

# 【2021 全國科學探究競賽-這樣教我就懂】

## 國中組 成果報告表單

題目名稱：肝未人生，肝緊治療

### 一、摘要：

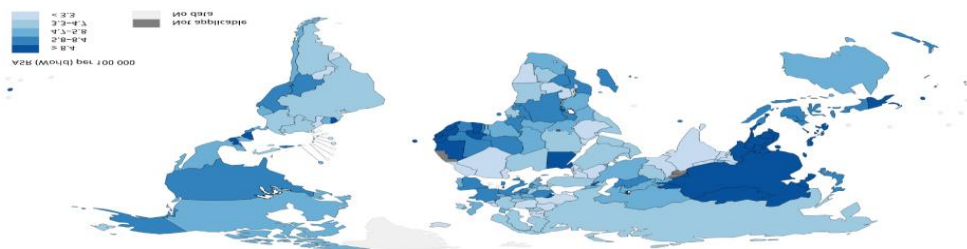
瞭解台灣除了標靶藥物和輻射治療等方式以外，還能使用什麼藥物抵抗肝癌細胞。透過生物林明智老師與國家衛生研究院喻秋華教授的指導下，我們到國衛院進行斑馬魚實驗室與系統，以端粒酶轉基因斑馬魚模型來進行實驗，餵食三種藥物十天，分別是小分子褐藻醣膠(OF)、鯽魚複合配方(CACF)、麩胺酸螯合鈷(GACC)。實驗共分成兩階段，第一階段是混和三總藥物，以不同的濃度分成實驗組及對照組，之後送去切片及做 qPCR;第二階段是三種藥物各自以最高濃度做實驗，再加上混合三總藥物的最高濃度做比較，送去切片及做 qPCR，最後再分析數據。我們發現這些藥物能有效抑制肝癌，未來可廣泛運用在醫學上。

### 二、探究題目與動機

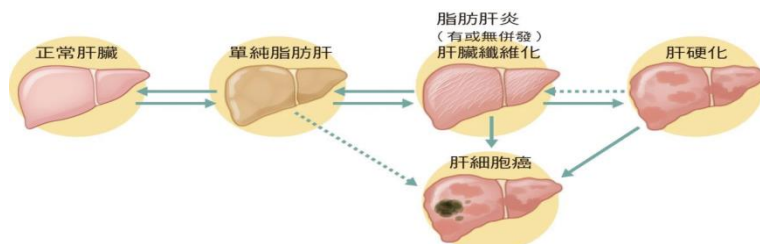
根據世界衛生組織國際癌症研究機構 ( IARC ) 的統計，肝癌是癌症死因排名的第三名，在台灣，則是第二名，近幾年，得肝癌人數也持續攀升，尤其是在東南亞，非洲等地方如圖一。

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，致病過程經過慢性肝炎、脂肪肝、肝纖維化與肝硬化，最後發展成肝癌(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，而標靶藥物方面目前不但費用昂貴，也難以預測其副作用。

為了想更深入了解肝的世界，以及找出適合的藥物種類，我們利用寒假期間到國衛院進行實驗，並使用基因組與人類基因組相似的斑馬魚來探討藥物作用的機制，希望我們的研究能改善現今在肝醫學上的不足。



圖一、世界肝癌分布情形:肝癌是東南亞以及北部和西部非洲最常見的癌症。



圖二、肝癌的治病過程

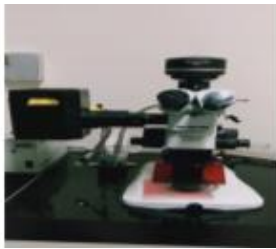
(圖片來源:[https://enews.tsgh.ndmctsgh.edu.tw/edm/content\\_detail.aspx?eid=1171](https://enews.tsgh.ndmctsgh.edu.tw/edm/content_detail.aspx?eid=1171))

