

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 *
* : 利用斑馬魚胚胎作為奈米碳管毒性測試的平台 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 林俞君
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-022-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 潘惠錦

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 99年03月31日

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

*

* 計畫名稱：利用斑馬魚胚胎作為奈米碳管毒性測試的平台 *

執行計畫學生：林俞君

學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040-022-B

研究期間：98年7月1日至99年2月底止，計8個月

指導教授：潘惠錦老師

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後
可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中華民國99年3月29日

中山醫學大學生物醫學科學學系

大專生國科會計畫及專題研究報告

98 年大專生國科會計畫-利用斑馬魚胚胎作為奈米碳管毒性測

試的平台

(國科會計畫編號) 98-2815-C-040-022-B

指導老師: 潘惠錦 教授

學生: 林俞君

目錄

摘要.....	4
緒論.....	5
材料與方法.....	9
結果.....	13
討論.....	16
參考文獻.....	29

摘要

奈米科技已經成為全世界科技發展的重點之一，奈米碳管（carbon nanotube, CNT）也因為其獨特的特性而成為研究最廣泛的奈米材料。量子點(quantum dot)，具有光激發光(photoluminescence)的特性。奈米碳管的應用漸趨廣泛，在生物醫學領域也備受重視，但將奈米碳管用於臨床上的研究尚未成熟。如將奈米碳管與量子點 conjugate 後，並利用量子點來追蹤奈米碳管的去向，由此概念出發可將載有藥物的奈米碳管送入生物體內，並有效的把藥物送達目標細胞；或是將奈米碳管接上 amide 官能基，也可增加奈米碳管的水溶性，以利接下來的實驗進行。但在進行進一步的應用之前，研究經過不同修飾的奈米碳管及其衍生物在生物體內的可能的毒性是一必須且極重要的課題。在本計劃中，我們利用斑馬魚作為模式生物，探討經過不同化合物的修飾的奈米碳管對於水生生物是否具有胚胎發育毒性。我們將奈米碳管接上 quantum dot，再注射進斑馬魚胚胎體內後，會導致胚胎死亡且嚴重畸形，證明 CNT-QD 對於胚胎具有發育毒性。因此我們改以浸泡 amide-CNT 的方式來測試環境中奈米碳管對於胚胎的影響。實驗的結果發現利用浸泡的方式將斑馬魚胚胎暴露在含有 amide-CNT 的毒性明顯比注射 CNT-QD 來的小，且暴露於低劑量的 amide-CNT 環境下對於斑馬魚胚胎的發育似乎沒有顯著的影響，卻會使胚胎出現體軸縮短的現象，但不會影響體節發育的基因表現量，由此推測 amide-CNT 也許是經由其他機制使得體軸變短。在成魚方面我們利用鰓的暴露以及餵食的方式進行奈米碳管的暴露，並以切片觀察細胞的型態。暴露於 amide-CNT 的環境中的鰓並沒有發現有任何異常；但是在腸道方面，餵食 CNT 的小腸絨毛顯的較為粗，並且出現空泡化，我們推測奈米碳管可能會破壞小腸絨毛或是影響養分的吸收。經由上述研究得知，低劑量的奈米碳管並不會對胚胎及成魚造成顯著的毒性。

緒論

奈米科技已經成為全世界科技發展的重點之一，而奈米材料的應用也不單只是應用於半導體，如化學、能源、醫療等等都有廣泛的涉及。在醫療方面的應用尤其受到重視，例如磁共振造影（MRI）是顯影劑以奈米級顆粒的螢光染料做為染料、胰島素的「奈米膠囊」。

奈米碳管（carbon nanotube，CNT）因為其獨特的特性而成為研究最廣泛的奈米材料（Klumpp et al., 2006）。奈米碳管是指由碳原子所形成新的碳物質，形狀為奈米級中空圓筒型的結構，因組合的型態不同可分成兩種：多層奈米碳管（multiwalled carbon nanotube，MWCNT）及單層奈米碳管（single-walled carbon nanotube，SWCNT），多層奈米碳管是由許多單層奈米碳管組合而成（Walters et al., 1999; Yu et al., 2000）。奈米碳管與其他物質比較起來有許多新的特性，如：質量輕、高強度、高韌性、高表面積、高熱傳導性，因此應用在資訊電子、醫療、新穎材料、節能技術、生物醫學、綠色永續工程等不同領域（Zhang et al., 2002; Lin et al., 2003）。在2004年，Nadine Wong Shi Kam等人指出，如果將培養human promyelocytic leukemia (HL60) cells的培養基中加入已經標定螢光的奈米碳管(0.05 mg/mL SWNT)，放置37°C一小時以共軛焦螢光顯微鏡觀察後發現細胞會以endocytosis pathway的方式將奈米碳管攝入細胞內（Kam et al., 2004）。未來可望藉由奈米碳管的此種特性將藥物攜帶至特定細胞內，進行較有效率的標靶治療，研究標靶治療在實驗室上已有相當的成果，但要轉移到臨床上的研究仍是有許多的障礙。

奈米材料的應用現今已十分廣泛，隨著合成、純化以及合成後修飾的方法不同，也會對奈米碳管的物理特性有所改變。隨著產業的需求量增加，如何更加了解及安全的發展奈米材料，則是目前另一個需要關注的議題（Cheng, J., et al., 2009）。在生產、使用或是出售奈米碳管的各個環節

中，都有可能使奈米碳管散佈到環境中，再經由生物的吸收、代謝或是排泄的方式進入生物鏈中（Halland et al., 2007）。奈米碳管對於人體及環境的影響所知非常有限(Colvin 2003)。2004年，Warheit 等人將小鼠進行氣管滴入的方式讓小鼠暴露於奈米碳管，發現小鼠只有短暫的發炎現象，但後來卻引發多發病灶的肉芽腫（Warheit et al., 2004）。2005年，Geiser et al. 研究顯示吸入奈米粒子會被肺吸收並且經由血液散佈到全身（Geiser et al., 2005），並有可能對肺部造成毒性。然而2008年，Dan Elgrabli 等人卻發現結合上鏢的多層奈米碳管，不會穿過小鼠肺部的屏障，而是停留在肺部六個月之後，經由巨噬細胞的吞噬作用慢慢代謝掉。另一項研究是

Kostas Kostarelos 教授藉由單層奈米碳管與

diethyltriaminepentaacetic (DTPA)螯合，將具放射性的銻(indium)同位素將奈米碳管染色顯影後以靜脈注射方式注入老鼠的體內，再以伽瑪閃爍計數器(gamma scintigraphy)追蹤奈米碳管。結果顯示奈米碳管並不會滯留在脾臟或肝臟內，而是藉由血液循環經腎臟排入尿液中。以電子顯微鏡檢驗尿液樣本，結果發現奈米碳管可完全經由尿液排出來。而多層奈米碳管也可經由尿液代謝排出老鼠體外（Singh et al., 2006）。以上研究顯示不同的暴露方式及材質造成的奈米碳管的潛在毒性可能有所不同。

在生命科學的領域上，許多研究都必須建立在選擇合適的模式生物上。斑馬魚（*Danio rerio*）是一近年來快速崛起的模式生物，在發育生物、分子遺傳學、毒性測試等研究上，都有莫大的貢獻。將斑馬魚利用在毒性測試的研究中，戴奧辛（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD）的毒性測試最為著名（Adrian J. et al., 2005）。此研究是將斑馬魚剛受精的胚胎浸泡在含有TCDD（2.5ngTCDD/g egg）的水中10天（Henry et al., 1998），研究結果顯示出斑馬魚的胚胎都出現嚴重的表型，包括心包膜及卵黃囊水腫、心臟功能受損造成心率下降且局部缺血、下巴發育不全等等。而在2004

年，Incardona, J. P. 等人也證實了不同的多芳香環碳氫化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)會對斑馬魚造成不同的毒性。例如將斑馬魚暴露在三環的多芳香環碳氫化合物二苯吩 (dibenzothiophene, DBT) 及菲 (phenanthrene) 會導致斑馬魚心臟功能發生缺陷；如果將斑馬魚暴露在四環的多芳香環碳氫化合物例如Benzo(a)pyrene (BaP) 中則會使斑馬魚有水腫、周邊血管缺陷、及神經細胞死亡等缺陷 (Incardona et al., 2004)。這些實驗都顯示斑馬魚模式是一種簡單、快速而有效的毒性分析測試平台。

