

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050008
參展科別 動物學
作品名稱 利用 *SLC13A3* 基因於果蠅體內建構代謝疾病
模型
得獎獎項 大會獎 四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 王培育、李宏孝
作者姓名 劉芷杉

關鍵詞 果蠅、*SLC13A3*、代謝

作者簡介



我是劉芷杉，現在就讀北一女中數理資優班三年級。

在國中時期，因緣際會下參加了科學營，激發出我內心對科學研究的熱忱，帶我步入奧秘的科學殿堂。

升上高中後幸運地加入了王培育副教授的實驗室，在高二、高三專題研究的日子裡，因為有教授級學長姐的指導，我得以徜徉於科學的領域，在小小的果蠅身上發現大大的驚奇。

最後很開心能參加國際科展和大家分享我在研究上所獲得的感動和喜悅。

摘要

隨著慢性代謝疾病日益普及，藥物的研發及測藥用的生物模型也越來越被重視，因此我們欲建立一個模擬代謝疾病的生物模型，以供藥物測試對象。有研究發現，當果蠅身上發生 *I'm not dead yet (Indy)* 基因突變時，會使果蠅在高熱量飲食狀態下延長壽命、降低體重增長，且影響果蠅體內脂質的代謝功能，目前認為這些現象與養分運輸進入細胞的減少有相關。本實驗中我們將存在於人類身上且為 *Indy* 基因的哺乳類同源基因 *Solute carrier family 13, member 3 (SLC13A3)* 轉殖入果蠅體內，並分別在全身、頭部脂肪體、腹部脂肪體及神經細胞中過度表達後，觀察果蠅的生長與代謝變化。實驗結果發現 *SLC13A3* 基因於果蠅的頭部脂肪體及神經細胞表達確實會出現與代謝疾病患者類似的生理現象，如壽命縮短、體重及三酸甘油脂增加等，且此作用機制與 AMPK 訊息傳遞路徑相關。因此我們認為 *SLC13A3* 基因於果蠅體內過量表達適合做為代謝疾病的生物模型，對於往後藥物開發極具潛力。

Abstract

With the increasing popularity of chronic metabolic diseases, biological models for drug discovery and development become more and more important. For this reason, we hope to establish an animal model which can mimic biological aspects of metabolic diseases. Previous studies have reported that when *I'm not dead yet (Indy)* gene mutations occur in *Drosophila*, the flies show extended lifespan, reduced weight gain and altered lipid metabolism in a high-calorie diet. These phenomena are currently thought to be associated with the reduction of nutrient transportation into cells. In the experiment, we have generated several mutant fly lines carrying human *solute carrier family 13, member 3 (SLC13A3)* gene, a mammalian homologous gene of *Indy*, specifically overexpressed in whole body, head fat body, abdominal fat body and nerve tissues, respectively. Our results show that human *SLC13A3* overexpression in the head fat body and nerve tissues of *Drosophila* display physiological phenotypes similar to those of metabolic diseases in patients, such as shortened lifespan and increased weight gain and triglyceride and the mechanism is related to AMPK signaling pathway. Although the molecular effects of human *SLC13A3* overexpression in *Drosophila* require further investigations, we believe these results represent a suitable biological model for future applications in treating metabolic diseases.

壹、前言

一、研究背景

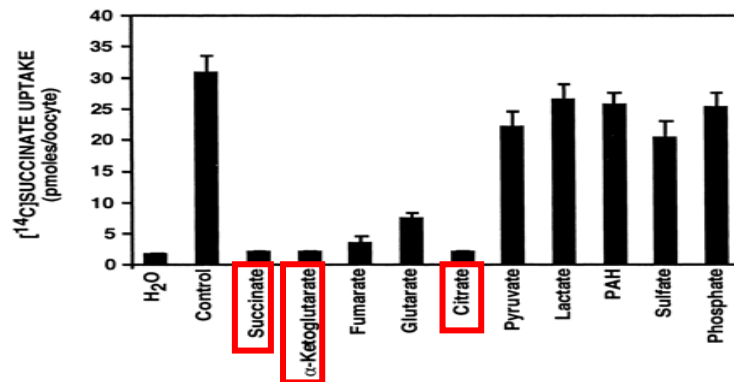
根據衛生福利部統計，台灣地區符合代謝症候群的人口約有 270 萬人，占男性 19.5%，女性 13.8%，而隨著肥胖人口的增加，代謝症候群也日益盛行，且代謝症候群所引發的腦血管疾病、糖尿病、心臟病等慢性病皆年居台灣十大死因中，已成為世界及我國重要的公共衛生議題。

代謝症候群的發生一般認為與飲食習慣有很大的關係，自 1935 年起即有很多研究證據指出，節制生物的卡路里攝取，能影響其生長與代謝並顯著延長壽命(Geoffrey Giller., 2014)。卡路里節制對於改善代謝及促進身體健康的效果十分驚人，然而，這些方法都有一定的代價，如動物必須處於半飢餓的狀態，或是降低生育能力，於現實生活上難以施行在人類身上。而在 2000 年，著名遺傳學家 Blanka Rogina 與 Stephen Helfand 等人發現了一種不尋常的果蠅突變，為老化研究帶來一絲希望，這種突變抑制果蠅的一個基因表現，與正常果蠅相比，這些突變果蠅的壽命增加了 45-92%，他們將此基因命名為 *I'm not dead yet (Indy)*。(Rogina, B., Helfand, S.L., 2000)

(一) *Indy* 基因

Indy 基因表現於細胞膜上的運轉蛋白，負責運送檸檬酸循環 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 的中間產物，如琥珀酸、檸檬酸等。圖一顯示，實驗將殖有 *Indy* 基因的細胞分別置於多種羧酸物質中，觀察此細胞於各種羧酸物質的競爭下，對琥珀酸^[14C]的吸收力，結果發現琥珀酸鹽、檸檬酸和 α -酮戊二酸皆可導致琥珀酸^[14C]的吸收率下降，顯示 *Indy* 基因對於這些物質有較高的親和力，為細胞主要的運輸物質。(Knauf, F et al., 2002)

在 *Indy* 突變果蠅中，檸檬酸被運輸至細胞中的速率較低，進而降低細胞內檸檬酸鹽對脂肪酸和膽固醇的合成，而出現類似於卡路里節制理論中的代謝變化（Birkenfeld, et al., 2011.）。由於 *Indy* 突變果蠅能夠在食物攝取量、生育能力及活動力不受影響，各方面都處於健康狀況的條件下延長壽命，*Indy* 基因被認為是對抗老化及代謝疾病治療的重要標靶。

