

新北市政府 109 年度自行研究報告

研究主題:

探討 ENT1 以及 ENT2 平衡型核苷轉運蛋白在脊髓損傷小鼠中的作用

英文：

Investigation of the roles of equilibrative nucleoside transporter-1 (ENT1) and ENT2 in the spinal cord injury of mice model

研究機關：新北市立聯合醫院

研究人員：陳冠毓

研究期程：109.01.01-109.12.31

新北市政府衛生局編印

印製年月:109 年 12 月

新北市政府 109 年度自行研究計畫表

填表人：陳冠毓

填表日期：109.01.03

聯絡電話：0978695077

計畫名稱	探討 ENT1 以及 ENT2 平衡型核苷轉運蛋白在脊髓損傷小鼠中的作用		
研究機關及人員	新北市立聯合醫院 神經外科 陳冠毓醫師	期程	自 109 年 1 月 1 日 至 109 年 12 月 31 日
目的	創傷性脊髓損傷對人類來說一種破壞性的疾病，會造成社會巨大的成本，本研究計畫將利用平衡型核苷轉運蛋白 ENT1/ENT2 之基因剔除小鼠試圖找出該基因在創傷性脊髓損傷所扮演的角色		
方法	利用平衡型核苷轉運蛋白 ENT1/ENT2 之基因剔除小鼠，觀察在脊髓損傷後不同天數脊髓發炎之情形是否有改善		
經費	1,000,000 元		
備註			

備註：

- 一、研究機關及人員：包括研究機關、實際研究人員及參與工作人員。
- 二、方法：如研究方法之訂定、問題之發掘、研究設計、資料之蒐集與分析、解決方案之研擬、研究報告之提出。
- 三、已提報之自行研究計畫因故撤銷辦理者，應敘明原因行文通知。
- 四、自行研究報告內容應力求與所屬局處業務相關。

新北市政府 109 年度自行研究成果摘要表

計 畫 名 稱	探討 ENT1 以及 ENT2 平衡型核苷轉運蛋白在脊髓損傷小鼠中的作用
期 程	自 109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日
經 費	1,000,000 元
緣 起 與 目 的	創傷性脊髓損傷是一種破壞性的疾病，目前仍沒有特殊藥物可以治療，繼發性的神經發炎，也會加劇脊髓神經的損傷。在先前研究中發現 ENT1 或 ENT2 蛋白對發炎反應有保護的作用，故利用 <i>Ent1</i> ^{-/-} 以及 <i>Ent2</i> ^{-/-} 來探討兩者對脊髓損傷中所扮演的角色
方 法 與 過 程	利用 C57BL/6，週齡 8-10 週小鼠，進行實驗，預計將小鼠分為 2 個時間點：72 小時以及 10 天，每個時間點分成 Sham 組、SCI 組、 <i>Ent1</i> ^{-/-} +SCI 組、 <i>Ent2</i> ^{-/-} +SCI 組、不同時間點與不同組別每組 N 值接設為 1~4 隻，依實驗檢體處理方式不同，在分成蛋白質、RNA 以及石蠟包埋，並進行後續分子生物相關實驗。
研 究 發 現 及 建 議	推測 <i>Ent2</i> ^{-/-} 小鼠可能為加劇因子，而 <i>Ent1</i> ^{-/-} 小鼠則對神經具有保護作用。建議未來可朝向 <i>Ent1</i> ^{-/-} 小鼠神經保護作用繼續延伸研究，並將其餘結果修正使其有完整性，長期可發展 ENT1 抑制劑，先針對創傷性脊髓損傷小鼠進行抑制劑藥物測試，進而發展至人體臨床試驗，希望未來能夠造福創傷性脊髓損傷患者。並預計將在 110 年度計畫中延續此主題。
備 註	

新北市政府 109 年度自行研究計畫執行情形季報表

填表日期：109.12.10

計畫名稱	研究機關及人員	期程		執行情形概述	備註
		起	訖		
探討 ENT1 以及 ENT2 平衡型核苷轉運蛋白在脊髓損傷小鼠中的作用	新北市立聯合醫院 神經外科 陳冠毓醫師	109.1.1	109.12.31	1.配種 ENT1 以及 ENT2 小鼠 2.先使用 Wile-Type 小鼠建立腦部損傷模式 3.確認後續分生實驗所需要之器耗材	
探討 ENT1 以及 ENT2 平衡型核苷轉運蛋白在脊髓損傷小鼠中的作用	新北市立聯合醫院 神經外科 陳冠毓醫師	109.1.1	109.12.31	1.報告撰寫，資料分析，文獻收集。 2.6月19日舉行期中口頭報告。	
探討 ENT1 以及 ENT2 平衡型核苷轉運蛋白在脊髓損傷小鼠中的作用	新北市立聯合醫院 神經外科 陳冠毓醫師	109.1.1	109.12.31	因腦部損傷機器老舊且不堪使用，重新購買機器成本過高，遠超出預算，故而提出研究計畫題目及內容變更。	
探討 ENT1 以及 ENT2 平衡型核苷轉運蛋白在脊髓損傷小鼠中的作用	新北市立聯合醫院 神經外科 陳冠毓醫師	109.1.1	109.12.31	因建立動物模式以及機器損壞不可抗拒之因素有所延遲，目前有看到些許趨勢，並在未來將此份研究內容修正更加完整。	

報告內容

1. 摘要(包含研究目的、研究方法、重要發現、主要建議及政策意涵)。

創傷性的脊髓損傷(Spinal cord injury; SCI)是一種破壞性的疾病，會導致人體功能喪失，但目前仍沒有特定藥物可以治療，許多的證據表示脊髓的二次傷害可能是由發炎反應、粒線體功能喪失或是氧化壓力的產生，利用C57BL/6及*Ent1*與*Ent2*小鼠，週齡8-10週小鼠，進行實驗。在脊髓損傷後，仍屬於急性起，各組發炎反應都很高，且因在計畫執行初期仍在測試階段，建立動物模式，以及測試脊髓損傷條件，可用N值不足，雖部分結果有看到趨勢，但仍沒有顯著差異尚屬可惜，但參考10天小鼠行為分數，與3天結果相互應以。推測*Ent2*^{-/-}小鼠可能為加劇因子，而*Ent1*^{-/-}小鼠則對神經具有保護作用。未來將*Ent1*^{-/-}為主軸進行研究，也會證實*Ent2*所扮演之角色。

2. 主旨及背景說明(與現行業務關聯性)。

創傷性的脊髓損傷(Spinal cord injury; SCI)是一種破壞性的疾病，會導致人體功能喪失，全球約有一百萬人有脊髓損傷問題，每年新增脊髓損傷約13萬人，但目前仍沒有特定藥物可以治療¹。大多數人SCI病變是由於機械力量牽引和發生於急性擠壓、穿刺性的傷害，或由於骨頭移位骨頭碎片引起的長期壓迫²。近期有許多的證據表示脊髓的二次傷害可能是由發炎反應、粒線體功能喪失或是氧化壓力的產生³。但是目前詳細的機制能不適很了解。因本身為神經外科醫師，希望能夠找在動物模式中搜尋合適的藥物，為未來的藥物開發盡一份心力，並未脊髓損傷患者爭取更好的預後，以減輕患者以及社會負擔，故而決定投入此研究計畫。

3. 相關研究、文獻之檢討。

Spinal cord injury and M1 macrophage

中樞神經系統有多種類型的細胞相互作用，其包括神經元，神經膠質細胞和非神經細胞⁴。同樣，對中樞神經系統的損傷涉及複雜的多種細胞相互作用，並且有多種細胞活動類型可影響SCI結果⁵。不論脊髓損傷的原因或大小，成熟的SCI病變均可分為三個組織區域，每個組織區域都有獨特的細胞生物學特性：(a) 中央非神經病變核心(central non-neural lesion core)，通常稱為纖維化癥痕 (b) 星形膠質疤痕邊界緊密圍繞病灶核心(central non-neural lesion core) (c) 稀疏活著有功能的神經組織區域(Spared but reactive neural tissue)，每個區域皆有特定的細胞組成並相互作用⁶。

SCI後會從血液循環中募集中性粒細胞，並在最初24小時內激活CNS膠質細胞(星形膠質細胞(astrocytes)和小膠質細胞(microglia))。損傷後2-3天，血液單核細胞遷移到損傷部位，在那裡它們分化為巨噬細胞。在對創傷的急性反應M1時期中觀察到巨噬細胞(macrophage)並釋放大量的氧化壓力(ROS)⁷。M1巨噬細胞會吸引中性粒細胞並促進炎症，細胞因子IL-1 β ，TNF- α 和IL-6表現明顯上升，M1巨噬細胞促進先天免疫，透過增加吞噬作用和促發炎釋

放細胞因子，以清除異物和傷口受傷部位的碎屑⁸。

ENTs 與發炎反應及神經的保護

平衡核苷轉運蛋白 (Equilibrative Nucleoside Transporter; ENTs) 是多位整合膜蛋白，介導核苷(nucleosides)，核鹼基(nucleobases)和治療類似物(therapeutic analogs)的轉運，ENTs對上述物質的調節具有深遠的影響，腺苷(Adenosine)對多個器官系統廣泛的影響，與腺苷受體Adora1，Adora2A，Adora2B，和Adora3交互作用，再經由下游heterotrimeric G-proteins的調節支配細胞的功能⁹。

