

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052006

Hsp90 對果蠅抵禦奈米銀毒性之探討

學校名稱：國立臺南第一高級中學

作者： 高二 魏竣瀚	指導老師： 林靜吟
---------------	--------------

關鍵詞：奈米銀、果蠅、熱休克蛋白

摘要

奈米銀具優良的抗菌活性，市面上有越來越多標榜含奈米銀之產品。許多的細胞與動物實驗已指出奈米銀有潛在毒性，然而毒性的細胞與分子機轉仍需進一步釐清。近來的研究已發現粒線體是奈米銀進入細胞內攻擊標靶之一，然而粒線體本身也有維持其恆定性的機制，其中粒線體的伴護蛋白被認為是其自我保護的第一道防線。本研究將利用果蠅--這種已被很多科學文獻認為是探討奈米毒性分子機轉的優勢生物模式一來釐清粒線體的熱休克蛋白/伴護蛋白 Hsp90 是否具有保護生物個體來抵禦奈米銀毒性之功效，並利用這個模式來探討奈米銀誘發粒線體毒性之機轉。

壹、研究動機

奈米銀有抗菌活性，而透過奈米技術把銀奈米化後，讓其應用性更廣泛；根據 2015WWISC 奈米技術產品登入清單(Nanotechnology consumer products inventory, NCPI)的統計，全球有將近半數的奈米產品都含有奈米銀的成分(Vance et al., 2015)，而美國食藥署(FDA)也核准燒燙傷敷料添加奈米銀(Administration, 2018)。雖然目前並沒有危害人體健康的直接證據，但近年來許多體外(*in vitro*)與體內(*in vivo*)研究報告都指出，奈米銀對生物具有潛在危害性(Johnston et al., 2010)，但其細胞與分子層級的毒性機制仍須要進一步探討，以讓我們可針對其對人體的危害防範未然。奈米可藉由攝食、皮膚接觸、呼吸與注射等方式侵入人體(Mao, Tsai, Chen, Yan, & Wang, 2016)。奈米銀逐漸應用於食品包裝材料，所以透過飲食暴露到奈米銀的機會也隨之增高(Nowack, Krug, & Height, 2011)；另一方面，果蠅已被認為是探討奈米毒性分子機轉之優勢生物模式，所以我們的科展主題是利用果蠅且藉由飲食暴露的方式，來解析奈米銀對生物體的危害機轉，並希望能找出對抗奈米銀毒性之策略。細胞的粒線體已被認為是奈米銀的攻擊標靶之一(Mao, Chen, Wang, & Yan, 2018)，已知熱休克蛋白 Hsp90 (heat-shock protein 90)對粒線體的恆定性維持有著重要功能(Felts et al., 2000)，所以我們設計實驗以釐清此蛋白在生物體應對奈米銀毒性時能否提供保護效果。

貳、研究目的

粒線體為奈米銀可能攻擊之標靶，而熱休克蛋白 90 為保護粒線體的重要蛋白質，我們假設「提升此蛋白質之表達量有助於改善粒線體之功能，而讓生物體有較好的抗奈米銀毒性能力。」因此，我們透過以下實驗來驗證此假說。

- 一、探討奈米銀對果蠅粒線體結構與功能的影響。
- 二、探討奈米銀對受暴露果蠅幼蟲之蠕動能力的影響。
- 三、測試 Hsp90 基因之同型合子突變體(homozygous null mutant)、異型合子突變體(heterozygous null mutant)與野生型(wild type, control group)果蠅對奈米銀易感受性之差異。
- 四、檢測受奈米銀暴露之 Hsp90 基因同型合子與異型合子之幼蟲蠕動能力跟對照組之間

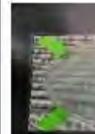
的差異性。

五、檢測增加表達人類 Hsp90 表達量對果蠅對抗奈米銀毒性之效果。

六、檢測增加表達人類 Hsp90 表達量對減輕奈米銀對蠕動能力損害之效果。

參、研究設備及器材

一、器材列表

CO2 麻醉組	解剖顯微鏡	培養箱	果蠅培養基	蘋果汁瓊脂培養基	塑膠試管
					
集卵器	3.5%(w/v) agarose gel	方格紙	鋁箔紙	AgNPs 溶液	檸檬酸鈉
					
挑蟲針	離心瓶	螢光顯微鏡	水浴槽	微波爐	超音波震盪器
					
蠕動幫浦	離心機	顯微鏡用攝影機	加熱盤	天平	培養基之藥品
					
硼氫化鈉	硝酸銀	20% 蔗糖水溶液	EtOH	preservative A	preservative B
					

二、自製果蠅培養基添加之防腐劑(preservative) 配方:

preservative A		
苯甲酸苯甲脂	80	g
總體積(EtOH 為溶劑)	400	ml
preservative B		
丙酸	418	ml
85%磷酸水溶液	41.5	ml
總體積(MQ H ₂ O)		ml

(表二)

三、果蠅培養基配方:

MQ H ₂ O	1900	ml
BRL agar	20	g
Glucose	105	g
Black sugar	52.4	g
Yeast powder	120	g
cornmeal	90.9	g
Preservative A	20.2	ml
Preservative B	25	ml

(表三)

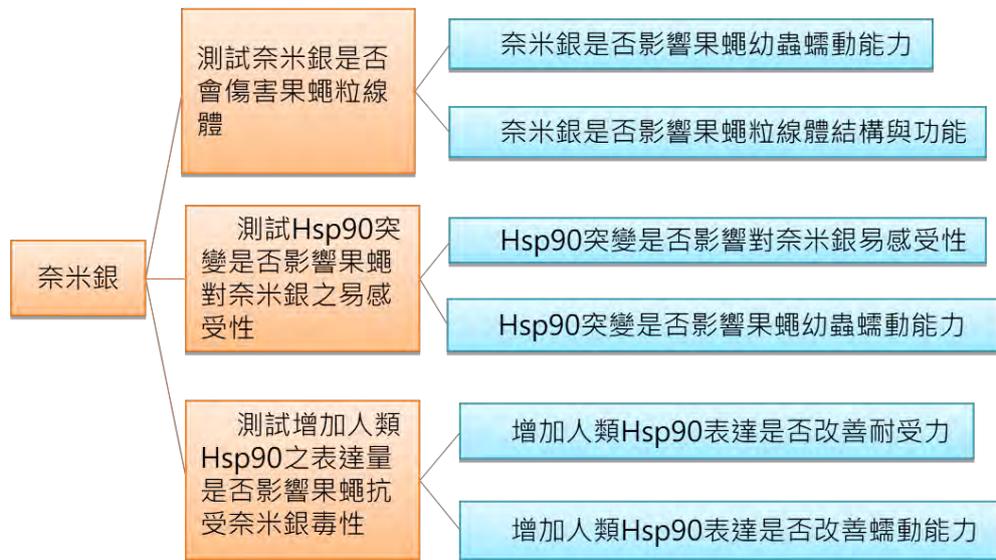
四、蘋果汁瓊脂培養基配方:

Treetop 蘋果汁	300	ml
RO H ₂ O	676.2	ml
Agar	30	g
Preservative A	10.6	ml
Preservative B	13.2	ml
Sucrose	17	g

(表四)

