

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：動物學

作品名稱：酒精對斑馬魚胚胎眼睛發育的影響

得獎獎項：佳作

學校 / 作者：臺北市立第一女子高級中學 胡欣

作者介紹



我是一個愛花時間在實驗室的高三學生，科學實驗可以算是我的生活中很重要的一部分。我喜歡藉由研究的過程得到在學校或生活中都得不到的知識以及樂趣，並且從中學習，得到結論及成果。今年是第三次參加台灣國際科展，希望能夠藉由這次的機會與其他參賽隊伍多做交流，獲得平時在實驗室中無法得到的經驗。

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，造成胚胎畸形、成長遲緩等現象，稱為胎兒酒精症候群（fetal alcohol syndrome），但是其病理機制仍不清楚。最近的研究發現斑馬魚胚胎對於酒精有非常靈敏的反應，出現明顯的發育異常現象，例如心臟膨大、眼睛縮小、骨頭變形等現象，與人類胎兒酒精症候群相似，顯示斑馬魚非常適合作為研究胎兒酒精症候群的模式動物。在本實驗中，我們針對酒精影響視網膜神經發育的現象進行探討，並且也利用基因晶片篩選出胚胎發育時期受酒精影響的基因轉錄子，藉以了解酒精造成胚胎畸形發育的機制。實驗結果顯示在眼睛發育過程中，1.5%酒精浸泡會抑制視網膜神經細胞的分層（lamination），而進一步利用 RNA 定位雜交的方式以眼睛的標示基因 *rx1*、*pax6b*、*six3b*、*alpha-crystallin*、*rho*、*neuroD*、*huC* 觀察他們的表現，發現酒精會減少視網膜神經細胞的分化，造成眼睛發育的缺陷。在基因晶片的分析中，我們發現酒精處理會抑制許多控制眼睛發育的基因調控子的表現，包括了 *crx*、*rybp*、*irx4a*、*optx2*、*rx1*、*brn3b1* 與 *vsx1* 等，此外約有 16% 的眼睛相關基因亦受到酒精的抑制，遠高於其他基因受抑制的比例，顯示眼睛是酒精傷害最嚴重的區域之一。我們從實驗結果得知酒精並未對胚胎發育初期眼睛的發育造成明顯的影響，但是隨後由於控制細胞分化的幾個重要基因受到酒精的抑制作用，造成視網膜神經細胞的分化停止，引起眼睛的異常發育的情況。

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. Here we used zebrafish embryo as a model to investigate the toxic effect of alcohol in retinal development. The histochemical analysis revealed that the cell lamination was prohibited by alcohol incubation. It appears that the retinal cell differentiation was inhibited. As revealed by whole mount RNA *in situ* hybridization, it appears that the transcription of a number of retinal-related regulatory genes, including *rx1*, *pax6b*, *six3b*, *alpha-crystallin*, *rho*, *neuroD* and *huC*, were all inhibited in zebrafish embryo by alcohol exposure. The transcriptional profile of alcohol-exposed embryos was also compared with normal embryos by microarray analysis at different stages. It appears that 16% of retinal-related genes were all repressed by 1.5% alcohol incubation, including several retina-related transcriptional factors, including *crx*, *rybp*, *irx4a*, *optx2*, *rx1*, *brn3b1* and *vsx1*. Our results suggest that alcohol did not interfere the early development of the eye, but has inhibited the final cell differentiation of retina cells. This study helps us understand the molecular mechanism of alcohol-mediated retinal malformation.

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流產、死胎、胎兒畸形發育或智能障礙的情況 (Kesmodel et al., 2002a; Kesmodel et al., 2002b)。其中酒精所引起的胎兒畸形發育包括顱面畸形、中樞神經發育受阻，成長遲緩、視網膜神經發育停止、心血管異常等現象，稱之為胎兒酒精中毒症候群 (fetal alcohol syndrome) (Mukherjee et al., 2006)，有三分之一以上酗酒孕婦其胎兒會患有酒精中毒症候群。而酒精已被列為人類主要的化學畸胎原 (chemical teratogen) 之一，但目前對於造成胎兒酒精中毒症候群的可能細胞病理機制所知仍非常有限。已知的可能機制包括神經細胞凋亡 (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)、產生自由基誘發細胞氧化緊迫 (oxidative stress) (Cohen-Kerem and Koren, 2003)、細胞附著缺陷 (Bearer, 2001) 等。由於酒精對於胎兒的發育會造成極大的傷害，並且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大都是以小型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。

由於近年來科學家的努力，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的相似性。其受精卵透明，發育期短 (3 天完成孵化)，而其胚胎發育的過程與哺乳動物胚胎相似，並且對環境毒物有非常靈敏的反應，因此經常被用來作為研究脊椎動物胚胎發育以及毒物生理反應的模式動物 (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，且隨著酒精濃度的上升，畸形發育的情況愈加嚴重，尤其在酒精濃度達到 1.5% 以上時，更容易觀察到各種的胎兒酒精症候群的特徵，但是並未引起明顯細胞緊迫

基因 hsp70 的表現(Carvan et al., 2004; Hallare et al., 2006; Reimers et al., 2004)。由於胎兒酒精症候群外觀最明顯的徵狀在顱面與眼睛缺陷，而其機制尚不清楚，因此在我們的研究中乃專注在酒精對這些部位發育的影響。2006 年的研究中，我們曾針對斑馬魚的頭骨發育發現酒精會造成胚胎神經脊細胞減少，細胞遷移異常以及細胞分化停滯，另外亦降低腦垂體中的生長激素基因的表現，最後造成頭骨畸形且生長遲緩的現象（2007 年台灣國際科展動物學佳作：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，<http://www.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2007/pdf/050003.pdf>）。在這次的研究中，我們將觀察的重點放在酒精對眼睛發育的影響，並且利用生物晶片篩選的方式，分析酒精對胚胎發育時期基因體表現的影響。

（二）研究目的

由於在酗酒所引起的胎兒酒精症候群中，有相當多的比例會發生視網膜異常以及視力功能受損的情況，但是對其分子機制並不清楚。過去大部分的研究都是以哺乳動物為模式來探討酒精對胚胎發育的影響，但是受限於胚胎在子宮內的發育不易觀察。由於斑馬魚的胚胎在發育初期胚胎透明，且孵化期短，非常適合觀察胚胎發育的變化。另外，由於斑馬魚基因體已完成大部分的定序工作，提供了相當完整的標示基因序列，可供作追蹤胚胎發育的最佳工具，再者，近年來所發展的基因晶片篩選可對基因體的活性變化進行大規模分析，因此在本次的研究中，我們以眼睛發育的幾個關鍵性基因來觀察酒精對眼睛發育的影響，並且利用基因晶片篩選發育時期受到酒精抑制的基因，藉以了解酒精誘發眼睛異常發育的可能機制。

研究方法與流程

(一) 研究設備及器材

A. 實驗生物

斑馬魚(*Danio rerio*) 胚胎

B. 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)。

C. 酵素試劑

蛋白酶 (50ng/ml Proteinase K)

D. 實驗藥品及配方

- 0.37%鹽酸
37%鹽酸 2.5ml
蒸餾水 247.5ml
- 酸性酒精
100%絕對酒精 140ml
0.37%鹽酸 60ml
- 0.1% 阿爾襄藍
酸性酒精 50ml

- 阿爾襄藍粉末 5g
4. 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 ,
 5. 70% 甘油 35 ml 甘油加 15 ml 蒸餾水。
 6. 磷酸鹽緩衝液 (**PBS**, Phosphate Buffered Saline)

NaCl	8 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	2.88 g
KH ₂ PO ₄ pH7.4	0.48 g
蒸餾水	1000 ml
 7. 4% 聚甲醛 4 g 聚甲醛加 100 ml PBS。
 8. PBT : 以 PBS 配製 0.1%Tween 20
 9. 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 。
 10. 20×SSC

NaCl	87.64g
Na citrate	44.1g
蒸餾水	500ml
 11. HYB⁻

50-70% Formamide
5× SSC
0.1% Tween20
 12. HYB⁺

HYB ⁻
Heparin 50 g/ml
Yeast tRNA 500 g/ml
 13. 順丁烯二酸溶液 (Maleic acid buffer)

100mM Maleic acid
150mM NaCl
0.1% Tween20
 14. 阻滯液 (blocking solution)

blocking reagent 1g
Maleic acid buffer 100ml
 15. NTMT

0.1M NaCl
0.1% Tween20
50mM MgCl ₂

0.1M Tris-HCl

16. 呈色劑(BCIP/NBT)

每 1 ml NTMT 加 3.5 μ l BCIP 以及 4.5 μ l NBT

(二) 實驗過程

1. 觀察眼睛發育時期標示基因的表現：收集斑馬魚受精卵，浸泡於 1.5%酒精中，定期觀察胚胎變化，並進行 RNA 定位雜交分析眼睛發育時期各標示基因的表現受酒精的影響。
2. 酒精對胚胎發育時期基因體表現的影響：利用基因晶片，篩選受酒精抑制的基因，找出控制眼睛發育相關的基因調控子。

(三) 實驗方法

A. 斑馬魚飼養與受精胚胎收集 (Westerfield, 2000)

A-1 斑馬魚之飼養

使用 7-20 個月大的斑馬魚為實驗用魚，飼養於具有缸頂式過濾器循環系統之壓克力水缸 (30.5cm \times 61cm \times 33.5cm – W \times L \times H)，水位高 30 公分，水溫控制在 28 $^{\circ}$ C，以光照 14 小時，黑暗 10 小時的週期飼養。每日餵食三次飼料(海豐)。雌魚體型稍大，腹圓而大，體色銀白；雄魚細長苗條，體色略黃。以體色易分辨雌雄。斑馬魚魚卵為透明無黏性之沉性卵，因成魚嗜食受精卵，故將水缸底層鋪放玻璃珠使受精卵和成魚隔離。

A-2 斑馬魚受精卵收集以及酒精浸泡

收集斑馬魚受精卵前一天，將雌魚及雄魚移入備妥之魚缸內，在黑暗週期結束前兩個小時，以日光燈或檯燈照射雌雄和雄魚，促使其追尾，約 20 分鐘左右，將魚挪開，以虹吸管將魚卵收集。將魚卵以清水清洗後，浸泡於含有 30 ml 1.5%酒精之培養皿中，置入 28.5 $^{\circ}$ C 培養箱中孵化，每日取出置換 1.5%酒精溶液，並定期取出胚胎固定，直至實驗結束。

B. RNA 全覆式原位雜交 (RNA whole-mount in situ hybridization)

B-1 探針製作

將含有探針的重組質體 DNA 10 μ g，根據其正反接的情形，依次加入12 μ l 10 \times 酵素緩衝液、1.2 μ l 100 \times BSA、2 μ l限制酵素再加入H₂O 至總體積120 μ l，置於37 $^{\circ}$ C 下，作用3~4小時，將環狀質體直線化。取5 μ l反應液進行DNA電泳，確定內切酵素是否有作用完全。

取1 μ g(約8 λ)linearized plasmid DNA 作為模板、2 μ l RNA polymerase(T7, SP6,T3; 20U/ μ l)、2 μ l 10 \times DIG RNA labeling mix、4 μ l 5 \times Transcription Buffer、1 μ l RNase inhibitor (20U)、2 μ l DTT (100mM) 均勻混合後，以DEPC-H₂O 定量至最終體積為20 μ l，置37 $^{\circ}$ C 中，反應2.5~3小時，進行*in vitro* transcription 產生單股RNA。

加入2 μ l DNase I (20U, RNase free)，於37 $^{\circ}$ C，作用30分鐘，以去除DNA 模板。加入2 μ l EDTA (0.2M)、2.5 μ l LiCl (4M) 及75 μ l isopropanol (100%) 充分混合，置-20 $^{\circ}$ C 下，30分鐘。以14,000rpm速度離心30分鐘，去除上清液後，加入1ml 75% EtOH (DEPC-H₂O)，利用vortex 的方式清洗pellet，再以14,000rpm 的速度離心5分鐘，去除清洗的75% EtOH (DEPC-H₂O)，置於室溫下，待pellet 乾燥後，溶於100 μ l formamide 中，最後取出5 μ l，以1% agarose(in TAE)電泳作鑑定，並將其餘核糖核酸(RNA)探針(probe)分裝置於-20 $^{\circ}$ C 保存備用。

B-2 抗體的預吸附

將存在-20 $^{\circ}$ C methanol 環境下的胚胎，進行以下的復水步驟：以75% methanol/25% PBT 溶液作用5分鐘1次，再以50% methanol/50% PBT 溶液作用5分鐘1次，接著以25% methanol/75% PBT 溶液作用5分鐘1次，最後以100% PBT 溶液作用5分鐘4次。

將復水後的胚胎依固定前不同發育時期處以不同濃度的proteinase K 處理：若胚胎發育時數不到24小時，不需要以proteinase K 處理；若胚胎發育時數為24小時，需以10 μ g/ml proteinase K 作用12~15分鐘；若胚胎發育時數為36小時，需以10 μ g/ml 蛋白酶proteinase K 作用15~20分鐘；若胚胎發育時數為48小時，需以25 μ g/ml proteinase K 作用25分鐘；若胚胎發育時數為60小時，需以25 μ g/ml proteinase K 作用30分鐘；若胚胎發育時數為72小時，需以50 μ g/ml proteinase K 作用25分鐘；若胚

胎發育時數為84小時，需以50 μ g/ml proteinase K 作用30分鐘；若胚胎發育時數大於96小時，需以100 μ g/ml proteinase K 作用30分鐘。

隨後以PBT 溶液浸潤2次，再以4% paraformaldehyde (in PBS) 浸潤20分鐘，以避免魚體過度被digest，之後再以PBT 清洗，5分鐘3~5次。將HYB⁺ 放在65 $^{\circ}$ C 的 heater 上預熱5分鐘。再將胚胎置換於此HYB⁺，進行3小時預雜交反應。之後以65 $^{\circ}$ C 預熱以下的溶液(0.2 \times SSC要以70 $^{\circ}$ C 預熱)，並以下列溫度及時間進行溶液置換：在65 $^{\circ}$ C 下，以75% HYB⁻/25% 2 \times SSC 溶液作用5分鐘；再以50% HYB⁻/50% 2 \times SSC 溶液作用5分鐘；再以25% HYB⁻/75% 2 \times SSC 溶液作用5分鐘；接著以2 \times SSC 溶液作用5分鐘，最後在70 $^{\circ}$ C 溫度下，以0.2 \times SSC 溶液作用10分鐘2次。

以maleic acid buffer 溶液1ml 浸潤胚胎。加入1ml 1 \times blocking reagent，取2 μ l Anti-DIG-AP Antibody加入其中，置4 $^{\circ}$ C，旋轉混合大於14小時。以14,000rpm 速度離心10分鐘，取上清液。便可得濃度為1/500之Ab solution。

B-3 探針原位雜交

以4% PFA/PBS(Para formaldehyde/PBS)固定胚胎，overnight。Para formaldehyde 為一固定液，造成細胞內蛋白質的共價結合，將蛋白質固定，藉此固定存於細胞內特定位置的 mRNA。以 PBT 溶液清洗固定的胚胎，5分鐘兩次，PBT 為一 buffer solution，T20 為一介面活性劑，可以避免魚體組織相黏。清洗完成之後依照下列步驟進行脫水(Dehydration)，以便長期保存：加入 200 μ l 75% PBS + 25% methanol 溶液，作用 5 分鐘；加入 200 μ l 50% PBS + 50% methanol 溶液，作用 5 分鐘；加入 200 μ l 25% PBS + 75% methanol 溶液，作用 5 分鐘；加入 500 μ l 100% methanol 溶液，作用 10 分鐘 2 次。

在開始實驗的第一天，將脫水的胚胎依照下列步驟進行復水 (Rehydration)：以75% methanol/25% PBT 溶液作用5分鐘1次，再以50% methanol/50% PBT 溶液作用5分鐘1次，接著以25% methanol/75% PBT 溶液作用5分鐘1次，最後以100% PBT 溶液作用5分鐘4次。將復水後的胚胎依固定前不同發育時期處以不同濃度的 proteinase K 處理，如下：若胚胎發育時數不到24小時，不需要以proteinase K 處理；若胚胎發育時數為24小時，需以10 μ g/ml proteinase K 作用12~15分鐘；若胚胎發育

時數為36小時，需以10 μ g/ml proteinase K 作用15~20分鐘；若胚胎發育時數為48小時，需以25 μ g/ml proteinase K 作用25分鐘；若胚胎發育時數為60小時，需以25 μ g/ml proteinase K 作用30分鐘；若胚胎發育時數為72小時，需以50 μ g/ml proteinase K 作用25分鐘；若胚胎發育時數為84小時，需以50 μ g/ml proteinase K 作用30分鐘；若胚胎發育時數大於96小時，需以100 μ g/ml proteinase K 作用30分鐘。加入200 μ l PBT 中止Proteinase K 的作用。加入200 μ l 4% PFA/PBS 在室溫下作用20分鐘進行再次固定。PFA 可抑制proteinase K的活性，避免魚體被過度地digest。加入PBT 清洗5分鐘4次。之後進行預雜交反應 (Prehybridization)，先加入HYB⁻ 浸潤胚胎，HYB⁻ 內含60% formamide、5 \times SSC及0.1% Tween 20，formamide 可幫助打開probe 的二級結構，SSC 為鹽類，可提供離子幫助probe 的結合。加入200 μ l 預熱的HYB⁺，在65 $^{\circ}$ C 下作用2.5小時進行預雜交反應。HYB⁺ 內含HYB⁻、yeast tRNA 和heparin，yeast tRNA 和heparin 可幫助攜帶probe進入細胞中。

先將 RNA probe-HYB⁺ (each 200 μ l HYB⁺ containing 20~100ng RNA probe) 在 68 $^{\circ}$ C 加熱作用 10 分鐘,然後迅速置冰。此步驟為本實驗之關鍵點，68 $^{\circ}$ C 加熱之後迅速置冰，可以避免因為緩慢降溫，造成 probe 自我互補黏合的情況。取 200 μ l RNA probe-HYB⁺ 加入胚胎中，在 65 $^{\circ}$ C 下作用，過夜。

在實驗第二天，依照下列步驟，進行探針的移除 (Probe removal)：

於 65 $^{\circ}$ C 溫度下，先加入 75% HYB⁺/25% 2 \times SSC 溶液作用 10 分鐘；再以 200 μ l 50% HYB⁺/50% 2 \times SSC 溶液作用 10 分鐘；再以 200 μ l 25% HYB⁺/75% 2 \times SSC 溶液作用 10 分鐘；接著以 200 μ l 2 \times SSC 溶液作用 10 分鐘；隨後在 70 $^{\circ}$ C 溫度下，以 200 μ l 0.2 \times SSC 溶液作用 45 分鐘 2 次；最後在室溫下，以 500 μ l Maleic acid buffer 作用 5 分鐘 2 次。由於 SSC 的濃度逐漸降低，而無法提供足夠的離子幫助 probe 鍵結，因此可洗去非專一性結合的 probe。

加入 200 μ l maleic acid buffer (100mM maleic acid, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) 浸潤胚胎之後，加入 500 μ l 1 \times blocking reagent 在室溫作用 2 小時，進行 blocking 的反應。當 probe 和 mRNA 結合後，可藉由 blocking reagent 覆蓋未與 probe 結合的

mRNA 位置，使 antibody 和 DIG 的結合更具有專一性。

將前一步驟加入之 blocking reagent 吸出，加入 500 μ l antibody solution(1:8000)，置於 4 $^{\circ}$ C 下作用，過夜。

在實驗第三天，將 antibody solution 吸出，加入 500 μ l maleic acid buffer 清洗未專一性結合 antibody，作用 30 分鐘，並重複此一步驟 4 次。之後加入 500 μ l freshly made NTMT buffer，作用 5 分鐘，並重複此一步驟 4 次，NTMT buffer 通常在實驗之前配置，若預先配置，在保存過程當中，可能會產生 particle 而影響之後的呈色反應。加入 400 μ l NBT/BCIP buffer 進行呈色反應，並依據探針和胚胎時期的不同，來調整呈色的時間。呈色劑 (BCIP/NBT buffer) 的配置可以經由過濾，可以減少 particle 產生。加入 500 μ l PBT 作用 10 分鐘，並重複此一動作 3 次以終止呈色反應。加入 500 μ l 100 % methanol 作用 20 分鐘，並重複此一步驟 3 次以洗掉呈色非專一性的背景值。加入 500 μ l PBT 作用 10 分鐘，三次。加入 400 μ l 4% PFA 作用 5 分鐘，2 次，以進行再次固定。加入 500 μ l PBT 清洗三次，之後進行拍照或在 PBT 的狀態下保存於 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。

C. 斑馬魚基因晶片雜交分析

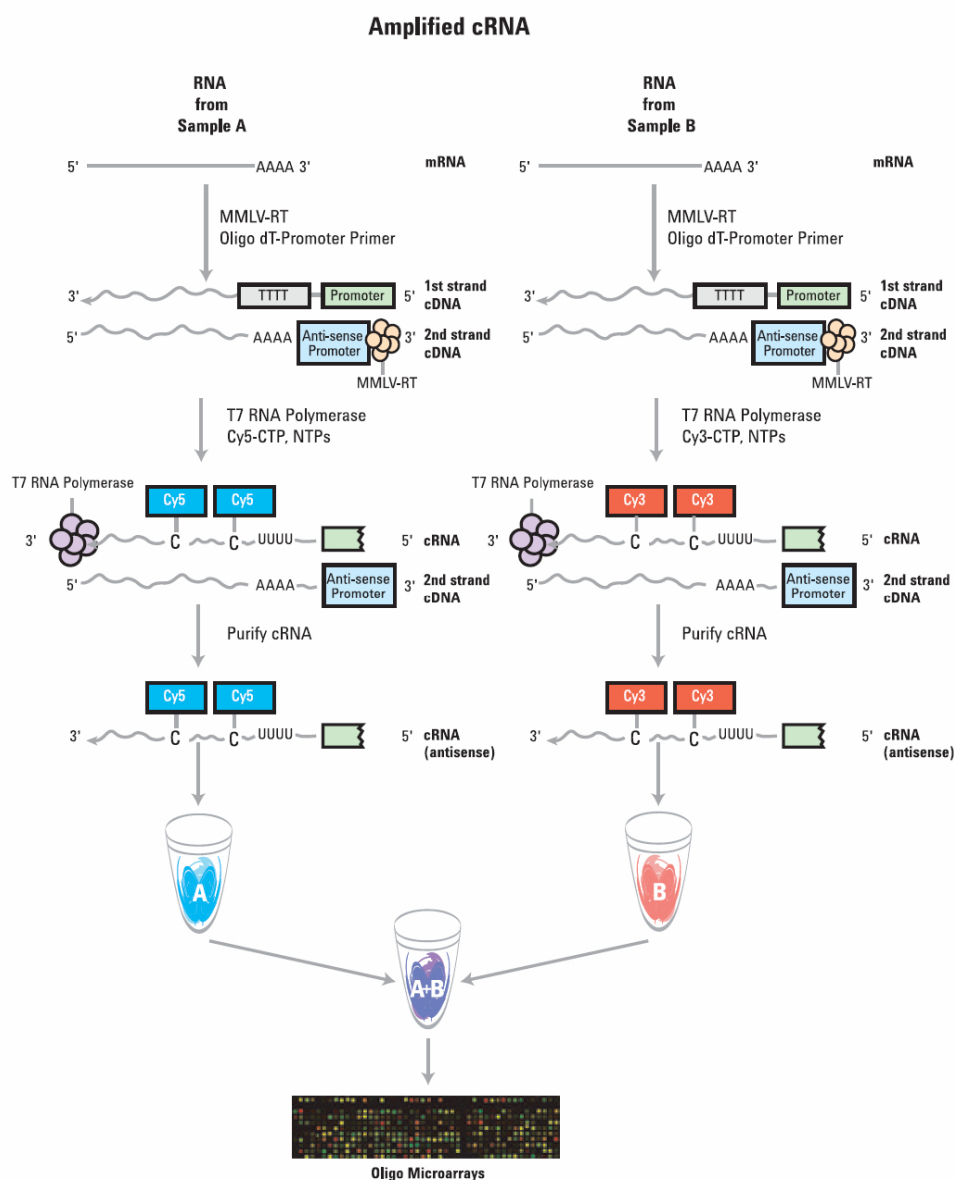
C-1 RNA 純化

將 1.5%酒精處理的胚胎與對照組胚胎放至 1.5ml tube 中，加入 500 μ l Tri reagent，以浸泡過 DEPC-H₂O 的研磨棒迅速且確實的將組織或胚胎磨碎，之後再加入 500 μ l 的 Tri reagent，靜置在冰上 1 分鐘。加入 250 μ l chloroform，震盪後，靜置在冰上 1 分鐘後離心 25 分鐘，取上清液後再以 Agilent Total RNA Isolation Mini Kit (Agilent) 進行處理，最後加入等體積的 70% 酒精沉澱。

C-2 cDNA 螢光標定與基因晶片雜交

使用 Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent) 進行 cDNA 的合成與螢光物質標定，控制組以 Cyanine 3-CTP (Cy-3) 標定，實驗組則 Cyanine 5-CTP (Cy-5) 標定，並由 Agilent 廠商 (威健公司) 提供協助以 Agilent G2519F 產品 Zebrafish Oligo Microarray Kit 斑馬魚基因晶片進行標準化基因晶片雜交分析，其實

驗步驟如示意圖。



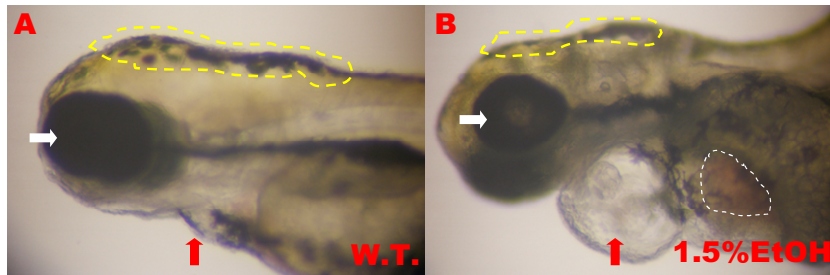
C-3 微矩陣資料處理

利用各微矩陣資料中處理過的 Cy-3 與 Cy-5 數值，以 6hpf 時期控制組胚胎 Cy-3 數值的中間數為基礎，將其他時間點的數值以此進行規格化 (normalization)，因此可以不同微矩陣資料進行相互比較。

使用 α -crystalline 於 12 小時微矩陣資料中的控制組數值 141.8 為篩選的閾值，以此判斷控制組表現與否作為定義，設計不同時間點的控制組基因表現與否來分組。

研究結果

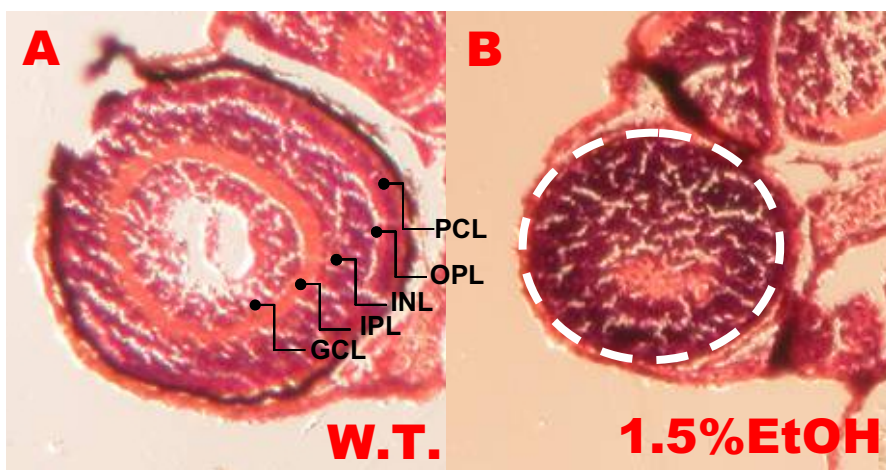
(一) 形態觀察：比較不同濃度酒精對於 72 hpf 時期之斑馬魚胚胎外觀影響。



圖一：72 hpf 胚胎外觀側視圖

斑馬魚胚胎在 72hpf 時已經孵化完成，大部分的器官也已經發育，因此本實驗選擇在 72hpf 時觀察其外型的變異。實驗結果發現以 1.5%酒精處理後，胚胎的眼睛（圖一 B 白色箭頭所指處）和頭顱明顯變小，心包膜（圖一紅色箭頭所指處）與卵黃囊(yolk)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，且有瘀血的情況（白色虛線部位），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（黃色虛線部位）。