細胞外核苷酸(nucleotides)和核苷（特別是ATP和腺苷）以及外切核苷酸酶(ectonucleotides)CD73和CD39（負責將ATP轉化為腺苷）和ENTs在急性肺部炎症的發病機理中起著至關重要的作用¹⁰。

利用7-0絲線將小鼠冠狀動脈結紮，30分鐘後將冠狀動脈再灌流，發現在ENT1-null 小鼠模型中心臟缺血面積有縮小¹¹。使用氣霧方式讓小鼠吸入發炎誘導藥物，再將肺部灌洗，灌洗出的細胞IL-1 β 以及TNF- α 皆有下降¹²。餵食小鼠dextran sulfate sodium(DSS)7天，誘導成發炎性的腸道疾病(inflammatory bowel disease ;IBD)，在ENT2 knock小鼠發現，腸道的腺苷水平有提高，發炎反應與體重減輕的幅度有減輕¹³。綜合上述，ENTs可以調節核苷等物質，在心臟、肺部以及腸道等器官，ENT1或ENT2剔除後可以發現對發炎反應的抑制是有幫助的。

ENTs抑制劑、發炎與神經保護之關係

在血管平滑肌細胞中，95%的腺苷轉運是由ENT-1介導的，其餘的是由ENT-2介導的。在內皮細胞中，分別由ENT-1，ENT-2和CNT-2介導60%，10%和30%的Adenosine轉運¹⁴。

Adenosine分別透過位於腸道上皮細胞的頂膜和基底外側膜中ENTs蛋白使得細胞外Adenosine水平升高會激活A2a受體¹⁵，在人類單核細胞中，A1a受體激活產生有促炎作用，而A2a受體激活則產生抗炎作用。單核細胞和巨噬細胞是TNF- α 的主要來源，TNF- α 是一種促炎細胞因子，參與許多慢性炎症的病理生理疾病。A2a受體的激活抑制了由細菌脂多醣（LPS）激活的人單核細胞以及小鼠腹膜內巨噬細胞中TNF- α 的產生。綜合上述，Adenosine在細胞位的濃度提高，有助於A2a受體激活抑制巨噬細胞釋放TNF- α ，而達到抑制發炎作用¹⁶。

脊髓運動迴路的是透過星形膠質細胞調節，從星形膠質細胞釋放ATP，ATP水解為腺苷以及隨後激活神經元A1腺苷受體（A1Rs）。腺苷參與巨噬細胞和小膠質細胞的活化^{1,14}。

在阿茲海默症與亨丁頓舞蹈症小鼠的模式中，使用ENT1抑制劑，可以防止阿茲海默疾病小鼠空間記憶力下降的問題，在亨丁頓舞蹈症可以改善運動功能，並表示ENT1的抑制有效的增加細胞外腺苷濃度對神經是有保護作用^{15,17}。在2020年的研究指出，利用LPS誘導腦部發炎，ENT2 knocks out小鼠的海馬迴發現，TNF- α 與IL-1 β 的表現量皆有下降¹⁸。

利用ENT1/2基因剔除小鼠，可以抑制發炎反應，在心臟、肺臟、腸道與神經皆有作用，並會提高細胞外腺苷的濃度，使得神經具有保護的效果。

4.研究方法(包含研究內容、範圍、對象、限制與過程)。

動物

利用C57BL/6，週齡8-10週小鼠，進行實驗，預計將小鼠分為2個時間點: 72小時以及10天，每個時間點分成Sham組、SCI組、ENT1 knock out+SCI組、ENT2 knock out+SCI組、不同時間點與不同組別每組N值接設為1~4隻，依實驗檢體處理方式不同，在分成蛋白質、RNA以及石蠟包埋，並進行後續分子生物相關實驗。

SCI手術方法

使用Ketamine 8.7mg + Xylazine 1.3mg + /100g腹腔注射，給予Cefazolin (30 mg/100g)抗生素皮下注射，防止感染。手術方式:確認麻醉完成後，將小鼠脊椎T8-T10節脊椎周圍剃毛，並使用優碘消毒，將皮與肌肉使用無菌剪刀與脊椎骨分開，將T9椎板打開，露出spinal cord，並使用Spinal cord損傷器、撞擊針10克重，從37.5mm高度自由落下損傷脊椎，最後使用4-0縫合線縫合，如圖一A及B。術後照護:將小鼠放置在加熱墊上或是有提供保溫燈的飼養盒中，直到小鼠完全甦醒，再將小鼠送回至動物中心。

犧牲與分子生物實驗

當小鼠達到實驗預計時間點時，給予二氧化碳犧牲，並依照不同實驗需求分別冰存於-80°C或是進行蛋白質或RNA萃取，如需進行石蠟切片，將檢體泡在福馬林中，並進行脫水與包埋。

RNA將進行反轉錄製成cDNA，並透過qPCR方式，測定IL-1 β 、IL-6、TNF- α 與iNOS的RNA表現量來比較不同組別之間的差異。

石蠟切片將進行Immunofluorescence (IF)染色、hematoxylin 與 eosin(HE)染色，IF染色預計使用抗體為NeuN、GAFP、IBA-1與Caspase-3，與HE染色與IF染色，觀察組織型態與發炎情形以及GAFP與IBA-1表達在星形膠狀細胞與小膠質細胞，如有增生情形表示發炎反應較強烈，上並透過定量比較各組間的差異，TUNEL assay則可觀察到細胞凋亡的數量。

Immunofluorescence

將組織蠟塊切成3 μ m 薄片，貼至載玻片上。將蠟溶解並進行脫蠟，100% Xylene 3分鐘→100% Xylene 3分鐘→100% Xylene 3分鐘→100% EtOH 浸泡30秒→90% EtOH 30秒→80% EtOH 30秒→70% EtOH 30秒，用清水清洗 10分鐘。Sodium Citrate Buffer (pH 6)，95°C 煮20~40分鐘進行抗原修復利用 1X TBS(PBS)清洗 5 分鐘 2 次，使用 ImmEdge Pen 將組織圈起，在圈起的組織上滴入使用Blocking Buffer進行 Blocking 1 小時加入初級抗體，室溫1小時，移至 4 °C 放置隔夜。使用 1X TBS(PBS)清洗數次，再 0.05% TBST(PBST) 清洗 3 次 每次 5 分鐘，最後在使用 1X TBS(PBS)清洗1次5分鐘。加入二級抗體，放置室溫 1 小時使用 1X TBS(PBS)清洗數次，再 0.05% TBST(PBST) 清洗 3 次 每次 5 分鐘，最後在使用1X TBS(PBS)清洗 1次5分鐘。加4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)/1X TBS(PBS) 1:200 染色5分鐘，使用 1X TBS(PBS)清洗1次5分鐘。將玻片擦乾並使用 FluoromountTM Aqueous Mounting Medium進行封片。

H&E 染色

將蠟溶解並進行脫蠟，100% Xylene 3分鐘→100% Xylene 3分鐘→100% Xylene 3分鐘→100% EtOH 浸泡30秒→90% EtOH 30→80% EtOH 30秒→70% EtOH 30秒，用清水清洗 10 分鐘→Hematoxylin，4分鐘→酸酒精，1秒→水洗，4分鐘
Eosin 2分鐘→95%酒精30秒→100%酒精30秒→100%酒精30秒→100%酒精30秒→Xylene 3分→Xylene 4分，完成後封片。

RNA萃取

將組織取下後放入液態氮，加入1mL TRIOL，並將組織均勻磨碎，放置室溫3分鐘，加入chloroform 200 μ L，用手輕搖15秒，放置室溫3分鐘，離心，12000g，15分鐘，4°C，取上清液500 μ L，加入IPA(異丙醇)，500 μ L，搖晃20下，放置室溫10分鐘，離心12000g，10分鐘，4°C，去除上清液，留下pellet，加入75%酒精，1mL，混合均勻離心7500g，5分鐘，4°C，去除上清液，加入75%酒精，1mL，混合均勻，離心7500g，5分鐘，4°C，盡量將酒精去除，放置抽風櫃烘乾，加入15 μ L DEPC回溶，測定濃度，冰存-80°C。

RNA轉cDNA

A管:RNA template 1000ng X μ L，Oligo (dt) 0.5 μ L，DEPC水 4.5-X μ L。B管:DEPC水 6.1 μ L，5X Reaction Buffer 4 μ L，RNase inhibitor 0.5 μ L，MgCl₂ 2.4 μ L，dNTP mix 1 μ L，Reverse transcriptase 1 μ L。使用PCR機器，A管:70°C，5分鐘□4°C，5分鐘□室溫5分鐘，完成後加入B管，A管+B管:42°C，60分鐘□75°C，15分鐘。

Real-time PCR

cDNA 1 μ L, DEPC 7 μ L, Primer Forward 1 μ L, Primer Reverse 1 μ L, SYBR green 10 μ L, 配置完成後放入機器中, 約2.5小時。

5. 研究發現。

*Ent1*及*Ent2*表現

使用C57BL/6健康小鼠, 將脊髓分成頸椎、胸椎以及腰椎、進行Real-Time PCR檢測, 證實*Ent1*以及*Ent2*在脊髓的這三個部位都有表現, 而*Ent3*則沒有表現在脊髓上。*Ent1*無論在脊髓哪一個區段表現量皆比*Ent2*高, 如圖一C。