肆、研究過程或方法

一、研究架構

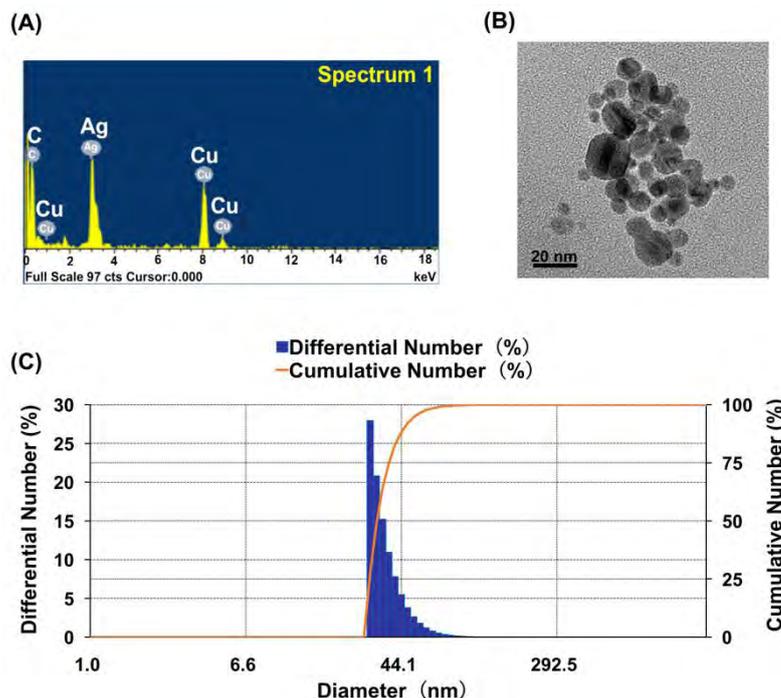


圖一：本研究架構。

二、奈米銀溶液製備

(一)簡介

本研究使用粒徑約為20 nm之奈米銀，有檸檬酸根包覆(citrate-coated)使其較為穩定，並以水性溶膠的形式添加到果蠅的培養基中，均勻混合後再讓果蠅的幼蟲透過飲食的方式暴露，以探討奈米銀暴露對粒線體之結構與功能性的影響，並釐清Hsp90是否有保護生物個體抵抗奈米銀毒性之功效與機轉。我們參照文獻中以化學還原之合成方法來製備奈米銀水性溶膠(Mulfinger et al., 2007)，圖二與表五是我們所使用之奈米銀物化特性分析結果(Mao et al., 2018)。



圖二：奈米銀之物化特性分析。(A)能量分散 X 射線元素組成光譜分析結果；(B)穿透式電子顯微鏡之粒徑與型態分析結果；(C)水合動態粒徑分析結果。

Table 5. Physico-chemical properties of the synthetic AgNPs and their measurements.

Items of Physico-chemical properties	Measurement	Citrate-capped AgNPs
Morphology	TEM	Roughly spherical
Actual diameter (nm)	TEM	18.2 ± 8.2
Hydrodynamic diameter (nm)	DLS	32.8. ± 4.4
Polydispersity index (PDI)	DLS	0.304 ± 0.037
Chemical composition	EDX	Silver (100%)
Zeta potential (mV)	PALS	-23.6
Maximum absorbance (nm)	UV-Vis	391

Transmission electron microscopy (TEM); Dynamic light scattering (DLS); Energy-dispersive X-ray spectroscopy; Phase analysis light scattering (PALS); Ultraviolet visible spectrometry (UV-Vis)

(表五：合成奈米銀之物化特性)(Mao et al., 2018)

(二)、合成程序與濃度定量

- 1、混合硝酸銀與檸檬酸鈉溶液
- 2、以蠕動幫浦滴定至一盛裝硼氫化鈉之錐形瓶中(800rpm、溫度4°C，鋁箔避光)
- 3、粗離心
- 4、高速離心以濃縮奈米銀，取下沉液
- 5、以石墨爐原子吸收光譜儀分析溶液中奈米銀之濃度。

三、果蠅培養基製備

(一)、簡介

本研究使用瓊脂、葡萄糖、黑糖、酵母粉末、玉米粉、為主要材料製成果蠅培養基。為了防止長時間、高濕度、高溫度的培養造成培養基中真菌滋生，我們在當中添加了具防腐特性之苯甲酸甲酯、丙酸做為防腐劑。在配製添加奈米銀之果蠅培養基前，我們讓奈米銀在 4°C 超音波震盪槽(800W)中震盪 10 分鐘來減少其保存時可能產生的聚集現象，然後再按測試劑量(包括 10 µg/ml、30 µg/ml 與 50 µg/ml)將奈米銀添加於還未凝固之果蠅培養基，由於奈米銀在食物中可能產生質變，所以須以新鮮配置之含奈米銀之果蠅培養基進行暴露實驗。

(二)、過程

- 1、取表三中除 preservative A、B 以外之配方，加熱。
- 2、待沸騰且 agar 完全溶解後加入 preservative A、B。
- 3、置於 60°C 水浴槽中，視需要添加奈米銀。
- 4、移液置空塑膠試管中，等待冷卻。

四、卵之收集

(一)、簡介

我們用集卵器、蘋果汁瓊脂培養基(“apple-juice agar” plate)供果蠅成蟲交配產卵。集卵器(figure2)為底面直徑約 9 公分，單面開口之圓柱體。一面有紗網攔阻的氣孔，另一面放置 apple-juice agar plate 以收集卵(圖三)，待卵孵化後，我們再挑取幼蟲進行暴露實驗。

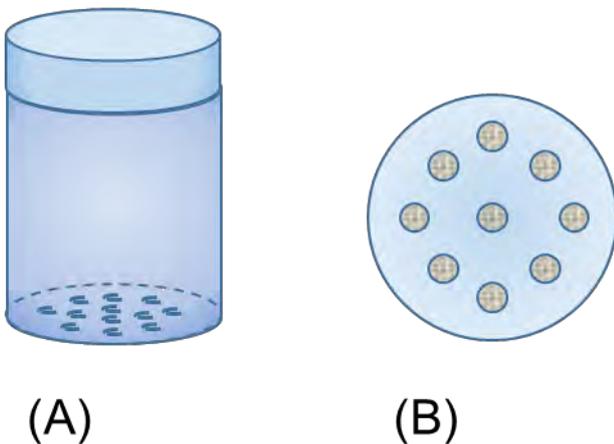
(二)、過程

1、apple-juice agar plate

- (1)、將表四中材料混合於一血清瓶
- (2)、以 121°C、20 分鐘濕熱滅菌處理
- (3)、倒入空的 petri dish 中
- (4)、冷卻後儲放於 4°C 環境

