

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology  
College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



以骨髓系特異表現 *FLT3-ITD* 轉殖基因斑馬魚

作為白血病藥物篩選平台的評估

Evaluation of Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*) zebrafish  
as a platform for screening anti-leukemic drugs

李子筠

Tzu-Yun Li

指導教授：林亮音 博士

Advisor: Liang-In Lin, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

# 國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

以骨髓系特異表現 *FLT3-ITD* 轉殖基因斑馬魚

作為白血病藥物篩選平台的評估

Evaluation of *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* zebrafish  
as a platform for screening anti-leukemic drugs

本論文係李子筠君（學號 R04424027）在國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系研究所完成之碩士學位論文，於民國 106 年 07 月 19 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

李子筠

(簽名)

(指導教授)

顏雅真

胡忠怡

郭遠輝

歐大滿

系主任、所長

林立言

(簽名)

## 致謝



謝謝指導教授林亮音老師，兩年間提供優渥的環境，讓我能順利且無資金上的困擾的完成每個實驗，也謝謝老師兩年間的教導與包容。

謝謝各位口試委員胡忠怡老師、郭遠燁老師、歐大諒老師和顧雅真老師在論文口試時給予的指正與建議及耐心地看完我的論文並更改錯誤，讓這本論文更加完整，也讓我收穫良多。另外，謝謝侯信安醫師曾在進度報告時給過我建議。

特別感謝正偉學長在實驗上的幫助，兩年間所學的斑馬魚相關技術全來自於學長的教導，這本論文，沒有正偉學長的建議與指導是無法完成的；謝謝我的好夥伴珮綺兩年間的陪伴與幫忙，聽我吐苦水、給予我建議、一起趕實驗及論文，有人和我經歷同樣的困難、同樣的喜悅真的很棒；謝謝實驗室的大家，羿鈴學姊、珩安學姊、孟珊學姊、玟君學姊、政豪學長、黃焱、潔雯、文惠，沒有因為我的不擅言詞及沉默而遠離我，給予我實驗上及生活上的幫助，也讓我這兩年的實驗室生活並不是只有數據、論文、電腦和斑馬魚而已。

最後，感謝每隻斑馬魚的犧牲與付出，每天看著你們游來游去是一種紓壓，看著你們一天一天的成長是一種喜悅與成就感，最後犧牲你們時心中只有感謝，沒有你們是無法完成這本論文的。

兩年過去，完成一本碩士論文，兩年之間，得到了許多幫助，謝謝這兩年間遇到的每個人，每隻魚，每件事。

李子筠

國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系

中華民國 106 年 7 月

# 目錄



口試委員會審定書 .....	I
致謝 .....	II
目錄 .....	III
圖目錄 .....	VI
表目錄 .....	VII
縮寫表 .....	VIII
摘要 .....	IX
Abstract .....	XI
第一章 前言 .....	1
1.1 斑馬魚 .....	1
1.2 斑馬魚造血系統與血球發育 .....	1
1.3 斑馬魚造血相關轉錄因子 .....	2
1.4 急性骨髓性白血病 .....	3
1.5 FLT3 .....	4
1.6 酪胺酸激酶抑制劑 .....	4
1.6.1 Cytarabine (AraC) .....	5
1.6.2 Midostaurin (PKC412) .....	5
1.6.3 Quizartinib (AC220) .....	5
1.6.4 Cabozantinib (XL184) .....	6
1.7 Tg( <i>spi1</i> :FLT3-ITD-2A-EGFP) .....	6
第二章 研究目的 .....	7
第三章 材料與方法 .....	8
3.1 材料 .....	8
3.1.1 斑馬魚 .....	8



3.1.2 儀器設備.....	8
3.1.3 藥品.....	9
3.1.4 抗體.....	11
3.1.5 酶素與試劑.....	11
3.1.6 生物試劑組.....	11
3.1.7 藥品與試劑配置.....	12
3.2 方法 .....	13
3.2.1 斑馬魚 .....	13
3.2.2 全量 RNA 萃取.....	14
3.2.3 反轉錄聚合酶連鎖反應.....	15
3.2.4 聚合酶連鎖反應.....	15
3.2.5 電泳分析.....	16
3.2.6 聚合酶連鎖反應產物純化.....	16
3.2.7 定量即時聚合酶連鎖反應.....	17
3.2.8 原位雜交.....	17
3.2.9 蘇丹黑染色.....	20
3.2.10 胚胎藥理學作用 .....	21
3.2.11 顯微鏡及影像處理.....	21
3.2.12 統計方法.....	21
第四章 實驗結果 .....	22
4.1 探討在骨髓系白血球中專一且過度表現 FLT3-ITD 的情況下對血球細胞的影響.....	22
4.1.1 骨髓系白血球.....	22
4.1.2 淋巴性白血球.....	22
4.1.3 紅血球.....	22



4.2 探討對造血相關轉錄因子的影響.....	23
4.3 評估此斑馬魚作為 AML 藥物篩選平台的可行性.....	23
第五章 討論 .....	25
第六章 參考文獻 .....	29
圖 .....	37
表 .....	56
附圖 .....	59
附表 .....	67



## 圖 目 錄

圖一、利用原位雜交測定骨髓系白血球標誌 <i>spi1</i> 和 <i>cebpa</i> 的表現.....	37
圖二、利用原位雜交測定骨髓系白血球標誌 <i>mpo</i> 的表現.....	39
圖三、利用蘇丹黑染色研究 <i>FLT3-ITD</i> 對顆粒性白血球之影響.....	40
圖四、利用原位雜交測定淋巴性白血球標誌 <i>rag1</i> 的表現.....	41
圖五、利用原位雜交測定紅血球標誌 <i>hbaf1</i> 的表現.....	42
圖六、利用 Q-PCR 測定 48 hpf 胚胎初級造血相關轉錄因子的表現.....	43
圖七、利用 Q-PCR 測定 48 hpf 胚胎次級造血相關轉錄因子的表現.....	45
圖八、AraC 對 Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )的影響.....	46
圖九、PKC412 對 Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )的影響.....	48
圖十、AC220 對 Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )的影響.....	50
圖十一、XL184 對 Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )的影響.....	52
圖十二、Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )所需之 XL184 有效濃度較高.....	54
附圖一、斑馬魚造血過程圖及位置.....	59
附圖二、 <i>FLT3</i> 蛋白結構及訊息傳遞路徑.....	61
附圖三、各種常用 AML 治療藥物的結構.....	62
附圖四、Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )之建構與鑑定.....	63
附圖五、Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )腎髓及周邊血血球型態.....	64
附圖六、基因轉殖魚之建立與篩選.....	65
附圖七、Multisite Gateway® 之原理與步驟.....	66

## 表目錄

表一、本研究所使用的引子序列.....	56
附表一、Tg( <i>spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP</i> )腎髓抹片之血球數量.....	67





## 縮寫表

項目	縮寫	全名
基因與蛋白	FLT3-ITD	FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication
發育構造	ALM	anterior lateral mesoderm
	PLM	posterior lateral mesoderm
	ICM	intermediate cell mass
	PBI	posterior blood island
	AGM	aorta-gonad-mesonephros
	CHT	caudal hematopoietic tissue
	KM	kidney marrow
疾病名	AML	acute myeloid leukemia
實驗名	Q-PCR	Quantitative real-time PCR
	WISH	Whole-mount in situ hybridization
血球細胞	HSC	hematopoietic stem cell
	EMP	erythroid-myeloid progenitors
其他	dpf	days post fertilization
	hpf	hours post fertilization
	TKI	tyrosine kinase inhibitor



## 摘要

斑馬魚有生長周期快速、胚胎透明易觀察和對小分子化合物穿透性高的優點，且在基因序列及造血過程與哺乳類相似，而常成為研究胚胎造血及相關血液疾病的模型和大規模基因或藥物篩選的動物平台。

急性骨髓性白血病(AML)為一種骨髓系白血球不正常增生及分化的血液疾病，在 AML 的病人中含有 *FLT3-ITD* (為 FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)的 juxtamembrane domain 突變)突變的病人占 20~30%且通常有著較差的預後、低存活率及高復發率；研究指出 *FLT3* 和細胞的存活、增生及分化有關，並已在細胞及老鼠實驗中發現 *FLT3-ITD* 確實會造成骨髓系白血球不正常增生並抑制其分化。本實驗室之前已成功建立一個可經由骨髓系白血球專一表現之啟動子驅動人類 *FLT3-ITD* 表現的基因轉殖斑馬魚模型- Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)。本論文主要是探討此斑馬魚之胚胎造血特性，並評估此斑馬魚能成為一個 AML 藥物篩選平台的可能性。

首先使用原位雜交(WISH)來觀察各種血球細胞的標誌，以評估各血球細胞表現狀況。先觀察骨髓系白血球相關標誌 *spil1*、*cebpa* 和 *mpo* 在 48 hpf 的斑馬魚中的表現量，發現在過度表現 *FLT3-ITD* 的斑馬魚胚胎中，三者的表現量均增加，也代表著骨髓系白血球的增加，並同時使用蘇丹黑染色再確認此骨髓系白血球增加的結果。另外，在此斑馬魚中可看到 48 hpf 時，紅血球標誌 *hbae1* 表現量減少及 96 hpf 在胸腺部位淋巴性白血球標誌 *rag1* 表現量增加。接著使用 Q-PCR 分析 48 hpf 時各造血相關轉錄因子之表現情況，發現血液血管母細胞(*scl* 和 *lmo2*)、淋巴性白血球(*rag1*)、骨髓系白血球(*cebpa* 和 *mpo*)相關之轉錄因子都有受到 *FLT3-ITD* 的影響而有改變；這些改變可能是造成斑馬魚中三種細胞數量都增加的原因。在紅血球中發現轉錄因子 *gata1* 的表現量與野生型斑馬魚的並無差異；可是代表血紅素之 *hbae1* 的表現量卻有減少的現象，顯示成熟紅血球減少。另外，巨噬細胞相關之轉錄因子則無顯著增加或減少。另一方面，在次級造血

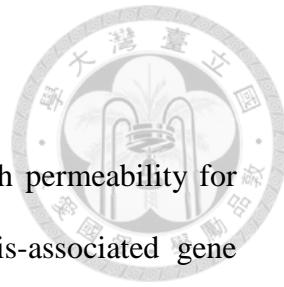


hematopoietic stem cell (HSC)相關之轉錄因子的部分則無顯著增加或減少，推測在骨髓系白血球中專一旦過度表現 *FLT3-ITD* 的情況下不會影響次級造血。

接著，我們使用常見 AML 治療藥物以及數種 *FLT3-ITD* 的標靶藥物來評估此平台可行性；將 6 hpf 的斑馬魚胚胎分別浸泡於 Cytarabine (AraC)、Midostaurin (PKC412)、Quizartinib (AC220)和 Cabozantinib (XL184)或 DMSO(對照組)的溶液中，在 48 hpf 時收集胚胎以原位雜交- *mpo* 及蘇丹黑染色作分析。結果顯示，使用 AraC、PKC412 和 AC220 者皆可抑制斑馬魚骨髓系白血球增加的情形，並回復到類似野生型斑馬魚的數量；而在 100 nM 的 XL184 中則無抑制效果。雖然將 XL184 的濃度提高到 250 nM 可以抑制骨髓系白血球的增加，但卻有 20% 的魚胚胎發生心臟水腫的現象。

從以上結果中可知，Tg(*spiI:FLT3-ITD-2A-EGFP*)胚胎雖然只在骨髓系白血球中專一旦過度表現 *FLT3-ITD*，卻會造成骨髓系白血球及淋巴性白血球的增加和紅血球的減少；使用 AML 相關藥物 AraC、PKC412 和 AC220 均可達到骨髓系白血球減少的效果。因此我們建議此基因轉殖斑馬魚可以作為白血病藥物篩選平台。

關鍵字：*FLT3-ITD*、*spiI* 啟動子、基因轉殖斑馬魚、造血、骨髓惡性血液疾病  
、酪胺酸激酶抑制劑

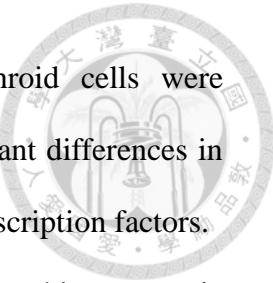


## Abstract

With the advantage of rapid growth, transparent embryos, high permeability for small molecules until 5 dpf and high similarity of hematopoiesis-associated gene sequences to mammals, zebrafish has been as a powerful animal model to study the hematopoiesis and hematologic malignancies, and as a suitable platform for large-scale genetic and drug screening.

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematologic malignancy characterized by uncontrolled proliferation of myeloid progenitor cells. *FLT3*-ITD mutation at juxtamembrane domain occurs in 20 ~30% AML patient and is associated with poor prognosis, low survival time and high frequency of relapse. *FLT3* can regulate proliferation, differentiation and apoptosis of hematopoietic progenitor cells; in contrast, *FLT3*-ITD mutation could result in uncontrolled cell proliferation and suppression of myeloid cell maturation both *in vitro* and *in vivo*. Previously, we established a transgenic zebrafish- Tg(*spi1*:*FLT3*-ITD-2A-EGFP) and characterized its leukemia phenotype. In this study, we want to evaluate the feasibility of this transgenic zebrafish to be an *in vivo* platform for anti-leukemic drugs screening.

At first, we found that the expressions of the myeloid cell markers, *spi1*, *cebpα* and *mpo*, were increased in 48 hpf fish by using whole-mount *in situ* hybridization (WISH); subsequently, the sudan black (SB) staining revealed similar findings. In addition, we found that the expression of lymphoid cell marker, *rag1*, was increased in 96 hpf fish, but the expression of erythroid cell marker, *hbaf1*, was decreased in 48 hpf fish. Then, quantitative real-time PCR (Q-PCR) revealed that the expressions of hemangioblast, myeloid cells and lymphoid cell-related transcription factors were increased in this zebrafish. There were no significant differences in the expression of erythroid cell-related transcription factor, *gata1*; however, significant decreased *hbaf1*



were noted. These results demonstrated decreased mature erythroid cells were decreased in this transgenic zebrafish. Finally, there were no significant differences in the expression of macrophage-related and definitive HSC-related transcription factors.

Then, we evaluated the effects of several anti-leukemic drugs on this transgenic zebrafish Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*). Embryos at 6hpf were incubated with Cytarabine (AraC), Midostaurin (PKC412), Quizartinib (AC220), Cabozantinib (XL184) or DMSO. The numbers of *mpo*<sup>+</sup> cells and SB<sup>+</sup> cells were calculated at 48 hpf. We found that AraC, PKC412 and AC220 significantly reduced the amount of myeloid cells in this zebrafish, while 100 nM XL184 had no effects on this zebrafish. Although XL184 at dosage of 250 nM could reduce the amount of myeloid cells in this zebrafish, the heart edema was emerged in 20% embryos at the same time.

In conclusion, although the Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*) zebrafish only expressed *FLT3-ITD* in myeloid cells, increased myeloid cells and lymphoid cells, as well as decreased erythroid cells were demonstrated. All compounds we used in this study could decrease the amount of myeloid cells in this zebrafish; therefore, Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*) zebrafish would be an appropriate platform for screening anti-leukemic drugs.

**key words :** *FLT3-ITD*、*spi1* promoter、transgenic zebrafish、hematopoiesis、hematologic malignancies、tyrosine kinase inhibitor



## 第一章 前言

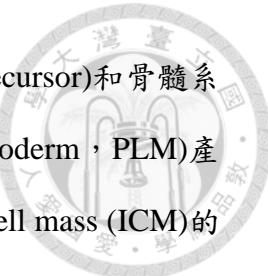
### 1.1 斑馬魚

斑馬魚 (zebrafish)，學名為 *Danio rerio*，屬於淡水卵生硬骨魚，為常用來研究脊椎動物發育的動物模式之一。其對研究早期發育之優勢為：(1)斑馬魚為體外受精，可易於進行人工受精；(2)繁殖週期短，到性成熟只需約三個月；(3)全年皆可繁殖且產量大，其產卵時間可經由交配的時間來調整控制；(4)卵及出生之幼魚皆透明，易於觀察其內部構造及發育；(5)對水質及水溫變化適應力強；(6)養殖過程所占空間及花費相較於小鼠動物模式節省；(7)基因圖譜已完全解碼並與人類基因有約 80% 的基因保守性<sup>1</sup>；(8)幼魚對小分子化合物穿透性高，小分子化合物到 5 dpf (days post fertilization) 皆可輕易進入魚體內<sup>2</sup>。因此，斑馬魚常成為分子生物學及大規模基因工程與藥物篩選的研究對象，其中在造血過程及血液相關疾病之研究已有極高的貢獻<sup>3,4</sup>。

### 1.2 斑馬魚造血系統與血球發育(如附圖一 A、B)

造血作用(Hematopoiesis)為多功能性(multipotent)造血幹細胞經由一系列分裂及分化而產生各類不同血球的過程<sup>5</sup>。研究發現斑馬魚造血相關基因與人類、小鼠等哺乳類動物具高度相似性<sup>6</sup>。雖然造血位置與哺乳類有些許不同，但仍有相似的造血過程與血球種類，因此，越來越多文獻以斑馬魚作為研究脊椎動物造血的動物模式。

斑馬魚類似脊椎動物造血有兩個階段—初級(primitive)造血與次級(definitive)造血<sup>7</sup>。斑馬魚的血球與血管由中胚層(mesoderm)發育而來，當胚胎原腸(gastrulation)形成之後，約 10 hpf (hours post fertilization) 時腹側中胚層(ventral lateral mesoderm)會形成血液血管母細胞(hemangioblast)，此細胞可繼續分化形成早期 HSC (hematopoietic stem cell) 及血管母細胞(angioblast)<sup>8,9</sup>。隨後在約 11 hpf 時胚胎開始進入初級造血，主要在前側中胚層(anterior lateral



mesoderm, ALM) 分化出早期的巨噬前驅細胞(macrophage precursor)和骨髓系白血球(myeloid cell)<sup>10,11</sup>；在後側中胚層(posterior lateral mesoderm, PLM)產出紅血球及少數骨髓系白血球<sup>12</sup>，並隨之形成 intermediate cell mass (ICM) 的構造<sup>13</sup>。在約 24 hpf 血液循環開始時會形成一個造血過渡期，主要在近尾端位置形成的 posterior blood island (PBI) 中有一群 erythroid-myeloid progenitors (EMP) 進行短暫的分化造血<sup>3</sup>。在約 26 ~30 hpf 時進入次級造血，具有多潛能(pluripotent)及自我更新能力的 HSC 會在 aorta-gonad-mesonephros (AGM) 中出現<sup>3</sup>，之後 HSC 隨血液遷移至靠近尾部的 caudal hematopoietic tissue (CHT) 中進行分化<sup>14</sup>，最後這些來自 AGM 和 CHT 的 HSC 便會移動到腎髓(kidney marrow, KM)，提供個體到死亡為止所需之各類血球細胞<sup>15</sup>。另外在約 3 dpf 時，另有一部份 HSC 則移動到胸腺(thymus)負責分化出淋巴性白血球。就物种間構造之同源性來說，CHT 相當於人類胚胎肝臟(fetal liver)，腎髓則等同於骨髓(bone marrow)<sup>4</sup>。

### 1.3 斑馬魚造血相關轉錄因子(如附圖一 C)

在複雜的造血過程中，需要許多不同轉錄因子及訊息傳遞分子參與其中，其表現位置、時間及表現量皆會影響造血細胞。一旦發生改變，可能影響血球發育及分化，而導致血液組成比例改變，甚至血液相關癌症產生。過去研究指出，這些在哺乳類動物中參與造血的調控因子也保守存在於斑馬魚中。*scl*、*lmo2* 和 *gata2* 及 *flk1* 和 *fli1* 分別為血液血管母細胞分化成血球及血管所需的轉錄因子，研究也已發現 *lmo2*、*fli1* 和 *scl* 對於造血前驅細胞的發育是重要的<sup>16-18</sup>。另外，*gata1* 和 *spil1* 也是參與調控初級造血的轉錄因子，在 12 hpf 時 *gata1* 表現於 PLM/ICM 中，主要影響紅血球之生成及分化<sup>19,20</sup>；而 *spil1* 為骨髓系白血球發育所需之轉錄因子，在 12 hpf 時開始表現在 lateral plate mesoderm (LPM)，在 14 ~22 hpf 間移往卵黃囊(yolk sac)中，22 hpf 時則移動



