

2009 年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

編號： 080007

作品名稱

生長因子 progranulin 參與斑馬魚肝臟生長之機制

得獎獎項

生物化學大會獎第二名

突尼西亞正選代表： 2009 年突尼西亞國際科學博覽會

學校名稱： 臺北市立第一女子高級中學

作者姓名： 王雅萱

指導老師： 吳金冽 薛如娟

關鍵字： progranulin、斑馬魚肝臟

作者簡介



我是王雅萱，目前就讀北一女中三年良班，高一時參加學校的生物專研，由老師帶領學習實驗的基礎，並且開啟了我對生物領域的好奇，高二時便開始著手進行生物專題研究，每個禮拜三番兩頭地往實驗室跑，即使在實驗過程中偶爾有些不順遂，但經過努力後終於突破瓶頸的感覺最令人回味，在進行研究的一年多的期間，我學到了許多無法自書本上獲取的經驗，並且從實驗過程中培養自己的耐心和細心。

摘要

肝臟的生長及發育是一個複雜且精密經由許多的因子所調控的過程。先前研究顯示，類胰島素生長因子（IGFI）在肝臟的生長上扮演重要的角色。缺乏 IGFI 接受器會導致細胞的死亡，然而相對於其他的生長因子，唯獨添加 progranulin（pgrn）可以恢復此類缺乏 IGFI 接受器細胞的存活。在試管內的研究上，progranulin 的免疫細胞增殖功能，已在許多不同種細胞株中証實亦有可以調節骨髓細胞的增殖的功能。然而，關於 progranulin 在肝臟生長發育所扮演的角色，我們所知還很少。

在這次研究上，我們擬利用 reverse-genetic 的方法來探討 progranulin 在斑馬魚肝臟生長的影響。首先，我們先克隆斑馬魚全長的 progranulin 基因，以肝臟擁有綠螢光蛋白的斑馬魚來探討其調節功能，透過反意核苷酸 morpholino（Mo）的方式去抑制 progranulin 蛋白之表現，以探討 progranulin 可能在肝臟生長發育中所扮演的角色。

Abstract

The growth and development of the liver controlled by many factors is a complicated and sophisticated process. According to previous researches, IGFI plays an important role in the growth of the liver. Deficiency in IGFI receptor will bring about the death of cells. However, compared with other growth factors, progranulin can resuscitate those cells which lack IGFI receptors. On the in vitro research, the function of progranulin immune cell proliferation in different cells has verified that progranulin also has the ability to regulate the proliferation of the bone marrow cells. Yet, we still know little about what kind of role progranulin plays in the growth and development of the liver.

In my research, I plan to use the reverse-genetic approach to probe into how progranulin influences the growth of zebrafish's liver. First, we clone the full-length progranulin gene of zebrafish, and use the zebrafish whose liver has green fluorescence to find out the regulating function. I use the approach of morpholino knocking out the progranulin protein manifestation to find out the possible role progranulin plays in the growth and development of the liver.

生長因子 progranulin 參與斑馬魚肝臟生長之機制

壹、研究動機

斑馬魚是一種小型觀賞魚，約 3-4 公分，容易飼養，胚胎發育期短，繁殖方式採體外授精，並且可利用光週期來控制產卵時間，每週可產卵一次，每次可取得大量的受精卵。在 28°C 下受精卵約 2-3 天可孵化，胚胎呈現透明狀，能夠直接在解剖顯微鏡下觀察其器官的形成，約 3 個月後性成熟，生殖週期短約 5 天，並且可利用各種突變方法，產生各種突變魚，並能針對某一表現型收集一系列突變魚，以研究其基因調節網絡。也可利用顯微注射技術(microinjection)，研究基因的功能。故近年來已成為國際間用於研究脊椎動物胚胎發育與遺傳的模式動物，其基因體也已完成解碼。對現今所有研究胚胎發育與遺傳工程研究方面的實驗動物模式做比較，果蠅雖然是理想的模式，但是屬於無脊椎動物；兩生類則是因為胚胎發育期過長；另外，大白鼠的胚胎是在母體子宮內發育，不容易觀察胚胎每一時期的變化。因此，研究神經發生學、胚胎學、分子生物學及基因轉殖等方面，斑馬魚被視為最佳的動物模式。

肝臟的生長及發育是一個複雜且精密經由許多的因子所調控的過程。先前研究顯示，類胰島素生長因子（IGFI）在肝臟的生長上扮演重要的角色。缺乏 IGFI 接受器會導致細胞的死亡，然而相對於其他的生長因子，唯獨添加 progranulin 可以恢復此類缺乏 IGFI 接受器細胞的存活。值得注意的是，肝細胞亦是屬於此類缺乏 IGFI 接受器的細胞。另一方面，許多人類肝癌的研究顯示，有七成的肝癌患者可以發現 Progranulin 大量表現。根據以上的現象可見 Progranulin 對於肝細胞的生長具有一定的影響。然而，關於 Progranulin 在肝臟生長發育所扮演的角色，我們所知還很少。

貳、研究目的

探討生長因子 Progranulin 在肝臟生長發育中所扮演的角色。

參、文獻探討

一、progranulin 與肝臟的異常生長

我們在許多癌症的研究上發現，眾多的癌症患者體內，可發現 pgrn 的大量表現，像是乳癌、卵巢癌、前列腺癌以及肝癌等。而針對肝癌來說，約有 70% 的患者體內有 pgrn 大量表現的現象。在 2004 年的一份 paper 上（附註一）我們發現，pgrn 可促使癌細胞的增長，以及增加其侵略性；2008 年已有科學家利用抗體與 pgrn 結合可抑制肝癌腫瘤的生長（附註二）。因此我們可推知，pgrn 的表現與肝臟的生長有關。

