

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 提升私校研發能量專案計畫--總計畫:腐植酸及重金屬的環境化學與環境毒物學研究(3/3) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型  
計畫編號：NSC 95-2745-B-040-001-URD  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：呂鋒洲

計畫參與人員：學士級-專任助理：林翠娟、周湘芸、李宜金  
大學生-兼任助理：林靖華、盧怡珠、葉帝言、李宥萱、鍾宛瑾、薛敬議

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 01 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

提升私校研發能量專案計畫

腐植酸及重金屬的環境化學與環境毒物學研究

總計畫

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2745 -B040 - 001 - URD -

執行期間：95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

總計畫主持人：呂鋒洲

計畫參與人員：陳建良、曾翠華、趙木榮、胡瓊文、巖正傑

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整  
報告

處理方式：可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中華民國九十六年十月三十日

## 目 錄

摘要	p. 3-4
研究計畫背景及目的	p. 4-7
研究方法	p. 8-33
結果與討論	p. 33-48
結 論	p. 48-49
參考文獻	p. 49-55
計劃成果自評	p. 55
圖表	p. 56-113
附件	p. 114-132

## 摘要

腐植酸 (humic acid) 是存在於環境中的酚類聚合物 (polymers of phenolic acids)。它們不僅參與環境中一系列與人類生存有關的過程，而且與人類的健康有密切的關係。腐植酸是一種外源性的「安定的自由基物質」，本身又是多陰離子性的聚合物，因此腐植酸除加上上述兩種因素外，再與第三種致病因子的結合可能是克山病、大骨節病、甲狀腺腫和烏腳病的病因因素。我們當前應當特別重視研究腐植酸在誘發不同地方性疾病的不同致病機理，才能防患腐植酸誘發其他疾病之可能性。

目前群體計畫已經有確認部份腐植酸之毒性較強，亦有和砷產生毒性加強之作用，砷或其化合物甚至其他部份金屬亦在環境中大量存在，同時砷亦被認為是重要的致病因子，再加上腐植物質是很好的金屬螯合劑，尤其是砷和腐植物質間之交互作用及和毒性作用間之相關性也需要更進一步之探討。由實驗數據顯示，砷和腐植酸確實有毒性相加作用。經由各子計畫之合作，探討腐植物質毒性作用之標的器官與影響程度，以及對某些疾病包括癌症、糖尿病、致畸胎等之影響，並朝更細部之毒性致病機轉探討。目前已完成 on-line cleanup LC-MS/MS 分析方法應用於動物臟器 8-OHdG 含量之測定以及腐植酸裂解產物之分析方法建立。藉由基因氧化傷害的角度首次證實腐植酸與砷同時存在時會加強老鼠的基因氧化傷害，同時亦看到腐植酸具有 tumor promotion 之作用，亦會影響腫瘤細胞之型態表現，顯示與癌症惡化轉移亦有關聯。雖然在安姆氏測試實驗並無法證實腐植酸具有明顯致突變性之作用，但在其他研究模式中已確認其產生氧化性壓力 (自由基) 之作用卻相當明顯，應為其重要之作用機轉之一。此外，在致畸胎實驗中亦有觀察到腐植酸與砷之暴露會影響與胚胎發育及分娩有關之賀爾蒙，因而可能與流產或早產有關，而多世代生殖試驗中亦初步觀察到腐植酸對老鼠受孕能力有負面影響。急毒性動物實驗除了證實高濃度之腐植酸具有高強致死性外，腐植酸與砷之暴露亦有加強作用，單獨暴露高濃度之腐植酸亦在施藥後 2-5 天在尾部末梢產生黑色沈積 (病變)，以較低劑量之腐植酸與砷長期餵食亦在病理切片中發現對胰臟、膀胱、肝臟等會有輕微病變產生，其較深入之作用機制則擬於後

續實驗中探討。

綜觀三年研究期間，共計發表 SCI 期刊論文已刊登有 3 篇，分別為 **Chemico Biological Interactions**，**Clinical Chemistry** 以及 **Toxicology Letters** 等，準備中有 6-7 篇。參與 2 次國際會議，並協辦其中一次及口頭報告相關研究成果，多次參與國內各種學術研討會並發表十餘篇壁報論文，而參與研究計畫之大專生與助理亦有十餘人次順利進入各校研究所進修，成果相當不錯。

## 研究計畫背景及目的

台灣是一個地狹人稠的海島，在此生活的人們本著刻苦耐勞的天性，於短短數十年間創造了舉世稱羨的經濟奇蹟，國民所得平均早已超過一萬美元。但是，近年來當民眾發現工商業的發達，雖然使大家的生活享受提高，卻讓我們的生活環境變差了，經常要面臨因事業廢棄物缺乏妥善處理所導致環境污染與潛藏之危害(1)。此外，在我們致力於提高糧食產量與生活便利等過程中，又使得大量使用的農藥，化學肥料，堆肥，塑膠製品，汽機車燃料廢氣，有機溶劑(如乾洗劑、粘著劑、芳香劑等)流佈到環境中，再加上環境中原本就存在的天然毒性物質如重金屬及類金屬物質—鉛、砷、汞等(李聰亮，1995)，有機物質如廣泛存在土壤及水中的腐植物質(陳立夫等，1992；賴進興等，2000)、植物毒素之藜蘆鹼、馬兜鈴酸等，著實令人感到生活中處處都隱藏著看不到的殺手正在影響自己的健康甚至危及性命。

幸而在許多專家學者的努力之下，有部分環境因子的毒理機制與預防之道已逐漸為大眾所了解。但是在這個領域之中，尚有許多的不明之處正等著更多的研究學者投身其中，一窺奧妙，建立較完整的環境毒性因子的健康風險評估，同時搭配更嚴謹的污染預防(工業減廢)，更完善的廢棄物處理程序以及末端管制工作或環境允許濃度之測定，相信一定可以給台灣帶來一個可以預期的未來，一個不會被環境毒性因子影響到大眾健康的未來。

這些工作是身為台灣醫療教育體系一員的我們所責無旁貸的。但是，如前所

述，環境有害物質何止成百上千，而其個別化合物的毒性作用與致病機轉亦各有不同，如何有效而能持續的對這些環境因子作更深入的探討就成為相當的重要。首先，就要對研究體系的長久運作建立一初步的架構，亦即是成立”環境因子對台灣本土性疾病的致病機轉研究中心”，同時邀請本校包括環境採樣、分析化學、有機合成化學、藥物化學、細胞分子生物學、癌化機制研究、動物毒理學、免疫學、生物化學等不同領域之學者參與而組成一個涵蓋環境化學及環境毒物學與生命科學之研究團隊。至於在研究主題的選擇上，大家希望對目前台灣地區暴露可能性較高，而危害性較強同時致病機轉尚需深入探討之環境物質作為中心成立初期之研究標的。幾經討論，同時考量在台灣本土性疾病中曾經最令人印象深刻的就是西南沿海地區的烏腳病，主要是飲用地下水造成這個俗稱「烏乾蛇」的怪病(Tseng et al., 1961; Lu et al., 1990)，雖然因改用自來水而使得它逐漸淡出大家的記憶，但是流行病學調查研究結果卻發現該地區的環境因子又以另外的疾病形式-如癌症、心血管疾病及糖尿病等困擾著當地居民(Tseng et al., 2002)。根據陳建仁教授、楊末雄教授、呂鋒洲教授以及楊新玲教授等學者之研究結果(Chen et al., 1994; 王少芬等, 2003; 呂鋒洲, 2003; 楊新玲, 1998)顯示，包括環境中的砷或是腐植質皆在這些慢性疾病中扮演重要的角色，但是其確實致病機轉以及原因尚待更多的研究數據加以釐清。同時，經由相關文獻報告的蒐集，腐植質不僅天然存在於地下水及土壤中，在人工堆肥與廢水處理之污泥中亦有大量存在(陳立夫等, 1992; 賴進興等, 2000; Inbar et al., 1990; Stelink et al., 1963)，許多農民使用腐植質作為土壤改良劑(林景和, 1992)等，使用相當廣泛。

腐植酸(humic acid)是存在於環境中的酚類聚合物(polymers of phenolic acids)。它們不僅參與環境中一系列與人類生存有關的過程，而且與人類的健康有密切的關係。由於分析設備技術的巨大發展，長期以來，難以解決的腐植酸的測定與分析的問題，逐步得到解決。在這種情況下，腐植酸類物質已成為環境地球化學以及環境毒理學的重要研究對象。近40年來，中國大陸和台

灣學者在「腐植酸自由基」與克山病、大骨節病、甲狀腺腫和烏腳病的致病的關係的研究證實，飲用水和土壤中過高的腐植酸有利於上述地方性疾病的發生(呂鋒洲，2003)。學者們進一步的研究顯示，環境中的腐植酸降低了硒、碘的生物可利用性。腐植酸是一種外源性的「安定的自由基物質」，本身又是多陰離子性的聚合物，因此腐植酸除加上上述兩種因素外，再與第三種致病因子的結合可能是克山病、大骨節病、甲狀腺腫和烏腳病的病因因素。我們當前應當特別重視研究腐植酸在誘發不同地方性疾病的不同致病機理，才能防患腐植酸誘發其他疾病之可能性。烏腳病是台灣西南沿海地區特有的一種末梢血管疾病，發病初期，患者通常是四肢先有麻木及冰冷現象，接著患部潰爛，然後壞疽病變。至今仍無良好預防及治療方法，唯有以手術鋸去患肢，但症狀仍會繼續惡化。此外，烏腳病地區亦具有高度流行率的癌症（膀胱癌、腎臟癌、肺癌、皮膚癌、肝癌、攝護腺癌等）、糖尿病、心血管疾病、高血壓以及甲狀腺腫大等各種疾病(Chen et al, 1994; Tseng et al., 1961; Lu et al., 1990 王少芬等，2003；呂鋒洲，2003；楊新玲，1998)。所有烏腳病病人都有飲用承壓自流井水的歷史。台灣學者先後發現井水中砷含量偏高和腐植酸偏高。

綜合前述，自從 200 多年前人們開始注意到環境中的腐植物質後，關於腐植物質對生物體之毒性影響，以及不同組成化合物分子在環境流佈上的意義與其在未來醫藥及生活上的應用，在過去三十前間已有較多層面的探討(呂鋒洲，2003)。但或許是受限於儀器功能抑或是人力的欠缺，尚有許多疑問正等待著我們去做更深入、更全面性的研究。例如不同來源的腐植物質即有可能見有不同的毒性反應，抑或龐大的化合物組合中，因組合比例不同或是結合不同的金屬也會對其毒性產生影響。為了克服因腐植物質來源不同而影響整體實驗評估之結果，群體計畫特別著重在腐植物質樣品來源的取得(包括井水、土壤、堆肥、市售藥品及自行合成)和分離與純化之工作。同時藉由實驗室內模擬探討腐植物質和砷化合物之錯合能力。此外，為避免多種來源之樣品數量過多，超過各子計畫所能承受之能力，在進入細胞與動物毒理試驗之前，先將各種來源之樣品或分

離之化合物單獨或和金屬化合物混合以快速毒性篩選方法—螢光菌之急毒性與致突變性分析和自由基反應分析將毒性影響較小之樣品先行排除在外。

經由篩選方法所找到的毒性較強之樣品以及自行純化之市售樣品，則分由各毒性評估子計畫進行各項毒理致病機轉探討，其中尤其著重環境分析及醫藥毒理研究之背景資料中常被提起的砷化合物和腐植物質或其分離之樣品共同暴露之影響也是群體計畫中所要深入探討之重點。整合型計畫將集合多個子計畫的力量對腐植物質的毒理機轉作一全面性的探討以及嘗試找到具毒性指標化合物作為環境安全指標之外，尚希望能為在腐植物質大量存在生活環境中的人們，嘗試經由代謝物的結構分析或是 DNA 傷害的相關指標例如 DNA 加成物的探求，建立其生物指標，作為健康影響評估之參考標準。



## 研究方法

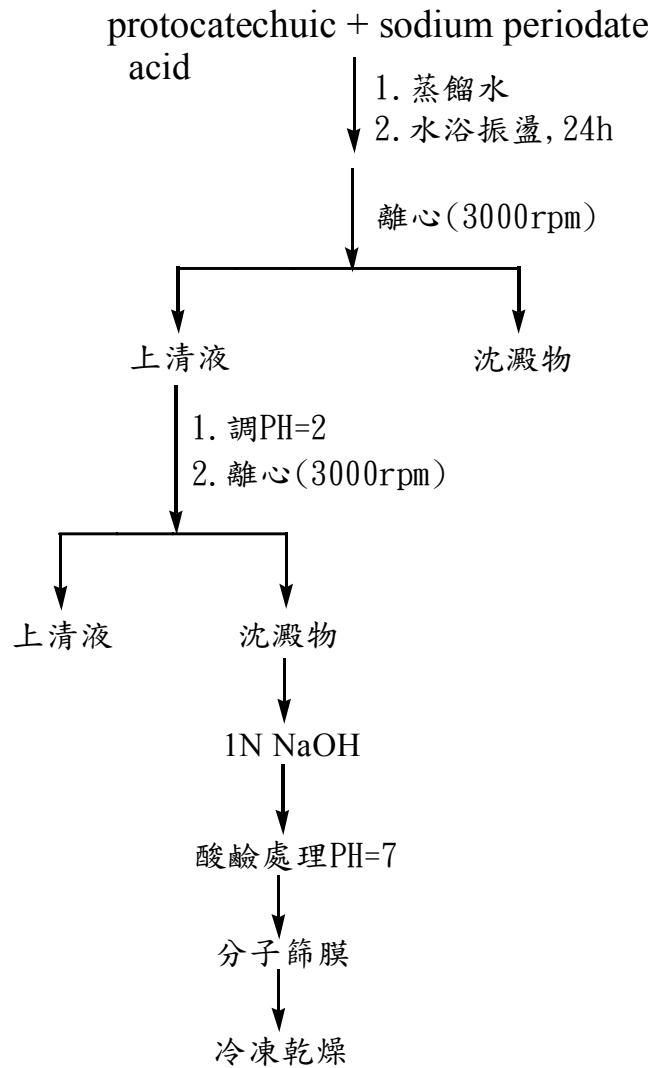
### 1. 腐植酸之來源與製備

編號	來源與處理內容敘述
HA	Commercial HA(Aldrich) 經酸鹼處理 3 次純化
SHA	合成 HA from Protocatechuic acid
HA 4	Protocatechuic acid
HA 6	Humic acid from protocatechuic acid
HA 13	Humic acid from Vanillic acid S2 (no fluorescent)
HA 16	合成 HA from Protocatechuic acid
HA 44	Commercial HA (Aldrich) M.W. > 5K
HA 71	合成 HA MW<500
HA 76	Humic acid from caffeic acid
HA 78	合成 HA from protocatechuic acid
HA 135	合成 HA from Protocatechuic acid
HA 189	鹽水鎮井水 → XAD-7 → condens → Soxhlet extract 之 methanol 8.21
HA 196	鹽水鎮井水 → XAD-7 → NaOH 沖下 → PH:11~12 → HCl 至 PH:1.5 → 離心 → 取上清液 → stir cell(1K) → 減壓濃縮 → 冷凍乾燥 (Fulvic acid)
HA 231	H.A of America 酸沉澱 -> benzene -> ethylacetate -> residue
HA 232	H.A of Taiwan 酸沉澱 -> benzene -> ethylacetate -> residue
HA 233	H.A of America 酸沉澱 -> benzene -> ethylacetate -> residue
HA 234	H.A of Taiwan 酸沉澱 -> benzene -> ethylacetate -> residue
HA 245	合成 HA from Gallic acid

