

第二十屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA20-390

作品名稱：探究神經對於棕色脂肪組織產熱及代謝之
影響及其對於癌症惡病質之可能應用

姓名：朱紹綸


關鍵字：棕色脂肪組織、交感神經、產熱

摘要

棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) 為非顫抖性產熱 (non-shivering thermogenesis, NST) 的主要來源。大量文獻中提到 BAT 受到交感神經的影響，卻鮮少說明交感神經在 BAT 的分布情形以及其作用模式。我們在小鼠的 BAT 附近找到了數條支配 BAT 的神經，並以切斷神經的方式探討其功能。首先，進行低溫試驗 (cold test) 和間接熱量測量 (indirect calorimetry)，探討切斷神經對於棕色脂肪組織產熱的影響，發現小鼠切斷棕色脂肪組織支配神經後，棕色脂肪組織產熱能力會下降；接著探討小鼠血清中正腎上腺素 (noradrenaline) 的含量，發現切斷 BAT 周圍神經會使正腎上腺素濃度下降；又接著追蹤切斷 BAT 周圍神經對小鼠體重的影響，發現切斷 BAT 周圍神經會導致體重上升；再取出 BAT，觀察組織 (BAT) 重量、組織切片，並測定組織中產熱蛋白 UCP-1 含量 (uncoupling protein 1)，發現切斷 BAT 支配神經會造成 BAT 萎縮且因 UCP-1 蛋白含量下降，產熱功能下降；最後我們透過切斷單邊神經實驗，推測神經應直接控制 BAT。癌症惡病質會造成病患進食量很大卻仍然消瘦，文獻指出白色脂肪組織變為棕色脂肪和棕色脂肪過度活躍是造成癌症惡病質的原因之一。因此，根據以上實驗結果，我們認為切斷 BAT 支配神經對於癌症惡病質極有可能有療效。

壹、研究背景

棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) 是動物體內三種脂肪組織之一 (圖一)，雖然分類上屬於脂肪，卻不同於一般的白色脂肪組織，BAT 的細胞內含有大量的粒線體，可以幾乎無節制地燃燒熱量，這與它們的粒線體中一種專有的蛋白質——解偶聯蛋白 1 (UCP-1 (uncoupling protein 1)) 有關，當質子通過 UCP-1 時，會破壞粒線體的離子梯度，產生熱量而非產生 ATP (adenosine triphosphate)，因此 BAT 對於小型哺乳動物的溫度調節很重要，許多小動物在冬眠前都會在體內囤積大量的 BAT。BAT 的產熱能力十分驚人，據估計，如果以最大程度地刺激僅 50 g 的 BAT，就可以利用成年人類高達 20% 的基礎卡路里需求。

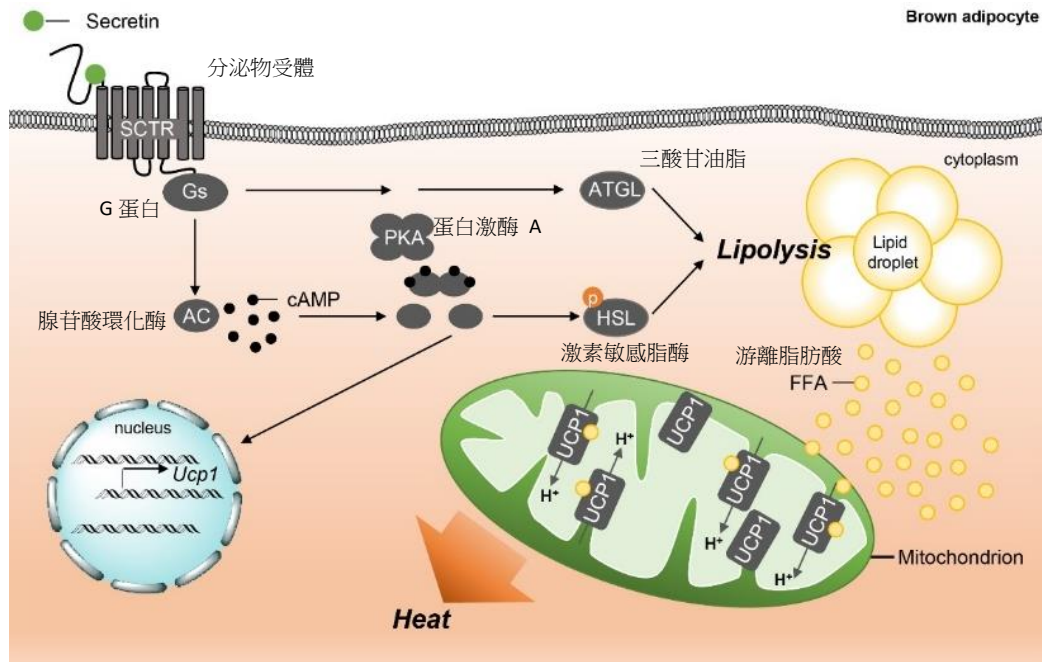


	WHITE ADIPOSE TISSUE	BROWN ADIPOSE TISSUE	BEIGE ADIPOSE TISSUE
Localization	<ul style="list-style-type: none">• Subcutaneous• Intra-abdominal• Epicardial• Gonadal	<ul style="list-style-type: none">• Interscapular• Paravertebral• Perirenal• Cervical• Supraclavicular	Emerges in white adipose tissue depots with appropriate stimuli
Morphology	Spherical	Elliptical and smaller than white	Spherical
Cell composition	<ul style="list-style-type: none">• Single lipid droplet• Few mitochondria• Flattened peripheral nucleus• Little endoplasmic reticulum	<ul style="list-style-type: none">• Multiple small lipid droplets• Large number of mitochondria• Oval central nucleus	<ul style="list-style-type: none">• Unilocular morphology but small lipid droplets after stimulation• Mitochondria appear after stimulation
Function	Storing energy	Expending energy and heat production (non-shivering thermogenesis)	Thermogenic potential
Uncoupling protein	Undetectable	Positive	Positive after stimulation

圖(一) 各種脂肪組織比較(Hamza, 2019)

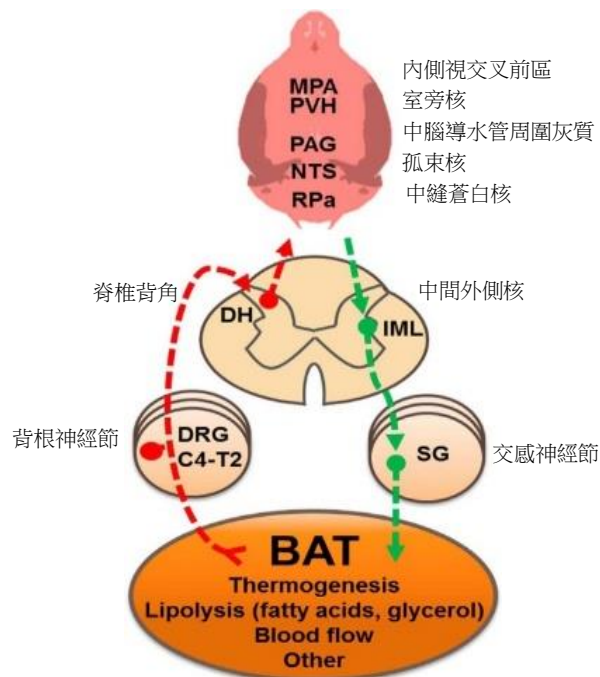
BAT 細胞上的 β -腎上腺素受體 (β -adrenergic receptor) 接受來自交感神經的正腎上腺素 (noradrenaline) 的刺激後，會促進蛋白質解偶聯蛋白 1 (UCP-1) 的轉錄及轉譯，並造成脂質滴 (lipid droplet) 分解成游離脂肪酸 (free fatty acids, FFA)。UCP-1 會附著在粒線體內膜上，當一個質子通過 UCP-1 向粒線體基質流動時，需要有一個 FFA 反向向粒線體膜間流動，此一作用

