

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Graduate Institute of Agricultural Chemistry

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

三泰芬及邁克尼干擾青鱗魚肝中細胞色素 P450 活性  
及全反式視黃酸相關基因表現量之研究

Triadimefon and Myclubutanil Interfere the Activity of  
Cytochrome P450s and mRNA Expression of All-*trans* Retinoic  
Acid-Related Genes in the Liver of Medaka (*Oryzias latipes*)

林均鴻

Chun-Hung Lin

指導教授：陳佩貞 博士

Advisor: Pei-Jen Chen, Ph.D.

中華民國 100 年 8 月

August, 2011

## 誌謝

這篇論文的完成，首先要感謝指導教授陳佩貞老師，在實驗室草創初期就願意收我這個完全沒有經驗的學生，讓我能從品保品管、藥品與儀器的選擇等實驗的基礎開始學習。感謝老師不論是研究還是課業上都不厭其煩的叮嚀指導，感謝老師為了這份研究四處奔波商借儀器，感謝老師對我不成熟的為人與實驗技術的包容與指正，讓我能完成這份研究。感謝系上的老師們在專題討論時提出的建議與指正，讓這份研究能在各個方面進行修正。感謝實驗室的成員們，已經畢業的蘇志翔學長、陳冠雯學姊、助理曾吉言學長、覃世偉同學和塗子毅、吳宛霖、廖珮涵、朱思泓和江峻蔚在實驗期間給予協助。感謝鄭鑫源、陳奕邵、陳昱達、洪偉峰從大學部開始六年來在各方面的指導與協助。感謝顏瑞泓老師、陳建德老師、洪傳揚老師、林乃君老師、黃良得老師、森林系葉汀峰老師、科技共同中心湯凱鈞先生提供各式儀器，讓這份研究能夠完成。感謝口試委員顏瑞泓老師、陳建德老師、生工系廖秀娟老師以及成大環工系周佩欣老師撥允為這篇論文給予建議與指教。最後要感謝我的家人，對我這段時間不規律的作息的包容、照顧與支持，讓我能無後顧之憂的完成這篇論文。

## 摘要

三泰芬 (Triadimefon) 及邁克尼 (Myclobutanil) 為農業上廣為使用的康唑類殺真菌劑 (Conazoles)。研究顯示三泰芬 (具致腫瘤性) 及邁克尼 (不具致腫瘤性) 會干擾小鼠肝中重要代謝酵素細胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 基因表現及酵素活性，進而加劇維生素 A 活性形式全反式視黃酸 (All-trans retinoic acid, atRA) 之代謝。但三泰芬及邁克尼對水生生物之影響的相關研究仍有限，因此本研究探討三泰芬及邁克尼對青鱒魚 (*Oryzias latipes*, medaka) 肝中 CYPs 基因表現量、酵素活性及 atRA 相關基因表現之干擾作用。結果顯示，暴露三泰芬及邁克尼 (2 mg/L) 3 天後青鱒魚肝中 CYP3A38 及 CYP3A40 之 mRNA 表現有提升趨勢。暴露三泰芬溶液 (2.0-3.5  $\mu$ M) 7 天後會提升 CYP1A 和 CYP3A 活性，而暴露邁克尼溶液 (2.0-3.5  $\mu$ M) 則僅提升 CYP3A 活性。此外，合成 atRA 之酵素 ALDH1A2 之 mRNA 表現量不受實驗處理影響，而代謝內生 atRA 之酵素 CYP26B1 之 mRNA 表現量則受三泰芬 (2.0-3.5  $\mu$ M) 誘導提升，顯示三泰芬造成水生生物中 atRA 過量代謝的可能性較邁克尼高。在 atRA 相關受體中，RAR $\gamma$ 1 受三泰芬 (2.0  $\mu$ M) 誘導，顯示三泰芬可能經由 RAR $\gamma$ 1 途徑誘導 CYP26B1 基因表現；而三泰芬及邁克尼 (2.0  $\mu$ M) 暴露後 RXR $\alpha$ 1 及 RXR $\beta$ 1 之 mRNA 表現量皆下降，顯示三泰芬及邁克尼皆可能會影響細胞對 atRA 之感知能力，進而影響 atRA 參與調控之生理機制，但無法以此做為康唑類殺真菌劑是否具有致癌性之生物指標。綜合以上結果，暴露於三泰芬和邁克尼會提高青鱒魚肝臟中特定 CYPs 基因表現及活性，並干擾 atRA 相關核受體之 mRNA 表現，可能會進而影響維生素 A 之正常代謝及其參與之生理調控機制。

關鍵詞：三泰芬 (Triadimefon)、邁克尼 (Myclobutanil)、細胞色素 P450 (Cytochrome P450)、全反式視黃酸 (All-trans-retinoic acid)、青鱒魚 (*Oryzias latipes*, medaka)

## Abstract

Triadimefon and myclobutanil are triazole-containing conazole fungicides widely used in agriculture. Previous studies show that some conazoles (e.g. triadimefon) at sublethal dose induced gene expression and enzymatic activity of cytochrome P450s (CYPs) in the liver of mouse, leading to a decrease in hepatic level of all-*trans* retinoic acid (atRA), an active form of vitamin A with anticancer properties. This study demonstrates the effects of carcinogenic triadimefon and non-carcinogenic myclobutanil on the activity of CYPs and mRNA expression of atRA-related genes in the liver of an aquatic organism, medaka (*Oryzias latipes*). Enzymatic activity analyses show triadimefon (2.0-3.5  $\mu$ M) induced the activities of CYP1A and CYP3A, while myclobutanil (2.0-3.5  $\mu$ M) only induced the activity of CYP3A. Quantitative real-time PCR analyses revealed that only triadimefon (2.0-5.0  $\mu$ M) induced mRNA expression of endogenous atRA metabolism enzyme CYP26B1. Results from both enzymatic and genetic analyses above indicating that triadimefon may enhance hepatic atRA metabolism more severely than myclobutanil could do. Gene expression of atRA-related nuclear receptors retinoid X receptors (*rxra1* and *rxr $\beta$ 1*) was depressed by both triadimefon and myclobutanil, indicating that both conazoles may interrupt the ability of cell to sense atRA and leading to disruption of atRA-regulated mechanisms. Overall, both triadimefon and myclobutanil interfere with the activity of cytochrome P450s and mRNA expression of all-*trans* retinoic acid-related genes in the liver of medaka.

Keywords: Triadimefon, Myclobutanil, Cytochrome P450, All-*trans*-retinoic acid, medaka (*Oryzias latipes*)

## 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	V
表目錄.....	VI
1. 緒言.....	1
1.1. 康唑類殺真菌劑.....	1
1.1.1. 三泰芬.....	3
1.1.2. 邁克尼.....	5
1.2. 三泰芬及邁克尼於環境中的宿命.....	7
1.3. 三泰芬及邁克尼之相關毒理研究.....	8
1.4. 細胞色素 P450.....	10
1.5. 全反式視黃酸.....	13
1.6. 模式生物的選擇.....	15
1.7. 研究目的.....	15
2. 材料與方法.....	16
2.1. 試驗設計.....	16
2.2. 實驗動物.....	17
2.3. 藥品與試劑.....	17
2.4. 儀器.....	19
2.5. 暴露實驗設計與樣品採集.....	19
2.5.1. mRNA 表現量分析預實驗.....	19
2.5.2. mRNA 表現量分析實驗.....	20
2.5.3. CYP 酵素活性分析實驗.....	20

2.6.	分析方法.....	21
2.6.1.	mRNA 表現量分析.....	21
2.6.1.1.	RNA 萃取.....	21
2.6.1.2.	TURBO 去 DNA 處理.....	21
2.6.1.3.	反轉錄.....	21
2.6.1.4.	引子設計與品質檢測.....	22
2.6.1.5.	即時定量聚合酶連鎖反應.....	23
2.6.2.	CYP 酵素活性分析.....	26
2.6.2.1.	微粒體萃取.....	26
2.6.2.2.	EROD 法.....	26
2.6.2.3.	DBF 試驗.....	26
2.7.	統計分析.....	27
3.	結果與討論.....	28
3.1.	引子品質及酵素分析條件測試.....	28
3.1.1.	引子品質測試.....	28
3.1.2.	酵素分析條件測試.....	28
3.2.	mRNA 表現量分析預實驗.....	35
3.3.	肝體指數.....	37
3.4.	CYP1A 基因表現及酵素活性.....	39
3.5.	CYP3A 基因表現及酵素活性.....	43
3.6.	atRA 恆定相關酵素之 mRNA 表現.....	48
3.7.	atRA 相關核受體之 mRNA 表現.....	50
3.8.	p53 之 mRNA 表現.....	53
4.	結論.....	55
	參考文獻.....	56

## 圖目錄

圖 1-1 康唑類殺真菌劑作用機制 .....	2
圖 1-2 全反式視黃酸結構 .....	13
圖 1-3 青鱈魚 .....	15
圖 2-1 研究架構 .....	16
圖 3-1 引子解離曲線 .....	29
圖 3-2 微粒體蛋白回溫時間與 DBF 試驗訊號關係 .....	31
圖 3-3 EROD 法與 DBF 試驗反應時間與訊號關係 .....	32
圖 3-4 CYP1A 活性誘導試驗 .....	33
圖 3-5 CYP1A 與 CYP3A 活性抑制實驗 .....	34
圖 3-6 青鱈魚暴露於處理組及控制組 3 天後肝中 CYP1A, CYP3A38, CYP3A40 及 PXR 之 mRNA 表現情形 .....	36
圖 3-7 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 CYP1A 活性 .....	41
圖 3-8 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後肝中 CYP1A 及 AhR 之 mRNA 表現量 .....	42
圖 3-9 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 CYP3A 活性 .....	45
圖 3-10 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後肝中 CYP3A38 及 CYP3A40 之 mRNA 表現量 .....	46
圖 3-11 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後肝中 PXR 之 mRNA 表現量 .....	47
圖 3-12 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 ALDH1A2 及 CYP26B1 之 mRNA 表現量 .....	49
圖 3-13 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 RAR $\alpha$ 1, RAR $\gamma$ 1, RXR $\alpha$ 1, RXR $\alpha$ 2, RXR $\beta$ 1 及 RXR $\beta$ 2 之 mRNA 表現量 .....	52
圖 3-14 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 p53 之 mRNA 表現量 .....	54

## 表目錄

表 1-1 三泰芬基本物化性質 .....	3
表 1-2 三泰芬之公告使用範圍 .....	4
表 1-3 邁克尼基本物化性質 .....	5
表 1-4 邁克尼之公告使用範圍 .....	6
表 2-1 水循環系統水質監測情形 .....	17
表 2-2 引子序列 .....	24
表 2-3 StepOne 儀器預設之即時定量聚合酶連鎖反應條件 .....	25
表 2-4 EROD 法反應中各成分濃度 .....	27
表 2-5 DBF 試驗反應中各成分濃度 .....	27
表 3-1 青鱒魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後的肝體指數 (HSI) .....	38





## 1. 緒言

### 1.1. 康唑類 (conazole) 殺真菌劑

三泰芬 (triadimefon) 及邁克尼 (myclobutanil) 為康唑類殺真菌劑之一，用於治療瓜果類、瓜菜類等作物的白粉病等病害。康唑類殺真菌劑為一類結構中含有含氮戊環 (azole) 的殺真菌劑，依其結構可分為雜環中含兩氮的咪康唑類 (imidazole) 及含三氮的三唑類 (triazole)。康唑類藥劑的殺真菌作用機制主要為干擾子囊菌及擔子菌中麥角固醇 (ergosterol) 的生合成。麥角固醇為真菌胞膜中重要成分，可調控胞膜流動性及完整性。文獻指出，康唑類殺真菌劑會與真菌中細胞色素 P450 51 (cytochrome P450 51, CYP51) 的鐵蛋白 (heme protein) 結合，抑制其對麥角固醇前驅物 lanosterol 的 14 $\alpha$ -去甲基 (14 $\alpha$ -demethylation) 活性，其機制如圖 1-1 所示。此抑制作用會使麥角固醇合成量降低，進而造成真菌胞膜結構及功能受損，最終導致真菌死亡 (Ghannoum and Rice, 1999)。部分咪康唑類殺真菌劑如克康那唑 (ketoconazole) 和咪康唑 (miconazole) 等藥劑則具有更複雜之殺真菌機制，如干擾真菌中脂質的生合成等生理機制等 (Sheehan et al., 1999)。

康唑類殺真菌劑的使用範圍相當廣泛，包括農業、醫療及個人保健用品中皆有可觀之使用量 (Kahle et al., 2008)。在農業的使用中，康唑類殺真菌劑通常做為系統性的殺真菌劑，依作物及防制病害種類不同而在幼苗期、花蕾萌出或發病初期時使用。其他用途包括蔬果與穀物的保存、草地維護及木材保存等 (Georgopapadakou and Walsh, 1996)。而在醫療及個人保健用品方面，康唑類殺真菌劑則可做為系統性或局部性的殺菌劑，用於外用藥膏、塞劑、口服藥錠及洗髮精等。除用於真菌治療外，部分康唑類化合物也有其他醫療用途，如克康那唑可阻斷腎上腺類固醇的生合成，應用於治療前列腺癌中；而 letrozole, anastrozole 等康唑類殺真菌劑則可抑制芳香環轉化酶 (aromatase) 活性，應用於乳癌的治療中 (Zarn et al., 2003)。

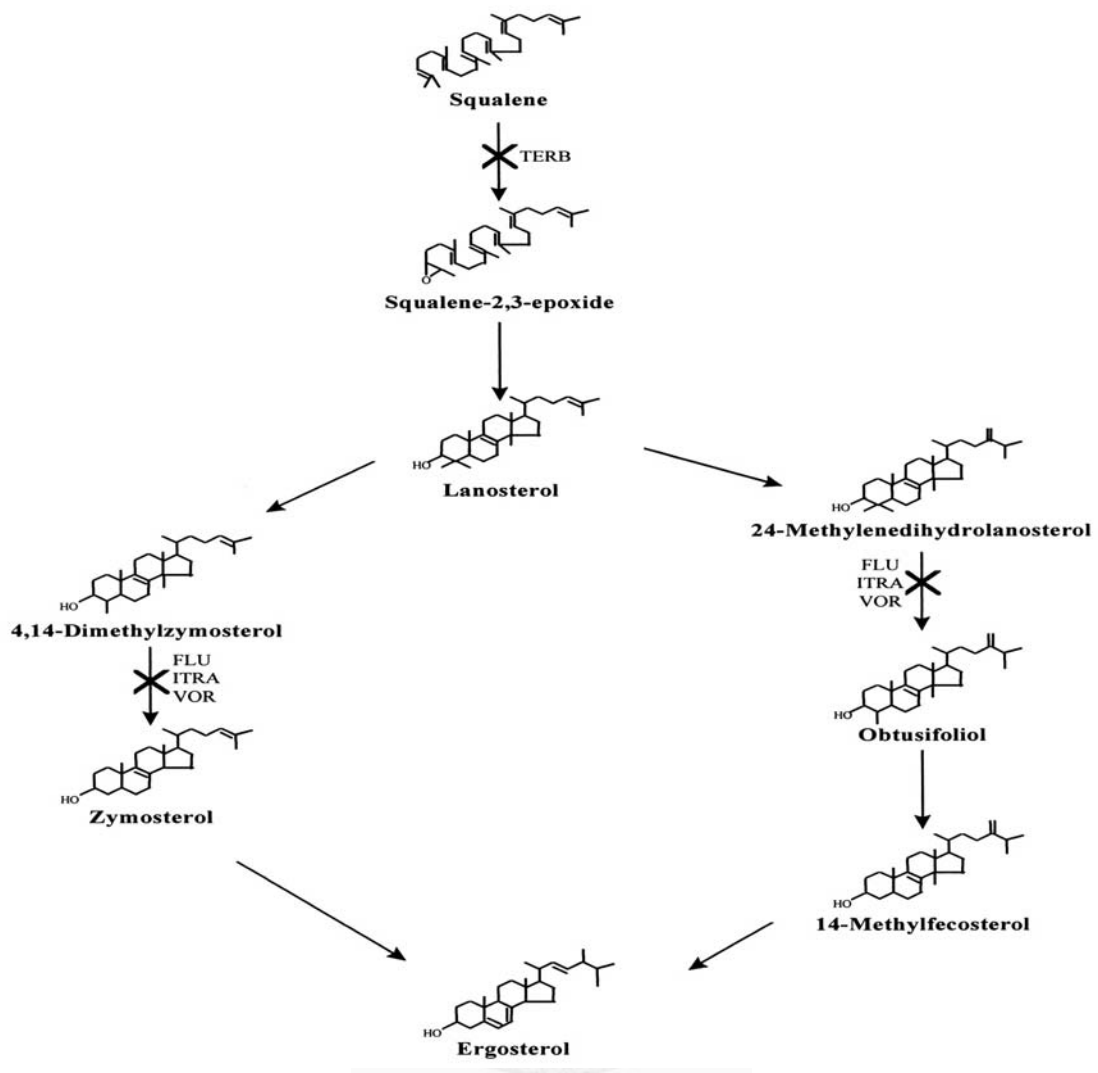


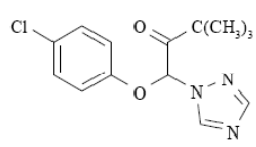
圖 1-1 康唑類殺真菌劑作用機制。(Ghannoum and Rice, 1999)

FLU, ITRA 和 VOR 分別為 fluconazole, itraconazole 及 voriconazole。此三種藥劑皆為三唑類殺真菌劑。

### 1.1.1. 三泰芬

三泰芬為三唑類殺真菌劑之一，其結構及基本物化性質如表 1-1 所示。三泰芬目前於我國之主要用途為預防及治療農作物的真菌感染，表 1-2 為我國農委會公告之三泰芬使用範圍，包括瓜果類、葡萄及蘋果等作物的白粉病治療，乾豆類的銹病治療等。以三泰芬為有效成分的農藥商品包括 Bayleton<sup>®</sup>、Amiral<sup>®</sup>、Sadifon<sup>®</sup>及 Strike<sup>®</sup>等，而目前於我國登記使用的包括有洽益化學的好搭擋<sup>®</sup>、峰農的富貴通<sup>®</sup>及世大農化的新世通<sup>®</sup>等產品。

表 1-1 三泰芬基本物化性質。

中文名稱	三泰芬
英文名稱	Triadimefon
IUPAC 化學名稱	1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanone
CAS 編號	43121-43-3
結構式	
分子式	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
分子量 (g/mole)	293.75
水溶解度 (20°C)	64 mg/L

參考文獻：(EPA, 2006)

