

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第三名

052009

以基因剔除小鼠模式剖析腸道菌叢與 T 淋巴細胞在高脂飲食所誘導肥胖中之功能性連結

學校名稱：臺北市立麗山高級中學

作者： 高二 翁詠緹	指導老師： 郭瓊華 林獻升
---------------	---------------------

關鍵詞：高脂飲食、腸道菌叢、T 淋巴細胞

摘要

肥胖是全球重要之健康隱憂，然而腸道菌叢與免疫細胞對肥胖過程之影響尚未被釐清。本研究主旨為探討腸道菌叢在高脂飲食所誘導肥胖中之角色，並剖析由 T 淋巴細胞所調控之免疫機轉。我們以小鼠模式發現，從低脂到高脂飲食會使擬桿菌門與厚壁菌門產生消長，並促進擬桿菌屬隨脂肪熱量佔比提升而減少，同時使乳桿菌屬增加，推測高脂飲食與腸道菌叢可能對肥胖是關鍵影響因子。我們進一步利用基因剔除鼠發現，後天免疫缺陷對高脂飲食誘導肥胖有助長趨勢，且 T 淋巴細胞中轉錄因子 *Maf* 和促發炎因子 IFN- γ 之增加與肥胖產生有正相關，若將 *Maf* 基因剔除則可促進抗發炎因子 IL-10 增加並抑制肥胖，證實未來在醫療上可利用 *Maf* 基因作為肥胖治療之新標靶並開發免疫治療策略。

壹、前言

在 2016 年 *Lancet* 雜誌 (NCD Risk Factor Collaboration, 2016) 中的一篇論文討論到關於世界人口的 BMI 指數在將近 40 年後各地區幾乎都有增加的趨勢：全球年齡標準化的男性平均 BMI 由 21.7 上升到 24.2；女性平均 BMI 則由 22.1 上升到 24.4，皆表示了全球人口明顯有肥胖的趨勢，此為重要的健康隱憂，也代表需要備受重視及研究，如何有效且健康的減肥也成為了重要的議題。

脂肪細胞由小到大、細胞內的脂肪油少到多會受到**腸道菌叢**、**飲食習慣**及**遺傳基因**三個因素的影響，脂肪細胞、T 細胞與腸道菌叢會互相拮抗平衡 (Tsai, Y. W.等, 2020)。免疫系統被破壞後導致腸道菌叢失衡，或是不同亞群之 T 細胞產生不同細胞激素，導致發炎引起肥胖。近年來，基因遺傳與肥胖的相關性與重要性已有不少研究證實。*Maf* 基因在白色脂肪組織 (White Adipose Tissue) 中調控血管周圍巨噬細胞，間接影響了促使脂肪炎症發生的細胞，研究證實 *Maf* 基因在先天免疫細胞巨噬細胞之專一性剔除對肥胖產生抑制效果

(Hernandez,M.S.等, 2021)，因此想探討 *Maf* 轉錄因子在後天免疫細胞剔除是否能成為治療肥胖的新標靶。為了驗證 *Maf* 轉錄因子剔除對肥胖是否有抑制效果，因此使用 T 淋巴細胞專一性 *Maf* 基因剔除模型進行實驗。首先，觀察實驗小鼠在高脂飲食對肥胖產生的影響；接著，探討後天免疫細胞與肥胖產生的關聯性；最後，針對 *Maf* 基因剔除是否能夠抑制體重的增加及對 CD4⁺ T 細胞中細胞激素的影響，希望能對 *Maf* 在抑制肥胖上提供一些實例參考，為未來治療肥胖的方法帶來新方向。

研究目的

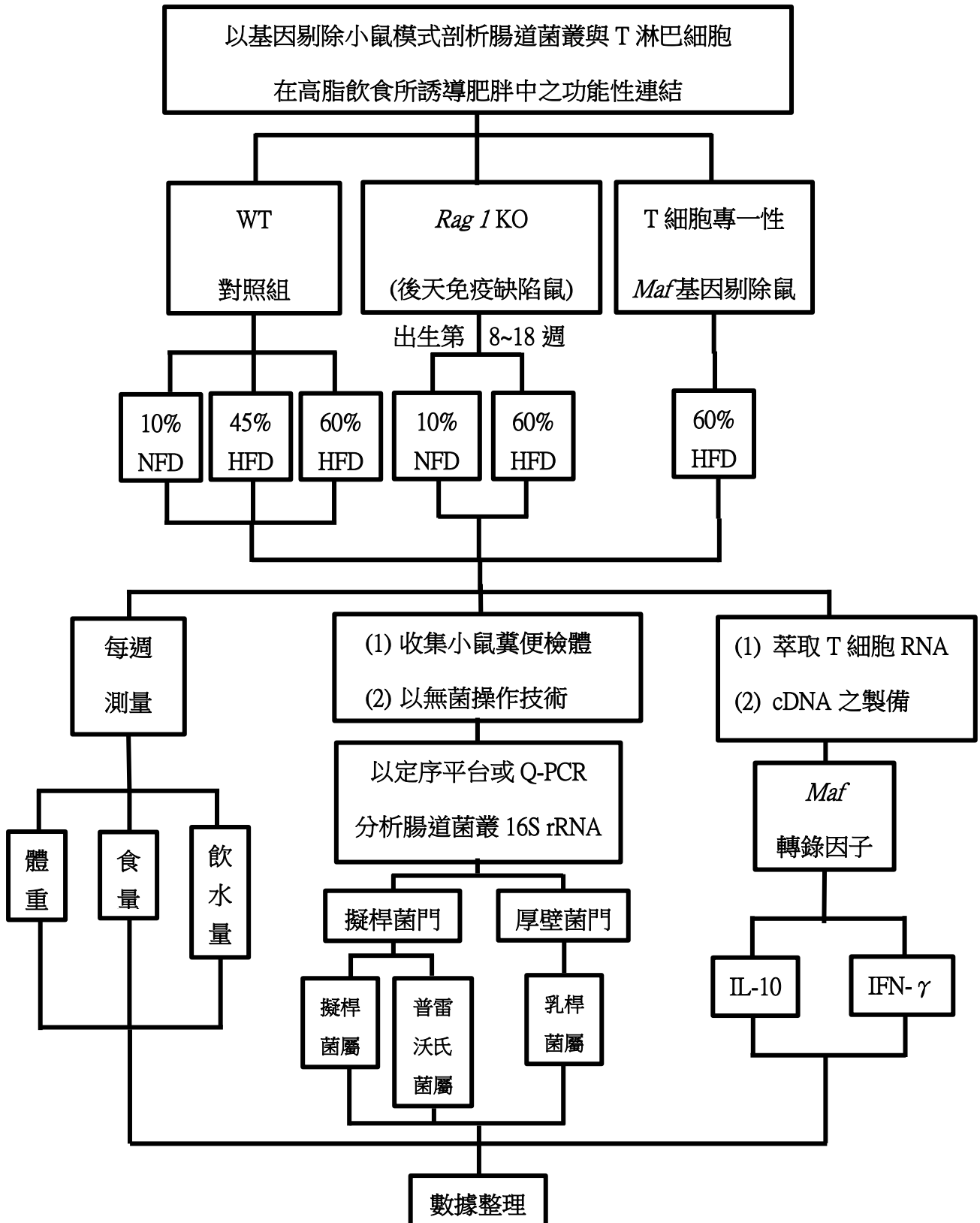
- 一、高脂飲食誘導之肥胖對腸道菌叢及細胞激素之影響
- 二、後天免疫細胞對高脂飲食環境下產生之肥胖及腸道菌叢之影響
- 三、T 淋巴細胞中 *Maf* 基因對發炎因子之影響，藉此尋找成為治療肥胖之新免疫標靶

貳、研究設備及器材

器材	用途	器材	用途
D12450Ji 10% NFD	餵食小鼠	烘箱	烘乾液體
D12451i 45% HFD	餵食小鼠	即時聚合酶連鎖反應機	Q-PCR
D12492i 60% HFD	餵食小鼠	微波爐	製作電泳凝膠
程式溫度控制儀	PCR	-80 度冰箱	保存檢體
離心機	離心	-20 度冰盒	保存檢體
測 DNA 濃度機器	測 DNA 濃度	無菌操作台	實驗用

參、研究過程與方法

實驗流程圖



一、動物實驗：

使用 C57BL/6J 基因剔除小鼠來模擬特定基因缺失。使用 Research Diets, Inc.的 Open Source DIETS，將飲食環境依照脂肪熱量佔比做為操縱變因，分別是正常飲食及高脂飲食。正常飲食之脂肪熱量佔比為 10%，其蛋白質熱量佔 20%，碳水化合物熱量佔 70%；高脂飲食分為脂肪熱量佔比 45%及 60%兩種，前者之蛋白質熱量佔比為 20%，碳水化合物熱量佔 35%；後者之蛋白質及碳水化合物熱量各佔 20%。我們將 C57BL/6J 小鼠依照不同飼料分組，並從小鼠 8 週齡（飼養第 0 週）開始記錄其體重變化至 18 週齡（飼養第 10 週），紀錄此期間內的體重及飲食量，比較體重增加之幅度差異、收集小鼠糞便，進而觀察、分析該基因對肥胖、腸道菌叢及促發炎因子的影響。



（一）小鼠模型

本研究使用之 C57BL/6J 小鼠品系，屬於 DIO 小鼠(Diet-induced obese mice)，特別適合肥胖與代謝綜合症等研究，且壽命較其他亞系小鼠長，並由教授實驗室之相關動物計畫購買自國家動物中心，而 B6.*Rag1* KO, B6.*Maf*^{fl/fl} 與 B6.*Lck*^{Cre} 原始來源分別來自 JAX Lab，並在動物中心繁殖代養。

（二）T 細胞專一性 *Maf* 基因剔除鼠原理

利用 Cre-loxP 基因剔除技術，製作出 *Maf* 基因剔除的實驗組。於小鼠為受精卵階段時將由 34 個核苷酸組成的 loxP 基因段加入，使其在小鼠 *Maf* 基因段兩端作為標

記，loxP 基因段不影響正常基因的執行，*Maf* 基因尚未剔除，為 WT 小鼠。若同時再加入 T 細胞組織專一性的 *Lck^{Cre}* 重組酶基因，則可以產生 T 細胞專一性 *Maf* 基因剔除之效果，為 KO 小鼠。

(三) 基因轉殖小鼠之基因型鑑定

1. 小鼠尾巴溶解

仔鼠於兩週大時剪其尾巴，約 0.2 公分。取出樣本，25°C, 11200 rpm 之設定離心兩分鐘。取 Proteinase K 退冰，並計算需要的混和液量（PK buffer 1ml + PK 50 μ L，一個樣本離心管需加入 200 μ L mix）。拿離心管（10ML 以內容量），取出 PK 緩衝液稍微搖勻後倒入算好之容量進入離心管。將 Proteinase K 震盪並離心，倒入 PK 緩衝液混和均勻再震盪。加入每管離心管各 200 μ L 的 Mix 後，放進烘箱。

2. DNA Extraction

取出放置溶解後小鼠尾巴之離心管架，震盪每一個離心管後，以常溫高速（25°C, 11200 rpm）離心 5 分鐘。準備新的離心管並且做好標記後加入 200 μ L 的濃度 100% 的酒精。從離心好的離心管中取 50 μ L 的上清液到新備好的離心管中後震盪，之後常溫高速（25°C, 11200 rpm）離心 10 分鐘。準備空廢瓶及擦手紙擺放於桌面，將每一離心過的離心管中的酒精倒入空廢瓶，之後蓋上保鮮膜進行 30 分鐘烘乾。烘乾結束後進行 DNA 的濃度檢測，依照測出的濃度數值進行濃度調整至 DNA 濃度為 100ng/ μ L，結束作業後將 DNA 保存於 4°C。

3. 聚合酶連鎖反應（Polymerase Chain Reaction, PCR）

取出 DNA 樣本放在室溫的離心管架上，準備實驗需要用之試劑放在-20°C 的冰桶中保冰。配置試劑量，配置完成後震盪及離心，準備小的離心管（0.2 cc）排兩排，分別加入兩種試劑（Prdm1 promoters & Lck-Cre primers）及 2 μ L DNA，開機 PCR 機器，將所有小離心管放置於機器盤子上，確認關緊，蓋上蓋子，設定參數值，即可進行 PCR，大約進行 2~2.5 小時取 PCR 結果。做膠，PCR 結束後取出膠的齒梳，加進 25 μ L DNA 樣本，marker 6 μ L。取出膠體，使用紫外線照結果。

