

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作品名稱：類固醇對斑馬魚胚胎細胞的影響

得獎獎項：第三名

學校 / 作者：臺北市立第一女子高級中學 羅雅云
臺北市立第一女子高級中學 柯品仔

作者介紹

一、羅雅云

目前就讀北一女中三年良班，身為數理資優班的一員，從高二便開始進行專題研究，並進入中研院分生所鍾邦柱教授的實驗室做實驗，作品曾榮獲校內科展佳作及最佳團隊獎、臺北市 96 年度中等學校學生科學教育獎助計畫二等獎。我的個性活潑、有毅力，並隨時保持樂觀的態度來迎接未來；平常的興趣為繪畫、閱讀及聽音樂。



二、柯品仔

就讀台北市立第一女子高級中學數理資優班。高中時參與「中央研究院高中生命科學資優生培育計畫」，進入分生所鍾邦柱教授的實驗室做實驗，並在「臺北市 96 年度中等學校學生科學教育獎助計畫」獲生物科二等獎與獎助學金。豎笛一直是我陶冶性情、放鬆壓力、調整心情的好夥伴，小學及國中都參加管樂團。



摘要

英文摘要(Abstract)

Functional study of steroids during embryogenesis in zebrafish

Steroid hormones are very important for physiological homeostasis, but some functions of steroids are still unclear during embryonic development. Embryonic cell movements are required forming embryonic body. Recently, there is already known Pregnenolone (P5) which could affect epiboly movement of zebrafish embryos is the first product of the steroidogenesis pathway, but effects of further downstream products on epiboly movement are unknown. In order to know this, we treat embryos with Pregnenolone (P5), 17α -Hydroxypregnenolone (17OH-P5), DHEA, Progesterone (P4), 17α -Hydroxyprogesterone (17OH-P4), 11-Deoxycortisol (D), or Testosterone (T). We found out that P5 can accelerate epiboly movement, 17OH-P5 and D have no significant effects on it, and DHEA, P4, 17OH-P4, and T can decelerate it. These results indicated that steroids play important roles on embryonic epiboly movement in zebrafish.

類固醇對斑馬魚胚胎細胞移動的影響

中文摘要

類固醇荷爾蒙對生理平衡很重要，但其對於胚胎發育的影響仍舊不明。胚胎個體的形成需要胚胎細胞進行不同的移動排列。目前研究已知類固醇荷爾蒙生合成機制的第一個產物 pregnenolone (P5)對斑馬魚胚胎 epiboly 移動有影響，但其它更下游的類固醇荷爾蒙對 epiboly 移動的影響仍然未知。爲了了解類固醇其他下游產物對魚卵早期細胞移動的影響，將胚胎處理 Pregnenolone (P5)、 17α -Hydroxypregnenolone (17OH-P5)、DHEA、Progesterone (P4)、 17α -Hydroxyprogesterone (17OH-P4)、11-Deoxycortisol (D)、Testosterone (T)，發現 17OH-P5、D 對 epiboly 的移動沒有影響，而 DHEA、P4、17OH-P4、T 會使其變慢。這些結果說明了類固醇對胚胎細胞的移動扮演著重要角色。

壹、介紹

一、斑馬魚

我們會選擇斑馬魚為我們的實驗材料，主要是因其有以下幾個優點：飼育容易、產卵數多、胚胎透明容易觀察。近年來斑馬魚已成為研究發育生物學的新興模式動物。

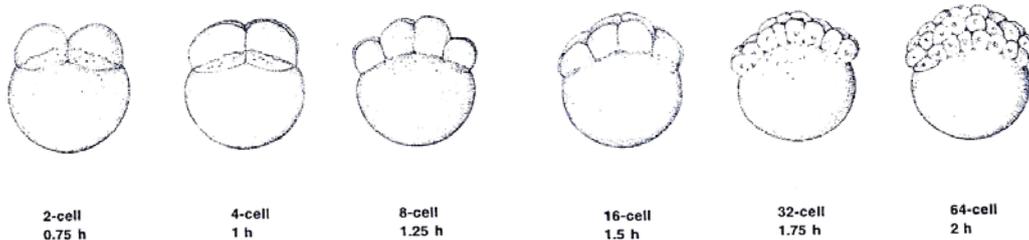
以下是其胚胎發育階段示意圖：

1. 受精卵時期 Zygote period (0-0.75 hpf)：精子與卵子結合後，細胞開始分裂。



1-cell
0.2 h

2. 細胞分裂時期 Cleavage period (0.75-2.25 hpf)：細胞持續分裂，直到分裂出 64 個細胞。



2-cell
0.75 h

4-cell
1 h

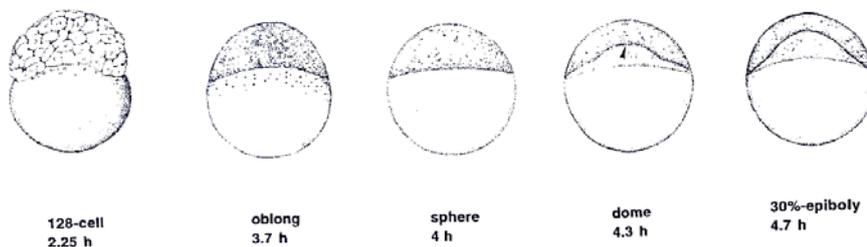
8-cell
1.25 h

16-cell
1.5 h

32-cell
1.75 h

64-cell
2 h

3. 囊胚期 Blastula period (2.25-5.25 hpf)：在分裂第 14 次後進入囊胚期，至開始形成原腸。



128-cell
2.25 h

oblong
3.7 h

sphere
4 h

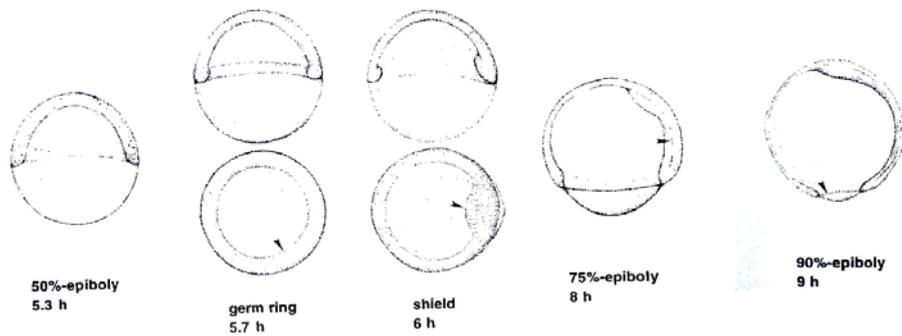
dome
4.3 h

30%-epiboly
4.7 h

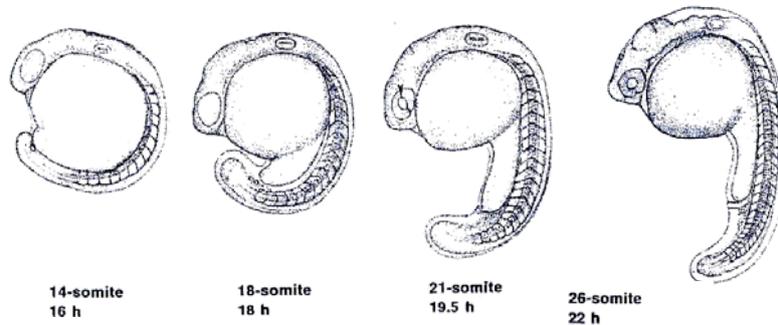
Epiboly(4.7-10hpf)：細胞藉由細胞骨架的幫助，一邊分裂，一邊漸漸從動物極(animal pole)移往植物極(vegetal pole)的過程；這個階段可以幫助我們很清楚的觀察到胚胎早期細胞移動的速率。