表 1-2 三泰芬之公告使用範圍。

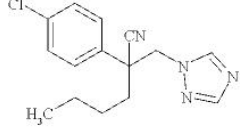
劑型	使用方法		作物名稱	使用範圍
	每公頃每 次用藥量	稀釋倍數		
25%	3g/株		香蕉	葉斑病及葉黑星病
可濕性粉劑	0.5 kg	2000	茶	茶餅病
	2 kg	600	大豆	銹病
	0.5 kg	2000	牛蒡	白粉病
	0.5 kg	2000	瓜果類	白粉病
	0.5-0.7 kg	2000	瓜菜類	白粉病
	0.5 kg	2000	西瓜	白粉病
	5%	0.5-0.7 kg	2000	胡瓜
可濕性粉劑	2 kg	600	乾豆類	銹病
		1000	梨	赤星病
		1500	梨果類	白粉病
		2000	葡萄	白粉病
		1000	檬果	白粉病
		1500	蘋果	白粉病

參考文獻：農委會公告農藥使用範圍

### 1.1.2. 邁克尼

邁克尼為一結構與三泰芬相似之三唑類殺真菌劑，其結構與基本物化性質如表 1-3 所示。邁克尼目前也僅用於農業上之真菌治療中，表 1-4 為我國公告之邁克尼使用範圍，包括瓜菜類、葡萄及蘋果等作物的白粉病治療及蘋果的黑星病治療等。以邁克尼為有效成分的農藥商品包括 Nova<sup>®</sup>、Eagle<sup>®</sup>及 Systhane<sup>®</sup>等，而目前於我國登記使用的包括有萬德發的粉好效<sup>®</sup>、惠光的信心<sup>®</sup>及雅飛的勝生<sup>®</sup>等產品。

表 1-3 邁克尼基本物化性質。

中文名稱	邁克尼
英文名稱	Myclobutanil
IUPAC 化學名稱	(RS)-2-(4-chlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazole-1-ylmethyl)hexanenitrile
CAS 編號	88671-89-0
結構式	
分子式	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN
分子量 (g/mole)	288.8
水溶解度 (20°C)	124 mg/L

參考文獻：(EPA, 2009)

表 1-4 邁克尼之公告使用範圍。

劑型	使用方法		作物名稱	使用範圍
	每公頃每次 用藥量	稀釋倍數		
13.4%乳劑	0.25-0.35 L	4000	瓜菜類	白粉病
	0.25-0.35 L	4000	胡瓜	白粉病
	0.25 L	4000	香瓜	白粉病
40% 可濕性粉劑		6000	印度棗	白粉病
		4000	柿	角斑病
	0.1 kg	12000	柿	白粉病
		3000	桃	縮葉病
		8000	梅	白粉病
		12000	葡萄	白粉病
		12000	蘋果	黑星病
	0.1 kg	12000	蘋果	白粉病

參考文獻：農委會公告農藥使用範圍

## 1.2. 三泰芬及邁克尼於環境中的宿命

雖然前人研究已發現目前廢水處理設備無法有效移除普克利 (propiconazole)、氟康唑 (fluconazole) 等康唑類殺真菌劑 (Kahle et al., 2008)，且已在環境水體中測得 ng/L 至  $\mu\text{g/L}$  濃度範圍的依普座 (epoxiconazole)、得克利 (tebuconazole) 等農業用途之康唑類殺真菌劑 (Berenzen et al., 2005)，但目前對於三泰芬及邁克尼在環境中流佈的相關研究仍相當有限。

文獻指出，三泰芬在土壤中主要經由微生物作用途徑降解，於有氧及無氧的砂質壤土中之半生期分別為 5.6 及 23.1 天，屬於非持久性農藥 (EPA, 2006; Singh, 2005)。因三泰芬不易被水解，故在水中之主要降解途徑則為光降解與微生物降解，而在無氧水體中半生期則可達 217 天 (EPA, 2006)。雖然三泰芬之土壤吸附係數 (adsorption coefficients,  $K_{oc}$ ) 為 387 L/kg，在土壤中移動性不高，但仍有可能因降雨或灌溉行為而被淋洗出，並經地表逕流而進入表面水體中 (EPA, 2006)。

邁克尼在有氧土壤中之半生期大於 70 天，為中度持久性 (moderately persistent) 農藥，在無氧土壤中之半生期則更長，為持久性農藥 (EPA, 2009)。因邁克尼微溶於水，且不易被水解或光降解，故美國環境保護局 (Environmental Protection Agency, EPA) 推估淋洗、地表逕流及灌溉等作用或行為是邁克尼施用後的主要消散 (dissipation) 途徑 (EPA, 2009)，因此邁克尼亦有進入環境水體中之風險。

### 1.3. 三泰芬及邁克尼之相關毒理研究

由於三泰芬及邁克尼皆為上市之商品，其對哺乳動物和環境水生生物的急毒性、慢毒性等基礎毒理試驗皆已在小鼠、大鼠、虹鱒或藍腮魚等模式生物 (model organism) 中完成 (EPA, 2006; EPA, 2009)。三泰芬和邁克尼和其他康唑類殺真菌劑相似，對哺乳動物的急毒性和慢毒性皆為輕微，對水生生物則具有中等毒性，而在亞致死劑量下對大鼠皆具致畸性 (INCHEM, 1981; INCHEM, 1992)。而隨著科技進步與人們對毒理效應的重視程度增加，關於三泰芬及邁克尼對生物正常生理機制之影響的研究也陸續被進行與發表 (Allen et al., 2006; Chen et al., 2009; EPA, 2006; EPA, 2009; Sun et al., 2007)。

文獻指出，三泰芬和邁克尼會誘導小鼠肝中 CYPs 酵素活性表現，而增加對維生素 A (retinol, vitamin A) 活性形式—全反式視黃酸 (all-trans retinoic acid, atRA) 的代謝，進而使小鼠體內 atRA 濃度降低 (Chen et al., 2009)。此現象可能會導致維生素 A 缺乏，並引發相關症狀，影響生物維持視覺、骨骼健康及免疫調控等生理功能 (Morriss-Kay and Ward, 1999)。然而，有關三泰芬及邁克尼是否會影響環境生物的瞭解仍十分有限，尤其在三泰芬及邁克尼經表面逕流等方式進入環境後，水生生物為直接暴露於三泰芬及邁克尼的環境生物，故瞭解三泰芬及邁克尼對水生生物之影響為評估其對環境衝擊中的重要議題。

另外，三泰芬與邁克尼影響 atRA 代謝之研究最初起因於三泰芬致癌機制之探討。文獻指出，三泰芬對小鼠具致肝腫瘤性，並對雄性大鼠具致甲狀腺腫瘤性，因此三泰芬被美國環境保護局列為可能之致癌物 (C 類) (EPA, 1996)。而邁克尼在相似劑量下於小鼠和大鼠中皆無致腫瘤反應，因此被美國環境保護局列為非致癌物 (E 類) (EPA, 2000; INCHEM, 1992)。由於三泰芬及邁克尼在化學結構、使用範圍及可能之流佈情形上有許多相似處，因此在許多三泰芬致癌機制的研究中皆以邁克尼做為非致癌性的康唑類殺真菌劑代表 (Allen et al., 2006; Chen et al., 2009;



Hester et al., 2006; Ward et al., 2006)。

Ward 等學者以核酸微陣列 (microarray) 分析小鼠在餵食 1,800 ppm 三泰芬或 2,000 ppm 邁克尼 4 天後約 34,000 個基因之 mRNA 表現情形，發現共有 8 個機制共 259 個基因的 mRNA 表現量會受三泰芬干擾，而不受邁克尼影響 (Ward et al., 2006)。以此研究為基礎，許多學者針對三泰芬與邁克尼影響機制間的差異性深入探討三泰芬可能之致癌機制，而維生素 A 相關代謝機制便是其中之一 (Chen et al., 2009; Nesnow et al., 2009)。雖然在小鼠研究中，三泰芬與邁克尼對 atRA 代謝途徑造成之影響相似，但此影響是否會有物種間的差異，也是評估其三泰芬及邁克尼對環境生物影響中的重要議題之一。

此外，文獻指出三泰芬對小鼠及大鼠具有致腫瘤性，邁克尼則無此現象 (INCHEM, 1981; INCHEM, 1992)，但尚無研究證實兩藥劑是否對水生生物具致腫瘤性。前人研究指出，部分康唑類殺真菌劑會干擾小鼠體內腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) p53 的基因及蛋白表現量 (Hester et al., 2006; Ho et al., 1998; Ward et al., 2006)，而其是否可做為康唑類殺真菌劑對水生生物是否具致腫瘤性之生物指標也將於本研究中探討。

#### 1.4. 細胞色素 P450

細胞色素 P450 是由許多單氧酶 (monooxygenase) 組成之酵素 superfamily，當氨基酸序列相似度大於 40% 時分為同一 family (如 CYP1)，大於 55% 時則分為同一 subfamily (如 CYP1A)。目前在人類基因中已發現 18 個以上的 CYP family，合計超過 57 種 CYP 酵素 (Nebert and Russell, 2002)。不同 CYP 酵素對基質具有不同選擇性，分別在生物體中參與不同生理機制，如人體中 CYP11, CYP17 及 CYP19 參與性賀爾蒙合成、CYP24 代謝維生素 D 並調節相關的生理反應等，而體內內生之 atRA 濃度則由 CYP26 代謝調控 (Lewis, 2004; Nebert and Russell, 2002; Sakaki et al., 2005; Thatcher and Isoherranen, 2009)。

此外，CYPs 也是第一階段代謝 (phase I metabolism) 中重要的氧化酵素，可藉由氧化作用代謝外來物質，產生親水性較高之代謝產物，或產生高反應性代謝產物以利第二階段代謝 (phase II metabolism)，進而促進代謝產物排出體外 (Honkakoski and Negishi, 2000)。但在代謝過程中也可能會活化 (bioactivation) 外來物質的毒性，或是影響藥物及外來物質在生物體內的相互作用，故瞭解 CYP 之作用機制為毒理研究中重要的議題。

人體中主要進行第一階段代謝的 CYP 酵素包括了 CYP1, CYP2 及 CYP3，分別可代謝不同的外來物質 (Lewis, 2003)。其中 CYP1A 可代謝多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、異環芳香胺 (heterocyclic aromatic amines) 等物質 (Monostory et al., 1996; Smolowitz et al., 1992)。當這些物質進入人體後，會與核受體 (nuclear receptor) aryl hydrocarbon receptor (AhR) 結合，調控 CYP1A 基因及蛋白表現，進而氧化代謝外來物質 (Tompkins and Wallace, 2007)。然而在許多 PAH 的代謝中，由 CYP1A 氧化產生的高反應性代謝產物會和 DNA 作用，並進而造成致癌性，此現象即為 CYP1A 對 PAH 致癌性之生物活化 (Ma and Lu, 2007)。

在目前使用的人類用藥中，CYP2C 可代謝的種類僅次於 CYP3A，而 CYP2B

表現量雖較少，但也參與活化古柯鹼 (cocaine) 的肝毒性及黃麴毒素 (aflatoxins) 的致肝腫瘤性等機制 (Boelsterli et al., 1992; Guengerich, 2003; Robertson et al., 1983)。CYP2B 及 CYP2C 在人類及許多哺乳動物中主要由核受體 constitutive androstane receptor (CAR) 調控誘發，但目前在魚類中仍未發現 CAR, CYP2B 及 CYP2C 的存在 (Tompkins and Wallace, 2007)。

CYP3A 為人類肝臟中表現量最大的 CYP 酵素，可代謝的藥品種類也最多 (Williams et al., 2004)。文獻指出，CYP3A 主要由核受體 pregnane X receptor (PXR) 調控誘發，但因 PXR 與 CAR 之功能有部分重疊，故也可經由 CAR 途徑誘發 CYP3A 表現 (Nannelli et al., 2008; Tompkins and Wallace, 2007)。由於 CYP3A 參與多種藥物代謝，因此 CYP3A 活性會影響藥物及環境毒物在生物體中之相互作用，如 CYP3A 活性被抑制時可能會導致其他藥物或環境毒物累積而產生毒性，CYP3A 活性被誘導時則可能會引起活化黃麴毒素 B<sub>1</sub> 的基因毒性及 troglitazone (糖尿病用藥) 的肝毒性等現象 (Kassahun et al., 2001)。目前在水生生物中已發現多種 CYP3A 形式 (isoform)，如在青鱗魚中即有 CYP3A38 及 CYP3A40 兩種形式，雖然現今對於水生生物中不同形式的 CYP3A 酵素可代謝基質種類的瞭解相當有限，但已有研究指出不同物質對不同形式 CYP3A 的誘發效果不盡相同，因此不同形式 CYP3A 對不同內生及外來物質可能具有不同之代謝能力 (Kashiwada et al., 2007; Yamauchi et al., 2008)。

文獻指出三泰芬及邁克尼會誘導小鼠及大鼠肝中 AhR, CAR 及 PXR 等核受體之 mRNA 表達，並提升下游調控基因 CYP1A, CYP2B 及 CYP3A 之 mRNA 表達及酵素活性 (Allen et al., 2006; Chen et al., 2009; Goetz and Dix, 2009; Goetz et al., 2006; Sun et al., 2007; Tully et al., 2006)。當 CYP 酵素活性受干擾時，除會影響對環境汙染物及藥物的代謝及生物活化外，因 CYP1A 及 CYP3A 具有代謝 atRA、性賀爾蒙等內生物質的活性，當酵素活性被誘發時可能會加速體內重要物質的代謝速度，進而影響正常生理機能的運作 (Chen et al., 2009; Williams et al., 1998)。因此，

瞭解外來物質如何影響 CYP 的表現及活性在毒理研究中具有重大的意義。

雖然目前並無文獻探討三泰芬及邁克尼對魚類 CYP 表現及活性的影響，但已有許多研究證實撲克拉 (prochloraz)、克康那唑等康唑類殺真菌劑會干擾青鱈魚、虹鱒等魚類中 CYP 的表現情形 (Hasselberg et al., 2008; Zhang et al., 2008a)，顯示康唑類殺真菌劑具有影響水生生物 CYP 表現的可能性，以及相關研究的急切與必要性。



### 1.5. 全反式視黃酸

全反式視黃酸為具有生理活性的維生素 A 衍生物之一，其化學結構如圖 1-2 所示。廣義之維生素 A 包含超過 4,000 種形式的維生素 A 衍生物及具維生素 A 活性之物質。而在天然維生素 A 衍生物中，大部分的形式並不具有生理活性，如酯質型態維生素 A (retinyl esters) 即為動物儲存及運輸之維生素 A 形式 (Theodosiou et al., 2010)。

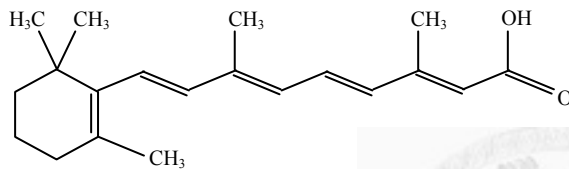


圖 1-2 全反式視黃酸結構。

由於大部分動物無法自行合成維生素 A，必須經由攝食含有維生素 A 前驅物的植物，或儲存有維生素 A 之動物內臟補充維生素 A，以維持其相關機能之正常運作 (Blomhoff and Blomhoff, 2006)。Theodosiou 等學者回顧並發表了維生素 A 於人體內之轉化、運作及代謝機制，動物在攝入維生素 A 前驅物或酯質型態維生素 A 後，經由一連串的代謝反應，最後由 aldehyde dehydrogenases 1a (ALDH1A) 酵素生成具有生理活性的 atRA 或 9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA)，而 atRA 和 9-*cis* RA 在與核受體 retinoic acid receptor (RAR) 和 retinoid X receptor (RXR) 結合後，可調控相關基因表現 (Theodosiou et al., 2010)，並藉由不同濃度的 atRA 調控胚胎發育、器官分化等機制，或維持足量濃度以維持正常視力、皮膚健康等機制 (Morriss-Kay and Ward, 1999)。

當長期維生素 A 攝取不足時，會造成維生素 A 缺乏 (vitamin A deficiency, VAD)，引起結膜乾燥、角膜軟化等症狀 (Sommer, 2008)。而在 atRA 濃度過高時，過量之

atRA 在和 RAR 結合後，會誘導 CYP26 基因及蛋白表現，進而由 CYP26 及其他第二階段代謝酵素作用清除過量 atRA，以避免過量 atRA 造成發育畸形、神經損傷等傷害 (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Collins and Mao, 1999)。

1925 年，Wolbach 和 Howe 發現在 VAD 的患者中出現腫瘤組織 (Wolbach and Howe, 1925)，自此開始維生素 A 與癌症之相關研究。1985 年，Kark 等學者分析了 174 人的血液中維生素 A 含量，發現其中的 85 名癌症患者中，血液中維生素 A 含量明顯較平均值低 (Kark et al., 1981)。而後在動物實驗和流行病學研究中也發現了 VAD 與腫瘤形成間具有良好關聯性 (Sun and Lotan, 2002)。目前對於維生素 A 與腫瘤形成間的詳細作用機制仍不完全瞭解，普遍認為維生素 A 具有抑制不正常細胞增生、誘發不正常細胞凋亡及促進正常細胞增生及分化等功用 (Niles, 2000)，可抑制腫瘤細胞增生。相反地在維生素 A 缺乏的情況下，腫瘤細胞則會加速增生。因此，破壞生物體內維生素 A 的恆定亦被認為是與致癌相關之機制之一。

另外，目前已在多種癌症前期細胞及組織中發現 atRA 相關之核受體 RARs 及 RXRs 之表現量有降低情形 (Berard et al., 1996; Castillo et al., 1997; Houle et al., 1993; Lotan et al., 1995; Lotan et al., 2000; Picard et al., 1999; Qiu et al., 1999; Widschwendter et al., 1997; Xu et al., 1994; Xu et al., 1997a; Xu et al., 1997b)。RARs 及 RXRs 在人類中分別具有  $\alpha$ ,  $\beta$  及  $\gamma$  三種亞型 (subtype)，每種亞型又有數種同功酶 (如 RXR $\alpha$ 1 及 RXR $\alpha$ 2)，不同 RARs 及 RXRs 的表現量比例依組織及發育時期而不同，亦可能僅有單一 RAR 或 RXR 表現 (Chambon, 1996)。雖然目前對於 atRA 相關核受體表現、維生素 A 缺乏及其相關致癌性的詳細關聯性及機制仍不完全明瞭，但為探討在致癌性及非致癌性康唑類殺真菌劑暴露下對水生生物肝中 atRA 相關核受體表現是否會有所影響，以及 atRA 相關核受體之 mRNA 表現情形是否能做為康唑類殺真菌劑具致癌性與否之生物指標，本研究也將分析青鱗魚暴露三聚芬及邁克尼後，其肝中 atRA 相關核受體之 mRNA 表現情形。

## 1.6. 模式生物的選擇

為探討三泰芬及邁克尼對水生生物肝中 CYP 酵素活性及 atRA 相關基因表現量之影響，本研究選用青鱗魚 (*Oryzias latipes*, medaka) 做為模式生物。青鱗魚為輻鰭魚綱 (Actinopterygii) 鶴鱗目 (Beloniformes) 異鱗亞目 (Adrianichthyoidei) 異鱗科 (Adrianichthyidae) 青鱗屬 (*Oryzias*) 之小型淡水魚種，原生於日本、台灣、韓國等東南亞淡水域，成熟期約 2-3 個月，成魚體長約 2-3 公分 (圖 1-3)，不作食用亦不作觀賞魚用。以魚類做為毒理研究之模式生物可提供快速、經濟的初步篩選，並可做為化合物對環境生物影響之研究。

