

第十四屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA14-002

作品名稱：探討抗憂鬱症藥物 phenelzine 對於發生
在小鼠巨噬細胞中的細胞凋亡所產生
的保護作用及機制

An insight into the mechanism of the protection against
tumor necrosis factor- α -dependent apoptosis from an
antidepressant phenelzine in mice's macrophages

姓名：陳奕愷

關鍵字：細胞凋亡(apoptosis)

腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α)

抗憂鬱症藥物(antidepressant)

摘要

之前有研究指出，使用一些單胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)的抑制劑如 pargyline 和 clorgyline，皆可以保護 serum starvation 所導致的細胞凋亡，表示 MAO 可能在細胞凋亡的路徑中扮演重要的角色。

本研究著重於一個臨床上被拿來當抗憂鬱症藥物的 MAO 抑制劑苯乙肼(phenelzine, PZE)對於沿著腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)途徑而產生細胞凋亡的小鼠骨髓巨噬細胞(bone marrow-derived macrophages, BMDM)所產生的保護作用。

本研究的結果顯示 PZE 的確可以保護循 TNF- α 途徑死亡的細胞，同時使活性氧化物質(reactive oxygen species, ROS)的量下降。我們推論造成此現象的原因是 PZE 藉由抑制 MAO，使得 ROS 的量下降，進而保護細胞。

Abstract

Researches have pointed out that by using different inhibitors of monoamine oxidase (MAO), such as pargyline and clorgyline (CGE), can protect cells against serum starvation-induced apoptosis, demonstrating that MAO may play an important role in the pathway of apoptosis.

This work focuses on the protection from an antidepressant and also a MAO inhibitor phenelzine (PZE) against tumor necrosis factor alpha (TNF- α)-dependent apoptosis induced by a transforming growth factor beta (TGF- β)-activated kinase 1 (TAK1) inhibitor (TAKI): 5Z-7-Oxozeaenol in mice's bone marrow-derived macrophages (BMDM).

The results of this work show that PZE does have protection against TAKI-induced cell death and that PZE can reduce ROS amount in cells when treated with TAKI. We hypothesize that this phenomenon is caused by the inhibition of MAO from PZE, resulting in the decline of ROS amount, causing the protection against apoptosis.

壹、研究動機

一、研究動機

上生物課時，我們學到了細胞凋亡這種特別的細胞死亡方式，我們對這種細胞有計畫、有程序性的死亡方式感到十分感興趣，而且像是癌症、阿茲海默症、帕金森氏症等疾病也都和細胞凋亡有關，這更加深了我們朝此領域研究的動機。

之後我們看到了一篇有關單胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)的抑制劑可以保護細胞凋亡的論文，這就讓我們想到一種臨床上被拿來當抗憂鬱症的藥物苯乙肼(phenelzine, PZE)，這種藥也是 MAO 的抑制劑，所以我們就想要了解一個抗憂鬱症藥物 PZE 是否能夠保護細胞死亡呢？如果可以，它的機制又是如何？

二、研究背景介紹

(一) 細胞凋亡(apoptosis)

細胞凋亡是一種細胞有程序性、計畫性的死亡，與細胞壞死相比是一種較不傷害個體的死亡方式。細胞凋亡在胚胎生長的過程中扮演著很重要的角色，例如五隻手指的分離。而細胞凋亡時，細胞內發生的現象包括 DNA 碎片化、蛋白質被切斷、形成凋亡小體等。

細胞凋亡的原因有非常多，此實驗以腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)途徑造成細胞凋亡，並研究 PZE 對此種方式造成的細胞凋亡所產生的保護作用及其機制。

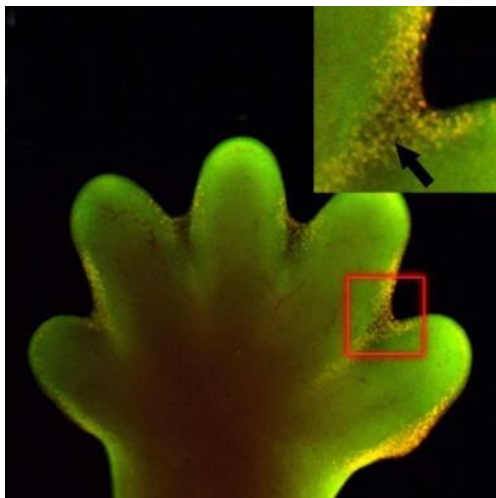


圖1.五隻手指因為細胞凋亡而得以自由活動
(https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Mouse_interdigit_apoptosis_01.jpg)

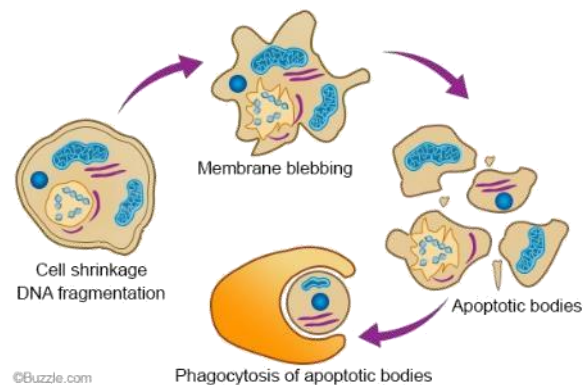


圖2.細胞凋亡中細胞的發生變化及的現象
(<http://www.buzzle.com/images/diagrams/apoptosis-morphological-changes.jpg>)

(二) 腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)

TNF- α 是一種涉及到系統性發炎的細胞因子，也可以導致細胞凋亡。此因子主要由活化的巨噬細胞分泌。有研究指出 TNF- α 的失調可能與癌症、阿茲海默症有關。

(三) 單胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)

MAO 是一種存在於粒線體外膜上催化單胺類物質氧化脫氨反應的酶。MAO 有兩種類型: MAO-A 和 MAO-B。人體內常見的單胺類有: 多巴胺(dopamine)、去甲基腎上腺素(norepinephrine)、腎上腺素(adrenaline)、血清素(serotonin)、褪黑激素(melatonin)等等, 因此 MAO 的抑制劑常常在臨床上被用來當作抗憂鬱症的藥物。而當 MAO 在代謝單胺類時會產出副產物: 過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)。

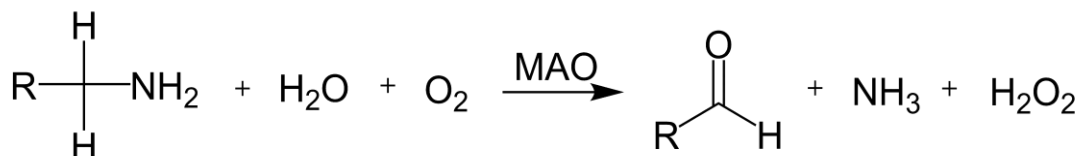


圖 3. MAO 代謝單胺類時的反應
(Edmondson DE 2014)

(四) 苯乙肼(phenelzine, PZE)

PZE 是一種不可逆的 MAO-A 和 MAO-B 的抑制劑。臨床上因為可以抑制 MAO, 防止其氧化多巴胺、血清素等神經衝動傳導物質, 因此常被用來當抗憂鬱症的藥物。

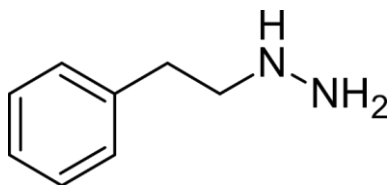


圖 4. PZE 的化學式
(msds)

(五) 活性氧化物質(reactive oxygen species, ROS)

ROS 是生物有氧代謝過程中的一種副產品, 包括氧離子、過氧化物和含氧自由基等。由於這些粒子存在未配對的自由電子, 因而十分活躍。過多的 ROS 會對細胞和基因結構造成損壞, 以及提高細胞的氧化壓力, 進而導致細胞凋亡。

(六) 轉化生長因子- β -活化激酶 1 的抑制劑 5Z-7-Oxozeaenol (Transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1) inhibitor, TAKI)

由圖 5 可以看出 TAK1 是一個保護細胞不會凋亡的蛋白質，它可以使細胞轉錄轉譯出抗氧化酵素，降低粒線體中 ROS 的量使細胞存活。

當我們加入 TAK1 的抑制劑(TAKI)到細胞中，且細胞又有接收到 TNF- α 這個因子時，細胞就會凋亡。此實驗就是利用這個原理讓細胞凋亡，並探討 PZE 對於此種細胞凋亡的保護作用及其機制。

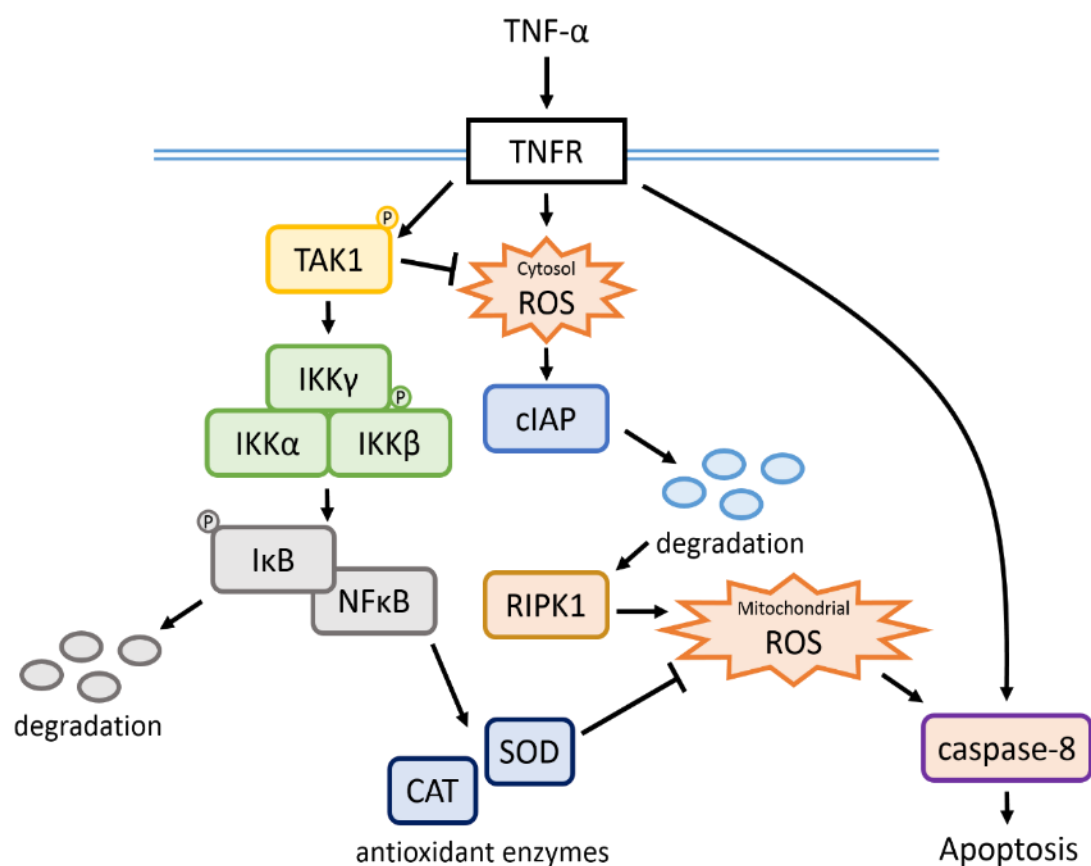


圖 5. TNF- α 途徑所造成的細胞凋亡路徑及參與此路徑的蛋白質

三、假說

由於我們已經知道 ROS 的量越多，細胞的氧化壓力就越大，進而導致細胞凋亡。所以當我們加入 TAKI 時，因為 TAK1 被抑制，造成 ROS 的量上升，導致細胞凋亡。

因 MAO 在代謝單胺類時會產生過氧化氫，而過氧化氫是屬於 ROS 的一種，因此我們猜測：當我們加入 PZE 時，由於 MAO 被抑制，造成 ROS 的量下降。所以當我們同時加入 TAKI 和 PZE 時，TAKI 造成的效果是增加 ROS 的量而 PZE 造成的效果是減少 ROS 的量，兩者的效果一來一往，使得加入 PZE 的細胞相較於沒有加入 PZE 的細胞，細胞死亡的數量較少。