到 ICM，最後於腎髓中表現<sup>21</sup>，而這些表現 *spil* 的前驅細胞則具有分化形成表現 *l-plastin* 的巨噬細胞及表現 *mpo* 的顆粒性白血球的能力<sup>4,10,22</sup>。

在次級造血中主要參與之轉錄因子為 *runx1* 和 *c-myb*，當 HSC 在 AGM 生成的同時 *runx1* 和 *c-myb* 也隨之大量表現，研究指出 *runx1* 基因敲落後會伴隨 *c-myb* 表現量下降並影響次級造血的發育，證明 *runx1* 對次級造血的發育是重要的<sup>23</sup>；而 *c-myb* 可經由影響造血細胞的生成及調控顆粒相關基因表現來參與顆粒性白血球之分化與成熟<sup>24,25</sup>。另外在淋巴性白血球則有 *ikaros* 和 *rag1* 負責其分化與增生<sup>3</sup>。

#### 1.4 急性骨髓性白血病

急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)為一種骨髓系造血幹細胞不正常增生及分化的血液腫瘤疾病<sup>26</sup>，患者可能出現貧血、易受感染、出血等症狀。AML 為成人最常見的白血病之一，病人五年相對存活率約只有 27%<sup>27</sup>，在 AML 病人中常見之基因突變主要分成融合基因(fusion gene)和點突變(point mutations)，融合基因如預後較好的 t(15;17)、t(8;21)、inv(16)和 t(9;11)，常見的點突變如 *NPM1*、*FLT3*、*KIT* 和 *CEBPA*，AML 突變點的不同會影響病人的預後<sup>4</sup>，且發病機率會隨年齡增長而升高，並伴隨著治療成效下降及預後差的情形<sup>28</sup>。

當骨髓中芽細胞數目大於等於 20% 時即診斷為 AML；目前化學治療仍是主要治療策略。化學治療可分為兩個階段，分為前導性治療(Induction therapy) 及緩解後繼續治療(Post-remission therapy)。前導性治療主要給予 Cytarabine (AraC) 七天加上 idarubicin 或 daunorubicin 三天的療程來清除白血病細胞，當疾病達到緩解，即進入緩解後繼續治療。緩解後繼續治療主要使用高劑量 AraC 或合併其他藥物來治療，也可選擇進行幹細胞移植<sup>29</sup>。



## 1.5 FLT3(如附圖二)

FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)為 class-III receptor tyrosine kinase (RTK)家族中的一員，與其他家族成員如 FMS、PDGFR 和 KIT 有相似的結構，包含細胞外結構(extracellular ligand-binding domain)、穿膜結構(transmembrane domain)、近膜結構(juxtamembrane domain)以及兩個以 kinase insert 區隔之酪胺酸激酶結構(tyrosine kinase domain)<sup>30</sup>。

此激酶正常活化過程需 FLT3 ligand (FL)的結合才能使 FLT3 受體形成雙體，並進行自體磷酸化(autophosphorylation)使細胞膜內的酪胺酸接上磷酸根，活化下游訊息傳遞路徑，如 Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt 和 STAT5，影響細胞增生及分化和抑制細胞凋亡(apoptosis)<sup>31</sup>。FLT3 會表現在造血幹細胞及前驅細胞中，調控早期造血功能及血球分化及增生<sup>32</sup>。

*FLT3* 最常突變之位置位於近膜結構及酪胺酸激酶結構，其中在近膜結構的外顯子序列中發生內部串聯重複(internal tandem duplication)，簡稱 *FLT3-ITD*，為最常見之突變，在 AML 病人中有 20 ~30% 會發生此突變<sup>33</sup>，且通常有著較差的預後、低存活率及高復發率<sup>34</sup>。此突變會使 *FLT3* 不需 *FLT3 ligand* (FL)的刺激便可形成雙體，而持續活化下游訊息傳遞路徑，造成細胞不正常增生及分化和抗細胞凋亡。

由於此突變之高發生率及其在 AML 的發展上為驅動突變(driver mutation)的角色<sup>35</sup>，因此 *FLT3* 已成為發展藥物的重要標的，如 *FLT3* 的酪胺酸激酶抑制劑。

## 1.6 酪胺酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitor , TKI)

TKI 依其作用位置不同分成第一型和第二型。第一型 TKI 會作用在目標激酶活化態的構型，而與 ATP 競爭 ATP 接合位，針對 *FLT3* 的第一型 TKI 藥物包含 Midostaurin (PKC412)、crenolanib 等；第二型 TKI 則作用在目標激



酶的不活化態構型，造成激酶無法變成活化態，針對 FLT3 的第二型 TKI 藥物包含 Sorafenib、Quizartinib (AC220)、Cabozantinib (XL184) 等小分子藥物<sup>36</sup>。

多數激酶抑制劑前期都能有效降低血癌細胞，但最終仍因 AML 病人產生抗藥性而對藥物反應不佳而復發，使治療更加困難<sup>37</sup>。不少研究提出造成抗藥性的可能原因為病人在其他基因發生突變、FLT3 配體的高濃度<sup>38</sup> 及骨髓微環境(microenvironment)中的基質細胞(stromal cell)提供血癌細胞保護與支持作用等<sup>39</sup>，因此近期搭配其他非激酶抑制劑藥物來做治療的研究也越來越多。

### 1.6.1 Cytarabine (AraC) (如附圖三 A)

Cytarabine (AraC) 為主要 AML 化療藥物，主要機制為活化後產物 Ara-CTP 可取代 dCTP 嵌入 DNA 分子中造成構型改變，而使 DNA polymerase 無法辨認，進而抑制 DNA 合成，使細胞週期停留在 G1/S 期<sup>40,41</sup>。常因治療後有復發的情況，因此必須搭配其他藥物做治療。

### 1.6.2 Midostaurin (PKC412) (如附圖三 B)

Midostaurin (PKC412) 為第一型 TKI 藥物，除了可抑制 FLT3 外，還可抑制 JAK2、PDGFR、VEGFR 和 KIT；臨床上已證實可用於 *FLT3-ITD* 和 *FLT3-TKD* 突變的新診斷 AML 病患，與化療藥物合併使用時，可提高完全緩解的比例<sup>42</sup>。

### 1.6.3 Quizartinib (AC220) (如附圖三 C)

Quizartinib (AC220) 為第二型 TKI 藥物，是針對 FLT3 設計的第二代抑制劑。在 *in vitro* 和 *in vivo* 實驗中已被證實對 *FLT3-ITD* 的 AML 病患有治療效



果<sup>43</sup>；若與化療藥物 AraC 合併使用時，能對新診斷的 AML 有更好的治療效果<sup>44</sup>。

#### 1.6.4 Cabozantinib (XL184) (如附圖三 D)

Cabozantinib (XL184)為第二型 TKI 藥物，可以抑制 MET、VEGFR2、RET、KIT、TIE-2 和 FLT3 的活性<sup>45</sup>；在 *in vitro* 實驗中已被證實可造成細胞週期停留在 G0/G1 期並促進細胞凋亡，進而抑制帶有 *FLT3-ITD* 之 AML 細胞株的生長<sup>46</sup>。在 *in vivo* 實驗中則可成功抑制老鼠中異種移植之 *FLT3-ITD* 突變細胞的腫瘤生長，為具有潛力的 *FLT3-ITD* 治療藥物<sup>47</sup>。

### 1.7 Tg(*spil:FLT3-ITD-2A-EGFP*)

此基因轉殖斑馬魚主要經由 *spil* 啟動子在骨髓系白血球中專一表現人類 *FLT3-ITD* 及 *EGFP*，因作為表現載體的質體含心臟專一表現的 *cmlc2* (cardiac myosin light chain 2) 啟動子使後方 *EGFP* 表現，因此以心臟表現綠螢光來作為挑選基因轉殖魚的依據(如附圖四)。本實驗室先前的研究中已證實此斑馬魚在六個月大時，可以在腎髓中看到前驅細胞大量增生；在九個月大時，周邊血發現前驅細胞(如附圖五)並在腎髓中發現前驅細胞增加及成熟紅血球減少的現象(如附表一)<sup>48</sup>。



## 第二章 研究目的

*FLT3-ITD* 為 AML 病人中常見之突變，並在 AML 的發展上為驅動突變的角色，而且容易在藥物治療後有再復發的情形，因此 *FLT3* 常成為發展 AML 治療藥物的重要目標。由本實驗室先前的研究中 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 這隻過度表現人類 *FLT3-ITD* 的斑馬魚已經確認在九個月大時可看到類似 AML 的腎髓血液相，而對幼魚的影響還未加以研究。

因此本篇研究目的為釐清當在骨髓系白血球中專一且過度表現 *FLT3-ITD* 的情況下，幼魚之各種血球細胞的影響以及評估此基因轉殖斑馬魚是否能作為 AML 藥物篩選平台。



## 第三章 材料與方法

### 3.1 材料

#### 3.1.1 斑馬魚

AB 野生型斑馬魚

Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)

#### 3.1.2 儀器設備

低溫培養箱(飼養幼魚)：DENG YNG DB30

四層水生養殖系統(飼養成魚)：群達海洋科技

無菌操作台：HIGH TEN 4BH-24

冰箱：King Cool KC-4579B(4°C)、Whirlpool Model EV150F(-20°C)、Thermo

ULT2586-4-D42(-80°C)

烘箱：Cherng Huei CON 560

高壓滅菌器：SAKURA ASV-3023

超純水機：Mili-ORG

製冰機：Scotsman AF200；Freser V150

電子天秤：Mettler PJ300

往復式震盪恆溫水槽：HOTECH 905D

高速冷凍離心機：KUBOTA 8800

落地型大容量冷凍離心機：KUBOTA 1920

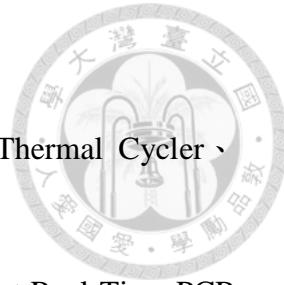
桌上型微量離心機：Beckman Coulter Microfuge® 16 Microcentrifuge

平面震盪器：Digisystem Labortary Instrument inc. DSR-2100P

迴轉式震盪器：Yihder TS-500 orbital shaker

酸鹼指示儀：JENCO microcomputer pH-VISION 6173

電磁攪拌器：Thermolyne nuova II stir plate



乾浴器：Barnstead Thermolyne Type 17600 Dri-Bath

聚合酶連鎖反應器：Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler、

Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2400

即時定量聚合酶連鎖反應器：Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

DNA 電泳槽：Major Science MP-100

照膠系統：Vilber Lourmat E-Box-1000/20M

超微量分光光度計：Thermo Fisher Scientific Nanodrop™ 1000

螢光倒立顯微鏡：OLYMPUS IX71

解剖顯微鏡：Leica zoom 2000

正立顯微鏡：OLYMPUS BX51、OLYMPUS DP20

### 3.1.3 藥品

20X SSC (友和) (#URSSC001)

5X TBE buffer (BIOMAN Scientific) (#TBE05500)

5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (BCIP) (Sigma) (#B8503)

Agarose powder (INFINIGEN) (#IN0126)

Albumin from bovine serum (BSA) (Sigma) (#A1933)

Cabozantinib-malate (XL184) (Exelixis) (COMETRIQ®)

Chloroform (Aldrich) (#132950)

Citric acid (和光純藥工業株式會社) (#030-05525)

Cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride (AraC) (Sigma) (#C1768)

Diethylpyrocarbonate (DEPC) water (Protech) (#P560)

Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma) (#D2650)

Ethanol , absolute (J.T. Baker) (#8006-05)



- Ethidium bromide (EtBr) (GeneTex) (#AE0270-0010)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo scientific) (#A1933)
- Formamide (Merck) (#104008)
- Glycerol (AMRESCO) (#56-81-5)
- Heparin (Sigma) (#H3393)
- Hydrogen chloride (HCl) (Merck) (#100317)
- Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Nihon shiyaku reagent) (#NS-18304)
- Isopropanol (Merck) (#818766)
- Levamisole (Sigma) (#L9756)
- Magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ ) (Sigma) (#M8266)
- Methanol (MACRON) (#3016-68)
- Midostaurin (PKC412) (Sigma) (#M1323)
- Nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma) (#N6639)
- Normal goat serum (Jackson ImmunoResearch) (#005-000-121)
- Paraformaldehyde (PFA) (和光純藥工業株式會社) (#168-23255)
- Phenol (Sigma) (#P1037)
- Phosphate buffered saline (PBS) (AMRESCO) (#0780-2PK)
- Propidium iodide (PI) (Sigma) (#81845)
- Proteinase K (MACHEREY-NAGEL) (#740506)
- Potassium hydroxide (KOH) (和光純藥工業株式會社) (#160-23575)
- Quizartinib (AC220) (Selleckchem) (#S1526)
- Ribonucleic acid from torula yeast Type VI (Sigma) (#R6625)
- Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ) (Merck) (#106404)
- Sodium Hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) (和光純藥工業株式會社) (#192-15985)
- di-Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck)

(#106579)

Sudan Black B (Sigma) (#86015)

Tricaine (Sigma) (#A-5040)

Tris (BioLink) (#BL0018)

Tween-20 (Merck) (#817072)



### 3.1.4 抗體

anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche) (#11-093-274-910)

### 3.1.5 酶素與試劑

6X loading buffer (PRO-TECH) (#915-67-3)

Bio-100bp DNA Ladder (PRO-TECH) (#PT-M1-100)

DIG RNA labeling mix (Roche) (#11-277-073-910)

KOD FX : KFX-101 (TOYOBO) (#KFX-101)

RNase Inhibitor (HT BIOTECHNOLOGY Ltd.) (#R101a)

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) (#4309155)

TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) (#15596-018)

### 3.1.6 生物試劑組

DNA-free<sup>TM</sup> DNA removal kit (Ambion) (#AM1906)

GenePHlow<sup>TM</sup> Gel/PCR kit (Geneaid) (#DFH300)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)  
(#4368814)

MEGAscript<sup>®</sup> T7 (Ambion) (#AM1333)

NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) (#740609.50)



### 3.1.7 藥品與試劑配置

#### A. 1X PBS 溶液

取 9.88 g phosphate buffered saline 粉末回溶於 1 L ddH<sub>2</sub>O，高溫高壓滅菌後，放涼即可使用

#### B. 蘇丹黑染色 (Sudan black stain)

- Sudan black B stock solution: 取 0.15 g Sudan black 粉末加入 50 mL 絕對酒精中，室溫攪拌一天後置於 37°C 水浴槽中直到完全溶解
- Stock buffer solution : 取 4 g phenol 加入 7.5 mL 絕對酒精中，另取 0.075 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 溶於 25 mL ddH<sub>2</sub>O 中，將兩種溶液混合均勻備用

將上述溶液以 3 : 2 的比例混合均勻後以濾紙及 20 μm filter 過濾

#### C. 原位雜交 (Whole-mount in situ hybridization , WISH)

##### ● HYB 溶液

- 取 25 mL formamide 、 12.5 mL 20X SSC 及 0.5 mL 10% Tween-20 後，以 1M Citric acid 調 pH 至 6，補 ddH<sub>2</sub>O 至 50 mL 即為 HYB<sup>-</sup> 溶液，保存於 -20°C
- 將 0.1 g yeast torula RNA 溶於 1 mL HYB<sup>-</sup> 溶液，另取 0.01 g heparin 溶於 2 mL HYB<sup>-</sup> 溶液，分別取 250 μL yeast torula RNA 溶液及 500 μL heparin 溶液加入含有 25 mL formamide 、 12.5 mL 20X SSC 及 0.5 mL 10% Tween-20 的溶液後，以 1M Citric acid 調 pH 至 6，補 ddH<sub>2</sub>O 至 50 mL 即為 HYB<sup>+</sup> 溶液，保存於 -20°C

##### ● Staining buffer (以 10 mL 為例，現配)

取 1 mL 1M Tris-HCl pH9.5 、 0.5 mL 1M MgCl<sub>2</sub> 、 0.2 mL NaCl 、 0.1 mL 10% Tween-20 、 10 μL 1M levamisole 後，補 ddH<sub>2</sub>O 至 10 mL



- 呈色溶液 (以 2 mL 為例)

取 2 mL staining buffer 加入 9  $\mu$ L NBT 及 7  $\mu$ L BCIP

## 3.2 方法

### 3.2.1 斑馬魚

#### A. 斑馬魚的成魚飼養

飼養水溫控制在  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ，並提供每日 14 小時光照及 10 小時黑暗之環境，每日餵食飼料或豐年蝦 (以曝氣鹽水培養至少兩天) 2~3 次。

#### B. 繁殖

繁殖方法參考 The Zebrafish Book<sup>49</sup>，雄魚體型細長且腹部平坦，體色偏黃；雌魚體型較大且腹部圓潤，體色偏銀白。交配前一天待餵食完畢後，將公母魚以 2：2、2：3 或 3：3 比例放置於裝有曝氣淡水的產卵箱中，並以透明塑膠隔板將公母隔開，隔天光照開始後將隔板拉開使其追尾交配，待 20~30 分鐘後收集受精卵於 10 公分的培養皿中。

#### C. 幼魚飼養

受精卵以 ddH<sub>2</sub>O 清洗數次後置於  $28^\circ\text{C}$  低溫培養箱培養，約 5 天後將幼魚移至 7.5 x 18 公分的塑膠盒中室溫飼養並餵食草履蟲，待 16~20 天後漸漸改以豐年蝦餵食。

#### D. 基因轉殖魚之篩選 (如附圖六)

基因轉殖魚主要經由 Multisite Gateway® (如附圖七)結合 Tol2 蛋白轉位酶的技術來製作，因為注入受精卵的表現載體上含有心臟專一表現的 *cmlc2* (*cardiac myosin light chain 2*) 啟動子使後方 *EGFP* 表現，因此在斑馬魚 16~24 hpf 大時即可經由螢光顯微鏡觀察到心臟帶有綠螢光<sup>50</sup>，並以此作為挑選基因轉殖魚的依據，而經由顯微注射後挑選出心臟帶有綠螢光的幼魚即為 F0 (Founder)。



### ● 基因轉殖魚 F1 之篩選

將 F0 飼養至性成熟後，分別與野生型斑馬魚以 1：1 或 1：2 的比例進行繁殖，若親代 F0 具有將轉殖基因遺傳到下一代的能力，則可收集到在 16 hpf 後心臟有綠螢光的子代，稱為 F1，而子代沒有綠螢光的 F0 則不做保留。由於 F1 的生殖細胞穩定帶有外來轉殖基因，又可稱為 stable line。

### ● 基因轉殖魚 F2 之篩選

為了取得基因表現更穩定且數量更多的基因轉殖魚，因此將 F1 飼養至性成熟後，分別與野生型斑馬魚以 1：2 或 2：2 的比例進行繁殖，16 hpf 後心臟有綠螢光的子代則稱為 F2。

本研究以 F3 及 F4 的世代為實驗的主要對象。

#### 3.2.2 全量 RNA 萃取

將要萃取 RNA 的魚胚胎或魚器官組織放於 ddH<sub>2</sub>O 中置於冰上，以 ddH<sub>2</sub>O 清洗數次後，完全去除 ddH<sub>2</sub>O 並加入 100 mL TRIzol<sup>®</sup> reagent，以研磨棒將組織均質化，再加入 400 mL TRIzol<sup>®</sup> reagent 混合均勻後室溫靜置 5 分鐘後，保存於-80°C 中。樣品置於冰上解凍後，加入 0.1 mL chloroform 用力震盪 15 秒，冰上靜置 10 分鐘後，以 4°C 轉速 13000 rpm 離心 30 分鐘。吸取上清液約 280 μL 至新 1.5 mL 離心管中，並加入等體積 Isopropanol，搖晃均勻後置於-20°C 至少 30 分鐘或隔夜。接著以 4°C 轉速 13000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液後加入 1 mL 冰 75% ethanol(in DEPC)，輕彈使 pellet 飄起，再以 4°C 轉速 13000 rpm 離心 15 分鐘。吸乾上清液後，將離心管倒扣於室溫下風乾 20 到 30 分鐘使 RNA 沉澱物呈半透明狀態。加入 DEPC 水 20 μL，置於 60°C 乾熱器上加熱 15 分鐘使 RNA 溶解。接著加入 3 μL 10X DNase I buffer、6 μL Nuclease-free water、1 μL DNase I 與 RNA 混合均勻



