

目錄

目錄.....	1
中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
前言.....	6
斑馬魚腎間腺組織的早期型態發育.....	6
血管周圍內皮細胞影響腎間腺組織發育.....	7
細胞外間質蛋白 Fn.....	8
Fn 與其接受器 Integrins.....	9
Integrin 與其下游訊號傳遞.....	10
Fn 相關的研究與其在發育過程及疾病中所扮演的角色.....	11
<i>fn</i> ^{kt259} 突變種的表型特徵.....	12
以 <i>Tg(ff1bEx2:GFP)</i> 作為探索腎間腺發育的工具.....	13
以 <i>Tg(kdrl:GFP)</i> ^{s843} 作為探索血管發育的工具.....	14
實驗研究方向.....	15
材料與方法.....	16
一、斑馬魚品系與培養.....	16
二、反義核苷酸顯微注射技術.....	16
三、微型血管造影注射.....	17

四、 3β -Hsd 組織染色法.....	17
五、震盪切片.....	18
六、免疫組織化學染色法.....	19
七、雷射共軛焦顯微鏡觀察技術及分析軟體.....	20
結果.....	21
一、斑馬魚在不同時期腎間腺組織周圍 Fn 分佈情形.....	21
二、觀察 Fn1 缺失對斑馬魚腎間腺組織所造成的影響.....	22
三、觀察在 Fn1 有缺失的斑馬魚其腎間腺組織周圍血管型態....	23
四、Fn1b 的缺失對腎間腺組織與周圍血管的影響.....	25
五、Fn 的接受器 Integrin $\alpha 5$ 受到抑制時對腎間腺組織與其周圍 血管的影響.....	27
六、利用顯微注射 RGD 寡胜肽以影響 Fn 與 Itga5 的結合位....	28
七、抑制斑馬魚的血流無法影響 IRV 的新生.....	30
討論.....	34
Fn 在腎間腺原基細胞移行過程所扮演的角色.....	35
Fn 對腎間腺原基細胞的發育的影響.....	36
FAK 是否參與 Itga5 下游的信號傳遞.....	36
血流與腎間腺組織的移行以及 IRV 發育之間的相關性.....	37
調控 IRV 新生可能的促血管新生因子.....	38

參考文獻.....	40
圖表目錄.....	45
圖表說明.....	47
縮寫對照表.....	64
個人資料.....	66

摘要

魚類的腎間腺組織在功能上等同於哺乳類腎上腺的皮質，在斑馬魚胚胎發育早期，腎間腺組織是由腎間腺周圍之血管母細胞與中軸血管促進其型態發育。在此研究中，我們確定了 Interrenal vessel (IRV) 在受精後兩天時，已經由背主動脈發育出來。IRV 的侵入及形成的時間與腎間腺組織細胞的 central migration 有所關連，而且與腎間腺組織細胞與嗜鉻細胞 (chromaffin cell) 的組合也有相關。在這組織與組織交互作用的過程中，細胞外間質蛋白 Fibronectin (Fn) 會分佈在腎間腺組織與中軸血管交界；同時，也會沿著 IRV 與腎間腺細胞 central migration 的方向分佈。Fn 是一種細胞外間質醣蛋白，對於細胞黏著、生長、移行與分化都是非常重要的。在 *fn1* 突變種與 *fn1* morphant 中，顯示了當腎間腺組織周圍的 Fn 有缺失的時候，並不會影響到腎間腺組織的特化與分化。然而在 Fn 降低的斑馬魚中，腎間腺組織細胞的 central migration 與血管新生的侵入都會被抑制。我們的結果證明了 Fn 在調節 intra-interrenal angiogenesis 中的角色。

Abstract

Early morphogenetic movements of interrenal tissue, the equivalent of the adrenal cortex, are promoted by peri-interrenal angioblasts and the axial vasculature. In this study, we identified the interrenal vessel (IRV) which develops from dorsal aorta (DA) as early as 2 days post fertilization (dpf). The angiogenic invasion and formation of IRV were temporally correlated with central migration of steroidogenic interrenal cells, as well as the integration between the interrenal and chromaffin cells. During this process of dynamic tissue-tissue interactions, the extracellular protein Fibronectin (Fn) was distributed at the junction between interrenal tissue and the axial vasculature. Also, it was expressed along the direction of intra-interrenal angiogenesis as well as that of interrenal relocation. Fn is an extracellular matrix glycoprotein which is important for cell adhesion, growth, migration and differentiation. Genetic mutant and morphant analyses revealed that the loss of Fn protein at the peri-interrenal area did not affect specification and differentiation of the steroidogenic interrenal tissue. However, central migration and angiogenic invasion of steroidogenic cells were both inhibited upon the knockdown of Fn. Our results thus suggested a role of Fn for mediating intra-interrenal angiogenesis.

前言

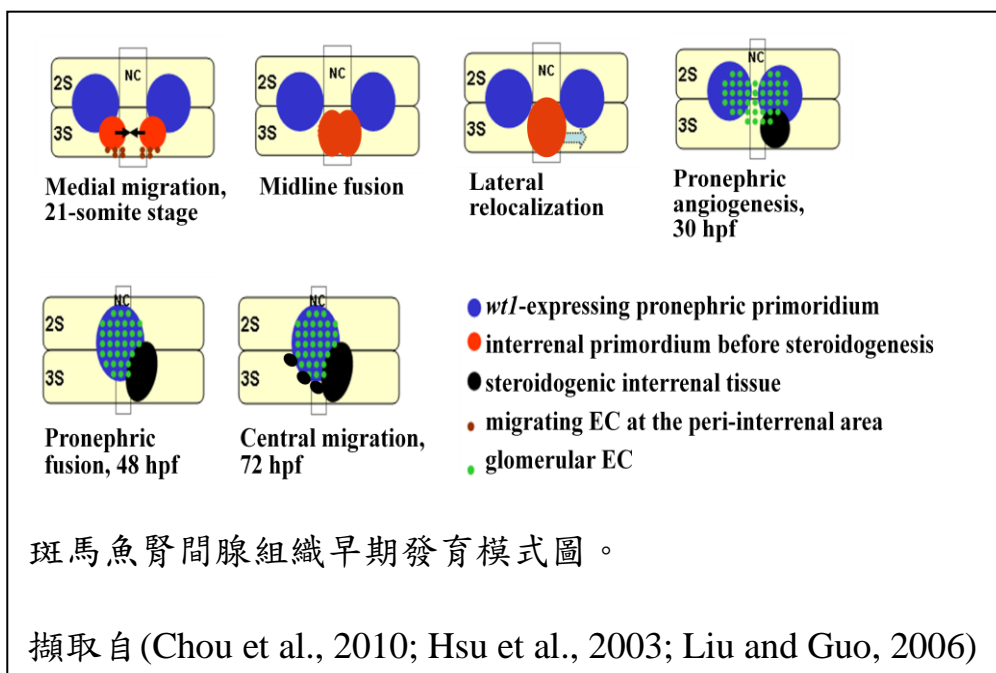
斑馬魚腎間腺組織的早期型態發育

在過去的研究中，已經了解斑馬魚的腎間腺 (Interrenal gland) 在功能上與哺乳類腎上腺 (Adrenal gland) 相似。在斑馬魚中，腎間腺只有一個，並且包埋在斑馬魚成魚頭腎的位置 (Chai et al., 2003; Hsu et al., 2003)，並且分為腎間腺組織 (Interrenal tissue) 與嗜鉻性細胞 (Chromaffin cells)；哺乳類有兩個腎臟，腎上腺位於腎臟的上方，並且區分為腎上腺皮質與髓質，分別分布於腎上腺的表面與內側。而斑馬魚腎間腺組織與嗜鉻性細胞則是分別相當於哺乳類的腎上腺皮質與腎上腺髓質。斑馬魚腎間腺組織和嗜鉻性細胞是來自不同的原基細胞，腎間腺組織由中間中胚層 (intermediate mesoderm) 發育，可分泌固醇類荷爾蒙；嗜鉻性細胞則是從外胚層的神經脊 (neural crest) 發育而來，主要分泌腎上腺素和正腎上腺素。在斑馬魚卵受精後約 22 小時，腎間腺組織原基細胞會呈現群集狀 (cluster) 出現在脊索 (notochord) 的兩側，位置大概在第二和第三的體節之間，並且與原腎原基細胞混合在一起。在大約受精後 24.5 小時，腎間腺組織原基細胞會從原腎原基細胞移行出來，並往脊索的方向進行移行，並且在脊索下方融合，這個過程稱為 midline fusion。到了受精後 30 小時，

腎間腺組織會在中線（以脊索為中線）的右方，第三體節的位置融合，並具有類固醇荷爾蒙的生成能力，而腎間腺組織在融合後由中線移行到中線右方的過程稱為 lateral relocalization。到受精後三天的胚胎中，腎間腺組織會由中線的右方往中線方向移行，由背側觀察，腎間腺組織形成一個 V 或 U 字型，這個過程稱為 central migration（Chou et al., 2010; Hsu et al., 2003; Liu and Guo, 2006）。

血管內皮細胞影響腎間腺組織發育

我們實驗室之前的觀察中指出，由背側觀察斑馬魚腎間腺組織與血管內皮細胞時，可發現腎間腺組織與周圍血管內皮細胞相當接近，並且發現在血管內皮細胞被破壞的 *cloche (clo)* 突變種中，腎間腺組織 midline fusion 的過程受到了抑制（Liu and Guo, 2006），這結果指出腎間腺組織往中軸移行的過程中，會受到血管內皮細胞所釋出的訊號所引導。而實驗室更進一步研究發現，當斑馬魚中軸的動脈或靜脈有缺失時，腎間腺組織的位置就會受到影響，沒有辦法正常發育（Chou et al., 2010），所以推測血管內皮細胞與釋放的訊號在腎間腺組織中軸移行的過程中扮演一個重要的角色。



細胞外間質蛋白 Fn

在動物個體中，細胞外間質可以幫助細胞形成組織；並可活化細胞外的信號傳遞來協助細胞功能，藉此控制細胞的生長、分化以及基因的表達。細胞外間質主要有 Proteoglycans、Collagen、Laminins、Perlecan、Nidogen 以及 Fibronectin (Lodish et al., 2007)。

細胞外間質中的 Fibronectin 蛋白，是一個高分子量醣蛋白，可以在多種細胞粗糙內質網進行合成，並且分泌到細胞外進行連結，目前已知所有脊椎動物都可以分泌這種蛋白。Fn 會與細胞外的 Collagens 結合，並且會藉由與接受器 Integrins 結合細胞內蛋白質固定於細胞骨架上，並且影響到下游的訊號傳遞；藉此去提升細胞外間質間的附著和伸展，也會參與在對細胞提供支持和固定，以及調節細胞間的溝通 (Danen and Yamada, 2001)。在過去的研究也指出，Fn 會影響小鼠與

斑馬魚心血管發育、血管生成與血管新生，在胚胎早期血管發育或腫瘤生成扮演重要的角色 (Astrof and Hynes, 2009) 。同時在過去也已經在斑馬魚中發現了另一種 fibronectin gene *fibronectin 1b* (*fn1b*) (Sun et al., 2005) ，與 *fn1* 胺基酸序列有 62% 相似，*fn1b* 基因轉錄出來的蛋白質，同樣也是一個高分子醣蛋白的細胞外間質分子，目前對 Fn1b 研究主要是著重在體節邊界或是肌肉纖維方面，使用 *fn1b* 的 morphant 來抑制 Fn1b 的表達 (Julich et al., 2005) ，結果顯示，注射 *fn1b* morpholino 後的胚胎在體節邊界 (somite boundary) 會有體節不易辨認的表型，而注射了 *fn1* 與 *fn1b* double morpholino 的胚胎中，體節邊界被破壞的更加嚴重，無法辨識體節，可以證明 *fn1b* 與 *fn1* 在體節邊界的發育上的共同作用，是扮演重要的角色。

Fn 與其接受器 Integrins

細胞與細胞外間質之間的連結是非常重要的，可以調控基因的表達、細胞內的酸鹼值、鈣離子濃度、磷酸脂的代謝、GTPases、kinases 及 phosphatases (Lodish et al., 2007) 。 Integrins 本身是一種由 α 、 β 兩種次單元蛋白在細胞膜上所組成的 dimer，會與 Fn 結合。Fn 的胺基酸序列中有一段 Arg-Gly-Asp (RGD) 的排列，這三個胺基酸會與 Integrins 上的 α 及 β 次單元蛋白形成鍵結，使訊息可由 Integrins 傳入至細胞內，達到調節細胞的能力； Integrins 與細胞外間質結合後，

與一些細胞內蛋白質結合，共同形成一個 focal adhesion (集中附著點)，focal adhesion 是一個很大的蛋白質複合物，在 Integrin signaling 中扮演訊號傳遞的角色 (Astrof and Hynes, 2009; Danen and Yamada, 2001)。此外，Integrins 與細胞內的蛋白 Actin、Filamin、Vinculin、Talin、 Paxillin 與 Tensin 結合形成 focal adhesion。Talin 是 focal adhesion 的主要構造蛋白，並與 Actin、Vinculin 和 Focal adhesion kinase (FAK) 結合 (Danen and Yamada, 2001)。

