

# 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黴菌毒素 patulin 之毒理機轉(第  
3年)  
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 97-2313-B-040-004-MY3  
執行期間：99年08月01日至100年10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

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：呂權蓁  
博士班研究生-兼任助理人員：吳亭萱

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 100年11月02日

中文摘要： 棒麴毒素(patulin, 簡稱 PAT)是一種在許多食物和飼料中常見的黴菌毒素，由 *Penicillium* 和 *Aspergillus* 菌屬所分泌。PAT 已知在動物中及細胞實驗中造成腎臟功能缺損，此外亦可以造成動物的致畸胎性，但是對於胚胎早期發育的影響並不清楚。因此本篇研究分別利用人類腎臟細胞株探討 PAT 所引起的活性氧分子(ROS)生成與細胞凋亡之間的關聯性，並且以斑馬魚系統探討 PAT 的腎臟發育毒性。在本篇研究中指出，PAT 會造成許多哺乳動物細胞株氧化性傷害。細胞以螢光染劑處理後作為 (ROS)的生成指標，我們發現在 PAT 的處理下會直接增加人類胚胎腎臟細胞 (HEK293) 內的氧化壓力。利用微干擾 RNA(small interference RNA, 簡稱 siRNA)的技術來抑制 CuZn-SOD 在哺乳細胞中的表現，發現會增加 PAT 所調節的細胞膜損傷，而當過量表達人類 CuZn-SOD 或過氧化氫則可以還原受損的現象，當以斑馬魚做為模式動物觀察 PAT 毒性時，我們發現當 PAT 處理 6 hpf 的斑馬魚達 72 hpf 時 (method III)，LC50 為 204.8 微 M，若 PAT 延後胚胎處理的起始點自 24 hpf，當處理時間達 120 hpf 時(method IX)，胚胎偶有死亡的現象，LC50 超過 250 微 M。在外型的觀察上，50 及 200 微 M PAT 以 method VII (24-72 hpf)處理後，整體外型與野生型及控制組都沒有顯著的不同，此外亦不影響原腎各部位包括腎絲球及原腎管的發育情形，wt1a 的基因表現及 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 蛋白質表現量亦沒有顯著改變。就組織學層面來說，200 微 M PAT 處理造成腎絲球的細胞排列有鬆散不規則的情形，但在原腎管部分組織結構看似完整。若以 dextran 清除率做為腎功能的指標，50 及 100 微 M PAT 處理的組別導致清除率分別下降至 22 及 16.7 %。由此可知 PAT 處理會造成腎絲球過濾率降低，滲透壓藥物 mannitol 則可部分逆轉 PAT 所造成的腎功能缺損。

英文摘要： Patulin (PAT), a mycotoxin mainly produced by *Penicillium* and *Aspergillus*, is found in various foods and feed and also considered as a nephrotoxic compound in cell and animal models. In the present study, its effects on oxidative stress in various mammalian cell lines were investigated. When

cell-permeating fluorescent dyes were used as indicators of the generation of reactive oxygen species (ROS), we found that PAT treatment directly increased intracellular oxidative stress in human embryonic kidney (HEK293) and human promyelocytic leukemia (HL-60) cells.

Suppression of CuZn-SOD expression in mammalian cells by small interfering RNA (siRNA) resulted in an increase in PAT-mediated membrane damage, while overexpression of human CuZn-SOD or catalase led to a reduction in damage, indicating the involvement of ROS in PAT toxicity.

When zebrafish was used as a model species, various concentrations of PAT were introduced to zebrafish embryos at 24 hour postfertilization (hpf) and the endpoints were examined at 72 hpf. After exposed to PAT at a concentration up to 200  $\mu$ M, the larval zebrafish, wild type or transgenic line, did not exhibit an altered morphology in their pronephrons, including glomerulus and pronephric tubule/duct. However, histological sections after H & E staining revealed that PAT treatment may disturb the development of pronephric glomerulus, but not the pronephric duct. PAT at the concentrations of 50 and 100  $\mu$ M decreased the dextran clearance rate to 22 and 16.7 %, respectively, suggesting the disturbance of renal function. Co-treatment of PAT with mannitol, an osmotic diuretic, reversed the clearance rate triggered by PAT.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成果報告

利用細胞及動物模式探討黴菌毒素 patulin 之毒理機轉

計畫類別：■ 個別型計畫    □ 整合型計畫

計畫編號：NSC 97 - 2313 - B - 040 - 004 - MY3

執行期間：97 年 8 月 1 日至 100 年 10 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學生物醫學科學系

計畫主持人：劉秉慧

共同主持人：

計畫參與人員：博士生吳亭萱

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：□ 精簡報告    ■ 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 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 100 年 10 月 31 日

## 目錄

中文摘要	-----	1
英文摘要	-----	II
報告內容		
前言	-----	1
研究目的	-----	2
結果與討論	-----	2
實驗圖表	-----	6
參考文獻	-----	13
計畫成果自評	-----	15

## 【中文摘要】

棒麴毒素(patulin, 簡稱PAT)是一種在許多食物和飼料中常見的黴菌毒素，由Penicillium 和Aspergillus 菌屬所分泌。PAT已知在動物中及細胞實驗中造

成腎臟功能缺損，此外亦可以造成動物的致畸胎性，但是對於胚胎早期發育的影響並不清楚。因此本篇研究分別利用人類腎臟細胞株探討 PAT 所引起的活性氧分子(ROS)生成與細胞凋亡之間的關聯性，並且以斑馬魚系統探討 PAT 的腎臟發育毒性。在本篇研究中指出，PAT 會造成許多哺乳動物細胞株氧化性傷害。細胞以螢光染劑處理後作為 (ROS)的生成指標，我們發現在 PAT 的處理下會直接增加人類胚胎腎臟細胞 (HEK293) 內的氧化壓力。利用微干擾 RNA(small interference RNA, 簡稱 siRNA)的技術來抑制 CuZn-SOD 在哺乳細胞中的表現，發現會增加 PAT 所調節的細胞膜損傷，而當過量表達人類 CuZn-SOD 或過氧化氫則可以還原受損的現象，