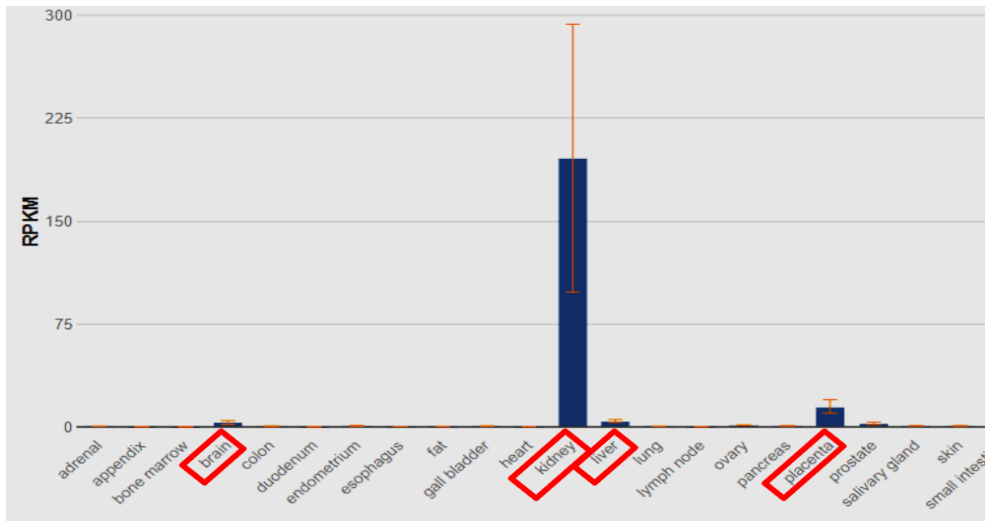


圖一、帶有 *Indy* 基因轉殖的細胞於各種羧酸物質的競爭下，對琥珀酸^[14C]的吸收力。（取自 Knauf, F et al., 2002）

(二) *SLC13* 基因家族

哺乳類動物身上 *Indy* 基因的同源蛋白，根據核酸序列的相似性，被歸類在 *SLC13* 基因家族之中（*SLC13A1-SLC13A5*）。*SLC13* 基因家族皆表現於細胞膜上的轉運蛋白，介導 Na⁺ 在上皮細胞（主要是腎臟、肝臟、小腸和胎盤）和神經細胞質膜上的轉運。（Ana M.Pajor, 2006）

在 *SLC13* 基因家族中，以 *SLC13A3* 和 *SLC13A5* 和果蠅基因 *Indy* 的序列較為相近，*SLC13A3* 表現於許多物種上，如圖三，在人類體內 *SLC13A3* 表現於肝、腦、腎、胎盤，負責 TCA 循環中間物的運輸。有研究發現其 mRNA 的表現量會隨著年齡的增長而上升，且通過基因分析鑑定出 *SLC13A3* 與高血壓及第二型糖尿病的發生有關。（Diana M Willmes, 2013）



圖二、*SLC13A3* 基因在人類特定部位的表現量。(取自 NCBI)

二、 研究動機

隨著人口高齡化的發展，慢性代謝疾病越來越普及，許多科學家致力於相關藥物的研發，因此，我們希望利用 *SLC13A3* 基因建立一個模擬慢性代謝疾病的生物模型，以供未來藥物測試的對象。目前 *SLC13A3* 基因被認定可能和代謝疾病相關，但相關的研究不多，且尚未有 *SLC13A3* 基因缺陷的小鼠模型的相關報導，因此本實驗中利用 *SLC13A3* 在果蠅體內的過度表現觀察果蠅的各項生理變化，以探討 *SLC13A3* 在果蠅體內的作用機制。

貳、研究目的及研究問題

- 一、探討 *SLC13A3* 在果蠅體內過度表現對果蠅的壽命及相關生理變化的影響。
- 二、了解 *SLC13A3* 影響生理代謝的作用機制。
- 三、利用 *SLC13A3* 建立一個模擬慢性代謝疾病的生物模型。

參、研究設備及器材

設備：即時聚合酶連鎖反應儀、磁力攪拌器、微波爐、恆溫箱、精秤、研磨機、吸光光度儀、離心機、解剖顯微鏡、光學顯微鏡、電泳及轉印裝置

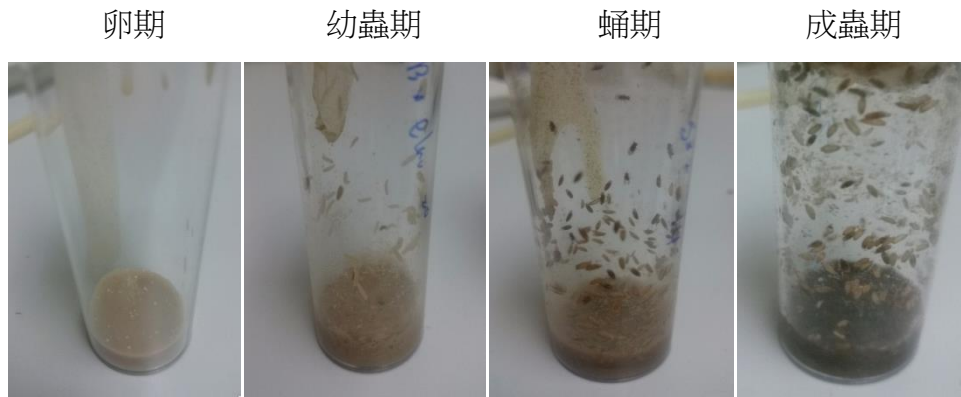
藥品：酒精、美服培酮 (RU486 TargetMol-T1102)、對羟基苯甲酸甲酯 (防腐劑)、0.5% FD&C no. 1 blue food dye (sigma)、磷酸鹽緩衝生理鹽 (PBS)、NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel)、SYBR Green Master Mix (Fermentas)、Triglyceride Quantification Colorimetric Assay Kit、Portein Assay dye、Portein sample dye、30% Acrylamide Solution、10% SDS solution、ammonium persulfate (APS)、TEMED solution、10X Running buffer、Transfer buffer

肆、研究過程或方法

一、黑腹果蠅 (學名：*Drosophila melanogaster*)

品系： w^{1118} , *tubulin-gene switch (GS)*, *S32-GS(#56756)*, *elav-GS(#43642)*, *S106-GS*, *UAS-GFP (#8151)*(取自布魯明頓果蠅庫存中心)。

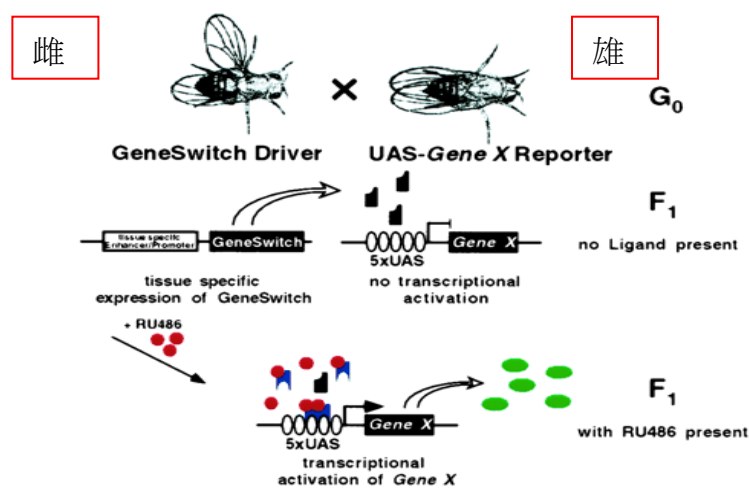
我們自 HEK-293 人類細胞(Human Embryonic Kidney Cells 293) 中提取 *SLC13A3* 基因片段，交由微傳股份有限公司 WellGenetics Inc 製作基因轉殖果蠅，利用顯微注射器將基因打入果蠅受精卵，篩選五珠健康果蠅分別命名為 A 到 E， 養殖於光照與黑暗 12 小時交替、濕度 60%、溫度 25°C 的恆溫箱中。我們取帶有 *Tubulin-gla4*、*S32-gal4*、*S106-gal4* 及 *elav-gal4* gene switch 的處女果蠅和帶有 *UAS-SLC13A3* 基因的雄果蠅各十隻，養殖於同一果蠅管中，餵食 0.8% 洋菜粉 6% 酵母粉 2% 蔗糖及 4.5% 酵母粉，使其交配並收集子代。收集的子代以雄雌果蠅各 20 隻養殖於一果蠅管，餵食 1% 洋菜粉 5% 酵母粉 5% 蔗糖、5% 玉米粉及 200 μ M RU486 或酒精(EtOH)，待其羽化後十天即進行實驗，而測定壽命的果蠅則是一羽化即被取出進行實驗。