脊髓損傷後72小時之比較

ENT1

在免疫螢光染色中, GFAP螢光表現亮無論在*Ent1*^{-/-}小鼠脊髓的背側或是腹側都有下降的趨勢, 可解釋為星形膠狀細胞增生較少, 如圖二。在Nissl染色方面, 脊髓背側*Ent1*^{-/-}小鼠染到存活的神經元, 比起*Ent1*^{+/+}小鼠數量有些微上升, 如圖三。NeuN以及Caspase-3共同免疫螢光染色觀察到, *Ent1*^{-/-}小鼠在脊髓背側或是腹側共同染色到的神經元顆數較*Ent1*^{+/+}小鼠低, Caspase-3會促使細胞凋亡(Apoptosis)的發生, 如圖四。另外, 使用IBA-1可以染色小膠質細胞(microglia), CD68則可以染到巨噬細胞(macrophage)。使用兩種抗體觀察, 針對脊髓的小膠質細胞活化數量以及從血液吸引過來的巨噬細胞數量之差異比較。發現*Ent1*^{+/+}或*Ent1*^{-/-}是脊髓小膠質細胞活化數量差異不多, *Ent1*^{+/+}小鼠外源性巨噬細胞較少, 但*Ent1*^{-/-}小鼠則較多。兩種抗體都有染到的細胞為活化染色小膠質細胞(microglia)/阿米巴形狀巨噬細胞(macrophage), *Ent1*^{-/-}小鼠則較少, 如圖五。

ENT2

在72小時mRNA檢體中, 透過Real-Time PCR檢測IL-1 β 、IL-6以及TNF- α , 發現*Ent2*^{-/-}小鼠在IL-1 β 沒有顯著的差異, IL-6比起*Ent2*^{+/+}小鼠有些許升高, 而TNF- α 與參考文獻相同, 在*Ent2*^{-/-}小鼠, 表現量有比*Ent2*^{+/+}小鼠要低, 如圖六。透過Nissl化學染色, 可以染到存活的神經元(Neuron), *Ent2*^{+/+}與*Ent2*^{-/-}小鼠沒有差異, 圖七。在免疫螢光染色GFAP方面, *Ent2*^{-/-}小鼠無論在脊髓的背側或腹側, 螢光的表現量皆有些微的上升, 推測與星形膠狀細胞增生有關, 如圖八。利用NeuN以及Caspase-3共同染色觀察細胞凋亡情形, 發現*Ent2*^{-/-}小鼠雖在脊髓腹側有些微下降, 但背側仍與*Ent2*^{+/+}小鼠相近, 如圖九。

6. 結論與建議(分立即可行之建議及長期性建議)。

在脊髓損傷後, 仍屬於急性起, 各組發炎反應都很高, 且因在計畫執行

初期仍在測試階段，建立動物模式，以及測試脊髓損傷條件，可用N值不足，雖部分結果有看到趨勢，但仍沒有顯著差異尚屬可惜，但參考10天小鼠行為分數，如圖十及附錄一，與3天結果相互應以及2018 Acton, D.所表示¹⁸，細胞Adenosine約60%為ENT1調控，30%為ENT2調控，其餘10%由其他相關蛋白調控，綜合以上推測Ent2^{-/-}小鼠可能為加劇因子，而Ent1^{-/-}小鼠則對神經具有保護作用。

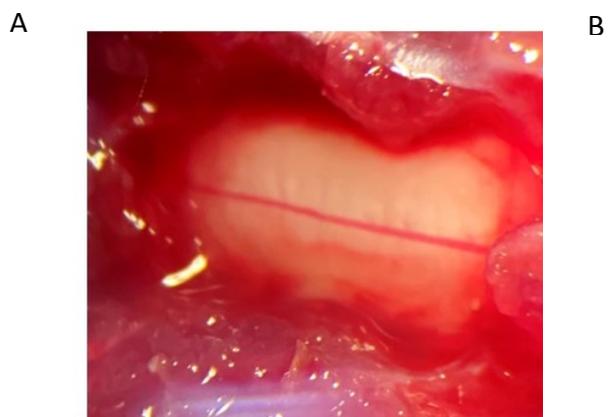
建議未來可朝向Ent1^{-/-}小鼠神經保護作用繼續延伸研究，並將其餘結果修正使其有完整性，長期可發展ENT1抑制劑，先針對創傷性脊髓損傷小鼠進行抑制劑藥物測試，進而發展至人體臨床試驗，希望未來能夠造福創傷性脊髓損傷患者。並預計將在110年度計畫中延續此主題。

7. 參考文獻。

- 1 Xu, S. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) attenuates inflammation after spinal cord injury by promoting macrophages/microglia M2 polarization in mice. *J Neuroinflammation* **15**, 155, doi:10.1186/s12974-018-1183-8 (2018).
- 2 McDonald, J. W. & Sadowsky, C. Spinal-cord injury. *Lancet* **359**, 417-425, doi:10.1016/S0140-6736(02)07603-1 (2002).
- 3 Jiang, W., Li, M., He, F., Zhou, S. & Zhu, L. Targeting the NLRP3 inflammasome to attenuate spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation* **14**, 207, doi:10.1186/s12974-017-0980-9 (2017).
- 4 Barres, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* **60**, 430-440, doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013 (2008).
- 5 Burda, J. E. & Sofroniew, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* **81**, 229-248, doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034 (2014).
- 6 O'Shea, T. M., Burda, J. E. & Sofroniew, M. V. Cell biology of spinal cord injury and repair. *J Clin Invest* **127**, 3259-3270, doi:10.1172/JCI90608 (2017).
- 7 Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321, doi:10.1038/nature07039 (2008).
- 8 Gensel, J. C. & Zhang, B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res* **1619**, 1-11, doi:10.1016/j.brainres.2014.12.045 (2015).
- 9 Boswell-Casteel, R. C. & Hays, F. A. Equilibrative nucleoside transporters-A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **36**, 7-30, doi:10.1080/15257770.2016.1210805 (2017).
- 10 Le, T. T. *et al.* Purinergic Signaling in Pulmonary Inflammation. *Front Immunol*

