

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 利用細胞及動物模式探討植物毒素調控 BLCAP 基因的毒理 機轉 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 100-2313-B-040-005-  
執行期間：100年08月01日至101年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

計畫主持人：劉秉慧

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101 年 11 月 20 日

中文摘要：馬兜鈴酸是一種小分子的天然植物毒素，廣存於馬兜鈴屬和細辛屬等中草藥植物中，臨床上觀察人體服用含有馬兜鈴酸的藥物會造成急性腎臟纖維化、腎小管嚴重萎縮甚至導致泌尿道癌症。BLCAP 基因的表現則已知與膀胱癌演變有密切相關性。由於部分研究指出服用馬兜鈴酸可能導致膀胱腫瘤的形成，但是 BLCAP 在細胞中的功能仍有待探討。所以本研究以人類胚胎腎臟細胞株(HEK 293 cell)和斑馬魚為標的來探討馬兜鈴酸抑制 BLCAP 基因表達的機轉。

利用不同濃度的馬兜鈴酸 (50 貢 M 至 200 貢 M)處理 HEK293 細胞 24 小時後，會使 BLCAP mRNA 表現量顯著的減少。接著為了探討馬兜鈴酸是否在轉錄層次影響 BLCAP 基因的表達，我們把建構 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體轉染到 HEK293 細胞中，並利用不同濃度的馬兜鈴酸 (50 貢 M 至 200 貢 M)處理後，發現馬兜鈴酸會抑制 BLCAP 啟動子的活性。發現此現象後，於是本研究進一步分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區，實驗結果顯示，隨著 BLCAP 啟動子長度的縮短，馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的比例相似，所以本研究無法利用該實驗方法分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區域。但是本研究也發現在溶劑環境中當剔除位於 BLCAP 啟動子 -66 至 -31 片段的 GC box 序列時，BLCAP 啟動子的活性明顯的下降，因此本研究認為 BLCAP 基因的表達與 GC box 的啟動有關。

此外以斑馬魚為動物模式探討不同濃度馬兜鈴酸的發育毒性，受精後 6 小時(6 hpf)的斑馬魚胚胎，分別處理對照組溶液(A)、5 貢 M (B)、10 貢 M (C) 及 20 貢 M (D) 的馬兜鈴酸溶液，於 48 hpf 時以解剖顯微鏡觀察。與對照組相比較下，馬兜鈴酸處理後的斑馬魚胚胎有 yolk 變黑及體軸彎曲的現象。

中文關鍵詞：植物毒素馬兜鈴酸， BLCAP 基因，人類腎臟細胞株，斑馬魚模式

英文摘要：

英文關鍵詞：

行政院國家科學委員會補助專題研究  
計畫 期中報告 期末報告

計畫名稱:利用細胞及動物模式探討植物毒素調控 BLCAP 基因的  
毒理機轉

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 100 - 2313 -B -040-005 -

執行期間：100 年 8 月 1 日至 101 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學生醫系

計畫主持人：劉秉慧

共同主持人：

計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 101 年 10 月 30 日

## 【中文摘要】

馬兜鈴酸是一種小分子的天然植物毒素，廣存於馬兜鈴屬和細辛屬等中草藥植物中，臨床上觀察人體服用含有馬兜鈴酸的藥物會造成急性腎臟纖維化、腎小管嚴重萎縮甚至導致泌尿道癌症。BLCAP基因的表現則已知與膀胱癌演變有密切相關性。由於部分研究指出服用馬兜鈴酸可能導致膀胱腫瘤的形成，但是BLCAP在細胞中的功能仍有待探討。所以本研究以人類胚胎腎臟細胞株(HEK 293 cell)和斑馬魚為標的來探討馬兜鈴酸抑制 BLCAP 基因表達的機轉。

利用不同濃度的馬兜鈴酸 (50  $\mu\text{M}$  至 200  $\mu\text{M}$ )處理 HEK293 細胞 24 小時後，會使 BLCAP mRNA 表現量顯著的減少。接著為了探討馬兜鈴酸是否在轉錄層次影響 BLCAP 基因的表達，我們把建構 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體轉染到 HEK293 細胞中，並利用不同濃度的馬兜鈴酸 (50  $\mu\text{M}$  至 200  $\mu\text{M}$ )處理後，發現馬兜鈴酸會抑制 BLCAP 啟動子的活性。發現此現象後，於是本研究進一步分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區，實驗結果顯示，隨著 BLCAP 啟動子長度的縮短，馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的比例相似，所以本研究無法利用該實驗方法分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區域。但是本研究也發現在溶劑環境中當剔除位於 BLCAP 啟動子 -66 至 -31 片段的 GC box 序列時，BLCAP 啟動子的活性明顯的下降，因此本研究認為 BLCAP 基因的表達與 GC box 的啟動有關。

此外以斑馬魚為動物模式探討不同濃度馬兜鈴酸的發育毒性，受精後 6 小時 (6 hpf)的斑馬魚胚胎，分別處理對照組溶液(A)、5  $\mu\text{M}$  (B)、10  $\mu\text{M}$  (C) 及 20  $\mu\text{M}$  (D)的馬兜鈴酸溶液，於 48 hpf 時以解剖顯微鏡觀察。與對照組相比較下，馬兜鈴酸處理後的斑馬魚胚胎有 yolk 變黑及體軸彎曲的現象。

關鍵字：植物毒素馬兜鈴酸， BLCAP基因，人類腎臟細胞株，斑馬魚模式

## 【背景介紹】

國人利用中草藥來治病已經有數千年的歷史，長久下來中草藥被認為是性溫，副作用相當低的藥物。但是近年在許多常見的中藥內發現含有高量的植物毒素馬兜鈴酸(aristolochic acid, 簡稱馬兜鈴酸)，馬兜鈴酸此種小分子毒素是由植物的根和地下莖萃取而來，泛存於馬兜鈴屬和細辛屬中藥材(包括關木通、廣防己、青木香、細辛、黃細辛等)之中 (Ong, et al., 2000)。國際社會間頻頻傳出因為服用含有馬兜鈴酸的藥材，導致腎臟衰竭或癌症的病例的報告發生，最早於1991年在比利時發現約有100個病人是因為服用含有馬兜鈴酸的減肥藥造成急性腎臟衰竭，其中約有半數病人需要作腎臟移植，較嚴重者則引發泌尿系統之腫瘤發生。臨床上觀察人體服用含有馬兜鈴酸的藥物會造成腎小管間質組織纖維化及腎小管嚴重萎縮，此種特殊的急性腎臟纖維化疾病稱為馬兜鈴酸腎臟病變 (aristolochic acid nephropathy)或是中藥腎病變在台灣區統計調查1997-2002年4590個病患資料得知服用含有馬兜鈴酸的中藥。

先前研究指出馬兜鈴酸對於細胞株與動物具有腎毒性 (nephrotoxic) 和致癌性 (Stiborova et al., 2008)，在中藥腎病變的患者腎臟組織中，發現馬兜鈴酸會和DNA形成共價的核酸鍵結物 (DNA-adduct)，主要是以7-(deoxyadenosin-N6-yl) aristolactam (dA-AA)和7-(deoxyguanosin-N2-yl) aristolactam (dG-AA) 的形式出現 (Stiborova et al., 2008)，因而造成DNA核酸中AT-TA transversion mutation。另有研究指出，在馬兜鈴酸所引起的尿路上皮細胞癌病患的細胞組織切片中，發現馬兜鈴酸會和 p53 基因的核苷酸產生 DNA-adduct，使原先 AAG 的序列發生突變，造成 p53 基因功能喪失 (Lord et al., 2004)。若是利用馬兜鈴酸處理人類腎臟HK-2細胞株則發現其能誘發氧化壓力，降低DNA 修補能力並且影響細胞週期和凋亡 (Chang et al., 2006; Chen et al., 2010; Hsin et al., 2006)。目前包括美國、歐盟陸續禁用含有馬兜鈴酸成份的產品，台灣衛生署則在2003年公告全面禁止含有馬兜鈴酸的藥品，並撤銷相關之中草藥藥品證，國際癌症研究中心 (IARC, 2010) 則將馬兜鈴酸分類為group 1-確定為人類的致癌物。

