

106 學年度第五屆

中山醫學大學生物醫學科學系

研究成果發表會

大會手冊

主辦單位：

中山醫學大學生物醫學科學系

中華民國一百零七年五月二十三日

目錄

海報論文發表	3
海報論文摘要	4
1. 王映鄺/斑馬魚 OPTN 基因之鑑定與功能分析.....	5
2. 王思瓊/齊帕特羅單株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與免疫層析試紙之開發.....	5
3. 趙子惟/氟甲磺氯黴素多株抗體之製備與其酵素連結免疫分析法之開發.....	6
4. 洪宗蓮/萊克多巴胺單株及多株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與奈米金粒子免疫層析試紙之開發.....	6
5. 連 怡/DnaD 對 DnaA-DnaB 的雙股 DNA 解旋活性的影響與機制研究.....	7
6. 羅仁宏/金黃色葡萄球菌 DinG 蛋白質的特性分析.....	7
口頭論文發表大會議程	8
口頭論文摘要	9
1. 陳怡穎/在乳癌幹細胞中 Hsp90 藉由促進 c-myc 和 EZH2 核轉位使 bmi1 表現.....	10
2. 張慕亞/NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 表現增加導致人類乳癌細胞產生放射線抗性..	11
3. 林冠宇/以重複序列擴增斑馬魚和細胞疾病模式探討天然抗氧化化合物和解旋酶的作用.....	12
4. 王映鄺/斑馬魚 OPTN 基因之鑑定與功能分析.....	13
5. 莊詠荃/利用斑馬魚作為模式生物進行乳癌分析.....	14
6. 劉沛勳/評估 Kv7 鉀離子通道開啟劑在於癲癇以及心肌缺血再灌流傷害的保護作用.....	15
7. 趙珮君/代謝症候群狀態對運動次數的影響.....	17

海報論文發表

106 年 5 月 23~24 日(星期三~四)正心 1 樓總務處前走廊(12:00~13:00 接受師生提問)

序號	海報講題	學生/指導教授
1	斑馬魚 OPTN 基因之鑑定與功能分析 Identification and functional analysis of zebrafish OPTN	王映麗/楊建洲
2	齊帕特羅單株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與免疫層析試紙之開發 Production of Monoclonal Antibody and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Strip for Zilpaterol	王思瓊/余豐益
3	氟甲磺氯黴素多株抗體之製備與其酵素連結免疫分析法之開發 Production of poyclonal Antibody and Development of ELISA for Florfenicol	趙子惟/余豐益
4	萊克多巴胺單株及多株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與奈米金粒子免疫層析試紙之開發 Production of Monoclonal and polyclonal Antibody and Development of ELISA and Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip for Ractopamine	洪宗蓮/余豐益
5	DnaD 對 DnaA-DnaB 的雙股 DNA 解旋活性的影響與機制研究 DNA-unwinding Influence and Mechanism of DnaD to DnaA-DnaB	連怡/黃晟洋
6	金黃色葡萄球菌 DinG 蛋白質的特性分析 Characterization of Staphylococcus aureus DinG Protein	羅仁宏/黃晟洋

海報發表論文摘要

1

斑馬魚 OPTN 基因之鑑定與功能分析

Identification and functional analysis of zebrafish OPTN

學生：王映鄺 指導教授：楊建洲

中文摘要：

青光眼是全球引發雙眼失明的疾病主因之一，其特點是導致視網膜神經節細胞和神經纖維層逐漸病變且薄化，且伴隨相對應的視野缺損。依病因可分為原發性和續發性，原發性意謂自發性。先前有研究指出原發性開放性青光眼(primary open-angle glaucoma)與optineurin的突變有關，另外肌萎縮性脊髓側索硬化症還有佩吉特氏病也與OPTN相關。Optineurin是一種多功能蛋白，有一些捲曲螺旋和C端與泛素結的結構，其參與在許多訊息傳遞的路徑上，像是NFκB 的活化、自噬作用或者是自體免疫反應。青光眼發病的主要症狀為視野缺損、視力喪失，主要是由於神經節細胞中的視神經死亡。Optineurin作為其中的關鍵蛋白，包括參與囊泡分泌和回收的運輸路徑、NF-κB 訊號、有絲分裂、高基氏體積轉和抗病毒信號，影響甚鉅，但此相關研究仍缺乏，機轉不明，因此釐清此基因相關的功能及分析，為本篇研究的主要目的。

本研究針對斑馬魚 OPTN 基因進行研究。如以半定量 RT-PCR 觀察斑馬魚早期胚胎各個發育時期的基因表現量，發現在 120hpf 時期表現量為最高，後利用全胚胎原位雜交的方式觀察基因在 120hpf 發育時期表現情形。為瞭解 OPTN 在斑馬魚體內的生理功能，我們利用反股寡核酸 (Antisense Morpholino Oligonucleotides, MO) 顯微注射抑制 OPTN 基因的功能，為了確認 MO 對 OPTN 基因的抑制是專一性的，我們建構了帶有紅色螢光蛋白的 OPTN 表現質體 (OPTN-TaqRFP)，藉由統計螢光表現率來探討 MO 的專一性，結果發現 OPTN 的 MO 可以有效的抑制紅色螢光表現，因此我們確認其具專一性 knockdown OPTN 的基因表現，為後續切片觀察其眼部病變情形，此數據可供往後研究原發性開放性青光眼之早期病程。

2

齊帕特羅單株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與免疫層析試紙之開發

Production of Monoclonal Antibody and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Strip for Zilpaterol

