

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：橘黴素在人類胚胎腎臟細胞調控 Beta-catenin 的機轉探討 *
* ***** *

執行計畫學生：李昌達
學生計畫編號：NSC 101-2815-C-040-032-B
研究期間：101年07月01日至102年02月28日止，計8個月
指導教授：余豐益

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 102年03月29日

摘要 (Abstract)

橘黴素 (Citrinin, 簡稱 CTN) 是真菌類的二次代謝產物, 具致畸胎毒性 (teratogenicity)、腎臟毒性及癌化細胞的潛力。在許多食品與飼料中均可檢測到橘黴素的存在, 長期誤食被汙染的食品和飼料時可能會危及人類及動物的健康。因此, 探討橘黴素在細胞中引起細胞毒性的作用機轉, 將有助於我們對於食品及飼料進一步的安全評估, 以期望維護公共食品安全及大眾健康。

在本研究中, 我們利用人類胚胎腎臟細胞 (HEK293) 進行橘黴素毒理機轉的研究。隨著橘黴素處理濃度的提高, 造成 HEK293 細胞的存活率下降, 而在 HEK293 細胞中, E-cadherin 的表現量會隨著橘黴素劑量的提高而下降, 意味著表皮細胞正處於間質轉化的狀態, 並使細胞具有轉移或是侵襲的能力。

為了進一步探討橘黴素是否能活化 Wnt / β -catenin 路徑, 本實驗將 HEK293 細胞利用不同劑量的橘黴素處理, 並利用 Western Blot 與免疫螢光染色法觀察 β -catenin 在細胞中的表現, 結果顯示 β -catenin 的表現量會隨著增加橘黴素處理的時間或劑量的增加而上升。綜合以上結果, 本實驗推測橘黴素具有癌化細胞的潛力, 且橘黴素可能造成 β -catenin 在細胞核中堆積, 進而促使細胞癌化的生成。

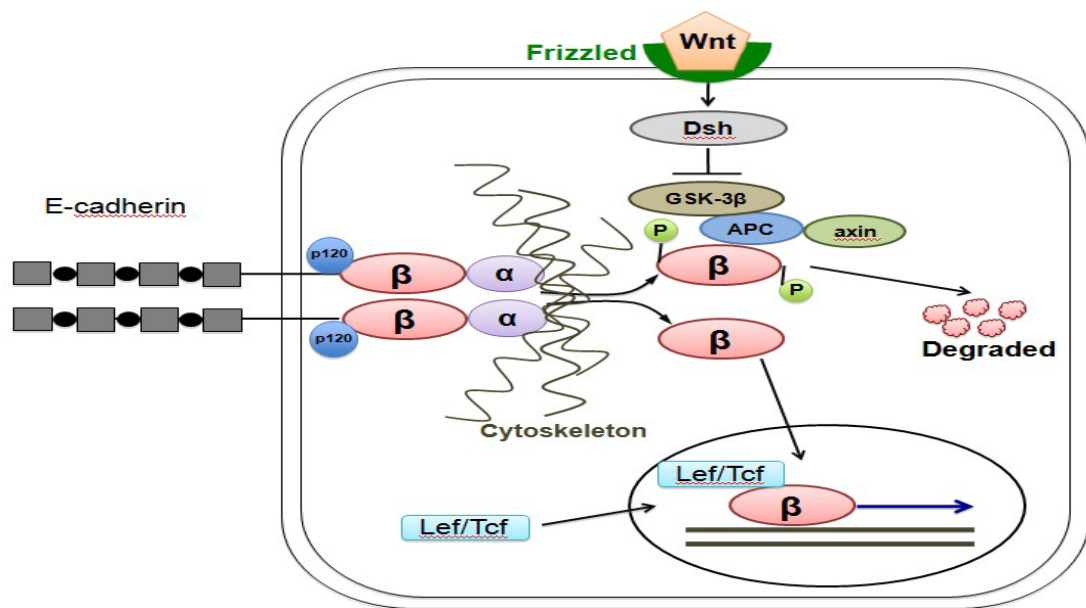
序論 (Introduction)

橘黴素 (Citrinin, 簡稱 CTN), 於 1931 年由 *Penicillium citrinum* (青黴屬) 分離出來而得名 (Abramson *et al.*, 2001), 普遍存在於受黴菌污染的穀類製品中, 包括玉米、小麥、大麥及米等 (Blanc *et al.*, 2001)。在動物實驗結果顯示橘黴素會造成腎臟近端曲管損傷及干擾肝腎細胞粒線體功能 (Chagas *et al.*, 1995), 同樣的結果在大鼠實驗中也證實橘黴素具有腎毒性和肝毒性, 會導致腎臟腺腫瘤生成 (Aleo *et al.*, 1991)。之前文獻指出橘黴素具有抑制蛋白質合成、抑制細胞增生、引起細胞週期停滯 (Chang *et al.*, 2010) 的能力。過去研究中也陸續發現, 紅麴具有影響血中膽固醇含量及血壓等作用 (Kohama *et al.*, 1987), 所以目前全球將紅麴發酵產品廣泛應用在食品工業中, 而紅麴發酵的過程, 常伴隨著具有肝腎毒性的橘黴素產生, 如果人類及牲畜長期攝取被橘黴素污染的食品或飼料, 可能會影響生命安全, 藉由了解橘黴素的致毒劑量及致毒機轉, 將有助於我們對於食品及飼料進一步的安全評估, 以期望維護公共食品安全及大眾健康。

