國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

順鉑對斑馬魚仔魚側線毛細胞和皮膚離子細胞之影響

Effects of cisplatin on hair cells and ionocytes in the skin of zebrafish larvae

研　究　生：鄒宜玲
Yi-Ling Chou
指導教授：林豊益博士
Li-Yih Lin

中　華　民　國　102 年　12 月

謝誌

在研究所的這兩年半，不算長也不算短的日子裡，有一大堆人要感謝。最先要感謝的就是林豊益老師。謝謝老師不厭其煩、耐心的指導。也非常感謝洪君琳老師體貼、溫柔地教導。謝謝曾庸哲老師在百忙之中擔任我的口試委員，並給與我許多寶貴的意見。還有系辦的漢英助教和美美小姐熱心地提醒我一些大小事情。我們親愛的 B316 實驗室的夥伴，謝謝施廷哥和阿台哥，兩位帥氣又熱心助人的大學長，教我算濃度、拍照(斑馬魚)和測離子細胞。感謝 GB 哥教我算統計和實驗上的提醒，謝謝高揚哥教我養魚的大小事情，謝謝偉民學長教我測可愛的毛細胞。更要感謝我的好搭檔—聖文哥，還好有聖文哥共患難，互相鼓勵和陳媽媽的美味下午茶。還有我不敢直呼他名諱—亮晶晶—的大哥，謝謝大哥多方的幫忙，我十根手指頭都數不完的幫助和感激。謝謝元誠的幫忙，在我剛進實驗室一切還懵懵懂懂的狀況下，給我的協助。也要謝謝我們超級可愛的學弟妹，謝謝 Tina 姐、阿班、小小胖和映璇兒，謝謝你們的幫忙(尤其是在電腦這方面)和貢獻你們每個人的特殊才藝。感謝我生理、分生和生態組同學和學弟妹們的提醒和關心。謝謝大家!真的是萬分感激，獻上我最真誠的祝福：祝福大家健康、平安、快樂 !事事順心、如意!

宜玲敬上

目錄

摘要

Cisplatin 在臨床上是最廣泛用於治療惡性腫瘤的藥物之一。然而，cisplatin 常會造成的副作用包括腎毒性和耳毒性的傷害。斑馬魚已經被廣泛用來作為模式動物,研究藥物對胚胎發育以及生理功能的影響。過去研究發現 cisplatin 對斑馬魚側線毛細胞也會造成傷害，因此利用斑馬魚作為研究毛細胞的毒理模式。然而，目前仍未有研究利用斑馬魚去探討 cisplatin 的腎毒性。斑馬魚胚胎皮膚上分布數種離子細胞與哺乳動物腎臟上皮細胞有許多相似之處，因此本實驗想探討 cisplatin 對於斑馬魚離子細胞的影響。分析 cisplatin 對斑馬魚胚胎毛細胞與離子細胞的發育與功能的影響結果顯示，短時間處理濃度 500 μM cisplatin 30 分鐘後，顯著抑制斑馬魚胚胎側線毛細胞上的機械通道鈣離子流入,顯示毛細胞的功能受損。胚胎處理 10 μM cisplatin 四天後，毛細胞鈣離子流不但下降，而且毛細胞數目也顯著減少。在離子細胞的部分，處理 1000 μM cisplatin 30 分鐘後，會顯著降低離子細胞的排酸能力。同時離子細胞的粒腺體染色(??)性降低，顯示粒線體受到損傷。處理 100 μM cisplatin 4 天後，不但胚胎排酸量顯著受到抑制，也發現離子細胞數目減少。

關鍵字：順鉑、耳毒性、腎毒性、斑馬魚、毛細胞、離子細胞

Abstract

Cisplatin is a clinical drug for the treatment of cancer but it usually causes severe side-effects including nephrotoxicity and ototoxicity. Zebrafish has been an animal model to study the toxicity of drugs and small compounds. The purpose of this study is to examine the effects of cisplatin on the development and function of skin hair cells (HCs) and ionocytes (ICs) which are respectively similar to mammalian inner-ear HCs and renal ICs. The cell number of ICs and H^+ secretion by ICs were significantly suppressed by 0-96 hpf treatment of 10 µM and 100 µM cisplatin. Acute exposure to1 mM cisplatin for 30 min significantly suppressed H^+ secretion by ICs. The mitochondria staining of ICs were significantly reduced by 30 min treatment of cisplatin 1 mM but the cell number of ICs was not affected. In lateral line HCs, the mechanotransducer channel mediated Ca^{2+} influx and the number of HCs (labeled with S100) were suppressed by 0-96 hpf treatment of 10 µM and 100 µM cisplatin. Acute exposure to 500 µM cisplatin for 30 min also significantly suppressed Ca^{2+} influx of HCs. Exposure to cisplatin caused both acute and chronic toxicity to the development and function of HCs and ICs.

Keyword：cisplatin, ototoxicity, nephrotoxicity, zebrafish, hair cells, ionocytes

研究背景

Cisplatin

Cisplatin（cis-diamminedichloroplatinum（II）， CDDP）是一個帶有2氯2氨白金類的化療藥物。1965年首次發現它具有抑制細胞分裂的功能（Rosenberg et al., 1965）。到1969年，cisplatin在動物實驗中被發現具有抗腫瘤作用（Rosenberg et al., 1969）。因為cisplatin進入細胞內部後會crosslinks DNA，造成DNA的傷害，而引起DNA的修復機制，但這反而活化了細胞凋亡的路徑，進而造成細胞的死亡。也因為cisplatin這些特性，在現今臨床治療癌症上包括：頭/頸、肺、卵巢、子宮頸、睪丸、膀胱癌等，cisplatin一直是第一線用藥。然而，與大部分化療藥物一樣，cisplatin也有副作用的產生。從70年代到現在，陸續有cisplatin副作用報告出現，它的副作用包括：腎、耳、神經、腸胃毒性、過敏反應、嚴重嘔吐和骨髓功能抑制等。而其中最主要的副作用為腎毒性和耳毒性。

Cisplatin的腎毒性

在cisplatin所引起的腎毒性方面，從臨床研究得知cisplatin在人體內作用後經由肝臟代謝，再由腎臟排出。這時cisplatin會蓄積在腎絲球、近端腎小管和遠端腎小管處，特別是在近端腎小管會有大量的

累積情況。並且經由腎臟上皮細胞上的Oct 2（organic cation transporter 2）和Ctr 1（copper transport protein 1）（Ishida et al., 2002; Stewart, 2007; Filipski et al., 2008）進入細胞，在細胞內造成：1）內質網壓力（ER stress），引起caspase 12路徑，造成細胞凋亡或細胞壞死。2）增加p21活性，因而抑制了cdk2，而直接造成細胞死亡。3）直接造成DNA的損傷，導致活性氧自由基(Reactive Oxygen Species；ROS)的產生和p53的活性增加，進而造成粒線體功能受損，引起一連串的caspase（9，3/ 6/ 7）路徑造成上皮細胞受損或死亡（Kruidering et al., 1997；Portilla et al., 2002；Li et al., 2004；Miller et al., 2010），因而影響到腎臟正常功能造成：腎絲球過濾率下降（reduce GFR、Glomerular filtration rate）、血清肌酸酐增加（increase Serum creatinine）、低鎂血症（Hypomagnesemia）、低鉀血症（Hypokalemia）等臨床表徵。

Cisplatin腎毒性的研究模式

在先前的研究發現，處理cisplatin 2天後的大鼠（5mg/ kg），H^+−ATPase的活性明顯降低，這結果表示cisplatin造成腎小管功能的受損，導致近端腎小管的酸中毒（Shiraishi et al., 2000；Takano et al., 2002）。而最近的一篇研究報告，以大鼠做為模式，著重在鼠尾草酸對cisplatin引起腎臟上皮細胞內的氧化壓力和細胞凋亡所產生的保護

作用（Sahu et al., 2011）。另一篇回顧性的報告詳細介紹了cisplatin腎毒性的機制和臨床的特徵，並討論如何將這些研究導入在臨床上，做為一個更有效預防腎毒性的方法（Miller et al., 2010）。

而在以斑馬魚仔魚做為cisplatin腎毒性藥物測試的模式系統中，以斑馬魚的腎臟作為研究模式，cisplatin在人體所導致的腎毒性，也在斑馬魚仔魚的腎臟上出現典型的病理組織學變化及腎功能的下降（Hentschel et al., 2005）。

Cisplatin的耳毒性

cisplatin所產生的耳毒性會造成內耳系統−耳蝸和前庭的機械性感覺毛細胞的損傷或死亡。Cisplatin可經由毛細胞上的機械性通道進入細胞內，在細胞內直接造成DNA的損傷，引起活性氧自由基（Reactive Oxygen Species；ROS）產生和p53的活性上升，造成粒線體功能受損，引起一連串的caspase路徑導致機械性感覺毛細胞損傷或死亡，進而影響到聽覺和平衡覺的功能（Rybak and Ramkumar 2007；Thomas et al., 2013）。

Cisplatin耳毒性的研究模式

在以斑馬魚仔魚做為cisplatin耳毒性藥物測試的模式系統中，前人以DASPEI標定毛細胞，斑馬魚仔魚處理濃度50 µM cisplatin 24小時

後毛細胞數目顯著減少（Ton and Parng 2005）。而在另一研究中以FM1-43 FX標定毛細胞，斑馬魚仔魚處理濃度500、750和1000 µM cisplatin 4個小時後，毛細胞存活率約為70%、50%和30%（Ou et al., 2007）。另外相關的研究則是針對cisplatin進入機械性感覺毛細胞內引起ROS所導致的細胞凋亡路徑的探討（Rybak et al., 2007）。關於前人們的研究多是著重在以染色法觀察毛細胞的損傷和死亡的情況。然而在毛細胞損傷、死亡之前毛細胞的功能是否就已經受損？卻是所知甚少。

以斑馬魚胚胎表皮為腎臟離子細胞研究模式

在魚類胚胎和仔魚的時期，由於鰓、腎臟的發育尚未完全，其所需的酸鹼調節、離子吸收和含氮廢物的排除功能，皆是利用胚胎和仔魚的表皮來進行（Hiroi et al., 1999；Hwang et al., 1999；Kaneko et al., 2002；Lin and Hwang 2001, 2004），因此斑馬魚胚胎和仔魚的表皮是一個很好的模式用來研究腎臟功能。而且胚胎和仔魚的表皮分布著許多類似哺乳類腎臟的離子細胞，不但易於觀察還可做活體的功能分析。相較於其他魚類，如salmon、trout和tilapia等，斑馬魚也是一個新的且又強大物種模式，因為牠有豐富的基因資料庫和已建立的分子生物學研究方法。

在斑馬魚胚胎表皮上發現不同型態的離子細胞(Lin et al., 2006)，HRCs（H^+-ATPase-rich cell）和NaRCs（Na^+-K^+-ATPase rich cell）。先前的研究（Pan et al., 2005）指出，NaRCs頂膜有zECaC（epithelial Ca^{2+} channel）負責鈣的吸收。在隨後斑馬魚胚胎表皮離子細胞的研究中，進一步證實了Na^+的吸收是經由HRCs（Horng et al., 2007）。而相關的證據顯示，Na^+/ H^+ exchange（NHE3）定位於HRCs頂膜，並參與Na^+的吸收（Yan et al., 2007）。另一研究則提出了以斑馬魚的鰓和表皮離子細胞做為模式的離子調節機制(Hwang and Lee, 2007)，包含HRCs、NaRCs和NCC（Na^+-Cl^- cotransporter）cells。另外關於斑馬魚胚胎表皮離子細胞排除含氮廢物的功能，在最近的研究中證實斑馬魚仔魚的H^+-ATPase和Rhcg1參與氨的排出（Shih et al., 2008）。這些報告顯示，在研究酸鹼調節、離子吸收和含氮廢物的排除，斑馬魚不失為是一個很好的模式動物（Dymowska et al., 2012）。

目前為止的研究，發現這些仔魚表皮的離子細胞功能類似哺乳類腎臟上皮細胞的功能。在斑馬魚的HR cell 負責排除H^+/吸收Na^+，NaR cell 吸收Ca^{2+}，NCC cell（Na^+-Cl^- cotransporter）吸收Cl^-及KS cell（K^+-secreting）排出K^+。HR cell功能相似於哺乳類腎臟近曲小管的上皮細胞(proximal tubular cell)、集尿管的α-IC (α-intercalated cell)， NaR cell 和NCC cell功能則相似於遠曲小管的上皮細胞DCT cell (distal convoluted tubule)，KS cell則與亨利氏套上行支TAL cell (thick ascending limb)功能相似。

在離子細胞分型中了解比較多的是HRC。HRC的頂膜表現氫離子幫浦（H^+-ATPase）並進行排酸的功能（Lin et al., 2006）。利用抑制劑bafilomycin（H^+-ATPase inhibitor）阻斷H^+-ATPase後，斑馬魚仔魚表皮排酸量會降低，證明H^+-ATPase為HRC主要排酸的蛋白質（Shih et al., 2008）。由於魚類主要是藉由離子細胞做酸鹼調節，因此以morpholino knock down的方式阻斷H^+-ATPase的表現後發現胚胎的排酸下降而發育也受到嚴重影響（Horng et al., 2007），顯示HRC對酸鹼平衡的重要性。