附註一

Vol. 10, 7629–7636, November 15, 2004		Clinical Cancer Research 7629
Granulin–Epithelin Precursor Overexpression Promotes Growth and Invasion of Hepatocellular Carcinoma		
Siu Tim Cheung, ^{1,2} San Yu Wong, ^{1,2} Ka Ling Leung, ^{1,2} Xin Chen, ⁴ Samuel So, ⁵ Irene O. Ng, ^{1,3} and Sheung Tat Fan ^{1,2}		
¹ Centre for the Study of Liver Disease and Departments of ² Surgery and ³ Pathology, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong, China; ⁴ Department of Biopharmaceutical Sciences, University of California-San Francisco, San Francisco, California; and ⁵ Department of Surgery, Asian Liver Center, Stanford University School of Medicine, Stanford, California		
of GEP protein levels resulted in decreased cell proliferation rates, tumor invasion ability, anchorage-independent growth in soft agar, and tumorigenicity in nude mice ($P < 0.05$).		Conclusion: GEP is an important factor for HCC growth, invasion, and metastasis. GEP has the potential to serve as a tumor marker and therapeutic target.

Hepatobiliary Malignancies Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma Jenny C. Ho ^{1†} , Ying Chi Ip ^{1†} , Siu Tim Cheung ^{1*‡} , Yuk Ting Lee ¹ , Kui Fat Chan ² , San Yu Wong ¹ , Sheung Tat Fan ¹ ¹ Department of Surgery, The University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Pokfulam, Hong Kong, China ² Department of Pathology, Pamela Youde Nethersole Eastern Hospital, Chai Wan, Hong Kong, China	<i>Hepatology</i> , 2008
---	--------------------------

二、progranulin 是什麼？

Pgrn 是一種醣蛋白，結構上是由許多雙硫鍵和 granulin 的次單元所組成；它可以調節細胞的週期循環、生長發育和傷口的癒合，是一種多功能的生長因子。

三、Pgrn 是唯一能使缺乏 IGF-I 接受器細胞存活的生長因子

類胰島素生長因子 IGF-I 是一種能調控細胞生長發育的重要生長因子，缺乏 IGF-I 接受器的細胞會死亡，而在眾多的生長因子中，唯獨添加 pgrn 能維持此類缺乏 IGF-I 接受器細胞的存活。而肝臟也是屬於此類缺乏 IGF-I 接受器的器官，因此我們推測 pgrn 可能具有調控肝臟生長發育的功能。

四、Morpholino 是什麼？

Morpholino 是一段能與 RNA 5'UTR (Un-Translate-Region 不會轉譯的區域) 互補結合的寡核酸，它能與目標 RNA 互補結合成雙股螺旋，進而抑制 RNA 的轉譯功能，使其無法產生表現蛋白。

Mo 的優點有高明確性、高效率、高穩定度，以及它可以阻礙基因的轉譯功能，修飾基因的接合，以及阻礙其他與 RAN 的反應。缺點是：1.對基因的作用必須是全身性的，我們不能指定它必須只作用於某些部位；2.它的有效作用期限不長，約

可維持 7 天的效用，但在我的實驗中這樣已經足夠，因為斑馬魚肝臟的發育約在授精後 48 至 52 小時便已完成，而我們只需採樣這之前的樣本；3.Mo 並無誘發性，開始作用後就不能在中途停止它，或者使它再重新產生作用，一直到七天後它才會失效，但在我的實驗中，可利用 PFA 固定斑馬魚於特定的時刻，並保持樣本於當時狀態，以利觀察。

肆、研究方法與流程

一、接合作用與轉形作用 (Ligation and transformation)

取 5 μ l DNA 片段加入 1 μ l pGEM-T easy 載體、5 μ l 2x rapid ligation buffer 及 1 μ l T4 DNA ligase，25°C 反應 1 小時或 4°C 反應隔夜，反應完成後加入 50 μ l 勝任細胞，冰上作用 30 分鐘後置於 45°C 水浴 1 分鐘進行 heat-shock，然後加入 950 μ l LB 液體培養基，於 37°C 培養箱中震盪培養 1~2 小時。之後將微量離心管以 4000rpm 離心 2 分鐘，將上清液移除後再加入 200 μ l LB 液體培養基重新懸浮，取 100 μ l 菌液加入 100 μ l IPTG 及 25 μ l X-gal 均勻塗在 LB/Amp 培養基上，於 37°C 培養箱中培養 12~16 小時，培養完成後取 5 個白色菌落進行小量質體 DNA 製備並定序，定序後選擇含有嵌入正確 DNA 片段之質體，進行大量質體 DNA 之抽取。

二、小量質體 DNA 的製備 (mini-prep. Of plasmid DNA)

將 LB/Amp plate 上長出之白色菌落用白金針挑入含 3 ml LB/Amp 培養液的養菌管中，於 37°C 培養箱中震盪培養過夜 (約 16 小時)，培養完成後取 1 ml 到微量離心管中，以桌上型離心機於 4°C、8000rpm 離心 1 分鐘，將上清液移除並加入 100 μ l Lysis buffer，將菌體重新懸浮後置於 95°C 煮沸的水中加熱 15 分鐘，完成後將微量離心管置冰上冷卻 2 分鐘，再利用桌上型離心機 4°C、12000rpm 離心 5 分鐘，取 17.3 μ l 上清液加入 0.2 μ l BSA、2 μ l 10x EcoR1 buffer 及 0.5 μ l EcoR1

進行限制切割反應，置於 37°C 反應 2 小時，反應後取 5 μ l 用 1.2% 洋菜膠跑電泳以確定銜接 DNA 片段大小，若與預期之大小相符則繼續進行定序反應。

三、大量質體 DNA 的製備 (max-prep. of plasmid DNA)