當以斑馬魚做為模式動物觀察 PAT 毒性時，我們發現當 PAT 處理 6 hpf 的斑馬魚達 72 hpf 時 (method III)，LC50 為 204.8  $\mu\text{M}$ ，若 PAT 延後胚胎處理的起始點自 24 hpf，當處理時間達 120 hpf 時(method IX)，胚胎偶有死亡的現象，LC50 超過 250  $\mu\text{M}$ 。在外型的觀察上，50 及 200  $\mu\text{M}$  PAT 以 method VII (24-72 hpf) 處理後，整體外型與野生型及控制組都沒有顯著的不同，此外亦不影響原腎各部位包括腎絲球及原腎管的發育情形，wt1a 的基因表現及 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 蛋白質表現量亦沒有顯著改變。就組織學層面來說，200  $\mu\text{M}$  PAT 處理造成腎絲球的細胞排列有鬆散不規則的情形，但在原腎管部分組織結構看似完整。若以 dextran 清除率做為腎功能的指標，50 及 100  $\mu\text{M}$  PAT 處理的組別導致清除率分別下降至 22 及 16.7%。由此可知 PAT 處理會造成腎絲球過濾率降低，滲透壓藥物 mannitol 則可部分逆轉 PAT 所造成的腎功能缺損。

關鍵字: 棒麴毒素，斑馬魚，腎臟功能，人類腎臟細胞株，活性氧分子

## 【英文摘要】

Patulin (PAT), a mycotoxin mainly produced by *Penicillium* and *Aspergillus*, is found in various foods and feed and also considered as a nephrotoxic compound in cell and animal models. In the present study, its effects on oxidative stress in various mammalian cell lines were investigated. When cell-permeating fluorescent dyes were used as indicators of the generation of reactive oxygen species (ROS), we found that PAT treatment directly increased intracellular oxidative stress in human embryonic kidney (HEK293) and human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. Suppression of CuZn-SOD expression in mammalian cells by small interfering RNA (siRNA) resulted in an increase in PAT-mediated membrane damage, while overexpression of human CuZn-SOD or catalase led to a reduction in damage, indicating the involvement of ROS in PAT toxicity.

When zebrafish was used as a model species, various concentrations of PAT were introduced to zebrafish embryos at 24 hour postfertilization (hpf) and the endpoints were examined at 72 hpf. After exposed to PAT at a concentration up to 200  $\mu\text{M}$ , the larval zebrafish, wild type or transgenic line, did not exhibit an altered morphology in their pronephrons, including glomerulus and pronephric tubule/duct. However, histological sections after H & E staining revealed that PAT treatment may disturb the development of pronephric glomerulus, but not the pronephric duct. PAT at the concentrations of 50 and 100  $\mu\text{M}$  decreased the dextran clearance rate to 22 and 16.7 % , respectively, suggesting the disturbance of renal function. Co-treatment of PAT with mannitol, an osmotic diuretic, reversed the clearance rate triggered by PAT.

Key word: patulin, zebrafish, pronephric function, human embryonic cell, reactive oxygen species (ROS)

## 【前言】

棒麴毒素(patulin, 簡稱 PAT, figure 1B)的分子量為 154.12, 是一種熱穩定的黴菌毒素(Moss, 2008), 主要由 *Aspergillus* 和 *penicillium* 菌屬所分泌的二級代謝物, PAT 常常在發霉的蘋果和蘋果製品中被發現, 其他如發霉的水果、蔬菜及穀物都可能含有 PAT (CAST, 2003)。世界衛生組織 (WHO) 及食物添加及污染委員會(The Codex Committee on Food Additives and Contaminants)將蘋果汁及蘋果汁的即食飲用製品中, PAT 的最大可容許量訂在 50 µg/L (Van Egmond, 1989)。然而在 2000 年美國食品及藥物檢驗局所作的檢測中發現, 在蘋果汁中 PAT 的濃度範圍為 68-3700 µg/L (Roach et al., 2000)。可見食品中污染 PAT 的情形是我們需要正視的。

在細胞實驗上得知, PAT 處理腎臟細胞後會引發活性氧分子的生成(Liu et al., 2007), 另外也會抑制 RNA 和蛋白質的生合成 (Arafat et al., 1985; Wu et al., 2005) 而且在血球細胞中 PAT 會引發細胞凋亡(Wu et al., 2008)。以 PAT 處理人類胚胎腎臟細胞株 (HEK293) 會造成染色體的斷裂及異常及姊妹染色體 (sister chromatid exchange) 互換的頻率增加 (Thust et al., 1982; Liu et al., 2003)。此外利用 PAT 處理中國倉鼠 V79 細胞株, 則是會促使細胞產生致突變性和致癌性。動物實驗證實, 大鼠服食高量的 PAT (295 mg/L) 4 週後, 發現 creatinine 清除率下降, 代表腎絲球過濾率功能下降, 但是腎臟外形沒有顯著的改變(Speijers et al., 1988)。另外 PAT 也會造成小鼠和兔子免疫球蛋白數目下降和影響大鼠肝臟酵素系統的生合成 (Escoula et al., 1988; Sakthisekaran et al., 1989)。一般而言, 人類誤食到污染食品的 PAT 會產生胃發炎、反胃、嘔吐和腹瀉等病癥。另一方面在胚胎致畸性的研究中指出, 當雞胚胎暴露在 1-2 µg PAT/egg 的環境中發現有 36-47% 的胚胎出現畸胎, 利用胃插管的方式給予懷孕小鼠總計量達 24mg/kg 的 PAT, 結果發現近 20% 的初生小鼠死亡, 然而在大鼠胚胎的研究上也發現, 62 µM PAT 處理 40 小時後會導致大鼠胚胎死亡 (Ciegler et al., 1976; Osswald et al., 1978; Smith et al., 1993)。可見 PAT 在胚胎層面上的影響不容忽視。