青鱗魚做為模式生物具有體積小、繁殖快、卵透明易觀察等優點，且為亞洲地區原生之野生物種，而本研究主要利用其對多種環境物質具高敏感性之特性進行研究。



圖 1-3 青鱗魚。



## 1.7. 研究目的

本研究將探討青鱗魚暴露三泰芬及邁克尼後，對其肝中 CYP 活性及 atRA 恆定相關基因表現量之影響，以評估三泰芬及邁克尼對水生生物中 atRA 代謝情形之影響，及比較三泰芬及邁克尼在青鱗魚及哺乳動物中造成之影響的差異。並將以青鱗魚暴露三泰芬及邁克尼後，其肝中 p53 和 atRA 相關核受體之 mRNA 表現量改變情形，作為三泰芬及邁克尼是否對水生生物致腫瘤性之初步評估。

## 2. 材料與方法

### 2.1. 試驗設計



圖 2-1 研究架構。

本研究將以即時定量聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time polymerase chain reaction, q-RT-PCR) 及兩種酵素活性測定法分析青鱈魚暴露三泰芬及邁克尼後肝中 CYP 酵素活性與 atRA 相關基因表現量。q-RT-PCR 分析項目包括 CYP 與其相關核受體、atRA 相關酵素及核受體、p53 之 mRNA 表現量。Ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) 法及 Dibenzylfluorescein (DBF) 試驗則分別用於測定 CYP1A 及 CYP3A 活性。因 CYP1A 及 CYP3A 皆為內質網 (endoplasmic reticulum) 上之膜蛋白，故實驗時須先打破細胞，萃取出由內質網碎片形成的微粒體 (microsome) 部分後，再以酵素活性測定法測定酵素活性。

本研究將以 7 月齡青鱈魚雄魚進行暴露及分析，此時期之青鱈魚已達性成熟，各項生理機制表現穩定，且萃取出之 RNA 及微粒體蛋白足夠進行基因表現及酵素活性分析。



## 2.2. 實驗動物

實驗用魚於實驗室附設魚房之水循環系統中飼養繁殖。每 10-15 隻青鱒魚成魚飼養於 1 個 3 L 壓克力魚缸中，以微弱水流循環並以風管插入液面打氣維持溶氧量充足。水循環系統每日更換 1/3 過濾之除氯自來水以避免硝酸態氮累積。飼養環境為每日 14 小時光照，溫度為  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，每日餵食豐年蝦及乾飼料 otohime- $\beta 1$  共 2-3 次，每週以市售水質檢測試劑監控系統中水質如表 2-1。

表 2-1 水循環系統水質監測情形。

監測項目	濃度
硝酸態氮	< 5 mg/L
亞硝酸態氮	< 0.5 mg/L
氨態氮	~0.5 mg/L
總硬度	~17.9 mg/L
碳酸鹽硬度	6-15 mg/L
溶氧	~8 mg/L
氯	< 0.5 mg/L

## 2.3. 藥品與試劑

二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、氯化鎂 (magnesium chloride,  $\text{MgCl}_2$ )、磷酸氫二鉀 (dipotassium hydrogen phosphate,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、Tris base、醋酸 (acetic acid)、甘油 (glycerol)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide, NaOH) 購自 J.T. baker (U.S.A)。1-溴-3-氯丙烷

(1-bromo-3-chloropropane)、異丙醇 (isopropanol)、乙醇 (ethanol)、乙烯二胺四醋酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、雙丁基氫氧甲苯 (butylated hydroxytoluene, BHT)、苯基甲基磺醯氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、乙氧基間一苯二酚 (ethoxyresorufin, ER)、菸鹼醯胺腺嘌呤 (β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium, NADP<sup>+</sup>)、葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate, G6P)、葡萄糖-6-磷酸脫氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6DPH)、β-奈黃酮 (β-naphthoflavone, β-NF) 購自 Sigma (U.S.A)。甲醇 (methanol)、甲醛 (formaldehyde) 購自 Merck (U.S.A)。Dibenzylfluorescein (DBF) 購自 BD (U.S.A)。RNAlater<sup>®</sup>, TRI Reagent<sup>®</sup> Solution, Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, Nuclease-Free Water 購自 Applied Biosystems (U.S.A)。

#### 商業套組

TURBO DNA-free™ kit, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 購自 Applied Biosystems (U.S.A)。Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit 購自 Thermo Fisher Scientific (U.S.A)。

#### 配置溶液

- a.) DEPC 水：0.1% DEPC 配置於 milli Q 水中。
- b.) TE 緩衝液：10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA 配置於 milli Q 水中。
- c.) 均質用緩衝液：0.1 M Tris-acetate, 1 mM EDTA, 0.02 mM BHT, 0.1 mM PMSF 配置於 milli Q 水中，調整 pH 至 7.4。
- d.) 保存用緩衝液：10 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, 20% glycerol 配置於 milli Q 水中。

## 2.4. 儀器

離心機 FORCE1418 (ForceMicro)

低溫離心機 (Eppendorf)

超高速低溫離心機 Optima™ MAX-XP Benchtop Ultracentrifuge (Beckman Coulter)

均質器 D-54518 Niersbach MICROMOT (PROXXON)

手動均質器 Wheaton Tenbroeck Tissue Grinder (Fisher)

四位天平 AC204 (METTLER TOLEDO)

五位天平 (denver)

分光光度計 BioPhotometer (Eppendorf)

微量分光光度計 Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)

熱循環反應器 T3000 Thermocycler (Biometra)

核酸即時定量 PCR StepOne (Applied Biosystems)

恆溫培養箱 LE09RD (裕德)

微盤讀儀 Microplate reader BLX808 (Bio-Tek)

多功能微盤讀儀 FlexStation3 microplate reader (MDS)

## 2.5. 暴露實驗設計與樣品採集

### 2.5.1. mRNA 表現量分析預實驗

為求得最佳反應之實驗條件，本研究先將青鱈魚暴露於亞致死劑量的三泰芬及邁克尼 3 天，分析其肝中 CYP1A, CYP3A38, CYP3A40 及 PXR 之 mRNA 表現情形。實驗步驟為將 9 隻七月齡青鱈魚雄魚隨機平分為三組，於實驗前一天分別放入 3 個裝有 600 mL 除氯水之 1 L 燒杯中適應。實驗開始當天將燒杯中的除氯水更換為暴露溶液以開始暴露實驗，處理組別包括溶劑控制組 (0.007% DMSO)、2 mg/L 三泰芬 (~6.8  $\mu$ M) 及 2 mg/L 邁克尼 (~6.9  $\mu$ M)，暴露持續 3 天，每日餵食

otohime- $\beta$ 1 1 次，並於餵食 1 小時後更換暴露溶液。暴露條件為光週期為每日 14 小時光照，溫度為  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。適應及實驗期間皆以風管插入液面打氣以維持溶氧，並於杯口套上尼龍網防止魚隻跳出。暴露結束後犧牲魚隻，取下肝臟保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中留待 mRNA 表現量分析。

### 2.5.2. mRNA 表現量分析實驗

為求得更佳顯著的反應，mRNA 表現量分析實驗中將暴露時間拉長為 7 至 14 天，並為避免造成魚隻死亡而將暴露濃度降為  $2.0\text{-}5.0\ \mu\text{M}$ 。實驗步驟為將 80 隻七月齡青鱒魚雄魚隨機平分為 16 組，於實驗前一天分別放入 16 個裝有 600 mL 除氯水之 1 L 燒杯中適應。實驗開始當天將燒杯中的除氯水更換為暴露溶液以開始暴露實驗，處理組別包括除氯水控制組、溶劑控制組 (0.001% DMSO)、不同濃度之三泰芬 (2.0, 3.5, 5.0  $\mu\text{M}$ ) 及邁克尼 (2.0, 3.5, 5.0  $\mu\text{M}$ ) 共八組，每組 2 杯分別暴露 7 天及 14 天。換水、餵食及其他暴露條件同預實驗。暴露完成時秤量魚隻重量、犧牲魚隻取出肝臟、將肝臟浸於 RNAlater<sup>®</sup> 樣品保存液中秤量肝重後，依 RNAlater<sup>®</sup> 原廠操作手冊，將樣品冷藏隔夜後置於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存留待 mRNA 表現量分析。

秤得之肝重與體重用於計算肝體指數 (hepatosomatic index, HSI)，計算方式為  $\text{HSI} = \text{肝重} / \text{體重}$ 。

### 2.5.3. CYP 酵素活性分析實驗

綜合 mRNA 表現量分析預實驗及 mRNA 表現量分析實驗之結果，為避免高濃度、長時間的暴露造成毒性，CYP 酵素活性分析實驗將最高暴露濃度降為  $3.5\ \mu\text{M}$ ，並僅進行 7 天之暴露。實驗步驟為將 60 隻七月齡青鱒魚雄魚隨機平分為 12 組，於實驗前一天分別放入 12 個裝有 600 mL 除氯水之 1 L 燒杯中適應。實驗開始當天將燒杯中的除氯水更換為暴露溶液以開始暴露實驗，處理組別包括除氯水控制

組、溶劑控制組 (0.001% DMSO)、不同濃度之三泰芬 (2.0, 3.5  $\mu$ M) 及邁克尼 (2.0, 3.5  $\mu$ M) 共六組，暴露持續 7 天，換水、餵食及其他暴露條件同預實驗。暴露完成時秤量魚隻重量、犧牲魚隻取出肝臟、將肝臟浸於均質用緩衝液中秤量肝重後，立即進行微粒體萃取。秤得之肝重與體重用於計算肝體指數，計算方法同上。

## 2.6. 分析方法

### 2.6.1. mRNA 表現量分析

#### 2.6.1.1. RNA 萃取

將樣品自  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出解凍，並除去 RNAlater<sup>®</sup> 溶液後，使用 TRI Reagent<sup>®</sup> Solution 萃取青鱒魚肝臟中之 RNA (除因樣品較小而將操作體積減半外，實驗步驟如原廠操作手冊)。萃取出之總 RNA 回溶於 50  $\mu$ L DEPC 水，取出 3  $\mu$ L 測定 RNA 濃度，其餘置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。RNA 濃度測定以分光光度計 BioPhotometer 進行，以 TE 緩衝液為空白樣品校正後，將 3  $\mu$ L RNA 樣品以 TE 緩衝液稀釋 25 倍，測量 260 nm 吸光值，並以  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$  估算 RNA 濃度。

#### 2.6.1.2. TURBO 去 DNA 處理

自總 RNA 樣品中取出 10  $\mu$ g RNA，以 TURBO DNA-free<sup>™</sup> kit 及 T3000 Thermocycler 移除 RNA 樣品中的 DNA (實驗步驟如原廠操作手冊)。RNA 濃度測定以微量分光光度計 Nanodrop 進行，以 Nuclease-Free Water 為空白樣品校正後，取 1.2  $\mu$ L 去 DNA 之 RNA 樣品測量 260 nm 吸光值，並以  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$  估算 RNA 濃度。將去 DNA 之 RNA 樣品置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

#### 2.6.1.3. 反轉錄 (reverse transcription)

自去 DNA 之 RNA 樣品中取出 10  $\mu$ g RNA，以 High-Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit 及 T3000 Thermocycler 進行反轉錄 (實驗步驟如原廠操作手冊)。  
反應完成後之 cDNA 樣品置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

#### 2.6.1.4. 引子設計與品質檢測

引子序列設計以文獻中之序列為優先。查無相關文獻或文獻中之引子序列無法通過下述之品質檢測時，使用文獻中之基因編號於 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中取得其完整序列，並使用 PrimerExpress 3.0 設計引子。

由於引子於即時定量聚合酶連鎖反應中需具有良好專一性，不產生自黏現象，以及在實驗使用之 cDNA 濃度範圍中有穩定放大效果等性質，所有引子序列在分析樣品前皆需經過品質檢測。引子品質檢測包括引子濃度測試及引子放大效率測試兩部分，前者測試足量且不產生自黏現象之引子濃度，後者則測試引子於實驗使用之 cDNA 濃度範圍中之放大效果及不產生非專一性鍵結之 cDNA 濃度。

##### a.) 引子濃度測試

各基因分別配置 100 nM 及 300 nM 引子濃度組合，進行 q-RT-PCR。確認引子濃度 300 nM 反應結果中解離曲線，如為單一波峰則表示此引子於 300 nM 反應時不會產生自黏現象，即可以 300 nM 進行反應。若具兩個以上之波峰，則確認引子濃度 100 nM 反應結果中解離曲線，如為單一波峰則以 100 nM 進行後續反應。若仍具兩個以上之波峰，且其中之一的訊號值明顯隨引子濃度下降而減少，則再下降引子濃度進行實驗。唯若兩波峰之訊號值皆隨引子濃度下降而明顯減少時，表示此引子在反應所需之足量濃度下皆會產生自黏現象，需重新設計引子。

##### b.) 引子放大效率測試

將 cDNA 樣品以 Nuclease-Free Water 做序列稀釋，進行 q-RT-PCR。各基因使

用之引子濃度皆為 300 nM。作  $\log[\text{cDNA}] - C_T$  圖之線性迴歸方程式，確認判定係數 ( $R^2$ ) 大於 0.99，且斜率介於 -3.587 至 -3.103 間。若線性因高或低濃度點而偏差，或  $C_T$  值已低於 20 或高於 35，則於線性區間內重新稀釋數個濃度進行實驗，以確認引子於實驗使用之 cDNA 濃度範圍中之放大效果穩定，且所得之  $C_T$  值介於  $\Delta\Delta C_T$  法可定量之範圍內。若反應結果中解離曲線具兩個以上之波峰，且其中之一的訊號值於 cDNA 濃度下降後消失，則表示高濃度反應中 cDNA 濃度過高，使引子產生非專一性鍵結。此時需選用不於解離曲線中產生雙波峰之 cDNA 濃度進行反應，唯若降低 cDNA 濃度後  $C_T$  值高於 35 時需重新設計引子。

#### 2.6.1.5. 即時定量聚合酶連鎖反應

將 cDNA 樣品稀釋 10 倍後，以 Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 及 StepOne 進行即時定量聚合酶連鎖反應 (除因樣品較少而將操作體積由 50  $\mu\text{L}$  減少至 20  $\mu\text{L}$  外，實驗步驟如原廠操作手冊)。本實驗共測定 1 個參考基因 (*rpl-7*) 及 14 個目標基因，每樣品每基因測定二重複。使用之引子序列如表 2-2 所示。PCR 反應條件為 StepOne 預設程序，如表 2-3 所示。實驗結果以  $\Delta\Delta C_T$  法計算所有處理組相較於 DMSO 控制組之表現倍數。

表 2-2 引子序列。

基因	引子序列 (F：前置、R：後置)		來源
<i>rpl-7</i>	F	CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT	(Zhang et al., 2008b)
	R	AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT	
<i>ahr</i>	F	CCTTTCCCGAGGACGTCAT	自行設計
	R	GAGGTAGCTGACGCTAAGCCTTA	
<i>cyp1a</i>	F	CGCAGAAAGTTGGCCTACAGT	(Hong et al., 2007)
	R	TCTGCATTGCTGCCCTCTAG	
<i>pxr</i>	F	GAGGAGCAAGAGCACGAATC	(Yamauchi et al., 2008)
	R	ATGAAGCACAGAGGCTGGAG	
<i>cyp3a38</i>	F	AGGAAACAGAGATCCCCTTCGA	(Zhang et al., 2008b)
	R	AGGCACCAGCTTCAGAAAGATG	
<i>cyp3a40</i>	F	AGATGGATGTCCAGGGTTTCC	(陳, 2011)
	R	GGCGTGAGCTTCAGTTGGAT	
<i>aldh1a2</i>	F	GGTTTCCACCAGGAGTTGTCAA	(Zhang et al., 2008b)
	R	GATAAGCTTGCCGACCTCAGTT	
<i>cyp26b1</i>	F	CTGCCTCGACATTCTGATCCTC	(Zhang et al., 2008b)
	R	TTGTGCATCTGTGTGCGGTT	
<i>rara1</i>	F	TGGACATTCTGATTCTGCGGAT	(Zhang et al., 2008b)
	R	GGAGAAGGTCATGGTGTCTCTGT	
<i>rara1</i>	F	CCTCGTGTCTACAAACCCTGCT	(Zhang et al., 2008b)
	R	TGCGACGGAAGAAACCCTT	
<i>rxra1</i>	F	CCGAGCAGGTTGGAATGAACT	(Zhang et al., 2008b)
	R	CCCGTCTTTCACCTGCTATGGAA	
<i>rxra2</i>	F	TGGGGAGAACGAGGTTGAGT	(Zhang et al., 2008b)
	R	ATCTTGTCACGGGC ATCTC	
<i>rxrβ1</i>	F	TAGTGCCCATAGTGCTGGTGTT	(Zhang et al., 2008b)
	R	CGAGTTGGACAAACCCTTAGCAT	



<i>rxrβ2</i>	F	CTGCCTTCGAGCTATTGTTCTG	(Zhang et al., 2008b)
	R	TTAGAGAGCCCTTTAGCATCTGG	
<i>p53</i>	F	CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT	(Zhang et al., 2008b)
	R	AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT	

表 2-3 StepOne 儀器預設之即時定量聚合酶連鎖反應條件。

步驟	溫度 (°C)	時間 (秒)
Holding	95	600
Cycling (40 cycles)	95	15
	60	60
Melting Temperature	95	15
	60	60
	95	15

## 2.6.2. CYP 酵素活性分析

### 2.6.2.1. 微粒體萃取

微粒體萃取實驗方法為參考 Tatarazako 等學者之研究，並將實驗步驟做部分修正 (Tatarazako et al., 2002)。將 2 隻青鱈魚之肝臟合併為 1 樣品，在冰冷的均質用緩衝液中均質，並在 4°C 中離心 (10,000 g, 10 分鐘) 後，將上清液於 4°C 中進行超高速離心 (120,000 g, 120 分鐘)，再將沉澱物回溶於 200  $\mu$ L 冰冷的保存用緩衝液中，取出 25  $\mu$ L 以 Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit 試劑組測定微粒體蛋白濃度 (實驗步驟如原廠操作手冊)，其餘置於 -80°C 冰箱中保存。

### 2.6.2.2. EROD 法

EROD 法步驟為參考 Tatarazako 等學者之研究 (Tatarazako et al., 2002)，並經反應條件測試後修正部分反應條件。實驗步驟為取 20  $\mu$ g 微粒體蛋白 22°C 下回溫 5 分鐘後，與基質 ethoxyresorufin 和其他反應輔助因子於 22°C 反應 20 分鐘，反應中各成分濃度如表 2-4 所示。反應完成後，以甲醇停止反應，再以多功能微盤讀儀 FlexStation3 microplate reader 測定反應產物放射之螢光，測定條件為激發光 550 nm，發散光 585 nm。

