

國立臺灣大學獸醫專業學院  
分子暨比較病理生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Molecular and Comparative Pathobiology

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

黃麴毒素 B<sub>1</sub> 對豬免疫細胞及豬第二型環狀病毒細胞內  
複製的影響

The Effect of Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) on Swine Immunocytes  
and Intracellular Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)  
Replication

林媻媻

Chuan-Chuan Lin

指導教授：龐 飛 博士

鄭謙仁 博士

Advisor: Victor Fei Pang, D.V.M., Ph.D.

Chian-Ren Jeng, D.V.M., Ph.D.

中華民國 102 年 6 月

June 2013

## 致謝



感謝敬愛的指導教授 龐飛老師與 鄭謙仁老師，從進入碩士班起對於學生專題的研究方向、實驗設計及論文撰寫的用心指導，以及在待人處事及生活態度上都以身作則，讓學生受益良多。感謝口試委員 張志成老師百忙中給予指教，讓論文內容更為踏實。研究過程中， 劉振軒老師、 張本恆老師、 王汎熒老師及 萬灼華老師在專題討論及病理輪值中悉心給予建議，激發學生的思考。特別感謝 姜延年老師費心教導學生統計分析並給予指正；感謝國立中興大學 張文發老師、 許慶宗老師及 林正忠老師對我學習獸醫病理學的啟蒙及推薦，使我有機會進入碩士班進一步學習病理；感謝 董光中老師、 楊志寰老師及 鍾楊聰老師總是在學生迷網時給予支持及開闊的建議。

感謝林俊明博士、蔡依潔博士及天富學長總是耐心的帶領實驗，並解答實驗中大大小小的問題；邱慧英學姊不厭其煩，細心的從零開始指導獸醫病理的諸多細節；曠棋學姐、惟蒂學姐、李遙學姐及宛玲學姐總是默默維繫實驗室的節奏，讓研究生們能無憂無慮的投入實驗或輪值；凱鴻學長、泓錫學長及卉蓉學姐總是願意放下手邊工作，帶著我們到豬場採樣；學弟妹晏禎、雨軒及嶽安讓 513 休息室充滿歡笑，使實驗室充滿活力，有你們一起學習病理跟實驗是珍貴的體驗；感謝同屆的權星、子婷、黃崢及貽安在生活及實驗上適時的給予刺激及幫助。此外，系辦路先生、高小姐及劉先生總願意熱心給予協助，讓系館充滿溫馨的人情味。

感謝東盈豬場徐場長熱心協助實驗的進行，以及工讀生安珣、陳阿姨、俞蓁、主霖、盈臻、恆睿、皓偉、萱琪及景舜在豬舍維護上的用心；感謝實驗豬隻們為了實驗而受苦及犧牲。最後要感謝我的父母的全力支持，使我能無憂的完成碩士班的學業。

謹以本論文的成果獻予各位，並致最深的感謝。

林嫻嫻 2013 於台大分子暨比較病理生物學研究所

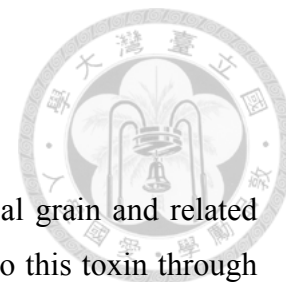
## 中文摘要



黃麴毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)是常見於亞熱帶及熱帶地區飼料原料穀物的黴菌毒素，豬隻可能因攝食到黴菌污染的飼料而接觸 AFB<sub>1</sub>，由於長期接觸低劑量 AFB<sub>1</sub> 會影響動物的免疫系統，因此 AFB<sub>1</sub> 可能成為豬隻產生豬環狀病毒相關症(PCVAD)的環境因子。本研究自無臨床症狀的豬第二型環狀病毒(PCV2)感染豬隻分離周邊血液單核細胞(PBMCs)，並將細胞進一步分化為單核球來源的樹突細胞(MoDCs)以做為抗原呈獻細胞(APCs)的研究模式，檢測豬免疫細胞於 *in vitro* 條件下與 AFB<sub>1</sub> 共同後培養，對其細胞功能及 PCV2 複製的影響。在對免疫細胞功能影響的結果顯示，10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 處理 72 小時會減少 PBMCs 受到致裂原 Con A 刺激後之細胞存活率及細胞增殖能力；10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 處理 48 小時會使 MoDCs 變小、變圓，並失去樹突狀結構，並會降低 MoDCs 的抗原攝取與處理能力；10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 處理 24 小時後會增加 MoDCs 的細胞表面抗原 CD40、CD83 及 CD86，以及免疫抑制性細胞激素 IL-10 的 mRNA 表現量；0.001 µg/ml 低濃度 AFB<sub>1</sub> 則在處理後 6 小時造成 MoDCs 的 CD40 及 CD83 mRNA 表現量上升。在對 PCV2 複製的影響上，PBMCs 受到 72 小時致裂原 Con A 的活化下，雖然 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 處理並不影響整個處理單位內細胞中的總病毒量，但卻可能增加單位細胞內所含的 PCV2 病毒量；而 MoDCs 經過 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 處理 72 小時後，也有處理單位內細胞量減少但細胞中總病毒量與對照組含量相近的現象。本研究結果顯示 10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 有機會增加 MoDCs 及 Con A 活化之 PBMCs 單位細胞內的 PCV2 病毒複製、傷害細胞媒介性免疫中的 APCs 功能及細胞增殖能力，並與 PCV2 同樣能刺激細胞的 IL-10 mRNA 表現而造成免疫抑制，故可能促使攝食到飼料被高量 AFB<sub>1</sub> 污染的 PCV2 次臨床感染豬隻發展為 PCVAD 患豬。

關鍵字：黃麴毒素 B<sub>1</sub>、豬周邊血液單核細胞、豬單核球來源的樹突細胞、豬第二型環狀病毒、豬環狀病毒相關症

## Abstract



Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) is a mycotoxin commonly found in cereal grain and related products in subtropical and tropical regions, and pigs may expose to this toxin through contaminated feed. Chronic, low-dose exposure of AFB<sub>1</sub> is known to affect the immunity, and may be a potential environmental factor in association with porcine circovirus type 2 (PCV2) in the induction of porcine circovirus-associated disease (PCVAD). In this study, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy subclinically PCV2-infected pigs and further differentiated to monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) as an antigen-presenting cells (APCs) model to investigate the changes in immunocyte functions and PCV2 replication after *in vitro* AFB<sub>1</sub> exposure. The PBMCs viability and Con A-induced proliferation were impaired after treated with AFB<sub>1</sub> at 10 µg/ml for 72 hours. The cell morphology of MoDCs became smaller or rounded, contained shorter dendrites, and lost the antigen uptaking and processing abilities after exposure to 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> for 48 hours. The mRNA expression levels of surface markers CD40, CD83, and CD86 and regulatory cytokine IL-10 increased in MoDCs after treated with 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> for 24 hours. A significantly up-regulated CD40 and CD83 mRNA levels were observed in MoDCs after treated with 0.001µg/ml AFB<sub>1</sub> for 6 hours. The cell-based PCV2 load appeared to increase in 10 µg/ml AFB<sub>1</sub>-treated Con A co-treated PBMCs, although no significant difference was seen in the total copy number of PCV2 genome; similar increase in cell-based PCV2 load might also occur in 10 µg/ml AFB<sub>1</sub>-treated MoDCs. These results indicate that a relatively higher concentration of AFB<sub>1</sub> such as 10 µg/ml may have the potential to increase PCV2 replication in PBMCs and MoDCs, impair the APCs cell function and cell proliferation in cell-mediated immunity, and cause immunosuppression through enhancement of IL-10 mRNA expression. Thus, it is suggested that AFB<sub>1</sub> may potentiate PCVAD development in subclinically PCV2 infected pigs through dietary exposure to AFB<sub>1</sub>.

Key words: Aflatoxin B<sub>1</sub>, porcine peripheral blood mononuclear cells, porcine monocyte-derived dendritic cells, porcine circovirus type 2, porcine circovirus-associated diseases

# 目錄



中文摘要	i
英文摘要	ii
目錄	iii
表次	vii
圖次	viii
簡寫對照表	x
第一章 序言	1
第二章 文獻回顧	3
第一節 黃麴毒素	3
1-1 黃麴毒素的生成與常見病徵	3
1-2 黃麴毒素 B <sub>1</sub> 的主要毒性及作用機制	4
1-3 氣候變遷與黃麴毒素的關係	5
第二節 黃麴毒素對免疫的影響	6
2-1 黃麴毒素對免疫的影響	6
2-2 活體試驗中黃麴毒素對免疫的影響	7
2-3 黃麴毒素對細胞激素的影響	8
2-4 黃麴毒素對巨噬細胞的影響	8
2-5 黃麴毒素對病毒的影響	9
第三節 豬單核球來源的樹突狀細胞研究模式	10
3-1 豬單核球來源的樹突狀細胞簡介	10
3-2 黴菌毒素對單核球來源的樹突狀細胞(MoDCs)的影響	12
第四節 豬環狀病毒相關症	13
4-1 豬環狀病毒及離乳後多系統消耗症後群	13

4-2	豬環狀病毒相關症	14
第五節	豬環狀病毒相關症的免疫調控	15
5-1	離乳後多系統消耗症候群(PMWS)的免疫學變化	15
5-2	豬體內豬第二型環狀病毒(PCV2)病毒量與 PMWS 發病的關係以及致裂原 concanavalin A (Con A)刺激模式	16
5-3	豬第二型環狀病毒與先天性免疫系統(innate immune system)的交互作用	17
5-4	豬第二型環狀病毒對細胞激素的影響	19
第三章	材料與方法	22
第一節	實驗設計	22
1-1	黃麴毒素對於豬周邊血液單核細胞之功能及豬環狀病毒病毒量之影響	22
1-2	黃麴毒素對於豬單核球來源的樹突狀細胞之功能及豬環狀病毒病毒量之影響	23
第二節	實驗材料	24
2-1	實驗動物與採血	24
2-2	黃麴毒素 B <sub>1</sub> 、致裂原 concanavalin A (Con A)與脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)泡製	24
2-3	細胞培養液	24
2-4	血球分離及清洗用之溶液	25
2-5	核酸萃取及聚合酶鍊鎖反應之藥品	26
2-6	流式細胞儀相關藥品	28
2-7	儀器	28
第三節	實驗方法	28
3-1	細胞的分離及培養模式之建立	28





3-1.1	豬周邊血液單核細胞的分離與純化	28
3-1.2	豬單核球來源的樹突狀細胞的分離與純化	29
3-2	黃麴毒素 B <sub>1</sub> 及致裂原 Con A 對周邊血液單核細胞 (PBMCs) 的影響	29
3-2.1	以 propidium iodide (PI) 染色檢測細胞存活率	30
3-2.2	以 CFSE 染色檢測細胞增生能力(blastogenesis)	30
3-2.3	以 Real-Time PCR 偵測豬第二型環狀病毒(PCV2)量	31
3-3	黃麴毒素 B <sub>1</sub> 及脂多糖(LPS)對樹突狀細胞的影響	32
3-3.1	倒立顯微鏡觀察形態學變化	32
3-3.2	以細胞表面抗原 CD14 染色檢測單核球來源細胞純度	32
3-3.3	以 propidium iodide 染色檢測細胞存活率	33
3-3.4	以 DQ™ ovalbumin 檢測 MoDCs 攝取及處理抗原能力(antigen uptaking and processing)	33
3-3.5	MoDCs 表面抗原及細胞激素 mRNA 表現量	34
3-3.6	以 Real-Time PCR 偵測 PCV2 含量	36
3-4	統計分析	36
第四章	結果	38
第一節	黃麴毒素 B <sub>1</sub> 及致裂原 Con A 對豬周邊血液單核細胞的影響	38
1-1	豬周邊血液單核細胞(PBMCs)的純化	38
1-2	細胞存活率	38
1-3	細胞增生能力(blastogenesis)	39
1-4	豬第二型環狀病毒量變化情形	40
第二節	黃麴毒素 B <sub>1</sub> 及脂多醣對豬單核球來源樹突狀細胞	41

(MoDCs)的影響	
2-1 豬 MoDCs 的純化	41
2-2 MoDCs 細胞形態學變化	41
2-3 MoDCs 細胞存活率、細胞大小及顆粒性變化	43
2-4 MoDCs 抗原攝取及處理能力	43
2-5 MoDCs 細胞表面抗原及細胞激素 mRNA 表現的變化	44
2-6 豬第二型環狀病毒量變化情形	49
第五章 討論	64
第六章 參考文獻	75
附錄	88



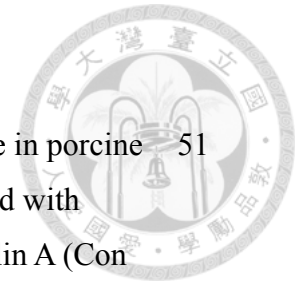


## 表次

Table 1.	Genes analysed and primer sets used in the present study.	27
Table 2.	The PBMCs viability, proliferation index and PCV2 load of an AFB <sub>1</sub> highly susceptible pig.	88



## 圖次



- Fig. 1. Changes in the viability and proliferation index with time in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and/or concanavalin A (Con A). 51
- Fig. 2. Changes in the copy number of porcine circovirus type 2 (PCV2) genome in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and/or concanavalin A (Con A) for 72 hours. 52
- Fig. 3. Morphological changes of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 48 hours. 53
- Fig. 4. Morphological changes of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> for 72 hours. 55
- Fig. 5. Changes in the viability (A) and the size and granularity (B) of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) for 48 hours. 57
- Fig. 6. Changes in the DQ<sup>TM</sup> ovalbumin uptaking ability of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 48 hours by FACS analysis. 58
- Fig. 7. Morphological observation of DQ<sup>TM</sup> ovalbumin uptaking by porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) under the inverted fluorescent microscope (400X) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 48 hours. 60
- Fig. 8. The mRNA expression levels of CD40, CD83, and CD86 in porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 6 or 24 hours. 61
- Fig. 9. The mRNA expression levels of IL-10 and IL-12p40 in porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 6 or 24 hours. 62

Fig. 10. Changes in the copy number of porcine circovirus type 2 (PCV2) 63  
genome in porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after  
treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) for 72 hours.

Fig. 11. Changes in the viability and proliferation index with time in porcine 89  
peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after treated with  
different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and/or concanavalin A (Con  
A).

## 簡寫對照表



AF	Aflatoxin
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxin B <sub>1</sub>
APC	Antigen-presenting cell
CFSE	Carboxyfluorescein succinyl ester
Con A	Concanavalin A
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DON	Deoxynivalenol
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
iDC	Immature dendritic cell
IL-10	Interleukin-10
iMoDC	Immature monocyte-derived dendritic cell
LPS	Lipopolysaccharide
mDC	Mature dendritic cell
mMoDC	Mature monocyte-derived dendritic cell
MoDC	Monocyte-derived dendritic cell
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction
PCV	Porcine circovirus
PCV2	Porcine circovirus type 2
PI	Propidium iodide
PMWS	Post-weaning multisystemic wasting syndrome
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcriptase–polymerase chain reaction
SPF	Specific pathogen free
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha

## 第一章 序言



黃麴毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)是常見於亞熱帶及熱帶穀物的黴菌毒素，在適合具產生 AFB<sub>1</sub> 能力黴菌產製 AFB<sub>1</sub> 的溫濕度條件下，即會隨著作物生長及不適當的飼料儲存環境而累積，並造成飼料的污染，而豬隻在食入受污染飼料時接觸到 AFB<sub>1</sub> (Meissonnier et al., 2008)。由於氣候變遷使得天候變化較為劇烈，進而使植物天然抗黴菌防禦力下降，以及氣候暖化可能使 AFB<sub>1</sub> 的污染範圍增加(Cotty et al., 2007)，此等原因均使得 AFB<sub>1</sub> 對動物的影響也可能較過往更為顯著。AFB<sub>1</sub> 的毒性除了肝毒性及致肝癌外，低濃度的長期暴露也會造成動物體免疫系統的傷害，特別是細胞媒介性免疫所受到的影響較體液免疫更為顯著，但細胞媒介性免疫的受損機制，特別在抗原呈獻細胞受 AFB<sub>1</sub> 影響的層級則較少被研究。在豬隻的免疫學研究模式中，隨著單核球來源的樹突細胞(MoDCs)能成功的藉由添加外緣細胞激素而誘導分化，並能以細胞激素或細菌內毒素刺激其成熟(Carrasco et al., 2001)，已經被認為是一種 *in vitro* 研究豬抗原呈獻細胞的良好模式，並被應用於黴菌毒素 DON 的研究 (Bimczok et al., 2007a)。

豬第二型環狀病毒(PCV2)是造成豬隻發生豬離乳後多系統消耗症(PMWS)等一系列多種疾病，總稱為豬環狀病毒相關症(PCVAD)的主要病因，雖然目前已有多種疫苗被研製以控制 PMWS 的爆發，但由於無法完全根除疾病，因此疾病的重要性依然存在(Darwich et al., 2012)。由於 PCVAD 的發生被認為是 PCV2、豬隻、其它病原共同感染，以及環境因子的交互作用的共同結果，且臨床症狀的嚴重程度與體內 PCV2 病毒量呈正相關(Krakovka et al., 2005; McIntosh et al., 2009)。因此需要了解環境中是否有免疫調節因子可造成豬隻免疫系統失調，或直接促進 PCV2 複製，進而造成 PCVAD 的發生。

Tischer 等人(1987)以 D-glucosamine 延長 PK-15 細胞的 S 期，可以使人工培養 PCV2 病毒得到較高的病毒力價，證明環狀病毒的複製與宿主細胞之細胞週期(cell cycle)有密切關係。因為 PCV2 為小型病毒，且不具有轉譯(encode)複製酶的基因，因此病毒須需要於宿主細胞進入 S 期時，利用宿主細胞核內的 DNA polymerase 方能進行複製，以完成整個複製過程(Darwich et al., 2004)。由於 AFB<sub>1</sub> 毒性與核酸及

蛋白質合成有關，而能使細胞停留在細胞分裂過程的 S phase (Bianco et al., 2012)，因此推測 AFB<sub>1</sub> 若能使細胞停留在 S phase，則有可能有助於延長 PCV2 利用宿主 DNA polymerase 的時間，進而增加 PCV2 病毒產量。

PCV2 在致病機制上被認為與宿主免疫系統的調控有關，特別在 PMWS 病豬身上可以發現到免疫調節及抑制性細胞激素 IL-10 的增加 (Darwich et al., 2003)，而食入 AFB<sub>1</sub> 污染飼料的豬隻在脾臟的 IL-10 也有上升的現象 (Meissonnier et al., 2008)，因此在 *in vitro* 系統確認 AFB<sub>1</sub> 對抗原呈獻細胞的細胞素分泌的影響也是需要被探討的。

為了了解黴菌毒素 AFB<sub>1</sub> 是否會影響 PCV2 的複製及抗原呈獻細胞功能，因此本研究選用豬隻周邊血液單核細胞及 MoDCs，以期了解 AFB<sub>1</sub> 的免疫毒性及對 PCVAD 發生的影響。



## 第二章 文獻回顧

### 第一節 黃麴毒素

#### 1-1 黃麴毒素的生成與常見病徵

黴菌毒素(Mycotoxin)是由絲狀真菌所產生的低分子量化學物質，為黴菌的二次性代謝產物，其對於黴菌本身的生長及競爭性沒有影響，但對於較高等的脊椎動物則可能造成疾病，統稱為「黴菌毒素症(Mycotoxicosis)」(Kabak et al., 2006; Madrigal-Santillán et al., 2010)。黃麴毒素(Aflatoxin, AF)主要由麴菌屬(*Aspergillus*)黴菌所產生，最主要為 *Aspergillus flavus* 及 *Aspergillus parasiticus* 兩菌種，這些黴菌適宜的生長溫度約在 24 到 35°C 間，適宜生長濕度介於 7 到 10% (Kogbo et al., 1985; Williams et al., 2004)。

這些黴菌盛行於亞熱帶及熱帶氣候的食用穀物，特別是玉米、花生、油菜等。影響黴菌產生黃麴毒素的因子，包括乾旱及暴雨、穀物對於其所處環境的適應力、昆蟲傷害及農作方式(Wu et al., 2011)。這些黴菌也能在收穫後的儲存、運輸及加工過程中持續產生黃麴毒素。

食入黃麴毒素的影響在各動物物種間皆相似，但動物對黃麴毒素的感受性則依物種、年齡及個體差異而有所不同(Pier, 1992)。在臨床上急性黃麴毒素中毒症中，急性肝臟損傷的症狀主要以凝血異常、微血管脆性增加、出血及凝血時間延長等症狀為臨床表徵。血色素可能出現在尿液且黏膜可能出現黃疸。肝臟的病變主要為中心小葉鬱血及出血，以及殘存肝細胞的脂肪變性。動物可能在數小時或數天內死亡。在慢性中毒時，雖然致害程度較輕微，但大部分的效應還是與肝損傷有關。慢性中毒中最敏感的臨床症狀即是幼年動物生長率的下降。其他症狀則包含凝血時間延長、血清中 glutamic oxalacetic transaminase 與 ornithine carbamyl transferase 活性及 cholic acid 濃度的上升等。肝臟呈黃色，膽囊擴張且膽汁變稀，組織病理學檢查則有肝細胞脂肪變性、膽管增生等。慢性黃麴毒素中毒的症狀相當多變，使得中毒狀態可能長期存在而未被發現，然而其卻是最常影響動物並造成嚴重經濟損失的一個因素。



## 1-2 黃麴毒素 B<sub>1</sub> 的主要毒性及作用機制

依照照射紫外光後所呈現的螢光顏色差異，可將黃麴毒素區分為黃麴毒素 B(藍色)及黃麴毒素 G(綠色)，並可再細分為 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及 G<sub>2</sub>，以及經身體代謝後出現於乳汁的黃麴毒素 M 等。其中毒性以黃麴毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)為最強，其次依序為 G<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及 G<sub>2</sub> (Hussein et al., 2001)。A. *flavus* 僅產生黃麴毒素 B，而 A. *parasiticus* 及 A. *nomius* 則除了 B 外，也會產生黃麴毒素 G (Alcaide-Molina et al., 2009)。

黃麴毒素 B<sub>1</sub> 為黃麴毒素中最重要且最具生物活性的成員，可在多種重要動物飼料原料中產生。Aspergillus *flavus* 和 A. *parasiticus* 產毒株好生長於玉米、棉籽及花生，常產出達致害濃度的 AFB<sub>1</sub>，這三種原料也是動物飼料中最重要黃麴毒素來源(Cheeke and Shull, 1985)。AFB<sub>1</sub> 為人類及多種動物如齧齒類、非人靈長類及魚類等的強致癌物(Kimura et al., 2004; Santacroce et al., 2008)，其主要標的器官為肝臟，但腫瘤可能發生在其他器官如肺臟、腎臟及大腸等(Wang et al., 1999)。因此自 1993 年起，國際癌症研究署(International Agency for Research on Cancer, IARC)將其歸類為高度致癌物(Class I)(IARC, 1993)。除了致癌性外，黃麴毒素與 B 型肝炎及 C 型肝炎間也有很強的加成性，該毒素與肝炎病毒的合併存在，會顯著的增加肝癌發生的風險(Wang et al., 2001)。

AFB<sub>1</sub> 於小腸吸收，藉血行而分布於全身。分析 AFB<sub>1</sub> 生理化學及生化特性，顯示其在毒理活性上有兩大重要位置，其一是位於 furofuran 環上 C-8,9 的雙鍵，黃麴毒素與 DNA 及蛋白質在此位置的反應改變了大分子的功能，造成細胞的傷害；另一反應位則為香豆素(coumarin)構型上的內酯環(lactone ring)，其易於水解而容易分解(Banu et al., 2010)。AFB<sub>1</sub> 經由肝臟細胞色素 P450 代謝後，活化形成兩種環氧化物(epoxide)，AFB<sub>1</sub>-8,9-exo 及 -8,9-endo epoxides，然而只有 8,9-exo isomer 能與 DNA 反應，其與 DNA 之鳥糞嘌呤(guanine)的第七氮形成共價鍵，使核酸結構發生突變，該不穩定結構可能進一步開環而形成較為穩定的 AFB<sub>1</sub>-formamidopyrimidine (AFB<sub>1</sub>-FAP)，造成 DNA 修復速率降低，此導致了 AFB<sub>1</sub> 的基因毒性，可能導致原致癌基因(protooncogene)的活化或使腫瘤抑制基因(tumor suppressor gene)發生不活化(Johnson et al., 1997)。細胞色素也可將 AFB<sub>1</sub> 代謝成不易形成環氧化現象的產物，

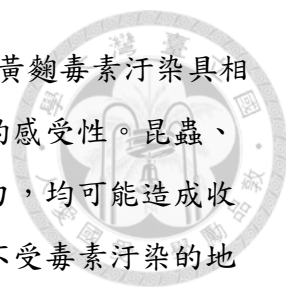


如 AFM、AFQ 及 endo-epoxide 等，而不與 DNA 反應(Johnson et al., 1997; Guengerich et al., 1998)。此外，AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxide 也可經由快速的非酵素性水解形成 AFB<sub>1</sub>-1,8,9-dihydrodiol，而與胺基酸反應，造成細胞死亡，此即造成 AFB<sub>1</sub> 的急毒性。

AFB<sub>1</sub> 造成的基因毒性已知能抑制 DNA 合成、DNA 依賴性 RNA 聚合酶活性、傳訊 RNA (mRNA) 合成及蛋白質合成等(McLean et al., 1995; Wang et al., 1999)。上述的基因毒性與黃麴毒素的致癌性是有關的，肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常見的惡性腫瘤之一，而其中的主要危險因子即為飲食中黃麴毒素的暴露。基因(genetic)及上基因(epigenetic)的改變與疾病的致病機轉有關，包含腫瘤抑制基因 p53 於第 249 密碼子之第三對鹼基由 G:C 轉變為 T:A 等。此外，肝炎病毒的慢性感染及活性氧/氮化物的產生，也能傷害 DNA 並造成 p53 等癌症相關基因的突變。

### 1-3 氣候變遷與黃麴毒素的關係

即使在適合麴菌生長的作物上，仍需特定的濕度及環境才能使 *A. flavus* 或 *A. parasiticus* 產毒株產生足量的毒素，而在這兩種黴菌中僅有 50% 的菌株會產生毒素，且飼料中的濕度需要高於 15% 才能支持黴菌的生長。這些黴菌必須順利侵入植物感受性高的部位，如 corn kernel、cotton seed 等，才能生長並產生黃麴毒素。黃麴毒素濃度的季節性高峰僅見於乾旱或蟲害，以致出現黴菌較易侵害植物的特定年份。收穫季潮濕也會造成特定穀物中含高量的黃麴毒素，黃麴毒素有時會在儲存環境濕度高於 15% 時產生。將穀物儲存在乾燥的環境，有助於防止毒素的產生；因此，氣候對於黴菌毒素汙染的影響對於農作物生產者而言相當重要。以黃麴毒素來說，乾旱會使其汙染程度加重。將穀物發育階段以「收穫前(pre-harvest)」及「收穫後(post-harvest)」做一區分，前者指穀物發育過程，後者則指穀物成熟後，可對應黴菌毒素的汙染特性，也可指出主要的問題是在於收穫前及穀物發育過程中受到昆蟲咬傷，或是收穫後儲存不當。分類上，歸類於「收穫前」汙染者有黃麴毒素、嘔吐毒素(deoxynivalenol)、伏馬鐮孢毒素(fumonisin)及赭麴毒素(ochratoxin A)等。而除收穫前汙染外，黃麴毒素也會在「收穫後」的條件下產生(Paterson et al., 2010)。



一般而言，發育中的穀物多半對於 *A.flavus* 的感染及後續的黃麴毒素汙染具相當高的抵抗力，除非環境因素適合黴菌生長並增加穀物對黴菌的感受性。昆蟲、哺乳動物或鳥類的咬傷、機械處理傷害或乾熱的環境造成的壓力，均可能造成收穫前階段感染程度的上升。汙染可能因氣候變遷而擴大，如原不受毒素汙染的地區可能因乾旱造成的高熱而被波及。這種黴菌分布範圍的擴大所造成的影響，可能嚴重的影響到第二階段(收穫後階段)，特別是當穀物於收穫當下，或恰於收穫前，遭遇大雨時最為嚴重(Jaime-Garcia et al., 2003)。由於產生黃麴毒素的黴菌適宜生長在溫暖的環境，因此全球暖化對於黃麴毒素汙染的潛在影響，將可能在溫帶地區最為顯著，其可能使昆蟲、哺乳動物及鳥類的存活季節及分布區改變，也可能改變昆蟲增殖的速度。穀物及土壤中具生產黃麴毒素能力的黴菌量與氣候有關，這類黴菌在較冷的條件下(最低 20°C)的競爭力，較處於較溫暖環境下(最低 25°C)為差(Shearer et al., 1992)，因此高溫有助於黃麴毒素濃度的上升。具生產黃麴毒素能力的黴菌為熱帶、溫帶、乾旱及半乾旱地區的常在菌，氣候的改變可大幅改變這類黴菌的數量(Bock et al., 2004; Shearer et al., 1992)。*A.flavus* 具有兩種表型，即 S 與 L 型，此型態可於培養基上予以區分，其中 S 型的黃麴毒素產量較高，若受到氣候改變的影響而改變 S 型的發生率，將影響黃麴毒素的總產量(Cotty et al., 2007)。

基於黃麴毒素盛行於重要飼料原料產地，以及具生產黃麴毒素能力的黴菌適宜生長於作為豬隻飼料原料的作物，而可能引致對豬隻的危害，加上近年來日趨嚴重的氣候變遷問題，使得黃麴毒素汙染量及盛行率可能隨著氣候變遷的加劇而增加，本研究遂針對黃麴毒素 B<sub>1</sub> 對豬隻免疫細胞及重要豬病 PCVAD 的影響進行探討。

## 第二節 黃麴毒素對免疫的影響

### 2-1 黃麴毒素對免疫的影響

黃麴毒素被確認具動物毒性至今已 50 年，但事實上這種具有強毒性的黴菌毒素已經伴隨我們更長久的時間，由於它們在 1960 年代涉及許多急性動物疾病的爆發，人們因而開始進行分離、分析及探討這類重要的毒素族群(Pier, 1992)。這些事件屬典型的黴菌毒素中毒症，其發生具有季節性高峰的特性使人們把焦點投注在

急性臨床疾病上。雖然急性中毒症相當嚴重且對經濟造成重大的損失，但它們僅佔黴菌毒素對生物及經濟影響的一小部分，而更重要的則是更普遍存在的低濃度黴菌毒素所造成的慢性傷害(Pier, 1992)。