圖三、果蠅由卵期、幼蟲期、蛹期至成蟲期的成長過程。

二、Gal4-gene switch 系統

當一隻帶有 Gal4 基因的果蠅和另一隻帶有 UAS-植入基因的果蠅交配後，生下來的子代會表現目標基因。Gal4-gene switch 系統作用機制是透過修飾的 Gal4 基因前面接的啟動子促使修飾的 Gal4 基因表現，而被轉譯後修飾的 Gal4 蛋白配合 RU486(美服培酮 Mifepristone) 的使用即會活化 UAS-植入基因，進而促使目標基因表達，如圖五。在此系統中，必須添加 RU486 才能讓目標基因成功表現，因此添加 RU486 為我們控制 *SLC13A3* 是否表現的決定機制。



圖四、Gal4-gene switch 系統作用機制。(取自 Benjamin H White ,2001)

三、即時聚合酶連鎖反應(qPCR)

我們利用 NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel)自 20 隻帶有 *Tub-GS>UAS-SLC13A3* 基因的果蠅中提取 RNA，並利用 cDNA 合成酶(Thermo)將 RNA 反轉錄成 cDNA，用聚合酶連鎖反應儀和 SYBR Green Master Mix (Fermentas)進行 qPCR。我們選用在細胞中穩定表現的 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)作為對照組和 *SLC13A3* 基因的表現量做比較，在 95°C 反應 15 秒鐘，60°C 反應 1 分鐘，重複 40 次。mRNA 的表現量用相對定量 $\Delta\Delta$ Ct 法表示。引子序列為：

GAPDH：5' -GACGAAATCAAGGCTAAGGTCG -3' 和

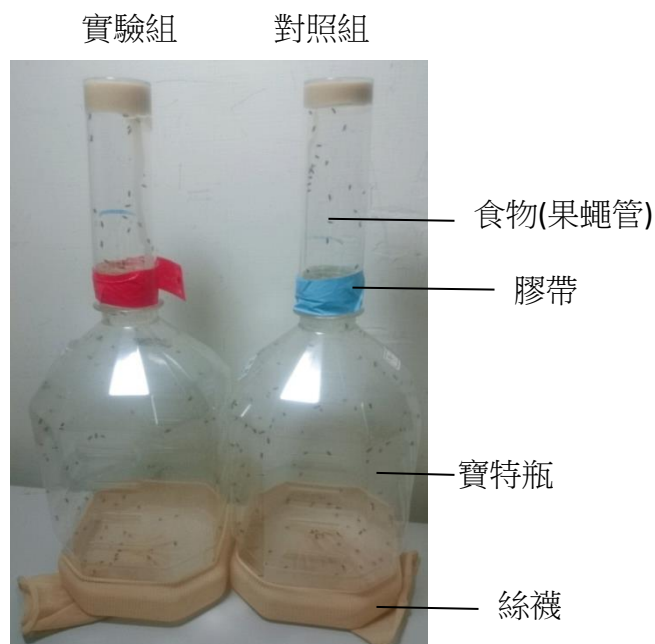
5' -AATGGGTGTCGCTGAAGAAGT-3'

SLC13A3：5-CGGCCAAGAAGGTGTGGAG -3' 和

5' - AAGCAGCGGCCTTCCTTG-3'

四、測定果蠅壽命

將剛羽化的實驗組及對照組果蠅以雄雌果蠅各 110 隻為一紀錄單位，養殖於測定壽命用之自製養殖裝置中，放至恆溫箱內，以兩天為單位記錄一次死亡果蠅數目並更換食物。



圖五、實驗中測定果蠅壽命之自製養殖裝置。

五、測定果蠅體重

將羽化後十天大的實驗組及對照組果蠅以雄或雌果蠅十隻為一紀錄單位，在早上 10:30 轉移果蠅至裝有額外添加 0.5% FD&C no. 1 blue food dye 食物的果蠅管中，餵食 30 分鐘後將果蠅在-20°C 凍死，用精秤測量果蠅體重。

六、測定果蠅食物攝取量

將測量完體重後的實驗組及對照組果蠅以雄或雌果蠅十隻為單位溶於 400mLPBS，以研磨機搗碎並離心後取 200mL 上清液，用吸光光度儀測量染劑的吸光值(波長設定 620nm)。

七、測定果蠅生育能力

將羽化後十天大的實驗組及對照組果蠅以雄雌果蠅各三隻為一紀錄單位，置於恆溫箱 24 小時，以解剖顯微鏡紀錄產卵量。

八、測定果蠅抗飢餓能力

將羽化後十天大的實驗組及對照組果蠅以雄或雌果蠅十隻為一紀錄單位，在 16:00 轉移果蠅至只添加 1%洋菜粉食物的果蠅管中，置於恆溫箱內並在每天的 8:00、12:00、16:00 和 20:00 紀錄死亡的果蠅數目。

九、測定果蠅體內三酸甘油酯含量變化

將羽化後十天大的實驗組及對照組果蠅以雄或雌果蠅十隻為單位分別溶於 200mL 或 400mL 5% NP40 中，用研磨機搗碎後分裝成兩管。將其中一管加熱於 85°C 下 5 分鐘，重複兩次，離心後利用 Triglyceride Quantification Colorimetric Assay Kit 測定果蠅體內三酸甘油酯濃度，另一管直接離心後，以 20%Portein Assay dye 對果蠅體內蛋白質進行定量，進而求得果蠅體內三酸甘油酯重/蛋白質重之濃度。

十、以西方墨點法測定 *SLC13A3* 對 AMPK、dTOR 蛋白表現量之影響

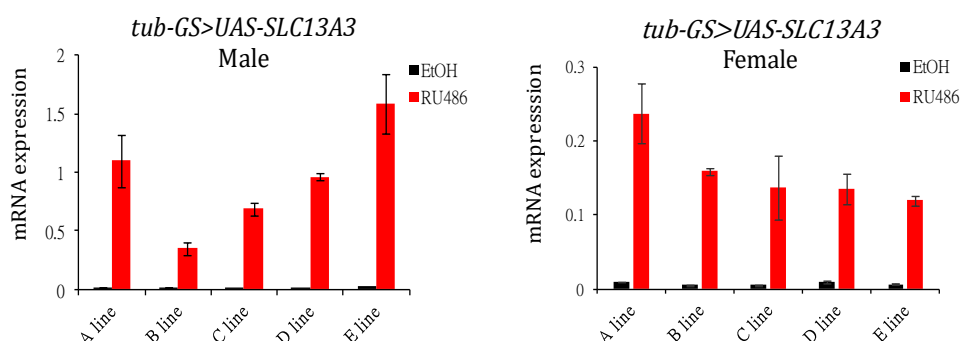
將蛋白質樣品稀釋至 $50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，以 80°C 加熱 10 分鐘，加入 Running buffer 至電泳槽外槽，以電壓 165V，120 分鐘進行電泳分析。電泳完畢後，取 PVDF transfer membrane，用甲醇潤濕，以(-)3M paper-gel-membrane-3M paper(+)方向放入西方墨點轉印裝置，注入適量 transfer buffer，以電壓 140V，120 分鐘進行蛋白質轉印。

轉印後以 5%BSA blocking 搖晃 1 小時，完成後加一抗。放置 16 小時後以 TBST 沖洗三次，加入二抗，反應 1 小時，完成後再次以 TBST 沖洗三次，加入顯影劑曝光拍照

伍、研究結果及討論

一、基因表達

為了確認 *SLC13A3* 基因成功表達，我們取全身性表達基因(*Tub-GS>UAS-SLC13A3*)的果蠅進行 qPCR 測試，實驗結果顯示 *SLC13A3* 基因的表現量在有添加 RU486 的果蠅上確實都有明顯大幅提升，即此 Gal4-GS 系統能正確的運作。