斑馬魚是一種在毒理測試上理想的模式動物, 由於牠屬於脊椎動物, 並且其的生理及生化機轉與高等脊椎動物非常類似。此外魚胚胎的優點在於其澄清透明且易於觀察篩選, 生長周期短, 一次產卵的數目多, 器官在 48 小時內便分化完成, 並且在 72 小時後功能性便開始成熟。對斑馬魚施與藥物的方式相當簡單, 只要在飼養的水內加入藥物, 便可以由鰓或皮膚吸收到魚體內, 而且斑馬魚對環境毒素的刺激非常的敏感, 包含了重金屬(Li et al., 2009)、多環芳香族(Grimes et



*al.*, 2008)和黴菌毒素(Wang *et al.*)等環境因子。所以非常適合用來當作毒理研究中胚胎早期發育的模式動物(Hill *et al.*, 2005)。

## 【實驗目的】

本研究報告的實驗內容主要針對以下兩大目標進行探討，

目標 I (Aim I)：以人類細胞株探討 PAT 所引起的 ROS 生成與細胞凋亡之間的關聯性

目標 II(Aim II)：以斑馬魚系統探討 PAT 的腎臟及心臟發育毒性。

## 【實驗結果和討論】

### **Intracellular ROS generation increases after PAT treatment**

Fluorescence spectrophotometry and cytometry using H<sub>2</sub>DCF-DA as the probe were used, respectively, to measure intracellular ROS production in HEK293 and HL-60 cells. Intracellular H<sub>2</sub>DCF is oxidized to fluorescent DCF by several oxidants, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide, hydroxyl radicals, and cellular peroxidases. After treatment of HEK293 cells for 45 min with various concentrations of PAT, intracellular DCF fluorescence increased in a dose-dependent manner (Fig. 1A). PAT at 50 and 100 μM caused a marked increase of fluorescence to 1.9 and 2.6 folds of control levels, respectively. Hydrogen peroxide at 100 μM worked as a positive control. To evaluate whether the ROS-inducing ability of PAT is cell type specific, HL-60 cells were also exposed to PAT and then examined by fluorocytometry. Incubation of HL-60 cells with 100 μM PAT led to a 7.4-fold increase in fluorescence compared to solvent-treated cells (Fig. 1B). To further understand the type of ROS induced by PAT, dihydroethidium, a dye generally used as probe for superoxide anions, were applied in HL-60 cells and a dose-dependent increase in ethidium fluorescence was seen in PAT-treated cultures (Fig. 1C). Exposure of HL-60 cells to 100 μM PAT resulted in a significant 2.3-fold increase in superoxide anion production compared to controls. These data indicate that PAT treatment is able to generate ROS, including superoxide anion, in different human cell lines.

## **Roles of CuZn-SOD and catalase in PAT-induced cytotoxicity**

It has been suggested that SODs and catalase work in concert to detoxify superoxide anion and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To determine the role of superoxide anion in PAT-induced cytotoxicity, we decreased CuZn-SOD levels in HEK293 cells using siRNA. Three weeks after transfection, three stable clones containing the CuZn-SOD siRNA plasmid were selected and subjected to Western blotting for CuZn-SOD levels, and all showed a dramatic reduction compared to vector-transfected cells (Fig. 2A). Since in Table 1 PAT was able to activate lipid peroxidation, cellular membrane damage was used as a parameter to evaluate the cytotoxicity of PAT treatment. As shown in Figure 2B, significant LDH leakage was detected when clone 1 was treated for 4 h with PAT concentrations of 50 and 100  $\mu$ M. After incubation with 50  $\mu$ M PAT, LDH leakage from clone 1 ( $14.89 \pm 1.74$ ) was 16-fold higher than that from vector-transfected cells ( $0.92 \pm 0.04$ ).

On the other hand, to confirm the effect of CuZn-SOD on PAT-induced cytotoxicity, stable CuZn-SOD-overexpressing clones were established from CHO-K1 cells (Figure 3A). Compared to HEK293 cells, CHO-K1 showed a much lower level of endogenous CuZn-SOD, so it was chosen for easily observing the effect of overexpressed CuZn-SOD. As shown in Fig. 3B, overexpression of CuZn-SOD significantly reduced LDH leakage from cells treated with 50 or 100  $\mu$ M PAT by ~50% compared to PAT-treated vector-transfected cells.

## **PAT 對斑馬魚的致死濃度及型態**

在本實驗室過去的研究報告中指出，PAT 在人類細胞株上會造成各種細胞毒性，包含了活化 MAPK 訊息傳導途徑、DNA 損傷及細胞凋亡等，並且在文獻上也指出 PAT 具有相當程度的胚胎毒性，但是關於毒素影響胚胎早期發育的情形並不清楚，因此我們將探討 PAT 對胚胎發育早期的影響。

不同濃度之 PAT (10, 20, 50, 100 及 200  $\mu$ M) 分別依不同處理方法(method I - IX)來進行存活率的觀察藉此計算一半致死劑量(LC50)(Fig 4)，當 PAT 處理 6 hpf 的斑馬魚達 72 hpf 時 (method III)，LC50 為 204.8  $\mu$ M，而暴露時間延長至 120 hpf 時(method V)，LC50 仍高達 176.8  $\mu$ M。若 PAT 延後胚胎處理的起始點自 24 hpf，當處理時間達 120 hpf 時(method IX)，胚胎偶有死亡的現象，LC50 過高無法估計，因此標記為 >250  $\mu$ M。由此結果可知，斑馬魚胚胎自 6 hpf 開始暴露於 PAT 的環境中，LC50 低於 24 hpf 開始暴露的組別，顯示胚胎較早開始暴露在 PAT 的環境中會有較高的胚胎毒性。