不同於 ATP 生成酶合成 ATP，而是產生熱能，如圖 (二) 所示。



圖(二) BAT 的產熱機制(Braun, Oeckl, Westermeier, Li, & Klingenspor, 2018)

BAT 和 WAT 在維持適當的能量平衡和代謝健康中扮演十分關鍵的角色。為了有效發揮功能，這些組織需要與大腦內分泌和神經系統溝通。訊息由大腦的下視丘經 SNS 交感神經系統 (sympathetic nerve system) 傳遞至 BAT，促進其產熱；與此同時，BAT 也會驅動 SS 神經系統將熱脂解 (thermogenesis lipolysis) 的訊息傳回腦部，形成一個 SNS (sympathetic nervous system) -SS (spiny stellate) 的反饋迴路 (SNS-SS feedback loops)，如圖 (三) 所示，若將其神經連結打斷，BAT 和大腦之間的訊息傳遞則無法進行，可能會連帶影響其產熱的能力。



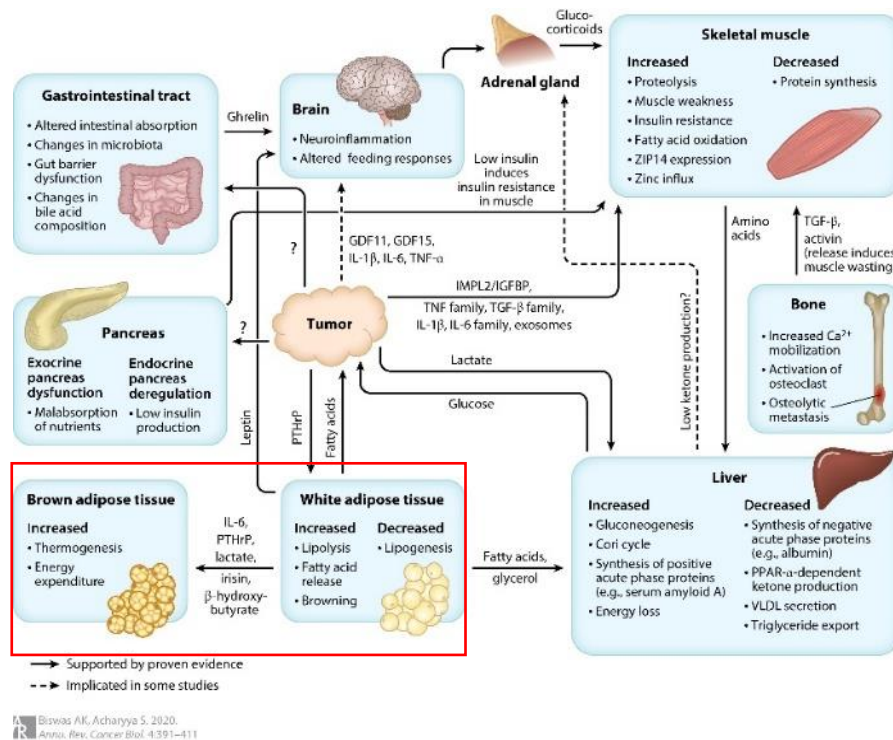
圖(三) SNS-SS 的反饋迴路示意圖(Ryu, Garretson, Liu, Vaughan, & Bartness, 2015)

貳、研究動機

在偶然的情況下，我們讀到數篇有關棕色脂肪組織的文章報導，這些文章激發了我們對於棕色脂肪組織的興趣。我們推測神經對於 BAT 之影響有可能是最有效的，因此在指導老師建議之下，我們決定著手於小鼠 BAT 與周圍神經的相關研究，然而在讀了數本小鼠與人體神經解剖專書及相關文獻後，我們決定先從找到 BAT 周圍神經開始進行實驗，接著也在文獻的探討中陸續得到了 BAT 對於代謝、癌症惡病質等影響的資訊。

由於神經和 BAT 的產熱有十分強大的關聯性，我們的實驗將利用此一關聯，將 BAT 周圍的支配神經切斷，並利用低溫試驗 (cold test) 確認所切斷的神經確實和 BAT 的產熱有關。

在數篇學術文章中都有提到過在癌症惡病質 (cachexia) 的形成鏈中，棕色脂肪組織可能扮演著重要的角色 (圖 (四))。癌症惡病質，其特徵為病患進食量很大卻仍然消瘦，在許多癌症患者身上，有觀察到許多白色脂肪組織變為棕色脂肪，以及棕色脂肪過度活躍，推測是造成體重下降的原因之一，若能透過神經切斷的方式抑制這些棕色脂肪組織產熱，將可以有效防止此情況的出現，成為癌症惡病質治療的曙光。



圖(四) 癌症惡病質相關的過程和機制(Biswas, Anup K., Acharyya, Swarnali, 2020)

參、研究目的

- 一、探討 BAT 周圍神經對小鼠代謝表現型的影響。
- 二、探討 BAT 周圍神經對小鼠血清正腎上腺素濃度之影響。
- 三、探討 BAT 周圍神經對小鼠 BAT 及相關組織型態 (腹股溝脂肪、性腺脂肪) 與產熱功能之影響。
- 四、探討 BAT 周圍神經對小鼠 BAT 作用機制。

肆、研究設備與材料

一、實驗小鼠

- (一) 品種：C57BL/6Jnar1
- (二) 品系種類：近親品系 (Inbred strain)
- (三) 配種方式：兄妹交配
- (四) 毛色：黑色 (black, a/a)
- (五) 性別：公
- (六) 來源：1995 年自 The Jackson Laboratory 引進國研院動物中心。
- (七) 培育歷程：1921 年 Dr. Little 透過將 Miss Abbie Lathrop 種原中 57 系母鼠與 52 系公鼠配種得到 C57BL 品系。1937 年將 C57BL 品系區分為 C57BL/6 與 C57BL/10 兩種次品系。

二、低溫試驗 (cold test)

- (一) 16 個 cold test cage 和水瓶 (一隻小鼠一個，8 control、8 neuron-cut)
- (二) 冰箱 (4°C)
- (三) 肛溫計 (physitemp micro therma TH-5)

三、間接熱量測量 (indirect calorimetry)

- (一) 間接式能量測卡計
- (二) 數據分析軟體

四、血清正腎上腺素定量

- (一) ELISA kit
 1. 酶結合物 (enzyme conjugate)
 2. 停止液 (stop solution)
 3. 正腎上腺素微量滴定盤 (noradrenaline microtiter strips)
 4. 正腎上腺素抗血清 (noradrenaline antiserum)
 5. 醯化緩衝液 (acylation buffer)
 6. 裂解緩衝液 (assay buffer)
 7. 輔酶 (coenzyme)
 8. 酵素 (enzyme)
 9. 鹽酸
 10. 基質 (substrate)
 11. 標準對照溶液

- (二) 動物血清

五、組織切片觀察

- (一) 福馬林
- (二) 顯微鏡
- (三) 組織包埋盒
- (四) 組織包埋機

六、西方點墨法 (western blot)