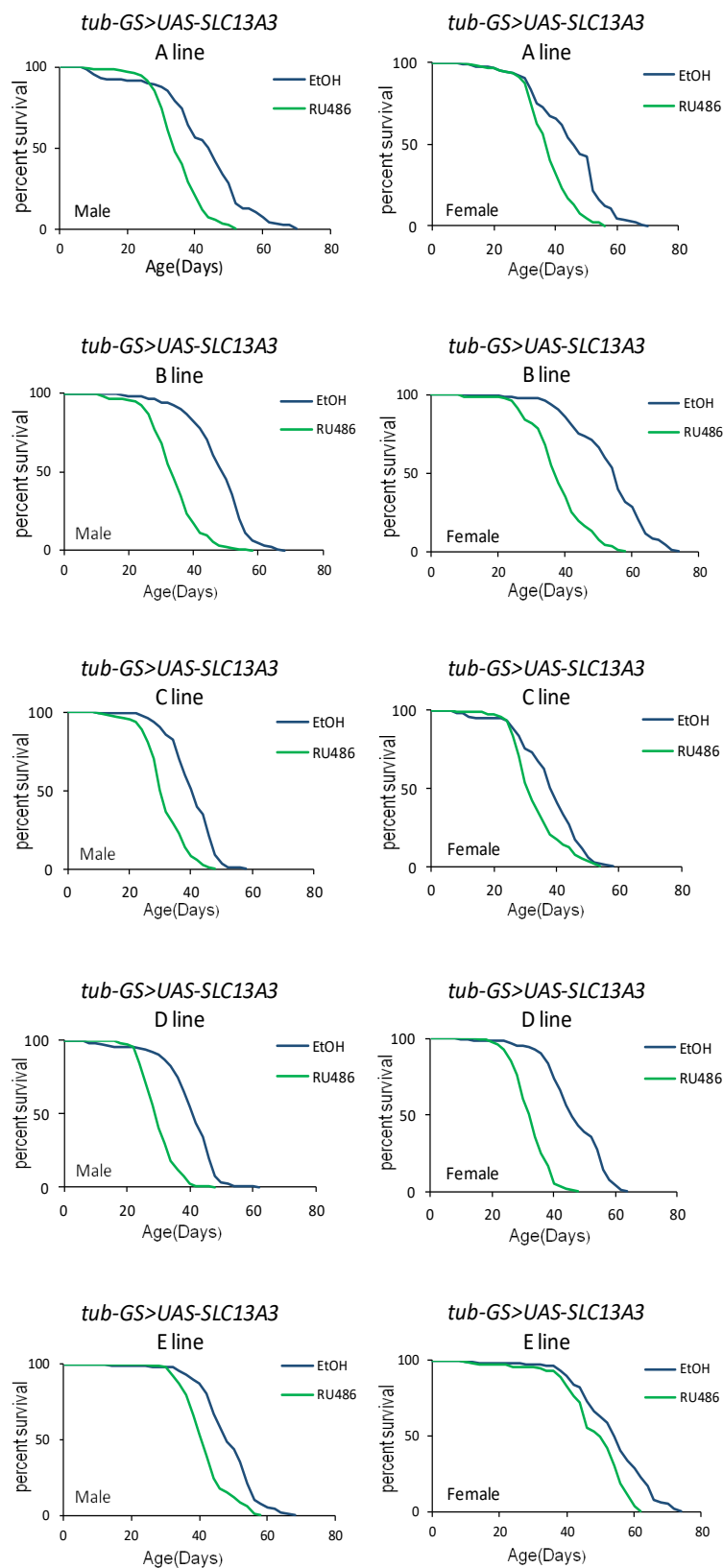


圖六、以 qPCR 驗證人類 *SLC13A3* 基因於雄果蠅及雌果蠅全身中過量表達。圖表以 mean \pm SEM (n=2) 統計。本實驗由實驗室助理協助完成。

二、*SLC13A3* 基因全身性表現對果蠅壽命的影響

為了探討 *SLC13A3* 基因在果蠅體內過度表達對果蠅壽命的影響，我們以全身性表達 *SLC13A3* 基因的果蠅進行實驗。實驗結果顯示，人類 *SLC13A3* 基因在果蠅全身表達，造成壽命明顯縮短的現象，而為了更深入解其作用機制，我們將會在果蠅的全身、頭部脂肪體、腹部脂肪體及神經組織過度表達 *SLC13A3* 基因，並觀察果蠅的生理變化，由於壽命測定結

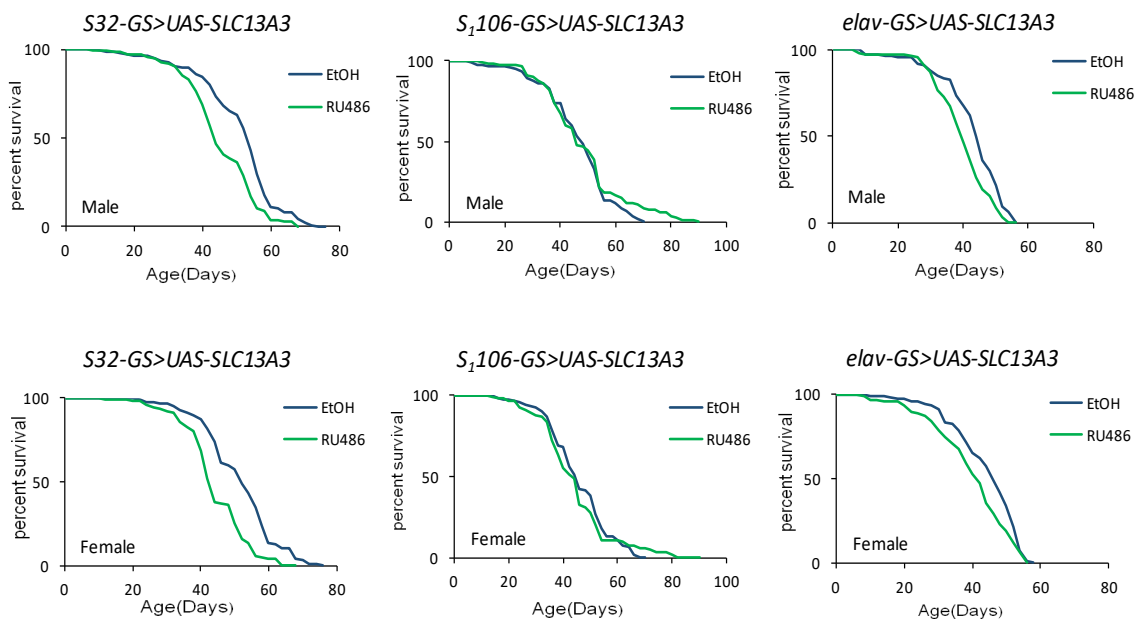
果中以 D 組最為明顯，故後續實驗將以此組的果蠅進行。



圖七、A 到 E 組雄雌果蠅全身性表達 *SLC13A3* 基因(*Tubulin-gla4 GS>SLC13A3*)壽命變化。圖表以 log-rank test 統計(n=170~220)，結果 p 值皆<0.05。