Bladder cancer associated protein (BLCAP) 的基因含有10,513 個鹼基對，由其coding region分析預測BLCAP應是一個分子量大小約10 kDa 的蛋白質，由胺基酸序列顯示 BLCAP 在不同物種中(如斑馬魚、小鼠、大鼠、牛及線蟲等)的同源保留度極高 ( Clutterbuck et al., 2005 )。BLCAP 在不同組織間表現程度不一，但許多組織皆可偵測到 BLCAP mRNA表達，如大腦、子宮頸、膀胱、睪丸、胎盤、脾臟，以及周邊血白血球細胞等 (Xinxing et al., 2008)。

雖然 BLCAP 在生物體內的功能尚未明朗，但是經由生物資訊軟體的分析預測 BLCAP 蛋白質構型在第 19-39 以及第 43-68 的胺基酸序列為 trans-membrane helices，其 N 端序列與 Src homology 3 domain 序列相似並且還具有 tyrosine kinases cleavage site 使 N 端形成 signal peptide，除此之外，軟體亦預測 BLCAP 蛋白質的 C 端可能有三個 serine 的磷酸位並且具有 SPXX motif，這種 motif 通常出現在轉錄因子或是 DNA 結合蛋白之中。綜合以上的預測可知 BLCAP 蛋白質極可能為穿膜蛋白，且具有訊息傳遞之功能 (Gromova et al., 2002; Moreira et al., 2010)，但是目前這一切預測並無實驗數據作為證實。

BLCAP 的發現和命名是由於 1999 年 Gromova 等人利用 differential-display PCR 比較轉移性以及非轉移性膀胱癌檢體時，觀察到一個未知基因的 mRNA 表現量明顯降低與膀胱癌的發展進程有高度相關性，此外在子宮頸癌組織、腎臟癌病患組織、舌癌組織中及骨肉瘤都發現 BLCAP mRNA 表現量的大量缺失的現象 (Zuo et al., 2006; Yao et al., 2007; Rae et al., 2000)，所以 BLCAP 被視為辨識轉移性腫瘤 transitional cell carcinoma 的指標，也極可能為腫瘤抑制基因 (Gromova et al., 1999)。Zuo 等人曾將 BLCAP cDNA 轉染到子宮頸癌細胞後，結果顯示 BLCAP 基因大量表現導致細胞生長停滯，並誘發 HeLa 細胞凋亡 (Zuo et al., 2006)。若是將 BLCAP 在人類舌癌細胞中過度表現亦觀察到舌癌細胞中 p21 表現上升而 Bcl-XL 和 Bcl-2 的表現下降，使人類舌癌細胞生長趨緩。

## 【研究目的】

- 目標 1. BLCAP 所影響的下游基因為何
- 目標 2. 馬兜鈴酸是經由 promoter 上哪一個區域降低 BLCAP 基因的轉錄活性；
- 目標 3. 馬兜鈴酸是否經由干擾特定轉錄因子而影響 BLCAP 基因的轉錄活性
- 目標 4. 探討馬兜鈴酸對於斑馬魚存活暨腎臟發育的影響；
- 目標 5. 製備對於 BLCAP 蛋白質具有專一性的抗體並且確認其在細胞中的分布位置
- 目標 6. 馬兜鈴酸是否對於斑馬魚胚胎發育過程中 BLCAP 基因的表達及分布造成影響。

## 【本計畫之重要性及國內外相關文獻】

近年在許多常見的中草藥內發現含有高量的植物毒素馬兜鈴酸，此種小分子泛存於馬兜鈴屬和細辛屬中藥材(包括關木通、廣防己、青木香、細辛、黃細辛等)中，調查發現植株中毒素含量可高達600 至 960 ppm (Li et al., 2004; Lee, et al., 2001)。由1991年在比利時發生的大規模馬兜鈴酸中毒事件即可得知人體服用含有馬兜鈴酸的藥物會造成急性腎臟衰竭，甚至引發泌尿系統之腫瘤發生。國際癌症研究中心 (IARC, 2010) 目前將含有馬兜鈴酸的馬兜鈴屬草藥確認為人類的致癌物質 (Group 1)，台灣衛生署則在 2003 年公告全面禁止含有馬兜鈴酸的藥品，但是因為各類中草藥的外型相似，通俗名稱容易混淆，再加上大陸地區並未對馬兜鈴酸和馬兜鈴屬草藥規範設限，所以誤用情況嚴重，根據Yu, et al., (2006)調查結果顯示市面上仍有許多含高量馬兜鈴酸的藥材或減肥食品仍在販售中，其中高達 80 %的樣品含有2.1至668 ppm的馬兜鈴酸。在本實驗室的數據顯示以35 ppm的馬兜鈴酸處理人類腎臟細胞株12小時即可造成氧化壓力和DNA斷裂，而我們也發現馬兜鈴酸會令正常細胞中BLCAP基因的表達量顯著下降，本計劃主要在探討馬兜鈴酸對膀胱癌相關蛋白質BLCAP的影響，所得到的資訊不只有助於將來對於馬兜鈴酸的毒性及致癌毒機轉有深入的了解，也可以得知 BLCAP蛋白質在細胞內的訊息傳遞及調控癌症形成的機制。

國外研究馬兜鈴酸AA的方向著重在其致癌機轉，包括AA會與組織形成DNA共價鍵結物，國內先進研究的一部份著重在臨床上提供證據來強化AA和腎病變及泌尿道癌化的相關性(Lai et al., 2010)，另一部份則是從基礎研究的層面發現AA能夠誘發腎臟細胞株的氧化壓力，降低DNA 修補能力並且影響細胞週期和凋亡 (Chang et al., 2006; Chen et al., 2010; Hsin et al., 2006)，此外亦有一篇報導指出AA會影響斑馬魚的心臟功能 (Huang et al., 2007)。BLCAP 基因在1999年自膀胱癌組織中被identify之後，國外研究主要集中在各式癌組織細胞中BLCAP的表達量探討，亦有兩篇文章提到BLCAP基因在癌細胞中與細胞凋亡間的關連性( Yao et al., 2007; Zuo et al., 2006)，國內則尚無BLCAP的相關報告。本計劃研究內容著重在利用細胞株及斑馬魚動物模式來探討AA與BLCAP之間的相關性，並且試圖對BLCAP蛋白質進行定性研究，這個方向目前所知並無相關報告發表。

## 【材料與方法】

## 1. 細胞培養 (Cell culture)

人類胚胎腎臟細胞 (Human Embryonic Kidney 293 cells, 簡稱 HEK 293 cell), 購自食品工業發展研究所菌種中心。細胞培養於含 10 % 馬血清 (HS)、100 U/ml penicillin 及 0.1 mg/ml streptomycin 的 MEM 培養基中。細胞培養環境設定為 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 待細胞生長至約七、八分滿盤時依實驗給予不同處理或繼代培養

## 2. 細胞冷凍保存

將 HEK 293 細胞培養在 10 cm 培養盤中, 待細胞生長約至八成時, 利用 0.05% TE buffer (Trypsin and EDTA buffer) 將細胞從盤中分離下來, 將分離的細胞移到 15 ml 離心管中, 以 1,000 rpm 離心 5 分鐘使懸浮的細胞沉澱下來, 接著移除上清液, 並緩緩加入含有 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 的培養基, 並以每管約  $1 \times 10^7$  顆細胞分裝入 500  $\mu$ l 冷凍管中, 接著將細胞直接凍入 -80°C 中, 隔日再移至液態氮桶中保存。

## 3. 細胞存活率測試 (MTT assay)

將 HEK 293 細胞培養於 96 微孔盤中, 每一微孔中約有  $8 \times 10^3$  顆細胞, 置於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 培養箱培養 24 小時後, 以不同濃度之 AA (50、100 及 200  $\mu$ M) 處理 24 小時後, 於每個微孔中加入 100  $\mu$ l 的 MTT reagent 後, 將 96 微孔盤置於細胞培養箱中培養約 4 小時, 接著移除 MTT reagent 並加入 100  $\mu$ l isopropanol 反應 30 分鐘, 並接著將上清移至另一個 96 微孔盤中, 以吸收光波長 570 nm 進行偵測 (Analyzed by ELISA Reader), 藉此得知細胞存活率。