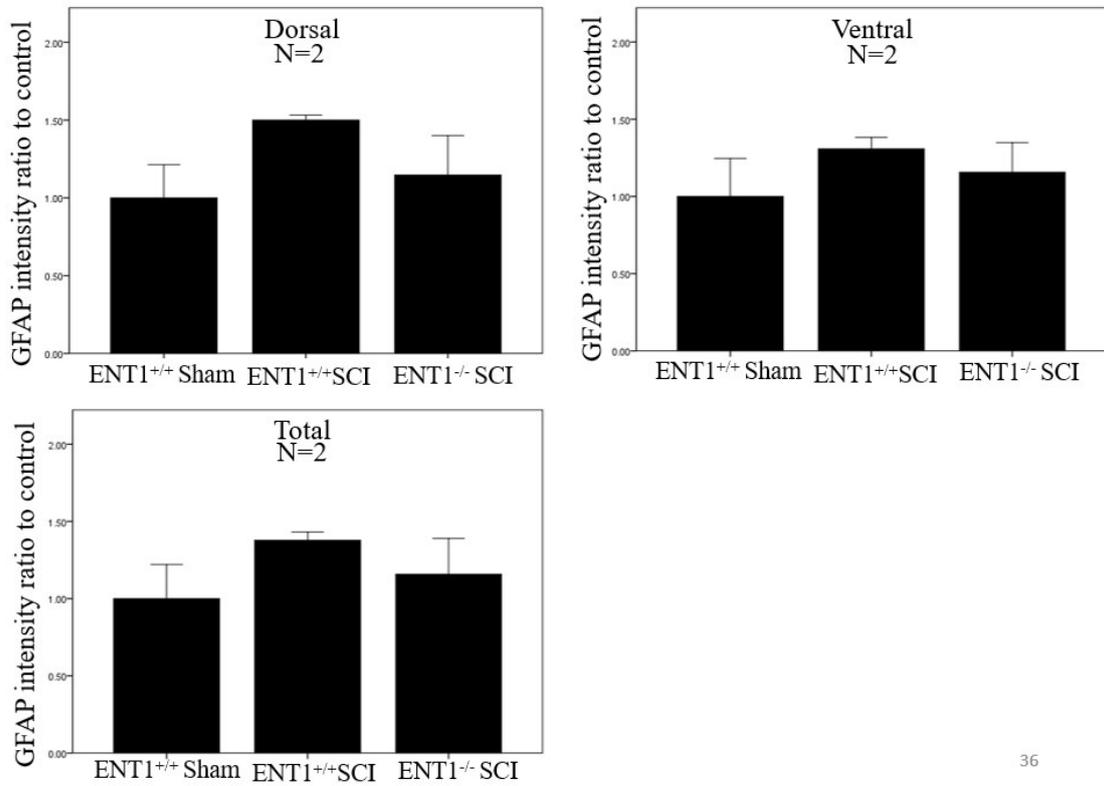
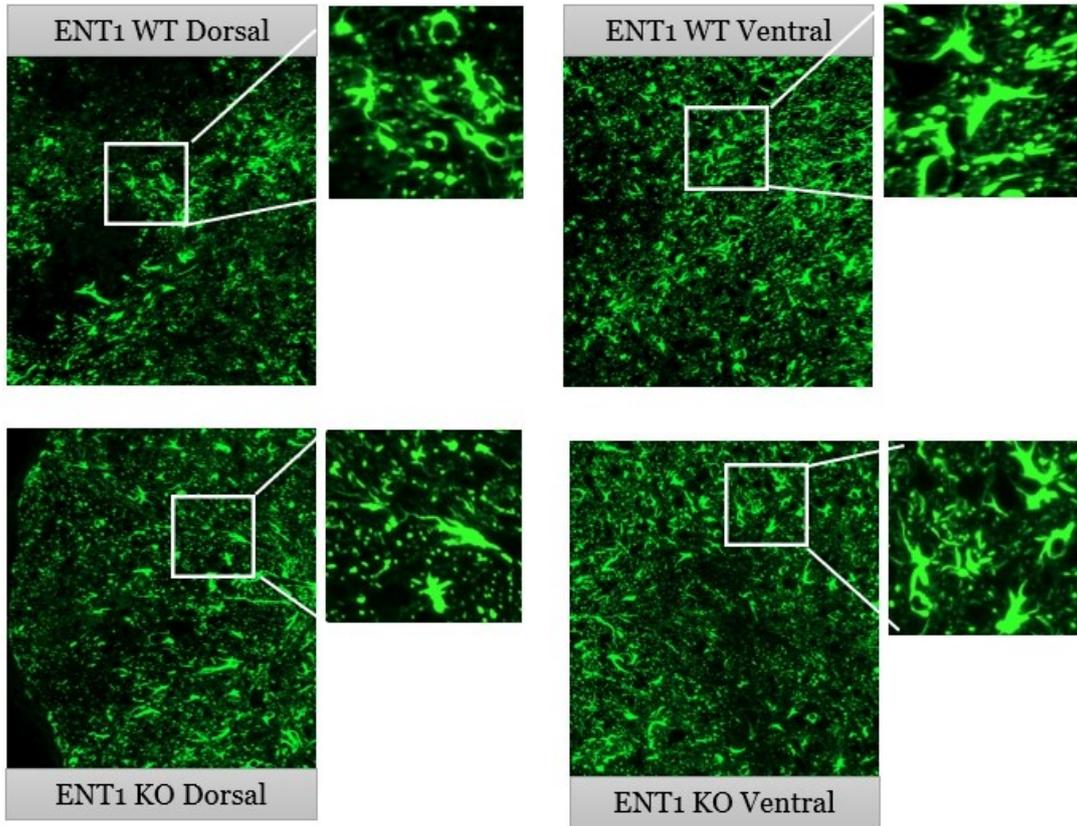
- 10**, 1633, doi:10.3389/fimmu.2019.01633 (2019).
- 11 Rose, J. B. *et al.* Equilibrative nucleoside transporter 1 plays an essential role in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H771-777, doi:10.1152/ajpheart.00711.2009 (2010).
- 12 Morote-Garcia, J. C. *et al.* Repression of the equilibrative nucleoside transporters dampens inflammatory lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 296-305, doi:10.1165/rcmb.2012-0457OC (2013).
- 13 Aherne, C. M. *et al.* Coordination of ENT2-dependent adenosine transport and signaling dampens mucosal inflammation. *JCI Insight* **3**, doi:10.1172/jci.insight.121521 (2018).
- 14 Acton, D., Broadhead, M. J. & Miles, G. B. Modulation of spinal motor networks by astrocyte-derived adenosine is dependent on D1-like dopamine receptor signaling. *J Neurophysiol* **120**, 998-1009, doi:10.1152/jn.00783.2017 (2018).
- 15 Kao, Y. H. *et al.* Targeting ENT1 and adenosine tone for the treatment of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **26**, 467-478, doi:10.1093/hmg/ddw402 (2017).
- 16 Blackburn, M. R., Vance, C. O., Morschl, E. & Wilson, C. N. Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol*, 215-269, doi:10.1007/978-3-540-89615-9_8 (2009).
- 17 Lee, C. C. *et al.* Adenosine Augmentation Evoked by an ENT1 Inhibitor Improves Memory Impairment and Neuronal Plasticity in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* **55**, 8936-8952, doi:10.1007/s12035-018-1030-z (2018).
- 18 Wu, K. C., Lee, C. Y., Chou, F. Y., Chern, Y. & Lin, C. J. Deletion of equilibrative nucleoside transporter-2 protects against lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and blood-brain barrier dysfunction in mice. *Brain Behav Immun* **84**, 59-71, doi:10.1016/j.bbi.2019.11.008 (2020).

8.附錄(包含研究調查問卷、研究報告修訂說明表、相關統計資料、法規及文件等重要資料)。



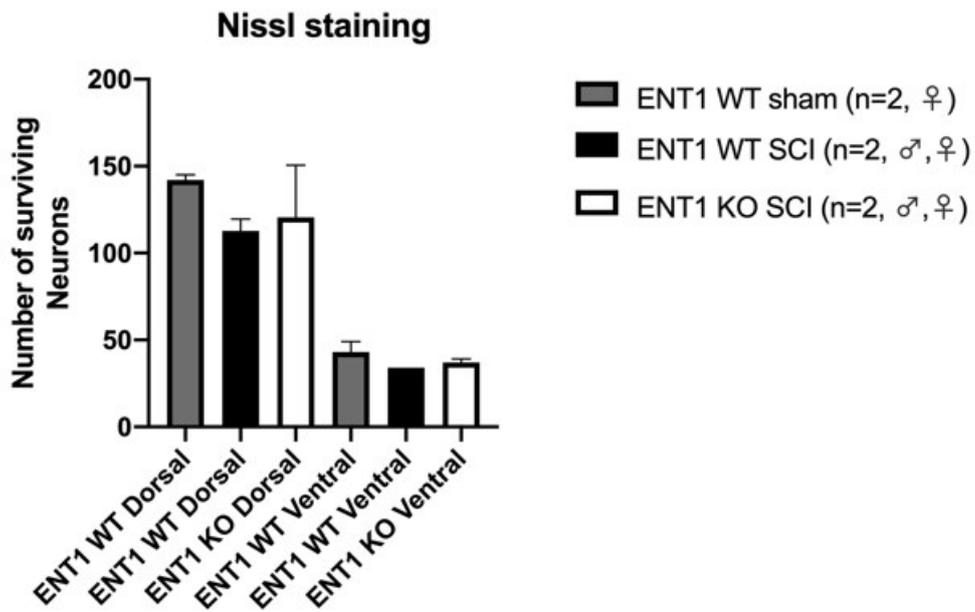
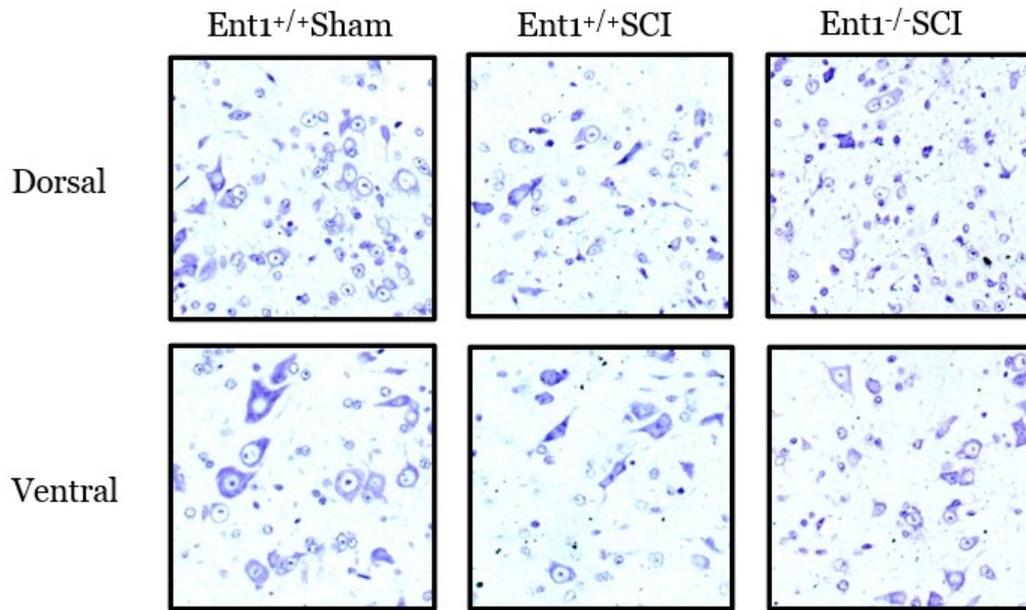
C57BL/6	Δ Ct(ENT1)	Δ Ct(ENT2)	Δ Ct(ENT3)
Cervical (C1-C8)	5.52	6.77	0.00
Thoracic (T1-T12)	4.86	6.43	0.00
Lumber (L1-L2)	5.24	6.87	0.00