學生：王思瓊 指導教授：余豐益

中文摘要：

齊帕特羅 (Zilpaterol, ZIL) 為一種 β2 腎上腺素受體激動藥 (β2-adrenergic receptor agonists)。由於可提高瘦肉比例，常被添加於畜產飼料中，若誤食過量瘦肉精會造成頭暈、心搏過速甚至心臟麻痺死亡，因此台灣規範肉品中 ZIL 不得檢出，故本研究欲利用抗體-抗原專一性結合的特性，建立一套快速且便捷之酵素連結免疫吸附分析法。首先以 Glutaric anhydride (GH) 合成 ZIL 衍生物 ZIL-GH，再利用 EDC/NHS 作為鏈結橋梁與載體蛋白質 Thyroglobulin from bovine thyroid (BTG) 進行共價接合，並以此接合物免疫一對 BalB/c 小鼠。以直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA) 檢測老鼠血清中多株抗體之專一性，其抑制 50% 抗體與 ZIL-酵素接合物結合時 ZIL 的濃度 (IC₅₀) 分別為 100 ng/mL 及 289 ng/mL，未來將會提升抗體專一性，並以融合瘤技術篩選出專一性佳之單株抗體，並以此單株抗體開發免疫層析試紙，使社會大眾免於受到瘦肉精之威脅。

3

氟甲磺氯黴素多株抗體之製備與其酵素連結免疫分析法之開發

Production of ployclonal Antibody and Development of ELISA for Florfenicol

學生：趙子惟 指導教授：余豐益

中文摘要：

氟甲磺氯黴素 (Florfenicol, FF) 被廣泛應用於畜牧、水產動物的疾病預防與治療，為合法的動物抗生素。然而有研究指出，在哺乳動物中，高劑量的 FF 會導致雄性生殖毒性。因此建立一套敏感度高、專一性強且快速便利的方法來檢測食品中 FF 是需要的。

本研究先利用 Succinic anhydrate (SH) 對 FF 進行衍生，接著將衍生物用 Thin layer chromatography (TLC) 純化後與載體蛋白 Bovine thyroglobulin (BTG) 進行接合，使其具有免疫原性。FF-SH-BTG 之後被用來免疫 Balb/c 小鼠與紐西蘭大白兔，以產生具有專一性的抗體。並利用此抗體開發直接競爭型酵素連結免疫分析法 (competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA) 以檢測 FF 之含量。目前小鼠與兔子之多株抗體其抑制 50% 抗體結合至 horseradish peroxidase (HRP) 所需的濃度 (IC₅₀) 分別為 2.3 和 93 ng/mL。未來會使用兔子之多株抗體來開發免疫層析試紙用來檢測 FF，得以快速及簡便檢驗食品中 FF 的含量，避免人類誤食含有過量 FF 的食物而導致疾病的發生。

4

萊克多巴胺單株及多株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與奈米金粒子免疫層析試紙之開發

Production of Monoclonal and polyclonal Antibody and Development of ELISA and Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip for Ractopamine

學生：洪宗蓮 指導教授：余豐益

中文摘要：

萊克多巴胺 (Ractopamine, Rac) 是一種常見的瘦肉精，畜牧業者常將其加入動物飼料中，以增加畜牧動物瘦肉比例。若誤食含有萊克多巴胺之肉品，將造成心悸、肌肉震顫、血壓上升等症狀。因此台灣明文訂定其不得殘留於豬與火雞等肉類，而美國進口牛肉的殘留容許量為 10 ppb。本研究希冀利用抗體-抗原專一性結合之特性，製備抗體來建立一套快速且靈敏之檢測方式，並用於檢測肉品中萊克多巴胺的殘留量。首先利用 Succinic anhydride 衍生萊克多巴胺，再利用 Carbodiimide 法接合載體蛋白質 Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 及 Thyroglobulin from bovine thyroid (BTG)，並將其分別免疫紐西蘭大白兔及 Balb/c 小鼠，用以製備萊克多巴胺多株抗體，再利用融合瘤技術製備萊克多巴胺單株抗體。利用直接競爭型酵素連結免疫吸附法 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA) 檢測萊克多巴胺單株及多株抗體之專一性，其抑制 50% 萊克多巴胺-酵素接合物與抗體結合所需的萊克多巴胺濃度分別為 19.7 ng/mL 及 24 ng/mL。利用萊克多巴胺多株抗體製備免疫層析試紙，其檢測極限為 500 ng/mL。未來將提升抗體專一性，使免疫層析試紙能符合現行法規，讓社會大眾免於瘦肉精的危害。

5

DnaD 對 DnaA-DnaB 的雙股 DNA 解旋活性的影響與機制研究

DNA-unwinding Influence and Mechanism of DnaD to DnaA-DnaB

學生：連怡 指導教授：黃晟洋

中文摘要:

DNA 複製對於細菌的生存、細胞功能和遺傳物質交換非常重要。在大腸桿菌的模型中顯示，複製初期需要召集 DnaA、DnaB 與 DnaC 蛋白質結合到特定序列的 DNA 上。首先 DnaA 會先結合到 *oriC* 上，接著 DnaB 解旋酶與 DnaC 解旋酶載入因子再依序結合到此 DNA 上，並開始喚入 DNA 聚合酶與引子合成酶開始後續 DNA 複製程序。然而在革蘭氏陽性菌中，此複製程序與大腸桿菌並不相同。例如在金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中，還需要 DnaD 蛋白質與其他解旋酶載入因子來活化此複製程序。DnaD 已知是一種單股 DNA 結合蛋白質(SSB)，然而與大部分的 SSB 利用寡核苷酸結合折疊區(OB fold)的單股 DNA 結合模式不同，DnaD 是以 C 端 5 螺旋區結合單股 DNA。另外，DnaD 如何的結合 DnaA 與參與 DNA 解旋仍不清楚。在此研究，我們先將這些相關的重組蛋白質選殖並純化出，未來並希望透過不同長度的 DnaD 蛋白質片段來觀察 DnaA-DnaB 解旋雙股 DNA 程度的變化，以便具體結論革蘭氏陽性菌為何需要使用與大腸桿菌不同的 DNA 複製程序。

6

金黃色葡萄球菌 DinG 蛋白質的特性分析

Characterization of *Staphylococcus aureus* DinG Protein

學生：羅仁宏 指導教授：黃晟洋

中文摘要:

在細菌 DNA 受損時，需要一系列的蛋白質群進行 DNA 修復，其中包含一重要的解旋酶 DinG。在大腸桿菌的模型中顯示，DinG 會結合在特定的叉型 DNA 結構並與單股 DNA 結合蛋白質(SSB)產生交互作用，啟動雙股 DNA 解旋程序。然而在革蘭氏陽性菌中，DinG 已被報導具有核酸水解酶活性可非專一的切割 DNA，並且此活性是大腸桿菌 DinG 所沒有的。此外，革蘭氏陽性菌 DinG 的胺基酸長度也明顯高出大腸桿菌 DinG。因此，革蘭氏陽性菌 DinG 的結構與功能與大腸桿菌的 DinG 不同並且後續 DNA 修復的機制上也將有所差異。在此研究，我們首先選殖了金黃色葡萄球菌的 DinG 解旋酶，並利用金屬管柱層析法純化了此蛋白質。利用電泳遲滯法我們初步的分析了金黃色葡萄球菌的 DinG 確有 DNA 結合活性。由於金黃色葡萄球菌的 DinG 與大腸桿菌 DinG 的主要差異來自與其 N 端，未來希望透過各種突變株與分析法來更詳細分析其核酸切割活性、DNA 結合與解旋酶活性。由於 DinG 解旋酶並無結晶結構，我們亦希望以各蛋白質結晶條件篩選並得到晶體，以便更具體的分析革蘭氏陽性菌 DinG 解旋酶的核酸水解酶活性以及為何需要使用與大腸桿菌不同的 DNA 修復系統。

口頭論文發表大會議程

106 年 5 月 25 日(星期五) 正心 0316 教室

9:20~9:30 (未定) 主任致辭		
時間	報告講題	學生/指導教授
9:30~9:50	在乳癌幹細胞中 Hsp90 藉由促進 c-myc 和 EZH2 核轉位使 bmi1 表現 Hsp90 Mediates BMI1 Expression in Breast Cancer Stem Cells through Facilitating Nuclear Translocation of c-Myc and EZH2	陳怡穎/張文瑋
9:50~10:10	NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 表現增加導致人類乳癌細胞產生放射線抗性 The involvement of NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 in radiation response of human breast cancer cells	張慕亞/張文瑋
10:10~10:30	以重複序列擴增斑馬魚和細胞疾病模式探討天然抗氧化化合物和解旋酶的作用 Investigate the effects of natural anti-oxidative compounds and helicase on the zebrafish and cell models of trinucleotide repeat disease	林冠宇/潘惠錦
10:30~10:50	斑馬魚 OPTN 基因之鑑定與功能分析 Identification and functional analysis of zebrafish OPTN	王映艷/楊建洲
10:50~11:10	利用斑馬魚作為模式生物進行乳癌分析 Using zebrafish as an animal model for breast cancer analysis	莊詠荃/楊建洲
11:10~11:30	評估 Kv7 鉀離子通道開啟劑在於癲癇以及心肌缺血再灌流傷害的保護作用 The protective effect of Kv7 potassium channel opener on epilepsy and myocardial ischemia reperfusion injury	劉沛勳/黃相碩、余豐益
11:30~11:50	代謝症候群狀態對運動次數的影響 Effect of metabolic syndrome status on the frequency of physical activity.	趙珮君/楊浩然、張文瑋
11:50 休息(備茶點、飲品)		
12:00 頒獎		

口頭報告論文摘要

在乳癌幹細胞中 Hsp90 藉由促進 c-myc 和 EZH2 核轉位使 bmi1 表現
Hsp90 Mediates BMI1 Expression in Breast Cancer Stem Cells through Facilitating Nuclear
Translocation of c-Myc and EZH2

學生：陳怡穎 指導教授：張文瑋

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are a subpopulation of cancer cells with self-renewal and differentiation capabilities and play an important in tumor initiation and metastasis. Thus, targeting CSCs is considered as a key for successful cancer therapy. Heat shock protein 90 (Hsp90) is an intracellular chaperon protein to stabilize the structure of its clients which include many oncogenes and is often overexpressed in cancers. 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) is an Hsp90 inhibitor through the competitively binding to the ATP binding region of Hsp90. In this study, we first found that 17-DMAG inhibited BMI1 expression through decreasing the binding of c-Myc to BMI1 promoter in breast CSCs. We further discovered that enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a histone methyltransferase, participated in 17-DMAG induced downregulation of BMI1. The 17-DMAG treatment caused downregulation of EZH2 in breast CSCs. The overexpression of EZH2 abolished the effect of 17-DMAG in the inhibition of BMI1 expression. By chromatin immunoprecipitation assay, we found that EZH2 and c-Myc formed as a complex binding to BMI1 promoter and the binding capacity was suppressed by 17-DMAG. Furthermore, Hsp90 complexed with EZH2/c-myc in nucleus of breast CSCs and the nuclear translocation of EZH2/c-Myc could be inhibited by 17-DMAG treatment. Our data indicate that Hsp90 involves in EZH2/c-myc mediated BMI1 expression in breast CSCs by shuttling EZH2/c-Myc complex into nucleus.