三、*SLC13A3* 基因在特定部位表現對果蠅壽命的影響

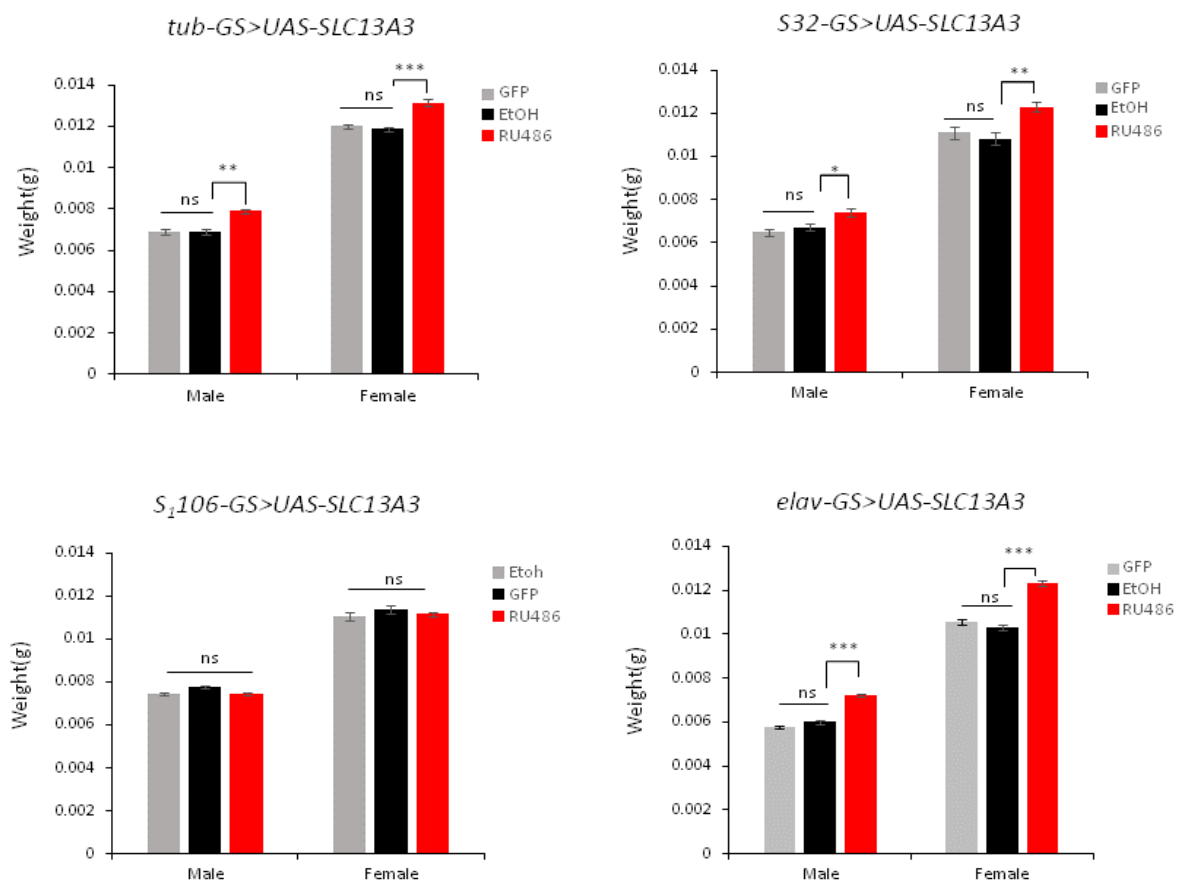
欲探討 *SLC13A3* 基因的作用部位，我們將此基因分別在頭部脂肪體 (*S32-GS>UAS-SLC13A3*)、腹部脂肪體 (*S₁106-GS>UAS-SLC13A3*)及神經組織 (*elav-GS>UAS-SLC13A3*)過度表達，觀察果蠅的壽命變化。實驗結果顯示 *SLC13A3* 基因於果蠅的頭部脂肪體和神經表達，皆促使果蠅壽命縮短，而表達於腹部脂肪體則對果蠅壽命無影響。



圖八、*SLC13A3* 基因於果蠅特定部位表達對果蠅壽命之影響。圖表以 log-rank test 統計 (n=170~220)，結果顯示 *SLC13A3* 基因表現於頭部脂肪體和神經的 p 值皆<0.05，而表現於腹部脂肪體則無統計差異(ns)。

四、*SLC13A3* 基因在特定部位表現對果蠅體重的影響

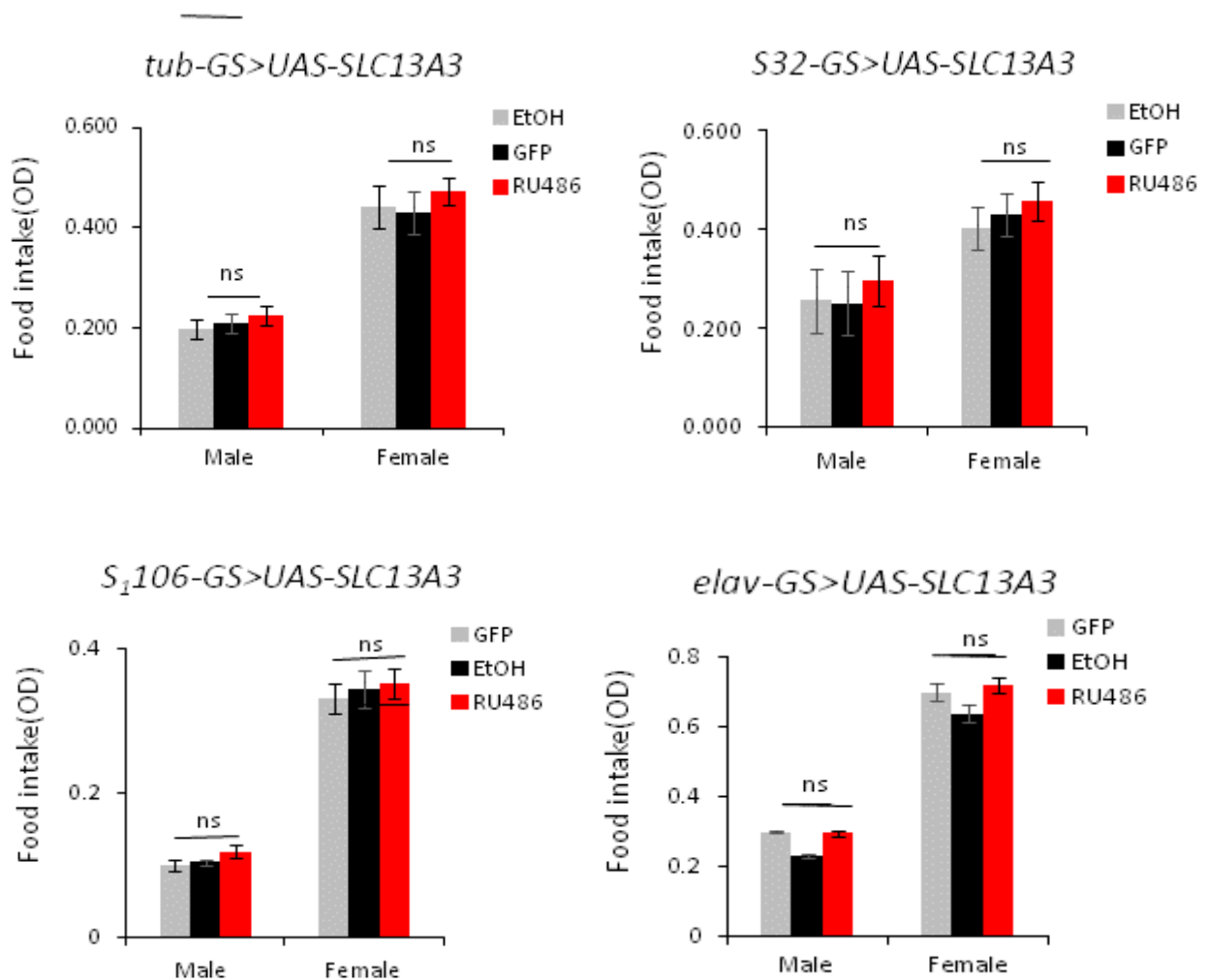
為了探討 *SLC13A3* 基因對果蠅壽命的影響是否與體內代謝相關，我們初步對果蠅進行體重測定。為確保攝取 RU486 並不會影響果蠅的生理，我們將餵食 RU486 後表現螢光蛋白的果蠅 (*-GS>UAS UAS-GFP*) 一起比較，實驗結果顯示於全身 (*tub-GS>UAS-SLC13A3*)、頭部脂肪體 (*S32-GS>UAS-SLC13A3*) 及神經組織 (*elav-GS>UAS-SLC13A3*) 過度表達 *SLC13A3* 的果蠅，體重皆有增加的趨勢，而於腹部脂肪體 (*S106-GS>UAS-SLC13A3*) 過度表達 *SLC13A3* 的果蠅則沒有差異。