圖一、Spinal Cord Injury手術前(A)手術後(B)，黑色圓圈處為撞擊損傷位置。C圖為脊髓頸椎、胸椎以及腰椎Ents表現量

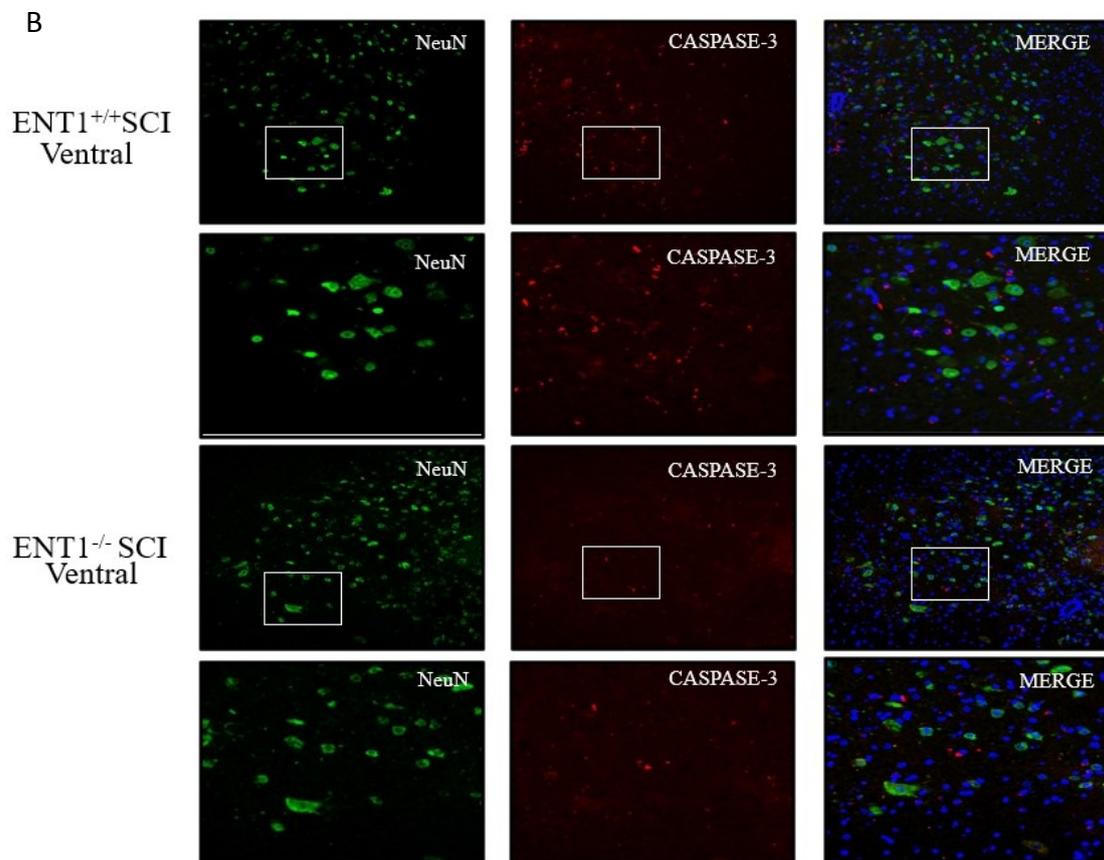
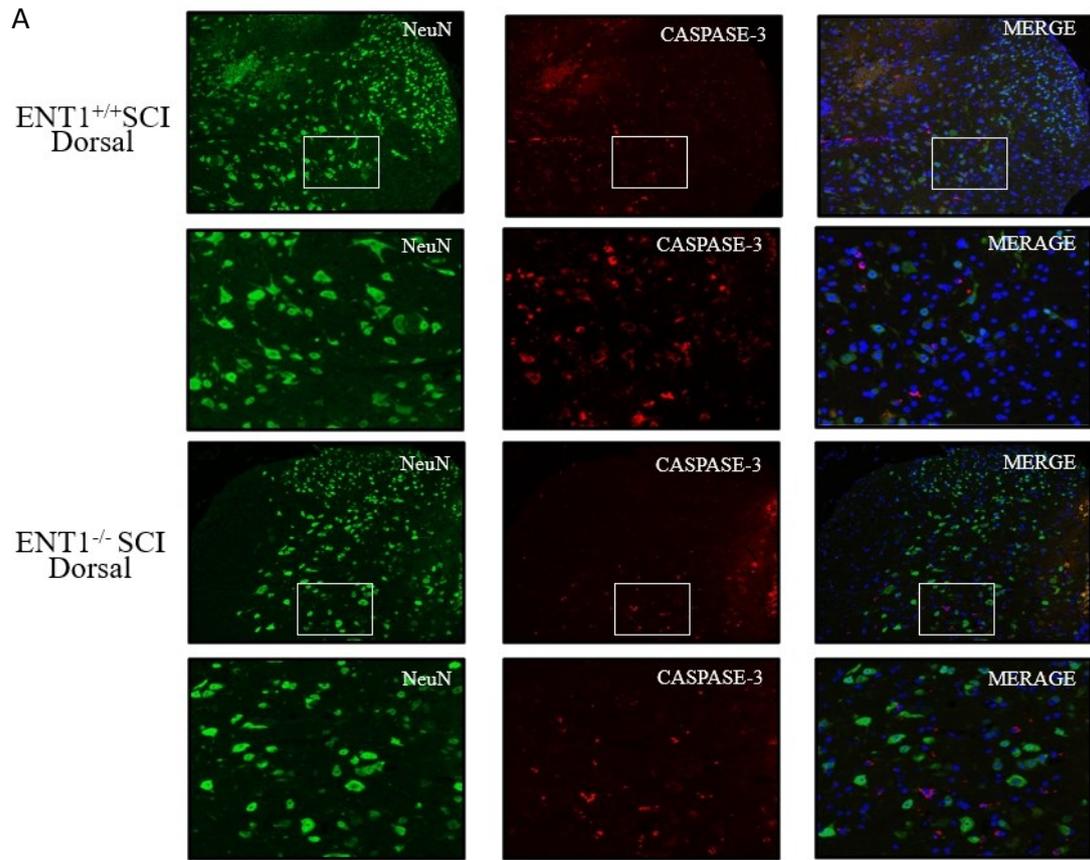