### 2.6.2.3. DBF 試驗

DBF 試驗步驟為參考 Kashiwada 等學者之研究 (Kashiwada et al., 2007)，並經反應條件測試後修正部分反應條件。實驗步驟為取 20  $\mu$ g 微粒體蛋白於 25°C 下回溫 5 分鐘後，與基質 dibenzylfluorescein 和其他反應輔助因子於 25°C 反應 15 分鐘，反應中各成分濃度如表 2-5 所示。反應完成後，以 2N 氫氧化鈉停止反應，再以多功能微盤讀儀 FlexStation3 microplate reader 測定反應產物放射之螢光，測定條件為激發光 485 nm，發散光 538 nm。

表 2-4 EROD 法反應中各成分濃度。

成分	濃度
Potassium phosphate buffer (pH 7.7)	50 mM
Magnesium chloride	5 mM
NADP <sup>+</sup>	0.5 mM
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1 IU
Ethoxyresorufin	2 μM
Glucose-6-phosphate	10 mM

表 2-5 DBF 試驗反應中各成分濃度。

成分	濃度
Potassium Phosphate Buffer (pH 7.4)	200 mM
Magnesium chloride	30 mM
NADP <sup>+</sup>	2 mM
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.5 IU
Dibenzylfluorescein	1 μM
Glucose-6-phosphate	25 mM

## 2.7. 統計分析

統計分析以 statistics analysis system (SAS) 9.1 軟體之單因子變方分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 進行，並以 Dunnett's t test 進行所有處理組與 DMSO 溶劑控制組之比較。各級差異顯著水準隻表示如下： $*$ :  $p < 0.05$ ； $**$ :  $p < 0.01$ ； $***$ :  $p < 0.001$ 。所有圖表數據皆以平均值  $\pm$  標準誤 (standard error) 表示。

### 3. 結果與討論

#### 3.1. 引子品質及酵素分析條件測試

##### 3.1.1. 引子品質測試

圖 3-1 為本研究使用之引子之解離曲線，所有使用引子之 PCR 反應產物皆為單一波峰，顯示反應中無非專一性結合或引子雙體等非預期之反應產物干擾反應訊號。

##### 3.1.2. 酵素分析條件測試

微粒體蛋白回溫時間以 DBF 試驗測試，測試時間包括 3, 5 及前人研究使用之 10 分鐘。測試結果如圖 3-2 所示，在微粒體蛋白回溫 5 分鐘後進行的反應得到的訊號值最高，而在回溫 10 分鐘時其訊號值下降，故將接續之反應條件測試及正式實驗中微粒體蛋白回溫修正為 5 分鐘。

EROD 法反應時間測試條件包括 10, 20 及 30 分鐘，測試結果如圖 3-3a 所示，測得之訊號值在 30 分鐘內呈線性關係，與文獻之結果相符 (Tatarazako et al., 2002)。故接續之反應條件測試及正式實驗中 EROD 法之反應時間固定為文獻中使用之 20 分鐘 (Tatarazako et al., 2002)。而 DBF 試驗反應時間測試條件包括 5, 10, 15 及 20 分鐘，測試結果如圖 3-3b 所示，反應 15 至 20 分鐘間測得之訊號改變量開始有下降之現象，可能為反應進行效率降低、反應原料不足或訊號飽和等因素造成，故接續之反應條件測試及正式實驗中 DBF 試驗之反應時間固定為 15 分鐘。

EROD 法之正控制組以文獻中 CYP1A 誘導劑  $\beta$ -naphthoflavone 進行 (Beijer et al., 2010)，測試結果如圖 3-4 所示，青鱈魚暴露 1 mg/L  $\beta$ -naphthoflavone 達 48 小時後，其肝中 EROD 活性提升為 DMSO 控制組的 68.5 倍。EROD 法和 DBF 試驗之酵素抑制實驗則以 CYP1A, CYP3A 之活性抑制劑克康那唑進行 (Beijer et al., 2010; Greenblatt et al., 2011)，測試結果如圖 3-5 所示，微粒體蛋白加入 5 及 50  $\mu$ L 克康那唑後反應測應測得之訊號降低至與背景值相近。

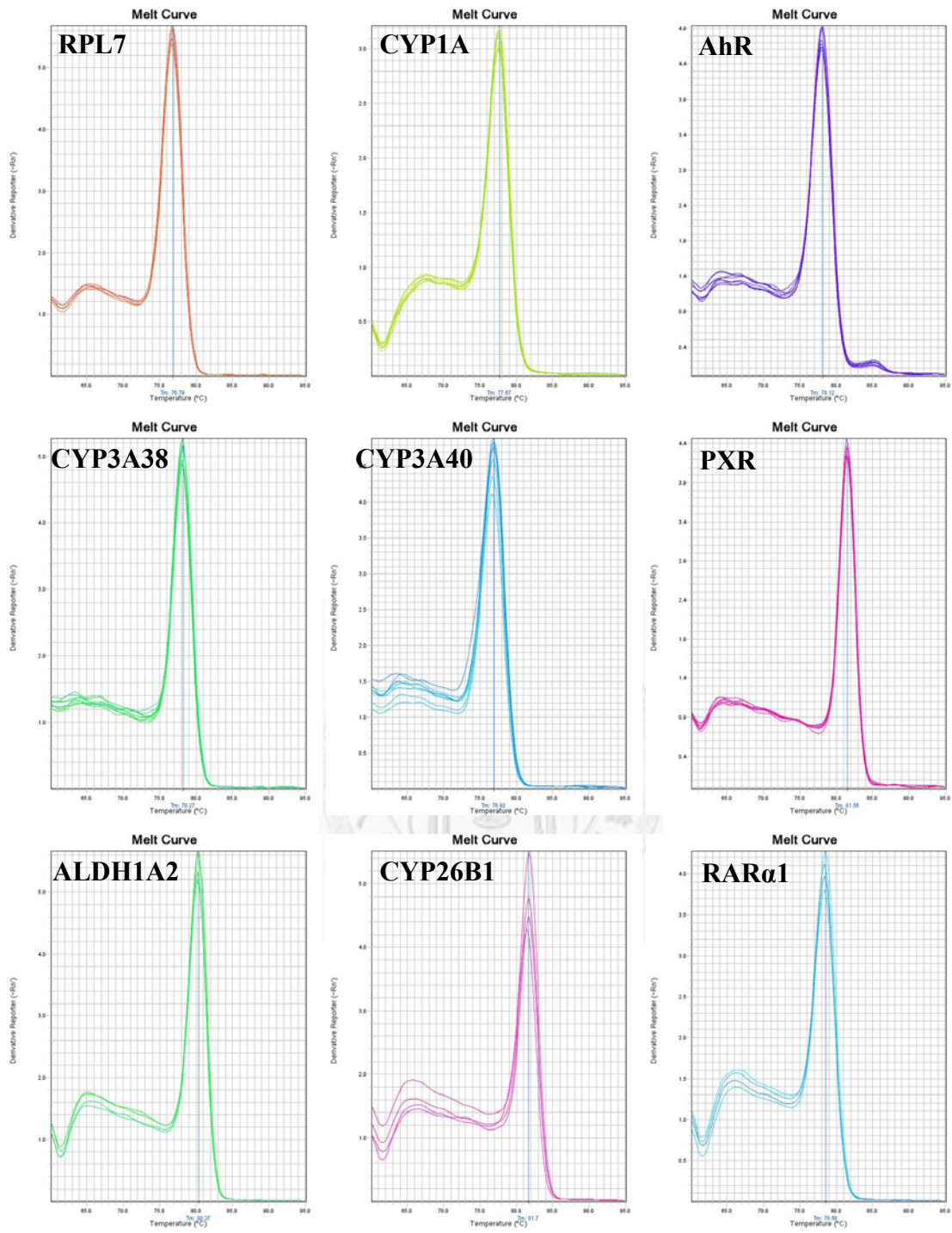


圖 3-1 引子解離曲線。

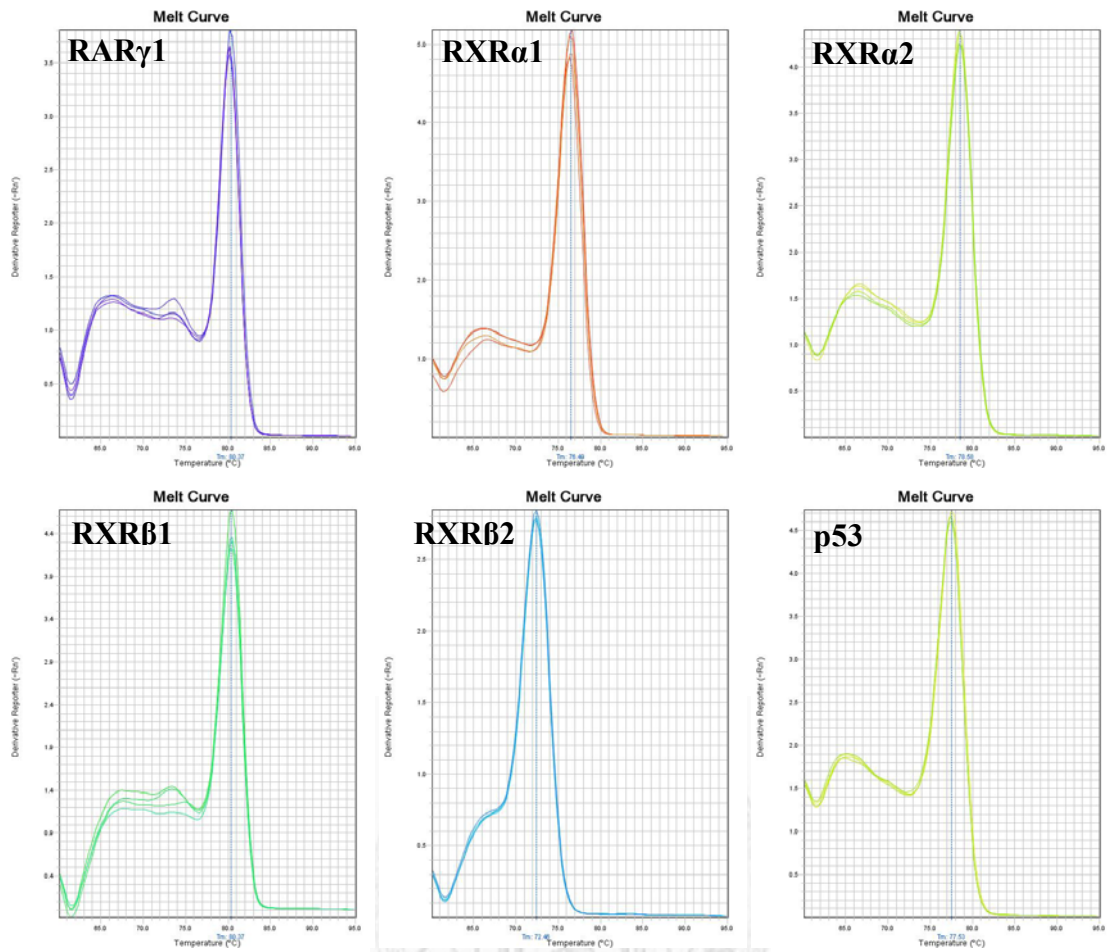


圖 3-1 引子解離曲線 (續)。

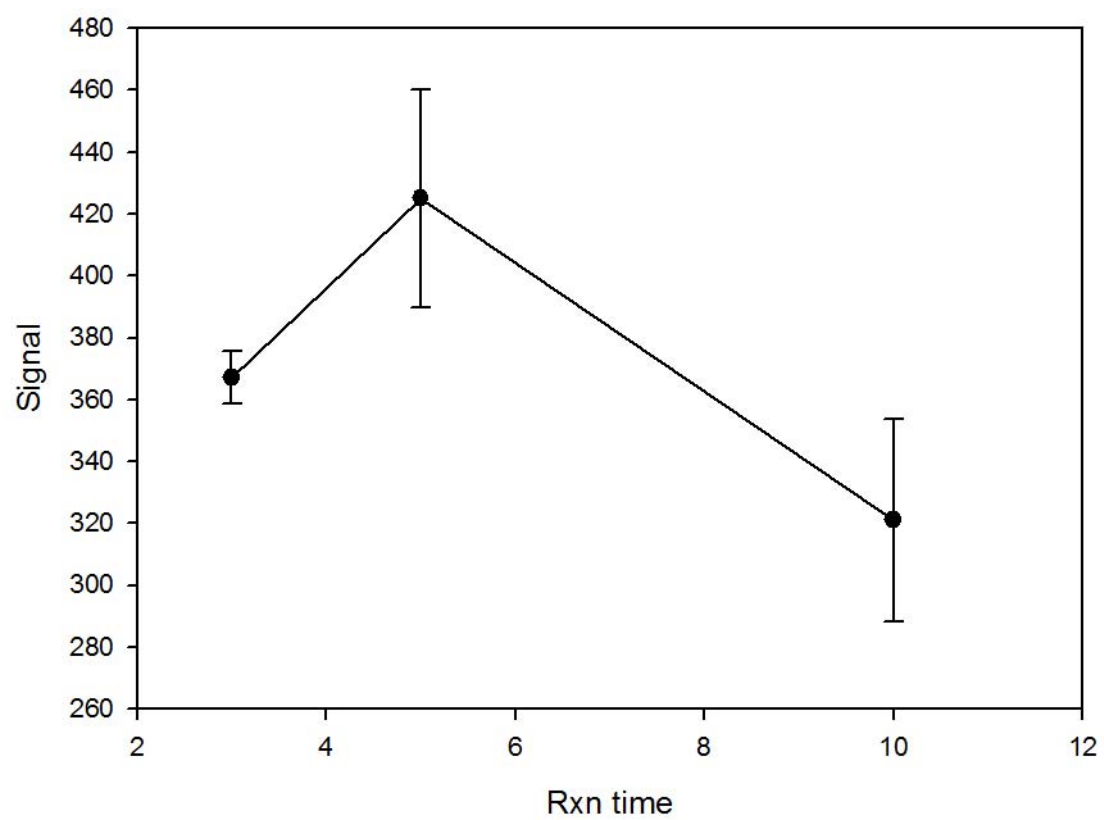


圖 3-2 微粒體蛋白回溫時間與 DBF 試驗訊號關係。



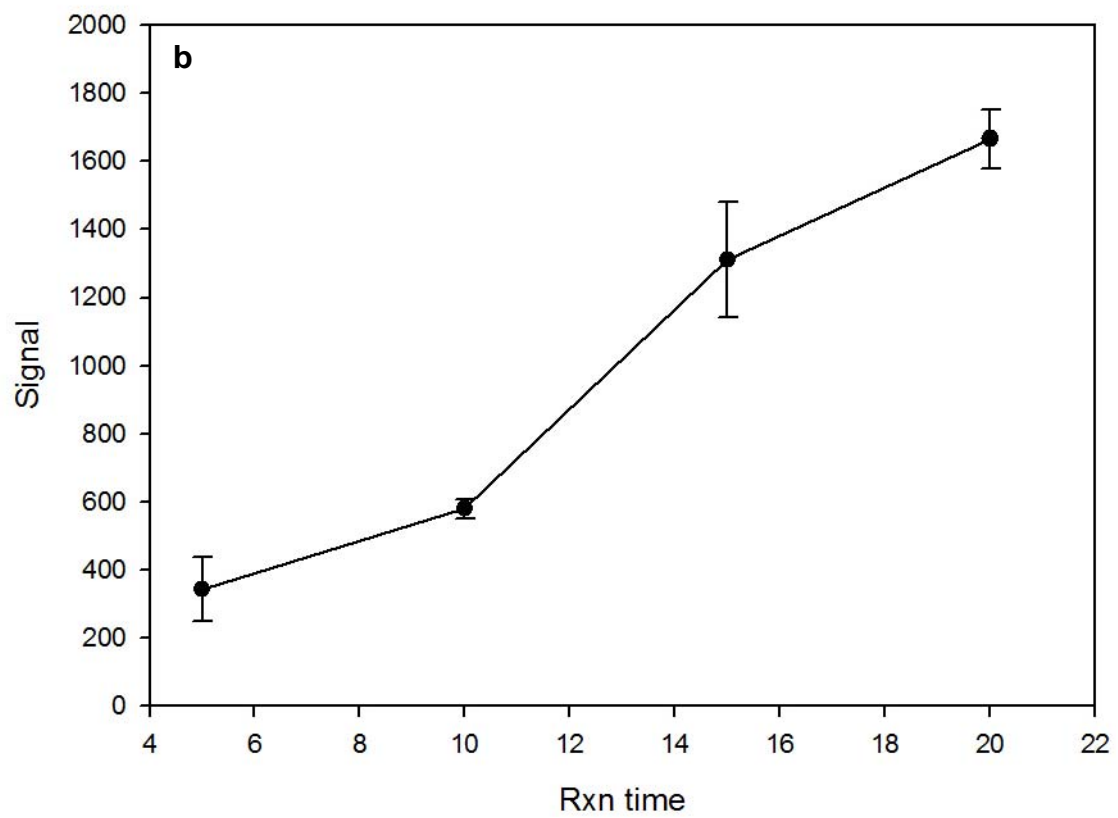
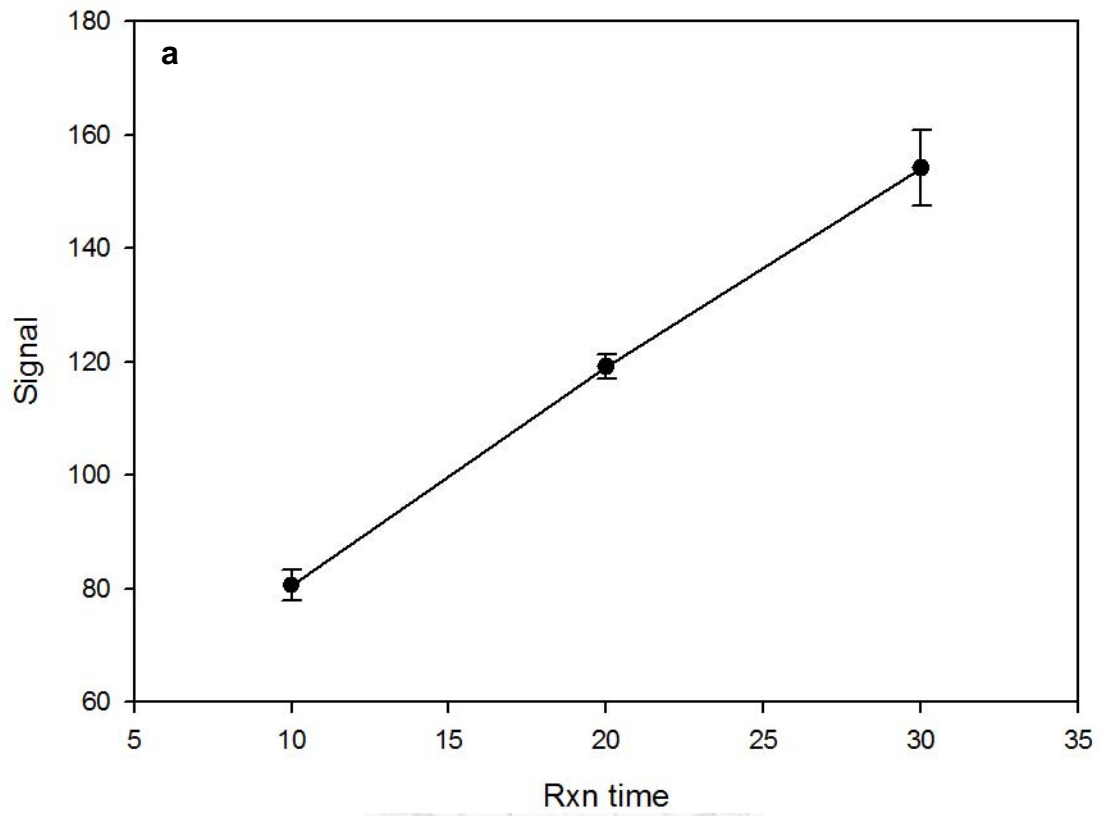