4. 原腸期 Gastrula period (5.25-10hpf)：細胞會移動摺疊，形成三個胚層(外胚層、中胚層、內胚

層)。

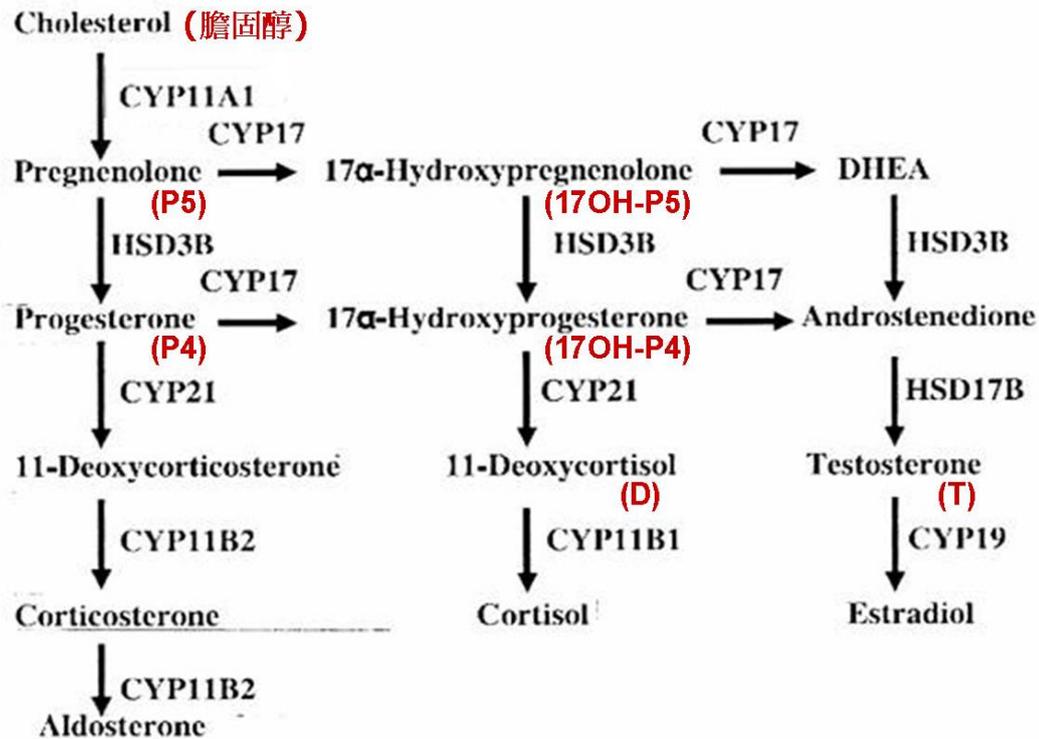


5.體節形成期 Segmentation period(10-24hpf)：各種器官、體節形成。



二、類固醇

類固醇是一個主要以三個六碳環及一個五碳環結構組成的化合物的總稱，屬於脂類的一類。在人類生理及藥理上，最為人所知的類固醇是膽固醇，在細胞內膽固醇是細胞膜、細胞核膜重要的組成物質，例如神經的髓鞘需要它來組成細胞膜以使神經傳導訊息漏電比例下降。另外，在個體內膽固醇會出現在血液、膽汁或淋巴液。除此之外，在某些會生合成類固醇荷爾蒙的器官，如腎上腺，膽固醇可經由類固醇生合成機制(steroidogenesis pathway)(圖一)，藉由一系列不同酵素催化(CYP11A1、CYP17、CYP21 等)，產生 P5、P4 等中間產物至最後的三組產物：糖皮質素(Corticosterone)—提高血糖、鹽皮質素(Aldosterone)—提高腎臟從尿液裡回收水的能力，及性荷爾蒙(Testosterone 及 Estradiol)，這些都是動物體內不可或缺的物質。



圖一、類固醇合成機制(steroidogenesis pathway)

前人的報告(Nature 439, 480-83, 2006 Jan)中提到，類固醇激素合成中的中間產物 P5 對斑馬魚胚胎細胞的移動會造成的影響。他們發現 P5 可以促進微管的聚合並促進細胞的移動與遷徙，因此當他們注射 *cyp11a1* MO[註一](可以干擾 *cyp11a1* 基因的表現，使早期胚細胞的移動與形態發生受到抑制)，P5 的合成便消失，微管的聚合也相對應地減少，胚胎細胞的移動接著受到干預，胚胎形態發生不全自然會造成胚胎早期的死亡；所以如果同時注射 MO 後加入 P5，MO 所造成的現象將會有所改善。

[註一] MO (antisense morpholino oligonucleotide)：一種結構類似 DNA 的物質(nucleic analog)，其上有鹼基對可與 mRNA 結合，核糖體便無法嵌上 mRNA，接下來便無法形成蛋白質。

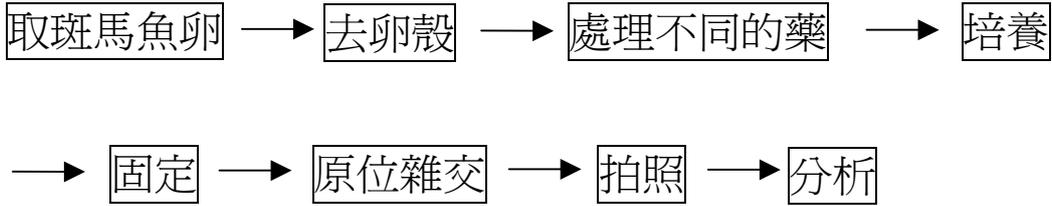
貳、研究動機

目前已知 P5 會對斑馬魚胚胎的 epiboly movement 有影響。但從 steroidogenesis pathway 可以看出，它的下游仍有許多產物如 17OH-P5、17OH-P4、DHEA……等，我們並不知道上述的其他產物對斑馬魚胚胎 epiboly movement 有何影響，因此我們決定使用斑馬魚為我們的實驗動物，嘗試加入 17OH-P5、17OH-P4、DHEA、D、T，觀察它們對斑馬魚卵 epiboly movement 造成什麼樣的影響。

參、研究目的

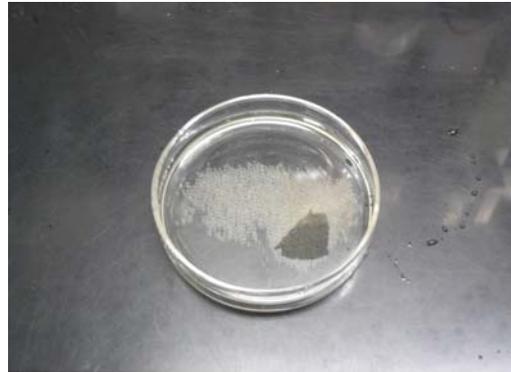
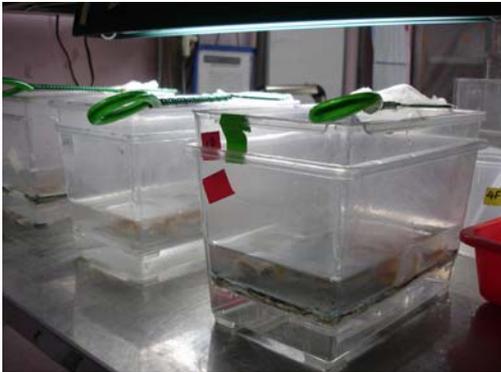
了解膽固醇下游產物對斑馬魚胚胎早期細胞移動的影響。

肆、研究方法或過程



一、取斑馬魚卵

先將一缸魚公母分開，隔天早上再將中間的隔板取出，待過 5 分鐘後，利用網孔小的漁網將魚卵收集起來，置於玻璃培養皿中。



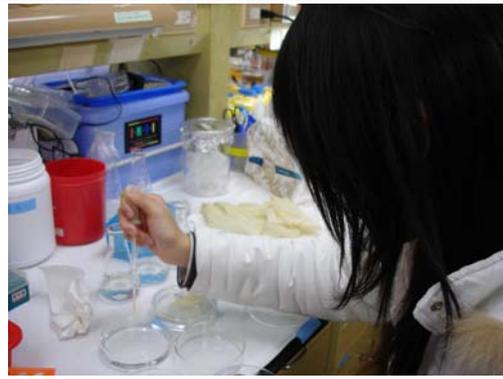
二、去卵殼

將取來的卵滴入 protease，置於 shaker 上使之均勻分布搖動，等到看到大約有三顆卵的卵殼已脫落，即可停止並將含有 protease 的魚水倒掉，使之用小水流慢流輕輕的脫去卵殼。



三、處理不同的藥

將 $50 \mu\text{M}$ 的 P4、P5、DHEA、17OH-P4、17OH-P5、D、T(10mM)各加入裝有 50c.c 水的培養皿中(最終濃度為 $10 \mu\text{M}$)，再準備一盤裝有 50c.c 水的培養皿作為對照組，每盤各加入約 50 顆已去卵殼的魚卵。



四、培養

將魚卵放置於 33°C 培養箱中約 7 個小時，待對照組(未加藥)魚卵已達約 85% epiboly stage 時，即可用塑膠滴管吸出置於 eppendorf 中。



五、固定

在各 eppendorf 中加入 1c.c 4%PFA/PBS，將其橫放置於 4°C 冰箱中的 shaker 上。



六、原位雜交

1. 樣品保存

加 4% 聚甲醛(PFA) --固定在 4°C 冰箱，14~16 小時--> 置換 PBS 清洗 --5min 重複 3 次--> 25% 甲醇+75%PBST --5min--> 50%甲醇+50%PBST --5min--> 75%甲醇+25%PBST --5min--> 100% 甲醇 --5min4 次--> 在-20°C 冰箱。

2. 樣品覆水

75%甲醇+25%PBS —5min--> 50%甲醇+50%PBS —5min--> 25%甲醇+75%PBS —5min--> 1X PBS 5min 4 次。

3. 雜交反應前置作業

加 HYB- --5min 65°C--> 加 HYB+ 2hr 65°C。

4. 雜交反應

加 RNA 探針 probe: nt1, 主要是表現 margin(epiboly 細胞移動最下緣)跟 axail mesoderm, 我們利用它會染 margin 的特性來觀察 epiboly 移動 (事先在 68°C 加熱 10min, 置冰上 5min) 14~16hr 65°C。

5. 探針偵測

75%HYB⁺+25% 2X SSC —10min 65°C--> 50%HYB⁺+50% 2X SSC —10min 65°C--> 25%HYB⁺+75% 2X SSC —10min 65°C--> 2X SSC —1hr 65°C--> 0.2X SSC —30min 65°C 2 次--> Maleic acid buffer —5min 2 次 室溫--> 阻滯液 —3hr 室溫--> 抗-DIF 抗體(AP anti-Dig) 4°C 冰箱 14~16 小時。

6. 呈色反應

置換 150mM Maleic acid/100mM NaCl + Tween20 —25min 室溫 清洗 5 次--> 呈色緩衝液 —10min 3 次--> 加 BCIP/NBT 呈色 —2~4 小時 避光--> PBST —5min 清洗 3 次--> 4%PBS 停止呈色。

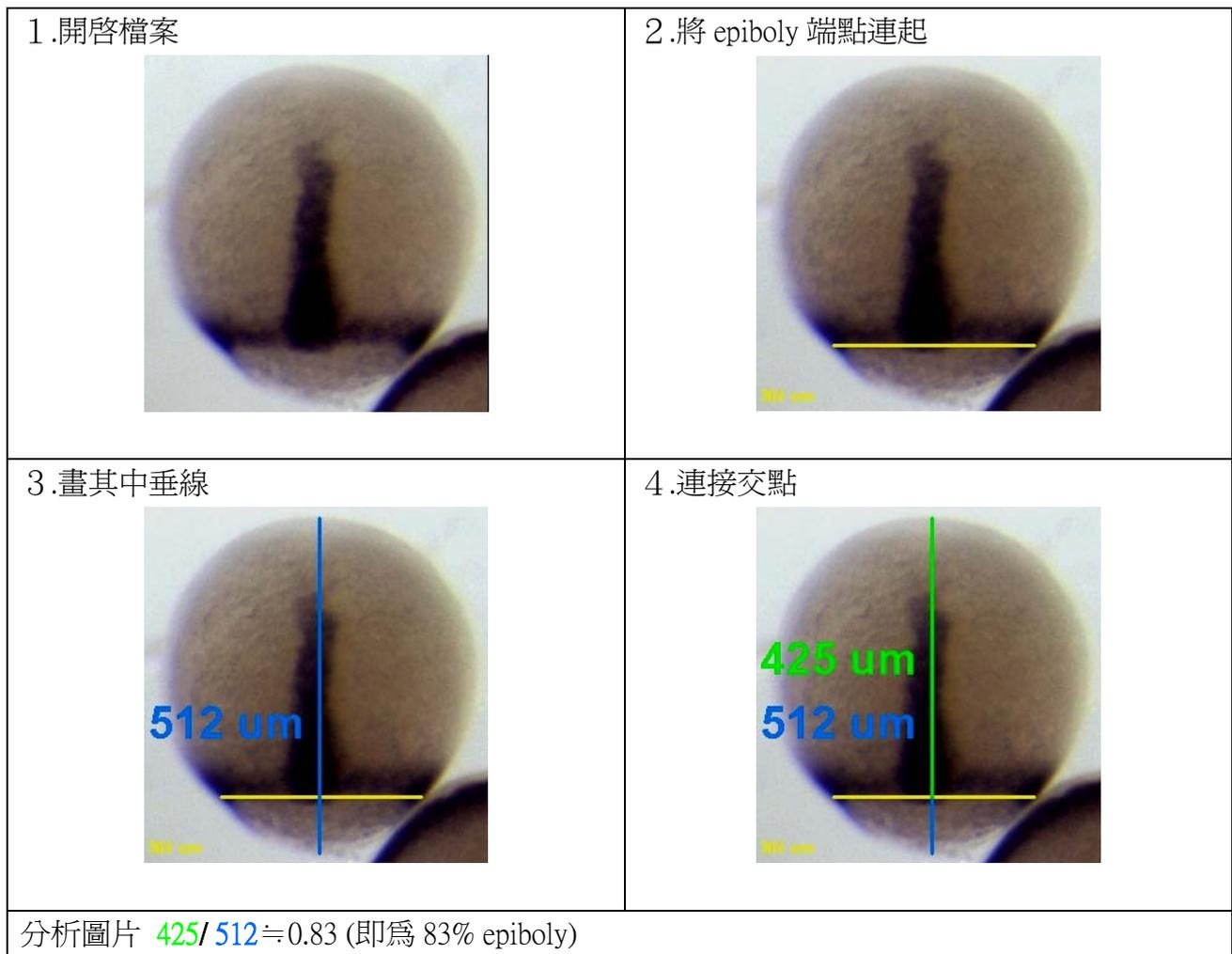
七、拍照

先將 eppendorf 內的 4%PFA/PBS 換成 PBST。利用鑷子在顯微鏡下將卵調至適當角度，顯微鏡上頭 CCD 拍下存檔。



八、分析

將所照下的圖片利用軟體 SPOTCam Advanced 算其 epiboly 百分比。將數據紀錄下來，利用 excel 算其平均，並用 STDEV、TTEST 檢視其數據準確性。



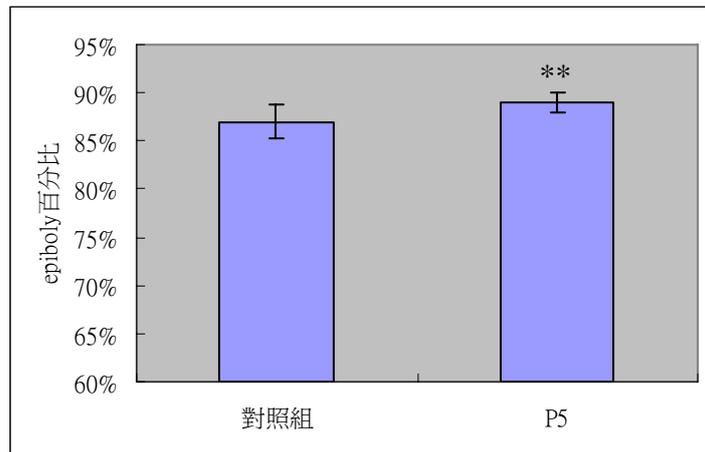
伍、研究結果

一、P5

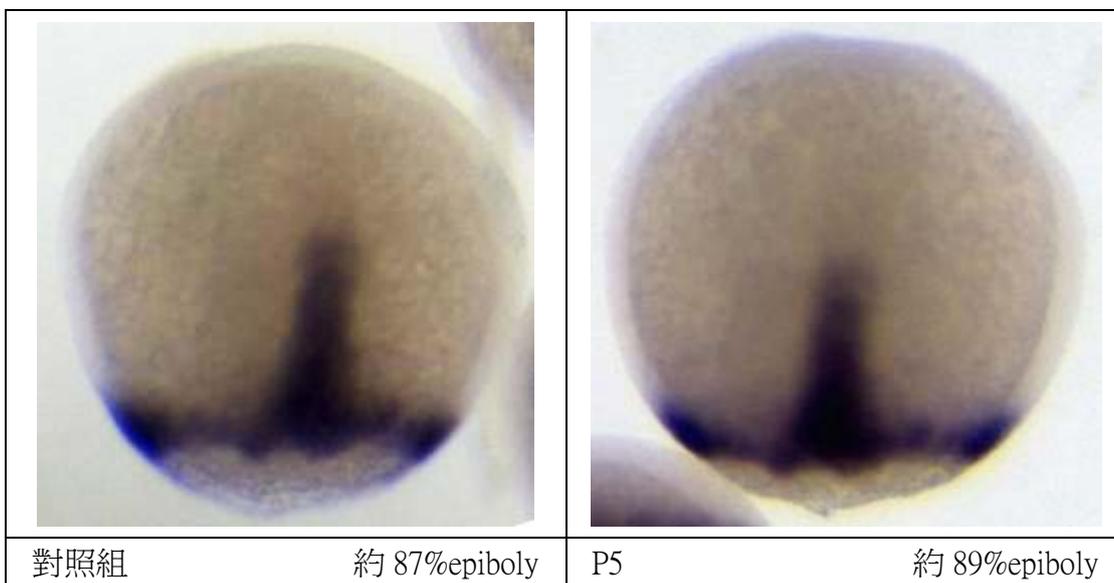
我們重複一次前人的實驗，一方面確定其正確性，一方面練習處理魚卵的技術。由此實驗可知，P5 會使 epiboly 的移動變快約 2 個百分比。

表一、P5 處理後對 epiboly 百分比之影響

	第一次	第二次	第三次	平均
對照組	85%	88%	88%	87%
P5	88%	89%	90%	89%



圖二、P5 處理後對 epiboly 百分比之影響



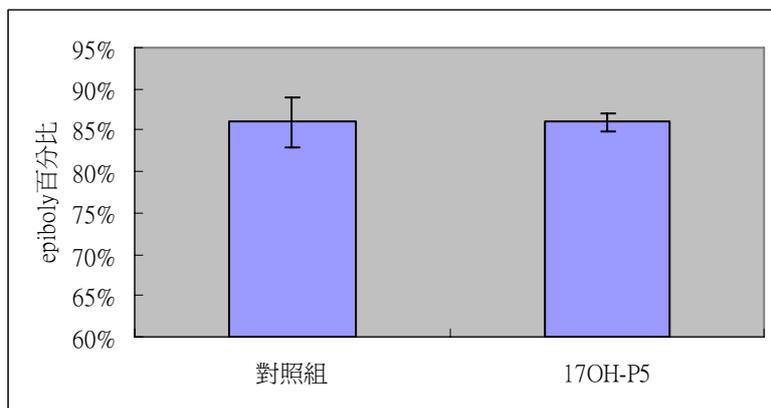
圖三、P5 處理後對 epiboly 百分比影響之顯微鏡下圖

二、17OH-P5

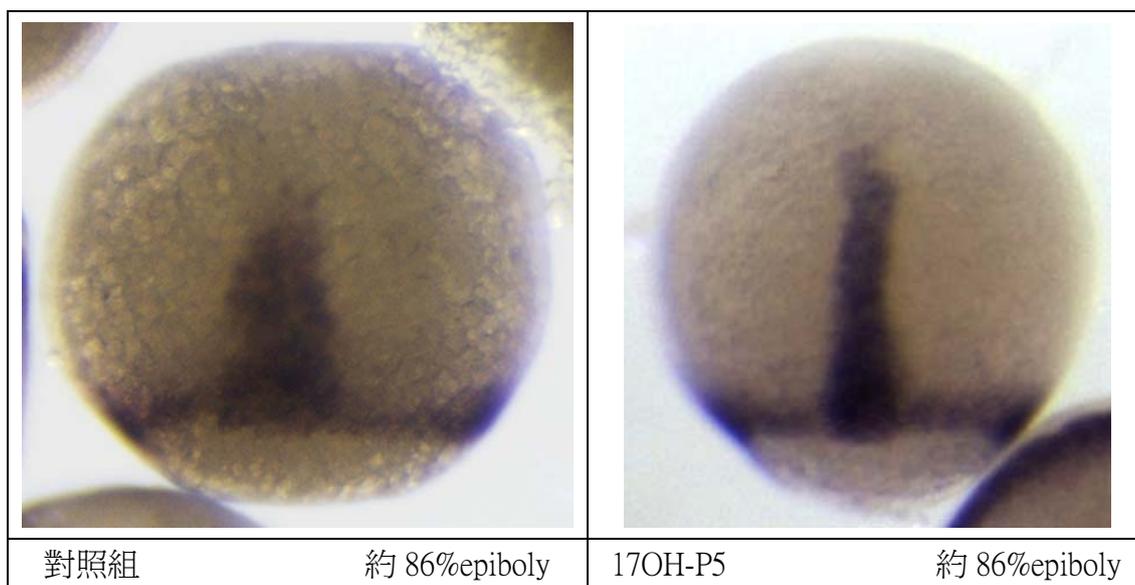
將魚卵用 17OH-P5 處理過後，發現其似乎對 epiboly 的移動沒有顯著影響。