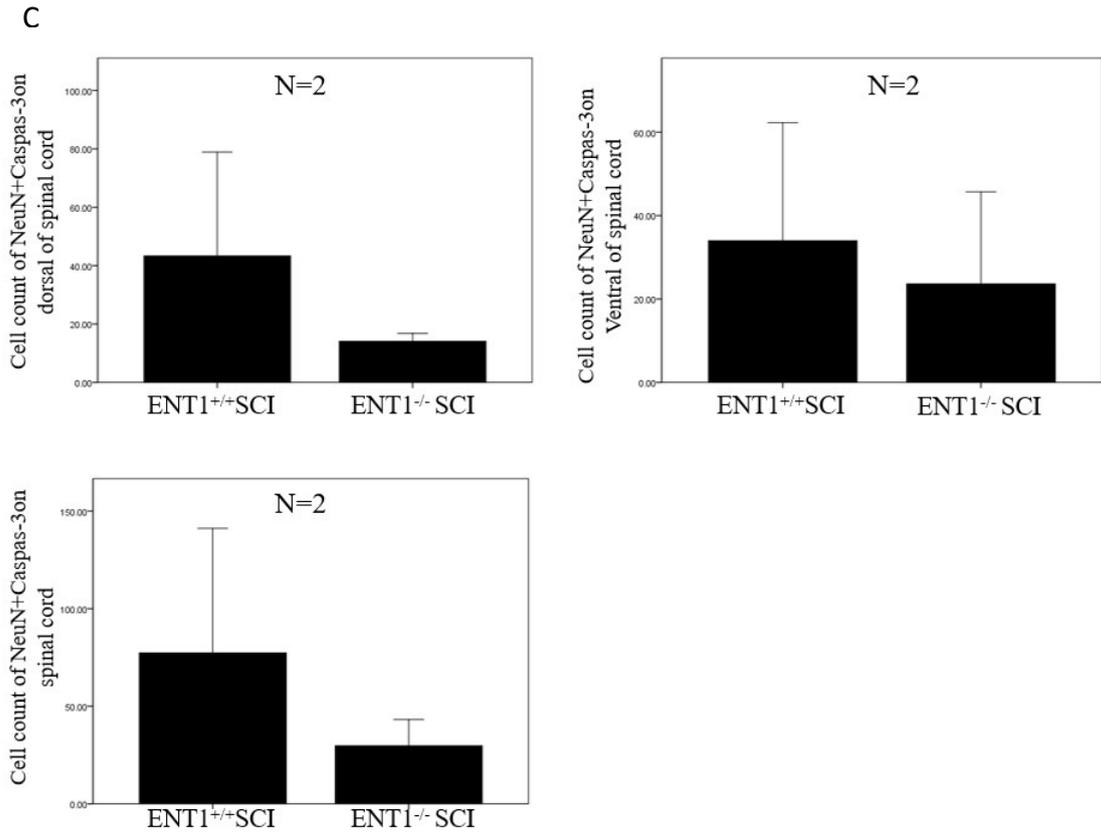
36

圖二、*Ent1*小鼠GFAP染色圖，上圖為GFAP免疫螢光代表圖，下圖為螢光表現量之比較。



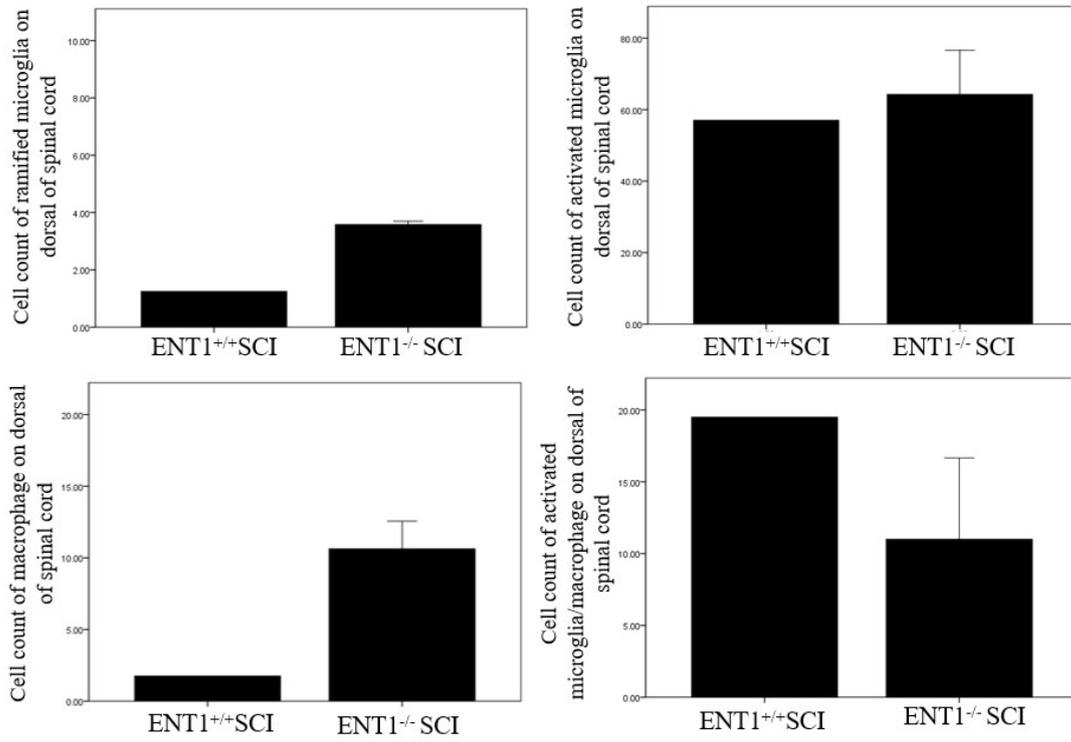
圖三、*Ent1*小鼠NISSL染色，上圖為染色代表圖，下圖為神經元計算數目。



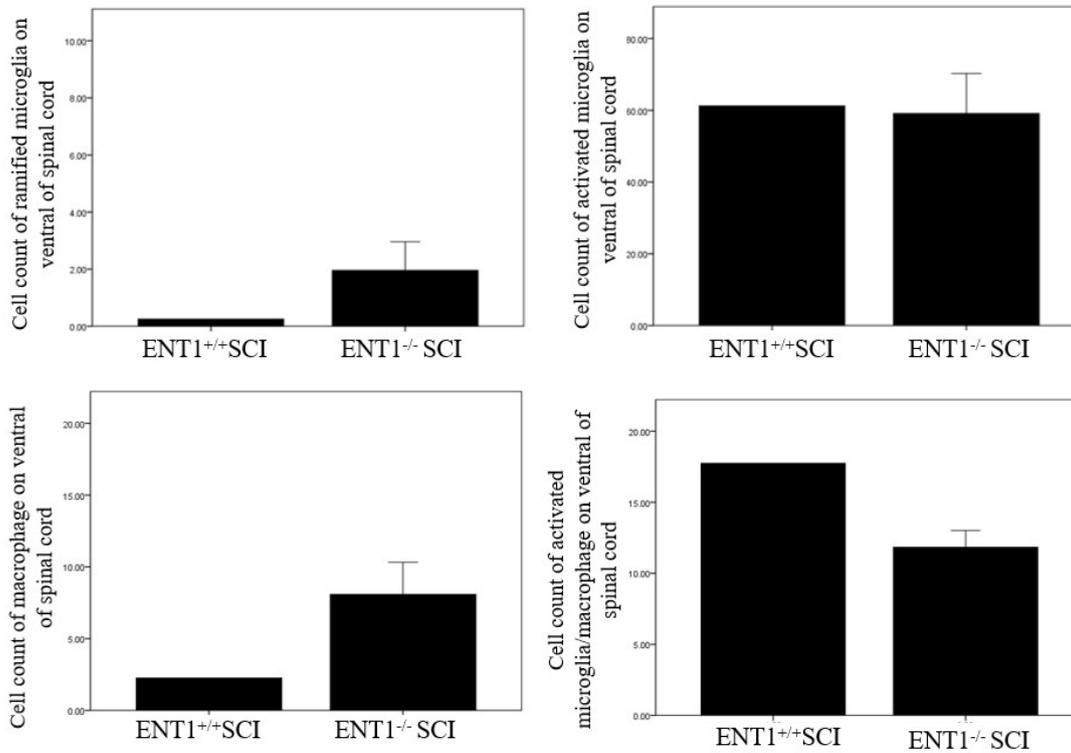


圖四、*Ent1*小鼠NeuN與Caspase-3共同染色圖，A圖為脊髓背側免疫螢光代表圖，B圖為脊髓腹側，C圖為神經元有表現Caspase-3數目之比較。

C
Dorsal

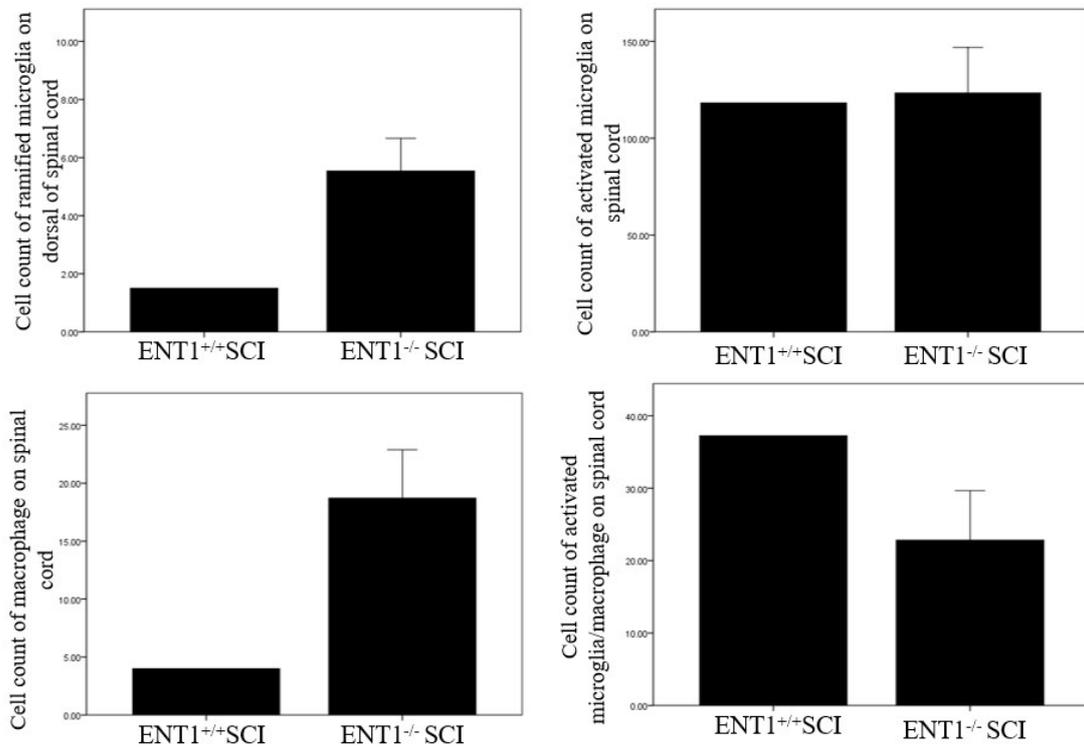


D
Ventral

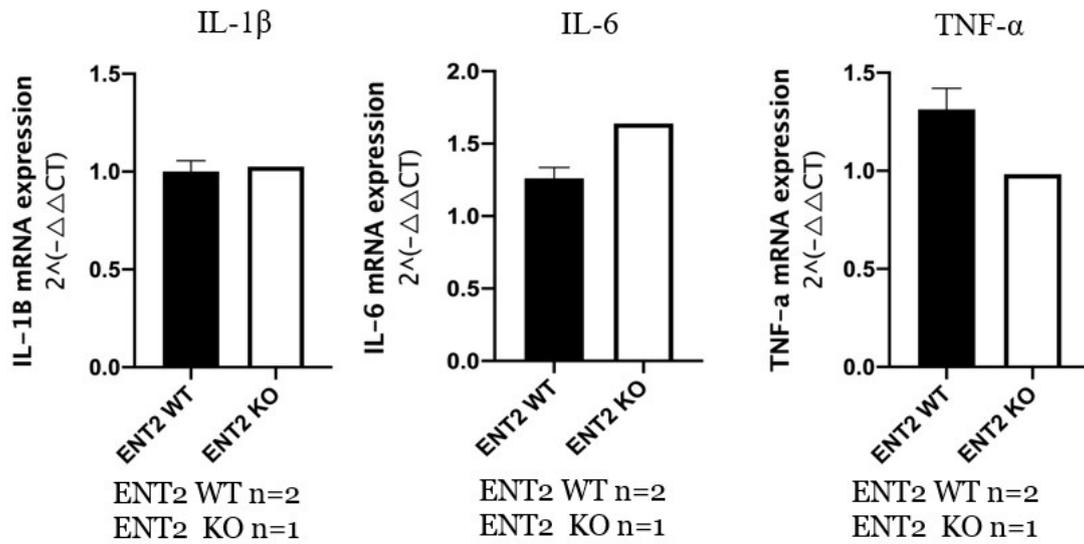


E