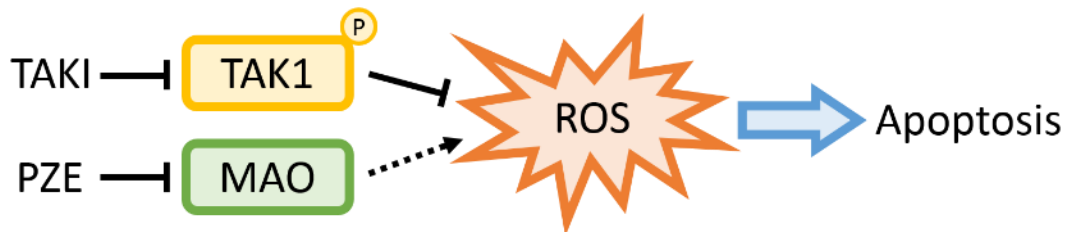


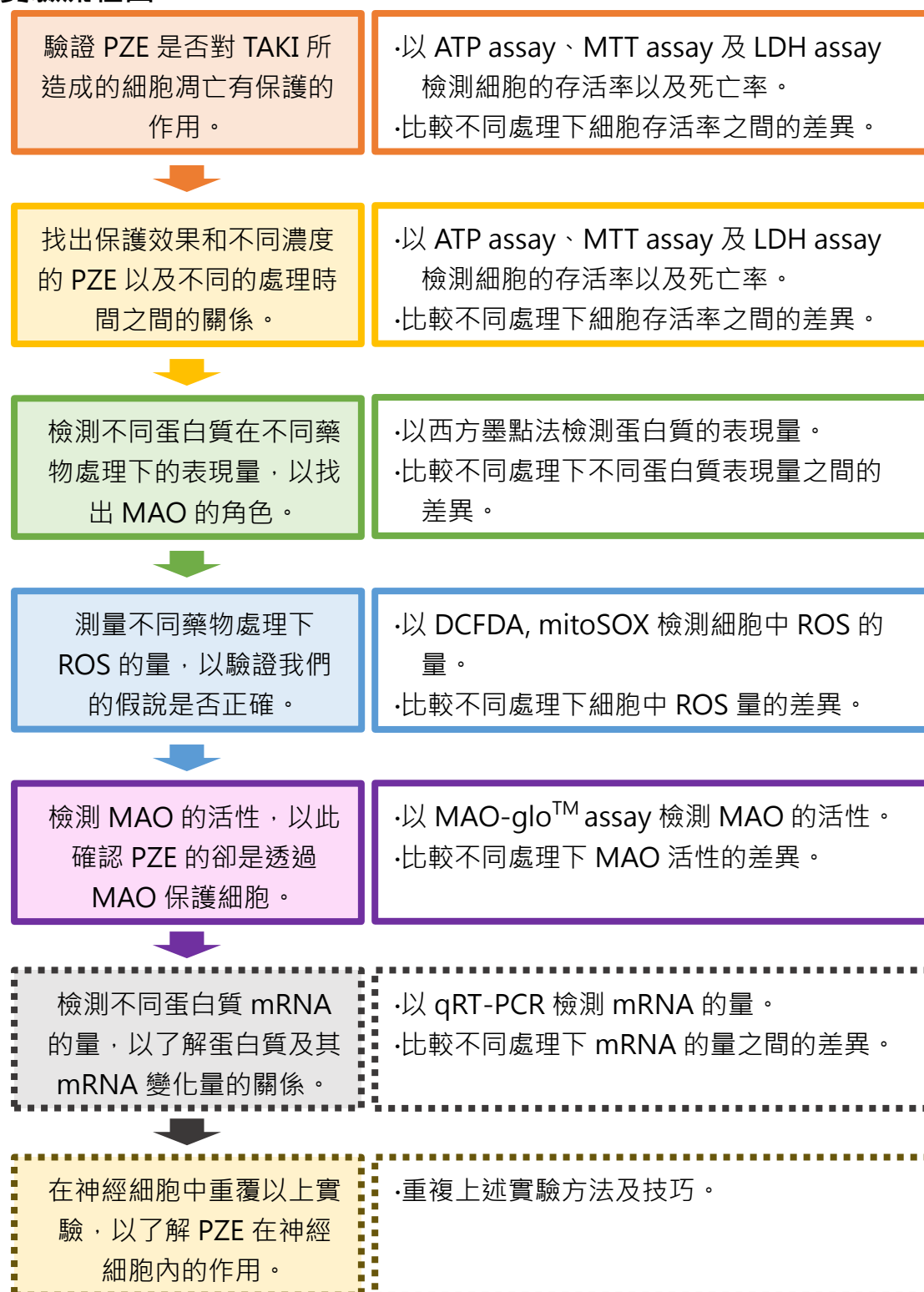
圖 6. 根據我們的假說所繪製出的簡略路徑圖

貳、研究目的

- 一、驗證 PZE 在小鼠的巨噬細胞中是否真的對 TAKI 導致的細胞凋亡有保護作用。
- 二、找出保護作用與 PZE 濃度和處理時間之間的關係。
- 三、找出 PZE 為何可以保護細胞和此現象的訊號傳遞途徑及機制。
- 四、驗證我們的假說：PZE 藉由抑制 MAO 造成 ROS 的量下降，導致細胞受到保護。

參、研究流程及方法

一、實驗流程圖



二、實驗原理

(一) ATP assay

利用活細胞才會製造 ATP 的特點來檢測細胞存活率，ATP 會和 ATP assay solution 反應並發螢光，其發光的原理和螢火蟲是一樣的，因此只要比較螢光值就可以知道細胞的存活率。

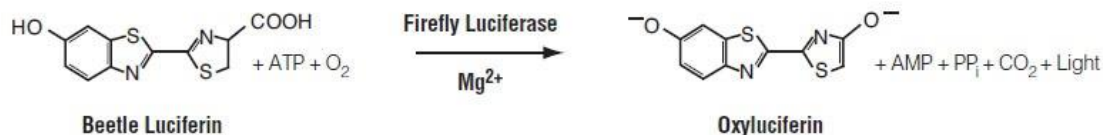


圖 7. ATP assay 的原理

(https://lh4.googleusercontent.com/o35YeL9cleddkGFNS31UxxeHvRKy9s_recQGQXaeWhL7w4QN6xGI0xJbWVqzPHjJhbkIspJ4-0a0C_ORqWwEaWkNqs7c7JcC6cMZEhHZINheSBF-SeM)

(二) MTT assay

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide，為一黃色化學物質)在活的細胞內會在粒線體中被琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogenase, SDH)及細胞色素 C (cytochrome C)還原成甲臍(formazan,為一紫色化學物質)，並結晶沉澱在細胞中，死細胞則不會反應，因此只需要將紫色的 formazan 溶出來並測量吸光值就可以知道細胞的存活率。

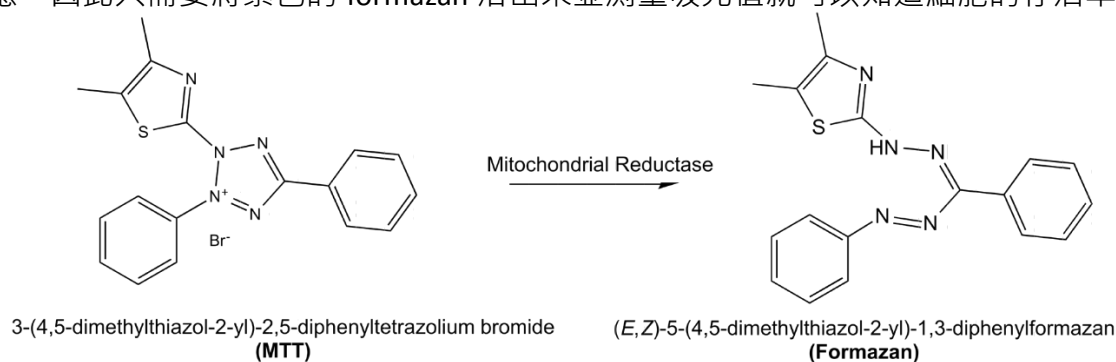


圖 8. MTT assay 的原理

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/MTT_reaction.png)

(三) LDH assay

乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)是大多數細胞中常見的酵素，當細胞膜因細胞死亡而破裂時，LDH 便會跑到 medium 中和 LDH substrate solution 反應並產生紅色的 formazan，因此檢測吸光率即可得知細胞的死亡率。

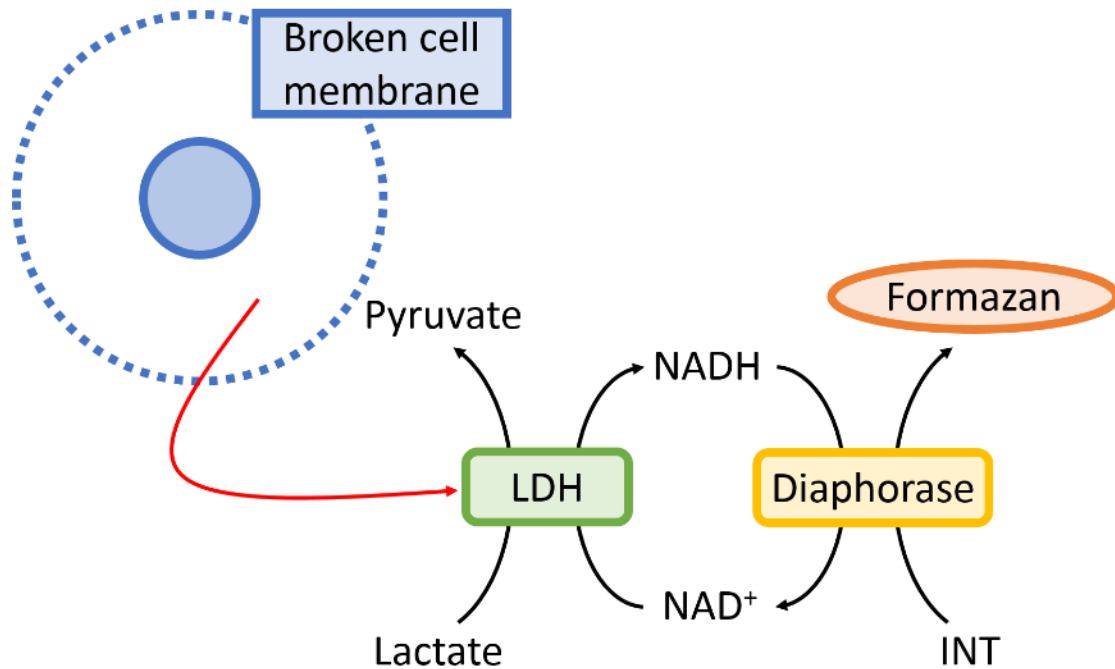


圖9. LDH assay 的原理

(四)西方墨點法

[原理]

利用十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)將被拉成直線的蛋白質胺基酸鏈依分子量大小分開，再以抗體接上目標蛋白質，讓其發光，之後以底片感光顯像以檢測蛋白質的表現量。

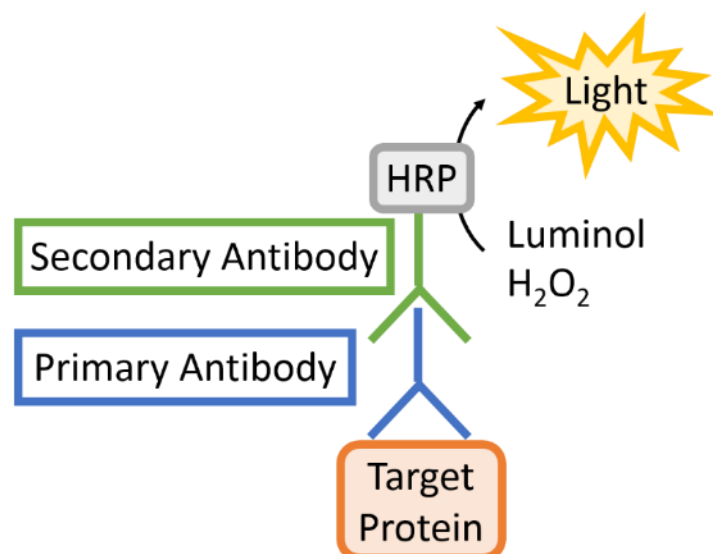


圖10. Western blot 偵測蛋白質量並使其發光的原理

(五) DCFDA

當 DCFDA 進入細胞後，若細胞中有 ROS，會把 DCFDA 氧化成會發出螢光的 DCF，並進入細胞核中與 DNA 結合，所以只要測定螢光的強度，便可以知道細胞質中 ROS 的量。