E-cadherin 蛋白質鑲嵌於表皮細胞的細胞膜中, 其主要功能是藉由 β -catenin、 α -catenin 以及 γ -catenin 等蛋白質結合之後, 再與 actin 細胞骨架形成牢固的鍵結, 藉此結構來維持細胞間的形態。過去文獻指出癌細胞的轉移與 E-cadherin 表達有關, 若失去 E-cadherin 的表現會造成 cell-cell junction 的系統失去功能, 細胞便失去 contact inhibition 的特性, 造成細胞分裂增生並且改變細胞分化的狀態, 使細胞產生轉移的現象 (Nagafuchi *et al.*, 1988)。因此, 可知 E-cadherin 在抑制腫瘤細胞發生轉移的作用上具有極重要的功能。之前研究指出 E-cadherin 基因突變, 造成 E-cadherin 蛋白質 C 端的變異, 使 E-cadherin 無法與 α -catenin 結合, 當 α -catenin 蛋白質表現異常以及 β -catenin 磷酸化狀態改變時, 會進而影響 E-cadherin 與 APC 蛋白的結合, 而導致 E-cadherin 表現量下降 (Hirohashi, 1998)。

β -catenin 為 Wnt 傳遞路徑下游的 effector, 在細胞的附著與訊號傳遞中扮演重要的角色。在一般正常休眠之細胞中, β -catenin 在細胞質中含量極低, 因為游離態的 β -catenin 會迅速經由 ubiquitin - proteasome 的路徑降解, 在降解過程中, 需要與多種蛋白質作用, 首先與 APC 及 Axin 蛋白質結合, 再經由

GSK3 將 β -catenin 磷酸化，最後使 p- β -catenin 降解 (Conacci-Sorrel *et al.*, 2002)。另一方面，當 Wnt 存在時，Wnt 會鍵結到細胞表面的接受器 (receptor of Frizzled family)，誘發 Dvl 蛋白質 (Dishevelled protein)，此蛋白作用後抑制 GSK3 對於 β -catenin 之磷酸化作用，因而抑制 β -catenin 被降解，使得 β -catenin 轉移至細胞核中，並與 TCF/LEF 轉錄因子結合，調控細胞增生有關的基因，而其調控的目標基因為 Cyclin D1、Myc、BMP-4、MMP-7 等 (Peifer *et al.*, 2000)。前人研究指出 CTN 處理腎臟細胞將導致 E-cadherin 的表現量下降 (尚未發表)，而 E-cadherin 基因突變會使 β -catenin 磷酸化狀態改變，且 E-cadherin 的表現量也會下降，所以本計畫推測橘黴素可能藉由調控 β -catenin 的表達而造成細胞癌化的潛能，由於橘黴素對於 β -catenin 的機制尚未有相關文獻討論其途徑及作用機制，本計劃希望以細胞模式了解橘黴素影響 β -catenin 的作用機轉，以更明確地得知其二者在細胞中是否與促使細胞癌化形成的機制相關。



研究動機與研究問題

在過去的動物實驗中證實橘黴素可能導致細胞癌化，若長期食入高劑量的橘黴素會造成肝、腎等器官的損害。之前研究證實 CTN 導致腎臟細胞中 E-cadherin 表現量下降，參考文獻指出 E-cadherin 表現量下降與 β -catenin 蛋白質表現相關，由於調控 β -catenin 蛋白質的表達在細胞癌化中扮演重要的角色，但是橘黴素與 β -catenin 的關係尚未明確，所以本計畫擬以細胞模式探討橘黴素調控 β -catenin 的作用機轉。

【子目標一】 橘黴素是否調控 β -catenin 的 mRNA 和蛋白質表現量

過去文獻指出橘黴素可能導致細胞具有癌化的潛力，但是橘黴素是否藉由調控 β -catenin 而導致細胞癌化的機轉尚不明確，因此我們擬進一步探討橘黴素是否影響細胞中 β -catenin 的表現量，進而影響細胞癌化。

【子目標二】 橘黴素是否藉由活化 Wnt 訊息傳遞路徑影響 β -catenin 的表現

先前研究顯示 β -catenin 堆積在細胞核中會導致惡性腫瘤的生成，腫瘤的生成機制主要藉由不正常活化 Wnt/ β -catenin 路徑。當 Wnt 未活化時， β -catenin 與 Axin、APC、glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)、CK1 α 形成 destruction complex，其中 GSK3 β 與 CK1 分別將 β -catenin 的 Ser33、Ser37、Thr41 與 Thr45 磷酸化，使 p- β -catenin 被降解。因此我們想進一步探討橘黴素是否活化 Wnt/ β -catenin 路徑，進而抑制 β -catenin 磷酸化，使得 β -catenin 堆積在細胞核內，並影響下游的基因。

【子目標三】 橘黴素是否在轉錄調節中影響 β -catenin 下游基因的活性

已知當 β -catenin 轉移到細胞核時，其與 TCF (T cell factor) / LEF (lymphoid enhancer factor) 蛋白質結合，進而驅使 basal transcriptional factor 與 co-activator 的結合並活化，最後造成下游與癌細胞不正常的增生或促進細胞入侵的能力有關的基因之表達，例如：cyclin D1、c-myc、c-jun、matrix metalloproteinase 2 與 7 (MMP2 與 MMP7)。所以我們擬進一步探討橘黴素是否藉由調控 β -catenin 蛋白質而影響其下游基因的表達。

研究方法及步驟

【子目標一】 橘黴素是否調控 β -catenin 的 mRNA 和蛋白質表現量

(i) 橘黴素在 HEK293 細胞中適合作用的濃度範圍

利用 MTS assay 偵測細胞毒性，將細胞處理不同濃度的 CTN 後，加入 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation assay (Promega, USA)，並以波長 490 nm 的吸光值測定細胞的存活率。

(ii) β -catenin mRNA 的表現量

將 HEK293 細胞處理橘黴毒素，抽取細胞中的 RNA 並反轉錄 cDNA，再利用半定量 PCR 分析橘黴素對 β -catenin mRNA 表現量的影響。PCR 所使用的引子為 β -catenin - F - 5' - TGGAATGCAAGCTTTAGGAC - 3'
 β -catenin - R - 5' - TCTGAACCCAGAAGCTGAAC - 3'

