國立臺灣師範大學理學院生命科學系

碩士論文

Department of Life Science
College of Science
National Taiwan Normal University

Master's Thesis

粘桿菌素對斑馬魚胚胎之毒性並探討鈣離子對粘桿菌素的影響

Investigation of the toxicity of colistin in zebrafish embryos and the influence of calcium on the toxicity

林佳柔

Lin, Jia-Rou

指導教授：林豊益 博士

Advisor：Lin, Li-Yih, Ph.D.

中華民國 110 年 8 月

August 2021

致謝

研究所兩年的時間受到不少人的幫助，首先感謝林豊益老師在我入學時用心指導藥品濃度計算，訓練實驗設計技巧與口頭報告能力等，打好做為研究生的基礎，並帶領大家養殖斑馬魚，使在入學的期間對於斑馬魚一竅不通的我能夠在最短的時間內學習養殖技術。最讓我印象深刻的是求學期間老師注重每個學生的身心靈狀況，提供一個能夠討論的空間與對象，並在困難中給予方向，調適身心與思考未來發展。論文方面在架構上給予我不少建議，遇上疫情導致討論時間或方式被迫改變下還能仔細指導，這都要感謝林豊益老師。

實驗的技術與安排上特別感謝 GB 哥、巧羚與清華，不論是實驗操作或是壓力排解都歸功於他們三位，在夜間做實驗時提供充飢甜點，實驗遇上低潮時給予方向與鼓勵，並在情緒起伏較明顯時給予陪伴與照顧，帶領我參與課外活動散心，對我而言他們都是不可或缺最重要的學長姐。

感謝實驗室內一起努力的大家，在研究相關討論上特別感謝耕心，互相討論實驗是一直以來的習慣，在研究所期間能有一個一起努力成長的夥伴是我堅持下去的動力，也感謝阿台哥在我有困難時找我談心，支持我的決定，直到最後口試前都還為我打氣了一番。入學期間感謝倢安與亞珊帶領我融入實驗室。感謝愷霆在各種方面總是幫助我，不論是值班、認識校園、實驗與論文排版等都有著愷霆協助的痕跡。謝謝小天使學弟元廷與彥成擔任實驗室中心情調適與紓壓的對象，遇上種種麻煩下若沒有他們的支持也不會有今天的自己，感謝 Phun、旭證、凡瑄、冠儀、欣儀、雯筑、柏翔，謝謝大家平時熱心的幫助與鼓勵！

交接報帳一職後認識了很多貴人，報帳期間特別感謝系辦的廖小姐、友信大哥與黃先生，以及北榮的志彧學長與在呂老師實驗室的維星學長，遇到種種麻煩時都是經由他們耐心指導，並給予我在處理帳務時的知識與議價時的用詞，如果沒有大家熱心的協助，我也無法在短短的一年內將報帳事項處理得宜，謝謝大家。

在入學期間結交很多一起努力奮鬥的朋友，感謝在失落時總是傾聽我訴苦的詠馨、總是充滿證能量鼓勵我的瑀熙姐姐及 Fiona 姐姐、課程中不可或缺的組隊搭檔柏叡以及總是支持我並鼓勵我的維星、洪煜、鵬愷、佑萱、子雅、宗訓，在實驗以外的時間帶給我歡笑與自信，在情緒低落時給我一個家一般的避風港，大家都是我最重要的夥伴。

在論文定稿與口試方面十分感謝林豊益老師、洪君琳老師與周銘翊老師，口試期間給予豐富建議，並在問答時磨練我的思考邏輯與勇氣，整體架構與內容完整性都必須歸功於各位老師，謝謝大家的用心指導。

最後要感謝支持我遠赴台北念書的家人，感謝爺爺、父母及哥哥到最後一刻都在鼓勵我，也不否定我的所學，謝謝。

目錄

摘要.....v
Abstract.....vi
研究背景.....1
粘桿菌素 Colistin 介紹及臨床應用.....1
粘桿菌素畜產養殖業之應用.....1
粘桿菌素之抗藥性環境危害.....2
粘桿菌素對細菌之作用機制.....2
粘桿菌素的腎毒性研究.....3
粘桿菌素的神經毒性研究.....4
抑制粘桿菌素殺菌機制.....4
模式動物-斑馬魚.....5
毒理模式.....5
斑馬魚的表皮功能.....6
斑馬魚的離子細胞.....6
斑馬魚毛細胞.....7
研究目的.....8
實驗設計.....9
第一部分-粘桿菌素 96 小時毒性試驗.....9
第二部分-粘桿菌素 24 小時毒性試驗.....9
第三部分-不同人工水組成條件下對於粘桿菌素毒性影響.....10
第四部分-觀測粘桿菌素與鈣離子含量之毒性相關性.....10
實驗流程.....11
材料與方法.....13
實驗動物.....13
粘桿菌素的製備.....13
高、低鈣水、高鎂水、高硫酸鈉水及高氯化鈉水的製備.....14
斑馬魚仔魚的死亡率及孵化率觀察.....15
斑馬魚仔魚的發育相關指標.....15
斑馬魚仔魚的活體螢光染色.....16
連續攝影測量方法.....17
掃描式電子顯微鏡影像觀測（Scanning electron microscopy,SEM）（SU-3500）.....18
掃描式離子選擇電極技術（SIET）（NMT, YoungerUSA, Amherst, MA, USA）.....18
感應耦合電漿質譜儀（ICP-MS）.....19
統計數據分析.....19

結果.....21
第一部分-colistin 的毒性試驗.....21
實驗一：96 小時計算斑馬魚的死亡率及孵化率.....21
實驗二：96 小時偵測斑馬魚的發育毒性.....21
實驗三：96 小時計算斑馬魚的毛細胞數量及功能.....22
實驗四：96 小時計算斑馬魚的離子細胞數量.....22
實驗五：96 小時觀察斑馬魚在電子顯微鏡下的型態.....22
第二部分-高濃度 colistin 24 小時暴露的急毒性試驗.....23
實驗六：24 小時計算斑馬魚的死亡率.....23
實驗七：2 小時縮時攝影下觀察斑馬魚的體表狀況.....24
實驗八：6 小時處理以 ICP-MS 測量斑馬魚體內離子含量.....24
第三部分-不同人工水組成條件下對於粘桿菌素毒性影響.....24
實驗九：96 小時以 $CaSO_4$、$MgSO_4$、Na_2SO_4、NaCl 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成死亡率之影響.....24
實驗十：96 小時以 $CaSO_4$、$MgSO_4$ 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成毛細胞數目改變之影響.....25
第四部分-改變鈣離子濃度加 colistin 長時間暴露下保護效果.....26
實驗十一：96 小時計算斑馬魚在 NW、高鈣水與低鈣水之死亡率.....26
實驗十二：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的毛細胞數量.....26
實驗十三：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的離子細胞數量.....27
實驗十四：96 小時觀察斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理之電子顯微鏡下的型態.....28
討論.....29
粘桿菌素毒性探討.....29
高鈣離子保護相關機制.....31
24 小時實驗濃度及實驗限制.....33
MET 通道與粘桿菌素毒性的關係.....34
離子細胞分析.....34
氧化壓力與細胞凋亡路徑分析.....35
結論.....37
參考資料.....38
附圖.....46
圖 1：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3、10 μM）暴露 96 小時下的連續死亡率及孵化率。.....46
圖 2：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下的魚體型態與體長、眼睛大小、卵黃囊面積及心跳變化。.....48

圖 3：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下以 FM1-43 標定斑馬魚毛細胞數量並以 SIET 方式檢測毛細胞鈣離子流。 50
圖 4：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下 Rhodamine 123 標定斑馬魚卵黃囊上離子細胞數量 52
圖 5：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下以掃描式電子顯微鏡拍攝魚體毛細胞及角質細胞型態。 55
圖 6：在不同濃度 colistin（0、1、2、3、5、10 μM）暴露 24 小時下的連續死亡率及孵化率。 56
圖 7：在高濃度 colistin（5 μM）暴露 2 小時下的縮時攝影圖。 57
圖 8：在高濃度 colistin（5 μM）暴露 6 小時候以 ICP-MS 測量斑馬魚體內離子含量。 59
圖 9：96 小時以 CaSO4、MgSO4、Na2SO4、NaCl 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成死亡率之影響 60
圖 10：96 小時以 CaSO4、MgSO4 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成毛細胞數目改變之影響 62
圖 11：96 小時計算斑馬魚在 NW、高鈣水與低鈣水之死亡率.....64
圖 12：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的毛細胞數量.....66
圖 13：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的離子細胞數量.....68
圖 14：96 小時觀察斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理之電子顯微鏡下的型態 71

摘要

近年來因為抗生素的過度使用導致環境汙染的問題逐漸受到重視。目前在臨床上使用之粘桿菌素（colistin）會對人體造成腎毒性及神經毒性等副作用，因此被列為對抗格蘭氏陰性細菌感染的最後一線用藥。在許多國家中粘桿菌素也被大量使用在畜產業上作為動物傳染病的防治，進而導致粘桿菌素隨著動物排泄物及未食用完畢的食物進入水域環境中，產生具有抗藥性的大腸桿菌。然而，粘桿菌素對水生動物可能的危害卻仍未被研究。因此本研究目的是利用斑馬魚胚胎為模式以探討粘桿菌素暴露對魚類可能產生的毒性以及水中離子濃度對其毒性之影響。結果發現斑馬魚胚胎暴露粘桿菌素 96 小時之半致死濃度約為 3 μM，死亡個體出現皮膚細胞破損現象，但未產生發育異常與畸形；在亞致死濃度下桿菌素會減少側線毛細胞數量以及離子細胞數量，並損害角質細胞結構。綜合上述在隨時間的觀察發現魚體皮膚角質細胞在暴露粘桿菌素後會逐漸破損，最終導致皮膚細胞瓦解，體內離子失衡，魚體死亡。藉由改變水中的離子濃度，發現鈣離子濃度對粘桿菌素的毒性有關鍵性的影響。提高鈣濃度可以有效減低其毒性，降低鈣濃度會提高毒性。本研究證實了粘桿菌素在水域汙染後可能對魚類產生危害，藉由提高水中的鈣離子濃度可減低其毒性。

關鍵字：粘桿菌素、毒性、毛細胞、角質細胞、離子細胞

Abstract

In recent years, the problem of environmental pollution caused by the excessive use of antibiotics has gradually attracted attention. In clinical, colistin is listed as the last-line drug to combat Gram-negative bacterial infections due to the side effects such as nephrotoxicity and neurotoxicity to the human. However, colistin has been widely used in the animal industry to prevent and treat animal infectious diseases in many countries. Colistin was found to contaminate water environments and produced drug-resistant *Escherichia coli*. However, the potential toxicity of colistin to aquatic animals has not been studied yet. The purpose of this study was to use zebrafish embryos as a model to explore the toxicity of colistin. The result showed that the 50% lethal concentration after 96 hrs colistin exposure was about 3 μM. The skin was damaged in the dead individual. However, developmental abnormalities and deformities were not found. Colistin decreased the number of lateral hair cells and ionocytes, and damaged the keratinocytes structure. We found that skin keratinocytes were severely damaged and detached after exposure, leading to hypotonic swelling of the yolk sac, loss of ion contents, cell lysis, and eventual death. We also found that increasing the calcium concentration of water reduced the toxicity of colistin. In conclusion, this study demonstrated that colistin can pose a threat to fishes by impairing skin cells and functions.

Keyword : colistin、toxicity、hair cell、keratinocyte、ionocyte

研究背景

粘桿菌素 Colistin 介紹及臨床應用

粘桿菌素（colistin , polymyxin E）是被歸類在多肽類（polymyxin）的抗生素。結構為 7 個胺基酸形成的環狀結構與 3 個胺基鏈連接至一個親脂肪性醯基側鏈(Abd El-Baky *et al.*, 2020; Sabnis *et al.*, 2021)。多肽類抗生素被分為 Polymyxin A~E 五種不同結構，大部分皆具有腎毒性。目前臨床上使用的只有 polymyxin B 以及粘桿菌素兩種(Horton & Pankey, 1982)，且僅用於臨床中病患體內分離出抗 carbapenem 類藥物(Sun *et al.*, 2017)之具有多種抗藥性格蘭氏陰性桿菌（Multidrug resistant Gram-negative bacteria, MDR-GNB），如：鮑氏不動桿菌（*Acinetobacter baumannii*）或綠膿桿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）等感染(Moffatt *et al.*, 2010; Bassetti *et al.*, 2019)。多重抗藥性的細菌對常用的 β-lactam（破壞細胞壁）、aminoglycosides（破壞蛋白質）或是 Sulfonamides（磺胺類）藥物（抑制葉酸合成）都具有抗藥性，導致剩下毒性較強的 polymyxin B 及粘桿菌素藥物可以治療(Evans *et al.*, 1999)，使粘桿菌素及 polymyxin B 成為革蘭氏陰性細菌感染下所使用的最後一線用藥(Sun *et al.*, 2017)，而有研究推測在未來可能已經沒有新的抗生素能夠治療這類細菌造成的疾病(Dai *et al.*, 2019)。與粘桿菌素相比，polymyxin B 抗生素有著更強的腎毒性(Kwa *et al.*, 2007)，因此粘桿菌素成為臨床上較多使用之多肽類抗生素。

粘桿菌素畜產養殖業之應用

在畜產養殖業上，嚴重的腸胃道問題可能導致養殖場的動物死亡。斷奶後豬隻的腹瀉對於全球養豬業者而言是最嚴重的威脅(Rhouma *et al.*, 2017)，在研究中農場報告提到由於輪狀病毒（Rotavirus）導致的腸炎與具有多重抗藥性的腸致病性大腸桿菌 O139：K82（enteropathogenic E. coli O139:K82, ETEC）及沙門氏菌

（*Salmonella*）並發感染，導致動物腹瀉死亡(Anjum *et al.*, 2016)，因此農場在豬、牛等養殖動物之飲用水及飼料中加入粘桿菌素作為預防性的投藥，以維持動物健康狀態。2004 年，英國首次被授權使用在因大腸桿菌引起的牛、羊、豬及家禽等之腸胃道感染(Anjum *et al.*, 2016)，而德國在 2011 年記錄這 495 間養豬場中所使用的 20,373.6 公斤抗生素中，粘桿菌素佔全部的 4.2%(Rhouma *et al.*, 2016a)。

粘桿菌素之抗藥性環境危害

從養殖的豬、牛、雞等生物中分離出具有抗粘桿菌素藥物的抗藥基因 *mcr-1* 的大腸桿菌(Kempf *et al.*, 2016)，有研究證實細菌的質體與遺傳基因相互轉移的物體會使抗生素抗藥性基因在細菌間水平轉移，導致共生細菌與致病菌間抗藥基因的相互轉移(Duggett *et al.*, 2018)，目前已在不同的國家中發現具有粘桿菌素抗藥性的細菌，而確認粘桿菌素已進入環境，研究指出在畜牧業中所使用的抗生素是造成農場及牧場四周產生抗生素抗藥性環境的原因(Heuer *et al.*, 2011)。

根據上述可推測粘桿菌素因農場或養殖場的大量使用而已經進入環境當中，而具有粘桿菌素抗藥基因的大腸桿菌也確實可從水域及農場側得，粘桿菌素隨著動物的排泄物與未食用完畢的飼料及飲用水排放至環境，再以基因水平轉移的方式導致外界有更多抗藥基因出現為目前受矚目的議題。

粘桿菌素對細菌之作用機制

粘桿菌素與 Polymyxin B 的結構相似(Li *et al.*, 2005)，為少數人畜共通帶正電荷的藥物(Horton & Pankey, 1982; Rhouma *et al.*, 2016b)，因靜電作用會與帶負電荷的細胞膜外脂多醣（Lipopolysaccharide, LPS）相互吸引結合(Dixon & Chopra, 1986)，與穩定革蘭氏陰性細菌細胞膜結構的鈣及鎂等二價離子競爭性置換（displacement），並結合至 LPS 的 lipid A，修飾 lipid A 以改變細胞外膜結構

(Peterson *et al.*, 1985; Moffatt *et al.*, 2010)，運用粘桿菌素脂質尾部結構作用破壞細菌細胞外膜，進入細菌內膜後，比照外膜機制結合至內膜 LPS 上，導致細胞膜通透性增加，細胞內容物流出後導致細菌體死亡(Newton, 1953; Gupta *et al.*, 2009; Sabnis *et al.*, 2021)。

在(Sabnis *et al.*, 2021)文章中提到即便是低濃度 LPS 對粘桿菌素進入細菌體而言也是必要的，清楚表示粘桿菌素的殺菌素透過與細菌 LPS 專一結合，透過 mcr-1 基因編碼的 pEtN 或 4 - amino – deoxy – L- arabinos 與 lipid A 的至少一個磷酸機團替換(Hamel *et al.*, 2021)，使細菌對粘桿菌素產生抗藥性(Nang *et al.*, 2019)，而 lipid A 為 LPS 結構中的一部分，運用表現 *mcr-1* 基因的細菌中發現內膜比外膜的保護效果來的好，證實 LPS 在內膜中的含量較外膜高，所以內膜保護效果較好，也證實粘桿菌素與 LPS 的結合有 LPS 濃度依賴性(Sabnis *et al.*, 2021)。

粘桿菌素的腎毒性研究

目前研究提出，粘桿菌素在人體中進入到細胞的方式，主要透過增加腎小管上皮的細胞膜通透性，經人類的腎小管上皮頂側膜再吸收作用進入到細胞內，接著經由人類的 peptide transporter 2（PEPT2）及（OCTN2）兩個轉運蛋白進入細胞(Gai *et al.*, 2019)，最後使過多的水分或離子流入細胞內，使細胞腫脹甚至使細胞溶解(Falagas *et al.*, 2005)。

也有研究顯示，病人如果每天若攝取過量的粘桿菌素，會導致腎毒性的發生率上升(Deryke *et al.*, 2010)，研究中提到粘桿菌素的腎毒性與其患者年齡相關，在 60 歲以上的患者服用粘桿菌素後腎毒性的發生率有顯著上升(Balkan *et al.*, 2014)。底特律醫學中心接受為期 5 年使用粘桿菌素≥48 小時的患者所統計出的結果中顯示，使用粘桿菌素治療的人當中，腎毒性的發生率雖有下降，然而還是有 43%的病患發生一定程度的腎功能不全(Pogue *et al.*, 2011)。

綜合以上機制表明：粘桿菌素對於人類具有相當嚴重的腎毒性，研究指出腎

臟的損傷與粘桿菌素在體內的累積劑量有關，若縮短藥物的治療時間可以降低腎毒性的發生率(Spapen *et al.*, 2011)，且目前臨床上也會建議使用該藥物時必須慎重評估患者的腎功能。

粘桿菌素的神經毒性研究

過去研究中曾提到在臨床治療期間，神經毒性的發生並不是主要的問題(Spapen *et al.*, 2011)，但也有研究指出粘桿菌素會引起與乙醯膽鹼釋放相關的非競爭性肌肉突觸前神經元抑制劑，且神經毒性通常發生於女性或腎功能受損與重症肌無力的女性患者(Nigam *et al.*, 2015)，也有研究推測粘桿菌素的神經毒性是因短時間內藥物與乙醯膽鹼競爭抑制使血鈣下降，進而延長去極化的時間(Falagas & Kasiakou, 2006)，或是粘桿菌素與脂類含量高的神經元相互作用引起神經毒性(Dai *et al.*, 2013)，在過去與粘桿菌素造成神經毒性相關的細胞實驗中，有研究使用小鼠的神經母細胞瘤 2a（neuroblastoma2a）細胞做粘桿菌素在神經細胞的細胞毒性實驗，毒性主因是由粒線體的氧化壓力上升進而導致細胞凋亡(Dai *et al.*, 2016)，證實了粘桿菌素在體外的神經細胞實驗中具有神經細胞毒性。

抑制粘桿菌素殺菌機制

在(Janssen & van Schaik, 2021)提出粘桿菌素與 LPS 之 lipid A 結合後與穩定細胞膜之陽離子置換，而在細菌細胞膜的成分中鈣及鎂為兩個維持細胞膜的穩定性的陽離子。

多粘菌素對綠膿桿菌而言為相當具有感受性的抗生素，過去(Newton, 1953)曾證實將培養液中的鎂離子濃度提高至 0.05 M 可以抑制多粘菌素的殺菌作用，文中也提到機制可能有兩種：其一為多粘菌素和細胞內或細胞內結合位的離子之間競爭性吸收，第二則是形成多粘菌素金屬離子複合物，從而使抗生素失去活性。

目前研究也紛紛指出細菌如果對多肽類抗生素產生抗藥性，通常是因為藥物

無法穿透細菌細胞膜進入到細菌體內，其數據顯示鈣離子與鎂離子可以阻止這類藥物的殺菌作用，也有效的與 polymyxin B 產生拮抗的作用，並能保護綠膿桿菌及大腸桿菌不受粘桿菌素破壞，推測高濃度二價陽離子改變細菌細胞壁結構，使粘桿菌素能進入細胞的通道發生變化，然而其中的作用機制目前尚不清楚(Chen & Feingold, 1972; Horton & Pankey, 1982)。

模式動物-斑馬魚

斑馬魚的胚胎及仔魚在高通量藥物篩選和「預測毒理學」方面特別有用(Hung et al., 2021)，斑馬魚優勢在於一次下蛋的數量達幾百顆之多，提升樣本數，且孵化成為胚胎後魚的身體會成透明，可以輕易地使用解剖顯微鏡觀察魚體內部的變化，測量較為方便，同時，斑馬魚的基因已經被解碼，可以確定在基因方面與人類有 70%的相似，在疾病方面更是有 84%相似的基因可以從斑馬魚身上找到。上述條件也使斑馬魚成為非常適合用在實驗上的模式物種，2003 年美國國立衛生研究院將斑馬魚列為僅次於小鼠和大鼠的第三大重要實驗生物。(Hung et al., 2021)

毒理模式

本研究參考經濟合作暨發展組織公認的化學物質測試準則測試魚急毒性偵測及魚胚胎期和囊胚期的短期毒性測試（OECD No. 203: Fish, Acute Toxicity Test 及 Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages），以斑馬魚胚胎為毒理學模式進行化學藥物的毒性偵測，分別在準則（OECD No.203 及 OECD No. 212）中提到毒性試驗中魚或胚胎的藥物總暴露時間為 96 小時，分別在第 24、第 48、第 72 及第 96 小時進行死亡率的紀錄，藥物濃度至少為五個，而樣本數目至少 30 隻魚，從這五個濃度中算出藥物的半致死濃度（LC50, Lethal concentration 50%）、孵化率（Hatching rate）及外觀上的影響。

