

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計 畫 : 利用基因轉殖斑馬魚模式篩檢預防耳毒性藥物造成聽 \*  
\* 名 稱 : 障的保護藥物 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 林丞偉  
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-048-B  
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月  
指導教授： 楊建洲

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 106年04月01日

## (一) 前言

胺基糖苷類 (aminoglycosides, AGs) 抗生素在臨床上被用於治療革蘭氏陰性菌感染的疾病，但是 AGs 常導致許多副作用包括內耳毛細胞的損傷，嚴重甚至聽力喪失，導致耳毒性的傷害。魚類的側線毛細胞為一種機械性接受器，負責感覺外在水體的流動。而哺乳動物內耳與魚類側線的毛細胞，兩者不論是構造形態或是功能特性都有相似點，因此斑馬魚常被採用作為抗生素耳毒性保護藥物測試的模式動物。先前本實驗室對 Tg(*pvalb3b : TagGFP*) 轉殖基因魚做藥物 Ferulic acid 耳毒性保護試驗，已建立藥物 Ferulic acid 能保護魚的側線受 neomycin 的破壞，我也利用斑馬魚 Tol 2 基因轉殖系統建立以專一性啟動子 *pvalb3b* 表現 *TagRFP* 融合基因之轉殖基因魚(其融合紅螢光蛋白會表現於內耳或側線系統的毛細胞)，重複藥物 Ferulic acid 耳毒性保護試驗，結果與實驗室之前建立的結果一致，確立正確的實驗步驟之後，再繼續進行 AICAR 和 AMPK inhibitor 兩藥物對 Tg(*pvalb3b : TagGFP*) 轉殖魚的耳毒性保護實驗，觀察側線的螢光表現，另外也透過文獻及資料找到 Gallic acid 及 Cichoric acid 兩種藥物，利用 Tg(*pvalb3b : TagRFP*) 基因轉殖斑馬魚做這兩種藥物的耳毒性保護實驗，而 Gallic acid 和 Cichoric acid 在初步耳毒性保護試驗的結果都顯示有保護耳毒性的情況，於是我們先針對藥物 Gallic acid 做六點毛細胞總數的計數及藥物作用濃度時間序，顯示 Gallic acid 在濃度 200 $\mu$ M 作用一小時在保護魚類側線免受 neomycin 破壞效果最佳，未來期望有一天這些藥物能被做之後一系列的動物實驗，還有人體試驗，最後用於治療人類的疾病，對臨床應用有所貢獻。

### 研究問題：

1. 利用綠螢光斑馬魚做 AMPK inhibitor 的耳毒性保護藥物試驗，觀察不同濃度藥物對魚類側線螢光的變化，初步篩選 AMPK 這藥物是否能當 neomycin 側線破壞的保護藥物。
2. 利用綠螢光斑馬魚做 AICAR 的耳毒性保護藥物試驗，觀察不同濃度藥物對魚類側線螢光的變化，初步篩選 AICAR 這藥物是否能當 neomycin 側線破壞的保護藥物。
3. 利用紅螢光斑馬魚做 Gallic acid 的耳毒性保護藥物試驗，觀察不同濃度藥物對魚類側線螢光的變化，初步篩選 Gallic acid 這藥物是否能當 neomycin 側線破壞的保護藥物。
4. 利用紅螢光斑馬魚做 Cichoric acid 的耳毒性保護藥物試驗，觀察不同濃度藥物對魚類側線螢光的變化，初步篩選 Cichoric acid 這藥物是否能當 neomycin 側線破壞的保護藥物。

### (三)文獻回顧與探討

斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)是目前常用來研究脊椎動物發育的模式動物，為一種體型約 3~5 公分的熱帶淡水魚，其在胚胎發育上的機制與哺乳類動物非常相近。斑馬魚有許多研究操作上的優點而有很高的利用價值，例如：體型小、飼養容易、不佔太多空間、具有光週期誘發產卵、每次產卵數量眾多(約 100~200 顆)、其透明的胚胎使得器官在發育時期即可利用解剖顯微鏡從外部觀察、胚胎發育期短(約 2-3 天)等等[1-3]。近年來，許多斑馬魚基因陸續被發現，重要的調控蛋白質其表現位置和時間也都和哺乳類動物類似，所以可利用突變的方法，包括物理、化學和分子生物學方法，來改變特定基因的表現及建立基因轉殖魚動物模式，以研究基因與發育和疾病之間的相關機制[4]。最近，一些斑馬魚突變的研究已發現在一些器官組織如耳朵、眼睛、心臟、肌肉、血液、脊柱、胰臟及腎等所產生的缺陷，與人類這些器官所產生的一些疾病之病理特徵相似，且為相同基因或同源基因突變所造成。因此，斑馬魚可進一步做為人類疾病研究的動物模式。目前，斑馬魚的動物模式已被運用於癌症、心血管疾病、器官發育、脊椎動物胚胎發育、神經發育、細胞凋亡和聽覺等相關研究，且在藥物篩檢也扮演重要角色[5]。

