



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I723562 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：108135728

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 02 日

(51)Int. Cl. : *C12N5/18 (2006.01)* *A01K67/027 (2006.01)*
C12N15/01 (2006.01) *A61P1/16 (2006.01)*
A61K45/00 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)
 高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：許世賢 HSU, SHIH HSIEN (TW)；王麗婷 WANG, LI TING (TW)；王森稔 WANG, SHEN NIEN (TW)；劉奎延 LIU, KWEI YAN (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

許世賢等，探討表觀調節基因 PCAF 對致癌基因轉錄體 ISX-Brd4-RNapolIII 在肝癌微環境及轉移上之調控機轉及臨床預後之觀察，科技部補助專題研究計畫成果報告，107 年 10 月 22 日。[online] <https://www.grb.gov.tw/search/planDetail?id=12019621>

Shen-Nien Wang et al., Intestine-specific homeobox (ISX) upregulates E2F1 expression and related oncogenic activities in HCC. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36924-36939.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：3 項 圖式數：6 共 27 頁

(54)名稱

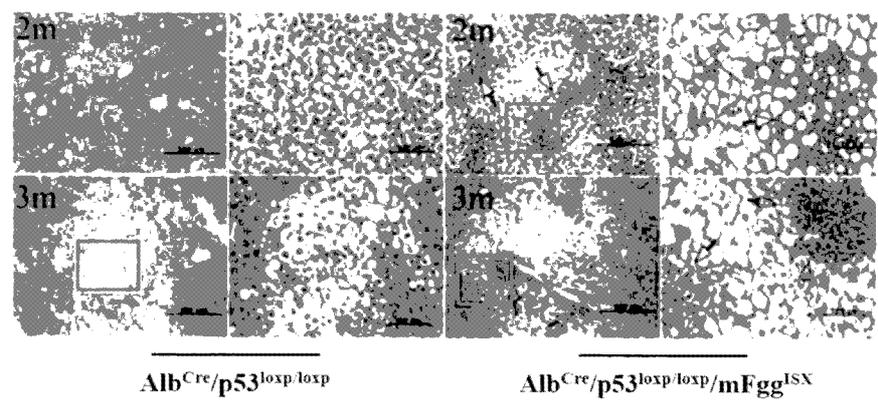
肝病變的小鼠模式的製備方法及其應用

(57)摘要

本發明係揭示一種肝病變之小鼠模式的製備方法，其步驟包含：將一肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠和一肝特異性 p53 基因剔除小鼠進行交配，以獲得一肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠，其中該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠餵食高熱量飼料後，以誘發肝病變。本發明亦揭露一種利用該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠來篩選治療肝病變藥物的方法。

The present invention discloses a method for producing a liver lesion-mouse model, steps of which include: mating a liver-specific ISX gene transgenic mouse with a liver-specific p53 knockout mouse to obtain a liver-specific ISX gene expression and p53 gene knockout transgenic mouse, wherein the liver-specific ISX gene expression and p53 gene knockout transgenic mouse is fed with the high calorie diet to induce liver lesion. The present invention also discloses a method for screening for a drug for treating liver lesion by using the liver-specific ISX gene expression and p53 gene knockout transgenic mouse.

指定代表圖：



第 4 圖

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

肝病變的小鼠模式的製備方法及其應用/METHOD FOR PRODUCING A LIVER LESION-MOUSE MODEL AND USE THEREOF

【中文】

本發明係揭示一種肝病變之小鼠模式的製備方法，其步驟包含：將一肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠和一肝特異性 p53 基因剔除小鼠進行交配，以獲得一肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠，其中該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠餵食高熱量飼料後，以誘發肝病變。本發明亦揭露一種利用該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠來篩選治療肝病變藥物的方法。

【英文】

The present invention discloses a method for producing a liver lesion-mouse model, steps of which include: mating a liver-specific ISX gene transgenic mouse with a liver-specific p53 knockout mouse to obtain a liver-specific ISX gene expression and p53 gene knockout transgenic mouse, wherein the liver-specific ISX gene expression and p53 gene knockout transgenic mouse is fed with the high calorie diet to induce liver lesion. The present invention also discloses a method for screening for a drug for treating liver lesion by using the liver-specific ISX gene expression and p53 gene knockout transgenic mouse.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 4 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

肝病變的小鼠模式的製備方法及其應用/ METHOD FOR PRODUCING A LIVER LESION-MOUSE MODEL AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種肝病變的小鼠模式的製備方法，特別是讓一基因轉殖小鼠的肝臟特異表現 ISX 基因並 p53 基因被剔除，而使該基因轉殖小鼠餵食高熱量飼料後會誘發肝病變。

【先前技術】

【0002】 肝癌為世界上罹患率排行第六，死亡率排行第三位，其主要原因是太晚才被診斷出罹患肝癌。在台灣，其發生常與病毒感染（HBV 及 HCV）、環境、飲食、污染物及藥物使用有關，在歐美，則主要與高熱量飲食所誘發的脂肪肝臟堆積有關。目前，除早期發現早期手術治療外，並沒有其它較有效的治療藥物及方法。近年來，受到台灣飲食西化的影響，脂肪肝（Steatosis）亦成為一些慢性代謝性疾病及肝癌的主要原因。非酒精性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）是一種常見的慢性肝臟疾病，其疾病範圍從脂肪過度囤積肝臟到肝硬化，此一慢性肝臟疾病並經常導致肝癌的發生。雖然，高熱量飲食攝取，肥胖，代謝失調和各種各樣的發炎反應均被認為是在該疾病發展過程中發揮促進作用，但是，NAFLD 導致慢性肝臟疾病及肝癌的發病機制仍然大部分為未知，亦無相關生物標記可供使用。