#### A. 各種腐植酸之合成

由 protocatechuic acid, gallic acid, caffeic acid, vanillic acid 合成酚類

polymer 即合成腐植酸,流程如下:



#### B. 腐植酸 (Humic acid) 純化步驟 (HA)

量取適量之 humic acid (Aldrich) 粉末溶於 1N NaOH (in dd H<sub>2</sub>O), PH=10,攪拌至溶解後靜置 2-3 小時,並不時攪拌後,加入 1NHCl (in ddH<sub>2</sub>O), 調 PH 到約為 2, 產生沉澱,靜置隔夜,分裝到 50ml 試管,以 3000 rpm 15°C, 離心 10 分鐘去掉上層黃色透明液體,將下層褐色沉澱物收集,重複上述步驟鹼→酸→離心→分離 共 3 次,收集最後一次沉澱物後先以較少量之 1N NaOH 攪拌使之溶解後再加入少許 dd H<sub>2</sub>O 攪拌,調整至 PH 約為 7(視需要可加入少許 1N HCl 調整 PH 值)將 Humic acid 純化後之溶液,以濾紙過濾去除不溶性

雜質,將溶液冷凍乾燥後收集粉末置於乾燥箱內備用(HA).

### C. 井水腐植酸(HA#196)之純化步驟

將 40 L 地下水以 0.45  $\mu\text{M}$  濾膜過濾,濃縮至 300 ml, 以 HCl 酸化至 pH=2, 置入 XAD-7 樹脂管柱, 以濃 NaOH 沖提後以 HCl 調為中性後乾燥.

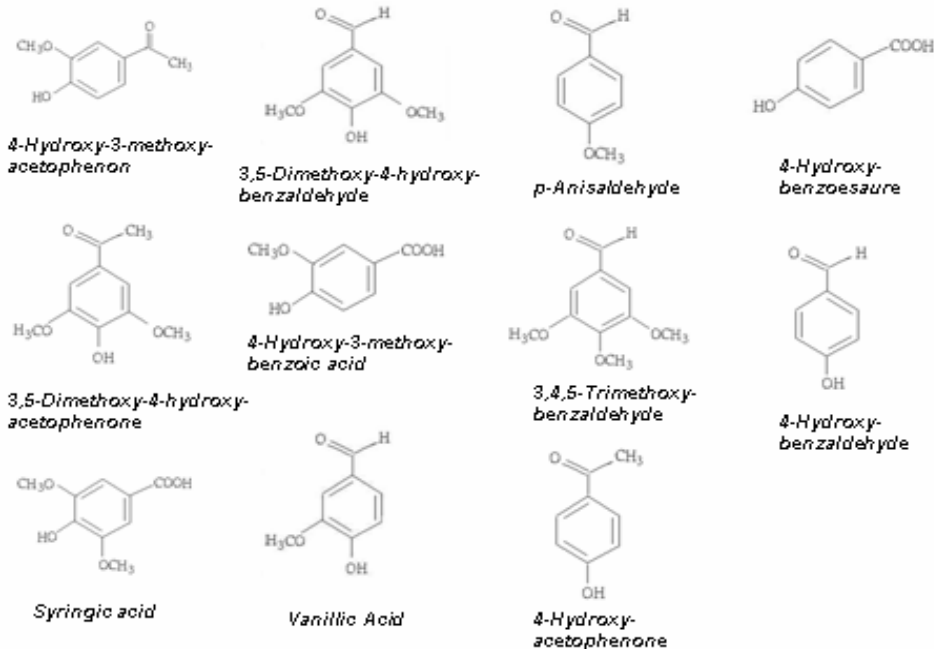
## 2. 砷化合物包括 arsenic trioxide( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), DMA(dimethylarsinic acid)

## 3. 各子計畫之重要研究工作內容

### A. 腐植酸聚合物及其裂解單體分析

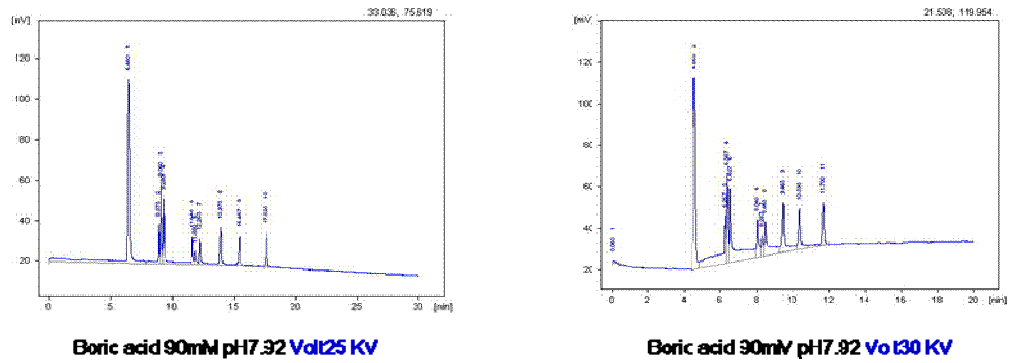
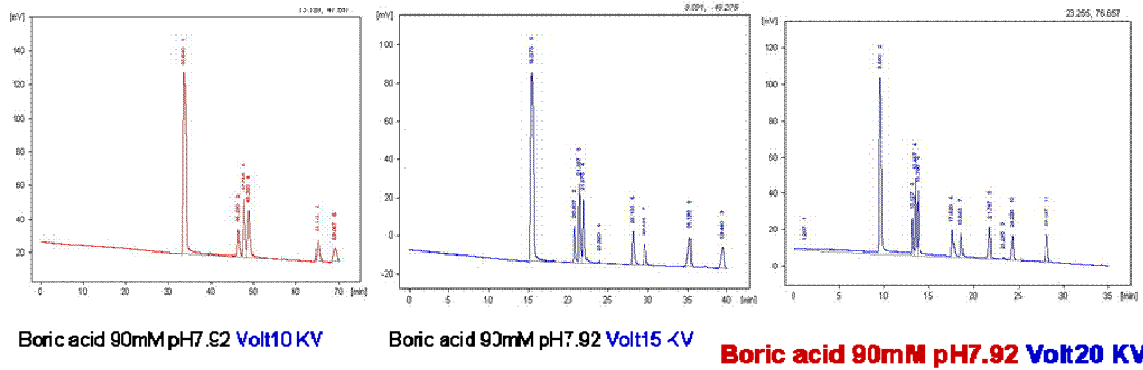
完成毛細管電泳法分析腐植酸可能裂解之 11 種單體的最佳化條件, 以多種腐植酸聚合物為樣品, 經消化釜裂解後分析單體組成及含量, 並且輔以光譜分析及元素分析比較 12 種腐植酸聚合物之可能化學結構與組成。

#### 11 種腐植酸單體的化學結構

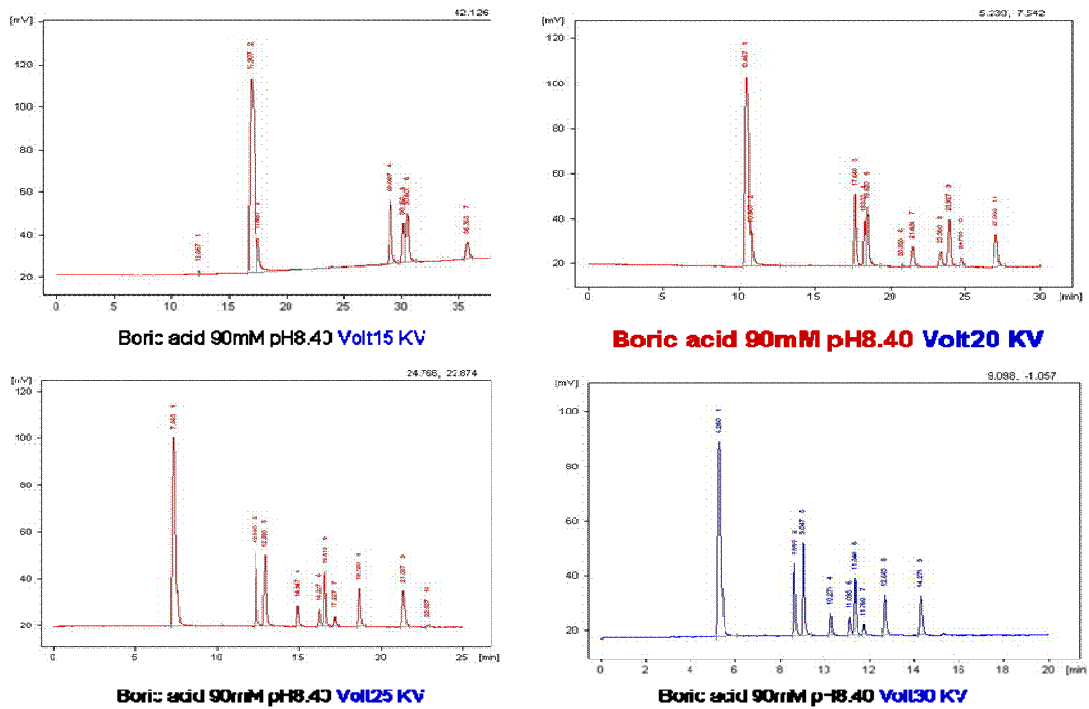


(A) 11 種單體的最佳化毛細管電泳分析條件建立: 在操作電壓 10、15、20、25 及 30 kV 條件下, 嘗試配製沖提液為 115 mM pH 8.08、8.45 及 8.80 的 Tris 緩

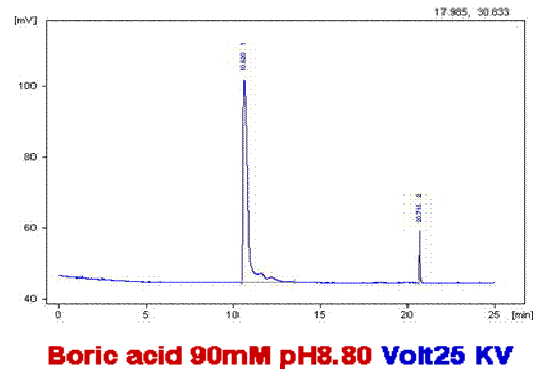
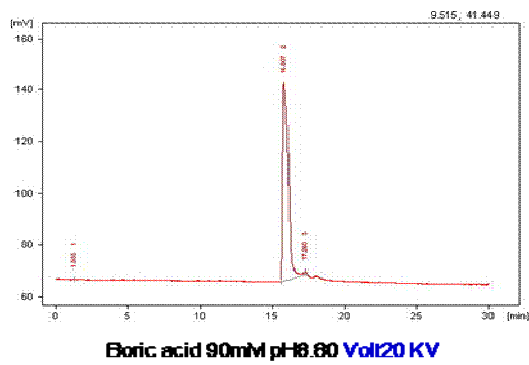
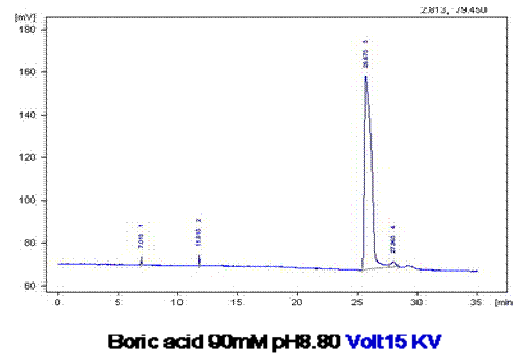
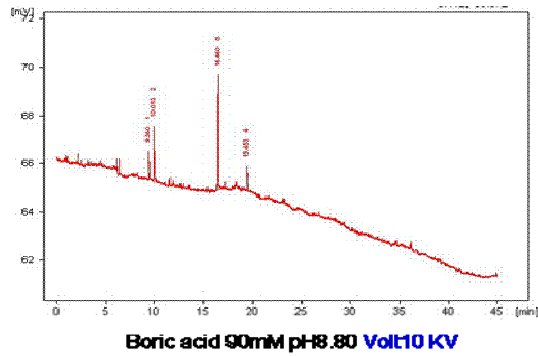
衝溶液以及 0.75 mM pH 8.08、8.40 及 8.82 的 EDTA 緩衝溶液，其結果皆不如 boric acid 所建立的緩衝溶液系統，其中以 Volt 20 KV 為最佳。



