

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 赭麴毒素 A 對斑馬魚胚胎造成的毒性影響
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 朱光駿
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-033-B
研究期間： 100 年 07 月 01 日至 101 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 劉秉慧

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 101 年 04 月 09 日

(一) 摘要

本次的研究計畫中執行了型態變化上的影響測試、斑馬魚胚胎致死率及毒性損傷上的測試以及免疫螢光染色的操作和影像拍攝。

在型態變化上如同初步結果一般，在經過OTA處理後的斑馬魚胚胎在接下來的5天觀察其中身體結構上會開始出現變異，類似心膜腫脹、卵黃發黑、身體彎曲等等變化，而劑量較重的組別甚至會導致胚胎死亡。

經由 OTA 處理過後的組別在致死率以及毒性損傷的數據都會隨著劑量的加重而明顯升高；其中又以受精後 6 小時和受精後 24 小時兩種不同的胚胎來進行對 OTA 敏感度的觀察，結果顯示在受精後 6 小時（心臟構造發育完成）開始加藥處理的組別在外部變化上有著較為顯著的表現，對 OTA 處理似乎有著要高的敏感度。

利用免疫螢光染色的方式去標定心房及心室來觀察心臟構型，染色後以正立螢光顯微鏡拍攝斑馬魚胚胎側面（lateral），結果顯示 OTA 劑量在超過 0.5 μ M 後心房心室間的繞環會有被解開現象，側面影像的重疊會被拉長成一線形的長管狀構造。

冷凍切片的部份由於後續切片厚度大小有限，因此修改為石蠟切片的方式來進行組織採樣，石蠟切片的結果在以 HE stain 的方式來染色觀察，不過目前此步驟仍在進行中。

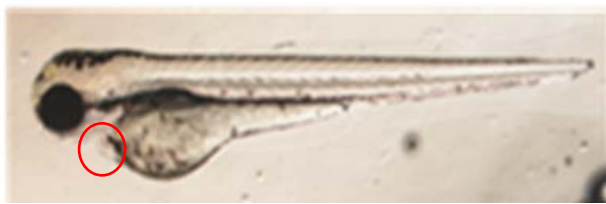
(二) 研究成果

1. OTA 對斑馬魚胚胎型態上的變化的影響

1. 方法：

首先利用 OTA 毒素處理受精後 24 小時的斑馬魚胚胎，並在接下來的五天當中逐日觀察魚胚胎的身體結構變化。

(圖一)



(Control)

(圖二)



(0.25 μ M OTA)

2. 成果數據：

比照兩組間的差異發現到，經過毒素處理的魚在外型上確實出現很大的不同，在劑量的濃度上也會有所影響。經毒素處理過的斑馬魚胚胎構造上的改變包含卵黃發黑、心包膜腫脹以及身體上黑色斑點增多等等。

2. OTA 濃度對於斑馬魚胚胎的致死率

1. 方法：

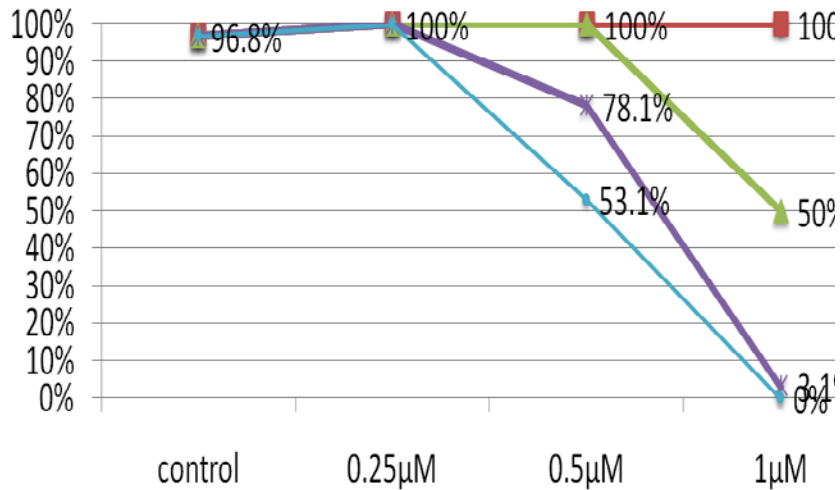
將斑馬魚胚胎依不同濃度分成 4 個組別，每個組別中含 10 個胚胎，分別暴露在 0.1、0.25、0.5、1 μ M 的 OTA，並連續觀察 5 天內觀察魚胚胎的存活情況。

2. 成果數據：

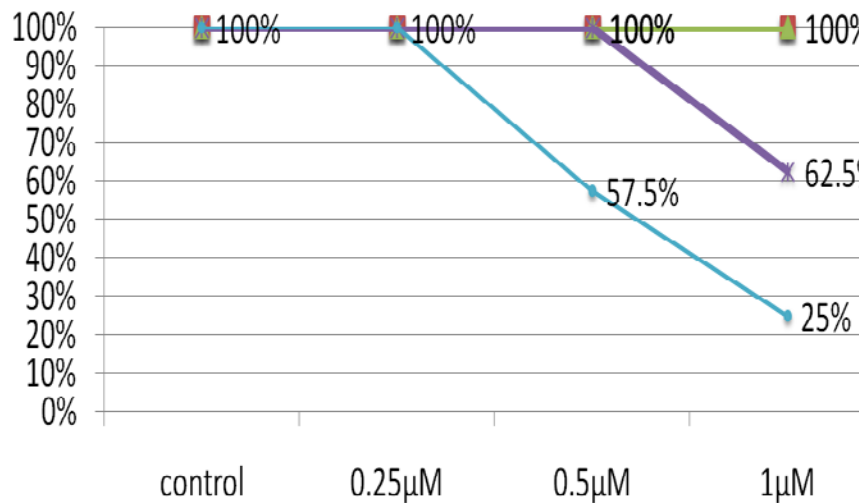
以下為 4 種不同條件處理的斑馬魚胚胎組別所蒐集到的結果。為了測試斑馬魚胚胎受精的時間長短是否會對藥物敏感度有所差異，我們同時挑了兩個受精後

的時段進行比較；受精後 6 小時以及受精後 24 小時，前者為心臟結構成型的時段、後者為胚胎發育完成階段。

<表一> 以下為胚胎受精後 6 小時後加藥處理的存活率統計



<表二> 以下為胚胎受精後 24 小時後加藥處理的存活率統計



3. 討論：

經表一和表二的結果顯示，斑馬魚胚胎的死亡率和加藥的濃度劑量呈現正比關係，當中又以 0.5 μM 的濃度開始出現明顯的下滑趨勢，而在 1 μM 的濃度下存活率降低至 50% 以下，因此 OTA 劑量於 1 μM 濃度下為對斑馬魚胚胎的最大致死劑量。而在受精後 6 小時的斑馬魚胚胎有著顯著的藥物敏感度。

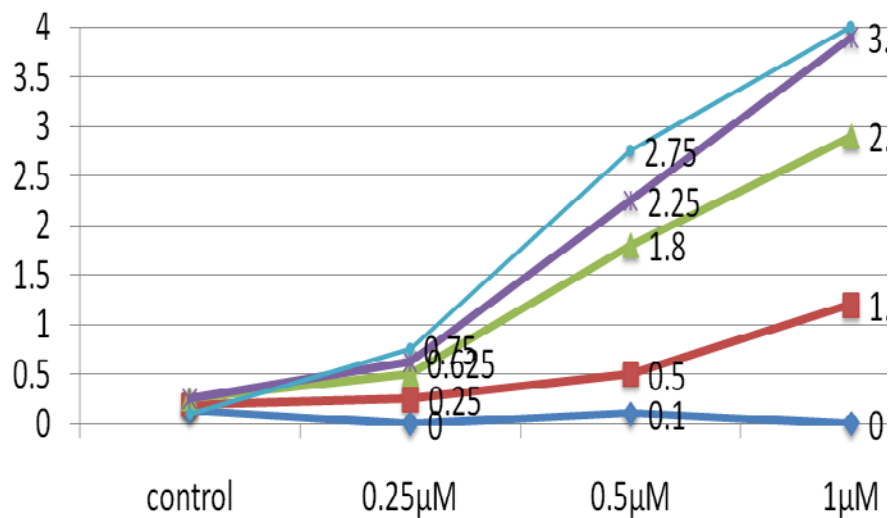
3. OTA 濃度對於斑馬魚胚胎的毒損傷率

1. 方法：

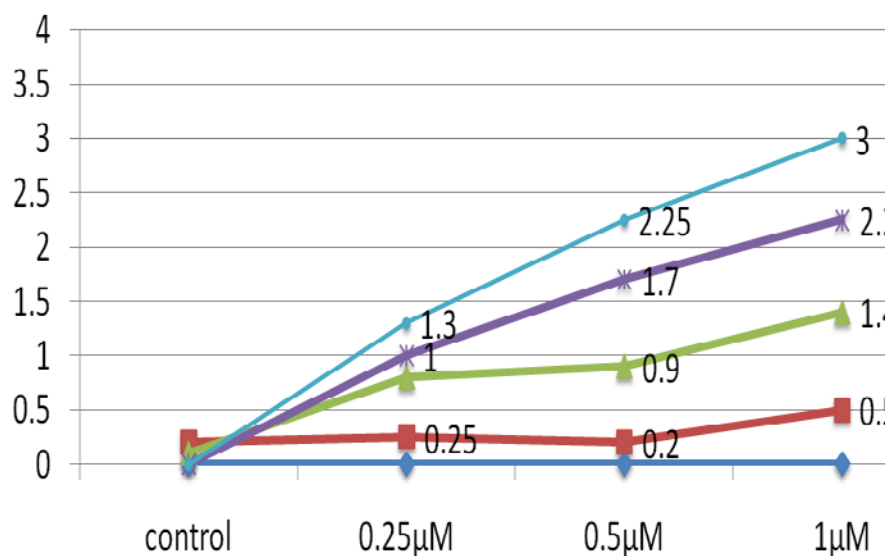
另外我們也將毒性損傷分數區分成 4 個等級來做評分，0 為胚胎正常發育、1 為輕微異常（一處構造異常）、2 為部分異常（二處構造異常）、3 為嚴重傷害（三處以上異常，瀕死）而 4 則代表死亡。連續紀錄觀察五天後，將毒性損傷分數（toxicity score）以平均分數做為計算評分。

第二部分為毒性損傷的統計，同樣的利用了兩組不同受精時段進行條件測試。

<圖三> 以下為胚胎受精後 6 小時後加藥處理的毒性損傷統計



<圖四> 以下為胚胎受精後 24 小時後加藥處理的毒性損傷統計



討論：

經由圖三和圖四的表示，毒性損傷分數隨著 OTA 處理天數呈現正比影響。在 0.25 μ M 的 OTA 濃度條件下較無明顯的差異性，但是在 0.5 μ M 的 OTA 濃度下兩個不同組別的斑馬魚胚胎皆具有明顯的外表變化，最後 1 μ M 的 OTA 濃度組別在到達第五天時損傷分數也平均上升至 3 以上。同時也觀察到兩個不同的組別在毒性損傷分數上也略有不同，在胚胎受精後 6 小時後加藥處理的組別中分別於 0.5 μ M 和 1 μ M OTA 的濃度下呈現較高的損傷分數，而 0.25 μ M OTA 濃度下兩者卻無明顯的差異。

3. OTA 會對斑馬魚心臟構型造成影響變化

1. 方法：

利用免疫螢光染色法：

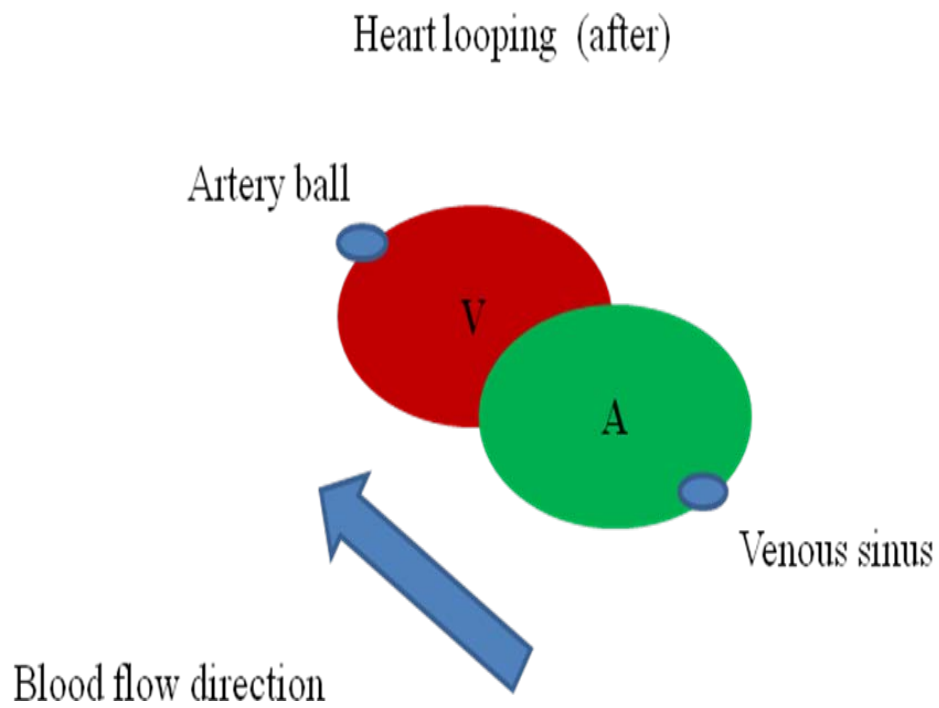
為了觀察 OTA 對於心臟發育的影響，我們利用 MF20 和 S46 兩個單株抗體來辨識心房及心室的位置，MF20 及 S46 皆為肌凝蛋白重鏈 (myosin heavy chain) 抗體，MF20 可辨識心房及心室，但是在辨識心室上有著較為明顯的訊號，S46 則專一性辨識心房。

當魚胚胎固定後放入一級抗體 MF20 及 S46 於 4 °C 中反應 18 小時，經 PBST 洗滌三次後以二級抗體 Goat anti-mouse IgG2b(γ 2b) Alexa 594 nm (for S46) 和 Goat anti-mouse IgG1(γ 1) Alexa 488 nm (for MF20) 於室溫中反應兩小時三十分，接著用 PBST 清洗三次後泡入 H₂O₂ / MeOH (30 % H₂O₂ / MeOH 以 1:1 的比例混合) 中，放於室溫至少 12 小時，用 PBST 清洗三次後即可用倒立螢光顯微鏡拍照。

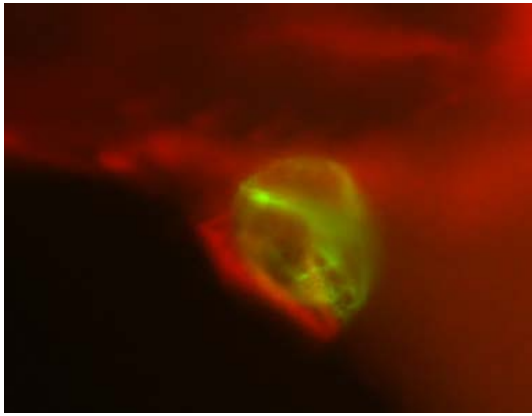
2. 成果數據

<表三> 螢光染色的目標圖五為呈色後拍照結果

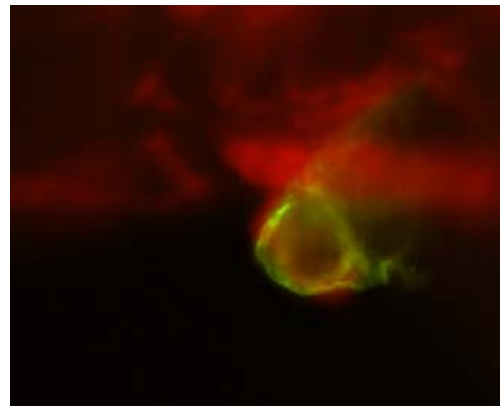
| | 1AB | 2AB | Alexa(光波長) | 呈色(螢光) |
|---------------|------|-----------------|------------|--------|
| 心房(Atrium) | S46 | anti-mouseIgG1 | 488 | 綠 |
| 心室(ventricle) | MF20 | anti-mouseIgG2b | 594 | 紅 |



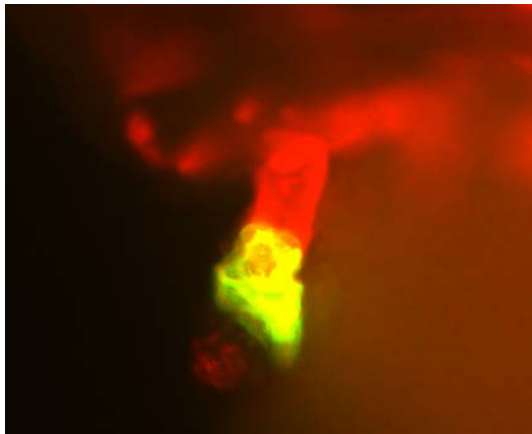
<圖五> 利用免疫螢光染色後結果，樣品為斑馬魚胚胎的側面 (lateral) 相片



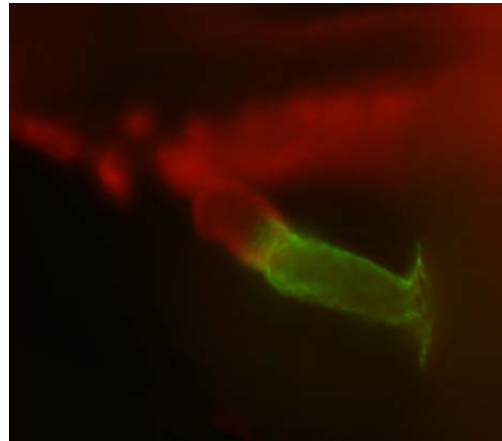
(control)



(0.25 μ M OTA)



(0.5 μ M OTA)



(1 μ M OTA)

討論：

經由免疫螢光染色後發現到隨著 OTA 濃度的上升，心臟的心房和心室構型會產生變化，在 0.25 μ M OTA 處理的魚胚胎組和一般組無明顯的差異，心房和心室會因為繞環 (looping) 現象而在拍照時呈現重疊，但是在 OTA 的處理濃度上升至 0.5 μ M 以上後，心房和心室的繞環現象變的相當不明顯，所以使的照相後的結果心房及心室被拉長成一線狀。