中文摘要

癌症幹細胞是癌症組織中具有幹細胞特性的癌細胞，具有自我更新及細胞分化的能力，並與癌症的抗藥性與轉移有關，因此標靶癌幹細胞是目前癌症治療的重點發展項目之一。Heat shock protein 90 (Hsp90) 是一種熱休克蛋白，具有穩定蛋白質結構的功能，有許多致癌基因是 Hsp90 的客戶蛋白，許多癌症中都發現具 Hsp90 的過度表現。

17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) 為 Hsp90 的抑制劑，透過競爭性結合 Hsp90 蛋白內 ATP 結合區，抑制 Hsp90 活性，進而影響 Hsp90 客戶蛋白的功能。我們實驗室先前發現 17-DMAG 在乳癌幹細胞內能藉由抑制 c-myc 來下調 BMI1 蛋白的表現，進一步也發現一種組蛋白甲基轉移酶 EZH2 參與 17-DMAG 誘導的 BMI1 下調機制。因此本研究目標為探討 Hsp90 在乳癌幹細胞內如何調控 EZH2 的表現，以及 EZH2 或 c-myc 的轉錄活性是否需要 Hsp90 參與，以釐清 17-DMAG 抑制乳癌幹細胞的分子機制。我們首先觀察到加入 17-DMAG 能夠導致乳癌幹細胞中 EZH2 的下降。過度表達 EZH2 能消除 17-DMAG 對 BMI1 表達的抑制。通過染色質免疫沉澱法，我們發現 EZH2 能與 c-myc 形成複合物並結合 BMI1 啟動子，並且此複合體的結合作用受到 17-DMAG 抑制。因此我們認為 Hsp90 會在乳癌幹細胞內與 EZH2 / c-myc 接合促進 EZH2/c-myc 進入細胞核，透過細胞核蛋白的免疫沉澱，也發現經過 17-DMAG 的處理後，會抑制 EZH2 / c-myc 的核轉位。我們的結果顯示 Hsp90 參與了乳癌幹細胞中 EZH2/ c-myc 的核轉位，進而影響 BMI1 的表達。

NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 表現增加導致人類乳癌細胞產生放射線抗性

The involvement of NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 in radiation response of human breast cancer cells

學生：張慕亞 指導教授：張文瑋

Abstract

Breast cancer is one of the common cancer in women worldwide. In recent years, the radiation therapy was used as a common therapy in breast cancer and often combined with other treatments. The NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) is an FAD containing quinone reductase that catalyzes the 2-electron reduction of a broad range of quinones to provide cytoprotection and chemoprevention in normal tissue. NQO1 also presents high-level activity in many inflammatory conditions and in the tumorous tissues, such as breast, lung, and gastric cancers. In the present study, our laboratory used the MDA-MB-231 human breast cancer cell line (called 231-P) to establish a radioresistant subline (called 231-RR) and to examine the NQO1 expression in breast cancer cells after requiring radioresistant feature. We first confirmed that the NQO1 protein expression was elevated in 231-RR then that in 231-P cells to 20 fold. In addition, the NQO1 activity was also increased in 231-RR cells then 231-P cells. We further used γ -Lapachone, which is bioactivated by NQO1 to become cytotoxic, to compare the sensitivity between 231-P and 231-RR cells and results indicated that 231-RR was more sensitive to growth inhibition by γ -Lapachone then 231-P cells. With the treatment of dicoumarol, an NQO1 inhibitor, the inhibition of NQO1 activity suppressed cell growth of 231-RR cells. These results indicate that NQO1 is a potential target for treatment of breast cancer patients who encounter with radiation therapy failure. In the future, we will continue to examine if the suppression of NQO1 or the treatment of NQO1 bioactive compounds could serve as an adjuvant therapy for cancer radiation. The involvement of Notch signaling pathway in the upregulation of NQO1 in radioresistant breast cancer cells will also be investigated.

中文摘要

乳癌在全球婦女當中為常見的癌症之一，而放射治療常作為乳癌的療法，但臨床上常見放射線治療後復發的乳癌患者，因此了解乳癌產生放射線抗性的原因有助於發展放射線治療的輔助療法。NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) 是一種含有醌還原酶的黃素腺嘌呤二核苷酸(FAD)，能夠催化大部分的醌進行雙電子還原，在正常組織中具有提供細胞保護和預防化學物毒害的作用。在許多發炎的環境和腫瘤組織中 NQO1 也會有大量活性的表現，例如乳癌、肺癌和胃癌。在本研究中，我們利用 MDA-MB-231 人類乳癌細胞株(簡稱 231-P)來建立放射線抗性的亞細胞株(簡稱 231-RR)，並利用這兩株細胞株分析 NQO1 在乳癌細胞產生放射線抗性的角色。我們首先發現 NQO1 的蛋白質表現在 231-RR 中較 231-P 細胞高 20 倍，並且 NQO1 的活性同樣在 231-RR 中較 231-P 細胞呈現增加的現象。我們進一步的利用 NQO1 生物活性藥物， γ -Lapachone，比較 231-P 和 231-RR 細胞對於 γ -Lapachone 的敏感性，證明 231-RR 細胞對 γ -Lapachone 的生長抑制敏感性較 231-P 細胞高。而以 NQO1 抑制劑-Dicoumarol 處理 231-RR 細胞，則能抑制其生長能力。這些結果說明 NQO1 的蛋白表現及活性的增加，可能是乳癌細胞產生放射線抗性的原因之一，並且 NQO1 的表現可能作為乳癌患者是否在放射線治療後產生復發的潛力預測指標。在未來，我們將繼續檢測抑制 NQO1 或 NQO1 生物活性化合物的處理是否能夠作為癌症放射治療的輔佐療法。另外也將探討在放射線抗性乳癌細胞中參與上調 NQO1 表現的分子訊號途徑。

以重複序列擴增班馬魚和細胞疾病模式探討天然抗氧化化合物和解旋酶的作用

Investigate the effects of natural anti-oxidative compounds and helicase on the zebrafish and cell models of trinucleotide repeat disease

學生：林冠宇 指導教授：潘惠錦

Abstract

Part 1:

Polyglutamine (polyQ) diseases are inherited neurodegenerative disorders caused by an abnormal expansion of a coding trinucleotide (CAG) repeat, which is translated into an elongated glutamine (Q) tract in the respective mutant proteins. It leads to protein misfolding and aggregation, altering the function of neuronal cells and eventually resulting in neurodegeneration. Currently there is no treatment to prevent or cure the disease, only symptomatic treatments exist. We have established transgenic zebrafish and N2a cell lines expressing polyQ proteins. The polyQ zebrafish showed growth retardation, delayed hatching and increased mortality rate. The escape response and swimming pattern were also affected. In N2a cells, polyQ protein aggregation in the cytoplasm was observed and expanded polyQ interrupts branching of neuronal processes upon differentiation. Since ROS is increased in cells expressing polyQ proteins, we tested the effects of curcumin and resveratrol, both known as antioxidative compounds, in rescuing the phenotypes in the polyQ fish and cell models. After treating with curcumin and resveratrol, the mortality rate, hatching rate and escapes response were all improved significantly. In addition, both compounds decreased ROS production in the polyQ fish and cell models. The results demonstrated that curcumin and resveratrol are beneficial for the polyQ diseases and that the zebrafish model is a feasible platform for polyQ disease drug test.