急性及慢性黃麴毒素中毒都會影響免疫反應及先天防禦機制(Meissonnier et al., 2006)。食入受汙染的飼料會增加動物對疾病的感受性(Joens et al., 1981; Venturini et al., 1996)並減少疫苗的保護性(Venturini et al., 1990)。AFB<sub>1</sub> 主要影響細胞媒介性免疫(cell-mediated immunity, CMI)(CAST, 2003; Meissonnier et al., 2006)。其會減少淋巴細胞族群，特別是循環中的活化淋巴球，並抑制淋巴母細胞的增生(blastogenesis)及干擾遲發型過敏反應(delayed-type hypersensitivity, DTH)、移植排斥反應(graft versus host reaction, GVH)及白血球移行。AFB<sub>1</sub> 也會減少自然殺手細胞的細胞毒殺作用及巨噬細胞的多種功能，如降低吞噬能力、胞內毒殺作用及產生氧自由基的能力(Ghosh et al., 1991)，這不僅對清除入侵宿主的微生物能力有所影響，同時也會影響抗原呈獻的能力。其對體液免疫(humoral immunity)的影響，較不如對細胞媒介性免疫顯著，但部分體液免疫相關功能也會受黃麴毒素影響而減弱，包含補體(C4)、干擾素、IgG 及 IgA 等，但對 IgM 的影響則較不顯著。AFB<sub>1</sub> 對體液免疫的影響，在動物種別間的表現也較不一致，且似乎須在較高劑量下方能觀察到效應(Meissonnier et al., 2006)；通常需要極高濃度的黃麴毒素，才會影響抗體力價以及腸管相關淋巴組織與禽類的華氏囊。

家禽霍亂(fowl cholera)及豬丹毒(porcine erysipelas)藉由免疫計畫所獲得的免疫力，會受到黃麴毒素影響而減弱，但新城雞病(Newcastle disease)則否。受毒素影響，動物對 *Salmonella*、*Candida*、*Treponema*、*Eimeria* 及 infectious bursal disease virus 等感染原的感受性會增加，但並非所有感染都會受影響。而另一會造成重要經濟損失的部分，則是黃麴毒素會由母畜子宮經胎盤而影響胎兒(Pier et al., 1992)，造成新生幼畜缺乏對抗感染的能力且無法有效受到疫苗的保護，這對依賴疫苗注射保護的集約式經濟動物飼養模式，造成相當大的影響。

## 2-2 活體試驗中黃麴毒素對免疫的影響

在細胞媒介性免疫的研究上，以卵白蛋白(ovalbumin)作為免疫原，施打於餵




飼含 385、867、1807  $\mu\text{g}/\text{kg}$  等不同濃度黃麴毒素之飼料的豬隻後，檢測淋巴球增殖指數(proliferation index)，可觀察到隨著飼料中毒素濃度增加，淋巴球增殖指數的下降呈劑量正相關效應，而在體液免疫上，則在分別檢測 IgA、IgG、IgM 及 anti-OVA IgG 總量後，觀察到皆無明顯組間差異，顯示黃麴毒素對於細胞性免疫的影響較體液免疫來得明顯(Meissonnier et al., 2008)。此外，檢測經過為期 28 天的不同濃度 AFB<sub>1</sub> 飼料餵飼後的豬隻脾臟內細胞激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 及 IL-10 mRNA 的表現差異，結果在 IL-6 及 IL-10 有隨著飼料中毒素濃度增加而增加的正相關性，因而推測 AFB<sub>1</sub> 對於免疫的調控，是來自於 IL-6 及 IL-10 干擾抗原呈獻細胞的成熟及抗原呈獻，使 T 細胞的增殖效率下降，進而減少細胞媒介性免疫及對疫苗的反應，並增加對疾病的感受性(Meissonnier et al., 2008)。

使用 400  $\mu\text{g}/5 \text{ ml}/\text{kg}$  體重的 AFB<sub>1</sub> 劑量，隔日給予 6 週齡 CD-1 小鼠連續兩週後，分離腹腔巨噬細胞，觀察到 AFB<sub>1</sub> 會顯著的使 O<sub>2</sub>-及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產量以及細胞的吞噬能力(phagocytosis)下降；以 L929 細胞檢測受 AFB<sub>1</sub> 影響的巨噬細胞，也發現細胞的抗腫瘤能力下降，且巨噬細胞的 NO 及 TNF- $\alpha$  產量也有所下降(Moon et al., 1999)。

### 2-3 黃麴毒素對細胞激素的影響

AFB<sub>1</sub> 對於細胞激素影響的相關文獻較少，且部分結果常因動物別、標的細胞及 AFB<sub>1</sub> 所用濃度的不同而不一致。以 *in vitro* 方式將 AFB<sub>1</sub> 作用於經 LPS 活化的人類單核球(monocytes, Mos)，發現 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 AFB<sub>1</sub> 濃度即可造成 IL-1 $\alpha$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表現及釋出下降(Rossano et al., 1999)，但對於 LPS 刺激後的豬肺泡巨噬細胞則無明顯影響(Liu et al., 2002)。以體外試驗方式分析口服 AFB<sub>1</sub> 小鼠的腹腔巨噬細胞，於實驗中每日口服給予 0、0.03、0.145 及 0.7  $\text{mg}/\text{kg}$  持續兩週，則發現實驗使用的低濃度及中間濃度的 AFB<sub>1</sub> 會造成 IL-1 $\alpha$ 、IL-6 或 TNF- $\alpha$  的表現增加(Dugyala et al., 1996)。取餵飼含 AFB<sub>1</sub> 污染飼料的豬隻淋巴球，於 *in vitro* 以致裂原(mitogen)刺激，則顯示 IL-1 $\beta$  表現量下降，而 IL-10 的表現量則上升(Marin et al., 2002)。

### 2-4 黃麴毒素對巨噬細胞的影響



穀物中的黃麴毒素除了可經由食入造成動物體的毒害，吸入的影響也可能會造成嚴重的傷害，因此在 Liu 等人(2002)選用豬肺泡巨噬細胞(alveolar macrophages, AMs)，以不同濃度的 AFB<sub>1</sub> (0.1、0.2、0.5 及 1.5 mg/kg)及不同作用時間(24、48、72 及 96 小時)的處理，探討對呼吸系統重要免疫細胞造成的傷害。在該研究中隨劑量或時間的提高，細胞的存活率下降，約 0.1 μg/ml 的 AFB<sub>1</sub> 處理 AMs 48 小時後，會造成 50%的細胞死亡率。黃麴毒素的生物效應相當多元，在急性細胞毒殺的機制中，需要宿主先進行生物轉換，以 monooxygenase 將 AFB<sub>1</sub> 轉變為 2,3-epoxide 代謝物，這種活性代謝產物便能以共價鍵與細胞大分子結合(Karenlampi et al., 1987; Eaton et al., 1994)。許多哺乳動物的單核吞噬細胞類免疫細胞都具有 monooxygenase，能活化許多環境中的有毒物質(Minchin et al., 1985; Peterson et al., 1987)。在該研究中也顯示豬 AM 具有 monooxygenase，能使 AFB<sub>1</sub> 變成具毒性的代謝物，進而造成細胞及細胞功能的傷害。而相較於肝臟細胞的 primary cell culture 及腎臟細胞，豬 AMs 明顯的對 AFB<sub>1</sub> 較具感受性。在該研究中也發現 AFB<sub>1</sub> 會造成 AMs 吞噬能力隨毒素處理劑量上升而有負相關的下降效應。

Bianco 等人(2012)發表黃麴毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及兩者之代謝產物 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 對於巨噬細胞的影響，他們使用來自小鼠的巨噬細胞株 J774A.1，單一或並用兩種劑量介於 10 – 100 μM 間的黃麴毒素與細胞共同培養後，以 PI 檢測細胞存活率、細胞週期以及細胞的亞硝酸鹽釋放量。結果顯示，經過黃麴毒素 B<sub>1</sub> 處理 24 小時即能顯著的降低處於 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase 的細胞比例，而有較多細胞的 DNA 量在 2N 到 4N 間，亦即處於 S phase，這顯示細胞的去氧核糖核酸可能受到黃麴毒素 B<sub>1</sub> 傷害而停留在 checkpoint，以修復黃麴毒素 B<sub>1</sub> 相關的加合物(adduct)，由於豬環狀病毒複製需要宿主細胞的 DNA 聚合酶，若細胞停留在 S phase 的時間延長，預期將可增加病毒利用宿主 DNA 聚合酶的時間，而可能會增加病毒的產量。此外，本文獻中亦同時提到黃麴毒素對於亞硝酸鹽釋放量的影響，特別在同時給予細胞兩種黃麴毒素時，能顯著降低細胞的亞硝酸鹽釋放量，顯示巨噬細胞的功能受損。

## 2-5 黃麴毒素對病毒的影響

有關黃麴毒素對於病毒直接影響的文獻資料極為有限，Barraud 等人(1999)以 0.1 mg/kg 體重的毒素注射於鴨腹腔內，觀察鴨 B 型肝炎(Duck hepatitis B)病毒的基

因表現，以南方墨點法(Southern blot analysis)分析胞內 DNA，結果顯示暴露於 AFB<sub>1</sub> 下確實能增加嗜肝 DNA 病毒科(hepadnaviridae)病毒的基因表現。

綜合以上，由於黃麴毒素對免疫系統的影響主要在於 CMI 的部分已被周知，但在 CMI 整個機制中又劃分為較上游的抗原呈獻細胞、較下游的 T 及 B 細胞，以及在抗原呈獻機制過程中參與刺激訊息增減作用的細胞表面抗原及細胞激素等，因此本研究選擇以在黃麴毒素研究領域中較少被提及，但推測可能與黃麴毒素降低 CMI 能力機制有關，且在豬環狀病毒研究領域中被日漸重視的樹突細胞作為研究的標的細胞。於下一節針對豬隻樹突細胞的概況作一簡介。


### 第三節 豬單核球來源的樹突狀細胞研究模式

#### 3-1 豬單核球來源的樹突狀細胞簡介

豬隻的免疫學因異體移植(xenotransplantation)(Sachs et al., 1994)及大型動物免疫研究模式等需求，在近 20 – 25 年有相當多的研究及進展，其中早期主要是以淋巴球及巨噬細胞為研究對象，至約 2000 年，樹突細胞(DCs)的次族群、細胞型態、表型以及相關功能被逐漸了解，並在近 10 年間已發展成為相當成熟的 *in vitro* 研究模式。在 Carrasco 等人(2001)的研究背景中，豬 DCs 的相關知識還相當貧乏，但其在抗原呈獻過程以及免疫反應調節上的重要性，則已開始受到重視。在不同的 DCs 次族群間，也有相當大的功能分歧，因此漸受到移植免疫學及具免疫抑制性病毒疾病相關研究的重視。

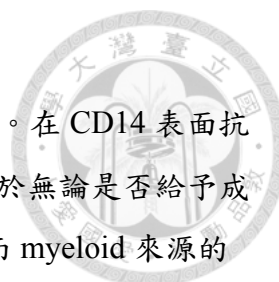
樹突細胞在循環的血液中及淋巴器官中所佔的比例皆較少，因此以 *in vitro* 培養方式產生 DCs，便成為取得大量研究用 DCs 的主要方式，其中又以自骨髓分離及分化而成的 BMDCs 以及從血液中單核球分離分化而成的 MoDCs 為最主要的兩種模式。與它種動物的 DCs 模式相較，BMDCs 的分化過程是否需要 TNF- $\alpha$  及 IL-4，有較多的物種間差異，而 MoDCs 則幾乎在各種動物的 DCs 分化過程中都需要外源給予 GM-CSF 及 IL-4 (Carrasco et al., 2001)。

2009 年 Summerfield 及 McCullough 整理一系列近年來有關豬 DCs 次族群的研



究資訊，將在 *in vitro* 條件下能產生的豬 DCs，依照來源分為單核球來源的樹突細胞(MoDCs)以及骨髓來源的樹突細胞(BMDCs)。而由於 MoDCs 的取得較為方便，因此是研究 DCs 的良好模式。一般將豬單核球分化為樹突細胞的方式與其它物種相似，均是在給予 IL-4 及 GM-CSF 條件下培養約 3–7 天，收取未貼附或半貼附且具有樹突狀構造的細胞進行後續實驗(Carrasco et al., 2001; Paillot et al., 2001)。但後續也有人嘗試以 GM-CSF 配合 IFN- $\alpha$ ，來取代傳統配方，而以此法獲得的 DCs 對於病毒特異性細胞毒性 T 細胞(Tc)具有較強的刺激能力(Balmelli et al., 2005)。此外，在 IL-4/GM-CSF 傳統配方中添加 IFN- $\alpha$  也能影響 DCs，增加其在白血球混合反應(mixed leukocyte reaction)中刺激 T 細胞的能力(Johansson et al., 2003)。事實上，細胞激素對於這類型 DCs 的操作相當重要，TGF- $\beta$  能讓細胞分化成具 Langerhans cell 的特徵(Paillot et al., 2001)，而 PAMPs 則能調控特定 TLR mRNA 的表現(Raymond et al., 2005)。Bautista 等人(2007)也發表以 IL-13 取代 IL-4 的分化方式。MoDCs 的細胞表型特徵為 CD1<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD80/86<sup>+</sup>CD172a<sup>+</sup>及 MHCII<sup>+</sup>(Bautista et al., 2007; Carrasco et al., 2001; Chamorro et al., 2004; Foss et al., 2003; Paillot et al., 2001)。從比較免疫學的觀點來看，由於在人 DCs 中，CD14 被認為是單核球/巨噬細胞的表面抗原，而非屬樹突細胞所有(Banchereau et al., 2000)，因此豬的 DCs 被預期不會表現 CD14，但在貓、牛及狗的 DCs 都具有 CD14 (Miranda ed Carvalho et al., 2006)，在其餘的 marker 中，豬 DCs 帶有 CD172a 是可被預期的，因為它屬於 SWC3，為屬於骨髓單核細胞來源會表現的表面抗原(Alvarez et al., 2000)。它會表現在許多單核球性或顆粒球性細胞的分化早期(Summerfield et al., 1997)，就功能上來說，此 marker 代表訊息調控蛋白  $\alpha$ (SIRP- $\alpha$ )。雖然同時表現 CD172a、CD1 以及表現量相對較高的 CD80/86 及 MHCII 是豬 MoDCs 的表型特徵，但並沒有表面抗原能明確分辨 MoDCs 及單核球來源的巨噬細胞。

以 IL-4 及 GM-CSF 誘發產生的豬 MoDCs 與人 MoDCs 的相同處，在於兩者皆處於未成熟狀態，可作為研究 DCs 成熟的便利細胞培養模式。如同人的 MoDCs，豬 MoDCs 在成熟時會有 CD80/86、MHC I 及 II 的表現量上升，以及 T 細胞刺激能力的上升，而炎症化學介質受器如 CCR1 及 macropinocytic activity 則會下降 (Bimczok et al., 2007 ; Carrasco et al., 2001 ; Ceppi et al., 2005 ; Paillot et al., 2001 ; Rau et al., 2006 ; Raymond et al., 2005)。



關於豬 MoDCs 是否具有 CD14 抗原，已有多篇文獻探討過。在 CD14 表面抗原表現部分，研究顯示豬 BMDCs 與人及鼠的模式不同之處，在於無論是否給予成熟訊號如 LPS 或 TNF- $\alpha$  等，均會持續的表現 CD14 及 CD16；而 myeloid 來源的 MoDCs 有別於 BMDCs 之處，則在於 CD1 的表現量低，且給與 LPS 後會造成 CD16 的表現量下降，而 CD14 的表現狀況與 BMDCs 則相似；在 BMDCs 及 MoDCs 的模式中，給予 LPS 均會造成 CD80/86 表現量的顯著上升。在另一篇文獻中，則觀察到在 *in vitro* 條件下所誘發產生的 MoDCs，會出現 CD14 的 down-regulation (Paillot et al., 2001)。但由於 Carrasco et al. (2001) 及 Paillot et al. (2001) 兩方所使用的 CD14 抗體及 MoDCs 培養條件都不同，因此 CD14 的表現與否，被認為與細胞激素及培養環境有關。對單核球而言，CD14 是作為 LPS 的受體 (Meszaros et al., 1994)，但相對於單核球，LPS-enhanced procoagulant activity (PCA) 由於未受到抗 CD14 單株抗體的影響，推測 DCs 的 CD14 功能可能與單核球有所不同，但也可能是因為 LPS 係經由 TLR3 路徑刺激細胞，而非以 CD14 路徑為之 (Visintin et al., 2001)。綜合以上，本研究中將選用 CD14 作為細胞純化步驟中，單核球來源細胞的純度判斷依據，同時亦將針對本研究中所使用的樹突細胞是否具有 CD14 表面抗原進行分析。

### 3-2 黴菌毒素對單核球來源的樹突狀細胞(MoDCs)的影響

Hymery 等人(2006)以 T-2 toxin、deoxynivalenol (DON) 等 trichothecene 類黴菌毒素及細菌 LPS 同時處理人的 MoDCs，觀察在 LPS 促使樹突細胞的成熟過程中，是否會受到黴菌毒素的影響。針對 FITC-dextran 內吞作用(endocytosis)、細胞表面抗原 CD1a、CD86、HLA-DR、CCR7 及細胞素 IL-10 和 IL-12p70 分泌能力檢測的結果顯示，在較高劑量 10 nM T-2 毒素及 DON 的處理下，會影響人 MoDCs 的成熟，其中又以 DON 能在未造成細胞死亡的劑量下即有明顯的成熟抑制作用。Bimczok 等人(2007)進一步針對 DON 對豬 MoDCs 的影響進行探討，他們以 propidium iodide (PI) 染色後的細胞，透過流式細胞儀，來判讀細胞的存活率後，選擇不影響存活率的 100 – 400 ng/ml 之間的濃度進行型態學、FITC-dextran 抗原攝取能力(antigen uptake)、白血球混合反應(mixed leukocyte reaction)、細胞激素的分泌及 mRNA 表現，以及 MAPK 路徑的蛋白質等分析。結果顯示，經 400 ng/ml 的 DON 處理 48



小時後，會造成豬的 MoDCs 脫離培養皿，並使細胞變圓；而經過毒素處理 6 小時後，以 RT-PCR 觀察 IL-10 及 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表現量及偵測毒素處理 24 小時後的 IL-10 及 TNF- $\alpha$  蛋白量，均顯示 DON 對 TNF- $\alpha$  的產量影響不顯著，但在較高濃度 400 ng/ml 時，會使 IL-10 mRNA 表現量及產量下降。對於未成熟的豬 MoDCs，在給予 400 ng/ml 的 DON 條件下，對 FITC-dextran 抗原攝取能力的影響，與給予 LPS 或 TNF- $\alpha$  相似，均會使抗原攝取能力下降。其中最特別的是，MHC-II 表面抗原的分析結果，顯示對照組細胞在給予 LPS 或 TNF- $\alpha$  後，MHC-II 表面抗原量會上升，但於 *in vitro* 給予 MoDCs DON 或餵豬吃含 DON 的飼料後，MoDCs 對 LPS 或 TNF- $\alpha$  的刺激則無顯著反應，但餵飼含 DON 飼料豬隻的 MoDCs，於 *in vitro* 條件下再與 DON 共同培養後，其 MHC-II 的表面抗原量則會上升。

樹突細胞功能在豬隻的重要性除了其以抗原呈獻細胞的身分在細胞媒介性免疫中扮演重要角色外，由於企業化飼養常需借助疫苗的使用以提升豬群之群體免疫以對抗共存於豬場的多種病原，此時做為第一線辨識以呈獻疫苗抗原給淋巴球的 DC 在豬隻的免疫便有其無可取代的功能，因此 AFB<sub>1</sub> 對 DCs 功能的影響除了考量對 PCV2 的免疫外，還需考量其可能因此降低多種豬用疫苗的效果。而雖然樹突細胞是研究抗原呈獻細胞及樹突細胞成熟過程的良好模式，但豬 MoDCs 的研究在近 10 年來才逐漸發展完備而受到重視，且黴菌毒素對這類細胞是否有影響的探討十分有限，因此本研究選擇實驗室誘導產生的豬 MoDCs 作為研究抗原呈獻的細胞模式，以觀察黃麴毒素 B<sub>1</sub> 對抗原呈獻細胞以及樹突細胞成熟過程中的可能影響。

## 第四節 豬環狀病毒相關症

### 4-1 豬環狀病毒及離乳後多系統消耗症後群

豬第二型環狀病毒(porcine circovirus type 2, PCV2)為環狀病毒科(circoviridae)，環狀病毒屬(circovirus)的小型單股環狀 DNA 病毒，其為一系列總稱為豬環狀病毒相關症(porcine circovirus associated disease, PCVAD)之主要病因。PCV2 可在胚胎細胞、胎兒肝臟及心肌細胞、巨噬細胞以及分裂中的淋巴球內複製(Lin et al., 2008)，病毒雖可在 DCs 內偵測到，但並不影響樹突細胞的存活，且似乎也不會經由樹突

細胞感染淋巴球(Vincent et al., 2003)。



離乳後多系統消耗症後群(post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)是 1990 年代被發現的豬新興疾病，最早的報告(Clark, 1996)指出，在離乳及肥育期豬隻出現消瘦(wasting)、呼吸疾病、黃疸及腸炎等症狀。大多數發病豬隻會死亡，而以淋巴結腫大為最明顯的肉眼病變。淋巴組織的組織病理學檢查，顯示嚴重的淋巴球流失，伴隨廣泛的組織球浸潤，推測此疾病可能涉及炎症反應。其他炎症性病變如間質性肺炎、間質性腎炎及門脈周圍的肝炎(periportal hepatitis)等也被觀察到。這些現象與以往所知的豬病特徵有所不同，而隨後被認為與豬環狀病毒(porcine circovirus, PCV)的存在有關，且被證實該病毒與造成 PK15 細胞株污染(Ellis et al., 1998)的豬環狀病毒有所不同，故此種新病原被定名為豬第二型環狀病毒 (PCV type 2, PCV2)(Meehan et al., 1998)。

#### 4-2 豬環狀病毒相關症

豬環狀病毒相關症包含有離乳後多系統消耗症候群、豬皮膚及腎病症候群 (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)，PCV2 相關性腸炎 (PCV2-associated enteritis)、PCV2 相關性肺炎(PCV2-associated pneumonia)、PCV2 相關性神經病(PCV2-associated neuropathy)、PCV2 相關性繁殖障礙 (PCV2-associated reproductive failure)等數種不同臨床疾病(Opriessnig et al., 2007)，其中最重要的疾病即為 PMWS，在美國主要發生於 7–16 週齡豬隻，在歐洲則主要發生在 5–12 週齡豬隻(Allan et al., 2000, Segalés et al., 2002)。死亡的發生被認為與病毒血症及淋巴球減少有關。死亡率通常約 10% (4 - 20%) (Segalés et al., 2002)，但可達 50% (Allan et al., 2000, Harding et al., 1997)。因臨床表現為消瘦，並會造成經濟效益損失，因此發生 PCVAD 的豬隻有 70 - 80%被淘汰(Segalés et al., 2002)。PCVAD 的診斷主要是根據臨床症狀、組織病理學檢查淋巴組織的淋巴球流失及病毒抗原的偵測，而病毒抗原或核酸的偵測被視為黃金準則。若病變十分嚴重卻僅偵測到少量抗原則被視為慢性嚴重型 PCVAD(Chronic severe PCVAD)。典型的 PCVAD 病變是於淋巴組織觀察到融合細胞，或於巨噬細胞中觀察到葡萄串樣嗜鹼性質內包涵體的存在，此特徵性病變被認為是診斷本病的最佳依據(Gillespie et al., 2009, Opriessnig et al., 2007)。



## 第五節 豬環狀病毒相關症的免疫調控

### 5-1 離乳後多系統消耗症候群(PMWS)的免疫學變化

自然發生的 PMWS 發病豬具有對抗生素治療反應不佳的特徵，特別是對於治療細菌性肺炎的抗生素。這種對抗生素治療反應不佳的現象，與發生二次性感染比例上升及分離到 *Pneumocystis carinii* 或 *Chlamydia* spp. 等同機性病原的機會增加等現象，共同引出一個推測，即 PMWS 是一種後天性的免疫缺陷疾病(Cavallini Sanches et al., 2006)。

幾乎所有企業化飼養的豬隻都曾在飼養期間受到 PCV2 的感染，但僅有少數的豬隻發生 PMWS，這種現象被認為可能尚有其他因子決定疾病的嚴重度，以致出現次臨床型(subclinical)或致死型感染。早期的實驗模擬 PMWS 模式，包含與豬小病毒(parvovirus)共同感染(Ellis et al., 1999)或共同感染豬生殖與呼吸綜合症病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)(Harms et al., 2001)、porcine torque teno virus (Ellis et al., 2008)、肺炎黴漿菌(*Mycoplasma hyopneumoniae*) (Opriessnig et al., 2004)等病原，或是於感染 PCV2 的同時給予免疫刺激劑，如 keyhole limpet 或費氏不完全佐劑(Grasland et al., 2005)等，這些模式在引發 PMWS 上呈現不同的成功率。其他因子如細菌脂多醣(LPS)、疫苗等也曾被用來測試，但引發 PMWS 的成功率均極低甚至無法引發成功。雖有少數成功個案，但一般來說單以 PCV2 難以造成 PMWS 的產生(Bolin et al., 2001)，且甚至連單純 PCV2 所引發的免疫刺激都被認為對 PMWS 的產生沒有幫助(Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002)。整體來說，大多數研究者均認同某種程度的免疫刺激有助於 PMWS 的發生。因此，PMWS 的形成機制中，主要與 PCV2 病原本身的致病力，以及受到基因背景及其他感染或環境因子影響的宿主免疫反應等兩大因子有關。依照這些因子的交互影響而有次臨床感染或死亡的不同嚴重度之分。此外，PCV2 不同的次基因型(sub-genotype)的存在也被認為可能會影響其毒力(Chae et al., 2010)，而不同次基因型 PCV2 的共同感染則可能加重疾病嚴重度(Harding et al., 2010)。

隨著能成功控制 PCV2 的疫苗的上市，PMWS 及其他 PCV2 相關疾病的嚴重

度目前已漸趨緩和，然而 PMWS 的發生，已讓我們了解小型的病毒能對豬隻免疫系統造成巨大的影響。然而，有關 PCV2 如何與免疫系統，仍有許多尚待釐清之處。



## 5-2 豬體內豬第二型環狀病毒(PCV2)病毒量與 PMWS 發病的關係以及致裂原

### concanavalin A (Con A)刺激模式

Krakowka 等人(2005)以免疫組織化學染色(IHC)的方式，檢測 PMWS、PMWS 臨床前期、次臨床感染及未感染豬隻等不同嚴重程度的 PCV2 感染症中的組織病毒量，觀察到病毒量與疾病嚴重度呈正相關，顯示豬體內病毒量可以用來推估疾病的嚴重程度。而 McIntosh 等人(2009)的研究中以 PCV2 感染實驗豬，同時檢測不同感染階段豬隻血清及肝臟中病毒的 TCID<sub>50</sub> 及以 real-time PCR 測得的病毒量，顯示 real-time PCR 檢測的病毒量雖無法與傳統檢測病毒力價所得的 TCID<sub>50</sub> 完全相同，但兩者之間以及兩者與 PMWS 疾病嚴重程度間也具有正相關。由於 real-time PCR 測得的病毒量跟疾病嚴重度間具正相關，這提供了一個在 *in vitro* 系統中簡易推估疾病嚴重度的方式。因此在後續的 PCV2 研究中(Lin et al., 2008)，也開始以 real-time PCR 等定量方式偵測血球中病毒量，觀察不同因子是否能造成病毒量的增加，或許即有可能在 PMWS 的產生中成為具影響力的因子。

Yu 等人(2007)提到，以 Con A 刺激周邊血液單核細胞(PBMCs)能增加 PBMCs 中的 PCV2 複製，且病毒主要在淋巴球中複製，特別是活化的 T 淋巴球。Lefebvre 等人(2008)及 Lin 等人(2008)也在 *in vivo* 及 *in vitro* 實驗中得到類似的結果。這些觀察顯示活化且增殖中的淋巴球能增加 PCV2 的複製，而休止狀態的淋巴球則否。Yu 等人(2009)發現與未處理的細胞比較，細胞受到 Con A 或 pokeweed mitogen (PWM)刺激後，其 Cap 蛋白的 mRNA 表現量會較高，但增殖與未增殖的細胞具有相同的病毒 mRNA 表現量。這表示 PCV2 的複製會受到致裂原刺激而增加，但並非嚴格要求細胞需要處於有絲分裂的狀態。因 Con A 及 PWM 所刺激的淋巴球次族群不同，並引發不同的細胞激素反應，推測 PCV2 能在不同的淋巴細胞次族群中進行某種程度的複製，抑或是在不同的細胞激素環境下，能影響淋巴球對 PCV2 的感受性。此外，Rodriguez-Carino 等人(2011)發現，PCV2 能在淋巴球母細胞 (lymphoblastoid cell)中複製，且病毒的感染可能造成細胞的溶解。



鑒於以 Con A 刺激淋巴球中 PCV2 複製的現象已在多篇文獻中被證實，因此本研究中也選用 Con A 作為 PBMCs 細胞培養及刺激模式的陽性對照，並且將 Con A 視為動物受到外源性免疫刺激如疫苗注射或它種病原感染等狀況時的模擬，以觀察受到免疫活化的細胞在 AFB<sub>1</sub> 處理下，是否會造成 PCV2 病毒複製量的改變。

### 5-3 豬第二型環狀病毒與先天性免疫系統(innate immune system)的交互作用

病原與宿主的早期交互作用，被認為對於感染的最終結果有關鍵性的影響。在 PCV2 的感染中，由於病原本身的標的細胞即屬免疫系統或與淋巴組織關係密切，例如 stromal cells，這種交互作用下的結果就顯得更為重要(Steiner et al., 2008)。因此，PCV2 與先天免疫系統元素間的交互關係遂逐漸被檢視而展現其重要性。

在抗原呈獻細胞受 PCV2 感染的研究中，PCV2 常被發現廣存於單核球/巨噬細胞系列單核吞噬細胞及 DCs 中，但這類細胞似乎並不是 PCV2 病毒複製的標的細胞(Chang et al., 2006)。PCV2 雖可能留在 DCs 內數天，但並不傷害該細胞，然而雖不會造成細胞凋亡也不影響單核球來源 DCs 細胞表面分子的調控，但推測 PCV2 可能利用 DCs 作為其散播的一種機制(Vincent et al., 2003)。有鑑於 PCV2 在巨噬細胞內的低複製力及其不在 DCs 內複製等現象，推測 PCV2 於這些細胞中的存在較可能係因 DCs 的正常吞噬或 endocytic 活性的抗原攝取所致，而非因病毒的主動感染細胞(Kekarainen et al., 2010)。Chang 等人(2006)認為某些細菌來源的 LPS 能刺激 PCV2 在豬肺泡巨噬細胞中的複製。

