



促進產學合作先導型研究計畫 I

心臟螢光基因轉殖魚用於心血管 藥物篩選及安全性評估研究

Cardiovascular Drug Screening and Safety Assessment by Using Heart-Specific Fluorescent Transgenic Fish

文・圖／蔡懷楨（分子與細胞生物研究所教授）

斑馬魚(*Danio rerio*)是一種小型淡水魚，是目前十分新穎的模式動物。因為魚是脊椎動物，又擁有許多其他模式動物所沒有的優點，包括：體型小（3~5公分），卵多、卵徑大，用光即可控制產卵，沒有產卵期的限制，繁殖簡單，發育快，基因體大小只有哺乳類的40%；而且斑馬魚的 genome 大部分都已解開，基因轉殖簡易，胚胎透明可直接觀察，又可任意突變。這些都使得斑馬魚成為模式魚(model fish)，以使用來分析脊椎動物的基因功能、重要調控序列與途徑。此外，可利用綠色螢光蛋白當報導基因，轉殖到斑馬魚的受精卵內，經篩選、培育及繁殖，得到具有細胞、組織或器官專一性帶有螢光的轉殖品系。

斑馬魚是心臟疾病研究最佳模式動物

哺乳類的胚胎在母體內，不利觀察；若要偵測某一基因在胚胎發育各階段的情形，必須犧牲該個體進行組織切片。而模式魚類的胚胎則是透明的，可以做活體觀察，並且可以追蹤固定基因在發育過程中參與組織、器官形成的動態表現，所以斑馬魚及其轉殖魚或突變種最適合用於心臟發育研究（Fishman and Chien, 1997），其特點歸納如下：

（1）斑馬魚有一心房一心室，是哺乳類二心

房二心室的雛型，其胚胎早期發育過程及參與其中的基因調控機制，與哺乳類十分相似。其心臟的前驅細胞從體軸兩側往身體的中軸移動，融合為心錐，再延伸為心管，經過左移(jogging)、彎曲(looping)後，形成心房、心室，整個發育過程在受精後72小時完成（Yelon, 1999）；

（2）具有心臟專一 GFP 標誌的基因轉殖魚，可用來追蹤心臟細胞的動態發育（Huang *et al.*, 2003）；

（3）心臟或血管基因突變後發生疾病可能死亡，由於哺乳類是胎死腹中，無法觀察，但斑馬魚在胚胎早期仍可利用水中已滲透的氧，存活5天左右，所以如有心血管疾病仍可繼續發育；



■ 小巧玲瓏的斑馬魚是心臟疾病研究最佳模式動物。

(4) 心臟基因的突變種可以用 ENU 的方式進行突變，然後篩選心臟發育時功能異常、發育異常的突變種，進而找出哪個基因發生突變，而了解該心臟基因的功能 (Stainier *et al.*, 1996; Schnert *et al.*, 2002)。例如 myocardin mutant 為目前所發現最早影響心肌發育的基因 (Wang *et al.*, 2001)；NFAT 的訊息傳遞會影響心臟瓣膜發育 (Chang *et al.*, 2004)；UDP-glucose 的水解亦影響瓣膜 (Walsh and Stainier, 2001)；Retinoic acid 的表現，更限制心臟前驅細胞的形成 (Keegan *et al.*, 2005) 等。

值得注意的是，有些斑馬魚突變種的特徵與人類某些疾病的症狀十分類似，都是同源的基因突變所致，因此基因轉殖斑馬魚可用來研究人類致病的可能機轉 (Shnert *et al.*, 2002)、基因治療及藥物篩選的評估 (Yabu *et al.*, 2005)。

藥物安全分析及新藥篩選

因為哺乳類不方便研究藥物對孕育中胚胎發育的影響，又由於許多孕婦在懷孕過程多少可能服用或暴露在藥物或環境因子中，而許多在臨床上必須使用的急救藥物對於孕婦與胎兒的影響，仍有許多未知，亟待實證醫學研究。

