

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050015
參展科別 動物學
作品名稱 探討粒線體對果蠅卵巢生殖幹細胞維持的影響
得獎獎項 大會獎 一等獎

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學
指導教師 許惠真、謝育慈
作者姓名 徐衍揚、張東林

關鍵詞 生殖幹細胞、粒線體、脂肪酸代謝

作者簡介



我們是來自師大附中數資班的學生徐衍揚、張東林，從進入高中以來就對生物方面的科學感到有興趣。於是在高一時到中央研究院尋找能提供我們進行專題研究的教授，而我們也就找到了許惠真教授，很大方地讓我們可以在實驗室中向友善的學長姐學習、進行果蠅生殖幹細胞方面的實驗。

摘要

幹細胞會進行不對稱分裂以維持組織恆定，一個子細胞分化為有特定功能的細胞，而另一個則維持其細胞潛能。粒線體能進行分裂和融合並維持動平衡。現今的研究已經了解，誘導型多能幹細胞(iPSC)的粒線體動平衡變化會促使其直接分化 (Seo BJ, et al., 2018)。然而，果蠅卵巢生殖幹細胞(GSC)內粒線體動平衡與幹細胞分化的關聯仍不清楚。本研究利用容易辨認的果蠅卵巢生殖幹細胞來探討這個問題，並使用 Gal4-UAS 系統與 RNAi 操縱粒線體動平衡，並發現粒線體融合蛋白被抑制會導致油滴堆積及幹細胞損失。另外，使用左旋肉鹼(L-carnatine)增進脂肪酸代謝，發現增進代謝會導致油滴減少及幹細胞回復。本研究著重於探討粒線體動平衡對 GSC 維持與脂肪酸代謝的影響，並對粒線體脂肪酸代謝與幹細胞分化的潛在關係提出觀點與佐證，盼未來能有更進一步的研究與醫療方面的應用。

Abstract

Stem cells have the ability to divide asymmetrically, with one daughter cell acquiring a stem cell fate and the other differentiating to maintain tissue homeostasis. Mitochondria are dynamic organelles that undergo fusion and fission; recent studies have documented changes in mitochondrial dynamics control Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) fate (Seo BJ, et al., 2018). However, the mechanisms of how mitochondrial dynamics affect stem cell fate is still unknown. To address this question, we utilized the Gal4-UAS system and RNAi to disrupt mitochondrial dynamics in a well-characterized model, *Drosophila* ovarian germline stem cells (GSCs). We found that depletion of mitochondrial fusion proteins led to lipid droplet (LD) accumulation and GSC loss. Treatment with L-carnitine, which promotes fatty acid metabolism by carrying fatty acids into the mitochondria, decreased the number of LDs and rescued GSC number. Our results highlight the idea that mitochondrial fusion is crucial for GSC maintenance via fatty acid metabolism. This study provides insights and evidence into the potential relationship between mitochondrial-dynamics-regulated lipid metabolism and stem cell fate decision that are crucial for tissue homeostasis. We hope that there will be extending studies and medical application in the future.

壹、前言

一、研究背景介紹

(一)粒線體

1. 功能

粒線體的主要功能是進行呼吸作用產生 ATP、維持鈣平衡、細胞信號傳遞、代謝長鏈脂肪酸、胺基酸等物質。當長鏈脂肪酸沒有被代謝時，就會以油滴的形式堆積在細胞質中。

2. 粒線體動平衡(mitochondrial dynamics)

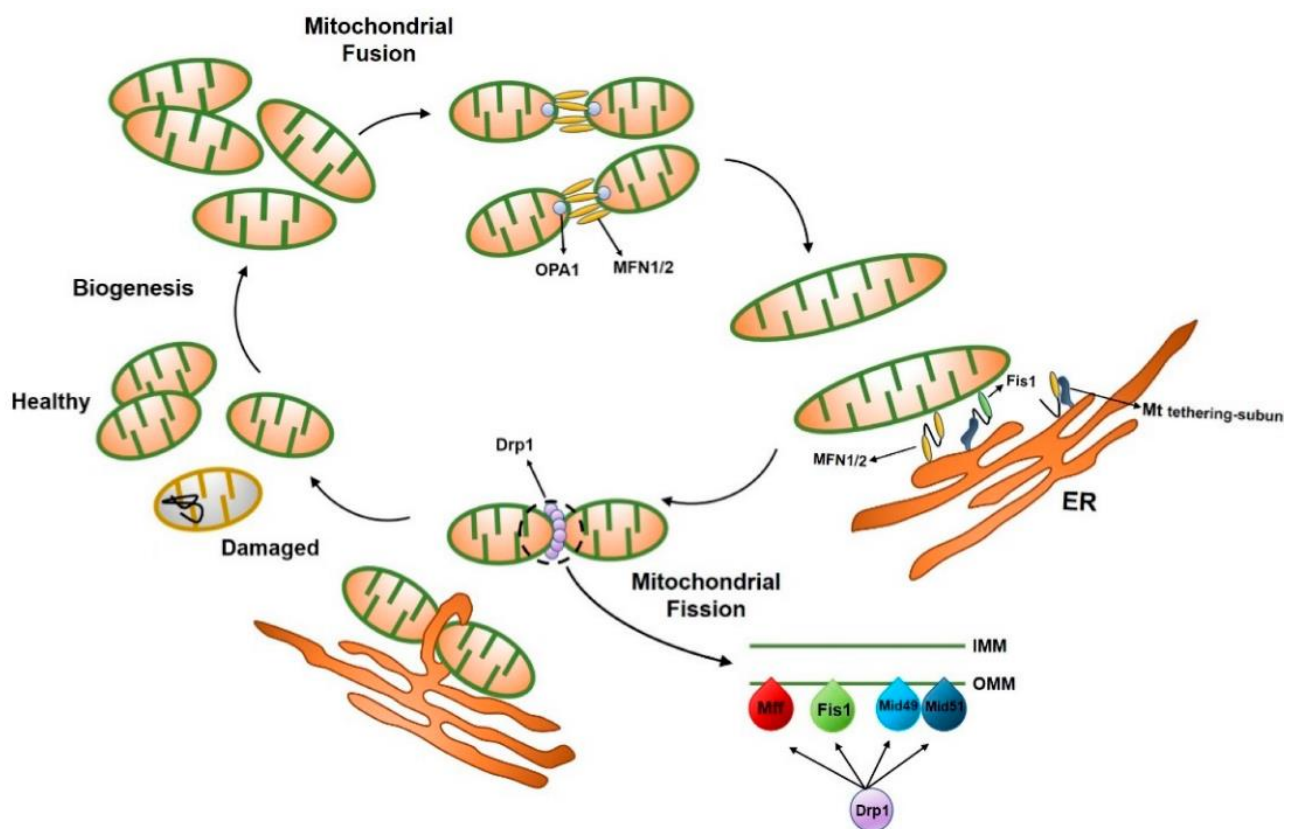
粒線體的形狀受到多種因素或環境的影響，像低氧、較高的能量需求與代謝。而粒線體膜蛋白與輔酶可以控制粒線體的分裂與融合。

(1) 分裂(fission)

粒線體分裂可確保粒線體適當分配和品質控制。在 Dynamin-like 1 (Dnm1) 種類的蛋白中，Drp1(Dynamin related protein 1)是主要進行粒線體分裂的蛋白質(如圖一)，而其編碼基因為 *drp1*。從酵母菌的研究中已經得知，Dnm1分裂粒線體時需要外膜上的 Fis1(Fission, mitochondrial 1) 等蛋白的參與。前人的研究發現幹細胞的粒線體動平衡變化會促使其走向分化而導致幹細胞流失(Seo BJ, Yoon SH, Do JT, 2018)。

(2) 融合(fusion)

