

國立臺灣大學臨床醫學研究所

博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

doctoral dissertation

脊髓肌肉萎縮症：由動物模式到治療

**Spinal Muscular Atrophy:
From Animal Model to Treatment**

蔡 力 凱

Li-Kai Tsai

指導教授：胡 務 亮 博士

楊 偉 勛 博士

Advisor: Wuh-Liang Hwu, Ph.D.

Wei-Shuan Yang, Ph.D.

中華民國九十九年十二月

December, 2010

國立臺灣大學
臨床醫學研究所

博士論文

脊髓肌肉萎縮症：
由動物模式到治療

蔡力凱
撰

99

12

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

脊髓肌肉萎縮症：由動物模式到治療

**Spinal Muscular Atrophy:
From Animal Model to Treatment**

本論文係蔡力凱君（Q92421016）在國立臺灣大學臨床醫學研究所所完成之博士學位論文，於民國 99 年 12 月 3 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

胡銘亮	楊偉勳	(簽名)
胡銘亮	(指導教授)	徐偉成
楊偉勳		
謝清梅		
謝松蒼		
高嘉宏		(簽名)

系主任、所長

致謝

在本論文完成之際，回首來時路，不禁百感交集。首先感謝我的前指導老師李鴻教授，李老師帶領我進入了基礎研究的世界，從實驗上的支持、生活上的協助、乃至於人生的規劃，處處給予我無微不至的關心，可以在他的指導下作研究，是我實驗生涯中最幸運的事，遺憾的是我無法在李老師生前和他分享畢業的喜悅，但期望未來能持續進行脊髓肌肉萎縮症小鼠的相關研究。此外，我要感謝指導老師胡務亮主任，他不但給予我實驗的構想與信心，亦在我最失落的階段給了我溫暖的扶持；指導老師楊偉勛，協助我順利完成畢業論文。另外，也感謝蔡明勳博士，他是我基礎實驗的啟蒙良師兼益友；丁振紘博士，協助我完成許多瑣碎卻關鍵的實驗；林則斌老師，幫助我建立了小鼠的電生理評估系統。當然，多位其它老師和同事的支持，包括葉炳強老師、吳瑞美老師、謝松蒼老師、鄭建興老師、徐偉成老師、謝秀梅老師、蘇怡寧老師及陳壹純助理等等，因為有他們的幫助，此篇論文才得以完成。此外也感謝罕見疾病基金會對此論文的獎助和支持。

在我的研究過程中，歷經了人生的重大起落，也因為我的賢內助又甄，她無怨地照顧二個聰明調皮的小孩，在我疲憊失意的時候給我鼓勵，讓我無後顧之憂，使我得以繼續擁抱理想，我由衷地感謝她。也感謝我的雙親，他們在我研究的道路上，一直給予我心理及物質上的支持。孩子伊瑄和伊甯，在我忙碌生活中帶來的體貼與安慰，成了我最大的鼓舞力量。

最後，謹將此論文獻給愛我最深的家人，和勇敢的脊髓肌肉萎縮症的病友們。

中文摘要

脊髓肌肉萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, 簡稱 SMA) 為一遺傳性神經退化性疾病，因脊髓之運動神經元退化，造成患者四肢無力和肌肉萎縮。傳統上，疾病依臨床症狀及發病時間的不同，可分成第一型/嚴重型、第二型/中間型和第三型/輕型，目前尚無有效的根本治療。SMA 為一自體隱性遺傳疾病，SMA 的相關基因為運動神經元存活基因(*SMN*)，一般正常人在第 5 條染色體上分別有一個 *SMN1* 及 *SMN2* 基因，*SMN1* 基因所製造出的 SMN 蛋白質是正常且功能完整的，但 *SMN2* 基因的蛋白質產物大多是不穩定且無功能的 SMN 蛋白質。SMA 疾病的表現導因於 SMN 蛋白質的不足，而大約有百分之九十六的 SMA 病患因在兩股染色體上之 *SMN1* 基因皆發生突變，其體內只能產生少數由 *SMN2* 基因所製造的正常 SMN 蛋白質，所以病患因缺乏 SMN 蛋白質而產生 SMA 的臨床表現。

將小鼠二股的 *Smn* 基因剔除，並同時植入人類的 *SMN2* 基因，此小鼠 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+}) 表現和人類 SMA 的病患相似，具有脊髓運動神經元的退化和四肢肌肉的萎縮，可作為 SMA 的小鼠模式。但目前的 SMA 小鼠多有存活時間過短的缺點，不利於治療性研究的進行，而第三型(輕型)SMA 小鼠雖可存活數月，但尚無明顯的表現型分析，因此本論文首先嘗試進行第三型小鼠的表現型分析，以期此 SMA 小鼠有機會成為適當且理想的 SMA 小鼠模式運用於後續治療性研究。

將第三型 SMA 小鼠和正常小鼠分別以其接受試驗的時間分為 4 組，包括三、六、九及十二個月大，每隻小鼠皆接受形態學分析、運動功能試驗、電生理檢查及脊髓病理分析。運動功能試驗包括了傾斜試驗、轉輪試驗、RotaRod 試驗及下落試驗。在電生理測試中，以電刺激小鼠的坐骨神經，記錄腓腸肌經活化後所產生訊號 (CMAP) 的振幅。在脊髓病理分析中，將小鼠腰髓以 H&E 法染色，觀察並計算脊髓前角區域內的神經元密度。

分析發現，第三型 SMA 小鼠的脊髓運動神經元於 6 個月大時開始退化，而在 9 個月大時，脊髓運動神經元的數目和正常小鼠相比，只剩下 71%，同時在小鼠 9

個月大時，可檢測出 SMA 小鼠明顯的形態學異常，如尾末端壞死變短、耳殼不規則及後肢缺指的現象，而四個運動功能測試皆顯示有功能的下降，且腓腸肌出現了肌肉萎縮的情形；而在小鼠 12 個月大時，脊髓運動神經元的數目和正常小鼠相比只剩 60%，該時在電生理檢查中，CMAP 的振幅較正常小鼠要小。以上結果顯示，本論文所運用的形態學分析、運動功能檢測、脊髓及肌肉分析和電生理檢查，可以用來評估第三型 SMA 小鼠的表現型，且其在 9 個月大至 12 個月大時，是比較治療反應最適合的時間點。

過去在細胞研究上已發現，藥物 valproic acid (VPA) 的治療可使細胞內的 SMN 表現量增加，由於體內 SMN 蛋白質的多寡和疾病嚴重度呈逆相關，因此，VPA 具有治療 SMA 的潛力。此外，以 VPA 治療 SMA 的療效機轉尚未非常明瞭，VPA 除了可能使神經元內的 SMN 蛋白質表現量增加外，過去曾有研究發現 VPA 亦可能增加抗細胞凋亡因子的表現和促進神經元及肌肉細胞的再生。因此本論文接著以 VPA 治療第三型 SMA 模式小鼠，嘗試證實 VPA 於 SMA 的治療效果，另外並探索 VPA 對 SMA 小鼠的療效機制。

將第三型 SMA 小鼠隨機分為 VPA 治療組及無治療組，在治療組中，從小鼠 6 個月大起，取 VPA 置於飲用水中 (0.2 mg/ml) 給小鼠飲用，VPA 治療持續至小鼠 12 個月大，另取同年齡經 VPA 治療及未治療的正常小鼠作為比較。療效評估法包括了形態學分析、運動功能試驗、電生理檢查及脊髓和肌肉病理分析。此外亦使用西方點墨法、同步定量 PCR 和免疫螢光染色法來探索 VPA 於 SMA 的治療機制。

研究顯示，以 VPA 長期治療第三型 SMA 模式小鼠，可以減少 SMA 小鼠形態學的異常、減緩運動功能的退化、避免電生理檢查中 CMAP 振幅的下降、減少神經肌肉交界處的去神經化現象、降低肌肉纖維的萎縮及延緩脊髓運動神經元的退化，然而 VPA 的療效似乎仍不足以根治 SMA 小鼠的病態表現。而 VPA 對 SMA 的治療作用機制是多元的，可能的作用包括了增進 *SMN2* 基因 promoter 之活性及使 SMN 訊息 RNA 的 alternative splicing 趨向於全長 SMN 的狀態，因而使脊髓運

動神經元及肌肉組織內的 SMN 蛋白質含量增加；此外，VPA 提升了小鼠脊髓神經元內 Bcl-2 和 Bcl-x_L 的表現量，因而可能具有抗細胞凋亡的作用；最後，VPA 於 SMA 小鼠的脊髓內誘發了神經細胞生成及增進了神經膠質細胞的增生，也許此作用可形成神經保護的現象。

SMA 患者脊髓內有過度細胞凋亡的現象。而 Bcl-x_L 是一個抗細胞凋亡因子，具有抑制神經細胞死亡的能力，由於 SMA 病患的病理組織中曾發現有抗細胞凋亡因子 Bcl-x_L 表現下降的情形，因此若能增加 SMA 模式小鼠體內神經細胞之 Bcl-x_L 表現，則可能可減緩脊髓神經元的細胞凋亡，達到治療的目的。

將 SMA 小鼠和 Bcl-x_L 基因轉殖小鼠交配，得到含有 Bcl-x_L 轉殖基因的第三型 SMA 模式小鼠 (SMA/Bcl-x_L, *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}*Bcl-x_L*^{+/-})，另取原 SMA 小鼠作為對照。分別進行形態學分析、運動功能試驗、電生理檢查、脊髓病理分析及存活分析。此外亦使用西方點墨法和免疫螢光染色法了解脊髓內 Bcl-x_L 和 SMN 蛋白質的表現量及細胞凋亡的狀態。

結果顯示，SMA/Bcl-x_L 小鼠的脊髓內 Bcl-x_L 含量約為 SMA 小鼠的二倍，但 SMA/Bcl-x_L 小鼠和 SMA 小鼠的脊髓內 SMN 蛋白質含量皆較正常小鼠明顯偏低。而分析 SMA/Bcl-x_L 小鼠的表現型可知，SMA/Bcl-x_L 小鼠的存活時間較 SMA 小鼠長約 1.5 倍、尾巴及耳緣的退化較少、運動功能較佳、肌肉萎縮較輕、電生理分析結果較為正常、脊髓運動神經元退化較少、且脊髓內有較少的細胞凋亡反應。

以上研究發現，在不影響 SMN 蛋白質表現的情況下，Bcl-x_L 的基因轉殖對 SMA 有明顯的治療作用。由於目前全世界 SMA 的相關研究，幾乎皆是以 SMN 蛋白質為標的，嘗試尋找可以使 SMN 蛋白質表現增加的藥物，因此未來 Bcl-x_L 可作為一個新的 SMA 治療標的，尋找有潛力的治療藥物。

關鍵詞：脊髓肌肉萎縮症、動物模式、valproic acid、Bcl-x_L、細胞凋亡

英文摘要

Spinal muscular atrophy (SMA) is characterized by the degeneration of spinal motor neurons, and it is associated with muscle paralysis and atrophy. Childhood SMA exhibits an autosomal recessive pattern of inheritance. Based on age of onset of symptoms and achievement of motor milestones, SMA has been subdivided into three clinical types. No curative treatment is available so far for SMA.

Several mouse models for SMA have been generated through different methods. Because of the disadvantage of short survival time, heterogeneous phenotype or the non-homologous genetic situation compared to human SMA in these mouse models, there is still no standard preclinical therapeutic testing system for SMA. Type III (mild-type) SMA mice have a lifespan longer than half a year, offering a chance to become a good therapeutic testing system. This study first characterized the type III SMA mice by a series of examinations.

For characterization of SMA mice, type III SMA mice ($Smn^{-/-}SMN2^{+/-}$) and wild-type mice ($Smn^{+/+}$) were subdivided into four subgroups, according to their evaluated age: 3, 6, 9 and 12 months old. Each mouse underwent morphological, motor functional, electrophysiological and pathological studies.

The results revealed that motor neuron degeneration in type III SMA mice started at 6 months of age, and the number of residual motor neurons reduced to 71% of wild-type mice at the age of 9 months. At the same time, SMA mice exhibited clear morphological changes such as short tails and irregular ears, motor function decline demonstrated by four motor functional tests and muscle atrophy measured by gastrocnemius muscle weight. By 12 months old, the number of residual motor neurons reduced to 60% of wild-type mice. In addition, the amplitudes of compound muscle action potentials (CMAPs) in SMA mice had decreased significantly.

Valproic acid (VPA), a histone deacetylase inhibitor, increased SMN protein levels in cells derived from SMA patients. VPA also improved muscle strength in some SMA patients. SMA-related physicians and patients are becoming more interested in VPA; however, the therapeutic effects of VPA in treating SMA are still not fully understood. This study thus further investigated the treatment effects and therapeutic mechanisms of VPA in type III SMA mice.

Type III SMA mice were randomly assigned to treated and untreated groups. In treated mice, VPA was added to the daily drinking water at 0.2 mg/ml from 6 to 12 months of age. The therapeutic effects were evaluated using morphological tests, motor functional tests, electrophysiological studies, spinal pathological tests, and muscle pathological studies. For investigation of therapeutic mechanisms of VPA, Western blots, real-time PCR, and immunohistochemistry were used.

We found that VPA-treated SMA mice showed considerably reduced degeneration of spinal motor neurons compared to untreated SMA mice. As such, their motor function was better preserved with less muscle denervation and atrophy, greater CMAP amplitudes on sciatic nerves, and less morphological abnormalities than seen in untreated SMA mice. In addition, VPA exhibited multiple therapeutic effects in SMA. VPA elevated SMN protein levels in the spinal motor neurons. VPA also increased the levels of Bcl-2 and Bcl-x_L proteins in the spinal neurons, which may reduce motor neuron apoptosis in SMA. Furthermore, VPA probably could induce neurogenesis and promoted astrocyte proliferation in the SMA mouse spinal cord, which might contribute to therapeutic effects by enhancing neuroprotection.

Moreover, Bcl-x_L is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family and acts by inhibiting proapoptotic members of the Bcl-2 family through heterodimerization. Viral-mediated Bcl-x_L expression can protect motor neuron death in primary motor neuron cultures. Since the degeneration of spinal motor neurons in SMA is mediated by

apoptosis, over-expression of Bcl-x_L may be of benefit in SMA. This study then investigated the benefits of *Bcl-x_L* transgenes in type III SMA mice.

Crossing type III SMA mice with *Bcl-x_L* transgenic mice created SMA/Bcl-x_L mice. The *Bcl-x_L* transgenic effects were evaluated using morphological tests, motor functional tests, electrophysiological studies, spinal pathological tests, and survival analysis. For investigation of SMN and Bcl-x_L expression and degrees of spinal apoptosis, Western blots and immunohistochemistry were used.

The levels of Bcl-x_L protein in spinal neurons of SMA/Bcl-x_L mice were nearly double of that in SMA mice while the levels of SMN protein were similar between these two groups. The SMA/Bcl-x_L mice showed preserved motor function, normalized electrophysiological tests, diminished muscle atrophy, and less motor neuron apoptosis and degeneration. Although the SMA/Bcl-x_L mice still showed the typical SMA morphological phenotypes throughout their lives, they lived 1.5 times longer than SMA mice.

In summary, the above studies established a standard therapeutic testing system for SMA with type III SMA mice. The morphological, motor functional, electrophysiological and spinal pathological tests here could be used to evaluate treatment responses in both treated and non-treated mice between 9 and 12 months of age. In addition, by a combination of effects such as increased SMN protein levels, anti-apoptosis, and probable neuroprotection, VPA showed considerable therapeutic benefit in the mouse model of type III SMA. Over-expression of Bcl-x_L has a potential for amelioration of SMA.

Keywords: spinal muscular atrophy, animal model, valproic acid, bcl-x_L, apoptosis

目錄

章節	標題	頁碼
	口試委員會審定書	i
	誌謝	ii
	中文摘要	iii
	英文摘要	vi
1	緒論	1
1.1	研究背景	3
1.1.1	建立脊髓肌肉萎縮症小鼠模式之治療評估方法	5
1.1.2	以 valproic acid 治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式	9
1.1.3	建立 Bcl-x _L 基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估 Bcl-x _L 的治療效果	14
1.2	研究假說及目的	18
2	研究方法與材料	21
3	結果	
3.1	建立脊髓肌肉萎縮症小鼠模式之治療評估方法	35
3.2	以 valproic acid 治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式	39
3.3	建立 Bcl-x _L 基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估 Bcl-x _L 的治療效果	46
4	討論	
4.1	建立脊髓肌肉萎縮症小鼠模式之治療評估方法	52
4.2	以 valproic acid 治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式	59
4.3	建立 Bcl-x _L 基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估 Bcl-x _L 的治療效果	66
5	展望	
5.1	建立脊髓肌肉萎縮症小鼠模式之治療評估方法	72
5.2	以 valproic acid 治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式	74
5.3	建立 Bcl-x _L 基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估 Bcl-x _L 的治療效果	79
6	參考文獻	82
7	英文縮寫	94
8	圖表	96
9	附錄：博士班修業期間所發表之相關論文	118

圖目錄

圖序	標題	頁碼
圖一	SMA/Bcl-x _L 小鼠交配法及基因型鑑定	96
圖二	第三型 SMA 小鼠之形態學分析	97
圖三	性別和尾長對小鼠之運動功能的影響	98
圖四	第三型 SMA 小鼠的運動功能分析	99
圖五	第三型 SMA 小鼠的電生理分析	100
圖六	第三型 SMA 小鼠的脊髓病理分析	101
圖七	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的運動功能、形態學和電生理分析	102
圖八	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓病理分析	103
圖九	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓病理肌肉及神經肌肉交界分析	104
圖十	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓 SMN 表現量	105
圖十一	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓 SMN 表現分布	106
圖十二	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的肌肉 SMN 表現	107
圖十三	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠脊髓內 Bcl-2 和 Bcl-x _L 之表現量	108
圖十四	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠脊髓內 Bcl-2 和 Bcl-x _L 之表現分布	109
圖十五	經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠脊髓及肌肉內之細胞再生	110
圖十六	第三型 SMA/Bcl-x _L 小鼠脊髓內 Bcl-x _L 及 SMN 蛋白質之表現	111
圖十七	第三型 SMA/Bcl-x _L 小鼠之存活曲線和形態學分析	112
圖十八	第三型 SMA/Bcl-x _L 小鼠的運動功能、電生理檢測和肌肉重量	113
圖十九	第三型 SMA/Bcl-x _L 小鼠的脊髓病理分析	114
圖二十	第一型 SMA/Bcl-x _L 小鼠之蛋白質表現和存活分析	115
圖二十一	第三型 SMA 小鼠的表現型整理	116
圖二十二	VPA 於 SMA 之療效機制	117

第一章 緒論

脊髓肌肉萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, 簡稱 SMA) 為一遺傳性神經退化性疾病，因脊髓之運動神經元退化，造成患者四肢無力和肌肉萎縮。在西方國家，SMA 是第二常見的致命性遺傳性疾病，僅次於肺泡纖維化症 (cystic fibrosis)；而在東方人，SMA 亦是第二常見的隱性遺傳性疾病，僅次於重型乙型地中海貧血，平均約六千至一萬個新生兒就有一人帶病 (Talbot et al, 2001)，而此發生率在世界各個種族間皆類似 (Pearn, 1980)。傳統上，疾病依臨床症狀及發病時間的不同，可分成三型：第一型為嚴重型 (SMA Type I，又稱 Werdnig-Hoffmann disease; MIM#253300)，大約占 SMA 患者的 50%，病患出生六個月內會發病，多無法學會起坐，通常兩歲前患者會因呼吸衰竭併發肺炎死亡；第二型為中間型 (SMA Type II; MIM#253550)，病患於出生後十八個月內發病，可存活大於兩歲，雖然少數病患可能保有短暫站立的功能，但是通常無法行走，大部分的病人可存活至成人，但常因長期的肌肉無力導致骨骼及呼吸方面的併發症；第三型輕型 (SMA Type III，又稱 Kugelberg-Welander disease; MIM#253400)，病患於出生十八個月後發病，即發病年齡常在病童學會走路以後，部分病患在學齡時期便需以輪椅代步，而部分病患到成年仍保有獨立行走的能力，病患的壽命幾乎和正常人相同。此外，近年來，有學者另將輕型的 SMA 分出第四型 SMA，即病患的發病時間於二十歲以後，他們僅有輕微的無力，而行走和運動能力只有些微的影響，此型病患不會出現呼吸方面的併發症 (Zerres et al, 1997)。

SMA 病患的肌肉萎縮和無力常從四肢肌肉開始發生，尤其以四肢的近端肌肉影響最為明顯，如上臂及大腿的肌肉，而到疾病晚期時，病患的呼吸橫膈肌可能也會出現無力的現象，因而影響到呼吸的功能。而 SMA 所引起的運動神經元退化，除了包括脊髓運動神經元外，還影響到腦幹的運動神經元，所以 SMA 病患亦有可能出現吞嚥肌肉無力的情形，然而病患的動眼肌通常不會有問題。此外，病

患的深部肌腱反射 (deep tendon reflex) 會下降或消失，但感覺功能多為正常或只有輕微的異常；病患的大腦功能，如記憶及理解能力，都是正常的 (von Gontard et al, 2002)。

以往 SMA 在診斷上，若見到病患有肌張力不全 (hypotonia) 或四肢無力、四肢深部肌腱反射下降、感覺神經檢測正常等符合臨床 SMA 之表徵時，可以安排肌電圖檢查和肌肉切片檢查。在肌電圖檢查下，可見到受影響的肌肉出現去神經化 (denervation) 的現象，而其運動單元活動電位 (motor unit action potential) 的振幅和寬度會延長；而在肌肉的病理切片下可見到肌肉細胞的萎縮，且有肌肉同型聚集的現象 (muscle type grouping) (Lunn et al, 2008)。這些表現主要可用來和肌肉失養症 (muscular dystrophy) 作區分，肌肉失養症為一肌肉病變，其病患在肌電圖和肌肉切片檢查下的結果和 SMA 病患有明顯的不同，可幫助臨床上的鑑別診斷。然而，現今因 DNA 診斷發達，對於 SMA 的診斷已不太需要作到肌肉切片檢查，只要抽血並以 PCR 等的方式分析白血球內的 DNA，就可以正確診斷出大部分的 SMA 患者 (敏感度可達 95%；特異度可達 100%) (Rodrigues et al, 1995)。

SMA 病患的治療，目前僅侷限於併發症的處置及預防，而以增進病患的生活品質為目標，其中，在 SMA 病患發生的併發症，常見於呼吸、消化及骨骼系統 (Wang et al, 2007)。在呼吸系統方面，病患因呼吸肌肉的無力，可能會出現咳痰困難、換氣不足和反覆感染的情形，所以 SMA 病患若有呼吸相關的異常，應定期評估追蹤呼吸功能，進行胸腔物理治療，並定期施打疫苗預防呼吸道感染。在消化系統方面，病患可能出現吞嚥困難、胃食道逆流、營養不良和便秘等症狀，這些患者可以接受營養師的飲食建議，醫師可開予腸胃蠕動促進劑，嚴重的病患可能需要置放鼻胃管或進行胃造瘻手術。而在骨骼系統方面，肌肉的無力可能引起關節攣縮、脊椎側彎及疼痛等症狀，病患需定期接受物理治療及職能治療的復健，有些患者針對脊椎側彎需作外科手術矯正。至於 SMA 的治本藥物，目前尚未有研究證實任何藥物可確實根治或延緩疾病的進程，由於現今 SMA 基因診斷已有機會

可篩檢出還未發病的潛在患者，因此，未來若有合適且有效的 SMA 治療藥物，早期治療在 SMA 是可以達到的理想。

1.1 研究背景

SMA 為一自體隱性遺傳模式 (autosomal recessive) 的遺傳性疾病，在人群中，約 35 至 50 人就有一個人是帶有異常基因的帶原者 (Wirth, 2000)。SMA 的相關基因，稱為運動神經元存活基因 (*survival motor neuron gene*，簡稱 *SMN*)，此基因位於第 5 對染色體的長臂上 (5q13)，該位置的特色為基因之重覆 (duplication)，亦即一段基因會有另一相似的基因和其呈鏡向對應，故一般正常人在第 5 條染色體上有一個 *SMN1* 基因 (MIM#600354) 及一個 *SMN2* 基因 (MIM#601627)，兩個基因非常相似，皆有九個 exon 及八個 intron，長度約為 20kb，*SMN1* 及 *SMN2* 基因彼此之間只有十一個鹼基的差異 (Farrar et al, 2009)。*SMN1* 基因所製造出的 SMN 蛋白質是正常且功能完整的，有 38kDa 而含 294 個胺基酸，但 *SMN2* 基因的蛋白質產物大多是不穩定且無功能的 SMN 蛋白質。這是因為在 *SMN1* 及 *SMN2* 兩基因之間的十一個鹼基差異中，其在第七個 exon 的第六個鹼基因呈 C 到 T 的變化 (Ex7+6)，此改變破壞了該位置原有的 exon splicing enhancer，使基因轉譯的過程中，exon 7 因 alternative splicing 被去除掉，導致 *SMN2* 基因所轉譯的訊息 RNA (messenger RNA，簡稱 mRNA)，有 80-95% 是缺少 exon 7 的 truncated mRNA，也因此，*SMN2* 基因的蛋白質產物大多是不穩定且無功能的 SMN 蛋白質，只有約 10% 是正常具有功能的 SMN 蛋白質 (Cartegni and Krainer, 2002)。SMA 疾病的表現導因於 SMN 蛋白質的不足，而大約有百分之九十六的 SMA 病患因在兩股染色體上之 *SMN1* 基因皆發生突變 (deletions, missense, non-sense or splice site mutations)，其體內只能產生少數由 *SMN2* 基因所製造的正常 SMN 蛋白質，所以病患因缺乏足夠的 SMN 蛋白質而產生了 SMA 的臨床表現。

目前已知，體內 SMN 蛋白質的多寡和疾病嚴重度呈逆相關，也就是 SMN 蛋白質愈少的患者，疾病表現愈嚴重；反之，SMN 蛋白質愈多的患者，疾病的嚴重度愈輕 (Feldkotter et al, 2002; Lefebvre et al, 1997)。SMN 蛋白質表現於所有體細胞的細胞核和細胞質，而其中又以脊髓內的運動神經元表現特別多。在細胞核內，SMN 蛋白質集成許多小顆粒（直徑 0.1-2 μm ），名為 gems (Gubitz et al, 2004)，在 SMA 患者的細胞核內，gems 的數目比正常人要來的少 (Lefebvre et al, 1997)。研究顯示，SMN 蛋白質在細胞內可能有以下功能：（1）協助訊息 RNA 的剪接 (pre-mRNA splicing)：在細胞內，切結體 (spliceosome) 負責了 DNA 轉譯後 (post-transcriptional) 之訊息 RNA 的切結，而 small nuclear ribonuclear proteins (snRNPs) 為切結體內之重要成分；snRNP 主要由 small nuclear RNA (snRNA) 及 Sm 蛋白質所組成。在細胞質內，SMN 蛋白質幫助 snRNA 和 Sm 蛋白質組成 snRNP，並接著幫忙 snRNP 運輸至細胞核內，以進行後續的訊息 RNA 的切結功能，因此，SMN 蛋白質和訊息 RNA 的切結息息相關 (Pellizzoni et al, 2002)。在一 SMA 模式小鼠的脊髓內，SMN 蛋白質表現量為正常鼠的八分之一，而其脊髓及大腦內的 snRNP 的活性只有正常鼠的十分之一 (Gabanella et al, 2007)。然而，體內所有的細胞皆需作 DNA 轉譯後之訊息 RNA 的切結，但 SMN 蛋白質表現不足時，卻只選擇性地呈現脊髓運動神經元的退化，此現象似乎難以用此 SMN 的功能完全解釋。（2）SMN 蛋白質可能和 β -actin 的生成運輸及神經軸突的生長有關：位於運動神經元的生長椎 (growth cone) 位置之 β -actin，扮演了神經軸突生長的重要角色，而研究顯示，SMN 蛋白質會和 β -actin 形成聚合體，並幫助 β -actin 的運輸；而 SMN 蛋白質缺乏的運動神經元中， β -actin 的量會減少，神經軸突生長也較差 (Rossoll et al, 2003)。由於運動神經元有非常長的軸突，故或許此 SMN 功能可用來解釋為何 SMA 選擇性地造成脊髓運動神經元的退化。雖然 SMN 蛋白質可能有以上功能，然而目前為止，為何 SMN 減少會導至 SMA，詳細的致病機轉至今尚未非常明瞭。

雖然 SMA 患者的兩股 *SMN1* 基因皆為異常，但基因分析可發現，每位 SMA

病患皆有 *SMN2* 基因存在，根據此 SMA 基因的特性，SMA 治療的策略可包括：(1) 改變 *SMN2* 基因 alternative splicing 的狀態，使增加 *SMN2* 產生正常 (含有 exon 7) 的訊息 RNA 及 SMN 蛋白質的產物量。(2) 增進 *SMN2* 基因啟動子 (promoter) 的活性，使 *SMN2* 基因的整體產物增加。(3) 改變 *SMN2* 訊息 RNA 轉錄蛋白質的過程：經 alternative splicing 所形成的缺少 exon 7 之 *SMN2* 訊息 RNA，所轉錄的蛋白質會在 C 端缺少 16 個胺基酸，此異常將影響 SMN 蛋白質的群聚化 (oligomerization) (Lorson et al, 1998)；若我們可在異常 SMN 蛋白質後加上非特異性的尾巴，則可促進該蛋白質的正常群聚化 (Hua et al, 2004)。亦即，若能使 *SMN2* 訊息 RNA 轉錄蛋白質的過程中跳過 stop codon，使其保有一段非特異性的 C 端尾巴，可能對 SMN 的功能上有所助益。(4) 因缺少 exon 7 的 *SMN2* 訊息 RNA 所轉錄的蛋白質之代謝率較高，故減少 SMN 蛋白質的代謝也是治療的方向之一。

1.1.1 脊髓肌肉萎縮症的動物模式

由於 SMA 至今並無有效的治療藥物，目前國內外皆有相關的 SMA 研究持續的進行中，尤其是嘗試在 SMA 患者的培養細胞上作藥物的治療 (*in vitro* study)，以找尋合適的藥物。然而，當尋找到具有潛力的治療藥物後，下一步應嘗試在活體上作藥物測試 (*in vivo* study)，若該藥物亦可在 SMA 動物模式上看到好的治療效果，可進而再進行人體臨床試驗以確立療效。因此，建立合適的 SMA 之動物模式，以利後續治療藥物的探索，為 SMA 研究領域中相當重要的一個課題。

SMA 為兩股染色體上之 *SMN1* 基因發生突變，故若想要建立 SMA 的小鼠動物模式，最直接的方法為將小鼠兩股的 *SMN1* 基因同時剔除，然而此方法會造成小鼠的死胎 (embryonic lethal) (Schrank et al, 1997)。其原因在於小鼠和人類基因型態的不同：小鼠只有 *Smn* 基因，不像人類有 *SMN1* 和 *SMN2* 基因，而 SMN 蛋白質可能和生命之維持有關，當把小鼠二股 DNA 上的 *Smn* 基因皆剔除時，則小

鼠便無法生存，可能是如前述，SMN 蛋白質和訊息 RNA 的切結有關，而所有體內的細胞在製造訊息 RNA 時，皆需要 SMN 蛋白質的幫助，因此當體內完全沒有 SMN 蛋白質的存在時，體內的所有細胞皆無法正確的進行訊息 RNA 的切結，因此個體便無法存活；而在人類，當兩股 *SMN1* 皆突變時，尚有 *SMN2* 基因製造出少量完整的 SMN 蛋白質作為代償以維持生命，因此尚能維持生命的運作，但是因為 SMN 蛋白質的表現仍為低下，故此基因的異常便造成了脊髓運動神經元的退化。

目前全世界主要有三種主要的 SMA 小鼠動物模式，一般稱為台灣模式、美國模式及法國模式，該名稱是以製作模式的實驗室國別來命名，其個別皆具有其優缺點。

Hsieh-Li 將小鼠二股的 *Smn* 基因剔除，並同時植入人類的 *SMN2* 基因，其基因型為 *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}，如此的小鼠不但能正常出生，而且表現和人類 SMA 的病患相似 (Hsieh-Li et al, 2000)。這是因為所植入的人類 *SMN2* 基因在小鼠體內製造了少量的正常 SMN 蛋白質，其量雖少，但卻避免了小鼠的死胎，而因為 SMN 的量仍不足以讓運動神經元存活，故此 SMA 小鼠出現了類似人類 SMA 病患的表現型：此小鼠和人類一樣呈現三種不同的疾病嚴重度，第一型 SMA 小鼠存活不到十天，其死亡前可見四肢無力及呼吸衰竭；第二型 SMA 小鼠存活不到二十八天 (大部分小於十四天)，其四肢無力和呼吸功能較第一型 SMA 小鼠要來的好；而第三型 SMA 小鼠可存活大於六個月，外觀上可見小鼠的尾巴較肥短，但其一般的運動功能和正常小鼠在肉眼的觀察下並無明顯的不同。病理切片下，可見脊髓內的運動神經元的退化和四肢身軀肌肉的萎縮。此 SMA 小鼠模式常被稱為台灣模式。

此外，Monani 亦使用類似的方法，即小鼠 *Smn* 基因剔除加上人類 *SMN2* 基因植入法 (Monani et al, 2000)，製作出 SMA 的小鼠模式，基因型亦為 *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}，常被稱為美國模式。此 SMA 小鼠在剛出生時，於脊髓內的運動神經元之個數尚且正常，但在第三天大時運動神經元已明顯退化，而在小鼠出生後第五至第六天時，

大部份即會死亡。但由於此小鼠模式的存活時間過短，難以進行後續的治療研究，因為治療期相對較短，因此在藥物療效研究中，在治療效果尚未出現前，小鼠可能便已死亡，在此缺點下，之後此小鼠模式被進行了一些調整：Le 在此 SMA 小鼠中再植入 *SMNΔ7* 基因，即基因型為 *Smn^{-/-}SMN2^{+/-}SMNΔ7^{+/-}*，其中 *SMNΔ7* 為去除了 exon 7 的 *SMN2* 基因，結果，此小鼠之存活時間由原來的 5.2 天增加為 13.3 天 (Le et al, 2005)，也因此該 SMA 模式小鼠可以在約兩週內進行相關的治療。

由於單純將小鼠兩股的 *Smn* 基因剔除會造成小鼠的 embryonic lethal (Schränk et al, 1997)，Frugier 使用了神經元專一的 *Smn* 基因剔除術 (Neuron-specific *Smn* knock-out)，製作出一般稱為法國模式的 SMA 小鼠模式 (Frugier et al, 2000)。此小鼠體內只有神經元內的 *Smn* 基因被剔除，而其它體內的細胞仍然擁有正常的兩股 *Smn* 基因，如此，此小鼠不會因全身皆缺乏 SMN 蛋白質而死亡，但因為神經元內的 *Smn* 基因被剔除，造成神經元內沒有足夠的 SMN 蛋白質，故產生了 SMA 的表現型。此小鼠具有較差的運動功能，異常的脊髓運動神經元形態及肌肉的萎縮和群化，而這些小鼠的存活時間約為 25 天 (Frugier et al, 2000)。

SMA 小鼠模式的建立，對於 SMA 的研究有相當大的助益及潛力：在將某藥物或治療方法應用於病患前，我們可以將此治療在 SMA 動物模式上測試，若可以看到好的治療效果，再使用於 SMA 病患，如此可減少未知藥物在臨床試驗中對參與病患造成的傷害。然而，目前世界上所存在的 SMA 小鼠模式，各有其缺點，使 SMA 治療的測試難以順利且適當的進行：

(1) 台灣模式：SMA 模式小鼠和人類 SMA 病患一樣呈現三種不同的疾病嚴重度，其中，第一型及第二型 SMA 小鼠的存活時間過短，大部分皆小於二週，因此藥效研究實驗中，小鼠僅能治療約一至二週便要評估其治療效果，而當藥物治療的期間短時，則相對較難看出明顯的藥物療效；而第三型 SMA 小鼠雖可存活數月，但尚無明顯的表現型分析的相關研究報告，即目前尚不知以何種方法作為療效分析較為適當。

(2) 美國模式：該模式為經兩股 *Smn* 基因剔除加上人類 *SMN2* 基因植入法所得的 SMA 小鼠 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+})，其平均存活時間僅有 5.2 天 (Monani et al, 2000)；而若再植入 *SMN17* 基因的 SMA 小鼠 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+}*SMN17*^{+/+})，雖然存活時間可增加為 13.3 天 (Le et al, 2005)，但仍相對較短。小鼠可斷奶的時間約為一至二週，其間，小鼠需要吸取媽媽的奶水，故若想要在存活時間的兩個星期內作治療，有其困難度。因此，Butchbach 發明了新生小鼠餵食法 (Butchbach et al, 2007)，嘗試將餵食器口置入新生小鼠口中，並灌入藥物，並證實其可用性，然而其最早的餵食時間仍需待出生後第四天才較適合進行，這時，可利用的治療時間只剩下約十天了。是故，若以某藥物治療此 SMA 小鼠，但不見療效，其可能是藥物效果不好，也可能是治療的時間不夠。

(3) 法國模式：其為以神經元專一的 *Smn* 基因剔除術所製作出的 SMA 小鼠模式，也因此小鼠體內只有神經元內的 *Smn* 基因被剔除，而其它體內的細胞仍然擁有正常的兩股 *Smn* 基因，所以此小鼠雖然可產生類似 SMA 的表現型，但基因型和人類 SMA 是不同的，故治療此小鼠模式所得到的療效，其代表性可被質疑。尤其是當以肌肉專一的 *Smn* 基因剔除術 (Muscle-specific *Smn* knock-out) 去除小鼠肌肉中的 *Smn* 基因時 (Cifuentes-Diaz et al, 2001)，小鼠肌肉呈現類似肌肉萎縮症 (muscular dystrophy) 所看到的變化；而若將果蠅的 *Smn* 基因剔除，其肌肉的肌纖維將呈不正常的排列 (Rajendra et al, 2007)，此結果代表雖然 SMN 蛋白質的缺乏主要影響了脊髓的運動神經元，但亦會直接影響到肌肉組織，故 SMA 小鼠模式若只有神經元內的 *Smn* 基因被剔除，的確無法代表整個個體真實而完整的變化。此外，在 SMA 治療策略上，我們可以嘗試以藥物使 *SMN2* 基因的表現量增加，或是使 *SMN2* 基因的轉譯減少 alternative splicing 的發生，以增加正常 SMN 蛋白質的生成，然而以神經元專一的 *Smn* 基因剔除術所製作出的 SMA 小鼠模式，DNA 並無 *SMN2* 基因的存在，因此這個現象也限制了此種小鼠模式在 SMA 治療研究的可用性。

對於任何疾病，在動物模式上進行藥物或相關治療的測試，為連結細胞實驗和人體試驗的橋樑，所以在目前尚未有有效治療 SMA 疾病的方法，且並無良好 SMA 模式小鼠的情形下，建立一個合適且兼具代表性的 SMA 小鼠模式是重要且刻不容緩的。

1.1.2 以 valpoic acid 治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式

透過藥物篩檢研究，sodium butyrate 在細胞及動物實驗上皆證實了對 SMA 具有療效 (Chang et al, 2001)：使用不同濃度的 sodium butyrate 治療 SMA 患者的淋巴細胞株 (lymphoid cell lines)，可發現細胞內的 SMN 蛋白質和訊息 RNA 表現量，皆隨治療的濃度增加而增加；以 sodium butyrate 治療 SMA 模式小鼠，可見其尾部肌肉較無萎縮，而小鼠的存活時間增長；另以 sodium butyrate 治療和 $Smn^{+/-}$ 小鼠交配並已懷孕的 $Smn^{+/-}$ $SMN2^{+/-}$ 母鼠時，可發現所生出的 SMA 小鼠子代，其為 SMA 嚴重型的機會減少 (Chang et al, 2001)。此重要的結果為 SMA 治療開啟了一扇窗：它第一次發現了可能有效的 SMA 治療藥物。然而 sodium butyrate 在人體約 6 分鐘的半衰期和其生物毒性限制了它的臨床應用而難以進入臨床試驗 (Monneret, 2005)。而由 sodium butyrate 結構所衍生出的 sodium vanadate 和 aclarubicin 兩藥物，亦已在細胞實驗上證實其可增加 SMN 訊息 RNA 的表現量 (Andreassi et al, 2001; Zhang et al, 2001)，然而同樣的，它們的生物毒性亦使其在病患上的長期使用造成困難。

Sodium butyrate 是一個組蛋白去乙酰酶抑制劑 (histone deacetylase (HDAC) inhibitor)。組蛋白是在染色質周圍的蛋白質，組蛋白的乙酰化 (acetylation) 及去乙酰化 (deacetylation) 在基因的調控上扮演了相當重要的角色，一般而言，組蛋白的高乙酰化狀態常導致染色質結構的鬆散，促進了轉譯因子 (transcription factor) 和某些基因 promoter 的結合，進而增進該基因的表現 (Mai et al, 2005)。組蛋白去

乙醯酶 (HDAC) 的作用為使組蛋白去乙醯化，間接抑制了一些基因的表現；而相反地，組蛋白去乙醯酶抑制劑的作用為抑制組蛋白的去乙醯化，增加了組蛋白的乙醯化狀態，進而活化一些基因的表現。目前認為，sodium butyrate 之所以能在細胞上或小鼠體內增加 SMN 蛋白質的表現，即是透過抑制組蛋白去乙醯酶的結果。

我們在臨床上常使用的一個處方藥：valproic acid (VPA, 2-propylpentanoic acid)，已被常規的使用於癲癇症及躁鬱症患者的治療和偏頭痛病患的頭痛預防 (Monti et al, 2009)。近年來研究發現，VPA 和 sodium butyrate 一樣是個 HDAC inhibitor (Göttlicher et al, 2001; Phiel, et al, 2001)，由於 VPA 在臨床使用的經驗很豐富，藥物副作用並不大，故該藥物是一個值得在 SMA 的領域上進行療效試驗的藥物。

Brichta 等人使用 VPA 治療由 SMA 患者所取得的培養纖維母細胞 (fibroblast culture cells) (Brichta et al, 2003)，發現細胞內的 SMN 蛋白質和訊息 RNA 表現量，皆隨 VPA 治療的濃度增加而上升，其 SMN 蛋白質的表現量可增加至約二到四倍；此外，因 SMA 為神經疾病，若只有在纖維母細胞上證實 VPA 的療效仍為不足，為了確定 VPA 的治療效果亦可在神經細胞中發生，作者亦利用大鼠的大腦海馬迴切片培養 (organotypic hippocampal slice cultures) 進行分析，當給予 VPA 治療後，培養細胞中的 SMN 蛋白質和訊息 RNA 表現量皆顯著增加，其 SMN 蛋白質的表現量可增加至 1.8 倍。

Sumner 等人亦使用 VPA 治療由 SMA 患者所取得的培養纖維母細胞 (Sumner et al, 2003)，發現細胞內的 SMN 蛋白質和訊息 RNA 表現量皆隨著治療而增加，其 SMN 蛋白質的表現量可增加至約二到三倍。此外，SMN 蛋白質在細胞內會聚集在細胞核內形成 gems，研究發現，經 VPA 治療的細胞，其 gems 的個數較多。以上兩篇研究皆在細胞的層次上，確認了 VPA 治療可使細胞內的 SMN 量增加，由於體內 SMN 蛋白質的多寡和疾病嚴重度呈逆相關，也就是 SMN 蛋白質愈多的患者，疾病的嚴重度愈輕 (Feldkotter et al, 2002; Lefebvre et al, 1997)，因此，在細

胞實驗上，VPA 的確被證實是一個具有潛力的 SMA 治療藥物，接下來的研究可進而在 SMA 小鼠模式上進行 VPA 治療測試，甚至是應用於臨床試驗。

VPA 在 SMA 病患的使用上，相關的研究仍相當稀少。Weihl 等人以 VPA 治療七名第三型或晚發病之 SMA 的患者，其平均年齡為 33 歲（17-45 歲），用藥後並追蹤達平均 8 個月（Weihl et al, 2006）。在治療之前，所有病患的肌力強度在半年至一年內並無明顯變化，但經 VPA 治療後，以肌力器(hand-held dynamometry)測量肌力時，可發現病患的肌力平均分數由治療前的 33%進步到 49%（100%為正常人的平均肌力），其進步近乎原來的 1.5 倍。經治療病患的 VPA 體內濃度為 87 $\mu\text{g/mL}$ ，為臨床使用 VPA 時可接受的安全濃度（50-100 $\mu\text{g/mL}$ ）（Brodie et al, 1996），而其中，有一名患者因體重過度增重而停止使用 VPA，有二名患者在使用 VPA 初期會有輕度頭暈的情形，此外，在規則檢測血球計數及肝臟功能下，並無發現明顯的異常。此研究讓我們了解到，SMA 病患在接受 VPA 的治療後，可能有功能性的肌力進步，且 VPA 藥物的安全性和副作用在 SMA 患者上尚可接受。

此外，Brichta 等人以 VPA 治療十位 SMA 的帶因者（carrier）（Brichta et al, 2006），發現其中七位帶因者的全長（full length）*SMN* 訊息 RNA 表現量有 1.6 至 3.4 倍的上升，但隨著追蹤的時間不同，表現量有所起伏，整體而言，只有二位帶因者的全長 *SMN* 訊息 RNA 表現量呈顯著的增加，而在 *SMN* 蛋白質的分析中，*SMN* 蛋白質的表現量在七位帶因者，可見到 1.8 至 13.7 倍的增加。其次，作者以 VPA 治療二十名 SMA 的患者，發現有三分之一的病患的全長 *SMN* 訊息 RNA 的表現量增加，但同樣的，由於表現量隨時間有所起伏，只有一位患者的全長 *SMN* 訊息 RNA 表現量增加為顯著的，而另外有三分之一的病患之全長 *SMN* 訊息 RNA 表現量沒有明顯的變化，甚至有三分之一的病患之全長 *SMN* 訊息 RNA 表現量呈現下降。由這些研究的結果亦可知，VPA 在人體的療效仍然無法完全確定，且可能有些病患對於 VPA 的效果並不佳。

雖然VPA在細胞實驗上顯示了其治療SMA的高度潛力，但在缺乏動物實驗佐

證，且在SMA病患上的使用又模稜兩可的情況下，若有完整的動物實驗證實VPA在SMA的療效，則可激勵VPA大型臨床試驗的進行。

此外，VPA於SMA的治療機轉，目前尚未相當了解。以VPA治療由SMA患者所取得的培養之纖維母細胞，可增加細胞內SMN蛋白質和SMN 訊息RNA的表現量（Brichta et al, 2003；Sumner et al, 2003），然而如上所述，以VPA治療SMA病患，並分析其白血球內SMN的表現量，可發現只有部分的病患白血球之SMN表現量增加（Brichta et al, 2006），此現象可能導因於VPA在活體並不如預期的會升高SMN基因的表現，亦或白血球內的SMN表現和脊髓運動神經元內的SMN表現並非呈平行的相關性。VPA在活體下是否可增加SMN的表現，需後續動物實驗證實。

由於體內SMN蛋白質的多寡和疾病嚴重度呈逆相關（Feldkotter et al, 2002; Lefebvre et al, 1997），因此VPA對SMA的療效可能單純來自於提高運動神經元內SMN蛋白質的表現。然而，van Bergeijk在細胞研究上發現，低濃度的VPA (0.5-1 M) 可促進神經細胞突起（neurite）的生長，但進一步分析，此濃度的VPA治療並無改變細胞內的SMN蛋白質表現量；高濃度的VPA (4-6 mM) 才會顯著提高SMN的表現量，此研究似乎顯示了VPA對於神經細胞的正向作用，和SMN蛋白質的濃度是彼此獨立而無相關的（van Bergeijk et al, 2006）。因此，VPA對SMA疾病的療效，除了使SMN蛋白質增加外，可能另有其它的機制，亦或其療效可能是多重的機轉。

SMA 為一神經退化性疾病，在 SMA 病患和動物模式的脊髓病理切片下，可發現有過度細胞凋亡（apoptosis）的現象（Desjardins and Ledoux, 1998; Soler-Botija et al, 2002; Tsai MS et al, 2006），而過去 VPA 在細胞及動物實驗，曾發現 VPA 具有抑制細胞凋亡的作用。以 VPA 治療小腦神經培養細胞發現，VPA 可對 glutamate 引起的毒性，表現神經保護作用，分析並可發現神經細胞內的 Bcl-2 之表現量增加（Leng et al, 2006），其中，Bcl-2 即為一抗細胞凋亡因子（anti-apoptotic factor）。此外，人類神經母細胞瘤培養細胞（SH-SY5Y）經 VPA 治療後，會活化 ERK 路徑（Extracellular signal-regulated kinase pathway），增加 Bcl-2 的表現，並刺激細胞存活

及神經細胞突起的生長 (Yuan et al, 2001)。其次，以臨床劑量的 VPA (39 ug/ml) 長期治療正常大鼠四週後，分析大鼠大腦的額葉處，可發現神經元內 Bcl-2 的表現量會明顯增加 (Chen et al, 1999)。然而，是否 VPA 同樣可以增加脊髓內神經元 Bcl-2 的表現量，進而減緩運動神經元的細胞凋亡，需要後續的相關研究去證實。

過去一般認為發育後的中樞神經是充分分化且不會再生的系統，但近幾年來，成體神經生成 (adult neurogenesis) 的證據一再被提出 (Eriksson et al, 1998; Gould et al, 1999a)。中樞神經在充分發育後，神經細胞的生成作用便趨向和緩，而之後的成體神經生成主要侷限於大腦的側腦室之下腦室區 (subventricular zone) 及海馬迴 (hippocampus) 的 dentate gyrus 之下顆粒細胞區 (subgranular zone)，新生的細胞將由此兩區移行至大腦的其它部位，並分化為神經元、astrocyte 及 oligodendrocyte，加入正常大腦的功能性運作。近年來，學者陸續又發現在腦部的其它部位亦有成體神經生成的證據：如大腦皮質 (Gould et al, 1999b)、小腦 (Ponti et al, 2008) 及腦幹的黑質體 (substantia nigro) (Zhao et al, 2003)。至於脊髓部分，健康成體的神經生成發生於脊髓的 central canal 附近 (Johansson et al, 1999)，若自小鼠的腦室打入生長因子，則脊髓 central canal 附近的神經生成作用會增加 (Martens et al, 2002)。而在疾病的狀態，當脊髓發生損傷 (spinal injury) 時，會誘發脊髓的神經生成作用，新生的神經細胞在 central canal 附近經分裂、分化及移行，並取代部分受傷脊髓神經的功能 (Mothe et al, 2005; Zai et al, 2005)；另外在另一運動神經元疾病，肌肉失養側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)，病患因大腦及脊髓內的運動神經元退化而發生四肢和呼吸肌肉無力的現象，最終將造成呼吸衰竭而致命，而其動物模式小鼠的脊髓內，亦可見到新生的神經細胞因運動神經元退化所刺激而分裂、分化及移行 (de Hemptinne et al, 2006; Ohta et al, 2006)。

過去研究曾發現，VPA 具有提升神經生成的作用。Laeng 等人以 VPA 治療胚胎大腦皮質之培養細胞後，神經細胞的增生提高了六倍 (Laeng et al, 2004)。此外，Hao 等人以 VPA 治療胚胎大腦皮質培養細胞後，神經細胞的增生提高了十倍，並證

實此作用來自於VPA對ERK路徑的活化；另以VPA治療大鼠六週後，大鼠dentate gyrus的神經生成現象增加了一半（Hao et al, 2004）。Liu等人亦發現，以VPA治療oligodendrocyte progenitor培養細胞後，經由抑制HDAC，使細胞傾向分化為神經元細胞或astrocyte，而不分化為oligodendrocyte (Liu et al, 2007)。在缺血性腦中風的大鼠模式上，若以HDAC抑制劑sodium butyrate治療，則可增加缺血側大腦包括subventricular zone、dentate gyrus、striatum及額葉皮質部位的神經元及astrocyte之再生 (Kim et al, 2009)。然而到目前為止，VPA是否可以促進脊髓內神經元的再生認是未知，若其可形成大量具功能性的再生運動神經元，則SMA病患即有可能恢復其肌力。

Trichostatin A亦為一HDAC抑制劑，以trichostatin A治療第一型的SMA模式小鼠，可增加脊髓內SMN的表現量，並使SMA小鼠的存活時間延長、減少脊髓和肌肉的退化及增進小鼠的運動功能 (Avila et al, 2007)，代表Trichostatin A亦可用來治療SMA。而在肌肉傷害 (muscle injury)的小鼠模式中，trichostatin A的治療曾被證實具有促進肌肉細胞再生的作用 (Iezzi et al, 2004)。雖然SMN蛋白質的缺乏主要影響了脊髓的運動神經元，但亦造成了肌肉細胞的異常 (Cifuentes-Diaz et al, 2001; Rajendra et al, 2007)，或許Trichostatin A於SMA的治療效果，有部分亦來自於對肌肉的再生刺激作用。通常個體的肌肉細胞的再生能力亦不強，故若同是HDAC抑制劑的VPA能促進SMA患者的肌肉細胞再生，使萎縮的肌肉由新生的肌肉細胞所取代，亦有可能使SMA個體的肌力上升。故促進肌肉細胞的再生也可能是VPA在SMA的療效機制之一。

1.1.3 建立Bcl-x_L基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估Bcl-x_L的治療效果

體內細胞死亡可分為細胞凋亡 (apoptosis) 和細胞壞死 (necrosis)。其中，細胞凋亡為細胞主動實施的程序性細胞死亡，細胞凋亡發生時，細胞會縮小，DNA

被分解成小片段 (DNA fragmentation), 核染色質出現濃縮 (chromatin condensation) 的現象, 細胞骨架會瓦解並形成凋亡體 (apoptotic bodies), 最終被鄰近具有吞噬能力的細胞所吞噬 (Hengartner et al, 2000); 而細胞壞死為細胞遭受外在傷害, 被動的引發細胞膜破壞, 並導致細胞膜的通透性改變, 使細胞腫脹, 而後引起細胞破裂及局部組織發炎反應 (Lockshin and Zakeri, 2002)。兩者相較, 細胞凋亡是較常見的細胞死亡形式, 其在胚胎發育、組織更新、自體免疫及體內的恆定等皆扮演了重要的角色。

細胞凋亡的作用為經由外始途徑 (extrinsic pathway) 或內生途徑 (intrinsic pathway) 活化 caspase (cysteine-containing aspartate acid-specific protease) 的反應。其中, 外始途徑為經由癌症壞死因子受體 (tumor necrosis factor receptor) 被癌症壞死因子或細胞因子的激活, 將細胞凋亡的訊息傳遞到細胞內, 並在 Fas-associated death domain protein (FADD) 的協助下, 將 procaspase 8 活化為 caspase 8, 進而引發後續的 caspase 反應 (Ashkenazi and Dixit, 1998)。而內生途徑為一種粒線體媒介的細胞凋亡路徑 (mitochondria-dependent apoptotic pathway), 其調控和 Bcl-2 蛋白質家族 (B cell lymphoma 2 family) 的平衡有關, 當細胞受到傷害訊息刺激後, Bcl-2 蛋白質家族中的抗細胞凋亡因子 (anti-apoptotic factor) 與促細胞凋亡因子 (proapoptotic factor) 的表現會失去平衡, 當前者無法抑制後者時, 會使存在於粒線體中的細胞色素 C (cytochrome C) 釋放到細胞質, 而細胞色素 C 和細胞質中的 Apaf-1 (protease activating factor 1) 以及 procaspase 9 共同組成凋亡體, 進而引起後續的 caspase 反應 (Hill et al, 2003)。而 caspase 反應中, 先由起始蛋白酶 (initiator caspase), 如 caspase 2、8、9 及 10 的系列活化開始, 其功能為活化下游對應之 caspase 的活性, 此反應最後會活化能引起細胞程序性死亡的蛋白酶, 包括了 caspase 3、6 及 7, 以執行細胞凋亡的過程, 包括了細胞膜和細胞骨架的分解和 DNA 修復的抑制。

如上述, 一般的細胞凋亡反應由 Bcl-2 蛋白質家族來調節, 而中樞神經的神經元之細胞凋亡反應, 和一般細胞是相同的 (Yuan and Yankner, 2000)。Bcl-2 蛋白質

家族皆擁有一至四個Bcl-2 homology (BH) domains，包括了BH1、BH2、BH3及BH4，這些BH domains負責了各蛋白質功能的執行。Bcl-2蛋白質家族可分為抗細胞凋亡因子和促細胞凋亡因子兩群，前者包括了Bcl-2和Bcl-x_L (B cell lymphoma-extra large)等，此兩因子皆擁有BH1-4四個domains；而後者包括了Bax、Bad及Bid等，其中，Bad和Bid只有BH3 domain，而Bax有BH1-3 domains (Chao et al, 1998)。Bcl-2蛋白質的表現和許多疾病的生成有關：若抗細胞凋亡的功能過強，則可能會形成腫瘤，譬如同時表現 Bcl-2和protooncogene myc時，可能會引起B細胞淋巴瘤 (Otake et al, 2007)；若抗細胞凋亡的功能過低，則可能會造成神經退化，譬如Bcl-2表現過低而caspase 3表現過高時，可能會引發精神分裂症 (Glantz et al, 2006)。

Bcl-x_L是一個抗細胞凋亡因子，其由*Bcl-x*基因所轉譯轉錄而成，*Bcl-x*基因轉譯時經alternative splicing產生三種訊息RNA形式，分別為Bcl-x_L、Bcl-x_S及Bcl-x_β，其中，Bcl-x_L為神經系統內主要的*Bcl-x*之訊息RNA和蛋白質產物形態 (González-García et al., 1995)。在Bcl-2家族中，Bcl-x_L和Bcl-2擁有最相似的結構，相似度可達56%，因Bcl-x_L蛋白質的大小、結構及功能和Bcl-2相當相似，且其在細胞內的位置，和Bcl-2一樣皆位於粒線體的外膜部位，因此，Bcl-x_L和Bcl-2的抗細胞凋亡機制可能是類似的，即皆為利用BH1及BH2 domains來和促細胞凋亡因子，如Bax、Bak和Bid進行heterodimerization，以抑制細胞凋亡的發生 (Merry and Korsmeyer, 1997)。在中樞神經系統內，Bcl-x_L出現於大腦各區的神經元內，而Bcl-x_L和Bcl-2皆自胚胎時期大腦發展起就開始表現，不同的是，Bcl-2的表現在胚胎期達到頂峰，於出生後表現便逐漸減少；而Bcl-x_L的表現在出生後隨著個體成長，表現仍逐漸上升，至成人時期才到達頂峰 (González-García et al, 1995)。

若將小鼠的*bcl-x*基因剔除，則小鼠會在胚胎期第13天時死亡，進一步分析可發現，該小鼠胚胎的發育中之大腦內有大量的神經細胞死亡，這些死亡的神經細胞雖然已經有細胞分化的現象，但尚未成熟，且仍未有突觸的形成，此結果代表

了缺乏Bcl-x_L的神經細胞之死亡，較不像是大量的細胞凋亡反應所引起，反之，Bcl-x_L應該是神經細胞在分化成熟時期，存活所必需的蛋白質 (Motoyama et al, 1995)。綜合以上結果，Bcl-x_L應該是神經細胞在發育及成熟時期的一個重要的細胞存活因子。

Bcl-x_L 具有抑制神經細胞死亡的能力：於交感神經元培養細胞中，若停止給予 neural growth factor，則 95% 以上的神經元細胞無法存活五天，但如果先將 Bcl-x_L 的質體以微細注射 (microinjection) 的方式打入細胞中以表現 Bcl-x_L，雖仍不給予 neural growth factor，但仍有 43% 的神經元細胞可存活五天 (Gonzalez-Garcia et al, 1995)。此外，Garrity-Moses 等人以腺相關病毒 adeno-associated virus 攜帶 *Bcl-x_L* 基因，對胚胎運動神經元培養細胞 (primary motor neuron cultures) 上進行治療，可見當增加運動神經元內 Bcl-x_L 的表現時，可減少運動神經元因 glutamate 毒性所造成的細胞凋亡 (Garrity-Moses et al, 2005)。另外，Parsadanian 等人將 *Bcl-x_L* 基因植入小鼠，得到具有高度 Bcl-x_L 蛋白質表現的 *Bcl-x_L* 基因轉殖小鼠 (Parsadanian et al, 1998)。當我們將一般小鼠的顏面神經截斷時，可能會造成位於腦幹之橋腦部位的顏面神經元的死亡，但若將此 *Bcl-x_L* 轉殖小鼠的顏面神經截斷時，顏面神經元的死亡情形會減少 (Parsadanian et al, 1998)；而若以此 *Bcl-x_L* 轉殖小鼠來進行缺血性腦中風的研究，亦可見到和正常的小鼠比起來，轉殖小鼠的腦中風範圍較小 (Parsadanian et al, 1998)，由此可見，Bcl-x_L 的表現的確可以活體實驗下降低神經細胞的死亡。

SMA 患者體內有過度細胞凋亡的現象 (Desjardins and Ledoux, 1998; Soler-Botija et al, 2002)，在第一型 SMA 的胎兒患者，懷孕第十二至十五週的脊髓組織中，前角 (anterior horn) 運動神經元的數量較正常胎兒的少，以 terminal deoxynucleotidyl transferase uUTP nick end labeling (TUNEL) 染色可見 SMA 胎兒的脊髓組織有較多的細胞凋亡現象 (Soler-Botija et al, 2002)。在第一型 SMA 模式小鼠的脊髓組織中，亦可見類似的表現，即前角運動神經元的數量減少及於 TUNEL

染色下較多細胞凋亡的現象 (Tsai MS, et al, 2006)。此外，SMA 患者的病理組織中亦曾發現有 Bcl-x_L 表現下降的情形：研究罹患第一型 SMA 的胎兒在懷孕第十五週的脊髓組織，可發現其脊髓運動神經元內的 Bcl-x_L 表現較為低下 (Soler-Botija et al, 2003)，而在第二型 SMA 患者上，也曾有小腦的 Purkinje cells 出現了 Bcl-x_L 表現低下的報告 (Araki et al, 2003)。因此，若能使 SMA 個體的脊髓運動神經元細胞能夠高度表現 Bcl-x_L，則有機會使 SMA 的病程減緩，達到治療的目的。

1.2 研究假說及目的

如前所述，SMA 目前尚未有有效的治療方法，且目前並無良好的 SMA 模式小鼠以供藥物療效測試。總括而言，我們的台灣模式 SMA 小鼠雖然基因型和 SMA 病患相似，但是仍然存在有若干缺點：第一型及第二型 SMA 小鼠的存活時間過短，而第三型 SMA 小鼠雖可存活數月，但尚無深入的小鼠表現型分析之報告。因此，如果我們對第三型 SMA 小鼠進行仔細的表現型分析，則我們的第三型 SMA 小鼠有機會成為適當且理想的 SMA 小鼠動物模式，用於未來的治療療效評估。

在臨床的 SMA 病患評估中，我們可能會使用到以下四種方法，包括（1）以神經學檢查評估患者的肌肉力量及運動功能；（2）以電生理檢查評估運動神經的活動電位強度（compound motor action potential; CMAP）；（3）以肌肉病理切片及染色評估肌纖維萎縮的情形；（4）當病患死亡後，以脊髓病理切片及染色評估脊髓前角運動神經元退化情形。因此，在本論文中，SMA 小鼠的疾病評估使用以上相對應的檢查，應用於小鼠身上，評估法即包括了（1）運動功能測試；（2）電生理檢查；（3）肌肉萎縮分析；及（4）脊髓病理切片之脊髓前角運動神經元的分析。

本論文的第一個研究假說為：第三型 SMA 模式小鼠和正常小鼠相比，在運動功能測試、電生理檢查、肌肉萎縮分析及脊髓前角運動神經元的分析上，有較差的表現。其研究目的為：在以上的檢查中，找出具有可比較性的方法，可區分出

第三型 SMA 小鼠和正常小鼠的表現型之不同，以指引未來在藥物測試下，有那些評估方法可適當地分析出治療的反應。此外，此論文亦需尋找合適的 SMA 小鼠評估時間點，使用的方法為同時分析不同年紀的第三型 SMA 小鼠和正常小鼠，比較 SMA 小鼠和正常小鼠在不同年紀時各項檢查及分析的差異，以了解在何年紀時，可得到相對應檢查的最佳可比較性。

過去已有研究在細胞的層次上，確認了 VPA 治療可使細胞內的 SMN 量增加，由於體內 SMN 蛋白質的多寡和疾病嚴重度呈現逆相關，因此，VPA 具有治療 SMA 的潛力。目前尚無以 VPA 治療 SMA 動物模式的相關研究，當此論文於第三型 SMA 模式小鼠詳細的分析了小鼠之病態表徵，確認其可應用性及可比較性後，其次，可以在此第三型 SMA 小鼠模式上進行 VPA 藥物治療測試，以瞭解 VPA 於 SMA 的治療潛力。此外，VPA 除了可能使神經元內的 SMN 蛋白質表現量增加外，由 VPA 在其它疾病的研究中可發現，VPA 亦可能增加抗細胞凋亡因子的表現和促進神經元及肌肉細胞的再生。充分了解 VPA 在 SMA 的療效機制，除了可能從中發現新的 SMA 治療標的，亦有可能進而擴展了 VPA 於臨床上的治療應用。

本論文的第二個研究假說為：以 VPA 治療第三型 SMA 小鼠，在運動功能測試、電生理檢查、肌肉萎縮分析及脊髓前角運動神經元的分析上，較無治療的 SMA 小鼠有顯著的進步，此外，VPA 於 SMA 的治療，可能具有多元機制，除了上升 SMN 蛋白質的表現，可能亦包括了增加抗細胞凋亡因子的表現和促進神經元及肌肉細胞的再生。其研究目的為：證實 VPA 於活體實驗下對 SMA 是有正面的療效，並且藉由探索 VPA 對 SMA 小鼠的療效機制，進而從中發現新的 SMA 治療標的，並嘗試擴展 VPA 的治療應用。

目前全世界 SMA 的相關研究，幾乎皆是以 SMN 蛋白質為標的，嘗試尋找可以使 SMN 蛋白質表現增加的藥物。由於 SMA 病患的病理組織中曾發現有抗細胞凋亡因子 Bcl-x_L 表現下降的情形(Soler-Botija et al, 2003; Araki et al, 2003)，因此，若能增加 SMA 個體中神經細胞 Bcl-x_L 的表現，則可能可以減緩脊髓神經元的細胞

凋亡，達到治療的目的。如此，未來我們也可以用 Bcl-x_L 作為另一個 SMA 治療的標的，若在藥物篩檢中發現某藥物可以使 Bcl-x_L 的表現明顯增加，則可以在 SMA 動物實驗或臨床試驗上證實其治療效果。

本論文的第三個研究假說為：經 *Bcl-x_L* 基因轉殖的 SMA 小鼠 (SMA/Bcl-x_L) 和傳統的 SMA 小鼠相比，SMA/Bcl-x_L 小鼠脊髓內的 Bcl-x_L 蛋白質之表現量增加，且 SMA/Bcl-x_L 小鼠存活時間較傳統 SMA 小鼠長，運動功能較好，脊髓運動神經元及肌肉的退化較少，且脊髓內細胞的細胞凋亡現象較少。其研究目的為：了解增加 SMA 小鼠體內的 Bcl-x_L 蛋白質表現時，是否對 SMA 的病情有所益處。

第二章 研究方法與材料

2.1 脊髓肌肉萎縮症模式小鼠

2.1.1 第一型及第三型脊髓肌肉萎縮症模式小鼠

Hsieh-Li等人將小鼠二股的*Smn*基因剔除，並同時植入人類的*SMN2*基因，得到基因型為*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+}的SMA模式小鼠，此SMA小鼠和人類SMA病患一樣呈現三種不同的疾病嚴重度（Hsieh-Li et al, 2000）。取此SMA模式小鼠，並以backcross方式純化此SMA小鼠的基因型背景，即將其中數隻SMA小鼠配上正常的C57BL/6J小鼠，之後再取其子代的*Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}小鼠配上正常的C57BL/6J小鼠，再由其子代中，再取*Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}小鼠，去配上正常的C57BL/6J小鼠，重覆此步驟六次，使*Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}小鼠的基因型背景純化為C57BL/6J型式後，最終取子代*Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}小鼠和*Smn*^{+/+}*SMN2*^{-/-}小鼠交配，可得SMA小鼠(*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+})，其中一個line可存活九至十五個月，意即為經純化的第三型SMA小鼠，以此第三型SMA模式小鼠進行後續研究；而另一個line只能存活約八天，即為經純化的第一型SMA小鼠。

這些小鼠飼養於台大醫學院動物中心或中央研究院分子生物所動物中心，在十二小時的日夜周期下自由進食小鼠飼料及飲水。在VPA治療組，將VPA (valproic acid sodium salt, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)置於飲用水中(0.2mg/ml)，給小鼠飲用，含有VPA之飲用水每週會更新二至三次。此論文之動物實驗研究經台大醫學院動物照護使用委員會 (National Taiwan University College of Medicine, Institutional Animal Care and Use Committee; Number #20050056)及中央研究院動物照護使用委員會 (Academia Sinica Animal Care and Use Committee; Master Protocol #RMiRbIMBLH2001132) 所核可。

2.1.2 確定脊髓肌肉萎縮症模式小鼠之基因型

小鼠的基因型皆在分組前確定。剪下 0.5 公分小鼠的尾巴末端，置入 200 微升的 lysis buffer (50 mM EDTA、1% SDS、20 mM Tris、100 mM HCL)，並加入 8 微升 proteinase K，於 65°C 下搖晃至隔天，之後加入 80 微升 5M potassium acetate，置於冰上一小時，再以每分鐘 13,500 轉 4°C 下離心 20 分鐘，而後將上液移至新的 eppendorf，並加入 500 微升 99% 乙醇，再離心二分鐘，並移除上液，再加入 500 微升 70% 乙醇後，離心二分鐘，移去上液後風乾沈澱 10 分鐘，之後以 200 微升去離子純水將沈澱溶解得 DNA 溶液，並取其中一微升進行後續聚合酶鏈鎖反應 (PCR)。

在每個聚合酶鏈鎖反應的 25 微升溶液中，包含 1 微升 DNA 溶液、4 微升 primer pairs (S1/S2; S1/H1; 1F/1B; 5-oligo/3-oligo)、2.5 微升 10×PCR buffer (750 mM Tris-Cl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20 and 25 mM MgCl₂)、1 微升 dNTP mixture (5 mM)、0.2 微升 Taq polymerase (5U/μl) 及 16.3 微升的 DEPC 水，PCR 條件為 95°C denature 5 分鐘，再作 31 cycles 的 [95°C denature 1 分鐘、56°C annealing 1 分鐘、72°C extension 2 分鐘]，最終以 72°C extension 5 分鐘。其中，primer pairs S1 及 S2 可用以偵測正常 DNA (S1, 5'-ATAACACCACCACTCTTACTC-3', S2, 5'-GTAGCCGTGATGCCATTGTCA-3'; 1,150 bp)，primer pairs S1 及 H1 可用以偵測經 *smn* 剔除的 DNA 和 *smn* 剔除 DNA (S1, 5'-ATAACACCACCACTCTTACTC-3', H1, 5'-AGCCTGAAGAACGAGATCAGC-3'; 950 bp)；而 primer pairs 1F 及 1B 可用以偵測區分 *SMN2* 基因植入 (1F, 5'-ACTGCAACCTCCTGGGTTCAAGTG-3', 1B, 5'-CAGTTCGAGACCAGCCTGACCAAT-3')；primer pairs, 5-oligo 及 3-oligo 可用以偵測區分 *Bcl-x_L* 基因植入 (5-oligo, 5'-CTGAATGACCACCTAGAGCCTTGG-3', 3-oligo, 5'-GAATGTTGAGAGTCAGCAGTAGCC-3')。

配製 1×TAE buffer，將其放入電泳槽內。另將 agarose 加入 1×TAE buffer 以製備

0.7% agarose gel溶液，用微波爐將gel溶液加熱後，加入EtBr (使0.5 ug/ml)，再倒入鑄膠模內，待其溫度下降後，將凝固之膠體置入4°C 冰箱10分鐘，再置於電泳槽內。取前述聚合酶鏈鎖反應產物10毫升，加上2毫升的6× tracking dye混合後，加入DNA gel的孔中，以50伏特進行電泳。20分鐘後，取出DNA gel，並置入紫外線燈箱中照相。

2.1.3 建立 Bcl-x_L 基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠

由Dr. William Snider實驗室取得*Bcl-x_L*基因轉殖鼠 (transgenic line 7193, *Bcl-x_L* copy number: ~40)，此基因轉殖鼠的*Bcl-x_L*基因由廣泛性神經元相關的啟動子 (pan-neuronal promoter) α -tubulin所啟動 (Parsadanian et al, 1998)。

以第三型 SMA 模式小鼠 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+})和正常鼠 (*Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+})交配後，獲得 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}小鼠，之後如圖一，將此小鼠 (即圖一 A a 鼠)和 *Bcl-x_L* 基因轉殖鼠 (圖一 A f 鼠)交配，得 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}*Bcl-x_L*^{+/+}小鼠 (圖一 A e1 鼠)，再將此 e1 小鼠和 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{-/-}交配，得 *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+}*Bcl-x_L*^{+/+}小鼠 (圖一 A d 鼠)，即 DNA 的一股含有 *Bcl-x_L* 轉殖基因的第三型 SMA 模式小鼠。

此外，另取可生出第一型 SMA 小鼠的 line 之 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}小鼠，亦如圖一 A，將此小鼠 (即圖一 A a 鼠)和 *Bcl-x_L* 基因轉殖鼠 (圖一 A f 鼠)交配，得 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}*Bcl-x_L*^{+/+}小鼠 (圖一 A e1 鼠)，再將此 e1 小鼠和 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{-/-}交配，得 *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+}*Bcl-x_L*^{+/+}小鼠 (圖一 A d 鼠)，即 DNA 的一股含有 *Bcl-x_L* 轉殖基因的第一型 SMA 模式小鼠。另為了獲得 DNA 的二股皆含有 *Bcl-x_L* 轉殖基因的第一型 SMA 模式小鼠，將前述 e1 小鼠和 *Bcl-x_L* 基因轉殖鼠 (*Bcl-x_L*^{+/+})交配，可得 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+}*Bcl-x_L*^{+/+} (圖一 A e2 鼠)小鼠和 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{-/-}*Bcl-x_L*^{+/+} (圖一 A c 鼠)小鼠，而為了確定 e2 及 c 鼠為二股 DNA 皆含有 *Bcl-x_L* 轉殖基因，將 e2 及 c 鼠和正常鼠交配，所得的下一代鼠皆含有 *Bcl-x_L* 轉殖基因。其次，將 e2 及 c 鼠彼此交配，

可得 $Smn^{-/-}SMN2^{+/-}Bcl-x_L^{+/+}$ 小鼠 (圖一 A d 鼠), 即為 DNA 的二股皆含有 $Bcl-x_L$ 轉殖基因的第一型 SMA 模式小鼠。

交配過程中, 子代鼠皆以前述 PCR 方法作基因型鑑定, 以區分 Smn 、 $SMN2$ 及 $Bcl-x_L$ 基因的狀態, 其中, 小鼠 a、b、c、d、e1/2、f 及正常鼠 g 的基因型鑑定結果如圖一 B 所示。

2.2 運動功能測試

小鼠的運動功能測試包括了:(1) 傾斜試驗 (tilting test)、(2) 轉輪試驗 (wheel running test)、(3) RotaRod 試驗 (RotaRod maintenance test)、(4) 下落試驗 (landing foot spread test)。

在傾斜試驗中, 將小鼠置於一可變換傾斜角度 (0 至 90 度) 的清潔乾燥木板上, 之後慢慢增加木板傾斜的角度, 小鼠將以四肢抓住木板, 以避免滑下, 記錄小鼠所能維持至少 5 秒鐘而不滑下的角度, 該角度愈大, 代表小鼠的肌力愈強。

在轉輪試驗中, 將小老鼠置於一圓形的轉輪內 (直徑 13 公分, 寬 4.5 公分), 經過訓練後, 使小鼠在轉輪內跑動, 計算一分鐘內轉輪的轉數, 重覆三次實驗, 並將較佳之二次的結果平均, 小鼠的運動功能愈好, 則在轉輪內跑動愈快, 轉輪的轉數也就愈多。

在 RotaRod 試驗中, 將小鼠置於 RotaRod 的橫桿上 (rota rod, diameter 3.5 cm, Acceler Rota-Rod 7650, UGO BASILE, Varese, Italy), 橫桿以每分鐘 8 轉的速度緩慢加速, 隨著轉速增快, 若小鼠欲維持在橫桿上, 必需加快跑動的速度, 當小鼠跑動的速度較橫桿轉速慢時, 小鼠便會掉落, 而 RotaRod 儀器將自動顯示小鼠在橫桿上所維持的時間, 若小鼠在橫桿上可維持超過 300 秒, 則以 300 秒為其結果。小鼠先經過訓練後, 重覆五次試驗並記錄小鼠每次掉落的時間, 將較佳之二次結果平均, 小鼠的運動功能愈好, 則可在橫桿上所維持的時間使愈長。

在下落試驗中，先將小鼠的兩後腳腳掌沾上墨水，把小鼠提到桌面上方 30 公分高，背部向上，再使其自由落下，如此在桌面上的白紙上將有兩後腳的印痕，計算兩後肢之第四指間的距離，重覆五次試驗，並將較佳之二次結果平均，小鼠的運動功能愈好，則兩後肢之第四指間的距離愈短。

2.3 電生理測試

將小鼠以 60 mg/kg 的 pentobarbital 以腹腔注射麻醉，待小鼠無知覺後，將其背部朝上置於手術台上，四肢使其外展並固定。將小鼠的兩下肢後側的毛剔除，並以 70%乙醇消毒後，用手術刀將小鼠兩側 sciatic notch 部位分別縱切切開一約 1 公分的開口，在剝開皮下組織及肌肉後，將坐骨神經 (sciatic nerve) 曝露出來。電刺激 (supramaximum, square pulses, 0.1 ms duration) 由刺激器 (S88, Grass-Telefactor, RI) 經 stimulus isolation unit (SIU5, Grass-Telefactor, RI), 再經 constant current unit (CCU1A, Grass-Telefactor, RI), 最終至雙極電極刺激器 (bipolar electrode stimulator), 將此雙極電極置於小鼠的坐骨神經上，陰極位於遠端，陽極位於近端，以電刺激小鼠的坐骨神經。

以兩水平細針作為雙極接受器 (bipolar recorder, length of 5 mm with the two needles 1 mm apart), 將其由小鼠腳根處，和腳骨平行方向向上插入內側腓腸肌 (medial gastrocnemius muscle) 內，在坐骨神經被電所刺激後，電流會向坐骨神經遠端傳遞，並經過神經肌肉交界 (neuromuscular junction), 使腓腸肌興奮活化，而在腓腸肌內的雙極接受器接受到腓腸肌興奮活化所產生的訊號後，可將訊號傳入 preamplifier (P511 AC, Grass-Telefactor, RI), 經過放大 50 倍，並以 bandpass filtered (30 Hz 至 3 KHz) 過濾肌肉產生的干擾訊號 (myoelectric artifacts), 訊號傳送至 MP30 系統分析 (MP30, BIOPAC system, CA), 在電腦螢幕上顯示出訊號波，該波即為 compound muscle action potential (CMAP)。

首先計算訊號波的最高點和最低點間的距離 (peak-to-peak)，即為其振幅 (amplitude)，再計算電刺激時間點至訊號波最高點的時間之間距，即為其潛時 (latency)。變換腓腸肌內的雙極接受器之位置三處，每一個位置接受至少五次電刺激的訊號，取所得的最大振幅波及其潛時為其結果，將刺激左右兩側的坐骨神經所得的 CMAP 之振幅和潛時結果平均，即代表此小鼠的 CMAP 振幅和潛時。當脊髓內運動神經元退化時，會使坐骨神經內的神經纖維量減少，如此當以電刺激坐骨神經時，在腓腸肌內所得的訊號波之振幅便會減少。

在實驗過程中，定期以生理食鹽水滴於坐骨神經上以避免神經的乾燥，並加以加熱燈照射小鼠，使其維持生理性的溫度。當結束刺激，將之前剝開的肌肉回復原位，以蓋住坐骨神經，並以手術縫線將表皮縫合，用優碘在傷口處消毒，再將其置回籠內。

2.4 脊髓病理切片

將小鼠用過量的pentobarbital (120 mg/kg)以腹腔注射將小鼠安樂死，把小鼠腰椎連著脊髓一起取下，馬上浸泡於10%之福馬林 (neutral-buffered formalin, Fisher Scientific, PA)，而後進行H&E染色 (hematoxylin and eosin stain)、免疫組織螢光染色 (immunohistochemistry)及fluorogold反向追蹤 (fluorogold retrograde tracing)。

2.4.1 Hematoxylin and Eosin 染色

組織經福馬林於4°C下浸泡一天後，將脊椎和脊髓分離，第二天以脫水包埋機 (Tissue-Tek VIP, Sakura, CA)將脊髓脫水及以石蠟 (paraffin)包埋，之後送台大病理部作切片，每一片為7毫米厚橫切 (cross section)，片與片之間間隔50毫米，之後進行H&E染色，而後於光學顯微鏡 (Leica DM RA, Leica Microsystems, Germany)下觀察並數位照相，影像在MetaMorph software分析 (MetaMorph version 4.6r5,

Universal Imaging Corporation, PA)。

神經元具有角錐形、大細胞核、明顯的nucleolus及Nissle body等特色，在顯微鏡下以細胞形態辨別神經元。由脊髓的中心孔 (central canal)畫一水平線，計算所有在水平線之前的灰質 (gray matter)，即前角 (anterior horn)區域中神經元之個數及其細胞本體的在切面下的面積，以該面積區分神經元的大小，而對應的神經元大小之神經元個數除以脊髓前角的面積即為神經元的密度，而將五片切片所得的結果平均，即為該小鼠的對應神經元大小之脊髓神經元密度。

2.4.2 免疫組織螢光染色

組織在室溫經福馬林浸泡 2 小時後，移至 15% sucrose 溶液中 3 小時，之後於 4°C 下浸泡在 30% 的 sucrose 溶液中過夜以充分脫水，第二天再將脊椎和脊髓分離，將脊髓置於 OCT 內以液態氮及 isopentane 快速冰凍，而後再以冷凍切片機作橫向切片，每片 7 毫米，並冰於負 20°C 冰箱中，直到進行後續免疫螢光染色。

將組織切片以phosphate buffered saline (PBS)清洗三次，每次5分鐘，再以 blocking buffer，即含5% goat serum的TBS-T (10 mM Tris-HCl/pH 8.0, 150mM NaCl, and 0.1% Tween 20)於室溫下浸泡1小時，之後以含有一抗抗體 (primary antibody) 的TBS-T溶液於4°C下作用隔夜，而一抗抗體及其濃度包括了： anti-choline acetyltransferase (ChAT, 運動神經元標記; 1:500; Chemicon, Temecula, CA, USA), anti-SMN (1:500; exon 2 epitope, labeling both SMN1 and SMN2 protein; BD, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-neuronal nuclear antigen (NeuN, 神經元標記; 1:50; Chemicon), anti-Bcl-2 (1:200; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-Bcl-x_L (1:200; Cell Signaling)和anti-active caspase 3 (1:50; Abcam, Cambridge, UK)。隔天，以TBS-T清洗三次，每次各5分鐘，而後加上含二抗 (secondary antibody)的螢光抗體 (fluorescence dye-conjugated antibodies, 1:500; Molecular Probes, Eugene, OR)之

TBS-T溶液在室溫下閉光進行反應一個小時，再以TBS-T清洗三次，每次各5分鐘。加入DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 1:10,000, Sigma Aldrich)反應5分鐘以染細胞核，再一次以TBS-T清洗三次，每次各5分鐘。待於室溫下閉光風乾後，蓋上蓋玻片，並以螢光顯微鏡 (fluorescence microscope IX70 (Olympus Optical Co., Japan) 或共軛焦顯微鏡 (LSM510 laser-scanning confocal microscope; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)觀察，並以SPOT software v2.2 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) 分析。

為了了解細胞增生分化的現象，小鼠在十一個月大時，每日於腹腔注射 100 mg/kg BrdU (5-bromo-20-deoxyuridine)，共連續三天，之後在第十二個月大時將小鼠安樂死，把小鼠 L4 部位的脊髓取下，依序浸泡於 10%之福馬林 2 小時，15% sucrose 溶液 3 小時，及 30% 的 sucrose 溶液隔夜，第二天將脊髓置於 OCT 內以液態氮及 isopentane 快速冰凍，而後再以冷凍切片機作橫向切片，每片 7 毫米。組織切片以 PBS 清洗後，以含 50% formamide 的 2× standard saline citrate 於 65°C 將 DNA denature 2 個小時，再置於 37°C 2N HCl 30 分鐘，最後浸泡於 0.1 mol/L 的 pH8.5 boric acid。之後如前述，再以 blocking buffer blocking 1 小時，之後以一抗溶液於 4°C 下作用隔夜，而一抗抗體及其濃度包括了：anti-BrdU (1:200; Chemicon), anti-NeuN (1:50; Chemicon), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, astrocyte 標記; 1:300; Chemicon)和 anti-von Willebrand factor (vWF, 血管內皮細胞標記; 1:50; Sigma Aldrich)。隔天，加入二抗螢光抗體，而後以共軛焦顯微鏡 (LSM510 laser-scanning confocal microscope; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)觀察分析。

2.4.3 Fluorogold反向追蹤

將小鼠以 60 mg/kg的pentobarbital以腹腔注射麻醉，待小鼠無知覺後，將其背部朝上置於手術台上，並將其兩小腿後側的毛剔除，並以70%乙醇消毒後，以30

G×1/2細針和100微升的Hamilton microsyringe (ITO, Fuji, Japan)，將20微升的fluorogold (Fluorochrome, Denver, CO, USA)以每分鐘1微升的速度分別注射入小鼠兩側的腓腸肌中。之後用優碘在傷口處消毒，待小鼠回復意識後，再將其置回籠內。

一週後，將小鼠L4部位的脊髓取下，以10%之福馬林固定2小時，以15%及30%的sucrose溶液脫水，第二天將脊髓置於OCT內以液態氮及isopentane快速冰凍後，再以冷凍切片機作橫向切片，每片7毫米。而後以螢光顯微鏡 (fluorescence microscope IX70 (Olympus Optical Co., Japan)觀察分析。注入腓腸肌內的fluorogold將被神經末端的synapse所吸收，反向傳遞回脊髓的運動神經元，並使運動神經元發出螢光，是以在脊髓組織切片中，若觀察到帶有螢光的細胞，則代表該細胞為運動神經元，且其axon有經坐骨神經支配腓腸肌。分析至少20片切片，計算每片脊髓切片擁有帶有螢光的運動神經元的數量，並將所有切片所得的數量平均。

2.5 肌肉病理切片

將小鼠用過量的pentobarbital (120 mg/kg)以腹腔注射將小鼠安樂死，把小鼠兩側的小腿腓腸肌、大腿前側四頭肌 (Quadriceps)及大腿後側Hamstring肌肉取下。先將二側腓腸肌秤重，取其平均值並除以小鼠的體重，記錄此比例。而後將所有肌肉進行免疫組織螢光染色或adenosine triphosphatase (ATPase)染色。

2.5.1 免疫組織螢光染色

將Hamstring肌肉在室溫下以10%福馬林浸泡2小時後，移至15% sucrose溶液中3小時，之後於4℃下浸泡在30%的sucrose溶液中過夜以充分脫水，第二天，將肌肉置於OCT內以液態氮及isopentane快速冰凍，而後再以冷凍切片機將肌肉

組織作縱向切片，每片 15 毫米，並冰於負 20°C 冰箱中，直到進行後續免疫螢光染色。

將肌肉組織切片以 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘，再以 blocking buffer 於室溫下 blocking 1 小時，之後以含有一抗抗體，包括 anti-neurofilament H 200 kDa (神經纖維標記;1:200; Chemicon)及 anti-SMN (1:500; exon 2 epitope, labeling both SMN1 and SMN2 protein; BD)的 TBS-T 溶液於 4°C 下作用隔夜，另外，以 α -bungarotoxin Alexo Fluor 555 conjugate (1:1,000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)來進行神經肌肉交界 post-synaptic muscle end plate 的染色。隔天，以 TBS-T 清洗三次，每次各 5 分鐘，而後加上二抗螢光抗體 (1:500; Molecular Probes)在室溫下閉光進行反應一個小時，再以 TBS-T 清洗三次，每次各 5 分鐘。加入 DAPI (1:10,000, Sigma Aldrich)反應 5 分鐘以染細胞核，再一次以 TBS-T 清洗三次，每次各 5 分鐘。待於室溫下閉光風乾後，蓋上蓋玻片，並以螢光顯微鏡或共軛焦顯微鏡觀察，並以 SPOT software v2.2 進行分析。

為了了解肌肉細胞增生分化的現象，小鼠在十二個月大時，於腹腔注射 150 mg/kg BrdU，六小時之後將小鼠安樂死，把小鼠的腓腸肌取下後，同上述方法將腓腸肌固定、脫水，再製作出每片 7 毫米的橫切切片。之後以 PBS 清洗後，使用含 50% formamide 的 2× standard saline citrate 於 65°C 將 DNA denature 2 個小時，再置於 37°C 2N HCl 30 分鐘，最後浸泡於 0.1 mol/L 的 pH8.5 boric acid。之後再如同前述，以 blocking buffer blocking 1 小時，再加入一抗 anti-BrdU (1:200; Chemicon)。隔天，加入二抗螢光抗體，而後以共軛焦顯微鏡 (LSM510 laser-scanning confocal microscope; Carl Zeiss, Gottingen, Germany)觀察分析。

2.5.2 ATPase 染色

將小鼠四頭肌取下後，直接把肌肉置於 OCT 內以液態氮及 isopentane 快速冰凍，而後再以冷凍切片機將肌肉組織作橫向切片，每片 15 毫米，並冰於負 20°C 冰箱中，直到進行後續 ATPase 染色。

ATPase 染色於台大病理部進行。在室溫下將肌肉切片浸泡於 pH 4.3 之 acetate buffer 10 分鐘，而後先以 ATP incubation medium (1.6 mg/ml ATP, 0.1 M sodium barbital, 0.18 M calcium chloride, pH 9.4) 於 37°C 下進行 myofibrillar ATPase 反應 20 分鐘，再以 1% 的 calcium chloride 於室溫下浸泡 3 分鐘，接著以 2% 的 cobalt chloride 反應 3 分鐘，最後加入 1% 的 ammonium sulfide 作用 3 分鐘，待組織乾燥後，蓋上蓋玻片，並以螢光顯微鏡觀察，並以 SPOT software v2.2 進行分析，包括肌肉細胞的大小和肌肉單一型群聚現象 (muscle-type grouping)。

2.6 同步定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應

將小鼠用過量的 pentobarbital (120 mg/kg) 以腹腔注射將小鼠安樂死，把小鼠腰椎部脊髓取下，馬上放入 1.5 毫升的 eppendorf 中，並在室溫下加入 1 毫升的 Trizol 試劑 (Invitrogen)，經 homogenization，以每分鐘 12,000 轉速離心 10 分鐘，之後將上清液移至另一乾淨的 eppendorf 中，再加入 Choroform 200 毫升，搖晃後靜置 3 分鐘，再以每分鐘 12,000 轉速離心 15 分鐘，此時溶液會分成上中下三層，取上層液並移至另一乾淨的 eppendorf 中，加入 isopropanol 500 毫升，搖晃後靜置 10 分鐘，再以每分鐘 12,000 轉速離心 10 分鐘，此時可見 eppendorf 下方會有一白色微小的沈澱，而後吸掉上清液，加入 75% 的酒精，以每分鐘 7,500 轉速離心 5 分鐘，再吸掉上清液，加入 100% 的酒精，以每分鐘 7,500 轉速離心 5 分鐘，待吸掉上清液並風乾後，加入 DEPC 水 40 毫升，此即為 RNA 溶液。以 2 毫升 RNA 溶液定量後，取含 1 毫克 RNA 的 RNA 溶液進行後續 RNA 反轉轉錄 (RNA reverse transcription)。

以 Promega Reverse Transcription System 進行反轉錄。於 200 微升 eppendorf 中加入含 1 毫克 RNA 的 RNA 溶液、Reverse Transcription 10x buffer 2 毫升、25 mM MgCl₂ 4 毫升、10 mM dNTP Mixture 2 毫升、Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.5 毫升、Reverse Transcriptase 15 毫升、Random Primers (0.5 µg/µl) 1 毫升，並以 nuclease-free 的純水將溶液體積調整為 20 毫升。將溶液混勻後，靜置於室溫下 10 分鐘，再移至 42°C 下 15 分鐘，而後於 95°C 下 5 分鐘，最後於 4°C 下 5 分鐘。將所得的 cDNA 溶液冰於負 20°C 冰箱直到進行後續同步定量聚合酶鏈鎖反應。

在同步定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction) 中，分別以二組 primers/probe sets (SMN+7 set 及 SMNΔ7 set) 進行反應，SMN+7 set 中的 forward primer 為 5'-CAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATT-3'，reverse primer 為 5'-GTGTCATTTAGTGCTGCTCTATGC-3'，而 probe 為 5'-FAM-CAGCATTTCTCCTTAATTTA-NFQ-3'；SMNΔ7 set 中的 forward primer 為 5'-CATGGTACATGAGTGGCTATCATACTG-3'，reverse primer 為 5'-TGGTGTTCATTTAGTGCTGCTCTATG-3'，而 probe 為 5'-FAM-CCAGCATTTCCATATAATAGC-NFQ-3'。SMN+7 set 可定量出含 exons 6、7 及 8 的 cDNA 片斷，即代表全長的 SMN cDNA；SMNΔ7 set 可定量出含 exon 6 及 8 但不含 exon 7 的片斷，即代表不含 exon 7 的 SMN cDNA (Sumner et al, 2006)。同步定量聚合酶鏈鎖反應於 Roche LightCycler 1.5 (Roche, Basel, Switzerland) 進行，每一個檢體分別以 SMN+7 和 SMNΔ7 primer sets 分析其 cDNA 含量，並以 β-actin 作為 internal control，每一結果皆重覆三次，並將三次的結果平均。

2.7 西方點墨法 (Western Blotting)

將小鼠用過量的 pentobarbital (120 mg/kg) 以腹腔注射將小鼠安樂死，把小鼠腰

椎部脊髓取下並置於eppendorf中，加入500微升含有蛋白酶抑制劑 (CompleteTM proteinase inhibitor Cocktail)的蛋白質抽取液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.4% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS))處理，經homogenize後，將eppendorf置於冰上30分鐘，之後以每分鐘12,000轉轉速離心10分鐘，再將上清液移入另一eppendorf中，並取10微升溶液作蛋白質定量。取20微克蛋白質以12% SDS-polyacrylamide gel在125伏特電壓下進行電泳，約一小時20分鐘後將gel取出，並移至transfer chamber中，並以45伏特電壓下於4°C將蛋白質transfer至polyvinyl difluoride membranes (Millipore)2小時。

而後，將membrane取出，以TBST buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)和4% non-skimmed milk在室溫下處理2小時，再以含有一抗抗體的TBS-T溶液於4°C下作用隔夜，而一抗抗體及其濃度包括了： anti-SMN (1:1000), anti-Bcl-2 (1:50; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), anti-Bcl-x_L (1:500; Cell Signaling), Htra2-β1 (Transformer-2 protein homolog beta 1; 1:1000; Abnova, Taipei, Taiwan), anti-phosphoERK42/44 (1:1000; BD), anti-ERK42/44 (1:5,000; Upstate, Lake Placid NY, USA), anti-phospho-STAT5A/B (1:1,000; Upstate), anti-STAT5A/5B (1:1,000; Upstate), anti-α-tubulin (1:4,000; Chemicon)和anti-β-actin (1:5,000; Santa Cruz Biotech)。隔天，以TBS-T清洗三次，每次各5分鐘，而後加上接有horseradish peroxidase之anti-rabbit or anti-goat IgG TBST溶液(1:5,000; Chemicon)於室溫下反應2個小時，最後以chemiluminescence (Chemiluminescence Reagent Plus, PerkinElmer Life Sciences)觀察結果。所得影像以AlphaEase densitometry (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)進行定量分析。

2.8 統計分析

實驗所得結果以平均值加上正負標準誤 (mean ± SEM)來表現。在兩組間連續

性數值 (continuous data)的比較分析中，以Wilcoxon's rank-sum test來評估兩組間的結果是否有差異。在兩組間類別性結果 (categorical data)的比較分析中，以Fisher's Exact test來比較兩組間的結果是否有差異。在評估小鼠在剪去尾巴前及剪去尾巴後對於運動功能的影響時，以Wilcoxon's signed-rank test來比較剪尾前後的結果是否有差異。在小鼠存活分析中，以Kaplan-Meier analysis來建構存活曲線，並以log-rank test來比較兩組的存活曲線間是否有差異。

在所有的統計檢定中，當雙尾 p 值 (two-tailed p values)小於 0.05 時，則定義為有統計上的顯著差異。而統計檢定以 STATA 軟體 (STATA sofeware version 8.0; Stata, College Station, TX, USA)進行分析。

第三章 結果

3.1 建立脊髓肌肉萎縮症小鼠模式之治療評估方法

將 20 隻第三型 SMA 小鼠和 20 隻正常小鼠，以其接受試驗的時間各分為 4 組，包括三個月大、六個月大、九個月大及十二個月大，每組各五隻，每隻小鼠皆分別接受形態學分析、運動功能試驗、電生理檢查及脊髓病理分析。

3.1.1 小鼠形態學分析

首先測量小鼠的尾巴長度，由小鼠的肛門測量至尾巴末端，在不同年紀的四組中，SMA 小鼠的尾長和正常小鼠的尾長相比，SMA 小鼠的尾長皆顯著較短 (圖二 A)，觀察顯示，從 SMA 小鼠約 3 週大起，其尾巴開始相對變得較為粗短，且此現象隨著年紀愈來愈明顯。而在耳朵形態部分，於三個月大時，SMA 小鼠和正常鼠的形態皆正常，耳緣皆呈現平滑規則的圓弧形狀，但是之後，SMA 小鼠的兩側耳朵開始陸續出現有邊緣不規則的現象，此為耳廓由外而內產生的萎縮情形，其使耳廓對稱的逐漸變小，在六個月起評估時，幾乎所有的 SMA 小鼠皆可見此耳部的異常，且此異常隨著年紀愈大亦越來越嚴重，而所有正常鼠的耳朵無論何年紀為何皆為正常 (圖二 B)。此外，在三個月及六個月大時，SMA 小鼠和正常鼠的腳趾形態尚正常，然而在九個月起評估時，SMA 小鼠的後腳腳趾常可見水腫的現象，且有些腳趾甚至出現斷趾，而正常小鼠皆無此腳趾的異常情況 (圖二 C)。

SMA 小鼠和正常鼠的體重，在不同年紀的四組中，並無明顯的不同。由於 SMA 小鼠在十二個月大時，可感覺到四肢明顯較為瘦小，推測可能有肌肉萎縮的現象，故將小鼠兩側的腓腸肌 (gastrocnemius muscles) 取下並稱重，將兩側腓腸肌重量平均後，除以該小鼠的體重，以此數值代表小鼠的肌肉狀態。比較顯示，自九個月

起，此數值在SMA小鼠比正常鼠顯著較小（圖二D），此結果代表SMA小鼠的肌肉從九個月起即出現有明顯萎縮的現象。而雖然肌肉呈現萎縮，但體重並無顯著變化，其可能因為SMA小鼠的頭部及軀幹部位的肌肉尚未明顯影響的緣故。

3.1.2 小鼠運動功能試驗

本研究中，小鼠的運動功能評估方法包括傾斜試驗、轉輪試驗、RotaRod 試驗及下落試驗。為了排除性別對運動功能產生的影響，取十二隻公鼠和十二隻母鼠分別進行上述四種運動功能試驗，結果顯示，公鼠和母鼠在所有四種試驗的表現上無顯著不同（圖三 A）。此外，由於 SMA 小鼠的尾長會隨年紀逐漸變短，為了排除尾巴長度對小鼠運動功能的影響，取十二隻正常鼠，先分別進行上述四種運動功能試驗，之後將其尾巴由原來約九公分剪成至剩下二公分，以手術線將小鼠尾巴綁起以止血，而後再進行一次四項運動功能試驗，比較剪尾前後小鼠的運動試驗表現，發現剪尾前和剪尾後的結果並無顯著的差異（圖三 B），這代表著尾巴的長短不影響本研究所使用的四種運動功能試驗的結果。

將二十隻 SMA 小鼠和二十隻正常鼠依其評估年紀各分為四組後，分別進行上述四種運動功能試驗。結果顯示，於小鼠三個月大和六個月大時，SMA 小鼠和正常鼠在四個運動功能試驗的表現上皆無明顯的差異，然而在九個月大和十二個月大時，SMA 小鼠的表現皆較正常鼠差（圖四）：傾斜試驗中，SMA 小鼠所能支持的傾斜角度較小 ($P = 0.02$)；轉輪試驗中，SMA 小鼠所能跑動的圈數較少 ($P = 0.01$)；RotaRod 試驗中，SMA 小鼠能維持在橫桿的時間較少 ($P = 0.04$)；下落試驗中，SMA 小鼠下落時兩腳張開的距離較大 ($P = 0.04$)。此結果代表了第三型 SMA 小鼠的運動功能在六個月到九個月大之間開始變差。

3.1.3 小鼠電生理檢查

取雙極電極電刺激正常小鼠的坐骨神經時，在同側腓腸肌內的接受電極所接受到的訊號經放大並過濾後，在螢幕上顯示為一 biphasic sine-wave signal，其出現的時間約為電刺激過後 2.4 毫秒 (圖五 A)。為了確定所得的訊號為 CMAP，使用不同的電刺激強度來刺激坐骨神經，當電刺激強度介於 12 至 15 伏特時，所得 sine-wave 的振幅亦跟著增加，而當電刺激強度超過 15 伏特時，該振幅即到達 plateau (圖五 B)，此現象表示此 sine-wave 的確是 CMAP，因為在電刺激強度較小時 (12 至 15 伏特)，電刺激尚未能活化在坐骨神經內所有的神經纖維，故所得的訊號振幅較小，而當增加電刺激強度時，所活化的神經纖維變多，因此所得的訊號因而較大，但是若電刺激強度大到已使坐骨神經內所有的神經纖維活化，此時再增加電刺激強度也不會使訊號振幅變大，是以接收的訊號達到極大值，即呈現 plateau。由此結果，後續皆以 20 伏特的電刺激強度刺激坐骨神經，以確保所得的訊號為 CMAP，即該刺激已活化所有的神經纖維。

由於在上述電刺激方法中，以手術方式將雙極電極直接碰觸於坐骨神經並加以多次刺激，此法有可能導致坐骨神經的永久性傷害而影響到後續的電刺激結果。為了排除此可能性，取二隻 SMA 小鼠和二隻正常小鼠，分別在其 4、5.5、7.5 及 9.5 個月大時進行電刺激檢測，以得到其不同時間的 CMAP 振幅，結果顯示，所有小鼠的四次 CMAP 振幅大小皆無明顯差異 (圖五 C)，此結果證實本研究所使用的電刺激檢測法並不會明顯對神經造成傷害。

其次，將二十隻 SMA 小鼠和二十隻正常鼠依其評估年紀各分為四組後，分別進行電生理檢測。結果顯示，於小鼠 3、6 和 9 個月大時，SMA 小鼠和正常鼠之間的 CMAP 振幅大小皆無明顯的差異，然而在十二個月大時，SMA 小鼠的 CMAP 振幅較正常鼠小 ($p = 0.04$) (圖五 D)，而無論是何時期，在正常小鼠或 SMN 小鼠所得的 CMAP 潛時皆無明顯不同。

3.1.4 小鼠脊髓病理分析

為了了解位於脊髓前角區域 (spinal anterior horn) 的神經元細胞種類和細胞大小間的關係性，取一隻經 Hb9-enhanced green fluorescence protein (Hb9-eGFP) 基因轉殖的小鼠，由於其 eGFP 的基因表現由運動神經元專一之促進子 (promoter) Hb9 所調控，因此在該小鼠體內的所有細胞中，只有運動神經元會帶有 eGFP 之綠色螢光，將此小鼠在二個月大時進行安樂死，並取出其腰椎部位之脊髓作固定及切片 (7 毫米厚)，在以螢光顯微鏡進行觀察及照相後，將切片以 H&E 法染色，再以一般光學顯微鏡進行觀察及照相。測量 100 個神經元的截面積，並以其是否帶有綠色螢光來對應其是否為運動神經元，分析可見，幾乎所有運動神經元的截面積皆大於 200 微米平方，而幾乎所有非運動神經元的細胞截面積皆小於 400 微米平方 (圖六 A)。根據此結果，將後續分析所得之神經元以截面積大小分為三組：截面積大於 400 微米平方的神經元可代表運動神經元；截面積小於 200 微米平方的神經元則代表非運動神經元，如 interneurons；截面積介於 200 到 400 微米平方的神經元則為混合了運動及非運動神經元的細胞。

其次，分析不同年紀的二十隻 SMA 小鼠和二十隻正常鼠在脊髓前角區域內神經元的密度。結果顯示，在截面積小於 200 微米平方及介於 200 到 400 微米平方的分析中，無論在何年紀，SMA 小鼠和正常鼠之間的神經元密度皆無明顯的差異，然而在截面積大於 400 微米平方的分析中 (即運動神經元分析)，於 9 個月及 12 月大的兩組，SMA 小鼠脊髓前角區域的運動神經元密度較正常鼠小 ($p = 0.01$)，而 3 個月及 6 個月大的兩組，SMA 小鼠和正常鼠之間則無明顯不同 (圖六 B,C)，這代表了 SMA 小鼠的脊髓神經元退化，僅侷限於運動神經元，因此在後續的療效分析中，可只分析截面積大於 400 微米平方的脊髓神經元 (單一脊髓切片下約為 15 至 20 個)，而不需分析所有大小的脊髓神經元 (單一脊髓切片下大於 100 個)。

其次，計算不同年紀的 SMA 小鼠，其脊髓運動神經元密度相對於正常小鼠的比例，分析可見，在 3、6、9 及 12 個月大時，該比例分別為 1.02、0.95、0.17 及 0.6，若作曲線圖可發現 (圖六 d)，本研究所使用的第三型 SMA 小鼠之運動神經元

退化主要起始於 6 至 9 個月大之間，且此退化非線性的退化，在運動神經元的退化早期 (6 至 9 個月大)，脊髓運動神經元的密度快速下降，而後 (9 至 12 個月大)，該退化則趨於緩和。

除此之外，將截面積大於 400 微米平方的神經元再進而區分為三組，即截面積介於 400 至 500 微米平方、介於 500 至 900 微米平方及大於 900 微米平方，分別分析此三組的脊髓神經元密度和年紀的關係可發現，三組的神經元密度皆隨年紀而明顯下降 (圖六 E)，且神經元的大小愈大，神經元密度下降的愈快。

3.2 以 valproic acid 治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式

將第三型 SMA 小鼠隨機分為 VPA 治療組及無治療組，在治療組中，從小鼠 6 個月大起，取 VPA 置於飲用水中 (0.2mg/ml) 給小鼠飲用，VPA 治療持續至小鼠 12 個月大，另取同年齡經 VPA 治療及未治療的正常小鼠進行相同的評估以作為比較。

3.2.1 運動功能/電生理/形態學評估

使用前述四種小鼠運動功能試驗來評估小鼠的運動功能，即傾斜試驗、轉輪試驗、RotaRod 試驗及下落試驗。在小鼠 6 個月大尚未治療前，於 SMA 小鼠及正常鼠的治療及非治療組之運動功能，以四種運動功能試驗評估的結果皆是相似的 (圖七 A)，然而在小鼠 12 個月大時，無治療的 SMA 小鼠之運動功能，在四種功能測試上皆顯示較正常小鼠差，而經 6 個月 VPA 治療的 SMA 小鼠，其運動功能表現比無治療的 SMA 小鼠顯著較好 ($p = 0.02$)，且其表現和正常小鼠的表現相似，除了在下落試驗中，經 VPA 治療的 SMA 小鼠表現仍較正常鼠差外 ($p = 0.01$)，其餘三個試驗在 VPA 治療的 SMA 小鼠和正常小鼠之間並無明顯的不同。

此外，於小鼠 12 個月大時，四組小鼠的體重彼此並無顯著差異。而在之前分

析不同年紀 SMA 小鼠的腓腸肌重量時，已發現小鼠自九個月起，將腓腸肌重量除以該小鼠的體重所得之數值在 SMA 小鼠比正常鼠顯著較小，代表 SMA 小鼠的腓腸肌有萎縮的現象。但是 SMA 小鼠在 6 個月的 VPA 治療後，在 12 個月大時，腓腸肌重量除以該小鼠的體重所得之數值較無治療的 SMA 小鼠顯著較大 ($P = 0.02$)，其和正常鼠間並無明顯不同 (圖七 B)，代表 VPA 的治療有減少肌肉萎縮的能力。

在電生理分析中，於之前的分析發現 SMA 小鼠在 12 個月大時，用電刺激小鼠之坐骨神經，在腓腸肌所得的 CMAP 振幅有明顯下降的現象。然而 SMA 小鼠在經過 VPA 治療 6 個月後，於 12 個月大時，其 CMAP 的大小和正常小鼠相似，且明顯較無治療 SMA 小鼠的 CMAP 大 ($P = 0.02$) (圖七 C)。除此之外，SMA 小鼠隨著年紀會出現尾巴變短、耳朵不規則及後足缺指的情況，但此形態學的異常可因 6 個月的 VPA 治療而減少 (圖七 D)。

3.2.2 脊髓運動神經元病理分析

為了確定 VPA 於 SMA 的治療效果來自於對脊髓運動神經元的作用，SMA 小鼠在經 6 個月的 VPA 治療後，將其腰髓部位取下分析，並和正常小鼠及未治療的 SMA 小鼠比較。

首先以 ChAT 抗體進行脊髓切片的免疫螢光染色，ChAT 為運動神經元專一蛋白質，因此有染出的細胞即為運動神經元。比較發現，經 VPA 治療的 SMA 小鼠之脊髓運動神經元數量，較無治療的 SMA 小鼠要多 (25 ± 2.1 v.s. 16 ± 1.6 個/切面； $P = 0.02$) (圖八 A,D)。

由於無論是否經 VPA 治療，SMA 小鼠的脊髓運動神經元在顯微鏡觀察下似乎皆較小，因此接著嘗試使用 H&E 染色法來分析小鼠運動神經元的大小分布。在 H&E 染色下，將脊髓運動神經元 (切面面積大於 400 平方微米)依切面面積大小分

為 400–600、600–900 及大於 900 平方微米三組，於三組中分別比較脊髓運動神經元密度在經 VPA 治療的 SMA 小鼠和未經治療的 SMA 小鼠之比例，分析可見，該比例在三組中依序為 1.5、1.4 及 1.1 (圖八 B,E)，此結果代表了 VPA 的治療效果似乎主要針對較小的運動神經元，而 VPA 對於較大的運動神經元的作用相對較少。

雖然以上結果顯示，VPA 治療具有降低脊髓運動神經元退化的能力，即經 VPA 治療的 SMA 小鼠比未治療的 SMA 小鼠擁有較多的脊髓運動神經元，但是否這些運動神經元仍然是具有功能性的則仍未知。為了證實經 VPA 治療的 SMA 小鼠和未治療的 SMA 小鼠比較，亦擁有較多的脊髓運動神經元—且該脊髓運動神經元具有支配下肢肌肉的軸突 (axon)，嘗試以神經性回溯追蹤法 (retrograde neuronal tracing method) 來驗證：注入腓腸肌內的 fluorogold 被神經末端的 synapse 吸收後，反向傳遞回脊髓的運動神經元，使運動神經元發出螢光。比較發現，經 VPA 治療的 SMA 小鼠之帶螢光脊髓運動神經元數量，較無治療的 SMA 小鼠要多 (12.5 ± 0.5 v.s. 7.9 ± 1.3 個/切面； $P = 0.03$) (圖八 C,F)。

比較經 VPA 治療的 SMA 小鼠和正常小鼠的脊髓組織切片可發現，前者的運動神經元數目約為後者的 90% ($P = 0.2$) (圖八 D)，且無顯著差異，然而若比較兩者具有支配腓腸肌之 axon 的運動神經元數目，前者約為後者的 75% ($P = 0.02$) (圖八 F)，且呈現顯著的不同，此結果代表雖然 VPA 的確可減少脊髓運動神經元的退化，但其中約有 15% 的運動神經元沒有支配腓腸肌的 axon，即其為不具功能的運動神經元。

3.2.3 肌肉纖維和神經肌肉交界

其次，分析小鼠之肌肉纖維和神經肌肉交界的變化，分析是否 SMA 小鼠在經 VPA 治療後會有所變化。

正常小鼠的股四頭肌以 ATPase 法 (pH 值為 4.3) 染色後，可見第一型肌肉纖維

(type I muscle fiber)呈現深褐色，而第二型肌肉纖維 (type II muscle fiber)呈現淺褐色，而第一型肌肉纖維所佔的比例不大，且彼此獨立未相連 (圖九 C)。然而十二個月大未經治療之 SMA 小鼠的股四頭肌以 APase 法染色後，可見整體肌肉纖維之截面積較小，第一型肌肉纖維所佔比例增加，且第一型肌肉纖維彼此間常群聚在一起 (muscle type grouping)，其代表 SMA 小鼠的肌肉有去神經化的現象 (denervation) (圖九 A)。SMA 小鼠在經 6 個月 VPA 的治療後，上述異常現象有部分被校正 (圖九 B)，即整體肌肉纖維的截面積較大 ($1,290 \pm 24$ v.s. $1,117 \pm 22$ 平方微米； $P = 0.02$) (圖九 G)，且其第一型肌肉纖維所佔的比例較未治療 SMA 小鼠低 ($56 \pm 3\%$ v.s. $75 \pm 5\%$ ； $P = 0.03$) (圖九 H)，此外，第一型肌肉纖維彼此間的群聚現象在 VPA 治療後亦較輕。

而後進行小鼠後肢 hamstring muscles 的免疫螢光染色，以神經軸突標記 neurofilament H 染出綠色的神經纖維，以神經肌肉交界標記 α -bungarotoxin 染出紅色的 post-synaptic muscle end plate，在正常小鼠的肌肉中，幾乎所有的綠色的神經纖維會深入紅色的 post-synaptic muscle end plate (圖九 F)。然而在 SMA 小鼠 12 個月大時，約只有六成的 end plate 有神經纖維深入 (圖九 D)，經過 6 個月 VPA 的治療，此比例顯著增成，可達近八成 ($79 \pm 5\%$ v.s. $62 \pm 3\%$ ； $P = 0.04$) (圖九 E,I)，但此比例仍較正常小鼠要低 ($P = 0.04$)，此結果代表了雖然 VPA 治療可減少 SMA 小鼠的 post-synaptic muscle end plate 無神經深入的比例，但尚無法完全避免此異常的發生。除此之外，過去研究曾發現，在 SMA 模式小鼠的 post-synaptic muscle end plate 常有神經纖維異常聚積的現象 (neurofilament accumulation) (Cifuentes-Diaz et al, 2002b)，在本研究中，此異常可見於經治療及未治療的 SMA 小鼠 (圖九 D,E)，此再次顯示 VPA 的療效無法完全根治 SMA 小鼠在肌肉所存在的不正常表現。

3.2.4 SMN 蛋白質和 SMN2 基因表現分析

在證實了 VPA 對 SMA 小鼠具有明顯療效後，接著嘗試探索 VPA 於 SMA 小鼠的治療機制。以 VPA 治療由 SMA 患者所取得的培養纖維母細胞，可增加細胞內 SMN 蛋白質和 *SMN* 訊息 RNA 的表現量 (Brichta et al, 2003; Sumner et al, 2003)，因此於經 VPA 治療的 SMA 小鼠，首先嘗試分析其脊髓內 SMN 蛋白質和 *SMN* 訊息 RNA 的表現。

以西方點墨法分析小鼠脊髓內的 SMN 蛋白質含量，並以 α -tubulin 的含量作校正，結果顯示，經 6 個月 VPA 治療後，SMN 蛋白質的含量顯著較沒治療的 SMA 小鼠要高 ($0.35 \pm 0.03\%$ v.s. $0.26 \pm 0.02\%$; $P = 0.04$) (圖十 A,B)，但無論是否經過治療，SMA 小鼠脊髓內的 SMN 蛋白質含量皆較正常小鼠要低 ($P = 0.01$) (圖十 B)。此外，以 VPA 治療正常的小鼠並無增加其脊髓內的 SMN 蛋白質含量 (圖十 A,B)，此結果可能因為正常小鼠脊髓內的 SMN 蛋白質含量原本就會高，故經 VPA 治療後所能增加的 SMN 蛋白質相對有限，所以無法分析出來。過去曾有細胞研究發現，VPA 增加 SMN 蛋白質表現的機轉，起始於 VPA 增加 Htra2- β 1 的表現所產生的作用 (Brichta et al, 2003)，然而於本研究中，無論是 SMA 小鼠或正常小鼠以及是否經過治療，各組之脊髓內的 Htra2- β 1 含量皆是相似的 (圖十 A,B)。

為了了解 SMN 蛋白質在脊髓運動神經元內的分布，其次進行小鼠脊髓之免疫螢光染色，以 SMN 抗體染出 SMN 蛋白質 (綠色)，以運動神經元標記 ChAT 染出運動神經元 (紅色) (圖十一)。結果可見，在未經治療 SMA 小鼠中，只有部分的運動神經元的細胞質可染出 SMN 蛋白質 ($31 \pm 5\%$)，而 SMA 小鼠經 6 個月的 VPA 治療後，此比例顯著增加 ($49 \pm 2\%$; $P = 0.03$) (圖十一 J)。SMN 蛋白質在細胞核內會集成許多名為 gems 的小顆粒，以執行其生理功能 (Gubitz et al, 2004)，計算運動神經元內的 gems 個數可發現，SMA 小鼠運動神經元的 gems 數量較正常小鼠少，但經過 VPA 治療後，gems 的個數顯著較多 (1.1 ± 0.2 v.s. 0.5 ± 0.1 ; $P = 0.04$) (圖十一 K)，此結果代表 SMA 小鼠的脊髓運動神經元內經 VPA 治療後所增加的 SMN 蛋白質，似乎是具功能性的。

接著嘗試了解 VPA 治療對轉殖入小鼠體內的人類 *SMN2* 基因表現之影響。以同步定量聚合酶鏈鎖反應分析小鼠脊髓內的全長及 truncated *SMN* 訊息 RNA 含量，並以 β -actin 訊息 RNA 的含量作校正，結果顯示，經 6 個月 VPA 治療後，整體的 *SMN* 訊息 RNA 含量顯著較沒治療的 SMA 小鼠要高 ($P = 0.02$) (圖十 C)，代表 VPA 可增進 *SMN2* promoter 的活性，促進其表現。且全長 *SMN* 訊息 RNA 的含量和 truncated 訊息 RNA 的含量相除之比例有較高的趨勢 ($P = 0.08$) (圖十 D)，可能代表 VPA 可促使 *SMN2* 基因的轉錄產物趨向全長的訊息 RNA 的狀態。

由於 *SMN* 蛋白質除了在脊髓運動神經元扮演了重要的角色外，近年來發現 *SMN* 蛋白質亦在肌肉組織中表現了功能性的作用 (Rajendra et al, 2007; Cifuentes-Diaz et al, 2001)。為了了解是否 VPA 的治療亦會影響到肌肉組織內 *SMN* 蛋白質的含量，進行小鼠肌肉組織之免疫螢光染色，以 *SMN* 抗體染出 *SMN* 蛋白質 (綠色) (圖十二)。結果可見，在未經治療 SMA 小鼠肌肉組織內，*SMN* 蛋白質之免疫螢光染色強度較正常小鼠低，但 SMA 小鼠在經 6 個月的 VPA 治療後，此強度明顯增加

3.2.5 抗細胞凋亡因子

過去相關研究曾發現，VPA 具有增進抗細胞凋亡因子表現及抑制細胞凋亡的作用 (Leng et al, 2006; Yuan et al. 2001)，是以接著嘗試探索以 VPA 治療 SMA 小鼠後，其脊髓內的抗細胞凋亡因子之表現是否有相對應的變化。

取 12 個月大的未經治療之 SMA 小鼠、經 6 個月 VPA 治療的 SMA 小鼠以及正常小鼠，首先以西方點墨法分析其脊髓內之蛋白質含量。比較可見，SMA 小鼠的 Bcl-2 和 Bcl-x_L 兩個抗細胞凋亡因子之表現量較正常小鼠顯著較低 ($P = 0.04$) (圖十三)，然而 SMA 小鼠經 VPA 治療後，Bcl-2 和 Bcl-x_L 的含量皆顯著較高 ($P = 0.03$)。過去研究曾顯示，VPA 透過 ERK 的活化而增加 Bcl-2 的表現 (Laeng et al,

2004)，在此進而分析發現，VPA 的治療的確增加了 SMA 小鼠脊髓內磷酸化 ERK42/44 的含量 ($P = 0.04$)，但不影響非磷酸化 ERK42/44 的含量，此結果代表了 VPA 在 SMA 小鼠促進 Bcl-2 表現的現象，亦有可能是透過對 ERK42/44 的活化所完成。除此之外，由於 Bcl-x_L 在過去研究發現其經由磷酸化的 STAT5 所調節 (Dumon et al, 1999)，在此分析 SMA 小鼠脊髓內 STAT5 含量可見，無論是磷酸化及非磷酸化的 STAT5，在 VPA 治療組與無治療組的 SMA 小鼠間皆無明顯的差別，此結果顯示 VPA 對脊髓內 Bcl-x_L 的促進作用，有可能是透過其它的途徑。而以上 VPA 對 Bcl-2、Bcl-x_L 及磷酸化 ERK42/44 的增進反應，在正常小鼠亦可發現 ($P = 0.04$)，這表示了此 VPA 的作用不單只侷限於 SMA 小鼠。

其次進行小鼠脊髓之免疫螢光染色，以了解 Bcl-2 及 Bcl-x_L 蛋白質在脊髓神經元內的分布，以 Bcl-2 及 Bcl-x_L 抗體分別染出 Bcl-2 及 Bcl-x_L 蛋白質 (紅色)，以神經元標記 NeuN 染出運動神經元 (綠色) (圖十四)。結果可見，在未經治療 SMA 小鼠中，只有部分的神經元的細胞質可染出 Bcl-2 ($48 \pm 9\%$) 及 Bcl-x_L ($41 \pm 4\%$) 蛋白質，而 SMA 小鼠經 6 個月的 VPA 治療後，此比例顯著增加 ($76 \pm 4\%$, $P = 0.04$; $59 \pm 4\%$, $P = 0.04$)。

3.2.6 神經細胞生成與神經膠質細胞增生

過去在細胞培養及動物實驗之研究皆顯示，VPA 具有促進神經生成的作用 (Laeng et al, 2004; Hao et al, 2004; Liu et al, 2007)，因此接著在 SMA 小鼠脊髓中嘗試尋找是否有 VPA 促進神經細胞生成的證據。

在 SMA 小鼠 11 個月大時，連續三天於腹腔注射 100 mg/kg/day BrdU，之後以 VPA 治療 1 個月，並在小鼠 12 個月大時將脊髓取下，以進行切片分析。於脊髓免疫螢光染色可見，在小鼠脊髓中心孔 (central canal) 附近，有少許的 BrdU 和 NeuN (神經元標記) 雙重染色的細胞 (BrdU/NeuN double positive cells)，其比例約為 1000 個 NeuN 正染的細胞中有 2 個亦呈 BrdU 正染的情形 (圖十五 A)，而此現象在未經 VPA

治療的SMA小鼠上並無觀察到，此結果顯示VPA在SMA小鼠的治療可產生少許神經細胞生成的現象。而無論是否經VPA治療，在SMA小鼠脊髓內皆沒有看到呈現BrdU和ChAT (運動神經元標記)雙重染色 (BrdU/ChAT double positive cells)或是BrdU和vWF (血管內皮細胞標記)雙重染色的細胞 (BrdU/vWF double positive cells)。

除此之外，無論是否經VPA治療，在SMA小鼠脊髓內皆存在著BrdU和GFAP (神經膠質細胞標記/astrocyte marker)雙重染色的細胞 (BrdU/GFAP double positive cells)，其位置大部分主要在脊髓中心孔附近，而比較可發現，經VPA治療的SMA小鼠 (每1000個GFAP正染細胞中有 7 ± 1.5 個細胞其BrdU亦呈正染)比無治療的SMA小鼠 (每1000個GFAP正染細胞中有 2 ± 0.8 個細胞其BrdU亦呈正染)擁有較多具BrdU和GFAP雙重染色的細胞 ($P = 0.03$) (圖十五B)，此結果代表VPA在SMA小鼠的治療可增進神經膠質細胞的增生。

過去曾有在肌肉傷害的小鼠模式中，發現trichostatin A治療可促進肌肉細胞再生的研究報告 (Iezzi et al, 2004)，由於VPA和trichostatin A皆為HDAC抑制劑，故在此取經VPA治療的SMA小鼠之肌肉進行分析，以了解其肌肉細胞是否有增生分化的現象。SMA小鼠從6個月大時經VPA治療6個月後，在十二個月大時，於腹腔注射150 mg/kg BrdU，而6小時之後將小鼠腓腸肌取下切片，並以BrdU抗體進行免疫螢光染色，結果可見，雖然肌肉細胞呈現明顯的異常群聚現象，代表該肌肉組織有去神經化的變化 (denervating change)，然而染色結果並沒有發現有呈現BrdU正染的細胞 (圖十五C)，顯示在SMA小鼠的異常肌肉組織中，即使經過長期的VPA治療，仍沒有肌肉細胞增生的現象。

3.3 建立 *Bcl-x_L* 基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估 *Bcl-x_L* 的治療效果

取含有 *Bcl-x_L* 轉殖基因的第三型 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}*Bcl-x_L*^{+/-})及第一型 SMA 模式

小鼠 ($Smn^{-/-}SMN2^{+/-}Bcl-x_L^{+/-}$ 和 $Smn^{-/-}SMN2^{+/-}Bcl-x_L^{+/+}$)，分別進行以下分子生物學和小鼠存活時間等分析。

3.3.1 Bcl-x_L 轉殖基因之表現

依圖一 A 法獲得含有 *Bcl-x_L* 轉殖基因的第三型 SMA 小鼠 (SMA/Bcl-x_L; $Smn^{-/-}SMN2^{+/-}Bcl-x_L^{+/-}$) 及不含 *Bcl-x_L* 轉殖基因的第三型 SMA 小鼠 (SMA; $Smn^{-/-}SMN2^{+/-}Bcl-x_L^{-/-}$) 進行分析，並取年齡一致的正常小鼠作比較 ($Smn^{+/+}SMN2^{-/-}Bcl-x_L^{-/-}$)。

首先，為了確定 *Bcl-x_L* 轉殖基因的確有表現 Bcl-x_L 之蛋白質，取帶有及不帶有 *Bcl-x_L* 轉殖基因的第三型 SMA 小鼠和正常小鼠，以西方點墨法分別進行其脊髓內 Bcl-x_L、SMN 及 α -tubulin 的含量的分析。結果發現，SMA 小鼠脊髓內的 Bcl-x_L 含量較正常小鼠低 (0.37 ± 0.04 vs. 0.59 ± 0.06 , $P = 0.04$)，但 SMA/Bcl-x_L 小鼠的 Bcl-x_L 含量較 SMA 小鼠高 (0.69 ± 0.05 , $P = 0.02$) (圖十六 A,B)。然而，無論是 SMA/Bcl-x_L 小鼠或 SMA 小鼠，其脊髓內的 SMN 蛋白質含量皆較正常小鼠低 (0.23 ± 0.05 , 0.18 ± 0.07 vs. 0.55 ± 0.06 , $P = 0.03$)。

為了了解 Bcl-x_L 蛋白質在脊髓神經元內的分布，其次進行小鼠脊髓之免疫螢光染色，以 Bcl-x_L 抗體染出 Bcl-x_L 蛋白質 (紅色)，以神經元標記 NeuN 染出運動神經元 (綠色) (圖十六 C)。分析可見，SMA 小鼠和正常小鼠相較，前者只有少部分的神經元之細胞質可染出 Bcl-x_L 蛋白質 ($35 \pm 8\%$ vs. $75 \pm 6\%$, $P = 0.03$) (圖十六 C,D)，而於 SMA/Bcl-x_L 小鼠，此比例和 SMA 小鼠相比顯著增加 ($72 \pm 9\%$, $P = 0.04$)。

3.3.2 小鼠存活及形態學分析

取 41 隻第三型 SMA/Bcl-x_L 小鼠和 42 隻第三型 SMA 小鼠，並分析其存活時間。經過近三年的追蹤發現，SMA/Bcl-x_L 小鼠的存活時間較 SMA 小鼠顯著要長 (20 ± 2 vs. 13 ± 2 , $P < 0.001$) (圖十七 A)。正常小鼠的存活年紀約為 2 至 3 年 (Flurkey et al, 2001)，而約有近五分之一的 SMA/Bcl-x_L 小鼠其存活時間大於 2 年，但沒有任何一隻 SMA 小鼠可存活超過 2 年。

此外，於小鼠 12 個月大時，SMA/Bcl-x_L 小鼠的尾巴較 SMA 小鼠長，且當所有的 SMA 小鼠之雙耳皆因退化而呈不規則邊緣時，有一半的 SMA/Bcl-x_L 小鼠之耳緣仍為正常的 (圖十七 B)。然而幾隻 SMA/Bcl-x_L 小鼠在超過 2 歲時，可發現其尾巴已幾乎消失，雙耳耳殼已退化至根部，而四肢之腳指多有缺指的情況，尤其是後肢甚至萎縮至整個腳掌皆不見 (圖十七 C)。此結果代表了雖然 Bcl-x_L 的基因轉殖可明顯延長 SMA 小鼠的存活時間，但仍無法完全阻止其形態學異常的發生。

3.3.3 運動功能/電生理/形態學評估

取 12 個月大的第三型 SMA/Bcl-x_L 小鼠、第三型 SMA 小鼠及正常小鼠各 4 隻，使用 4 種小鼠運動功能試驗來評估小鼠的運動功能，即傾斜試驗、轉輪試驗、RotaRod 試驗及下落試驗。結果發現，SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠在傾斜試驗 ($P = 0.02$)、轉輪試驗 ($P = 0.04$)、RotaRod 試驗 ($P = 0.03$)及下落試驗 ($P = 0.04$)上擁有較佳的表現 (圖十八 A)，且 SMA/Bcl-x_L 小鼠和正常小鼠的運動功能評估結果並無明顯的差異。

在電生理分析中，用電刺激 12 個月大之小鼠的坐骨神經，比較在腓腸肌所得的 CMAP 可見，SMA 小鼠的 CMAP 振幅大小比正常小鼠顯著要小 (141 ± 5 vs. 160 ± 3 , $P = 0.04$) (圖十八 B)，而 SMA/Bcl-x_L 小鼠的 CMAP 則和正常小鼠類似，並比 SMA 小鼠的 CMAP 明顯較大 (161 ± 5 , $P = 0.04$)。

此外，於小鼠 12 個月大時，SMA/Bcl-x_L 小鼠、SMA 小鼠及正常小鼠彼此間

的體重並無顯著差異 (圖十八 C)。而當以小鼠腓腸肌重量除以該小鼠的體重所得之數值代表小鼠的肌肉狀態時，此數值在 SMA 小鼠比正常小鼠顯著要小 ($0.49 \pm 0.01\%$ vs. 0.56 ± 0.01 , $P = 0.04$) (圖十八 C)，而在 SMA/Bcl-x_L 小鼠則和正常小鼠類似，並比 SMA 小鼠明顯較大 (0.54 ± 0.01 , $P = 0.04$)。此結果代表 Bcl-x_L 的基因轉殖可明顯增進 SMA 小鼠的運動功能、正常化電生理之 CMAP 大小及減少肌肉之萎縮。

3.3.4 脊髓運動神經元病理分析

取 12 個月大的第三型 SMA/Bcl-x_L 小鼠、第三型 SMA 小鼠及正常小鼠各 4 隻，將其腰髓部位取下分析，首先以 ChAT 抗體進行脊髓切片的免疫螢光染色。比較發現，SMA/Bcl-x_L 小鼠之脊髓運動神經元數量較 SMA 小鼠要多 (24 ± 2 vs. 15 ± 1 個/切面； $P = 0.03$) (圖十九 A,D)。

由於無論是 SMA/Bcl-x_L 小鼠或 SMA 小鼠，其脊髓運動神經元的大小在顯微鏡觀察下似乎皆較小，因此接著嘗試使用 H&E 染色法來分析小鼠運動神經元的大小分布。在 H&E 染色下，將脊髓運動神經元 (切面面積大於 400 平方微米) 依切面面積大小分為 400-600、600-900 及大於 900 平方微米三組，於三組中分別比較脊髓運動神經元密度在 SMA/Bcl-x_L 小鼠、SMA 小鼠和正常小鼠之比例。在 SMA/Bcl-x_L 小鼠和 SMA 小鼠的分析可見，SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較多的較小運動神經元 (400-600 平方微米) (12.8 ± 1.5 vs. 7.5 ± 1 , $P = 0.04$) (圖十九 B,E)，但兩組間在 600-900 及大於 900 平方微毫米的神經元之分析並無明顯不同；而於 SMA/Bcl-x_L 小鼠和正常小鼠的分析可見，兩組間在 400-600 及 600-900 平方微米的神經元之分析並無明顯不同，但正常小鼠比 SMA/Bcl-x_L 小鼠擁有較多的較大運動神經元 (大於 900 平方微米) (2.5 ± 0.3 vs. 1.3 ± 0.2 , $P = 0.04$)。此結果代表了 Bcl-x_L 轉殖基因的作用似乎主要針對較小的運動神經元，而對於較大的運動神經

元的保護作用相對較少。

由於 Bcl-x_L 是一個抗細胞凋亡因子，為了了解 Bcl-x_L 基因轉殖是否可減少 SMA 小鼠脊髓神經元的細胞凋亡，接著進行小鼠脊髓之免疫螢光染色。以 active caspase 3 抗體染出 active caspase 3 (紅色)，以神經元標記 NeuN 染出運動神經元 (綠色) (圖十九 C)，因為 active caspase 3 為細胞發生細胞凋亡時的後期共同產物，因此 active caspase 3 正染的細胞即為正在進行細胞凋亡的細胞。分析可見，SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較少 NeuN 和 active caspase 3 皆呈正染的細胞 ($1.3 \pm 0.4\%$ vs. $75 \pm 6\%$, $P = 0.03$) (圖十九 C,F)。此結果顯示，Bcl-x_L 基因轉殖的確可以減少 SMA 小鼠脊髓神經元的細胞凋亡。

3.3.5 第一型Bcl-x_L基因轉殖SMA小鼠

在證實了Bcl-x_L基因轉殖可以延長第三型SMA小鼠的存活時間、增進運動功能、減少脊髓神經元的退化及降低細胞凋亡反應後，其次嘗試探索是否Bcl-x_L基因轉殖亦可在較嚴重的第一型SMA小鼠表現類似的效果。

依圖一 A 法獲得含有 heterozygous Bcl-x_L 轉殖基因的第一型 SMA 小鼠 (SMA/Bcl-x_L(+/-); *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}*Bcl-x_L*^{+/-})、含有 homozygous Bcl-x_L 轉殖基因的第一型 SMA 小鼠 (SMA/Bcl-x_L(+/+); *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}*Bcl-x_L*^{+/+})及不含 Bcl-x_L 轉殖基因的第一型 SMA 小鼠 (SMA; *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}*Bcl-x_L*^{-/-})進行分析。首先，以西方點墨法分別進行其脊髓內 Bcl-x_L、SMN 及 α -tubulin 的含量的分析，結果發現，SMA/Bcl-x_L(+/+)及 SMA/Bcl-x_L(+/-)小鼠脊髓內的 Bcl-x_L 含量皆較 SMA 小鼠高 (0.43 ± 0.03 , 0.40 ± 0.02 vs. 0.32 ± 0.02 , $P = 0.04$) (圖二十 A)，但三組之間之脊髓內的 SMN 蛋白質含量皆無顯著不同。

而後取25隻第一型SMA/Bcl-x_L(+/+)小鼠、16隻SMA/Bcl-x_L(+/-)小鼠和17隻第一型SMA小鼠，並分析其存活時間。結果發現，三組的存活時間彼此並無明顯差

異 (8.7 ± 0.5 , 8.1 ± 0.4 , 8.5 ± 0.5) (圖二十B), 代表 *Bcl-x_L* 基因轉殖雖然可以延長較輕型 (第三型) SMA 小鼠的存活時間, 但並無法延長較嚴重型 (第一型) SMA 小鼠的存活時間。

第四章 討論

4.1 建立脊髓肌肉萎縮症小鼠模式之治療評估方法

4.1.1 第三型脊髓肌肉萎縮症小鼠模式

在以往的 SMA 動物治療性研究中，大部分使用的 SMA 動物模式是第一型（嚴重型）或及第二型（中間型）的模式小鼠（Chang et al, 2001; Lesbordes et al, 2003; Haddad et al, 2003; Azzouz et al, 2004），而這些小鼠即使是經過有效的治療，皆會在出生 40 天內便死去。由於這些小鼠的生存期過短，有時會使治療性研究的實驗設計較為困難，一方面治療的時間過短，有時難以得到足夠的療效，導致有些可能有效的藥物，將因此無法被檢驗出來；而另一方面，一些特殊的治療，如基因治療或幹細胞治療，常需要夠長的時間去產生治療的反應，且若小鼠的體型過小，也較難以將病毒載體或幹細胞注射入脊髓腔或脊髓中。此外，由於這些小鼠因年紀尚小因而體型過小，如此使療效評估方法有其侷限，較難以進行如全面的運動功能或電生理檢測等檢查，而在此論文中所分析的小鼠為第三型 SMA 模式小鼠（輕型），在仔細地檢測其表現型後，此小鼠未來可作為一個非常好的治療性研究之 SMA 動物模式。

臨床上，神經科醫師在面對 SMA 患者時，常會進行包括肌肉力量測定的神經學檢查及包括神經傳導測試的神經電生理檢查，過去若有必要，可能會再加上肌肉切片染色以偵測肌肉細胞病理變化，而在非常少數的病例中，於病人死去後，可能會進行脊髓組織的切片以進行脊髓運動神經元相關的分析（Zerres and Davies, 1999），於是在此論文中，上述臨床所使用的評估方法皆嘗試運用在 SMA 小鼠模式上。分析發現，第三型 SMA 小鼠的脊髓運動神經元於小鼠 6 個月大時開始退化，而在 9 個月大時，脊髓運動神經元的數目和正常小鼠相比，只剩下 71%；同時在

小鼠 9 個月大時，SMA 小鼠可檢測出明顯的形態學異常、運動功能下降及肌肉萎縮的現象；而在小鼠 12 個月大時，可發現在電生理檢查中，刺激 SMA 小鼠的坐骨神經時，在腓腸肌所得到的 CMAP 振幅，比正常小鼠要來的小。圖二十一整理了以上結果，以橫軸為小鼠年齡，縱軸為剩餘的脊髓運動神經元之比例，而在不同的小鼠年紀可以分析到不同的小鼠表現型的異常，由此可發現，本論文所運用的形態學分析、運動功能檢測、脊髓及肌肉病理分析和電生理檢查，可以用來評估第三型 SMA 小鼠的表現型，且其在 9 個月大至 12 個月大時，因已出現顯著的形態學、運動功能、脊髓及肌肉病理和電生理檢查之異常，所以這個時段是在治療第三型 SMA 小鼠之後，比較經治療和未治療之 SMA 小鼠的治療反應時最適合的小鼠年紀。

國際上，仍有其它不同的 SMA 小鼠模式可茲使用 (Monani et al, 2000; Frugier et al, 2000; Le et al, 2005; Jablonka et al, 2000)。過去研究曾發現，專一地將小鼠之神經元內 *SMN* 基因剔除時，小鼠會出現脊髓運動神經元的退化，此結果代表 *SMN* 的表現的確在脊髓運動神經元中扮演非常重要的角色；但另一方面，專一地將小鼠之肌肉內 *SMN* 基因剔除時，小鼠亦會出現肌肉纖維的異常，此結果代表了 *SMN* 不僅是維持脊髓運動神經元正常生理功能所必需的重要蛋白質，其亦在肌肉正常功能的表現佔有了不可或缺的角色 (Frugier et al, 2000; Cifuentes-Diaz et al, 2002a)。也因此，過去曾被使用的神經元專一 *SMN* 基因剔除之 SMA 模式小鼠 (法國模式) (Frugier et al, 2000)，由於該小鼠體內只有脊髓運動神經元中的 *SMN* 基因遭到基因剔除，使脊髓運動神經元無法產生 *SMN* 蛋白質而造成退化，但其無法顯示出因為肌肉細胞缺乏 *SMN* 蛋白質所引起的運動障礙，所以此種 SMA 模式小鼠無法良好的用以代表 SMA 患者體內的病態生理學，也因此該模式不是個非常適當的 SMA 模式小鼠。而過去曾有人分析具 heterozygous *SMN* 基因剔除的小鼠，發現其亦具有輕微的表現型，但此種小鼠的基因型狀況和 SMA 病患並不相同，故亦非適當的 SMA 模式小鼠 (Jablonka et al, 2000)。另外一方面，美國 SMA 小鼠模

式亦和台灣模式相同，為經兩股 *Smn* 基因剔除加上人類 *SMN2* 基因植入法所得的 SMA 小鼠 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+})，但可能是其所植入的人類 *SMN2* 基因之原始長度較台灣模式的短，因此美國 SMA 模式小鼠的存活年紀非常短，僅小於 2 週 (Monani et al, 2000; Le et al, 2005)，較不利於治療性研究的實驗設計。

本論文中所使用的 SMA 模式小鼠，是將小鼠二股的 *Smn* 基因剔除，並同時植入人類的 *SMN2* 基因，而得到基因型為 *Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+} 的 SMA 模式小鼠 (Hsieh-Li et al, 2000)，此基因型和大部分的人類 SMA 病患是相同的 (Wirth, 2000; Watase and Zoghbi, 2003)，然而此 SMA 小鼠和人類 SMA 病患一樣呈現三種不同的疾病嚴重度，此現象亦不利於治療性研究的設計。因此本論文所分析及使用的第三型 SMA 模式小鼠，為取原始的 SMA 模式小鼠 (Hsieh-Li et al, 2000)，以 backcross 方式純化此 SMA 小鼠的基因型背景，即將其中數隻 SMA 小鼠配上正常的 C57BL/6J 小鼠，之後取其子代的 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+} 小鼠配上正常的 C57BL/6J 小鼠，重覆此步驟六次，使 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+} 小鼠的基因型背景純化為 C57BL/6J 型式後，最終取子代 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{+/+} 小鼠和 *Smn*^{+/+}*SMN2*^{-/-} 小鼠交配，得到純化的第三型 SMA 小鼠，此法解決了 SMA 小鼠表現型不一致的問題，即確保了每一代配種所得的 SMA 模式小鼠即為第三型。而經過本論文中詳細的表現型分析後，此第三型 SMA 小鼠可以成為標準的 SMA 模式小鼠，用以作為測試藥物、基因治療或幹細胞治療之療效反應之用。

4.1.2 小鼠表現型之評估法

本論文所使用的運動功能測試包括了傾斜試驗、轉輪試驗、RotaRod 試驗及下落試驗四項。在傾斜試驗中，如果小鼠肌力不足時，其四肢將難以穩穩抓住傾斜中的木板，當傾斜角度較大時，小鼠將無法支撐住而往下滑，所以試驗結果所得的傾斜角度，則會較小；在轉輪試驗中，小鼠跑動的距離以滾輪滾動之圈數來表

示，當小鼠肌肉較無力時，其跑動的距離將較短，而實驗結果所得的圈數將較正常鼠要小；而 RotaRod 試驗中，當小鼠置於平衡桿，並啟動平衡桿之轉動時，小鼠必需隨著平衡桿的轉動速動而跑動，否則小鼠會因平衡不足而下落，當小鼠肌力不夠時，小鼠將因跑動的速度不如平衡桿的轉速而提早下掉，因此研究結果所得小鼠在平衡桿上所得的時間，也因此較短；在下落試驗中，正常小鼠在桌上 30 公分以背部朝上而下落時，四肢會約和身寬平形，穩穩地落在其下的白紙上，又因為小鼠的兩後肢已印上顏料，因此小鼠在下落時，兩後肢腳指的位置將會顯現於白紙上，而兩後肢第四腳指之間的距離，則可以用來代表兩四肢在下落時的距離，當小鼠肌肉較無力時，可以發現兩後肢在下落時彼此間的距離會較長，因此測量兩後肢第四腳指之間的距離將會較長。以上四種運動功能性檢測皆可測出小鼠的運動功能，由於本論文中所使用的第三型 SMA 小鼠，其在出生後九個月起，以上述四種運動功能測驗所得的結果，皆顯著較正常小鼠要差，代表此時這些 SMA 小鼠不但已出現運動功能異常，且此異常可由以上四種測試所表現，因此未來這四種測驗可有效當作 SMA 小鼠運動功能評估之用。

在小鼠運動功能之評估法中，原本亦嘗試使用另兩種方法，即橫桿上立法及正立反射法。在橫桿上立法中，置小鼠於一細橫桿之下方，並使其四肢抓住橫桿，正常小鼠在此時會嘗試向上翻轉，以站立於橫桿之上，以此法研究可發現，大部分的正常小鼠皆可向上翻轉並站立於細橫桿之上，而許多 SMA 小鼠則無法站上橫桿，SMA 小鼠多會嘗試向上翻轉，但在試過幾次，小鼠無法站上橫桿後，小鼠使會放棄並維持懸掛於橫桿的狀態，或是直接因無力懸掛而掉下來。因此理論上，此法亦可用於評估 SMA 小鼠運動功能之用，但若將正常小鼠的尾巴剪短再作實驗時，可發現幾乎所有的正常小鼠在剪尾巴前皆可翻轉上立於橫桿，但剪尾後，許多小鼠使無法上立，此結果代表小鼠的尾巴對此試驗的結果有明顯的影響，因為 SMA 小鼠會出現尾巴變短退化的情形，因此橫桿上立法在此並不是一個適當的 SMA 運動功能評估法。另一方面，在正立反射法中，將小鼠以背部朝下置於桌上，

視其是否可成功翻轉，以站立於桌上，而實驗發現，無論是正常小鼠或第三型 SMA 小鼠，且無論是在何年紀組，所有小鼠皆可成功翻轉，此結果代表即使是第三型 SMA 小鼠在十二個月大時，運動功能仍沒有退化到此正立反射出現問題的狀況，因此正立反射法亦非適合的評估 SMA 小鼠運動功能的方式。

在電生理測試中，原本實驗的設計欲仿照臨床病患所進行的神經傳導檢查之方法，將接受電極貼在小鼠的腓腸肌上（小鼠的後掌過小，無法貼電極，故以腓腸肌代替），而以雙極電極於小鼠的大腿後部以電刺激小鼠的坐骨神經，期望可以偵測到於腓腸肌的 CMAP，然而此方法在較弱電刺激強度時，無法偵測到任何訊號，但在較強電刺激強度時，所得訊號過強，前者可能是電刺激太小時，無法經皮膚以電刺激到坐骨神經，但電刺激太強時，由於小鼠後肢長度不夠長，因此電刺激可能直接經皮膚或皮下組織傳至位於腓腸肌的接受器，故該方法是失敗的。為了使較弱的電刺激強度仍然可刺激到小鼠的坐骨神經，將針形電極直接插入小鼠後肢中，企圖直接將針極置於坐骨神經旁，但此法不但難以準確刺激到坐骨神經，且有可能刺到神經而造成坐骨神經的傷害。其次，嘗試將小鼠於後肢大腿上方的皮膚切開，並裸露出坐骨神經，並直接將電極置於坐骨神經上以電刺激，由於擔心電極會傷害到坐骨神經，因此以具圓頭的雙極電極取代針形電極，用來進行小鼠坐骨神經電的刺激，此法的確可得到於腓腸肌的訊號，但訊號並不穩定。而後，將接受電極更改為兩水平細針接受器，並將此接受器插入腓腸肌內，當以電刺激小鼠的坐骨神經時，此時於腓腸肌所得的訊號則相當穩定，故之後以此法作為後續的電刺激方式。

電生理檢測顯示，第三型 SMA 小鼠在十二個月大時，其在腓腸肌所得的 CMAP 振幅顯著較同年紀的正常小鼠要來的小，此結果可以代表 SMA 小鼠的坐骨神經內的神經軸突之數量已有明顯的下降，因此當以電刺激坐骨神經時，所能刺激到的神經軸突較少，因而坐骨神經能活化的腓腸肌肌肉束也因此較少，所以在接受器能得到的訊號便較小。相對而言，無論是正常或 SMA 的小鼠，其所得 CMAP

的潛時皆相似，代表神經雖然退化，但其髓鞘 (myelin sheath)並沒有受到疾病所影響，因此兩組的 CMAP 潛時便無明顯的差異。

4.1.3 脊髓病理和運動功能/電生理之關係性

本論文依小鼠年齡分析了 SMA 模式小鼠的脊髓病理、運動功能和電生理表現，因此可嘗試比較不同年齡的 SMA 小鼠之表現型及 SMA 小鼠的脊髓病理和運動功能/電生理之關係性。

過去曾有學者觀察 SMA 病患後發現，SMA 患者的病情表現似乎呈現兩個階段 (Crawford and Pardo, 1996)：第一個階段為快速惡化期，第二階段為和緩期。亦即 SMA 疾病的演進，並非直線式的惡化，病患在症狀剛出現時的頭一、二年，病情的惡化較為快速，肌力的退化較為明顯，然而後續病況則傾向和緩，肌力的衰退較不明顯，只呈現小幅退化或持續穩定的狀態，然而此觀察的結果並未在病理學上被驗證過。本論文計算不同年紀的 SMA 小鼠之脊髓運動神經元密度相對於正常小鼠的比例，分析可見，第三型 SMA 小鼠之運動神經元退化主要起始於 6 至 9 個月大之間，且此退化非線性的退化，在運動神經元的退化早期 (6 至 9 個月大)，脊髓運動神經元的密度快速下降，而後 (9 至 12 個月大)，該退化則趨於緩和，因此過去所認知的 SMA 兩段式病情發展的現象，此論文第一次以脊髓病理變化所證明，並以曲線圖清楚呈現 (圖六 D)。

此外，本論文所使用的第三型 SMA 模式小鼠，其在 6 個月大前，和正常小鼠比較分析可發現，這些 SMA 小鼠不但運動功能及電生理檢測皆為正常，且其脊髓運動神經元亦尚未退化。這個發現代表著脊髓運動神經元在第三型 SMA，並非一出生就發生了退化的情形，而是後來才開始漸漸凋亡，也因此，如果將來研究出對 SMA 有效的藥物，由於 SMA 的診斷可以用基因篩檢的方式正確診斷，則我們未來應積極地以基因篩檢的方式早期診斷出 SMA 的病患，若能提早診斷出尚未發

病的 SMA 病人，其脊髓運動神經元可能還未出現退化，早期的藥物治療可能可以使脊髓運動神經元持續保持在正常的密度，甚至可以預防疾病的發生，或減緩疾病的進程。

將第三型 SMA 模式小鼠的運動功能、電生理檢測結果與脊髓運動神經元及肌肉病理變化相互作比較時，本論文亦提供了以下新的研究數據。由圖二十一之結論可知，第三型 SMA 小鼠在九個月大時，其運動功能明顯下降、肌肉出現萎縮、且脊髓運動神經元密度剩下正常的 70% 左右；而在十二個月大時，其電生理檢測結果開始出現異常，而此時脊髓運動神經元密度約剩下正常的 60%。由此結果可回推，當臨床上看到 SMA 病患的運動功能障礙及肌肉萎縮時，則代表了其脊髓運動神經元密度只剩下正常的 70%；而當發現 SMA 病患的神經傳導檢查出現異常，即 CMAP 的振幅變小時，可能代表了其脊髓運動神經元密度只剩下正常的 60%。而此結論亦證實了，電生理的檢測在 SMA 並非一高敏感度的檢查，其異常經常不會在疾病的早期即出現。

4.1.4 脊髓運動神經元之病理變化

目前對於 SMA，其脊髓運動神經元發生細胞凋亡的機制尚未非常清楚(Frugier et al, 2002)。此論文在分析脊髓運動神經元之病理變化時發現，將脊髓運動神經元依大小區分為三組時（即截面積介於 400 至 500 微米平方、介於 500 至 900 微米平方及大於 900 微米平方），分別分析此三組的脊髓神經元密度和年紀的關係可發現，雖然三組的脊髓神經元密度皆隨年紀而明顯下降，然而較大的脊髓運動神經元和較小的脊髓運動神經元相比較，相對容易發生退化的情形（圖六 E），亦即神經元的大小愈大，神經元密度下降的愈快。

較大的脊髓運動神經元為何會較易造成退化，目前原因仍未明。一個可能性為，由於較大的細胞需要較多的能量，以維持細胞正常的生理運作，也因此需要

較高的粒線體活性以製造足夠的能量以茲利用，因此一方面，較大的細胞也就可能對能量的不足較為敏感，而另一方面，該細胞亦較易曝露於較高的 oxidative stress 之下 (Shaw and Eggett, 2000)，所以這些大的脊髓運動神經元也就可能因較易受到傷害而引起細胞凋亡。

此外，較大的脊髓運動神經元常擁有較長的軸突，如位於腰髓支配足部肌肉的運動神經元，也因此這些運動神經元含有較高量的 neurofilaments (Shaw and Eggett, 2000; Ho et al., 1992)。而過去研究曾顯示，當大量的 neurofilaments 堆積於神經末稍時，可能造成 SMA 中的軸突病變 (axonopathy) (Cifuentes-Diaz et al., 2002b)，是否這些大的脊髓運動神經元的細胞凋亡和 neurofilaments 相關的病理變化有關，則需未來的研究加以證明。

4.2 以 valproic acid 治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式

4.2.1 Valproic acid 於脊髓肌肉萎縮症之療效

在過去細胞研究中已發現，以 VPA 治療由 SMA 患者所取得的培養纖維母細胞內，可使細胞內 SMA 蛋白質的表現顯著增加 (Brichta et al, 2003; Sumner et al, 2003)，由於體內 SMN 蛋白質的多寡和疾病嚴重度呈逆相關 (Feldkotter et al, 2002; Lefebvre et al, 1997)，因此 VPA 具有治療 SMA 的潛力。本論文以 VPA 長期治療第三型 SMA 模式小鼠，證實了當 VPA 自 SMA 小鼠之脊髓運動神經元退化起始時 (六個月大) 開始治療，可以減少 SMA 小鼠形態學的異常、減緩運動功能的退化、避免電生理檢驗中 CMAP 振幅的下降、減少神經肌肉交界處的去神經化現象、降低肌肉纖維的萎縮及延緩脊髓運動神經元的退化，此結果在第一次證實了 VPA 對 SMA 模式小鼠具有明顯療效的具體報告。

以脊髓切片 ChAT 免疫螢光染色法、H&E 染色法及神經性回溯追蹤法

(retrograde neuronal tracing method)可證實，長期 VPA 的治療可減緩第三型 SMA 小鼠之脊髓運動神經元的退化（圖八）。ChAT 免疫螢光染色法以運動神經元專一的標記 ChAT 來偵測運動神經元，以此方法，脊髓內帶有螢光的細胞皆為運動神經元，但當神經元已然因退化而出現蛋白質表現障礙，但尚未死亡時，可能不會正常的表現 ChAT 蛋白質，因而該細胞無法以 ChAT 免疫螢光染色法來顯現，但這些細胞可以用 H&E 染色法來顯示；至於以 H&E 染色法進行脊髓切片的分析時，此法只能以形態學證實某一細胞為神經元，但無法確認該細胞為運動神經元，且本論文分析經 *Hb9-eGFP* 基因轉殖的小鼠的脊髓後，已證實較大的神經元（切面面積大於 400 平方微米）即為運動神經元，但其實部分切面面積界於 200 至 400 平方微米的神經元亦為運動神經元，因此只分析切面積較大的神經元其實亦無法完全代表所有運動神經元實際的狀況，這時以 ChAT 免疫螢光染色法來分析可解決此問題，因此同時以 ChAT 免疫螢光染色法和 H&E 染色法進行分析具有相輔相成的作用。另一方面，無論是 ChAT 免疫螢光染色法或 H&E 染色法，皆無法證實所分析的運動神經元仍然具有支配下肢肌肉的軸突，而當以神經性回溯追蹤法來分析運動神經元時，幫助了解這些運動神經元的軸突是否有仍有支配下肢肌肉，然而此法所偵測到的運動神經元僅是某一脊髓切面中部分的運動神經元，因為有些運動神經元的軸突所支配的肌肉並沒有接受 fluorogold 的注射。由此可知，並沒有一個脊髓運動神經元的分析法是完美的。因此本論文在 VPA 治療後脊髓運動神經元的偵測，同時以三種方法來分析，而所得的結果皆證實，VPA 的治療可減緩第三型 SMA 小鼠之脊髓運動神經元的退化。

進一步分析可知，VPA 的治療不只是僅僅使 SMA 小鼠之脊髓運動神經元退化減緩，而是可以在電生理分析、肌肉狀態和運動功能上得到效果。首先，電生理檢測顯示，第三型 SMA 小鼠經長期的 VPA 治療後，其在腓腸肌所得的 CMAP 振幅顯著較未治療的 SMA 小鼠來的大，此結果可以代表經 VPA 治療的 SMA 小鼠之坐骨神經內，神經軸突之數量並無異常的下降，因此當以電刺激坐骨神經時，所

能刺激到的神經軸突較大，因而坐骨神經能活化的腓腸肌肌肉束也因此較多，由此可知，經 VPA 治療的 SMA 小鼠，其脊髓運動神經元不但退化減緩，且其軸突亦保持了正常的數量而無減少。此外，肌肉神經交界的分析中，VPA 的治療部分維持了神經纖維深入 post-synaptic muscle end plate 的比例，且在肌肉纖維的分析中，VPA 可避免肌肉組織之纖維群聚異常現象，這些結果皆可以間接表示，經 VPA 處理後所避免退化的脊髓運動神經元，其大部分的神經末梢仍有深入 post-synaptic muscle end plate，以進行其功能。而由腓腸肌重量的分析和病理切片下肌肉纖維切面面積的分析可知，VPA 亦可減少 SMA 小鼠的肌肉萎縮，證實了經 VPA 治療後，肌肉纖維因保持了神經的支配，因此也因而避免了可能的萎縮及退化。最後，由四種小鼠運動功能之檢測分析可見，VPA 可減緩 SMA 小鼠之運動功能的退化，此結果驗證了 VPA 在減緩脊髓運動神經元、神經纖維及肌肉細胞的退化之後，的確可維持了 SMA 小鼠的運動功能。

VPA 在臨床上作為抗癲癇藥物及情緒安定劑以有多年的經驗，目前已常規的使用於癲癇及躁鬱症的成人及幼童患者，且 VPA 的藥物動力學及副作用也已相當了解 (Brodie and Dichter, 1996; Belmaker, 2004)。在此論文的實驗中，將 VPA 置於飲用水中 (0.2mg/ml) 給小鼠飲用，這些小鼠一天約喝掉 5 至 8 毫升含有 VPA 的水，其等同於 40-64 mg/kg/day 的 VPA 劑量，而該劑量類似於目前癲癇患者所使用的最高劑量 (Brodie and Dichter, 1996)。考量到 VPA 對 SMA 模式小鼠上的明顯療效和 VPA 的使用的安全性，VPA 應嘗試應用於大型的 SMA 臨床試驗，以在病患上證實其療效。

然而，研究中亦發現，VPA 對第三型 SMA 模式小鼠的治療效果，雖然的確可延緩脊髓運動神經元的退化及維持運動功能的表現，但分析神經肌肉交界的狀態時，仍可發現，即使 SMA 小鼠經過長期的 VPA 治療，雖然神經纖維深入 post-synaptic muscle end plate 的比例較無治療的小鼠要高，但和正常小鼠比較起來，仍明顯偏低 (圖九)。而 SMA 模式小鼠即使經過 VPA 治療，但其 post-synaptic

muscle end plate 仍有異常神經纖維異常聚積的現象 (neurofilament accumulation)。

除此之外，在 SMA 小鼠之 ChAT 免疫螢光法和神經性回溯追蹤法分析中發現，經 VPA 治療的 SMA 小鼠之運動神經元數目約為正常小鼠的 90%，且無顯著差異，然而若比較兩者具有支配腓腸肌之 axon 的運動神經元數目，前者約為後者的 75%，並呈現顯著的不同 (圖八)，此結果代表雖然 VPA 的確可減少脊髓運動神經元的退化，但其中約有 15% 的運動神經元沒有支配腓腸肌的 axon，即其可能為不具功能的運動神經元。另一方面，SMA 小鼠在經 VPA 治療後，雖然的確可減少脊髓運動神經元的退化，但主要的作用侷限於較小的運動神經元，而較大的運動神經元仍還是有明顯退化的情形。以上這些結果皆代表了 VPA 的療效無法完全根治 SMA 小鼠在脊髓和肌肉所存在的不正常表現。因此，未來 SMA 的治療，可能仍需尋找其它的 HDAC 抑制劑，具有較強的 HDAC 抑制能力，以更加提高細胞內 SMN 蛋白質的含量，增進其治療的反應。另一方面，亦可尋找可能有效且其治療機制和 VPA 不同的藥物，當 VPA 和該藥物合併使用時，可能可增加其對 SMA 的治療效果。

4.2.2 Valproic acid 於脊髓肌肉萎縮症之機制

VPA 對 SMA 的治療作用，其機制是多元的 (圖二十二)，可能的作用包括了增加 SMN 蛋白質的濃度、提升抗細胞凋亡因子 (Bcl-2 和 Bcl-x_L) 的表現及增進神經細胞的新生。

首先，由脊髓組織之西方點墨法分析可知，VPA 可增加脊髓內 SMN 蛋白質的濃度，且經過脊髓免疫螢光染色法亦見，所增加的 SMN 蛋白質的確表現在脊髓之神經元中。在正常的情況下，SMN 蛋白質在細胞核內會集成許多名為 gems 的小顆粒，以執行其生理功能 (Gubitz et al, 2004)，計算運動神經元內的 gems 個數可發現，SMA 小鼠運動神經元的 gems 數量較正常小鼠少，但經過 VPA 治療後，gems 的個數顯著較多，由此可以推測，因 VPA 治療所增加的 SMN 蛋白質，應該

是有其生理功能的。此外，SMN 不僅是維持脊髓運動神經元正常生理功能所必需的重要蛋白質，其亦在肌肉正常功能的表現佔有了不可或缺的角色 (Frugier et al, 2000; Cifuentes-Diaz et al, 2002a)，在肌肉組織免疫螢光染色法分析可見，VPA 亦增加了肌肉組織中 SMN 蛋白質的含量，因此 VPA 於 SMA 的作用標的，同時包含了脊髓神經元及肌肉組織，又由於體內 SMN 蛋白質的多寡和疾病嚴重度呈逆相關，(Feldkotter et al, 2002; Lefebvre et al, 1997)，因此 VPA 於脊髓神經元及肌肉組織增加了 SMN 蛋白質的含量，應是其減緩運動功能的退化、降低肌肉纖維的萎縮及延緩脊髓運動神經元的退化的機制之一。

過去在細胞實驗之研究中曾發現，VPA 之所以會使 SMN 蛋白質表現增加，主要是 VPA 可使 *SMN* 基因在轉譯時，不但讓 *SMN* 基因的 promoter 之活性變高，使整體 SMN 訊息 RNA 的表現增加，另一方面，VPA 使 SMN 訊息 RNA 的 alternative splicing 趨向於全長 SMN 的狀態，因而製造出較多的 SMN 蛋白質 (Brichta et al, 2003; Sumner et al, 2003)。在本論文的小鼠活體實驗中，以同步定量聚合酶鏈鎖反應分析，結果顯示，總 SMN 訊息 RNA (全長加上 truncated SMN 訊息 RNA) 的含量，在經 VPA 治療的 SMA 小鼠較未治療的 SMA 小鼠要高。此外，於經 VPA 治療的 SMA 小鼠，其全長 SMN 訊息 RNA 的含量和 truncated 訊息 RNA 的含量相除之比例，有較高的趨勢，代表 VPA 的確可使小鼠脊髓組織內 SMN 訊息 RNA 的 alternative splicing 趨向於全長 SMN 的狀態 (圖十)。綜合以上結果，證實了過去有關 VPA 對 *SMN* 基因表現機制的細胞實驗所得的結果，在活體動物實驗上亦可發現。

過去曾有細胞研究發現，VPA 增加 SMN 蛋白質表現的機轉，起始於 VPA 增加 Htra2- β 1 的表現所產生的作用 (Brichta et al, 2003)，然而於本研究中，無論是 SMA 小鼠或正常小鼠以及是否經過治療，各組之脊髓內的 Htra2- β 1 含量皆是相似的 (圖十)。此相異的研究結果可能導因於，脊髓組織中或許只有神經細胞在經 VPA 治療後，Htra2- β 1 的含量才會增加，但在分析小鼠脊髓內的 Htra2- β 1 含量時，脊

髓中所有細胞內的 Htra2- β 1 皆會測量到，也因此可能神經細胞中在經 VPA 治療後，Htra2- β 1 含量的上升程度因而被稀釋掉。然而真正的原因，仍需後續的研究去證明。

另一方面，本論文亦發現，兩種抗細胞凋亡因子：Bcl-2 和 Bcl-x_L，其在 SMA 小鼠的脊髓中，濃度較正常小鼠要低，其實過去亦有在 SMA 病患的研究上顯示，Bcl-2 和 Bcl-x_L 在 SMA 患者的體內表現量，明顯較正常人來的少 (Solar-Botija et al, 2003; Araki et al, 2003)，由於 SMA 患者的脊髓組織有過度細胞凋亡的現象 (Desjardins and Ledoux, 1998; Solar-Botija et al, 2002)，而在第一型 SMA 模式小鼠的脊髓組織中，亦可見前角運動神經元的數量減少及於 TUNEL 染色下較多細胞凋亡的現象 (Tsai MS et al, 2006)，因此，以藥物或其它相關治療來提升抗細胞凋亡因子 Bcl-2 或 Bcl-x_L 的表現可成為一個不錯的治療 SMA 的新方向。

過去研究曾證實，VPA 可增加大鼠大腦額葉處神經元內，Bcl-2 的表現 (Chen et al, 1999)，此外，以 VPA 治療小腦神經培養細胞時，細胞內的 Bcl-2 之表現量亦會增加 (Leng et al, 2006)。在作用機制方面，SH-SY5Y 細胞經 VPA 治療後，會先活化 ERK 路徑，以增加 Bcl-2 的表現，並刺激細胞存活及神經細胞突起的生長 (Yuan et al, 2001)。在本論文中，SMA 小鼠和正常小鼠在經 VPA 治療了 6 個月後，其脊髓內的磷酸化 ERK44 和 ERK42 的含量提升，但未磷酸化的 ERK44 及 ERK42 含量不變，代表 ERK 路徑的活化，而經 VPA 治療後的 SMA 小鼠脊髓內的 Bcl-2 蛋白質濃度增加，以免疫螢光染色法證實了此 Bcl-2 蛋白質濃度之提升發生於脊髓內的神經元中，綜合以上結果可知，VPA 亦可在脊髓組織內活化 ERK 路徑，並增加脊髓神經元內 Bcl-2 的表現。

除此之外，VPA 的治療亦增加了 SMA 小鼠和正常小鼠之脊髓內 Bcl-x_L 蛋白質濃度，免疫螢光染色法證實了此 Bcl-x_L 蛋白質濃度之提升發生於脊髓內的神經元中，這是第一次有 VPA 可增加 Bcl-x_L 表現的研究報告。過去研究顯示，Bcl-x_L 是經由磷酸化的 STAT5 所調節 (Dumon et al, 1999)，但在此分析 SMA 小鼠脊髓內

STAT5 含量發現，磷酸化及非磷酸化的 STAT5，在 VPA 治療組與無治療組的 SMA 小鼠間皆無明顯的差別，此結果暗示 VPA 對脊髓內 Bcl-x_L 的促進作用，有可能是透過其它的途徑。

另一方面，SMA 小鼠在經 VPA 治療後，於脊髓免疫螢光染色可見，在小鼠脊髓中心孔附近，有少許的 BrdU 和 NeuN 雙重正染的細胞，而此現象在未經 VPA 治療的 SMA 小鼠上並無觀察到，而無論是否經 VPA 治療，在 SMA 小鼠脊髓內皆沒有看到呈現 BrdU 和 ChAT 雙重正染的細胞。此結果代表了 VPA 在 SMA 小鼠的治療可產生少許神經細胞生成的現象，但由於分化成神經元細胞的個數不高，且並沒有觀察到分化成運動神經元的細胞，因此，這種 VPA 在 SMA 小鼠上所造成的神經生成的現象，對其運動功能的作用應非形成新生的運動神經元，以取代原已退化的運動神經元的角色。過去在缺血性腦中風的大鼠模式上，若以 HDAC 抑制劑 sodium butyrate 治療，則可增加缺血側大腦包括 subventricular zone、dentate gyrus、striatum 及額葉皮質部位的神經元及 astrocyte 之再生 (Kim et al, 2009)，在本論文中，無論是否經 VPA 治療，在 SMA 小鼠脊髓內脊髓中心孔附近，皆存在著 BrdU 和 GFAP 雙重染色的細胞，經比較，VPA 治療後的 SMA 小鼠比無治療的 SMA 小鼠擁有較多具 BrdU 和 GFAP 雙重染色的細胞，此結果代表 VPA 在 SMA 小鼠的治療可增進神經膠質細胞的增生，也許此 VPA 的作用在 SMA 小鼠上可形成神經保護的現象，以減少 SMA 脊髓運動神經元的細胞凋亡反應，進而維持了小鼠的運動功能。

健康成體的脊髓神經生成作用發生於脊髓的中心孔附近 (Johansson et al, 1999)，而脊髓發生損傷時，此脊髓神經生成作用會提高，以取代部分受傷脊髓神經的功能 (Mothe et al, 2005; Zai et al, 2005)。而過去研究曾發現，以 VPA 治療胚胎大腦皮質培養細胞及胚胎大腦皮質培養細胞後，神經細胞的增生經 ERK 路徑的活化大幅的提高，而以 VPA 治療大鼠後，其 dentate gyrus 的神經生成現象亦明顯增加 (Laeng et al, 2004; Hao et al, 2004)。在本論文中，VPA 在 SMA 小鼠的治療可產生少許神經細胞生成的現象，且亦合併 ERK 路徑的活化，代表 VPA 對神經細胞的生成

作用，亦發生於SMA小鼠的脊髓組織中，是否VPA引起的神經細胞生成作用亦出現在其它脊髓的疾病仍然未知，若後續研究發現，VPA可對許多脊髓疾患產生明顯的神經細胞生成作用，則未來對如脊髓外傷和肌肉失養側索硬化症等疾病，可嘗試以VPA為治療藥物，以動物實驗來確認否有因神經細胞生成的促進作用而對疾病有不錯的療效。

於ALS的小鼠模式脊髓內，亦可見到新生的神經細胞之分裂、分化及移行 (de Hemptinne et al, 2006; Ohta et al, 2006)，但同樣是運動神經元疾病，本論文中第三型SMA小鼠在未治療時，並無明顯的神經細胞生成作用，此相異的結果可能是因為，ALS的病程較為快速，其約於發病五年內，大部分的病患的患者便會因呼吸肌肉無力而死亡 (Tabolt et al, 2001; Rowland et al, 2001)，但第三型SMA的患者病程則相對緩慢，由於其脊髓內的運動神經元退化比ALS要輕，可能因此對神經細胞生成作用的刺激力便較小。又過去曾有在肌肉傷害的小鼠模式中，發現另一HDAC抑制劑 trichostatin A 治療可促進肌肉細胞再生的研究報告 (Iezzi et al, 2004)，但同樣是HDAC抑制劑，SMA小鼠即使經過長期的VPA治療，雖然SMA小鼠的因運動神經元退化引起肌肉組織之異常，但仍沒有出現肌肉細胞增生的現象，此結果可能也是因為於SMA疾病和肌肉傷害不相同，前者的肌肉異常是慢性的變化，故沒有足夠強的訊號引導肌肉發生肌肉細胞再生的作用。

4.3 建立 Bcl-x_L 基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估 Bcl-x_L 的治療效果

由 Bcl-x_L 基因轉殖鼠和第三型 SMA 模式小鼠交配，獲得含有 Bcl-x_L 轉殖基因的第三型 SMA 模式小鼠 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/+}*Bcl-x_L*^{+/+})。首先以西方點墨法證實，SMA/Bcl-x_L 小鼠的 Bcl-x_L 含量較 SMA 小鼠高，接近後者的二倍；且以脊髓之免疫螢光染色，確定可染出 Bcl-x_L 蛋白質的神經元之比例，SMA/Bcl-x_L 小鼠和 SMA 小鼠相比顯著增加，此結果確定 Bcl-x_L 轉殖基因的確有表現 Bcl-x_L 之蛋白質。但

無論是 SMA/Bcl-x_L 小鼠或 SMA 小鼠，其脊髓內的 SMN 蛋白質含量皆較正常小鼠明顯偏低。其次，分析此 SMA/Bcl-x_L 小鼠的表現型可知，SMA/Bcl-x_L 小鼠的存活時間較 SMA 小鼠長約 1.5 倍、尾巴及耳緣的退化較少、運動功能較佳、肌肉萎縮較輕、電生理分析結果較為正常、脊髓運動神經元退化較少、且脊髓內有較少的細胞凋亡反應。此結果第一次證實 Bcl-x_L 對 SMA 有明顯的治療作用。

由於 SMA 的疾病發生導因於脊髓運動神經元內 SMN 的表現減少，研究亦顯示，SMA 疾病嚴重度和體內 *SMN2* 基因的 copy number (Feldkotter et al, 2002; Parsons et al, 1998) 和 SMN 的表現量多寡呈現明顯的逆相關 (Lefebvre et al, 1997; Coover et al, 1997)，因此目前全世界 SMA 的治療相關研究，主要皆是以 SMN 蛋白質為標的，尋找可以使 SMN 表現增加的藥物。然而此論文中研究發現，在不影響 SMN 蛋白質表現的情況下，*Bcl-x_L* 的基因轉殖對 SMA 有明顯的治療作用，此外，SMA 胎兒患者的脊髓組織中，以體內有增加細胞凋亡的情形：在第一型 SMA 的胎兒患者，前角運動神經元的數量較正常胎兒的少，而 TUNEL 染色可見 SMA 有較多的細胞凋亡現象 (Soler-Botija et al, 2002)。而 SMA 患者的病理組織中亦曾發現有 Bcl-x_L 表現下降的情況：如第一型 SMA 的胎兒脊髓組織內，其運動神經元內的 Bcl-x_L 表現下降 (Soler-Botija et al, 2003)，而在第二型 SMA 患者上，小腦組織亦有 Bcl-x_L 表現低下的情形 (Araki et al, 2003)。且在 SMA 模式小鼠上，亦可見明顯的細胞凋亡的情形，即前角運動神經元的數量減少及於 TUNEL 染色的反應下有較多細胞凋亡的現象 (Tsai MS, et al, 2006)。而本論文又發現，Bcl-x_L 的表現在 SMA 小鼠的脊髓中下降。綜合以上結果，未來 Bcl-x_L 可作為一具潛力的 SMA 治療新標的。

然而，Bcl-x_L 的基因轉殖在較嚴重的第一型 SMA 小鼠，並無類似的治療效果。在西方點墨法分析中，SMA/Bcl-x_L(+/+) 及 SMA/Bcl-x_L(+/-) 小鼠脊髓內的 Bcl-x_L 含量皆較 SMA 小鼠高，但比較其存活時間可見，三組的存活時間彼此並無明顯差異，代表 Bcl-x_L 基因轉殖雖然可以延長較輕型 (第三型) SMA 小鼠的存活時間，但並

無法延長較嚴重型（第一型）SMA 小鼠的存活時間。於第一型 SMA 患者，脊髓運動神經元的退化起始於胎兒時期 (Soler-Botija et al, 2002)，在如此嚴重的疾病反應下，*Bcl-x_L* 的基因轉殖可能也因此無法足夠於第一型 SMA 小鼠中，避免運動神經元的細胞凋亡。除此之外，即使是具有二倍 *Bcl-x_L* 基因轉殖的 SMA/*Bcl-x_L*(+/+) 小鼠，其脊髓中 *Bcl-x_L* 的濃度和 SMA 小鼠相比，雖然有顯著的提高，但增加幅度並不是非常的大（僅增加了三分之一倍），這可能是 SMA/*Bcl-x_L* 小鼠的存活時間和 SMA 小鼠並無明顯不同的另一個可能性。

在本論文中所使用的第三型或第一型 *Bcl-x_L* 基因轉殖小鼠，基因型無論是 SMA/*Bcl-x_L*(+/+) 或 SMA/*Bcl-x_L*(+/-)，其 *Bcl-x_L* 基因皆是由廣泛性神經元相關的啟動子 (pan-neuronal promoter) α -tubulin 所啟動 (Parsadanian et al, 1998)。此啟動子 α -tubulin 在神經元的生成期便呈活化狀態，並在神經元的持續發展中維持高度的活性，而後於神經元分化成熟後便逐漸減少活性，但之後一旦有神經元之去神經化現象存在時，此啟動子的活性又會被提升 (Gloster et al, 1994, 1999)。於第三型 *Bcl-x_L* 基因轉殖小鼠，可能是脊髓運動神經元的退化引起了去神經化的反應，因而誘發了啟動子 α -tubulin 的活化，因此 *Bcl-x_L* 蛋白質在第三型 SMA 小鼠脊髓內的表現便相當好。但相對的，理論上，啟動子 α -tubulin 在第一型 SMA 小鼠，由於該啟動子理應在小鼠出生前後的神經元發展分化期，皆處於高度活化的狀態，也因此，*Bcl-x_L* 蛋白質在第一型 SMA 小鼠脊髓內的表現理應不錯，但實際上的表現並不理想，而此現象的原因目前尚不明瞭。

將 *Bcl-x_L* 的質體以微細注射的方式打入交感神經元培養細胞中以表現 *Bcl-x_L* 時，*Bcl-x_L* 可減少神經元因缺乏給予 neural growth factor 而引起的死亡反應 (Gonzalez-Garcia et al, 1995)。而當以腺相關病毒攜帶 *Bcl-x_L* 基因，對胚胎運動神經元培養細胞進行治療時，可減少運動神經元因 glutamate 毒性所造成的細胞凋亡 (Garrity-Moses et al, 2005)。此外，於活體的小鼠研究中，於 *Bcl-x_L* 基因轉殖小鼠，其截斷顏面神經後所造成的顏面神經元之死亡情形減少；且當誘發小鼠缺血性腦

梗塞時，亦可見到和正常的小鼠相比，*Bcl-x_L* 基因轉殖小鼠的腦中風範圍較小 (Parsadanian et al, 1998)。由此可見，*Bcl-x_L* 的表現的確可以降低包括運動神經元在內的神經細胞的死亡。而本論文第一次證實了，當在第三型 SMA 小鼠的脊髓內以基因轉殖方式增加 *Bcl-x_L* 蛋白質的表現量時，可降低 caspase 3 正染的神經元個數，並減少脊髓運動神經元的死亡，其代表了 *Bcl-x_L* 蛋白質的高度表現，的確亦可在 SMA 小鼠中降低脊髓運動神經元細胞凋亡的反應，以減少神經元的死亡。

Bcl-x_L 是一個抗細胞凋亡的因子，可以中止細胞內細胞凋亡的反應，然而，單純增加 *Bcl-x_L* 的表現有可能只是減少細胞的死亡，意即有可能該細胞已經啟動了細胞凋亡的機制，並退化到不具功能的細胞，而只是在 *Bcl-x_L* 的刺激下避免了死亡而已 (Dumas and Sapolsky, 2001)。就如同過去研究發現，在 *Bcl-x_L* 的治療下，spiral ganglion 之神經元的死亡可獲得抑制，但該神經元的功能仍無法維持原有的狀態 (Hansen et al, 2007)，此結果顯示，*Bcl-x_L* 的治療有可能只是避免細胞死亡，但並無法拯救細胞的功能。然而在本論文中的第三型 SMA 小鼠中，提高 *Bcl-x_L* 的表現不僅只是避免了脊髓運動神經元的細胞凋亡，而且 SMA 小鼠的運動功能表現亦提升，且存活時間亦明顯增長，因此 *Bcl-x_L* 對 SMA 的作用，似乎超過了單純的對細胞凋亡的抑制。

目前已知，SMN 蛋白質在細胞內主要的功能為協助訊息 RNA 的切結 (pre-mRNA splicing)，在細胞質內，SMN 蛋白質幫助 snRNA 和 Sm 蛋白質組合成 snRNP，並接著幫忙 snRNP 運輸至細胞核內，以進行後續的訊息 RNA 的切結功能，因此，SMN 蛋白質和訊息 RNA 的切結相關 (Pellizzoni et al, 2002; Gubitz et al, 2004)，進而幫助 DNA 的轉譯；此外，SMN 蛋白質亦可能和 β -actin 的生成運輸及神經軸突的生長有關，SMN 蛋白質會和 β -actin 形成聚合體，並幫助 β -actin 的運輸。然而目前為止，為何 SMN 缺乏會導至 SMA，詳細的致病機轉至今尚未非常明瞭。過去曾有研究發現，*Bcl-2* 蛋白質和 SMN 蛋白質有明顯的交互作用 (Sato et al, 2000)，由於 *Bcl-x_L* 亦是 *Bcl-2* 家族的一員，因此 *Bcl-x_L* 有可能也和 *Bcl-2* 一

樣和 SMN 有彼此間的交互作用，而這種交互作用可能不是增加 SMN 的表現量，而是參與了 Bcl-x_L 在 SMA 小鼠中的正向治療反應，是否 Bcl-x_L 在 SMA 的疾病病理變化扮演了重要且直接的角色，或者是單純為細胞凋亡的抑制，需要未來進一步的研究去證實。

本研究中的 SMA/Bcl-x_L 小鼠當超過 2 歲大時，可發現其尾巴已幾乎消失，雙耳耳殼已退化至根部，而四肢腳指多有缺指的情況，尤其是後肢甚至萎縮至整個腳掌皆不見。此結果代表了雖然 Bcl-x_L 的基因轉殖可明顯延長 SMA 小鼠的存活時間及維持了其運動功能，但仍無法完全阻止其形態學異常的發生。此外，使用 H&E 染色法來分析小鼠運動神經元的大小分布，發現 Bcl-x_L 轉殖基因的作用似乎主要針對較小的運動神經元，而對於較大的運動神經元的保護作用相對較少。因此，Bcl-x_L 的治療對 SMA 小鼠的療效亦無法完全治癒 SMA 疾病，後續研究仍需尋找工作方法去提高 Bcl-x_L 的治療效果或嘗試二種以上不同機制藥物的合併治療，以增加的整體治療的反應。

Bax 蛋白質亦屬於 Bcl-2 家族中的主要一員 (Oltvai et al, 1993)，Bcl-x_L 和 Bax 同樣是神經系統在分化成熟後，控制細胞生存的重要調節者 (Merry and Korsmeyer, 1997)，但 Bcl-x_L 是抑制細胞凋亡，而 Bax 是促進細胞凋亡。過去研究發現，SMA 小鼠脊髓內的 Bax 蛋白質表現量有異常增加的現象 (Tsai MS et al, 2006)，Bax 含量在第一型 SMA 小鼠 (嚴重型) 的脊髓內是正常小鼠的 4.7 倍，而在第二型 SMA 小鼠 (中間型) 的脊髓內是正常小鼠的 2.8 倍，因此此結果亦顯示了，Bax 的脊髓中含量和 SMA 疾病的嚴重度呈正向的相關。而為了證實促細胞凋亡因子 Bax 的確在 SMA 的致病機轉扮演了重要的角色，該研究亦製作了具有 Bax 基因剔除的 SMA 模式小鼠，當小鼠體內的兩股 Bax 皆被剔除時，脊髓內完全沒有 Bax 蛋白質的表現。將 *Smn*^{+/-}*SMN2*^{+/-}*Bax*^{+/-} 小鼠和 *Smn*^{+/-}*SMN2*^{-/-}*Bax*^{+/-} 小鼠交配後，將得到 *Smn*^{-/-}*SMN*^{+/-}*Bax*^{-/-} 小鼠 (Bax(-/-)/SMA) 和 *Smn*^{-/-}*SMN*^{+/-}*Bax*^{+/-} 小鼠 (SMA)，分析顯示，在 Bax(-/-)/SMA 中，有 60% 屬於輕型，11% 屬於重型，而在 SMA 小鼠中，只

有 38%屬於輕型，但有 28%屬於重型。分析第二型（中間型）Bax(-/-)/SMA 小鼠和第二型 SMA 小鼠，首先可發現 Bax(-/-)/SMA 小鼠的生存時間較 SMA 小鼠要長，前者約有 60%的小鼠可存活超過 28 天，相對的，後者只有 40%的小鼠存活超過 28 天。而在小鼠形態學異常方面，Bax(-/-)/SMA 小鼠的尾巴較 SMA 小鼠長，且比較 Bax(+/-)/SMA 及 Bax(-/-)/SMA 小鼠可見，後者小鼠的尾巴又比前者的小鼠要長，因此 Bax 的含量亦有 dose-dependent 的效果。此外，比較第三型（輕型）Bax(-/-)/SMA 小鼠和第三型 SMA 小鼠之脊髓神經元的密度可見，無論是在頸髓、胸髓或腰髓，前者的脊髓神經元的密度為後者的 30-40%。這些結果皆顯示，Bax 表現量的下降在 SMA 小鼠上的確有正向的療效 (Tsai MS et al, 2006)。而在本論文中，增加 Bcl-x_L 在 SMA 小鼠脊髓神經元的表現量亦具有明顯的治療效果。過去對於 SMA 治療藥物的篩選，皆是以藥物是否能使 SMN 蛋白質的表現量增加為標準 (Jarecki et al, 2005)，然而綜合以上兩結果，Bcl-x_L 和 Bax 之比例，即 Bcl-x_L/Bax，似乎亦可以用來作為一個療效篩選指標，換句話說，當有一篩選藥物可增加 Bcl-x_L/Bax 的數值時，多代表了該藥物可以同時增加 Bcl-x_L 的表現及/或減少 Bax 的表現，此時，這個藥物便有可能是一個非常具有潛力的 SMA 治療藥物。

第五章 展望

5.1 建立脊髓肌肉萎縮症小鼠模式之治療評估方法

本論文中首先分析了第三型 (輕型)SMA 模式小鼠，在仔細地檢測其表現型後，確定了小鼠的形態學變化、運動功能表現、坐骨神經電生理結果、脊髓運動神經元密度及肌肉萎縮程度，皆可以用來評估後續治療的反應，此研究結果已發表於國際期刊 (Tsai et al, 2006a)。而後，本論文分別以藥物 VPA 及 *Bcl-x_L* 轉殖基因來治療此輕型 SMA 小鼠時，亦皆成功的證實了其正向的療效，在另一方面，這些驗證也再次確立了此小鼠模式可用來確立治療後的療效結果。因此，本論文中所使用的第三型，即輕型 SMA 模式小鼠，未來可作為一個非常好的治療性研究之 SMA 動物模式，而形態學變化、運動功能表現、神經電生理結果、脊髓運動神經元密度及肌肉萎縮程度，皆可以用來評估療效反應，而適合的治療後檢測時間點約於小鼠出生後 9-12 個月。事實上，本論文的結果在發表後，陸續有一些在較輕型 SMA 小鼠成功進行的治療性研究，例如 Simon 等人證實輕型 SMA 小鼠的脊髓內運動神經元有退化的情形，且神經肌肉交界及肌肉組織有去神經化的現象；另外研究亦發現，將輕型 SMA 小鼠體內兩股 DNA 上的 *ciliary neurotrophic factor* 基因剔除，可見該基因剔除小鼠的肌力較差 (Simon et al, 2010)。而這些結果也間接顯示了，輕型 SMA 模式小鼠的確可用來作為 SMA 治療後，療效反應的評估系統。

近年來，針對小鼠動物模式的治療性研究，所採用的方法愈來愈推陳出新。在藥物治療方面，由於治療的標的在脊髓內，該位置屬於中樞神經系統，脊髓組織和血液間具有 blood brain barrier，此意謂著，若單純使用口服藥物、靜脈注射藥物或腹腔注射藥物以治療 SMA，需注意是否該藥物可以通過 blood brain barrier，以進入脊髓中。然而，如果治療研究使用脊髓內注射或腦脊髓液腔 (CSF space)內注射，則可以解決藥物是否穿透 blood brain barrier 的問題。但是，若使用體身較

小的幼鼠來作研究，會增加了整體注射的困難度，因此，使用較輕型的 SMA 小鼠有其優勢。

在此前題下，Hua 等人首先發現使用 phosphorothioate-modified antisense oligonucleotide (ASO)去抑制 *SMN2* 基因的 intronic splicing silencer element 時，可增加含 exon7 的 *SMN2* 之訊息 RNA 產物，因此他們將 ASO 注射入輕型 SMA 小鼠的大腦腦室內，分析發現，ASO 可促進脊髓內正常 SMN 訊息 RNA 及蛋白質的表現，且該治療可使小鼠的尾巴和耳朵的退化減少 (Hua et al, 2010)。此研究一方面顯示了，大腦腦室注射術在輕型的 SMA 小鼠上，由於小鼠的體型較大，所以注射的難易度相對比較嚴重型的 SMA 小鼠 (體型很小)要簡單；另一方面，該研究也間接證實了，輕型 SMA 小鼠的尾巴和耳朵的退化程度的確可用來評估 SMA 小鼠在藥物治療後的療效反應。

除此以外，基因治療或幹細胞治療是這幾年來被賦予新希望的治療模式，但無論是基因治療或幹細胞治療，一方面如前所述，在動物實驗上仍需將治療物質，如病毒載體、DNA或幹細胞直接注射至老鼠模式的脊髓、腦脊髓液腔、肌肉或小腦中，因此同樣的，因為較輕型的SMA小鼠的體型較大，故注射可以較為精準，適合進行相關的研究；另一方面，通常以病毒載體表現基因，或以幹細胞進行治療時，若治療時間較長，可能成效會較好，尤其是幹細胞的治療可能牽涉了細胞的分裂及分化，所以長期的治療較了解幹細胞在移植入小鼠體內後，其治療效果的機制主要為何。

Corti等人首先成功的在體外系統將胚胎幹細胞 (embryonic stem cell)分化為神經幹細胞 (neural stem cell)，進一步再將其刺激分化為運動神經元。因而其次，他們嘗試將神經幹細胞直接注射入第一型 (嚴重型)SMA小鼠的脊髓中，再進而分析其治療的效果，結果顯示，這些注射入的神經幹細胞不但能正常的存活，且可在小鼠體內移行至脊髓的anterior horn，而且部分的幹細胞可見可分化為運動神經元，此外，SMA小鼠在接受幹細胞移植後，其運動功能較佳，且生存時間明顯較

長 (Corti et al, 2010)。然而由於此第一型SMA小鼠的存活時間較短，此研究設計無法了解是否移植的幹細胞可繼續長久存活，且後續的治療效果是否能繼續維持，因此未來相關的研究仍需應用在第三型的SMA小鼠上。

5.2 以valproic acid治療脊髓肌肉萎縮症小鼠模式

本論文以VPA長期治療第三型SMA模式小鼠，證實了當VPA自SMA小鼠之脊髓運動神經元退化起始時開始治療，可以減少SMA小鼠形態學的異常、減緩運動功能的退化、避免電生理檢驗中CMAP振幅的下降、降低肌肉纖維的萎縮及延緩脊髓運動神經元的退化，此結果確立了VPA對SMA模式小鼠具有明顯的治療效果，研究結果亦已發表於國際期刊 (Tsai et al, 2008a)。由於VPA已在臨床上具有至少二十年的使用經驗，其使用方法和在使用的病患可能產生的副作用皆相對清楚，且許多病患亦因為癲癇的控制而曾長期服用VPA達數年的時間，因此根據本論文的結果，後續的SMA大型臨床試驗應當嘗試進行，以證實VPA在SMA病患上的療效。

近來曾有六位門診的SMA病患接受了VPA的治療。其中兩名兒童病患於治療時的年紀分別為6歲 (疾病發生於2歲)及5歲 (疾病發生於1歲)，VPA使用後，其血液內的藥物濃度分別為60-70及50-60 微克/毫升，該濃度皆為臨床VPA運用在癲癇患者的標準劑量，結果病患在使用VPA長達9個月後，可見兩人的四肢肌肉力量有明顯提升，且療效可持續維持，此外，除了一位病患產生了輕微雙手顫抖的副作用，並無其它明顯的藥物不良反應。另一方面，兩名青少年病患的治療年紀分別為15 (疾病發生於11歲)及13歲 (疾病發生於2歲)，VPA的使用後其血液內的藥物濃度皆為70-100 微克/毫升，結果兩位病患在使用VPA後，起初的四肢肌力有些微的上升，但療效無法在後續數月中有效維持，而再提高VPA的劑量後，可發現肌力又稍有上升的情形，然而，除了兩位病患皆發生了雙手顫抖的副作用外，其中一位患者亦出現了肝功能血液指標的異常上升及體重增加的藥物不良反應。最後，兩

名成年病患的治療年紀分別為36 (疾病發生於9歲)及47歲 (疾病發生於1歲)，該兩病患在使用VPA後，不但四肢肌力沒有任何明顯的進步，而且兩位病患皆產生了體重增加的副作用，由於體重上升，反而間接使活動力相對下降，此外甚至有一位患者出現了頭暈的藥物不良反應。根據以下觀察結果可見，似乎VPA的作用在不同的SMA病患身上可能有不同的效果，大致而言，愈年輕的病患可能VPA的療效愈好，而成人的SMA病患可能已無明顯的VPA治療反應，反而容易因VPA的藥物副作用影響到活動力。以上的治療結果及觀察經驗已發表於國際期刊 (Tsai et al, 2007)。

當細胞研究、動物研究及少數SMA病患使用VPA的經驗顯示VPA的治療潛力後，Swoboda等人集合了42位SMA的患者，分別以VPA治療6至12個月，以充分了解VPA於SMA患者上是否有明顯的副作用及檢測其可能的療效 (Swoboda et al, 2009)。該研究中，包含了2位第一型SMA的病患 (年紀為2-3歲)，29位第二型SMA的病患 (年紀為2-14歲)，及11位第三型SMA的患者 (年紀為2-31歲)，在使用了VPA後，大部分的病患皆能承受VPA的使用，且並無患者發生嚴重的肝臟毒性，然而在二位患者則出現了體內carnitine濃度下降的藥物不良反應，並因此而產生肌力下降的情形。在治療效果的評估中，使用包括modified Hammersmith Functional Motor Scale (MHFMS)來作運動功能性分析，使用尺神經 (ulnar nerve)的電生理檢查 (CMAP和motor unit number estimation (MUNE))來作脊髓運動神經元退化的客觀分析，及利用dual-energy X-ray absorptionmetry (DEXA)進行體組成和骨密度的分析，最後使用血液白血球中的SMN messenger RNA濃度來檢測是否VPA可顯著增加體內SMN的表現。研究結果顯示，在27位可分析的第二型SMA患者中，其VPA治療後的MHFMS有顯著的提升 ($p \leq 0.001$)，代表VPA具有明顯增進運動功能的療效，但深入分析可見，在這些病患當中，幾乎都是年紀小於5歲的患者有明顯的功能性進步。而電生理的分析可看到CMAP的顯著上升 ($p \leq 0.0001$)。許多SMA病患在VPA使用後有食慾增加、體重上升及平均脂肪組織增加的情形，且因該體重的增

加而影響到運動功能，使MHFMS的評估出現下降的情況。至於血液中白血球的SMN訊息RNA濃度分析顯示，全長的SMN訊息RNA並無明顯改變，但缺少exon 7的SMN訊息RNA濃度則反而常有表現下降的現象。以上研究顯示，的確在年紀較小的SMA病患，似乎VPA的治療比較可能有較佳的反應，然而VPA所造成的體重上升及carnitine缺乏之副作用，有可能會影響到VPA的正向治療效果，因此後續的VPA相關研究需要考慮到包括治療年紀、體重增加及carnitine缺乏對VPA療效的影響。

而後，和上述研究相同的研究團隊再度收集了61位SMA的患者，並以VPA進行了一臨床試驗，而由於之前研究發現VPA可能會減少體內carnitine的表現，因此在此研究中，VPA的治療搭配了carnitine的使用 (Swoboda et al, 2010)。SMA患者年紀為2至8歲，而所有的病患皆在治療前已呈現無法行走的狀態。該研究的設計為將61個SMA病患隨機分組為VPA組 (n = 30)及對照組 (n = 31)，在雙盲分析下追蹤病患6個月後，所有的患者皆接受VPA的治療。在治療效果的評估中，同樣使用了包括MHFMS來作運動功能性分析，使用尺神經的電生理檢查 (CMAP)來表現神經退化的狀態，利用DEXA進行體組成和骨密度的分析，及測量血液白血球中的SMN訊息RNA濃度，此外，另增加肌力分析 (myometry analysis)和肺功能檢查 (pulmonary functional test)來作為療效的指標。研究結果顯示，在6個月時，比較VPA治療組和對照組之間的MHFMS之變化，可發現兩組間並無顯著的差別，但VPA治療組卻較對照組的病患出現較多的藥物不良反應，其中，體重上升是最常見的副作用，而病患平均脂肪組織的增加和MHFMS的結果有顯著的負相關，亦即脂肪組織愈多，運動功能表現愈差。進一步分析可見，在控制了體重增加的因素後，2至3歲的SMA患者在經過12個月的VPA治療後，有顯著的MHFMS之增加 ($p = 0.03$)，而線性回歸性分析再一次證實了年紀較小的患者對VPA的療效較佳 ($p = 0.007$)。至於在電生理、肌力分析及肺功能分析上則無明顯的治療後差異，而血液白血球中的SMN訊息RNA濃度亦無明顯治療後的改變，但分析亦顯示，血液白血球中的

SMN訊息RNA濃度似乎和臨床上運動功能性的變化並無很好的相對關係，暗示了該濃度可能不是一個很好的療效指標。綜合分析後，再次證實了在一些SMA患者，尤其是年紀較小的SMA病患，對VPA的治療有不錯的療效反應，然而體重增加仍然顯示了其對VPA療效的影響。

在SMA模式小鼠上使用VPA治療的結果可以發現，由於VPA在SMA小鼠的治療並無法完全避免肌肉內神經纖維深入post-synaptic muscle end plate比例的減少，post-synaptic muscle end plate仍有異常神經纖維異常聚積的現象，且雖然VPA的確可減少脊髓運動神經元的退化，但其中約有15%的運動神經元為不具功能的運動神經元，因此VPA的療效似乎無法完全避免SMA小鼠的病態變化。而在SMA病患使用VPA的經驗可知，並非所有的病患對VPA皆有不錯的治療效果，主要在部分的兒童患者對VPA較有反應，但許多的其它SMA病患則對VPA沒有任何的效果，甚至會出現藥物不良反應，反而影響到運動功能。由此可知，即使VPA是目前SMA的治療領域中相當具有潛力的藥物，但由於療效不夠廣泛及深入，因此後續仍需繼續尋找其它較VPA更有效力的SMA治療藥物，或是發掘其它不同於VPA治療機制的SMA藥物，以期與VPA並用而達到加成的治療反應。

VPA的療效機制，來自於對HDAC的抑制，以活化細胞內SMN promoter的表現及促進SMN2基因表現含exon 7的訊息RNA產物，進而增加整體的SMN蛋白質表現量，因此尋找其它較強的HDAC抑制劑，可以更加提高細胞內SMN蛋白質的含量，以增進其治療的反應。目前有愈來愈多新一代的HDAC抑制劑被發展出來，如 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、m-Carboxycinnamic acid bis-Hydroxamide、suberoyl bishydroxamic acid、M344、MS-275及LBH589等，其中 m-Carboxycinnamic acid bis-Hydroxamide、suberoyl bishydroxamic acid及M344在使用上有較大的副作用，而MS-275無法有效的增加細胞內SMN蛋白質的含量，但是，SAHA在非毒性的治療劑量時，可經由HDAC的抑制作用，活化SMN2的基因表現，有效提升包括大鼠hippocampus大腦切片及富含運動神經元的細胞內之SMN

蛋白質濃度，且其對SMN蛋白質的促進作用較VPA還好 (Hahnen et al, 2006)，由於SAHA此藥物已在癌症治療中進入了人體試驗，其藥物具有良好的口服後之身體吸收，副作用亦還可接受，且SAHA可有效經過blood brain barrier，代表SAHA在吸收後可經血液進入中樞神經系統，且其在規則劑量下在體內的表現濃度已足夠來增加運動神經元內的SMN之表現，因此SAHA此口服藥物極具有後續於SMA治療上的研究潛力。另外，LBH589亦已在癌症治療中進入了人體試驗，以LBH589治療SMA病患的纖維母細胞可增加其SMN蛋白質濃度達10倍之多 (Garbes et al, 2009)，此增加量是目前所研究的藥物中增加SMN表現之幅度最大的，因此LBH589亦是一個相當具有潛力的SMA治療藥物。

Riessland等人嘗試以SAHA治療兩個不同的SMA模式小鼠，即美國SMA模式小鼠 ($Smn^{-/-}SMN2^{+/+}$)及嚴重型的台灣SMA模式小鼠 ($Smn^{-/-}SMN2^{+/-}$)，以了解SAHA對SMA治療的效果 (Riessland et al, 2010)。首先，SAHA的治療可明顯增加小鼠在脊髓及肌肉組織內，SMN訊息RNA及蛋白質的含量。其次，在美國SMA模式小鼠的分析可見，以SAHA治療SMA小鼠的孕母時，可避免子代出現死胎的機會；而以SAHA治療台灣SMA模式小鼠的分析顯示，SAHA的治療 (25 mg/kg twice daily)可降低脊髓內運動神經元的退化，增進SMA小鼠的運動功能，增加神經肌肉交界的完整性及提高肌肉纖維的大小，更重要的是SAHA的治療可延長SMA小鼠的壽命達百分之三十，此研究明顯說明了SAHA在SMA的治療上有不錯的療效反應，因此未來此藥物應嘗試在SMA病患上進行臨床試驗，驗證是否SAHA在患者身上亦具有治療反應，是否藥物的副作用可以被接受，甚至了解SAHA的治療效果是否較VPA要更好，可有效取代VPA於SMA的治療地位。

除此之外，如前述LBH589是一個具有潛力的新一代HDAC抑制劑，研究發現，此藥物在細胞內增加SMN蛋白質的作用是多元性的 (Garbes et al, 2009)，包括了增進Tra2 β 1的表現，以使SMN2的訊息RNA傾向含有exon 7的產物；增進SMN2 promoter位置上H3K9的乙醯化狀態，以提高SMN的轉譯達2至3倍；而LBH589亦可

透過降低SMN蛋白質之ubiquitylation，以增加SMN蛋白質的穩定性，減少其代謝；其LBH589可增進SMN蛋白質組合入SMN complex，且治療後細胞內的gems的個數也明顯提高。值得一提的是，當有些SMA病患的纖維母細胞對VPA不具有增進SMN表現的情形時，LBH589的治療仍能有效的增加SMN蛋白質的含量 (Garbes et al, 2009)，且LBH589在低劑量時仍可有SMN的促進效果，而並不出現細胞的毒性，因此LBH589有希望在未來進行更進一步的研究，了解此藥物在SMA的治療地位。

5.3 建立Bcl-x_L基因轉殖之脊髓肌肉萎縮症小鼠，評估Bcl-x_L的治療效果

含有Bcl-x_L轉殖基因的第三型SMA模式小鼠 (*Smn*^{-/-}*SMN2*^{+/-}*Bcl-x_L*^{+/-})，存活時間較SMA小鼠長約1.5倍、尾巴及耳緣的退化較少、運動功能較佳、肌肉萎縮較輕、電生理分析結果較為正常、且脊髓運動神經元退化較少，此結果證實Bcl-x_L的轉殖基因對SMA有明顯的治療作用，而該研究已發表於國際期刊 (Tsai et al, 2008b)。此論文發現SMA小鼠之脊髓內的Bcl-x_L蛋白質表現量較正常鼠來的低，由於Bcl-x_L為一抗細胞凋亡因子，而SMA的脊髓神經元退化起因於過度的細胞凋亡的現象 (Soler-Botija et al, 2002; Tsai et al, 2006b)，故Bcl-x_L值得在SMA作更進一步的相關研究。目前全世界SMA的治療相關研究，皆是以SMN蛋白質為標的，尋找可以使SMN表現增加的藥物。由於此論文中研究發現，在不影響SMN蛋白質表現的情況下，Bcl-x_L的基因轉殖對SMA有明顯的治療作用，因此未來Bcl-x_L可作為一具潛力的SMA治療新標的。

此外，Bax蛋白質屬於Bcl-2家族中的主要一員 (Oltvai et al, 1993)，可促進細胞凋亡。由於SMA小鼠脊髓內的Bax蛋白質表現量有異常增加的現象 (Tsai MS et al, 2006)，當小鼠體內的兩股Bax皆被剔除時，小鼠的尾巴較SMA小鼠長，脊髓神經元的密度較高，因此Bax表現量的下降在SMA小鼠上具有正向的療效。合併本論文

的結果，Bcl-x_L和Bax之比例，即Bcl-x_L/Bax，可能可以用來作為一個療效篩選指標，亦即當有一篩選藥物可增加Bcl-x_L/Bax的數值時，可能代表這個藥物是個具有潛力的SMA治療藥物。

另一運動神經元疾病ALS，於其模式小鼠 (SOD1 mutant mice)的脊髓中亦可發現有低Bcl-x_L和高Bax濃度的現象 (Vukosavic et al, 1999)，而當以基因殖入的方式增加Bcl-2的表現時，Bcl-2會和Bax形成heterodimers，使Bax產生的不良作用減少，間接達到治療的效果。由於SMA模式小鼠的脊髓中亦有低Bcl-x_L和高Bax濃度的現象，同理也許Bcl-2相關的治療亦可推廣於SMA的治療，即增加Bcl-2的表現量亦可能可以成為SMA治療的一個新方向。

過去研究曾發現，生長因子 insulin-like growth factor 1 (IGF-1)可在脊髓缺血的兔子動物模式中提升脊髓內 Bcl-x_L 和降低 Bax 的表現 (Nakao et al, 2001)，且使脊髓內運動神經元退化減少，免疫染色亦顯示 IGF-1 的治療可降低脊髓內缺血區域之細胞凋亡的發生。此外，IGF-1 曾成功的在 ALS 的小鼠模式中顯示其明顯的療效，經 IGF-1 基因治療的 ALS 模式小鼠擁有較長的存活時間、較佳的運動功能及較少的脊髓內細胞凋亡反應 (Kaspar et al, 2003)，因此，也許透過 IGF-1 提升脊髓內 Bcl-x_L 和降低 Bax 表現的作用，未來 IGF-1 相關的治療，亦可應用於 SMA 的模式小鼠及病患上，如使用基因治療或以注射 recombinant IGF-1 等的方式，得到不錯的療效反應。

目前已知，SMN 蛋白質在細胞內主要的功能為協助訊息 RNA 的切結 (pre-mRNA splicing)及協助 β -actin 在細胞內的生成運輸。此外，過去曾有研究發現，Bcl-2 蛋白質和 SMN 蛋白質有明顯的交互作用 (Sato et al, 2000)，由於 Bcl-x_L 亦是 Bcl-2 家族的一員，因此 Bcl-x_L 有可能也和 Bcl-2 一樣和 SMN 有彼此間的交互作用，而這種交互作用可能並不會增加 SMN 的表現量，而是參與了 Bcl-x_L 在 SMA 小鼠中的正向治療反應，且 Bcl-x_L 可能在 SMA 的疾病病理變化扮演了重要且直接的角色，未來需進一步深入的研究 Bcl-x_L 此蛋白質於 SMA 上於致病機轉和

疾病治療上的地位。

綜合以上結果，Bcl-x_L在SMA上可能不僅僅只是個細胞凋亡的抑制蛋白，有可能亦參與了SMA的疾病形成，因此未來仍需研究SMA和Bcl-x_L的關係。而由於Bcl-x_L在SMA小鼠的基因轉殖具有治療作用，因此未來可以Bcl-x_L作為藥物篩檢或其它相關治療的標的，以期找尋到有效的SMA治療藥物。

第六章 參考文獻

- Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, et al. Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10:2841-2849.
- Araki S, Hayashi M, Tamagawa K, et al. Neuropathological analysis in spinal muscular atrophy type II. *Acta. Neuropathol.* 2003;106:441-448.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
- Avila AM, Burnett BG, Taye AA, et al. Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* 2007;117:659-671
- Azzouz M, Le T, Ralph GS, et al. Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1726-1731.
- Belmaker RH. Medical progress: bipolar disorder. *N. Engl. J. Med.* 2004;351: 476-486.
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, et al. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12:2481-2489.
- Brichta L, Holker I, Haug K, et al. In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann. Neurol.* 2006;59:970-975.
- Brodie MJ, Dichter MA. Antiepileptic drugs. *N. Engl. J. Med.* 1996;334:168-175.
- Butchbach ME, Edwards JD, Schussler KR, et al. A novel method for oral delivery of drug compounds to the neonatal SMN Δ 7 mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neurosci. Methods* 2007;161:285-290.
- Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer

- in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* 2002;30:377-384.
- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, et al. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98:9808-9813.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:395-419.
- Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, et al. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein Bcl-2 in the CNS. *J. Neurochem.* 1999;72:879-882.
- Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, et al. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 2001;152:1107-1114.
- Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, et al. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 2002a;152:1107-1114.
- Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, et al. Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 2002b;11:1439-1447.
- Covert DD, Le TT, McAndrew PE, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1997;6:1205-1214.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain* 2010;133:465-481.
- Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 1996;15:97-101.
- De Hemptinne I, Boucherie C, Pochet R, et al. Unilateral induction of progenitors in the spinal cord of hSOD1G93A transgenic rats correlates with an asymmetrical hind

- limb paralysis. *Neurosci. Lett.* 2006;401:25-29
- Desjardins P, Ledoux S. The role of apoptosis in neurodegenerative diseases. *Metab. Brain Dis.* 1998;13:79-96.
- Dumas TC, Sapolsky RM. Gene therapy against neurological insults: sparing neurons versus sparing function. *Trends Neurosci.* 2001;24:695-700.
- Dumon S, Santos SC, Debierre-Grockiego F, et al. IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 1999;18:4191-4199.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 1998;4:1313-1317.
- Farrar MA, Johnston HM, Grattan-Smith P, et al. Spinal muscular atrophy: molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.* 2009;9:851-862.
- Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;70:358-368.
- Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, et al. Life span extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98:6736–6741.
- Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, et al. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2000;9:849-858.
- Frugier T, Nicole S, Cifuentes-Diaz C, et al. The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002;12:294-298.
- Gabanella F, Butchbach MER, Saieva L, et al. Ribonucleoprotein assembly defects

- correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRPs. *PloS ONE* 2007;2:e921.
- Garbes L, Riessland M, Holker I, et al. LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18:3645-3658.
- Garrity-Moses ME, Teng Q, Liu J, et al. Neuroprotective adeno-associated virus bcl-xL gene transfer in models of motor neuron disease. *Muscle Nerve* 2005;32:734-744.
- Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA, et al. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2006;81:47-63.
- Gloster A, Wu W, Speelman A, et al. The T alpha 1 alpha-tubulin promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J. Neurosci.* 1994;14:7319-7330.
- Gloster A, El-Bizri H, Bamji SX, et al. Early induction of T alpha1 alpha-tubulin transcription in neurons of the developing nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1999;405:45-60.
- González-García M, García I, Ding L, et al. Bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92:4304-4308.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001;20:6969-7698.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, et al. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999a;96:5263-5267.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, et al. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 1999b;286:548-552.
- Gubitza AK, Feng W, Dreyfuss G. The SMN complex. *Exp. Cell Res.* 2004;296:51-56.

- Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, et al. Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve* 2003;28:432-437.
- Hahnen E, Eyupoglu IY, Brichta L, et al. In vitro and ex vivo evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J. Neurochem.* 2006;98:193-202.
- Hao Y, Creson T, Zhang L, et al. Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J. Neurosci.* 2004;24:6590-6599
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
- Hansen MR, Roehm PC, Xu N, et al. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL prevents spiral ganglion neuron death and inhibits neurite growth. *Develop. Neurobiol.* 2007;67:316-325.
- Hill MM, Adrain C, Martin SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol. Interv.* 2003;3:19-26.
- Ho KC, Gwozdz JT, Hause LL, et al. Correlation of neuronal cell body size in motor cortex and hippocampus with body height, body weight, and axonal length. *Int. J. Neurosci.* 1992 ;65:147-153.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 2000;24:66-70.
- Hua Y, Zhou J. Modulation of SMN nuclear foci and cytoplasmic localization by its C-terminus. *Cell Mol. Life Sci.* 2004;61:2658-2663.
- Hua Y, Sahashi K, Hung G, et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 2010;24:1634-1644.
- Iezzi S, Padova MD, Serra C, et al. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev. Cell* 2004;6:673-684

- Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, et al. Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum. Mol. Genet.* 2000;9:341-346.
- Jarecki J, Chen X, Bernardino A, et al. Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14:2003–2018.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DR, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999;96:25-34.
- Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, et al. Retrograde viral delivery of IGF01 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 2003;301:839-842.
- Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, stimulates cell proliferation in the ischemic brain: roles of BDNF-TrkB signaling. *J. Neurochem.* 2009;110:1226-1240.
- Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, et al. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cell. *J. Neurochem.* 2004;91:238-251.
- Le TT, Pham LT, Butchbach ME, et al. SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14:845-857.
- Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 1997;16:265-269.
- Leng Y, Chuang DM. Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *J. Neurosci.* 2006;26:7502-7512.
- Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, et al. Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum.*

- Mol. Genet.* 2003;12:1233–1239.
- Liu A, Han YR, Li J, et al. The glial or neuronal fate choice of oligodendrocyte progenitors is modulated by their ability to acquire an epigenetic memory. *J. Neurosci.* 2007;27:7339-7343.
- Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell deaths. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002;14:727-733.
- Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, et al. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat. Genet.* 1998;19:63-66.
- Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet* 2008;371:2120-2133.
- Martens DJ, Seaberg RM, van der Kooy D. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neuronal progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 2002 ;16:1045-1057.
- Mai A, Massa S, Rotili D, et al. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med. Res. Rev.* 2005;25:261-309.
- Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 1997;20:245-267.
- Monani UR, Sendtner M, Coover DD, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*($-/-$) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2000;9:333-339.
- Monneret C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2005;40:1-13.
- Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr. Mol. Phar.* 2009;2:95-109.
- Mothe AJ, Tator CH. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience* 2005;131:177-187.

- Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995;267:1506-1510.
- Nakao Y, Otani H, Yamamura T, et al. Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death and paraplegia in the rabbit model of spinal cord ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001;122:136-143.
- Ohta Y, Nagai M, Nagata T, et al. Intrathecal injection of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes proliferation of neural precursor cells in the spinal cords of mice with mutant human SOD1 gene. *J. Neurosci. Res.* 2006;84:980-992.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1999;74:609-619.
- Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, et al. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* 2007;109:3069-3075.
- Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, et al. Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J. Neurosci.* 1998;18:1009-1019.
- Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1980;1:919-922.
- Pellizoni L, Yong J Dreyfuss G. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* 2002;298:1775-1779.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, et al. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer and teratogen. *J. Biol. Chem.* 2001;276:36734-36741.
- Ponti G, Peretto B, Bonfanti L. Genesis of neuronal and glial progenitors in the cerebellar cortex of peripuberal and adult rabbits. *PLoS ONE* 2008;3:e2366.

- Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, et al. A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J. Cell Biol.* 2007;176:831-841.
- Riessland M, Ackermann B, Forster A, et al. SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19:1492-1506.
- Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, et al. Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1995;4:631-634.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, et al. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.* 2003;163:801-812.
- Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Eng. J. Med.* 2001;344:1688-1700.
- Sato K, Eguhi Y, Kodama TS, et al. Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product. *Cell Death Differ.* 2000;7:374-383.
- Schrank B, Gotz R, Gunnarsen JM, et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:9920-9925.
- Shaw PJ, Eggett CJ. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 2000;247:SI/17-SI/27.
- Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, et al. Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves mtor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19:973-986.

- Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, et al. Neuronal death is enhanced and begins during fetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 2002;125:1624-1634.
- Soler-Botija C, Ferrer I, Alvarez JL, et al. Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003;62:420-426.
- Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, et al. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann. Neurol.* 2003;54:647-654.
- Sumner CJ, Kolb SJ, Harmison GG, et al. SMN mRNA and protein levels in peripheral blood: Biomarkers for SMA clinical trials. *Neurology* 2006;66:1067-1073.
- Swoboda KJ, Scott CB, Reyna SP, et al. Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 2009;4:e5268.
- Swoboda KJ, Scott CB, Crawford TO, et al. SMA CARNI-VAL trial part I: double-blind, randomized, placebo-controlled trial of L-carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 2010;5:e12140.
- Talbot K, Davies KE. Spinal muscular atrophy. *Semin. Neurol.* 2001;21:189-197.
- Tsai LK, Tsai MS, Lin TB, et al. Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 2006a;24:286-295.
- Tsai MS, Chiu YT, Wang SH, et al. Abolishing Bax-dependent apoptosis shows beneficial effects on spinal muscular atrophy model mice. *Mol. Ther.* 2006b;13:1149-1155.
- Tsai LK, Yang CC, Hwu WL, et al. Valproic acid treatment in six patients with spinal muscular atrophy. *Eur. J. Neurol.* 2007;14:e8-9.
- Tsai LK, Tsai MS, Tin JH, et al. Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J. Mol. Med.* 2008a;86:1243-1254.
- Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, et al. Restoring Bcl-xL levels benefits a mouse model of

- spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 2008b;31:361-367.
- Van Bergeijk JV, Haastert K, Grothe C, et al. Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein. *Chem. Biol. Drug Des.* 2006;67:244-247.
- Von Gontard A, Zerres, K, Backes M, et al. Intelligence and cognitive function in children and adolescents with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord.* 2002;12:130-136.
- Vukosavic S, Dubois-Dauphin M, Romero N, et al. Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 1999;73:2460-2468.
- Wang CH, Finkel RS, Bertini, ES, et al. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J. Child Neurol.* 2007;22:1027-1049.
- Watase K, Zoghbi HY. Modelling brain diseases in mice: the challenges of design and analysis. *Nat. Rev. Genet.* 2003;4:296-307.
- Weihl CC, Connolly AM, Pestronk A. Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy. *Neurology* 2006;67:500-501.
- Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.* 2000;15:228-237.
- Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, et al. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *J. Biol. Chem.* 2001;276:31674-31683.
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407:802-809.
- Zai LJ, Wrathall JR. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 2005;50:247-257

- Zerres K, Davies KE. 59th ENMC International Workshop: spinal muscular atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria. *Neuromuscul. Disord.* 1999;9:272-278.
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forrest E, et al. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *Neurol Sci*, 1997;146:67-72.
- Zhang ML, Lorson CL, Androphy EJ, et al. An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA. *Gene Ther.* 2001;8:1532-1538.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100:7925-7930.

第七章 英文縮寫

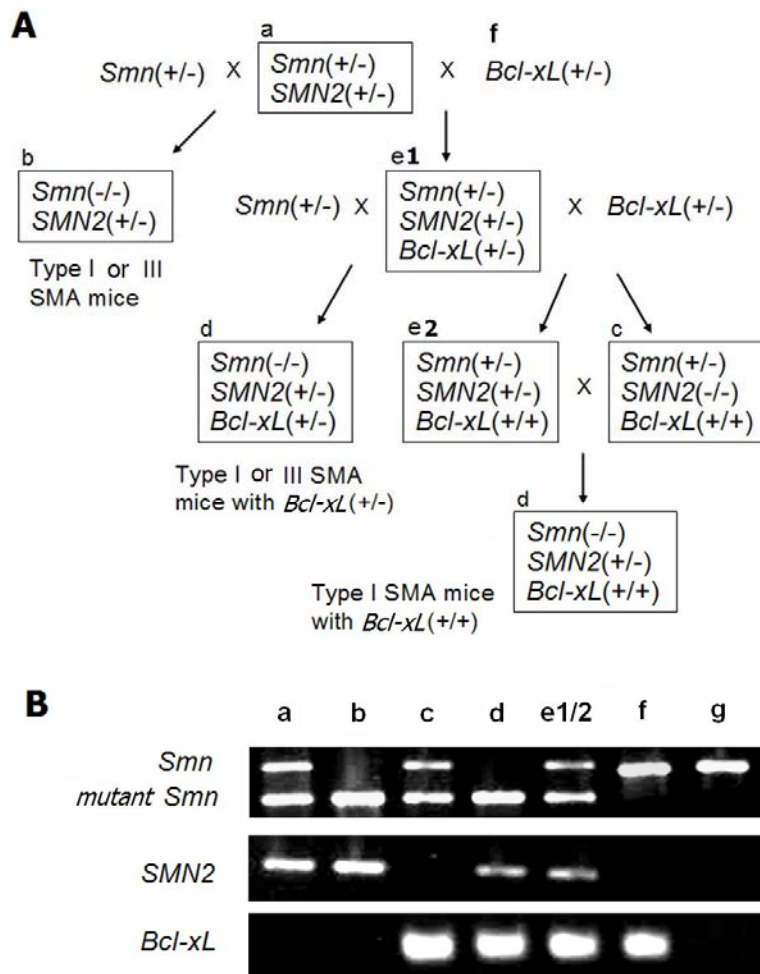
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ATPase	Adenosine triphosphatase
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-xL	B cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 homology
BrdU	5-bromo-20-deoxyuridine
Caspase	Cysteine-containing aspartate acid-specific protease
ChAT	Choline acetyltransferase
CMAP	Compound motor action potential
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
eGFP	Enhanced green fluorescence protein
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GFAP	Glial fibrillary acid protein
HDAC	Histone deacetylase
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonuclear protein
H&E	Hematoxylin and eosin
IGF-1	insulin-like growth factor 1
MHFMS	Modified Hammersmith Functional Motor Scale
NeuN	Neuronal nuclear
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleic acid
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid

SMA	Spinal muscular atrophy
SMN	Survival motor neuron protein
<i>SMN</i>	Survival motor neuron gene (human)
<i>Smn</i>	Survival motor neuron gene (mice)
snRNP	Small nuclear ribonuclear protein
Htra2-β1	Transformer-2 protein homolog beta 1
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase uUTP nick end labeling
VPA	Valproic acid

第八章 圖表

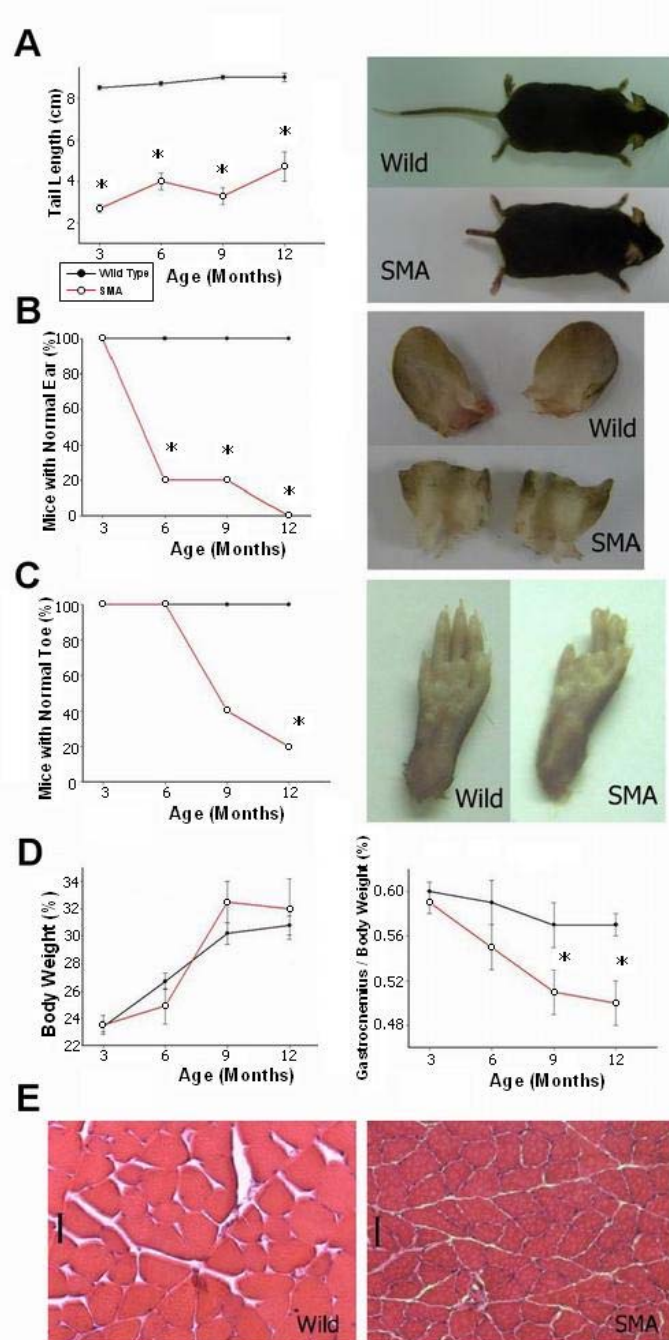
圖一 SMA/Bcl-x_L 小鼠交配法及基因型鑑定

(A) 小鼠交配流程。其中，b 鼠為 SMA 小鼠，d 鼠為 SMA/Bcl-x_L 小鼠，而為了證實 e2 和 c 鼠為 Bcl-x_L (+/+) 小鼠，將其與 Bcl-x_L (+/-) 小鼠交配，發現其子代全含 Bcl-x_L 的轉殖基因。(B) 以 PCR 方式進行基因型鑑定，其中，g 鼠為正常鼠。



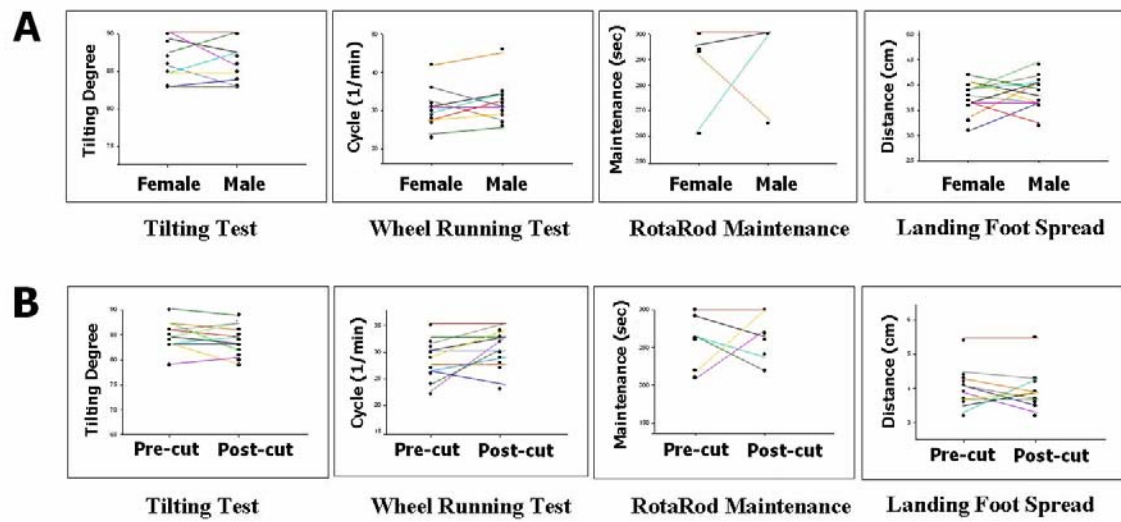
圖二 第三型 SMA 小鼠之形態學分析

(A) SMA 小鼠比正常小鼠有因末端壞死而較短的尾巴。(B) 自小鼠六個月大起，SMA 小鼠比正常小鼠有較高不規則耳緣的比例。(C) 於小鼠十二個月大時，SMA 小鼠比正常小鼠有較高異常腳指的比例。(D) 自小鼠九個月大起，SMA 小鼠比正常小鼠有較重的腓腸肌重量。(E) 於小鼠十二個月大時，SMA 小鼠比正常小鼠有較小的肌肉纖維截面積大小。H&E 染色。標長為 50 微尺。*, $p < 0.05$.



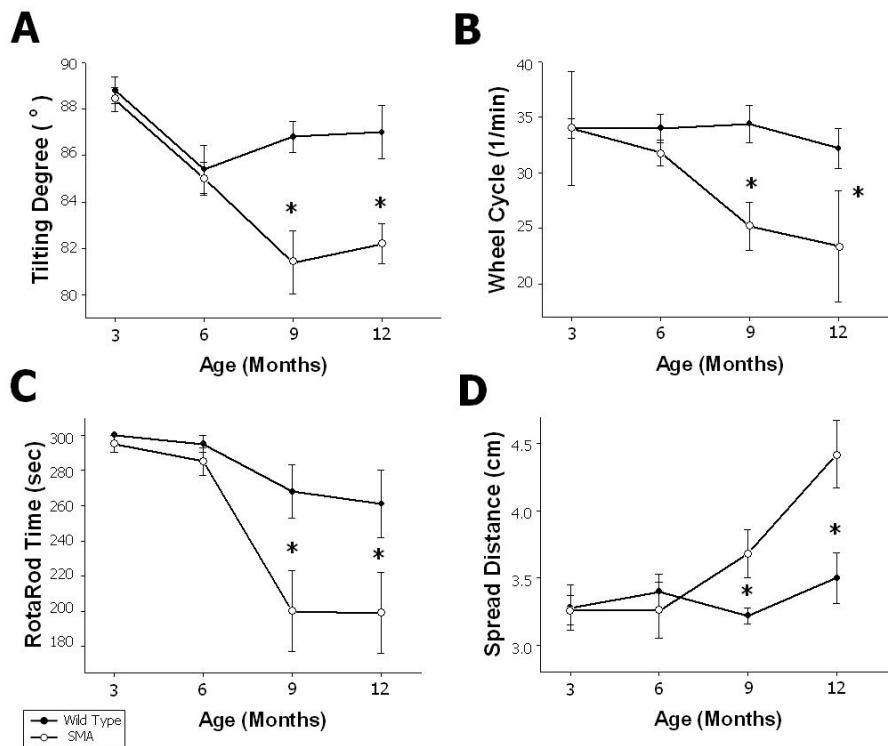
圖三 性別和尾長對小鼠之運動功能的影響

(A) 性別對小鼠之運動功能無顯著的影響。(B) 尾長對小鼠之運動功能無顯著的影響。



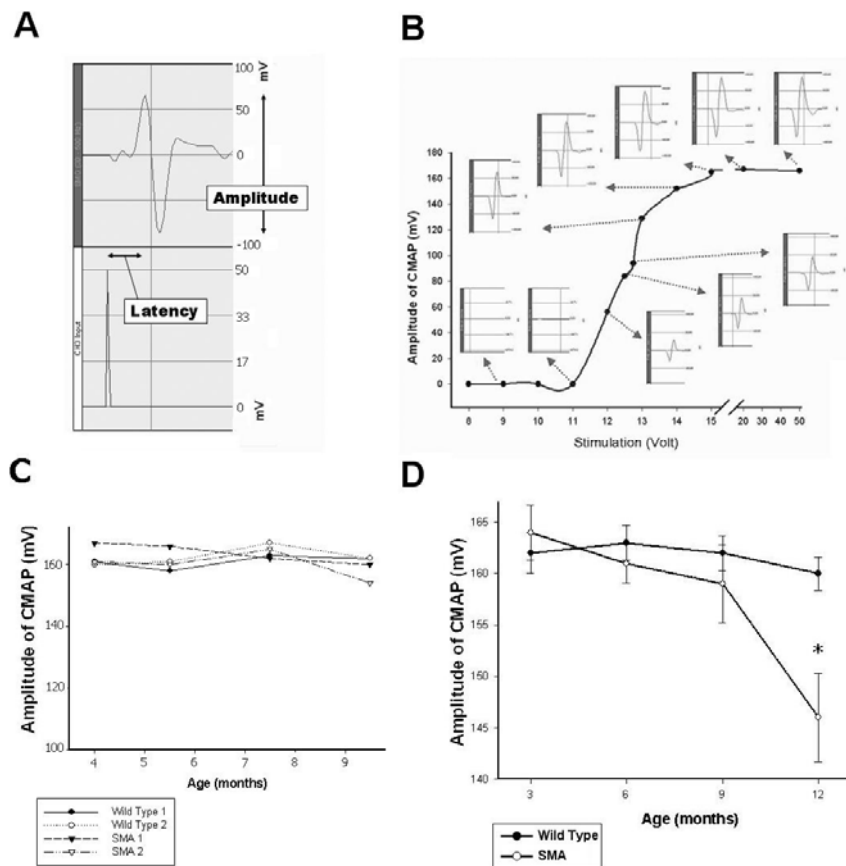
圖四 第三型 SMA 小鼠的運動功能分析

(A) 自小鼠九個月大起，SMA 小鼠能夠維持於傾斜平台之斜度較正常小鼠要小。
 (B) 自小鼠九個月大起，SMA 小鼠在滾輪內能夠跑的圈數較正常小鼠要少。(C) 自小鼠九個月大起，SMA 小鼠能夠在轉動橫桿上維持的時間較正常小鼠要短。(D) 自小鼠九個月大起，SMA 小鼠之雙後肢之下落腳距較正常小鼠要大。*, $p < 0.05$.



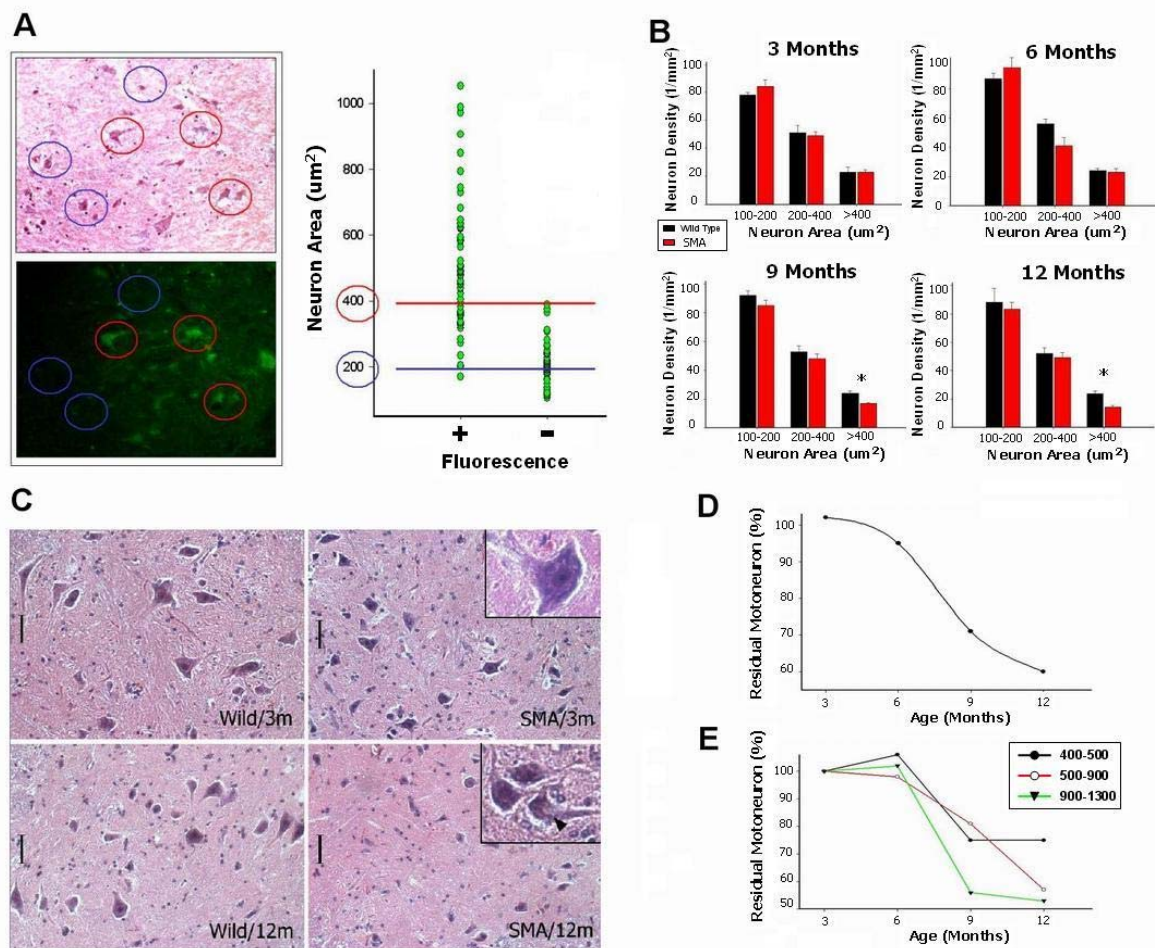
圖五 第三型 SMA 小鼠的電生理分析

(A) 電刺激正常小鼠的坐骨神經時，在同側腓腸肌可偵測到 biphasic sine-wave signal (CMAP)。(B) 使用不同的電刺激強度來刺激坐骨神經，當電刺激強度介於 12 至 15 伏特時，所得 sine-wave 的振幅亦跟著增加，而當電刺激強度超過 15 伏特時，該振幅即到達 plateau。(C) 於小鼠 4、5.5、7.5 及 9.5 個月大時進行電刺激檢測，可發現所有小鼠的四次 CMAP 振幅大小皆無明顯差異。(D) 於小鼠十二個月大時，SMA 小鼠的 CMAP 振幅較正常鼠小。



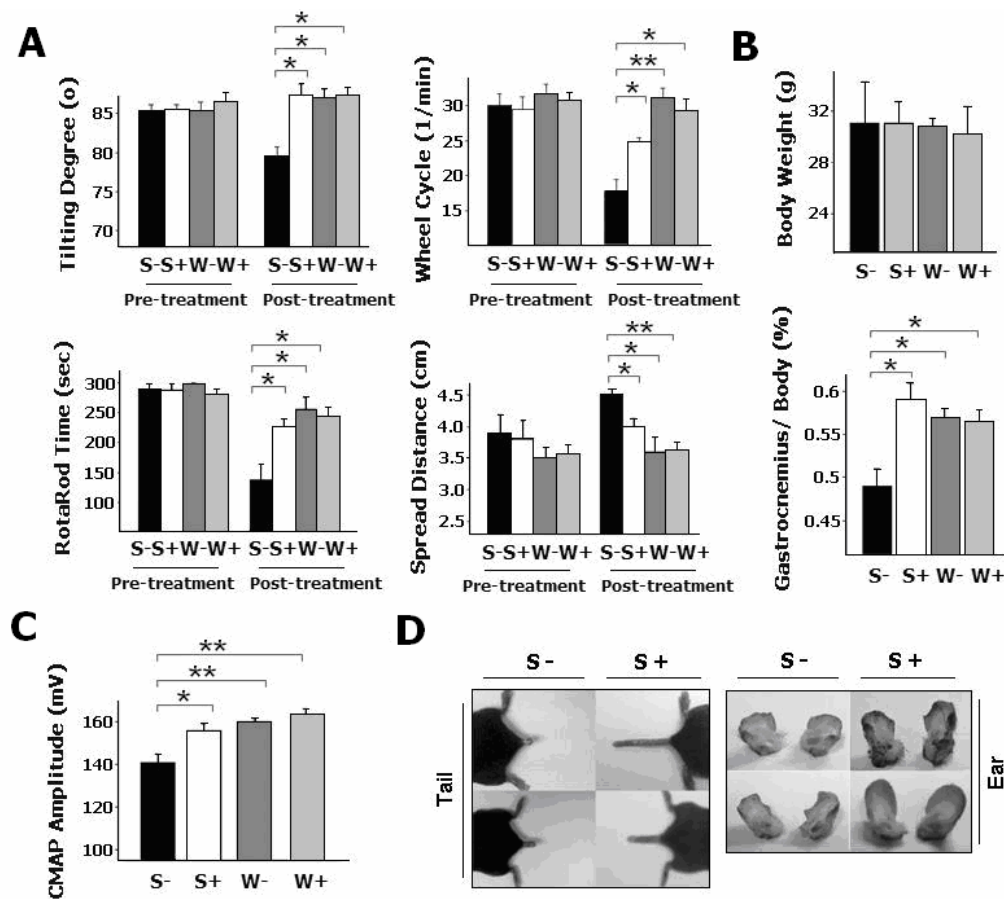
圖六 第三型 SMA 小鼠的脊髓病理分析

(A) 於 *Hb9-eGFP* 基因轉殖小鼠的脊髓中，帶有綠色螢光的神經元為運動神經元（紅圈），不帶有綠色螢光的神經元不是運動神經元（藍圈），分析可見，運動神經元的細胞截面大小為大於 200 平方微米，不是運動神經元的則為小於 400 平方微米。(B) SMA 小鼠的脊髓運動神經元（大於 400 平方微米）之密度於 9 個月大後有下降的現象。(C) SMA 小鼠的脊髓運動神經元密度於 3 個月大時和正常小鼠相似，於 12 個月大時有下降的現象，且有些神經元細胞質內可發現空泡。標長為 50 微米。(D) 隨著小鼠年紀，脊髓運動神經元呈非線性的退化。(E) 愈大的脊髓運動神經元愈容易造成退化。*, $p < 0.05$.



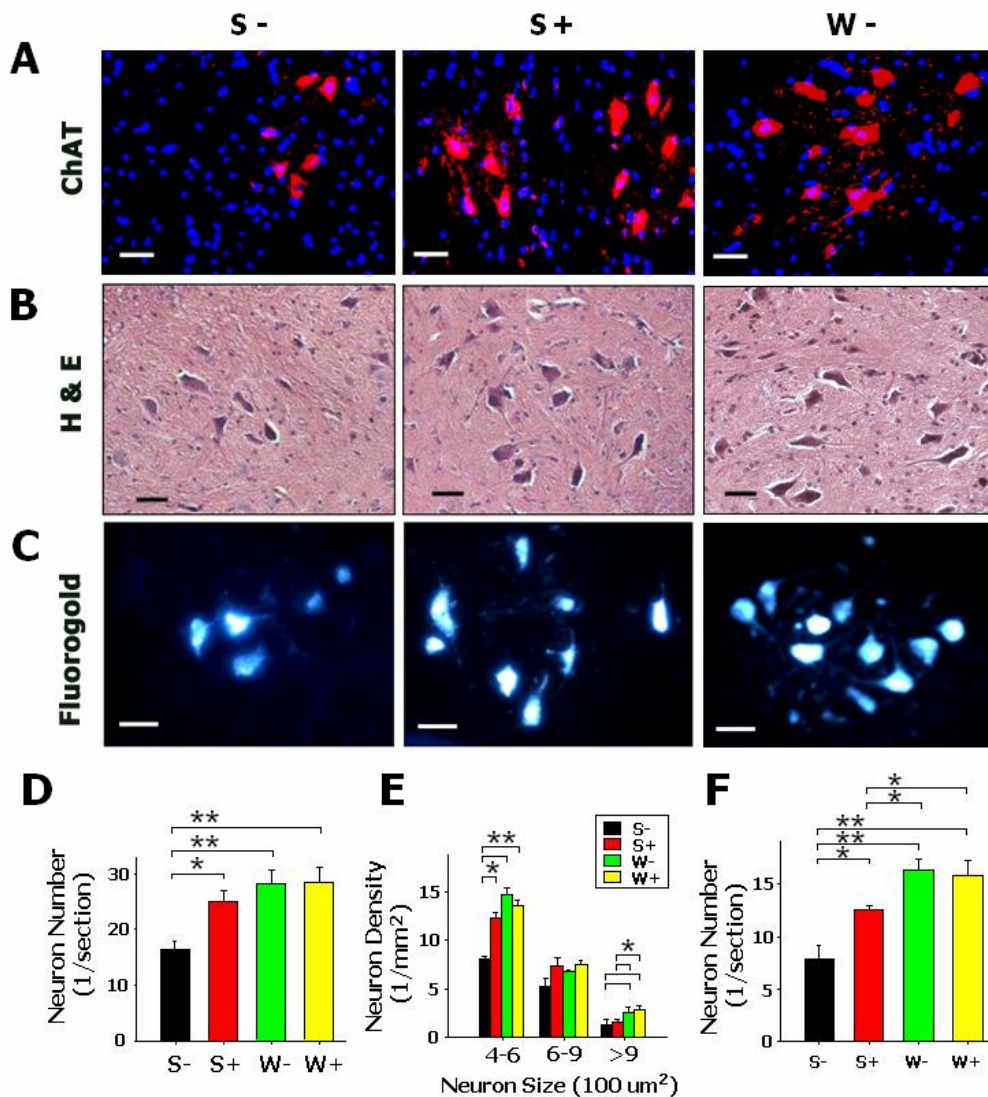
圖七 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的運動功能、形態學和電生理分析

(A) 經 VPA 治療之 SMA 小鼠擁有較佳的運動功能。(B) 經 VPA 治療之 SMA 小鼠擁有較重的腓腸肌重量。(C) 經 VPA 治療之 SMA 小鼠擁有較大的 CMAP 振幅。(D) 經 VPA 治療之 SMA 小鼠擁有較長的尾巴和較輕的不規則耳緣。S+, 經 VPA 治療的 SMA 小鼠; S-, 無治療的 SMA 小鼠; W+, 經 VPA 治療的正常小鼠; W-, 無治療的正常小鼠。*, $p < 0.05$; **, $p \leq 0.01$.



圖八 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓病理分析

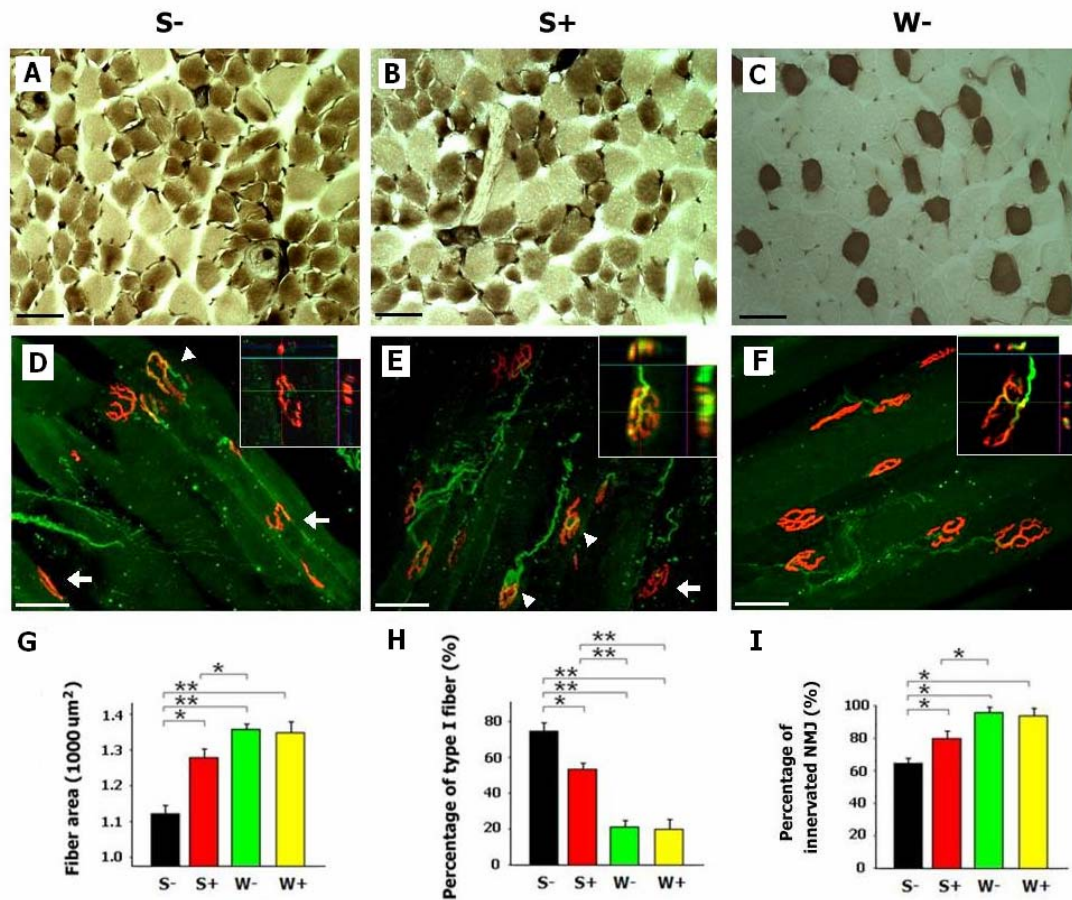
(A) 以 ChAT 抗體進行免疫螢光染色法，發出紅色螢光的細胞為運動神經元，藍色為經 DAPI 染色的細胞核。(B) 以 H&E 染色進行不同大小之脊髓神經元之密度。(C) 將 retrograde neural tracer Fluorogold 注射入小鼠的腓腸肌，脊髓內顯現螢光的細胞為含有功能現軸突的運動神經元。(D) 經 VPA 治療之 SMA 小鼠擁有較高的脊髓運動神經元密度。(E) VPA 治療主要減少較小神經元 (400-600 平方微米) 的退化。(F) VPA 增加具功能性的脊髓運動神經元密度。S⁺，經 VPA 治療的 SMA 小鼠；S⁻，無治療的 SMA 小鼠；W⁺，經 VPA 治療的正常小鼠；W⁻，無治療的正常小鼠。
*, $p < 0.05$; **, $p \leq 0.01$.



圖九 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓病理肌肉及神經肌肉交界分析

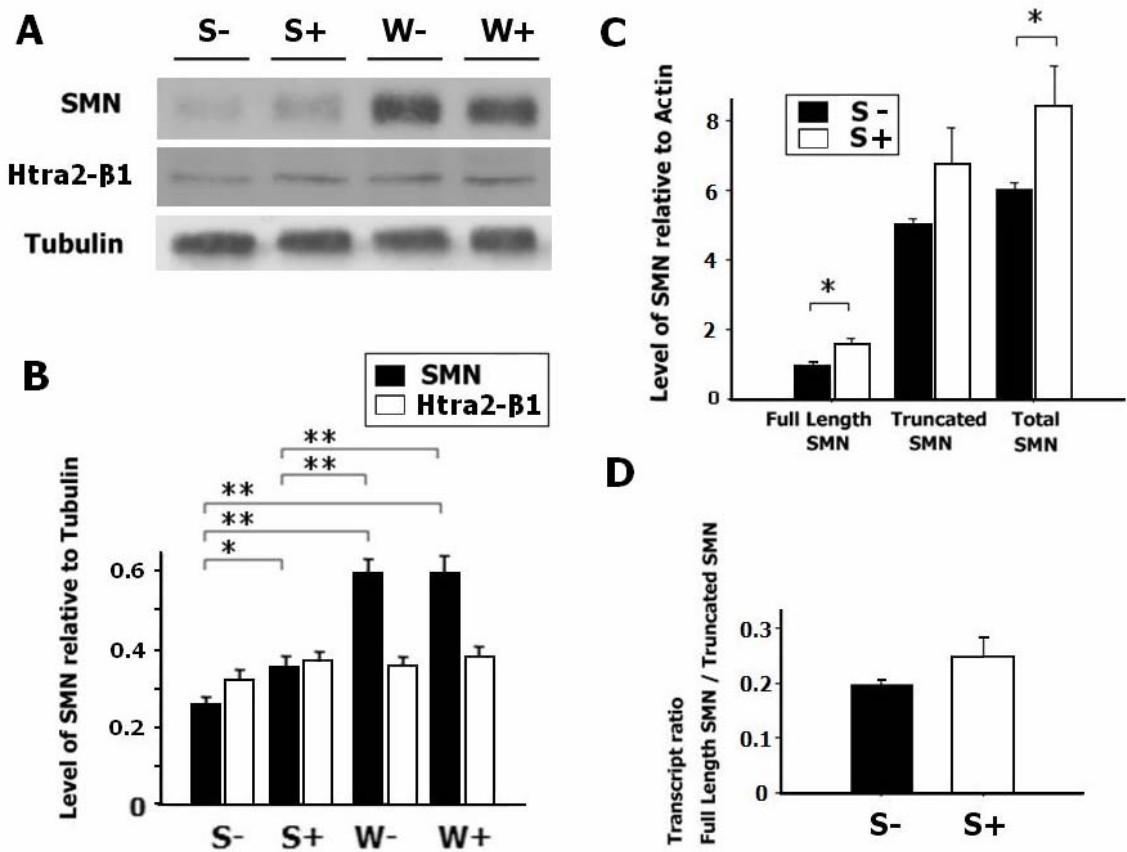
(A-C) 以 ATPase 染色可顯示較深的第一型及較淡的第二型肌肉纖維，SMA 小鼠經 VPA 治療後，異常第一型肌肉纖維群聚現象減少。(D-F) 以 α -bungarotoxin 和 neurofilament 抗體進行免疫螢光染色法，可見綠色的神經深入紅色的 post-synaptic muscle end plate。(G) 經 VPA 治療的 SMA 小鼠有較大的肌肉纖維大小。(H) 經 VPA 治療的 SMA 小鼠有較低的第一型肌肉纖維之比例。(I) 經 VPA 治療的 SMA 小鼠有較高具神經深入之 post-synaptic muscle end plate 的比例。標長為 50 微米。

S+, 經 VPA 治療的 SMA 小鼠；S-, 無治療的 SMA 小鼠；W+, 經 VPA 治療的正常小鼠；W-, 無治療的正常小鼠。*, $p < 0.05$; **, $p \leq 0.01$.



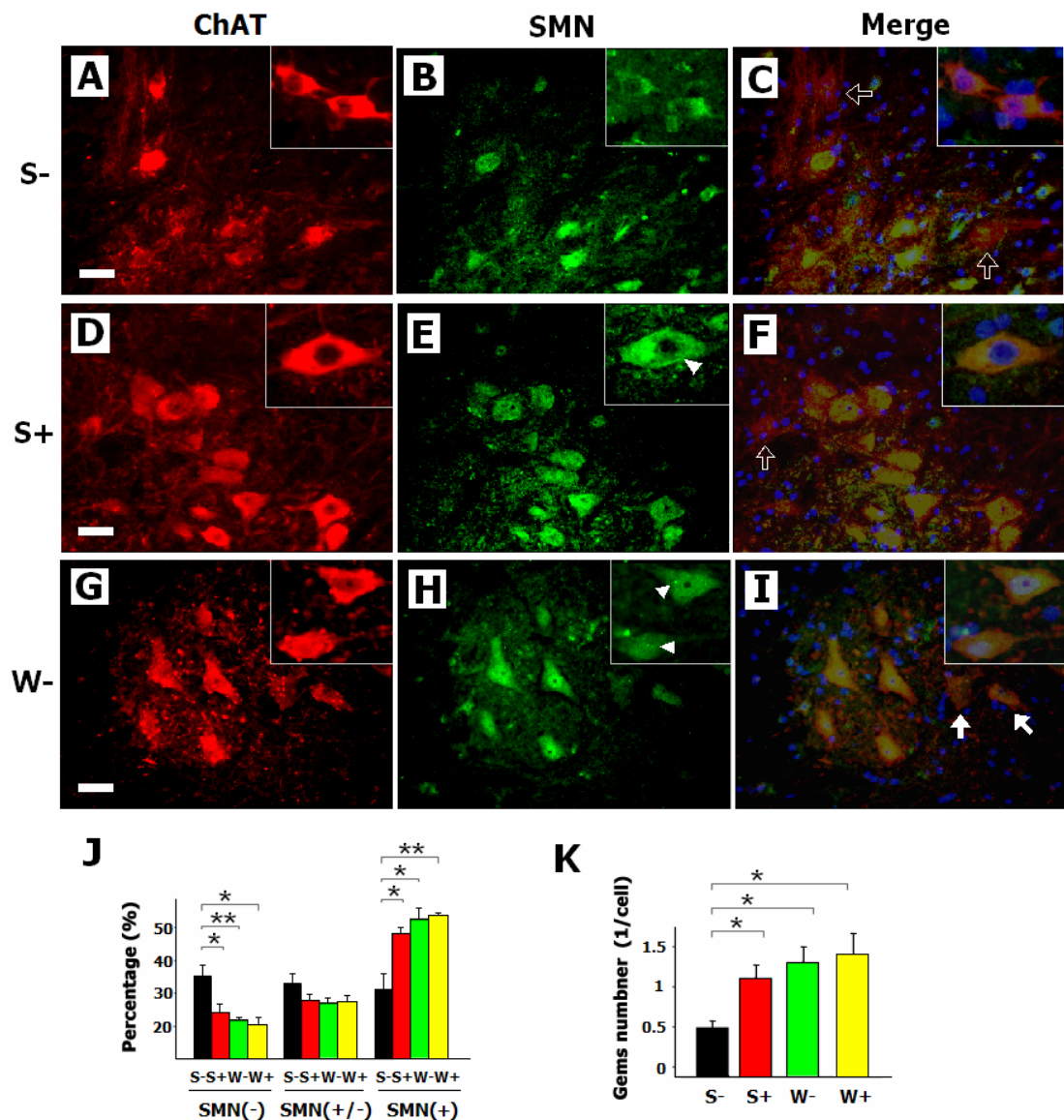
圖十 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓 SMN 表現量

(A) 以SMN、Htra2- β 1和 α -tubulin進行西方點墨法。(B) VPA治療增加了SMA小鼠脊髓內SMN蛋白質的表現。(C) VPA治療增加了SMA小鼠脊髓內SMN訊息RNA的表現。(D) VPA治療稍增加了SMA小鼠脊髓內全長除以非全長SMN訊息RNA的比例。S+, 經VPA治療的SMA小鼠；S-, 無治療的SMA小鼠；W+, 經VPA治療的正常小鼠；W-, 無治療的正常小鼠。Htra2- β 1, Transformer-2 protein homolog beta 1; *, $p < 0.05$; **, $p \leq 0.01$.



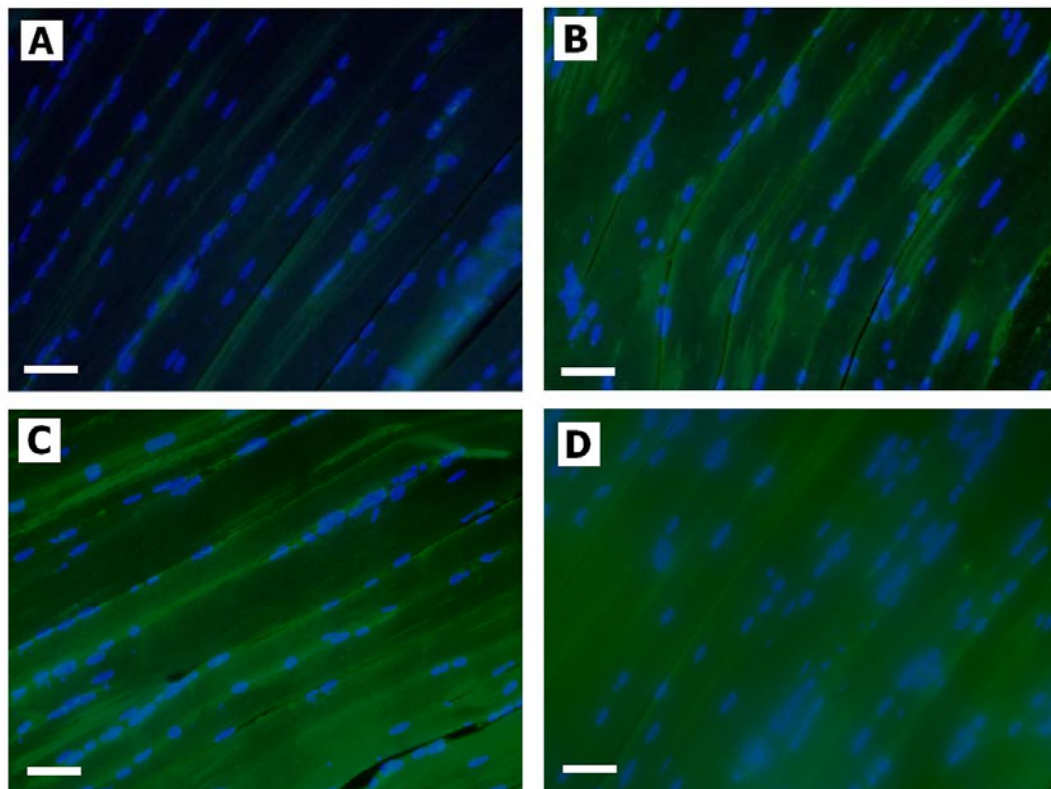
圖十一 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的脊髓 SMN 表現分布

(A-I) 以 ChAT 和 SMN 抗體進行免疫螢光染色法，發出紅色螢光的細胞為運動神經元，SMN 蛋白質會發出綠色螢光，藍色為經 DAPI 染色的細胞核。(J) SMA 小鼠經 VPA 治療後，含有 SMN 蛋白質的運動神經元的比例增加，不含 SMN 蛋白質的運動神經元(如空箭號)的比例減少，而稍含 SMN 蛋白質的運動神經元 (如實箭號)的比例不變。(K) SMA 小鼠經 VPA 治療後，運動神經元細胞核內的 gems (如箭頭)數量增加。S+, 經 VPA 治療的 SMA 小鼠；S-, 無治療的 SMA 小鼠；W+, 經 VPA 治療的正常小鼠；W-, 無治療的正常小鼠。標長為 50 微米。*, $p < 0.05$; **, $p \leq 0.01$.



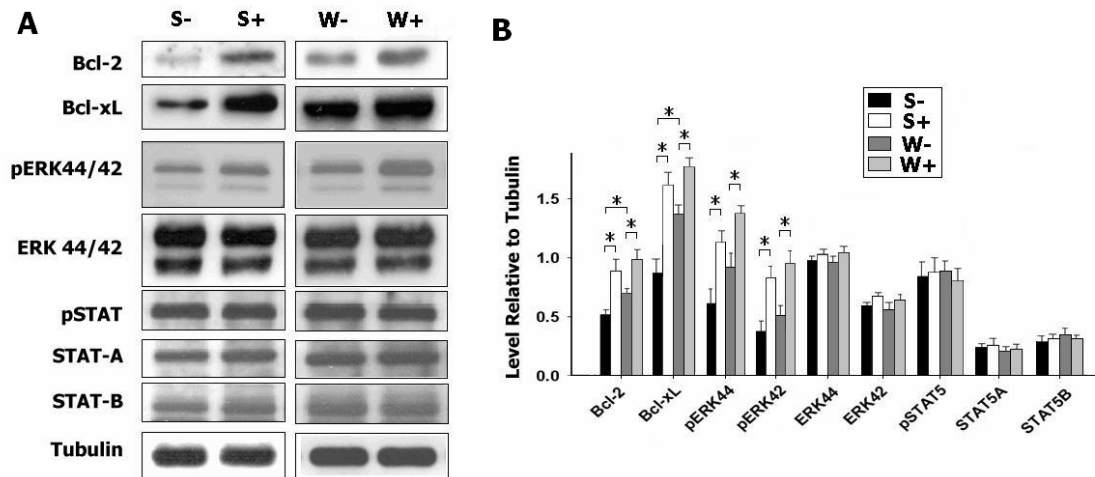
圖十二 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠的肌肉 SMN 表現

以 SMN 抗體（綠色）對肌肉組織進行免疫螢光染色法，藍色為經 DAPI 染色的細胞核。SMA 小鼠經 VPA 治療後(C 圖)，肌肉內 SMN 蛋白質的分布較無治療的 SMA 小鼠(B 圖)要高，但似乎仍較正常小鼠(D 圖)低。其中，A 圖為不加 SMN 抗體的對照組。標長為 50 微米。



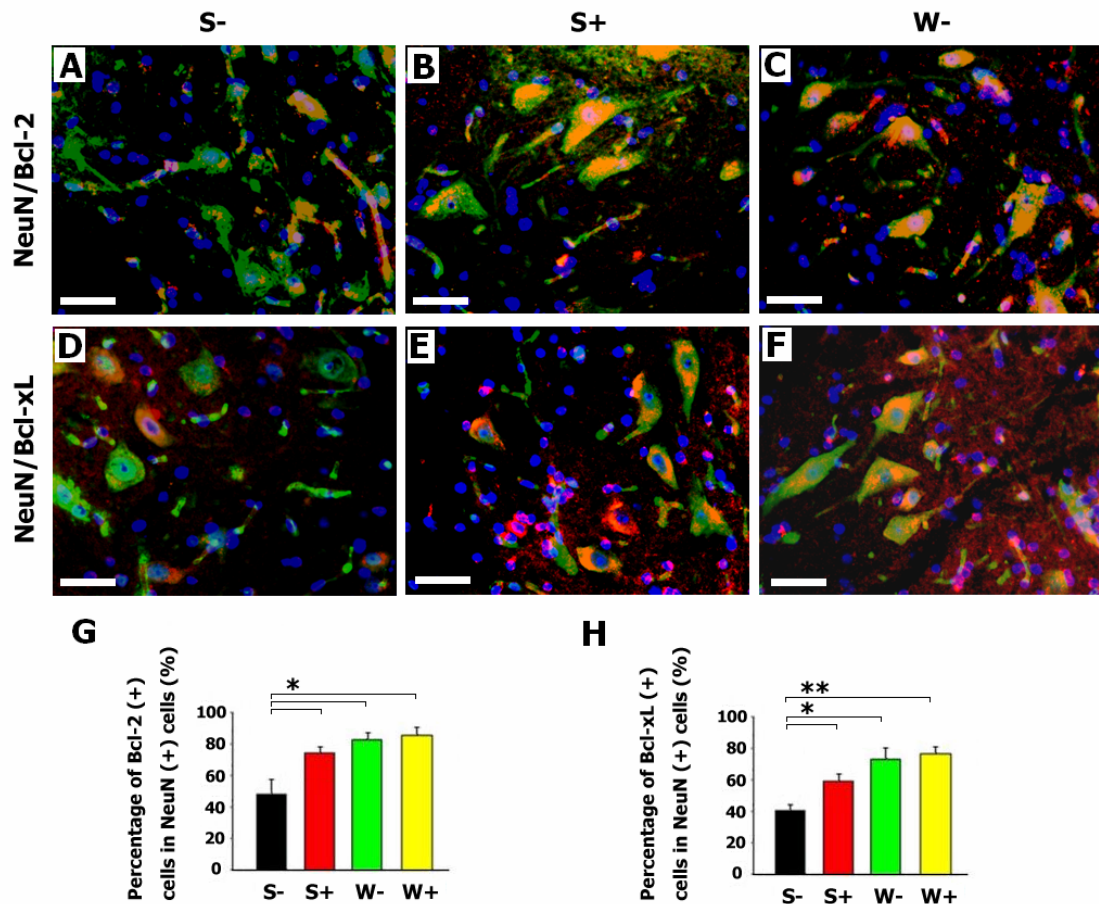
圖十三 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠脊髓內 Bcl-2 和 Bcl-x_L 之表現量

(A) 以 Bcl-2、Bcl-x_L、磷酸化及未磷酸化的 ERK44/42、磷酸化及未磷酸化的 STAT5 和 α -tubulin 進行西方點墨法。(B) SMA 小鼠脊髓內的 Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白質的表現較正常小鼠低，而 VPA 治療增加了 Bcl-2、Bcl-x_L 和磷酸化 ERK44/42 蛋白質於脊髓內的表現量。S⁺，經 VPA 治療的 SMA 小鼠；S⁻，無治療的 SMA 小鼠；W⁺，經 VPA 治療的正常小鼠；W⁻，無治療的正常小鼠。*， $p < 0.05$ 。



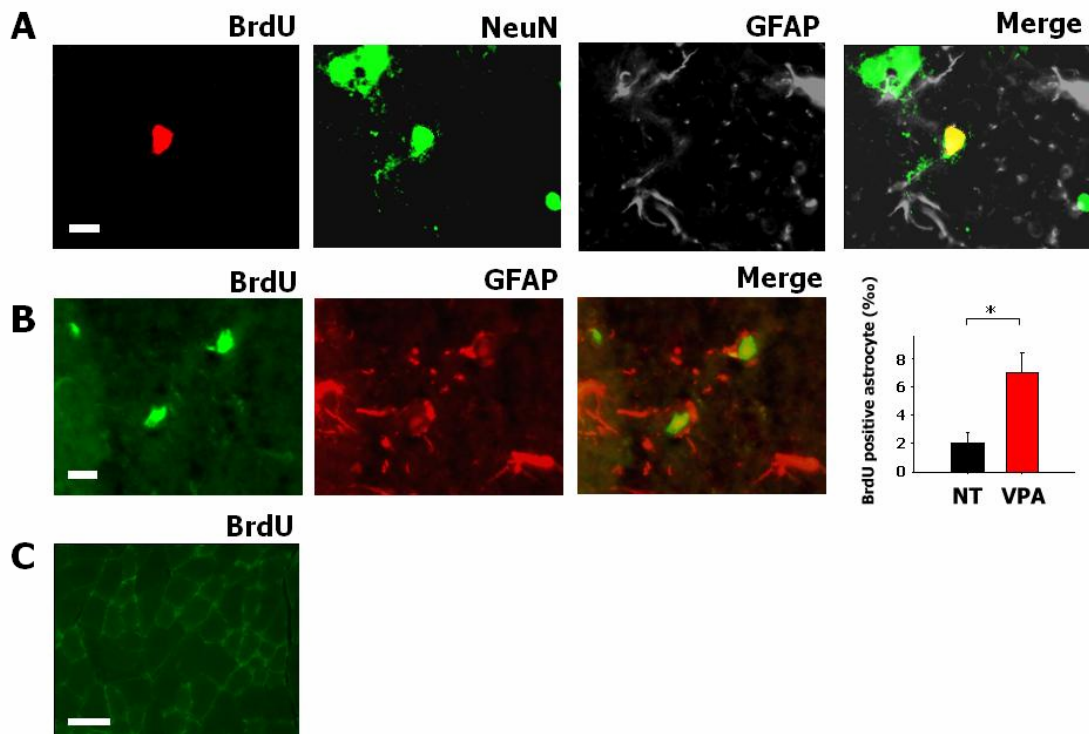
圖十四 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠脊髓內 Bcl-2 和 Bcl-x_L 之表現分布

(A-C) 以 NeuN 和 Bcl-2 抗體進行脊髓組織之免疫螢光染色法，發出綠色螢光的細胞為神經元，Bcl-2 蛋白質會發出紅色螢光，藍色為經 DAPI 染色的細胞核。(D-F) 以 NeuN 和 Bcl-x_L 抗體進行脊髓組織之免疫螢光染色法，發出綠色螢光的細胞為神經元，Bcl-x_L 蛋白質會發出紅色螢光，藍色為經 DAPI 染色的細胞核。(G) SMA 小鼠經 VPA 治療後，表現 Bcl-2 的神經元之比例增加。(H) SMA 小鼠經 VPA 治療後，表現 Bcl-x_L 的神經元之比例增加。S⁺，經 VPA 治療的 SMA 小鼠；S⁻，無治療的 SMA 小鼠；W⁺，經 VPA 治療的正常小鼠；W⁻，無治療的正常小鼠。標長為 50 微米。*, $p < 0.05$; **, $p \leq 0.01$.



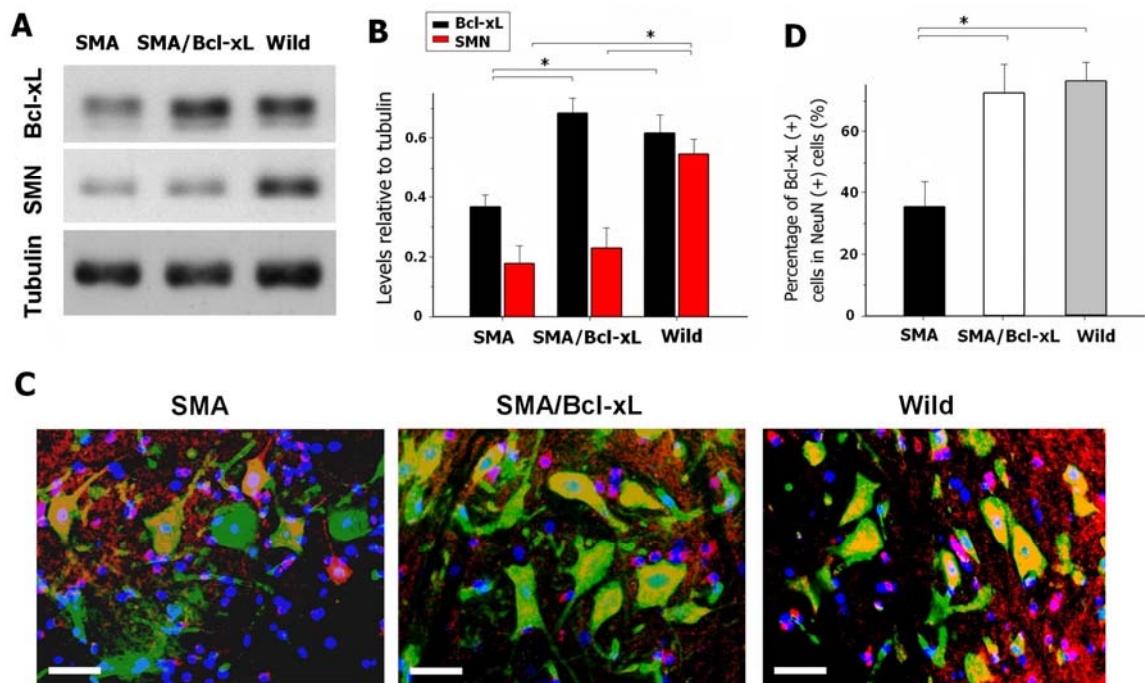
圖十五 經 VPA 治療之第三型 SMA 小鼠脊髓及肌肉內之細胞再生

(A) 以 BrdU(紅色)、NeuN(綠色)和 GFAP(白色)抗體進行脊髓組織之免疫螢光染色法發現，SMA 小鼠經四週的 VPA 治療後，脊髓中心孔附近可見到少許經細胞分裂的神經元細胞 (BrdU+/NeuN+)。(B) 以 BrdU(綠色)和 GFAP(紅色)抗體進行脊髓組織之免疫螢光染色法發現，SMA 小鼠經四週的 VPA 治療後，脊髓中心孔附近的 astrocyte 增生現象和無治療 SMA 小鼠(NT)相比較為增加。標長為 10 微米。*, $p = 0.03$ 。(C) SMA 小鼠經 VPA 治療後，仍不見有肌肉組織內的肌肉細胞再生之現象。表現 Bcl-xL 的神經元之比例增加。S+, 經 VPA 治療的 SMA 小鼠；S-, 無治療的 SMA 小鼠；W+, 經 VPA 治療的正常小鼠；W-, 無治療的正常小鼠。標長為 100 微米。*, $p = 0.03$ 。



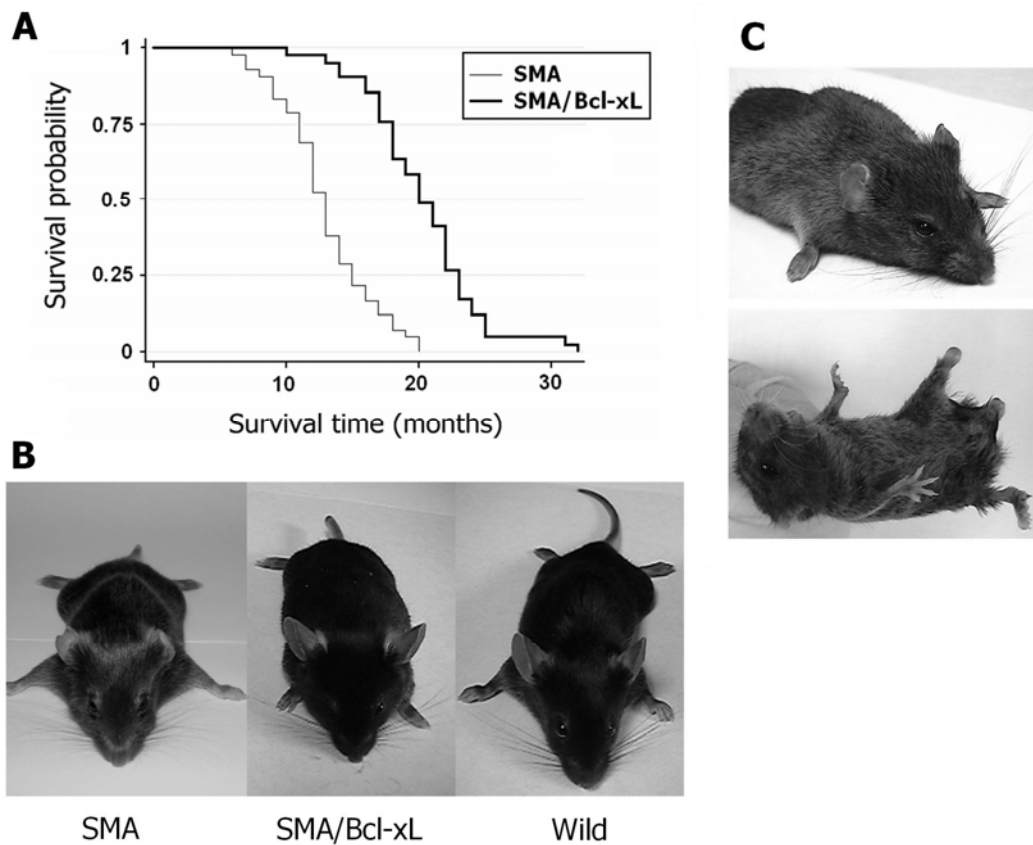
圖十六 第三型 SMA/Bcl-x_L 小鼠脊髓內 Bcl-x_L 及 SMN 蛋白質之表現

(A) 以西方點墨法分析脊髓內 Bcl-x_L 及 SMN 蛋白質之表現。(B) *Bcl-x_L* 的轉殖基因提升了 SMA 小鼠脊髓內 Bcl-x_L 的濃度，但不影響 SMN 蛋白質之表現。(C) 以免疫螢光染色法分析脊髓神經元 (NeuN 染色；綠色)內蛋白質 Bcl-x_L (紅色)之表現。藍色為細胞核 (DAPI)。標長為 50 微米。(D) *Bcl-x_L* 的轉殖基因提升了 SMA 小鼠脊髓內擁有 Bcl-x_L 正染的神經元之比例。*, $p < 0.05$.



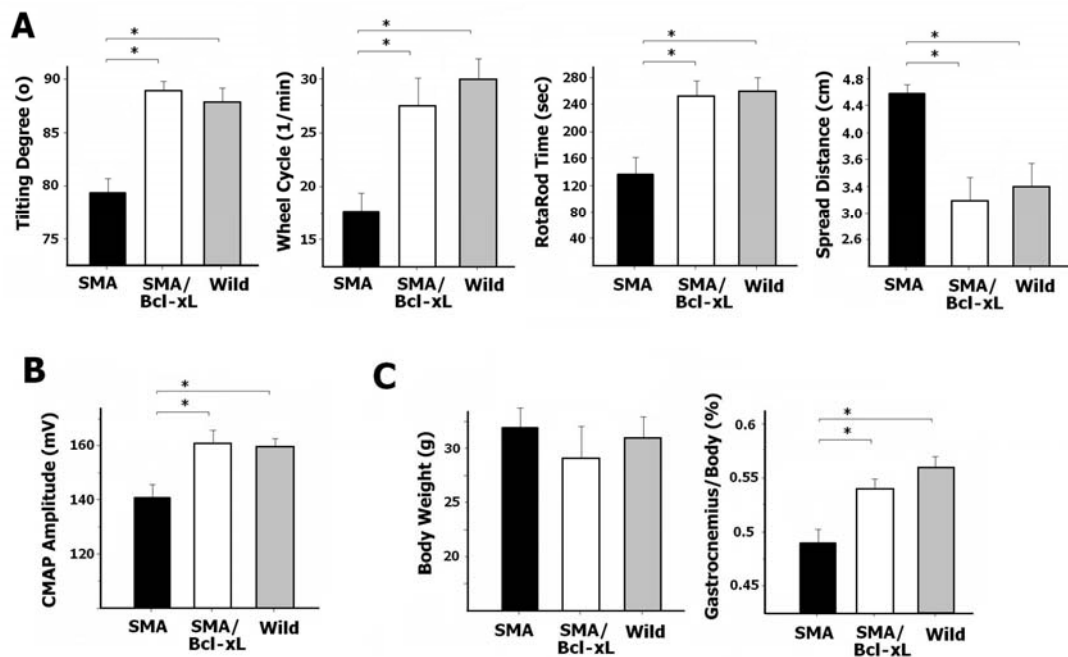
圖十七 第三型 SMA/Bcl-x_L 小鼠之存活曲線和形態學分析

(A) SMA/Bcl-x_L 小鼠的存活時間較 SMA 小鼠長 ($p < 0.001$)。(B) 在小鼠 12 個月大時，SMA/Bcl-x_L 小鼠較 SMA 小鼠擁有較長的尾巴和較正常的耳緣。(C) 在小鼠 2 歲大時，SMA/Bcl-x_L 小鼠可見極短的尾巴和嚴重的耳殼及四肢退化。



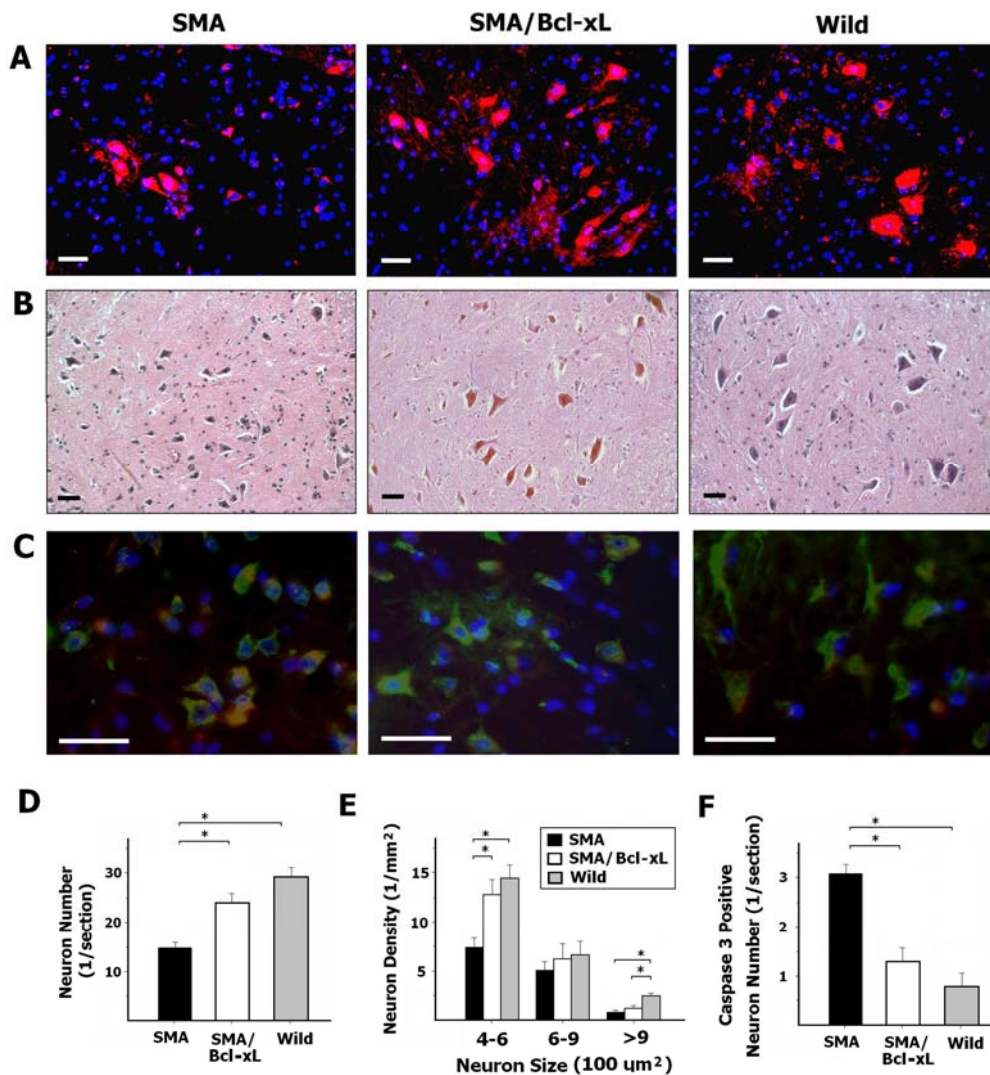
圖十八 第三型 SMA/Bcl-x_L 小鼠的運動功能、電生理檢測和肌肉重量

(A) 在小鼠 12 個月大時，SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較佳的運動功能。(B) SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較大的 CMAP 振幅。(C) SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較重的腓腸肌重量。*, $p < 0.05$.



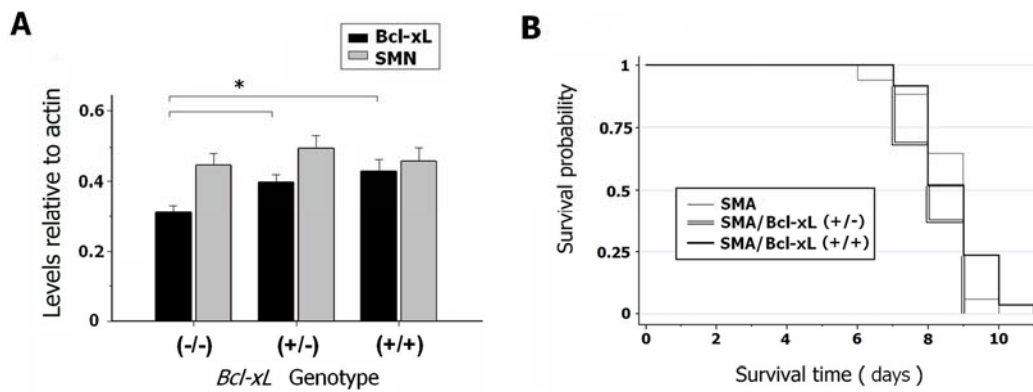
圖十九 第三型 SMA/Bcl-x_L 小鼠的脊髓病理分析

(A) 以免疫螢光染色法分析脊髓運動神經元 (ChAT 染色；紅色)的密度。藍色為細胞核 (DAPI)。(B) 以 H&E 染色法分析脊髓神經元的密度。(C) 以免疫螢光染色法分析脊髓神經元 (NeuN 染色；綠色)內具有活化型 caspase 3 (紅色)表現的比例。(D) SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較高的脊髓運動神經元密度。(E) SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較高的截面積較小之神經元 (細胞面積為 400 至 600 平方微米) 密度。(F) SMA/Bcl-x_L 小鼠比 SMA 小鼠擁有較少之具有活化型 caspase 3 表現的比例。標長為 50 微米。*, $p < 0.05$.

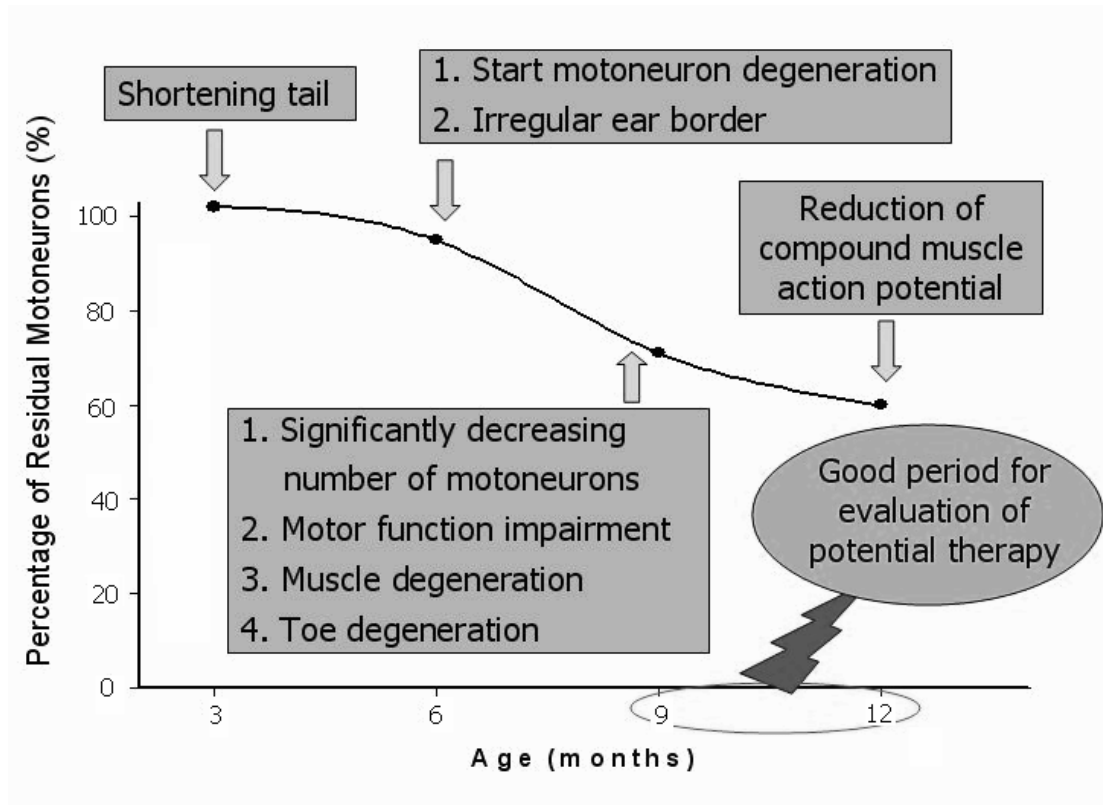


圖二十 第一型 SMA/Bcl-x_L 小鼠之蛋白質表現和存活分析

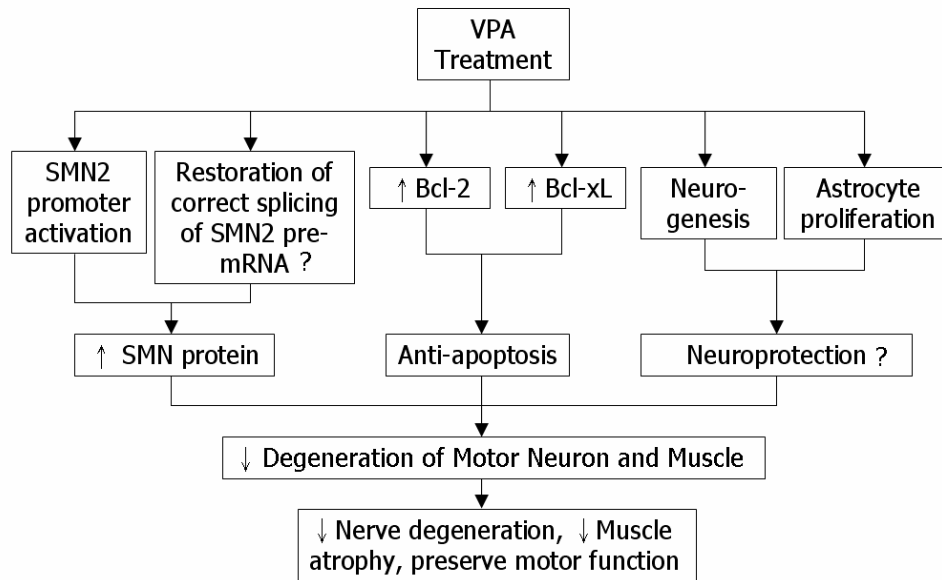
(A) 以西方點墨法分析脊髓內 Bcl-x_L 及 SMN 蛋白質之表現。Bcl-x_L 轉殖基因提升了 SMA 小鼠脊髓內 Bcl-x_L 的濃度，但不影響 SMN 蛋白質之表現。(B) *Bcl-x_L* 的轉殖基因不影響第一型 SMA 小鼠的存活時間。



圖二十一 第三型SMA小鼠的表現型整理



圖二十二 VPA 於 SMA 之療效機制



第九章 附錄：博士班修業期間所發表之相關論文

1. Tsai LK, Tsai MS, Lin TB, Hwu WL, Li H. Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 2006;24:286-295.
2. Tsai LK, Yang CC, Hwu WL, Li H. Valproic acid treatment in six patients with spinal muscular atrophy. *Eur. J. Neurol.* 2007;14:e8-9.
3. Tsai LK, Tsai MS, Tin JH, Li H. Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J. Mol. Med.* 2008;86:1243-1254.
4. Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Wang SH, Li H. Restoring *Bcl-xL* levels benefits a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 2008;31:361-367.
5. Tsai LK, Yang CC, Ting JH, Hwu WL, Tsai MS, Li H. High correlation of SMN in leukocytes and spinal cord. *J. Pediatr.* 2009;154:303-305.