

# 第十四屆旺宏科學獎

## 成果報告書

參賽編號：SA14-450

作品名稱：吃太多、吃太油、小心你的「肝」!!

姓名：饒佩書

關鍵字：致癌基因、脂肪合成、斑馬魚

## 壹、 研究動機

根據 103 年衛生福利部國民健康署公佈國人十大死因，癌症已連續三十年居首。而肝癌在十大癌症死因排名第二，其中肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)約占肝癌的 85%至 90%。肝細胞癌的病程進展，歷經慢性肝炎、脂肪肝、肝纖維化與肝硬化，最後發展成為肝癌。過去研究指出，在亞洲區有 80%肝癌是由於 B 型肝炎病毒(HBV)感染所造成，其中的 X 抗原(HBx)為最明顯的致癌因子。60%肝癌患者有 SRC 大量表現，且 60%肝癌患者發生 *p53* 基因在特定位點突變。目前治療肝癌的主要方法包含手術切除、局部消融、血管栓塞，以及肝臟移植等，而對於肝癌的化學治療目前仍缺乏有效藥物，也無法預測抗癌藥劑帶來的副作用。由於斑馬魚較其他模式動物有許多獨特的優點，已成為癌症和藥物篩選的熱門研究模式動物。

斑馬魚(zebrafish)，學名 *Danio rerio*，是一種體積小(3-4 公分)的雜食性魚類，主要棲息地在北印度、北巴基斯坦、尼泊爾等南亞地區，屬於熱帶地區的淡水魚。近年來斑馬魚已發展為一研究脊椎動物遺傳與發育的重要模式動物，由於其優點包含：具有誘發產卵的光週期、體外受精能大量產生子代、透明及發育期短的胚胎 (5-7 天)、易於觀察器官形成的過程、性成熟期短(3 個月)、可以物理及化學方法產生變種魚、可用分子生物學方法改變特定基因的表現及產生基因轉殖魚等特性(Lieschke and Currie, 2007)。

同時，近年來用斑馬魚來探討藥物作用的機制，如一些心血管、抗血管形成及抗癌等藥物，都已經發現在斑馬魚胚胎及哺乳類系統皆能產生相似的生理及形態的反應。另外，以一些小分子的化學物質浸泡處理斑馬魚胚胎，亦可觀察到明顯的器官及發育上的變化，且有些化學物質所引起器官的改變與特定基因缺陷所產生的變異種相類似。因此斑馬魚可用來從事各種藥物研究，例如化學藥物庫的篩選、藥物毒性及畸型的預測、藥理及毒物基因學等研究(MacRae and Peterson, 2003; Parnig et al., 2002; Rubinstein, 2003; Terriente and Pujades, 2013; Zon and Peterson, 2005)。同時，更可以斑馬魚做為測試人類治療新藥的一個介於細胞培養及昂貴的老鼠活體測試系統的橋樑。

近年來斑馬魚蛋白編碼基因功能的系統的全基因組分析工作已大致完成，並於 2013 年自然(Nature)期刊上發表(Kettleborough et al., 2013)。從基因組比較顯示斑馬魚與人類基因組間高度同源，有 70%的人類基因具有至少一個顯而易見的斑馬魚直向同源物，且 80%的人類疾病相關基因可在斑馬魚找到對等的基因(Howe et al., 2013)。這一發現更加強了使用斑馬魚研究人類疾病的適用性。

國家衛生研究院喻秋華博士的實驗室先前在小鼠的肝癌模式，找出四個肝癌形成的關鍵基因，可作為未來肝癌早期診斷或治療的有用分子標靶。誘導肝癌的小鼠模型，從肝癌後期

兩百多個致癌基因中發現四個基因(*Src*, *Edn1*, *Bmp4*, *Bmp7*) 與肝癌具有高度相關性。研究成果已於 2012 年 1 月發表於 *Carcinogenesis*(Lu et al., 2012)。為了更進一步研究肝癌並開發肝癌藥物篩選平台，喻秋華實驗室改用斑馬魚動物模式，並在之前建立了黃麴毒素(AFB1)和 HBx 誘導肝癌模式，發現 HBx 和 AFB1 在脂肪肝、肝炎、及肝細胞增生上皆有協同作用。成果於 2013 年發表於 *Acta Histochemica*(Lu et al., 2013a)。運用斑馬魚基因改造疾病模式，發現在 p53 突變的斑馬魚過度表達 HBx 或是 SRC 可誘導肝癌。這種現象與人類肝癌形成的機制非常類似，將為治療人類肝癌提供了潛在的藥物篩選平台。成果於 2013 年發表於 *PLoS One*(Lu et al., 2013b)。

先前已利用轉殖基因斑馬魚，發現HBx和p53突變有協同作用，在11個月大時會誘發肝細胞增生及肝癌形成；也建立src轉殖基因斑馬魚，並發現在p53突變種中會大量表現src基因，比較單獨表現src基因，更加速肝癌形成(Lu et al., 2013b)。由於近年來國民經濟能力提高，消費飲食習慣也逐漸改變。除興起的各式高油脂、高熱量、高鹽、及高糖的食品外，更因現代人生活壓力沉重、步調緊湊，外食者眾多，導致飲食習慣不佳、攝取偏多的油脂及熱量，而造成肥胖。根據衛福部顯示：2013年國人過重和肥胖比率與世界肥胖聯盟(World Obesity Federation)資料比較，我國成年男性及兒童肥胖比率皆為亞洲之冠，顯示我國肥胖人數偏多。而肥胖通常為許多疾病形成的高危險因子，如：代謝症候群、第二型糖尿病、非酒精性脂肪肝 (NFLD)等。更重要的是，肥胖也被認定為造成HCC的重要因子之一(Ray, 2013; Sun & Karin, 2012)。

但目前對於飲食誘發的肥胖與肝病肝癌的危險因子有何交互影響則不清楚。這也是本篇研究的重要性—了解飲食與肝臟疾病的相關性。而斑馬魚作為飲食誘發的肥胖的模式動物已有發表(Oka et al., 2010)，且已證實斑馬魚模式與哺乳動物的飲食誘發的肥胖是透過相類似的機制。

本研究欲以野生種、HBx(p53<sup>-</sup>)、src(p53<sup>-</sup>)、HBx,src(p53<sup>-</sup>)此四種基因轉殖斑馬魚為模式，探討過量及高脂飲食與 HBx、src 及 p53 基因突變之間的交互影響，了解在不同的基因表現下，過量及高脂飲食是否會提早誘發脂肪肝及肝癌，希望日後能藉此尋找其相互作用的機制，並建立加速肝病形成的斑馬魚模式，進一步研究分子標靶藥物以及作藥物篩選，造福群眾。

## 貳、研究目的

探討四種不同基因背景的斑馬魚，在三種不同飼食的條件下，經過 8 週及 16 週後，在體重、基因表現、組織病理上的變化：

- (一) 探討以三種不同飲食：正常(NOR-normal diet)、過度飲食誘發肥胖(DIO-diet induce obesity)及高脂飲食(FAT-high fat diet)，飼食三個月大斑馬魚八週後，所造成的肥胖現象及其導致肝臟病變的影響。
- (二) 以四種不同基因背景的斑馬魚：野生種、表現 *HBx* 加上 *p53* 基因突變、表現 *src* 加上 *p53* 基因突變、同時表現 *HBx* 及 *src* 加上 *p53* 基因突變，探討不同飲食與肝臟病變的危險因子對肝臟病變的加成作用。
- (三) 以體重變化、組織病理變化、基因表現、探討不同飼食方式與不同基因背景對肥胖及肝臟病變的影響。

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗動物：

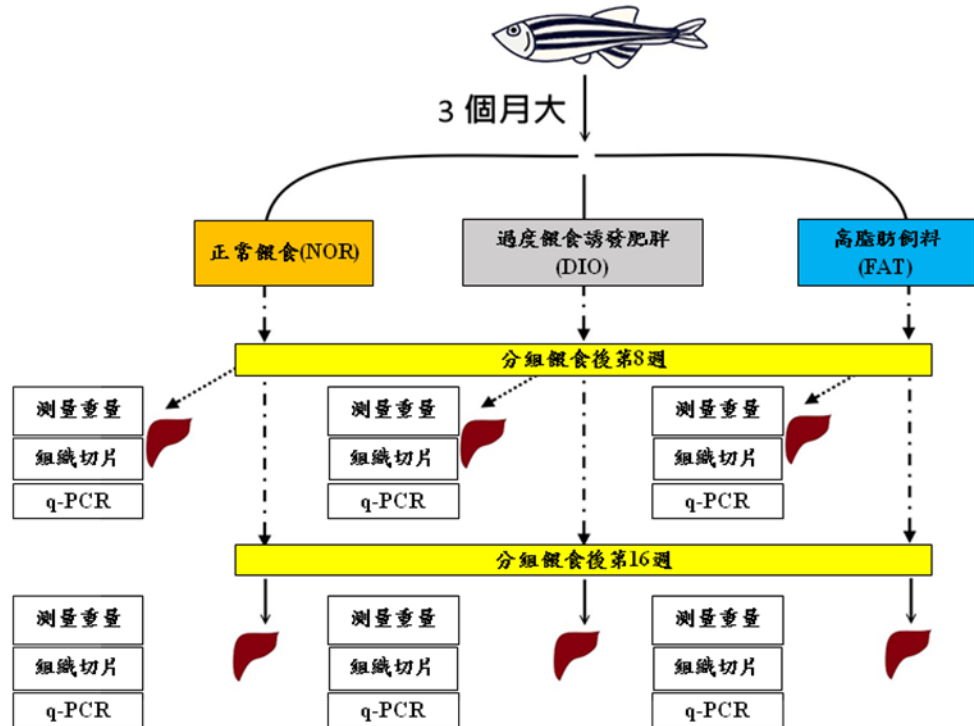
- (一) 野生種斑馬魚 AB stain(wild-type)以 WT 表示。在一般飼食條件下，用以模擬正常肝臟。
- (二) *p53* 突變的基因轉殖斑馬魚肝臟的啟動子 *fabp10a* (fatty acid binding protein 10a) 表現 B 型肝炎病毒 X 抗原基因(*HBx*)，以 *HBx(p53<sup>-</sup>)*表示。在一般飼食條件下，肝臟在 11 個月大時有 44%的機率產生肝癌(Lu et al., 2013b)。
- (三) 於 *p53* 突變的轉殖斑馬魚肝臟的啟動子 *fabp10a* 表現致癌基因 *src*，以 *src(p53<sup>-</sup>)*表示。在一般飼食條件下，肝臟在 9 個月有 33%產生肝癌(Lu et al., 2013b)。
- (四) 將 *HBx(p53<sup>-</sup>)*與 *src(p53<sup>-</sup>)*任意雌雄配對，使 *p53* 突變的轉殖斑馬魚肝臟的啟動子 *fabp10a* 同時表現 B 型肝炎病毒 X 抗原基因(*HBx*)及致癌基因 *src*，以 *HBx,src(p53<sup>-</sup>)*表示。此轉殖斑馬魚為新建立而目前尚未發表。