後於 37°C 水浴槽反應 30 分鐘，再加入 4 μL 10X DNase inactivation reagent、6 μL Nuclease-free water 終止反應。接著以 4°C 轉速 10000 g 離心 1 分鐘，上清液即為萃取出的 RNA，可用 Nanodrop<sup>TM</sup> 1000 定量、跑膠確認品質、轉 cDNA 或置於 -80°C 保存。

### 3.2.3 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription PCR, RT-PCR)

利用試劑組 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 將 RNA 反轉錄成 complementary DNA (cDNA)。

每一反應試管中包含：

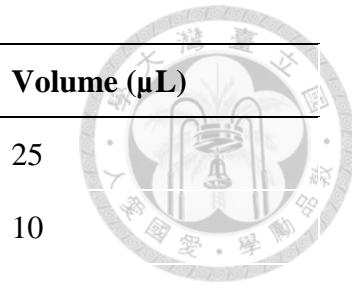
Component	Volume (μL)
10X RT buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
10X RT random primer	2
MultiScribe <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase	1
RNase inhibitor (40 U/μL)	0.5
DEPC water	13.7-X
RNA sample (1 μg)	X
<b>Total</b>	<b>20</b>

反應溫度條件為 25°C 作用 10 分鐘、37°C 作用 120 分鐘、85°C 作用 5 分鐘、最終溫度為 4°C，產物可長期保存於 -20°C。

### 3.2.4 聚合酶連鎖反應 (PCR)

利用試劑組 KOD kit 將 DNA 放大。

每一反應試管中包含：



Component	Volume ( $\mu\text{L}$ )
2X PCR buffer for KOD FX	25
2 mM dNTPs	10
10 $\mu\text{M}$ Primer (F/R)	3
ddH <sub>2</sub> O	10
KOD FX (1.0 U/ $\mu\text{L}$ )	1
Template DNA	1
<b>Total</b>	<b>50</b>

反應溫度條件如下：

1 cycle	30~35 cycle			1 cycle	
94°C	98°C	58°C	68°C	68°C	4°C
2 分鐘	10 秒	30 秒	X (1kb=1min)	7 分鐘	$\infty$

產物可長期保存於-20°C。

### 3.2.5 電泳分析

取 1X TBE buffer 和 agarose 粉末配置成濃度 1% agarose gel，待 agarose gel 凝固後，將 agarose gel 放入含有 1X TBE buffer 的電泳槽中，將 DNA 產物和 6X loading buffer 混合均勻，並放入 agarose gel 的 well 中。設定電壓 50 伏特 10 分鐘加上 100 伏特 20 分鐘進行電泳，將 agarose gel 放入 EtBr 中反應 15 分鐘，清水退染 15 分鐘，使用照膠系統擷取影像分析。

### 3.2.6 聚合酶連鎖反應產物純化

利用試劑組 GenePHlow™ Gel/PCR kit 純化 PCR 產物，將 PCR 產物和 5 倍體積的 Gel/PCR buffer 在 1.5 mL 離心管中混合均勻，將全部溶液移至 DFH



column 中，以 15000 rpm 離心 30 秒後倒掉收集管中廢液，加入 600  $\mu$ L Wash buffer 靜置 1 分鐘後以 15000 rpm 離心 30 秒，去除廢液後再以 15000 rpm 離心 3 分鐘以移除 column 上的有機溶液。將 column 移到新 1.5 mL 離心管中，加入 20~50  $\mu$ L Elution buffer 靜置至少 2 分鐘後，以 15000 rpm 離心 2 分鐘，即為純化過的 PCR 產物。

### 3.2.7 定量即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative real-time PCR , Q-PCR)

利用 SYBR Green 偵測特定 mRNA 表現，並以  $\beta$ -actin 作為內源性控制基因。引子設計根據 NCBI 所公布的資料庫序列，所使用的引子序列如表 1。每一反應試管中包含：

Component	Volume ( $\mu$ L)
2X SYBR Green PCR Master Mix	12.5
5 $\mu$ M Primer (F/R)	3
稀釋後的 cDNA (20 $\mu$ L cDNA + 170 $\mu$ L ddH <sub>2</sub> O)	9.5
<b>Total</b>	<b>25</b>

將反應管以 1000 rpm 離心 30 秒後上機。反應條件為 50°C 作用 2 分鐘, 95°C 變性 10 分鐘，之後以 95°C 作用 15 秒、60°C 作用 1 分鐘，進行 40 個循環。以 SYBR Green 偵測時會同時進行分離曲線(dissociation curve)程式，於前述反應結束後將溫度由 95°C 緩慢降至 60°C，以偵測產物 Tm 值，確認產物為單一目標物質。結果以軟體 7500 Software v2.0.4 分析，利用  $2^{-\Delta Ct}$  計算出目標基因之相對表現量，計算公式為  $-\Delta Ct = Ct(\text{Target gene}) - Ct(\beta\text{-actin})$ 。

### 3.2.8 原位雜交 (Whole-mount *in situ* hybridization , WISH)

#### A. 核醣核酸探針 (RNA probe)的合成



針對目標基因片段設計含有受 T7 polymerase 辨認的片段的引子(如表一)，取 24、48、72 hpf 及 5 dpf 胚胎的 cDNA 當模板以聚合酶連鎖反應放大，經純化、定量和跑膠確認產物，以此產物作為 template DNA，加下列 MEGAscript® T7 試劑組的試劑於 0.2 mL 離心管中：

Component	Volume ( $\mu$ L)
10X transcription buffer	2
DIG-RNA labeling mix (UTP)	2
T7 RNA polymerase (20 U/ $\mu$ L)	2
RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L)	1
Nuclease-free water	13-X
Template DNA (1 $\mu$ g)	X
<b>Total</b>	<b>20</b>

在 37°C 反應 3.5 小時，加入 1  $\mu$ L TURBO DNase (40 U/ $\mu$ L) 後在 37°C 下反應 15 分鐘，以去除 DNA 模板。再加入 30  $\mu$ L DEPC 水、30  $\mu$ L Lithium Chloride Precipitation Solution 於 -20°C 靜置 30 分鐘以上以終止 RNA 探針合成反應。以 4°C 轉速 13000 rpm 離心 15 分鐘後去上清液，加 1 mL 70% ethanol(in DEPC) 後輕彈使 pellet 飄起，再以 4°C 轉速 14000 rpm 離心 15 分鐘後去上清液，倒放風乾，最後另以 100  $\mu$ L DEPC 水及 1  $\mu$ L RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L) 比例配好溶液取 57  $\mu$ L 回溶沉澱物後定量和跑膠確認產物大小，產物保存於 -20°C 中。

#### B. 胚胎收集

將胚胎置於 28°C 恒溫飼養，收集不同時期胚胎以 5 號鑷子在顯微鏡下將卵膜剝除，以 PBST 清洗數次後，加入 4% PFA/PBST(in DEPC) 置於 4°C 隔夜。



### C. 胚胎脫水(Dehydration)與復水(Rehydration)

將胚胎以 PBST(in DEPC)清洗 4 次，每次 5 分鐘，接著以 25% methanol/75% PBST(in DEPC)、50% methanol/50% PBST(in DEPC)、75% methanol/25% PBST(in DEPC)處理各 5 分鐘，最後以 100% methanol 處理 10 分鐘 2 次後保存在 100% methanol，保存於-20°C 中。將-20°C 中的胚胎依下列步驟進行復水：75% methanol/25% PBST(in DEPC)、50% methanol/50% PBST(in DEPC)、25% methanol/75% PBST(in DEPC)處理各 5 分鐘，接著以 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1% KOH(現混)室溫靜置 15 分鐘去除黑色素，最後用 PBST(in DEPC)清洗 5 分鐘 4 次。接著以 10 μg/mL Proteinase K 於室溫反應(48 hpf 約 20 分鐘、96 hpf 約 30 分鐘)，隨後用 PBST(in DEPC)清洗 2 次，以 4% PFA/PBST(in DEPC)室溫靜置 20 分鐘再固定，再用 PBST(in DEPC)清洗 5 次，每次 5 分鐘。

### D. 預雜交反應(Prehybridization)

將胚胎在 65°C 的 HYB<sup>-</sup>溶液中反應 5 分鐘，再換置於 65°C 預熱好的 HYB<sup>+</sup>溶液中，65°C 反應 2 小時。

### E. 雜交反應(Hybridization)

在每 300 μL 的 HYB<sup>+</sup>溶液中加入探針至少 150 ng，在 68°C 下反應 10 分鐘後，置於冰上至少 5 分鐘，再將胚胎浸於此溶液中，於 65°C 或 60°C(依 probe 不同)反應隔夜。

### F. 抗體預吸附(Preabsorption)

取 30~50 隻胚胎(已完成預雜交反應 1 小時)，用 PBST(in DEPC)清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入經由 1 mL blocking buffer 1 : 100 稀釋的 anti-DIG-AP Fab 抗體，於 4°C 搖晃隔夜，再以 4°C 轉速 13000 rpm 離心 15 分鐘後取上清液。



#### G. 清除探針

於  $65^{\circ}\text{C}$  下依序置換以下溶液：HYB<sup>-</sup>溶液 5 分鐘、75% HYB<sup>-</sup> + 25% 2X SSC 10 分鐘、50% HYB<sup>-</sup> + 50% 2X SSC 10 分鐘、25% HYB<sup>-</sup> + 75% 2X SSC 10 分鐘、2X SSC 1 小時，在  $70^{\circ}\text{C}$  下和 0.2X SSC/0.1% Tween-20 反應 4 次，每次 30 分鐘，最後於 PBST(in DEPC)反應 5 分鐘。

#### H. Blocking 與抗體吸附

將胚胎以 Blocking buffer (2% normal goat serum + 2 mg/mL BSA(in PBST))潤洗 2 次，加入 1 mL Blocking buffer 室溫靜置 2 小時。接著將經過預吸附之抗體以 Blocking buffer 稀釋成 1：5000，取 500  $\mu\text{L}$  浸泡胚胎於  $4^{\circ}\text{C}$  下隔夜。

#### I. 呈色

以 PBST(in DEPC)清洗 8 次，每次 15 分鐘，吸乾 PBST(in DEPC)後加入 staining buffer 快速潤洗 1 次，再以 staining buffer 處理 3 次，每次 5 分鐘，最後加入 400  $\mu\text{L}$  呈色溶液於黑暗中反應，每隔 30 分鐘觀察一次直到顏色出現為止。以 PBST(in DEPC)清洗 3 次，每次 5 分鐘，再以 100% methanol 清洗 2 次，每次 20 分鐘，經 PBST(in DEPC)潤洗 2 次後再加入 4% PFA/PBST(in DEPC)室溫靜置 20 分鐘固定，以 PBST(in DEPC)潤洗 2 次後於  $4^{\circ}\text{C}$  下避光保存或照相。

### 3.2.9 蘇丹黑染色 (Sudan black stain)

將 48 hpf 胚胎以 4% PFA/PBST(in DEPC)室溫靜置 2 小時固定，以 PBST(in DEPC)潤洗 1 次後，加入 200~400  $\mu\text{L}$  Sudan black 染劑室溫作用 30~40 分鐘，以 70% ethanol(in DEPC)室溫搖晃 15 分鐘至少 2 次，再以 PBST(in DEPC)潤洗 1 次後，加 200~400  $\mu\text{L}$  1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 1% KOH(現混)室溫靜置 15 分鐘去除黑色素，最後用 PBST(in DEPC)清洗 2 次後於  $4^{\circ}\text{C}$  保存或照相。



### 3.2.10 胚胎藥理學作用

將 6 hpf 胚胎浸於  $2.5 \mu\text{M}$  AC220、 $100 \text{nM}$  XL184、 $100 \text{nM}$  PKC412 或  $10^3$   
 $\text{mg/L}$  AraC 中，並以  $0.025\%$  DMSO、 $0.001\%$  DMSO 及  $\text{ddH}_2\text{O}$  做為控制組，  
於胚胎 24 hpf 大時換藥一次，收集 48 hpf 胚胎做蘇丹黑染色及 WISH。

### 3.2.11 顯微鏡及影像處理

使用 OLYMPUS BX51 和 OLYMPUS IX71 觀察並以 OLYMPUS DP71 照相，  
以 Helicon Focus 5.3 及 Adobe Photoshop CS6 進行疊圖及影像處理。

### 3.2.12 統計方法

使用 Microsoft Excel 或 GraphPad Prism 6 進行計算與作圖，並以雙尾 t 檢定和卡方檢定來檢驗實驗組與控制組的差異性。當 p 值小於 0.05 時，統計學上有顯著意義。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ ，ns 表示無統計上差異。



## 第四章 實驗結果

### 4.1 探討在骨髓系白血球中專一且過度表現 *FLT3-ITD* 的情況下對血球細胞的影響

#### 4.1.1 骨髓系白血球

由於 *spil* 和 *cebpα* 為骨髓系白血球前驅細胞會表現的轉錄因子，而 *mpo*(骨髓系過氧化酶)主要表現在較成熟的骨髓系白血球中，為嗜中性白血球內的重要酵素之一，常被用來當作骨髓系白血球的標誌。我們利用 WISH 的方法，以專一結合 *spil*、*cebpα* 和 *mpo* 的 RNA 探針進行偵測目標基因之表現位置及數量。結果顯示，在 48 hpf 時，*spil* 和 *cebpα*，相較於控制組，均有表現增加(如圖一)，另外在 *mpo* 也可看到表現增加的情形(如圖二)。

我們也使用了蘇丹黑染色來確認以上結果，蘇丹黑染色主要染上中性脂肪、磷脂和固醇，可染上血球中的初級及次級顆粒，因此此方法主要可以觀察顆粒性白血球數量及發育上的變化，並可觀察到一些骨髓系白血球及巨噬細胞的前驅細胞。結果顯示，染上蘇丹黑的血球主要集中在 CHT 的位置，相較於控制組，有明顯增加的情況(如圖三)。

#### 4.1.2 淋巴性白血球

淋巴性白血球的發育在斑馬魚中起始於約 3 dpf，因此選用 4 dpf (96 hpf)的斑馬魚為偵測對象，使用 WISH 的方式分析淋巴性白血球轉錄因子 *rag1* 的表現。結果顯示，在 96 hpf 時，斑馬魚的胸腺中 *rag1* 的表現，相較於控制組，有增加的情形(如圖四)。

#### 4.1.3 紅血球

*hbaf1* 為斑馬魚中表現血紅蛋白 α1 多肽鏈的基因，可做為分析紅血球數量的標誌。結果顯示，成熟紅血球數量，相較於控制組，有明顯減少的情形(如圖五)。

從以上結果可看出在骨髓系白血球中專一且過度表現 *FLT3-ITD* 的情況下，



不只骨髓系白血球受到明顯影響而增加，其他沒有過度表現 *FLT3-ITD* 的血球細胞也受到影響，例如淋巴性白血球增加，紅血球則是減少。

#### 4.2 探討對造血相關轉錄因子的影響

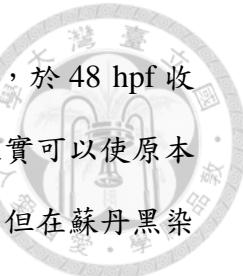
為了確認前面 WISH 的結果並了解對其他造血相關轉錄因子的影響，我們使用 Q-PCR 來分析 48 hpf 時各轉錄因子之表現情況。結果顯示，在血液血管母細胞相關之轉錄因子中 *scl* 表現量有增加的趨勢，而 *lmo2* 表現量減少(如圖六 A)；在骨髓系白血球相關之轉錄因子中 *cebpα* 和 *mpo* 的表現量有受到 *FLT3-ITD* 的影響而有顯著增加，*spil* 表現量與控制組並無差異(如圖六 B)；在淋巴性白血球相關之轉錄因子中 *rag1* 表現量有增加的趨勢(如圖六 C)；在紅血球相關之轉錄因子中 *gata1* 表現量與控制組並無差異，而在 *hbaf1* 則表現量減少，顯示成熟紅血球相對減少(如圖六 D)；在單核/巨噬細胞相關之轉錄因子中 *csf1r*、*mpeg1*、*l-plastin* 和 *mfap4* 均無顯著增加或減少(如圖六 E)；在次級造血中，HSC 相關之轉錄因子 *c-myb* 和 *runx1* 均無顯著增加或減少(如圖七)。

從 WISH 及 Q-PCR 結果可以推測出在骨髓系白血球中專一且過度表現 *FLT3-ITD* 的情況下，會造成骨髓系白血球增加，淋巴性白血球增加，成熟紅血球減少，巨噬細胞及次級造血之 HSC 則不受影響。

#### 4.3 評估此斑馬魚作為 AML 藥物篩選平台的可行性

由於 *FLT3-ITD* 為 AML 常見的突變，因此需要一個動物模式的藥物篩選平台，因此為了評估此斑馬魚作為藥物篩選平台的可行性，我們使用了三種常見 TKI 藥物和一種化學治療藥物，來觀察此斑馬魚在使用藥物後能否有抑制骨髓系白血球細胞增加的情形。

我們將 6 hpf 胚胎浸於  $10^3$  mg/L AraC<sup>51</sup>、100 nM PKC412<sup>52</sup>、2.5 μM AC220<sup>53</sup> 和 100 nM XL184<sup>46</sup> 中(各藥物濃度參考之前研究，並已經確認對斑馬魚無外觀上



影響)，並以 0.025% DMSO、0.001% DMSO 及 ddH<sub>2</sub>O 做為控制組，於 48 hpf 收集胚胎做蘇丹黑染色及 WISH。結果顯示，AML 化療藥物 AraC 確實可以使原本受到 *FLT3-ITD* 影響而增加的較成熟骨髓系白血球受抑制而下降，但在蘇丹黑染色卻無法看到此結果(如圖八)。另外使用已經用於臨床的 AML 第一型 TKI 藥物 PKC412 為陽性對照組，確認此斑馬魚受 PKC412 影響而造成骨髓系白血球受抑制而下降到類似野生型斑馬魚的骨髓系白血球數量(如圖九)。使用第二型 TKI 藥物 AC220 發現原本受到 *FLT3-ITD* 影響而增加的骨髓系白血球確實受到抑制而下降，但卻發現野生型斑馬魚也受到藥物影響而造成骨髓系白血球減少(如圖十)。使用另一種在 *FLT3-ITD* 的情況也有效的第二型 TKI 藥物 XL184，發現在 100 nM 濃度下，並無法對 Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)產生降低骨髓系白血球數目的效果(如圖十一)。



## 第五章 討論

在 AML 病人中有 20~30% 會發生 *FLT3-ITD* 突變，且通常有著較差的預後、低存活率及高復發率，因此有許多研究以 *FLT3-ITD* 為研究對象探討其與 AML 生成與發展的相關性。在細胞模型已存在常用的 *FLT3-ITD* 同型合子突變 MUTZ-11 和 MV4-11 細胞及異型合子突變的 MOLM-13 和 PL-21 細胞<sup>54</sup>。在老鼠模型上，2002 年的文獻中指出經由骨髓移植植入有表現 *FLT3-ITD* 細胞的老鼠，可發現其發生骨髓增生性疾病、脾臟腫大及白血球增多症<sup>55</sup>；在另一篇文獻中，將 ITD 突變基因嵌入 *FLT3* 的近膜結構基因中，此老鼠也可發現有骨髓增生性疾病、脾臟腫大、白血球增多症及骨髓性白血球增生等症狀<sup>56</sup>。在斑馬魚模型上，2014 年的文獻中發現，當全身性表現人類 *FLT3-ITD* 時可看到骨髓系白血球增生<sup>53</sup>；本研究所使用之 Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)在六個月大時即可看到腎髓中的前驅細胞增生，並隨著年齡增長有越來越嚴重的趨勢；在九個月大時，幾近達到 AML 的腎髓相以及血液相<sup>48</sup>。然而以上的 *FLT3-ITD* 動物模型所產生之病徵均無法稱為 AML，推斷還需其他基因的調控使病徵轉變成 AML。

本研究主要針對此 Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)的胚胎進行研究，希望確認其造血特性，來評估其能成為研究 AML 致病機轉的動物模型，並成為 AML 藥物篩選平台。使用 Q-PCR 定量此斑馬魚血液血管母細胞相關之轉錄因子，其中 *scl* 表現量有增加的趨勢而 *lmo2* 表現量則為減少；文獻指出 *scl* 和 *lmo2* 會形成 complex 來調控血液血管母細胞中之相關基因表現，但是 *scl* 和 *lmo2* 沒有自體調控，且彼此之間也沒有互相調控的機制<sup>16,18</sup>。在斑馬魚中，經由 morpholino 下調 *FLT3* 後，發現 *scl* 和 *lmo2* 的表現並不受影響<sup>48</sup>；而關於 *FLT3-ITD* 對 *scl* 和 *lmo2* 的影響則未在其他動物模型被提及。推論在骨髓系白血球中專一表現 *FLT3-ITD* 的情況下，*FLT3-ITD* 的表達是可以對在初級造血中的血液血管母細胞造成影響的。