斑馬魚的表皮功能

表皮是脊椎動物最大的器官，同時也是對抗外來物質的第一道防線。其中硬骨魚的表皮分化成角質細胞、單細胞腺體（粘液細胞）、感覺細胞及離子調節細胞用以保護生物體不受水生環境的影響(Chang & Hwang, 2011)，斑馬魚的表皮組成主要分為粘膜及粘液，粘膜成分包含蛋白質、脂質、碳水化合物、代謝物等，粘液成分包含許多重要的蛋白質及酵素，溶菌酶、免液球蛋白、凝集素等都有在魚體粘液中被發表出來(Dash *et al.*, 2018)。

在魚胚胎階段，於鰓、腎臟和腸道具有功能之前，表皮被認為是透過離子細胞吸收水中離子，並透過鰓、皮膚或離子細胞排出酸，以調節體液中之離子成分並維持 pH 值，也因此被用在研究離子調節相關之實驗模式動物(Lin *et al.*, 2006)。

表皮也是魚體優先暴露毒物及藥物的器官，過去研究曾以 Vincristine 暴露斑馬魚體，能觀察到優先暴露藥物之表皮角質細胞及毛細胞能觀察到損傷，且離子調節之離子細胞數目也有下降的情形，這也表示毒性試驗可以從表皮優先觀測到損傷(Hung *et al.*, 2021)，而皮膚直接暴露到微米及奈米顆粒更能造成斑馬魚血栓的影響(McLeish *et al.*, 2010)。

斑馬魚的離子細胞

斑馬魚的離子細胞位於魚體表面，而離子細胞的功能與人類腎小管細胞功能類似(Hwang & Chou, 2013)，斑馬魚離子細胞負責從環境水中吸收離子(Horng et al., 2009; Hwang et al., 2011)，並向水中分泌酸和氨(Horng et al., 2015; Hung et al., 2021)。斑馬魚的離子細胞主要分為五型，與本研究較相關的為其中兩型細胞，分別為 HR（H+-ATPase-rich cell, HR cell）細胞及 NaR（Na+-K+-ATPase-rich cell,NaR）細胞。HR 細胞（H+-ATPase-rich cell,HR cell）為負責主要的排酸功能，NaR 細胞（Na+-K+-ATPase-rich cell,NaR）則主要是負責鈣離子的交換(Guh

et al., 2015)。

過去有研究指出，斑馬魚在許多腎臟離子轉運疾病及許多通道和轉運蛋白功能研究中，是具有價值的模型，可能在生理及病理機制方面有相當優秀的利用價值，但並不是所有人類腎臟電解質轉運機制和人類疾病都可以在斑馬魚中建立模式(Kersten & Arjona, 2017)。

斑馬魚毛細胞

斑馬魚的毛細胞位於魚體表面側線上方，為一種機械感覺器官，由頭部沿著身體連成一線的神經叢組成，其中包含毛細胞和支持細胞(Santos *et al.*, 2006)。在斑馬魚身上，不論是內耳毛細胞或側線毛細胞，都與人體的毛細胞在形態和功能上相似，但與人類不同的是斑馬魚的毛細胞具有再生的功能。也因為具有再生的功能，斑馬魚的毛細胞成為偵測藥物毛細胞毒性及保護效果的動物模式(Coffin *et al.*, 2010)。而目前斑馬魚毛細胞與聽力損失相關的化學藥物耳毒性上，也已成為研究聽力功能喪失和前庭功能障礙的動物模式(Nicolson, 2017)，當毛細胞受損可能會降低魚類對於環境的適應能力，可能會進一步影響它們的生存(Santos *et al.*, 2006)。

研究目的

粘桿菌素主要所使用的場合為養殖相關產業，藥物隨著動物的飲用水及排泄物進入到環境當中，進而導致具有抗藥基因的大腸桿菌出現，粘桿菌素進入到水域中對魚體造成的毒性研究並不是十分充足，本研究以斑馬魚為模式動物觀測粘桿菌素對於水生生物的毒性分為兩個部分探討。

斑馬魚在環境當中優先暴露到藥物的部位為表皮細胞，表皮細胞包含角質細胞、離子細胞及毛細胞等，因此將毒性試驗著重於表皮細胞。首先針對毛細胞、離子細胞及角質細胞進行毒性的分析，透過暴露藥品計算粘桿菌素對於斑馬魚胚胎的死亡率，觀測斑馬魚的毛細胞型態及功能，再量化斑馬魚仔魚體表的離子細胞、毛細胞及角質細胞數目，確認粘桿菌素對於上述細胞的影響。再以急性暴露粘桿菌素方式觀測魚體死亡狀態。

最後針對受損細胞進行機轉探討，以細菌在高濃度的鈣離子下可以保護不被粘桿菌素傷害之機制下手，透過提高鈣的濃度，觀察保護斑馬魚仔魚體表的離子細胞、毛細胞及角質細胞，確認鈣離子對於粘桿菌素影響的上述細胞之保護效果。

實驗設計

第一部分-粘桿菌素 96 小時毒性試驗

參考 OECD 203 魚急毒性偵測及 OECD 212 胚胎期和囊胚期的短期毒性測試（No. 203: Fish, Acute Toxicity Test and Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages）準則方式測試粘桿菌素對斑馬魚胚胎連續暴露 96 小時（於受精後 4 小時暴露至 100 小時）之毒性，並於藥物暴露 96 小時後測得粘桿菌素對斑馬魚胚胎之半致死濃度及對於胚胎之發育相關毒性（眼睛大小、卵黃囊大小、體長及心跳），本實驗運用活體螢光染色方式分析離子細胞（Rhodamine 123）及毛細胞（FM1-43）是否受到藥物毒性影響，並使用掃描式電子顯微鏡觀測斑馬魚體表狀況，最後以電生理方式偵測毛細胞功能是否喪失。確認優先暴露藥物之表皮角質細胞及毛細胞是否因藥物暴露下而產生外觀上的損傷。

第二部分-粘桿菌素 24 小時毒性試驗

暴露 96 小時粘桿菌素毒性實驗中發現魚體死亡，後續實驗設計 24 小時（受精後第 76 小時暴露至的 100 小時）暴露粘桿菌素下觀測魚體死亡相關機制，運用與 96 小時暴露之相同濃度粘桿菌素確認死亡率趨勢是否相符，並運用斑馬魚仔魚（受精後第 76 小時）連續暴露 24 小時高濃度粘桿菌素（5 μM）連續攝影，觀察在高濃度粘桿菌素處理下優先損傷部位，並將粘桿菌素濃度 5 μM 處理之魚體運用感應耦合電漿質譜儀（ICP-MS）測量斑馬魚體內離子含量是否因藥物處理而導致內部離子流失。

第三部分-不同人工水組成條件下對於粘桿菌素毒性影響

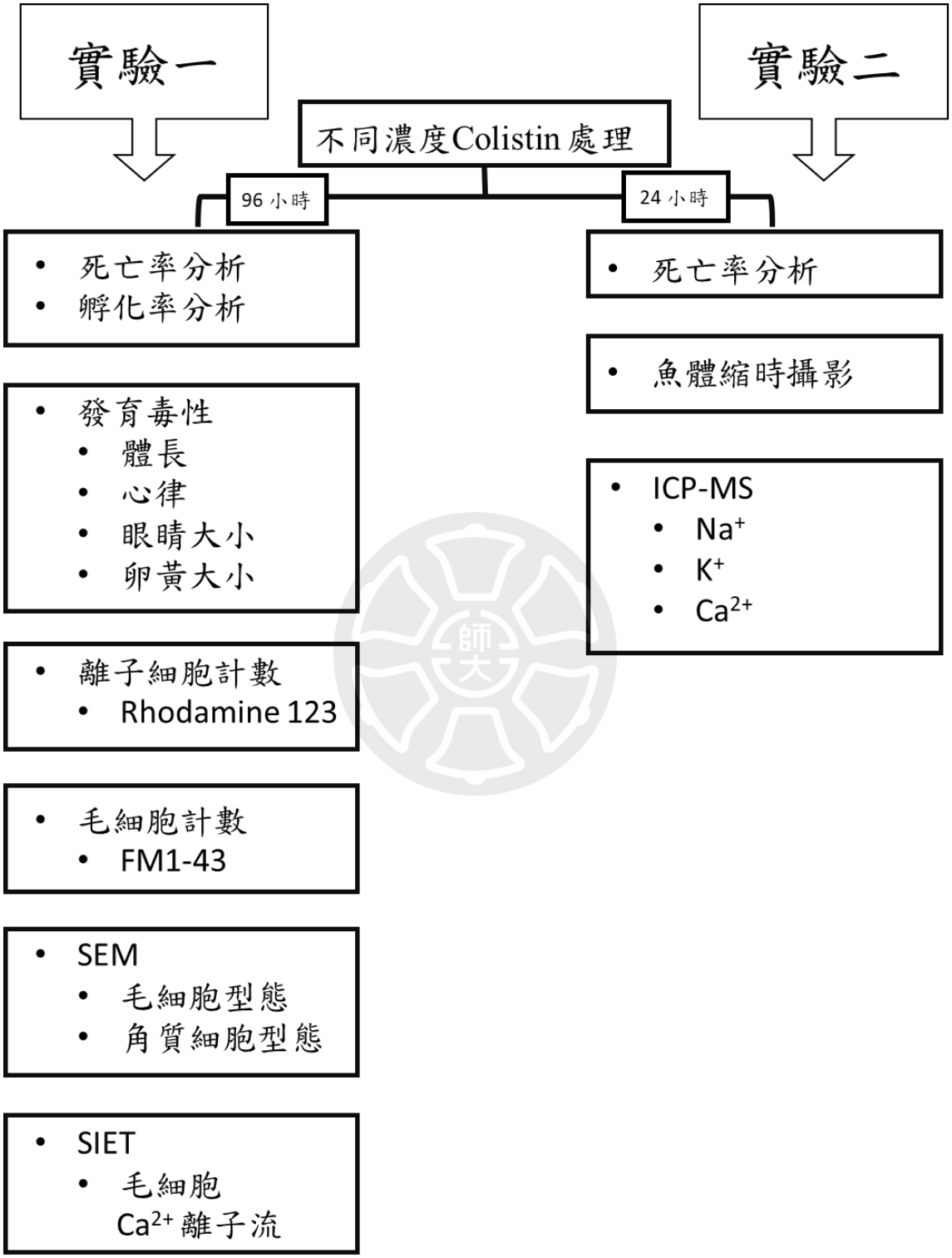
由於過去實驗中提到二價陽離子可以與粘桿菌素競爭結合進入細胞之結合位(Gupta *et al.*, 2009)，過去研究數據顯示鈣離子與鎂離子可以阻止這類藥物的殺菌作用，也有效的與 polymyxin B 產生拮抗的作用，並能保護綠膿桿菌及大腸桿菌不受粘桿菌素破壞(Chen & Feingold, 1972)，本實驗以 $CaSO_4$、$MgSO_4$ 及 Na_2SO_4 配製出高鈣、高鎂及高硫酸鈉溶液觀測不同離子組成下對粘桿菌素毒性之影響，同時為了確認鈉離子相關之毒性影響，本實驗多做了與 Na_2SO_4 相同濃度鈉離子之 NaCl 組別，其離子組成條件請參閱表 1。運用五種不同人工水組成條件下觀測各水體對粘桿菌素毒性之影響。

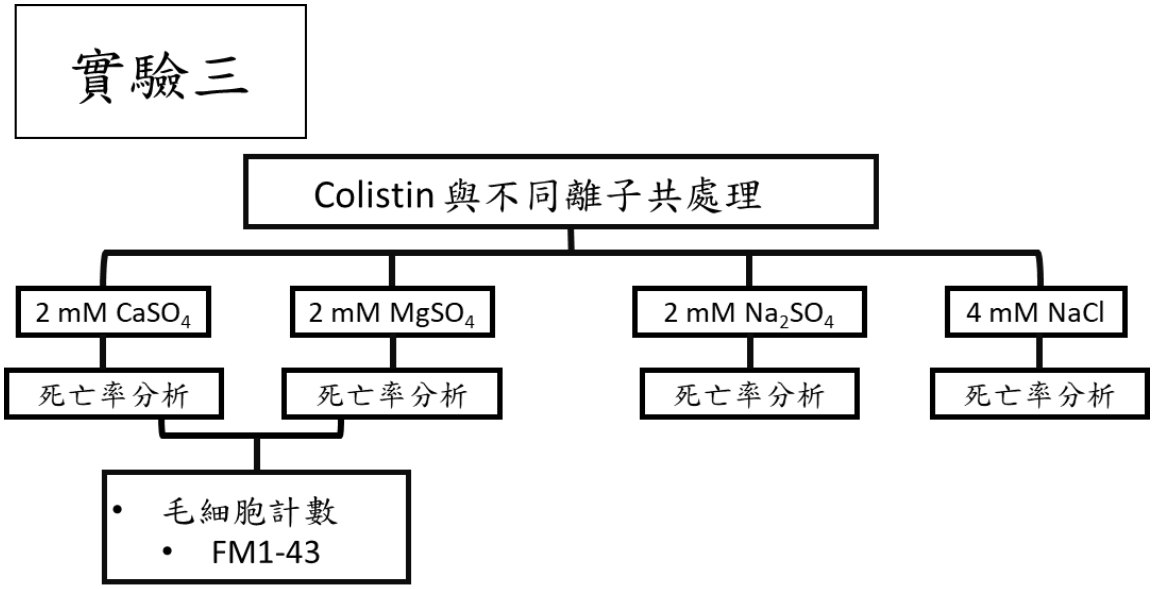
因曾有研究提出二價陽離子可以與粘桿菌素競爭結合進入細胞(Gupta *et al.*, 2009)，本實驗推測透過提高二價陽離子濃度可以與粘桿菌素競爭，並在死亡率上達到保護的效果，特別將高鈣及高鎂組以活體螢光染色方式（FM1-43）觀測不同離子組成之人工淡水對於粘桿菌素損傷之毛細胞影響。

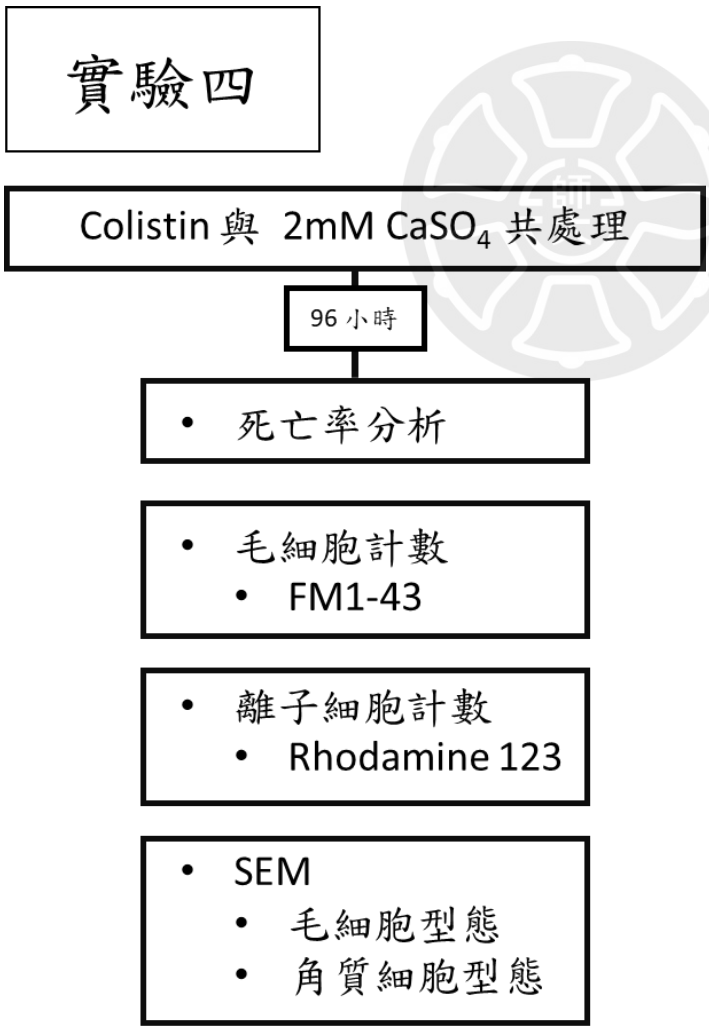
第四部分-觀測粘桿菌素與鈣離子含量之毒性相關性

在不同人工水組成條件下，於粘桿菌素之影響實驗中發現斑馬魚仔魚在高鈣水中，不論是死亡率或毛細胞數量，皆達到保護魚體毒性之效果，本實驗將鈣離子組別分為低鈣組及高鈣組，以觀測對於粘桿菌素之毒性影響是否與鈣離子的含量有相關性，推測降低人工淡水中之鈣離子濃度會增加粘桿菌素進入魚體的機率，增強粘桿菌素對於魚體之毒性，而高鈣組別中則有效與粘桿菌素競爭結合位，降低粘桿菌素進入魚體含量，對魚體之毒性有保護效果，因此計算了死亡率、並以活體螢光染色分析毛細胞及離子細胞的數量，最後運用掃描式電子顯微鏡觀測魚體表面狀況，其高鈣及低鈣水之製備請參閱（表 1）。

實驗流程


實驗一
實驗二
不同濃度Colistin處理
96 小時
24 小時
• 死亡率分析
• 孵化率分析
• 發育毒性
• 體長
• 心律
• 眼睛大小
• 卵黃大小
• 離子細胞計數
• Rhodamine 123
• 毛細胞計數
• FM1-43
• SEM
• 毛細胞型態
• 角質細胞型態
• SIET
• 毛細胞
Ca^{2+} 離子流
• 死亡率分析
• 魚體縮時攝影
• ICP-MS
• Na^{+}
• K^{+}
• Ca^{2+}


實驗三
Colistin 與不同離子共處理
2 mM $CaSO_4$
2 mM $MgSO_4$
2 mM Na_2SO_4
4 mM NaCl
死亡率分析
死亡率分析
死亡率分析
死亡率分析
• 毛細胞計數
• FM1-43


實驗四
Colistin 與 2mM $CaSO_4$ 共處理
96 小時
• 死亡率分析
• 毛細胞計數
• FM1-43
• 離子細胞計數
• Rhodamine 123
• SEM
• 毛細胞型態
• 角質細胞型態

材料與方法

實驗動物

本實驗使用的模式動物為斑馬魚的胚胎及斑馬魚的仔魚（zebrafish, *Danio rerio*）。斑馬魚的種魚馴養在光 14 小時、暗 10 小時的斑馬魚房內，飼養環境為具循環設備的系統缸，水溫控溫在 28±1℃。同批種魚一週交配一次，每週進行交配取卵，取得受精卵後以 0.5mM NaCl、0.2 mM $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$、0.2 mM $CaSO_4$（$2H_2O$）、0.16 mM K_2HPO_4 及 0.16 mM KH_2PO_4 所配置出的人工淡水（normal water, NW）進行馴養，人工淡水酸鹼值介於 pH6.8-7.0 之間，馴養環境為光 14 小時、暗 10 小時，恆溫在 27℃的恆溫箱中。馴養期間皆無餵食且每日換水以維持水質，斑馬魚的受精卵大約在受精後第 2 至第 3 天孵化，實驗使用的斑馬魚分為兩個階段，一是受精後 4 小時（hour post feritilization, hpf）的胚胎，運用致死及亞致死（一個不利於生物生長但未嚴重致死的範圍，sublethal injury）的粘桿菌素劑量以 NW、高濃度鈣水（將 NW 中的 [$CaSO_4$] 增加至 2 mM）及低濃度鈣水（將 NW 中的 [$CaSO_4$] 減少至 0.02 mM）溶解後進行浸泡處理 96 小時（4-100 hpf）觀察藥物毒性；二是以孵化當天的斑馬魚仔魚（3dpf）以致死及亞致死的 colistin 劑量加入 NW（0.2 mM $CaSO_4$）、高濃度鈣水（2 mM $CaSO_4$）及低濃度鈣水（0.02 mM $CaSO_4$）溶解後進行浸泡處理 24 小時（24hpf）觀察急性暴露下的毒性，並收集實驗數據。

不論是長時間（96 小時）實驗或是短時間（24 小時）實驗，斑馬魚的胚胎及仔魚皆馴養於 24 孔盤內，1 孔內有 10 顆胚胎，每個濃度處理數量為 4 孔，期間每日換水以維持水質及藥效。

粘桿菌素的製備

粘桿菌素 Colistin sulfate（Cayman Item No. 17584）原為白色粉末，可溶於

水，每次實驗以 NW、高鈣水（2 mM $CaSO_4$）溶液、低鈣水（0.02 mM $CaSO_4$）、高鎂水（2 mM MgSO4）、高硫酸鈉水（2 mM Na_2SO_4）及高氯化鈉（4 mM NaCl）水溶液溶解藥物粉末，每次實驗（4 天）配製一次 100 μM 的粘桿菌素濃縮液，濃縮液保存於室溫控制在 28±1 ℃的環境下，依實驗所需要的濃度進行序列稀釋，96 小時的實驗濃度為 0.01、0.1、1、2、3 μM 粘桿菌素處理，而 24 小時的仔魚暴露藥物濃度為 1、5、10 μM 粘桿菌素，藥物酸鹼維持在 pH 6.8~7.2 之間，實驗期間室溫控制於 28±1℃，馴養期間皆無餵食且每日換水以維持水質。

高、低鈣水、高鎂水、高硫酸鈉水及高氯化鈉水的製備

原本 NW 中所含之硫酸鈣（$CaSO_4$）濃度為 0.2 mM，高鈣水以 10 倍量的硫酸鈣（$CaSO_4$）加入 NW 中溶解，最終獲得濃度為 2 mM 的硫酸鈣（$CaSO_4$）水溶液；而低鈣水則以原本泡製 NW 時減少 10 倍量的硫酸鈣（$CaSO_4$）混入水溶液中溶解，最終獲得 0.02 mM 的低鈣水溶液，高鎂水是以原本 NW 所含硫酸鎂濃度（0.2mM $MgSO_4$）提高 10 倍硫酸鎂加入 NW 中溶解，最終濃度為 2 mM 的 $MgSO_4$ 水溶液；高硫酸鈉水為運用與高鈣水同濃度硫酸根之 Na_2SO_4 水製備，最後濃度為 2 mM 之 Na_2SO_4 水溶液；高氯化鈉水為運用與 2 mM Na_2SO_4 相同之鈉濃度所配置之 NaCl 水溶液，最終濃度為 4 mM NaCl 水溶液；高鈣水、低鈣水、高鎂水、高硫酸鈉水及高氯化鈉水的酸鹼值為 pH 6.8~7.2 之間。（表 1）