(二) 組織切片觀察：酒精抑制眼睛視網膜神經細胞分化

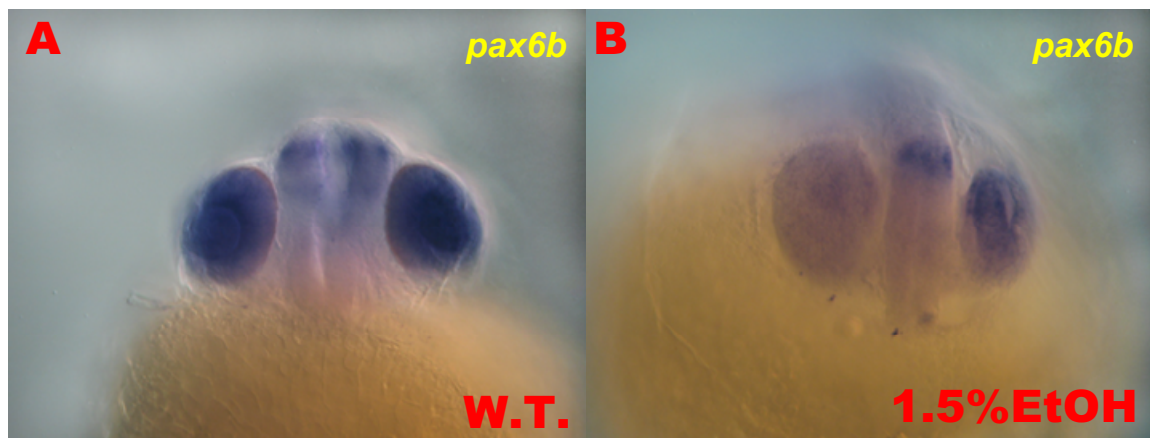


圖二：84 hpf 時期視網膜神經細胞分層結構。PCL，感光細胞層（photoreceptor cell layer）；OPL，外神經叢（outer plexiform layer）；INL，內核層（inner nuclear layer），IPL，內神經叢（inner plexiform layer），GCL，神經節細胞（ganglion cell layer）。

斑馬魚的眼睛發育大約在受精後 12 小時 (12 hours-post-fertilization, 12 hpf) 開始，從神經管前端向左右延伸為視原基 (optic primordia)，逐漸形成視胞 (optic vesicle)，隨後由視腔分隔形成柱狀皮層，經過細胞遷移以及向內凹陷後形成眼杯 (optic cup)。在 24 hpf 時期左右，眼杯內外背側的柱狀細胞開始逐漸分化為神經視網膜 (neural retina)，晶體則與外胚層細胞分離，而被視網膜所包圍。新生成的血管通過脈絡膜溝 (choroids fissure)，而在視網膜內壁分支形成玻璃狀血管 (hyaloid blood vessels)。視網膜的發育過程約在 72 hpf 時期發育完成，細胞由內而外分為感光細胞、外神經叢、內核層、內神經叢與神經節細胞等層，其中感光細胞含有桿狀細胞 (rod cells) 與錐狀細胞 (cone cells)，內核層含有無軸突細胞 (amacrine cells) 與兩極細胞 (bipolar cells)。我們取 84 hpf 時期胚胎觀察，發現 1.5% 酒精浸泡的胚胎，其視網膜無法分層，停留在未分化的狀態 (圖二 B)，細胞排列紊亂。

(三) 酒精對眼睛發育基因的影響

1. *pax6b* 基因

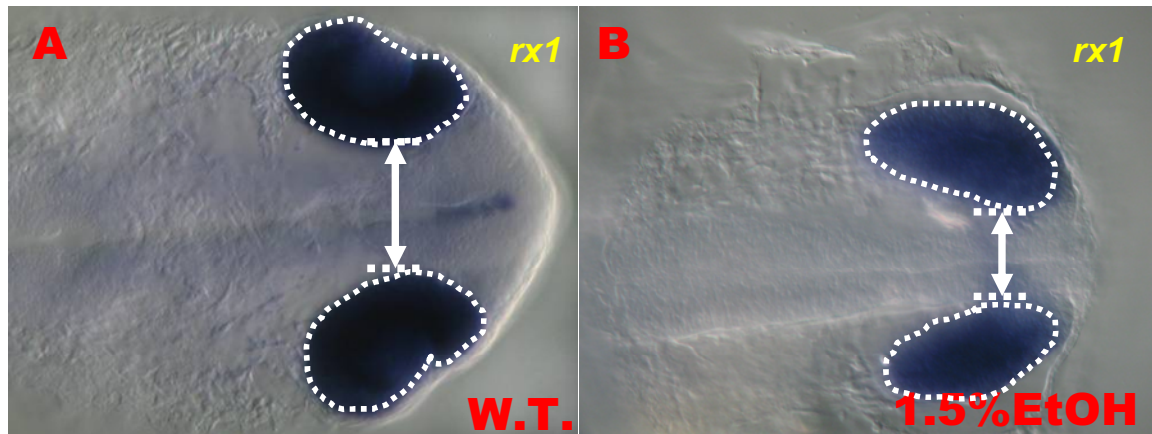


圖三：1.5%酒精會降低控制眼睛發育的重要轉錄子 *pax6b* 基因的表現。發育階段：24 hpf 時期。

Pax6 為一屬於 homeobox 家族的轉錄子，控制了脊椎動物視網膜及晶體的發育。在蛙類 (*Xenopus laevis*) 的胚胎內，*pax6* 的錯位表現 (misexpression) 會誘導異位性 (ectopic) 眼睛的生成 (Chow et al., 1999)。在斑馬魚中具有 *pax6a* 和 *pax6b* 兩種 *pax6* 基因，其轉譯蛋白 *Pax6a* 與 *Pax6b* 皆屬於基因活化子 (activator)，而 *Pax6b*

活化下游目標基因的能力比 Pax6a 強(Nornes et al., 1998)。在酒精處理的胚胎中 *pax6b* 基因的表現受到抑制而降低。此外我們也觀察到在酒精處理的胚胎中，神經管並未分開形成腦室，顯示中樞神經的發育亦發生了問題。

2. *rx1* 基因

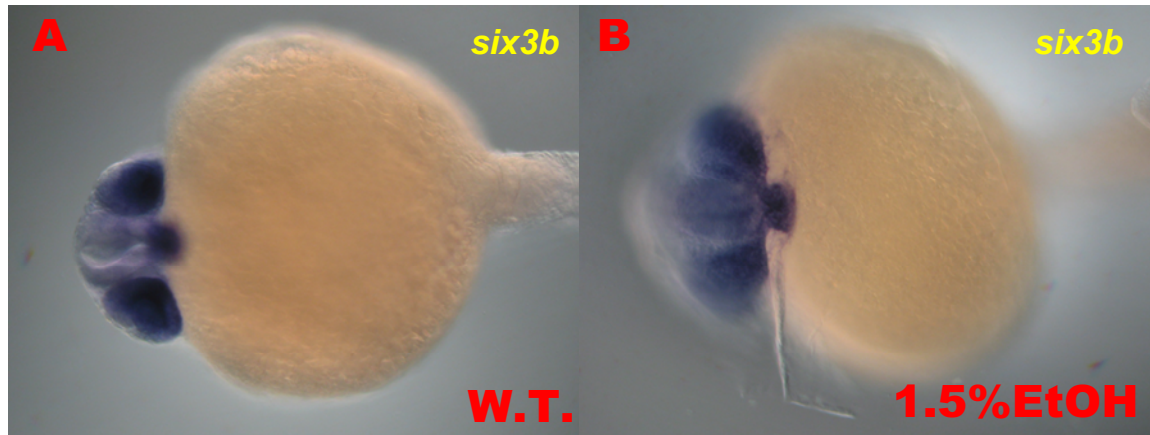


圖四：1.5%酒精會降低控制眼睛發育的重要轉錄子 *rx1* 基因的表現，並且造成視杯範圍縮減（虛線區域），兩眼距離縮短（雙箭頭標示）。發育時期：24 hpf。

rx1 與 *pax6* 同屬於 homeobox gene 家族，具有調控眼睛前驅細胞的增生並具有誘導前驅細胞發育成視網膜和晶體的功能(Mathers and Jamrich, 2000)。在眼睛發育的初期，*rx1* 會表現在視網膜幹細胞 (retinal stem cell) 和前驅細胞 (progenitor cell)，在成熟的視網膜 (retina) 中，若是增加 *rx1* 的表現會抑制或是延遲眼睛神經細胞的分化(Zaghloul and Moody, 2007c)以及抑制一些與眼睛發育相關的基因如 *otx2*、*six3*、*pax6* 的表現(Andreazzoli et al., 1999)。斑馬魚中有三種 *rx* 基因分別為 *rx1*、*rx2*、*rx3* 在視網膜發育初期表現於視原基 (optic primordia) 中，過量表現 *rx1* 與 *rx2* 會造成眼睛增大 (Chuang et al., 1999; Chuang and Raymond, 2001; Mathers et al., 1997)，同時也會造成視網膜各細胞的增生(Casarosa et al., 2003)。最近的研究中發現，*rx1* 會讓細胞停留在眼睛幹細胞的狀態持續增生，並且延遲其它促使眼睛前驅細胞分化的基因的表現(Zaghloul and Moody, 2007a)。在酒精浸泡的胚胎中，*rx1* 基因的表現減少，視杯的範圍縮小，同時兩眼間的距離縮短，顯示眼睛幹細胞的數目