分析骨髓系白血球相關之轉錄因子 *spil1*、*cebpα* 和 *mpo* 的表現量，雖然 Q-PCR 的結果與 WISH 的結果不盡相同，不過，還是可以推論此斑馬魚之成熟骨髓系白



血球及前驅細胞均有增加。臨牀上，在 AML 病人中能觀察到骨髓系白血球不正常增生，而在其他 *FLT3-ITD* 動物模型中也能有類似此現象<sup>48,53,55,56</sup>。

此基因轉殖魚之單核/巨噬細胞相關的轉錄因子表現沒有顯著變化；2005 年的文獻中提及人類單核球中 *PU.1* 的高表現會使細胞分化趨向樹突細胞而使分化成巨噬細胞的路徑受到抑制<sup>57</sup>，而 2008 年的文獻中則提及 *FLT3* 可影響樹突細胞的恆定性<sup>58</sup>，因此推測本研究的斑馬魚的巨噬前驅細胞也可能受 *FLT3-ITD* 影響，造成分化偏向樹突細胞；然而實驗結果顯示此種細胞的總量不受影響。

此基因轉殖魚之淋巴性白血球相關的轉錄因子 *rag1* 表現量增加，代表淋巴性白血球的增加。在先前 *FLT3-ITD* 的老鼠動物模型中有觀察到白血球增多症<sup>55,56</sup>；另外 2016 年文獻中之 *FLT3-ITD* 的老鼠動物模型，則有樹突細胞發育受影響、間接調控淋巴性白血球和調節型 T 細胞的增生的現象<sup>59</sup>。理論上，本研究之斑馬魚的淋巴性白血球不會表現 *FLT3-ITD*；因此，*FLT3-ITD* 可能是經由間接調控來影響淋巴性白血球。

此基因轉殖魚之紅血球相關的轉錄因子 *gata1* 表現量與控制組無顯著差異；然而，代表血紅素的 *hbaf1* 基因的表現量減少，可以反映出成熟紅血球的減少。AML 病人中常有貧血的現象，而造成紅血球減少的原因大致可分成三類，紅血球流失、生成減少和破壞增加；實驗中，斑馬魚固定前並無造成傷口，所以可去除紅血球流失的可能性；在本實驗室先前的研究已確認此基因轉殖斑馬魚並不會在紅血球表現 *FLT3-ITD*<sup>48</sup>。雖然文獻報告 *gata1* 的表現會受 *spil1* 表現的增加影響而下降<sup>60</sup>，然而此斑馬魚的 *gata1* 表現並無增加；顯示紅血球前驅細胞生成並無受到抑制；另外，2007 年的文獻中提到，斑馬魚中的 microRNA-*miR-451* 可在不影響 *gata1* 的表現下，調控紅血球的成熟<sup>61</sup>；另一篇文獻中提到，大於 60 歲的 *FLT3-ITD* 突變的 AML 病患之 *miR-144* 和 *miR-451* 的表現與具有正常 *FLT3* 之 AML 病患相比來的低<sup>62</sup>；因此，本研究所觀察到之斑馬魚成熟紅血球減少的現象，可能是紅血球成熟受到抑制或是血紅素生成減少所致。



在藥物測試方面，AraC 為常用 AML 化療藥物；使用  $10^3$  mg/L AraC 後在本研究之斑馬魚中發現 WISH- *mpo* 及蘇丹黑染色結果不一致的情形，因此推測可能為 AraC 總量不夠去影響前驅細胞，又或是如 2017 年的文獻中發現 AML 病人的幹細胞或前驅細胞相較於較成熟的血球細胞對 AraC 的敏感度較低<sup>63</sup>，因此觀察到成熟骨髓系白血球的標誌 *mpo* 受到影響，而能檢測到骨髓系白血球及巨噬細胞的前驅細胞之蘇丹黑染色則無明顯差異。在臨牀上也常發現病人在使用 AraC 後仍有復發的可能性而產生抗藥性；文獻指出這些病人之協助 AraC 進入細胞的 *hENT1*(human equilibrative nucleoside transporter 1)基因有表達較低的情況<sup>64</sup>。也有文獻指出在 AML 細胞株中的 *FLT3-ITD* 可藉由 *HIF-1α* 負調控 *hENT1* 的表現，使細胞株對 AraC 較具抗藥性<sup>65</sup>。因此，將此斑馬魚長期置於 AraC 中的模式，可以研究相關之抗藥性機制。

在本研究中，第一型 TKI 藥物 PKC412 處理斑馬魚後有與臨床相似之抑制骨髓系白血球增生的效果。文獻指出在細胞實驗中，PKC412 使不含 *FLT3* 突變之 AML 細胞停留在 G2/M 期；而使有 *FLT3* 突變的 AML 細胞停留在 G1 期<sup>66</sup>。取此斑馬魚 EGFP<sup>+</sup>的細胞(有表現 *FLT3-ITD*)做細胞週期分析或許也能驗證此現象。

在本研究中，第二型 TKI 藥物 AC220 也可以抑制斑馬魚中骨髓系白血球的增生；但所使用的濃度也會抑制野生型斑馬魚之骨髓系白血球的增生。本研究所用濃度參考在 2014 年的研究 *FLT3* 在斑馬魚的作用的文獻，而其內容提到當在野生型斑馬魚使用 AC220 後，可觀察到類似 *FLT3* 被基因剔除所造成的各血球表現<sup>53</sup>；可見 AC220 對正常的 *FLT3* 也會造成影響。

至於第二型 TKI 藥物 XL184 的藥物實驗文獻報告，雖然使用 100 nM 的 XL184 會造成斑馬魚血管生成的抑制<sup>45</sup>，但是可以成功抑制植入斑馬魚中的 *FLT3-ITD* 的 AML 細胞株<sup>46</sup>。然而，本研究應用此濃度並不會抑制此基因轉殖斑馬魚骨髓系白血球的增生；提高濃度到 250 nM 時，則可看到骨髓系白血球受到抑制而減少。但是這樣的濃度會使約 20% 的野生型及本研究所用之斑馬魚有心臟水腫的現



象。當濃度向上提升到 500 nM 時，雖然兩者的骨髓系白血球均受到抑制而明顯減少，但是在此濃度下，分別有高達 75% 基因轉殖斑馬魚與 100% 野生型斑馬魚有心臟水腫的現象(如圖十二)。臨床上，使用 XL184 後在心血管上的副作用包含心臟毒性造成的胸悶、心電圖異常及心血管毒性造成的高血壓、凝血困難，嚴重甚至會造成心衰竭<sup>67</sup>。另有文獻指出斑馬魚經由浸泡或注射擁有心血管毒性的藥物能造成心臟水腫及血液循環障礙；因此，本研究中斑馬魚出現的心臟水腫可能是因為 XL184 具有心臟或心血管毒性造成<sup>68</sup>。

從本研究的結果中可看出 *FLT3-ITD* 對每隻斑馬魚所造成的影响不甚相同，有時差距頗大；除了每隻胚胎的個體差異外，親代之 *FLT3-ITD* 表現量高低也是原因之一。文獻中的細胞實驗也已經證明並不是所有有表現 *FLT3-ITD* 的細胞都能產生高表現的活化 *FLT3* 蛋白<sup>54</sup>，因此本研究未來或許能將 *FLT3-ITD* 表現量做分類，確認 *FLT3-ITD* 的表現量高低是否會造成不同程度的影響。

綜合以上之結果與討論，在此斑馬魚中可觀察到骨髓系白血球增加與成熟紅血球減少等 AML 病患常見病徵；因此，此斑馬魚可作為研究 *FLT3-ITD* 的動物模型之一。使用 AML 常見化療藥物 AraC 與 *FLT3* 標靶藥物 PKC412、AC220 和 XL184，均能看到原先受 *FLT3-ITD* 影響而增加之骨髓系白血球數目受到抑制的效果；因此，此斑馬魚也可成為一個 AML 藥物的篩選平台；同時也可作為研究 *FLT3-ITD* 對藥物效用所產生的影響及機制的動物模型。

## 第六章 參考文獻



1. Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet.* 1998 Apr; 18(4):345-9.
2. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Jan; 4(1):35-44.
3. Rasighaemi P, Basheer F, Liongue C, Ward AC. Zebrafish as a model for leukemia and other hematopoietic disorders. *J Hematol Oncol.* 2015; 8: 29.
4. Lu JW, Hsieh MS, Liao HA, Yang YJ, Ho YJ, Lin LI. Zebrafish as a Model for the Study of Human Myeloid Malignancies. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:641475.
5. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008 Feb 22; 132(4):631-44.
6. Davidson AJ, Zon LI. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene.* 2004 Sep 20; 23(43):7233-46.
7. Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol.* 2003; 53:139-58.
8. Kimmel CB, Warga RM, Schilling TF. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development.* 1990 Apr; 108(4):581-94.
9. Warga RM, Nüsslein-Volhard C. Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development.* 1999 Feb; 126(4):827-38.
10. Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development.* 1999 Sep; 126(17):3735-45.
11. Crowhurst MO, Layton JE, Lieschke GJ. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *Int J Dev Biol.* 2002; 46(4):483-92.
12. Berman JN, Kanki JP, Look AT. Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis. *Exp Hematol.* 2005 Sep; 33(9):997-1006.



13. Detrich HW, Kieran MW, Chan FY, Barone LM, Yee K, Rundstadler JA, et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 7; 92(23):10713-7.
14. Jin H, Xu J, Wen Z. Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development. *Blood*. 2007 Jun 15; 109(12):5208-14.
15. Murayama E, Kiss K, Zapata A, Mordelet E, Briolat V, Lin H-F, et al. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity*. 2006 Dec; 25(6):963-75.
16. Dooley KA, Davidson AJ, Zon LI. Zebrafish scl functions independently in hematopoietic and endothelial development. *Dev Biol*. 2005 Jan 15; 277(2):522-36.
17. Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol*. 2010; 54(6-7):1127-37.
18. Patterson LJ, Gering M, Eckfeldt CE, et al. The transcription factors Scl and Lmo2 act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood*. 2007 Mar 15; 109(6):2389-98.
19. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*. 2002 May 13; 21(21):3368-76.
20. Amatruda JF, Zon LI. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol*. 1999 Dec 1; 216(1):1-15.
21. Ward AC, McPhee DO, Condron MM, et al. The zebrafish spi1 promoter drives myeloid-specific expression in stable transgenic fish. *Blood*. 2003 Nov 1; 102(9):3238-40.
22. Bennett CM, Kanki JP, Rhodes J, et al. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood*. 2001 Aug 1; 98(3):643-51.
23. Kalev-Zylinska ML, Horsfield JA, Flores MV, et al. Runx1 is required for



- zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development*. 2002 Apr; 129(8):2015-30.
24. Zhang Y, Jin H, Li L, Qin FX, Wen Z. cMyb regulates hematopoietic stem/progenitor cell mobilization during zebrafish hematopoiesis. *Blood*. 2011 Oct 13; 118(15):4093-101.
25. Jin H, Huang Z, Chi Y, et al. c-Myb acts in parallel and cooperatively with Cebp1 to regulate neutrophil maturation in zebrafish. *Blood*. 2016 Jul 21; 128(3):415-26.
26. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006 Nov 25; 368(9550):1894-907.
27. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017. *Atlanta: American Cancer Society*; 2017.
28. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999 Sep 30; 341(14):1051-62.
29. Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21; 115(3):453-74.
30. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:178-84.
31. Swords R, Freeman C, Giles F. Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012 Oct; 26(10):2176-85.
32. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30; 368(22):2059-74.
33. Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, et al. Identification of a novel type of



- ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood*. 2009 Apr 23; 113(17):4074-7.
34. Levis M, Small D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia*. 2003 Sep; 17(9):1738-52.
35. Smith CC, Wang Q, Chin CS, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2012 Apr 15; 485(7397): 260–263.
36. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jan; 9(1):28-39.
37. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10; 29(5):487-94.
38. Chang E, Ganguly S, Rajkhowa T, et al. The combination of FLT3 and DNA methyltransferase inhibition is synergistically cytotoxic to FLT3/ITD acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2016 May; 30(5):1025-32.
39. Parmar A, Marz S, Rushton S, et al. Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first-generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2011 Jul 1; 71(13):4696-706.
40. Lamba JK. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*. 2009 Oct; 10(10):1657-74.
41. Richard L. Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2013; 2: 20.
42. Fathi AT, Chen YB. The role of FLT3 inhibitors in the treatment of FLT3-mutated acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2017 Apr; 98(4):330-336.
43. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML).



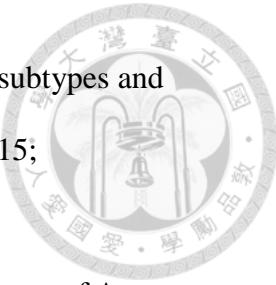
- Blood*. 2009 Oct 1; 114(14):2984-92.
44. Burnett AK, Bowen D, Russell N, et al. AC220 (Quizartinib) can be safely combined with conventional chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia: Experience from the AML18 pilot trial. *Blood* 122:622, 2013
45. Yakes FM, Chen J, Tan J, et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther*. 2011 Dec; 10(12):2298-308.
46. Lu JW, Wang AN, Liao HA, et al. Cabozantinib is selectively cytotoxic in acute myeloid leukemia cells with FLT3-internal tandem duplication (FLT3-ITD). *Cancer Lett*. 2016 Jul 1; 376(2):218-25.
47. Liao HA. Exploration of cabozantinib as selective inhibitor against refractory acute myeloid leukemia with flt3-itd mutations in vitro and in vivo. National Taiwan University, 2015.
48. Lu JW, Hou HA, Hsieh MS, et al. Overexpression of FLT3-ITD driven by spi-1 results in expanded myelopoiesis with leukemic phenotype in zebrafish. *Leukemia*. 2016 Oct; 30(10):2098-2101.
49. Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed.
50. Huang CJ, Tu CT, Hsiao CD, et al. Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish. *Dev Dyn*. 2003 Sep; 228(1):30-40.
51. Liu W, Wu M, Huang Z, et al. c-myb hyperactivity leads to myeloid and lymphoid malignancies in zebrafish. *Leukemia*. 2017 Jan; 31(1):222-233.



52. Peng X, Dong M, Ma L, et al. A point mutation of zebrafish c-cbl gene in the ring finger domain produces a phenotype mimicking human myeloproliferative disease. *Leukemia*. 2015 Dec; 29(12):2355-65.
53. He BL, Shi X, Man CH, et al. Functions of flt3 in zebrafish hematopoiesis and its relevance to human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014 Apr 17; 123(16):2518-29.
54. Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia*. 2003 Jan; 17(1):120-4.
55. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, et al. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2002 Jan 1; 99(1):310-8.
56. Li L, Piloto O, Nguyen HB, et al. Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood*. 2008 Apr 1; 111(7):3849-58.
57. Bakri Y, Sarrazin S, Mayer UP, et al. Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood*. 2005 Apr 1; 105(7):2707-16.
58. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jèze G, et al. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2008 Jun; 9(6):676-83.
59. Lau CM, Nish SA, Yoge N, et al. Leukemia-associated activating mutation of Flt3 expands dendritic cells and alters T cell responses. *J Exp Med*. 2016 Mar 7; 213(3):415-31.
60. Rhodes J, Hagen A, Hsu K, et al. Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell*. 2005 Jan; 8(1):97-108.
61. Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, et al. A GATA-1-regulated microRNA locus



- essential for erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 4; 105(9):3333-8.
62. Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2010 Nov 4; 116(18):3622-6.
63. Knorr KL, Finn LE, Smith BD, et al. Assessment of Drug Sensitivity in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Ex Vivo. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Mar; 6(3):840-850.
64. Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, et al. The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*. 2005 Dec 12; 93(12):1388-94.
65. Jin G, Matsushita H, Asai S, et al. FLT3-ITD induces ara-C resistance in myeloid leukemic cells through the repression of the ENT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 18; 390(3):1001-6.
66. Furukawa Y, Vu HA, Akutsu M, et al. Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines. *Leukemia*. 2007 May; 21(5):1005-14.
67. Food and Drug Administration. COMETRIQ™ (cabozantinib) Label. Food and Drug Administration 2012.
68. Zhu JJ, Xu YQ, He JH, et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *J Appl Toxicol*. 2014 Feb; 34(2):139-48.
69. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979

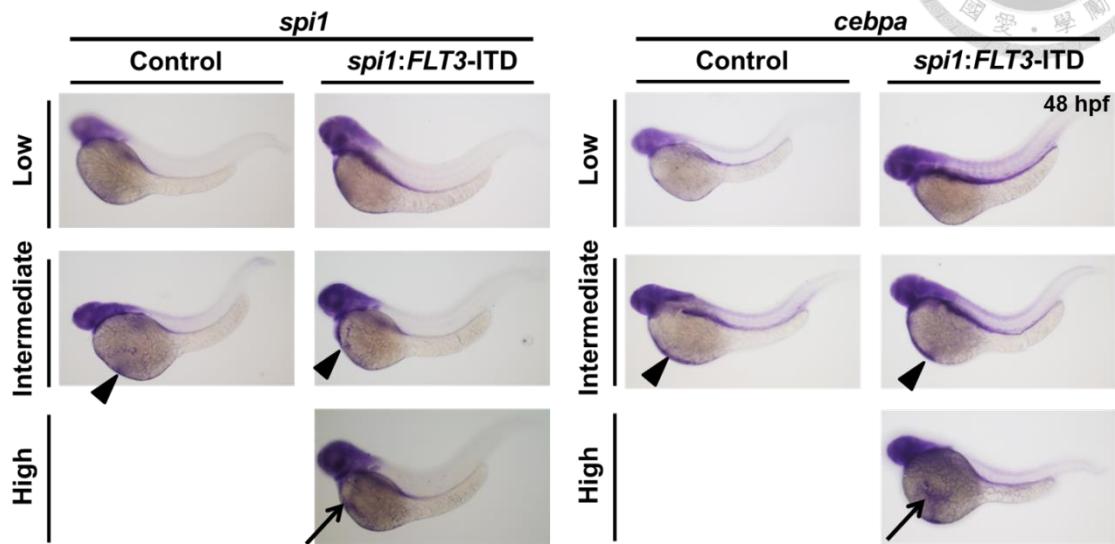


- patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002 Jun 15; 99(12):4326-35.
70. Testa U, Pelosi E. The Impact of FLT3 Mutations on the Development of Acute Myeloid Leukemias. *Leukemia Research and Treatment*. 2013; 2013:275760.