2、製成集卵器

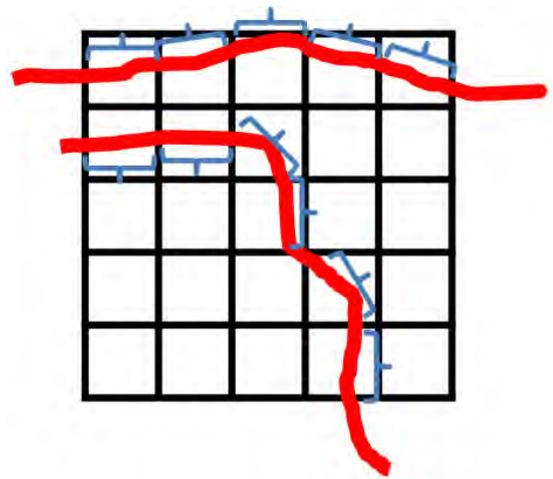
- (1)、取足量成蟲公母果蠅。
- (2)、倒入集卵器中。
- (3)、apple-juice agar plate 上灑酵母粉。
- (4)、蓋上集卵器。
- (5)、置於 25°C、濕度 60%之培養箱中，每日更換 apple-juice agar plate 並清潔。



(A)

(B)

圖三：果蠅集卵器。(A)圓柱形之集卵器，開口面(圖示上方)可接蘋果汁瓊脂培養基盤，其下方為(B)有覆蓋紗網之氣孔。以此集卵器(將圖示集卵器倒置)收集卵，隔天後取下培養基盤，待卵孵化後再挑取幼蟲進行奈米銀暴露實驗。



圖四：評估果蠅幼蟲蠕動能力之示意圖(方格大小為 0.2 cm × 0.2 cm)

五、粒線體產生 ATP 功能損害之檢測

(一)、簡介

在動機的部分，我們提及 Hsp90 對粒線體恆定有著重要功能，而過許多利用細胞模式(*in vitro*)所做的研究已發現粒線體為奈米銀的胞內攻擊標靶之一。我們欲釐清奈米銀是否能藉由飲食暴露的方式在生物體內模式誘發粒線體損傷，首先我們先分析果蠅的整體 ATP 產生量，藉以推論粒線體的功能性是否受到奈米銀暴露影響。我們使用 BioVision 之 ATP 吸光法/螢光法分析套組(Catalog # K354-100)及去蛋白質套組(Catalog # K808-200)測定果蠅體內 ATP 含量。

(二)、過程

1、準備樣品

- (1)、加入 ATP assay buffer，均質化(homogeneous)果蠅
- (2)、取上清液與過氯酸(perchloric, PCA)混合，靜置 5 分鐘。
- (3)、離心，取上清液
- (4)、加入中和液，靜置 5 分鐘
- (5)、將樣品加至 96 well plate 中。用專用緩衝液補體積至每孔 50 μ l

2、繪製標準曲線

- (1)、將乾燥的標準 ATP 樣品溶解於蒸餾水中，備用。
- (2)、將 10 μ l 標準 ATP 樣品加入 900 μ l d.d.H₂O 稀釋。
- (3)、96 well plate(三重複) 加(2、)中溶液 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ l，補專用緩衝液至 50 μ l

3、反應所需藥品配製

- (1)、使用螢光法，配方如下:

ATP 專用緩衝液	916	μ l
2、ATP probe	4	μ l
3、ATP converter	40	μ l
4、顯影劑混合液	40	μ l

- (2)、取每孔 50 μ l，分別加入樣品及標準樣品所在孔位。

4、測量:

- (1)、室溫下避光 30 分鐘。
- (2)、用 elisa reader 進行螢光分析(放射波長/激發波長=535/587)
- (3)、收集數據

六、粒線體結構分裂/融合之狀態觀察

(一)、簡介

粒線體之功能性取決於其結構上的完整性以及分裂/融合之狀態，所以我們透過觀果蠅組織中的粒線體分佈以及分裂/融合之狀態，來評估奈米銀對粒線體的結構是否有影響。我們將表達 mitoGFP 且受奈米銀暴露之果蠅三齡幼蟲解剖，取出特定組織(腦和腸子)，觀察粒線體之分布與結構變化。

(二)、過程

1、解剖

- (1)、取三齡幼蟲，置於 PBS，使其懸浮
- (2)、以鑷子切開身體後半段
- (3)、鑷住頭，將表皮推開，使內臟外露
- (4)、鑷住頭，去除多餘器官
- (5)、取腦或腸子

2、染 DAPI

- (1)、以 PBS 潤洗組織
- (2)、將組織浸入 DAPI
- (3)、靜置數分鐘
- (4)、再以 PBS 潤洗，去除多餘 DAPI

3、觀察

- (1)、置於共軛焦顯微鏡下觀察
- (2)、DAPI 顯示出細胞位置(細胞核)
- (3)、觀察粒線體(表達 GFP 之細胞結構)之分佈與結構

七、奈米銀對果蠅之毒性評估實驗

(一)簡介、

我們透過檢測果蠅生命週期中蛹化與羽化之情形，來探討 Hsp90 的表達程度對果蠅抗受奈米銀毒性能力的影響。實驗分成暴露組(10 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ 與 50 $\mu\text{g/ml}$)與未暴露組(0 $\mu\text{g/ml}$)，每組各 5 管，每管培養基放 50 隻幼一齡幼蟲(1st instar larvae)，暴露至三齡(3rd instar larvae) 晚期後，幼蟲會爬至管壁蛹化，然後點算蛹的數量，而後亦紀錄羽化成蟲之數量，除以最初放入的幼蟲數，即為蛹化率與羽化率。實驗中，果蠅皆置於 25°C、濕度 60%、12 小時晝夜交替之培養箱中。

(二)、過程

- 1、準備底部盛果蠅培養基之塑膠試管，以鋁箔避光
- 2、將一齡幼蟲以挑蟲針從 apple-juice agar plate 移置管中。
- 3、培養。
- 4、及其蛹化、羽化，觀察並紀錄之。

八、果蠅幼蟲爬行能力受奈米銀毒性影響實驗

(一)、簡介

我們假設藉由飲食暴露之方式，奈米銀會在果蠅組織誘發粒線體結構與功能性損傷，粒線體為 ATP 的製造工廠，粒線體的損傷會影響生物能量產生，所以其極可能會干擾到生物的運動能力。我們設計此實驗以檢測奈米銀對果蠅的運動能力之影響。如上述蛹化率與羽化率的評估實驗，我們將幼蟲於一齡(1st instar larvae)至三齡(3rd instar larvae) 階段暴露在含奈米銀之培養基中，並於三齡蟲階段將其移至瓊脂糖膠盤(agarose gel plate)上，估算其爬行距離。實驗中，果蠅皆置於 25°C、濕度 60%、12 小時晝夜交替之培養箱中。

(二)、過程

- 1、準備底部盛果蠅培養基之塑膠試管，以鋁箔避光
- 2、將一齡幼蟲以挑蟲針從 apple-juice agar plate 移置管中。
- 3、培養。
- 4、以 20%蔗糖水溶液使其浮起，並以 RO H₂O 清洗之。
- 5、準備一 3.5% agarose gel plate。
- 6、準備一 0.2cm x0.2cm 之方格紙，墊於 agarose gel plate 下。
- 7、以具攝影功能之解剖顯微鏡拍攝，計時一分鐘。
- 8、以「體長中點位置越過一條線」為越過一格之標準(圖三)，估計之。
- 9、計算爬過格線數，並記錄之。

