

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090002

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 肝未人生，肝緊治療-利用端粒酶轉基因斑馬
魚斑馬魚模式研究三種藥物的組合抗肝癌作用

得獎獎項

就讀學校 苗栗縣立竹南國民中學

指導教師 林明智、陳渝喬

作者姓名 林祈佑、顧梓妍、魏涵妮

關鍵詞 斑馬魚、基因、肝癌

作者簡介

老師們好，我叫林祈佑，目前就讀竹南國中三年級，國中階段就對自然科學抱有熱忱，因此經常利用課餘時間研讀生物方面的書籍，追根究底的精神去尋求任何問題的答案，很高興能藉這次研究參透肝臟的秘密，並幸運入選國際科展。求學階段一路上要感謝的人不知凡幾，感謝養育我的父母，及一路教育我的老師們，更感謝科展指導老師不離不棄地陪完我們走完最艱辛的路程，謝謝。



教授好，我叫顧梓妍，今年就讀竹南國中三年級。家中除了父母外，還有個哥哥，由於哥哥常常和我分享科學知識，加上小時候全家會去露營和爬山，我從小對自然科學充滿熱忱，因此我國小加入機器人等科學社團，來鑽研更多科學知識，很榮幸能入選國際科展的競賽，我將全力以赴爭取優勝，贏得出國比賽的機會，期許我努力的醫學研究結果，能對醫學界做出許多貢獻。



教授好，我叫魏涵妮，目前就讀竹南國中三年級，求學階段的我，遇到問題時，我喜歡先自己思考、求證，無法參透才會向老師詢問解答，我熱愛自然科和數學科，因為在自然和數學中，都有許多的規律和法則，而每一個法則和規律的產生，都讓我更了解世界的奧妙，很幸運能入選國際科展的競賽，感謝支持我的老師及同學，我將全力以赴在這次的國際科展，不辜負大家對我的期望。

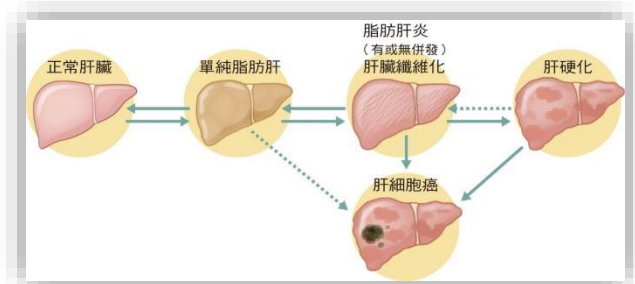


摘要

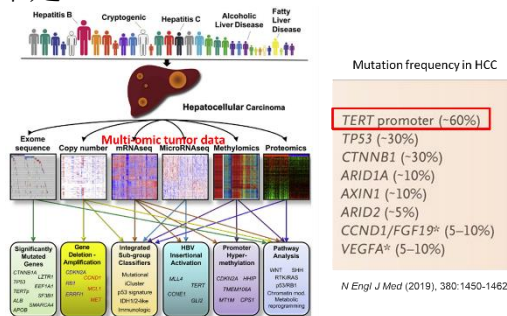
癌症為台灣國人十大死因之首，在台灣地區肝癌在十大癌症死因排名第二。雖然有第一線以及第二線藥物，但是頂多只能延長病人 13 個月的壽命，所以急需開發有效抑制肝癌的新藥。斑馬魚屬於脊椎動物，斑馬魚基因與人類基因的相似度達到 87%，且繼代快成本低，對於研究人類的疾病或篩選藥物助益極大。在肝癌病患當中具有高達百分之六十的人，在肝癌中發現了端粒酶逆轉錄酶（TERT）啟動子的突變，這項突變會導致在肝癌細胞中端粒酶的過量表現並促進癌細胞的生長。先前在研究員實驗室建立了端粒酶轉基因斑馬魚，在 15 天有顯著增加細胞增殖相關基因以及 b-catenin 下游基因的表現，並且利用 HE 染色細胞組織病理學分析，有絲分裂以及三核的比例也大大增加。我們這個研究就是利用端粒酶轉基因斑馬魚研究三種藥物(小分子褐藻醣膠，鯽魚複合配方，麩胺酸螯合鈷)單獨使用跟組合使用抗肝癌的作用。我們發現使用三種藥物混合能有效抑制肝癌，未來可廣泛運用在醫學。