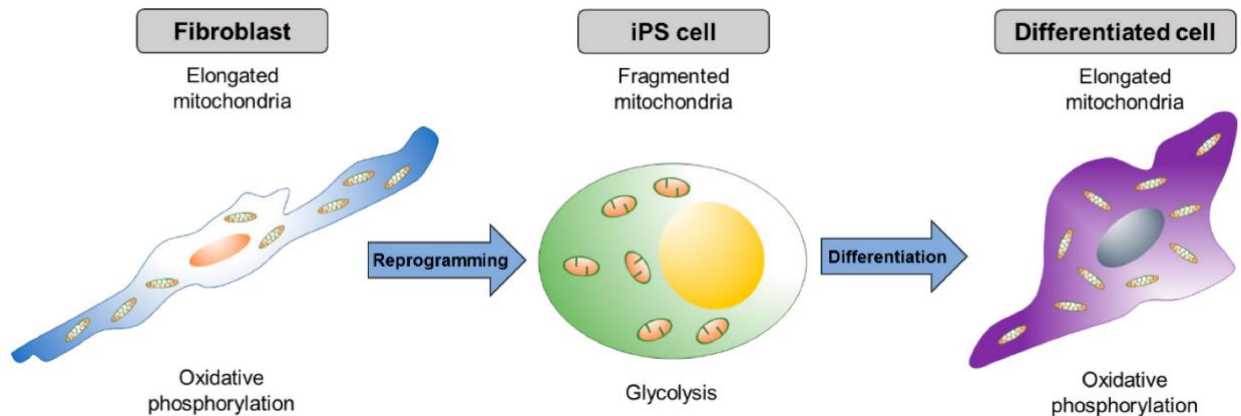
粒線體融合是一個兩步驟的過程，分為外膜與內膜。在哺乳動物中有三種蛋白質參與(如圖一)，分別有外膜的 Mitofusin 1/2 (Mfn1/2)，其編碼基因為 *marf*，與內膜的 Optic atrophy 1 (Opa1)。Mfn1/2的 RNA 有80%的序列是相似的，並且從酵母菌到人類都有存在。Opa1是一種粒線體內膜的蛋白質，伴隨 Mfn1/2 作用(Seo BJ, et al., 2018)。



圖一:粒線體的融合與分裂(以人類粒線體為例)(Seo BJ, et al., 2018)

3. 與幹細胞分化的關係

在幹細胞分化的過程中，粒線體型態也會隨著改變。目前粒線體動平衡被研究出也會影響分化的過程(如圖二)。在誘導型多能幹細胞(iPSC)中，當其仍為幹細胞時，其粒線體較趨向於分裂狀態，但當其分化為體細胞時，其粒線體較趨向融合狀態。(Seo BJ, et al., 2018)

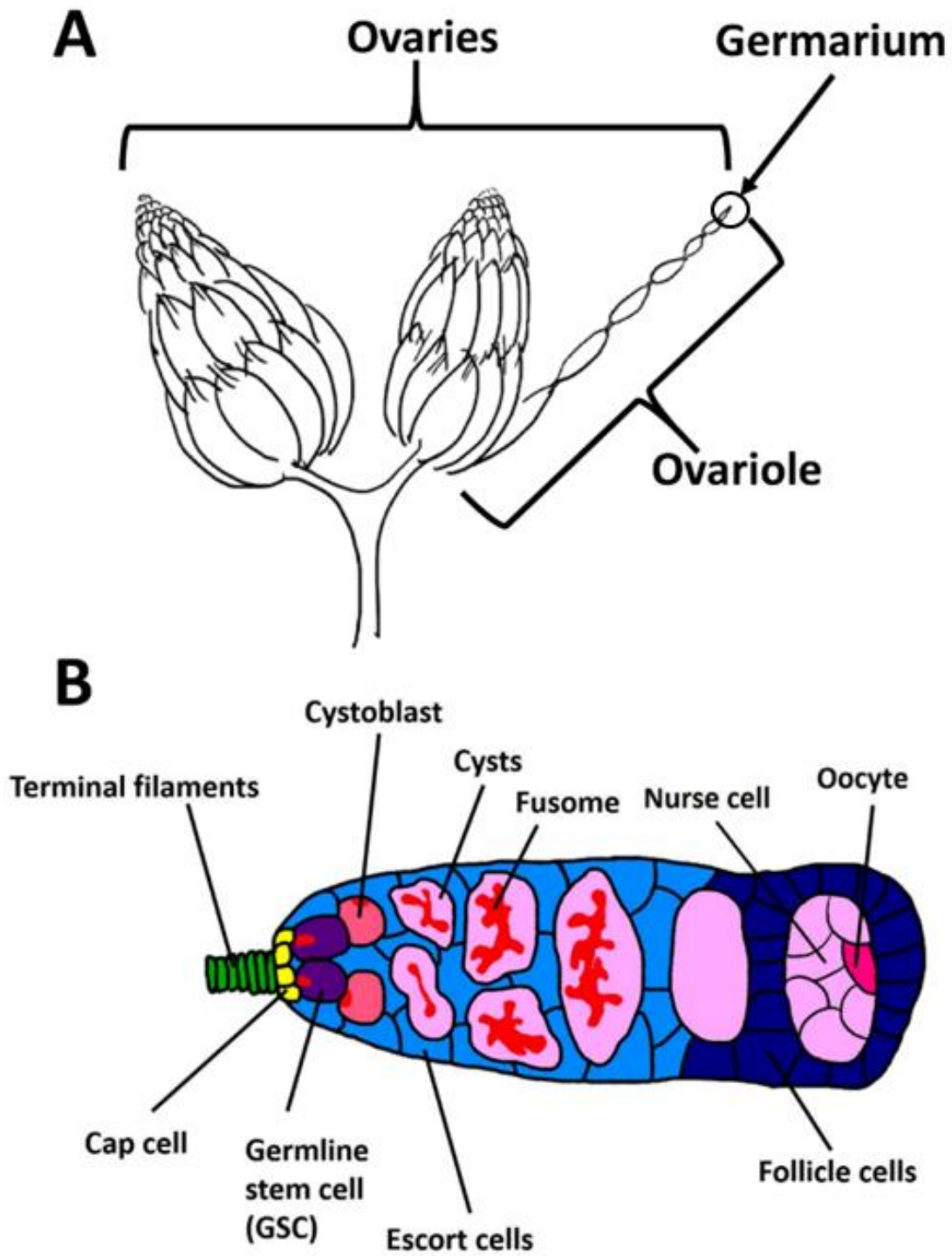


圖二:肺纖維細胞的重新編列(reprogramming)與 iPSC 的分化(differentiation)(Seo BJ, et al., 2018)

這次研究中我們希望能了解粒線體內長鏈脂肪酸的代謝是否會影響幹細胞的分化。而果蠅的卵巢生殖幹細胞在其生殖腺中可以被清楚的分辨，因此選擇使用黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)卵巢生殖幹細胞作為材料進行實驗，並使用 Gal4-UAS 系統和 RNAi 的系統來操縱粒線體蛋白 Drp1、Mfn1/2 的表現。