奈米碳管因為其特殊的物理特性、化學性質，及奈米級的大小而成為現今最熱門的研究物質。奈米碳管本身並不溶於水，但奈米碳管卻擁有一個特別的特性，就是可以藉由接合上特別的分子進行修飾，使奈米碳管對水的溶解性增加 (Hirsch, 2002; Sun et al., 2002)。例如可將奈米碳管接上醯胺 (amide) 官能基，便可大大的增加奈米碳管的水溶性。量子點 (quantum dot) 是準零維 (quasi-zero-dimensional) 的奈米材料，由少量的原子所構成，具有光激發光 (photoluminescence) 的特性。與一些半導體量子點相較，碳量子點較無毒性，對環境的危害也比較小。在醫療上更利用各種發光波長不同的量子點製成螢光標籤，成為生物檢測用的「奈米條碼」。

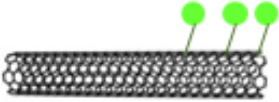
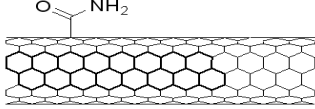
本計畫是想藉由奈米碳管與量子點 conjugate 在一起，增加奈米碳管的水溶性，並利用量子點可以用光激發的特性來追蹤奈米碳管的去向。而這些修飾過後的奈米碳管對於臨床醫學的研究非常重要，然而奈米碳管在被送入生物體內後，將如何被運送或是運送到何處也是一個關鍵的問題。由於奈米碳管為一新興的科技，在進行研究之前，也應先評估奈米碳管對於環境或是生物的影響。本計劃想開發利用斑馬魚胚胎作為一個奈米碳管毒性測試的平台。斑馬魚在毒性測試的研究上有許多優點。與其他的脊椎動物相較之下，斑馬魚的體積小，且子代數目多，一對公母魚一次可產下將

近300顆卵，在做毒性測試時能使用最少的藥劑量，得到最大的實驗數據（Hill et al., 2002）。斑馬魚最大的優點在於，幼魚在發育的過程中，胚胎呈半透明，可利用顯微鏡清楚的觀察到胚胎發育的情形，且斑馬魚胚胎發育時間短，目前對其器官發育的研究已非常透徹，可以在特定的時間點觀察到特定器官的發育。在技術上可以使用24孔盤將胚胎浸泡於含各種濃度毒性物質的水溶液中，或使用顯微注射的方式將有興趣的物質顯微注射至胚胎中，直接以顯微鏡觀察胚胎發育的情形（Adrian J. et al., 2005）。利用以上的優點，我們將分別測試不同種類的奈米碳管對於斑馬魚胚胎是否具有生物毒性，或是經由環境的暴露進入到魚體內。在本計劃中，我們想要利用斑馬魚作為模式生物，進一步探討奈米碳管對於生物是否具有毒性，且利用量子點標記的奈米碳管，藉此追蹤奈米碳管的走向、分佈以及代謝情形；並且利用石蠟切片的方式希望透過這個實驗能瞭解奈米碳管的生物特性，探討可能對生物或是環境的傷害，並在奈米碳管的發展及研究上作出貢獻。

材料與方法

本實驗所使用的奈米碳管為單層的奈米碳管，並針對不同合成方式的奈米碳管對於斑馬魚胚胎的毒性探討。我們將分別利用顯微注射以及浸泡的方式來進行毒性測試。

以下是我進行實驗的流程。

CNT-QD 	Amide-CNT 
1. 顯微注射 quantum dot	1. 將胚胎浸泡在含有 F68 的溶液中*
2. 顯微注射 CNT	2. 將胚胎浸泡在含有 Amide-CNT 的溶液中
3. 顯微注射 CNT-QD	3. 將成魚進行鰓的暴露及餵食的方式，再將組織切片作 HE 染色，觀察組織型態的改變

* Amide-CNT 溶於 2% 的 F68 中，故本實驗先針對 F68 進行毒性測試。

實驗材料皆由國立中正大學生命科學系周正中助理教授合成且提供。

實驗方法：

1. 利用顯微注射的方式將 quantum dot (量子點 QD) 注射至一個細胞的斑馬魚胚胎中，分別於 6、24、48、72、96、120hpf 時期利用顯微鏡拍照觀察其存活率及表型，並測試在不同濃度 ($1\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.02\mu\text{M}$) 下的 QD 對於胚胎是否有毒性及利用螢光顯微鏡來觀察在不同濃度下的 QD 的表現位置。
2. 利用顯微注射的方式將 CNT 注射至一個細胞的斑馬魚胚胎中，分別於 24、48、72、96、120hpf 時期利用顯微鏡拍照觀察其存活率及表型，測

試在不同濃度（0.05ng/2.3nl、0.1ng/2.3nl、0.5ng/2.3nl）下的 CNT 對於胚胎是否有毒性，且是否能觀察到 dose dependent 的現象。

3. 將 CNT 及 QD conjugate 在一起後，利用顯微注射的方式將 CNT-QD 注射至一個細胞的斑馬魚胚胎中，分別於 24、48、72、96、120hpf 時期統計胚胎存活率，並利用顯微鏡拍照觀察表型，測試在不同結合方式、不同濃度下的 CNT-QD 對於胚胎是否有毒性，且利用螢光顯微鏡來追蹤 CNT- QD 表現位置。
4. 測試斑馬魚胚胎處在不同濃度的 F68 溶液中對於斑馬魚胚胎生長是否具有毒性。將胚胎分別浸泡在含有不同濃度 F68（0%、0.1%、0.5%、0.75%、1%、1.5%）的 24 孔盤中，並於 6、24、48、72、96、120hpf 時期利用顯微鏡拍照觀察其表型是否異常。
5. 將斑馬魚胚胎浸泡在含有不同濃度的 amide-CNT（2 μ g/ml、5 μ g/ml、7.5 μ g/ml、10 μ g/ml）中，並於 24、48、72、96、120hpf 時期利用顯微鏡拍照觀察其表型是否異常。
6. 對斑馬魚成魚連續 14 天進行 450 μ g/ μ l 之 amide-CNT 暴露，並將斑馬魚的各個組織摘下，進行石蠟切片及 H&E stain，看是否可藉由切片的方式來觀察組織的型態。

實驗步驟

1. **斑馬魚的養殖：**實驗室所養殖的斑馬魚為 AB strain，飼養於 28 $^{\circ}$ C 的恆溫系統中，並且設定每日的日夜週期為光照期 10 小時且黑暗期 14 小時。交配的前一天晚上將公魚和母魚分開，隔天進行交配，再收集魚卵。胚胎可以馬上拿來進行顯微注射，顯微注射完後放入 egg water 中，在 28 $^{\circ}$ C 的培養箱中飼養，並且要定時更換 egg water，直到實驗所需的時期再利用顯微鏡觀察胚胎的表現型是否與 wild type 有所差異，並拍照進行往後

的分析及探討胚胎的表現型在不同濃度下是否會有 dose dependent 的現象。

2. **CNT 的配製：**將 carbon nanotube (奈米碳管 CNT) 原液利用超音波震盪 30 分鐘，使 CNT 可以分散開來,再將濃度稀釋成 0.05ng/2.3nl、0.1ng/2.3nl、0.5ng/2.3nl， microinjection 前需再超音波震盪 15 分鐘。
3. **Microinjection:** 將剛授精的胚胎收集好後，在受精卵分化成一個細胞後即開始進行顯微注射。本次實驗的注射位置依奈米碳管的水溶性而定，水溶性較好的 CNT-QD 打在 yolk，水溶性較差的奈米碳管則必須注射至細胞本體。顯微注射後的胚胎將培養在 egg water，並於 24、48、72、96、120hpf 進行死亡率與畸形率的統計，並拍照作為往後的毒性探討。
4. **螢光顯微鏡使用及拍照：**先將顯微鏡電源及 CCD 電源開啟，再開電腦主機，打開影像程式並放置好標本，調整好光原後先以最小倍率找到標本，調整粗調節輪找到焦距，再放大倍率，調整好細調節輪並拍照。如要觀察螢光則須先開啟螢光燈源，螢光燈源在開啟後 20 分鐘內不得關閉以免傷害汞燈。先將胚胎以 Tricaine 麻醉後放入雙凹槽玻片中，利用 3%Methyl Cellulose 使胚胎處在較黏稠的環境中以利拍照，以螢光燈激發 CNT-QD 觀察螢光，以追蹤奈米碳管的走向。
5. **石蠟包埋及組織切片：**將胚胎用 4%PFA/PBS(4% paraformaldehyde in PBS)於 4°C 固定隔夜再以 PBS 清洗，把胚胎固定在 0.8% agarose 中，之後交由中山醫學大學病理科人員進行脫水及石蠟浸潤整夜後，以石蠟包埋機進行包埋。將包埋好的組織塊，利用組織切片機切成 4 μ m 的連續切片，置於 50°C 的水浴槽中展開後，將其連續切片貼在處理過的玻片上，放在組織烘片機上乾燥一整夜(37°C)，最後將玻片保存在防潮箱中。
6. **Hematoxylin and Eosin 染色：**將胚胎石蠟組織切片依序浸入二甲苯 10