壹、研究動機

首先來講一下，我們為什麼要研究這個題目。因為癌症是國人十大死因之首。連續三十幾年都是如此。而在臺灣，肝癌在所有的癌症排名第三。所以肝癌在臺灣是一個棘手的問題。在肝癌內，又以肝細胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最為常見的肝癌類型，占原發性肝癌的 90%以上，肝癌的形成過程是由慢性肝炎、脂肪肝、肝纖維化與肝硬化，最後發展成肝癌(圖一)。端粒酶（tert）的啟動子突變而且造成端粒酶過量表現是肝癌中最常見的突變(圖二)，目前肝癌的治療包括手術治療、肝動脈栓塞及放射線治療等，而第一線以及第二線標靶藥物不但費用昂貴，也難以預測其副作用。為了想更深入了解肝癌，以及找出治療肝癌的藥物，我們利用寒假期間到實驗室進行實驗，並使用肝臟過量表達端粒酶逆轉錄酶的轉基因斑馬魚，來測試小分子褐藻醣膠 (OF)、鯽魚複合配方(CACF)、麩胺酸螯合鈷(GACC)抑制肝癌的效果，希望我們的研究能改善現今在肝癌醫學上的不足。



圖一、肝癌的致病過程



Cell (2017), 169.7, 1327-1341

圖二:激活端粒酶是肝癌中最常見的突變

貳、研究目的

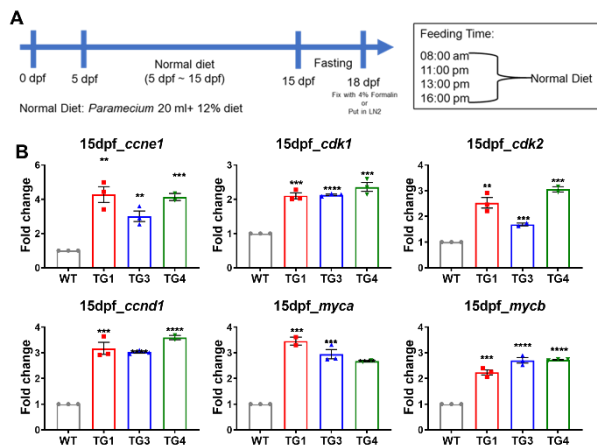
利用端粒酶轉基因斑馬魚研究三種藥物(小分子褐藻醣膠，鯽魚複合配方，麩胺酸螯合鈷)單獨使用跟組合使用抗肝癌的作用。

參、研究材料和方法

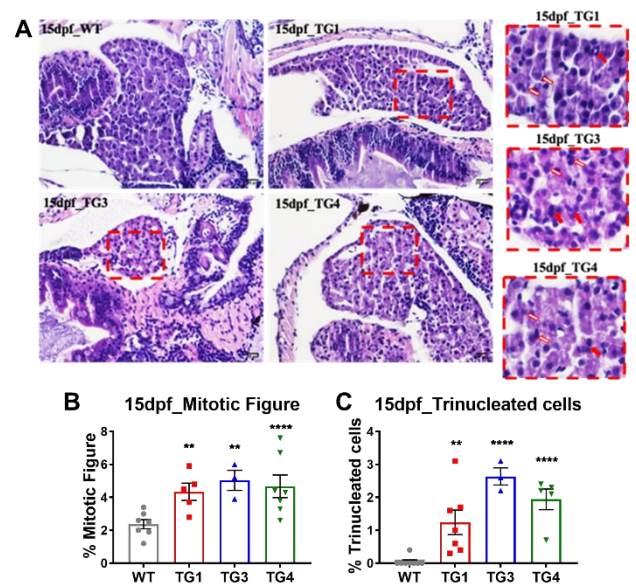
一、實驗動物:

(一)、端粒酶轉基因斑馬魚以 *tert* 表示，之前學長做的結果發現在 15 天時，*tert* 轉基因魚中細胞週期/細胞增殖相關的基因表現會增加， β -catenin (和癌症發生相關的基因) 的下游基因表現會增加(圖三)。

(二)、*tert* 轉基因斑馬魚有絲分裂、三核也會增加(圖四)，因此可得知使用 *tert* 轉基因斑馬魚能更快速的得到肝癌。



圖三:*tert* 轉基因斑馬魚細胞週期/細胞增殖相關基因， β -catenin (和癌症發生相關的基因) 下游基因表現增加。



圖四: 蘇木精-伊紅(HE)染色法觀察肝細胞組織形態學變化- *tert* 轉基因斑馬魚增加有絲分裂、三核。

二、飼食材料:

- (一) 草履蟲:斑馬魚幼魚所吃的食物，是主要的營養來源。
- (二) 藻粉: 斑馬魚幼魚所吃的食物，已達營養平衡。
- (三)、野生種斑馬魚(wild-type)以 WT 表示，WT 具有正常肝作為對照組 (圖五)。



圖五:野生種斑馬魚

三、實驗用藥物:

(一)食用藥物

1. 小分子褐藻醣膠 Oligo-fucoidan，以 OF 表示。
2. 鯽魚複合配方，Carassius auratus complex formula，以 CACF 表示。
3. 麩胺酸螯合鈷，Glutamic acid chelating cobalt，以 GACC 表示

(二)犧牲魚

1. 10%福馬林
2. 液態氮

(三)抽取 RNA

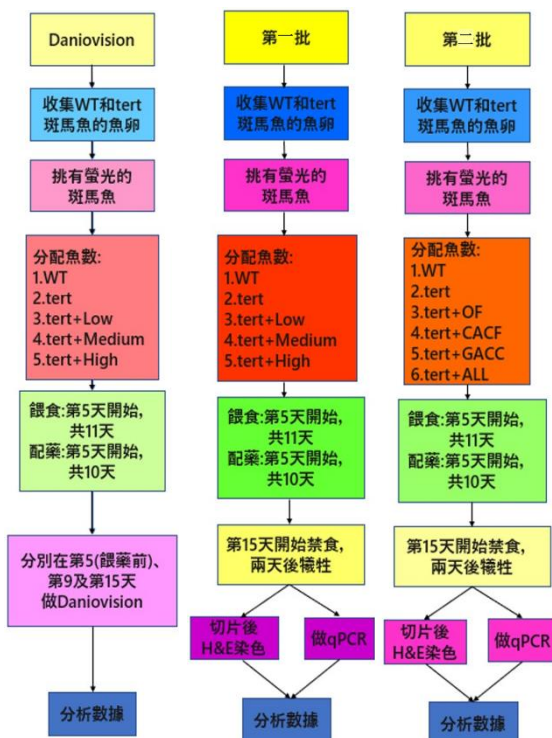
RA1, β -ME, MDB, DNase, Rxn Buffer, RA2, RA3, RNase-free H₂O

(四)RT-PCR 及 qPCR

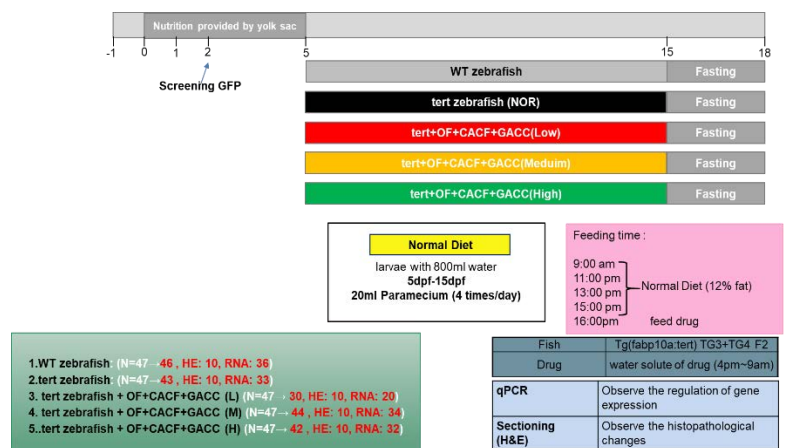
1. 無 RNase 的水
2. 5x iScript Reaction Mix(iScript cDNA 合成試劑盒)
3. iScript Reverse Transcriptase (iScript cDNA 合成試劑盒)
4. 2X SYBR Green