表二、17OH-P5 處理後對 epiboly 百分比之影響

	第一次	第二次	第三次	平均
對照組	83%	86%	89%	86%
17OH-P5	85%	85%	87%	86%



圖四、17OH-P5 處理後對 epiboly 百分比之影響



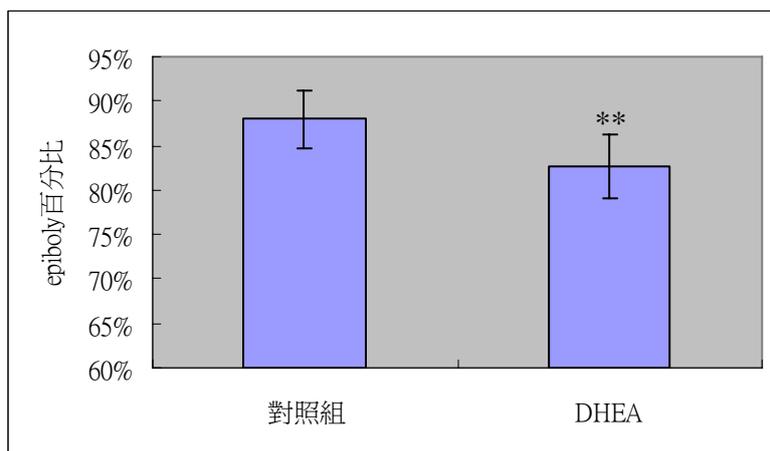
圖五、17OH-P5 處理後對 epiboly 百分比影響之顯微鏡下圖

三、DHEA

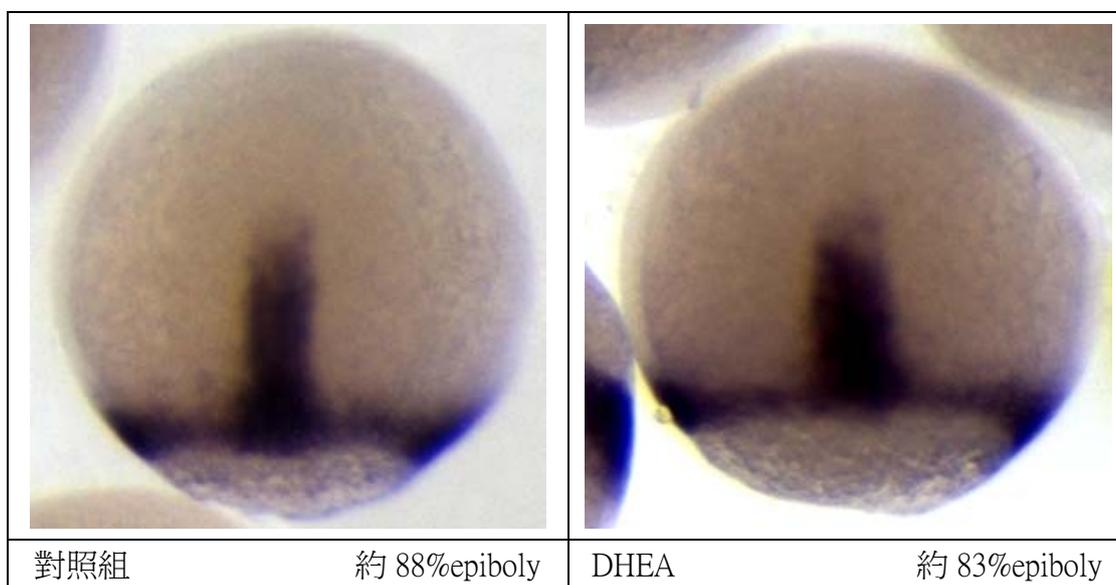
令人驚訝的，能提高人肌肉和運動表現、改善認知功能，被喻為「抗老荷爾蒙」的 DHEA 竟會使 epiboly 的移動變慢約 5 個百分比。

表三、DHEA 處理後對 epiboly 百分比之影響

	第一次	第二次	第三次	平均
對照組	92%	84%	88%	88%
DHEA	87%	78%	83%	83%



圖六、DHEA 處理後對 epiboly 百分比之影響



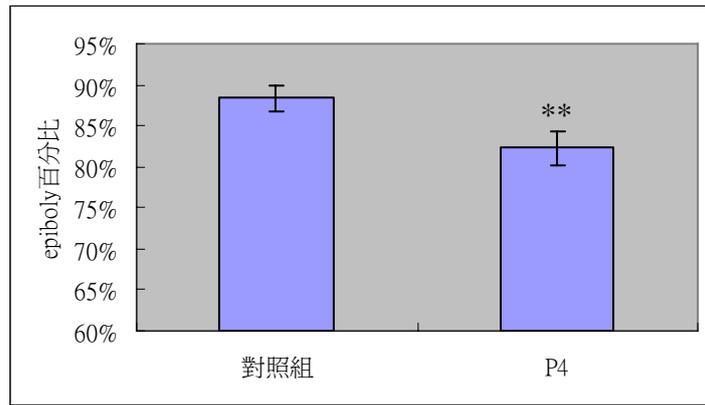
圖七、DHEA 處理後對 epiboly 百分比影響之顯微鏡下圖

四、P4

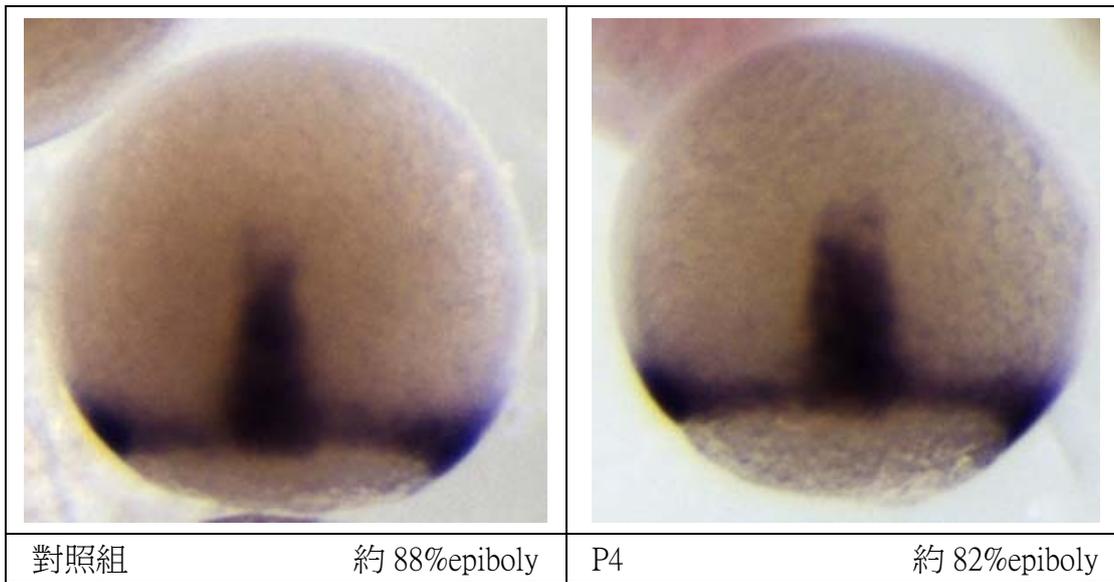
P4 會使 epiboly 的移動變慢，大約 delay 對照組 6 個百分比，差別相當明顯。

表四、P4 處理後對 epiboly 百分比之影響

	第一次	第二次	第三次	平均
對照組	87%	90%	88%	88%
P4	80%	84%	83%	82%



圖八、P4 處理後對 epiboly 百分比之影響



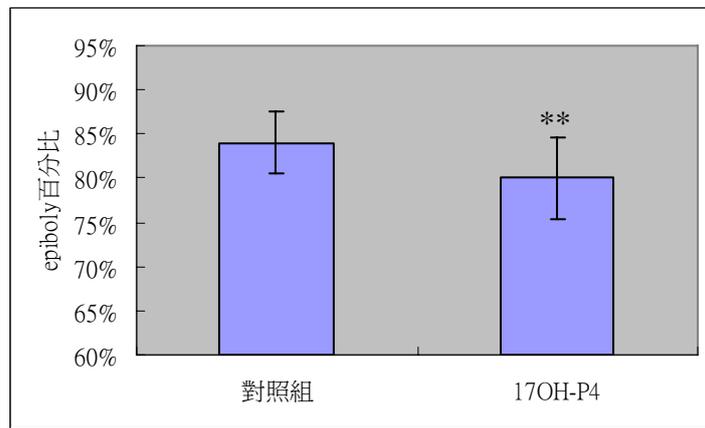
圖九、P4 處理後對 epiboly 百分比影響之顯微鏡下圖

伍、17OH-P4

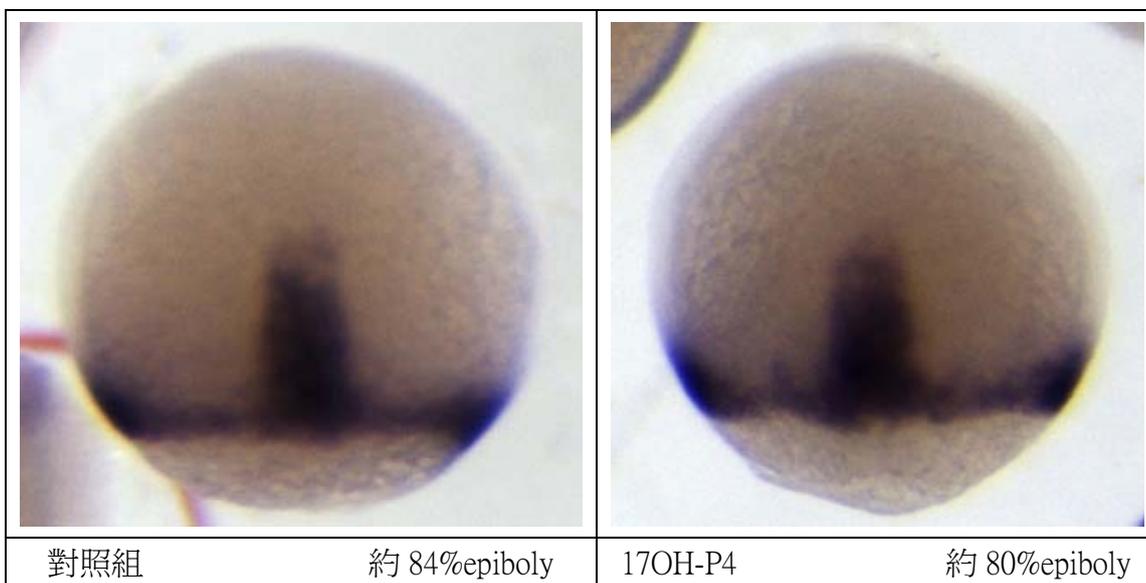
由實驗得知，17OH-P4 會使 epiboly 移動變慢 4 個百分比，與對照組相比也有顯著差異，而 P4 變慢的程度比 17OH-P4 大。