### 三、探究目的與假設

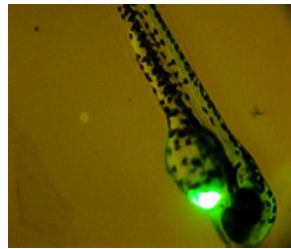
- 一、探討斑馬魚餵食三種個別藥物最高濃度後的基因及細胞的變化。
- 二、探討斑馬魚餵食三種混和藥物不同的濃度後的基因及細胞的變化
- 三、探討斑馬魚餵食三種混和藥物不同的濃度後的游泳速度的變化

### 四、探究方法與驗證步驟

- 一、收集斑馬魚的卵(因應疫情人數太多無法在魚房操作，改由國衛院楊助理代為操作)  
在前一天晚上隔離出 WT 和 tert 一公一母的魚進行交配後，隔天收集卵。
- 二、挑有螢光的斑馬魚轉基因斑馬魚內有螢光的基因，因此我們使用國衛院內的螢光顯微鏡(圖七)來挑有螢光的斑馬魚(圖八、圖九)。



圖七、螢光顯微鏡



圖八、螢光斑馬魚



圖九、螢光微鏡下的轉基因斑馬魚

### 三、分配魚數

將挑出的螢光魚平均分配成第一批和第二批各四組，兩批皆加一組野生種斑馬魚當對照組，並從第一批的五組各中分八隻出來成 DanioVision 組。分配結果如下：

第一批：

WT	47 隻
tert	47 隻
tert+mix100%	47 隻
tert+mix50%	47 隻
tert+mix25%	47 隻

第二批：

WT	27 隻
tert	22 隻
tert+OF100%	19 隻
tert+CACF100%	21 隻
tert+GACC100%	18 隻
tert+mix100%	22 隻

DanioVision：

WT	8 隻
tert	8 隻
tert+mix100%	8 隻
tert+mix50%	8 隻
tert+mix25%	8 隻



圖十、餵食藻粉

#### 四、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，參考時間為：

9:00、11:00、13:00、15:00

飼料是藻粉和草履蟲

(一)藻粉：

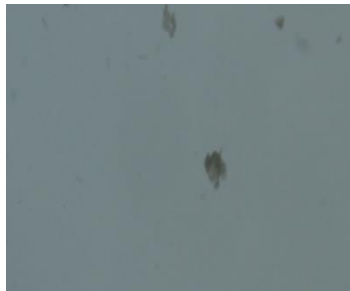
藻粉多寡以第一批的為基準：

第一批 > 第二批 > DanioVision，每缸大約 4mg

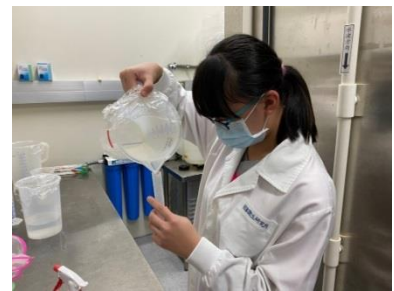
(二)草履蟲：

第一批和第二批餵 20ml

DanioVision 的餵 5ml



圖十一、草履蟲



圖十二、測量草履蟲的量

#### 五、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。

濃度如下：

(一)個別最高濃度

1.OF-100 ug/ml (\*25 ml，每次換水到培養皿的水量)=2.5mg

2.CACF-40 ug/ml (\*25 ml，每次換水到培養皿的水量)=1mg

3.GACC-0.5X =12.5ul/25ml(每次換水到培養皿的水量)

(二)第一批及 DanioVision 濃度分配

1.最高濃度組：

OF(100 ug/ml)+CACF(0.04 mg/ml)+GACC(0.5X)=2.5mg OF+1 mg CACF+12.5ul GACC

2.中間濃度組：

OF(50 ug/ml)+CACF(0.02 mg/ml)+GACC(0.25X)=1.25mg OF+0.5 mg CACF+6.25ul GACC

3.最低濃度組：

OF(25 ug/ml)+CACF(0.01 mg/ml)+GACC(0.125X)=0.625mg OF+0.25 mg CACF)+ 3.125ul GACC