以下為Primers資訊：

Maf-flox	(F) CTGGTTTTCTTCTCCGCGTG (R) GCGAAGTTTAGTGCAACGAGG
pLck-Cre	(F) TAATGAAGAGGGACAGGTACCCTC (R) TGCACGTTTCAACCGGCATCAACGTT

（四）餵食小鼠

使用基因正常鼠與 T 細胞專一性 *Maf* 基因剔除實驗小鼠 C57BL/6J，自出生第八週開始進行實驗，依照三種不同脂質熱量佔比飼料（10%、45%、60%），每籠 3 隻，將以「籠」為實驗單位進行其體重、食量、飲水量數據量化單位。每週進行一次更換飼養籠、飼料及飲用水，並測量三項目之容量（mL）與重量（g）。

二、檢測樣本中菌相組成

（一）萃取小鼠排遺物內腸道菌叢DNA（Fecal DNA Extraction）

取出糞便樣本，秤重樣本重量，在含珠子的管內加入InhibitEX濾液並置入樣本

後進行震盪及加熱10分鐘，離心（25°C,11200 rpm,2min）。抽取200 μ L上清液置入已加入Proteinase K之離心管中，再加入200 μ L 緩衝液AL，加熱10分鐘。再加入100%酒精併震盪，吸取全部液體加入上下分層離心管中，離心（25°C,11200 rpm,1min）。丟棄下層管，放上新下層管並加入500 μ L緩衝液AW1到上層管，離心1分鐘。重複動作加入緩衝液AW2，離心1分鐘。重複動作，空離5分鐘。將下層管丟棄，上層管放在新離心管，並加入水52 μ L，靜置並離心後液體即為DNA萃取液樣本。

（二）即時定量聚合酶連鎖反應（Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction，Q-PCR）

檢測樣本 FDNA 濃度後進行稀釋。配置溶液：SYBR:10 μ L/per well、Primer:4.4 μ L/per well、QH₂O:0.6 μ L/per well，準備96-well plate並加入15 μ L/per well混合液及2 μ L/per well的稀釋20倍之樣本，放入即時聚合酶連鎖反應機，等待實驗數據。

以下為Primers資訊：

<i>Eubacteria</i>	(F) A C T C C T A C G G G A G G C A G C A G T (R) A T T A C C G C G G C T G C T G G C
<i>Bacteroides</i>	(F) G G T T C T G A G A G G A G G T C C C (R) C T G C C T C C C G T A G G A G T
<i>Prevotella</i>	(F) C A C G G T A A A C G A T G G A T G C C (R) G G T C G G G T T G C A G A C C
<i>Lactobacillus</i>	(F) G G A A A C A G A T G C T A A T A C C G (R) C A C C G C T A C A C A T G G A G

<i>Bacteroidetes</i>	(F) G T T T A A T T C G A T G A T A C G C G A G (R) T T A A G C C G A C A C C T C A C G G
<i>Firmicutes</i>	(F) G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A (R) A G C T G A C G A C A A C C A T G C A C

三、檢測T淋巴細胞之基因表現

(一) RNA之抽取

以小鼠尾巴血純化出T淋巴細胞，細胞經4°C 離心1300rpm，5分鐘後去除上清液，加入1mL TRIZOL Reagent，將含有細胞之TRIZOL Reagent置於1.5mL離心管，於室溫下反應五分鐘，加入200 μ L的chloroform，激烈震盪15分鐘混合均勻，以4°C 離心12,000xg(eppendorf Centrifuge 5415R) 10分鐘，將上層透明液吸出移至新的離心管，再加入等量的isopropanal混和均勻，靜置於-20°C 冰箱隔夜；以4°C 離心12,000xg10分鐘，除去上清液，加入1mL 75%酒精混和均勻，以4°C 離心 8,000xg 5分鐘，除去上清液並風乾；再加入適量的DEPC-H2O(0.1%DEPC 在室溫中攪拌至完全混和以破壞RNase 後，再經濕熱高壓滅菌除去DEPC)，約100 μ L DEPC-H2O，置於冰上並以分光光度儀測其OD值。

(二) c-DNA之製備及Q-PCR反應

取5mgRNA、1 μ L 50 μ M oligo(dT)₂₀ 引子及1 μ g 10mM dNTP混合後，以DEPC水將體積補到13 μ L。以65°C加熱5分鐘，置於冰上10分鐘後再加入1 μ L, 1M DTT，4 μ L 5xbuffer、1 μ L 40U/ μ L RNAaseOUT、RNAase inhibitor及 1 μ L 200U/ μ L Superscript III reverse transcriptase(Invitrodene, USA)混合後，50°C作用60分鐘後，保存於-20°C。

Q-PCR反應溶液體積為20 μ L，其中包含2倍SYBR Reagent buffer、0.5 μ M設計之 c-Maf 引子及5%DMSO，混和均勻後置於溫度循環控制機(ABI PCR system 9700)。

以下為Primers資訊：

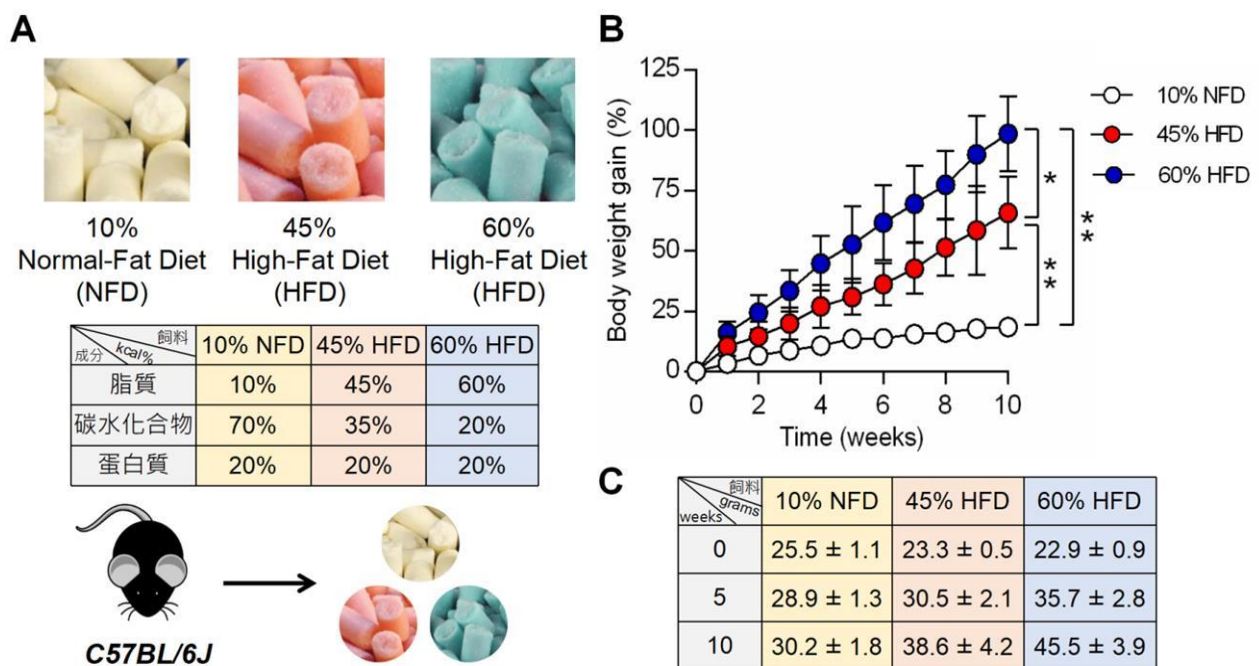
Maf	(F) AAATA CGAGA AGCTG GTGAG CAA (R) CGGGA GAGGA AGGGT TGTC
IFN- γ	(F) ATCTG GAGGA ACTGG CAAAA (R) TTCAA GACTT CAAAG AGTCT GAGG
IL-10	(F) AACTGCACCCACTTCCCAGTC (R) CATTAAGGAGTCGGTTAGCAG

肆、研究結果

一、探討高脂飲食對肥胖的影響

飲食習慣是導致肥胖的關鍵因素之一，因此本研究想了解在不同的脂肪熱量佔比飲食環境之下會如何影響肥胖的程度。本研究使用 Research Diets, Inc.的 Open Source DIETS，依照餵食飼料之脂肪熱量佔比做為操縱變因，分別是低脂飲食及高脂飲食。低脂飲食之脂肪熱量佔比為 10%，其蛋白質熱量佔 20%，碳水化合物熱量佔 70%；相對為高脂飲食之飼料分為脂肪熱量佔比 45%及 60%兩種，前者之蛋白質熱量佔比為 20%，碳水化合物熱量佔 35%；後者之蛋白質及碳水化合物熱量各佔 20%。將 C57BL/6J 小鼠依照三種飼料分組，每組 3 隻，共 3 組（圖一(A)），並從小鼠 8 週齡（飼養第 0 週）開始記錄其體重變化至 18 週齡（飼養第 10 週）。飼養第 0 週至第 2 週，三種飲食環境下之小鼠體重增加百分比差距不大，皆不超過首次測量體重之 25%（10%NFD: 3.6%；45%HFD: 22%；60%HFD: 25%）；飼養至第 3 週時，三組小鼠之體重增加百分比開始有明顯的差異，首

先是食用飼料脂肪熱量佔比為 60% 小鼠的體重增加百分比超過首次測量體重之 25%，接著為 45% 之高脂飲食環境下的小鼠；飼養至第 10 週時，食用脂肪熱量佔 60% 飼料之小鼠，其體重增加了趨近於首次測量體重的 100%，而餵食低脂飲食之小鼠的體重增加量仍低於首次測量體重之 25%（圖一(B)）。起初從低脂飲食轉變為高脂飲食的體重增加幅度沒有太大差異，表示短期食用含較高油脂的食物還不至於使體重增加過多而導致肥胖；在高脂飲食環境下一段時間後，體重增加幅度逐漸變大，促使肥胖的產生，但持續在低脂飲食環境下，體重增加趨勢平緩，增加幅度不大。因此顯示，**高脂飲食是肥胖產生的關鍵因素**。



圖一：探討高脂飲食對肥胖的影響

(A) Research Diets, Inc. 的 Open Source DIETS 飼料成分熱量佔比，用來模擬低脂飲食（10% NFD）與高脂飲食（45%、60% HFD）習慣，分別餵食三種特殊飼料作為 C57BL/6J

小鼠分組依據。

(B) 10 週內 C57BL/6J 小鼠體重增加百分比。

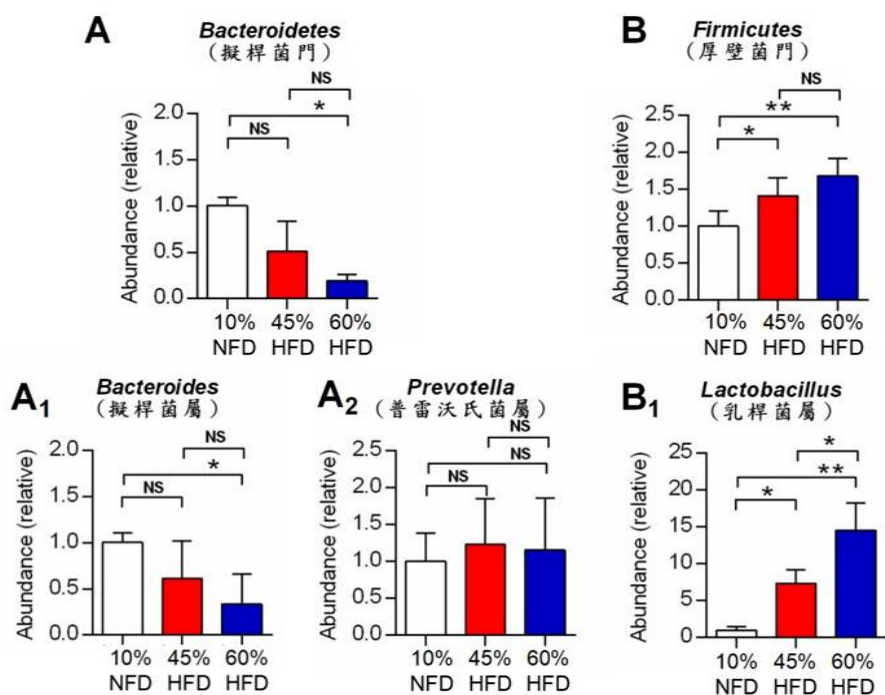
(C) 擷取飼養第 0, 5, 10 週之體重。

※每次實驗每組使用 3 隻 C57BL/6J 小鼠（共 3 組），共 1 次實驗。

（統計方式：one-way ANOVA with Tukey's post test，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ ）