目前人類臨床用藥對於胎兒的危險程度分為 A、B、C、D、X 等五級。A 級是對前三個月 (first trimester) 胎兒無害，對後期的胎兒亦無證據有害，如大部分的維生素。B 級是在動物研究未發現對胎兒有害或副作用，但沒有在懷孕婦女作控制性研究，如硝化甘油 Nitroglycerin、止痛劑 acetaminophen 等。C 級是在動物研究已証實有副作用，但未進行人體控制性研究。此類藥物只在對胎兒的潛在益處大於危險時才建議使用。如腎上腺素 epinephrine，beta 腎上腺接受器阻斷劑 propranolol，血管張力素轉換型酶抑制劑 (ACEI)，治療心室上心博過速的 adenosine，非類固醇抗發炎藥如 aspirin、ketorolac，支氣管擴張劑

theophylline，降血糖藥 rosiglitazone 等。D 級是有證據對人類胎兒有害，但在危急狀況或嚴重疾病，或其他安全的藥物治療無效時，可用於孕婦。如抗心律不整藥 Amiodarone、心臟專一 beta 腎上腺接受器阻斷劑 atenolol、抗生素 tetracycline、類固醇 prednisolone (在 first trimester)、乙醇 (ethanol)、大部分的抗癌藥或化學抑制劑等。X 級是無論動物與人類研究均證實對胎兒有害，孕婦使用的危險性高於好處，如免疫抑制劑 thalidomide、女性荷爾蒙 estradiol 等。前述藥物以 B、C 級最多，其中 C 級是大宗。

孕婦用藥對急診臨床醫師是一項挑戰，尤其在危及孕婦與胎兒的情況下，故有賴於更多證據，以提供急診醫師為孕婦施藥的依據。妊娠引起的急重症，常見的有子癲症 (preclampsia)、妊娠高血壓、心律不整等，而孕婦有可能因為支氣管氣喘 (bronchial asthma)、糖尿病、感染、免疫性疾病等，必須用藥物治療，然許多藥物在人類與動物研究尚未完全，甚至已經上市的藥品對胚胎發育的影響仍有待檢驗。利用模式魚類的透明胚胎，可以在活體上直接觀察臨床藥物或新藥是否對某些發育中的組織或器官有潛在的不良影響。

作為產學合作之優勢

筆者十多年來致力於水產分子生物和基因轉殖科技的研究，透過基因轉殖技術產製各種遺傳品系的轉殖魚，此研究成果曾被 *Far Eastern Economic Review*、*The Wall Street Journal*、*Science*、*Time* 等國際平面媒體報導，另外像 *Discovery*、*Animal Planet*、法國第三電視台及日本電視台也曾來筆者實驗室拍攝。筆者利用心臟專一表現的 cardiac myosin light chain 2 啟動子驅動綠螢光表現，產製出心臟專一性帶有綠螢光的轉殖斑馬魚 (Huang *et al.*, 2003)，是世界上第一個可讓整個心臟為綠色螢光活性標識的品系 (已獲專利)。



有鑑於將來或可替臺大爭取更豐富的資源，本實驗室於2006年9月申請本校產學合作先導型研究計畫，與邵港水產生物科技公司合作，進行產品量化的先前工作，如：產量標準化、產品規格化、基因標記鑑定、遺傳穩定篩選、種魚配子保存和疾病防治等，並進而建立藥物對心臟發育之影響篩選的技術平台，用於臨床用藥安全性評估以及新藥開發時找尋有意義的化合物，還可針對心臟發育之影響，分析可能致病的分子機制。此外，此一基因轉殖斑馬魚，配合本實驗室已研發之全身（Chou *et al.*, 2001; Hsiao *et al.*, 2001）、肌肉（Lin *et al.*, 2006）、皮膚（Wang *et al.*, 2005）、眼睛（Ma *et al.*, 2003）、卵巢（Hsiao and Tsai, 2003）或肌節（Chen *et al.*, 2007）具有綠或紅螢光等其他品系，加上本實驗室所建立的“誘導式開啓基因表現系統”（Huang *et al.*, 2005），將可作為生物醫學研究的新材料。