(一) 電泳膠體 (gel)

1. 下膠 10 % (separating gel)

配方見表 (一)

表 (一) 下膠配方

	ddH ₂ O	4X separating buffer (pH=8.8) *	30 % bis-acrylamide	50 % glycerol	10 % APS	TEMED
含量 (2 片)	2.17 mL	2.5 mL	3.33 mL	2 mL	100 μL	7 μL

* 4X separating buffer (100 mL) : Tris base 18.2 g + SDS 0.4 g, 加水至 100 mL 以鹽酸調至 pH=8.8。

2. 上膠 4 % (stacking gel)

配方見表 (二)

表 (二) 上膠配方

	ddH ₂ O	4X stacking buffer (pH=6.8) *	30 % bis-acrylamide	10 % APS	TEMED
含量 (2 片)	3.08 mL	1.25 mL	0.66 mL	50 μL	4 μL

(二) 離心分離機 (13000 rpm)

(三) 均質機

(四) 動物組織樣本。

(五) 電泳槽

(六) 齒梳

(七) 微量滴管

(八) 酒精

(九) 磁珠

(十) 微盤分析儀 (ELISA reader)

(十一) running buffer, 見表 (三)

(十二) 甲醇

(十三) transfer buffer, 見表 (四)

(十四) PVDF membrane

(十五) 海綿

(十六) 濾紙

(十七) 奶粉

(十八) 一級抗體 (UCP-1)

(十九) 二級抗體

(二十) 0.05 % PBST, 見表 (五)

表(三)running buffer 配方

10X Running buffer (1L)	
Tris base	30.3g
Glycine	144g
SDS	10g
1X for using (100ml 10X Tank buffer + 900ml ddH ₂ O), pH= 8.3	

表(四)transfer buffer 配方

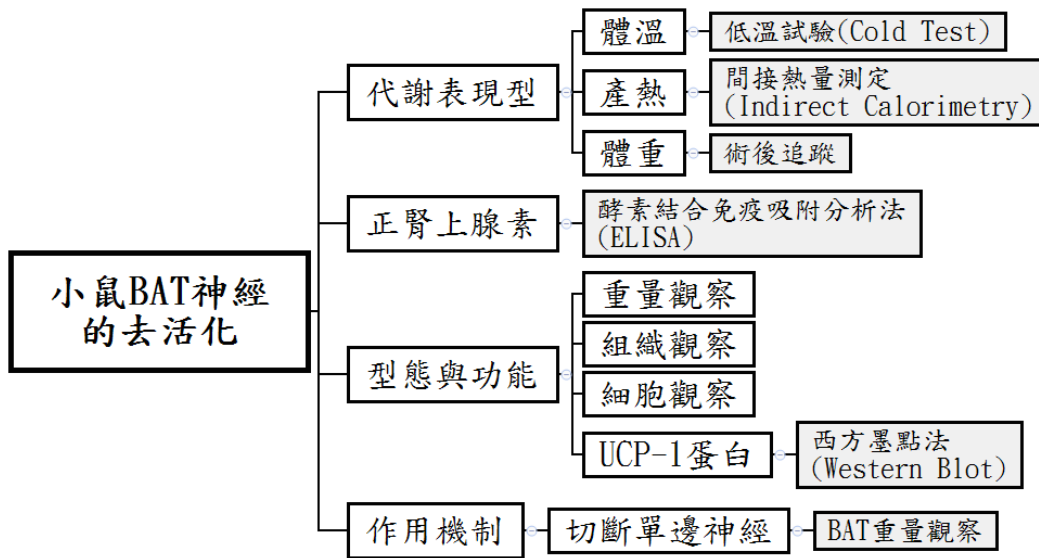
10X Transfer buffer (1L)	
Tris base	30.3g
Glycine	144g
1X for using (100ml 10X Transfer buffer + 150ml methanol + 750ml ddH ₂ O) pH= 8.3	

表(五) PBS 及 PBST 配方

10X PBS (1L)	
Trisbase	30g
NaCl	80g
KCl	2g
0.1% PBST (1L)	
100ml 10X PBS + 900ml ddH ₂ O + 1 ml Tween 20	
0.05% PBST (500ml)	
50ml 10X PBS + 450ml ddH ₂ O + 250 ul Tween 20	

伍、研究方法與過程

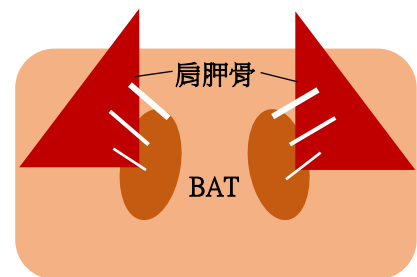
一、研究架構圖



圖(五)研究架構圖

二、神經切斷手術

我們在BAT周圍發現上、中、下三束神經，其中最上面神經束最粗，應有三條神經，下面兩束較細，各有一條神經。實驗的小鼠分為兩組，分別為全部神經皆進行切斷的實驗組，和進行假手術的對照組。



圖(六)BAT周遭神經示意圖

三、低溫試驗 (cold test)

(一) 預先準備

1. 前兩天將小鼠移到 cold test 室適應環境。
2. 預先備好肛溫計電池。
3. 8AM 禁食。

(二) 流程

1. 12PM 測驗時每一隻一籠，給予飲水，不給予墊料和飼料，先測 0 hr 肛溫，以肛溫計探頭最細部分沒入為統一深度。
2. 放置小鼠於 4 °C 環境，每一小時測定肛溫，持續 6 小時。
3. 測驗時間固定於整點。

(三) 注意事項

1. 注意籠內不能有水，適時以衛生紙拭乾。

四、間接熱量測量 (indirect calorimetry)

(一) 原理

間接熱量測定法，即通過測量生物體產生的二氧化碳和氮廢料的產生量 (尿氮量)，以及通過其耗氧量來計算生物體產生的熱量。

(二) 預先準備

將選取體重相近的神經切斷組小鼠和控制組小鼠各 8 隻。

(三) 流程

1. 將小鼠 1 隻 1 籠放入間接式能量卡計。
2. 持續 2 天。
3. 將小鼠移出間接式能量卡計。
4. 以下列公式計算實驗結果。

(四) 計算公式

1. 體內氧化蛋白質的量=氮廢料的產生量 X 6.25。
2. 蛋白質代謝產熱量=氧化蛋白質的量 X 18 kJ/g。
3. 蛋白質代謝 O₂ 消耗量=氧化蛋白質的量 X 0.95 L/g。
4. 蛋白質代謝 CO₂ 產生量=氧化蛋白質的量 X 0.76 L/g。
5. 非蛋白質代謝 O₂ 消耗量=總 O₂ 消耗量-蛋白質代謝 O₂ 消耗量。
6. 非蛋白質代謝 CO₂ 產生量=總 CO₂ 產生量-蛋白質代謝 CO₂ 產生量。
7. NPRQ (非蛋白質呼吸商)=非蛋白質代謝 CO₂ 產生量/非蛋白質代謝 O₂ 消耗量。
8. 根據 NPRQ (非蛋白質呼吸商) 的氧熱價計算非蛋白質代謝產熱量。
9. 非蛋白質代謝產熱量=非蛋白質代謝 O₂ 消耗量 X 氧熱價。
10. 總產熱量=非蛋白質代謝產熱量+蛋白質代謝產熱量。

