

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：動物學

作品名稱：斑馬魚胚胎發育時期中樞神經系統與單羧基運輸蛋白之相關性

學校 / 作者：臺北市立第一女子高級中學 陳佩君
臺北市立第一女子高級中學 黃暉琇

作者：陳佩君

簡介：現就讀於北一女中數理資優班，國中就讀於師大附中音樂班，學習鋼琴、小提琴、理論作曲、揚琴等，曾參加多項比賽及舉辦獨奏會。興趣有閱讀、看電影、爬山等，更從小就對生物有濃厚的興趣，進入數理資優班後即參加生物專研，並參加中研院生命科學資優生培育計畫，於高二開始進行現在專題的研究。

照片：



作者：黃暉琇

簡介：現就讀於北一女中數理資優班，喜愛運動，常代表班級參加體育競賽，國中時取得黑帶資格，並於高中時擔任跆拳道社長，喜愛數理科目，尤對生物有濃厚的興趣，進入數理資優班後即參加生物專研並參加中研院生命科學資優生培育計畫，於高二開始進行現在專題的研究。

照片：



斑馬魚胚胎發育時期中樞神經系統與單羧基運輸蛋白之相關性

Association of MCTs Expression with CNS in Zebrafish

英文摘要 (Abstract)

Astrocytes provide energy to neuron mainly with lactate, which is transported through monocarboxylate transporters (MCTs). Among 14 isoforms of MCTs reported in mammals, only MCT1, 2 and 4 are expressed in brain and the three isoforms are found to differentially expressed in neuron and astrocyte, respectively. Based on these, “astrocyte-neuron lactate shuttle” has been proposed. However, no *in vivo* evidence was available so far to support this hypothesis.

In the present study, zebrafish was used as a model to provide *in vivo* molecular physiological evidence for the involvements of MCTs in the development and functioning of central nervous system (CNS). Full-length cDNAs of the zebrafish MCT1-4 were cloned from zebrafish. Based on RT-PCR results, zMCT1 and zGLUT4 expressed in brain were chosen for further experiment. Morpholino knockdown experiments provided for the 1st time the *in vivo* evidence to indicate that the zMCT1 and zMCT4 may be involved in energy translocation and functioning of the developing CNS.

摘要

於前人預備實驗中，發現斑馬魚胚胎時期肝醣訊號會於腦部與中樞神經系統區位出現。因此，醣類的分布與在細胞間的傳遞應可視為腦部發育的重要指標。

我們以基因體資料庫為工具，研究斑馬魚腦部相關基因異構型分布。目前，我們選殖到數個葡萄糖運輸 (GLUT)、鈉離子/葡萄糖協同運輸(SGLT)與單羧基運輸(MCT)通道在斑馬魚腦部表現，其表現是否與胚胎初期中樞神經系統的發育相關仍未知。

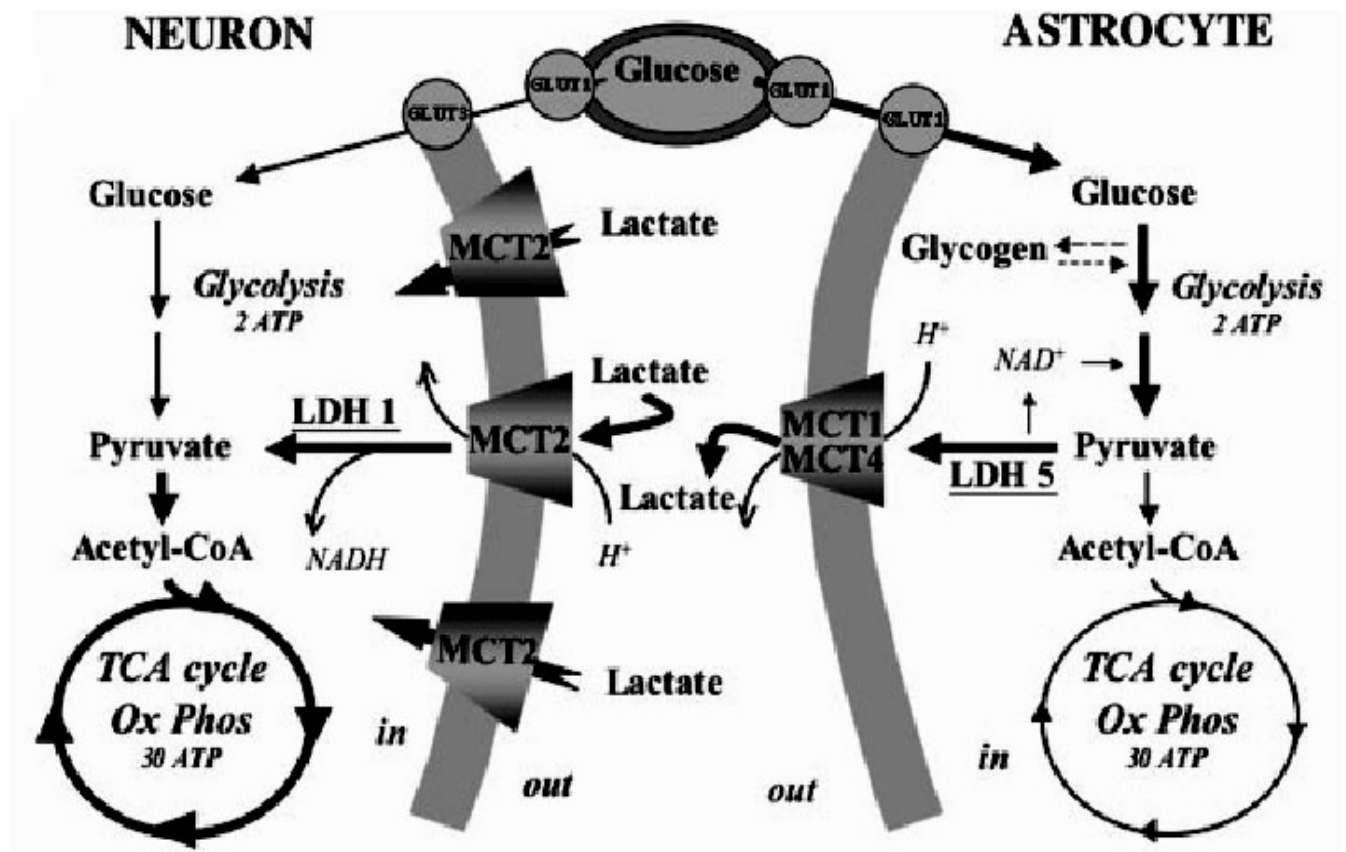
經過初步基因分析後，我們決定以 MCT 中第一和四異構型作為研究對象，並用 Anti-Hu，與 PCNA 做神經觀測，將施打反股寡核苷酸進行突變操作的斑馬魚，與對照組進行免疫染色分析，以螢光顯微鏡觀察發現：抑制 MCT 表現，確實影響胚胎時期中樞神經細胞發育及鰓部細胞分裂；亦可能造成畸形出現。

壹、研究動機

在生物的胚胎時期，腦部及中樞神經的發育完全與否，可以說是左右該生物未來生長的

極重要因素。於生命科學上冊第一章(1-2)中，我們學到了細胞內的化學組成，以及擴散、滲透和膨壓的機制。另外，於高一基礎生物中，我們學知：三磷酸腺苷(ATP)是所有細胞維持正常活動能量的來源，其可由肝醣分解而來的葡萄糖(glucose)與乳酸(lactate)供應。然而，脊椎動物胚胎時期的腦部及中樞神經細胞，於發育時期所需的龐大養分，究竟是如何有效自循環系統中運輸而來與分配呢？假如把這些碳水化合物/能量運輸通道阻斷，又將對該生物胚胎時期，甚至中樞神經系統的發育造成何種影響呢？這些在在均是未解且令人好奇的謎團！

以下(圖一)即舉單羧基運輸蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)及葡萄糖運輸通道(glucose transporter, GLUT)為例，說明本實驗之主角—碳水化合物/能量運輸通道，於哺乳類動物體內的位置、運輸物質，及其於生物體中作用之方法、流程。



圖一 中樞神經系統(Central nervous system, CNS)能量運輸模式。葡萄糖(Glucose)藉由葡萄糖運輸通道(glucose transporter, GLUT)自微血管運輸至神經元(Neuron)與星芒狀細胞(Astorcyte)。下游代謝產物-乳酸(Lactate)藉由單羧基運輸蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)在細胞間傳遞運輸。