Part 2:

Myotonic dystrophy type1 (DM1) is an autosomal dominant disorder caused by the expansion of a CTG trinucleotide repeat in the 3'-UTR of the dystrophin myotonia-protein kinase (*DMPK*) gene. The transcripts of CUG repeats accumulate in nucleus and disrupt a variety of cellular regulatory pathways including splicing and transcription by sequestration of MBNL proteins. Previous study using a DM1 *C. elegans* model and RNAi library screening has revealed several modifier genes that could mitigate the disease phenotype. One of the candidate genes is WRN (Werner syndrome helicase), a DNA helicase of the RecQ family that plays a critical role in repairing DNA and maintaining the structure of DNA. The endogenous expression of WRN in C2C12-CUG200 cells and DM1 cells are higher than in control. To investigate the role of WRN in DM1 disease, we used lentiviral shRNA of WRN to knock down its expression in C2C12-CUG200 cells. Decreased expression of WRN could rescue cell differentiation defect caused by the CUG repeats. In addition, knockdown of WRN reduced the expression of EGFP in CUG200 cells, suggesting that WRN could modify the CUG repeats and facilitate its expression at the RNA level. We also used siRNA to suppress WRN expression in human DM1 cells. Similarly, knockdown of WRN decreased the expression of *DMPK* gene and RNA foci in the nucleus. These results indicate that WRN is required for the toxic effect caused by expanded CUG repeats and down-regulation of WRN may provide an avenue for treatment of DM1 disease.

中文摘要

第一部分

多麩醯胺酸疾病(polyQ)為 CAG 三聯核酸重複序列位於基因的轉譯區內異常擴增，造成蛋白質形成長鏈的麩醯胺酸 (polyglutamine)，突變的蛋白會產生不正常折疊而改變神經細胞的功能，造成細胞凋亡等，最終造成神經退化性疾病。目前對於這類疾病並沒有預防或治療的方法，只能藉由減緩其症狀來達到改善的效果。先前實驗室已建立能表達 polyQ 蛋白的轉殖基因斑馬魚和 N2a 細胞。在 polyQ 轉殖魚中，我們觀察到有發育遲緩、脫卵膜率和生存率下降的情況。我們也發現 polyQ 蛋白擴增對於斑馬魚逃脫反應和游動行為是有影響的。在 N2a 細胞中，我們可觀察到 polyQ 蛋白的聚集，以及神經細胞分化異常的現象。近期的研究指出 polyQ 蛋白的擴增會造成氧化自由基(ROS)的上升，因此，我們測試兩種具有抗氧化能力的天然化合物薑黃素(Curcumin)和白藜蘆醇(Resveratrol)，觀察其是否在斑馬魚和細胞中能改善 polyQ 疾病表型。在薑黃素和白藜蘆醇分別處理後，我們發現斑馬魚胚胎的生存率和脫卵膜率、逃脫反應和行為分析有明顯的回復，對於神經細胞突觸分化也有改善的效果。利用 dihydroethidium (DHE) 染色，可觀察到薑黃素和白藜蘆醇皆能降低斑馬魚和細胞在氧化壓力下所產生的 ROS。此結果證實薑黃素和白藜蘆醇對於 polyQ 疾病表型有改善的作用，也顯示我們所建立的斑馬魚模式適合作為藥物篩選的平台。

第二部分

強直型肌肉萎縮症第一型(myotonic dystrophy,DM1)是一種顯性遺傳疾病，由 DMPK 基因 3 端非轉譯區內的 CTG 重複序列擴增所引起。轉錄出來的 CUG 擴增 RNA，會與一些蛋白如 MBNL 結合，並在細胞核內形成 RNA foci，進而造成 RNA 剪切和基因轉錄異常。先前以 DM1 線蟲疾病模式和 RNAi library 篩選找到一些疾病的修飾基因，其中之一為 Werner syndrome 解旋酶(WRN)，它屬於 RecQ 解旋酶家族成員的 DNA 解旋酶，在 DNA 修補和 DNA 結構穩定上扮演重要的角色。以即時定量 PCR 分析 C2C12 小鼠肌纖維母細胞內生性 WRN 表現量，發現 CUG200 的細胞內 WRN 表現量相較於對照組明顯增多。為了探討 WRN 和 CUG 擴增的交互作用和機制，我們利用 WRN shRNA 的慢病毒進行 WRN 弱化，發現在感染 shWRN 後可以改善因 CUG RNA 毒性所造成肌肉分化異常的現象、提高 MHC 蛋白質表現量。另外，我們觀察到在弱化 WRN 後 CUG200 的細胞 EGFP 蛋白質和 RNA 表現量大幅下降，暗示 WRN 可能可解開擴增 CUG 重複序列的結構並促進其表現。我們也利用 siRNA 方式弱化 DM1 病人細胞的 WRN 基因，同樣地發現 DMPK 表現量下降，且細胞核內的 RNA 聚集減少。這些結果指出 WRN 對擴增的 CUG 重複序列所導致的毒性效應是必須的，而弱化 WRN 的表現可能可以成為治療 DM1 疾病的一條途徑。

4.