(iii) β -catenin 蛋白質的表現量

利用 Western blot 觀察 β -catenin 蛋白質的表現量，將 HEK293 細胞利用不同濃度的橘黴毒處理素，接著萃取細胞內的蛋白質，接下來利用 SDS-PAGE 凝膠電泳及 Western blot (使用對 β -catenin 有專一性的抗體) 以分析橘黴素對 β -catenin 蛋白質表達量的影響。

(iv) β -catenin 在細胞中的分布的影響

利用免疫螢光染色法觀察 β -catenin 在細胞核中的表現，以正立螢光顯微鏡 (ZEISS AXOPLANT) 放大 1000 倍，搭配 420 nm 的濾鏡觀察綠色螢光訊號的 α -tubulin 及搭配 365 nm 的濾鏡觀察藍色螢光訊號的細胞核。

【子目標二】 橘黴素是否藉由活化 Wnt 訊息傳遞路徑影響 β -catenin 的表現

(i) β -catenin 是否被磷酸化

利用 Western blot 觀察 β -catenin 是否被降解，將 HEK293 細胞利用不同濃度的橘黴毒處理素，接著萃取細胞內的蛋白質，接著利用 SDS-PAGE 凝膠電泳及 Western blot (所用的抗體為 anti-phosphorylation- β -catenin 抗體) 以分析橘黴素對 β -catenin 磷酸化程度的影響。

(ii) 橘黴素是否影響 Dvl 蛋白質的表現量

將 HEK293 細胞的培養液中分別加入不同濃度的橘黴素處理 24 小時後，萃取細胞內的所有蛋白質並利用 Protein Assay 進行蛋白質定量，接著使用 SDS-PAGE 依分子量大小分離細胞內的蛋白質，接著利用轉漬法將 SDS-PAGE 上的蛋白質轉到膜上方便接下來的 Western blotting，在 Western blotting 中所使用之一級抗體分別為 (所用的抗體為 anti-Dvl 的抗體)，最後利用 Millipore 的 ITM Western Chemiluminescent HRP Substrate 溶液 (HRP substrate Luminal reagent: HRP substrate solution=1:1) 進行冷光偵測，並且以 Fuji 軟體進行蛋白質的量化分析。

【子目標三】 橘黴素是否在轉錄調節中影響 β -catenin 下游基因的活性

(i) 偵測 cyclin D1 基因的表現量

將 HEK293 細胞處理橘黴毒素，抽取細胞中的 RNA 並反轉錄 cDNA，最後再利用半定量 PCR 及 Real-time PCR 分析橘黴素對 cyclin D1 mRNA 表現量的影響。PCR時分別加入設計好的兩股引子：

cyclin D1 - F - 5'-CCGCAATGACCCCGCACGAT-3'

cyclin D1 - R - 5'-TGCCACCATGGAGGGCGGAT-3'

(ii) 偵測 c-myc 基因的表現量

將 HEK293 細胞處理橘黴毒素，抽取細胞中的 RNA 並反轉錄 cDNA，最後再利用半定量 PCR 及 Real-time PCR 分析橘黴素對 c-myc mRNA 表現量的影響。PCR時分別加入設計好的兩股引子：

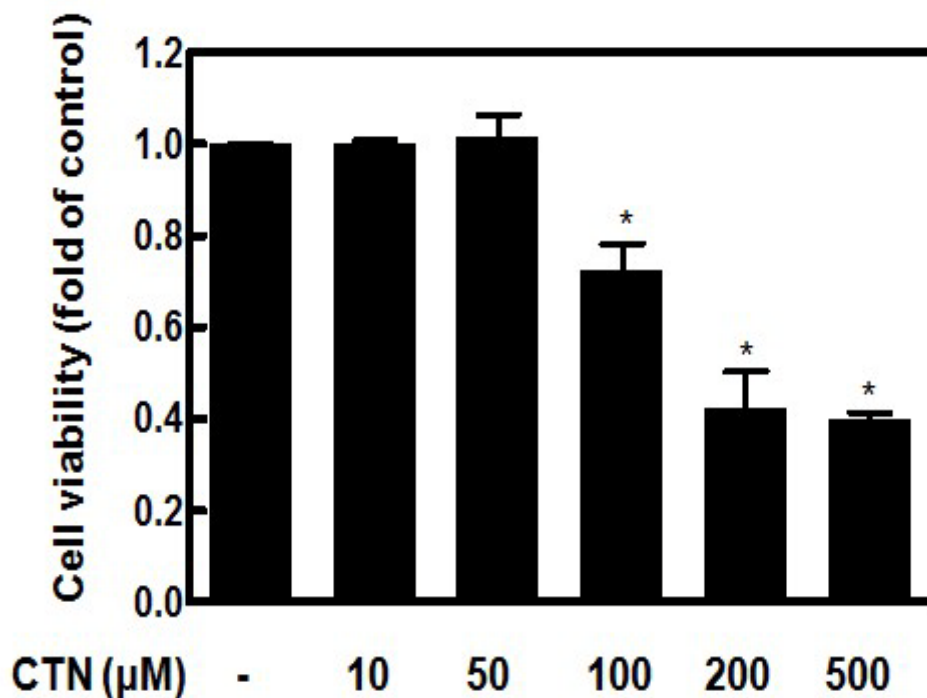
c-myc - F - 5' - GTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA - 3'

c-myc - R - 5' - TAGCATAGGTGCTGAAGGTGCCTC- 3'

實驗結果

1. 不同濃度之橘黴素對人類胚胎腎臟細胞HEK293 存活率的影響

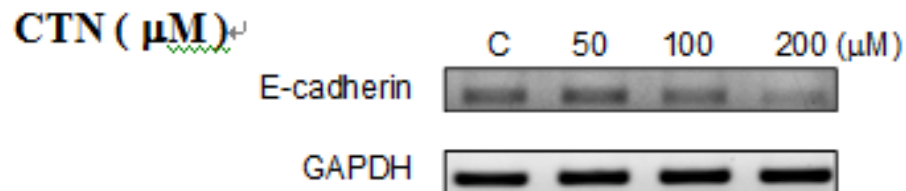
以 MTS assay 分析細胞存活率，由圖一可以得知在人類胚胎腎臟細胞 (HEK 293) 中，隨著橘黴素的提高，細胞存活率有下降的趨勢，當 HEK293 細胞在橘黴素 200 μM 的處理下細胞的存活率僅剩下 4 成，所以結果說明橘黴素會抑制細胞的生長。



圖一：將 HEK293 細胞種在 96 孔盤中培養 24 小時，約長至 8 成滿後，以不同濃度的橘黴素處理 24 小時，接著使用 MTS assay 偵測細胞存活率。以加入溶劑者作為控制組，並將其細胞存活率設為 1 來和實驗組進行比較。收集三次獨立的實驗數據進行統計分析並以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 的方式表示。* 表示和控制組相比具有顯著差異。* $P < 0.05$ ；** $P < 0.001$ （實驗室學姊提供）

2. 橘黴素抑制 HEK293 細胞 E-cadherin 的表現量

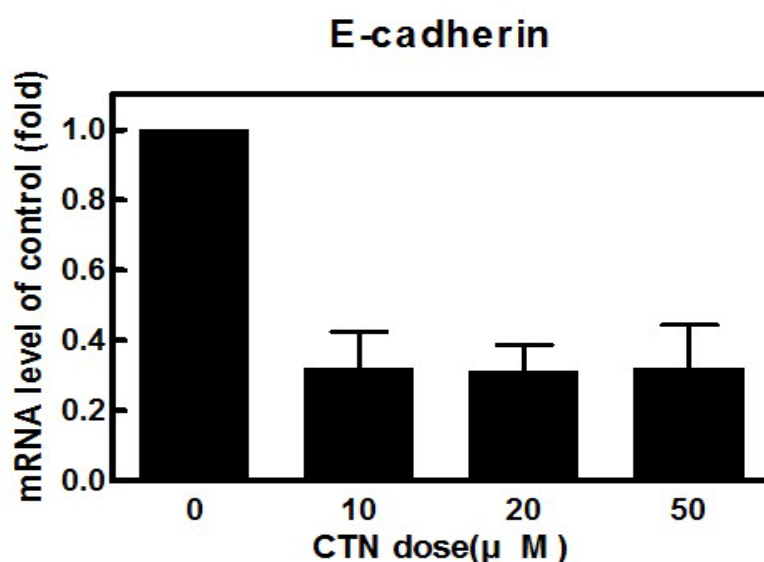
由圖二結果可以說明隨著橘黴素劑量提高，HEK293 細胞中的 E-cadherin 表現量有降低的現象，當橘黴素的劑量提高至 200 μM 時 E-cadherin 表現量有明顯下降，所以可以說明橘黴素可能促使細胞中 E-cadherin 表現量降低。



圖二：將細胞培養於 35 mm 培養盤中培養 24 小時後，分別加入不同劑量的橘黴素處理 24 小時後，經 PCR 觀察其 E-cadherin 的表現量，以 GAPDH 作為 internal control 。

3. 橘黴素抑制 HEK293 細胞 E-cadherin mRNA 的表現量

由圖三結果可以說明隨著橘黴素劑量提高，HEK293 細胞中的 E-cadherin mRNA 表現量有降低的現象，當橘黴素的劑量提高至 200 μ M 時 E-cadherin 幾乎沒有表現，所以可以說明橘黴素可能促使細胞中 E-cadherin mRNA 表現量降低。

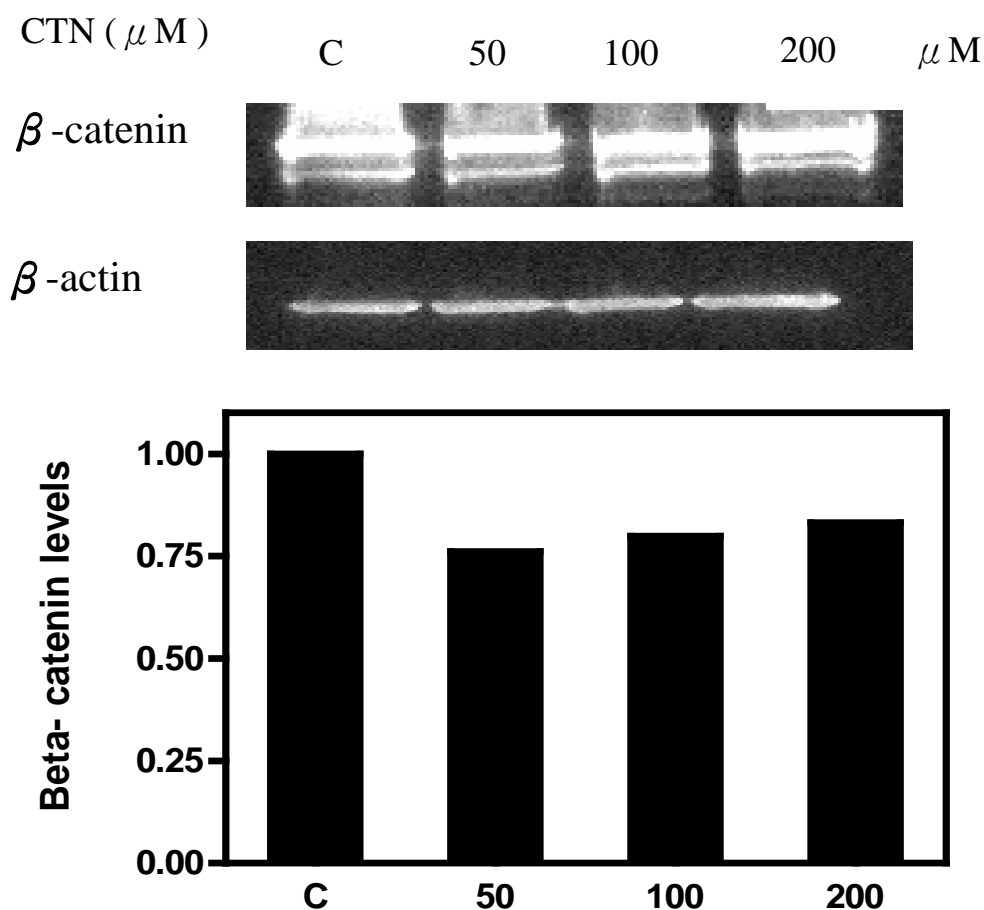


(實驗室學姊提供)

圖三：利用 soft agar 將細胞培養於 35 mm 培養盤中培養 7 個月(subculture in normal medium) 分別加入不同劑量的橘黴素處理後，將細胞內的 RNA 萃取出來再經 RT-PCR 及 PCR 觀察其 RNA 的表現量，收集三次獨立的實驗數據進行統計分析並以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 的方式表示。

4. β -catenin 蛋白質的表現量

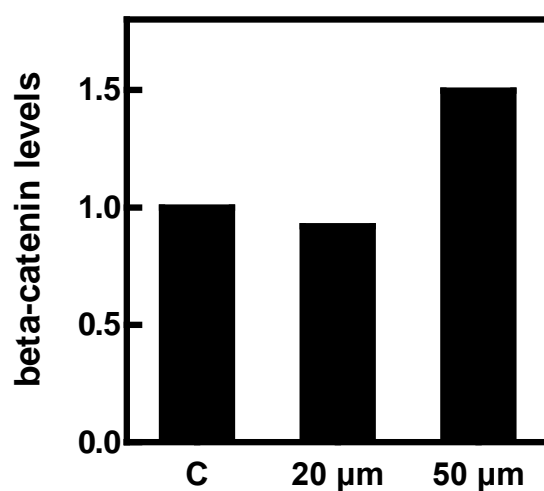
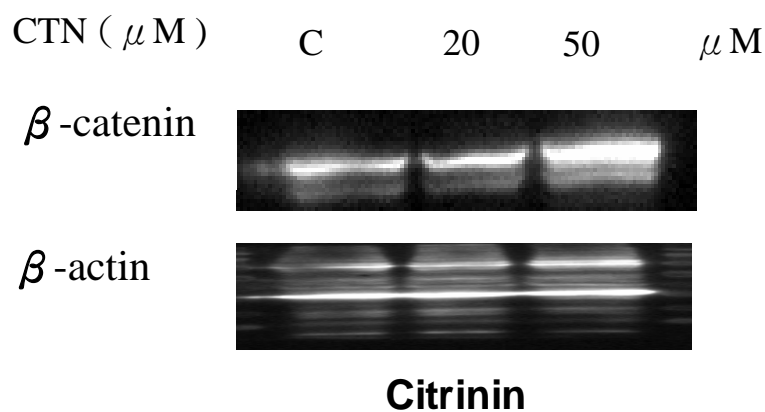
在圖四的結果中，是將 HEK293 利用橘黴素處理 24 小時，不能很明顯的看出 β -catenin 是否隨著橘黴素劑量提高而上升或下降，當橘黴素的劑量提高至 200 μ M 時 β -catenin 沒有明顯的變化，所以無法說明橘黴素可能促使細胞中 β -catenin 的表現量上升。



圖四：將細胞培養於 35 mm 培養盤中培養 24 小時後，分別加入不同劑量的橘黴素處理 24 小時後，接著萃取細胞內的蛋白質，接下來利用 SDS-PAGE 凝膠電泳及 Western blot（使用對 β -catenin 有專一性的抗體）以分析橘黴素對 β -catenin 蛋白質表達量的影響。此為一次的實驗數據。

5. β -catenin 蛋白質的表現量

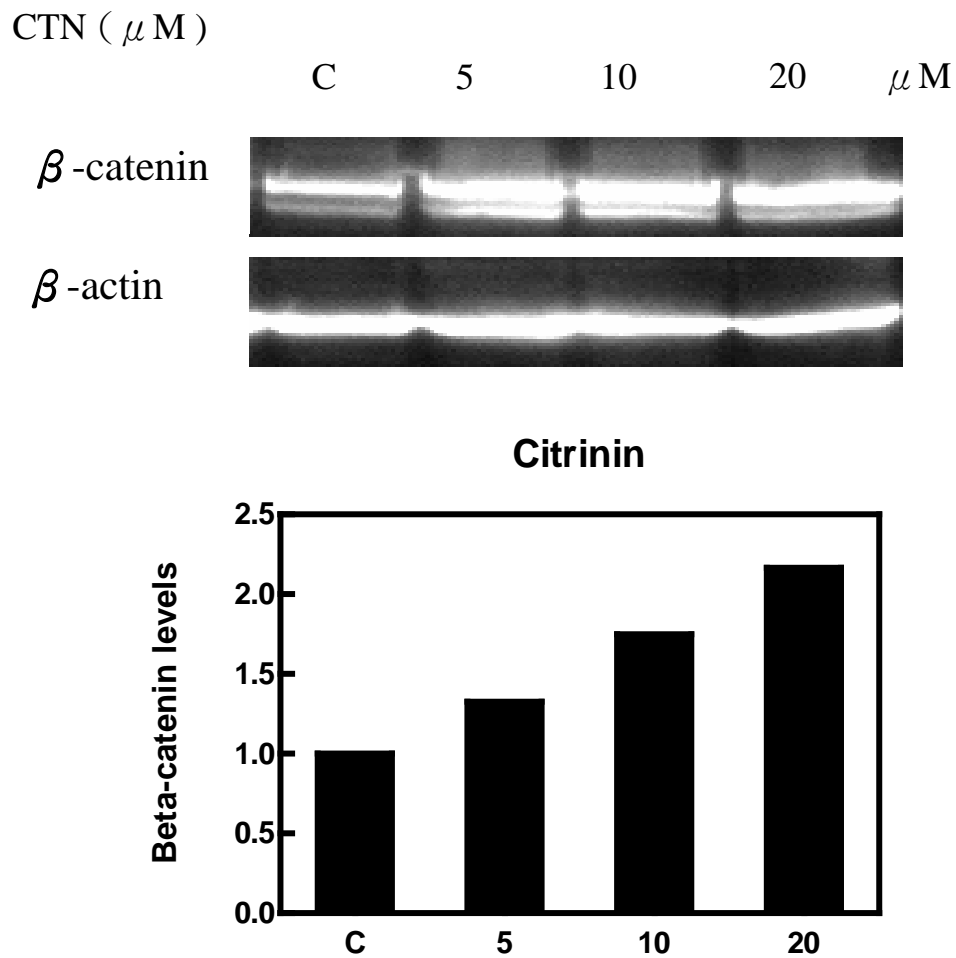
在圖五的結果中，是將 HEK293 利用橘黴素處理 72 小時很明顯的看出 β -catenin 會隨著橘黴素劑量提高而上升，當橘黴素的劑量提高至 200 μM 時 β -catenin 的表現量有明顯的增加，說明橘黴素可能促使細胞中 β -catenin 的表現量上升，使 β -catenin 堆積在細胞核內。



圖五：將細胞培養於 35 mm 培養盤中培養 24 小時後，分別加入不同劑量的橘黴素處理 72 小時後，接著萃取細胞內的蛋白質，接下來利用 SDS-PAGE 凝膠電泳及 Western blot（使用對 β -catenin 有專一性的抗體）以分析橘黴素對 β -catenin 蛋白質表達量的影響。此為一次的實驗數據。

6. β -catenin 蛋白質的表現量

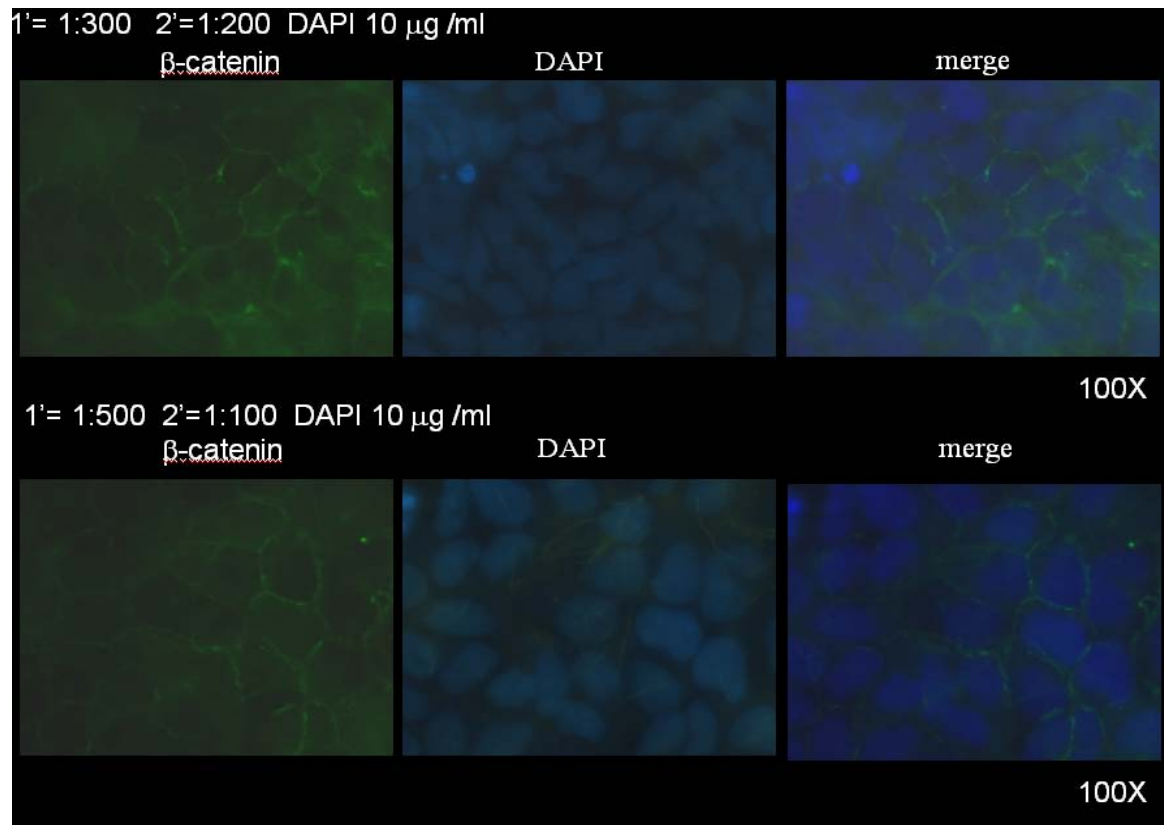
在圖六的結果中，是將 HEK293 利用橘黴素處理 30 天，很明顯的看出 β -catenin 會隨著橘黴素劑量提高而上升，當橘黴素的劑量提高至 200 μ M 時 β -catenin 的表現量有明顯的增加，說明橘黴素可能促使細胞中 β -catenin 的表現量上升，使 β -catenin 堆積在細胞核內。