### 二、飼食材料：

- (一) 豐年蝦(brine shrimp, 學名 *Artemia*): 水產常見的活體飼料。因其不易汙染水質、含較高蛋白質量，可為斑馬魚日常的營養來源之一。
- (二) 粉狀飼料：斑馬魚生長所需飼料，每日一匙，成分因年齡而異。
- (三) 香魚飼料：一種誘發魚類生成脂肪的水產飼料。原設計給香魚養殖業增加肉質肥美度使用，目前也有人用來飼食觀賞魚。

## 肆、研究過程及方法

一、實驗流程及步驟(如圖一):



圖一、實驗流程及步驟

表一、取樣數目(單位：隻)

8 weeks	treatment	WT	HBx(p53 <sup>-/-</sup> )	src(p53 <sup>-/-</sup> )	HBx,src(p53 <sup>-/-</sup> )
	NOR	20	20	20	15
	DIO	20	20	20	15
	FAT	20	18	20	-
16 weeks	treatment	WT	HBx(p53 <sup>-/-</sup> )	src(p53 <sup>-/-</sup> )	HBx,src(p53 <sup>-/-</sup> )
	NOR	20	20	20	15
	DIO	20	20	20	15
	FAT	20	17	20	-

- (一) 將 wild-type、src(p53<sup>-/-</sup>)、HBx(p53<sup>-/-</sup>)、HBx,src(p53<sup>-/-</sup>)此四種魚自受精後三個月大起，分別以三種不同的餵食方式餵食以模擬正常、過量、高油脂的飲食。
- (二) 分組餵食 8 週後採集肝臟組織(約 20 隻魚)，並於取肝前測量每隻魚的重量(表一)
- (三) 餵食未取肝斑馬魚持續至第 16 週。每週紀錄、觀察各組重量變化。
- (四) 分組餵食第 16 週再次採集肝臟組織(約 20 隻魚)，並於取肝前測量每隻魚的重量。(取樣數目如表一)
- (五) 收集肝臟組織後，取 1/3 肝臟組織進行 RNA 萃取，並將所得 mRNA 反轉錄成 cDNA。

- (六) 完成後的 cDNA 進行即時定量聚合酶連鎖反應(q-PCR)，並分析 Ct 值。
- (七) 收集肝臟組織後，取 1/3 肝臟組織進行病理切片，並做 HE 染色，染色後的切片拍攝照片並分析肝臟組織的病理型態。

## 二、 餵食方式(如表二)

表二、餵食方式

時間 \ 餵食組別	正常餵食組(NOR)	過度餵食組(DIO)	高脂肪飼料組(FAT)
09:00	粉狀飼料 1 匙	粉狀飼料 1 匙	粉狀飼料 1 匙
11:00		豐年蝦 2 ml	香魚飼料 1 匙
15:00	豐年蝦 0.5ml	豐年蝦 2 ml	香魚飼料 1 匙 豐年蝦 0.5ml
17:30		豐年蝦 2 ml	香魚飼料 1 匙

- (一) 所有的組別每日 9:00 餵食粉狀飼料一匙(約 0.22g)
- (二) 豐年蝦濃度計算:
1. 豐年蝦：整體溶液= 10 : 48.5
  2. 取一 50 ml 離心管盛入剛孵化的豐年蝦，並靜置於暗室，只留底部照光，使全部豐年蝦因趨光而集聚於底部。
  3. 濃縮豐年蝦體積至 10ml，並吸取上清液使總體積達 48.5ml。於餵食前搖勻。
- (三) 正常餵食組(NOR):
- 每日 15:00 以滴管餵食 1 次豐年蝦，每次 0.5ml
- (四) 過度餵食誘發肥胖組(DIO): (共為 NOR 組的 12 倍)
- 每日以滴管餵食 3 次豐年蝦，時間分別為 11:00, 15:00, 17:30，每次 2ml
- (五) 高脂肪飼料組(FAT):
1. 每日 15:00 以滴管餵食 1 次豐年蝦，每次 0.5ml
  2. 每日餵食 3 次香魚飼料，時間分別為 11:00, 15:00, 17:30，每次一匙(約 0.22g)

### 三、 測量重量並記錄

(一) 開始餵食後的 8~16 週間，每週測量，紀錄於體重的連續變化：

1. 取一個 200ml 燒杯置於電子天秤上並歸零。
2. 取一魚缸並配製 1X 麻藥：Tricaine powder 10mg, ddH<sub>2</sub>O 48 ml, Tris(1M, PH9.5) 2 ml，中和至 PH7.0~7.5。
3. 將整缸魚浸入麻藥中，待所有魚麻醉後，將全數撈起，以擦手紙瀝乾後，即放入燒杯內讀取天秤數字。
4. 置入裝清水的魚缸中，等到其恢復後，置回原魚缸內，並換取下一缸。

(二) 取肝臟前，測量重量：

1. 取一個 200ml 燒杯置於電子天秤上並歸零。
2. 將欲採集肝臟的魚浸入麻藥中，待其麻醉後，撈起、以擦手紙瀝乾後，即放入燒杯內讀取電子天秤數字。讀取數字後，放入培養皿中，開始收集肝臟。

### 四、 收集肝臟組織

- (一) 以解剖剪刀剪開魚腹，取出肝臟，清除其他的內臟，並將肝臟分三等份。
- (二) 1/3 肝臟放入微量離心管內，加入均質用的珠子(0.5mm)，待所有魚處理完後，投入液態氮桶，保存於-80°C，此部分用來萃取 RNA。
- (三) 1/3 肝臟放入已加入 10%福馬林的微量離心管內，再經由 NHRI 病理核心實驗室進行組織石蠟包埋及切片。
- (四) 1/3 肝臟放入微量離心管內，內含萃取蛋白質的試劑及均質用的珠子(0.5mm)，待所有魚處理完後，投入液態氮桶，保存於-80°C，將來可分析蛋白質的表現。

### 五、RNA 分析基因表現

- (一) 以均質機磨碎肝臟組織，並使用 RNA Spin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) 萃取 RNA。
- (二) RNA 反轉錄 PCR (Reverse Transcription PCR, RT-PCR):使用 High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit(Life Technologies)
  1. 加入 2X RT Buffer 10μl、20X Enzyme Mix 1μl、RNA sample 2μg、最後補 Nuclease-free H<sub>2</sub>O 至 20μl
  2. 於聚合酶連鎖反應器進行反應：37°C - 60min、95°C - 5 min、最終降回 4°C
- (三) 即時聚合酶連鎖反應(quantitative real-time PCR, q-PCR)
  1. 將 cDNA 稀釋 100 倍

2. 於 384 光學反應盤的每個 well 內依序加入 primer mix(Forward and Reverse, 如表三) 2.5pM/μl、2X SYBR Green Mix 5μl、每樣本 cDNA 3.8μl。
3. 每樣本偵測 10 個基因(*actin*, *pparg*, *srebpl*, *chrebp*, *fasn*, *pap*, *agapt*, *ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)，每樣本每基因重複 3 次，不同組別利用 q-PCR 儀器偵測 3 次 Ct 值，以減少機器及實驗操作誤差。以 *actin* 做為 internal control。
4. 利用 q-PCR 儀器(ABI PRISM 7900)測量 Ct 值:
  - (1) 第一階段：50°C – 2min, 95°C – 5 min, 4°C – forever
  - (2) 第二階段：95°C – 10min
  - (3) 第三階段：(40 次循環) 95°C – 15 sec, 60°C – 1min
  - (4) 第四階段：95°C – 15 sec, 60°C – 15 sec, 95°C – 15 sec
5. 分析整理：所有樣本中不同基因的 Ct 值皆與 *actin* 基因的 Ct 值相減，得 ΔCt 值。再由  $(1 + q\text{-PCR 反應效率})^{-(\Delta Ct)}$  推測原始 cDNA 含量。所有數據皆以 wild-type NOR(8 或 16 週)為對照組，並得其比例後比較分析數據。

表三、引子序列(Primer sequence)：

Gene Name	Primer name	Start	Sequence (5' to 3')	Accession number	Size (bp)
<b>lipogenic factors</b>					
<i>pparg</i>	Q- <i>pparg</i> -F	513	GGTTTCATTACGGCGTTCAC	NM_131467.1	250
	Q- <i>pparg</i> -R	762	TGGTTCACGTCACCTGGAGAA		
<i>srebpl</i>	Q- <i>srebpl</i> -F	2163	CATCCACATGGCTCTGAGTG	NM_001105129.1	250
	Q- <i>srebpl</i> -R	2412	CTCATCCACAAAGAAGCGGT		
<i>chrebp</i>	Q- <i>chrebp</i> -F-2	818	GGAGATGGACTCGCTCTTTG	XM_001338467	200
	Q- <i>chrebp</i> -R-2	513	GCAGAGGCTCAAAAGTGTCC		
<b>lipogenic enzyme</b>					
<i>fasn</i>	Q- <i>fasn</i> -F	7183	ATCTGTTCTGTTTCGATGGC	XM_682295	250
	Q- <i>fasn</i> -R	7432	AGCATATCTCGGCTGACGTT		
<i>pap</i>	Q- <i>pap</i> -F	976	CAGTTCTTCCTGATTGCTGC	XM_692415	250
	Q- <i>pap</i> -R	1225	TCCTCAAAGCTTAGTTCGGG		
<i>agapt</i>	Q- <i>agapt</i> -F	517	TTGGCGAAAAAGGAACTGTC	NM_212992	250
	Q- <i>agapt</i> -R	820	GGTGGTACTTGAGTTTGGGG		
<b>cell cycle/division related genes</b>					
<i>ccne1</i>	Q- <i>ccne1</i> -F	371	TCCCGACACAGGTTACACAA	NM_130995.1	201
	Q- <i>ccne1</i> -R	571	TTGTCTTTTCCGAGCAGGTT		
<i>cdk1</i>	Q- <i>cdk1</i> -F	779	CTCTGGGGACCCCTAACAAAT	NM_212564.2	200
	Q- <i>cdk1</i> -R	978	CGGATGTGTCATTGCTTGTC		
<i>cdk2</i>	Q- <i>cdk2</i> -F	794	CAGCTCTCCGGATATTTTCG	NM_213406.1	199
	Q- <i>cdk2</i> -R	992	CCGAGATCCTCTTGTTTGGGA		