圖 3-3 (a) EROD 法與 (b) DBF 試驗反應時間與訊號關係。



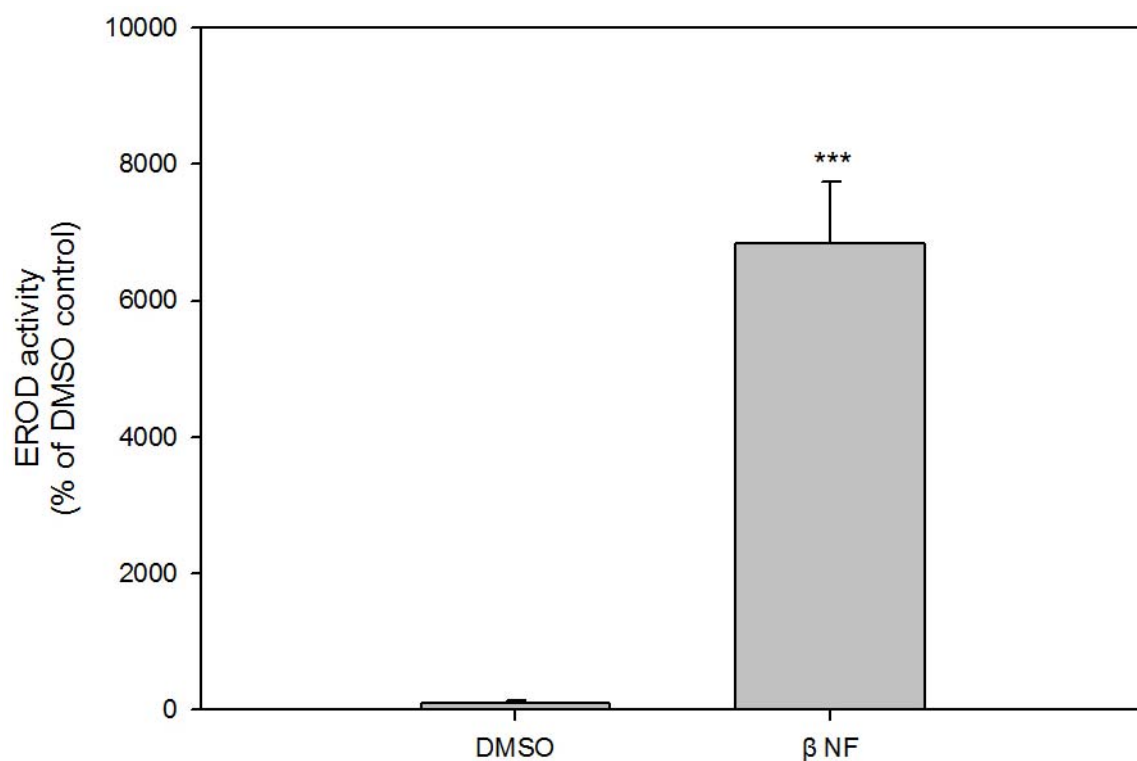


圖 3-4 CYP1A 活性誘導試驗。圖中 DMSO 為 0.01% DMSO 溶劑控制組， $\beta$ NF 為 1 mg/L 之 CYP1A 誘導劑  $\beta$ -naphthoflavone。暴露時間為 48 小時，其於暴露環境條件同 CYP 酵素活性分析實驗。 $\beta$ NF 處理組與 DMSO 控制組之比較以 ANOVA 進行。各級差異顯著水準之表示如下： \*\*\*： $p < 0.001$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

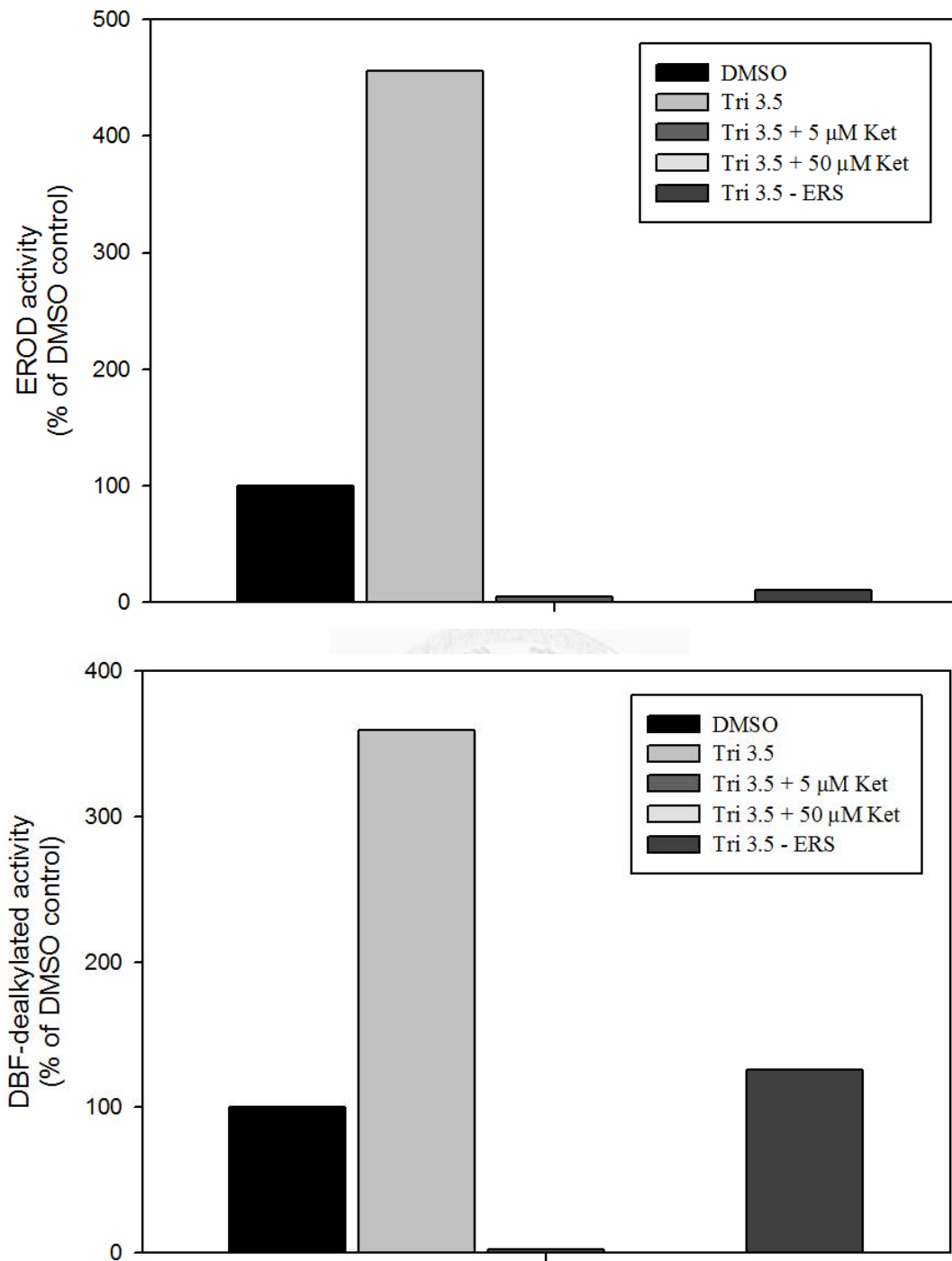


圖 3-5 (a) CYP1A 與 (b) CYP3A 活性抑制實驗。圖中 DMSO 和 Tri 3.5 為 CYP 酵素活性分析實驗之樣品，Ket 為 CYP 活性抑制劑 ketoconazole，ERS 為能量再生系統 (NADP<sup>+</sup>, glucose-6-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate)。

### 3.2. mRNA 表現量分析預實驗

前人文獻指出投以亞致死劑量的三泰芬及邁克尼會誘導小鼠肝中 CYP1A 及 CYP3A 之 mRNA 表現 (Allen et al., 2006; Chen et al., 2009; Goetz and Dix, 2009; Goetz et al., 2006)。故本研究將青鱈魚暴露於 2 mg/L 三泰芬及邁克尼 3 天後採樣肝臟分析 CYP1A 及 CYP3A 之 mRNA 表現量。實驗結果如圖 3-6 所示，CYP1A 及核受體 PXR 之 mRNA 表現於三泰芬及邁克尼處理組中皆無上升現象，而兩種 CYP3A 形式 CYP3A38 及 CYP3A40 之 mRNA 表現則於三泰芬及邁克尼處理組中皆有上升趨勢。顯示三泰芬及邁克尼可能具有誘導 CYP3A 基因表現及酵素活性之能力。但預實驗中因操作不慎而使 DMSO 控制組之樣本數僅有 2 隻，無法進行統計分析。而為得到更明顯之反應結果，mRNA 表現量分析之正式實驗中將暴露時間延長為 7 至 14 天，暴露濃度降低為 2.0-5.0  $\mu\text{M}$ 。



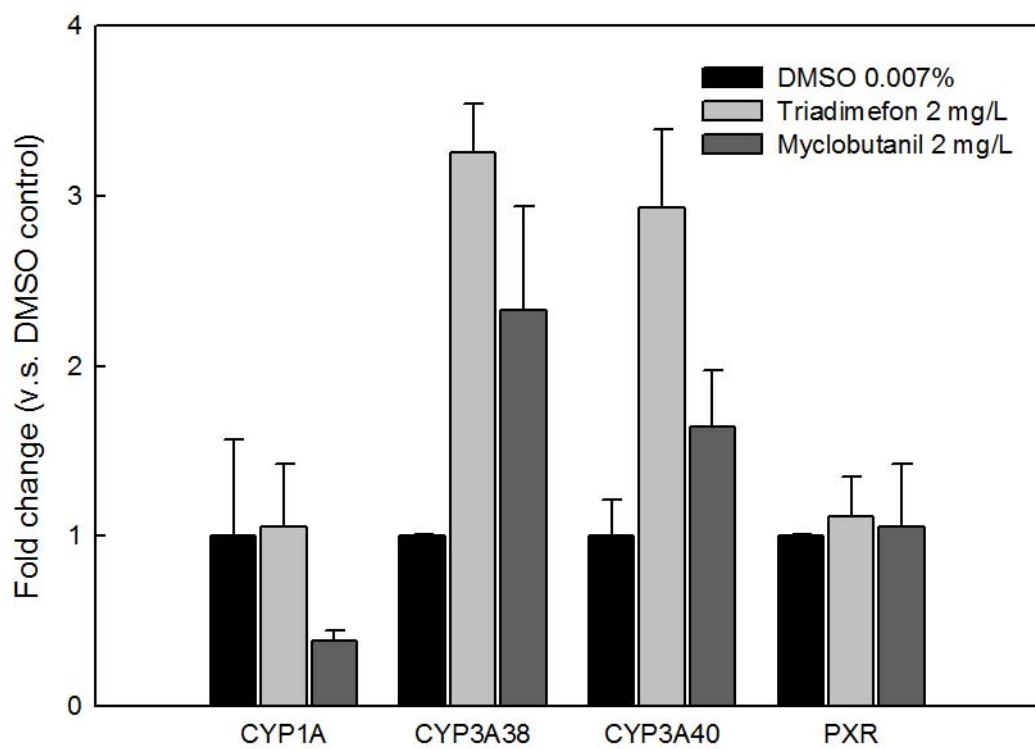


圖 3-6 青鱗魚暴露於處理組及控制組 3 天後肝中 CYP1A, CYP3A38, CYP3A40 及 PXR 之 mRNA 表現情形。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

### 3.3. 肝體指數

肝體指數為生物肝臟重與體重之比值。普遍而言，在條件較惡劣的環境下，生物體內儲存的能量較少，而肝體指數較低，因此肝體指數一般用於評估環境是否適合動物生存。而在毒理研究中，許多研究發現暴露毒物後，生物之肝體指數相較於控制組有顯著提升。文獻指出，亞致死劑量之三泰芬及邁克尼可顯著提升小鼠及大鼠之肝體指數，其機制可能為三泰芬及邁克尼誘導 CYPs 蛋白大量表現，進而造成肝腫大所致 (Allen et al., 2006; Chen et al., 2009; Sun et al., 2007)。故本研究將青鱈魚暴露於 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼，並於暴露第 7 天及第 14 天採樣肝臟測量肝體指數，觀察肝體指數是否可做為三泰芬及邁克尼投藥成功之生物指標。結果顯示，本實驗所有處理組之肝體指數與控制組間均無顯著差異 (表 3-1)，顯示肝體指數可能並非三泰芬及邁克尼於青鱈魚中投藥成功之良好生物指標。

目前在青鱈魚相關毒理研究中，肝體指數主要是做為暴露雌激素或類雌激素之生物指標。文獻指出雌激素可誘導卵黃前質蛋白 (vitellogenin, VTG) 大量表現，因而可使肝體指數顯著提升 (Ma et al., 2007; Ma et al., 2005; Zhang and Hu, 2008)。而本實驗中肝體指數無顯著變化可能是本研究之暴露處理誘導之酵素表現量並未如 VTG 效應可造成顯著的肝體指數差異所致。

表 3-1 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後的肝體指數 (HSI)。

a.) 7 天

Conazole 處理組別	體重 (mg)	肝重 (mg)	HSI (%)
Control <sup>a</sup>	310.46 ± 14.88	4.68 ± 0.28	1.51 ± 0.06
DMSO <sup>a</sup> 0.001 %	288.94 ± 10.88	4.66 ± 0.35	1.61 ± 0.10
三泰芬	2 μM <sup>a</sup>	281.12 ± 7.16	4.64 ± 0.26
	3.5 μM <sup>b</sup>	279.31 ± 9.67	4.52 ± 0.40
	5 μM <sup>c</sup>	312.92 ± 19.99	4.79 ± 0.70
邁克尼	2 μM <sup>a</sup>	314.09 ± 6.87	4.37 ± 0.31
	3.5 μM <sup>a</sup>	296.55 ± 8.18	4.03 ± 0.29
	5 μM <sup>c</sup>	317.16 ± 29.50	4.74 ± 0.53

<sup>a</sup> n=13, <sup>b</sup> n=12, <sup>c</sup> n=5

b.) 14 天

Conazole 處理組別	體重 (mg)	肝重 (mg)	HSI (%)
Control <sup>a</sup>	303.00 ± 25.77	4.38 ± 0.52	1.43 ± 0.08
DMSO <sup>a</sup> 0.001 %	335.30 ± 15.33	4.72 ± 0.30	1.40 ± 0.05
三泰芬	2.0 μM <sup>b</sup>	306.55 ± 28.89	4.74 ± 0.56
	3.5 μM <sup>b</sup>	262.83 ± 32.75	5.09 ± 1.12
	5.0 μM <sup>b</sup>	314.55 ± 43.34	5.23 ± 1.04
邁克尼	2.0 μM <sup>a</sup>	280.16 ± 30.28	3.88 ± 0.97
	3.5 μM <sup>a</sup>	280.88 ± 17.39	4.38 ± 0.52
	5.0 μM <sup>a</sup>	309.58 ± 22.54	5.93 ± 0.81

<sup>a</sup> n=5, <sup>b</sup> n=4

### 3.4. CYP1A 基因表現及酵素活性

CYP1A 酵素活性為毒理研究中重要的生物指標之一，可代表實驗處理對 CYP1A 代謝基質能力之影響程度。前人研究指出，投以亞致死劑量的三泰芬及邁克尼會使小鼠肝中 CYP1A 活性顯著提升 (Allen et al., 2006; Goetz and Dix, 2009; Goetz et al., 2006)。故本研究將青鱗魚暴露於 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼，並於暴露第 7 天及第 14 天採樣肝臟分析 CYP1A 之 mRNA 表現量；另將青鱗魚暴露於 2.0-3.5  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼 7 天後，採樣肝臟以 EROD 法分析 CYP1A 酵素活性，觀察三泰芬及邁克尼對青鱗魚肝中 CYP1A 活性之影響。結果顯示，暴露 2.0 及 3.5  $\mu\text{M}$  三泰芬 7 天後，青鱗魚肝中 CYP1A 活性 (以 EROD 活性表示) 分別提升為約 2.8 及 3.9 倍，顯示此濃度下的三泰芬可誘導 CYP1A 酵素活性。相同暴露條件下，邁克尼則不影響青鱗魚肝中 CYP1A 活性 (圖 3-7)。然而，青鱗魚 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬 7 天後，肝中 CYP1A 之 mRNA 表現量於暴露下降約 36-63%，相同暴露條件下邁克尼則使 CYP1A 之 mRNA 表現量下降約 25-47%，但因組內個體差異較大而均未達顯著水準 (圖 3-8a)。另外，前人研究指出 CYP1A 的基因及蛋白表現主要經由 AhR 調控 (Tompkins and Wallace, 2007)，故本研究也進行青鱗魚肝中 AhR 之 mRNA 表現量分析 (實驗條件同 CYP1A 之 mRNA 表現量分析)，結果顯示所有處理組和控制組相比皆無顯著差異 (圖 3-8b)，即無法判定 CYP1A 活性的提升是否為經由 AhR 途徑。

CYP1A 在許多脊椎動物中參與雌激素及多種環境污染物之代謝。研究指出許多環境污染物如 PAH、戴奧辛 (dioxin) 等皆會誘導生物肝中 CYP1A 表現 (Monostory et al., 1996; Smolowitz et al., 1992)。然而 CYP1A 活性的提升一方面可能會過量代謝內生雌激素，進而造成干擾性別分化、發育、生殖行為及能力等負面影響 (Williams et al., 1998)；另一方面也會干擾多種環境污染物及藥物在生物體內之代謝情形。在 CYP1A 代謝之外來物質中，目前以 PAH 之研究最為詳盡。CYP1A 可