## 4. 核糖核酸萃取 (RNA extraction)

將 HEK 293 細胞培養在 35 mm 盤中 (每盤約有  $6 \times 10^5$  顆細胞) 在細胞培養箱中培養 24 小時後, 在依不同濃度的馬兜鈴酸 (50、100 及 200  $\mu$ M) 培養 24 小時, 隨後將培養液移除並加入 1 ml 的 Tri-reagent 作用 5 分鐘, 接著將含有細胞溶出物的 Tri-reagent 移至微量離心管中, 並分別加入 200  $\mu$ l 的 Chloroform 將核糖核酸與蛋白質分離, 接著 13,000 rpm 且 4°C 環境下離心 15 分鐘, 接著將上清液 (150  $\mu$ l) 移至新的微量離心管中, 並加入等體積 (150  $\mu$ l) 的 Isopropanol 反應 10 分鐘, 接著 13,000 rpm 且 4°C 環境下離心 15 分鐘, 再將上清液移除並置於室溫中使 isopropanol 自然揮發後, 即可加入 10  $\mu$ l DEPC 水並置於 56°C 水浴槽中 10 分鐘使核糖核酸溶解, 利用測量吸光值的方式定出樣品中核糖核酸的濃度, 並取 2  $\mu$ g 的核糖核酸進行反轉錄聚合反應。

## 5. 反轉錄作用 (Reverse transcription (RT) reaction)

取 2  $\mu$ g 的 RNA, 加入 10  $\mu$ M oligo-d T18 與 10 mM dNTP 於 70°C 下作用 10 分鐘, 再加入 Revert Aid™ Reverse Transcriptase (Fermentas) 進行反轉錄作用, 反轉錄後的 cDNA 即可繼續進行聚合連鎖反應實驗或保存於 -20°C 中。

## 6. 半定量聚合連鎖反應 (Semi - quantitative PCR)

取 cDNA 1  $\mu$ l 當作模板，分別加入 2  $\mu$ l 的 10 X DreamTaq™ 緩衝液、0.4  $\mu$ l 的 10  $\mu$ M 正股引子、0.4  $\mu$ l 的 10  $\mu$ M 反股引子(引子詳細序列見附表一)、0.4  $\mu$ l 的 10 mM dNTP 混合物及 0.2  $\mu$ l 的 5u/ $\mu$ l DreamTaq™ DNA Polymerase (MBI Fermentas, Hanover, Md.)，最後加入 d2H2O 至反應總體積為 20  $\mu$ l，以 GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, California, USA) 機器設定反應條件：94°C 作用 5 分鐘，接著以 94°C 進行變性作用 (denaturation) 30 秒、視引子不同之黏合 (annealing) 溫度作用 30 秒，再以 72°C 進行延長作用 (elongation) 30 秒，再依不同基因表現量差異將此循環重複 26-30 次不等，結束後再以 72°C 反應 10 分鐘。待作用完成後，取 10  $\mu$ l 產物利用含有溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 之 1.5% 瓊膠電泳分離不同大小之核酸序列，經 UV 照射後以數位影像系統分析。

## 7. 冷光酵素報導基因試驗之質體建構

分別利用聚合酶連鎖反應製備不同長度的 BLCAP 啟動子片段 (分別為 -1941、-419 bp、-172 bp、-90 bp、-66 bp、-419 66/32 及 -419 31/1)，聚合酶連鎖反應所使用的引子兩端分別含有 *Xho*I 及 *Hind*III 的限制酶切位，接著將 BLCAP 啟動子片段和 pGL3-Basic vector 質體 (含有 luciferase 冷光報導者基因)(附圖四)(實驗室建構)分別以 *Xho*I 及 *Hind*III 限制酶於 37°C 作用 2 小時後，以 1.5% 瓊膠電泳分離樣品，接著在 UV 光照射下將膠體上的正確片段取下，再利用 QIAquick® Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Valencia, CA) 回收雙股 DNA 片段及 pGL3 質體，接著將經過酵素切割完成的質體與雙股 DNA 片段以 1:3 的莫耳數比混合後，再加入 1  $\mu$ l T4 DNA ligase reaction buffer、1  $\mu$ l 10 mM ATP、1  $\mu$ l 的 T4 DNA ligase (promega)，最後利用二次滅菌水將反應體積補至 10  $\mu$ l，在 16°C 下反應 16 至 18 小時，使雙股 DNA 片段建構到質體中，接著進行大腸桿菌質體轉型作用。

## 8. 冷光酵素報導基因活性分析 (Luciferase reporter gene assay)

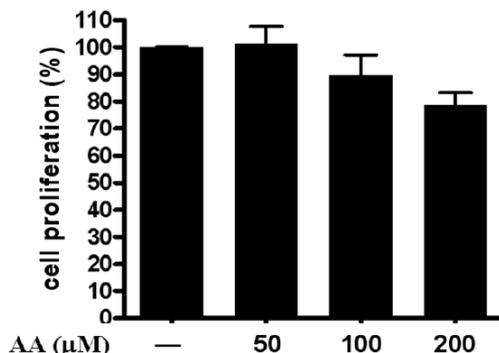
將完成基因轉染的細胞加藥處理 24 小時後，移除培養基，並以 0.01 M PBS 清洗 2 次，加入 Luciferase assay kit (Promega, Madison, WI) 的細胞萃取液 (Lysis buffer) 100  $\mu$ l 後在室溫中作用 15 分鐘，接著將細胞從培養盤上刮下連同萃取液一併移入微量離心管中，以 Vortex machine 將細胞與萃取液充分混合均勻，接著以 13,000 rpm 及 4 °C 的環境中離心 5 分鐘，將細胞殘渣與細胞萃取液分離，取 100  $\mu$ l 細胞萃取液移到新的微量離心管中，分別進行兩種測試。第一，取 10  $\mu$ l 的細胞萃取液加至 96 微孔盤中，並加入 60  $\mu$ l 的 Luciferase assay buffer 進行反應，利用五合一測定儀以動態的方式 (每 30 秒偵測一次，共偵測 6 分鐘) 進行冷光偵測；第二，取 50  $\mu$ l 的細胞萃取液到 96 微孔盤中，並加入 50  $\mu$ l 的 2x -galactosidase buffer (200 mM Sodium phosphate buffer, PH 7.3、2 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、1.33 mg/ml ONPG) 在 37°C 的環境下利用五合一測定

儀以動態偵測(每 1 分鐘偵測一次，共偵測 20 分鐘)的方式進行波長 420 nm 的吸光值測定。

## 【實驗結果】

### 1、馬兜鈴酸對 HEK293 人類胚胎腎臟細胞存活率的影響

為了避免過高的馬兜鈴酸劑量導致細胞凋亡進而影響後續實驗的結果分析，所以本研究首先利用 MTT assay 分析處理不同濃度下的細胞存活率。實驗結果顯示（圖一），隨著馬兜鈴酸劑量的提高，HEK293 細胞的存活率沒有顯著性的差異，在前人的研究中發現經 500  $\mu\text{M}$  馬兜鈴酸劑量處理的 HEK293 細胞在，其細胞存活率顯著性降低（數據未發表），因此本研究以 200  $\mu\text{M}$  馬兜鈴酸為最高劑量的條件下，探討馬兜鈴酸調控 BLCAP 基因表達的機轉。

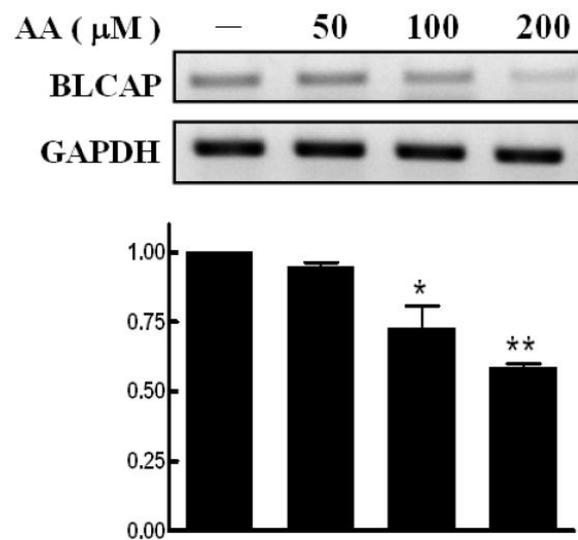


圖一、不同濃度的馬兜鈴酸對 HEK293 細胞存活率之影響

將 HEK 293 細胞在 96 微孔盤中（約  $8 \times 10^3$  顆/well）培養 24 小時，以不同濃度的馬兜鈴酸處理 24 小時，接著利用 MTT assay 偵測細胞存活率，已加入溶劑 50 % ethanol 組為控制組，將控制組的細胞存活率當作 100 % 與實驗組進行比較。收集三次獨立實驗數據統計分析後以 mean  $\pm$  SEM 的方式表示