以側線為毛細胞的研究模式

魚類的機械性感覺和哺乳動物一樣，包括聽覺與平衡覺。魚類的內耳構造，分佈在頭部左右兩側，當聲波傳遞時，由於水壓的關係和水中聲波的特性以及魚的比重與環境水體差異小等原因，因此水中的聲音是可以直接穿透過魚體進而傳到頭部內耳的聽囊（sacculus），聽囊中含有耳石（otolith）及毛細胞，聲波的震動造成內耳聽覺感受毛細胞與耳石相互磨擦，使得陽離子流入毛細胞內進而產生神經動作電

位，神經動作電位再傳送到腦部，因而產生聽覺。而平衡覺則是由內耳半規管內的耳石隨著重力的不同，改變位置因而壓迫毛細胞，使魚在游動的時候能感測頭部的位置，進而保持平衡（Dijkraaf, 1989）。

魚類的側線系統（lateral-line system）位於體表兩側，由頭部延伸到尾部，呈線性排列，是一特化的感覺器官，用來感受水中微小的活動，對水流及水壓非常敏感，在魚類許多行為中（如群游、追捕獵物和逃避敵害等）常扮演重要角色。側線系統的感覺單位是神經丘（neuromast），主要由兩型細胞組成：毛細胞（hair cell）及支持細胞（support cell）。仔魚時期的神經丘表現在體表上，能直接接觸水體環境，容易進行型態觀察及功能性的測量，隨著發育會逐漸包埋進表皮下（Ghysen et al., 2004, 2007）。側線毛細胞的型態與功能與哺乳類毛細胞相似，越來越多毛細胞的研究以魚類側線為動物模式，應用於聽覺的保護及藥物的毒性研究（Williams and Holder, 2000； Nicolson, 2005； Nayak et al., 2007）。

斑馬魚研究的優勢

在本實驗中以斑馬魚做為模式動物，用以研究cisplatin所導致的腎毒性和耳毒性。主要是斑馬魚仔魚體表分佈著不同型態的離子細胞，容易觀察型態以及測量功能。而斑馬魚側線系統的機械性感覺毛細胞，

不管是在構造或是功能方面都和哺乳類動物的內耳機械性感覺毛細胞相似，將較於哺乳類的毛細胞位於顳骨裡，側線毛細胞明顯較容易觀察測定。除此之外斑馬魚還具有多項優勢：1）豐富的基因庫資料，可方便做基因層面的操作。2）發育快速和高度繁殖力，從受精卵到成魚只要3個月，產卵數量多。3）仔魚體積小，身體呈現半透明狀便於在顯微鏡下操作。4）完整的個體，較符合正常生理功能的狀態。5）低成本。綜合以上所述，使用斑馬魚仔魚做為本實驗藥物測試動物。

研究目的

Cisplatin從70年代的動物實驗中被發現具有抗腫瘤作用（Rosenberg et al.,1969），到現今一直是臨床治療癌症的第一線用藥。而它的副作用：耳毒性和腎毒性，是眾所皆知且無法事前預測的。關於cisplatin耳毒性的研究，前人在功能性研究使用的技術大多是利用fluorescent dye FM1-43與DASPEI等染色法觀察毛細胞的損傷、死亡。然在染色的量化上並不是那麼的精確，染色法只能觀察到毛細胞的損傷和死亡的情況，而無法反應cisplatin對毛細胞功能的影響。而本實驗想了解的是給予cisplatin後毛細胞尚未損傷、死亡的情況下，毛細胞功能的表現。所以本實驗的研究目的為利用非侵入的SIET技術，量測斑馬魚胚胎毛細胞鈣離子流量，以作為毛細胞功能是否受到影響的指標（Lin et al., 2013）。此外也探討在處理cisplatin後對毛細胞的發育的影響。本實驗的第二個研究目的是分析cisplatin對斑馬魚仔魚表皮離子細胞的傷害，試圖建立離子細胞作為腎毒性藥物的模式。

材料與方法

一、實驗動物

斑馬魚（*Danio rerio*, AB strain）馴養於 28±1℃恆溫飼養箱中，光週期為 12/12h（light：dark），產蛋後以馴養水（Normal Water; NW）配方為 0.4 NaCl, 0.2 $MgSO_4$, 0.08 K_2HPO_4, 0.005 KH_2PO_4 與 0.2$CaSO_4$, pH 6.8 馴養蛋及仔魚。或是依實驗的需要以抗氧化水（antioxidant water）馴養。每天換水一次，持續到實驗開始，實驗所使用的仔魚分別為 72 hpf（hour postfertilization）和 96 hpf。

二、Cisplatin 的處理

Cisplatin（Sigma）溶解在 DMSO 裡，再以馴養水（NW）配置成不同濃度（0/ 100/ 250/ 500/ 1000 μM），短時間處理 30min，觀察 72hpf 仔魚側線毛細胞上機械性通道的鈣離子流量。在長時間馴養的實驗中，cisplatin 以馴養水或抗氧化水配置成較低的不同濃度（0/ 10/ 50/ 100 μM），馴養 0-96 hpf 在 96 hpf 觀察仔魚的存活率、型態、測量側線毛細胞上機械性通道的鈣離子流量並且計算毛細胞的數目。另一組實驗則是將 cisplatin 直接溶解在馴養水和抗氧化水裡，濃度和時間處理則和上述一樣。

Cisplatin 溶解在 DMSO 裡，再以馴養水配置成不同濃度（0/ 100/

500/ 750/ 1000 μM),處理短時間 30min,觀察 72 hpf 仔魚卵黃囊表面氫離子濃度和離子細胞氫離子流量。長時間的馴養則是配置成較低的不同濃度(0/ 10/ 50/ 100 μM),處理 0-96 hpf 在 96 hpf 觀察仔魚的存活率、型態、測量仔魚卵黃囊表面氫離子濃度和離子細胞的氫離子流量並且計算離子細胞的數目。另一組實驗則是將 Cisplatin 直接溶解在馴養水裡,濃度和時間處理則和上述一樣。

三、掃描式離子選擇電極技術(scanning ion selective electrode technique, SIET)

此技術是為測量斑馬魚仔魚側線毛細胞上機械性通道的鈣離子流量和仔魚卵黃囊表面及離子細胞的氫離子流量,是一特定離子選擇性微電極構造。先利用拉針器製作出玻璃毛細管做為探針,直徑約為 3-4 μm 的微電極,之後置入 120℃烘箱 24 小時去除水氣,即完成前置步驟。進行實驗時,將探針的前端裝入約 5~7mm 的液態離子交換膜(liquid ion exchanger cocktail;LIX),本實驗中以 Ca^{2+} LIX 和 H^+ LIX 製作電極以測定 Ca^{2+}(量測毛細胞功能的指標)與 H^+(量測卵黃囊與離子細胞功能的指標)。然後將此探針裝到前放大器,再連接到訊號放大器,放大後的訊號(1000 倍)再經由轉換器(A/ D converter)後經由電腦讀取與軟體分析。探針的移動則是由電腦驅動馬達來控制,

可做三度空間移動，藉由偵測固定距離間的單一種類離子濃度差，進而計算出偵測的離子在細胞表面的流動方向(吸收或是排放)與流量。在測量仔魚前先利用配置的標準溶液 H^+：pH6、7、8；Ca^{2+}：$CaCl_2$ 1mM、10mM、100mM，透過 log $[H^+]$、$[Ca^{2+}]$所得到的電壓輸出值，再經由線性迴歸產生該離子的涅斯特斜率（Nernstian slope），即可將測量的樣本電壓值換算成該離子所相對應的濃度。並且在正立顯微鏡上裝置 CCD 攝影系統，將探針與仔魚影像傳送至電腦螢幕，以便進行探針的操控。SIET 具有即時、高空間解析度與非侵入性的特性，已被應用於多種領域之研究測量（Smith et al., 1999; McLamore et al., 2009）。

離子流量的計算方法，參考前人已發表的研究（Donini and O'Donnell, 2005； Shih et al., 2008；Smith et al., 2009）。經由 ASET 軟體獲得電位差值，進而利用下列方程式轉換成濃度：

$$\Delta C = C_b \times 10^{(\Delta V/S)} - C_b\text{；} \qquad (1)$$

ΔC（umole $l^{-1}cm^{-3}$）為兩點的濃度梯度；C_b（umole l^{-1}）為背景值的濃度；ΔV為電位梯度；S 為涅斯特斜率。經由 Fick's 擴散定律，將已知濃度利用下列方程式換算成離子流量：

$$J = D(\Delta C)/\Delta X\text{；} \qquad (2)$$

J（pmole $cm^{-2}s^{-1}$）為離子的淨流量；D 為離子的擴散常數（淡水 Ca^{2+}：7.9×10^{-6} cm^2 s^{-1}）；ΔC（pmole cm^{-3}）為離子濃度梯度；ΔX（cm）為兩點距離。欲求ΔC，將公式反推即可得細胞累積濃度：

$$\Delta C = J/D \times \Delta X; \qquad (3)$$

四、體表整體氫離子濃度測定

96 hpf 斑馬魚仔魚馴養於 NW 環境。測量時維持室溫在 26~28℃。測量前需先將仔魚麻醉，麻醉劑配置為 2ml 的測量麻醉劑配製為ＮＷ加入 300 μM tricine 緩衝溶液（Sigma-Aldrich）和 0.3 mg/l ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate（MS222, Sigma- Aldrich），接著再利用 1N NaOH 和 1N HCl 滴定至 pH7±0.03。麻醉後讓仔魚靜置 3 分鐘，累積體表氫離子濃度，以探針測量仔魚卵黃囊表面的微電壓（mv），再將探針移動到距離仔魚約 1 公分處測量水體的微電壓（mv）當做背景值，所測得的卵黃囊表面微電壓（mv）和背景值相減套入公式及可得到氫離子的流量。離子流量的計算方法如上所述。

五、細胞離子流測定

藉由DIC光學顯微鏡與數位相機等設備，建構出即時影像（LiveView），將畫面傳送至電腦螢幕，以便操作微電極的移動和辨識側線毛細胞及表皮離子細胞。之後進行斑馬魚仔魚側線毛細胞及表

皮離子細胞的測量，測量時維持室溫在26~28℃。以MS-222將斑馬魚仔魚麻醉後擺放至顯微鏡載台上，使魚側躺，使用電動馬達將探針的位置移動到斑馬魚仔魚側線上的神經丘旁或是體軸與卵黃囊交界處旁，之後在60倍水鏡下找到感覺纖毛束與離子細胞，將探針移動到感覺纖毛束的底部或是離子細胞頂膜開口處上（2 µm的位置）。並確定探針有壓迫到感覺纖毛束或是探針位於離子細胞頂膜開口上，將此點設為原點（o），之後向上移動10 µm遠離毛細胞及離子細胞，並將此點設為（x），之後利用SIET軟體在每3.33秒分別移動到o點與x點進行測量，最後將測得的微電壓（mv）套入公式及可得到鈣離子和氫離子的流量。離子流量的計算方法如上所述。

六、免疫組織化學染色 （Immunohistochemistry）

將未處理與處理不同濃度 cisplatin 的斑馬魚仔魚以 4%的 paraformaldehyde 置於 4℃環境的 shaker 上搖動 2 小時，之後以 PBST 溶液清洗樣本 2 次，接著浸泡 100% methanol 於-20℃環境 30 分鐘。接著去除 methanol，以 PBS 溶液清洗樣本 3 次，每次 5 分鐘，置於室溫環境的 shaker 上搖動。去除 PBS 後加入 10 倍稀釋（以 PBST 配置）的 blocking buffer，浸泡樣本 30 分鐘，於室溫環境的 shaker 上搖動。去除 blocking buffer 後以 PBST 溶液清洗樣本 3 次，每次 5 分鐘，

於室溫環境的 shaker 上搖動。配置 1 抗溶液（以 PBST 配置成 1000 倍稀釋），使樣本均勻浸泡於抗體中，置於 4℃環境的 shaker 上搖動 over night。隔天將 1 抗去除，以 PBST 溶液清洗樣本 3 次，每次 5 分鐘，於室溫環境的 shaker 上搖動。將配置好的 2 抗溶液（以 PBST 配置成 500 倍稀釋）均勻浸泡樣本，置於室溫環境的 shaker 上避光搖動 2 小時。去除 2 抗溶液後將樣本以 PBST 溶液清洗樣本 3 次，即可置於螢光顯微鏡下進行觀察。

七、粒腺體數目測定

MitoTracker Green FM（M7514, Molecular Probes）和 rhodamine 123（Sigma）染劑標定粒腺體並測量其數目。將斑馬魚仔魚（72hpf）預處理 mitotracker 1µM 或 rhodamine 123 200µM 各 15 分鐘，接著再將斑馬魚仔魚轉置在 0 和 1000 µM cisplatin 30 分鐘或 1 小時，之後以麻醉劑（MS 222）麻醉進行螢光顯微鏡拍攝。

八、自由基測定

自由基的測定藉由使用化學冷光分析儀（Chemiluminescence analyzing system，CLD－110，Tohoku Electronic Industrial Co., Sendai，Japan）及化學冷光（Chemiluminescence，CL）加強劑 luminol 和 lucigenin 來進行，其分析儀的裝置包含：冷光計數器（CL counter）、