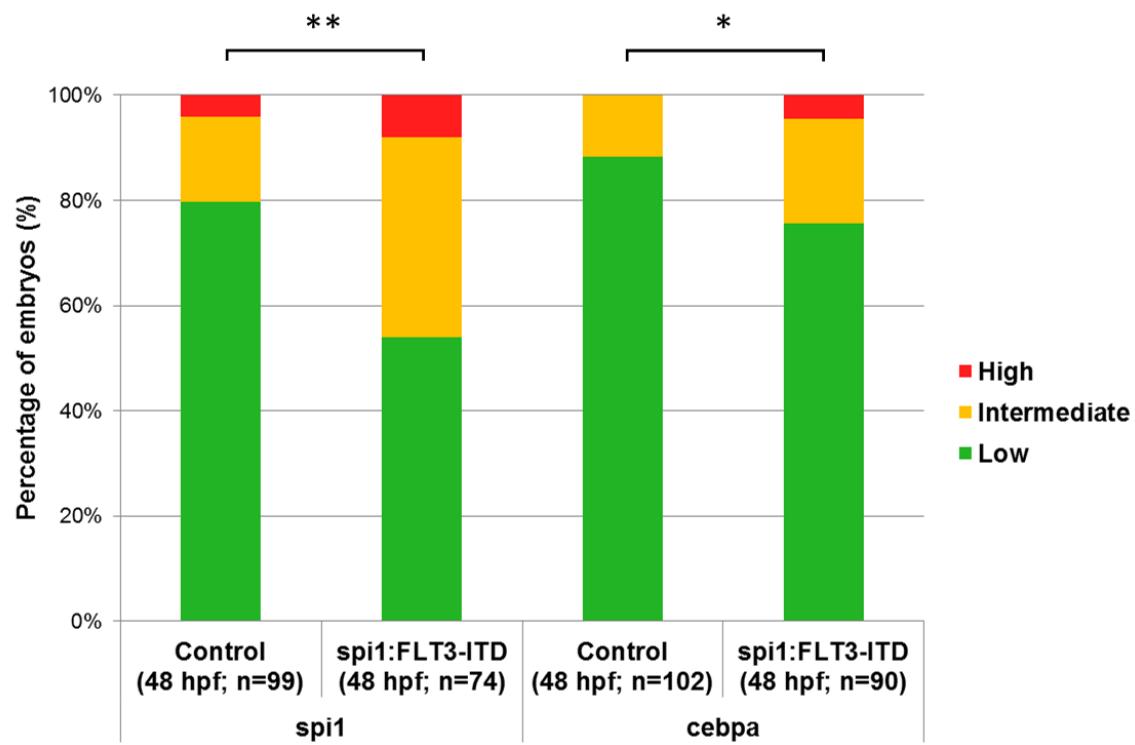


圖

A



B



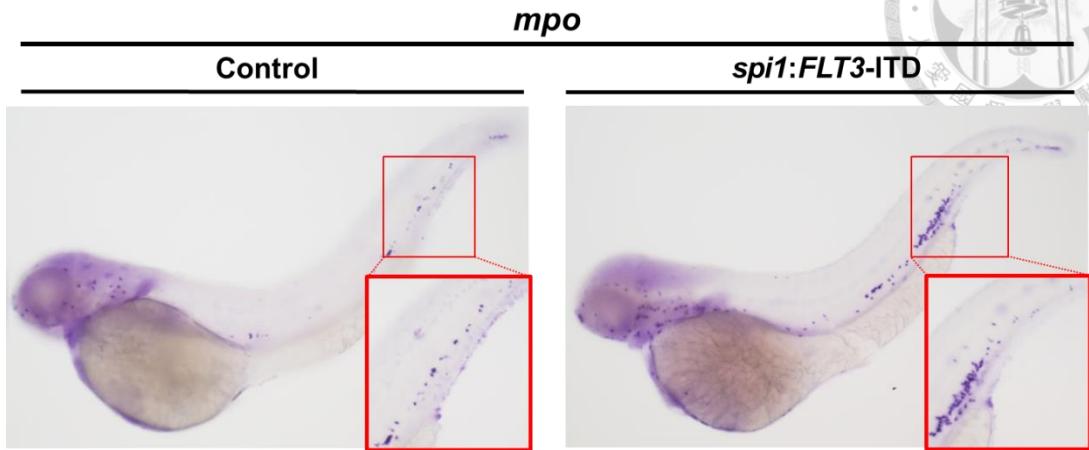


## 圖一、利用原位雜交測定骨髓系白血球標誌 *spil* 和 *cebpa* 的表現

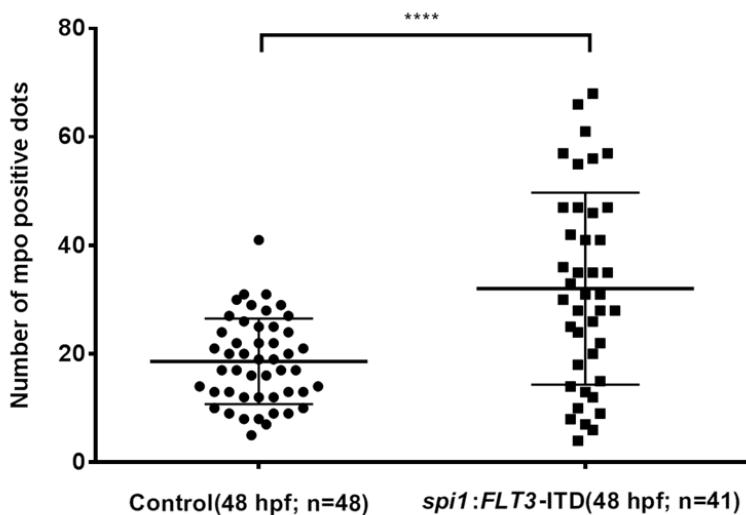
- (A) 定義及分類 *spil* 和 *cebpa* 原位雜交表現，主要將表現分成低、中和高度表現，低度表現為在卵黃囊部位無明顯的聚集，中度表現為在卵黃囊部位有明顯的表現並有小於或等於 1 的聚集(黑色三角形)，高度表現為在卵黃囊部位有明顯的表現並有大於或等於 2 的聚集(箭頭)。*spil* 和 *cebpa* 高度表現的控制組缺乏完整個體而造成沒有圖片。
- (B) 計數各程度表現之個體數，利用卡方檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spil*:*FLT3*-ITD-2A-EGFP) 在胚胎 48 hpf 時 *spil* ( $p = 0.0014$ ) 和 *cebpa* ( $p = 0.023$ ) 均表現增加並有顯著差異。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ 。



A



B

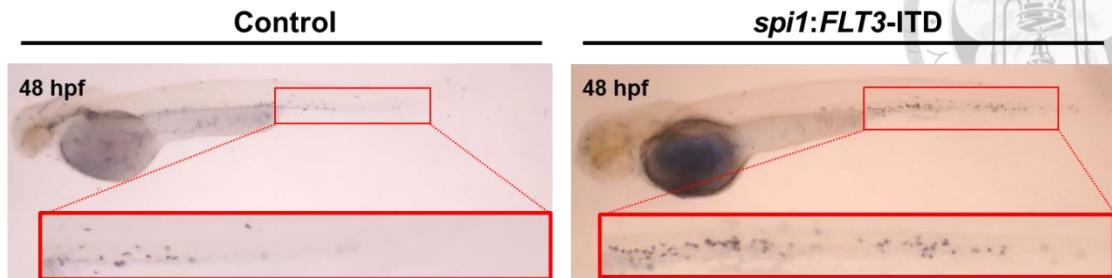


圖二、利用原位雜交測定骨髓系白血球標誌 *mpo* 的表現

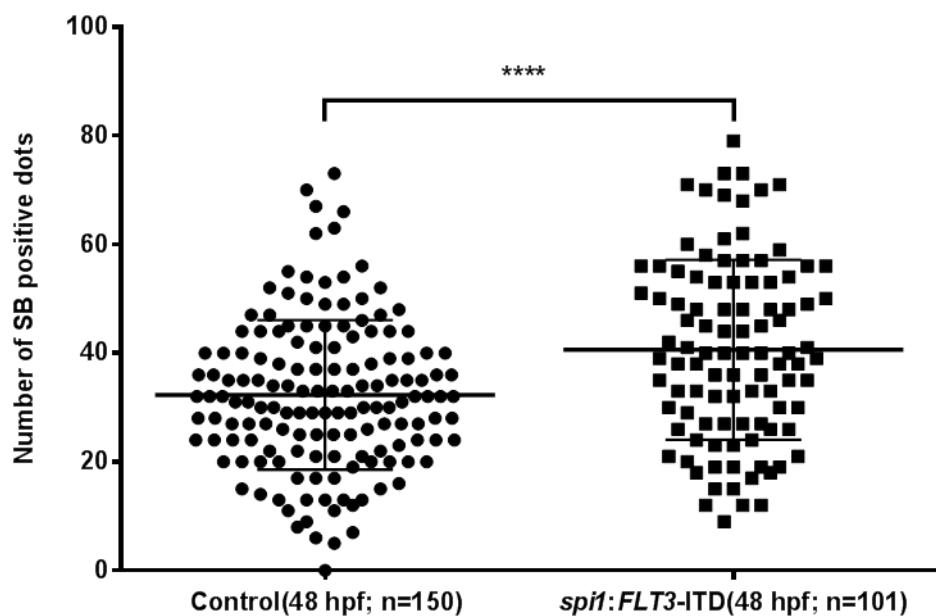
- (A) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到 *mpo* 表現的嗜中性白血球，紅色框格為 AGM 及 CHT 位置及放大圖。
- (B) 計數圖 A 中紅色框格中 *mpo*<sup>+</sup>的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*) 在胚胎 48 hpf 時 *mpo* (控制組  $18.6 \pm 7.9$ ，實驗組  $32.1 \pm 17.7$ ， $p < 0.0001$ ) 有表現增加並有顯著差異。圖中每一點代表一隻魚的結果，數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示。\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ 。



A



B

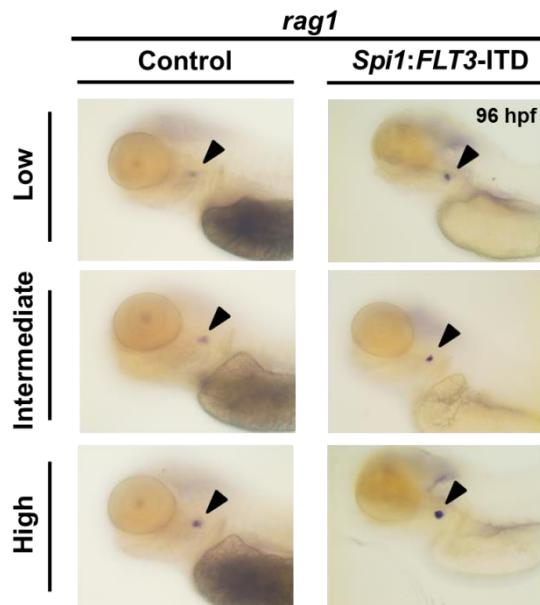


圖三、利用蘇丹黑染色研究 *FLT3-ITD* 對顆粒性白血球之影響

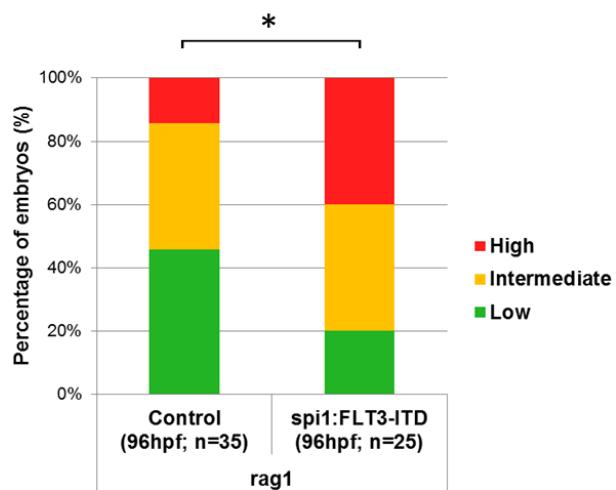
- (A) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到被蘇丹黑染上的血球，紅色框格為 CHT 位置及放大圖。
- (B) 計數圖 A 中紅色框格中有染上蘇丹黑的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*) 在胚胎 48 hpf 時顆粒性白血球有增加並有顯著差異(控制組  $32.3 \pm 13.8$ ，實驗組  $40.6 \pm 16.5$ ， $p < 0.0001$ )。圖中每一點代表一隻魚的結果，數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示。\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ 。



A



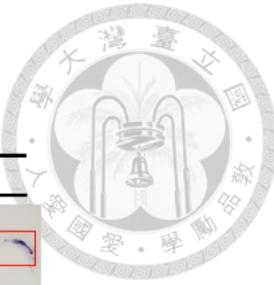
B



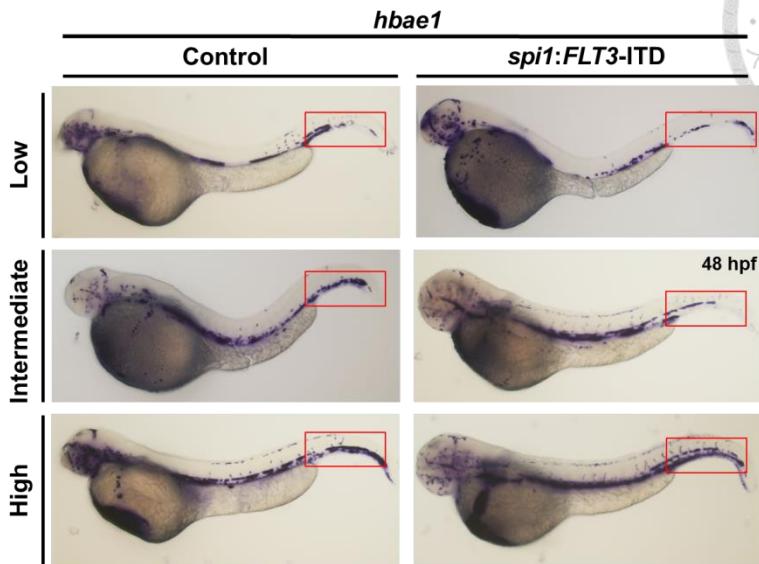
圖四、利用原位雜交測定淋巴性白血球標誌 *rag1* 的表現

(A) 定義及分類 *rag1* 原位雜交表現，主要將表現分成低、中和高度表現，低度表現為在胸腺部位(箭頭)有表現，中度表現為在胸腺部位有較高表現的點(較深的點)但並未遍佈全胸腺，高度表現為全胸腺均為高表現(較深的點)。

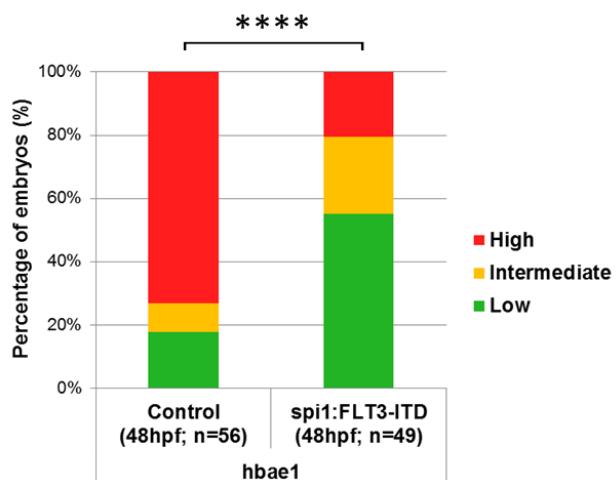
(B) 計數各程度表現之個體數，利用卡方檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*) 在胚胎 96 hpf 時 *rag1* ( $p = 0.0367$ ) 表現增加並有顯著差異。\*表示  $p < 0.05$ 。



A



B



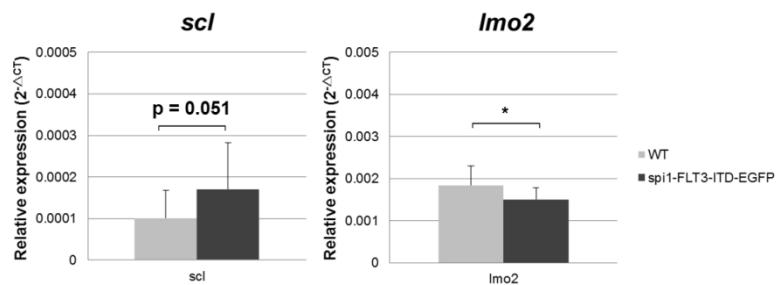
圖五、利用原位雜交測定紅血球標誌 *hbae1* 的表現

(A) 定義及分類 *hbae1* 原位雜交表現，主要將表現分成低、中和高度表現，主要以 CHT 部位(紅色框格)*hbae1* 表現多寡為主要判斷依據，並以其他部位的 *hbae1* 表現為輔。當全體 *hbae1* 表現量皆較少時為低度表現，CHT 或其他部位表現較少時為中度表現，全體 *hbae1* 表現量皆較多時為高度表現。

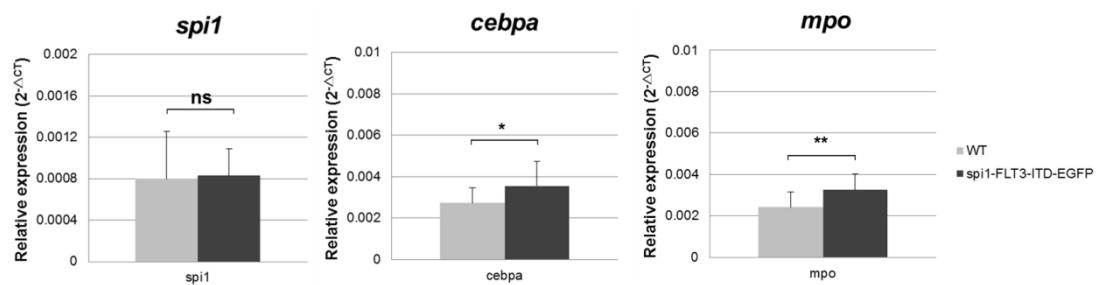
(B) 計數各程度表現之個體數，利用卡方檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*) 在胚胎 48hpf 時 *hbae1* ( $p < 0.0001$ ) 表現增加並有顯著差異。\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ 。



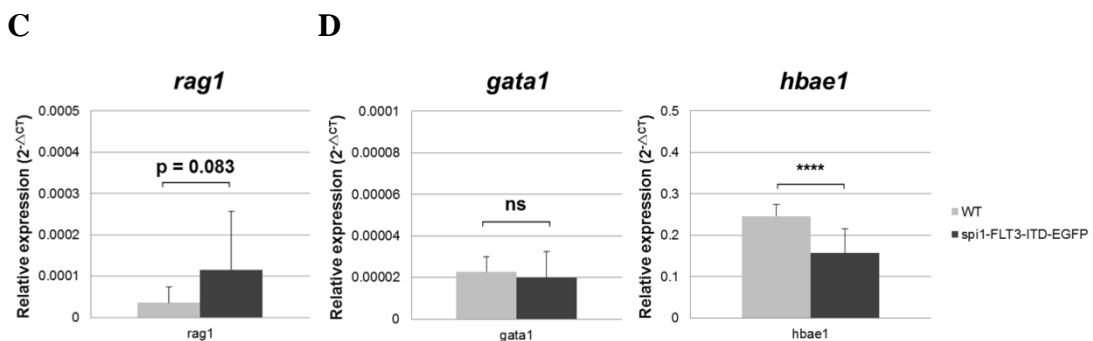
**A**



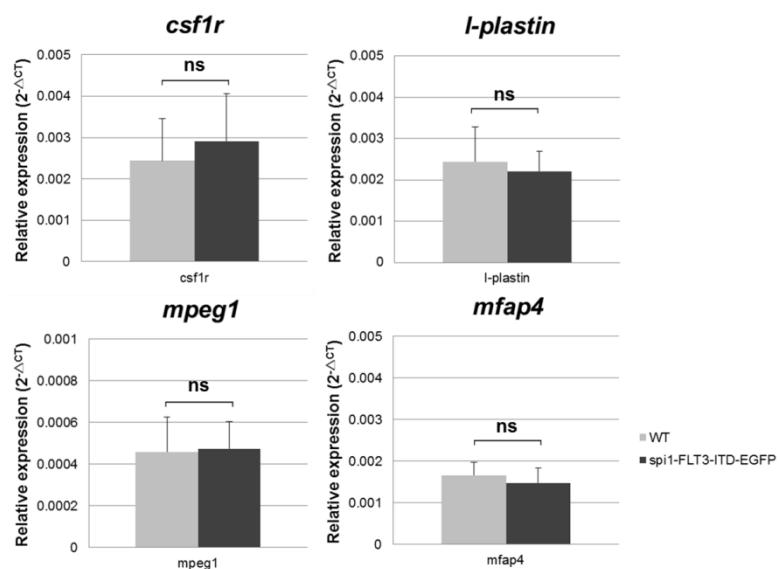
**B**



**C**



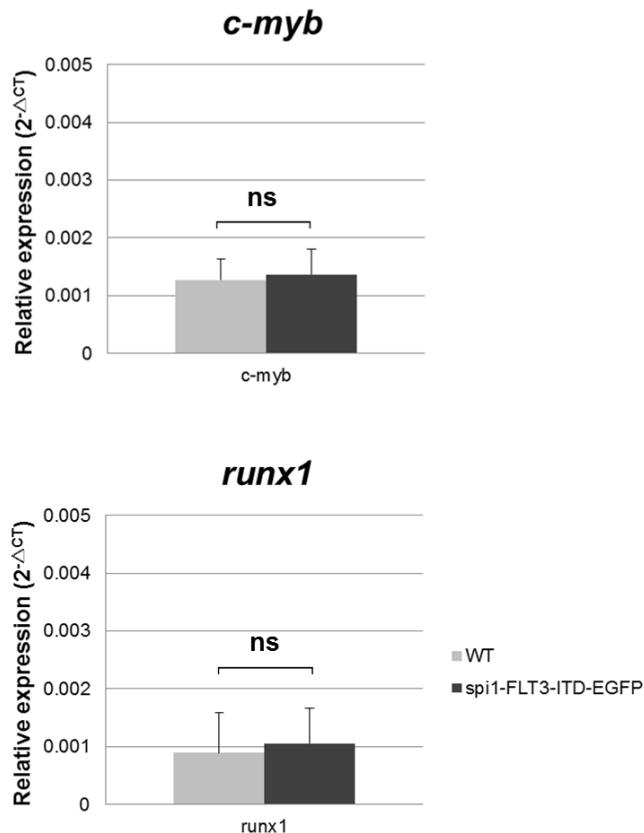
**E**





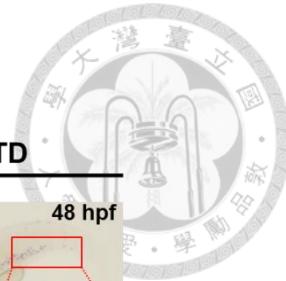
## 圖六、利用 Q-PCR 測定 48 hpf 胚胎初級造血相關轉錄因子的表現

