

研究成果

利用斑馬魚作為人類疾病模型及藥物篩選

黃政鎮（細生所博士後）、游正博（特聘研究員兼所長）

斑馬魚是一種小型亞熱帶淡水魚，近年來在全世界被廣泛用於研究脊椎動物的胚胎發育，甚至推廣至疾病研究、藥物篩選、及毒物測試。有鑑於斑馬魚在這些研究領域的極大貢獻，本院細胞與個體生物研究所近一兩年積極推動斑馬魚研究，建立專業養殖系統、設備，推動整合型研究計劃，並嘗試建立斑馬魚作為人類疾病模型，及利用斑馬魚作為藥物篩選的研究平台。本文將介紹如何利用斑馬魚作為基礎研究及人類疾病模型研究、細生所新設立之斑馬魚核心設施，及我們初步的突變篩選及藥物篩選實驗中所得之令人興奮的成果。

一、斑馬魚作為基礎研究及人類疾病模型

（一）斑馬魚利於發育遺傳學研究

斑馬魚是近十幾年內被開發成為實驗模型動物，具有諸多優點，僅概述重要幾項：

1. 它是脊椎動物，且具有近似人類的各種器官系統，例如：心臟血管系統、消化系統、神經系統。適合用來研究脊椎動物的胚胎及器官發育。
2. 它是體外受精的動物，且早期胚胎是透明的，利於觀察發育過程中完整型態的變化。
3. 斑馬魚的養殖設備比老鼠簡單，且花費也低。
4. 斑馬魚成熟快，且繁殖力強，受精卵在 3、4 個月即可成熟繁殖下一代，且可於每 1、2 週內交配，產出 100 至 300 個卵，利於遺傳學之研究。
5. 斑馬魚可以很容易進行誘發突變及基因轉植，利於研究基因功能。

因此，十多年前由美國及德國科學家進行大規模的突變篩選計劃，已得到上千株有趣的突變魚[1]。其中有不少從型態分析得知，類似人類疾病症狀。而從基因定位分析，找出與已知的人類相同的致病基因，或新的基因。因此，增進我們對這些病症機制，及相關連的基因群組的瞭解。

（二）突變斑馬魚及轉基因斑馬魚表現類似人類疾病

利用傳統的誘發突變方法或新穎的轉基因方法，可以產生人類疾病模型的斑馬魚株。例如：突變斑馬魚 *gridlock* 發生主動脈發育不正常，造成血液阻塞無法流至軀幹及尾部，也因此阻塞區域常發育出額外平行的動脈。這樣的病症，類似人類的一種先天性動脈發育缺陷，稱為 *coarctation* [2]。在人類遺傳學研究，尚無法瞭解這個缺陷是如何造成的，但藉由研究 *gridlock* 得知，問題出在早期動、靜脈細胞分化的過程，原來該發育為動脈的細胞轉發育成靜脈。更可貴的是，*gridlock* 被用來作藥物篩選，得到兩種藥物可以醫治動脈發育的缺陷，可能是藉由刺激血管內皮細胞增生因子（VEGF）的合成[3]。在轉基因方法的應用上，哈佛大學的研究團隊首先利用轉基因方法，過度表達 *myc* 基因造成一株類似人類 T 細胞白血病（T cell leukemia）的斑馬魚[4]。之後，另有許多轉基因魚會表現人類癌症病症的斑馬魚被發表[5]。這些魚將來可幫助我們進一步瞭解癌症病變機制、過程，甚至可用作藥物篩選，找出新的特異抗癌藥，相當具有醫藥前景。

二、細生所斑馬魚核心設施

本所近年來也開始推動斑馬魚之研究，設立新型斑馬魚養殖設備。位於本所地下室的斑馬魚核心設施，主要有兩室：分別為魚房及顯微鏡室。魚房內目前設有一套 7 排養殖架，是由美國 *Aquatic Habitats* 公司（圖 1）設計，專門用來養殖大量的小型魚種，因此特別適合斑馬魚遺傳研