(二) 果蠅卵巢生殖幹細胞

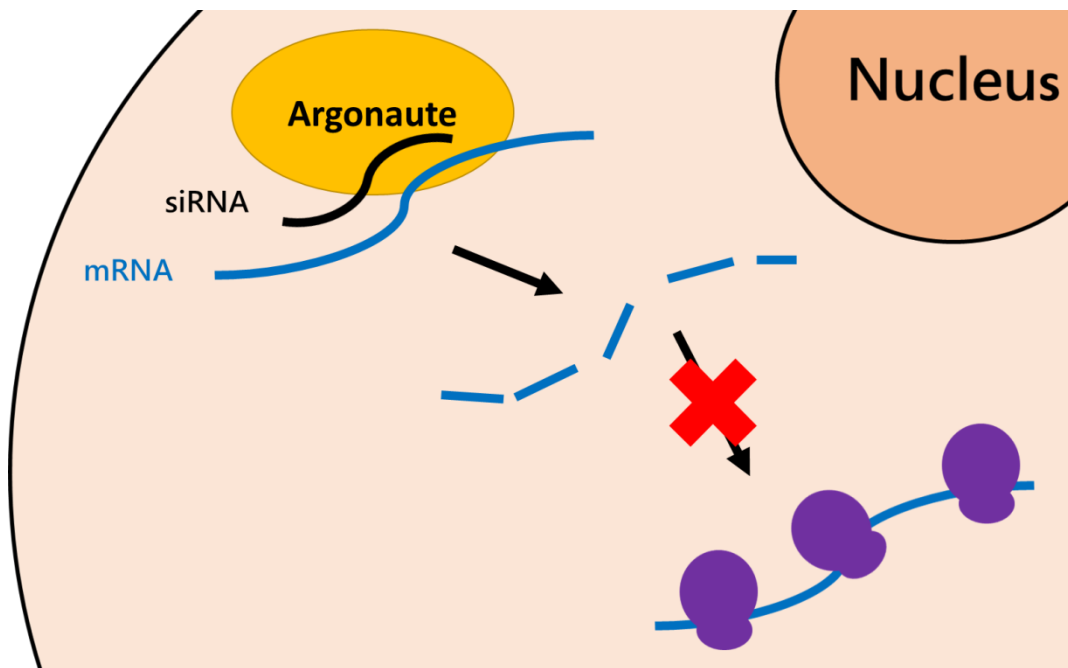
雌果蠅的腹部有一對卵巢，一個卵巢通常是由 15-20 條卵巢管(ovarioles)所構成，ovarioles 的最前端有一個稱為生殖腺(germarium)的組織(如圖三)。一個生殖腺通常有 2~3 個生殖幹細胞 (GSC, Germline Stem Cell) 位在生殖腺的前端緊鄰 cap cell。GSC 與其他生殖細胞內有一種特殊胞器構造稱為 fusome，其由細胞骨架組成，在 GSC 中會面向並且十分靠近 cap cells，可作為辨認 GSC 的依據。GSC 會進行 4 次分裂成 16 個具有相連的 fusome 的細胞，16 個子細胞中只有其中一個會成為卵(Waghmare I, Page-McCaw A, 2018)。



圖三:A 為果蠅的卵巢、B 為 germarium 內部細胞構造

(三)RNA 干擾(RNAi, RNA interference)

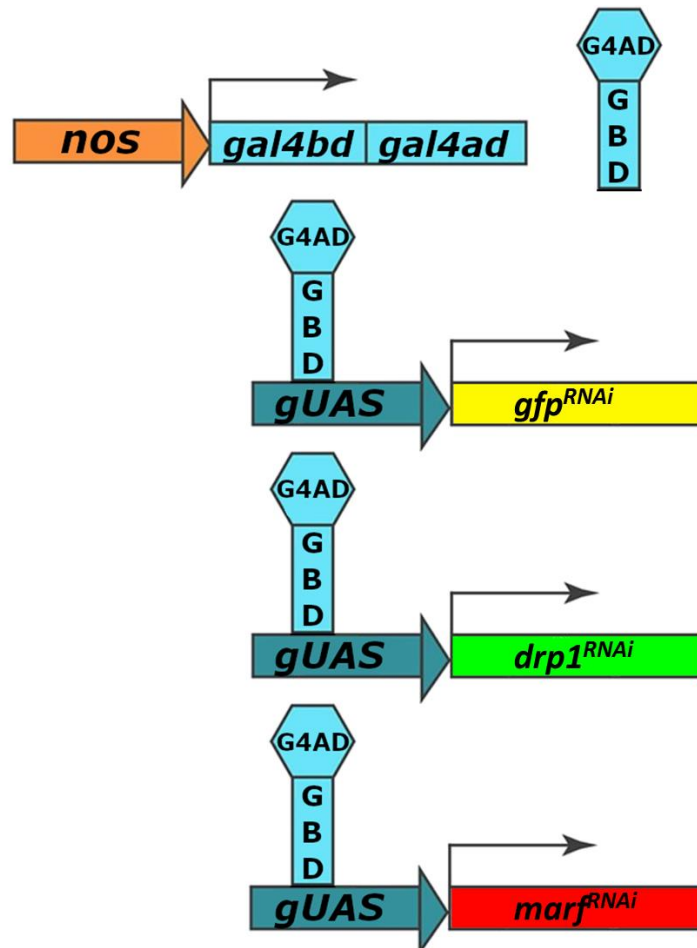
RNAi 是一種由雙鏈 RNA(double stranded RNA, dsRNA)誘發的 RNA 干擾現象。其原理是利用 siRNA(small interference RNA)或 mi RNA (microRNA)與 Argonaute 蛋白質家族(Argonaute protein family, AGO protein)結合為 RNA 誘導靜止複合體(RNA-inducing silencing complex, RISC)·降解目標 mRNA·造成轉錄後基因靜止(posttranscriptional gene silencing , PTGS) (Lars Aagaard and John J. Rossi, 2007)。



圖四:RNAi 的作用機制

(四) Gal4-UAS (Gal4-upstream activating sequences)系統

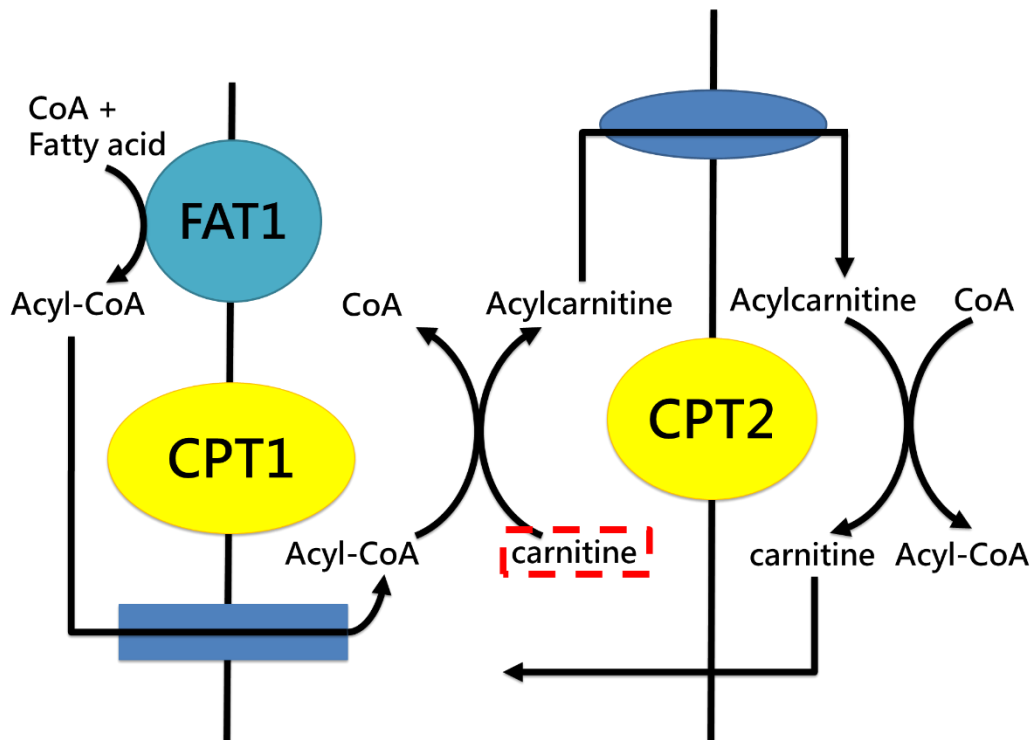
Gal4-UAS 系統來自於酵母菌中，為一種廣泛利用於果蠅遺傳實驗的工具，可用於控制實驗所需目標基因的表現。分別由 *nos-gal4-vp16* 與帶有 *UAS* (upstream activating sequence) 的兩種轉基因(transgene)所構成，*nos* 為胚胎發育的母源基因只會表現在生殖細胞，Gal4蛋白為 *UAS* 的轉錄因子，而 *vp16* 為一種由病毒而來的基因，可以使 Gal4 更容易接合在 *UAS* 上。*nos* 會啟動 *gal4* 基因的表現，進而使 *gal4* 轉錄轉譯為 Gal4 蛋白。當 Gal4 蛋白結合到 *UAS* 上，會啟動下游基因的表現(Rørth P, 1998)。另外，此系統可以被溫度調控。當 18°C 時幾乎不會啟動，而 29°C 時會啟動整個系統導致目標基因表現。本研究利用 *nos-gal4-vp16* 讓 *uas-marf^{RNAi}* 及 *uas-drp1^{RNAi}* 在生殖細胞表現以抑制 *marf* 及 *drp1* 的表現。