Integrin 與其下游訊號傳遞

先前提到 Integrins 會與細胞外間質的蛋白質結合後，進一步調控使細胞內多種與細胞結構相關的蛋白質彼此聚集，共同形成一個大分子蛋白質複合物 focal adhesion 集中附著點，而調控 focal adhesion 功能的 Focal adhesion kinase (FAK) 已經知道是一種存於細胞質中的 protein tyrosine kinase，分子量大約為 125 kDa。當 FAK 被活化後，會引起細胞內的訊號傳遞途徑被啟動，導致細胞的移行，在細胞的運動以及存活扮演重要的角色 (Vuori, 1998)。

Integrins 與細胞外間質結合活化 FAK 後，可以藉由 PI3K- Akt 訊號傳遞，影響細胞的存活；藉由 Grb2- Ras- Erk 訊號傳遞，影響細胞的增生及基因的表達；藉由 Cas- Crk 訊號傳遞，導致細胞骨架的改變、細胞遷移與基因的表達。這些訊號的傳遞都是透過細胞外間質-

Integrins- FAK 之間的作用，因此這三種蛋白之間的連結在細胞的各種信號傳遞都會扮演非常重要的角色 (Lodish et al., 2007; Vuori, 1998)。

Fn 相關的研究與其在發育過程及疾病中所扮演的角色

在過去研究中，Fn 是主要的細胞外間質之一，會參與在 Integrins receptor family 跟細胞底層之間的黏附與延伸、細胞移行、細胞週期過程以及細胞骨架的形成 (Danen and Yamada, 2001; Hynes, 1992; Sechler and Schwarzbauer, 1998)。在斑馬魚中，過去經由體節邊界的研究，藉由表型的特徵已經指出 Integrin $\alpha 5$ (Itga5) 是 Fn 的接受器，會與 Fn 共同調節體節邊界的形成 (Koshida et al., 2005)。在過去雞胚的研究中發現，Fn 也會分佈在內胚層與中胚層的介面並且與心肌移行有關 (Drake et al., 1990; Linask and Lash, 1986; Linask and Lash, 1988)。在斑馬魚中，Fn 也會分佈在心肌前驅細胞的周圍，及中線區域的內胚層與心內膜前導細胞之間 (Trinh and Stainier, 2004)。在血管管腔形成的過程中，Fn 分佈在聚集中的血管母細胞之間，以及分佈在內皮細胞周圍 (Jin et al., 2005)。分析 Fn 有缺陷的老鼠及斑馬魚的突變種，心肌細胞的特化是正常的，但是心肌細胞移行則會受到影響；心肌細胞一開始位於中軸的兩側，並且逐漸向中央移行，在 Fn 有缺陷的老鼠及斑馬魚的突變種中，心臟的前導細胞會無法向中央正

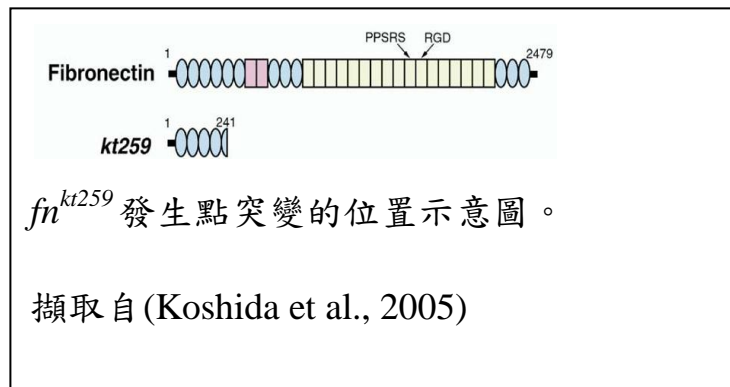
常移行，且位於中軸的兩側 (George et al., 1997; Trinh and Stainier, 2004)。此外，在 Fn 有缺陷的老鼠胚胎中，會導致 vesicular smooth muscle cells (VSMCs) 的極性發生改變，進而導致血管粥狀病變與血栓的形成 (Astrof and Hynes, 2009)。在腫瘤細胞中，腫瘤動脈周圍的 Fn 也會大量表達，目前原因並不清楚 (Astrof and Hynes, 2009)。在魚、青蛙、老鼠實驗中，都證明了 Fn 對於極性的建立與維持都扮演了重要的角色，因此 Fn 也成為腫瘤以及心血管疾病中重要的研究目標 (Astrof and Hynes, 2009)。

在沒有內胚層的斑馬魚 *casanova* (*cas*) 與全身血管內皮細胞有缺陷的 *cloche* (*clo*) 突變種中，中軸附近 *fn1* 的表達都有缺失 (Trinh and Stainier, 2004)，我們實驗室過去研究中也發現，在 *cas* 與 *clo* 這兩種突變種中，腎間腺組織的 midline fusion 會有不同程度的缺陷 (Hsu, 2010; Liu and Guo, 2006)。因此我們假設，這樣的結果或許是因為這兩種突變種的 *fn1* 分佈都有缺失；但是我們對於 Fn 是否及如何參與到腎間腺組織發育的過程並不了解，因此藉由本篇研究對於腎間腺組織的發育與細胞外間質 Fn 在其中所扮演的角色進行探討。

fn^{kt259} 突變種的表型特徵

在 2005 年日本 Shinji Takada 的團隊發表運用 ENU 這種致突變劑進行突變篩選，篩選到 Fn 有缺失的突變種，其中的 kt259 allele 是在

fn1 基因的第 241 個鹼基對發生點突變，從原本的 AAG 突變成 TAG，TAG 是一個 stop codon，所以 Fn1 蛋白就不能正常被完整轉譯出來，因而導致斑馬魚 Fn 的缺失。斑馬魚 *fn1* 有缺失的突變種 *fn^{kt259}* 表型主要有以下幾項：頭部相較於野生種較小、後腦部位塌陷、在軀幹前半部的體節邊界形成有缺陷與全身沒有血流等 (Koshida et al., 2005)。



以 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 作為探索腎間腺發育的工具

在過去新加坡大學 Chan Woon Khiong 博士的團隊，發現在斑馬魚中與哺乳類 Steroidogenic Factor 1 (SF-1) 功能相似的 *Ff1b* (*nr5a1a*, *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1a*)。SF-1 在過去已知是一種 orphan nuclear hormone receptor。而 *ff1b* mRNA 目前已經會表達在斑馬魚的 Ventromedial hypothalamus、Interrenal tissue、Gonads 三個位置，並在早期腎間腺組織的分化中，扮演重要的角色；當 *ff1b* 有缺失的時候，斑馬魚的腎間腺組織會完全消失 (Chai et al., 2003)。

為了更清楚的研究 *ff1b* 在早期發育所參與的調控，因此 Chan Woon

Khiong 博士的團隊利用了 Red/ET homologous recombination 的方式，將 EGFP 的序列插入斑馬魚 Exon2 的位置，培育出帶有 *ff1b*-EGFP 的 *Tg(ff1bEx2:GFP)* (Quek, 2009)。

以 *Tg(kdrl:GFP)*^{s843} 作為探索血管發育的工具

斑馬魚在過去，一直是研究血管發育很好的模式生物，因為早期胚胎魚身呈現透明，容易進行心臟與血管的觀察。而 Fetal liver kinase (Flk1) 是一個表達在全身血管內皮細胞的蛋白質，功能上則是 VEGF receptor。因此，美國加州大學 Didier Y. R. Stainier 博士的團隊，將 EGFP 序列建構在 *flk1* 7kb promoter 的下游，之後進行注射篩選，得到帶有 *flk1*-EGFP 的 *Tg(flkl:EGFP)*^{s843}，後來 *flk1* 更名為 *kdrl* (*kinase insert domain receptor like*)，因此現在稱為 *Tg(kdrl:GFP)*^{s843} (Jin et al., 2005)。

實驗研究方向

本論文的研究方向，是想藉由實驗了解細胞外間質 Fn 是如何影響斑馬魚腎間腺組織的發育，並且進一步探討 Fn 在腎間腺組織發育中所扮演的角色為何。因此研究重點共分為以下幾點：

- 一、 Fn 在野生種斑馬魚的腎間腺中，於不同時期的表達及分布情形。了解野生種的 Fn 分佈後，再以 Fn 突變種與 *fn1* morphant 進一步了解 Fn 降低對腎間腺組織發育的影響。
- 二、 過去研究中了解小鼠 Fn 有缺失時，會造成血管形成、血管新生缺陷 (Astrof and Hynes, 2009)，那麼在斑馬魚腎間腺組織周圍血管的型態是否會受到相似的影響。
- 三、 斑馬魚 *fn* 在過去已經知道有兩種，分別為 *fn1* 與 *fn1b* 兩種，分別進行抑制並比較結果，藉此了解何種型態對於腎間腺組織發育扮演較為重要的角色。
- 四、 目前已知 Integrin $\alpha 5$ 為 Fn 的受器，所以對 *itga5* 進行抑制是否也會得到與 Fn 有缺失的斑馬魚一樣的結果。
- 五、 以外加方式注射 RGD 寡胜肽競爭 Fn-Intergrins 之間的結合，是否會影響腎間腺組織與周圍血管的發育。

材料與方法

一、斑馬魚品系與培養

本實驗所使用的模式動物為斑馬魚 (*Danio rerio*)。實驗魚以標準準則飼養 (Westerfield, 2000)。為了使斑馬魚胚胎更加容易觀察，胚胎於受精後約 10 小時之後 (gastrulation 後)，添加 0.01% phenylthiourea (PTU) (Sigma) 以抑制斑馬魚幼魚的黑色素的形成。而本次實驗所採用的 *fn*^{kt259} 突變種來自 Prof. Shinji Takada (Okazaki Institute for Integrative Bioscience/ National Institute for Basic Biology, Japan)。Tg(*kdrl:EGFP*)^{s843} 基因轉殖魚則由加州舊金山大學 Didier Stainier 教授所提供，Tg(*ff1bEx2:GFP*)則由新加坡國立大學 Chan Woon Khiong 博士所提供。

二、反義核苷酸顯微注射技術

斑馬魚胚胎在 1 至 4 細胞時期時，使用 Nanojet injector (Drummond) 及長 10 公分，內徑 0.58 mm 的玻璃毛細管 (Sutter Instrument) 進行微量注射。在本次實驗中所使用的反義核苷酸序列為：

MO3-*fn1*: 5' - CACAGGTGCGATTGAACACGCTAAA - 3'

(Trinh and Stainier, 2004)

MO1-*fn1b*: 5' - TACTGACTCACGGGTCATTTTCACC - 3'

(Julich et al., 2005)

MO2-*fn1b*: 5' - GCTTCTGGCTTTGACTGTATTTTCGG - 3'

(Julich et al., 2005)

MO2-*itga5*: 5' - CATAGTAACCGATGTATCAAAATCC - 3'

(Koshida et al., 2005)

MO3-*itga5*: 5' - ACTGCTTTATTAAACTTCTTTCACA - 3'

(Koshida et al., 2005)

MO1-*tnnt2a*: 5' -CATGTTTGCTCTGATCTGACACGCA - 3'

(Sehnert et al., 2002)

三、微型血管造影注射

我們為了實驗的目的，將胚胎受精後放置 28°C 培養箱培養，在胚胎受精後 37 小時去除卵殼並且進行顯微注射，在將 rhodamine dextran (Invitrogen) 注射溶劑中加入由 7 個胺基酸組成包含 RGD (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys, Sigma) 片段的寡胜肽，以 10 mM 濃度注入 4.6 nl，注射至胚胎 posterior cardinal vein 後靜置 28°C 培養箱，到胚胎受精後 52 小時以 2% Paraformaldehyde (PFA 內含 0.1% Tween 20, PFAT) 進行固定及後續實驗。

四、3 β -Hsd 組織染色法

參照 (Grassi Milano et al., 1997) 方法修改後，我們利用

3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 Δ -4 Δ - isomerase (3 β -Hsd) 酵素活性染色法對斑馬魚的完整胚胎染腎間腺組織。首先將經過 PTU 處理過的斑馬魚胚胎，在解剖顯微鏡下去除卵殼後，使用 phosphate buffered saline (PBS) 清洗後，用 2% PFAT 於 4°C 下固定 12 至 16 小時。之後再用 PBST (PBS 內含 1% Tween 20) 進行清洗，每次清洗 10 分鐘共四次。然後進行 3 β -Hsd 組織染色，反應全程避光，於室溫下作用 8 到 12 小時。染劑內含 0.2 mg/ml NAD (Sigma) ， 0.1 mg/ml nicotinamidec (Sigma) ， 0.1 mg/ml 15 etiocholan-3-ol-17-one (Sigma) ， 0.1 mg/ml nitroblue tetrazolium (Promega) ， DMSO 以及 DHEA ，反應過後，再以 PBST 進行清洗，每次清洗 10 分鐘共四次，請洗完畢使用 2% PFAT 於 4°C 下再固定 1 小時。

五、震盪切片

主要參照 (Trinh and Stainier, 2004) 的方法並加以修改後，將斑馬魚胚胎去卵殼後，用 2% PFAT 或 PFATx (內含 0.1% Triton X-100) 於 4°C 下固定 12-16 小時後，包埋在 45°C 的 4% NuSieve low melting agarose (溶於 PBS buffer) 中並且調整至適當角度，等待 agarose 凝固後，以三秒膠固定在 Leica VT1000M 震盪切片機底座，並利用刀片切割成一個含胚胎在內的長方塊狀 agarose，為了保持切片時胚胎

與切出的樣品濕潤與潤滑，在 agarose 上方滴上接下來反應所需溶液 PBST 或 PBSTx (內含 1% Triton X-100) ，並且開始進行切片，全程保持濕潤。切片的厚度為 100 – 200 μm ，收集在玻片上，並且放到內含 PBST 或 PBSTx 溶液的 96 孔盤中，以便接下來染色或拍照。