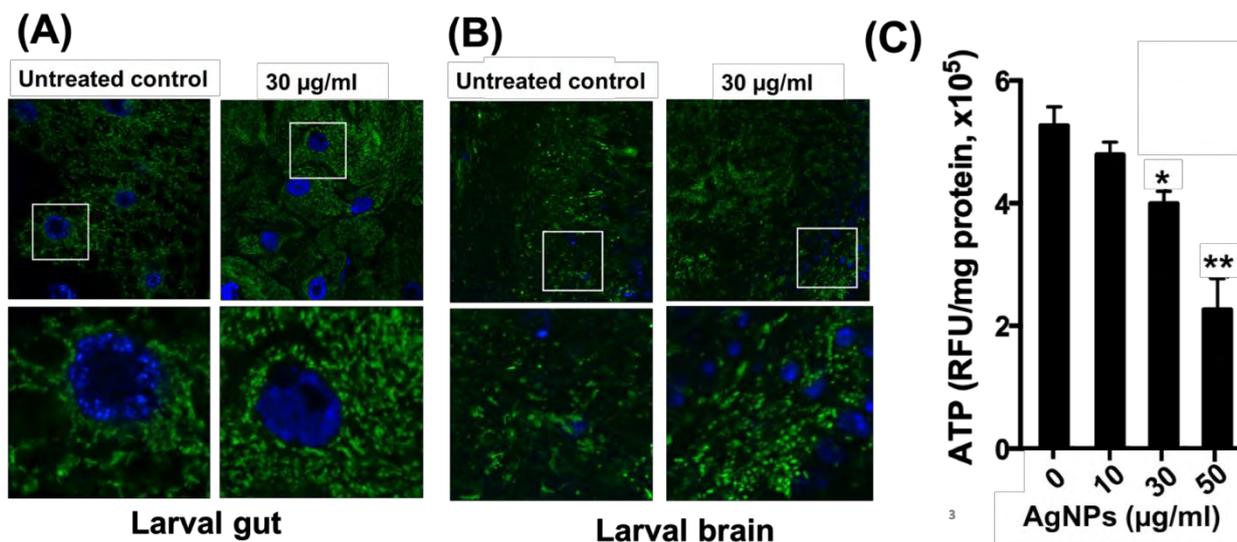
九、數據分析

我們使用 Student' s T test 做為比較兩數據間差異的方法。以 levene test 做變異數之 F test。其中 $p < 0.05$ 為可交受的信心水準。圖中標示*、# 符號以表明檢定不拒絕 H_0 之機率。*表 $p < 0.05$; **表 $p < 0.01$; ***表 $p < 0.001$ 。

伍、研究結果

一、暴露奈米銀造成粒線體結構與功能性之損害

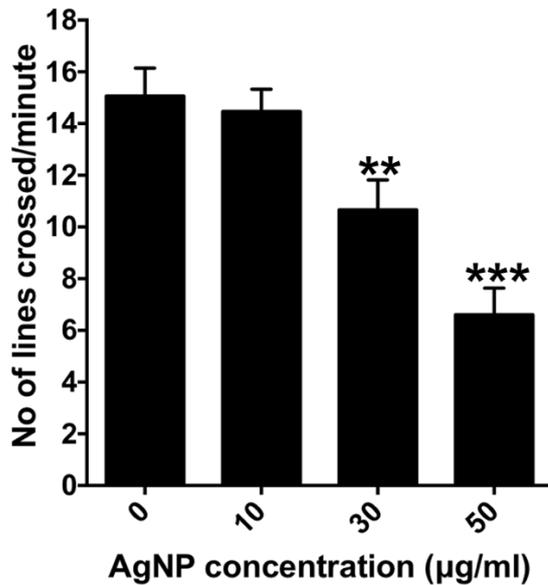
本研究第一個目的即在檢測奈米銀是否真對粒線體造成影響，而已有研究(Mao et al., 2018)證實致死劑量(Lethal dose)的奈米銀會造成果蠅成蟲體內活性氧類物質(reactive oxygen species, ROS)含量上升。因此，我們猜測，奈米銀是否也對氧化還原旺盛的粒線體具有結構性或者功能性的影響。我們於是選擇能在粒線體表達綠色螢光蛋白(mitochondria green fluorescence protein, mitoGFP)之果蠅品系進行粒線體結構之觀察，如圖五(A)所示，受奈米銀暴露的果蠅，整體的腸道細胞粒線體數量都有明顯增加的現象，且變得比較片斷化；相較之下，圖五(B)指出果蠅的腦部的粒線體只有靠近表面（DAPI 的染色只能染到腦部結構的表層）的腦細胞的有稍微明顯的數量增加與片斷化的現象。這些結果顯示奈米銀暴露可能會提升粒線體 biogenesis 且導致其片斷化，進而影響其產生 ATP 的能力。如圖五(C)所示，我們確實也觀察到奈米銀的暴露會呈現劑量相依的方式降低 ATP 的產生量。



圖五：奈米銀暴露對粒線體結構與功能的影響。果蠅的(A)腸道與(B)腦部中粒線體的分佈與結構； (C)果蠅體內 ATP 含量之測定結果。

二、暴露奈米銀降低果蠅幼蟲之蠕動能力

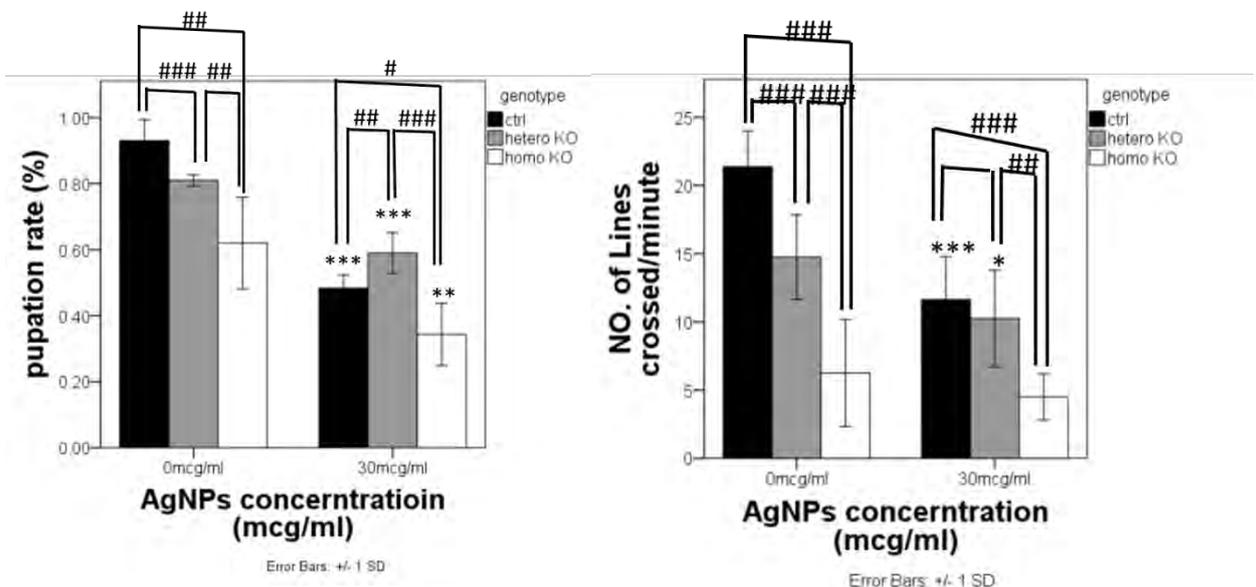
確認粒線體確實受到奈米銀暴露而有結構與功能性的損傷後，我們進一步地去評估果蠅的運動能力是否也受到奈米銀的暴露而影響，於是我們幼蟲的蠕動能力作為評估指標，發現奈米銀的暴露確實會損害幼蟲的蠕動能力（如圖六所示）。