(A) hemangioblast 相關之轉錄因子，*scl* ( $p = 0.051$ ) 表現量增加的趨勢而 *lmo2* ( $p = 0.0177$ ) 表現量減少。(B) 骨髓系白血球相關之轉錄因子，*spi1* 表現量與控制組並無差異，*cebpα* ( $p = 0.035$ ) 和 *mpo* ( $p = 0.0047$ ) 表現量有顯著增加。(C) 淋巴性白血球相關之轉錄因子，*rag1* ( $p = 0.0083$ ) 表現量有增加的趨勢。(D) 紅血球相關之轉錄因子，*gata1* 表現量與控制組並無差異，*hbaf1* ( $p < 0.0001$ ) 則表現量減少。(E) 巨噬細胞相關之轉錄因子，*csf1r*、*mpeg1*、*l-plastin* 和 *mfap4* 均無顯著增加或減少。取 48 hpf 胚胎以 Q-PCR 測定初級造血相關轉錄因子的表現，以  $\beta$ -actin 為內源性控制基因，利用  $2^{-\Delta CT}$  計算各基因 mRNA 相對表現量。以上數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示，控制組樣本數為 6，實驗組樣本數為 7。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ ，ns 表示無統計上差異。

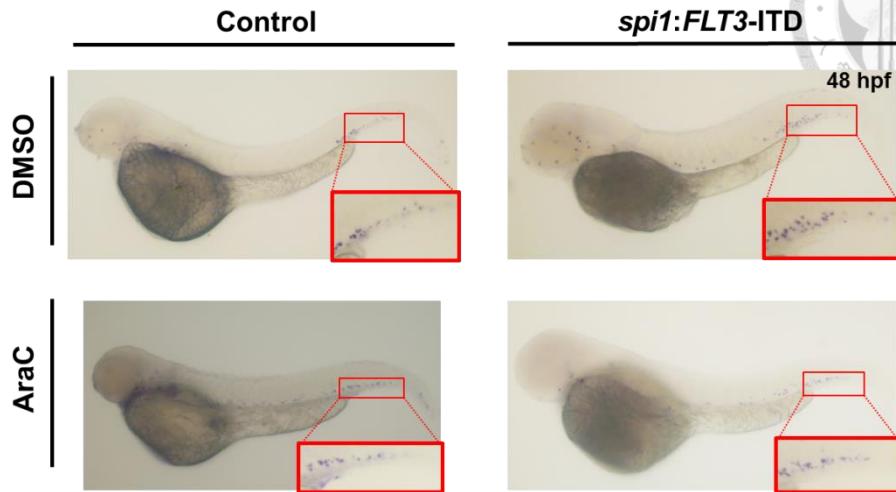


圖七、利用 Q-PCR 測定 48 hpf 胚胎次級造血相關轉錄因子的表現

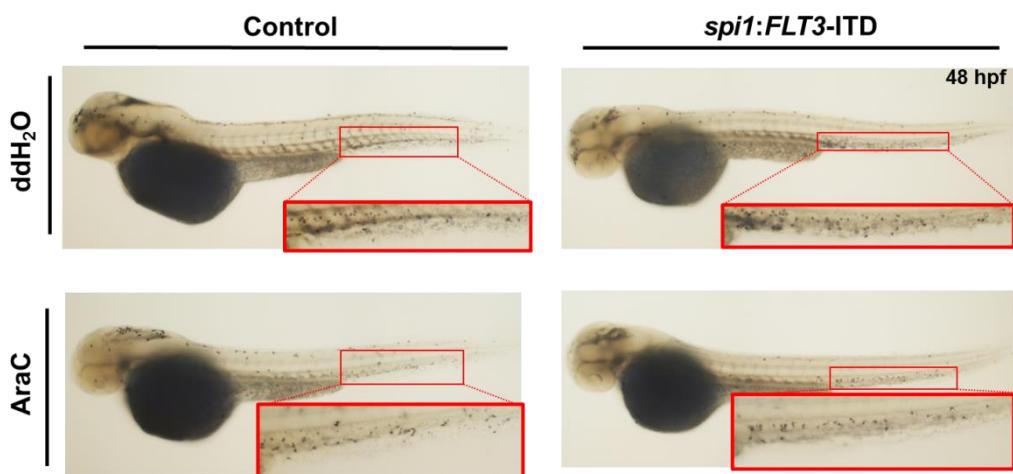
次級造血 HSC 相關之轉錄因子 *c-myb* 和 *runx1* 均無顯著增加或減少。取 48 hpf 胚胎以 Q-PCR 測定次級造血相關轉錄因子的表現，以  $\beta$ -actin 為內源性控制基因，利用  $2^{-\Delta CT}$  計算各基因 mRNA 相對表現量。以上數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示，控制組樣本數為 6，實驗組樣本數為 7。ns 表示無統計上差異。



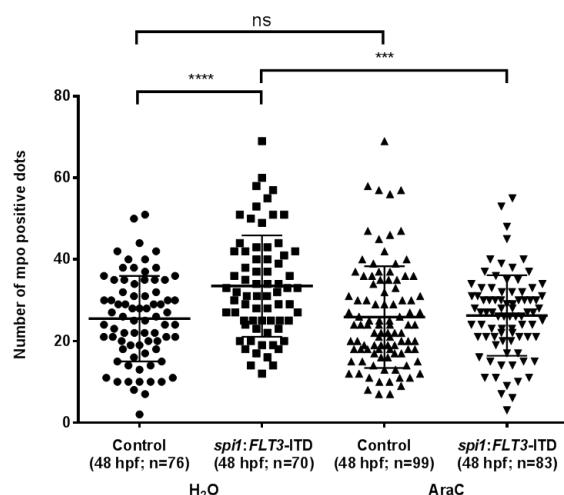
A



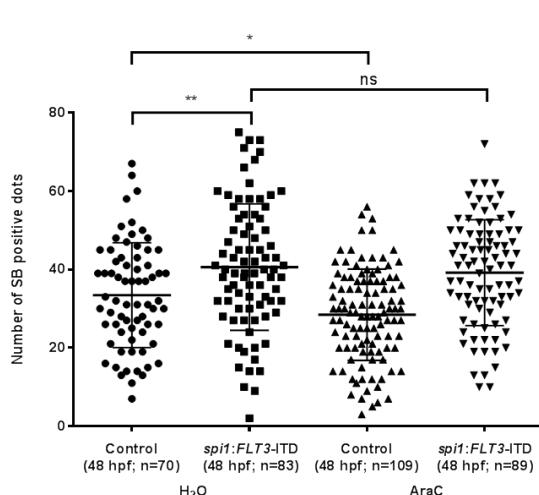
B



C



D





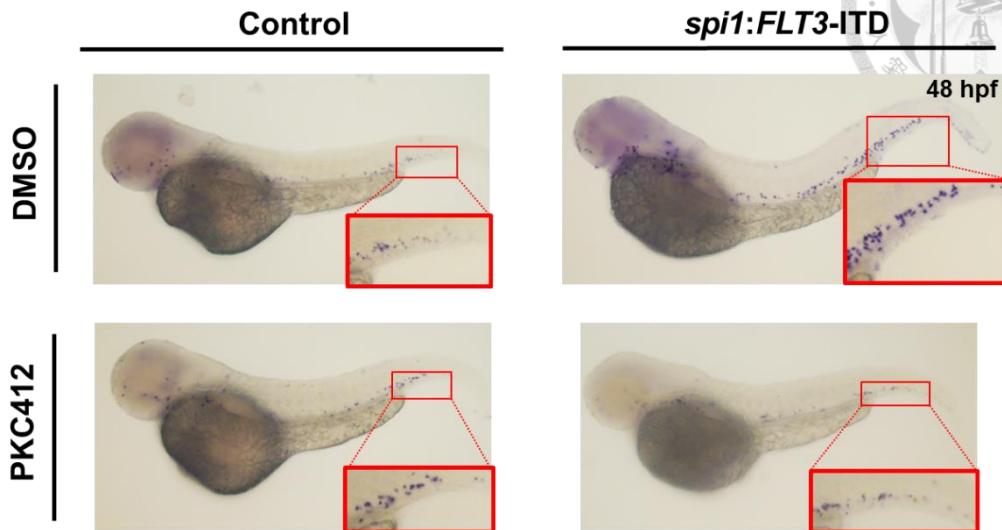
### 圖八、AraC 對 Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)的影響

- (A) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到 mpo 表現的嗜中性白血球，紅色框格為 AGM 及 CHT 位置及放大圖。
- (B) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到被蘇丹黑染上的血球，紅色框格為 CHT 位置及放大圖。
- (C) 計數圖 A 中紅色框格中  $mpo^+$  的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)在胚胎 48 hpf 時 *mpo* ( $p = 0.0001$ ) 表現受  $10^3$  mg/L AraC 影響而下降 ( $H_2O$ ：控制組  $25.5 \pm 10.5$ ，實驗組  $33.5 \pm 12.4$ ；AraC：控制組  $25.9 \pm 12.5$ ，實驗組  $26.3 \pm 9.9$ )。
- (D) 計數圖 B 中紅色框格中有染上蘇丹黑的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spil1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)在胚胎 48 hpf 時染上蘇丹黑的顆粒性白血球並沒有受  $10^3$  mg/L AraC 影響而下降 ( $H_2O$ ：控制組  $33.4 \pm 13.4$ ，實驗組  $40.6 \pm 16.1$ ；AraC：控制組  $28.4 \pm 11.7$ ，實驗組  $39.2 \pm 13.5$ )。

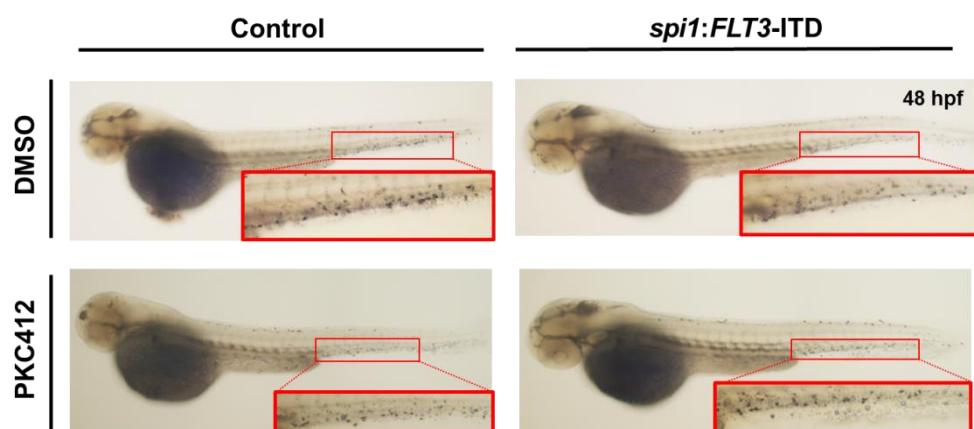
圖中每一點代表一隻魚的結果，數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ ，ns 表示無統計上差異。



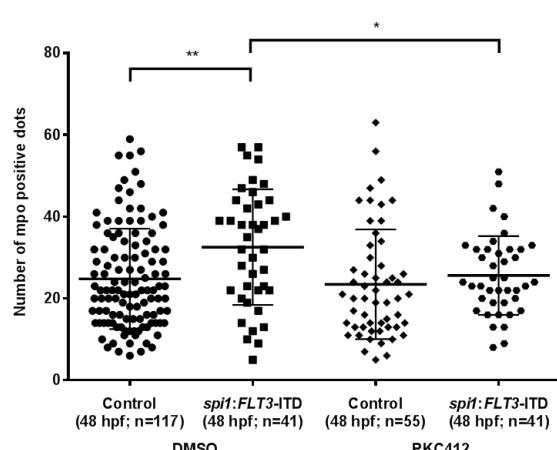
A



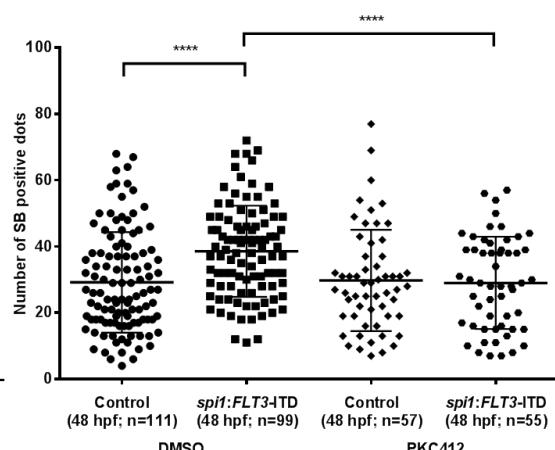
B



C



D





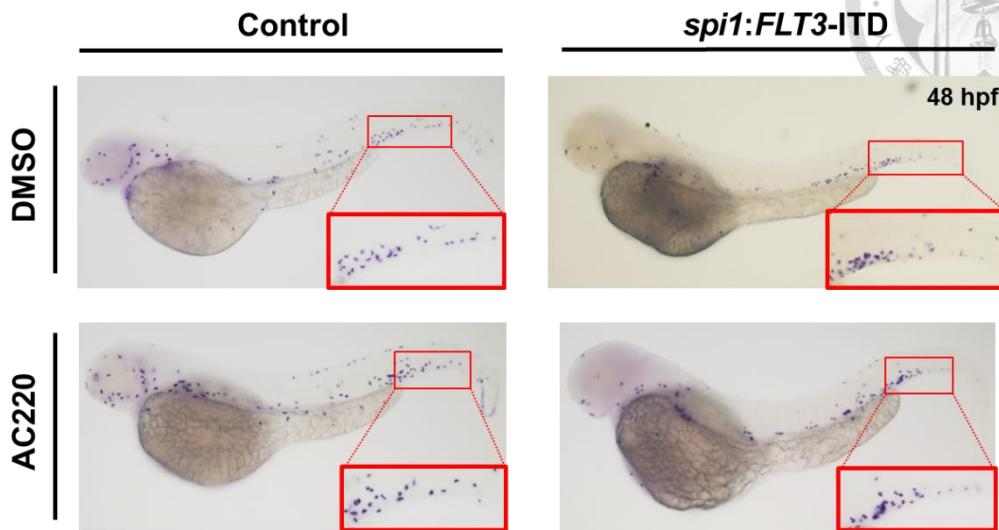
### 圖九、PKC412 對 Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)的影響

- (A) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到 mpo 表現的嗜中性白血球，紅色框格為 AGM 及 CHT 位置及放大圖。
- (B) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到被蘇丹黑染上的血球，紅色框格為 CHT 位置及放大圖。
- (C) 計數圖 A 中紅色框格中  $mpo^+$  的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)在胚胎 48 hpf 時 *mpo* ( $p = 0.0116$ )表現受 100 nM PKC412 影響而下降(DMSO：控制組  $24.8 \pm 12.3$ ，實驗組  $32.6 \pm 14.1$ ；PKC412：控制組  $23.5 \pm 13.4$ ，實驗組  $25.6 \pm 9.6$ )。
- (D) 計數圖 B 中紅色框格中有染上蘇丹黑的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)在胚胎 48 hpf 時染上蘇丹黑的顆粒性白血球受 100 nM PKC412 影響而下降( $p < 0.0001$ ) (DMSO：控制組  $29.2 \pm 15.1$ ，實驗組  $38.6 \pm 13.8$ ；PKC412：控制組  $29.8 \pm 15.3$ ，實驗組  $29.1 \pm 13.9$ )。

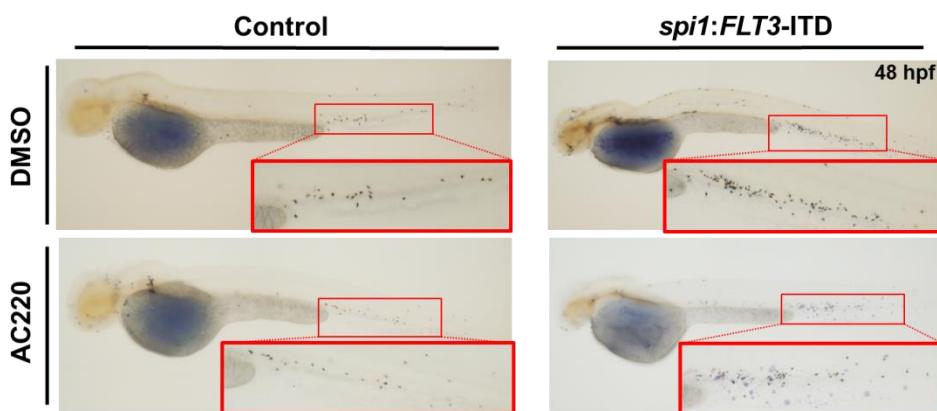
圖中每一點代表一隻魚的結果，數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ ，ns 表示無統計上差異。



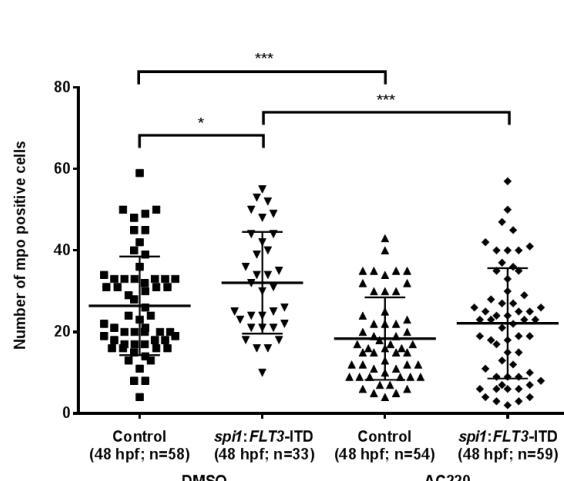
A



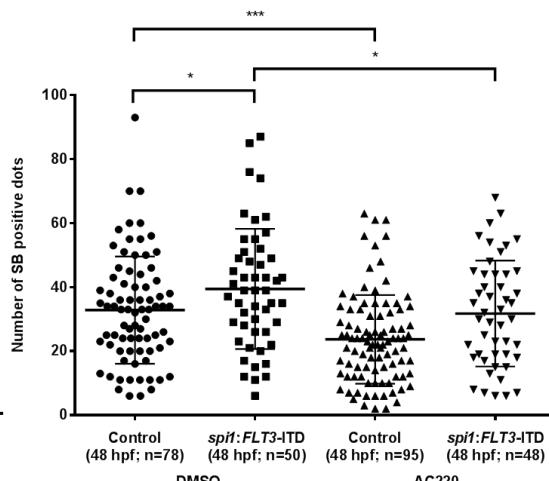
B



C



D





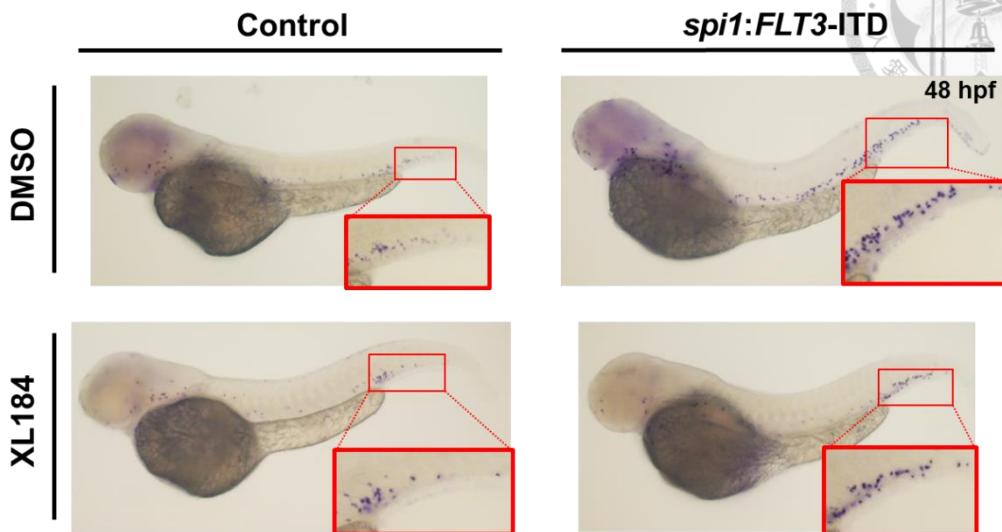
### 圖十、AC220 對 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 的影響