分鐘 X2、100%酒精 10 分鐘 X2、75%酒精 10 分鐘 X1、50%酒精 10 分鐘 X1、30%酒精 10 分鐘 X1、二次水五分鐘 X1。接著以 Hemayoxylin 染色 3~8 分鐘，自來水清洗直到切片呈現藍紫色後，浸入 80%酒精 10 分鐘 X1，再以 Eosin 染色 3~8 分鐘、95%酒精退染、100%酒精 5 分鐘 X1、二甲苯 5 分鐘 X2，最後以封片膠封片(ASSISTANT-Histokitt No.1025/100)隔夜，觀察拍照。

結果

A. CNT-QD 的胚胎毒性測試

我主要所探討的是當奈米碳管接上不同的化合物或是官能基時，對於斑馬魚胚胎是否會造成毒性。第一種實驗材料是將奈米碳管 (CNT) 接上 Quantum dot (QD) 來增加奈米碳管的水溶性。QD 是一種量子點，可以經由光的激發而發出螢光，方便我們往後用於追蹤 CNT 的走向。在實驗設計上我先分別測試 QD、CNT 對胚胎本身是否具有毒性。在將 QD 注射進胚胎後觀察到無論在各種濃度都會造成胚胎嚴重的畸形，其表型包括頭部變小、體軸彎曲、發育不良 (圖一 A)；在死亡率以及畸形率的統計上，發現越高濃度的 QD 會使胚胎的死亡率及畸形率上升 (圖一 B)。在螢光追蹤方面，我們觀察到在六個小時可以看見 QD 所發出的螢光分佈在細胞中，但在 24 小時以後則無法觀察到明顯的螢光 (圖二)。而單純注射奈米碳管的胚胎發育遲緩，當胚胎逐漸發育完成時，則會發現胚胎的心臟出現水腫，也會導致頭部變小 (圖三)。

雖然 QD 對於胚胎具有高度的毒性，且 CNT 也會使胚胎發育遲緩，但我們還不知道當 CNT 接上 QD 之後是否會改變其化學特性。當我們將 CNT-QD 顯微注射近胚胎中發現 CNT-QD 對於胚胎具有很強的毒性，不但會使胚胎發育嚴重遲緩 (圖四 A)，對於胚胎也會有致死性的毒性 (圖四 B)；在螢光觀察方面我們依舊無法在 48 小時之後觀察到螢光 (圖四 C)。

目前的實驗結果總結發現注射 CNT-QD 對於胚胎的毒性較強，而且也無法對於奈米碳管進行定量以及追蹤，所以我們接下來將針對另外一種接上 amide 官能基的奈米碳管做為毒性測試的探討，將實驗著重於奈米碳管是否會對環境造成影響，將斑馬魚作為河川代表性生物，以浸泡胚胎及成魚的暴露、餵食的方式來測試 amide-CNT 對於胚胎或是成魚是否會造成毒

性，而 amide-CNT 又是否可經由鰓的暴露或是餵食的方式進入成魚體內，假設 amide-CNT 能夠進入成魚體內，又是否會對成魚的組織產生毒性。

B. amide-CNT 的胚胎毒性測試

第二種實驗材料則是將奈米碳管接上 amide 這個官能基，並將 amide-CNT 溶於 F68 之中，更可以增加 amide-CNT 的水溶性。所以在測試 amide-CNT 的毒性前，我先測試 F68 對於胚胎本身是否會造成毒性。實驗證實，浸泡 F68 會使卵膜皺縮，但對於胚胎本身並不會造成影響(圖五 A)，且存活率以及畸形率趨勢都與 wild type 類似(圖五 B)。所以我們接下來就再更進一步的測試將胚胎浸泡於 amide-CNT 中是否會對胚胎造成毒性。我們將 amide-CNT 溶於 1% 的 F68 之中，從胚胎受精後兩小時開始浸泡，觀察至 120 小時，發現浸泡 amide-CNT 會造成少數胚胎出現心臟水腫的情況(圖六)。由存活率的統計上來看發現 expose $7.5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 及 $10 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 濃度下的胚胎死亡率明顯較高(圖七 A)，但就其正常比率來看則是 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的比率最低(圖七 B)，因此我們利用 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的胚胎來做表型上面的進一步觀察與分析。將 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的胚胎與 expose 1%F68 的胚胎比較來看，可以發現 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的胚胎體軸明顯比 1%F68 的胚胎來的短(圖八 A)。量化來看可知體軸縮短的情形在 48hp 時具有統計上的意義(圖八 B)。若將 WT、expose 1%F68、expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的胚胎表現型細分為脫卵膜率、黑色素生成、心包膜腫大、卵黃柄型態來看，可發現 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的胚胎其脫卵膜率及黑色素生成率上比 WT 來的較低，我們推測為 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的胚胎發育較為遲緩，而心包膜腫大、卵黃柄型態異常比 WT 來的嚴重，推測在 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的濃度下會對胚胎造成發育遲緩及心包膜腫大、卵黃

柄型態異常的現象，但其比例不高(圖八 C)。由圖中可以看出 expose 5 μ g/ml amide-CNT 的胚胎體軸較短及 yolk stalk 也較為粗短的情形(圖九)。由於 expose 5 μ g/ml amide-CNT 的胚胎體軸較短，因此我們推測 expose amide-CNT 可能會造成斑馬魚胚胎的體節有變短或是變少的情形，所以我將利用 Whole mount in situ hybridization 的方式分別觀察 *myoD*、*myoG* 的表現情形(圖十 A)，由 Whole mount in situ hybridization 可以看出 expose 5 μ g/ml amide-CNT 會使 *myoD* 的表現界線較模糊；但若是抽取 expose 1%F68、expose 5 μ g/ml amide-CNT 胚胎的 RNA，並利用 RT-PCR 觀察 *myoD*、*myoG* 的表現量，發現其表現量並不會因為 expose 5 μ g/ml amide-CNT 使這兩個基因的表現量異常(圖十 B)。由此推測 expose 5 μ g/ml amide-CNT 並不會使調節體軸發育的基因表現量異常，也許是經由其他機制使得 *myoD* 的表現界線變得模糊。

C. amide-CNT 的成魚毒性測試

在測試完 amide-CNT 的毒性之後，我們想更進一步了解 amide-CNT 是否會進入斑馬魚成魚體內，因此我們利用鰓的暴露以及餵食的方式，並摘取斑馬魚組織，作石蠟切片並以 HE 染色，對於細胞的型態加以觀察。我取了鰓以及腸道來作為主要的觀察重點，並以正立顯微鏡 400 倍的倍率來觀察細胞的型態。在魚鰓的切片中我們可以看到鰓的組織呈現葉片散開狀，但將 wild type 與暴露於 CNT 的環境中的鰓切面並沒有發現有任何異常(圖十一 A)；但是在腸道方面，wild type 的小腸絨毛排列較整齊，而餵食 CNT 的小腸絨毛顯的較為粗，並且出現空泡化(圖十一 B)。目前我們推測奈米碳管可能會破壞小腸絨毛或是影響養分的吸收。另外我們也想利用拉曼光普及 IR 的檢測方式來偵測奈米碳管停留在魚體內的含量，並且更進一步的追蹤奈米碳管在魚體的代謝情形。

討論

A. CNT-QD 對於胚胎之毒性探討

這次的計畫我主要是想藉由斑馬魚作為一個毒性測試的研究模式動物，來探討奈米碳管的毒性。在我研究的材料中，我使用了兩種經過不同化合物修飾的奈米碳管來當作最主要的研究重點。第一種材料是將奈米碳管接上 Quantum dot，實驗結果發現注射 QD、CNT、CNT-QD 對於胚胎都具有一定的毒性且 QD 的螢光也會隨著時間而減退，因此也無法用來追蹤 CNT 的走向。由於 CNT-QD 的毒性太強，所以我們推測 CNT-QD 無法應用在臨床醫學上，且沒辦法對其進行定量也是一個重要的問題。

B. amide-CNT 對於胚胎及成魚之毒性探討

我們使用了第二種的奈米碳管，藉由將奈米碳管接上醯胺基，也同樣的可以增加奈米碳管的水溶性，並改以環境的毒性測試來探討 amide-CNT 對於環境是否具有潛在的危機。我們將斑馬魚當作河川環境的代表性生物，分別對於斑馬魚胚胎及成魚都進行暴露。實驗的結果發現利用浸泡的方式將斑馬魚胚胎暴露在含有 amide-CNT 的毒性明顯比 injection CNT-QD 來的小，且 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 的環境下對於斑馬魚胚胎的發育似乎沒有顯著的影響，因此接下來我們想要提高 expose amide-CNT 的濃度並且做進一步的分析及探討。但是 amide-CNT 是否會進入到斑馬魚胚胎中我們還不得而知，接下來想繼續利用拉曼及 IR 光譜的方式來偵測 expose $5 \mu\text{g/ml}$ amide-CNT 是否真的會經由浸泡的方式進入到胚胎體內，或是會被卵膜保護使得 amide-CNT 對於斑馬魚胚胎的毒性減低這是我們需要更進一步探討的重點。