六、免疫組織化學染色法

參照 (Koshida et al., 2005; Trinh and Stainier, 2004) 的方法加以修改後，利用以 Leica VT1000M 震盪切片機切出來的樣本先以 PBSTx 在室溫下清洗 10 分鐘 5 次，Blocking 則用 10% Fetal Calf Serum (FCS) 加入 PBSTx 作用 2 個小時。一次抗體使用 1: 100 Rabbit Anti-Fn Polyclonal Antibody (Sigma)或 Mouse anti-FAK (pY397) Monoclonal Antibody (BD Biosciences) 加入 PBSTx/ 10% FCS, 4°C 下作用 1.5 天。作用結束後用含有 10% FCS 的 PBSTx 進行清洗； Blocking 後，使用的二次抗體比例為 1: 200 Anti-Rabbit (DyLight[®] 488) 或 Anti-Mouse (DyLight[®] 488) 加入含有 10% FCS 的 PBSTx, 4°C 下作用 1.5 天。之後再用含有 10% FCS 的 PBSTx 及 PBSTx 進行清洗後，置換到滴有 50% glycerol 的玻璃孔盤，稀釋 PBSTx 後再以 50% 甘油進行封片， phalloidin (Invitrogen) 染色也是參照一抗染法與濃度，並且在反應一天後進行清洗封片，最後用雷射共軛焦顯微鏡進行觀察及攝

影。

七、雷射共軛焦顯微鏡觀察技術及分析軟體

固定及染色後的斑馬魚胚胎經 50% 甘油處理封片後，使用 Zeiss LSM 510 雷射共軛焦顯微鏡 (Carl Zeiss Inc) 的白光掃描切片中 3β -Hsd 組織染色法所染出位置，並以 488-nm 雷射管偵測綠螢光的表現；543-nm 雷射管偵測紅螢光的表現，進行免疫組織染色之結果觀察，再用軟體之內建單張掃描或 z-stack 與 3D 功能將腎間腺組織周圍綠螢光與紅螢光影像堆疊，觀察腎間腺組織與周邊組織型態。利用 Zeiss LSM 510 雷射共軛焦顯微鏡，附設軟體 LSM510 內建長度測量，將 *Tg(kdrl:GFP)*^{s843} 血管螢光魚所表達的血管螢光做為判斷的標準，以背主動脈管腔下緣定為起始，測量到 IRV 的末端的長度，將長度製表後利用 Microsoft Office Excel 軟體進行平均值，樣本平均的標準差 (standard error of the mean) 以及 student's t test 的統計及製圖，p value 的標記為 * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$ 。

結果

一、斑馬魚在不同時期腎間腺組織周圍 Fn 分佈情形

Ff1b 是腎間腺組織發育中，非常重要的蛋白，所有腎間腺原基細胞與腎間腺組織細胞都會有 Ff1b 的表達，當斑馬魚胚胎 *ff1b* 的表達受到抑制的同時，腎間腺組織也會因此無法被偵測到。因此藉由觀察 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 螢光魚的綠色螢光表達的區域，便可了解腎間腺原基細胞或腎間腺組織細胞所在的位置。在受精後的胚胎，進行切片與免疫螢光染色的實驗，36 小時就可以觀察到腎間腺組織位於中線右側的位置，在腎間腺組織周圍 Fn 在靠近中軸方向有明顯分佈的情形〔圖一，A〕，並且在逐漸發育的過程中，腎間腺組織細胞所移行的方向與脊索下方可觀察到 Fn 的明顯分佈〔圖一，B、C、D〕。

在過去已經知道腎間腺組織的發育與周圍血管有很密切的關係 (Liu and Guo, 2006)，因此我們運用了 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 這種全身血管內皮細胞會發出綠色螢光的品種進行研究 (Jin et al., 2005)，在受精後胚胎進行切片免疫螢光染色後發現，在脊索下方所觀察到的空腔是背主動脈的管腔，在管腔周圍有大量的 Fn 分佈，更可以看到 Fn 所分佈的位置是位於背主動脈與腎間腺組織之間〔圖二〕。有趣的是，在我們所有切片中，都有一條血管由背主動脈新生出來，並且沿著腎間

腺組織的方向延伸、生長〔圖二〕，最後接到 anterior mesenteric artery (AMA) 沿著 swim bladder 生長，這條由背主動脈順著腎間腺組織生長後接到 AMA 的血管，在過去似乎沒有被詳細討論過，因此，我們將這條新發現的血管，命名為 Interrenal vessel (IRV)。

二、觀察 Fn 缺失對斑馬魚腎間腺組織所造成的影響

在過去 Fn 已經被證明與許多細胞、血管與器官的移行有關 (Danen and Yamada, 2001)。並且過去報導指出在 *clo* 與 *cas* 兩種突變種中，在早期胚胎進行偵測 *fn1* mRNA 的原位雜交實驗中，都可以看到在中軸周圍的 *fn1*，與野生種相較之下，都有明顯缺失的情形 (Trinh and Stainier, 2004)。在這兩種 *fn1* 表達明顯降低的突變種中，腎間腺組織的型態卻是相當類似，都會位於中軸的兩側，沒有辦法正常的進行 midline fusion。在實驗室過去對 *fn* 缺失的斑馬魚腎間腺組織研究中，都是以 whole-mount 方式對背側或腹側進行觀察，為了更清楚觀察 *fn* 缺失對於腎間腺組織造成的影響，我們將 *fn*^{kt259} 與 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 進行交配後，將帶有綠螢光的胚胎養至成魚後，再將 *fn*^{kt259} 的 heterozygous carrier 互相交配，取胚胎進行切片與免疫螢光染色，藉此觀察 Fn 分佈有缺失的斑馬魚，腎間腺組織所受的影響。在〔圖三〕結果中，可以看到控制組的腎間腺組織位於中線的右邊，

並且有向中線延伸的現象，Fn 的分佈與先前所觀察的結果相同，分佈於脊索下方與腎間腺組織移行的方向〔圖三，A〕；在 *fnl* 突變種中，可以觀察到腎間腺組織的型態分為兩種，一種位於中線右側，無法正常向中間進行 central migration〔圖三，B〕，另一種腎間腺組織是位於中線的兩側，在早期 midline fusion 階段就無法正常移行〔圖三，C〕，而 *fnl* 突變種中腎間腺組織的兩種型態，Fn 分佈都有明顯降低的情形〔圖三，B、C〕。

三、觀察在 Fn 有缺失的斑馬魚其腎間腺組織周圍血管型態

在本實驗中，我們運用了 antisense oligo morpholino injection 的方式，藉由注射 morpholino 抑制斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 早期胚胎 *fnl* 的表達，將 morphant 在不同時期進行切片染色〔圖四；圖五〕。在 standard morphant 中我們可以觀察到跟正常斑馬魚受精後兩天以及三天相同的腎間腺型態，在兩天已經可以觀察到腎間腺組織朝向脊索方向伸出觸手狀延伸，在三天的圖片可以更清楚看到腎間腺組織呈現 central migration 後的型態〔圖四，A、圖五，A〕。由於我們實驗使用 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎，因此，我們可以藉由綠色螢光觀察到斑馬魚胚胎的血管型態。在血管型態的觀察中，standard morphant 的背主動脈在脊索下方形成管腔，並且由背主動脈新生出 IRV，朝著腎間腺

組織的方向進行延伸，在兩天與三天的結果中都可以看到一樣的型態，而三天所觀察到的 IRV 明顯較兩天的長度更長〔圖四，A、圖五，A〕。

在 *fnl* morphant 的結果中，可以看到腎間腺組織與先前研究的 *fnl* 突變種的型態是相同的，分為兩種型態，位於中線右側，並且無法正常進行 central migration 步驟的型態 (I) 〔圖四，B、圖五，B〕；另一種則是位於中線的兩側，無法正常進行 midline fusion 步驟的型態 (II) 〔圖四，C、圖五，C〕。在我們實驗中，於受精後 45 小時的 *fnl* morphant 可以觀察到這兩種的型態，在總數 47 隻的胚胎中，有 39 隻為型態 (I)，其餘的胚胎為型態 (II)；另外在三天的 *fnl* morphant 同樣可以觀察到一樣的型態，在總數 30 隻的胚胎中，有 24 隻為型態 (I)，其餘的胚胎為型態 (II) 〔表一〕，因此在我們統計斑馬魚受精後 45 小時與三天的結果顯示，腎間腺組織型態 (I) 為 83%，型態 (II) 為 17%。

在控制組中，受精後 45 小時胚胎在總數 19 隻當中，有 16 隻可進行正常 central migration；3 天的胚胎中，總數為 16 隻，全部都正常 central migration 〔表三〕。不管是型態 (I) 或是型態 (II) 的 *fnl* morphant 中，都可以觀察到 Fn 的分佈明顯降低的現象，這種結果與 *fn^{kt259}* 所觀察到的結果是相同的。*fnl* morphant 除了腎間腺組織型態與 *fnl* 突變種相同外，我們也對其它部位進行觀察，*fnl* morphant 也會有頭部相較於野生種較小、後腦部位塌陷、心臟發育不正常、在驅幹前半部

的體節 (somite) 發育會有缺陷與全身沒有血流等特徵，與先前的突變種相符。因此，我們確定了使用的 *fnl* morpholino 確實可以對斑馬魚 Fn 進行抑制，並且表型與 *fn^{kl259}* 相同，因此我們能利用 *fnl* morphant 來進行 Fn 缺失的相關研究。在 *fnl* morphant 中，我們觀察到脊索下方的背主動脈形成管腔之型態異常，並且 IRV 也無法正常由背主動脈新生出來。在型態 (II) 的背主動脈管腔的缺陷，又會比型態 (I) 的更加嚴重。在進行切片的觀察，受精後 45 小時胚胎腎間腺組織為型態 (I) 的胚胎在總數為 19 隻中，有 15 隻胚胎在切片觀察，IRV 的發育受到影響 (79%)；在型態 (II)，7 隻胚胎的 IRV 全部都受影響而有較短或是消失的情況；在受精後 3 天的胚胎中可以觀察到，在總數 11 隻的腎間腺型態 (I) 胚胎中，有 10 隻 IRV 發育受影響，而型態 (II) 在 11 隻胚胎中進行觀察，有 9 隻 IRV 發育受影響〔表二〕；在兩組實驗中控制組分別為 19 以及 16 隻，全部 IRV 發育都正常的發育延伸〔表二〕。我們由實驗對 *fnl* morphant 的切片染色，觀察到腎間腺組織型態發育、腎間腺組織附近背主動脈管腔的型態與 IRV 的發育，都會因 Fn 的缺失而造成缺陷。

四、不同的 Fn 的缺失對腎間腺組織與周圍血管的影響

在過去研究報導中，已經確立在斑馬魚中，除了我們先前所觀察

研究的 *fn1* 以外，斑馬魚還有另外一種 fibronectin gene，稱為 *fibronectin 1b (fn1b)*，但是在過去研究中，主要是觀察體節邊界的型態是否會因為 *fn1b* 被抑制後造成缺陷 (Julich et al., 2005)。所以我們也想了解，若是 *fn1* 的缺失會造成腎間腺組織型態發育、腎間腺組織附近背主動脈管腔的型態與 IRV 的發育等影響，*fn1b* 的缺失是否也會造成腎間腺組織與周圍血管的發育受到影響。我們利用了 *fn1b* morpholino 對 *fn1b* 進行抑制後，我們觀察受精後三天的胚胎在驅幹前端的體節邊界確實有明顯的缺失，相較於 standard morphant 體節邊界有較模糊的情況。在切片染色觀察中，可以看到 standard morphant 結果與先前研究相符，腎間腺組織可正常進行 central migration 並且背主動脈的管腔與 IRV 都有正常發育〔圖六，A〕。在 *fn1b* morphant 中，我們可以觀察到腎間腺組織有正常的 midline fusion 或 central migration，因為腎間腺組織位於脊索的下方，在脊索下方的 Fn 分佈似乎沒有因為 *fn1b* 的缺失而有降低的現象，在血管型態方面，背主動脈可以正常形成管腔，IRV 也有由背主動脈新生出來〔圖六，B〕。這結果證明了，*fn1b* 缺失所表現出的表型與 *fn1* 在腎間腺組織周圍是不同的，*fn1* 的缺失會造成腎間腺組織與周圍血管嚴重的缺陷，*fn1b* 的缺失則是沒有明顯的影響。

五、Fn 的接受器 Integrin $\alpha 5$ 受到抑制時對腎間腺組織與其周圍血管的影響

在過去報導已經提出 Integrin $\alpha 5$ (Itga5) 是 Fn 的接受器 (Koshida et al., 2005) , 當 Fn 與細胞膜上的 Itga5 進行結合後, 可以啟動下游許多的訊號傳遞 (Danen and Yamada, 2001) 。本論文的結果顯示 Fn 的缺失會對斑馬魚腎間腺組織、鄰近的背主動脈管腔與 IRV 的發育造成影響, 因此, 我們想知道在 Fn 的接受器 Itga5 有缺失的情況下, 是否會產生與 Fn 有缺失的斑馬魚相同的效果。為了觀察 Itga5 降低所造成的影響, 我們使用了 *itga5* morpholino 來降低 Itga5, 在結果中, 我們觀察到 standard morphant 的腎間腺組織有明顯進行 central migration 的情況, 而 *itga5* morphant 中, 我們可以清楚觀察到腎間腺組織有兩種型態 [圖七, B、C], 一種是位於中線的兩側, 以及位於中線的右側。這結果與先前 *fn1* morphant 的結果相符, 一樣都有這兩種的型態, 在我們所進行 *itga5* morpholino 注射後的 27 隻胚胎中, 有 15 隻為型態 (I) (56%), 剩餘的 12 隻為型態 (II) (44%) [表三]。在 IRV 的觀察中, IRV 發育也受到影響, 沒有辦法正常的由背主動脈新生出來, 或是生長有過短的情況, 在 15 隻型態 (I) 的切片觀察中, 有 11 隻胚胎 IRV 發育受影響; 在 12 隻型態 (II) 切片觀察中, 有 9 隻胚胎 IRV 發育受影響而不能正常發育延伸; 在控制組方面則是