PCV2 對於抗原呈獻細胞功能影響的研究顯示，PCV2 存在於巨噬細胞中似乎能造成其功能上的改變。在 *in vitro* 條件下，PCV2 會降低巨噬細胞吞噬及殺滅微生物的能力，可能是藉由干擾了 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的產生而減少對 *Candida albicans* 的破壞(Chang et al., 2006)。這些觀察結果加強了巨噬細胞在 PCV2 感染中所扮演的角色或許就如同特洛伊木馬(Trojan horse)般的假設，即 PCV2 藉由在宿主細胞中存活及宿主細胞在宿主體內自由移動的特質，達到病毒散播的目的，而非作為病毒的複製工廠。

此外，豬肺泡巨噬細胞於接種 PCV2 後，能產生高量的 TNF- $\alpha$  及 IL-8，並提升嗜中性球化學趨化因子-II(neutrophil chemotactic factor-II)、G-CSF 及 monocyte chemotactic protein-1 的表現，此等因子的表現或許是導致肺炎產生的原因 (Chang et al., 2006)。

關於病毒組成對於 PCV2 引起的免疫調節的研究顯示，PCV2 的 Cap 蛋白對單核球或 DCs 沒有負面影響，但病毒 DNA 則會影響單核球或 DCs (Hasslung et al., 2003)。分析 PCV2 基因體中的 CpG-ODN 構型，顯示其中許多部份會影響抗原呈獻細胞及周邊血液單核細胞的細胞激素產生(Kekarainen et al., 2010)。以自感染 PCV2 的細胞萃取出病毒核酸，或以含病毒基因體全長的 clone 處理純化的 plasmacytoid DCs (pDCs)，觀察到抑制 IFN- $\alpha$  的效應呈現顯著的劑量關係現象 (Vincent et al., 2005)。

PCV2 大體上並不影響 myeloid 來源的 DCs (MoDCs 也屬之)，但對免疫調節作用產生影響則在 pDCs 被觀察到。由於 pDCs 的成熟(maturation)不同於 MoDCs 常用的 LPS、TNF- $\alpha$  或 IFN- $\alpha$ ，而是使用 CpG-ODN D32 刺激而使其成熟，因此在 Vincent 等人(2005) 針對 pDCs 的研究中，先讓 pDCs 與 PCV2 接觸，再使用 CpG-ODN D32 使 pDCs 成熟，觀察到 pDCs 會因為受到 PCV2 的影響，而降低共同刺激 myeloid DCs 的能力(Vincent et al., 2005)。他們也觀察到，正常的 pDCs 受到 CpG-ODN D32 的刺激後，會產生 IFN- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$ ，而在給予 pDCs CpG-ODN D32 前與 PCV2 的接觸，可能造成細胞產生 IFN- $\alpha$  及 TNF- $\alpha$  的能力受到抑制(Vincent et al., 2005)。Vincent 等人(2007)發現，pDCs 的功能受到抑制，會對於由 TLR7 及 TLR9 的配體(ligand)所造成的刺激，產生負面的影響。這種現象在 PCV2 致病機制解釋上的重要性，在於是由於細胞辨識危險(danger recognition)的能力受到影響，而干擾了 mDCs 的活化訊號及後續抗原呈獻的有效性(Takeda et al., 2003)。

影響細胞對於「危險(danger)」訊息反應的病毒 DNA，並不僅有 CpG-ODN 一種。在一個近期的研究中(Balmelli et al., 2011)，發現複製期 PCV2 的雙股 DNA 也具有明顯的免疫調節能力，其會干擾細胞骨架的重組及 pDCs 與 myeloid DCs 的胞吞作用(endocytic process)，也會降低 myeloid DCs 攝入 PCV2 類病毒顆粒(viral like

particles, VLP)的能力。在受到 PCV2 病毒 DNA 的影響下，pDCs 對於豬隻其他病毒(如傳染性胃腸炎病毒、豬瘟病毒或假性狂犬病病毒)的病原相關性分子構造(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)的反應進而產生細胞激素的能力也會受到影響(Vincent et al., 2007)。這些對於 DCs 的抑制作用，顯示 PCV2 對於先天性防禦機制具有強烈的抑制性，符合臨床上所見 PMWS 患豬的二次性及伺機性病原感染率增加的現象。

觀察 PCV2 對 DCs 的影響，顯示 DCs 的研究在 PCV2 免疫的研究領域中相當重要。雖然一般認為 PCV2 對 MoDCs 的功能影響較不顯著(Vincent et al., 2005)，也不會在 MoDCs 內複製(Vincent et al., 2003)，本研究選用 MoDCs 作為細胞模式，係為了觀察是否在受到 AFB<sub>1</sub> 的影響下，會改變 PCV2 在 MoDCs 的複製情形。

#### 5-4 豬第二型環狀病毒對細胞激素的影響

早期研究 PMWS 患豬之組織或 PBMCs 的細胞激素表現，顯示在淋巴組織中的 IL-10 表現量有明顯的上升(Darwich et al., 2003)。Darwich 等人(2003)的研究顯示，PMWS 患豬的胸腺有細胞激素表現上升的現象。Doster 等人(2010)發現，感染 PCV2 的豬隻於下頷淋巴結、脾臟及扁桃腺等處的 IL-10 表現量會上升。這種 IL-10 表現量上升的現象，主要發生於富含 T 細胞的區域，而罕見於 B 細胞或巨噬細胞區。Crisci 等人(2010)發現 PMWS 患豬的 IL-10 表現量上升，且主要與脾臟中的 CD163<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>及 CD8<sup>+</sup>細胞次族群有關；而 Fort 等人(2009)則觀察到，以完整的 PCV2 刺激未感染豬隻的 PBMCs 後，能誘導 IL-10 的反應，而僅以 Cap 或 Rep 蛋白刺激，則無此現象。有趣的是，IL-10 在未受 PCV2 感染的鄰近細胞(bystander)的表現量比本身受 PCV2 感染的細胞要來得高，這顯示 IL-10 的產生可能來自於旁泌作用(paracrine action)(Doster et al., 2010)。活體外(*ex vivo*)研究指出，PMWS 患豬的血清中 IL-10 也有上升的現象(Hasslung et al., 2005)。Darwich 等人(2008)發現，PCV2 的次臨床感染豬在病毒血症期間，會有暫時性的 IL-10 反應，此如同他們過去的研究結果，以 PCV2 刺激 PMWS 患豬的 PBMCs，會造成 IL-10 的上升(Darwich et al., 2003)。

在其他的細胞激素方面，PCV2 對感染及未感染 PCV2 豬隻之 PBMCs，能誘

導強勁的 IL-1 $\beta$  及 IL-8 反應(Darwich et al., 2003)，此現象與 PMWS 的慢性炎症狀態相吻合。

此外，與健康豬隻相較，PMWS 患豬的 PBMCs 在以致裂原或超級抗原(superantigen)刺激時，較無法產生 IL-2、IL-4 及 IFN- $\gamma$ (Darwich et al., 2003)，這顯示淋巴球反應的模式受到了改變。目前的研究還不清楚這樣的改變是來自於免疫反應的異常，或是受到了抑制或調節訊號的影響。此外，T 細胞的細胞激素產量的下降，亦可能是來自於 PMWS 所導致的淋巴球流失現象。

由於 PCV2 核酸中的 CpG-ODN 所造成之免疫效應與 PCV2 同樣被受到重視，因此其對於細胞激素的影響，也有相關文獻針對其作探討。有關 CpG-ODN 的相關研究顯示，大多數來自 PCV2 的 CpG-ODN 能誘發 PBMC 產生 IFN- $\alpha$ ，而僅少數會抑制 IFN- $\alpha$  的產生(Hasslung et al., 2003)。Kekarainen 等人(2008) 曾以豬 PBMCs 及 BMDCs，進一步探討 PCV2 對 antigen recall response 及細胞激素釋放等免疫調節效應的影響。結果顯示，具活性的 PCV2 能明顯的誘導 PBMCs 釋放 IL-10，而 CpG-ODN 或 VLP 則沒有 IL-10 的誘導現象，即 PCV2 的 CpG-ODN 不會誘發 IL-2、IL-10 及 IFN- $\gamma$ 。然而，IFN- $\gamma$  及 IL-2 的 recall 反應則會被 PCV2 及多數已被研究過的 CpG-ODN 所抑制，但不受 VLP 的影響。而 BMDCs 受假性狂犬病病毒誘導產生 IFN- $\alpha$  的現象，則會被 PCV2 及大多數的 CpG-ODN 所抑制，這些具抑制性的 CpG-ODN 亦存在於 PCV2 的 Rep 基因內。在 BMDCs 的培養實驗中，顯示完整且具活性的 PCV2 病毒顆粒及 VLP 為強有力的 IL-12 誘導物。Wikström 等人(2011) 發現 CpG-ODN 的二級結構對其調控能力具有重要的影響，對具有 IFN- $\alpha$  抑制性的 CpG-ODN 而言，hairpin 構造的破壞會造成其抑制力的喪失。這些觀察顯示，免疫調節作用的產生可能與感染初期時病毒的完整分子結構有關。在同一篇文獻中，另有一項有趣的發現，即當刺激細胞時同時給予 poly I:C 或 class A ODN 會導致不同的結果，這顯示不同的 ODN 會藉由個別的機制影響免疫細胞所產生的細胞激素(Wikström et al., 2011)。

綜合以上結果顯示，IL-10 在 PCV2 致病機制上扮演重要的角色。IL-10 的誘導可能結合了自然及再臨反應(natural and recall response)，而 IL-10 造成的免疫抑



制可能在 PCV2 自然感染的機制及維持中扮演著重要的角色。因此本研究也將檢測 MoDCs 的 IL-10 表現，以了解其是否會受到 AFB<sub>1</sub> 影響而改變，以推估 AFB<sub>1</sub> 對 PCVAD 產生機制的可能影響。









## 第二節 實驗材料

### 2-1 實驗動物與採血

共使用三批 18 頭(含東盈第一批 7 頭、第二批 7 頭及實驗室另一計畫留下之對照組豬隻 4 頭)約克夏和藍瑞斯兩品種雜交母豬和閩公豬，由 6 週齡飼養至 18 週齡作為供血豬。於針筒內裝置適量 1 % EDTA 後，自豬隻頸靜脈竇採血，以 9:1 的比例將新鮮血液與 1 % EDTA 混合。

### 2-2 黃麴毒素 B<sub>1</sub>、致裂原 concanavalin A (Con A)與脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)泡製

將購買之黃麴毒素 B<sub>1</sub>(Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>)結晶 (10 mg/vial) (Cat. A6636, Sigma-Aldrich, MO, USA)，以 1 ml 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)完全溶解成 10 mg/ml 之澄清 stock solution。使用時，以 100  $\mu$ l stock、500  $\mu$ l DMSO 及 400  $\mu$ l PBS 泡製成 1 mg/ml 雲霧狀 working solution，再以實驗細胞所用之同類培養液作 10 倍連續稀釋至所需濃度。AFB<sub>1</sub> 於培養皿之最終濃度為 0.001 – 10  $\mu$ g/ml。

脂多醣(LPS) (*Escherichia coli* 055:B5) (Cat. L2880, Sigma-Aldrich)及致裂原 concanavalin A (Con A) (*Canavalia exsiformis*, Jack bean) (Cat. C5275, Sigma-Aldrich)，以無菌 DPBS 完全溶解粉末後，配製成 1 mg/ml stock solution 待用，LPS 經連續稀釋後於培養皿之最終濃度為 1  $\mu$ g/ml，Con A 經連續稀釋後於培養皿之最終濃度為 1 或 5  $\mu$ g/ml。

### 2-3 細胞培養液

1. 豬周邊血液單核細胞(PBMCs)培養液 RPMI-Culture (RPMI-C)：用以培養 PBMCs。

RPMI 1640 (Cat. 31800-014, Gibco, NY, USA) ... 445 ml

Antibiotic-antimycotic (Anti-Anti; Cat. 15240-062, Gibco) ... 5 ml

NaHCO<sub>3</sub> ... 1 g

Foetal bovine serum (Cat. 04-001-1A, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) ... 50 ml



2. 豬單核球來源樹突狀細胞(MoDCs)培養液 MoDC medium：自 PBMCs 分離出單核球(Mos)後，將單核球培養於此培養基中以刺激其分化為 MoDCs。

Dulbecco's modified Eagle medium (Cat. 12100-046, Gibco) ... 445 ml  
Anti-Anti (Cat. 15240-062, Gibco) ... 5 ml  
NaHCO<sub>3</sub> ... 1.85g  
Foetal bovine serum (Cat. 04-001-1A, Biological Industries) ... 50 ml  
Recombinant swine IL-4 (Cat. PSC0041, Biosource, Camarillo, CA, USA) ... 10 ng/ml  
Recombinant swine GM-CSF (Cat. PSC2011, Biosource) ... 20 ng/ml

3. RPMI-Wash (RPMI-W)：於 PBMCs 分離過程中清洗細胞。

RPMI 1640 (Cat. 31800-014, Gibco) ... 485 ml  
NaHCO<sub>3</sub> ... 1 g  
Anti-Anti (Cat. 15240-062, Gibco) ... 5 ml  
1 % EDTA ... 10 ml

4. RPMI-Seeding (RPMI-S)：主要用以懸浮貼附於培養皿之 MoDCs。

RPMI 1640 (Cat. 31800-014, Gibco) ... 395 ml  
NaHCO<sub>3</sub> ... 1 g  
Anti-Anti (Cat. 15240-062, Gibco) ... 5 ml  
1 % EDTA ... 100 ml

#### 2-4 血球分離及清洗用之溶液

1. 1% EDTA：作為抗凝劑。

EDTA (ethylenedinitinitetraacetic acid, MERCK®) ... 10 g  
DPBS ... 1l  
調整 pH 值至 7.5 - 8.0  
高壓滅菌

2. ACK 緩衝液：於 PBMCs 分離過程中去除紅血球。

NH<sub>4</sub>Cl (0.15M) ... 8.29 g  
KHCO<sub>3</sub> (1.0M) ... 1 g

Na<sub>2</sub>EDTA (0.01M) ... 37.2 mg

H<sub>2</sub>O ... 1l

調整 pH 值至 7.2-7.4

以 0.2 μm 孔徑之濾膜過濾滅菌



3. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Cat. 21600-051, Gibco)
4. Ficoll-Paque PLUS (Cat. 17-1440-03, GE Healthcare, Uppsala, Sweden): 於 PBMCs 分離過程中藉由比重分離，去除顆粒球及紅血球。

## 2-5 核酸萃取及聚合酶鍊鎖反應之藥品

1. SYBR<sup>®</sup> Advantage<sup>®</sup> qPCR Premix (Cat. 639676, Clontech, CA, USA)
2. EZtime Real-Time PCR Premix (Cat. YT103-5, Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan)
3. 2-mercaptoethanol (Cat. M6250, Sigma-Aldrich): 用以添加於 RNeasy Mini Kit 中之 Buffer RLT，減緩收取細胞過程中發生 RNA 降解。
4. RNeasy Mini Kit (Cat. 74106, Qiagen, Hilden, Germany): 用以自細胞萃取 RNA，其內含 RNeasy Mini Spin Columns、Collection Tubes (1.5 ml)、Collection Tubes (2 ml)、Buffer RLT、Buffer RW1、Buffer RPE 及 RNase-Free Water
5. QuantiTect Rev. Transcription Kit (Cat.205313, Qiagen): 用以將 RNA 反轉錄為 cDNA，其內含 gDNA Wipeout Buffer、Quantiscript<sup>®</sup>、Reverse Transcriptase、Quantiscript RT Buffer、RT Primer Mix 及 RNase-Free Water
6. DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat. 69506, Qiagen): 用以萃取細胞 DNA，其內含 DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml Collection Tubes、Collection Tubes (2 ml)、Buffer ATL、Buffer AL、Buffer AW1、Buffer AW2、Buffer AE 及 Proteinase K
7. 實驗所使用的 PCV2、CD40、CD83、CD86、IL-10、IL-12p40 及 GAPDH 引子序列列於 Table 1.



Table 1. Genes analysed and primer sets used in the present study.

Gene symbol	Accession number	Annealing temperature (°C)	PCR product length (bp)	Gene description	Forward primer	Reverse primer
CD40	NM_214194.1	60	161	Sus scrofa CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	CTTCCCTGGCCTCGGG GTCA	TCCCCGCACGTTGTTC CACC
CD83	XM_001928655 .2	62	217	Sus scrofa CD83 antigen-like, transcript variant 1	TTCCTGCTCCTGAGCT GCGCCT	GGGCCCCCGAAGAGC CATTCT
CD86	NM_214222.1	64	82	Sus scrofa CD86 molecule	AGACTGGAGAACTGC CGTGCCA	GGGTCCAGGTGGCCTG GTCAA
IL-10	HQ236499.1	60	89	Sus scrofa interleukin 10	CGGCGCTGTCATCAAT TTCTG	CCCCTCTCTTGGAGCT TGCTA
IL-12p40	NM_214013.1	60	75	Sus scrofa interleukin 12 p40 subunit	AACTCTTCACGGACCA AATCTCA	GGTCCCCGGGCTTGCA
GAPDH		60			ACATGGCCTCCAAGG AGTAAGA	GATGGAGTTGGGGCTG TGACT
PCV2	AY146993	60	340	PCV2 ORF1 region	TCCGCGGGCTGGCTG AACT	AACGGGGTCTGATTGC TGGTAATC



## 2-6 流式細胞儀相關藥品

1. DQ™ ovalbumin (Cat. D-12053, OR, Molecular Probes)：用以檢測細胞攝取抗原之能力，以流式細胞儀偵測螢光變化。
2. Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit (Cat. V12883, Molecular Probes)：Carboxyfluorescein succinimidyl ester 能於蛋白質結合，並產生螢光訊號，用以檢測細胞分裂狀況，其螢光強度隨細胞分裂而遞減，以流式細胞儀偵測螢光變化。
3. FITC-goat anti-mouse Ig (BD Pharmingen™, NJ, USA)：作為二級抗體。
4. Mouse anti-pig CD14 (Cat. MCA1218, AbD Serotec, PA, U.S.A.)：與單核球來源細胞的表面抗原 CD14 結合，為一級抗體。

## 2-7 儀器

1. 離心機：5810R 15 amp version (Eppendorf, Hamburg, Germany)
2. Real-time PCR 機器：Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany)
3. PCR 機器：PTC-100™ (MJ Research™, MA, USA)
4. 流式細胞儀：FACSCalibur flow cytometer (Becton and Dickinson, Pharmingen, CA, USA)

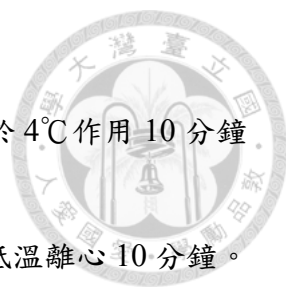
## 第三節 實驗方法

### 3-1 細胞分離及培養模式之建立

#### 3-1.1 豬周邊血液單核細胞(PBMCs)的分離與純化

1. 預先以針筒抽取適量 1% EDTA，以 1:9 的比例與自豬隻頸靜脈竇採得之新鮮血液混合。
2. 4°C 低溫離心 300 xg，30 分鐘。
3. 將 buffy coat 抽出，與等量 RPMI-W(約 3 ml)充分混合後，緩慢將此細胞懸浮液置於等量(7 ml) Ficoll-Paque PLUS 之上。
4. 以 300 xg 20°C 常溫離心 30 分鐘。
5. 將中層細胞(即 PBMCs)取出(約 2–3 ml)，與 15 ml RPMI-W 混合。



- 
6. 以 200 xg 4°C 低溫離心 10 分鐘。
  7. 去除液體，將細胞團塊與 5 ml ACK 緩衝液充分混合，置於 4°C 作用 10 分鐘以去除紅血球。
  8. 加入 10 ml RPMI-W 中止 ACK 緩衝液作用，以 180 xg 4°C 低溫離心 10 分鐘。
  9. 去除液體，將細胞團塊與 15 ml RPMI-W 混合後，以 120 xg 4°C 低溫離心 10 分鐘。
  10. 去除上清液，加入適量 RPMI-C 與細胞充分混合後，計數之。

### 3-1.2 豬單核球來源樹突狀細胞(MoDCs)的分離與純化

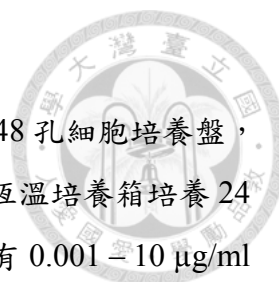
豬單核球來源樹突狀細胞分化與培養：

1. 將懸浮於 RPMI-C 之 PBMCs 以  $2 \times 10^7$  cells /5 ml/well 置於 6 孔盤(Costar, Cambridge, MA, USA)，隔夜培養於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 恆溫培養箱中。
2. 去除培養液，以 4°C 冰 DPBS 清洗細胞 3 次以去除懸浮之淋巴球，加入 3 ml MoDC-medium，培養於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 恆溫培養箱中，以促使貼附於培養盤之單核球分化成 MoDCs。
3. 每日觀察細胞，每隔兩日將半量培養液以新鮮 MoDC-medium 置換，依照豬隻個體之 MoDCs 分化情況判斷，取分化 3–6 日具樹突狀形態之 MoDC 進行後續實驗。

將分化完成之 MoDCs 重新分配至細胞培養盤：

1. 吸取細胞培養液保留，收存於無菌離心管中待用。
2. 於 6 孔盤中加入 3 ml 4°C 冰 RPMI-S，作用約 10 分鐘，待細胞懸浮於 RPMI-S 後，收集細胞至無菌離心管中，加入不含 EDTA 之 RPMI 培養液以稀釋 EDTA。
3. 以 180 xg 4°C 低溫離心 10 分鐘後，去除液體。
4. 將細胞懸浮於步驟 1 保留之原始之細胞培養液及新鮮 MoDC-medium 後，配合成各試驗所需之細胞濃度。

### 3-2 黃麴毒素及致裂原 Con A 對周邊血液單核細胞(PBMCs)的影響



### 3-2.1 以 propidium iodide (PI) 染色檢測細胞存活率

1. 將 PBMCs 以 RPMI-C 調整濃度為  $10^6$  cells/ml/well，置於 48 孔細胞培養盤，於培養液中添加 AFB<sub>1</sub> 及 Con A 後，於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 恆溫培養箱培養 24 及 72 小時。AFB<sub>1</sub> 以 RPMI-C 作 10 倍連續稀釋，濃度組別有 0.001 – 10 µg/ml 共五階及 0 µg/ml 共 6 個處理組別。Con A 有 0 及 5 µg/ml 兩個處理組別。
2. 與 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 作用後之細胞，以溫 DPBS 清洗兩次，以去除殘留之培養液。
3. 將細胞懸浮於 1 ml DPBS，添加 1 mg/ml PI 溶液使 PI 最終濃度為 50 µg/ml 後，立即以流式細胞儀讀取 FL3 channel 之螢光數值。
4. 數值以 CellQuest™ 軟體進行分析。以未經 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理細胞直方圖中之螢光陰性細胞定義為存活之細胞 M1 區，將其餘各處理組與此 M1 區比較。

### 3-2.2 以 CFSE 染色檢測細胞增生能力(blastogenesis)

1. 依照商品說明書以 90 µl DMSO 溶解冷凍乾燥粉末，儲存及使用皆須避光。
2. 將  $5 \times 10^7$  PBMCs 以 180 xg 4°C 低溫離心 10 分鐘後，去除液體。
3. 將細胞懸浮於 5 ml 含 10 µM CFSE working solution，作用 15 分鐘。
4. 以 0.5 ml 胎牛血清中止反應後，以 RPMI-C 清洗細胞 3 次，以去除殘留之螢光染劑。
5. 染色完成之細胞團塊呈淡黃色。將細胞以  $10^6$ /ml/well 懸浮於 RPMI-C，以不同濃度之 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理，細胞培養於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37°C 恆溫培養箱中 24 及 72 小時。AFB<sub>1</sub> 處理組別有 0.001 – 10 µg/ml 共五階及 0 µg/ml 共 6 個處理組別。Con A 有 0 及 5 µg/ml 兩個處理組別。
6. 將細胞培養液去除，以 DPBS 清洗細胞 2 次，以去除殘留之培養液。
7. 以 DPBS 懸浮細胞後，使用流式細胞儀偵測細胞螢光強度，讀取 FL1 channel 之螢光數值。
8. 數值以 ModFit LT 軟體進行分析。以未經 AFB<sub>1</sub> 及 Con A 處理之對照組細胞直方圖中螢光陽性且呈尖峰之細胞定義為親(parent)細胞群，由於子代細胞之螢光強度會隨細胞分裂而遞減，因此以固定螢光間隔定義各子代細胞，

計算出各處理組之 proliferation index。



### 3-2.3 以 Real-time PCR 偵測豬第二型環狀病毒(PCV2)量

以 DNeasy Blood & Tissue Kit 萃取去氧核糖核酸(DNA)

1. 由於豬隻體內 PCV2 病毒量增加可能增進 PMWS 發生機會，因此本試驗以豬隻 PBMCs 所含之 PCV2 病毒量作為評估指標，藉由病毒量變化以推測 AFB<sub>1</sub> 能否影響 PMWS 的發生。分離已知帶有 PCV2 病毒豬隻的 PBMCs，將固定量的 PBMCs 分置於各 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理組的細胞培養皿中，培養 72 小時後，離心去除上清液，測定細胞的 PCV2 量。
2. 將 PBMCs 以 10<sup>6</sup> cells/ml/well 懸浮於 RPMI-C，以 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理 72 小時後收取細胞。AFB<sub>1</sub> 處理組別有 0.001 – 10 µg/ml 共五階及 0 µg/ml，共 6 個處理組別。Con A 有 0、1 及 5 µg/ml 計三個處理組別。
3. 將細胞置於 1.5 ml 微量離心管，於 300 xg 離心 5 分鐘後，去除培養液，將細胞懸浮於 200 µl 之 DPBS，於 -20°C 冷凍備用。
4. 將細胞懸浮液解凍，加入 20 µl proteinase K 及 200 µl AL 緩衝液。
5. 充分混合後，置於 56°C 乾浴機作用 10 分鐘。
6. 加入 200 µl 無水酒精，充分混合後，將液體移入商品化套組提供之 spin column。
7. 以 6000 xg 離心 1 分鐘後，去除收集管，將 spin column 套上新的收集管。
8. 加入 500 µl AW1 緩衝液，於 6000 xg 離心 1 分鐘後，去除收集管，將 spin column 套上新的收集管。
9. 加入 500 µl AW2 緩衝液，於 20000 xg 離心 3 分鐘後，去除收集管，將 spin column 套上新的 1.5 ml 微量離心管。
10. 加入 200 µl AE 緩衝液，靜置 2 分鐘後，以 6000 xg 離心 1 分鐘，去除 spin column，將收得之核酸冷凍於 -20°C 備用。

以 Real-time PCR 偵測 PCV2 病毒量

1. 標準曲線繪製：自 2.2 x 10<sup>9</sup> copies/µl 之 DNA 模板以 PCR 用水做 10 倍連續稀釋。
2. Real-time PCR 反應配方為 10 µl SYBR<sup>®</sup> Advantage<sup>®</sup> qPCR Premix (Cat.

