

# 2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090012  
參展科別 醫學與健康科  
作品名稱 不飽和脂肪酸 omega-3 對膽管癌的影響  
得獎獎項 大會獎：一等獎

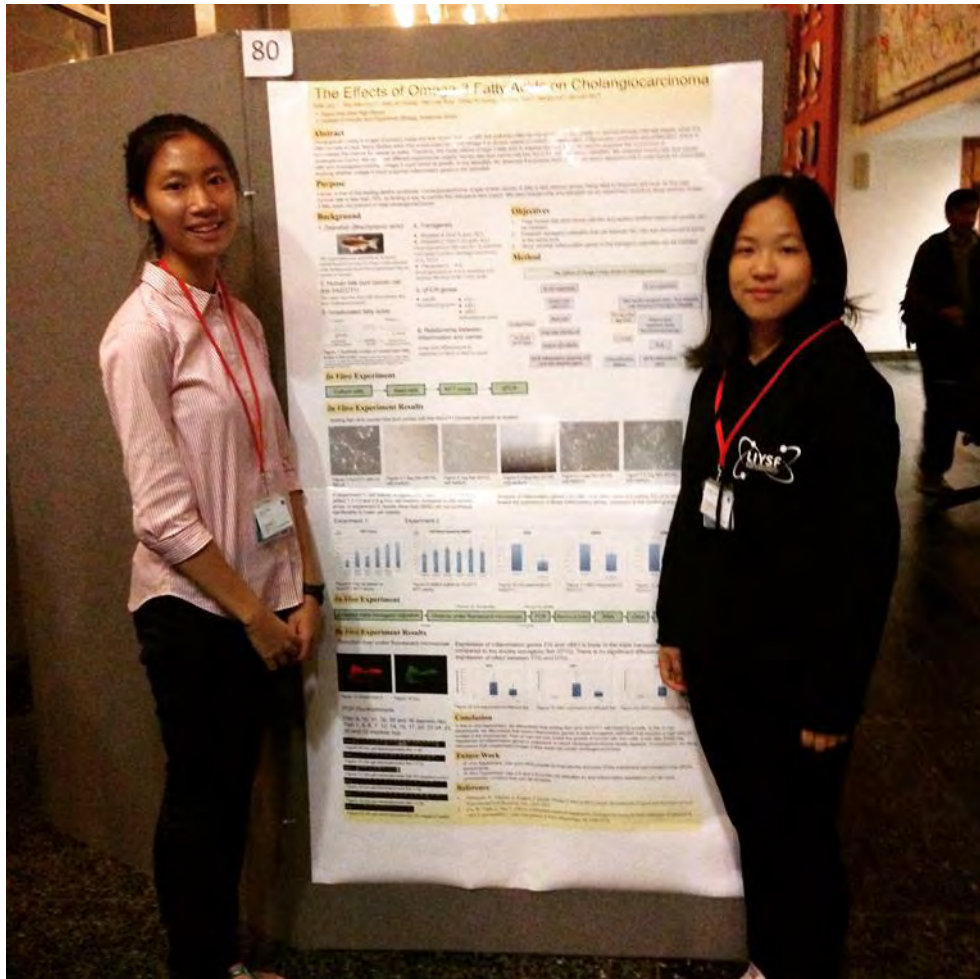
就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 孫譽真、吳金洌

作者姓名 羅亦甯、朱讚美

關鍵字 omega-3、膽管癌、斑馬魚

## 作者簡介



我是羅亦甯（右），目前就讀北一女中三年級。我從小就很喜歡科學，尤其是生物。很幸運，在上了高中後第一次進實驗室。我們都覺得很新鮮，熱情滿滿。過了兩年了，實驗方面遇到了許多困難，但也學會了很多，也沒有忘記當初的熱情。很感謝這幾年一直陪伴我的所有人！

我是朱讚美（左），目前就讀台北第一女子高級中學，從小就對科學與動手做實驗非常就興趣。進入高中數理資優班第一次有機會接觸實驗室，在生物這個領域盡情探索。

很開心遇到志同道合的夥伴在研究上努力，一起朝著真理邁步。

## 摘要

膽管癌是原發性惡性肝腫瘤，其存活率不高且症狀不明顯，診斷出癌症通常已無藥可醫，因此研發抑制的方法極為迫切。許多研究指出不飽和脂肪酸 **omega-3** 和抑制發炎反應有密切關聯，發炎反應會使細胞增生，進而有機會導致癌症。本研究使用 **omega-3**，探討其是否能應用於抑制膽管癌。

我們使用兩種對象，一為人類膽管癌細胞株 HuCCT1，二為轉基因斑馬魚。我們觀察人類膽管癌細胞，探討 **omega-3** 是否抑制其生長情形，並進行即時聚合酶鏈鎖反應測試發炎、細胞週期與細胞轉移基因。在斑馬魚上則研究 **omega-3** 能否降低斑馬魚發炎基因的表現量。結果顯示發炎、細胞週期、細胞轉移基因在添加魚油後的膽管癌細胞株中表現量降低。動物實驗中，患有能夠導致膽管癌且有較高比例 **omega-3** 的三轉基因魚，其中發炎基因表現量和只具有能夠導致膽管癌的斑馬魚相較有降低。

## Abstract

Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is a type of primary malignant liver tumor. Many studies show that unsaturated fatty acid omega-3 (n-3) is closely related to inhibiting inflammation. Inflammation promotes cell proliferation, which in creates the chance for cancer to strike. Therefore, this study utilizes n-3 to explore whether it can be used to suppress the occurrence of ICC. We used two different experimental targets: human bile duct cancer cell line HuCCT1 and transgenic zebrafish. In HuCCT1, we investigated whether n-3 could inhibit its growth, and conducted qPCR experiments on inflammation, cell cycle, and metastasis genes. In zebrafish, we studied whether n-3 could suppress inflammation genes in the zebrafish. Our results reveal that inflammation, cell cycle and metastasis genes are inhibited after adding fish oil to HuCCT1. In our *in vivo* model, those with ICC-inducing genes and a higher ratio of n-3 in their body have lower inflammation gene expression compared to those with only ICC-inducing genes.

# 壹、前言

## 一、研究動機

十幾年以來，癌症為台灣前十死因之首，而「肝和肝內膽管癌」位居癌症十大中的第二位，而且還是醫學界中一個難以治療的癌症，因此找出減緩膽管癌惡化的方法極為迫切。研究指出，膽管癌的病例不斷地提高，而且其五年存活率極低，不到 18%。我們利用細胞株與模式生物斑馬魚作為研究題材，探討不飽和脂肪酸 **omega-3** 對膽管癌是否有預防或使病情好轉的效果。

## 二、研究目的及研究問題

- (一) 使用人類膽管癌細胞株，加入魚油，探討癌細胞是否被抑制。
- (二) 建立同時表現 *hbz*、*hcp* 與 *desaturase-6* 的斑馬魚。
- (三) 利用轉基因斑馬魚探討斑馬魚發炎基因表現是否被抑制。

## 貳、文獻探討

以膽管癌斑馬魚作為模式生物有許多優點，目前牠是唯一能表現膽管癌的模式生物，且在實驗上表現膽管癌的模式和人類極為相似。(Feitsma & Cuppen, 2008)

由文獻得知 B 型肝炎病毒 X 蛋白 (Hepatitis B Virus X protein, HBX)，C 型肝炎病毒蛋白質 (Hepatitis C Virus Core Protein, HCP) 有機會導致膽管癌 (Liu et al., 2012)。而酵素 *delta-6-desaturase* (*desaturase-6*) 會提高體內的不飽和脂肪酸 omega-3 的比例，如 Figure 1。(Venegas-Calcrón, Sayanova, & Napier, 2010)

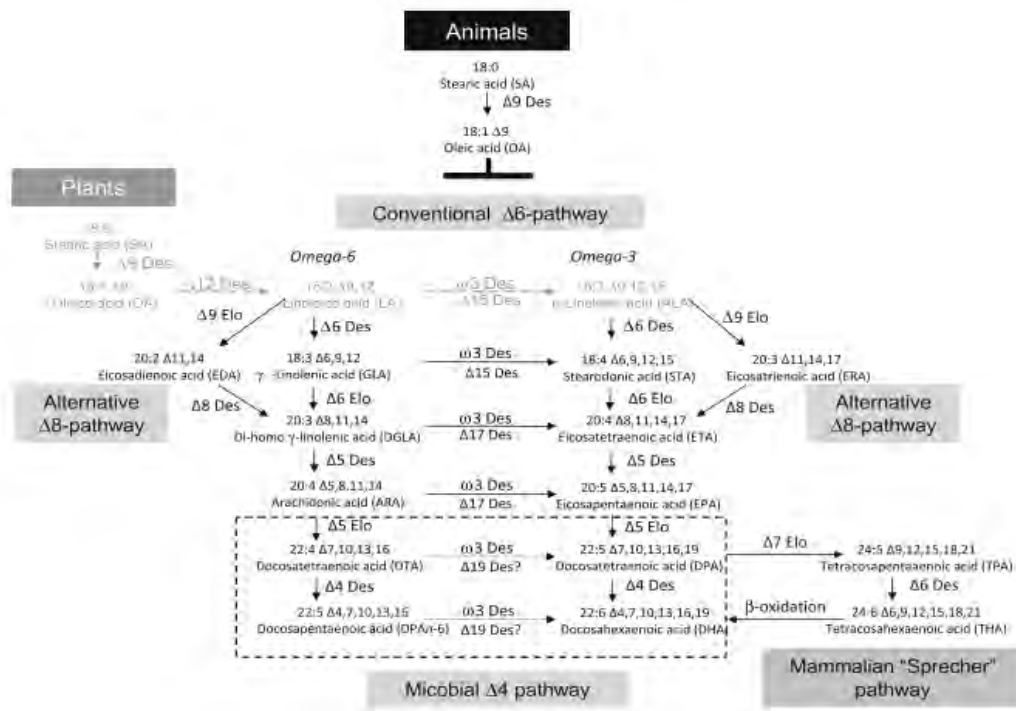


Figure 1 不飽和脂肪酸在生物體內的轉換途徑

我們建立可同時表現 *hbh*、*hcp* 及 *desaturase-6* 基因的轉基因斑馬魚，其中 *hbh* 及 *hcp* 基因會增加斑馬魚發炎基因表現，而提高罹患膽管癌的機率，*desaturase-6* 基因提高體內 omega-3 不飽合脂肪酸比例。我們假設不飽合脂肪酸會抑制膽管癌細胞的生成及表現，因此使用即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, qPCR) 以確認發炎基因是否被抑制。