- (A) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到 mpo 表現的嗜中性白血球，紅色框格為 AGM 及 CHT 位置及放大圖。
- (B) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到被蘇丹黑染上的血球，紅色框格為 CHT 位置及放大圖。
- (C) 計數圖 A 中紅色框格中  $mpo^+$  的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 在胚胎 48 hpf 時 *mpo* ( $p = 0.0007$ ) 表現受  $2.5 \mu M$  AC220 影響而下降，但同時野生型斑馬魚也受到影響( $p = 0.0002$ ) (DMSO：控制組  $26.4 \pm 12.1$ ，實驗組  $32.1 \pm 12.5$ ；AC220：控制組  $18.4 \pm 10.1$ ，實驗組  $22.1 \pm 13.5$ )。
- (D) 計數圖 B 中紅色框格中有染上蘇丹黑的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 在胚胎 48 hpf 時染上蘇丹黑的顆粒性白血球受  $2.5 \mu M$  AC220 影響而下降( $p = 0.0337$ )，同時野生型斑馬魚也受到影響( $p = 0.0002$ ) (DMSO：控制組  $32.8 \pm 16.8$ ，實驗組  $39.4 \pm 18.8$ ；AC220：控制組  $23.7 \pm 13.9$ ，實驗組  $31.8 \pm 16.5$ )。

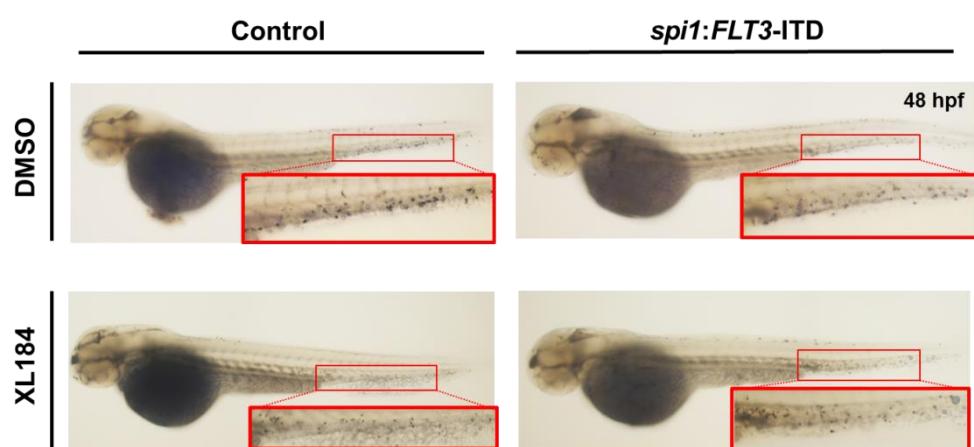
圖中每一點代表一隻魚的結果，數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ ，ns 表示無統計上差異。



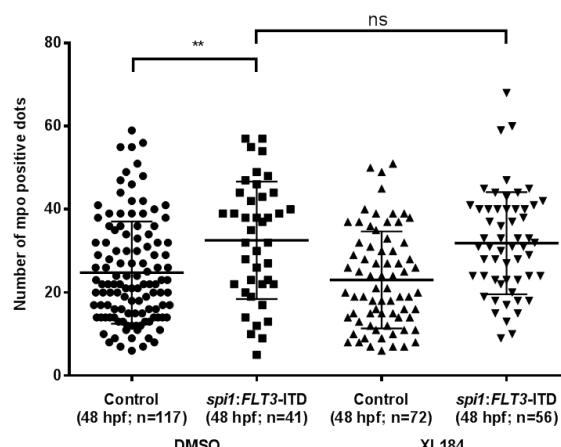
A



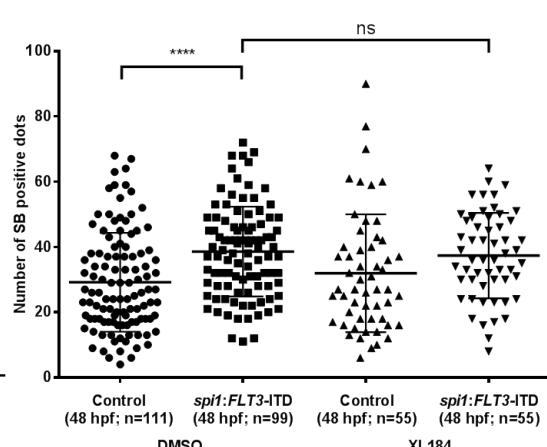
B



C



D

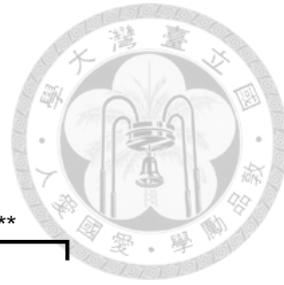




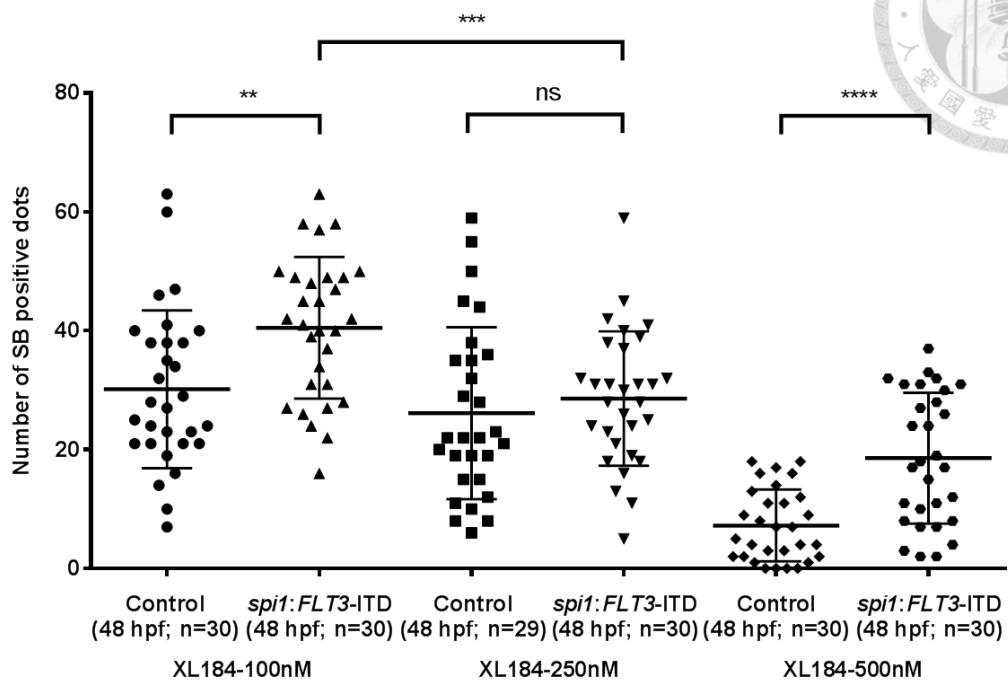
### 圖十一、XL184 對 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 的影響

- (A) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到 mpo 表現的嗜中性白血球，紅色框格為 AGM 及 CHT 位置及放大圖。
- (B) 在 48 hpf 時可於 AGM 及 CHT 位置觀察到被蘇丹黑染上的血球，紅色框格為 CHT 位置及放大圖。
- (C) 計數圖 A 中紅色框格中  $mpo^+$  的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 在胚胎 48 hpf 時 *mpo* 表現不受 100 nM XL184 影響 (DMSO：控制組  $24.8 \pm 12.3$ ，實驗組  $32.6 \pm 14.1$ ；XL184：控制組  $23.1 \pm 11.7$ ，實驗組  $31.9 \pm 12.3$ )。
- (D) 計數圖 B 中紅色框格中有染上蘇丹黑的點，並以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 在胚胎 48 hpf 時染上蘇丹黑的顆粒性白血球不受 100 nM XL184 影響(DMSO：控制組  $29.2 \pm 15.1$ ，實驗組  $38.6 \pm 13.8$ ；XL184：控制組  $31.9 \pm 18.1$ ，實驗組  $37.3 \pm 13.1$ )。

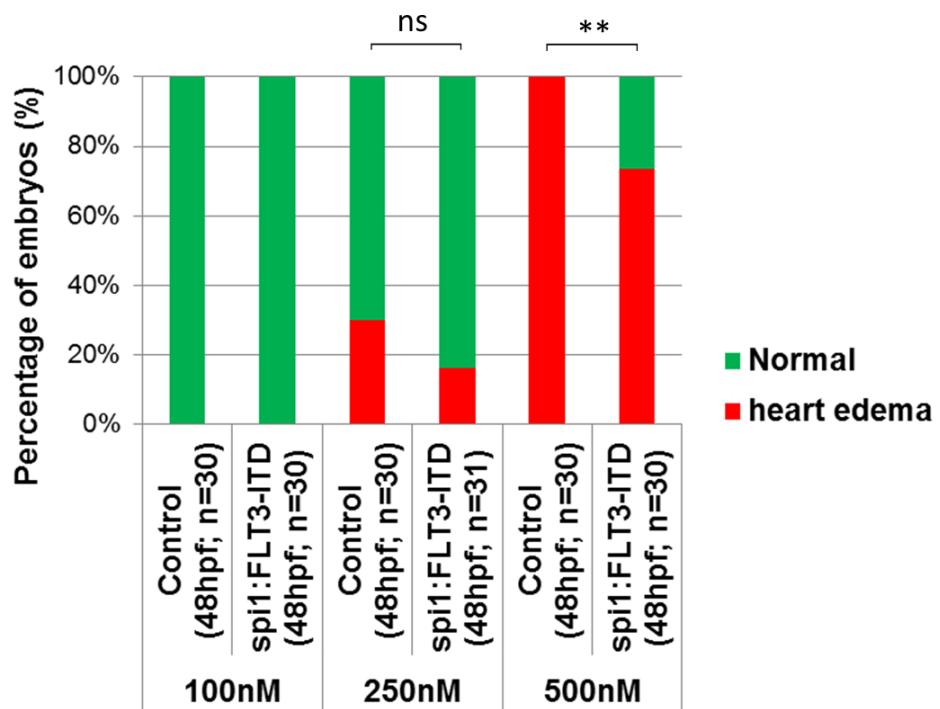
圖中每一點代表一隻魚的結果，數據均以 mean  $\pm$  standard deviation 表示。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ ，ns 表示無統計上差異。



A



B





## 圖十二、*Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)*所需之 XL184 有效濃度較高

(A) 使用 100、250 和 500nM 的 XL184，並在 48 hpf 時使用蘇丹黑染色研究對顆粒性白血球之影響，計數 CHT 有染上蘇丹黑的點，以雙尾 t 檢定進行統計分析。結果顯示，隨著 XL184 濃度升高顆粒性白血球受到抑制而減少的影響越明顯(250 nM,  $p = 0.0002$ ) (100 nM：控制組  $30.2 \pm 13.3$ ，實驗組  $40.1 \pm 11.9$ ；250 nM：控制組  $26.1 \pm 14.5$ ，實驗組  $28.6 \pm 11.3$ ；500 nM：控制組  $7.2 \pm 6.1$ ，實驗組  $18.6 \pm 11.1$ )。圖中每一點代表一隻魚的結果，數據以 mean  $\pm$  standard deviation 表示，且為兩次實驗所得到的結果。

(B) 利用卡方檢定進行統計分析各濃度心臟水腫的比例。結果顯示，在使用 250 nM XL184 後有約 20% 的心臟水腫且與野生型斑馬魚無統計上差異，而在使用 500 nM XL184 後全體野生型斑馬魚均有嚴重心臟水腫而 *Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)* 則只有約 75% 的心臟水腫，並且與野生型斑馬魚有統計上差異( $p = 0.0024$ )。\*表示  $p < 0.05$ ，\*\*表示  $p < 0.01$ ，\*\*\*表示  $p < 0.001$ ，\*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ ，ns 表示無統計上差異。

表



A. WISH

名稱		序列(5'→3')
<i>spi1</i>	Forward	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGGAGAACACGTCCAGCC</u>
	<u>T3-<i>spi1</i></u>	ATCTCCTCT
	Reverse	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTCTCCGTCTTT</u>
	<u>T7-<i>spi1</i></u>	CCGTAGTTTC
<i>cebpa</i>	Forward	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGGAGAGGAGCAAGCAAAC</u>
	<u>T3- <i>cebpa</i></u>	CTCTACG
	Reverse	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCCTGTACTCGGT</u>
	<u>T7- <i>cebpa</i></u>	GCTGTT
<i>mpo</i>	Forward	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGGAGATTCTCAGCCAAA</u>
	<u>T3- <i>mpo</i></u>	AGGATGG
	Reverse	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGACGTTCGCAAT</u>
	<u>T7- <i>mpo</i></u>	GGTAGG
<i>rag1</i>	Forward	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGGAGAGATGTGCCTTACGC</u>
	<u>T3- <i>rag1</i></u>	AGGATGGGC
	Reverse	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGAGCTTAGTGC</u>
	<u>T7- <i>rag1</i></u>	TCAGATGGTC
<i>hbae1</i>	Forward	<u>AATTAACCCTCACTAAAGGGAGACCACAATGAGTCT</u>
	<u>T3- <i>hbae1</i></u>	CTCTGCCAA
	Reverse	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGAGAGGAACCTT</u>
	<u>T7- <i>hbae1</i></u>	GTCCATTGC



## B. Q-PCR

名稱		序列(5'→3')
<i>scl</i>	Forward	AGCCATAAGGTGCAGACCAC
	Reverse	CGTTGAGGAGCTTAGCCAGA
<i>lmo2</i>	Forward	TCTTTCTGAAGGCCATCGAGCAGT
	Reverse	GCACAGCTTCTGCCGAGTTGTA
<i>spi1</i>	Forward	GTTCCTGCTTGACCTCTGCGAAA
	Reverse	TCAGTGCTCTGCCATCTCTGGT
<i>cebpα</i>	Forward	AACGGAGCGAGCTTGACTT
	Reverse	AAATCATGCCATTAGCTGC
<i>mpo</i>	Forward	CCGTGGATTGATTGGTCGTC
	Reverse	CACCACAGCCAATTCTTGCT
<i>rag1</i>	Forward	CATGGTGCTGCATTCCATCACA
	Reverse	TCACGCAGTCGTCTGCTGACT
<i>gata1</i>	Forward	ATGAACCTTCTACTCAAGCT
	Reverse	GCTGCTTCCACTTCCACTCAT
<i>hbae1</i>	Forward	CCAGGATGTTGATTGTCTAC
	Reverse	CAGTCTGCCGTGTTTC
<i>csf1r</i>	Forward	TTCGCGCTTTATTCCCTCAT
	Reverse	TTGGAAATGTAGCGCTTGTG
<i>mpeg1</i>	Forward	ACTGCCATTCTGTGGTTTC
	Reverse	GGACAACTGCTGGATTGGT
<i>l-plastin</i>	Forward	GCCCTTCACCACAGGGAGA
	Reverse	AGCAGAGCGATCAGAGCTTC



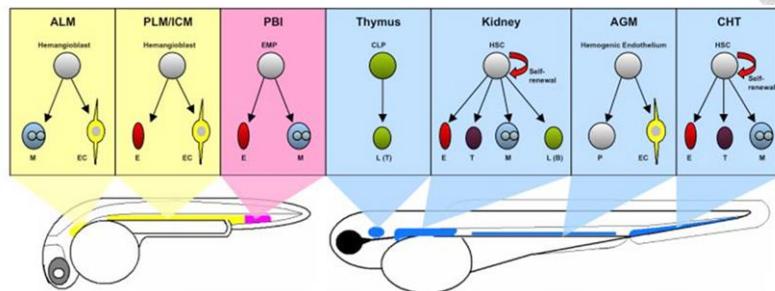
<i>mfap4</i>	Forward	GGATGGACGGTGATTCAAGAG
	Reverse	CAGATAAAGAGTCGCCTGCT
<i>runx1</i>	Forward	TTGGGACGCCAAATACGAACC
	Reverse	ATATCACCAAGGGCAACCACC
<i>c-myb</i>	Forward	GCTGACTAGCTCTGTGCTGATG
	Reverse	GCTGAGGTATTGTGCGTGG
$\beta$ -actin	Forward	CTCCATCATGAAGTGCGACGT
	Reverse	CAGACGGAGTATTGCGCTCA

表一、本研究所使用的引子序列

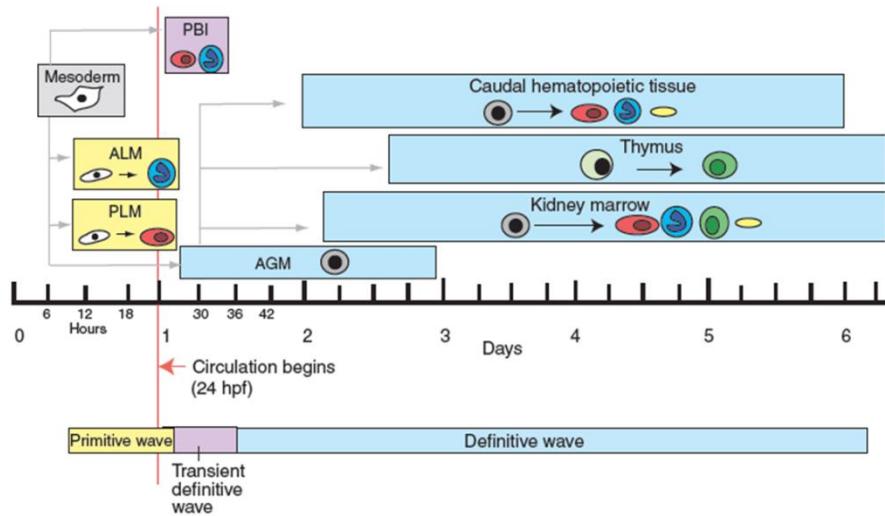
# 附圖



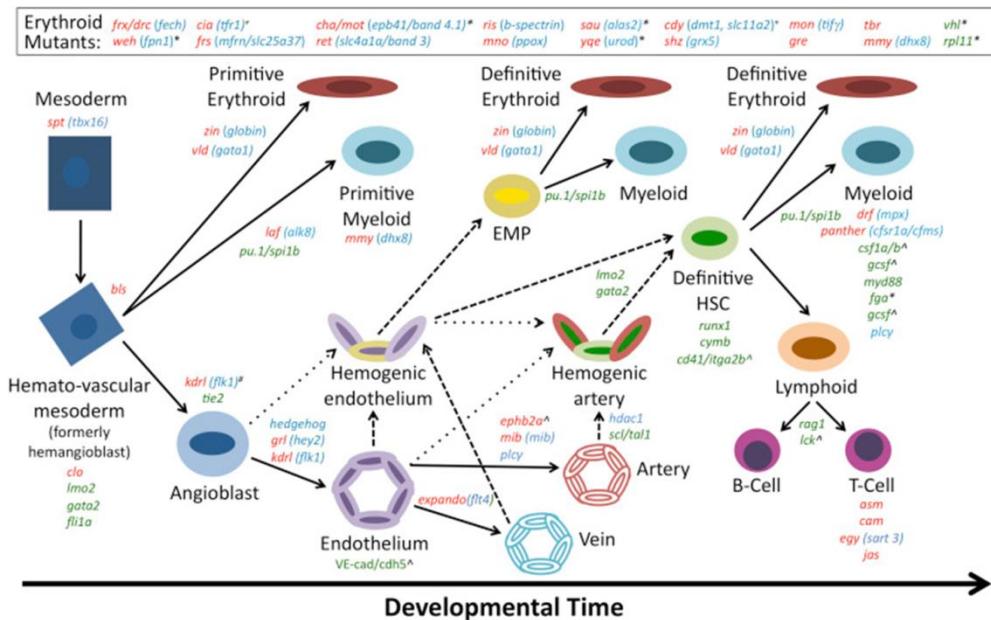
**A**



**B**



**C**





### 附圖一、斑馬魚造血過程圖及位置

(A) 斑馬魚造血位置。

(B) 斑馬魚造血由中胚層發育而來，分成初級(primitive)和次級(definitive)造血。

在約 11 hpf 時胚胎初級造血開始在 ALM 及 PLM 分別生成早期的巨嗜前驅細胞、骨髓系白血球和紅血球、少數骨髓系白血球(黃色)；在約 24 hpf 時血液循環開始，進入一個過渡期，主要在 PBI 中有一群 EMP 進行短暫的分化造血(紫色)。在約 26 ~30 hpf 時進入次級造血(藍色)，具有多潛能及自我更新能力的 HSC 會在 AGM 中出現，之後 HSC 隨血液遷移至靠近尾部的 CHT 中進行分化，最後這些來自 AGM 和 CHT 的 HSC 便會移動到腎髓，提供個體到死亡為止所需之各類血球細胞。另外在約 3 dpf 時，另有一部份 HSC 則移動到胸腺負責分化出淋巴性白血球。

(C) 斑馬魚血球分化圖及所需之轉錄因子。圖中各血球細胞下所標示之基因，為當此基因的序列產生變化時，會導致該細胞產生分化或增生上的變化。

摘自：

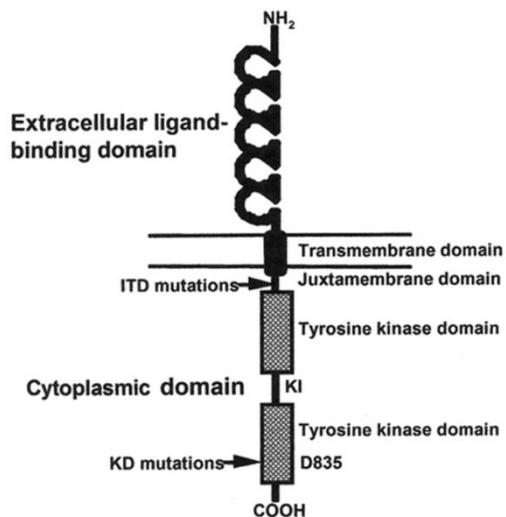
<https://zon.tchlab.org/>

Jing L, Zon LI. Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. *Dis Model Mech.* 2011 July; 4(4):433-8.