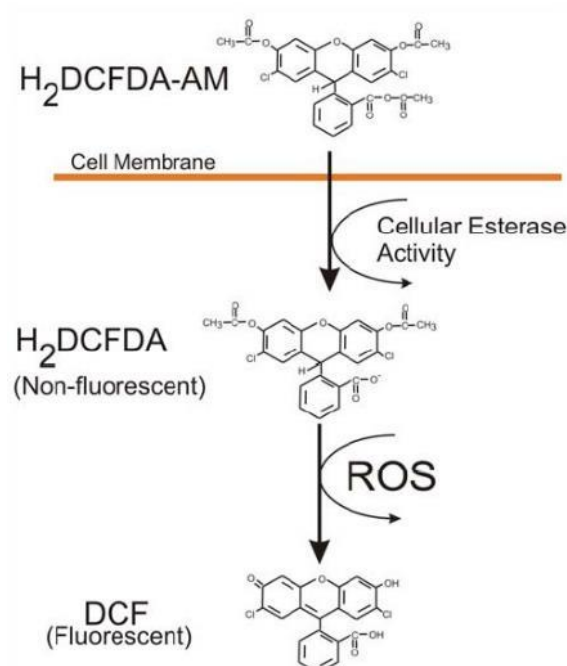


圖 11. DCFDA 偵測 ROS 量的原理

(http://www.biotek.com/assets/tech_resources/202/fig2.jpg)

(六) mitoSOX

mitoSOX™紅色試劑在加入細胞後會被選擇性地導入線粒體，在與粒線體中的 ROS 反應後與粒線體 DNA 結合並發出螢光，所以只要測定螢光的強度，便可以知道細胞質中的 ROS 量。

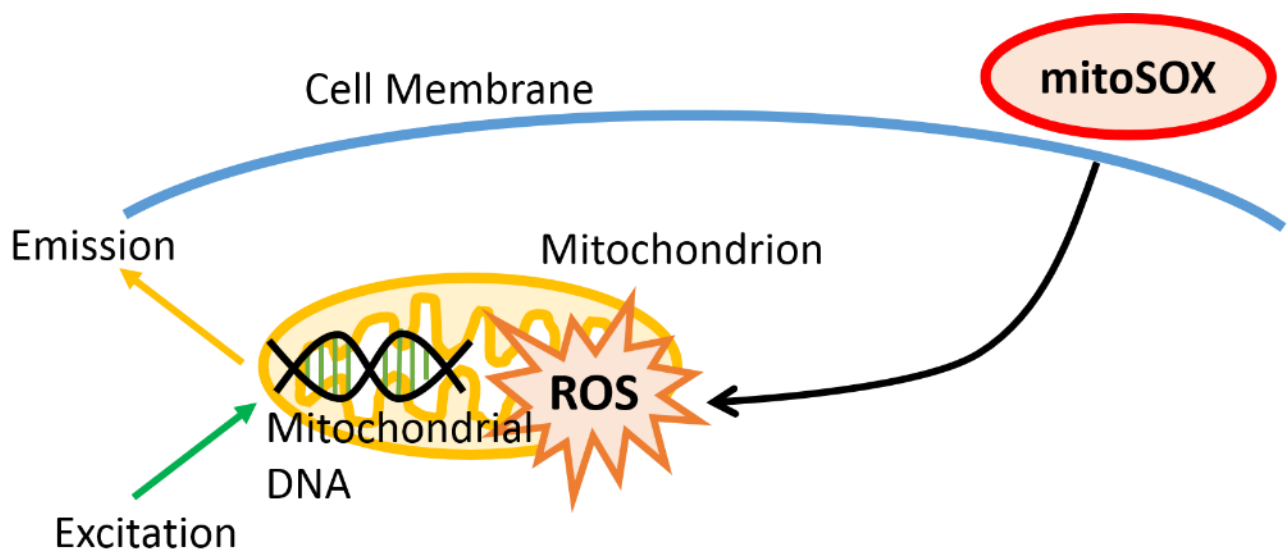


圖 12. mitoSOX 偵測粒線體 ROS 量的原理

(七) MAO-glo assay

加入 MAO 的受質，並使其產生一連串反應後發螢光，所以只要比較螢光值就可以知道 MAO 的活性。

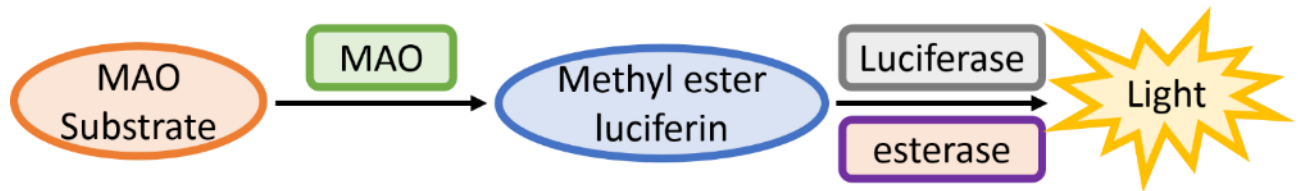


圖 13. MAO-glo 偵測 MAO 活性的原理

(八) qRT-PCR (quantitative reverse transcription PCR)

利用反轉錄酶將 mRNA 反轉錄成 cDNA，再將想要知道相對量的蛋白質的 cDNA 的引子加入，使其產生即時聚合酶連鎖反應，並在每一個 PCR 循環運用螢光染劑偵測產物總量。相較於傳統的終端 PCR 方式，qPCR 的結果可以較快取得且穩定。

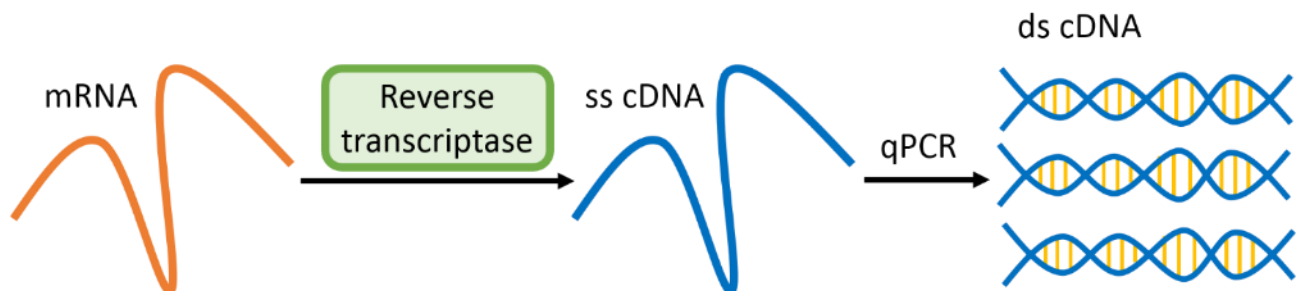


圖 14. qRT-PCR 的原理

肆、實驗結果

實驗一：確認 PZE 是否有保護作用

	DMSO			TAKI (300nM)		
H ₂ O						
DMSO						
PZE (300μM)						
Nec-1 (10μM)						

表 1. 此實驗 96 well plate 的配置

- 每個 well 中都有 2×10^4 個細胞。
- 每一種藥物組合都做三重複。

- TAKI 作用 4 小時。
- H₂O, DMSO, PZE, Nec-1 在加入 TAKI 前 30 分鐘加入。
- H₂O 是 PZE 的溶劑。
- DMSO 是 TAKI, Nec-1 的溶劑。
- Nec-1 是 PZE 的 positive control (一定有保護作用)。

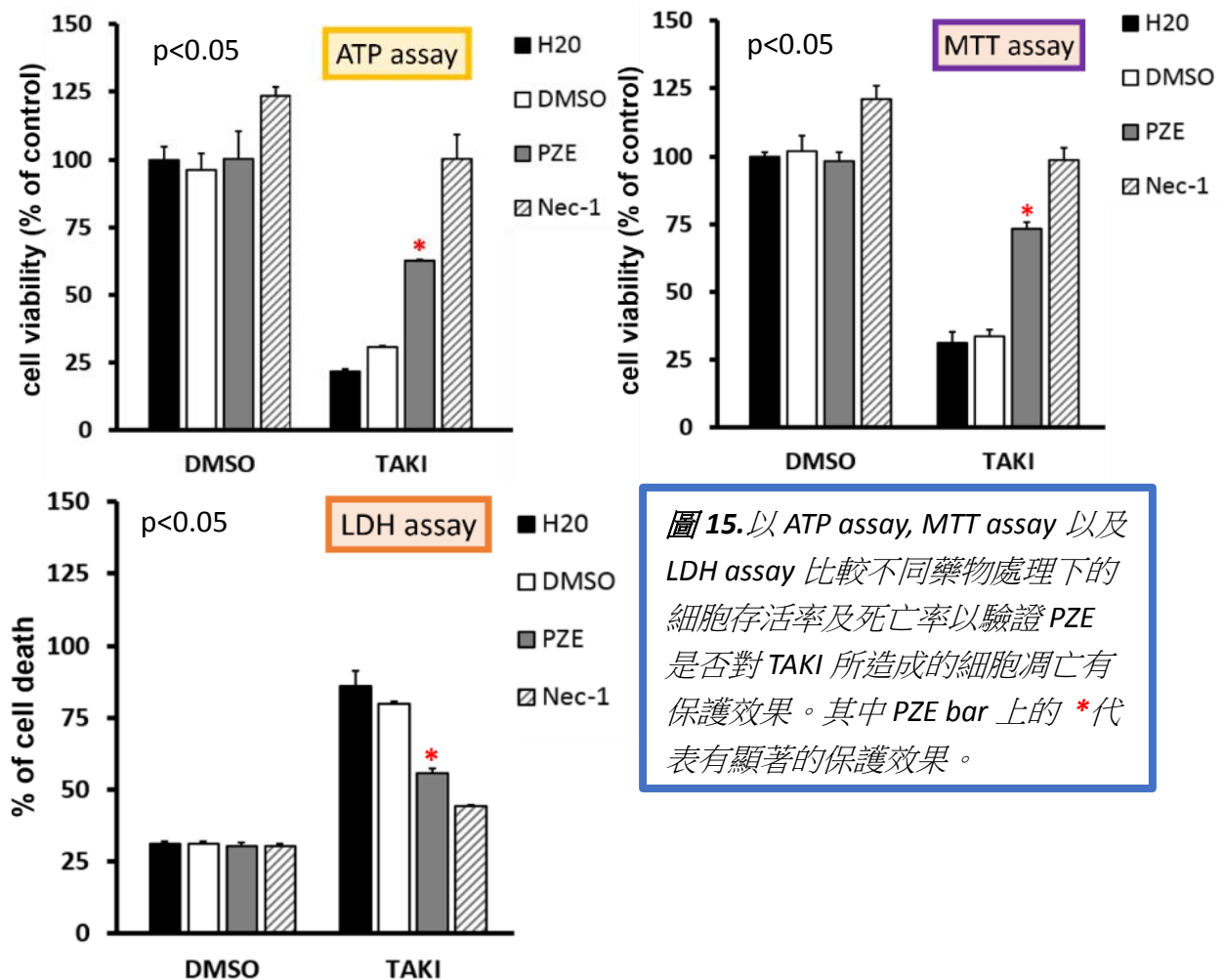


圖 15. 以 ATP assay, MTT assay 以及 LDH assay 比較不同藥物處理下的細胞存活率及死亡率以驗證 PZE 是否對 TAKI 所造成的細胞凋亡有保護效果。其中 PZE bar 上的 * 代表有顯著的保護效果。

實驗二：找出 PZE 濃度和保護作用之間的關係

	DMSO			TAKI (300nM)		
H ₂ O						
PZE (1000μM)						
PZE (300μM)						
PZE (100μM)						
PZE (30μM)						
PZE (10μM)						
PZE (3μM)						
PZE (1μM)						

- TAKI 作用 4 小時。
- H₂O, PZE 在加入 TAKI 前 30 分鐘加入。
- H₂O 是 PZE 的溶劑。
- DMSO 是 TAKI 的溶劑。