表五、P4 處理後對 epiboly 百分比之影響

	第一次	第二次	第三次	平均
對照組	84%	88%	81%	84%
17OH-P4	79%	85%	76%	80%



圖十、17OH-P4 處理後對 epiboly 百分比之影響



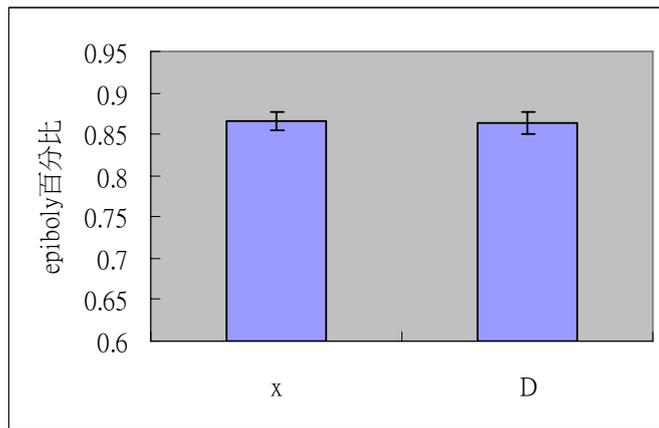
圖十一、17OH-P4 處理後對 epiboly 百分比影響之顯微鏡下圖

六、D

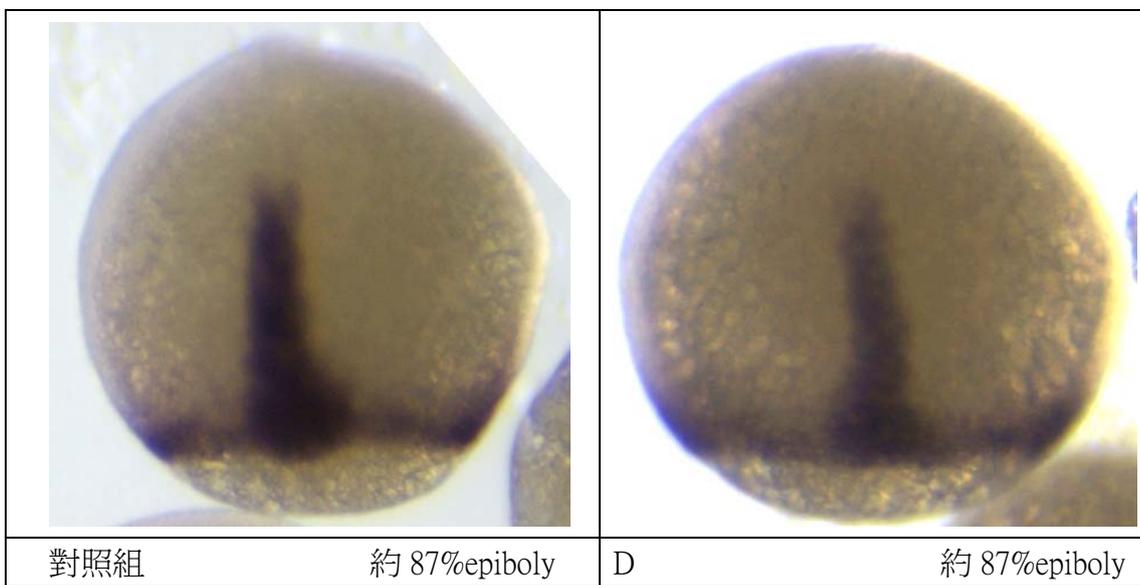
由實驗得知，D 對 epiboly 的移動速率沒有顯著影響。

表六、D 處理後對 epiboly 百分比之影響

	第一次	第二次	第三次	平均
對照組	85%	87%	88%	87%
D	85%	87%	88%	87%



圖十二、D 處理後對 epiboly 百分比之影響



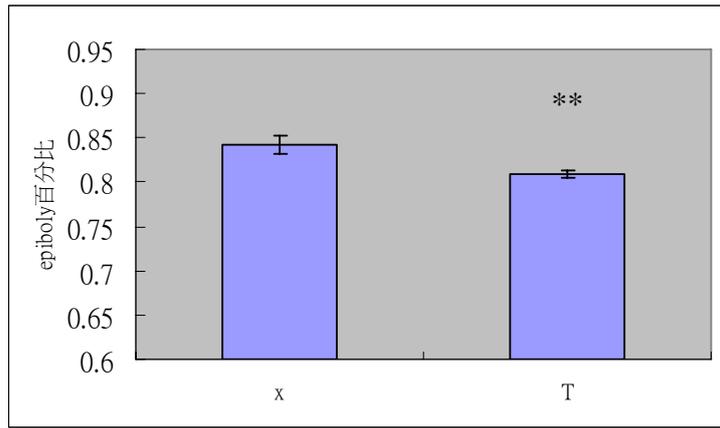
圖十三、D 處理後對 epiboly 百分比影響之顯微鏡下圖

七、T

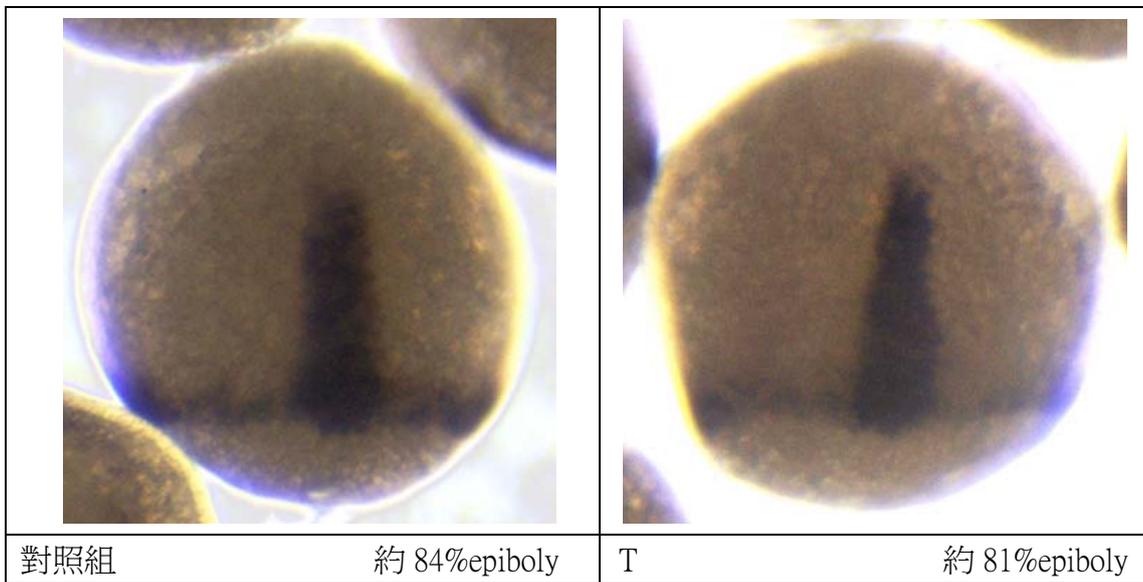
由實驗得知，T 會使 epiboly 移動變慢約 3 個百分比。

表七、T 處理後對 epiboly 百分比之影響

	第一次	第二次	第三次	平均
對照組	84%	83%	85%	84%
T	81%	81%	81%	81%



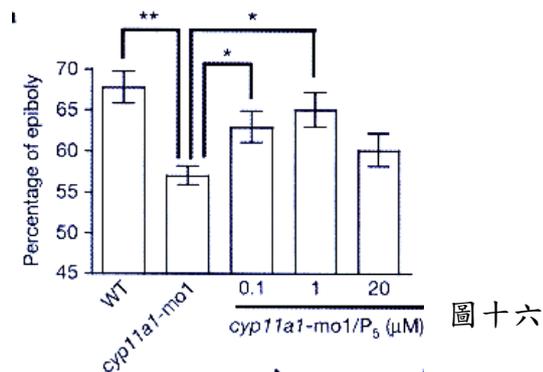
圖十四、T 處理後對 epiboly 百分比之影響



圖十五、T 處理後對 epiboly 百分比影響之顯微鏡下圖

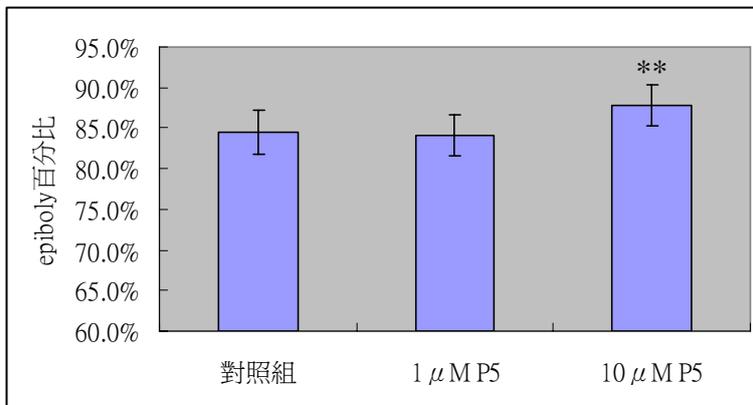
陸、討論

一、前人研究中，在注射完 *cyp11a1* MO 後，會使斑馬魚卵無法自行產生 P5，因此造成斑馬魚卵 epiboly 移動延遲，所以又外加了 P5，不同濃度的 P5 會造成不同的影響(圖十六)；在 treat 0.1 μ M, 1 μ M, 20 μ M 的 P5 中，使之回復最多的是加入 1 μ M 的 P5。



圖十六

雖然上述的結果顯示，加入 $1\ \mu\text{M}$ 可以看到最明顯的差異，但我們加入 $1\ \mu\text{M}$ 卻看不出明顯的差異(圖十七)，因此我們將濃度加到 $10\ \mu\text{M}$ ，實驗後發現有明顯差異，所以其他的實驗的濃度皆以 $10\ \mu\text{M}$ 。



圖十七、 $1\ \mu\text{M P5}$ 及 $10\ \mu\text{M P5}$ 處理後對 epiboly 百分比之影響

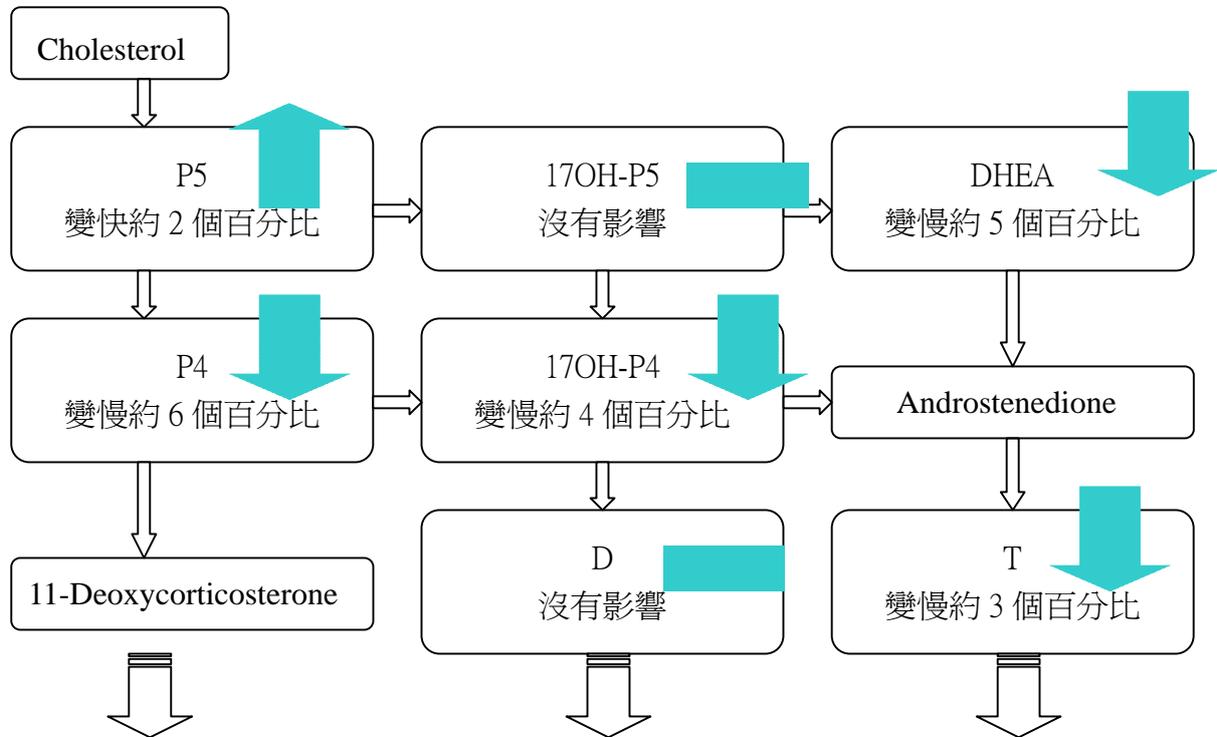
會做出和前人不同的結果可能是因為其實驗是先阻擋 P5 的生成再加入 P5，而我們的實驗卻是在正常的魚卵中加入 P5，其內原本已有自行產生的 P5，若再加入 $1\ \mu\text{M}$ ，對 P5 的量來說，增加的不多，因此我們看不到明顯差異。

另外在前人的實驗結果中，注射 *cyp11a1* MO 後，加了 P5 比沒有加 P5 *cyp11a1* MO 的 epiboly 移動至少都快了約 5 個百分比；而我們使用正常魚卵的結果卻只有相差約 2 個百分比。有可能因為在我們的實驗中，WT 原有的 P5 和再增加 $10\ \mu\text{M}$ 的 P5，差距沒有前人的顯著；也有可能是因為我們使用的濃度太大了，我們推測應該是下游的某種類固醇會使 epiboly 比較慢，所以當超過一定外加濃度如 $20\ \mu\text{M P5}$ ，有更多的 P5 被帶謝成此類固醇，此時的作用大過 P5 促進 epiboly movement 的功能，於是就變成是 delay 的結果，因此我們的量可能需再做調整，做進一步研究。

- 二、由前人的文章中我們得知，加入 P5 確實會影響斑馬魚卵 epiboly 的移動，但是什麼樣的機制造成的呢？Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor (Virginie, 2006) 裡提到微管中蛋白質 MAP2 可以和 P5 結合，並刺激微管的聚合。他們利用從老鼠腦中純化出的微管蛋白質，在加入 P5 後，發現微管長度有明顯的增加；另外 PC12 神經細胞，在加入 P5 後其微管也有明顯的變長。他們還測試了類固醇對 PC12 細胞生長的影響，加入了 P5 後神經突觸明顯的增加，且長度也有增長，不過利用 RNAi 抑制了 MAP2 後，增加增長的效果很明顯的也跟著被抑制了；而什麼藥品也沒加的對照組則在加入 RNAi 後沒有顯這的影響。因此推論 P5 應該是藉由 MAP2 來刺激微管的聚合，但更詳盡的機制還是未知。而斑馬魚卵 epiboly 之所以會移動，是因其細胞骨架移動帶動 epiboly 所造成，因此若 P5 會影響微管的長短，他則進可以影響 epiboly 的移動。

柒、結論與應用

一、結論



二、應用

類固醇對細胞生理機制的調控很重要，目前 P5 被研究出可增加細胞骨架的聚合，和細胞移動有很大的相關性，而同屬膽固醇及 P5 下游的其他類固醇，我們觀察出它們對細胞移動的影響，可以往後研究更細部細胞移動的相關機制。

捌、參考文獻

- (一)、Charles B.Kimmel et al.
1995
Stages of embryonic development of the zebrafish.
Developmental Dynamics , 203, 253-310
- (二)、Christiane Nüsslein-Volhard et al.
Zebrafish, 219-236
- (三)、Etienne-emile Baulieu et al.
2004

Mapreg- Toward a Novel Approach of Neuroprotection and Treatment of Alzheimer' s Disease.

Journal of Molecular Neuroscience, 24, 63-65

(四) 、 Hwei-Jan Hsu et al.

2006

Pregnenolone stabilizes microtubules and promotes zebrafish embryonic cell movement.

Nature, 439, 480-83

(五) 、 Koichi Murakami et al.

2000

Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly.

PNAS, 97, 3579-3584

(六) 、 Monte Westerfield

The zebrafish book

Edition 2.1,

The Institute of neuroscience, University of Oregon, Monte Westerfield

The University of Oregon Press

9.16-9.21, 1994

(七) 、 Virginie Fontaine-Lenoir et al.

2006

Microtubule-associated protein (MAP2) is a neurosteroid receptor.

PNAS , 103, 4711-4716

評語

- 1) 能仔細觀察並紀錄實驗結果。
- 2) 口語表達清晰流利。
- 3) 建設加入 CYP11 knockdown 之實驗對照組。