圖六：將細胞培養於 35 mm 培養盤中培養 24 小時後，分別加入不同劑量的橘黴素處理 30 天後，接著萃取細胞內的蛋白質，接下來利用 SDS-PAGE 凝膠電泳及 Western blot（使用對 β -catenin 有專一性的抗體）以分析橘黴素對 β -catenin 蛋白質表達量的影響。此為一次的實驗數據。

7. β -catenin 在細胞中的分布的影響

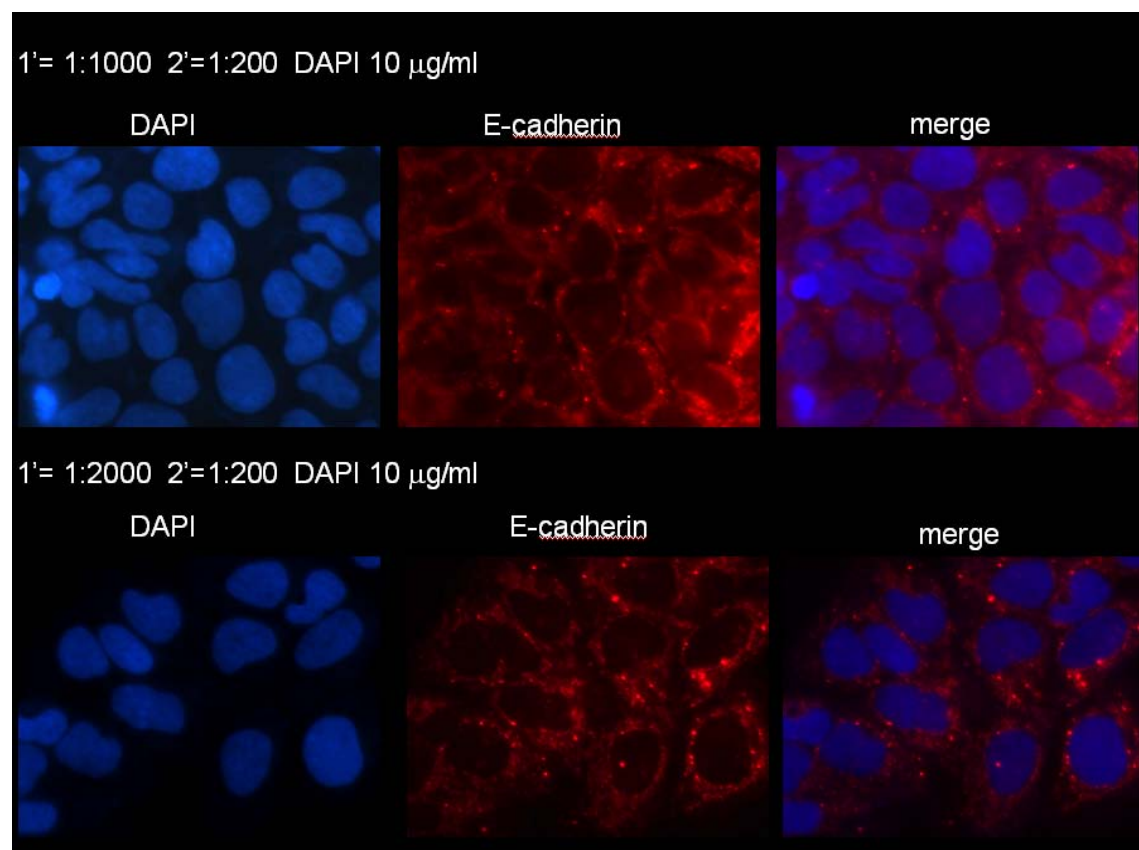
在圖七的結果中，利用免疫螢光染色法觀察 β -catenin 在細胞中的表現，由於先前實驗室沒有做過此實驗，所以本實驗先利用沒有處理橘黴素的 HEK293 測試條件。實驗結果顯示沒有處理橘黴素的 HEK293， β -catenin 會位於細胞膜上，且一抗使用 1:5000，二抗使用 1:100 效果會比較好。



圖七：利用免疫螢光染色法觀察 β -catenin 在細胞中的表現，以正立螢光顯微鏡 (ZEISS AXOPLANT) 放大 1000 倍，搭配 420 nm 的濾鏡觀察綠色螢光訊號的 β -catenin 及搭配 365 nm 的濾鏡觀察藍色螢光訊號的細胞核。

8. E-cadherin 在細胞中的分布的影響

本實驗也想比較 E-cadherin 和 β -catenin 的關係，在圖八的結果中，利用免疫螢光染色法觀察 E-cadherin 在細胞中的表現，由於先前實驗室沒有做過此實驗，所以本實驗先利用沒有處理橘黴素的 HEK293 測試條件。實驗結果顯示沒有處理橘黴素的 HEK293，E-cadherin 會位於細胞膜上，且一抗使用 1:2000，二抗使用 1:200 效果會比較好。



圖八：利用免疫螢光染色法觀察 E-cadherin 在細胞中的表現，以正立螢光顯微鏡（ZEISS AXOPLANT）放大 1000 倍，搭配 420 nm 的濾鏡觀察紅色螢光訊號的 E-cadherin 及搭配 365 nm 的濾鏡觀察藍色螢光訊號的細胞核。

討論

黴菌毒素 Citrinin (CTN) 常常被發現存在於被黴菌污染的食物及飼料之中，許多研究顯示 CTN 在穀類或玉米相關的發酵食品中的含量分別可以高達 180 及 584 ng/g (Vrabcheva *et al.*, 2000)，荷蘭及台灣的調查報告也在許多的紅麴發酵產品萃取物中檢測到 CTN 的存在 (Liu *et al.*, 2005; Sabater-Vilar *et al.*, 1999)。在國人的日常飲食中，紅麴無論在米類及肉類製品中長期被視為一種調色及調味劑，近年紅麴製品因為具有降低血脂的功效，在國內或國外更被視為一種保健食品在食用，然而其組成成份中往往含有次及代謝物 CTN 的存在，因此被視為紅麴產品發展上的一大隱憂。