二、探討高脂飲食對腸道菌叢的影響

肥胖的產生亦與腸道菌叢的組成比例息息相關，若組成比例改變可能使人體代謝功能降低、對健康產生影響，因此本實驗想探討高脂飲食誘發之肥胖會如何影響菌叢佔比變化。於飼養 6 週後收集小鼠糞便檢體，並萃取腸道菌叢 DNA 進行分析。厚壁菌門 (Firmicutes) 與擬桿菌門 (Bacteroidetes)，是人體腸道菌叢之主要組成，也是菌相檢測時作為評估的主要標準。本實驗使用可檢測特定基因序列之 Primers，不同菌門及菌屬使用相對應序列之 Primers，透過 Q-PCR 測定某菌 16s rRNA 片段中之可變異區，判斷其是否為目標菌門或菌屬以計算比例。在一般情況下，擬桿菌門之比例會多於厚壁菌門；在從低脂到高脂飲食下，擬桿菌門比例有逐漸減少的趨勢（圖二(A)），而厚壁菌門有逐漸增加的趨勢(B)，最後高脂飲食所誘導之肥胖者的腸道菌叢組成比例產生失衡現象，為肥胖模式菌相。我們進一步往菌屬分析：擬桿菌門擬桿菌屬 (*Bacteroides*)、普雷沃氏菌屬 (*Prevotella*) 及厚壁菌門乳桿菌屬 (*Lactobacillus*)，此三種菌屬在過去已經被報導跟肥胖相關，根據實驗數據顯示，普雷沃氏菌屬之比例變化趨勢不明顯（圖二(A₂）），而擬桿菌屬之比例明顯隨著飼料脂肪熱量佔比提升而有減少的趨勢（圖二(A₁）），而乳桿菌屬有增加的趨勢（圖二(B₁））。由此可知，飲食習慣的不同確實會造成腸道菌叢之比例影響，高脂飲食所誘導的肥胖會使擬桿菌屬比例變少，乳桿菌屬比例增加。



圖二：探討高脂飲食對腸道菌叢的影響

(A) 擬桿菌門與隸屬其底下之擬桿菌屬(A₁)、普雷沃氏菌屬(A₂)在低脂與高脂飲食下之比例。

(B) 厚壁菌門與隸屬其底下之乳桿菌屬(B₁)在低脂與高脂飲食下之比例。

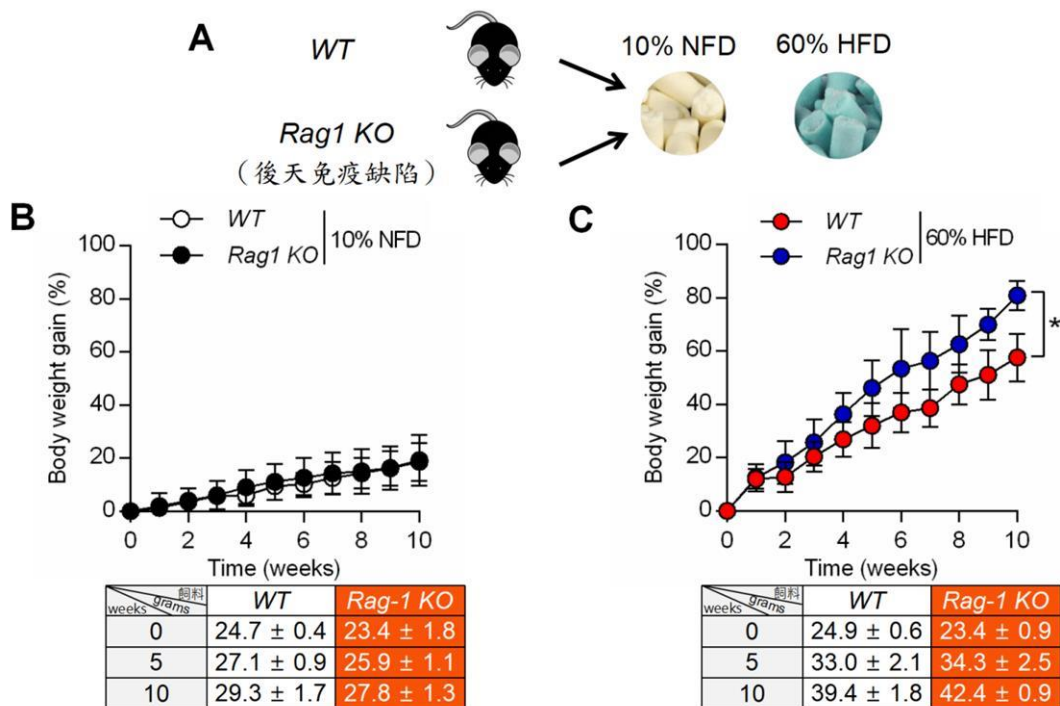
※每次實驗檢測每組 3 隻 C57BL/6J 小鼠 (共 3 組) 之糞便樣本，每個樣本檢測兩次，共 2 次實驗。

(統計方式：2-tailed Student's *t* test，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$)

三、探討後天免疫缺陷對高脂飲食下誘導之肥胖的影響

肥胖會受到後天免疫細胞所表現的抗發炎或促發炎細胞激素影響 (Tsai, Y. W.等, 2020)，因此想比較在後天免疫缺陷的情況下對肥胖的產生會有什麼影響。本實驗使用 C57BL/6J 小鼠進行重組激活基因 Rag-1 (Recombination activating gene 1) 基因剔除，剔除後使 T 細胞與 B 細胞無法成熟，可作為後天免疫缺陷模型。之外，本實驗也想了解在

後天免疫缺陷之情況下，肥胖程度在餵食低脂飲食或高脂飲食下的影響是否與後天免疫健全之情況相同，因此將 WT 模型與 Rag-1 基因剔除 (Rag-1 KO) 模型，依據餵食 10% NFD 與 60% HFD 之飼料分組，每組 3 隻，共 4 組 (圖三(A))。在食用 10%NFD 飼料情況下，WT 與 Rag-1KO 小鼠之體重增加百分比的趨勢相近，且飼養第 10 週時兩者之體重增加百分比皆小於 20% (WT: 18.6% ; Rag-1 KO: 19.2%)，增加幅度皆不明顯 (圖三(B))；相對於圖三(B)，在餵食 60% HFD 飼料情況下，兩者體重有明顯大幅增加之趨勢，且於飼養第 3 週時兩者之體重增加百分比皆超過 20% (WT: 20.4% ; Rag-1 KO: 25.7%)；又於飼養第 2 週時 Rag-1KO 小鼠之體重增加趨勢開始明顯較 WT 有上升的現象，至飼養第 10 週時，兩者體重增加百分比相差約 16.9%(WT: 57.5% ; Rag-1 KO: 74.4%) (圖三(C))。由此推測後天免疫缺陷所導致的肥胖建立在食用高脂飲食上，若食用低脂飲食的小鼠體重增加趨勢較平緩；而後天免疫缺陷確實有促進肥胖產生的趨勢，推論後天免疫系統在肥胖的產生過程中扮演重要的控制角色。



圖三：探討後天免疫缺陷對高脂飲食誘導之肥胖的影響

(A) WT 與 Rag-1 KO 分組，各組再依據餵食 10% NFD 與 60% HFD 分組共四組。

(B) 10 週內餵食 10% NFD 之 WT 與 Rag-1 KO 小鼠體重增加圖及擷取餵食第 0, 5, 10 週之體重。

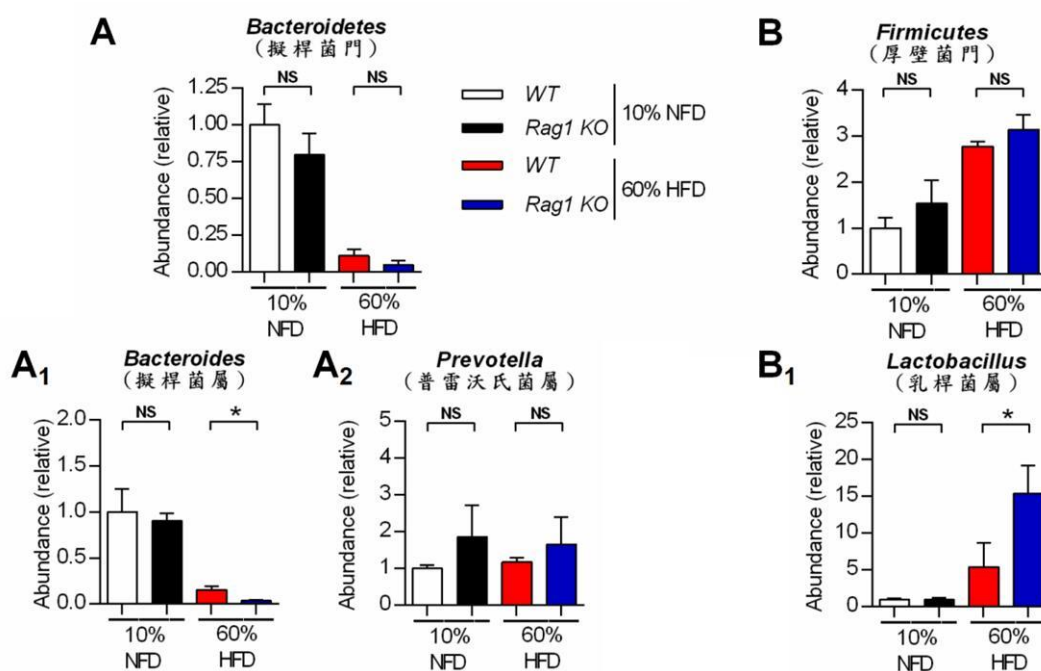
(C) 10 週內餵食 60% HFD 之 WT 與 Rag-1 KO 小鼠體重增加圖及擷取餵食第 0, 5, 10 週之體重。

※每次實驗每組使用 3 隻 C57BL/6J 小鼠（共 2 組）或 Rag-1 KO 小鼠（共 2 組），共 1 次實驗。

（統計方式：2-tailed Student's *t* test，*表示 $p < 0.05$ ）

四、探討後天免疫缺陷在低脂與高脂飲食下對腸道菌叢的影響

同樣探討免疫缺陷讓高脂飲食造成的肥胖更嚴重是否是因為影響到腸道菌叢。延續前面三種菌屬針對後天免疫缺陷在高脂飲食下所誘導之肥胖進行分析，發現普雷沃氏菌屬與後天免疫健全小鼠之結果相同，變化趨勢不明顯（圖四(A₂））。餵食高脂飲食會讓乳桿菌屬比例有增加趨勢（圖四(B₁）），擬桿菌屬比例有減少趨勢（圖四(A₁））。在後天免疫缺陷造成的肥胖增加狀況下，乳桿菌屬比例變更多，擬桿菌屬比例減少更多，腸道菌叢比例失衡現象更加劇烈。實驗數據顯示這兩種菌屬的消長在免疫系統跟肥胖交互影響下，扮演重要角色。



圖四：探討後天免疫缺陷在低脂與高脂飲食下對腸道菌叢的影響

(A) C57BL/6 小鼠與 Rag-1 KO 小鼠糞便中擬桿菌門與隸屬其底下之擬桿菌屬(A₁)、普雷沃氏菌屬(A₂)在低脂與高脂飲食下之比例。

(B) C57BL/6 小鼠與 Rag-1 KO 小鼠糞便中厚壁菌門與隸屬其底下之乳桿菌屬(B₁)在低脂與高脂飲食下之比例。

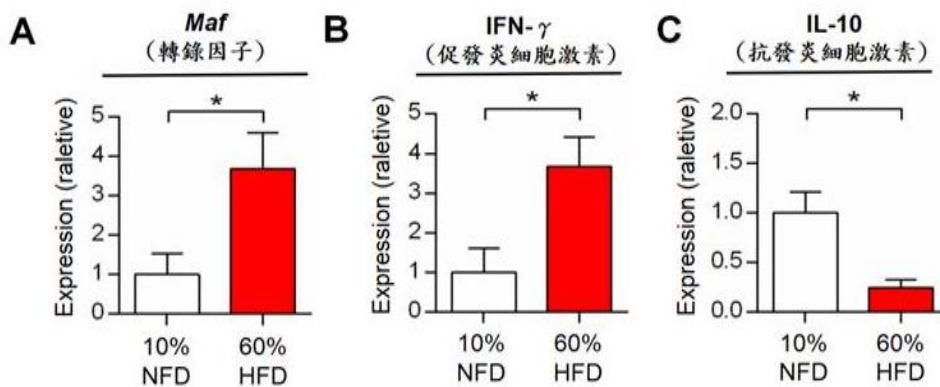
※每次實驗檢測每組 3 隻 C57BL/6J 小鼠（共 2 組）或 Rag-1 KO 小鼠（共 2 組）之糞便樣本，每個樣本檢測 2 次，共 2 次實驗。