水循環槽（water circulator）、主機、光子檢測（photon detector）等設備。此分析儀直接偵測液體（例如血液）中 ROS 產生的情形，特別是針對超氧陰離子的形成來做測量。而偵測的原理乃是利用液體（例如血液）中自由基所含的電子，將電子轉移給化學冷光加強劑，使自由基本身由高能位階轉換成低能位階，藉以釋放能量使得化學冷光加強劑發光，而激發出的冷光再經由光電倍增管（photomultiple tube，PMT）接收，轉換成電流，經由檢測器測得電流強度，則可轉換成計數值（Chien et al.,2001）。

使用自由基分析儀測量 96hpf 仔魚均質後的液體，看其液體中所含的自由基。在每次的實驗中，皆使用均質後的液體 200μl 放置於不銹鋼的凹盤中，接著放入測定儀測量 60 秒作為基準值，之後再分別加入 500μl luminol 0.2mM（偵測 H_2O_2、$\cdot OH$）和 lucigenin 0.1mM（偵測$O_2\cdot^-$）進行自由基的測量，每次檢測的反應時間為 240 秒，總測量時間共為 300 秒。

九、統計分析

使用 MiniTab 軟體進行統計分析。實驗結果為平均值±標準偏差（SEM）。比較兩組平均值以 Student's *t*-test（two-tailed）進行分析。三組以上數值以 one-way ANOVA 與 Tukey's *post-hoc* test 分析。達到

統計上的顯著差異為 p -value 小於 0.05（$p < 0.05$）。

實驗設計

一、實驗設計

實驗一：長時間（0-96 hpf）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養斑馬魚仔魚觀察其存活率與體長。將 cisplatin 溶解在 DMSO（0.01、0.05 和 0.1%）及 NW 中，分別在 0, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 78 和 96 小時觀察其存活數目，並在第 96 小時，針對每個組別做最終存活率與體長計算。

實驗二：長時間（0-96 hpf）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養斑馬魚仔魚，偵測仔魚卵黃囊體表氫離子濃度與離子細胞的氫離子排出量，並計算離子細胞數目。將 cisplatin 溶解在 DMSO（0.01、0.05 和 0.1%）及 NW 中，以 SIET 探針測量仔魚卵黃囊體表氫離子累積程度與離子細胞氫離子的排出量。利用免疫組織化學染色法進行染色觀察離子細胞的數目。

實驗三：短時間（30 分鐘）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、100、500、750 和 1000 μM），測量斑馬魚仔魚（72hpf）卵黃囊體表氫離子濃度與離子細胞的氫離子排出量，並計算離子細胞和富含粒腺體細胞數目。將 cisplatin 溶解在 DMSO（0.1、

0.5、0.75 和 1%）及 NW 中，以 SIET 探針測量仔魚卵黃囊體表氫離子累積程度與離子細胞氫離子的排出量。利用免疫組織化學染色法進行染色觀察離子細胞的數目，並以 MitoTracker Green FM 和 Rhodamine 123 染劑標定粒腺體並測量染色的離子細胞數目。

實驗四：長時間（0-96 hpf）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養斑馬魚仔魚，偵測仔魚側線毛細胞對鈣離子流入量的影響，並計算毛細胞數目。將 cisplatin 溶解在 DMSO（0.01、0.05 和 0.1%）及 NW 中，以 SIET 探針測量仔魚鈣離子的流入量。利用免疫組織化學染色法進行染色觀察毛細胞數目。

實驗五：抗氧化水對毛細胞的保護作用。長時間（0-96 hpf）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養斑馬魚仔魚，偵測仔魚側線毛細胞對鈣離子流入量的影響，並計算毛細胞數目。將 cisplatin 溶解在抗氧化水中，以 SIET 探針測量仔魚側線毛細胞鈣離子的流入量。利用免疫組織化學染色法進行染色觀察毛細胞數目。

實驗六：長時間（0-96 hpf）處理不同濃度的 cisplatin（0 和 100 μM）

馴養斑馬魚仔魚，測量 ROS 含量。將 cisplatin 溶解在 NW 及抗氧化水中，將每組仔魚（n=35）均質後離心，取上清液放入自由基分析儀測定。

實驗七：短時間（30 分鐘）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、100、250、500 和 1000 μM），測量斑馬魚仔魚（72hpf）側線毛細胞對鈣離子流入量的影響。將 cisplatin 溶解在 DMSO（0.1、0.25、0.5 和 1%）及 NW 中，以 SIET 探針測量仔魚側線毛細胞鈣離子的流入量。

實驗八：短時間（連續 30 分鐘）處理 cisplatin（500 μM）測量斑馬魚仔魚（72hpf）同一顆神經丘上毛細胞的鈣離子流入量。將 cisplatin 溶解在 NW 中，以 SIET 探針連續測量 30 分鐘，偵測仔魚側線毛細胞鈣離的流入量。

二、實驗流程

1. 仔魚長時間處理

0-96 hpf 仔魚馴養在 0、10、50 和 100 μM 的 cisplatin

仔魚存活率的統計與型態的觀察

毛細胞功能測試

（Ca^{2+} 流入）

仔魚體表/離子細胞排酸

測量（H^+排出）

計算毛細胞數目

計算離子細胞/ p63 數目

2. 仔魚短時間處理

72hpf 仔魚處理 0、100、250、

500 和 1000 μM cisplatin 30min

72hpf 仔魚處理 0、100、500、750

和 1000 μM cisplatin 30min

SIET 毛細胞功能測試

（Ca^{2+} 流入）

SIET 仔魚體表/離子細胞排酸測

量（H^+排出）

計算 Mitotracker 和 Rhodamin 123 數目

結果

實驗一、長時間（0-96 hpf）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 µM）馴養斑馬魚仔魚觀察其存活率與體長。

圖一 A 為斑馬魚仔魚馴養在不同濃度（0、10、50 和 100 µM）的 cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO）。圖一 B 為斑馬魚仔魚馴養在不同濃度（0、10、50 和 100 µM）的 cisplatin（馴養水）。圖一 A 控制組與馴養 10 µM 的組別，存活率分別約為 92%和 87%，並無顯著差異，而 50 和 100 µM 的組別，存活率分別約為 74%及 16%，與控制組相較分別減少了 18%與 76%，呈現顯著差異。而圖一 B 控制組與馴養 10、50 和 100 µM 的組別，存活率分別約為 92%、91%、90%和 84%，並無顯著的差異。由圖一 C 的影像為斑馬魚仔魚分別處理 0 和 100 µM cisplatin（馴養水），100 µM cisplatin 馴養的仔魚外觀型態有生長遲緩的現象，計算其體長有明顯下降（圖一 D），而控制組與 10、50 cisplatin 馴養的仔魚則無顯著差異。

實驗二、長時間（0-96 hpf）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 µM）馴養斑馬魚仔魚，偵測仔魚卵黃囊體表氫離子濃度與離子細胞的氫離子排出量，並計算離子細胞數目。

圖二 A 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin （0.01、0.05 和 0.1%

DMSO；0-96hpf）的組別，圖二 B 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（馴養水；0-96hpf）的組別。之後在 96 hpf 以 SIET 測量卵黃囊表面氫離子排出量，做為整體排酸功能被抑制的指標。可以看到 100 μM 組別的氫離子排出皆有顯著下降（圖二 A，B），與控制組相較，氫離子排出分別減少約 48%和 40%。圖二 C 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO；0-96hpf）的組別，圖二 D 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（馴養水；0-96hpf）的組別，之後在 96 hpf 以 SIET 測量離子細胞氫離子排出量做為離子細胞功能被抑制的指標。可以看到在 10、50 和 100 μM cisplatin 的馴養之下，氫離子排出皆有顯著下降。分別減少約 32%、44%、68%（圖二 C）和 26%、35%、44%（圖二 D）。

圖三 A、D 和 G 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（馴養水；0-96hpf）的 HR cell、NaR cell 和 p63 的影像。圖三 B 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO；0-96hpf）的組別，圖三 C 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（馴養水；0-96hpf）的組別。之後在 96 hpf 計算斑馬魚仔魚的 HR cell（H^+-ATPase rich cell）的數目，可以看到在馴養 100 μM 濃度之下 HR cell 數目顯著地減少。圖三 E 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO；0-96hpf）的組別，

圖三 F 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（馴養水；0-96hpf）的組別。之後在 96 hpf 計算斑馬魚仔魚的 NaR cell（Na^+-ATPase rich cell）數目，結果顯示在馴養 100 μM 濃度下 NaR cell 數目顯著地減少。圖三 H 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（馴養水；0-96hpf）。在 96 hpf 計算斑馬魚仔魚的表皮幹細胞 p63 數目，結果顯示在馴養 100 μM 濃度下 p63 數目顯著地減少。

實驗三、短時間（30 分鐘）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、100、500、750 和 1000 μM），測量斑馬魚仔魚（72hpf）卵黃囊體表氫離子濃度與離子細胞的氫離子排出量，並計算離子細胞和富含粒腺體細胞數目。

圖四 A 為仔魚浸泡在不同濃度 cisplatin（0.5 和 1% DMSO）30 分鐘後，以 SIET 測量卵黃囊表面氫離子排出量，做為整體排酸功能被抑制的指標。結果顯示控制組與處理組並無顯著差異。圖四 B 為 72 hpf 仔魚浸泡在不同濃度 cisplatin（0.1、0.5、0.75 和 1% DMSO）30 分鐘的組別，圖四 C 為 72 hpf 仔魚浸泡在不同濃度 cisplatin（馴養水）30 分鐘的組別。之後再以 SIET 測量離子細胞氫離子排出量做為離子細胞功能被抑制的指標。可以看到在濃度 1000 μM 的組別，氫離子排出有顯著減少，分別減少約 44%和 39%（圖四 B，C）。

圖五 A 和 C 為斑馬魚仔魚（72hpf）分別浸泡在 cisplatin（馴養水）30 分鐘以 mitotracker 和 rhodamin 123 螢光染劑染富含粒腺體細胞數目的影像。圖五 B 和 D 分別為浸泡 cisplatin（馴養水）30 分鐘分鐘後的量化圖。在 1000 μM cisplatin 的處理之下，斑馬魚仔魚富含粒腺體細胞數目有顯著下降，分別減少約 30%和 34%（圖五 B 和 D）。

圖六 A 和 C 為斑馬魚仔魚（72hpf）分別浸泡在 cisplatin（馴養水）30 分鐘 HR cell 和 NaR cell 的影像。圖六 B 和 D 分別為浸泡 cisplatin（馴養水）30 分鐘分鐘後的量化圖。在 1000 μM cisplatin 的處理之下，斑馬魚仔魚離子細胞數目皆無顯著下降（圖六 B 和 D）。

實驗四、長時間（0-96 hpf）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養斑馬魚仔魚，偵測仔魚側線毛細胞對鈣離子流入量的影響。

圖七 A 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（0.01 和 0.05 % DMSO；0-96hpf）的組別。圖七 B 為仔魚馴養在不同濃度 cisplatin（馴養水；0-96hpf）的組別。在 96 hpf 以 SIET 測量毛細胞機械性通道的鈣離子流入量做為毛細胞功能的指標。可以看到 cisplatin 馴養濃度 10 和 50 μM 的組別，鈣離子流入量減少約 67%、74%和 51%，呈現顯著差異。

實驗五、抗氧化水對毛細胞的保護作用。長時間（0-96 hpf）處理各

種不同濃度的 cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養斑馬魚仔魚，偵測仔魚側線毛細胞對鈣離子流入量的影響，並計算毛細胞數目。

圖九 A 為斑馬魚仔魚（0-96 hpf）分別馴養在 cisplatin（馴養水）及 cisplatin（抗氧化水）之下，可以看到在 10 μM cisplatin（馴養水）的處理之下毛細胞的鈣離子流量明顯的減少約 59%。而在 10 μM cisplatin（抗氧化水）的處理之下毛細胞的鈣離子流量則沒有減少。

圖八 A 和 B 為斑馬魚仔魚（0-96 hpf）分別馴養在 cisplatin（馴養水）及 cisplatin（抗氧化水）之下，側線毛細胞的共軛焦顯微鏡（confocal）影像。圖八 C 和 D 分別為 cisplatin（馴養水）及 cisplatin（抗氧化水）細胞數目量化圖。可以看到在 10 μM cisplatin（馴養水）馴養之下，毛細胞數目顯著減少約 52% （圖八 C），而在 10 μM cisplatin（抗氧化水）馴養之下毛細胞數目則沒有減少，無顯著差異。

實驗六：長時間（0-96 hpf）處理不同濃度的 cisplatin（0 和 100 μM）馴養斑馬魚仔魚，測量 ROS 含量。

圖九 B 為 ROS 含量，10 μM cisplatin（馴養水）的處理之下 ROS 含量明顯增加約 247%，而在 10 μM cisplatin（抗氧化水）的處理之下 ROS 含量則沒有顯著變化。