表(六) 氧熱價換算表

非蛋白呼吸商	氧化百分比(%)		氧熱價 (kJ/L)
	糖	脂肪	
0.707	0.00	100.00	19.62
0.71	1.10	98.90	19.64
0.75	15.60	84.40	19.84
0.80	33.40	66.60	20.10
0.81	36.90	63.10	20.15
0.82	40.30	59.70	20.20
0.83	43.80	56.20	20.26
0.84	47.20	52.80	20.31
0.85	50.70	49.30	20.36
0.86	54.10	45.90	20.41
0.87	57.50	42.50	20.46
0.88	60.80	39.20	20.51
0.89	64.20	35.80	20.56
0.90	67.50	32.50	20.61
0.95	84.00	16.00	20.87
1.00	100.00	0.00	21.13

五、血清正腎上腺素定量

(一) 預先準備

1. 配製酵素溶液。
2. 血液樣本採集。

(二) 流程

1. 萃取。
2. 醃化。
3. 加入酵素、萃取液後搖盪 30 分鐘。
4. 加入抗血清後搖盪 2 小時。
5. 加入酶結合物後搖盪 30 分鐘。
6. 加入基質後搖盪 25 分鐘。
7. 加入停止液後混合均勻。
8. 上 ELISA reader 紀錄結果，讀取 OD 值。

六、組織切片觀察

(一) 預先準備

1. 配製福馬林。
2. 準備好包埋盒。

(二) 流程

1. 將取下的動物組織放入包埋盒。
2. 將包埋盒放入先前配製好的福馬林之中。
3. 重複上述步驟直至所有樣本皆採樣完畢。
4. 將包埋盒放入包埋機中包埋。
5. 將包埋好的組織切片。
6. 以顯微鏡觀察並拍照。

七、西方點墨法 (western blot)

(一) 預先準備

1. 配膠：依研究器材中表 (一)、表 (二) 中配方配製
2. 組織採樣：先將組織切適當大小，加入小試管中並置入磁珠跟 buffer (RIPA:25xpro inhibitor = 24:1)。再放入均質機 (轉速 4500 rpm) 15 秒，後放入冰中 1 分鐘，重複 3 次。以 13.3 rpm 之轉速離心 10 分鐘後，以微量滴管吸取清澈溶液，重複 2 次。
3. 測定蛋白質濃度：配製 1x 考馬斯亮藍 G-250 溶液。並將上述組織溶液以適當比例稀釋後，與牛血清白蛋白 (BSA) 標準蛋白濃度液一併放入 96 孔微量滴定盤中。使用生物功能微量盤分析儀之分光光度計功能 (595 nm)，測定各孔溶液吸光度，以牛血清白蛋白 (BSA) 標準蛋白濃度液繪製標準濃度回歸線，推算蛋白質濃度。
4. 統一蛋白質濃度：以 6x dye 和 ddH₂O 稀釋組織原液，將組織原液稀釋成固定濃度。
5. 電泳：將配好的膠放入電泳槽中，加入 running buffer 後，以微量滴管將統一蛋白質濃度後的樣本滴入膠孔中，通電開始電泳 (先 80 V 30 分鐘，再 120 V 90 分鐘)。

(二) 流程

1. 轉漬 (transfer)：PVDF membrane 在甲醇活化 1 分鐘，ddH₂O 裡雙面洗乾淨後，和三明治板及黑紗布一併置於 transfer buffer 中，開始鋪層，順序由正極開始為黑紗→濾紙→membrane→膠→濾紙→黑紗。接著扣起放入電泳槽中，槽內加入 ice bank 及攪拌子 (轉速=5)，通電開始電泳 (100 V 60 分鐘)。
2. 封閉 (blocking)：先用奶粉為溶質，0.05 % PBST 當溶劑，配製成 blocking solution，將其和轉漬好的 PVDF membrane 一同放入小盒子中以 50 rpm 震盪一小時。

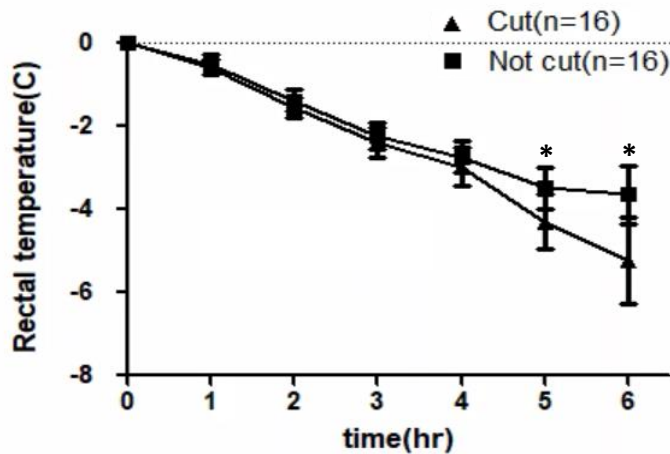
3. 一級抗體反應 (primary antibody incubation) : blocking 結束後，配製初級抗體 (用 0.05% PBST 配製)，PVDF mambrane 包膜 (三口封住) 用 tip 注入一抗後封口，放入 4°C 冰箱中的水平振盪器反應 16 小時。
4. 二級抗體反應 (secondary antibody incubation) : 先以 PBST 洗三次 PVDF mambrane，並配製二抗，將兩者一併放入小盒中，置於水平振盪器反應 1 小時。
5. 利用冷光顯影機紀錄結果。

陸、研究結果

一、BAT 周圍神經對小鼠代謝表現型的影響

1. 低溫試驗 (cold test)

經過三個禮拜的休養，我們將手術 (神經切斷) 後的小鼠進行低溫試驗 (cold test)，觀察其體溫變化如圖 (七) 所示，從圖可看出失去棕色脂肪組織 (BAT) 之周圍神經的小鼠，其在低溫環境下體溫下降幅度較一般小鼠大，可支持該神經叢為 BAT 支配神經的假設。

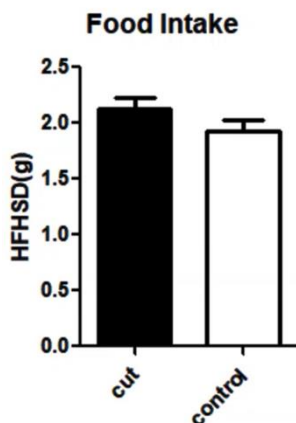


圖(七) 低溫試驗結果

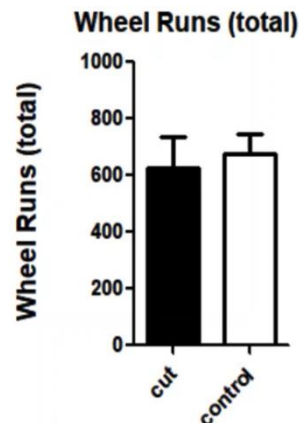
從低溫試驗的結果可知切斷神經的小鼠相較於正常小鼠，在面對低溫的刺激時，體溫的流失十分迅速，由此推知切斷棕色脂肪組織周圍神經會降低小鼠棕色脂肪組織在低溫環境下的產熱功能。

2. 間接熱量測量 (indirect calorimetry)