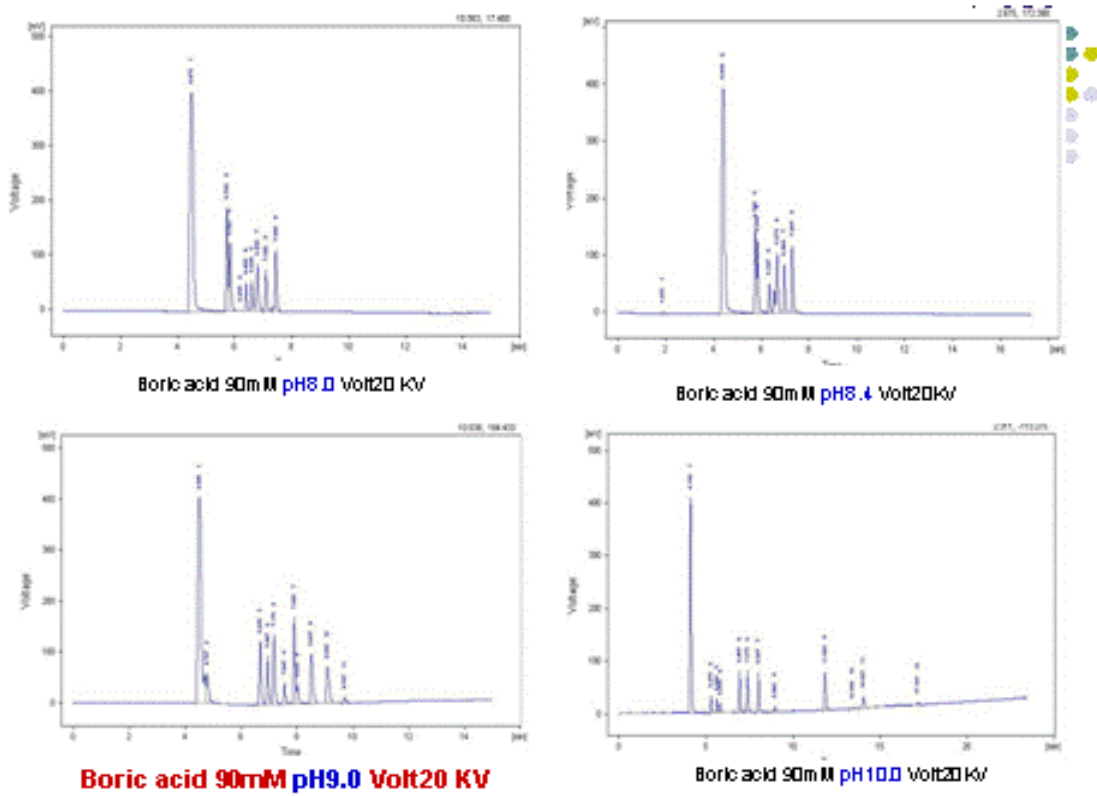
Boric acid 緩衝溶液 90mM pH 8.40 在 10~30 KV 操作電壓下的層析圖，其中以 Volt 20 KV 為最佳。



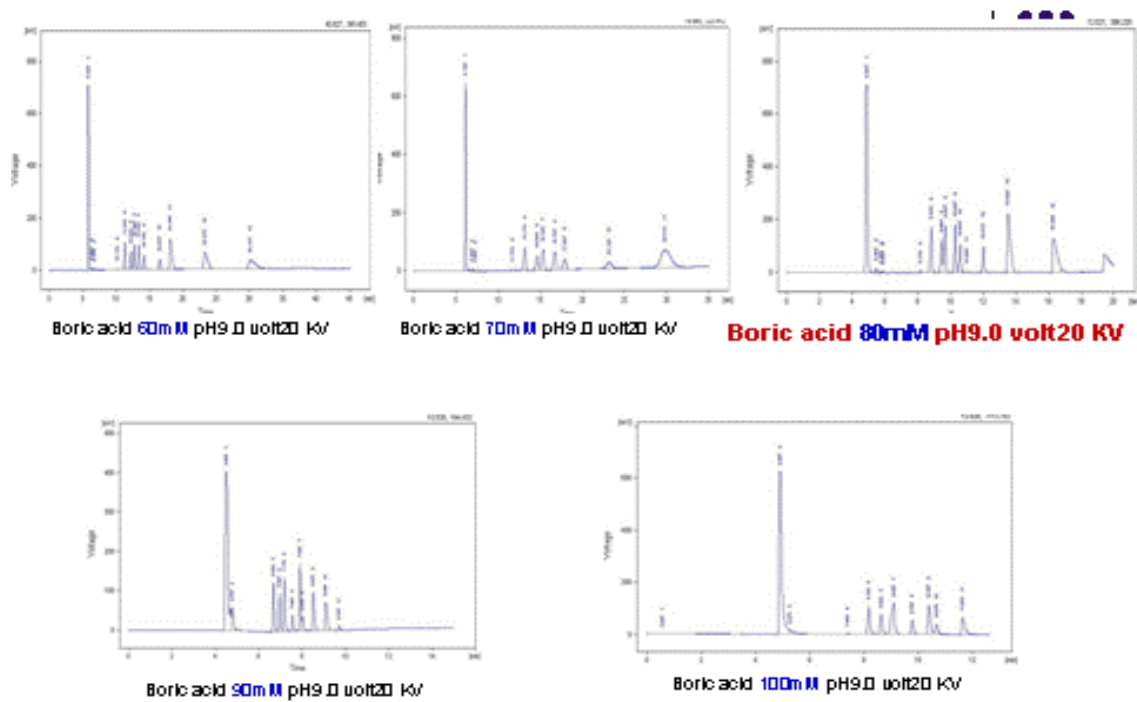
Boric acid 緩衝溶液 90mM pH 8.80 在 10~30 KV 操作電壓下的層析圖，其中以 Volt 25 KV 為最佳。



比較以上三組層析圖初步得知 Boric acid 緩衝溶液以 90mM pH 8.40 為最佳，據此再嘗試 90 mM pH 8.0, 9.0 及 10.0，在下圖表示其 20 KV 操作電壓下之層析圖，結果以 pH 9.0 為最佳。



再嘗試 pH 9.0 濃度範圍 60~100 mM 的 Boric acid 緩衝溶液，在下圖表示其 20 KV 操作電壓下之層析圖，結果以 80 mM 為最佳。



## (B) 多種腐植酸聚合物之裂解

腐植酸樣品可經以下反應裂解成寡聚合或單體，再由已最佳化之毛細管電泳系統分析。

- (1) 25 mg 土壤或井水樣品置於密封的鐵氟龍小瓶，再以鋼製的 bomb 保護。
- (2) 將 1 克 CuO、ammonium iron(II) sulfate hexahydrate  $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  75 mg、8% hydroxide sodium 7ml 等加入樣品中，以氮氣壓力密封。
- (3) 將 bomb 置於攝氏 150 度烤箱 4 小時，此時，CuO 的氧化作用便開始。
- (4) 經冷卻後，將反應產物及以 4% NaOH 30ml 清洗 bomb 後一齊置入 50ml 的離心管內。
- (5) 離心之後的上澄清液要保留下來，下沉澱物以 4% NaOH 10ml 清洗。
- (6) 上澄清液和清洗沉澱物後之萃取液混合，以 6M HC 使其酸性化至 pH 值為 1。
- (7) 減壓濃縮後之固體，經乙醚萃取溶解。乙醚蒸發後，其固體殘渣以 5ml 甲醇溶解之。
- (8) 甲醇溶液以 22um 的濾紙過濾，放入密封小瓶中，置於氮氣壓下、攝氏 4°C 黑暗中。

## (C) 12 種腐質酸之光譜分析

取 5 毫克腐植酸樣品，加入 180  $\mu\text{L}$  1M 的氫氧化鈉溶液溶解之，再以水稀釋至 100 毫升，即可以 UV-VIS 分光光譜儀分析之，下表 a 是 12 種腐植酸樣品的來源。

## (D) 元素及光譜分析

依據國際腐植質學會(International Humic Substance Society) 建議之方法依序以 0.1 M HCl 及 0.1 M NaOH 初步萃取出腐植酸 (表b) 並純化之，然後分析其特性如下：

E4/E6 值測定：將樣品溶解於 0.05M  $\text{NaHCO}_3$ ，濃度為 200~400 ppm，pH 9.0，以 UV-VIS 分光光度計通過 0.05M  $\text{NaHCO}_3$  為參考光束，測定溶液波長 465 nm 和

685 nm 之吸收光度值。

元素分析：秤取約2~20 mg 之樣品。以元素分析儀測定C, H, O, N, S 等五種元數之比例含量。

表 a：12 種腐植酸樣品的來源

編號	樣品來源及處置
1	購自 Aldrich，並經酸鹼再純化。
2	Protocatechuic acid 單體合成
3	台灣鹽水鎮井水經 XAD7 吸附後，以 MeOH 進行 Soxhlet 萃取
4	台灣鹽水鎮井水經 XAD7 吸附，NaOH 沖洗脫附，酸化離心後，取澄清液。
5	美洲土壤樣品，經酸化沈澱後，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體
6	台灣西南沿海土壤樣品，經酸化沈澱後，再以苯及乙酸乙酯萃取，減壓乾燥至固體
7	同 5
8	同 6
9	Gallic acid 單體合成
10	台中農試所液狀腐植土
11	台中農試所粒狀腐植土
12	台中農試所粉狀腐植土



Table b. Humic substances used in the present study

Abbreviation Name	Source	Pattern
American HA	USA	Soil
ARI-L-HA	Agricultural Research Institute, Taiwan	Liquid
ARI-S-HA	Agricultural Research Institute, Taiwan	Soil
Taiwan HA	Sea front in Southwestern Taiwan	Soil
Taiwan FA	Tainan County in Southwestern Taiwan	Well water
Synthetic HA1	Polymerization of protocatechuic acid	Synthetic polymer
Synthetic HA2	Polymerization of gallic acid	Synthetic polymer

## B. 螢光菌急毒性及安姆氏致突變性分析

### 一、研究目的

在土壤或水源中腐植酸當然可能與許多環境毒物間的作用頻繁。並且人們在日常生活也會同時暴露，例如蔬菜中的腐植酸與農藥、或井水中的砷與腐植酸。然而腐植酸與其他環境毒物間的交互作用，是否會造成彼此間的毒性大幅改變則鮮有文獻可循。安姆氏試驗(Ames test)是最常被用來探討環境毒物致突變性的方法。近年來螢光菌毒性試驗(bacterial bioluminescence assays)也逐漸受到重視。基於便利、快速、便宜且敏感度高等優點，螢光菌的急毒性試驗(Microtox 及 Mutatox)常用於毒性的篩選測試。然而本年度生產 Mutatox 菌種的 Strategic Diagnostics Inc.，無法提供穩定可靠的測試菌種(dark strain, M169)。因此第二年急毒性試驗依然採用 Microtox，致突變性試驗則改採 Ames test。

**本研究的主要研究目的如下：**

1. 改良螢光菌毒性測試系統 Microtox，使其適用於腐質酸之急毒性及致突變性測試。
2. 應用 Microtox 於各種腐質酸樣本的篩選測試工作上，藉以針對大量不同環境來源的腐質酸進行毒性評估。
3. 腐植酸與重金屬間的急毒性交互作用，尤其是與砷的混和效應

4. 應用 Ames test 於各種腐植樣本(含腐植酸)的篩選測試工作上，藉以針對大量不同環境來源的腐植酸進行致突變性評估。
5. 探討腐植酸與重金屬間的致突變性交互作用，尤其是與砷的混和效應。

## 二、研究方法

### 1. Microtox 急毒性試驗：

Microtox 急毒性試驗 (Microtox acute toxicity test)所使用的螢光菌為本身具有發光性的 *Vibrio fischeri* NRRL B-11177。Microtox 毒性試驗之操作步驟遵循 Microbics Corp. 建議之標準方法中之 100% 試驗法[趙木榮，2001]。採用等倍率方式依次稀釋毒性物質，在植菌後藉由與控制組的發光強度比較，計算出 EC50 值。

### 2.化學物質交互作用之評估

Isobologram(毒性等高線圖)係分析二種毒性物質取不同毒性單位的比例加以混合，在一固定的抑制率或死亡率(EC50 或 LC50)之下，依照不同的混合比例繪出一等抑制率或等死亡率曲線，由圖形來分析混合物之間的效應。Isobologram 圖形如下圖所示，x,y 兩軸分別代表二種混合物毒性物質之各別毒性單位 TU，其公式如下：

$$TU = \frac{z_1}{Z_1} + \frac{z_2}{Z_2}$$

式中 $z_1, z_2$ 為混合毒性試驗中各個組成毒性物質的效應濃度，如EC50； $Z_1, Z_2$ 為受體生物對於兩種毒性物質分別在單一毒性試驗時的效應濃度。

不論是二種毒性物質皆發生效應，或僅二種毒性物質之一發生效應，只要是二種毒性物質混合後之 $TU=1$ ，即稱為毒性相加(additive或zero-interactive)，而其 Isobologram則如下圖一所示成一直線，可以公式表示如下：

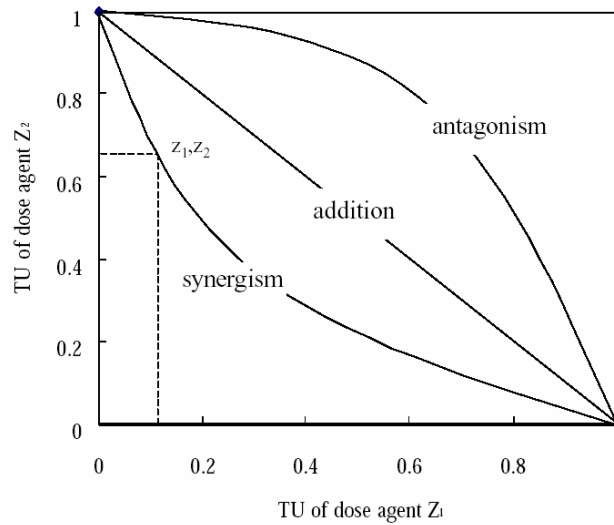
$$TU = \frac{z_1}{Z_1} + \frac{z_2}{Z_2} = 1$$

當兩種毒性物質混合後的混合毒性單位 $TU < 1$ ，亦即兩種混合物之間的交互作用遠大於毒性相加時，稱為毒性增強(synergistic)，將呈現下圖中下凹曲線，可以公式表示如下：

$$TU = \frac{z_1}{Z_1} + \frac{z_2}{Z_2} < 1$$

當二種毒性物質的混合毒性單位 $TU > 1$ 時，代表兩種混合物產生互相抵抗(counteracts)，此情況稱為毒性拮抗(antagonism)，將呈現下圖一中上凸曲線，以公式表示如下：

$$TU = \frac{z_1}{Z_1} + \frac{z_2}{Z_2} > 1$$



圖、Isobologram 示意圖

## 2.沙門菌回復突變測試法(Ames test)

Ames *Salmonella*/microsome assay最常被用於致突變性鑑定。其測定方法係利用經突變的沙門氏菌，它們在缺乏組氨酸(histidine)之環境下不能生存，如果有引起致突變物質存在，可使試驗菌種再次突變為反突變細菌，得以再合成組氨酸而生存。所以試驗菌種倘若能在缺乏組氨酸培養基中生成清晰可見的菌落，表示有致突變物質存在[Maron and Ames, 1983; 台灣省農業藥物毒物試驗所，1987]。

## C. 促癌作用評估

### (一) 腐植酸 (Humic acid; HA) 純化步驟

量取適量之 humic acid (Aldrich) 粉末溶於 1N NaOH (in dd H<sub>2</sub>O), PH=10,攪拌至溶解後靜置 2-3 小時,並不時攪拌後,加入 1NHCl (in ddH<sub>2</sub>O),調 PH 到約為 2,產生沉澱,靜置隔夜,分裝到 50ml 試管,以 3000 rpm 15°C,離心 10 分鐘去掉上層黃色透明液體,將下層褐色沉澱物收集,重複上述步驟 鹼→酸→離心→分離 共 3 次,收集最後一次沉澱物後先以較少量之 1N NaOH 攪拌使之溶解後再加入少許 dd H<sub>2</sub>O 攪拌,調整至 pH 約為 7(視需要可加入少許 1N HCl 調整 pH 值)將 HA 純化後之溶液,以濾紙過濾去除不溶性雜質,將溶液冷凍乾燥後收集粉末置於乾燥箱內備用.