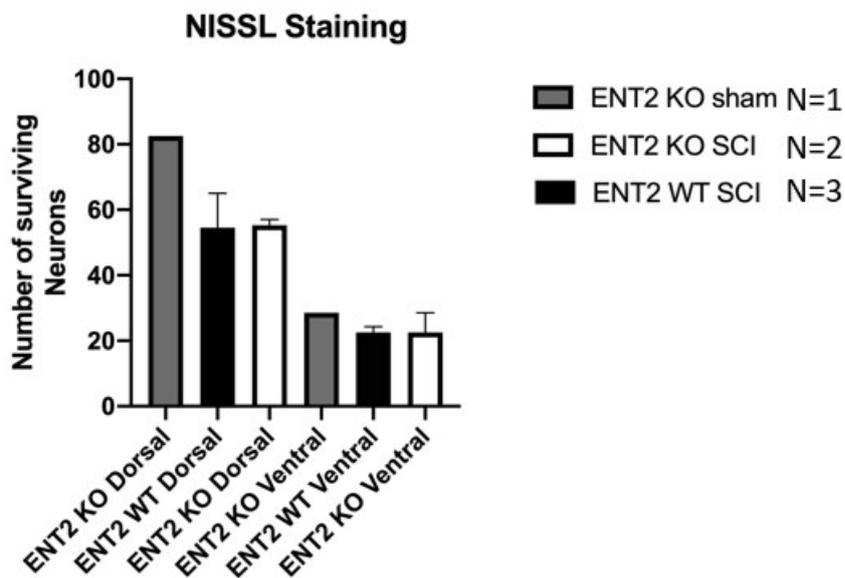
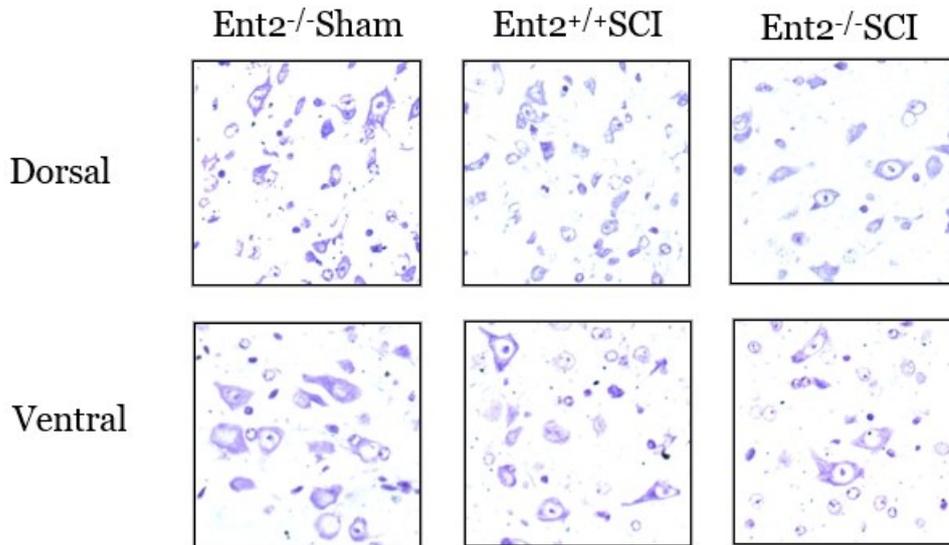
All



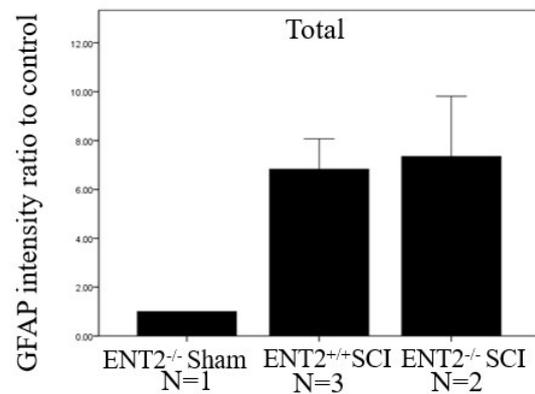
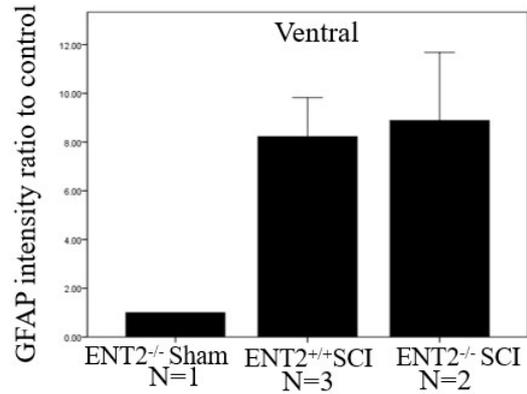
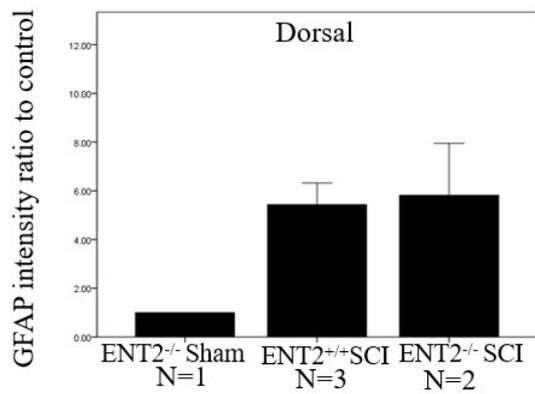
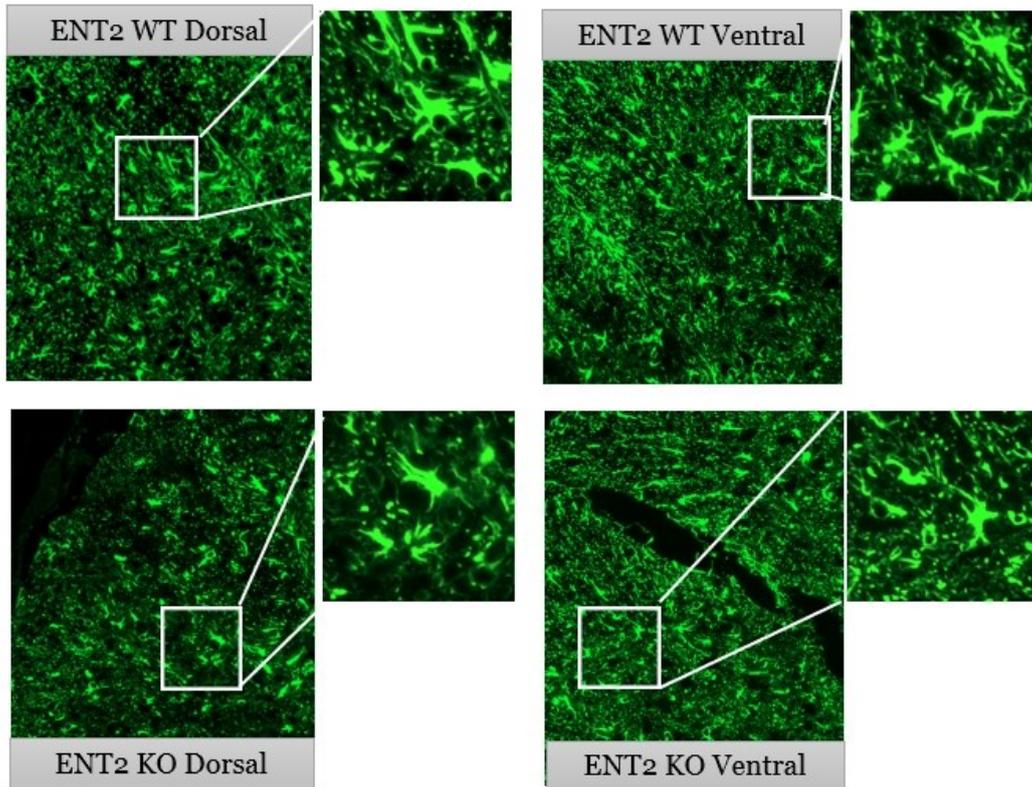
圖五、*Ent1*小鼠NeuN與Caspase-3共同染色圖，A圖為脊髓背側免疫螢光代表圖，B圖為脊髓腹側，C-E圖為IBA-1不同細胞型態、CD68單獨表現或是IBA-1與CD68共同表現數目之比較。白色箭頭為未活化microglia，紅色箭頭為活化microglia，黃色箭頭為單獨CD68表現為macrophage、藍色箭頭則為IBA-1與CD68共同表現。