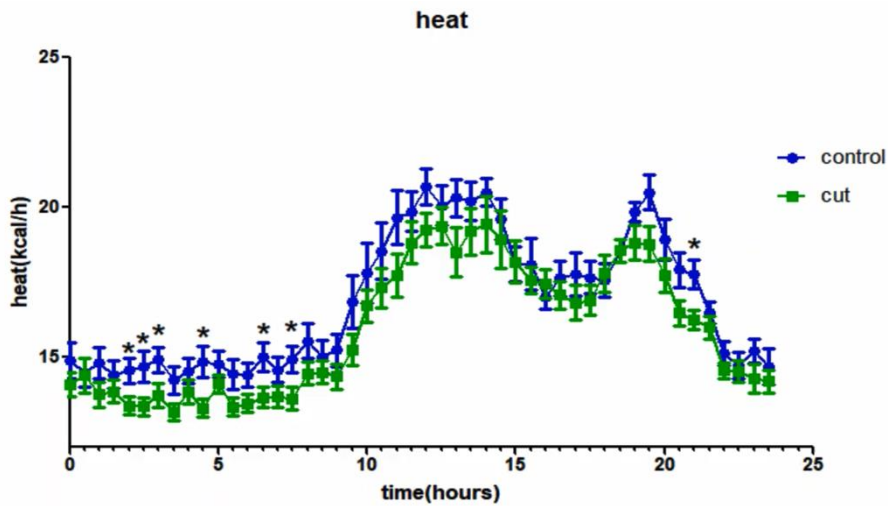
低溫試驗後，我們將小鼠分為已切斷及未切斷兩組，進行間接熱量測量，測量小鼠整體產熱，觀察得以下結果，如下圖 (八)、圖 (九)、圖 (十) 所示。



圖(八) 進食量



圖(九) 運動量

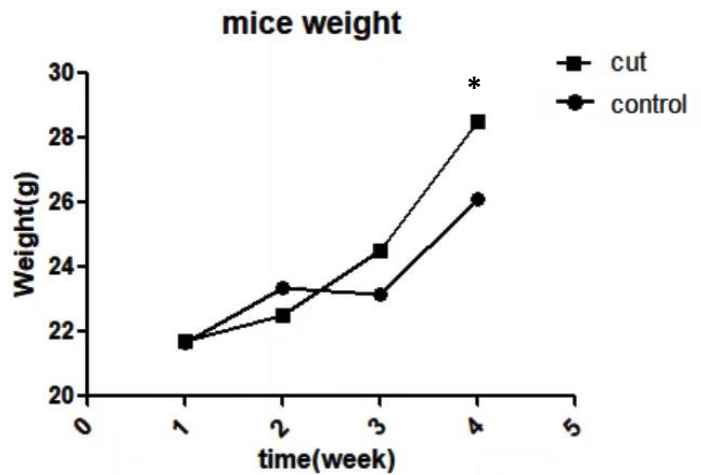


圖(十) 產熱量

透過間接熱量測量，我們得知切斷棕色脂肪組織 (BAT) 周圍神經之小鼠，在進食量 (圖八)、運動量 (圖九) 差距不大時，產熱量較控制組小鼠低 (圖十)，由此可重複驗證我們對於切斷棕色脂肪組織周圍神經會降低代謝速率，進而降低產熱的效果之推測，最終達到增加體重的效果。

3. 體重追蹤

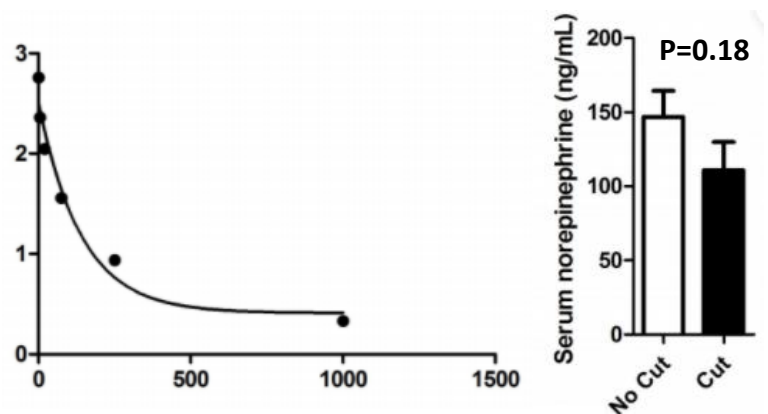
在切斷神經後，我們對於兩組小鼠進行術後體重追蹤，如圖 (十一) 所示。可看出將神經全數切斷的小鼠體重及體重上升幅度皆較大，而控制組小鼠的體重及體重上升幅度則較小。



圖(十一) 術後體重追蹤

二、BAT 神經對血清正腎上腺素之影響

利用酵素結合免疫法分析血清中正腎上腺素濃度的實驗結果如圖 (十二) 所示。左圖為此實驗之濃度標準曲線，而右圖則顯示切斷 BAT 旁神經小鼠血清中正腎上腺素濃度較控制組小鼠有比較低的趨勢，也代表切斷 BAT 旁神經後小鼠全身交

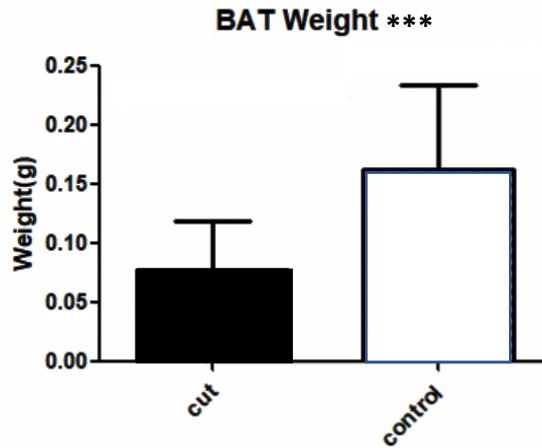


圖(十二) ELISA norepinephrine

三、BAT 周圍神經對小鼠 BAT 及相關組織型態與產熱功能之影響

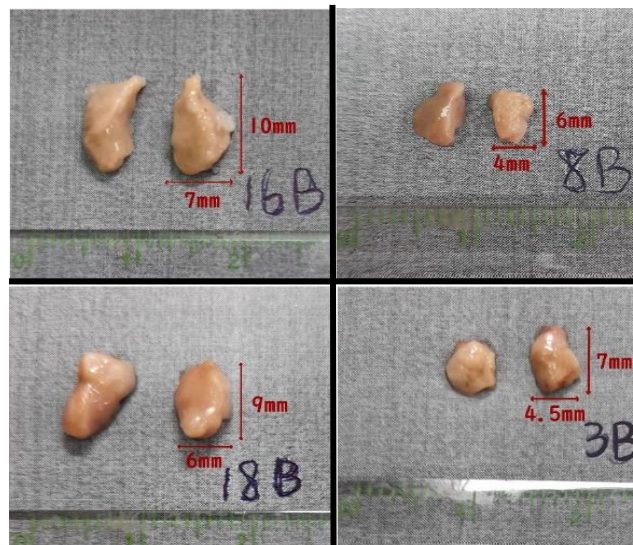
1.組織觀察

我們將小鼠 BAT 取出秤重並拍照，其結果如圖 (十三) 所示，由圖中可看出，經切斷神經的小鼠，其 BAT 重量大幅減小。



圖(十三) 小鼠 BAT 重量

從組織觀察的結果圖 (十四) 可推知切斷棕色脂肪組織周圍神經會顯著減少 (p value <0.001) 小鼠的棕色脂肪組織重量。而照片中也顯示經神經切斷的小鼠，其 BAT 較控制組小鼠小。我們推測若小鼠失去該神經，棕色脂肪組織在此情況下將因失去功能而萎縮甚至消失。



