

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

類胰島素生長因子調節斑馬魚胚胎心跳之分子機轉

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2311-B-040-010-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

計畫主持人：謝錦源

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

(一)、預期研究成果：

IGF-I 與 IGF-II 在心臟病患者身上，已知可能與心肌肥大 (hypertrophy) 有關，而心肌肥大是心臟衰竭的危險因子之一 (Ritter and Neyses, 2003)，然而，IGF-I 與 IGF-II 在心跳速率的調節機轉上，目前並無文獻探討，僅有少數提及心跳的變化情形。本計劃將是第一個探討 IGF-I 與 IGF-II 對心跳速率的調節機轉；而我們最終要證明的是，類胰島素生長因子在胚胎心跳的調節上，可能是透過兩個不同的因子 (IGF-I, IGF-II)，作用在 IR、IGF-IR 或 IGF-IIR 上，經由不同的訊息傳遞路徑，調節兩個不同接受器 (M_2 mAChR, β 1-AR) 基因的表現，來進行基礎心跳的調節作用，維持身體的恒定。本計劃並可提供心血管研究學者參考，進一步了解心臟病患者，初期心肌肥大與心臟衰竭的可能生理及分子變化機轉。

(二)、計畫報告

先前在探討斑馬魚胚胎發育的研究中發現，第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器基因裂解後，會導致斑馬魚胚胎心跳速率增加 (Hsieh and Liao, 2002)；另外經過初步實驗結果發現，IGF-I 基因裂解後，也會使的斑馬魚胚胎心跳速率增加，因此猜想此心跳速率的增加，是否因為 IGF-I 基因裂解造成第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器減少所致。

利用 IGF-I、IGF-IRa、IGF-IIa、IGF-IIb Morpholino (MO)，進行基因降解 (knockdown) 後，進行 RT-PCR 實驗分析第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器基因的表現情形，發現於胚胎 48 小時時，IGF-IRa、IGF-IIa MO，明顯的降低第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器基因的表現，於胚胎 72 小時時，IGF-I、IGF-IRa、IGF-IIa MO，明顯的降低第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器基因的表現 (fig.1)。

同時在 IGFs Morpholino (MO)，進行基因降解 (knockdown) 後，利用整體原位雜交技術 (Whole mount in-situ hybridization) 以 Dig 標定之 RNA 探針分析，第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器 RNA 的表現情形，發現 IGF-I、IGF-IRa、IGF-IIa、IGF-IIb

MO 進行基因降解(knockdown)後，IGF-IRa MO 對斑馬魚的外表型態較無明顯影響，然而，IGF-I、IGF-IIa、IGF-IIb MO 對斑馬魚的外表型態有明顯之影響，尤其是 IGF-IIa、IGF-IIb MO；對於胚胎心臟型態的影響亦如上述，IGF-IRa MO 對斑馬魚的心臟型態較無明顯影響，然而，IGF-I、IGF-IIa、IGF-IIb MO 對斑馬魚的心臟型態有明顯之影響，尤其是 IGF-IIa、IGF-IIb MO；除此之外，本實驗發現 IGF-I、IGF-IRa、IGF-IIa、IGF-IIb MO 進行基因降解(knockdown)後，於胚胎 72 小時時，第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器 RNA 的表現情形明顯受到抑制，其中以 IGF-IIa MO 的抑制作用最為明顯(fig.2)。

在斑馬魚胚胎時期，當第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器 RNA 的表現情形受到抑制時，斑馬魚的基礎胚胎心跳速率會上升約百分之十左右。從上述結果，IGF-I、IGF-IRa、IGF-IIa、IGF-IIb MO 基因降解(knockdown)後，抑制第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器 RNA 的表現情形(fig.1, fig.2)，同時發現，在於胚胎 72 小時時，在 IGF-I、IGF-IRa MO 基因降解後，斑馬魚的基礎胚胎心跳速率上升約百分之十左右(fig.3)，由此初步之結果，猜想 IGF-I、IGF-IRa 參與斑馬魚基礎胚胎心跳速率的調節作用，而此作用機轉可能是透過對第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器基因的表現來調節。

另外，在於胚胎 72 小時時，在 IGF-IIa、IGF-IIb MO 基因降解後，斑馬魚的基礎胚胎心跳速率下降約百分之十左右(fig.3)；在哺乳類有關心跳速率的調節，主要受到自主神經系統之交感神經與副交感神經之調控，分別是透過 β 1-adrenergic receptor (β 1-AR)與第二亞型萆毒乙醯膽鹼接受器，來進行正向及負向心跳速率的調節；由此初步之結果，猜想 IGF-IIa、IGF-IIb 參與斑馬魚基礎胚胎心跳速率的調節作用，而此作用機轉可能是透過對 β 1-腎上腺接受器 (β 1-AR)基因的表現來調節，因為 IGF-IIa、IGF-IIb MO 對胚胎心跳的影響恰好與 IGF-I、IGF-IRa MO 的結果相反。