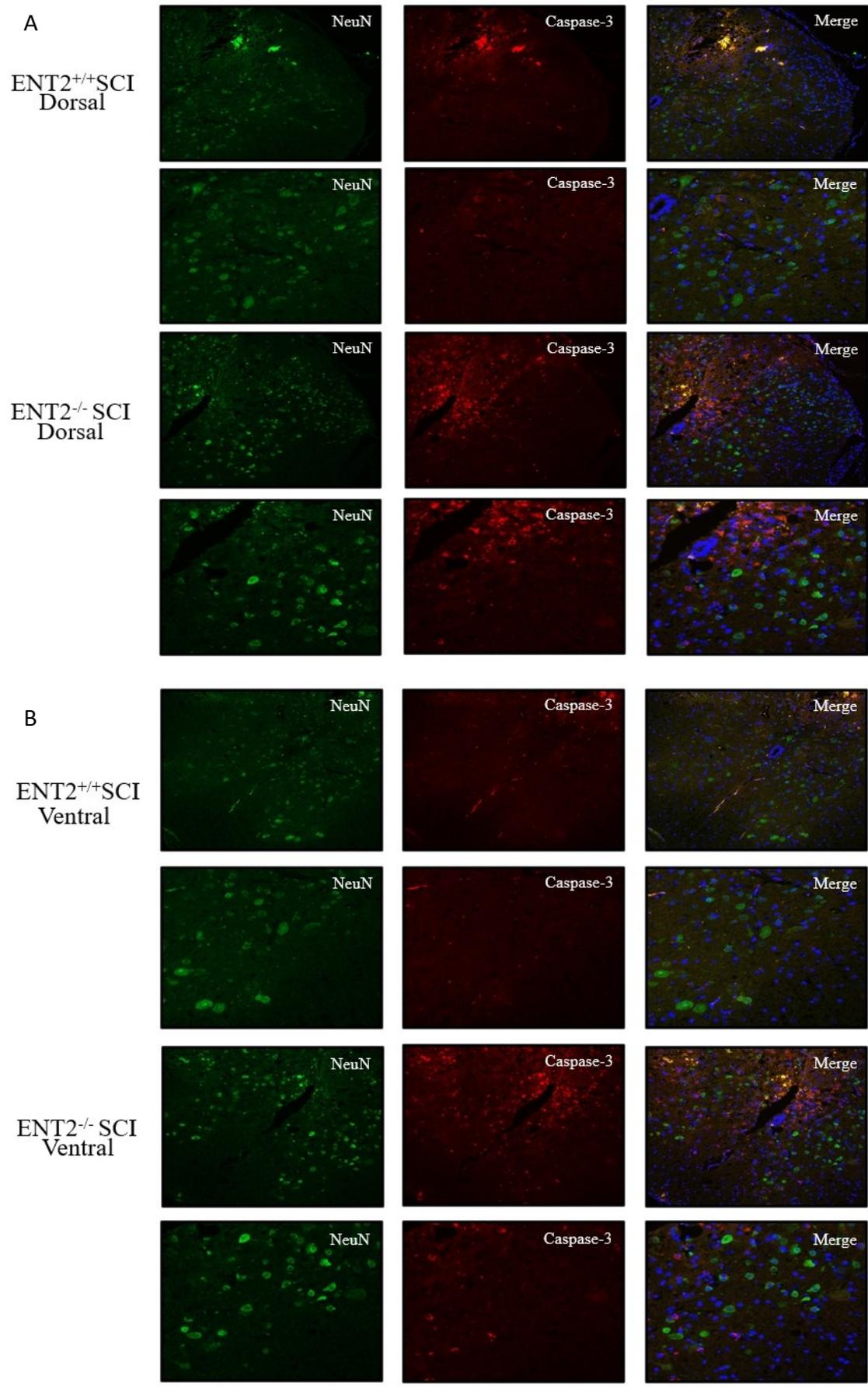
圖六、*Ent2*小鼠脊髓損傷後72小時IL-1 β 、IL-6以及TNF- α 之mRNA表現量。



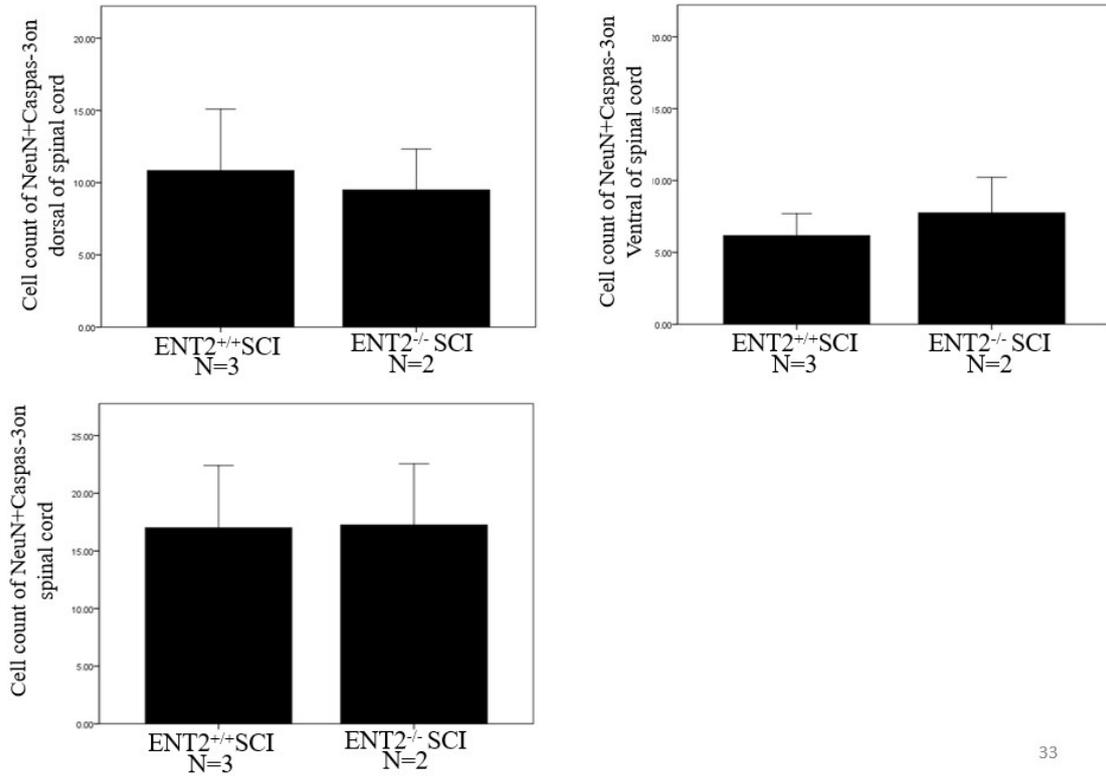
圖六、*Ent2*小鼠NISSL染色，上圖為染色代表圖，下圖為神經元計算數目。



圖七、*Ent2*小鼠GFAP染色圖，上圖為GFAP免疫螢光代表圖，下圖為螢光表現量之比較。

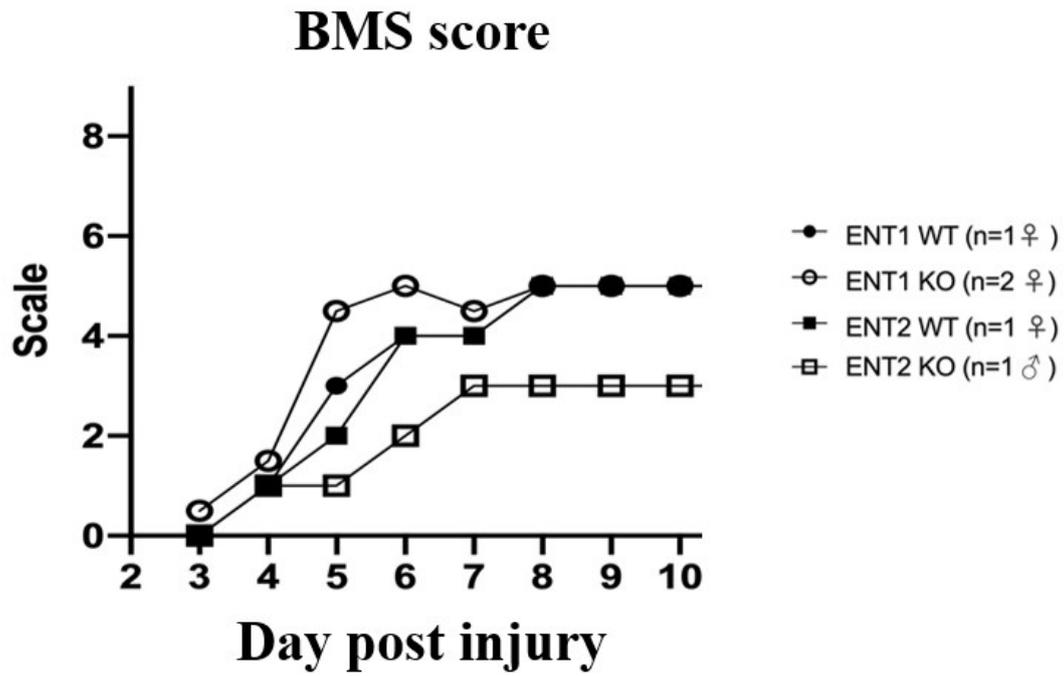


C



33

圖九、*Ent2*小鼠NeuN與Caspase-3共同染色圖，A圖為脊髓背側免疫螢光代表圖，B圖為脊髓腹測，C圖為神經元有表現Caspase-3數目之比較。



圖十、Ent1或Ent2小鼠脊髓損傷後1~10日BMS(Basso Mouse Scale)分數曲線圖。

TABLE 1. SCORES AND OPERATIONAL DEFINITIONS FOR THE BASSO MOUSE SCALE FOR LOCOMOTION (BMS)

Score	
0	No ankle movement
1	Slight ankle movement
2	Extensive ankle movement
3	Plantar placing of the paw with or without weight support -OR- Occasional, frequent or consistent dorsal stepping but no plantar stepping
4	Occasional plantar stepping
5	Frequent or consistent plantar stepping, no coordination -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>some</i> coordination, paws <i>rotated</i> at initial contact <u>and</u> lift off (R/R)
6	Frequent or consistent plantar stepping, <i>some</i> coordination, paws <i>parallel</i> at initial contact (P/R, P/P) -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>rotated</i> at initial contact <u>and</u> lift off (R/R)
7	Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> <i>rotated</i> at lift off (P/R) -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>severe</i> trunk instability
8	Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>mild</i> trunk instability -OR- Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>normal</i> trunk stability and tail <i>down or up & down</i>
9	Frequent or consistent plantar stepping, <i>mostly</i> coordinated, paws <i>parallel</i> at initial contact <u>and</u> lift off (P/P), and <i>normal</i> trunk stability and tail <i>always</i> up.

附錄一、D. MICHELE BASSO 等1995年提出BMS Score。