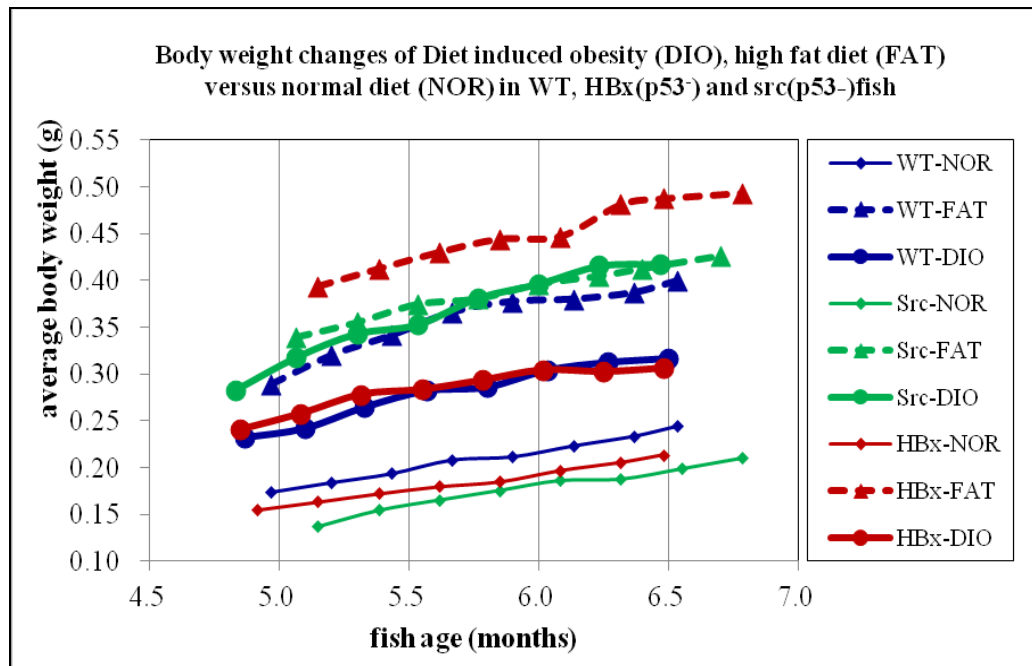


## 六、組織切片分析

- (一) 取用部分肝臟石蠟包埋並切片並執行 HE(hematoxylin and eosin)染色
- (二) 使用 Non-xylene, Ethanol 以逐步脫蠟復水後，加入 hematoxylin、eosin 染劑，再逐步脫水且封片保存。
- (三) 病理分析方式
  - 1.正常組織(normal)：細胞排列整齊、核大小相近、細胞核質比不高。
  - 2.脂肪肝(steatosis)：肝細胞的細胞質中，具明顯由脂肪油滴組成的空泡。
  - 3.肝細胞增生(hyperplasia)：具較大且輕微不正常的細胞核，有較高的核質比。
  - 4.肝細胞非典型增生(dysplasia)：已改變型態的細胞，有較大的細胞核及明顯的核仁。
  - 5.肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)：大片多型態且增大的細胞核，能明顯觀察出核仁。

## 伍、研究結果

一、野生種、表現 *HBx* 加上 *p53* 基因突變、表現 *src* 加上 *p53* 基因突變、同時表現 *HBx* 及 *src* 加上 *p53* 基因突變分組餵食後約 8 週至 16 週期間的重量變化(如圖二)：



圖二、三種不同餵食方法對四種不同基因背景的斑馬魚造成的體重變化

### 結論 1：

- (1) 各組斑馬魚重量隨餵食時間增加而增加。
- (2) 對於野生種、表現 *HBx* 加上 *p53* 基因突變、表現 *src* 加上 *p53* 基因突變各組間比較，高脂飲食增加的平均重量比較正常飲食、過度餵食更為高。
- (3) 在所有魚種，高脂飲食增加的平均重量高於過度餵食。
- (4) 在正常飲食組，野生種的重量最大；在過度餵食組，表現 *src* 加上 *p53* 基因突變的魚種重量最大；在高脂飲食組，表現 *HBx* 加上 *p53* 基因突變的魚種重量最大。
- (5) 各組直線斜率間相近，推論在餵食後前 8 週重量變化較顯著。

二、 wild-type、src(p53<sup>-</sup>)、HBx(p53<sup>-</sup>)、HBx,src(p53<sup>-</sup>)在分組餵食後於第 8、16 週收集肝臟前的重量：

(一) 野生種(WT) (圖三 A)

1. 在野生種過量餵食或高脂飲食 8 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有極顯著差異(\*\*, p<0.01)或顯著差異(\*, p<0.05)。
2. 過量餵食或高脂飲食 16 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。

(二) HBx(p53<sup>-</sup>) (圖三 B)

1. 在 HBx(p53<sup>-</sup>)過量餵食或高脂飲食 8 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。
2. 過量餵食或高脂飲食 16 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。

(三) src(p53<sup>-</sup>) (圖三 C)

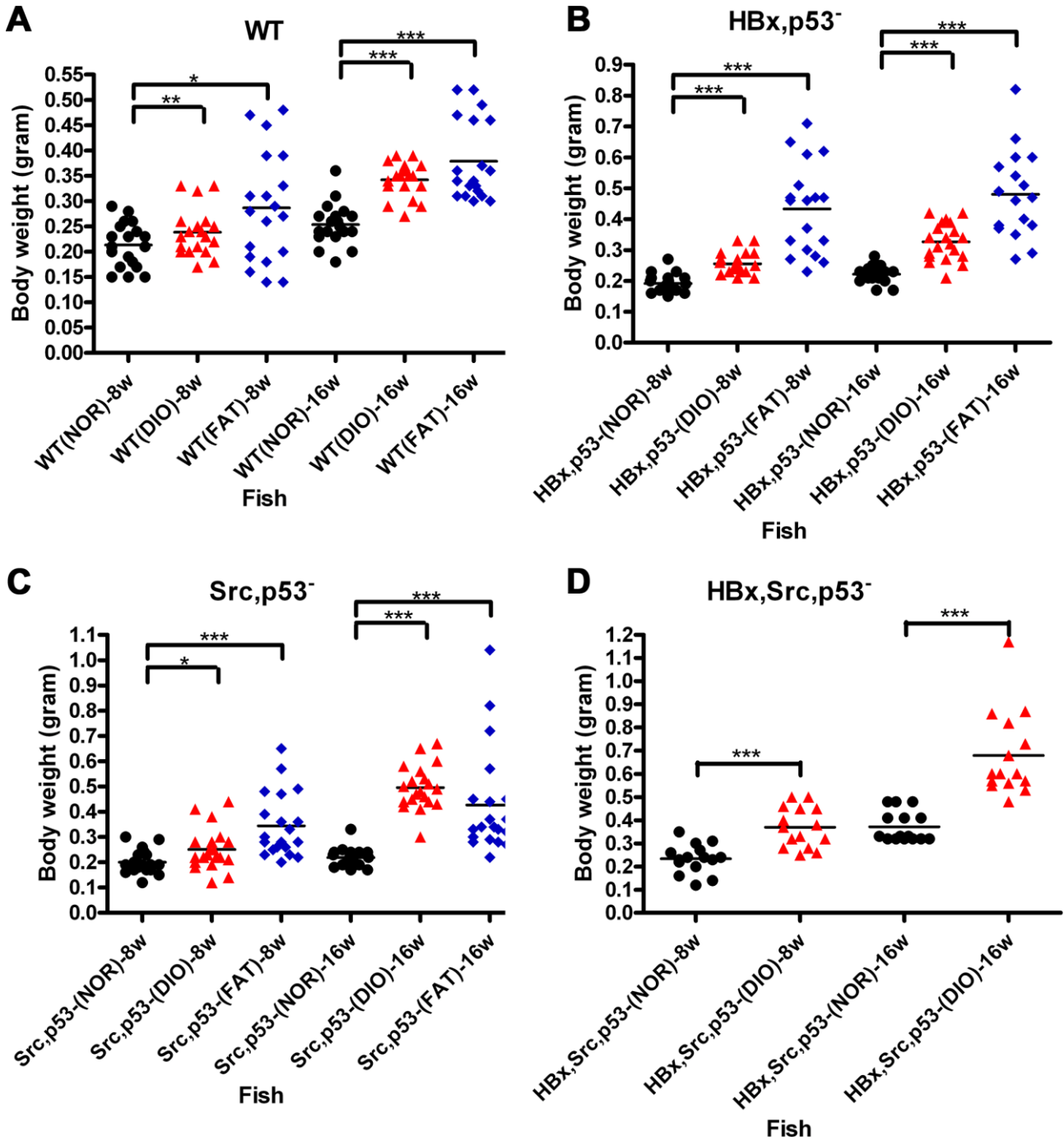
1. 在 src(p53<sup>-</sup>)過量餵食或高脂飲食 8 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有顯著差異(\*, p<0.05)或超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。
2. 過量餵食或高脂飲食 16 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。

(四) HBx,src(p53<sup>-</sup>) (圖三 D)

1. 在 HBx,src(p53<sup>-</sup>)過量餵食 8 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。
2. 過量餵食 16 週後其重量明顯高於正常餵食組，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。

結論 2：

- (1) 不同基因背景的魚在過量餵食或高脂飲食都會增加體重。
- (2) 且過量餵食或高脂飲食 16 週比 8 週後其重量明顯更多。



圖三、不同餵食方法對四種不同基因背景的斑馬魚造成的體重變化

三、利用 q-PCR 方法得到以野生種(WT)正常餵食組(NOR)的基因表現量作為基準值(對照組)，探討**野生種(WT)在過量餵食或高脂飲食下**，脂肪合成因子(lipogenic factor)、脂肪合成酶(lipogenic enzyme)、細胞週期相關(cell cycle related)基因表現量的結果：

(一)野生種(WT)過量餵食或高脂飲食—脂肪合成因子表現量(圖四 A, B, C)

1. 野生種過量餵食 8 週後脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*)比正常餵食組都有較高表現。且有顯著差異(\*,  $p<0.05$ )或極顯著差異(\*\*,  $p<0.01$ ) 超級顯著差異。
2. 高脂飲食 8 週後脂肪合成因子(*srebp1*)比正常餵食組都有較高表現，且有超級顯著差異(\*\*\*,  $p<0.001$ )。
3. 過量餵食或高脂飲食 8 週 *chrebp* 則表現更低。
4. 野生種過量餵食或高脂飲食 16 週後脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*, *chrebp*)都表現更高，比正常餵食組有超級顯著差異(\*\*\*,  $p<0.001$ )。

(二) 野生種(WT)過量餵食或高脂飲食—脂肪合成酶相關基因表現量(圖四 D, E, F)

1. 野生種過量餵食 8 週後脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *pap*)比正常餵食組沒有差異，*fasn* 則有較低表現。
2. 高脂飲食 8 週後脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*)比正常餵食組都有較高表現，且有顯著差異(\*,  $p<0.05$ )。 *pap* 沒有差異。
3. 野生種過量餵食或高脂飲食 16 週後脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *pap*)表現量比正常餵食組都有較高表現，且有超級顯著差異(\*\*\*,  $p<0.001$ )或顯著差異(\*,  $p<0.05$ )。 *fasn* 則有較低表現。

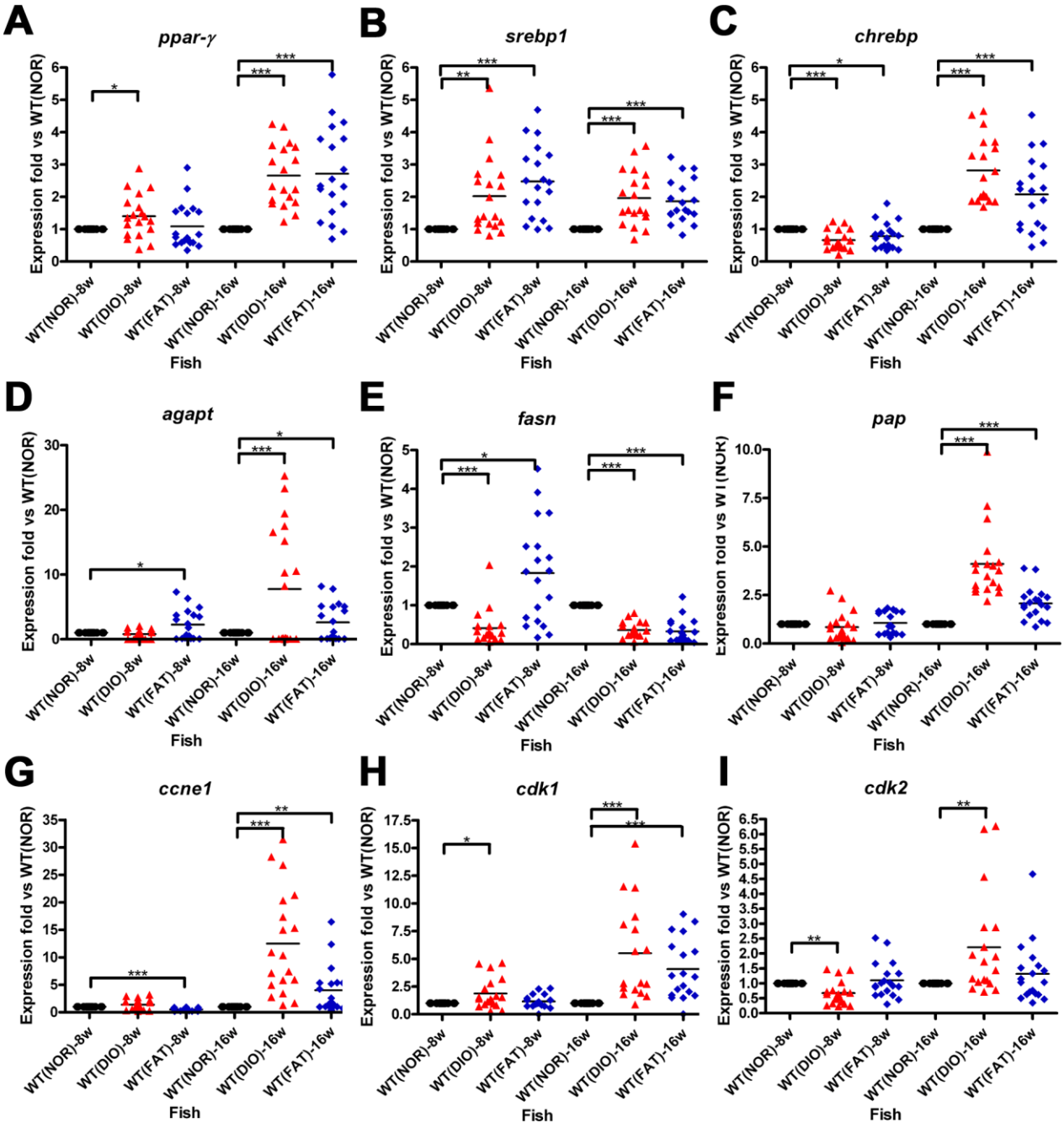
(三) 野生種(WT)過量餵食或高脂飲食—細胞週期相關基因表現量(圖四 G, H, I)

1. 野生種過量餵食 8 週後細胞週期相關基因(*cdk1*)比正常餵食組都有較高表現，且有顯著差異(\*,  $p<0.05$ )。 *ccne1* 沒有顯著差異， *cdk2* 則有較低表現。
2. 高脂飲食 8 週後所有細胞週期相關基因比正常餵食組都沒有較高表現。
3. 野生種過量餵食或高脂飲食 16 週後細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)表現量比正常餵食組都有較高表現，且有超級顯著差異(\*\*\*,  $p<0.001$ )或極顯著差異(\*\*,  $p<0.01$ )。只有 *cdk2* 在高脂飲食 16 週後比正常餵食組沒有差異。

結論 3:

- (1) 野生種的魚在過量餵食或高脂飲食都會增加脂肪合成因子及脂肪合成酶相關基因表現，且過量餵食或高脂飲食 16 週比 8 週後增加更多。
- (2) 過量餵食 8 週只有增加 *cdk1* 表現，高脂飲食 8 週並不會增加細胞週期相關基因表現。
- (3) 過量餵食 16 週後細胞週期相關基因表現量比正常餵食組都有較高表現。

### Wild-type fish



圖四、野生種(WT)過量餵食或高脂飲食—脂肪合成因子、脂肪合成酶、細胞週期相關基因相關基因表現量

四. 不同基因背景對脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*, *chrebp*)、脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*, *pap*)、細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)表現的結果：

(一) 不同基因背景正常餵食組脂肪合成因子表現量(圖五 A, B, C)

1. HBx(p53<sup>-</sup>) 及 src(p53<sup>-</sup>)正常餵食(NOR) 8 週(相當於 5 個月大的魚)，脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*, *chrebp*)表現量都比野生種(WT)要高，且有顯著差異極顯著差異(\*\*, p<0.01)或超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001) ，除了 *srebp1* 在 HBx(p53<sup>-</sup>)的魚比野生種(WT)沒有差異。
2. HBx(p53<sup>-</sup>) 及 src(p53<sup>-</sup>)正常餵食(NOR) 16 週(相當於 7 個月大的魚)，脂肪合成因子表現量都比野生種(WT)要高，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)。
3. 16 週(相當於 7 個月大的魚)比 8 週(相當於 5 個月大的魚)表現量更高。

(二) 不同基因背景正常餵食組脂肪合成酶相關基因表現量(圖五 D, E, F)

1. src(p53<sup>-</sup>)正常餵食(NOR) 8 週(相當於 5 個月大的魚)，脂肪合成酶相關基因(*fasn*, *pap*)表現量都比野生種(WT)要高，且有極顯著差異(\*\*, p<0.01)或超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001) 。HBx(p53<sup>-</sup>)沒有更高表現。*fasn* 在 HBx(p53<sup>-</sup>)表現比 WT 更低。
2. src(p53<sup>-</sup>)正常餵食(NOR) 16 週(相當於 7 個月大的魚)，脂肪合成因子(*agapt*, *pap*)表現量都比野生種(WT)要高，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001) 。HBx(p53<sup>-</sup>)只有 *pap* 表現量都比野生種(WT)要高，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001) 。*fasn* 在 src(p53<sup>-</sup>) HBx(p53<sup>-</sup>)表現比 WT 更低。
3. src(p53<sup>-</sup>)比 HBx(p53<sup>-</sup>)表現量更高。

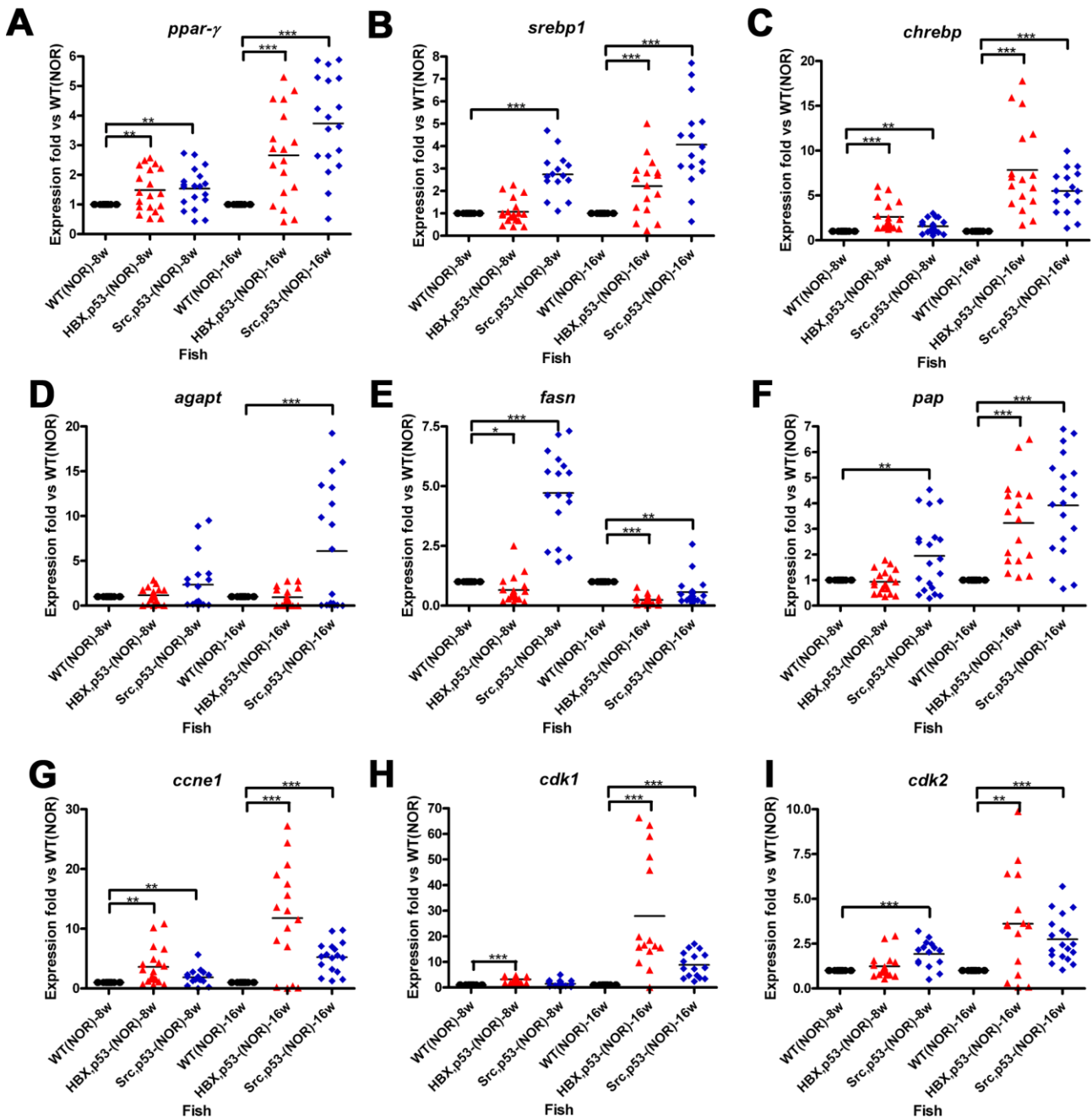
(三) 不同基因背景正常餵食組細胞週期相關基因表現量(圖五 G, H, I)