9 隻胚胎全部都有 IRV 的正常發育延伸〔表四〕。在我們進行 Fn 的免疫螢光染色後，可以觀察到 Fn 也確實有降低的現象。過去在 Koshida et al (2005) 對斑馬魚體節邊界的研究中亦發現類似的現象，他們的解釋是，Fn 的分佈或許需要有 Itga5 的存在，才能使 Fn 堆積在體節邊界的周圍，我們的結果也是當 Itga5 缺失的同時，Fn 分佈也會明顯的降低。因此我們藉由實驗得到的結果，可以更加證明 Fn 確實會是影響腎間腺組織的 midline fusion 或 central migration，同時也會對 IRV 的發育造成影響，讓 IRV 無法正常新生或是有過短的情況。除此之外我們也間接證明 Fn 與 Itga5 之間的關係，因為在腎間腺組織與 IRV 的型態都非常相似，因此更加證明 Fn 與 Itga5 共同參與在腎間腺的型態發生及血管生成。

在我們進行 *itga5* morpholino 注射的胚胎中，在總數 58 隻胚胎有 41% 為型態 (I) 另外 59% 為型態 (II)，這與我們在 *fn1* morphant 所觀察到型態比例有明顯的差異，這或許代表了 Itga5 在腎間腺組織 midline fusion 的過程會比 Fn1 扮演更為關鍵的角色，而 Itga5 在 midline fusion 時期，可能有除了 Fn1 外的交互作用對象，可共同參與在腎間腺組織的 midline fusion。

六、利用顯微注射 RGD 寡胜肽以影響 Fn 與 Itga5 的結合位

過去研究已經知道老鼠的 Fn 與 Integrin $\alpha5\beta1$ 之間的結合是藉由一段 Fn 上的 RGD 序列(Astrof and Hynes, 2009)，因此，我們就想了解，若是利用這段寡胜肽序列來競爭 Integrins 上的 Fn 結合位，是否會導致與本篇論文先前所觀察的 *fn* 或 *itga5* 有缺失的斑馬魚相似的缺陷。於是我們進行了血管造影(micro-angiography)的實驗，我們使用了七個胺基酸(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys)所組成的 RGD 序列，在胚胎受精後 37 小時的時候進行注射，並且放回 28 度培養箱繼續培養，直到 52 小時進行固定。在結果中，我們觀察到在我們控制組的胚胎中(以 Bovine serum albumin，BSA 處理)，腎間腺組織的型態明顯開始進行 central migration 並且 IRV 也由背主動脈新生，並且朝向腎間腺組織生長延伸〔圖八，A〕。經過 RGD 顯微注射後的胚胎，我們可以觀察到腎間腺組織似乎沒有正常的進行 central migration，並且呈現較為緊密的橢圓形，在 IRV 方面，可以觀察到 IRV 的長度與控制組相較之下有較短的情況〔圖八，B〕，因此我們對 IRV 的長度進行統計，在統計結果中確實有顯著差異〔表五〕。在這組實驗中，我們確定了 Fn 在腎間腺組織與 IRV 的發育都扮演重要的角色，不管是先前在胚胎所進行 *fn1* 或 *itga5* morpholino 的實驗，或是在受精後 37 小時進行 RGD 顯微注射的實驗，都可以觀察到胚胎的腎間腺組織無法正常進行 central migration 並且 IRV 發育會無法新生或是有較短的現

象。

七、抑制斑馬魚的血流無法影響 IRV 的新生

在過去研究與本論文都觀察到在 Fn 有缺失的胚胎，無法觀察到血流 (Koshida et al., 2005; Trinh and Stainier, 2004)，我們想確定血流是否會是 IRV 無法由背主動脈新生的原因，而不是因為 Fn 缺失所導致。為了解這個疑問，我們使用了 *cardiac troponin T2a (tnnt2a)* morpholino 來進行實驗 (Sehnert et al., 2002)。 *tnnt2a* 基因所做出的蛋白質是一種 thin-filament contractile protein cardiac troponin T。在人類如果有缺陷時會導致心肌肥大而造成死亡，是一種遺傳性疾病 (Maron et al., 1996; Thierfelder et al., 1994)。而在 *tnnt2a* 有缺失的斑馬魚中，會表現出心臟水腫、停跳和全身沒有血流的缺陷 (Sehnert et al., 2002)。我們對 *tnnt2a* morphant 進行切片及免疫螢光染色後，觀察到 IRV 確實能由背主動脈新生〔圖九〕，但是卻無法正常延伸到腎間腺組織內側，而是比較凌亂的生長。證明了血流並不是影響 IRV 新生的重要角色，但是卻會影響 IRV 生長的型態。

為了知道抑制 Itga5 的表達或破壞 Fn- Itga5 的結合是否會導致 Itga5 下游訊號傳遞的改變，我們首先檢查在腎間腺區域的 Focal Adhesion Kinase (FAK) 是否會被活化。如前言所提到的，在 FAK 正

常作用情況下，FAK 會在其第 397 個氨基酸 tyrosine 上自我磷酸化，所以我們對斑馬魚胚胎進行切片後進行磷酸化 FAK 之免疫螢光染色，來確定 FAK 確實是有受到磷酸化並且有活性的，在結果中可以觀察到磷酸化的 FAK 確實在腎間腺組織周圍的表達，並呈現與 Fn 非常接近的分布型態〔圖十〕，接下來，我們將會去對 Fn 有缺失的胚胎進行磷酸化 FAK 之免疫螢光染色。

過去已經知道細胞膜上的 Integrins 會透過 focal adhesion complex 與 F-actin 進行連結，來達到細胞移行等調控，所以我們也運用了 phalloidin 來對 F-actin 進行染色，來了解在腎間腺組織移行方向的 F-actin 是否會有增多的情況。我們將胚胎切片後進行染色，卻只有觀察到肌肉部分的 F-actin 表達，在其他部位完全染不上〔圖十一〕，因此無法確定 F-actin 在正常與 Fn 缺失的胚胎中表達是如何，可能要借助其它種染色才能進行觀察。

總結以上實驗，我們觀察到腎間腺組織周圍以及鄰近的背主動脈周圍，都有 Fn 的大量分佈，當更進一步觀察 Fn 在腎間腺組織與背主動脈的分布位置，意外發現了 Interrenal vessel (IRV) 由背主動脈新生後向腎間腺組織延伸。在了解正常情況下 Fn 的分佈情況後，我們開始對 Fn 有缺失的斑馬魚胚胎進行研究，在 *fn1* 突變種中，我們觀察

到胚胎外表有幾種容易辨認的型態：小頭、後腦塌陷、心臟發育缺失並水腫、軀幹前端的體節邊界不清楚、沒有血流等的表型。並且藉由對腎間腺組織進行染色後，發現腎間腺組織會因為缺少 Fn 而有兩種型態，一種位於中線的兩側；一種位於中線的右側，並且在右側的腎間腺組織明顯較為紮實不會像正常有向中線延伸的型態。為了更方便在不同的螢光魚進行研究，我們利用了 *fn1* morpholino 的技術來抑制 Fn 的表達。在血管螢光魚中，我們運用 *fn1* morpholino 抑制 Fn 後，觀察到與 *fn1* 突變種外表的型態相同，並且在腎間腺組織也同樣有兩種型態，因此確定所使用的 morpholino 可確實的抑制 Fn 的表達。在 Fn 缺失的情況下，原本由背主動脈新生的 IRV 無法正常發育，因此我們猜測 Fn 或許對於腎間腺組織與 IRV 的發育都扮演重要的角色。但是在過去斑馬魚研究已經發現 *fn* 基因有兩種型態，分別為 *fn1* 與 *fn1b* 兩種，所以我們想確定除了我們先前所做的 *fn1* 外，*fn1b* 的缺失是否也會影響腎間腺組織與 IRV 的發育，在結果中，似乎 *fn1b* 的缺失並不會明顯影響腎間腺組織與 IRV 的發育。接著我們對 Fn 的接受器 *Itga5* 進行抑制，也得到了相似的結果，腎間腺組織分為兩種型態，IRV 的發育也會受到影響。在前面研究都是在斑馬魚胚胎一個細胞時進行 Fn 的抑制，我們想知道在胚胎有血流之後的階段進行抑制是否也會影響腎間腺組織與 IRV 的發育，我們利用注射

Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys (Sigma) 這個 Fn 拮抗胜肽來進行研究，發現在腎間腺組織與 IRV 發育過程中，Fn 與 Itga5 的結合被拮抗也會使腎間腺組織與 IRV 發育受到影響。在以上的實驗中，我們證明了 Fn 在斑馬魚腎間腺組織的發育與 IRV 的新生扮演了非常重要的角色。

討論

在我們研究中，已經了解到在斑馬魚腎間腺與周圍血管發育的情形，會因 Fn 的缺失而造成缺陷，Fn 對於腎間腺組織的 central migration 以及 IRV 的新生與延長有一定的重要性；但是 IRV 與腎間腺組織之間的交互作用究竟由哪些分子決定仍不清楚。在血管發育方面，約受精後 16 小時可以觀察到軀幹主要血管內皮細胞的發育，並且在受精後 20-24 小時可以觀察到背主動脈的管腔已經形成 (Jin et al., 2005)；在腎間腺組織發育的部分，早期腎間腺組織是位於中線的兩側；而腎間腺組織究竟是受到血管所釋放出的何種因子，引導腎間腺組織向中線進行 midline fusion 目前並不清楚，約在受精後 28 小時可以藉由 3 β -Hsd 染出有固醇類荷爾蒙合成能力的腎間腺組織，位於中線右側；本論文觀察腎間腺組織周圍血管的結果中，約受精後 30-32 小時，IRV 由背主動脈朝著腎間腺組織方向新生出來；腎間腺組織在受精後 48 小時已經可以觀察到腎間腺組織向中線伸出觸手狀延伸；在這些時間點比對之後發現，腎間腺組織發育較背主動脈晚，並且當背主動脈形成管腔之後，間隔幾小時後，對腎間腺組織新生出一條 IRV，究竟腎間腺組織是釋放何種訊號使背主動脈新生出 IRV 將會是接下來的一個研究重點，如果能找出這個引導背主動脈新生出 IRV 的訊號因子，我們就可以做出一個假設：在早期背主動脈血管發

育形成管腔後，藉由腎間腺組織所釋放的促進血管新生因子，引導背主動脈朝向腎間腺組織新生出 IRV，隨後 IRV 分泌出 Fn 並且分佈在 IRV 延伸的方向，同時也是在中線附近的位置，而 Fn 的分佈與腎間腺組織細胞膜上的 Integrins 進行結合，並且引發腎間腺組織細胞移行，逐漸向中線移行延伸。

Fn 在腎間腺原基細胞移行過程所扮演的角色

我們也想知道，腎間腺組織未分化之前的時期，也就是腎間腺原基細胞在 midline fusion 的過程中，是否也有 Fn 的分佈來影響腎間腺的移行，但是在這麼早期想觀察腎間腺原基細胞有著一定的難度，因為早期沒有辦法由 3β -Hsd 觀察腎間腺原基細胞的分布，因此必須利用 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 螢光魚所帶有的綠色螢光來進行觀察，而 *ff1b-GFP* 所發出的綠色螢光，包含了發育早期腎間腺原基細胞以及較晚期有固醇類荷爾蒙合成能力的腎間腺組織。但是在 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 的異型合子中，需要到 30 多小時後才能夠藉由螢光顯微鏡進行螢光的篩選，在更早的時間點因螢光太弱不容易進行篩選，在同型合子的轉基因魚中，在 midline fusion 時期就可以觀察到腎間腺原基細胞的螢光 (Chou et al., 2010)，但是在同型合子的 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 胚胎，卻會有心臟水腫、體軸彎曲以及發育遲緩的缺陷 (Quek, 2009)，而這些缺陷可

能會影響接下來我們進行切片及 Fn 免疫螢光染色所觀察腎間腺原基細胞與周圍血管的結果。

Fn 對腎間腺原基細胞的發育的影響

在本研究之實驗中，將 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 與 *fn^{kt259}* 進行交配後的子代進行螢光篩選，篩選出的胚胎養至成魚後進行交配，可得到帶有 *ff1b-GFP* 的 *fn1* 突變種，在本篇實驗可以觀察到，腎間腺組織確實與實驗室先前觀察一致，腎間腺組織有分成兩種型態，並且藉由 3 β -Hsd 染色(可以染出有固醇類荷爾蒙合成能力的腎間腺組織細胞，染色結果呈現黑色)跟 *ff1b-GFP* 有共同表達情況，來確定 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 的綠色螢光確實表達在腎間腺組織〔圖三〕。但是在切片結果中，我們同樣也觀察到一些有趣的情形，在 Fn 的突變種中，不管是型態 (I) 或型態 (II) 都可以觀察到 *ff1b-GFP* 的表達量似乎有明顯下降〔圖三〕，我們知道在 3 β -Hsd 染色下，可能會蓋掉綠色螢光，因此，綠色螢光所代表的就是尚未分化的腎間腺原基細胞，所以腎間腺組織可能會因為 *fn1* 的降低而減少未分化的腎間腺細胞。

