

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：動物學科

作品名稱：Ethidium Bromide 對 p53 基因缺陷老鼠致癌影響

學 校：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作 者：徐瑛檀

謝承展

作者簡介



※圖左為徐瑛檀，右為謝承展

謝承展

1986年3月31日生於台北，新湖國小、三民國中畢業，國二時跳級進入師大附中數理實驗班就讀，喜愛自然學科，特別是細胞生理、分子生物及量子力學等方面。曾獲全國生物科能力競賽二等獎，遠哲科學趣味競賽與同學合作獲校內第一名。高二因學校安排「專題研究」時間，因此和徐瑛檀一同至中研院分生所，在楊性芳老師的實驗室一同做實驗，因而完成了此次的作品。

徐瑛檀

1984年11月15日生於台北，敦化國小、敦化國中畢業，現就讀於附中數理實驗班。喜愛數學及自然學科，特別是生物技術及生物醫學方面。曾獲環球城市數學競賽二等獎，遠哲科學趣味競賽與同學合作

獲校內第一名。高二因學校安排「專題研究」時間，因此和謝承展一同至中研院分生所，在楊性芳老師的實驗室一同做實驗，因而完成了此次的作品。

英文摘要：

p53 is a transcription factor that plays an important role in suppression of tumorigenesis. Previous reports showed it regulates cell cycle and enhances cell apoptosis by effecting specific proteins expression. By this way, the problematic tumor cell can be deleted to protect organism from tumor damage.

According above conclusion, we are interested to know whether p53 plays a role involved the carcinogens-EtBr induced tumorigenesis. We compared the differences of tumorigenesis between mice express normal (p53+/+) or low (p53+/-) expression level of p53 proteins when they are smeared equal amount of EtBr on skin of thigh. In here, our results show three of fourteen p53+/- mice had pathological changes, containing spleen enlargement and lymphoma. However, other three comparisons, smear p53+/+ mice with EtBr (1), without EtBr (2) or p53+/- without EtBr(3), are normal. Therefore, We suggest that p53+/- mice are easily to obtain tumor than p53+/+ mice after EtBr treatment.

中文摘要：

p53 蛋白是一種轉錄調控因子，其在抑制癌症的形成扮演很重要的角色。已知的報告顯示它能影響下游特定蛋白表現進而調控細胞週期或促使細胞進行凋亡作用。如此作用機制對於可能癌化的細胞在生物體造成傷害之前能被先行消滅，因此正常的 p53 蛋白存在與否，對癌症的產生有很大的影響。

根據上述結果，我們想分析不同表現量的 p53 是否對於致癌藥劑-EtBr 所引發的癌化細胞有所影響。所以我們設計實驗，將具有正常表現量 p53 蛋白的老鼠 (p53+/+)與僅能表現少量 p53 蛋白的老鼠(p53+/-)，均塗以等劑量之致癌藥劑 EtBr 於其大腿皮膚上，觀察其致癌情形的差異。實驗結果發現：在塗 EtBr 的 14 隻 p53+/-老鼠中，有 3 隻出現了組織病變的症狀，包括脾臟腫大，淋巴組織長出腫瘤，而其他對照組(一)塗 EtBr 的 p53+/+老鼠，(二)不塗 EtBr 的 p53+/+老鼠或(三)不塗 EtBr 的 p53+/-老鼠都沒有產生異常的症狀。因此根據上述實驗結果進行推論，發現經 EtBr 的刺激後，p53+/-的老鼠的確較其他的老鼠更容易得到癌化細胞。

前言

壹、p53 蛋白

p53 蛋白是由 p53 基因所製造,由四個或更多 p53 蛋白分子組成具有功能的大單元，目前已知此大單元之 p53 蛋白若含有在癌細胞內發現之變異種分子，則整個 p53 大分子將不具原來功能。p53 +/− 老鼠兩條染色體的其中一條上的 p53 基因是以基因剔除法剔除的，此種老鼠只會產製正常老鼠一半量之 p53 蛋白。已知實驗證實 p53 +/− 的老鼠較 wild type 的老鼠容易罹患癌症 顯示 P53 蛋白對癌症的生成抑制扮演重要角色。

現已知 p53 會結合到 DNA 上，屬於基因轉錄（transcription）分子的一種；可開啓 Cipl 基因轉錄作用，產生一種 21 千道耳頓的蛋白，此 p21 白可以和 cdk 酵素結合，使他失去活性（cdk 要和細胞週期蛋白結合才具活性），如此可抑制細胞分裂。DNA 修補作用發生於有絲分裂及下一次細胞分裂前 DNA 複製間的時期，假如待修補 DNA 無法進行修補時，p53 會促進細胞凋亡。有很多的因素可以用來解釋癌症，例如 DNA 突變導致了細胞生長蛋白質的改變，直接或間接影響細胞分裂。了解這些相關因子以及它們之間如何影響，是目前尋找如何治癒癌症的方法。