初步成果呈現

本計畫執行至今（2007.6）已有初步成果，茲簡述如下：

（一）斑馬魚之飼養標準化及量化：

大型控溫控光的專用養殖房已重建完畢。斑馬魚個體成長至2~3個月時，飼養在28.5℃左右、光/暗週期分別14/10小時的恆溫培養箱（大小為60cm x 20cm x 30cm）。雄、雌成魚比例為2:3，共約40尾，以適量的人工乾燥飼料與豐年蝦餵食。目前已繁殖500餘隻，具有量化之養殖條件（圖1）。

（二）遺傳穩定品系的培養：

將轉殖品系量化後，再把具有單套外來基因的品系(heterozyotic strain)雜交育種及篩選成具有雙套外來基因的品系(homozygotic strain)，這樣的子代就會100%帶有轉殖基因。為了避免近親繁衍，還要經常與野生種互配，以免個體越來越不健康。現已分別從德國及日本輸入不同來源野生種進行飼

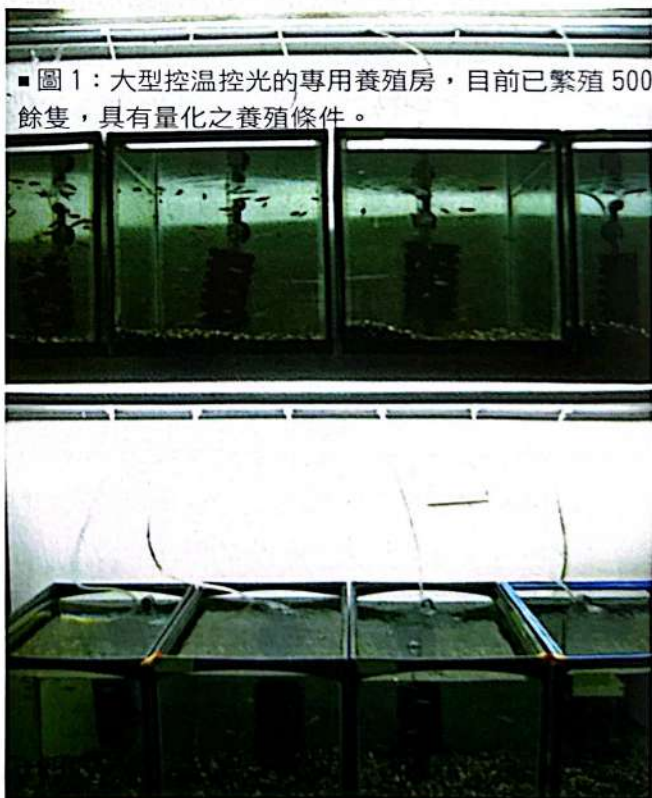
養及量化。

（三）更多轉殖品系的獲得：

使用顯微注射受精卵，以滅菌水清洗後，置入28.5℃左右恆溫箱中培育。在螢光顯微鏡下（顯微鏡：Leica MZ-12；螢光系統：燈源Hg100w、filter set GFP-Plus；照相裝置：MPS60），觀察綠螢光表現及分布情形。經過大量顯微注射之後，已篩選出可以遺傳轉殖基因到子代的親代（F0），共約50不同的lines，並觀察外形是否健全及在螢光心臟表現專一性的亮度，擇優保留。

（四）基因標記鑑定：

利用DNA片段擴增法(PCR)判定外來基因片段在某一品系染色體內的排列組合。共挑出53 colonies以 *Pst*I 確認大致有兩種 patterns：（1）預期片段，如 clone 1 大小為9kb，大於 concatemer 之3kb；（2）非預期片段，如 clone 28、31、33出現兩個片段，較預期多出一個 *Pst*I 切點。