控制組

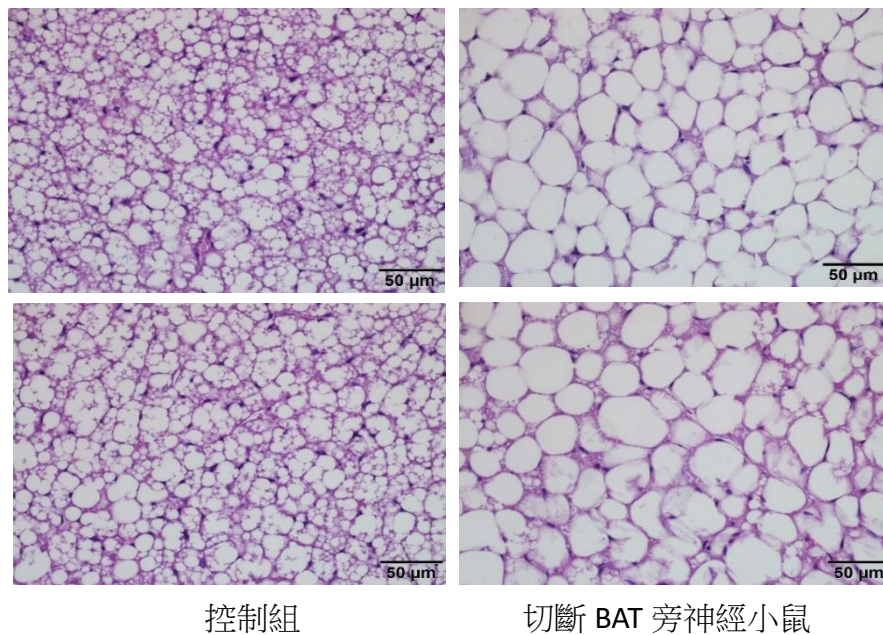
切斷 BAT 旁神經小鼠

圖(十四) 小鼠 BAT 大小比較(控制組和實驗組各呈現兩個代表性樣本的結果)

2.組織切片

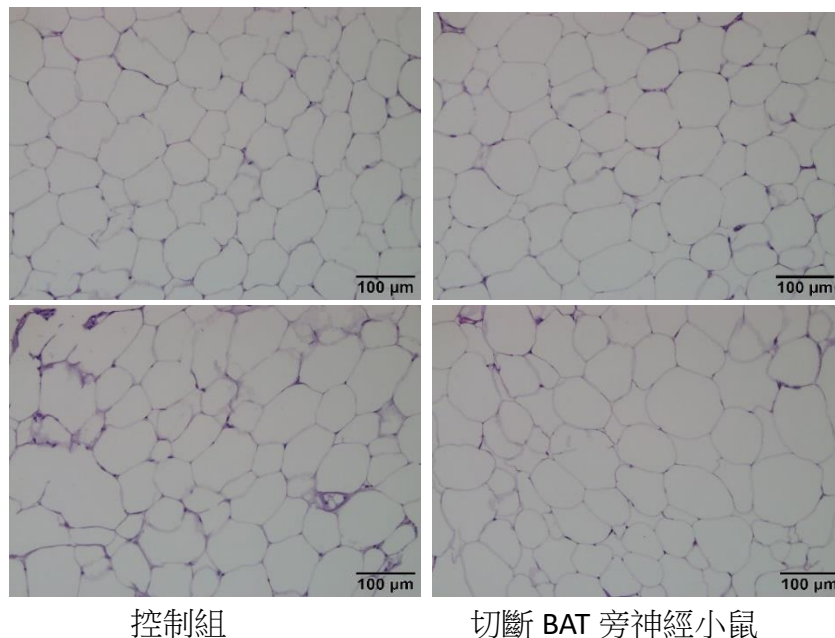
在秤重及照相完成之後，我們將 BAT 及相關組織 (腹股溝脂肪、性腺脂肪) 進行切片，在顯微鏡下觀察組織內細胞的情形。

在 BAT 組織切片中，我們看到結果如下圖 (十五) 所示。可以清楚的發現實驗組小鼠 BAT 的細胞型態較接近白色脂肪組織，推測實驗組小鼠的 BAT 因為已轉換成白色脂肪組織，失去產熱功能，所以功能不及實驗組小鼠。



圖(十五) 小鼠 BAT 組織 H&E 染色切片(400X) (控制組和實驗組各呈現兩個代表性樣本的結果)

如下圖 (十六) 、 (十七) 所示，在腹股溝脂肪、性腺脂肪組織切片中，我們的觀察重點為比較兩組小鼠白色脂肪細胞的大小，可以發現實驗組小鼠的白色脂肪細胞較控制組小鼠大，可驗證實驗組小鼠體重過重可能是因脂質堆積較多所導致。

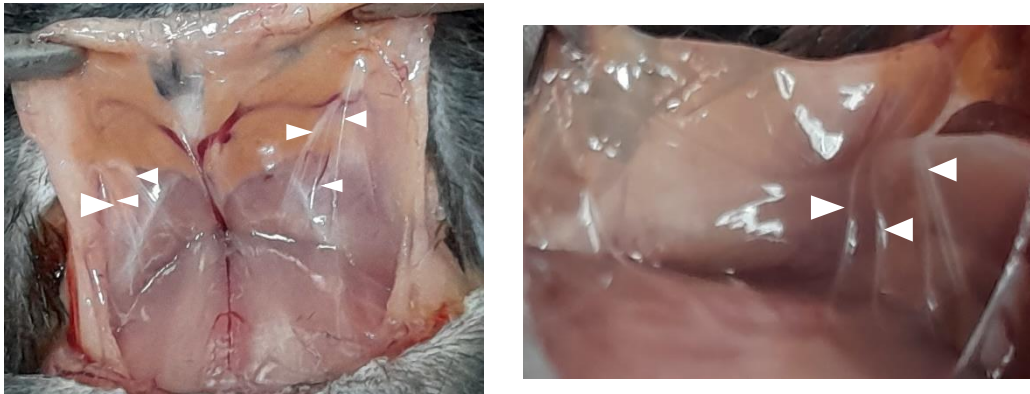


圖(十六) 小鼠腹股溝脂肪組織 H&E 染色切片(200X)
(控制組和實驗組各呈現兩個代表性樣本的結果)

四、探討 BAT 周圍神經對小鼠 BAT 作用機制

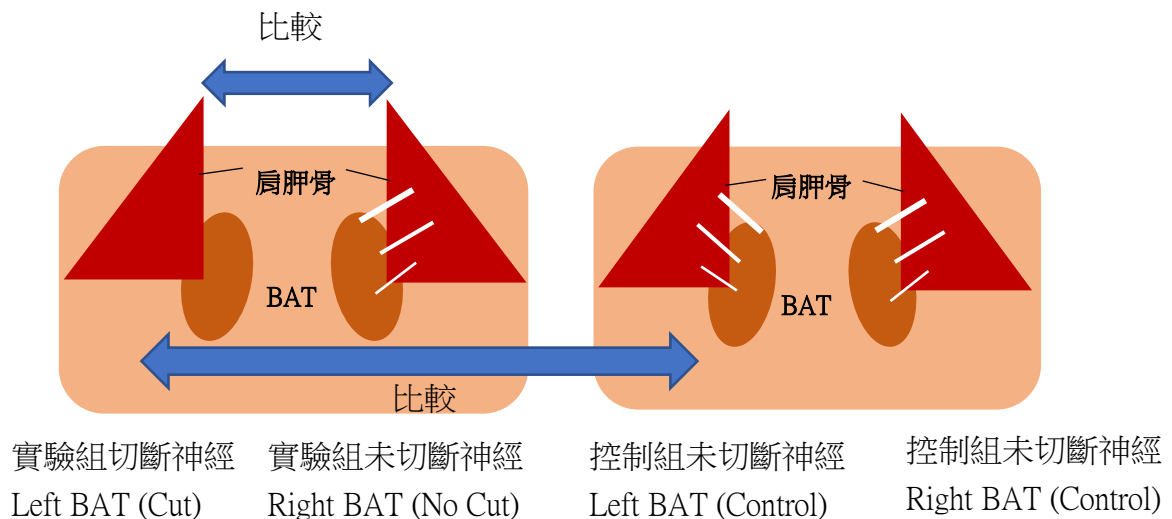
如下圖 (十九) 所示，小鼠 BAT 支配神經直接進入 BAT 中，因此我們推論此神經的作用機制應為直接控制 BAT，而不是間接影響 BAT。