表 2. 此實驗 96 well plate 的配置

- 每個 well 中都有 2×10^4 個細胞。
- 每一種藥物組合都做三重複。

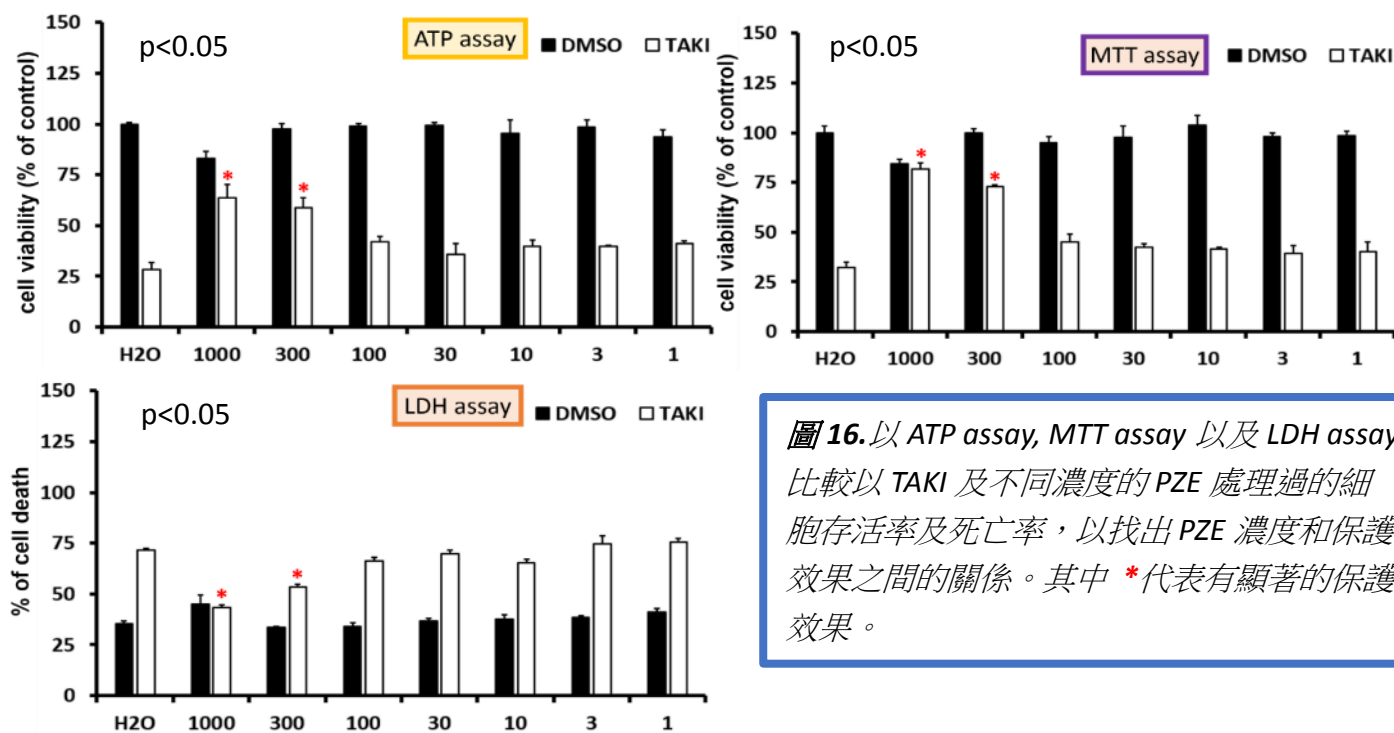


圖 16. 以 ATP assay, MTT assay 以及 LDH assay 比較以 TAKI 及不同濃度的 PZE 處理過的細胞存活率及死亡率，以找出 PZE 濃度和保護效果之間的關係。其中 * 代表有顯著的保護效果。

實驗三：找出 PZE 處理時間和保護作用之間的關係

	DMSO			TAKI (300nM)		
H ₂ O						
PZE (300μM) pretreat 2 hrs.						
pretreat 1 hrs.						
pretreat 0.5 hrs.						
co-treat						
post treat 0.5 hrs.						
post treat 1 hrs.						
post treat 2 hrs.						

- TAKI 作用 4 小時。
- PZE 在加入 TAKI 前/後 2 小時間加入。
- H₂O 是 PZE 的溶劑。
- DMSO 是 TAKI 的溶劑。

表3. 此實驗 96 well plate 的配置

- 每個 well 中都有 2×10^4 個細胞。
- 每一種藥物組合都做三重複。

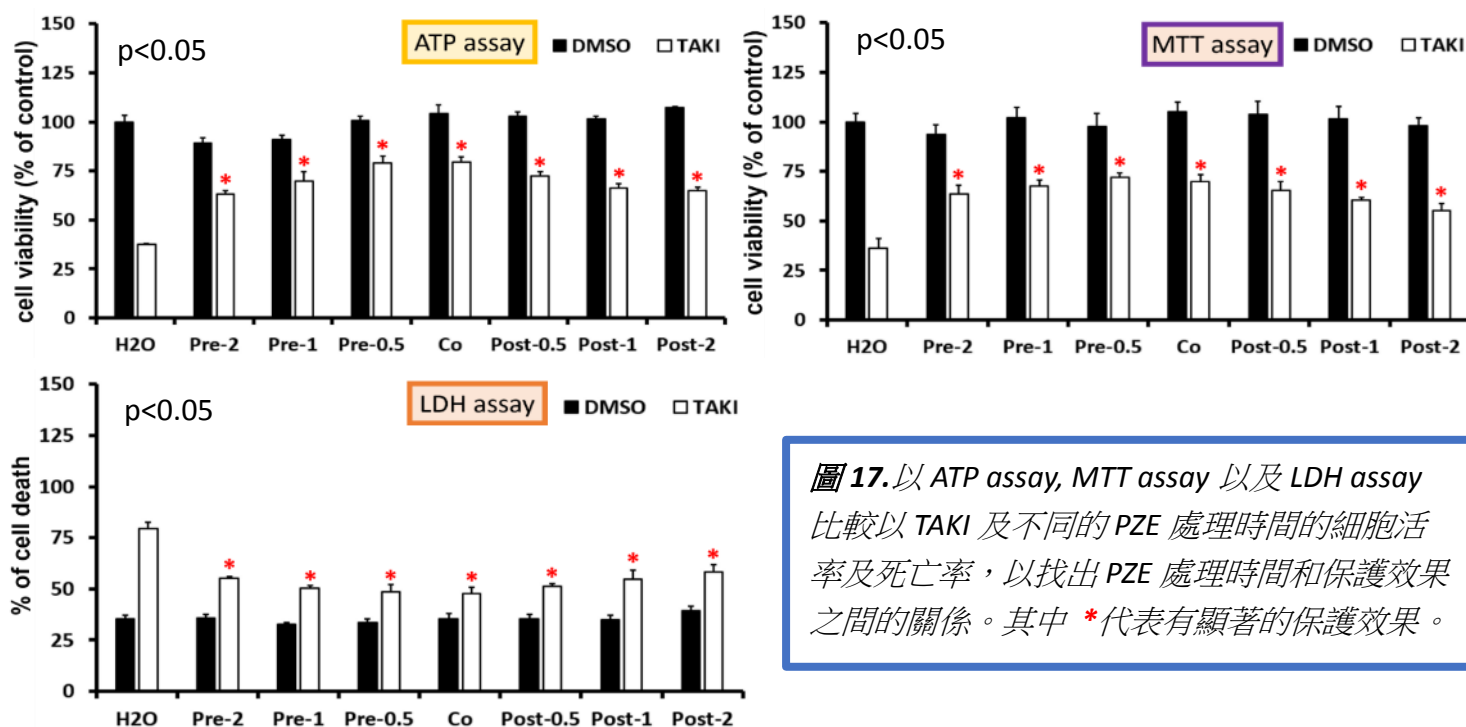


圖17. 以 ATP assay, MTT assay 以及 LDH assay 比較以 TAKI 及不同的 PZE 處理時間的細胞活率及死亡率，以找出 PZE 處理時間和保護效果之間的關係。其中 * 代表有顯著的保護效果。

實驗四：找出不同的 MAO 抑制劑和保護作用之間的關係

	DMSO			TAKI (300nM)		
H ₂ O						
DMSO						
PZE (300μM)						
PH (500μM)						
CGE (20μM)						
PH+CGE						

- TAKI 作用 4 小時。
- H₂O, DMSO, PZE, PH, CGE 在加入 TAKI 前 30 分鐘加入。
- PH 是 MAO-B 的抑制劑。
- CGE 是 MAO-A 的抑制劑。
- H₂O 是 PZE, PH 的溶劑。
- DMSO 是 TAKI, CGE 的溶劑。

表 4. 此實驗 96 well plate 的配置

- 每個 well 中都有 2×10^4 個細胞。
- 每一種藥物組合都做三重複。

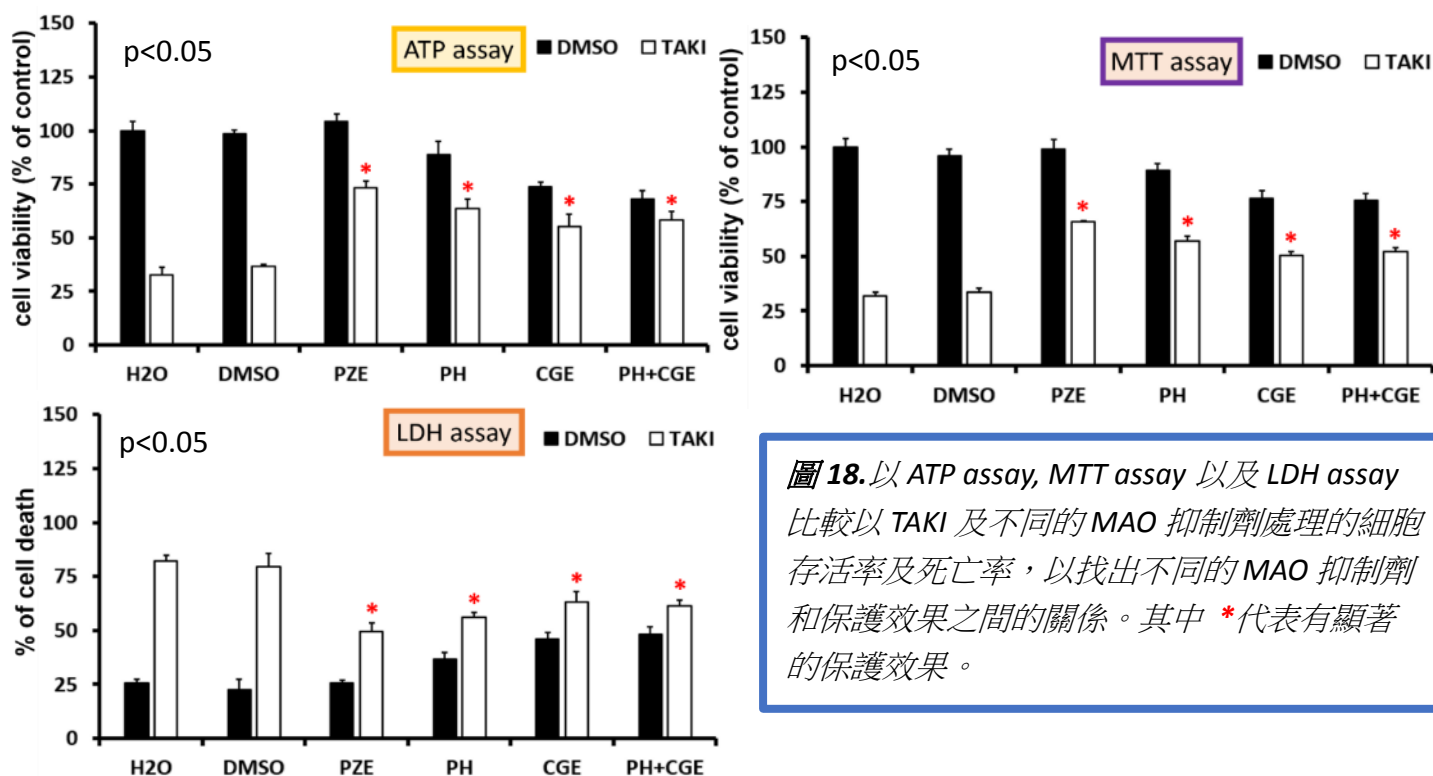


圖 18. 以 ATP assay, MTT assay 以及 LDH assay 比較以 TAKI 及不同的 MAO 抑制劑處理的細胞存活率及死亡率，以找出不同的 MAO 抑制劑和保護效果之間的關係。其中 * 代表有顯著的保護效果。