639676, Clontech, CA, USA)、5  $\mu$ l PCR 用水、正向及負向豬第二型環狀病毒引子(Table 1.)各 0.5  $\mu$ l, 以及 4  $\mu$ l 待測之去氧核糖核酸樣本。以 4  $\mu$ l PCR 用水作為陰性對照。

3. Real-time PCR 反應條件為：以 95 °C 10 秒升溫，95 °C 5 秒將 DNA 打開形成模板，60 °C 30 秒使引子黏合、延展及螢光偵測，上述打開、黏合、延展及螢光偵測為 1 個循環，共進行 45 個循環，反應後期，從 60 °C~95 °C 進行 melting temperature ( $T_m$ ) 的分析。
4. 經分析後，位於參考  $T_m$  值之樣本即視為陽性檢體，經程式計算後之數值即為樣本之病毒 copy number。

### 3-3 黃麴毒素 B<sub>1</sub> 及脂多醣(LPS)對樹突狀細胞的影響

#### 3-3.1 倒立顯微鏡觀察形態學變化

1. 將分化完成之 MoDCs 重新分配至 48 孔細胞培養盤(Costar)，細胞濃度為 10<sup>4</sup> cells/ml/well，以 AFB<sub>1</sub> 及 LPS 處理 48 小時，或以 AFB<sub>1</sub> 處理 72 小時。
2. 以 AFB<sub>1</sub> 及 LPS 處理 48 小時之處理組別為：AFB<sub>1</sub> 以 MoDC-medium 作 10 倍連續稀釋，濃度組別有 0、0.001、0.1 及 10  $\mu$ g/ml 等；LPS 濃度組別有 0 及 1  $\mu$ g/ml 等；共 8 種處理組合。
3. 以 AFB<sub>1</sub> 處理 72 小時之處理組別為 0.001 – 10 共五階及 0  $\mu$ g/ml 共 6 個處理組別。
4. 將培養盤之細胞培養液去除後，以溫 DPBS 清洗兩次。
5. 於各培養盤加入 500  $\mu$ l 溫 DPBS 後，於倒立顯微鏡下觀察。

#### 3-3.2 以細胞表面抗原 CD14 染色檢測單核球來源細胞純度

1. 將分化完成之 10<sup>6</sup> MoDCs 與 50 倍稀釋之 mouse anti-pig CD14 抗體(AbD Serotec)於冰上作用 30 分鐘。
2. 以 DPBS 清洗兩次。
3. 將細胞與 500 倍稀釋之二級抗體 FITC-goat anti-mouse Ig (BD Pharmingen™) 於冰上避光作用 30 分鐘。對照組細胞僅與二級抗體作用。
4. 以 DPBS 清洗兩次。

5. 以流式細胞儀偵測細胞螢光，讀取 FL1 channel 之螢光數值。
6. 數值以 CellQuest™ 軟體進行分析。以螢光强度高於對照組細胞處定義 M1 區，換算得檢測樣本位於 M1 區之細胞百分比。



### 3-3.3 以 propidium iodide 染色檢測細胞存活率

5. 將分化完成之 MoDCs 重新分配至 48 孔細胞培養盤，細胞濃度為  $10^4$  cells/ml/well，以 AFB<sub>1</sub> 處理 48 小時。AFB<sub>1</sub> 以 MoDC-medium 作 10 倍連續稀釋，濃度組別有 0.001 – 10  $\mu$ g/ml 共五階及 0  $\mu$ g/ml 共 6 個處理組別。
6. 與 AFB<sub>1</sub> 作用後之細胞以溫 DPBS 清洗兩次，以去除殘留之培養液。
7. 將 4°C 0.2 % EDTA 溶液加入細胞培養盤，作用約 10 分鐘，待細胞懸浮於 0.2 % EDTA 溶液後，收集細胞至無菌離心管中。
8. 以 180 xg 4°C 離心 10 分鐘，去除 0.2 % EDTA 溶液，將細胞懸浮於 400  $\mu$ l DPBS，添加 1 mg/ml PI 溶液使 PI 最終濃度為 50  $\mu$ g/ml 後，立即以流式細胞儀讀取 FL3 channel 之螢光數值。
9. 數值以 CellQuest™ 軟體進行分析。以未經 AFB<sub>1</sub> 處理細胞直方圖中螢光陰性細胞定義為存活細胞之 M1 區，將其餘各處理組與此 M1 區進行比較。
10. 同時觀察各處理組細胞於散點圖(Dotplot)中，以前向散射光(Forward scatter，FSC)為 X 軸，側向散射光(Side scatter，SSC)為 Y 軸之圖像。

### 3-3.4 以 DQ™ ovalbumin 檢測 MoDCs 攝取及處理抗原能力(antigen uptake and processing)

1. 原理：DQ™ ovalbumin 經蛋白降解後其片段才會呈現綠色螢光，其螢光呈色劑為 BODIPY® FL dye，用來檢測抗原呈獻細胞的抗原處理(antigen processing)及處理 (processing) 的能力。將 37°C 下的細胞呈獻作用之幾何平均螢光強度減去 4°C 下作用之背景值進行分析。
2. DQ™ ovalbumin 泡製：以 1 ml DPBS 溶解冷凍乾燥粉末得 1 mg/ml stock solution，使用及儲藏皆須避光。
3. 將分化完成之 MoDCs 重新分配至 48 孔細胞培養盤，細胞濃度為  $10^4$  cells/ml/well，以 AFB<sub>1</sub> 及/或 LPS 處理 48 小時。AFB<sub>1</sub> 以 MoDC-medium 作 10 倍連續稀釋，濃度組別有 0、0.001、0.1 及 10  $\mu$ g/ml 等；LPS 濃度組別有



- 0 及 1  $\mu\text{g/ml}$  等；共 8 種處理組合。
4. 以溫 DPBS 清洗細胞兩次，以去除殘留之培養液。
  5. 將含 10  $\mu\text{g/ml}$  之 DQ™ ovalbumin working solution 以 500  $\mu\text{l/well}$  方式加入培養皿，於含 5%  $\text{CO}_2$  之 37°C 恆溫培養箱中避光作用 1 小時。另有對照組細胞於 4°C 作用，以做為背景值。
  6. 作用完畢之細胞以溫 DPBS 清洗兩次，以去除殘留之 working solution。於各培養盤加入 500  $\mu\text{l}$  溫 DPBS 後，直接於顯微鏡下觀察。以流式細胞儀分析之細胞處理步驟為 7–9。
  7. 將 1% EDTA 溶液以 DPBS 稀釋成 0.2 % EDTA 溶液，以冰 0.2 % EDTA 溶液加入細胞培養盤，作用約 10 分鐘，待細胞懸浮於 0.2 % EDTA 溶液後，收集細胞至無菌離心管中。
  8. 以 180  $\times\text{g}$  4°C 離心 10 分鐘，去除 0.2 % EDTA 溶液，將細胞懸浮於 500  $\mu\text{l}$  DPBS，以流式細胞儀讀取 FL1 channel 之螢光數值。
  9. 數值以 CellQuest™ 軟體進行分析。分析直方圖中螢光強度之幾何平均數。

### 3-3.5 MoDCs 表面抗原及細胞激素 mRNA 表現量

以 RNeasy Mini Kit 萃取細胞核糖核酸(RNA)

1. 將 10  $\mu\text{l}$  2-mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) 加入 1 ml RLT 緩衝液以減少 RNA 降解。
2. 將分化完成之 MoDCs 重新分配至 48 孔細胞培養盤，細胞濃度為  $10^4$  cells/ml/well，以 AFB<sub>1</sub> 及/或 LPS 處理 6 及 24 小時。AFB<sub>1</sub> 以 MoDC-medium 培養液作 10 倍連續稀釋，濃度組別有 0、0.001、0.1 及 10  $\mu\text{g/ml}$  等；LPS 濃度組別有 0 及 1  $\mu\text{g/ml}$  等；共 8 種處理組合。
3. 去除培養液，以 350  $\mu\text{l/well}$  之 RLT 緩衝液溶解培養盤中之細胞，收存於 1.5 ml 微量離心管，冷凍儲存於 -80°C 待萃取核糖核酸。
4. 解凍儲存於 RLT 緩衝液中之核酸溶液，加入等體積(350  $\mu\text{l}$ )之 70 % 乙醇，混勻後，將液體加入商品化套組提供之 spin column。
5. 以 8000  $\times\text{g}$  常溫離心 1 分鐘，去除濾液。
6. 加入 700  $\mu\text{l}$  RW1 緩衝液，以 8000  $\times\text{g}$  常溫離心 1 分鐘，去除濾液。
7. 加入 500  $\mu\text{l}$  RPE 緩衝液，以 8000  $\times\text{g}$  常溫離心 1 分鐘，去除濾液。
8. 再次加入 500  $\mu\text{l}$  RPE 緩衝液，以 8000  $\times\text{g}$  常溫離心 2 分鐘，去除收集管。

9. 將 spin column 置於 RNase free 之 1.5 ml 微量離心管，加入 50  $\mu$ l RNase-free water 靜置 2 分鐘。
10. 以 8000 xg 常溫離心 1 分鐘，去除 spin column，將收得之核酸冷凍於 -80°C 備用。



以 QuantiTect Rev. Transcription Kit 將核糖核酸反轉錄成互補 DNA (Complementary DNA, cDNA)

1. 將冷凍於 -80°C 之 RNA 樣本解凍，取 10  $\mu$ l RNA 樣本與 2  $\mu$ l 之 gDNA Wipeout Buffer 及 2  $\mu$ l 之 RNase-free water 混合，使總體積達 14  $\mu$ l，此為 Premix A。
2. 於 42°C 乾浴機作用 2 分鐘後，立即將樣本置於冰上。
3. 將作用完畢之 Premix A 與 1  $\mu$ l Quantiscript Reverse Transcriptase、4  $\mu$ l 之 Quantiscript RT Buffer 及 1  $\mu$ l RT Primer Mix 混合，使總體積達 20  $\mu$ l。
4. 於 42°C 作用 30 分鐘，隨即以 95°C 3 分鐘終止反轉錄酵素作用。
5. 將轉錄完成之 cDNA 樣本冷凍於 -20°C 備用。

以 Real-time PCR 檢測細胞表面抗原及細胞激素之 mRNA 表現量

1. Real-time PCR 反應配方為 10  $\mu$ l EZtime Real-Time PCR Premix (Yeastern Biotech)、7.2  $\mu$ l PCR 用水、正向及負向引子(Table 1.)各 0.4  $\mu$ l，以及 2  $\mu$ l 待測之 cDNA 樣本。以 2  $\mu$ l PCR 用水作為陰性對照。
2. 使用之引子有 house-keeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)，及細胞表面抗原基因 CD40、CD83、CD86 與細胞激素基因 IL-10 及 IL-12p40 等六種。
3. Real-time PCR 反應條件為：95 °C 10 分鐘，95 °C 15 秒將 DNA 打開形成模板，60 °C 30 秒使引子黏合、72°C 10 秒延展及螢光偵測，上述打開、黏合、延展及螢光偵測為 1 個循環，共進行 40 個循環，反應後期，從 60 °C~95 °C 進行 melting temperature ( $T_m$ ) 的分析。
4. 經分析後，位於參考  $T_m$  值之樣本即視為陽性檢體。將細胞表面抗原基因與細胞激素基因等欲評估之基因的 cycle threshold (Ct) 減去 house-keeping gene GAPDH 的 Ct 值可得  $\Delta Ct$  值。帶入  $2^{-\Delta Ct}$  公式即得欲評估基因之 mRNA 相對表現量，以供比較。



### 3-3.6 以 Real-time PCR 偵測 PCV2 含量

以 DNeasy 萃取細胞之去氧核糖核酸(DNA)


1. 將分化完成之 MoDCs 重新分配至 48 孔細胞培養盤，細胞濃度為  $10^5$  cells/ml/well，以 AFB<sub>1</sub> 處理 72 小時。AFB<sub>1</sub> 以 MoDC-medium 作 10 倍連續稀釋，濃度組別有 0.001 – 10 µg/ml 共五階及 0 µg/ml 共 6 個處理組別。
2. 將培養液去除，並以 DPBS 清洗一次以去除剩餘之培養液，細胞懸浮於 200 µl 之 DPBS，置於 1.5 ml 微量離心管，儲存於 -20°C 冷凍待萃取去氧核糖核酸。
3. 步驟同 3-2.3 PBMCs 部分 4 – 10，將第 10 步驟使用的 AE 緩衝液使用量改為 100 µl。

以 Real-time PCR 偵測 PCV2 含量，步驟同 PBMCs 部分 1 – 4

### 3-4 統計分析

1. 除型態學結果外，試驗結果均以 mean ± standard error of the mean (SEM) 表示，並以 Prism 5 程式做圖，使用 SAS<sup>®</sup> 9.2 Software 進行統計分析。以 SAS 程式提供之廣義線性模型 (General Linear Model) 進行變方分析，當其中任兩組處理組別之  $p < 0.05$ ，則以雪菲 S 法 (Scheffe's S method)  $\alpha = 0.05$  進行處理均值的比較。依照處理均值由高到低排序，以英文字母自 a 開始標示，不同字母標示者表處理組別間差異達  $p < 0.05$ 。字母表示法以外之標示方式，則於各圖說處標示。
2. 各試驗所使用之試驗設計：
  - A. 以 AFB<sub>1</sub> 及 Con A 處理 PBMCs：
    - i. AFB<sub>1</sub> 及 Con A 之交互作用檢測：先以 AFB<sub>1</sub> 及 Con A 作為兩因子複因子設計，並以豬為區集因子作隨機完全區集設計 (randomized complete block design, RCBD)，重複次數同該試驗使用之豬數。
    - ii. AFB<sub>1</sub> 處理效應比較：以 AFB<sub>1</sub> 處理變級為處理因子，以豬為區集因子作隨機完全區集設計 (RCBD)。
  - B. 以 AFB<sub>1</sub> 處理 MoDCs：採隨機完全區集設計 (RCBD)，重複次數同該試驗使用之豬數，以豬為區集因子。
  - C. 以 AFB<sub>1</sub> 及 LPS 處理 MoDCs：



- 
- i. AFB<sub>1</sub> 及 LPS 之交互作用檢測：以 AFB<sub>1</sub> 及 LPS 作為兩因子複因子設計，以隨機完全區集設計(RCBD)，重複次數同該試驗使用之豬數，以豬為區集因子。
  - ii. AFB<sub>1</sub> 處理效應比較：以 AFB<sub>1</sub> 處理變級為處理因子，以豬為區集因子作隨機完全區集設計(RCBD)。

## 第四章 結果



### 第一節 黃麴毒素 B<sub>1</sub> 及致裂原 Con A 對豬周邊血液單核細胞的影響

#### 1-1 豬周邊血液單核細胞(PBMCs)的純化

30 ml 豬隻血液經去除血清、紅血球、顆粒球及血小板後，約可得  $8 \times 10^7$  至  $1.5 \times 10^8$  PBMCs。

#### 1-2 細胞存活率

有關 AFB<sub>1</sub> 影響 PBMCs 存活率的測試，是將細胞以 propidium iodide (PI) 染色，因為 PI 無法通過活細胞的細胞膜，僅死亡的細胞會因細胞膜通透性的改變而使 PI 可以與核酸結合，故可以流式細胞儀激發後偵測其發散之螢光，將螢光陽性細胞判定為死亡。在本研究的先導試驗中，使用相當於 10  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 組中所含的 DMSO 量的純 DMSO 作為溶劑對照組(vehicle control)，進行 PBMCs 存活率及細胞增殖試驗，由於結果中實驗組與對照組數值無顯著差異，而初步排除 DMSO 對細胞的毒性。主試驗則以來自 7 頭豬隻之 PBMCs 試驗結果作為 7 重複(replicate)。由於存活率數值為百分比值，因此將數值先經正弦反函數轉換(arcsin transformation)後，再進行統計分析，作圖之數值則為未經轉換之原始數值。

統計分析先以複因子變方分析觀察在 24 及 72 小時之兩時間點，AFB<sub>1</sub> 及 Con A 兩項因子各組間是否具顯著差異，以及兩項因子間是否具交互作用。經過 24 小時的 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理後，AFB<sub>1</sub> 六組間( $p = 0.0004$ )及 Con A 兩組間( $p < 0.0001$ )皆有顯著差異，但此時 AFB<sub>1</sub> 與 Con A 兩因子間不具有交互作用( $p = 0.9092$ )；經 72 小時處理後，AFB<sub>1</sub> 六組間( $p = 0.0023$ )及 Con A 兩組間( $p < 0.0001$ )之差異及兩因子間的交互作用( $p = 0.0014$ )均具顯著性。

本實驗的結果顯示，不同時間點無論是否同時給予 Con A，AFB<sub>1</sub> 各處理組之變方分析皆具顯著差異性，24 小時無同時給予 Con A 之  $p = 0.0057$ ，72 小時無同時給予 Con A 之  $p < 0.0001$ ，24 小時同時給予 Con A 之  $p = 0.0061$ ，72 小時同時給予 Con A 之  $p = 0.0015$ 。整體而言，隨著作用時間的增長，細胞的存活率會隨之下

降；在 24 小時的 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理後，最低濃度處理組(0.001 µg/ml)的存活率平均值為各組中最低者，單獨處理 AFB<sub>1</sub> 時(Fig. 1A)，0.001 µg/ml AFB<sub>1</sub> 組及未給予 AFB<sub>1</sub> 對照組分別為 81.54±1.28%及 82.47±1.66%，而同時給予 5 µg/ml Con A 時，0.001 µg/ml AFB<sub>1</sub> 及未給予 AFB<sub>1</sub> 對照組分別為 77.47±2.56%及 79.79±2.69%，但無論有無添加 Con A，0.001 µg/ml 與 0 µg/ml AFB<sub>1</sub> 組間均無明顯差異。類似的情形亦出現於 72 小時，在僅給予 AFB<sub>1</sub> 時，仍然出現最低濃度處理組(0.001 µg/ml)的存活率(63.73±2.68%)低於對照組(71.70±1.58%)及其餘各組的現象，且除 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 組外(69.28±2.07%)，其餘 AFB<sub>1</sub> 組的存活率均顯著低於對照組(Fig. 1A)；在同時給予 5 µg/ml Con A 時，存活率則隨著 AFB<sub>1</sub> 濃度上升而下降，且 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 組的存活率 66.11±2.80%顯著低於對照組的 74.87±2.68%(Fig. 1B)。

### 1-3 細胞增生能力(blastogenesis)

在細胞增生能力試驗中，因為 CFSE 能與細胞內蛋白質結合並產生螢光訊號，並能隨著細胞分裂螢光強度會減半，而能以流式細胞儀進行定量，因此可以用來偵測細胞的有絲分裂活性。ModFit LT 軟體分析是經人工定義親細胞群(parent)所在的螢光強度位置後，軟體依照螢光遞減而界定各代子細胞，算出樣本的增殖指數；若細胞幾乎未分裂而停留在親細胞群，則數值會停留在 1；但若細胞會分裂，則隨分裂代數或有分裂細胞數的增加，增殖指數可隨之上升，達 2 或 3 以上的數值。

在細胞增殖能力之實驗，亦是以來自 7 頭豬隻之 PBMCs 作為 7 重複的檢測對象。統計分析上先以複因子分析兩時間點，AFB<sub>1</sub>(六個處理組別)及 Con A (兩個處理組別)兩因子之各處理組間是否具顯著差異，以及交感作用是否存在。結果顯示，經過 24 小時的 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理後，AFB<sub>1</sub> 六組間具顯著差異( $p = 0.0049$ )，但 Con A 兩組間( $p < 0.1245$ )，以及 AFB<sub>1</sub> 與 Con A 之交感作用( $p = 0.9238$ )則不具顯著性；在處理 72 小時後，Con A 兩組間具顯著差異( $p < 0.0001$ )，AFB<sub>1</sub> 六組間卻不具顯著差異( $p = 0.1104$ )，且 AFB<sub>1</sub> 與 Con A 兩因子間依然不具交感作用( $p = 0.0747$ )。

在單獨給與 AFB<sub>1</sub> 時，細胞在經過 24 小時( $p = 0.0467$ )或 72 小時( $p = 0.2274$ )處理後，各組間的增殖指數皆趨近於 1，AFB<sub>1</sub> 各組與對照組間均無統計上的差異

(Fig. 1C)，顯示 AFB<sub>1</sub> 不像致裂原，在所選擇的濃度下無法刺激淋巴細胞的增殖。若同時給予 5 μg/ml Con A 時(Fig. 1D)，在處理後 24 小時，細胞尚未有明顯的分裂，因此各組間均無顯著差異( $p = 0.0224$ )且均趨近 1；但作用時間延長至 72 小時( $p = 0.0042$ )，則可以觀察到細胞的增殖現象，但隨 AFB<sub>1</sub> 濃度的上升而漸趨下降並趨近於 1，其中最高濃度之 10 μg/ml AFB<sub>1</sub> 組的細胞增生能力  $1.34 \pm 0.11$  顯著低於對照組的  $2.06 \pm 0.36$  ( $p < 0.05$ )。這顯示 AFB<sub>1</sub> 在致裂原 Con A 刺激淋巴細胞分裂增殖的過程中，具抑制細胞的分裂增殖程度，使得反應值趨近於親細胞群。此外，當 AFB<sub>1</sub> 的濃度越低，細胞增殖指數的標準機差亦有隨之增大的趨勢，顯示低量 AFB<sub>1</sub> 的影響在豬隻個體間有較大的差異性。

#### 1-4 豬第二型環狀病毒量變化情形

在未經校正的 PCV2 病毒量檢測中，使用 10 頭實驗豬隻之 PBMCs，依照 Qiagen DNeasy 套組的建議細胞數，將各處理組的起始細胞數固定在  $1 \times 10^6$ /well，經過 72 小時的作用後，將各處理組之細胞培養皿中的上清液經離心去除後，收集各處理組的培養皿底部所有細胞作為檢測樣本，以套組建議的流程收取所有細胞核酸於 200 μl 固定體積中。再固定取其中 4 μl，即 1/50 的體積，以 real-time PCR 檢測 PCV2 的核酸量，結果以病毒 copy number 經對數轉換來表示並進行統計分析(Fig. 2A)。檢測結果顯示，豬隻於 10 至 18 週齡實驗期間，在  $10^6$  PBMCs 中所含的 PCV2 病毒量介於  $10^2$  至  $10^5$  copies/μl DNA，呈常態分佈，且病毒量的改變與豬隻年齡增長無明顯關聯。經 5 μg/ml Con A 處理 72 小時後，可使病毒量達  $3.94 \pm 1.52 \times 10^8$  copies/μl DNA，以下以經對數轉換之數值詳述本試驗之結果。

試驗結果顯示，經 72 小時的 AFB<sub>1</sub> 及/或 Con A 處理後，AFB<sub>1</sub> 的各處理組間無論是否同時給予 Con A 均無顯著差異( $p = 0.3203$ )，其中在未給予 Con A 之 AFB<sub>1</sub> 各組病毒量對數值由 0 – 10 μg/ml 六組分別為  $5.56 \pm 0.41$ 、 $5.46 \pm 0.38$ 、 $5.63 \pm 0.28$ 、 $5.35 \pm 0.34$ 、 $5.42 \pm 0.32$ 、 $5.06 \pm 0.32$ ；而 PCV2 病毒量在 Con A 處理組中，則無論 AFB<sub>1</sub> 濃度高低均隨 Con A 濃度上升而增加( $p < 0.0001$ )；其中在未給予 AFB<sub>1</sub> 之 0、1、5 μg/ml 三個 Con A 處理組之病毒量對數值，分別為  $5.56 \pm 0.41$ 、 $7.55 \pm 0.21$  及  $8.26 \pm 0.29$ ，組別間比較結果顯示三變級間皆達顯著差異。然 AFB<sub>1</sub> 與 Con A 間，以複因子分析，則不具交感作用( $p = 0.8642$ )。



依照細胞存活率及增生能力的結果顯示，由於較高濃度的 AFB<sub>1</sub> 會干擾細胞增生及存活率，故而推測經過 72 小時的處理後，給予同樣濃度 Con A 處理的 AFB<sub>1</sub> 各組間的細胞數應亦會隨 AFB<sub>1</sub> 濃度的上升而下降，因而可能造成細胞數量上的差異，雖然各處理組培養皿內所有細胞所帶有的總病毒量是相近，但單位細胞所含的病毒核酸量可能並不同，亦即高濃度 AFB<sub>1</sub> 組可能在細胞數量較少的前提下而帶有與對照組近似同量的總病毒量。由於細胞增殖指數是大於 1 的正數，且細胞數量與細胞增殖指數成正相關，因此為了簡易推估細胞量與病毒量間的關係，遂取其中 7 頭參與細胞存活率及細胞增生能力試驗的豬隻，將同一頭豬隻的 PCV2 核酸量除以自身的細胞增殖指數作為一校正數值，使病毒量在經由細胞數相關數值的校正後，再進行分析(Fig. 2B)。圖中 0–10 µg/ml 六個 AFB<sub>1</sub> 處理組，在 72 小時的作用過程中，皆同時添加了 5 µg/ml 的 Con A，經校正後的數值顯示，由於 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 組的增值指數及存活率相較於對照組有顯著的下降，因此校正後的病毒量，在 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 組(6.02±0.50)相較於對照組(4.63±0.70)有顯著的上升，變方分析結果具顯著差異(p < 0.0001)，此結果顯示 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 組的細胞數雖較少，但單位細胞內所含有的平均病毒核酸量卻較對照組為高。

## 第二節 黃麴毒素 B<sub>1</sub> 及脂多醣對豬單核球來源樹突狀細胞(MoDCs)的影響

### 2-1 豬 MoDCs 的純化

將 6 孔盤內分化完成之 MoDCs 進行細胞計數，可得約 2–3 x10<sup>5</sup> cells/well。將細胞以 mouse anti-pig CD14 抗體及二級抗體 FITC goat anti-mouse Ig (BD Pharmingen™) 進行染色及分析後，得單核球來源之細胞純度為 78.34 %。

### 2-2 MoDCs 細胞形態學變化

豬隻 MoDCs 經 AFB<sub>1</sub> 及/或脂多醣(LPS)處理 48 小時後，於倒立顯微鏡下觀察其型態學之變化，結果如 Fig. 3，試驗為三重複，由於不同豬隻的 MoDCs 型態變化之觀察結果在各處理組間具有一致性，故任選其中一頭豬為代表。在單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時，於 0 µg/ml AFB<sub>1</sub> 及 0 µg/ml LPS 對照組中，MoDCs 呈典型之樹突狀結構

並貼覆於培養皿(Fig. 3A)，以最低濃度 0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 處理的組別在形態上與對照組幾乎相同(Fig. 3C)。隨著 AFB<sub>1</sub> 濃度上升至 0.1  $\mu\text{g/ml}$  開始，細胞逐漸出現變小且樹突構造變短的情形(Fig. 3E)，至最高濃度之 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組，細胞型態明顯變得更小而圓且較為不完整，並脫離培養皿，而培養皿之背景中可觀察到許多細胞碎片(Fig. 3G)。

在同時給予 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 刺激組，以促使未成熟之 MoDCs (iMoDCs)轉趨成熟 (mMoDCs)，於 0  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 及 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 組，細胞較為立體且細胞核較大，並常有空泡出現於細胞質中(Fig. 3B)。隨著 AFB<sub>1</sub> 濃度上升，0.001  $\mu\text{g/ml}$  及 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組均未見明顯的變化(Fig. 3D, 3F)，而在最高濃度之 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 及 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 組，則觀察到細胞型態較小且不完整，少數仍具樹突狀結構之細胞表面易黏附細胞碎屑，大多數細胞均已脫離培養皿，且培養皿之背景具許多細胞碎片(Fig. 3H)。

由於 0.001、0.1 及 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 各組濃度相差 100 倍，使得 AFB<sub>1</sub> 濃度間的差異較大，且環狀病毒病毒量變化的檢測是以較長時間的 72 小時為作用時間，因此另外進行濃度相差 10 倍的設計，以觀察豬隻 MoDCs 經過 0.001 – 10  $\mu\text{g/ml}$  五階 AFB<sub>1</sub> 作用後較細微的濃度間變化，並選擇較長時間的 72 小時作為觀察時間點，以了解在較長作用時間下 AFB<sub>1</sub> 對細胞的影響。處理後的細胞一樣置於倒立顯微鏡下觀察其型態學之變化，結果如 Fig. 4，試驗為三重複，由於不同豬隻的 MoDCs 型態變化之觀察結果在各處理組間具有一致性，故任選其中一頭豬為代表。

經過 72 小時的 AFB<sub>1</sub> 作用，細胞的型態變化狀況與 48 小時所見相似，在低濃度的 0.001 (Fig. 4B)及 0.01  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組(Fig. 4C)，細胞與對照組類似，均貼附於培養皿，細胞大小不一，並具有典型的樹突狀結構。在 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 中間濃度下大多數細胞的型態仍然完整，但樹突較短且細胞常呈圓形，且已經可以於培養皿背景中觀察到少量明顯較細胞小的細胞碎屑出現(Fig. 4D)。至 1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組，於培養皿背景可以觀察到碎屑明顯增加，且細胞密度明顯下降，殘存的細胞大小不一，但樹突狀構造明顯的變短至幾乎消失，並失去貼附性(Fig. 4E)。於 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組，則觀察到大量的細胞碎屑，僅有少量的殘存細胞，細胞較圓且缺乏樹突結構，

並同樣失去貼附性(Fig. 4F)。



### 2-3 MoDCs 細胞存活率、細胞大小及顆粒性變化

試驗的進行與 PBMCs 的實驗方法相同，數值來源為 9 頭豬。豬隻 MoDCs 在無 LPS 存在下，經 AFB<sub>1</sub> 處理 48 小時後之存活率顯示於 Fig. 5A，由於存活率數值為百分比值，因此先將數值經正弦反函數轉換(arcsin transformation)，再進行統計分析。AFB<sub>1</sub> 各處理組間的存活率無明顯差異( $p = 0.1218$ )，由 0 – 10  $\mu\text{g/ml}$  各組之存活率分別為  $82.54 \pm 2.80\%$ 、 $84.52 \pm 2.68\%$ 、 $82.28 \pm 2.37\%$ 、 $81.29 \pm 3.09\%$ 、 $82.02 \pm 2.86\%$ 、 $82.23 \pm 2.75\%$ )，顯示 AFB<sub>1</sub> 在所測試的濃度下對 MoDCs 的存活率無顯著影響。

觀察流式細胞儀之散點圖 (Dotplot)，以前向散射光(Forward scatter, FSC)為 X 軸，側向散射光(Side scatter, SSC)為 Y 軸之圖像方式呈現，由於不同豬隻的 MoDCs 細胞散點圖之變化在各處理組間具有一致性，故任選其中一頭豬隻為代表作圖，發現隨 AFB<sub>1</sub> 濃度的增加，細胞的大小及顆粒性之分散性均呈下降趨勢，顯示細胞的顆粒性及大小皆漸趨一致，即細胞顆粒變少且型態變小(Fig. 5B)，此與前述型態學的變化一致。

### 2-4 MoDCs 抗原攝取及處理能力

豬隻 MoDCs 經 AFB<sub>1</sub> 及/或脂多醣 LPS 處理 48 小時後，攝取 DQ<sup>TM</sup> ovalbumin 抗原能力的變化情形，以任選其中一頭豬之 FL1 channel 直方圖為代表顯示於 Fig. 6A 及 6B 中。各試驗組細胞均於 37°C 進行測試，並安排一未經 AFB<sub>1</sub> 及 LPS 處理之細胞於 4°C 作用，由 CellQuest<sup>TM</sup> 程式自各處理組所收取之細胞螢光強度計算其幾何平均數，作為本實驗之數據來源。由於細胞於 4°C 時活性下降而較不具抗原攝取能力，因此以其螢光數值作為背景值，將作用於 37°C 之各試驗組的螢光數值扣去 4°C 背景值後進行分析，其結果列於 Fig. 6C 及 6D 中。在單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時，10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 處理組的螢光強度下降(曲線左移)至趨近於 4°C 對照組之螢光背景值(Fig. 6A)；而類似現象在同時給予 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 時也可觀察到(Fig. 6B)。

在本實驗中，是以 8 頭豬之結果進行分析，各處理組在扣去 4°C 背景值後，以 mean  $\pm$  SEM 表示之。結果顯示，在給予 LPS 後，細胞對於 DQ<sup>TM</sup> ovalbumin 的攝

入能力稍有下降，但未達統計上的顯著差異( $p = 0.0571$ )；在未給予 AFB<sub>1</sub> 條件下，LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  組與未添加 LPS 組的平均值分別為  $77.27 \pm 21.95$  及  $95.72 \pm 25.16$ 。但在有 AFB<sub>1</sub> 存在的條件下，無論是否同時給予 LPS，10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的螢光強度均出現顯著的下降( $p < 0.0001$ )，趨近於在 4°C 下的背景值。在單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時，各處理組變方分析達顯著差異( $p = 0.0002$ )，其中最高濃度之 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 處理組的螢光強度幾何平均值  $24.18 \pm 7.91$  顯著低於對照組  $95.72 \pm 25.16$  及其它 0.001 及 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組( $p < 0.05$ ) (Fig. 6C)。在同時給予 LPS 及 AFB<sub>1</sub> 時(Fig. 5D)，各處理組變方分析亦達顯著差異( $p = 0.0006$ )，與單獨給予 AFB<sub>1</sub> 處理時之結果相同，10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 及未添加 AFB<sub>1</sub> 組的平均值分別為  $21.17 \pm 6.96$  及  $77.27 \pm 21.95$ 。複因子分析顯示 AFB<sub>1</sub> 與 LPS 不具交互作用( $p = 0.8846$ )。

