)。Resistin 是一種 12.5 kDa 的蛋白質，在老鼠雖然是由脂肪組織製造，但是在人體則發現主要是由脂肪組織周邊的巨噬細胞所產生 (McTernan et al.

2006)。Resistin 的表現量在發炎反應下會增加，但在人體的作用目前還不是非常清楚，除了肥胖與胰島素抗性外，目前已知它與許多疾病有關，如：atherosclerosis (Jung et al. 2006)，cancer (Housa et al. 2006)，rheumatic disease (Schaffler et al. 2003)，inflammatory bowel disease (Konrad et al. 2007)，chronic kidney disease (Axelsson et al. 2006)及 asthma (Larochelle et al. 2007)等。目前唯一被證明對人體有益的是 resistin 在缺血性心臟病有心肌保護的作用 (Gao et al. 2007)。

六、細胞凋亡之簡介

神經退化疾病對於神經細胞最終的影響在於造成細胞的細胞凋亡 (apoptosis)，使得細胞數目減少。細胞凋亡是 programmed cell death 的一種，它可以是人體正常的生理反應，維持體內的恆定，也可以是一種防衛機制，淘汰受傷的細胞 (Bredesen et al. 2006)。細胞凋亡是一種需耗能的過程，藉著活化一種叫做 caspases (Cysteine aspartate protease) 的蛋白酶，將死亡訊號往下游傳去，最後破壞 DNA，造成細胞死亡。傳統上細胞凋亡分成外路徑及內路徑，經由不同的機制啟動。在外路徑，外來的死亡訊號與細胞膜上的死亡受器結合，並與 adaptor protein 結合，形成 death-inducing signal complex，活化 procaspase 8/procaspase 10 成為 caspase 8/caspase 10。內路徑則是因為細胞受到如放射線或缺氧等傷害而引發，造成粒線體外膜通透性增加

而釋放出 cytochrome c，與 procaspase 9 及 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) 形成 apoptosome。內路徑與外路徑最後皆走向一共同的執行路徑，活化 procaspase 3 成為 caspase 3，再活化其受質，造成細胞形態及生化作用上的變化 (圖 5)。在外觀上，細胞凋亡典型的變化為細胞膜突起 (plasma membrane blebbing)，細胞萎縮 (cell shrinkage)，染色質濃縮 (chromatin condensation 或稱 pyknosis)，細胞分段 (fragmentation) 形成凋亡小體 (apoptotic body)，細胞膜內層的 phosphatidylserine (PS) 外翻 (Elmore 2007)。生化作用上的變化則包括粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$) 的減少 (Ly et al. 2003) 及活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 的增加 (Simon et al. 2000)。

七、 Poly (ADP-ribose) polymerase-1 和細胞凋亡

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) 由 DNA binding domain (DAD)，automodification domain (AD) 及 catalytic domain (CD) 所組成，長度為 113 kDa。在有 DNA 片段破損的情況下，PARP-1 可偵測到此破損處並藉由 DAD 結合，經由 CD 將 β -NAD⁺ 轉變成 ADP-ribose，利用 AD 進行 ADP-ribose polymerization，然後再脫離 DNA，使其它的 DNA 修復酶能進行作用 (Ivana Scovassi et al. 2004)。PARP-1 是已知的 caspase 受質，細胞發生細胞凋亡時，活化的

caspace-3 可將 PARP-1 切割成 24 kDa 及 89 kDa 兩個片段，使 PARP-1 失去修復 DNA 的功能 (Soldani et al. 2002)。

八、 與細胞保護有關之蛋白質

1. Bcl-2

在細胞凋亡的途徑裏有一群很重要的蛋白質叫做 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) families，藉由調節粒線體外膜的通透性來調控細胞凋亡的作用 (Martinou et al. 2001)。屬於抗細胞凋亡的蛋白質除了 Bcl-2，還包括 Bcl-xL 及 Bcl-W，而促細胞凋亡蛋白質則包括 Bax 及 Bad 等。

2. Heat shock protein 73

熱休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 是一群壓力性蛋白，最初是在微環境溫度升高的條件下發現會被誘發，此外在許多環境壓力下，細胞也會產生，用於適應環境改變 (Didelot et al. 2006)。HSPs 主要分成 HSP 90, HSP 70, HSP 60 及 small HSP (如 HSP 27) 四大類，其作用大部分為 chaperones，幫助其它蛋白質正常地合成或分解錯誤合成的蛋白質。以 HSP 70 為例，在正常情況下可幫助新合成的蛋白質正確地 folding，將蛋白質運送出細胞膜；但是在壓力反應的情況下，HSP 70 可幫助細胞在惡劣的環境下存活，目前已知主要是靠著其抑制細胞凋亡的能力，達到細胞保護的作用 (Li et al. 2000)。

3. Heme oxygenase-1

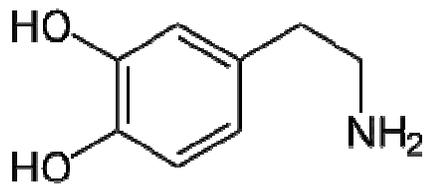
Heme oxygenase-1 (HO-1)，亦即 heat shock protein 32，可將 heme 轉變成 biliverdin, carbon monoxide 及 iron (Gozzelino et al. 2010)。

Heme 本身即具有製造自由基的能力，而 biliverdin 可代謝成 bilirubin，具有抗氧化的作用 (Stocker et al. 1987)，故 HO-1 在 oxidative stress 的情況下可保護細胞。

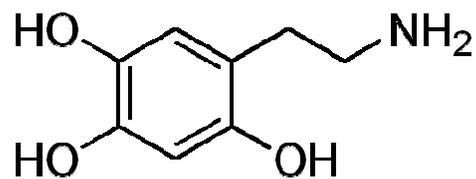
第二節 研究目的

Resistin 是一種脂肪激素，與大多數的脂肪激素一樣 (如 leptin 及 adiponectin)，主要是與體內能量平衡有關。除了脂肪激素以外，胃部所分泌的一種叫做 ghrelin 的 peptide 也與能量平衡有關，主要是促進食慾。在 leptin，adiponectin 及 ghrelin 相繼被發現與神經保護有關以後，目前並沒有 resistin 與神經保護作用有關的文獻，因此本論文要探討 resistin 的神經保護作用。

本研究的目的是在於利用已知的 6-OHDA 實驗室模型，初步探討 resistin 是否具有神經保護的作用。此模型為利用 6-OHDA 作為神經毒素，觀察在先行以 resistin 處理的 dopaminergic 細胞加入 6-OHDA，是否會降低神經毒性，之後再推論其可能的途徑。此結果可作為更進一步研究 resistin 的作用的基礎，並能對於 PD 的治療提供一個潛在的新方向。



Dopamine



6-hydroxydopamine

圖 1

6-hydroxydopamine (6-OHDA) 是一種 dopamine 的衍生物，在結構上比 dopamine 多了一個 hydroxyl group (Adapted from Wikimedia Commons website)。



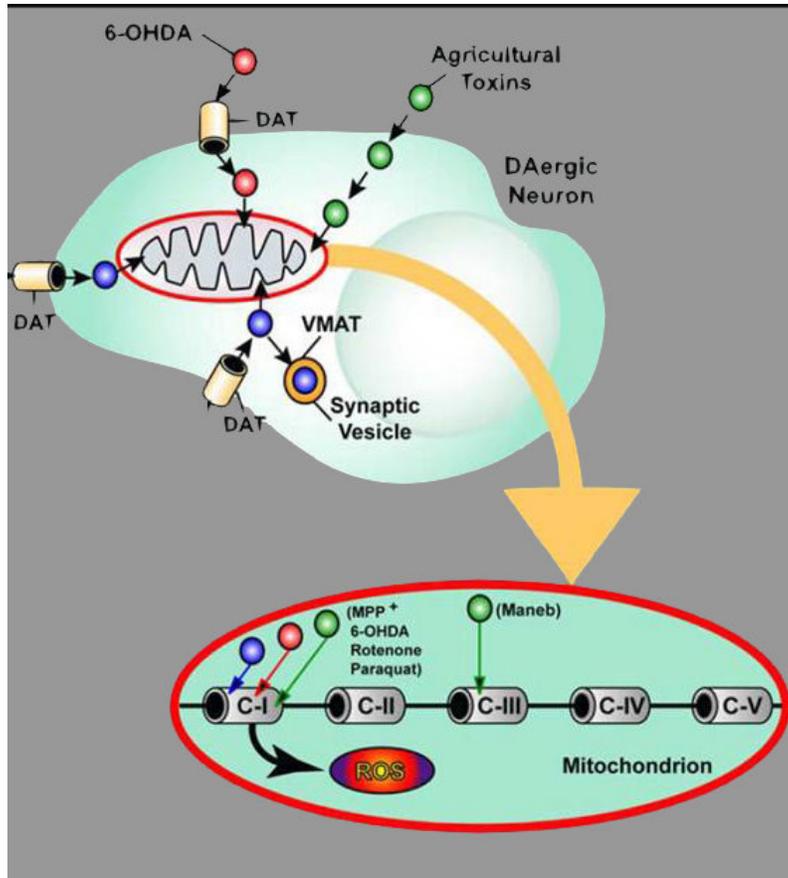


圖 2

6-OHDA 藉著其與 dopamine 結構上的相似性經由 dopamine transporter 進入細胞。一旦進入細胞，6-OHDA 會促進活性氧化物的生成，並抑制粒線體的電子傳遞鏈活性，造成細胞毒性 (Adapted from Schober 2004)。

