

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：伏馬鐮孢毒素 B₁ (Fumonisin B₁)對豬的免疫傷害：肺泡巨噬細胞細胞與週邊血液單核細胞的致害及其作用機制

The immunotoxicity of fumonisin B₁ in swine: Toxic effects on alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells and its mechanism of action

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-073, NSC 89-2313-B-002-157, NSC 90-2313-B-002-297

執行期限：88 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：龐飛 國立臺灣大學獸醫學系

摘要

伏馬鐮孢毒素(fumonisin)是由多種鐮孢菌屬黴菌(*Fusarium* spp.)所產生之二次性代謝物，其中以 fumonisin B₁ (FB₁)為最常見的玉米、玉米製品及飼料污染物。研究顯示 FB₁ 會對禽類、大小鼠造成免疫系統的影響，為探討 FB₁ 對豬隻免疫系統的可能影響，選擇豬肺泡巨噬細胞(SAM)與週邊血液單核細胞(SP BMC)，在活體外與不同濃度 FB₁ 共同培養不等時間，以評估該等細胞的 viability 與功能是否會受到影響。同時，另以 LPS 與 Con A 兩種致裂原分別刺激 SAM 與 SP BMC，使其成為活化狀態，藉以瞭解不同活化狀態下的細胞，對於 FB₁ 的感受性是否相同。在 SP BMC，分別測定其 viability、DNA、RNA 及 protein 合成能力、IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-10、IL-12 及 IFN- γ 等細胞素 mRNA 表現能力以及 IL-2 產生能力。在 SAM，則分別測其 viability、吞菌與殺菌能力，自由基(O₂⁻和 H₂O₂)產生能力、IL-1 β 、IL-8 及 TNF- α 等細胞素 mRNA 表現能力以及 TNF- α 與 PGE₂ 產生能力。同時也進一步分析 FB₁ 是否具干擾 SP BMC 與 SAM 抱合脂質 sphinganine (Sa)及 sphingosine (So)之代謝。實驗結果顯示，於所測試之劑量及培養時間條件下，無論是經 Con A 活化及未經 Con A 活化的 SP BMC，FB₁ 均會造成其細胞存活率、DNA、RNA 及蛋白質合成能力與 IL-2 產生能力的下降；在細胞素 mRNA 表現上，在未經 Con A 活化之細胞，其 IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-10 及 IFN- γ mRNA 之表現於早期多呈下降，但後期則大致上升；而 IL-12 及 TNF- α 於攻毒 36 小時前，其 mRNA 之表現大致呈現上升，但之後則下降。經 Con A 活化之 SP BMC 細胞素 mRNA 表現則較不一致，其中 IL-1 β 於各攻毒時間多呈現上升；IL-2、IL-8、IL-12 及 IFN- γ 則不一致；TNF- α mRNA 之表現多呈下降之趨勢。大體而言，經 Con A 活化之對照組細胞，其細胞素 mRNA 之表現能力皆較未經 Con A 活化之對照組為差。在 FB₁ 對 SP BMC 抱合脂質代謝之影響方面，與對照組相較下，於攻毒後 24 小時在 20 及 50 μ g/ml FB₁ 處理組，其