仔細考慮了未來實驗動物所應具備的特質後，我們決定選用斑馬魚(*Danio rerio*)作為研究對象，原因如下：斑馬魚繁殖能力強、雌性斑馬魚產卵數多(一次100~200個)、飼養容易、體積小、發育時間短(從受精到孵化只需48小時)；除此之外，更重要的有：其胚胎透

明，易觀察到藥物對其體內器官的影響；胚胎在24小時內就可發育成形，這使得我們可以在同一代魚身上進行不同的實驗；然而，最重要的是：斑馬魚的基因體序列資料庫(genome database)完整，且其基因與人類基因相似性高達87%！這意味著在其身上做藥物實驗所得到的結果，在多數情況下也適用於人體。基於上述原因，我們選定牠為實驗材料。

貳、研究目的

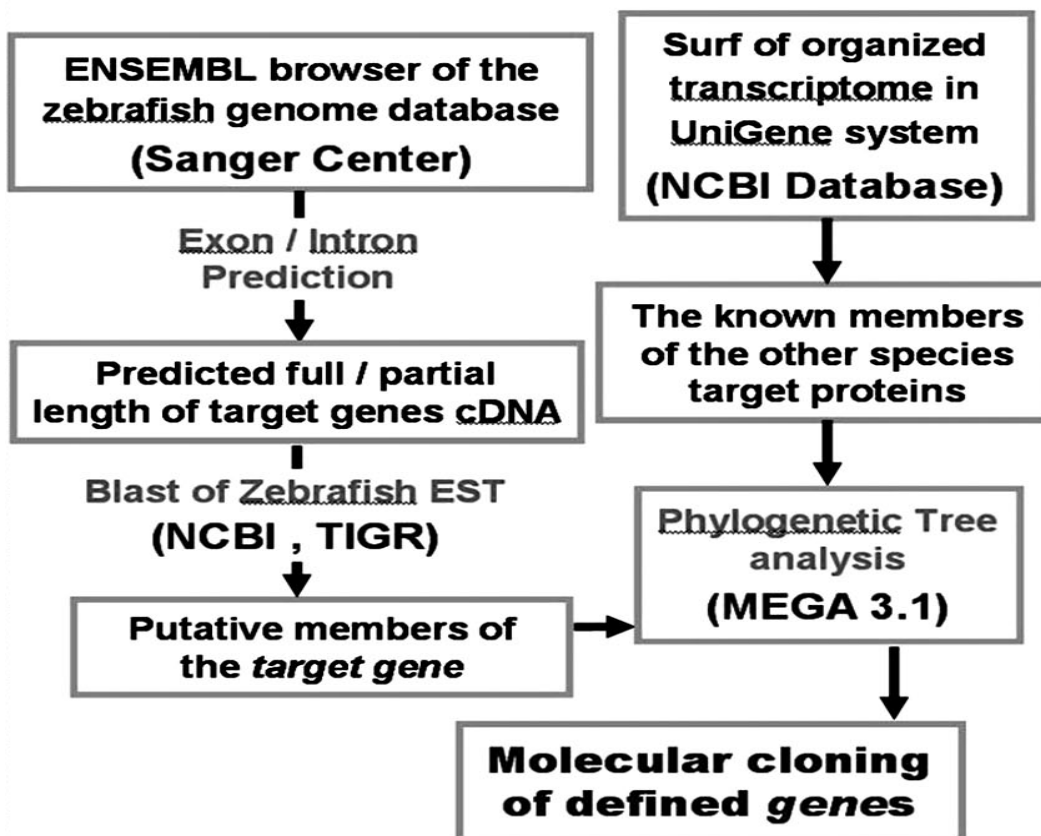
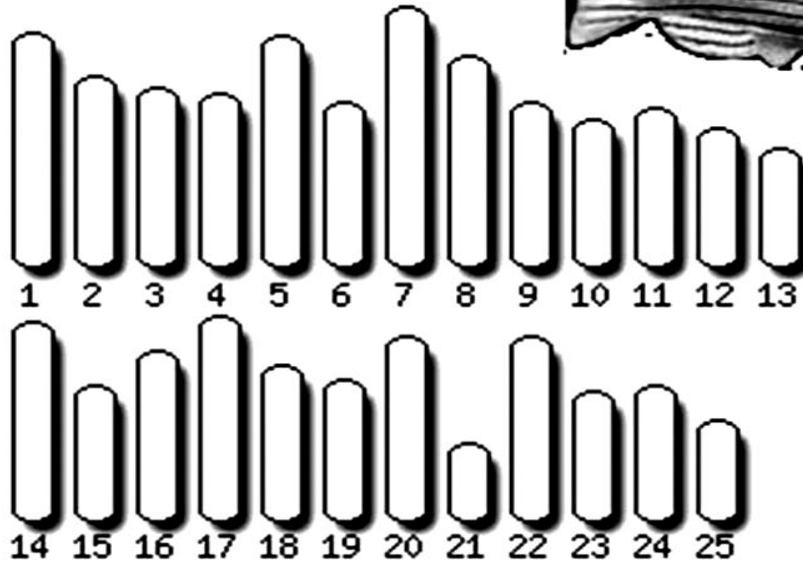
了解 pyruvate 與 lactate 等所謂單羧基代謝產物對於胚胎發育時期神經細胞的發育與功能維持。

參、研究設備及器材

1. 斑馬魚 (zebrafish、Danio rerio)
2. 奈米分光光度儀 (照片一)
3. 小型電泳槽 (照片二)
4. Pipetment & Tip (照片三)
5. 28°C 斑馬魚受精卵恆溫培養箱 (照片四、照片五)
6. 循環水浴槽
7. 37°C 恆溫箱
8. 洋菜膠
9. PCR tube
10. PCR Machine (照片六)
11. Orbital Shaker (照片七)
12. 解剖顯微鏡 (照片八)
13. 離心機 (照片九)
14. 正立螢光顯微鏡
15. 顯微注射機 (Microinjector)
16. 反股寡核苷酸morpholino (MO)
17. Phosphate Buffer Saline (PBS)
18. Bovine Serum Albumin (BSA)
19. 單株抗體 (Anti-Hu-FITC: 發散綠螢光的神經發育細胞表現蛋白及增生細胞核抗原 (Proliferating-cell Nuclear Antigen, PCNA)) & 二抗(Anti-mouse-FITC)

肆、研究過程及方法

確定實驗對象為斑馬魚後，爲了往後製作專一性引子（用於取出研究所需碳水化合物/能量運輸通道的mRNA，使其成爲cDNA後加以RT-PCR，即可大量取得研究所需之通道蛋白）以及確認通道蛋白之異構型的需要，我們找出基因庫(ENSEMBL Genome database browser system)中斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)相關的葡萄糖運輸通道(glucose transporter, GLUT)，鈉離子/葡萄糖協同運輸通道(Na^+ -dependent glucose co-transporter, SGLT)，及相關單羧基運輸蛋白(MCT)所含基因資訊分析的結果。(圖二、表一、表二)



圖二 斑馬魚基因生物資訊分析策略示意圖。

Class	Protein	Accession / Prediction Numbers	Genomic Location
GLUT1	zGLUT1a	ENSDART00000046227	Chromosome 16
	zGLUT1b	ENSDART00000025414	Chromosome 23
	zGLUT1c	ENSDART00000019804	Chromosome 1
GLUT2	zGLUT2	ENSDART00000046227	Chromosome 16
GLUT3	zGLUT3	ENSDART00000019941	Chromosome 3
GLUT4 *	—	—	—
GLUT5	zGLUT5	ENSDART00000045075	Chromosome 23
GLUT6	zGLUT6	ENSDART00000018236	Chromosome fragment ctg10644
GLUT7 *	—	—	—
GLUT8	zGLUT8	NM_212798	Chromosome 5
GLUT9	zGLUT9a	ENSDART00000054742	Scaffold Zv5_scaffold1472
	zGLUT9b	ENSDART00000064663	Scaffold Zv5_NA2351
GLUT10	zGLUT10	ENSDART00000013280	chromosome fragment ctg11341
GLUT11	zGLUT11a	ENSDART00000017028	Chromosome 10
	zGLUT11b	ENSDART00000048605	Chromosome 5
GLUT12	zGLUT12	NM_956832	Chromosome 23
GLUT13	zGLUT13a	ENSDART00000019487	Chromosome 25
	zGLUT13b	ENSDART00000034647	Chromosome 25

SGLT1	zSGLT1a	ENSDART00000048218	Chromosome 3
	zSGLT1b	ENSDART00000039955	Chromosome 10
SGLT2	zSGLT2	ENSDART00000040380	Chromosome 20
SGLT3*	—	—	—
SGLT4	zSGLT4	ENSDART00000024433	Chromosome 8

表一 基因庫(ENSEMBL Genome database browser system)中斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)相關葡萄糖運輸通道(glucose transporter, GLUT)與鈉離子/葡萄糖協同運輸通道(Na^+ -dependent glucose co-transporter, SGLT)資訊分析結果。

		Human	Zebrafish		
Gene name	Protein name	Nucleotide ID	Nucleotide ID	ENSEMBL predict transcript ID	Protein ID
SLC16A1	MCT1	NM_003051	NM_200085	ENSDARG00000042516	NP_956379
SLC16A2	MCT8	NM_006517			
SLC16A3	MCT4	NM_004207	NM_212708		NP_997873
				ENSDART00000038525	
SLC16A4	MCT5	NM_004696		ENSDART00000005677	
SLC16A5	MCT6	NM_004695		ENSDART00000045186	
SLC16A6	MCT7	NM_004694		ENSDART00000033382	
				ENSDART00000009363	
				ENSDART00000018177	
SLC16A7	MCT2	NM_004731	XM_684122	ENSDART00000023099	XP_689214
SLC16A8	MCT3	NM_013356	XM_681038	ENSDART00000045856	XP_686130
SLC16A9	MCT9	NM_194298		ENSDART00000020167	
SLC16A10	MCT10	NM_018593			
SLC16A11	MCT11	NM_153357			
SLC16A12	MCT12	NM_213606		ENSDART00000014087	
SLC16A13	MCT13	NM_201566			
SLC16A14	MCT14	NM_152527			

表二 基因庫(ENSEMBL Genome database browser system)中斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)相關單羧基運輸蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)基因資訊分析結果。方框表示負責乳酸運輸的異構型(isoform)。

一、實驗一：確定研究對象

(一) 實驗1-1 取斑馬魚各重要組織器官的total RNA，作為之後實驗所需材料

1. 在解剖顯微鏡下以軟鑷子取出成魚體中九種器官之組織，分別如下（括號中為其英文代號）：眼（E）腦（B）腮（G）心臟（H）小腸（I）肝臟（L）脾臟（Sp）腎臟（K）肌肉（M），約取3-6隻，將各組織分別置於裝有600-800uL TRIZOL(RNA萃取保存試劑)的管中。
2. 在抽氣櫃中將每管加入0.8uL的chloroform，徒手劇烈搖晃15秒後靜置於常溫下3分鐘。
3. 離心（4°C，12000rpm，30分鐘），離心完在避免搖晃的情況下小心吸取上清液，即為total RNA。
4. RNA中加入isopropanol 0.4mL、NaOAc 120 uL、Glycogen 2uL，置於-20°C冰櫃裡一晚使RNA沉澱。

(二) 實驗1-2 RNA反轉錄實驗

1. 將total RNA進行離心(4°C, 13000rpm, 30分鐘)後, 以70%EtOH清洗並烘乾(37°C烘箱)。
2. 在烘乾的total RNA中加入Oligo(dT)₁₈ Primer 1uL、dNTP Mix 8uL、RDW 14uL, 放在65°C環境下5分鐘後, 快速移至冰上靜置1分鐘。
3. 加入0.1M DTT 4uL、5X First-strand Buffer 8uL、Random Primer 2uL、RNase Inhibitor 1uL, 置於42°C環境中2分鐘
4. 拿出來迅速加入Reverse Transcriptase (RT) 2uL, 並確認管內體積為40uL, 無誤則放於42°C 1小時
5. 加入1X TE Buffer 40uL後放於80°C 5分鐘, 之後加入RNaseH 3uL, 放於37°C 30分鐘, 最後置於冰上即可進行cDNA定量或PCR。

(三) 實驗1-3 定量反轉錄後之cDNA, 並進行PCR及電泳分析

1. 將cDNA進行定量(濃度單位: ng/uL), 若A260(核酸)與A280(蛋白質)比值於1.6以上, 則進行PCR。
2. 進行PCR及電泳分析確認cDNA品質與存在與否:
管中加入2xPCR MIX(含Dye、Buffer、Taq(溫泉菌中的聚合酶鏈酶)、dNTP 10uL、cDNA 1uL、細胞骨架蛋白-β-actin 的Forward and reverse Primer各1uL、ddRDW 7mL後, 進行PCR及電泳分析, 確認各組織cDNA濃度與品質。

(四) 實驗1-4 觀察欲研究之通道基因在各組織中的表現程度

* 目前研究的有glucose transporter (*GLUT*)、sodium-glucose co-transporter (*SGLT*)、單羧基運輸蛋白 (*MCT*)

1. 將cDNA加入基因專一性primer, 對象:

(1) *GLUT*: 目前已知在哺乳動物中樞神經系統中的有五種, 而在斑馬魚中應存有

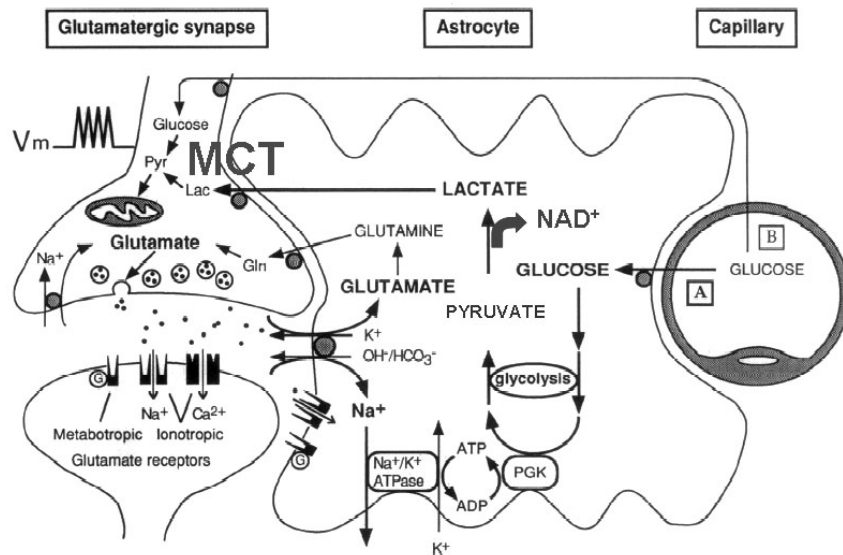
1a、

1b、1c、2、3、5

(2) *SGLT*: 1a、1b、2、4

(3) *MCT*: 1、2、3、4

進行PCR及電泳分析, 依結果選出首要的研究對象—單羧基運輸蛋白 (*MCT*)。



圖三 中樞神經系統能量運輸模式。單羧基運輸蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)在神經細胞間對於神經訊號傳遞過程中扮演的角色。

二、實驗二：進行研究——Immunocytochemistry 免疫化學染色

* 抗體：PCNA：表示正在分裂之細胞

Anti-Hu：表示發育分化中的神經細胞

* 反股寡核苷酸 Morpholino (MO)：抑制目標蛋白質合成(最佳有效作用時間為受精胚胎開始發育後三天之內)

(一) 實驗2-1 確認所選的基因在三天前開始表現：

1. 分別將3.6.10.12.14.16.18.20.22 hpf (hpf: hours post-fertilization) 及 1.2.3.5.7dpf (dpf: days post-fertilization) 共14組各取8uL, 另加 2xPCR MIX 10uL、基因專一性 Forward and reverse Primer各1uL, 進行PCR及電泳分析, 確定所選基因在三天前開始表現(注射MO才會有作用)。

(1) 對照組：直接進行免疫化學染色

(2) 實驗組：以顯微注射技術(microinjection)將MO打入一細胞或二細胞期的斑馬魚受精卵, 之後以4%paraformaldehyde進行蛋白固定3小時(4°C), 以此方式製備免疫化學染色樣本。

(二) 實驗2-2 免疫化學染色

將魚分成1dpf.2dpf.3dpf, 分別進行染色：

1. 將魚以1xPBS清洗2-3次, 每次10分鐘, 之後加入100% Ethanol置於-20°C 10分鐘, 再以1xPBS充分清洗2-3次(每次10分鐘), 樣本以3%BSA進行blocking 30分鐘,

- 分別加入一級單株抗體：增生細胞核抗原, Proliferating-cell Nuclear Antigen, PCNA; 以及Anti-Hu:神經發育細胞表現蛋白充分覆蓋樣本表面,並於4°C靜置一晚。
2. 用1×PBS將一級單株抗體清洗（每次10分鐘，約2-3次）乾淨後，運用二級抗體 (Anti-mouse-FITC)進行螢光標記，室溫靜置兩小時。
 3. 以1×PBS洗淨2-3次，每次10分鐘，之後置於正立螢光顯微鏡下觀察魚體標記蛋白的表現。

三、實驗三：實驗數據量化——西方墨點分析法

（一）實驗3-1 蛋白質均質液的製備

1. 取出斑馬魚腦，存放於低溫培養皿中，加入2 ml適量之均質液 (homogenizing buffer; 25 mM Tris-HCl, 0.25 mM sucrose, 20 mM EDTA, 0.4% NaDeoxycholate, pH=7.0) 與蛋白質分解酶抑制劑 (Sigma, USA)。倒入玻璃研磨管 (Potter-Elvehjem homogenizer)，以600 rpm的轉速來回20次進行研磨後，4°C下13,000 rpm離心30分鐘，去除細胞雜物，過程中須保持低溫。離心後吸取上清液分裝，存放於-80°C冰箱中，在2週內進行蛋白質分析。
2. 蛋白質定量參照Bradford (1976) 的方法，將均質溶液稀釋2000倍，利用小牛血清為標準液，再加入蛋白質染劑，以波長595 nm的分光光度計測量並定量。

（二）實驗3-2 西方墨點分析法

1. 每個樣本取蛋白質量40 μ g，做濃度為6% SDS聚丙烯醯膠電泳分析 (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。
2. 採用Tricine-sodium dodecyl sulfate電泳系統，在均質後的蛋白質樣本中加入5倍濃度的sample buffer，於37°C加熱10分鐘後，以SDS-PAGE進行電泳，直至染劑到達凝膠底部。

（三）實驗3-3 免疫轉印分析

1. 經由SDS-PAGE電泳後之膠體，利用Transfer buffer以電氣轉印裝置 將凝膠所分離之蛋白質轉印到Immobilon-P membranes (Millipore, USA) 上，以100伏特40安培進行轉印4小時後，經blocking solution (5% nonfat powdered milk in PBST, Phosphate buffered saline supplemented with Tween 20; 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ and 2 mM KH₂PO₄, 0.2% Tween 20, pH=7.4) 反應至少2小時以上，加入PBST buffer沖洗10分鐘，重複3次，以1000倍稀釋的Hu-protein老鼠單株抗體，反應2小時，以PBST清洗3次10分鐘後，再分別與Goat anti-mouse IgG-AP

conjugated二級抗體 (Immuno Reseach, USA) (1000倍稀釋) 室溫進行雜合2小時，以PBST清洗3次10分鐘後，加入alkaline phosphate substrate buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl and 5 mM MgCl₂, pH=9.5) 潤濕平衡1分鐘，最後以NBT (nitroblue tetrazolium salt) 和BCIP (5 - Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate) substrate kit (Zymed, SF, California, USA) 為受質呈色。

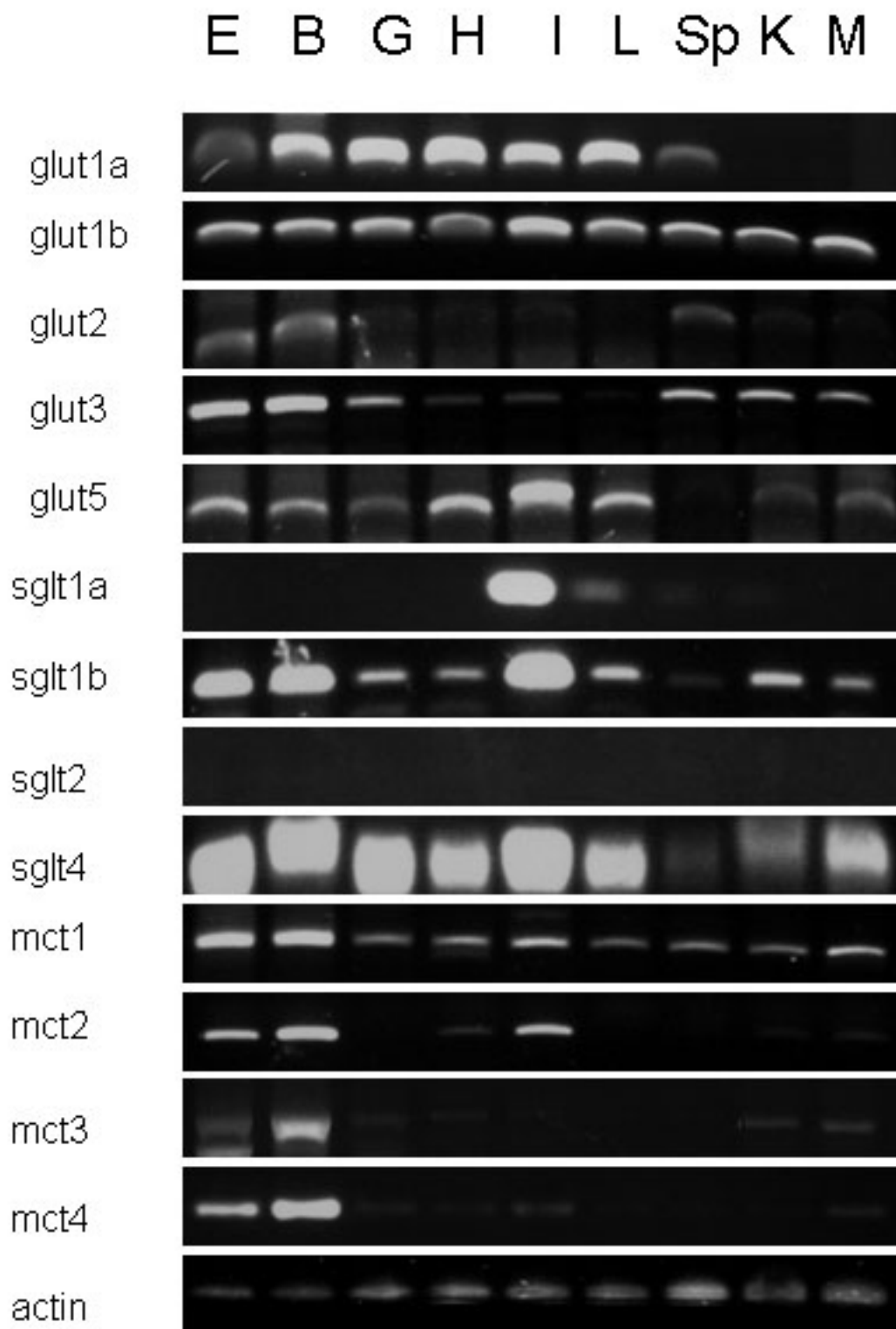
2. 於顯色過程後利用甲醇去除過度染色而完成適當之顯色。免疫呈色最後取影像並存成TIFF 檔案，用商業軟體 (Image-Pro Plus, Version 1.2, Media Cybernetics, Silver Springs, MD., 1994) 進行分析和判讀，將結果轉換成數據以利比較免疫反應的濃度。

伍、研究結果及討論

一、研究各通道基因在各組織中的表現程度 (實驗1-4) 的結果 (圖四)：

我們對所有的碳水化合物與乳酸通道進行了檢測，並以腦部為主要討論及觀察的器官，發現sglt1a、sglt2幾乎無表現量。這與一開始實施此實驗之目的：探討碳水化合物/能量運輸通道的表現與腦部 / 中樞神經系統發育之關係不符，因為其於未被抑制前就已無表現。因此，鈉離子/葡萄糖協同運輸通道(Na⁺-dependent glucose co-transporter, SGLT)被剔除出未來待續的實驗。