■圖1：大型控溫控光的專用養殖房，目前已繁殖500餘隻，具有量化之養殖條件。

(五) 建立心血管疾病常用藥對斑馬魚胚胎心臟發育影響之平台：

利用綠螢光標定心臟的斑馬魚轉殖品系 Tg(*cm1c2:EGFP*)，針對人類常用心血管疾病用藥進行研究。實驗發現浸泡部分藥物的斑馬魚胚胎不會造成胚胎發育的缺陷，例如Methyldopa、Heparin sodium等藥物；然而，有些藥物卻會對體節(somite)或心臟發育產生影響，如Aminophylline、Dopamine等(表1)。

近期，我們更利用此一技術平台發現一種孕婦常用於抗心律不整的藥物，對斑馬魚心臟胚胎發育與功能產生嚴重的影響，如心臟發育時心房心室彎曲不完全(圖2)。此外，我們也觀察到該胚體心臟的功能也受到影響，如心跳緩慢、圍心腔腫大、體軸變短、尾部部分細胞壞死等。由於此一技術平台可以很迅速地獲知藥物對胚胎的心臟發育是否造成影響，或許對孕婦常用心血管藥物的安全性篩選有所助益。

(六) 探討藥物影響心臟發育分子機制的新材料：

(1) 肝糖生成酵素激酶(Glycogen synthase kinase)調控斑馬魚的心臟發育：

在人類心臟疾病中，心臟肥大(cardiac hypertrophy)的問題在過去十年越來越受重視。許多研究者投入探討其分子機制，已知mitogen-activated protein kinases、calcineurin (a Ca^{2+} /calmodulin dependent protein phosphatase) 和 Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinases 等因子為正調控，也有足夠證據顯示GSK-3s是負調控因子。此外在*in vitro*研究中，GSK-3s也會藉由影響Wnt signaling來調控心臟的發育(Stefan *et al.*, 2001)。

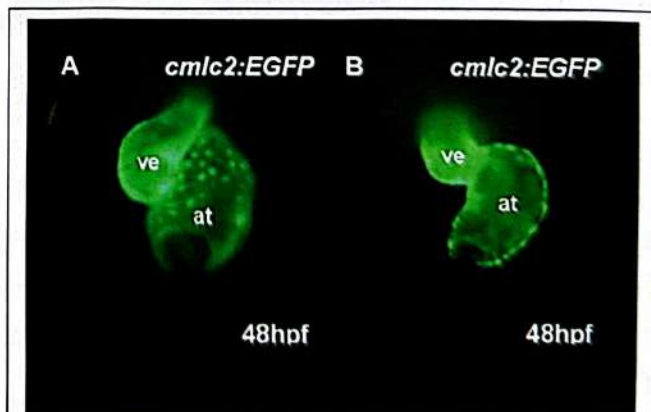
GSK-3s是一種全身持續性表現的serine-threonine protein kinase，並可藉由磷酸化其他受質而影響細胞及其生理功能。其活性調控機制非常複雜，有isoform-GSK-3 α 與GSK-3s兩型，而目前常用的GSK3 inhibitor無法專一性地抑制GSK-3 α 或GSK-3s。在人類的臨床病例中顯示，孕婦服用GSK3 inhibitor藥物

■表1：利用斑馬魚針對人類常用心血管疾病用藥研究實驗結果

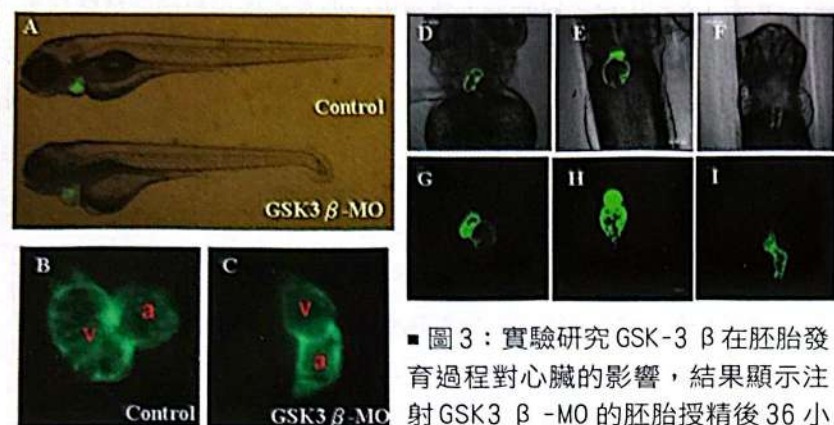
藥物名稱	成份	劑量	30hpf	48hpf	72hpf
Aminophylline	Aminophylline	0.7 μ g/ml		尾巴略彎	尾巴彎曲 數隻有白化現象
Dopavate	Dopamine	0.004 μ g/ml	Somite vessel malfunction	Heart-beating rate slower	Heart-beating rate slower
Methyldopa (Aldomet)	Methyldopa	5 μ g/ml		One dead	白化現象
pharmacare	Heparin sodium	0.17857i.u/ml			白化現象 banding tail
Prostaphlin	Oxacillin	14.2857 μ g/ml	One of all somite vessel malfunction		白化現象 banding tail
Control 1	H ₂ O	50ml			白化現象

LiCl，會導致胎兒心臟發育異常或缺失(Harris *et al.*, 2003; Shader and Greenblatt, 1990; Zierler, 1985)。

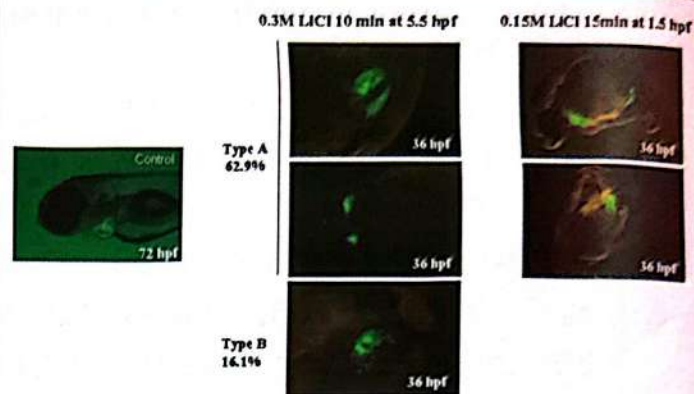
為了解兩型GSK isoforms在胚胎發育過程對心臟的影響，我們使用綠螢光標定心臟的斑馬魚轉殖品系 Tg(*cm1c2:GFP*)來輔助心臟形態功能實驗觀察的進行。又為了有效且專一地抑制GSK-3 β 表現，我們在胚胎細胞時期注射GSK-3 β antisense morpholino oligos (GSK3 β -MO)來抑制GSK-3 β 蛋白質生成。結果顯示注射GSK3 β -MO的胚胎授精後24小時，心臟先驅細胞已在中軸位置癒合並形成心管，然而過了36小時，管狀心臟仍無法正確地進行左移與彎曲等左右非對稱發育過程(cardiac left-right asymmetry)(圖3)。第四天過後，可觀察到細長的條狀心臟，且心跳速率變慢、心臟收縮力減弱，甚至有圍心腔異



■圖2：利用斑馬魚針對孕婦抗心律不整用藥的實驗發現，心臟發育的心房心室有彎曲不完全影響細胞及其生理功能。



■ 圖 3：實驗研究 GSK-3 β 在胚胎發育過程對心臟的影響，結果顯示注射 GSK3 β -MO 的胚胎授精後 36 小時，管狀心臟仍無法正確地進行左移與彎曲等左右非對稱發育過程 (cardiac left-right asymmetry)。