圖五：本實驗應用的 Gal4-UAS (Gal4-upstream activating sequences)系統

(五)L-carnitine(左旋肉鹼)

L-carnitine 為一種市售營養補充劑(左旋肉鹼)，可以幫助粒線體代謝脂肪酸。脂肪酸必須先在細胞質轉為 Acyl-coA，而 carnitine 經由粒線体外膜的肉鹼醯基轉移酶 1(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)可以與乙醯輔酶 A (Acyl-coA)作用合成乙醯肉鹼 (Acyl-carnitine)。Acyl-carnitine 可以通過粒線體內膜但 Acyl-coA 不能，所以要用 Acyl-carnitine 的形式才能進入粒線體。通過內膜後，Acyl-carnitine 會再經由內膜上的肉鹼醯基轉移酶2(carnitine palmitoyltransferase 2, CPT2)將 Acyl-carnitine 分解為 Acyl-coA 與 carnitine。最後 Acyl-coA 進行 β 氧化，而 carnitine 再通過內膜運輸蛋白來到細胞質。因此可以藉由 carnitine 與長鏈脂肪酸結合將長鏈脂肪酸帶入粒線體 (Saro H, et al., 2015)。



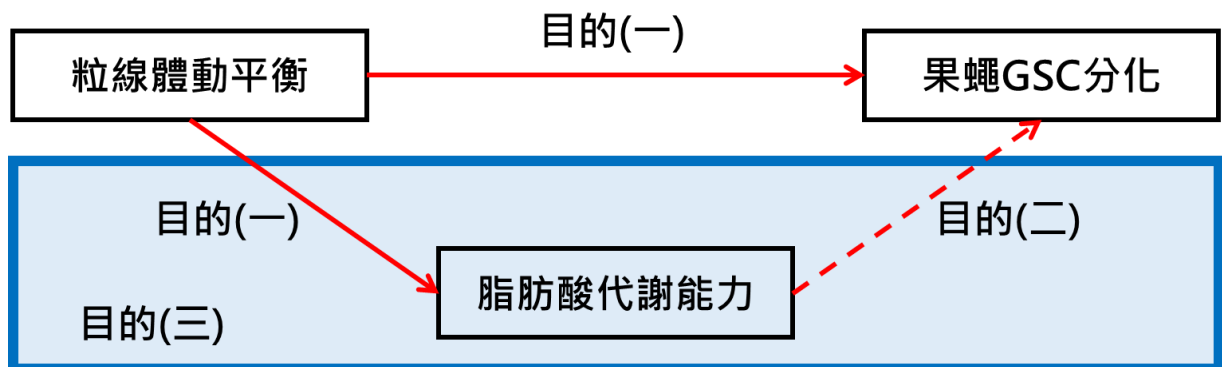
圖六:脂肪酸代謝途徑

二、 研究動機

幹細胞對於維持組織功能正常運作而言十分重要，幹細胞的功能或數目會下降造成組織退化。而組織中的幹細胞透過不對稱分裂，一個子細胞分化，另一個子細胞維持其細胞潛能，以此維持組織的正常運作。我們從文獻中得知，粒線體動平衡對幹細胞的分化會造成影響(Seo BJ, et al., 2018)，但其中的機制仍不清楚。我們推測是因為其代謝能力變化導致幹細胞分化，因此進行本研究探討粒線體動平衡是否透過影響脂肪酸代謝進而導致幹細胞分化。

三、 研究目的

- (一) 了解粒線體動平衡對果蠅 GSC 造成的影響。
- (二) 了解脂肪酸代謝是否對果蠅 GSC 造成影響。
- (三) 探討粒線體動平衡是否透過影響脂肪酸代謝能力進而影響幹細胞分化。



圖七:實驗目的

貳、 研究方法或過程

一、 假設

若原本因粒線體蛋白被抑制而使代謝能力較差的組別，在餵食 L-carnitine 後 GSC 數量顯著改變，且油滴(Lipid droplets, LD)量與 GSC 數量有顯著相關，則可以確定粒線體動平衡透過影響脂肪酸代謝能力進而影響 GSC 分化。

二、 變因:

(一)操縱變因一:為了了解粒線體動平衡對果蠅 GSC 造成的影響，使用 *nos-gal4 -vp16* 與 RNAi 控制粒線體融合和分裂的蛋白質表現。

1. *gfp^{RNAi}* 作為控制組。因為 Gfp 蛋白不存在果蠅體內，*gfp^{RNAi}* 對果蠅不會有影響。
2. *marf^{RNAi}* 作為實驗組 1，抑制粒線體融合。
3. *drpl^{RNAi}* 作為實驗組 2，抑制粒線體分裂。

(二)操縱變因二:為了了解脂肪酸代謝是否對果蠅 GSC 造成影響，以餵食 L-carnitine 增進果蠅脂肪酸代謝能力。

1. 每組分成兩小組分別餵食 L-carnitine wet yeast 與普通 wet yeast。

(三)控制變因:

1. 取 Day1 果蠅培養於 29°C 培養箱 7 天開始餵食 wet yeast 持續 7 天後(14 天)解剖卵巢並免疫染色。
2. 使用 Student' s t-test 計算兩組間 p 值，做為判斷差異的依據。

(四)應變變因:統計 GSC 數量與 LD 數量及面積並分析其相關性。

三、 實驗分組

- (一)控制組 : *nos-gal4 -vp16 > gfp^{RNAi}*
- (二)控制組 0-1 : *nos-gal4 -vp16 > gfp^{RNAi} +L-carnitine*
- (三)實驗組 1-1 : *nos-gal4 -vp16 > marf^{RNAi}*
- (四)實驗組 1-2 : *nos-gal4 -vp16 > marf^{RNAi} +L-carnitine*
- (五)實驗組 2-1 : *nos-gal4 -vp16 > drpl^{RNAi}*
- (六)實驗組 2-2 : *nos-gal4 -vp16 > drpl^{RNAi} +L-carnitine*

四、 實驗流程

探討粒線體動平衡是否透過影響脂肪酸
代謝能力進而影響幹細胞分化

了解粒線體動平衡是否
對果蠅GSC分化
及代謝能力造成影響

控制組
實驗組1-1
實驗組2-1

Day1

: *nos-gal4 -vp16 > gfp^{RNAi}*

: *nos-gal4 -vp16 > marf^{RNAi}*

: *nos-gal4 -vp16 > drp1^{RNAi}*

了解脂肪酸代謝是否
對果蠅GSC造成影響

Day7

每組取兩瓶，分別開始餵
普通 wet yeast
L-carnitine wet yeast

Day14
解剖卵巢

免疫染色

Confocal 拍攝影像

計算GSC數量、
油滴數量、面積

分析數據

討論

結論

五、 研究方法

(一)果蠅培養:

1. 取一瓶 *nos-gal4-vp16* 的果蠅，置於 18°C，收集其中的處女蠅。
2. 取 *uas-gfp^{RNAi}* 公蠅 15 隻 x *nos-gal4-vp16* 處女蠅 30 隻(控制組)、
uas-marl^{RNAi} 公蠅 15 隻 x *nos-gal4-vp16* 處女蠅 30 隻(實驗組 1)、
uas-drp1^{RNAi} 公蠅 15 隻 x *nos-gal4-vp16* 處女蠅 30 隻(實驗組 2)，分為 3 瓶。
3. 約五天換一次食物，並只保留成蟲 (為了不讓子代和親代混在一起)。
4. 取其子代每 10 公 20 母置入瓶中，改置於 29°C。
5. 1 周後取每組果蠅各兩管，換普通食物為特殊食物 (molasses vials，只提供水份迫使果蠅食用 wet yeast)分別塗上普通 wet yeast 及 L-carnitine wet yeast，每天更換食物與 wet yeast。
6. 餵食 1 周後(14 天大時)解剖並取出卵巢。

(二)特殊食物製作(molasses vials)