## 2、馬兜鈴酸抑制 BLCAP mRNA 的表達

由於前人研究中發現，人類近曲小管上皮細胞（Proximal tubule epithelial cell, 簡稱 HK2 cell）經處理 200  $\mu\text{M}$  馬兜鈴酸後，其細胞 BLCAP mRNA 表現量有降低的現象，所以本研究推測 HEK293 細胞的 BLCAP mRNA 也會受到馬兜鈴酸的抑制，因此本研究利用半定量 PCR 以偵測馬兜鈴酸對 BLCAP mRNA 的影響。本實驗將 HEK 293 細胞處理不同濃度的馬兜鈴酸 24 小時後，接著萃取細胞內的 RNA 並反轉錄為 cDNA，最後利用半定量 PCR 分析。實驗結果顯示，隨著馬兜鈴酸劑量提高的情況下，BLCAP mRNA 的表現量有顯著的降低，且細胞在 100  $\mu\text{M}$  及 200  $\mu\text{M}$  馬兜鈴酸濃度下，BLCAP mRNA 的表現量明顯的被抑制，分別降低至 75% 及 60% (圖二)。由實驗結果證實，馬兜鈴酸具有抑制 HEK293 細胞 BLCAP mRNA 的表達的效果。

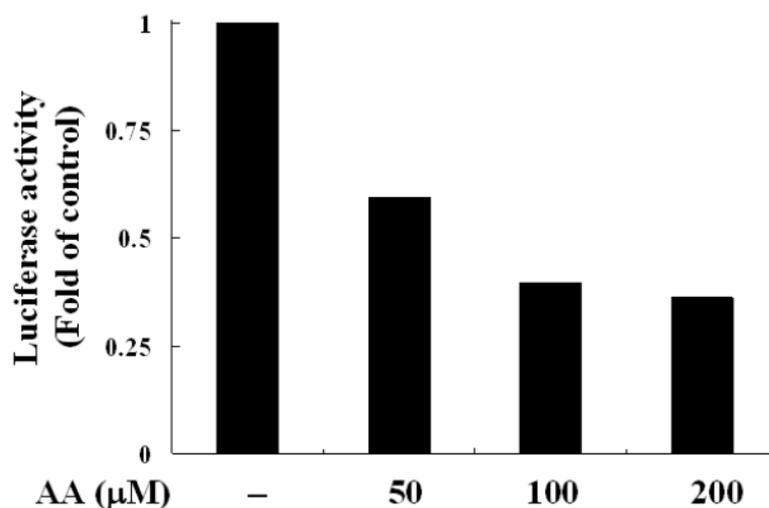


圖二、馬兜鈴酸抑制 BLCAP mRNA 的表現量

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中（約  $5 \times 10^5$  顆細胞 / 盤）培養 24 小時後，以不同濃度的馬兜鈴酸處理 24 小時，接著萃取 RNA 並將其反轉錄為 cDNA，接著進行半定量 PCR，其中以 GAPDH 為內部控制組，以溶劑組的 BLCAP 表現量設定為 1 與實驗組進行比較。收集三次獨立實驗數據統計分析後以 mean  $\pm$  SEM 的方式表示，\*表示與控制組具有顯著差異 \*  $P < 0.05$ ；\*\*  $P < 0.01$ 。

### 3、馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子的活性

由於 BLCAP mRNA 的表現量受馬兜鈴酸抑制，因此本研究進一步利用 BLCAP promoter 進行冷光活性分析以探討馬兜鈴酸是否影響轉錄層次的調節，導致下游的 BLCAP mRNA 的表現量降低。首先將 BLCAP 的啟動子（約 1941 bp）建構到帶有 luciferase 冷光報導基因的載體（pGL3 Basic vector）中，並將建構完成的質體轉染入 HEK293 細胞中，並以不同濃度的馬兜鈴酸處理細胞 24 小時後，接著萃取細胞內的蛋白質並進行冷光酵素分析。實驗結果顯示，BLCAP 啟動子的活性隨馬兜鈴酸濃度的提高而有降低的趨勢，在 100  $\mu\text{M}$  及 200  $\mu\text{M}$  的馬兜鈴酸劑量下，BLCAP 啟動子的活性皆降低至 5 成以下（圖三），因此由結果推測馬兜鈴酸藉由抑制 BLCAP 基因轉錄層次，而使得 BLCAP mRNA 表現量降低。

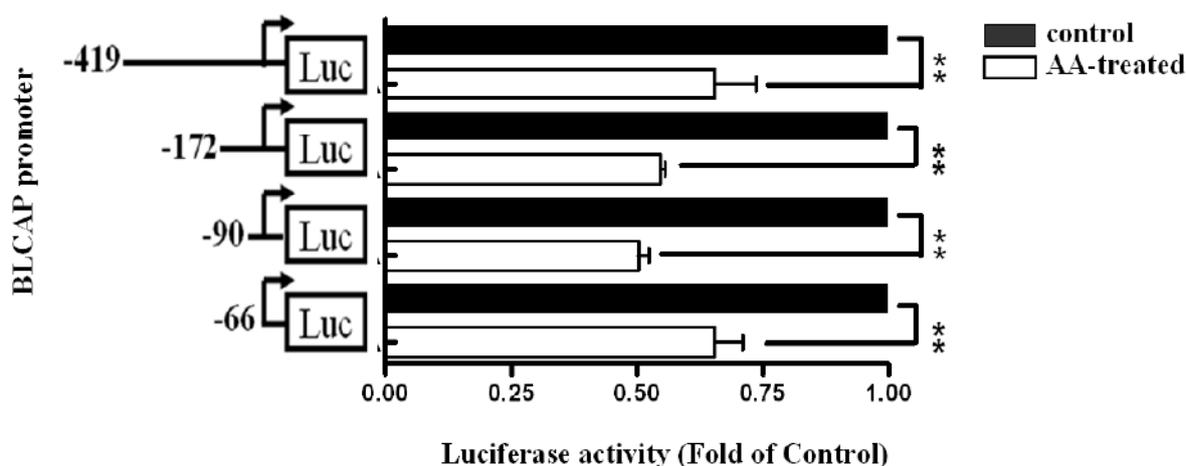


圖三、馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子的活性

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中（約  $5 \times 10^5$  顆細胞 / 盤）培養 24 小時後，將建構好 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體，轉染到細胞中並以不同濃度的馬兜鈴酸處理細胞 24 小時，接著萃取細胞的蛋白質進行冷光酵素活性分析及  $\beta$ -galactosidase 酵素活性分析，以  $\beta$ -galactosidase 酵素的活性為內部控制組。以溶劑組的冷光酵素活性設定為 1 與實驗組進行比較。此為單一次實驗的結果。

#### 4、馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性之調控區域

由於 BLCAP promoter 活性受到馬兜鈴酸的抑制，所以本研究進一步將 BLCAP promoter 縮短以分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP promoter 活性的區域。前人的研究中顯示馬兜鈴酸抑制 -1941 及 -412 的 BLCAP promoter 活性的比例相似（數據未發表），所以本研究將由轉錄起始點往前算含有 -412、-172、-90、-66 的 BLCAP promoter 序列建構到帶有 luciferase 冷光報導基因的載體 (pGL3 Basic vector) 中，並將建構完成的質體轉染入 HEK293 細胞中；因為在探討馬兜鈴酸抑制 BLCAP promoter 活性的結果中顯示 BLCAP promoter 活性在馬兜鈴酸 100  $\mu\text{M}$  及 200  $\mu\text{M}$  的情況下沒有顯著的差異，所以本實驗以馬兜鈴酸 100  $\mu\text{M}$  處理細胞 24 小時後，接著萃取細胞內的蛋白質並進行冷光酵素分析。實驗結果顯示，隨著 BLCAP promoter 的減短，馬兜鈴酸皆使 BLCAP promoter 的活性降低約 50 % (圖四)。所以推測此實驗方法，無法找出馬兜鈴酸抑制 BLCAP promoter 活性的調控區域。