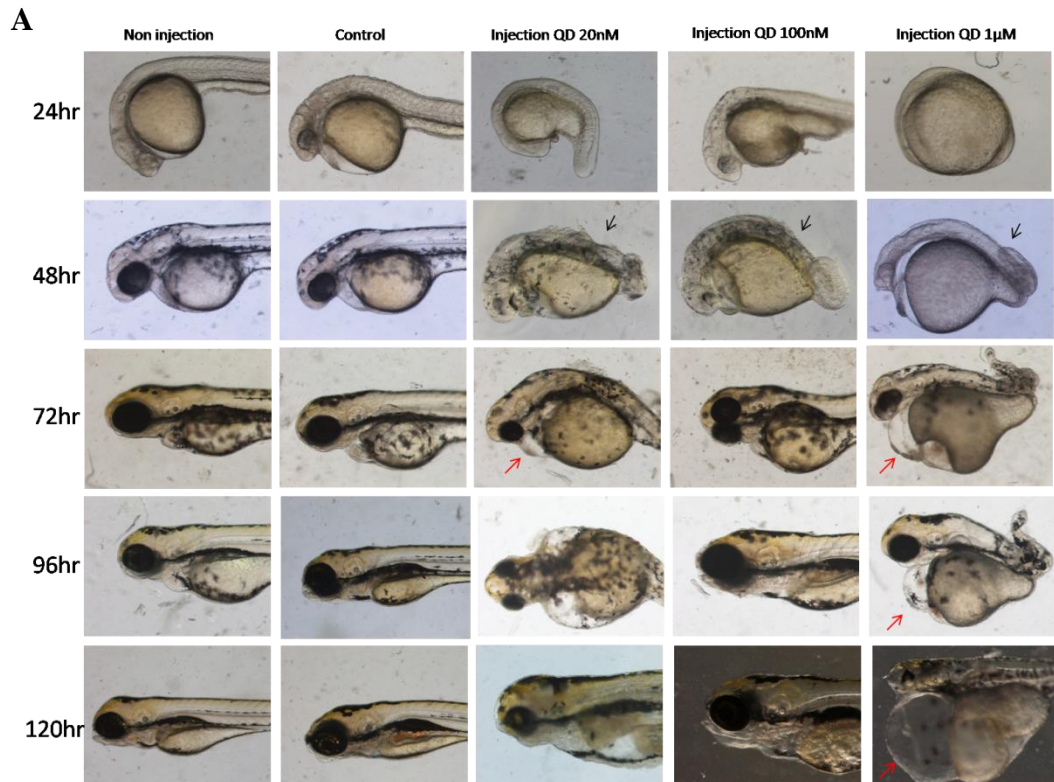
藉由成魚的組織切片來看 amide-CNT 似乎對於斑馬魚的腸道具有影響，但是確切影響到哪一個部分則有待進一步的實驗確認。

C. 未來方向

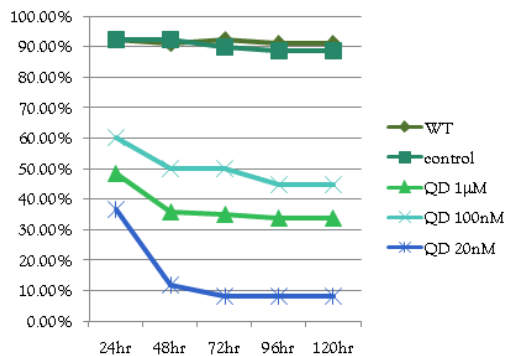
未來的實驗我們想要提高奈米碳管的濃度，並觀察在高濃度的奈米碳管環境下對胚胎發育的影響，並比較暴露在低濃度及高濃度的奈米碳管環境中對於胚胎的影響是否有所差異。並且希望能夠更進一步的分析胚胎的活動力及行為模式是否會受奈米碳管影響而有所改變，並且分析這些胚胎對於環境的改變是否會誘發一些基因的表現，而這些基因又是扮演著甚麼樣的功能，這是我們將來有興趣的研究目標之一。

在成魚方面，我們想著重奈米碳管在成魚體內的代謝情形，以及對於組織的型態變化，並想要利用拉曼光譜、IR 來偵測奈米碳管在斑馬魚體內的含量以及去向。

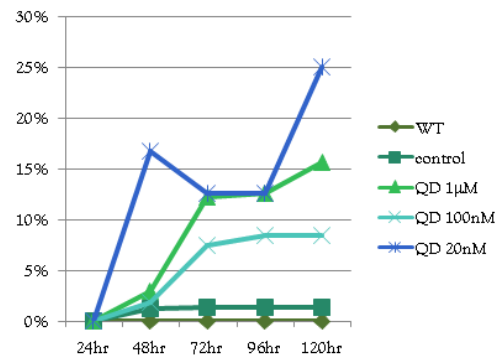
我們希望藉由斑馬魚來做為奈米碳管毒性測試的平台，藉以了解奈米碳管對於水中生物的影響，也可藉由偵測奈米碳管的含量及去向，提供奈米醫學往後發展的研究指標。