斑馬魚 *OPTN* 基因之鑑定與功能分析

Identification and functional analysis of zebrafish *OPTN*

學生：王映鄺 指導教授：楊建洲

Abstract

Glaucoma is a leading cause of irreversible visual impairment and blindness resulting from progressive degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) and optic neuropathy. Optineurin was originally identified as a gene responsible for primary open-angle glaucoma. The gene, *OPTN*, codes for the protein optineurin, which is involved in a variety of functions including regulation of endocytic trafficking, autophagy, immune response, mitosis and NF- κ B signal transduction. Many missense mutations in optineurin have been reported and the association of the mutation with the disease varies in different populations. Optineurin is localized to pathological structures also seen in several neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, etc. However,

functional alterations caused by mutations in optineurin are poorly understood.

In this study, we investigated the physiological functions of *OPTN* in the zebrafish embryonic development. RT-PCR analysis of zebrafish *OPTN* transcripts were revealed significantly in the 120hpf embryos. Meanwhile, whole-mount in situ hybridization (WISH) signals were also observed in the 120hpf embryos. In addition, we established the fusion protein construct *OPTN*-TagRFP that was injected into embryos in the presence or absence of *OPTN*-targeting morpholinos. We have found that *OPTN*-targeting MO was able to specifically knockdown the expression of TagRFP-tagged *OPTN* fusion proteins in a dose-dependent manner. These data may be useful for studying early POAG pathophysiology.

中文摘要

青光眼是全球引發雙眼失明的疾病主因之一，其特點是導致視網膜神經節細胞和神經纖維層逐漸病變且薄化，且伴隨相對應的視野缺損。依病因可分為原發性和續發性，原發性意謂自發性。先前有研究指出原發性開放青光眼(primary open-angle glaucoma)與optineurin的突變有關，另外肌萎縮性脊髓側索硬化症還有佩吉特氏病也與*OPTN*相關。Optineurin是一種多功能蛋白，有一些捲曲螺旋和C端與泛素結的結構，其參與在許多訊息傳遞的路徑上，像是NFκB 的活化、自噬作用或者是自體免疫反應。青光眼發病的主要症狀為視野缺損、視力喪失，主要是由於神經節細胞中的視神經死亡。Optineurin作為其中的關鍵蛋白，包括參與囊泡分泌和回收的運輸路徑、NF-κB訊號、有絲分裂、高基氏體積轉和抗病毒信號，影響甚鉅，但此相關研究仍缺乏，機轉不明，因此釐清此基因相關的功能及分析，為本篇研究的主要目的。

本研究針對斑馬魚 *OPTN* 基因進行研究。如以半定量 RT-PCR 觀察斑馬魚早期胚胎各個發育時期的基因表現量，發現在 120hpf 時期表現量為最高，後利用全胚胎原位雜交的方式觀察基因在 120hpf 發育時期表現情形。為瞭解 *OPTN* 在斑馬魚體內的生理功能，我們利用反股寡核酸 (Antisense Morpholino Oligonucleotides, MO) 顯微注射抑制 *OPTN* 基因的功能，為了確認 MO 對 *OPTN* 基因的抑制是專一性的，我們建構了帶有紅色螢光蛋白的 *OPTN* 表現質體(*OPTN*-TagRFP)，藉由統計螢光表現率來探討 MO 的專一性，結果發現 *OPTN* 的 MO 可以有效的抑制紅色螢光表現，因此我們確認其具專一性 knockdown *OPTN* 的基因表現，為後續切片觀察其眼部病變情形，此數據可供往後研究原發性開放青光眼之早期病程。

5.

利用斑馬魚作為模式生物進行乳癌分析

Using zebrafish as an animal model for breast cancer analysis

學生：莊詠荃 指導教授：楊建洲

Abstract

Zebrafish is an animal model which widely utilized in manifold biomedical experiments such as embryo development, hearing loss and toxicity assessment. In recent years, however, zebrafish has been used for cancer research since the advantage of costly and easy caring. Basically, the application of zebrafish in cancer research usually focuses on the property of cancer metastasis and stress resistance ability. Thus, the experiments been conducted would follow this conception mainly.

On the other hand, it is been well established that Hsp27 could associate with the ability of enduring the extracellular stresses in the cell, and mainly participate in anti-apoptosis, cell cycle regulation, and treatment resistance. The activation of downstream mechanism depends on the different type of the

Hsp27 multimer conformation (phosphorylation or non-phosphorylation), which initiate different activity of Hsp27 protein polymer.

The aim of the experiment is to attempt to evaluate the Hsp27 associated breast cancer activity in the zebrafish model. The 3dpf (day post-fertilization) zebrafish embryo would be utilize for cancer cell xenograft operation. In order to investigate the Hsp27 phosphorylation pattern affects in breast cancer, the Hsp27D (mimic phosphorylated), and Hsp27A (mimic non-phosphorylated) had been established, and compare the result to wtHsp27 (Hsp27 overexpression) and control for further experiments. In BT-474 breast cancer cell line, expressing Hsp27D seems to have more metastasis tendency than others. As for the MDA-MB-231, the result shows that the cell over expressing Hsp27 is inclined to aggregate in metastatic site and shows more resistance upon confronting stresses. Furthermore, zebrafish sample grafting MDA-MB-231 with Hsp27 overexpression and MDA-MB-231 is also treated with several drugs. The result shows that the group with Hsp27 overexpression remaining more cancerous properties in drug treatment duration compare to control.

In sum, several studies had rectified that Hsp27 property in vitro and mice. The result using zebrafish 3dpf embryo for cancer research is similar with previous studies. Illustrating that zebrafish is seems to be a feasible model for cancer research.