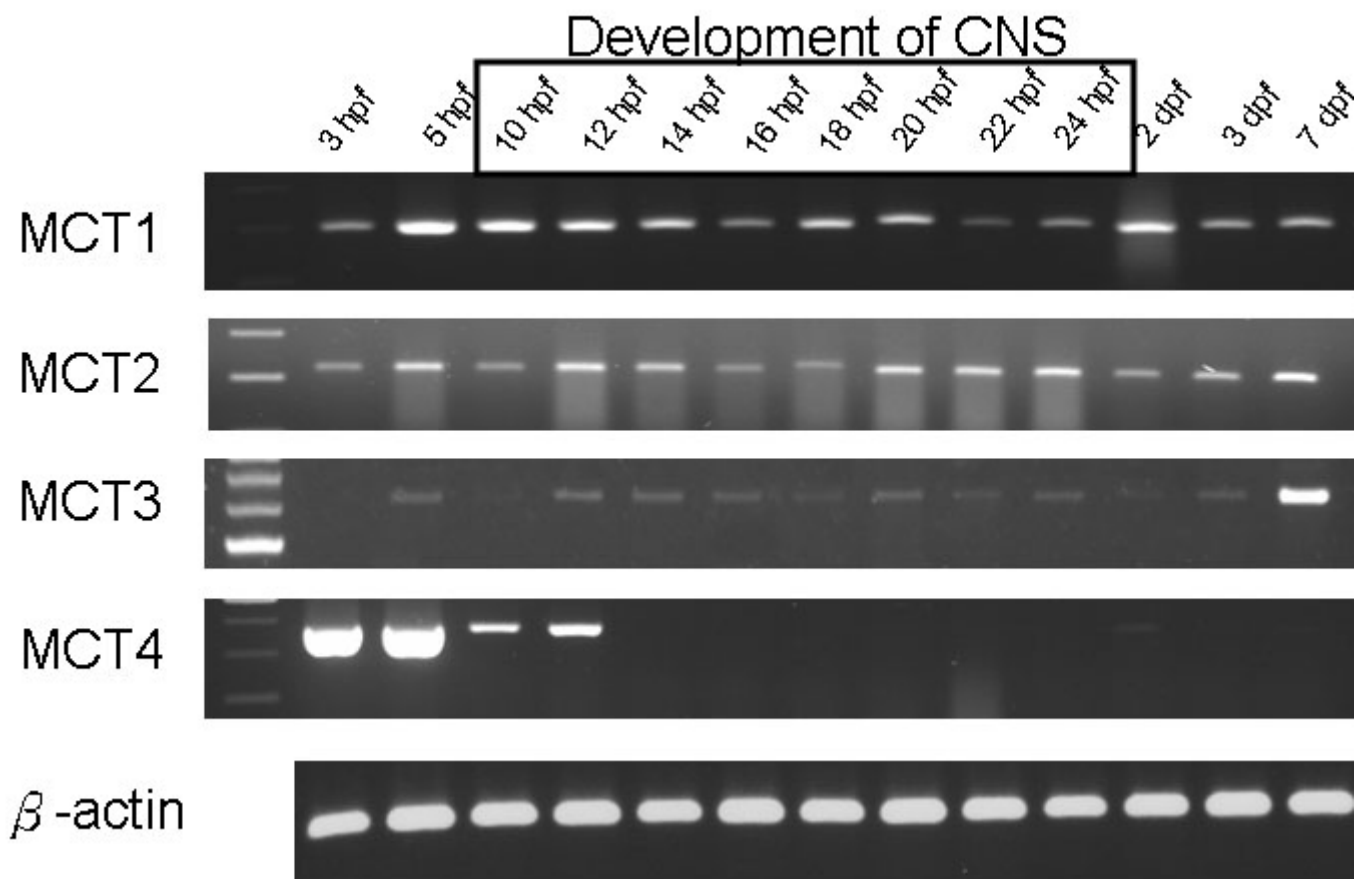
至於葡萄糖運輸通道(glucose transporter, GLUT)與單羧基運輸蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)，於腦部皆幾乎有明顯表現。但由於葡萄糖運輸通道(glucose transporter, GLUT)已有他人進行研究，而單羧基運輸蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)的確切功能：也就是乳酸供應對脊椎動物胚胎時期中樞神經系統與腦部的發育影響等的相關研究尚附之闕如，經過討論，我們決定以負責乳酸運輸的單羧基運輸蛋白 (MCT) 為首要研究對象。



圖四 表現在中樞神經系統能量運輸通道基因在斑馬魚各組織的表現。設計專一性引子 (primer) 進行 30 cycles 半定量性的反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)。actin 基因表現是控制組。眼 (E) 腦 (B) 腮 (G) 心臟 (H) 小腸 (I) 肝臟 (L) 脾臟 (Sp) 腎臟 (K) 肌肉 (M)

二、確認所選基因在三天前開始表現（實驗2-1）的結果（圖五）：

MCT1及MCT2自受精卵到仔魚發育初期均有持續性的表現，但MCT1基因表現的訊號較MCT2的訊號為強，故將MCT1選為實驗對象。而MCT4在初期表現相當明顯，但在14hpf後卻又不再表現，因此有可能扮演著魚體早期成長乳酸運輸的關鍵通道，故也選擇MCT4為研究對象。

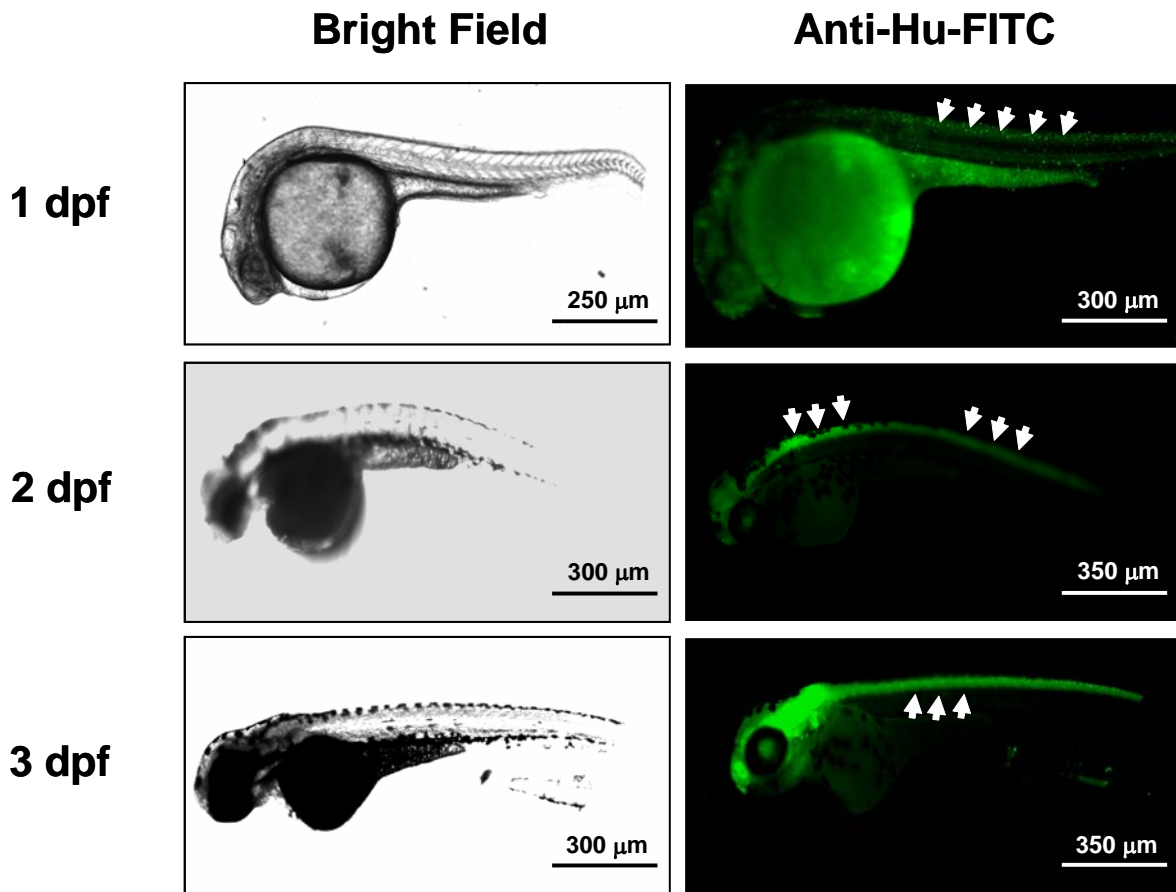


圖五 單羧基運輸蛋白 (monocarboxylate transporter, MCT)在斑馬魚不同發育時期的基因表現。專一性引子(primer)進行30 cycles半定量性的反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse- transcriptionpolymerase chain reaction, RT-PCR)。actin基因表現是控制組。hpf: hours post-fertilization; dpf: days post-fertilization。

三、對照組與施打MO之實驗組之比較 (Anti-Hu)

(一) 對照組 (Anti-Hu)

將正常且孵化天數不同 (1,2,3 dpf)、利用 Anti-Hu (神經發育細胞專一蛋白)染色的斑馬魚置於螢光顯微鏡下，分別於白色光及綠色螢光下拍照，結果如下：



圖六 神經發育細胞在斑馬魚不同發育時期的免疫蛋白螢光標定。Bright Field: 可見光下斑馬魚仔魚魚體。Anti-Hu-FITC: 發散綠螢光的神經發育細胞表現蛋白-Hu protein。箭頭所指為神經軸發育的神經細胞。dpf: days post-fertilization。

由照片圖中可知:

1. 1dpf的斑馬仔魚

於可見光下，可明顯見其巨大卵黃囊及彎曲身形，頭部尚小。

於發散綠色螢光下，則可見其頭部與脊椎有些微的螢光，卵黃囊部分則有明顯螢光反應。然而，這應並不代表卵黃囊有許多發育中的神經細胞，因其日後不免漸漸消失。可能是因卵黃囊所佔體積、面積特別大所發散的自體螢光所導致的。

2. 2dpf的斑馬仔魚

於可見光下，可見其卵黃囊已縮小，身體彎曲度變小，頭部變大。

於發散綠色螢光下，則可明顯看見其頭部接連脊椎(神經軸)有一整條明顯的綠色螢光，可知此處神經細胞發育旺盛(如白色箭頭所指處)。

3. 3dpf的斑馬仔魚

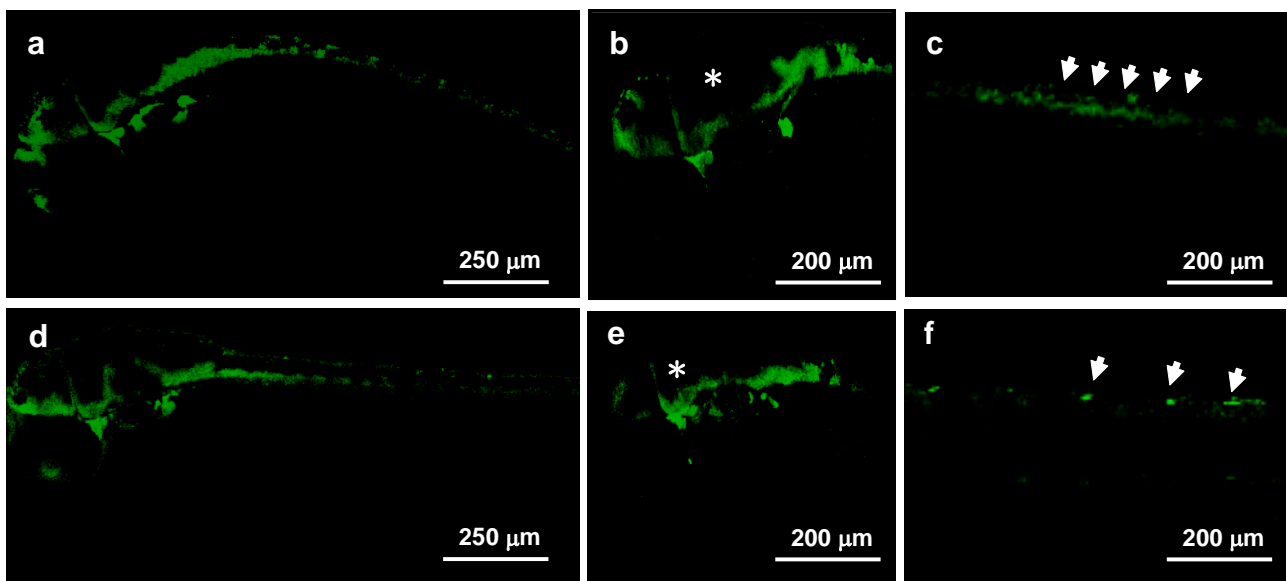
於可見光下，可見其卵黃囊越發縮小，身體幾乎平伸，頭部變大許多。

於發散綠色螢光下，則可清楚看見頭部與脊椎的綠色螢光，範圍愈發大、顏色愈發明顯；尤其頭部又比脊椎部分更為亮。可知受精後三天的斑馬魚腦部神經遠比胚胎發育初期成熟，神經細胞在中樞神經的發育（如白色箭頭所指處）極其旺盛，尤其是腦部。

(二) 實驗組 (Anti-Hu)

由於MO的強度與作用時間以2 dpf為最佳(1dpf, MO的效力仍未達到頂點; 3dpf, MO效果逐漸失效),而本實驗中想看到的是MCT蛋白在受到轉譯限制後,對胚胎神經系統的影響,並非去追蹤整個發育時間點;因此,我們以2dpf的實驗結果進行討論。

將注射了反股寡核苷酸(兩種:zMCT1 morpholino,抑制MCT1的合成;zMCT4 morpholino,抑制MCT4的合成)的受精後兩天斑馬魚置於螢光顯微鏡下,以適當濾鏡拍照結果如下:



圖七 注射反股寡核苷酸(morpholino)的受精兩天後(2dpf)斑馬魚神經發育細胞的免疫蛋白(Hu-protein)螢光標定。圖 a-c 為注射 zMCT1 morpholino; 圖 d-e 為注射 zMCT4 morpholino。圖 a, d: 全魚免疫螢光染色; 圖 b, e: 腦部局部放大; 圖 c, f: 脊髓部位局部放大。* 表示腦部位置, 箭頭所指為神經軸發育的神經細胞。

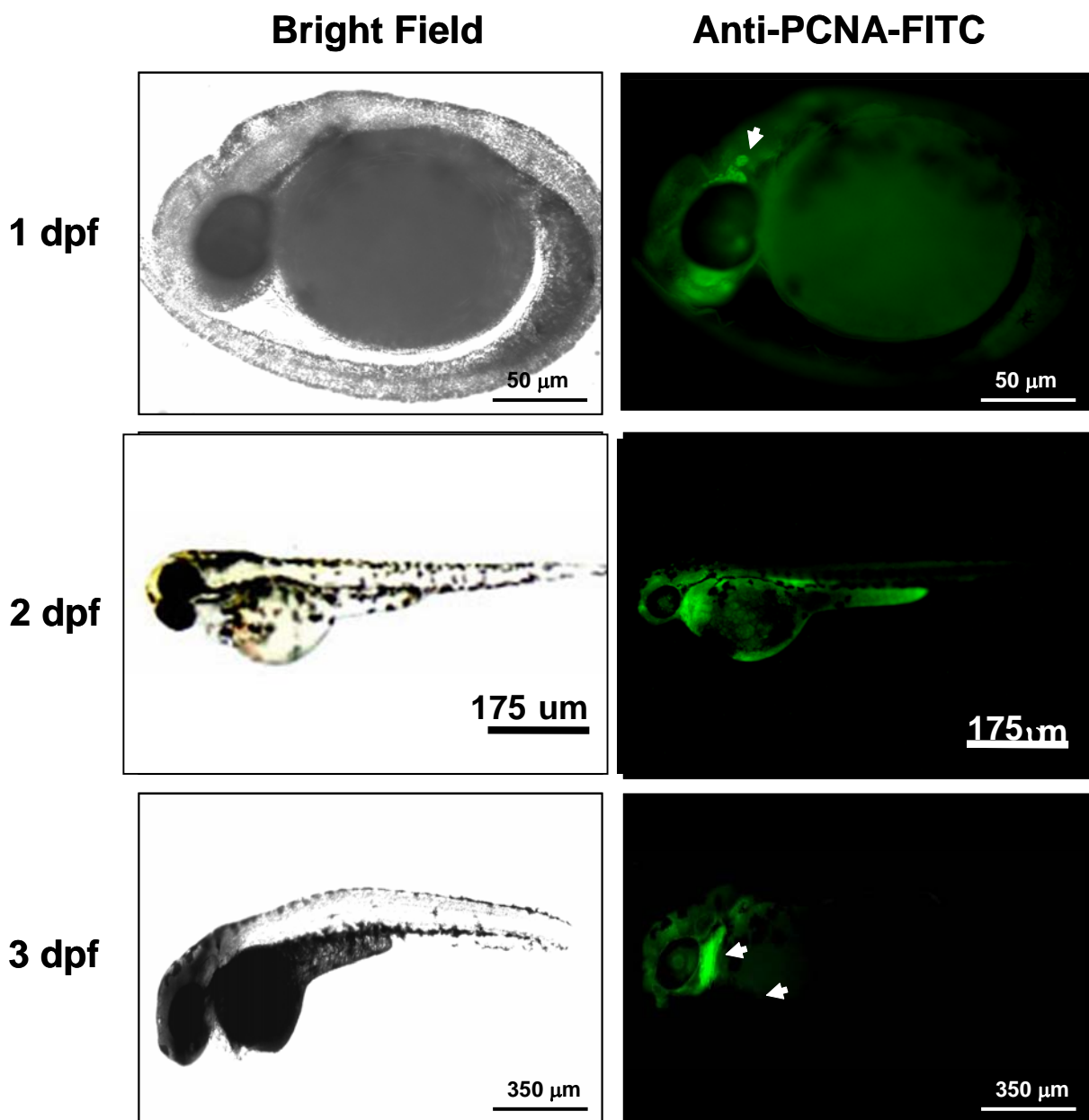
比較對照組與實驗組之結果:

由圖七 a-f 中可發現其螢光強度遠較對照組（圖六）來的微弱，範圍也較小，即可推論施打 MO 以阻斷通道蛋白 MCT1 及 MCT4 的合成，對神經細胞的發育有抑制作用，換言之 MCT1 及 MCT4 的蛋白表現與否，對於神經細胞的發育有關鍵性的影響。

四、對照組與施打 MO 之實驗組之比較（PCNA）

（一）對照組

將正常且孵化天數不同（1,2,3 dpf）的斑馬魚仔魚、利用 PCNA（Proliferating-cell Nuclear Antigen，增生細胞核抗原）進行抗體染色，樣本置於螢光顯微鏡下，以適當濾鏡拍照，結果如下：



圖八 增生細胞核抗原(Proliferating-cell Nuclear Antigen, PCNA)在斑馬魚不同發育時期的免疫蛋白螢光標定。Bright Field:可見光下斑馬魚仔魚魚體。Anti-PCNA-FITC: 發散綠螢光的增生細胞核抗原。箭頭所指為增生細胞核抗原訊號。dpf: days post-fertilization。

由照片圖中可知:

1. 1dpf的斑馬仔魚

於可見光下，可明顯見其巨大卵黃囊及彎曲成球狀的身形，似其未孵化之前於卵中的模樣，頭部尚小。於發散綠色螢光下，則可見其頭部及鰓有綠色螢光，卵黃囊部分也有些許，不過暗沉的多；可知一天仔魚鰓細胞正在分裂。

2. 2dpf的斑馬仔魚

於可見光下，可見其身體彎曲度變小。於發散綠色螢光下，鰓的綠色螢光變明顯且範圍變大，魚的卵黃囊、卵黃棒處，細胞分裂、增生亦多。

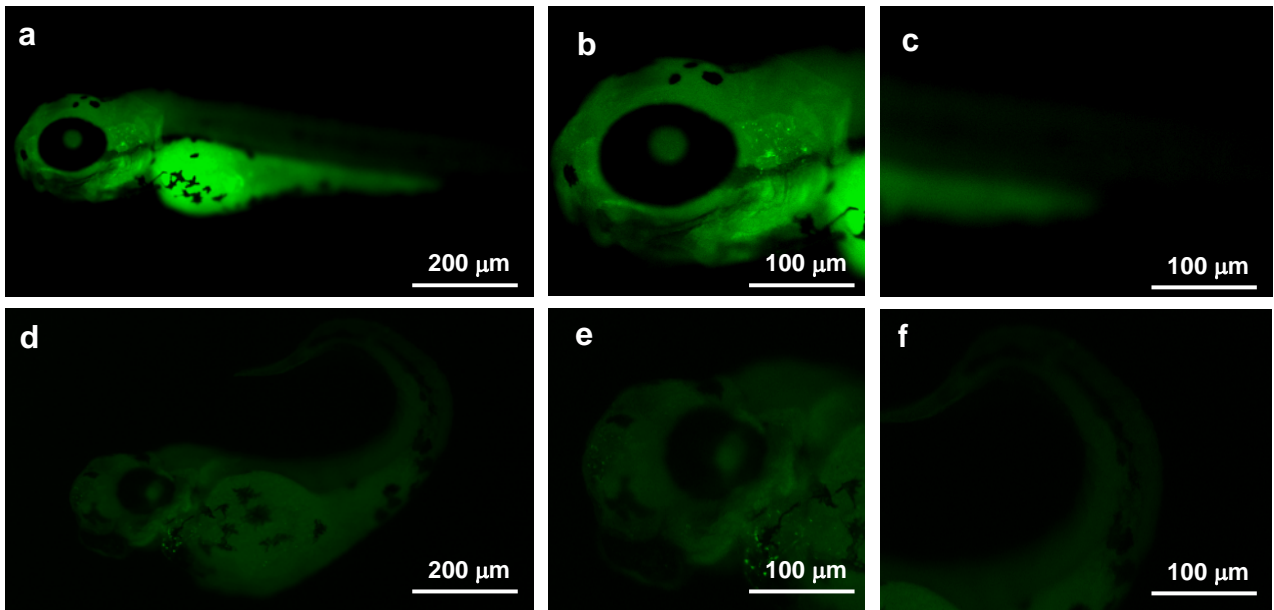
3. 3dpf的斑馬仔魚

於可見光下，可見其卵黃囊越發縮小，身體幾乎平伸，頭部變大許多。於發散綠色螢光下，則可清楚看見頭部及鰓部綠色螢光，範圍愈發大、顏色愈發明顯；尤其鰓部又比頭部其他部分更為明亮，卵黃囊則已幾乎毫無螢光反應。可知，三天的斑馬魚遠比之前細胞分裂、增生的快速及旺盛，尤其是鰓部(如白箭頭所指處)。

(二) 實驗組 (PCNA)

由於MO的強度與作用時間以2 dpf為最佳，因此我們亦以2dpf的實驗結果進行討論。

將注射了反股寡核苷酸(兩種:zmCT1 morpholino, zmCT4 morpholino)的受精後兩天斑馬魚置於螢光顯微鏡下，以適當濾鏡拍照結果如下：



圖九 注射反股寡核苷酸(morpholino)的受精兩天後(2dpf)，斑馬魚增生細胞核抗原(Proliferating-cell Nuclear Antigen, PCNA)螢光標定。圖 a-c 為注射 zMCT1 morpholino；圖 d-e 為注射 zMCT4 morpholino。圖 a, d: 全魚免疫螢光染色；圖 b, e: 腦部局部放大；圖 c, f: 脊髓部位局部放大。

比較對照組與實驗組之結果：

由(圖八) Anti-PCNA-FITC 2dpf 之圖中可觀察出其脊髓部位有明顯之螢光，而在實驗組(圖九 c.f)中，其訊號十分微弱，在腦部(圖九 b.e)也無明顯表現(圖九 c.f)，甚至有些魚體的外表型(圖九 d)因為 MO 的注射，而產生明顯畸形現象，故可以推論：MCT1 及 MCT4 對其胚胎的發育、細胞的複製分裂有著明顯的影響。

五、活體螢光觀察中 MCT1 與 MCT4 之比較

(一) Anti-Hu

由圖七 a 和 d 可看出對於神經細胞的發育，MCT4 的影響遠較於 MCT1 大，因為由圖 a.d 中可發現 a 圖發育中的神經細胞分布範圍較廣且反應較強。而在腦部的局部觀察中，圖 e 的訊號分布範圍也較圖 b 小。脊髓的發育現象則可更加明顯的看出兩者影響力之不同：在圖 f 中已幾乎沒有反應，而在圖 c 中還可看到明顯的中樞神經細胞。

(二) PCNA

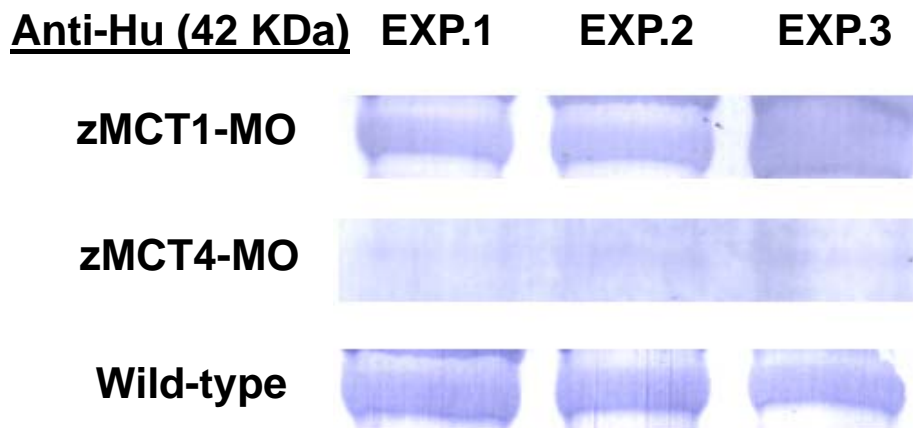
在圖九d-f 中，螢光訊號已非常微弱，顯示出在MCT4的蛋白表現受到抑制，

影響乳酸的運輸能力後，斑馬魚仔魚的細胞幾乎不再分裂，也因此造成魚體的畸形，而在圖九a-c中，即使MCT1被抑制，還能略見螢光，魚體的畸形也沒有MCT4 morphants嚴重，局部看來，圖e.f中魚的腦部及脊髓細胞已鮮少分裂，而圖b.c中仍有反應。

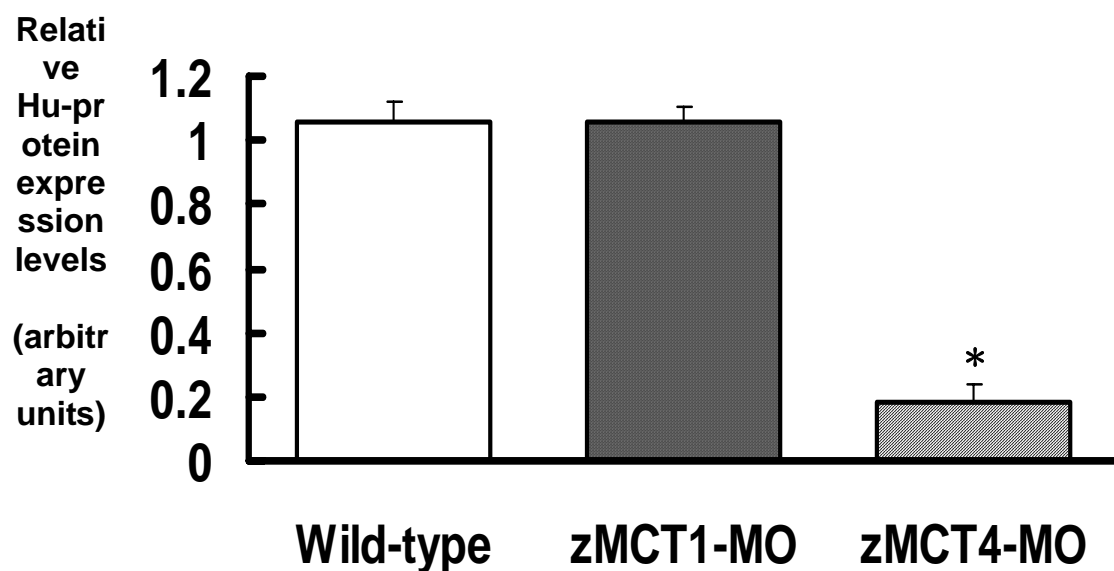
(三) 綜合以上兩項，可以看出對於斑馬魚3dpf前的發育，MCT4的影響遠較MCT1來的大，也呼應圖五中對「MCT4可能是魚類早期胚胎發育時期（孵化後12小時前）能量(乳酸)運輸的重要通道」的假設。

六、西方墨點法分析結果

我們以 Hu-protein 專一性一級抗體進行西方免疫轉漬實驗 (Western-blotting), 每種處理均進行三次重複，結果如圖十。圖十一則為以三次重複實驗的平均結果做成的統計圖表。由圖中可看出 zMCT1-MO 處理後的樣本，所含的 Hu protein 量與 wild-type 相比沒有顯著差異，而 zMCT4-MO 處理後的樣本所含的 Hu protein 量與 wild-type 相比有顯著下降的趨勢。與螢光圖得到之結果大致相符。



圖十 以Hu-protein專一性一級抗體進行西方免疫轉漬實驗 (Western-blotting), 每種處理均進行三次重複



圖十一 統計圖表-三次重複實驗後的平均結果

陸、結論

- 一. 檢測了所有碳水化合物與乳酸通道後，因單羧基運輸蛋白於腦部皆有明顯表現，且其相關研究尚缺乏，而選之為研究對象。
- 二. 因 MCT1 基因表現訊號較強，而選之為實驗對象；MCT4 則在初期表現極明顯，之後卻不再表現，故也值得探討。
- 三. MCT1 和 MCT4 與斑馬魚神經細胞的發育及細胞分裂生長的能量代謝有關；其抑制造成斑馬魚發育緩慢、身體畸形。
- 四. 對於斑馬魚初期胚胎發育，MCT4 的影響遠較 MCT1 大，初步確定 MCT4 可能是魚類早期胚胎發育時期重要的乳酸運輸通道。

柒、應用

經此次實驗，我們推斷運輸乳酸的蛋白質通道與斑馬魚早期胚胎發育，與中樞神經系統發生的能量供給息息相關，而在其他高等脊椎動物中，此類似的蛋白質通道是否也是影響早期胚胎中樞神經及腦部發育的關鍵，應是一個值得深究的問題。我們期望可以找出存在於各式各樣生物體間的通則，並且加以應用。

捌、未來展望

一、MCT4 對發育的影響大於 MCT1 的確切原因：

由以上實驗可看出，MCT4 對腦部及中樞神經發育的影響明顯大於 MCT1。我們猜想可能是因 MCT4 直接位於神經細胞上；或可能其在星芒狀細胞上的表現重要性遠勝於 MCT1，因此對胚胎初期發育的影響較大。然而，確切機制及通道位置仍待未來設計實驗證明。

二、MCT2、SGLT 和 GLUT 的接續實驗：

研究過 MCT1 及 MCT4 對斑馬魚腦部及中樞神經發育的影響後，我們未來打算繼續研究 MCT2、SGLT 及 GLUT 對其產生的影響，並與 MCT 比較。

玖、參考資料及其他

1. Pellerin, L. (2005) How astrocytes feed hungry neurons. *Mol. Neurobiol.* 32(1): 59-72.
2. Pellerin, L., Pellegri, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.L., Stella, N., Magistretti, P.J. (1998) Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev. Neurosci.* 20(4-5): 291-299.
3. Magistretti, P.J., Sorg, O., Naichen, Y., Pellerin, L., de Rham, S., Martin, J.L. (1994) Regulation of astrocyte energy metabolism by neurotransmitters. *Ren. Physiol. Biochem.* 17(3-4):168-171.
4. Schurr, A., Miller, J.J., Payne, R.S., Rigor, B.M. (1999) An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. *J. Neurosci.* 19(1):34-39.
5. Schurr, A. (2006) Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 26(1):142-152.
6. Kasischke, K.A., Vishwasrao, H.D., Fisher, P.J., Zipfel, W.R., Webb, W.W. (2004) Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305(5680):99-103.

評語

此作品利用 oligonucleotide 的技術，抑制單羧基運輸蛋白的表現，觀察其對神經系統的影響，非常有趣。但單羧基運輸蛋白在斑馬魚胎發育之表現應用免疫化學方來染色確認。西方點墨法分析蛋白的表現，也應有 loading control。此作品若能再改進研究結果的表達，應有發展的潛力。