圖九、*SLC13A3* 基因於果蠅特定部位過度表達對果蠅體重的影響。圖表以 mean \pm SEM (n=20~30) 統計，統計結果 *SLC13A3* 基因表現於全身、頭部脂肪體和神經的 p 值皆 <0.05，而表現於腹部脂肪體則統計差異 (ns)。(* 表示 p < 0.05 ; ** 表示 p < 0.01 ; *** 表示 p < 0.001)。

五、*SLC13A3* 基因在特定部位表現對果蠅食物攝取的影響

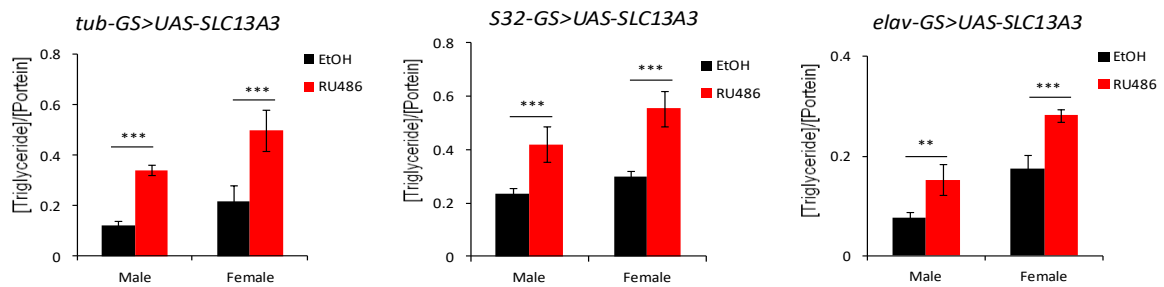
發現有過度表達 *SLC13A3* 基因的果蠅體重確實增加後，我們想進一步探討此現象是否由果蠅食物攝取量的改變導致，實驗結果顯示 *SLC13A3* 基因在果蠅各部位過度表現對食慾方面都沒有統計差異，因此果蠅體重的增加與食物攝取量無明顯相關，推測可能是果蠅體內的代謝出現不尋常而促成果蠅體重增加。



圖十、*SLC13A3* 基因於果蠅特定部位過度表達對果蠅食物攝取量的影響。圖表以 mean ± SEM (n=20~30) 統計，統計結果皆 P>0.05，無統計差異 (ns)。

六、*SLC13A3* 基因在特定部位表現對果蠅體內三酸甘油酯含量影響

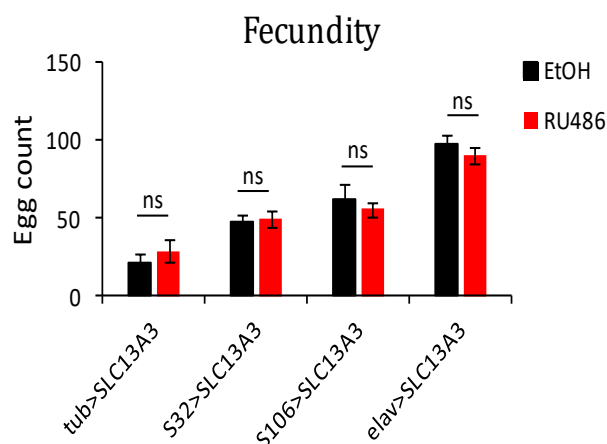
欲探討果蠅體重增加的原因，我們對果蠅進行三酸甘油酯的測定，實驗結果顯示，於全身(*tub-GS>UAS-SLC13A3*)、頭部脂肪體 (*S32-GS>UAS-SLC13A3*)及神經組織 (*elav-GS>UAS-SLC13A3*)過度表達 *SLC13A3* 的果蠅，體內三酸甘油酯含量皆有增加的趨勢，推測果蠅體重的增加與果蠅體內三酸甘油酯的代謝變化相關。



圖十一、*SLC13A3* 基因於果蠅特定部位過度表達對果蠅體內三酸甘油酯含量的影響。圖表以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ($n=20\sim30$) 統計，統計結果 *SLC13A3* 基因表現於全身、頭部脂肪體和神經的 p 值皆 <0.05 。(*表示 $p<0.05$ ；**表示 $p<0.01$ ；***表示 $p<0.001$)。

七、*SLC13A3* 基因在特定部位表現對果蠅生育能力的影響

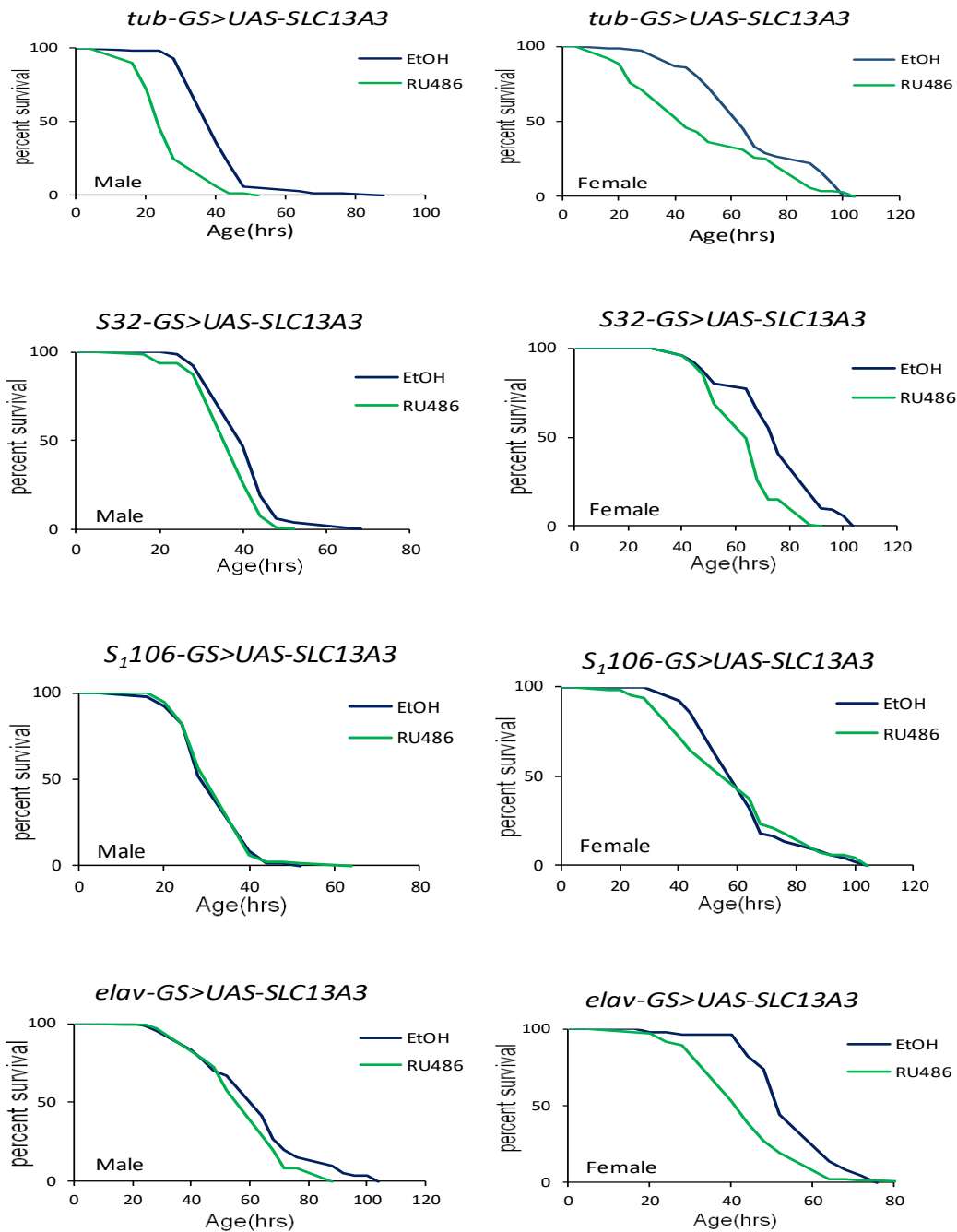
欲探討此基因在果蠅體內過度表達是否會造成果蠅其他生理影響，我們也測定果蠅的產卵量，以觀察果蠅生育能力的變化。實驗結果顯示 *SLC13A3* 基因在果蠅各部位表現對果蠅生育能力皆沒有統計差異。



