

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 探討雙同源箱基因 Duxbl 調控哺乳動物早期胚胎肌肉 *
* 名稱 : 分化的分子機制 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 賴禹安

學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-001-B

研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月

指導教授： 王淑紅

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國

105年03月31日

目錄

摘要·····	2
研究動機與研究問題·····	3
文獻探討·····	4
研究方法·····	6
結果與討論·····	7
參考文獻·····	12
計畫結果自評·····	13

摘要

同源箱基因家族(homeobox gene families)普遍存在高等及低等動物中，不同的同源箱基因藉高度保留的同源箱區(homeodomain)60個胺基酸，形成 helix-turn-helix 的結構和特定 DNA 序列結合，來調節下游基因之表現，調控胚胎發育過程中器官的形成、細胞增生以及分化。本研究中的 Duxbl 蛋白具兩個同源箱區，屬雙同源箱基因家族。目前雙同源箱基因家族(DUX)對於個體發育或疾病的生成所扮演的角色並不清楚，雖然根據生物資訊學及演化的分析，DUX 家族包含 intronless 的 DUX4 及鼠類的 Dux 及有 intron 的 DUXA, DUXB, DUXBL 及 DUXC 次家族，但真正了解其基因分子結構及證實有基因產物存在的的雙同源箱基因只有人類的 DUX4 及鼠類 Duxbl。Duxbl 同源箱區與人類 DUX4 有高達 67% 的相似度，DUX4 是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症(FSHD)的候選基因，由我們過去的研究顯示，Duxbl 與 DUX4 都表現於肌肉細胞，而且異常的 Duxbl 與 DUX4 表現都造成肌肉細胞的分化異常，代表人類 DUX4 與鼠類 Duxbl 在蛋白結構與功能上有一定程度的相似性。我們實驗室之前以 C2C12 細胞為模式的研究中發現，過度表現 Duxbl 會促進 myoblast 的增生並抑制肌肉的分化。Duxbl 促進 *MyoD* 及 satellite cell 的標記基因 *Pax7* 的表現增加，但會抑制分化因子 *MyoG* 的表現。由於 C2C12 細胞只限於研究 satellite cell 的增生及分化機制，無法分析在 myoblast 形成之前的肌肉前趨細胞的決定或分化的分子機制，因此，我們想要探討更早期，也就是胚胎發育時期，Duxbl 基因在肌肉發育上扮演何種角色，是否也會像在 C2C12 細胞中一樣會抑制肌肉細胞的分化。由於早期胚胎取得不易，因此本研究目標以 P19 cell 為模式來分析 *Duxbl* 如何影響早期胚胎的肌肉發育。P19 癌化的胚胎幹細胞體外分化為肌肉細胞的分子機制和早期胚胎發育及正常胚胎幹細胞是相似的，因此 P19 是研究體外肌肉組織分化很好的模式，可以取代早期胚胎，研究基因在早期肌肉分化的功能並探討其分子機制。首先我們以低劑量 RA 及 DMSO 將 P19 誘導分化為骨骼肌，分析 *Duxbl* 表現的變化，發現 P19 分化為骨骼肌時 *Duxbl* 的表現明顯的增加，和肌肉細胞標記基因 *MyoD*, *MyoG* 的表現情形一致，證明 *Duxbl* 確實參與胚胎早期骨骼肌的發育。接下來我們在 P19 細胞中過度表現 *Duxbl*，利用 RT-PCR 和細胞免疫螢光染色來看過度表現 *Duxbl* 對早期肌肉分化所造成的影響。從 RT-PCR 的結果來看，發現過度表現 *Duxbl* 時，肌肉前趨細胞標記基因 *Pax7* 的表現會被延長，而肌肉細胞標記基因 *MyoD*, *MyoG* 的表現則明顯受到抑制；從細胞免疫螢光染色的結果來看，過量表現 *Duxbl* 後，MHC(myosin heavy chain)的表現量大幅下降。因此我們推測，過量表現 *Duxbl* 會藉由延長肌肉前趨細胞標記基因並且抑制肌肉細胞標記基因導致早期肌肉發育異常。這和我們在 C2C12 成體肌纖維細胞中所看到的現象一致。

研究動機

在我們實驗室過去的研究中已知胚胎發育 12.5 天時 *Duxbl* 開始表現並維持至出生後開始減少，但我們的研究結果也顯示，著床前胚胎及胚胎幹細胞中 *Duxbl* 基因的表現量都相當高，而人類 *DUX4* 基因也可以在 iPS 細胞表現，推測雙同源箱基因在早期胚胎發育中扮演很重要的角色，由於早期胚胎取得不易，因此本研究目標將以 P19 cell 為模式分析 *Duxbl* 如何影響早期胚胎的發育。P19 分化為骨骼肌的分子機制相關的研究很多，相較於 C2C12 細胞只限於研究肌纖維母細胞分化為肌小管的分子機制，只能探討 myoblast 之後的分化機制，P19 在進行分化的過程當中則可以追蹤肌纖維母細胞之前的 premyogenic mesoderm cell 的分化，所以我們將 P19 以 DMSO 及 RA 共同誘導分化 9 天，分化細胞開始表現一些 premyogenic mesoderm 的基因如 *Pax3*, *Pax7* 等基因 (Wong, et al., 2013)，這些基因都是胚胎時期 somite/premyogenic mesoderm 所表現的基因，因此以 P19 體外分化為骨骼肌細胞，可以模擬胚胎時期肌肉發育的過程，由 myogenic precursor 的決定到成熟肌細胞的分化，並可以研究其分子調控機制，由我們初步的結果顯示，*Duxbl* 確實參與中胚層的分化。因此以表現載體過度表現 *Duxbl* 的方式，了解 *Duxbl* 如何影響 premyogenic mesoderm 基因的表現，進而影響肌肉細胞的分化，藉此了解異常 *Duxbl* 基因的表現，影響胚胎時期肌肉發育的分子機制，是否與成體肌纖維細胞一樣。

研究問題

- (1). 以 P19 細胞為模式，進行骨骼肌的分化，分析 *Duxbl* 的表現分佈與其他 premyogenic mesoderm 的標記基因 (*Pax3/7*) 及肌肉細胞分化的 MRFs (*MyoD*, *MyoG*) 的表現，在表現時間或表現量上的差異，藉此了解 *Duxbl* 可能參與早期胚胎骨骼肌發育的時間點。
- (2). 以 P19 細胞為模式，以現有的 *Duxbl*-v5 表現載體轉染至 P19 細胞過度表現 *Duxbl* 基因，再以 500 ug/ml G418 篩選 2 週後，得到 P19[*Duxbl*] 與 P19[control]。得到 P19[*Duxbl*] 與 P19[control] 後先分析細胞的增生速度，再根據中胚層分化方法進行骨骼肌的分化與各分化時期標記分子的分析。瞭解 *Duxbl* 表現增加會影響哪個時期的細胞分化及可能影響的分子為何。

文獻探討

同源箱基因家族(homeobox gene families)普遍存在高等及低等動物中，不同的同源箱基因藉高度保留的同源箱區(homeodomain)60個胺基酸，形成 helix-turn-helix 的結構和特定 DNA 序列結合，來調節下游基因之表現。同源箱基因編碼調控胚胎發育過程中器官生成、體軸形成、四肢發育的轉錄因子。

同源箱基因異常表現除了會造成個體發育異常外，也會導致腫瘤和疾病的形成，本研究中的 *Duxbl* 蛋白具兩個同源箱區，屬雙同源箱基因家族。目前雙同源箱基因家族(DUX)對於個體發育或疾病的生成所扮演的角色並不清楚，雖然根據生物資訊學及演化的分析，DUX 家族包含 intronless 的 DUX4 及鼠類的 *Dux* 及有 intron 的 DUXA, DUXB, DUXBL 及 DUXC 次家族，但真正了解其基因分子結構及證實有基因產物存在的雙同源箱基因只有人類的 DUX4 及鼠類 *Duxbl*，其他次家族是否真的存在並不清楚，而人類 DUX4 被認為是造成人類顏面及肩胛肱肌肉失養症(FSHD)的候選基因。*Duxbl* 同源箱區與人類 DUX4 有高達 67%的相似度，而且 *Duxbl* 是目前唯一發現存在鼠類完整有功能的雙同源箱基因（非 pseudogene），由我們過去的研究也顯示，*Duxbl* 與 DUX4 都表現於肌肉細胞，而且異常的 *Duxbl* 與 DUX4 表現都造成肌肉細胞的分化異常，代表人類 DUX4 與鼠類 *Duxbl* 在蛋白結構與功能上有一定程度的相似性。

過去的研究中也已經知道胚胎發育 12.5 天時 *Duxbl* 開始表現並維持至出生後開始減少，但我們的研究結果也顯示，著床前胚胎及胚胎幹細胞中 *Duxbl* 基因的表現量都相當高，而人類 DUX4 基因也可以在 iPS 細胞表現，推測雙同源箱基因在早期胚胎發育扮演很重要的角色，由於早期胚胎取得不易，因此本研究以 P19 cell 為模式分析 *Duxbl* 如何影響早期胚胎的發育。

P19 細胞來自老鼠胚胎的畸胎瘤，具有和胚胎幹細胞相似的增生以及分化的能力，可被培養在未分化的狀態也可被誘導分化成三種胚層的細胞類型。未分化的 P19 細胞表現高量的 alkaline phosphatase(ALP) 及胚胎幹細胞的標記基因 *Oct4*，由於 P19 細胞培養時不需添加 LIF 或 feeder cell，又具有很好的分化潛力，因此在研究早期胚胎發育的分子機制上，P19 是一個很好的組織培養系統。尤其在心肌與骨骼肌發育上的研究發現，以 P19 體外分化為肌肉細胞的分子機制上與早期胚胎發育是相似的，

特別是將 P19 誘導為中胚層及心肌或骨骼肌的過程，一些相關因子表現的先後順序與胚胎發育是一樣的，目前常用的分化方式是將 P19 細胞懸浮培養使其形成 EB(embryoid body)，在 EB 培養液中加入 0.5-1% DMSO 可以誘導心肌及骨骼肌的分化，誘導 4-5 天時可以誘導出 premyogenic mesoderm cells，分化 8-9 天 myoblast 開始出現，第九天時會出現分化的骨骼肌細胞。以 P19 為模式進行肌纖維的分化，其分子機制與 mES 及 human ES 相同，因此 P19 是研究體外肌肉組織分化很好的模式，可以取代早期胚胎，研究基因在早期肌肉分化的功能及探討其分子機制，將有助於將來以胚胎幹細胞進行體外分化為肌肉細胞作為細胞治療的參考。

在 P19 細胞進行中胚層分化的過程中，stem cell-specific marker gene(例如：*SSEA-1, Oct-3*)的表現量會下降，而 mesoderm-specific marker gene(例如：*Brachyury T, BMP-2/4*)的表現量會增加。*Brachyury T*在分化第二天時表現量最高，*BMP-2/4*則是在分化第三天時表現量最高。在分化第四天時會開始表現出 skeletal muscle-specific gene *Pax-3*，到第九天時會開始表現 *MyoD, Myogenin(MyoG)*。

骨骼肌的形成是個複雜的過程，包含肌肉前趨細胞表達早期分化因子、進入細胞週期、表達 muscle-specific structural gene 以及融合形成多核的肌小管。骨骼肌專一的 myogenic regulatory factors(MRFs)和 myocyte enhancer factor 2(MEF2)會誘導肌肉生成並決定肌肉標記基因的表現。MRFs 包括 *MyoD, Myf5, MyoG, Mrf4*，*MyoD* 是主要起始肌肉標記基因(例如：*MyoG, M-cadherin*)轉錄的調控因子，這些肌肉標記基因共同促進細胞週期的停止，而且 *MyoG* 的表現代表著肌肉分化的起始。

在我們之前以 C2C12 為模式的研究可以發現在肌肉再生的過程中 *Duxbl* 和 *MyoD, MyoG* 的表現情形相似，我們也發現過度表現 *Duxbl* 可以促進 myoblast 的增生卻會藉由干擾 *MyoD* 下游基因的表現來抑制肌肉分化，可以看見 *MyoD* 的表現量增加但 *MyoG* 的表現受到抑制。因此認為 *Duxbl* 在肌肉生成的過程中扮演重要的角色。

研究方法

1. 中胚層分化

P19 細胞購自食品工業研究院，培養在含 α -MEM, FBS, NaHCO₃, P/S 的培養液內，於 37°C、5%CO₂ 的環境中。細胞先在 tissue culture dish 中培養，長滿後切下，在第零天時種 4.5x10⁵ 個 P19 細胞到 bacterial culture dish 中，懸浮培養使其形成 EB，在 EB 的培養液中需加入 1%DMSO 和 3nM RA，進行四天的 EB 培養，在第四天將細胞換至 tissue culture dish 中貼盤培養至第九天。每兩天更換一次 medium。第二天及第四天自 EB 細胞萃取 RNA，第五天及第九天收細胞萃取 RNA 並以 RT-PCR 分析 premyogenic mesoderm 基因：*Pax3*, *Pax7*, *MRFs* 及 *Duxbl* 的表現。

2. Transfection

將 transfection reagent 和現有的 Duxbl-v5 表現載體稀釋於 Opti-MEM 中後靜置 5 分鐘，再將此兩種溶液混和均勻，在室溫下靜置反應 20 分鐘，之後再將此混和液加入細胞中。

3. 篩選 stable clone

將現有的 Duxbl-v5 表現載體轉染至 P19 細胞後，以 500ug/ml G418 篩選 2 週，可得到 P19[Duxbl] clone 與 P19[control]。

4. RNA extraction

[懸浮細胞(EB)]將細胞吸至 15 ml 離心管離心，去上清液，加 DEPC-PBS 2ml 清洗（混勻），吸至 2 ml tube，12000 rpm，4°C，3 min（看 pellet 有無離下來），去上清液，加 1 ml tri-reagent，以研磨棒磨碎後用液態氮冷凍，

[貼盤細胞]吸除 medium，DEPC-PBS 清洗，加 1 ml tri-reagent，加完搖晃，放在冰上，用刮棒將細胞刮下，吸至 2 ml tube，液態氮冷凍

液態氮冷凍或從 -80°C 拿出後，放室溫回溶，然後加入 200 μ l chloroform，Vortex 15 s（混合均勻，有分層），on ice 2 min，離心 4°C，12000 rpm，15 min，將上層吸至 1.5 ml tube，加入 500 μ l isopropanol，上下翻轉 5-10 次，靜置室溫 10 分鐘，離心 4°C，12000 rpm，10 min，去除上清液，留下 pellet，加入 1 ml 75%酒精離心 4°C，12000 rpm，5 min，去除上清液，開蓋風乾約 10 分鐘，以 70°C DEPC-d₂H₂O 回溶。

5. 細胞免疫螢光染色

細胞自細胞培養箱拿出後以 PBS 洗 5 分鐘，共 3 次，以 -20°C Methanol 固定 5 分鐘，吸除 methanol，加入 PBS 覆水，靜置 30 分鐘，以 0.2%Triton-X-100+0.2% Tween-20+2%BSA in PBS 進行 blocking 30 分鐘，吸除 blocking buffer 後以 PBS 洗 5 分鐘，共 3 次，吸除 PBS 後加入一抗，放至 4°C overnight，隔天拿出吸除一抗，以 PBS 洗 5 分鐘，共 3 次，加入二抗，放至 37°C，1 小時，吸除二抗後以 PBS 洗 5 分鐘，共 3 次，加 DAPI，隔天拍照。

結果與討論

(1)肌肉分化流程圖



Fig 1. Day 0 時將細胞種到 bacterial-grade dish 中進行四天的懸浮培養，在懸浮培養過程中 medium 需加入 1%DMSO 和 3nM RA 進行誘導，第四天時將細胞改至 tissue culture dish 中貼盤培養至第九天。

(2)P19 細胞肌肉分化細胞型態圖

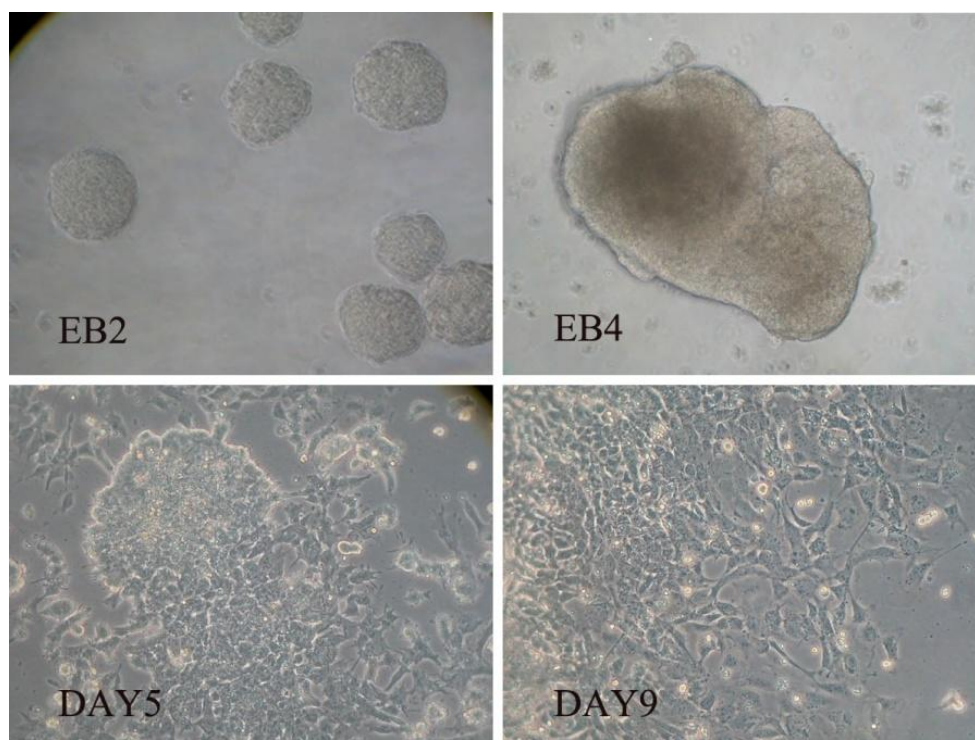


Fig 2. 將 P19 進行肌肉分化，在懸浮培養過程中可看到 EB 隨時間逐漸變大，在第五天開始可以看到肌肉前趨細胞的出現，第九天可以看到紡錘狀肌肉細胞形成。

(3) 在不同分化時期 P19 細胞內各基因表現情形

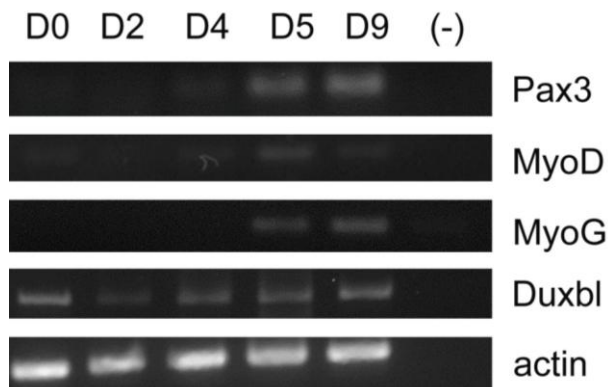


Fig 3. 我們分別在第 0, 2, 4, 5, 9 天萃取 RNA 進行 RT-PCR，分析各時期標記基因的表現，肌肉前趨細胞標記基因 *Pax3* 從第四天開始表現，肌肉細胞標記基因 *MyoD*, *MyoG* 則從第五天開始表現至第九天，而目標基因 *Duxbl* 在胚胎幹細胞時期就有高表現，在肌肉分化過程中 *Duxbl* 的表現量也會逐漸增加。

(4) 篩選 P19 [*Duxbl*] stable clone

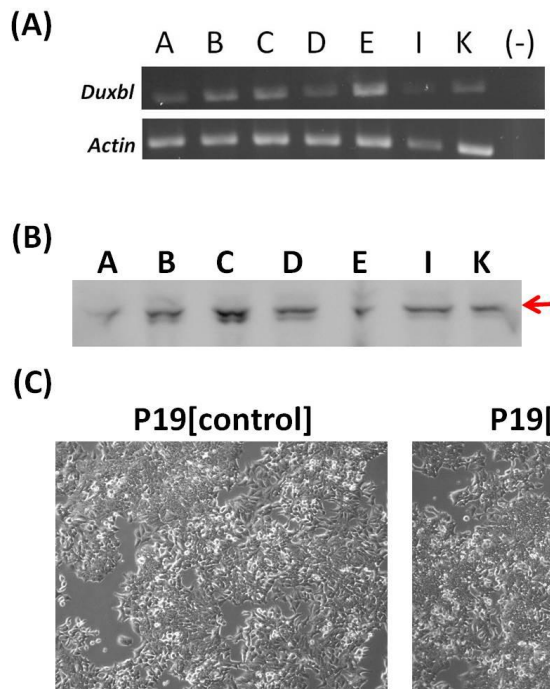


Fig 4. 將 *Duxbl*-v5 載體轉染到 P19 細胞中，利用 G418 進行兩周的篩選，得到 P19[control] 和 P19 [*Duxbl*]。我們利用 RT-PCR(A) 和 Western blotting(B) 分析每個 clone 的 *Duxbl* 表現量，最後選擇 *Duxbl* 表現量較高的 clone C 進行後續的分化實驗。我們以 beta-actin 作為 internal control 並以 anti-v5 進行 western blotting。從(C)圖可以看到 P19 [control] 和 P19 [*Duxbl*] 的細胞型態，兩者在正常培養下型態沒有差異。

(5) P19 [control] 和 P19 [Duxbl] 肌肉分化細胞型態圖

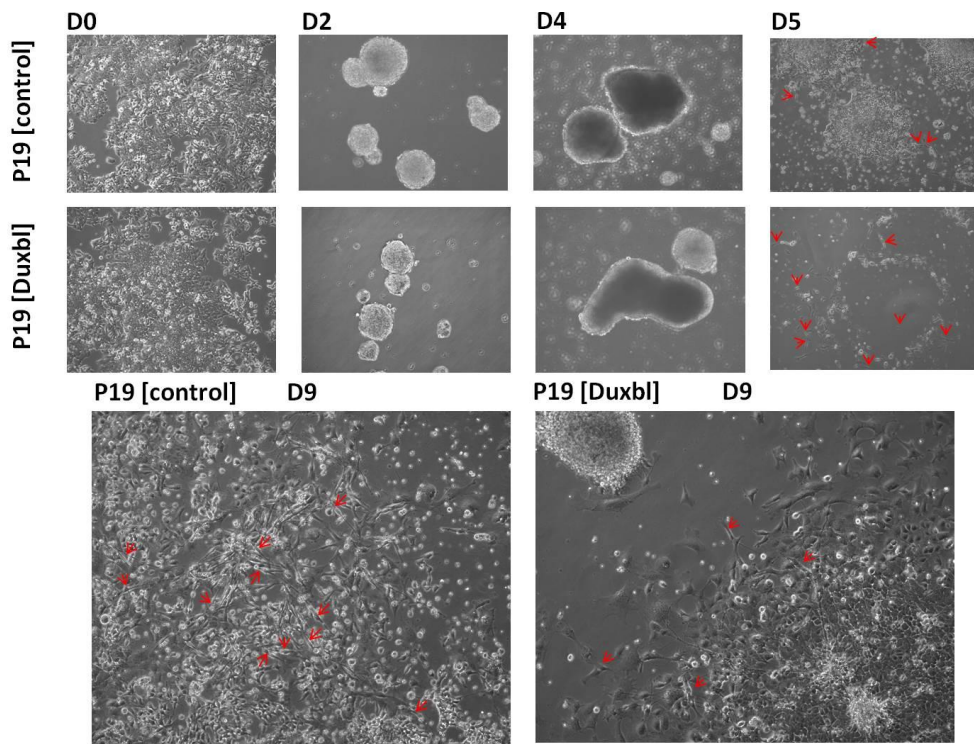


Fig 5. 從細胞型態圖我們可以發現在 EB 時期，P19 [control] 和 P19 [Duxbl] 細胞型態沒有太大的差異。在將細胞貼盤培養後，可以看到在 P19 [control] 組有較多紡錘狀肌肉細胞和肌小管的形成。

(6) P19 [control] 和 P19 [Duxbl] 進行肌肉分化過程中各時期標記基因表現情形

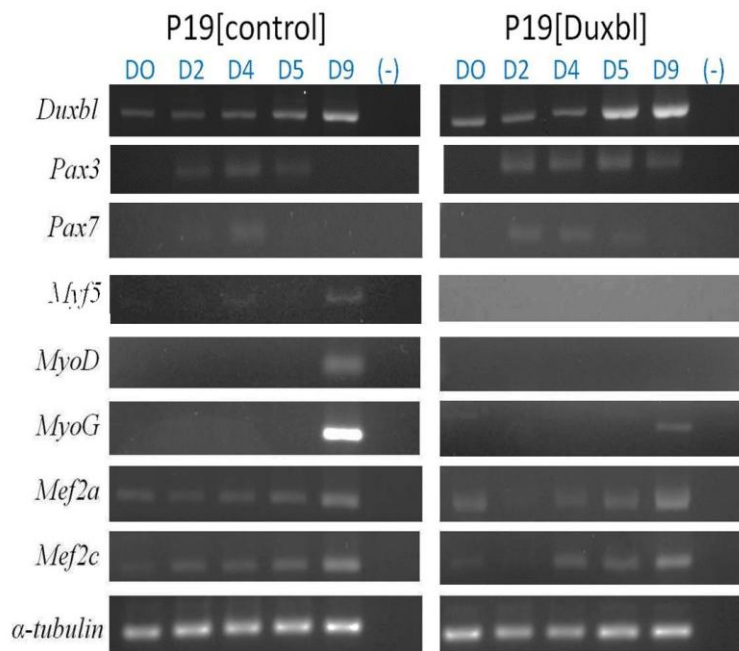


Fig 6. 我們從 RT-PCR 的結果中可以看到 *Duxbl* 在胚胎幹細胞時期就有表現，隨著分化時間增加，*Duxbl* 表現量隨之上升，在 P19 [Duxbl] 可看到 *Duxbl* 的表現

在第五天大幅提升，這是由於外源性 *Duxbl* 在第五天開始大量表現所導致。再來可以看到肌肉前趨細胞標記基因 *Pax3*, *Pax7* 皆在第二天開始表現，在過量表現 *Duxbl* 的情況下，*Pax3*, *Pax7* 的表現都會被延長。而肌肉細胞標記基因 *Myf5* 從第四天開始表現至第九天，*MyoD*, *MyoG* 則在第九天大量表現，過量表現 *Duxbl* 後，肌肉細胞標記基因皆受到抑制，表現量大幅降低。最後看到 MyoD activator, MEF2 family, 中的 *Mef2A*, *Mef2C*，他們的表現不受到 *Duxbl* 過度表現所影響。我們由此推測 *Duxbl* 藉由延長肌肉前趨細胞標記基因 *Pax3*, *Pax7* 的表現和抑制肌肉細胞標記基因 *Myf5*, *MyoD*, *MyoG* 表現來造成異常的肌肉分化。

(7) 在肌肉分化過程中，過量表現 *Duxbl* 會延長肌肉前趨細胞標記基因 *Pax3*, *Pax7* 的表現

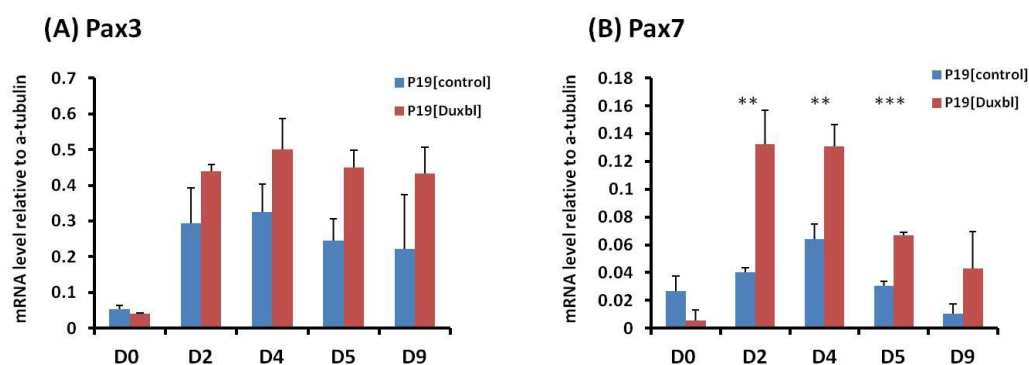


Fig 7. 我們利用 RT-PCR 分析肌肉分化過程中 day0, 2, 4, 5, 9 的肌肉前趨細胞標記基因 *Pax3*(A), *Pax7*(B) 的表現情形，可以看到在過量表現 *Duxbl* 的情況下，*Pax3* 的表現量略為提升，而 *Pax7* 則在 day2~5 大幅提升。由此結果我們推測過量表現 *Duxbl* 會增加肌肉分化過程中 *Pax7* 的表現。我們利用 *alpha-tubulin* 進行定量，並進行三重覆的實驗(N=3)。**:p<0.01 and***:p<0.001 .

(8)P19[control]和 P19 [Duxbl]在肌肉分化第九天肌肉細胞標記蛋白 MHC(myosin heavy chain)的表現情形

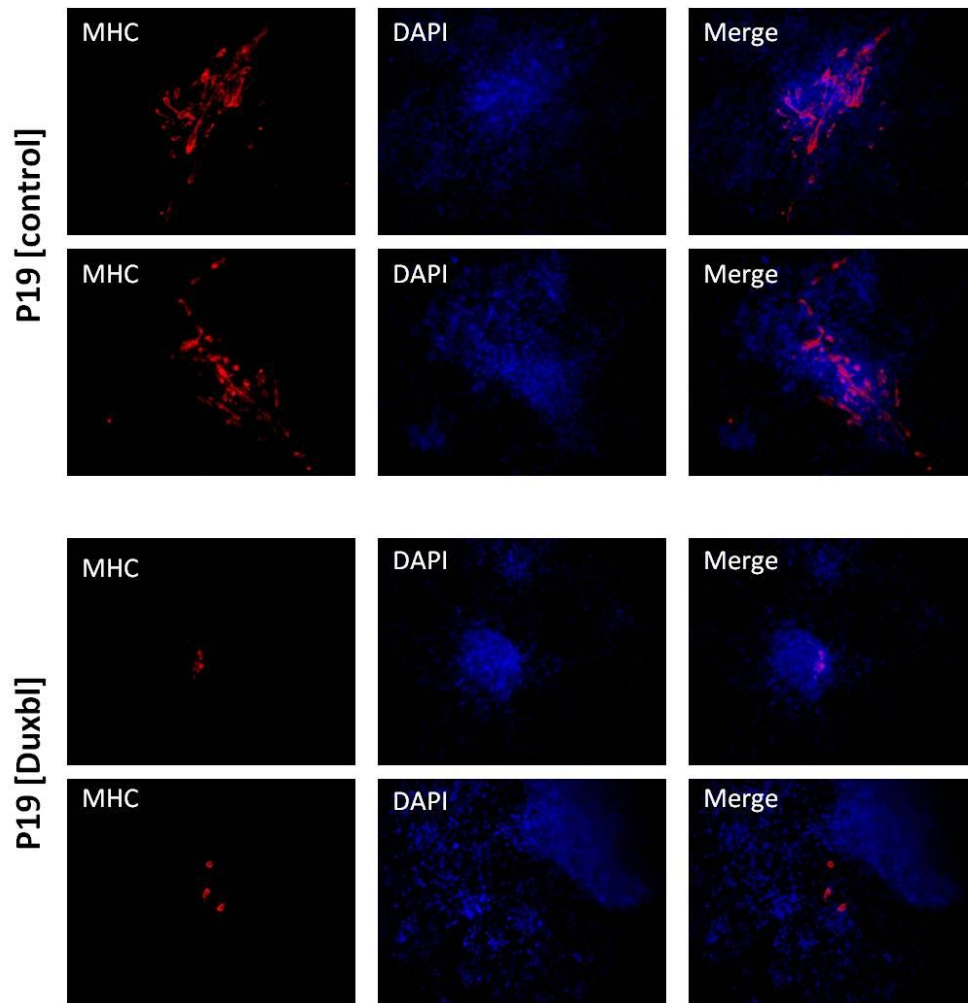


Fig 8. 我們利用 anti-MHC antibody(red)進行細胞免疫螢光染色，可以看到在 P19[control]中有較多的 MHC 表現，而在 P19 [Duxbl]中幾乎沒有 MHC 的訊號。我們由此推測，過量表現 Duxbl 會造成 MHC 表現量降低進而導致肌肉細胞的異常分化。我們以 DAPI(blue)染細胞核。

根據以上結果我們發現 *Duxbl* 在胚胎幹細胞時期即有表現，在肌肉分化的過程中會隨著時間而增加，表現情形和肌肉細胞標記因子 *MyoD*, *MyoG* 相似。當我們過量表現 *Duxbl* 時，會造成肌肉前趨細胞標記因子 *Pax7* 的表現延長，並且使得肌肉細胞標記因子 *Myf5*, *MyoD*, *MyoG* 受到抑制，表現量大幅下降，因而導致早期胚胎肌肉分化的異常。雙同源箱基因 *Duxbl* 影響 P19 肌肉生成更詳細的分子機制還有待我們進一步研究。

參考文獻

- Andreas Leidenroth and ,Jane E Hewitt. A family history of *DUX4*: phylogenetic analysis of *DUXA*, *B*, *C* and *Duxbl* reveals the ancestral *DUX* gene. BMC Evolutionary Biology 2010;10:364. DOI: 10.1186/1471-2148-10-364.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., Wuthrich, K. Homeodomain-DNA recognition. Cell. 1994 Jul 29;78(2):211-23
- Ilona S. Skerjanc Cardiac and Skeletal Muscle Development in P19 Embryonal Carcinoma Cells. TCM 1999 July; Volume 9, Issue 5, Pages 139–143.
- Jannine Clapp, Laura M. Mitchell, Daniel J. Bolland, Judy Fantes, Anne E. Corcoran, Paul J. Scotting, John A. L. Armour, and Jane E. Hewitt. Evolutionary Conservation of a Coding Function for D4Z4, the Tandem DNA Repeat Mutated in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. Am J Hum Genet. 2007 Aug; 81(2): 264–279.
- Kassar-Duchossoy L¹, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. Nature. 2004 Sep 23;431(7007):466-71.
- Kitzmann M¹, Fernandez A. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. Cell Mol Life Sci. 2001 Apr;58(4):571-9.
- Vicente Andrés and Kenneth Walsh Myogenin Expression, Cell Cycle Withdrawal, and Phenotypic Differentiation Are Temporally Separable Events that Precede Cell Fusion upon Myogenesis. J Cell Biol. 1996 Feb; 132(4):657-66.
- Wu SL, Li GZ, Chou CY, Tsai MS, Chen YP, Li CJ, Liou GG, Chang WW, Chen SL, Wang SH (2014) Double homeobox gene, *Duxbl*, promotes myoblast proliferation and abolishes myoblast differentiation by blocking MyoD Transactivation. Cell Tissue Res. 2014 Nov;358(2):551-66. doi: 10.1007/s00441-014-1974-x.
- Zhu C, Chen YL, Wang XJ, Hu XS, Yu ZB, and Han SP (2012) ShRNA-mediated gene silencing of AHR promotes the differentiation of P19 mouse embryonic carcinoma cells into cardiomyocytes. MOLECULAR MEDICINE REPORTS. 6:3 2012 Sep pg 513-8
- .

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

■ 達成目標

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：無

專利：無

技轉：無

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）：

從我們的結果發現，過量表現 *Duxbl* 會影響其他基因的表現情形，包含延長肌肉前趨細胞標記因子 *Pax7* 的表現及抑制肌肉細胞標記因子 *Myf5*, *MyoD*, *MyoG* 表現，進而影響早期胚胎的肌肉發育。這和我們實驗室之前在 C2C12 成肌纖維細胞中所觀察的現象一致，由此可知，不論是在早期胚胎肌肉發育或者成熟肌纖維的再生與修復，雙同源箱基因皆扮演重要的調控角色。此外，我們亦進行 *Duxbl* 的 knockdown，發現這會造成 P19 細胞的死亡。人類有許多器官由肌肉組成，若是在胚胎發育時期，雙同源箱基因即異常表現，可能造成其肌肉發育的異常，此胚胎可能就無法存活。之後也可利用此模式來嘗試找出治療異常肌肉發育可能的方法。