當定序完成確定為正確之菌落後，將原本小量培養之菌液取 100 μ l 加到含有 100 ml LB/Amp 液體培養液的三角錐形瓶中，於 37°C 培養箱中震盪培養過夜 (約 16 小時)，將菌液移至 50 ml 離心管中，以 4°C、5000rpm 離心 10 分鐘，加入 10 ml E1 將菌體重新懸浮打散，加入 10 ml E2 反覆搖晃 5 次 (不可震盪)，置於室溫反應 5 分鐘，再加入 10 ml E3 反覆搖晃 5 次，室溫下以 15000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液移到 column (先用 30 ml E4 潤濕)，將通過 column 之上清液倒掉，再加入 60 ml E5 到 column 中清洗。加入 15 ml elution buffer 到 column 並收集流下之液體，收集完成後加入 10.5 ml isopropanol，於 4°C、15000 rpm 離心 30 分鐘，將上清液移除後加入 5 ml 70% 酒精清洗，於 4°C、15000 rpm 離心 5 分鐘，之後加入適量 TE buffer 或滅菌水將質體溶解，於 -20°C 保存備用。

四、膠體萃取 (Gel extraction)

準備 1.5% 低溶點瓊脂膠體 (1.5 克 SEAKEM GTG agarose gel 溶於 100ml 1xTAE buffer 中，待冷卻至 55°C 後注入製膠器中)，置於電泳槽中，加入 1x TAE 電泳緩衝液直至高於膠體表面 1mm；取 DNA 產物與 5 μ l DNA loading dye 混合均勻後注入瓊脂膠體中，在 20V 下泳動過夜，直至黃色染劑泳動到膠體底端；將膠體取出，以溴化二錠染色後置於照相系統下拍照；將所需大小的 DNA 片段利用刀片自膠體上切下，將所切下的膠體秤重。使用 QIAquick Gel xtraction Kit(QIAGEN) 進行膠體萃取；以每 10mg 加入 30 μ l buffer QC 的比例加入膠體溶解緩衝液，置於 50°C 水浴槽中 10 分鐘溶解膠體，每 2~3 分鐘搖晃一次，待膠體完全溶於溶解液後依照廠商提供的步驟進行膠體萃取；最後以 50 μ l 的 buffer EB(10mM Tris-Cl,

pH8.5) 將 DNA 片段萃取下來。

五、斑馬魚之飼養與產卵

1.飼養

將斑馬魚飼養在 28°C 的魚房，並給予 14 小時的光照，待斑馬魚成長到三個月大，把公母分開於不同的魚缸飼養，每天定時投與飼料，且每週定時換水與清洗魚缸，待要產卵前一週每天餵食三次，以期營養狀況良好，產下健康的魚卵。

2.產卵

產卵前一天最後一次餵食後，確定魚群食用完畢，撈出公母魚(1：1)至產卵箱，並以擋板區隔，待隔天開始光照後 30 分鐘，更換產卵箱的水並拉開擋板，待 15 到 20 分鐘後收取魚卵。

六、顯微注射

1.拉針與磨針(Pulling and grinding of injection needle)

將直徑 1mm 之毛細管以水平拉針器(Glass microelectrode puller model PA-91)，拉成針形，於磨盤上以俯角 30 度磨出適當口徑與角度。

2.注射

將收集到的魚卵排列在置卵盤中，質體(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)事先混合 0.2% phenol red 吸入針中，注射條件設定為注射壓力 20kpa，注射時間為 20msec，並視實際條件略為調整，使注射之紅點直徑約卵的 1/4，針以 45 度角自胚胎細胞刺入，將質體釋放在細胞中或細胞與卵黃介面附近，待進入二細胞期即停止注射，將魚卵放在 10 公分培養皿，於 28°C 培養箱發育，定時觀察。

七、顯微鏡觀察

螢光顯微鏡之觀察選擇 488 / 568 nm 作為激發光波長，以 520 / 550 nm 的散射濾鏡觀察 FITC 的螢光；以 600 / 630 nm 的散射濾鏡的觀察 Texas Red 的螢光。

八、仔魚冷凍切片

- 1.將仔魚放至 4% paraformaldehyde(PFA)fixative 中，4°C 固定隔夜，取出並以 1XPBS 清洗 1~3 次。
- 2.準備以 1.5% agarose+15% sucrose 放至 70°C 的水浴槽。
- 3.將仔魚放至準備好的 70°C 1.5% agarose+15% sucrose 中固定方向並包埋之，將包埋好之 gel 切下，放至 30% sucrose in 1xPBS 隔夜脫水。
- 4.在冷凍切片機內以 O.C.T.冷凝劑將樣本固定在冷凍載台上，將載台底部與液態氮接觸降溫（sample 勿直接與液態氮接觸），以冷凍切片機進行 5~10 μ m 厚度的切片，並將所切成的薄片粘黏於玻片上。
- 5.以顯微鏡觀察或置於 4°C 冰箱保存。

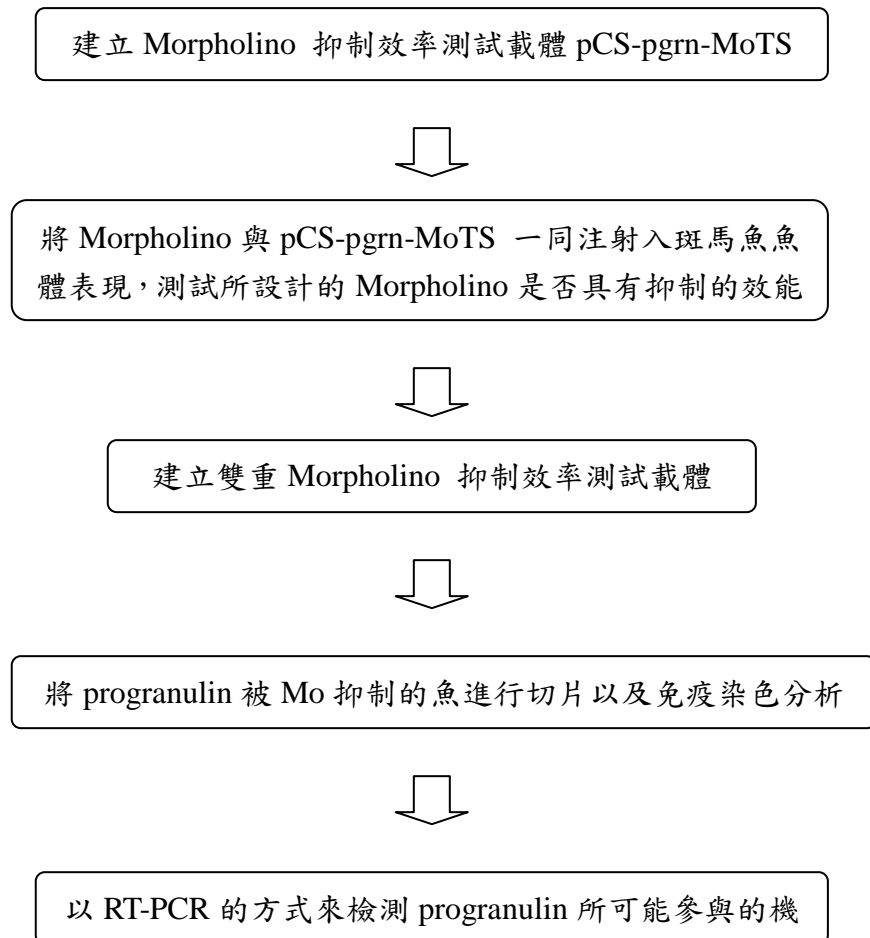
九、RT-PCR

使用 THERMOSCRIPT™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, life technologies)製備 cDNA。取 2.5 μ g RNA 加入 2 μ l 10mM dNTP、1 μ l Oligo (T) 及 1 μ l Random hexamer，加水至總體積 12 μ l，置於 65°C 反應 5 分鐘，然後置冰上 1 分鐘。加入混合好之緩衝液 (4 μ l 5x RT buffer, 1 μ l DTT, 1 μ l water, 1 μ l RNase out and 1 μ l Thermoscript RT)，先置於 25°C 反應 10 分鐘，然後移至 55°C 反應 1 小時，最後再移至 85°C 反應 5 分鐘。加入 1 μ l RNase H 於 37°C 反應 20 分鐘，之後置於 4°C 保存。

我們從已知的基因序列設計專一性引子，使用上述做好之 cDNA 進行聚合連鎖反應 (PCR)，將 PCR 所得產物以 1%瓊脂膠體進行電泳分離，以溴化二錠 (EtBr)染

色後置於照相系統照相。

十、研究步驟流程圖



伍、研究結果

一、建立 Morpholino 抑制效率測試載體

首先，以 pCS-EGFP 載體為模板，加入包含 morpholino targeting sequence (MoTS) 的引子進行 PCR，如此便能使 MoTS 與 EGFP 接合。(MoTS 為位於 pgrn 5' 不會轉譯且最接近 pgrn 序列的複製)再來，將接合完成的 MoTS-EGFP 與 pGEMT-EASY 質體接合。(此步驟是因為 pGEMT-EASY 質體有很多限制酶的切點，以及如果需要可以繼續養菌放大它的量，再加上 PCR 後 MoTS-EGFP 可能不純或根本沒接成功，所以之後便需使用限制酶來檢查，更可以減少直接接入 pCS-IGF2b-MoTS 的風險)之後，以 BsaI 與 EcoRV 兩限制酶在接合完成的 pGEMT-EASY 切三刀，再以跑電泳的方式確定三段切下片段的大小是否符合 400、700、3000bp，如果符合就表示已有成功的將 MoTS-EGFP 與 pGEMT-EASY 質體接合成 pGEMT-EASY-grnA-MoTS (如圖 1.A 所示)。由於 pGEMT-EASY-grnA-MoTS 質體並沒有辦法直接注射入斑馬魚胚胎內表現，所以需再以 AgeI 與 KpnI 將 pGEMT-EASY-grnA-MoTS 質體及新質體 pCS-IGF2b-MoTS (此為可注射入魚體表現之質體)各切兩刀，跑電泳後取下 MoTS-EGFP(約 1K)片段和 pCS-IGF2b-MoTS 切下後骨架完整部份(約 4k)(如圖 1.B 所示)以刀片取下，並進行 Gel Extraction 以純化此兩片段，之後再以 MoTS-EGFP 為插入體、pCS-IGF2b-MoTS 切下後骨架完整部份為載體進行接合，為了確認是否接合成功，以限制酶 KpnI 和 EcoRI 作用，並跑電泳確認片段大小是否正確，此測試載體構築完成(如圖 1.C 所示)。

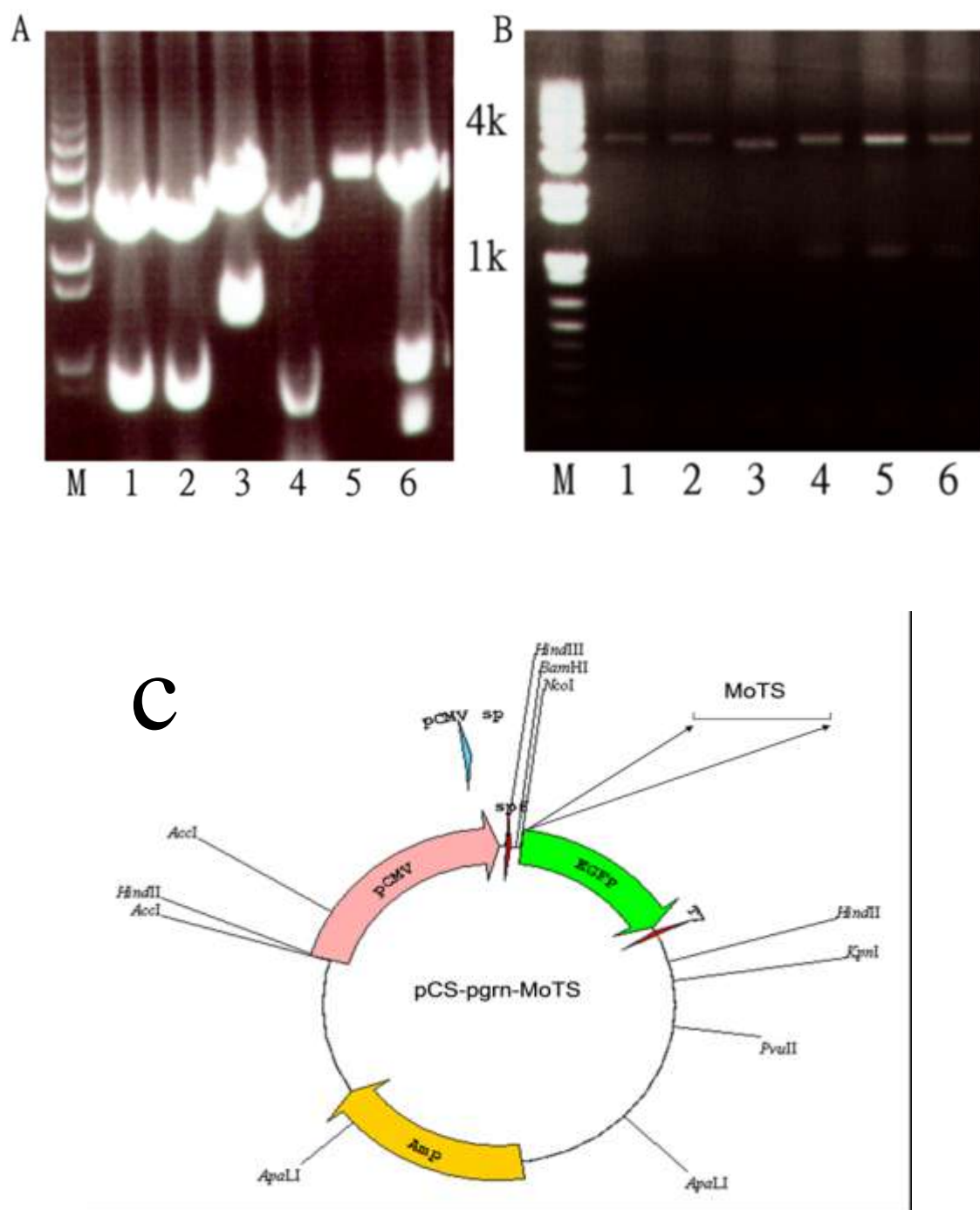


圖 1 建立 Morpholino 抑制效率測試載體 pCS-MOTS-pgrn。A.將 MoTS-EGFP 與 pGEMT-EASY 質體接合成 pGEMT-EASY-grnA-MoTS 之篩選限制酶圖譜。B. 再以 AgeI 與 KpnI 將 pGEMT-EASY-grnA-MoTS 質體及新質體 pCS-IGF2b-MoTS 作用。C.pCS-pgrn-MoTS



圖 2 此為雙重 Morpholino 抑制效率測試載體

接著，將接合成功的質體注射入斑馬魚胚胎內，並剝去卵殼以便在顯微鏡下觀察，魚體在汞燈的照射下，激發產生綠螢光(此為 EGFP 所表現)(如圖 3 所示)，證明了實驗所建立的 Morpholino 抑制效率測試載體已成功的注射入魚體內。

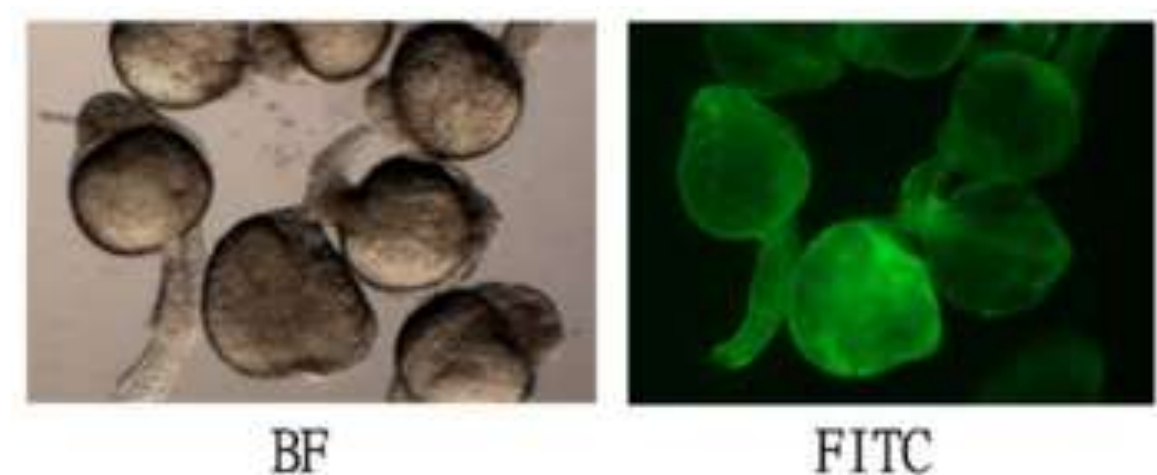


圖 3

二、將 Morpholino 和 Morpholino 抑制效率測試載體一同注射入斑馬魚體內表現

將雙重 Mo 抑制效率測試載體和 Mo 一同注射入魚體表現，經 24 小時後，以 PFA 固定斑馬魚，利用顯微鏡觀察並將其數據化。如圖 4 所示為斑馬魚經由 Mo 抑制後於顯微鏡下所拍的照片，可發現其螢光基因明顯被抑制了，因此可由 Mo 能抑制綠螢光的表現，得出 Mo 也擁有抑制 pgrn 蛋白表現的功能。(因為此抑制效

率測試載體是 pgrn 5'UTR 序列的複製，而抑制了此載體綠螢光蛋白的表現，便可同樣抑制 pgrn。）

如圖 5 所示為斑馬魚經由 Mo 抑制後與正常斑馬魚之間仍發綠螢光數目的比較長條圖，由圖我們可知，由單一 Mo 抑制後，斑馬魚體內發綠螢光的數目明顯減少，而經雙重 Mo 抑制後，斑馬魚體內發綠螢光的數目又更少了，因此知道雙重 Mo 能有效抑制 pgrn 蛋白的表現。

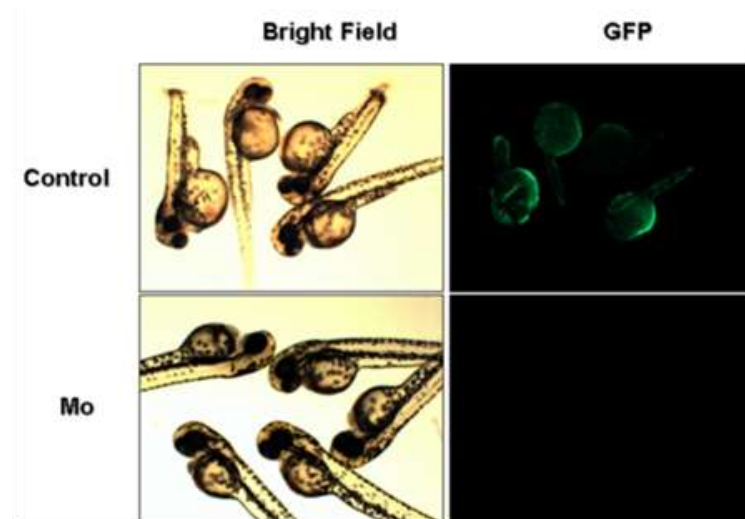


圖 4

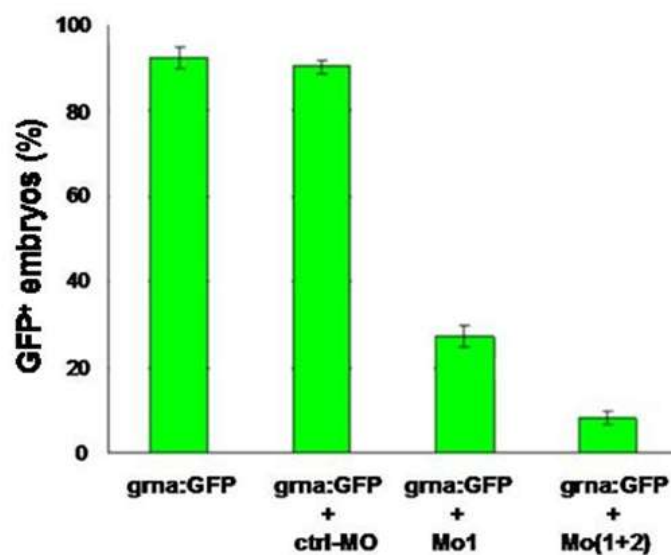


圖 5

三、測量體長

經由上述實驗確認 Mo 具有抑制 pgrn 的功能後，我們便將斑馬魚於顯微鏡下拍照，並測量體長，發現注射 Mo 抑制 pgrn 後的斑馬魚（如圖 7 所示），體長和正常的斑馬魚（wild type 如圖 6 所示）之間並沒有明顯的改變關係。（如圖 8 所示）



（上：圖 6 下：圖 7）

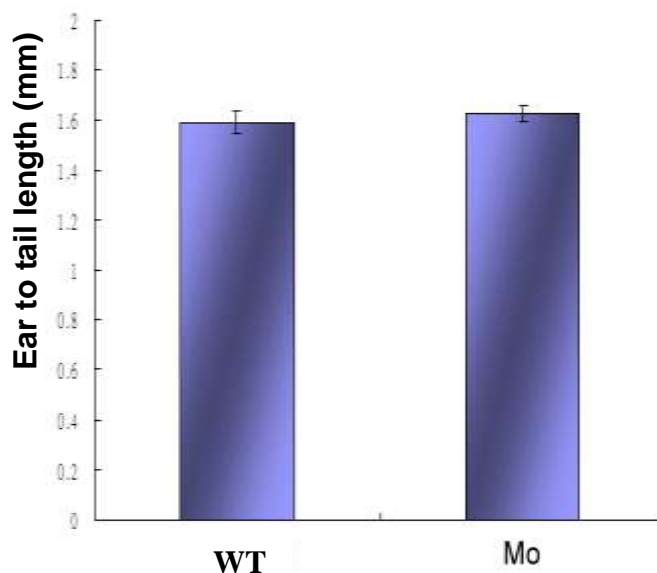


圖 8

四、注射 Morpholino 造成斑馬魚肝臟顯著縮小

經由上述實驗得知 Mo 能有效抑制 pgrn 蛋白的表現後，再利用已成功建立的肝臟擁有綠螢光的斑馬魚來進行實驗，如圖 9 所示中的最上側是作為 wild type 的正常斑馬魚，而最下側是注射 Mo 後的斑馬魚，可以明顯發現牠的肝臟綠螢光有明顯被抑制的現象，推測是因為抑制 pgrn 造成肝臟的萎縮，而中間的是將 Mo 其中的五個序列作改變，再注射入斑馬魚體內表現，由結果可發現這樣的 Mo 並不會對斑馬魚肝臟產生明顯的影響。

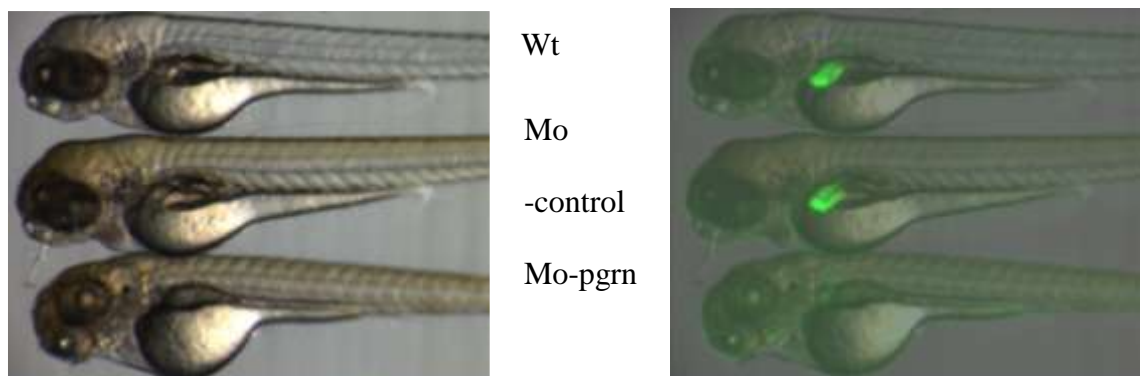


圖 9

五、切片染色分析

對斑馬魚進行切片染色分析，如圖 10 所示的 A 圖（control；注射將 Mo 其中的五個序列作改變的斑馬魚）和 B 圖（注射 Mo 後的斑馬魚）可以明顯發現，注射 Mo 後的斑馬魚，牠體內黃色虛線肝臟部分有明顯萎縮的現象，因此能更進一步的確定 Mo 抑制 pgrn 後將會導致肝臟的萎縮。此外，也發現紅色虛線腸道部分有較疏鬆的現象。

如圖 11 所示是測量 Mo 和 control 斑馬魚肝臟的細胞核間距，可以明顯看到：注射 Morpholino 後的斑馬魚，牠的細胞核間距明顯變小，因此可以確認，注射 Morpholino 抑制 progranulin 後將會導致斑馬魚肝臟明顯的萎縮。

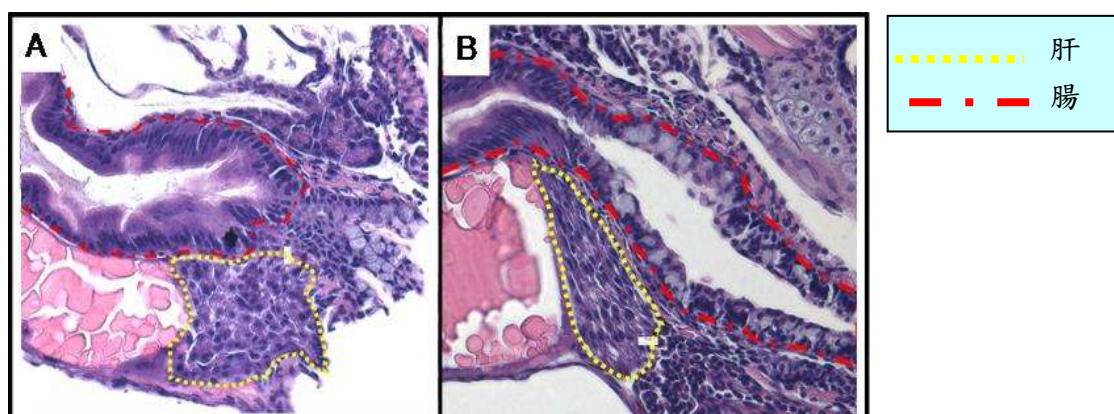


圖 10

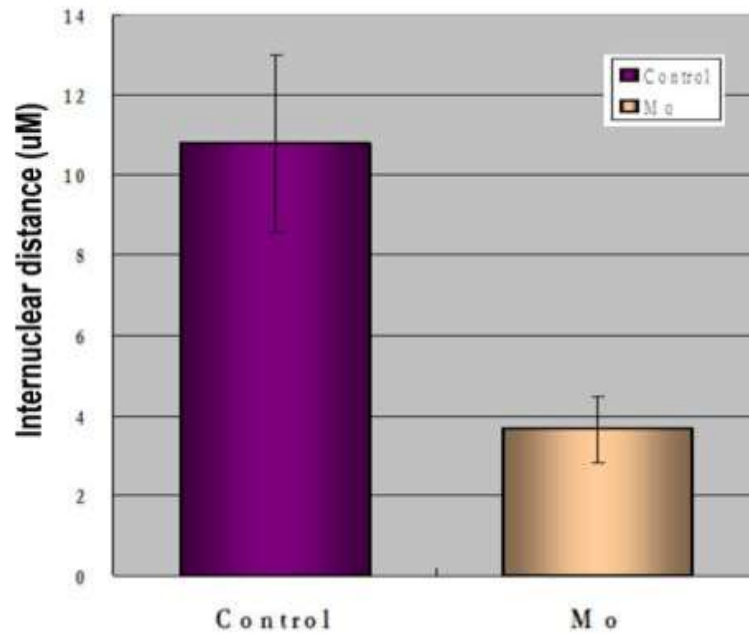


圖 11

六、RT-PCR

經由上述實驗確認抑制 pgrn 將會導致肝臟萎縮後，便利用 RT-PCR 並配合电泳的方式，更進一步的比較注射 Mo 前後，斑馬魚體內某些特定基因濃度改變關係的分析，發現許多與斑馬魚肝臟初期生長發育有關的基因，它們的濃度大多有明顯改變的現象（如圖 12 所示），其中 efla 是一種已知不會受 Mo 影響的基因，在實驗中用它來確認注射 Mo 前後所使用的基因量是固定的。

經由實驗可以得知，pgrn 在肝臟發育初期扮演了十分重要的角色，而抑制 pgrn 蛋白表現對肝臟的發育會造成全面性的影響。

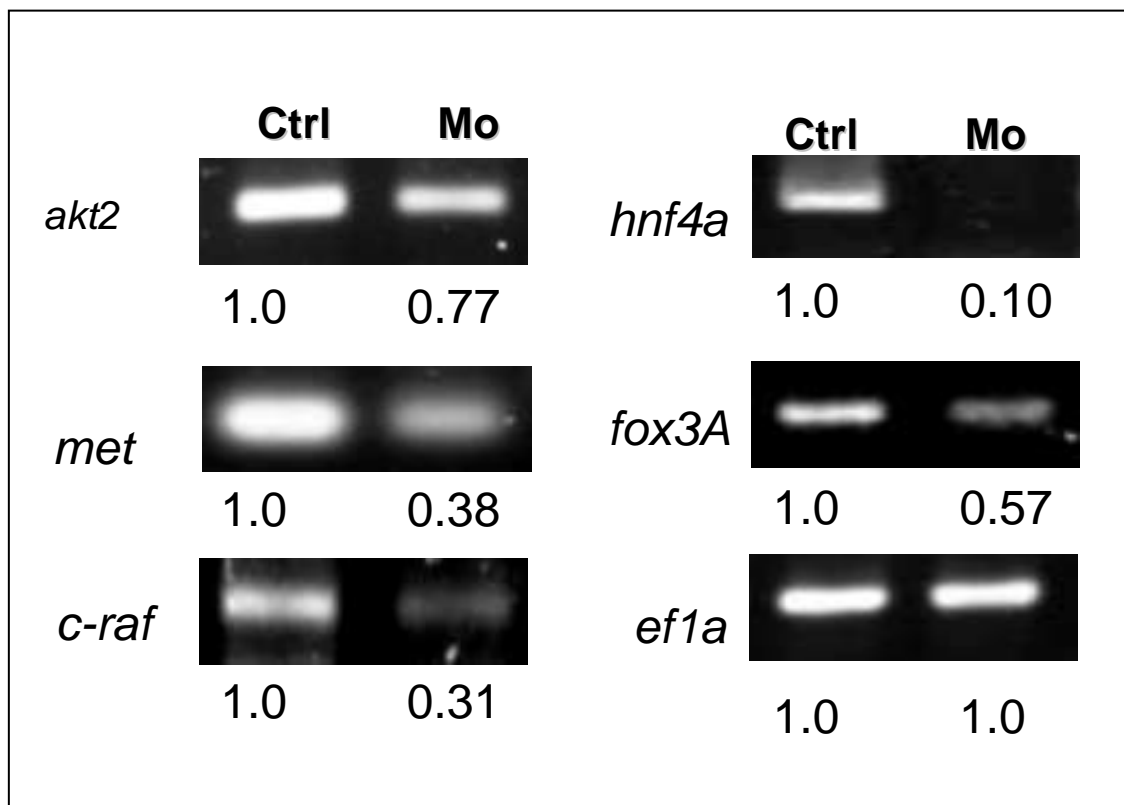


圖 12

陸、討論與未來展望

由我的實驗發現 progranulin 能影響肝臟的生長發育，而抑制 progranulin 將會導致肝臟的萎縮，然而，其更進一步的 progranulin 不同含量對肝臟的影響仍未確定,值得做進一步的研究。

Ex: 1.如果回復 pgrn 到正常量值，是否會使肝臟恢復初始大小呢？

2.如果使 pgrn 過量表現，將對肝臟產生怎樣的影響呢？

這些都是值得做進一步延伸探討的問題。

柒、結論與應用

從我的實驗發現，由螢光顯微鏡觀察，以及染色切片分析結果顯示，抑制 pgrn 的表現將會造成肝臟萎縮，並且透過 RT-PCR 分析得知 progranulin 會從肝臟發育初期即影響肝臟生長。

由於斑馬魚與人類的親緣關係相近，又容易獲得大量的突變魚種，生物學家認為瞭解斑馬魚基因圖譜將有助於了解人類的基因圖譜。而肝臟生長發育的過程對於解開肝癌的分子機制是十分重要的，因此了解 progranulin 此一生長因子是否參與此複雜過程中及各個因子的角色和功能，在肝臟組織工程和再生醫學的應用是有極大幫助的。

捌、參考文獻

Cadieux, B., B. P. Chitramuthu, et al. (2005). "The zebrafish progranulin gene family and antisense transcripts." BMC Genomics 6: 156.

Cheung, S. T., S. Y. Wong, et al. (2004). "Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res 10(22): 7629-36.

He, Z., C. H. Ong, et al. (2003). "Progranulin is a mediator of the wound response." Nat Med 9(2): 225-9.

Liu, Y., L. Xi, et al. (2007). "Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin-epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through downregulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2." BMC Cancer 7: 22.

Ong, C. H. and A. Bateman (2003). "Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell

derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis." Histol Histopathol 18(4): 1275-88.

Xu, S. Q., D. Tang, et al. (1998). "The granulin/epithelin precursor abrogates the requirement for the insulin-like growth factor 1 receptor for growth in vitro." J Biol Chem 273(32): 20078-83.

Zanocco-Marani, T., A. Bateman, et al. (1999). "Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor." Cancer Res 59(20): 5331-40.

評語

探討生長因子在肝臟生長發育中所扮演的角色，研究目的的明確有重要性。

利用斑馬魚為模式動物結果及發現有潛力。

已經 Fusion GFP, 圖 3 為何是偵測 FITC 的螢光？請再深入解釋。