圖六：奈米銀暴露對果蠅幼蟲蠕動能力之影響。

三、Hsp90 基因之同型合子突變（無表達 Hsp90 蛋白）相較於異型合子突變體（約略半量表達 HSp90 蛋白）似乎更易受奈米銀毒性影響。

已知的研究中(Felts et al., 2000), Hsp90 和粒線體之恆定有關, 於是我們猜測 Hsp90 的表達量可能會藉由調節奈米銀對粒線體的毒性而影響果蠅個體對奈米銀的抗受能力。如圖七所示, 在未受奈米銀暴露的情況, Hsp90 的突變似乎就會影響到幼蟲的存活與蛹化能力, 且相較於異型合子突變, 同型合子突變的影響更大。受奈米銀暴露之後, 三組幼蟲的存活與蛹化能力都顯著顯著下降 (以星號表示顯著性), 奈米銀對同型合子突變體的負面影響比對異型合子突變體的影響來得強烈。然而, 有可能是因為培養箱溫度調節故障的緣故, 或其他人為因素, 導致我們在進行對照組的暴露實驗時, 幼蟲的蛹化出現比預期更多得下降。未來還會再重複此實驗, 也會將受暴露幼蟲之成蟲羽化率列為評估指標。



圖七：奈米銀對 Hsp90 同型合子突變體、異型合子突變體與正常表達之對照組之蛹化能力影響評估。

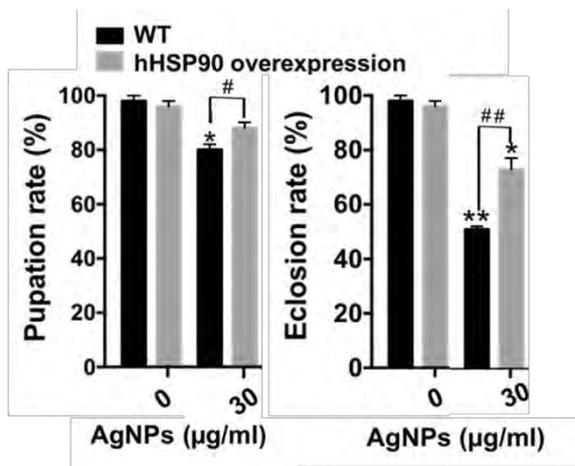
圖八：Hsp90 表達量影響果蠅蠕動能力

四、Hsp90 基因之同型合子突變（無表達 Hsp90 蛋白）其蠕動相較於異型合子突變體（約略半量表達 HSp90 蛋白）更易受奈米銀毒性影響。

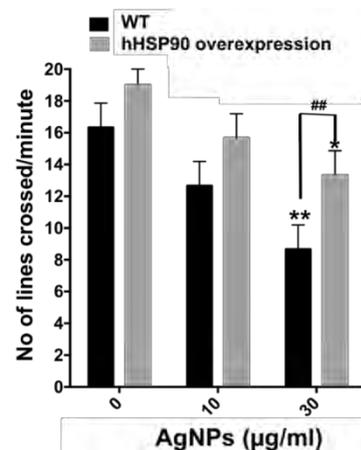
在知道 Hsp90 基因和果蠅耐受力之關係後，我們想確認 Hsp90 和運動能力的關係，在蠕動能力測試中，我們可以看出 Hsp90 基因和蠕動能力之間的相關性，而在暴露奈米銀的組別中，Hsp90 的表達量和蠕動格子數有顯著相關(圖八)。

五、增加表達人類 Hsp90 表達量提升使果蠅具較好之奈米銀耐受力

為進一步了解 Hsp90 基因表達量和果蠅生長的關係，我們選擇增加表達人類 Hsp90 基因的品系進行蛹化、羽化情形的檢測。由於在人類體內亦有相似的基因序列，我們增加人類的 Hsp90 基因於果蠅體內，檢測增加人類 Hsp90 的表達是否能改善奈米銀對果蠅耐受力下降的問題，藉由人類 Hsp90 基因於果蠅模式取得之研究成果，我們希望未來對人體生理機轉之研究能有新的進步。於圖九中可見基因表達量之增加和果蠅蛹化、羽化數量之提升有關。



圖九：增加 hsp90 表達量提升暴露奈米銀之果蠅蛹化、羽化能力。



圖十：增加 hsp90 表達量提升暴露奈米銀之果蠅蠕動能力。

六、Hsp90 表達量提升減輕奈米銀對蠕動能力造成損害

知道提升人類 Hsp90 基因表達量緩解奈米銀造成毒性後，我們想了解提升 Hsp90 表達量伴隨的效果是否和幼蟲蠕動能力有關。於是我們進行了如是實驗。而於圖十中可見增加表達和奈米銀對蠕動能力傷害之減少有關，而未暴露奈米銀但增加表達的品系蠕動能力亦較野生種佳。

陸、討論

一、由暴露奈米銀的幼蟲蠕動能力下降、暴露奈米銀的果蠅體內 ATP 含量較低，我們推測，幼蟲蠕動能力之下降和暴露奈米銀造成之 ATP 含量下降有關。

二、由 Hsp90 表達下降和蛹化羽化數量下降、蠕動格數變少，我們推測，Hsp90 的表達量和果蠅健康情形有關。

三、由奈米銀暴露對蛹化羽化數量和 Hsp90 表達量無明顯相依關係，認為有如下可能：

(一)、實驗人為誤差：

在奈米銀濃度的測量時，我們使用石墨爐原子吸收光譜儀(Graphite Atomic Absorption Spectroscopy, GAAS)測量單位溶液中特定原子(銀)的含量，而應儀器本身設計的要求，需要事先稀釋數個數量級，在多次稀釋後，誤差亦乘上了數個數量級。而由 Figure 5 可知數十 mcg/ml 的差異便可造成明顯的影響，於是我們認為人為誤差是不可避免但確實存在的問題。

四、由增加表達人類 Hsp90 基因可改善果蠅蛹化、羽化情形、增加表達人類 Hsp90 基因可改善果蠅幼蟲蠕動能力。我們推測，在果蠅模式取得之人類 Hsp90 奈米銀毒性抗受研究成果或與人類體內 Hsp90 之作用機轉有關。

五、未來努力方向：

(一)、可增加實驗之樣本數，以求實驗數據之證據力。

(二)、事實上，我們亦有進行增加表達人類 Hsp90 但無 ATP 結合位品系之實驗，若實驗結果肯定則可說明人類 Hsp90 對增加果蠅耐受力之機轉是否關乎 ATP 之導使。礙於實驗尚未完整，未能撰諸文中，尚屬可惜。