斑馬魚的聽覺主要是藉由內耳(inner)和側線(lateral line)來偵測水中聲波顫動的刺激而產生[6]。雖然斑馬魚的內耳在構造、功能上與脊椎動物不盡相同，但在內耳的發育形成上，基因的機轉與脊椎動物非常類似[3, 7, 8]。在斑馬魚的內耳構造中，經顯微分析後發現在內耳聽斑區(macula)和側線(lateral line)的毛細胞構造與人類耳蝸內感覺受器的毛細胞構造是相類似的[9]。因為先前有研究文獻指出氧化壓力 ROS (reactive oxygen species) 參與聽覺組織的細胞凋亡及細胞壞死等路徑，而這些路徑也是造成神經性聽力損失的主因，包括跟老化有關的聽覺受損、遺傳性的聽覺受損、耳毒性藥物誘導的聽覺受損和噪音造成的聽覺受損等，當異常的粒線體氧化磷酸化常常會造成 ROS 的產量累積，進而造成細胞凋亡、壞死，使得聽力方面受損[10、11]，本實驗著重在耳毒性藥物誘導的聽覺受損[12]，過去有研究文獻指出胺基糖苷類(aminoglycosides, AGs) 抗生素會造成耳毒性[13、14]，使得 ROS 氧化壓力累積過多造成聽力損害，因為造成 ROS 過量累積的路徑很多，於是我們就朝多條路徑中的其中一條去做研究，也就是 AMPK 這條路徑，因此我們就找了兩種藥物一個是 AMPK inhibitor (adenosine monophosphate-activated kinase inhibitor)，另一個藥物是 AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)，兩者的作用是相反的，前者是抑制 AMP-dependent protein kinase (AMPK) 活性[15]，後者是 AMPK 的 activator 活化子，刺激 AMP-dependent protein kinase (AMPK) 活性，有研究指出 ROS 氧化壓力通過 AMPK 訊號路徑的活化誘導細胞自噬[16]，另有一個研究表示 AICAR 可減弱 LPS 導致的 ROS 訊號[17]。此外我們在篩藥過程中，也

不斷的以抗 ROS 氧化壓力為出發點在找尋其他具有潛力的藥物，分別找到 Gallic acid、Cichoric acid、Vitamin E；這三種都是很好的抗氧化藥物，甚至 Gallic acid 及 vitamin E 都是存在於我們日常生活中可以吃到的食物中；比如說 Gallic acid 在一些葉菜類，如萵苣；一些天然辛香料含量都是挺高的；而廣為人知的 Vitamin E 在菠菜及堅果；還有海鮮(魚、蝦)等，都有高的含量，而 Cichoric acid 則是在 E. purpurea, dandelion 等植物中萃取出高濃度的萃取液，研究指出 Gallic acid 在對抗癌症的效果很好，如胰臟癌、頭頸癌、卵巢癌等[18、19、20]，在抗氧化部分 Gallic acid 在鉛中毒的小鼠，可以提高抗氧化的防禦力，降低 Pb 對身體臟器如肝、腎的傷害[21]；vitamin E 甚至在豬的研究上顯示減緩了在 Gentamicin 作用下造成嚴重的聽力損失[22]；而在 Cichoric acid 的文獻顯示是個很好的自由基清除者[23]，有了這些文獻跟研究佐證這些藥物是非常具有抗氧化的潛力，本篇先針對 Gallic acid、Cichoric acid 利用 Tg(pvalb3b:TagRFP)紅螢光轉殖基因魚進行藥物對耳毒性的保護試驗。

綜上所述，斑馬魚做為模式生物，找到新的藥物可以保護因使用有耳毒性的用藥所造成的損傷，目前臨床上具有耳毒性的用藥多達百餘種，舉例而言，當具有耳毒性的後線抗生素藥物在無法以其他藥物替代的情況下，病人往往需要承擔耳毒性的風險以對抗可能致命的感染，造成臨床上的兩難困境。本實驗想要驗證這些藥物是否真的能保護耳毒性損害，研究之結果或許亦能進一步應用於內耳保護機制之研究上，期望能對人類健康之促進有所裨益，如果藥物試驗結果得知藥物有保護耳毒性的潛力，之後可能會用模式動物行為分析觀察其行為的變化，透過攝影與軟體分析比較加有保護性藥物和甚麼都沒加的控制組的斑馬魚在受到刺激後之反應有何不同。

#### (四)研究方法及步驟

##### 1. 斑馬魚(*Danio rerio*)基因轉殖系統

1. 最近在斑馬魚的基因轉殖主要是利用 MultiSite Gateway Technology (Tol2 system)，此系統可以快速和有效率的將異源性基因(heterologous)的建構在多位點的載體去進行蛋白質表現和功能分析。整個質體建構包括基因選殖的方法和步驟，主要依據 MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit(Catalog no. 12537-032)的操作手冊進行。建構好的質體利用顯微注射 (Microinjection) 的方式打入 1-2cell 時期斑馬魚胚胎 (不要超過 8 個 cell 期)，方法和步驟如前所述。因斑馬魚體內有 Tol2 酵素是一種 transposase，所以可以將基因插入斑馬魚的染色體內。基因轉殖魚可以利用螢光顯微鏡和 RT-PCR 的方式來加以確定。

##### 2. 顯微注射 microinjection

以拉針器製作注射所需的毛細管針，條件為 heat:330、pull:150、vel:150、

time:150。用高度密合鑷子將拉好的毛細管針前端以 45 度斜口切斷，再以針筒灌入礦物油以平衡注射時的壓力，將準備好的毛細管針架上顯微注射器 (Drummondsc, Nanoject II)，把注射液體吸入毛細管中，再注射至 1~2 cell 時期胚胎之卵黃內，每次 2.3nl。將注射過的胚胎加入 egg water ( $\mu\text{g}$  instant salt/ml distilled water) 置於 28°C 恆溫培育觀察。

## 2. 斑馬魚(*Daniorerio*)之飼養

本實驗室將綠螢光基因型斑馬魚(Tg(*pvalb3b*:*TagGFP*))及野生型斑馬魚(AB strain)和紅螢光基因型斑馬魚(Tg(*pvalb3b*:*TagRFP*))，一同飼養於 28°C 恆溫系統中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食