肆、研究過程與方法

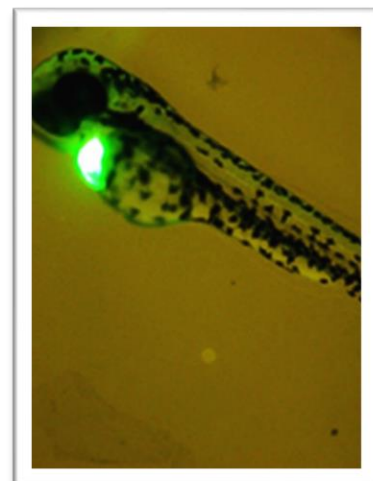
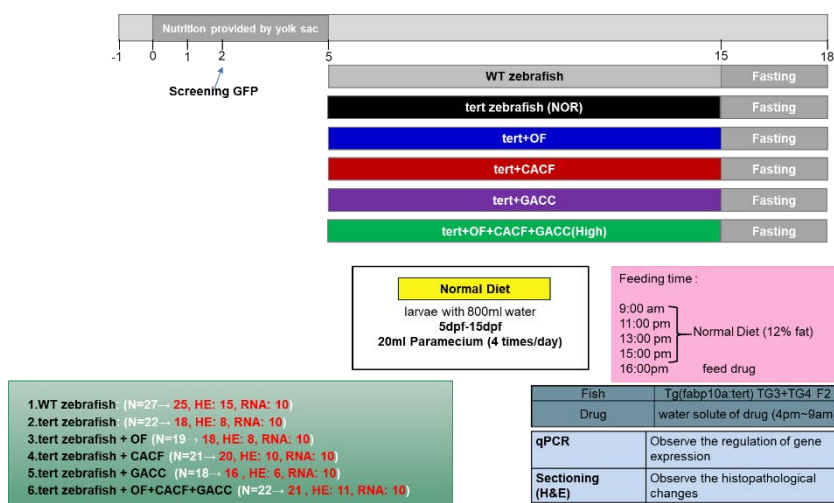
表一、實驗流程圖



第一批魚



第二批魚



圖六、螢光斑馬魚

一、收集斑馬魚的卵

二、挑有螢光的斑馬魚:轉基因斑馬魚內有螢光的基因，因此我們使用實驗室內的螢光顯微鏡來挑有螢光的斑馬魚(圖六)。

三、餵食: 一天四餐，每兩個小時餵一次，到第 15 天的最後一餐後開始禁食。

四、配藥: 每天餵完最後一餐後，開始配藥，一天一次，第 14 天的配藥室最後一次。

五、換水。

六、DanioVision: 我們分別在第 5 天(加藥前)、第 9 天(加藥前間一半)、第 15 天(停藥)讓這些魚去 DanioVision 上測量游泳速度。

七、犧牲斑馬魚: 此步驟由研究助理代操作。

八、基因表現:

(一)萃取 RNA(因屬危險實驗室，此步驟由研究助理代理操作)

(二) RNA 反轉錄 PCR (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

(三) 即時聚合酶連鎖反應(quantitative real-time PCR, qPCR)

伍、研究結果

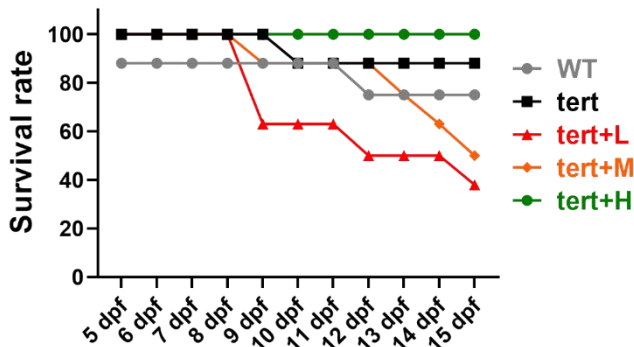
一、存活率

(一)游泳速度的這組: tert 轉基因魚餵了低濃度的混和藥物(tert L) 存活率是最低的，tert 轉基因魚餵了高濃度的混和藥物(tert+H)後存活率是最高。

(二)第一批魚: tert 轉基因魚中餵了低濃度的混和藥物(tert L)的存活率是最低的，餵了高濃度的混和藥物(tert+H)後存活率是最高。

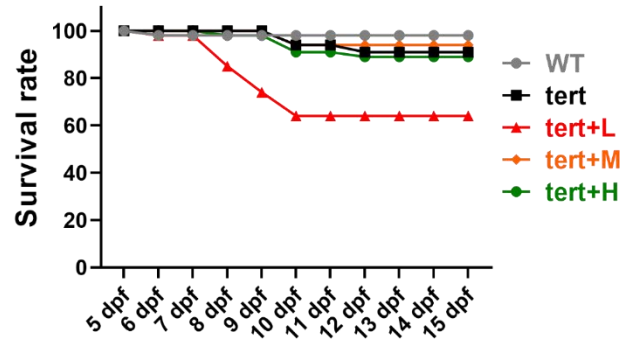
(三)第二批魚: tert 轉基因魚中餵了 OF 、 CACF 、 GACC 、高濃度的混和藥物(ALL)，其存活率都非常接近。