在外型的觀察上，50 及 200  $\mu$ M PAT 以 method VII (24-72 hpf) 處理後，整體

外型與野生型及控制組都沒有顯著的不同；由於斑馬魚的心臟裸露，是最容易觀察的部分，我們也仔細觀察心臟的外型，並沒有發現顯著的異常(Fig 5)。

### **PAT 對腎臟發育的影響**

由於 PAT 普遍被認為具有腎毒性(Aleo et al. 1991)，首先，我們利用腎臟螢光魚 Tg(wt1b:GFP)來進行斑馬魚胚胎原腎發育的觀察(Fig 6A)。當 200  $\mu$ M PAT 由 24 hpf 開始處理螢光魚胚胎達 48 至 72 hpf 時，原腎構造中的腎絲球、原腎小管及原腎管型態都與控制組相似，顯示 PAT 對原腎的整體構造沒有造成可觀察到的異常。接著，利用腎絲球的標記基因 wt1a 來觀察腎絲球的構型及其在腎絲球中的 RNA 表現情形，以全胚體原位雜交法來觀察 PAT 對斑馬魚腎臟發育的影響。正常發育下腎絲球在 24 hpf 時會在體軸兩側由鎖狀聚集成球狀，並且在 48 hpf 後聚合在魚體的中央。結果顯示，在 200  $\mu$ M PAT 處理的組別中，腎絲球的型態與控制組相似，且 wt1a 表現量也與控制組相似(Fig 6B)。另外以辨識 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 的單株抗體 $\alpha$ 6F 來標示斑馬魚胚胎中的原腎小管及原腎管，藉此觀察原腎小管及原腎管型態及 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 酵素表現量。全胚體免疫染色法的結果顯示 200  $\mu$ M PAT 處理魚胚胎達 48 及 72 hpf 時，原腎小管及原腎管構型及表現量都與控制組相仿。由以上結果顯示，200  $\mu$ M PAT 由 24 hpf 開始處理魚胚胎至 72 hpf 時，並不會影響原腎各部位發育的情形，同時不影響 wt1a 的基因表現及 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 酵素表現量。

就組織學層面來說，200  $\mu$  PAT 處理 24-72 hpf 的胚胎，發現腎絲球的細胞排列有鬆散不規則的情形，原腎管的部分，組織結構看似完整。可見 PAT 處理後對腎絲球的結構造成影響(Fig 7)。

### **PAT 對腎功能的影響**

腎絲球過濾率為評估腎臟功能的一項重要指標，腎絲球具有分子篩的能力，可以限制血液中特定大小的物質進入腎小管。Hentschel 等人在 2005 年的文章中指出(Hentschel et al. 2005)，72 hpf 的腎絲球過濾功能已啟動，10 kDa 大小的 Dextran 可以通過腎絲球進入腎小管而排出體外。由圖 8 結果顯示，控制組的胚胎在 72 hpf 時以顯微注射的方式將 10 kDa Dextran-Rhodamine 注入靜脈竇，注射後 7 小時，腎絲球清除率為 60 %；而 50 及 100  $\mu$ M PAT 處理的組別，清除率分別下降至 22 及 16.7 %。由此可知 PAT 處理下會造成腎絲球過濾率降低的情形。

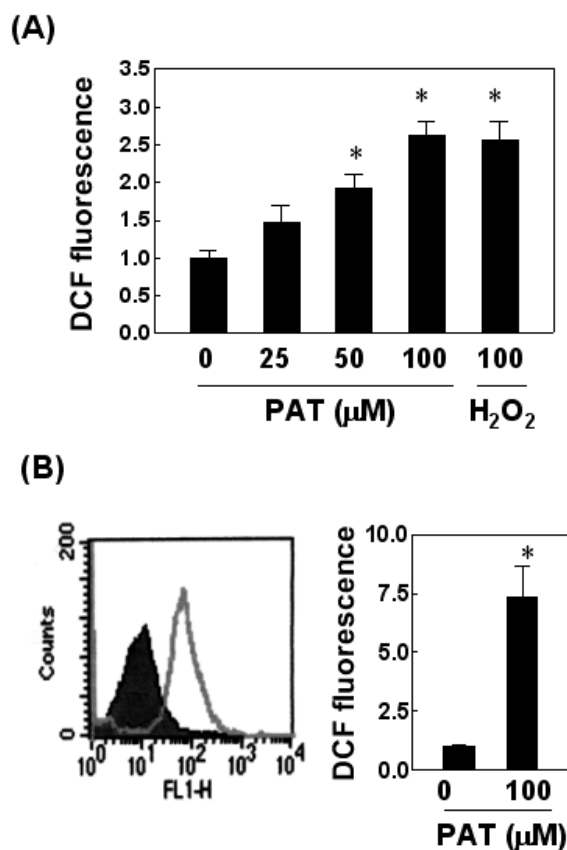
由於腎絲球過濾率除了與腎絲球本身的功能相關外，心臟的功能也扮演了重要的角色，因此利用心跳速率來進行心臟功能的評估。72 hpf 時控制組的心跳速

率為  $148.2 \pm 1.35$  次/min，當 50 及 100  $\mu\text{M}$  PAT 處理後，心跳速率分別為  $144.2 \pm 1.63$  次/min 及  $139.1 \pm 2.7$  次/min，並沒有統計學上的意義。因此，50 及 100  $\mu\text{M}$  的 PAT 並不影響心跳功能。由以上結果得知，PAT 在不影響心臟功能的狀態下就足以造成腎功能低下的情形。

為了研究 PAT 所造成的腎功能缺損，利用常見的腎臟藥物(mannitol 及 trental)來推斷 PAT 所引發的現象為何種類型。Mannitol 是一種高滲透性利尿劑，藉由提高滲透壓與影響鉀離子濃度，以增加液體進入腎小管，來提高腎絲球過濾的速度。Trental 可以增加末端血管的血流量，以增加血液通過腎絲球的速度，來提升過濾率。統計的結果顯示(Fig 10)，控制組的清除率平均可達  $43.6 \pm 4.5\%$ ，而 50  $\mu\text{M}$  PAT 處理的組別，清除率顯著下降至  $13.14 \pm 7.2\%$ 。當 PAT 與 Mannitol 共同處理魚胚胎，清除率又顯著的回升至  $39.7 \pm 7.4\%$ ，然而共同處理 Trental 的組別清除率仍維持  $11.8 \pm 6.8\%$ 。因此推論 PAT 所造成的腎功能缺損可能與滲透壓的改變有相關性。