實驗五：在加入 PZE 和 TAKI 後不同蛋白質的表現量

Control	TAKI (300nM) 2hrs.	PZE (300μM) 2hrs.	TAKI+PZE 2hrs.	TAKI 4hrs.	PZE 4hrs.	TAKI+PZE 4hrs.
---------	--------------------------	-------------------------	-------------------	---------------	-----------	-------------------

表 5. 此次西方墨點法的配置

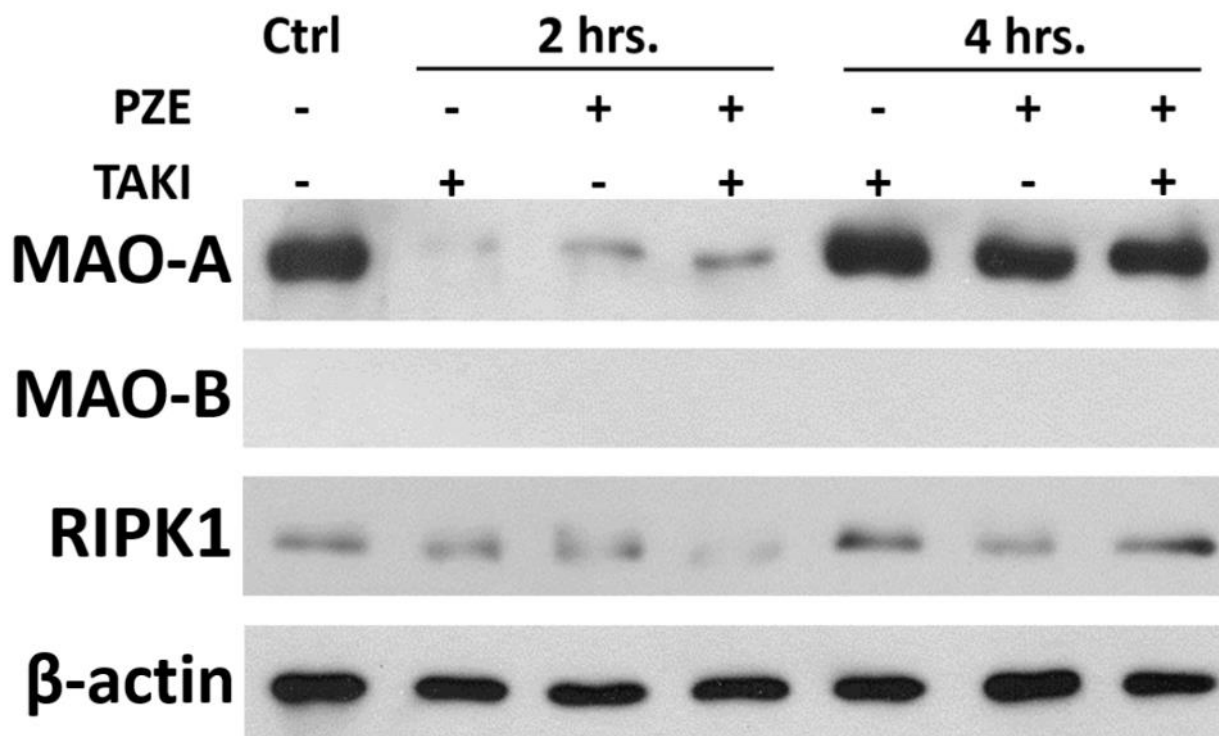


圖 19. 以西方墨點法比較不同蛋白質在 TAKI 及 PZE 的處理下的表現量，以找出 PZE 可能是透過甚麼機制來保護細胞不會死亡。

實驗六：在加入 PZE 和 TAKI 後細胞質和粒線體中 ROS 的量

	DMSO(2 hrs.)			TAKI (300nM, 2 hrs.)			DMSO(4 hrs.)			TAKI (4 hrs.)		
H ₂ O												
PZE(300μM)												

表 6. 此實驗 96 well plate 的配置

- 每個 well 中都有 2×10^4 個細胞。
- 每一種藥物組合都做三重複。

- TAKI 作用 2 或 4 小時。
- H₂O, PZE 在加入 TAKI 前 30 分鐘加入。
- H₂O 是 PZE 的溶劑。
- DMSO 是 TAKI 的溶劑。

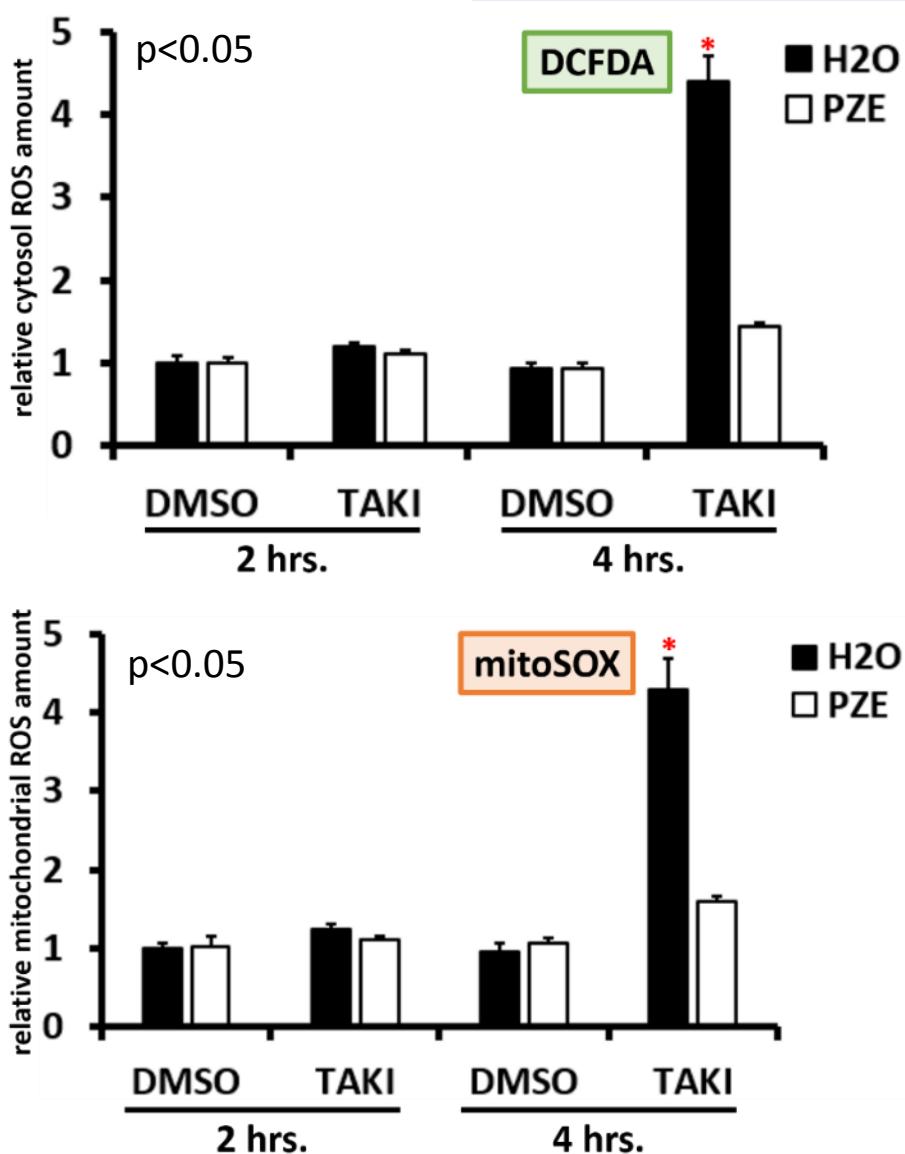


圖 20. 以 DCFDA 和 mitoSOX 檢測細胞在 TAKI 及 PZE 的處理下細胞質和粒線體 ROS 的表現量，以找出 ROS 量和細胞存活率間的關係。

實驗七：在加入 PZE 和 TAKI 後 MAO 的活性

	Ctrl			TAKI (300nM)			PZE (300μM)			TAKI+PZE		
1 hrs.												
3 hrs.												