96 小時及 24 小時實驗中，不同組成條件之水體分別依不同實驗加入不同濃度的粘桿菌素馴養斑馬魚的胚胎及仔魚，馴養環境皆為 24 孔盤內，馴養期間皆無餵食且每日換水以維持水質。

表 1：各種人工水的鹽類濃度。NW：正常水，H-$CaSO_4$：高鈣水，L-$CaSO_4$：低鈣水，H-$MgSO_4$：高鎂水，H-Na_2SO_4：高鈉水，H-NaCl：高氯化鈉水。

組別 濃度 (mM)	NW 正常水	H-$CaSO_4$ 高鈣水	L-$CaSO_4$ 低鈣水	H-$MgSO_4$ 高鎂水	H-Na_2SO_4 高鈉水	H-NaCl 高氯化鈉
NaCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	**4**
$MgSO_4$	0.2	0.2	0.2	**2**	0.2	0.2
$CaSO_4$	0.2	**2**	**0.02**	0.2	0.2	0.2
K_2HPO_4	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
KH_2PO_4	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Na_2SO_4	0	0	0	0	**2**	0

斑馬魚仔魚的死亡率及孵化率觀察

每日固定於下午 2 點進行死亡率及孵化率的觀測，本實驗採累計死亡率及累計孵化率的方式記錄，並計算出實驗中粘桿菌素對於斑馬魚胚胎的半致死濃度（Lethal concentration 50%，LC50）以進一步設計以下實驗。

斑馬魚仔魚的發育相關指標

斑馬魚仔魚魚體透明，能透過解剖顯微鏡觀測魚體，測量發育相關的指標，本實驗測量了斑馬魚的身體長度以觀察生長狀況，並以 15 秒心跳數推算一分鐘的心跳次數測量心跳是否有增加或是減少；以解剖顯微鏡（Carl Zeiss Microscopy GmbH）拍攝魚體照片，顯微鏡配備數位相機（ILCE-5000 SONY CORP,

Thailand）進行影像拍攝，以 Image J（ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_172）測量斑馬魚的眼睛面積及卵黃囊面積及體長，若眼睛大小及有變小或是卵黃囊有腫大，並且體長有顯著上升或下降的變化下表示在發育方面有相關毒性。

斑馬魚仔魚的活體螢光染色

藉由不同的活體螢光染劑觀察斑馬魚卵黃囊上的離子細胞及側線毛細胞的變化，在離子細胞的觀測方面，因離子細胞為富含粒線體的細胞（Mitochondrial rich cell, MRC），可以使用觀測粒線體的染劑標定離子細胞位置。粒線體在呼吸氧化的過程中，會產生內膜為正、外膜為負電的電位，而藉由 Rhodamine 123（Sigma-Aldrich）(Liu *et al.*, 2019)染劑進行膜電位的標定可以準確標定出粒線體的位置，進而標定離子細胞。本實驗以乙醇稀釋 Rhodamine 123（MedChemExpress, CAS: 62669-70-9, Lot: #48793）配置成 2.6 mM 的染劑濃縮液(Lee *et al.*, 2019)，在染色期間所使用的 Rhodamine 123 濃度為 52 μM，染色 15 分鐘並以人工淡水沖洗多餘的染劑，在 Rhodamine 123 所標定到的離子細胞為綠色螢光(Lee *et al.*, 2020)，利用影像分析軟體為 Image J（ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_172）進行離子細胞數量分析，實驗中所取區域大小為 0.09 mm^2 所框出的正方形面積，裁切位置約在每隻魚側線 L1 的毛細胞為中央垂直往下的卵黃囊中央區域，所得之離子細胞數量除 0.09 mm^2 以測得實際離子細胞數量。

側線毛細胞則是使用可以進入正在釋放神經傳遞物質的神經元的螢光染劑 FM™ 1-43 Dye（N-（3-Triethylammoniumpropyl）-4-（4-（Dibutylamino）Styryl）Pyridinium Dibromide）進行活體螢光染色(Santos *et al.*, 2006)，FM™ 1-43 為可以在活體上標定毛細胞之螢光染劑(Seiler & Nicolson, 1999)，本實驗 FM™ 1-43 Dye（Invitrogen, Lot: 2161915）使用二甲基亞碸（Dimethyl sulfoxide, DMSO）（Sigma-Aldrich, Lot: BCCD8942）溶解配置成 3 mM 的濃縮液(Lin *et al.*, 2018)，染色時間為 1 分 30 秒。FM™ 1-43 從毛細胞之頂端由上往下染至毛細胞的基底細

胞，經由毛頂端內吞 FM™ 1-43 進入到細胞內(Seiler & Nicolson, 1999)，也有研究指出將具有耳毒性之氨基糖甘類抗生素及 neomycin 加入 FM™ 1-43 可以降低兩者耳毒性的發生，間接證明 FM™ 1-43 進入毛細胞的方式與兩者抗生素相同，皆為通過 MET 通道進入毛細胞(Gale *et al.*, 2001)。毛細胞被激發出螢光後可以準確標定毛細胞數量，水洗可以將非特異性結合之染劑洗去（https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T3163#/T3163），被 FM™ 1-43 染上的毛細胞會在斑馬魚仔魚側線上呈現出綠色的螢光可計算數目。

在進行活體螢光染色前，以 3-氨基苯甲酸乙酯甲磺酸鹽（Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, MS222）（Sigma-Aldrich）浸泡麻醉，麻醉劑以 NW 配製成 0.77 μM 的濃度 (Gordon *et al.*, 2019)，酸鹼值使用 NaOH 調成 pH 6.8~7.2 之間，其中緩衝溶液以 3-嗎啉基-丙烷磺酸（3-Morpholino-propanesulfonic acid, MOPS, Merck）穩定 pH，因染劑的特性不同選擇在染色前或染色後進行麻醉。

螢光染劑的溶劑粉末則以二甲基亞砜（Dimethyl sulfoxide, DMSO）溶解後稀釋使用，最後的 DMSO 濃度不超過 0.1%(Gordon *et al.*, 2019)。

將螢光染色完畢之魚體運用汞燈（Power Supply For 100w Pressure Mercury Burner, Modle BH2-RFL-T3）發射不同波長的激發光在透過螢光顯微鏡（Olympus, Model BX60F-3）與配備之數位相機（Canon DS126271, Japan）進行螢光拍攝。

連續攝影測量方法

連續攝影實驗使用 60 倍放大倍率之水鏡（LUMPlanFL N, Japan）搭配顯微鏡配備數位相機（ILCE-6300 SONY, Thailand）以拍攝照片，將受精後第 72 小時之斑馬魚胚胎以濃度 5 μM 粘桿菌素處理，連續拍攝 2 小時所擷取之影像。

掃描式電子顯微鏡影像觀測（Scanning electron microscopy,SEM）（SU-3500）

實驗中使用掃描式電子顯微鏡（SEM）（SU-3500）觀測魚體的外觀型態差異，本實驗主要用以觀測毛細胞及角質細胞外觀。將馴養 96 小時之斑馬魚仔魚以 4% paraformaldehyde（Sigma-Aldrich, P6148 Batch# : 126K0670）-5% Glutaraldehyde（Sigma-Aldrich, G5882, Lot #SLCF6048）固定，固定期間溫度皆為 4℃並固定超過 24 小時，在運用乙醇進行序列脫水（70%、85%、95%、100%），乾燥後把樣本放於真空蒸發器（IB-2, Hitachi）內鍍上金膜作為標靶，再經由 SEM（SU-3500, Hitachi）做畫面的呈像。

利用影像分析軟體為 Image J 進行毛細胞開口面積，計算斑馬魚側線 L1 毛細胞在掃描式電子顯微鏡下之毛細胞開口面積，設定完已知長度單位後圈選待測區域便能得出斑馬魚仔魚毛細胞開口大小。

掃描式離子選擇電極技術（SIET）（NMT, YoungerUSA, Amherst, MA, USA）

掃描式離子選擇電極技術為運用毛細管製造之微電極並以離子濃度梯度方式測量單一離子濃度差，該方法可測細胞離子流量，本實驗以掃描是離子選擇電極技術測量斑馬魚側線毛細胞 L1 之鈣離子流量，利用拉針機（Sutter Instrument, model P-97）將口徑 1.5 mm 之毛細管（Thin Wall Glass Capillaries, No Filament, TW 150-4, World Precision Instruments, Inc., USA）以高溫方式拉至口徑 3~4 μm，再放入 100℃烘箱內靜置 12 小時去除水氣，期間加入 N, N-Dimethyltrimethylsilylamine（Sigma-Aldrich, Lot #BCBM2625V），待 N, N-Dimethyltrimethylsilylamine 揮發後可確認為電極內已鍍上一層 N, N-Dimethyltrimethylsilylamine 用以避免離子選擇液流失。

在微電極中加入待測之電極液並沾取專一離子通透液（Liquid ion exchanger cocktail, LIX）專一選擇離子通透至微電極內，本實驗使用 Calciun ionophore I – cocktail A（Fluka Analytical, Lot #BCBK9148V）作為離子通透液，待測離子進入微電極內通過前放大器放大 10 倍後再以主要放大器放大 100 倍呈現出該次實驗測得之離子流量，最後運用類比數位轉換器轉換成數字訊號進行數據分析。本實驗測量之毛細胞鈣離子流是參照實驗(Lin *et al.*, 2013)中之方式，運用電腦控制三向儀定位微電極之測量位置，測量斑馬魚側線 L1 毛細胞之鈣離子流。

感應耦合電漿質譜儀（ICP-MS）

感應耦合電漿質譜儀（Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer（Agilent 7800 ICP-MS）實驗目的為偵測魚體內離子含量。先將小魚以二次水洗去身上殘留的藥物後，運用 70%純硝酸（J.T.Baler, CAS: 7697-37-2, Canada）於 60℃的烘箱中 12 小時以待小於均質化，分別將樣本中硝酸濃度稀釋為 2%硝酸，再將稀釋後的樣本以 2 %硝酸分別進行不同倍率的稀釋，鈉離子為 5 倍稀釋，鉀離子為 15 倍稀釋，鈣離子則為 2.5 倍稀釋，再稀釋後的樣本放入 ICP-MS 內偵測魚體內離子濃度。

每次進行樣本質譜分析前都會進行校正曲線的設定，運用鈉離子標準液（Sigma-Aldrich, 19051 Lot: BCBW9699）、鉀離子標準液（Sigma-Aldrich, 06335 Lot: BCBX0642）、鈣離子標準液（Sigma-Aldrich, 00462 Lot: BCBZ3750）分別以 2%硝酸稀釋成 0、25、50、75、100 ppb 作為該次實驗之校正曲線，以確保機器狀況及離子測量濃度的可信度。

統計數據分析

本實驗所使用的統計軟體為 GraphPad Prism 8，每個結果數據的 n 值約落在範圍 12~20 之間，所使用的統計方式為三個組別以上用 One way ANOVA 及

Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，而僅有兩個組別者以 T-Test 分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值，並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，圖形中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），星號標示（*）方式規則為 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$

結果

第一部分-colistin 的毒性試驗

實驗一：96 小時計算斑馬魚的死亡率及孵化率

將斑馬魚的胚胎從受精後 4 小時開始浸泡在不同濃度的粘桿菌素（0、0.01、0.1、1、2、3、10 μM）下馴養，分別在第一天、第二天、第三天及第四天的同一時間記錄斑馬魚的死亡率，本實驗所採用的死亡率記錄方式為累計死亡率，在粘桿菌素暴露第四天時，濃度 1 μM 在下有 10%的死亡率，2 μM 粘桿菌素處理下有 35%死亡，在 3 μM 處理下有 56.6%死亡，在濃度達到 10 μM 時則會完全死亡，在粘桿菌素處理下藥物對斑馬魚的半致死濃度（LC50）約為 3 μM，可以發現死亡率隨著粘桿菌素濃度上升而上升，具有劑量依賴性，並且死亡率大幅上升的時間點為斑馬魚孵化後（圖 1A）；從累計孵化率中可以發現孵化率並不會因為粘桿菌素的影響而改變（圖 1B）。

實驗二：96 小時偵測斑馬魚的發育毒性

將斑馬魚的胚胎從受精後 4 小時開始浸泡在不同濃度的粘桿菌素（0、0.01、0.1、1、2、3 μM）下馴養，並且在受精後第四天（4dpf）使用解剖顯微鏡拍攝魚體，運用 Image J 計算仔魚體長以及眼睛面積及卵黃囊面積。在體長方面魚體並沒有因為粘桿菌素濃度上升而有所改變（圖 2B）；測量斑馬魚的眼睛大小也並沒有因為粘桿菌素的濃度上升而有所變化（圖 2D）；卵黃囊的面積計算也沒有因為粘桿菌素的濃度上升而有明顯變化（圖 2E），在拍攝的過程紀錄斑馬魚 15 秒下的心律並計算出 1 分鐘的心跳速率，心跳速率也沒有因為粘桿菌素的濃度上升而有明顯改變（圖 2F）。

實驗三：96 小時計算斑馬魚的毛細胞數量及功能

將斑馬魚的胚胎受精後 4 小時放入 24 孔盤內，並分別加入不同濃度的粘桿菌素（0.01、0.1、1、2、3 μM）處理 96 小時，在受精後第四天（4dpf）進行 FM1-43 螢光染色分析毛細胞的數量多寡（圖 3A~F），將圖 3A~F 之細胞數量化後，從統計圖中可觀察隨著粘桿菌素濃度上升毛細胞數目逐漸下降之劑量依賴性，並在濃度 0.1 μM 粘桿菌素處理下細胞數目與控制組相比下降了 27.66%（P = 0.0018）。（圖 3G）

將粘桿菌素處理第 96 小時之斑馬魚仔魚以電生理方式測得毛細胞之鈣離子流，從統計圖中可觀察隨著粘桿菌素濃度上升毛細胞數目逐漸下降之劑量依賴性，並在濃度達 0.1 μM 達顯著下降。（圖 3H）

實驗四：96 小時計算斑馬魚的離子細胞數量

將斑馬魚的胚胎受精後 4 小時放入 24 孔盤內，分別加入不同濃度的粘桿菌素（0.01、0.1、1、2、3 μM）處理 96 小時，並於受精後第四天（4dpf）使用 Rhodamine 123 進行活體螢光染色，運用標定粒線體膜電位的方式標定富含粒線體的離子細胞數量（圖 4~E），從數量方面可以發現隨著粘桿菌素的濃度到達 1 μM 時，離子細胞數量下降了 35.08%（P = 0.0005）達顯著差異，並可觀察到粘桿菌素濃度上升離子細胞數量有逐漸下降的劑量依賴性（圖 4B）。

實驗五：96 小時觀察斑馬魚在電子顯微鏡下的型態

將斑馬魚胚胎受精後 4 小時開始浸泡在不同濃度下的粘桿菌素處理，在受精後第四天進行掃描式電子顯微鏡拍攝斑馬魚毛細胞及角質細胞型態（圖 5A~E），在畫面中看見有毛細胞及角質細胞，毛細胞可以從細胞的毛的形態及毛細胞的開口大小去定義毛細胞的狀態。若毛細胞拍攝出來的畫面中毛量相當稀少或是開口

大小變小皆可能是毛細胞死亡的象徵。角質細胞方面我們可以觀察他的排列，從影像中可以看見魚體使用高濃度粘桿菌素處理後，角質細胞中間緊密接合的邊緣有變的鬆散，角質細胞中央的指紋狀紋路（微脊）也會逐漸變的平滑，這都是角質細胞受到傷害的表徵。

結果顯示，斑馬魚的毛細胞開口在高濃度粘桿菌素（2、3 μM）處理下有縮小的狀況，濃度 2 μM 粘桿菌素處理之毛細胞開口大小與控制組相比下降了 59.3%（$p = 0.0244$），其後濃度處理下毛細胞開口面積亦顯著下降（圖 5F），圖中可觀測毛細胞中央毛的數量也有明顯變少（圖 5E），可以察覺受到粘桿菌素處理的斑馬魚毛細胞有損傷甚至萎縮的現象。

斑馬魚的表皮角質細胞方面，一般的斑馬魚角質細胞中間有似迷宮狀的彎曲紋路，邊緣為規則稜角狀的緊密排列，而受到粘桿菌素處理的斑馬魚表皮角質細胞中央彎曲紋路變為扁平不明顯，規則緊密的排列也變的不規則，可以顯示粘桿菌素處理下之表皮角質細胞有損傷的狀況（圖 5G~K）。

第二部分-高濃度 colistin 24 小時暴露的急毒性試驗

實驗六：24 小時計算斑馬魚的死亡率

將受精後第三天（3dpf）的斑馬魚仔魚分別浸泡在不同濃度的粘桿菌素（1、2、3、5、10 μM）下，並於第一、第二、第四、第六、第十二、第二十四小時記錄斑馬魚仔魚的累計死亡率，可以看見部分致死濃度（5、10 μM）的死亡率從 4~6 小時開始逐漸攀升，死亡率也與浸泡 96 小時的斑馬魚死亡率有相同趨勢，當粘菌素濃度到達 3 μM，死亡率則在 35%，5 μM 時死亡率則為 62.5%，在最高濃度 10 μM 處理下死亡率則高達 82.5%，證明粘桿菌素所造成的死亡率上升大多從孵化後開始。（圖 6）

實驗七：2 小時縮時攝影下觀察斑馬魚的體表狀況

將斑馬魚以高濃度粘桿菌素（5 μM）浸泡下，用每 10 秒拍攝一張照片連續拍攝 2 小時的條件進行縮時攝影（圖 7 A0~A3），從攝影中可以發現高濃度處理下的斑馬魚在急性暴露下，魚鰭已經有明顯破損（圖 7A1），隨著時間拉長，斑馬魚表皮破損位置逐漸增多，死亡之前能觀察到脊椎彎曲（圖 7A2），最後卵黃囊破裂導致魚體完全死亡（圖 7A3），將破損部位放大下，魚鰭及表皮細胞皆有破損的狀況（圖 7B~D），卵黃下緣則會發現有內容物流出（圖 7E），證明 2 小時急性暴露粘桿菌素下魚體的表皮會優先破損，卵黃囊會破裂導致魚體死亡。

實驗八：6 小時處理以 ICP-MS 測量斑馬魚體內離子含量

將受精後第三天的斑馬魚仔魚浸泡在高濃度的粘桿菌素（5 μM）下，浸泡 6 小時候使用 ICP-MS 偵測斑馬魚體內鈉離子、鉀離子及鈣離子的含量，鈉離子含量與正常的魚相比，處理組下降了 38.5%（$p=0.0159$）達顯著差異（圖 8A）；鉀離子方面處理組與控制組相比則只能觀察到有下降的趨勢，並沒有統計上的差異（圖 8B）；鈣離子方面處理組的含量與控制組相比下降了 45.5%（$p=0.0079$）達顯著差異（圖 8C）。實驗證實斑馬魚經由粘桿菌素 6 小時急性暴露下，體內離子含量在鈉及鈣離子方面有流失的情形。

第三部分-不同人工水組成條件下對於粘桿菌素毒性影響

實驗九：96 小時以 $CaSO_4$、$MgSO_4$、Na_2SO_4、NaCl 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成死亡率之影響

將受精後四小時的斑馬魚胚胎以十顆為一孔放入 24 孔盤內，每孔內水體為 1 毫升，水體分別加入不同濃度粘桿菌素（0、1、5、10 μM）與 2 mM $CaSO_4$ 、2

mM $MgSO_4$、2 mM Na_2SO_4 及 4 mM NaCl 進行處理，每個濃度 4 孔（40 個胚胎），並於下午 2 點紀錄受精後第四天的斑馬魚胚胎紀錄累計死亡率。

在僅加入 2 mM $CaSO_4$ 之組別中粘桿菌素度到達 5 μM 時，死亡率為 7.5%，與人工淡水加入 5 μM 粘桿菌素組別相比死亡率下降了 92.1%（$p=0.0295$）達顯著下降；當 2 mM $CaSO_4$ 之組別中粘桿菌素到達 10 μM 時死亡率則為 12.5%，與人工淡水加入 10 μM 粘桿菌素組別相比死亡率下降了 87.5%（$p=0.02$）達顯著差異；加入 2 mM $MgSO_4$ 之組別中當粘桿菌素濃度到達 5 μM 時，死亡率為 12.5%，與人工淡水加入 5 μM 粘桿菌素組別相比死亡率下降了 86.8%，統計上未達顯著差異；2 mM $MgSO_4$ 之組別當粘桿菌素到達 10 μM 時死亡率則為 27.5%，與人工淡水加入 10 μM 粘桿菌素組別相比死亡率下降了 72.5%，統計上未達顯著差異；使用 2 mM Na_2SO_4 與粘桿菌素的濃度 5 μM 處理時後死亡率高達 77.5%，而粘桿菌素濃度提高至 10 μM 時死亡率則達到 97.5%；使用 4 mM NaCl 與粘桿菌素濃度 5 μM 處理時，死亡率高達 92.5%，而粘桿菌素濃度提高至 10 μM 時死亡率則達到 100%（圖 9）。

實驗十：96 小時以 $CaSO_4$、$MgSO_4$ 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成毛細胞數目改變之影響

將受精後四小時之斑馬魚胚胎以十顆為一孔放入 24 孔盤內分別以 NW（內含 0.2 mM $MgSO_4$ 及 0.2 mM $CaSO_4$）、高鎂水（2 mM $MgSO_4$）、高鈣水（2 mM $CaSO_4$）與不同濃度粘桿菌素（0、1、5、10 μM）處理下，96 小時候使用 FM1-43 進行毛細胞的螢光標定（圖 10A~M），並將數量量化以計算毛細胞數量。NW 組別中，濃度 1 μM 粘桿菌素處理下之斑馬魚毛細胞數量下降了 33.4%（$p=0.0008$）達顯著下降，並在其後濃度皆達顯著差異（圖 10N）；在高鈣水（2 mM $CaSO_4$）搭配濃度 3 μM 粘桿菌素處理下毛細胞數量與僅加入 2 mM $CaSO_4$ 之組別相比下降了 29.9%（$p<0.0001$）達顯著下降，其後濃度統計上皆達顯著差異，