實驗七：短時間（30 分鐘）處理各種不同濃度的 cisplatin（0、100、

250、500 和 1000 µM），測量斑馬魚仔魚（72hpf）側線毛細胞對鈣離子流入量的影響。

圖十 A 和 B 為仔魚（72 hpf）分別浸泡在不同濃度 cisplatin（0.1、0.25、0.5 和 1% DMSO）和 cisplatin（馴養水）30 分鐘的處理。之後以 SIET 測量毛細胞機械性通道的鈣離子流入量做為毛細胞功能的指標。可以看到在 500 和 1000 µM 的處理之下鈣離子流入有明顯減少，與控制組比較約減少 80%、86%和 67%、78%。

實驗八：短時間（連續 30 分鐘）處理 cisplatin（500 µM）測量斑馬魚仔魚（72hpf）同一顆神經丘上毛細胞的鈣離子流入量。

圖十 C 以 SIET 連續測量毛細胞 30 分鐘，紅色箭頭為加入 500 µM cisplatin（馴養水），在加入 cisplatin 後毛細胞鈣離子流入逐漸降低，在 20 至 30 分鐘時，鈣離子流入約減少 66%。

討論

DMSO 的毒性

DMSO 是給藥時常用的溶劑，然而在最近的研究（Uribe et al., 2013）中，指出 DMSO（Dimethyl sulfoxide；0.5%）會加劇 cisplatin 誘發斑馬魚仔魚側線毛細胞的死亡。在文獻研究中，比較 5 dpf（day postfertilization）斑馬魚仔魚處理 1 mM cisplatin 4 個小時，以及除了 cisplatin 之外另外加入不同濃度 DMSO（0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%和 0.5%），結果顯示在有加入 DMSO（0.01%、0.05%、0.1%和 0.5%）的組別比單獨處理 cisplatin，其仔魚側線毛細胞的死亡數目顯著的增加。而在本論文實驗結果顯示，由 Fig. 1 的結果可得知 DMSO（0.05%和 0.1%）會加劇 cisplatin 所導致斑馬魚仔魚（0-96 hpf）的死亡。然而並不影響斑馬魚仔魚側線毛細胞和離子細胞的發育與功能（Fig. 2、3、7）。雖然還不知道 DMSO 增加 cisplatin 藥性的機制，在將來使用 DMSO 為藥物溶劑時必須考慮到他對藥物的協同作用(synergistic effect) 。

利用 SIET 測量斑馬魚仔魚體表離子細胞做為腎毒性藥物篩選方法的建立

在前人（Shiraishi et al., 2000）的研究中，使用大鼠（5mg/ kg）

做為模式，給予cisplatin兩天後，觀察到H^+-ATPase活性明顯的下降，這結果表示cisplatin造成腎臟上皮細胞的損傷，進而影響了腎小管的功能，導致近端腎小管的酸中毒。以斑馬魚仔魚做為cisplatin腎毒性藥物測試的研究（Hentschel et al., 2005）中，藉由注射到仔魚（48 hpf）心臟靜脈竇（4.6 nl，濃度1.5 mg/ml）的方式，在96 hpf 觀察到菊糖清除率下降，前腎管的病理組織學呈現上皮細胞空泡化（vacuolization）、刷狀緣（brush border）部分消失的現象。因此cisplatin在哺乳動物所引發的腎毒性，也在斑馬魚仔魚的前腎器官上出現典型的病理組織學變化及腎功能的下降。然而在魚類仔魚時期，前腎大部份的功能是在仔魚體表執行的，因此仔魚體表的細胞功能與型態都與腎臟的功能與型態比較相近（Chang and Hwang, 2011）。本論文以仔魚體表組織為模式，分析cisplatin的確對子魚體表離子細胞功能的影響。

在本論文實驗結果顯示長時間（0-96 hpf； Fig. 2A、B）處理cisplatin的斑馬魚仔魚，可以發現在100 μM的濃度處理之下顯著地抑制斑馬魚仔魚體表整體的排酸。而在10、50和100 μM的濃度處理之下顯著地抑制離子細胞的細胞功能（Fig. 2C、D）。從細胞染色的結果也可發現在100 μM的濃度處理之下仔魚卵黃表皮HR cell

（H^+-ATPase rich cell）與NaR cell（Na^+-ATPase rich cell）的數目顯著地減少（Fig. 3A－F）。以p63抗體標定表皮幹細胞的結果顯示在100 μM的濃度處理之下，表皮幹細胞數目也同樣顯著地減少（Fig. 3H）。這些結果顯示cisplatin不但會降低單一離子細胞的排氫功能，也會降低離子細胞的發育以及數目，最後使得仔魚整體的排酸降低。

另一方面在短時間（30 min）處理cisplatin的實驗結果顯示，仔魚整體的排酸並沒有顯著降低（Fig. 4A），但測定單一顆離子細胞的功能則可以發現在1000 μM的處理之下顯著地降低細胞氫離子排出的流量（Fig. 4B、C）。顯示在1000 μM的濃度之下，雖然整體看不出影響，但在細胞的層次上已經可以看到有抑制的現象。

由於文獻指出cisplatin會造成粒線體的傷害(Miller et al., 2010)，所以本論文以短時間（30 min）浸泡cisplatin並以粒線體染劑標定仔魚（72 hpf）體表的細胞粒線體。在1000 μM處理下斑馬魚仔魚富含粒線體細胞數目顯著下降（Fig. 5B、D）。而離子細胞數目並無減少（Fig. 6B、D）。由富含粒腺體細胞數目降低可知cisplatin確實會降低粒線體數目，而粒線體數目的降低減少了ATP的產生進一步可能影響斑馬魚仔魚離子細胞氫離子經由H^+-ATPase的排出。

在本實驗中以SIET技術做為測量斑馬魚仔魚體表整體排酸與單

一顆離子細胞氫離子排出功能，相較於前人的方法，本實驗更為直接觀察到cisplatin對於斑馬魚仔魚體表排酸與離子細胞排酸功能的影響，提供更直接的數據顯示出cisplatin如何影響此類專門進行離子運輸功能的離子細胞的影響。

利用SIET測量cisplatin對於斑馬魚仔魚側線毛細胞機械性通道功能的影響

在評估cisplatin造成毛細胞受損與死亡的研究中，前人使用5 dpf的斑馬魚仔魚處理各種濃度的cisplatin(10、25、50 and 100 µM)，再以DASPEI標定毛細胞，處理50 µM cisplatin 24小時後毛細胞數目顯著減少（Ton and Parng 2005）。短時間處理的研究，以5 dpf的斑馬魚仔魚處理cisplatin4個小時，再以FM1-43 FX標定毛細胞，結果顯示250、500 µM處理下毛細胞存活率約70%，750 µM約50%，而1000 µM約30%（Ou et al., 2007）。

本論文中以短時間（30 min）浸泡斑馬魚仔魚（72 hpf），結果顯示500 µM cisplatin的處理顯著降低斑馬魚仔魚毛細胞鈣離子流量（Fig. 10），並且不會造成細胞死亡。比較前人所使用cisplatin的濃度（Ou et al., 2007），以5 dpf的斑馬魚仔魚處理4個小時(250、500 µM)，造成毛細胞30%的死亡率。本實驗能在較早期且直接觀察到cisplatin

對於斑馬魚仔魚側線毛細胞功能所造成的影響。

另一方面在長時間（0-96 hpf）的處理之下，10 μM cisplatin顯著地降低斑馬魚仔魚側線毛細胞鈣離子流量（Fig. 7）以及減少毛細胞數目（Fig. 8A、C）。結果顯示長時間處理cisplatin使得毛細胞數目減少並造成功能喪失。在前人的研究中認為cisplatin造成毛細胞自由基增加是使得毛細胞死亡的原因之一（Rybak and Ramkumar, 2007），也有文獻給予抗氧化劑vitamin E, D-methionine, α-lipoic acid 和 Ebselen來保護毛細胞（Rybak and Whitworth, 2005），因此本論文在長時間（0-96 hpf）處理cisplatin（10 μM）的斑馬魚仔魚的同時給予抗氧化水，結果顯示，抗氧化水能夠保護毛細胞的功能不受cisplatin（10 μM）的傷害（Fig. 9），也保護側線毛細胞數目，無顯著減少（Fig. 8B、D），顯示抗氧化水對於斑馬魚仔魚側線毛細胞確實有保護作用。

前人對於毛細胞功能和毛細胞損傷的研究，大多採用DASPEI與fluorescent dye FM1–43等染色法或是藉由觀察魚類行為：auditory-evoke responses（驚嚇反應；startle response）、seeker response（Buck et al., 2012）等，來證明毛細胞機械性通道功能是否受損。本論文利用SIET技術偵測在處理cisplatin後對於毛細胞功能的影響，能夠更直接觀察藥物對於細胞功能的影響。

總結

1. 在這項研究中，我們發現，使用 DMSO（0.05%和 0.1%）加劇 cisplatin 導致斑馬魚仔魚（0-96 hpf）的死亡率。但並不影響到斑馬魚仔魚側線毛細胞和離子細胞的功能，提供將來實驗以 DMSO 當作溶劑的參考。
2. 短時間 cisplatin 的處理(1000 µM/ 30 min)降低表皮細胞粒線體的數目，進一步降低 ATP 的生產導致離子細胞經由 H^+-ATPase 排氫的功能下降。長時間 cisplatin 的處理(0-96 hpf)，不但降低單一個離子細胞的排氫功能(10 µM)，也減少離子細胞的數目與整體排酸的功能(100 µM)。
3. 短時間cisplatin的處理(500 µM/ 30 min)降低毛細胞機械性感測傳導通道的功能，長時間的處理降低毛細胞數目以及毛細胞功能(10 µM/ 0-96 hpf)，而在處理cisplatin同時給予抗氧化水可保護毛細胞。
4. 本論文建立以斑馬魚仔魚的表皮離子細胞以及毛細胞做為測試藥物腎毒性以及耳毒性的模式。

References

1. Ali, D. A., Abdeen, A. M., Ismail, M.F. and Mostafa, M. A. (2013). Histological, ultrastructural and immunohistochemical studies on the protective effect of ginger extract against cisplatin-induced nephrotoxicity in male rats. *Toxicology and Industrial Health*: 1–12.
2. Brannen, K. C., Panzica-Kelly, J. M., Danberry, T. L. and Augustine-Rauch, K. A. (2010). Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Research (Part B)* 89: 66–77.
3. Buck, L. M.J., Winter, M. J., Redfern, W. S. and Whitfield, T. T. (2012). Ototoxin-induced cellular damage in neuromasts disrupts lateral line function in larval zebrafish. *Hear Res* 284: 67–81.
4. Chien, C. T., Lee, P. H., Chen, C. F., Ma, M. C., Lai, M. K. and Hsu, S. M. (2001). De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/ reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 12 (5): 973–982.
5. Chiu, L. L., Cunningham, L. L., Raible, D. W., Rubel, E. W. and Ou, H. C. (2008). Using the zebrafish lateral line to screen for ototoxicity. *J Assoc Res Otolaryngol* 9: 178–190.
6. Chang, W. J. and Hwang, P. P. (2011). Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Research (Part C)* 93: 205–214.
7. Coffin, A. B., Williamson, K. L., Mamiya, A., Raible, D. W. and Rubel, E. W. (2013). Profiling drug-induced cell death pathways in the zebrafish lateral line. *Apoptosis* 18: 393–408.

8. Dijkgraaf, S. (1989). A short personal review of the history of lateral line research. In: Coombs, S., Görner, P., Münz, H. (Eds.), The mechanosensory lateral line. Neurobiology and Evolution. Springer-Verlag, New-York, pp. 7-14.
9. Ding, D., He, J., Allman, B. L., Yu, D., Jiang, H., Seigel, G. M. and Salvi, R. J. (2011). Cisplatin ototoxicity in rat cochlear organotypic cultures. *Hear Res* 282: 196-203.
10. Dos Santos, N. A. G., Carvalho Rodrigues, M. A., Martins, N. M. and Dos Santos, A. C. (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol* 86 (8): 1233–1250.
11. Dymowska, A. K., Hwang, P. P. and Goss, G. G. (2012). Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respir Physiol Neurobiol* 1; 184 (3): 282–292.
12. Filipski, K. K., Loos, W. J., Verweij, J., Sparreboom, A. (2008). Interaction of cisplatin with the human organic cation transporter 2. *Clin Cancer Res* 14: 3875–3880.
13. Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol* 14 (1): 67–73.
14. Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C. and Raible, D. (2007). Making sense of zebrafish neural development in the Minervois. *Neural Dev* 2:15.

15. Giari, L., Dezfuli, B.S., Astolfi , L. and Martini, A. (2012). Ultrastructural effects of cisplatin on the inner ear and lateral line system of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J Appl Toxicol* 32: 293–299.
16. Hwang, P. P., Lee, T. H., Weng, C. F., Fang, M. J. and Cho, G. Y. (1999). Presence of Na-K-ATPase in mitochondria-rich cells in the yolk-sac epithelium of larvae of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *Physiol Biochem Zool* 72 (2): 138–144.
17. Hiroi, J., Kaneko, T. and Tanaka, M. (1999). In vivo sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation. *J Exp Biol* 202 Pt 24: 3485–3495.
18. Hentschel, D. M., Park, K. M., Cilenti, L., Zervos, A. S., Drummond, I. and Bonventre, J. V. (2005). Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: 923–929.
19. Huang, K. C., Yang, C. C., Lee, K. T. and Chien, C. T. (2003). Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney Int* 64(2):704–714.
20. Horng, J. L., Lin, L. Y., Huang, C. J., Katoh, F., Kaneko, T. and Hwang, P. P. (2007). Knockdown of V-ATPase subunit A (*atp6v1a*) impairs acid secretion and ion balance in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292 (5): 2068–2076.

21. Hwang, P. P., Lee, T. H. (2007). New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148 (3): 479–497.

22. Huang, K. C., Hsu, S. P., Yang, C. C., Ou-Yang, P., Lee, K. T., Morisawa, S., Otsubo, K. and Chien, C. T. (2010). Electrolysed-reduced water dialysate improves T-cell damage in end-stage renal disease patients with chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 25 (8): 2730–2737.

23. Hirose, Y., Simon, J. A. and Ou, H. C. (2011). Hair cell toxicity in anti-cancer drugs: evaluating an anticancer drug library for independent and synergistic toxic effects on hair cells using the zebrafish lateral line. *J Assoc Res Otolaryngol* 12: 719–728.

24. Hailey, D. W., Roberts, B., Owens, K. N., Stewart, A. K., Linbo, T., Pujol, R., Alper, S. L., Rubel, E. W. and Raible, D. W. (2012). Loss of Slc4a1b chloride/ bicarbonate exchanger function protects mechanosensory hair cells from aminoglycoside damage in the zebrafish mutant persephone. *PLoS Genet* 8 (10): e1002971.

25. Howell, S. B., Safaei, R., Larson, C. A. and Sailor, M. J. (2010). Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol* 77: 887–894.

26. Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14298–14302.

27. Kruidering, M., Van de Water, B., de Heer, E., Mulder, G.J. and Nagelkerke, J. F. (1997). Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine

proximal tubular cells: Mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 280： 638–649.

28. Kaneko, T., Shiraishi, K., Katoh, F., Hasegawa, S. and Hiroi, J. (2002). Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. *Fisheries Sci* 68: 1–9.
29. Lin, L. Y. and Hwang, P. P. (2001). Modification of morphology and function of integument mitochondria-rich cells in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to ambient chloride levels. *Physiol Biochem Zool* 74 (4): 469–476.
30. Lin, L. Y. and Hwang, P. P. (2004). Mitochondria-rich cell activity in the yolk-sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae acclimatized to different ambient chloride levels. *J Exp Biol* 207 (Pt 8): 1335–1344.
31. Li, S., Basnakian, A., Bhatt, R., Megyesi, J., Gokden, N., Shah, S.V. and Portilla, D. (2004). PPAR-alpha ligand ameliorates acute renal failure by reducing cisplatin-induced increased expression of renal endonuclease G. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: 990–998.
32. Li, S., Wu, P., Yarlagadda, P., Vadjunec, N.M., Proia, A.D., Harris, R.A. and Portilla, D. (2004). PPAR alpha ligand protects during cisplatin-induced acute renal failure by preventing inhibition of renal FAO and PDC activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 572–580.

33. Lin, L. Y., Horng, J. L., Kunkel, J. G. and Hwang, P. P. (2006). Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: 371–378.

34. Liao, C., Hu, B., Arno, M. J. and Panaretou, B. (2007). Genomic screening in vivo reveals the role played by vacuolar H^+ ATPase and cytosolic acidification in sensitivity to DNA-damaging agents such as cisplatin. *Mol Pharmacol* 71: 416–425.

35. Lin, L. Y., Pang, W., Chuang, W. M., Hung, G. Y., Lin, Y. H. and 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* 15; 305(10): 1060–1068.

36. Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G. and Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* 2: 2490–2518.

37. Mackenzie, S. M. and Raible, D. W. (2012). Proliferative regeneration of zebrafish lateral line hair cells after different ototoxic insults. *PLoS One* 7 (10): e47257.

38. Nicolson, T. (2005). The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu Rev Genet* 39: 9–22.

39. Nayak, G. D., Ratnayaka, H. S., Goodyear, R. J. and Richardson, G. P. (2007). Development of the hair bundle and mechanotransduction.

Int J Dev Biol 51 (6-7): 597–608.

40. Ou, H. C., Raible, D. W. and Rubel, E. W. (2007). Cisplatin-induced hair cell loss in zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Hear Res* 233: 46–53.

41. Portilla, D., Dai, G., McClure, T., Bates, L., Kurten, R., Megyesi, J., Price, P. and Li, S. (2002). Alterations of PPAR alpha and its coactivator PGC-1 in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int* 62: 1208–1218.

42. Pan, T. C., Liao, B. K., Huang, C. J., Lin, L. Y. and Hwang, P. P. (2005). Epithelial Ca^{2+} channel expression and Ca^{2+} uptake in developing zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289 (4): 1202–1211.

43. Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205 (4972): 698–699.

44. Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J. E., Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222 (5191): 385–386.

45. Rybak, L. P. and Whitworth, C. A. (2005). Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov Today* 10 (19): 1313–1321.

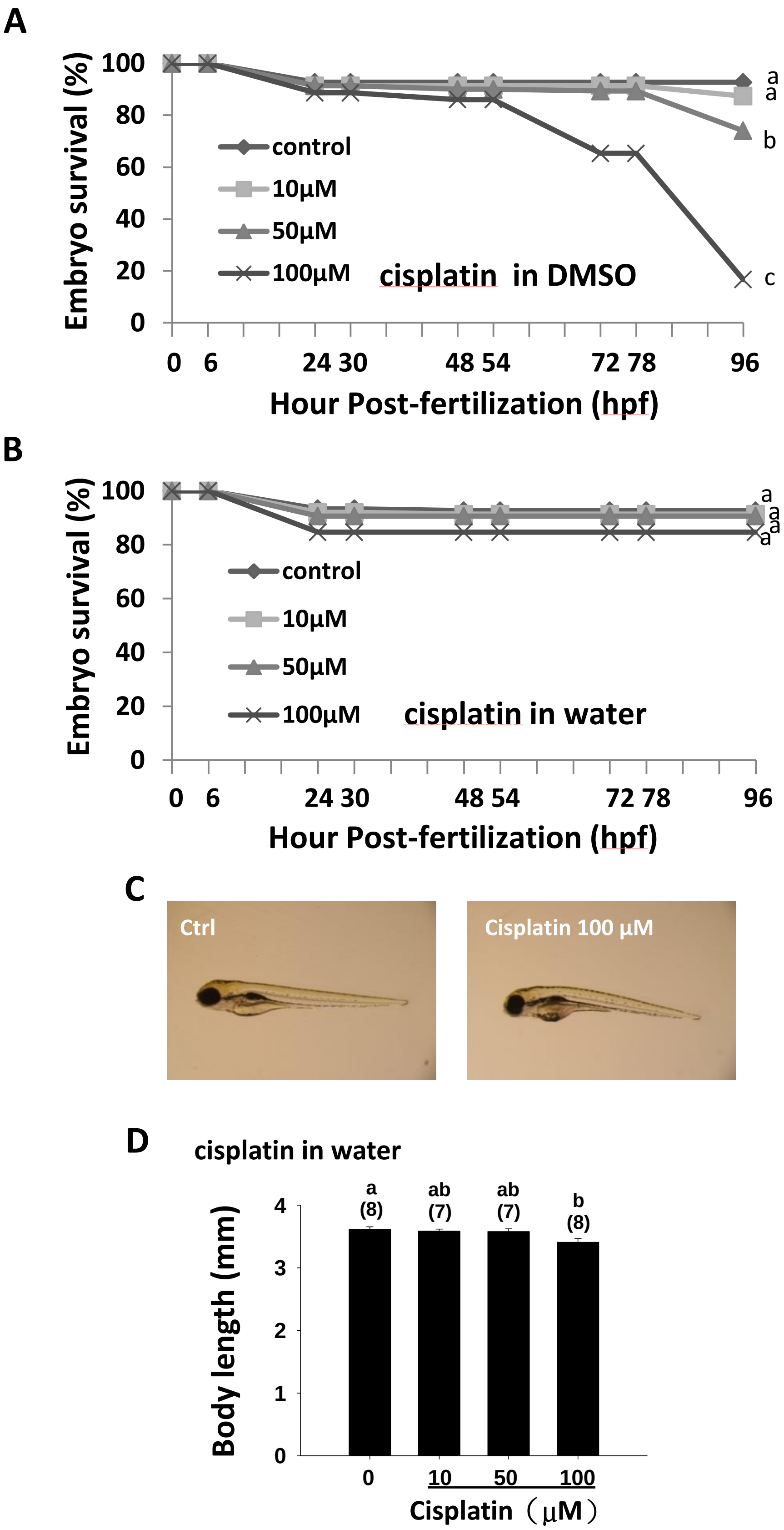
46. Rybak, L. P. and Ramkumar, V. (2007). Ototoxicity. *Kidney Int* 72 (8): 931–935.

47. Rybak, L. P., Whitworth, C. A., Mukherjea, D. and Ramkumar, V. (2007). Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 226 (1–2): 157–167.

48. Shiraishi, Y., Nagai, J., Murakami, T. and Takano, M. (2000). Effect of cisplatin on H^+ transport by H^+– ATPase and Na^+/H^+ exchanger in rat renal brush-border membrane. *Life Sciences* 67: 1047–1058.
49. Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* 63: 12–31.
50. Shih, T. H., Horng, J. L., Hwang, P. P. and Lin, L. Y. (2008). Ammonia excretion by the skin of zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (6): 1625–1632.
51. Sahu, B. D., Rentam, K. K., Putcha, U. K., Kuncha, M., Vegi, G.M. and Sistla R. (2011). Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol* 49 (12): 3090–3097.
52. Stewart, J. D. and Bolt, H. M. (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity. *Arch Toxicol* 86 (8): 1155–1156.
53. Takano, M., Nakanishi, N., Kitahara, Y, Sasaki, Y., Murakami T. and Nagai, J. (2002). Cisplatin-induced inhibition of receptor-mediated endocytosis of protein in the kidney. *Kidney International* Vol. 62: 1707–1717.
54. Ton, C. and Parng, C. (2005). The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents. *Hear Res* 208: 79–88.
55. Thomas, A. J., Hailey, D. W., Stawicki, T. M., Wu, P., Coffin, A. B., Rubel, E. W., Raible, D. W., Simon, J. A. and Ou, H. C. (2013). Functional mechanotransduction is required for cisplatin-induced hair cell death in the zebrafish lateral line. *J Neurosci* 33 (10): 4405–4414.

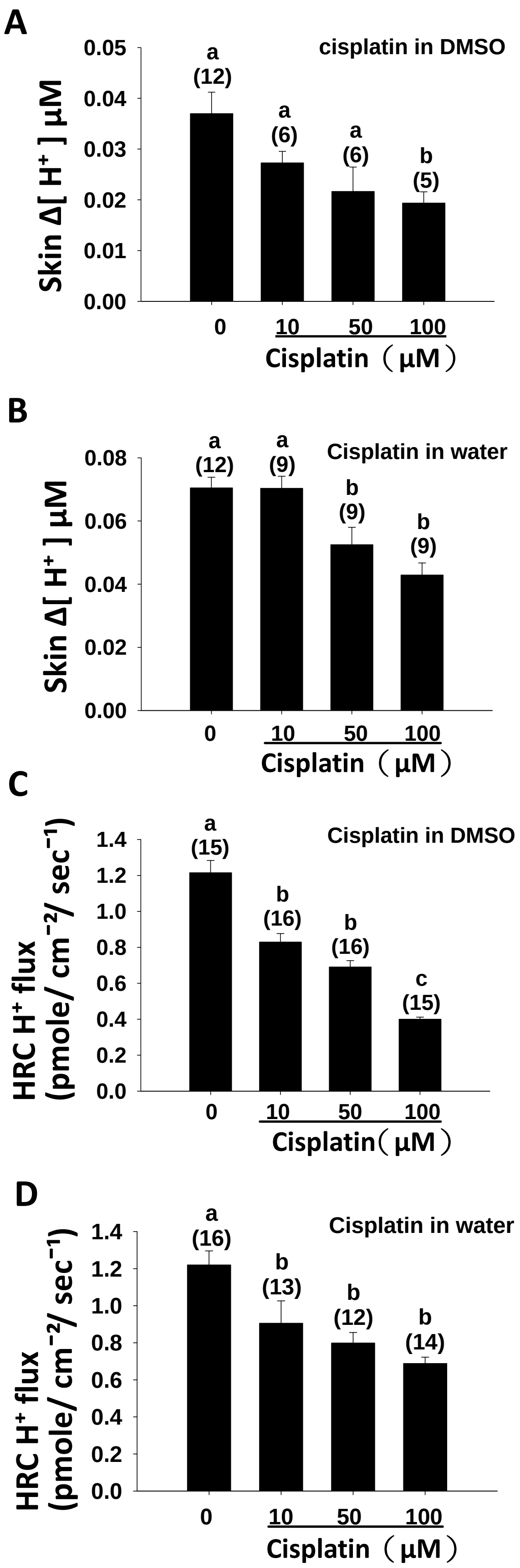
56. Uribe, P. M., Mueller M. A., Gleichman, J. S., Kramer, M. D., Wang, Q., Sibrian-Vazquez, M., Strongin, R. M., Steyger, P. S., Cotanche, D. A. and Matsui, J. I. (2013). Dimethyl Sulfoxide (DMSO) exacerbates cisplatin induced sensory hair cell death in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One* 8 (2): e55359.
57. Vlasits, A. L., Simon, J. A., Raible, D. W., Rubel, E. W. and Owens, K. N. (2012). Screen of FDA-approved drug library reveals compounds that protect hair cells from aminoglycosides and cisplatin. *Hear Res* 294 : 153–165.
58. Williams, J.A. and Holder, N. (2000). Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res* 143 (1-2): 171–181.
59. Yan,J. J.,Chou, M. Y., Kaneko, T. and Hwang, P. P. (2007). Gene expression of Na^+/H^+ exchanger in zebrafish H^+-ATPase-rich cells during acclimation to low-Na^+ and acidic environments. *Am J Physiol Cell Physiol* 293 (6): 1814–1823.