於倒立螢光顯微鏡下直接觀察細胞所呈現的螢光陽性率及強度，0  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 及 0  $\mu\text{g/ml}$  LPS 對照組(Fig. 7A) 及單獨給予 LPS 的 0  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 及 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 組(Fig. 7B)中，都可以觀察到大量的 MoDCs 細胞質中有明顯的綠色螢光物質。而在給予 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 的組別中，無論是否同時給予 LPS (Fig. 7C, 7D)，大多數細胞之細胞質內均不含綠色螢光物質，僅少數細胞帶有明顯低於對照組細胞其螢光亮度，且背景出現較多的碎片所產生的非特異性螢光。此結果顯示，在經過較高濃度的 AFB<sub>1</sub> 處理後，未成熟及成熟的 MoDCs 對於抗原的攝取或處理能力皆呈顯著的下降。

## 2-5 MoDCs 細胞表面抗原及細胞激素 mRNA 表現的變化

MoDCs 實驗中，可以使用炎症細胞素或來自病原菌的分子，如 LPS、CpG DNA 或 viral RNA，與 iDCs 所帶有的受體(innate receptor)結合而誘導 iMoDCs 的成熟。本研究參考犬 MoDCs 研究方式(Liu et al., 2007)，挑選 CD40、CD86、IL-12 及樹突細胞成熟時預期會有表現量上升的 CD83，以及 anti-inflammatory cytokine IL-10 做為檢測目標，以 real-time RT-PCR 方式檢測上述標的的 mRNA 表現量，以間接推估相同的蛋白表現。以單獨給予 AFB<sub>1</sub> 而無 LPS 處理，檢測 AFB<sub>1</sub> 對 iMoDCs 的影響，以及同時給予 AFB<sub>1</sub> 及 LPS 處理，檢測 AFB<sub>1</sub> 在 iMoDCs 成熟過程中的影響。在作用時間上的選擇，由於 mRNA 的表現相較於蛋白質最終產物，屬於較早期會發生的變化，因此參考 fumonisin 對人 DCs 的研究(Stockmann-Juvala et al., 2010)選



擇 6 小時及 24 小時的觀測結果進行判讀。

豬隻 MoDCs 經 AFB<sub>1</sub> 及/或脂多醣(LPS)處理 6 或 24 小時後之細胞表面抗原 CD40、CD83 及 CD86 (Fig. 8)，及細胞素 IL-10 及 IL-12p40 mRNA 表現量(Fig. 9) 的數值，均來自於 8 頭豬，以  $2^{-\Delta Ct}$  公式計算之數據表示細胞表面抗原及細胞素 mRNA 經 house-keeping gene GAPDH 校正後的表現量。

CD40、CD83 及 CD86 均是會在 DCs 成熟時表現量上升(upregulation)的表面抗原，其中 CD40 及 CD86 又是在與 T 細胞進行抗原呈獻過程中的 co-stimulator，因此可以用來評估 DCs 是否成熟且具有抗原呈獻的功能。在處理 6 小時時，CD40 及 CD83 的表現量在僅添加 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 處理組均高於未添加 LPS 的對照組；其中 CD40 在未添加 LPS 及添加 1  $\mu\text{g/ml}$  條件下，分別為  $0.00263 \pm 0.00097$  及  $0.03463 \pm 0.00674$ ，而 CD83 則分別為  $0.00018 \pm 0.00007$  及  $0.00168 \pm 0.00053$ 。此結果顯示，LPS 的確能夠促使 MoDCs 表現具抗原呈獻功能的表面抗原，往成熟的方向改變。

在單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時，就 CD40 而言，6 小時的結果顯示低濃度 0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組( $0.00816 \pm 0.00196$ )及中濃度 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組( $0.00558 \pm 0.00128$ )的表現量均高於對照組( $0.00263 \pm 0.00097$ )，其中 0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的表現量顯著高於對照組( $p < 0.05$ )及 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組( $0.00280 \pm 0.00042$ )。至 24 小時，則是最高濃度的 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組( $0.00880 \pm 0.00135$ ) 顯著高於對照組( $0.00221 \pm 0.00025$ ) 及其他處理組( $p < 0.05$ ) (Fig. 8A)。此結果顯示，AFB<sub>1</sub> 能夠促使 iMoDCs 表現較多的 CD40，但是較高濃度的 AFB<sub>1</sub> 在 CD40 mRNA 的表現上則有延遲的效應。

各 AFB<sub>1</sub> 處理組的 CD40 mRNA 表現量，若在同時給予 LPS 時，6 小時的結果顯示，除低濃度 0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組( $0.02282 \pm 0.00947$ )的表現量稍低外，其他處理組的表現量維持稍高，但各組均與對照組無顯著差異( $0.03463 \pm 0.00675$ )；至 24 小時，各 AFB<sub>1</sub> 組的 mRNA 表現量均隨時間而消退至低於 6 小時的數值，其中 0.001 及 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 處理組的表現量與對照組的表現量  $0.00853 \pm 0.000992$  相近無顯著差異，惟在 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組，與單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時所觀察的現象相同，則仍有較

高的表現量  $0.02419 \pm 0.00490$ ，且顯著高於對照組及其他 AFB<sub>1</sub> 處理組 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 8B)。

CD83 的 mRNA 表現模式與 CD40 相似，在單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時，6 小時的結果顯示低濃度  $0.001 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組 ( $0.00093 \pm 0.00015$ ) 及中濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組 ( $0.00084 \pm 0.00026$ ) 的 CD83 表現量均顯著高於對照組 ( $0.00018 \pm 0.00007$ ) ( $p < 0.05$ )；至 24 小時，CD83 表現量隨 AFB<sub>1</sub> 濃度上升而遞增，最高濃度的  $10 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組 ( $0.00163 \pm 0.00055$ ) 顯著高於對照組 ( $0.00038 \pm 0.00007$ ) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 8C)。此結果顯示，AFB<sub>1</sub> 能夠促使 iMoDCs 表現較多的 CD83，但是較高濃度的 AFB<sub>1</sub> 在 CD83 mRNA 的表現上則亦有延遲的效應。

CD83 的 mRNA 表現量在同時給予 LPS 及 AFB<sub>1</sub> 時 (Fig. 8D)，雖然各 AFB<sub>1</sub> 組的表現量與對照組皆未達顯著差異，且處理後 24 小時各組的表現量低於 6 小時的數值，但是 6 小時及 24 小時的波動模式相似，均可觀察到相同的圖形分布，即  $0.001 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組 (6 小時為  $0.00047 \pm 0.00010$ ，24 小時為  $0.00046 \pm 0.00009$ ) 的表現量均低於對照組 (6 小時為  $0.00168 \pm 0.00053$ ，24 小時為  $0.00082 \pm 0.00020$ )，而  $10 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的表現量 (6 小時為  $0.00232 \pm 0.00073$ ，24 小時為  $0.00129 \pm 0.00027$ ) 則稍高於對照組。

CD86 的 mRNA 表現量，在經 LPS 處理後 6 小時，與對照組相似，在未給予 AFB<sub>1</sub> 時， $0 \mu\text{g/ml}$  及  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 的表現量分別為  $0.00222 \pm 0.00118$  及  $0.00696 \pm 0.00377$ ，無統計上差異 ( $p > 0.05$ )；但其表現量在 24 小時  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS 處理組達  $0.00795 \pm 0.00178$ ，明顯較  $0 \mu\text{g/ml}$  LPS 對照組  $0.00316 \pm 0.00098$  為高 (Fig. 8E, 8F)。在單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時，各 AFB<sub>1</sub> 組在 6 小時的表現量雖略高於對照組，自  $0 - 10 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組分別為  $0.00222 \pm 0.00118$ 、 $0.00497 \pm 0.00256$ 、 $0.00415 \pm 0.00225$ 、 $0.00244 \pm 0.00118$ ，但因各組內均有相當大的變異，而與對照組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )；至 24 小時，AFB<sub>1</sub> 各組表現量較對照組高，特別是  $0.1 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組 ( $0.00772 \pm 0.00194$ ) 顯著高於對照組 ( $0.00316 \pm 0.00098$ ) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 8E)。當同時給予 LPS 及 AFB<sub>1</sub> 時，處理後 24 小時各組的表現量均高於 6 小時的數值，但各 AFB<sub>1</sub> 處理組皆與對照組無顯著差異 (Fig. 8F)。



依照單獨給予 AFB<sub>1</sub>(Fig. 8A, 8C, 8E)、同時給予 LPS 及 AFB<sub>1</sub>(Fig. 8B, 8D, 8F)，以及兩時間點分別進行 4 組 AFB<sub>1</sub> 處理之變方分析及處理組間比較。CD40 的 mRNA 表現量部分(Fig. 8A – B)，無論是否同時給予 LPS，兩時間點的 AFB<sub>1</sub> 處理組變方分析結果均達顯著，6 小時無 LPS 之  $p = 0.0037$ 、24 小時無 LPS 之  $p < 0.0001$ 、6 小時有 LPS 之  $p = 0.0494$  及 24 小時有 LPS 之  $p < 0.0001$ 。CD83 的 mRNA 表現量部分(Fig. 8C – D)，無論是否同時給予 LPS，兩時間點的 AFB<sub>1</sub> 處理組變方分析結果亦均達顯著，6 小時無 LPS 之  $p = 0.0017$ 、24 小時無 LPS 之  $p = 0.0065$ 、6 小時有 LPS 之  $p = 0.0108$  及 24 小時有 LPS 之  $p = 0.0030$ 。CD86 的 mRNA 表現量部分(Fig. 8E – F)，無論是否同時給予 LPS，AFB<sub>1</sub> 處理組變方分析結果在 6 小時均不顯著，而 24 小時則具顯著差異，6 小時無 LPS 之  $p = 0.0915$ 、24 小時無 LPS 之  $p = 0.0201$ 、6 小時有 LPS 之  $p = 0.1935$  及 24 小時有 LPS 之  $p = 0.0222$ 。

將細胞表面抗原 CD40、CD83 及 CD86 mRNA 表現量的變化，依時間點不同進行複因子變方分析，其中 CD40 的 mRNA 表現量，在處理 6 小時，AFB<sub>1</sub> 處理組間無顯著差異( $p = 0.2103$ )，而 LPS 處理組則具顯著差異( $p < 0.0001$ )，但 AFB<sub>1</sub> 與 LPS 間無交感作用( $p = 0.0728$ )；在處理 24 小時，AFB<sub>1</sub> 及 LPS 處理組則皆具顯著差異( $p < 0.0001$ )，且交感作用顯著( $p = 0.0039$ )。CD83 的 mRNA 表現量，在處理 6 小時，AFB<sub>1</sub> 處理組間無顯著差異( $p = 0.1865$ )，而 LPS 處理組亦具顯著差異( $p < 0.0001$ )，且 AFB<sub>1</sub> 與 LPS 間具交感作用( $p = 0.0015$ )；在處理 24 小時，AFB<sub>1</sub> 處理組間具顯著差異( $p < 0.0014$ )，而 LPS 處理組( $p = 0.4049$ )及 AFB<sub>1</sub> 與 LPS 間交感作用( $p = 0.2468$ )則皆不顯著。CD86 的 mRNA 表現量，在處理 6 小時，AFB<sub>1</sub> ( $p = 0.2417$ )及 LPS( $p = 0.4302$ )處理組皆無顯著差異，但 AFB<sub>1</sub> 與 LPS 間的交感作用則具顯著性( $p = 0.0487$ )；處理 24 小時，AFB<sub>1</sub>( $p < 0.0075$ )及 LPS( $p = 0.0094$ )處理組，以及兩者間的交感作用( $p = 0.0411$ )皆具顯著性。

在本研究中所檢測的兩項細胞激素中，IL-10 的 mRNA 表現量有較特別的變化模式。在 6 及 24 小時兩個時間點，均可觀察到 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的表現量與其他各處理組間具顯著差異；在給予 LPS 的組別，具較高的 IL-10 表現量，其中 6 小時之 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 組為  $0.01393 \pm 0.00167$ ，未給 LPS 之對照組為  $0.00152 \pm 0.00034$ ，

而 24 小時則分別為  $0.01489 \pm 0.00445$  及  $0.00136 \pm 0.00025$ 。在單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時(Fig. 9A)，處理 6 小時後的 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的 IL-10 mRNA 表現量  $0.000666 \pm 0.00018$  顯著低於對照組的  $0.00152 \pm 0.00034$  ( $p < 0.05$ )及其他處理組(0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組為  $0.00159 \pm 0.00035$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組為  $0.00138 \pm 0.00029$ ); 於處理 24 小時後, 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的  $0.00617 \pm 0.00137$  則顯著高於對照組的  $0.00136 \pm 0.00025$  及其他處理組 (0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組為  $0.00150 \pm 0.00033$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組為  $0.00129 \pm 0.00025$ ) ( $p < 0.05$ )。

在同時給予 LPS 及 AFB<sub>1</sub> 時(Fig. 9B)，處理 6 小時的 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的 IL-10 mRNA 表現量  $0.00472 \pm 0.00074$  也顯著低於對照組的  $0.01393 \pm 0.00167$  ( $p < 0.05$ )及其他處理組(0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組為  $0.01314 \pm 0.00117$ , 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組為  $0.01423 \pm 0.00211$ )，與單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時所觀察到的現象相同; 至 24 小時, 除與 0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的差異未達顯著外, 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的表現量  $0.02679 \pm 0.00795$  也顯著高於對照組的  $0.01489 \pm 0.00445$  及 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的  $0.02027 \pm 0.00595$ ，與單獨給予 AFB<sub>1</sub> 時所觀察到的現象相似。綜合 6 及 24 小時的結果, 無論是否給予 LPS, 均可觀察到相似的變化模式, 即 AFB<sub>1</sub> 似乎在作用初期會造成 MoDCs IL-10 mRNA 表現量的下降, 但當作用時間延長後, 則會促使細胞產生較高的 IL-10。

相較於本研究中所檢測的其他表面抗原及細胞激素, IL-12p40 的 mRNA 表現量在各處理組皆相當低, 因此在數據上出現相當大的變異, 但在處理 6 及 24 小時, 添加 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 的組別之表現量顯著高於未給予 LPS 的組別, 6 小時之 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS 組為  $0.00100 \pm 0.00080$ , 未給予 LPS 之對照組為  $0.00010 \pm 0.00002$ , 而 24 小時則分別為  $0.00046 \pm 0.00019$  及  $0.00011 \pm 0.00004$ 。此結果顯示, LPS 的確能夠促使 MoDCs 表現具增進抗原呈獻功能的細胞激素, 往成熟的方向改變。而無論是單獨給予 AFB<sub>1</sub> 或同時給予 AFB<sub>1</sub> 及 LPS, AFB<sub>1</sub> 在各處理組間的統計分析上, 皆無顯著差異。但無論是否同時給予 LPS, MoDCs 經過 24 小時的 AFB<sub>1</sub> 處理後, 在 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的 IL-12p40 表現量(LPS 0  $\mu\text{g/ml}$  : 1  $\mu\text{g/ml}$  =  $0.00016 \pm 0.00006$  :  $0.00106 \pm 0.00036$ )雖均較對照組(LPS 0  $\mu\text{g/ml}$  : 1  $\mu\text{g/ml}$  =  $0.00011 \pm 0.00004$  :  $0.00046 \pm 0.00019$ )及其他 AFB<sub>1</sub> 組別要稍高, 但均未達顯著( $p > 0.05$ )。

依照單獨給予 AFB<sub>1</sub>(Fig. 9A, 9C)、同時給予 LPS 及 AFB<sub>1</sub>(Fig. 9B, 9D)，以及兩時間點分別進行 4 組 AFB<sub>1</sub> 處理之變方分析及處理組間比較。IL-10 的 mRNA 表現量部分(Fig. 9A – B)，無論是否同時給予 LPS，兩時間點的 AFB<sub>1</sub> 處理組變方分析結果均達顯著，6 小時無 LPS 之  $p = 0.0005$ 、24 小時無 LPS 之  $p < 0.0001$ 、6 小時有 LPS 之  $p < 0.0001$  及 24 小時有 LPS 之  $p = 0.0016$ 。在 IL-12p40 的 mRNA 表現量部分(Fig. 9C – D)，無論是否同時給予 LPS，兩時間點的 AFB<sub>1</sub> 處理組變方分析結果則均不顯著，6 小時無 LPS 之  $p = 0.0668$ 、24 小時無 LPS 之  $p = 0.4875$ 、6 小時有 LPS 之  $p = 0.4876$  及 24 小時有 LPS 之  $p = 0.1720$ 。

將細胞激素 IL-10 及 IL-12p40 等 mRNA 表現量，依不同時間點進行複因子變方分析，IL-10 的 mRNA 表現量在處理 6 小時後，AFB<sub>1</sub>( $p < 0.0001$ )及 LPS ( $p < 0.0001$ ) 處理組及其交互作用( $p = 0.0002$ )均具顯著性；處理 24 小時後，AFB<sub>1</sub> 處理組間的差異不顯著( $p = 0.0628$ )，而 LPS 處理組的差異則顯著( $p < 0.0001$ )，但交互作用不顯著( $p = 0.7039$ )。IL-12p40 的 mRNA 表現量在處理 6 及 24 小時後，AFB<sub>1</sub> 處理組無顯著差異( $p = 0.7285$  及  $p = 0.1592$ )，LPS 處理組則均具顯著差異( $p = 0.0081$  及  $p < 0.0001$ )，但 AFB<sub>1</sub> 與 LPS 間均不具交互作用( $p = 0.7330$  及  $p = 0.3415$ )。

## 2-6 豬第二型環狀病毒量變化情形

豬 MoDCs 的 PCV2 病毒量檢測方式與 4-1.4PBMCs 中 PCV2 病毒量的檢測方式相似，但由於 MoDCs 細胞數量上的限制，因此固定每培養皿內均為  $10^5$  MoDCs/well 作為起始細胞量，而各處理組最後的 DNA 均固定溶於 100  $\mu$ l 的 AE 緩衝液中，取 4  $\mu$ l，即其中 1/25 進行 real-time PCR 之檢測。數值來源為 7 頭豬，分析方式同 4-1.4，均以經對數轉換之 copy 數進行統計分析及繪圖(Fig. 10)，在 13 週齡豬隻測得 MoDCs 的 PCV2 病毒量分布範圍自  $10^2$  至  $10^5$  不等，各組經 AFB<sub>1</sub> 處理 72 小時後，PCV2 copy number 經對數轉換後，變方分析結果為  $p = 0.0212$ ，小於顯著水準 0.05，但各組間比較顯示各組間皆未有顯著差異( $p > 0.05$ )。各組數值依序為：無 AFB<sub>1</sub> 處理之對照組  $4.30 \pm 0.29$ 、0.001  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 組之  $4.28 \pm 0.41$ 、0.01  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 組  $4.44 \pm 0.44$ 、0.1  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 組之  $4.02 \pm 0.45$ 、1  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 組之  $3.84 \pm 0.42$  及 10  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 組之  $3.87 \pm 0.40$ ，可以觀察到低濃度 AFB<sub>1</sub> 組(0.01 及 0.001  $\mu$ g/ml) 的 PCV2 病毒量稍偏高，而高濃度 AFB<sub>1</sub> 組(1 及 10  $\mu$ g/ml) 的 PCV2 病毒量則較為偏

低。



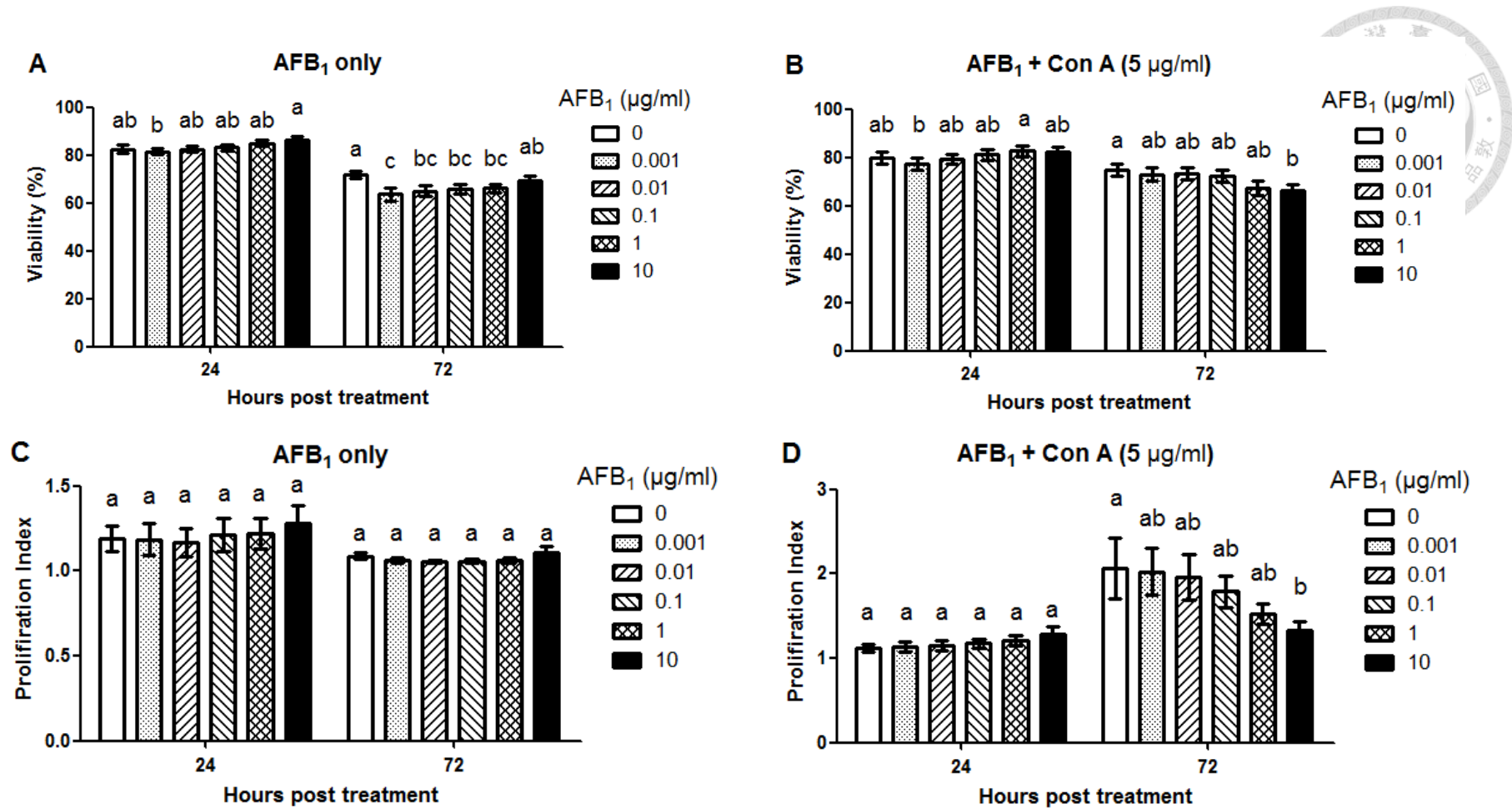


Fig. 1. Changes in the viability and proliferation index with time in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and/or concanavalin A (Con A). The data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) of 7 pigs (the viability was arcsin transformed for analysis, and back-transformed for presentation).<sup>a, b</sup> Values of different treatments at the same time point with different labels differ significantly (p < 0.05).

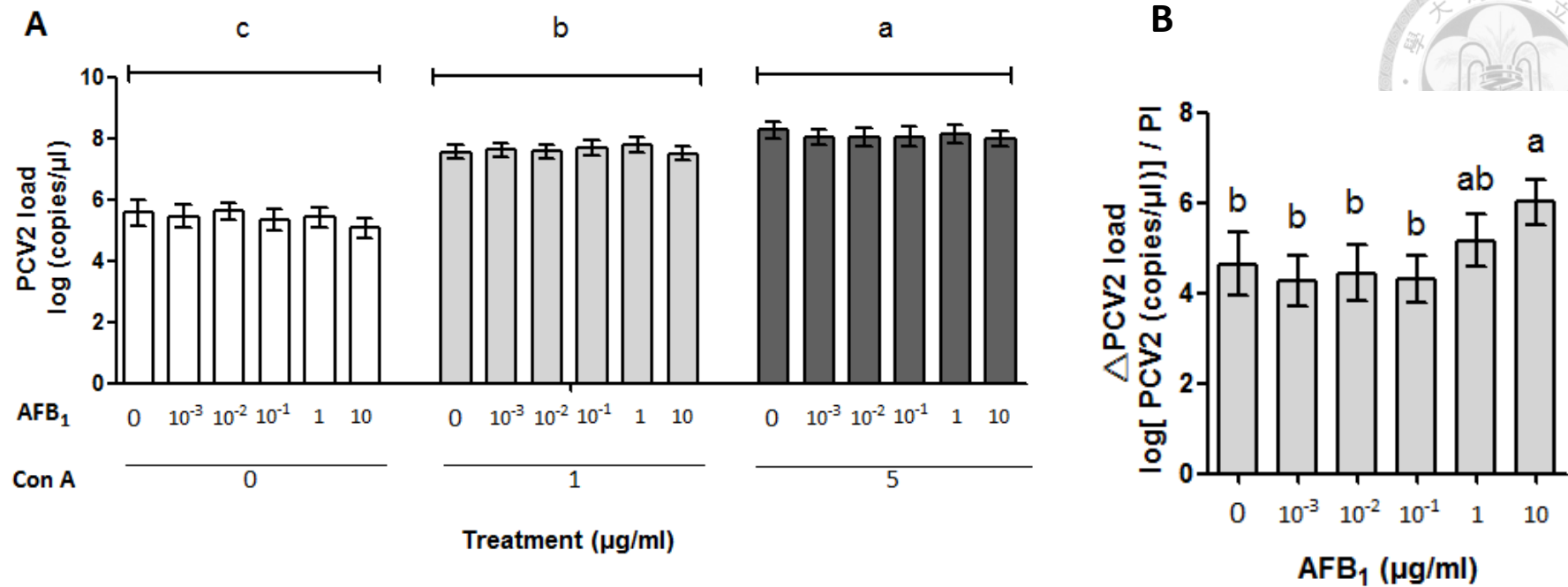


Fig. 2 Changes in the copy number of porcine circovirus type 2 (PCV2) genome in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and/or concanavalin A (Con A) for 72 hours. (A) Results of different combination of AFB<sub>1</sub> and Con A treatments. The data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) of 10 pigs. (B) Changes in adjusted PCV2 viral load (ΔPCV2 load) under different levels of AFB<sub>1</sub> in the presence of 5 µg/ml Con A. The ΔPCV2 load is the log transformed viral load divided by the corresponding proliferation index. The data are shown as mean ± SEM of 7 pigs. <sup>a, b, c</sup> Values with different labels differ significantly ( $p < 0.05$ ).



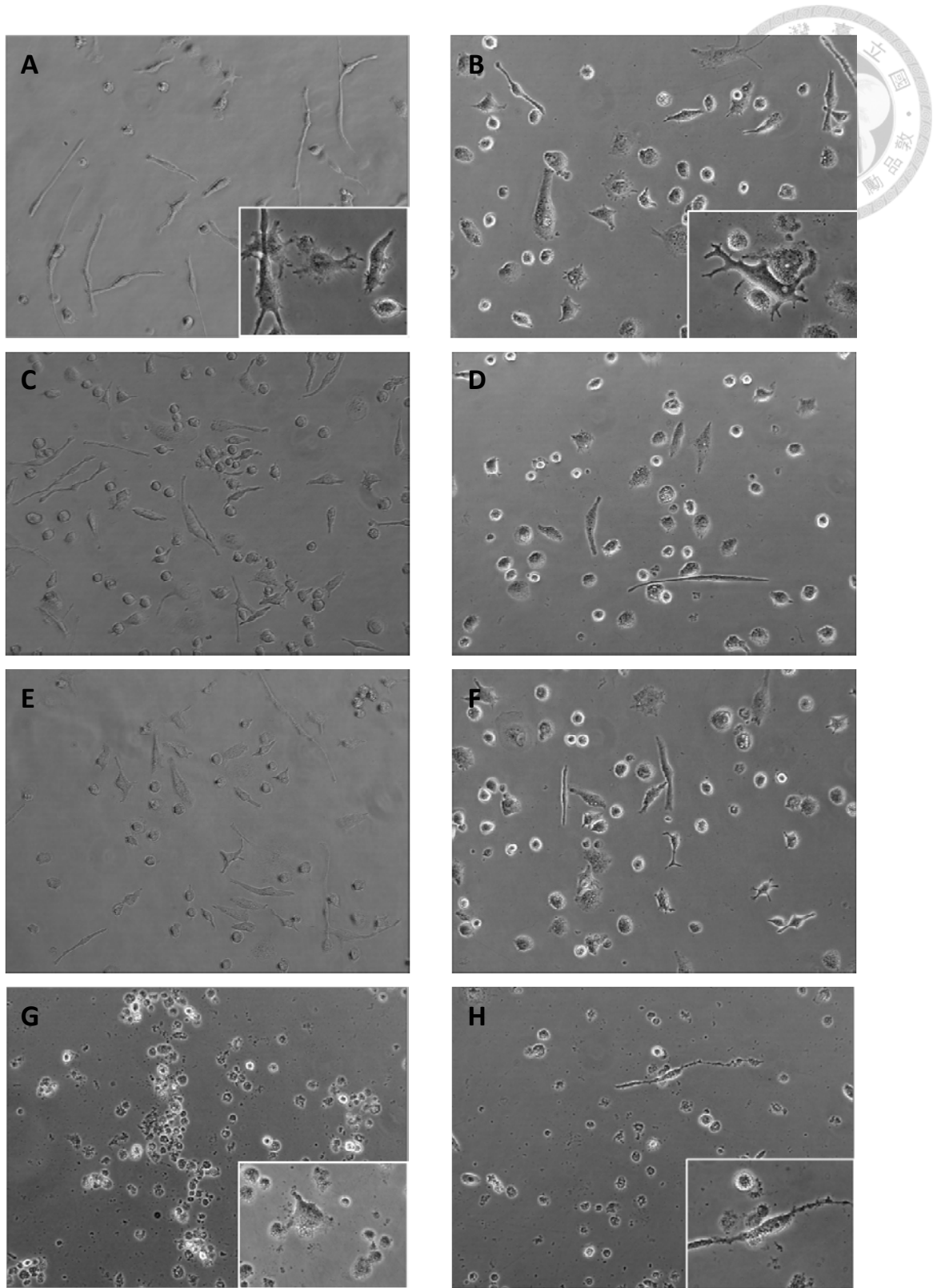
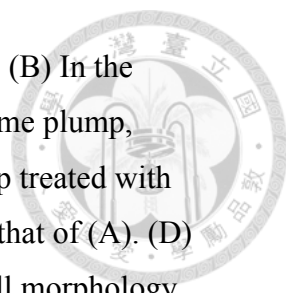


Fig. 3. Morphological changes of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 48 hours. Under the inverted microscope (×200), (A) the MoDCs in the control group (0 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 0 μg/ml LPS) have a



pleomorphic appearance, which are still adherent to the culture plate. (B) In the group treated with 0  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> and 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS, the MoDCs become plump, contain cytoplasmic granules, and have larger nuclei. (C) In the group treated with 0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> and 0  $\mu\text{g/ml}$  LPS, the cell morphology resembles that of (A). (D) In the group treated with 0.001  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> and 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS, the cell morphology resembles that of (B). (E) In the group treated with 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 及 0  $\mu\text{g/ml}$  LPS, the cells appear to be smaller and contain shorter dendrites. (F) In the group treated with 0.1  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> and 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS, the cell morphology resembles that of (B). (G) In the group treated with 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> and 0  $\mu\text{g/ml}$  LPS, the cells become rounded or fragmented, and completely detached from the culture plate. Much cell debris is noted in the background of the culture plate. (H) In the group treated with 10  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> and 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS, the cells become smaller, rounded to fragmented, with cell debris adherent to the cell membranes of the survived MoDCs. The majority of the cells have completely detached from the culture plate and much cell debris is noted in the background of the culture plate. Inset: higher magnification (400X) of the cells in the same group.