粘桿菌素處理濃度為 10 μM 粘桿菌素處理下毛細胞數量與僅加入 2 mM $CaSO_4$ 之組別相比則下降了 36.9%（圖 10O）；在高鎂水（2 mM $MgSO_4$）搭配濃度 3 μM 粘桿菌素處理下毛細胞數量與僅加入 2 mM $MgSO_4$ 之組別相比下降了 59%（$p < 0.0001$）達統計上顯著下降（圖 10P）；將同濃度不同組別之數據合併後計算同濃度下之差異，在濃度 1 μM 處理下 NW 組與高鈣水組有顯著上升（$p = 0.0002$），在濃度 3 μM 處理下 NW 組與高鈣水組有顯著上升（$p = 0.0025$），濃度 5 及 10 μM 之高鈣水組與高鎂水組相比，高鎂水組毛細胞數量達顯著下降（$p < 0.0001$）。（圖 10Q）

第四部分-改變鈣離子濃度加 colistin 長時間暴露下保護效果

實驗十一：96 小時計算斑馬魚在 NW、高鈣水與低鈣水之死亡率

將斑馬魚的胚胎從受精後 4 小時開始浸泡不同濃的粘桿菌素處理，搭配不同鈣離子濃度的水體，分別在受精後第一天、第二天、第三天、第四天同一時間記錄死亡率。在 NW 組別中，隨著粘桿菌素的濃度上升，死亡率有逐漸上升的趨勢，有劑量依賴性，並在濃度 3 μM 粘桿菌素處理下死亡率達 60%（圖 11A）；在低鈣水（0.02 mM）馴養下搭配不同濃度粘桿菌素處理，也有隨著粘桿菌素濃度上升，死亡率也逐漸上升，有劑量依賴性，並在濃度 3 μM 粘桿菌素處理下死亡率達 100%（圖 11B）；最後使用高鈣水（2 mM）搭配不同濃度粘桿菌素處理，死亡率並沒有逐漸上升的趨勢（圖 11C）。

實驗十二：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的毛細胞數量

將斑馬魚的胚胎從受精後 4 小時開始浸泡不同濃的粘桿菌素處理，搭配不同鈣離子濃度的水體，在受精後第四天進行毛細胞的活體螢光染色（圖 12A~L），

本實驗使用的染劑為 FM1-43，使用 NW 搭配不同濃度粘桿菌素處理下，可以看見隨著粘桿菌素的濃度上升，毛細胞數量逐漸下降，並在 1 μM 粘桿菌素處理下與控制組相比下降了 51.29%（p =0.0018），在統計上達顯著下降，其後之粘桿菌素濃度處理下毛細胞數量皆達顯著差異（圖 12M）；使用低鈣水搭配不同濃度粘桿菌素處理下，可以看見隨著粘桿菌素濃度上升，毛細胞數量沒有顯著性差異（圖 12N）；最後使用高鈣水搭配不同濃度的粘桿菌素處理下毛細胞數量與控制組相比下降了 25.8%（p =0.0126），在統計上達顯著下降（圖 12O），

將以上三個結果以同濃度粘桿菌素進行比較，可以發現低鈣水處理下的毛細胞數量與控制組相比有統計上 3 顆*的下降，比控制組更加嚴重的現象，而高鈣水處理下與控制組相比在同樣為 1 μM 粘桿菌素處理後之毛細胞數量有顯著上升，2 μM 粘桿菌素處理後之毛細胞數量有顯著上升，3 μM 粘桿菌素處理後之毛細胞數量有顯著上升（圖 12P），證明提高鈣離子濃度對毛細胞數目有達到保護的效果。

實驗十三：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的離子細胞數量

將斑馬魚的胚胎從受精後 4 小時開始浸泡不同濃的粘桿菌素處理，搭配不同鈣離子濃度的水體，在受精後第四天進行離子細胞的 Rhodamine 123 活體螢光染色（圖 13A~K），所選擇的部位為卵黃囊中央，綠色圓形細胞為離子細胞。使用 NW 與不同濃度粘桿菌素處理下可以看見，隨著粘桿菌素的濃度上升，離子細胞的數量有逐漸下降的情形，在粘桿菌素濃度為 1 μM 時與控制組相比下降了 28.5%（p =0.0341），統計上達顯著下降，其後濃度皆在統計上達亦顯著下降（圖 13L）；在低鈣離子的組別中粘桿菌素的濃度為 1 μM 時，離子細胞數目下降了 51.7%（p =0.0006），統計上達顯著下降，其後濃度亦達顯著下降（圖 13M）；高鈣水組別中離子細胞數目下降僅在 3 μM 粘桿菌素處理時，與控制組相比下降了

17%（p =0.0133），統計上達顯著下降（圖 13N）。

將以上三個結果以同濃度粘桿菌素進行比較，高鈣水處理下與控制組相比在同樣為 1 μM 粘桿菌素處理後之離子細胞數量有顯著上升，2 μM 粘桿菌素處理後之離子細胞數量有顯著上升，3 μM 粘桿菌素處理後之離子細胞數量有顯著上升（圖 13O），證明提高鈣離子濃度對離子細胞數目有達到保護的效果。

實驗十四：96 小時觀察斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理之電子顯微鏡下的型態

將斑馬魚的胚胎從受精後 4 小時開始浸泡不同濃度的粘桿菌素處理，搭配不同鈣離子濃度的水進行馴養 96 小時，並在受精後第四天以電子顯微鏡中觀測毛細胞及角質細胞在形態上的不同，從電子顯微鏡中可以發現毛細胞的狀態在未加高鈣的組別下有嚴重受損，角質細胞的排列與中央的微脊皆有受損，在加入 10 倍鈣離子後有達到保護的效果（圖 14A~H）。

在離子細胞方面可以發現加入鈣的組別離子細胞開口有塞子狀的東西堵住開口，角質細胞則在加鈣的組別中依舊緊密排列（圖 14I~P），可見提高水中鈣離子濃度可以保護角質細胞及毛細胞不被粘桿菌素傷害。

討論

粘桿菌素毒性探討

本研究中參考經濟合作暨發展組織 OECD 準則設計之毒性試驗方式，發現粘桿菌素對於斑馬魚胚胎之毒性半致死濃度為 3 μM（3.5 mg L^{-1}）。根據(de Oliveira et al., 2020)文獻中曾提出水域中的抗生素濃度大約介於 0.4~1.9 mg L^{-1}，而眾多抗生素中（ammpicillin, ceftazidime, chloramphenicol 等）的半致死濃度約介於 1~1000 mg L^{-1}，本研究中粘桿菌素半致死濃度為 3.5 mg L^{-1} 在眾多抗生素中屬於較低的濃度，因此可以確認粘桿菌素較其他抗生素而言毒性較高。

外觀上的損傷透過高濃度粘桿菌素（10 μM）暴露 1 至 4 小時下即可察覺魚體破損死亡，連續觀察下即可發現魚鰭等較為脆弱的部位優先破損。表皮角質細胞的損傷導致卵黃囊破裂，而在低濃度下也能以掃描式電子顯微鏡觀察到魚體損傷（圖 5）。在死亡率方面，死亡的高峰期都在斑馬魚胚胎破殼後才開始有死亡的現象（圖 1），推估粘桿菌素的毒性在胚胎破殼後較胚胎發育時期來的劇烈，並且透過破壞表皮細胞導致斑馬魚死亡。

在(Abd El-Baky *et al.*, 2020)有提到粘桿菌素為親脂性藥物，主要接在細菌脂多醣的 lipid A 上進一步與細胞膜作用，最後將親脂性的尾狀結構插入細菌細胞膜內導致細胞溶解死亡(Sabnis *et al.*, 2021)。在魚體方面有研究顯示魚體表皮具有粘膜與粘液的構造，硬骨魚孵化後不久就會有微生物附著在表皮上，因此硬骨魚擁有粘膜的表面構造作為防禦外來物的第一道防線，其中粘膜又大致區分為胃腸道粘膜及外粘膜表面（即皮膚、鼻子和鰓）(Kelly & Salinas, 2017)，在黏膜與粘液構造中尤其粘膜是被證實具有脂質、蛋白質等結構(Dash *et al.*, 2018)。過去也有文章使用 Chol-PEG-Cy5 可以在未清洗魚體粘液的狀態下染上細胞膜的螢光染劑，從文章中可以發現斑馬魚表皮皆由雙層磷脂質構造的細胞膜構成(Jia *et al.*, 2019)，本實驗暴露粘桿菌素的魚體優先受損部位為表皮細胞，在電子顯微鏡中就能明確觀察表皮角質細胞或毛細胞等暴露在斑馬魚表皮上的細胞皆有受損（圖

5)，推測粘桿菌素與斑馬魚表皮粘膜作用進一步傷害表皮細胞。

神經毒性方面，臨床上可能產生的神經毒性例如：知覺異常、頭痛、發燒、嗜睡、運動失調、視覺障礙等，而在特定的人身上較常發生神經毒性，例如有重症肌無力的女性及腎功能不全等有較為嚴重疾病的患者中，也較容易發生使用粘桿菌素後有神經毒性的現象(Nigam *et al.*, 2015)，在臨床人體使用粘桿菌素時嚴重腎毒性發生比例較高，神經毒性發生的機率則較低，因此目前有研究提出在臨床上治療的期間神經毒性的發生並不是粘桿菌素使用後主要的問題(Spapen *et al.*, 2011)，雖然目前對於粘桿菌素的毒性尚未完全理解，但在本實驗中粘桿菌素的毒性研究方面可以發現，活體螢光染色下可見毛細胞數量顯著降低的粘桿菌素濃度約在 0.1 μM，而運用電生理方式測試毛細胞功能，也可以發現當粘桿菌素濃度在 0.1 μM 時，鈣離子流與控制組相比有顯著下降，證實不論在外觀或功能上，只要粘桿菌素濃度超過 0.1 μM 即可造成損傷（圖 3），而 0.1 μM 的濃度也是本毒理實驗中發現的最低影響濃度，過去有研究指出神經毒性的定義，其內容為因生物、化學或物理因素而對中樞和周邊神經系統的結構或功能產生的任何不利影響，即可稱為神經毒性(Mohammad Ahmadi Soleimani *et al.*, 2016)。透過本研究數據顯示斑馬魚周邊側線毛細胞皆因粘桿菌素的暴露而造成結構及功能上的異常，因此認為粘桿菌素造成之神經毒性是不能忽視的問題。

此外側線毛細胞對魚體而言是非常重要的神經器官，正常斑馬魚在面臨水流時會產生迎向水流的現象，而毛細胞損傷會影響斑馬魚感受水流刺激的能力，倒置失去迎向水流的行為(Niihori *et al.*, 2015)，因此推測受到粘桿菌素傷害之斑馬魚也會因毛細胞的受損而影響活動能力，活動力及感知水流刺激能力，降低魚體捕食及逃跑的能力，進一步影響生存。

粘桿菌素的危害不僅單純魚體上的毒性，研究指出畜牧業、養殖業所排放之粘桿菌素進入到水域中容易被水中魚類攝入，即便濃度較低也無法確保藥物進入魚體內之毒性，藥物進入水中環境後也可能使水體汙染環境中的野菜蔬果，最終

導致人類攝取魚類或蔬果時獲得該藥物的抗藥基因(Rhouma *et al.*, 2016b)，這也表明粘桿菌素的毒性不僅傷害魚體，下游引發之抗藥基因的危害更是廣泛，對整個生態系造成莫大威脅。

高鈣離子保護相關機制

一般硬水環境含 120~180 mg/L 的鈣離子濃度，而本實驗所使用的高鈣水溶液是將人工淡水的鈣離子含量增加 10 倍，然而鈣離子濃度超過該區間，而本實驗重點為高鈣離子是否能保護受粘桿菌素傷害的斑馬魚，所以高鈣濃度並非環境中硬水濃度。目前有研究中使用 520 mg/L 的高鈣水浸泡虹鱒及鮭魚的胚胎，發現在過高的鈣離子處理下會使死亡率提高，而在 34~64 mg/L 的鈣離子濃度水溶液處理下就可以使死亡率顯著降低(Lashomb, 1988)，本實驗中所使用的高鈣組的人工淡水鈣離子濃度為 344 mg/L（2mM $CaSO_4$），並沒有發現死亡率提高的現象（圖 11）。加入高濃度的鈣離子進入水中與粘桿菌素處理下可以看見高濃度鈣離子對於斑馬魚受到粘桿菌素傷害是具有保護效果的，在死亡率方面將鈣離子濃度提升 10 倍（2mM $CaSO_4$）並搭配 10μM 粘桿菌素處理時能達到不死的狀態（圖 9），而降低鈣離子濃度後斑馬魚的死亡率也明顯上升（圖 11），以上實驗結果推測與其他研究提出的粘桿菌素進入到細菌體內的機制中有一樣機制類似，粘桿菌素進入到體內或許是與二價陽離子競爭置換進而影響細胞膜電位的不穩定(Dixon & Chopra, 1986)，但目前沒有更加直接的證據能夠證明出鈣離子與粘桿菌素進入到魚體內的機制相關性。

然而斑馬魚的表皮角質細胞與細菌細胞膜結構並不相同，但根據本研究中發現表皮角質細胞的損傷與細菌細胞膜損傷情況相似，暴露粘桿菌素改變細胞膜的通透性導致細胞溶解死亡。過去其他細菌相關研究顯示提高二價陽離子濃度可以與粘桿菌素競爭其結合位(Gupta *et al.*, 2009)，在本研究證實斑馬魚體受到粘桿菌素暴露而損傷的毛細胞（圖 12）、離子細胞（圖 13）及角質細胞（圖 14）皆能透

過提高濃度鈣離子處理達到細胞保護效果，因此推測提高鈣離子濃度進而保護斑馬魚不被粘桿菌素傷害，主要原因為高濃度鈣離子已與粘桿菌素競爭進入細胞之結合位，導致實際進入魚體之粘桿菌素含量與實際濃度有落差，將來可使用液相層析質譜儀（Liquid Chromatography Mass Spectrometry, LC-Mass）的方式測量魚體內實際粘桿菌素濃度，若比實際投藥之濃度顯著下降則可以進一步確認粘桿菌素進入細胞之相關機制。

過去有研究指出斑馬魚角質細胞中的指紋構造又稱微脊（microridges），是由F-actin 作為紋路的組成結構，微脊的存在可增加斑馬魚表面粘液的附著表面積，降低黏液流失的速度，並且保護下層細胞避免磨損(Depasquale, 2018)。而當表皮受損時，靠近傷口處角質細胞會變形且拉長，而越靠近受損區的微脊則越少甚至消失(Richardson *et al.*, 2016)，在傷口癒合的初步階段會發現微脊有破碎的情形，而在傷口癒合時微脊重新出現，推測微脊的存在協助表皮細胞遷移至傷口區域進行傷口癒合(Verma *et al.*, 2017)。眾多實驗數據指出微脊的存在與細胞的修復有關，本實驗中觀測到斑馬魚暴露 3 μM 粘桿菌素時可見角質細胞微脊消失，而緊密的排列的現象及角質細胞的六邊形形狀都可觀察到與控制組有極大的不同，3 μM 粘桿菌素暴露的斑馬魚角質細胞有微脊受損的特徵（圖 5），而當加入高鈣水後可以發現微脊並沒有消失的情形（圖 14），以此推測高鈣離子與微脊參與了細胞修復功能。

在(Moe *et al.*, 2015)的研究中提到細胞膜受損後的癒合方式有收縮（actomysoin-based contracion）、胞吐（Exocytosis）、補丁（patching）、內化（Internalization）、外化（Externalization）及堵塞（Plugging）等六種機制，其中必須仰賴細胞外高濃度鈣離子觸發細胞修復的機制，而在收縮的過程則是仰賴肌動蛋白及球蛋白收縮（F-actin 及 Myosin-2），最後達到細胞修復的效果。推測本實驗中受損的魚角質細胞中失去的微脊構造是作為細胞修復的一個反應，而消失的 F-actin 有可能是協助角質細胞拉長變形以修復損傷區域，因此角質細胞結構並

非整齊且緊密排列的六邊形（圖 5）。而表皮細胞因體外有高濃度鈣離子，使魚體細胞可以如上述實驗一樣達到修復的效果，而在有高濃度鈣離子處理的組別當中也能發現微脊重新出現（圖 14）。

高鈣及高鎂水皆能在魚體死亡率上達到保護的效果（圖 9），而高鎂水卻無法保護毛細胞的數量（圖 10），推測因鈣及鎂離子皆能參與細胞融合相關機制，而細胞修復的過程中必須透過細胞融合機制達到修復的效果，因此斑馬魚死亡率皆能受到保護。然而毛細胞方面過去有研究透過高濃度鎂及高濃度鈣離子可以保護受到胺基醣甘類藥物所引起的毛細胞死亡現象(Coffin *et al.*, 2009)，正常斑馬魚的毛細胞受到機械性刺激後會流入鈣離子，然而當斑馬魚暴露 neomycin 及 gentamycin 時，毛細胞鈣離子流入的量會大幅下降，透過加入高濃度鈣離子時，兩種藥物處理下的毛細胞鈣離子流有顯著回升，但加入高濃度鎂離子下則在 neomycin 藥物處裡的斑馬魚毛細胞無法達到保護的效果，因此研究推測高濃度鎂離子僅能替代部分鈣離子的功能(Lin *et al.*, 2013)，而在本實驗中發現高濃度鎂離子與鈣離子皆能在死亡率上達到保護的效果，然而在高鎂水處理下的毛細胞卻沒受到保護，推測鎂在本實驗的毛細胞上無法與鈣離子達到一樣的趨勢。

24 小時實驗濃度及實驗限制

雖然在 24 小時處理粘桿菌素的實驗下最高濃度使用到 10 μM，但由於取樣問題，過高的粘桿菌素處理下沒辦法維持魚體完整，且死亡率超過 80%不好取樣，在做電子顯微鏡及 ICP-MS 偵測魚體內離子含量的實驗操作下不好進行前處理，例如使用二次水洗淨魚體藥物的步驟就很容易將魚體破壞，所以該實驗中採用的濃度為 5 μM 粘桿菌素處理。

在 24 小時處理的實驗中，可以發現在濃度 5 μM 粘桿菌素搭配低鈣（0.02 mM）的水馴養，死亡率較為不穩定，而高鈣水（2 mM）馴養下則每次都能有相當明顯的保護效果，推測在低鈣下本來就較不適合小魚生長，有研究證實淡水魚

若生長環境變成低鈣離子的水域，那魚體的鈣離子平衡也會面臨挑戰 (Kwong *et al.*, 2014)，這項研究也與本研究中發現的低鈣水域（0.02mM）處理下的斑馬魚死亡率並不穩定相呼應，推測原先較不容易生存的水域中再加入粘桿菌素會導致死亡率更加不穩定，但因僅有低鈣水處裡的組別並沒有顯著死亡，這能說明在本研究中低鈣水與粘桿菌素處理下的斑馬魚死亡原因是來自粘桿菌素的毒性。

MET 通道與粘桿菌素毒性的關係

原先推測粘桿菌素進入毛細胞的方式是經由 MET 通道進入，設計實驗原理是以 MET 通道的阻斷劑阻斷後能使粘桿菌素無法進入毛細胞，進而達到保護效果。MET 通道的阻斷劑有 Gd^{3+}及 La^{3+}(Lin *et al.*, 2013)，而在本實驗中使用 MET 通道的阻斷劑 La^{3+}金屬與粘桿菌素處理，24 小時候以 FM1-43 標定毛細胞，在毛細胞的數量上並沒辦法用 La^{3+}金屬達到保護的效果，死亡率也沒有達到保護的效果，但這個實驗的數據並沒有在結果中列出來。這項實驗的觀察結果可以間接證明粘桿菌素在斑馬魚的側線毛細胞方面並不是經由 MET 通道進入毛細胞，進而導致毛細胞死亡，但粘桿菌素實際進入毛細胞使毛細胞損傷及死亡的機制仍不清楚，在未來可以進一步使用螢光染劑與粘桿菌素結合後處理斑馬魚，推測該方法能與 neomycin-Texas Red 一樣觀測到傷害毛細胞的過程(Kitcher *et al.*, 2019)。

離子細胞分析

本實驗中使用掃描式電子顯微鏡可以觀測到斑馬魚角質細胞有損傷（圖 5），急性暴露粘桿菌素後連續觀察 2 小時下可以發現卵黃囊破損（圖 7），運用 ICP-MS 短時間暴露下可以偵測到離子的流失（圖 8），推測因表皮角質細胞破損而導致離子流失而死亡。由於主要導致斑馬魚體內離子流失的原因不僅是角質細胞排列鬆散或受損引起，離子細胞的數量及功能降低也可能引發斑馬魚體內離子含量的不穩定，本研究中可以發現離子細胞數量上在暴露粘桿菌素後有顯著下降（圖

4)，對斑馬魚而言，離子細胞是主要用以吸收水中離子，排出酸及氨的離子調節細胞(Horng *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011; Horng *et al.*, 2015; Hung *et al.*, 2021)，未來可以運用細胞免疫螢光染色方式標定斑馬魚主要排酸的 HR 細胞及鈣離子交換的 NaR 細胞數量，準確標定斑馬魚離子細胞數目降低的主要細胞。

氧化壓力與細胞凋亡路徑分析

minocycline 為神經實驗中常用的保護神經藥劑，過去研究指出在經由 minocycline 預處理之神經細胞可以降低粘桿菌素傷害，在該研究中預處理過 minocycline 的細胞內粘桿菌素造成的細胞凋亡（apoptosis）相關路徑之細胞標誌 caspase 3 及 caspase 9 活性確實降低，抗氧化相關之 SOD 及 catalase 蛋白活性也有顯著上升，實驗中證實粘桿菌素對神經細胞的損傷途徑是經由增加粒線體之氧化壓力進而導致細胞凋亡，minocycline 保護神經細胞的機制則是經由抗氧化之途徑抑制細胞凋亡的產生。(Dai *et al.*, 2017)

然而 minocycline 為鈣離子螯合劑，實驗中推測該藥物先螯合細菌細胞膜鈣離子後再以粘桿菌素殺菌，能降低粘桿菌素殺菌時的使用量，並透過抑制粒線體的氧化壓力等途徑保護神經細胞以達到協同作用之效果。(Dai *et al.*, 2017)