B Survival rate

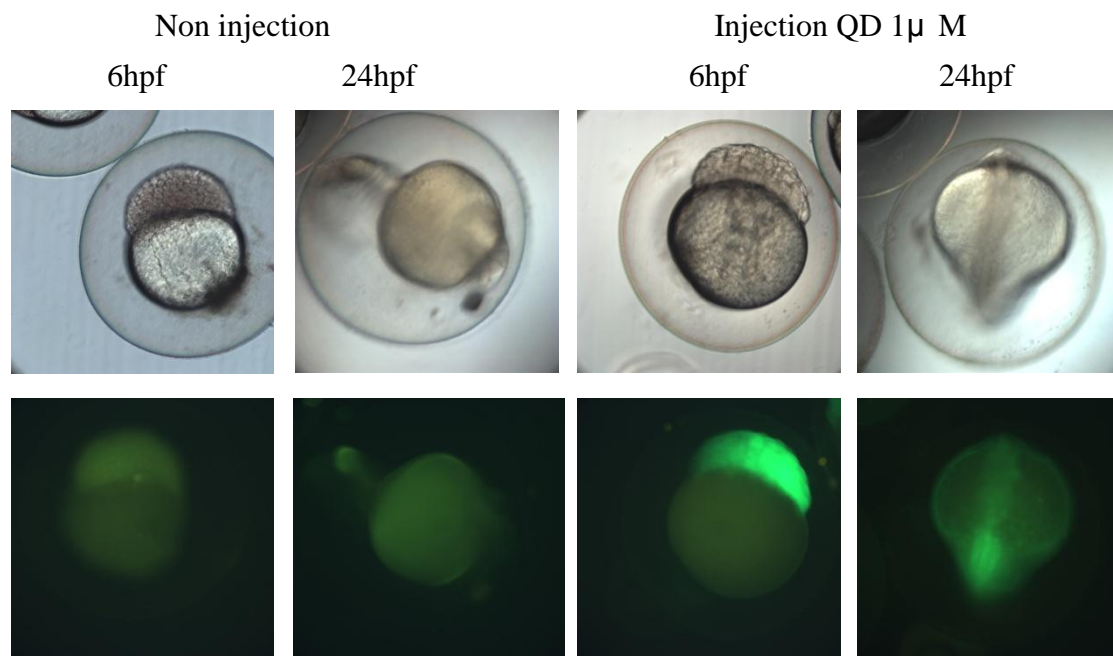


Defect rate



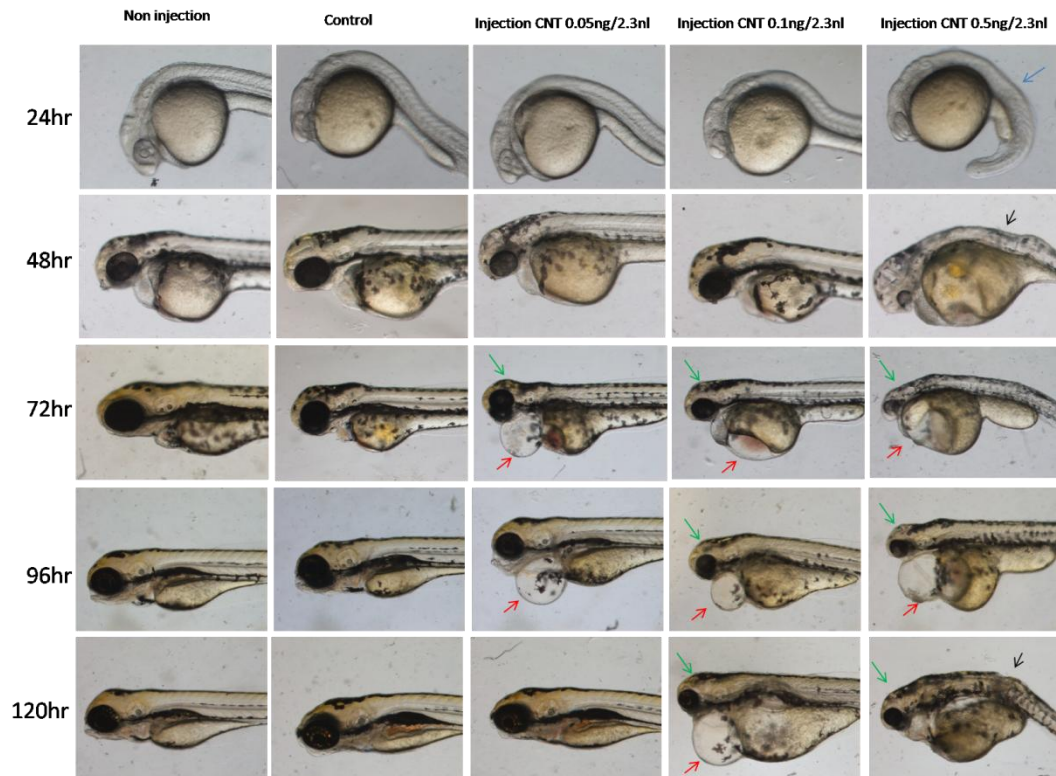
(圖一) 顯微注射不同濃度之 Quantum dot 的胚胎表現型

在 24 小時的時期可以觀察到注射 Quantum dot 的濃度越高，胚胎發育嚴重遲緩，且在 48 小時後開始出現體軸彎曲的異常(黑色箭頭)。到了 72 小時以後的胚胎則出現心臟水腫的表型(紅色箭頭)，體軸彎曲的情形也會更加的嚴重(A)。注射越高濃度的 QD 其存活率越低，畸形率也越高(B)。



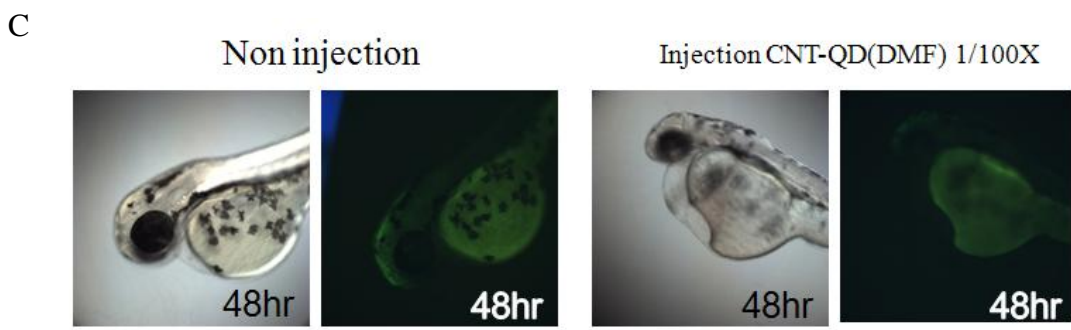
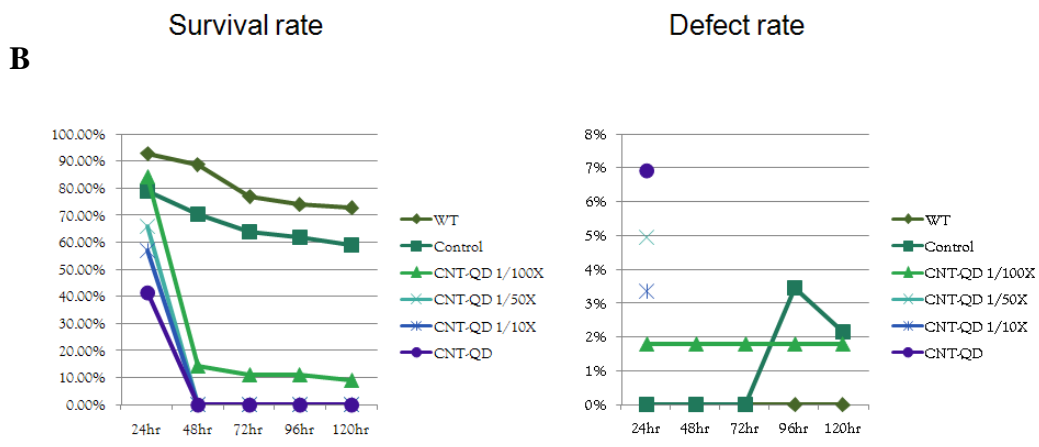
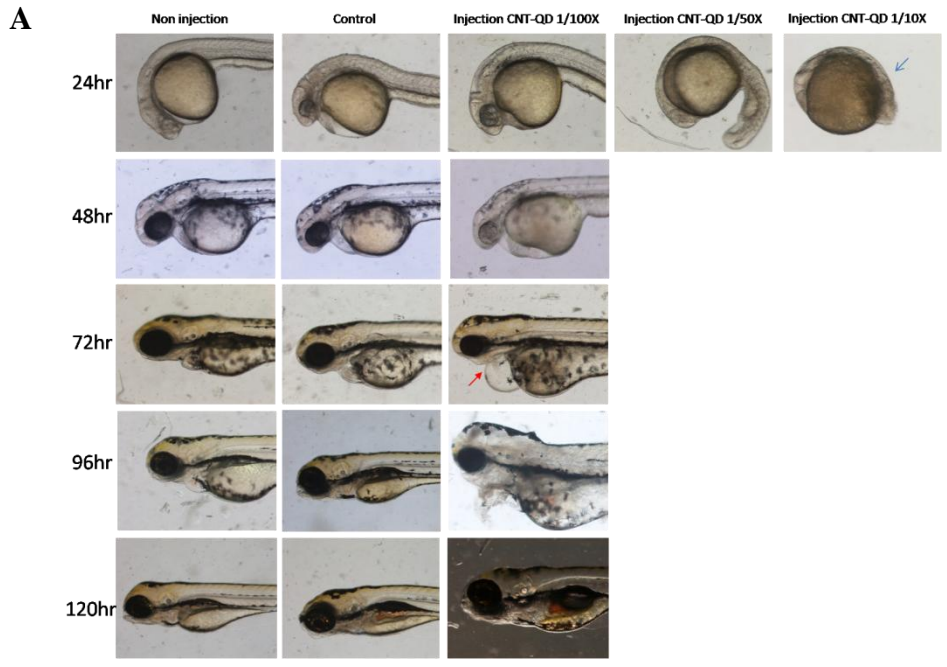
(圖二) 顯微注射Quantum dot 的螢光表現

利用螢光顯微鏡觀察注射1 μ M Quantum dot的胚胎，在6小時時可看到螢光堆積在細胞中，但在24小時以後螢光亮度明顯降低，且48小時之後的胚胎則已經無法觀察到螢光。