圖 1. 斑馬魚房，成魚室

究。我們正籌購第二套養殖系統，預計將可容近 900 個魚缸，養殖超過 15,000 隻魚。除此，有一套櫥櫃式養殖架，是用來設定高溫養殖（33°C），專門作為篩選對溫度敏感的突變魚。顯微鏡室又分隔為二室，一為誘發突變室，內設有化學抽風櫃，為專門用來操作誘發突變實驗，並嚴格管制進出人員，且對於操作誘發突變實驗之安全防護採嚴格要求。另一室為顯微鏡室，設有一座立體螢光顯微鏡搭配 CCD 相機，以供快速觀察照相，分析突變魚之型態。

三、成果

（一）血管突變魚

本實驗室目前擁有幾株不同品系的野生種、轉基因及突變斑馬魚。其中轉基因魚株 *fli1:EGFP* 是由 Weinstein Lab, NIH, USA 所製造出來，可以表達螢光在血管中內皮細胞，因此，可以很容易觀察到血管發育的整個過程。我們利用它來研究本實驗室既有的 3 株非常珍貴的血管突變魚。第 1 株叫 *reg6*，它會影響血管分支，當血管在快速增生時需要大量分枝，來擴充提供其他組織的養份，這時候血管會形成很密的微血管網路稱為 vascular plexus。我們發現 *reg6* 這個突變無法正常分枝，於是血管膨脹形成血泡（圖 2）。這種病症其實非常類似人類中一種血管疾病，稱為 Hemangioma。*reg6* 是一個溫度敏感的突變魚，我們正試圖定位 *reg6* 基因 [6]。

第 2 株血管突變魚叫 *dll4*，是一個顯性突變 (dominant mutation) 會造成動脈整型的缺陷，當密微血管網路進行整型要成為成熟的簡單血管時，*dll4/+* 突變無法形成正常的動脈，然而靜脈卻是非常正常。這個突變是發生在一個基因叫 delta-like 4 (*dll4*)，這基因的功能還不清楚，但很可能與細胞分化有關。目前人類沒有發現類似的血管疾病。

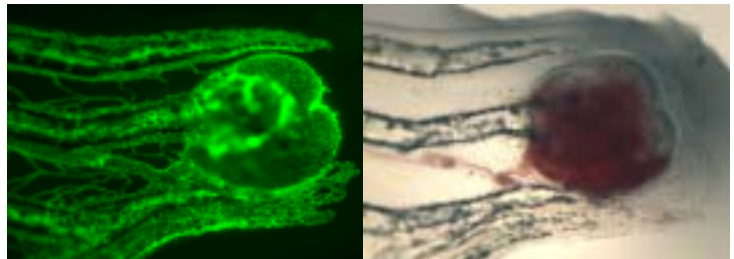


圖 2. *reg6* 突變魚在再生的尾鰭中形成血泡，類似人類一種血管疾病 Hemangioma。(左)綠螢光顯示尾鰭血管，(右)一般光顯示積血的血泡。

第 3 株突變叫 *prp* (for *persistent plexus*) 是屬於隱性突變，*prp* 的問題出在它會持續地形成微血管網路，這是一株較新的突變，目前所知有限，但伴隨血管的問題是尾鰭骨骼生長變曲、減慢。我們也正在定位 *prp* 基因。

（二）誘發突變及突變篩選

目前我們採用傳統利用化學藥物 (ENU; ethylnitrosourea) 在斑馬魚體內誘發突變，這種藥物已在斑馬魚及其他實驗動物廣泛被使用，方法簡述如下：將年輕的雄魚（約 4 個月大），浸泡於 3mM ENU 1 小時，連續操作 4 次，每次間隔 10 天。6 週後，與同品系之母魚交配繁殖大批子代，稱為 F1 founders。理論上這些 F1 founders 大都是帶有單一突變（稱 carriers 或 heterozygotes）。待 F1 founder 的母魚成熟，則可進行突變篩選。目前斑馬魚突變篩選有數種方法，我們採用一種稱為早期水壓法 (Early Pressure)。這是將 F1 founder 的母魚的卵擠在培養皿，用紫外光處理過的精子（破壞精子中的 DNA）來假受精，再立即將卵裝瓶放入密閉的水容器中加壓，去抑制受精卵正在進行的第 2 次減數分裂，而造成雙倍體的受精卵。此法比傳統篩選方法可縮短一代的時間，且大幅減少突變篩選過程所需的養殖空間。