（統計方式：2-tailed Student's *t* test，*表示 $p < 0.05$ ）

五、探討在低脂與高脂飲食下對輔助型 CD4⁺ T 細胞中細胞激素的影響

後天免疫細胞是由輔助型 CD4⁺ T 細胞、毒殺型 CD8 T 細胞及製造抗體的 B 細胞組成，因為輔助型 CD4⁺ T 細胞又可分為 Th1 與 Th2 型，Th1 型會促進毒殺型 CD8 T 細胞的毒殺功能，而 Th2 行促進 B 細胞分泌抗體。在後天免疫缺乏症候群中(AIDS)中，CD4⁺ T

細胞受到 HIV 病毒感染而全數瓦解，致使毒殺性 CD8 T 細胞與 B 細胞也完全失去功能，最後造成後天免疫缺陷，顯現了 CD4⁺ T 細胞在後天免疫系細胞中扮演最關鍵的角色。肥胖的產生意味著發炎反應的發生，因此細胞激素中彼此抗衡的促抗炎因子是肥胖產生的重要的因素之一。*Maf* 基因在 CD4⁺ T 細胞中扮演重要的細胞激素轉錄因子，其中包含 IFN- γ 與 IL-10 等，我們鎖定健全小鼠中 CD4⁺ T 細胞中的 *Maf* 轉錄因子、CD4⁺ Th1 表現之 IFN- γ 促炎因子及 IL-10 抗炎因子之表現量變化。純化出小鼠血液中 CD4⁺ T 細胞，並經由 Q-PCR 檢測後，實驗數據顯示，在高脂飲食所誘導之肥胖中的 *Maf* 轉錄因子有明顯的表現量增加（圖五(A)）。而受其調控之 IFN- γ 促炎因子表現量增加（圖五(B)），IL-10 抗炎因子表現量減少（圖五(C)）。



圖五：探討在低脂與高脂飲食下對輔助型 CD4⁺ T 淋巴細胞中對細胞激素的影響

(A) *Maf* 轉錄因子之基因表現量。

(B) IFN- γ 促炎因子之基因表現量。

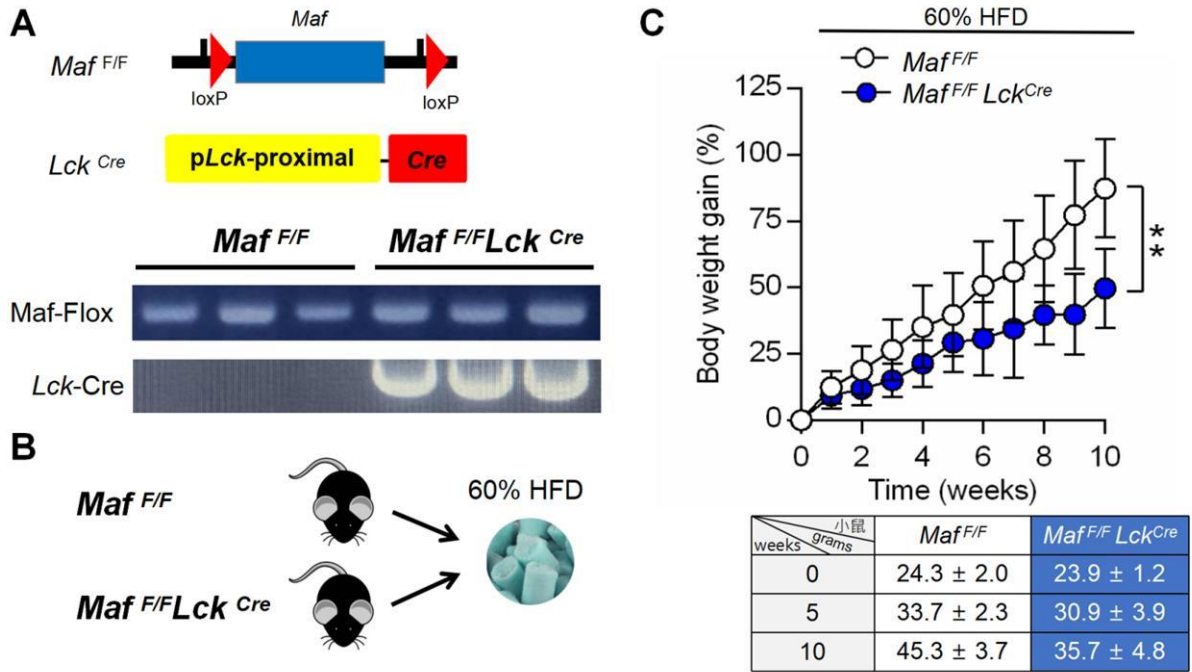
(C) IL-10 抗炎因子之基因表現量。

※每次實驗檢測每組 3 隻 C57BL/6J 小鼠（共 3 組）血液樣本，每個樣本檢測 2 次，共 1 次實驗。

（統計方式：2-tailed Student's *t* test，*表示 $p < 0.05$ ）

六、探討 *Maf* 基因缺失對肥胖的影響

Maf 轉錄因子 (proto-oncogene c-Maf, V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog) 在白色脂肪組織 (WAT) 中扮演了調控血管周圍巨噬細胞的重要角色，而間接影響了促使脂肪炎症發生的細胞，在先天免疫細胞中 *Maf* 剔除對肥胖的產生抑制效果 (Hernandez, M.S. 等, 2021)。而我們好奇在後天免疫細胞中 *Maf* 基因缺失對肥胖有什麼影響，又 CD4⁺ T 細胞在後天免疫細胞中扮演最關鍵角色，因此鎖定 CD4⁺ T 細胞進行專一性 *Maf* 基因剔除。我們使用 T 細胞專一性 *Maf* 基因剔除之 C57BL/6J 小鼠進行實驗，此模型利用 Cre-loxP 重組系統進行條件式剔除 *Maf* 基因：同時加入 loxP 基因段與 T 細胞組織專一性的 *Lck^{Cre}* 重組酶基因，則可以產生 T 細胞專一性 *Maf* 基因剔除之效果 (圖六(A))。我們想探討 *Maf* 基因剔除在高脂飲食誘導之肥胖情況中對體重有何影響，因此皆餵食 *Maf^{FF}* 小鼠 (*Maf* 未剔除) 與 *Maf^{FF} Lck^{Cre}* 小鼠 (*Maf* 已剔除) 60% HFD, *Maf^{FF}* 小鼠每組 5 隻, *Maf^{FF} Lck^{Cre}* 小鼠每組 6 隻, 共兩組 (圖六(B))。在餵食高脂飲食下, *Maf^{FF} Lck^{Cre}* 組之小鼠體重增加百分比明顯較未剔除組減少, 且餵食高脂飲食的時間越長, 體重增加百分比差異越大, 至飼養第 10 週時體重增加百分比已差距近 40% (*Maf^{FF}*: 86.8%; *Maf^{FF} Lck^{Cre}*: 48.4%) (圖六(C))。由此趨勢推測 *Maf* 基因剔除在食用高脂飲食情況下對肥胖的增加有抑制效果, 且在此狀態下越久其抑制效果越佳, 顯示 T 細胞中的轉錄因子 *Maf* 在調控免疫系統及肥胖的增加扮演重要角色。



圖六：探討 *Maf* 基因缺失對肥胖的影響

(A) 利用 Cre-loxP 系統進行條件式剔除 *Maf* 基因製作 T 細胞專一性 *Maf* 基因剔除模型。

(B) *Maf*^{F/F} 小鼠與 *Maf*^{F/F} *Lck*^{Cre} 小鼠分組，皆餵食 60% HFD，共 2 組。

(C) 10 週內餵食 60% HFD 之 *Maf*^{F/F} 小鼠與 *Maf*^{F/F} *Lck*^{Cre} 小鼠體重增加百分比及擷取飼養第 0, 5, 10 週之體重。

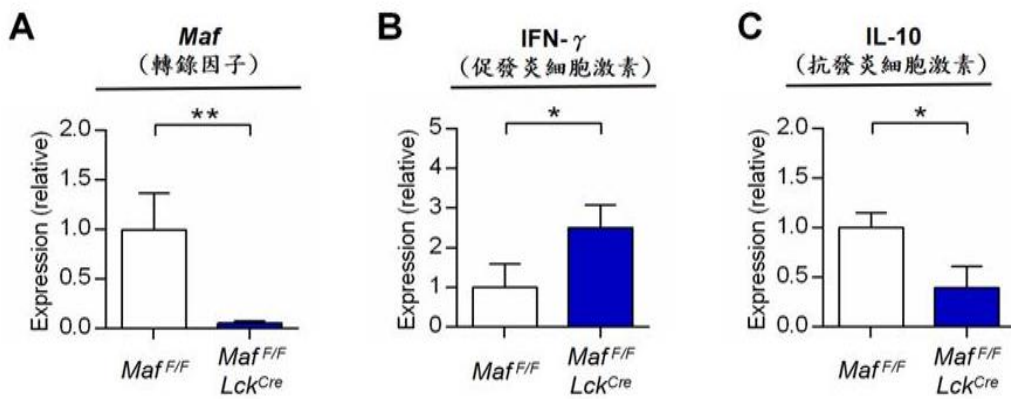
※每次實驗使用 *Maf*^{F/F} 小鼠每組 5 隻（共 1 組），*Maf*^{F/F} *Lck*^{Cre} 小鼠每組 6 隻（共 1 組），共 1 次實驗。

（統計方式：2-tailed Student's *t* test，**表示 $p < 0.01$ ）

七、探討 *Maf* 基因剔除在低脂與高脂飲食下對輔助型 CD4⁺ T 細胞中細胞激素的影響

純化出小鼠血液中 CD4⁺ T 細胞，並經由 Q-PCR 檢測後，實驗數據顯示，*Maf* 基因缺陷在高脂飲食所誘導之肥胖中的 *Maf* 轉錄因子幾乎無表現量（圖七(A)）。而受其調控之

IL-10 抗炎因子表現量增加 (圖七(B))，IFN- γ 促炎因子表現量減少 (圖七(C))。



圖七：探討 *Maf* 基因缺失在高脂飲食下對 T 細胞中細胞激素的影響

(A) *Maf* 轉錄因子之基因表現量變化。

(B) IFN- γ 促炎因子之基因表現量變化。

(C) IL-10 抗炎因子之基因表現量變化。

※每次實驗檢測 *Maf^{F/F}* 小鼠每組 5 隻 (共 1 組)，*Maf^{F/F} Lck^{Cre}* 小鼠每組 6 隻 (共 1 組) 之血液樣本，每個樣本檢測 2 次，共 1 次實驗。

(統計方式：2-tailed Student's *t* test，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$)

伍、結論

一、脂肪熱量佔比之小鼠模型實驗

- (一) 由不同佔比飼料餵食小鼠實驗中可發現高脂飲食對促進肥胖的產生是關鍵因素。
- (二) 高脂飲食明顯提高厚壁菌門乳桿菌屬之比例；降低擬桿菌門擬桿菌屬之比例。
- (三) 在高脂飲食環境下在 CD4⁺ T 淋巴細胞中 *Maf* 轉錄因子表現增加，且促進 IFN- γ 表現、抑制 IL-10 表現。

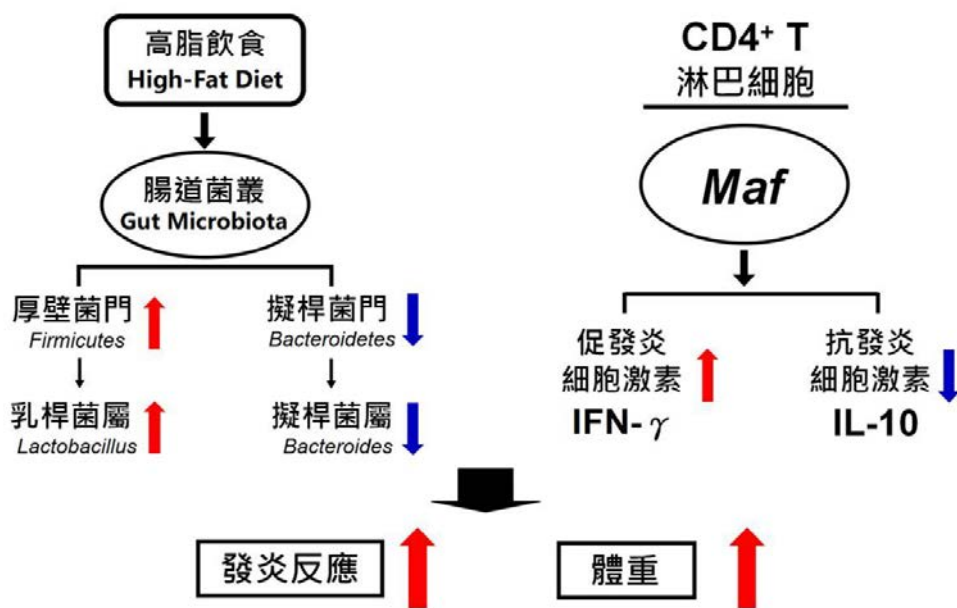
二、後天免疫缺陷小鼠模型實驗

- (一) 在後天免疫缺陷模擬實驗中，藉由餵食低脂與高脂飼料後記錄其體重可發現食用高脂飲食更加促進肥胖產生。
- (二) 後天免疫缺陷加劇了厚壁菌門乳桿菌屬之增加及擬桿菌門擬桿菌屬之減少。

三、*Maf*基因缺陷小鼠模型實驗

- (一) *Maf* 基因缺失在高脂飲食下有抑制體重增加之效果。
- (一) *Maf* 轉錄因子在 CD4⁺ T 淋巴細胞中表現幾乎消失，其抑制 IFN- γ 表現、促進 IL-10 表現。

綜合以上，高脂飲食對腸道菌叢及細胞激素皆有影響，其在免疫細胞之影響更扮演誘導肥胖之關鍵角色；而 *Maf* 基因缺陷具有抑制高脂飲食產生之肥胖的效果，確實有望成為治療肥胖之新標的。



陸、參考文獻資料

NCD Risk Factor Collaboration. (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*, 387(10026), 1377-1396.

Tsai, Y. W., Fu, S. H., Dong, J. L., Chien, M. W., Liu, Y. W., Hsu, C. Y., & Sytwu, H. K. (2020). Adipokine-Modulated Immunological Homeostasis Shapes the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9564.

Zou, W., & Restifo, N. P. (2010). TH 17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 10(4), 248-256.

Imbratta C, Hussein H, Andris F, Verdeil G.(2020).c-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes. *Front Immunol*.Feb 14;11:206.

Hernandez, M. S., Jamil, Z. K., Camila, P. Q., Lina, K., Fanny, M., Katharine, L.Y.,Christine Ren-Fielding, Dan, R. L., Marcelo, T. B., Daniel, M., Juan José Lafaille (2021). c-MAF dependent perivascular macrophages regulate diet induced metabolic syndrome. *Science Immunology*, 6(64).

【評語】 052009

利用基因剔除鼠發現，後天免疫缺陷對高脂飲食誘導肥胖有助長趨勢，且 T 淋巴細胞中轉錄因子 Maf 和促發炎因子 IFN- γ 之增加與肥胖產生有正相關，若將 Maf 基因剔除則可促進抗發炎因子 IL-10 增加並抑制肥胖，證實未來在醫療上可利用 Maf 基因作為肥胖治療之新標靶並開發免疫治療策略。 研究目的

- 一、 高脂飲食誘導之肥胖對腸道菌叢及細胞激素之影響
- 二、 後天免疫細胞對高脂飲食環境下產生之肥胖及腸道菌叢之影響
- 三、 T 淋巴細胞中 Maf 基因對發炎因子之影響，藉此尋找成為治療肥胖之新免疫標靶
 1. 除了 Maf 基因缺失在高脂飲食下對 T 細胞中細胞激素的影響 之外， Maf 基因缺失如何影響到肥胖相關的基因呢？
 2. MafB deficiency accelerates the development of obesity in mice (FEBS Open Bio. 2016 Jun; 6(6): 540 – 547.) Maf 基因缺失在高脂飲食下有抑制體重增加之效果。和此次的結果是否一致？ 應該增加一組，Maf 基因缺失在正常飲食的對照組。

3. 在後天免疫 Rag-1 KO mice 造成的肥胖增加狀況下，乳桿菌屬比例變更多，擬桿菌屬比例減少更多，這些腸道菌叢如何影響肥胖？
4. 後天免疫缺陷 Rag-1 KO mice 確實有促進肥胖產生的趨勢，後天免疫系統如何影響肥胖？

作品簡報

以基因剔除小鼠模式剖析腸道菌叢與T淋巴細胞 在高脂飲食所誘導肥胖中之功能性連結

Functional dissection of the linkage between gut microbiota and T lymphocytes
in high-fat-diet-induced obesity by using genetic deficiency mouse models

作品編號：052009

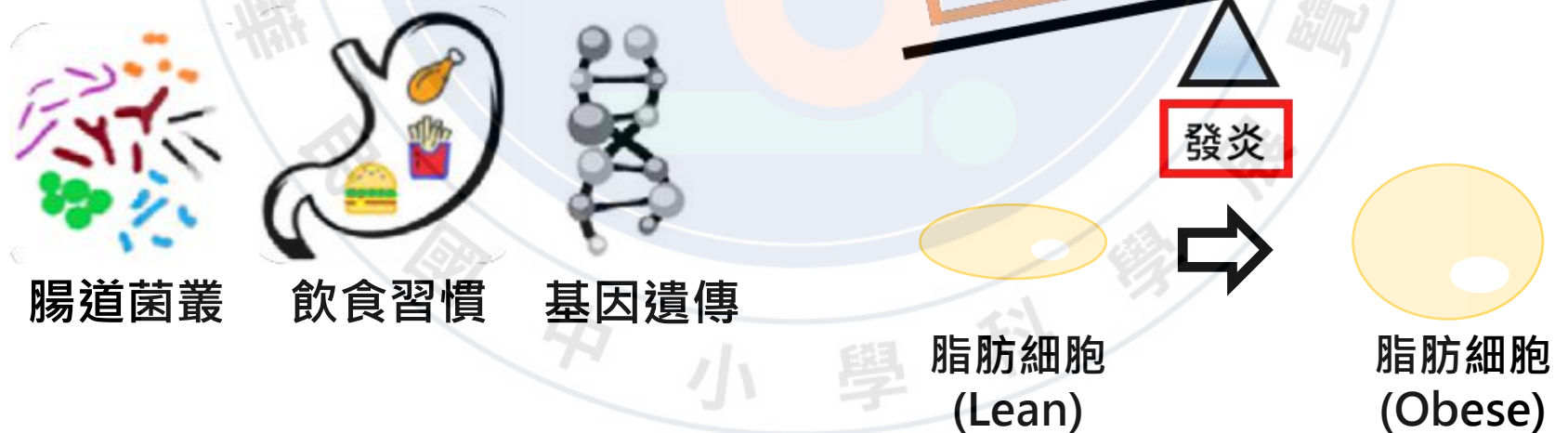
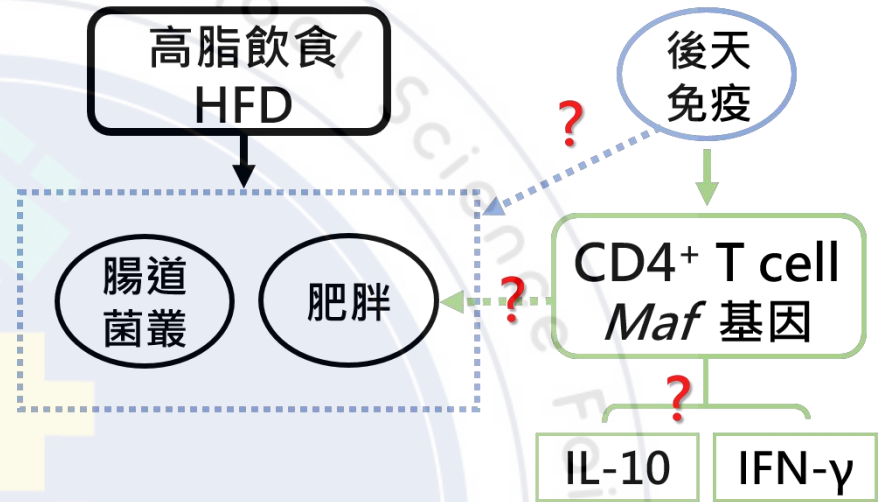
科 別：動物與醫學學科

組 別：高級中等學校組

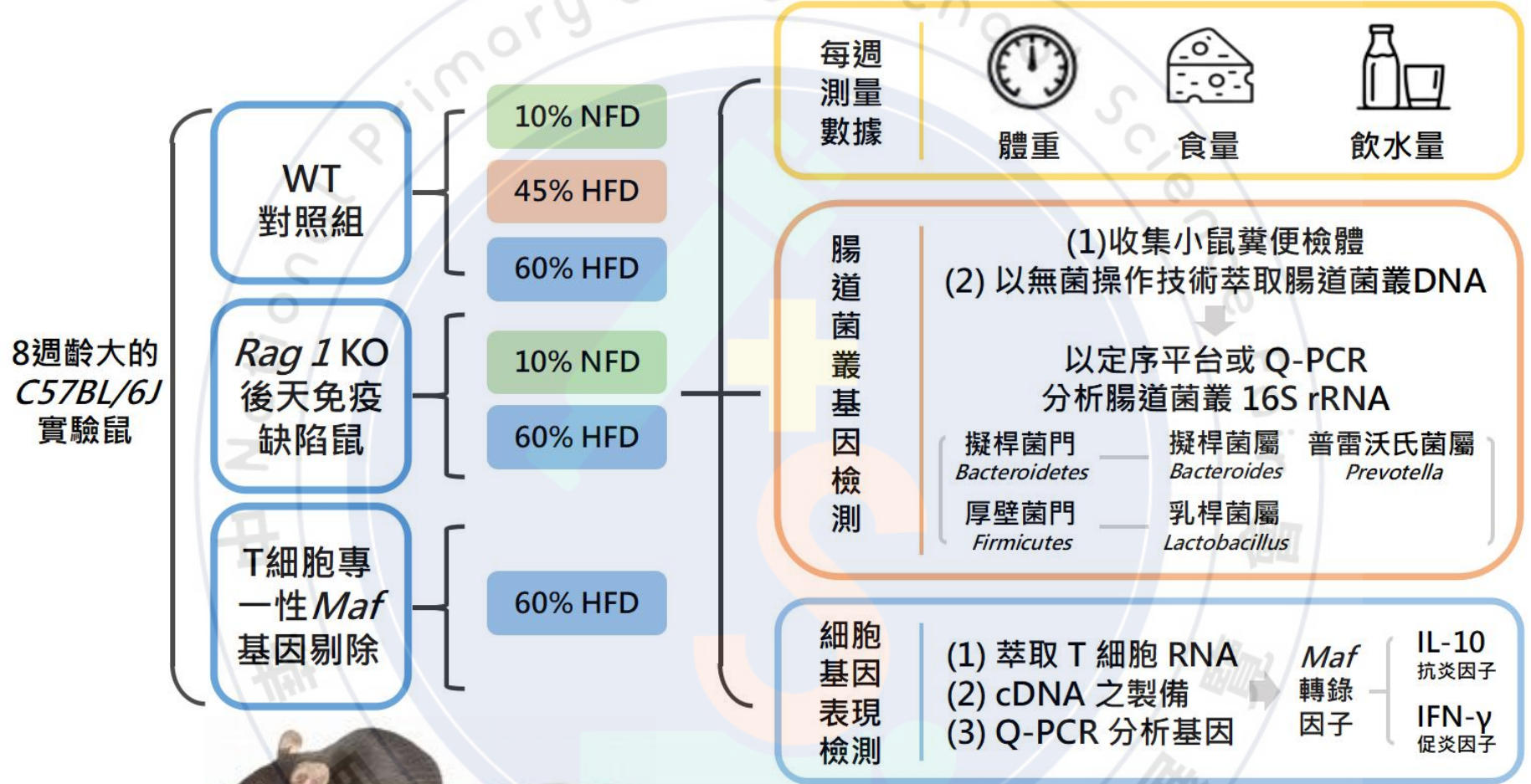
研究動機

實驗目標

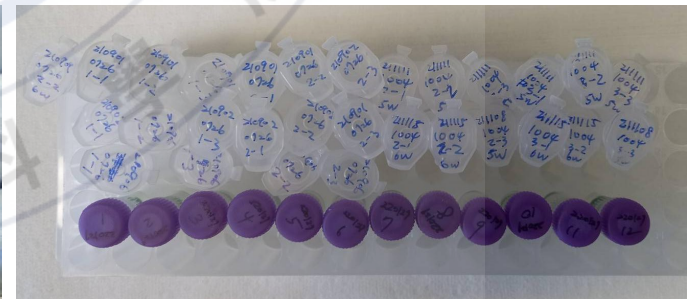
- 一、脂肪細胞受到腸道菌叢、飲食習慣及遺傳基因的影響。
- 二、脂肪細胞、T細胞分泌之細胞激素與腸道菌叢會互相拮抗平衡。免疫系統被破壞後導致腸道菌叢失衡或是不同亞群之T細胞產生不同細胞激素，導致發炎引起肥胖。
- 三、已知：基因遺傳與肥胖的相關性與重要性有不少研究證實。
- 四、後天免疫系統對肥胖與腸道菌叢的影響尚未被釐清。