過度發炎為引起癌症的原因之一，我們在細胞實驗中測試的發炎相關基因都與癌症極有關係，本研究中我們測試了 *il1b*、*il8*、*il18*、*il6*、*nfkb1*、*nfkb2*、*tlr3*、*tnfa* 等 8 種發炎基因。細胞週期的規則擾亂也是癌症的特徵之一，文獻指出許多癌症皆會過度表現細胞週期基因 (Collins, Jacks, & Pavletich, 1997)，而本研究測試了 *ccna1*、*ccnb1*、*ccnd1*、*ccne1* 等 4 個細胞週期基因。此外癌症患者的高死亡率極高與轉移能力有關，本研究測試了 *mmp2*、*mmp7*、*mmp9* 等 3 種細胞轉移基因。

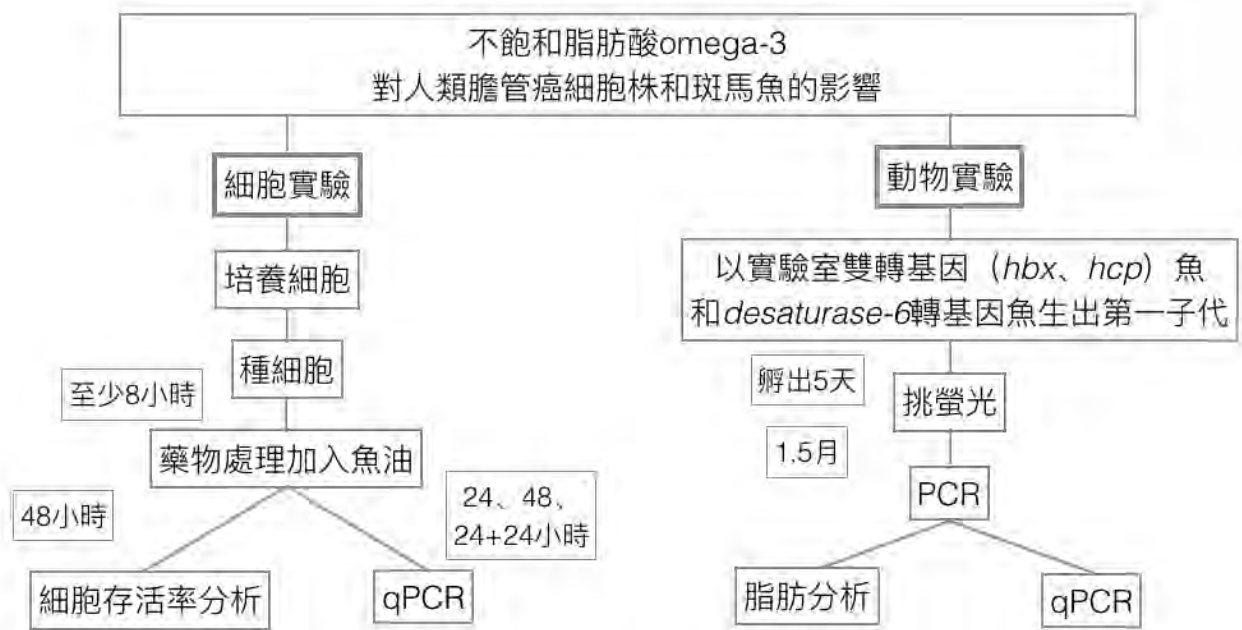


Figure 2 總實驗流程圖

## 參、研究過程與方法



Figure 3 細胞實驗流程圖

### 一、細胞實驗

#### (一) 細胞培養

將人類膽管癌細胞 HuCCT1 培養於含有 10 % 胎牛血清的 RPMI Medium 1640 培養基的 75T 細胞培養角瓶中，設定培養箱條件為 37 °C、5% 二氧化碳，視細胞生長速度，約 2-3 天更換一次培養液，使其有充足空間和養分繼續生長。

當細胞生長至約八分滿時，進行細胞繼代培養。先移除舊的 RPMI Medium 1640 培養基，以 5 mL phosphate buffered saline (PBS) 清洗，接著移去 PBS，加入 1mL trypsin（能分解細胞與瓶壁之間的附著蛋白），搖晃角瓶使 trypsin 均勻覆蓋細胞，放進 37 °C、5 % 二氧化碳培養箱中反應約 10 分鐘使細胞懸浮在溶液中，再加入 RPMI Medium 1640 以終止 trypsin 作用。均勻打散後分入角瓶中，再放入 37 °C、5 % 二氧化碳培養箱中。

#### (二) 種細胞

先將舊的 RPMI Medium 1640 培養基移除，以 5 mL PBS 清洗，接著移去 PBS，加入 1mL trypsin，搖晃角瓶使 trypsin 均勻覆蓋細胞，放進 37 °C、5 % 二氧化碳培養箱中反應約 10 分鐘使細胞懸浮在溶液中，視細胞量加入 RPMI Medium 1640 稀釋細胞液，在 96 孔細胞盤中每個孔加入 100 $\mu$ L 的細胞液體，約 20 小時後細胞會貼附在底部。

#### (三) 藥物處理

有控制組與魚油兩組。控制組只加入 RPMI Medium 1640，魚油組則做濃度梯度，在 RPMI Medium 1640 每一毫升中分別添加 1.3  $\mu$ g、1 $\mu$ g、0.8  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g、0.1  $\mu$ g 的魚油。



我們使用 dimethyl sulfoxide (DMSO) 將魚油溶解在 RPMI Medium 1640 中，DMSO 為一使細胞能夠吸收油脂的界面活性劑。在濃度 1.3mg 之魚油中添加百分比 0.8 的 DMSO，濃度 0.8 $\mu$ g 的魚油中添加百分比 0.6 的 DMSO，濃度 0.5 $\mu$ g 的魚油中添加百分比 0.4 的 DMSO，濃度 0.2 $\mu$ g 的魚油中添加百分比 0.2 的 DMSO，濃度 0.1 $\mu$ g 的魚油中添加百分比 0.1 的 DMSO，DMSO 濃度隨著魚油濃度降低而降低。

#### (四) 細胞存活率測試 (MTT assay)

MTT assay 是測定細胞存活率的方法。MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 為一種黃色化合物，活細胞內粒線體中的琥珀酸去氫酵素 (succinate dehydrogenase) 和細胞色素 C 會作用，使 MTT 生成紫色的 formazan 結晶，其生成量與活細胞數目成正相關。加入 MTT 試劑後測量細胞吸光值，可得知細胞還原 MTT 的能力 (formazan 形成量)，此吸光值表示粒線體的活性，也代表活細胞數目，故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標。

細胞加入藥物培養 48 小時後，每 100  $\mu$ L MTT 加入 1mL 培養液中均勻混合，96well 每孔加入 110  $\mu$ L MTT 混合液，放入 37  $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培養箱中反應 3.5 小時。形成藍紫色晶體後每孔加入 100  $\mu$ L DMSO，放至迴旋震盪器上搖 15 分以溶解結晶，再使用五合一多功能微量盤分析儀測量 540 nm 吸光值即可計算細胞存活率。

#### (五) 即時聚合酶鏈鎖反應 (qPCR)

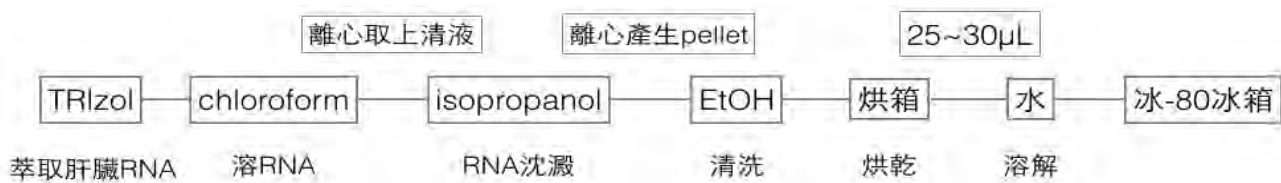


Figure 4 抽 RNA 流程圖

##### 1. 種細胞

如前面細胞存活率測試的方法種細胞，但是本實驗室使用 6 孔細胞盤。

##### 2. 藥物處理

如前面細胞存活率測試的方法添加藥物，但此實驗使用濃度為每一毫升 0.1  $\mu$ g 的魚油。而因濃度低，所以不需使用 DMSO，細胞培養液與魚油就可互溶。

### 3. 抽 RNA

添加魚油 24 或 48 小時後，使用 TRIzol solution 將細胞中的 RNA 萃取出來，經過 isopropanal 沈澱後得到的 RNA 用 70% EtOH 清洗之後，在烘箱烘乾，加少量水使 RNA 溶解，冰在-80°C。

將氯仿加入含有 TRIzol 和細胞 RNA 的 eppendorf 內，使 RNA 溶於氯仿中。再將 eppendorf 離心，使細胞骨架、蛋白質、DNA 與其他 RNA 以外的物質沈澱，取溶有 RNA 的氯仿。再加入 isopropanol，使 RNA 與其作用產生沈澱。再離心，使 RNA 在 eppendorf 底部形成 pellet，將上清液吸掉。接著用乙醇清洗 pellet，再將 eppendorf 放置 60°C 的烘箱烘乾。最後，將 pellet 溶於水中，再冰入-80°C 冰箱中，以確保 RNA 不降解。

### 4. 測濃度

使用 nanodrop 1000，程式為 nanodrop 1000，清洗完儀器探測器後，每個樣本以 1 $\mu$ L RNA 測其濃度，若蛋白質量值（260/280），其數值為 1.8-2.0 表示為 RNA。鹽離子濃度（260/230）數值為越靠近 2 表示其鹽離子濃度越低，鹽離子濃度低越佳。

### 5. 反轉錄反應

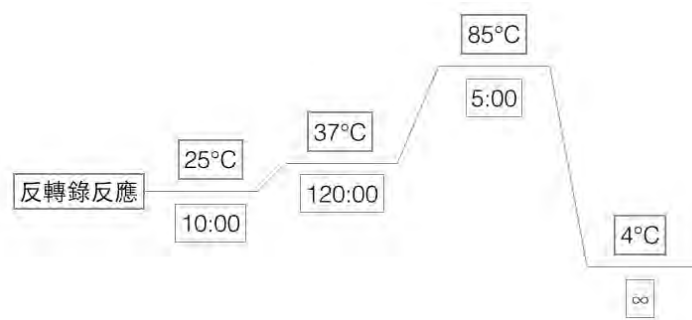


Figure 5 反轉錄反應 PCR 程序

得知濃度後，經過計算，以每管 1000ng/20 $\mu$ L 進行反轉錄反應，添加 5.8  $\mu$ L PCR buffer mix，如表格 1，在加水至 20 $\mu$ L。使用 PCR Machine 機器進行反轉錄，軟體設定為 25°C 10 分鐘，接著 37°C 120 分鐘，最後 85°C 5 分鐘，得到 cDNA。

cDNA 為互補 DNA，利用反轉錄酶，以 RNA 做模板做成的複製品。

成分	體積 (μL)
RT Buffer	2.0
dNTP	0.8
RT Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
總體積	5.8

Table 1 反轉錄反應之 PCR buffer mix

## 6. 即時聚合酶鏈鎖反應 (qPCR)

即時聚合酶鏈鎖反應 (qPCR) 作用的原理與 PCR 相同，但是 qPCR 不是在反應後得到結果，而是在反應時就會及時得到結果。qPCR 是用化學螢光偵測，與 PCR 相比，污染機率較低，也較精確。若是基因的螢光較早被激發出來，表示其基因表現量較高。

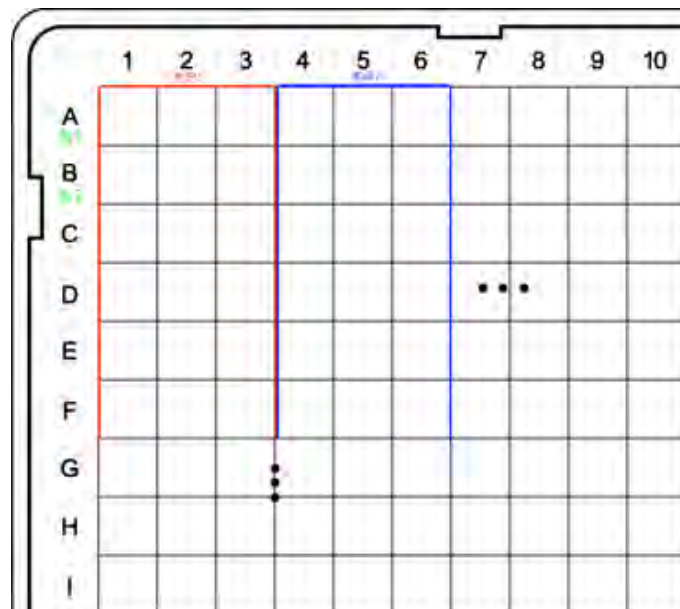


Figure 6 384 plate 之一部份使用範例

將待測基因 (*gapdh*、*il8*、*il18*、*il6*、*nfkb1*、*nfkb2*、*tlr3*、*tnfa*、*ccna1*、*ccnb1*、*ccnd1*、*ccne1*、*mmp2*、*mmp7*、*mmp9*) 的 primer 稀釋成 1uM。我們使用 384 plate，每個 well 的細胞每個基因都有 3 個 well，我們將此實驗重複三次，以增

加實驗可信度。橫排皆為同一個 well 的細胞，每三個直排為同一個基因。將 cDNA 稀釋 20 倍，每個 well 加入 4uL，與 1uL 的 primer 與 5uL 的 SYBR Green Master Mix。SYBR Green 為一種綠螢光，會與 RNA 結合，作為判斷是否表現的標誌。我們使用 Roche Lightcycler 480 機器與 Lightcycler 480 軟體測反應訊號。

我們使用的 qPCR 基因有 *il8*、*il6*、*nfkbl*、*nfkbl2*、*tlr3*、*tnfa*、*ccna1*、*ccnb1*、*ccnd1*、*ccne1*、*mmp2*、*mmp7*、*mmp9*。 *Il1b*、*il8*、*il18*、*il6*、*nfkbl*、*nfkbl2*、*tlr3*、*tnfa* 為發炎基因，*ccna1*、*ccnb1*、*ccnd1*、*ccne1* 為細胞週期基因，*mmp2*、*mmp7*、*mmp9* 為細胞轉移基因。*Gapdh* 為一種 housekeeping gene，會穩定的表現在所有的細胞中。因為它的穩定性，所以在 qPCR 中常作為控制組。

## 二、動物實驗

### (一) 設缸

以實驗室原有的雙轉 *hbz*、*hcp* 魚及單轉 *desaturase-6* 斑馬魚設缸使其追尾生下小魚。此步驟目的為建立實驗需要之三轉魚。

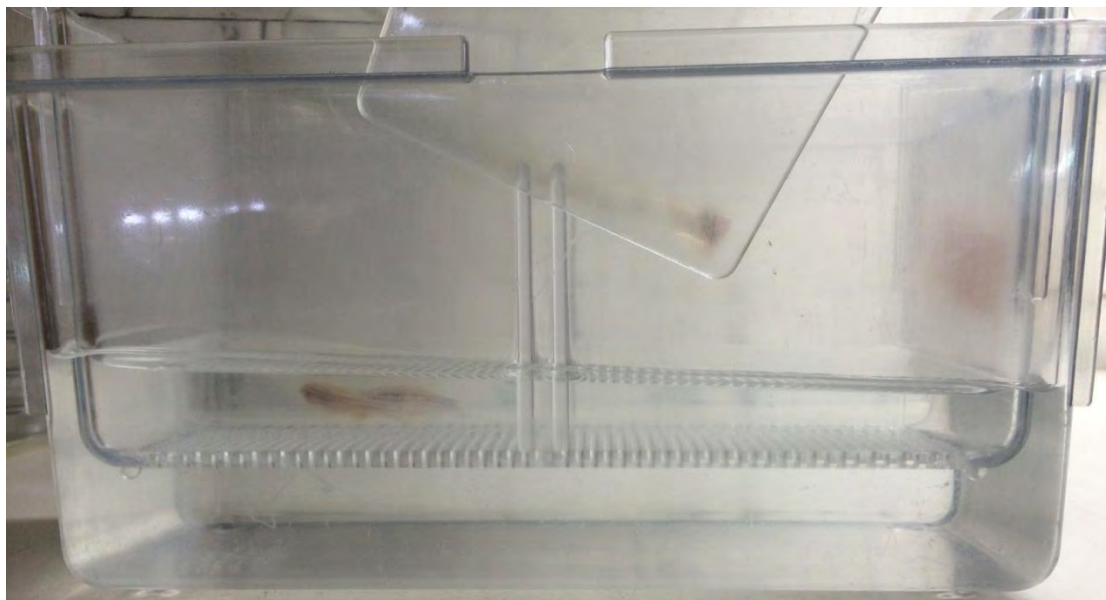


Figure 7 設缸中的斑馬魚

## (二) 挑螢光

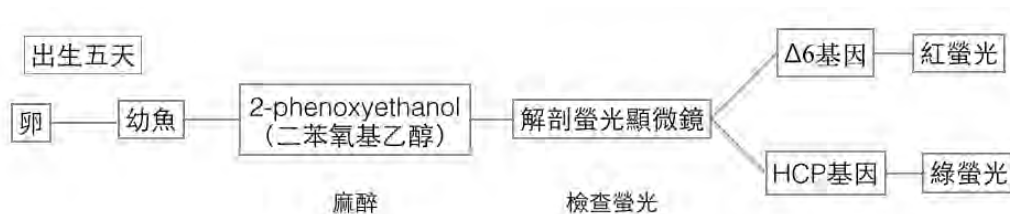


Figure 8 挑螢光流程圖

當斑馬魚孵出 5-7 天後，可以在顯微鏡下檢查斑馬魚肝臟是否發出螢光，以檢測基因是否成轉入。*Desaturase-6* 基因表現時肝臟會發出紅色螢光，*hcp* 基因表現時會發出綠色螢光，而 *hbz* 基因也是紅色螢光。但是因為 *desaturase-6* 和 *hbz* 的光譜重疊，而人類眼睛較易察覺出 *desaturase-6* 基因的光譜，所以顯微鏡下只能察覺到 *desaturase-6* 的紅螢光，*hcp* 基因會再用 PCR 確認。先以二苯氧基乙醇將培養皿中的小魚麻醉，再將培養皿放到顯微鏡下，將皆亮紅螢光與綠螢光的幼魚挑出，表示其為有 *desaturase-6*、*hcp* 基因。*hbz* 基因將會在小魚大約 1.5 個月的時候剪尾鰭以 PCR 確認。

## (三) 聚合酶鏈鎖反應 (PCR)

我們使用 PCR 確認斑馬魚的 *hbz*、*hcp* 基因是否成功轉入。

### 1. 前置作業：剪尾鰭

將魚放入稀釋四倍的麻藥 (Tricaine methanesulfonate) 中，使魚昏迷不再游動，以鑷子夾出放在沾有麻藥的海綿上，以專用解剖剪刀剪下魚的尾鰭，接著使用 MasterPure DNA Purification Kit 萃取尾鰭中的 DNA。

### 2. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

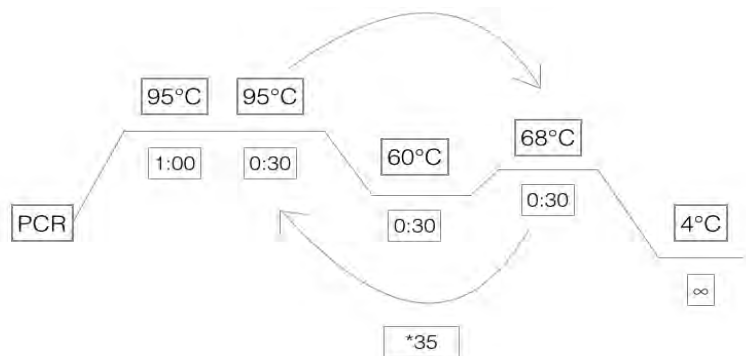


Figure 9 PCR 程序

聚合酶連鎖反應是一種將一已知序列的 DNA 片段放大的技術。我們將斑馬魚的 DNA、DNA 聚合酶、去氧核苷三磷酸與待測基因的引子放在 PCR tube 中，加入表格二的 PCR Buffer Mix，利用 PCR machine 造成溫度的差別使 DNA 的雙股分開，以便引子與對應的去氧核苷三磷酸接上。我們使用的軟體設定的溫度為 94°C、60°C 與 72°C。94°C 使 DNA 雙股分開，60°C 使引子接上，72°C 使 dNTP 接上。重複 35 個循環，使 DNA 片段放大  $2^{35}$  倍。

成分	體積 (μL)
10X PCR Rxn Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	2
dNTP	1.6
MgCl <sub>2</sub>	0.6
Primer (10μM)	1
Taq Polymerase	0.1
ddH <sub>2</sub> O	13.7
總體積	20

Table 2 PCR 成分

### 3. 電泳

使用 LE agarose 與 TAE buffer 配置 1.2%、17 孔的膠。第一孔加入 5uL 1KB marker，其他孔加入 10uL DNA 與 2uL dye 的混合液。最後一孔則加入 negative control，為 10uL 的水與 2uL 的 dye 的混合液。將加好樣本的膠放入電泳槽，以電位差的原理使樣本從負極跑至正極。再將膠泡入 EtBr 5 分鐘，泡完後放入水使 EtBr 洗淨，再使用電泳槽偵測電泳結果。

## (四) 即時聚合酶連鎖反應 (qPCR)

### 1. 取肝臟

使用解剖刀，從斑馬魚心臟部分插入，沿腹部切直線，到泄殖孔停止，再從泄殖孔向兩旁切，用鑷子將皮往兩旁翻開，在顯微鏡下將發出螢光的肝取出一部分剪下，並放入裝有 TRIzol 的 eppendorf 中。取過小部分肝臟的斑馬魚放回乾淨的水中，兩天即可癒合。

### 2. 抽 RNA

與細胞實驗步驟相同。

### 3. 測濃度

與細胞實驗步驟相同。

### 4. 反轉錄反應

與細胞實驗步驟相同。

### 5. 即時聚合酶鏈鎖反應 (qPCR)

與細胞實驗步驟相同。

與細胞實驗步驟相同，但此時側的基因為 *il1b*、*nfkb1* 與 *nfkb2*，皆為發炎基因。

## 肆、研究結果

### 一、細胞實驗

#### (一) 加入藥物處理細胞死亡狀況

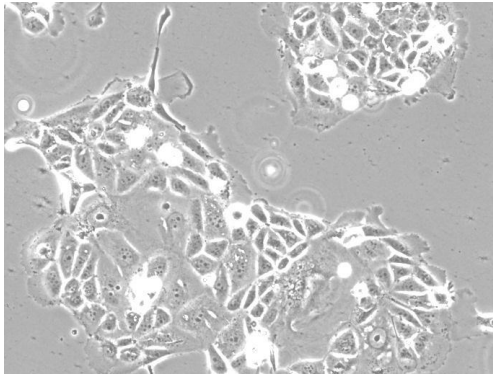


Figure 10 不添加於由的膽管癌細胞

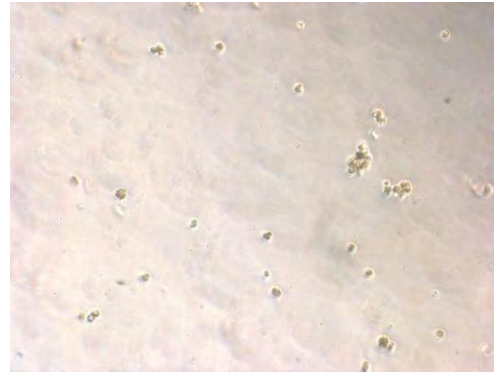


Figure 11 每一毫升培養液中添加 1.3 $\mu$ g 魚油的膽管癌細胞

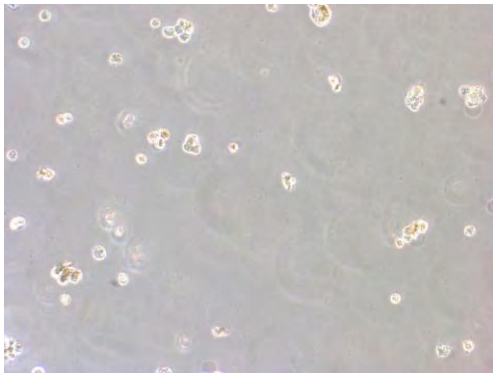


Figure 12 每一毫升培養液中添加 1 $\mu$ g 魚油的膽管癌細胞

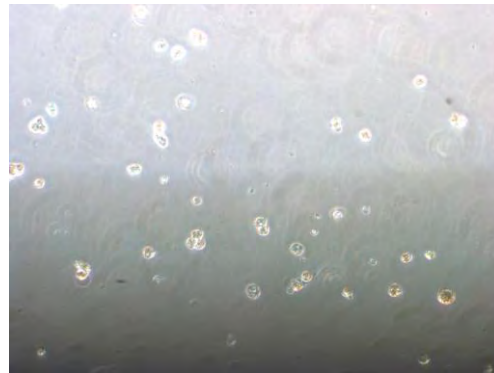


Figure 13 每一毫升培養液中添加 0.8 $\mu$ g 魚油的膽管癌細胞

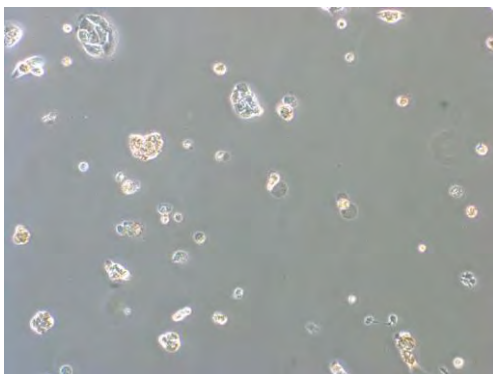


Figure 14 每一毫升培養液中添加 0.5 $\mu$ g 魚油的膽管癌細胞

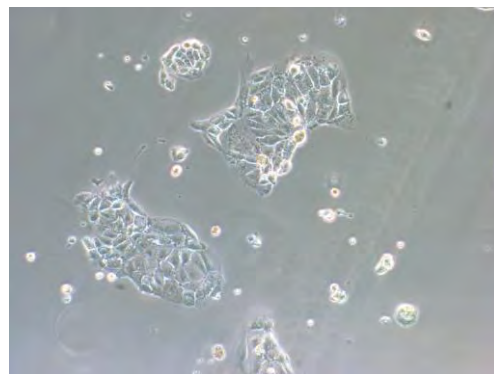


Figure 15 每一毫升培養液中添加 0.1 $\mu$ g 魚油的膽管癌細胞

Figure 10 為不添加魚油之膽管癌細胞，可以見其生長情形非常良好。Figure 11 – figure 15 依次為每毫升培養液加入 1.3 $\mu$ g、1 $\mu$ g、0.8 $\mu$ g、0.5 $\mu$ g、0.1 $\mu$ g 魚油的膽管癌細胞生長情形，其生長情形隨濃度增高而越差，濃度高存活細胞數少。



(二) 細胞加入不同濃度的魚油進行 MTT assay

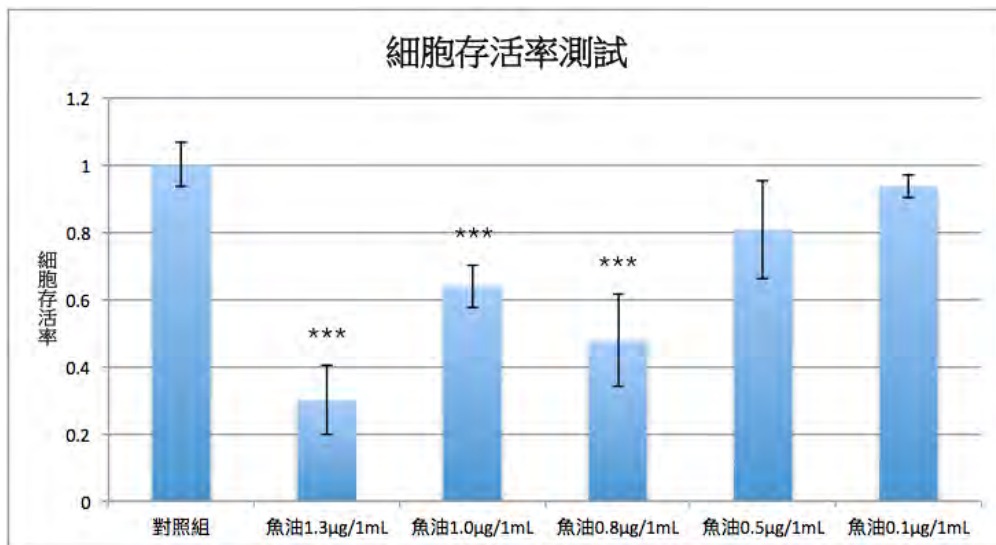


Figure 16 細胞加入不同濃度的魚油進行 MTT assay

由 figure 16 可以得知各濃度魚油對人類膽管癌細胞生長情形。有加入魚油的膽管癌細胞有明顯被抑制，且濃度越高抑制效果大致上越佳。

(四) DMSO 所造成的細胞死亡量

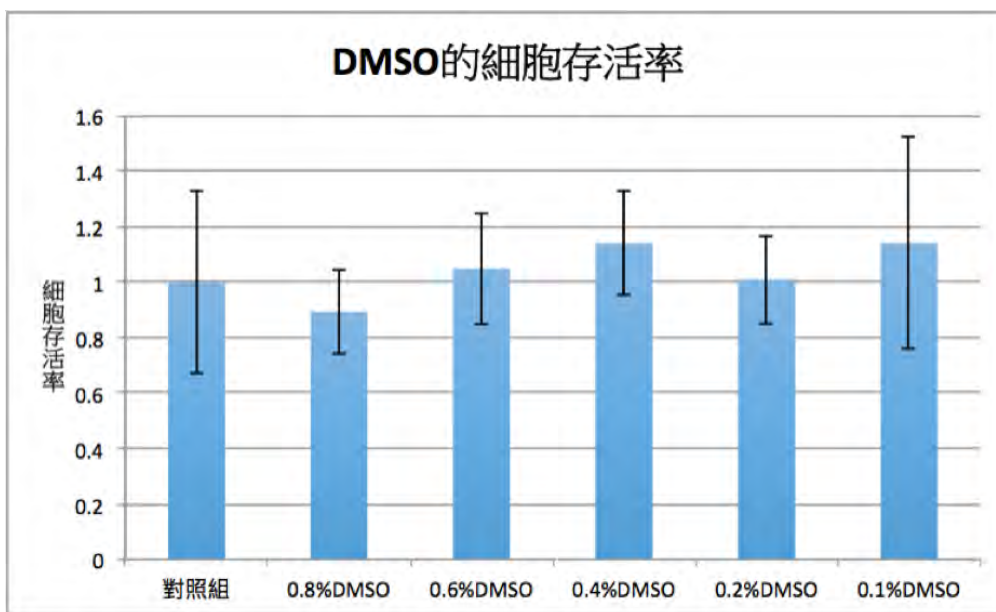


Figure 17-1 DMSO 造成的細胞死亡量

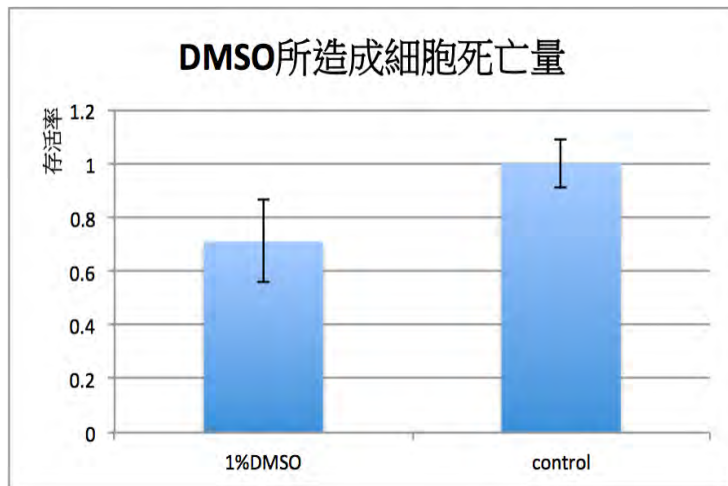


Figure 17-2 DMSO 造成的細胞死亡量

由 figure 17-1, 17-2 可見得實驗組中各種 DMSO 濃度和對照組比較，細胞死亡率沒有明顯的變化，因此可以推論在 DMSO 濃度 0.8% 以下是不會因為其毒素而造成細胞死亡，可以認定我們的細胞死亡的改變是魚油濃度變化所造成。

(五) qPCR 基因表現量。對照組為 *gapdh* 的表現量，其餘橫軸上的皆為各基因在每毫升培養液添加 0.1 $\mu$ g 魚油的膽管癌細胞中的表現量。

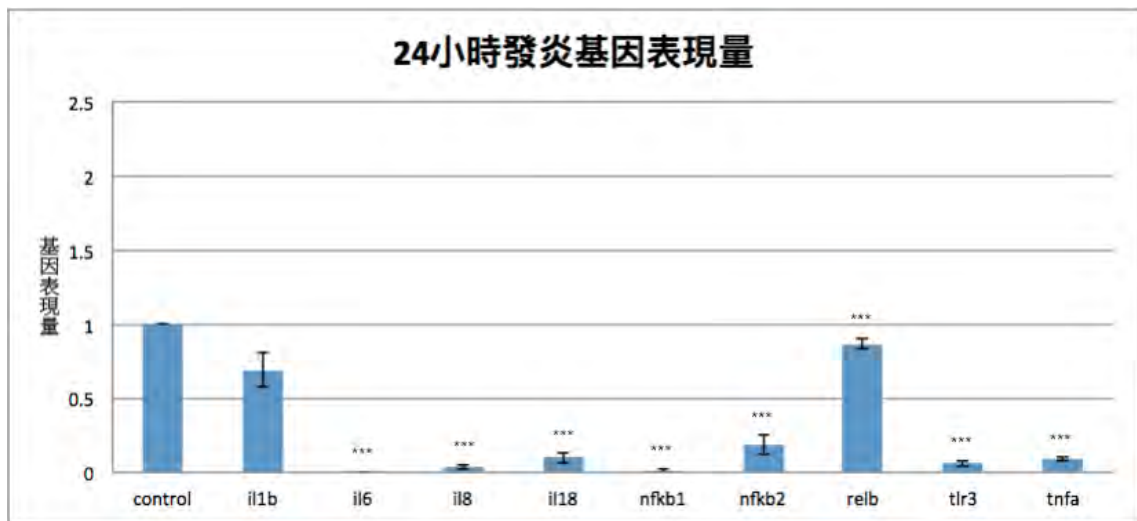


Figure 18 24 小時發炎基因表現量

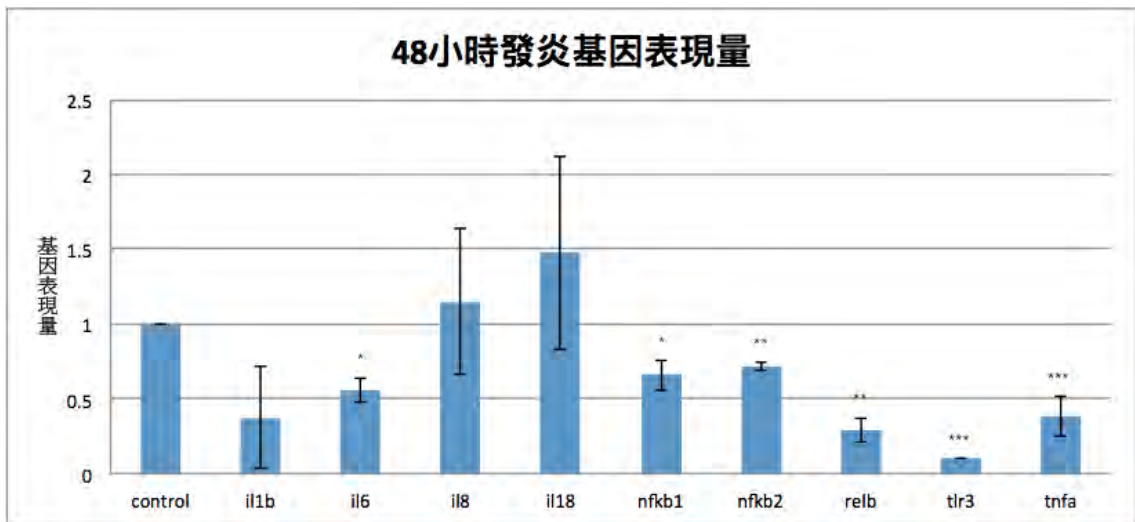


Figure 19 48 小時發炎基因表現量

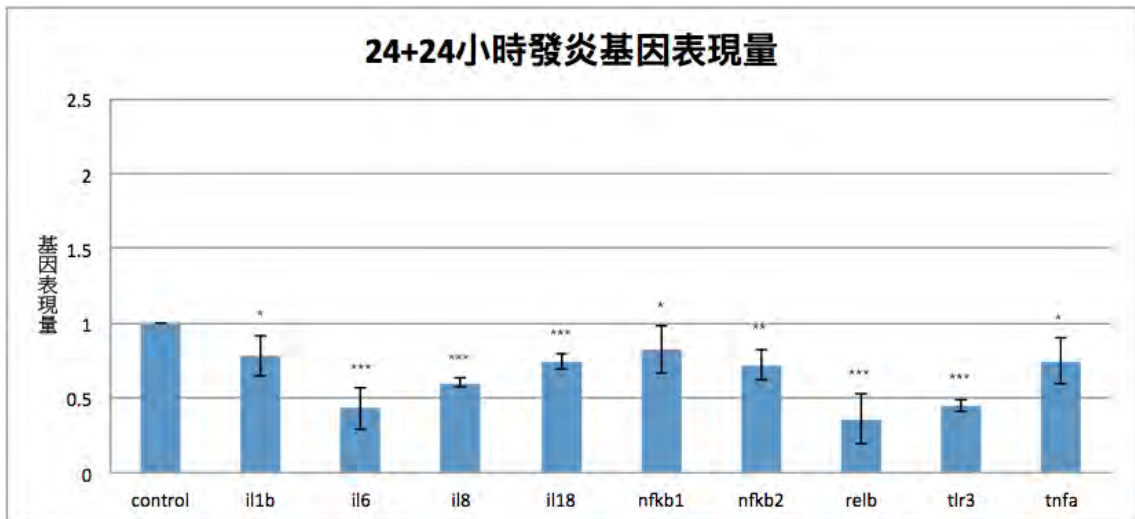


Figure 20 24+24 小時發炎基因表現量

由 figure 18 得知，*il6*、*il8*、*il18*、*nfkb1*、*nfkb2*、*relb*、*tlr3* 與 *tnfa* 八個發炎基因在添加 24 小時魚油的細胞中表現量都有明顯下降。但是從 figure 19 可見只有 *il6*、*nfkb1*、*nfkb2*、*relb*、*tlr3* 與 *tnfa* 在添加 48 小時魚油的細胞中表現量有下降，其他有些基因不僅沒下降，還上升，而表準差相對上大。24+24 小時為加魚油 24 小時後，再換一次培養液，加魚油，也就是總共為 48 小時，而添加兩次魚油，確保魚油的新鮮。由 figure 20 得知在 24+24 小時的情況下，發炎基因的表現量皆有降低。

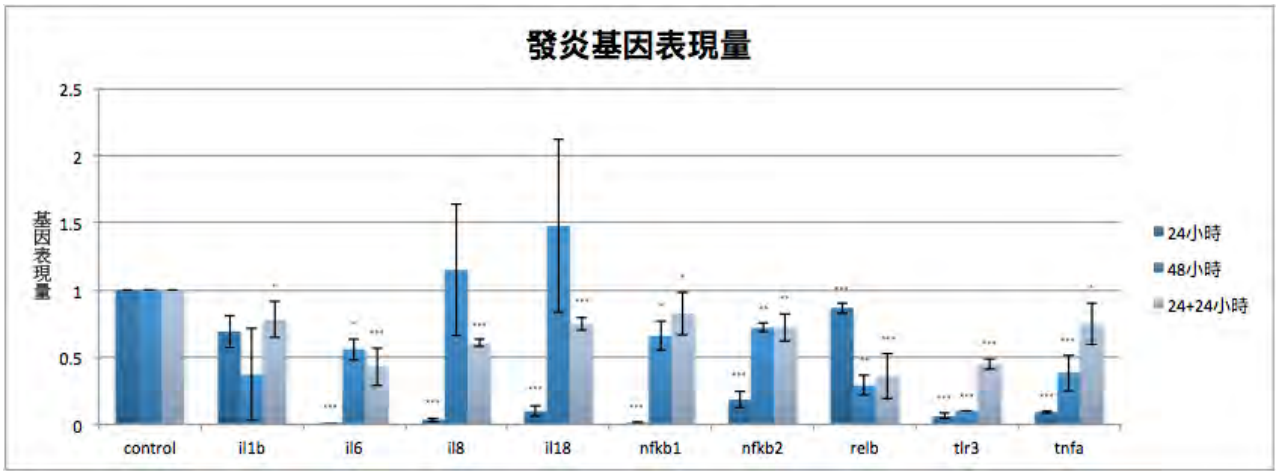


Figure 21 發炎基因表現量

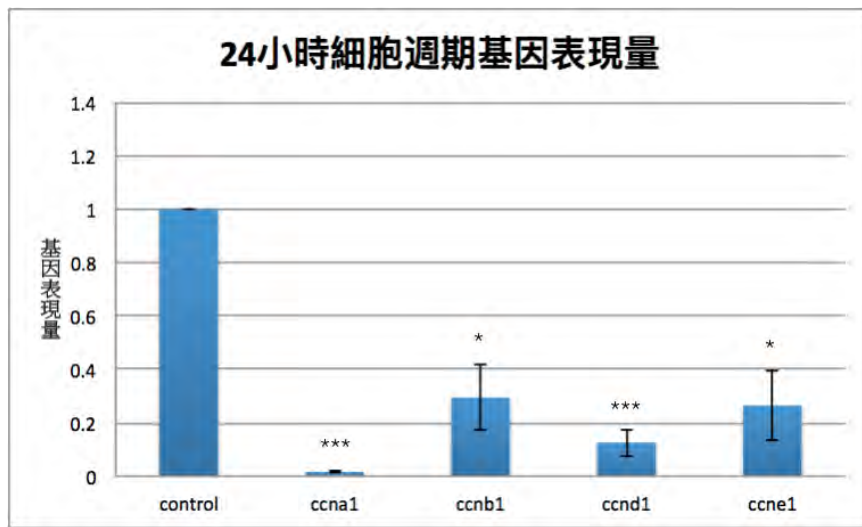


Figure 22 24 小時細胞週期基因表現量

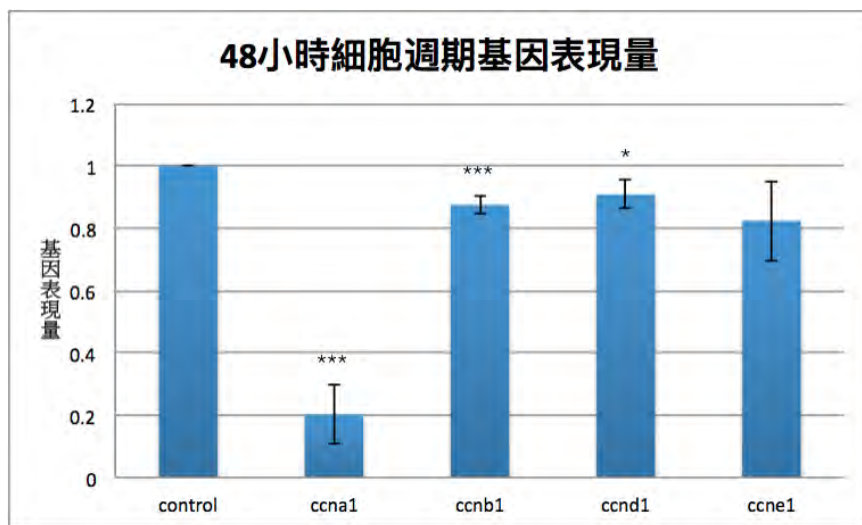


Figure 23 48 小時細胞週期基因表現量

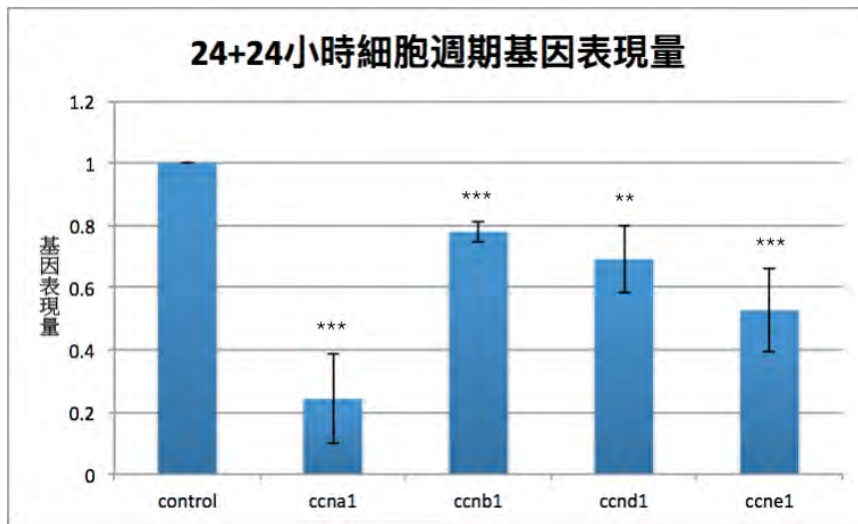


Figure 24 24+24 小時細胞週期基因表現量

由 figure 22 可見，細胞週期基因 *ccna1*、*ccnb1*、*ccnd1*、*ccne1* 皆在 24 小時後下降，而在 figure 23 中 *ccna1*、*ccnb1*、*ccnd1* 在 48 小時後下降，*ccne1* 則沒有。在 24+24 小時後，*ccna1*、*ccnb1*、*ccnd1*、*ccne1* 基因表現量皆明顯下降。