在氧化壓力方面，若粘桿菌素處理下離子細胞及毛細胞有氧化壓力上升並能準確標記毛細胞的氧化壓力程度，也能進一步觀察毛細胞及離子細胞的死亡與粒線體氧化壓力是否有關，推測離子細胞、角質細胞及毛細胞的損傷是因氧化壓力上升進而導致細胞凋亡，未來能使用 caspase 3 抗體進行免疫螢光染色或是使用 qPCR 做相關基因檢測，可使用 CAT 與 SOD 等抗氧化相關基因測量魚體的抗氧化基因含量，在測試 caspase 3 及 caspase 9 全體細胞及粒線體凋亡等基因含量，進而證明受到粘桿菌素傷害的斑馬魚是經由氧化壓力導致細胞凋亡的路徑以致死亡。過去研究指出使用溴化阻燃劑 2,2'，4,4'-四溴二苯醚（brominated flame retardant, 2,2’,4,4’-tetrabromodiphenyl ether）處理虹鱒後，發現其虹鱒的性腺內質

網受到氧化壓力傷害，使內質網中的鈣離子釋放，而被釋放出的鈣離子被粒線體吸收後使粒線體有膨脹的現象(Zhou *et al.*, 2019)，導致粒線體氧化壓力上升，然而本實驗中高鈣水組別中富含粒線體之離子細胞數量並沒有下降趨勢，推測在氧化壓力的實驗下，本實驗高鈣組也會有氧化壓力較高的現象，但不導致粒線體死亡。

目前有研究指出當小鼠的神經母細胞瘤 2a（neuroblastoma2a, N2a）細胞中受到粘桿菌素的傷害，氧化壓力有顯著上升，然而加入乙醯半胱胺酸（N-acetyl-L-cysteine, NAC）抗氧化劑共處理後，氧化壓力有明顯下降的趨勢(Dai *et al.*, 2016)。若實驗中可以證明出斑馬魚受到粘桿菌素離子細胞及毛細胞損傷的方式是透過氧化壓力導致細胞凋亡的路徑，之後的實驗可以設計為使用乙醯半胱胺酸（N-acetyl-L-cysteine, NAC）抗氧化劑與粘桿菌素共處理後，檢測是否能保護斑馬魚的離子細胞及毛細胞不受粘桿菌素的傷害。

目前有研究指出可以使用 Anti-polymyxin B mouse IgM antibody（Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA）進行小鼠皮下注射粘桿菌素後的腎組織抗體染色，進而觀察粘桿菌素造成的腎毒性(Yun *et al.*, 2015)及用粘桿菌素誘發小鼠的神經母細胞瘤 2a（neuroblastoma2a, N2a）細胞觀測粘桿菌素的神經毒性(Dai *et al.*, 2018)，未來可以運用該抗體標記粘桿菌素，觀測其造成魚體損傷的主要位置。

結論

綜合以上所述，在毒理學方面的相關數據以斑馬魚為模式動物下粘桿菌素的致死濃度（LC,Lethal concentration）為 10 μM、半致死濃度（LC50, Lethal concentration 50%）大約落在 3 μM 上下，而在對於粘桿菌素較為敏感的斑馬魚側線毛細胞方面最低影響濃度（LOAEL,Lowest observed adverse effect level）則為 0.1 μM。

在粘桿菌素對於斑馬魚的死亡率方面發現死亡率大幅上升時間為斑馬魚孵化後開始，該數據表明粘桿菌素對斑馬魚胚胎毒性較不明顯。在粘桿菌素對於斑馬魚的發育毒性方面並沒有明顯的發現，不論是在眼睛及卵黃囊的大小或是體長皆與人工淡水馴養的斑馬魚沒有明顯的差異，在斑馬魚的離子細胞可以觀察到數量上的改變，表示粘桿菌素對於斑馬魚的離子細胞也具有毒性，最後最為明顯的毒性則為斑馬魚的側線毛細胞，粘桿菌素濃度到達 0.1 μM 時數量及功能都有顯著下降的狀況，綜合上述整理粘桿菌素對於斑馬魚的毒性有離子細胞毒性及毛細胞毒性。

從低鈣及高鈣水組別中觀測到之粘桿菌素毒性變化，如：斑馬魚的死亡率、毛細胞數量及離子細胞數量等，皆能確定粘桿菌素之毒性與鈣離子的濃度具有相關性，高鈣水組別處理下之損傷部位皆能達到保護的效果。

由於增加鈣離子的含量就能使受到粘桿菌素傷害的斑馬魚死亡率、毛細胞及離子細胞達到保護的效果，但斑馬魚與菌細胞膜的結構並不相同，推測因高濃度鈣離子與細胞膜的癒合有關，所以加入高濃度鈣離子可以對受到菌素處理之斑馬魚達到保護效果。

參考資料

Abd El-Baky, R.M., Masoud, S.M., Mohamed, D.S., Waly, N.G., Shafik, E.A., Mohareb, D.A., Elkady, A., Elbadr, M.M. & Hetta, H.F. (2020) Prevalence and Some Possible Mechanisms of Colistin Resistance Among Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa. *Infect Drug Resist*, **13**, 323-332.

Anjum, M.F., Duggett, N.A., AbuOun, M., Randall, L., Nunez-Garcia, J., Ellis, R.J., Rogers, J., Horton, R., Brena, C., Williamson, S., Martelli, F., Davies, R. & Teale, C. (2016) Colistin resistance in Salmonella and Escherichia coli isolates from a pig farm in Great Britain. *J Antimicrob Chemother*, **71**, 2306-2313.

Balkan, II, Dogan, M., Durdu, B., Batirel, A., Hakyemez, I.N., Cetin, B., Karabay, O., Gonen, I., Ozkan, A.S., Uzun, S., Demirkol, M.E., Akbas, S., Kacmaz, A.B., Aras, S., Mert, A. & Tabak, F. (2014) Colistin nephrotoxicity increases with age. *Scand J Infect Dis*, **46**, 678-685.

Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A. & Giacobbe, D.R. (2019) Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Front Med (Lausanne)*, **6**, 74.

Chang, W.J. & Hwang, P.P. (2011) Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **93**, 205-214.

Chen, C.C. & Feingold, D.S. (1972) Locus of divalent cation inhibition of the bactericidal action of polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother*, **2**, 331-335.

Coffin, A.B., Ou, H., Owens, K.N., Santos, F., Simon, J.A., Rubel, E.W. & Raible, D.W. (2010) Chemical screening for hair cell loss and protection in the zebrafish lateral line. *Zebrafish*, **7**, 3-11.

Coffin, A.B., Reinhart, K.E., Owens, K.N., Raible, D.W. & Rubel, E.W. (2009) Extracellular divalent cations modulate aminoglycoside-induced hair cell death in the zebrafish lateral line. *Hear Res*, **253**, 42-51.

Dai, C., Ciccotosto, G.D., Cappai, R., Tang, S., Li, D., Xie, S., Xiao, X. & Velkov, T. (2018) Curcumin Attenuates Colistin-Induced Neurotoxicity in N2a Cells via Anti-inflammatory Activity, Suppression of Oxidative Stress, and Apoptosis. *Mol*

Neurobiol, **55**, 421-434.

Dai, C., Ciccotosto, G.D., Cappai, R., Wang, Y., Tang, S., Xiao, X. & Velkov, T. (2017) Minocycline attenuates colistin-induced neurotoxicity via suppression of apoptosis, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *J Antimicrob Chemother*, **72**, 1635-1645.

Dai, C., Li, J. & Li, J. (2013) New insight in colistin induced neurotoxicity with the mitochondrial dysfunction in mice central nervous tissues. *Exp Toxicol Pathol*, **65**, 941-948.

Dai, C., Tang, S., Velkov, T. & Xiao, X. (2016) Colistin-Induced Apoptosis of Neuroblastoma-2a Cells Involves the Generation of Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Dysfunction, and Autophagy. *Mol Neurobiol*, **53**, 4685-4700.

Dai, C., Xiao, X., Li, J., Ciccotosto, G.D., Cappai, R., Tang, S., Schneider-Futschik, E.K., Hoyer, D., Velkov, T. & Shen, J. (2019) Molecular Mechanisms of Neurotoxicity Induced by Polymyxins and Chemoprevention. *ACS Chem Neurosci*, **10**, 120-131.

Dash, S., Das, S.K., Samal, J. & Thatoi, H.N. (2018) Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iran J Vet Res*, **19**, 72-81.

de Oliveira, R.C.S., Oliveira, R., Rodrigues, M.A.C., de Farias, N.O., Sousa-Moura, D., Nunes, N.A., Andrade, T.S. & Grisolia, C.K. (2020) Lethal and Sub-lethal Effects of Nitrofurantoin on Zebrafish Early-Life Stages. *Water, Air, & Soil Pollution*, **231**, 54.

Depasquale, J.A. (2018) Actin Microridges. *Anat Rec (Hoboken)*, **301**, 2037-2050.

Deryke, C.A., Crawford, A.J., Uddin, N. & Wallace, M.R. (2010) Colistin dosing and nephrotoxicity in a large community teaching hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 4503-4505.

Dixon, R.A. & Chopra, I. (1986) Leakage of periplasmic proteins from Escherichia coli mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother*, **29**, 781-788.

Duggett, N.A., Randall, L.P., Horton, R.A., Lemma, F., Kirchner, M., Nunez-Garcia, J., Brena, C., Williamson, S.M., Teale, C. & Anjum, M.F. (2018) Molecular epidemiology of

isolates with multiple mcr plasmids from a pig farm in Great Britain: the effects of colistin withdrawal in the short and long term. *J Antimicrob Chemother*, **73**, 3025-3033.

Evans, M.E., Feola, D.J. & Rapp, R.P. (1999) Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother*, **33**, 960-967.

Falagas, M.E., Fragoulis, K.N., Kasiakou, S.K., Sermaidis, G.J. & Michalopoulos, A. (2005) Nephrotoxicity of intravenous colistin: a prospective evaluation. *Int J Antimicrob Agents*, **26**, 504-507.

Falagas, M.E. & Kasiakou, S.K. (2006) Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*, **10**, R27.

Gai, Z., Samodelov, S.L., Kullak-Ublick, G.A. & Visentin, M. (2019) Molecular Mechanisms of Colistin-Induced Nephrotoxicity. *Molecules*, **24**.

Gale, J.E., Marcotti, W., Kennedy, H.J., Kros, C.J. & Richardson, G.P. (2001) FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel. *J Neurosci*, **21**, 7013-7025.

Gordon, W.E., Espinoza, J.A., Leerberg, D.M., Yelon, D. & Hamdoun, A. (2019) Xenobiotic transporter activity in zebrafish embryo ionocytes. *Aquat Toxicol*, **212**, 88-97.

Guh, Y.J., Lin, C.H. & Hwang, P.P. (2015) Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation. *EXCLI J*, **14**, 627-659.

Gupta, S., Govil, D., Kakar, P.N., Prakash, O., Arora, D., Das, S., Govil, P. & Malhotra, A. (2009) Colistin and polymyxin B: a re-emergence. *Indian J Crit Care Med*, **13**, 49-53.

Hamel, M., Rolain, J.M. & Baron, S.A. (2021) The History of Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria: Progress and Challenges. *Microorganisms*, **9**.

Heuer, H., Schmitt, H. & Smalla, K. (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol*, **14**, 236-243.

Horng, J.L., Chao, P.L., Chen, P.Y., Shih, T.H. & Lin, L.Y. (2015) Aquaporin 1 Is Involved in Acid Secretion by Ionocytes of Zebrafish Embryos through Facilitating CO2 Transport. *PLoS One*, **10**, e0136440.

Horng, J.L., Hwang, P.P., Shih, T.H., Wen, Z.H., Lin, C.S. & Lin, L.Y. (2009) Chloride transport in mitochondrion-rich cells of euryhaline tilapia (Oreochromis mossambicus) larvae. *Am J Physiol Cell Physiol*, **297**, C845-854.

Horton, J. & Pankey, G.A. (1982) Polymyxin B, colistin, and sodium colistimethate. *Med Clin North Am*, **66**, 135-142.

Hung, G.Y., Chen, P.Y., Horng, J.L. & Lin, L.Y. (2021) Vincristine exposure impairs skin keratinocytes, ionocytes, and lateral-line hair cells in developing zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*, **230**, 105703.

Hwang, P.P. & Chou, M.Y. (2013) Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Arch*, **465**, 1233-1247.

Hwang, P.P., Lee, T.H. & Lin, L.Y. (2011) Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **301**, R28-47.

Janssen, A.B. & van Schaik, W. (2021) Harder, better, faster, stronger: Colistin resistance mechanisms in Escherichia coli. *PLoS Genet*, **17**, e1009262.

Jia, H.R., Zhu, Y.X., Xu, K.F., Pan, G.Y., Liu, X., Qiao, Y. & Wu, F.G. (2019) Efficient cell surface labelling of live zebrafish embryos: wash-free fluorescence imaging for cellular dynamics tracking and nanotoxicity evaluation. *Chem Sci*, **10**, 4062-4068.

Kelly, C. & Salinas, I. (2017) Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System. *Front Immunol*, **8**, 559.

Kempf, I., Jouy, E. & Chauvin, C. (2016) Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents*, **48**, 598-606.

Kersten, S. & Arjona, F.J. (2017) Ion transport in the zebrafish kidney from a human disease angle: possibilities, considerations, and future perspectives. *Am J Physiol Renal Physiol*, **312**, F172-F189.

Kitcher, S.R., Kirkwood, N.K., Camci, E.D., Wu, P., Gibson, R.M., Redila, V.A., Simon, J.A., Rubel, E.W., Raible, D.W., Richardson, G.P. & Kros, C.J. (2019) ORC-13661 protects sensory hair cells from aminoglycoside and cisplatin ototoxicity. *JCI Insight*, **4**.

Kwa, A., Kasiakou, S.K., Tam, V.H. & Falagas, M.E. (2007) Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert Rev Anti Infect Ther*, **5**, 811-821.

Kwong, R.W., Auprix, D. & Perry, S.F. (2014) Involvement of the calcium-sensing receptor in calcium homeostasis in larval zebrafish exposed to low environmental calcium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **306**, R211-221.

Lashomb, H.G.K.D.L.A.G.L.P.R. (1988) High Calcium Concentration in Water Increases Mortality of Salmon and Trout Eggs. *The Progressive Fish-Culturist*, **50**, 129-135.

Lee, C.Y., Horng, J.L., Chen, P.Y. & Lin, L.Y. (2019) Silver nanoparticle exposure impairs ion regulation in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*, **214**, 105263.

Lee, C.Y., Horng, J.L., Liu, S.T. & Lin, L.Y. (2020) Exposure to copper nanoparticles impairs ion uptake, and acid and ammonia excretion by ionocytes in zebrafish embryos. *Chemosphere*, **261**, 128051.

Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D. & Coulthard, K. (2005) Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, **25**, 11-25.

Lin, L.Y., Horng, J.L., Kunkel, J.G. & Hwang, P.P. (2006) Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, C371-378.

Lin, L.Y., Pang, W., Chuang, W.M., Hung, G.Y., Lin, Y.H. & Horng, J.L. (2013) Extracellular Ca(2+) and Mg(2+) modulate aminoglycoside blockade of mechanotransducer channel-mediated Ca(2+) entry in zebrafish hair cells: an in vivo study with the SIET. *Am J Physiol Cell Physiol*, **305**, C1060-1068.

Lin, L.Y., Yeh, Y.H., Hung, G.Y., Lin, C.H., Hwang, P.P. & Horng, J.L. (2018) Role of Calcium-Sensing Receptor in Mechanotransducer-Channel-Mediated Ca(2+) Influx in Hair Cells of Zebrafish Larvae. *Front Physiol*, **9**, 649.

Liu, Z., Liu, Y., Gu, Y., Gao, L., Li, A., Liu, D., Kang, C., Pang, Q., Wang, X., Han, Q. & Yu, H. (2019) Met-enkephalin inhibits ROS production through Wnt/beta-catenin signaling in the ZF4 cells of zebrafish. *Fish Shellfish Immunol*, **88**, 432-440.

McLeish, J.A., Chico, T.J., Taylor, H.B., Tucker, C., Donaldson, K. & Brown, S.B. (2010) Skin exposure to micro- and nano-particles can cause haemostasis in zebrafish larvae. *Thromb Haemost*, **103**, 797-807.

Moe, A.M., Golding, A.E. & Bement, W.M. (2015) Cell healing: Calcium, repair and regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, **45**, 18-23.

Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J.D., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St Michael, F., Cox, A.D., Adler, B., Nation, R.L., Li, J. & Boyce, J.D. (2010) Colistin resistance in Acinetobacter baumannii is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 4971-4977.

Mohammad Ahmadi Soleimani, S., Ekhtiari, H. & Cadet, J.L. (2016) Drug-induced neurotoxicity in addiction medicine: From prevention to harm reduction. *Prog Brain Res*, **223**, 19-41.

Nang, S.C., Li, J. & Velkov, T. (2019) The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit Rev Microbiol*, **45**, 131-161.

Newton, B.A. (1953) Reversal of the antibacterial activity of polymyxin by divalent cations. *Nature*, **172**, 160-161.

Nicolson, T. (2017) The genetics of hair-cell function in zebrafish. *J Neurogenet*, **31**, 102-112.

Nigam, A., Kumari, A., Jain, R. & Batra, S. (2015) Colistin neurotoxicity: revisited. *BMJ Case Rep*, **2015**.

Niihori, M., Platto, T., Igarashi, S., Hurbon, A., Dunn, A.M., Tran, P., Tran, H., Mudery, J.A., Slepian, M.J. & Jacob, A. (2015) Zebrafish swimming behavior as a biomarker for ototoxicity-induced hair cell damage: a high-throughput drug development platform targeting hearing loss. *Transl Res*, **166**, 440-450.

Peterson, A.A., Hancock, R.E. & McGroarty, E.J. (1985) Binding of polycationic antibiotics

and polyamines to lipopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*, **164**, 1256-1261.

Pogue, J.M., Lee, J., Marchaim, D., Yee, V., Zhao, J.J., Chopra, T., Lephart, P. & Kaye, K.S. (2011) Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis*, **53**, 879-884.

Rhouma, M., Beaudry, F. & Letellier, A. (2016a) Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents*, **48**, 119-126.

Rhouma, M., Beaudry, F., Theriault, W. & Letellier, A. (2016b) Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol*, **7**, 1789.

Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Beaudry, F. & Letellier, A. (2017) Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand*, **59**, 31.

Richardson, R., Metzger, M., Knyphausen, P., Ramezani, T., Slanchev, K., Kraus, C., Schmelzer, E. & Hammerschmidt, M. (2016) Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals. *Development*, **143**, 2077-2088.

Sabnis, A., Hagart, K.L., Klockner, A., Becce, M., Evans, L.E., Furniss, R.C.D., Mavridou, D.A., Murphy, R., Stevens, M.M., Davies, J.C., Larrouy-Maumus, G.J., Clarke, T.B. & Edwards, A.M. (2021) Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *Elife*, **10**.

Santos, F., MacDonald, G., Rubel, E.W. & Raible, D.W. (2006) Lateral line hair cell maturation is a determinant of aminoglycoside susceptibility in zebrafish (Danio rerio). *Hear Res*, **213**, 25-33.

Seiler, C. & Nicolson, T. (1999) Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J Neurobiol*, **41**, 424-434.

Spapen, H., Jacobs, R., Van Gorp, V., Troubleyn, J. & Honore, P.M. (2011) Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann Intensive Care*, **1**, 14.

Sun, J., Xu, Y., Gao, R., Lin, J., Wei, W., Srinivas, S., Li, D., Yang, R.S., Li, X.P., Liao, X.P., Liu, Y.H. & Feng, Y. (2017) Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *mBio*, **8**.

Verma, N., Kumari, U., Mittal, S. & Mittal, A.K. (2017) Scanning electron microscope investigation on the process of healing of skin wounds in Cirrhinus mrigala. *Microsc Res Tech*, **80**, 1205-1214.

Yun, B., Azad, M.A., Wang, J., Nation, R.L., Thompson, P.E., Roberts, K.D., Velkov, T. & Li, J. (2015) Imaging the distribution of polymyxins in the kidney. *J Antimicrob Chemother*, **70**, 827-829.

Zhou, Z., Zhou, B., Chen, H., Tang, X. & Wang, Y. (2019) Reactive oxygen species (ROS) and the calcium-(Ca(2+)) mediated extrinsic and intrinsic pathways underlying BDE-47-induced apoptosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) gonadal cells. *Sci Total Environ*, **656**, 778-788.