## 3. 斑馬魚(*Daniorerio*)交配

將螢光基因魚進行交配生下來的蛋，(發育狀態良好的胚胎留下來)，將胚胎分盤收集，並將其放置 28°C 培養箱養至四天大，之後做耳毒性加藥實驗。

## 4. 斑馬魚(*Daniorerio*)耳毒性保護實驗

本實驗利用兩種螢光魚為 Tg(*pvalb3b*:*TagRFP*)轉殖魚做藥物 FA 耳毒性保護實驗，每盤 20 隻，作用濃度分別為控制組(不加 FA 及 neomycin)、0 $\mu\text{M}$ 、50 $\mu\text{M}$ 、100 $\mu\text{M}$  及 150 $\mu\text{M}$  和 200 $\mu\text{M}$ ，體積均為 5C.C；另外利用 Tg(*pvalb3b*:*TagGFP*)轉殖魚分別做藥物 AMPK inhibitor 和藥物 AICAR 的耳毒性保護試驗，每盤 20 隻，兩種藥物作用濃度都是控制組(不加保護藥物及 neomycin)、0 $\mu\text{M}$ 、2.5 $\mu\text{M}$ 、5 $\mu\text{M}$ 、7.5 $\mu\text{M}$  和 10 $\mu\text{M}$  及 20 $\mu\text{M}$ ，體積均為 5C.C (控制組即為不加預測性保護藥物及 neomycin)。藥物配好之後，用 vortex 機震盪混合均勻，將加藥盤中蛋水盡量吸乾，將不同濃度的藥物加進相對應的組別中，拿至培養箱，避光作用 1 小時，再將 neomycin 50 $\mu\text{M}$  加進各組中，再放到 28°C 培養箱避光處理 30 分鐘，將加藥盤從培養箱拿出來，把盤內藥物混和液吸出，加蛋水清洗盤內殘留的藥物，在將液體吸出，此步驟要做四次。另外兩個新藥物 Gallic acid(GA)及 Cichoric acid(CA)的耳毒性藥物保護實驗也是每盤 20 隻，Gallic acid 作用濃度分別為控制組(不加 GA 及 neomycin)、0 $\mu\text{M}$ 、50 $\mu\text{M}$ 、100 $\mu\text{M}$ 、150 $\mu\text{M}$  及 200 $\mu\text{M}$  和 250 $\mu\text{M}$ ，體積均為 5C.C，而 Cichoric acid 作用濃度分別為控制組(不加 CA 及 neomycin)、0 $\mu\text{M}$ 、12.5 $\mu\text{M}$ 、25 $\mu\text{M}$ 、50 $\mu\text{M}$ 、100 $\mu\text{M}$

## 5. 配 0.5% 的 agarose 膠

先取 50c.c 的燒杯加 40c.c 的二次水，再取稱量紙稱量 agarose 粉末 0.2 克，小心將粉末倒入二次水，取適當大小的保鮮膜蓋住燒杯，在保鮮膜上戳幾個洞，再放進微波爐微波，直到杯內澄清沒有膠狀物即可，微波完，放入 60°C 定溫箱持續保溫。

## 6. 斑馬魚(*Danio rerio*)包埋

1. 取一個新的 ependorf 插入定溫加熱器，其溫度定在 55 度左右，並把 ependorf 內填入剛剛微波好的膠。取兩隻滴管，一支吸魚，一支吸膠，避免搞混，吸取適量數目要進行包埋的魚放入加有蛋水的盤子中。

### 2. 麻醉

另取一盤加一點蛋水和 3 滴麻醉藥。(麻醉藥是用 0.4% Tricaine Stock) 將要準備包的魚吸到麻醉藥裡，以降低於魚的活動性，大約等 30 秒，以免影響實驗。

### 3. 包埋

將麻醉好的魚吸到放有包埋盤的顯微鏡載物台上，吸取適量膠滴到要包埋的地方，用鈍的針頭將魚調好角度，大概是 45 度角，使其在倒立螢光顯微鏡下好觀察。

## 7. 斑馬魚(*Danio rerio*)側線毛細胞的分析方式

轉殖螢光魚經藥物 AMPK、AICAR、Gallic acid、Cichoric acid 和 neomycin 分別作用後，以倒立顯微鏡觀察側線毛細胞的螢光表現情形，如果藥物螢光四型初篩結果是有保護耳毒性的效果，將會固定計數 3 點前側線(O、OC、MI)和 3 點後側線(P1、P2、P3)的毛細胞數目，經個體平均化後即可得到各組毛細胞的總平均數，再將毛細胞以毛細胞存活率表示，最後利用統計分析網頁 GraphPad 5 Prism，以 *anova* 計算各組之間的差異性而得到，*P* value 及統計圖。

### (五)結果與討論


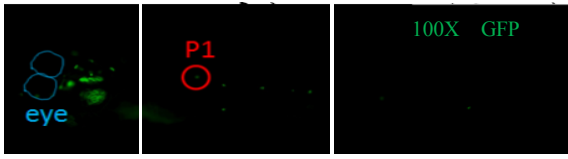
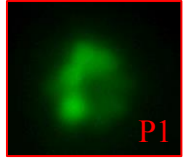

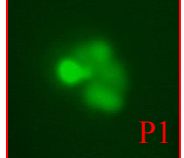
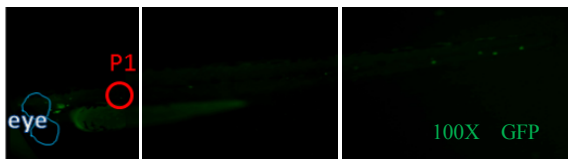
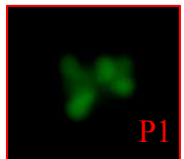