- 每個 well 中都有 2×10^4 個細胞。
- 每一種藥物組合都做三重複。

- 藥物作用 1 或 3 小時。
- H₂O 是 PZE 的溶劑。
- DMSO 是 TAKI 的溶劑。

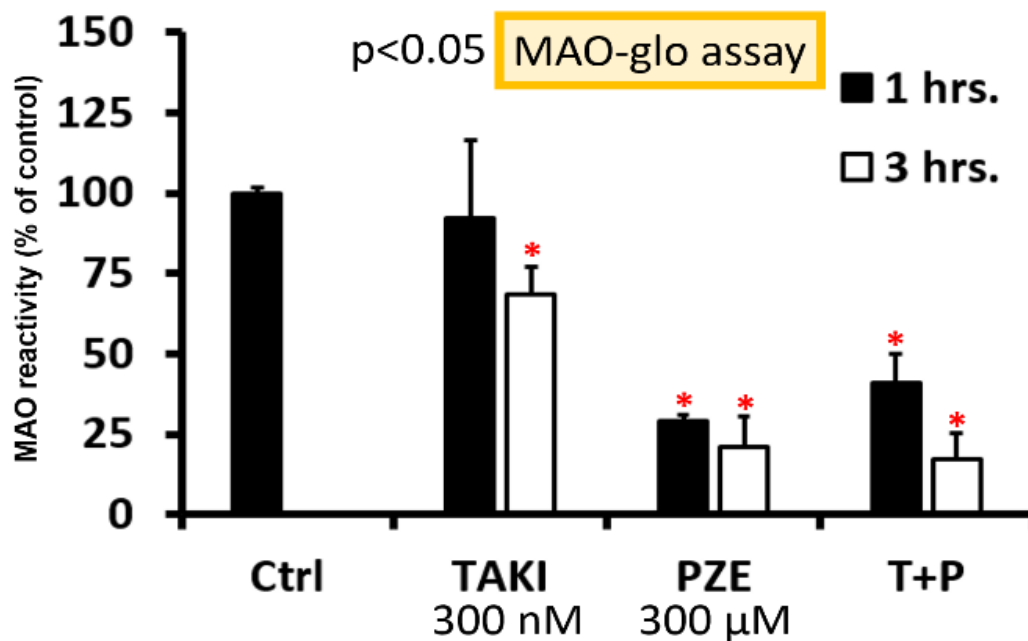


圖 21. 以 MAO-glo assay 檢測 MAO 的活性，以找出 MAO 活性和細胞存活率間的關係。

伍、討論

實驗一：確認 PZE 是否有保護作用

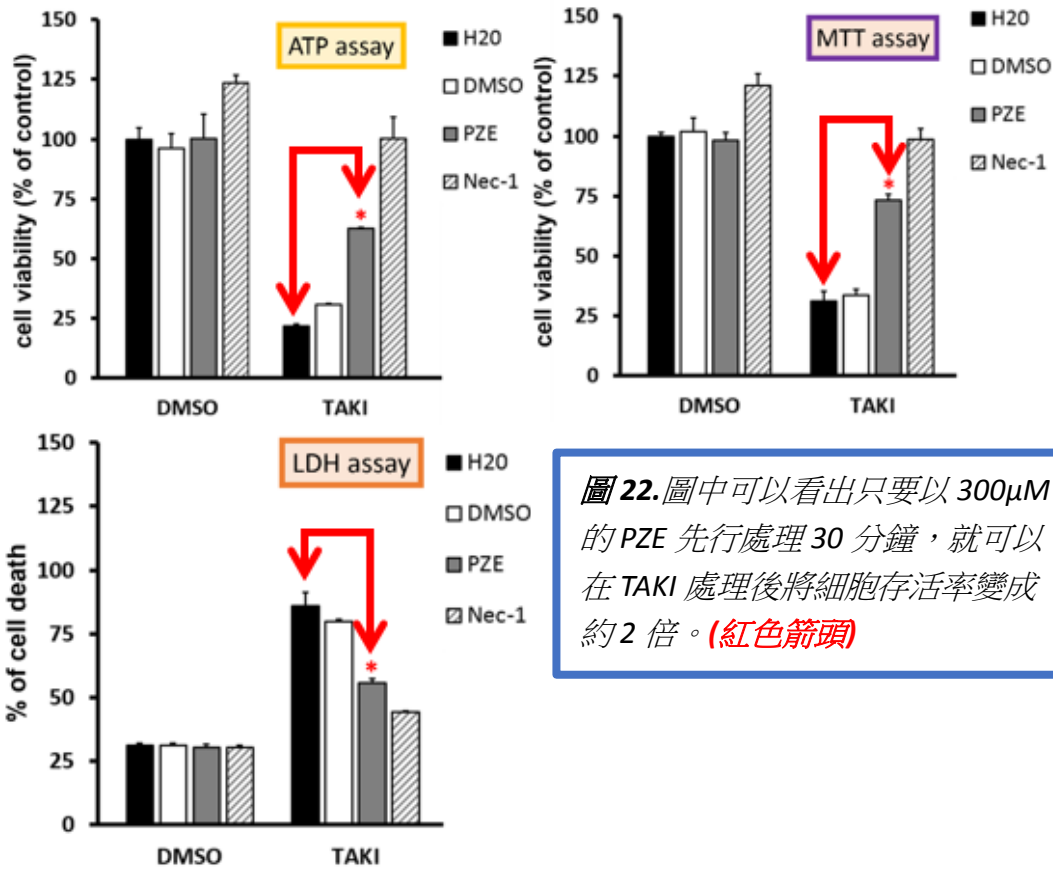


圖 22. 圖中可以看出只要以 300 μ M 的 PZE 先行處理 30 分鐘，就可以在 TAKI 處理後將細胞存活率變成約 2 倍。(紅色箭頭)

實驗二：找出 PZE 濃度和保護作用之間的關係

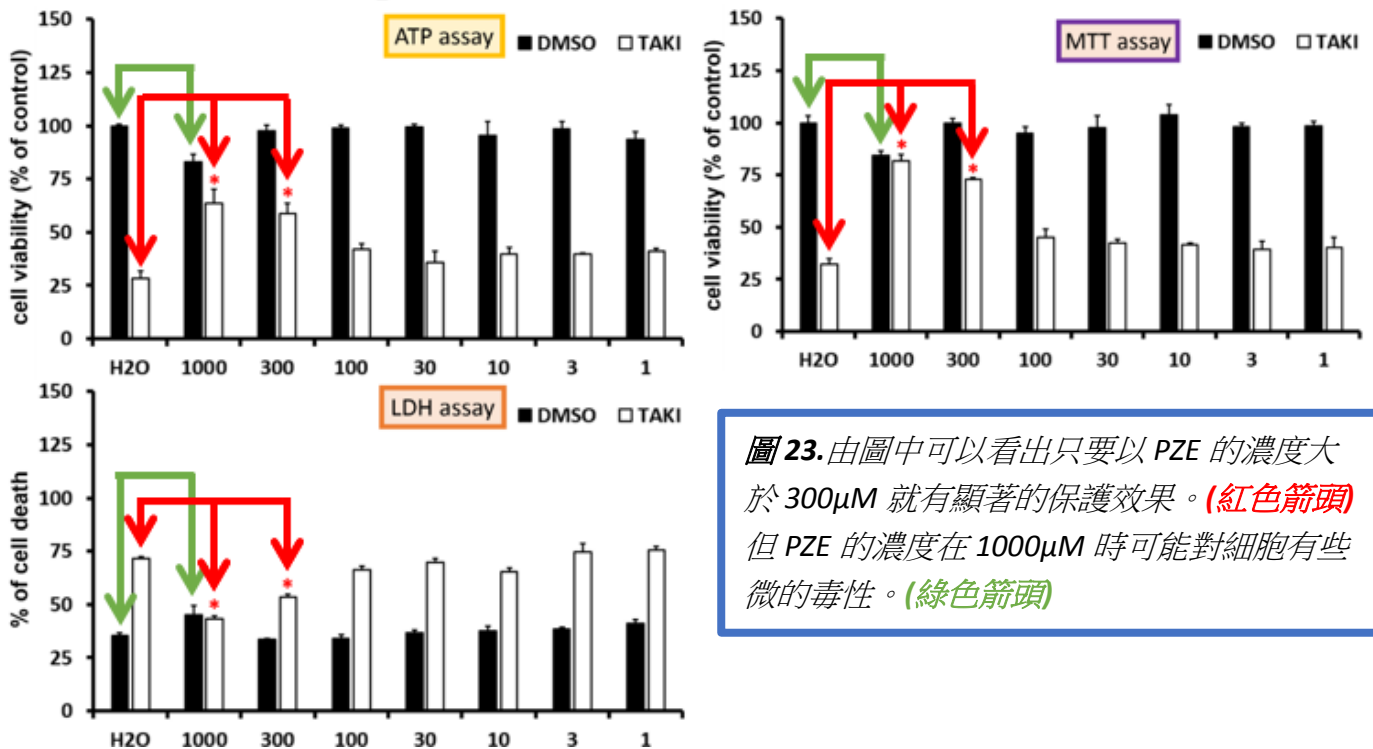


圖 23. 由圖中可以看出只要以 PZE 的濃度大於 300 μ M 就有顯著的保護效果。(紅色箭頭) 但 PZE 的濃度在 1000 μ M 時可能對細胞有些微的毒性。(綠色箭頭)

實驗三：找出 PZE 處理時間和保護作用之間的關係

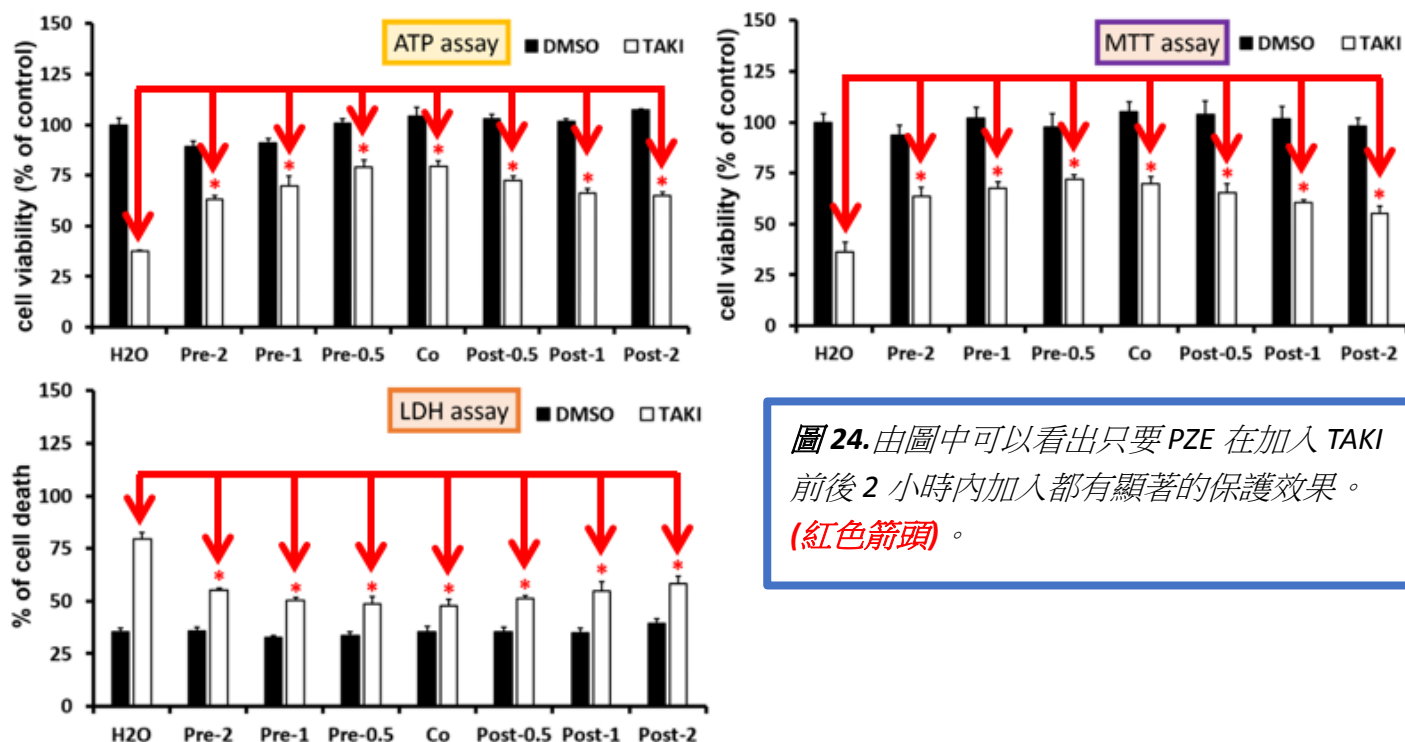


圖 24. 由圖中可以看出只要 PZE 在加入 TAKI 前後 2 小時內加入都有顯著的保護效果。(紅色箭頭)。

實驗四：找出不同的 MAO 抑制劑和保護作用之間的關係

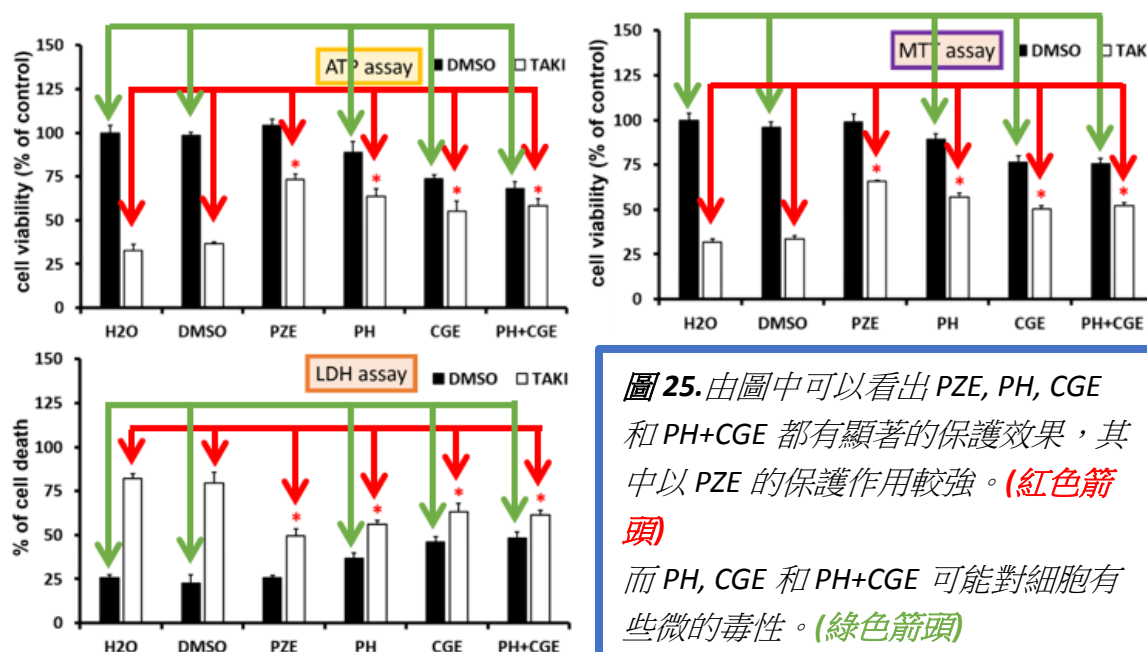


圖 25. 由圖中可以看出 PZE, PH, CGE 和 PH+CGE 都有顯著的保護效果，其中以 PZE 的保護作用較強。(紅色箭頭) 而 PH, CGE 和 PH+CGE 可能對細胞有些微的毒性。(綠色箭頭)