附圖

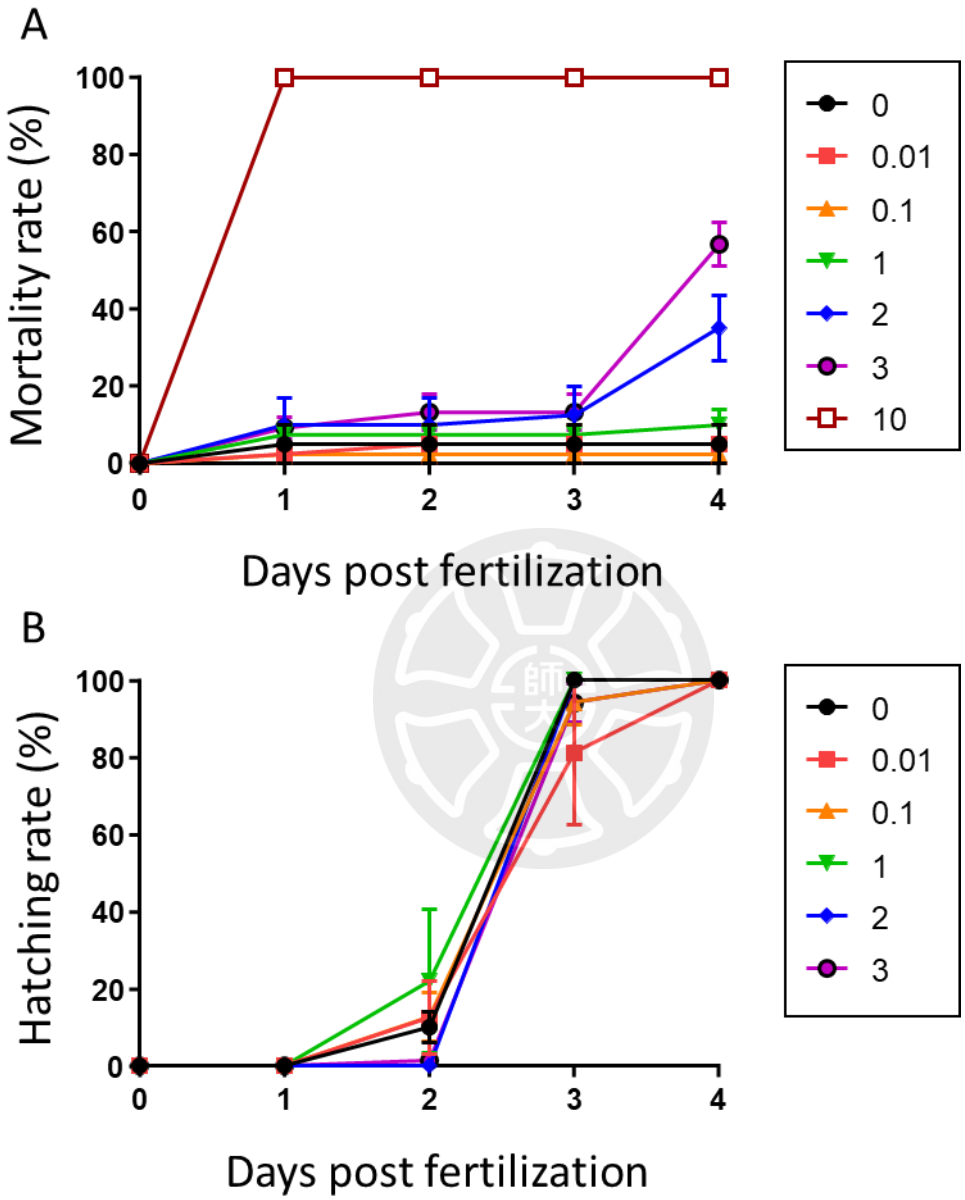


圖 1：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3、10 μM）暴露 96 小時下的連續死亡率及孵化率。

以受精後 4 小時之斑馬魚胚胎暴露不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3、10 μM）96 小時計算胚胎每日累計死亡率（圖 1A）；每日在同一時間記錄累計孵化率（圖 1B）。

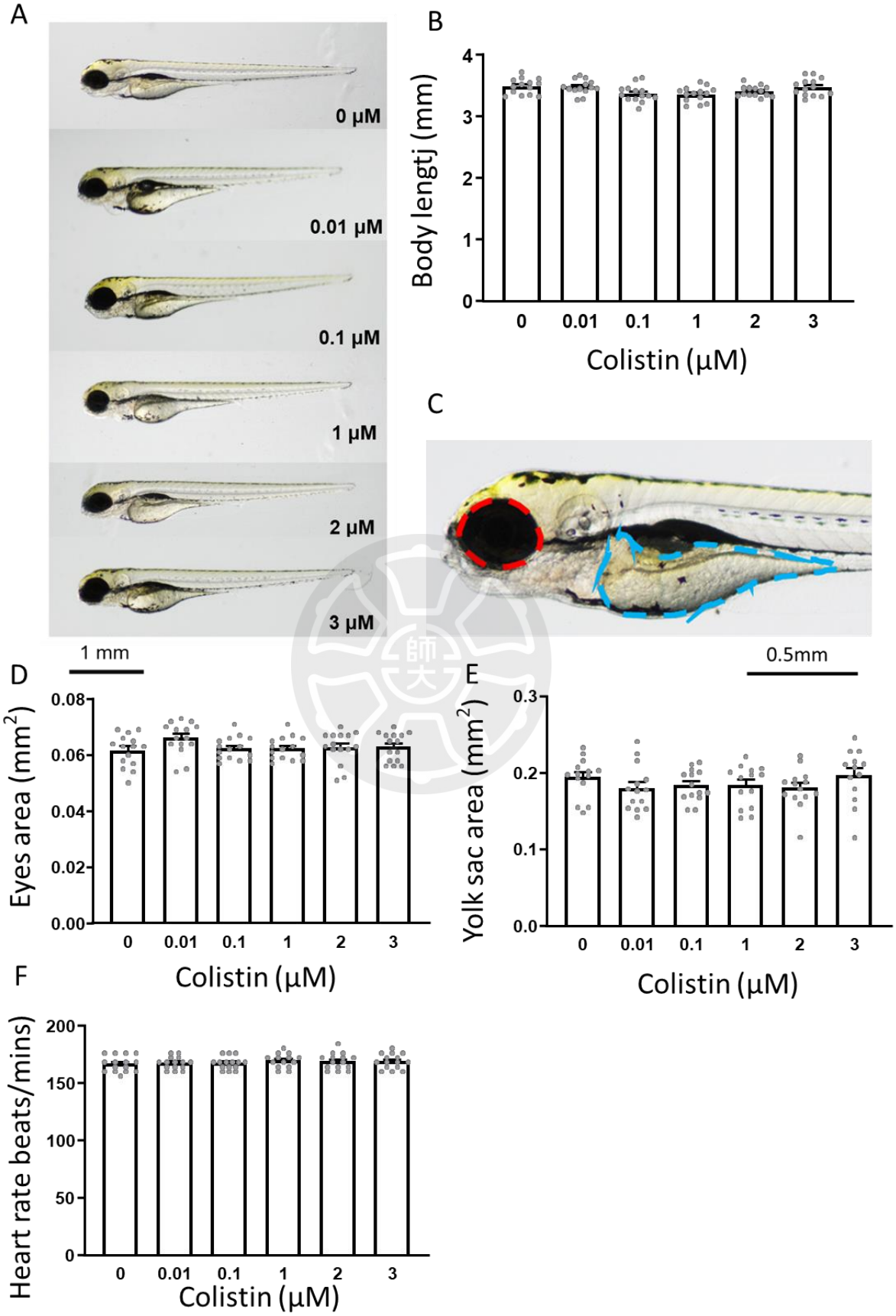
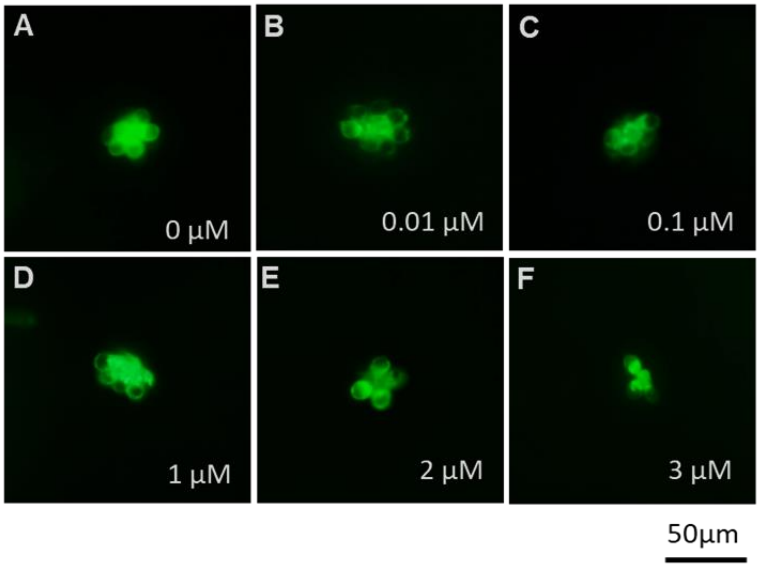
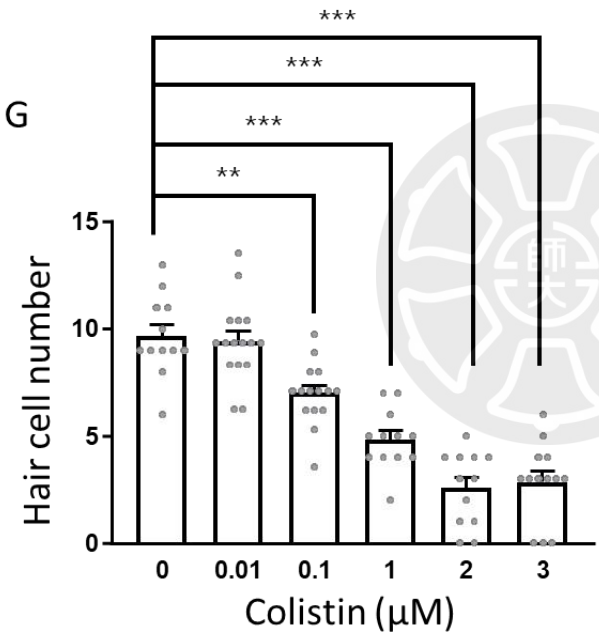

A
0 μM
0.01 μM
0.1 μM
1 μM
2 μM
3 μM
B
Body lengtj (mm)
0
1
2
3
4
0
0.01
0.1
1
2
3
Colistin (μM)
C
1 mm
0.5mm
D
Eyes area (mm2)
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0
0.01
0.1
1
2
3
Colistin (μM)
E
Yolk sac area (mm2)
0.0
0.1
0.2
0.3
0
0.01
0.1
1
2
3
Colistin (μM)
F
Heart rate beats/mins)
0
50
100
150
200
0
0.01
0.1
1
2
3
Colistin (μM)

圖 2：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下的魚體型態與體長、眼睛大小、卵黃囊面積及心跳變化。

以不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）浸泡魚體 96 小時候的魚體型態（圖 2 A），並將魚體體長量化（圖 2 B）。將魚體進行拍攝後圈取眼睛（紅虛線）及卵黃囊（藍虛線）以計算面積知識意圖（圖 2 C）；將圖 2 B1 中之紅虛線所圈選的眼睛量化之統計圖（圖 2 D）；將圖 2 B1 中之藍色虛線所圈選之卵黃囊面積量化統計圖（圖 2 E）。計算一分鐘心跳次數之統計量化圖（圖 2F），圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值， 並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 *p<0.05 ；**p<0.01 ; ***p < 0.001。


A
0 μM
B
0.01 μM
C
0.1 μM
D
1 μM
E
2 μM
F
3 μM
50μm


G
***
***
***
**
Hair cell number
15
10
5
0
0
0.01
0.1
1
2
3
Colistin (μM)

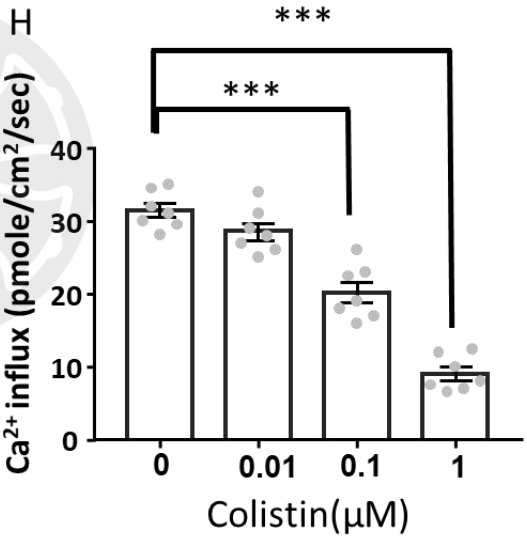
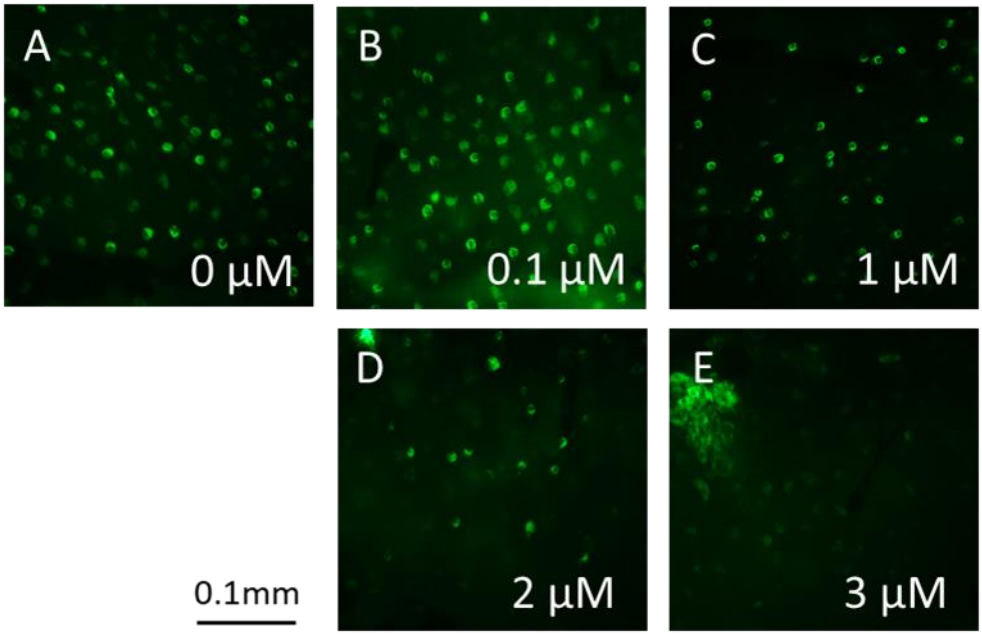

H
***
***
Ca2+ influx (pmole/cm2/sec)
40
30
20
10
0
0
0.01
0.1
1
Colistin(μM)

圖 3：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下以 FM1- 43 標定斑馬魚毛細胞數量並以 SIET 方式檢測毛細胞鈣離子流。

以不同濃度的 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下以 FM1- 43 標定斑馬魚毛細胞數量（圖 3A~F）；將螢光標定之毛細胞數量量化圖（圖 3G）；將毛細胞鈣離子流量化後之統計圖（圖 3H）。圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值， 並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 **p<0.01 ; ***p < 0.001。


A
0 μM
B
0.1 μM
C
1 μM
D
2 μM
E
3 μM
0.1mm

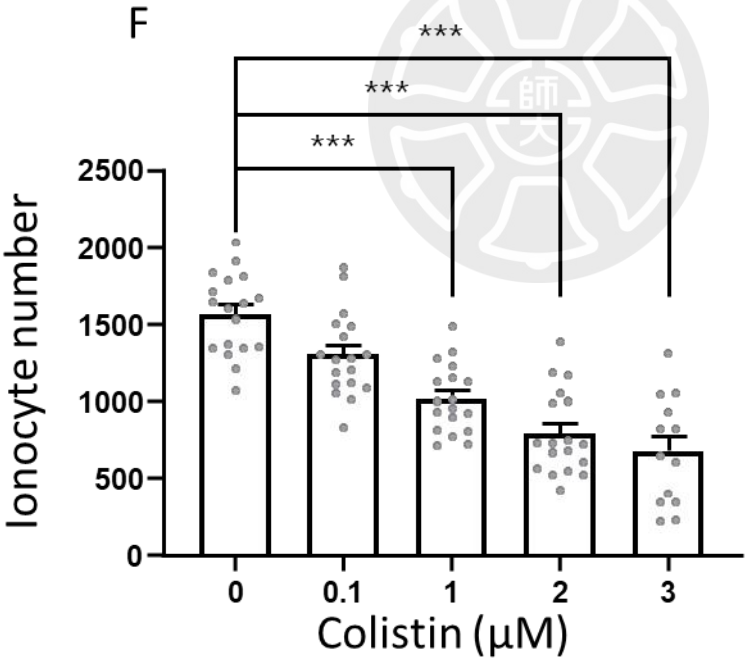
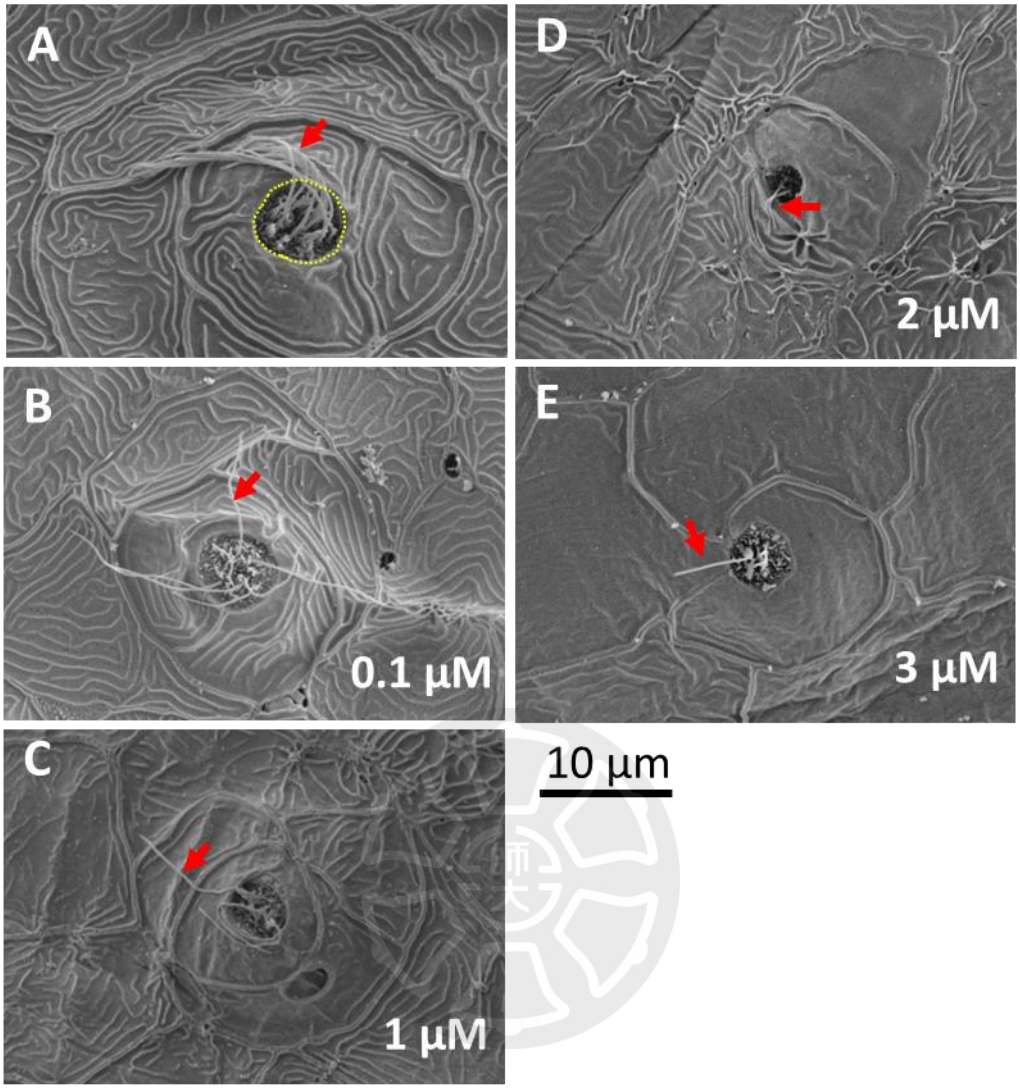
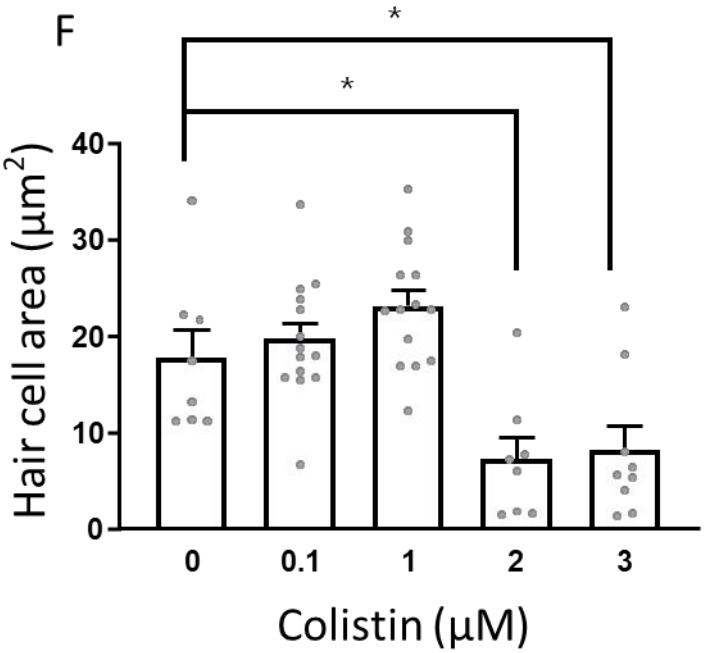

F
***
***
***
Ionocyte number
2500
2000
1500
1000
500
0
0
0.1
1
2
3
Colistin (μM)

圖 4：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下 Rhodamine 123 標定斑馬魚卵黃囊上離子細胞數量

以不同濃度之 colistin 暴露 96 小時下以 Rhodamine 123 進行粒線體膜電位之活體螢光染色（圖 4A~E），將螢光標定之細胞數量進行量化分析圖（圖 4F）。圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值，並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 ***p <0.001。


A
D
2 µM
B
0.1 µM
E
3 µM
C
1 µM
10 µm


F
*
*
Hair cell area (µm²)
40
30
20
10
0
0
0.1
1
2
3
Colistin (µM)