【0003】 同源箱基因-ISX 是一個小腸專一性表現之箱型基因，此轉錄因子可經由發炎因子 (IL-6) 所誘發並且高量表現在肝癌細胞及病人組織中。在細胞核中，ISX 經由直接結合下游細胞週期因子 (cyclin D1 及 E2F1) 之啟動子，調控下游與細胞週期相關基因表現，調控癌細胞的增生並與病人之生存時間、腫瘤大小及腫瘤期別有著緊密的調控關係。此外，生活環境中之環境汙染物暴露會經由其上游之調控基因-AHR 的作用藉由誘發 ISX 箱型基因及表觀基因的表現，引發及加劇肝癌。同時，ISX 在肝癌細胞的表現亦可經由調控免疫檢查點及色胺酸代謝相關基因的調控抑制宿主本身的免疫系統，促使肝癌細胞進一步生長及轉移。

【0004】 因此，為了肝臟疾病的研究和治療，一個肝臟疾病的動物模式的建立是必須的。

【發明內容】

【0005】 本發明利用 mFgg-ISX 小鼠與 Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠進行交配，產生子代的 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠。該 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠為一種肝特異性 ISX 基因表現且剔除 p53 基因轉殖鼠，且經實驗發現該 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠因高熱量飲食攝取會快速誘發該小鼠體內的脂肪肝，進而導致肝慢性纖維化，最後發展成肝癌等肝臟疾病。此外，在該小鼠的肝臟疾病發展的同時，類似人類肝病相關之代謝性疾病亦伴隨產生。

【0006】 故該 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠是一個透過高熱量飲食攝取誘發脂肪肝、肝慢性肝疾病及肝癌的動物模式。

【0007】 本文中的用語「一」或「一種」係用以敘述本發明之元件及成分。此術語僅為了敘述方便及給予本發明之基本觀念。此敘述應被理解為包括一種或至少一種，且除非明顯地另有所指，表示單數時亦包括複數。於申請專利範圍中和”包含”一詞一起使用時，該用語「一」可意謂一個或超過一個。

【0008】 本發明提供一種肝病變的小鼠模式的製備方法，其步驟包含：(a) 將一小鼠胚胎，其具有經顯微注射入的一受肝特異性啟動子驅動之 ISX 基因，轉殖到同品系母鼠中使該小鼠胚胎發育成鼠；(b) 從 (a) 步驟所獲得的成鼠利用基因檢測方法分析篩選出帶有 ISX 基因之陽性小鼠，以得到一肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠；以及 (c) 將該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠和一肝特異性 p53 基因剔除小鼠進行交配，以獲得一肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠。

【0009】 本文所使用的「肝病變」係指肝臟細胞因某些因素受傷或被破壞，造成肝臟的病變，進而可能導致肝臟機能受到影響。一般來說，該肝病變發展的過程中會出現許多肝臟疾病，例如新陳代謝異常性肝病、慢性肝疾病、脂肪肝、肝纖維化、肝硬化和肝癌等。因此，本發明之肝病變的小鼠模式為一種與肝病變發展中相關疾病的小鼠模式，可以用於研究肝病變發展病程中的相關疾病，例如脂肪肝轉變成肝纖維化或肝癌的機轉。故於一具體實施例中，該與肝病變發展中相關疾病包含新陳代謝異常性肝病、慢性肝疾病、脂肪肝、肝纖維化、肝硬化和肝癌。

【0010】 於一具體實施例中，該肝病變為一由高熱量飼料所誘發的肝

病變。本發明的該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠，在經過高熱量飼料餵食後，會造成肝臟的脂肪堆積，進而造成肝病變。因此，高熱量飼料餵食會誘發該基因轉殖小鼠的脂肪肝、肝纖維化、甚至發展成肝癌等肝臟疾病。故該基因轉殖小鼠經過高熱量飼料餵食後，會誘發該基因轉殖鼠的肝病變的病程發展。於一較佳具體實施例中，該肝病變的小鼠模式為一高熱量飼料所誘發的肝病變的小鼠模式。於一更佳具體實施例中，該肝病變的小鼠模式為一高熱量飼料所誘發的與肝病變發展中相關疾病的小鼠模式。

【0011】 於另一具體實施例中，該高熱量飼料包含一高脂飼料、一高醣飼料、一高脂高醣飼料或一高膽固醇飼料。於一較佳具體實施例中，該高熱量飼料為一高脂飼料。於另一具體實施例中，該高脂飼料之脂肪、該高醣飼料之醣類，或該高脂高醣飼料之脂肪及醣類係佔總熱量 40-80%。於一較佳具體實施例中，該高脂飼料之脂肪、該高醣飼料之醣類，或該高脂高醣飼料之脂肪及醣類係佔總熱量 60-80%。

【0012】 本文所使用的「肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠」係指在肝臟會特異表現 ISX 基因的小鼠。由於該小鼠的 ISX 基因的前端加入一段肝特異性啟動子，故使 ISX 基因能特異性表現在肝臟上。於一具體實施例中，該肝特異性啟動子包含 mFgg 和 Alb。於一較佳具體實施例中，該肝特異性啟動子為 mFgg。故於另一具體實施例中，該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠為一 mFgg 所驅動之肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠；或稱為 mFgg-ISX 小鼠。

【0013】 本發明的該肝病變的小鼠模式的製備方法中 (b) 步驟進一

步包含一 (b1) 步驟，其位於 (c) 步驟前，包含將該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠與野生型 (wild type) 同品系小鼠互相交配，以產出 F0 小鼠，再次以基因檢測方法篩選出 F0 小鼠中帶有 ISX 基因之陽性 F0 小鼠，以得到一肝特異性 ISX 基因轉殖 F0 小鼠。(b1) 步驟的目的在於確保該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠的特性 (即在肝臟中特異性表達 ISX 基因) 遺傳到下一代 (例如 F0 小鼠)。

【0014】 因此，不管是(b)步驟的帶有 ISX 基因之陽性小鼠或是(b1)步驟的帶有 ISX 基因之陽性 F0 小鼠都可以進一步利用基因檢測方法分析確認 ISX 基因在肝臟中特異性表現，以確認都是該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠。因此，(c) 步驟前中的該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠可用該肝特異性 ISX 基因轉殖 F0 小鼠替代，因為用該肝特異性 ISX 基因轉殖 F0 小鼠與該肝特異性 p53 基因剔除小鼠進行交配，同樣也可以獲得該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠。