## (二) 細胞試驗

### (A) JB6 (+)上皮細胞 (JB6 clone 41 cell)之培養

JB6 (+)細胞是一 post-initiated mouse epidermal cell line 很常用於 tumor promotion 之研究。將 JB6 (+)細胞培養於 5 % FBS 之 MEM (內含 100U/ml penicillin;100  $\mu$ g/ml streptomycin; 2 mM L-glutamine)的角瓶中,置於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養,長滿後以 PBS wash 2 次,加以 1 ml trypsin-EDTA,將細胞打下,立即加入 10 ml MEM 放入 15 ml 離心管離心去上液,再加新 medium 重新培養。

### (B) 轉形作用試驗

根據 Mondal 等人之方法(Ref),種植 200 個 JB6 細胞於 60 mm dish,培養 24 h 後加入各種試藥,1 天後加入新 medium 每週換兩次 medium 培養 6-8 週後以酒精固定,利用 5 % Giemsa 染色 30 分鐘,顯微鏡下觀察計算 3 mm 之 foci 染色較深者為 type II 及 type III 計算 foci 數目.

### (C) Intracellular ROS 試驗

細胞培養 24 小時後,換 starvation medium (含 0.1% FBS) 24 小時後分別加不同濃度的腐植酸處理 24, 48, 72, 96 小時後再加入 DCFDA (10 $\mu$ M), 經 30 分鐘收細胞跑 flow。另外處理腐植酸 48 h 以 PBS wash 兩次後再培養兩天後再加入 DCFDA (10 $\mu$ M), 經 30 分鐘收細胞跑 flow。

#### (D) 細胞架構之偵測

將細胞以腐植酸處理 48 h 再以 PBS wash 兩次後再培養兩天後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿 trypsinize 下來，用 PBS 沖洗後，以 TRITC-phalloidin(500ng/ml)(染 F-actin)或染核之 DAPI 染色 1h (DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)是一種 DNA 染劑，可以穿透細胞膜至細胞核內，插入雙股 DNA 的 minor groove 中 Adenine 及 Thymine rich 的位置。利用 DAPI 在螢光顯微鏡 (340 / 380 excitation )可以看出 DNA 的改變，來判斷是否有別于正常細胞)。以 PBS wash 2X。再以相位差顯微鏡及 Fluorescence Microscopy 進行觀察。

#### (E) Wound healing method

細胞培養換 starvation medium (含 0.1% FBS) 24 小時後,加入不同濃度的腐植酸在含血清之培養基中處理 48 小時後，劃線，換 starvation medium 再繼續培養 48 小時，以相位差顯微鏡觀測後照像，並任選五個視野數細胞數目平均後作圖。

#### (F) 細胞週期分析 (Cell cycle assay)

將細胞以腐植酸處理 48 h 再以 PBS wash 兩次後再培養兩天後，以 trypsin - EDTA 將細胞由培養皿打下，PBS 沖洗，調整細胞濃度成  $2 \times 10^6$  cells/ml，以 300 x g 離心，倒除上層液，加入 80%酒精置入  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱固定細胞至少 30 分鐘以上。接著以 400 x g 離心 5 分鐘，倒除上層液，並加 0.1% tritonX-100 0.5ml 於暗室中反應 30 分鐘。再次離心，倒除上層液，加入 1ml PI solution (10 $\mu\text{g/ml}$ ，內含 40 $\mu\text{g/ml}$  RNase A)，於  $37^{\circ}\text{C}$  水浴槽中避光反應 30 分鐘，最後置於冰上，以流式細胞儀 (flow cytometry)測定。

#### (G) Anchorage-independent growth assay

將細胞以腐植酸處理 48 h 再以 PBS wash 兩次後算取 5000 個細胞種於 soft agar dish (上層: 1ml 0.33% Basal Medium Eagle(BME)含 10% FBS,下

層:3.5 ml 0.5% BEM) 將細胞培養於 95 % air plus 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 21 天  
後，顯微鏡下觀察並計算多於 8 細胞之 colony.

#### (H) ELISA assay for NFκB

將腐植酸處理過之細胞依不同時間收集先製備 nuclear extracts

##### \*\*Nuclear extracts Preparation:

(1) The cells were lysed with 500 μl of lysis buffer (50 mM KCl, 25 mM Tris, 0.5% NP-40, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μg of leupeptin per ml, 20 μg of aprotinin per ml, and 100 μM DL-DTT).

- a. Centrifugation at 2,000 rpm for 10 min.(上清液cytosol去除)
- b. Nuclei were washed with the 500 μl of the same buffer without NP-40.
- c. Then placed into 300 μl of extraction buffer (400 mM LiCl, 20% glycerol and with the same concentration of Tris, phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin, aprotinin and DL-DTT as the lysis buffer).

(2) Centrifugation at 14,000 rpm for 5 min, the supernatant was harvested as nuclear protein extract and stored at -70°C.

\*\*拿出 kit 使用之 plate 至室溫回溫，依說明加藥進行試驗.最後 Add 100 μl chemiluminescent substrate.( 50%Luminol Enhancer Solution + 50% Stable Peroxide Solution) , Measure the chemiluminescence using a CCD camera system.

#### (I) 西方墨點法(Western blot analysis) :

實驗原理為利用電流將帶有負電荷的不同分子量的蛋白分離，並以專一抗

體與標的蛋白結合，放大並顯示該蛋白表現的變化情形。

試劑：

1. Lysis Buffer內含RIPA buffer：150mM NaCl，1%NP-40，0.5%Deoxycholic acid，0.1%SDS，50mMTris-base，PH=7.5；1mM sodium orthovanadate；100μg/mL PMSF；170μg/mL Leupeptin。
2. Sample Buffer內含2mL 0.5M Tris-HCl(PH=6.8)；1.6mL Glycerol；2mL 10% SDS；0.8mL 2-β-mercaptoethanol；0.4mL 0.5% Bromophenolblue
3. Washing buffer內含PBS with 0.5% Tween-20

步驟：

#### (1) 細胞的準備與處理

將細胞培養後，以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿 trypsinize 下來，用 PBS 沖洗後以 1000rpm 離心 5 分鐘，取沈澱細胞，加培養基使細胞懸浮，將細胞濃度調整成  $1 \times 10^6$  cells/10 cm dish，培養於 10 cm dish 中。待細胞貼壁後，以 0.1% MEM 進行 Starvation overnight。然後更換新的培養基再依序將藥物加入(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 先前處理 5 分鐘，再加入 Humic Acid)，培養至特定時間在將細胞收下。

#### (2) 蛋白質的萃取及定量

將舊的培養基倒掉，利用 cold PBS wash 2 次，在利用刮杓將細胞刮下收集至 eppendorf 離心 1000rpm 5 分鐘，再去除 PBS，然後加入 Lysis buffer 50μl (內含 protinase inhibitor) 加入放置於 4°C 震盪 30 分鐘，再離心 10000g 10

分鐘，取上清液即為 Total cell lysate，再以 Coomassie blue 定量蛋白質含量(以 U-2000 Spectrophotometer 分析吸光值，來測定各標本之蛋白質量)。

### (3) SDS 膠體之準備

將電泳玻璃片洗淨，擦拭乾淨後，把兩片玻璃架至電泳座上固定，若欲分離小分子量之蛋白，則配置 12% 的下層 separating gel；若欲分離大分子量之蛋白，則配置 8% 或 10% 的下層 separating gel。配膠所需物質混合均勻後，直到液面離 well 約 1.5 cm 處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，將上層的二次水吸乾，再配置上層 stacking gel 倒入及插入 comb，待完全聚合後，小心將 comb 拔出，再將 sandwich clamp assemblies 放入電泳槽中，加入 1X Running buffer 觀察無洩漏情況後，即完成膠體與電泳槽之製備。

### (4) 加入樣本 (Loading sample) 及電泳

樣品槽由左至右，依序注入 protein standard marker 及 sample 以進行電泳。電壓在前十分鐘 (stacking gel) 用 80 volts，帶 sample 移動到 separating gel 再調高到 120 volts。待 tracking dye 跑至接近底層 1cm 處並且 marker 可看到清楚的分開，此時關掉電源，結束電泳，隨即拆除電泳儀組，進行轉印 (electrotransfer) 步驟。

### (5) 轉漬 (electrotransfer) 步驟

先將 nitrocellulose (NC) paper (transfer membrane) 及 3M 濾紙浸泡於轉液中，直到紙之各部分均勻潤濕為止。Electrotransfer 的方向是由負極 (anode) 到正極 (cathode)，而 NC paper 要置於接近正極，膠體那一面向負極。將已浸濕的 3M 濾紙，整齊重疊至於半乾式電轉漬器中間，為最底層。再平鋪膠體於濾紙之上，並將 NC paper 蓋在膠體上，最上層



再鋪上 3M 濾紙，最後蓋上蓋子。接上電源，維持電壓 100 volts，轉漬 1 小時。

### (6) 免疫轉漬法 (immunoblotting)

轉漬完成後，將 NC paper 置於 5% blocking solution 中，用振盪器振盪室溫 1 小時 blocking。以 washing buffer 洗三次再加入初級抗體，用振盪器振盪 overnight at 4°C。隔天之後將初級抗體吸起以 washing buffer 洗三次，再加入二級抗體用振盪器振盪室溫 1 小時之後將二級抗體吸起以 washing buffer 洗三次，將 transfer membrane 夾起蔭乾，置入 chemiluminescence reagents (PerkinElmer Life Science；Western Lightning：Enhanced luminol reagent 1.5ml 配上 Oxidizing reagent 1.5ml) 作用反應螢光。最後以冷光儀偵測觀察結果。

### (三) 動物實驗

加藥方式：

分別於每週一、三、五加藥。

Control (6 隻)：投予 Acetone 200  $\mu$ l/mouse 每週 3 次，持續 24 週。

B[a]p single dose (6 隻)：只在第 1 週投予 0.2  $\mu$  mol /200  $\mu$  l acetone，其餘 23 週只給予 acetone。

B[a]p+HA<sub>H</sub> (6 隻)：只在第 1 週投予 0.2  $\mu$  mol B[a]p /200  $\mu$  l acetone，其餘 23 週給予 250  $\mu$  g HA<sub>H</sub> /200  $\mu$  l acetone。

B[a]p+HA<sub>L</sub> (6 隻)：只在第 1 週投予 0.2  $\mu$  mol B[a]p /200  $\mu$  l acetone，其餘 23 週給予 50  $\mu$  g HA<sub>L</sub> /200  $\mu$  l acetone。

HA<sub>H</sub> (6 隻)：每週給予 250  $\mu$  g HA<sub>H</sub> /200  $\mu$  l acetone。

處理方式：

於實驗後第 24 週犧牲老鼠，取其加藥皮膚（2/3 送至病理切片室；1/3 用來 test western）。

## D. 致畸胎評估

### 1. 腐植酸之來源與製備

編號	來源與處理內容敘述
HA	Commercial HA(Aldrich) 經酸鹼處理 3 次純化
SHA	合成 Humic acid from Protocatechuic acid
HA 4	Protocatechuic acid 單體
HA 6	Humic acid from protocatechuic acid
HA 13	Humic acid from Vanillic acid S2 (no fluorescent)
HA 16	合成 HA from Protocatechuic acid
HA 44	Commercial HA (Aldrich) M.W. > 5K
HA 135	合成 HA from Protocatechuic acid

### 2. 砷化合物 arsenic trioxide(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

### 3. 重要研究工作內容

#### (1) 老鼠胚胎暨小鼠發育毒性試驗

自樂斯科生技公司訂購 4-5 週大之 ICR 小鼠，待其適應 1-2 週後，採集母鼠陰道抹片，觀察細胞型態若為 P 或 E phase 即給予交配。隔天再度採集陰道抹片，觀察有無精蟲若有，將給與交配後一天定為第一天。於受精後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物，如下表：

藥物	濃度	劑量
腐植酸	20mg/ml	0.25ml/40g B.W.
砷 As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2mg/ml	0.25ml/40g B.W.
Normal saline	-	0.25ml/40g B.W.