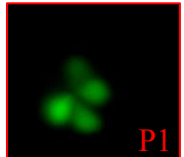
由於先前有文獻發現 neomycin 會造成氧化壓力 ROS 增加，AMPK 又跟 ROS 氧化壓力有關，於是本實驗利用同樣的藥物篩選模式進行 AMPK inhibitor 和 AICAR 兩種藥物對 neomycin 耳毒性的保護性實驗。由於 Tg(*pvalb3b:TagRFP*)目前僅篩選到異型合子基因型，因此先使用同型合子的轉殖基因魚 Tg(*pvalb3b:TagGFP*)進行實驗。胚胎經藥物處理後，我根據後側線的螢光亮度表現將胚胎分為四型，與控制組螢光表現相似的歸為第一型；螢光表現較第一型不明顯的歸為第二型；螢光表現極弱且分布比第二型更加零星則歸為第三型；第四型則為後側線螢光表現幾乎被完全破壞【Figure2】，同時我放大後側線 P1 觀察也確實發現毛細胞的數量會隨著螢光表現強度減弱而下降。而藥物 AMPK inhibitor 的實驗結果如【Table 1】和【Figure 3】，從數據發現 AMPK inhibitor 並不會造成胚胎死亡，對 neomycin 也不具有保護作用。另外藥物 AICAR 的結果則如【Table 2】和【Figure 4】，統計結果也發現胚胎經 AICAR 前處理作用後，胚胎的存活率也很高，但是也無法避免毛細胞受到 neomycin 的破壞，因此我們推測 neomycin 所造成的 ROS 氧化壓力並不是藉由 AMPK 訊息傳遞路徑所調控。那另外兩種藥物保護耳毒性效果，Gallic acid(GA)方面：結果顯示在 0 $\mu$ M(不加

GA，只加 neomycin)，後側線的螢光表現為最差的第四型接下來隨著藥物(GA)作用濃度增加，先看存活率方面；顯然影響不大，再從側線螢光表現來說明；可以看出藥物 GA 對斑馬魚側線的保護有一個鐘形的分布，以 200 $\mu$ M 保護效果達到高峰，相對其他濃度，在第一型的側線螢光表現率以 79.6% 高居首位，其次是 250 $\mu$ M 的 57.6%；再次說明藥物(GA)針對耳毒性造成的影響在 200 $\mu$ M 發揮最佳的保護效果。【Table3】，而 Cichoric acid 方面：在藥物 0 $\mu$ M(不加 cichoric acid，只加 neomycin)，後側線的螢光表現為最差的第四型接下來隨著藥物 cichoric acid 作用濃度增加，先看存活率方面：藥物濃度從 12.5 $\mu$ M 一直提升至 100 $\mu$ M；存活率都維持在 100%，但當藥物濃度增加至 200 $\mu$ M 時，存活率大幅下降；顯然這濃度太高對側線的保護反而是一種傷害，再從側線螢光表現來說明；可以看出藥物 cichoric acid 對斑馬魚側線的保護在濃度 50 $\mu$ M 是比 100 $\mu$ M 在側線的保護效果為佳；再次說明藥物 cichoric acid 針對耳毒性造成的影響在 50 $\mu$ M 發揮最佳的保護效果。依前述的保護耳毒性藥物初步篩選結果看來，Gallic acid 和 Cichoric acid 似乎有保護耳毒性的效果；於是我們先針對 Gallic acid 和 neomycin 做用完之後，計數前側線 3 點(O、OC、MI)和後側線 3 點(P1、P2、P3)的毛細胞數目【Figure 1】，經個體平均化後即可得到各組毛細胞的總平均數，最後我利用統計分析軟體 GraphPad 5 Prism，以 *anova* 計算各組之間的差異性而得到，*P* value 及統計圖，希望藉此找到藥物在斑馬魚起保護耳毒性的最有效濃度，結果發現，隨著藥物 gallic acid 的作用濃度上升，毛細胞總數確實從 0 $\mu$ M 最低點，逐漸增加到 200 $\mu$ M 達到最高點；跟 control 組比較顯示 ns；當濃度增加至 250 $\mu$ M 時，毛細胞數量反而下降了；可見 gallic acid 在 200 $\mu$ M 這個濃度下，對 neomycin 造成的耳毒性保護效果最佳【Figure 5】，接著針對 gallic acid 200 $\mu$ M 再多做了 2 組藥物作用時間序，分別是 0.5h、1.5h，想比較 0.5h、1h、1.5h 三組不同的作用時間跟控制組比有無差異，對毛細胞總平均數的影響，發現 0.5h、1h 兩組跟 1.5h 的數據比較，都有顯著意義，而 0.5h 跟 1h 則顯示 NS，但還是可以從圖表中看出毛細胞總平均數在 1h 這組是比 0.5h 高的，於是之後將會以 1h 作為 gallic acid 藥物處理的基準。【Figure 6】