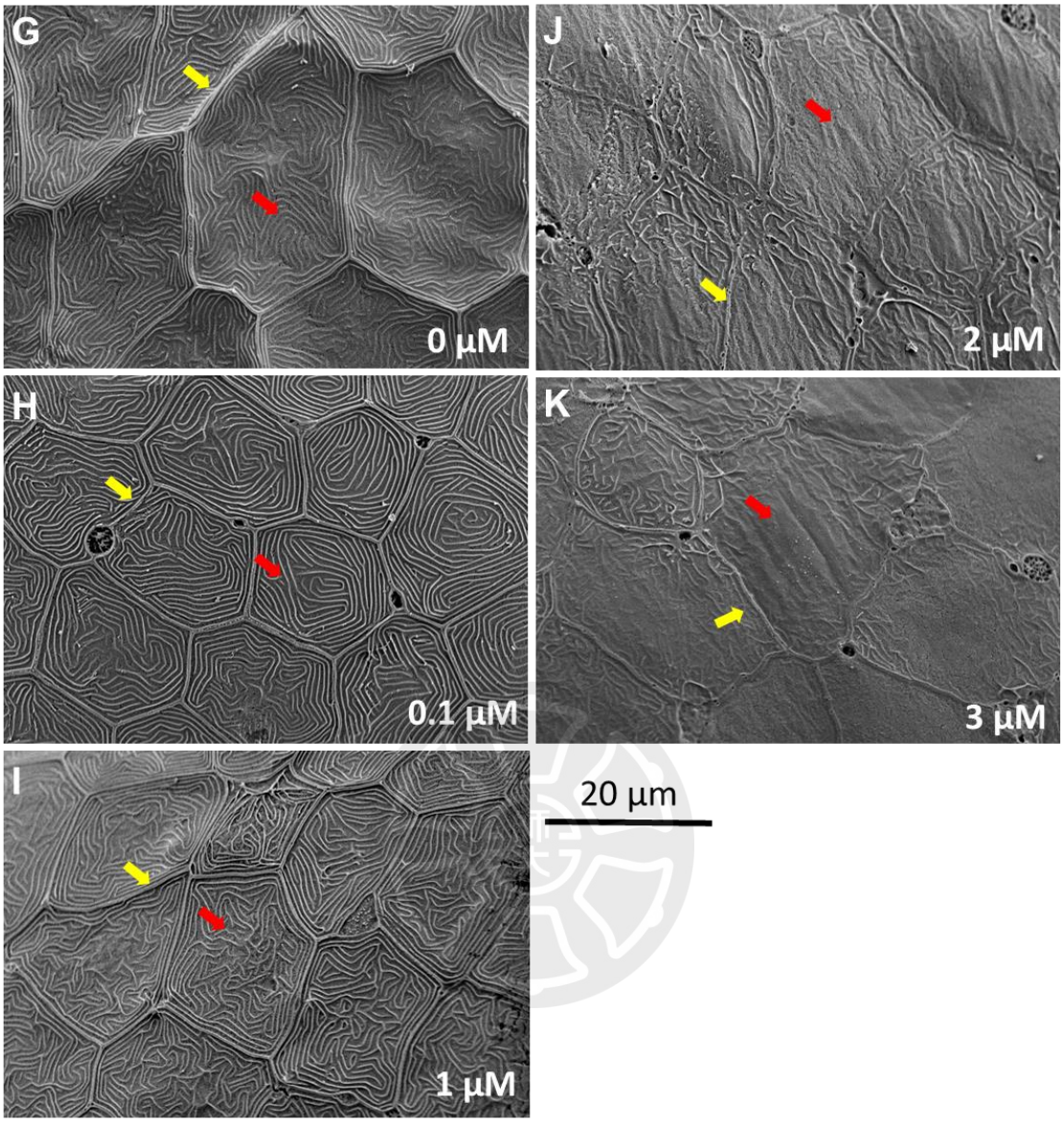

G
0 µM
J
2 µM
H
0.1 µM
K
3 µM
I
1 µM
20 µm

圖 5：在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下以掃描式電子顯微鏡拍攝魚體毛細胞及角質細胞型態。

在不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）暴露 96 小時下以掃描式電子顯微鏡拍攝魚體毛細胞的型態；紅色箭頭為毛細胞毛量指示（圖 5A~E）；選取圖 5A 之毛細胞開口（黃色虛線位置）計算面積之量化圖（圖 5F）；以掃描式電子顯微鏡拍攝不同濃度 colistin（0.01、0.1、1、2、3 μM）處理下之斑馬魚角質細胞是示意圖；紅色箭頭為角質細胞中央紋路指示；黃色箭頭為角質細胞兩者間的接合狀況指示（圖 5G~K）。圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值，並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 *$p<0.05$。

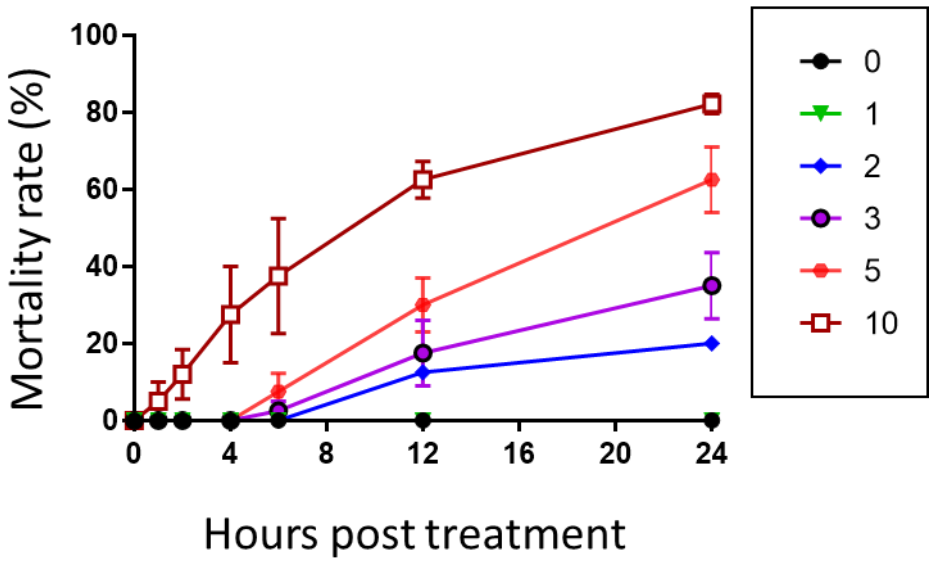


圖 6：在不同濃度 colistin（0、1、2、3、5、10 μM）暴露 24 小時下的連續死亡率及孵化率。

在斑馬魚仔魚受精後第三天進行不同濃度支 colistin 暴露 24 小時之第一、第二、第四、第六、第八、第十二及第二十四小時進行累計死亡率的結果量化圖（圖 6）。

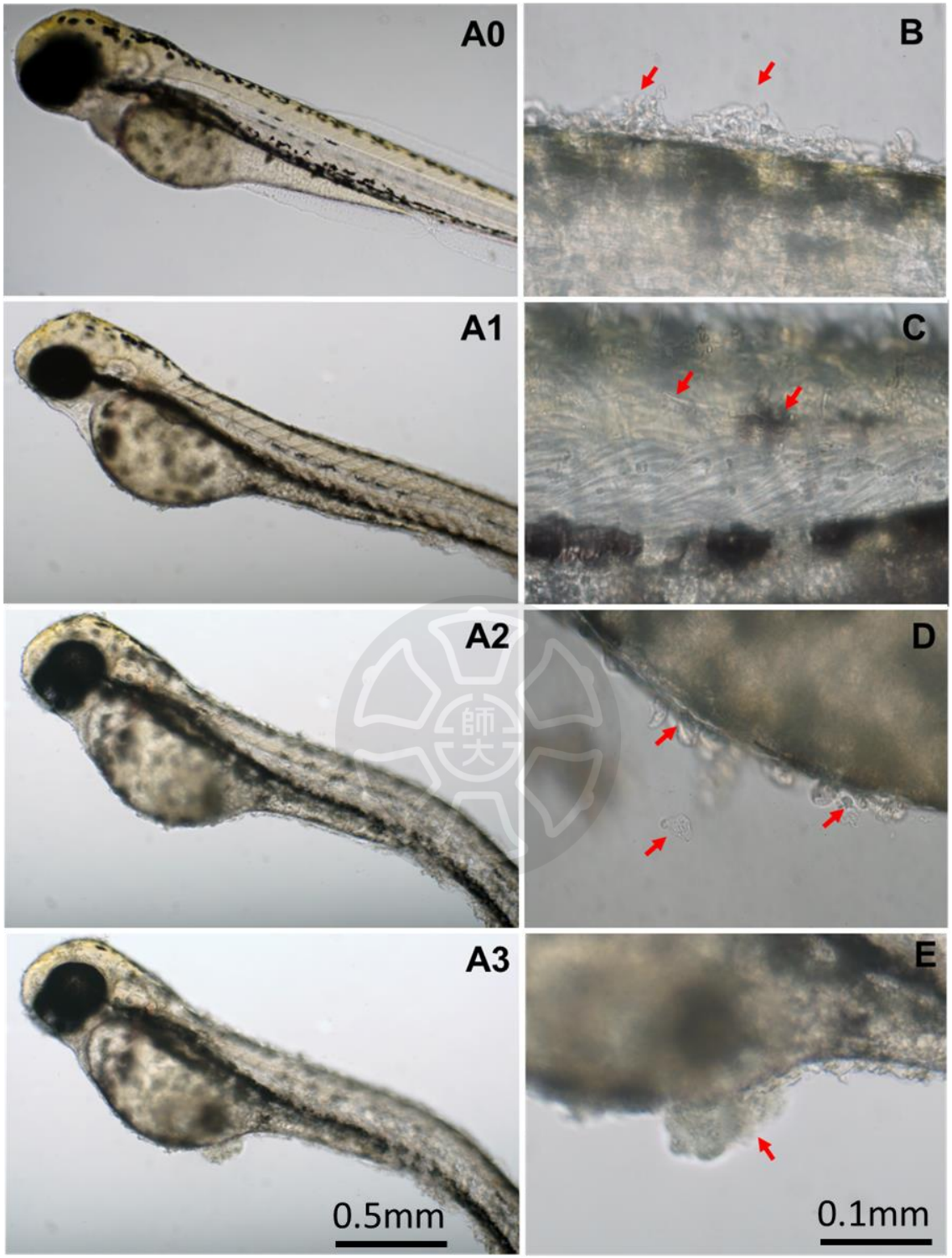


圖 7：在高濃度 colistin（5 μM）暴露 2 小時下的縮時攝影圖。

受精後第四天之斑馬魚仔魚以高濃度 colistin（5 μM）暴露兩小時，期間以每 10 秒拍攝一張照片，連續拍攝 2 小時候之示意圖（圖 7 A0~A3），及暴露 2 小時 5 μM colistin 後破損之魚體表皮狀態（圖 7 B~E）。

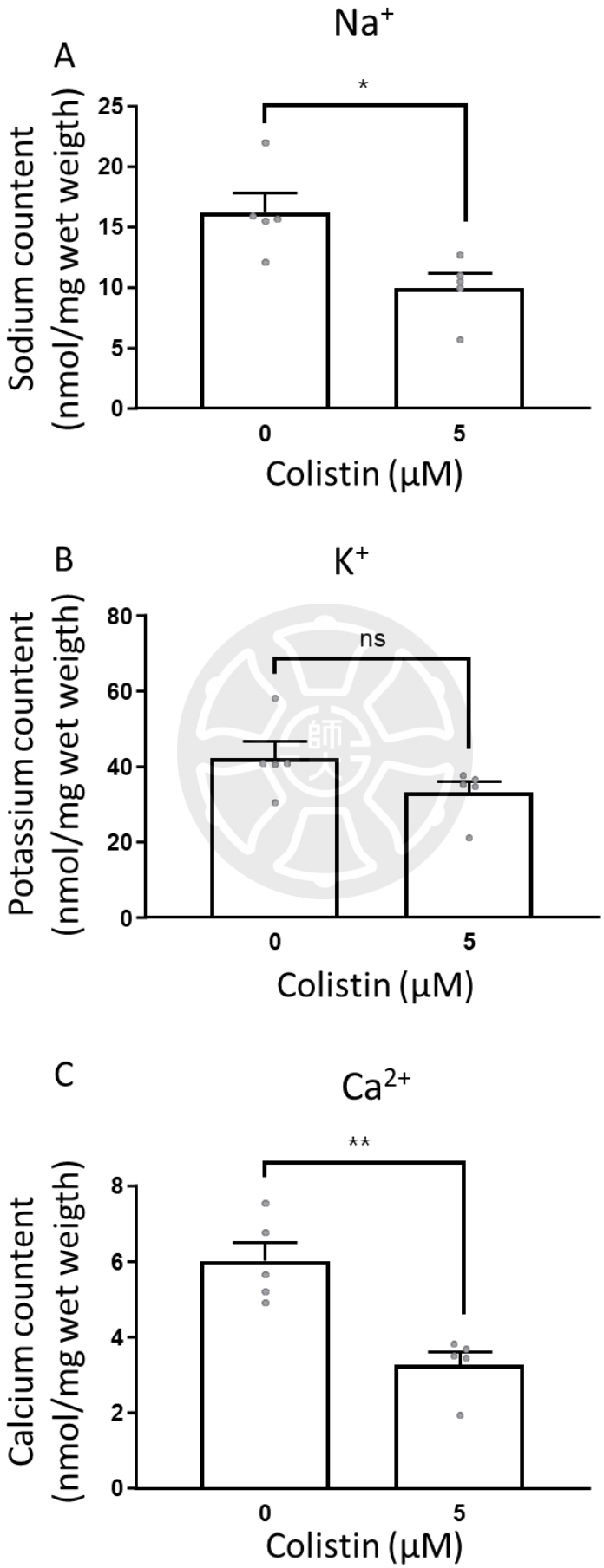

A
Na+
*
Sodium countent
(nmol/mg wet weigth)
25
20
15
10
5
0
0
5
Colistin (μM)
B
K+
ns
Potassium countent
(nmol/mg wet weigth)
80
60
40
20
0
0
5
Colistin (μM)
C
Ca2+
**
Calcium countent
(nmol/mg wet weigth)
8
6
4
2
0
0
5
Colistin (μM)

圖 8：在高濃度 colistin（5 μM）暴露 6 小時候以 ICP-MS 測量斑馬魚體內離子含量。

將受精後第 3 天之斑馬魚胚胎暴露在高濃度 colistin（5 μM）中 6 小時候，以 ICP-MS 偵測斑馬魚體內離子含量（圖 8）。以 ICP-MS 偵測斑馬魚體內之鈉離子含量統計圖（圖 8A）；偵測斑馬魚體內之鉀離子含量統計圖（圖 8B）；偵測斑馬魚體內之鈣離子含量統計圖（圖 8C）。圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值，並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 *$p<0.05$； **$p<0.01$。

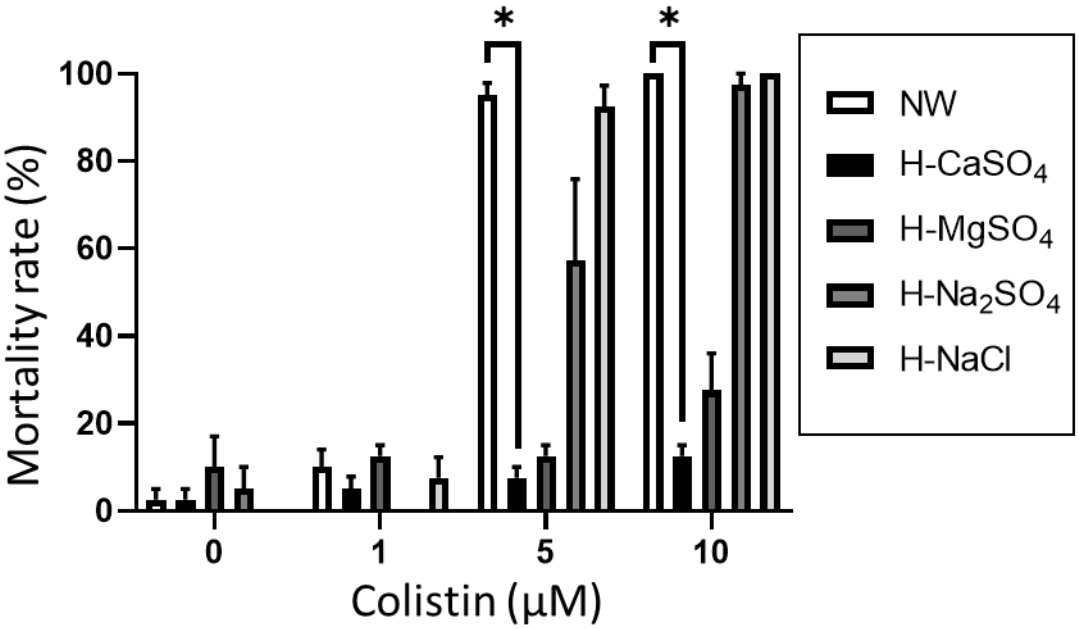


圖 9：96 小時以 CaSO4、MgSO4、Na2SO4、NaCl 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成死亡率之影響

斑馬魚仔魚在不同離子組成之人工淡水與不同濃度 colistin（0、1、5、10 μM）處理 96 小時下之死亡率比較，並量化第 96 小時之累計死亡率之統計圖以篩選保護劑（圖 9）96 小時以 CaSO4、MgSO4、Na2SO4、NaCl 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成死亡率之影響

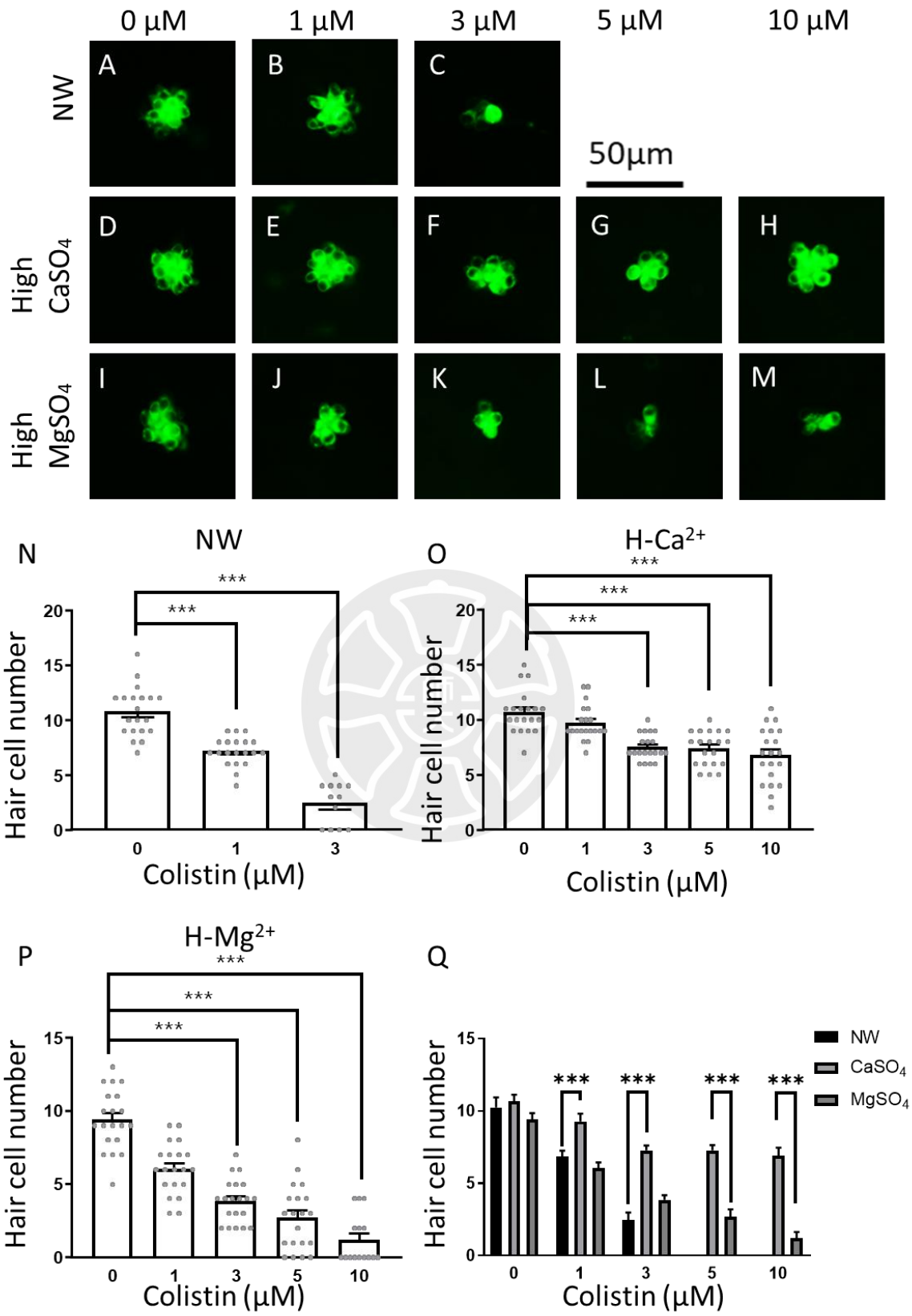

0 μM
1 μM
3 μM
5 μM
10 μM
NW
High CaSO4
High MgSO4
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
50μm
N
NW
O
H-Ca2+
P
H-Mg2+
Q
Hair cell number
Colistin (μM)
***
NW
CaSO4
MgSO4

圖 10：96 小時以 CaSO4、MgSO4 不同離子組成之人工水對粘桿菌素造成毛細胞數目改變之影響

斑馬魚仔魚在不同離子組成之人工淡水與不同濃度 colistin（0、1、3、5、10 μM）處理 96 小時下之毛細胞數量比較（圖 10）；以人工淡水、高鎂水、高鈣水與不同濃度 colistin 處理 96 小時後使用 FM1-43 標定斑馬魚毛細胞螢光染色示意圖（圖 10A~M）；以人工淡水、高鎂水、高鈣水與不同濃度 colistin 處理第 96 小時天下使用 FM1-43 標定斑馬魚毛細胞數量之量化圖（圖 10N~Q）。圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值， 並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 *$p<0.05$ ；**$p<0.01$; ***$p < 0.001$。