A.自母鼠生產當日算起於第一天、滿三克（約第五天）、五至六克（約十天）及滿二十一天，共分四階段，取其所生之小鼠數隻給予犧牲，將欲取得之器官冰於-85°C之冰箱待生化分析或 8-OHdG 含量。另外滿 21 天之小鼠取其後腿骨去毛及皮膚泡於 95% 之酒精固定，或將重要臟器泡於福馬林溶液中待做病理切片。

B. 在分娩前一天（鼠在懷孕第 20 天）全部雌性動物進行解剖（15），檢測其懷孕成功率、胎兒的死亡率、黃體數目等。存活的胎兒則進行體重測量並檢驗其外觀（在懷孕後期仍存活的胎兒，須檢查其性別及體內、外之器官與組織的變化。骨骼與成骨經透明及染色處理製作成骨骼標本，以觀察其內部骨骼形態變化。此外，實驗亦於母鼠懷孕第 7, 14 及 19 天經眼窩採血供檢測懷孕相關之賀爾蒙。或是產生明顯毒性效應如流產或懷孕中止時予以犧牲，計算其黃體數目與胚胎發育情形，並取樣待生化分析或病理切片。

### (3) 生化分析

1. 8-OHdG 含量：取適量之器官樣品交由「基因氧化性傷害子計畫」分析。所取得之細胞或動物器官組織需先 DNA 萃取出並進而消化。然而

這些步驟過程中經常會導致人為氧化而造成人為的 8-OHdG 生成。因此本研究將加入不同濃度之抗氧化劑(Desferrioxamine)，以求在各種生物樣本 DNA 萃取的最佳方法，避免 DNA 在萃取過程中有人為氧化發生。消化過後之 DNA 細胞樣本需經固相萃取之步驟以純化細胞樣本。固相萃取採用 Sep-pak 之 C18 cartridge (100mg/ml)，經過 1ml 之 Methanol 及水活化過後，便倒入消化過後之細胞樣本。最後以 40% Methanol 沖提出。再將富含 8-OHdG 及 dG 之沖提液濃縮後回溶至 5% acetonitrile/0.1% formic acid 準備以 LC-MS/MS 分析。

2. **抗氧化能力評估**：取適量之器官樣品分別加入 Tris-HCL buffer 或 5% trichloroacetic acid 均質液研磨後，測其組織中 SOD、Catalase、GSH peroxidase 及 GSH redustase 之濃度。
3. **懷孕與胚胎發育相關賀爾蒙之分析**

在母鼠懷孕之第 7,14,及 19 天以眼窩採血之方式，採取適量血液離心後取上清液凍於-85°C 保存，待賀爾蒙分析用。

**hCG(Chorionic Gonadotropin)**：取適量樣品依照 HCG+beta ELISA 試劑組 (IBL, HAMBURG, Germany) 之實驗步驟進行分析。

**Estradiol**：取適量樣品依照 Estradiol EIA 試劑組 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) 之實驗步驟進行分析。

**Progesterone**：取適量樣品依照 Progesterone EIA 試劑組 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) 之實驗步驟進行分析。

**Prolactin**：取適量樣品依照 Prolactin EIA 試劑組 (SPI-bio, Massy Cedex, France) 之實驗步驟進行分析。

- C. **母鼠預先暴露腐植酸與砷，懷孕中止觀察胚胎之發育**

在母鼠懷孕之前先預處理暴露腐植酸與砷 4 週後，採集母鼠陰道抹片，觀察細胞型態若為 P 或 E phase 即給予交配。隔天再度採集陰道抹片，觀察有無精蟲若有，將給與交配後一天定為第一天。於受精後第 9 天，進

行解剖，檢測其懷孕成功率、胎胎的數目、黃體數目等。胚胎取出後以解剖顯微鏡觀察其外部結構是否正常，並在培養箱中培養 1-2 天觀察其發育情形。

## **E. 糖尿病致病機轉評估**

細胞培養：

HIT-T15  $\beta$  cell 培養於含 10% 胎牛血清之 RPMI 1640 培養液(內含 100U/ml penicillin; 100  $\mu$ g/ml streptomycin)的培養瓶中，置於 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中，長滿後以 PBS wash 2 次，加以 1 ml trypsin-EDTA，將細胞打下，立即加入 RPMI 1640 培養液放入 15 ml 離心管離心去上清液，再加新 medium 重新培養。

將細胞培養於 6、24 或 96 well culture plate 加入不同濃度試藥(腐植酸 HA 或砷 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)後於 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 中反應 2、4、8 或 24h 後，分別測其細胞含氧自由基、ATP、胰島素分泌、細胞週期等。

動物試驗：

自樂斯科生技公司訂購4-5週大之ICR小鼠，待其適應1-2週後，依下列組別隨機分組：(1) control group without any drug treatment for 12 weeks ( $n = 14$ ). (2) HA group, mice received 500 mg/L humic acid in drinking water for 12weeks ( $n = 14$ ). (3) As group mice received 10 mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>in drinking water for 12 weeks ( $n = 14$ ). (4) HA+As groupmice received both 10 mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and 500 mg/L humic acidin drinking water for 12 weeks ( $n = 14$ ). 於實驗開始後第3、5、7及12週分別由眼窩靜脈採血，分離血漿(4  $^{\circ}$ C, 1500 $\times$ g, for 10 min) 後-85 $^{\circ}$ C凍存待胰島素分析使用。此外，每組於第5週分別犧牲6隻小鼠，取出胰臟供病理切片使用。

## **F. 基因氧化性傷害評估**

本子計劃將配合群體計劃研究之架構，針對腐植酸造成動物體內氧化壓力的改變作一完整探討。

- 建立”液相層析串聯質譜儀(LC-MS/MS)配合同位素稀釋法”之分析技術能夠快速、準確分析各種不同生物樣本之 8-OHdG 含量。
  1. 合成 8-OHdG 之同位素內標準品  $^{15}\text{N}_5$ -8-OHdG。
  2. 運用 LC-MS/MS 配合同位素稀釋法分析 8-OHdG 之方法建立。
  3. 建立各種生物樣本 DNA 萃取的最佳方法，力求避免在 DNA 萃取過程中有人為氧化發生。
  4. 開發 8-OHdG 連線固相萃取方法(on-line solid phase extraction)，樣本經自動萃取後直接注入 LC-MS/MS 進行分析。以大量節省前處理所需之時間與耗材，並可快速連續分析樣本。
- 配合本整合計畫中各子計畫，將建立好之 8-OHdG 分析方法(LC-MS/MS)運用於各種生物樣本分析(配合其他子計畫)。有以下幾點目標：
  1. 瞭解各種不同環境來源的腐植酸，是否都能造成細胞或動物器官的基因氧化傷害？何者可造成較高的基因氧化傷害？
  2. 探討烏腳病流行區井水中腐質酸的基因氧化傷害特質，是否隨腐植酸濃度而有所變化。
  3. 探討腐植酸與金屬間的交互作用是否能明顯提高細胞或動物器官的基因氧化傷害？

### **二、研究方法**

#### **1. 同位素 $^{15}\text{N}_5$ 標示之 8-OHdG(內標準品)之合成**

本研究將開發以液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法(isotope dilution LC-MS/MS)定量生物樣本中 8-OHdG 之含量。此方法首重於以同位素  $^{15}\text{N}_5$  標示

之 8-OHdG (內標準品) 之合成，以利於運用同位素稀釋法精準分析樣本 8-OHdG。其合成方法主要是利用  $^{15}\text{N}_5\text{-dG}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  並加入 ascorbic acid 作催化劑。取 2 mg 之  $^{15}\text{N}_5\text{-dG}$  溶於 50 ml-0.1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  水溶液中，並調整 pH=7.0。加入 8.8 mg ascorbic acid，再加入 200 $\mu\text{l}$  的 35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  於 37°C 水浴下強烈攪拌 30min。每隔 30min 即重複加入 ascorbic acid 及  $\text{H}_2\text{O}_2$  一次，共八次。至此同位素  $^{15}\text{N}_5$  標示之 8-OHdG(內標準品)之合成完成。新合成之  $^{15}\text{N}_5$  標示之 8-OHdG 將以固相萃取方式予以純化。濃縮乾燥稱重備用 (Hu et al., 2004)。

## 2. 生物樣本 8-OHdG 分析程序建立

此分析方法程序將首先用於分析未經腐植酸或砷暴露之動物尿液與器官組織 8-OHdG 的含量，以求建立各種生物樣本 8-OHdG 分析方法。尿液 8-OHdG 分析，尿液只需以 5%methanol/0.1% formic acid 稀釋 10 倍後加以同位素內標即可上機分析。而臟器中 8-OHdG 之定量流程如圖所示：

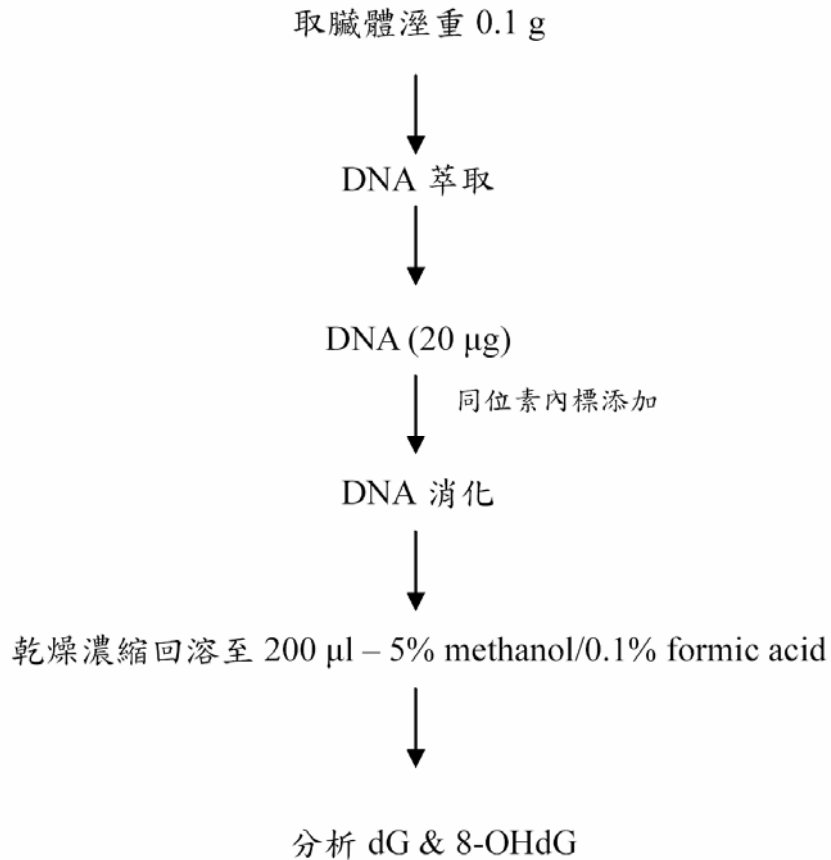
### 1. 樣品前處理：

所取得之細胞或動物器官組織需先萃取出 DNA 並進而消化。然而這些步驟過程中經常會導致人為氧化而造成人為的 8-OHdG 生成。因此本研究將參考 Ravanat et al., (2002) 所提出之建議，加入不同濃度之抗氧化劑 (Desferrioxamine)，以求在各種生物樣本 DNA 萃取的最佳方法，避免 DNA 在萃取過程中有人為氧化發生。

### 2. 新開發之「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」：

本實驗所有生物樣本(尿液或動物臟器)係利用本研究新開發之「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」分析之。其相關細節詳述於”研究成果與討論”。

本研究中所使用的貴重儀器 LC-MS/MS 由國家衛生研究院環境衛生與職業醫學研究組提供。其組成由一個 PE 200 之自動取樣器及二個 PE 200 micro pump 所組成 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)連接一三段式四極棒串聯質譜儀(API 3000, Applied Biosystem)。



圖：臟器中 8-OHdG 定量流程圖

## G. 動物急毒性、亞慢性及慢性毒性評估

為了進一步探討腐植酸和砷對小白鼠之毒性作用，本計劃採用 6-8 週之 ICR 小鼠以每組 5-10 隻之數量連續 5、28 天、90 天腹腔注射不同劑量之腐植酸 (HA) 和砷 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)，或是以不同世代連續飲用腐植酸 (HA) 和砷 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 1 年，各實驗分組如下：



第一組：5 天

組別	給藥劑量
Control	Saline
HA	HA 125 mg/Kg BW
As1	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.2 mg/Kg BW
As2	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.8 mg/Kg BW
HA + As1	HA 125 mg/Kg BW As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.2 mg/Kg BW
HA + As2	HA 125 mg/Kg BW As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.8 mg/Kg BW

第二組：28 天

組別	給藥劑量
Control	Saline
HA 1	HA 62.5 mg/Kg BW
HA 2	HA 31.25 mg/Kg BW
HA 3	HA 15.625 mg/Kg BW
As1	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.8 mg/Kg BW
As2	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.4 mg/Kg BW
HA 1+ As	HA 62.5 mg/Kg BW As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.2 mg/Kg BW
HA 2+ As	HA 31.25 mg/Kg BW As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.2 mg/Kg BW

第三組：90 天

組別	給藥劑量
Control	Saline
HA 1	HA 15.625 mg/Kg BW
HA 2	HA 7.8125 mg/Kg BW
As	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.2 mg/Kg BW
HA 1+ As	HA 15.625 mg/Kg BW As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.2 mg/Kg BW
HA 2+ As	HA 7.8125 mg/Kg BW As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.2 mg/Kg BW

第四組：1 年

組 別	給 藥 劑 量
Control	Saline
HA	HA 500mg/L
As	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 10 mg/L
HA + As	HA 500mg/L As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 10 mg/L

## 結果與討論

### 1. 目前研究成果

#### A. 腐植酸聚合物及其裂解單體分析

1. 建立最佳條件下 11 種腐質酸單體的滯留順序，未來也將以此為條件對裂解後之腐植酸進行單體分析(圖 1)。
2. 購自 Aldrich 再酸鹼純化後樣品：  
腐植酸經裂解後注入電泳系統分析，計算得到約有 67.2% (w/w) 的單體組成，此單體有可能只是 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde (圖 2)，也有可能其它單體經裂解步驟後轉成單一單體，但這方面疑慮經確認實驗證實並沒有因裂解步驟轉成單一單體的現象。
3. 台灣西南沿海土壤樣品酸化沈澱，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體：計算得到約有 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (42.3%) 以及 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (39.6%) (圖 3)。
4. 美洲土壤樣品，經酸化沈澱後，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體：經計算得到約有 78.9 % (w/w) 的單體組成，此單體可能 4-Hydroxy-3-methoxy-benzoic acid (圖 4) 。