1. 燒杯裝 900ml ddH₂O，加 130g 紅糖+10g 洋菜粉。
2. 在加熱攪拌器上加熱至 60 °C。
3. 在微波爐內加熱至沸騰。
4. 加 400ml ddH₂O，置於加熱攪拌器上。
5. 待其降溫置 75 °C。
6. 加 8.4ml Formaldehyde(防腐劑)與 6ml 丙酸。
7. 每 10ml 分裝至一個瓶中。
8. 用棉布覆蓋管瓶口。
9. 在 4 °C 冰箱中保存。

(三) 含 L-carnitine wet yeast 製作

1. 取 25mg L-carnitine 。
2. 加入 10ml ddH₂O 。
3. 加入約 5g 乾酵母粉，持續攪拌直到成濃稠狀。
4. 用保鮮膜與石蠟膜包覆，避免水分蒸發使濃度升高。

(四) 普通 wet yeast 製作

1. 取 25ml ddH₂O 。
2. 分次加入約 12.5g 乾酵母粉 。
3. 持續攪拌直到成濃稠狀。



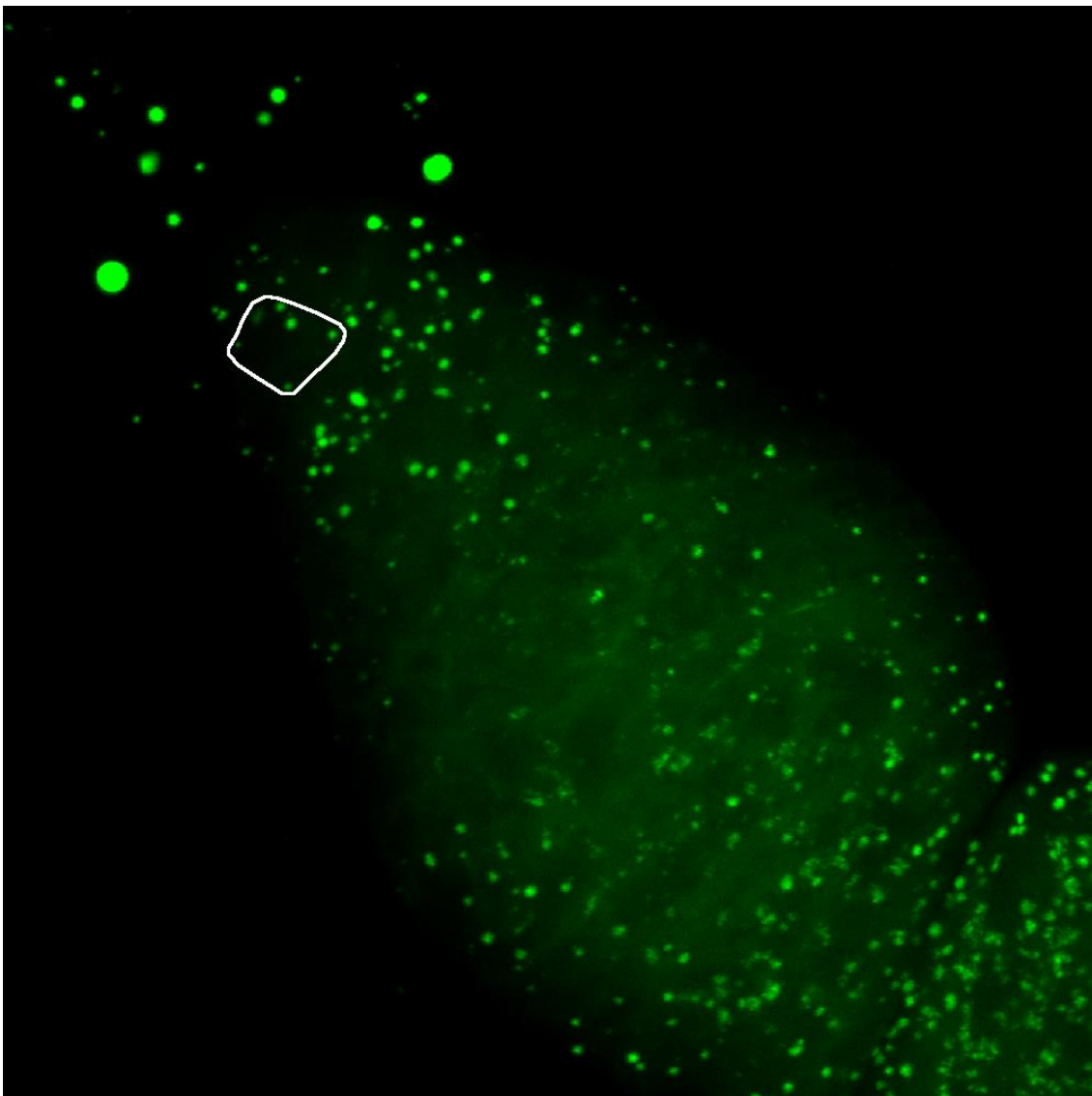
圖九: L-carnitine wet yeast(左)、特殊食物(molasses vial, 右上)、果營培養瓶(Bottles, 右下)

(五) 免疫組織染色+ BODIPY493/503 染色法(IHC+ BODIPY493/503 staining):

1. 將 1.25ml 離心管加入 1 ml 的 3% BSA，震盪 5 分鐘。
 - (1) 為了讓管壁更加光滑，使卵巢不會黏在管壁。
2. 將管中液體清空，將解剖後的卵巢連同 GIM(Grace Insect Medium)加入管中。
 - (1) GIM 與昆蟲體液性質相似，可防止卵巢內組織壞死。
3. 將管內液體清空，加入 Formaldehyde(防腐劑)，用 GIM 稀釋成 5%。放在 Rotator 上搖晃 12-15 分鐘。
4. 用 PBST(PBS:Triton:ddH₂O=10:1:89 混和)清洗三次，每次 20 分鐘。
 - (1) PBST 為緩衝液，用來洗淨殘留的藥物。
5. 將卵巢吸出，在 PBST 中把尖端梳開後(去除包覆生殖腺的肌肉)再放回管中。加入 blocking solution 放置於 rotator 3 小時。
6. 在管中置入第一抗體 LamC (Blocking solution 濃度 5%)共 1ml 放置於 rotator 3 小時。
7. 用 PBST 清洗三次，每次 20 分鐘。
8. 在管中置入第一抗體 mouse 1B1(Blocking solution 濃度 2%)共 1ml 放置於 rotator 3 小時。
9. 用 PBST 清洗三次，每次 20 分鐘。
10. 在管中置入第二抗體 mouse 568(Blocking solution 濃度 2%)共 1ml 放置於 rotator 3 小時。
11. 用 PBST 清洗三次，每次 20 分鐘。
12. 在管中置入 DAPI:BODIPY493/503:Blocking solution =1:5:500 溶液共 1ml 放置於 rotator 3 小時。
 - (1) DAPI 染核酸，BODIPY493/503 染細胞內長鏈脂肪酸。
13. 用 PBST 清洗三次，每次 20 分鐘。
14. 將卵巢取出，在載玻片上將末端的生殖腺切下其餘部分丟棄。
 - (1) 壓平玻片，約 20 μ m 厚。
15. 於共軛焦顯微鏡下拍攝圖片。

(六) 影像處理與計算 LD(Lipid droplets):