圖表



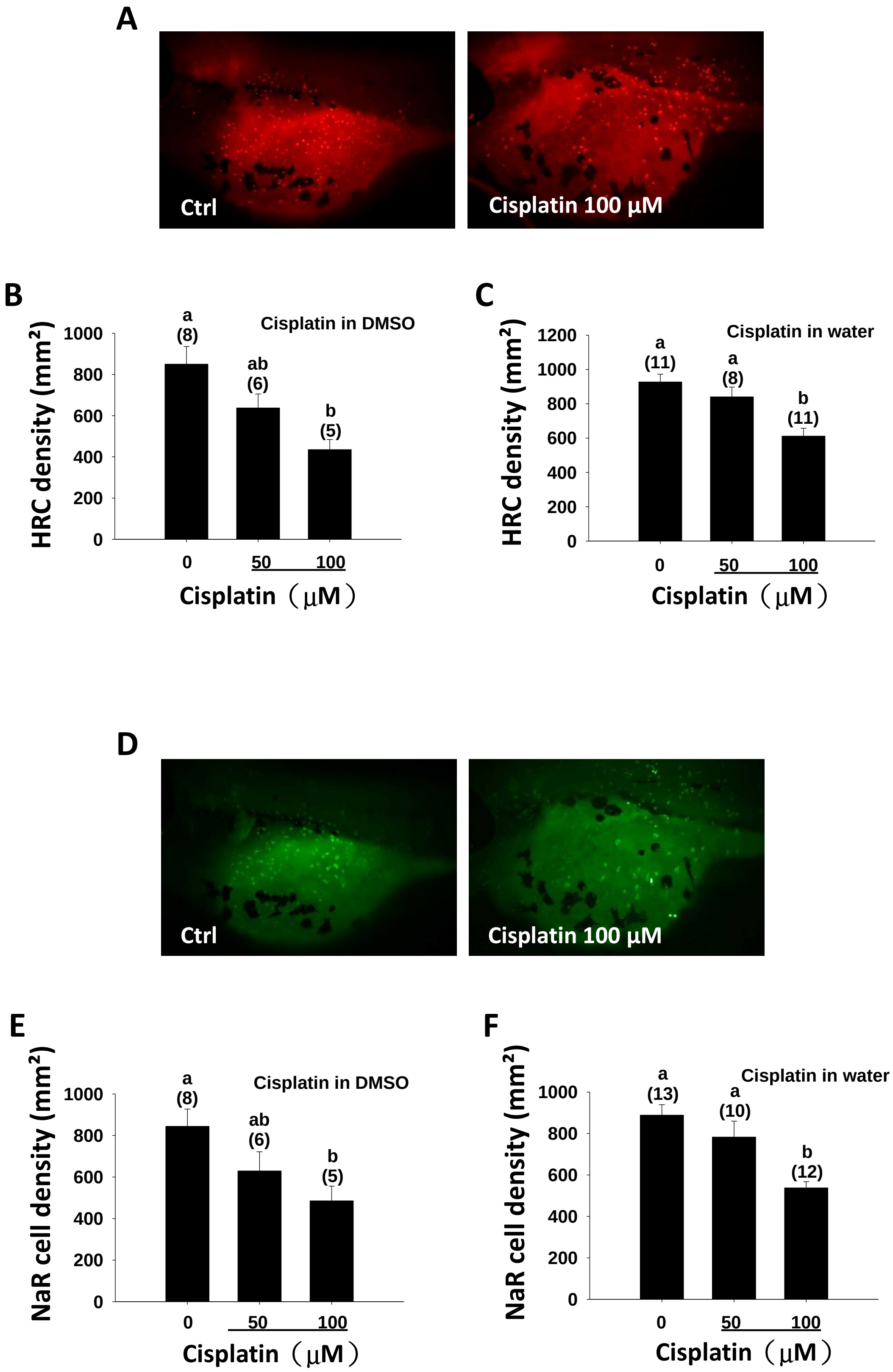
A
Embryo survival (%)
100
80
60
40
20
0
control
10μM
50μM
100μM
cisplatin in DMSO
a
a
b
c
0 6 24 30 48 54 72 78 96
Hour Post-fertilization (hpf)
B
Embryo survival (%)
control
10μM
50μM
100μM
cisplatin in water
a
a
a
a
0 6 24 30 48 54 72 78 96
Hour Post-fertilization (hpf)
C
Ctrl
Cisplatin 100 μM
D
cisplatin in water
Body length (mm)
a
(8)
ab
(7)
ab
(7)
b
(8)
0 10 50 100
Cisplatin（μM）

圖 1.斑馬魚仔魚以 cisplatin 馴養 0-96 hpf 存活率及外觀型態。(A)斑馬魚仔魚(0-96 hpf)馴養在 0、10、50 和 100 µM cisplatin(0.01、0.05 和 0.1% DMSO)。(B)斑馬魚仔魚(0-96 hpf)馴養在 0、10、50 和 100 µM cisplatin(馴養水)。(C)斑馬魚仔魚(0-96 hpf)馴養在 0 和 100 µM cisplatin(馴養水),並在 96 hpf 紀錄外觀型態。(D)斑馬魚仔魚(0-96 hpf)馴養在 0、10、50 和 100 µM cisplatin(馴養水),並在 96 hpf 測量體長,在 100 µM 的處理之下,斑馬魚仔魚體長顯著減少。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果,不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異(p<0.05)。數據為 means ± SEs(樣本數標示於圖中)。

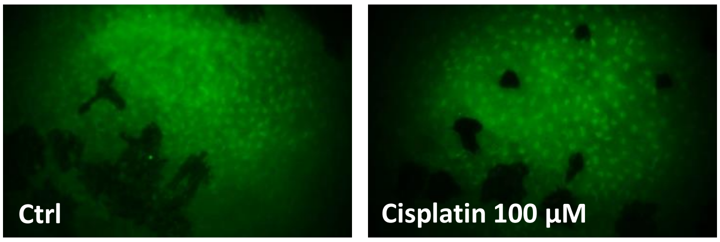


A
cisplatin in DMSO
Skin Δ[H+] µM
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
a (12)
a (6)
a (6)
b (5)
0
10
50
100
Cisplatin（µM）
B
Cisplatin in water
Skin Δ[H+] µM
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
a (12)
a (9)
b (9)
b (9)
0
10
50
100
Cisplatin（µM）
C
Cisplatin in DMSO
HRC H+ flux (pmole/ cm−2/ sec−1)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a (15)
b (16)
b (16)
c (15)
0
10
50
100
Cisplatin（µM）
D
Cisplatin in water
HRC H+ flux (pmole/ cm−2/ sec−1)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a (16)
b (13)
b (12)
b (14)
0
10
50
100
Cisplatin（µM）

圖 2.cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養的斑馬魚仔魚（0-96 hpf）卵黃囊表面排酸及離子細胞氫離子流量。(A)和(B)分別為處理 0-96 hpf cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO）和 cisplatin(馴養水)。100 μM 的馴養處理顯著地抑制斑馬魚仔魚體表的排酸。(C) 和 (D) 分別為處理 0-96 hpf cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO）和 cisplatin（馴養水)。10、50 和 100 μM 的處理顯著地抑制斑馬魚仔魚離子細胞的氫離子流量。abcde 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p<0.05$)。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中)。


A
Ctrl
Cisplatin 100 μM
B
Cisplatin in DMSO
HRC density (mm²)
1000
800
600
400
200
0
a
(8)
ab
(6)
b
(5)
0
50
100
Cisplatin（μM）
C
Cisplatin in water
HRC density (mm²)
1200
1000
800
600
400
200
0
a
(11)
a
(8)
b
(11)
0
50
100
Cisplatin（μM）
D
Ctrl
Cisplatin 100 μM
E
Cisplatin in DMSO
NaR cell density (mm²)
1000
800
600
400
200
0
a
(8)
ab
(6)
b
(5)
0
50
100
Cisplatin（μM）
F
Cisplatin in water
NaR cell density (mm²)
1000
800
600
400
200
0
a
(13)
a
(10)
b
(12)
0
50
100
Cisplatin（μM）

G


Ctrl
Cisplatin 100 μM

H

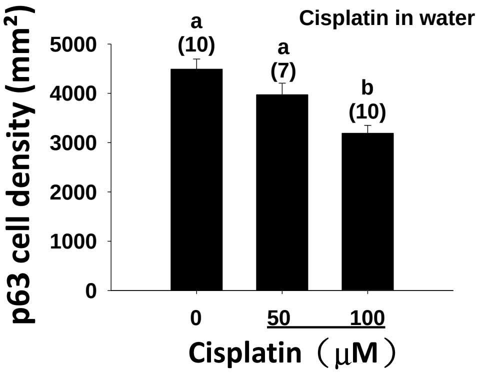

Cisplatin in water
p63 cell density (mm²)
5000
4000
3000
2000
1000
0
a
(10)
a
(7)
b
(10)
0
50
100
Cisplatin (μM)

圖 3. cisplatin（0、10、50 和 100 μM）馴養的斑馬魚仔魚（0-96 hpf）離子細胞數目。（A、D 和 G）為處理 0-96 hpf cisplatin（馴養水）之後 HR cell、NaR cell 和 p63 的影像。（B）和（C）分別為處理 0-96 hpf cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO）和 cisplatin（馴養水）之後，計算斑馬魚仔魚 HR cell（H^+-ATPase rich cell）的細胞數目。在 100 μM 的濃度下顯著地減少。（E）和（F）分別為處理 0-96 hpf cisplatin（0.01、0.05 和 0.1% DMSO）和 cisplatin（馴養水）之後，計算斑馬魚仔魚的 NaR cell（Na^+-ATPase rich cell）的細胞數目。在處理 100 μM 的濃度下也顯著地減少。（H）處理 0-96 hpf cisplatin（馴養水）之後斑馬魚仔魚的表皮幹細胞 p63 數目，在 100 μM 的濃度下同樣顯著地減少。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p < 0.05$）。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。

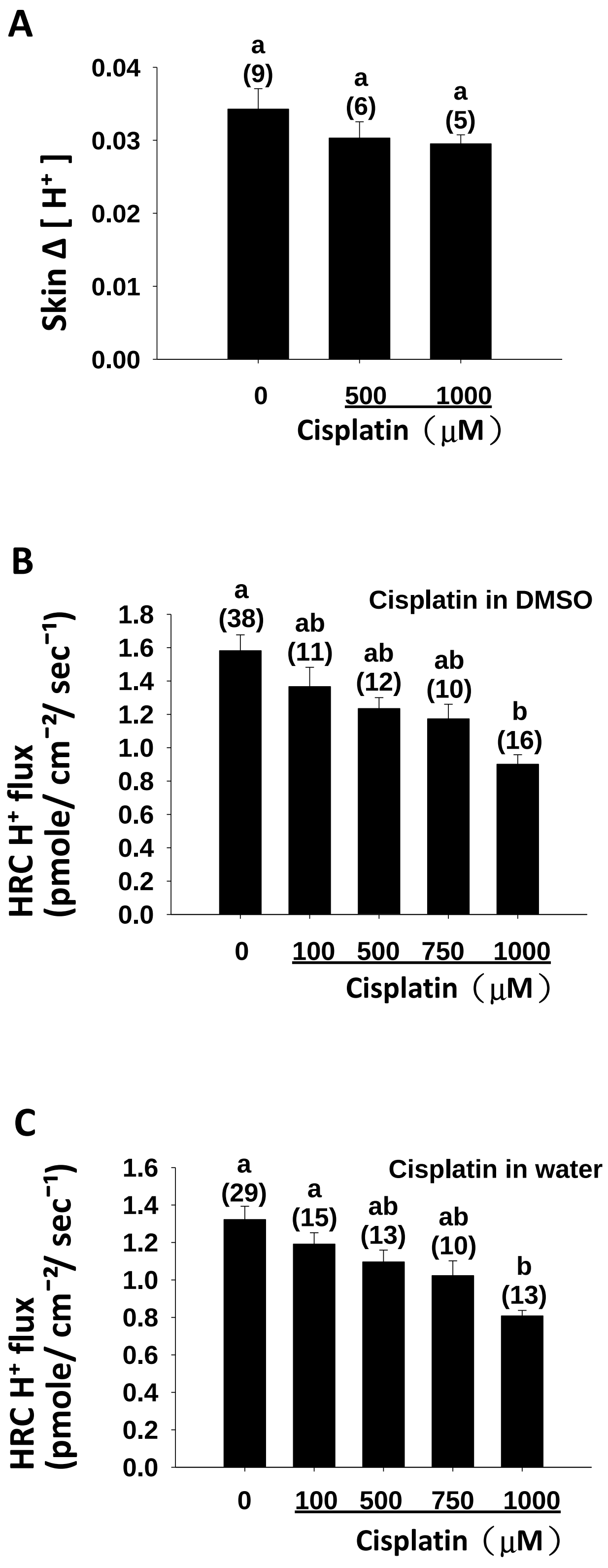

A
a
(9)
a
(6)
a
(5)
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Skin Δ [H+]
0
500
1000
Cisplatin（μM）
B
Cisplatin in DMSO
a
(38)
ab
(11)
ab
(12)
ab
(10)
b
(16)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
HRC H+ flux
(pmole/ cm-2/ sec-1)
0
100
500
750
1000
Cisplatin（μM）
C
Cisplatin in water
a
(29)
a
(15)
ab
(13)
ab
(10)
b
(13)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
HRC H+ flux
(pmole/ cm-2/ sec-1)
0
100
500
750
1000
Cisplatin（μM）