1. HBx(p53<sup>-</sup>) 及 src(p53<sup>-</sup>)正常餵食(NOR) 8 週(相當於 5 個月大的魚)，細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)表現量都比野生種(WT)要高，且有極顯著差異(\*\*, p<0.01)或超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001) 。除了 *cdk1* 在 src(p53<sup>-</sup>)及 *cdk2* 在 HBx(p53<sup>-</sup>)比野生種(WT)沒有差異。
2. HBx(p53<sup>-</sup>) 及 src(p53<sup>-</sup>)正常餵食(NOR) 16 週(相當於 7 個月大的魚)，細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)表現量都比野生種(WT)要高，且有超級顯著差異(\*\*\*, p<0.001)或極顯著差異(\*\*, p<0.01) 。
3. 16 週(相當於 7 個月大的魚)比 8 週(相當於 5 個月大的魚)表現量更高。

**結論 4：**

- (1) HBx(p53<sup>-</sup>)或 src(p53<sup>-</sup>)對脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*, *chrebp*)、脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*, *pap*)、細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)表現有重大影響。src(p53<sup>-</sup>)比 HBx(p53<sup>-</sup>)表現量更高。
- (2) 正常餵食(NOR) 16週(相當於7個月大的魚)比正常餵食(NOR) 8週(相當於5個月大的魚)在這些基因的表現上影響更大，代表魚愈老其致癌基因會誘發更高的病變。

**Normal diet in Different genetic background**



圖五、不同基因背景正常餵食組—脂肪合成因子、脂肪合成酶、細胞週期相關基因相關基因表現量



五、利用 q-PCR 方法得到以野生種(WT)正常餵食組(NOR)的基因表現量作為基準值(對照組)的結果，探討 **HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚**在**過量餵食或高脂飲食**下，脂肪合成因子(lipogenic factor)、脂肪合成酶(lipogenic enzyme)、細胞週期相關(cell cycle related)基因表現量：

(一) HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食－脂肪合成因子表現量(圖六 A, B, C)

1. HBx(p53<sup>-</sup>)過量餵食或高脂飲食 8 週後脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*)比正常餵食組都有較高表現。且有顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )或超級顯著差異(\*\*\*,  $p < 0.001$ )。  
*chrebp* 沒有差異。
2. HBx(p53<sup>-</sup>)過量餵食或高脂飲食 16 週後，只剩 *ppar-γ* 比正常餵食組表現更高，有顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )或極顯著差異(\*\*,  $p < 0.01$ )。  
*srebp1*, *chrebp* 沒有差異。

(二) HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食－脂肪合成酶相關基因表現量(圖六 D, E, F)

1. HBx(p53 突變)斑馬魚過量餵食 8 週後脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*, *pap*)比正常餵食組都有較高表現，且有極顯著差異(\*\*,  $p < 0.01$ )或顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )。
2. 高脂飲食 8 週後脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*)比正常餵食組都有較高表現，且有顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )。
3. HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食或高脂飲食 16 週後脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*)表現量比正常餵食組都有較高表現，且有超級顯著差異(\*\*\*,  $p < 0.001$ )或顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )。

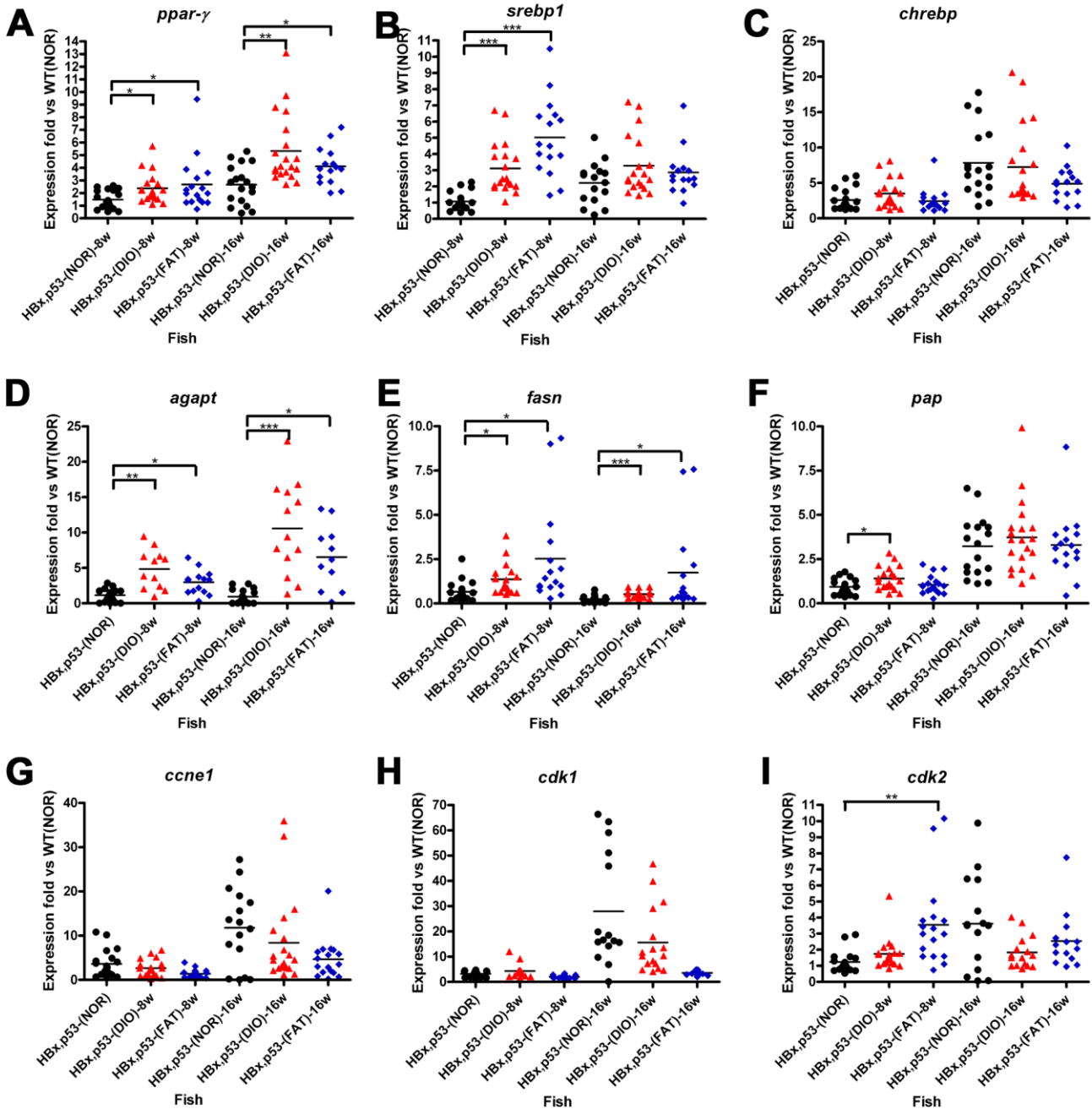
(三) HBx (p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食－細胞週期相關基因表現量(圖六 G, H, I)

1. HBx(p53<sup>-</sup>)過量餵食 8 週後所有細胞週期相關基因比正常餵食組都沒有較高表現。
2. 高脂飲食 8 週後細胞週期相關基因(*cdk2*)比正常餵食組有較高表現，且有極顯著差異(\*\*,  $p < 0.01$ )。  
*ccne1*, *cdk1* 沒有顯著差異。
3. HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食 16 週後細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)表現量比正常餵食組都沒有較高表現。

結論 5：

- (1) HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚在過量餵食或高脂飲食都會增加脂肪合成因子及脂肪合成酶相關基因表現，且過量餵食或高脂飲食 16 週比 8 週後增加更多。
- (2) HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食 8 週後所有細胞週期相關基因比正常餵食組都沒有較高表現。
- (3) HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚高脂飲食 8 週後細胞週期相關基因(*cdk2*)比正常餵食組有較高表現

### HBx, p53- fish



圖六、HBx(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食或高脂飲食—脂肪合成因子、脂肪合成酶、細胞週期相關基因相關基因表現量

六、利用 q-PCR 方法得到以野生種(WT)正常餵食組(NOR)的基因表現量作為基準值(對照組)的結果，探討 **src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚**在**過量餵食或高脂飲食**下，脂肪合成因子、脂肪合成酶、細胞週期相關基因表現量：

(一) **src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚**過量餵食—脂肪合成因子表現量(圖七 A, B, C)