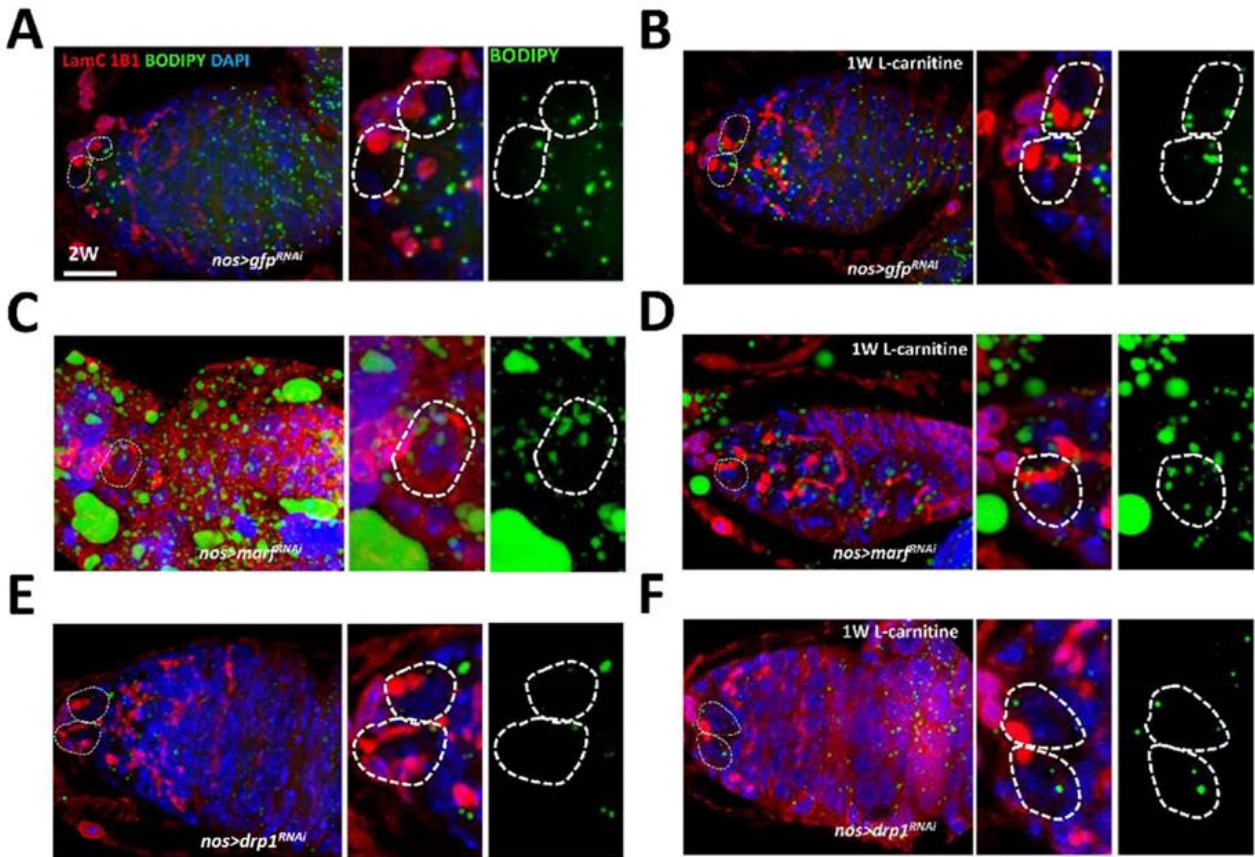
1. 使用共軛焦顯微鏡顯微鏡(confocal)拍攝完整生殖腺影像。
2. 使用 ZEN 軟體製出約 20~30 層的分層圖。
3. 用 LSM Image Browser 進行影像處理
 - (1) 因為我們處理的果蠅生殖腺已經是被壓成厚度約 20 μm 左右的樣本，所以用投影的方式將剛好包含整個長鏈脂肪酸的分層投影成一個影像。
4. 接著用 ImageJ 中的外掛程式導入投影過的影像計算油滴的數量以及每個油滴的大小。



圖十: 處理後的影像，白色圈選處為 GSC 位置(以控制組0-0為例)

參、 研究結果與討論

一、 共軛焦顯微鏡拍攝圖



圖十一:

- A: 控制組 : $nos > gfp^{RNAi}$ 在共軛焦顯微鏡顯微鏡下的影像
- B: 控制組0-2: $nos > gfp^{RNAi}$ +L-carnitine 在共軛焦顯微鏡顯微鏡下的影像
- C: 實驗組1-1: $nos > marf^{RNAi}$ 在共軛焦顯微鏡顯微鏡下的影像
- D: 實驗組1-2: $nos > marf^{RNAi}$ +L-carnitine 在共軛焦顯微鏡顯微鏡下的影像
- E: 實驗組2-1: $nos > drp1^{RNAi}$ 在共軛焦顯微鏡顯微鏡下的影像
- F: 實驗組2-2: $nos > drp1^{RNAi}$ +L-carnitine 在共軛焦顯微鏡顯微鏡下的影像

圖中紅色部分:使用 LamC(第一抗體)染細胞膜、mouse 1B1(第一抗體)染 fusome 用於辨別 GSC，第二抗體為 mouse568。

綠色部分:使用 BODIPY493/503染長鏈脂肪酸。

藍色部分:使用 DAPI 染細胞核中的核酸。

二、數據分析

(一) $p < 0.05$ 標記為*，為產生顯著差異。

(二) $p < 0.01$ 標記為**，為產生非常顯著差異。

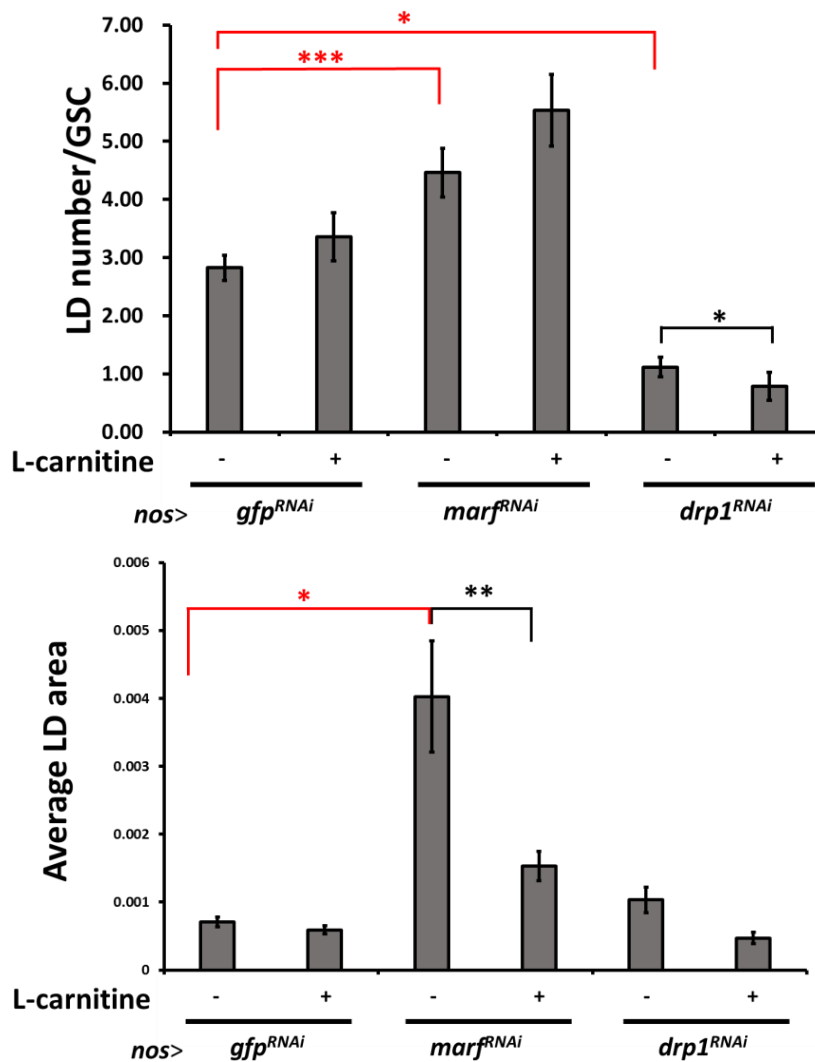
(三) $p < 0.001$ 標記為***。

三、結果與討論

(一) 了解粒線體動平衡對果蠅 GSC 造成的影響。

1. 粒線體動平衡對 GSC 脂肪酸代謝的影響

根據圖十二，比較實驗組1-1 $nos > marf^{RNAi}$ 與控制組 $nos > gfp^{RNAi}$ 的油滴數量及面積能觀察到實驗組1-1顯著的高於控制組。而實驗組2-1 $nos > drp1^{RNAi}$ 則是顯著低於控制組 $nos > gfp^{RNAi}$ 。



圖十二:LD 數量圖(上)與每個 LD 平均面積圖(下)