然而，僅有圖片的說明可能略顯不足，因此我們設計了僅切斷單邊 BAT 神經的實驗，若為直接調控，則應該只有單邊的 BAT 萎縮；若為間接控制，則兩邊的 BAT 都應部分萎縮。



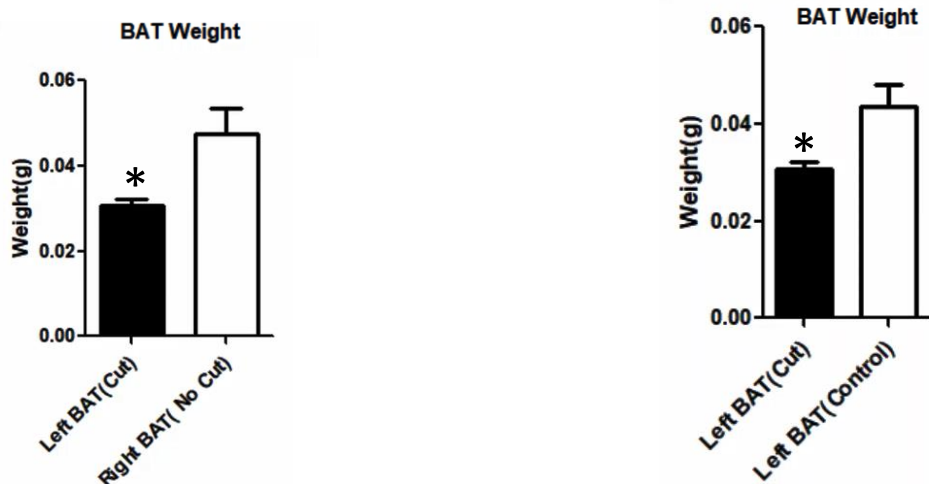
圖(十九) 小鼠 BAT 周圍神經分布(三角形指出三條神經束)

有關於切斷單邊神經的實驗設計，如圖 (二十) 所示，我們將切斷神經的小鼠同一隻有切斷神經和沒切斷神經的 BAT 重量進行比較，也比較切斷單邊神經小鼠與假手術的控制組小鼠同側 BAT 重量。

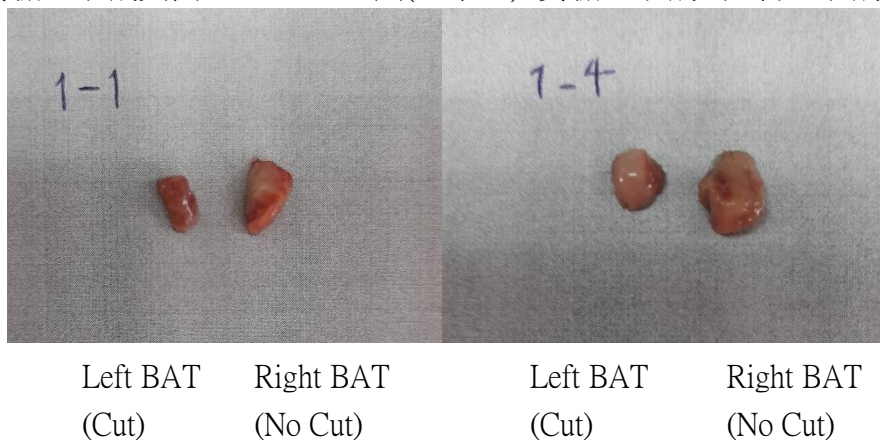


圖(二十) 切斷單邊神經的實驗設計示意圖

切斷單邊 BAT 神經實驗結果如圖 (二十一)、(二十二)、(二十三) 所示。從圖 (二十一) 中，我們可以看出實驗組小鼠在切斷左側 BAT 神經右側不處理的情況下，左側 BAT (Left BAT (Cut)) 明顯萎縮，和右側的 BAT 重量 (Right BAT (No Cut)) 達到了顯著差異。圖 (二十二) 中，我們可以看出實驗組小鼠左側 BAT (Left BAT (Cut)) 和控制組小鼠的左側 BAT (Left BAT (Control)) 組織重量也有明顯的差異。說明小鼠切斷單邊 BAT 神經後，和另一側未切斷神經及假手術的個體同側，相比起來組織萎縮。圖 (二十三) 的組織觀察中，也能看出左側(Left BAT (Cut)) BAT 大小明顯不及右側(Right BAT (No Cut))。



圖(二十一) 實驗組小鼠異側 BAT 重量 圖(二十二) 實驗組小鼠&控制組小鼠同側 BAT 重量



圖(二十三) 實驗組小鼠異側 BAT 大小比較

綜合以上實驗結果，我們推斷至少大部份神經對於 BAT 的影響是直接的。

柒、結論

依據上述研究結果，我們歸納出以下八點結論：

一、從低溫試驗結果可知，切斷 BAT 周圍的神經會使得 BAT 在低溫環境下的產熱功能減少或完全喪失，因此推測該神經束應與 BAT 具有關聯性。

二、由間接熱量測量的結果可知，控制組小鼠的整體代謝狀況較實驗組小鼠旺盛，推測其 BAT 失去功能後，使整體的代謝狀況降低。

三、在進行小鼠術後體重追蹤期間，可明顯看出進行神經切斷的實驗組小鼠，其體重及體重上升程度皆較控制組小鼠大，推測切斷神經後使 BAT 失去或降低其產熱功能，當產熱作用減少，代表能量消耗量也會減少，而使切斷神經之小鼠體重增加。

四、測定血清中正腎上腺素濃度的實驗結果，實驗組小鼠血清中正腎上腺素濃度較控制組小鼠有較低的趨勢，也代表切斷 BAT 旁神經小鼠全身交感神經興奮程度較低。

五、從組織觀察的結果中，我們看到了 BAT 的大小和重量，在實驗組小鼠和控制組小鼠之間有著十分明顯的差異，這很有可能是因為切斷神經後，造成 BAT 萎縮或不再成長。

六、而在組織切片的觀察中，我們也發現了實驗組小鼠和控制組小鼠的 BAT 在細胞型態層面有相當的差異。實驗組小鼠 BAT 的細胞型態較接近白色脂肪組織，白色脂肪細胞也較控制組小鼠大，可驗證實驗組小鼠體重較重。