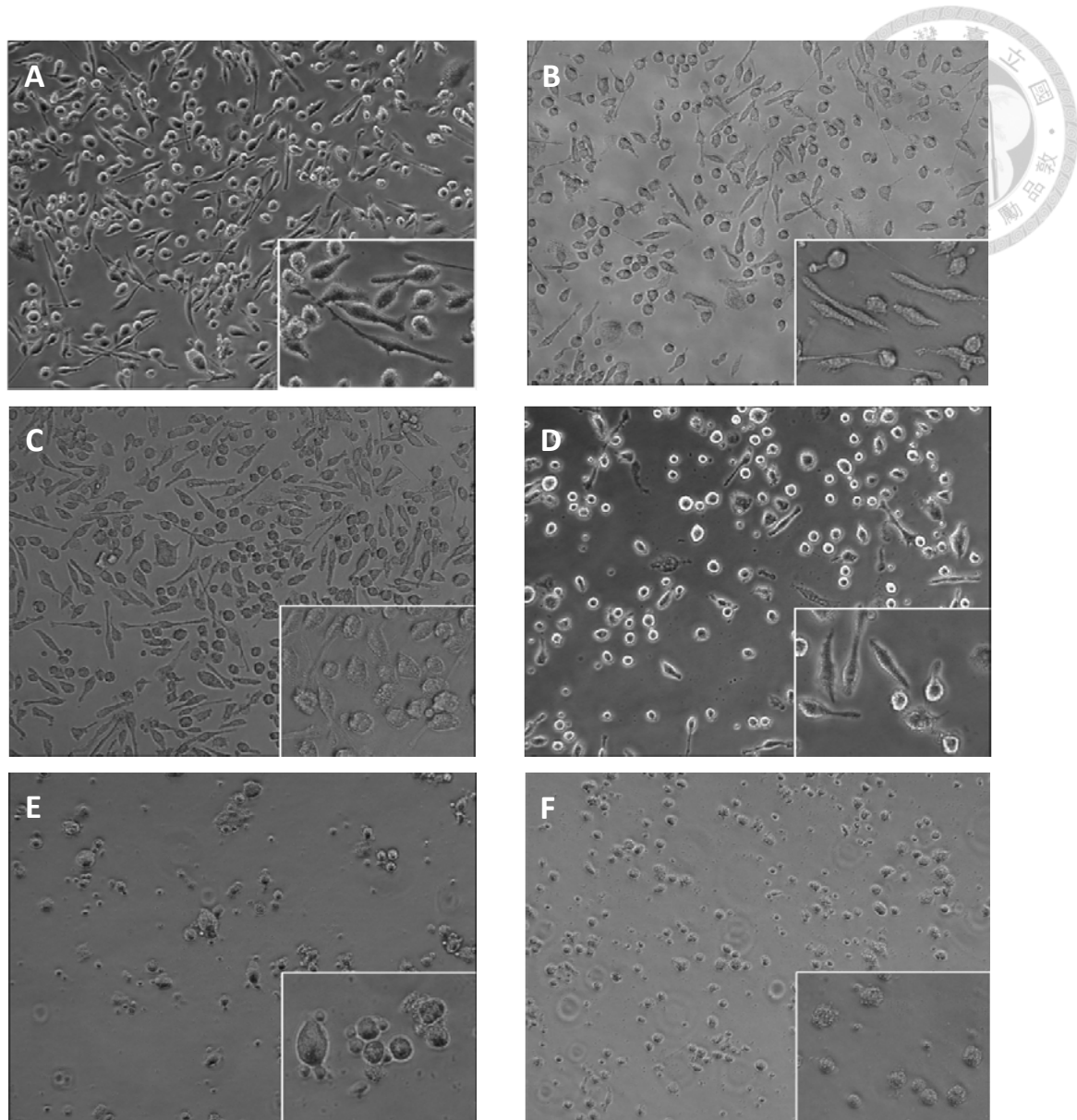
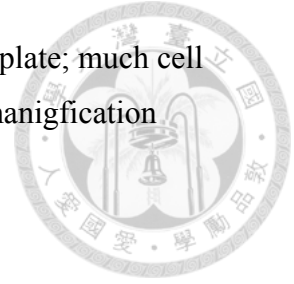


Fig. 4. Morphological changes of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> for 72 hours. Under the inverted microscope ( $\times 200$ ), the MoDCs in the control group ( $0 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub>) (A) have a pleomorphic appearance and contain long dendrites and are tightly adherent to the culture plate. In the groups treated with  $0.001$  (B) and  $0.01$  (C)  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub>, the cell morphology resembles that of (A). In the group treated with  $0.1 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> (D), some of the cells appear to be smaller or rounded and contain shorter dendrites. In the group treated with  $1 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> (E), there is marked decrease in the cell density and the remaining cells have prominent size variation, contain shorter dendrites, and become easily detached from the culture plate along with apparent fragmented cell debris. In the group treated with  $10 \mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> (F), cell density become less; the cell morphology of the remaining cells resembles that of E but

even smaller, fragmented, and completely detached from the culture plate; much cell debris is noted in the background of the culture plate. Inset: higher magnification (400X) of the cells in the same group.



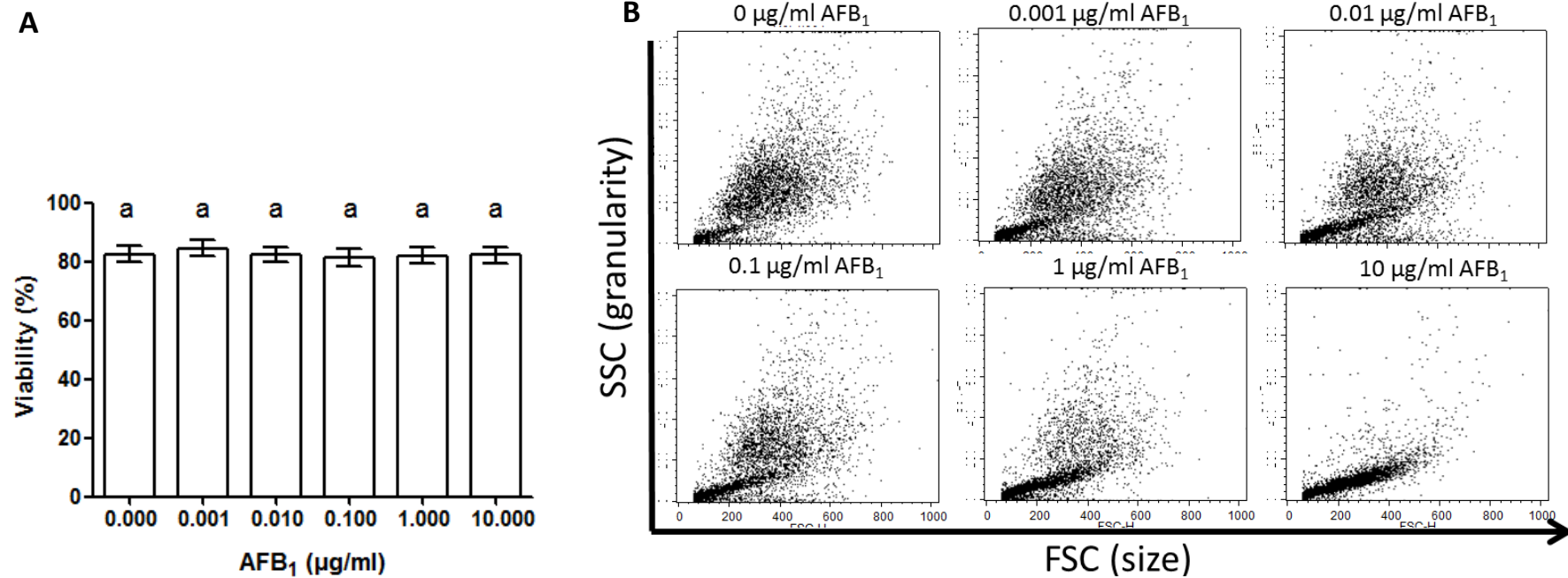


Fig. 5. Changes in the viability (A) and the size and granularity (B) of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) for 48 hours. (A) The data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) of 9 pigs (the viability was arcsin transformed for analysis, and back-transformed for presentation). (B) The dotplots of a representative pig show that the variation in size and granularity of the MoDCs decreases as the concentration of AFB<sub>1</sub> increases, indicating that the cells become smaller in size and contain fewer cytoplasmic granules. <sup>a</sup> Values of different treatments with same label are statistically insignificant ( $p > 0.05$ ).

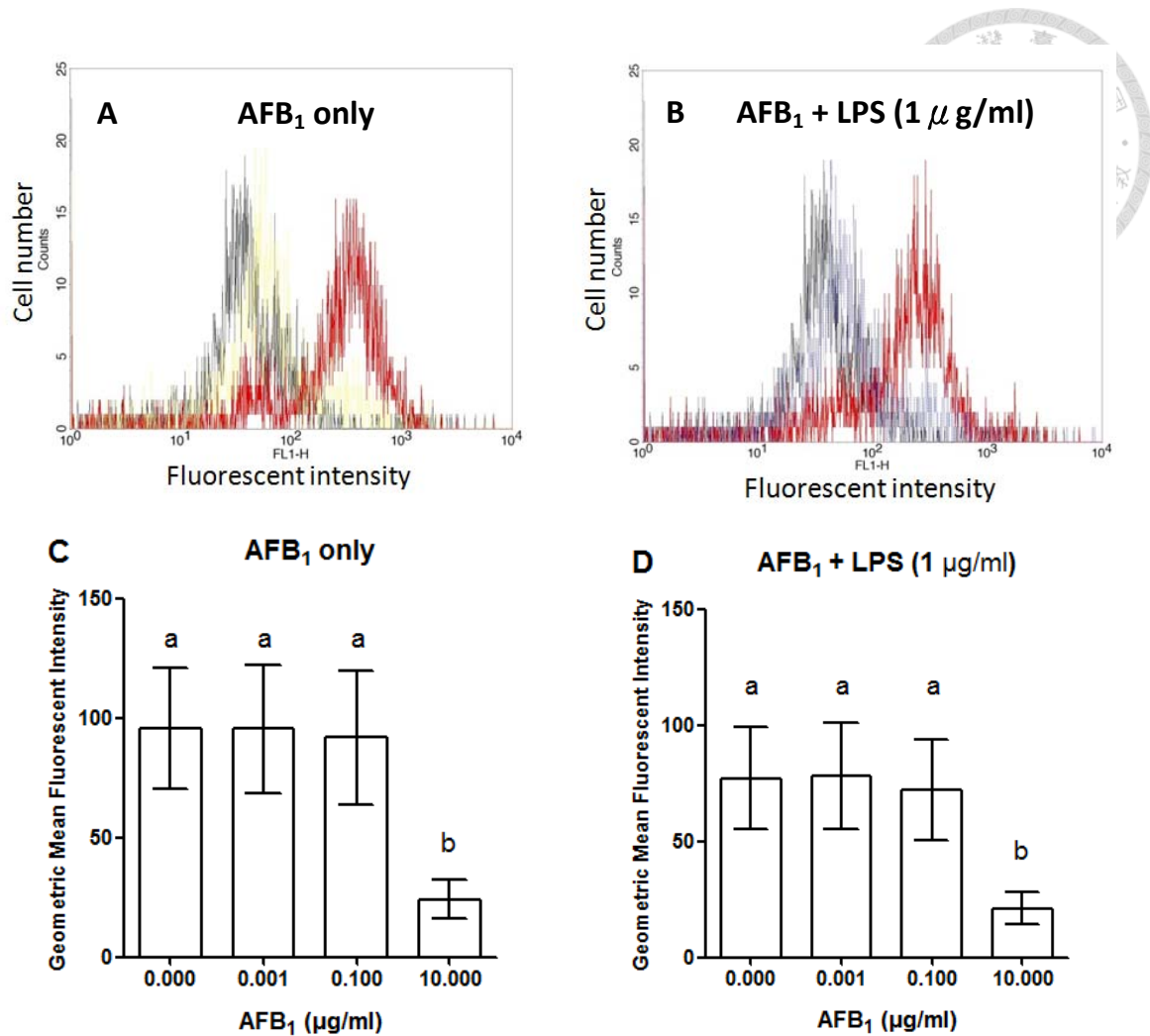
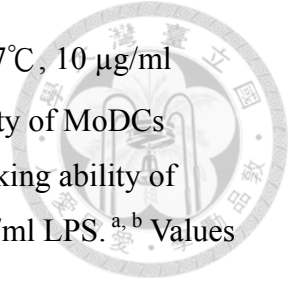


Fig. 6. Changes in the DQ<sup>TM</sup> ovalbumin uptaking ability of porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 48 hours by FACS analysis. Representative results from one pig out of a group of 8 pigs are shown (A and B). The summarized data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) of 8 pigs (C and D). (A) Comparing with the 37°C, 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> control group, the fluorescence intensity of 37°C, 10 μg/ml AFB<sub>1</sub>-treated group decreases (shift to the left), close to the 4°C, 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> control. Black outline: 4°C, 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> control group; red outline: 37°C, 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> control group; yellow outline: 37°C, 10 μg/ml AFB<sub>1</sub>-treated group. (B) In the presence of 1 μg/ml LPS, comparing with the group treated with 37°C, 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 1 μg/ml LPS, the fluorescence intensity of the group treated with 37°C, 10 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 1 μg/ml LPS decreases (shift to the left), close to the 4°C, 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 0 μg/ml LPS control. Black outline: 4°C, 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 0 μg/ml LPS control; red

outline: 37°C, 0 µg/ml AFB<sub>1</sub> and 1 µg/ml LPS group; blue outline: 37°C, 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> and 1 µg/ml LPS group. (C) The DQ ovalbumin uptaking ability of MoDCs treated with different levels of AFB<sub>1</sub>. (D) The DQ<sup>TM</sup> ovalbumin uptaking ability of MoDCs treated with different levels of AFB<sub>1</sub> in the presence of 1 µg/ml LPS. <sup>a, b</sup> Values with different labels differ significantly ( $p < 0.05$ ).



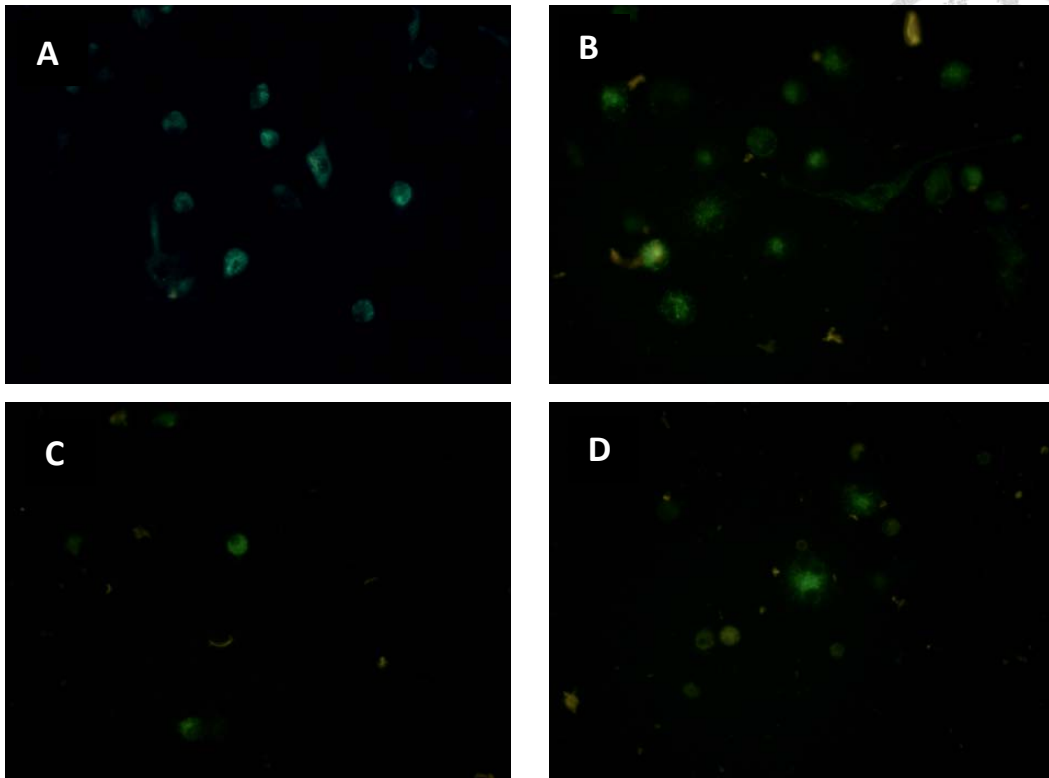


Fig. 7. Morphological observation of DQ<sup>TM</sup> ovalbumin uptake by porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) under the inverted fluorescent microscope (400X) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 48 hours. The cytoplasm of the majority of MoDCs in the control group (0 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 0 μg/ml LPS) (A) and in the group treated with 0 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 1 μg/ml LPS (B) contain bright, greenish fluorescence signals. In contrast, only a few MoDCs contain weak fluorescence signals in the groups treated with 10 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 0 μg/ml LPS (C) or 10 μg/ml AFB<sub>1</sub> and 1 μg/ml LPS (D).



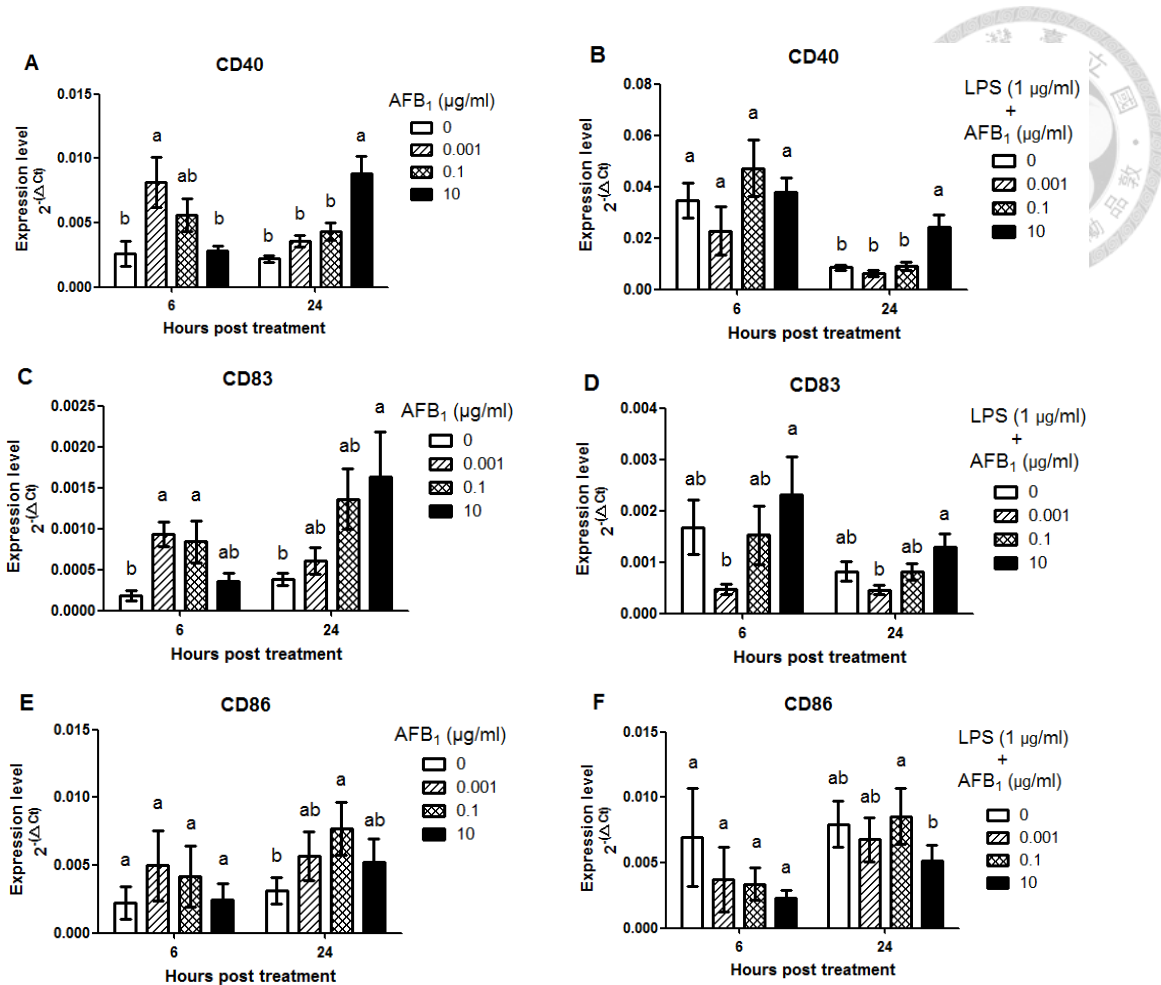


Fig. 8. The mRNA expression levels of CD40, CD83, and CD86 in porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 6 or 24 hours. The data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) of 8 pigs. (A, C, E) showing the CD40 (A), CD83 (C), and CD86 (E) mRNA expression levels of MoDCs treated with different levels of AFB<sub>1</sub> only. (B, D, F) showing the CD40 (B), CD83 (D), and CD86 (F) mRNA expression levels of MoDCs treated with different levels of AFB<sub>1</sub> in the presence of 1 µg/ml LPS. <sup>a, b</sup> Values of different treatments at the same time point with different labels differ significantly ( $p < 0.05$ ).

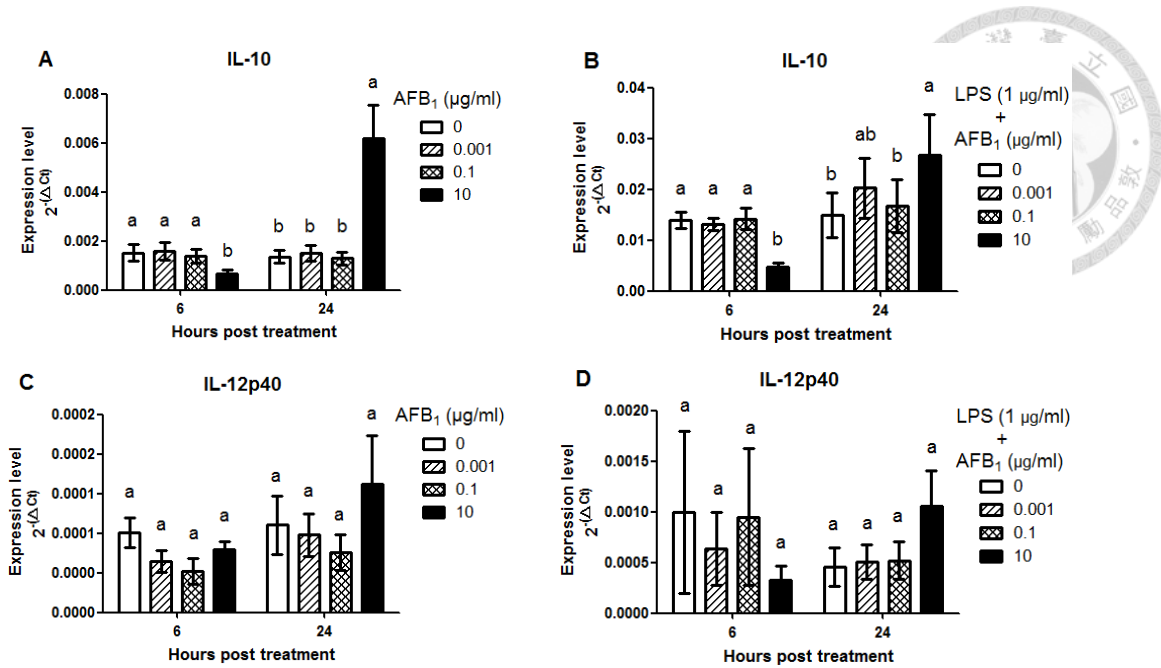


Fig. 9. The mRNA expression levels of IL-10 and IL-12p40 in porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of AFB<sub>1</sub> and/or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) for 6 or 24 hours. The data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) of 8 pigs. (A, C) showing the IL-10 (A) and IL-12p40 (C) mRNA expression levels of MoDCs treated with different levels of AFB<sub>1</sub> only. (B, D) showing the IL-10 (B) and IL-12p40 (D) mRNA expression levels of MoDCs treated with different levels of AFB<sub>1</sub> in the presence of 1 µg/ml LPS. <sup>a, b</sup> Values of different treatments at the same time point with different labels differ significantly ( $p < 0.05$ ).

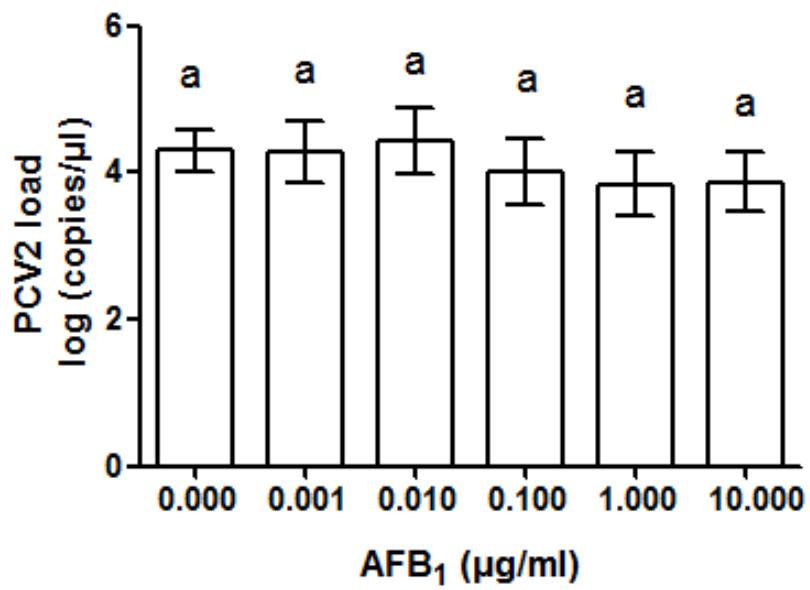



Fig. 10. Changes in the copy number of porcine circovirus type 2 (PCV2) genome in porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) for 72 hours. The data are shown as mean  $\pm$  SEM of 7 pigs.<sup>a</sup> Values of different treatments with same label are statistically insignificant ( $p > 0.05$ ).