藉由氧化 PAH 以增加其水溶性，或產生高反應性的代謝產物以利第二階段代謝之進行，如環氧化物 (epoxide) 即是高反應性之 CYP1A 代謝產物之一。但文獻指出部分 PAH 之環氧化物具致癌性，故 CYP1A 活性提升反而可能引起生物活化反應，進而產生有毒或致癌之代謝產物 (Gabelova et al., 2004; Selkirk, 1977)。另外，文獻指出人類及小鼠之 CYP1A 具有代謝 atRA 之活性 (Chen et al., 2000)，顯示誘導 CYP1A 活性亦可能加速代謝體內 atRA，因而造成維生素 A 缺乏的可能性亦較高。因此，提高青鱈魚肝中 CYP1A 活性可能會干擾內生雌激素平衡、生物活化現象及 atRA 恆定，顯示三泰芬對水生生物造成的致癌性可能較邁克尼大。

在小鼠實驗中，亞致死劑量的三泰芬及邁克尼皆可誘導肝中 EROD 活性提升 (Allen et al., 2006; Goetz and Dix, 2009; Goetz et al., 2006)；而本研究發現在青鱈魚中僅有三泰芬會誘導肝中 EROD 活性，顯示康唑類殺真菌劑對 CYPs 活性之影響具物種差異性，也顯示以環境生物評估農業用藥對生態影響的重要性。

本實驗中並未測得 CYP1A 之 mRNA 表現量提升，可能是由於 CYP1A 的 mRNA 與蛋白表現有一時間差 (Leguen et al., 2010)，因此本實驗設計僅測得 CYP1A 活性提升，並未捕抓到最高的 mRNA 表達量；而暴露 14 天時 CYP1A 及 AhR 之 mRNA 表現量有下降趨勢，則可能是因為高劑量的暴露已造成某一程度的肝毒性，因而抑制了 CYP1A 及 AhR 之 mRNA 表現量，因此酵素活性試驗並未進行 14 天的暴露處理。



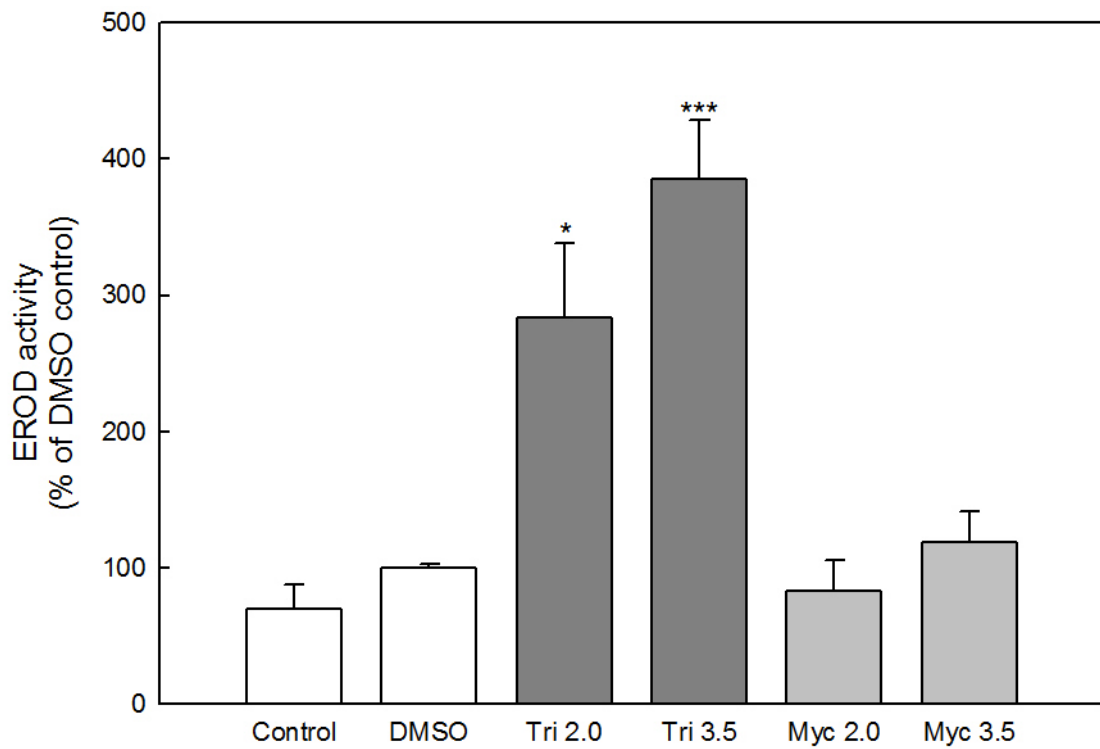


圖 3-7 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 CYP1A 活性 (以 EROD 活性表示)。  
 圖中 Control 為除氯水控制組, DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組, Tri 為三泰芬,  
 Myc 為邁克尼, 2.0 及 3.5 為濃度 ( $\mu\text{M}$ )。所有處理與 DMSO 控制組之比較以  
 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下: \* :  $p < 0.05$ ; \*\*\* :  $p < 0.001$ 。  
 誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

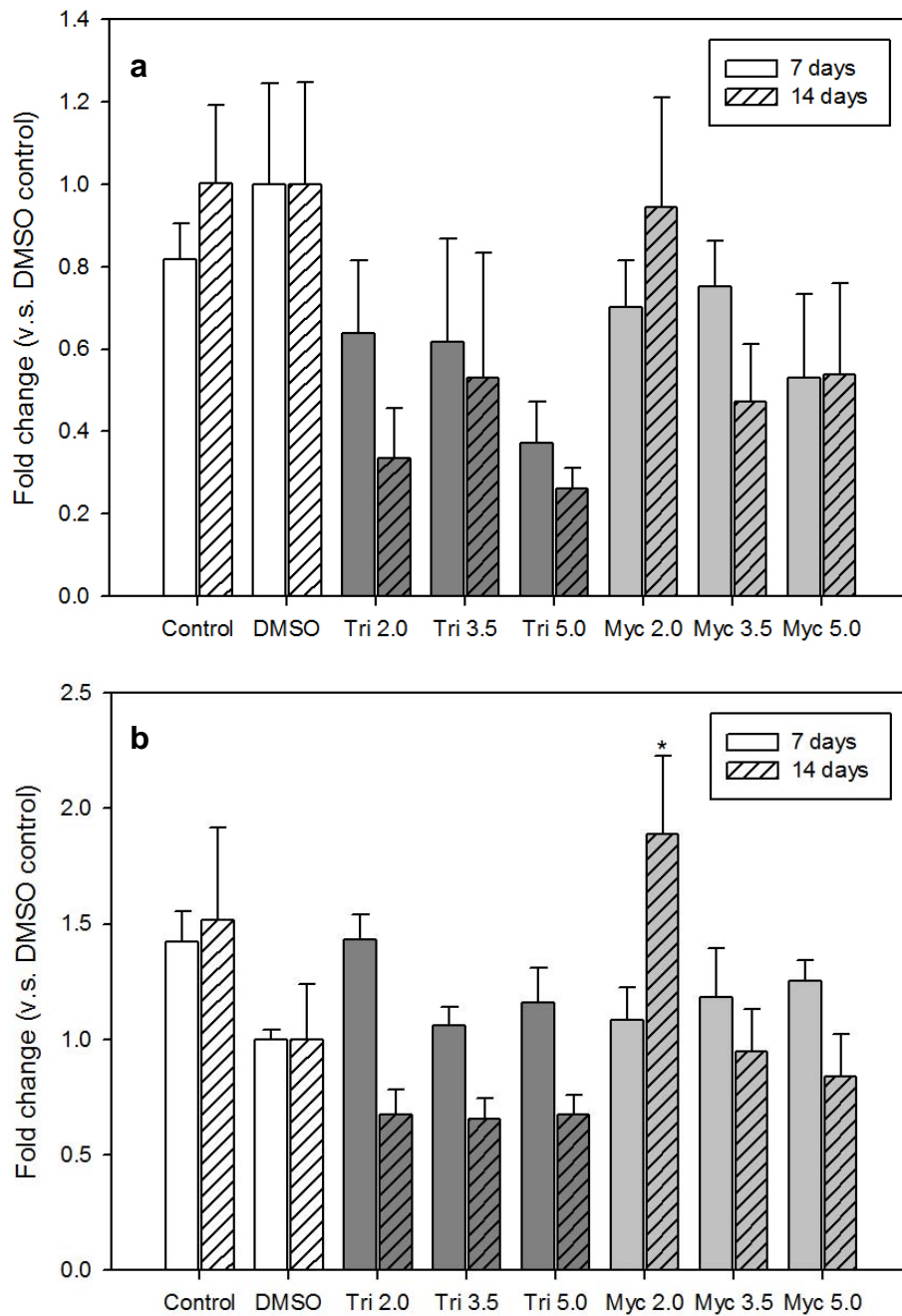


圖 3-8 青鱗魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後肝中 (a) CYP1A 及 (b) AhR 之 mRNA 表現量。圖中 Control 為除氯水控制組，DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組，Tri 為三泰芬，Myc 為邁克尼，2.0-5.0 為濃度 ( $\mu\text{M}$ )。所有處理與 DMSO 控制組之比較以 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下：\*： $p < 0.05$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

### 3.5. CYP3A 基因表現及酵素活性

CYP3A 為 CYPs 中表現量最大，可代謝基質最多的 subfamily。前人研究指出，投以亞致死劑量的三泰芬及邁克尼會使小鼠肝中 CYP3A 活性顯著提升 (Allen et al., 2006; Chen et al., 2009; Sun et al., 2007)。故本研究將青鱈魚暴露於 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼，並於暴露第 7 天及第 14 天採樣肝臟分析 CYP3A38 及 CYP3A40 之 mRNA 表現量；另將青鱈魚暴露於 2.0-3.5  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼 7 天後，採樣肝臟以 DBF 為基質分析 CYP3A 酵素活性，觀察三泰芬及邁克尼對青鱈魚肝中 CYP3A 活性之影響。結果顯示，暴露 2.0 及 3.5  $\mu\text{M}$  三泰芬 7 天後，青鱈魚肝中 CYP3A 活性 (以 DBF 脫烷活性表示) 分別提升為約 3.0 及 2.8 倍，相同暴露條件下邁克尼則使 CYP3A 活性提升為約 3.2 及 4.3 倍，顯示此暴露條件下三泰芬及邁克尼皆可誘導 CYP3A 酵素活性 (圖 3-9)。基因表現部分，預實驗結果顯示青鱈魚暴露 6.8  $\mu\text{M}$  三泰芬及 6.9  $\mu\text{M}$  邁克尼後 3 天後，肝中 CYP3A38 之 mRNA 表現量分別提升為約 3.3 及 2.3 倍，CYP3A40 之 mRNA 表現量則分別提升為約 2.9 及 1.6 倍 (圖 3-6)。但 14 天暴露實驗中除暴露 2.0  $\mu\text{M}$  三泰芬 7 天後青鱈魚肝中 CYP3A40 之 mRNA 表現量提升 69% 達顯著差異外，其餘組別之 CYP3A38 及 CYP3A40 之 mRNA 表現量於暴露 7 天後皆無顯著改變，暴露達 14 天時 mRNA 表現量更有下降之趨勢 (圖 3-10a, b)。另外，前人研究指出 CYP3A 的基因及蛋白表現主要經由 PXR 調控，故本研究也進行青鱈魚肝中 PXR 之 mRNA 表現量分析 (實驗條件同 CYP3A38 及 CYP3A40 之 mRNA 表現量分析)，結果顯示，暴露 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬 7 天後，青鱈魚肝中 PXR 之 mRNA 表現量降低 64-74%，相同暴露條件下邁克尼則使 PXR 之 mRNA 表現量降低 33-50% (圖 3-11)。

文獻指出，CYP3A 代謝機制多為受基質調控，當雌激素或藥物等基質進入細胞後，會與核受體 PXR 結合，進而誘發 CYP3A 基因表現，再進而產生 CYP3A 蛋白以代謝基質 (Tompkins and Wallace, 2007)。由本實驗中三泰芬及邁克尼可誘導

CYP3A 活性及 CYP3A38, CYP3A40 之 mRNA 表現之結果推測，青鱈魚中之 CYP3A38 及 CYP3A40 可能皆具有代謝三泰芬及邁克尼之能力，但是否以 PXR 途徑誘發 CYP3A 活性則仍不清楚。

然而 CYP3A 除了參與多種藥物及環境物質的代謝與解毒外，也參與內生雌激素或雄激素等固醇類荷爾蒙的代謝，因此提升 CYP3A 活性亦可能干擾生物之性別分化、發育、生殖行為及能力等機制。此外，在小鼠實驗中由三泰芬及邁克尼誘發的 CYP3A 酵素活性會提升對 atRA 的代謝能力 (Chen et al., 2009)，可能造成體內 atRA 濃度下降，進而影響維生素 A 相關生理機制之正常運作。



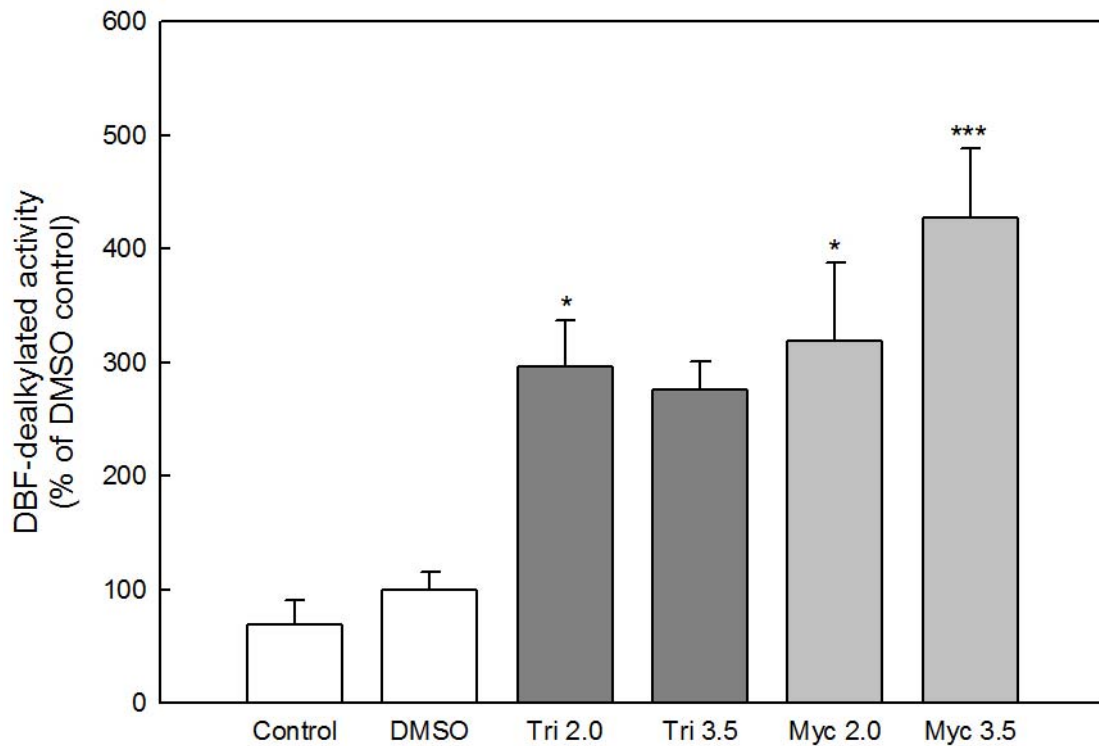


圖 3-9 青鱒魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 CYP3A 活性 (以 DBF 脫烷活性表示)。圖中 Control 為除氯水控制組，DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組，Tri 為三泰芬，Myc 為邁克尼，2.0 及 3.5 為濃度 ( $\mu\text{M}$ )。所有處理與 DMSO 控制組之比較以 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下： $*$ ： $p < 0.05$ ； $***$ ： $p < 0.001$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

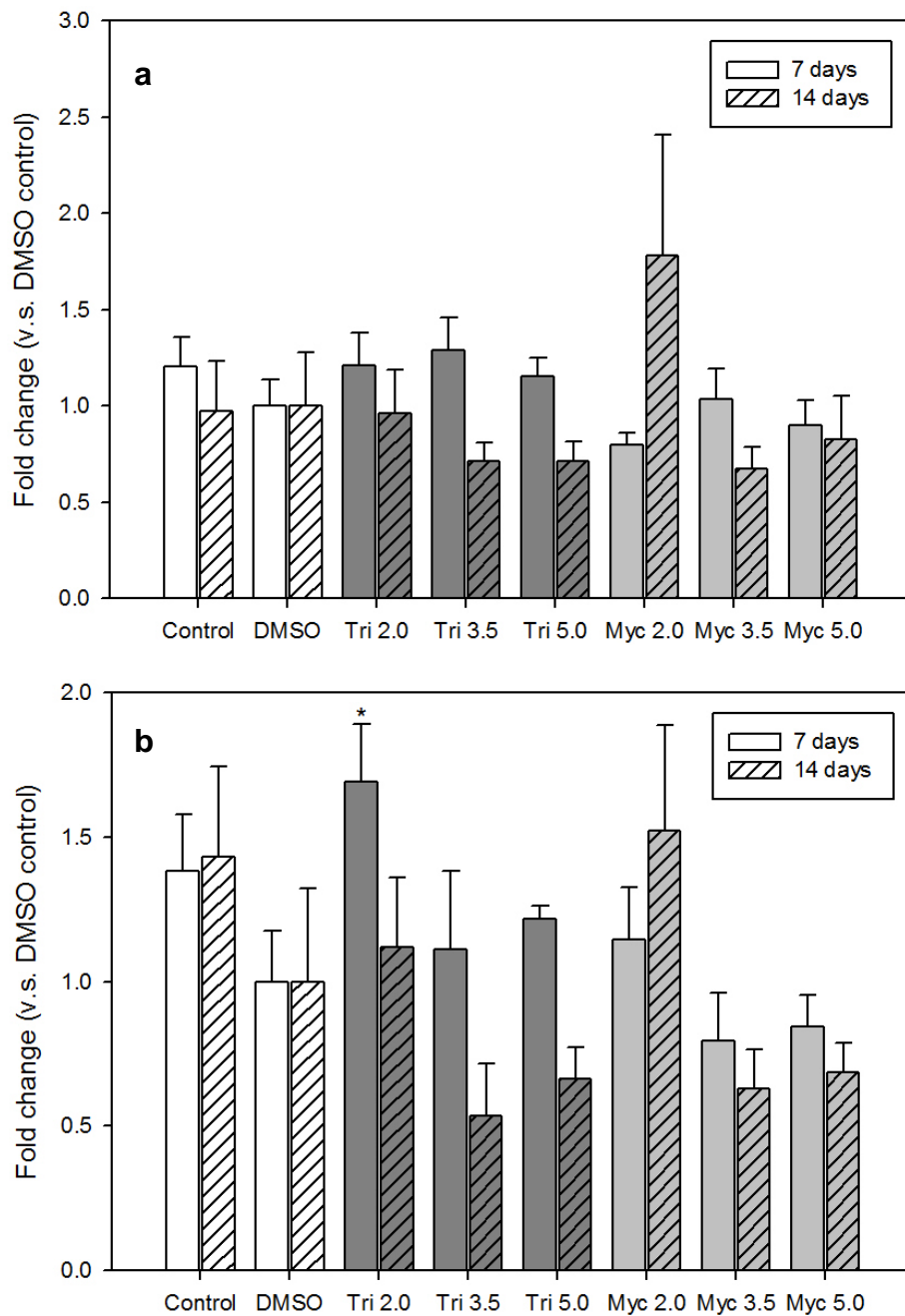


圖 3-10 青鱗魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後肝中 (a) CYP3A38 及 (b) CYP3A40 之 mRNA 表現量。圖中 Control 為除氯水控制組，DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組，Tri 為三泰芬，Myc 為邁克尼，2.0-5.0 為濃度 ( $\mu\text{M}$ )。所有處理與 DMSO 控制組之比較以 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下：\*： $p < 0.05$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