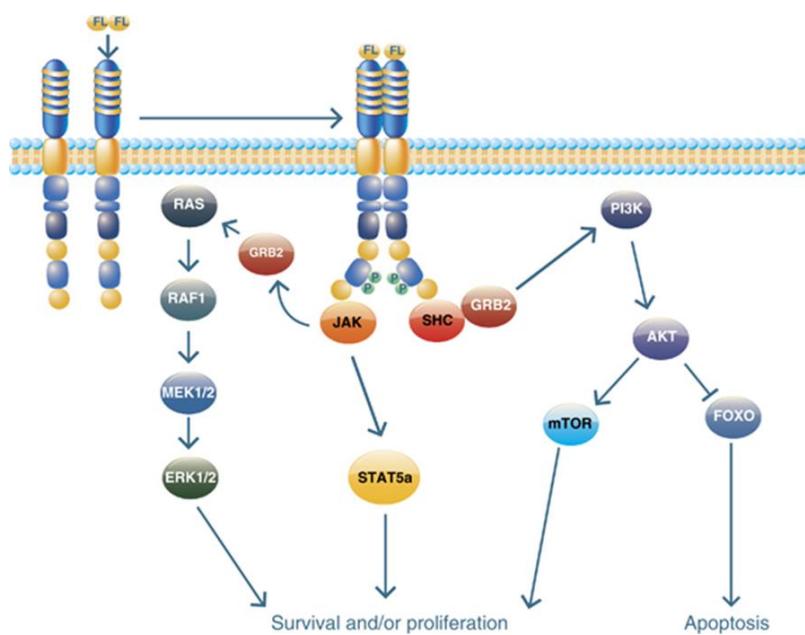
Kelli J. Carroll and Trista E. North. Oceans of Opportunity: Exploring Vertebrate Hematopoiesis in Zebrafish. *Exp Hematol.* 2014 Aug; 42(8): 684–696.



A



B



附圖二、FLT3 蛋白結構及訊息傳遞路徑

(A) 蛋白結構。(B) 訊息傳遞路徑。

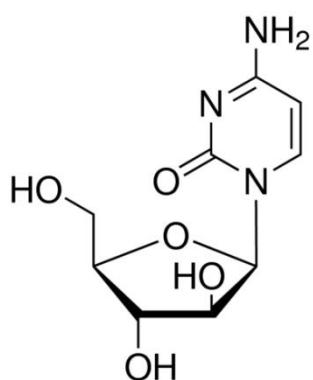
摘自：

Small D. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;178-84.

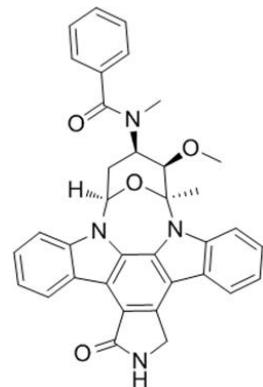
Swords R, Freeman C, Giles F. Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012 Oct; 26(10):2176-85.



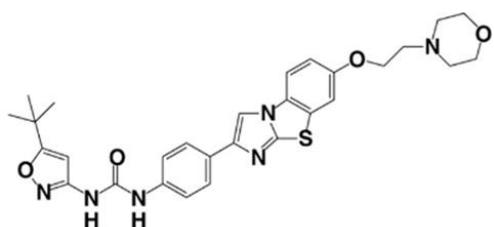
A



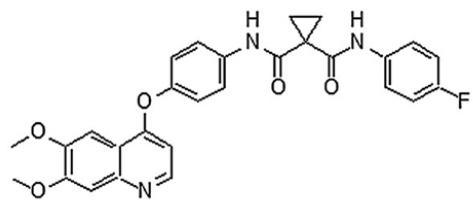
B



C



D



附圖三、各種常用 AML 治療藥物的結構

(A) Cytarabine (AraC)。 (B) Midostaurin (PKC412)。

(C) Quizartinib (AC220)。 (D) Cabozantinib (XL184)。

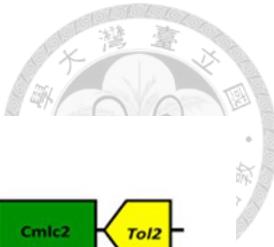
摘自：

Sigma-Aldrich

<https://focusbio.com.au>

Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2009 Oct 1; 114(14):2984-92.

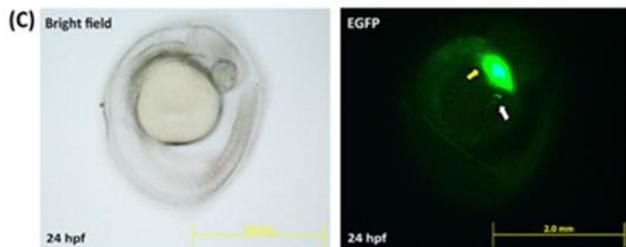
Yakes FM, Chen J, Tan J, et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther*. 2011 Dec; 10(12):2298-308.



A



B



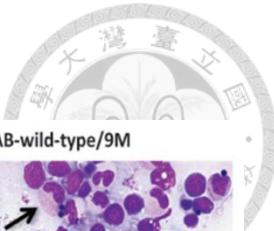
#### 附圖四、Tg(*spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP*)之建構與鑑定

(A) 載體建構圖。Tol2 : Tol2 element ; B1~B4 : Recombination site ; pA : poly A tail ; *spi1* 及 *cmlc2* 分別為骨髓系白血球專一和心臟專一表現的啟動子。

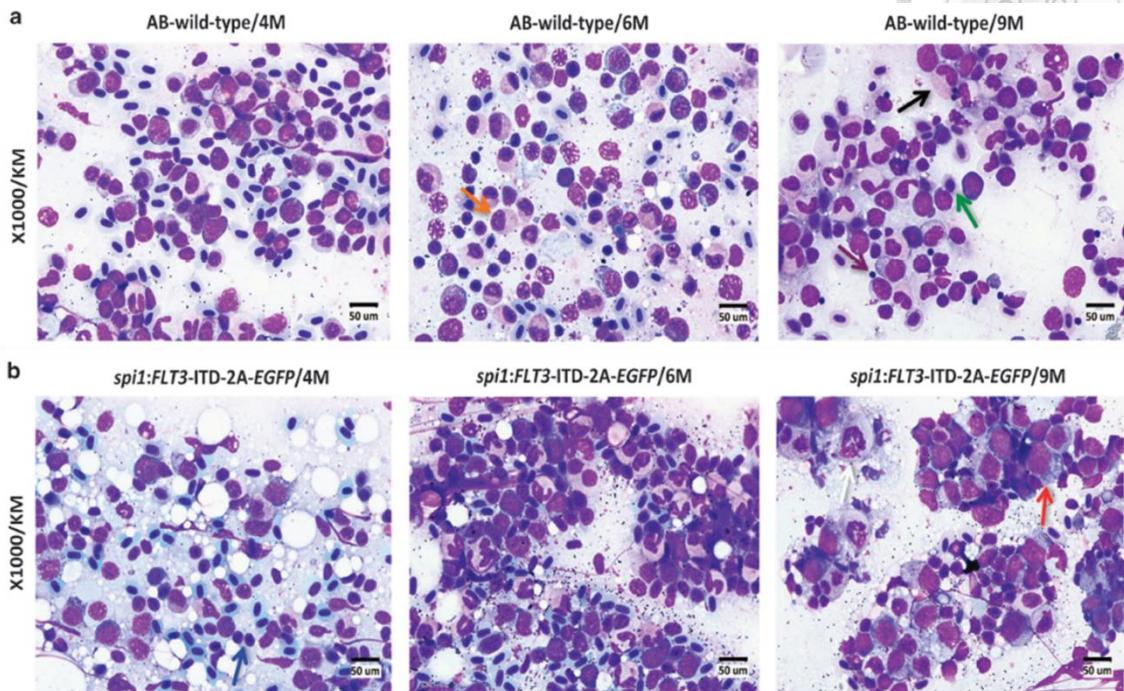
(B) 心臟的綠螢光蛋白

摘自：

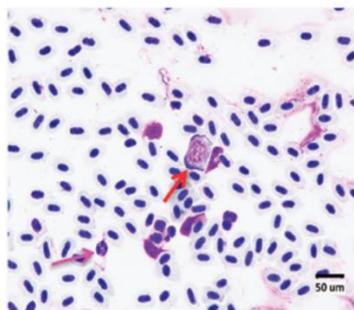
Lu JW, Hou HA, Hsieh MS, et al. Overexpression of FLT3-ITD driven by spi-1 results in expanded myelopoiesis with leukemic phenotype in zebrafish. *Leukemia*. 2016 Oct; 30(10):2098-2101.



A



B

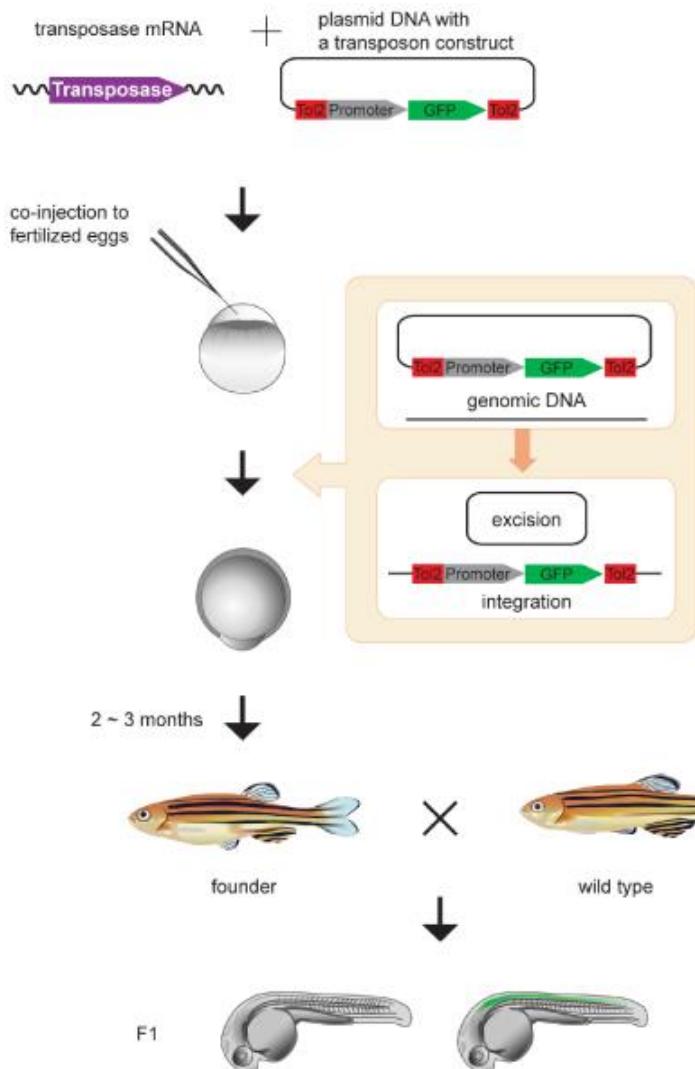


#### 附圖五、*Tg(spi1:FLT3-ITD-2A-EGFP)*腎髓及周邊血血球型態

(A) 四、六和九個月大斑馬魚之腎髓血球型態，在六個月大時即可在腎髓中看到前驅細胞增生。(B) 九個月大斑馬魚之周邊血血球型態，周邊血可見前驅細胞。

摘自：

Lu JW, Hou HA, Hsieh MS, et al. Overexpression of FLT3-ITD driven by *spi-1* results in expanded myelopoiesis with leukemic phenotype in zebrafish. *Leukemia*. 2016 Oct; 30(10):2098-2101.



**附圖六、基因轉殖魚之建立與篩選**

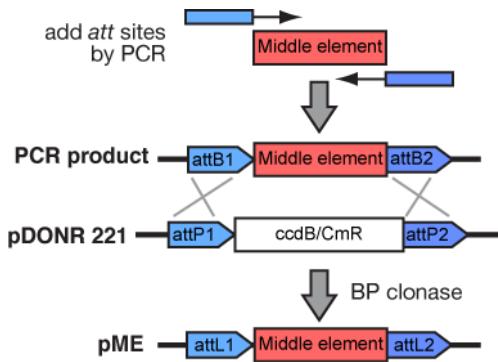
將 Tol2 轉位酶核糖核酸及表現載體顯微注射入一細胞時期之胚胎，成功表現目標基因(圖中以綠螢光基因为挑選基因轉殖魚的依據)為 F0，將 F0 培養至性成熟後和野生型斑馬魚交配，產生出有表現綠螢光基因的子代為 F1。在本實驗中雖然 F1 已可作為實驗對象，但為了提高子代數量，仍將 F1 與野生型斑馬魚交配生出有表現綠螢光基因的子代為 F2，再以其子代 F3 或 F4 進行實驗分析。

**摘自：**

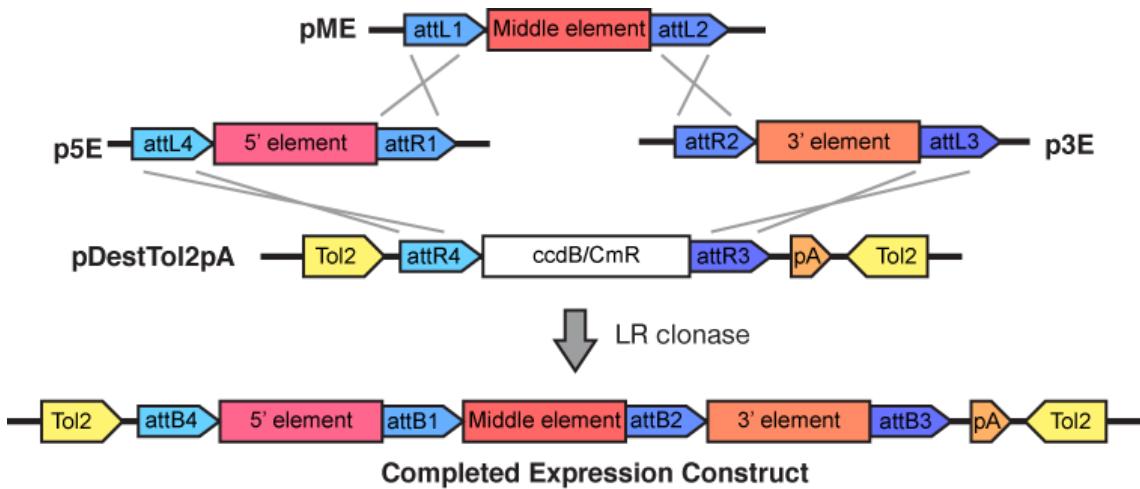
Kawakami K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* 2007; 8 Suppl 1:S7.



A



B



### 附圖七、Multisite Gateway® 之原理與步驟

- (A) 先利用 BP 反應分別構築三個載體，分別為 5'、中間和 3' entry clone 輽體。
- (B) 在利用 LR 反應將三個載體構築成最終表現載體。

摘自：

[http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Basic\\_Gateway\\_principles](http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Basic_Gateway_principles)

## 附表



**Table S2 Morphological analysis of blood cell types in the kidney marrow from 9 months old *FLT3*-ITD and *NPM1*-Mut transgenic fish compared with wild-type**

	Myeloid progenitors (blasts/blast-like; %)	Myelomonocyte/ Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Immature erythroid (%)	Mature erythroid (%)	M:E ratio
9M-wild-type #1	5.33	35.67	17.67	13.00	28.33	3.15:1
9M-wild-type #2	6.00	33.00	11.30	12.00	37.67	3.25:1
9M-wild-type #3	6.67	44.33	12.00	12.33	24.67	4.14:1
9M-wild-type #4	5.67	42.33	17.33	13.00	21.67	3.69:1
9M-wild-type #5	5.00	43.00	13.67	11.00	27.33	4.36:1
9M-wild-type (n=5)	5.73±0.64	39.67±5.01	14.39±2.97	12.27±0.83	27.93±6.03	3.72:1±0.53
9M- <i>NPM1</i> -Mut #1	7.67	44.33	10.33	10.00	27.67	5.20:1
9M- <i>NPM1</i> -Mut #2	6.00	44.00	12.33	12.00	25.67	4.17:1
9M- <i>NPM1</i> -Mut #3	4.33	44.67	10.67	10.00	30.33	4.90:1
9M- <i>NPM1</i> -Mut #4	5.00	43.33	12.67	12.33	26.67	3.92:1
9M- <i>NPM1</i> -Mut #5	8.33	33.67	9.33	9.00	39.67	4.67:1
9M- <i>NPM1</i> -Mut (n=5)	6.27±1.71	42.00±4.68	11.07±1.40	10.67±1.43	30.00±5.68	4.57:1±0.52
9M- <i>FLT3</i> -ITD #1	7.33	38.67	18.67	11.00	24.33	4.18:1
9M- <i>FLT3</i> -ITD #2	21.00	35.00	13.00	9.00	22.00	6.22:1
9M- <i>FLT3</i> -ITD #3	15.67	38.33	12.33	10.00	23.67	5.40:1
9M- <i>FLT3</i> -ITD #4	16.33	38.67	13.67	9.33	22.00	5.50:1
9M- <i>FLT3</i> -ITD #5	18.00	43.00	15.00	9.00	15.00	6.78:1
9M- <i>FLT3</i> -ITD #6	37.33	30.67	13.33	6.00	12.67	11.33:1
9M- <i>FLT3</i> -ITD (n=6)	19.28±9.95**	37.39±4.16	14.33±2.30	9.06±1.68*	19.95±4.88*	6.57:1±2.49**

### 附表一、Tg(*spi1*:*FLT3*-ITD-2A-EGFP)腎髓抹片之血球數量

Tg(*spi1*:*FLT3*-ITD-2A-EGFP)在九個月大時六隻中有兩隻達 AML 診斷標準。

摘自：

Lu JW, Hou HA, Hsieh MS, et al. Overexpression of *FLT3*-ITD driven by *spi-1* results in expanded myelopoiesis with leukemic phenotype in zebrafish. *Leukemia*. 2016 Oct; 30(10):2098-2101.