FAK 是否參與 Itga5 下游的信號傳遞

在過去已經知道 FAK 在 Integrin pathway 中扮演重要的角色，並且 FAK 也會位於許多 pathway 的下游，如果對 FAK 進行抑制，是否會跟 *fn1* 與 *itga5* 有缺失的胚胎，有著相同的腎間腺組織或是 IRV 的

缺陷，也可能是更加嚴重的型態。在斑馬魚中 FAK 有 *protein tyrosine kinase 2a (ptk2.1)* 以及 *protein tyrosine kinase 2b (ptk2.2)* 兩種，都表達於 somite border、vertical myoseptum 等 (Crawford et al., 2003)。或許我們可以去作 *ptk2.1* 或 *ptk2.2* 的 mRNA 原位雜交的實驗，之後進行切片觀察在腎間腺周圍的分布情況，再更進一步利用 morpholino 進行抑制來觀察結果。

血流與腎間腺組織的移行以及 IRV 發育之間的相關性

在血流抑制的實驗中，我們抑制了 *tnnt2a* 這個基因來達到抑制血流的目的，但是在本篇中沒有仔細探討，血流對 IRV 生長方向所造成的影響，在過去研究中已經知道血流在斑馬魚腎臟的發育扮演了重要的角色 (Serluca et al., 2002)。然而血流如何影響 IRV 生長的方向，以及腎間腺組織的 central migration 的機制目前並不清楚。過去已經知道血流會引導血管內皮細胞釋放 *matrix metalloproteinase-2 (mmp2)* 這個可以引導細胞移行的因子 (Serluca et al., 2002)，因此 *tnnt2* morphant 是不是因為 *mmp2* 的降低，而導致腎間腺無法 central migration，在我們的假設腎間腺組織會釋放出促血管新生因子引導 IRV 的生長，*tnnt2* morphant 有可能因為腎間腺組織的移行受到影響，導致腎間腺所釋放的促血管新生因子異常，所以 IRV 的生長方向會發生變化，是將來值得探討的問題。

調控 IRV 新生可能的促血管新生因子

在我們本篇研究中，確立了 Fn 藉由 Itga5 影響到 IRV 的發育延伸與腎間腺組織的移行，卻沒有直接的證據來解釋 IRV 為何會由背主動脈新生出來，並且延伸到腎間腺組織靠近中軸的方向，目前猜測有可能是腎間腺組織釋放出某一種或是數種血管新生因子進行引導，血管新生因子中最常見的 Vascular Endothelial Growth Factor family (VEGF family) 或許會是 IRV 促新生因子的一部分。在過去乳癌細胞所進行研究報導指出，VEGF₁₆₅ 會透過 Fn 與 Heparins 長期作用影響細胞分裂與移行 (Miralem et al., 2001)；Fn 也會與 VEGF 交互作用調節內皮細胞移行與分化 (Wijelath et al., 2002; Wijelath et al., 2004)；在腎上腺的血管生成則是需要 EG-VEGF (endocrine-gland-derived VEGF 或 prokineticin 1) (LeCouter et al., 2001)、Angiopoietin2 (Ishimoto et al., 2006; Ishimoto et al., 2008) 及 VEGF (Heikkila et al., 2000)，因此 VEGF family 血管新生因子，或許會是接下來我們所探討 IRV 由背主動脈新生並且延伸至腎間腺組織的一個關鍵，若是可以確立是哪種血管新生因子，就可以在我們所推論的腎間腺組織與周圍血管之間的交互作用，進而引導 IRV 的新生，做一個更清楚的敘述。

在我們找出 IRV 並且進行研究的同時，我們也證明了一件事，斑馬魚胚胎可以進行在固醇類生成組織的血管新生之新藥篩選，因為我

們實驗利用了微型血管注射，成功的影響了新生血管的生長以及腎間腺組織的移行，這指出了斑馬魚腎間腺是一種可以在抗血管新生與抗細胞移行的胜肽藥物理想的篩選平台。

參考文獻

- Astrof, S. and Hynes, R. O.** (2009). Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* **12**, 165-75.
- Chai, C., Liu, Y. W. and Chan, W. K.** (2003). Ff1b is required for the development of steroidogenic component of the zebrafish interrenal organ. *Dev Biol* **260**, 226-44.
- Chou, C. W., Hsu, H. C., Quek, S. I., Chan, W. K. and Liu, Y. W.** (2010). Arterial and venous vessels are required for modulating developmental relocation and laterality of the interrenal tissue in zebrafish. *Dev Dyn* **239**, 1995-2004.
- Crawford, B. D., Henry, C. A., Clason, T. A., Becker, A. L. and Hille, M. B.** (2003). Activity and distribution of paxillin, focal adhesion kinase, and cadherin indicate cooperative roles during zebrafish morphogenesis. *Mol Biol Cell* **14**, 3065-81.
- Danen, E. H. and Yamada, K. M.** (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* **189**, 1-13.
- Drake, C. J., Davis, L. A., Walters, L. and Little, C. D.** (1990). Avian vasculogenesis and the distribution of collagens I, IV, laminin, and fibronectin in the heart primordia. *J Exp Zool* **255**, 309-22.
- George, E. L., Baldwin, H. S. and Hynes, R. O.** (1997). Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* **90**, 3073-81.
- Grassi Milano, E., Basari, F. and Chimenti, C.** (1997). Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *Gen Comp*

Endocrinol **108**, 483-96.

Heikkila, P., Arola, J., Voutilainen, R., Salmenkivi, K., Kahri, A. I. and Liu, J. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor in human adrenals. *Endocr Res* **26**, 867-71.

Hsu, H. C. (2010). Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *M.D. thesis, Tunghai University.*

Hsu, H. J., Lin, G. and Chung, B. C. (2003). Parallel early development of zebrafish interrenal glands and pronephros: differential control by wt1 and ff1b. *Development* **130**, 2107-16.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.

Ishimoto, H., Ginzinger, D. G. and Jaffe, R. B. (2006). Adrenocorticotropin preferentially up-regulates angiopoietin 2 in the human fetal adrenal gland: implications for coordinated adrenal organ growth and angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1909-15.

Ishimoto, H., Minegishi, K., Higuchi, T., Furuya, M., Asai, S., Kim, S. H., Tanaka, M., Yoshimura, Y. and Jaffe, R. B. (2008). The periphery of the human fetal adrenal gland is a site of angiogenesis: zonal differential expression and regulation of angiogenic factors. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 2402-8.

Jin, S. W., Beis, D., Mitchell, T., Chen, J. N. and Stainier, D. Y. (2005). Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development* **132**, 5199-209.

Julich, D., Geisler, R. and Holley, S. A. (2005). Integrin α 5 and

delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somitogenesis. *Dev Cell* **8**, 575-86.

Koshida, S., Kishimoto, Y., Ustumi, H., Shimizu, T., Furutani-Seiki, M., Kondoh, H. and Takada, S. (2005). Integrin 5-Dependent Fibronectin Accumulation

for Maintenance of Somite Boundaries

in Zebrafish Embryos. *Developmental Cell*, Vol. 8, 587–598, April, 2005,.

LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G. A.

et al. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **412**, 877-84.

Linask, K. K. and Lash, J. W. (1986). Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement. *Dev Biol* **114**, 87-101.

Linask, K. K. and Lash, J. W. (1988). A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. I. Dose-dependent effects of fibronectin antibody. *Dev Biol* **129**, 315-23.

Liu, Y. W. and Guo, L. (2006). Endothelium is required for the promotion of interrenal morphogenetic movement during early zebrafish development. *Dev Biol* **297**, 44-58.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P. T. (2007). Chapter 19 Integrating cells into tissues. *Molecular Cell Biology* 6th edition. (Freeman) p. 820-834.

Maron, B. J., Shirani, J., Poliac, L. C., Mathenge, R., Roberts, W. C.

- and Mueller, F. O.** (1996). Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *Jama* **276**, 199-204.
- Miralem, T., Steinberg, R., Price, D. and Avraham, H.** (2001). VEGF(165) requires extracellular matrix components to induce mitogenic effects and migratory response in breast cancer cells. *Oncogene* **20**, 5511-24.
- Quek, S. I.** (2009). Molecular characterization of the zebrafish ff1b gene. . *National University of Singapore*.
- Sechler, J. L. and Schwarzbauer, J. E.** (1998). Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *J Biol Chem* **273**, 25533-6.
- Sehnert, A. J., Huq, A., Weinstein, B. M., Walker, C., Fishman, M. and Stainier, D. Y.** (2002). Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet* **31**, 106-10.
- Serluca, F. C., Drummond, I. A. and Fishman, M. C.** (2002). Endothelial signaling in kidney morphogenesis: a role for hemodynamic forces. *Curr Biol* **12**, 492-7.
- Sun, L., Zou, Z., Collodi, P., Xu, F., Xu, X. and Zhao, Q.** (2005). Identification and characterization of a second fibronectin gene in zebrafish. *Matrix Biol* **24**, 69-77.
- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H. P., Seidman, J. G. and Seidman, C. E.** (1994). Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* **77**, 701-12.
- Trinh, L. A. and Stainier, D. Y.** (2004). Fibronectin regulates epithelial

organization during myocardial migration in zebrafish. *Dev Cell* **6**, 371-82.

Vuori, K. (1998). Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J Membr Biol* **165**, 191-9.

Wijelath, E. S., Murray, J., Rahman, S., Patel, Y., Ishida, A., Strand, K., Aziz, S., Cardona, C., Hammond, W. P., Savidge, G. F. et al. (2002). Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res* **91**, 25-31.

Wijelath, E. S., Rahman, S., Murray, J., Patel, Y., Savidge, G. and Sobel, M. (2004). Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *J Vasc Surg* **39**, 655-60.

圖表目錄

表一	<i>fn1</i> morphant 受精後 45 小時與 3 天的腎間腺組織型態統計...	47
表二	<i>fn1</i> morphant 受精後 45 小時與 3 天的 IRV 型態統計.....	48
表三	<i>itga5</i> morphant 受精後 2 天的腎間腺組織型態統計.....	49
表四	<i>itga5</i> morphant 受精後 2 天的 IRV 型態統計.....	50
表五	在斑馬魚胚胎 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 發育 37 小時後注射 BSA 或 RGD 後在 52 小時 IRV 的發育長度統計.....	51
圖一	Fn 在斑馬魚 <i>Tg(ff1bEx2:GFP)</i> 胚胎不同時期的分佈情形.....	52
圖二	Fn 在斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎不同時期的分佈情形.....	53
圖三	Fn 在斑馬魚 <i>fn^{kt259}</i> ; <i>Tg(ff1bEx2:GFP)</i> 胚胎受精後 3 天的分佈情形.....	54
圖四	Fn 在注射 <i>fn1</i> morpholino 的斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎受精後 2 天的分佈情形.....	56
圖五	Fn 在注射 <i>fn1</i> morpholino 的斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎受精後 2 天的分佈情形.....	57
圖六	Fn 在注射 <i>fn1b</i> morpholino 斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎受精後 3	

天的分佈情形.....	58
圖七 Fn 在注射 <i>itga5</i> morpholino 斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎受精後 2 天的分佈情形.....	59
圖八 斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎發育 37 小時後注射 BSA 或 RGD 後在 52 小時 IRV 的發育情形.....	60
圖九 Fn 在注射 <i>tnnt2</i> morpholino 斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎受精後 2.5 天的分佈情形.....	61
圖十 pFAK 在斑馬魚 <i>Tg(kdrl:GFP)^{s843}</i> 胚胎受精後兩天的表達情 形.....	62
圖十一 F-actin 在斑馬魚 <i>Tg(ff1bEx2:GFP)</i> 與 <i>fn1</i> morphant 胚胎受精後 75 小時的分佈情形.....	63

表一、 *fn1* morphant 受精後 45 小時與 3 天的腎間腺組織型態統計

	45 hpf 控制組	45 hpf <i>fn1</i> morphant	72 hpf 控制組	72 hpf <i>fn1</i> morphant
正常發育	n=16/19 (84%)		n=16/16 (100%)	
腎間腺組織型態 (I)		n=39/47 (83%)		n=24/83 (83%)
腎間腺組織型態 (II)	n=3/19 (16%)	n=8/47 (17%)		n=6/30 (17%)