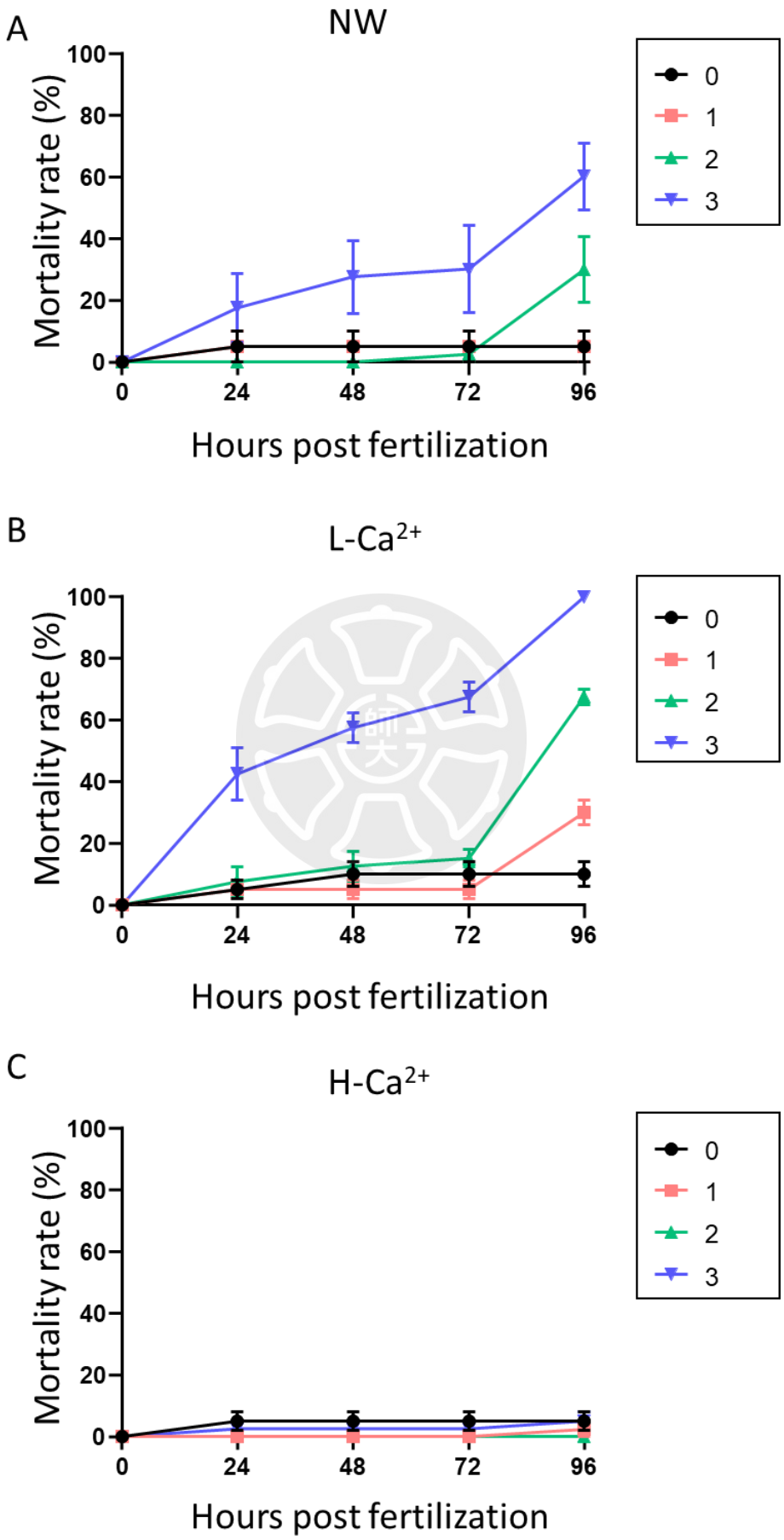

A
NW
Mortality rate (%)
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Hours post fertilization
0
1
2
3
B
L-Ca2+
Mortality rate (%)
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Hours post fertilization
0
1
2
3
C
H-Ca2+
Mortality rate (%)
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Hours post fertilization
0
1
2
3

圖 11：96 小時計算斑馬魚在 NW、高鈣水與低鈣水之死亡率

以受精後 4 小時的斑馬魚分別暴露在高鈣水（2 mM CaSO4）、人工淡水（0.2 mM CaSO4）及低鈣水（0.02 mM CaSO4）與不同濃度 colistin 處理 96 小時之死亡率（圖 11）。在人工淡水（0.2 mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、2、3 μM）處理下之死亡率是意圖（圖 11A）；在低鈣水（0.02 mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、2、3 μM）處理下之死亡率是意圖（圖 11B）；在高鈣水（2 mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、2、3μM）處理下之死亡率是意圖（圖 11C）。

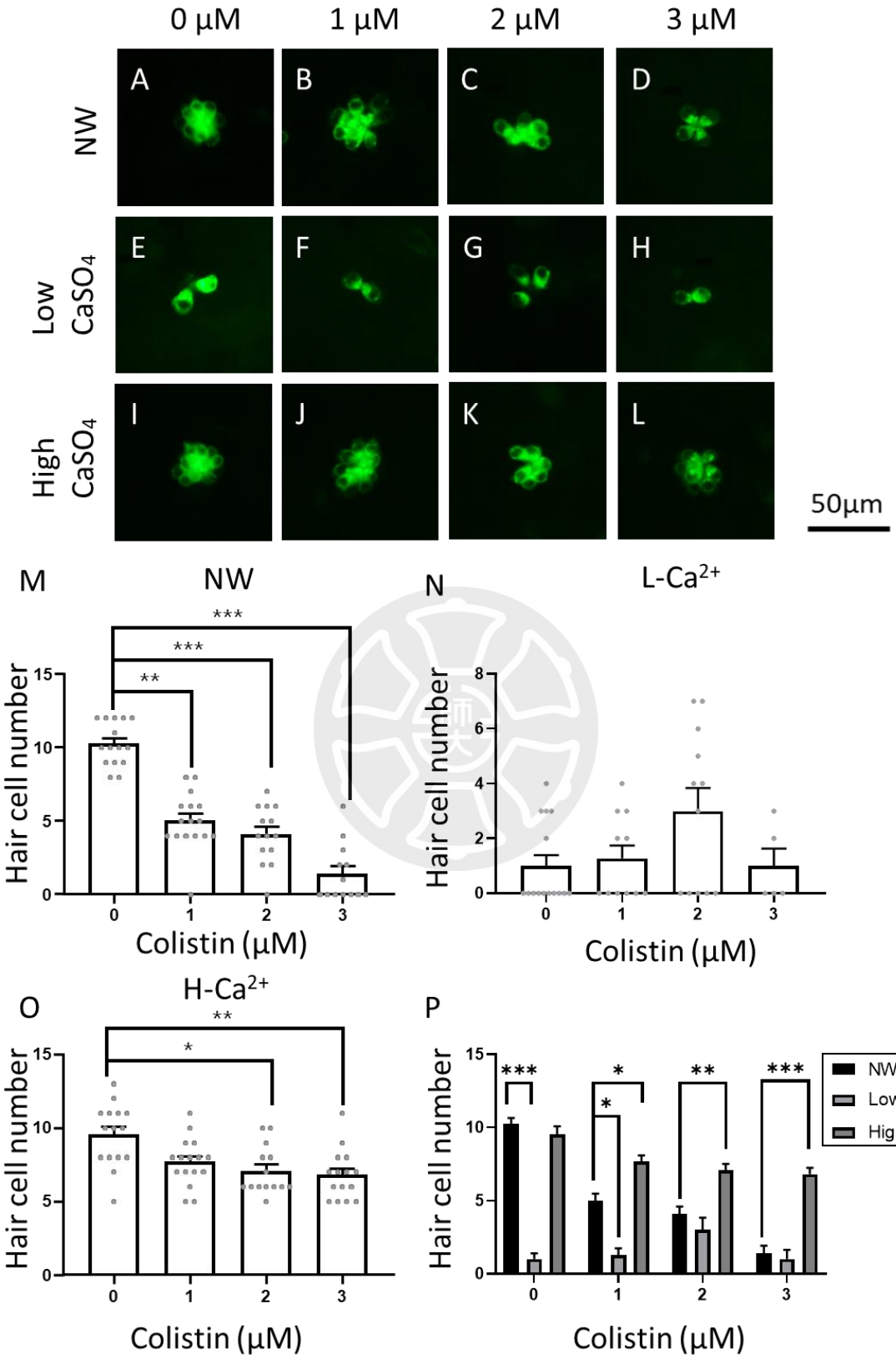

0 μM
1 μM
2 μM
3 μM
NW
Low CaSO4
High CaSO4
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
50μm
M
NW
Hair cell number
Colistin (μM)
N
L-Ca2+
Hair cell number
Colistin (μM)
O
H-Ca2+
Hair cell number
Colistin (μM)
P
Hair cell number
Colistin (μM)
NW
Low CaSO4
High CaSO4

圖 12：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的毛細胞數量

以受精後 4 小時之斑馬魚仔魚以不同濃度之 colistin（1、2、3 μM）與高鈣水（2 mM CaSO4）、人工淡水（0.2 mM CaSO4）及低鈣水（0.02 mM CaSO4）共暴露 96 小時候用活體螢光染劑 FM1-43 標定毛細胞（圖 12A~L）。將標定出之毛細胞數量進行量化統計後之量化圖（圖 12M~P）。在人工淡水（0.2 mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、2、3 μM）處理下之毛細胞數量量化圖（圖 12M）；在低鈣水（0.02mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、2、3 μM）處理下之毛細胞數量量化圖（圖 12N）；在高鈣水（2 mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、2、3 μM）處理下之毛細胞數量量化圖（圖 12O）；將高鈣組、人工淡水組及低蓋組合併後之統計圖（圖 12P）。圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值， 並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 *p<0.05 ；**p<0.01 ; ***p < 0.001。

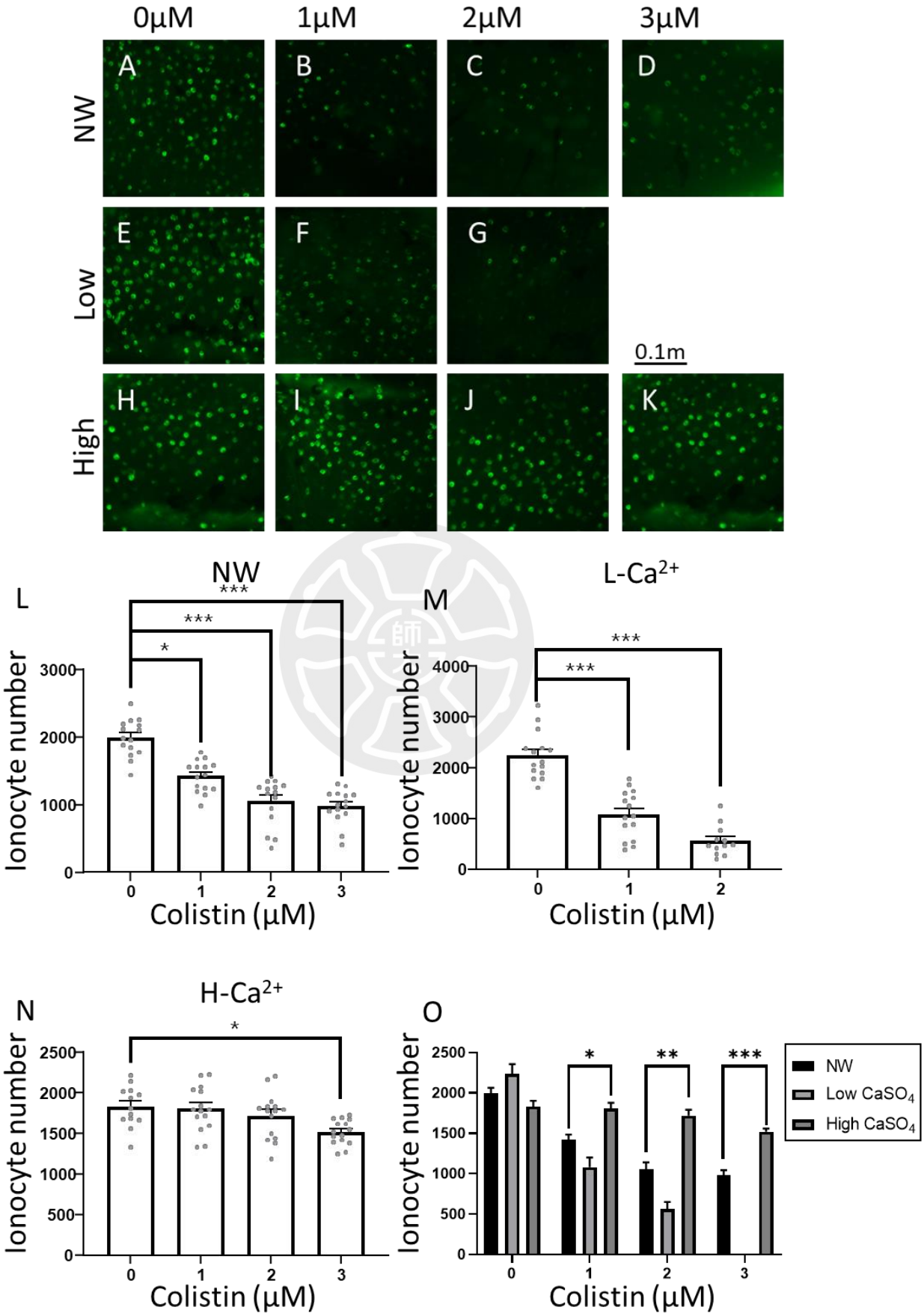
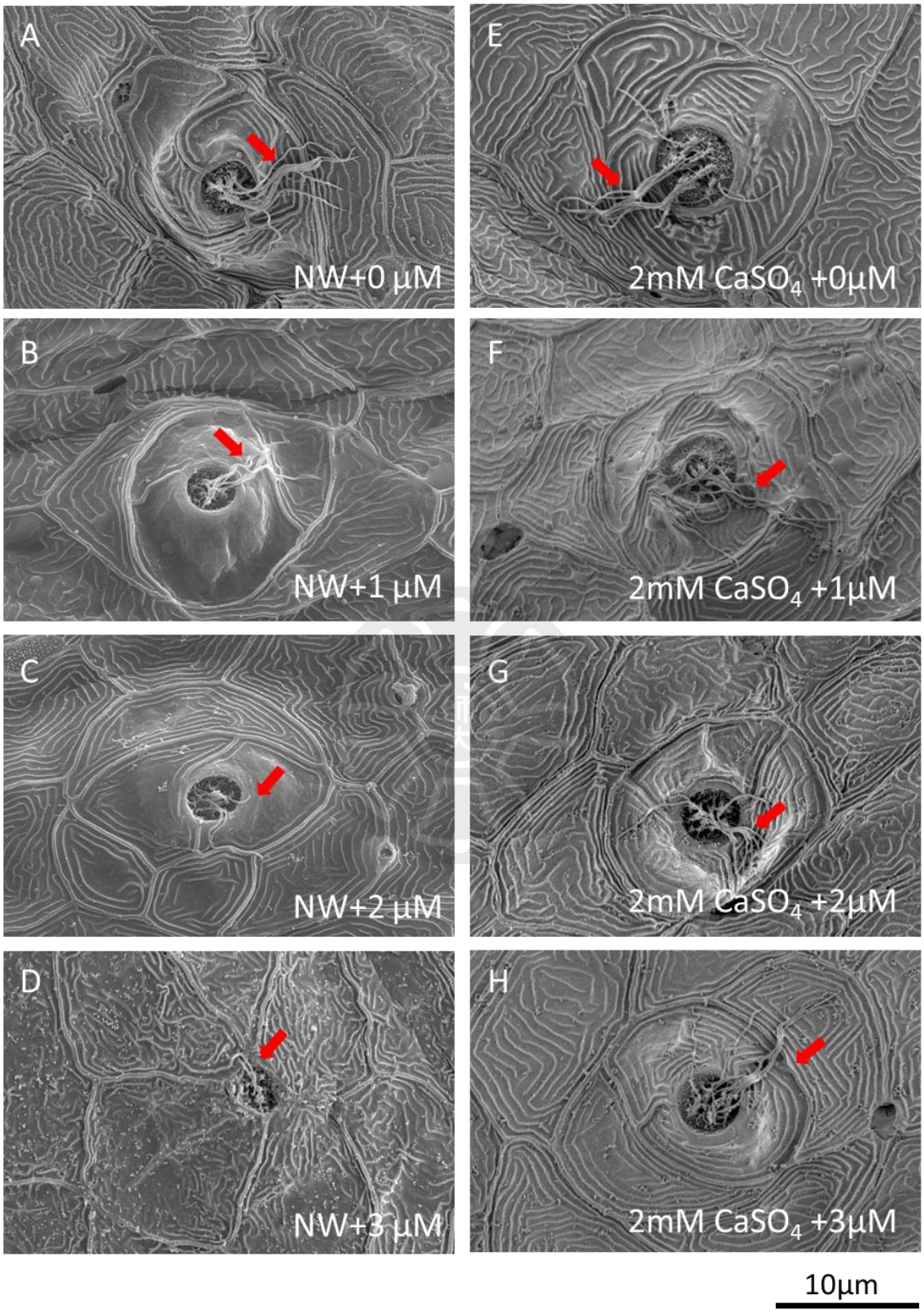

0μM
1μM
2μM
3μM
NW
Low
High
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
0.1m
L
NW
Ionocyte number
Colistin (μM)
M
L-Ca2+
N
H-Ca2+
O
NW
Low CaSO4
High CaSO4

圖 13：96 小時計算斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理的離子細胞數量

將受精後 4 小時之斑馬魚仔魚以不同濃度之 colistin（1、2、3 μM）與高鈣水（2 mM CaSO4）、人工淡水（0.2 mM CaSO4）及低鈣水（0.02 mM CaSO4）共暴露 24 小時候用活體螢光染劑 Rhodamine 123 標定離子細胞（圖 13A~K）。將標定出之離子細胞數量進行量化統計後之量化圖（圖 13L~O）。在人工淡水（0.2 mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、5、10μM）處理下之離子細胞數量量化圖（圖 13L）；在低鈣水（0.02 mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、5、10 μM）處理下之離子細胞數量量化圖（圖 13M）；在高鈣水（2mM CaSO4）中以不同濃度 colistin（1、5、10 μM）處理下之離子細胞數量量化圖（圖 13N）；將高鈣組、人工淡水組及低蓋組合併後之統計圖（圖 13O）。圖中所表達的±值為平均值標準誤差（standard error of the mean, SEM），以 One way ANOVA 及 Dunn's multiple comparisons test 進行無母數分析，原始數據使用 Identify outliers 剔除極端值， 並以 Normality and Lognormality tests 確認是否符合常態分佈，最後再以圖形方式表達數據，星號標示（*）方式規則為 *p<0.05 ；**p<0.01 ; ***p < 0.001


A
NW+0 µM
E
2mM CaSO4 +0µM
B
NW+1 µM
F
2mM CaSO4 +1µM
C
NW+2 µM
G
2mM CaSO4 +2µM
D
NW+3 µM
H
2mM CaSO4 +3µM
10µm

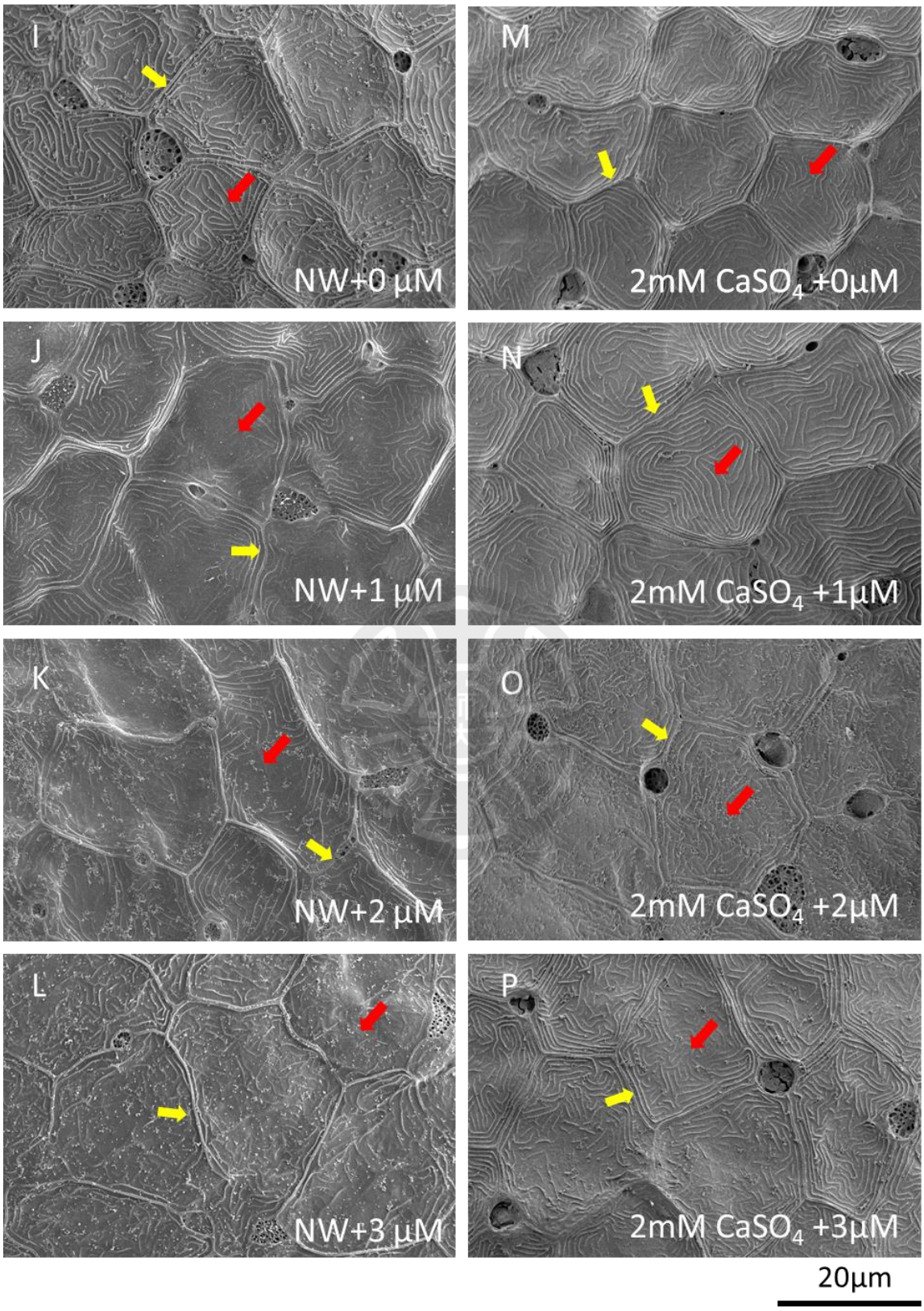

I
NW+0 µM
M
2mM CaSO4 +0µM
J
NW+1 µM
N
2mM CaSO4 +1µM
K
NW+2 µM
O
2mM CaSO4 +2µM
L
NW+3 µM
P
2mM CaSO4 +3µM
20µm

圖 14：96 小時觀察斑馬魚在不同離子組成人工水中與粘桿菌素處理之電子顯微鏡下的型態

將受精後 4 小時斑馬魚胚該在不同濃度 colistin 與人工淡水及高鈣水處理 96 小時後使用掃描式電子顯微鏡觀測斑馬魚的毛細胞表面型態；紅色箭頭為毛細胞毛量指示（圖 14A~H）。在掃描式電子顯微鏡下觀測之斑馬魚角質細胞及離子細胞型態；紅色箭頭為角質細胞中央紋路指示；黃色箭頭為角質細胞兩者間的接合狀況指示（圖 14I~Q）。