中文摘要

斑馬魚是一個被廣泛應用於生醫研究的模式生物，大多是用在胚胎發育、聽覺缺失及毒性分析。近年來，因為斑馬魚飼養容易且成本較低，基本上來說，斑馬魚在癌症研究上的應用大多集中在轉移及壓力承受分析，此次實驗也大多會圍繞這些主軸進行實驗。

另一方面，諸多研究顯示 Hsp27 對於細胞的壓力承受能力有很大的關聯，對於調控細胞的抗凋亡、細胞週期調控及治療抗性的相關機轉扮演了關鍵的角色，而下游機轉的調控根據 Hsp27 的磷酸化狀態改變所引起的 Hsp27 蛋白聚合體構型的不同而有所相異。

這項實驗的目的在於利用斑馬魚模式來探討 Hsp27 對於乳癌的影響，實驗中將使用 3 天大斑馬魚胚胎進行異種移植手術。而為了將 Hsp27 的磷酸化的因素納入實驗中，特別設計了 Hsp27D(模擬磷酸化活化型)及 Hsp27A(模擬磷酸化死亡型)兩種突變型並和 wtHsp27(Hsp27 過表現型)及控制組進行比較。在 BT-474 乳癌細胞的實驗中，表現 Hsp27D 的似乎展現了較強的轉移傾向。至於 MDA-MB-231，Hsp27 過表現的細胞具有再轉移位點產生細胞聚集的現象並對壓力環境有較為良好的抵抗性。而在斑馬魚乳癌移植樣本的藥物處理實驗中，過表現 Hsp27 的 MDA-MB-231 的組別可以觀察到癌細胞有較強的癌化傾向。

總結來說，Hsp27 的性質再先前的研究中已經用了活體外及老鼠實驗中證實，而在使用斑馬魚 3 天大的乳癌移植實驗中可以看到類似的結果，說明了斑馬魚對於癌症研究似乎是個可行的模式。

6

評估 Kv7 鉀離子通道開啟劑在於癲癇以及心肌缺血再灌流傷害的保護作用

The protective effect of Kv7 potassium channel opener on epilepsy and myocardial ischemia reperfusion injury

學生：劉沛勳 指導教授：黃相碩 余豐益

Abstract

The Kv7 (KCNQ) potassium channel opener acts on the voltage-gated potassium channel to stabilize membrane potential. Recently, Kv7 potassium channel opener is a new target of drug development. In

clinical, Kv7 potassium channel opener is used on the treatment of epilepsy, arrhythmia and neuropathic pain. ML213 and Retigabine are known Kv7 potassium channel opener at present.

In this study, we investigated the protective effect of Kv7 potassium channel opener, ML213, Retigabine and the derivatives of Retigabine #8692 and #5540, on *in vitro* phrenic nerve-diaphragm model and *in vivo* models of epilepsy and myocardial ischemia/reperfusion injury.

There are three parts in our study: 1. tension of diaphragm, 2. epilepsy, 3. myocardial ischemia/reperfusion injury.

Tension of diaphragm:

We investigated the effect of ML213, Retigabine, #8692 and #5540 on neuron transmission and ion channel regulation by phrenic nerve-diaphragm model in ICR mice. In our study, Retigabine and #8692 inhibited the myotonia induced by 9-AC on low frequency directly and indirectly electrical stimulation. Retigabine also improved the myotonia induced by 9-AC on high frequency directly and indirectly electrical stimulation, but not #8692.

Epilepsy:

In this study, we induced tonic-clonic seizure by maximal electroshock seizure (MES) model to compare the protective effect of #5542 and #8692 with Retigabine and ML213 in ICR mice. The ML213, Retigabine, #8692 and #5540 were administered by intraperitoneal injection 15 min before maximal electroshock. We found that there are no significant differences among ML213, Retigabine, #8692 and #5540 on tonic duration. However, administration of #5540 had a better protective effect than Retigabine on clonic duration.

Myocardial ischemia/reperfusion injury:

In this study, we examined the cardioprotective effect of ML213, Retigabine, and #8692 on rats subjected to myocardial ischemia/reperfusion injury. We compared mortality, arrhythmias and infarct size which induced by myocardial ischemia / reperfusion injury with or without ML213, Retigabine, and #8692 administration,

Myocardial I/R injury was induced by one hour occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery and followed by three hours reperfusion in Sprague-Dawley (SD) rats. Vehicle or ML213, Retigabine, and #8692 were administered intravenously 15 minutes before LAD occlusion. We found that the administration of Retigabine and ML213 decreased arrhythmias induced by myocardial I/R injury, and significantly decreased infarct size compared to the vehicle-treated group.

Our results suggested that Retigabine and #8692 has the potential to treat myotonia. #5540 prevent clonic happen, that means it might be an anticonvulsant. In addition, Retigabine and ML213 have the potential to protect heart against myocardial I/R injury.

中文摘要

作用在電位依賴型鉀離子通道 Kv7(KCNQ)家族的鉀離子通道開啟劑具有穩定神經元細胞膜電位的作用，近年來 Kv7 鉀離子通道開啟劑是藥物開發的一個新的領域，藉由活化 Kv7 蛋白，可以有效的來治療涉及神經元的過度興奮相關疾病，如癲癇、心律不整和神經性疼痛等，目前已知 Kv7 鉀離子通道開啟劑有 ML213 與 Retigabine。

本研究希望評估已知之鉀離子通道開啟劑 ML213、Retigabine 與本實驗室新篩檢出之鉀離子通道開啟劑 Retigabine 的乙苯胺醯衍生物 #5540 和 #8692 在於膈神經—橫膈膜張力離體模式，以及在

癲癇和心肌缺血再灌流活體模式中的保護效果。

本研究分為橫膈膜張力、癲癇及心肌缺血再灌流三個部分：

在橫膈膜張力方面，利用小白鼠膈神經－橫膈膜模式，評估藥物對神經傳遞的影響，以確認其對離子通道的調控作用。

研究使用遠交系(ICR)小鼠，進行膈神經-橫膈膜之製備，以電刺激橫膈肌，紀錄其張力的變化。實驗結果發現，不論是藉由間接刺激還是直接刺激，在低頻率的電刺激下，9-AC(30 M)誘發之肌強直現象都會受 Retigabine、#8692 拮抗；在高頻的刺激下，Retigabine 可以拮抗給予 9-AC 後誘發的肌強直現象所造成的 TCM 下降，#8692 無法拮抗 9-AC(30 M)誘發之肌強直現象。