受到酒精的影響而減少，影響眼睛的發育。

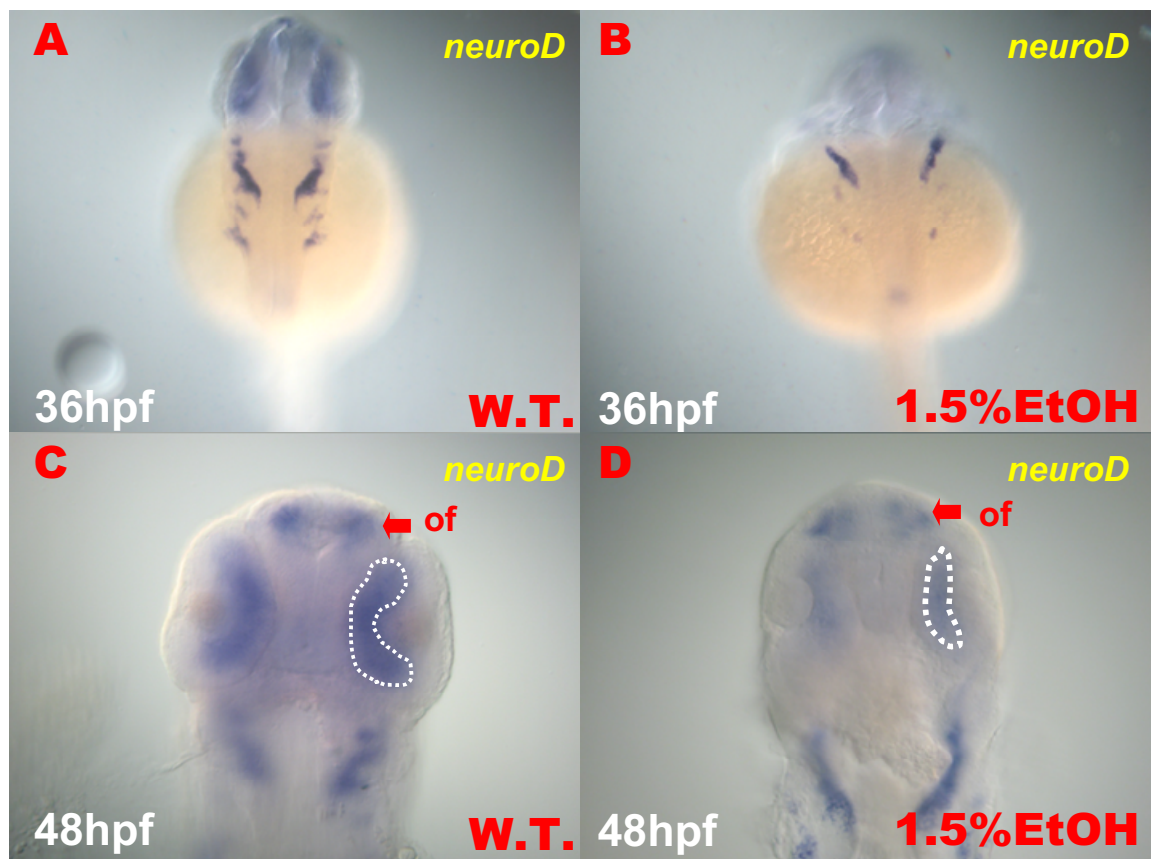
3. *six3b* 基因



圖五：1.5%酒精輕微降低眼睛部位的 *six3b* 基因的表現活性。發育時期：24 hpf。

Six3 亦為 homeobox gene 家族的一員，控制晶體細胞的發育。在老鼠的胚胎中 *six3* 最先表現在晶狀體基板 (lens placode) 的部位，而在分化的過程當中，表現在晶體的上皮組織 (epithelium) (Oliver et al., 1995)。在青鱗魚 (medaka) 的胚胎中，*six3* 表現在晶體外胚層 (ectoderm)，但在晶體 (lens) 開始分化之前，*six3* 的表現量會逐漸下降 (Loosli et al., 1998)。在青鱗魚胚胎耳囊的部位錯位表現 (misexpression) 老鼠 *six3* 基因會誘導耳囊的細胞形成晶體 (Oliver et al., 1996)。在實驗中，我們發現 1.5% 酒精雖然亦會降低控制晶體發育的 *six3b* 基因的表現，但是其受影響的程度比 *pax6b* 以及 *rx1* 基因所受的影響輕微。

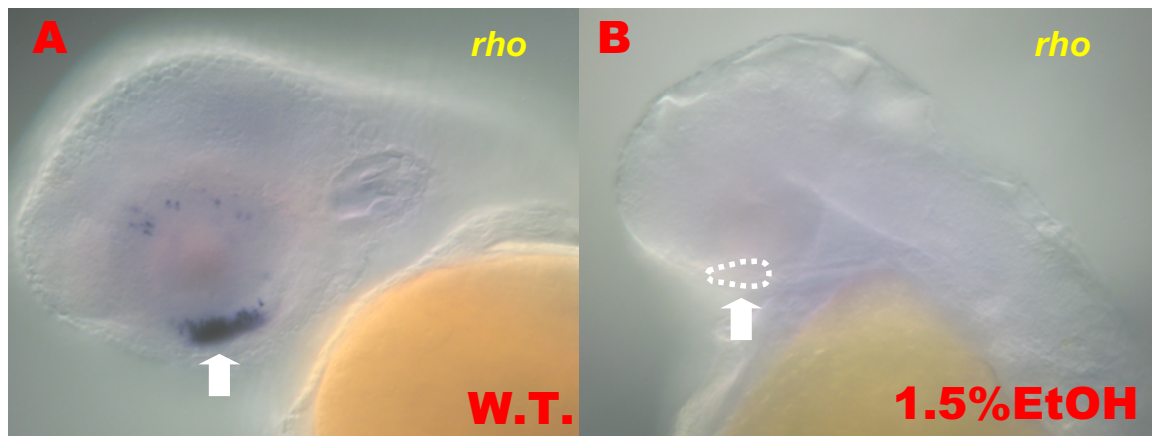
4. *neuroD* 基因



圖六：1.5%酒精會延遲腦部 *neuroD* 基因表現的時間 (B)，並且降低在視網膜 (白色虛線) 以及嗅球 (olfactory bulb, 紅色箭頭) 區域的表現。

NeuroD 為一 bHLH DNA 辨識蛋白家族的成員，在老鼠胚胎發育過程中會表現在視網膜上尚未分化的前驅細胞 (undetermined precursor cells) 和發育中的無軸突細胞 (amacrine cell) 與感光細胞 (photoreceptors)，並控制這些細胞的分化 (Morrow, 1998; Yan and Wang, 1998)，在視網膜細胞的分化後其扮演相當重要的角色 (Ahmad et al., 1998)。在我們的實驗當中發現 1.5% 酒精會延遲頭部 *neuroD* 基因的表現時期 (圖六 B)，並且降低在視網膜區域以及嗅球區域的表現 (圖六 D)，顯示酒精會干擾視網膜細胞的分化工作。

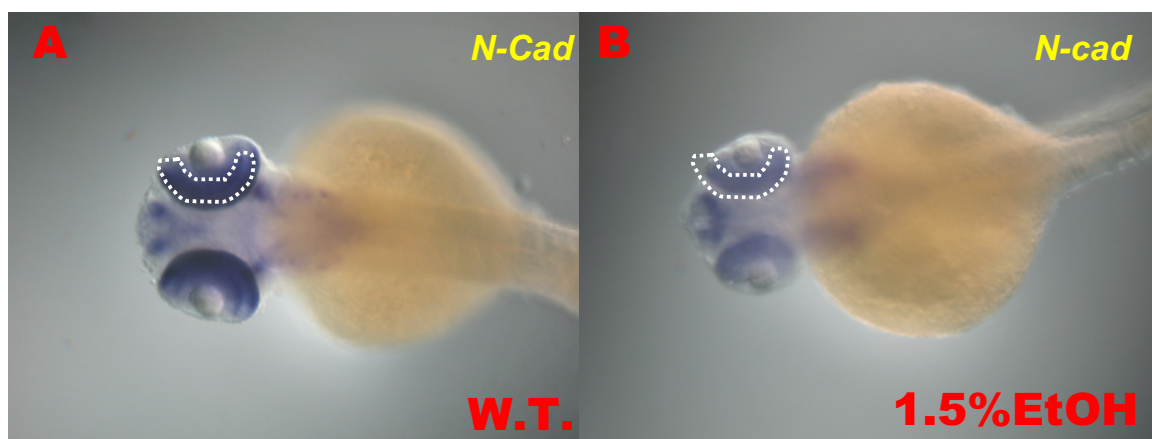
5. *rho* 基因



圖七：1.5%酒精會抑制視紫蛋白基因表現（B，白色虛線）。發育時期：72 hpf。

rho 為感光細胞中的視紫蛋白（rhodopsin）之基因，其轉譯產物視紫蛋白為桿狀感光細胞上之膜蛋白，屬於 G-protein-coupled receptors (GPCR) 蛋白質家族 (Vihtelic et al., 1999)，其功能在協助眼睛在微弱光度下進行黑白影像的形成。在斑馬魚胚胎內，*rho* 約在 50hpf 時期開始表現在視網膜腹側的部位 (Raymond et al., 1995)。在本實驗中，我們以 *rho* 基因作為視網膜中桿狀感光細胞的標示基因，以判別感光細胞的分化狀況。實驗結果發現 1.5%酒精會抑制 *rho* 基因的表現，顯示感光細胞的分化受到干擾。

6. *N-cadherin* 基因

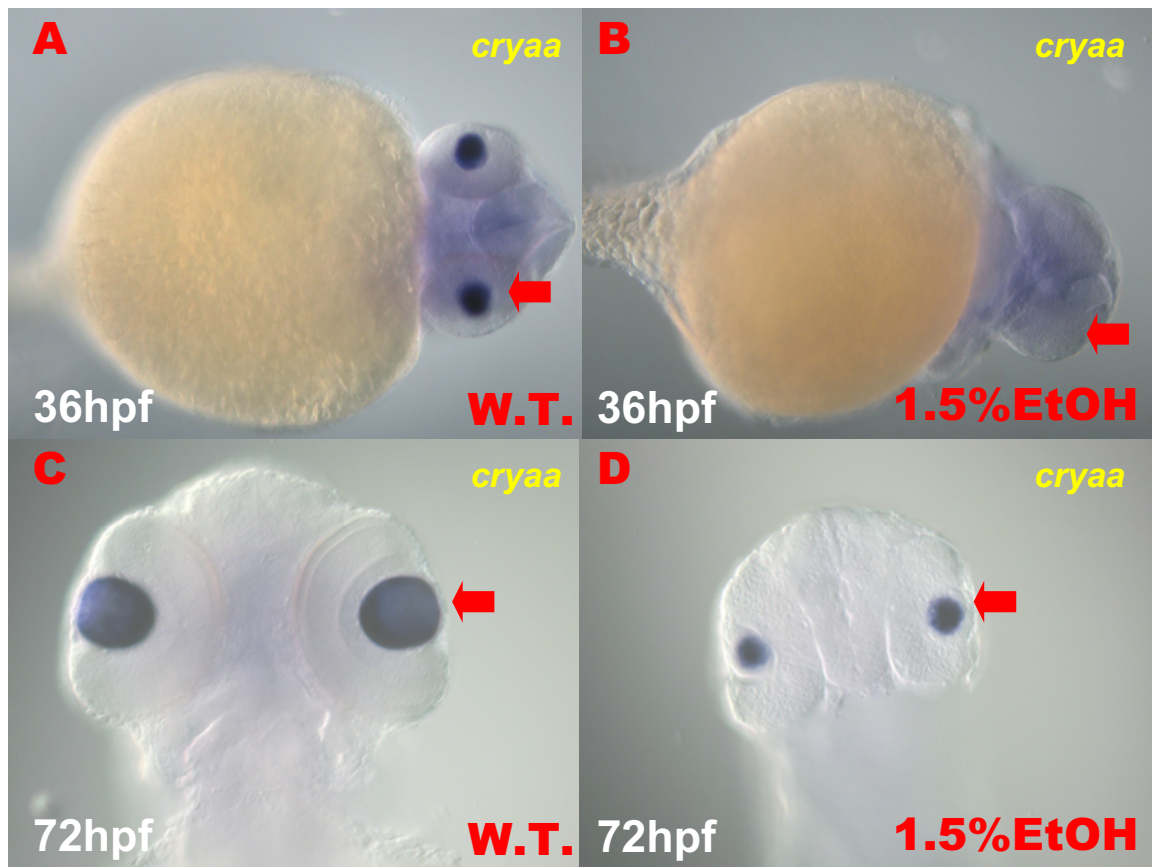


圖八：1.5%酒精抑制視網膜 *N-cadherin* 基因的表現。

N-cadherin (*N-cad*) 基因為一鈣離子依賴性細胞附著蛋白 (Ca^{2+} -dependent cell

adhesion protein)，在視網膜細胞分層上扮演了重要的角色。基因突變會造成嚴重的視網膜分層缺陷(Erdmann et al., 2003; Masai et al., 2003)。在實驗中發現 1.5%酒精浸泡會降低視網膜區域 N-cad 的表現(白色虛線部位)，這項結果可能是導致最終視網膜神經細胞分層失敗的一項重要因素。

7. α -A crystalline (*cryaa*)

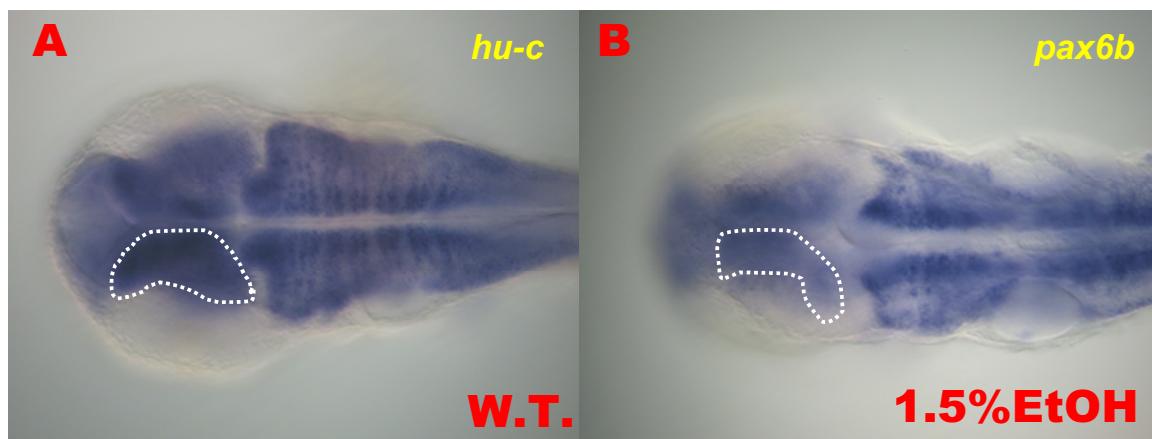


圖九：1.5%酒精延遲 alpha crystalline-A chain 基因的表現 (B)，且其表現區域大幅縮小 (D)。

alpha crystalline-A chain 為一小型蛋白摺疊輔助因子 (molecular chaperon)，會在晶體纖維細胞 (lens fiber cell) 中表現，主要在幫助晶體蛋白避免錯誤摺疊，造成白內障病變 (Cataracts) (Bloemendal et al., 2004; Franck et al., 2004; Goishi et al., 2006; Horwitz, 2003)。在本實驗中主要是以 *alpha crystalline-A chain (cryaa)* 作為晶體的標示基因，以觀察酒精對晶體發育的影響。在斑馬魚胚胎中 *cryaa* 基因的表現在 30 hpf 時期前即在晶體發育的部位開始有明顯的表現，到了 36 hpf 時期在晶體發育

的部位出現大量而專一性的表現(圖九A)。實驗結果發現1.5%酒精浸泡會造成 *cryaa* 的表現延遲，在36 hpf 時期仍無 *cryaa* 基因的表現。在72 hpf 時期 *cryaa* mRNA 在晶體正中央部位的表現會隨著晶體細胞分化其細胞核的消失而減弱，但是在酒精處理的胚胎中 *cryaa* 基因的表現範圍明顯縮小，且晶體中央部位的表現量仍與周圍細胞相似，呈現均勻分布的情況。實驗結果顯示胚胎的晶體亦隨著視網膜同步縮小，並且細胞的分化停止，並未完成晶體細胞的最後分化過程。

8. *huc*

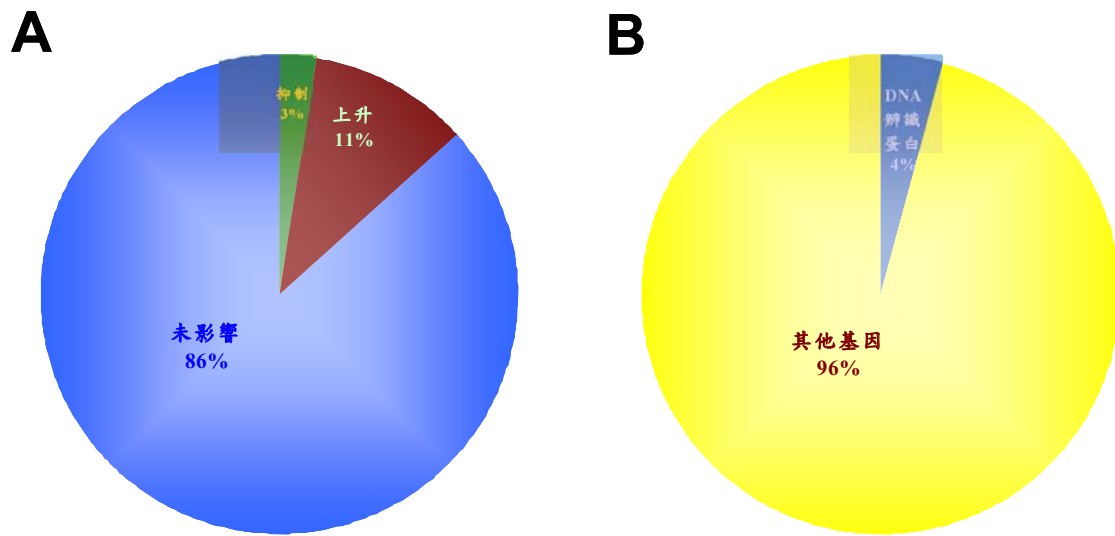


圖十：1.5%酒精大幅降低在視網膜神經節與無軸突神經細胞（白色虛線區域）標示基因 *huC* 的表現。

HuC 是一種控制神經細胞生長的 RNA 辨識蛋白，會表現在細胞分裂旺盛的神經細胞中(Kim et al., 1996; Marusich et al., 1994)。在視網膜發育過程中，*huc* 會專一性表現在神經節細胞與無軸突細胞層(Ekstrom and Johansson, 2003)。為了解在酒精浸泡的胚胎中這兩種視網膜神經細胞的分化狀況，我們利用 *huc* 標識基因來分析在視網膜細胞的表現，結果發現1.5%酒精會明顯降低 *huc* 在視網膜區域的表現活性。由此證實酒精不但抑制了感光細胞的分化，也普遍對其他的視網膜神經細胞，包括無軸突細胞（內核細胞層）與神經節細胞等的分化產生明顯的抑制作用。

(四) 酒精對胚胎發育期間基因體的影響：基因晶片分析

1. 1.5%酒精對整體基因體的影響



圖十一：1.5%酒精浸泡對斑馬魚胚胎基因體的影響。A.酒精對全部基因體表現的影響分析。B.全部受抑制基因中約有 4%為 DNA 辨識蛋白。

在實驗中，我們利用斑馬魚基因晶片來分析不同發育時期（6, 12, 24, 96 hpf 時期）酒精對胚胎內 21,495 個基因的個別影響。篩選標準為酒精處理的胚胎各基因與控制組相對基因相比，其表現量降低至 0.67 倍以下者判為受到抑制，表現量較控制組上升至 1.33 倍以上者判為表現上升，介於 0.67-1.33 倍之間者列為未受明顯影響。如同一基因在一個取樣時間點以上表現時，取其平均值計算。實驗結果發現有 3%（539）基因以及 11%（2355）基因的表現分別受到酒精影響而被抑制與上升，其餘 86%（18601）基因則未受影響(圖十一 A)。隨後我們針對受到抑制的基因，分析其中屬於 DNA 辨識蛋白/基因調控子的比例約占受酒精抑制之基因群組（539 個基因）中的 4%（22 個）(圖十一 B)。這些基因名稱與基因編號如下（表一）：

表一：斑馬魚胚胎發育時期受 1.5%酒精抑制的 DNA 辨識蛋白基因

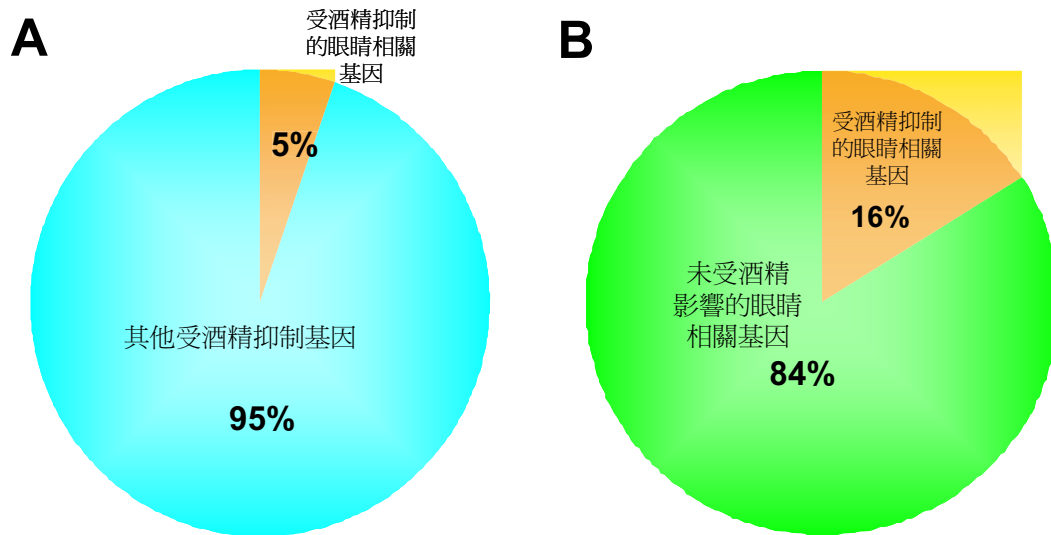
基因名稱	編號	基因名稱	編號
SNAPc -43 kd subunit	TC294178	zgc:86933	NM_001002084
Nr1d1	NM_205729	LOC407718	NM_214797
HDAC	NM_001002171	fig1a	NM_198919
FIG alpha	TC296075	L3MBTL3	AF149720
her12	NM_205619	crx	NM_152940
egr2b	NM_130997	maf	NM_131844
hoxc9a	NM_131528	rybp	TC279689
dharma	NM_130979	wu:fi15h09	AW116541
per4	NM_212439	zgc:85969	NM_212914
BC076175	BC076175	irx4a	NM_205698
rx1	NM_131225	optx2	TC2740544

在這些受抑制的 DNA 辨識蛋白中，與眼睛的發育相關的基因有 5 個，分別是 *crx*、*rybp* (*ring1/yy1 binding protein*)、*irx4a*、*rx1* 與 *optx2*。此外 HDAC (histone deacetylase) 亦與控制眼睛發育的基因調控子 (包括 *crx*、*otx2*、*nr1* 等) 的表現相關 (Chen and Cepko, 2007)。在上述的這些基因中，Crx 與 Six3b 共同調控眼睛視紫蛋白 rhodopsin 基因的表現 (Manavathi et al., 2007; Peng and Chen, 2007; Shen and Raymond, 2004)；Rybp (RING1/YY1 binding protein) 是一種屬於 polycomb 家族的蛋白質，在大鼠中被證實對眼睛的發育扮演重要的角色 (Pirity et al., 2007)；Irx4a 則是透過控制 *slit1* 的表現來提供眼睛發育的軸向 (Jin et al., 2003)；Rx1 具有調控眼睛前驅細胞的增生以及誘導前視網膜和晶體的發育的功能 (Mathers and Jamrich, 2000)；Optx2 則是參與了眼睛發育初期的工作 (Bernier et al., 2000; Zuber et al., 2003)。

與我們先前的 RNA 定位雜交的實驗結果相對照，證實 *rx1* 其表現量確實有明顯的下降，而在先前的定位雜交的分析中 *six3b* 僅受酒精輕微的影響，而在基因晶

片中亦未觀察到 *six3b* 的明顯抑制現象，顯示在酒精所引起的眼睛發育異常的機制中 *six3b* 並未扮演主要的角色。

2. 1.5%酒精對眼睛相關基因的影響



圖十二：A.受 1.5%酒精浸泡所抑制之眼睛相關基因占全部受酒精抑制基因的 5%。B.在 1.5%酒精環境中與眼睛相關之基因有 16%受到抑制。

在前述受酒精抑制的 539 個基因中，我們找出 29 個與眼睛相關基因，約占全部受酒精抑制基因的 5% (表二)。在另一方面，我們進一步發現在斑馬魚胚胎中與眼睛相關的 184 個基因，其中有 16%的基因受到抑制，遠超過全部基因中受酒精抑制的基因所占比例 (3%)。這項結果顯示眼睛是斑馬魚胚胎中受酒精嚴重影響的部位之一。

表二：受酒精抑制的眼睛相關基因

基因名稱	編號	基因名稱	編號
gnat2	NM_131869	RGS-R	TC283615
zgc:56548	NM_201014	opn1mw1	NM_131253
opn1sw2	NM_131192	opn1mw2	NM_182891
opn1lw2	NM_001002443	opn1sw1	NM_131319
rds4	NM_131567	rds2	NM_131566
pdc1	BC060908	crx	NM_152940
zgc:73336	NM_200794	nsf	NM_201490
pde6g	NM_212799	gsnl1	NM_178131
vangl2	BC065983	γ -crystallin M2	TC290579
optx2	TC270544	RPE65	TC292426
uncl19b	TC292819	brn3b-1	TC271657
RGS9	TC278031	Phosphodiesterase 6 γ subunit rod form	TC275774
opn4	NM-178289	blue-sensitive opsin	TC269441
col11 alpha-2	TC293803	vsx1	NM_131333
fgf8	NM_131281		

在這些受酒精影響的眼睛相關基因中，除了部分為控制眼睛細胞分化的基因調控子，包括 *vsx1*、*brn3b1*、*optx2*、*crx* 之外，大部分為眼睛的結構性蛋白與功能性基因。在基因調控子方面 *Brn3b1* 控制神經節細胞的分化(Das et al., 2007)，*Crx* 調控眼睛視紫蛋白 *rhodopsin* 基因的表現(Manavathi et al., 2007; Peng and Chen, 2007; Shen and Raymond, 2004)，*Optx2* 參與了眼睛發育初期的工作(Bernier et al., 2000; Zuber et al., 2003)，*Vsx1* 控制錐狀感光細胞的分化(Clark et al., 2007)。

討論

Discussion:

1. **Pax6 and rx1 – 控制眼睛幹細胞生長 (Dev Biol 306)**
2. **BMP13 regulate pax6, reduction of pax6 caused small eye size, stop lamination and cell differentiation (BMC Dev Biol 6)**
3. **competition between alcohol and retinal metabolism**

在我們的實驗中發現斑馬魚胚胎視網膜的發育會受到酒精浸泡影響而受阻，且出現視網膜細胞分層失敗的情況，顯示了在眼睛發育的初期，視網膜神經先驅細胞的特化並未受到酒精浸泡的影響，因此可以觀察到眼睛的初始發育的情況。但是發育後期細胞分化的工作則受到抑制。我們判斷酒精對眼睛發育的影響主要發生在細胞的分化作用上。

在利用標示基因分析酒精影響眼睛發育方面，我們首先測試了控制眼睛發育的兩個基因調控子 Pax6 與 rx1 基因的表現，結果發現在浸泡了酒精的胚胎中兩者在眼睛發育區域內的表現均明顯降低，這顯示了雖然發育初期眼睛的先驅細胞能夠形成初級的眼睛構造，但是當細胞需要進一步分化時，所需要的基因調控子在細胞內的表現量卻明顯不足，這可能是導致最後細胞分化失敗，視網膜停止分層的直接原因。最近的研究發現 rx1 與 Pax6 基因在眼睛發育的過程中分別扮演不同的角色。rx1 主要在維持眼睛的幹細胞 (stem cells) 的增生，以維持眼睛發育時的需求，Pax6 的功能則較偏重在促使眼睛細胞的分化工作上(Zaghloul and Moody, 2007b)。與 rx1 及 Pax6 基因的表現相比，酒精對另一個控制眼睛發育的重要基因調控子 *six6b* 的影響較為輕微，顯示在眼睛發育的過程中，酒精對 *pax6* 與 *rx1* 基因的影響應為造成眼睛發育缺陷的較重要的因素。

為了更進一步篩選出胚胎內受酒精影響的基因，以了解胎兒酒精症候群的分子機制，我們進行了基因晶片的分析。實驗結果發現酒精浸泡會造成 3%的基因受到

抑制，11%的基因活性上升，其餘 86%的基因則未受明顯影響。在受到酒精抑制的基因中，有 4%的基因為基因調控子或是 DNA 辨識蛋白基因。在眼睛相關的基因中，我們發現有 16%的基因受到酒精抑制，遠高於整體基因中受到酒精抑制的基因比例。這顯示 1.5%酒精對胚胎發育的影響並非是”非專一性”的對胚胎細胞傷害所造成，而眼睛是酒精傷害的一個重要區域。

在另一方面，我們的基因晶片分析與 RNA 定位雜交分析結果有相當高的一致性。在基因晶片分析中，我們篩選出 7 種與眼睛發育相關的基因調控子受到酒精影響而被抑制，分別是 *crx*、*rybp*、*irx4a*、*optx2*、*rx1*、*brn3b1* 與 *vsx1*，而我們的 RNA 定位雜交分析也發現在酒精浸泡的胚胎中 *rx1* 的表現受到明顯抑制，至於其他基因的活性則有待進一步確認。從另一方面來看，我們定位雜交所觀察的另一個眼睛發育關鍵基因 *six3b* 並未受酒精明顯的影響，而在基因晶片分析中亦呈現了不顯著的狀況，其結果相符。

有關胎兒酒精症候群引起多重胚胎發育障礙的原因有許多假說，其中有一種說法認為胚胎內酒精的代謝反應與維生素 A (retinol) 代謝的路徑相互競爭，導致視黃酸(retinoic acid)的合成降低，引起胚胎發育異常。在細胞內酒精代謝為醋酸(acetic acid)與維生素 A 代謝產生視黃酸的路徑共用兩個相同的氧化酵素，分別是乙醇脫氫酶(alcohol dehydrogenase)與乙醛脫氫酶(aldehyde dehydrogenase)，因此在酒精浸泡的環境下，胚胎內的酒精與維生素 A 相互競爭氧化酵素，造成視黃酸的合成不足，而產生發育的問題(Clagett-Dame and DeLuca, 2002; Marill et al., 2003)。在我們的實驗中觀察到酒精會抑制或降低 *pax6b*、*rx1*、*neuroD* 等基因調控子以及其他標示基因的表現，這些抑制作用是否是由於酒精代謝造成視黃酸的含量降低所造成將有待進一步證實。

結論

在這次的實驗當中，我們發現酒精對胚胎內眼睛的發育有特別明顯的專一性影響。經過 RNA 定位雜交與基因晶片分析，我們初步篩選出多個控制眼睛發育的基因調控子的表現會受到酒精的抑制作用，最後造成眼睛發育的缺陷。其中在眼睛發育初期控制細胞分化的關鍵性基因中，酒精對 *pax6b* 以及 *rx1* 基因的影響大於 *six3b*，顯示酒精影響眼睛的發育較偏向影響 *pax6b* 與 *rx1* 相關的路徑，而與 *six3b* 的關係較不密切。除了基因調控子之外，酒精對於細胞附著蛋白 *N-cadherin* 的抑制也可能是導致視網膜神經細胞分層失敗的重要原因。未來將進一步探討酒精浸泡的胚胎內基因表現的變化是否與降低視黃酸合成有關，以確認其干擾胚胎發育的機制。

參考文獻及附錄

- Ahmad, I., Acharya, H. R., Rogers, J. A., Shibata, A., Smithgall, T. E. and Dooley, C. M.** (1998). The role of NeuroD as a differentiation factor in the mammalian retina. *J Mol Neurosci* **11**, 165-78.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Angeloni, D., Menna, E. and Barsacchi, G.** (1999). Role of Xrx1 in Xenopus eye and anterior brain development. *Development* **126**, 2451-60.
- Bearer, C. F.** (2001). L1 cell adhesion molecule signal cascades: targets for ethanol developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology* **22**, 625-33.
- Bernier, G., Panitz, F., Zhou, X., Hollemann, T., Gruss, P. and Pieler, T.** (2000). Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in Xenopus embryos. *Mech Dev* **93**, 59-69.
- Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C. and Tardieu, A.** (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol* **86**, 407-85.
- 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.
- Casarosa, S., Amato, M. A., Andreazzoli, M., Gestri, G., Barsacchi, G. and Cremisi, F.** (2003). Xrx1 controls proliferation and multipotency of retinal progenitors. *Mol Cell Neurosci* **22**, 25-36.
- Chen, B. and Cepko, C. L.** (2007). Requirement of histone deacetylase activity for the expression of critical photoreceptor genes. *BMC Dev Biol* **7**, 78.
- Chen, E. and Ekker, S. C.** (2004). Zebrafish as a genomics research model. *Curr Pharm Biotechnol* **5**, 409-13.
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* **126**, 4213-22.
- Chuang, J. C., Mathers, P. H. and Raymond, P. A.** (1999). Expression of three Rx homeobox genes in embryonic and adult zebrafish. *Mech Dev* **84**, 195-8.
- Chuang, J. C. and Raymond, P. A.** (2001). Zebrafish genes rx1 and rx2 help define the region of forebrain that gives rise to retina. *Dev Biol* **231**, 13-30.
- Clagett-Dame, M. and DeLuca, H. F.** (2002). The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr* **22**, 347-81.
- Clark, A. M., Yun, S., Veien, E. S., Wu, Y. Y., Chow, R. L., Dorsky, R. I. and Levine, E. M.** (2007). Negative regulation of Vsx1 by its paralog Chx10/Vsx2 is conserved in the vertebrate retina. *Brain Res.*
- 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.

Das, A. V., James, J., Bhattacharya, S., Imbalzano, A. N., Antony, M. L., Hegde, G., Zhao, X., Mallya, K., Ahmad, F., Knudsen, E. et al. (2007). SWI/SNF Chromatin Remodeling ATPase Brm Regulates the Differentiation of Early Retinal Stem Cells/Progenitors by Influencing Brn3b Expression and Notch Signaling. *J Biol Chem* **282**, 35187-201.

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.

Ekstrom, P. and Johansson, K. (2003). Differentiation of ganglion cells and amacrine cells in the rat retina: correlation with expression of HuC/D and GAP-43 proteins. *Brain Res Dev Brain Res* **145**, 1-8.

Erdmann, B., Kirsch, F. P., Rathjen, F. G. and More, M. I. (2003). N-cadherin is essential for retinal lamination in the zebrafish. *Dev Dyn* **226**, 570-7.

Franck, E., Madsen, O., van Rheede, T., Ricard, G., Huynen, M. A. and de Jong, W. W. (2004). Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. *J Mol Evol* **59**, 792-805.

Goishi, K., Shimizu, A., Najarro, G., Watanabe, S., Rogers, R., Zon, L. I. and Klagsbrun, M. (2006). AlphaA-crystallin expression prevents gamma-crystallin insolubility and cataract formation in the zebrafish cloche mutant lens. *Development* **133**, 2585-93.

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.

Hallare, A., Nagel, K., Kohler, H. R. and Triebkorn, R. (2006). Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **63**, 378-388.

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.

Horwitz, J. (2003). Alpha-crystallin. *Exp Eye Res* **76**, 145-53.

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.

Jin, Z., Zhang, J., Klar, A., Chedotal, A., Rao, Y., Cepko, C. L. and Bao, Z. Z. (2003). Irx4-mediated regulation of Slit1 expression contributes to the definition of early axonal paths inside the retina. *Development* **130**, 1037-48.

Kesmodel, U., Wisborg, K., Olsen, S. F., Henriksen, T. B. and Secher, N. J. (2002a).

Moderate alcohol intake during pregnancy and the risk of stillbirth and death in the first year of life. *Am J Epidemiol* **155**, 305-12.

Kesmodel, U., Wisborg, K., Olsen, S. F., Henriksen, T. B. and Secher, N. J. (2002b). Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol* **37**, 87-92.

Kim, C. H., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S. Y., Huh, T. L. and Miki, N. (1996). Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci Lett* **216**, 109-12.

Loosli, F., Koster, R. W., Carl, M., Krone, A. and Wittbrodt, J. (1998). Six3, a medaka homologue of the Drosophila homeobox gene sine oculis is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech Dev* **74**, 159-64.

Manavathi, B., Peng, S., Rayala, S. K., Talukder, A. H., Wang, M. H., Wang, R. A., Balasenthil, S., Agarwal, N., Frishman, L. J. and Kumar, R. (2007). Repression of Six3 by a corepressor regulates rhodopsin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13128-33.

Marill, J., Idres, N., Capron, C. C., Nguyen, E. and Chabot, G. G. (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* **4**, 1-10.

Marusich, M. F., Furneaux, H. M., Henion, P. D. and Weston, J. A. (1994). Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiol* **25**, 143-55.

Masai, I., Lele, Z., Yamaguchi, M., Komori, A., Nakata, A., Nishiwaki, Y., Wada, H., Tanaka, H., Nojima, Y., Hammerschmidt, M. et al. (2003). N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* **130**, 2479-94.

Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A. and Jamrich, M. (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* **387**, 603-7.

Mathers, P. H. and Jamrich, M. (2000). Regulation of eye formation by the Rx and pax6 homeobox genes. *Cell Mol Life Sci* **57**, 186-94.

Morrow, M. J. (1998). Function and dysfunction of supranuclear and internuclear eye movement pathways. *Curr Opin Ophthalmol* **9**, 46-53.

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

Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J. P., Krauss, S. and Johansen, T. (1998). Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev* **77**, 185-96.

Oliver, G., Loosli, F., Koster, R., Wittbrodt, J. and Gruss, P. (1996). Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech Dev* **60**, 233-9.

Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development.

Development **121**, 4045-55.

Peng, G. H. and Chen, S. (2007). Crx activates opsin transcription by recruiting HAT-containing co-activators and promoting histone acetylation. *Hum Mol Genet* **16**, 3433-52.

Pirity, M. K., Wang, W. L., Wolf, L. V., Tamm, E. R., Schreiber-Agus, N. and Cvekl, A. (2007). Rybp, a polycomb complex-associated protein, is required for mouse eye development. *BMC Dev Biol* **7**, 39.

Raymond, P. A., Barthel, L. K. and Curran, G. A. (1995). Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish. *J Comp Neurol* **359**, 537-50.

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

Shen, Y. C. and Raymond, P. A. (2004). Zebrafish cone-rod (crx) homeobox gene promotes retinogenesis. *Dev Biol* **269**, 237-51.

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.

Vihtelic, T. S., Doro, C. J. and Hyde, D. R. (1999). Cloning and characterization of six zebrafish photoreceptor opsin cDNAs and immunolocalization of their corresponding proteins. *Vis Neurosci* **16**, 571-85.

Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Univ. of Oregon Press, Eugene.

Yan, R. T. and Wang, S. Z. (1998). neuroD induces photoreceptor cell overproduction in vivo and de novo generation in vitro. *J Neurobiol* **36**, 485-96.

Zaghloul, N. A. and Moody, S. A. (2007a). Alterations of rx1 and pax6 expression levels at neural plate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities. *Dev Biol*.

Zaghloul, N. A. and Moody, S. A. (2007b). Alterations of rx1 and pax6 expression levels at neural plate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities. *Dev Biol* **306**, 222-40.

Zaghloul, N. A. and Moody, S. A. (2007c). Changes in Rx1 and Pax6 activity at eye field stages differentially alter the production of amacrine neurotransmitter subtypes in *Xenopus*. *Mol Vis* **13**, 86-95.

Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. and Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-67.

評語

本作品係針對酒精對胚胎的發育的影響進行研究。應用斑馬魚系統觀察酒精對眼睛發育的影響，本研究發現 1.5% 酒精時眼睛的發育有些微的影響 (16%)。研究的設計尚稱合乎邏輯，工作的進行亦詳盡，除了運用酒精之濃度應再考量外，是一件具有潛力的作品，頗值鼓勵。