Sa 與 So 含量以及 Sa/So 的比例均有提升的趨勢，其中 Sa 的提升在兩處理組均達統計上極顯著性(P < 0.01)。在 SAM 方面，其 viability 呈早期提升而晚期抑制的情形，且此趨勢以 LPS 活化的 SAM 反應較早；在自由基 O₂⁻和 H₂O₂ 的產生能力上亦均受到抑制，其中以 O₂⁻較為明顯；FB₁ 攻毒組對 *Candida albicans* 的吞菌能力較差，且隨攻毒時間的延長而下降程度越大，其中以 LPS 活化之 SAM 受抑制的情形較非活化 SAM 來得明顯；在 SAM 的 *C. albicans* 殺菌能力上亦受到抑制，且以 LPS 活化之 SAM 較明顯，而此抑制程度與 FB₁ 濃度成正相關；就 IL-1 β mRNA 的表現，在經 LPS 或未經 LPS 活化的 SAM 中，均呈先下降後提昇的現象；就 IL-8 mRNA 的表現，在經 LPS 活化的 SAM，呈早期輕微上升，其後持平的現象，而在未經 LPS 活化的 SAM，則呈早期下降，而後期微升的趨勢；就 TNF- α mRNA 的表現，經 LPS 活化與否之表現則不一致；FB₁ 會造成 LPS 活化 SAM TNF- α 產生能力的下降，而非活化 SAM 之 TNF- α 產生能力在早期呈抑制，但後期則呈上升的趨勢；FB₁ 對於經 LPS 活化與非活化 SAM 之 PGE₂ 產生能力影響不盡相同，活化狀態 SAM 的 PGE₂ 產生是呈上升的現象，而非活化 SAM 在攻毒早期呈增加的趨勢，但後期則呈抑制；在 FB₁ 對 SAM 抱合脂質代謝之影響方面，經 LPS 活化的 SAM 經 FB₁ 處理後，其抱合脂質的代謝情形亦出現 Sa 和 So 濃度及 Sa/So 比率上升的現象，且隨攻毒時間的延長，更趨明顯。根據上述結果顯示，FB₁ 的確會造成 SP BMC 及 SAM 的死亡、多重功能的受損及其抱合脂質代謝異常。因此推測長期攝食受到 FB₁ 污染的飼料，可能會造成豬隻免疫調節功能的干擾，進而影響豬隻對疾病的抵抗力。而此免疫功能的干擾可能與抱合脂質代謝異常有關。

關鍵詞：伏馬鐮孢毒素 B₁、免疫毒性、細胞素、抱合脂質、週邊血液單核細胞、肺泡巨噬細胞、豬

Abstract

by *Fusarium* species in which Fumonisin B₁ (FB₁) is the most common corn, corn product, and feedstuff contaminant. It has been shown that it may cause immunological effects in poultry, mice, and rats. To evaluate the potential effect of FB₁ on swine immune functions, swine peripheral blood mononuclear cells (SPBMC) and alveolar macrophages (SAM) were incubated with FB₁ *in vitro* at various concentrations for different time periods. The cell viability and various functions of both cells were examined. Additionally, the SAM and SPBMC were activated by LPS and Con A, respectively, to compare the susceptibility of resting and activated cells to FB₁ toxicity. For SPBMC, the parameters examined included cell viability; DNA, RNA, and protein synthesis; mRNA expression of IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, and IFN- γ ; and IL-2 production. For SAM, the parameters examined included cell viability; phagocytic and microbicidal activities; O₂⁻ and H₂O₂ production; mRNA expression of IL-1 β , IL-8, and TNF- α ; and TNF- α and PGE₂ production. In addition, the effects of FB₁ on the metabolism of sphinganine (Sa) and sphingosine (So) of SPBMC and SAM were also evaluated. The results showed that under the selected doses and incubation periods FB₁ could cause significant reduction in the cell viability; DNA, RNA, and protein synthesis; and IL-2 production in either Con A-activated SPBMC or non-Con A-activated SPBMC. For the mRNA expression in non-Con A-activated SPBMC, it was reduced at the early stage but then increased in IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, and IFN- γ , but it was increased before 36 hours of incubation (HOI) and reduced thereafter in IL-12 and TNF- α . The cytokine mRNA expression in Con A-activated SPBMC was inconsistent, among which IL-1 β was constantly increased in most of the time points; significant variations were present in IL-2, IL-8, IL-12, and IFN- γ ; and it was decreased in TNF- α . For the medium control, the level of cytokine mRNA expression in Con A-activated SPBMC was lower than that in non-Con A-activated SPBMC. For the sphingolipid metabolism, the content of Sa and So and the Sa/So ratio were elevated following 24 HOI in both 20 and 50 μ g/ml FB₁-treated SPBMC. As for the SAM, the cell viability was increased at the early stage but reduced later in both LPS-activated and non-LPS-activated groups with the former occurring earlier. The potential of O₂⁻ and H₂O₂ production were all reduced in both groups with O₂⁻ more prominent. The ability of SAM to engulf *Candida albicans* was reduced in both LPS and