Survival rate:DanioVision group



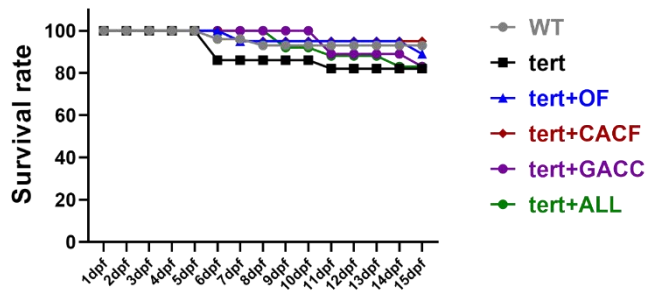
圖七、DanioVision 組存活率的分析

Survival rate:1st group



圖八、第一批魚存活率的分析

Survival rate: 2nd group



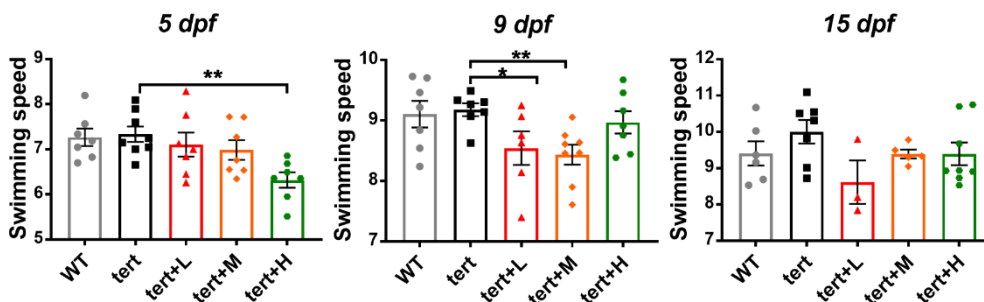
圖九、第二批魚存活率的分析

二、 tert 轉基因魚中餵了低、中、高濃度的混和藥物後的游泳速度的變化

(一)每組魚在第 5、9、15 天游泳速度的比較

1. tert 轉基因魚中餵高濃度的混和藥物(tert+H)組在加藥前是游最慢的。
2. tert 轉基因魚中餵了高濃度的混和藥物(tert+H)後游泳速度加快。

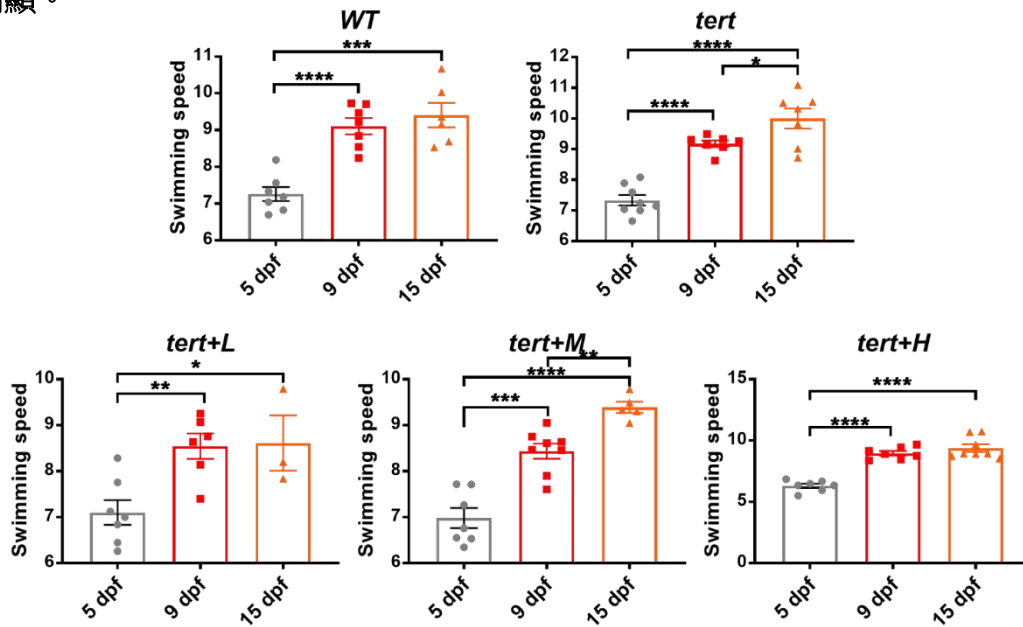
tert 轉基因魚中餵了低、中濃度的混和藥物(tert+L, tert+M)後游泳速度相對比較。



圖十、每組魚在第 5、9、15 天游泳速度的比較

(二)各組魚在不同天數游泳速度的比較

每組魚在游泳速度皆能比上一次游泳的快，在沒加藥的組別上，第一次測量和第二次測量的游泳速度增加較多，加藥的組別也是，尤其是餵高濃度的混和藥物(*tert+H*)這組游泳速度增加最為明顯。

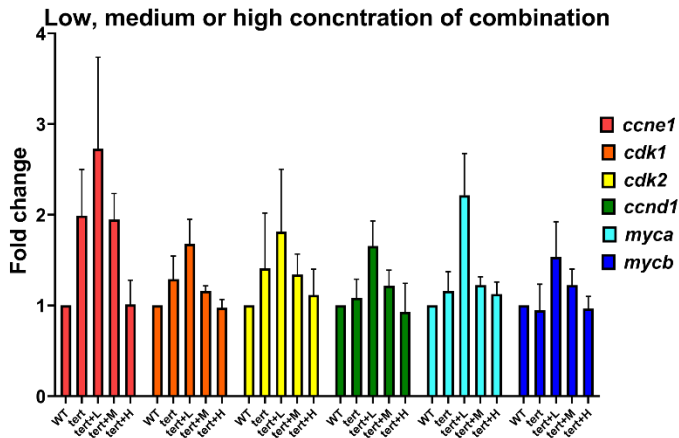


圖十一、各組魚在不同天數游泳速度的比較

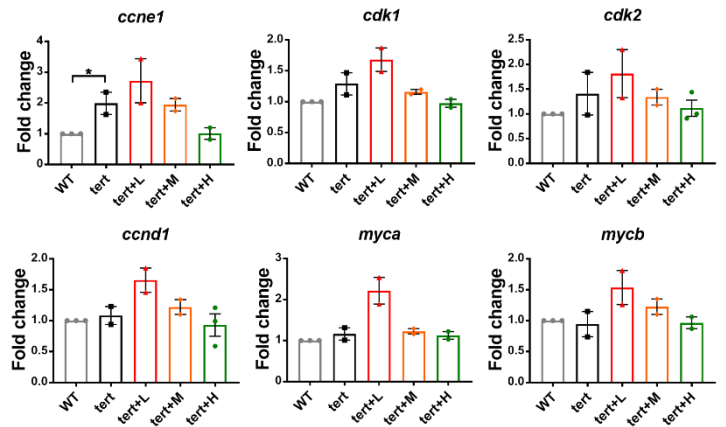
三、 *tert* 轉基因魚餵了藥物後的細胞週期/細胞增殖相關基因、 β -catenin (和癌症發生相關的基因) 的下游基因表現

(一)第一批: *tert* 轉基因魚中餵了低、中、高濃度的混和藥物後的基因表現

1. 每個組別的基因比較: 由圖十二可看出，WT 和 *tert* 比確實有明顯的差異，然而餵了低濃度的混和藥物(*tert+L*)未必有效，餵了中濃度的混和藥物(*tert+M*) 和 *tert* 比較基因表現沒有顯著的差異，餵了高濃度的混和藥物(*tert+H*)和 *tert* 比，大部分細胞週期/細胞增殖相關基因表現有下降。
2. 每個基因的個別比較: 由圖十三可看出，在 *ccne1* 這組基因 WT 和 *tert* 有顯著差異(*, $p < 0.05$)，其餘基因大多是 *tert+L* 基因量最高，其次是 *tert* 或 *tert+M*，最低則是 WT 或 *tert+H*。



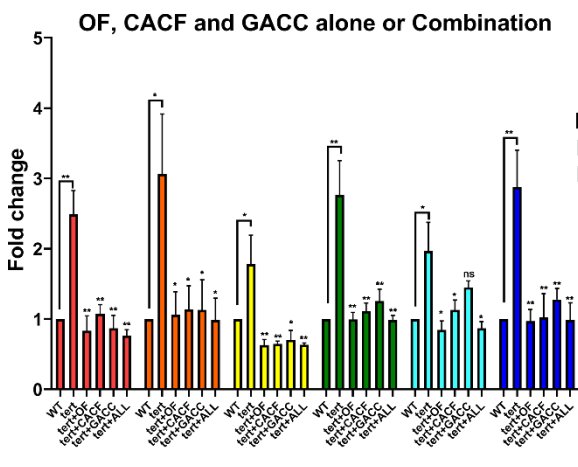
圖十二、第一批魚每個組別的基因比較



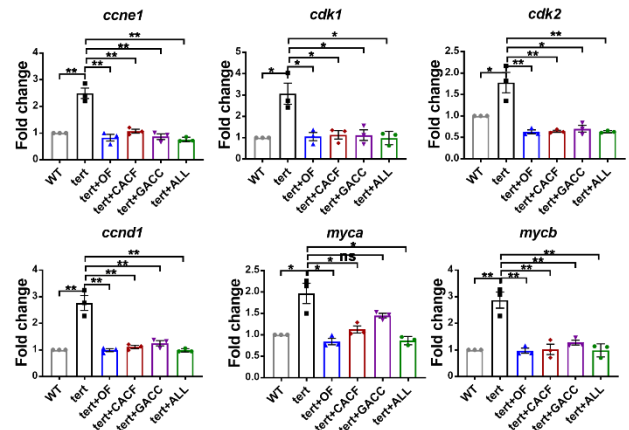
圖十三、第一批魚每個組別的基因比較

(二)第二批: tert 轉基因魚中餵了三種個別藥物&高濃度三種混和藥物後的基因表現

1. 每個組別的基因比較:由圖十四可看出, tert 在各組基因中有最高的表現, tert+CACF、tert+GACC 和 WT 的基因表現為其次。
2. 根據圖十五, 餵了 OF(tert+OF)、高濃度的混和藥物(tert+H)和 tert 比, 細胞週期/細胞增殖相關基因表現顯著下降。



圖十四、第二批魚每個組別的基因比較



圖十五、第二批魚每個組別的基因比較

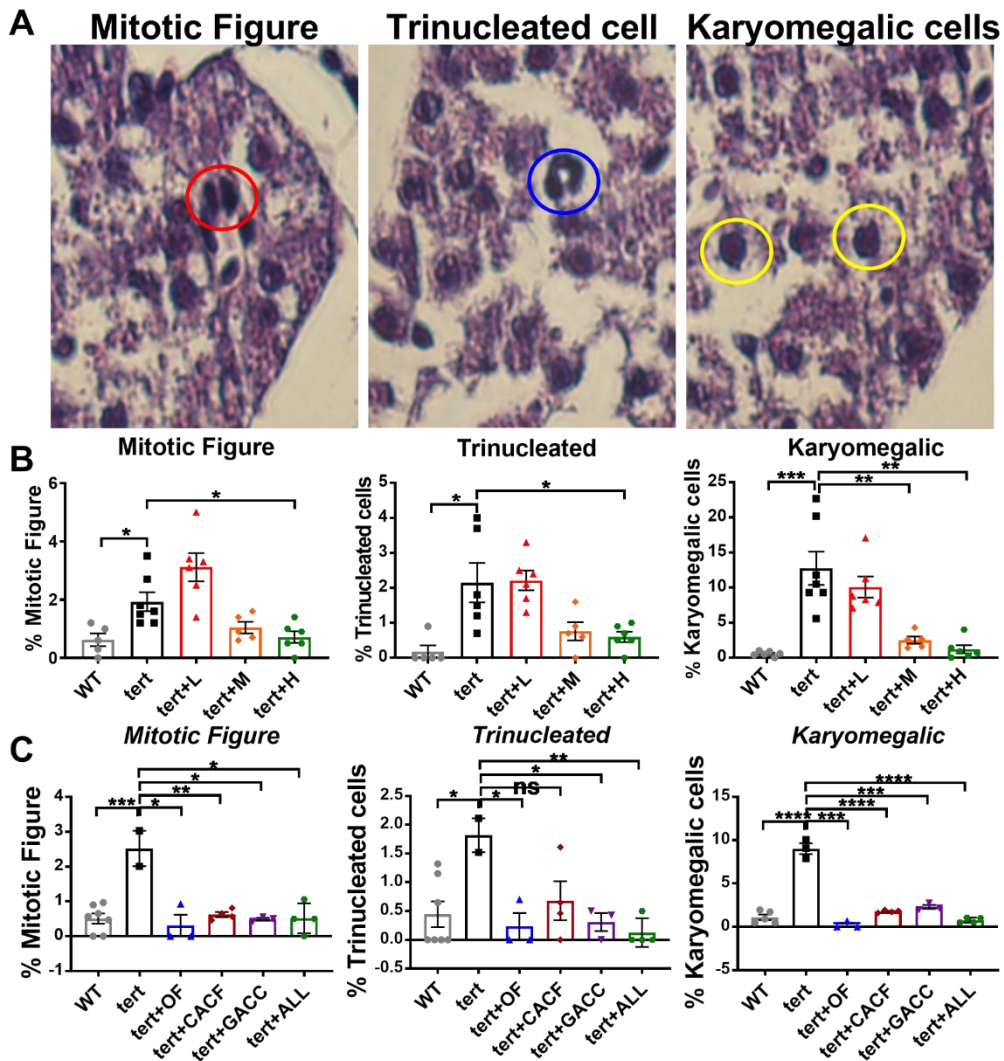
四、蘇木精-伊紅(HE)染色法觀察肝細胞組織形態學變化

(一)第一批魚: tert 轉基因魚中餵了低、中、高濃度混和藥物

1. 由圖十六 B 可看出, tert 比 WT 確實有明顯增加有絲分裂、三核、大核。
2. 由圖十六 B 可看出, 餵了高濃度的混和藥物(tert+H)和 tert 比, 有絲分裂、三核、大核有顯著下降。

(二)第二批魚: tert 轉基因魚中餵了三種個別藥物&高濃度三種混和藥物(圖十六 C)

1. 有絲分裂: tert 比 WT 確實有超級顯著增加(***, $p < 0.001$)，tert+CACF 和 tert 比有極顯著顯著下降(**, $p < 0.01$)，其餘的藥物組和 tert 比皆是顯著下降(*, $p < 0.05$)。
2. 三核: WT 和 tert 比有顯著增加(*, $p < 0.05$)，tert+OF 和 tert+GACC 與 tert 比有顯著下降(*, $p < 0.05$)，tert+ALL 和 tert 比有極顯著下降(**, $p < 0.01$)。
3. 大核: WT 和 tert 比有極超級顯著增加(****, $p < 0.0001$)，tert+CACF 和 tert+ALL 與 tert 比也有極超級顯著下降(****, $p < 0.0001$)，tert+OF 和 tert+GACC 比有超級顯著下降(***, $p < 0.001$)。
4. 由圖十六 C 可看出，餵了三種個別藥物&高濃度的混和藥物和 tert 比，有絲分裂、三核、大核有顯著下降。



圖十六、HE 染色後的有絲分裂、三核、大核圖病理分析

陸、結論

- 一、我們由存活率、游泳速度的變化、基因的表現及肝細胞組織形態變化的數據，比較小分子褐藻醣膠(OF)、鯽魚複合配方(CACF)和麩胺酸螯合鈷(GACC)三種藥物單獨或混合使用的抗肝癌作用。
- 二、端粒酶轉基因斑馬魚單獨使用三種藥物，由基因的表現及肝細胞組織形態變化的數據可知，OF的抑制效果比CACF和GACC更加有效。
- 三、端粒酶轉基因斑馬魚使用三種藥物混合(OF+CACF+GACC)，高濃度藥物恢復原本的行為能力，對於癌症最適合使用的是三種藥物混合的最高濃度，三種藥物混合後對三核、大核的抑制效果比三種藥物單獨使用更加有效。
- 四、因此我們結論是治療癌症不能單方，使用三種藥物混合效果更好。而且濃度非常重要。若濃度不夠可能會造成無效。

柒、參考資料

- 一、『肝』『脂』如飴---保肝丸減少脂肪累積和抑制肝癌在斑馬魚模式之研究。
- 二、國衛院、高醫大與清大攜手解碼原肌球蛋白。
- 三、基因突變與先天性肌病之關係並篩選解藥為罕病患者帶來曙光。
- 四、小分子褐藻醣膠抑制肝癌發生和非酒精性脂肪肝在斑馬魚模型之研究成果。

【評語】 090002

1. 使用動物模式篩選特定藥物的主題。雖然針對疾病與所使用的疾病模式有作討論，不過對於藥物的使用與所選擇的藥物之預期的作用機轉尚需多做討論。

對於實驗設計的目的需要更加詳盡的描述，例如內容中的動物行為實驗對於肝癌的意義，錯別字稍多。

2. 圖表的數據整理方式有待改進。
3. 基因量的變化之外，還需要利用西方墨點做基因表現量的測定。
4. 測定這些基因的理由應該解釋清楚。
5. 這三種藥物的作用機制也可以探討。