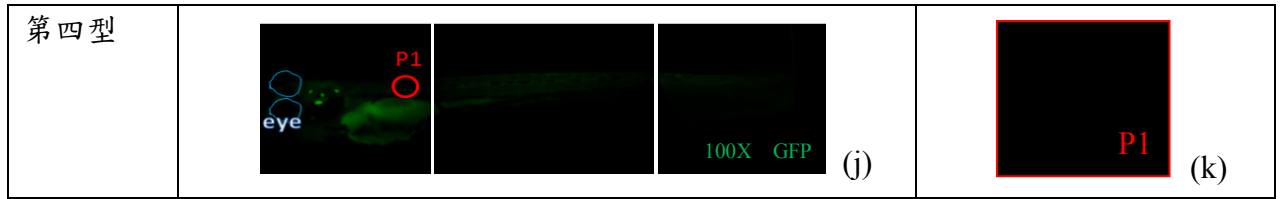
。



【Figure 1】 *Tg(pvalb3b:TagRFP)* 轉殖螢光斑馬魚 4dpf 所觀察之螢光影像。在藥物 FA 對 neomycin 作用的耳毒性加藥保護試驗中，我們取了六個點作數據統計，分別是 o=the otic、oc=occipital、MI= middle、P1=posterior lateral line hair cells 1、P2=posterior lateral line hair cells 2、P3= posterior lateral line hair cells 3

控制組	100X	400X
	 (a)	
	 (b)	 (c)
第一型	 (d)	 (e)
第二型	 (f)	 (g)
第三型	 (h)	 (i)



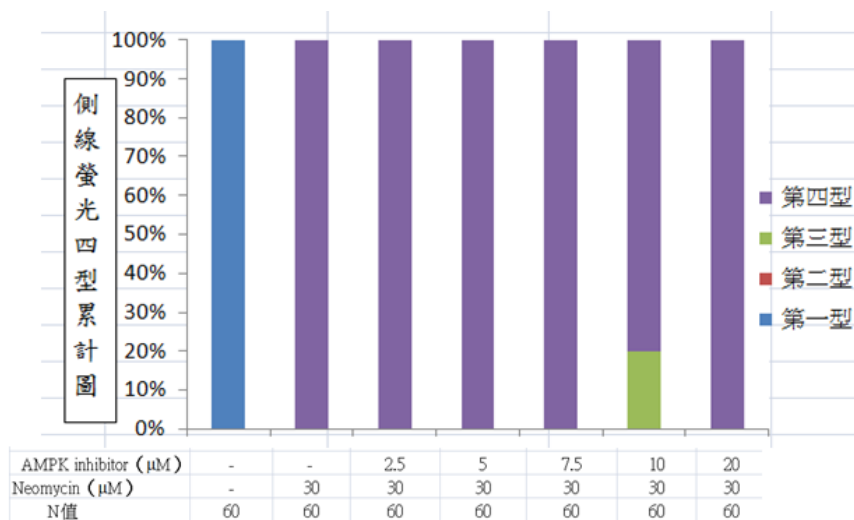


【Figure 2】斑馬魚胚胎之後側線毛細胞經藥物處理後的四種螢光表現形態。圖 (a) 為綠螢光斑馬魚在控制組的可見光型態，圖 (b、d、f、h、j) 為 100X 螢光放大，圖 (c、e、g、i、k) 為後側線 P1 做 400X 螢光放大，放大觀察後側線 P1 也確實發現毛細胞的數量隨著螢光表現強度的減弱而有減少的現象。

### AMPK inhibitor

AMPK inhibitor ( $\mu\text{M}$ )	Neomycin ( $\mu\text{M}$ )	N值	存活率	後側線螢光表現			
				第一型	第二型	第三型	第四型
-	-	60	60/60 (100%)	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)
-	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
2.5	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
5	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
7.5	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
10	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	12/60 (20%)	48/60 (80%)
20	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)

【Table 1】AMPK inhibitor 對 neomycin 耳毒性的保護試驗結果。

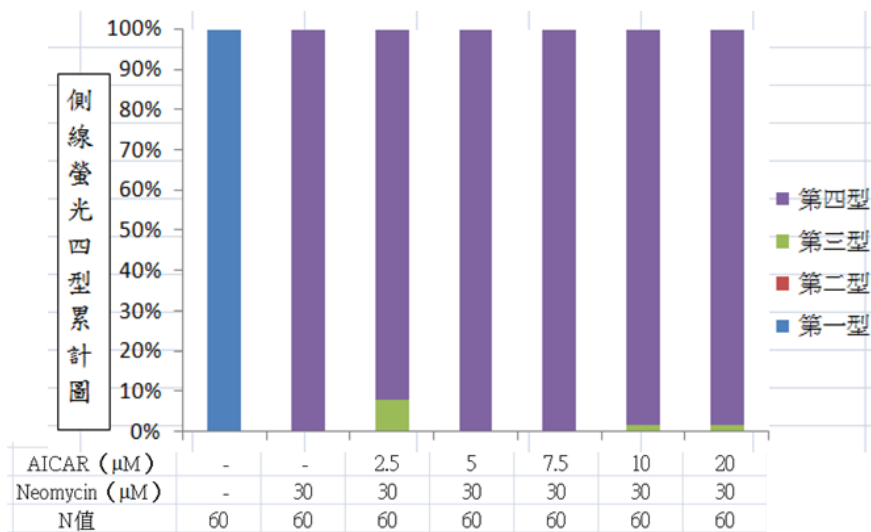


【Figure 3】斑馬魚胚胎經藥物 AMPK inhibitor 和 neomycin 處理後之後側線螢光表現四型累計圖。那 AMPK inhibitor 之後側線螢光表現，控制組維持在第一型，其他 6 種濃度，雖然 AMPK inhibitor 的濃度有在上升，但在螢光表現方面依舊還是維持跟 0 $\mu\text{M}$  一樣都是第四型，偶有第三型的表現，但數量看的出來真的不多，所以推測 AMPK inhibitor 無法勝任耳毒性的保護藥物。