透過結果可以確認粒線體動平衡確實會對果蠅 GSC 脂肪酸代謝能力造成影響，抑制融合會降低代謝能力使油滴堆積，抑制分裂則會提升代謝能力使油滴減少。

2. 粒線體動平衡對 L-carnitine 藥效的影響

根據圖十二，在控制組 $nos > gfp^{RNAi}$ 中並無顯著差異。在實驗組 1 $nos > marf^{RNAi}$ 中餵食 L-carnitine 後油滴面積非常顯著下降。在實驗組 2 $nos > drp1^{RNAi}$ 中餵食 L-carnitine 後油滴數量顯著下降。

(1) 控制組

控制組 $nos > gfp^{RNAi}$ 在加入 L-carnitine 之後雖然油滴數量看似有增加，但油滴量其實兩者沒有顯著差異。我們推測是因為控制組屬於2周果蠅，其代謝能力較好，因此再加入 L-carnitine 將油滴送入粒線體內不會對其油滴代謝能力造成顯著上升，所以結果顯示沒有顯著差異。

(2) 實驗組 1

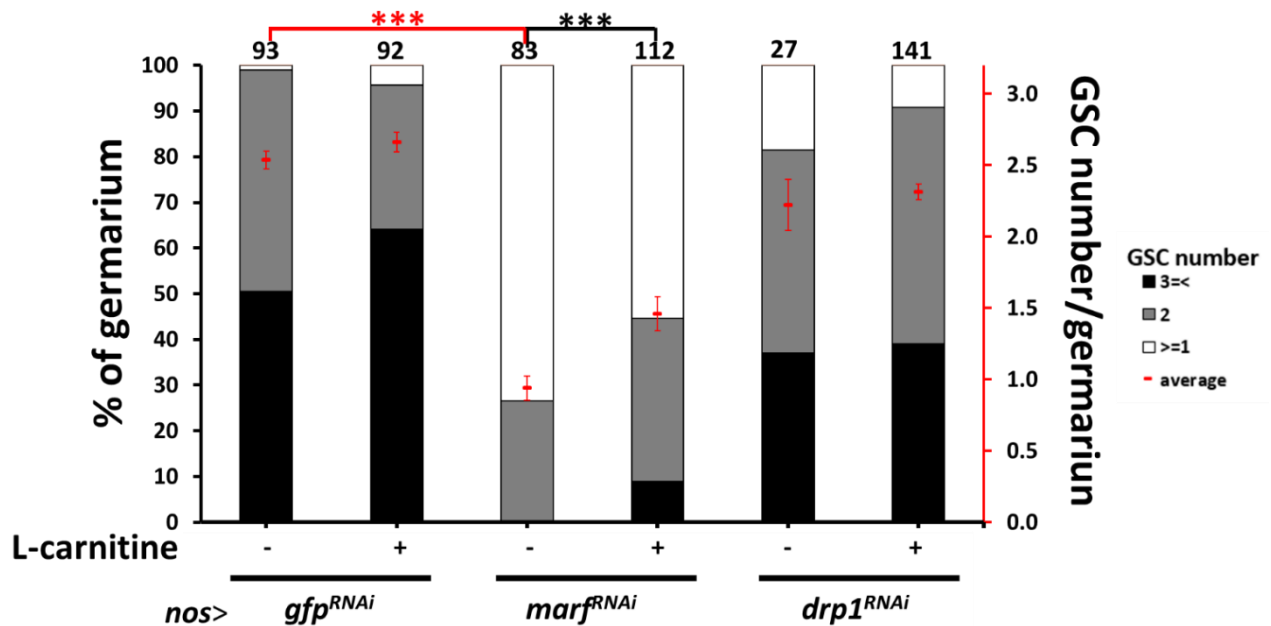
實驗組 1 $nos > marf^{RNAi}$ 在加入 L-carnitine 後油滴數量無顯著差異，油滴平均面積卻非常顯著的下降。可以推測是因為 L-carnitine 與長鏈脂肪酸結核，但其粒線體無法完全代謝，導致長鏈脂肪酸留在細胞質中但無法堆積為大型油滴。

(3) 實驗組 2

在實驗組 2 $nos > drp1^{RNAi}$ 加入 L-carnitine 後只有數量顯著下降，原因與控制組相似，在代謝能力較好的情況下，再加入 L-carnitine 對油滴面積不會造成顯著的影響。而油滴總量持續下降可能是因為原本的脂肪酸代謝能力就比控制組還高。

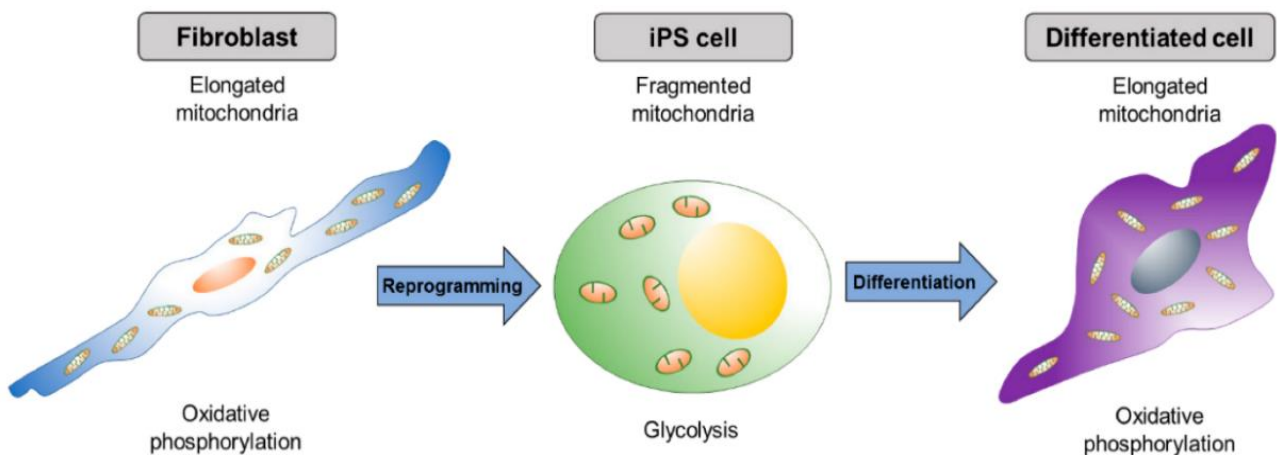
3. 粒線體動平衡對果蠅 GSC 數量的影響

根據圖十三，實驗組1-1*nos* > *marf*^{RNAi}與控制組 *nos* > *gfp*^{RNAi} 產生顯著差異，其中實驗組1-1*nos* > *marf*^{RNAi} 非常顯著低於控制組 *nos* > *gfp*^{RNAi}。而實驗組2-1*nos* > *drp1*^{RNAi}與控制組 *nos* > *gfp*^{RNAi} 並無顯著差異。



圖十三:GSC 數量圖

這部份結果與所閱讀的文獻結果不同(Seo BJ, et al., 2018)，在 iPSC 中分裂狀的粒線體應導致幹細胞數量增加，但我們認為是實驗對象不同造成的結果，論文中所使用的是誘導型多能幹細胞(iPSC)，而我們使用的生殖幹細胞(GSC)為寡能幹細胞。



圖十四:文獻示意圖(Seo BJ, et al., 2018)

(二) 了解脂肪酸代謝是否對果蠅 GSC 造成影響

1. 脂肪酸代謝對果蠅 GSC 數量的影響

根據圖十三，只有實驗組1- $nos > marf^{RNAi}$ 在餵食 L-carnitine 後有顯著差異。餵食 L-carnitine 後使 GSC 非常顯著回升，但仍然比控制組顯著降低。而控制組 $nos > gfp^{RNAi}$ 與實驗組2 $nos > dpl^{RNAi}$ 在加入 L-carnitine 後並無顯著差異。

實驗中油滴較多的組別 GSC 數量會下降，且 GSC 數量下降程度與油滴量類似；油滴較少的組別 GSC 數量則無顯著差異(如表一)。由此推測粒線體動平衡藉由影響脂肪酸代謝能力影響 GSC 分化。趨向分裂使代謝能力降低會造成 GSC 分化，降低 GSC 數量；趨向融合使代謝能力增進會維持 GSC 正常進行不對稱分裂，維持 GSC 數量。