圖 4. 浸泡 cisplatin（0、100、500、750 和 1000 μM，30 分鐘）的斑馬魚仔魚（72hpf）卵黃囊表面排酸和離子細胞氫離子流量。（A）浸泡 0、500 和 1000 μM cisplatin（0.5 和 1% DMSO）30 分鐘後並無顯著降低斑馬魚仔魚卵黃囊的排酸。（B）和（C）分別為浸泡 cisplatin（0.1、0.5、0.75 和 1% DMSO）和 cisplatin（馴養水）30 分鐘後測量仔魚離子細胞氫離子流量。1000 μM 的處理之下，顯著地降低離子細胞氫離子流量。abcde 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p<0.05$）。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。

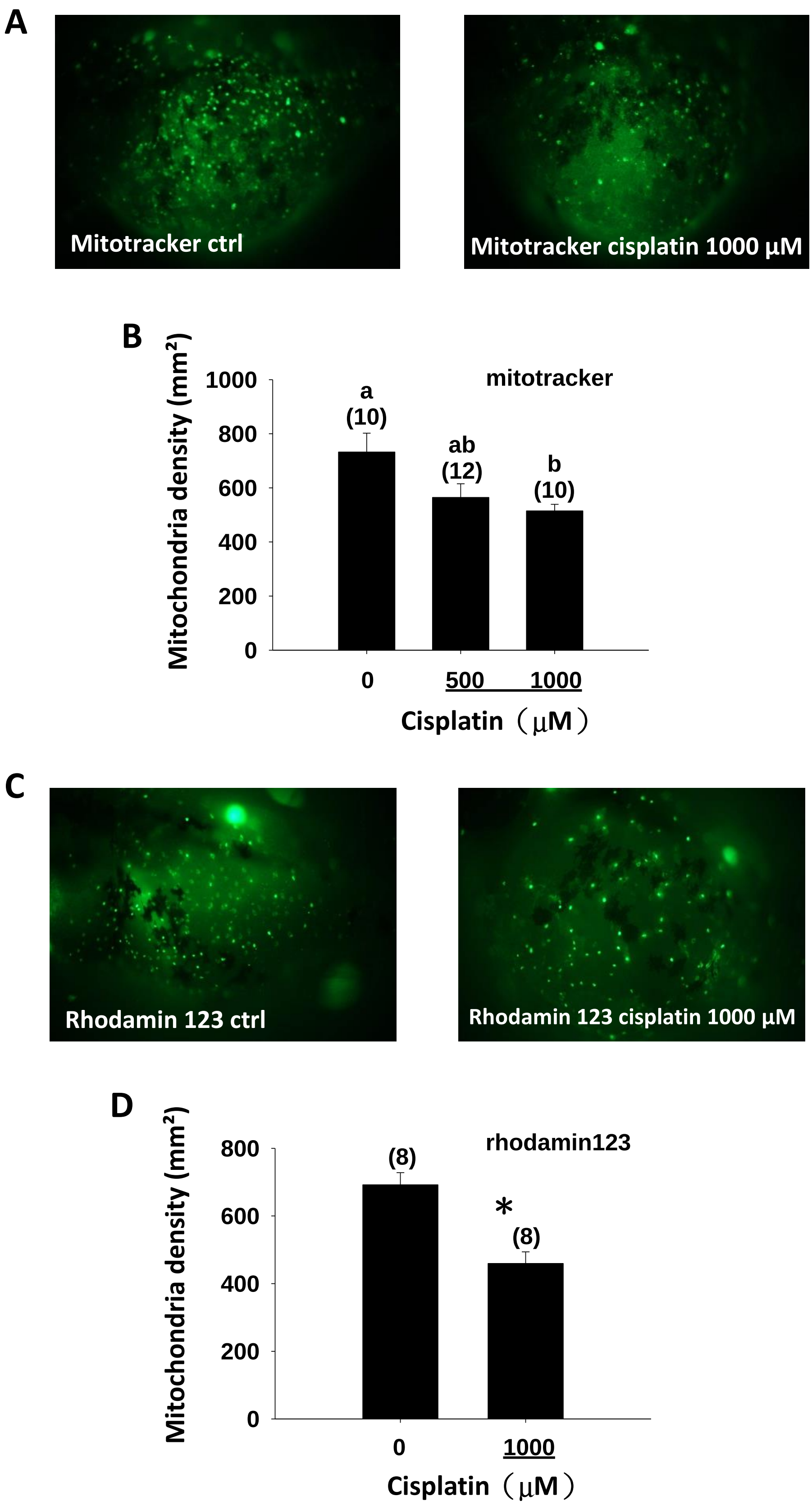

A
Mitotracker ctrl
Mitotracker cisplatin 1000 μM
B
Mitochondria density (mm²)
1000
800
600
400
200
0
mitotracker
a
(10)
ab
(12)
b
(10)
0
500
1000
Cisplatin（μM）
C
Rhodamin 123 ctrl
Rhodamin 123 cisplatin 1000 μM
D
Mitochondria density (mm²)
800
600
400
200
0
rhodamin123
(8)
*
(8)
0
1000
Cisplatin（μM）

圖 5.浸泡 cisplatin（0、500、1000 μM，30 分鐘）的斑馬魚仔魚（72hpf）粒線體數目。（A 和 C）為斑馬魚仔魚浸泡 cisplatin 30 分鐘以 mitotracker 和 rhodamin 123 螢光染劑染富含粒腺體細胞的影像。（B）斑馬魚仔魚（72hpf）浸泡 cisplatin（馴養水）30 分鐘後以 mitotracker 螢光染劑計算富含粒腺體細胞數目。在 1000 μM 處理下斑馬魚仔魚富含粒腺體細胞數目顯著下降。（D）斑馬魚仔魚（72hpf）浸泡 cisplatin（馴養水）30 分鐘後以 rhodamin 123 螢光染劑計算富含粒腺體細胞數目。1000 μM 處理也顯著地降低斑馬魚仔魚富含粒腺體細胞數目。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p<0.05$）。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。

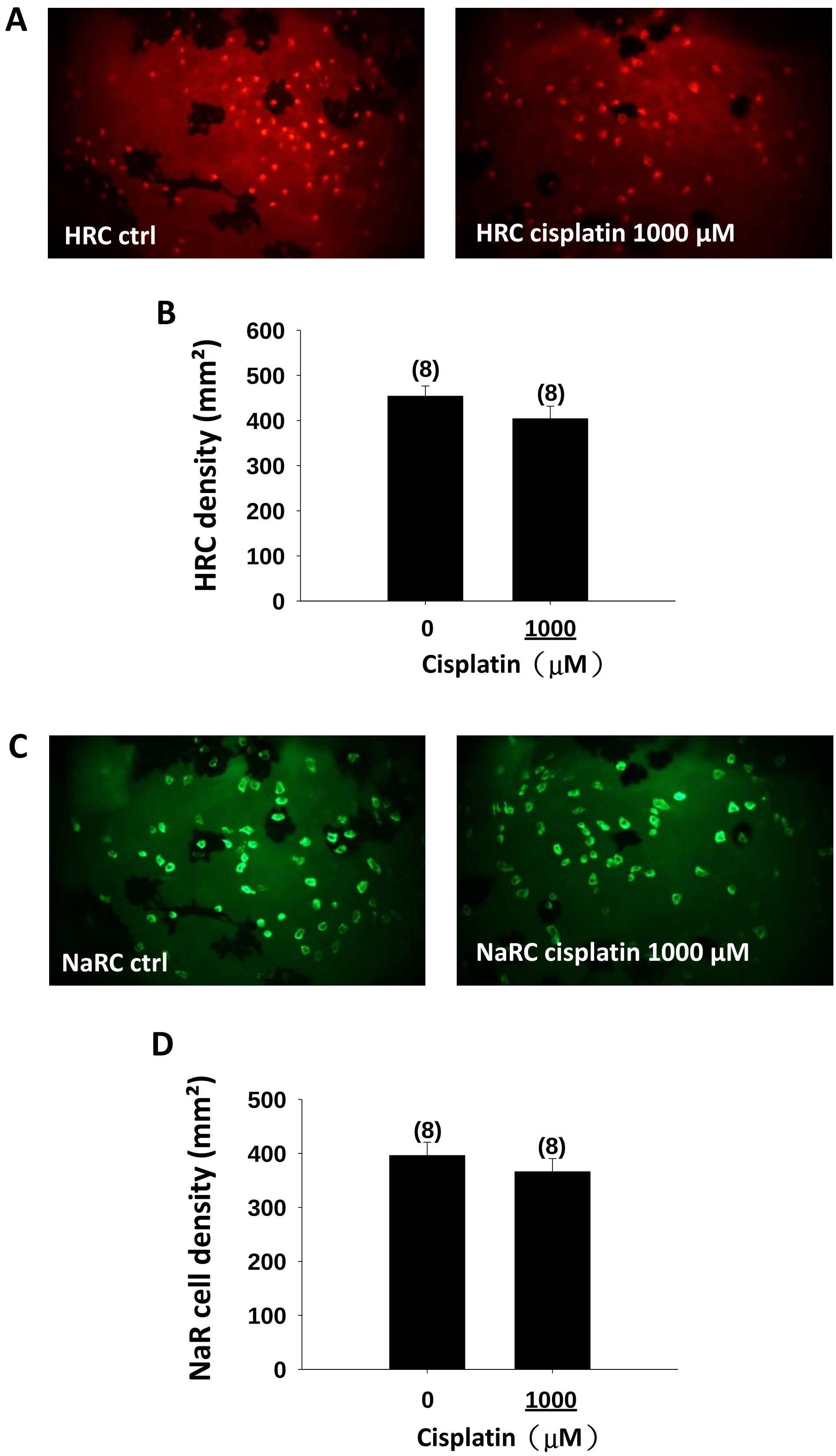

A
HRC ctrl
HRC cisplatin 1000 µM
B
HRC density (mm2)
600
500
400
300
200
100
0
(8)
(8)
0
1000
Cisplatin（µM）
C
NaRC ctrl
NaRC cisplatin 1000 µM
D
NaR cell density (mm2)
500
400
300
200
100
0
(8)
(8)
0
1000
Cisplatin（µM）

圖 6. 浸泡 cisplatin（0 和 1000 μM，30 分鐘）的斑馬魚仔魚（72hpf）離子細胞數目。（A 和 C）為斑馬魚仔魚浸泡 cisplatin（馴養水）30 分鐘之後 HR cell 和 NaR cell 的影像。（B）斑馬魚仔魚（72hpf）浸泡 cisplatin（馴養水）30 分鐘後，計算斑馬魚仔魚 HR cell（H^+-ATPase rich cell）的細胞數目。（D）斑馬魚仔魚（72hpf）浸泡 cisplatin（馴養水）30 分鐘之後計算斑馬魚仔魚的 NaR cell（Na^+-ATPase rich cell）的細胞數目。（B 和 D）在處理 1000 μM 的濃度下，離子細胞數目皆無顯著減少。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p < 0.05$）。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。