(三)、可進行增加人類 Hsp90 表達是否改善粒線體結構與功能之實驗，以完滿本研究之論點。

(四)、可進行如 western blot 等實驗以證實果蠅體內 hsp90 表達量是否真有改變。

(五)、可進行以羽化率作為指標下，Hsp90 突變果蠅對奈米銀毒性易感受性之實驗。

柒、結論

- 一、暴露於奈米銀影響粒線體之結構與功能，造成 ATP 產量下降。
- 二、暴露於奈米銀降低幼蟲蠕動能力。
- 三、蠕動力下降與 ATP 產量下降或有關連。
- 四、Hsp90 基因之表達量下降使得果蠅之蛹化、羽化數量下降。
- 五、Hsp90 基因之表達量下降與果蠅之蛹化、羽化數量無關。
- 六、Hsp90 基因之表達下降使得果蠅幼蟲蠕動格數下降。
- 七、提升 Hsp90 基因表達量改善果蠅對奈米銀之耐受性。
- 八、提升 Hsp90 基因表達量改善果蠅蠕動能力。
- 九、增加人類 Hsp90 基表達量改善耐受性與蠕動能力之機轉或與人體內相同。

捌、參考文獻及其他

- 一、Administration, U. S. F. D. (2018). 510(k) Premarket Notification.
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm?ID=K050842>
- 二、Felts, S. J., Owen, B. A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B., & Toft, D. O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(5), 3305-3312.
- 三、Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, *40*(4), 328-346.
- 四、Mao, B.-H., Chen, Z.-Y., Wang, Y.-J., & Yan, S.-J. (2018). Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. *Scientific Reports*, *8*(1), 2445.
- 五、Mao, B.-H., Tsai, J.-C., Chen, C.-W., Yan, S.-J., & Wang, Y.-J. (2016). Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*, *10*(8), 1021-1040.
- 六、Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ*, *84*(2), 322.
- 七、Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: implications for policy makers: ACS Publications.
- 八、Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology*, *6*, 1769.

【評語】 052006

本計劃分析熱休克蛋白質 90 對果蠅抵禦奈米銀毒性具保護作用，實驗包括(a)奈米銀對果蠅粒腺體結構與功能的影響；(b)奈米銀對受暴露果蠅幼蟲之蠕動能力的影響；以及(c) Hsp90 使果蠅具有較好之奈米銀耐受力。然未能檢測實際 HSP90 之表現量，所有結論皆言之過早；且粒線體影像圖擷取範圍太小，不具代表性。此外，除了量測 ATP 的量之外，若能一併分析 ATP 相關之蛋白質將更完整。探討議題重要，撰寫流暢，與過往研究之間的關係宜再清楚陳述。實驗結果描述需再更清楚些，並解釋各組別間之差異性。

摘要

奈米銀具優良的抗菌活性，市面上有越來越多標榜含奈米銀之產品。許多的細胞與動物實驗已指出奈米銀有潛在毒性，然其細胞與分子機轉仍需進一步釐清。近來的研究已發現粒線體是奈米銀進入細胞內攻擊標靶之一，但粒線體本身也有維持其恆定性的機制，其中粒線體的伴護蛋白被認為是其自我保護的第一道防線。本研究將利用果蠅——此一已被許多科學文獻認為是探討奈米毒性分子機轉的優勢生物模式——來釐清粒線體的熱休克蛋白/伴護蛋白Hsp90是否具保護生物個體抵禦奈米銀毒性之效，並以此模式探討奈米銀誘發粒線體毒性之機轉。

研究動機

全球近半數的奈米產品都含有奈米銀的成分(Vance et al., 2015)，而美國食藥署(FDA)也核准其添加於燒燙傷敷料(F.D.A., 2018)。近來許多體外(in vitro)與體內(in vivo)研究報告都指出，奈米銀對生物具潛在危害性(Johnston et al., 2010)，其細胞與分子層級的毒性機制仍須要進一步探討。奈米可藉由攝食、皮膚接觸、呼吸與注射等方式侵入人體(Mao, Tsai, Chen, Yan, & Wang, 2016)。其於食品包裝材料的應用漸增，透過飲食暴露奈米銀的機會亦增高(Nowack, Krug, & Height, 2011)；另一方面，果蠅已被認為是探討奈米毒性分子機轉之優勢生物模式。我們利用果蠅且藉由飲食暴露的方式，希望找出對抗奈米銀毒性之策略。粒線體已被認為是奈米銀的攻擊標靶之一(Mao, Chen, Wang, & Yan, 2018)，已知熱休克蛋白Hsp90 (heat-shock protein 90)對粒線體恆定性維持有著重要功能(Felts et al., 2000)，所以我們設計實驗祈釐清此蛋白在生物體應對奈米銀時能否提供保護。

研究目的

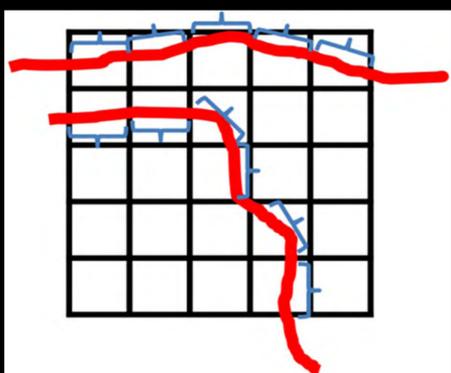


- 一、檢測奈米銀對粒線體結構與功能的影響
- 二、檢測奈米銀對幼蟲之蠕動能力的影響
- 三、檢測Hsp90基因之同型合子突變體、異型合子突變體與野生型果蠅對奈米銀之易感受性差異
- 四、檢測受奈米銀暴露之Hsp90基因同型合子與異型合子之幼蟲蠕動能力跟對照組之間的差異性
- 五、檢測提升Hsp90表達量對果蠅抗奈米銀毒性之效果
- 六、檢測提升HSP90表達量減輕奈米銀對蠕動能力損害之效果

研究動機

奈米銀合成

- 一、 $\text{AgNO}_3 + \text{Citrate Acid} / \text{NaBH}_4$
- 二、粗離心
- 三、高速離心濃縮
- 四、原子吸收光譜儀測濃度



蠕動能力測試

- 一、挑所欲之幼蟲
- 二、培養於果蠅培養基中
- 三、置於agarose plate上
- 四、以顯微鏡錄影功能紀錄

耐受力測試

- 一、挑所欲之幼蟲
- 二、培養於果蠅培養基中
- 三、記錄其蛹化、羽化數量

粒線體結構與功能檢測

- 一、mitoGFP之品系
- 二、染DAPI標示細胞核
- 三、觀察結構
- 四、均質化(homogeneous)果蠅
- 五、去除蛋白質
- 六、準備標準樣本
- 七、以螢光分析儀測定
- 八、測定ATP之相對螢光單位



結果

奈米銀對果蠅粒線體結構與功能造成影響

(A)