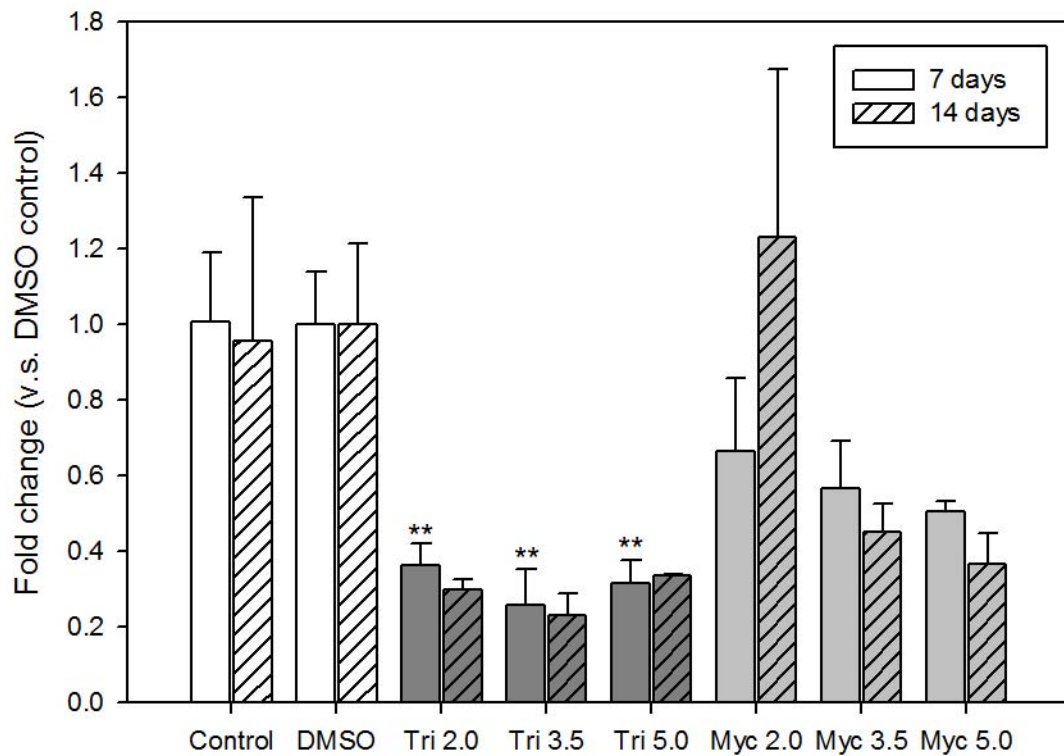


圖 3-11 青鱗魚暴露於處理組及控制組 7 天及 14 天後肝中 PXR 之 mRNA 表現量。圖中 Control 為除氯水控制組，DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組，Tri 為三泰芬，Myc 為邁克尼，2.0-5.0 為濃度 ( $\mu\text{M}$ )。所有處理與 DMSO 控制組之比較以 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下： $**$ ： $p < 0.01$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

### 3.6. atRA 恆定相關酵素之 mRNA 表現

本研究以 q-RT-PCR 分析生物體內分別合成及代謝 atRA 的酵素 ALDH1A2 及 CYP26B1 之 mRNA 表現情形。結果顯示，暴露 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬 7 天後可誘導青鱈魚肝中 CYP26B1 之 mRNA 表現提升為約 3.0-4.2 倍，相同暴露條件下之邁克尼則不造成影響 (圖 3-12b)。而暴露 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼 7 天皆不影響 ALDH1A2 之 mRNA 表現 (圖 3-12a)。

CYP26 為生物體內代謝 atRA 之酵素，正常情形下為受 atRA 誘導表現，藉以維持體內 atRA 濃度，避免過量 atRA 造成之傷害 (Thatcher and Isoherranen, 2009)。以 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬暴露 7 天後青鱈魚肝中 CYP26B1 之 mRNA 表現量提升，顯示此濃度之三泰芬可能藉由誘導 CYP26 而提升對體內 atRA 之代謝，並有進而造成維生素 A 缺乏的可能。

ALDH1A 為生物體內合成 atRA 之酵素，可將視黃醛 (retinal) 代謝為具有活性的 atRA，而文獻指出青鱈魚基因中缺少 ALDH1A1 及 ALDH1A3，因此僅有 ALDH1A2 一種合成 atRA 之酵素 (Canestro et al., 2009)。而暴露 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼 7 天皆不影響青鱈魚肝中 ALDH1A2 之 mRNA 表現，顯示此條件下三泰芬及邁克尼對 atRA 合成機制之影響可能較不明顯。



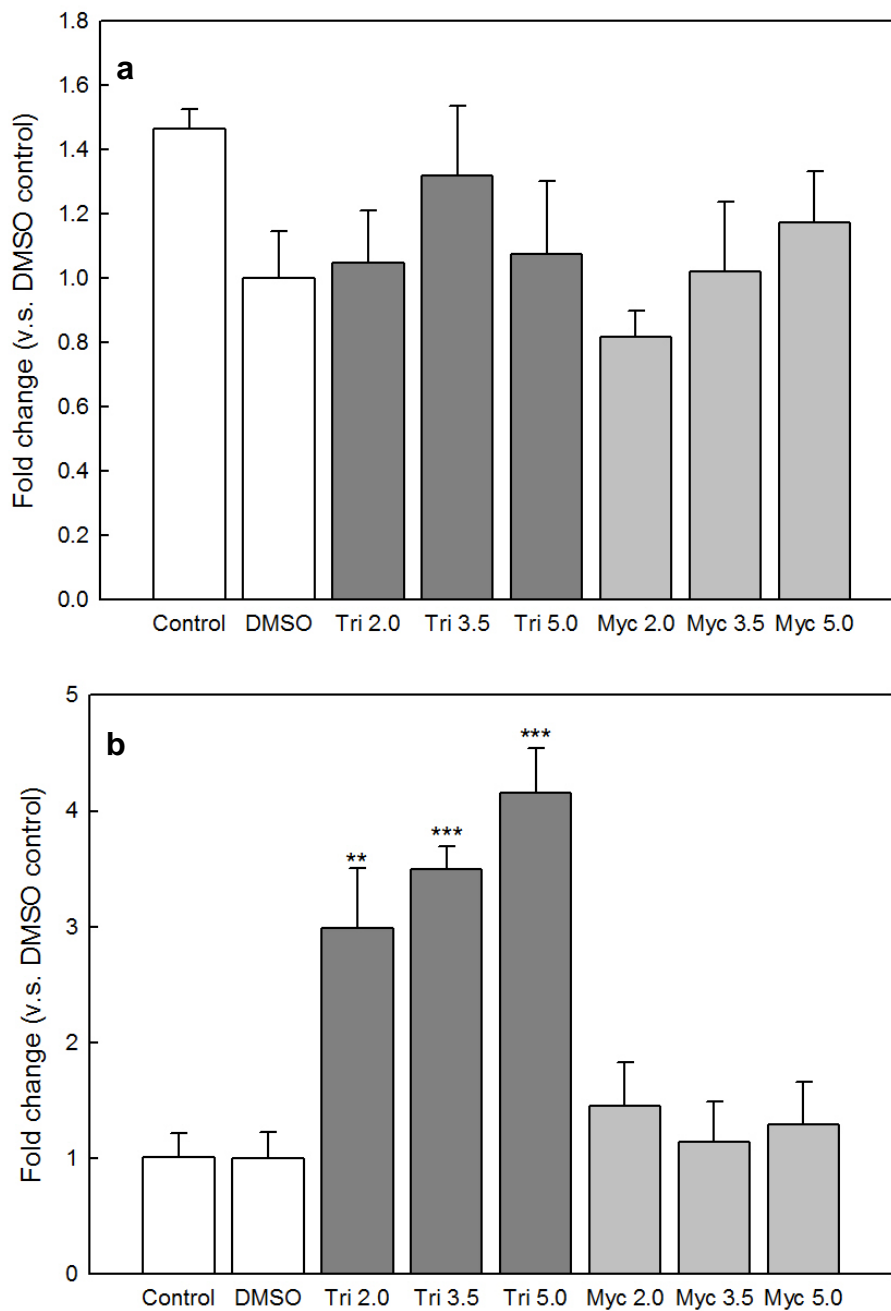


圖 3-12 青鱗魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 (a) ALDH1A2 及 (b) CYP26B1 之 mRNA 表現量。圖中 Control 為除氯水控制組，DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組，Tri 為三泰芬，Myc 為邁克尼，2.0-5.0 為濃度 ( $\mu\text{M}$ )。所有處理與 DMSO 控制組之比較以 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下：\*\*： $p < 0.01$ ；\*\*\*： $p < 0.001$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

### 3.7. atRA 相關核受體之 mRNA 表現

文獻指出，當 atRA 相關之核受體表現量受改變時，可能會干擾細胞對 atRA 之感知能力，而使 atRA 相關生理機制無法受到正確 atRA 濃度的調控 (Sun and Lotan, 2002)。且已在多種癌症前期細胞及組織中發現 atRA 相關之核受體表現量有降低情形 (Berard et al., 1996; Castillo et al., 1997; Houle et al., 1993; Lotan et al., 1995; Lotan et al., 2000; Picard et al., 1999; Qiu et al., 1999; Widschwendter et al., 1997; Xu et al., 1994; Xu et al., 1997a; Xu et al., 1997b)。雖然目前對於 atRA 相關核受體表現、維生素 A 缺乏及其相關致癌性的詳細關聯性及機制仍不明瞭，但為瞭解在小鼠中具致肝腫瘤性的三泰芬與不具致肝腫瘤性的邁克尼對青鱈魚肝中 atRA 相關核受體表現量之影響間是否有所差異，本研究以 q-RT-PCR 分析青鱈魚肝中 atRA 相關之核受體 RARs 及 RXRs 的 mRNA 於暴露 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼 7 天後之表現情形。結果顯示，青鱈魚肝中 RXR $\alpha$ 1 之 mRNA 表現量於暴露 2.0, 3.5, 5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬 7 天後分別降低約 49, 39, 37%，而暴露 2.0, 5.0  $\mu\text{M}$  邁克尼後 7 天後分別降低約 49, 42% (圖 3-13c); RXR $\beta$ 1 之 mRNA 表現量亦於暴露 2.0, 5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬後分別降低約 70, 84%，暴露 2.0  $\mu\text{M}$  邁克尼後則降低約 53% (圖 3-13e); RAR $\alpha$ 1, RXR $\alpha$ 2 及 RXR $\beta$ 2 之 mRNA 表現量不受實驗處理影響 (圖 3-13a, d, f); 而 RAR $\gamma$ 1 之 mRNA 表現量則於暴露 2.0  $\mu\text{M}$  三泰芬後提升約 1.5 倍 (圖 3-13b)。由以上結果可發現，三泰芬及邁克尼皆可使部分 atRA 相關核受體表現量降低，且兩者造成的影響相當相似，顯示三泰芬及邁克尼皆可能影響 atRA 相關生理機制的正常運作，但無法判定是否干擾 atRA 相關核受體表現量與康唑類殺真菌劑是否具有致肝腫瘤性之關聯性。

當生物體內 atRA 濃度過高時，atRA 會與 RAR 結合，RAR 再與 RXR 形成異構雙體後，會誘發 CYP26B1 基因及酵素表現，代謝過量 atRA，藉以維持相關生理機制之恆定 (Chambon, 1996)。RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  為同功酶，依物種、組織及發育時

期的不同，RARs 之表現量比例會有所不同，亦可能僅有單一 RAR 表現 (Chambon, 1996)。而實驗結果顯示三泰芬可誘導 RAR $\gamma$ 1 及 CYP26B1 之 mRNA 表現量提升，顯示三泰芬可能經由誘發 RAR $\gamma$ 1 途徑誘導 CYP26B1 表現。



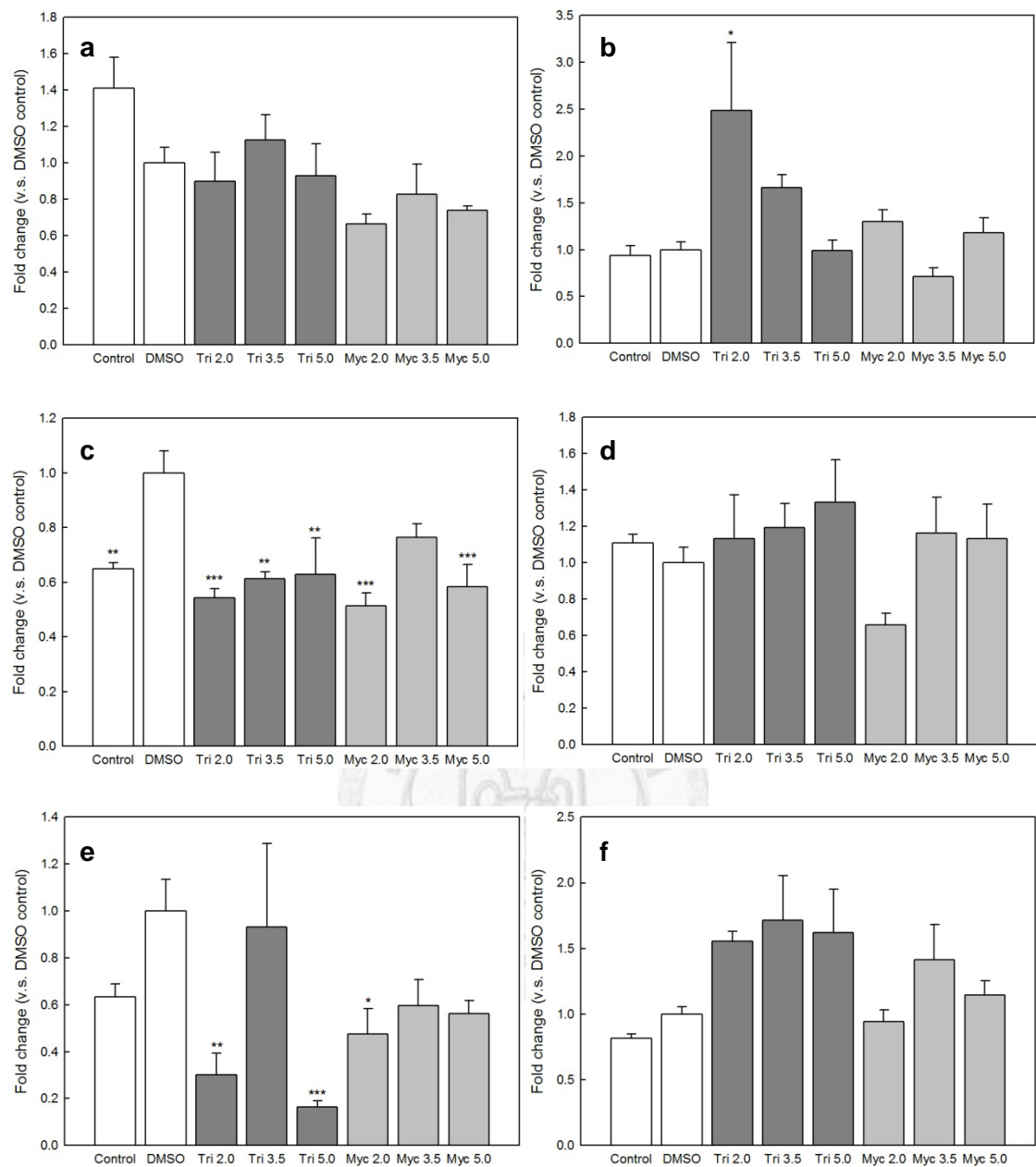


圖 3-13 青鱗魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 (a) RAR $\alpha$ 1, (b) RAR $\gamma$ 1, (c) RXR $\alpha$ 1, (d) RXR $\alpha$ 2, (e) RXR $\beta$ 1 及 (f) RXR $\beta$ 2 之 mRNA 表現量。圖中 Control 為除氯水控制組，DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組，Tri 為三泰芬，Myc 為邁克尼，2.0-5.0 為濃度 ( $\mu$ M)。所有處理與 DMSO 控制組之比較以 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下：\*： $p < 0.05$ ；\*\*： $p < 0.01$ ；\*\*\*： $p < 0.001$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

### 3.8. p53 之 mRNA 表現

前人文獻指出，三泰芬於小鼠中具致腫瘤性，而邁克尼則無此現象 (INCHEM, 1981; INCHEM, 1992)。為評估兩者在水生生物中造成致癌性的可能性，本研究以 q-RT-PCR 分析暴露 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬及邁克尼 7 天後，青鱈魚肝中致癌相關基因的 mRNA 表現情形。結果顯示，暴露 2.0-5.0  $\mu\text{M}$  三泰芬後青鱈魚肝中 p53 之 mRNA 表現量提升 53-113%，而相同暴露條件下邁克尼則不影響青鱈魚肝中 p53 之 mRNA 表現量 (圖 3-14)。

p53 蛋白在細胞中參與調控細胞凋亡、基因穩定及血管新生等重要生理機制，亦為腫瘤抑制基因 (tumor suppressing gene) 之一 (Choi and Donehower, 1999)。當細胞遭遇到 DNA 損傷、氧化壓力等逆境時會誘發 p53 蛋白大量表現，藉以調節相關修復機制 (Jackson et al., 2011)。文獻指出，部分康唑類殺真菌劑會干擾小鼠體內 p53 基因及蛋白表現量 (Hester et al., 2006; Ho et al., 1998; Ward et al., 2006)。而本研究發現暴露三泰芬後青鱈魚中 p53 之 mRNA 表現量顯著提升，可能原因為三泰芬直接誘導 p53 基因表現，或三泰芬造成之逆境誘發 p53 基因表現。雖然目前無法釐清三泰芬使 p53 基因表現量提升之機制，此結果已顯示三泰芬可能干擾由 p53 調控之生理機制，並進而影響細胞之正常生長。