表二、 *fn1* morphant 受精後 45 小時與 3 天的 IRV 型態統計

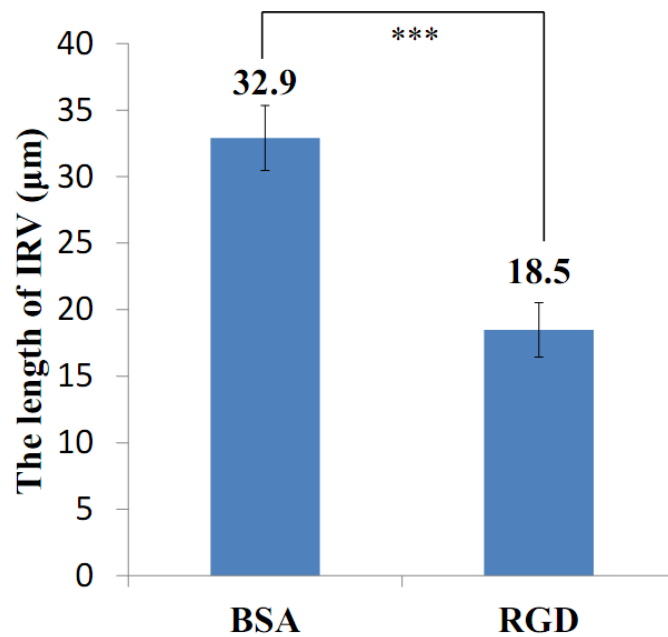
	45 hpf 控制組	45 hpf <i>fn1</i> morphant	72 hpf 控制組	72 hpf <i>fn1</i> morphant
腎間腺組織與 IRV 正 常發育	n=19 /19 (100%)		n=16 /16 (100%)	
腎間腺組織型態 (I) IRV 正常發育		n=3 /15 (21%)		n=1 /11 (9%)
腎間腺組織型態 (I) IRV 發育異常		n=12 /15 (79%)		n=10 /11 (91%)
腎間腺組織型態 (II) IRV 正常發育		n=0		n=2 /11 (18%)
腎間腺組織型態 (II) IRV 發育異常		n=7/7 (100%)		n=9 /11 (82%)

表三、 *itga5* morphant 受精後 2 天的腎間腺組織型態統計

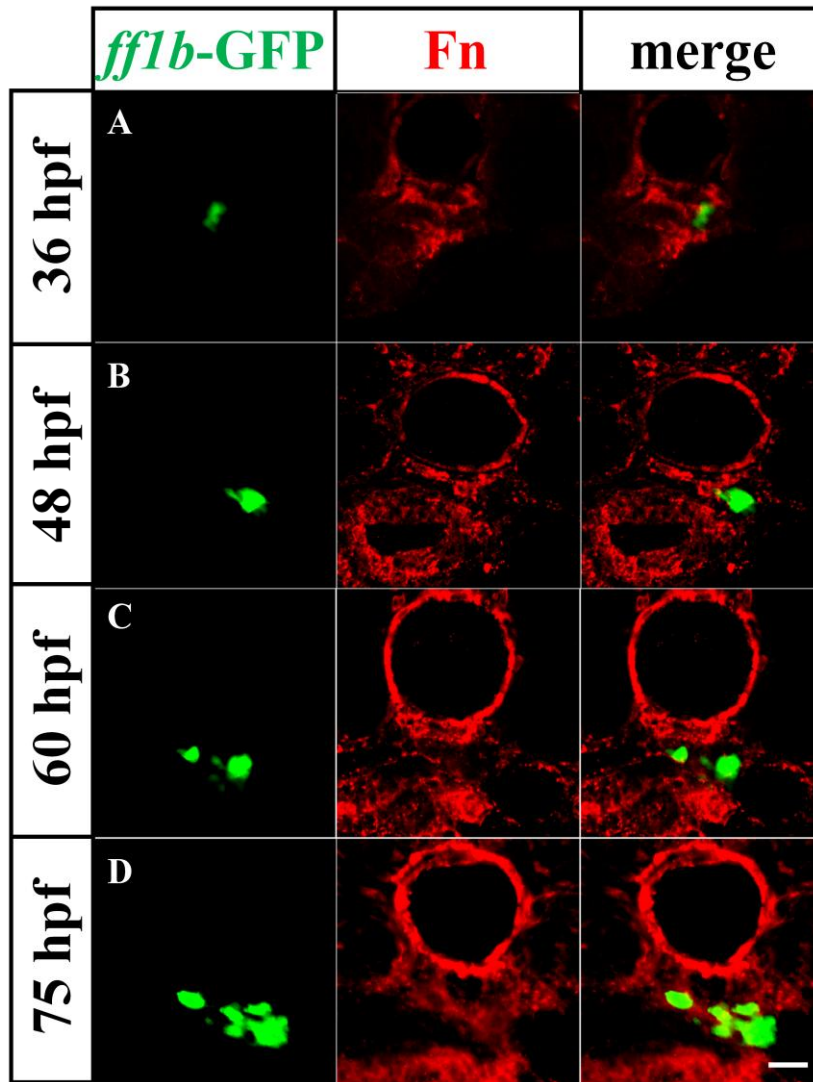
	2 dpf 控制組	2 dpf <i>itga5</i> morphant
正常發育	n=9/9 (100%)	
腎間腺組織型態 (I)		n=15/27 (56%)
腎間腺組織型態 (II)		n=12/27 (44%)

表四、 *itga5* morphant 受精後 2 天的 IRV 型態統計

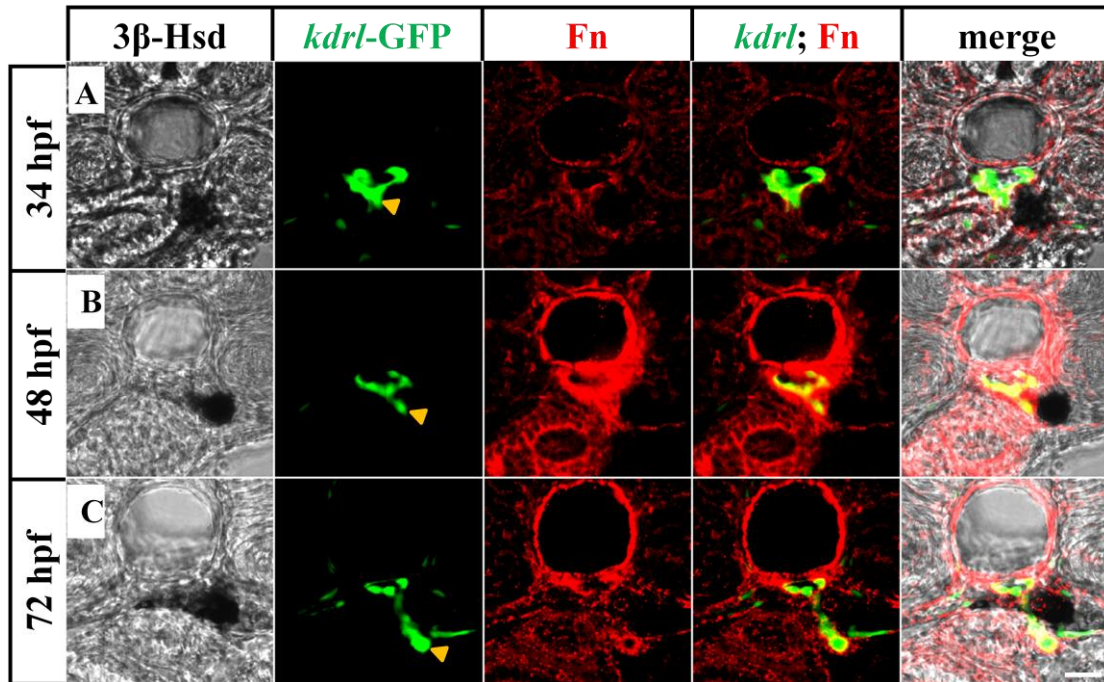
	2 dpf 控制組	2 dpf <i>itga5</i> morphant
腎間腺組織與 IRV 正常發育	n=9 /9 (100%)	
腎間腺組織型態 (I) IRV 正常發育		n=4/15 (27%)
腎間腺組織型態 (I) IRV 發育異常		n=11/15 (73%)
腎間腺組織型態 (II) IRV 正常發育		n=3/12 (25%)
腎間腺組織型態 (II) IRV 發育異常		n=9/12 (75%)



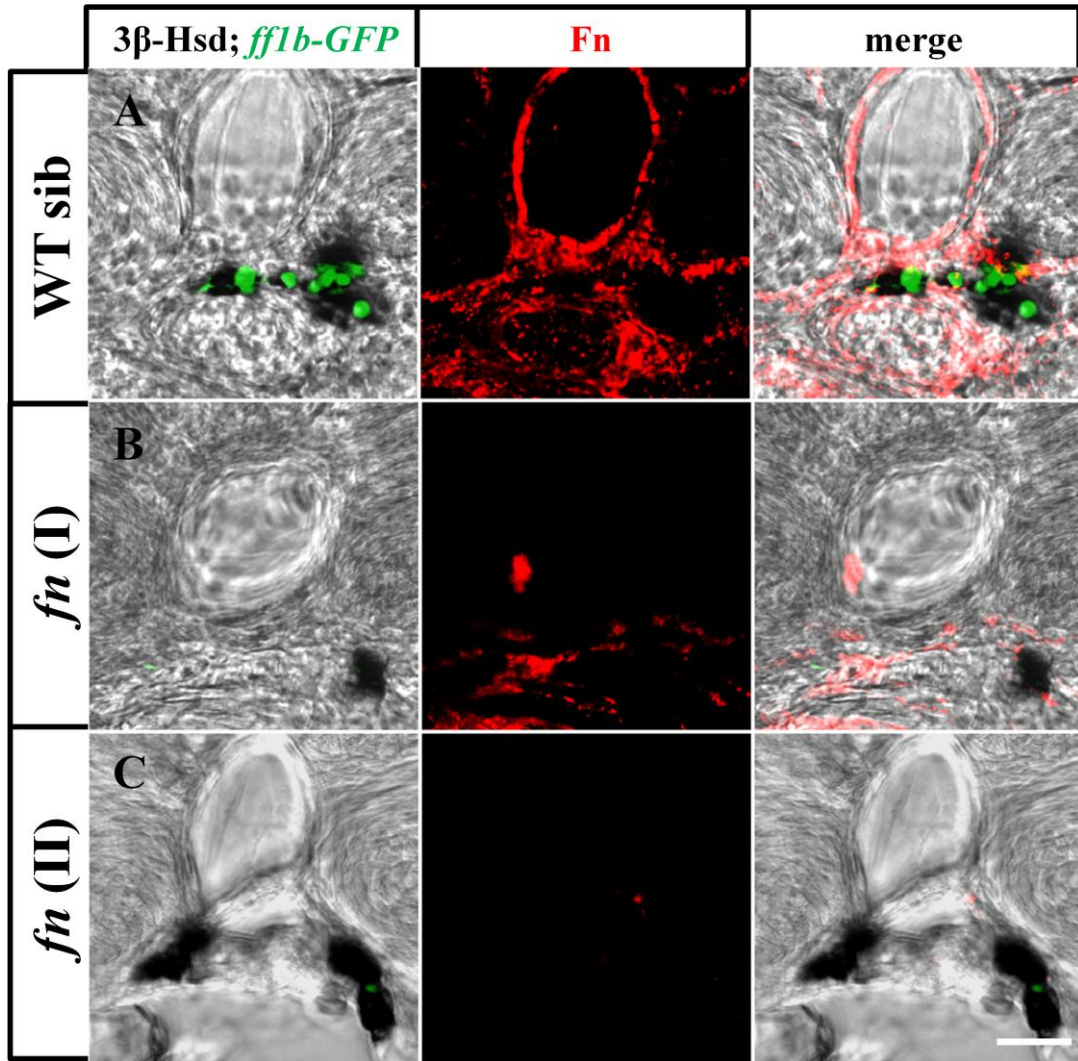
表五、在斑馬魚胚胎 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 發育 37 小時後注射 BSA 或 RGD 後在 52 小時 Interrenal vessel (IRV) 的發育長度統計。在統計表中，控制組 BSA 的 IRV 長度平均為 32.9 μm ；在注射 RGD 的胚胎中，IRV 長度平均為 18.5 μm ， $P < 0.001$ 。統計圖中可看出，經過 RGD 處理後的胚胎，IRV 明顯比控制組來的短。



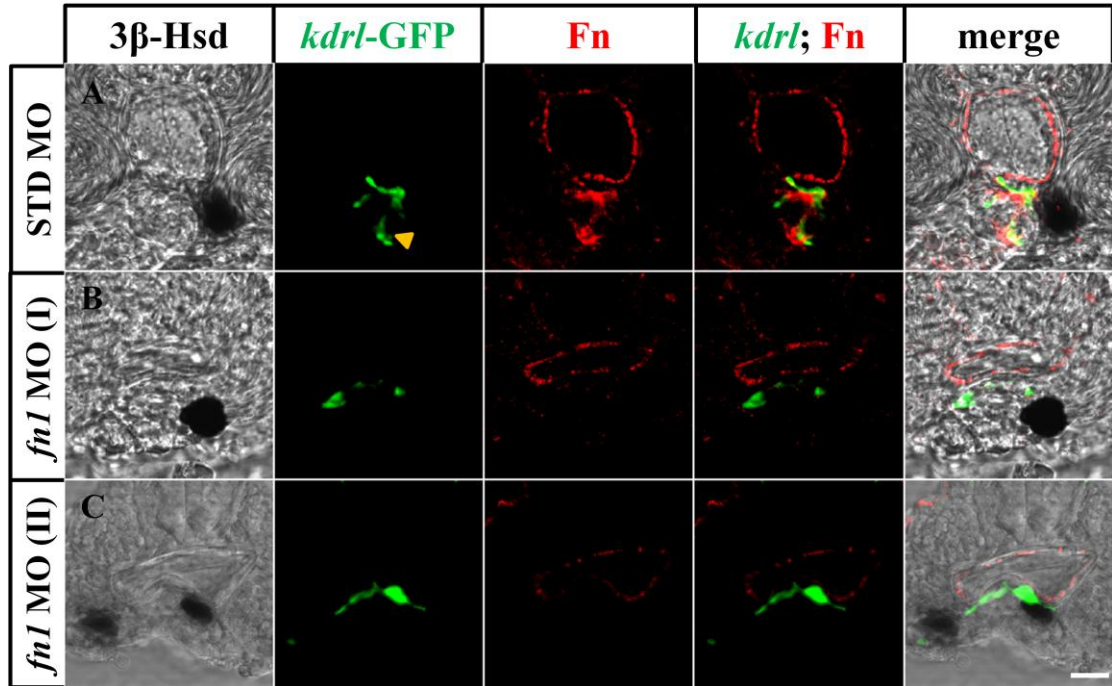
圖一、Fn 在斑馬魚 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 胚胎不同時期的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。綠色螢光為 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 的腎間腺組織所發出的 GFP；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。Fn 會在腎間腺組織的周圍分佈，並且在脊索下方明顯分佈。圖中 Fn 明顯分佈於中線位置，並且在 36、48、60、75 hpf (A、B、C、D) 的圖片中，可觀察到腎間腺組織朝有朝著中線做觸手狀的延伸，而 Fn 也會分佈在延伸的方向。比例尺：20 μ m。