【0015】 本文所使用的「肝特異性 p53 基因剔除小鼠」係指在肝臟 p53 基因特異性被剔除的小鼠。該肝特異性 p53 基因剔除小鼠可以透過肝特異性啟動子去啟動 Cre 酵素特異性切除具有 loxp 的 p53 基因序列，以達到在肝臟特異性剔除 p53 基因之目的。於一具體實施例中，該肝特異性啟動子包含 mFgg 和 Alb。於一較佳具體實施例中，該肝特異性啟動子為 Alb。於另一具體實施例中，該肝特異性 p53 基因剔除小鼠為 Alb 所驅動之肝特異性 p53 基因剔除小鼠；或稱為 Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠。

【0016】 因此，該肝特異性 p53 基因剔除小鼠的製備方法為：將

Alb-Cre 基因轉殖小鼠與 $p53^{loxP/loxP}$ 基因轉殖小鼠互相交配，以產出 Alb-Cre- $p53^{loxP/loxP}$ 之 $p53$ 同核型 (homozygous) 基因轉殖小鼠，即為肝特異性 $p53$ 基因剔除小鼠。

【0017】 Alb-Cre 基因轉殖小鼠的製備方法之步驟包含：(e) 將一小鼠胚胎，其具有經顯微注射入的一 Alb-Cre 基因，轉殖到同品系母鼠中使該小鼠胚胎發育成鼠；以及 (f) 從 (e) 步驟所獲得的成鼠利用基因檢測方法分析篩選出帶有 Alb 基因之陽性小鼠，以得到一 Alb-Cre 基因轉殖小鼠。此外，(f) 步驟進一步包含一 (f1) 步驟，包含將該 Alb-Cre 基因轉殖小鼠與野生型 (wild type) 同品系小鼠互相交配，以產出 F0 小鼠，再次以基因檢測方法篩選出 F0 小鼠中帶有 Alb 基因之陽性 F0 小鼠，以得到一 Alb-Cre 基因轉殖 F0 小鼠。(f1) 步驟的目的在於確保該 Alb-Cre 基因轉殖小鼠的特性 (即在肝臟中特異性表達 Alb 基因) 能遺傳到下一代 (例如 F0 小鼠)。

【0018】 因此，不管是 (f) 步驟的帶有 Alb 基因之陽性小鼠或是 (f1) 步驟的帶有 Alb 基因之陽性 F0 小鼠都可以進一步利用基因檢測方法分析確認 Alb 基因在肝臟中特異性表現，以確認都是該 Alb-Cre 基因轉殖小鼠。

【0019】 $p53^{loxP/loxP}$ 基因轉殖小鼠的製備方法之步驟包含：(g) 將一小鼠胚胎，其具有 loxP 序列的 $p53$ 基因，轉殖到同品系母鼠中使其發育成鼠；以及 (h) 從 (g) 步驟所獲得的成鼠利用基因檢測方法分析篩選出帶有 $p53^{loxP/loxP}$ 基因之陽性小鼠，以得到一 $p53^{loxP/loxP}$ 基因轉殖小鼠。此外，(h) 步驟進一步包含一 (h1) 步驟，包含將該 $p53^{loxP/loxP}$ 基因轉殖小鼠與同品系小鼠進行交配，以產出 F0 小鼠，再次以基因檢測方法篩選出 F0 小鼠中帶

有 $p53^{loxp/loxp}$ 基因之陽性 F0 小鼠，以得到一 $p53^{loxp/loxp}$ 基因轉殖 F0 小鼠。(h1) 步驟的目的在於是確保該 $p53^{loxp/loxp}$ 基因轉殖小鼠的特性能遺傳到下一代（例如 F0 小鼠）。

【0020】 因此，不管是 (h) 步驟的帶有 $p53^{loxp/loxp}$ 基因之陽性小鼠或是 (h1) 步驟的帶有 $p53^{loxp/loxp}$ 基因之陽性 F0 小鼠都可以進一步利用基因檢測方法以確認都是該 $p53^{loxp/loxp}$ 基因轉殖小鼠。

【0021】 於一具體實施例中，該基因檢測方法包含 PCR 和 RT-PCR。

【0022】 將該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠和該肝特異性 $p53$ 基因剔除小鼠進行交配後，就可獲得該肝特異性 ISX 基因表現且 $p53$ 基因剔除的基因轉殖小鼠。該肝特異性 ISX 基因表現且 $p53$ 基因剔除的基因轉殖小鼠的肝臟會特異性表現 ISX 基因，但 $p53$ 基因不存在；因此造成該基因轉殖小鼠在經過高熱量飼料餵食後，會出現脂肪肝、肝纖維化，甚至肝癌等肝臟疾病。故該肝特異性 ISX 基因表現且 $p53$ 基因剔除的基因轉殖小鼠可用於研究高熱量飼料所引起的肝病變或肝臟疾病的病程，包含新陳代謝異常性肝病、慢性肝疾病、脂肪肝、肝纖維化、肝硬化和肝癌等。

【0023】 於一具體實施例中，該基因轉殖小鼠的品系包含 C57BL/6、Balb/c 和 FVB/N。

【0024】 本發明亦提供一種篩選出治療肝病變的藥物之方法，其包含以下步驟：(1) 提供一患有肝病變的肝特異性 ISX 基因表現且 $p53$ 基因剔除的基因轉殖小鼠，其中該肝特異性 ISX 基因表現且 $p53$ 基因剔除的基因

轉殖小鼠係由一肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠和一肝特異性 p53 基因剔除小鼠交配後而得，且該肝臟特異性 ISX 基因表現且剔除 p53 基因轉殖小鼠經過高熱量飼料餵食後會出現肝病變的症狀；(2) 將一候選藥物給予步驟(1)之該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠；以及(3)觀察和分析該候選藥物對該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠之肝病變的治療情況，當該肝臟特異性 ISX 基因表現且剔除 p53 基因轉殖小鼠之肝病變有效改善時，判斷該候選藥物是一能夠治療肝病變的藥物。

【0025】 於一具體實施例中，該肝病變包含一與肝病變發展中相關疾病。於一較佳具體實施例中，該與肝病變發展中相關疾病包含新陳代謝異常性肝病、慢性肝疾病、脂肪肝、肝纖維化、肝硬化和肝癌。

【0026】 於另一具體實施例中，該肝病變為一由高熱量飼料所誘發的肝病變。於一較佳具體實施例中，該肝病變包含一高熱量飼料所誘發與肝病變發展中相關疾病。

【0027】 於一具體實施例中，該高熱量飼料包含一高脂飼料、一高醣飼料、一高脂高醣飼料或一高膽固醇飼料。於一較佳具體實施例中，該高熱量飼料為一高脂飼料。於另一具體實施例中，該高脂飼料之脂肪、該高醣飼料之醣類，或該高脂高醣飼料之脂肪及醣類係佔總熱量 40-80%。於一較佳具體實施例中，該高脂飼料之脂肪、該高醣飼料之醣類，或該高脂高醣飼料之脂肪及醣類係佔總熱量 60-80%。

【0028】 此外，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉

殖小鼠餵食該高熱量飼料 1 個月後會出現脂肪肝的症狀，餵食 2 個月會出現嚴重脂肪肝和肝纖維化等症狀，而餵食 3 個月後會出現嚴重肝纖維化，甚至會有肝癌的發生。因此，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠在餵食該高熱量飼料 1 個月後就會出現各種肝臟疾病，利於研究人員測試各種治療肝臟疾病的藥物，例如治療脂肪肝的藥物或是治療癌症的藥物。

【0029】 於一具體實施例中，該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠為一肝特異性啟動子所啟動之肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠。於一較佳具體實施例中，該肝特異性啟動子包含 mFgg 和 Alb。於一更佳具體實施例中，該肝特異性啟動子為 mFgg。因此，該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠為 mFgg 所啟動之肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠。

【0030】 於另一具體實施例中，該肝特異性 p53 基因剔除小鼠為一肝特異性啟動子所啟動之肝特異性 p53 基因剔除小鼠。於一較佳具體實施例中，該肝特異性啟動子包含 mFgg 和 Alb。於一更佳具體實施例中，該肝特異性啟動子為 Alb。因此，該肝特異性 p53 基因剔除小鼠為 Alb 所啟動之肝特異性 p53 基因剔除小鼠。

【0031】 於一具體實施例中，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠的品系包含 C57BL/6、Balb/c 和 FVB/N。

【0032】 在本發明相關領域下習知的治療方法中，該候選藥物是透過許多不同途徑給予至該肝臟特異性 ISX 基因表現且剔除 p53 基因轉殖小鼠。在一些實施例中，該候選藥物的給予方法包含外用、靜脈、肌肉、皮

下、局部、口服吸入或腹腔給予。該候選藥物將會透過消化及循環系統被傳遞到目標處。

【0033】 如本文所使用的，術語「治療」是指緩解症狀或併發症；延緩疾病、病症或病情的進展；減輕或緩解症狀和併發症；及/或治癒或消除疾病，病症或病情。

【0034】 本發明另外提供一種肝病變小鼠模式，其包含：一肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠，其中該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠經過高熱量飼料餵食後，會出現肝病變。

【0035】 於一具體實施例中，該肝病變包含一與肝病變發展中相關疾病。於一較佳具體實施例中，該與肝病變發展中相關疾病包含新陳代謝異常性肝病、慢性肝疾病、脂肪肝、肝纖維化、肝硬化和肝癌。

【0036】 於另一具體實施例中，該肝病變為由高熱量飼料所誘發的肝病變。於一較佳具體實施例中，該肝病變包含一高熱量飼料所誘發與肝病變發展中相關疾病。

【0037】 該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠處於成鼠階段時，開始餵食高熱量飼料，餵食 1 個月後，會開始出現脂肪肝，餵食 2 個月後會出現肝纖維化、新陳代謝異常性肝病和慢性肝疾病等疾病；餵食 3 個月後，甚至出現肝癌。於一具體實施例中，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠接受至少一個月的高熱量飼料餵

食。於一較佳具體實施例中，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠接受至少兩個月的高熱量飼料餵食。於一更佳具體實施例中，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠接受至少三個月的高熱量飼料餵食。

【0038】 此外，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠餵食高熱量飼料 2 個月後，其血液當的血糖會異常的增加，也會出現胰島素阻抗的現象。

【0039】 於一具體實施例中，該高熱量飼料包含一高脂飼料、一高醣飼料、一高脂高醣飼料或一高膽固醇飼料。於一較佳具體實施例中，該高熱量飼料為一高脂飼料。

【0040】 於另一具體實施例中，該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠係由一肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠和該肝特異性 p53 基因剔除小鼠交配而得。

【0041】 本發明的肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠的優勢在於：相較於目前的高脂飼料誘發脂肪肝的小鼠模式都至少需要餵食 17 週以上才會出現脂肪肝，本發明的該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠則只要餵食高脂飼料 1 個月（約 4 週）就會出現脂肪肝的症狀；故本發明可以大大減少高脂飼料誘發小鼠脂肪肝所需時間。此外，高熱量飲食攝取可快速誘發肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠脂肪肝，慢性纖維化並進一步發展成肝癌等肝臟疾病發展；且在該基因轉殖小鼠肝臟疾病發展的同時，類似人類肝病相關之代

謝性疾病亦伴隨產生。故本發明的小鼠模式將來可提供多重用途的使用，如探討脂肪肝導致肝癌之機轉、發現早期肝疾病生物因子及發展肝疾病相關藥物治療之動物模式，提供可能的新治療方法及高熱量飲食對肝疾病發展的影響。

【圖式簡單說明】

【0042】 第 1 圖為 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠之製備交配流程。

【0043】 第 2 圖為誘發 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠產生脂肪肝與肝癌之時間表。

【0044】 第 3 圖為收集於高脂飼料 (HFD) 餵食期間之不同時間點的小鼠體重及血液進行不同生理參數之分析。第 3A 圖顯示隨著 HFD 餵食時間的增加，與同胎之正常小鼠比較，mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠的體重亦隨著餵食時間而顯著增加；同時肝臟亦隨著餵食時間而明顯變大。第 3B 圖顯示血液中之脂質相關代謝物三酸甘油酯 (Triglyceride; TG) 亦隨著 HFD 餵食時間增加 (從 0 個月 (0 M)、1 個月 (1 M)、2 個月 (2 M) 到 3 個月 (3 M)) 而顯著增加。Core: C 型肝炎病毒核心蛋白 (HCV core protein) 之基因轉殖鼠；WT: 野生型小鼠；ISX: mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠；控制組: 野生型小鼠；ISX^{Tg}: mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠。

【0045】 第 4 圖顯示 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠在餵食高脂飼料 (HFD) 飲食 2 個月後，肝臟即有嚴重的脂肪肝外，亦有初步的肝纖維

化現象 (Fibrosis)。在 HFD 餵食到第 3 個月時，肝臟除了嚴重的肝纖維化外，亦有肝癌的發生。2m：2 個月；3m：3 個月。Alb^{Cre}/p53^{loxp/loxp}：Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠；Alb^{Cre}/p53^{loxp/loxp}/mFgg^{ISX}：mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠。

【0046】 第 5 圖為 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠在餵食高脂飼料 (HFD) 飲食 2 個月後，利用油滴染色試驗 (oil red stain) 發現肝臟即有嚴重的脂肪堆積。2M:2 個月;3M:3 個月。Alb^{Cre}/p53^{loxp/loxp}:Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠；Alb^{Cre}/p53^{loxp/loxp}/mFgg^{ISX}：mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠。

【0047】 第 6 圖為收集於高脂飼料 (HFD) 餵食期間之不同時間點的小鼠血液進行不同生理參數之分析。第 6A 圖顯示隨著 HFD 餵食時間的增加，與同胎之正常小鼠比較，mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠的血糖呈現異常變化。第 6B 圖顯示隨著 HFD 餵食時間的增加，與同胎之正常小鼠比較，mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠的胰島素呈現異常變化。Wild：野生型小鼠；ISX：mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠；F：母鼠；M：公鼠。

【實施方式】

【0048】 本發明包括但不限於上述與下開之說明。實施方法則如下範例所示。

【0049】 方法：

【0050】 (1) mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠的製備方法

【0051】 肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠係由國家實驗動物中心 (台北，

台灣) 所獲得。該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠的製備方法包含：(1) 將一小鼠胚胎，其經顯微注射入一 mFgg 啟動子 (肝臟特異性啟動子) 所驅動之 ISX 基因，轉殖到同品系母鼠中使該小鼠胚胎發育成鼠；以及 (2) 該些成鼠利用 PCR 分析篩選出帶有 ISX 基因之陽性小鼠，以得到該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠。或者是，該帶有 ISX 基因之陽性小鼠再與野生型同品系小鼠互相交配，以產出 F0 小鼠，再利用 PCR 方法篩選出帶有 ISX 基因之陽性 F0 鼠，同樣可以得到肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠。上述所得的該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠可利用 RT-PCR 再次分析確認該肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠的肝臟有特異性表現 ISX 基因。將肝特異性 ISX 基因轉殖小鼠 (mFgg-ISX 小鼠) 與肝特異性 p53 基因剔除雄性小鼠 ($p53^{loxP/-}$; Alb^{cre}) (Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠) 雜交以產生所需的基因型，即肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠 (mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠)。藉由標準基因分型技術 (genotyping techniques) 證實用於實驗的轉殖基因小鼠具有所需的基因型。

【0052】 另外，該肝特異性 p53 基因剔除小鼠的製備方法為將 Alb-Cre 小鼠與 p53^{loxp/loxp} 小鼠互相交配至產生出 Alb-Cre/p53^{loxp/loxp} 之 p53 同核型 (homozygous) 小鼠，即為肝特異性 p53 基因剔除小鼠。

【0053】 Alb-Cre 小鼠的製備方是為：(1) 將一小鼠胚胎，其經顯微注射入一 Alb-Cre 基因，轉殖到同品系母鼠中使該小鼠胚胎發育成鼠；以及 (2) 該些成鼠利用 PCR 分析篩選帶有 Alb 基因之陽性小鼠，以得到 Alb-Cre 小鼠。或者是帶有 Alb 基因之陽性小鼠再與野生形同品系小鼠互相交配，

以生成 F0 小鼠，再次以 PCR 方法篩選出 F0 小鼠中 Alb 基因呈現陽性之基因轉殖鼠，即 Alb-Cre 小鼠。上述所得到的 Alb-Cre 小鼠都可以再利用 RT-PCR 分析確認 Alb-Cre 小鼠的肝臟有表現 Alb 基因。

【0054】 p53^{loxp/loxp} 小鼠的製備方法：(1) 將具有 loxp 序列的 p53 基因的小鼠胚胎轉殖到同品系母鼠中，使該小鼠胚胎發育成鼠；以及 (2) 利用 PCR 分析篩選出其基因帶有 p53^{loxp/loxp} 之小鼠，以得到 p53^{loxp/loxp} 同核型基因轉殖小鼠。或者是該 p53^{loxp/loxp} 小鼠再與同品系小鼠互相交配，產出 F0 小鼠，再次以 PCR 方法篩選出 F0 小鼠中帶有 p53^{loxp/loxp} 基因之基因轉殖小鼠，即 p53^{loxp/loxp} 小鼠。上述所得到的 p53^{loxp/loxp} 小鼠都可以再利用 RT-PCR 再次分析確認。

【0055】 (2) 三酸甘油酯分析

【0056】 本發明係使用 Biovision 公司的小鼠三酸甘油酯 (Triglyceride ; TG) 的酵素連結免疫分析法 (ELISA) 試劑盒，並根據製造商的說明書進行實驗。從老鼠心臟採血後取得血清，經離心分離後得一上清液，然後對該上清液進行三重複的 ELISA 實驗。本發明參考由 ELISA 試劑盒中提供的純化的三酸甘油酯的標準曲線計算甘油三酯濃度。

【0057】 (3) 蘇木精-伊紅染色 (Hematoxylin and eosin stain)

【0058】 對玻片進行脫蠟，將該玻片浸泡二甲苯 (xylene) 兩次，每次 10 分鐘；再浸泡絕對酒精 (absolute alcohol) 兩次進行復水 (re-hydrate)，每次 5 分鐘；接著浸泡 95%酒精 2 分鐘，和浸泡 70%酒精 2 分鐘。用蒸餾

水短暫洗滌玻片。在哈里斯氏蘇木精 (Harris hematoxylin) 溶液中染色 8 分鐘。在流動的自來水下洗滌 5 分鐘。在 1% 酸性酒精中去除多餘染色 30 秒。用自來水沖洗 1 分鐘。在 0.2% 氨水或飽和碳酸鋰溶液中轉藍 30 秒至 1 分鐘。在流動的自來水下洗滌 5 分鐘。用 95% 酒精沖洗，10 次浸漬。在伊紅 (eosin) 溶液中反應 30 秒至 1 分鐘進行複染。藉由 95% 酒精進行脫水，浸泡絕對酒精兩次，每次 5 分鐘。浸泡二甲苯 2 次以進行清洗，每次 5 分鐘。使用含有二甲苯的包埋液進行包埋的動作。

【0059】 (4) 油紅 O 染色 (Oil Red O Staining)

【0060】 切下 5-10 μM 厚度的新鮮冷凍組織切片，並包埋在載玻片上。在室溫下以空氣乾燥該載玻片 30-60 分鐘，然後在冰冷的 10% 福馬林中固定 5-10 分鐘。再次以空氣乾燥 30-60 分鐘或立即用蒸餾水沖洗 3 次。讓該載玻片風乾幾分鐘。置於絕對丙二醇 (propylene glycol) 中 2-5 分鐘，以避免將水帶入到油紅 O 中。在 60°C 烘箱內，於預熱的油紅 O 溶液中進行染色 8-10 分鐘。在 85% 丙二醇 (propylene glycol) 溶液中去除多餘染色 2-5 分鐘。用蒸餾水沖洗 2 次。在基氏 (Gill) 或馬氏 (Mayer) 的蘇木精中染色 30 秒。在流動的自來水下徹底清洗 3 分鐘。將該載玻片置於蒸餾水中。用甘油凝膠 (glycerin jelly) 或其他包埋液進行包埋。

【0061】 (5) 統計：

【0062】 本發明的定量結果是以平均值 \pm 標準差來表示，而統計顯著差異是以 student's t 試驗來表示。不同組別之間的變異，利用卡方分析 (chi-squared analysis)、單因子變異分析 (one-way analysis of variance;

ANOVA)和 Fisher's exact 分析， $p < 0.05$ 為有意義。

【0063】 結果：

【0064】 將 mFgg-ISX 小鼠與 Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠交配產生 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠（第 1 圖），接著將 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠飼養至 5 個月大後，開始餵食 60% 的高脂飼料（high fat diet；HFD），分別在餵食後一個月、二個月及三個月時犧牲小鼠，犧牲的時候測量體重、抽取血液即取下小鼠之肝臟組織。第 2 圖為本發明的實驗進行之時程。

【0065】 收集於 HFD 餵食期間之不同時間點的小鼠體重及血液進行不同生理參數之分析，發現隨著 HFD 餵食時間的增加，與同胎之正常小鼠比較，ISX 基因轉殖小鼠的體重顯著增加（第 3A 圖）。同時，血液中之脂質相關代謝物三酸甘油脂（Triglyceride；TG）亦隨著 HFD 餵食時間增加而顯著增加（第 3B 圖）。

【0066】 將收集到餵食 HFD 老鼠之肝臟組織利用蘇木素-伊紅染色（hematoxylin and eosin stain；H&E stain），發現 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠在餵食 HFD 飲食 1 個月後，肝臟即有明顯脂肪肝的現象，在餵食 HFD 2 個月後，肝臟除了有嚴重的脂肪肝外，亦有嚴重的肝纖維化（Fibrosis）及硬化現象。在 HFD 餵食到第 3 個月時，肝臟除了嚴重的肝纖維化外，三分之一的小鼠亦有肝癌的發生（第 4 圖）。最後，利用油滴染色試驗（oil red stain）發現 mFgg-ISX/Alb-Cre-p53^{loxp/loxp} 小鼠在餵食 HFD 飲食 2 個月後，肝臟即有嚴重的脂肪堆積（第 5 圖）。在血液當中血糖會異常的增加；

至於胰島素 (insulin) 的部分，前 2 個月會增加到餵食第 3 個月的時候會出現胰島素阻抗 (insulin resistance) 的現象 (第 6 圖)。

【0067】 本發明適當地描述可以在本文未具體公開的要件或限制下實施。已被用作描述的術語並不是限制。在使用這些術語和除此之外的任何同等物的表達和描述是沒有差別的，但應當認識到本發明內的權利是可能修改的。因此，雖然本發明已說明實施例和其他情況，本文中所公開的內容可以被本領域的技術人員進行修飾和變化，並且這樣的修改和變化被認為是在本發明的權利範圍之內。

【符號說明】

【0068】 無。

【生物材料寄存】

無。

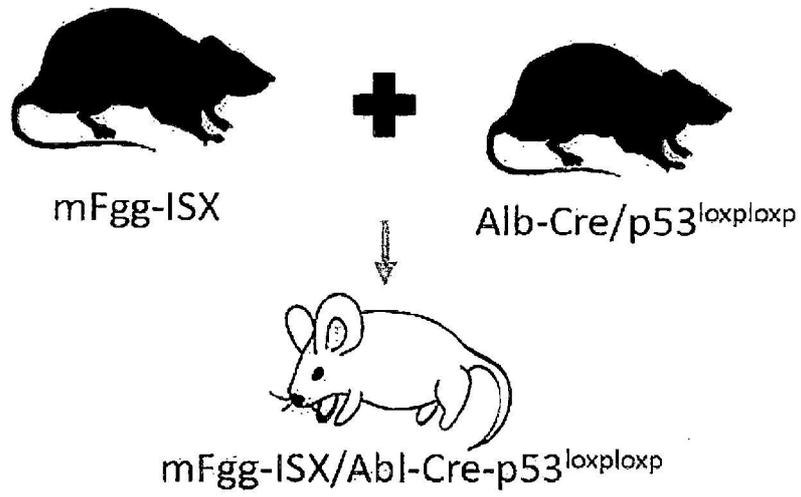
【序列表】 (請換頁單獨記載)