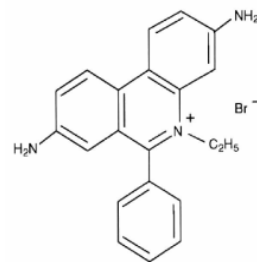
貳、細胞凋亡（apoptosis）

細胞凋亡在多細胞生物發育及某些生理功能中扮演重要角色。如：（1）個體發生時的可塑性（developmental plasticity）及挑選最適細胞（the fittest cells）：個體發生學的一個通則是在某個組織形成時，一開始往往製造數量過多的細胞，繼而再依據某種需求準則來選擇最後留存的功能細胞。例如，個體發生學的組織形成時，只有 50% 以下的原始腦神經細胞、少於 5% 的原始胸腺細胞、及大約 0.1% 的原始卵母細胞發育到能發揮生理功能。（2）細胞凋亡是塑造個體及器官形態

的機制：舉凡指頭形成、腸管腔道的形成、人類尾巴的消失、到昆蟲的蛻變 (metamorphosis) 等等的一切形態的形成。(3) 原狀恆定(homeostasis)：細胞數目的原狀恆定由細胞增殖與細胞凋亡二大動力來平衡。最明顯的例子可見於血液系統，血液細胞的細胞增殖與細胞凋亡可依其所需要的生長因子與介白質存在與否來決定；此時生長因子與介白質就是扮演著存活因子的角色。(4) 剔除危險性細胞：細胞凋亡也是保護生物個體的一項重要機制。當生物個體的某些細胞受到環境傷害或病毒感染而有傷害到遺傳物質之虞時，細胞凋亡就會被用來剔除這些有致癌可能的危險細胞，因而可保全整個生物個體。

參、EtBr(ETHIDIUM BROMIDE)

EtBr 是在實驗室中用來染 DNA 之染劑，由於它會嵌入 DNA 鹼基中，在 UV 照射下會發出約 600nm 螢光，因此若不慎接觸到，則它同樣會嵌入皮膚的 DNA 中，造成對 DNA 的傷害，故為一致癌物。



※EtBr 的分子結構

研究動機

在生物體中，細胞凋亡對於生物的生長發育以及對腫瘤的發生都具有極大的影響力，因此我們希望對細胞凋亡有更進一步的認識。我們知道 p53 蛋白是一個腫瘤抑制基因，有抑制腫瘤發生的功能；在許多的已知報告中指出 p53 蛋白可以對細胞週期的進行有所調控作用。在細胞欲進行 DNA 複製前，p53 可以控制 DNA 的複製進行使部分未完成修復的損傷 DNA 有充裕時間得以進行修復，或使細胞知道，當遇到大量無法修復的 DNA 時，可以走上凋亡之路。EtBr 與被認為是一種致

癌物質，我們對於它們是否在動物體會致癌及其可能的致癌過程和 p53 之功能關係相當感興趣。

研究方法

從已知報導得知,EtBr(與 DNA 鑲嵌化合物)是致癌物,利用此類物質,塗抹於 p53 表現量不同的老鼠身上,觀察此致癌物是否會致癌,若會,其所引發之癌症是否與 p53 有關,並藉此探討 p53 在此類致癌物引發的癌症中所扮演的角色。

研究問題

- 壹、EtBr 是否能引發癌症?
- 貳、wild type 與 p53^{+/-}老鼠之比較,受到相同 EtBr 的刺激, p53^{+/-}之老鼠是否相對較容易得到癌症?
- 參、EtBr 對老鼠組織造成的影響

實驗材料與實驗方法

我們設計是先確定 EtBr 塗在 p53+/-老鼠身上是否會導致癌症，所以就先用兩隻 p53 +/- 的老鼠來進行塗藥實驗。

壹、利用 PCR 方式來確定老鼠之基因型。

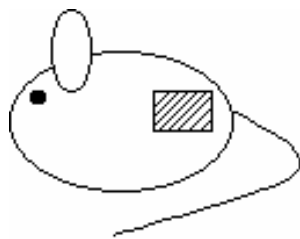
一、p53+/+：此為正常之基因形

二、p53+/-：p53 蛋白產量為正常之一半

剪下老鼠尾巴，溶去蛋白質及 RNA，將所得之老鼠 DNA 進行 PCR，因為加入之特定引子後，wild type p53 +/+與 p53+/-夾出之長度不同(因其 DNA 的差異)，依其所夾出片段之長度的不同，可以用來分析其 DNA 是 wild type p53+/+還是 p53+/-基因型之老鼠。