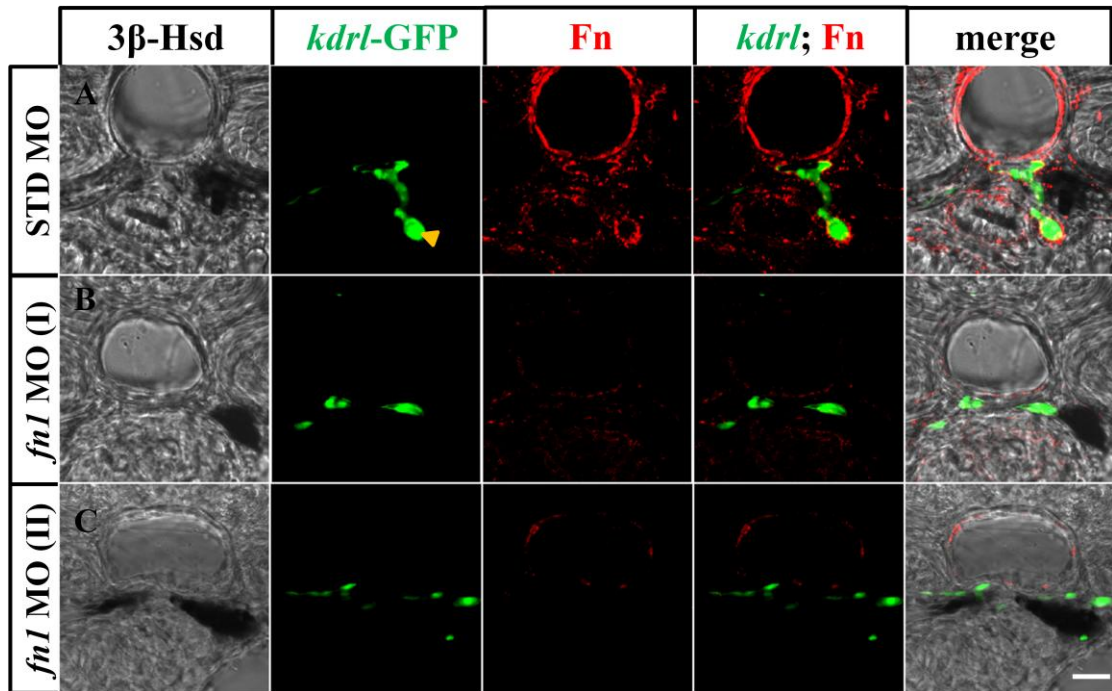
圖二、Fn 在斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎不同時期的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3β-Hsd 組織染色法 (黑色)；*Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 所表達的綠色螢光為血管內皮細胞；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。Fn 會在腎間腺組織的周圍分佈，並且在脊索下方圍繞背主動脈管腔外圍分佈，可清楚看到在 34 hpf 的胚胎中 (A)，背主動脈已經朝著腎間腺組織延伸出 IRV，隨著發育的時間逐漸向腎間腺組織延伸 (B:48 hpf、C:72 hpf)，並且在 IRV 周圍有明顯 Fn 分佈的現象。黃色箭頭：IRV。比例尺：20μm。



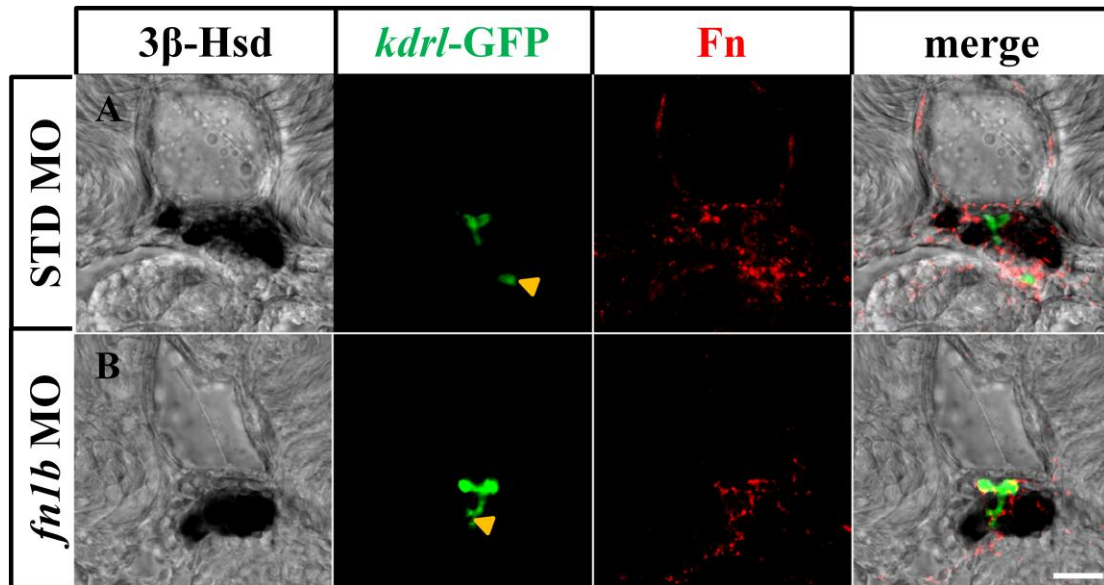
圖三、Fn 在斑馬魚 *fn*^{kt259}; *Tg(ff1bEx2:GFP)* 胚胎受精後 3 天的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3β-Hsd 組織染色法標記；*Tg(ff1bEx2:GFP)* 所表達的綠色螢光代表腎間腺組織與腎間腺原基細胞；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。Fn 在 wild type sibling (A) 的腎間腺組織周圍明顯分佈，並且在中線部分可看到明顯分佈；在 *fn1* mutant (B、C) 中，Fn 表現量明顯降低，並且 IR 發育異常分為兩種型態，一種位於中線右側，沒有正常向中線進行觸手狀的延伸 (B)；另一種型態在早期 midline fusion 時期就無法正常發育，腎間腺組織位於中線兩側 (C)，*ff1b-GFP* 的螢光在突變種中也有明顯下降的情形 (B、C)。比例尺：20 μm。



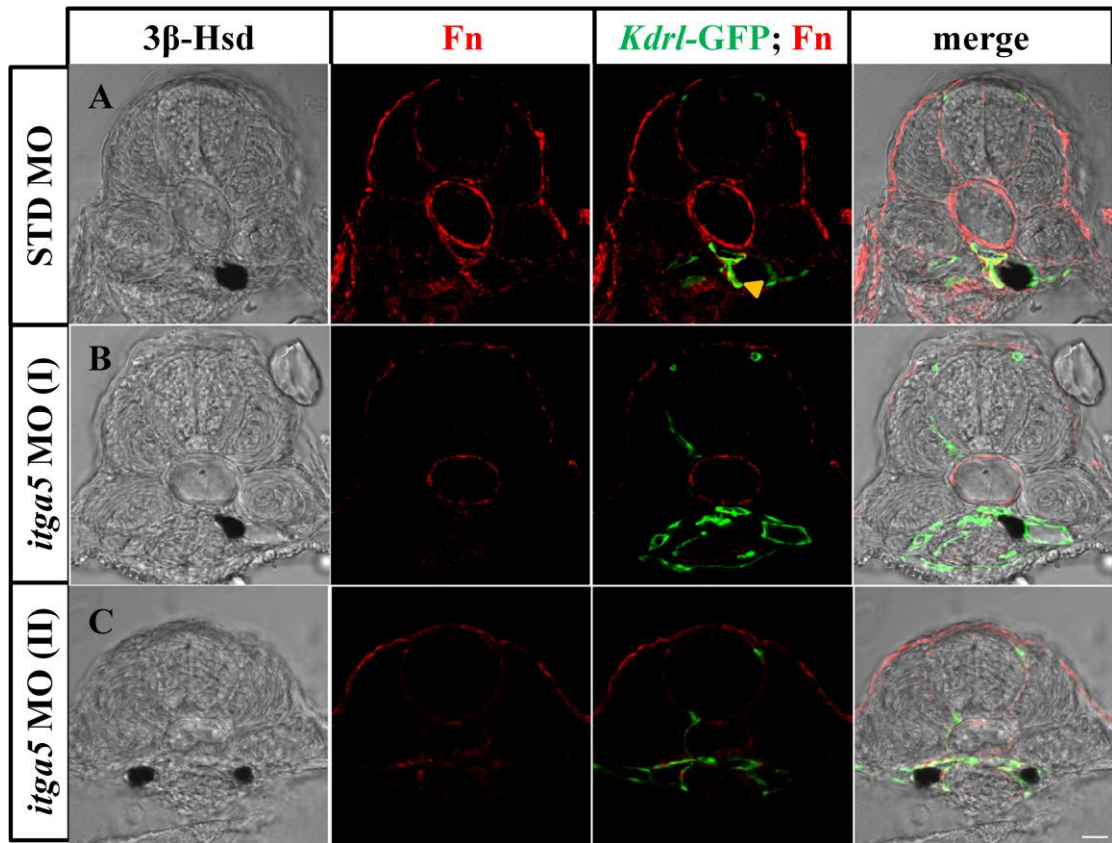
圖四、Fn 在注射 *fnl* morpholino 的斑馬魚 $Tg(kdrl:GFP)^{s843}$ 胚胎受精後 2 天的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3β-Hsd 組織染色法標記； $Tg(kdrl:GFP)^{s843}$ 所表達的綠色螢光代表血管內皮細胞；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。Fn 在控制組 (A) 的脊索下方圍繞背主動脈分佈，可清楚看到由背主動脈朝著腎間腺組織延伸出 IRV；在 $Tg(kdrl:GFP)^{s843}$ *fnl* morphant (B、C) 中，Fn 表現量明顯降低，並且腎間腺組織發育異常並且分為兩種型態，型態 (I) 是腎間腺組織位於中線右側 (B)；型態 (II) 是腎間腺組織位於中線兩側 (C)；兩種型態的背主動脈管腔型態呈現異常，IRV 也無法正常發育 (B、C)。黃色箭頭：IRV。比例尺：20 μm。



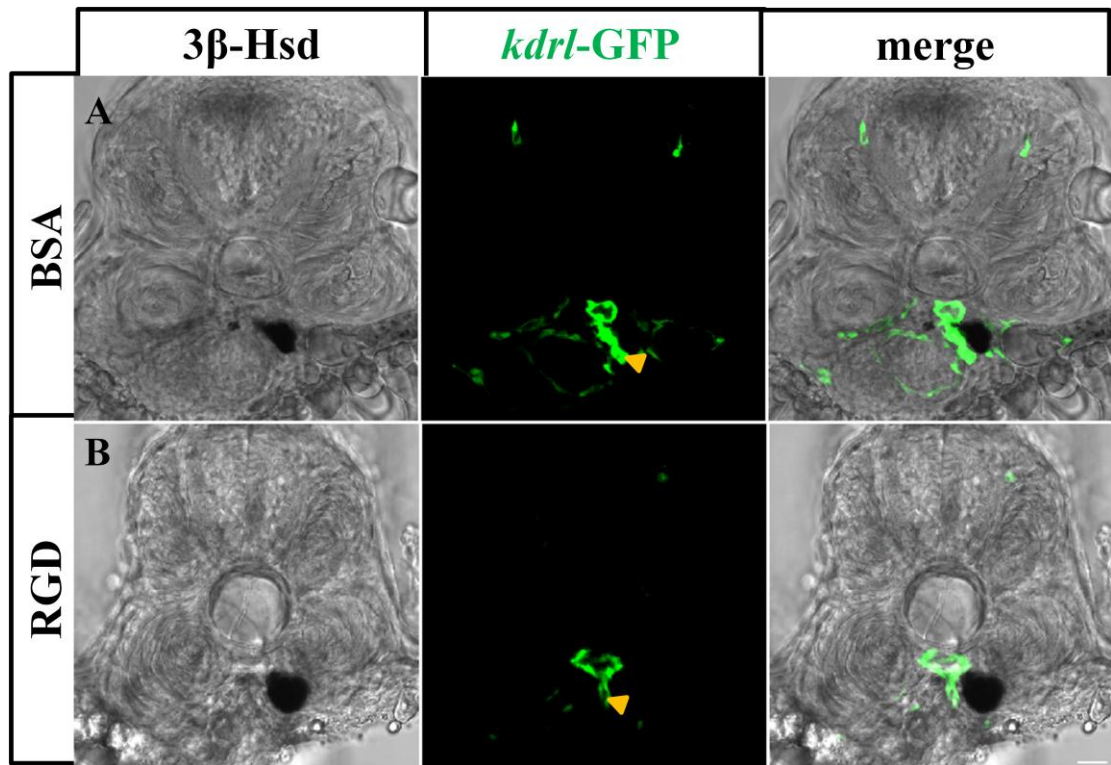
圖五、Fn 在注射 *fnl* morpholino 的斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎受精後 3 天的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3β-Hsd 組織染色法標記；*Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 所表達的綠色螢光代表血管內皮細胞；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。三天的結果與先前兩天的結果相似，在控制組 (A) 中，Fn 的分佈明顯隨著 IRV 朝向腎間腺組織的延伸而在周圍分佈，並且 IRV 相較於 2 天有明顯較長的趨勢。在 *fnl* morphant (B、C) 中，也與先前兩天結果相似：Fn 的表達量降低；血管管腔型態異常；IRV 無法由背主動脈新生。黃色箭頭：IRV。比例尺：20 μm。