1. **src(p53<sup>-</sup>)**過量餵食 8 週後脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*, *chrebp*)沒有比正常餵食組都有較高表現。
2. 高脂飲食 8 週後脂肪合成因子(*srebp1*, *chrebp*)比正常餵食組都有較高表現，且有超級顯著差異(\*\*\*,  $p < 0.001$ )。
3. **src(p53<sup>-</sup>)**過量餵食或高脂飲食 16 週後脂肪合成因子(*ppar-γ*)都表現更高，比正常餵食組有顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )。

(二) **src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚**過量餵食—脂肪合成酶相關基因表現量(圖七 D, E, F)

1. **src(p53<sup>-</sup>)**過量餵食高脂飲食 8 週後所有脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*, *pap*)比正常餵食組都沒有較高表現。*fasn* 表現更低。
2. **src(p53<sup>-</sup>)**過量餵食 16 週後脂肪合成酶相關基因(*pap*)表現量比正常餵食組都有較高表現，且有超級顯著差異(\*\*\*,  $p < 0.001$ )。
3. **src(p53<sup>-</sup>)**高脂飲食 16 週後脂肪合成酶相關基因(*fasn*, *pap*)表現量比正常餵食組都有較高表現，且有超級顯著差異(\*\*\*,  $p < 0.001$ )或顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )。

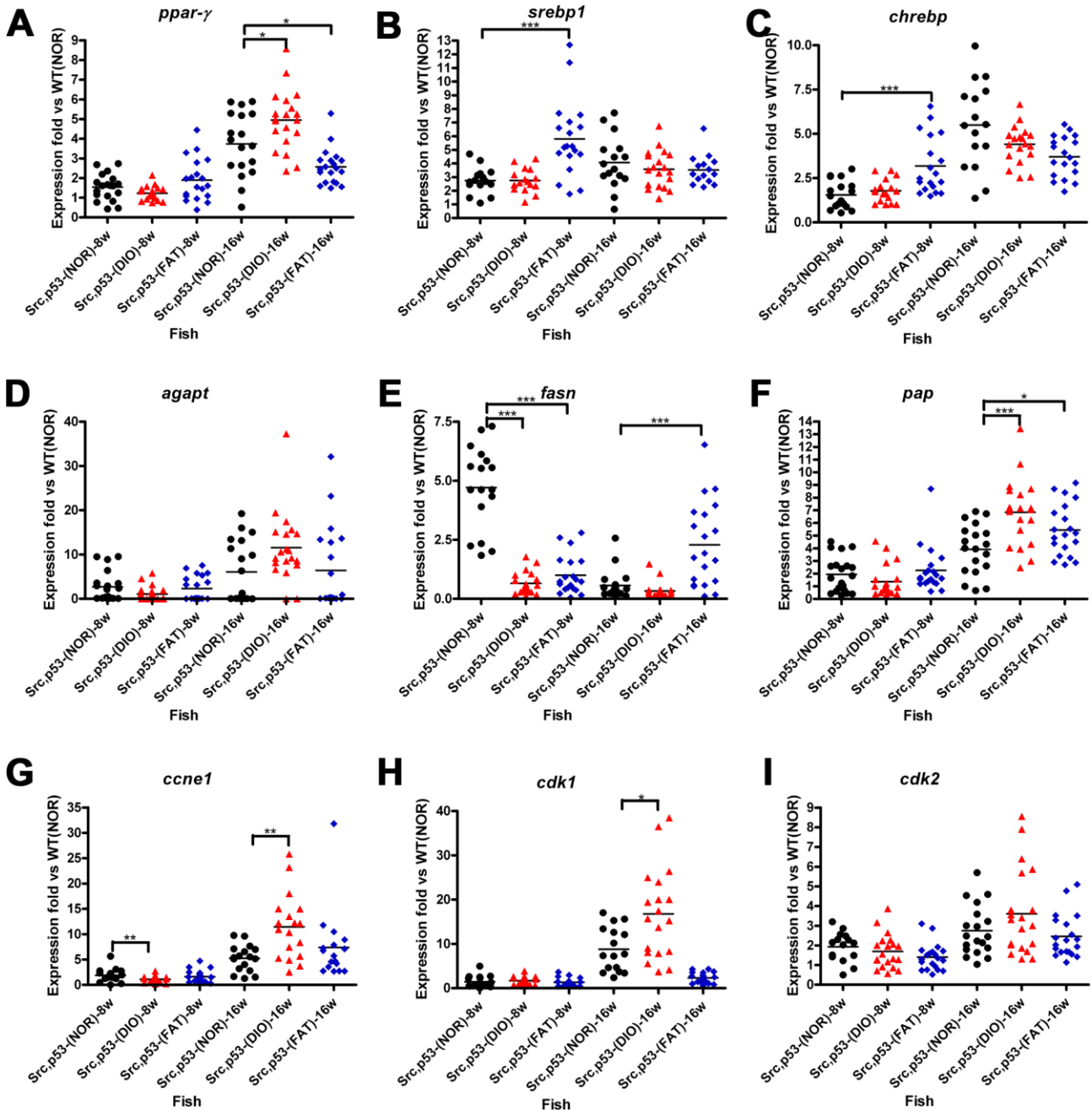
(三) **src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚**過量餵食—細胞週期相關基因表現量(圖七 G, H, I)

1. **src(p53<sup>-</sup>)**斑馬魚過量餵食，高脂飲食 8 週後所有細胞週期相關基因比正常餵食組都沒有較高表現。
2. **src(p53<sup>-</sup>)**斑馬魚過量餵食 16 週後細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*)表現量比正常餵食組有較高表現，且有極顯著差異(\*\*,  $p < 0.01$ )或顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )。

**結論 6：**

- (1) *src(p53)* 斑馬魚在過量餵食或高脂飲食皆會增加脂肪合成因子及脂肪合成酶相關基因表現，且過量餵食或高脂飲食 16 週比 8 週後增加更多。
- (2) *src(p53)* 斑馬魚過量餵食 8 週後所有細胞週期相關基因比正常餵食組都沒有較高表現。
- (3) *src(p53)* 斑馬魚過量餵食 16 週後細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*)表現量比正常餵食組有較高表現

**Src, p53- fish**



圖七、*src(p53)* 斑馬魚過量餵食或高脂飲食—脂肪合成因子、脂肪合成酶、細胞週期相關基因相關基因表現量

七、HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚在過量餵食後細胞週期相關基因表現：

(一) HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食—脂肪合成因子表現量(圖八 A, B, C)

HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食 8 週或 16 週後，脂肪合成因子(*ppar-γ*, *srebp1*, *chrebp*)比正常餵食組沒有較高表現。

(二) HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食—脂肪合成酶相關基因表現量(圖八 D, E, F)

HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食 8 週或 16 週後，脂肪合成酶相關基因(*agapt*, *fasn*, *pap*)比正常餵食組沒有較高表現。

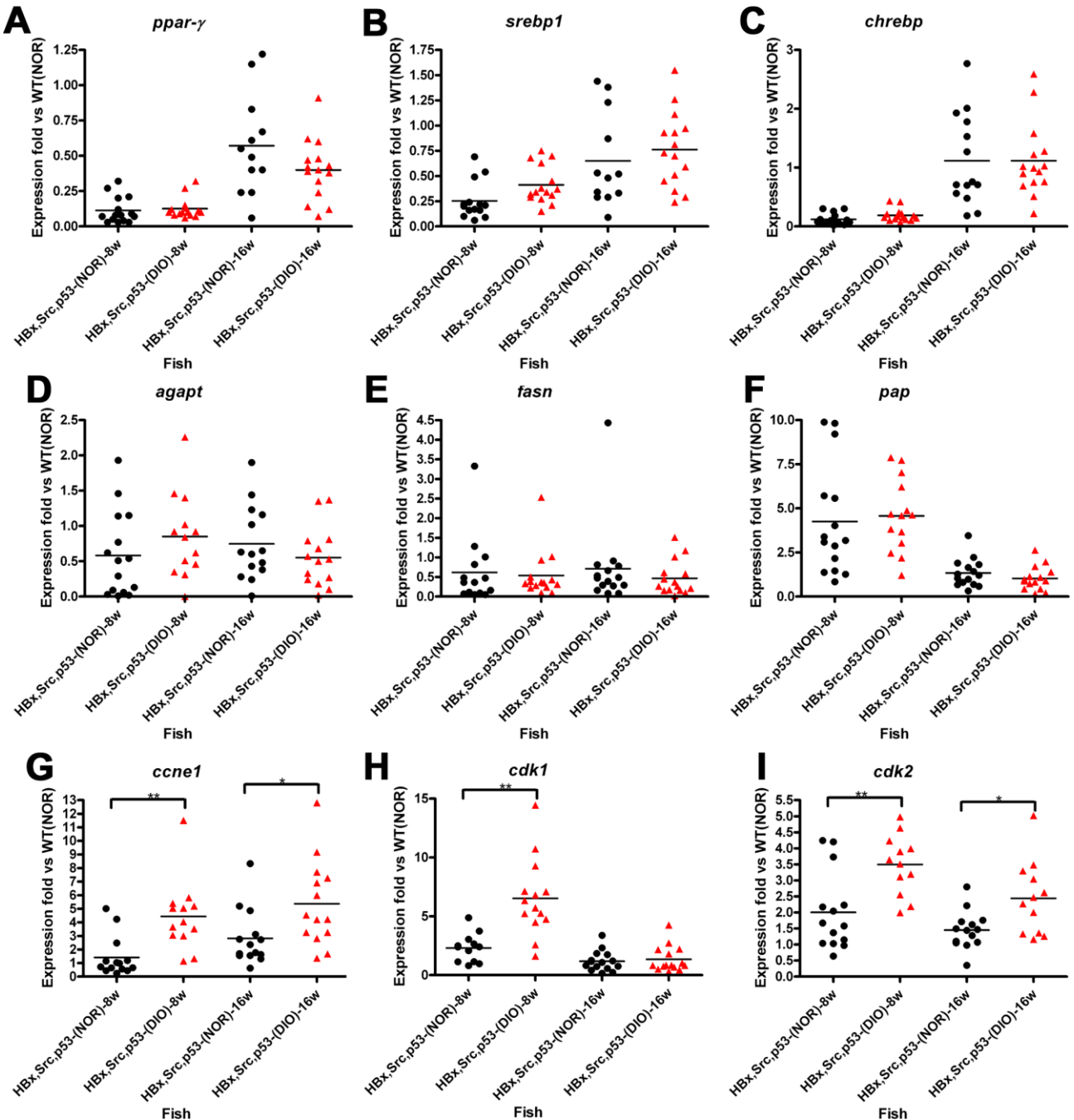
(三) HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食—細胞週期相關基因表現量(圖八 G, H, I)

1. HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食 8 週後細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk1*, *cdk2*)比正常餵食組都有較高表現，且有極顯著差異(\*\*,  $p < 0.01$ )。
2. HBx,src(p53<sup>-</sup>)斑馬魚過量餵食 16 週後細胞週期相關基因(*ccne1*, *cdk2*)表現量比正常餵食組都有較高表現，且有顯著差異(\*,  $p < 0.05$ )。
3. 過量餵食 8 週比 16 週後有較高表現。

結論 7:

HBx,src(p53)斑馬魚在過量餵食不會增加脂肪合成因子及脂肪合成酶相關基因表現，細胞週期相關基因表現量比正常餵食組有較高表現，且過量餵食 8 週比 16 週後有較高表現。

### HBx, Src, p53- fish

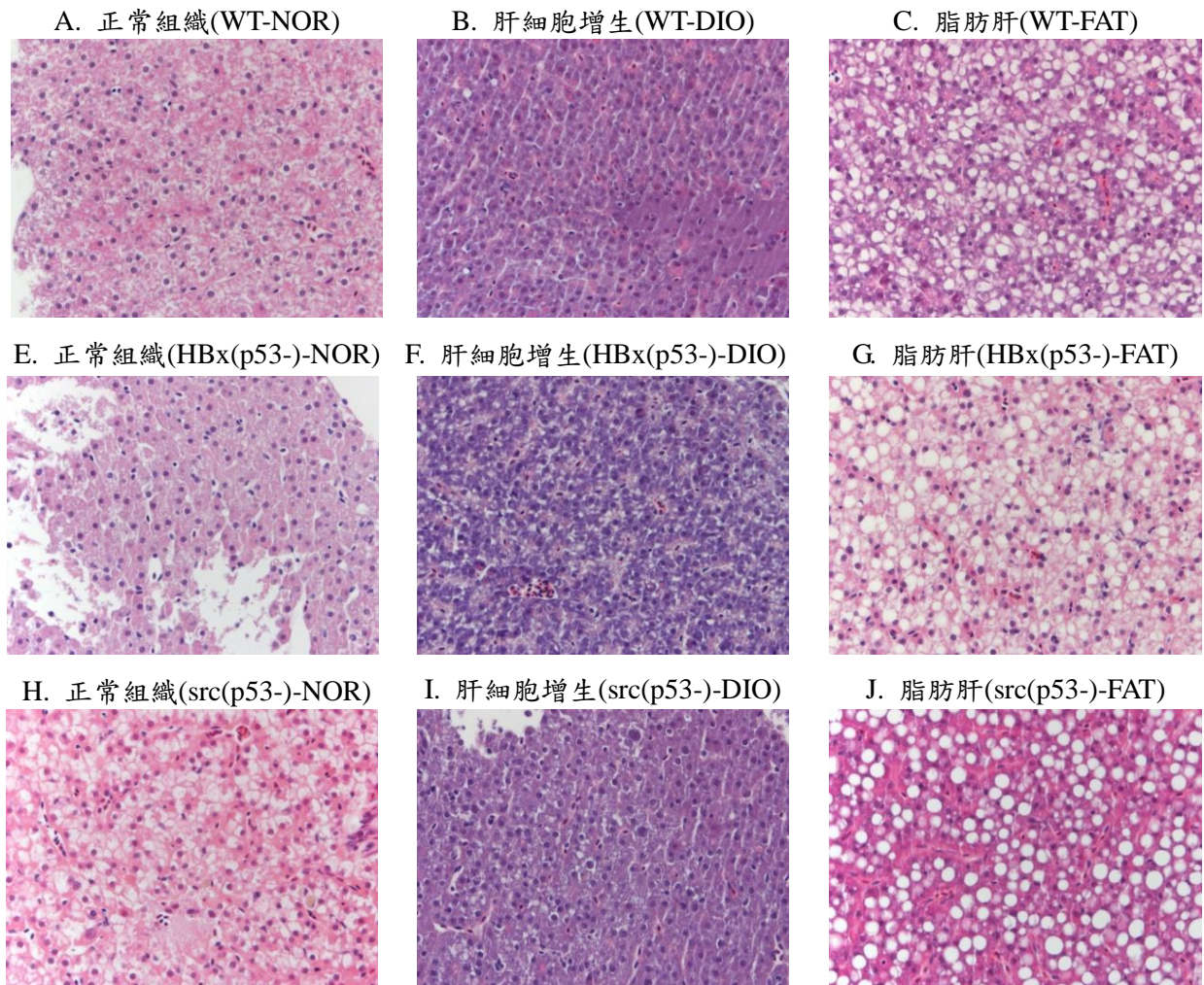


圖八、HBx,src(p53)斑馬魚過量餵食或高脂飲食—脂肪合成因子、脂肪合成酶、細胞週期相關基因相關基因表現量



## 八、肝臟組織病理變化

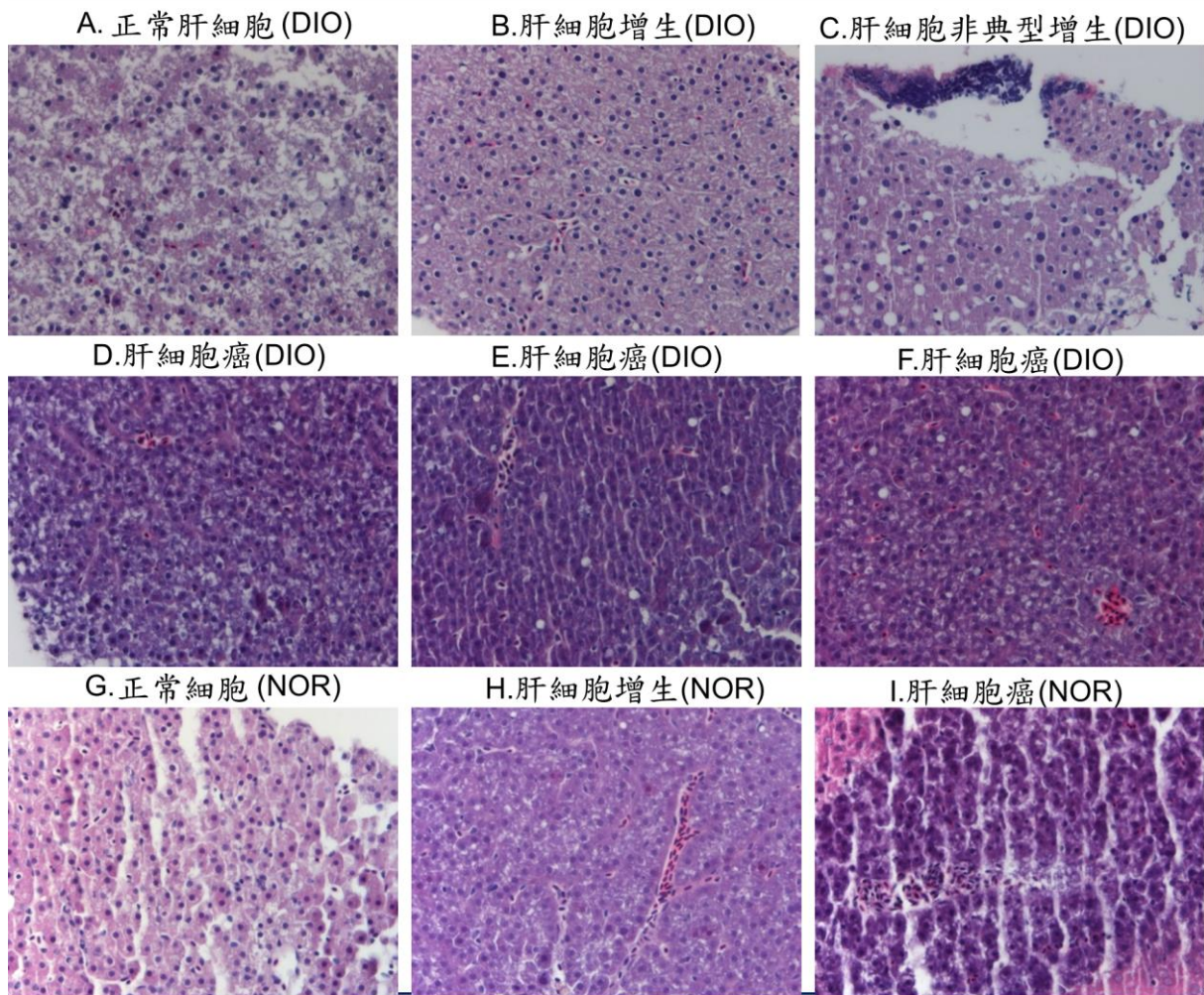
(一) wild-type、HBx(p53<sup>-</sup>)、src(p53<sup>-</sup>)以不同方式餵食 8 週後，各組具代表性的肝臟組織 HE 染色圖 (如圖九)



圖九、 wild-type, HBx(p53<sup>-</sup>), src(p53<sup>-</sup>)各組具代表性的 HE 染色圖



(二) HBx,src(p53<sup>-</sup>)以不同方式餵食 8 週後具代表性的肝臟組織 HE 染色圖 (如圖十)



圖十、HBx,src(p53<sup>-</sup>)的具代表性的 HE 染色圖

(三) 在不同餵食方式下，各種肝臟組織在不同斑馬魚所佔的比例：(如圖十一)

1. wild-type：

- (1) 過度餵食造成 20% 肝細胞增生。
- (2) 高脂飲食造成 75% 脂肪肝。

2. HBx(p53<sup>-</sup>)：

- (1) 較於正常魚，HBx(p53<sup>-</sup>)正常餵食造成 33% 肝細胞增生。
- (2) 較於正常魚，HBx(p53<sup>-</sup>)過度餵食造成 60% 肝細胞增生。
- (3) 較於正常魚，HBx(p53<sup>-</sup>)高脂飲食造成 60% 脂肪肝及 20% 肝細胞增生。



(4)在 HBx(p53<sup>-</sup>) ，過度餵食比起正常餵食肝細胞增生增加 2 倍(由 33% 增加至 60%) 。

(5)在 HBx(p53<sup>-</sup>) ，高脂飲食比起正常餵食由脂肪肝 0% 增加至 60% 。正常肝組織減少 3 倍(由 67% 減少至 20%) 。

### 3. src(p53<sup>-</sup>) :

(1)較於正常魚，src(p53<sup>-</sup>)正常餵食造成 50% 肝細胞增生。

(2)較於正常魚， src(p53<sup>-</sup>)過度餵食造成 50% 肝細胞增生及 25% 肝細胞非典型增生。

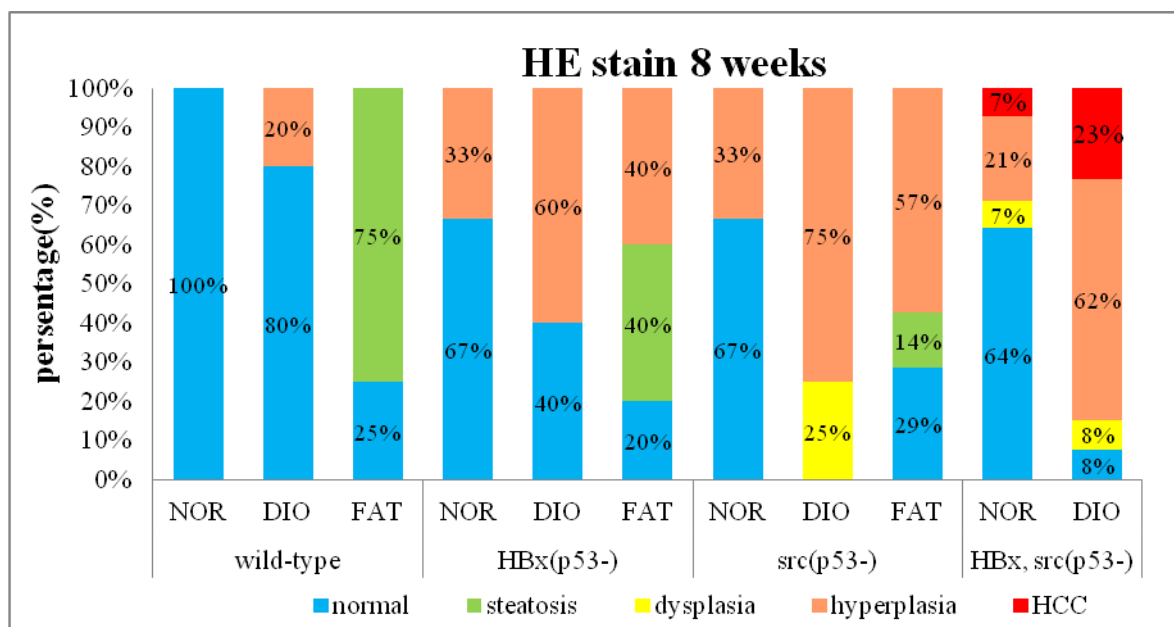
(3)較於正常魚， src(p53<sup>-</sup>)高脂飲食造成 29% 脂肪肝、14%肝細胞增生、14% 肝細胞非典型增生。

(4)在 src(p53<sup>-</sup>)過度餵食比起正常餵食肝細胞非典型增生由 0%增加至 25% 。

(5)在 src(p53<sup>-</sup>)高脂飲食比起正常飲食肝脂肪肝由 0%增加至 29% 。肝細胞非典型增生由 0%增加至 14% 。

### 4. HBx,src(p53<sup>-</sup>) :

(1)較於正常魚過度餵食造成 8% 肝細胞非典型增生、 62% 肝細胞增生、及 23% 肝細胞癌。



圖十一、各種肝臟病變在各組佔的比例

## 陸、討論及應用

一、由重量的差異初步了解不同餵食方式造成的肥胖影響。

- (一) 由結果可以發現，就所有魚種各組間比較，過度、高脂餵食，在重量方面較於正常餵食有明顯的增加，且高脂餵食增加的程度較過度餵食大，且隨餵食時間加長，差異更明顯。此現象在雌魚比雄魚明顯。
- (二) 對於帶有不同基因的斑馬魚而言，含 *HBx*、*src* 此二致癌基因的 *p53* 突變種的重量明顯高於相同餵食方式的其他魚種，但是含 *HBx* 或 *src* 單一基因的 *p53* 突變種與野生種斑馬魚並無存在特定規則。

二、帶有肝癌相關基因、野生種斑馬魚在餵食 8 週後，不同餵食方式、性別對肝臟病變的影響。

- (一) 野生種斑馬魚以不同餵食方式餵食 8 週後，餵食過度、高脂肪飼料只有在脂肪合成、脂肪合成酶的基因量有增加，且有脂肪肝的形成。顯示餵食過度、高脂肪飼料僅導致脂肪合成；而帶有 *HBx*、*src*、*p53* 突變的斑馬魚，各種餵食條件下，在細胞週期相關基因皆有表現。
- (二) *HBx(p53<sup>-</sup>)* 在細胞週期、脂肪合成酶相關基因表現僅呈現增加，但在 *FAT* 增加的程度較高，病理切片結果也有細胞增生、脂肪肝的情形。因此在含有 *HBx*、*p53* 突變的條件下，攝取過多脂肪有癌化的現象發生。同樣地，*DIO* 在脂肪合成、脂肪合成酶基因皆有增加；顯示攝取過多熱量亦導致脂肪生成。
- (三) *src(p53<sup>-</sup>)* 在 *FAT* 增加脂肪合成、脂肪合成酶、細胞週期相關基因表現量，且病理切片結果有細胞增生、脂肪肝的情形；而 *DIO* 在細胞週期相關基因增加比例較少，癌化程度較低。因此對於同時含 *src* 基因、*p53* 基因突變的條件下，攝取過多脂肪有脂肪生成、癌化的現象發生，但攝取過多熱量亦導致癌化現象。
- (四) *HBx,src(p53<sup>-</sup>)* 在細胞週期相關基因的表現更高，顯示同時含 *HBx* 基因、*src* 基因、*p53* 突變的因素，癌化程度更高，已有肝癌發生。而且攝取過多熱量更增加肝癌的比例。

## 柒、結論

本研究起初比較三種斑馬魚重量得知：給予過度餵食或高脂肪飼料，確實能誘發肥胖，且 16 週較 8 週顯著增加，雌魚有更明顯的情形。

對於野生種斑馬魚而言，在組織病理學方面，可發現高脂肪飼料可誘發脂肪肝形成；在分子生物學層次上，脂肪合成等相關基因表現亦增加。

較於正常斑馬魚，表現 *HBx* 加上 *p53* 突變或表現 *src* 加上 *p53* 突變，在餵食過度、高脂肪飼料 8 週後，能加速肝細胞增生、異常生長等開始癌化的情形，並伴隨增加脂肪合成、細胞週期相關基因的表現。其中過度餵食有肝細胞增生的現象，高脂肪飼料亦能誘發脂肪肝。且在餵食過度、高脂肪飼料 16 週後，在脂肪合成、細胞週期相關基因的表現更有增加的情形。

最後，同時表現 *HBx*、*src* 加上 *p53* 突變，在正常餵食下，約於斑馬魚 5 個月大，確實可較在正常餵食、表現 *HBx* 加上 *p53* 突變或表現 *src* 加上 *p53* 突變的條件下，造成明顯的細胞週期相關基因表現，進而提早誘發肝細胞癌。而在過量餵食 8 週後，更有明顯的細胞週期相關基因表現，與更高的肝細胞癌比例。但在過度餵食 16 週後結果較不如 8 週顯著，因此，在過度餵食 8 週、同時表現 *HBx*、*src* 加上 *p53* 突變的條件下，提供一個較佳的藥物篩選模式。

本研究以野生種、*HBx(p53<sup>-</sup>)*、*src(p53<sup>-</sup>)*、*HBx,src(p53<sup>-</sup>)* 此四種斑馬魚為模式，發現過度餵食及高脂餵食與 *HBx*、*src* 及 *p53* 基因突變對肝病變確實有加成影響。因此，吃太多、吃太油確實與肝病危險因子有加成作用。

## 捌、參考資料

- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., *et al.* (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503.
- Kettleborough, R.N., Busch-Nentwich, E.M., Harvey, S.A., Dooley, C.M., de Bruijn, E., van Eeden, F., Sealy, I., White, R.J., Herd, C., Nijman, I.J., *et al.* (2013). A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature* 496, 494-497.
- Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8, 353-367.
- Lu, J.W., Hsia, Y., Yang, W.Y., Lin, Y.I., Li, C.C., Tsai, T.F., Chang, K.W., Shieh, G.S., Tsai, S.F., Wang, H.D., *et al.* (2012). Identification of the common regulators for hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus X antigen in a mouse model. *Carcinogenesis* 33, 209-219.
- Lu, J.W., Liao, C.Y., Yang, W.Y., Lin, Y.M., Jin, S.L., Wang, H.D., and Yuh, C.H. (2014). Overexpression of endothelin 1 triggers hepatocarcinogenesis in zebrafish and promotes cell proliferation and migration through the AKT pathway. *PLoS One* 9, e85318.
- Lu, J.W., Yang, W.Y., Lin, Y.M., Jin, S.L., and Yuh, C.H. (2013a). Hepatitis B virus X antigen and aflatoxin B1 synergistically cause hepatitis, steatosis and liver hyperplasia in transgenic zebrafish. *Acta Histochem* 115, 728-739.
- Lu, J.W., Yang, W.Y., Tsai, S.M., Lin, Y.M., Chang, P.H., Chen, J.R., Wang, H.D., Wu, J.L., Jin, S.L., and Yuh, C.H. (2013b). Liver-specific expressions of HBx and src in the p53 mutant trigger hepatocarcinogenesis in zebrafish. *PLoS One* 8, e76951.
- MacRae, C.A., and Peterson, R.T. (2003). Zebrafish-based small molecule discovery. *Chemistry & biology* 10, 901-908.
- Parng, C., Seng, W.L., Semino, C., and McGrath, P. (2002). Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol* 1, 41-48.
- Rubinstein, A.L. (2003). Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6, 218-223.
- Terriente, J., and Pujades, C. (2013). Use of zebrafish embryos for small molecule screening related to cancer. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 242, 97-107.
- Zon, L.I., and Peterson, R.T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 4, 35-44.
- Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, Umemoto N, Kuroyanagi J, Nishimura N, Tanaka T. (2010) Diet-induced obesity in zebrafish shares common

pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* 2010 Oct 21;10:21. doi: 10.1186/1472-6793-10-21.

Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H.(2013) The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. *Dis Model Mech.* 2013 Jul;6(4):905-14. doi: 10.1242/dmm.011981. Epub 2013 May 29.

Sun B, Karin M (2012) Obesity, inflammation, and liver cancer. *Journal of hepatology* 56: 704-713  
<http://obesity.hpa.gov.tw/TC/index.aspx> 衛生福利部國民健康署肥胖防治網