■ 圖 4：藥物 LiCl 對斑馬魚心臟發育有類似雙心的型態發生。

常腫大的情形。隨著注射劑量提高，其損害心臟發育的程度和比例也隨之增加；同時注射 GSK-3 β -MO 和 GSK-3 β mRNA 則可達到救援(rescue)的效果，由嚴重異常 43%、輕微異常 53.5% 降為嚴重異常 31.8%、輕微異常 12.1%。至於 GSK-3 α isoform 對心臟的影響則證明是在早期胚胎發育過程中影響心肌細胞的生存；斑馬魚胚胎缺失 GSK-3 α 會造成心肌細胞凋亡，造成心臟發育異常，心跳速率大幅下降、心臟收縮力幾乎消失，圍心腔也呈現腫大現象(此結果剛發表: Lee *et al.*, 2007)。

(2) 藥物 LiCl 對斑馬魚心臟發育的影響：

Stefan *et al.* (2002) 以老鼠的心臟細胞進行培養，利用 LiCl 或 isoproterenol(ISO)等已知的抑制劑來抑制 GSK-3s(inhibition of GSK-3s, 主要是 serine (S) 9 被磷酸化)，會導致 GSK-3s 作用在其受質 GST-eIF2B 的活性降低，因而造成心臟肥大。但由於 LiCl 也會抑制 GSK-3 α 與一些類似 GSK3 的 kinase (如 CDK kinase 等) 的活性，因此在確定斑馬魚心臟發育所呈現的缺失後，我們進一步觀察斑馬魚胚胎浸泡 LiCl 對心臟發育所造成的影響。

在胚胎發育至原腸期(gastrulation)，即 5~6 小時時，以 0.3M LiCl 浸泡 13 分鐘，再以清水洗掉藥物，置於 28°C 環境下培養，於 36 小時時以螢光顯微鏡觀

察，發現類似雙心型態。胚胎出現雙心的比例則與浸泡 LiCl 的時間成正比，根據兩團螢光細胞距離可分為兩種 type (圖 4)，可見在此藥物條件下有類似雙心的型態發生。但在 GSK-3s morphant 中僅出現 heart positioning 缺失，因此 LiCl 對心臟發育的影響是否透過 GSK3 α 或有其他機制，將是我們未來要努力找尋的答案。[圖] (本專欄策畫／研究發展委員會)

部分參考文獻：

- [1]Chou CY, Horng LS and Tsai HJ. 2001. Transgenic Res. 10, 303-15.
- [2]Fishman MC and Chien KR. 1997. Development 124, 2099-117.
- [3]Hsiao CD and Tsai HJ. 2003. Dev. Biol. 262: 313-323.
- [4]Hsiao CD, Hsieh FJ and Tsai HJ. 2001. Dev. Dyn. 220, 323-36.
- [5]Huang CJ, Tu CT, Hsiao CD, Hsieh FJ and Tsai HJ. 2003. Dev. Dyn. 228 :30-40.
- [6]Huang CJ, Jou TS, Ho YL, Lee WH, Jeng YT, Hsieh FJ and Tsai HJ. 2005. Dev. Dyn. 233:1294-1303.
- [7]Lee HC, Tsai JN, Liao PY, Tsai WY, Lin KY, Chuang CC, Sun CK, Chang WC and Tsai HJ. 2007. BMC Dev. Biol. 7: 93.
- [8]Lin CY, Yunag RF, H. C. Lee HC, W. T. Chen WT, Y. H. Chen YH and Tsai HJ. 2006. Dev. Biol. 299: 594-608.
- [9]Ma GC, Wang TM, Su CY, Wang YL, Chen S and Tsai HJ. 2001. FEBS Lett. 508: 265-271.
- [10]Chen YH, Wang YH, Chang MY, Lin CY, Weng CW, Westerfield M. and Tsai HJ. 2007. BMC Dev. Biol. 7: 1-14.
- [11]Sehnert A, Huq A, Weinstein BM, Walker C, Fishman M and Stainier D. 2002. Nature Genet. 31, 106-110.
- [12]Wang YH, Chen YH, Lu JH, Lin YJ, Chang MY and Tsai HJ. 2006. Differentiation 74:186-194.
- [13]Yabu T, Tomimoto H, Taguchi Y, Yamaoka S, Igarashiand Y and Okazaki T. 2005. Blood 106:125-134.