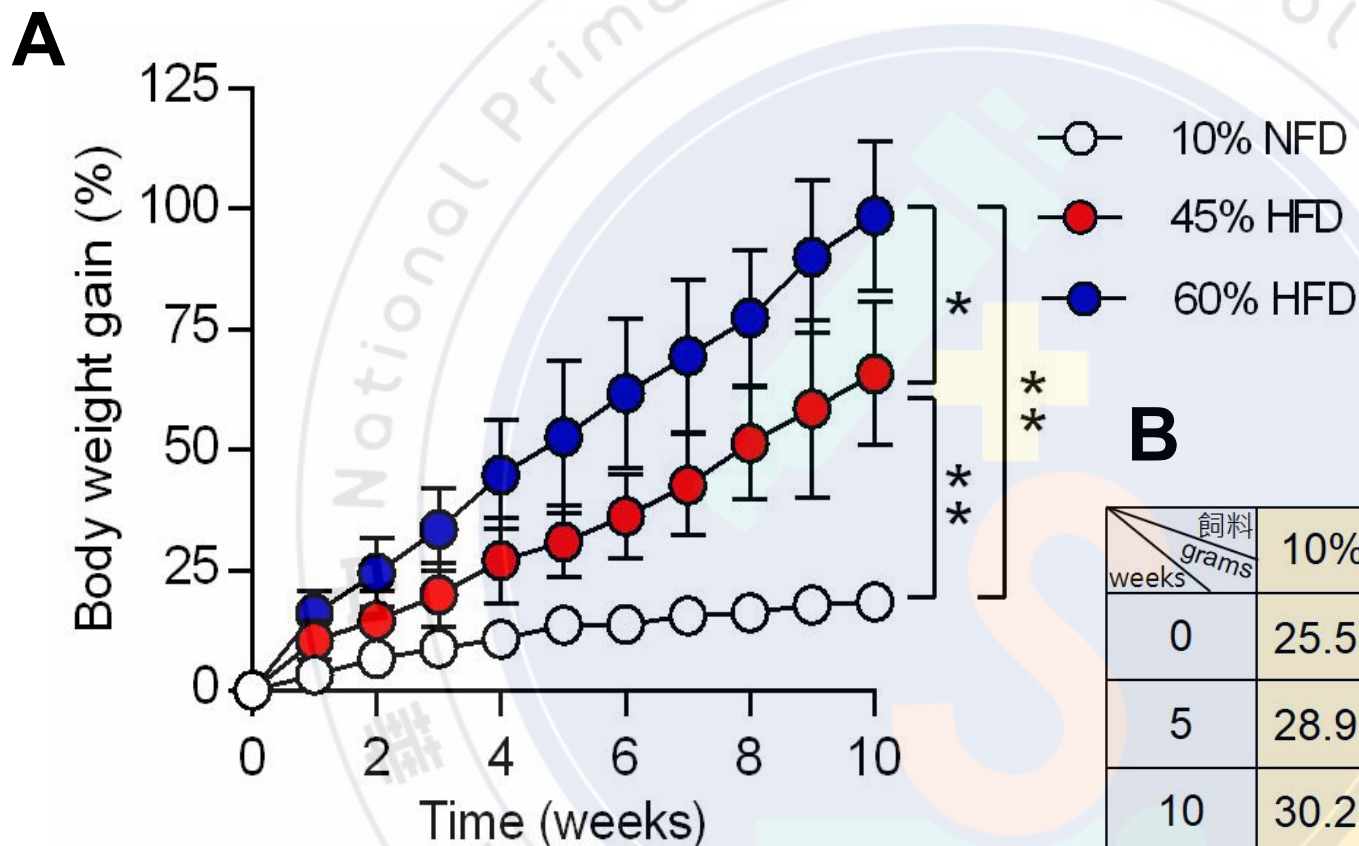
實驗過程



10% NFD 45% HFD 60% HFD



實驗結果-1: 探討高脂飲食對肥胖的影響



B

飼料 grams weeks	10% NFD	45% HFD	60% HFD
0	25.5 ± 1.1	23.3 ± 0.5	22.9 ± 0.9
5	28.9 ± 1.3	30.5 ± 2.1	35.7 ± 2.8
10	30.2 ± 1.8	38.6 ± 4.2	45.5 ± 3.9

Figure legend:

(A)10週內 C57BL/6J小鼠體重增加百分比。(B)擷取飼養第0, 5, 10週之體重。

(統計方式: one-way ANOVA with Tukey's post test, *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$)

結論

高脂飲食是肥胖產生的關鍵的因素

實驗結果-2: 探討高脂飲食對腸道菌叢的影響

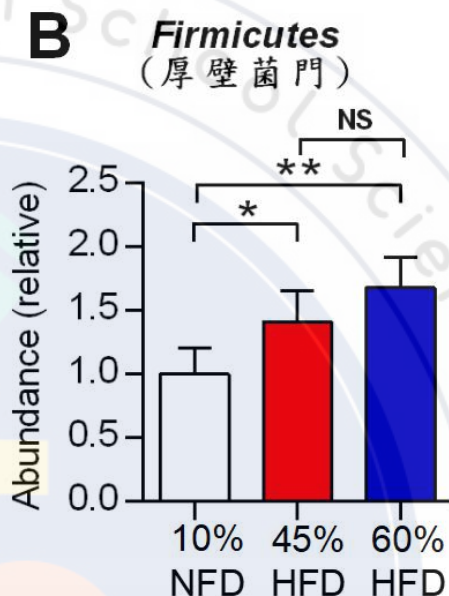
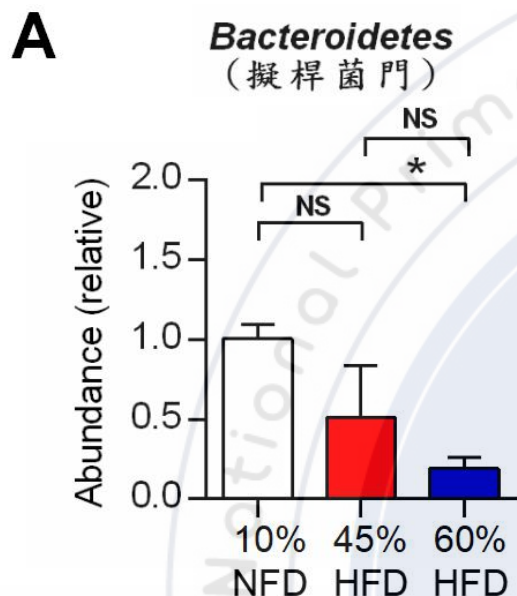
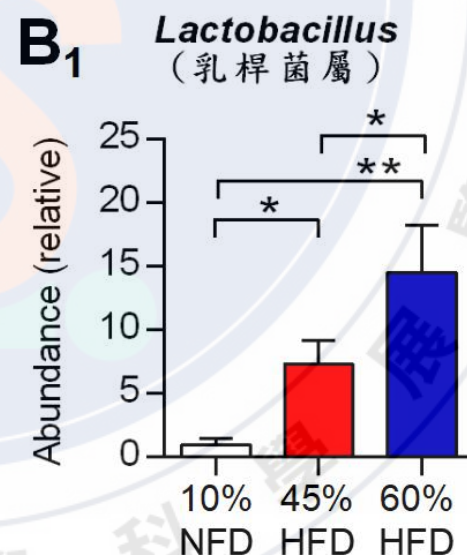
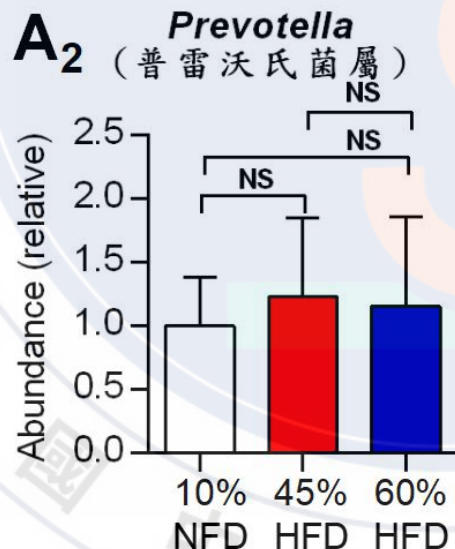
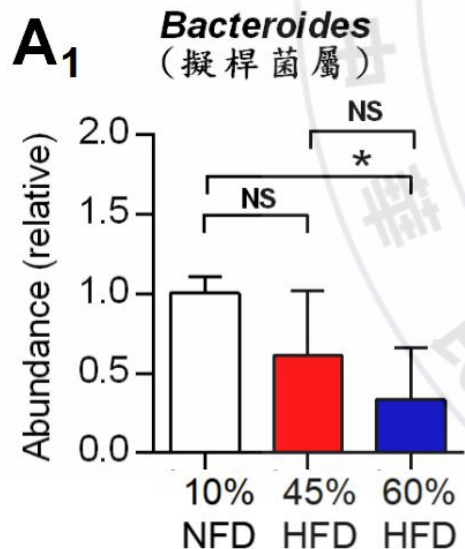


Figure legend:

(A) 擬桿菌門與隸屬其底下之擬桿菌屬(A₁)、普雷沃氏菌屬(A₂)在低脂與高脂飲食下之比例。

(B) 厚壁菌門與隸屬其底下之乳桿菌屬(B₁)在低脂與高脂飲食下之比例。

(統計方式: 2-tailed Student's *t* test · *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$)



結論

高油脂攝取會使擬桿菌屬比例變少而乳桿菌屬比例增加

實驗結果-3: 探討後天免疫缺陷對高脂飲食誘導肥胖影響

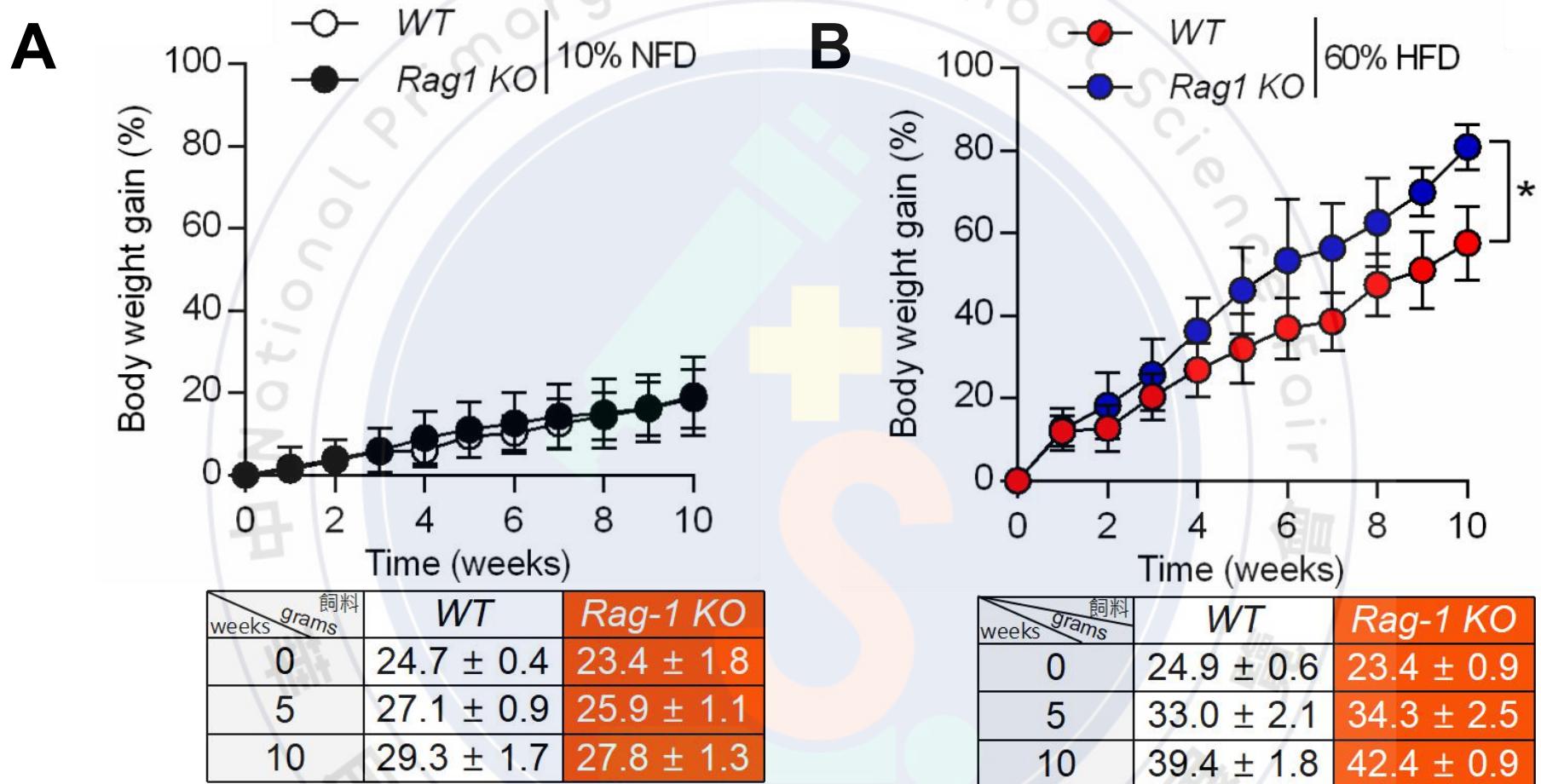


Figure legend:

(A)(B) 10週內餵食10% NFD及60% HFD之WT與 Rag-1 KO小鼠體重增加圖及擷取餵食第0, 5, 10週之體重。
(統計方式: 2-tailed Student's t test, *表示p<0.05)

結論

推論後天免疫系統在肥胖產生過程中扮演重要的控制角色

實驗結果-4: 後天免疫缺陷在高脂飲食對腸道菌叢之影響

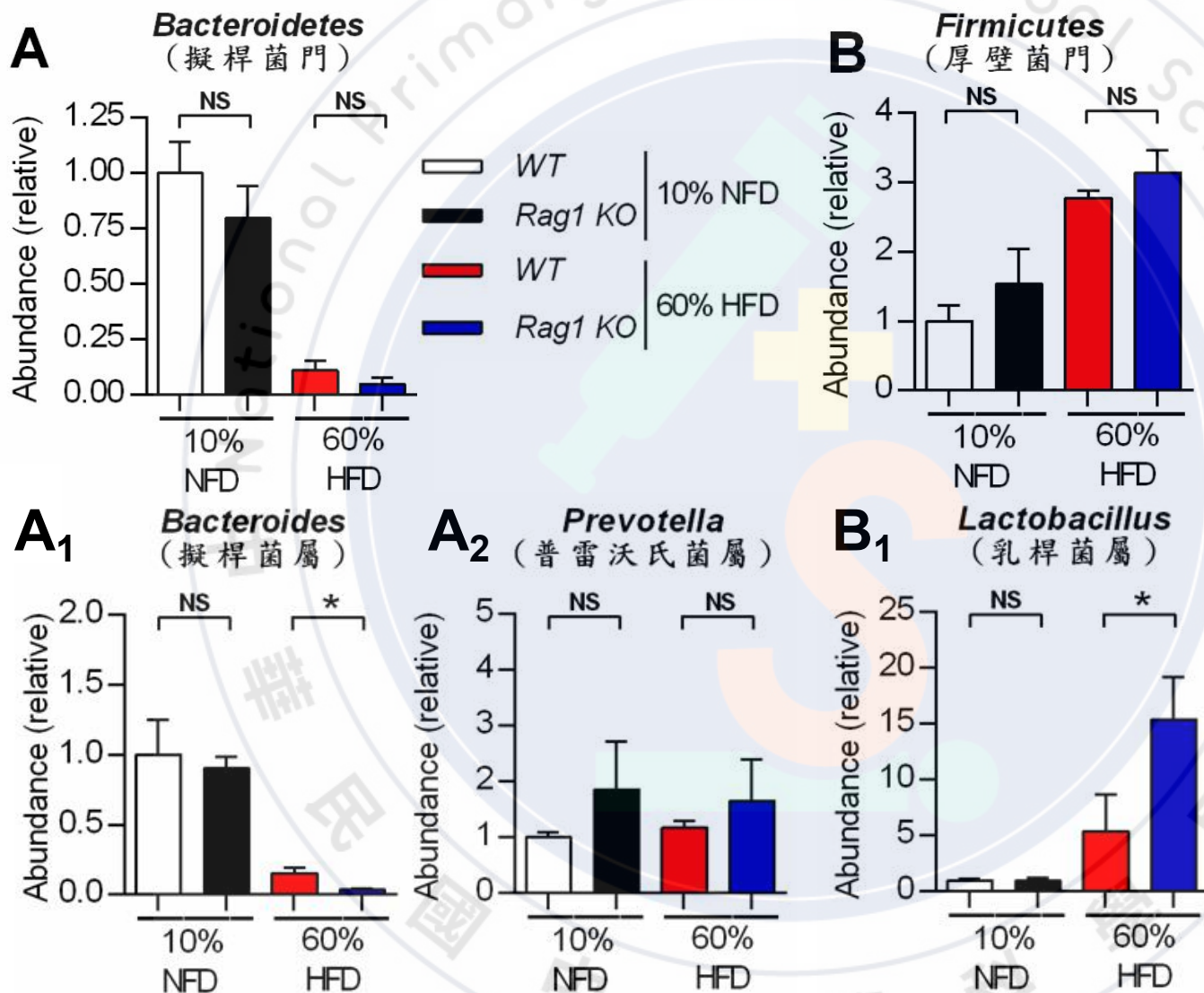


Figure legend:
 (A) C57BL/6 小鼠與 Rag-1 KO 小鼠糞便中擬桿菌門與隸屬其底下之擬桿菌屬(A₁)、普雷沃氏菌屬(A₂)在低脂與高脂飲食下之比例。
 (B) C57BL/6 小鼠與 Rag-1 KO 小鼠糞便中厚壁菌門與隸屬其底下之乳桿菌屬(B₁)在低脂與高脂飲食下之比例。
 (統計方式: 2-tailed Student's t test, *表示 p<0.05)

結論 後天免疫缺陷造成肥胖增加，而腸道菌叢比例變化更加劇烈

實驗結果-5: 高脂飲食對輔助型T淋巴細胞中細胞激素影響

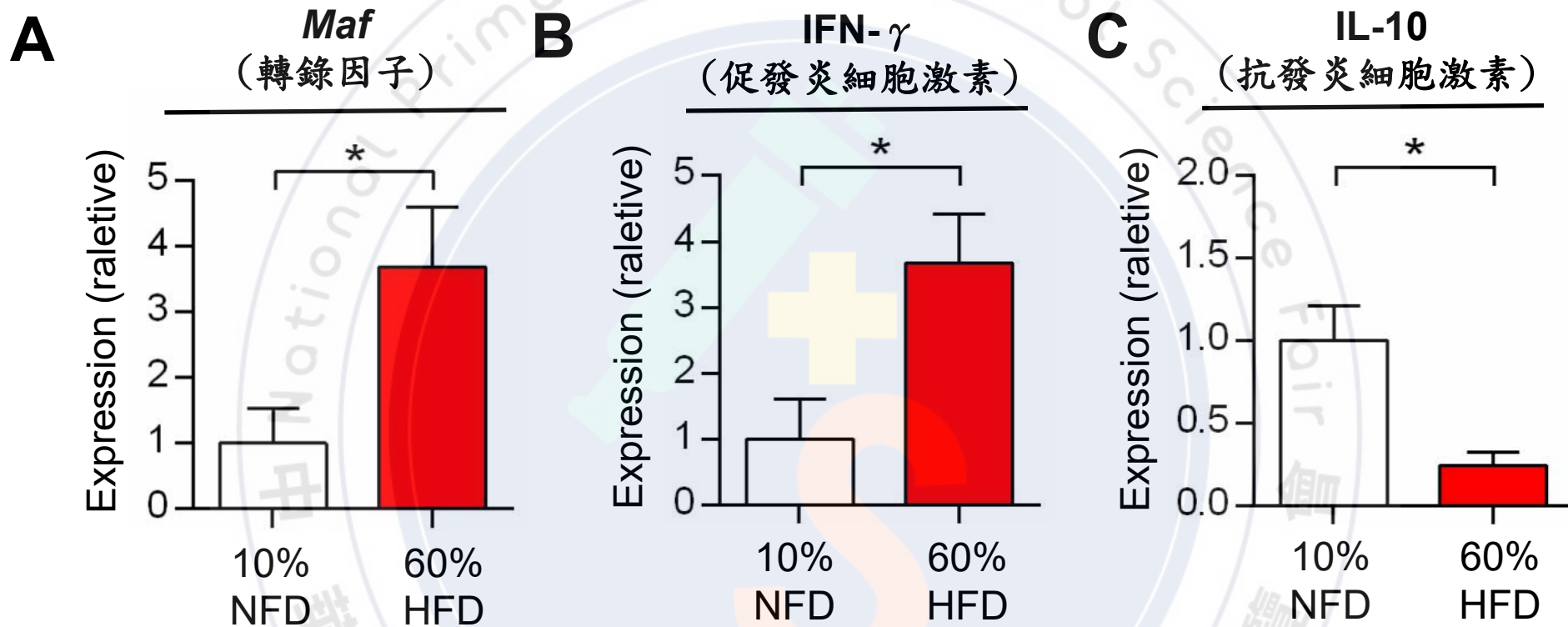


Figure legend:

(A) *Maf* 轉錄因子之基因表現量變化。 (B) IFN- γ 促炎因子之基因表現量變化。 (C) IL-10 抗炎因子之基因表現量變化。(統計方式: 2-tailed Student's *t* test, *表示 $p < 0.05$)

結論

高脂飲食會使 *Maf* 轉錄因子表現量增加而受其調控之 IFN- γ 促炎因子表現量增加, IL-10 抗炎因子表現量減少

實驗結果-6: 探討 *Maf* 基因缺陷在高脂飲食對肥胖的影響

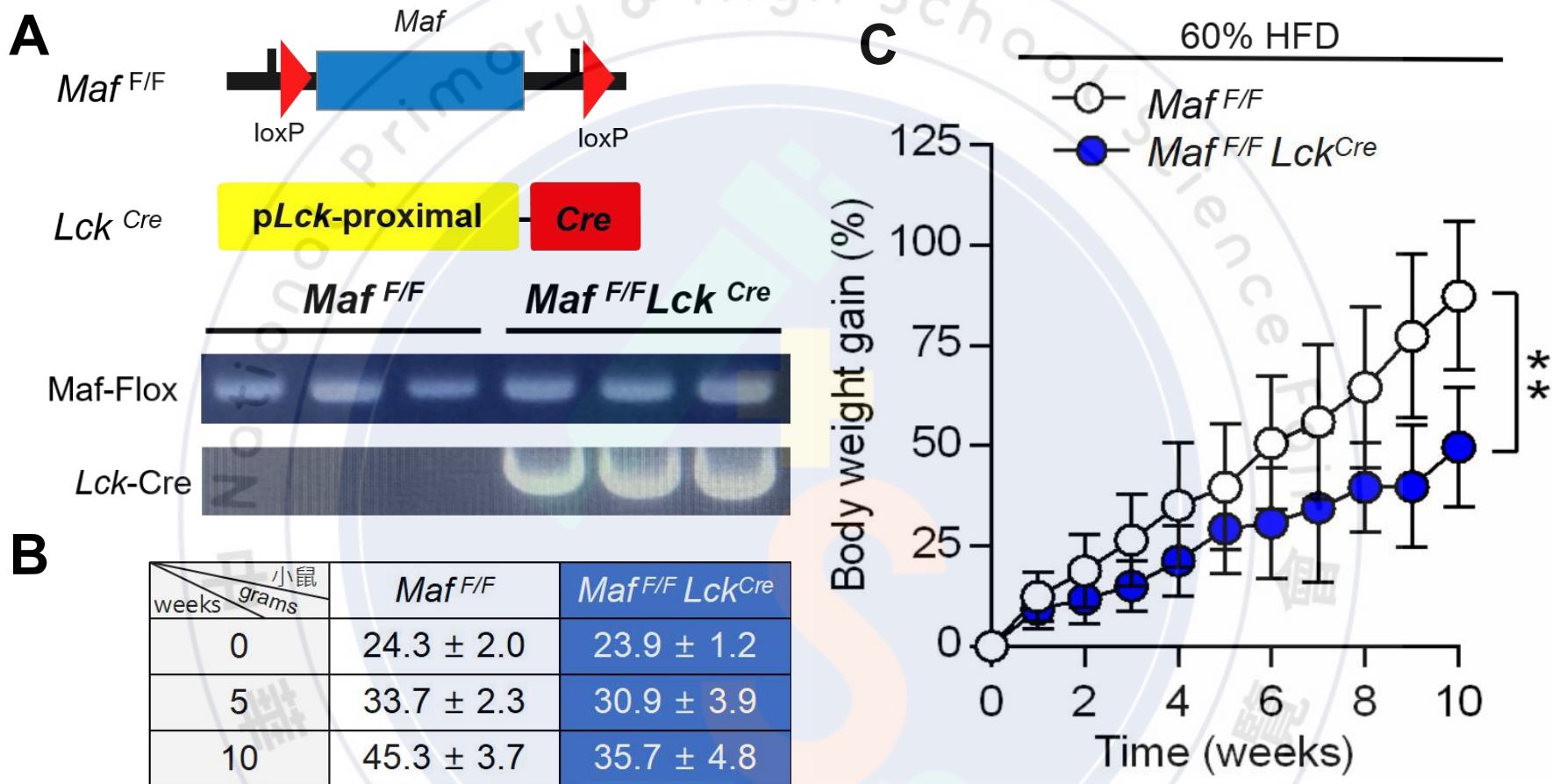


Figure legend:

(A) 利用Cre-loxP系統進行條件式剔除*Maf*基因製作T細胞專一性*Maf*基因剔除模型。

(B) 擷取飼養*Maf^{F/F}*小鼠與*Maf^{F/F} Lck^{Cre}*小鼠第0, 5, 10週之體重。

(C) 10週內餵食60% HFD小鼠體重增加百分比。(統計方式: 2-tailed Student's t test, **表示 $p < 0.01$)

結論

*Maf*基因剔除在高脂飲食環境下對肥胖的增加有抑制的效果

實驗結果-7: 探討 *Maf* 基因缺陷在高脂飲食下對輔助型T淋巴細胞中細胞激素影響

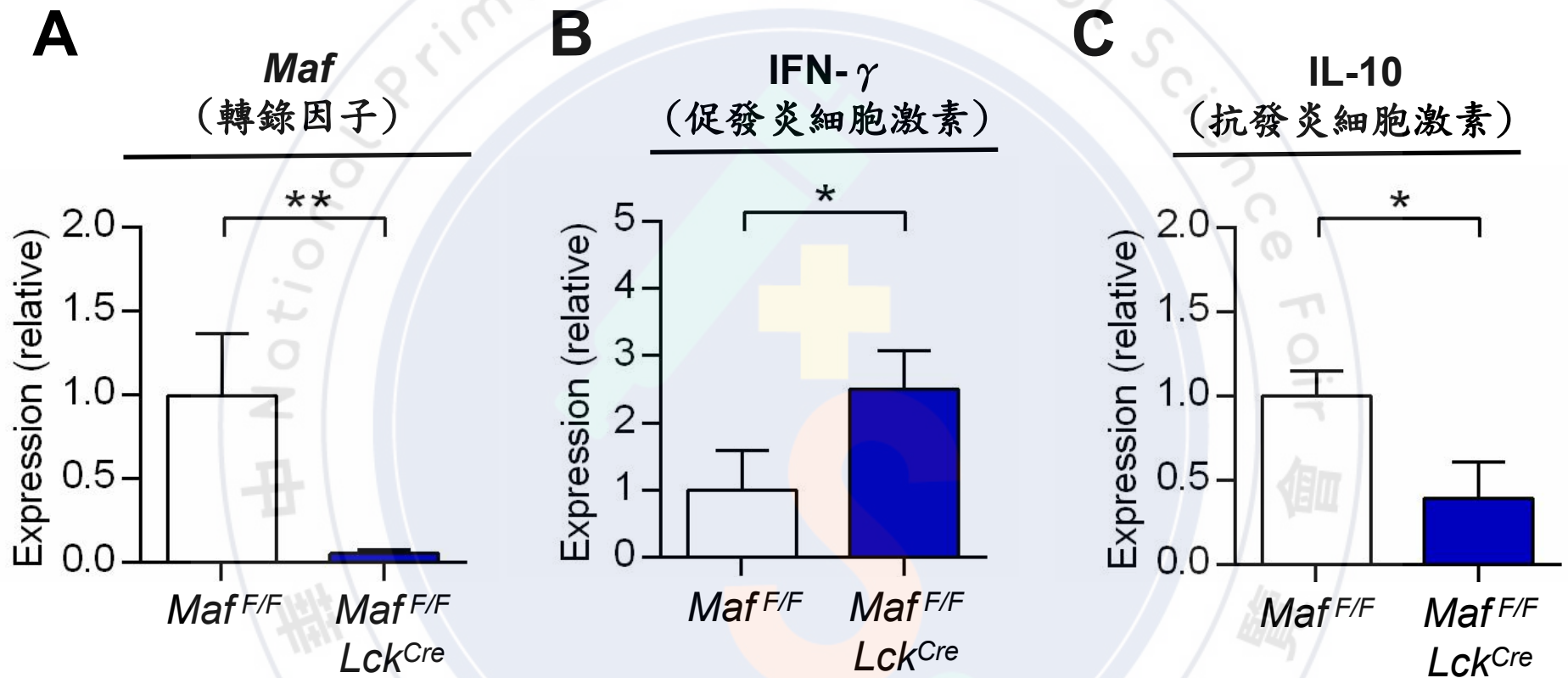


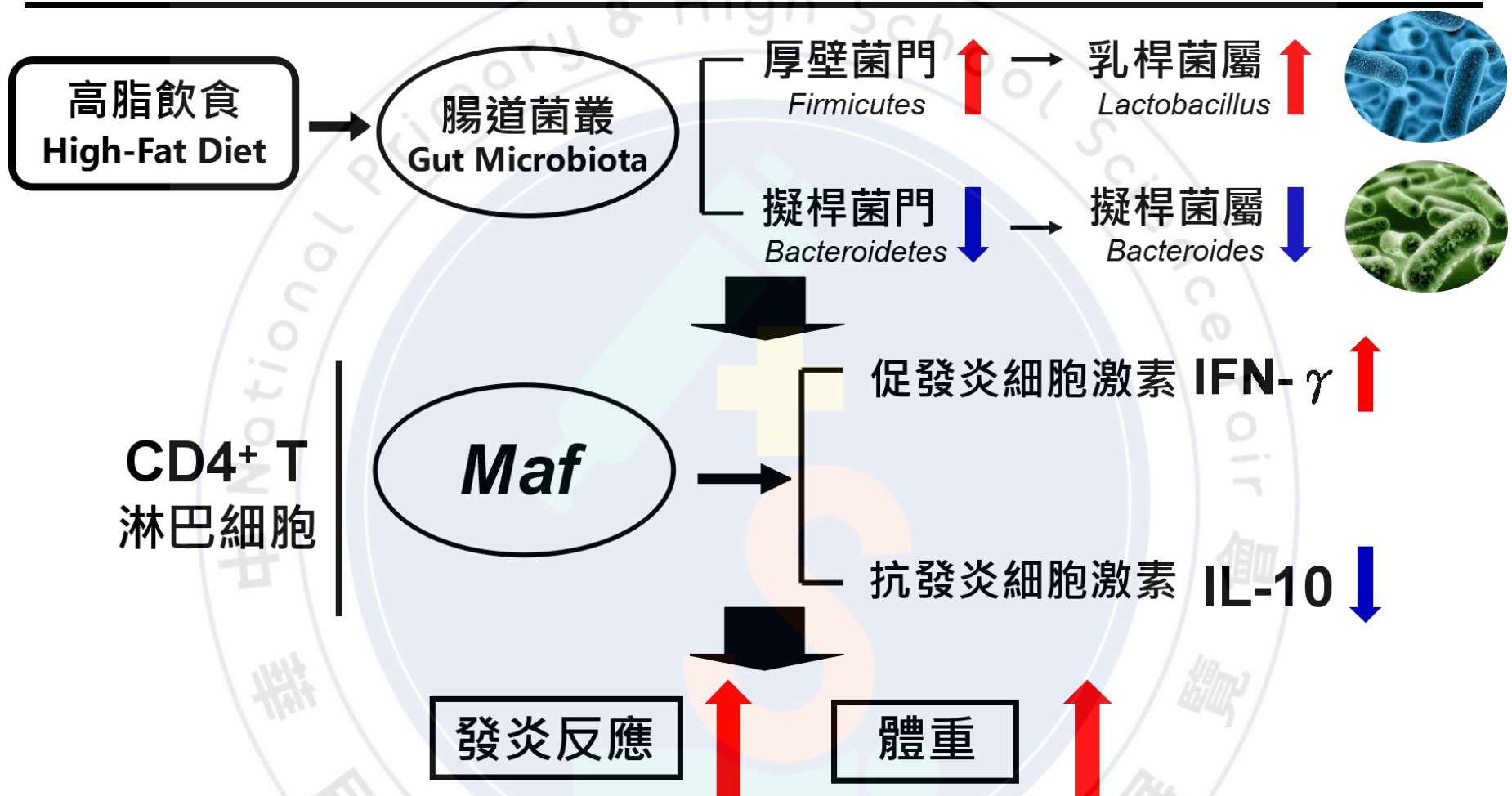
Figure legend:

(A) *Maf* 轉錄因子之基因表現量變化。(B) IFN- γ 促炎因子之基因表現量變化。(C) IL-10 抗炎因子之基因表現量變化。(統計方式: 2-tailed Student's t test, *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$)

結論

T細胞專一性 *Maf* 轉錄因子剔除可使 IL-10 抗炎因子增加，IFN- γ 促炎因子表現量減少。

結論



1. 在小鼠模式發現從低脂到高脂飲食促進擬桿菌門與厚壁菌門產生消長，並促進擬桿菌屬隨脂肪熱量佔比之提升而減少與促進乳桿菌屬增加；此兩種菌屬的消長在免疫系統跟肥胖交互影響下扮演重要角色
2. 利用基因剔除鼠發現後天免疫缺陷對高脂飲食誘導肥胖有助長趨勢以及T細胞中 *Maf* 轉錄因子及IFN- γ 促發炎因子表現增加與肥胖產生有關聯，若將 *Maf* 基因剔除可促進抗發炎因子IL-10增加並對於肥胖有抑制效果

未來應用

對 *Maf* 基因提供更進一步的研究參考，未來在醫療上可利用對 *Maf* 基因的抑制，進而增加抗炎因子表現、減少發炎，為肥胖症帶來可望治療新標靶並開發免疫治療策略。

參考資料

1. NCD Risk Factor Collaboration. (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*, 387(10026), 1377-1396.
2. Tsai, Y. W., Fu, S. H., Dong, J. L., Chien, M. W., Liu, Y. W., Hsu, C. Y., & Sytwu, H. K. (2020). Adipokine-Modulated Immunological Homeostasis Shapes the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9564.
3. Zou, W., & Restifo, N. P. (2010). TH 17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 10(4), 248-256.
4. Imbratta C, Hussein H, Andris F, Verdeil G. c-MAF, a Swiss Army Knife for Tolerance in Lymphocytes. *Front Immunol*. 2020 Feb 14;11:206.
5. Hernandez, M. S., Jamil, Z. K., Camila, P. Q., Lina, K., Fanny, M., Katharine, L.Y., Christine Ren-Fielding, Dan, R. L., Marcelo, T. B., Daniel, M., Juan José Lafaille (2021.10). c-MAF dependent perivascular macrophages regulate diet induced metabolic syndrome. *Science Immunology*, 6(64)