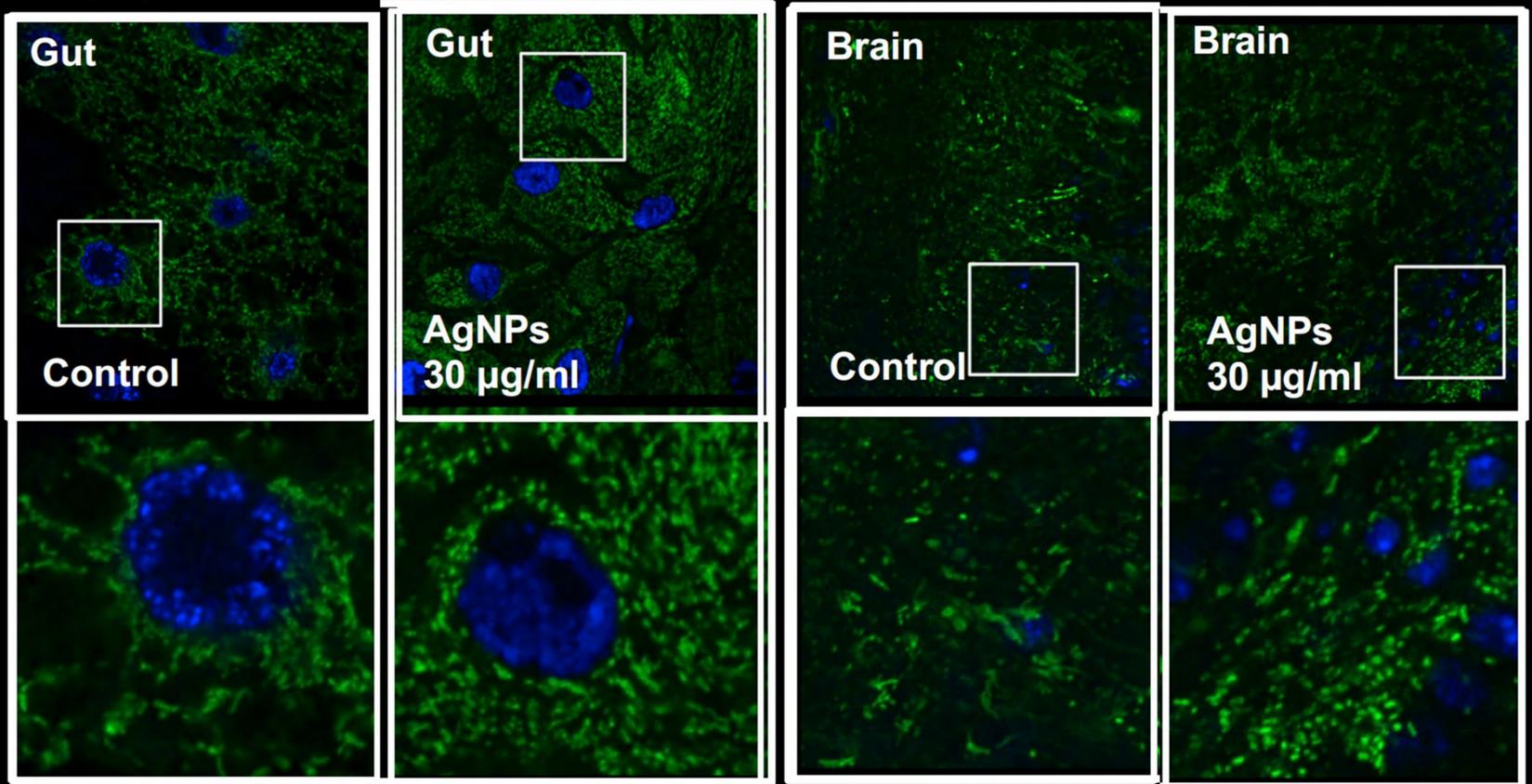


Fig.1 奈米銀之暴露確實對果蠅造成影響。(A)有暴露奈米銀之果蠅粒線體數量較多、且較為片斷化。推測奈米銀暴露可能提升粒線體之biogenesis，進而影響其產生ATP之能力。(B)暴露於奈米銀之果蠅體內ATP含量確實較少，而30mcg/ml以上可見顯著差異。(C)暴露於奈米銀之果蠅幼蟲蠕動格數確實較少。推測可能與ATP含量下降有關。

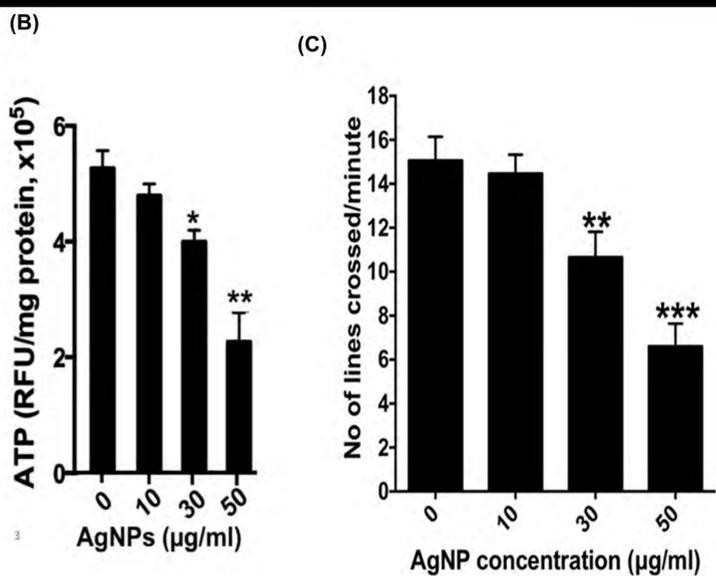
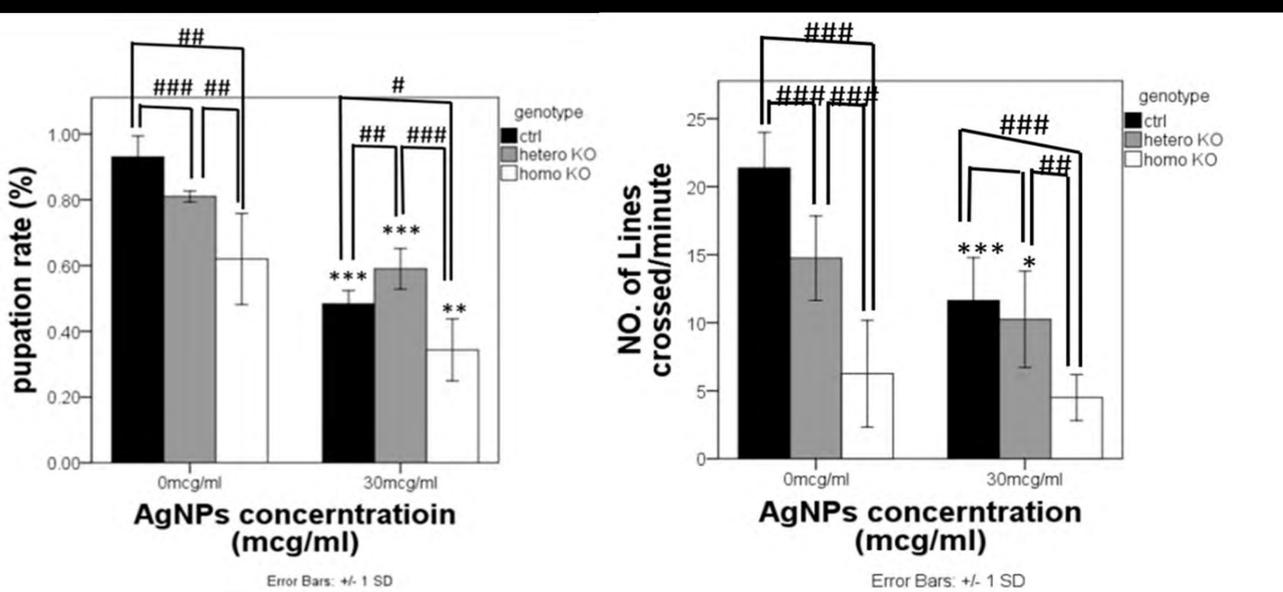