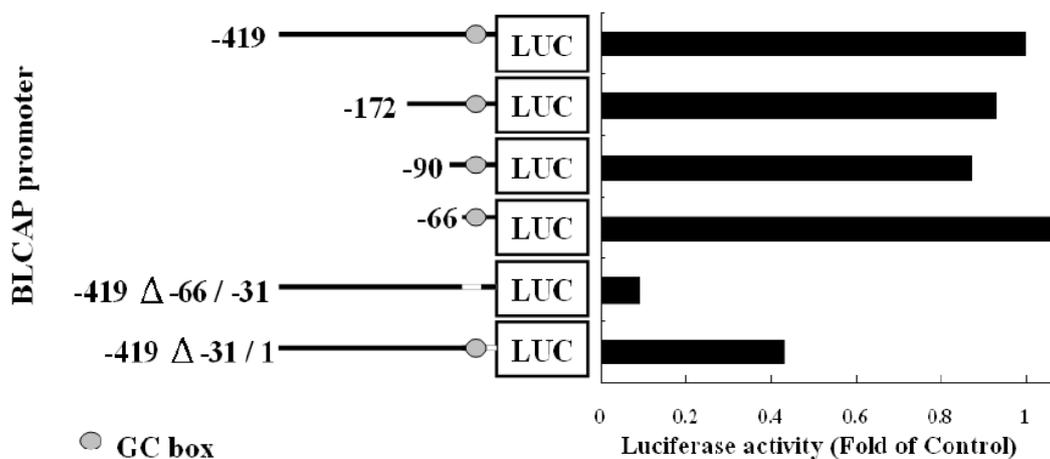


圖四、馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性的調控區域

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中 (約  $5 \times 10^5$  顆細胞 / 盤) 培養 24 小時後，將建構好 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體，轉染到細胞中並以馬兜鈴酸 100  $\mu\text{M}$  處理細胞 24 小時，接著萃取細胞的蛋白質進行冷光酵素活性分析及  $\beta$ -galactosidase 酵素活性分析，以  $\beta$ -galactosidase 酵素的活性為內部控制組。以溶劑組的冷光酵素活性設定為 1 與實驗組進行比較。收集三次獨立實驗數據統計分析後以 mean  $\pm$  SEM 的方式表示，\*表示與控制組具有顯著差異  $P < 0.05$ ；\*\*  $P < 0.01$ 。

### 五、細胞中調控 BLCAP promoter 活性之區域

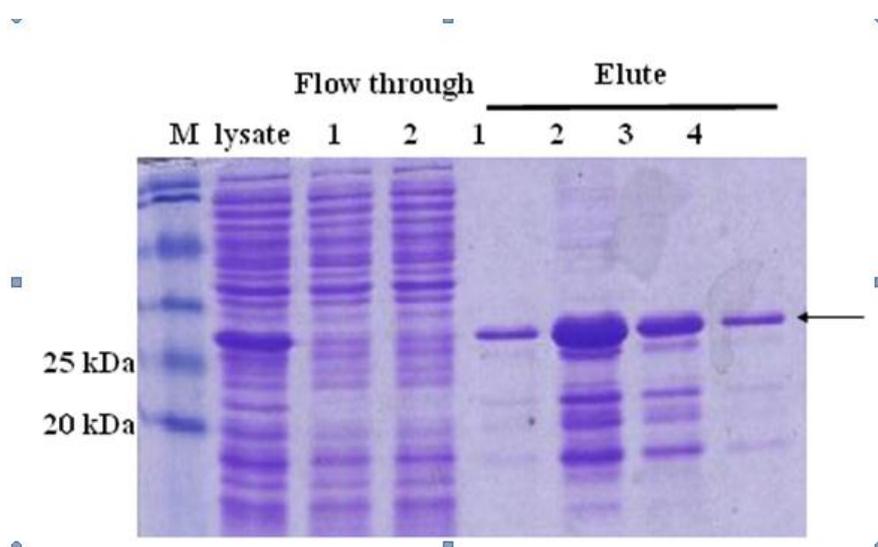
雖然以冷光活性分析的實驗無法分析出馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性的區域，但是本研究發現在沒有馬兜鈴酸處理的情況下，在 -419  $\Delta$  -66/-31 組別中發現 BLCAP promoter 的活性有降低的趨勢（圖五），而本研究利用 Transcription Element Search Software (Schug., et al 1998) 分析 BLCAP promoter，而分析結果顯示被剔除的片段中含有 GC BOX 的序列，因此本研究推測細胞中是藉由與 GC box 結合之相關轉錄因子而啟動 BLCAP 基因轉錄的進行。



圖五、馬兜鈴酸調控 BLCAP promoter 活性的調控區域

將 HEK 293 細胞在 35 mm 盤中（約 $5 \times 10^5$  顆細胞 / 盤）培養 24 小時後，將建構好不同長度 BLCAP 啟動子的冷光報導基因質體，轉染到細胞中並以溶劑處理細胞 24 小時，接著萃取細胞的蛋白質進行冷光酵素活性分析及  $\beta$ -galactosidase 酵素活性分析，以  $\beta$ -galactosidase 酵素的活性為內部控制組。以 -419 BLCAP promoter 的冷光酵素活性設定為 1 與實驗組進行比較。此為單一次實驗的結果。

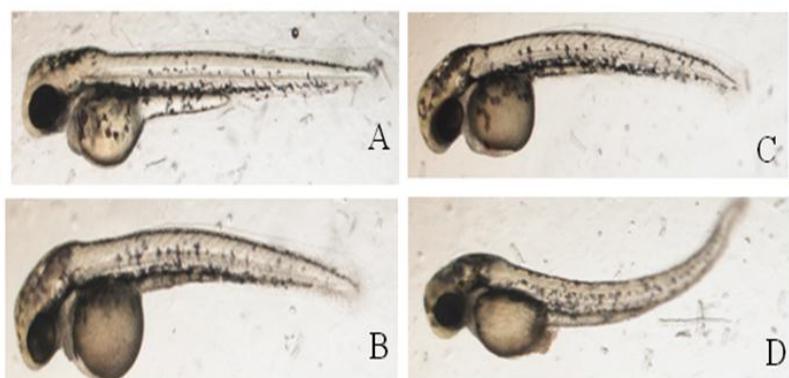
圖六. 大量產生 BLCAP 重組蛋白。將 BLCAP coding region 建構在 pET32b 的質體上並轉植至 BL21 菌體中大量表達，產生的 His-thioredoxin- BLCAP 重組蛋白質經由 Ni column 純化後，準備進一步經過陰離子交換樹脂移除雜蛋白。



圖七 AA

處理斑馬

魚後的形態變化。選取正常發育至受精後 6 小時(6 hpf)的斑馬魚胚胎，分別處理對照組溶液(A) 、5  $\mu$ M (B) 、10  $\mu$ M (C) 及 20  $\mu$ M (D) 的 AA 溶液，於 48 hpf 時以解剖顯微鏡觀察。與對照組相比較下，AA 處理後的斑馬魚胚胎有 yolk 變黑及體軸彎曲的現象。



## 【VI】 討論

馬兜鈴酸為馬兜鈴科植物的萃取物之一，從比利時事件後，科學家們著手於馬兜鈴酸毒性的研究，目前文獻指出，馬兜鈴酸是一種致癌物質，在連續餵食 3 個月高劑量馬兜鈴酸的老鼠中發現，具有泌尿上皮癌及胃癌等癌症的形成 (Mengs, 1988; Schmeiser *et al.*, 1988)。由於前人研究中發現馬兜鈴酸會降低人類近曲小管細胞(proximal tubule epithelial cell, 簡稱 HK2) BLCAP mRNA 的表現量 (數據未發表)，因為目前的文獻指出 Bladder cancer-associated protein (BLCAP) 基因是一種腫瘤抑制基因 (Gromova *et al.*, 1999)，所以本研究將以人類胚胎腎臟細胞 (HEK293 cell lines) 探討馬兜鈴酸抑制 BLCAP 基因表達的機制，以研究馬兜鈴酸調控細胞生長的機制。