## AICAR

AICAR ( $\mu\text{M}$ )	Neomycin ( $\mu\text{M}$ )	N值	存活率	後側線螢光表現			
				第一型	第二型	第三型	第四型
-	-	60	60/60 (100%)	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)
-	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
2.5	30	60	50/60 (83%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	4/50 (8%)	46/50 (92%)
5	30	60	59/60 (98%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	59/59 (100%)
7.5	30	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
10	30	60	53/60 (88%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	1/53 (1.8%)	52/53 (98.2%)
20	30	60	52/60 (86%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	1/52 (1.9%)	51/52 (98.1%)

【Table 2】AICAR 對 neomycin 耳毒性的保護試驗結果。

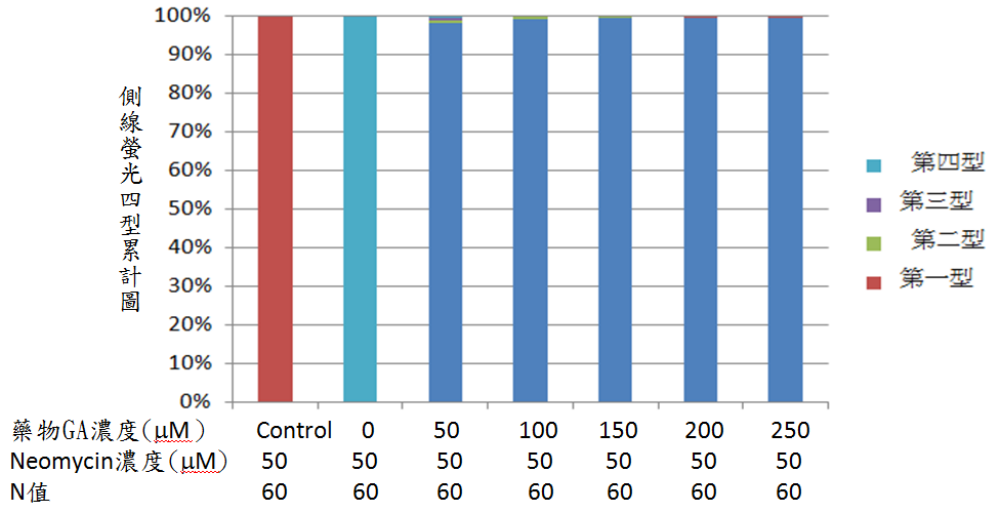


【Figure 4】斑馬魚胚胎經藥物 AICAR 和 neomycin 處理後之後側線螢光表現四型累計圖。控制組的側線螢光表現全為第一型，但其他濃度，雖然藥物 AICAR 的添加濃度有再提高，但依舊無法避免毛細胞受到 neomycin 的破壞，使得在螢光表現方面還是維持第四型表現，少數在 2.5 $\mu\text{M}$  和 10 $\mu\text{M}$  還有 20 $\mu\text{M}$  等濃度有少量的第三型表現但數量很少，因此我推測藥物 AICAR 可能不具有保護耳毒性藥物破壞的能力。

## Gallic acid(GA)

gallic acid( $\mu\text{M}$ )	Neomycin( $\mu\text{M}$ )	N值	存活率	後側線螢光表現			
				第一型	第二型	第三型	第四型
-	-	60	60/60 (100%)	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)
-	50	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
50	50	60	60/60 (100%)	6/60 (10%)	22/60 (36.6%)	19/60 (31.6%)	13/60 (21.6%)
100	50	60	60/60 (100%)	7/60 (11.6%)	44/60 (73.3%)	7/60 (11.6%)	2/60 (3.3%)
150	50	60	59/60 (98.3%)	23/59 (38.9%)	32/59 (54.2%)	4/59 (6.7%)	0/59 (0%)
200	50	60	59/60 (98.3%)	47/59 (79.6%)	12/59 (20.3%)	0/59 (0%)	0/59 (0%)
250	50	60	59/60 (98.3%)	34/59 (57.6%)	25/59 (42.3%)	0/59 (0%)	0/59 (0%)

【Table 1】Gallic acid(GA)對 neomycin 耳毒性的保護試驗初步結果。

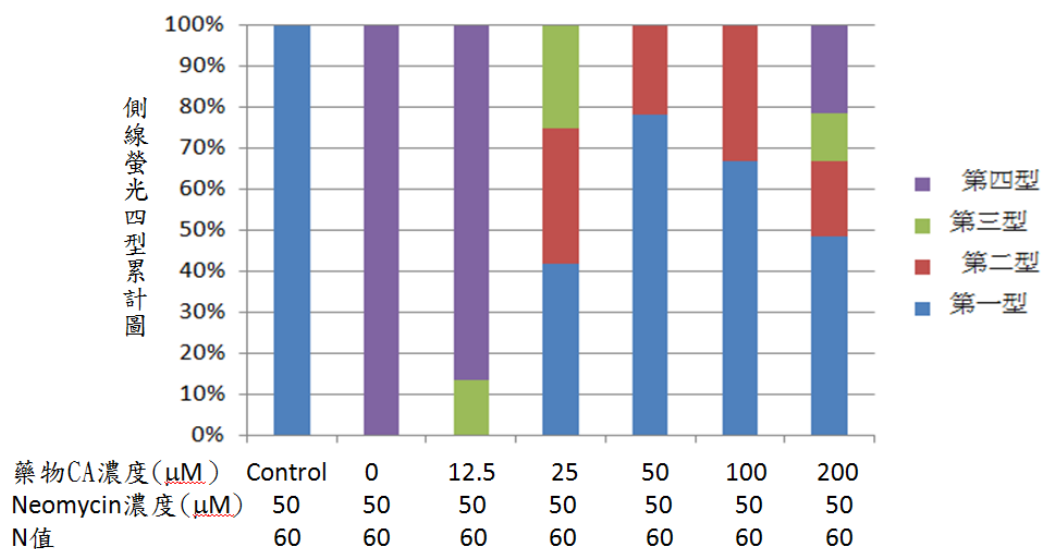


【Figure 5】斑馬魚胚胎經藥物 Gallic acid 和 neomycin 處理後之後側線螢光表現四型累計圖。從柱狀圖上顯示的顏色，很清楚的表示，control 組為 100% 的第一型，而 0μM 這組為 100% 的第四型，那藥物 GA 濃度從 50μM 一路增加到 200μM，第一型的比例持續上升，到 200μM 這組，達最高，濃度為 250μM 時，第一型的比例反而下降了。

