

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090003
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	降脂轉肌－將脂肪轉變成肌肉的可能性探討
得獎獎項	二等獎 國際科學博覽會(ESI)

就讀學校	臺北市立建國高級中學
指導教師	劉雅雯 周麗芬
作者姓名	張耕睿 吳奕廷 蔡尚軒

關鍵詞	<u>15-keto-PGE2、RNA定序、GSEA</u>
-----	--------------------------------

作者簡介



張耕睿，就讀建國中學，亦為中研院生物人才培育計畫的學生，自幼對科研極有興趣，在此專題中主要文獻查詢、撰寫及修改書面實驗報告。

吳奕廷，就讀建國中學，亦為中研院生物人才培育計畫的學生，在此專題研究中負責操作實驗及實驗記錄。

蔡尚軒，就讀建國中學，為建中生物研究社重要幹部之一，在此專題中負責操作實驗及實驗記錄。

2025年臺灣國際科學展覽會研究報告

科別：醫學與健康科學

作品名稱：降脂轉肌—將脂肪轉變成肌肉的可能性探討

關鍵字：15-keto-PGE2、RNA定序、GSEA

編號：

中文摘要

先前研究發現一種多元不飽和脂肪酸 15-keto-PGE2 能減少肌肉慢性發炎以及增加肌肉生長因子胰島素的敏感性，具有增加肌肉的潛力。我們探討此脂肪酸在小鼠中將脂肪組織轉成肌肉組織的可能性。

我們先以 15-keto-PGE2 治療肥胖型肌少症小鼠後，再以全基因組mRNA定序，發現在小鼠皮下脂肪中，肌肉特異基因表現量高度上升。透過基因表現路徑分析軟體 GSEA證實此脂肪酸會高度引發皮下脂肪中，與肌肉分化、肌肉收縮與肌肉結構相關的生物路徑。另外， 15-keto-PGE2 也可以誘導脂肪前驅細胞3T3-L1中與肌肉生成相關的基因表現。

最後，我們發現以 15-keto-PGE2 治療的老年肥胖型肌少症小鼠，體重、血糖、脂肪比例下降，肌肉質量及力量上升，證實了它在體內同時減少脂肪並增加肌肉量的效果。

英文摘要(Abtract)

Previous studies have identified a polyunsaturated fatty acid, 15-keto-PGE2, which can reduce muscle inflammation and increase insulin sensitivity, showing potential for muscle growth. We explored the possibility of this fatty acid converting adipose tissue to muscle tissue in mice.

After treating obese sarcopenic mice with 15-keto-PGE2, we conducted whole-genome mRNA sequencing and found a significant increase in the expression of muscle-specific genes in the subcutaneous adipose tissue of the mice. Pathway analyzing software GSEA confirmed that this fatty acid strongly stimulates biological pathways in subcutaneous adipose tissue related to muscle differentiation, contraction, and structure.

Further experiments with the 3T3-L1 adipocyte precursor cells showed that 15-keto-PGE2 can induce the expression of muscle-specific genes in adipocytes. Finally, we observed that in elderly obese sarcopenic mice treated with 15-keto-PGE2, there was a decrease in body weight, blood glucose, and fat mass, along with an increase in muscle mass and strength, confirming that 15-keto-PGE2 can simultaneously reduce fat and increase muscle mass in vivo.

壹、前言

一、研究動機

隨著社會高齡化，肌少症(sarcopenia) (約占高齡人口 16%[1])與肥胖(obesity)(約占高齡人口 33.6-37.1%[2])的盛行率節節上升，造成個人健康與社會醫療成本巨額負擔。肌少症會增加總體死亡率、各種術後併發症以及不同醫療狀況患者的住院時間、跌倒、骨折、失智症等風險[3]。肥胖會增加心血管疾病、糖尿病、高血壓、血脂異常、膝關節退化和某些癌症。

而合併兩者的肥胖型肌少症(sarcopenic obesity)(約占高齡人口 11%[4])，更大幅提高心血管疾病、癌症、糖尿病、骨折、衰老、失能、住院率與降低生活品質及增加總體死亡率[5]。目前針對肌少症的治療，除了飲食與運動等生活型態改變外，尚無藥物治療。而肥胖的治療除了飲食與運動控制外，以抑制食慾的藥物為主，如腸泌素促進劑，病態肥胖則以減重手術為首選，然而減重本身會伴隨約 10-20%的肌肉質量與肌力的流失[6]，形成減重(減少脂肪)療法的一個嚴重副作用。

基於目前無肌少症藥物治療，以及減重治療瘦肉流失的副作用，如果可以找出可以減脂並同時增肌的方法，可以改善高齡化社會的重大問題。因此本研究計畫探討在生物體上達成同時減少脂肪並增加肌肉的可能性。

二、研究背景與文獻探討

(一)肌少症的分子機轉包含了「肌肉合成減少」與「肌肉分解增加」(圖1)。

肌肉合成減少常與慢性發炎(chronic low-grade inflammation)有關，肌肉分解增加與胰島素(insulin)與 IGF-1 (insulin-like growth factor 1)等肌肉生長因子不足或阻抗性(resistance)有關[7]。

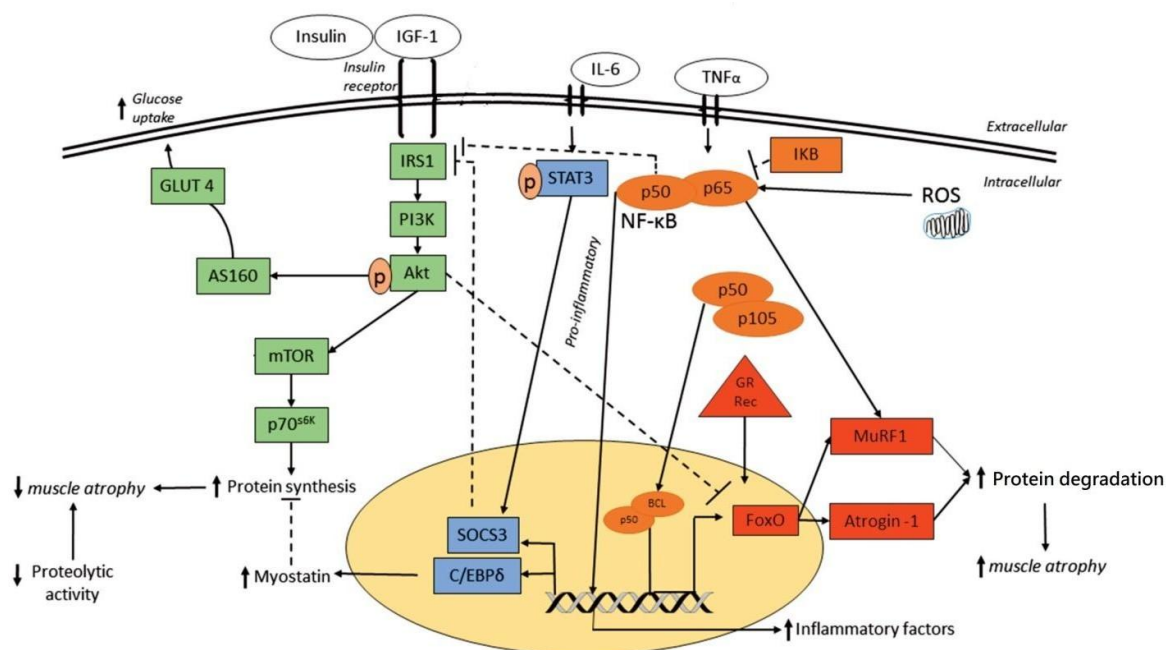


圖1、肌少症的分子機轉：「肌肉合成減少」，主要由生長因子胰島素與 IGF-1 減少引起。「肌肉分解增加」主要由發炎反應如 NF-κB 與 IL-6/STAT3 路徑引起[7]。

(IGF-1: Insulin-like growth factor 1; NF-κB: nuclear factor kappa B; IL6: interleukin 6; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3)

其中慢性低度發炎與肌少症有明顯相關，肌少症病患的血清中，與發炎相關的細胞激素如 IL-1β，TNF-α 與 IL-6 上升[8-11]。相反的，生長因子如 IGF-1 與胰島素不足則可能引起肌少症

[12-13]。肥胖亦與慢性低度發炎有關，肥胖患者血液中與發炎相關細胞激素如 IL-1 β ，TNF- α 與 IL-6 亦上升。除此之外，肥胖會引起胰島素抵抗性，造成生長因子如 IGF-1 與胰島素失去作用。綜上所述，肌肉減少與脂肪增加，都與與發炎相關的細胞激素增加以及生長因子如：GF-1 及胰島素作用減少有關。

食物中的脂肪酸攝取與脂肪代謝及肥胖[14]以及肌少症都有關[15]，其中 $\omega 6$ 多元不飽和脂肪酸如花生四烯酸(arachidonic acid)攝取後會增加前列腺素如 PGE₂(prostaglandin E₂)產生，並產生白三烯(leukotriene)和脂氧素(lipoxins)來引起發炎反應。

相反的，在上述過程中，有些多元不飽和脂肪酸的衍生物如 PGD₂ [16,17]、Resolvin D₂ [18]、15-keto-PGE₂ (15-keto-prostaglandin E₂) [19]，會抑制發炎反應，進而終結發炎反應。許多研究顯示 $\omega 3$ 多元不飽和脂肪酸則也具有抗發炎作用，並具有增加肌肉質量的作用，也可改善肥胖的情況[20,21]。

(二)15-keto-PGE₂ 的抗發炎效果

15-keto-PGE₂ 是一種 PGE₂ 的代謝物，其結構式與代謝途徑如圖2a。之前的研究發現15-keto-PGE₂ 具有抗發炎作用，可以抑制囊腫纖維症的呼吸道發炎 [22, 23]，減緩細菌性敗血症 [24]以及抑制肝臟脂肪性肝炎[25]，主要機轉包含透過共價鍵結合的轉譯後修飾，抑制NF- κ B 與 IL6/STAT3 發炎路徑。

其中 15-keto-PGE₂ 會透過共價鍵結合 STAT3 的 Cystine(半胱氨酸)259 胺基酸殘基，以抑制細胞激素如 IL-6 的促發炎作用已被廣泛證實[26] (圖2b)，此共價鍵結合會阻斷 STAT3 的雙元化(dimerization)，進一步抑制發炎反應，而長期活化 STAT3 會導致肌肉萎縮[27]，相反的，以小分子 STAT3 抑制劑化合物 C188-9 可減緩嚴重燒燙傷的肌肉耗損[28]。

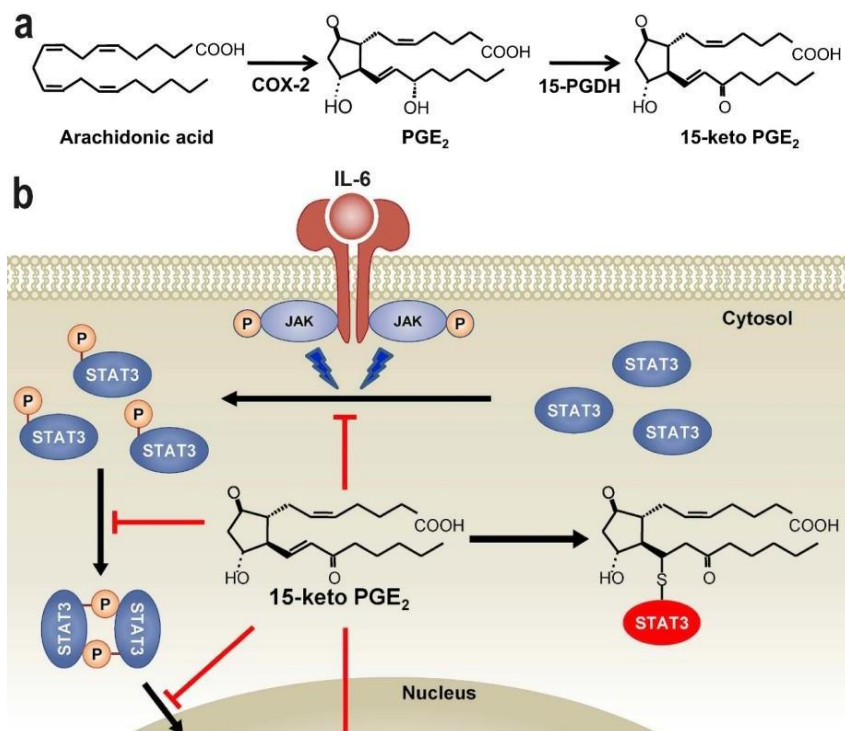


圖2、a圖：15-keto-PGE₂ 的結構式與代謝途徑。b圖：15-keto-PGE₂ 藉由 STAT3 抑制發炎反應的機轉[26]。(STAT3: signal transducer and activator of transcription 3 ; Arachidonic acid:花生四烯酸)

除此之外，15-keto-PGE₂ 也會透過共價鍵結合 NF- κ B 次單元 p105/p50 與 p65 的 Cys59/120 胺基酸殘基，抑制發炎反應 [25](圖3)。另外也有研究顯示 15-keto-PGE₂ 可以透過共價鍵結合活化 NRF2 (NF-E2 related factor 2 抗氧化路徑)[24]，減少發炎。而長期的發炎與氧化壓力都是導致耗損肌肉的重要因素。

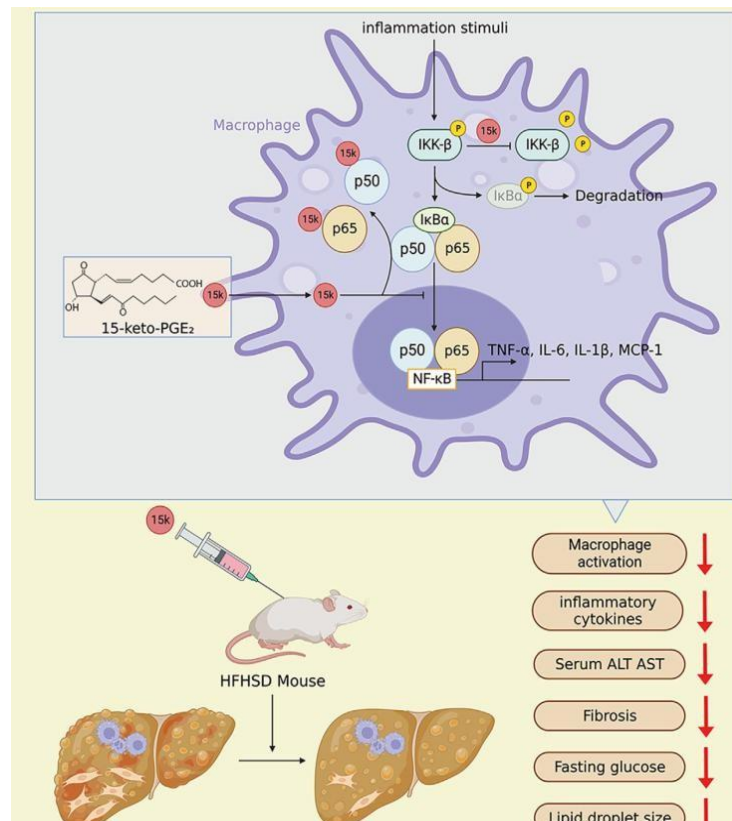


圖3、15-keto-PGE2 也會透過共價鍵結合 NF-κB 次單元 p65/p50 的 Cys59/120 胺基酸殘基，抑制發炎反應 [25]。

(三)15-keto-PGE2 增加胰島素作用的效果

胰島素與 IGF-1 等生長因子可促進肌肉再生，而肥胖或發炎會引起胰島素阻抗性，減少胰島素作用，進而減少肌肉合成。而過去研究亦顯示 15-keto-PGE2 施打到小鼠，可以透過與 PPARγ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)的 cys285 胺基酸殘基結合，大幅增強胰島素信息傳遞與降低胰島素阻抗性，並減少飲食引發之肥胖[29] (圖4)。綜合以上文獻探討，15-keto-PGE2 極有可能透過「抗發炎」與「促進肌肉生長因子」，達到增肌又可減脂的效果。

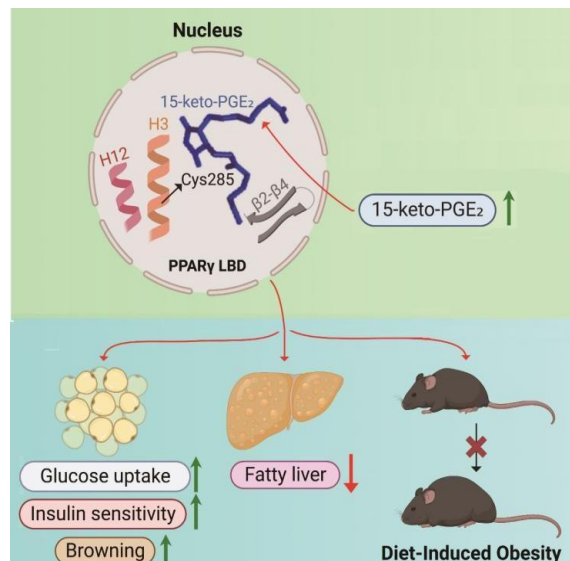


圖4、15-keto-PGE2 也會透過共價鍵結合與 PPARγ 的 cys285 結合，大幅增強胰島素信息傳遞，並減少飲食引發之肥胖[29]。(PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

三、研究目的

- (一)以核糖核酸(RNA)定序探討 15-keto-PGE2 能否將生物活體脂肪組織轉分化成肌肉組織。
- (二)利用細胞模型探討脂肪細胞轉分化成肌肉細胞可能涉及的機轉。
- (三)探討 15-keto-PGE2 能否減少小鼠的脂肪比例並同時增加肌肉比例。

貳、研究方法或過程

一、研究設備與器材

(一)細胞株

本次研究中使用的細胞株為 3T3-L1，3T3-L1 是一種前驅脂肪細胞，此細胞源自小鼠胚胎的 NIH 3T3 細胞系，它未分化時與成纖維細胞相似，呈紡錘形。經化學誘導藥劑分化後，會增加三酸甘油酯的合成及聚集，三酸甘油酯會聚集在細胞質形成脂滴(lipid droplets)，能形成脂肪細胞。

(二)研究硬體設備

器材	使用功能
光譜分析儀	定量核酸萃取的總量和純度
即時定量聚合酶連鎖反應器	測定特定核酸序列的相對表現量
離心機	將樣品內不同沉降係數或密度的物質分離
均質機	可在RNA 萃取過程中，將組織及細胞碎裂
無菌操作台	使細胞操作過程維持無菌，避免汙染
正立顯微鏡	放大細胞，觀察細胞的型態
細胞培養箱	將細胞維持在恆定的溫度及二氧化碳濃度環境
血糖測定儀	測量小鼠血糖
體組成分析儀	測量小鼠體脂肪及肌肉的質量
握力分析儀	測量小鼠前肢的握力
跑步機	測量小鼠肌肉耐力

二、研究架構圖

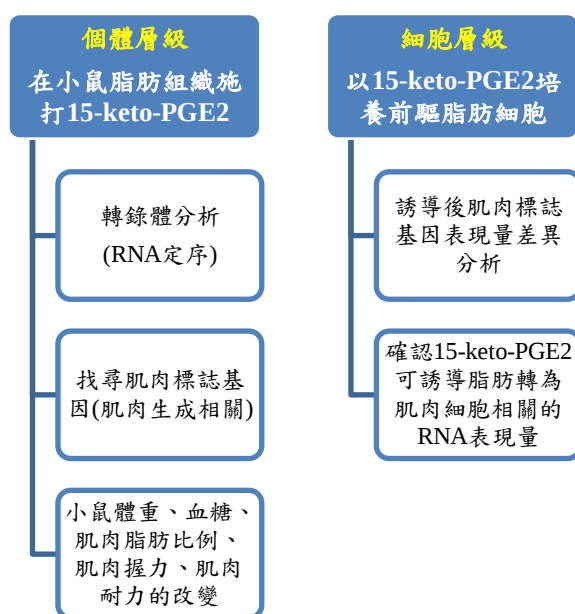


圖5、研究架構圖(來源:作者自繪)

三、研究過程與方法

(一)以 RNA 定序探討 15-keto-PGE2 能否在小鼠活體內將脂肪轉分化成肌肉組織

1. 脂肪組織添加 15-keto-PGE2 化學誘導後再進行 RNA 定序

(1)在實驗開始時，將 6 隻 6 週大的小鼠(品系:C57BL6/J)以高脂高糖飼料餵食，以誘發小鼠肥胖型肌少症[30]。同時，在其中 3 隻小鼠，連續 21 天，每天以 40mg/kg 濃度的 15-keto-PGE2 以胰島素空針注射至小鼠腹腔內作為實驗組。另外 3 隻小鼠僅以食鹽水腹腔注射作為對照組。

(2)第 21 天以切片取出皮下脂肪組織，將檢體進行核糖核酸定序(RNA-sequencing)，定序深度(sequencing depth，定序得到的鹼基總量與基因體大小的比值)為1000 倍。

(二) GSEA 原理概述

- 對於實驗組(注射 15-keto-PGE2)與對照組(注射食鹽水)兩種處理方式的脂肪組織樣本進行全基因組RNA 表現量定序的實驗，比較有無以誘導處理過的脂肪組織 mRNA表現量差異(以 log2 基因表現差異量來進行定量)，將表現量差異依照高到低排序成一張列表，並和「已預先定義生物路徑基因集(biological pathway gene set，比如橫紋肌發育、毛髮發育、免疫功能、致癌等)」進行相關性分析，分析結果可以指出表現量較高的基因可能與哪些特定的生物路徑有關(圖6A)。
- 給定「預先定義的生物路徑基因集」(在這裡我們使用 Gene Ontology 中的 Biological Process)，GSEA 的目標是測試個別的特定生物路徑基因組(Gene set S)的基因成員，這些基因的位置是否隨機分佈在整個「全基因組 RNA 表現量差異排序」的列表(Gene list rank)，或是主要分佈於列表的頂部(圖6B 中的左端)或底部(圖6B 中的右端)。

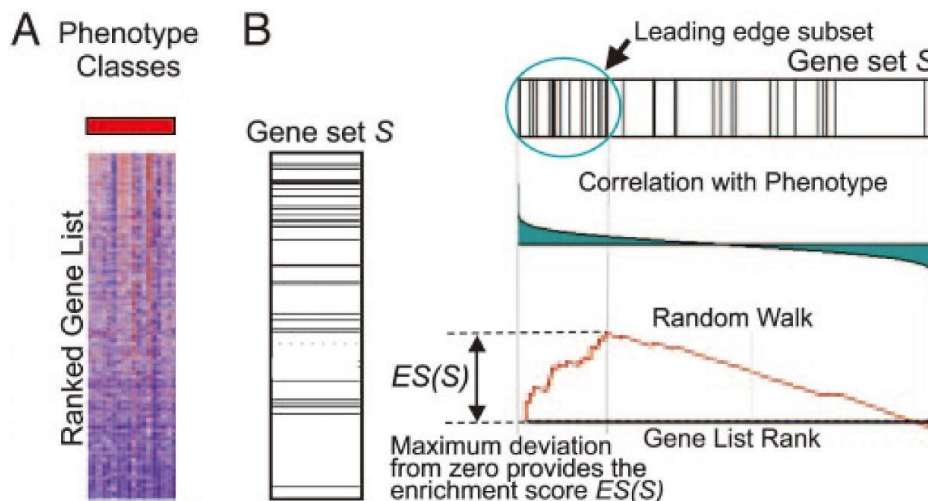


圖6、A圖:GSEA 的基因表現量差異排序(Ranked Gene List)

B圖:預先定義的生物路徑(biological pathway)基因集(Gene set)[31]

3.GSEA 方法有三個關鍵要素[31]：

(1)步驟 1：計算 Enrichment Score (ES)。我們需先計算一個 ES 分數。ES 分數的計算方法是沿著「兩組的全基因組 mRNA 表現量差異排序」列表由列表第一項基因向下移動計算，當我們在列表遇到 Gene Set S 中的基因時，就增加 ES 分數，當遇到不在 Gene set S 中的基因時，就減少 ES 分數。此沿列表向下移動計算出來的 ES，再與在列表隨機移動而算出來的 ES 相減，取與隨機移動的 ES 差異最大值，以得到每個生物路徑基因集 Gene set 的 ES(S)。

(2)步驟 2：ES 顯著性的估計。我們將「全基因組 mRNA 表現量差異排序」重新隨機排列(permutation) 1000 次，可以得到 1000 個 ES 值的分佈，計算將原本依 mRNA 表現量差異由高到低依序排列表所得的 ES 值，在這 1000 個隨機重排列所得的 ES 值中的相對

排名，以估計統計顯著性 p 值(nominal p-value)。

(3)步驟 3：多重假設檢定的調整(multiple testing correction)。基於「預先設定生物路徑基因集」的數目龐大，我們必須調整估計的顯著水準，以考慮多重假設檢定(multiple hypothesis testing)。我們首先將每個基因集的常態化(normalized)以考慮該基因組中基因的數目，從而產生常態化(normalized)的 ES (Normalized Enrichment Score, NES)。然後，我們透過計算每個 NES 對應的錯誤發現率 q 值(False Discovery rate q-value, FDR q-value) 來顯示 GSEA 分析結果錯誤的機率。FDR 是具有給定 NES 的集合代表「誤報」結果的估計機率；它是透過比較 NES 的觀察到的分佈和零分佈的尾部來計算的。

(三)、3T3L1 細胞株培養

- 1.細胞培養環境：取未分化 3T3-L1 細胞株，在 15cm 培養皿中加入細胞、15mL 的含有 10% CS(calf serum, 小牛血清)的新鮮 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培養液，每 2 天更換一次培養液，在 37°C、5%二氧化碳培養箱中培養。
- 2.細胞繼代：當細胞長滿時，在無菌操作台中，要收集細胞並轉移到其他培養皿繼續培養，並依實驗所需要的細胞數量分配到多個培養皿中。
- 3.分化前後細胞培養液更換：3T3-L1 細胞在分化前或分化後均為每 2 天更換一次培養液，每個直徑 3cm 培養在細胞分化前為加入 1ml 培養液，分化後為加入 1.5 ml 培養液。分化前使用 10% CS(小牛血清) in DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)，分化後使用 10% FBS(胎牛血清)、71.4μL insulin(胰島素)(100 IU/ml) in 50mL DMEM。
- 4.誘導 3T3L1 細胞分化為脂肪細胞：
 - (1)藥劑：(以下為 50 mL 10% FBS+DMEM 培養液中需要加入的份量)
71.4μL insulin (100 IU/ml) 5μL dexamethasone(地塞米松，簡稱 DXM)
1μL 3-isobutyl-1-methylxanthine(3-異丁基-1-甲基黃嘌呤，簡稱 IBMX)
 - (2)步驟：先依上述配方的濃度配出化學誘導分化的細胞培養液。在每個直徑 3cm 培養皿中加入 1.5mL 化學誘導分化試劑，蓋上蓋子，消毒後放入培養箱。
- 5.細胞收集：當脂肪細胞已經到達實驗所需要的細胞培養時間長度，需將細胞收集起來冷凍保存，以便進行後續的實驗。

(四)脂肪和肌肉組織、脂肪細胞轉錄體分析：

- 1.萃取肌肉及脂肪組織及脂肪細胞 RNA
- 2.即時聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT- qPCR)
 - (1)將 RNA 轉成互補 DNA(complementary DNA, cDNA)。
 - (2)cDNA 的 RT-qPCR 並分析 ct 值數據，計算出各基因的 RNA 相對表現量。

(五)握力(grip strength)測試：實驗者抓住小鼠的尾巴，將小鼠懸掛在一個金屬狀絲網上，絲網上的握力測試儀會測量小鼠前肢的握力。

(六)測量身體組成(body composition test)：以體組成分析儀(型號:Minispec LF50 TD-NMR)以核磁共振技術原理測量小鼠的體脂肪及肌肉重量，不具任何侵害性。

(七)跑步機測試(exhaustive treadmill test)：將小鼠放置於有坡度的跑步機(如圖7)[32]，在跑步機底端以輕微電擊驅使小鼠持續跑步至力竭為止，測量小鼠持續的跑步距離，以量化小鼠的肌肉耐力及力量。



圖7、跑步機測試使用之跑步機[32]

參、研究結果與討論

一、以 RNA 定序探討 15-keto-PGE2 能否將小鼠活體脂肪組織轉分化成肌肉組織

(一)目的：探討注射 15-keto-PGE2 是否能在小鼠脂肪組織中增加小鼠與肌肉功能相關基因的 mRNA 表現量。

(二)結果：將小鼠施打 15-keto-PGE2 之後，在脂肪組織的 RNA 定序進行轉錄體差異分析，相較於對照組 mRNA 表現量增加 4 倍以上的基因共有 71 個，再將此 71 個基因逐一藉由美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information ,NCBI)網站[33]查出其編碼的蛋白質功能，整理出表1。實驗組基因的 mRNA 表現量增加倍數即為 2 的”log₂ 值”次方倍，如實驗組的Myoz3的 mRNA 表現量即為對照組的2 的 3.28 次方倍。

(三)結論：由表1可見，經施打 15-keto-PGE2 後 mRNA 表現量增加 4 倍以上的基因共有 71 個，有 54 個(約 75%)的基因具有與肌肉分化、調控肌肉收縮、組成肌肉結構蛋白、肌肉結構調控、組成運動終板至少其中之一種功能相關。其中的Myod1 及 Mrf4 基因，都屬於肌肉分化調節因子(Myogenic regulatory factors，共有 Myod1, Mrf4, Myogenin, Myf5 四個基因)[34]，這些調節因子能夠調控肌肉生成(myogenesis)。

表1、RNA 定序結比較結果與NCBI 資料庫搜查結果整理表，施打 15-keto-PGE2 的實驗組 mRNA 表現量相較對照組增加 4 倍以上的基因共有 71 個，表中 log₂ 值為表現量增加幅度。(來源:作者自製以及NCBI網站[33])

基因名	基因全名	log ₂ 值	與肌肉相關的功能分類	編碼的蛋白質功能
Myoz3	myozenin 3	3.28	調控肌肉收縮	在骨骼肌中特異性表達，屬於 myozenin 家族。該家族的成員為鈣調神經磷酸酶(calcineurin) 相互作用蛋白，幫助將鈣調神經磷酸酶連接到心肌和骨骼肌的肌節。它們在鈣調神經磷酸酶訊號傳導的調節中發揮重要作用。
Myod1	myogenic differentiation 1	3.11	肌肉分化	負責肌肉分化的轉錄因子。它透過誘導細胞週期停滯來調節肌肉細胞分化，這是肌肉分化啟動的先決條件。該蛋白質也參與肌肉再生。它會激活自己的轉錄，以穩定肌肉生成過程。
Mrf4(Myf6)	myogenic factor 6	3.11	肌肉分化	在骨骼肌中特異性表達的肌肉分化調節轉錄因子。此基因的缺陷是常染色體顯性遺傳性中心核肌病變的原因。
Mybpc2	myosin binding protein C2	3.02	調控肌肉收縮	在橫紋肌表達的肌球蛋白(myosin)結合蛋白。該家族包括快型、慢型和心肌型亞型，每種亞型都是在橫紋肌 A 帶的跨橋承載區(C 區)中發現的肌球蛋白相關蛋白。此蛋白質為快速型亞型。
Nmrk2	nicotinamide riboside kinase 2	3.01	肌肉分化	菸鹼醯胺核甘激酶 2 (nicotinamide riboside kinase 2) 參與 NAD 代謝過程。調控成肌細胞分化的上游。
Actn3	actinin alpha 3	2.94	調控肌肉收縮	在骨骼肌中表達之 α -肌動蛋白(actin)結合蛋白基因家族的成員，負責連結肌動蛋白與細絲(thin filament)。
Dhrs7c	dehydrogenase/reductase 7C	2.93	調控肌肉收縮	NADH 依賴性氧化還原酶，參與調節肌質(sarcoplasmic reticulum)將隔離的鈣離子釋放到細胞質中，調節心臟和骨骼肌收縮。透過活化 PI3K 和 mTORC2 介導的 AKT1 磷酸化訊號通路，參與骨骼肌的葡萄糖攝取和肌肉性能。
Pvalb	Parvalbumin alpha	2.90	調控肌肉收縮	一種高親和力鈣離子結合蛋白，結合兩個鈣離子，在肌肉中參與收縮後的鬆弛。
Tmod4	tropomodulin 4	2.88	調控肌肉收縮	位於橫紋肌細絲內，增加原肌球蛋白(tropomyosin) 結合活性，阻止肌動蛋白絲(actin filaments)尖端的伸長和解聚，有助於肌動蛋白原絲的形成。
Rpl3l	ribosomal protein L3 like	2.85	調控肌肉收縮	心臟和骨骼肌特異的核糖體成分，負責細胞中蛋白質的合成，調節橫紋肌管生長和肌肉功能。

2310002 L09Rik	<i>RIKEN cDNA 2310002L09 gene</i>	2.81	肌肉結構 蛋白	參與肌動球蛋白結構(actomyosin)。
Sh3bgr	<i>SH3 domain binding glutamate rich protein</i>	2.80	肌肉結構 蛋白	在心臟和骨骼肌成熟肌節的 Z 線中一種小蛋白，含 SH3 結合結構域，對於橫紋肌組織中肌節的形成以及心臟發育至關重要。
Tnni2	<i>troponin I2 , fast skeletal type</i>	2.80	調控肌肉 收縮	一種快肌骨骼肌蛋白，屬於肌鈣蛋白(troponin)家族的成員，負責橫紋肌收縮中鈣依賴性收縮。
Tnnc2	<i>troponin C2 , fast skeletal type</i>	2.79	調控肌肉 收縮	肌鈣蛋白(Troponin)，為調節橫紋肌收縮的關鍵蛋白質複合物。
Myoz1	<i>myozenin 1</i>	2.79	調控肌肉 收縮	在橫紋肌中特异性表達，屬於 myozenin 家族。該家族的成員為鈣調神經磷酸酶(calcineurin)相互作用蛋白，幫助將鈣調神經磷酸酶連接到心肌和骨骼肌的肌節。它們在鈣調神經磷酸酶訊號傳導的調節中發揮重要作用。
Pgam2	<i>phosphoglycerate mutase 2</i>	2.77	調控肌肉 收縮	磷酸甘油酸變位酶(PGAM) 催化肌肉糖解途徑中 3-磷酸甘油酸(3-PGA) 轉化為 2-磷酸甘油酸(2-PGA) 的可逆反應。此基因的突變會導糖原累積病 X(glycogen storage disease X)，其特徵為肌紅蛋白尿、血清肌酸激酶水平升高、磷酸甘油酸變位酶活性降低、肌疼痛、肌肉疼痛、肌肉痙攣、運動不耐受。
Ckm	<i>creatine kinase, M-type</i>	2.76	調控肌肉 收縮	橫紋肌磷酸轉移酶，可逆地催化 ATP 和各種磷原（例如磷酸肌酸 creatine phosphate）之間的磷酸鹽轉移，參與能量平衡。是心肌梗塞的重要血清標記。
Ctxn3	<i>cortixin 3</i>	2.76	*(表示該 基因與肌肉 功能無關)	膜組成蛋白。
Myh4	<i>myosin heavy chain 4</i>	2.72	調控肌肉 收縮	肌球蛋白(myosin)，參與骨骼肌與心肌收縮。
Ube2c	<i>ubiquitin conjugating enzyme E2 C</i>	2.71	*	E2 泛素結合酶，參與有絲分裂週期和細胞週期進展。
1700061 G19Rik	<i>acyl-CoA synthetase bubblegum family member 3</i>	2.70	*	長鏈脂肪酸-CoA 連接酶活性。預計參與長鏈脂肪酸生物合成過程。
Usp50	<i>ubiquitin specific peptidase 50</i>	2.69	*	泛素樣蛋白特异性蛋白酶。在多種細胞成分中具有活性，包括樹突棘和突觸後密度。
Tnnt3	<i>troponin T3, fast skeletal type</i>	2.68	調控肌肉收縮	為快速骨骼肌肌鈣蛋白(troponin)三體複合物的子單元，鈣離子濃度增加會導致肌鈣蛋白(troponin)複合物發生構象變化，這種變化會傳遞到位於肌動蛋白絲(actin filament)上的原肌球蛋白(tropomyosin)產生肌肉收縮。
Mylpf	<i>myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle</i>	2.62	肌肉結構蛋白	肌球蛋白複合物的一部分。參與骨骼肌組織的發育。
Tceal7	<i>transcription elongation factor A like 7</i>	2.62	*	NF-kappaB 轉錄因子活性的負調節和轉錄的負調節，
Odf3l2	<i>outer dense fiber of sperm tails 3 like 2</i>	2.60	*	功能不詳，可能調控細胞質微管(microtubule)形成。
Cacng1	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 1</i>	2.60	調控肌肉收縮	骨骼肌電壓依賴性鈣通道蛋白組成成分白質之一，在肌肉興奮-收縮耦合中發揮作用。
Pde6h	<i>phosphodiesterase 6H</i>	2.59	*	抑制視網膜錐體細胞特异性 cGMP 磷酸二酯酶，參與視覺訊號的傳遞和放大。
Pygm	<i>glycogen phosphorylase, muscle associated</i>	2.59	調控肌肉收縮	肌肉中特異表達肝糖分解酵素，調節肌肉中葡萄糖代謝。
Tmem2 33	<i>transmembrane protein 233</i>	2.57	*	膜組成蛋白
Trim63	<i>tripartite motif containing 63</i>	2.56	肌肉結構蛋白	E3 泛素連接酶，位於橫紋肌纖維的 Z 線和 M 線區域，為橫紋肌 E3 泛素連接酶，在骨骼肌和心肌萎縮中發揮重要作用，負責降解肌球蛋白(myosin)、肌球蛋白結合蛋白(myosin binding protein)和肌肉型肌酸激酶(creatine kinase)

Asb11	<i>ankyrin repeat and SOCS box containing 11</i>	2.55	肌肉分化	介導標靶蛋白的泛素化和隨後的蛋白酶體降解，高度特異性地表現於肌肉衛星細胞。調節肌肉前驅細胞的擴張與分化，為胚胎和成人再生肌肉發生的主要調節因子。
Atp2a1	<i>ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 1</i>	2.54	調控肌肉收縮	此酵素催化 ATP 水解以及鈣從細胞質轉移到肌漿網(sarcoplasmic reticulum)，參與肌肉興奮和收縮。該基因的突變會導致一些體染色體隱性遺傳形式的 <u>布羅迪病</u> ，其特徵是運動期間肌肉鬆弛的損害增加。
Casq1	<i>calsequestrin 1</i>	2.52	肌肉結構蛋白	骨骼肌特異性 calsequestrin 蛋白家族的成員。Calsequestrin 在心肌和骨骼肌細胞中充當肌漿網(sarcoplasmic reticulum)鈣離子感測器。杜氏型和貝克爾型肌肉營養不良症患者中缺乏此蛋白質。
Hfe2	<i>hemojuvelin BMP co-receptor</i>	2.49	*	參與鐵代謝。可能活化鐵調素(hepcidin)的信號傳導或表達量。此基因的缺陷導致血色素沉著症，鐵超負荷導致性腺功能減退、肝纖維化或肝硬化和心肌病。
Plcd4	<i>phospholipase C, delta 4</i>	2.47	*	磷脂酶 C(phospholipase C)的成員。磷脂酶 C 將 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 水解成細胞內第二信使：inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol。
Kcnj11	<i>potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11</i>	2.46	調控肌肉收縮	鉀離子通道，讓鉀流入細胞而。此基因的突變是導致遺傳性嬰兒期高胰島素性低血糖症的原因，患者常有神經系統特徵包含明顯發育遲緩、嚴重全身性癲癇、肌張力低下和肌無力。
Ampd1	<i>adenosine monophosphate deaminase 1</i>	2.46	調控肌肉收縮	單磷酸腺苷脫氨酶 1，催化骨骼肌中 AMP 脫氨基為 IMP，在嘌呤核苷酸循環中扮演重要角色。此肌肉特異性酵素的缺乏是運動誘發的肌病變的常見原因，並且可能是人類代謝性肌肉病變最常見的原因。
Trim54	<i>tripartite motif containing 54</i>	2.45	調控肌肉收縮	調節橫紋肌中肌聯蛋白激酶(titin kinase)和微管(microtubule)依賴性信號通路。
Clcn1	<i>chloride voltage-gated channel 1</i>	2.44	調控肌肉收縮	電壓依賴性氯離子通道，調節骨骼肌膜的電興奮性。該基因的突變會導致兩種形式的遺傳性人類肌肉疾病：隱性先天性全身性肌強直(Becker)和顯性性肌強直(Thomsen)。
Cacng6	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 6</i>	2.44	調控肌肉收縮	骨骼肌特異性電壓依賴性鈣離子通道，讓鈣通道穩定在非活性(關閉)狀態。
Lrrc38	<i>leucine rich repeat containing 38</i>	2.42	調控肌肉收縮	骨骼肌特異性鉀離子通道複合體的一部分。
Ano5	<i>anoctamin 5</i>	2.42	調控肌肉收縮	鈣激活的氯離子通道。此基因的突變造成運動引起的肌痛到近端和/或遠端肌肉無力。
Fitm1	<i>fat storage-inducing transmembrane protein 1</i>	2.42	肌肉分化	在橫紋肌特異表現蛋白，加強二酰基甘油結(diacylglycerol)和甘油三酯(triacylglycerol)結合活性，參與脂滴形成，在肌肉細胞分化過程中是 MyoD1 在肌肉分化過程中的下游調控基因。
Olfir77	<i>olfactory receptor family 7 subfamily D member 10</i>	2.40	*	嗅覺受體與鼻子中的氣味分子相互作用，引發氣味感知。
Mettl21 c	<i>methyltransferase 21C, AARS1 lysine</i>	2.39	肌肉結構調控	骨骼肌特異性甲基轉移酶，參與蛋白質甲基化，並調節蛋白質自噬。
Klhl31	<i>kelch-like 31</i>	2.39	肌肉結構調控	在轉錄因子 MEF2 的控制下之肌肉特異性蛋白，將 Filamin-C 進行泛素化和降解。缺乏 Klhl31 的小鼠表現出生後骨骼肌生長遲緩、中心核肌病變、和肌漿網(sarcoplasmic reticulum)擴張。
Jsrp1	<i>junctional sarcoplasmic reticulum protein 1</i>	2.35	調控肌肉收縮	調節骨骼肌中的肌漿網(sarcoplasmic reticulum)鈣流入和流出以調節骨骼肌興奮-收縮耦合。
Mylk4	<i>myosin light chain kinase family, member 4</i>	2.35	調控肌肉收縮	肌球蛋白(myosin)輕鏈激酶，調節肌肉力量和肌肉硬度。
Myom2	<i>myomesin 2</i>	2.26	肌肉結構蛋白	巨大的蛋白肌聯蛋白(titin)與其相關蛋白，將肌節(sarcomere)的主要結構、M 帶和 Z 盤相互連接。
Htr2b	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B</i>	2.26	*	血清素受體，透過 HTR2B 增強的 5-HT 訊號促進脂肪分解。HTR2B 拮抗劑治療可減輕高脂飲食誘導的胰島素抗性、內臟脂肪組織發炎和脂肪肝。

Tspan8	<i>tetraspanin 8</i>	2.25	*	四跨膜蛋白家族 j, TSPAN8 為全基因組關聯研究中確定為第 2 型糖尿病相關的位點。缺乏 Tspan8 小鼠體重減輕與脂肪減少。
Acta1	<i>actin alpha 1, skeletal muscle</i>	2.25	肌肉結構蛋白	骨骼肌中的 α 肌動蛋白。此基因的突變會引起多種肌肉疾病，包括線狀肌病變、細肌絲過多的先天性肌病變、有核心的先天性肌病變和纖維類型不平衡的先天性肌肉疾病，以及導致肌纖維缺陷並表現為肌張力減退等表現的疾病。
Ky	<i>kyphoscoliosis peptidase</i>	2.24	組成運動終板 (motor end-plate)	轉谷氨酰胺酶，參與神經肌肉接頭的功能、成熟和穩定，為正常肌肉生長所必需的。該基因的突變與肌病變、肌原纖維有關。
Grin3b	<i>glutamate receptor, ionotropic, NMDA3B</i>	2.23	組成運動終板	N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受體次單元，主要存在於運動神經元中，產生興奮性甘氨酸受體。缺乏 Grin3b 小鼠在運動學習或協調顯著損傷，活動量減少。
Mylk2	<i>myosin, light polypeptide kinase 2, skeletal muscle</i>	2.22	調控肌肉收縮	僅在成人骨骼肌中表現的肌球蛋白(myosin)輕鏈激酶，一種鈣/鈣調蛋白(calmodulin)依賴性酶。與肌動蛋白絲形成相互作用，調控肌肉收縮。
Eno3	<i>enolase 3, beta muscle</i>	2.22	肌肉分化	催化 2-磷酸甘油酸 (2-phosphoglycerate) 為磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate)，在成人橫紋肌中表達，調控肌肉發育和再生。
Ddit4l	<i>DNA-damage-inducible transcript 4-like</i>	2.21	肌肉結構調控	在心肌細胞中促進壓力誘導的心肌自噬作用。心臟特异性過度表達此蛋白的小鼠有心肌收縮功能障礙、自噬增加。對運動等刺激的反應，被認為會促進適應性和有益的生理性心臟肥大。相反，在病理刺激會誘發病理性心臟肥與心臟衰竭。
C33002 1F23Rik	<i>ribosomal protein S23, retrogene 1</i>	2.17	*	促進腺苷酸環化酶(adenylate cyclase)活性。作用於澱粉樣蛋白-β 代謝過程的上游或內部。
Igfn1	<i>immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1</i>	2.15	肌肉結構調控及肌肉分化	在骨骼肌中表現的含有免疫球蛋白，調節肌動蛋白聚合，影響肌小管融合和與肌肉分化。
Apobec 2	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 2</i>	2.13	肌肉分化	表現主要在骨骼肌和心肌中。在成肌細胞早期分化階段升高，是肌肉再生中成肌細胞分化的關鍵負調節因子。此基因缺陷會導致肌肉質量減少和肌纖維增加。
Sgca	<i>sarcoglycan, alpha (dystrophin-associate d glycoprotein)</i>	2.12	肌肉結構調控	橫紋肌特異表現的肌肉營養不良蛋白-糖蛋白複合物 (dystrophin-glycoprotein complex) 組成部分，維持肌纖維膜的穩定性以及肌動蛋白(actin)與細胞外基質的連接。此基因突變會導致肌肉營養不良症。
Stac3	<i>SH3 and cysteine rich domain 3</i>	2.12	調控肌肉收縮	為橫紋肌興奮-收縮耦合機制的組件。此外，我們發現人類 STAC3 突變導致美洲原住民衰弱肌病變。
Asb14	<i>ankyrin repeat and SOCS box-containing 14</i>	2.11	*	將細胞激素訊號傳導抑制蛋白 (SOCS) 及其結合伴侶與 elongin B 和 C 複合物偶聯，進行降解。
Lrrc30	<i>leucine rich repeat containing 30</i>	2.09	*	活化絲氨酸/蘇氨酸磷酸酶(serine/threonine kinase)活性。
Cacna1s	<i>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit</i>	2.08	調控肌肉收縮	骨骼肌細胞中 L 型電壓依賴性鈣通道的亞基。此基因的突變與南美家族中的低鉀性週期性肌肉癱瘓、甲狀腺毒性週期性肌肉麻痺和惡性肌肉高熱易感性有關。
Asb5	<i>ankyrin repeat and SOCs box-containing 5</i>	2.05	肌肉分化	位於內皮細胞和平滑肌細胞以及衛星細胞中，參與動脈生成與胚胎體節發生後，肌肉發育的最早階段。
Mstn	<i>myostatin</i>	2.02	肌肉結構調控	一種在骨骼肌中組裝和產生和釋放的肌肉因子，作用於肌肉細胞以抑制肌肉生長。缺乏肌肉生長抑制素，或被阻斷肌肉生長抑制素活性的動物具有顯著較多的肌肉質量。
Klc3	<i>kinesin light chain 3</i>	2.01	*	驅動蛋白(kinesin)輕鏈基因家族的成員。驅動蛋白是參與沿著微管運輸貨物的分子馬達。
Trdn	<i>triadin</i>	2.01	肌肉結構蛋白	位於心肌漿網(sarcoplasmic reticulum)，協調肌漿網鈣離子釋放以及由此產生的興奮-收縮耦合。
Tcap	<i>titin-cap</i>	2.00	調控肌肉收縮	表達在心肌和骨骼肌中，參與肌節組裝，心肌細胞拉伸感覺，T 管結構和功能，心臟細胞凋亡，肌聯蛋白(titin)錨定，鈣通道功能。

二、GSEA 分析結果

經 GSEA 軟體分析後 NES(Normalized Enrichment Score)值最大且 FDR q-value(False Direction Rate q-value)小於 0.05 的 11 項生物途徑基因組(biological pathway gene sets)列出後，發現有 10 個生物途徑均與肌肉分化生長、調控肌肉收縮、形成肌肉結構蛋白的其中之一相關 (表 2)，此證實了在小鼠脂肪組織施打 15-keto-PGE2 的 RNA 定序結果中，其表現量增加最多的基因功能幾乎都與肌肉的功能相關的生物途徑有關，可見 15-keto-PGE2 極有可能會引發與肌肉的功能相關的生物途徑。

表 2、GSEA 分析結果 NES 值最大且 FDR q-value 小於 0.05 的 10 個與肌肉的功能相關生物途徑。

(ES: Enrichment Score, NES:Normalized Enrichment Score, NOM p-value: nominal p value, FDR q-value: False Direction Rate q-value.) (來源:作者自製)

編號	Gene Set 基因集	SIZE	ES	NES	NOM p-value	FDR q-value
1	Striated muscle cell development → 橫紋肌發育	69	0.65	2.06	0.000	0.001
2	Positive regulation of skeletal muscle tissue development → 骨骼肌組織發育正調控	18	0.84	2.05	0.000	0.001
3	Positive regulation of muscle tissue development → 肌肉組織發育正調控	22	0.78	2.00	0.000	0.002
4	Skeletal muscle contraction → 骨骼肌收縮	36	0.72	2.00	0.000	0.002
5	Myotube cell development → 肌管細胞發育	44	0.67	1.96	0.000	0.005
6	Sarcoplasmic reticulum calcium ion transport → 肌質網鈣離子運輸	30	0.72	1.95	0.000	0.005
7	Sarcomere organization → 肌小節組織	45	0.67	1.94	0.000	0.006
8	Regulation of myotube differentiation → 肌管分化調控	39	0.68	1.93	0.000	0.006
9	Regulation of skeletal muscle tissue development → 骨骼肌組織發育調控	26	0.72	1.91	0.000	0.009
10	Regulation of muscle tissue development → 肌肉組織發育調控	46	0.62	1.82	0.001	0.044

在以上生物途徑個別的 Enrichment plot 圖中的下半部(圖 8)，可以看到圖中橫軸為兩組基因 mRNA 表現量差異排行(下方的 Ranked in ordered dataset)，紅色系區塊(positively correlated)即為實驗組(施打 15-keto-PGE2)後 mRNA 表現量相對對照組較高的基因分布區，藍色系區塊(negatively correlated)即為實驗組 mRNA 表現量相對較低的基因分布區。紅藍色區塊上方的直立黑線(hits)即為各個該「生物途徑基因組」的各個基因在兩組「基因 mRNA 表現量差異排行」中的分布位置。若那些基因(圖中的直立黑線)主要聚集在紅色區塊，即代表該「生物途徑基因組」的基因在實驗組的 mRNA 表現量普遍較對照組高。

在 Enrichment plot 圖的上半部，可以看到 Enrichment score(ES)的綠色曲線(Enrichment profile)，此曲線的峰值即為該生物途徑基因組的 Enrichment Score 數值。若該生物途徑基因集的基因，多在實驗組的 mRNA 表現量較對照組高，則該生物途徑的 Enrichment score 曲線應呈現先往上後往下，且曲線峰值應出現在橫軸的左端。

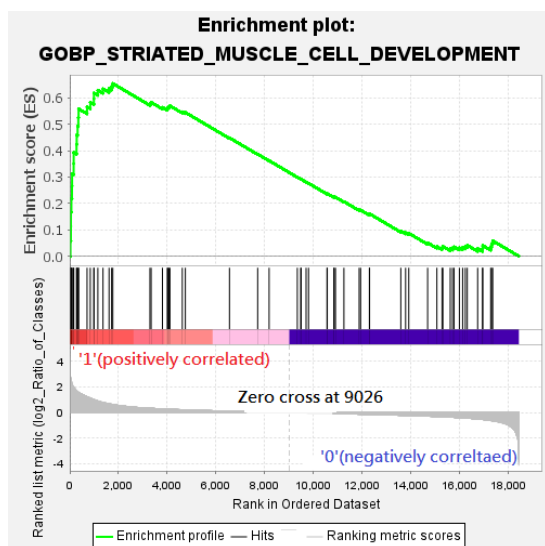


圖 8-1

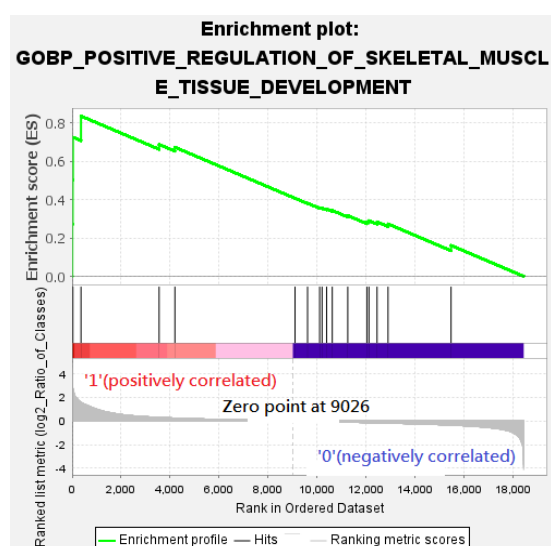


圖 8-2

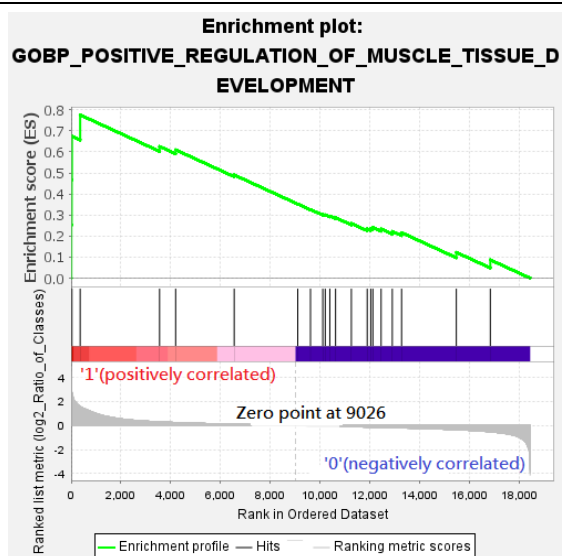


圖 8-3

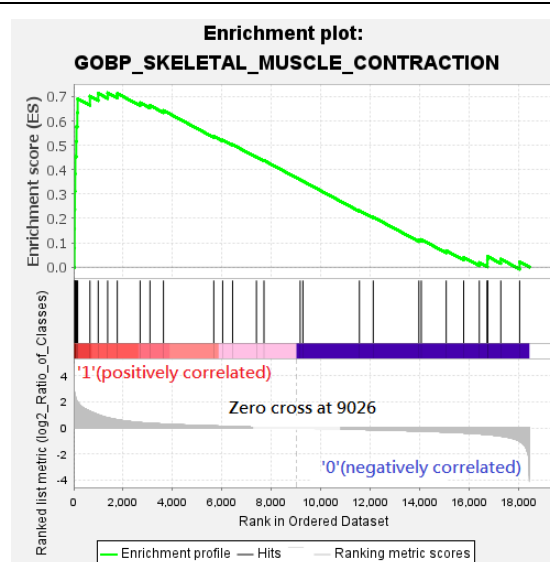


圖 8-4

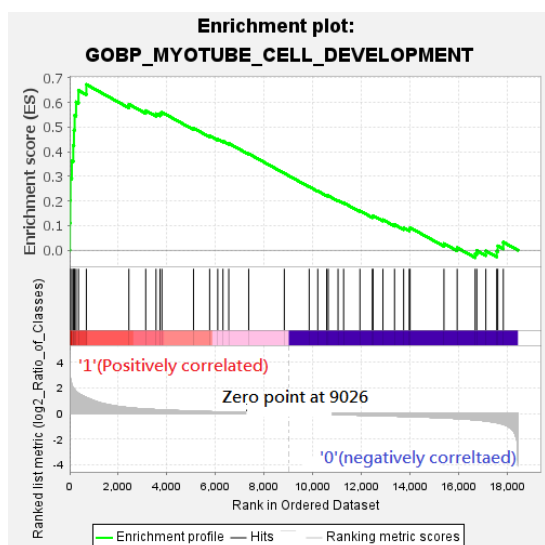


圖 8-5

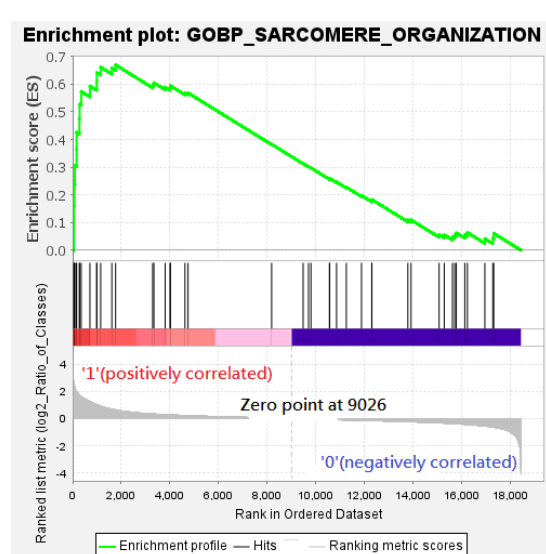


圖 8-6

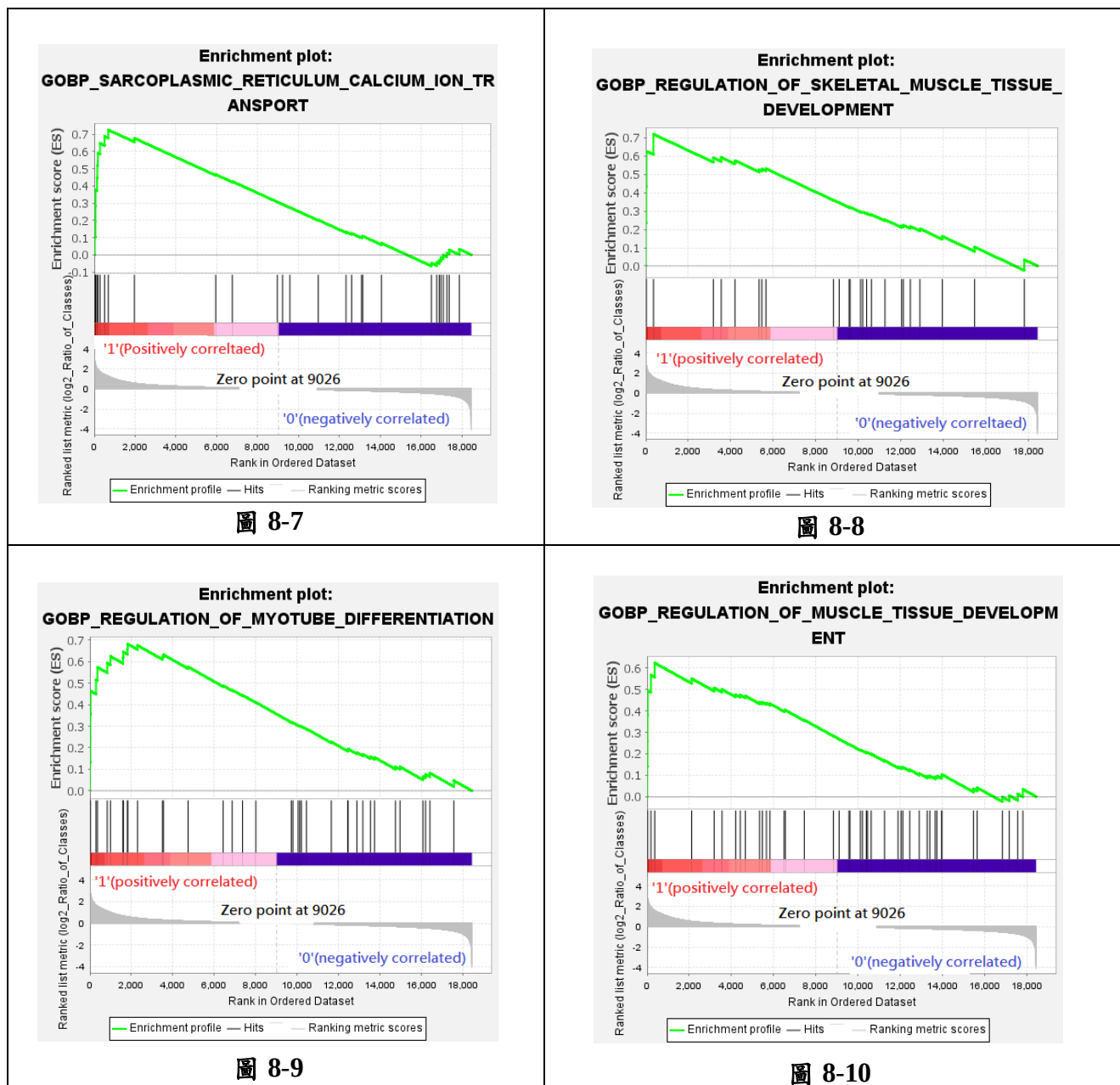


圖8、GSEA結果NES值最大且FDR q-value小於0.05 的10個與肌肉功能相關生物途徑(biological pathway)個別的Enrichment Plot圖。(來源:作者自製)

三、探討不同的肌肉功能相關基因在小鼠肌肉組織與脂肪組織 mRNA 表現量的差距

(一)目的：由小鼠注射 15-keto-PGE2 RNA 定序的結果(表1)，選出在小鼠身上脂肪組織注射15-keto-PGE2 21 天後，mRNA 表現量實驗組與對照組相差最大的 13 種與肌肉功能相關的基因，此實驗目標是探討這些功能與肌肉相關的基因，在小鼠肌肉組織與脂肪組織 mRNA表現量的差距，以證明這些基因能夠作為理想的肌肉組織的標誌基因(marker)。

(二)實驗方法：取3隻實驗室先前留存，冷凍在液態氮的小鼠的大腿股四頭肌(quadriceps)和皮下脂肪(inquinal fat)的組織約 100 mg，萃取其 mRNA，將 mRNA 樣品進行 qPCR 以測定這 13 個肌肉標誌基因，比較這些基因在肌肉和脂肪組織的 mRNA 表現量。

(三)數據分析方式：

1. 有3隻小鼠(biological replicates x3)，每隻小鼠的脂肪組織與肌肉組織的13個基因的 qPCR皆進行二重複擴增，意即有2個 technical replicates，因此每個組織所對應的每個基因引子都會有2個Ct值原始值，分析數據時取用兩個Ct值原始值的平均數。

2. 因為將Cyclophilin A作為qPCR的內部對照組(internal control gene)，因此將 Cyclophilin A的 Ct值分別減掉13個基因各自的Ct值，於是13個基因得到各自在肌肉以及脂肪組織的 $\Delta(\text{delta})$ Ct值，此數值越高，代表這個基因在組織的相對mRNA表現量越高。
3. 將13個基因中肌肉組織的 Δ Ct值減掉脂肪組織的 Δ Ct值，於是得到13個基因各自的 $\Delta\Delta(\text{delta delta})$ Ct 值，此數值越高，代表這個基因在肌肉的 mRNA表現量相較於脂肪更高。當一個基因的 $\Delta\Delta$ Ct值為x，代表該基因在肌肉的mRNA表現量為在脂肪的mRNA表現量的2的x 方倍。(一個基因的 $\Delta\Delta$ Ct值每增加1，代表該基因在肌肉的mRNA表現量相較於在脂肪的 mRNA表現量的倍數增加2倍。)

(四)結果：

圖9呈現各個肌肉基因在三隻小鼠的 $\Delta\Delta$ Ct 值(delta delta Ct 值)平均值，每個長條上三個黑點為在不同的三隻小鼠個體上的 $\Delta\Delta$ Ct 值，因為每個基因的平均 $\Delta\Delta$ Ct 值皆大於 3.4，意即這13個基因在小鼠的肌肉組織的平均mRNA 表現量均比在脂肪組織高 2 的3.4 次方倍以上(等於10倍以上)，呈現顯著差異，表示這13種基因在未來實驗中確實可以做為肌肉組織的標誌基因。

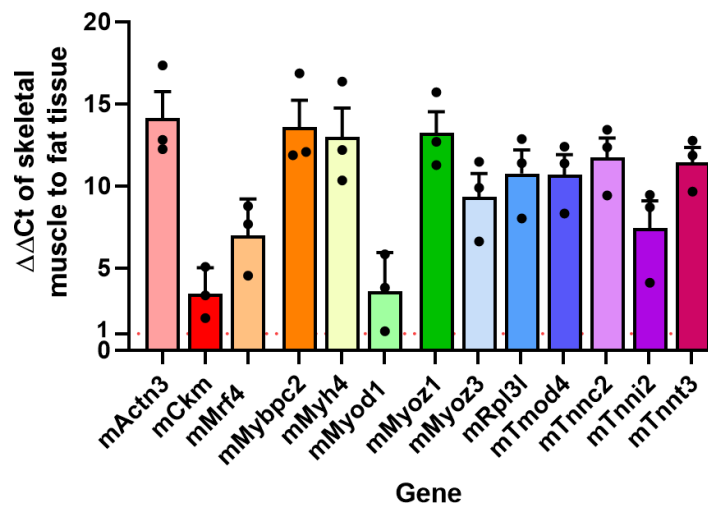


圖9、不同肌肉功能基因在肌肉組織相對於脂肪組織的 $\Delta\Delta$ Ct 值。(來源:作者自繪)

四、探討在 3T3L1 脂肪前驅細胞分化過程中加入 15-keto-PGE2 對於肌肉功能相關基因 mRNA 表現量的影響

- (一)目的：由文獻探討以及小鼠活體注射 15-keto-PGE2 造成與肌肉功能相關基因 mRNA 表現量普遍上升的實驗結果，推測 15-keto-PGE2 在前驅脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞時，也可以幫助脂肪細胞轉變為肌肉。因此欲以 3T3L1 細胞株的細胞實驗來測試此假說是否正確。
- (二)方法：在此實驗中，我們種植共九個孔(9 wells)的未分化的 3T3-L1 細胞，平分為三組，每組三孔(3 wells)細胞。在分化 3T3-L1 細胞同時，依細胞的分組，在培養液中分別加入濃度為 0(對照組)、5 及 10 μ M(實驗組)的 15-keto-PGE2。此後，每 2 天更換一次培養液(分化後到培養結束前共 30 天的時間，實驗組的細胞培養液均含有 15-keto-PGE2)，將細胞培養 30 天後收成細胞，並萃取其 RNA，最後以 qPCR 測定細胞在不同的肌肉標誌基因的 mRNA 表現量。
- (三)數據分析方式：

1. 此實驗按照培養液中不同 15-keto-PGE2 的濃度，共分 3 組，每組有 3 孔細胞(biological replicates x3)，每孔細胞的 13 個基因(含 12 個肌肉標誌基因及 Cyclophilin A)的 qPCR 皆實施二重複擴增，(technical replicates x2)，因此每孔細胞所對應的每個基因引子都會有 2 個 Ct 值原始值，分析數據時取用兩個 Ct 值原始值的平均數。
2. 因為將 Cyclophilin A 作為 qPCR 的對照基因(internal control gene)，因此將 Cyclophilin A 的

Ct 值分別減掉 12 個基因各自的 Ct 值，於是 12 個基因得到各自在各孔脂肪細胞的 Δ (delta)Ct 值，此數值越高，代表這個基因在細胞的相對 mRNA 表現量越高。

3. 將 15-keto-PGE2 濃度為 5 μ M 及 10 μ M 實驗組細胞各個基因的 Δ Ct 值減去濃度為 0 μ M 組(對照組)細胞各個基因的 Δ Ct 值，此時濃度為 5 μ M 及 10 μ M 的實驗組細胞得到它們各個基因的 $\Delta\Delta$ Ct 值。 $\Delta\Delta$ Ct 值越高，即代表該實驗組細胞的基因相較於對照組的細胞基因的 mRNA 表現量倍數越高。
4. 當一個實驗組細胞的基因的 $\Delta\Delta$ Ct 值為 x 時，代表該基因在該基因組細胞的 mRNA 表現量為在對照組細胞的 mRNA 表現量的 2 的 x 次方倍，所以可以經由 $\Delta\Delta$ Ct 值去推算實驗組細胞的肌肉標誌基因 mRNA 表現量為對照組的幾倍。

(四)結果：圖10呈現各個肌肉標誌基因在實驗組的不同濃度(5或10 μ M)15-keto-PGE2 培養的脂肪細胞，相較於沒有添加的細胞 mRNA 平均相對表現量倍數，每個長條上的黑點為在不同的三孔細胞個體上的基因相對表現量倍數。由圖10可知，除了 *Mrf4* 基因外，以5 μ M,10 μ M 的 15-keto-PGE2 培養細胞，在肌肉標誌基因的 mRNA 表現量皆比較高。

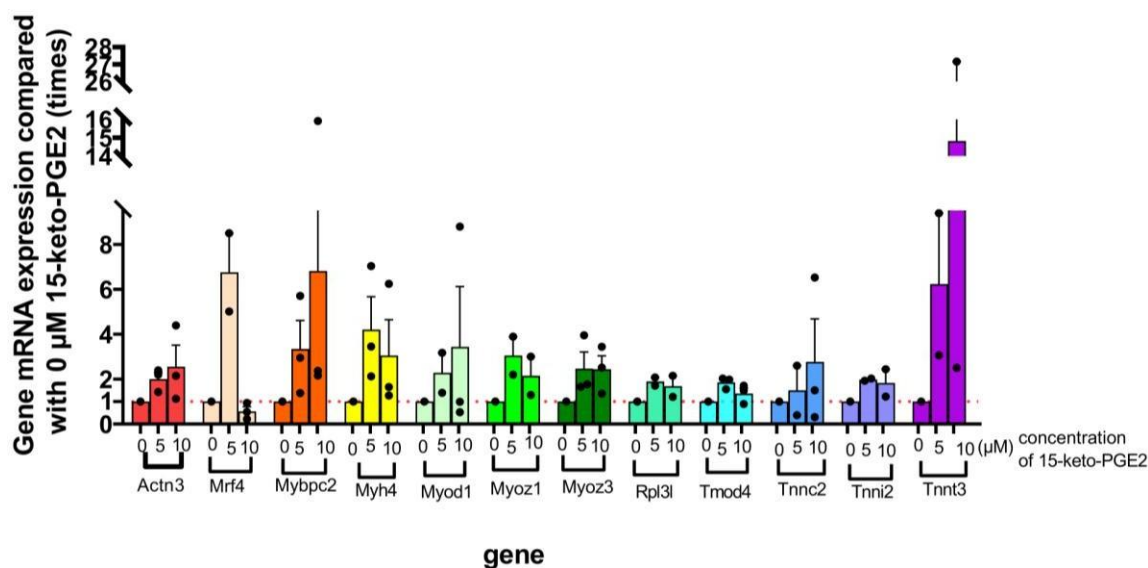


圖10、不同肌肉標誌基因在加入濃度為 5 μ M、10 μ M 的 15-keto-PGE2 的脂肪細胞(實驗組)相對於濃度 0 μ M 的脂肪細胞(對照組)的 mRNA 表現量倍數。(來源:作者自繪)

五、探討 15-keto-PGE2 對小鼠的體重、血糖、身體組成、肌肉握力的影響

(一)方法：先將 30 隻 56 週大的小鼠(品系:C57BL/6J)以高脂高果糖飼料餵食(High fat and high glucose diet)餵食，以引發高齡小鼠的肥胖型肌少症，依兩組的起始平均體重與血糖相等的原則，分為實驗組及對照組各 15 隻，在餵食高脂高果糖飼料 4 週後，實驗組小鼠每天施打 15mg/kg/day 濃度的 15-keto-PGE2(溶於微脂體中)，對照組施打無添加 15-keto-PGE2 的微脂體，共持續 10 週。

(二)結果：

1. **體重：**由圖11可以看出，注射 15-keto-PGE2 後的實驗組的體重隨著周次的增加，與對照組相比體重均較低，於第 6 週開始達統計顯著差異，在第 10 週結束時實驗組比對照組體重平均少了 4.16 克，顯示 15-keto-PGE2 有減重效果。
2. **血糖：**由圖12顯示，施打 15-keto-PGE2 後實驗組的血糖相較於對照組均較低，於第 6 週開始達統計顯著差異，最大差距達到 25.27 mg/dL，顯示 15-keto-PGE2 有降血糖效果。

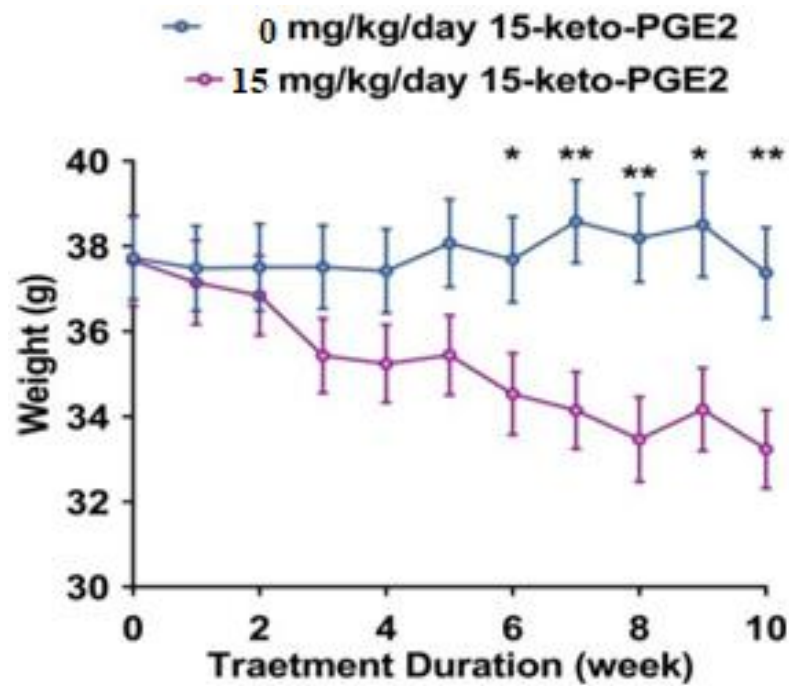


圖11、實驗組小鼠施打 15-keto-PGE2 與控制組各週的體重變化曲線
(註: *代表 P-value<0.05, **代表 0.01<p-value<0.05, ***代表 0.001<p-value<0.01)(來源:作者自繪)

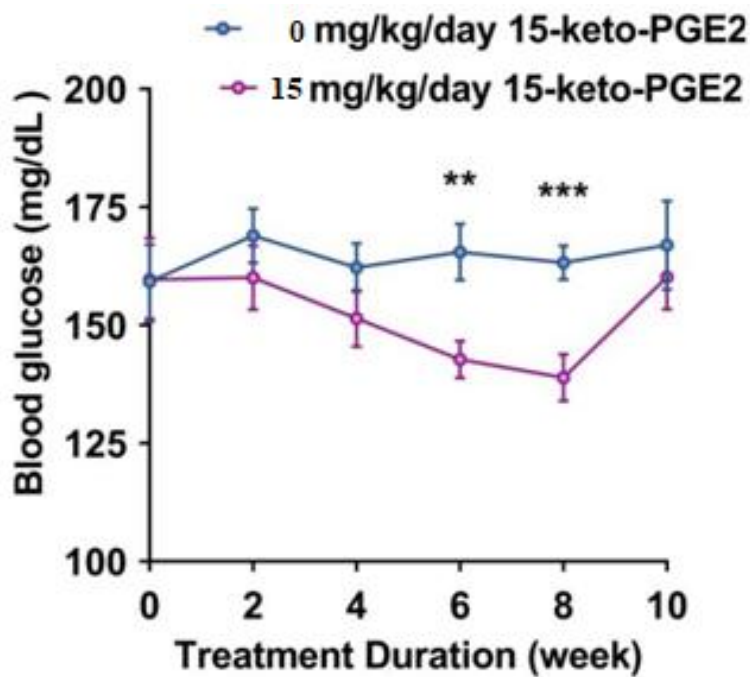


圖12、實驗組小鼠施打 15-keto-PGE2 與控制組各週的血糖比較
(註: *代表 P-value<0.05, **代表 0.01<p-value<0.05, ***代表 0.001<p-value<0.01)(來源:作者自繪)

3. **身體組成**：在注射 15-keto-PGE2 小鼠 10 週後，測量小鼠的肌肉及脂肪重量。結果如圖13可看出小鼠的脂肪(fat)重佔體重的比例在實驗組相較於對照組平均低了 5.18%，肌肉(lean)重比例在實驗組平均高了 4.91%，兩者均達到統計顯著差異，顯示 15-keto-PGE2 有「降脂又同時增肌」的效果。
4. **握力**：結果如圖14，顯示實驗組的小鼠的握力比控制組平均高了 0.507 gf/g (握力的公克重(gf)/體重的公克數(g))，達到統計顯著差異，顯示 15-keto-PGE2 增進了小鼠的肌肉力量。

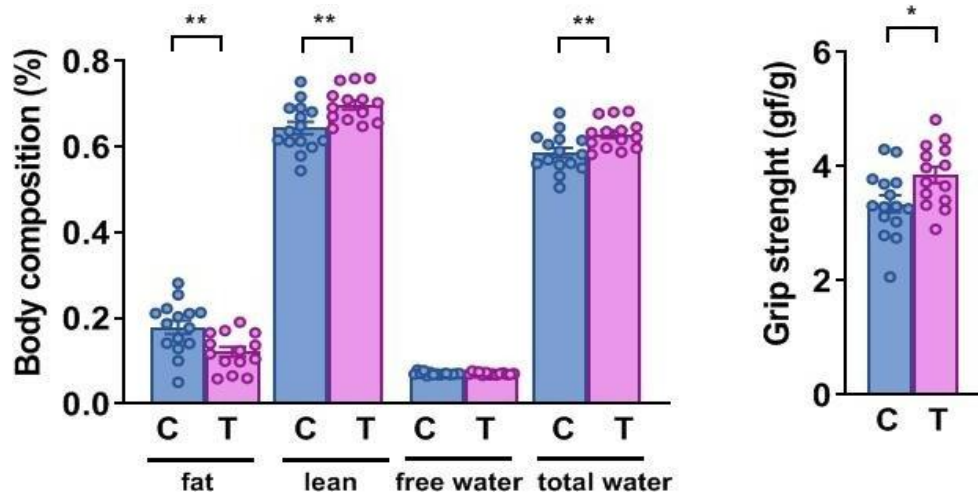


圖13(左圖)、實驗組及對照組在療程結束後小鼠的脂肪(fat)重量及肌肉(lean)重量佔體重比例的比較

(C:控制組、T:對照組)(來源:作者自繪)

圖14(右圖)、實驗組及對照組在療程結束後的握力(grip strength)比較(C:控制組、T 對照組)(來源:作者自繪)

六、探討 15-keto-PGE2 對小鼠的肌肉力量的影響

(一)方法：先將 30 隻 56 週大的小鼠(品系：C57BL/6J)以高脂高果糖飼料餵食(High Fat and high glucose diet)餵食，以引發高齡小鼠的肥胖型肌少症，依兩組的起始平均體重與血糖相等的原則，分為實驗組及對照組各 15 隻，在餵食高脂高果糖飼料 6 週後，實驗組小鼠每周注射六天 20mg/kg/day 濃度的 15-keto-PGE2(溶於微脂體中)，對照組施打無添加 15-keto-PGE2 的微脂體，共持續 7 個月，7 個月療程結束後進行跑步機測試。

(二)結果：以跑步機測試測量小鼠跑步的距離，如圖14，施打 15-keto-PGE2 的小鼠平均跑步距離較長，為 337.10 公尺，施打微脂體的對照組平均較短，為 185.44 公尺，兩組呈現統計顯著差異(p-value<0.0001)，顯示 15-keto-PGE2 增進了小鼠的肌肉耐力及力量。

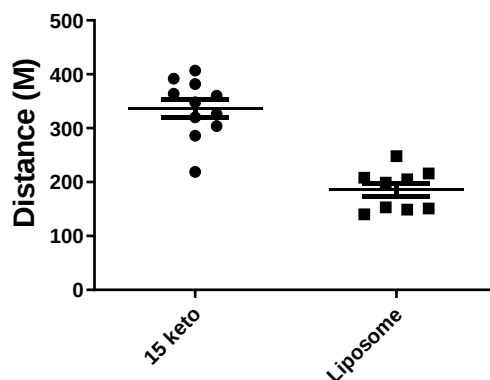


圖14、實驗組(15-keto)及對照組(Liposome)在療程結束後的跑步機測試距離比較(來源:作者自繪)

七、討論

我們在全基因組 RNA 定序結果中(表1)，發現施打 15-keto-PGE2 可促使 *Myod1* 及 *Mrf4* 基因的 mRNA 表現量大幅上升，根據前人研究，胚胎幹細胞(MSC)可透過 *Pax3* 及 *Pax7* 轉錄因子表現，活化基因表現，使其轉變為肌纖維前驅衛星細胞(satellite stem cells)，之後再由 *Myod1*、*Myf5*、*Myogenin* 及 *Mrf4* 等轉錄因子活化，讓肌纖維前驅衛星細胞再轉成肌纖維母細胞(myoblast) [35](圖15)。我們發現 *Myod1* 及 *Mrf4* 的轉錄因子 mRNA 表現量增加，推測應該是上游轉錄因子，如 *Pax3*、*Pax7* 向下調控所致。過去研究顯示，15-keto-PGE2 可能藉由共價鍵去結合 Cystine 胺基酸，改變了某些蛋白質的功能，所以我們根據結果推測，15-keto-PGE2 藉由與 *Pax3*、*Pax7* 轉錄因子結合，影響其蛋白質功能，進而增加了中下游的 *Myod1* 及 *Mrf4* 基因的 mRNA 的表現量，而後影響了下游與肌肉生成(myogenesis)、形成結構蛋白、調控肌肉收縮、形成運動終板的與肌肉相關功能基因 mRNA 表現量。

然而，之前的研究發現 15-keto-PGE2 能藉由共價鍵結合，影響 STAT3、NF-kB 途徑，抑制肌肉發炎，從而減少肌肉分解，並藉由 PPAR γ ，增進胰島素信息傳遞，而增進肌肉合成。然而我們尚未探討在實驗中發現的肌肉分化調節因子表現量上升現象的作用機轉，是否是經由 STAT3、NF-kB 及 PPAR γ 等路徑達成。我們也缺乏足夠的證據證實「15-keto-PGE2 會影響 *Pax3* 及 *Pax7* 轉錄因子功能」的猜想，我們期望能在之後的研究中陸續完成。

最後，根據前人研究，表觀遺傳調控劑 5-aza (5-Azacytidine，可抑制蛋白質甲基化)及 TSA(Trichostatin A，可抑制蛋白質去乙酰化)，能夠抑制 3T3-L1 脂肪前驅細胞在分化為成熟脂肪細胞過程中的脂肪生成 [36][37]，以及增加 C2C12 肌母細胞分化時的肌肉生成(myogenesis)(C2C12 細胞分化前為肌母細胞(myoblast)，經分化後會形成成熟肌肉組織，例如肌管(myotube)[38][39])，另外，5-aza 和 TSA 也能在小鼠活體內促進受損的肌肉再生[40][41]，因此在未來，我們會將 5-aza 以及 TSA 合併 15-keto-PGE2 施打到脂肪組織，觀察是否能夠更有效地增加肌肉功能相關基因的 mRNA 表現量，並觀察是否能更有效地改變小鼠的身體組成，使小鼠身體的脂肪比例下降，肌肉比例上升更明顯。