無。

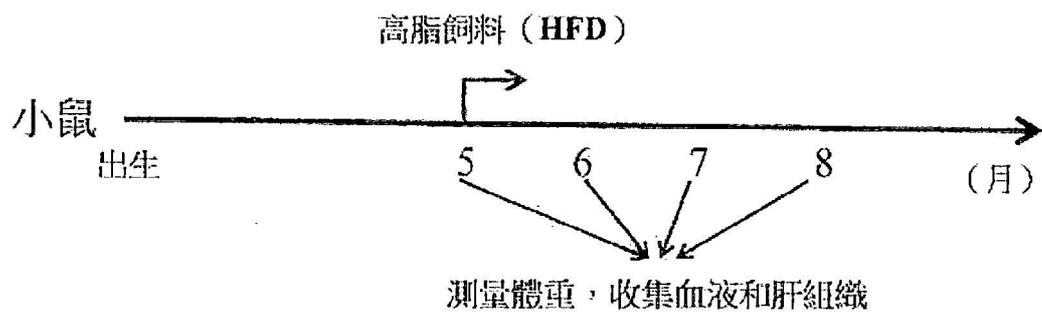
申請專利範圍

1. 一種篩選出治療肝病變的藥物之方法，其包含以下步驟：(1) 提供一具有肝病變的肝特異性腸特異性同源盒 (intestine-specific homeobox, ISX) 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠；(2) 餵食該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠一高熱量飼料以誘發該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠出現肝病變的症狀；(3) 將一候選藥物給予步驟(2)之出現肝病變的症狀的該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠；以及(4) 觀察和分析該候選藥物對該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠之肝病變的治療情況，當該肝特異性 ISX 基因表現且 p53 基因剔除的基因轉殖小鼠之肝病變有效改善時，判斷該候選藥物為一能夠治療肝病變的藥物。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該高熱量飼料包含一高脂飼料、一高醣飼料、一高脂高醣飼料或一高膽固醇飼料。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的方法，其中該肝病變包含脂肪肝、肝纖維化、肝硬化和肝癌。