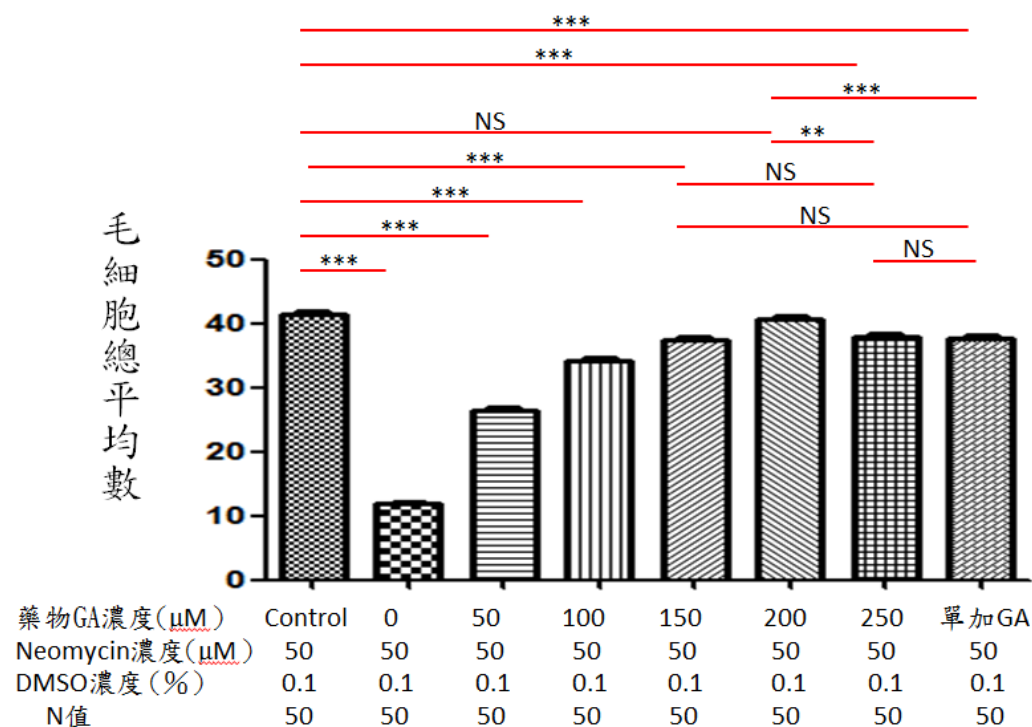
### Cichoric acid

cichoric acid(μM)	Neomycin (μM)	N值	存活率	第一型	第二型	第三型	第四型
-	-	60	60/60 (100%)	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)
-	50	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	60/60 (100%)
12.5	50	60	60/60 (100%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	8/60 (13.3%)	52/60 (86.6%)
25	50	60	60/60 (100%)	25/60 (41.6%)	20/60 (33.3%)	15/60 (25%)	0/60 (0%)
50	50	60	60/60 (100%)	47/60 (78.3%)	13/60 (21.7%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)
100	50	60	60/60 (100%)	40/60 (66.6%)	20/60 (33.3%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)
200	50	60	60/60 (100%)	29/60 (48.3%)	11/60 (18.33%)	7/60 (11.6%)	13/60 (21.6%)