為了探討馬兜鈴酸是否對 HEK293 細胞產生細胞傷害，本研究首先將 HEK293 細胞以不同濃度的馬兜鈴酸處理 24 小時後，接著進行 MTT assay 分析細胞的存活率，實驗結果顯示細胞存活率不會因為處理不同劑量的馬兜鈴酸，而有顯著性的差異，因為在 200  $\mu\text{M}$  馬兜鈴酸處理組別的細胞存活率沒有顯著的差異 (圖一)。所以在本研究中將以馬兜鈴酸 200  $\mu\text{M}$  為最高實驗劑量。接著本研究在不傷害 HEK293 細胞的馬兜鈴酸劑量下，觀察馬兜鈴酸是否影響 BLCAP 基因的表達。實驗結果顯示，BLCAP mRNA 表現量隨著馬兜鈴酸劑量的提高而有降低的趨勢，而且在馬兜鈴酸 100  $\mu\text{M}$  及 200  $\mu\text{M}$  的濃度中，HEK293 細胞的 BLCAP mRNA 表現量顯著的減少 (圖二)，此外過去的文獻中指出馬兜鈴酸會藉由抑制 Tsc1 及 WWOX1 等腫瘤抑制基因，而導致細胞處於不正常增生的狀態 (Kerstin *et al.*, 2007)，加上前人的實驗結果發現，馬兜鈴酸具有抑制 HK2 細胞 BLCAP mRNA 表現的效果，與本研究的結果相似，因此本研究推測馬兜鈴酸可能藉由抑制泌尿相關細胞中 BLCAP mRNA 的表現量，而導致泌尿系統病變的形成及細胞不正常的增生。

本研究已得知，馬兜鈴酸會使細胞的 BLCAP mRNA 表現量降低，因此本研究推測馬兜鈴酸可能藉由抑制 BLCAP 基因轉錄層次而導致此現象發生，為了證實此假設，因此本研究利用 Luciferase assay 以分析馬兜鈴酸是否影響 BLCAP 啟動子的活性，首先本研究建構 BLCAP promoter 之質體，接著將質體轉染入細胞中，並在不同劑量的馬兜鈴酸情況下進行活性分析，實驗結果顯示，隨著馬兜鈴酸劑量增加，BLCAP promoter 活性也隨之降低 (圖三)，所以本研究推測馬兜鈴酸藉由抑制 BLCAP 啟動子活性，而導致 mRNA 表現量降低。於是本研究進一步分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區域，於是建構

不同長度 BLCAP 啟動子片段之質體，實驗結果發現隨著 BLCAP 啟動子的減短，馬兜鈴酸顯著的抑制 BLCAP 啟動子活性，但是抑制的比例相似（圖四），所以本研究推測該實驗方法無法分析馬兜鈴酸抑制 BLCAP 啟動子活性的調控區域；但是從此次的實驗數據中我們分析出，在沒有馬兜鈴酸的情況下，當剔除 BLCAP promoter 中 GC box 位於的 - 66 至 - 31 片段時，BLCAP promoter 的活性明顯的降低（圖五），而過去文獻指出 house keeping 基因及腫瘤抑制基因的啟動子中含有 GC box 的頻率較高，此外過去研究也指出 GC box 在調控細胞生長及分化相關基因轉錄中扮演重要的角色（Philipsen and Suske., 1999），因此本研究推測 GC box 在調控 BLCAP 表達中扮演重要的角色。

綜合本研究的實驗結果發現，在 HEK293 細胞中馬兜鈴酸藉由抑制 BLCAP promoter 的活性，而抑制 BLCAP mRNA 的表現量，因為 BLCAP 基因是腫瘤抑制基因，因此本研究認為馬兜鈴酸可能藉由抑制 BLCAP 基因的表達，而導致細胞異常的增生，最後造成腫瘤或癌症的形成，所以本研究認為馬兜鈴酸為一種天然的致癌毒素。

## 【參考文獻】

- Arlt, V. M., Stiborova, M., and Schmeiser, H. H. (2001). Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* **17**(4), 265-277
- Bamias, G., and Boletis, J. (2008). Balkan nephropathy: evolution of our knowledge. *Am J Kidney Dis* **52**, 606-616
- Clutterbuck, D.R., Leroy, A., O'Connell, M.A., Semple, C.A. (2005). A bioinformatic screen for novel A-I RNA editing sites reveals recoding editing in BC10. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 2590-2595.
- Debelle, F. D., Nortier, J. L., De Prez, E. G., Garbar, C. H., Vienne, A. R., Salmon, I. J., Deschodt-Lanckman, M. M., and Vanherweghem, J. L. (2002). Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**, 431-436.
- Evans, H. K., Wylie, A. A., Murphy, S. K., Jirtle, R. L. (2001). The neuronatin gene resides in a "micro-imprinted" domain on human chromosome 20q11.2. *Genomics* **77**, 99-104
- Fan, D. G., Zhao, F., Ding, Y., Wu, M. M., Fan, Q. Y., Shimizu, K., Dohjima, T., Nozawa, S., Wakahara, K., Ohno, T., Guo, Y. S., Ma, B. A., and Jiang, J. L. (2011). BLCAP induces apoptosis in human Ewing's sarcoma cells. *Experimental Biology and Medicine* **236**. 1030-1035.
- Galeano, F., Leroy, A., Rossetti, C., Gromova, I., Gautier, P., Keeqan, L P., Massimi, L., Di Rocco, C., O'Connell, M. A., and Gallo, A. (2010). Human BLCAP transcript: new editing events in normal and cancerous tissues. *Int J Cancer* **127**(1), 127-137.
- Gromova, I., Gromov, P., Celis, J.E. (1999). Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure. *Electrophoresis* **20**, 241-248.
- Gromova, I., Gromov, P., Celis, J.E. (2002). bc10: A novel human bladder cancer-associated protein with a conserved genomic structure downregulated in invasive cancer. *International journal of cancer* **98**, 539-546.
- Kerstin, S., Heidrun, E. Z., Ahr, H. J., and Daniel, R. D. (2007). Carcinogen-specific gene expression profiles in short-term treated ether and Wild-type rats indicative of pathways involved in renal tumorigenesis. *Cancer Research* **67**, 4052-4068
- Lord, G. M., Hollatein, M., Arlt, V. M., Roufosse, C., Pusey, C. D., Cook, T., and Schmeiser, H. H. (2004). DNA adducts and p53 mutation in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *American journal of kidney diseases* **43**. e11-17.
- Mengs, U. (1987). Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Archives of toxicology* **59**, 328-331.-
- Mengs, U. (1988). Tumor induction in mice following exposure to aristolochic acid. *Archives of toxicology* **61**, 504-505.
- Moreira, J.M., Ohlsson, G., Gromov, P., Simon, R., Sauter, G., Celis, J.E., Gromova, I.

- (2010). Bladder cancer-associated protein, a potential prognostic biomarker in human bladder cancer. *Mol Cell Proteomics* **9**, 161-177.
- Philipsen, S., and Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factor. *Nucleic Acid Research* **27**, 2991-3000.
- Schmeiser, H. H., Schoepe, K.B., and Wiessler, M. (1988). DNA adduct formation in aristolochic acid I and II in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **9**, 297-303
- Schug, J., and Overton, G. C. (1998). Transcription Element Search Software on the WWW.
- Shibutani, S., Dong, H., Suzuki, N., Ueda, S., Miller, F., and Grollman, A. P. (2007) Selective toxicity of Aristolochic Acids I and II. *Drug Metabolism And Disposition* **35**, 1217-1222.
- Stiborova, M., Frei, E., Arlt, VM., and Schmeiser, H. H. (2008). Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Mutation research* **658**, 55-67
- Vanherweghem, J. L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. (1993). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 341-391
- Wang, W., and Zhang, J. (2008). Protective effect of erythropoietin against aristolochic acid-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells. *European journal of pharmacology* **588**, 135-140.
- Yao, J., Duan, L., Fan, M., Yuan, J., Wu, X. (2007). Overexpression of BLCAP induces S phase arrest and apoptosis independent of p53 and NF-kappaB in human tongue carcinoma : BLCAP overexpression induces S phase arrest and apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* **297**, 81-92.
- Zuo, Z., Zhao, M., Liu, J., Gao, G., Wu, X. (2006). Functional analysis of bladder cancer-related protein gene: a putative cervical cancer tumor suppressor gene in cervical carcinoma. *Tumour Biol* **27**, 221-226.



## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

國際癌症研究中心（IARC, 2010）目前將含有馬兜鈴酸的馬兜鈴屬草藥確認為人類的致癌物質（Group 1），台灣衛生署則在 2003 年公告全面禁止含有馬兜鈴酸的藥品，但是因為各類中草藥的外型相似，通俗名稱容易混淆，再加上大陸地區並未對馬兜鈴酸和馬兜鈴屬草藥規範設限，所以誤用情況嚴重。本研究致力探討馬兜鈴酸對於膀胱癌相關抑癌基因的作用，並且嘗試利用斑馬魚做為動物模式研究腎臟功能及毒性，雖然斑馬魚並非哺乳動物，但是其生理結構及功能仍和人類有高度相關性，其低污染低價位養殖很適合大量做為毒物篩檢。此外啮鼠類的胚胎發育在母體中進行不易觀察，而體外授精的魚胚胎正好可以作為黴菌毒素發育毒性的研究模式。

## 國科會補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：101 年 10 月 31 日

計畫編號	NSC 100-2313-B-040-005-		
計畫名稱	利用細胞及動物模式探討植物毒素調控 BLCAP 基因的毒理機轉		
出國人員 姓名	劉秉慧	服務機構 及職稱	中山醫學大學生醫系 教授
會議時間	101 年 3 月 11 日 至 15 日	會議地點	美國舊金山
會議名稱	(中文)毒理學會 51 屆年度會議 (英文) Society of Toxicology 51 <sup>nd</sup> Annual Meeting		
發表題目	(中文) 黴菌毒素 citrinin 和 patulin 對班馬魚腎臟發育的毒性 (英文) Nephrotoxicity of mycotoxin citrinin and patulin during zebrafish development		

## 一、參加會議經過

本人於 2012 年參加在美國加州舊金山市區的 Moscone 展覽與會議中心所進行的 Society of Toxicology 年度會議，會議於 3 月 11 日開始報到，本人於當日前往會場報到並繳交所需註冊費，展開五天的年會議程，拿到厚厚一本大會首冊仔細閱讀這次的議程安排，今年的議程與往年相似，主要分為 keynote 演講，口頭報告與海報發表兩部份，精華內容許多與 Nrf2, epigenetic target, 以及 micro RNA 相關。第一天的會議內容主要以各種毒理主題的 Continuing Education Courses 為主。第二天早上 symposium sessions 包括我有興趣的研究主題-DNA damage responses and repair, 抽空前往海報展示區瀏覽 Nanotoxicology: environmental toxicology, zebrafish 以及 Receptors and toxicity 的報告；下午的 symposium sessions 則以 Toxic cell death: signaling pathway 的系列演講為主要聽講部分，而海報區則挑選 DNA damage and repairs 以及 Nanotoxicology/nanoparticles 的海報詳讀；第三天(03/13)早上口頭報告部份並無本人研究相關議題，所以主要待在

海報區專注在下列數個主題，包括 epigenetics, food safety and nutrition, kidney and oxidative stress. 期間和一些來自世界的學者或是學生討論他們的研究成果，獲益良多，此外也終於有時間好好觀察參觀廠商展示區。下午口頭報告時間則有一個令本人非常有興趣的議題：Circulating microRNAs: a new class of biomarkers for tissue-specific toxicity。同樣在第四天(03/14)早上也有關於 micro RNA 的口頭報告時間 epigenetic and miRNA regulations in carcinogenesis: toxicological implication，但是本人同時必須在海報區(Food safety and nutrition)張貼此次研究成果，同時海報區也有 cell death pathways, gene regulation and signal transduction, Nrf2 等主題，所以本人只能盡力安排聽演講和海報展示區之間的時間分配。當天中午還巧遇本人就讀毒理所博士班的所上教授 Dr. Jefcote 和 Dr. Peterson，特地趨前問好。下午則是參與 trivalent Arsenic metabolites and Arsenic toxicity 的系列口頭報告，海報區的自然產品與本人研究主題密切相關，所以也刻意抽空前往獲取新知

## 二、與會心得

收穫方面：1. 在海報展示時，結識前來觀看討論的香港大學 Wong WX 教授，由於他也是從事以斑馬魚為動物模式的毒物研究，所以我們將有機會進一步合作，並且將發表的論文交予他審閱。2. 此外也和日本黴菌毒理學會的主席 Yoshiko, Sugita-Konishi 女士認識，Yoshiko 女士也同時是日本政府食品安全部門的高階負責官員，本人答應她的邀請於九月份前往日本沖繩於他們的年度大會中給與特別演講。在該九月份三天兩夜的會議中演說算是成功，而且更加認識日本國內對於黴菌毒素的要求、標準以及參與的相關人員。3. 藉由聽講過程中獲得許多新穎的觀念與技術，對於研究上能提供一些創新想法，對於往後實驗技術與方法能更上一層樓。尤其得知 microRNA and epigenetics 是目前毒物研究的新興方向，我於返台後立刻也積極朝這兩個方向前進，也因此得到一些有趣的數據。

尚需加強部分：1. 由於此次是本人第一次參與 SOT 的年度會議，所以不知要提早申請參加 Continuing Education Courses，錯失第一天參與課程的機會，下次若有機會再度前往將會提早報名繳費，以期得到目前最新的毒理領域技術及知識的再教育機會。2. 此外由於此為毒理學界一年一度的盛會，所以參與者眾，場地安排面積也非常廣大，因此本人往往必須在口頭報告區及海報區長程奔波，不僅耗費體力也偶爾錯失重要內容。

## 三、建議

毒理學雖然在基礎研究上並非主流，但是卻和日常生活以及環境密切相關。台灣的毒理學研究也因為現有毒理研究所的轉型改名或是整併而越顯凋零孤單，反觀此次許多前來與會及張貼海報的博士班學生都是來自中國的留美學生，不僅思慮清楚，態度積極自信，英文流利，卻鮮見台灣的學生。就毒理學領域而言台灣潛在人才不足不啻為一大隱憂。

## 國科會補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：101 年 10 月 31 日

計畫編號	NSC 100-2313-B-040-005-		
計畫名稱	利用細胞及動物模式探討植物毒素調控 BLCAP 基因的毒理機轉		
出國人員姓名	劉秉慧	服務機構及職稱	中山醫學大學生醫系 教授
會議時間	101 年 3 月 11 日至 15 日	會議地點	美國舊金山
會議名稱	(中文)毒理學會 51 屆年度會議 (英文) Society of Toxicology 51 <sup>nd</sup> Annual Meeting		
發表題目	(中文) 黴菌毒素 citrinin 和 patulin 對班馬魚腎臟發育的毒性 (英文) Nephrotoxicity of mycotoxin citrinin and patulin during zebrafish development		

## 一、參加會議經過

本人於 2012 年參加在美國加州舊金山市區的 Moscone 展覽與會議中心所進行的 Society of Toxicology 年度會議，會議於 3 月 11 日開始報到，本人於當日前往會場報到並繳交所需註冊費，展開五天的年會議程，拿到厚厚一本大會首冊仔細閱讀這次的議程安排，今年的議程