(三)第二批藥物濃度分配

1.褐藻醣膠組:OF(100 ug/ml) · 2.5mg OF

2.鯽魚複合配方組: CACF(0.04 mg/ml) · 1 mg CACF

3.麩胺酸螯合鈣組: GACC(0.5X) · 12.5ul GACC

4.三種藥物混合組：

OF(100 ug/ml)+CACF(0.04 mg/ml)+GACC(0.5X)

=2.5mg OF+1 mg CACF+12.5ul GACC

## 六、換水

於餵完最後一餐的一個小時後換水，約 16:00，步驟如下：

- (一)準備網子、裝藥的培養皿、新容器及滴管
- (二)新容器在下，網子在上，原裝斑馬魚魚缸朝網子到倒下
- (三)以滴管過濾網內的雜質
- (四)把網子連同魚翻面倒入藥的培養皿
- (五)清洗原魚缸

## 七、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。

## 八、犧牲斑馬魚(此步驟由國衛院楊助理代操作)

- (一)以解剖剪刀剪開魚腹。
- (二)將魚放入微量離心管內，加入均質用的珠子(0.5mm)，待所有魚處理完後，投入液態氮桶，保存於-80°C，此部分用來萃取 RNA。
- (三)將魚放入已加入 10%福馬林的微量離心管內，再經由 NHRI 病理核心實驗室進行組織石蠟包埋及切片。

## 九、RNA 基因表現

(一)萃取 RNA(因屬危險實驗室，此步驟由國衛院助理代理操作)

- 1.β-me3.5ml、Buffer RA1 350ml
- 2.30mg 組織磨碎(跟酒精 1:1)
- 3.離心過慮紫色 RNA 套⇨11000x g 1min (要下面液體，紫色濾膜丟掉)
- 4.用微量分注器混合 350μL70%乙醇
- 5.藍色套組要上面的 RNA (離心後 11000x g30s)
- 6.加 MDB 去鹽，11000 轉 1min
7. rDNase 去 DNA 酵素保留 RNA
8. RAW2 終止 rDNase 反應 (200μL 11000xg 30s)
- 9.用 buffer RA3 洗兩次 (主要成分酒精)



圖十二、每個 RNA sample

(1) 600μL RA3 11000x g 30s

(2) 250μL RA3 11000x g 2min

10.加入 60μL 無核酸酶水 (非 DEPC 處理) (Nuclease-Free Water, not DEPC-Treated)

11.上超微量分光光度計測量 RNA 濃度

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

1.計算每個樣本的 RNA 濃度 1μg 需要幾 μl 的 RNA 量

2.15μl-每個樣本算好的 RNA 量(μl)等於 dH<sub>2</sub>O 的量(μl)

3. 5x iScript Reaction Mix 4 $\mu$ l、iScript Reverse Transcriptase 1 $\mu$

4. 放入聚合酶連鎖反應器:25°C-5min、46°C-20min、95°C-1min、最後降回 4°C

圖十三、High-CapacityRNA-to-cDNA™ Kit



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

1. 將 cDNA 稀釋 25 倍

2. 於 384 光學反應盤的每個孔內依序加入 primer 1.2 $\mu$ l、2X SYBR Green 5 $\mu$  和每樣本 3.8 $\mu$ l 的 cDNA。

3. 每樣本偵測 7 個基因(actin、ccne1、cdk1、cdk2、myca、mycb、ccnd1)，每樣本每基因重複 3 次(圖十四、十五)

sample name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
WT	A																							
	B	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	C																							
tert	D	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	E																							
tert H	F	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	G																							
tert M	H	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	I																							
tert L	J	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	K																							
	L																							
	M																							
	N																							
	O																							
	P																							

圖十四、384 well 表格(第一批)

sample name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
WT	A																							
	B	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	C																							
tert	D	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	E																							
tert OF	F	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	G																							
tert CACF	H	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	I																							
tert GACC	J	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	K																							
tert mix	L	ccne1	ccne1	ccne1	cdk1	cdk1	cdk1	cdk2	cdk2	cdk2	myca	myca	myca	mycb	mycb	mycb	ccnd1	ccnd1	ccnd1	actin	actin	actin		
	M																							
	N																							
	O																							
	P																							