【Table 2】Cichoric acid 對 neomycin 耳毒性的保護試驗初步結果。

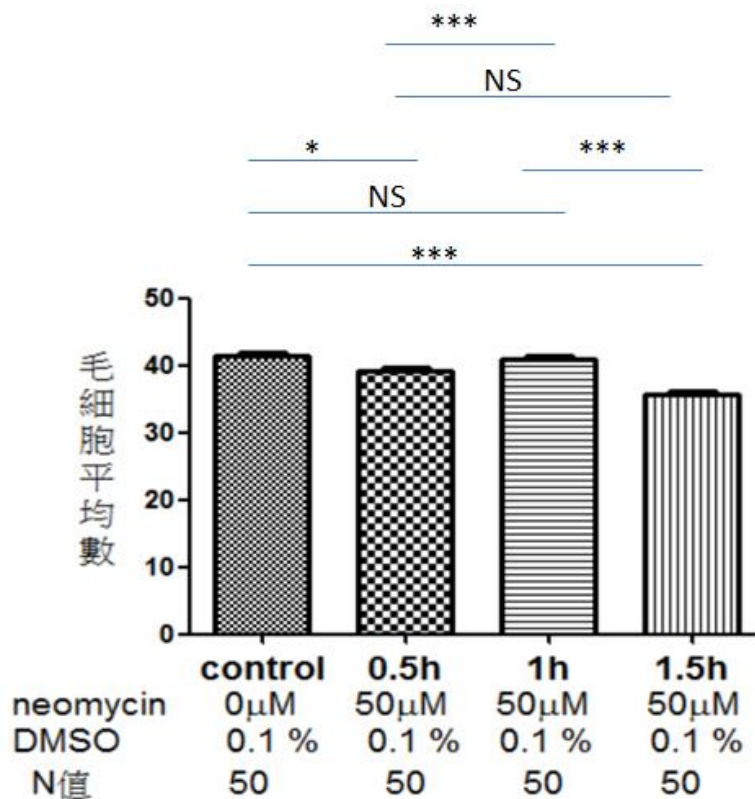


【Figure 6】斑馬魚胚胎經藥物 Cichoric acid(CA)和 neomycin 處理後之後側線螢光表現四型累計圖。從圖上顯示的四種顏色分布來看，很清楚的表示，control 組為 100% 的第一型，而 0 $\mu$ M 這組為 100% 的第四型，那藥物 CA 濃度從 12.5 $\mu$ M 一路增加到 50 $\mu$ M，第一型的比例持續上升，當濃度達到 100  $\mu$ M，第一型的比例反而下降了，當濃度達到 200  $\mu$ M 時，第一型的比例下降更劇烈了，從趨勢看來藥物 CA 在 50  $\mu$ M 起的耳毒性保護效果最佳。



【Figure 7】有了先前 gallic acid 對耳毒性的保護試驗初步結果之後；我們進行側線毛細胞總平均數的計算(採計前側線三點、後側線三點)，進行數據統計，結果發現，隨著藥物 gallic acid 的作用濃度上升，毛細胞存活率確實從 0 $\mu$ M 最低點，逐漸增加到 200 $\mu$ M 達到最高點；分析結果，200  $\mu$ M 跟 control 組比較顯示 ns；當濃度增加至 250 $\mu$ M 時，毛細胞總平均數反而下降了；可見 gallic acid 在 200 $\mu$ M 這個濃度下，對 neomycin 造成的耳毒性保護效果最佳。

## gallic acid 的 time course



**【Figure8】**我們在上一張實驗圖表中顯示，藥物 gallic acid 對耳毒性造成的影響在 200µM 發揮最佳的保護效果。於是針對 gallic acid 200µM 再多做了 2 組藥物作用時間，分別是 0.5h、1.5h，想將 0.5h、1h、1.5h 三組不同的作用時間序列跟 control 組(不加 GA 及 neomycin)做比較，並顯示對毛細胞總數的影響，發現 0.5h、1h 兩組跟 1.5h 的數據比較，都有顯著意義，而 0.5h 跟 1h 則顯示 NS，但還是可以從圖表中看出毛細胞總數在 1h 這組是比 0.5h 高的，於是之後將會以 1h 作為 gallic acid 藥物處理的基準。

## (七)參考文獻

1. Kimmel, C.B., et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 1995. 203(3): p. 253-310.
2. Postlethwait, J.H., et al., A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 1994. 264(5159): p. 699-703.

3. Whitfield, T.T., *Zebrafish as a model for hearing and deafness*. *Journal of neurobiology*, 2002. 53(2): p. 157-171.
4. Ikegami, R., P. Hunter, and T.D. Yager, *Developmental activation of the capability to undergo checkpoint-induced apoptosis in the early zebrafish embryo*. *Developmental biology*, 1999. 209(2): p. 409-433.
5. Zon, L.I., *Zebrafish: a new model for human disease*. *Genome Research*, 1999. 9(2): p. 99-100.
6. Moorman, S.J., *Development of Sensory Systems in Zebrafish (Danio rerio)*. *ILAR Journal*, 2001. 42(4): p. 292-298.
7. Haddon, C. and J. Lewis, *Early ear development in the embryo of the zebrafish, Danio rerio*. *Journal of Comparative Neurology*, 1996. 365(1): p. 113-128.
8. Haffter, P., et al., *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio*. *Development*, 1996. 123(1): p. 1-36.
9. Popper, A. and C. Platt, *Inner ear and lateral line. The physiology of fishes*, 1993: p. 99-136
10. *Reactive Oxygen Species, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss*. *BioMed Research International* , 2015, 617207,
11. *Age-related hearing impairment and the triad of acquired hearing loss*. *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 276.
12. *Drug-induced hearing loss*. *Prescrine Int*. 2014 .23(155):290-4
13. *Ototoxicity caused by aminoglycosides* , *BMJ*. 2007 Oct ; 335(7624): 784–785.
14. *Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss*. *Drug Discov Today*.2010 ; 15(7-8) : 265-271

15. *AMPK inhibition in health and disease. Journal of Crit Rev BiochemMolBiol* , 2010 ; 45 ( 4 : 276-295 )
16. *Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. Journal of [Cell Signal](#)*.2013;25(1):50-65.
17. *AMPK Inhibition Blocks ROS-NFκB Signaling and Attenuates Endotoxemia-Induced Liver Injury. Journal of PLoS ONE* , 2014; 9(1)
18. *Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1α/VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells [Oncol Rep](#)*. 2016 Jan; 35(1): 291–297.
19. *Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells [Oncol Lett](#)*. 2013 Dec; 6(6): 1749–1755.
20. *Gallic acid as a cancer-selective agent induces apoptosis in pancreatic cancer cells. Chemotherapy*. 2012;58(3):185-94.
21. *Antioxidant protection of gallic acid against toxicity induced by Pb in blood, liver and kidney of rats [Toxicology Reports](#) [Volume 3](#)*, 2016, Pages 351–356
22. *α-Tocopherol protective effects on gentamicin ototoxicity: An experimental study [International Journal of Audiology](#) 43(3):166-71*
23. *Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from Echinacea purpurea, alone and in combination Food Chemistry Volume 101, Issue 1, 2007, Pages 74–81*