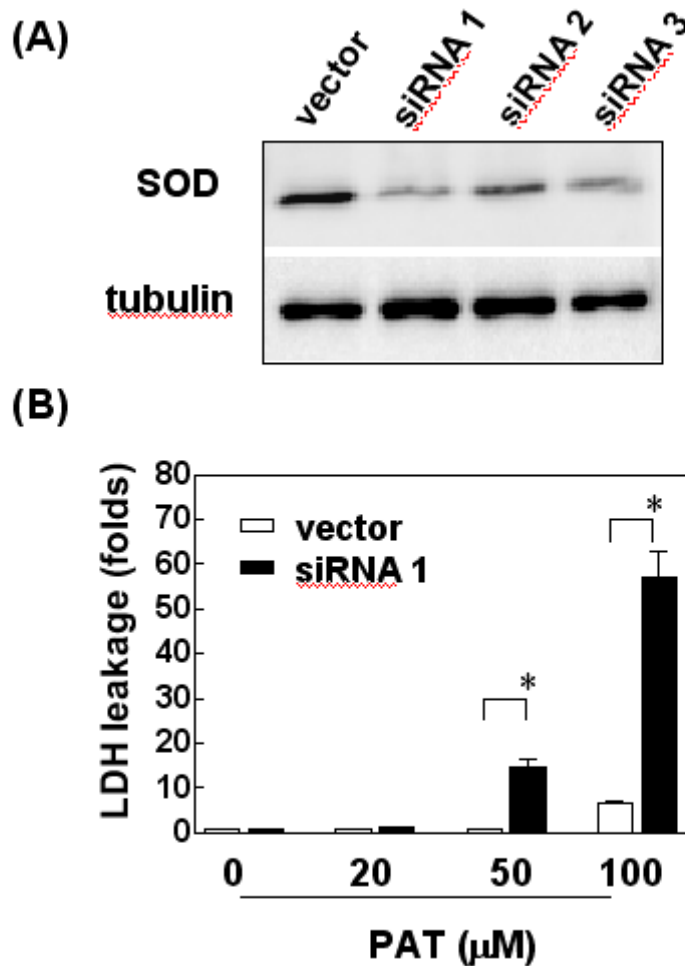
## 【實驗圖表】

Fig. 1. PAT increases intracellular ROS levels in HEK293 and HL-60 cells.



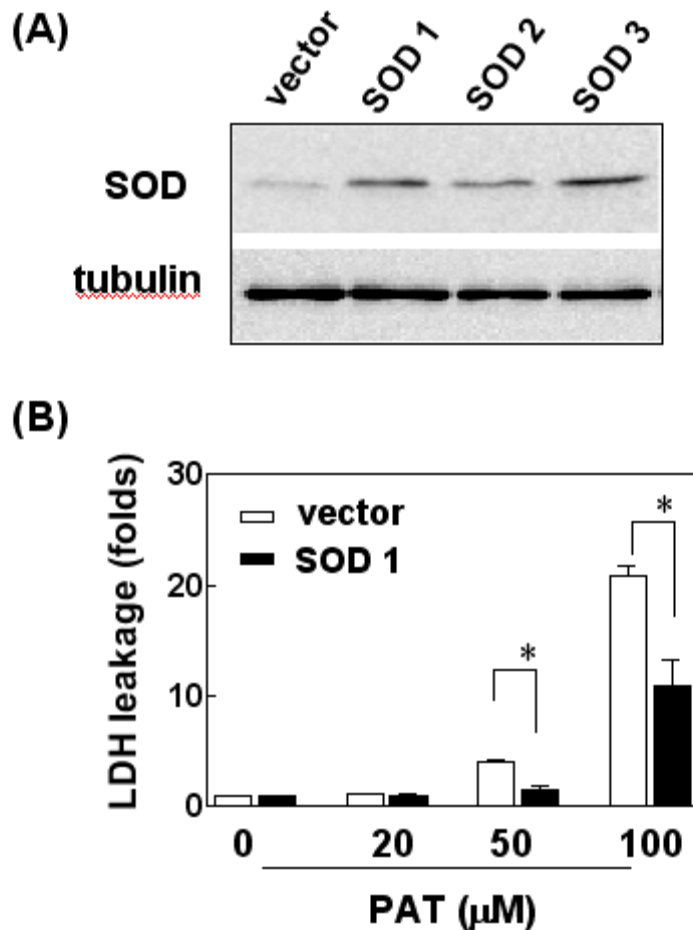
PAT increases intracellular ROS levels in HEK293 and HL-60 cells. HEK293 cells (A) or HL-60 cells (B) were incubated with 10  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCF-DA for 30 min, and then the medium was replaced with various concentrations of PAT or 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for another 45 min. For the HEK293 cultures, DCF fluorescence was analyzed by spectrofluorometry and the fluorescence in HL-60 cells was measured by fluorocytometry. In the chromatograph in (B), the open and solid areas represent the cultures treated with 100  $\mu\text{M}$  PAT and vehicle, respectively.

**Fig. 2.** Downregulation of CuZn-SOD in HEK293 cells and its effect on cell damage.



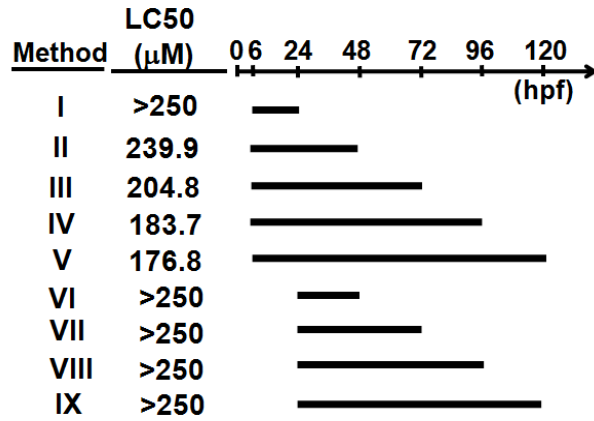
HEK293 cells were transfected with vector or CuZn-SOD siRNA plasmid, then stable clones were selected as described in the Materials and Methods. (A) Western blot analysis of stable clones for CuZn-SOD and tubulin. (B) Vector-treated and siRNA clone 1 cultures were exposed to various concentrations of PAT for 4 h, and then plasma membrane damage was estimated by measuring LDH activity released into the culture medium. The data are the mean  $\pm$  SEM for four independent experiments and expressed as a fold value of that seen with vehicle-treated cells (0  $\mu\text{M}$  PAT). \* Significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to the vector-treated group.

**Fig. 3. Overexpression of CuZn-SOD in CHO-K1 cells and the protection against cell damage.**



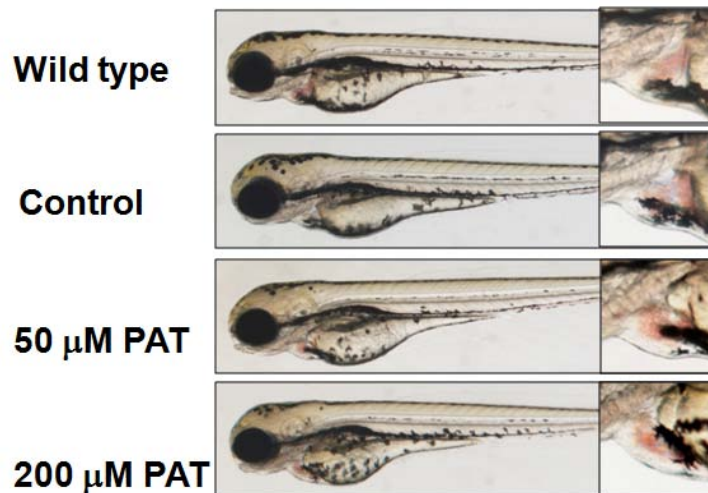
CHO-K1 cells were transfected with the pcDNA 3.1 vector or the human CuZn-SOD-expressing plasmid and stable clones selected. (A) Cell lysates of clones subjected to Western blot analysis for CuZn-SOD and tubulin. (B) Vector-treated and CuZn-SOD-overexpressing clone 1 cultures were exposed to PAT for 4 h, and then extracellular LDH activity was measured. The data, expressed as a fold value of that in cells exposed to vehicle (0  $\mu\text{M}$  PAT), are the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \* Significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to the paired group.

**Fig 4. PAT在斑馬魚中的一半致死濃度**



將斑馬魚依不同處理方法進行分組，分別自 6 hpf (method I -V)或 24 hpf (method VI-IX) 開始加入 10-200  $\mu\text{M}$  PAT，並於 24-120 hpf 時觀察胚胎存活率，以只加入溶劑的組別當作控制組畫出存活曲線，並計算一半致死濃度(LC50)。若 LC50 無法估計則標記大於最高濃度。數據取自六次獨立實驗。

**Fig. 5. PAT處理斑馬魚後的型態**

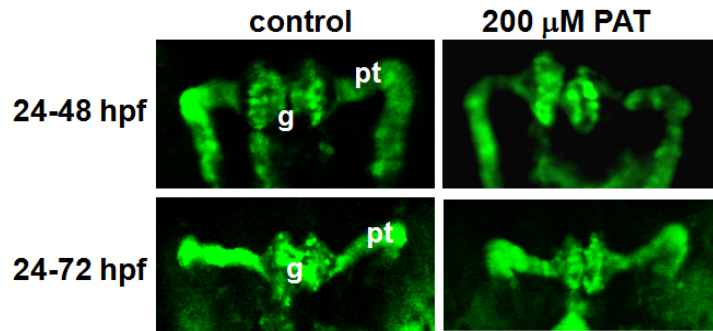


選取正常發育至 24 hpf 的斑馬魚胚胎，分別加入不同濃度之 PAT (50, 200  $\mu\text{M}$ )，並且於 72 hpf 時觀察記錄斑馬魚胚胎的型態圖，胚胎右側為心臟放大圖。魚頭部朝左，側面觀。

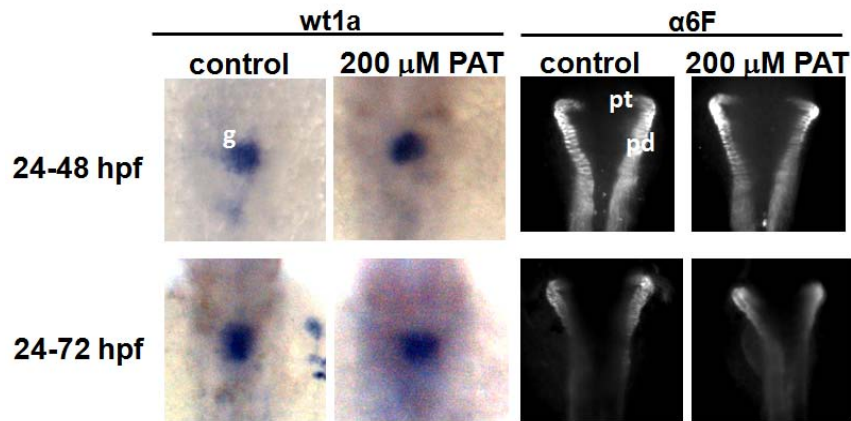


**Fig 6. PAT對腎絲球、原腎小管及原腎管發育的影響**

(A)