Fumonisin secondary metabolites produced non-LPS-activated FB₁-treated groups in a time-dependent manner with the former more evident. The ability of SAM to kill the engulfed *C. albicans* was also reduced in both groups in a dose-dependent manner with the LPS-activated FB₁-treated group more apparent. As for the IL-1 β mRNA expression, it was reduced initially followed by increase in both groups; for IL-8, it was slightly increased initially and then became plateau in the LPS-activated FB₁-treated group, but it was slightly decreased initially and then became increased in the non-LPS-activated FB₁-treated group; for TNF- α , no consistent results were revealed in both groups. FB₁ treatment caused the reduction in the level of TNF- α production in the LPS-activated SAM but caused initial reduction followed by elevation in the non-LPS-activated SAM. FB₁ treatment induced the increase in the level of PGE₂ production in the LPS-activated SAM but caused initial increase followed by decrease in the non-LPS-activated SAM. For the sphingolipid metabolism, the content of Sa and So and the Sa/So ratio were elevated in a time-dependent manner in the LPS-activated FB₁-treated SAM. The results indicate that FB₁ could indeed cause cell death, multiple functional alterations, and disturbance in the sphingolipid metabolism of SPBMC and SAM. It is anticipated that long-term consumption of FB₁-contaminated feed has the potential to interfere with the immune regulation in pigs with subsequent reduction in disease resistance. The immune deregulation is possibly related to the changes in sphingolipid metabolism.

Keywords: Fumonisin B₁, Immunotoxicity, Sphingolipid, Peripheral blood mononuclear cells, Alveolar macrophages, Swine

計畫緣由與目的

伏馬鐮孢毒素(fumonisin)是一群主要由鐮孢菌屬(*Fusarium* spp.)所產生且化學結構相似的黴菌毒素,其中以FB₁為最主要,致害也最大。伏馬鐮孢毒素廣泛的存於各種發黴穀物中,其中又以玉米最為普遍,調查報告顯示本省約有50%以上的美國進口玉米及約1/3的玉米製品亦遭受FB₁的污染。如同其他黴菌毒素,在高劑量下FB₁亦會引發動物致命性的疾病,如馬的腦白質部軟化症、豬的肺水腫,而長期攝食也會引發大鼠的肝癌,在南非及中國大陸的調查報告中亦顯示,某些地區高食道癌的發生率可能與當地玉米類食物受到高量FB的污染有關。如同黃麴毒素、褐黴素A及T-2毒素等,攝食低劑量的FB₁亦會造成免疫力的下降,但這方面的研究仍少且多集中於禽類。目前已知

造成雞隻腹腔巨噬細胞存活率與吞噬能力的降低，也會造成火雞淋巴球增殖反應的降低；而餵飼含有 FB₁ 的飼料，會造成牛隻淋巴球增殖反應的不佳，也會使得豬隻的肺臟對異物及病原性細菌的清除能力減弱。有鑑於 FB₁ 在台灣食品及穀物中的高污染率及其在免疫方面的研究極為有限，本計畫的目的在以活體外共同培養的條件，探討 FB₁ 對豬隻肺泡巨噬細胞 (SAM) 與週邊血液單核細胞 (SPBMC) 的細胞存活率；多重細胞基本生理功能、基礎防禦功能及免疫調控功能；以及抱合脂質代謝所可能具有的影響；進而推測長期攝食遭受 FB₁ 污染飼料，對豬隻免疫功能所可能造成的影響。在 SPBMC，分別測定其 viability、DNA、RNA 及 protein 合成能力、IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-10、IL-12、IFN- γ 及 TNF- α 等細胞素 mRNA 表現能力、IL-2 產生能力以及抱合脂質 sphinganine (Sa) 及 sphingosine (So) 之代謝。在 SAM，則分別測其 viability、吞菌與殺菌能力、自由基 (O₂⁻ 和 H₂O₂) 產生能力、IL-1 β 、IL-8 及 TNF- α 等細胞素 mRNA 表現能力、TNF- α 與 PGE₂ 產生能力以及抱合脂質 sphinganine (Sa) 及 sphingosine (So) 之代謝。

