

臺灣二〇〇七年國際科學展覽會

科 別：動物學

作 品 名 稱：丹尼爾寶寶的酗酒日記--酒精對斑馬魚
胚胎頭骨與腦下垂體基因的影響

得 獎 獎 項：佳作

學 校 / 作 者：臺北市立第一女子高級中學 胡 欣

作者簡介



Hi~！我是胡欣，現在是北一女中高二的學生。接觸專題研究 5 年左右，喜歡生命科學：)。從國中開始我就參加過很多科展比賽，也從中學習了許多。今年是第一次以生物科的作品參加國際科展，希望可以獲得一些不一樣的經驗。我喜歡做實驗，也喜歡從實驗中學習，實驗、思考和可以交到很多朋友是我喜歡做科展的原因。感謝一路上所有幫助我的老師和實驗室的大家，希望可以透過這次的比賽將我的研究成果呈現給大家，並互相交流學習，請大家多多指教。

摘要

長期以來，臨床研究發現酒精會影響人類胚胎的正常發育，但是其分子機制尚不清楚。在本研究中利用 RNA 定位雜交的方式觀察酒精對於胚胎發育過程中 *shh*、*sox9a*、*sox9b*、*col2a1*、*hand2* 的影響，發現這些基因的表現均會受到酒精的抑制。這項結果顯示在胚胎發育過程中，酒精透過對上述基因的影響，造成神經脊細胞減少，細胞遷移異常，以及干擾軟骨細胞分化的現象，進而造成頭骨發育的嚴重缺陷。此外，實驗中亦發現生長激素在腦下垂體的表現亦受到酒精抑制。這項研究的結果成功地從基因的層次深入了解胎兒酒精中毒症候群造成頭骨畸形及生長遲緩的病理機制。

Abstract

It was known that prenatal alcohol exposure may cause serious birth defects and developmental disabilities. The molecular mechanism of this fetal alcohol syndrome still remains unclear. As revealed by whole mount RNA in situ hybridization, it was shown that expression of a number of craniofacial cartilage-related genes, including *shh*, *sox9a*, *sox9b*, *col2a1* and *hand2*, were all inhibited in zebrafish embryo by alcohol exposure. It suggests that alcohol exposure may result in reducing neural crest cell production, interfering neural crest migration, preventing chondrogenesis and eventually cause craniofacial defects. In addition, the transcriptional profile of pituitary hormones were investigated by RNA in situ hybridization. It appears that only growth hormone, but not prolactin and thyroid stimulating hormone, was inhibited by alcohol exposure. The reduction of growth hormone transcription was also confirmed by real time PCR. It also appears that the expression of upstream transcription factor *pit1* and downstream target gene *igf1* remains unchanged. It suggests that the reduction of *gh* transcription is mediated by a PIT1-independent pathway. The transcriptional profile of alcohol-exposed embryo was investigated by gene microarray analysis. It appears that the expression profiles of a number of development, cellular signaling, cell growth and apoptosis related genes have be affected by 1.5% alcohol treatment. It was noted that a number of retinal-specific genes were all repressed significantly. It consists with histochemical observation that alcohol exposure results in loss lamination and disturbed differentiation. This study help us understanding the molecular mechanism of fetal alcohol syndrome.

一、前言

(一) 研究動機

長久以來，臨床研究發現孕婦酗酒往往會造成胎兒畸形發育的情況，包括顱面畸形、中樞神經發育受阻，成長遲緩、心臟異常等現象，稱之為胎兒酒精中毒症候群 (fetal alcohol syndrome) (Mukherjee et al., 2006)。目前所知對於造成胎兒酒精中毒症候群的可能病理機制包括引起神經細胞凋亡 (apoptosis) (Ikonomidou et al., 2000)、干擾視黃酸 (retinoic acid) 合成 (Deltour et al., 1996; Duester, 1991; Grummer and Zachman, 1995)、抑制 GABA 與 NMDA 神經傳遞質接受器的表現 (Toso et al., 2006)、誘發細胞氧化緊迫 (oxidative stress) (Cohen-Kerem and Koren, 2003) 等，但是對於酒精影響頭骨發育以及造成生長遲緩的分子機制則尚不清楚。由於酒精對於懷孕胎兒會造成極大的傷害，而且會帶給社會極大的困擾，因此我們有必要對於胎兒酒精中毒症候群的病理機制做進一步的探討。過去對於胚胎發育時期酒精中毒的相關研究均是以小形哺乳動物作為實驗模式，但是往往受限於生理條件 (體內受孕) 以及實驗處理不便 (酒精攝取與取樣)，不易觀察到胚胎受酒精影響的即時變化。

由於近年來國際間的努力，斑馬魚基因組定序工作已近完成，發現與人類基因組有高度之相似性，且其受精卵透明，發育期短 (3 天完成孵化)，易於進行胚胎發育之即時觀察，是近年來備受科學家青睞的理想模式動物，經常被用來作為研究脊椎動物胚胎發生學以及環境毒物學的工具 (Chen and Ekker, 2004; Hill et al., 2005)。先前的研究顯示斑馬魚胚胎受到酒精浸泡後會出現明顯的異常發育狀況，例如心臟膨大、脊椎彎曲、發育遲緩、眼睛縮小、神經細胞凋亡、骨頭變形等現象 (Carvan et al., 2004; Reimers et al., 2004)，而且先前的實驗亦顯示酒精對斑馬魚軟骨性頭骨發育有相當程度的影響 (2005 年第 45 屆全國中小學科展，基隆女中蔡旻臻等)，足以證明斑馬魚胚胎對於酒精中毒有非常敏感的反應，因此在本實驗中決定以斑馬魚胚胎作為探討酒精中毒機制的模式動物。

(二) 研究目的

在本項研究實驗中，以酒精浸泡發育中的斑馬魚胚胎，並觀察頭骨發育相關的基因與腦下垂體的生長激素基因的表現，目的在於探討酒精如何造成頭骨與腦下垂體異常的分子機制，藉以了解人類胎兒酒精中毒症候群的致病機轉。

在脊椎動物胚胎中，頭骨的先趨細胞源自中後腦區域的神經脊細胞，經過向前緣兩側遷移，並藉由與周邊細胞的接觸啟動細胞內的訊息系統，誘發細胞的分化。待細胞抵達最終遷移位置時，細胞會分化成髓顱、鯉弧等。這些連續性的細胞遷移，分化等過程均受到細胞內關鍵基因的嚴密調控。為了釐清酒精中毒所造成的畸形頭骨發育機制，我們利用 *shh*、*sox9a*、*sox9b*、*col2a1* 以及 *hand2* 基因的表現來觀察受酒精的影響。另一方面，本實驗亦利用生長激素基因 *growth hormone* 的表現來觀察腦下垂體中的變化。

二、研究方法與流程

(一) 實驗流程

本實驗之流程分爲外形觀察與基因活性分析兩項：

一、觀察不同酒精濃度對胚胎形態變化的影響

1. 比較不同酒精濃度對於 72 hpf 時期之斑馬魚胚胎外觀影響。
2. 比較不同酒精濃度對於 96 hpf 時期斑馬魚頭骨發育所造成的缺陷。

[註： hpf ：hours post fertilization，胚胎受精後發育時數]

二、以 RNA 定位雜交的方式探討酒精對重要頭骨發育基因的影響。

1. *shh* 基因表現
2. *sox9a* 基因表現
3. *sox9b* 基因表現
4. *col2a1* 基因表現
5. *hand2* 基因表現
6. *GH* 基因的表現

(二) 研究設備及器材

一、實驗生物

斑馬魚(*Danio rerio*) 胚胎

二、一般化學藥品

菸鹼酒石酸氫(Nicotine hydrogen tartrate salt)、100% 絕對酒精(absolute alcohol)、色素抑制劑(PTU, 1-phenyl-2-thiourea)、聚甲醛(Paraformaldehyde)、

阿爾襄藍(Alcian Blue)、甘油(glycerol)、磷酸鹽緩衝液(PBS, Phosphate Buffered Saline)、37%鹽酸 (Hydrochloric Acid)、二甲苯 (Xylene)、甘油 (Glycerol)、蘇木紫溶液 (Gill-Hematoxyl)、伊紅 (Eosin)、甲醇 (Methanol)、甲醯胺 (Formamide)、肝素(Heparin)、酵母菌 tRNA(Yeast tRNA)、順丁烯二酸(Maleic acid)、阻滯劑 (blocking reagent)、氯化鈉 (NaCl)、氯化鎂 (MgCl₂)、三羥甲基氨基甲烷 (Tris-HCl)、Tween20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium sal)、NBT (nitro blue tetrazolium)。

三、酵素試劑

胰蛋白酶 (2% trypsin-EDTA)

蛋白酶 (50ng/ml Proteinase K)

四、實驗藥品及配方

(一) 0.37%鹽酸

2.5ml 37%鹽酸

247.5ml 蒸餾水

(二) 酸性酒精

140ml 100%絕對酒精

60ml 0.37%鹽酸

(三) 0.1% 阿爾襄藍

酸性酒精 50ml

阿爾襄藍粉末 5g

(五) 0.5%酒精 0.075ml 100%絕對酒精加水稀釋到 500ml，

1%酒精 0.75ml 100%絕對酒精加水稀釋到 500ml，

1.5%酒精 7.5ml 100%絕對酒精加水稀釋到 500ml，

(六) 70% 甘油 35 ml 甘油加 15 ml 蒸餾水。

(七) 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Phosphate Buffered Saline)

NaCl 8g

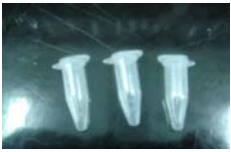

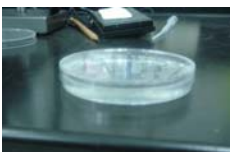





KCl 0.4g

Na₂HPO₄ 2.88g

KH₂PO₄ pH7.4 0.48g

- 蒸餾水 1000 ml
- (八) 4%聚甲醛 4 g 聚甲醛加 100 ml PBS。
- (九) PBT
以 PBS 配製 0.1% Tween 20
- (十) 75% 甲醇+25% PBT 75ml 甲醇加 25ml PBT，
50% 甲醇+50% PBT 50ml 甲醇加 50ml PBT，
25% 甲醇+75% PBT 25ml 甲醇加 75ml PBT。
- (十一) 20×SSC
NaCl 87.64g
Na citrate 44.1g
蒸餾水 500ml
- (十二) HYB⁻
50-70% Formamide
5× SSC
0.1% Tween20
- (十三) HYB⁺
HYB⁻內含有
50 μg/ml Heparin
500 μg/ml Yeast tRNA
- (十四) 順丁烯二酸溶液 (Maleic acid buffer)
100mM Maleic acid
150mM NaCl
0.1% Tween20
- (十五) 阻滯液 (blocking solution)
1g blocking reagent
100ml Maleic acid buffer
- (十六) NTMT
0.1M NaCl
0.1% Tween20
50mM MgCl₂
0.1M Tris-HCl
- (十七) 呈色劑(BCIP/NBT)
每 1 ml NTMT 加 3.5 μl BCIP
4.5 μl NBT

五、器材

項目	照片	項目	項目
1.5ml 微量試管		魚缸	打氣馬達
恆溫培養箱		打氣管	底砂
培養皿		滴管	50ml 試管
微量分注器 (micropipette)		檯燈	照相機
微吸管頭 (Micro Pipettor tip)		蓋玻片	載玻片
微量天平		血清瓶	秤量紙
複式顯微鏡		藥匙	計時器
升溫器		解剖顯微鏡	

(三) 研究方法



一、比較不同濃度酒精對於 72 hpf 時期之斑馬魚胚胎形態之影響。

1. 胚胎形態觀察：

以解剖式顯微鏡觀察各時期胚胎之外觀差異，並以數位像機紀錄之。

2. 其他生理現象比較：

以解剖式顯微鏡觀察各時期胚胎之外觀差異，並以紀錄其心跳、血流等與對照組相較之下是否異常。

二、比較不同濃度酒精對於 96 hpf 斑馬魚頭骨發育所造成的缺陷。

1. 骨頭染色 染劑：阿爾裏藍(Alcian Blue)

以 PBS 清洗 $\xrightarrow[\text{重複數次}]{5\text{min}}$ 置換酸性酒精 $\xrightarrow{\text{浸潤}}$ 置換 0.1% 阿爾裏藍
 $\xrightarrow{\text{染色}}$ 隔夜。

2. 清洗

加酸性酒精清洗 $\xrightarrow[\text{重複 10 次以上}]{1\text{hr 以上}}$ 75% 酒精 $\xrightarrow{5\text{min}}$ 50% 酒精
 $\xrightarrow[\text{重複數次}]{5\text{min}}$ 25% 酒精 $\xrightarrow[\text{重複數次}]{5\text{min}}$ 加 PBS 清洗 $\xrightarrow{5\text{min}}$ 胰蛋白酶
 $\xrightarrow{2\text{hr 以上}}$ 加 PBS 清洗 $\xrightarrow{5\text{min}}$

置換至 4% 聚甲醛中固定 30 分鐘 → 拍照。

三、探討酒精對頭骨發育與腦下垂體基因層級的影響：以 RNA 定位雜交法觀察斑馬魚頭骨發育中扮演重要功能之系列基因以及腦下垂體生長激素基因的表現。

1. 樣品保存

加 4% 聚甲醛 $\xrightarrow{\text{固定}}$ 在 4°C 冰箱，14~16 小時 \rightarrow 置換 PBS 清洗 $\xrightarrow[\text{重複 3 次}]{5\text{min}}$
25% 甲醇 + 75% PBT $\xrightarrow{5\text{min}}$ 50% 甲醇 + 50% PBT $\xrightarrow{5\text{min}}$ 75% 甲醇
+ 25% PBT $\xrightarrow[2\text{次}]{5\text{min}}$ 100% 甲醇 $\xrightarrow{10\text{min}}$ 在 -20°C 冰箱。

2. 樣品覆水

75% 甲醇 + 25% PBS $\xrightarrow{5\text{min}}$ 50% 甲醇 + 50% PBS $\xrightarrow{5\text{min}}$ 25% 甲醇
+ 75% PBS $\xrightarrow{5\text{min}}$ 1xPBS $\xrightarrow{5\text{min}}$ 4 次。

3. 蛋白酶處理

蛋白酶 $\xrightarrow{20\text{min}}$ PBT 清洗 $\xrightarrow{\text{重複 2 次}}$ 4% 聚甲醛固定 $\xrightarrow{20\text{min}}$ 1x
PBS $\xrightarrow{5\text{min}}$ 4 次

4. 雜交反應

加 HYB $\xrightarrow[65^\circ\text{C}]{+ 2\text{hr}}$ 加 RNA 探針(事先於 68°C 加熱 10min，再置冰五分鐘) \rightarrow 14~16hr。

5. 探針偵測

75% HYB⁺ + 25% 2xSSC $\xrightarrow[65^\circ\text{C}]{10\text{min}}$ 50% HYB⁺ + 50% 2xSSC $\xrightarrow[65^\circ\text{C}]{10\text{min}}$ 25%
HYB⁺ + 75% 2xSSC $\xrightarrow[65^\circ\text{C}]{10\text{min}}$ 2xSSC $\xrightarrow[65^\circ\text{C}]{10\text{min}}$ 0.2xSSC
 $\xrightarrow[70^\circ\text{C}]{45\text{min}}$ Maleic acid buffer $\xrightarrow{\text{室溫}}$ 阻滯液 $\xrightarrow[室溫]{3\text{hr}}$ 抗-DIG 抗
體 $\xrightarrow[4^\circ\text{C 冰箱}]{}$ 14~16hr。

6. 呈色反應

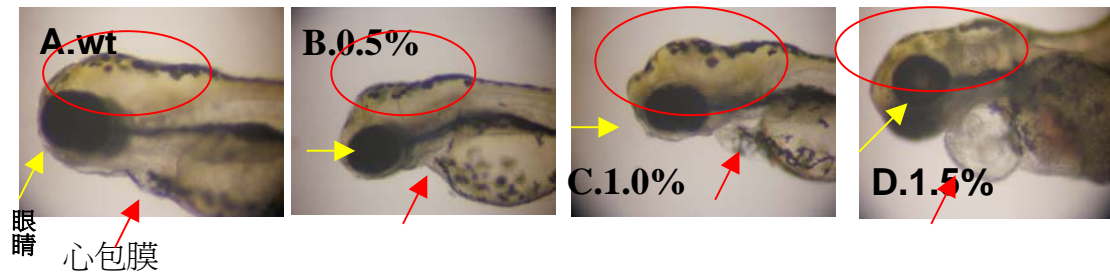
置換 Maleic acid buffer 清洗 $\xrightarrow[4 \text{ 次}]{30\text{min}}$ NTMT $\xrightarrow[3 \text{ 次}]{5\text{min}}$ 加 BCIP/NBT 呈
色 $\xrightarrow[3 \text{ 次}]{2 \sim 4\text{hr}}$ PBT 清洗 $\xrightarrow[3 \text{ 次}]{5\text{min}}$ 100% 甲醇 $\xrightarrow{20\text{min}}$ 70% glycerol \rightarrow
4°C 冰箱保存。

三、研究結果

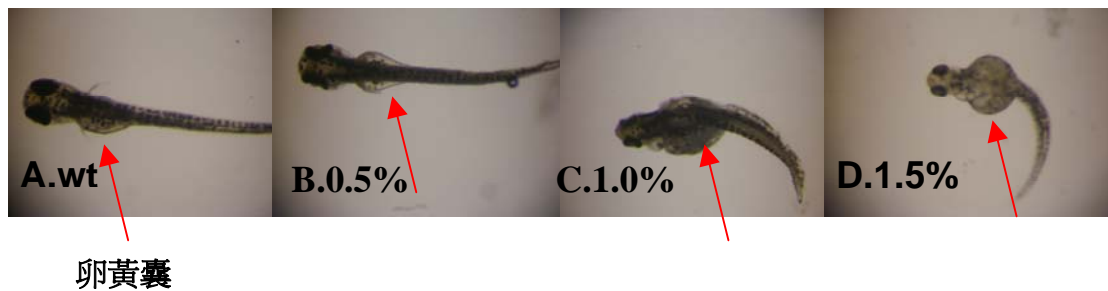
(一) 形態觀察

1. 比較不同濃度酒精對於 72 hpf 時期之斑馬魚胚胎外觀影響。

圖一：【72 hpf 胚胎外觀側視圖】



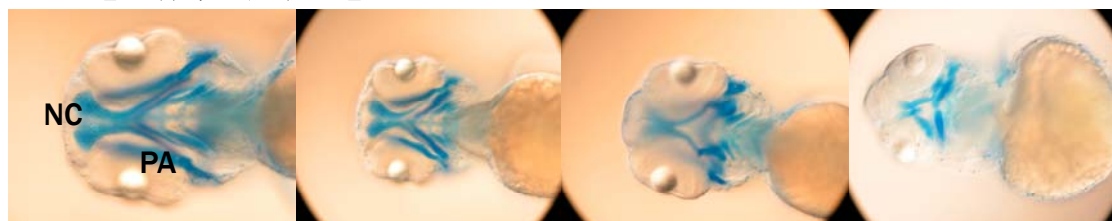
圖二：【72 hpf 胚胎外觀背視圖】



斑馬魚胚胎在 72hpf 時，所有器官即發育完成，因此本實驗選擇在 72hpf 時觀察其外型變異。以 0.5%酒精浸泡處理的斑馬魚胚胎與對照組相比較，在外觀上尚無明顯的變異。以 1.0%的酒精處理的斑馬魚胚胎，已經有心室稍微膨大與脊椎(somite)些許彎曲的情形。以 1.5%酒精處理後，胚胎的眼睛（圖一黃色箭頭所指處）和頭顱明顯變小，心包膜（圖一紅色箭頭所指處）、卵黃囊(yolk)（圖二紅色箭頭所指處）膨大，軀幹(trunk)呈嚴重彎曲狀，尾部扭曲，心臟雖然還在跳動，但心跳速率減慢，與對照組相較之下已呈現嚴重畸型。此外，體表色素生成亦被抑制（圖一圈記處）。

2. 比較不同濃度酒精對於 96 hpf 斑馬魚頭骨發育所造成的缺陷。

圖三：【頭骨染色腹視圖】



A. WT

B. 0.5%酒精

C. 1.0%酒精

D. 1.5%酒精

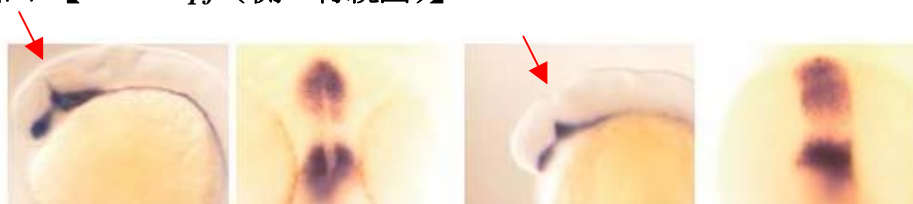
斑馬魚胚胎在 96hpf 時頭骨已發育成熟，為了進一步觀察頭骨發育的情形，本實驗於胚胎發育至 96hpf 時期以阿爾囊藍進行軟骨組織染色，以觀察斑馬胚胎頭部軟骨發育情況。斑馬魚的頭骨為一種軟骨構造，分為髓顱（neurocranium, NC）以及咽弧（pharyngeal arches, PA）(Kimmel et al., 2001)。在對照組的正常胚胎中，我們可以清楚的看見髓顱與咽弧已發育完成（圖三），隨著浸泡酒精濃度的增加，斑馬魚頭的大小有變小的情形，尤其是以 1.5% 酒精處理的胚胎變形特別嚴重，其髓顱消失，咽弧中的第一對鰓弧與第二對鰓弧形狀變形且排列角度變大，第三對到第七對鰓弧則完全消失。

3. 探討酒精對頭骨發育基因及腦下垂體生長激素基因的影響。

【基因活性分析】

3.1 *shh* 基因的觀察

圖四：【*shh*-25hpf（側、背視圖）】



A. WT（側視）

B. WT（背視）

C. 1.5%酒精（側視）

D. 1.5%酒精（背視）

*箭頭所標示部位即 ZLI

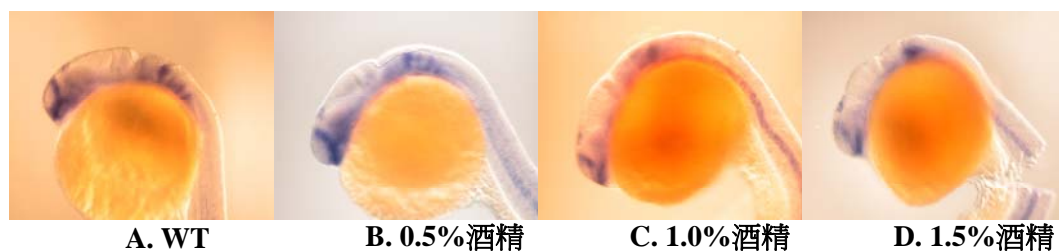
SHH（sonic hedgehog）是一種傳遞細胞訊息的分泌性蛋白質，在數個發育的關鍵時刻都扮演重要的角色，包括顏面頭骨的發育以及神經、心臟發育等。在

果蠅中，*shh* 基因會大量的表現在發育中的胚胎頭部。在老鼠與人類當中，*shh* 基因的突變會造成頭部與腦的發育異常。此外，抑制 SHH 蛋白的細胞訊息傳遞路徑也會造成顱面異常，而此結果是由於神經細胞死亡造成的，最後導致頭顱變小。利用抗體去抑制 SHH 蛋白的細胞訊息傳遞路徑造成的顱顏缺失與酒精處理的胚胎有相似的顱顏缺失，兩者均有頭部變小與顏面神經脊細胞死亡的情形出現 (Ahlgren et al., 2002)。*shh* 已被證明可以誘發腹側中腺細胞的產生，控制很多細胞分化與型態的重要關鍵決定步驟，且與髓顱的發育有關 (Davies and Miller, 2001, Wada et al., 2005)。另外在頭部 *zona limitans intrathalamica* 所表現的 *shh* 控制了間腦包括下視丘及腦下垂體的發育 (Scholpp et al., 2006)。

本實驗利用定位雜交法，以 *shh* 為指標基因，觀察 25hpf 時期的胚胎，*shh* 基因的表現是否會受到酒精的影響。在對照組正常胚胎中 *shh* 強烈地表現在斑馬魚頭部的 *zona limitans intrathalamica* (ZLI)、腦基板 (floor plate) 與脊索 (notochord) 等處，且可觀察到神經管的形成。相對的，浸泡於 1.5% 酒精的胚胎，表現在 ZLI 部位的 *shh* 縮短，而在腦基板與脊索部位的表現有些微的降低 (圖四)，顯示由 ZLI 的 SHH 所控制的下視丘-腦下垂體發育可能出現問題。至於酒精浸泡後，髓顱的發育的異常是否是由 *shh* 表現降低所造成，則尚待進一步確認。髓顱的發育亦會受到影響。此外由背視圖觀察到神經管的形成亦出現異常，中間的縫隙並未形成。

3.2 *sox9a* 與 *sox9b* 基因的觀察：

圖五：【*sox9a*-25hpf (側視圖)】



圖六：【*sox9b-25hpf* (側視圖)】

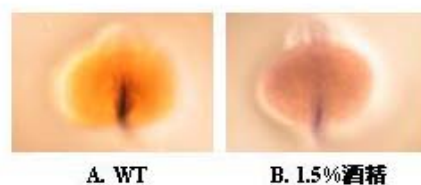


Sox9a 及 Sox9b 為具有 Sry-related high mobility-group (HMG) box 的轉錄因子，控制軟骨細胞 *col2a1* 基因的表現。在人類 *SOX9* 基因的缺失會造成骨骼的缺失 (skeletal defect) 和性別轉換 (male-to-female sex reversal)，所以 *SOX9* 基因被認為和軟骨形成 (chondrogenesis) 以及精巢 (testis) 的發育密切相關。

sox9a 基因的 mRNA 於 25 hpf 時會表現於前腦、腹側中腦、中腦-後腦界限 (midbrain-hindbrain boundary)、咽囊 (pharyngeal pouch) 以及後腦頭部的間葉細胞 (head mesenchyme) (Yan et al., 2002)，*sox9b* 則成對表現在中腦、後腦及軀幹部位的神經脊細胞中 (Li et al., 2002)。所以本實驗利用定位雜交法，以 *sox9a* 與 *sox9b* 為指標基因，觀察 25hpf 時期的胚胎 (圖五-六)。此時期的胚胎，*sox9a* 的 mRNA 於 25 hpf 的對照組，會表現於前腦、腹側中腦、咽囊以及後腦頭部的間葉細胞，而在酒精浸泡的胚胎中，前腦、腹側中腦、後腦頭部的間葉細胞、咽囊的表現都有降低的情形出現。*sox9b* 基因的表現亦與 *sox9a* 相似，在中腦、後腦等區域的表現受到了抑制。

3.3 *col2a1* 基因的觀察

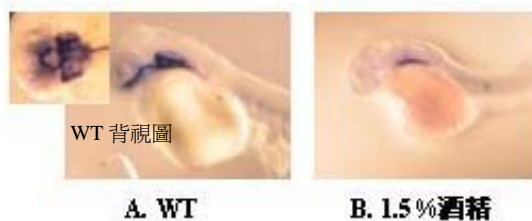
圖七：【*col2a1-25hpf* (背視圖)】



軟骨細胞 (chondrocyte) 會被蛋白多醣軟骨膠 (proteoglycan chondrin) 以及膠原纖維 (collagen fiber) 包裹。Col2a1 為膠原纖維中第二型的膠原蛋白 (type II collagen, col2a1)，是軟骨細胞外基質 (ECM) 中最豐富的蛋白質，因此常被用來當軟骨細胞以及間葉細胞的標識基因。在斑馬魚胚胎發育過程中，col2a1 的 mRNA 會大量表現在中胚層細胞以及間葉組織中 (Sherri et al., 2001)。

利用定位雜交法，以 Col2a1 為指標基因，觀察 25hpf 時期的胚胎 (圖七)，對照組的胚胎，會有 Col2a1 表現在間葉組織中，而在 1.5% 酒精浸泡的胚胎中，Col2a1 的表現會受到抑制。

圖八：【col2a1-48hpf 側視圖】

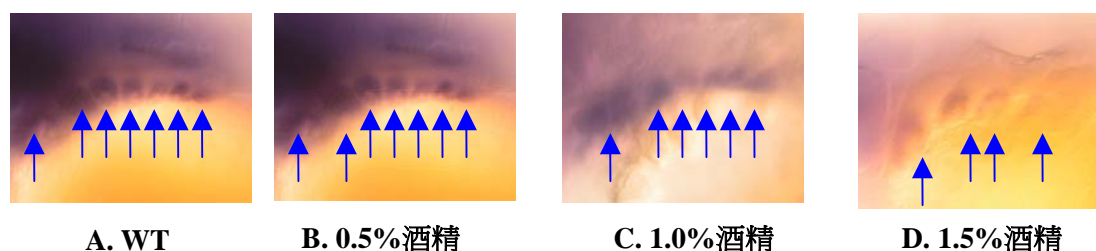


在斑馬魚胚胎發育後期，Col2a1 會表現在軟骨性頭骨包括髓顛以及咽弧。當軟骨細胞 (chondrocyte) 開始分化時，會有相當豐富的細胞外間質 (ECM) 圍繞著軟骨細胞，此時 Col2a1 基因會表現在位於細胞外間質的膠原蛋白 (collagen) (Aszodi et al., 2001)

利用定位雜交法，以 Col2a1 為指標基因，觀察 48hpf 時期的胚胎 (圖八)，此時期的胚胎，利用此指標基因觀察軟骨細胞的分化情形。對照組 Col2a1 強烈地表現在頭部軟骨細胞。於 1.5% 酒精浸泡的胚胎，其 Col2a1 表現受到抑制。

3.4 *hand2* 基因的觀察

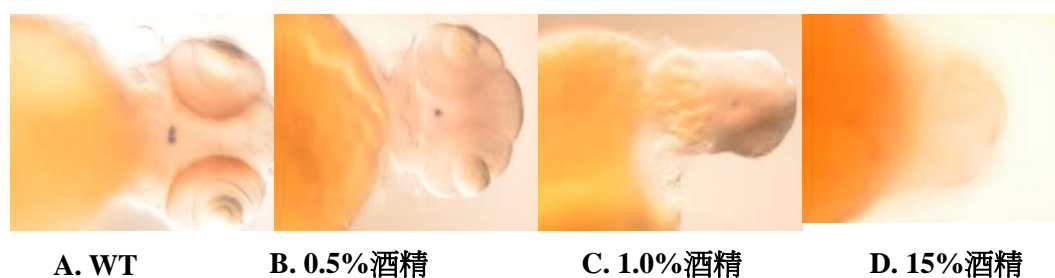
圖九：【*hand2-25hpf*】



利用定位雜交法，以 *Hand2* 為指標基因，觀察 25hpf 時期的胚胎(圖九)。此時期的胚胎，利用此指標基因觀察最後會分化形成軟骨細胞的神經脊細胞定位的情形。對照組中 *Hand2* 強烈地表現在正常胚胎的頭部，變成六團細胞(圖九 A)。浸泡於 1.5%酒精的胚胎，也許遷移與定位發生問題，導致鰓弧軟骨前趨細胞消失，且位於頭部位置的 *Hand2* 表現完全消失。

3.5 *GH* 基因的觀察

圖十：【*GH-72hpf*】



由於先前實驗發現酒精浸泡會抑制胚胎內 *shh* 基因的表現，而腦下垂體的發育受胚胎內的 SHH 蛋白細胞訊息路徑所控制，因此我們懷疑除了頭骨的發育會受酒精的影響外，腦下垂體的發育亦可能會受酒精影響。

哺乳類生物中，腦下垂體(pituitary)包含兩個部分：神經性垂體部(neurohypophysis)與腺性垂體部(adenohypophysis)。成熟的腺性垂體部包

含了六至七種不同的分泌荷爾蒙的細胞種類，而這些細胞會分泌及製造 peptide hormone，其中有一種細胞叫做 somatotropes，會分泌生長激素（GH, growth hormone）(Herzog et al., 2003)。因此，我們利用此標示基因 *GH* 來確定腦下垂體細胞是否正常發育。

在 72hpf 時期，對照組斑馬魚胚胎的 *GH* 基因會表現在腺性垂體部分泌生長荷爾蒙的細胞中。但是，隨著酒精濃度的增加，此細胞表現逐漸減少，直到浸泡於 1.5%酒精時，此基因表現完全消失（圖十）。

四、討論

酒精是一種已知的畸胎原 (teratogen)。在老鼠的胚胎實驗中，酒精會影響多種器官的發育，並造成腦以及顱顏的缺陷，除此之外，它也會造成胚胎體內細胞大量死亡 (Ahlgren et al., 2002)。

斑馬魚胚胎在 96hpf 時期頭骨即發育成熟，故本實驗在胚胎發育 96hpf 後進行軟骨性頭骨染色。經 1.5% 酒精處理後，斑馬魚胚胎軟骨性頭骨有縮小的表現型，篩板消失、第一對和第二對鰓弧角度因受酒精影響而明顯變大彎曲，且隨著酒精濃度的增加，其鰓弧有逐漸消失的情形。以上的實驗結果與前人 (蔡旻臻等, 2005) 所獲得之結果相似，確認酒精對斑馬魚胚胎頭骨發育的影響甚鉅。

隨後，本實驗針對頭骨發育時期的重要關鍵基因，利用定位雜交法分析酒精對這些基因的影響。我們依所觀察的結果討論如下：

(一) 以 *shh* 為指標基因，觀察浸泡於酒精的胚胎，發現酒精會縮短 ZLI 的結構，且些微降低腦基板與脊索部位的 *shh* 表現。究竟前述所觀察到的髓顱異常發育是否是由 *shh* 的表現些微降低所造成，有待進一步確認。

(二) 正常的 25 hpf 胚胎，*sox9a* 的會表現於前腦、中腦腹側、咽囊以及後腦的間葉細胞，然而，隨著浸泡酒精濃度的增高，胚胎前腦、腹側中腦、後腦頭部的間葉細胞、咽囊的表現都有降低的情形出現。正常胚胎的 *sox9b* 則成對表現在中腦、後腦及軀幹部位的神經脊細胞，酒精浸泡會抑制 *sox9b* 的表現。先前的研究發現 SOX9 是直接調控 *col2a1* 的一個基因調控子蛋白 (Yan et al., 2005)。因此本實驗結果顯示酒精抑制了 *sox9a* 與 *sox9b* 基因的表現，進而影響頭骨的發育。

(三) 上述的推論，更藉由 *col2a1* 的表現變化得到證實。在軟骨細胞的發育過程中，軟骨細胞會被蛋白多醣軟骨膠以及膠原纖維包裹，type II collagen 為膠原纖維中第二型的膠原蛋白，是軟骨細胞外基質中最豐富的蛋白質，因此其基因 *col2a1* 常被用來當軟骨細胞的標識基因。在本實驗中，觀察在 24 hpf 與 48 hpf 時期，發現浸泡酒精的胚胎中 *col2a1* 的表現受到明顯抑制，顯示細胞減少或畸

形。另外，根據前述資料及本實驗所得結果，我們推論在酒精造成頭骨發育畸形的系統中，*col2a1* 受到其上游調控基因 *sox9a* 及 *sox9b* 的表現降低影響而被抑制，因此影響到軟骨細胞的分化，造成頭骨的畸形。

(四)以 *hand2* 為指標基因，觀察 25 hpf 時期的胚胎。在對照組胚胎中，*hand2* 基因會強烈地表現在頭部，變成六團原始神經脊細胞。浸泡於 0.5%、1.0%、1.5% 酒精的胚胎，也許遷移與定位發生問題，導致鰓弧軟骨前趨細胞(即原始神經脊細胞)變少。另外，*hand2* 為 Et-1 分泌性蛋白的下游調控基因，除了參與咽弧的發育外，尚參與了心臟中胚層的發育。在老鼠的實驗當中，當 *Hand2* 基因缺失時，會有嚴重顱顏缺失以及心臟血管異常的現象(Miller et al., 2000)。在實驗中，發現 *hand2* 表現減少，表示除了神經脊細胞會受到酒精影響之外，也表示了由酒精浸泡斑馬魚胚胎心臟也受到嚴重影響（此點可由酒精浸泡造成心室膨大證實），這也是值得進一步實驗探討的方向。

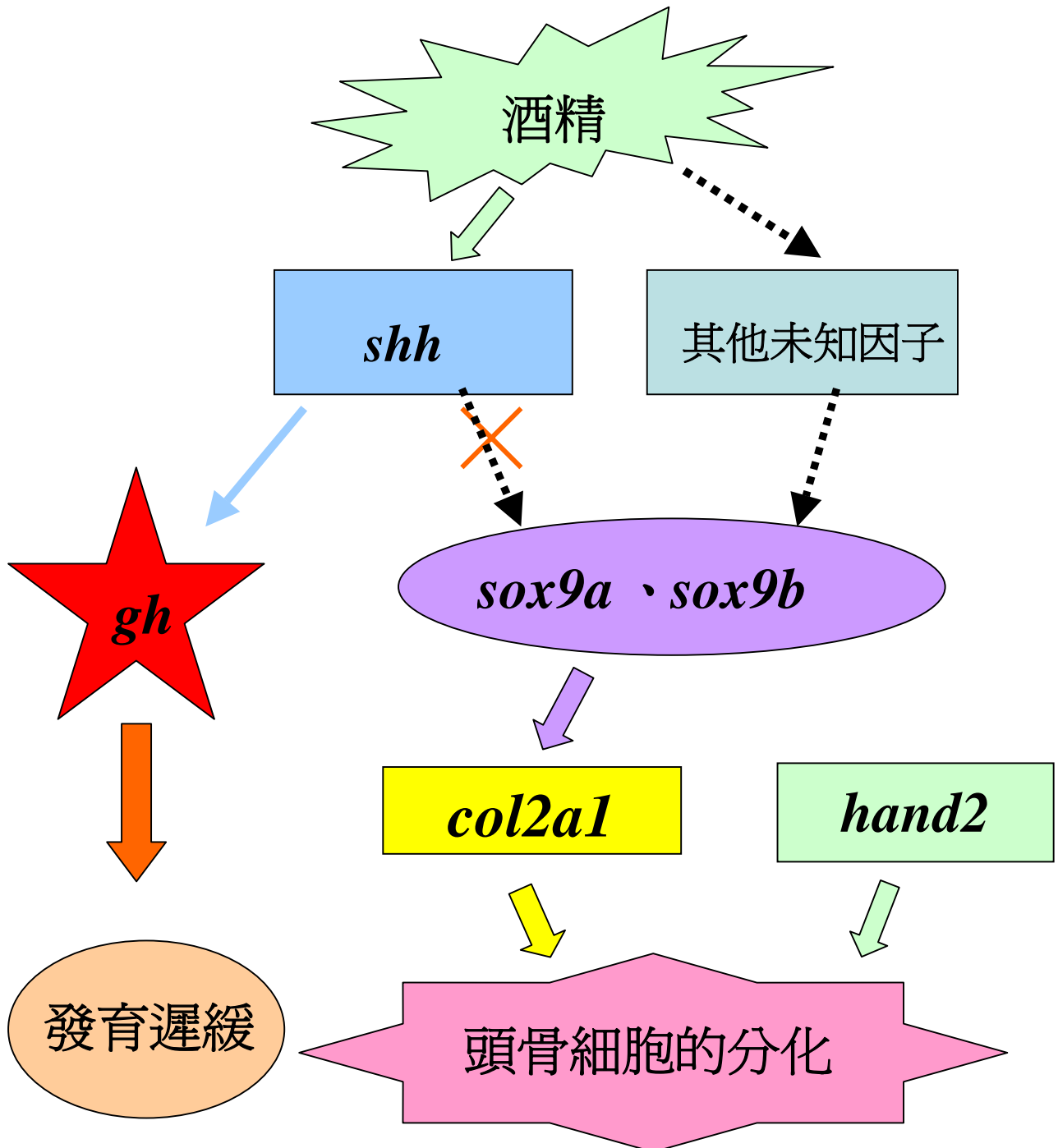
由於觀察 25hpf 胚胎 *shh* 的表現結果發現，胚胎在該時期原先會表現在 ZLI 區域的 *shh* mRNA 有受到抑制的現象，引起了我們的注意。最近的研究顯示在 ZLI 區域的 SHH 訊息系統與間腦(包括下視丘與腦下垂體)的發育有關(Vieira and Martinez, 2006)，因此推論酒精可能會對間腦的發育產生影響。觀察酒精處理時胚胎 *gh* 的表現情形，發現其表現量隨酒精濃度的上升而隨之減少，由此得知腦下垂體中的 somatotropes 細胞的確有大量減少的情形。而實驗中亦觀察到受到酒精處理的胚胎，具有魚體較小、以及其他發育遲緩的狀況，這些情況明顯與 growth hormone 分泌的減少相關。此結果足以證明腦下垂體在酒精影響的情況下，的確會受到 ZLI 縮短的影響。

整體而言，本實驗提供了直接的證據，證實酒精在胚胎發育過程中，會透過一系列基因的抑制現象，最後造成頭骨畸形及發育異常。因此我們推論其作用機制應如圖十一。在頭骨發育方面，雖然很多文獻提及是由 *shh* 影響 *sox9a* 和 *sox9b* 進而影響 *col2a1*，但在斑馬魚頭骨發育的過程中酒精處理並未大量抑制 *shh* 基因的表現，因此判斷 *sox9a* 與 *sox9b* 的抑制作用可能另有其他未知因子參

與，而 *shh* 的主要影響則是透過抑制腦下垂體分泌 *GH* 減少，而使胚胎生長發育異常。

在未來的實驗中，將採用 quantitative RT-PCR (Q-PCR)的方法，針對幾個關鍵基因的表現進行定量分析，以驗證所觀察的基因表現變化。另外，亦將比較不同濃度的酒精處理對胚胎產生的影響，以進一步釐清酒精中毒專一性病變的機制。

圖十一：酒精抑制頭骨發育及發育遲緩的可能機制



五、結論

在本實驗中，我們成功的利用基因定位雜交的方法找出酒精中毒造成胚胎頭骨發育異常的分子機制。在實驗中，與頭骨發育相關的 *sox9a* , *sox9b*, *Col2a1* 以及 *hand2* 基因的表現均受到酒精的抑制作用。這項結果顯示在胚胎發育過程中，酒精透過對上述基因的影響，造成神經脊細胞減少，細胞遷移異常，以及干擾軟骨細胞分化的現象，進而造成頭骨發育的嚴重缺陷。此外，在腦下垂體的生長激素表現亦受到酒精的抑制。這項實驗也對人類胎兒酒精中毒症候群提供了分子醫學上的重要線索。

六、參考文獻及附錄

Ahlgren, S. C., Thakur, V. and Bronner-Fraser, M. (2002). Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10476-81.

Aszodi, A., Hunziker, E. B., Olsen, B. R. and Fassler, R. (2001). The role of collagen II and cartilage fibril-associated molecules in skeletal development. *Osteoarthritis Cartilage* **9 Suppl A**, S150-9.

Carvan, M. J., 3rd, Loucks, E., Weber, D. N. and Williams, F. E. (2004). Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicol Teratol* **26**, 757-68.

Chen, E. and Ekker, S. C. (2004). Zebrafish as a genomics research model. *Curr Pharm Biotechnol* **5**, 409-13.

Chiang, E. F., Pai, C. I., Wyatt, M., Yan, Y. L., Postlethwait, J. and Chung, B. (2001). Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol* **231**, 149-63.

Cohen-Kerem, R. and Koren, G. (2003). Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity. I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol* **25**, 1-9.

Davies, J. E. and Miller, R. H. (2001). Local sonic hedgehog signaling regulates oligodendrocyte precursor appearance in multiple ventricular zone domains in the chick metencephalon. *Dev Biol* **233**, 513-25.

Deltour, L., Ang, H. L. and Duester, G. (1996). Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *Faseb J* **10**, 1050-7.

Duester, G. (1991). A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step. *Alcohol Clin Exp Res* **15**, 568-72.

Grummer, M. A. and Zachman, R. D. (1995). Prenatal ethanol consumption alters the expression of cellular retinol binding protein and retinoic acid receptor mRNA in

fetal rat embryo and brain. *Alcohol Clin Exp Res* **19**, 1376-81.

Herzog, W., Zeng, X., Lele, Z., Sonntag, C., Ting, J. W., Chang, C. Y. and Hammerschmidt, M. (2003). Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Dev Biol* **254**, 36-49.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W. and Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicol. Sci.* **86**, 6-19.

Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M. J., Wozniak, D. F., Koch, C., Genz, K., Price, M. T., Stefovskaja, V., Horster, F., Tenkova, T. et al. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* **287**, 1056-60.

Kimmel, C. B., Miller, C. T. and Moens, C. B. (2001). Specification and morphogenesis of the zebrafish larval head skeleton. *Dev Biol* **233**, 239-57.

Li, M., Zhao, C., Wang, Y., Zhao, Z. and Meng, A. (2002). Zebrafish *sox9b* is an early neural crest marker. *Dev Genes Evol* **212**, 203-6.

Miller, C. T., Schilling, T. F., Lee, K., Parker, J. and Kimmel, C. B. (2000). *sucker* encodes a zebrafish Endothelin-1 required for ventral pharyngeal arch development. *Development* **127**, 3815-28.

Mukherjee, R. A. S., Hollins, S. and Turk, J. (2006). Fetal alcohol spectrum disorder: an overview. *J R Soc Med* **99**, 298-302.

Reimers, M. J., Flockton, A. R. and Tanguay, R. L. (2004). Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* **26**, 769-81.

Scholpp, S., Wolf, O., Brand, M., and Lumsden, A. (2006) Hedgehog signaling from the zona limitans intrathalamica orchestrates patterning of the zebrafish diencephalons. *Development*, 133, 855-864.

Toso, L., Roberson, R., Woodard, J., Abebe, D. and Spong, C. Y. (2006). Prenatal alcohol exposure alters GABA(A)alpha5 expression: a mechanism of alcohol-induced learning dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* **195**, 522-7.

Vieira, C. and Martinez, S. (2006). Sonic hedgehog from the basal plate and the zona limitans intrathalamica exhibits differential activity on diencephalic molecular regionalization and nuclear structure. *Neuroscience* **143**, 129-40.

Wada, N., Javictan, Y., Nalson, S., Carney, T. J., Kelsh, R. N., and Schilling, T. F. (2005). Hedgehog signaling is required for cranial neural crest morphogenesis and chondrogenesis at the midline in the zebrafish skull. *Development* **132**, 3977-3988.

Yan, Y. L., Miller, C. T., Nissen, R. M., Singer, A., Liu, D., Kirn, A., Draper, B., Willoughby, J., Morcos, P. A., Amsterdam, A. et al. (2002). A zebrafish *sox9* gene required for cartilage morphogenesis. *Development* **129**, 5065-79.

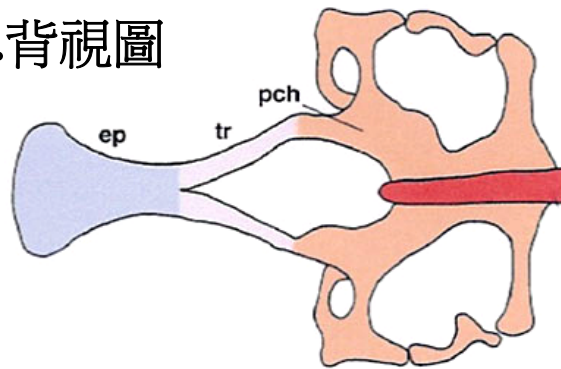
Yan, Y. L., Willoughby, J., Liu, D., Crump, J. G., Wilson, C., Miller, C. T., Singer, A., Kimmel, C., Westerfield, M. and Postlethwait, J. H. (2005). A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish *sox9* co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development* **132**, 1069-83.

蔡旻臻,朱育欣,尤嘉翕(2005)酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響,中華民國第45屆全國中小學科學展覽會中學組生物(生命科學)科第一名作品：
<http://www.ntsec.gov.tw/activity/race-1/45/senior/0407/040703.pdf>。

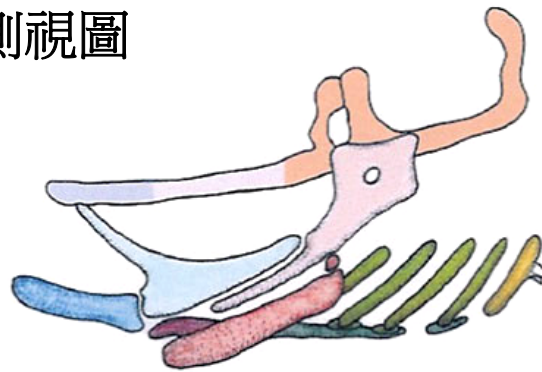
【附錄】

一、斑馬魚頭骨模型圖

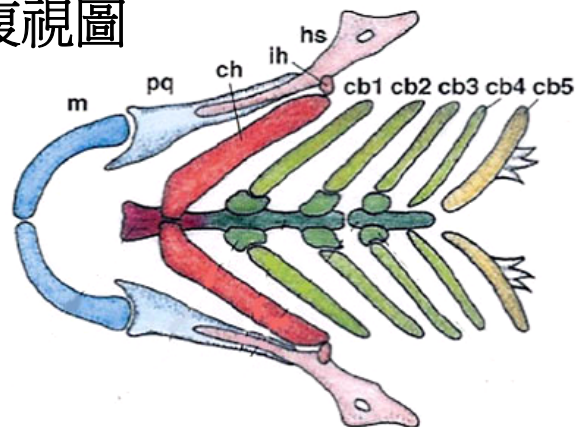
A. 背視圖



B. 側視圖



C. 腹視圖



評語

- 一、 能深入探討選定之生理反應機制。
- 二、 唯酒精之濃度甚高，因此可能造成更複雜之生理現象。
- 三、 思路清晰、表達之條理分明，能操作及瞭解精細的細胞生物實驗。