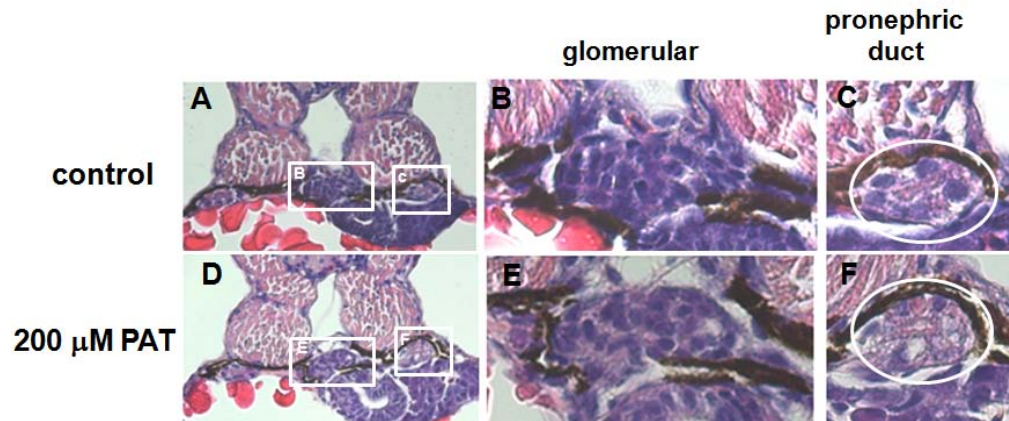


(B)



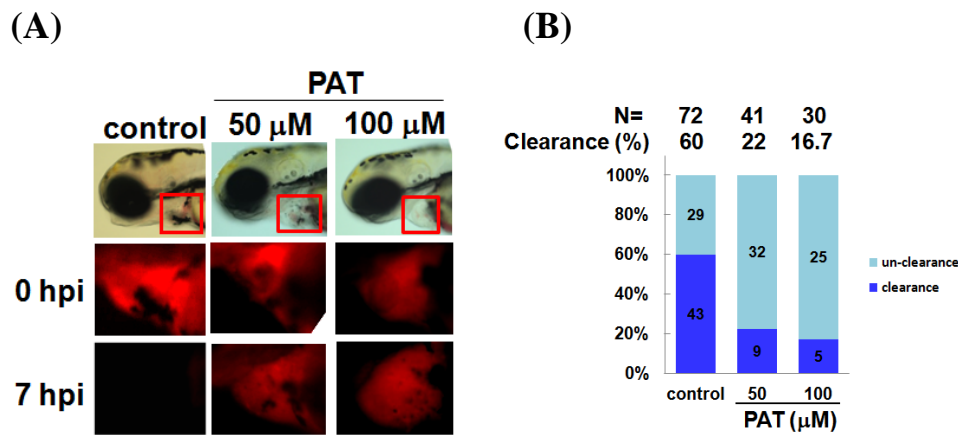
(A). 利用腎螢光轉基因魚 *Tg(wt1b:GFP)* 來觀察 PAT 對腎臟發育的影響，選取正常發育至 24 hpf 的魚胚胎，加入 200  $\mu$ M PAT 並且於 48 hpf 及 72 hpf 時以共軛焦螢光顯微鏡進行觀察。(B). 200  $\mu$ M PAT 處理 24 hpf 的野生型斑馬魚胚胎，分別於 48 hpf 及 72 hpf 時收集魚胚胎，利用全胚體原位雜交法，以 *wt1a* 為探針標定腎絲球。利用全胚體免疫螢光染色法，以辨識  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 的單株抗體  $\alpha$ 6F 來標記原腎小管和原腎管的位置。圖中是以背面觀，且魚胚胎頭部朝上。g: 腎絲球；pt: 原腎小管；pd:原腎管。

**Fig 7. PAT對腎臟組織的影響**



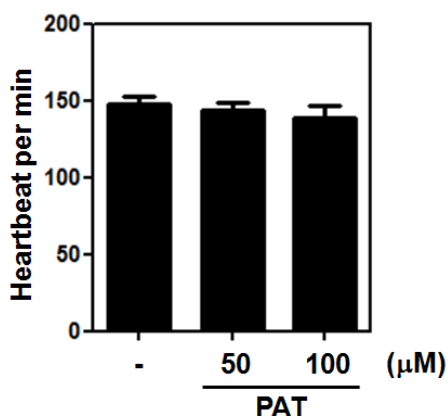
200  $\mu\text{M}$  PAT 處理正常發育至 24 hpf 的斑馬魚胚胎，於 72 hpf 時收集魚胚胎，經 4% paraformaldehyde 固定後以石蠟包埋，5  $\mu\text{m}$  厚度進行切片。利用 hematoxyline 及 eosin 染色後以正立顯微鏡進行觀察。

**Fig 8. PAT處理後對斑馬魚腎絲球過濾率的影響**



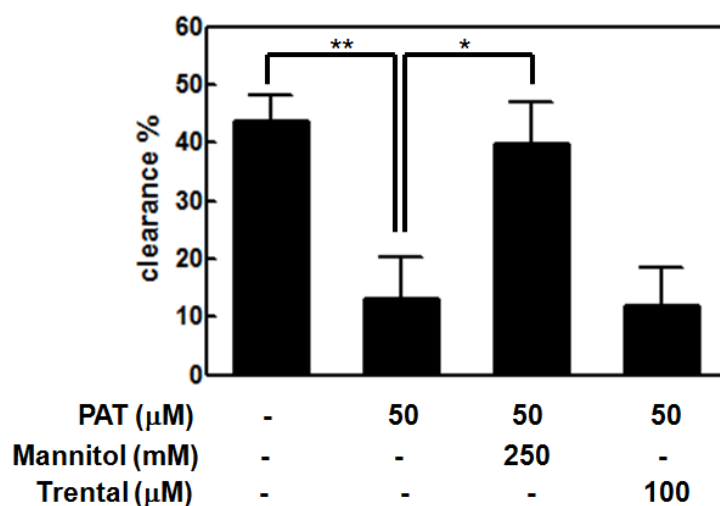
選取正常發育至 24 hpf 的魚胚胎，分別加入 50 或 100  $\mu\text{M}$  PAT 達 72hpf 時，將 25 ng Dextran-Rhodamine (10kDa) 以顯微注射的方式注入靜脈竇的位置，使 Dextran-Rhodamine 進入血液循環。注射後觀察心臟位置螢光來確認顯微注射是否成功，並於顯微注射後 7 小時(7 hpi)再度觀察 Dextran 清除的情形，若心臟位置沒有觀察到螢光則標記為清除。(A) 顯微注射後斑馬魚胚胎明視野側面觀及心臟螢光圖。(B) 以統計圖方式顯示顯微注射後 7h，PAT 處理後的腎絲球清除率。