圖十五、384 well 表格(第二批)

4. 用貼紙完全密封孔盤，並用鋁箔紙包住

5. 第一、二批都利用 qPCR 儀器偵測 3 次 Ct 值，以減少機器及實驗操作誤差。以 actin 做為 internal control。

6. 利用 qPCR 儀器(Quantstudio 5)測量 Ct 值:

(1) 第一階段：50°C – 2min, 95°C – 5 min, 4°C – forever

(2) 第二階段：95°C – 10min

(3) 第三階段：(40 次循環) 95°C – 15 sec, 60°C – 1min

(4) 第四階段：95°C – 15 sec, 60°C – 15 sec, 95°C – 15 sec

十、組織切片及 H&E 染色

(一) 送至 NHRI 病理核心實驗室進行組織石蠟包埋及切片等步驟

(二) 使用二甲苯及酒精進行逐步洗滌、脫水及透明後，加入 hematoxylin、eosin 染劑，再逐步脫水且封片保存。



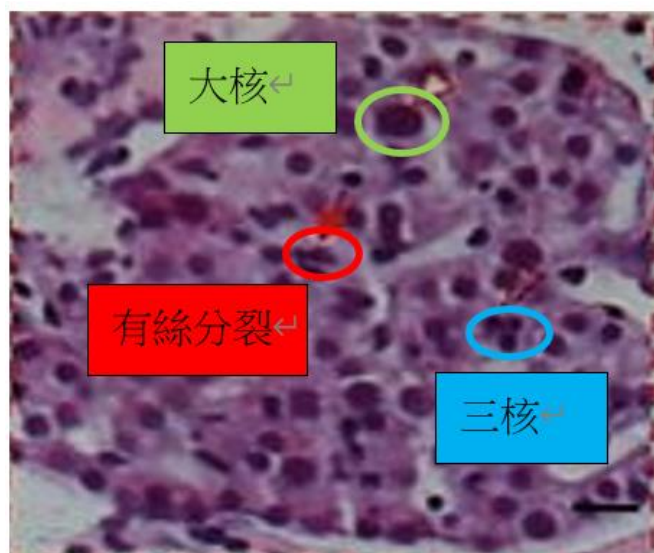
(三)拍下切片後的照片，分別用 10X 及 40X 的顯微鏡倍率拍照

#### 十一、病理分析方式

(一)三核(Trinucleated):三個核緊連在一起，若同時也有絲分裂或大核，則算三核，因為其癌化程度較嚴重。

(二)有絲分裂(Mitotic Figure):兩個核緊連在一起，若同時有大核，則算有絲分裂。

(三)大核(Karyomegalic):與旁邊的核比相對較大，其數量也相對較多。



圖十六、三核、有絲分裂、大核 H&E 染色後的圖

#### 五、結論與生活應用

一、第一批、DanioVision 由 qPCR、病理切片染色和 DanioVision 的數據可知，tert 斑馬魚餵食三種藥物混合(OF + CACF + GACC)最高濃度能有效降低細胞癌化並且讓 tert 轉基因斑馬魚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，若不當用藥可能會造成無效或是症狀更加嚴重。

#### 二、第二批

此次實驗結果表現出小分子褐藻醣膠 ( OF)的抑制效果比鯽魚複合配方 ( CACF)和麩胺酸螯合鈣( GACC)更加有效，將三種藥物混合後對 myca 的抑制效果不及小分子褐藻醣膠( OF) ，但對於其餘基因比(OF)有效，此結果可證明混合藥物 ( OF+CACF+GACC ) 比單一藥物的效果更好。

#### 參考資料

- 1.國衛院、高醫大與清大攜手解碼原肌球蛋白 3 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。
- 2.『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。
- 3.台灣褐藻醣膠發展學會。
- 4.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。
- 5.2021 年第十二屆台灣小分子褐藻醣膠國際研討會 喻秋華教授演講片段-2 。