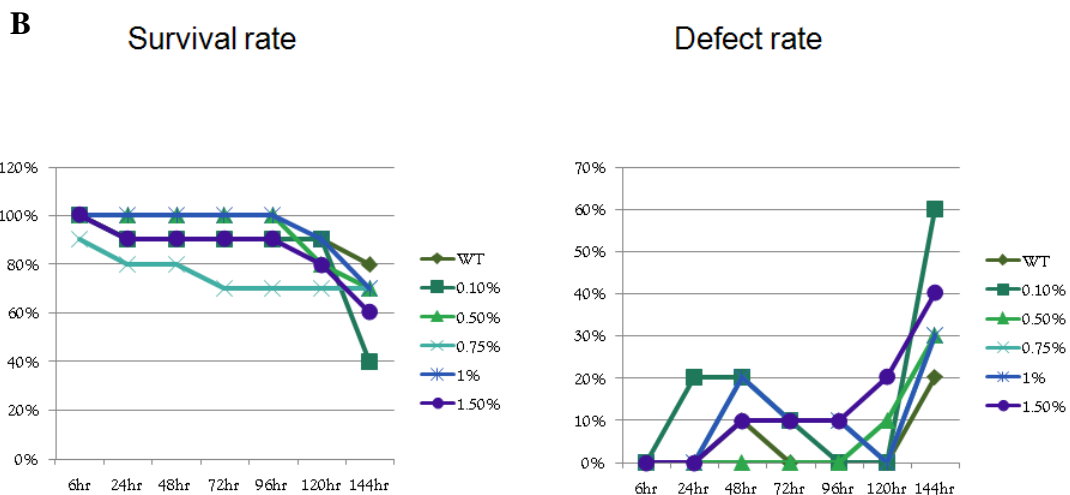
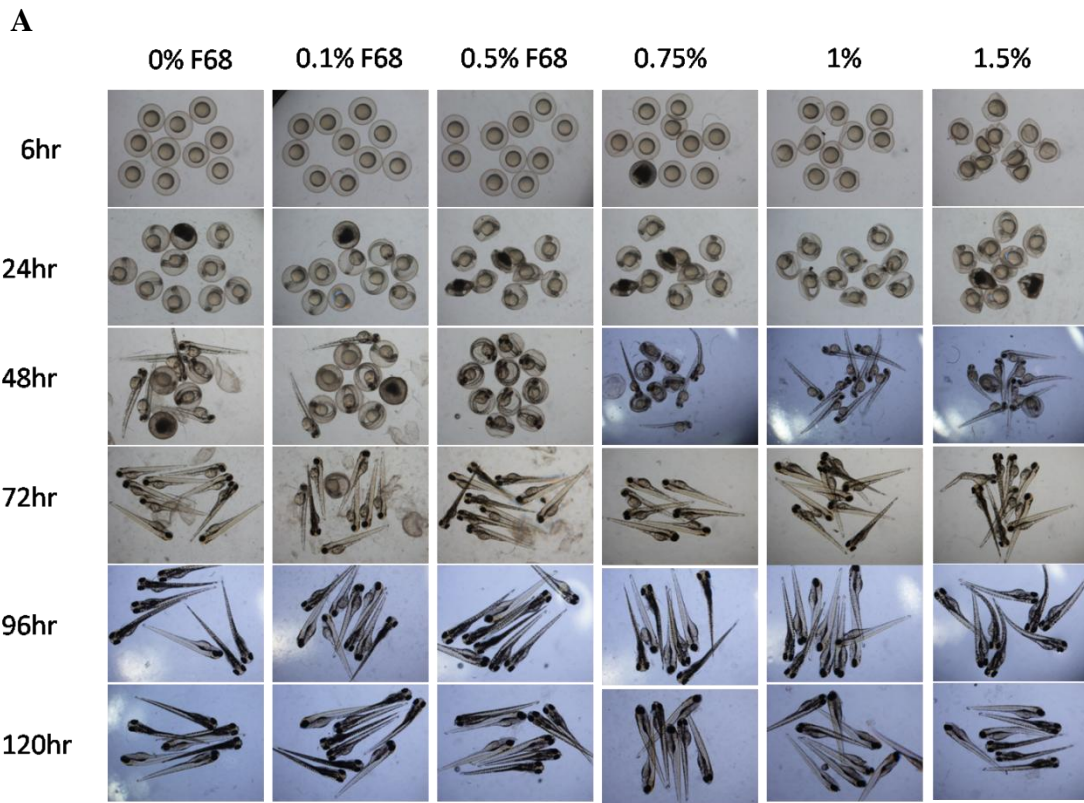


(圖三) 顯微注射不同濃度之奈米碳管的胚胎表現型

在 24 小時的胚胎的發育比對照組來的稍微緩慢，但在 48 小時注射 0.5ng/2.3nl 濃度的奈米碳管的胚胎則出現體軸彎曲的情形。在 72 小時以後可以發現注射不同濃度的奈米碳管的胚胎都會造成心臟水腫（紅色箭頭）以及頭部變小的情況（綠色箭頭），且其表型會隨著胚胎的發育逐漸嚴重。

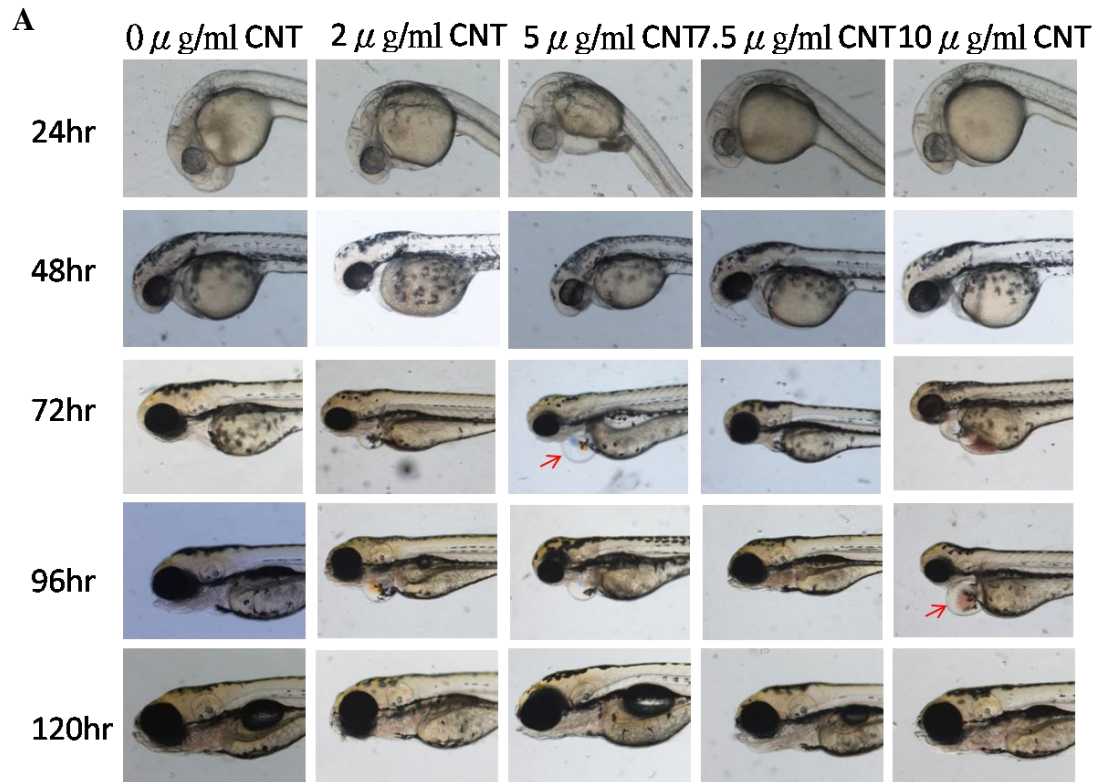


(圖四) 顯微注射不同濃度之 CNT-QD 的胚胎表現型及螢光表現
 在24小時的胚胎的發育嚴重遲緩 (A)，且注射較高濃度的CNT-QD 隻胚胎到了48小時後死亡率達100% (B)。利用螢光顯微鏡觀察注射 CNT-QD的胚胎，在48小時後無法觀察到螢光 (C)。



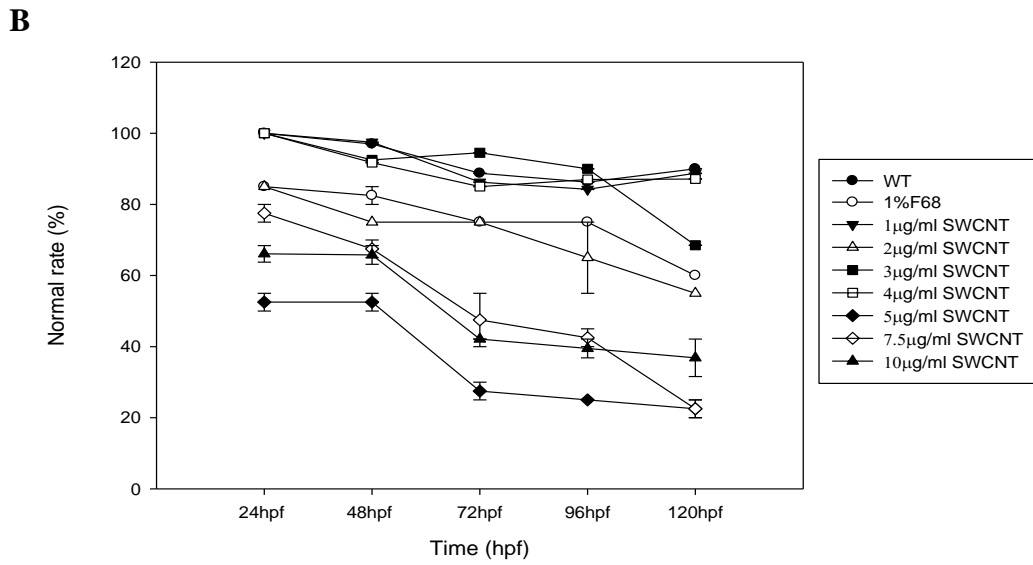
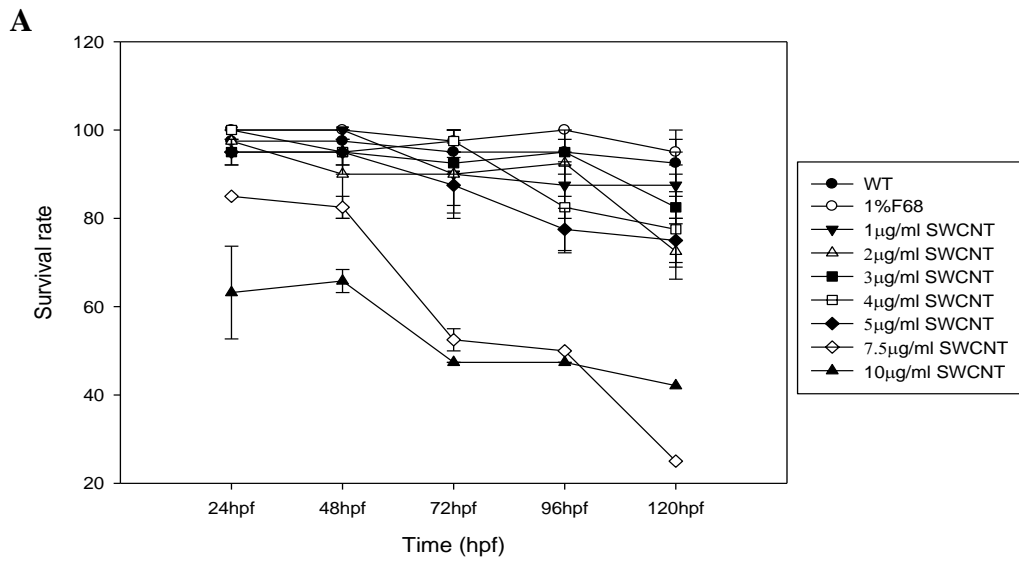
(圖五) 浸泡不同濃度之F68的胚胎表現型