**Fig 9. PAT處理斑馬魚後的心跳數**



選取正常發育至 24 hpf 的斑馬魚胚胎，放入 6 孔盤中(每孔盤中 20 個胚胎)，分別加入 50 及 100 μM PAT，於 72 hpf 時計算心跳數，計算 15 秒，求取平均數後乘以 4 求得每分鐘心跳數。數據採三次獨立實驗，以 mean ± SEM 表示。

**Fig 10. 腎臟藥物mannitol和trental對PAT所造成腎功能低下的影響**



選取正常發育至 24 hpf 的斑馬魚胚胎，放入 24 孔盤中(每孔盤中 10 個胚胎)，分別加入 50 μM PAT，或共同處理 250 mM Mannitol 及 100 μM trental。於 72 hpf 時進行顯微注射，並於注射後 7 小時進行清除率觀察。數據採四次獨立實驗，以 mean ± SEM 表示。 \*代表與相對應組別以 Student's t test 檢定後有顯著差異

## 【參考文獻】

- Arafat, W., Kern, D., and Dirheimer, G. (1985). Inhibition of aminoacyl-tRNA synthetases by the mycotoxin patulin. *Chem Biol Interact* **56**, 333-349.
- Ciegler, A., Beckwith, A. C., and Jackson, L. K. (1976). Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl Environ Microbiol* **31**, 664-667.
- Escoula, L., Thomsen, M., Bourdiol, D., Pipy, B., Peuriere, S., and Roubinet, F. (1988). Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. *Int J Immunopharmacol* **10**, 983-989.
- Grimes, A. C., Erwin, K. N., Stadt, H. A., Hunter, G. L., Gefroh, H. A., Tsai, H. J., and Kirby, M. L. (2008). PCB126 exposure disrupts zebrafish ventricular and branchial but not early neural crest development. *Toxicol Sci* **106**, 193-205.
- Hentschel, D.M., Park, K.M., Cilenti, L., Zervos, A.S., Drummond, I. and Bonventre, J.V. (2005) Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F923-929.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., and Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* **86**, 6-19.
- Li, D., Lu, C., Wang, J., Hu, W., Cao, Z., Sun, D., Xia, H., and Ma, X. (2009). Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol* **91**, 229-237.
- Liu, B. H., Wu, T. S., Yu, F. Y., and Su, C. C. (2007). Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicol Sci* **95**, 340-347.
- Liu, B. H., Yu, F. Y., Wu, T. S., Li, S. Y., Su, M. C., Wang, M. C., and Shih, S. M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol Appl Pharmacol* **191**, 255-263.
- Moss, M. O. (2008). Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *J Appl Microbiol* **104**, 1239-1243.
- Osswald, H., Frank, H. K., Komitowski, D., and Winter, H. (1978). Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Food Cosmet Toxicol* **16**, 243-247.
- Roach, J. A., White, K. D., Trucksess, M. W., and Thomas, F. S. (2000). Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of patulin in apple juice. *JAOAC Int* **83**, 104-112.

- Sakthisekaran, D., Shanmugasundaram, K. R., and Shanmugasundaram, E. R. (1989). Effect of patulin on some enzymes of carbohydrate metabolism studied in rats. *Biochem Int* **19**, 37-51.
- Smith, E. E., Duffus, E. A., and Small, M. H. (1993). Effects of patulin on postimplantation rat embryos. *Arch Environ Contam Toxicol* **25**, 267-270.
- Speijers, G. J., Franken, M. A., and van Leeuwen, F. X. (1988). Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastro-intestinal tract. *Food Chem Toxicol* **26**, 23-30.
- Thust, R., Kneist, S., and Mendel, J. (1982). Patulin, a further clastogenic mycotoxin, is negative in the SCE assay in Chinese hamster V79-E cells in vitro. *Mutat Res* **103**, 91-97.
- Van Egmond, H. P. (1989). Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food additives and contaminants* **6**, 139-188.
- Wu, T. S., Liao, Y. C., Yu, F. Y., Chang, C. H., and Liu, B. H. (2008). Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Toxicol Lett* **183**, 105-111.
- Wu, T. S., Yu, F. Y., Su, C. C., Kan, J. C., Chung, C. P., and Liu, B. H. (2005). Activation of ERK mitogen-activated protein kinase in human cells by the mycotoxin patulin. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 103-111.

### 【計畫成果自評】

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

-本篇研究報告的一部分已經發表在 SCI 期刊 toxicological Science，有關於以斑馬魚為模式動物的部分也以摘要型式投稿於國際會議，期刊論文目前撰寫中。由於目前黴菌毒素對於斑馬魚的發育及器官毒理尚未有論文發表，因此在本計畫中所建立的動物模式不僅有利於各種黴菌毒素的毒理機轉探討，並且可以進一步利用毒素所造成的致病模式做為一個篩檢有效治療藥物的平台。

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/11/02

國科會補助計畫	計畫名稱: 利用細胞及動物模式探討黴菌毒素patulin之毒理機轉
	計畫主持人: 劉秉慧
	計畫編號: 97-2313-B-040-004-MY3      學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

97 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：97-2313-B-040-004-MY3				計畫名稱：利用細胞及動物模式探討黴菌毒素 patulin 之毒理機轉	
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	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	1	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）

-本篇研究報告的一部分已經發表在 SCI 期刊 toxicological Science，有關於以斑馬魚為模式動物的部分也以摘要型式投稿於國際會議，期刊論文目前撰寫中。由於目前黴菌毒素對於斑馬魚的發育及器官毒理尚未有論文發表，因此在本計畫中所建立的動物模式不僅有利於各種黴菌毒素的毒理機轉探討，並且可以進一步利用毒素所造成的致病模式做為一個篩檢有效治療藥物的平台。