Fig.2 Hsp90突變影響果蠅對奈米銀之易感受性。(A)Hsp90同型合子突變較異型合子突變蛹化綠較差，但暴露於奈米銀十三組間未見劑量相依關係，且對照子用畫率低於預期。(C)可見hsp90突變會影響果蠅蠕動能力，而暴露於奈米銀可見劑量相依。

HSP90表達降低之突變降低果蠅暴露於奈米銀時之運動能力，對耐受力較無影響



結果

增加人類HSP90表達改善果蠅對奈米銀耐受力

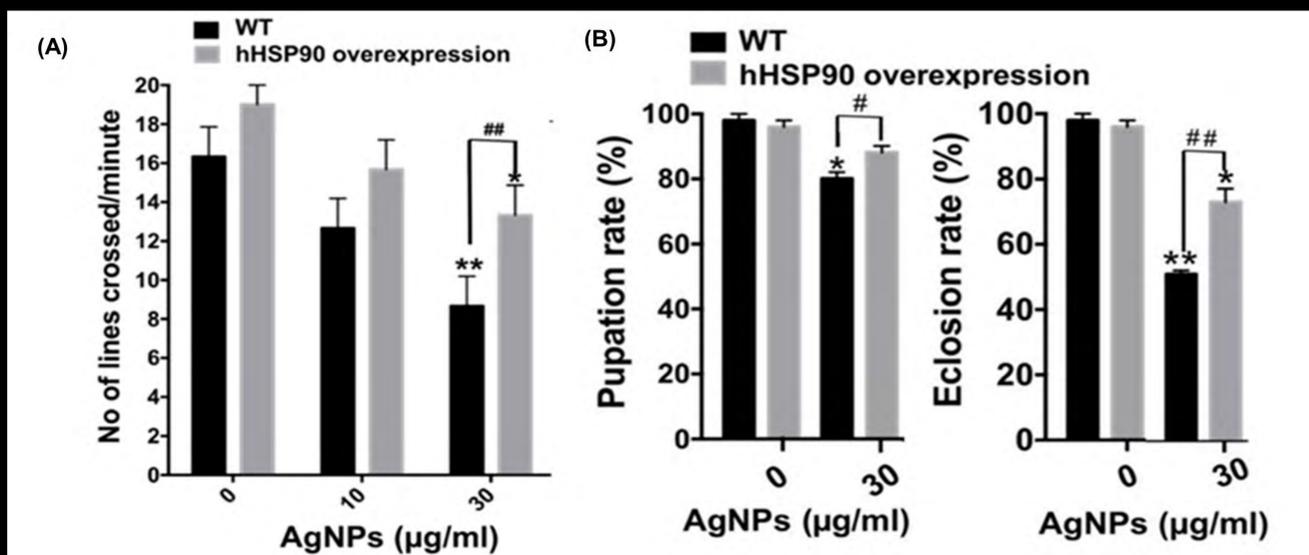


Fig.3 提升hsp90表達量可改善果蠅對奈米銀毒性之耐受力。(A) 在果蠅體內額外插入人類hsp90基因，發現暴露於奈米銀時增加人類hsp90之組別幼蟲蠕動格數較多。(B)在果蠅體內額外插入人類hsp90基因，發現暴露於奈米銀時增加人類hsp90之組別蛹化、羽化數量較多。

討論

- 一、由暴露奈米銀的幼蟲蠕動能力下降、暴露奈米銀的果蠅體內ATP含量較低，我們推測，幼蟲蠕動能力之下降和暴露奈米銀造成之ATP含量下降有關。
- 二、由Hsp90 突變表達下降和蛹化羽化數量下降、蠕動格數變少推測，Hsp90表達量和果蠅健康情形有關。
- 三、由奈米銀暴露對蛹化羽化數量和Hsp90表達量無明顯相依關係，認為有如下可能：
 - (一)、奈米銀粒子在培養基中的變化與果蠅幼蟲的個體間差異性
在進行實驗前，我們將定量過的奈米銀溶液加入降溫過約為攝氏 60 度之液態果蠅培養基中，待其冷卻凝固後再將欲暴露之幼蟲移入。果蠅培養基的組成富含硫，而已有文獻指出銀會與硫化合產生硫化銀，因此減低奈米銀的毒性，此外，我們使用的奈米銀僅透過檸檬酸鈉來達到靜電穩定的效果，所以相較於其他的表面修飾法，仍然較容易發生銀離子的溶離(dissolution)。雖然，我們盡量控制在配置好奈米銀果蠅培養基後的兩天內就讓幼蟲進行暴露，但技術上我們仍無法仍無法確切定量，奈米銀粒子在果蠅培養基中或進入幼蟲體內，發生硫化作用或溶離出銀離子的程度，並釐清其影響；此外，在暴露後第三天進行體長觀察，也發現受暴露之果蠅幼蟲間呈現個體差異性，顯示奈米銀對每隻幼蟲的影響程度並非完全一致。綜合以上，這些因素都可能導致蛹化率、羽化率以及蠕動能力等指標，在相同的暴露組間發生誤差。
- 四、由增加表達人類Hsp90基因可改善果蠅蛹化、羽化情形、幼蟲蠕動能力。我們推測在果蠅模式取得之人類Hsp90奈米銀毒性抗受研究成果或與人類體內Hsp90作用機轉有關

結論

- 一、暴露於奈米銀影響粒線體之結構與功能，造成ATP產量下降。
- 二、暴露於奈米銀降低幼蟲蠕動能力。
- 三、蠕動力下降與ATP產量下降或有關連。
- 四、Hsp90基因之表達量下降與果蠅之蛹化、羽化數量無關。
- 五、Hsp90基因之表達下降使得果蠅幼蟲蠕動格數下降。
- 六、提升Hsp90基因表達量改善果蠅對奈米銀之耐受性。
- 七、提升Hsp90基因表達量改善果蠅蠕動能力。
- 八、增加人類Hsp90基表達量改善耐受性與蠕動能力之機轉或與人體內相類。

參考資料

- 一、Administration, U. S. F. D. (2018). 510(k) Premarket Notification. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm?ID=K050842>
- 二、Felts, S. J., Owen, B. A., Nguyen, P., Trepel, J., Donner, D. B., & Toft, D. O. (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3305-3312.
- 三、Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 328-346.
- 四、Mao, B.-H., Chen, Z.-Y., Wang, Y.-J., & Yan, S.-J. (2018). Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. *Scientific Reports*, 8(1), 2445.
- 五、Mao, B.-H., Tsai, J.-C., Chen, C.-W., Yan, S.-J., & Wang, Y.-J. (2016). Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*, 10(8), 1021-1040.
- 六、Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ*, 84(2), 322.
- 七、Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: implications for policy makers: ACS Publications.
- 八、Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: