

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	090015
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	以果蠅建立單純型表皮水皰症(EBS)模型、建立藥物篩選流程並以雙醋瑞因(Diacerein)進行測試
得獎獎項	三等獎 體外生物學協會獎

就讀學校	高雄市立高雄女子高級中學
指導教師	張純純 呂雲瑞
作者姓名	黃昀蓁 卓伶恩 余亦甯

關鍵詞	<u>單純型遺傳性表皮分解性水泡症（EBS）、果蠅疾病模型、藥物篩選程序</u>
-----	--

作者簡介



我們是來自高雄女中的卓伶恩、黃昀蓁及余亦甯，有幸能在高一時進入成功大學張純純老師和中山大學張玉泉教授的實驗室進行研究，感謝一路上張純純老師、張玉泉老師、林妍妍學姊以及所有實驗室學長姊的幫助，很榮幸能有這次參加國際科展的機會，希望未來能繼續在科學領域學習、進步並做出貢獻。

研究報告封面

2025年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：南區

科別：醫學與健康科學

作品名稱：以果蠅建立單純型表皮水泡症（EBS）模型、
建立藥物篩選流程並以雙醋瑞因（Diacerein）進行測試

關鍵詞：單純型遺傳性表皮分解性水泡症（EBS）、果蠅
疾病模型、藥物篩選程序

編號：

（編號由國立臺灣科學教育館統一填列）

中文摘要

遺傳性表皮分解性水泡症（EB）是種罕見疾病，因突變使角蛋白異常，造成表皮組織脆弱易形成水泡，單純型水泡症（EBS）是最常見的類型。此計畫旨在：（一）建立果蠅EBS疾病模型；（二）探討溫度對病徵的影響；（三）以此果蠅EBS疾病模型發展藥物篩選平台。初步使用Diacerein測試，評估對EBS症狀的改善效果。

目前顯示突變角蛋白K5/K14^{R125C}會形成積聚體，與正常K5/K14形成的角蛋白網絡不同；全程25°C培養，約32%果蠅翅膀有水泡，亦符合EBS病徵。篩藥平台建置已完成色素和溶劑DM SO劑量測試，初步顯示Diacerein有助病徵緩解。目前將擴大統計不同溫度對 EBS果蠅死亡率、水泡發生率和角蛋白積聚形成比例。希望以本研究建立的果蠅EBS疾病模型與篩藥平台，能為罕見遺傳疾病療程開發奠定基礎。

英文摘要

Hereditary epidermolysis bullosa (EB) is a rare genetic skin disorder caused by mutations in keratin or other structural proteins, leading to extremely fragile skin that easily forms blisters. There is no cure for EB currently. Epidermolysis bullosa simplex (EBS), the most common subtype, accounts for about 70% of all EB cases and thus is the focus of this study. This research has three main objectives: (1) to establish a simple EBS disease model using *Drosophila*; (2) to explore the correlation between temperature and EBS symptoms by conducting heat shock experiments on different developmental stages of *Drosophila*, as described by the EB Patient Association that the EBS symptoms become more severe in high temperature; and (3) to develop a drug screening platform using this *Drosophila* EBS disease model, starting with Diacerein to assess its effectiveness in improving EBS symptoms.”

The confocal microscopy results showed that the mutant keratin K5/K14^{R125C} will form aggregates, while the normal one K5/K14 will form keratin networks. At a constant temperature of 25°C, about 32% of fruit flies had blisters on their wings, which is also consistent with the EBS symptoms. The drug screening platform has completed dosage testing for pigment and solvent DMSO, with initial results indicating that Diacerein may help alleviate symptoms. Currently, the study will expand to statistically assess the effects of different temperatures on mortality, blister formation rate, and keratin aggregation in EBS fruit flies. This research aims to establish a fruit fly EBS disease model and drug screening platform that can lay the groundwork for developing treatments for rare genetic diseases.

壹、前言

一、研究動機

皮膚是人類最大的器官，他使我們可以感觸這個世界，同時作為免疫系統的第一道防線，不讓病原體入侵。日常生活中，當我們不小心受傷了、割到手了，那些傷口都讓我們痛苦不已，尤其是洗澡時很不方便，傷口碰到水時疼痛難忍。但世界上有一種疾病，他們承載的艱苦是大部分人從未有過的，病人的身上充滿水泡，一不小心水泡破裂便會使得傷口遍佈全身，每日每夜重複這些事情，讓人心疼。他們只能靠一些舒緩的敷料來減少不適感，但更換敷料時也是一件風險極大的過程，因為也有可能造成損傷皮膚。這些病人就是遺傳性表皮分解症（Hereditary Epidermolysis Bullosa, EB）的罹患者。

遺傳性表皮分解性水泡症（Hereditary Epidermolysis Bullosa），簡稱EB，俗稱泡泡龍，是一種因負責製造皮膚組織間連結成分的角度蛋白基因產生突變，而造成的罕見遺傳性疾病，形式多為體染色體顯性遺傳。此疾病發生機率為1/17000，全球每百萬人中有9人罹患。根據組織病理學，依水泡破裂位置可分為三大類：單純型（EB Simplex）、接合型（Junctional EB）、失養型（Dystrophic EB）。

其中，單純型水泡症是EB中最常見的類型，簡稱EBS，約佔所有EB病例的70%~80%，故本研究針對此類型加以探討。單純型水泡症主要是由基底表皮角質細胞中角蛋白5（K5）和角蛋白14（K14）基因突變引起。又K5和K14上的基因為形成基底表皮角質細胞之中間絲（IF）網絡的基礎，最後使表皮無法正常被固定而在外力作用下形成水泡。然而，這些角蛋白基因的突變如何造成EBS和其他角蛋白疾病的作用機制尚不明瞭。

果蠅在遺傳學中為常見的模式生物。利用果蠅作為模式生物來研究EBS的機制具有多方面的優勢，例如果蠅與人類之間具有高度重疊的基因、果蠅不具有角蛋白，可提供生理的空白環境、果蠅適合篩藥...等。

在我們選定了這個主題後，有老師問我們為什麼不去研究癌症反而選擇這種罕病，因為目前有很多醫療團隊在研究癌症，且癌症只要勤加檢查，在早期發現痊癒的可能性都很高，反觀EB，研究此疾病的人少，就算早早確認了病況，但由於是基因的缺陷，他們也很難痊癒，雖說EB是罕見疾病，但罹患的人不在少數，光是台灣就有400~500個家庭，因此我們認為這是個對那些病人、社會有幫助的研究。

EBS病友在生活上經歷了許多不便，輕微的摩擦便會造成皮膚的損傷、每天更需要花數個小時換敷料，較嚴重的病症則有可能在口腔、食道等皮膜組織產生水泡，連吞食都難以進行。不僅社會對EBS的認識不多，甚至連醫界都陌生，但世界上依然有很多人因他而受難。病友們的治療需求更是此研究的主要動機之一。我們以果蠅作為模式生物，探討K5、K14及其突變基因K14^{R125C}運作機轉以及對個體的影響，更希望能藉此找出能緩解病友不適感的敷料配方及治療方法。

二、研究目的

(一) 以果蠅建立表皮水泡症EBS的疾病模型

1. 模式生物的選用
2. 基因轉殖方法

(二) 探討溫度對於EBS疾病表徵的影響

1. 探討果蠅不同生長階段以相同頻率加溫對EBS表現的影響
2. 探討不同溫度於果蠅相同生長階段對EBS表現的影響

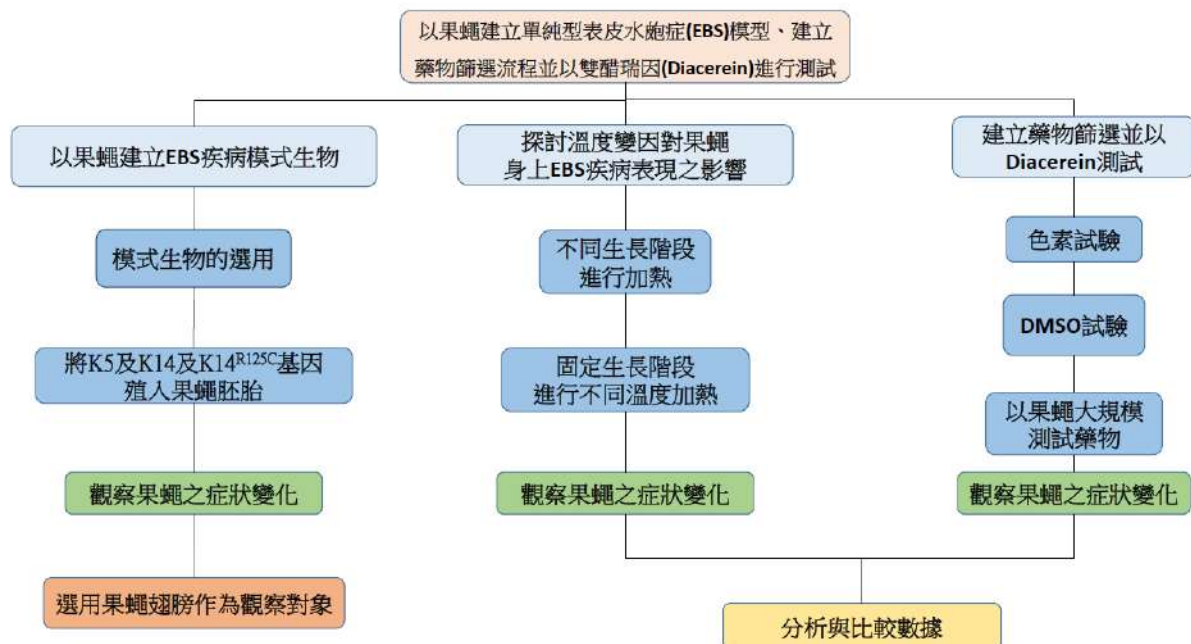
(三) 測試以Diacerein藥物減緩EBS疾病表現

1. 探討藍色食用色素於果蠅幼蟲的顯色程度與致死率
2. 探討二甲基亞砜(DMSO)於果蠅幼蟲的適用劑量
3. 探討Diacerein藥物於果蠅的適用劑量及對EBS表現的影響

三、研究問題

- (一) EBS致病基因於果蠅上皮細胞的表現機制是否和人類具有高度相似性？
- (二) 不同加熱時程與不同溫度對於果蠅翅膀水泡發展影響為何？
- (三) 何種色素劑量使果蠅食用後能穩定顯色而不造成過高致死率？
- (四) 何種濃度的DMSO既能溶解藥物也不會造成果蠅過高致死率？
- (五) Diacerin 藥物是否有助於緩解EBS疾病表現？作用機制與效果為何？

四、研究架構圖



五、文獻回顧

（一）遺傳性表皮分解性水泡症（Hereditary Epidermolysis Bullosa）

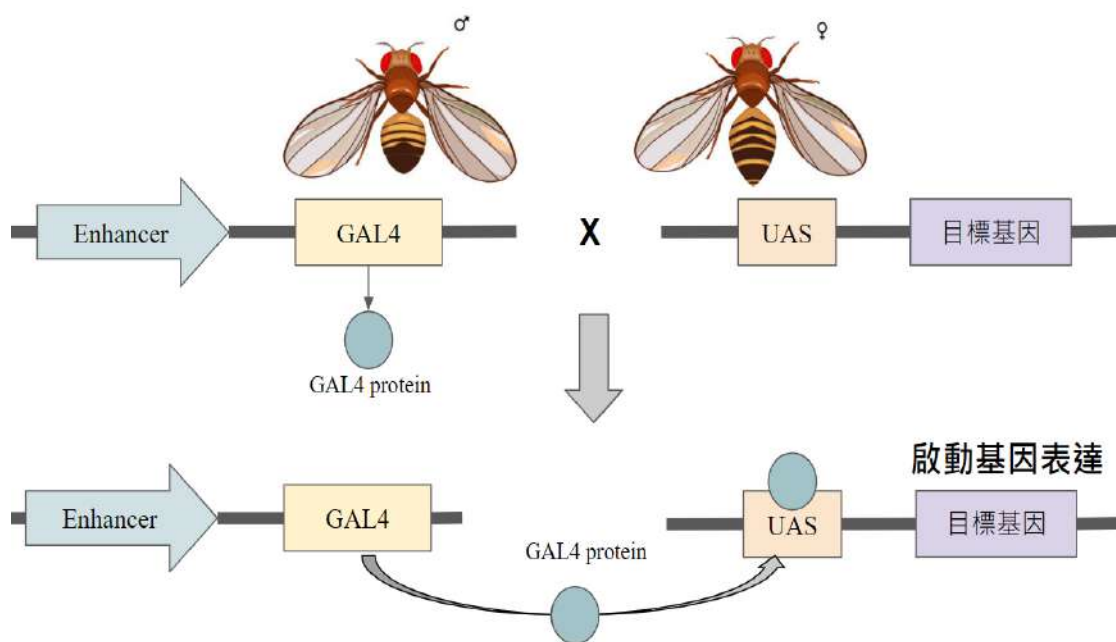
遺傳性表皮分解性水泡症（Hereditary Epidermolysis Bullosa），簡稱EB，俗稱泡泡龍，是因為負責製造維繫皮膚組織間連結成分的基因產生突變的罕見遺傳性疾病，發生機率為1/17000，形式多為體染色體顯性遺傳。根據組織病理學，依水泡破裂位置可分為三大類：單純型（EB Simplex）、接合型（Junctional EB）、失養型（Dystrophic EB）。

首先，接合型水泡症（JEB）在所有EB病例中的比例大約占20%，水泡形成於表皮層和真皮層間的連接區。在JEB中，因為LAMA3、LAMB3、LAMC2等基因突變，影響了肌聯蛋白與膠原蛋白的作用，導致了表皮基底膜與表皮細胞之間連接的缺陷，導致表皮層上表皮細胞無法穩固地附著在基底膜上。失養型水泡症（DEB）則在所有EB病例中大約占15%，水泡形成於真皮層，是最嚴重的EB類型。DEB主要成因是因為COL7A1基因的突變，這個基因編碼支撐表皮基底膜的膠原蛋白：Ⅶ型膠原蛋白，表皮基底膜幫助維持表皮細胞與基底膜的黏合，而當Ⅶ型膠原蛋白異常時，皮膚的基底膜脆弱，表皮細胞與基底膜會容易分離。

單純型水泡症是EB中最常見的類型，簡稱EBS，約佔所有EB病例的70%-80%，故本研究針對此類型加以探討。單純型水泡症主要是由於基底表皮細胞中的角蛋白5（K5）和角蛋白14（K14）的製造基因KRT5和KRT14突變引起，又K5和K14為形成基底表皮角質細胞之中間絲（intermediate filament, IF）網絡的基礎，故角蛋白K5或K14基因發生突變（如K14^{R125C}突變）時，便無法正常組裝為穩定的細絲網絡。這些錯誤摺疊的角蛋白在細胞質內聚集，形成異常的角蛋白聚集體（keratin aggregation）。這些聚集體影響細胞的結構完整性，導致細胞對機械壓力的脆弱性增加，亦會使得細胞崩解、表皮無法正常被固定而在外力作用下形成水泡。然而，這些角蛋白基因的突變如何造成EBS和其他角蛋白疾病的作用機制尚不清楚，更不知道是由於蛋白質功能的喪失或是增益導致病狀的表現。

（二）UAS-GAL4 system

UAS-GAL4系統是一種常用於研究果蠅等生物體中基因表現的方法，適合應用於觀察特定基因表現的成果。其中，UAS代表 "Upstream Activating Sequence"，為一種特殊的基因序列，可被人工轉移入欲研究基因的上游。而GAL4為一種由酵母菌而來轉錄因子（transcription factor），可促進目標基因的轉錄。當UAS與GAL4結合後，便可活化目標基因的表現。UAS-GAL4系統的運作模式為利用基因轉殖技術，讓雌雄果蠅其中一方帶有GAL4，另一方則帶有欲表現的基因和UAS序列，兩者交配產生的子代在UAS 與 GAL4結合後，便可表現目標基因。



圖一：UAS-GAL4 system 運作示意圖
(出處：自行繪製)

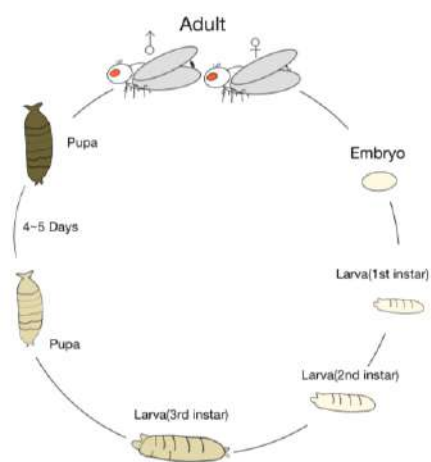
(三) 黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*)

黑腹果蠅的相對世代時間短，在25°C時約2~3週即可完成一生命週期，分別為：卵期、幼蟲期（一齡~三齡）、蛹期、成蟲，並能在十天之內完成一次繁殖，產出400~1000隻子代。由於現代分子遺傳學的研究主要是靠親代交配，進而獲得欲研究的目標基因型子代，觀察子代的表現型，即可知該基因對表現型的影響，引此果蠅容易繁衍、生長快速的特性便常用於基因的研究中，作為模式生物。

此外，果蠅僅有四對（八條）的染色體，約含14000個基因。果蠅的基因簡單，具又易轉殖、剔除或活化的特性。此外，約有50%的果蠅基因可在哺乳類中發現其同源基因，更有75%的人類疾病基因在果蠅中能找到相似序列。(Tolwinski, 2017)



圖二：野生型母果蠅與公果蠅

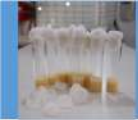
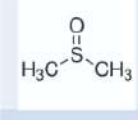


圖三：果蠅於25°C之生命週期

（出處：Basic Science Methods for Clinical Researchers by Morteza Jalali, p.212/自行繪製）

貳、研究方法或過程

一、研究器材

				
果蠅食物	二氧化碳氣瓶	食用色素 藍色一號	恆溫槽	雙醋瑞因 Diacerin
				
二甲基 亞砒 (DMSO)	解剖 顯微鏡	物鏡 測微器	磷酸鹽緩衝 生理鹽水 (PBS)	共軛焦 顯微鏡 NCKU-Carl Zeiss LSM 780 laser-scanning microscope

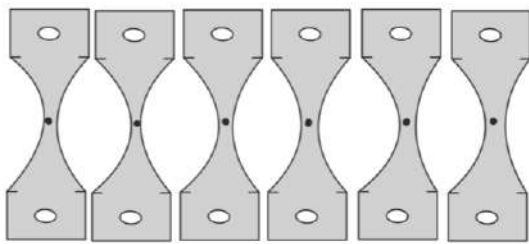
各基因型果蠅	簡介
K14 ^{R125C} ; K5/ K14 ^{R125C} ; K5	帶有UAS序列和人類EBS突變角蛋白基因，但表現量極低
K14YFP; K5/ K14YFP; K5	帶有UAS序列和正常人類角蛋白基因，但表現量極低
actGAL4; Dr/ S-T	帶有轉錄因子actGAL4，在和UAS結合後便可促進目標基因表現
W ¹¹¹⁸	帶有白眼基因，其餘基因和野生型果蠅相同

藥劑名稱	簡介
para-formaldehyde	4% para-formaldehyde (PFA，多聚甲醛溶液)
PBST	以水為溶劑配置1X PBS、0.3% Triton X-100
一級抗體	抗體 anti-K5 (Rabbit) 標記K5角蛋白、抗體 anti-LaminD (Mouse) 標記細胞核膜
二級抗體	Alexa Fluor™488 anti-rabbit (螢光綠色) Alexa Fluor™568 anti-rat (螢光紅色)

二、以果蠅建立表皮水泡症EBS的疾病模型

（一）模式生物的選用：

我們選用果蠅作為觀察EBS疾病表現的模式生物。由於果蠅細胞不具有能製造角蛋白的基因，故我們先轉殖正常人類角蛋白K5、K14，和EBS致病基因K5、K14^{R125C}至果蠅中，發現部分帶有致病基因的果蠅翅膀會出現水泡，此症狀符合EBS病徵的常見表現。因為果蠅翅膀是由上皮細胞層構成的雙層膜狀結構，類似於人類上皮組織的結構。果蠅翅膀發育過程中，細胞之間會藉由組織液的填充以幫助翅膀展開並固定其形狀，隨著組織液填充完畢、翅膀完全展開，組織液被重新吸收後，翅脈即硬化，提供翅膀必要的結構支持。若果蠅翅膀的表皮接合異常，組織液填充後便會形成水泡，即可模擬人類EBS病症的情形。（如圖四）



正常翅膀狀況



表皮黏合不全造成水泡

圖四：果蠅翅膀上下表皮接合情形對照圖

（出處：自行拍攝及繪製）

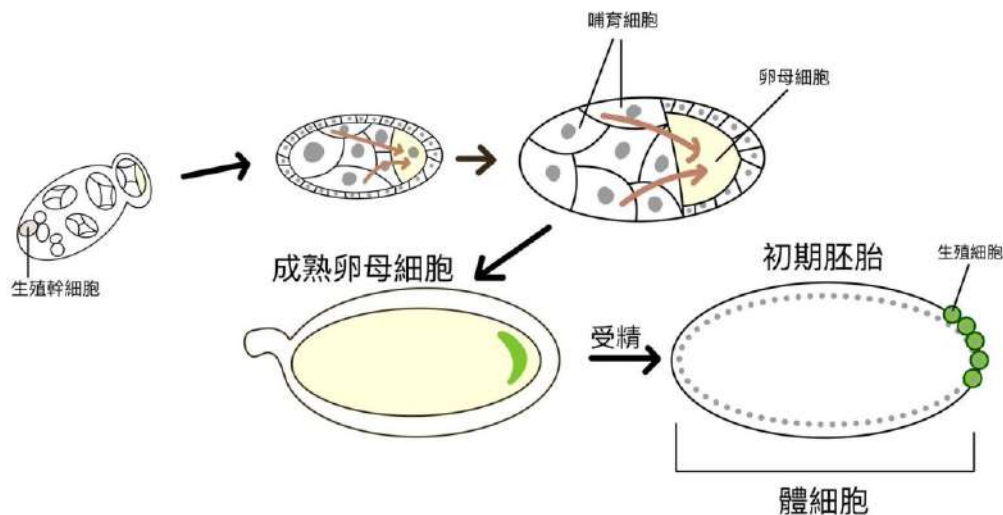
（二）基因轉殖方法：

我們利用微注射技術將K5、K14 和 K14^{R125C} 基因轉殖到果蠅體內，並結合UAS-GAL4系統來精確調控這些基因的表現。

微注射是一種廣泛應用於基因轉移的技術，能夠將外源基因直接導入目標細胞中。將目標基因精確注射到果蠅早期胚胎的生殖細胞區域。這個區域是將來發展成生殖細胞的地方，通過針對這些細胞進行注射，我們可以確保外源基因不僅僅是表現在個體的體細胞中，也能夠遺傳給後代。

1. 將目標基因微注射到果蠅胚胎的極細胞內：

果蠅胚胎的早期發育階段特徵是快速的細胞核分裂，這些分裂發生時並沒有伴隨著細胞分裂，因此果蠅初期的胚胎會形成一個多核細胞，在這個多核細胞分裂成單核細胞之前，果蠅胚胎中的極細胞會脫落，變成生殖細胞，因此，為了使果蠅子代能穩定遺傳目標基因，其必須吸收到注定成為生殖細胞的極細胞中。

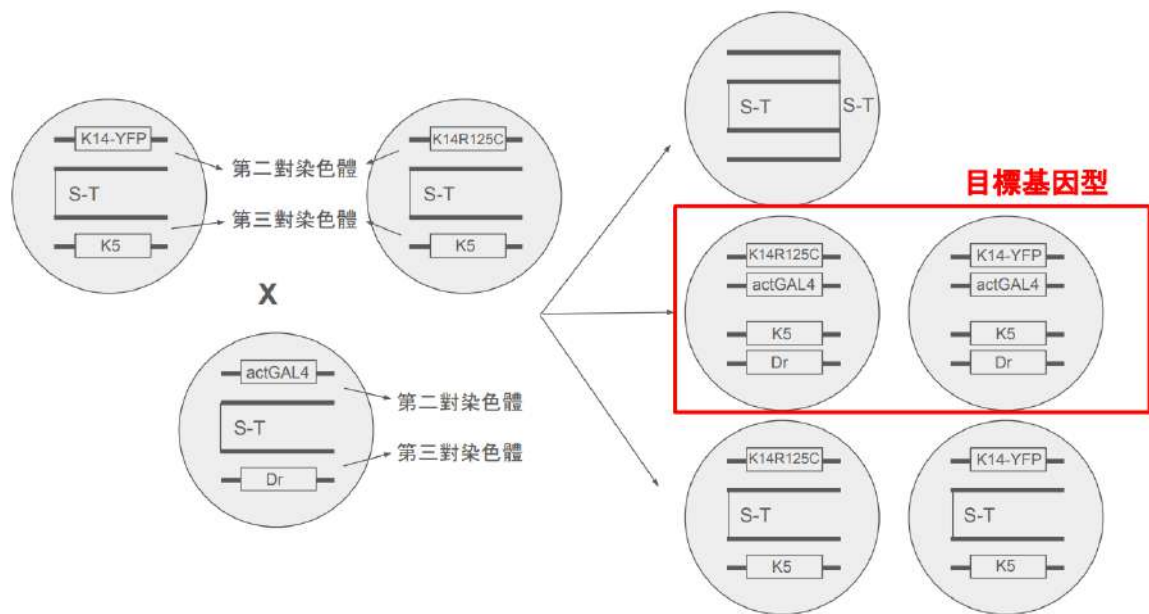


圖五：果蠅胚胎成長示意圖

（出處：自行繪製）

2. 將帶目標基因生殖細胞的果蠅和帶有GAL4的果蠅交配繁殖：

我們分別將帶有目標基因的果蠅（K14^{R125C}; K5/ K14^{R125C}; K5）和人類正常角蛋白基因（K14YFP; K5/ K14YFP; K5）的果蠅和帶能製造轉錄因子actGAL4的果蠅（actGAL4; Dr/ S-T）進行交配，透過子代身上的性狀（如：目標基因型的果蠅，具有Dr這項水滴眼的基因標記）便可篩選出能表現突變角蛋白基因（K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr）和人類正常角蛋白基因（K14YFP; K5/ K14YFP; K5）的果蠅。



圖六：果蠅交配所得之子代基因型與目標基因型子代
(出處：自行繪製)

3. 辨識子代是否遺傳目標基因：

根據上圖，只要該果蠅帶有目標基因（即 K14^{R125C}; K5/actGAL4; Dr），都攜帶Dr這個標記基因，會有水滴眼的表現（如圖七）。因此在觀察子代時，只要看到小眼睛的果蠅，就可以確定它們攜帶我們的目標基因型。

如果我們需要在幼蟲期辨識將進行後續實驗的果蠅，可以藉由S-T中TM6B的標記觀察。攜帶TM6B的果蠅幼蟲和蛹會呈現較短的型態。因此在篩選時，只要觀察到長的幼蟲和長蛹，就可以確定它們攜帶目標基因型。



圖七：
基因型K14R125C; K5/ actGAL4 Dr
且有表現EBS水泡病徵的果蠅
(出處：自行拍攝)

（三）觀測轉殖角蛋白基因隻果蠅唾腺細胞：

EBS病患因其角蛋白基因突變，無法正常形成角蛋白網絡，而是形成角蛋白聚集體（keratin aggregation）。在將人類正常及突變角蛋白分別移植入果蠅後，我們利用細胞免疫螢光染色技術（Immunofluorescence, IF）之間接法。間接法先利用一級抗體（Primary Antibody）和抗原結合，再將帶有螢光的二級抗體（Secondary Antibody）結合至一級抗體上。因為一個一級抗體可結合多個二級抗體，故採用間接法可節省一級抗體，並達到訊號放大的效果。我們標定果蠅唾腺細胞中的轉殖基因角蛋白，並使用共軛焦顯微鏡觀測。以下為使用果蠅唾腺細胞觀測角蛋白於細胞中狀態的流程：

1. 解剖（Dissection）：解剖果蠅三齡幼蟲，取出其唾腺細胞

我們於解剖顯微鏡下固定果蠅三齡幼蟲尾端，使用尖細鑷子從其口器向外拉出，剔除周邊組織（例如脂肪）後即可得兩片唾腺組織。（如圖八）



圖八：三齡幼蟲的唾腺組織（兩側半透明橢圓狀區域）

（出處：自行拍攝）

2. 固定（Fixation）：加入固定液放置15~20分鐘

使用4% para-formaldehyde（PFA，多聚甲醛溶液）固定液，將唾腺細胞浸入其中靜置10分鐘，以固定細胞的型態。

3. 洗滌（Washing）：使用PBST洗滌唾腺細胞

以水為溶劑配置1X PBS、0.3% Triton X-100作為洗滌液，清洗三次，每次10分鐘。

4. 加入一級抗體（Primary Antibody）

我們使用抗體 anti-K5（Rabbit）來標記K5角蛋白、抗體anti-LaminD（Mouse）來標記細胞核膜，置於4℃一天。

5. 洗滌（Washing）：使用PBST洗滌唾腺細胞

以水為溶劑配置1X PBS、0.3% Triton X-100作為洗滌液，清洗三次，每次10分鐘。

6. 加入二級抗體（Secondary Antibody）

加入Alexa Fluor™488 anti-rabbit和Alexa Fluor™568 anti-rat此兩種二級抗體來辨識一級抗體，染上螢光綠色與螢光紅色，並靜置搖晃 1小時。

7. 洗滌（Washing）：使用PBST洗滌唾腺細胞

以水為溶劑配置1X PBS、0.3% Triton X-100 作為洗滌液，清洗三次，每次10分鐘。

8. 封片（Blocking）：使用70%之甘油進行封片

9. 使用共軛焦顯微鏡（Confocal microscopy）進行觀測

三、探討溫度對於EBS疾病表徵的影響

根據EB病友協會所述，EB患者傷口發炎的症狀和環境溫度存在正相關。這表示外界環境溫度在一定程度上會影響EB患者的健康狀況。基於此，我們計劃透過改變溫度變因，探討溫度對於EBS患者表徵的影響，以及找出最適合模擬患者狀況的果蠅生存環境。

（一）探討果蠅不同生長階段以相同頻率加溫對EBS表現的影響

1. 實驗目的

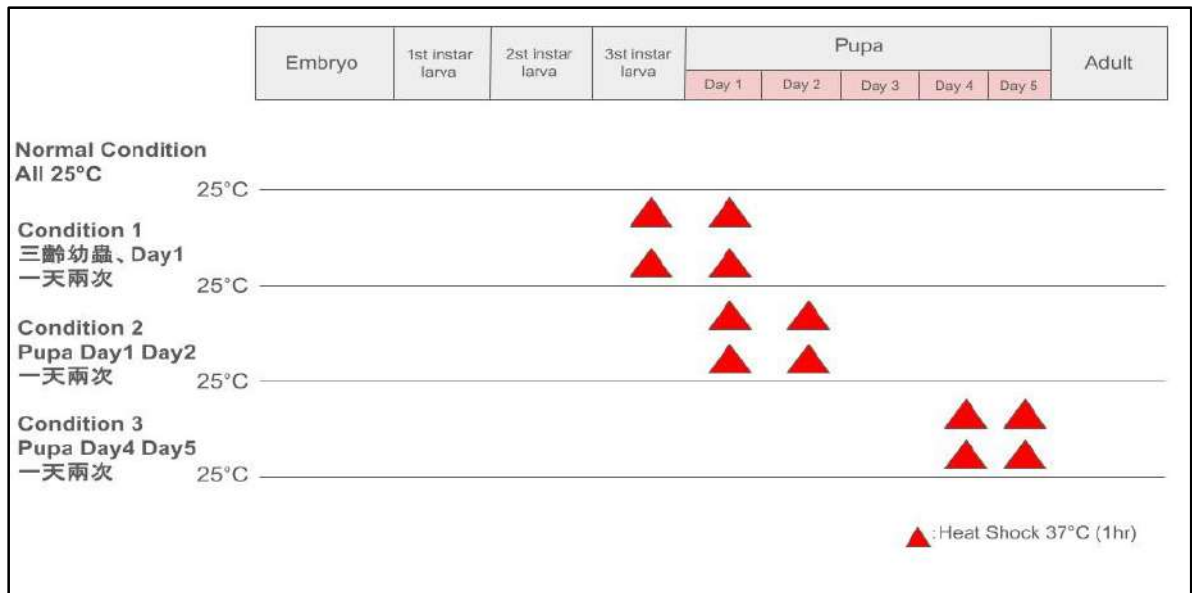
我們欲找出在果蠅生長過程中，在哪一個階段進行加溫，水泡出現比率可達明顯、穩定，以便後續實驗觀測其病徵的惡化與緩解。由於果蠅的翅膀形成主要發生在其蛻變階段，在蛹中羽化後，翅膀是皺縮和柔軟的，這時體內的組織液流入翅膀，使其展開並張開成完整的形態。最終，翅膀內的翅脈硬化，成為支持果蠅飛行的結構。這個過程大約需要數小時，翅膀從折疊狀態逐漸成形。因此我們分別設計三個實驗組與定溫25°C之對照組，來探討於果蠅幼蟲末期與蛹期不同階段加溫對於其翅膀水泡形成的影響（見表一）

2. 實驗方法

由於果蠅的適合生存溫度為8°C~33°C，故放置於37°C時時間不可過長。我們選擇將不同時期之幼蟲和蛹每日以37°C加溫2次，每次持續1小時，其餘時間皆於25°C養殖，並觀察其在各個生長階段的羽化率、病徵表現程度等型態變化及反應。下表與下圖為本實驗所選擇的加熱時程及溫度示意圖。

表一：探討於果蠅幼蟲末期與蛹期不同階段加溫的影響的實驗設計

組別名稱	實驗情形
對照組	於定溫25°C養殖
實驗組 1	於幼蟲末期、蛹期第1日，每日以37°C加溫2次，每次持續1小時，其餘時間皆於25°C養殖
實驗組 2	於蛹期第1日、第2日，每日以37°C加溫2次，每次持續1小時，其餘時間皆於25°C養殖
實驗組 3	於蛹期第4日、第5日，每日以37°C加溫2次，每次持續1小時，其餘時間皆於25°C養殖

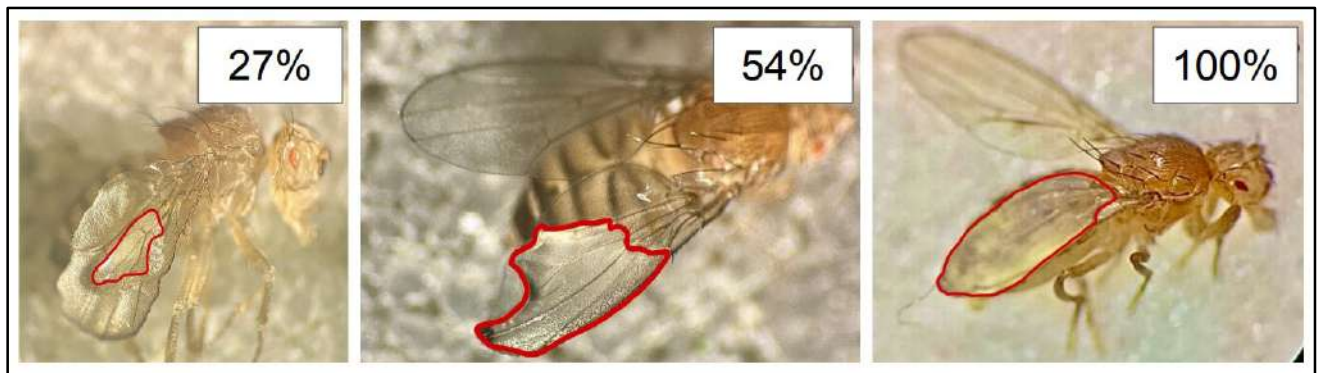


圖九：本實驗所選擇的加熱時程及溫度示意圖

（出處：自行繪製）

3. EBS 病徵嚴重程度分級

本實驗主要以果蠅翅膀產生的水泡來作為判斷EBS疾病表現的依據，故須制定一套統一的標準來量化病徵嚴重程度，有利於此疾病模型標準作業流程的建立。我們使用ImageJ計算果蠅翅膀依其水泡分布面積占總面積的比例，分成四個等級：無水泡、水泡比率小於50%、大於50%即100%。



圖十：K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr 之水泡表現及分級示意圖

（出處：自行拍攝與分析後製）

（二）探討不同溫度於果蠅相同生長階段對EBS表現的影響

1. 實驗目的

為了模擬病患在不同溫度環境下EBS疾病表現狀況，我們會採用上述實驗中，羽化率和水泡比率穩定的組別進行不同溫度的加熱。觀察果蠅在相同生長階段下的羽化率及水泡形成的變化，從而更好理解不同溫度對EBS疾病表現的影響。並希望能提供對EBS病患病情變化的預測指標，並為EBS病人適合的環境提供實驗依據，進而提升對患者的生活舒適程度和治療策略。

2. 實驗方法

我們預計會採用上述實驗中，羽化率和水泡比率穩定的組別，分別進行：33°C、35°C、37°C 每日加溫2次，每次持續1小時，其餘時間皆於25°C養殖；以及全程置於29°C養殖。

四、測試以Diacerein藥物減緩EBS疾病表現

為了發展藥物篩選，我們須先建立一套統一的藥物篩選程序。首先，添加色素以便讓研究者辨認果蠅幼蟲是否有攝入藥物；接著，須測試果蠅對藥物溶劑DMSO的耐受劑量；最後，便是進行不同的藥物測試。在本研究中，我們選用Diacerein作為我們初步篩藥的對象。

（一）探討藍色食用色素於果蠅幼蟲的顯色程度與致死率

1. 實驗目的

為了確保果蠅幼蟲能夠有效攝入藥物，我們進行了本色素實驗作為藥物篩選實驗的前測。本實驗的主要目的是尋找顯色效果良好且不會對果蠅的健康狀況造成不良影響的色素劑量。並確定色素、水和果蠅食物之間的最佳調配比例，以便更準確地監控幼蟲的攝食情況。在嘗試了四種顏色的食用色素後，我們選用了最能以肉眼觀察出效果的藍色食用色素來進行實驗。

2. 實驗方法

我們添加不同劑量之藍色食用色素來重新調製果蠅食物，並將果蠅的w1118野生型一齡幼蟲夾入調製好的食物中。待果蠅成長到三齡幼蟲時，將其夾出並用磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)洗去其表面殘留的食物殘渣，置於解剖顯微鏡下觀察其顯色情形並計算該濃度的死亡率。本實驗選用之色素劑量如下表。

表二：藍色色素與果蠅食物調製比例

	對照組	實驗組1	實驗組2	實驗組3
果蠅食物	4000 μ L	4000 μ L	4000 μ L	4000 μ L
藍色色素	0 μ L	20 μ L	60 μ L	100 μ L

（二）探討二甲基亞砷(DMSO)於果蠅幼蟲的適用劑量

在藥物篩選和生物學實驗中，二甲基亞砷（DMSO）是常用的溶劑，適合溶解疏水性化合物。由於許多藥物難以直接溶解於水，因此DMSO成為實驗中不可或缺的工具。在後續的藥物篩選過程中，我們使用DMSO作為Diacerein的溶劑。然而，DMSO本身可能對實驗對象（例如果蠅等生物體）產生毒性作用，因此進行DMSO的毒性測試是必要的。

本測試的目的是確定DMSO對於果蠅的安全劑量，即為能有效溶解目標藥物且不會對果蠅的健康造成影響的溶劑濃度，以確保在後續的篩藥過程中，藥物對果蠅產生的效果僅來自於Diacerein本身，而不是DMSO的副作用。

（三）探討Diacerein藥物於果蠅的適用劑量及對EBS表現的影響

我們選用Diacerein進行初步藥物試驗，中文名稱為雙醋瑞因，屬於蔥醌類化合物。由於部分EB患者的白血球介素-1 β （IL-1 β ）水平較高，因此認為白血球介素-1 β 和角蛋白的積聚、水泡有一定的關聯性，Diacerein正好是一種白血球介素-1族（IL-1）轉換酶抑制劑的前驅物，因此能夠抑制發炎反應，可能減少患者的水泡數量以及不適感。

白血球介素（Interleukin，簡稱IL），是由人體的免疫系統所產生的蛋白質，主要功能為調節免疫反應、促進發炎反應以及調控其他細胞因子，最早被發現於白血球間傳遞訊息的手段。白血球介素可由多種細胞產生，例如T細胞、巨噬細胞、上皮細胞...等。白血球介素有許多種類，每個種類掌管不同的作用，例如白血球介素-1族（IL-1）主要引起發熱和發炎，白血球介素-2族（IL-2）負責促進T細胞的增殖和活化，是免疫反應的重要調節者，白血球介素-6族（IL-6）涉及發炎反應和免疫調節，可以影響體內的其他細胞和器官。如上文所述，目前認為白血球介素-1 β （IL-1 β ）和EB患者發炎有相關性，因此接下來將針對白血球介素-1 β （IL-1 β ），探討其於EBS疾病中的作用。

白血球介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ），是一種促進發炎的細胞激素，和許多發炎反應相關的病理狀況有關。IL-1 β 能夠激活免疫系統，進而讓其他免疫細胞釋放更多的炎症因子，協助清除感染或損傷。

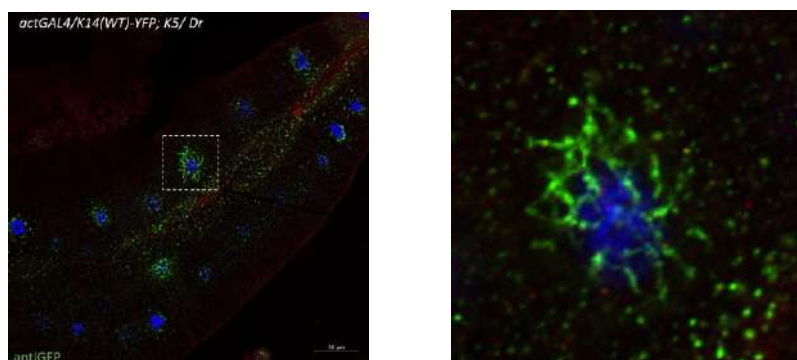
Diacerein經證明可抑制IL-1 β 轉換酶，對骨關節炎患者的軟骨基質破壞發揮保護作用，目前多用於治療骨關節炎和紅斑性狼瘡，是市面上許可的用藥，有止痛、退熱、抗炎等作用，我們試驗將藥物摻入果蠅幼蟲的食物中，讓果蠅幼蟲攝入藥物，而不是像現今EBS患者所採用的外敷，並藉由果蠅羽化後翅膀上的水泡占比判斷此藥物是否可有效減少水泡數量。

在完成色素和DMSO劑量之前測之後，我們將在已建立的EBS果蠅模型中對具潛力的藥物候選者Diacerein進行其半致死劑量（LD50）和功能性測試。透過觀測果蠅翅膀上的水泡數量、大小及分佈，以及測試與炎症相關的基因表達水平，評估其對水泡形成的影響以及細胞發炎狀況的變化，以確認這些藥物是否對EBS疾病有改善效果。

參、研究結果與討論

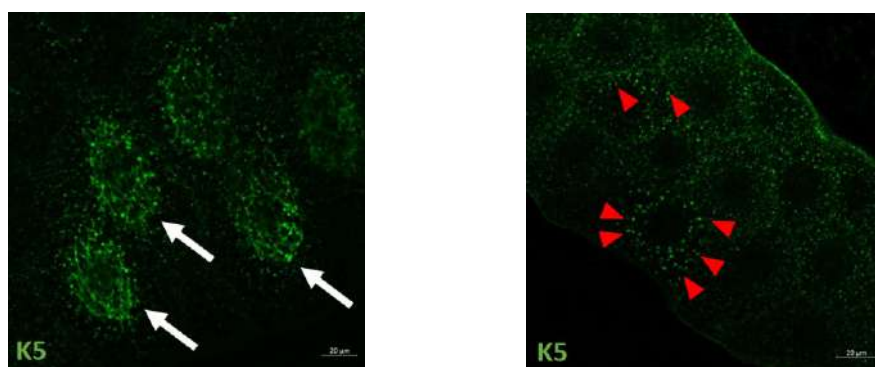
一、以果蠅建立表皮水泡症EBS的疾病模型

透過UAS-GAL4系統表達EBS致病基因，發現轉入人類正常K5; K14基因於果蠅細胞中，會形成廣泛的角蛋白網絡，從細胞核表面延伸到細胞膜。透過細胞免疫螢光染色（Immunofluorescence, IF）標定果蠅的唾液線細胞，並使用螢光顯微鏡觀察、拍攝。可以看到角蛋白網絡形成於所有受測組織中，且分布方式人類表皮細胞角蛋白分布情形相似。（如圖十一）



圖十一：正常K14; K5基因表達後所形成的角蛋白網絡
（右圖為左圖虛線方框內區塊之放大圖）
（出處：合作實驗室）

而轉入EBS致病基因 $K14^{R125C}$; K5於果蠅細胞中，發現有大量角蛋白聚集體（keratin aggregation）形成，符合EBS病患之表皮細胞角蛋白型態，且這些聚集體與健康細胞中組織良好的角蛋白纖維網絡有顯著區別。（如圖十二）



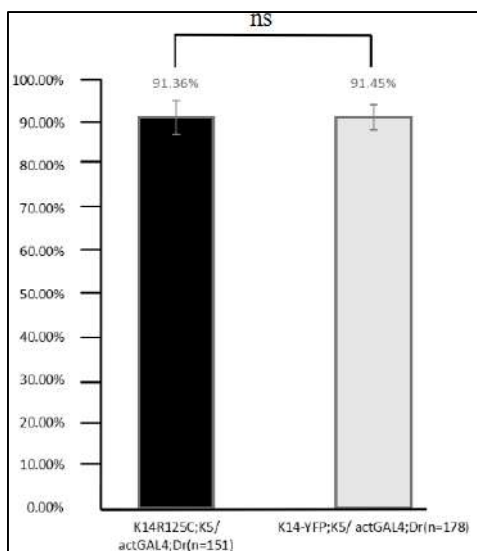
圖十二：左為帶有K14; K5 基因的果蠅，可形成和正常人類相似的角蛋白網絡；
右為帶有EBS致病基因 $K14^{R125C}$; K5 基因的果蠅，無法形成角蛋白網絡，而是形成角蛋白聚集體（出處：自行拍攝）

以上兩點果蠅細胞表現人類正常與致病角蛋白分布的狀況，皆與人類細胞相符，證明果蠅在EBS這個疾病上，是個合適的模式生物，故本實驗會進一步以果蠅建立EBS的疾病模型。

二、 探討果蠅不同生長階段以相同頻率加溫對EBS表現的影響

（一）控制組：定溫25°C 養殖

在定溫25°C的養殖中，從（圖十三-1）中可以得知，能表現致病基因的 $K14^{R125C}$; K5/ actGAL4; Dr 與表現正常人類角蛋白基因的 $K14YFP$; K5/ actGAL4; Dr，羽化率分別為90.36%與91.45%。而如（圖十三-2）所示，其水泡比率在未做任何加溫操作下， $K14^{R125C}$; K5/ actGAL4; Dr 較 $K14YFP$; K5/ actGAL4; Dr 略高。推測是因UAS-GAL4 系統的表達效率受果蠅的生長溫度影響，通常溫度越高，GAL4的活性越強，驅動基因的表達量也會增加；而本組實驗環境溫度較低，故致病基因的表現不甚顯著。而未帶致病基因的 $K14YFP$; K5/ actGAL4; Dr 之所以也會產生部分的翅膀水泡，推測是因為人類的角蛋白基因對果蠅細胞而言仍是外來基因，故在表皮接合時，會有小部分的影響。



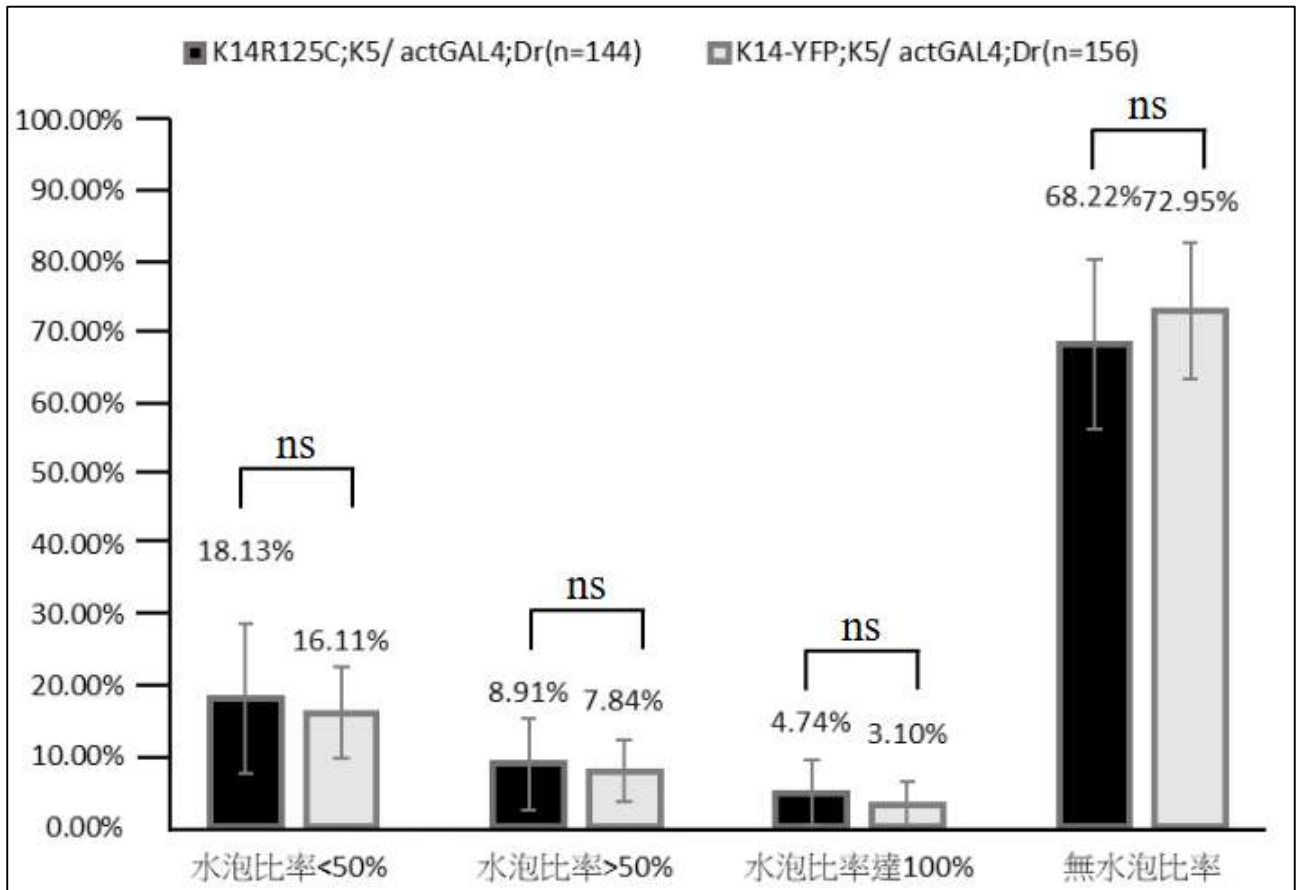
左圖中，x 軸表示果蠅的基因型，y 軸表示定溫25°C 養殖之羽化率，以 t-test 作統計分析。

$K14^{R125C}$; K5/ actGAL4; Dr 平均羽化率為91.36%； $K14YFP$; K5/ actGAL4; Dr 平均羽化率為91.45%，沒有顯著差異。

$K14^{R125C}$; K5/ actGAL4; Dr 的N值為151， $K14YFP$; K5/ actGAL4; Dr 的N值為178

*P value <0.05，**P value <0.005，*** P value <0.0005

圖十三-1：定溫25°C養殖之羽化率（出處：自行製作）



上圖中，x 軸表示果蠅的基因型，y 軸表示定溫25°C養殖之EBS病徵表現比率，以 t-test 作統計分析。

在K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50%的比率為18.13%，大於50%的比率為8.91%，而等於100%的比率為4.74%；

在K14YFP; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50% 的比率為16.11%，大於50%的比率為7.84%，而等於100%的比率為3.10%，

沒有顯著差異。

K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr的N值為144，K14YFP; K5/ actGAL4; Dr的N值為156

*P value <0.05，**P value <0.005，*** P value<0.0005

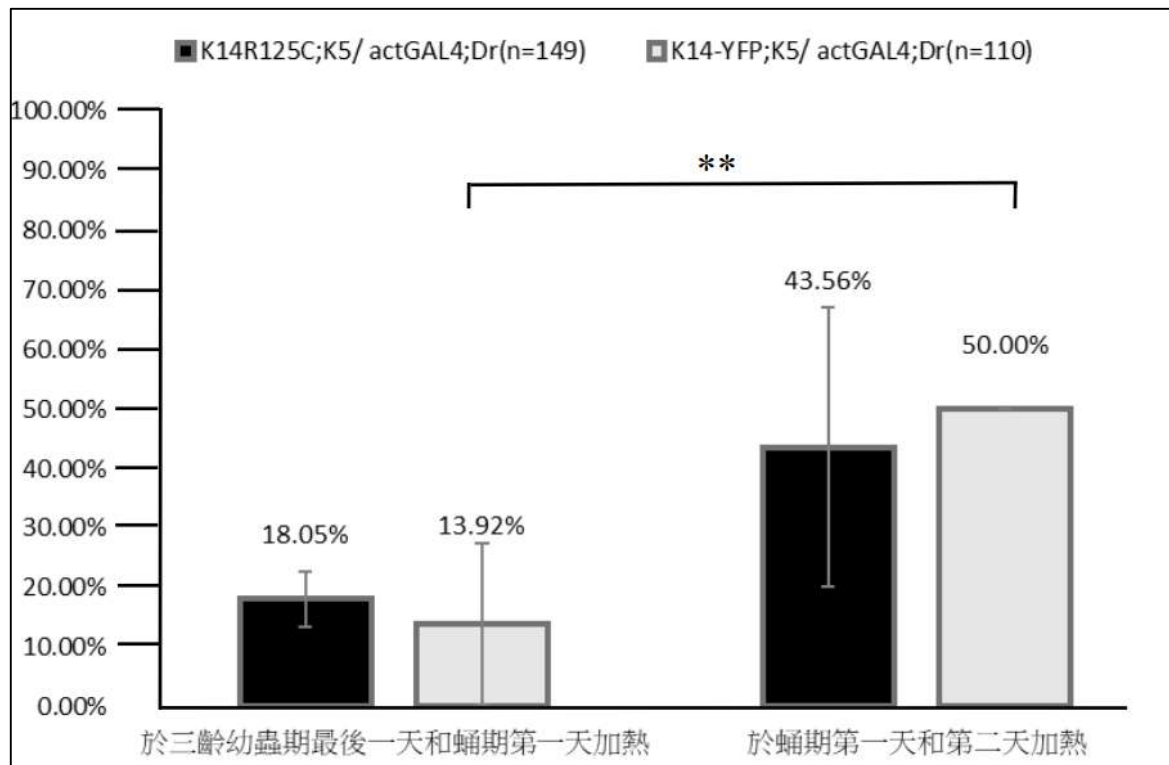
圖十三-2：定溫25°C養殖之EBS病徵表現比率（出處：自行製作）

(二) 實驗組1與實驗組2：分別於幼蟲末期、蛹期第1日及蛹期第1、2日，每日以37°C加溫2次，每次持續1小時，其餘時間皆於25°C養殖

由（圖十五）中所示，K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr 和 K14YFP; K5/ actGAL4; Dr 兩組的羽化率都偏低。在操作實驗組1和2 這兩個加熱期程時，我們觀察到會出現呈現如乾燥香蕉皮般的死亡蛹，如（圖十四）。



圖十四：如乾燥香蕉皮般呈乾癟狀的死亡蛹（出處：自行拍攝）

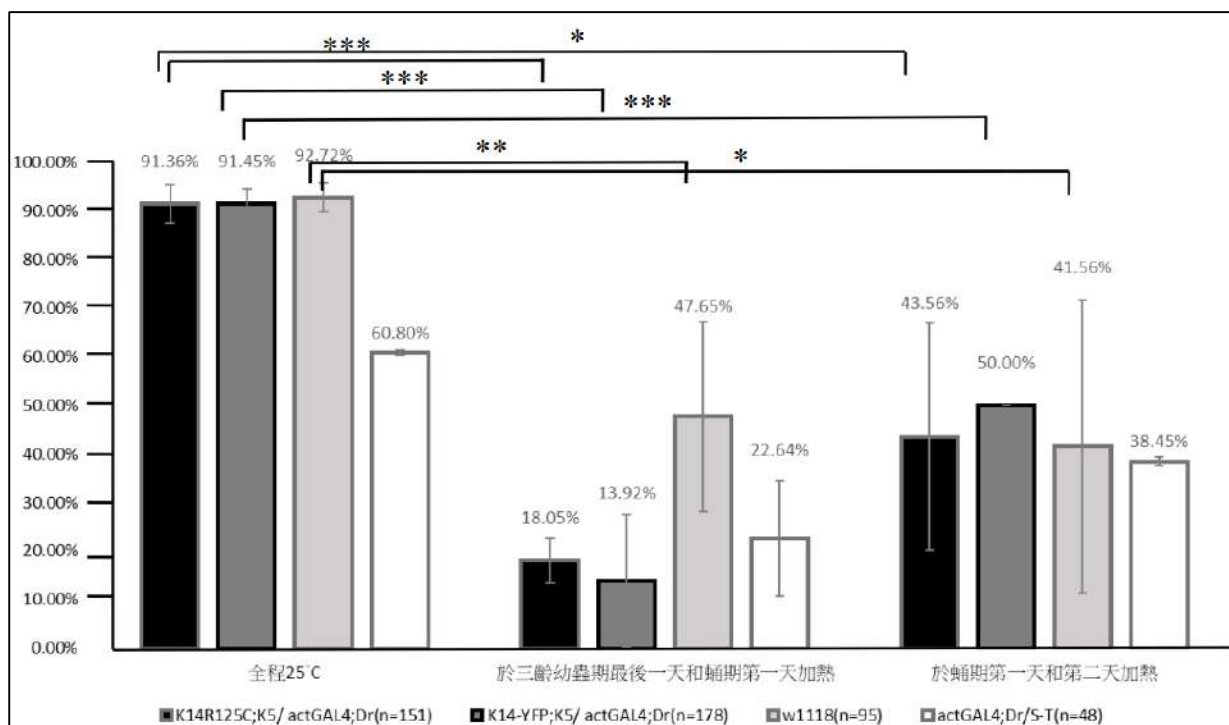


圖十五：幼蟲末期和蛹期第1日、蛹期第1和2日加溫之羽化率（出處：自行製作）

我們推測是可能因為蛹期初期時，雖然蛹的外表變化不大，但內部開始進行劇烈的細胞重組。幼蟲時期的一些細胞和組織（如肌肉、神經系統和消化系統）開始分解，並重新組織為成蟲所需的器官。故在這段期間加熱，對果蠅影響極大，甚至可能死亡。此外，還有一個可能的原因，那便是轉殖基因因為GAL4活性的增加的而過度表現，導致個體的死亡。

為了詳加探討果蠅在此狀況下大量死亡的原因，我們使用 w^{1118} 和 $actGAL4; Dr/ S-T$ 兩個基因型進行相同狀況的加溫操作。若 w^{1118} 也呈現極低的羽化率，便可推測此加熱期程對於果蠅本身便太劇烈，未來不適合採用此時程做後續實驗。若 w^{1118} 羽化率未明顯降低，而 $actGAL4; Dr/ S-T$ 則羽化率偏低，便可推測是基因過度表現所導致的死亡。