實驗五：在加入 PZE 和 TAKI 後不同蛋白質的表現量

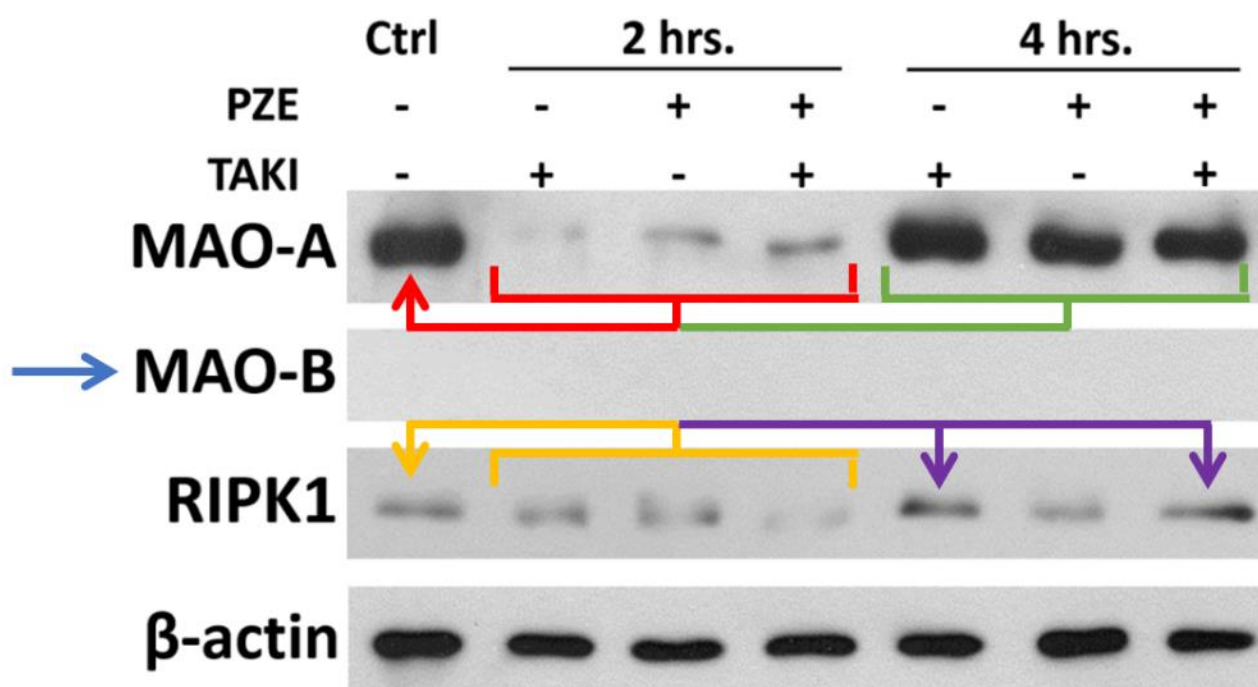


圖 26.由圖中可以看出不管是以 TAKI, PZE 或 TAKI+PZE 處理 2 小時後，MAO-A 的表現量都下降。(紅色箭頭)
但在 4 小時的處理後表現量又回升到與對照組差不多的量。(綠色箭頭)
而 MAO-B 在小鼠的骨髓巨噬細胞中幾乎不表現。(藍色箭頭)
RIPK1 的量在 2 小時的處理後幾乎沒有變化，說明在加入 TAKI 後的 2 小時內大部分細胞都還不會死亡。(橙色箭頭)
而 RIPK1 的量在 4 小時的處理後，只要有加 TAKI 的細胞都有上升，說明了這些細胞正在歷經細胞凋亡的過程。而且 TAKI 及 TAKI+PZE 兩組細胞間的 RIPK1 表現量相差不大，可能代表 PZE 不是透過抑制 RIPK1 的量來保護細胞。(紫色箭頭)

實驗六：在加入 PZE 和 TAKI 後細胞質和粒線體中 ROS 的量

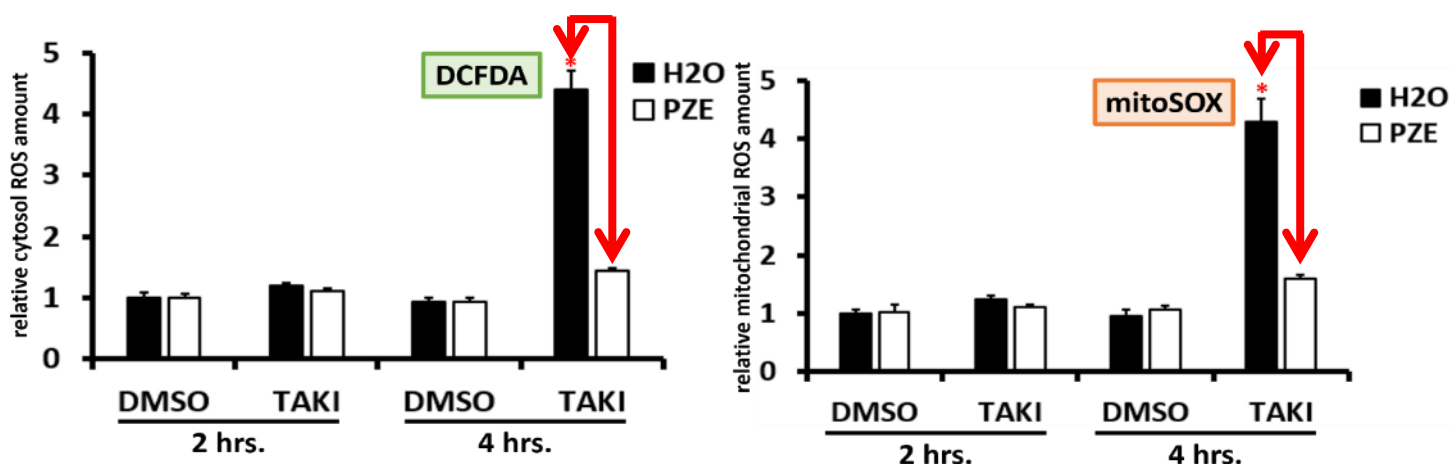


圖 27.由圖中可以看出以 TAKI 處理細胞後 4 小時後，ROS 的量明顯上升，但加入 PZE 後 ROS 的量有顯著的下降。(紅色箭頭)

實驗七：在加入 PZE 和 TAKI 後 MAO 的活性

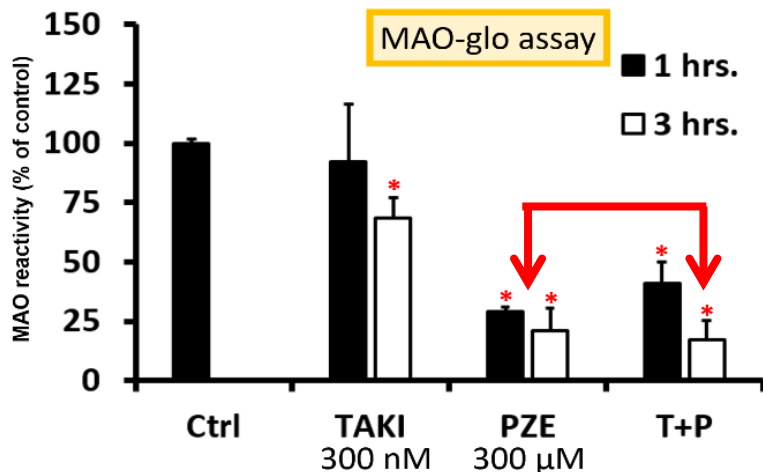


圖 28. 由圖中可以看出 TAKI 並不會影響原本 PZE 抑制 MAO 的功能。(紅色箭頭)

TAKI 在作用 2 小時內使細胞凋亡的效果並不顯著：

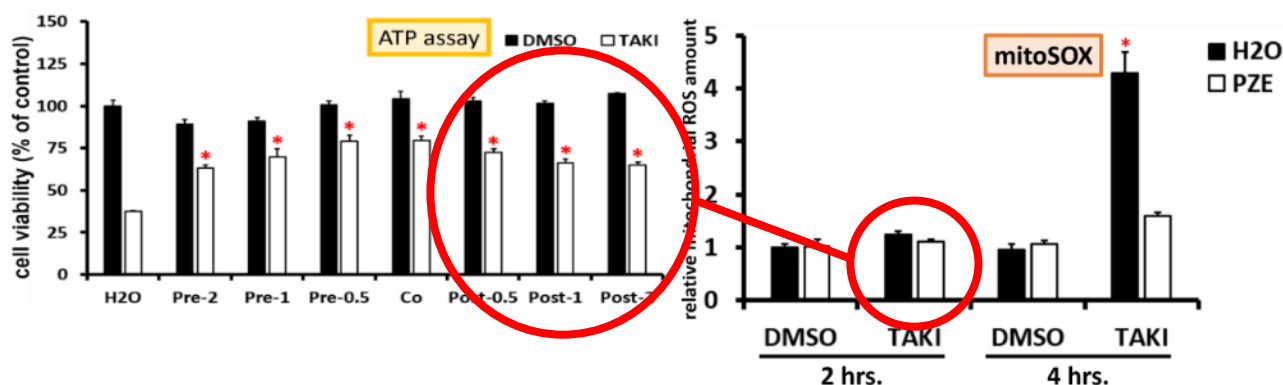


圖 29. 由圖中對比可以解釋為何在加入 TAKI 後 2 小時才加入 PZE 仍然有保護作用，從 mitoSOX 的結果可以得知在加入 TAKI 的 2 小時內 ROS 的含量還沒有明顯增加，因此 PZE 在這段時間內加入仍然有保護效果。(紅色圓圈)

ROS 直接和細胞存活率相關：

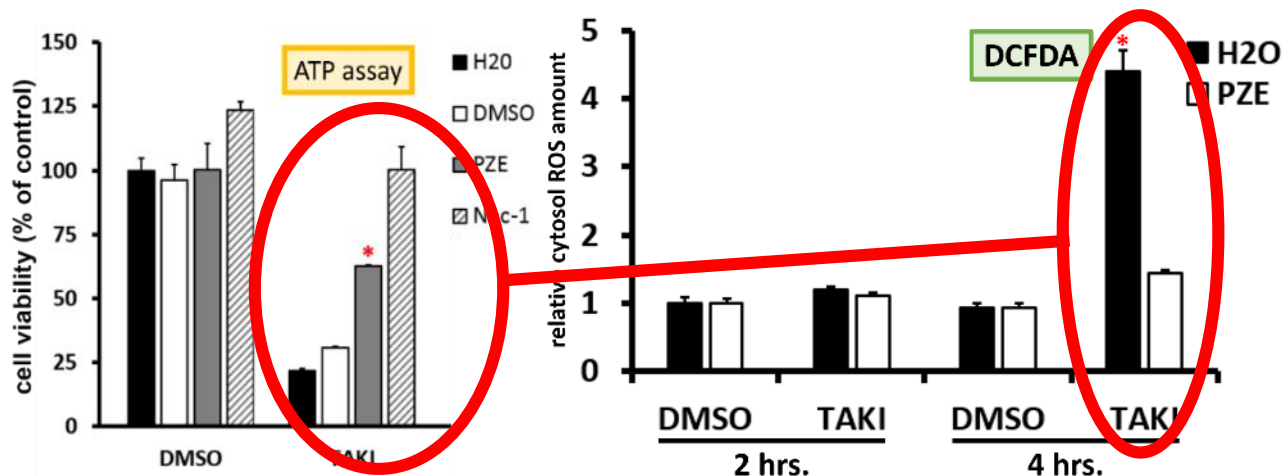


圖 30. 由圖中對比可以看出 ROS 的量直接和細胞存活率相關，這為 PZE 是以透過抑制 MAO 進而抑制 ROS 的量，導致細胞受到保護的假說提供了有力的證據。(紅色圓圈)