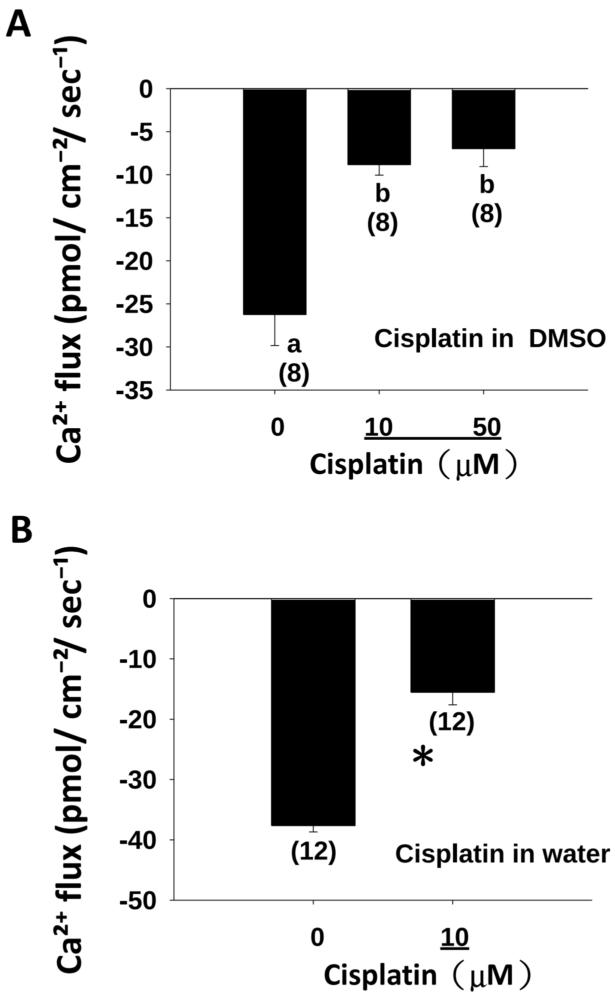


圖 7. cisplatin（0、10 和 50 μM）馴養的斑馬魚仔魚（0-96 hpf）側線毛細胞的鈣離子流量。(A）和（B）為仔魚馴養 cisplatin（0.01 和 0.05 % DMSO）和 cisplatin（馴養水）0-96 hpf，並在 96 hpf 測量毛細胞鈣離子流。10 μM 的處理顯著地降低斑馬魚仔魚側線毛細胞鈣離子流量。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p < 0.05$）。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。

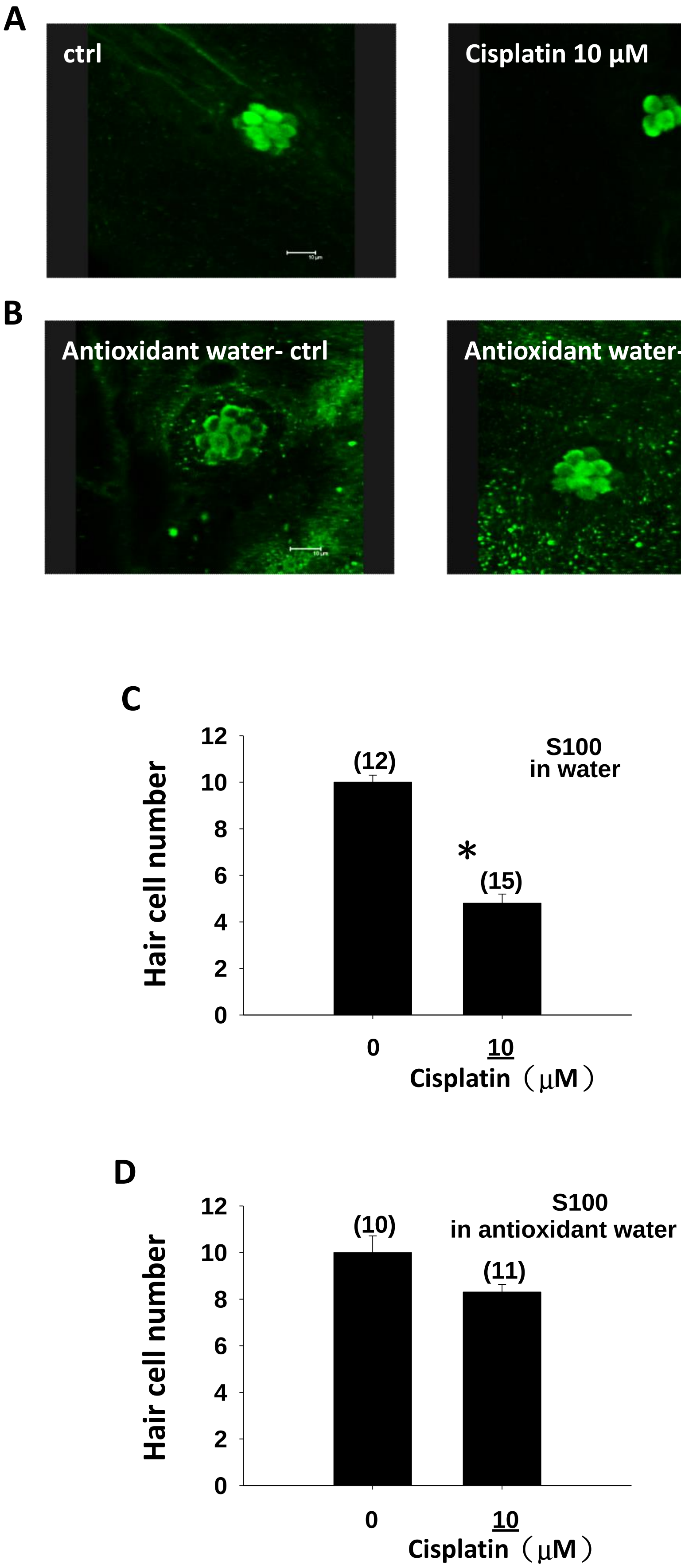
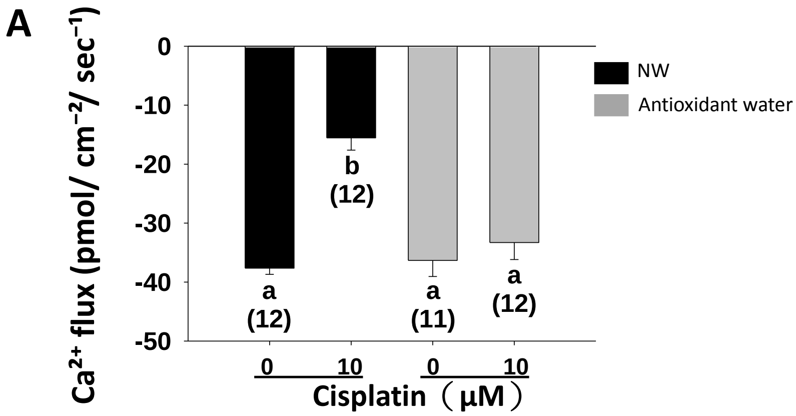

A
ctrl
Cisplatin 10 μM
B
Antioxidant water- ctrl
Antioxidant water- 10 μM
C
Hair cell number
0
2
4
6
8
10
12
(12)
*
(15)
S100
in water
0
10
Cisplatin（μM）
D
Hair cell number
0
2
4
6
8
10
12
(10)
(11)
S100
in antioxidant water
0
10
Cisplatin（μM）

圖 8. cisplatin（0、10 μM）馴養的斑馬魚仔魚（0-96 hpf）側線毛細胞數目。（A）和（B）分別為仔魚馴養在 cisplatin（馴養水）和 cisplatin（抗氧化水）0-96 hpf 之後以 S100 抗體標記的毛細胞的共軛焦顯微鏡（confocal）影像。（C）為 10 μM cisplatin（馴養水）處理下側線毛細胞數目顯著地減少。（D）為 10 μM cisplatin n（抗氧化水）處理下側線毛細胞數目並無顯著地差異。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p < 0.05$）。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。



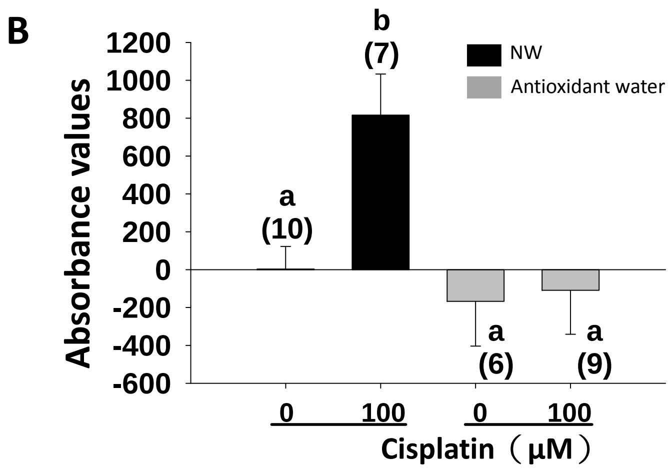


圖 9. cisplatin（0、10 μM）馴養在馴養水和抗氧化水中，斑馬魚仔魚（0-96 hpf）側線毛細胞的鈣離子流量及 ROS 含量。（A）在 10 μM cisplatin（馴養水）的馴養之下毛細胞的鈣離子流量顯著地減少，而在 10 μM cisplatin（抗氧化水）的馴養之下毛細胞的鈣離子流量則無變化。（B）在 10 μM cisplatin（馴養水）的馴養之下仔魚 ROS 含量明顯上升，而在 10 μM cisplatin（抗氧化水）的馴養之下仔魚 ROS 含量則無變化。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母示不同濃度處理之間具有顯著差異($p<0.05$)。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。

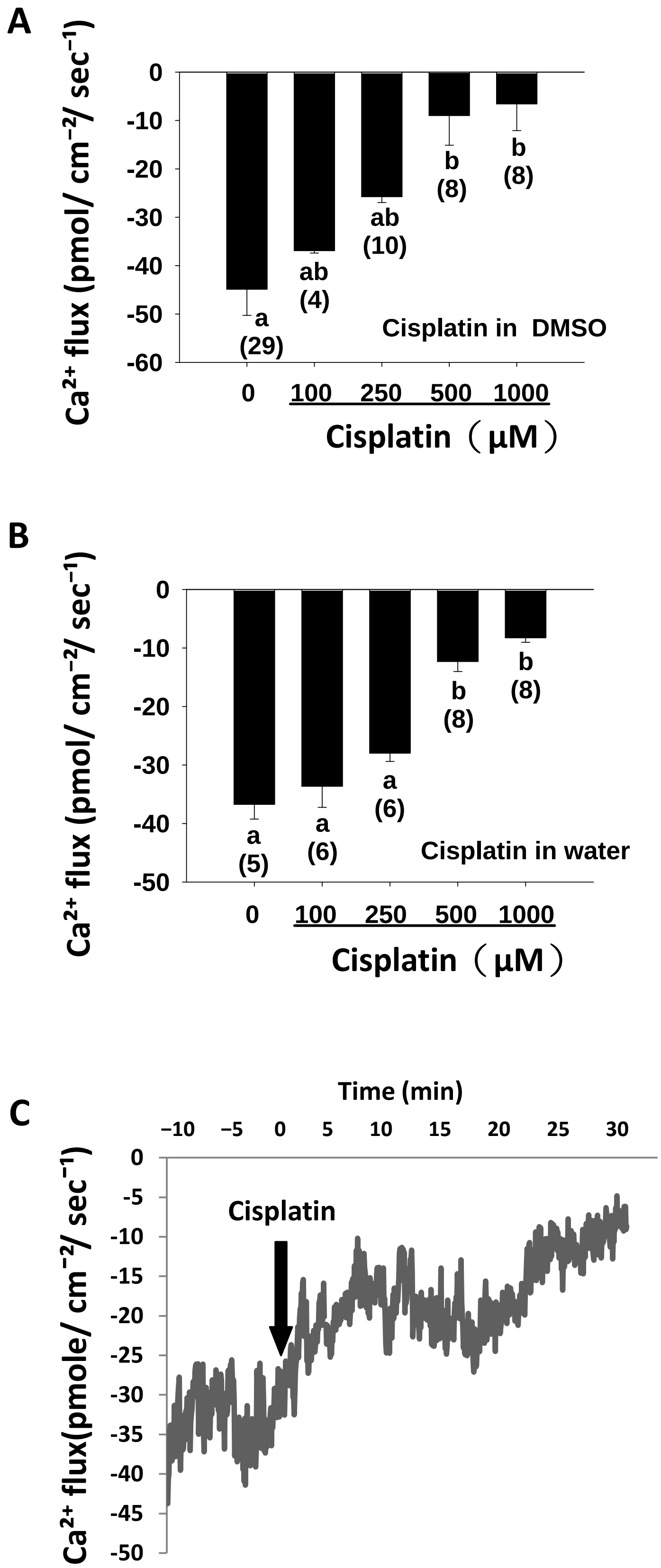

A
Ca²⁺ flux (pmol/ cm⁻²/ sec⁻¹)
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
a
(29)
ab
(4)
ab
(10)
b
(8)
b
(8)
Cisplatin in DMSO
0
100 250 500 1000
Cisplatin（μM）
B
Ca²⁺ flux (pmol/ cm⁻²/ sec⁻¹)
0
-10
-20
-30
-40
-50
a
(5)
a
(6)
a
(6)
b
(8)
b
(8)
Cisplatin in water
0
100 250 500 1000
Cisplatin（μM）
C
Time (min)
−10 −5 0 5 10 15 20 25 30
Ca²⁺ flux(pmole/ cm⁻²/ sec⁻¹)
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
-45
-50
Cisplatin

圖 10. 浸泡 cisplatin（0、100、250、500 和 1000 μM，30 分鐘）的斑馬魚仔魚（72 hpf）側線毛細胞的鈣離子流量。（A）和（B）分別為 cisplatin（0.1、0.25、0.5 和 1% DMSO）和 cisplatin（馴養水）處理之下側線毛細胞鈣離子流量。結果顯示 500 μM 處理顯著地降低斑馬魚仔魚毛細胞鈣離子流量。（C）為連續測量單一毛細胞 30 分鐘，箭頭為加入 cisplatin 500 μM。[abcde] 利用 One-way ANOVA, Tukey's test 比較試驗結果，不同字母顯示不同濃度處理之間具有顯著差異（$p<0.05$）。數據為 means ± SEs（樣本數標示於圖中）。