貳、用濃度 0.1mg/ml 之 EtBr 塗於 p53 +/-，及 wild type 之老鼠上先進行第一步之試驗，觀察其是否致癌，並記錄下致癌的天數及腫塊大小等。

塗法：用棉花棒沾取藥劑，均勻塗至老鼠後大腿皮膚上，左右後腿各沾藥劑三次塗到乾。每天塗一次，連續塗兩週，之後停藥，等待其致癌。(自開始塗起即進行觀察紀錄)



※斜線部分為塗藥部分

參、我們發現兩隻實驗的老鼠中，其中一隻得到了癌症，所以決定增加老鼠的數量以及對照組來進行進一步的實驗。其他的十隻老鼠，是出生於 12/10，於 1/14(91 年)分別塗上 1mg/mL、0.2mg/mL、0.1mg/mL、及 0.01mg/mL 的 EtBr

分別塗在 p53+/+ 及 p53+/- 之老鼠上(兩組各 8 隻，每兩隻一小組塗相同藥劑)，並養 p53+/+ 老鼠和 p53+/- 但不塗 EtBr 作為對照用。

肆、觀察老鼠之狀況，看是否有腫瘤產生，再將觀察所得之數據繪成表格，以便比較 wild type 與 p53+/- 老鼠之間的差異。

在取器官的同時，為了能夠有所對照，我們也殺了另一隻正常老鼠(wild type 未塗 EtBr 且年齡相同)，比較二者的器官和外表上有無差異，接著取下相同之組織與器官，做進一步分析，將這兩隻老鼠的器官一同做石蠟包埋，再做組織切片，比較其相異之處。

伍、石蠟切片：取下部分可能異常之組織，將其以石蠟固定，將其切片，再褪去石蠟，封片成爲異常組織之切片。再比較正常組織及異常組織間的差異。(如：細胞型態差異等)。

結果

p53+/-塗藥的 10 隻老鼠中，有三隻出現了異常，以下以 A、B 及 C 代表，和其他的對照組比較。

壹、異常老鼠與其他處理方式的老鼠之綜合比較

P53+/- 塗 EtBr	<u>A</u> : 死亡前看起來很虛弱，不停發抖，無法站立。脾臟異常，有腫大現象，長 1.7cm。用顯微鏡觀察，白髓擴大，紅髓白髓間隙不明顯，可能是癌症，或是免疫系統疾病。此外，塗藥部位的肌肉肌纖維間隙較 WT 塗藥鼠大，可能是造成其運動困難的原因。
	<u>B</u> : 脾臟腫大，約 1.7cm，症狀和 A 鼠相似。
	<u>C</u> : 死亡前和 A，B 不同，還很有精神。也有脾臟種大現象，長約 2.3cm，並從脖子附近，長出了一顆約 3.4cm 的腫瘤，推測應是淋巴細胞異常增生使淋巴結腫大而形成的腫瘤，其餘部分並未看出明顯異常症狀。
	其他 P53+/-塗 EtBr 老鼠無明顯異狀
P53+/- 不塗	組織與正常 WT 老鼠的切片相似，推測並無異常。
P53+/-塗 EtBr	與正常組織相同，除脾臟(1.2cm)及肌肉外，腎、肝細胞與 p53+/-異常老鼠的組織切片看起來並無差異。
P53+/-不塗	正常 WT 的老鼠組織，對照用。