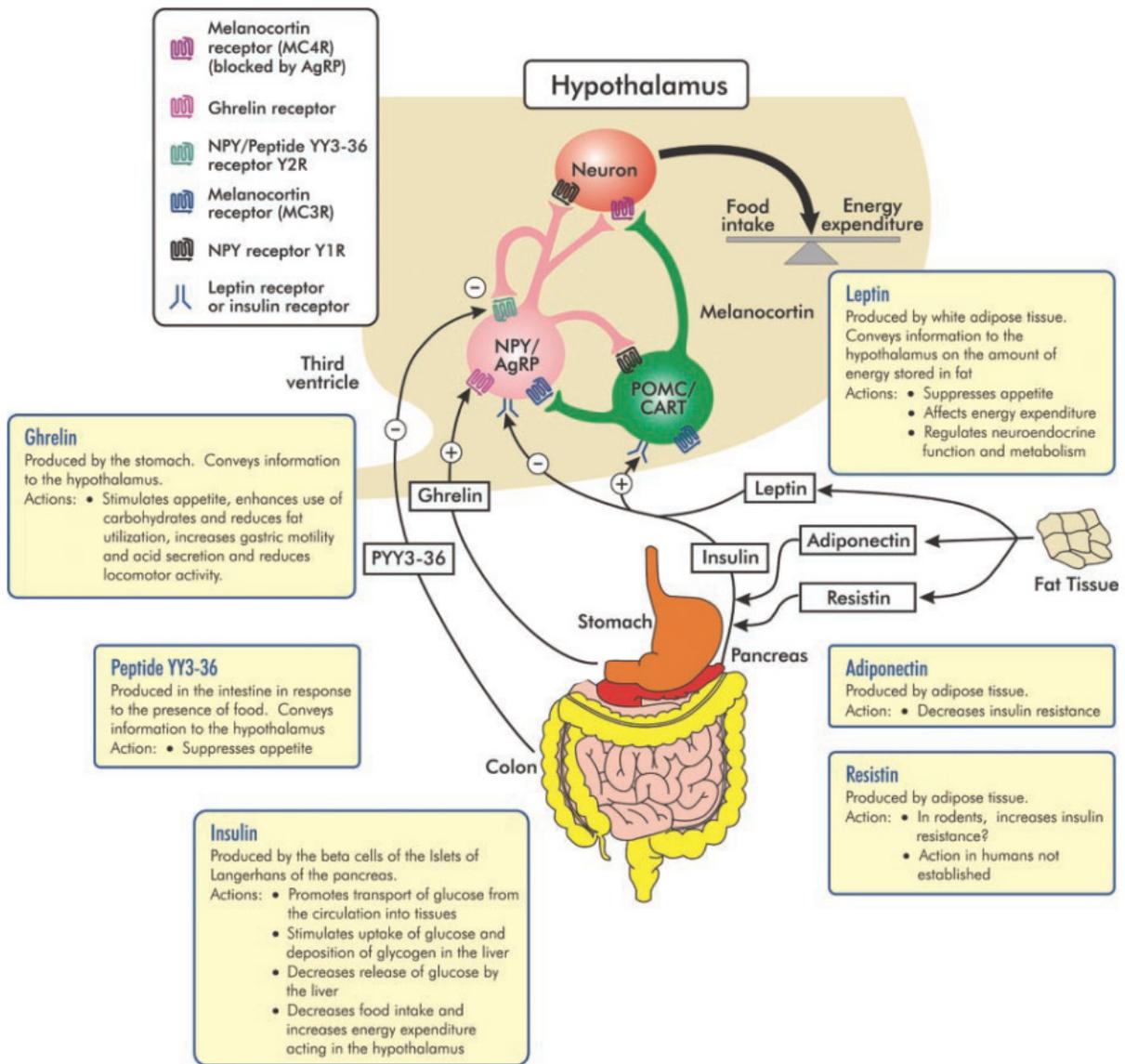


圖 3

人體的能量平衡與攝食行為受到許多蛋白質的調控，包括內分泌及脂肪激素都與其有關 (Adapted from Gale et al. 2004)。

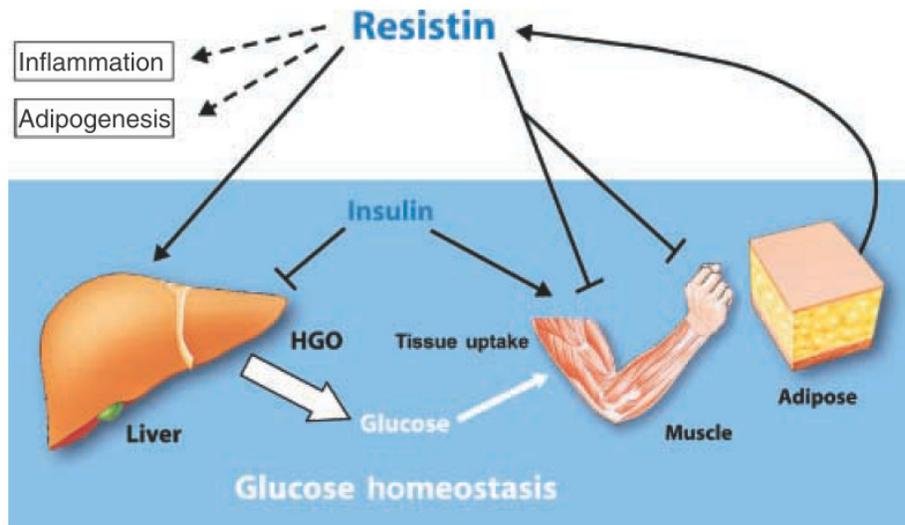


圖 4

在老鼠體內 resistin 由脂肪組織製造，在肝臟能增加糖新生作用，使血糖升高，在周邊肌肉組織能減低其在 insulin 刺激下的糖分攝取作用，產生胰島素抗性 (Adapted from Stepan et al. 2004)。

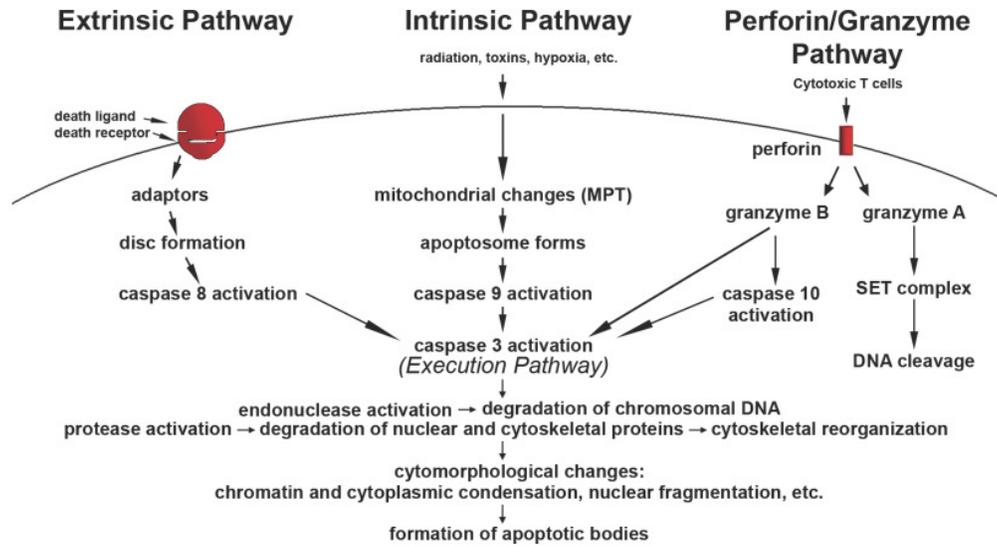


圖 5

細胞凋亡的啟動機制一般分成外路徑與內路徑，而其最終皆走向執行路徑，活化 caspase 3，造成細胞凋亡 (Adapted from Elmore 2007)。

第二章 研究方法

第一節 研究材料

一、細胞株

本實驗所使用的細胞株為 MES23.5，由 Dr. Wei-Dong Le(Baylor College of Medicine, Texas, USA)所提供。MES23.5 是由小鼠 N18TG2 細胞(neuroblastoma-glioma cell)與大鼠中腦神經元(mesencephalic neurons)雜交而來，與黑質神經元有許多相似性(如：具有 tyrosine hydroxylase，能夠合成 dopamine)，被廣泛用來當做研究 PD 的細胞材料(Crawford et al. 1992)。

二、藥品試劑

- Resistin 購自 PeproTech(Rocky Hill, NJ)。
- Fetal bovine serum(FBS)，LipofectamineTM 2000(LF2000)，Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)，DMEM/F12 及 OPTI-MEM 購自 Gibco BRL(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)。
- Goat anti-mouse 和 anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG，primary antibodies against Bax, Bcl-2, β -actin 及 PARP1/2 購自 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)。
- Primary antibody against cleavage caspase-3 購自 Cell Signaling

and Neuroscience(Danvers , MA)。

- Primary antibodies against HSP73 及 HO-1 購自 StressGen Biotechnologies(Victoria , BC , Canada)。
- Znpp IX 及 KNK 437 購自 Calbiochem(San Diego , CA)。
- 其它的試劑購自 Sigma-Aldrich(St Louis , MO)。

第二節 研究設計

一、 實驗架構

本實驗以一個 6-OHDA 的 PD 實驗室模型，觀察 resistin 是否具有神經保護的作用，並探討其可能的機轉。

(一) 以細胞存活分析法觀察 Resistin 是否具有神經保護之效果

本實驗先將 6-OHDA 加入 MES23.5 細胞株中，確認其神經毒性之作用，並分析其所造成的細胞死亡的方式，然後再比較先以 resistin 處理後再加入 6-OHDA 其細胞存活率是否有改變。

(二) 探討 Resistin 神經保護作用的可能機轉

在細胞存活率實驗中確認了 resistin 的神經細胞保護作用，接下來觀察其可能的作用途徑，包括抗細胞凋亡及內生性細胞保護蛋白質。

二、 實驗方法

(一) 細胞培養

將 MES23.5 細胞培養於 Sato 氏的 Dulbecco's Modified Eagle

Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12)中，同時給予 5% fetal bovine serum (FBS) 與 100 U/ml penicillin 及 100 mg/ml streptomycin，於 5% CO₂ 及 95% air，溫度為 37 °C 的細胞培養箱中培養，每隔 2 天，當細胞快長滿時，再以 Trypsin-EDTA 處理，更換一次培養液，收集細胞做進一步實驗或繼代培養(subculture)。