如（圖十六），當全程置於果蠅生長適宜溫度 $25^{\circ}C$ 養殖時，四種基因型的羽化率皆高。而當在幼蟲期最後一天、蛹期第一天，以及蛹期第一和第二天進行加溫，包含不帶有任何相關突變基因的 w^{1118} ，四種基因型之羽化率皆有明顯下降。又因 $K14YFP; K5/ actGAL4; Dr$ 此基因型表達的是正常人類的角蛋白基因，故若僅是表達量增加，應不至於造成其羽化率大量下降。故我們認為果蠅羽化率大幅下降主要因為這兩個狀況對果蠅而言太過劇烈，造成這兩個加熱期程之果蠅大量死亡。



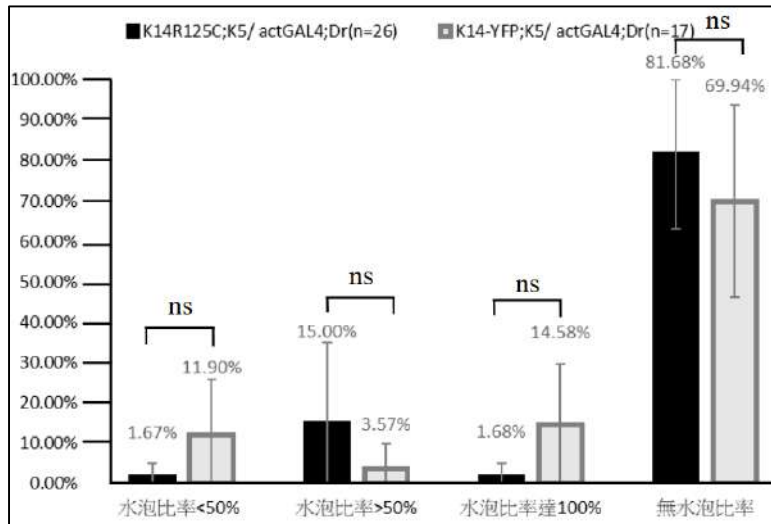
上圖中，x 軸表示不同的加熱時程，y 軸表示於不同加熱時程下的羽化率，以 t-test 作統計分析。

在全程 $25^{\circ}C$ 養殖環境下， $K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr$ 平均羽化率為 91.36%，對比三齡幼蟲最後一天即蛹期第一天加熱者，其羽化率為 18.05%，有顯著差異。 $K14YFP; K5/ actGAL4; Dr$ 平均羽化率為 91.45%，對比三齡幼蟲最後一天和蛹期第一天加熱、蛹期第一天和第二天加熱兩者，其羽化率分別為 13.92%、50.00%，皆有顯著差異。 w^{1118} 平均羽化率為 92.72%，對比三齡幼蟲最後一天即蛹期第一天加熱、蛹期第一天和第二天加熱者，其羽化率分別為 47.65%、41.56%，皆有顯著差異。 $actGAL4/S-T$ 平均羽化率為 60.80%，對比三齡幼蟲最後一天和蛹期第一天加熱、蛹期第一天和第二天加熱者，其羽化率分別為 22.64%、38.45%，皆無顯著差異。

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value <0.0005

圖十六：全程 $25^{\circ}C$ 、幼蟲末期和蛹期第 1 日、蛹期第 1 和 2 日加溫之果蠅羽化率比較 出處：自行製作

而由（圖十七）又發現，能表現致病基因的K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr 水泡比率竟較不能表現致病基因的另一基因型K14YFP; K5/ actGAL4; Dr略低。我們推測是因為actGal4對溫度敏感，當溫度提升時突變角蛋白表現量增加，EBS病徵也變得更加嚴重，導致原本能表現水泡的 K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr果蠅死亡。在此兩加溫時程能表現水泡的 K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr果蠅較少，但水泡佔翅膀面積的比率為50%者為大多數，即是突變角蛋白表現量增加，而加劇EBS病徵表現的證明。



左圖中，x 軸表示果蠅的基因型，y 軸表示於幼蟲最後一天及蛹期第一天加溫之EBS病徵表現比率。

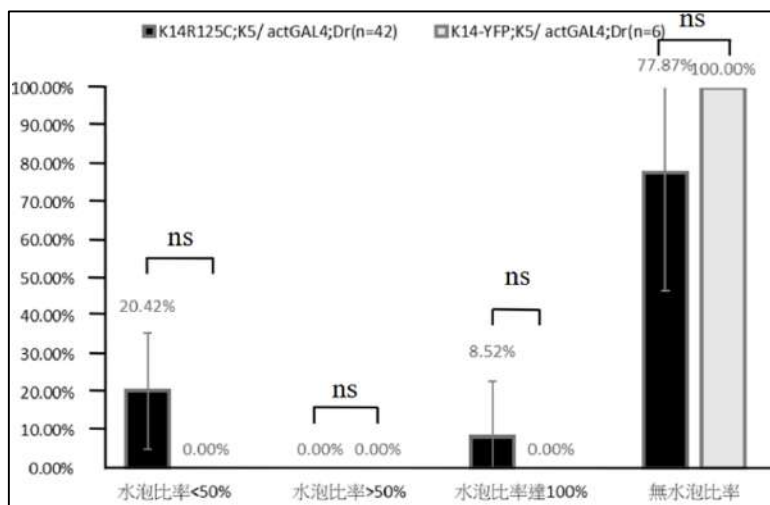
在K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50%為 1.67%，大於50%為15.00%，而等於100%的比率為 1.68%，無水泡的比率為81.68%；

在K14YFP; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50% 為 11.90%，比例大於50%為3.57%，而等於100%的為14.58%，無水泡的比率為69.94%，沒有顯著差異。

K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr的N值為26，K14YFP; K5/ actGAL4; Dr的N值為17

*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005

圖十七：幼蟲末期和蛹期第1日加溫之EBS病徵表現比率（出處：自行製作）



上圖中，x 軸表示果蠅的基因型，y 軸表示於蛹期第一天及第二天加溫之EBS表現比率。

在K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50%者為20.42%，大於50%為0%，而等於100%的為8.52%，無水泡的比率為77.87%；

在K14YFP; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50% 為0%，大於50%為0%，等於100%為0%，無水泡的比率為100%，沒有顯著差異。

K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr的N值為42，K14YFP; K5/ actGAL4; Dr的N值為6

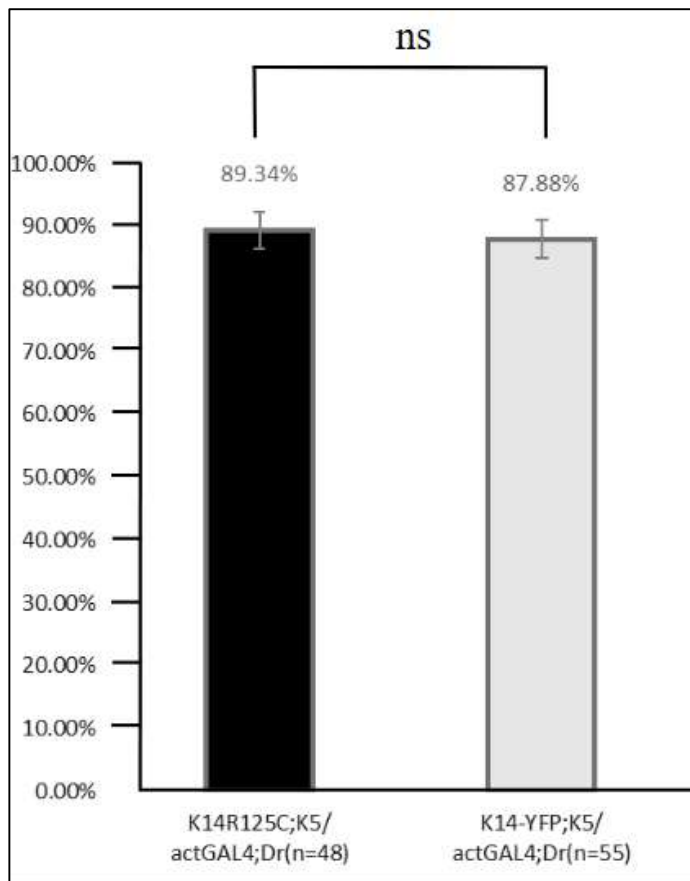
*P value <0.05, **P value <0.005, *** P value<0.0005

圖十八：蛹期第1和2日加溫之EBS病徵表現比率（出處：自行製作）

(三) 實驗組 3：於蛹期第4日、第5日，每日以37°C加溫2次，每次持續1小時，其餘時間皆於25°C養殖

由（圖十九-1）和（十九-2）可知，在蛹期第四、第五天加溫之存活率與常溫25°C養殖之存活率相近；而水泡比率較常溫25°C養殖則是微幅提升。

我們推測在幼蟲轉變到蛹及剛變成蛹這段時間，是果蠅翅膀結構形成的關鍵期，在此段時間加溫會對翅膀黏合造成相對較大的影響，而在蛹期末期準備要變成成蟲，果蠅身體的構造大致上已經發育完畢，雖然兩片翅膀尚未展開，但在此段時間加熱對翅膀骨架結構的影響相對其兩種狀況較小，因此死亡率也會較低，水泡比率也不會大幅上升。



左圖中，x 軸表示果蠅的基因型，y 軸表示於蛹期第四天及第五天加溫之羽化率

，以 t-test 作統計分析。

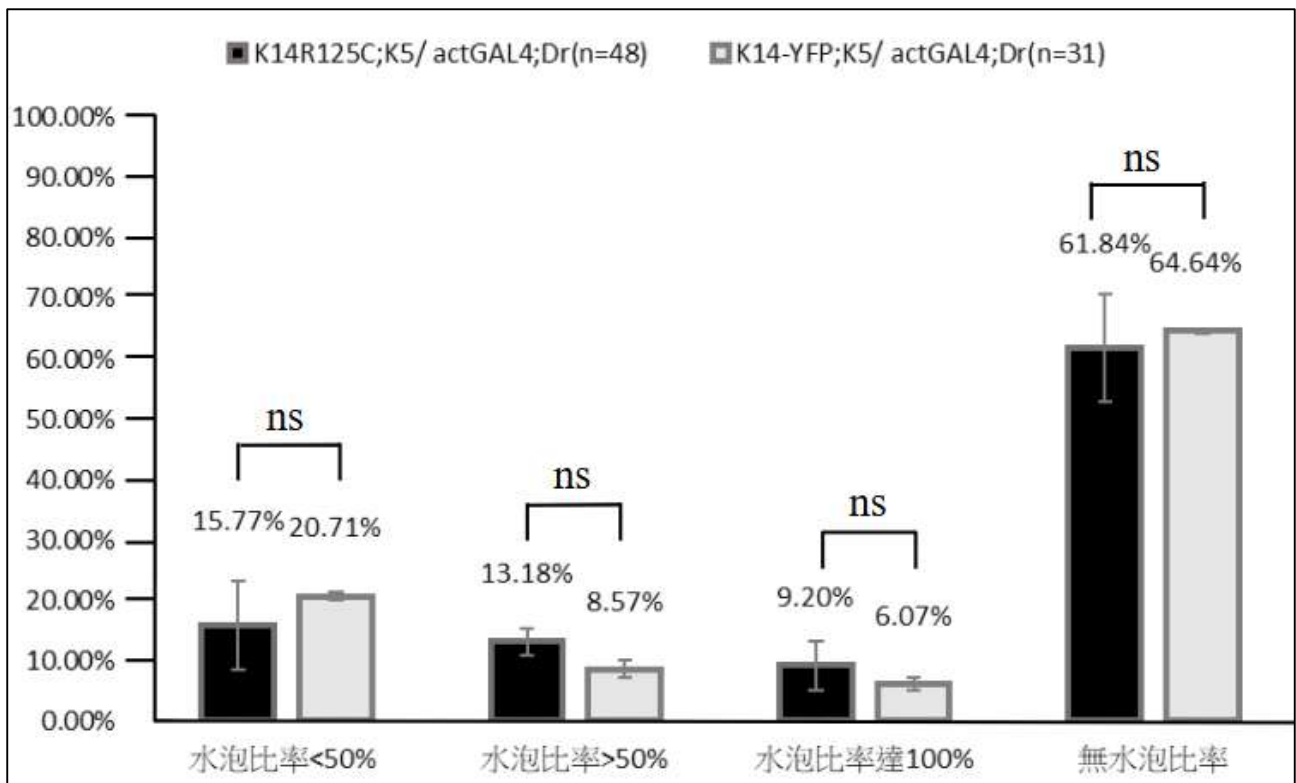
K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr 平均羽化率為 89.34%；K14YFP; K5/ actGAL4; Dr 平均羽化率為 87.88%，沒有顯著差異。

K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr 的 N 值為 48，K14YFP; K5/ actGAL4; Dr 的 N 值為 55

*P value < 0.05，**P value < 0.005，

*** P value < 0.0005

圖十九-1：蛹期第4和5日加溫之存活率（出處：自行製作）



左圖中，x 軸表示果蠅的基因型，y 軸表示於於蛹期第四天及第五天加溫之水泡比率，以 t-test 作統計分析。

在K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50%的比率為 15.77%，大於50%的比率為13.18%，而等於100%的比率為9.20%，無水泡的比率為61.84%；

在K14YFP; K5/ actGAL4; Dr中，翅膀水泡佔整個翅膀比例小於50% 的比率為 20.71%，大於50%的比率為8.57%，而等於100%的比率為6.07%，無水泡的比率為64.64%，沒有顯著差異。

K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr的N值為48，K14YFP; K5/ actGAL4; Dr的N值為31

*P value <0.05， **P value <0.005， *** P value<0.0005

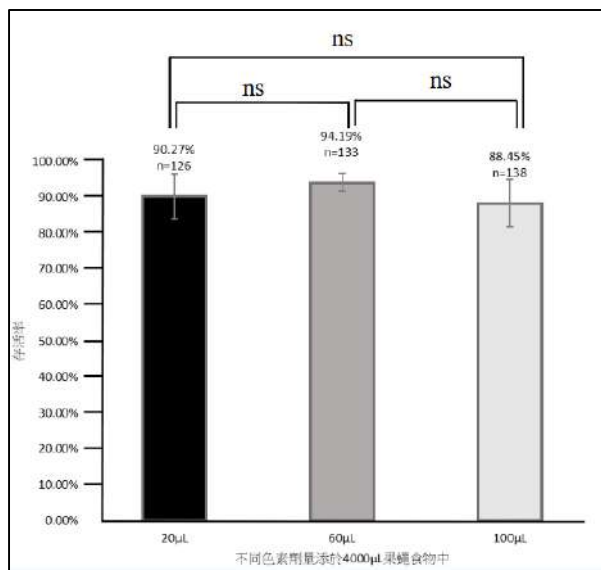
圖十九-2：蛹期第4和5日加溫之水泡比率（出處：自行製作）

三、測試以Diacerein藥物減緩EBS疾病表現

(一) 探討藍色食用色素於果蠅幼蟲的顯色程度與致死率

針對藍色食用素，我們比較添加 20、60、100 μL 容於 4000 μL 果蠅食物中，果蠅幼蟲的羽化率和顯色程度。（如圖二十和圖二十一）

可以發現，果蠅幼蟲在添加 60 μL 時可穩定存活且其顯色效果佳，故未來我們會採用此配方進行後續實驗。



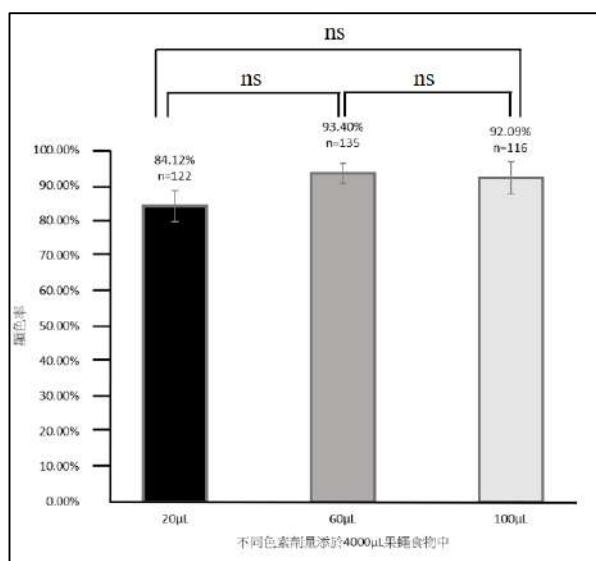
左圖中，x 軸表示在 4000 μL 食物中加入的藍色食用色素劑量，y 軸表示藍色食用色素於果蠅幼蟲(w^{1118})的羽化率，以 t-test 作統計分析。

20 μL 平均羽化率為 90.27%；60 μL 平均羽化率為 94.19%，100 μL 平均羽化率為 88.45%，沒有顯著差異。

20 μL 的 N 值為 126，60 μL 的 N 值為 133，100 μL 的 N 值為 138

*P value < 0.05, **P value < 0.005, *** P value < 0.0005

圖二十：藍色食用色素於果蠅幼蟲 (w^{1118}) 的羽化率（出處：自行製作）



左圖中，x 軸表示在 4000 μL 食物中加入的藍色食用色素劑量，y 軸表示藍色食用色素於果蠅幼蟲(w^{1118})的顯色程度，以 t-test 作統計分析。

20 μL 平均顯色程度為 84.12%；60 μL 平均顯色程度為 93.40%，100 μL 平均顯色程度為 92.09%，沒有顯著差異。

20 μL 的 N 值為 122，60 μL 的 N 值為 135，100 μL 的 N 值為 116

*P value < 0.05, **P value < 0.005, *** P value < 0.0005

圖二十一：藍色食用色素於果蠅幼蟲 (w^{1118}) 的顯色程度（出處：自行製作）

（二）探討Diacerein藥物在EBS疾病反應的作用

1. 實驗採用之Diacerein 用量

根據 Diacerein 於人類的參考劑量，一個80公斤的健康成年人每日服用劑量為50mg/day~100mg/day（J P Pelletier, 2000）。由於投餵藥物對象---三齡幼蟲平均每隻的體重約為1mg，換算出其適用劑量6.25 μ g/day~12.50 μ g/day。又已知Diacerein對溶劑DMSO的溶解度是1mg/mL，我們可以配置15mL的調製fly food，於EBS 模型中進行添加藍色食用色素、DMSO溶劑、不同濃度Diacerein 進行藥物測試，藥劑配置比例如下（表三）：

表三：依據人體適用的Diacerein劑量，換算出的藥劑配置比例

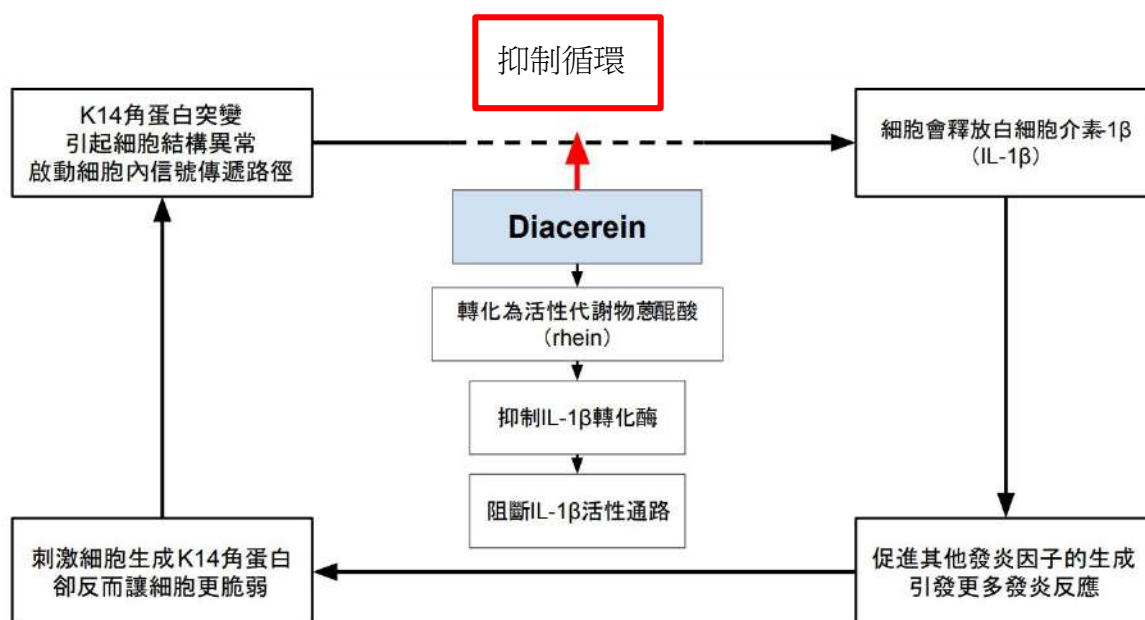
	對照組	實驗組1	實驗組2	實驗組3
fly food(mL)	15	15	15	15
藍色色素(μ L)	225	225	225	225
DMSO(μ L)	12.50	12.50	12.50	12.50
Diacerein(μ g)	0	6.25	9.40	12.50

由於果蠅每天平均攝取1.5 μ L食物，而每一管皆置入30隻果蠅幼蟲。配置完畢後，我們將調製果蠅食物分裝至每管，觀察果蠅幼蟲的羽化率、其唾腺細胞的角蛋白積聚情形、成蟲的水泡比率與促炎因子 IL-1 β 之水平。

2. Diacerein 於EBS疾病中預期結果與運作模式之探討

由於目前尚不清楚在EBS疾病中，病人身上常見的發炎反應是由其突變基因表達而形成角蛋白積聚體，促炎因子如 IL-1 β 偵測到異常而增加，誘發發炎反應；抑或是患者本身的發炎反應（例如：水泡破裂，由外界因素引起的發炎），促使更多的突變角蛋白產生、生成更多的角蛋白積聚體而使病徵加重。透過加入Diacerein來抑制IL-1 β 轉換酶，再觀測果蠅細胞的角蛋白積聚現象、翅膀水泡比例是否因此改善，可推論發炎反應和角蛋白積聚的因果關係。

根據現有的細胞培養研究結果(Wally et al., 2018)，EBS疾病與突變K14 蛋白的過量產生和聚集、和 IL-1 β 這個促進發炎的細胞激素有關。IL-1 β 會在自分泌作用模式下激活Jun氨基末端激酶壓力通路（Jun amino-terminal kinase stress pathway），促進K14^{R125C}表達，而此突變角蛋白基因又會加劇細胞的發炎反應，形成惡性循環。表皮細胞會產生IL-1 β 來引發發炎反應，這個作用如同一個警報，促使細胞加強角蛋白的生成以保護細胞的結構。但因EBS病患帶有的是的突變的角蛋白K14R^{125C}，無法形成正常的角蛋白網絡來穩固細胞，使細胞變得脆弱，反覆作用下即為EBS病徵的產生。

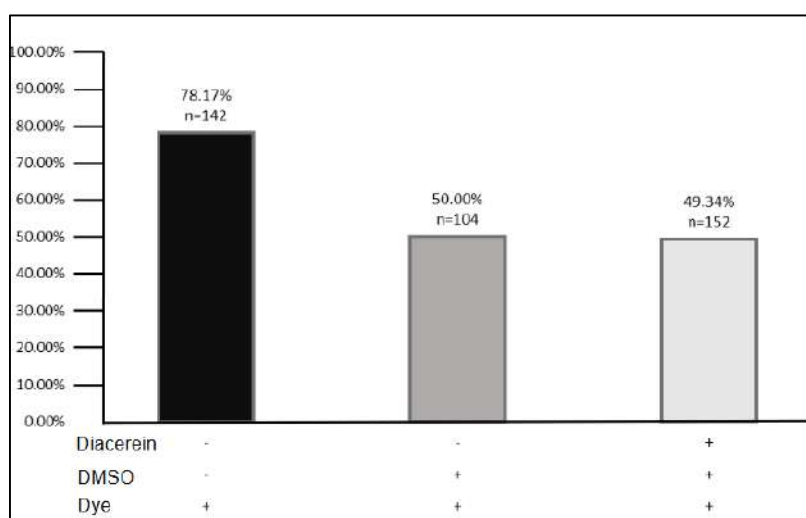


圖二十二：EBS疾病機轉運和Diacerein交互作用之推測圖

（出處：自行繪製）

3. 初步結果討論：

由（圖二十三-1），以能表現致病基因的果蠅K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr 為實驗對象，在Diacerein、DMSO、色素三者皆添加的組別，其羽化率和僅添加DMSO、色素的組別相近，可推得Diacerein對果蠅的生存無影響。由（圖二十三-2），有添加Diacerein的組別，其水泡比例明顯下降，可推測Diacerein對於EBS病徵的是有效的，惟須再增加樣本數，以更詳細探討Diacerein在此疾病中扮演的角色。



上圖中，x 軸表示是否添加雙醋瑞因（Diacerein）、二甲基亞砷（DMSO）或藍色食用色素（Dye），y 軸表示羽化率。

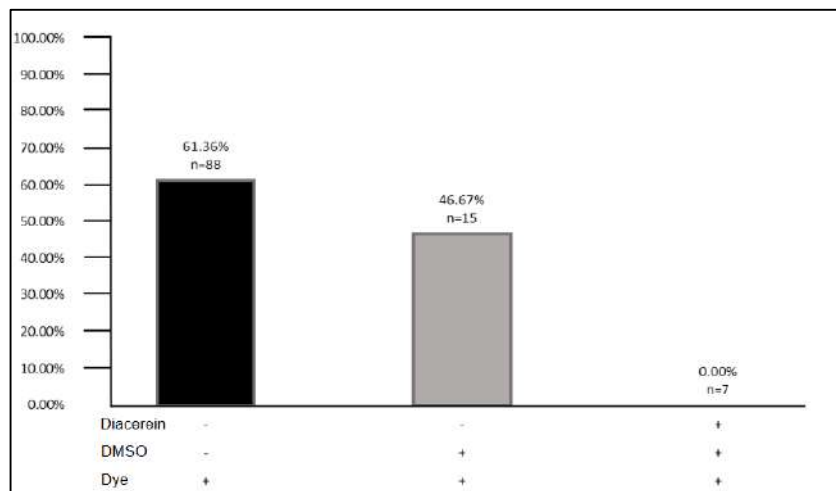
添加了Dye的平均羽化率為78.17%，

添加了DMSO及Dye的平均羽化率為50.00%，添加了Diacerein、DMSO及Dye的平均羽化率為49.34%。

添加了Dye的N值為142，添加了DMSO及Dye的N值為104，添加了Diacerein、DMSO及Dye的N值為152。

此圖之所以沒有標準差是因為數據筆數不足，未來我們會增加更多的樣本數以使此實驗更加完整。

圖二十三-1：添加色素、DMSO、Diacerein之羽化率比較（出處：自行製作）



上圖中，x 軸表示是否添加雙醋瑞因（Diacerein）、二甲基亞砷（DMSO）或藍色食用色素（Dye），y 軸表示水泡表現比率。

添加了Dye的水泡表現比率為61.36%，添加了DMSO及Dye的平均水泡表現比率為46.67%，添加了Diacerein、DMSO及Dye的平均水泡表現比率為0%。

添加了Dye的N值為88，添加了DMSO及Dye的N值為15，添加了Diacerein、DMSO及Dye的N值為7。

此圖之所以沒有標準差是因為數據筆數不足，未來我們會增加更多的樣本數以使此實驗更加完整。

圖二十三-2：添加色素、DMSO、Diacerein之EBS病徵表現比較（出處：自行製作）

肆、結論與應用

一、結論

(一) 果蠅對於單純型表皮水泡症(EBS)的建立具有高度潛力，因為果蠅與人類在角蛋白表現上具有相似性，能夠更深入了解EBS的病理機制，建立藥物篩選程序。透過UAS-GAL4系統表達EBS致病基因，發現將人類正常K5; K14基因導入果蠅細胞中，會形成廣泛的角蛋白網絡，與健康人類細胞中的角蛋白表現相似。而轉入EBS致病基因 $K14^{R125C}$; K5於果蠅細胞中，發現有大量角蛋白聚集體形成，符合EBS病患之表皮細胞角蛋白型態，且這些聚集體與健康細胞中組織良好的角蛋白纖維網絡有顯著區別。

(二) 在定溫25°C環境中，能表現致病基因的 $K14^{R125C}$; K5/ actGAL4; Dr與表現正常人類角蛋白基因的 K14-YFP; K5/ actGAL4; Dr，羽化率高且穩定。水泡比率在未做任何加溫操作下， $K14^{R125C}$; K5/ actGAL4; Dr 較 K14YFP; K5/ actGAL4; Dr 略高。推測是因UAS-GAL4 系統的表達效率受果蠅的生長溫度影響，通常溫度越高，GAL4的活性越強，驅動基因的表達量也會增加；而本組實驗環境溫度偏低，故致病基因的表現較不明顯。而未帶致病基因的果蠅之所以也會產生部分的水泡，推測是因為人類的角蛋白基因對果蠅細胞而言仍是外來基因，故在表皮接合時，會產生小部分的影響。

(三) 發現蛹期初期加熱， w^{1118} 、K14-YFP; K5/ actGAL4; Dr、 $K14^{R125C}$; K5/ actGAL4; Dr、actGAL4; Dr/S-T此四種基因型的果蠅，死亡率皆極高。我們推測主因為果蠅在此階段體內結構進行劇烈變化，較容易受到溫度影響，次因是轉殖基因因GAL4活性的增加的而使之過度表現，導致個體的死亡。

(四) 在蛹期第四、第五天加溫之存活率與常溫25°C養殖之存活率相近；而水泡比率較25°C養殖則是微幅提升。我們推測因為蛹期初期，是果蠅翅膀結構形成的關鍵期，在此段時間加溫會對翅膀黏合造成相對較大的影響。而在蛹期末期果蠅準備變成成蟲，雖然兩片翅膀尚未展開，但果蠅身體的構造大致上已經發育完畢，故此段時間加熱對翅膀結構的影響相對較小，死亡率較低，水泡比率也不會大幅上升。

(五) 在添加60 μ L於4000 μ L果蠅食物中，肉眼可以觀察到，果蠅幼蟲達到穩定顯色而不致死。未來會採取此配方做DMSO和Diacerein的試驗，以肉眼辨別果蠅是否有順利攝入藥物，增加藥物篩選的效率。

（六）篩藥實驗中，以能表現致病基因的果蠅K14^{R125C}; K5/ actGAL4; Dr 為主要實驗對象。在Diacerein、DMSO、色素三者皆添加的組別，其羽化率和僅添加DMSO、色素的組別相近，可推得Diacerein對果蠅的生存無影響。有添加Diacerein的組別，其水泡比例明顯下降，可推測Diacerein對於EBS病徵的是有效的。

二、本計畫之創建性及其未來應用

（一）我們使用果蠅這個模式生物，建立遺傳性表皮水泡症EBS的疾病模型，並將遺傳學科的基因技術和醫學皮膚科的臨床經驗做結合。透過果蠅建立的EBS疾病模型，進行基因操控和病徵觀察，加速對疾病機制的認識，並使篩藥流程更精準。

（二）利用果蠅建立的疾病模式系統，因果蠅具有生長週期短、易於培養、能表現出人類疾病病徵等優點，故能有效減少篩藥的時間與金錢成本。有助於為EBS患者提供嶄新的治療途徑，還可以擴展應用於其他相關的皮膚遺傳疾病。同時，果蠅篩藥流程的應用也有潛力在藥物的個性化醫療中發揮作用，根據患者的基因背景量身定製更為精確的治療策略。

（三）藉由果蠅研究EBS疾病，並開發疾病模型，可為多種皮膚疾病的研究和治療提供基礎。藉助基因編輯技術，果蠅模型可以引入其他遺傳疾病相關的基因突變。而本研究建立的篩藥程序，可加速藥物開發，還為相關遺傳疾病提供了低成本且高效率的基礎研究工具。

伍、參考資料

- 一、Barwell, T., DeVeale, B., Poirier, L., Zheng, J., Seroude, F., & Seroude, L. (2017). Regulating the UAS/GAL4 system in adult *Drosophila* with Tet-off GAL80 transgenes. *PeerJ*, 5. <https://doi.org/10.7717/peerj.4167>
- 二、Chengyu liu, & wen xie. Pronuclear Microinjection and Oviduct Transfer Procedures for Transgenic Mouse Production.
- 三、Fuying chen. (2021, November 29). Damaged Keratin Filament Network Caused by KRT5 Mutations in Localized Recessive Epidermolysis Bullosa Simplex.
- 四、Pelletier JP, Yaron M, Haraoui B, Cohen P, Nahir MA, Choquette D, Wigler I, Rosner IA, Beaulieu AD. Efficacy and safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. The Diacerein Study Group. *Arthritis Rheum.* 2000 Oct;43(10):2339-48. doi: 10.1002/1529-0131(200010)43:10<2339::AID-ANR23>3.0.CO;2-P. PMID: 11037895.
- 五、Tolwinski, N. S. (2017). Introduction: *Drosophila*—A Model System for Developmental Biology. *Journal of Developmental Biology*, 5(3).
- 六、Wally, V., Hovnanian, A., Ly, J., Buckova, H., Brunner, V., Lettner, T., Ablinger, M., Felder, T. K., Hofbauer, P., Wolkersdorfer, M., Lagler, F. B., Hitzl, W., Laimer, M., Kitzmüller, S., Diem, A., & Bauer, J. W. (2018). Diacerein orphan drug development for epidermolysis bullosa simplex: A phase 2/3 randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(5), 892-901.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.01.019>

【評語】 090015

1. 創新性與重要性：

本研究利用果蠅建立遺傳性表皮分解性水泡症(EB)的疾病模型，特別聚焦於最常見的單純型水泡症(EBS)，這在罕見疾病研究領域具有重要的創新意義。通過在果蠅中模擬 EBS 的病理特徵，研究為理解疾病機制和開發潛在治療方法提供了新的平台。特別是，研究探討了溫度對病徵的影響，這一方面反映了 EBS 患者在不同環境條件下的症狀變化，為臨床管理提供了重要參考。此外，利用此模型建立藥物篩選平台，為罕見遺傳疾病的治療開發提供了高效、低成本的初步篩選方法，這對於加速治療方案的研發具有重要意義。

2. 優點：

該研究展現了多個顯著優點。首先，成功在果蠅中重現了 EBS 的關鍵病理特徵，包括角蛋白 K5/K14R125C 的異常積聚和水泡形成，這證實了模型的可靠性。其次，研究系統地探討了溫度對 EBS 症狀的影響，這一設計不僅模擬了真實的環境因素，也為理解疾病的觸發機制提供了新的視角。此外，研究建立了初步的藥物篩

選平台，並以 Diacerein 為例進行了測試，顯示出該平台在評估潛在治療藥物方面的實用性。最後，研究計劃擴大統計不同溫度對 EBS 果蠅的影響，這種全面的數據收集方法將為後續研究提供堅實的基礎。

3. 待改進的部分：

果蠅雖然與人類基因有高度重疊，但缺乏角蛋白，這可能限制了模型在完全模擬人類 EBS 病理特徵方面的能力。因此，需要進一步驗證果蠅模型中觀察到的現象是否能準確反映人類 EBS 的病理過程(尤其是 IL1-beta signaling)。其次，研究強調溫度對 EBS 病徵的影響，但果蠅對環境的敏感性可能與人類不同，這可能限制了研究結果的臨床轉譯性。建議在未來研究中加入更多人類細胞或組織的驗證實驗。最後，雖然研究觀察到角蛋白聚集與病徵之間的關聯，但缺乏對深層機制的探討，例如這些聚集體如何具體影響細胞功能或結構。建議在後續研究中深入探討這些分子機制，以更全面地理解 EBS 的發病過程並為靶向治療提供更精確的方向。