七、UCP-1 蛋白的西方墨點法結果，實驗組小鼠和控制組小鼠有明顯的差異，可佐證切斷神經後的 BAT 功能確實受到影響。

八、根據切斷單邊神經實驗結果，實驗組小鼠在切斷神經測的 BAT 明顯萎縮，至少大部分神經對於 BAT 的影響是直接的。

總結來說，切斷 BAT 周圍神經束，確實會減少 BAT 的功能，造成實驗組小鼠體重上升幅度較控制組小鼠大，此結果或許能對臨床癌症惡病質治療病患 BAT 過度活躍有正面的影響。

捌、討論及應用

棕色脂肪組織的功能是將食物中的能量轉化為熱量。在生理上，產生的熱量和由此導致的代謝效率的降低都是重要的。棕色脂肪組織對於典型的非顫抖性熱生成是必不可少的。當組織活躍時，組織中會燃燒大量的脂質和葡萄糖 (Cannon, et al., 2014)。但是若是過度活躍，可能造成不必要的能量消耗，造成體重過輕的情形。

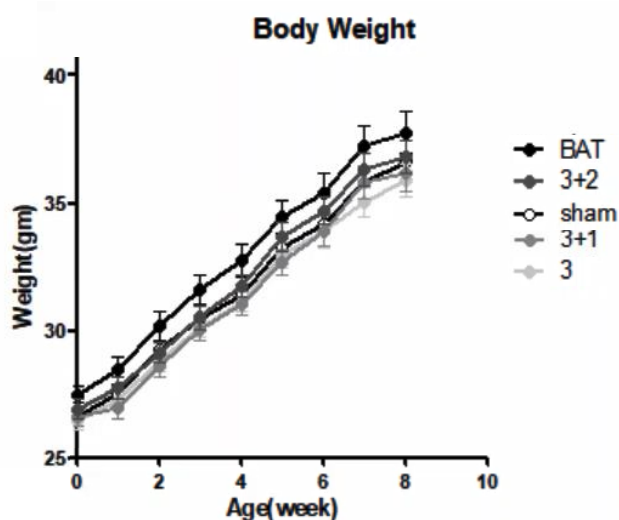
白色脂肪組織的堆積應是間接的，而且並沒有任何證據顯示我們所切斷的神經有支配白色脂肪組織。最主要的原因由於切斷神經造成的 BAT 的產熱功能下降，能量消耗減少，造成全身代謝表現型改變，能量進出不平衡，能量累積增加，最終老鼠體重上升以及白色脂肪組織的脂肪堆積增加，因此在組織切片的圖片中，觀察到白色脂肪組織細胞較大。

本研究最後設計了一個切斷單邊 BAT 交感神經的實驗，用以解答 BAT 作用機制的問題。我們認為若神經直接控制 BAT 則僅會有單邊的 BAT 受到影響；反之若為間接透過其他機制控制，則兩邊的 BAT 都會有部分影響。從最終的實驗結果加上神經直接進入 BAT 中，我們認為至少大部分神經直接控制 BAT。

本研究最大的貢獻在於實驗結果可以治療癌症惡病質症狀的新方法，透過微創手術方式切斷這些 BAT 支配神經，減少 BAT 不斷產熱，有助於改善患者過度消瘦，最終死亡的結果。從我們的實驗結果中，也能清楚看到切斷支配神經後，體重會有有更大的上升幅度。

玖、未來展望

在本研究中，我們進行了各項測試，從巨觀的體重、體溫、代謝，到細胞型態的觀察，以及分子尺度的蛋白質、正腎上腺素定量，皆呈現出小鼠之棕色脂肪組織在失去神經支配後，出現明顯的變化，如：體重上升、體溫下降速度較快、產熱能力下降、BAT 細胞如白色脂肪表現型以及 UCP-1 含量明顯下降。在未來，我們會探究不同條周圍神經對棕色脂肪組織產熱及代謝的影響，前面有提到神經為三條-一條-一條的分布情形，我們目前已著手進行切斷三條(3)、三條+一條(3+1)、三條+一條+一條(3+2)三組實驗，加上控制組(sham)及完全切除 BAT(BAT)兩組，已產出體重追蹤的結果 (圖 (二十四))，跟我們原先研究中的趨勢相符，希望未來能從各方面觀察各神經對小鼠 BAT 的影響。除此之外，也會測定切斷單邊神經的 BAT 的 UCP-1 蛋白含量，幫助我們對 BAT 作用機制有更深入的理解。最後在完整探討 BAT 的作用機制後，將其應用在癌症小鼠的治療上。



圖(二十四) 切斷不同條神經對小鼠體重影響 (右方圖例依照最後一點數據由高至低排序)

壹拾、參考文獻資料

- 一、Braun, K., Oeckl, J., Westermeier, J., Li, Y., & Klingenspor, M. (2018). Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. *The Journal of Experimental Biology*, 221 (Suppl 1), jeb165381. doi:10.1242/jeb.165381
- 二、Ryu, V., Garretson, J. T., Liu, Y., Vaughan, C. H., & Bartness, T. J. (2015). Brown Adipose Tissue Has Sympathetic-Sensory Feedback Circuits. *The Journal of Neuroscience*, 35 (5), 2181. doi:10.1523/JNEUROSCI.3306-14.2015
- 三、Shibata, H., & Nagasaka, T. (1984). Role of sympathetic nervous system in immobilization- and cold-induced brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Jpn J Physiol*, 34 (1), 103-111. doi:10.2170/jjphysiol.34.103

- 四、Fischer, A. W., Schlein, C., Cannon, B., Heeren, J., & Nedergaard, J. (2019). Intact innervation is essential for diet-induced recruitment of brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 316 (3) , E487-E503. doi:10.1152/ajpendo.00443.2018
- 五、Hiroshima, Y., Yamamoto, T., Watanabe, M., Baba, Y., & Shinohara, Y. (2018). Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 15, 36-42. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2018.01.005
- 六、Nedergaard, J. & Cannon, B. (2018). Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector. *Handbook of Clinical Neurology*, 156, 137-152. doi:10.1016/B978-0-444-63912-7.00009-6.
- 七、Saito, M., Matsushita, M., Yoneshiro, T., & Okamatsu-Ogura, Y. (2020). Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. *Frontiers in endocrinology*, 11, 222. doi:10.3389/fendo.2020.00222
- 八、Cannon B, Nedergaard J (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277 – 359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
- 九、Bartness, T., Vaughan, C. & Song, C. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 34, S36 – S42 doi:10.1038/ijo.2010.182
- 十、Virtanen, K., Lidell, M., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, NJ., Enerbäck, S. & Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England Journal of Medicine*, 360, 1518 – 1525. doi:10.1056/NEJMoa0808949
- 十一、Vosselman, M., Lichtenbelt, W. & Schrauwen, P. (2013). Energy dissipation in brown adipose tissue: From mice to men. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379, 43-50, doi:10.1016/j.mce.2013.04.017
- 十二、Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4 (9) , 429 – 434. doi:10.4103/1947-2714.100998
- 十三、Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfne AB, et al. (2009) .Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England Journal of Medicine*,360 (15) :1509 – 17. doi: 10.1056/NEJMoa0810780
- 十四、Biswas, Anup K., Acharyya, Swarnali. (2020). Cancer-Associated Cachexia: A Systemic Consequence of Cancer Progression. *Annual Review of Cancer Biology*, 4 (1) , 391-411., doi: 10.1146/annurev-cancerbio-030419-033642.
- 十五、Shellock, F.G., Riedinger, M.S. & Fishbein, M.C. (1986). Brown adipose tissue in cancer patients: Possible cause of cancer-induced cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 111, 82 – 85., doi: 10.1007/BF00402783