5. 三種添加腐植酸單體樣品：4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon;  
p-Anisaldehyde; 4-Hydroxybenzoesaure 三種單體標準液添加於消化  
槽內，經消化萃取後的回收率分別是 90, 86, 94%。
6. 表 1 是幾種腐植酸樣品元素分析之結果，C,H,O 是主要之組成元素。
7. 表 2 是各種腐植酸在 250, 272, 365, 465 及 665 nm 的吸收度值以及相互間比值。比值  $A_{465\text{ nm}}/A_{665\text{ nm}}$  是與平均分子量以及氧原子在分子中比例有關，此值若較高，表示此分子量較小以及較高比例的氧含量。由表二觀之， $A_{465\text{ nm}}$  與  $A_{665\text{ nm}}$  皆為負值的有 1~4 及 10 號樣品，比值趨勢應為樣品  $3 < 4 < 10 < 2 < 1$ ，其餘樣品的  $A_{465\text{ nm}}$  為正值而  $A_{665\text{ nm}}$  為負值，無法以  $A_{465\text{ nm}}/A_{665\text{ nm}}$  比較出趨勢，所以忽略  $A_{665\text{ nm}}$  只以  $A_{465\text{ nm}}$  大小排列出：樣品  $5 > 7 = 11 > 12 > 8 > 6 > 9$ ，故綜合觀之：高分子量及小含氧量的趨勢為鹽水鎮井水 > 台中農試所液狀腐植土 > Aldrich 商業樣品 > protocatechuic acid 合成樣品 > gallic acid 合成樣品 > 台灣西南沿海土壤樣品 > 台中農試所固狀腐植土 > 美洲土壤樣品。

比值  $A_{250\text{ nm}}/A_{365\text{ nm}}$  是與芳香族團比例有關，此值越大芳香族團比例越小，即長鏈脂肪族比例越大，由表 1 得知，除了樣品 2, 3 及 10 號的  $A_{365\text{ nm}}$  為負值不予比較外，其餘樣品的芳香族團比例由大排至小為：美洲土壤樣品 > 台中農試所固狀腐植土 > 台灣西南沿海土壤樣品 > gallic acid 合成樣品 > Aldrich 商業樣品 > protocatechuic acid 合成樣品。

以上兩比值之結果似乎透露出，低分子量、高含氧量的腐質酸樣品，其芳香族團的比例也越高，這是否表示苯環上取代基被氧化越嚴重，斷鏈成低分子量的寡聚合機率也越高；反之，高分子量的多聚合體，其苯環上取代基可能是長鏈烷基或短鏈多取代。

另外， $A_{272\text{ nm}}$  也是與芳香族團比例有關，此值越大芳香族團比例越大，即長鏈脂肪族比例越小，由表 1 得知，芳香族團比例由大排至小為：美洲土壤樣品 > 台中農試所固狀腐植土 > 台灣西南沿海土壤樣品 >

protocatechuic acid 合成樣品 > gallic acid 合成樣品 > Aldrich 商業樣品 > 井水樣品 > 台中農試所液狀腐植土。此趨勢大致也與上述相同。

## **B. 螢光菌急毒性分析**

本研究已成功建立螢光菌毒性測試系統 Microtox，使其可運用於腐植酸毒性篩選。同時在農藥毒物試驗所游碧瑋博士的熱心協助下，本實驗室已迅速建立 Ames test。我們針對各種腐植樣本進行急毒性及致突變性測試，並探討其與  $As^{+3}$  或  $As^{+5}$  間的混毒現象，結果列點如下：

### **1. Microtox 急毒性試驗**

#### **$As^{+3}$ 與腐植樣本混毒**

1. 本研究首先測試各種可能組成腐植酸的單體化合物 (Monomer)，如 Protocatechuic acid、4-Hydroxybenzoic acid、4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (Vanillic acid)、Syringic acid、3,5-Dimethoxy-4-hydrobenzaldehyde (Syringaldehyde) 及 Vanillin 等。其 EC50 毒性等高線圖 (Isobologram) 如圖 6 所示。這些單體化合物對螢光抑制的 EC50 值，約介於 20-45 mg/L。其中以 4-Hydroxybenzoic acid 毒性最高 (EC50 = 19.9 mg/L)，Syringaldehyde 毒性最低 (EC50 = 44.9 mg/L)。重金屬  $As_2O_3$  的 EC50 平均值為 53.8 mg/L。Protocatechuic acid 與  $As_2O_3$  間的交互作用呈現接近毒性相加 (additive)。有趣地，其餘單體化合物皆呈明顯的毒性拮抗 (antagonistic)。
2. 以各式單體所合成之腐植酸其 EC50 值，約介於 173-458 mg/L。相對於上述個別單體化合物的毒性，單體經合成為腐植酸後其毒性下降。同樣的，重金屬  $As_2O_3$  的 EC50 平均值介於 50.0-53.8 mg/L。其 EC50 毒性等高線圖 (Isobologram) 如圖 7 所示。Gallic acid 及 Protocatechuic acid 所合成的腐植酸與  $As_2O_3$  間的交互作用呈現毒性增強 (synergistic)。而合成後的腐植酸若將其分子量 (Molecular weight, MW) 小於 500 的部分分離而出，其與  $As_2O_3$  間的交互作用呈現接近毒性相加。
3. 市售腐植酸及環境中腐植酸其 EC50 值，約介於 252-375 mg/L。同樣的，重

金屬  $As_2O_3$  的  $EC_{50}$  平均值介於 50.0-59.1 mg/L。其  $EC_{50}$  毒性等高線圖 (Isobologram) 如圖 8 所示。市售腐植酸 (Aldrich) 與  $As_2O_3$  間的交互作用呈現毒性增強。而腐植酸若將其分子量 (Molecular weight, MW) 大於 5000 的部分分離而出，其與  $As_2O_3$  間的交互作用依然呈現毒性增強。由此或可推論分子量較大之腐植酸可與  $As_2O_3$  間有毒性增強之交互作用。然而腐植酸經 methanol 純化後其交互作用則接近毒性相加。美國的自然環境腐植酸與  $As_2O_3$  間的交互作用則略呈現毒性增強，台灣環境腐植酸則只接近毒性相加。

### $As^{+5}$ 與腐植樣本混毒

1. 如圖 9 所示，Protocatechuic acid 與  $As_2O_5$  間的交互作用呈現接近毒性相加 (additive)。有趣地，其餘單體化合物皆呈明顯的毒性拮抗。

2. 如圖 10 所示，Gallic acid 所合成的腐植酸與  $As_2O_5$  間的交互作用略呈毒性拮抗；Protocatechuic acid 所合成的腐植酸則與低量的  $As_2O_5$  略呈毒性增強。市售腐植酸 (Aldrich) 與  $As_2O_5$  間的交互作用略呈毒性增強；而腐植酸若將其分子量 (Molecular weight, MW) 小於 500 的部分分離而出，其與  $As_2O_5$  間的交互作用呈現明顯毒性增強；若將其分子量大於 5000 的部分分離而出，其與  $As_2O_5$  間在高低濃度有相反的交互作用。美國和台灣的自然環境腐植酸與  $As_2O_5$  間的交互作用則接近毒性相加。

## 2. 沙門菌回復突變測試 (Ames test)

### (1) 第一階段：低劑量測試

首先我們將測試劑量範圍訂於 0.05~5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 。如表 3-4 所示，在以 TA98 (-S9) 測試下， $As^{+3}$ 、 $As^{+5}$  及天然腐植酸 (Natural humic acids) 皆未測試出的致突變性；將  $As^{+3}$  及  $As^{+5}$  分別與天然腐植酸混和後也無發現致突變性。如下表二所示，在以 TA100 (-S9) 測試下，腐植質單體化合物 (Monomer)、合成的腐植酸 (Synthetic humic acids)、 $As^{+3}$ 、 $As^{+5}$  及天然腐植酸 (Natural humic acids) 皆未測試出明顯的致突變性；同時將  $As^{+3}$  及  $As^{+5}$  分別與天然腐植酸混和後並無發現致突變性。先前研究指出台灣部分區域腐植酸可能具有致突變性 (Yu, 2001)，同時以購自 Aldrich Co. 的腐植酸與砷互混後可在 TA98 (-S9) 上發現致突變性 (Yu et al., 1998)。然而本研究並無相似的結果，其原因可能是測試劑量的差異 (本

研究的測試劑量範圍低於上述文獻)。下一階段我們將再提高測試劑量與範圍，以驗證致突變性存在與否。

#### (1) 第二階段：高劑量測試

由於前一實驗的劑量可能過低，無法顯現腐植酸及砷的致突變性；因此我們將測試劑量範圍再提高約10倍。

首先針對於市面上可購得的腐植酸(Sigma-Aldrich)分別進行添加與不添加老鼠肝臟活化酵素(S9)的測試。結果顯示，在TA98不論有無添加S9的測試下，As<sup>+3</sup>、As<sup>+5</sup>及市售腐植酸皆未測試出致突變性(表5及表6)。對於TA100不論有無添加 S9 的測試下，腐植酸在20  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 及50  $\mu\text{g}/\text{plate}$  劑量下均具有致突變性 ( $P < 0.05$ )，而As<sup>+3</sup>與As<sup>+5</sup>則未測出致突變性(表7及表8)。

當腐植酸與 As<sup>+3</sup> 互混時，在TA100中有時可展現出致突變性( $P < 0.05$ )，而在 TA98 則未測出致突變性。綜合上述結果，該腐植酸在有無添加S9的情況下皆能造成鹼基置換突變(TA100)，而當與As<sup>+3</sup>互混時，在添加S9的情況下有時也具有鹼基置換突變的能力。

此外，我們也針對台灣烏腳病地區井水及美國地區土壤所分離出的腐植酸分別進行添加與不添加老鼠肝臟活化酵素(S9)的測試。結果顯示高劑量的台灣及美國腐植酸，在不論有無添加 S9 的狀況下，TA98及TA100皆未能測出致突變性(表9~表12)。唯一例外只有TA100在添加S9下，20  $\mu\text{g}/\text{plate}$  的台灣腐植酸能稍微顯出致突變性(表12)。

## C. 促癌作用評估

1. 先前報告中指出砷(III)可誘發上皮細胞 JB6+ cell 之轉形(細胞重疊生長且濃染之特徵)本年度研究首先觀察 HA 對砷(III)誘發上皮細胞 JB6+ cell 之轉形是否有增強之現象? 結果發現 HA 可促進砷(III)誘發 foci 之形成 (Fig.11)，因此想進一步探討 HA 本身是否即具有 promotion 之作用? 或其

透過何作用而有 promotion 之作用？

2. 過去文獻指出 HA 會造成紅血球及內皮細胞 ROS 之產生，即產生氧化壓力，進而傷害血球細胞或血管壁細胞，此與烏腳病的致病因有密切關係，因此本年度計畫首先想釐清 HA 是否亦於上皮細胞內產生 ROS，又產生 ROS 與上皮細胞之 transformation 是否有關？首先以 DCFDA 誘發螢光的原理以 flow cytometer 測定細胞內 ROS 之量，發現 HA 在 100 $\mu$ g/ml 處理 72h 及 96 h 後有意義增加 JB6+ 細胞內 ROS (Fig.12). 又發現不管任何濃度 HA 處理 48 h 後再繼續培養 48 h 皆可提升 JB6+ 細胞內生性 ROS (Fig.13)。同時我們亦發現 HA 處理過之細胞之形態有改變之現象所以作了以下形態之研究。
3. 在相位差顯微鏡下觀察發現 HA 處理過之細胞變為較細長而原細胞較圓，又由 F-actin 螢光染色之觀察發現 HA 處理過之細胞顯現 filopodia 之形態，而這些改變與處理 TPA (tumor promoter) 者有類似之結果 (Fig.14)，因此 HA 可能亦具有 tumor promotion 之能力。然而不管處理 HA 或 TPA 對核皆無明顯影響。
4. 細胞形態的改變常相伴影響細胞內 signal pathway，進而影響細胞週期，在 HA 處理過的細胞，我們發現其細胞週期停滯於 G0/G1 phase (Fig.15)。
5. mouse skin JB6+ cell 是一對 TPA 誘發 neoplastic transformation 敏感之細胞，根據文獻指出轉形細胞前期有較強之 migration activity，因此我們測定了 HA 處理後再 culture 2 天之 JB6+ cell 其 migration activity，由結果中發現 10 and 100  $\mu$ g/ml 劑量之 HA 有意義的增加 migration cells (Fig.16). 由此可知 HA 具有誘發 transformation 之作用。
6. 由文獻中得知 JB6(+) 是一個 post-initiated mouse epidermal cell line 如經 TPA, TNF- $\alpha$  等 tumor promoter 處理後在 soft agar 中會有高頻率之 anchorage-independent colonies 之形成，由 Fig.17 中發現 positive control TPA 產生大量之 colonies 而 HA 約只產生 TPA 之 10% 但為 control 組之

15 倍，由此可見 HA 是一 weak promoter.又 TPA 會活化氧化性酵素造成 oxidative stress 與其誘發轉形有密切關係，因此我們在實驗中加入抗氧化劑 N-acetyl-cysteine 結果發現其可 block tumor promoter TPA 及 HA 所造成的 anchorage-independent growth.因此推測 HA 可造成 JB6 (+)產生持續性內生性 ROS 的產生進而促進細胞之轉形。

7. 由於內生性 ROS 之產生與 NF-kB 轉譯因子的活化有密切關係，因此以 ELISA kit 測定 HA 之作用，結果發現 HA 處理後之細胞即持續性增加 NFkB 之 binding activity 即可增加 NF-kB 轉譯能力(Fig.18)。
8. 過去研究顯示 TPA 誘發 mouse skin JB6 Cl41 cell 細胞轉型與活化 MAPKs 訊息路徑有關. MAPKs 包括 Erk, JNK, p38,在我們研究中發現 HA 主要會活化 Erk, p38, TPA 和 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 則三者皆會活化，而 HA 會加強 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 所誘發 JNK 的活化(Fig.6),另外發現其會促進核中 p-cjun 及 p65 量(Fig.19-21)，亦即會促進 AP-1 及 NFkB 之轉譯能力。
9. 另外由於 HA 會加強 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 所造成形態的改變，我們進一步觀察 cell membrane vinculin 及 connexin 43 之表現，結果發現 HA 會減少 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 所造成 connexin 43 之表現即減少細胞與細胞之 communication, 即有促進細胞轉型之作用(Fig.22).
10. 由以上結果我們發現 HA 及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 皆有 tumor promotion 之作用且 HA 具有增強 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tumor promotion 之能力。然而我們在 mouse skin two step carcinogenesis 模式中，並無法成功誘導 skin tumor 之發生.在 Fig.23 中僅成功發現 HA 會誘導增生之現象，且發現其對 skin 蛋白的影響與 TPA 有類似之處,如促進 iNOS, Cox2, ODC, PCNA, OPN 等之表現(Fig.24).
11. 由以上結果我們發現 HA 及 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 皆有 tumor promotion 之作用且 HA 具有增強 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tumor promotion 之能力，因此 HA 可能會提高 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 污染地區癌症之發生率及嚴重性,值得重視.
12. HA 增強 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tumor promotion 之能力乃加強 JNK 訊息路徑增加 c-Jun