## 第五章 討論




由於在黴菌毒素污染飼料前必先有適宜環境讓黴菌增殖及製造黴菌毒素，因此黴菌毒素污染所涉及的範圍將受到黴菌菌落生長分布的影響，因而造成在同一批飼料中會有黴菌毒素污染濃度不均的現象，因此本研究在 AFB<sub>1</sub> 的使用劑量上，以 10 的倍數為一稀釋單位，以擴大 AFB<sub>1</sub> 之受檢測劑量範圍；但由於自豬隻個體採得新鮮豬血所能分離之血球數量有限，而限制實驗所能檢測之總樣本數量，因此本研究主要選用 0.001 – 10 µg/ml 的濃度做為檢測範圍。相較於牛 PBMCs 經 *in vitro* AFB<sub>1</sub> 作用後第七天的存活率高於第二天的現象(Bernabucci et al., 2011)，本實驗的結果顯示隨 AFB<sub>1</sub> 作用時間的增長，豬 PBMCs 的存活率會隨之下降；若同時給予 5 µg/ml Con A，經過 72 小時 PBMCs 的存活率隨著 AFB<sub>1</sub> 濃度的上升而顯著下降。推測在同時給予 Con A 而使免疫細胞活化時，可能因細胞在增殖過程中 AFB<sub>1</sub> 干擾了細胞核酸及蛋白質等重要分子的合成及功能(McLean et al., 1995)，導致細胞增殖時出現較多錯誤而增加了細胞的死亡率。相較於豬肺泡巨噬細胞(AMs)在 0.1 µg/ml AFB<sub>1</sub> 的濃度下即造成 50% 的死亡率(Liu et al., 2002)，豬 PBMCs 對 AFB<sub>1</sub> 的耐受性可能較 AMs 高，但也可能是因為檢測存活率的實驗方法及溶解 AFB<sub>1</sub> 的溶劑上與該文獻有所不同而造成差異，該文獻中使用 methanol 溶解 AFB<sub>1</sub>，但未在文中提及溶劑對照組(vehicle control)的結果，因此無法排除由 methanol 所造成的細胞毒性，而本研究中所使用溶劑 DMSO 在 AFB<sub>1</sub> 10 µg/ml 最高濃度組的 DMSO 含量為 0.6%，低於會降低人 PBMCs 的 T 細胞反應(T cell response)(Kloverpris et al., 2010)或引起 Burkitt's lymphoma 細胞 apoptosis(Lin et al., 1995)的 2 % DMSO，也低於同為 AFB<sub>1</sub> *in vitro* 研究中，對牛單核吞噬細胞(mononuclear phagocytes)所用之 1% DMSO (Kurtz et al., 1992)。

由於 AFB<sub>1</sub> 具環狀結構，需要以有機溶劑才能溶解，文獻中常用的溶劑主要以 methanol (Liu et al., 2002; Rossano et al., 1999)及 DMSO (Kurtz et al., 1992)為主，甚至部分文獻未提及泡製所用的溶劑(Bernabucci et al., 2011; Bianco et al., 2012)。雖然 DMSO 的細胞毒性較 methanol 為低，然而由於 DMSO 也被用作細胞冷凍時的抗凍劑或臨床上骨關節炎、類風濕性關節炎、慢性胰炎及神經損傷等疾病的消炎之用



(Santo et al., 2003)，因此其對於細胞通透性的影響以及對於免疫的影響不可忽視。DMSO 對細胞通透性的影響，可能會干擾病毒進出細胞、細胞存活率及細胞內抗原的染色性等檢測結果，雖然 DMSO 在細胞及分子階級的效應較不清楚，但近年來已有一些研究開始針對 DMSO 對細胞及分子層級的影響進行探討(Hollebeeck et al., 2011)。DMSO 對人 PBMCs 的研究顯示，雖然短時間的接觸不會造成細胞的死亡，但長時間的接觸下，即使是低濃度如 0.2–0.3% 的 DMSO，仍然會增加細胞的死亡率並降低 T 細胞的增殖能力，而該研究也認為與 DMSO 的接觸時間長短比接觸劑量要來得重要，相較於 1 小時的接觸時間，PBMCs 暴露於 1.25–2.5 % DMSO 6 小時，會降低 T 細胞對多肽刺激後的增生反應(peptide-specific T cell response)(Kloverpris et al., 2010)。使用濃度介於 0.05–1% 的 DMSO 處理腸細胞株 Caco-2 cell 的結果發現，雖然該研究使用 1% 的 DMSO 並不會造成細胞死亡，但隨 DMSO 劑量的增加，會降低其 IL-6 及 MCP-1 的分泌，而 0.5% 的 DMSO 會顯著的降低 IL-6、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 COX-2 之 mRNA 表現量(Hollebeeck et al., 2011)。於本研究中所使用的 DMSO 量，在 10  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 組中之最終比例為 0.6%，雖然檢測結果顯示此濃度下 DMSO 不會造成豬 PBMCs 存活率的影響，但對照文獻可能仍有對豬 PBMCs 細胞激素 mRNA 表現量造成影響的風險。

在細胞增殖能力的檢測上，相較於傳統的放射性同位素檢測方法 (radioisotope-based assay)，CFSE 染色需要的勞力及成本皆較少，且能與其它螢光分析實驗同時進行，有助於分析不同淋巴球次族群的分裂狀況，因此本研究使用 CFSE 進行細胞增殖能力的分析。由於 AFB<sub>1</sub> 主要的免疫毒性在細胞媒介性免疫，因此已有許多相關研究針對 AFB<sub>1</sub> 對細胞增殖能力影響進行探討，但 AFB<sub>1</sub> 對 Con A 所造成的淋巴球增殖之影響卻有許多研究結果上的分歧。在平均體重 17.5 公斤的生長豬隻之飼料中，添加 2.5 mg/kg (2.5 ppm) 的 AFB<sub>1</sub> 餵飼 35 天，以及每日餵飼二月齡兔子含 2 ppm AFB<sub>1</sub> 的飼料 12 週後，都可觀察到淋巴球對 phytohemagglutinin 或 ConA 造成的細胞增殖能力有下降的現象(Dimitri et al., 1996; Harvey et al., 1995)。但在 Meissonnier 等人(2008) *in vivo* 的實驗設計中，是給離乳豬隻食用含濃度分別為 385 (0.385 ppm)、867 (0.867 ppm) 及 1807 (1.807 ppm)  $\mu$ g/kg AFB<sub>1</sub> 濃度的飼料 28 天，觀察到各組豬隻 PBMCs 對於致裂原 Con A 的刺激效應無明顯的組間差異，而該研究同時進行針對抗原特异性細胞增殖能力的檢測，即於實驗第 4 及 15 天分別



進行 ovalbumin 的注射，並於 *in vitro* 使血球再次接觸 ovalbumin 以刺激細胞增生，研究發現淋巴球的細胞增殖能力會隨 AFB<sub>1</sub> 劑量上升而減弱，因而推測細胞增殖能力的減弱僅出現於 ovalbumin 等抗原特異性的刺激增生反應，對 Con A 這種較非特異性的刺激則沒有明顯影響，故 AFB<sub>1</sub> 對細胞媒介性免疫的影響可能是在較上游的抗原呈獻細胞，而非下游的淋巴細胞。然而在本研究中，觀察到隨著 AFB<sub>1</sub> 濃度的增加，豬 PBMCs 的增殖指數會隨之下降，因此位於細胞媒介性免疫下游的淋巴球本身，其增殖能力應該還是會受到 AFB<sub>1</sub> 的直接影響而減弱。

在本研究中也觀察到豬隻對 AFB<sub>1</sub> 反應的個體差異，在 PBMCs 存活率及細胞增殖能力試驗中所使用的 7 頭豬，若單獨觀察各頭豬的實驗數值後，發現其中 1 頭豬的 PCV2 病毒量、細胞增殖及細胞存活率的結果與其他 6 頭不同，因此將 7 頭豬的數值去除較特殊的 1 頭後，將 6 頭豬的結果以同 Fig. 1 的格式呈現在附錄之 Fig. 11，並將數值較特殊的豬隻數據單獨製表(參附錄)。結果發現這頭豬隻在 Con A 處理後的細胞增殖指數數值明顯較其他頭豬為高，而在 AFB<sub>1</sub> 處理後，也顯著的隨毒素劑量增加而出現細胞存活率及增殖指數下降的現象；其他 6 頭豬的數據則顯示即使是最高濃度 AFB<sub>1</sub>，仍然對具 PBMCs 的存活率的影響無顯著差異性，顯示這些豬隻的 PBMCs 對 AFB<sub>1</sub> 的毒性較不敏感，而同時給予 Con A 時，經過 72 小時的 AFB<sub>1</sub> 處理後，可以發現細胞增殖能力在 0.001 μg/ml 低濃度 AFB<sub>1</sub> 組有上升的現象，而隨 AFB<sub>1</sub> 濃度上升而逐漸下降，顯示低濃度 AFB<sub>1</sub> 對 PBMCs 增殖有促進的作用。以上結果顯示，該頭較特殊的豬對於 AFB<sub>1</sub> 的感受性較其他 6 頭豬明顯要來得高，因而推論在黴菌毒素的毒性研究中，個體的感受性是需要被考量的，特別當個體對黴菌毒素的感受性偏高，則可能出現免疫抑制及臨床症狀的產生。


在檢測細胞內 PCV2 病毒量的實驗中，致裂原 Con A 處理的結果與文獻相符合，經過 Con A 的處理後，淋巴球因活化有增殖的現象，同時 PCV2 genome 的 copy number 也隨之而增加(Lin et al., 2008)。然在本研究的先導實驗中，曾觀察到有少部分豬隻之 PBMCs 在 Con A 處理下並無增殖指數及病毒量上升的現象，抑或在 PBMCs 以 real-time PCR 檢測未偵測到 PCV2 核酸之豬隻，再於 *in vitro* 條件下進行 PCV2 攻毒後，雖然 Con A 的給予會導致 PBMCs 的增殖，但 PCV2 的核酸量卻無上升的現象；針對前者的推測是豬群中可能亦有少數個體的 PBMCs 對 Con A 不

敏感，而後者則可能與豬隻個體細胞對 PCV2 感受性不佳有關。但由於豬群中大部分豬隻對 Con A 的處理均有 PBMCs 的活化與增殖的典型效應及 PCV2 病毒量上升現象，因此本研究在觀察豬隻 PBMCs 對 AFB<sub>1</sub> 的反應時，會先觀察該 PBMCs 是否對 Con A 刺激有活化的現象，而實驗中所使用的 PBMCs 均有 Con A 活化前後的差異可供比較。

Tischer 等人(1987)以 D-glucosamine 延長 PK-15 細胞的 S 期，可以使人工培養 PCV2 病毒得到較高的病毒力價，此發現除使 PCV2 人工培養方式能藉由 D-glucosamine 添加以增進病毒產量外，並藉此證明環狀病毒的複製與宿主細胞之細胞週期(cell cycle)有密切關係。因為 PCV2 為小型病毒，且不具有轉譯(encode)複製酶的基因，因此病毒須需要於宿主細胞進入 S 期時，利用宿主細胞核內的 DNA polymerase 方能進行複製，以完成整個複製過程(Darwich et al., 2004)。由於 AFB<sub>1</sub> 毒性與核酸及蛋白質合成有關，且文獻指出 AFB<sub>1</sub> 能使細胞停留在細胞分裂過程的 S phase (Bianco et al., 2012)，因此本研究亦推測 AFB<sub>1</sub> 若能使細胞停留在 S phase 則能有助於延長 PCV2 利用宿主 DNA polymerase 的時間。在小鼠巨噬細胞細胞株的研究中(Bianco et al., 2012)，觀察到會使細胞停留在 S phase 的 AFB<sub>1</sub> 濃度為 50  $\mu$ M，換算後約為 16  $\mu$ g/ml，對照本研究中觀察到 10  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 會造成 PBMCs 的細胞增殖現象下降，但處理組中細胞內的病毒 genome 總量卻維持與對照組一致的現象，推測上述現象是可能存在的。

在本研究中，除了在 PBMCs 的  $\Delta$ PCV2 load (Fig. 2B)觀察到 10  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 高濃度組的單位細胞中 PCV2 病毒量可能較高之外，在針對豬 MoDCs 的細胞內 PCV2 病毒量檢測上，也觀測到類似的現象。如 Fig. 4 所示，在本研究中進行 MoDCs 的形態學觀察及後續細胞核酸萃取前，培養皿中的培養液都會先經過低速離心後，置換為 DPBS，而在 0.1 – 10  $\mu$ g/ml 濃度的 AFB<sub>1</sub> 組，可以觀察到細胞形態漸進性的改變為較小、較圓或甚至出現較多的細胞碎屑，顯示 MoDCs 有死亡及溶解的情形，由於死後細胞中的病毒可能會釋放至培養液中，因此在有較多 MoDCs 死亡的 AFB<sub>1</sub> 高濃度處理組所檢測到的 PCV2 核酸來源，應該主要還是來自存活之細胞，以及黏附在細胞表面及細胞碎屑的 PCV2 為主，對照 Fig. 10 所檢測之 MoDCs 細胞內 PCV2 病毒量結果，可以推測 1 – 10  $\mu$ g/ml AFB<sub>1</sub> 高濃度組雖會造成 MoDCs 死亡，

但似乎也有提高單位細胞內病毒量的傾向。




綜合本研究中 PBMCs 三個試驗之結果，細胞的存活及增殖能力可能會受 AFB<sub>1</sub> 影響而受損，然而由於細胞來源是 PCV2 次臨床感染的豬隻，因此 PBMCs 細胞內本身帶有的 PCV2 病毒效應也需要被考慮，由於致裂原 Con A 處理 PBMCs 後，會造成單位培養皿中的 PCV2 genome 總量增加，又由於 PMWS 的典型病變為淋巴球減少症(lymphopenia)，因此在高濃度的 AFB<sub>1</sub> 處理組所觀察到的淋巴球增殖能力下降的現象，也可能與 PCV2 的感染淋巴細胞有關，即前述所推論因刺激原如 Con A 的活化使淋巴球在進行細胞分裂的準備過程中，如 AFB<sub>1</sub> 的存在劑量適當，會導致淋巴細胞在分裂過程中停滯於 S 期的時間拉長，而使得 PCV2 有機會增加複製機會，細胞處在含高量 PCV2 的情形下，也可能會影響細胞的存活而造成淋巴球的減少，進而有機會增進臨床上所觀察到的二次性感染增加之現象。而 PCV2 雖然在 DCs 內不具明顯的複製(Vincent et al., 2003)，但由於 AFB<sub>1</sub> 處理實驗可能影響了 MoDCs 之核酸及蛋白質階層之完整性及功能，因此在細胞修補 DNA 傷害的期間就可能有機會使 PCV2 利用細胞 DNA 聚合酶進行複製。

DC 的存活率試驗係參考 Bimczok 等人(2007)所使用的方法，採用 propidium iodide (PI) 染色後以流式細胞儀觀察，結果顯示各 AFB<sub>1</sub> 組的存活率皆相近，與對照組無顯著差異，相較於 Bimczok 等人(2007)以 DON 處理豬 MoDCs 在 800 ng/ml 即能造成細胞毒性，可能表示在不同黴菌毒素毒性或細胞死亡的機制上有需要探討之處。以倒立螢光顯微鏡觀察以及以流式細胞儀觀察 MoDCs 的大小及顆粒性，均可以觀察到細胞型態隨 AFB<sub>1</sub> 濃度上升有明顯的變化。在 10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 組無論是否同時給予 LPS，流式細胞儀散點圖中細胞的顆粒性及大小皆下降，對照 AFB<sub>1</sub> 處理 48 及 72 小時的形態學變化，推測本實驗中所選用的兩個時間點在 1-10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 組應都已經有許多細胞可能處於變性或死亡的狀態，並有細胞溶解成碎屑。在本研究中細胞存活率的實驗方法，是以 PI 能否染上細胞核酸以判斷細胞的存活與否，但因為 PI 判讀結果與形態學觀察結果不同，推測在 AFB<sub>1</sub> 處理細胞 48 小時後細胞已經死亡破碎使流式細胞儀在定義細胞大小及顆粒性時將其判為雜質而予以剔除所致。而 PI 的檢測值事實上應該為資料分析當時尚接近正常細胞大小的細胞存活狀況，若在偵測時間前即已溶解成斷片的細胞則將無法被



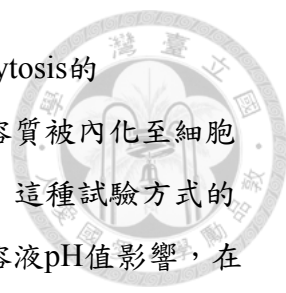
計入。



由於以 PI 染色方式檢視細胞存活率會有無法偵測細胞碎屑的盲點，因此在存活率檢測方式的檢討上，若欲以 PI 檢測細胞存活率，可能需要有較多的時間點組合，在實驗設計上須觀察 AFB<sub>1</sub> 處理後 6、12、24 小時等較多且較密集的時間點，但如此一來，若想兼顧同一細胞來源的一系列變化，即監測同一頭豬隻的 MoDCs 在各時間點的變化，則將較為耗費人力，且將需要較大量的 MoDCs，也就是較多起始血液量以獲取較多的 PBMCs。若以傳統 trypan blue 染色計算細胞存活率，需要先將所有處理後的細胞自培養皿中洗下，以計算在仍保有完整細胞型態的細胞中，trypan blue 染色陽性及陰性細胞所佔比例，以換算細胞的存活率，這種方式僅能在細胞死亡早期，細胞膜通透性已改變且仍然具有細胞型態的狀態下，才能被算為死細胞，而已經溶解成細胞碎屑的細胞需要比較實驗初始及處理後的細胞數才能推估，由於與 AFB<sub>1</sub> 作用後的細胞需要以細胞計數盤計數，因此也會需要較 PI 染色更大量的 MoDCs。以檢測細胞酵素活性的方式如 MTT 及 MTS 法偵測細胞存活率，雖然在細胞酵素活性一致的前提下，其呈色強度會與細胞數呈正相關，而能忠實反映培養皿中的細胞數，然而實驗所使用的 AFB<sub>1</sub> 對細胞而言會影響其核酸及蛋白質合成，因此將可能影響細胞活性，而使 MTT 的結果所反映的是細胞死亡及細胞活性降低兩種現象的加總結果，而無法單純的檢測細胞存活率。


Bernabucci 等人(2011)以 0、5 及 20  $\mu\text{g/ml}$  等濃度的 AFB<sub>1</sub> 以 *in vitro* 方式處理牛 PBMCs 兩天或七天，並使用 XTT assay 方式檢視細胞存活率，發現第七天之細胞存活率高於第二天，且 20  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 組的存活率顯著高於 5  $\mu\text{g/ml}$  AFB<sub>1</sub> 及對照組。雖然該文獻中認為高濃度 AFB<sub>1</sub> 使細胞存活率增加的現象是與細胞增殖有關，但或許也需要考慮可能因 AFB<sub>1</sub> 干擾細胞蛋白質活性，而有存活率判讀上的誤差。另一協助解釋 PI 存活率結果的方式，可採用 Annexin V/PI 檢測細胞 apoptosis 的狀態，同時分析與細胞 apoptosis 相關之 mRNA 表現，如 Bcl 6、Fas、caspase 3 等基因。

抗原攝取能力及胞飲作用(Endocytosis)是未成熟DCs(iDCs)的重要特徵，這種能力會隨細胞成熟而下降(Sallusto et al., 1995)。由於抗原的攝取是DCs作為APCs所需具備的重要功能，因此評估該項功能是DCs研究中的重要項目，亦即此能力的下降可能是來自於iDCs的成熟，或是功能受損。在DCs攝取抗原的機制中，有非特



異性胞飲作用及受體媒介性吞噬作用兩種，傳統用來評估endocytosis的 FITC-dextran，是將細胞置於含有FITC-dextran的溶液中，依照溶質被內化至細胞的多寡所反映在螢光上的強度，可以比較細胞攝入抗原的多寡，這種試驗方式的主要缺點在於其螢光背景值高，且螢光物質表現的強度易受到溶液pH值影響，在本研究之先導試驗中，也同樣曾觀察到其高螢光背景值的現象。在本研究中，因此選擇DQ<sup>TM</sup> ovalbumin作為抗原攝取能力的測試物質，DQ<sup>TM</sup> ovalbumin是屬於需要受體才能進入細胞的抗原，受體為mannose receptor，由於螢光需要經過細胞內酵素將蛋白質切割後才會出現，因此可以反映細胞攝入(uptaking)到處理(processing)抗原一系列的能力，對於評估未成熟樹突細胞處理抗原的功能有較完整的觀測，且因為螢光需要經過細胞處理後才會產生，而其螢光物質又較不受環境pH值影響，因此具有低螢光背景值的優點。在本實驗中，經給予iMoDCs LPS後，細胞對於DQ<sup>TM</sup> ovalbumin的攝入能力有下降的現象，此下降雖未達統計上的顯著差異，但與文獻相符(Bimczok et al., 2007)，顯示iMoDCs經過LPS處理後，確實會有抗原攝取能力的下降，而此可能與細胞的趨向成熟有關。但在對於AFB<sub>1</sub>的反應上，由於DQ<sup>TM</sup> ovalbumin攝入能力的大幅下降現象出於iMoDCs及mMoDCs的10 µg/ml AFB<sub>1</sub>高濃度組，且下降的幅度遠超過MoDCs成熟過程所造成的影響幅度，對照型態學觀察發現MoDCs的樹突結構幾乎消失，可以推論高濃度AFB<sub>1</sub>對MoDCs抗原接觸相關的樹突結構及抗原攝取及處理能力均會產生顯著性的傷害，失去面對抗原時的重要功能。相較於DON在400 ng/ml即會造成豬MoDCs攝入FITC-dextran能力的下降(Bimczok et al., 2007)，本研究的結果顯示AFB<sub>1</sub>對MoDCs抗原攝取能力產生影響可能在100 ng/ml以上的劑量，但確切的濃度仍需進一步實驗才能確定。對照Liu等人(2002)檢測同為具有抗原吞噬能力的豬AMs，發現經過100 ng/ml的AFB<sub>1</sub>處理後，其吞噬能力(phagocytosis)會顯著低於對照組及10 ng/ml AFB<sub>1</sub>處理組，顯示AFB<sub>1</sub>能減少巨噬細胞及DCs的抗原攝取能力，而造成吞噬細胞的功能受損。

IL-10 是一種具調控性及抗發炎作用的細胞激素，會降低 DCs 及巨噬細胞的抗原呈獻功能，並使 DCs 停留在未成熟狀態(Meissonnier et al., 2008)，其也與調控型 T 細胞(T regulatory cell)的活化有關，因此免疫抑制的產生常與 IL-10 分泌量的上升有關。而 IL-12 則是 myeloid DCs 呈獻抗原時的 co-stimulator，會隨 DCs 成熟而有分泌量的增加。鑑於 IL-10 與 IL-12 對 DCs 免疫反應之重要性，Pilon 等人(2009)



以 ELISA 檢視豬 DCs 產生 IL-10 及 IL-12 的情形，他們發現相較於人的 DCs 會持續的產生 IL-10，豬的 iMoDCs 不會產生 IL-10 及 IL-12。與本研究相比較，由於觀察的層級有 mRNA 表現及蛋白質產量之分，因此並不完全對等，但在本研究中可以觀察到豬 MoDCs 無論於成熟或未成熟狀態均可以偵測到 IL-10 及 IL-12p40 的 mRNA 表現，惟 IL-12p40 的 mRNA 表現量相對於本研究中檢測的其他標的基因低了許多，此可與文獻中所描述的低 IL-12 產量相呼應(Pilon et al., 2009)，此可能由於 mRNA 表現量低，以致於 ELISA 的檢測值低於偵測極限。由於使用豬 MoDCs 作為模式細胞的研究尚在發展階段，因此關於其他黴菌毒素對豬 MoDCs 所產製的細胞激素 mRNA 表現量的影響相關文獻也較少。以 400 ng/ml DON 處理豬 MoDCs 6 小時後，相較於對照組細胞，觀察到 IL-10 的 mRNA 表現及蛋白質產量都會上升，而對 TNF- $\alpha$  的 mRNA 及產生的影響則較不明顯，但報告中並未針對其它細胞激素進行檢測。與 DON 相同，AFB<sub>1</sub> 也會促使 MoDCs 的 IL-10 mRNA 表現量上升，但不如 DON 在 6 小時即觀察到此現象，AFB<sub>1</sub> 產生的時間在 24 小時才較為顯著。Meissonnier 等人(2008)以含 385、867 及 1807  $\mu\text{g}/\text{kg}$  不同劑量 AFB<sub>1</sub> 的飼料餵予豬隻，取其脾臟比較各組的細胞激素表現量，發現 IL-10 的產量隨飼料中 AFB<sub>1</sub> 濃度增加而上升，進而推測 IL-10 上升，使樹突細胞及巨噬細胞呈獻抗原能力的下降是 AFB<sub>1</sub> 造成細胞媒介性免疫受損的機制之一。在 Marin 等人(2002)的研究中，也觀察到 4 週齡豬隻口服 140 (0.14 ppm) 或 280 (0.28 ppm)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  AFB<sub>1</sub> 30 天後，其血球相較於對照組也有 IL-10 表現量上升的現象。在本研究中同樣觀察到 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的高濃度 AFB<sub>1</sub> 會使 iMoDCs 的 IL-10 mRNA 表現量上升，雖然相較於在有 LPS 的存在下引導 iMoDCs 轉化為 mMoDCs 過程中在 6 小時即有 IL-10 mRNA 的表現量上升，AFB<sub>1</sub> 刺激 iMoDCs 的 IL-10 mRNA 表現上升的出現時機則較晚至 24 小時才被觀察到，甚至在 6 小時還出現 IL-10 mRNA 表現量低於對照組的現象，但由於其在 24 小時的上升變化相當顯著，因此本研究在 IL-10 mRNA 表現量上升的結果與文獻結果一致，但由於本研究觀察了兩個時間點的表現量差異，因此發現 IL-10 表現量有時間點先後的差異，即 AFB<sub>1</sub> 會使細胞的 IL-10 mRNA 表現先降後升，有延遲性的刺激作用，而可能造成免疫抑制。由於多篇文獻顯示 PCV2 的免疫調節作用與 IL-10 的增加有關(Darwich et al., 2003; Darwich et al., 2008; Fort et al., 2009; Hasslung et al., 2005)，因此 AFB<sub>1</sub> 使豬 MoDCs 的 IL-10 mRNA 表現量上升的現象可能會與 PCV2 的致病機制產生加乘作用，進而增加 PCV2 的免疫抑制能力及致病性。



在豬 MoDCs 的細胞表面抗原研究中，常以免疫螢光染色法使用特異性抗體偵測細胞表面抗原後，再以流式細胞儀進行偵測，Carrasco 等人(2001)即觀察到豬 MoDCs 受到 LPS 及 TNF- $\alpha$  刺激後，會有 CD80/86 表面抗原的調升作用(upregulation)。在豬 MoDCs 的細胞表面抗原研究中，未有文獻以偵測 mRNA 表現量取代免疫螢光染色，因此本研究參考犬 MoDCs 的研究(Liu et al., 2007)選用偵測其 mRNA 表現量的方式，觀察豬 iMoDCs 受到 LPS 及 AFB<sub>1</sub> 作用後的細胞表面抗原改變情形。AFB<sub>1</sub> 對於豬 MoDCs 細胞激素及細胞表面抗原的 mRNA 表現量的影響，可簡單歸結為在本研究試驗條件下均具有刺激的效果，但 0.001  $\mu\text{g/ml}$  低濃度 AFB<sub>1</sub> 傾向於作用初期(6 小時)即有反應，而 10  $\mu\text{g/ml}$  高濃度 AFB<sub>1</sub> 則傾向於作用晚期(24 小時)才有刺激反應。


經過 LPS 刺激 6 小時，可以觀察到 MoDCs 的 CD40 及 CD83 的表現量高於對照組，顯示本實驗所使用的細胞確實有產生具抗原呈獻功能的表面抗原，使細胞往成熟的方向改變。促使豬 MoDCs 成熟一般常使用 TNF- $\alpha$  或 LPS 作為刺激物(Carrasco et al., 2001)，而近年也有以 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  及 LPS 合併的雞尾酒組合刺激 iMoDCs(Pilon et al., 2009)，但在較傳統的單方刺激方式中，TNF- $\alpha$  常與細胞作用 48 小時(Carrasco et al., 2001)，而 LPS 常與細胞作用 24 小時(Carrasco et al., 2001; Devriendt et al., 2010; Facci et al., 2009)，這顯示 MoDCs 在接受 LPS 刺激 24 小時後就可以藉免疫螢光染色觀察到細胞表面抗原的變化，此與本研究觀察到豬 MoDCs 在 LPS 刺激後，CD40 及 CD83 mRNA 表現量會在處理後 6 小時上升而 24 小時下降的情形對照下，推測 LPS 的促使豬 MoDCs 成熟反應在作用 6 小時後即可發生。除了 LPS 會使 MoDCs 的 CD40 及 CD83 的表現量上升外，0.001  $\mu\text{g/ml}$  低濃度 AFB<sub>1</sub> 在未同時給予 LPS 時，在 6 小時也可以觀察到 iMoDCs 的 CD40、CD83 及 CD86 mRNA 表現量上升的現象，對照型態學及 DQ<sup>TM</sup> ovalbumin 實驗中同一濃度 AFB<sub>1</sub> 對細胞的型態及抗原攝取功能都無明顯影響的結果，推測 0.001  $\mu\text{g/ml}$  低濃度 AFB<sub>1</sub> 似乎與 LPS 相似，都具有刺激 iMoDCs 成熟的效果，而在 24 小時亦與 LPS 相似，似乎已經度過刺激反應的高原期。雖然 AFB<sub>1</sub> 與 LPS 在單獨給予時都會造成代表細胞趨向成熟的 MoDCs co-stimulation 表面抗原的 mRNA 表現量上升，但兩者若同時給予則出現表現量下降的現象，此現象究竟是 LPS 降低 AFB<sub>1</sub> 的刺激效果，亦或

是 AFB<sub>1</sub> 降低了 LPS 的刺激效果，則仍有待進一步探討。

低濃度 AFB<sub>1</sub> 在細胞表面抗原 CD40 及 CD83 的刺激作用與 LPS 相似，但因為其不像 LPS 會使抗原攝取及處理能力下降，因此似乎不符合 mDCs 的抗原攝取及處理能力下降的典型現象(Hymery et al., 2006)，顯示低濃度 AFB<sub>1</sub> 可能僅單純刺激 iMoDCs 的 CD40、CD83 及 CD86 mRNA 表現，但並不涉及 MoDCs 成熟化的功能改變。

10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 處理在細胞表面抗原 mRNA 表現的效應，除了因為 CD40 及 CD83 於 6 小時對 LPS 的反應較強而會於 24 小時下降，使得添加 LPS 24 小時後的 CD40 及 CD83 mRNA 表現量比 6 小時低之外，在未同時添加 LPS 的 CD40 及 CD83 之結果以及 CD86 的 iMoDCs 與 mMoDCs 結果中都可以觀察到 mRNA 表現量相較於 0.001 µg/ml 低濃度 AFB<sub>1</sub> 組或對照組有先降後升的現象，即延遲性刺激的作用。因此高濃度的 AFB<sub>1</sub> 對 MoDCs 成熟可能有正向的效果，但因為 10 µg/ml 高濃度 AFB<sub>1</sub> 對細胞存活狀況及細胞型態的影響，因此 24 小時 CD40、CD83 及 CD86 表現量上升的現象是與細胞成熟有關，或是另一種細胞對應傷害的反應，則需要進一步分析細胞傷害或 apoptosis 相關之基因，方有機會較完整的解釋其現象。而對應於 AFB<sub>1</sub> 會傷害細胞核酸或蛋白質等分子機制，較高濃度的 AFB<sub>1</sub> 可能因會對細胞造成傷害而需進行修補，以致在 mRNA 的表現上有延遲的現象。Wogan 等人(1980)以 1 mg/ml 的 AFB<sub>1</sub> 腹腔注射於大鼠後，觀察肝臟 DNA adduct 的變化情形，發現注射後兩小時可測得最大值，而注射後 24 小時有 88% 的 AFB<sub>1</sub>-DNA adduct 已被清除。而 Bianco 等人(2012)以 *in vitro* 的方式，觀察小鼠巨噬細胞株受到 50 µM AFB<sub>1</sub> 作用後細胞週期停留在 S phase 的效應，雖然在處理 24 及 48 小時後都可觀察到，但 S phase 細胞多於 G0 - G1 phase 細胞的反轉現象僅出現在 24 小時，顯示細胞週期在處理後 48 小時後已漸恢復正常。而由於 10 µg/ml AFB<sub>1</sub> 刺激 CD40、CD83、CD86 及 IL-10 mRNA 表現量上升的現象都是在 24 小時較為顯著，推測在 AFB<sub>1</sub> 的作用初期，細胞需進行核酸及蛋白質合成功能的修復，因而有刺激反應的延遲現象。