PH 的保護作用和 MAO-B 之間的關係：

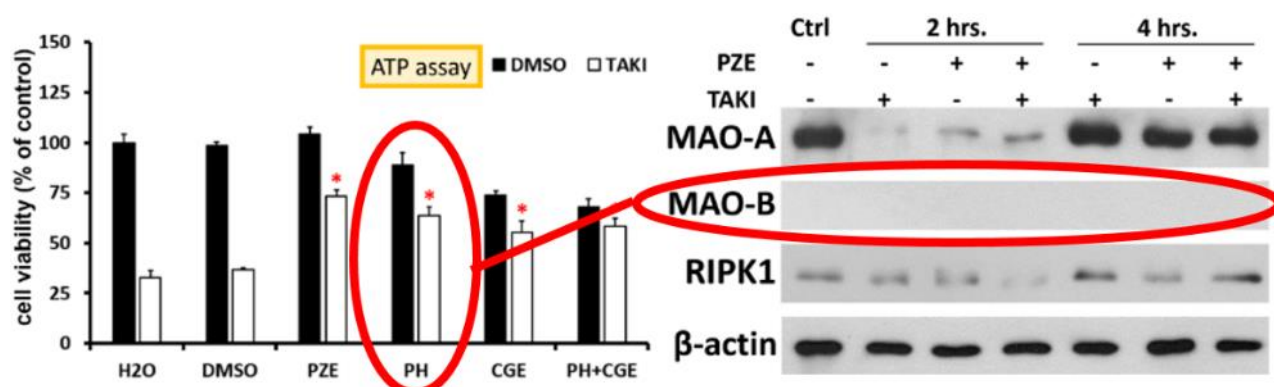


圖 31. 由圖中對比可以發現 MAO-B 在此實驗細胞：小鼠的骨髓巨噬細胞中幾乎不表現，那為甚麼 PH 這個 MAO-B 的抑制劑卻對此細胞也有保護作用呢？(紅色圓圈)
其實之前的研究對 PH 的抑制對象有兩種說法：(Murphy DL et al., 1979)

1. PH 只會抑制 MAO-B。
2. PH 除了會抑制 MAO-B 之外也會抑制 MAO-A。

根據我們的結果，我們比較支持 PH 也會抑制 MAO-A，因為 PH 可以在幾乎沒有 MAO-B 表現的細胞中產生保護效果。

PZE 保護效果的機制

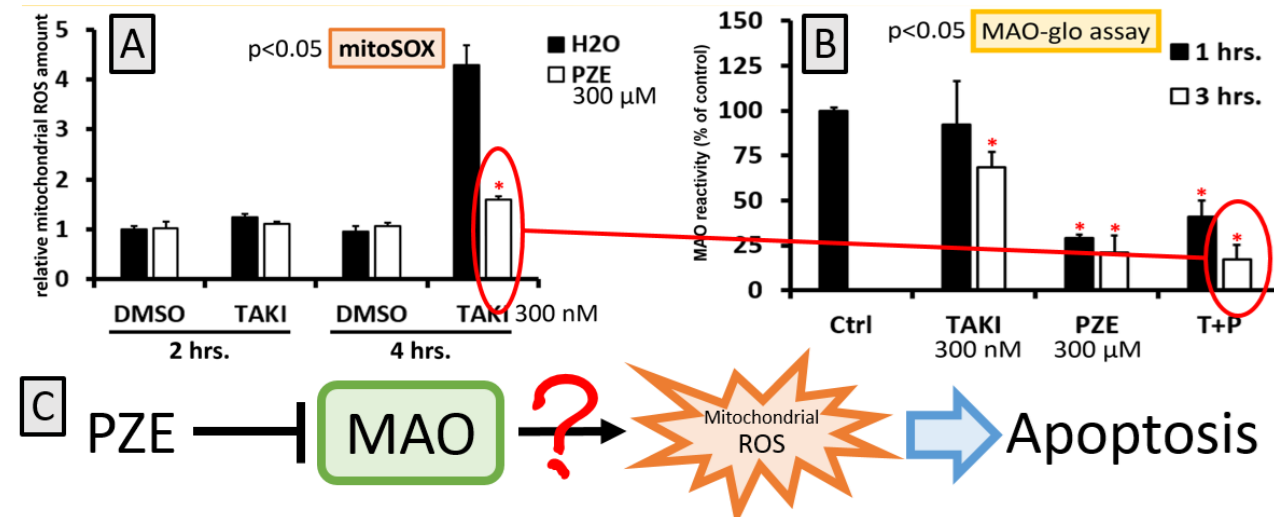


圖 32. 由圖 A 和圖 B，我們知道 PZE 會抑制 MAO 的活性，同時使細胞中 ROS 的量降低，導致細胞死亡率下降，但 TAKI 並不會增加 MAO 的活性，因此我們無法確定加入 PZE 抑制 MAO，是直接使 MAO 製造的 ROS 量降低，抑或是間接作用使得其他來源的 ROS 量下降。這部分還有待進一步的實驗驗證。

陸、結論

一、結論

透過這次的研究，我們確認了 PZE 的確可以在小鼠的骨髓巨噬細胞中保護 TAK1 所導致的細胞凋亡。而當加入的 PZE 濃度大於 300 μM ，且在給予 TAK1 的前後 2 小時內加入，則會有顯著的保護效果。並且不同的 MAO 抑制劑 PH 和 CGE 也有顯著的保護效果。

根據我們的研究結果，我們知道 PZE 會抑制 MAO 的活性，同時使細胞中 ROS 的量降低，導致細胞死亡率下降。但我們無法確定 PZE 和 MAO 是透過①的直接路徑抑制 MAO 製造的 ROS，抑或是透過②的間接路徑使 ROS 的量下降。

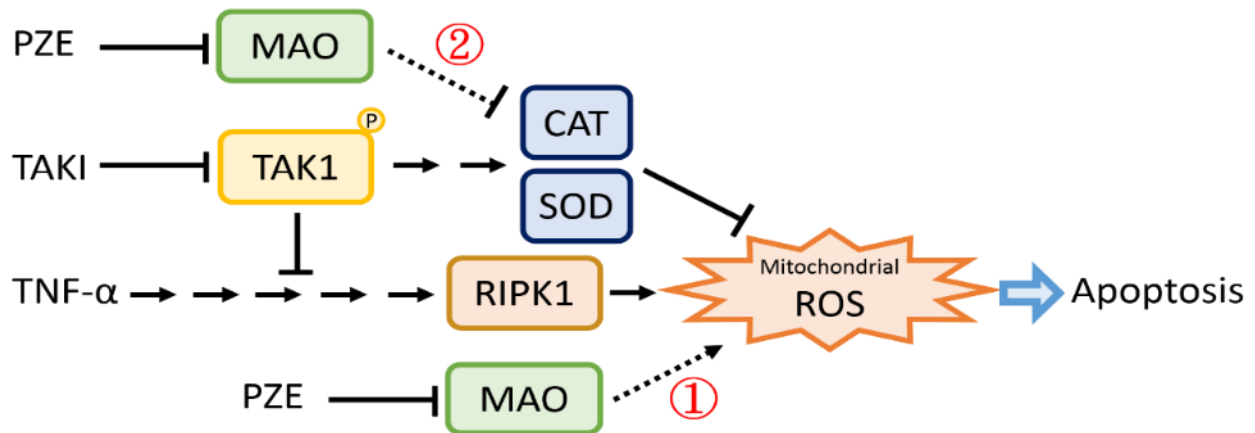


圖 33. 根據研究結果所繪製的路徑圖。

二、未來工作

(一) 驗證 MAO 與 ROS 的關係是直接影響或間接影響



圖 34.我們知道 PZE 會抑制 MAO 的活性，同時使細胞中 ROS 的量降低，導致細胞死亡率下降，但 TAKI 並不會增加 MAO 的活性，因此我們無法確定加入 PZE 抑制 MAO，是直接使 MAO 製造的 ROS 量降低，抑或是間接作用使得其他來源的 ROS 量下降。這部分還有待進一步的實驗驗證。

(二) 運用 qRT-PCR 確認我們西方墨點法的結果，以及提供更多資訊

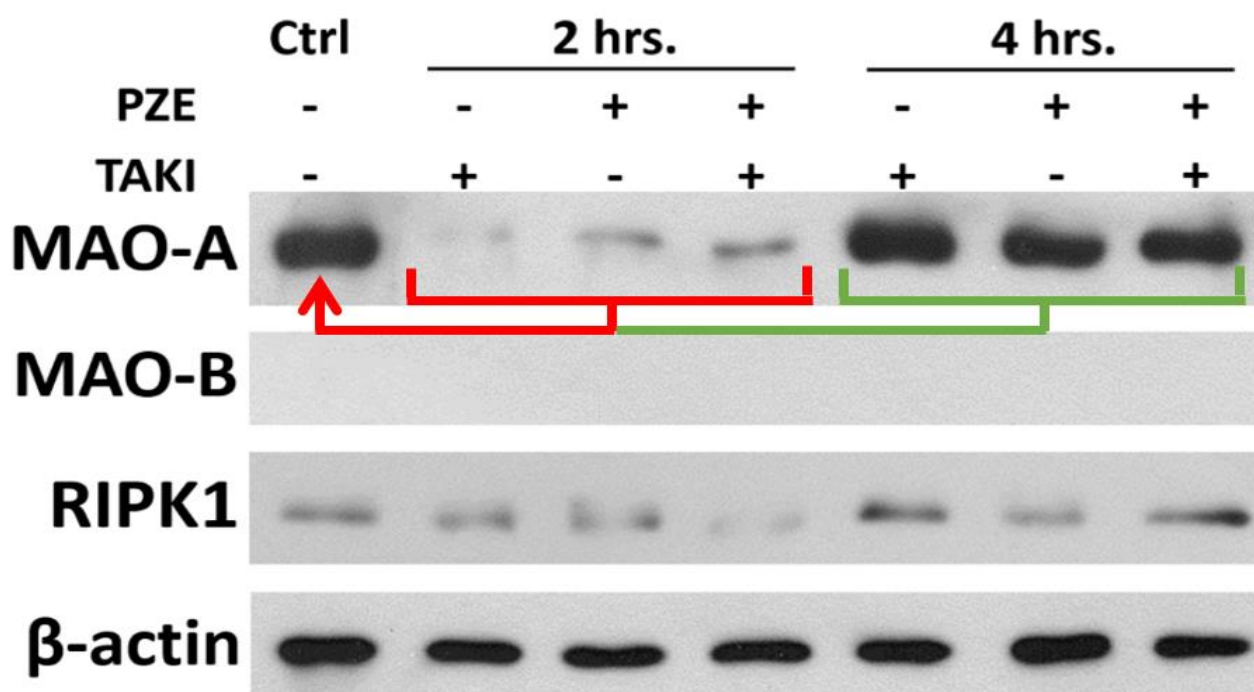


圖 35.由圖中可以看出不管是以 TAKI, PZE 或 TAKI+PZE 處理 2 小時後，MAO-A 的表現量都下降。(紅色箭頭)
但在 4 小時的處理後表現量又回升到與對照組差不多的量。(綠色箭頭)
我們希望以 qRT-PCR 檢測 mRNA 的量以了解此現象。

(四) 在神經細胞中重覆實驗

由於 PZE 在治療憂鬱症時主要是作用在腦細胞中，在家商阿茲海默症也與神經細胞的死亡有關，因此我們希望能在神經細胞中重覆實驗，看看有沒有保護效果。

三、此研究之應用性

因為有研究指出許多疾病像是癌症、阿茲海默症、帕金森氏症等等都和細胞凋亡有關，特別是與腫瘤壞死因子- α 途徑有關的細胞凋亡有特別強烈的關係。

我們希望透過這個研究，可以幫助科學界對 PZE 對於 TAK1 所引發的細胞凋亡的保護作用有更深入的了解，並期望可以讓科學界藉由這個實驗更了解癌症、阿茲海默症、帕金森氏症等等，更希望可以幫助科學界找到這些病症的解藥，對社會的幸福貢獻一些努力！

柒、參考資料及其他

- Malorni W, Giammarioli AM, Matarrese P, Pietrangeli P, Agostinelli E, Ciaccio A, Grassilli E, Mondovi B (1998). "Protection against apoptosis by monoamine oxidase A inhibitors." FEBS Lett. 426(1):155-9.
- Ou XM, Chen K, Shih JC (2006). "Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A. 103(29):10923-8.
- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, and De Laurenzi V (2012). "Role of Apoptosis in disease." Aging (Albany NY). 4(5): 330–349
- Edmondson DE (2014). "Hydrogen peroxide produced by mitochondrial monoamine oxidase catalysis: biological implications." Curr Pharm Des. 20(2):155-60.
- MihalySR, Ninomiya-Tsuji J, MorlokaS (2014). "Review: TAK1 control of cell death." Cell death and differentiation. 21:1667-1676
- Murphy DL, Lipper S, Slater S, Shiling D (1979). "Selectivity of clorgyline and pargyline as inhibitors of monoamine oxidases A and B in vivo in man." Psychopharmacology. 62(2):129-32.