(二) 細胞存活率分析

● MTT 分析法

MTT，即 3-[4,5,-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide，為一種黃色化合物，可作用在活細胞粒線體上，一旦被粒線體內膜上的琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase)還原，會形成紫色顆粒狀的 formazan 結晶，溶在 DMSO 中成為紫色溶液，而死亡的細胞因不含琥珀酸去氫酶，故無法形成此結晶。然後利用分光光譜儀(spectrophotometer)在波長 500 和 600 nm 之間測其吸光值定量，可代表細胞之活性(Hansen et al. 1989)。實驗步驟如下：將細胞置入 96-well plate 中，依實驗所需以不同濃度的 resistin，6-OHDA，HO-1 抑制劑 ZnPP IX 及 HSP 抑制劑 KNK 437 處理細胞 24 小時後，再以 PBS (PH 7.4)清洗。然後每個 well 加入 20 µl 濃度為 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液，放置在細胞培養箱中。1 小時後取出，小心地將黃色的 MTT 溶液抽走，再加入 200 µl DMSO 於每個 well 中，以震盪器搖動約 10 分鐘，

使 formazan 結晶完全溶解。之後將 microplate 中的每一個 well 之吸光值以 microplate reader(Bio-Tek, Winooski, VT)讀取(波長 550 nm)。

● SRB 分析法

SRB(sulforhodamine B)是一種粉紅色染劑，可與被 trichloroacetic acid(TCA)固定住的細胞的蛋白質結合，間接代表活細胞的總量，然後在分光光譜儀下測定其吸光值來代表細胞的存活率(Skehan et al. 1990)。實驗步驟如下：將細胞置入 96-well plate 中，依實驗所需以不同濃度的 resistin，6-OHDA，HO-1 抑制劑 ZnPP IX 及 HSP 抑制劑 KNK 437 處理細胞 24 小時或 48 小時後，加入 10%的 TCA 在 4°C 下固定細胞一小時，然後緩慢地在自來水下沖洗四次。接下來在每個 well 中加入 0.4%的 SRB，30 分鐘後用 1%的 acetic acid 洗掉未與細胞結合的 SRB，而與細胞結合的 SRB 則以 200 μ l 濃度為 10 mM 的 Trizma base 溶液洗出，然後利用 microplate reader 測定其在波長為 515 nm 下的吸光值。

● LDH 分析法

Lactate dehydrogenase(LDH)是存在於細胞質中的一種酶，當細胞死亡或受到破壞時，會自細胞質釋放出來至培養液，因此測量培養液中的 LDH 可作為細胞膜完整性的指標，間接代表測試藥物的細胞毒性，反之測量細胞溶解物中的 LDH 則可代表細胞活性。藉由 lactate

氧化成 pyruvate 的過程可將 NAD^+ 還原成 NADH，而 LDH 可催化此過程；接著 diaphorase 可利用此新生成的 NADH 來催化 tetrazolium salt(INT)還原成 formazan，然後在 490 nm 至 520 nm 波長下測其吸光值，間接代表 LDH 的量(Wolterbeek et al. 2005)。此實驗使用 LDH cytotoxicity assay kit(Promega, USA)，實驗步驟如下：將細胞置入 96-well plate 中，依實驗所需以不同濃度的 resistin, 6-OHDA, HO-1 抑制劑 ZnPP IX 及 HSP 抑制劑 KNK 437 處理細胞 24 小時或 48 小時後，以離心機離心 4 分鐘，取出 50 μl 上清液放置另一 96-well plate 中，然後加入 50 μl 的 substrate mixture，在避光的條件下使其作用 30 分鐘後加入 stop solution，接著利用 microplate reader 測其在波長 450 nm 的吸光值。

(三) DNA 螢光染色顯微鏡觀察

Hoechst dye 是一種藍色螢光的染劑，可穿透細胞膜進入細胞內而染在 DNA 上，對於 DNA 的結構變化及染色質的形態改變敏感，因此普遍被用來偵測 DNA 的傷害程度(Ellwart et al. 1990)。實驗步驟如下：將細胞經過 vehicle, resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μM 的處理，或是先經過 5 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 75 μM 繼續處理 2 小時，接下來加入濃度為 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 Hoechst 33258 染劑，在室溫下使其作用 10 分鐘，然後在螢光顯微鏡下觀察其外觀的變化。

(四) 流式細胞儀分析

流式細胞儀技術(flow cytometry)是一種能觀測細胞在流體狀態下運動的方法，將單一細胞被雷射光激發所產生的光學訊號轉換成電子訊號後，被電腦所偵測，分析細胞的顆粒與特性。利用可震盪的噴嘴(vibration nozzle)將含有細胞的水柱分裂成只含有單一細胞的水滴，並加上正電或負電荷，在高壓電場下使水滴偏折，篩選所要的細胞，若以特殊染劑染在細胞上，則流式細胞儀可利用不同激光波長將不同染劑的細胞分類。

● PI 與 Annexin V-FITC 雙染分析

此實驗利用 propidium iodide(PI)及 Annexin V 將細胞雙重染色，利用流式細胞儀區分染有 PI 或 Annexin V 的細胞。PI 是一種能染在 DNA 及 RNA 上的染劑，本身無法通過細胞膜，但是細胞死亡(凋亡或壞死)時細胞膜失去完整性，PI 就可進入細胞。Annexin V 是一種能與磷脂(phospholipid)結合的蛋白質，磷脂絲胺酸(phosphatidylserine, PS)即是一種磷脂，位於細胞膜內側面，在細胞凋亡初期時會外翻至外側面，可以被 Annexin V 結合，若 Annexin V 先接上螢光染劑(如：fluorescein isothiocyanate, FITC)再與 PS 結合，則可利用流式細胞儀區分出來。實驗步驟如下：將細胞培養於 37°C，5% CO₂ 條件下 24 小時，然後經過 vehicle，resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μM 的處理，

或是先經過 2 ng/ml, 5 ng/ml 或 10 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時, 然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時。接著加入濃度為 0.025 μ g/ml 的 FITC-Annexin V, 將此細胞及染劑的混合液於室溫下避光置放 10 分鐘後用 PBS 沖洗, 以離心機離心後加入 10 μ g 濃度為 1 μ g/ml 的 PI, 再利用流式細胞儀分析其結果。

(五) 活性氧化物生成量分析

活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)是氧化代謝作用的中間產物, 其生成量可利用螢光染色法加以監測, 常使用的染劑為 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate(DCFH-DA), 本身不發螢光, 在穿過細胞膜後被酯酶 (esterase) 去乙酰化 (deacetylated) 成為 2',7'-dichlorfluorescein(DCFH), 然後被活性氧化物轉為具螢光性的 DCF。實驗步驟如下: 細胞經過 vehicle, resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μ M 的處理, 或是先經過 5 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時, 然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時, 之後將含有細胞之培養液離心, 吸掉上清液, 加入 10 μ M 的 DCFH-DA, 於室溫下置放 30 分鐘, 然後在 20 倍螢光顯微鏡下觀察, 接著利用流式細胞儀定量在不同條件下的 DCF 產量, 即代表活性氧化物生成量。

(六) 粒線體膜電位分析

粒線體在是細胞內的能量製造工廠，在呼吸氧化過程中，將所產生的能量以電化學位能儲存於粒線體內膜，稱之為粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)，並以此位能來進行電子傳遞鏈，產生 ATP 供細胞使用。Rhodamine 123(Rh123)為一親脂性的螢光性陽離子化合物，會與能進行產能作用的活細胞粒線體內膜結合，對粒線體膜電位的變化敏感，可使用螢光顯微鏡來觀察(Johnson et al. 1980)。實驗步驟如下：將細胞經過 vehicle，resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μ M 處理，或是先經過 5 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時，加入 500 μ l 濃度為 1 μ g/ml 的 Rh123，在室溫下置放 10 分鐘，然後在 20 倍螢光顯微鏡下觀察，接著利用流式細胞儀定量在不同條件下的 Rh123 結合量，即間接代表粒線體膜電位。

(七) 西方墨點法

西方墨點法(Western blot)為一廣泛用來偵測特定蛋白質的分析法，其原理主要是以電泳分離蛋白質，利用螢光免疫染色在螢光下觀察特定蛋白質的表現量。此實驗方法由許多步驟組成，包括抽取細胞蛋白質，蛋白質電泳(SDS-PAGE)，轉漬(Transfer)，填充(Blocking)，抗體偵測及螢光偵測等。實驗步驟為：將 MES23.5 細胞依照 2×10^5 cells

/well 種植於 six-well 培養皿中，靜置 24 小時後，加入 6-OHDA (75 μ M)，不同濃度的 resistin (2 ng/ml, 5 ng/ml 或 10 ng/ml)，或先經過 resistin 前處理再加入 6-OHDA，經過不同時間後收集細胞，取得細胞溶解物(cell lysate)，此溶解物內含蛋白質。利用 10 % SDS-PAGE gel 電泳分離含 30 μ g 蛋白質的樣本，然後轉漬到 polyvinylidene difluoride (PVDF)膜(Millipore, Bedford, MA)。接著將 PVDF 膜於室溫下以 5% 脫脂奶粉進行 blocking，1 小時後取出 PVDF 膜，以 0.05 % Tween 20 及 1X PBS (PBST) 混和液清洗 10 分鐘共 3 次。之後加入一級抗體，於 4 $^{\circ}$ C 下搖晃 1 小時，然後用 PBST 清洗 PVDF 膜 5 分鐘共 3 次，再加入二級抗體(goat anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1000))，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出 PVDF 膜，以 PBST 清洗 15 分鐘共 3 次。最後進行壓片步驟，將 PVDF 膜浸泡於 enhanced chemiluminescence 試劑中，再進行壓片與感光顯示 immnoreactive band 的強度。