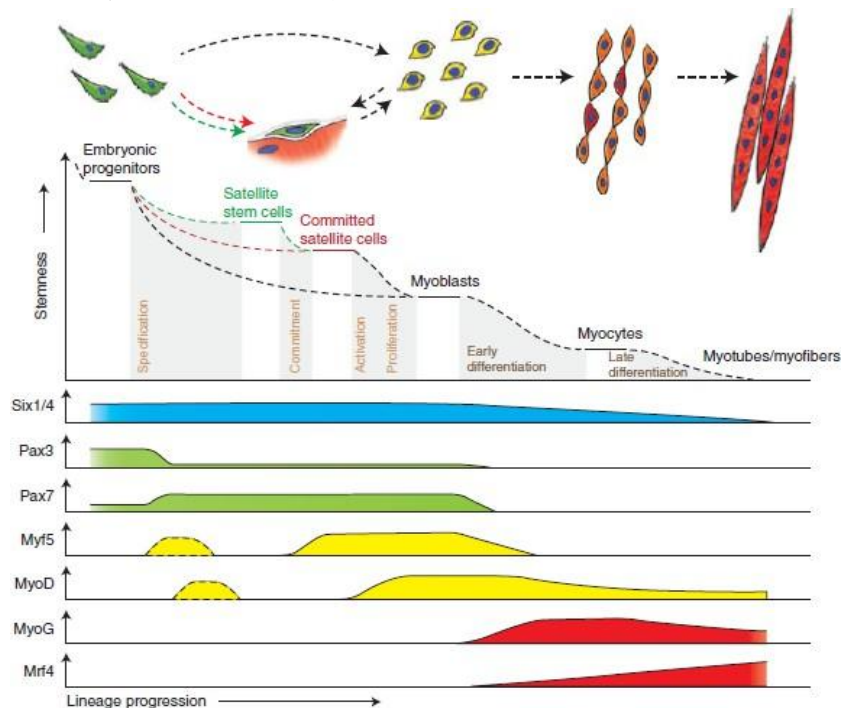


圖15、肌肉生成(myogenesis)過程中，由肌肉前驅細胞(embryonic progenitors)分化為肌肉組織的不同階段(lineage progression)中，作用的轉錄因子。satellite stem cells:衛星幹細胞; myoblasts:肌纖維母細胞; myocytes:肌細胞; myotubes:肌管細胞; myofibers:肌纖維細胞[35]

肆、結論與應用

根據前人的研究顯示，多元不飽和脂肪酸 15-keto-PGE2 能夠抑制肌肉發炎以及增加胰島素等肌肉生長因子信號傳遞，並減少脂肪。我們以 RNA 定序結果，透過分析轉錄體，證實 15-keto-PGE2 在小鼠活體內的皮下脂肪組織中，增加了相當多與肌肉相關功能基因的 mRNA 表現量，以及兩個參與脂肪分解的基因的 mRNA 表現量。並藉由 GSEA 生物路徑分析，顯示 15-keto-PGE2 高度引發了肌肉分化生長、形成肌肉結構蛋白、調控肌肉收縮以及形成運動終板等生物途徑。我們進一步以 15-keto-PGE2 處理脂肪前驅細胞的分化過程，透過 mRNA 表現量的差異分析，證實了 15-keto-PGE2 在體外細胞培養系統也能夠增加肌肉標誌基因轉錄。

最後透過實際測量小鼠的體重、血糖、身體組成、肌肉握力數值差異，發現 15-keto-PGE2 確實可以顯著地減少小鼠體內的脂肪比例、血糖，並增加肌肉的質量以及肌肉力量。我們的這些研究成果未來可以有助於同時解決肥胖和肌少症的問題，透過化學因子誘導基因表現，達到降脂轉肌，不但可以減少脂肪並可以增加肌肉的量，創造雙贏。

伍、參考文獻

1. Yuan S, Larsson SC. (2023). Epidemiology of sarcopenia: Prevalence, risk factors, and consequences. *Metabolism*, 144:155533.
2. Malenfant JH, Batsis JA. (2019). Obesity in the geriatric population - a global health perspective. *J Glob Health Rep*, 3:e2019045.
3. World Health Organization (June 9, 2021). Obesity and overweight. from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
4. Wei S, Nguyen TT, Zhang Y, Ryu D, Gariani K. (2023). Sarcopenic obesity: epidemiology, pathophysiology, cardiovascular disease, mortality, and management. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14:1185221.
5. Wei S, Nguyen TT, Zhang Y, Ryu D, Gariani K. (2023). Sarcopenic obesity: epidemiology, pathophysiology, cardiovascular disease, mortality, and management. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14:1185221.
6. Cava E, Yeat NC, Mittendorfer B. (2017) Preserving Healthy Muscle during Weight Loss. *Adv Nutr*, 8(3):511-519.
7. Perry BD, Caldwor MK, Brennan-Speranza TC, et al. (2016). Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 22:94-109.
8. Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, Nevitt M, Harris TB. (2002). Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and

- muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 57(5):M326-32.
9. Chang KV, Wu WT, Chen YH, Chen LR, Hsu WH, Lin YL, Han DS.(2023) .Enhanced serum levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and -6 in sarcopenia: alleviation through exercise and nutrition intervention. *Aging* (Albany NY), 15(22):13471-13485.
 10. Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E, Dela F, Pedersen BK.(2003). Circulating levels of TNF- α and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mech Ageing Dev.* ,124(4):495-502
 11. Li CW, Yu K, Shyh-Chang N, Li GX, Jiang LJ, Yu SL, Xu LY, Liu RJ, Guo ZJ, Xie HY, Li RR, Ying J, Li K, Li DJ.(2019). Circulating factors associated with sarcopenia during ageing and after intensive lifestyle intervention. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* ,10(3):586-600.
 12. Lu Y, Lim WS, Jin X, Zin Nyunt MS, Fulop T, Gao Q, Lim SC, Larbi A, Ng TP.(2022). Lower insulin level is associated with sarcopenia in community-dwelling frail and non-frail older adults. *Front Med* (Lausanne). , 9:971622.
 13. Jiang JJ, Chen SM, Chen J, Wu L, Ye JT, Zhang Q.(2022). Serum IGF-1 levels are associated with sarcopenia in elderly men but not in elderly women. *Aging Clin Exp Res.*,34(10):2465-2471
 14. Arner P, Rydén M.(2015). Fatty Acids,Obesity and Insulin Resistance. *Obes Facts* ,8(2):147-55.
 15. Al Saedi A, Debruin DA, Hayes A, Hamrick M.(2022). Lipid metabolism in sarcopenia. *Bone*, 164:116539.
 16. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y, Ozaki H.(2013). Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 26;110(13):5205-10.
 17. Maehara T, Nakamura T, Maeda S, Aritake K, Nakamura M, Murata T.(2019). Epithelial cell-derived prostaglandin D2 inhibits chronic allergic lung inflammation in mice. *FASEB J*, 33(7):8202-8210.
 18. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. (2012). Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature*, 29;461(7268):1287-91.
 19. Endo S, Suganami A, Fukushima K, Senoo K, Araki Y, Regan JW, Mashimo M, Tamura Y, Fujino H. (2012). 15-Keto-PGE2 acts as a biased/partial agonist to terminate PGE2-evoked signaling. *J Biol Chem*, 18;295(38):13338-13352.
 20. Bird JK, Troesch B, Warnke I, Calder PC.(2021) The effect of long chain omega-3 polyunsaturated

- fatty acids on muscle mass and function in sarcopenia: A scoping systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN*, 46:73-86
21. Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J.(2009) Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond)*, 116(1):1-16.
 22. Harmon GS, Dumlao DS, Ng DT, Barrett KE, Dennis EA, Dong H, Glass CK.(2010). Pharmacological correction of a defect in PPAR-gamma signaling ameliorates disease severity in Cfr-deficient mice. *Nat Med* ,16(3):313-8.
 23. Dekkers JF, van der Ent CK, Kalkhoven E, Beekman JM.(2012). PPAR γ as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Trends Mol Med*, 18(5):283-91.
 24. Chen IJ, Hee SW, Liao CH, Lin SY, Su L, Shun CT, Chuang LM.(2018). Targeting the 15-keto-PGE2-PTGR2 axis modulates systemic inflammation and survival in experimental sepsis. *Free Radic Biol Med*, 1;115:113-126
 25. Hee SW, Chang YC, Su L, Chen IJ, Jeng YM, Hsieh ML, Chang YC, Li FA, Liao D, Chen SM, Chuang LM.(2023). 15-keto-PGE2 alleviates nonalcoholic steatohepatitis through its covalent modification of NF- κ B factors. *iScience*, 22;26(10):107997.
 26. Lee EJ, Kim SJ, Hahn YI, et al. 15-Keto prostaglandin E2 suppresses STAT3 signaling and inhibits breast cancer cell growth and progression.
 27. Guadagnin E, Mázala D, Chen YW.(2018). STAT3 in Skeletal Muscle Function and Disorders. *Int J Mol Sci*, 19(8):2265.
 28. Ono Y, Saito M, Sakamoto K, et al.(2022). C188-9, a specific inhibitor of STAT3 signaling, prevents thermal burn-induced skeletal muscle wasting in mice. *Front Pharmacol*, 13:1031906.
 29. Tseng Y, Chuang L, Chang Y, et al.(2021). Increasing endogenous PPAR γ ligands improves insulin sensitivity and protects against diet-induced obesity without side effects of thiazolidinediones. *Research Square*.
 30. Xie WQ, He M, Yu DJ, Wu YX, Wang XH, Lv S, Xiao WF, Li YS. (2021). Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* .,12(3):538-554.
 31. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 25;102(43):15545-50.
 32. Ugo Basile. (2023). Treadmill – Interchangeable Lane Assembly for Mice and Rats. Ugo Basile. <https://ugobasile.com/products/categories/motory-coordination/treadmill-interchangeable-lane-assembly-for-mice-and-rats>
 33. National Library of Medicine, National Center for Biotechnonology information. (2024). Gene.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

34. Robert L.S. Perry, Michael A. Rudnick. (2000). Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, 5(3), 750–767.
35. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA.(2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1;4(2):a008342.
36. Yang X, Wu R, Shan W, Yu L, Xue B, Shi H.(2016). DNA Methylation Biphasically Regulates 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation. *Mol Endocrinol*, 30(6):677-87.
37. Michael Haberland, Michele Carrer, Mayssa H. Mokalled, Rusty L. Montgomery, Eric N. Olson. (2017). Redundant Control of Adipogenesis by Histone Deacetylases 1 and 2*, *Journal of Biological Chemistry*, 285(19):14663-14670.
38. Montesano A, Luzi L, Senesi P, Terruzzi I.(2013). Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts. *Int J Biol Sci*, 27;9(4):391-402.
39. Hagiwara H, Saito F, Masaki T, Ikeda M, Nakamura-Ohkuma A, Shimizu T, Matsumura K. (2011). Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances myogenesis by coordinating muscle regulatory factors and myogenic repressors. *Biochem Biophys Res Commun*, 414(4):826-31.
40. Ahmadi BM, Noori A, Ashtiani MK, Rajabi S, Talkhabi M. (2023). 5-Azacytidine incorporated skeletal muscle-derived hydrogel promotes rat skeletal muscle regeneration. *Cells Dev*, 173:203826.
41. Minetti, G., Colussi, C., Adami, R. et al. (2006). Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat Med* 12, 1147–1150 .

【評語】 090003

1. 創新性與重要性：

本研究探討了多元不飽和脂肪酸 15-keto-PGE2 在小鼠體內將脂肪組織轉化為肌肉組織的可能性，這是一個具有創新性和重要意義的研究方向。研究發現 15-keto-PGE2 不僅能減少肌肉慢性發炎，還能增加肌肉生長因子胰島素的敏感性，從而具有增加肌肉的潛力。這一發現為治療肥胖型肌少症提供了新的思路，可能對改善老年人的生活質量和健康狀況產生重大影響。

2. 研究優點：

該研究採用多種方法來驗證 15-keto-PGE2 的效果。首先，通過全基因組 mRNA 定序和基因表現路徑分析軟體 GSEA，研究團隊確認了 15-keto-PGE2 能夠顯著提高小鼠皮下脂肪中肌肉特異基因的表現量，並激活與肌肉分化、收縮和結構相關的生物路徑。其次，研究還在體外實驗中證實了 15-keto-PGE2 可以誘導脂肪前驅細胞 3T3-L1 中與肌肉生成相關的基因表現。最後，通過在老年肥胖型肌少症小鼠上的實驗，研究團隊成功驗證了 15-keto-PGE2 在體

內同時減少脂肪並增加肌肉量的效果，這一結果具有重要的臨床應用前景。

3. 待改進的部分：

本研究仍有一些方面需要進一步改進和深入研究。首先，研究缺乏對 15-keto-PGE2 誘導脂肪細胞向肌肉細胞分化的具體機制解釋。建議深入研究關鍵轉錄因子（如 MyoD、MyoG 等）或信號傳遞（如 Wnt/ β -catenin、Notch）在這一過程中的作用，並使用基因剔除或過表達技術來驗證 15-keto-PGE2 的作用機制。其次，研究僅分析了基因的 mRNA 表現，未進行蛋白質水平的驗證。建議加入蛋白層面的驗證（如 Western blot 或免疫組化分析），以確保 mRNA 表現與蛋白功能一致。此外，研究中存在一些專業術語的使用錯誤，如將半胱氨酸（cysteine）誤寫為 cystine，以及 COX2 的作用描述不準確等，這些細節需要在未來的研究報告中加以修正。