在胚胎發育至六個細胞時期浸泡於不同濃度的F68溶液中，在胚胎發育到6小時後觀察發現隨著F68的濃度升高，卵膜皺縮的情形也逐漸嚴重，到了24小時之後卵膜皺縮之情況也更加嚴重。但是在48小時之後胚胎脫出卵膜，觀察至120小時，發現浸泡於1.5%以下的F68並不會對胚胎發育造成影響(A)。且其胚胎的存活率也與WT相似，對胚胎也不會造成毒性(B)。



(圖六) 浸泡不同濃度之amide-CNT的胚胎表現型

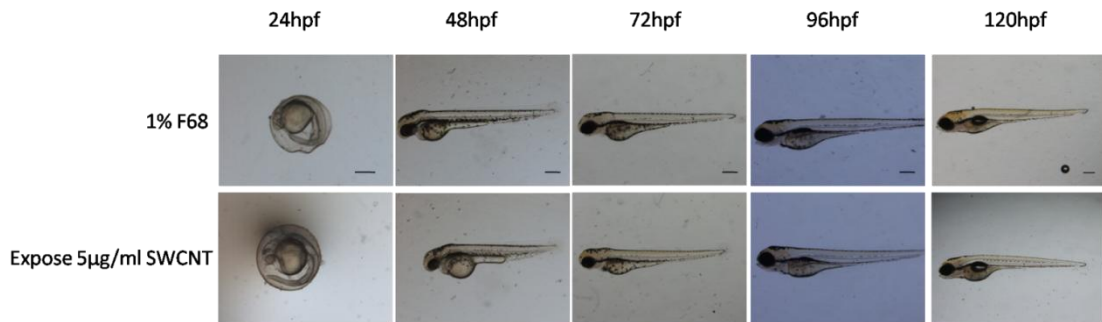
浸泡amide-CNT其表現型上出現了心臟水腫、頭部變小，yolk stalk異常等情況，但是其比例不高(A)。