結果與討論

以 RPMI-C 將所收集到的 SPBMC 調整至 1x10⁶ cells/ml 或 5x10⁶ cells/ml，加入終濃度 1 μ g/ml 的 Con A (活化狀態細胞)，或 RPMI-C (非活化狀態細胞)，於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中培養 6 小時。培養時間到後，以 RPMI-C 清洗細胞三次，然後分別以終濃度 0 (對照組)、2、10 及 20 μ g/ml FB₁ 攻毒 6、24、48 及 72 小時後，檢測細胞的 viability、DNA、RNA、protein 的合成能力、及白血球中介質 II (IL-2) 的產生能力。將 1x10⁶ cells/ml SAM，以每孔 1 ml 方式加入 24 孔培養盤中，於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中隔夜培養後，棄去上清液，並以 RPMI 培養液 (RPMI-C) 清洗細胞一次。加入終濃度 0.2 μ g/ml 的 LPS (活化狀態細胞)，或 RPMI-C (非活化狀態細胞)，於 37°C 含 5% CO₂ 的培養箱中再培養 2 小時。培養時間到後，以 RPMI-C 清洗細胞三次，然後分別以終濃度 0 (對照組)、2、10 及 20 μ g/ml FB₁ 攻毒 6、24、48 及 72 小時後，檢測細胞的 viability、自由基 (O₂⁻、H₂O₂) 的產生能力、吞噬與殺菌能力、TNF- α 及 PGE₂ 的產生能力。在 SPBMC 方面，以 FB₁ 攻毒後，其 viability 普遍的被抑制；FB₁ 對其 IL-2 產生能力的影響並不十分一致，但大致呈現抑制的趨勢；FB₁ 對其 DNA、RNA 及 protein 這三種大分子的合成能力均呈現抑制作用，其中以 RNA 和 protein 較為明顯，尤其是 RNA 於攻毒後 6 小時即顯著的低於對照組；比較兩種不同活化狀態 SPBMC 的

在活體外共同培養的條件下，FB₁ 會方面，以 Con A 活化的 SPBMC 抑制現象稍較明顯，但在 DNA 合成能力方面，則在經 Con A 活化與非活化二種狀態的細胞間無明顯差異。在 SAM 方面，其 viability 在 FB₁ 攻毒後，呈現一種早期提升而晚期抑制的情形，且這樣的趨勢以經 LPS 活化的細胞反應得較非活化細胞為早；SAM O₂⁻ 和 H₂O₂ 自由基的產生能力在 FB₁ 攻毒後亦會受到抑制，FB₁ 處理組的細胞對於受到 phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) 刺激後所引發的 O₂⁻ 產生能力較對照組為差，而此抑制情形在經 LPS 活化與非活化 SAM 分別於 FB₁ 處理後 48 與 72 小時達到顯著性水準 ($p < 0.05$)，至於 H₂O₂ 產生能力的抑制情形較 O₂⁻ 輕微，在攻毒之後 72 小時，處理組的 H₂O₂ 產生能力有明顯的被抑制現象 ($p < 0.05$)；FB₁ 攻毒組 SAM 對 *C. albicans* 的吞菌能力較對照組差，且有隨攻毒時間的延長而下降程度越大的趨勢，從攻毒 48 小時開始，LPS 活化與非活化狀態的 SAM 之吞菌能力被抑制的情形即有明顯的差異存在，其中經 LPS 活化 SAM 之 FB₁ 處理組的吞菌能力受抑制的情形比非活化 SAM 來得明顯；此外，SAM 經 FB₁ 攻毒後，對 *C. albicans* 的殺菌能力亦受到抑制，且經 LPS 活化之 SAM 較明顯，而此抑制程度與濃度成正相關，在攻毒 72 小時後，LPS 活化與非活化狀態 SAM 的殺菌能力均顯著的被抑制；FB₁ 會造成經 LPS 活化 SAM 之 TNF- α 的產生能力下降，而非活化 SAM 之 TNF- α 產生能力在攻毒早期呈現抑制的趨勢，但到了攻毒後 48 與 72 小時，則反有提高的趨勢；FB₁ 對於經 LPS 活化的 SAM 的 PGE₂ 產生是呈現提昇的作用，而在非活化 SAM，則是在攻毒後 6-24 小時，PGE₂ 的產生呈增加的趨勢，但在攻毒 48-72 小時，則呈抑制的現象。為進一步探討 FB₁ 對 SPBMC 和 SAM 細胞素 mRNA 表現及細胞內抱合脂質代謝的影響，在活體外的條件下，將 SPBMC 在有或無致裂原 Con A 的刺激下分別與 10 (14 μ M)、20 (28 μ M) 及 50 (70 μ M) μ g/ml 之 FB₁ 共同培養 6、12、24、36 及 48 小時，利用 trypan blue 色素排除試驗法檢測細胞之存活率，並以半定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應偵測細胞素之表現。另設計未經 Con A 活化 SPBMC 與 FB₁ 培養 24 小時，同時以高壓液相管柱層析法 (HPLC) 的方式檢測細胞內抱合脂質 sphinganine (Sa) 及 sphingosine (So) 含量的變化。實驗結果顯示，於所測試之劑量及培養時間條件下，無論是經 Con A 活化及未經 Con A 活化 SPBMC 之細胞存活率均普遍受到抑制。就 FB₁ 對 SPBMC 細胞素 mRNA 表現能力之影響而言，在未經 Con A 活化之細胞，其 IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-10 及 IFN- γ mRNA 之表現於攻毒 6 小時後多呈下降的趨勢，但於 12 小時之

反應，在 RNA 與 protein 的抑制而 IL-12 及 TNF- α 於攻毒 6 - 36 小時之間，其 mRNA 之表現大致呈上升的趨勢，但 48 小時則呈現下降的趨勢。而經 Con A 活化之細胞之細胞素 mRNA 表現則較不一致，其中 IL-1 β 於各攻毒時間多呈現上升的趨勢；IL-2、IL-8 及 IFN- γ mRNA 之表現於 6 及 24 小時有下降之趨勢，12 及 48 小時則又呈現提升之情形；IL-12 mRNA 之表現於 12 及 48 小時有下降之趨勢，6 及 36 小時則又呈現提升之情形；TNF- α mRNA 之表現於 12 - 48 小時則多呈現下降之趨勢。大體而言，經 Con A 活化之對照組細胞，其細胞素 mRNA 表現之能力皆較未經 Con A 活化之對照組為差。在 FB₁ 對 SPBMC 抱合脂質代謝之影響方面，與對照組相較下，於攻毒後 24 小時在 20 及 50 $\mu\text{g/ml}$ FB₁ 處理組，其 Sa 與 So 含量以及 Sa/So 的比例均有提升的趨勢，其中 Sa 的提升在兩個 FB₁ 處理組均達統計上極顯著性 ($P < 0.01$)。在 SAM 方面，將經過 LPS 或未經 LPS 活化的 SAM 分別與 10、20 或 50 $\mu\text{g/ml}$ 之 FB₁ 共同培養 2、6、12、18、24、36、48 或 72 小時，再以 LPS 刺激後，分別偵測細胞的存活率、細胞激素 (包括 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α) mRNA 的表現及抱合脂質堆積的情形。實驗結果發現，與對照組比較，經 LPS 活化的 SAM 之細胞存活率下降的幅度在 FB₁ 攻毒後呈現減緩的趨勢，而對於未經 LPS 活化的 SAM，FB₁ 處理導致細胞存活率下降的幅度則呈現加劇的情形；就 IL-1 β mRNA 的表現而言，在經 LPS 或未經 LPS 活化的 SAM 中，均呈現 6-12 小時先下降，24-48 小時後提昇的現象；就 IL-8 mRNA 的表現而言，在經 LPS 活化的 SAM，呈現 6 小時先輕微上升，12-48 小時後持平的現象，而在未經 LPS 活化的 SAM，則呈現 6-12 小時大多下降，而 24-48 小時微升的趨勢；就 TNF- α mRNA 的表現而言，經 LPS 活化與否之表現則不一致；經 LPS 活化的 SAM 經 FB₁ 處理後，其抱合脂質代謝的情形，如同其他細胞般，亦會發生 Sa 和 So 濃度及 Sa/So 比率上升的現象，且隨著攻毒時間的延長，其提升的情況亦隨之增加。整體而言，在活體外培養的條件下，FB₁ 對於 SAM 和 SPBMC 均能對其細胞產生毒殺作用，同時對這些細胞的基本生理作用 (如 DNA、RNA 及 protein 等大分子的合成作用)、細胞的基礎防禦功能 (如吞噬與殺菌力、氧自由基的產生能力、炎症反應前驅物前列腺素的產生能力)、炎症反應與免疫調控細胞激素 (如 IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-10、IL-12、IFN- γ 及 TNF- α) mRNA 或蛋白質的表現與產生能力等各項功能產生干擾的作用。根據上述結果，我們推測若長期攝取受到 FB₁ 污染的飼料，有可能會造成豬隻免疫力的下降及/或調控異常，雖然此時臨床可能並無明顯的 FR。

後，這些細胞素之表現則大致呈上升的趨勢；會受到干擾甚至降低。目前已知 FB₁ 的作用機制可能與干擾細胞內抱合脂質 (sphingolipid, SL) 的代謝有關，FB₁ 藉由抑制 ceramide synthase 的活性而造成細胞內之 complex SL (含 ceramide、glycosphingolipid、sphingomyelin 及其他 SL) 的減少、sphingoid bases (含 sphinganine (Sa) 與 sphingosine (So)) 的增加及 Sa/So ratio 的提高。這些 complex SL 及 sphingoid bases 在細胞內，不僅是一種細胞膜上的組成脂質 (約佔細胞膜上脂肪成分的 10%)，也在訊息傳遞 (signal transduction) 中擔任二次訊息傳遞者 (secondary messenger) 的角色，因此這些化合物不正常的增減，對細胞的生理會造成許多直接與間接的影響。而 FB₁ 之所以會造成 SAM 和 SPBMC 毒殺作用及各項功能改變的作用機制，推測可能也與干擾細胞內抱合脂質的代謝有關，然而這一部份仍有待進一步的驗證。

計畫成果自評

本實驗中，運用多種廣為使用的巨噬細胞與淋巴細胞的細胞存活率及功能檢測法，針對日益受到重視的伏馬鐮孢毒素 (FB) 多種致害中的免疫毒性傷害，以豬隻 SAM 及 SPBMC 兩種重要的免疫細胞為對象，進行多層面、廣泛性的探討。由於現階段商品化的豬隻細胞素 ELISA 套組僅有 IL-1 β 、IL-2、TNF- α 及 IFN- γ ，為能全面性了解 FB₁ 對豬隻 PBMC (含淋巴球及單核球) 細胞素表現的影響，因此採用半定量 RT-PCR 針對 PBMC 可能產生之重要細胞素，含 IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-10、IL-12、TNF- α 及 IFN- γ 等，進行廣泛的檢測，同時也針對 FB₁ 是否會干擾及其抱合脂質之代謝進行檢測。實驗證實，FB₁ 對於豬隻的 SAM 和 SPBMC 之細胞存活率和各項防禦及免疫調節相關功能，均能產生明顯的干擾作用，同時也會干擾及其抱合脂質之代謝。由於在目前的文獻中尚未看到有類似且完整的研究報告，因此本實驗室正著手進行各項結果的整理，以便將之發表於相關的國際性學術雜誌。

參考文獻

- 1 蔡群騰。黴菌毒素 T-2、黃麴毒素 B₁ 及伏馬鐮孢毒素 B₁ 對豬週邊血液單核球與支氣管肺泡沖洗液細胞的毒害作用中 apoptosis 所扮演的角色。國立台灣大學獸醫學研究所碩士論文。1998。
2. 曾聰徹。1994。正視伏馬鐮孢毒素問題。科學月刊 25: 354-356。
3. Ballou LR. 1992. Sphingolipids and cell function. *Immuno. Today* 13: 339-341.
4. Charoenpornsook C, Fitzpatrick JL, Smith JE. 1998. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine

- 控異常，雖然此時臨床上可能並無明顯的FB₁中毒症狀，但豬隻對於疾病的抵抗力可能因而
- Mycopathologia 143: 105-111.
5. Chatterjee D and Mukherjee SK. 1994. Contamination of Indian maize with fumonisin B₁ and its effects on chicken macrophage. Lett. Appl. Microbiol. 18: 251-253.
 6. Dombrink-Kurtzman MA., Javed T, Bennett, GA, Richard JL, Cote LM, and Buck, WB. 1993. Lymphocyte cytotoxicity and erythrocytic abnormalities induced in broiler chicks by fumonisins B₁ and B₂ and moniliformin from *Fusarium proliferatum*. Mycopathologia 124: 47-54.
 7. Dugyala RR., Sharma RP, Tsunoda M, and Riley RT. 1998. Tumor necrosis factor- α as a contributor in fumonisin B₁ toxicity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 285: 317-324.
 8. Dutton MG. 1996. Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: Their nature and their effects. Pharmacol. Ther. 70:137-161.
 9. Guzman RE, Bailey K, Casteel SW, Turk J, and Rottinghaus G. 1997. Dietary *Fusarium moniliforme* culture material induces in vitro tumor necrosis factor-alpha like activity in the sera of swine. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 19: 279-289.
 10. Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, and Cole JR. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. 2: 217-221.
 11. Li YC, Ledoux DR, Bermudez AJ, Fritsche KL, Rottinghaus GE. 1999. Effects of fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. Poultry Sci 78: 1275-82.
 12. Marasas WFO, Kriek NPJ, Fincham JE, and van Rensburg SJ. 1984. Primary liver cancer and oesophageal basal cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*. Int. J. Cancer 34: 383-387.
 13. Marijanovic DR, Holt P, Norred WP, Bacon CW, Voss KA, and Stancel PC. 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. Poultry Sci. 70: 1895-1901.
 14. Martinova EA and Merrill Jr AH. 1995. Fumonisin B₁ alters sphingolipid metabolism and immune function in BALB/c mice: immunological responses to fumonisin B₁. Mycopathologia 130: 163-170.
 15. Merrill AH, van Echten Jr G, Wang E, and Sandhoff K. 1993. Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) *N*-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. J. Biol. Chem. 268: 27299-27306.
 - peripheral blood mononuclear cell in vitro. 522-527.
 17. Qureshi MA and Hagler WM. 1992. Effect of fumonisin B₁ exposure on chicken macrophage functions in vitro. Poultry Sci. 71: 104-112.
 18. Riley RT, An NH, Showker JL, Yoo HS, Norred W P, Chamberlain WJ, Wang E, Merrill, Jr AH, and Motelin G. 1993. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. Toxicol. Appl. Pharmacol. 118: 105-112.
 19. Shephard GS, Thiel PG, Stockenstrom S, and Sydenham EW. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. J. AOAC Int. 79: 671-687.
 20. Smith GW, Constable PD, Smith AR, Bacon CW, Meresith FI, Wollenberg GK, and Haschek WM. 1996. Effects of fumonisin-containing culture material on pulmonary clearance in swine. Am. J. Vet. Res. 57: 1233-1238.
 21. Tryphonas H, Bondy G, Miller JD, Lacroix F, Hodhen M, Mcguire P, Fernie S, Miller D, and Hayward S. 1997. Effects of fumonisin B₁ on the immune system of Sprague-Dawley rats following a 14-day oral (average) exposure. Fundam. Appl. Toxicol. 39: 53-59.
 22. Tseng TC, Lee KL, Deng TS, Liu CY, and Huang J W. 1995. Production of fumonisins by *Fusarium* species of Taiwan. Mycopathologia 130: 117-121.
 23. Tseng TC and Liu CY. 1997. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn-based foodstuffs in Taiwan market. Mycopathologia 137: 57-61.
 24. Tseng TC, Tu JC, and Tzean SS. 1995. Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwan and in Ontario, Canada. Bot. Bull. Acad. Sin. 36: 229-234.
 25. Yoo HS, Norred WP, Showker J, and Riley RT. 1996. Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 138: 211-218.
 26. Yoshizawa T, Yamashita A, and Luo Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1626-1629.

16. Norred WP and Voss KA. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Prot.* 57: