

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫名稱：以斑馬魚為模式探討第一型 PTEN 誘導激酶在脂肪組織發育之角色 *
* *****

執行計畫學生： 陳佳華
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-041-B
研究期間： 98 年 07 月 01 日至 99 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 謝錦源

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 99 年 03 月 31 日

計畫摘要

糖尿病 (DM) 是常見的內分泌疾病，致病機轉仍然未知。許多因素可能會導致 DM，其中已環境因子與遺傳相關的研究最多。粒線體在糖尿病的致病機轉過程中所扮演的角色近年來逐漸被重視。粒線體為細胞能量的主要來源，已知其功能失調參與第二型糖尿病 (T2DM) 的致病過程。粒線體形態對其功能扮演重要的角色。已知神經退化性的帕金森氏症 (Parkinson's disease; PD) 之致病機轉與粒線體功能失調有關；而 PD 與粒線體功能失調相關研究文獻中又以第一型 PTEN 誘導激酶 (PTEN-induced kinase 1; PINK1) 最被廣泛探討。PINK1 可調控粒線體型態來維持細胞正常生理所需並緩解細胞內所產生的氧化壓力。綜觀 PD 與 PINK1 之相關研究指出 T2DM 為罹患 PD 的危險因子之一。PINK1 表現量不但與 DM 病人的糖化血色素與空腹血糖值等血液生化檢驗結果成負相關，和血液脂肪濃度也有相關性。此外，抑制 PINK1 的表現量會使細胞出現葡萄糖吸收與脂肪代謝的異常；而 PINK1 受到 PTEN 的調控，又 PTEN 參與胰島素訊息傳遞中的 P13K 路徑，所以曾有學者推測 PINK1 也可能參與細胞內能量代謝的訊息傳遞。我們在分析 PINK1 基因啟動子序列時，發現其啟動子序列上有許多參與脂肪細胞分化之轉錄因子的可能結合位；而且 PINK1 的表現量會隨著脂肪細胞分化過程而逐漸增加，並於脂肪細胞完全分化時達到最高表量。基於上述之脂肪細胞分化與 PINK1 表現初步分析結果，我們推測 PINK1 可能參與脂肪與葡萄糖代謝，促進胰島素作用而降低胰島素阻抗性與 T2DM 發病。因此本研究計畫主旨為利用在斑馬魚卵細胞內減少 PINK1 的表現量，再以組織切片的方式觀察脂肪和胚胎發育的狀況。

研究問題

1. 在斑馬魚的卵細胞中，KNOCKDOWN PINK1 的表現量後，斑馬魚的胚胎發育是否受到影響。
2. 在斑馬魚的卵細胞中，KNOCKDOWN PINK1 的表現量後，斑馬魚體內的脂肪發育是否受到影響。

預期結果

1. 在胚胎發育過程中發現斑馬魚的生長出現異常，如：尾巴長度改變、眼睛大小、體色變濁。
2. 在發育過程中，分別以不同時期，將同一生長條件的斑馬魚以組織切片的方式觀察脂肪發育受到抑制的情況。

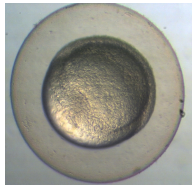
實驗結果




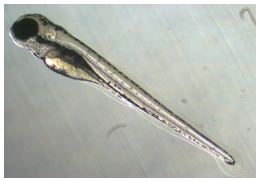
首先，因為要先找出實驗所需的劑量，所以一開始先分成野生型、control(phenol red only)、4 ng PINK1 MO、8 ng PINK1 MO 和 12 ng PINK1 MO

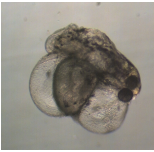


等五組做顯微注射，分別在顯微注射後 6hr、24 hr、48 hr、96 hr 拍照記錄各種不同濃度下的外顯型(圖一)。觀察後發現，在 control 組出現少部分和其他 MO 濃度一樣的 morphant; 而且死亡率偏高，而在注射 4 ng PINK1 MO、8 ng PINK1 MO 和 12 ng PINK1 MO 的各組，依照魚的外顯型將其分成 No tail、Short tail、Long tail 三種，並且在上述時間點統計魚的數量以觀察魚的生長情況(圖二)。




在魚的生長情況方面，除了野生型以外，其他有做顯微注射的各組在 24 hr 時的死亡數量較高，之後在 48 hr、96 hr 死亡的數量較少，經過統計，不論是 No tail、Short tail 還是 Long tail 的魚都可以活到第五天，以做組織切片觀察脂肪堆積的情況。

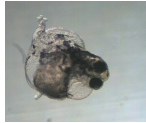
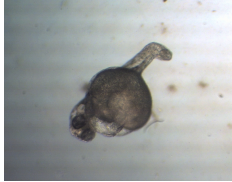
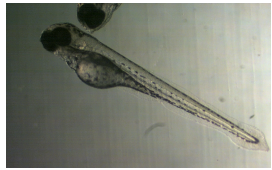
圖一：MO 劑量濃度會影響抑制轉譯使外顯型產生不同程度的變異，所以分別打入不同劑量的 MO 以找出最適合的劑量。

	6hr	24hr	48hr	96hr
WT				

	6hr	24hr	48hr	96hr
control				

		No tail	Short tal	Long tail
4ng	96hr			

		No tail	Short tal	Long tail
8ng	96hr			

12ng		No tail	Short tail	Long tail
	96hr			

圖二：魚的生長情況以及數量

		W	C	4	8	12
6hr	受精	75	25	24	18	23
	未受精	64	13	18	14	24
24hr	正常	0	6	4	2	6
	No tail	0	2	4	2	4
	Short tail	0	1	7	2	7
	Long tail	0	0	2	2	3
	死亡	10	16	7	10	3
	Total	65	9	17	8	20
48hr	正常	0	6	4	2	6
	No tail	0	2	3	2	1
	Short tail	0	1	6	2	7
	Long tail	0	0	2	2	3
	死亡	0	0	2	0	3
	Total	65	9	15	8	17

		W	C	4	8	12
72hr	正常	65	6	4	2	6
	No tail	0	1	2	1	1
	Short tail	0	1	5	1	4
	Long tail	0	0	2	2	3
	死亡	0	1	2	2	3
Total	65	8	13	6	14	
96hr	正常	65	6	4	2	6
	No tail	0	1	2	1	1
	Short tail	0	1	5	1	4
	Long tail	0	0	2	2	3
	死亡	0	0	0	0	3
Total	65	8	13	6	14	

W : WT C : control 劑量 : ng

※ control 組打 phenol red

		W	C	2	4	8	12
6hr	受精	40	8	19	16	47	22
	未受精	43	29	18	25	27	18
24hr	正常	19	1	0	0	13	3
	No tail	0	0	0	1	1	1
	Short tail	0	0	3	2	7	3
	Long tail	0	0	3	2	4	5
	死亡	21	7	13	11	22	10
	Total	19	1	6	5	25	12
48hr	正常	19	1	0	0	12	3
	No tail	0	0	0	1	1	1
	Short tail	0	0	3	2	7	1
	Long tail	0	0	3	2	4	5
	死亡	0	0	0	0	1	2
	Total	19	1	6	5	24	10

		W	C	2	4	8	12
72hr	正常	19	1	0	0	12	3
	No tail	0	0	0	1	1	1
	Short tail	0	0	3	2	7	1
	Long tail	0	0	3	2	4	5
	死亡	0	0	0	0	0	0
Total	19	1	6	5	24	10	

		W	C	2	4	8	12
96hr	正常	19	1	0	0	12	3
	No tail	0	0	0	0	1	1
	Short tail	0	0	3	2	7	1
	Long tail	0	0	3	2	4	5
	死亡	0	0	0	0	0	0
Total	19	1	6	4	24	10	

※同日學姐的實驗24hr後死亡率也很高

※9/2 24hr後僅剩6隻魚存活

		W	C1	C2
6 h r	受精	42	30	27
	未受精	7	9	4
2 4 h r	正常	42	12	10
	No tail	0	6	4
	Short tail	0	1	3
	Long tail	0	0	1
	死亡	0	11	9
	Total	42	19	18

		W	C1	C2
6 h r	受精	53	46	21
	未受精	12	8	5
2 4 h r	正常	53	23	2
	No tail	0	7	3
	Short tail	0	0	1
	Long tail	0	2	0
	死亡	0	14	15
	Total	53	32	6

結果討論：

一開始各組在顯微注射後的死亡率太高，而且 control 組都有出現 morphant，經過討論再排除掉 phenol red 的問題和克服魚群狀況不好等情況後，推測是注射用的針口徑太大，導致在注射時容易把卵黃和細胞倒吸，產生 morphant 和死亡率偏高的現象，為了解決這樣的問題，之後的顯微注射都改用磨針的針為注射工具以降低這樣的狀況，並在注射後的 6hr、48 hr 觀察魚的外顯型和生存的數量並記錄之(圖三)。

雖然已達實驗期限，但是目前觀察所得的結果已經確定所有的魚都可以活到第五天，並且可用組織切片的方式觀察脂肪在斑馬魚體內堆積的情況，未來仍會致力完成後續的實驗，包括：

1. 以 Oil Red O 染斑馬魚觀察脂肪堆積的情況。
2. 以組織切片的方式觀察斑馬魚體內脂肪代謝堆積的情況。

希望能盡自己最大力量完成這次實驗，為 PINK1 和斑馬魚體內脂肪代謝的相關性提出初步的結果。

圖三：換用磨針的方式降低針的孔徑減少倒吸的現象後所得的實驗數據。

10/26		W	C
6 h r	受精	20	37
	未受精	3	4
4 8 h r	正常	20	32
	No tail	0	3
	Short tail	0	2
	Long tail	0	0
	死亡	0	0
	Total	20	5

12/1		W	C
6 h r	受精	7	19
	未受精	0	2
4 8 h r	正常	7	13
	No tail	0	4
	Short tail	0	1
	Long tail	0	0
	死亡	0	1
	Total	7	18

W : wild type
C : control (phenol red)

		W	C	4ng
6 h r	受精	42	34	39
	未受精	12	9	6
4 8 h r	正常	42	30	29
	No tail	0	2	4
	Short tail	0	1	3
	Long tail	0	0	1
	死亡	0	1	2
	Total	42	33	37

		W	C	8ng
6 h r	受精	26	22	31
	未受精	5	3	1
4 8 h r	正常	26	17	21
	No tail	0	4	3
	Short tail	0	1	2
	Long tail	0	0	4
	死亡	0	0	1
	Total	26	22	30