及 NFkB 之轉譯能力。

## **D. 致畸胎評估**

1. 母鼠於受孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物。為評估劑量之毒性影響及基因氧化性傷害，將待胎鼠出生後，持續觀察其成長狀況及稱體重並按時於初生時、體重 3 克(或出生 5 天)、體重 5 克(或出生 10 天)及出生達 21 天時分批犧牲取樣。這些對小鼠成長速率之影響會和每胎仔鼠數目(表 13-14)、母鼠哺育情形以及藥物皆有影響，為克服部份影響因素，每種試劑組合多有 4-5 胎母鼠以上之試驗，以盡量有客觀之觀察。合成之腐植酸(HA16)+As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 卻一連造成 4 隻以上之母鼠死胎或流產，經腐植酸劑量減半後才有小鼠產出，但死亡率較高(表 13)。
2. 目前正依據前述實驗之經驗，持續餵食懷孕母鼠，並於懷孕第 20 天中止懷孕，取出胚胎觀察其發育情形，並取樣供後續染色觀察或生化分析使用，而不同來源之腐植酸(HA, HA135 及 SHA)單獨抑或是和砷共同暴露，即造成部份之母鼠死亡，死胎或流產，(表 14)。
3. 為進一步探討其原因，亦提供樣品給「基因氧化性傷害子計畫」來探討基因傷害(表 15-16)。我們也自行分析器官內抗氧化能力及作病理切片，目前已先完成部份抗氧化能力分析(圖 25-28)。
4. 懷孕與胚胎發育相關賀爾蒙之分析結果顯示(圖 29-32)，單獨餵食 HA 之母鼠在懷孕後期(給藥滿 11 天)血液中之 hCG(圖 29)含量明顯高於各組(p<0.05)，而 Estradiol(圖 30)在懷孕中期(給藥滿 6 天)在單獨餵食砷之母鼠血液中偏低(p<0.05)，但是在後期(給藥滿 11 天)之各給藥組皆較控制組為高(p<0.05)。單獨暴露砷及與 HA 共同暴露在懷孕中期(給藥滿 6 天)讓 Progesterone(圖 31)濃度較控制組有明顯上升之現象

( $p < 0.05$ )，但是到後期除了 HA 組稍高於控制組外，其他兩組皆較低。至於 Prolatin (圖 32) 之濃度則是給藥組在懷孕後期(給藥滿 11 天)皆較控制組為低，單獨暴露砷及與 HA 共同暴露組則呈現有意義之下降 ( $p < 0.05$ )。此外，在預先給藥暴露而在懷孕第 9 天中止懷孕取出胚胎觀察結果並未發現有外觀發育不良或畸型之現象。若進一步將配種生出之小鼠保留部分繼續於飲水中給予藥物 (HA 500mg/L or As 10 mg/L)，待其成熟後將暴露相同藥物之小鼠配種，持續觀察至第三子代，則可發現飲用腐植酸或是腐植酸加砷之母鼠受孕能力下降 (受孕比例：control 100%；HA 21.7%；As 13.3%；HA+As 30%)，其詳細機轉是否與賀爾蒙變化有關尚待進一步實驗證實。

## **E. 糖尿病致病機轉評估**

在糖尿病致病機轉之探討方面，我們選擇來源穩定之自行純化腐植酸(HA)及  $As_2O_3$  為實驗之主要試劑。

### 腐植酸與砷之細胞毒性

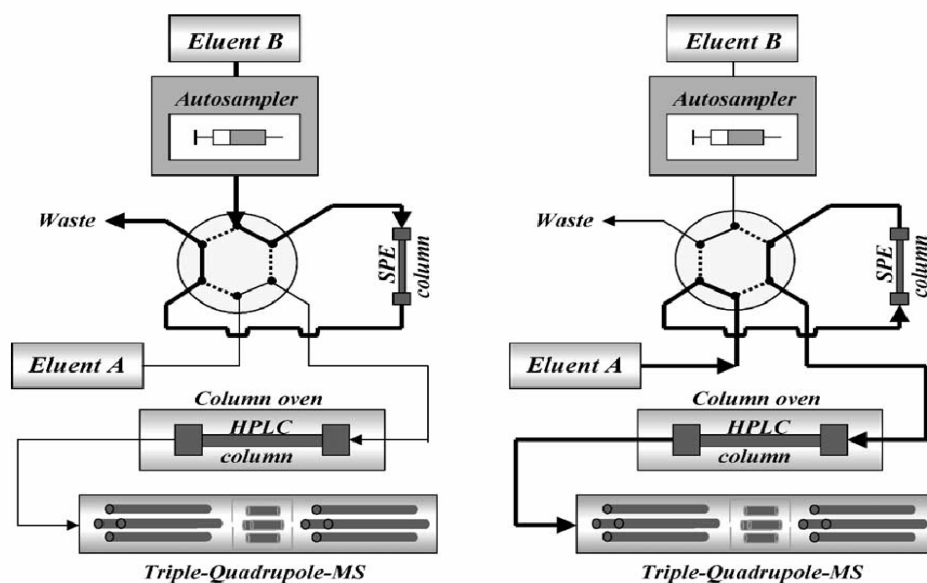
腐植酸 (HA) 單獨暴露對 HIT-T15  $\beta$  cell 之毒性並非很強，和無機砷共同暴露時則對低濃度砷的細胞毒性有部份緩解作用 (data not shown)。進一步分析其自由基生成發現，細胞暴露於試劑後 2 小時濃度最高，而且共同暴露具有相加效應(圖 33)。分析在 4 小時後胰島素分泌情形，腐植酸(HA)和無機砷皆會抑制胰島素之分泌，同時亦有相加效應 (圖 34)。由上述數據分析，腐植酸 (HA) 本身對  $\beta$  cell 之毒性並非很強，但其結構屬於穩定自由基之特性也具有誘導活性含氧物質(ROS)生成的能力，因此可以單獨或協同如砷之類的毒性物質產生自由基傷害。我們更進一步以抗氧化劑 NAC 先加入細胞培養液中，再重覆暴露腐植酸 (HA) 和無機砷，結果發現原先會被抑制之胰島素分泌大多回到正常 (圖 35)，因此也證明活性含氧物質(ROS)

生成在此所扮演之重要角色。此外，細胞之粒線體膜電位會因腐植酸和砷之暴露而下降（圖 36），細胞之 ATP 亦會下降（data not shown）。以 Annexin V-CY3 apoptosis detection kit 染色觀察發現腐植酸和砷之暴露會引起細胞凋亡（圖 37）。此外，在動物實驗亦發現，腐植酸與砷暴露會影響小鼠血液中之胰島素之含量（圖 38）在三週時略增但五週後即明顯下降，同時亦有部份小鼠之胰臟出現免疫細胞浸潤，週邊發炎之現象（圖 39）。

## F. 基因氧化性傷害評估

完成「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」於尿液 8-OHdG 之分析方法開發 (On-line SPE-LC-MS/MS)

如下圖所示，連線固相萃取方法(on-line solid phase extraction)的原理主要是利用在高效液相層析儀的分析管柱前加裝另一支固相萃取管柱(SPE column)與一轉換閥(Switching valve)，樣本注入後可自動萃取且連線直接進入 LC-MS/MS 進行分析。尿樣添加同位素內標後直接置於自動注射系統(Autosampler)上，樣本在注射進入系統後，先被 Eluent B 帶至固相萃取管柱(SPE column)進行吸附與淨化。接著藉由轉換閥轉位，利用 Eluent A 將待測物反沖提而出並進入 LC-MS/MS 系統分析。



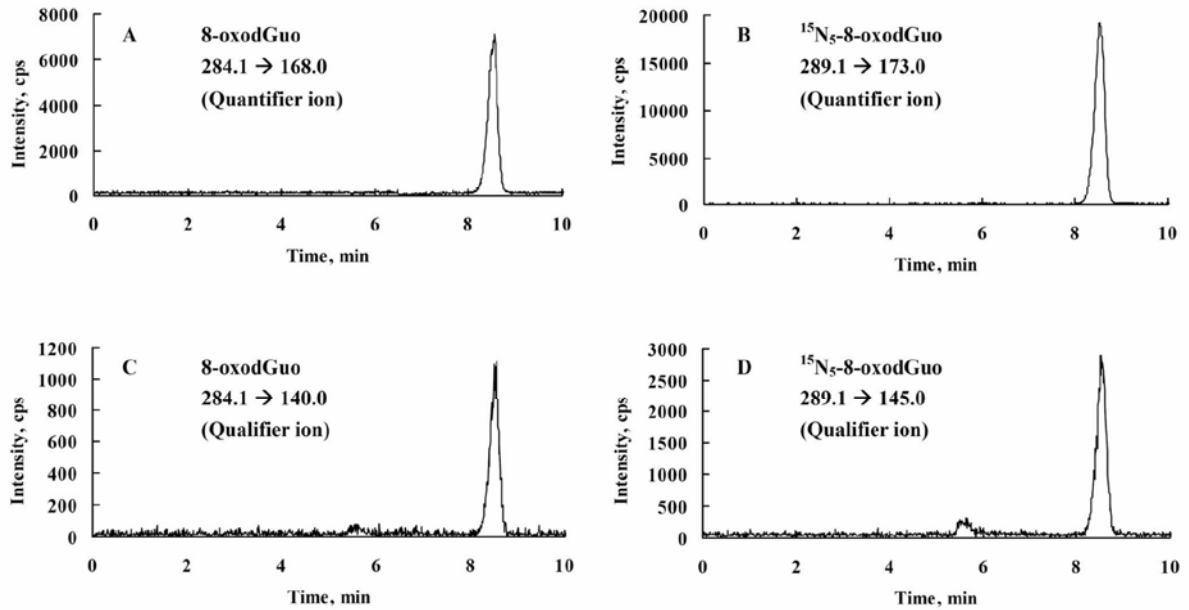
On-line SPE-LC-MS/MS 系統示意圖 (Koal et al., 2004)

本研究已成功建立「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」(On-line SPE-LC-MS/MS)於尿液 8-OHdG 之分析。此分析方法同時可用於臟器/細胞中 8-OHdG 之定量分析。其相關研究成果已發表於知名國際期刊(Clinical Chemistry, 2006, In press; SCI, Impact Factor= 6.5)。此分析方法具高敏感度及特異性。此方法擁有極佳的偵測極限(5.7 ng/L; 2.0 fmol on column)與再現性(inter- and intraday impression < 5%)。尿液樣本經適度稀釋再加入同位素內標後不需前處理即可上機分析，分析時間只需 10 min，可大大節省分析之時間與耗材且能快速連續處理大量樣本。另外因所需尿液量甚少(~20µL)，亦可減少樣本儲存所需空間。未來甚至可廣泛運用在臨床檢驗分析上。其分析條件及層析圖譜分別列於如下表及圖。

#### On-line SPE-LC-MS/MS 分析程序表

Time, min	Eluent I (trap column)		Eluent II <sup>c</sup> (analytical column)	Valve position	Flow rate, mL/min	Remarks
	Solvent Ia, <sup>a</sup> %	Solvent Ib, <sup>b</sup> %				
0	100	0	100	A	1	Injection and washing of sample
4	100	0	100	B	1	Start of elution to the analytical column
6	100	0	100	A	1	End of elution; trap column cleanup and reconditioning
8	0	100	100	A	1	
9	100	0	100	A	1	
10	100	0	100	A	1	

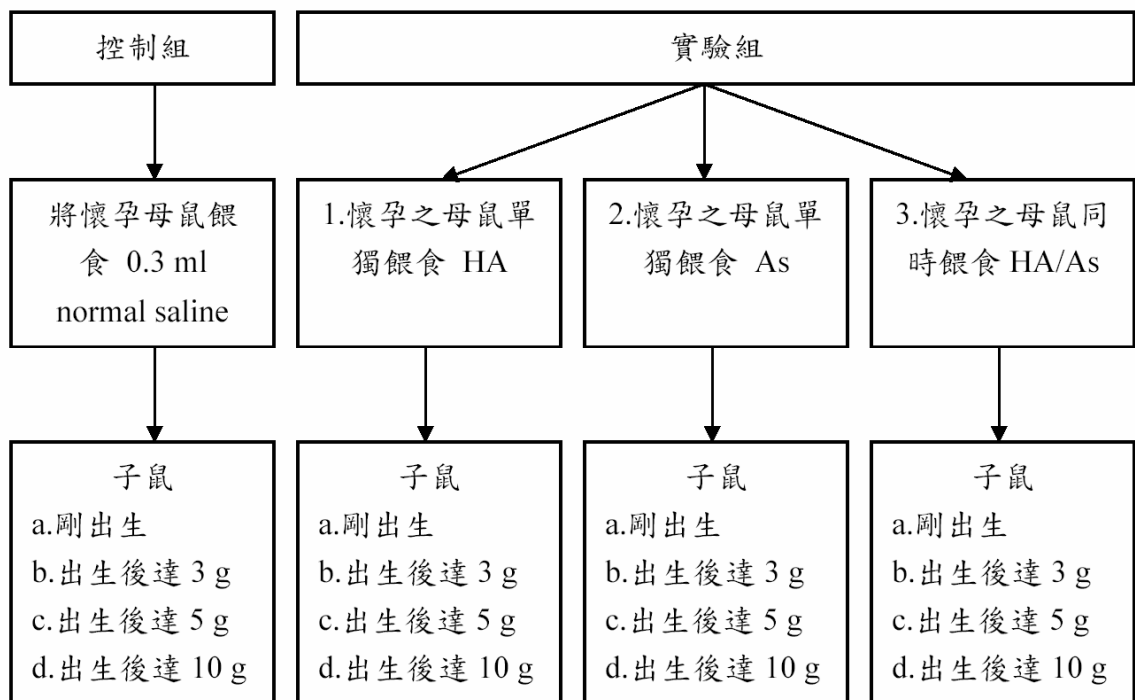
<sup>a</sup> 50 mL/L methanol-1 mL/L FA.  
<sup>b</sup> 500 mL/L methanol-1 mL/L FA.  
<sup>c</sup> 850 mL/L methanol-1 mL/L FA.