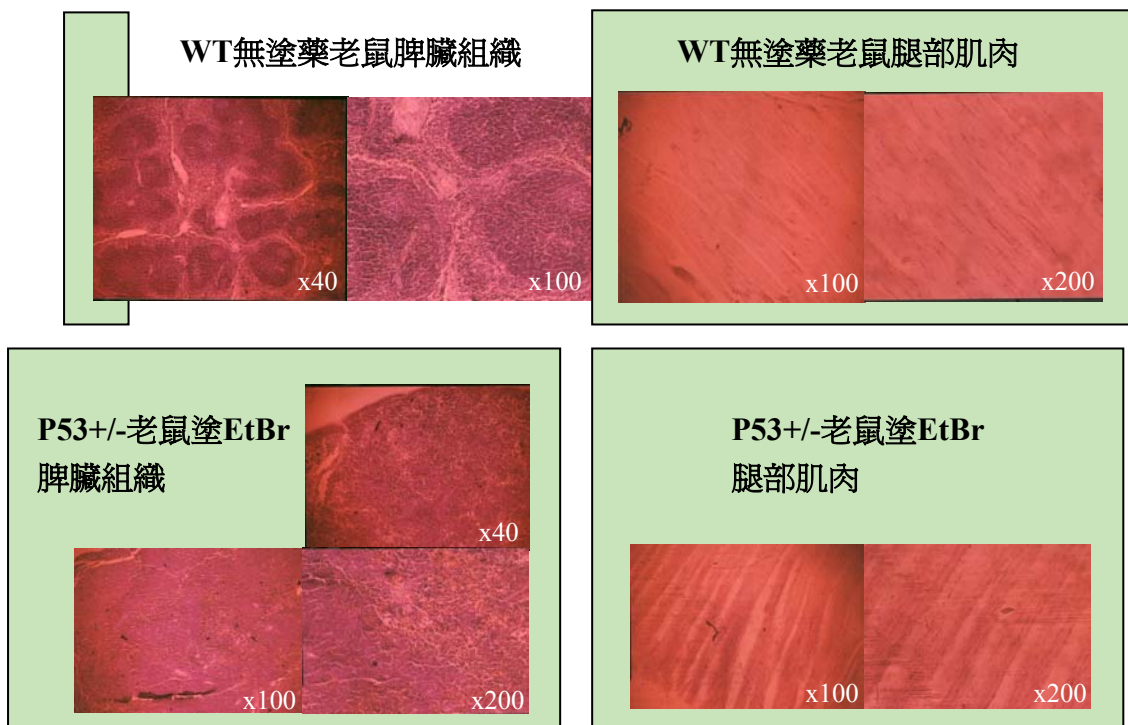
貳、不同濃度 EtBr 對 p53+/- 老鼠致病影響

[EtBr]	塗藥隻數	病變隻數
1mg/ml	2	0
0.2mg/ml	2	0
0.1mg/ml	4 (含第一次實驗)	1
0.01mg/ml	2	2

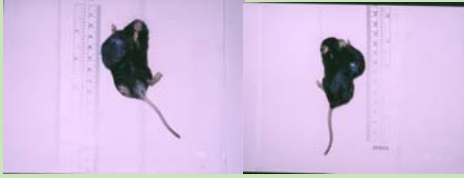
參、不同濃度 EtBr 對 p53+/+ 老鼠致病影響

[EtBr]	塗藥隻數	病變隻數
1mg/ml	2	0
0.2mg/ml	2	0
0.1mg/ml	4 (含第一次實驗)	0
0.01mg/ml	2	0

肆、組織切片結果



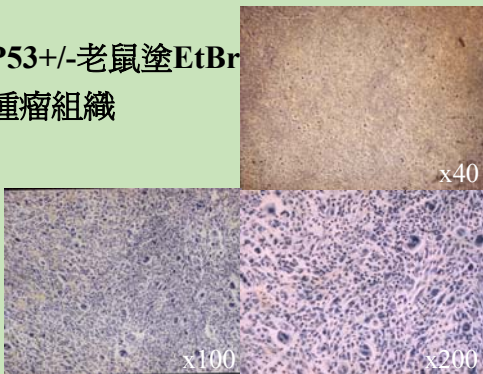
P53+/-老鼠塗EtBr
長腫瘤外觀



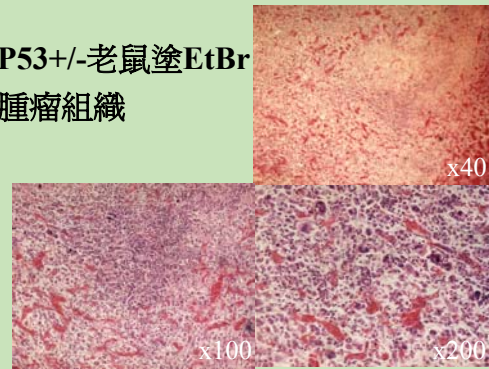
P53+/-老鼠塗EtBr
腫瘤



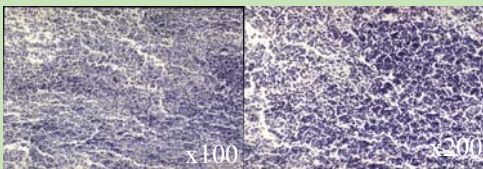
P53+/-老鼠塗EtBr
腫瘤組織



P53+/-老鼠塗EtBr
腫瘤組織



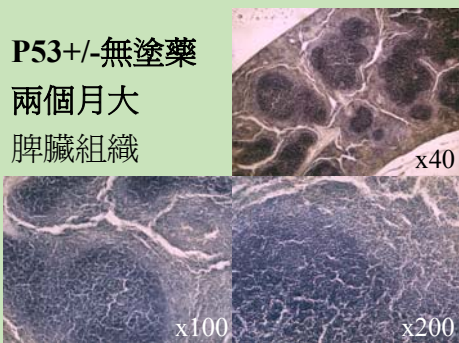
P53+/-老鼠塗EtBr
脾臟組織



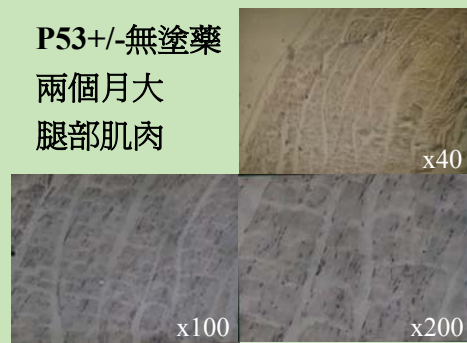
P53+/-與WT各別脾臟的比較



P53+/-無塗藥
兩個月大
脾臟組織



P53+/-無塗藥
兩個月大
腿部肌肉



討論

我們發現十隻塗 EtBr p53 +/– 老鼠中的 3 隻出現了異常現象，而對照組老鼠則沒有症狀發生。我們將三隻有狀況的老鼠編號為 A，B，C。A 是第一階段實驗的老鼠，發病較早。而 B 和 C 是第二階段發病的老鼠，發病較晚，但發病年齡大約都是四個月大。

其中 A 和 B 的症狀很像，都是活動力低以及不停發抖，且有脾臟腫大現象 (1.7cm)，由切片分析發現紅髓和白髓的已無法明顯區分。

C 的症狀與 A，B 較為不同，外觀上雖有一顆很大的腫瘤，但精神狀況及活動力都比 A，B 要好許多，由解剖觀察，其腫瘤長在腋下附近，只有一條血管與腫瘤相連，切片觀察發現腫瘤內的血球細胞占大多數，且有不少的淋巴球存在，我們將部份腫瘤切下作了 48 小時的細胞培養，除去紅血球，發現有很多的纖維母細胞，淋巴細胞。另外脾臟腫大情形也較 A 和 B 鼠嚴重 (2.3cm)，由切片觀察發現脾臟組織的紅髓及白髓也無法明顯區分。

由這三隻老鼠，我們發現其病因和免疫系統有密切的關係，我們在網路上也找到資料 p53+/- 老鼠脾臟癌的切片和我們的很相似，而我們沒有塗 EtBr 的 p53+/- 老鼠並沒有出現類似症狀，因此我們推測 EtBr 增加了 p53+/- 老鼠致癌的機會。

另一方面，我們對塗藥的老鼠施以不同濃度，但我們發現塗 10 μ g/mL 的 2 隻 p53 +/– 老鼠都發生了病變的現象，而兩隻塗 EtBr 100 μ g/mL 的 p53+/- 老鼠中的一隻也出現了病變的現象，但是相較起來，塗藥濃度較高的 200 μ g/mL 以及 1mg/mL 都沒有導致病變的發生。我們認為是因為所做的濃度數太少，使得數據不明確；或是老鼠的數量不足，才造成此的結果。

由以上討論我們得到的結論如下：

壹、p53+/- 的老鼠較正常老鼠得到癌症的機率較高

貳、EtBr 會導致 p53+/- 老鼠的病變

參、EtBr 會導致 p53+/- 老鼠的脾臟和淋巴等免疫組織相關的癌化現象

結論與應用

由這個實驗我們可以得知 p53 +/– 老鼠經 EtBr 刺激後較易誘發癌症的病變，未來我們可以進一步分析老鼠的蛋白質，找出在得得到癌症的老鼠體內，其體內的細胞週期條控蛋白與正常老鼠之差異，藉以推測致癌的機轉。未來即可針對此機轉下手，研究如何阻止細胞癌化或抑制癌細胞的生長。

參考資料：

- 壹、分子生物學新知，九州出版社
- 貳、細胞凋亡之核醫造影,台灣醫界 2002 年 Vol.45 三月號,p.82~p.85
- 參、生物化學，Mary K. Campbell 著，偉明出版社，p331~p337
- 肆、基因叛變記—癌的生物學,遠哲基金會出版
- 伍、藝軒組織學
- 陸、Nature (1 Nov, 2001)--How cells choose to die