與往年相似，主要分為 keynote 演講，口頭報告與海報發表兩部份，精華內容許多與 Nrf2，epigenetic target, 以及 micro RNA 相關。第一天的會議內容主要以各種毒理主題的 Continuing Education Courses 為主。第二天早上 symposium sessions 包括我有興趣的研究主題-DNA damage responses and repair, 抽空前往海報展示區瀏覽 Nanotoxicology: environmental toxicology, zebrafish 以及 Receptors and toxicity 的報告；下午的 symposium sessions 則以 Toxic cell death: signaling pathway 的系列演講為主要聽講部分，而海報區則挑選 DNA damage and repairs 以及 Nanotoxicology/ nanoparticles 的海報詳讀；第三天(03/13)早上口頭報告部份並無本人研究相關議題，所以主要待在海報區專注在下列數個主題，包括 epigenetics, food safety and nutrition, kidney and oxidative stress. 期間和一些來自世界的學者或是學生討論他們的研究成果，獲益良多，此外也終於有時間好好觀察參觀廠商展示區。下午口頭報告時間則有一個令本人非常有興趣的議題：Circulating microRNAs: a new class of biomarkers for tissue-specific toxicity。同樣在第四天(03/14)早上也有關於 micro RNA 的口頭報告時間 epigenetic and miRNA regulations in carcinogenesis: toxicological implication，但是本人同時必須在海報區(Food safety and nutrition)張貼此次研究成果，同時海報區也有 cell death pathways, gene regulation and signal transduction, Nrf2 等主題，所以本人只能盡力安排聽演講和海報展示區之間的時間分配。當天中午還巧遇本人就讀毒理所博士班的所上教授 Dr. Jefcote 和 Dr. Peterson，特地趨前問好。下午則是參與 trivalent Arsenic metabolites and Arsenic toxicity 的系列口頭報告，海報區的自然產品與本人研究主題密切相關，所以也刻意抽空前往獲取新知

## 二、與會心得

收穫方面: 1. 在海報展示時，結識前來觀看討論的香港大學 Wong WX 教授，由於他也是從事以斑馬魚為動物模式的毒物研究，所以我們將有機會進一步合作，並且將發表的論文交予他審閱。2. 此外也和日本黴菌毒理學會的主席 Yoshiko, Sugita-Konishi 女士認識，Yoshiko 女士也同時是日本政府食品安全部門的高階負責官員，本人答應她的邀請於九月份前往日本沖繩於他們的年度大會中給與特別演講。在該九月份三天兩夜的會議中演說算是成功，而且更加認識日本國內對於黴菌毒素的要求、標準以及參與的相關人員。3. 藉由聽講過程中獲得許多新穎的觀念與技術，對於研究上能提供一些創新想法，對於往後實驗技術與方法能更上一層樓。尤其得知 microRNA and epigenetics 是目前毒物研究的新興方向，我於返台後立刻也積極朝這兩個方向前進，也因此得到一些有趣的數據。

尚需加強部分: 1. 由於此次是本人第一次參與 SOT 的年度會議，所以不知要提早申請參加 Continuing Education Courses，錯失第一天參與課程的機會，下次若有機會再度前往將會

提早報名繳費，以期得到目前最新的毒理領域技術及知識的再教育機會。2. 此外由於此為毒理學界一年一度的盛會，所以參與者眾，場地安排面積也非常廣大，因此本人往往必須在口頭報告區及海報區長程奔波，不僅耗費體力也偶爾錯失重要內容。

### 三、建議

毒理學雖然在基礎研究上並非主流，但是卻和日常生活以及環境密切相關。台灣的毒理學研究也因為現有毒理研究所的轉型改名或是整併而越顯凋零孤單，反觀此次許多前來與會及張貼海報的博士班學生都是來自中國的留美學生，不僅思慮清楚，態度積極自信，英文流利，卻鮮見台灣的學生。就毒理學領域而言台灣潛在人才不足不啻為一大隱憂。

### 【邀請文件】

To: Prof. Biing-Hui Liu

From: William Slikker Jr., Scientific Program Committee Chair

Date: December 1, 2011

Congratulations! You are the designated contact person for the abstract listed below, which has been accepted for a poster presentation during the 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 11-15, 2012 at the Moscone Convention Center in San Francisco, CA.

Please note the following important information about your presentation:

Presenters should display posters only on the assigned date and time, which is listed below in this confirmation. Diagrams of the poster session layouts, for both morning and afternoon sessions, will be included in the Final Program. These diagrams will note the abstract final ID number followed by the poster board number. Your poster board number follows the abstract final ID number below.

#### ABSTRACT INFORMATION:

Abstract Number/Poster Board number: 2014 Poster Board -406

Abstract Title: The nephrotoxicity of mycotoxin citrinin and patulin during zebrafish development

Presenting Author: Biing-Hui Liu

Session Title: Food Safety and Nutrition I

Presentation Date & Time: March 14, 2012 from 9:00 AM to 12:30 PM

Presentation Location: Exhibit Hall

As the contact person, you are the only person who will receive this notification of abstract acceptance. If you are not the presenter, it is important to provide this information to the person who will present this scientific research. Instructions for preparing a poster presentation can be found on the SOT Web site at <http://www.toxicology.org/ai/meet/am2012/present.asp>.

If circumstances prevent attendance, the presenting author must arrange for the paper to be given by a substitute. Once in San Francisco, if the assigned presenter cannot attend his/her session, the presenter must leave a message in the SOT office at the convention center explaining the problem.

Please visit the SOT Annual Meeting Web site at <http://www.toxicology.org/ai/meet/am2012/sanfrancisco.asp> for up-to-date information on the planned featured lectures and special events.

The poster sessions will follow the schedule listed below for the 2012 SOT Annual Meeting:

Monday Morning 9:30 AM to 12:30 PM

Monday-Wednesday Afternoon 1:00 PM to 4:30 PM

Tuesday and Wednesday Morning 9:00 AM to 12:30 PM

Thursday Morning 8:30 AM to 12:00 Noon

If you have questions, please contact Nichelle Sankey ([nichelle@toxicology.org](mailto:nichelle@toxicology.org)) at SOT Headquarters. We look forward to seeing you in San Francisco, CA!

### 【會議摘要】

Citrinin (CTN) and patulin (PAT) are fungal secondary metabolites which are found in food and feed and showed organotoxicity in mature animals. In this study zebrafish embryos were applied to investigate the developmental toxicity of CTN and PAT on embryonic kidney. In the presence of CTN and PAT, the gross morphology of kidneys from embryos with green fluorescent kidney (wt1b:GFP) was not apparently altered. Histological analysis of CTN-treated embryos indicated cystic glomerular and tubular lesions; a disorganized arrangement of renal cells was also found in the PAT-treated group. From the view point of renal function, dextran clearance abilities of embryos exposed to CTN and PAT were significantly reduced. The damaged renal function caused by CTN could be partially rescued by the administration of pentoxifylline, suggesting the reduction of glomerular blood flow contributes to CTN-induced renal dysfunction. Additionally, CTN induced the expression of proinflammation genes, including COX2a, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but failed to modify the levels and distribution of wt1a transcript and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase protein. In summary, CTN and PAT caused profound nephrotoxicity in histological structure and biological function of zebrafish embryos; the inflammatory pathway and blood rheology may involve in CTN-induced renal impairment.

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/11/20

國科會補助計畫	計畫名稱: 利用細胞及動物模式探討植物毒素調控BLCAP基因的毒理機轉
	計畫主持人: 劉秉慧
	計畫編號: 100-2313-B-040-005- 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

100 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：劉秉慧		計畫編號：100-2313-B-040-005-					
計畫名稱：利用細胞及動物模式探討植物毒素調控 BLCAP 基因的毒理機轉							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

國際癌症研究中心（IARC, 2010）目前將含有馬兜鈴酸的馬兜鈴屬草藥確認為人類的致癌物質（Group 1），台灣衛生署則在 2003 年公告全面禁止含有馬兜鈴酸的藥品，但是因為各類中草藥的外型相似，通俗名稱容易混淆，再加上大陸地區並未對馬兜鈴酸和馬兜鈴屬草藥規範設限，所以誤用情況嚴重。本研究致力探討馬兜鈴酸對於膀胱癌相關抑癌基因的作用，並且嘗試利用斑馬魚做為動物模式研究腎臟功能及毒性，雖然斑馬魚並非哺乳動物，但是其生理結構及功能仍和人類有高度相關性，其低污染低價位養殖很適合大量做為毒物篩檢。此外啮鼠類的胚胎發育在母體中進行不易觀察，而體外授精的魚胚胎正好可以作為黴菌毒素發育毒性的研究模式。