圖式

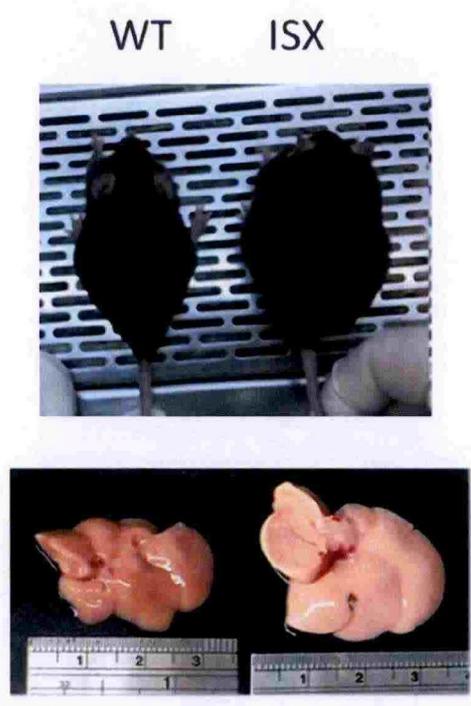


第 1 圖

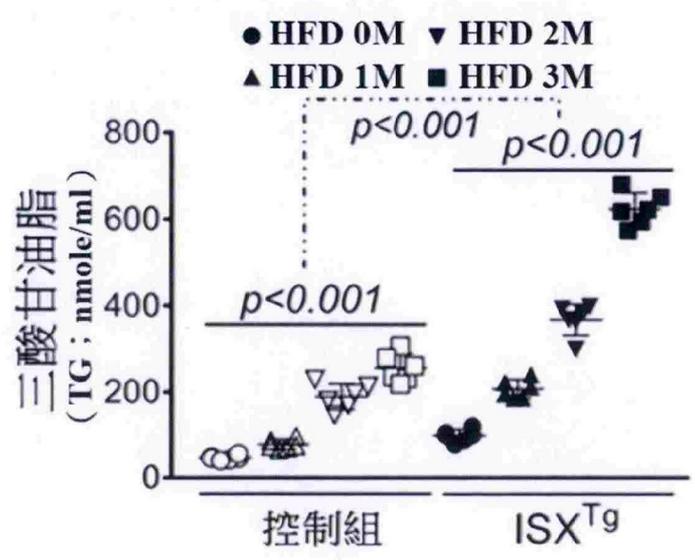


第 2 圖

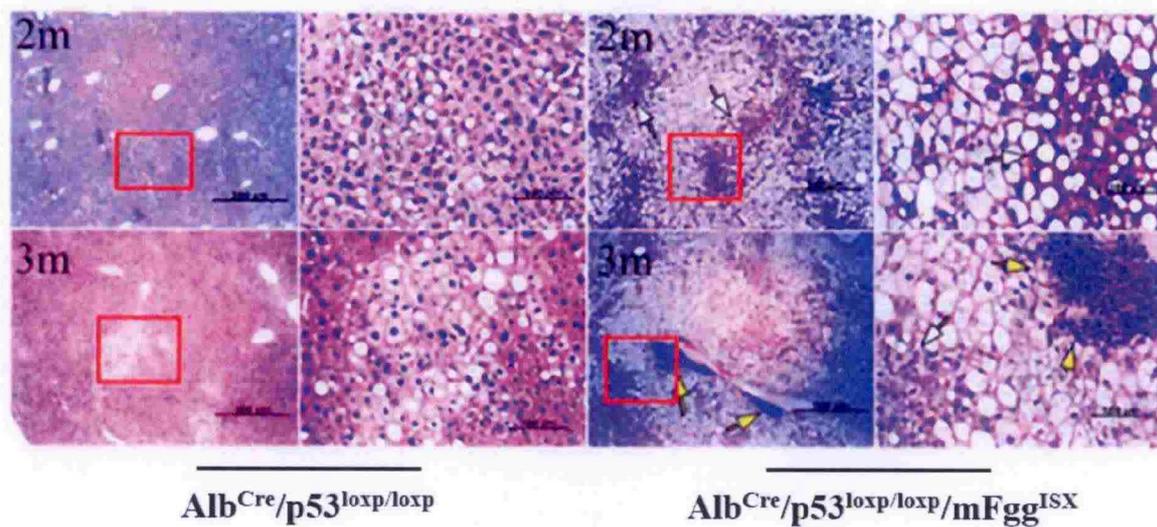
A



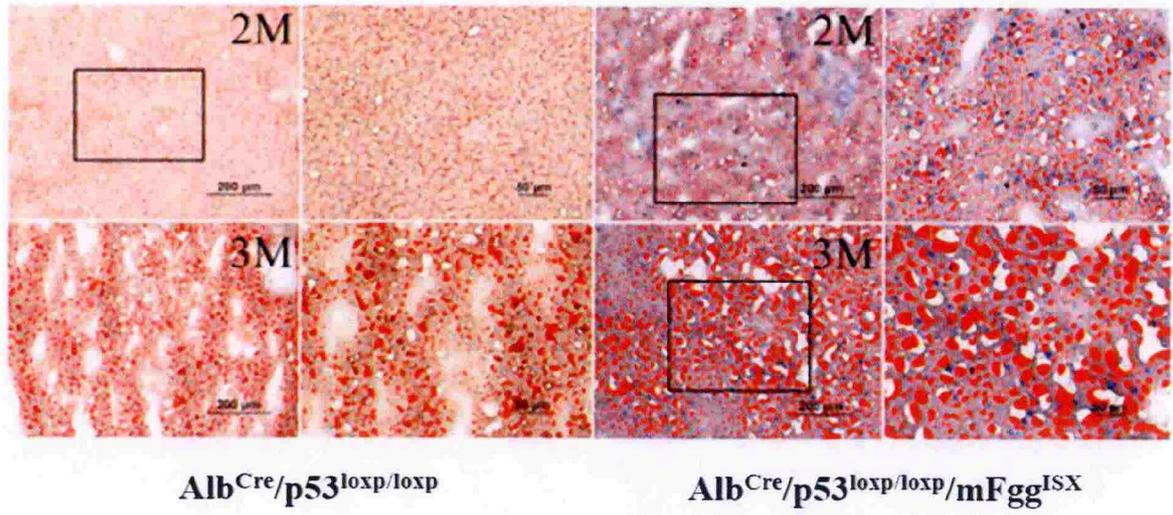
B



第3圖

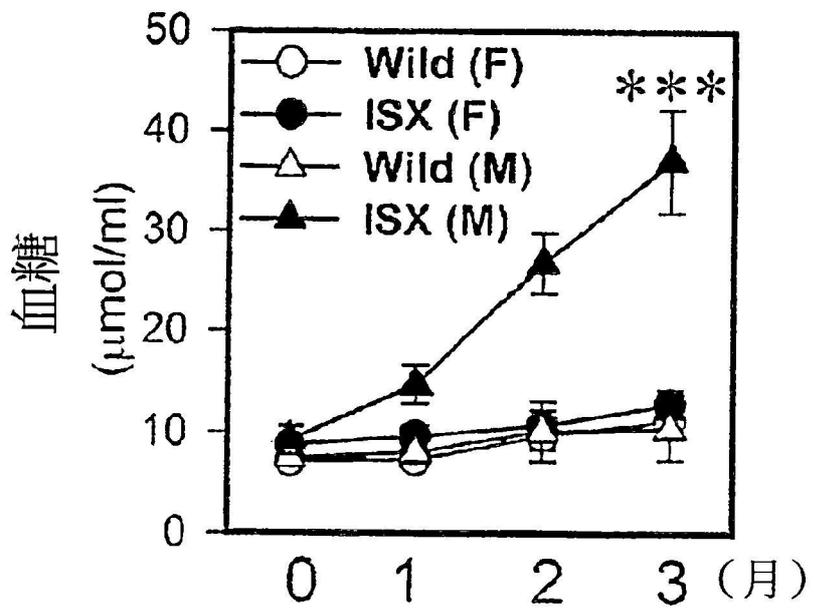


第 4 圖

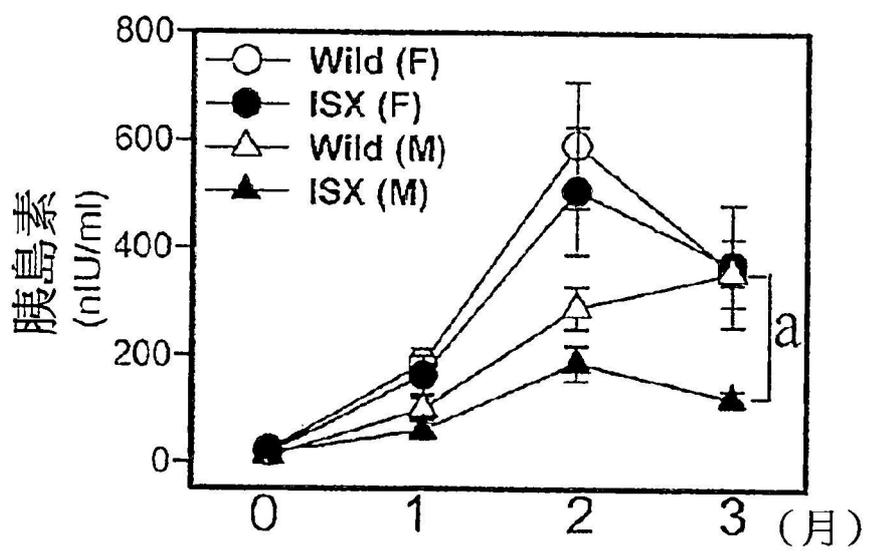


第 5 圖

A



B



第6圖