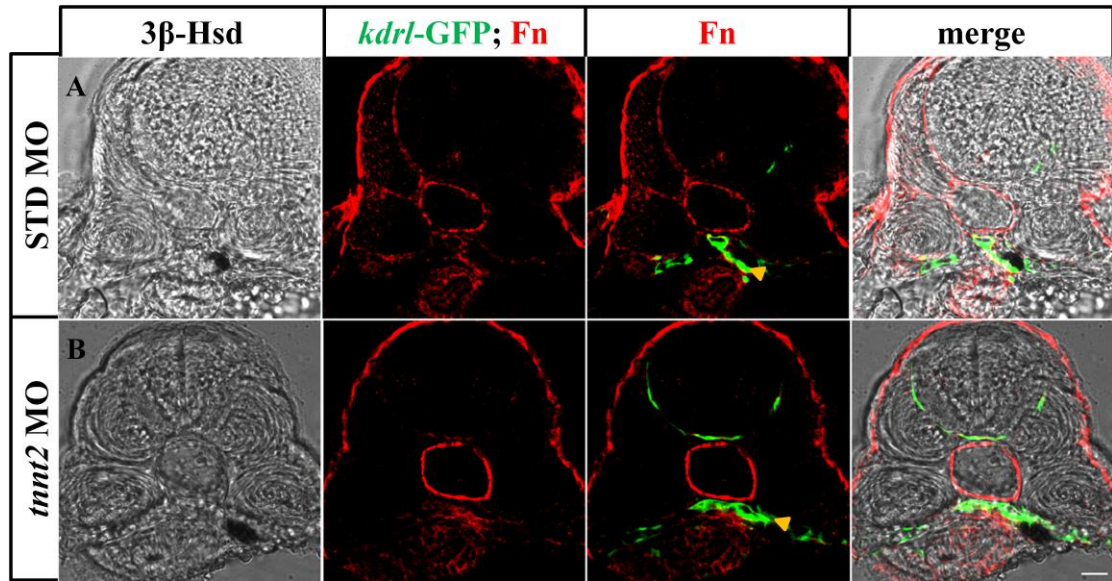
圖六、Fn 在注射 *fn1b* morpholino 斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎受精後 3 天的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3 β -Hsd 組織染色法標記；*Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 所表達的綠色螢光代表血管內皮細胞；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。控制組 (A) 在三天正常 central migration，並且 IRV 正常生長。在 *fn1b* morphant (B) 中，Fn 在胚胎的脊索下方依然圍繞背主動脈分佈，沒有因為 *fn1b* 受到抑制而有降低的現象；可清楚看到由背主動脈朝著腎間腺組織延伸出 IRV。*fn1b* 與 *fn1* morphant 在腎間腺組織所表現出的型態不同，並且在 *fn1b* morphant 的 IRV 可以正常生長及延伸。黃色箭頭：IRV。比例尺：20 μ m。



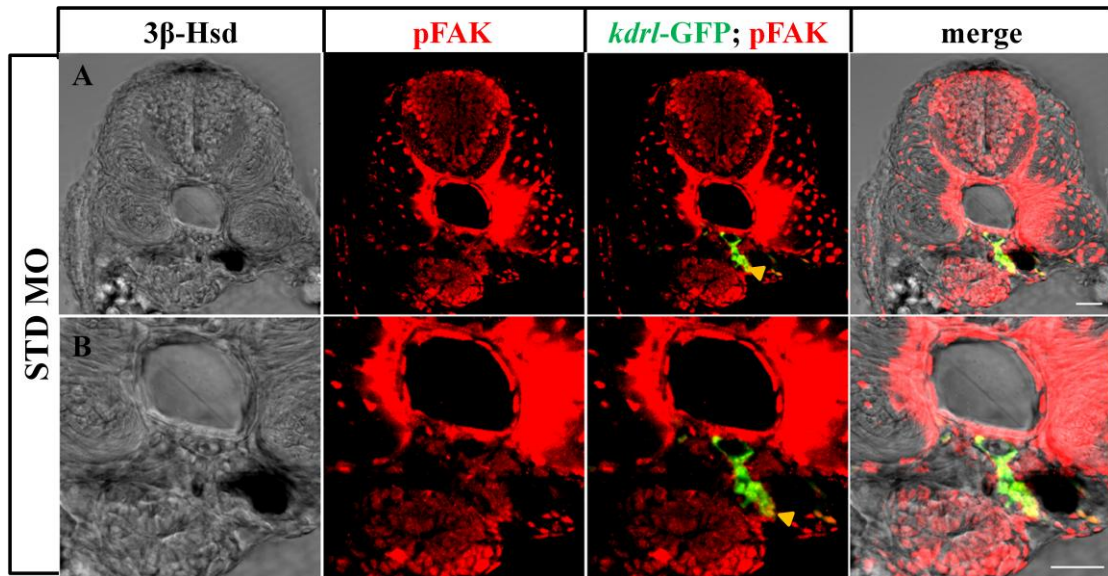
圖七、Fn 在注射 *itga5* morpholino 斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎受精後 2 天的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3 β -Hsd 組織染色法標記；*Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 所表達的綠色螢光代表血管內皮細胞；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。相對於控制組 (A)，在 *itga5* morphant (B、C) 中，Fn 表現量比起控制組有明顯降低；腎間腺組織型態分為兩種型態，一種位於中線右側 (B)；一種位於中線兩側 (C)；兩種型態的背主動脈的型態都呈現異常，而 IRV 的發育也會受到影響。黃色箭頭：IRV。比例尺：20 μ m。



圖八、斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎發育 37 小時後注射 BSA 或 RGD 後在 52 小時 IRV 的發育情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3 β -Hsd 組織染色法標記；*Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 所表達的綠色螢光代表血管內皮細胞。可清楚看到 BSA 控制組 (A) 的背主動脈朝著腎間腺組織延伸出 IRV；在注射 RGD 的胚胎中 (B)，IRV 有明顯較短，無法正常延伸的情況；並且腎間腺組織似乎無法正常 central migration。黃色箭頭：IRV。比例尺：20 μ m。

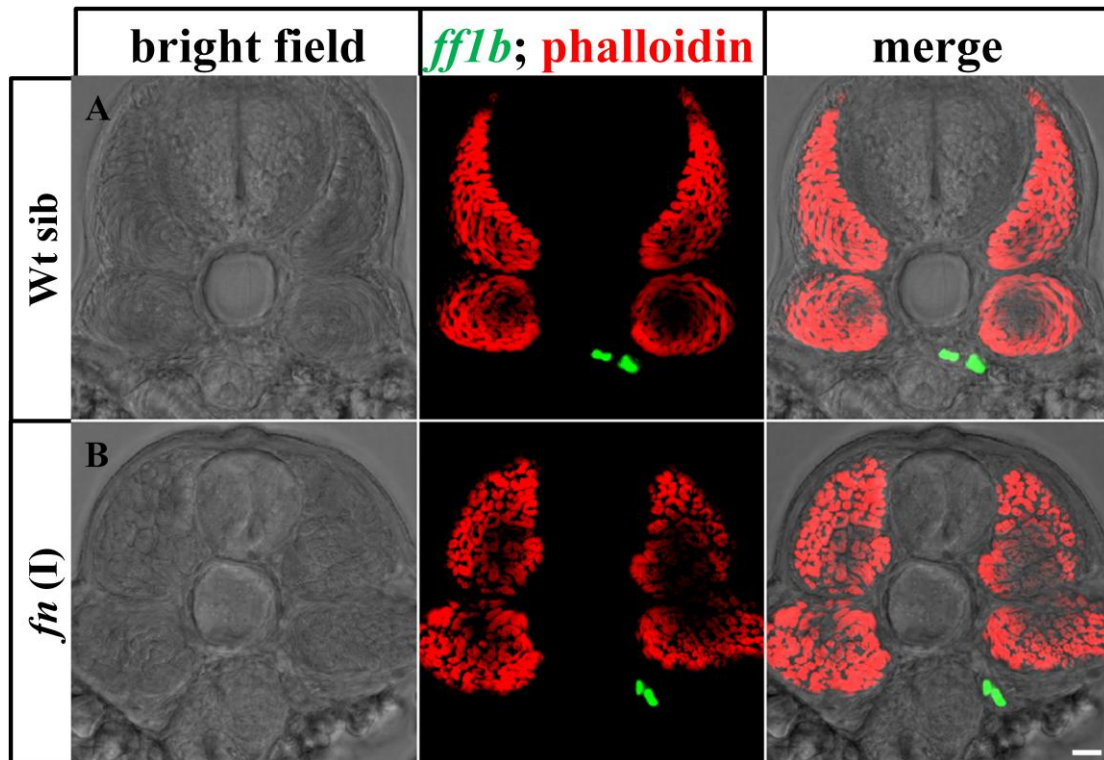


圖九、Fn 在注射 *tnnt2* morpholino 斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎受精後 2.5 天的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3 β -Hsd 組織染色法標記；*Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 所表達的綠色螢光代表血管內皮細胞；紅色螢光為 Fn 免疫組織化學染色的結果。相對於控制組 (A)，在 *tnnt2* morphant (B) 中，腎間腺組織全部位於中線右側，無法正常 central migration；Fn 的分佈會因 IRV 生長發生改變而有變化；可以看到背主動脈有 IRV 的新生並且延伸至腎間腺組織，但是 IRV 的生長方向與正常的情況有差異，會沿著腎間腺組織上端生長。黃色箭頭：IRV。比例尺：20 μ m。



圖十、pFAK 在斑馬魚 *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 胚胎受精後兩天的表達情形。

橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。腎間腺組織以 3β-Hsd 組織染色法標記； *Tg(kdrl:GFP)^{s843}* 所表達的綠色螢光代表血管內皮細胞；紅色螢光為 pFAK 免疫組織化學染色的結果。pFAK 在控制組靠近中線的腎間腺組織與 IRV 內皮細胞周圍明顯分佈，在脊索下方圍繞背主動脈分佈。pFAK 表達的型態與 Fn 在腎間腺組織周圍與 IRV 周圍分佈的結果有相似的地方。B 組圖片為 A 組圖片腎間腺及其周圍區域的兩倍放大圖。黃色箭頭：IRV。比例尺：20 μm。



圖十一、F-actin 在斑馬魚 *Tg(ff1bEx2:GFP)* 與 *fn1* mutant 胚胎受精後 75 小時的分佈情形。橫切面；背面朝上；頭朝前。雷射共軛焦掃描的結果。*Tg(ff1bEx2:GFP)* 所表達的綠色螢光代表腎間腺組織與腎間腺原基細胞；紅色螢光為 phalloidin 染色的結果，代表 F-actin。F-actin 不管在控制組 (A) 或是突變種 (B) 中，都只能染到肌肉的部分，在切片中的其它位置則完全無法染上。比例尺：20 μm 。

縮寫對照表

AMA (anterior mesenteric artery)

cas (*casnova*)

clo (*cloche*)

DA (dorsal aorta)

EC (endothelial cell)

EG- VEGF (endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor)

dpf (day postfertilization)

ECM (extracellular matrix)

FAK (Focal Adhesion Kinase)

ff1b (*nr5a1a*, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1a)

fn (*fibronectin*)

fn1 (*fibronectin1*)

fn1b (*fibronectin 1b*)

GFP (green fluorescent protein)

hpf (hour postfertilization)

IRV (interrenal vessel)

itga 5 (*integrin , alpha 5*)

kdrl (*kinase insert domain receptor like*)

mmp2 (*matrix metalloproteinase 2*)

MO (antisense morpholino oligonucleotide)

ptk2.1, *ptk2.2* (*protein tyrosine kinase 2a*, *protein tyrosine kinase 2b*)

STD (standard)

tnnt2a (*cardiac troponin T2a*)

VEGF (vascular endothelial growth factor)

VSMCs (vesicular smooth muscle cells)

WT (wild type)

個人資料

中文姓名：邱志豪

英文姓名：Chih-Hao Chiu

性別：男

出生日期：1987 年 4 月 6 日

戶籍地址：桃園縣桃園市長德里 22 鄰力行路 168 號

學歷：大葉大學生物產業科技學士

東海大學生命科學所生物醫學組碩士

經歷：東海大學生命科學系遺傳學助教

東海大學生命科學系普通生物學助教

東海大學生命科學系學生專題論文研討會評審

2010/12/4 Taiwan zebrafish symposium:

Poster presentation

2011/8/12 Development biology retreat:

Outstanding poster award (優良海報獎)

2011/12/10 Taiwan zebrafish symposium:

Poster presentation