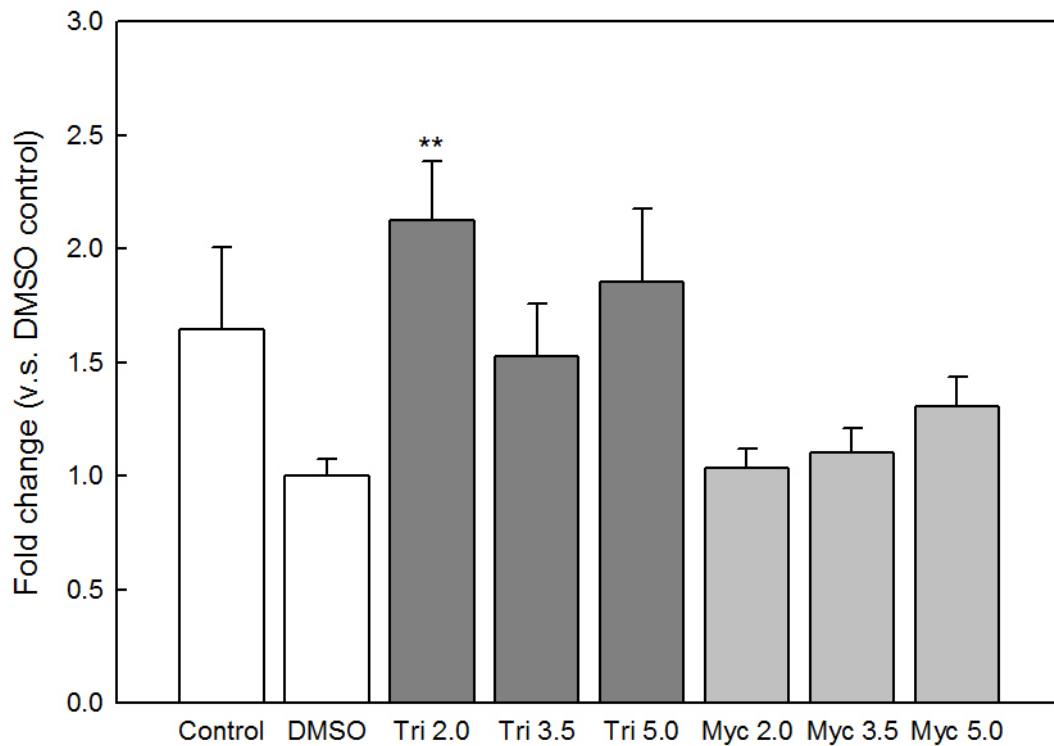


圖 3-14 青鱈魚暴露於處理組及控制組 7 天後肝中 p53 之 mRNA 表現量。圖中 Control 為除氯水控制組，DMSO 為 0.001% DMSO 溶劑控制組，Tri 為三泰芬，Myc 為邁克尼，2.0-5.0 為濃度 ( $\mu\text{M}$ )。所有處理與 DMSO 控制組之比較以 Dunnett's t test 進行。各級差異顯著水準之表示如下： $**$ ： $p < 0.01$ 。誤差線表示處理平均值的標準誤 (SE)。

#### 4. 結論

1. 肝體指數在本研究實驗條件下無法做為三泰芬與邁克尼對青鱈魚投藥成功之生物指標。
2. 三泰芬在本研究實驗條件下提升青鱈魚肝中 CYP1A 及 CYP3A 活性並誘導 CYP26B1 基因表現，邁克尼則僅提升 CYP3A 活性。
3. 三泰芬及邁克尼在本研究實驗條件下皆不影響青鱈魚肝中 ALDH1A2 之 mRNA 表現情形。
4. 三泰芬及邁克尼在本研究實驗條件下皆會使青鱈魚肝中 RXR $\alpha$ 1 及 RXR $\beta$ 1 等 atRA 相關核受體之 mRNA 表現量下降，故無法以此做為康唑類殺真菌劑是否具有致癌性之生物指標。



## 參考文獻

- Allen, J.W., D.C. Wolf, M.H. George, S.D. Hester, G. Sun, S.F. Thai, D.A. Delker, T. Moore, C. Jones, G. Nelson, B.C. Roop, S. Leavitt, E. Winkfield, W.O. Ward, and S. Nesnow. 2006. Toxicity profiles in mice treated with hepatotumorigenic and non-hepatotumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. *Toxicol Pathol* 34:853-62.
- Beijer, K., A. Abrahamson, B. Brunstrom, and I. Brandt. 2010. CYP1A inhibition in fish gill filaments: a novel assay applied on pharmaceuticals and other chemicals. *Aquat Toxicol* 96:145-50.
- Berard, J., F. Laboune, M. Mukuna, S. Masse, R. Kothary, and W.E. Bradley. 1996. Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *FASEB J* 10:1091-7.
- Berenzen, N., A. Lentzen-Godding, M. Probst, H. Schulz, R. Schulz, and M. Liess. 2005. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* 58:683-91.
- Blomhoff, R., and H.K. Blomhoff. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66:606-30.
- Boelsterli, U.A., A. Lanzotti, C. Goldlin, and M. Oertle. 1992. Identification of cytochrome P-450IIB1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 20:96-101.
- Canestro, C., J.M. Catchen, A. Rodriguez-Mari, H. Yokoi, and J.H. Postlethwait. 2009. Consequences of lineage-specific gene loss on functional evolution of surviving paralogs: ALDH1A and retinoic acid signaling in vertebrate genomes. *PLoS*



Genet 5:e1000496.

- Castillo, L., G. Milano, J. Santini, F. Demard, and V. Pierrefite. 1997. Analysis of retinoic acid receptor beta expression in normal and malignant laryngeal mucosa by a sensitive and routine applicable reverse transcription-polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay method. *Clin Cancer Res* 3:2137-42.
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-54.
- Chen, H., W.N. Howald, and M.R. Juchau. 2000. Biosynthesis of all-*trans*-retinoic acid from all-*trans*-retinol: catalysis of all-*trans*-retinol oxidation by human P-450 cytochromes. *Drug Metab Dispos* 28:315-22.
- Chen, P.J., W.T. Padgett, T. Moore, W. Winnik, G.R. Lambert, S.F. Thai, S.D. Hester, and S. Nesnow. 2009. Three conazoles increase hepatic microsomal retinoic acid metabolism and decrease mouse hepatic retinoic acid levels in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 234:143-55.
- Choi, J., and L.A. Donehower. 1999. p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. *Cell Mol Life Sci* 55:38-47.
- Collins, M.D., and G.E. Mao. 1999. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:399-430.
- EPA. 1996. Triadimefon; Pesticide Tolerances for Emergency Exemptions. *Fed Regist* 61:63721-6.
- EPA. 2000. Myclobutanil; pesticide tolerances. *Fed Regist* 65:29963-73.
- EPA. 2006. Re-registration eligibility decision for triadimefon and triadimenol and tolerance reassessment for triadimenol.
- EPA. 2009. Risks of Myclobutanil Use to Federally Threatened California Red-legged

Frog (*Rana aurora draytonii*) and Designated Critical Habitat.

- Gabelova, A., B. Binkova, Z. Valovicova, and R.J. Sram. 2004. DNA adduct formation by 7H-dibenzo[c,g]carbazole and its tissue- and organ-specific derivatives in Chinese hamster V79 cell lines stably expressing cytochrome P450 enzymes. *Environ Mol Mutagen* 44:448-58.
- Georgopapadakou, N.H., and T.J. Walsh. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother* 40:279-91.
- Ghannoum, M.A., and L.B. Rice. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12:501-17.
- Goetz, A.K., and D.J. Dix. 2009. Mode of action for reproductive and hepatic toxicity inferred from a genomic study of triazole antifungals. *Toxicol Sci* 110:449-62.
- Goetz, A.K., W. Bao, H. Ren, J.E. Schmid, D.B. Tully, C. Wood, J.C. Rockett, M.G. Narotsky, G. Sun, G.R. Lambert, S.F. Thai, D.C. Wolf, S. Nesnow, and D.J. Dix. 2006. Gene expression profiling in the liver of CD-1 mice to characterize the hepatotoxicity of triazole fungicides. *Toxicol Appl Pharmacol* 215:274-84.
- Greenblatt, D.J., Y. Zhao, K. Venkatakrishnan, S.X. Duan, J.S. Harmatz, S.J. Parent, M.H. Court, and L.L. von Moltke. 2011. Mechanism of cytochrome P450-3A inhibition by ketoconazole. *J Pharm Pharmacol* 63:214-21.
- Guengerich, F.P. 2003. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* 3:194-204.
- Hasselberg, L., S. Westerberg, B. Wassmur, and M.C. Celander. 2008. Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17alpha-ethynylestradiol exposure. *Aquat Toxicol* 86:256-64.
- Hester, S.D., D.C. Wolf, S. Nesnow, and S.F. Thai. 2006. Transcriptional profiles in liver from rats treated with tumorigenic and non-tumorigenic triazole conazole

- fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. *Toxicol Pathol* 34:879-94.
- Ho, Y.S., P.W. Tsai, C.F. Yu, H.L. Liu, R.J. Chen, and J.K. Lin. 1998. Ketoconazole-induced apoptosis through P53-dependent pathway in human colorectal and hepatocellular carcinoma cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 153:39-47.
- Hong, H.N., H.N. Kim, K.S. Park, S.K. Lee, and M.B. Gu. 2007. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere* 67:2115-21.
- Honkakoski, P., and M. Negishi. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 347:321-37.
- Houle, B., C. Rochette-Egly, and W.E. Bradley. 1993. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:985-9.
- INCHEM. 1981. Monograph 566. Triadimefon Pesticide residues in food: 1981 evaluations.
- INCHEM. 1992. Monograph 847. Myclobutanil Pesticide residues in food: 1992 evaluations Part II Toxicology.
- Jackson, J.G., S.M. Post, and G. Lozano. 2011. Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 *in vivo*. *J Pathol* 223:127-36.
- Kahle, M., I.J. Buerge, A. Hauser, M.D. Muller, and T. Poiger. 2008. Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ Sci Technol* 42:7193-200.
- Kark, J.D., A.H. Smith, B.R. Switzer, and C.G. Hames. 1981. Serum vitamin A (retinol) and cancer incidence in Evans County, Georgia. *J Natl Cancer Inst* 66:7-16.

- Kashiwada, S., M. Kameshiro, H. Tatsuta, Y. Sugaya, S.W. Kullman, D.E. Hinton, and K. Goka. 2007. Estrogenic modulation of CYP3A38, CYP3A40, and CYP19 in mature male medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145:370-8.
- Kassahun, K., P.G. Pearson, W. Tang, I. McIntosh, K. Leung, C. Elmore, D. Dean, R. Wang, G. Doss, and T.A. Baillie. 2001. Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates *in vitro* and *in vivo*. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. *Chem Res Toxicol* 14:62-70.
- Leguen, I., N. Odjo, Y. Le Bras, B. Luthringer, D. Baron, G. Monod, and P. Prunet. 2010. Effect of seawater transfer on CYP1A gene expression in rainbow trout gills. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156:211-7.
- Lewis, D.F. 2003. Human cytochromes P450 associated with the phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families. *Curr Med Chem* 10:1955-72.
- Lewis, D.F. 2004. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 5:305-18.
- Lotan, R., X.C. Xu, S.M. Lippman, J.Y. Ro, J.S. Lee, J.J. Lee, and W.K. Hong. 1995. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med* 332:1405-10.
- Lotan, Y., X.C. Xu, M. Shalev, R. Lotan, R. Williams, T.M. Wheeler, T.C. Thompson, and D. Kadmon. 2000. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal and malignant prostates. *J Clin Oncol* 18:116-21.
- Ma, Q., and A.Y. Lu. 2007. CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of *in vitro* and *in vivo* studies. *Drug Metab Dispos* 35:1009-16.

- Ma, T., Z. Wang, and S. Gong. 2007. Comparative sensitivity in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to ethinylestradiol. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 42:889-94.
- Ma, T., X. Wan, Q. Huang, Z. Wang, and J. Liu. 2005. Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 59:281-8.
- Monostory, K., K. Jemnitz, and L. Vereczkey. 1996. Xenobiotic metabolizing enzymes in fish: diversity, regulation and biomarkers for pollutant exposure. *Acta Physiol Hung* 84:369-81.
- Morriss-Kay, G.M., and S.J. Ward. 1999. Retinoids and mammalian development. *Int Rev Cytol* 188:73-131.
- Nannelli, A., V. Chirulli, V. Longo, and P.G. Gervasi. 2008. Expression and induction by rifampicin of CAR- and PXR-regulated CYP2B and CYP3A in liver, kidney and airways of pig. *Toxicology* 252:105-12.
- Nebert, D.W., and D.W. Russell. 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360:1155-62.
- Nesnow, S., W. Ward, T. Moore, H. Ren, and S.D. Hester. 2009. Discrimination of tumorigenic triazole conazoles from phenobarbital by transcriptional analyses of mouse liver gene expression. *Toxicol Sci* 110:68-83.
- Niles, R.M. 2000. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* 16:1084-9.
- Picard, E., C. Seguin, N. Monhoven, C. Rochette-Egly, J. Siat, J. Borrelly, Y. Martinet, N. Martinet, and J.M. Vignaud. 1999. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1059-66.

- Qiu, H., W. Zhang, A.K. El-Naggar, S.M. Lippman, P. Lin, R. Lotan, and X.C. Xu. 1999. Loss of retinoic acid receptor-beta expression is an early event during esophageal carcinogenesis. *Am J Pathol* 155:1519-23.
- Robertson, I.G., E. Zeiger, and J.A. Goldstein. 1983. Specificity of rat liver cytochrome P-450 isozymes in the mutagenic activation of benzo[a]pyrene, aromatic amines and aflatoxin B1. *Carcinogenesis* 4:93-6.
- Sakaki, T., N. Kagawa, K. Yamamoto, and K. Inouye. 2005. Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. *Front Biosci* 10:119-34.
- Selkirk, J.K. 1977. Benzo[a]pyrene carcinogenesis: a biochemical selection mechanism. *J Toxicol Environ Health* 2:1245-58.
- Sheehan, D.J., C.A. Hitchcock, and C.M. Sibley. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12:40-79.
- Singh, N. 2005. Factors affecting triadimefon degradation in soils. *J Agric Food Chem* 53:70-5.
- Smolowitz, R.M., M.E. Schultz, and J.J. Stegeman. 1992. Cytochrome P4501A induction in tissues, including olfactory epithelium, of topminnows (*Poeciliopsis* spp.) by waterborne benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 13:2395-402.
- Sommer, A. 2008. Vitamin a deficiency and clinical disease: an historical overview. *J Nutr* 138:1835-9.
- Sun, G., R.D. Grindstaff, S.F. Thai, G.R. Lambert, D.B. Tully, D.J. Dix, and S. Nesnow. 2007. Induction of cytochrome P450 enzymes in rat liver by two conazoles, myclobutanil and triadimefon. *Xenobiotica* 37:180-93.
- Sun, S.Y., and R. Lotan. 2002. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 41:41-55.
- Tatarazako, N., H. Takigami, M. Koshio, K. Kawabe, Y. Hayakawa, K. Arizono, and M.

- Morita. 2002. New Measurement Method of P450s Activities in the Liver Microsome with Individual Japanese Medaka(*Oryzias latipes*). *Environ Sci* 9:451-462.
- Thatcher, J.E., and N. Isoherranen. 2009. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:875-86.
- Theodosiou, M., V. Laudet, and M. Schubert. 2010. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 67:1423-45.
- Tompkins, L.M., and A.D. Wallace. 2007. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol* 21:176-81.
- Tully, D.B., W. Bao, A.K. Goetz, C.R. Blystone, H. Ren, J.E. Schmid, L.F. Strader, C.R. Wood, D.S. Best, M.G. Narotsky, D.C. Wolf, J.C. Rockett, and D.J. Dix. 2006. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicol Appl Pharmacol* 215:260-73.
- Ward, W.O., D.A. Delker, S.D. Hester, S.F. Thai, D.C. Wolf, J.W. Allen, and S. Nesnow. 2006. Transcriptional profiles in liver from mice treated with hepatotumorigenic and nonhepatotumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. *Toxicol Pathol* 34:863-78.
- Widschwendter, M., J. Berger, G. Daxenbichler, E. Muller-Holzner, A. Widschwendter, A. Mayr, C. Marth, and A.G. Zeimet. 1997. Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 57:4158-61.
- Williams, D.E., J.J. Lech, and D.R. Buhler. 1998. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. *Mutat Res* 399:179-92.
- Williams, J.A., R. Hyland, B.C. Jones, D.A. Smith, S. Hurst, T.C. Goosen, V. Peterkin, J.R. Koup, and S.E. Ball. 2004. Drug-drug interactions for

- UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 32:1201-8.
- Wolbach, S.B., and P.R. Howe. 1925. Tissue Changes Following Deprivation of Fat-Soluble a Vitamin. *J Exp Med* 42:753-77.
- Xu, X.C., J.Y. Ro, J.S. Lee, D.M. Shin, W.K. Hong, and R. Lotan. 1994. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res* 54:3580-7.
- Xu, X.C., G. Sozzi, J.S. Lee, J.J. Lee, U. Pastorino, S. Pilotti, J.M. Kurie, W.K. Hong, and R. Lotan. 1997a. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer *in vivo*: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* 89:624-9.
- Xu, X.C., N. Sneige, X. Liu, R. Nandagiri, J.J. Lee, F. Lukmanji, G. Hortobagyi, S.M. Lippman, K. Dhingra, and R. Lotan. 1997b. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis. *Cancer Res* 57:4992-6.
- Yamauchi, R., H. Ishibashi, M. Hirano, T. Mori, J.W. Kim, and K. Arizono. 2008. Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 90:261-8.
- Zarn, J.A., B.J. Brusweiler, and J.R. Schlatter. 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect* 111:255-61.
- Zhang, X., M. Hecker, A.R. Tompsett, J.W. Park, P.D. Jones, J. Newsted, D. Au, R. Kong, R.S. Wu, and J.P. Giesy. 2008a. Responses of the medaka HPG axis PCR



array and reproduction to prochloraz and ketoconazole. *Environ Sci Technol* 42:6762-9.

Zhang, Z., and J. Hu. 2008. Effects of p,p'-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Environ Sci (China)* 20:347-52.

Zhang, Z., J. Hu, H. Zhen, X. Wu, and C. Huang. 2008b. Reproductive inhibition and transgenerational toxicity of triphenyltin on medaka (*Oryzias latipes*) at environmentally relevant levels. *Environ Sci Technol* 42:8133-9.

陳冠雯. 2011. 康唑類殺菌劑和人造雌激素混合暴露干擾青鱗魚內分泌作用相關基因表達之研究, 臺灣大學.



附錄 縮寫對照表 (不含藥品與試劑)

縮寫	全名
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ALDH	Aldehyde dehydrogenases
atRA	All- <i>trans</i> retinoic acid
CAR	Constitutive androstane receptor
CYP	Cytochrome P450
EROD	Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylase
EPA	Environmental Protection Agency
HSI	Hepatosomatic index
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PXR	Pregnane X receptor
q-RT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RAR	Retinoic acid receptor
RXR	Retinoid X receptor
9- <i>cis</i> RA	9- <i>cis</i> retinoic acid