Binder 等人(2007)於 2003 - 2005 年間檢測全球多個地區牧場或飼料廠中飼料

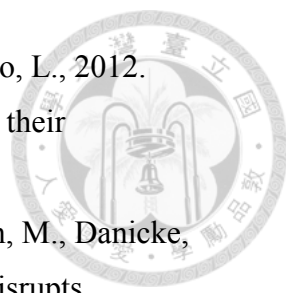


原料及配好之飼料中黴菌毒素的含量，觀察到含台灣在內的北亞組 3420 個樣本中，雖然 AFB<sub>1</sub> 陽性的比例僅 3%，但最高汙染量被發現是在作為重要飼料原料的玉米 (maize) 中，達 457 µg/kg (0.457 ppm)，而含巴基斯坦、孟加拉及印度的南亞組及馬來西亞、菲律賓、泰國及越南所屬之東南亞組的 AFB<sub>1</sub> 陽性率則分別高達 63% 及 34%。Wang 等人(2003)的研究中發現，在中國湖南、湖北及華中檢測的 109 個飼料樣本中，陽性率及平均含量在各次級樣本分類的檢測結果分別為玉米 83.9% 及 24.6 µg/kg (24.6 ppb)，完全飼料為 100% 及 8.27 µg/kg (8.27 ppb)，動植物蛋白質為 100% 及 6.81 µg/kg (6.81 ppb)。這些結果顯示 AFB<sub>1</sub> 雖然是受到國際規範的黴菌毒素，但是其在飼料中的汙染率及含量仍然相當高，而以含 AFB<sub>1</sub> 濃度分別為 385、867 及 1807 µg/kg 的飼料自離乳後餵飼實驗豬隻 28 天後，對照組豬隻血漿 AFB-albumin 檢測結果為陰性 (< 5 pg/mg albumin)，而實驗組豬隻的血漿 AFB-albumin 則與飼料 AFB<sub>1</sub> 濃度呈正相關，數值分別接近 2000、3000 及 7500 pg/ml albumin (Meissonnier et al., 2008)，顯示飼料中的 AFB<sub>1</sub> 汙染會忠實反應在豬隻的血中 AFB<sub>1</sub> 含量上，而豬隻的 DCs 除了作為抗原呈獻細胞參與細胞媒介性免疫以對抗外來病原外，由於企業化飼養常需借助疫苗的使用提升豬群之群體免疫，以對抗共存於豬場的多種病原，因此負責呈獻疫苗抗原給淋巴球的 DCs 功能是否受到傷害，便可能影響豬隻的疾病抵抗力及多種豬用疫苗的免疫效力。在本研究中觀察到豬 MoDCs 會受到 10 µg/ml 高劑量 AFB<sub>1</sub> 影響，而使細胞型態失去正常樹突結構並走向死亡，同時亦使 iMoDCs 的抗原攝取及處理功能下降，如此將可能使臨床上暴露於較高 AFB<sub>1</sub> 劑量汙染飼料的豬隻在對抗病原及接受疫苗注射時，因無法有效處理抗原，進而使呈獻抗原給後續淋巴球的能力受損。以 PMWS 的發生而論，豬場 PCV2 的感染情形在未有商品化疫苗使用前相當普遍，而即使現今已有商品化疫苗的上市，仍無法完全根絕 PCV2 的感染 (Darwich et al., 2012)，而將使 PCV2 更普遍的共存於豬場及豬群中，若對 AFB<sub>1</sub> 較敏感的豬隻攝取受汙染的飼料，則可能因此發生免疫功能或疫苗效力的改變，或在有其他免疫活化的條件下促成體內 PCV2 複製量的上升，是有可能進而轉變為 PMWS 患豬，造成企業的損失。

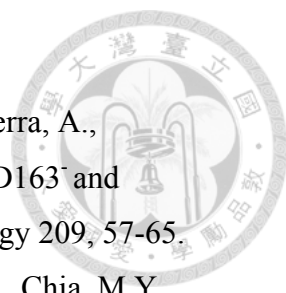
## 第六章 參考文獻

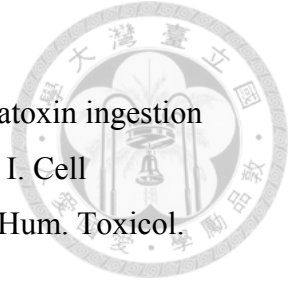


- Alcaide-Molina, M., Ruiz-Jimenez, J., Mata-Granados, J.M., Luque de Castro, M.D., 2009. High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solid-phase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1216, 1115-1125.
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3-14.
- Alvarez, B., Sanchez, C., Bullido, R., Marina, A., Lunney, J., Alonso, F., 2000. A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens* 55, 342-51.
- Balmelli, C., Ruggli, N., McCullough, K., Summerfield, A., 2005. Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *J. Leukoc. Biol.* 77, 923-33.
- Balmelli, C., Steiner, E., Moulin, H., Peduto, N., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2011. Porcine circovirus type 2 DNA influences cytoskeleton rearrangements in plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 132, 57-65.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.
- Banu, M., Muthumary J., 2010. Taxol as chemical detoxificant of aflatoxin produced by *Aspergillus flower* isolated from sunflower seeds. *Health* 2, 789-795.
- Barraud, L., Guerret, S., Chevallier, M., Borel, C., Jamard, C., Trepo, C., Wild, C.P., Cova, L., 1999. Enhanced duck hepatitis B virus gene expression following aflatoxin B1 exposure. *Hepatology* 29, 1317-1323.
- Bautista, E.M., Nfon, C., Ferman, G.S., Golde, W.T., 2007. IL-13 replaces IL-4 in development of monocyte derived dendritic cells (MoDC) of swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 56-67.
- Bernabucci, U., Colavecchia, L., Danieli, P.P., Basirico, L., Lacetera, N., Nardone, A., Ronchi, B., 2011. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Vitro* 25, 684-691.

- 
- Bianco, G., Russo, R., Marzocco, S., Velotto, S., Autore, G., Severino, L., 2012. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon* 59, 644-650.
- Bimczok, D., Doll, S., Rau, H., Goyarts, T., Wundrack, N., Naumann, M., Danicke, S., Rothkotter, H.J., 2007. The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro. *Immunobiology* 212, 655-666.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 265-282.
- Bock, C.H., Mackey, B., Cotty, P.J., 2004. Population dynamics of *Aspergillus flavus* in the air of an intensively cultivated region of south-west Arizona. *Plant Pathol.* 53, 422-433.
- Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P., Hamel, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 185-194.
- Carrasco, C.P., Rigden, R.C., Schaffner, R., Gerber, H., Neuhaus, V., Inumaru, S., Takamatsu, H., Bertoni, G., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2001. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 104, 175-184.
- CAST, 2003. *Mycotoxins: risks in plants, animals and human systems*. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa.
- Cavallini Sanches, E.M., Borba, M.R., Spanemberg, A., Pescador, C., Corbellini, L.G., Ravazzolo, A.P., Driemeier, D., Ferreira, L., 2006. Co-infection of *Pneumocystis carinii* f.sp suis and porcine circovirus-2 (PCV2) in pig lungs obtained from slaughterhouses in southern and midwestern regions of Brazil. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, S92-94.
- Ceppi, M., Ruggli, N., Tache, V., Gerber, H., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2005. Double-stranded secondary structures on mRNA induce type I interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) production and maturation of mRNA-transfected monocyte-derived dendritic cells. *J. Gene. Med.* 7, 452-65.
- Chae, J.S., Choi, K.S., 2010. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from

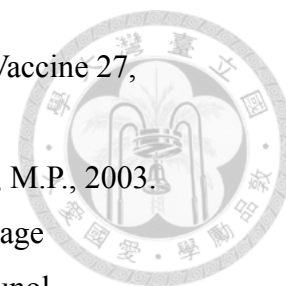


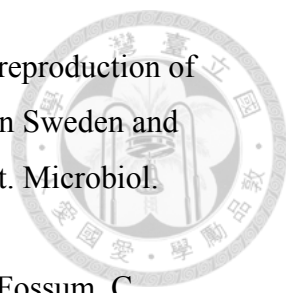
- 
- pigs in Republic of Korea. *Res. Vet. Sci.* 88, 333-338.
- Chamorro, S., Revilla, C., Gomez, N., Alvarez, B., Alonso, F., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2004. In vitro differentiation of porcine blood CD163<sup>-</sup> and CD163<sup>+</sup> monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology* 209, 57-65.
- Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Liu, J.J., Chiou, M.T., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Jan, T.R., Pang, V.F., 2006. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 207-219.
- Clark, T., 1996. Pathology of post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. In: *Proc. Ann. Meet. West. Can. Assoc. Swine Pract.*, Saskatoon, Canada, pp. 22-25.
- Cotty, P.J., Jaime-Garcia, R., 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int. J. Food. Microbiol.* 119, 109-115.
- Crisci, E., Ballester, M., Domínguez, J., Segalés, J., Montoya, M., 2010. Increased numbers of myeloid and lymphoid IL-10 producing cells in spleen of pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 305-310.
- Darwich, L., Balasch, M., Plana-Durán, J., Segalés, J., Domingo, M., Mateu, E., 2003. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J. Gen. Virol.* 84, 3453-3457.
- Darwich, L., Mateu, E., 2012. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164, 61-67.
- Darwich, L., Segalés, J., Mateu, E., 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol.* 149, 857-874.
- Darwich, L., Segalés, J., Resendes, A., Balasch, M., Plana-Durán, J., Mateu, E., 2008. Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs sub-clinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Res. Vet. Sci.* 84, 194-198.
- Devriendt, B., Verdonck, F., Summerfield, A., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2010. Targeting of *Escherichia coli* F4 fimbriae to Fcγ receptors enhances the maturation of porcine dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135,




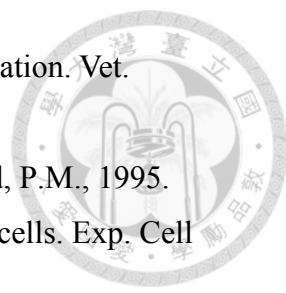
- 188-198.
- Dimitri, R.A., Gabal, M.A., 1996. Immunosuppressant activity of aflatoxin ingestion in rabbits measured by response to *Mycobacterium bovis* antigen I. Cell mediated immune response measured by skin test reaction. *Vet. Hum. Toxicol.* 38, 333-336.
- Doster, A.R., Subramaniam, S., Yhee, J.Y., Kwon, B.J., Yu, C.H., Kwon, S.Y., Osorio, F.A., Sur, J.H., 2010. Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs. *J. Vet. Sci.* 11, 177-183.
- Dugyala, R.R., Sharma, R.P., 1996. The effect of aflatoxin B1 on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 18, 599-608.
- Eaton, D. L., and Gallagher, E. P., 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 135-172.
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39, 44-51.
- Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S., McNeilly, F., 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 3-14.
- Ellis, J.A., Allan, G., Krakowka, S., 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 69, 1608-1614.
- Facci, M.R., Auray, G., Buchanan, R., van Kessel, J., Thompson, D.R., Mackenzie-Dyck, S., Babiuk, L.A., Gerdts, V., 2010. A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs. *Immunology* 129, 396-405.
- Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrarias, M., Mateu, E., Segalés, J., 2009. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and

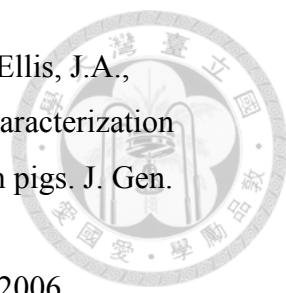
- significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27, 4031-4037.
- Foss, D.L., Bennaars, A.M., Pennell, C.A., Moody, M.D., Murtaugh, M.P., 2003. Differentiation of porcine dendritic cells by granulocytemacrophage colony-stimulating factor expressed in *Pichia pastoris*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 205-15.
- Ghosh, R.C., Chauhan, H.V., Jha, G.J., 1991. Suppression of cell-mediated immunity by purified aflatoxin B1 in broiler chicks. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 165-172.
- Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., and Buechner-Maxwell, V., 2009. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 1151-1163.
- Grasland, B., Loizel, C., Blanchard, P., Oger, A., Nignol, A.C., Bigarré, L., Morvan, H., Cariolet, R., Jestin, A., 2005. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet. Res.* 36, 685-697.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Shimada, T., Ueng, Y.-F., Yamazaki, H., Langouët, S., 1998. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutat. Res.* 402, 121-128.
- Harding, J.C., 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, Quebec City, Canada, p. 503.
- Harding, J.C., Ellis, J.A., McIntosh, K.A., Krakowka, S., 2010. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. *Vet. Microbiol.* 145, 209-219.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38, 528-539.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E., 1995. Influence of aflatoxin and fumonisin B1-containing culture material on growing barrows. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1668-1672.
- Hasslung, F., Wallgren, P., Ladekjaer-Hansen, A.S., Bøtner, A., Nielsen, J., Watrang, E., Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Timmusk, S., Belák, K.,



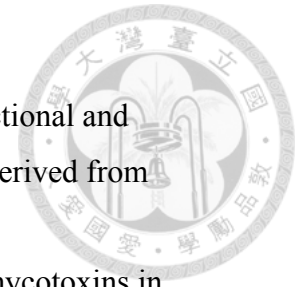
- 
- Segall, T., Melin, L., Berg, M., Fossum, C., 2005. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 106, 49-60.
- Hasslung, F.C., Berg, M., Allan, G.M., Meehan, B.M., McNeilly, F., Fossum, C., 2003. Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN- $\alpha$  production by porcine PBMCs. *J. Gen. Virol.* 84, 2937-2945.
- Hollebeeck, S., Raas, T., Piront, N., Schneider, Y.J., Toussaint, O., Larondelle, Y., During, A., 2011. Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model. *Toxicol. Lett.* 206, 268-275.
- Hussein, H. and Brasel, J., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101-134.
- Hymery, N., Sibiril, Y., Parent-Massin, D., 2006. In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells. *Toxicol. Vitro* 20, 899-909.
- IARC., 1993. Evaluation of carcinogen risks to humans. Some naturally occurring substances: food, items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs for Evaluation of Carcinogenic Risks in Humans*. Vol. 56 pp. 489-521.
- Jaime-Garcia, R., Cotty, P. J., 2003. Aflatoxin contamination of commercial cottonseed in south Texas. *Phytopathology* 93, 1190-1200.
- Joens, L.A., Pier, A.C., Cutlip, R.C., 1981. Effects of aflatoxin consumption on the clinical course of swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1170-1172.
- Johansson, E., Domeika, K., Berg, M., Alm, G.V., Fossum, C., 2003. Characterisation of porcine monocyte-derived dendritic cells according to their cytokine profile. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 183-97.
- Johnson, W.W., Guengerich, F.P., 1997. Reaction of aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide with DNA: kinetic analysis of covalent binding and DNA-induced hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6121-6125.
- Kabak, B., Dobson, A.D., Var, I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 593-619.

- 
- Karenlampi, S. O., 1987. Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 854-860.
- Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segalés, J., Allan, G.M., 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 185-193.
- Kekarainen, T., Montoya, M., Dominguez, J., Mateu, E., Segalés, J., 2008b. Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 41-49.
- Kimura, M., Lehmann, K., Gopalan-Kriczky, P., Lotlikar, P.D., 2004. Effect of diet on aflatoxin B1-DNA binding and aflatoxin B1-induced glutathione S-transferase placental form positive hepatic foci in the rat. *Exp. Mol. Med.* 36, 351-357.
- Kloverpris, H., Fomsgaard, A., Handley, A., Ackland, J., Sullivan, M., Goulder, P., 2010. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following coincubation for more than two hours. *J. Immunol. Methods* 356, 70-78.
- Kogbo, W., Lemarinier, S., Boutibonnes, P., 1985. Morphological characteristics and physiological properties of aflatoxin B1 producing and non-producing *Aspergillus flavus* strains. *Mycopathologia* 91, 181-186.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Allan, G., 2005. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 213-222.
- Kurtz, R.S., Czuprynski, C.J., 1992. Effect of aflatoxin B1 on in vitro production of interleukin-1 by bovine mononuclear phagocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34, 149-158.
- Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., Stadejek, T., Storgaard, T., Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Allan, G., Bøtner, A., 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* 89, 97-114.
- Lefebvre, D.J., Meerts, P., Costers, S., Misinzo, G., Barbé, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2008. Increased porcine circovirus type 2 replication in

- 
- porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. *Vet. Microbiol.* 132, 74-86.
- Lin, C.K., Kalunta, C.I., Chen, F.S., Nguyen, T.T., Kaptein, J.S., Lad, P.M., 1995. Dimethyl sulfoxide suppresses apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Exp. Cell Res.* 216, 403-410.
- Lin, C.M., Jeng, C.R., Chang, H.W., Guo, I.C., Huang, Y.L., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Pang, V.F., 2008. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 355-366.
- Liu, B.H., Yu, F.Y., Chan, M.H., Yang, Y.L., 2002. The effects of mycotoxins, fumonisin B1 and aflatoxin B1, on primary swine alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180, 197-204.
- Liu, C.C., Wang, Y.S., Lin, C.Y., Chuang, T.F., Liao, K.W., Chi, K.H., Chen, M.F., Chiang, H.C., Chu, R.M., 2008. Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 479-491.
- Madrigal-Santillan, E., Morales-Gonzalez, J.A., Vargas-Mendoza, N., Reyes-Ramirez, P., Cruz-Jaime, S., Sumaya-Martinez, T., Perez-Pasten, R., Madrigal-Bujaidar, E., 2010. Antigenotoxic studies of different substances to reduce the DNA damage induced by aflatoxin B(1) and ochratoxin A. *Toxins (Basel)* 2, 738-757.
- Marin, D.E., Taranu, I., Bunaciu, R.P., Pascale, F., Tudor, D.S., Avram, N., Sarca, M., Cureu, I., Criste, R.D., Suta, V., Oswald, I.P., 2002. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *J. Anim. Sci.* 80, 1250-1257.
- McIntosh, K.A., Tumber, A., Harding, J.C., Krakowka, S., Ellis, J.A., Hill, J.E., 2009. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet. Microbiol.* 133, 23-33.
- McLean, M., Dutton, M.F., 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol. Ther.* 65, 163-192.

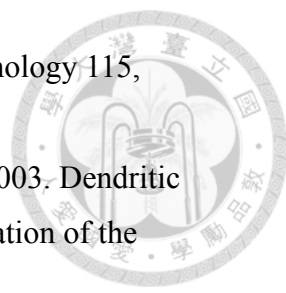
- 
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel cir-covirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79, 2171-2179.
- Meissonnier, G.M., Marin, D.E., Galtier, P., Bertin, G., Oswald, I.P., 2006. Modulation of the immune response by a group of fungal food contaminant, the aflatoxins. In: Mengheri, E., Roselli, M., Britti, M.S., Finamore, A. (Eds.), *Nutrition and Immunity. Research Signpost, Kerala*, pp. 147-166.
- Meissonnier, G.M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A.M., Gong, Y.Y., Wild, C.P., Bertin, G., Galtier, P., Oswald, I.P., 2008. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 231, 142-149.
- Meszaros, K., Aberle, S., Dedrick, R., Machovich, R., Horwitz, A., Birr, C., Theofan, G., Parent, J.B., 1994. Monocyte tissue factor induction by lipopolysaccharide (LPS): dependence on LPS-binding protein and CD14, and inhibition by a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood* 83, 2516-2525.
- Minchin, R. F., McManus, M. E., Thorgeirsson, S. S., Schwartz, D., and Boyd, M. R., 1985. Metabolism of 2-acetylaminofluorene in isolated rabbit pulmonary cells: Evidence for the heterogeneous distribution of monooxygenase activity in lung tissue. *Drug Metab. Dispos.* 13, 406-411.
- Miranda de Carvalho, C., Bonnefont-Rebeix, C., Rigal, D., Chabanne, L., 2006. "Dendritic cells in different animal species: an overview". *Pathol. Biol.* 54, 85-93.
- Moon, E.Y., Rhee, D.K., Pyo, S., 1999. Inhibition of various functions in murine peritoneal macrophages by aflatoxin B1 exposure in vivo. *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 47-58.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591-615.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus

- type 2. *Vet. Pathol.* 41, 624-640.
- Paillot R, Laval F, Audonnet JC, Andreoni C, Juillard V., 2001. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology* 102, 396-404.
- Paterson, R.R.M., Lima, N., 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 43, 1902-1914.
- Peterson, T. C., 1987. Drug-metabolizing enzymes in rat, mouse, pig and human macrophages and the effect of phagocytic activation. *Biochem. Pharmacol.* 36, 3911-3916.
- Pier, A.C., 1992. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J. Anim. Sci.* 70, 3964-3967.
- Pilon, C., Levast, B., Meurens, F., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Salmon, H., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y., Baron, C., 2009. CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1. *Mol. Immunol.* 46, 437-447.
- Rau, H., Revets, H., Cornelis, P., Titzmann, A., Ruggli, N., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2006. Efficacy and functionality of lipoprotein OprI from *Pseudomonas aeruginosa* as adjuvant for a subunit vaccine against classical swine fever. *Vaccine* 24, 4757-4768.
- Raymond CR, Wilkie BN., 2005. Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by porcine monocytes and monocytederived dendritic cells in response to microbial pathogenassociated molecular patterns. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107, 235-247.
- Rodriguez-Carino, C., Duffy, C., Sanchez-Chardi, A., McNeilly, F., Allan, G.M., Segales, J., 2011. Porcine circovirus type 2 morphogenesis in a clone derived from the I35 lymphoblastoid cell line. *J. Comp. Pathol.* 144, 91-102.
- Rossano, F., Ortega De Luna, L., Buommino, E., Cusumano, V., Losi, E., Catania, M.R., 1999. Secondary metabolites of *Aspergillus* exert immunobiological effects on human monocytes. *Res. Microbiol.* 150, 13-19.
- Sachs, D.H., 1994. The pig as a potential xenograft donor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 185-91.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in



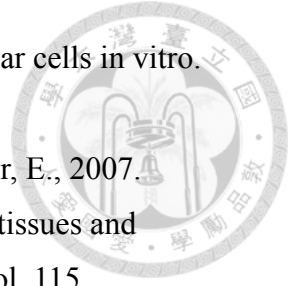


- the major histocompatibility complex class II compartment: down-regulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389-400.
- Santacroce, M., Conversano, M.C., Casalino, E., Lai, O., Zizzadoro, C., Centoducati, G., Crescenzo, G., 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 18, 99-130.
- Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C., 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1035.
- Segalés J, Domingo M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Q.* 24,109-124.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.
- Shearer, J. F., Sweets, L. E., Baker, N. K., & Tiffany, L. H., 1992. A study of *Aspergillus flavus* *Aspergillus parasiticus* in Iowa Crop Fields: 1988-1990. *Plant Dis.* 76, 19-22.
- Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K., 2008. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology* 378, 311-322.
- Summerfield, A., McCullough, K.C., 1997. Porcine bone marrow myeloid cells: phenotype and adhesion molecule expression. *J. Leukoc. Biol.* 62, 176-185.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376.
- Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96, 39-57.
- Venturini, M.C., Perfumo, C.J., Risso, M.A., Gomez, C.M., Piscopo, M.V., Sala de Miguel, M., Godoy, H., 1990. Effect of aflatoxin B1 on resistance induced by *Bordetella bronchiseptica* vaccine in rabbits. *Vet. Microbiol.* 25, 209-216.
- Vincent, I.E., Balmelli, C., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology* 120, 47-56.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005. Subset-dependent

- 
- modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115, 388-398.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B., Allan, G., 2003. Dendritic cells harbour infectious PCV2 in the absence of apparent modulation of the cells or replication of the virus. *J. Virol.* 77, 13288-13300.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wyllie, D.H., Dower, S.K., Segal, D.M., 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 249-255.
- Wang, J.-S., Groopman, J.D., 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.* 424, 167-181.
- Wang, J.S., Huang, T., Su, J., Liang, F., Wei, Z., Liang, Y., Luo, H., Kuang, S.Y., Qian, G.S., Sun, G., He, X., Kensler, T.W., Groopman, J.D., 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People's Republic of China. *Cancer Epidem. Biomar.* 10, 143-146.
- Wang, R., Miao, C., Zhang, Z., 2003. Investigation of mould toxin pollution of feed and feedstuff. *Feed Industry* 24, 11-15.
- Wikström, F.H., Meehan, B.M., Berg, M., Timmusk, S., Elving, J., Fuxler, L., Magnusson, M., Allan, G.M., McNeilly, F., Fossum, C., 2007. Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 81, 4919-4927.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1106-1122.
- Wogan, G., Croy, R., Essigmann, J., Bennett, R. 1980. Aflatoxin-Dna Interactions: Qualitative, Quantitative and Kinetic Features in Relation to Carcinogenesis, In: Pullman, B., Ts'o, P.P., Gelboin, H. (Eds.) *Carcinogenesis: Fundamental Mechanisms and Environmental Effects*. Springer Netherlands, pp.179-191.
- Wu, F., Bhatnagar, D., Bui-Klimke, T., Carbone, I., Hellmich, R., Munkvold, G., Paul, P., Payne, G., Takle, E., 2011. Climate Change Impacts on Mycotoxin Risks in US Maize. *World Mycotoxin J.* 4, 79-93.
- Yu, S., Halbur, P.G., Thacker, E., 2009. Effect of porcine circovirus type 2 infection

and replication on activated porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 127, 350-356.

Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007.  
Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and  
immune cells in early infected pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 115,  
261-272.



## 附錄



Table 2. The PBMCs viability, proliferation index and PCV2 load of an AFB<sub>1</sub> highly susceptible pig.

Assay	AFB <sub>1</sub> treatment (µg/ml)					
	0	0.001	0.01	0.1	1	10
<b>Viability (%)</b>						
AFB <sub>1</sub> only, 24 hr	88.99	83.48	82.64	83.15	86.69	93.12
AFB <sub>1</sub> + 5 µg/ml Con A, 24 hr	93.39	89.97	90.19	90.35	89.74	88.55
AFB <sub>1</sub> only, 72 hr	70.99	52.45	56.39	63.63	65.03	63.73
AFB <sub>1</sub> + 5 µg/ml Con A, 72 hr	83.07	78.51	76.08	71.32	59.09	59.77
<b>Proliferation index</b>						
AFB <sub>1</sub> only, 24 hr	1.61	1.65	1.64	1.68	1.63	1.88
AFB <sub>1</sub> + 5 µg/ml Con A, 24 hr	1.39	1.46	1.46	1.46	1.5	1.5
AFB <sub>1</sub> only, 72 hr	1.05	1.03	1.02	1.03	1.03	1.04
AFB <sub>1</sub> + 5 µg/ml Con A, 72 hr	4.09	3.51	3.44	2.66	1.85	1.24
<b>PCV2 load (copies/µl)</b>						
AFB <sub>1</sub> only	3.29	3.31	3.38	3.38	3.28	3.42
AFB <sub>1</sub> + 1 µg/ml Con A	5.81	5.84	5.72	5.83	5.95	5.65
AFB <sub>1</sub> + 5 µg/ml Con A	5.82	6.00	5.77	5.84	6.12	5.88
<b>△PCV2 load</b>						
AFB <sub>1</sub> + 5 µg/ml Con A	1.42	1.71	1.68	2.20	3.31	4.74

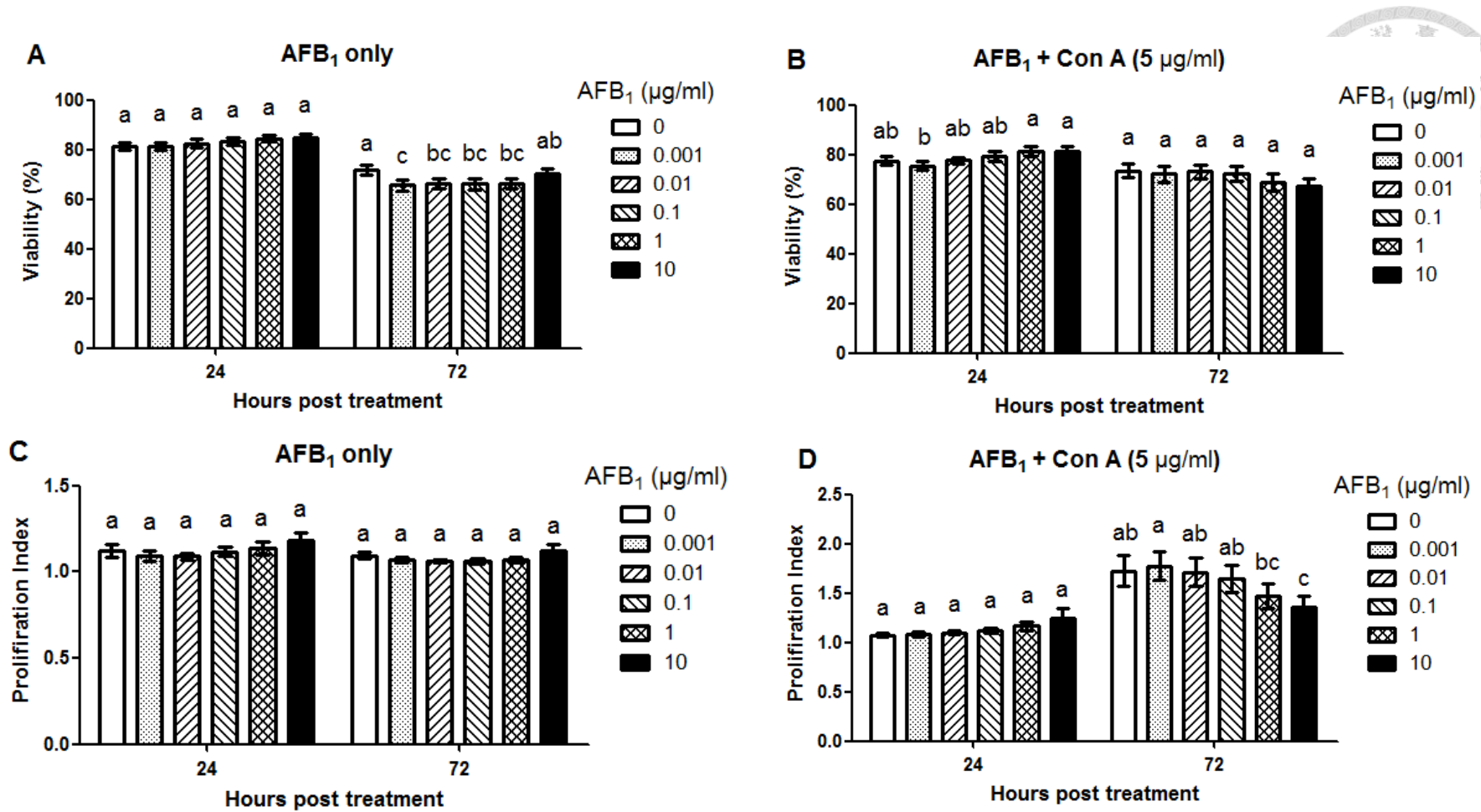


Fig. 11. Changes in the viability and proliferation index with time in porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after treated with different levels of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and/or concanavalin A (Con A). The data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) of 6 pigs (the viability was arcsin transformed for analysis, and back-transformed for presentation). <sup>a, b, c</sup> Values of different treatments at the same time point with different labels differ significantly (p < 0.05).