我們最近進行一次小規模的突變篩選，發現一株新的突變，暫名 MS7。這是隱性突變，會造成嚴重的組織退化 (degeneration)，主要在腦部。我們也發現它缺乏腦部的血管。利用這些及將來更多的血管突變魚，我們期待對血管增生及再生能更多的瞭解。

（三）藥物篩選

利用斑馬魚作藥物篩選，有下列優點：(1) 斑馬魚是整隻動物直接作測試，可同時測驗毒性及藥效，省時又有效率，不像一般用細胞篩選得的藥物，往往到了動物身上會產生毒性，或根本沒有預期的藥效；(2) 斑馬魚胚胎非常小，所需藥劑量非常少，且發育快，比用老鼠要節省且快速多了；(3) 斑馬魚胚胎在體外發育，易觀察研究藥效。我們利用野生種 *fli1:EGFP* 及 *reg6* 突變魚來嘗試作藥物篩選，主要的想法如下：1. 目前有一些抗癌新藥是藉著抑制血管增生，我們希望利用 *fli1:EGFP* 來篩得更多抑制血管增生的藥，未來或者可以成為抗癌新藥。2. 我

們利用類似人類疾病的突變魚來做藥物篩選，希望能得到新藥將可以用來治療人類類似的疾病。為了證明斑馬魚的確可以拿來做藥物篩選，我們首先用兩種已知的抑制血管增生藥物 (SU4312 及 SU5416) 來測試，我們發現他們在斑馬魚胚胎也能抑制血管增生，顯示斑馬魚的確能用來篩選抑制血管增生的藥。這樣的實驗僅需 1 微克 (μg) 的藥，且在 3 天內完成。當我們用 *reg6* 突變魚去做藥物篩選，我們驚訝地找到一種藥可以抑制及醫治 *reg6* 的病症 (SKF91488, Sigma)，這是一個與組織胺 (histamine) 代謝有關的藥 (圖 3)。

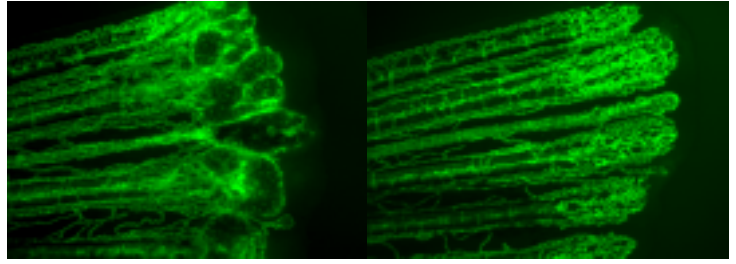


圖 3. *reg6* 突變魚的再生尾鰭中形成血泡(左)，但加入一個與組織胺代謝有關的藥後，血管再生恢復正常(右)

(四) 舊藥新知

在這段藥物篩選的測試過程中，我們意外地發現一些舊的藥，似乎有一些我們未知的藥效。舉一個例子：馬兜鈴酸 (Aristolochic Acid)，是曾用於減肥藥中的一個中藥成分，已知很可能會造成腎小管組織間纖維化，且或腎表皮細胞癌化，進而造成腎毒。當我們嘗試用斑馬魚來測試時，發現它會影響心臟的早期發育及後來的功能，被馬兜鈴酸處理過的斑馬魚，其心臟內腔會逐漸縮小，血液無法循環，最後導致全身性組織壞死。

我們相信斑馬魚在不久的將來對人類疾病研究及藥物開發，會成為極有利的實驗工具。在此感謝基因體中心鄭義循老師的協助及提供藥物於藥物篩選實驗。

參考文獻：

- [1] (1996) *Development* 123;whole issue
- [2]Zhong, T.P. et al, (2000) *Science* 287;1820-1824
- [3]Peterson, R.T. et al., (2004) *Nat. Biotech.* 22; 595-599
- [4]Langenau, D.M. et al., (2003) *Nature* 299;887-890
- [5]Stern, H.M. and Zon, L.I. (2003) *Nat. Rev. Cancer* 3;533-539
- [6]Huang, C.C. et al., (2003) *Dev. Biol.* 264;263-274