在癲癇方面著重於探討#5540 與#8692 是否對於癲癇有較 Retigabine 和 ML213 更好的保護效果，本部分利用電眼模式(maximal electroshock seizure, MES)去模擬癲癇全身性的強直-陣攣性發作(tonic-clonic seizure) 評估#5540 與#8692 是否可以有效地降低癲癇的發作頻率與強度。

研究使用遠交系(ICR)小鼠，進行電刺激誘發癲癇發生，於誘發癲癇前 15 分鐘經由腹腔注射，投予藥物，統計發生癲癇時的 tonic duration 和 clonic duration，評估 #5540 和 #8692 的癲癇保護作用。實驗初步結果發現#5540 在癲癇小發作(clonic)上，似乎較 Retigabine 有更好的保護潛力。

在心肌缺血再灌流方面，利用大鼠心肌缺血再灌注損傷動物模式，評估是否可以藉由 Kv7 鉀離子通道開啟劑活化鉀離子通道，減少心肌缺血再灌流損傷所引起的死亡率，心律不整(Arrhythmia)，並減少心肌梗塞體積(Infarct size)，進而達到心臟保護作用。

研究使用 Sprague-Dawley (SD)大鼠，進行一小時左冠狀動脈前降支(the left anterior descending, LAD)結紮及三小時的再灌流，造成心肌缺血再灌流損傷，在左冠狀動脈結紮前十五分鐘經靜脈投予藥物，計算動物心肌梗塞區域、心律不整及死亡率，評估 Kv7 蛋白鉀離子通道開啟劑是否具有心臟保護作用可以減少心肌缺血再灌流損傷。實驗初步結果發現相較於投與溶劑的對照組，投予 Retigabine、ML213 可以減少心律不整發生時間的長短，並顯著減少心肌缺血再灌流誘發的心肌梗塞大小。

研究結果證明 Retigabine、#8692 在治療肌強直疾病上，可能是一個具有潛力的發展方向。#5540 可以預防癲癇小發作發生，降低癲癇發作的機率和程度，#5540 可能是具有潛力之癲癇用藥。而 Retigabine 及 ML213 可能是具有潛力之心臟保護劑，可以保護心臟對抗心肌缺血再灌注損傷。

7.

代謝症候群狀態對運動次數的影響

Effect of metabolic syndrome status on the frequency of physical activity.

學生：趙珮君 指導教授：楊浩然 張文瑋

Abstract

Purpose: This research uses the long term and large scale data of Landseed Cohort This research is to understand the effect of metabolic syndrome on the frequency of physical activity.

Method: This research uses SPSS 20 Statistics to do the analysis research. We collect the data from both genders in regardless of metabolic syndrome status and ages to be the sample. Choose the samples which gone through health checking and the surveys three years. The research is based on the third wave which has 1718 people. In order to know there is a difference between the ages and genders, the data is divided into four groups. They are the ones who are above and below 65 years old in both genders. Use the four group data to know the number and percentage on the metabolic syndrome and health group with descriptive analysis. Use the four group data to know the number and percentage of physical activity

level, three highs, smoking, drinking, chewing betel nuts, activity amount, cooking or not, and basic population with cross test method. Use the four group data to know the average and standard variance of physical activity frequency (times/week), physical activity time (minute/time), SF36, biochemical index, and cigarettes number (number/week).

Result: There physical activity frequency and biochemical index increases in the metabolic syndrome group. The significant data in four groups shows as the following: Male above 65 years old and four groups are significant in physical activity frequency (times/week), high-blood pressure, diabetes, hyperlipidemia, energy, overall health status, waist, blood pressure, hypercholesterolemia, fasting blood glucose, triglycerides, weight, and hips. Male above 65 years old shows significant data in chewing betel nut. Female above 65 years old shows significant data in physical activity time (minute/times), creatine, heart attack, body function, emotion, and pain. Male below 65 years old shows significant data in body function, emotion, and pain. Female below 65 years old shows significant data in cigarette number (number/week), emotion, and pain.

Conclusion: The data is used with the third wave. Hence, the people in metabolic syndrome group aware of their obesity, choose to do physical activity more often than the health group people to decrease metabolic syndrome problem.

中文摘要:

研究目的: 本研究採用「壟新世代」之長期追蹤大規模資料, 研究代謝症候群狀態對運動次數的影響。

研究方法: 本研究用 SPSS20 統計軟體進行分析研究。收集對象不分男女與健康, 為了檢視不同年齡與性別是否有所差異, 分為四組, 分別是 65 歲以上和以下男女生, 挑選三次都有參與健康檢查與調查的民眾作為研究樣本, 第三波的數據, 共有 1718 人作研究。採用四組數據以敘述統計分析代謝症候群和健康群的個數和百分比, 以四組數據分別以交叉法研究運動程度、三高、抽菸喝酒嚼檳榔、活動量、是否煮飯和基本人口學了解其人口在代謝族群和健康群的個數和百分比。再以單因子變異數了解運動次數(次/週)、運動時間(分/次)、SF36、生化指標和抽菸支數(支/週)的平均值和標準差。

結果: 運動次數會因為本身是代謝族群而有較高傾向, 生化指標會因為本身是否為代謝族群而有較高傾向。顯著的在四組分別為: 65 歲以上男生和四組皆在運動次數(次/週)、高血壓、糖尿病、高血脂、活力、整體健康、腰圍、血壓、高膽固醇、空腹血糖、三酸甘、體重和臀圍。65 歲以上男生檳榔習慣。65 歲以上女生運動時間(分/次)、肌酸、心臟病、身體功能、情緒和疼痛。65 歲以下男生身體功能、情緒和疼痛。65 歲以上女生抽菸支數(支/週)、情緒和疼痛。

結論: 因為採用的是第三波數據, 較高代謝症候群會因為意識到本身肥胖和健康問題, 進而進行運動以減少代謝狀況。