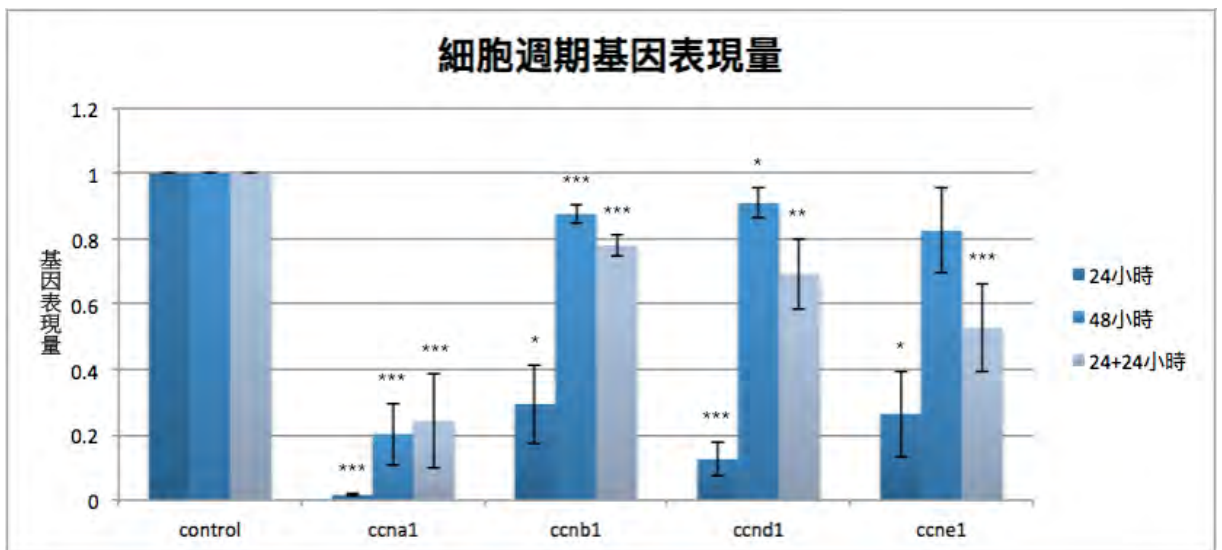


Figure 25 細胞週期基因表現量

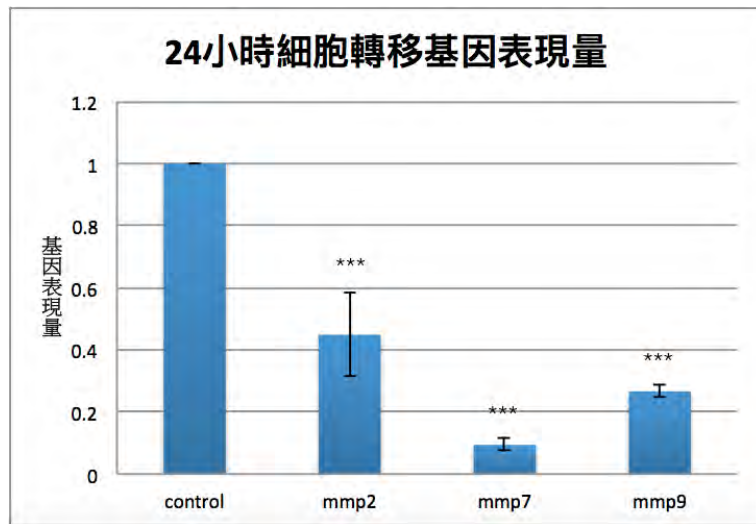


Figure 26 24 小時細胞轉移基因表現量

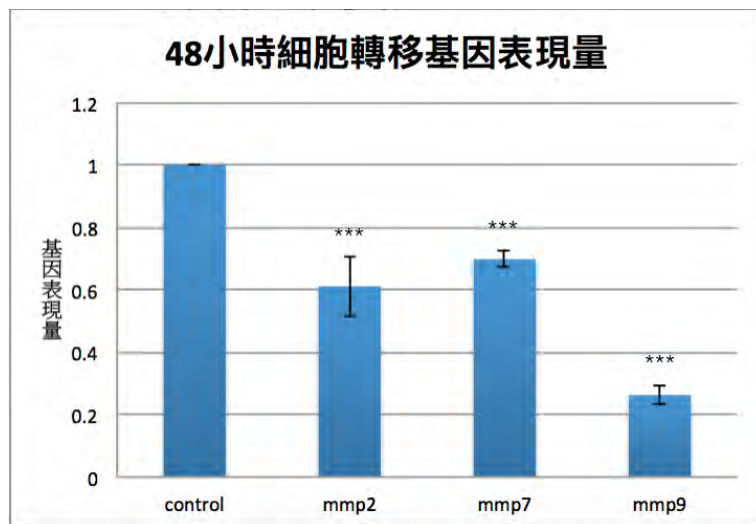


Figure 27 48 小時細胞轉移基因表現量

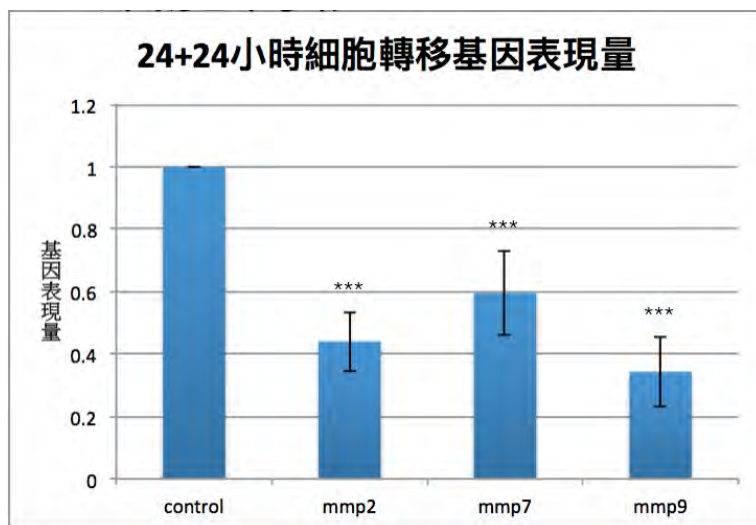


Figure 28 24+24 小時細胞轉移基因表現量

由 figure 26、27、28 可知細胞轉移基因在 24、48、24+24 小時後皆明顯下降。

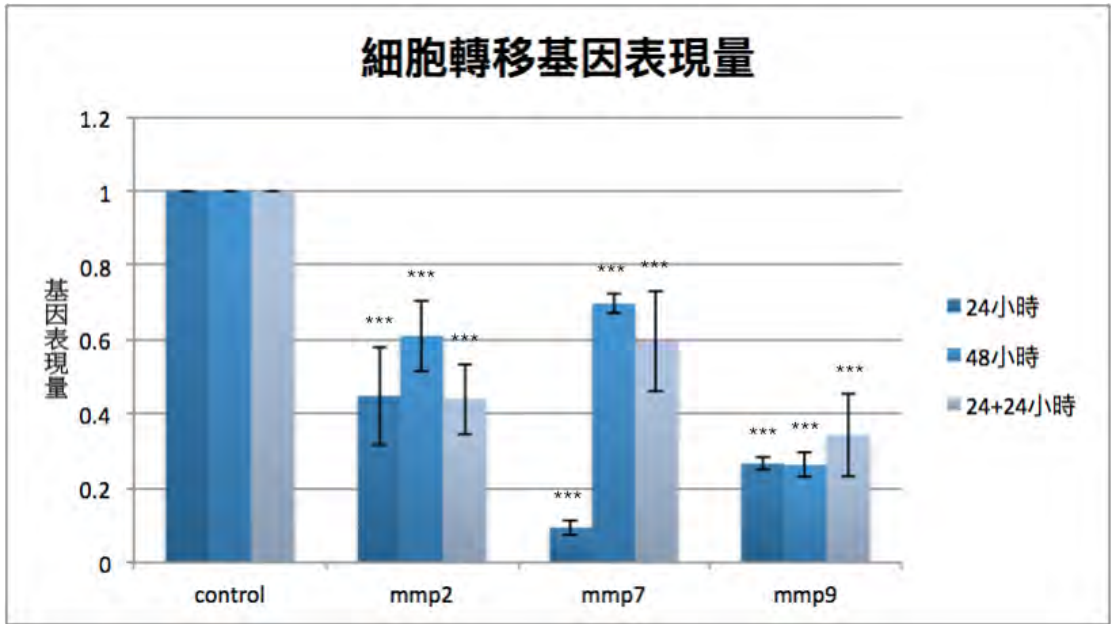


Figure 29 細胞轉移基因表現量

## 二、動物實驗

### (一) 螢光顯微鏡挑小魚螢光結果

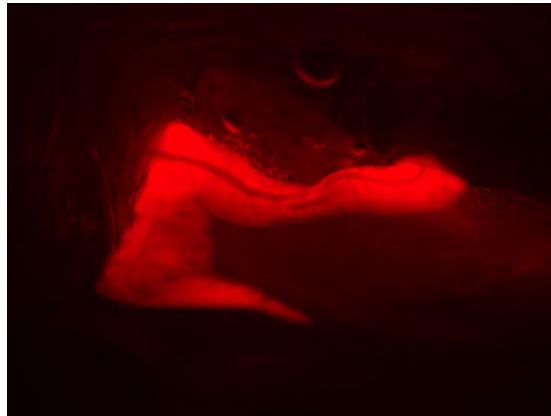


Figure 30 *desaturase-6* 基因

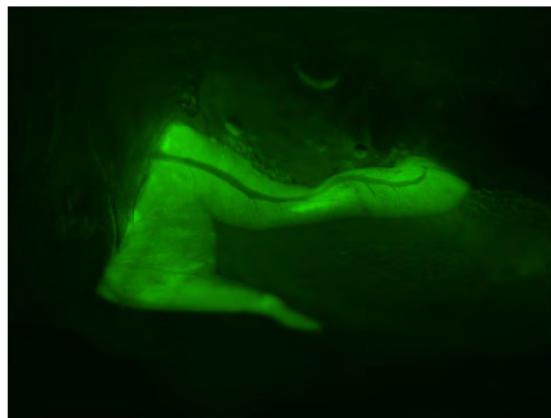


Figure 31 *hcp* 基因

若是有如 figure 30 的紅螢光表示其有 *desaturase-6* 基因，要再確認有如 figure 31 的綠螢光表示其有 *hcp* 基因轉入，有此兩種螢光的小魚為有 *desaturase-6*、*hcp* 基因的雙轉魚，由於 *desaturase-6* 和 *hbx* 光譜重疊，所以顯微鏡下只能察覺到 *desaturase-6* 的紅螢光，因此要再利用 PCR 才能確定是否為三轉魚。

## (二) 確認基因結果

利用 PCR 確認基因

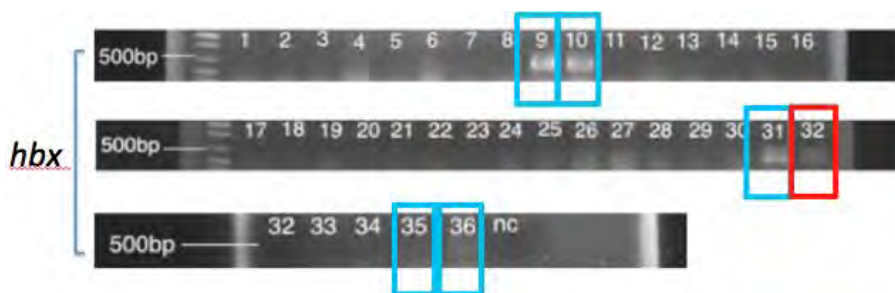


Figure 32 *hbx* PCR 結果

表現 *hbx* 基因的魚為 9、10、31、32、35、36。

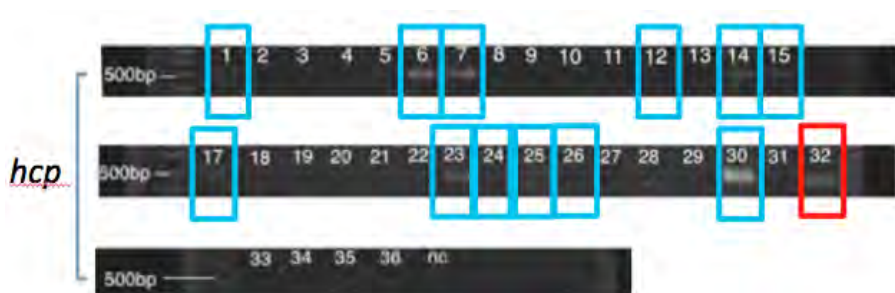


Figure 33 *hcp* PCR 結果

表現 *hcp* 基因的魚為 1、6、7、12、14、15、17、22、23、24、25、30、32。

魚 32 表現 *hcp*、*hbx*，代表牠為三轉魚。在斑馬魚 5-7 天大時，*desaturase-6* 基因已用顯微鏡篩選過，因為其紅色螢光非常明顯，所以不用再使用 PCR 確認。

## (三) 以 qPCR 比較其三轉基因魚、雙轉基因魚及 wild type 魚發炎基因表現量



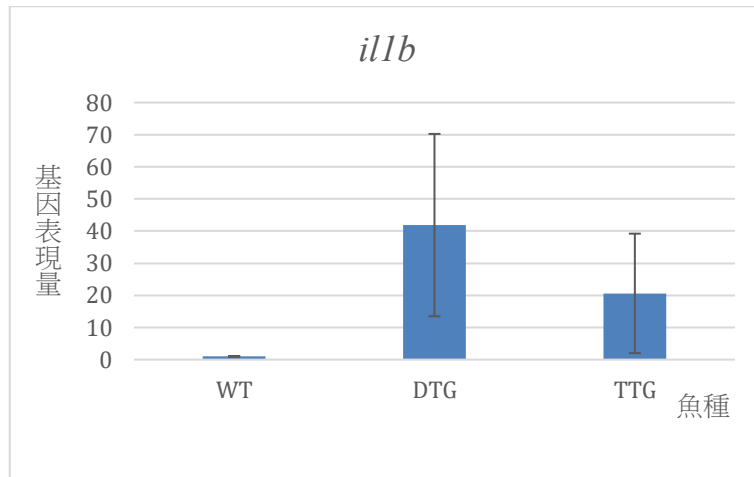


Figure 34 *il1b* 基因在不同魚種表現量比較

Figure 34 顯示，*il1b* 發炎基因在三轉魚斑馬魚中，表現量明顯比雙轉魚的表現量低。由此得知，將 *desaturase-6* 基因轉入斑馬魚中，會使發炎改善。

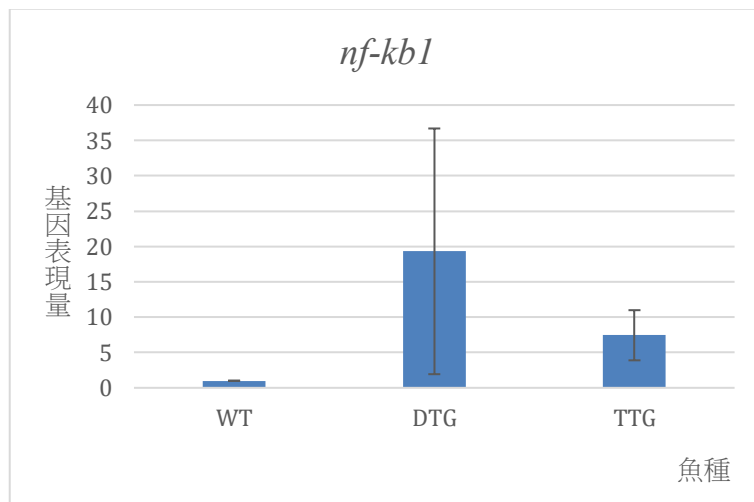


Figure 35 *nf-kb1* 基因在不同魚種表現量比較

Figure 35 顯示，*nf-kb1* 發炎基因在三轉魚斑馬魚中，表現量明顯比雙轉魚的表現量低。由此得知，將 *desaturase-6* 基因轉入斑馬魚中，會使發炎改善。

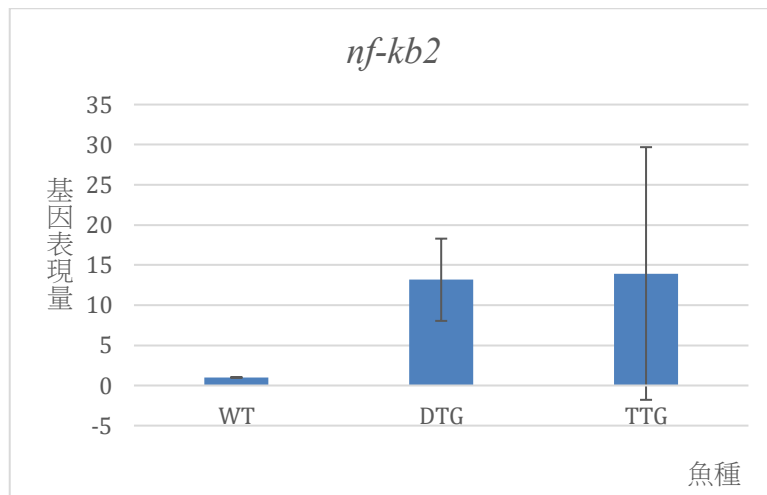


Figure 36 *nf-kb2* 基因在不同魚種表現量比較

Figure 36 顯示，*nf-kb2* 發炎基因在三轉魚斑馬魚中，表現量與雙轉魚的表現量沒有顯著差異。

## 伍、討論

### 一、細胞實驗

我們使用的魚油濃度受限於 dimethyl sulfoxide (DMSO)，它為我們實驗所使用的界面活性劑。DMSO 能將魚油溶於培養液中，使魚油進入膽管癌細胞，但其有細胞毒性，在培養液佔比 0.8% 以上就會使細胞死亡率提高，而影響實驗結果。我們實驗基於魚油濃度考量，將 1.0% DMSO 溶於培養液中，而此濃度在我們實驗中是在一毫升中加入 1.3  $\mu\text{g}$  的魚油。我們也有設計只添加 DMSO 的細胞作為控制組，分別在培養液中加入 1.0%、0.8%、0.6% 的 DMSO，與以 1.0%、0.8%、0.6% DMSO 溶魚油加入膽管癌細胞的組別做對照。

另外我們所使用的魚油的純度非百分之百，所以未來也許能使用純 DHA 粉末，使實驗準確度提高。

由 qPCR 實驗結果可得到的結論為 24 小時的實驗幾乎都符合預期，而 48 小時則否。24 小時的實驗中，加入魚油後發炎基因都被抑制，細胞週期基因表現量也降低，細胞轉移基因也皆降低。我們設想魚油可能有時效型，於是進行 24+24 小時的 qPCR 實驗，此實驗結果與 24 小時的結果相近，代表魚油的藥效不能持久，或許需要天天攝取。

### 二、動物實驗

qPCR 測試發炎基因結果顯示，三轉魚中 *il1b*、*nfkb1* 基因有被抑制，而 *nfkb2* 基因沒有被抑制。我們推測 *nf-kb2* 基因沒有被抑制的原因是因為發炎反應極為複雜，我們無法抑制所有的發炎基因。另一個原因為 *nfkb1* 與 *nfkb2* 雖然為同一蛋白組，但是並不一定同時表現，所以兩個基因可以單獨來比較。而 qPCR 中的誤差值非常大，是因為每隻魚的個體差異，三轉魚的數量不夠多，與我們人為技術的不夠成熟有關。

本實驗基於時間與斑馬魚生育能力的限制，而使用 1.5 個月大的第一子代轉基因斑馬魚。因為使用的為第一子代，又為幼魚，所以雖然發炎基因有被抑制，但效果不明顯。我們最終目標為使用 2.5、3.5 個月大的第二子代斑馬魚，對發炎基因會有更大的抑制效果。在未來我們希望測試更多細胞實驗已確認的基因。

## 陸、結論

在細胞實驗中，我們發現將魚油加入膽管癌細胞株確實會抑制其生長，在加入魚油後 24 小時也都可以抑制發炎基因、細胞週期基因與細胞轉移基因。在動物實驗中，我們發現表現高量的 omega-3 三轉魚抑制某些發炎基因的效果比未轉入 *desaturase-6* 基因得雙轉魚好。魚油不但能抑制膽管癌細胞株生長狀況，也會抑制轉入 *hbz*、*hcp* 基因的斑馬魚中之發炎基因。

## 柒、參考資料

- 一、102 年國人死因統計結果（民 103 年 6 月 24 日）。衛生福利部。民 104 年 2 月 25 日，  
取自：[http://www.mohw.gov.tw/cht/Ministry/DM2\\_P.aspx?f\\_list\\_no=7&fod\\_list\\_no=4558&doc\\_no=45347](http://www.mohw.gov.tw/cht/Ministry/DM2_P.aspx?f_list_no=7&fod_list_no=4558&doc_no=45347)
- 二、Berquin, Isabelle M., Iris J. Edwards, and Yong Q. Chen. "Multi-targeted Therapy of Cancer by Omega-3 Fatty Acids." *Cancer Letters* 269.2 (2008): 363-77. Web.
- 三、Collins, Kathleen, Tyler Jacks, and Nikola P. Pavletich. "The Cell Cycle and Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997): 2776-78. Web
- 四、Feitsma, Harna, and Edwin Cuppen. "Zebrafish as a Cancer Model." *Molecular Cancer Research* 6.5 (2008): 685-94. Web.
- 五、Gleissman, Helena, John Inge Johnsen, and Per Kogner. "Omega-3 Fatty Acids in Cancer, the Protectors of Good and the Killers of Evil?" *Experimental Cell Research* 316.8 (2010): 1365-373. Web.
- 六、Goessling, W., T. E. North, and L. I. Zon. "New Waves of Discovery: Modeling Cancer in Zebrafish." *Journal of Clinical Oncology* 25.17 (2007): 2473-479. Web.
- 七、Liu, Wangta, Jim-Ray Chen, Chih-Hao Hsu, Yen-Hsing Li, Yi-Meng Chen, Chien-Yuan Lin, Shin-Jie Huang, Zen-Kuei Chang, Yen-Chun Chen, Chi-Hsueh Lin, Hong-Yi Gong, Ching-Chun Lin, Koichi Kawakami, and Jen-Leih Wu. "A Zebrafish Model of Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Dual Expression of Hepatitis B Virus X and Hepatitis C Virus Core Protein in Liver." *Hepatology* 56.6 (2012): 2268-276. Web.
- 八、Venegas-Calderón, Mónica, Olga Sayanova, and Johnathan A. Napier. "An Alternative to Fish Oils: Metabolic Engineering of Oil-seed Crops to Produce Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids." *Progress in Lipid Research* 49.2 (2010): 108-19. Web.
- 九、Wang, Weicang, Julia Zhu, Fei Lyu, Dipak Panigrahy, Katherine W. Ferrara, Bruce Hammock, and Guodong Zhang. " $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids-derived Lipid Metabolites on Angiogenesis, Inflammation and Cancer." *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 113-115 (2014): 13-20. Web.
- 十、Yang, Rong, Tsuyoshi Nakamaki, Michael Lübbert, Jonathan Said, Akiko Sakashita, Bettina S. Freyaldenhoven, Susan Spira, Vong Huynh, Carsten Müller, and H. Phillip Koeffler. "Cyclin A1 Expression in Leukemia and Normal Hematopoietic Cells." *Blood* 93.6 (1999): 2067-074. Print.

## 【評語】 090012

探討魚油  $\omega$ -3 對於人類膽管癌細胞是否有抑制作用，僅探討基因變化之層次，對於蛋白持是否有同樣趨勢，並問探討 Apoptosis 可用 TUNEL 來確定。