第三節 統計方法

實驗結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm S.E.)表示，使用 Unpaired Student's t-test 來決定實驗組與對照組之差異。*表示 $p < 0.05$ ，表示統計上具有顯著差異(significant difference)。

第三章 研究結果

第一節 描述性統計分析

一、 6-OHDA 造成細胞死亡及存活率下降

6-OHDA 對於 dopaminergic 神經細胞而言為已知的神經毒素，故被廣泛地應用在 PD 的實驗室模型中。本實驗首先確認 6-OHDA 的神經毒性，將 MES23.5 細胞經過不同濃度的 6-OHDA 處理 24 小時，然後藉由 MTT 分析法，SRB 分析法及 LDH 分析法來觀察其細胞存活率，結果發現加入 6-OHDA 之後，其細胞存活率在三種分析法觀察下皆呈現下降的情形，且下降的幅度與 6-OHDA 的濃度成正比，如圖 6-1 所示。

接下來為了觀察細胞在外觀上的變化，我們利用相位差顯微鏡，觀察細胞在接受 vehicle 或 6-OHDA 75 μ M 的處理所造成的形態上的改變，結果如圖 6-2 所示，在經過 6-OHDA 處理之後，神經細胞呈現皺縮的變化，而且細胞的神經突觸(neurite)幾乎完全消失，證實了 6-OHDA 對於 MES23.5 細胞的毒性。

二、 Resistin 可減少 6-OHDA 所引起的細胞存活率下降

為了觀察 resistin 是否具有保護細胞，減少 6-OHDA 引起的細胞存活率下降的作用，我們先將細胞前處理不同濃度的 resistin，然後再加入 6-OHDA 75 μ M，結果如圖 6-3 所示，藉由 MTT 分析法，SRB

分析法及 LDH 分析法可發現接受過 resistin 前處理的細胞其存活率比未接受 resistin 前處理的細胞高，且最佳濃度為 5 ng/ml。利用相位差顯微鏡也可以觀察到，細胞接受過 resistin 前處理後再加入 6-OHDA 會減少其 neurites 消失的比例，細胞皺縮的情形也比較不明顯，如圖 6-2 所示。

三、 Resistin 可減少 6-OHDA 所引發的細胞凋亡現象

在證實 resistin 確實可保護細胞，減少 6-OHDA 所引起的細胞毒性後，下一步是探討其可能的機轉。首先是觀察 6-OHDA 引起的細胞死亡是何種形式，我們利用 Hoechst 染色法在螢光顯微鏡下觀察染色質的變化，結果如圖 7-1 所示，細胞經過 6-OHDA 處理後，染色質呈現濃染且細胞核成裂片狀，符合 apoptosis 的外觀變化特徵。接下來我們利用流式細胞儀進行 PI 及 Annexin V 的雙染分析，結果如圖 7-2 所示，將細胞分布的區域分成四個象限，Q1 代表 necrosis 的細胞，Q3 代表正常的細胞，Q2 及 Q4 分別代表 late 及 early apoptosis 的細胞，在經過 6-OHDA 處理後，細胞的分佈偏向 late apoptosis (Q2, 54.5%)；但是細胞如果先經過 resistin 前處理再加入 6-OHDA，可以發現細胞的分佈又趨向正常細胞，而且 resistin 劑量是 5 ng/ml 時最明顯(Q3, 82.1%)。由以上結果可推論，resistin 可以抑制 6-OHDA 所引起的 apoptosis 現象。

四、 Resistin 可降低 6-OHDA 所引起的活性氧化物生成量增加

活性氧化物的增加是 apoptosis 的一個特徵，我們利用 DCFH-DA 分析法來觀察細胞的活性氧化物在加入 6-OHDA 是否增加，結果如圖 8 所示，加入 6-OHDA 會增加在螢光顯微鏡下 DCF 的量，而以 resistin 前處理後再加入 6-OHDA，增加的量會明顯減少，以流式細胞儀分析量化其結果，可發現前處理 5 ng/ml 的 resistin 所造成的抑制活性氧化物增加的效果最好。由以上結果可推論，resistin 具有減少 6-OHDA 所引起的活性氧化物增加的效果。

五、 Resistin 可回復 6-OHDA 所引起的粒線體膜電位下降

粒線體膜電位的減少也是 apoptosis 的一個特徵，我們利用 Rh123 分析法，在螢光顯微鏡下觀察 Rh123 染劑在細胞的強度，結果如圖 9 所示，細胞在加入 6-OHDA 後螢光染色明顯減弱，但是如果先將細胞予以 resistin 前處理再加入 6-OHDA，螢光亮度減弱的程度明顯降低，以流式細胞儀分析量化後，更可看出 5 ng/ml 的 resistin 效果最好。由以上結果可推論，resistin 具有減少 6-OHDA 所引起的粒線體膜電位減少的效果。

六、 Resistin 與細胞凋亡蛋白質的關係

下一步我們以 Western blot 分析法來觀察 resistin 與各種細胞凋亡蛋白的關係，首先在細胞中加入 6-OHDA，結果如圖 10 所示，6-OHDA

會減少抗細胞凋亡蛋白質 Bcl-2 的表現量，但是會增加促細胞凋亡蛋白質 Bax，cleaved PARP-1 及 cleaved caspase 3 的表現量，將細胞先經過 resistin 前處理後再給予 6-OHDA，則 Bcl-2 減少和 Bax，cleaved PARP-1 及 cleaved caspase 3 增加的程度皆會降低。由以上結果可推論在加入 6-OHDA 後，會有促進細胞凋亡的現象發生，但是將細胞先經過 resistin 前處理再加入 6-OHDA，此促進細胞凋亡的現象會較不明顯。

七、 Resistin 與細胞保護蛋白質的關係

由以上結果可推論 resistin 具有抑制 6-OHDA 所引起的細胞凋亡的作用，本實驗下一步要探討此作用與已知的細胞保護蛋白質是否有關。HSP 70 及 HO-1 為已知的具神經保護作用的蛋白質，首先我們先觀察細胞加入 resistin 後，對於此兩種蛋白質及 Bcl-2 表現量的影響，如圖 11-1 所示，在加入不同劑量的 resistin 24 小時後，此三種蛋白質的表現量皆增加，圖 11-2 則是觀察到在加入 5 ng/ml 的 resistin 後，隨著時間的變化此三種蛋白質的表現量也逐步增加。接著我們利用 HSP70 及 HO-1 的抑制劑來證明此兩種蛋白質的必要性，結果如圖 12-1，12-2 及 12-3 所示，將 HO-1 抑制劑 zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) 及 HSP 抑制劑 KNK 437 加入細胞後，再以 MTT 分析法，SRB 分析法及 LDH 分析法觀察細胞存活率，可以發現 resistin 抑制 6-OHDA

所引起的細胞毒性的能力會降低。

第二節 推論性統計分析

本實驗為一 *in vitro* 研究，利用已知的 6-OHDA PD 模型，探討 resistin 是否具有神經保護的作用，並推論在相同的條件下其它的 dopaminergic 細胞也會有一樣的變化。



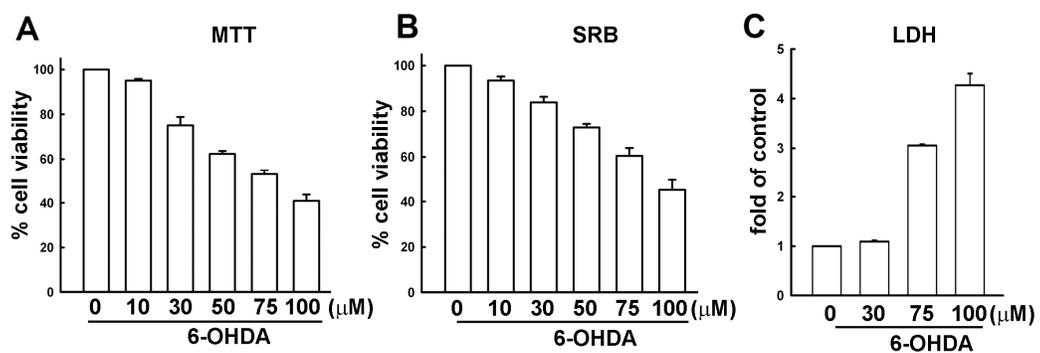


圖 6-1

6-OHDA 引起細胞死亡及形態上的破壞。細胞先經過不同濃度的 6-OHDA 處理 24 小時，然後利用 MTT 分析法(A)，SRB 分析法(B) 及 LDH 分析法(C)來分析細胞的存活率。結果以 means \pm SEM 表示，n=4。



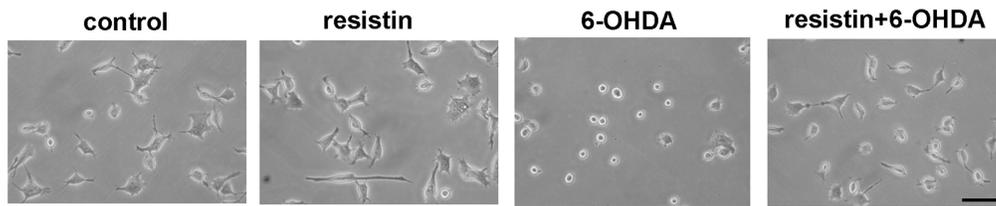


圖 6-2

MES23.5 細胞經過 resistin 及 6-OHDA 處理後在 phase-contrast 顯微鏡下觀察到的變化。細胞經過 vehicle, resistin 5 ng/ml, 6-OHDA 75 μ M 的處理，或是先經過 5 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時。Scale bar: 50 μ m。



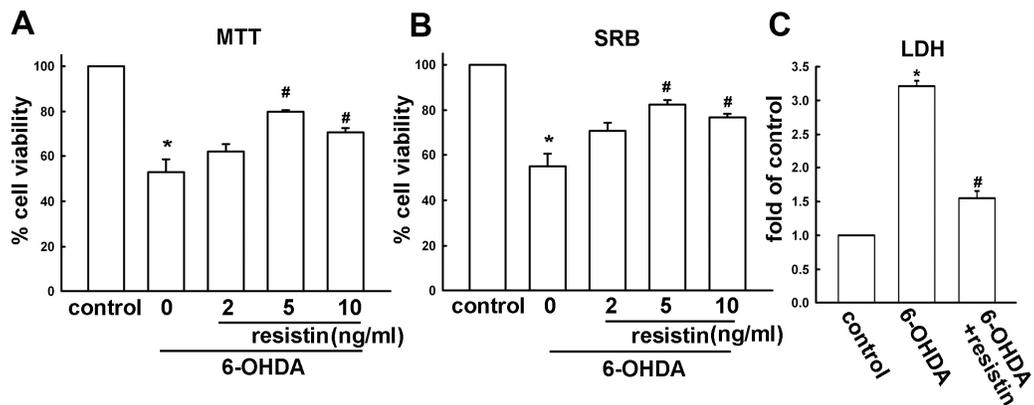


圖 6-3

Resistin 減少 6-OHDA 引起的細胞死亡。細胞先經過不同的 resistin 濃度處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 繼續處理 24 小時，之後利用 MTT 分析法(A)，SRB 分析法(B)及 LDH 分析法(C)來分析細胞的存活率。結果以 means \pm SEM 表示，n=4。*與控制組相比 $p < 0.05$ ；#與 6-OHDA 組相比 $p < 0.05$ 。

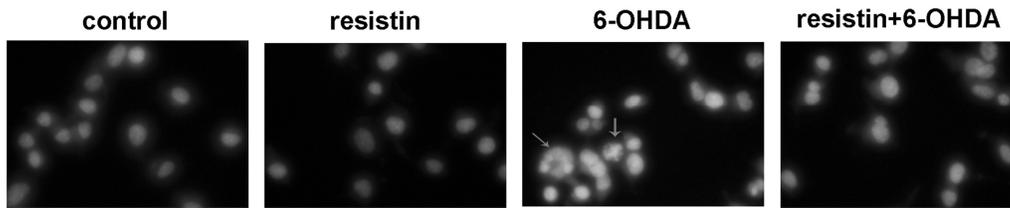


圖 7-1

在螢光顯微鏡下利用 Hoechst 染色觀察到的細胞外觀變化。細胞經過 vehicle, resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μ M 的處理, 或是先經過 5 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時, 然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時。箭號表示細胞內染色質濃縮。



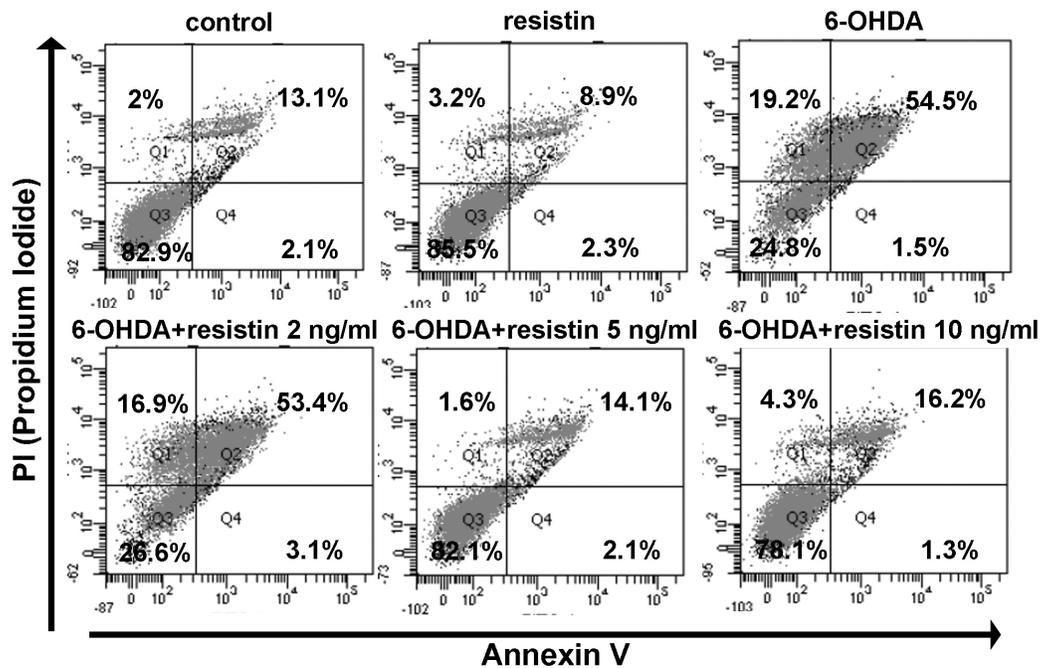


圖 7-2

Annexin V 及 PI 的流式細胞儀雙染分析。將 MES23.5 細胞株置放在不同條件下(經過 vehicle, resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μ M 的處理, 或是先經過 2 ng/ml, 5 ng/ml 或 10 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時, 然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時), 然後以流式細胞儀利用 Annexin V 與 PI 雙染法分析, 觀察 apoptosis 之變化。Q2 區代表 late apoptosis, Q4 區代表 early apoptosis。

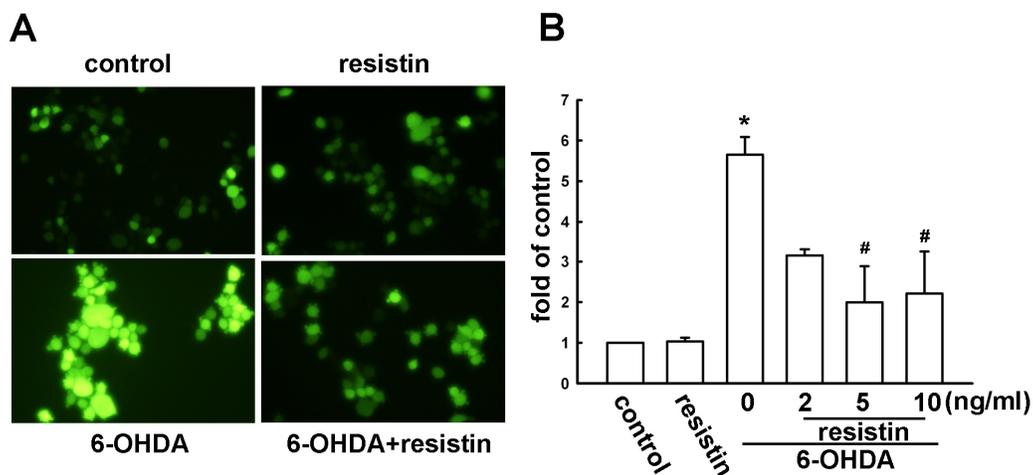


圖 8

6-OHDA 會增加 MES23.5 細胞株的活性氧化物生成量，而將細胞前處理 resistin 會抑制此現象。(A) 細胞經過 vehicle，resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μ M 的處理，或是先經過 5 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時。活性氧化物生成量的變化是將細胞以 DCFH-DA 染色，然後在 20 倍螢光顯微鏡下觀測。(B) 以流式細胞儀定量在不同條件下活性氧化物生成量。結果以 means \pm SEM 表示，n=4。*與控制組相比 $p < 0.05$ ；#與 resistin 組相比 $p < 0.05$ 。

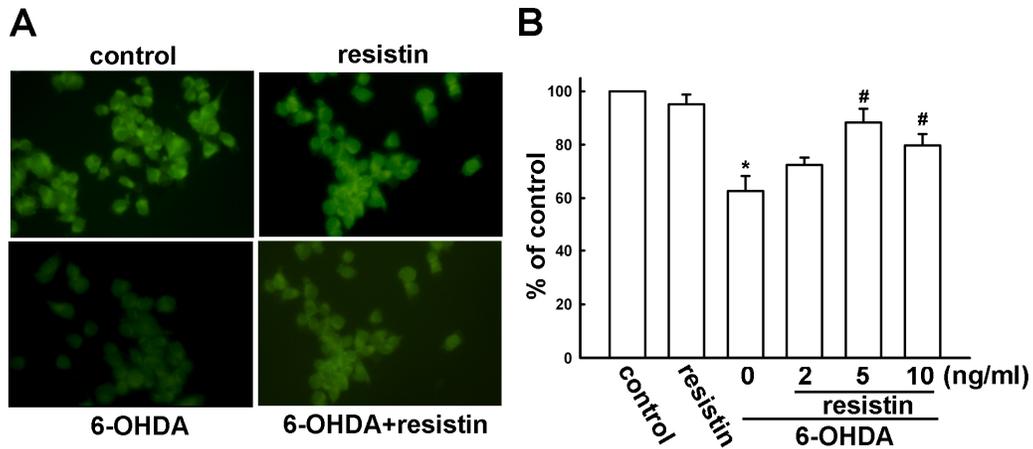


圖 9

6-OHDA 會減少 MES23.5 細胞株的粒線體膜電位，而將細胞先行以 resistin 前處理會抑制此現象。(A) 細胞經過 vehicle，resistin 5 ng/ml 或 6-OHDA 75 μ M 處理，或是先經過 5 ng/ml 的 resistin 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 75 μ M 繼續處理 24 小時。粒線體膜電位的變化是將細胞以 Rh123 染色，然後在 20 倍螢光顯微鏡下觀測。(B) 以流式細胞儀定量在不同條件下的粒線體膜電位。結果以 means \pm SEM 表示，n=4。*與控制組相比 $p < 0.05$ ；#與 resistin 組相比 $p < 0.05$ 。

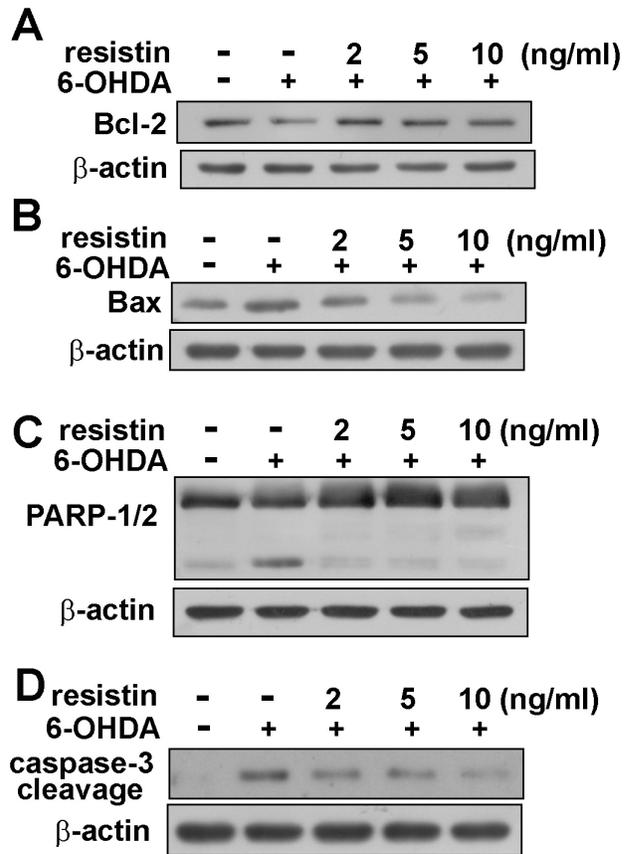


圖 10

以 Western blot 分析 6-OHDA 與 resistin 對於 apoptosis 相關蛋白質表現量的影響。加入 6-OHDA (75 μ M) 會減少 Bcl-2 表現量，但是會增加 Bax，cleaved PARP-1 及 cleaved caspase 3 的量。將細胞先行經過不同濃度的 resistin 處理 (2 ng/ml，5 ng/ml 或 10 ng/ml) 再加入 6-OHDA 會抑制這些變化 (n=3)。

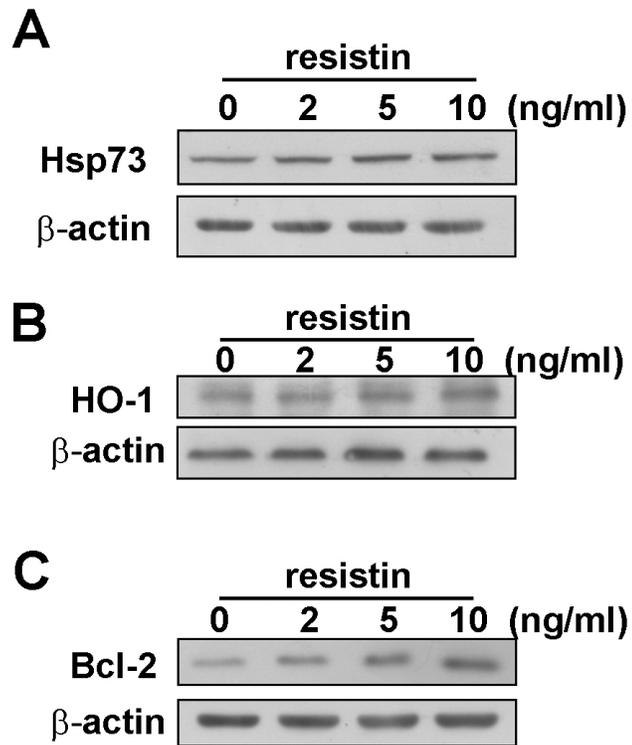


圖 11-1

以 Western blot 分析不同濃度的 resistin 對於三種細胞保護蛋白質表現量的影響。將 MES23.5 細胞株經過不同濃度的 resistin 處理 24 小時，結果發現 Hsp 73，HO-1 及 Bcl-2 的表現量都增加 (n=3)。

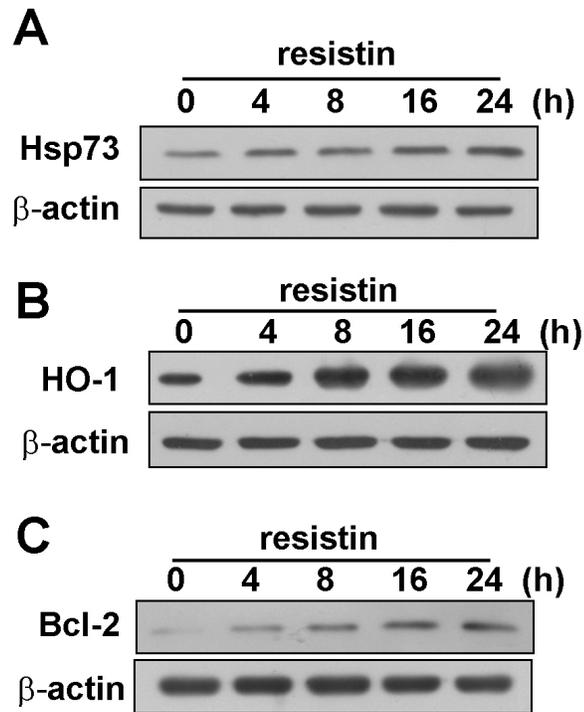


圖 11-2

以 Western blot 分析 resistin 經過不同時間後對於三種細胞保護蛋白質表現量的影響。將 MES23.5 細胞株經過 5 ng/ml 的 resistin 處理不同時間，結果發現 Hsp 73，HO-1 及 Bcl-2 的表現量都增加 (n=3)。

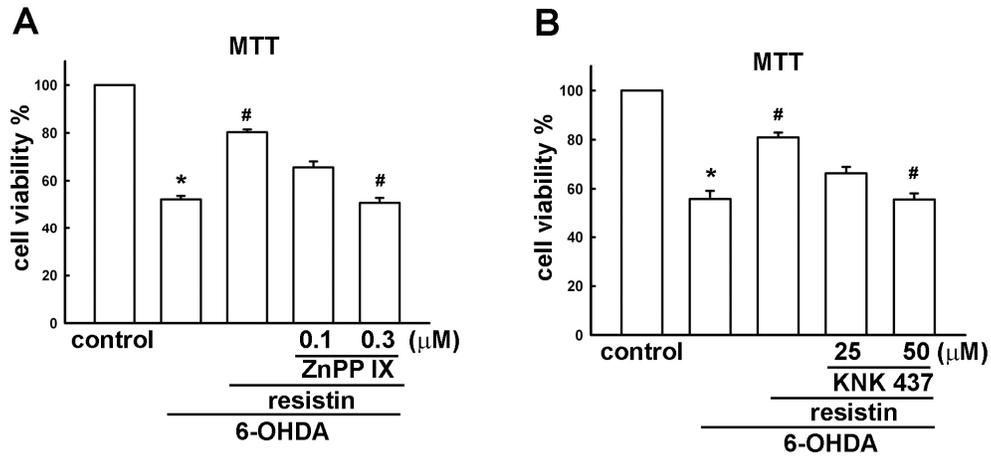


圖 12-1

以 MTT 分析法分析 resistin 經由 heat shock protein 的表現而抑制 6-OHDA 所引起的細胞死亡現象。將細胞經過不同濃度的 ZnPP IX (0.1 或 0.3 mM) 或 KNK 437(25 或 50 μM)處理 30 分鐘，接著加入 resistin 5 ng/ml 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 繼續處理 24 小時，再以 MTT 分析法觀察細胞存活率。*與控制組相比 $p < 0.05$ ；#與 6-OHDA 組相比 $p < 0.05$ 。

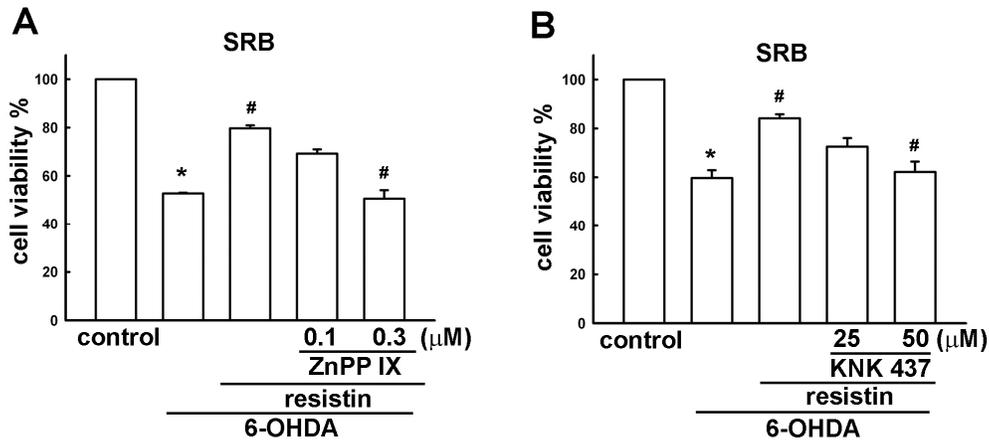


圖 12-2

以 SRB 分析法分析 resistin 經由 heat shock protein 的表現而抑制 6-OHDA 所引起的細胞死亡現象。將細胞經過不同濃度的 ZnPP IX (0.1 或 0.3 mM) 或 KNK 437 (25 或 50 μM) 處理 30 分鐘，接著加入 resistin 5 ng/ml 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 繼續處理 24 小時，再以 SRB 分析法觀察細胞存活率。*與控制組相比 $p < 0.05$ ；#與 6-OHDA 組相比 $p < 0.05$ 。

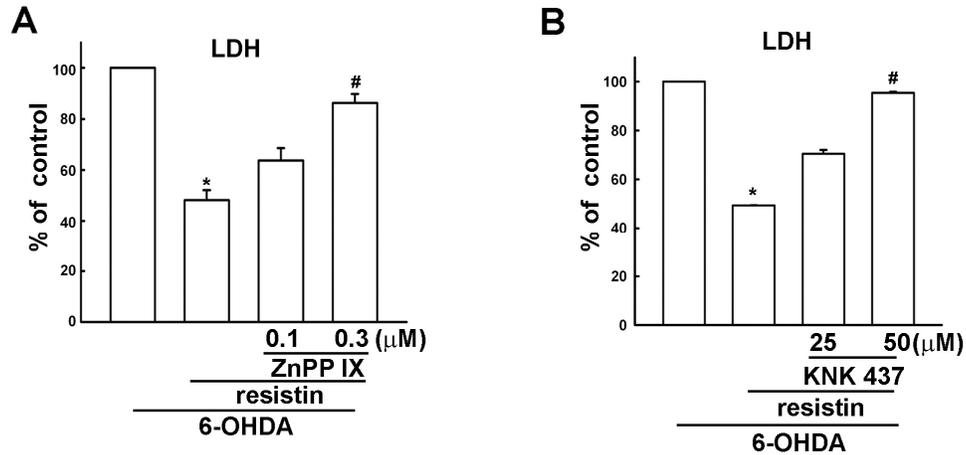


圖 12-3

以 LDH 分析法分析 resistin 經由 heat shock protein 的表現而抑制 6-OHDA 所引起的細胞死亡現象。將細胞經過不同濃度的 ZnPP IX (0.1 或 0.3 mM) 或 KNK 437 (25 或 50 μM) 處理 30 分鐘，接著加入 resistin 5 ng/ml 處理 1 小時，然後再加入 6-OHDA 繼續處理 24 小時，再以 LDH 分析法觀察細胞存活率。#與 6-OHDA 組相比 $p < 0.05$ 。

第四章 討論

第一節 結果討論

人體的能量平衡(energy balance)需要許多荷爾蒙及蛋白質的參與，有些是促食慾(orexigenic，如：ghrelin)，有些是抑食慾(anorexigenic，如：insulin，leptin)，這些 peptides 統稱為 ingestive peptides(Pan et al. 2006)。如前所述，leptin 及 adiponectin 屬於脂肪激素，原先認為它們只與能量平衡有關，但是後續的研究發現 leptin 與 adiponectin 也具有神經保護的作用。至於本實驗的主題 resistin，目前則尚無有關其神經保護作用的發現被報導出。

一、 Ingestive peptides 與脂肪激素的神經保護作用文獻回顧

Leptin 已被證實能抑制多種細胞的細胞凋亡，包括：lymphocytes(Howard et al. 1999)，pancreatic β -cells(Shimabukuro et al. 1998)及 hepatic stellate cells(Saxena et al. 2004)等，而在 cancer cell lines 的實驗中也證實 leptin 可減少癌細胞(Russo et al. 2004)或神經細胞(Guo et al. 2008)的死亡，而其中參與的訊息傳遞路徑(signaling pathway)包括 JAK-STAT，PI3K/Akt 及 MAPK/ERK 等。

Adiponectin 是另一種被證實具神經保護作用的脂肪激素，在 *in vitro* 的實驗中，將 adiponectin 加入 primary hippocampal neuron，可保護 neuron 受 kainic acid(一種 glutamate 的衍生物)所引起的細胞凋

亡現象(Qiu et al. 2011)，而 adiponectin 也可以保護 SH-SY5Y 細胞株受到 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) 或 1-methyl-4-phenylpyridinium ion(MPP+)所引起的細胞死亡，其機轉可能與 AMPK 的活化有關(Jung et al. 2006)。

Ghrelin 可說是一種來自胃部的飢餓信號，由二十八個胺基酸組成，主要由胃底(fundus)的上皮細胞分泌，具有刺激食慾的作用。ghrelin 受體(receptor)位於腦下垂體中分泌生長激素的細胞，稱為生長激素分泌受體(Growth hormone secretagogue receptor, GHS-R)，ghrelin 與其結合後會刺激進食增加體重，此外更具有增加脂肪貯存的作用。在許多研究 PD，中風及癲癇的報告中，ghrelin 都被證實具有神經保護的作用(Andrews 2011)。

二、 Resistin 與細胞凋亡的結果討論

由本論文的實驗結果，我們證實 resistin 對於 6-OHDA 的 PD 實驗室模型有神經保護的作用。PD 是一種神經退化性疾病，其主要的病理變化為黑質的 dopaminergic 神經元漸進式損傷，但是真正的致病因目前還不是很清楚，一般認為氧化壓力(oxidative stress)及粒線體病變(mitochondrial dysfunction)是可能的機轉(Lin et al. 2009)。MES23.5 細胞株具有 dopaminergic 細胞的特色，利用 6-OHDA 與 dopamine 結構的相似性，將 6-OHDA 加入此細胞株後，6-OHDA 會被細胞經由

dopamine transporter 吸收，增加活性氧化物生成以及破壞粒線體電子傳遞鏈，造成細胞死亡。如果先加入 resistin 到細胞再加入 6-OHDA，此細胞損傷或死亡的比例會降低。

由細胞存活率分析法(MTT, SRB 及 LDH 分析法)我們可得知 6-OHDA 確實可減少 MES23.5 細胞存活率，而且在相位差顯微鏡下觀察可發現神經細胞的 neurites 幾乎完全消失；然而細胞如果先經過 resistin 前處理再加入 6-OHDA，則可發現這些現象的程度較不嚴重，因此可證明 resistin 確實有保護神經細胞的效果。經由 PI 與 Annexin V-FITC 雙染流式細胞儀分析可知，6-OHDA 會使細胞分布趨向細胞凋亡的象限(Q2 及 Q4)，且由本實驗可知，6-OHDA 會引起活性氧化物增加及造成粒線體受損(由粒線體膜電位減少推論而來)，而此兩種現象都會因為細胞凋亡而產生，再加上 6-OHDA 會減少抗細胞凋亡蛋白質 Bcl-2 及增加促細胞凋亡蛋白質 Bax 的表現量，而且 cleaved PARP-1 及 cleaved caspase-3 的表現量都會增加，這些現象更加佐證細胞凋亡的產生，故 6-OHDA 引起的神經細胞死亡較有可能的機轉為細胞凋亡。如果先將 MES23.5 細胞經過 resistin 前處理再加入 6-OHDA，則以上細胞凋亡的現象皆會被抑制，且最佳濃度為 5 ng/ml。由以上結果可推論，resistin 具有抑制 6-OHDA 引發的細胞凋亡的效果。

三、 Resistin 與細胞保護蛋白質的討論

本實驗證明 resistin 會增加 Bcl-2, HSP73(HSP70)及 HO-1(HSP32)的表現量。Bcl-2 是一種抗細胞凋亡的蛋白質，其主要作用為抑制促細胞凋亡蛋白質的作用，而達到保護細胞的效果。熱休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一種壓力性蛋白質，能被許多外在壓力所引發，如：感染，抗癌藥物，氧化壓力(Morimoto et al. 1992)等等，在動物實驗中被證明能減少腦部及心肌缺氧的程度(Plumier et al. 1997; Trost et al. 1998)，且具有抑制細胞凋亡的作用(Li et al. 2000)。

細胞凋亡有一個很重要的現象，就是促細胞凋亡的 Bcl-2 家族蛋白質(如：Bax)在粒線體外膜開孔，造成通透性(mitochondrial outer membrane permeability, MOMP)增加，使得粒線體內的促細胞凋亡因子(如：cytochrome c)滲出至粒線體外。Bcl-2 則是抗細胞凋亡 Bcl-2 家族的代表，藉由抑制促細胞凋亡蛋白質的作用來維持粒線體外膜的完整性，進而抑制細胞凋亡現象的產生。

有文獻提出 HSP73 抑制細胞凋亡的作用可分成三個層級(Lanneau et al. 2007)，首先是粒線體前層級(pre-mitochondrial level)，HSP73 可結合至 c-Jun N-terminal kinase(JNK)上，抑制其作用，進而防止 caspase-3 的活化；在粒線體層級(mitochondrial level)，HSP73 可以抑制 Bax translocation 至粒線體外膜，防止 cytochrome c 自粒線體釋放

出來；在粒線體後層級(post-mitochondrial level)，HSP73 可直接與 Apaf-1 結合，防止其與 procaspase 9 形成 apoptosome。

HO-1，亦稱為 HSP32，是另外一種具有細胞保護作用的蛋白質，可將 heme 轉變成 biliverdin，carbon monoxide(CO)及 iron。神經細胞只含有極少濃度的 antioxidants，如 glutathione(GSH)，而 biliverdin 及它的代謝產物 bilirubin 具有 antioxidant 的功能，故在氧化壓力下，可提供抗氧化的作用(Nimura et al. 1996)。由於外加的 CO 具有類似 HO-1 的細胞保護作用，故目前認為 HO-1 是藉由 CO 而達成細胞保護的效果(Brouard et al. 2000)。細胞凋亡可以由許多具細胞毒性的因子所誘發，以 tumor necrosis factor(TNF)為例，其與 TNF receptor 結合後會形成 complex I，HO-1 可與之活化 nuclear factor kappa B(NF- κ B)，進入細胞核後與 DNA 結合，再活化抗細胞凋亡的基因(Brouard et al. 2002)。另一方面，TNF 與 TNF receptor 結合後會形成另一 protein complex 稱為 complex II，其與 Fas-associated death domain 及 caspase 8 結合後會活化 caspase 8，進而引發細胞凋亡的反應，而 Complex II 也會經由 JNK 而持續活化 caspase 8。HO-1 會活化 p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 路徑，然後經由 phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K/Akt)路徑而活化 Bcl-xL 和 Bcl-2，達到抗細胞凋亡的效果(Katori et al. 2002)。

如果加入 ZnPP IX 及 KNK 437(分別是 HO-1 及 HSP 的抑制劑)，則原先 resistin 所呈現的神經保護作用在細胞存活率分析法的檢測下皆呈現下降的變化，由此可推論，HO-1 及 HSP73 為 resistin 能夠有神經保護作用所必需。