圖十二、*SLC13A3* 基因於果蠅特定部位過度表達對生育能力的影響。圖表以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ($n=10\sim20$) 統計，統計結果皆 $P>0.05$ ，無統計差異(ns)。

八、*SLC13A3* 基因在特定部位表現對果蠅抗飢餓能力的影響

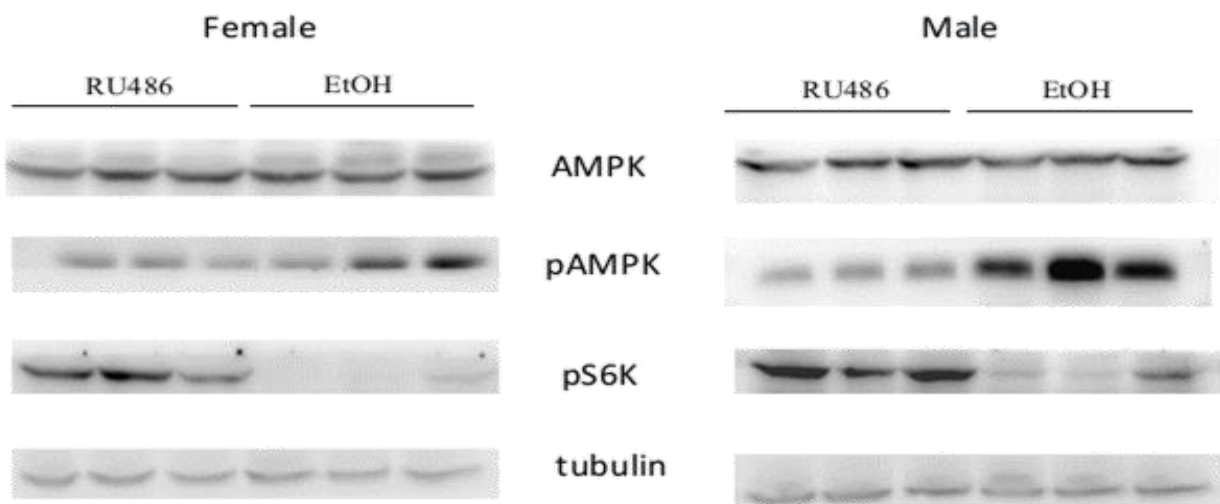
我們對果蠅進行抗飢餓能力的實驗，藉此觀察果蠅是否能有效運用體內養分抵抗飢餓，然而，實驗結果顯示 *SLC13A3* 於全身(*tub-GS>UAS-SLC13A3*)、頭部脂肪體(*S32-GS>UAS-SLC13A3*)及神經組織(*elav-GS>UAS-SLC13A3*) 過度表達的果蠅，在飢餓狀態下的生存時間都有減少的趨勢，但是 *SLC13A3* 於腹部脂肪體(*S₁106-GS>UAS-SLC13A3*)過度表達的果蠅則無統計差異。



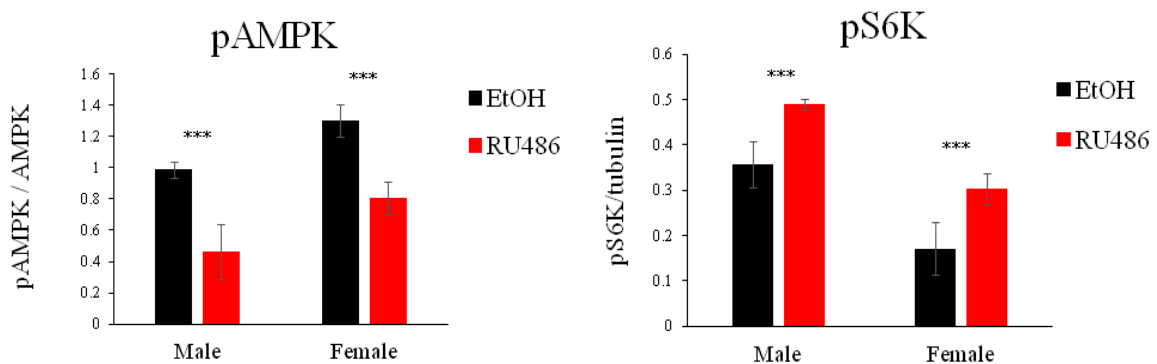
圖十三、*SLC13A3* 基因於果蠅特定部位表達對抗飢餓能力的影響。圖表以 log-rank test (n=70~100) 統計，結果 *SLC13A3* 基因表現在全身、頭部脂肪體和神經的 p 值皆<0.05，而表現於腹部脂肪體則無統計差異(ns)。

九、*SLC13A3* 基因對果蠅 AMPK、dTOR 蛋白表現量之影響

由於 *Indy* 基因是透過 AMPK、dTOR 蛋白調控果蠅的生理，我們也對過度表達 *SLC13A3* 的果蠅進行西方墨點法，以測定 AMPK、dTOR 蛋白的表現。實驗結果顯示全身性表達 *SLC13A3* 的果蠅體內的 AMPK 表現量顯著降低，而 dTOR 表現量顯著提升。



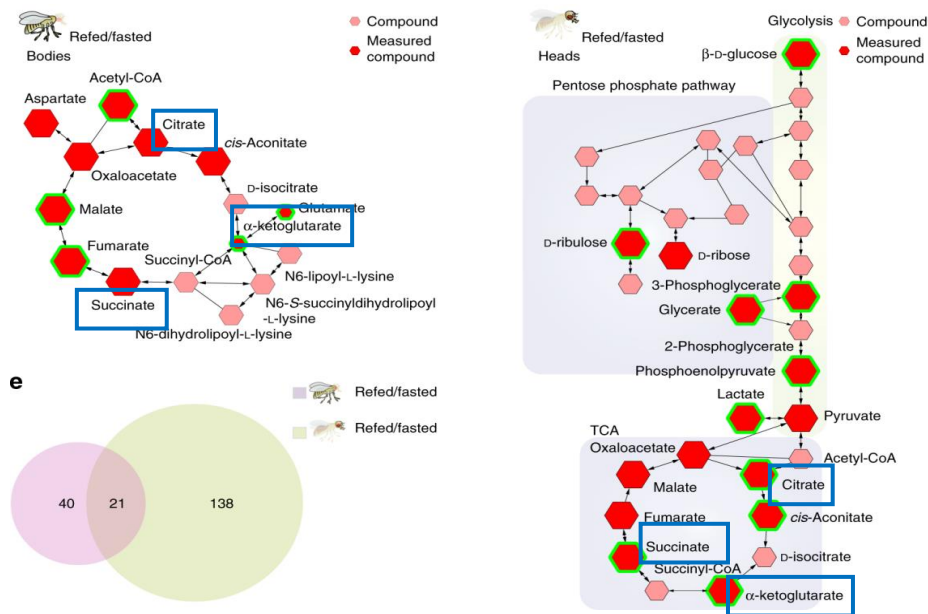
圖十四、西方墨點法測定 *SLC13A3* 基因對果蠅 AMPK、dTOR 蛋白表現量影響之結果。