表一:結果表

		控制組 $nos > gfp^{RNAi}$	實驗組1 $nos > marf^{RNAi}$	實驗組2 $nos > dpl^{RNAi}$
組間 差異	LD 量		非常顯著上升(***)	顯著下降(*)
	GSC 數量		非常顯著下降(***)	無顯著差異
組內 差異	LD 量	無顯著差異	非常顯著下降(**)	顯著下降(*)
	GSC 數量	無顯著差異	非常顯著上升(***)	無顯著差異

四、推論與延伸

我們推測代謝能力對幹細胞分化造成影響是因為幹細胞對能量的需求與其他細胞可能有差異，且不同種類幹細胞間能量需求也可能不同，因此粒線體的代謝能力改變會導致幹細胞分化為能量需求較符合此情境的細胞。盼能進行進一步實驗探討其能量需求差異。

肆、 結論與應用

一、 粒線體動平衡對果蠅 GSC 的影響

(一) 粒線體動平衡對果蠅 GSC 脂肪酸代謝的影響

1. 粒線體動平衡對脂肪酸代謝會造成影響
 - (1) 趨向分裂會導致代謝能力下降使油滴量增加。
 - (2) 趨向融合會導致代謝能力提升使油滴量減少。
2. 粒線體動平衡對 L-carnitine 藥效的影響
 - (1) 在代謝能力較差的個體中較為顯著。

(二) 粒線體動平衡對果蠅 GSC 分化的影響

1. 粒線體動平衡對幹細胞分化會造成影響
 - (1) 趨向分裂會減少 GSC 數量。
 - (2) 趨向融合則會維持 GSC 數量。

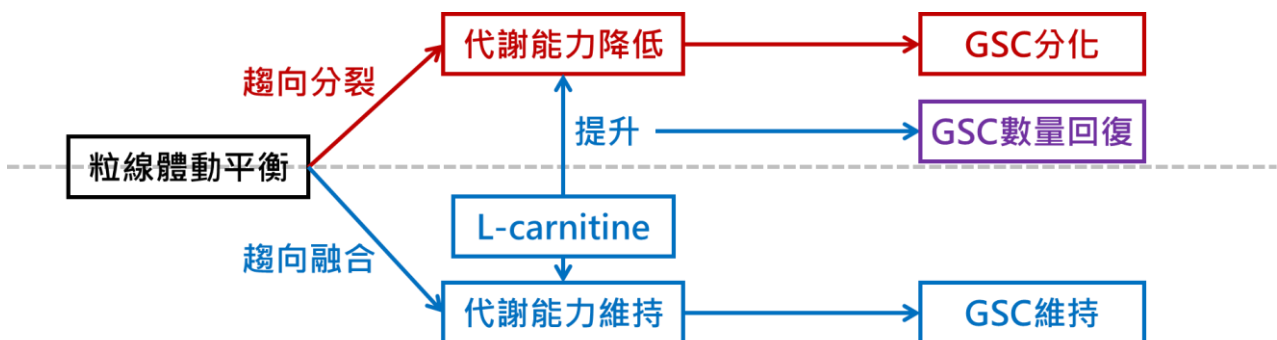
二、 脂肪酸代謝能力對果蠅 GSC 的影響

(一) 增進代謝能力對果蠅 GSC 的影響

1. 增進代謝能力降低油滴量並且維持 GSC 數量。
2. 降低代謝能力降低油滴量並且使 GSC 趨向分化。
3. 個體代謝能力較低時透過藥物提升代謝能力會使 GSC 數量回升。

三、 總結

粒線體動平衡會透過影響脂肪酸代謝進而影響 GSC 的分化。

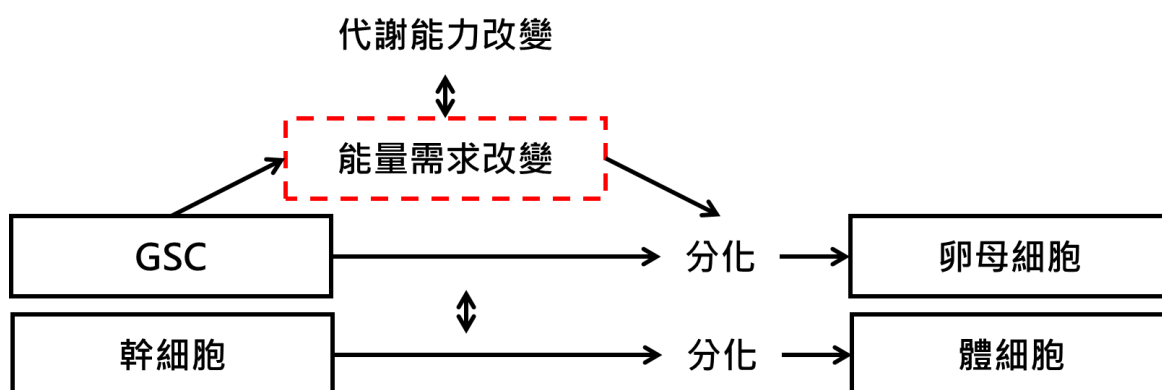


圖十五:結論示意圖

四、應用與展望

本研究以操縱脂肪酸代謝能力的方式，得知脂肪酸代謝能力與幹細胞型態有相關。可以透過增進代謝能力的方式維持幹細胞正常進行不對稱分裂。我們希望能進行進一步實驗探討代謝能力與生殖幹細胞及其他寡能或多能幹細胞的關聯，盼將來可以應用於組織培養等醫療用途，未來的研究方向如下：

- (一) 探討生殖幹細胞的能量產生方式與需求，並與卵母細胞比較其代謝差異。
- (二) 透過操控代謝能力誘導幹細胞分化或維持細胞潛能。
- (三) 透過操控代謝能力挽回幹細胞分化的趨勢。
- (四) 觀察其他幹細胞是否有類似的能量需求變化，並實驗其是否可被類似的方式誘導分化或維持細胞潛能。



圖十六:未來研究方向

伍、 參考資料及其他

- 一、 Banerjee KK, Ayyub C, Sengupta S, Kolthur-Seetharam U(2013) Fat body dSir2 regulates muscle mitochondrial physiology and energy homeostasis nonautonomously and mimics the autonomous functions of dSir2 in muscles. *Mol Cell Biol*, 33(2),252-264.
- 二、 Seo BJ, Yoon SH, Do JT.(2018) Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. *Int J Mol Sci*, 19(12).
- 三、 Saro H. Armenian, Sarah K. Gelehrter, et al(2015) Carnitine and cardiac dysfunction in childhood cancer survivors treated with anthracyclines, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,23(6),1109-1114.
- 四、 Jernberg JN, Bowman CE, Wolfgang MJ, Scafidi S.(2017) Developmental regulation and localization of carnitine palmitoyltransferases (CPTs) in rat brain. *J Neurochem*, 142(3),407-419.
- 五、 Rørth P,(1998) Gal4 in the Drosophila female germline. *Mech Dev*, 78(1-2),113-118.
- 六、 Bo Qiu , M. Celeste Simon(2017) BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry, *Bio Protoc*,6(17).
- 七、 Spandl J, White DJ, Peychl J, Thiele C.(2009) Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic*,10(11),1579-1584.
- 八、 Wang L, Zhang T, Wang L, Cai Y, Zhong X, He X, Hu L, Tian S, Wu M, Hui L, Zhang H, Gao P(2017) Fatty acid synthesis is critical for stem cell pluripotency via promoting mitochondrial fission. *EMBO J*,36(10),1330-1347.
- 九、 Waghmare I, Page-McCaw A(2018) Wnt Signaling in Stem Cell Maintenance and Differentiation in the Drosophila Germarium. *Genes (Basel)*, 9(3),127.
- 十、 Lars Aagaard and John J. Rossi(2007) RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. *Adv Drug Deliv Rev*,59(2-3),75-86.

【評語】 050015

1. 此作品以 UAS-gal4 系統與 RNAi 來探討果蠅卵巢生殖幹細胞內粒腺體平衡與幹細胞分化的關聯。是一邏輯清楚及方法正確的研究。
2. 研究數據須以正確的統計方法分析才有統計上的意義。