雖然對於 CTN 的管控標準至今還沒有統一的官方標準，但是在動物或細胞實驗中已經有很多的證據指出 CTN 能引起肝腎毒性 (Aleo *et al.*, 1991; Kogika *et al.*, 1993)，在此計畫中，也証實了人類的腎臟細胞 (HEK293) 會隨著 CTN 的處理劑量增加而使細胞存活率下降 (圖一)。

過去文獻指出癌細胞的轉移與 E-cadherin 表達有關，若失去 E-cadherin 的表現會造成 cell-cell junction 的系統失去功能，使細胞產生轉移的現象 (Nagafuchi *et al.*, 1988)，在此計畫中，也証實了人類的腎臟細胞 (HEK293) 隨著橘黴素的劑量提高，E-cadherin 表現量有明顯下降，推測橘黴素可能促使細胞中 E-cadherin 表現量降低 (圖二、圖三)。文獻也指出 E-cadherin 表現量下降與 β -catenin 蛋白質表現相關，由於調控 β -catenin 蛋白質的表達在細胞癌化中扮演重要的角色，所以本計畫更進一步的探討橘黴素調控 β -catenin 的作用機轉，在實驗結果中，發現將 HEK293 分別加入不同劑量的橘黴素處理 24 小時後， β -catenin 的表現量不如預期結果，沒有很明顯的變化 (圖四)。所以我們推測橘黴素的作用時間是否需要更久，因此在研究中，將 HEK293 分別加入不同劑量 (20、50 μ M) 的橘黴素處理 72 小時後，發現 β -catenin 會隨著橘黴素劑量提高而上升 (圖五)。本實驗也想更進一步的觀察將 HEK293 利用橘黴素處理更長的時間 (30 天) 檢測 β -catenin 的結果是否也是一樣，結果顯示 β -catenin 也會隨著橘黴素劑量提高而上升 (圖六)。所以本實驗推測隨著橘黴素劑量的提高，會使 β -catenin 堆積。

由於已知 β -catenin 堆積在細胞中會導致細胞增生的現象，且許多細胞癌化的發生與 Wnt/ β -catenin 傳遞路徑的活化有關。當 Wnt 存在時，Wnt 會鍵結到細胞表面的接受器（receptor of Frizzled family），抑制 GSK3 對於 β -catenin 之磷酸化作用，而抑制 β -catenin 被降解，使得 β -catenin 轉移入細胞核中。所以將來我們會利用 Western blot 觀察 β -catenin 是否被降解（所用的抗體為 anti-phosphorylation- β -catenin 抗體），進一步探討橘黴素是否藉由調節 Wnt/ β -catenin 傳遞路徑進而影響 β -catenin 的表現量。先前研究中已知 LEF/TCF 轉錄因子結合，而造成下游基因表達，由於 cyclin D1 與 c-myc 已知是 Tcf 的下游基因，當外界的刺激訊息促使 cyclin D1 與 c-myc 活化時，Rtinoblastoma protein (RB) 原本抑制 E2F 的功能被阻斷，細胞週期從 late G1 進到 S 期，造成細胞的增生、分化甚至會使細胞凋亡，所以如果證實 Wnt 傳遞路徑會被活化，使 β -catenin 堆積在細胞核中，我們未來將進一步探討橘黴素是否可調控 β -catenin 下游基因 cyclin D1 與 c-myc 的表現量。

總體而言，對於這種常常出現在食物、保健食品及牲畜飼料中的橘黴素，本實驗結果顯示，橘黴素確實會導致人類胚胎腎臟細胞的存活率下降，而這樣的現象可能是經由 CTN 影響 β -catenin 所造成的，但是對於橘黴素是否真的會導致腫瘤或癌症的發生，能須做進一步的探討，所以之後本實驗也會證實橘黴素是否能活化 Wnt/ β -catenin 的訊息傳遞途徑，並活化不同的轉錄因子進而造成下游基因的表達，來評估橘黴素對人類胚胎腎臟細胞的癌化能力。

參考文獻

- Aleo, M. D., Wyatt, R. D., Schnellmann, R. G., (1991) The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109, 455-463
- Abramson, D., Usleber, E., Martlbauer, E., (2001) Immunochemical method for citrinin. *Methods in molecular biology.* 157, 195-204
- Blanc, P. J., Laussac, J. P., Le Bars, J., Le Bars, P., Loret, M. O., Pareilleux, A., Prome, DProme, J. C., Santerre, A. L., Goma, G., (2001) Characterization of monascidinA from *Monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 201-213
- Chagas, G. M., Oliveira, M. A., Campello, A. P., Kluppel, M. L., (1995) Mechanism of citrinin induced dysfunction of mitochondria. IV. effect on Ca²⁺ transport. *Cell Biochem. Funct* 13, 53-9
- Chang, C. H., Yu, F. Y., Wu, T. S., Wang, L. T., Liu, B. H., (2010) Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2 / M Arrest and Numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule Formation in human cells. *Toxicological sciences* 119, 84-92
- Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Ben-Ze'ev, A., (2002) The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 190, 987-991
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A., Nakanishi, T. (1987) Isolation and identification of hypotensive principles in red mold rice. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 35: 2484-9
- Kumar, M., Dwivedi, P., Sharma, A. K., Singh, N.D., Patil, R.D., (2007) Ochratoxin A and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: an ultrastructural assessment. *Mycopathologia* 163, 21-30
- Hirohashi, S., (1988) Inactivation of the E-cadherin mediated cell adhesion system in human cancer. *Am J Pathol.* 153, 333-339
- Nagafuchi, A., Takeichi, M., (1988) Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 7, 3679-3684
- Peifer, M., Polakis, P., (2000) Wnt signaling in oncogenesis and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18, 7860-7872