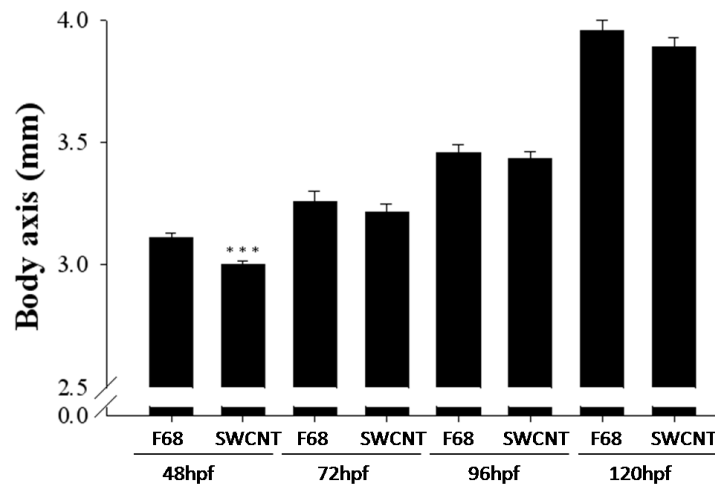
(圖七) 浸泡不同濃度之amide-CNT的胚胎存活率及正常比例的統計圖

浸泡amide-CNT的胚胎存活率其7.5 μ g/ml、10 μ g/ml的存活率較低 (A)，但就其正常比率來說5 μ g/ml的比率明顯較低 (B)。

A



B

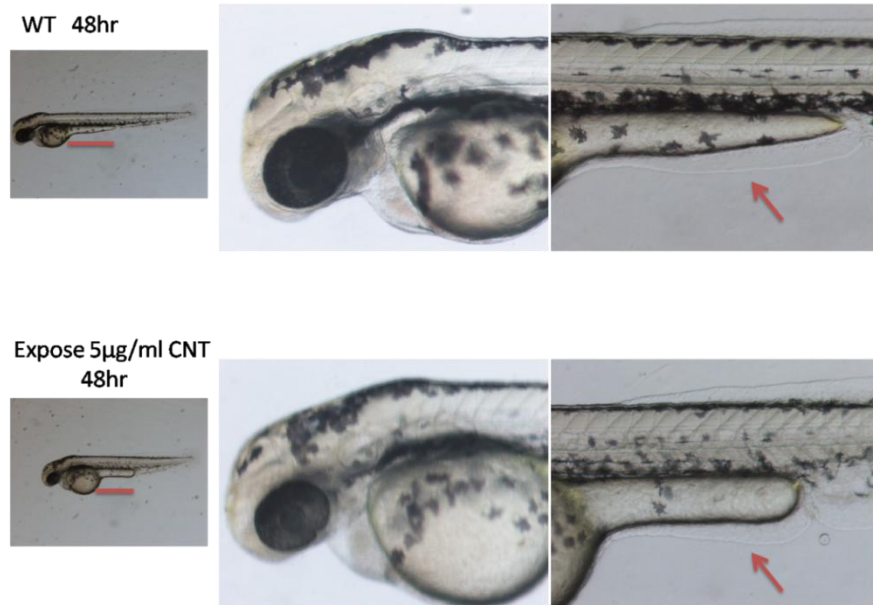


C

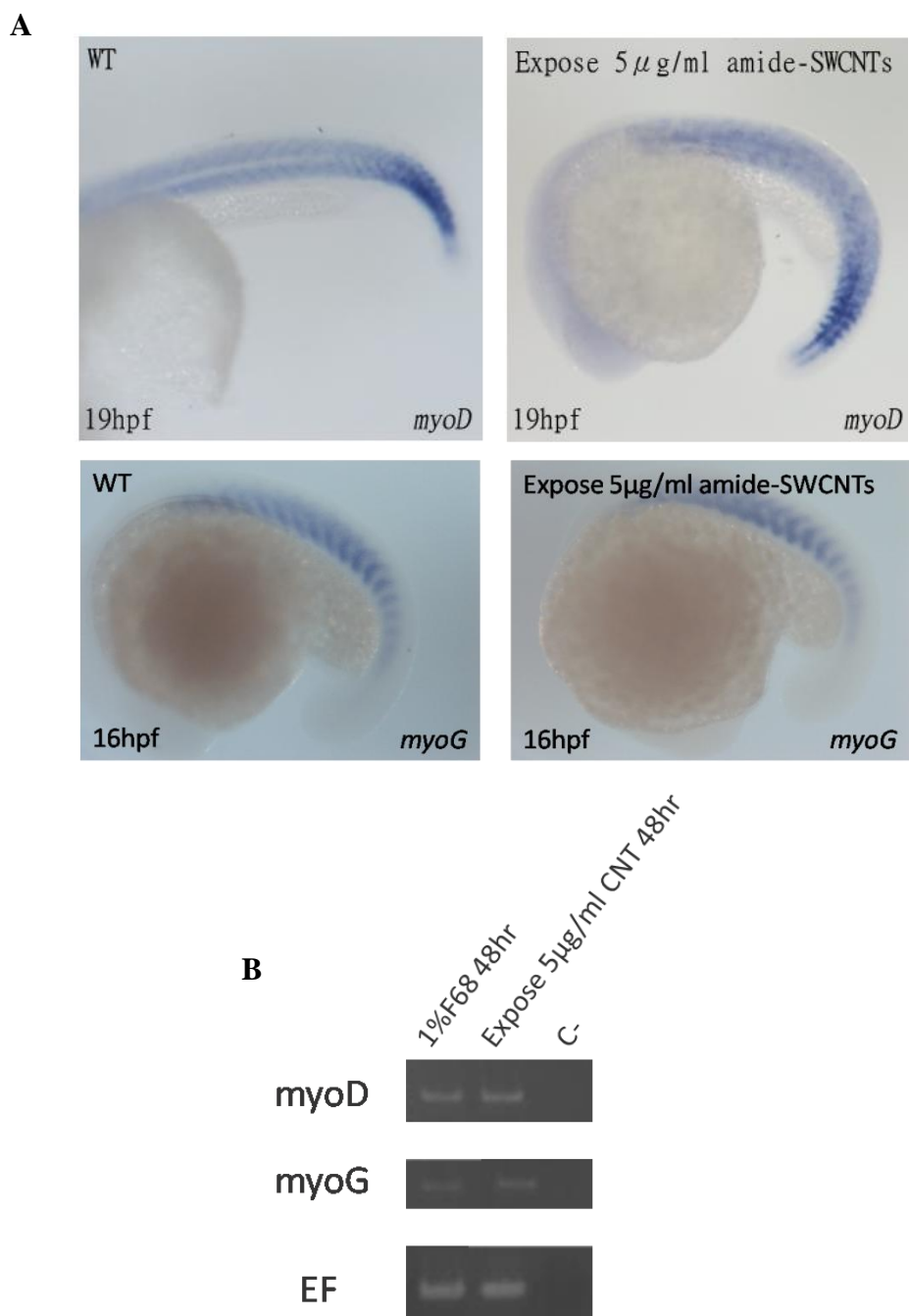
	WT	1% F68	5μg/ml SWCNT
Hatching (48hpf)	2/39=5.128%	8/40=20%	8/37=21.62%
(72hpf)	36/38=94.73%	39/40=97.5%	32/36=88.88%
Pigmentation(48hpf)	31/39=79.48%	20/40=50%	10/37=27.02%
(72hpf)	35/38=92.10%	38/40=95%	34/36=94.44%
Pericardial edemas (72hpf)	2/38=5.26%	1/40=2.5%	6/36=16.66%
Yolk stalk abnormality	4/38=10.52%	6/40=15%	11/36=30.55%

(圖八) 為Expose 5 μg/ml SWCNT之不同時期的胚胎表型、表型統計及體軸

由圖中可觀察出Expose 5 μg/ml SWCNT的胚胎其體軸與Control組比起來略為縮短 (A)。量化來看可知體軸縮短的情形在48hp時具有統計上的意義 (B)。觀察WT、Expose 1%F68、Expose 5 μg/ml SWCNT的胚胎表現型，可以發現Expose 5 μg/ml SWCNT的胚胎在孵出率、色素生成、心包膜腫大及yolk stalk的型態上與WT相較之下顯得異常(C)。



(圖九) 為Expose 5 μ g/ml SWCNT 48hpf的胚胎表型
可由此圖中看出胚胎體軸較短及yolk stalk也較為粗短。

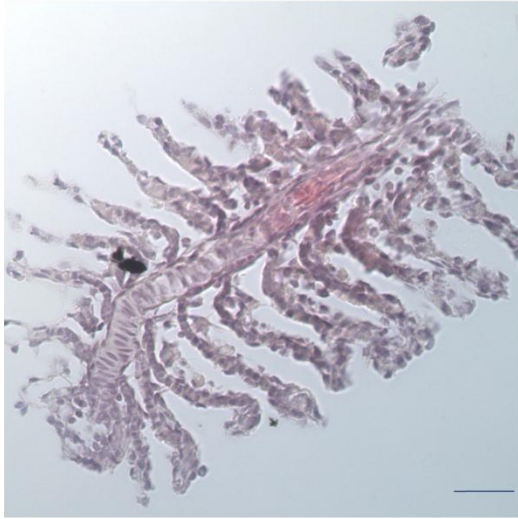


(圖十)將Expose 5 μ g/ml SWCNT 及WT的胚胎利用WISH及RT-PCR觀察胚胎RNA的表現位置及表現量的差異

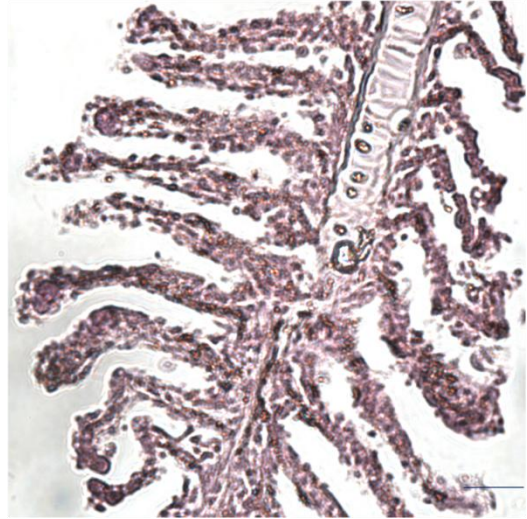
Expose 5 μ g/ml SWCNT 及WT的胚胎利用 Whole mount *in situ* hybridization的方式分別觀察*myoD*、*myoG*的表現情形 (A)。抽取Expose 1%F68、Expose 5 μ g/ml SWCNT胚胎的RNA，並利用RT-PCR的方式觀察*myoD*、*myoG*的表現量 (B)。

A

WT gill 400X

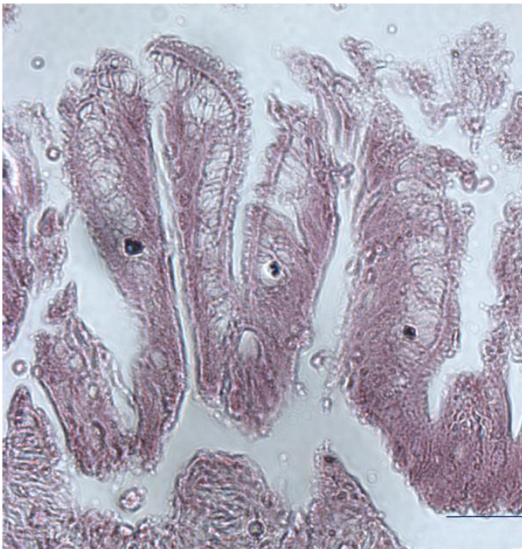


espose CNT 450ng/day gill 400X



B

WT gut 400X



Feeding CNT 450ng/day gut 400X



(圖十一) Wild type與暴露在CNT環境中的成魚組織切片

比較wild type與暴露於CNT的環境中的鰓切面並沒有發現有任何異常 (A)；但是在腸道方面，wild type的小腸絨毛排列較整齊，而餵食CNT的小腸絨毛顯的較為粗，並且出現空泡化 (B)。

參考文獻

1. **J. Cheng , C. M. Chan , L. Monica Veca , W. L. Poon , P. K. Chan , L.Qu ,Y.P. Sun , S. H. Cheng** (2009) Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
2. **K. Donaldso, R. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest, and A.Alexander** (2006) Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicol. Sci.* 92(1), 5–22.
3. **A. J. Hill, H. Teraoka, W. Heideman, and R. E. Peterson** (2005) Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicol. Sci.* 86(1), 6–19.
4. **Z.Liu, C. Davis, W. Cai, L. He, X. Chen, and H. Dai** (2007) Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy *PNAS* 105 (5) , 1410-1415
5. **J.F. Campbell, I. Tessmer, H. H. Thorp, and D. A. Erie** (2008) Atomic Force Microscopy Studies of DNA-Wrapped Carbon Nanotube Structure and Binding to Quantum Dots ,*JACS*, 130 (32), 10648-10655
6. **G. Gotz, G. A. Steele, W-J Vos, and L. P. Kouwenhoven** (2008) Real Time Electron Tunneling and Pulse Spectroscopy in Carbon Nanotube Quantum Dots *Nano Lett.*, 8 (11), 4039-4042
7. **A. L Rubinstein, Z. LLC, K. Hall** (2006) Zebrafish assays for drug toxicity screening *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2006) 2(2):231-240
8. **E. J. Petersen, Q. Huang, and W. J. Weber Jr.** (2008) Ecological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Lumbriculus variegatus* *Environmental Health Perspectives*, 116 (4) ,496-500
9. **N Wong, S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, and H. Dai** (2004) Nanotube Molecular Transporters: Internalization of Carbon Nanotube-Protein Conjugates into Mammalian Cells *JACS*, 126 (22) ,1850-1851
10. **M. C Buford, R. F Hamilton J. and A. Holian** (2007) A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles *Particle and Fibre Toxicology* 2007, 4:6