我們依據人類、大鼠、小鼠等不同物種的已知腎上腺接受器序列，利用退化性引子(degenerate primers)的設計，試圖去夾出染色體基因庫或 cDNA 基因庫中的

相關的腎上腺接受器序列，一直都沒有成功。然而，2005年6月30日在NCBI網站上發表了一段可能是斑馬魚 $\beta 1$ -腎上腺接受器基因的序列(Accession No. XM_680208)，因此，接下來我們將進一步去分析此段序列的相似度，之後再利用此段序列來設計引子，進一步以RT-PCR以及整體原位雜交技術分析IGF-I、IGF-IRa、IGF-IIa、IGF-IIb MO對 $\beta 1$ -腎上腺接受器基因表現的影響，以釐清IGF-I、IGF-IRa、IGF-IIa、IGF-IIb MO對斑馬魚胚胎心跳的調控機轉。

Fig.1

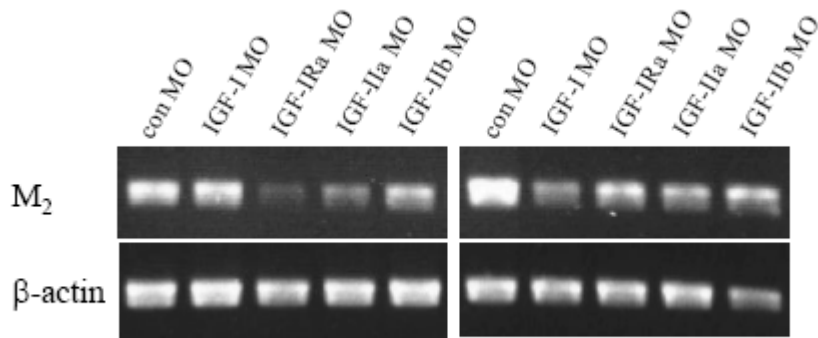


Fig.2

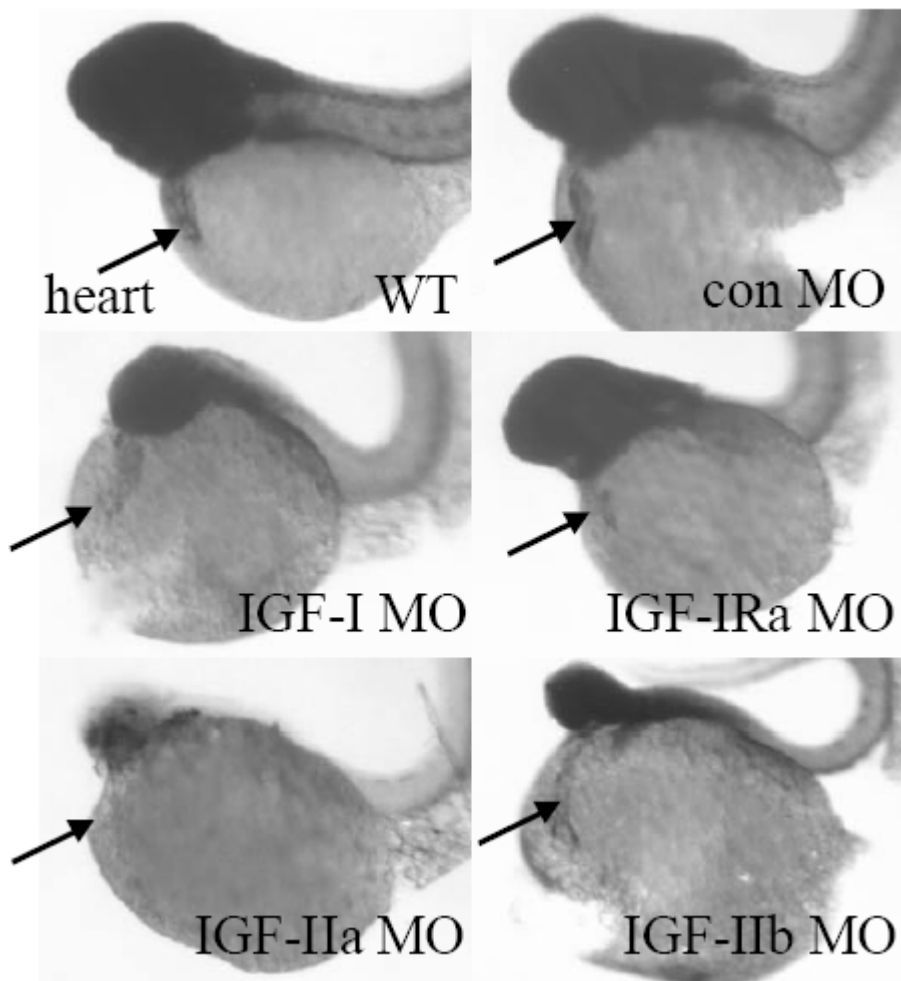


Fig.3