四、 Resistin 神經保護作用的可能機轉

綜合以上的討論結果，我們可以推論 resistin 神經保護作用的可能機轉為：Resistin 透過增加 HSP73 及 HO-1 的表現量，然後經過對抗氧化壓力及抗細胞凋亡的機制，達到神經保護的作用。對於 resistin 增加 HO-1 及 HSP73 的訊息調節機制還需要更多實驗證實。

第二節 其他相關性討論

目前 Parkinson's disease 的治療藥物主要是左旋多巴 (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, levodopa)，藉由其可通過血腦屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的特性進入中樞神經系統，然後轉換成 dopamine，補充 PD 病人 dopamine 的不足；然而左旋多巴也有其副作用在，長期使用會產生情緒激動，腸胃障礙，不隨意運動等情形，或引起「開關現象」發作，此時病人會不能運動數秒或數分鐘，此外在用藥約 8 年後可能會出現神智混亂的副作用(Jankovic 1999)。在外科手術方面，治療方法有三種：損毀術(切除)、深部腦刺激術(DBS)和修復術(移植)，然而這些方法目前並無完全治癒的效果，且還在

研究階段(Arenas 2010; Foltynie et al. 2010)。本實驗的結果提供另外一種 PD 的可能治療方向，HSP73 及 HO-1 皆為內生性的神經保護蛋白質，藉由 resistin 的神經保護作用可能是經由 HSP73 及 HO-1 的結論，可作為進一步探討其對於 PD 的可能治療效果。

第三節 研究限制

- (1) Resistin 的 receptor 目前還沒有被找到，因此由本實驗的結果無法得知 MES23.5 cell line 是否本身即具有 resistin receptor，所以是否 resistin 經由與其 receptor 結合而產生神經保護作用，亦或 resistin 是經由不同的 pathway 而達到神經保護的效果，需要更進一步實驗探討。
- (2) 本實驗為一細胞株的 *in vitro* study，僅能由此推論 resistin 對於 dopaminergic 神經元有類似的效果，但在活體內的效果是否一樣，則需更進一步的動物實驗甚至是人體實驗才能得知。
- (3) 以 ZnPP IX 及 KNK 437 來證明 HO-1 及 HSP73 為 resistin 的必需條件未來可考慮以 HO-1 及 HSP73 的 siRNA 來加以印證。

第五章 結論與建議

第一節 結論

由以上的實驗及討論結果，我們可以得知 resistin 對於 MES23.5 細胞株在 6-OHDA 所引起的神經毒性方面的確具有細胞保護的作用，而此種保護作用來自於 resistin 的抗氧化壓力及抗細胞凋亡作用。至於 resistin 引發抗細胞凋亡的機轉，來自於 resistin 會使得細胞保護蛋白質增加，主要是 Bcl-2，HO-1 及 HSP73。此結論引申出對於治療諸如 PD 的神經退化性疾病的新方向，也就是利用內生性的神經保護蛋白質作為研發新藥物的治療方向。

第二節 建議

證明 Resistin 的神經保護作用使得至少已經有三種 adipokines(加上 leptin 及 adiponectin)被發現有保護神經細胞的功能，而且大部分的 adipokines 都能通過血腦屏障(blood-brain barrier, BBB)到達中樞神經系統，並在腦脊髓液中被檢測出(Kos et al. 2007)。將 *in vitro* 實驗外推至 *in vivo* 動物實驗或人體實驗，證明 adipokines 除了能量平衡(energy balance)的作用外，真正在臨床上有神經保護的作用，將會是下一個課題。

參考文獻

- Abou-Sleiman, P. M., M. M. Muqit, et al. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* **7**(3): 207-219.
- Andrews, Z. B. (2011). The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci* **34**(1): 31-40.
- Arenas, E. (2010). Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **396**(1): 152-156.
- Axelsson, J., A. Bergsten, et al. (2006). Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. *Kidney Int* **69**(3): 596-604.
- Bredesen, D. E., R. V. Rao, et al. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature* **443**(7113): 796-802.
- Brouard, S., P. O. Berberat, et al. (2002). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **277**(20): 17950-17961.
- Brouard, S., L. E. Otterbein, et al. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* **192**(7): 1015-1026.
- Chaldakov, G. N., M. Fiore, et al. (2010). Neuroadipology: a novel component of neuroendocrinology. *Cell Biol Int* **34**(10): 1051-1053.
- Chen, B., W. Q. Liao, et al. (2009). Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action. *Brain Res* **1273**: 129-137.
- Crawford, G. D., Jr., W. D. Le, et al. (1992). A novel N18TG2 x mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a

- dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *J Neurosci* **12**(9): 3392-3398.
- de Lau, L. M. and M. M. Breteler (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **5**(6): 525-535.
- Didelot, C., E. Schmitt, et al. (2006). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol*(172): 171-198.
- Ellwart, J. W. and P. Dormer (1990). Vitality measurement using spectrum shift in Hoechst 33342 stained cells. *Cytometry* **11**(2): 239-243.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Foltynie, T. and M. I. Hariz (2010). Surgical management of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* **10**(6): 903-914.
- Galic, S., J. S. Oakhill, et al. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* **316**(2): 129-139.
- Gao, J., C. Chang Chua, et al. (2007). Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **43**(5): 601-609.
- Gozzelino, R., V. Jeney, et al. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**: 323-354.
- Guo, Z., H. Jiang, et al. (2008). Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* **283**(3): 1754-1763.
- Hansen, M. B., S. E. Nielsen, et al. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**(2): 203-210.
- Housa, D., J. Housova, et al. (2006). Adipocytokines and cancer. *Physiol Res* **55**(3): 233-244.
- Howard, J. K., G. M. Lord, et al. (1999). Leptin protects mice from

- starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest* **104**(8): 1051-1059.
- Ivana Scovassi, A. and M. Diederich (2004). Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1041-1047.
- Jankovic, J. (1999). New and emerging therapies for Parkinson disease. *Arch Neurol* **56**(7): 785-790.
- Johnson, L. V., M. L. Walsh, et al. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(2): 990-994.
- Jung, H. S., K. H. Park, et al. (2006). Resistin is secreted from macrophages in atherosclerotic lesions and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **69**(1): 76-85.
- Jung, T. W., J. Y. Lee, et al. (2006). Adiponectin protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **343**(2): 564-570.
- Katori, M., R. Buelow, et al. (2002). Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* **73**(2): 287-292.
- Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140**(901): 578-596.
- Konrad, A., M. Lehrke, et al. (2007). Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **19**(12): 1070-1074.
- Kos, K., A. L. Harte, et al. (2007). Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(3): 1129-1136.
- Lang, A. E. and A. M. Lozano (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* **339**(15): 1044-1053.
- Lanneau, D., A. de Thonel, et al. (2007). Apoptosis versus cell

differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* **1**(1): 53-60.

Larochelle, J., J. Freiler, et al. (2007). Plasma resistin levels in asthmatics as a marker of disease state. *J Asthma* **44**(7): 509-513.

Li, C. Y., J. S. Lee, et al. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**(33): 25665-25671.

Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**(7113): 787-795.

Lin, T. K., C. W. Liou, et al. (2009). Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Med J* **32**(6): 589-599.

Ly, J. D., D. R. Grubb, et al. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **8**(2): 115-128.

Martinou, J. C. and D. R. Green (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 63-67.

McTernan, P. G., C. M. Kusminski, et al. (2006). Resistin. *Curr Opin Lipidol* **17**(2): 170-175.

Morimoto, R. I., K. D. Sarge, et al. (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* **267**(31): 21987-21990.

Nimura, T., P. R. Weinstein, et al. (1996). Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* **37**(1-2): 201-208.

Pan, W., H. Tu, et al. (2006). Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides* **27**(4): 911-916.

Plumier, J. C., A. M. Krueger, et al. (1997). Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to

- ischemic injury. *Cell Stress Chaperones* **2**(3): 162-167.
- Qiu, G., R. Wan, et al. (2011). Adiponectin protects rat hippocampal neurons against excitotoxicity. *Age (Dordr)* **33**(2): 155-165.
- Ross, C. A. and M. A. Poirier (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* **10** **Suppl**: S10-17.
- Russo, V. C., S. Metaxas, et al. (2004). Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* **145**(9): 4103-4112.
- Saxena, N. K., M. A. Titus, et al. (2004). Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* **18**(13): 1612-1614.
- Schaffler, A., A. Ehling, et al. (2003). Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA* **290**(13): 1709-1710.
- Schapira, A. H. (2006). Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* **66**(10 **Suppl 4**): S10-23.
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* **318**(1): 215-224.
- Shimabukuro, M., M. Y. Wang, et al. (1998). Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9558-9561.
- Simon, H. U., A. Haj-Yehia, et al. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **5**(5): 415-418.
- Skehan, P., R. Storeng, et al. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**(13): 1107-1112.
- Soldani, C. and A. I. Scovassi (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**(4): 321-328.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**(6818): 307-312.
- Stocker, R., A. N. Glazer, et al. (1987). Antioxidant activity of

- albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(16): 5918-5922.
- Stryjecki, C. and D. M. Mutch (2011). Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity. *Eur J Clin Nutr* **65**(3): 285-297.
- Tang, B. L. (2008). Leptin as a neuroprotective agent. *Biochem Biophys Res Commun* **368**(2): 181-185.
- Trost, S. U., J. H. Omens, et al. (1998). Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70. *J Clin Invest* **101**(4): 855-862.
- Weng, Z., A. P. Signore, et al. (2007). Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* **282**(47): 34479-34491.
- Wolterbeek, H. T. and A. J. van der Meer (2005). Optimization, application, and interpretation of lactate dehydrogenase measurements in microwell determination of cell number and toxicity. *Assay Drug Dev Technol* **3**(6): 675-682.
- Wozniak, S. E., L. L. Gee, et al. (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* **54**(9): 1847-1856.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**(6505): 425-432.