圖十五、量化 *SLC13A3* 基因對果蠅 AMPK、dTOR 蛋白表現量之影響。結果全身性表達 *SLC13A3* 的果蠅體內的 AMPK 表現量降低，而 dTOR 表現量提升，統計 p 值皆<0.05。(*表示 p<0.05；**表示 p<0.01；***表示 p<0.001)。

十、討論

本實驗成功建立了與代謝疾病相仿的模型，並於實驗結果中發現當 *SLC13A3* 基因單獨表達在頭部脂肪體及神經時，皆有發生壽命縮短、體重三酸甘油酯增加的現象，但在腹部脂肪體卻沒有。為了解釋此現象，我們蒐集了許果蠅代謝的相關資料，其中發現了一篇關於果蠅在飢餓和正常飲食時頭部和腹部的代謝變化的文獻。實驗中探討果蠅是否處於飢餓狀態對身體和頭部新陳代謝的影響，其中由 *SLC13A3* 基因負責運輸的物質，如琥珀酸鹽，檸檬酸和 α -酮戊二酸，在頭部都有明顯變化，而在腹部沒有，可以解釋為何 *SLC13A3* 基因的表達只對頭部脂肪體有影響而對於腹部則無。在有變化的化合物中，有 159 種位於頭部，61 種位於腹部，有 21 種並存於兩者，且位於頭部的以脂質佔大多數（85 種），與本實驗中三酸甘油酯測定結果相符，我們進而推測過量表現 *SLC13A3* 基因造成果蠅的體重上升、抗飢餓能力下降等生理變化的主因，可能與脂質含量的變化最為相關。此外，實驗結果也發現，果蠅的體重雖然增加，但抗飢餓能力卻反而下降，我們推測可能原因為果蠅體內雖然有脂肪存積，卻無法被正常代謝利用，使得果蠅無法抵抗飢餓，往後會在進行更多代謝體相關的研究加以驗證。



圖十六、正常果蠅與飢餓果蠅的身體和頭部的代謝變化，六邊形的大小為正常果蠅和飢餓果蠅之間代謝化合物的變化量，標示綠色輪廓為具有統計意義的測量值。(取自 Daniel Wilinski.2019)

陸、結論與應用

根據目前實驗結果，在果蠅身上過度表達 *SLC13A3* 基因時，確實與 *Indy* 基因缺失的結果相互驗證，使果蠅體重及三酸甘油酯增加，進而造成壽命的縮短，且 *SLC13A3* 的表現對果蠅的食慾及生育能力皆沒有影響，而 AMPK、dTOR 兩蛋白在此生理變化中參與分子機轉，這些現象有類似於代謝疾病患者的生理反應，因此我們認為 *SLC13A3* 基因是個適合做為代謝疾病生物模型的潛力基因。未來我們將會針對 *SLC13A3* 基因對脂肪代謝途徑的影響進行更深入的研究，以完整呈現 *SLC13A3* 影響果蠅代謝作用的細胞及分子機制。

柒、參考資料

- 一、Daniel Wilinski, Jasmine Winzeler, William Duren, Jenna L. Persons, Kristina J. Holme, Johan Mosquera, Morteza Khabiri, Jason M. Kinchen, Peter L. Freddolino, Alla Karnovsky. (2019) Rapid metabolic shifts occur during the transition between hunger and satiety in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications* 10:4052.
- 二、Willmes DM, Kurzbach A, Henke C, Schumann T, Zahn G, Heifetz A, Jordan J, Helfand SL & Birkenfeld AL. (2018) The longevity gene *INDY* (I'm Not Dead Yet) in metabolic control. *Pharmacol Ther.* 185:1-11.
- 三、Hemphill W, Rivera O, Talbert M. (2018) RNA-Sequencing of *Drosophila melanogaster* Head Tissue on High-Sugar and High-Fat Diets. *G3 Bethesda.* 8(1):279-290.
- 四、Zhang Y, Xi Y. (2015) Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. *J Tissue Sci Eng* 6:141.
- 五、Raschpichler M, Straatman K, Schroeter ML, Arelin K, Schlögl H, Fritsch D, Mende M, Pampel A, Böttcher Y, Stumvoll M, Villringer A, Mueller K. (2013) Abdominal fat distribution and its relationship to brain changes: the differential effects of age on cerebellar structure and function: a cross-sectional, exploratory study. *BMJ Open.* 24:3(1).
- 六、Birkenfeld AL, Lee HY, Guebre-Egziabher F, Alves TC, Jurczak MJ, Jornayvaz FR, et al. (2001) Deletion of the mammalian *INDY* homolog mimics aspects of dietary restriction and protects against adiposity and insulin resistance in mice. *Cell Metab.* 14(2):184-95.
- 七、Dalton JE¹, Kacheria TS, Knott SR, Lebo MS, Nishitani A, Sanders LE, Stirling EJ, Winbush A, Arbeitman MN. (2010) Dynamic, mating-induced gene expression changes in female head and brain tissues of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics.* 11:541.
- 八、Wang PY, Neretti N, Whitaker R, Hosier S, Chang C, Lu D, Rogina B, Helfand SL. (2009) Long-lived *Indy* and calorie restriction interact to extend life span. *Leon N Cooper.*
- 九、Cheryl L. Gatto & Kendal Broadie. (2008) Temporal Requirements of the Fragile X Mental Retardation. *Development.* 135(15):2637-48.

- 十、Knauf F. (2006) The life-extending gene *Indy* encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates. *Biochem J*.397(1):25-9.
- 十一、 Ana M.Pajor.(2006) Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch*. 451(5): 597 – 605.
- 十二、 Felix Knauf,Blanka Rogina,Zhirong Jiang,Peter S. Aronson,Stephen L. Helfand. (2002) Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene *Indy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(22): 14315 – 14319.
- 十三、 Benjamin H White. (2001) Conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *National Academy of Sciences*98(22):12596-601.
- 十四、 Rogina, B., Reenan, R.A., Nilsen, S.P., and Helfand, S.L. (2000) Extended Life-Span Conferred by Cotransporter Gene Mutations in *Drosophila*. *Science* 290, 2137-2140

【評語】 050008

1. 此研究利用 SLC13A3 基因在果蠅體內的過度表現觀察果蠅的各項生理變化，以探討 SLC13A3 在果蠅體內的作用機制，擬藉此建立一個模擬慢性代謝疾病的生物模型。
2. 所有測試的影響因子與結果之間的解釋應該有更深入的討論。例如，有無影響的原因，有影響者之正負影響關係又是什麼原因？
3. 應注意實驗數據的重複數及統計分析結果是否有意義。
4. 作者強調實驗的結果完美，但是對於實驗過程細節並不清楚。代表實驗的操作仍不熟練，實驗記錄簿也嫌過度簡略，看不出實驗的過程。沒有說明清楚何項實驗為自己親自操作，何種實驗為學長姐帶著操作。為美中不足。