8-OHdG 之 on-line SPE-LC-MS/MS 層析圖譜 (Hu et al., 2006)

### 腐植酸與砷所造成基因氧化傷害之初步結果

我們運用已建立完成之 on-line SPE-LC-MS/MS 分析方法於動物臟器 8-OHdG 含量測定。我們所分析的動物臟器是由子計劃 6 (致畸胎計劃) 中所提供。如下圖所示: 將已懷孕之 ICR Mice 母鼠分為控制組與實驗組。對於控制組之母鼠, 在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天), 以灌胃管方式每天注入 0.3 ml normal saline. 而實驗組部份, 母鼠同在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天), 以灌胃管方式每天注入腐植酸或砷 (HA 劑量: 20 mg/ml-0.25ml/40g B.W.; As 劑量: 2 mg/ml-0.25ml/40g B.W.)。其中腐植酸(Humic acid)購買自 Sigma-Aldrich 再經實驗室溶於鹼(1N NaOH)不溶酸(1N HCl)純化而得。待實驗組母鼠產下小鼠哺乳結束後(約 21 天), 仍給予實驗組母鼠以飲用水的方式持續暴露(劑量: 1.單獨餵食腐植酸組 HA 劑量: 500 ppm 2.單獨餵食砷組 As 劑量: 20 ppm 3.同時餵食腐植酸和砷組 HA 劑量: 500 ppm、As 劑量: 20 ppm)。母鼠在犧牲前會放入代謝籠收集尿液, 最後分析其尿液及肝臟之 8-OHdG 含量。控制組及實驗組所產下之小鼠依成長大小分批犧牲(共包括剛出生、出生後達 3g、5g 及 10g 四組), 並分析其臟器之 8-OHdG 含量。



**實驗設計圖**

控制組及實驗組各組母鼠其肝臟及尿液中 8-OHdG 含量的分析結果如表 15 所示。母鼠在單獨餵食腐植酸的情況下相較於控制組其肝臟以及尿液中 8-OHdG 有明顯增加( $p < 0.05$ )。過去有許多體外實驗指出腐植酸其本身可形成一個穩定的自由基(Lu et al., 1988)，亦會促使細胞累積鐵，增加細胞內游離鐵的含量進而增加細胞內的氧化壓力(Ho et al., 2003)。腐植酸會刺激血管內皮細胞活性含氧物質(ROS)的生成而造成血管內皮細胞的氧化壓力傷害(Gau et al., 2001)。本實驗以動物實驗證實以腐植酸直接餵食母鼠會造成動物體內嚴重的基因氧化傷害。另外母鼠在單獨餵食砷的情況下，母鼠肝臟以及尿液中 8-OHdG 相較於控制組亦有明顯增加( $p < 0.05$ )。先前研究以含砷的飲水餵食老鼠(3.2 mg/L)，發現老鼠肝臟中 glutathione (GSH)的含量明顯增加，顯示砷會增加老鼠肝臟的氧化壓力(Santra et al., 2000)。本實驗藉由母鼠肝臟以及尿液中 8-OHdG 分析結果也同樣證實砷的暴露會導致基因的氧化性傷害。母鼠在同時餵食腐植酸與砷時肝臟中 8-OHdG 含量除了相較於控制組明顯增加外( $p < 0.05$ )，其 8-OHdG 含量相較於單獨餵食腐植酸

的母鼠在統計上亦達到顯著( $p < 0.05$ )。這似乎顯示腐植酸與砷同時存在時會加強母鼠的基因氧化傷害。過去研究發現以腐植酸與砷同時注射小白鼠時，小白鼠的組織傷害遠比只注射腐植酸的小白鼠來得嚴重，指出砷與腐植酸同時存在的毒性有加強作用(李 and 呂，1997)。本實驗藉由 8-OHdG 定量分析的結果證實腐植酸與砷同時存在時會加強老鼠的基因氧化傷害。

對應控制組與實驗組母鼠所產下子鼠，其各組剛出生子鼠肝臟及腎臟 8-OHdG 含量分析結果，如表 16 所示。母鼠在懷孕期間單獨餵食腐植酸時其剛出生子鼠肝臟及腎臟 8-OHdG 含量相較於控制組無明顯增加，顯示腐植酸似乎不會透過胎盤對子鼠造成基因氧化傷害。先前有研究發現烏腳病患地區地下飲用水所含螢光物質會對雞胚胎造成畸形發育(Lu et al., 1977)，然而本實驗以純化過後的市售腐植酸及老鼠作為實驗對象，結果顯示母鼠暴露腐植酸的情況下未對其子鼠造成嚴重基因氧化傷害，也沒有發現到任何致畸胎的效應。相反地，母鼠在懷孕期間單獨餵食砷及同時餵食砷與腐植酸的狀況下，其剛出生子鼠肝臟、腎臟 8-OHdG 含量相較控制組卻有明顯增加( $p < 0.05$ )。顯示砷似乎可透過胎盤進而對子鼠造成基因氧化傷害。先前流行病學研究中，孕婦若暴露於高砷的狀況下，會提高流產、死胎或是新生兒死亡的風險(Milton et al., 2005)。我們的研究結果也許可提供部分線索來說明高砷地區有較高流產、死胎或是新生兒死亡的風險。另外在表 16 中，母鼠單獨餵食砷其子鼠肝臟 8-OHdG 含量比腎臟 8-OHdG 含量高 3 倍之多，顯示肝臟所受到的基因氧化傷害遠比腎臟來得嚴重。這可能是由於肝臟為砷主要累積的器官(Biswas et al., 2000)而導致。

除剛出生子鼠外，另有三組子鼠(出生後達 3g、5g 及 10g 三組)。各組子鼠肝臟 8-OHdG 含量在不同生長時期的變化情形，如圖 40 所示。我們意外發現，實驗組中母鼠單獨餵食砷及同時餵食砷與腐植酸，其子鼠肝臟 8-OHdG 含量隨著年紀增長而減少。相同趨勢在子鼠腎臟中也看的到，顯示子鼠體內基因氧化傷害會隨著年紀的增長而自動慢慢修復。

#### 不同腐植酸來源所造成之基因氧化傷害

本實驗另選擇三種不同之腐植酸分別是：1. Proto-catechuic acid:是具代表性的腐植酸單體之一。此單體是酚酸(phenolic acid)之一種，是 lignin 的典型分解物，也發現存在於煤炭中；2. "HA-unpurified" 是由 Aldrich 公司購買所得，是一般市售之腐植酸其分子量大於 5000；3. "HA" 是一般市售之腐植酸再經實驗室純化[溶鹼(1N NaOH)不溶酸(1N HCl)]所得。實驗簡述如下：將已懷孕之 ICR Mice 母鼠分為控制組與實驗組。對於控制組之母鼠，在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天)，以灌胃管方式每天注入 0.3 ml normal saline. 而實驗組部份，母鼠同在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天)，以灌胃管方式每天注入不同來源之腐植酸 (HA 劑量：20 mg/ml-0.25ml/40mg B.W)。控制組及實驗組所產下之小鼠依成長大小分批犧牲，並分析其臟器之 8-OHdG 含量。共包括剛出生、出生後達 3g、出生後達 5g 三組。結果如表 17 所示。我們發現到針對剛出生、出生達 3g、出生達 5g 等不同大小之小鼠，只要其母鼠在懷孕期間曾受過腐植酸單體(Proto-catechuic acid)或市售未經純化之腐植酸(分子量大於 5000) 餵食注入，皆明顯造成小鼠肝臟中 8-OHdG 的增加(8-OHdG 含量皆明顯高於控制組， $P < 0.05$ )。而母鼠在懷孕期間餵食經純化過後之腐植酸(HA)其所產下之小鼠並沒有類似的現象。結果顯示似乎單體 Proto-catechuic acid 及這些未純化之腐植酸因本身含有大量會誘導活性含氧物質(ROS)生成的物質(例如多酚類)較易透過胎盤對子鼠造成基因氧化傷害。而經純化過後之腐植酸(HA)，在純化的過程中有可能將這些會誘導活性含氧物質(ROS)生成的物質移除或破壞，剩下穩定大分子的部份較不易透過胎盤，進而降低對小鼠肝臟基因氧化傷害的程度。此結果證實不同來源的腐植酸對基因的氧化傷害程度也不相同。

## G. 動物毒性評估

腐植酸和砷對小白鼠之急毒性，以及對凝血時間、血糖之變化(data not shown)，本計劃採用 6-8 週之 ICR 小鼠以每組 5-10 隻之數量連續 28 天腹腔注射不同劑量之腐植酸 (HA) 和砷 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 計算其存活率，不論是單獨暴露高劑



量之腐植酸或是和砷共同暴露皆可造成動物之死亡(圖 41)。同時亦在高劑量之腐植酸暴露小鼠觀察到尾部末梢之疑似病變(圖 42)，而其病理切片觀察發現有肌肉退化發炎之現象(圖 43)。而在亞慢性與慢性毒性影響方面則亦有尾部肌肉退化發炎之現象(亞慢性)以及部分器官產生輕微發炎之現象(慢性)，推論長期暴露腐植酸及砷確實會影響末梢組織與體內器官之健康。

## 結論

1. 腐植物質是相當複雜的化合物組合，可能因不同的時空與環境因素而有所不同，但是其中確實有某些成份是具有相當強的毒性。在環境暴露機率如此高的情形下，若能藉由各子計畫間之通力合作，相信可以找到一些毒性高之指標化合物，不僅可作為環境安全管理之依據，亦可成為腐植物質相關製造業或使用者之品管標準。目前群體計畫已經有確認部份腐植酸之毒性較強，亦有和砷產生毒性加強之作用，未來將更進一步探討其細部結構或組成分子所扮演之角色。
2. 砷或其化合物甚至其他部份金屬亦在環境中大量存在，同時砷亦被認為是重要的致病因子，再加上腐植物質是很好的金屬螯合劑，尤其是砷和腐植物質間之交互作用及和毒性作用間之相關性也需要更進一步之探討。由實驗數據顯示，砷和腐植酸確實有毒性相加作用。
3. 經由各子計畫之合作，探討腐植物質毒性作用之標的器官與影響程度，以及對某些疾病包括癌症、糖尿病、致畸胎等之影響，未來將朝更細部之毒性致病機轉探討。
4. 藉由結構鑑定之結果，將針對毒性作用強之化合物建立其體內代謝物及 DNA 加成物之偵測技術與方法，以提供生物偵測使用。今年已完成 on-line cleanup LC-MS/MS 分析方法應用於動物臟器 8-OHdG 含量之測定以及腐植酸裂解產物之分析方法建立，並運用於真實樣品之分析工作。

5. 由基因氧化傷害的角度首次證實腐植酸與砷同時存在時會加強老鼠的基因氧化傷害，同時亦看到腐植酸具有 tumor promotion 之作用，雖然在致突變性實驗中未能得到腐植酸具有明顯致突變性之作用，但其產生氧化性壓力（自由基）之作用卻相當明顯，應為其重要之作用機轉之一。此外，在致畸胎實驗中亦有觀察到腐植酸與砷之暴露會影響與胚胎發育及分娩攸關之賀爾蒙，因而可能與流產或早產有關。急毒性動物實驗除了證實高濃度之腐植酸具有高強致死性外，腐植酸與砷之暴露亦有加強作用，單獨暴露高濃度之腐植酸亦在施藥後 2-5 天在尾部末梢產生黑色沈積（病變）。而在亞慢性與慢性毒性影響方面則亦有尾部肌肉退化發炎之現象（亞慢性）以及部分器官產生輕微發炎之現象（慢性），推論長期暴露腐植酸及砷確實會影響末梢組織與體內器官之健康。

## 參考文獻

- 李聰亮 化學廢棄物之環境污染與職業性傷害 永續發展 9:22-27, 1995.
- 李豐、呂鋒洲。螢光腐植酸與砷所引起動物組織的病理變化。台灣醫學會雜誌 1997
- 陳立夫 王敏昭 台灣兩種主要農科土壤腐植酸之光譜及其他分析特性 中國農業化學會誌 30(1):33-42, 1992.
- 賴進興 陳世裕 鐘燕昌 何郁旻 氧化鐵覆膜濾砂應用於去除水中腐植酸之研究 工業污染防治 74:74-84,2000
- 簡慧貞 環境污染物健康風險度推估架構 環保資訊 12:21-26, 1994
- 台灣省農業藥物毒物試驗所，1987，應用毒理系技術專刊第一號，化學物質遺傳毒性之簡易偵測法 1.沙門菌回復突變測試法，中華民國七十六年二月。
- 趙木榮，2001，螢光菌對空氣中半揮發性有機物之毒性測試方法建立及其運用，博士論文，國立成功大學環境工程學系。
- 呂峰洲 腐植酸,自由基與烏腳病 國科會生命科學簡訊 17(6)：2003.

<http://biometrics.sinica.edu.tw/nsc/v17-06/article/.php3>.

廖勇柏,陳建仁,李文宗,徐書儀 台灣地區癌症死亡率與發生率電子地圖的建構及使用 台灣衛誌 22(3):227-236, 2003.

王少芬,魏建模,楊詔凱,楊末雄 地下水的砷污染 烏腳病和其他相關的健康問題 化學 61(3):351-362, 2003.

呂峰洲,楊重光,林國煌,嘉南烏腳病患區飲用地下水之理化性質 台灣醫學會雜誌 74:596-605, 1975.

呂峰洲,蔡孟慧,林國煌,烏腳病地區飲水中螢光物質之研究 第一版, 雞胚胎毒性研究 台灣醫學會雜誌 76:58-63, 1977.

呂峰洲,蔡孟慧,林國煌,烏腳病地區飲水中螢光物質之研究 第二版, 螢光物質之分離與其鑑定 台灣醫學會雜誌 76:209-217, 1977.

呂峰洲,蔡孟慧,林國煌,烏腳病地區飲水中螢光物質之研究 第三版, 螢光物質之分離與其鑑定 台灣醫學會雜誌 77:68-76, 1978.

呂峰洲,林信源,許隆隆,林國煌 烏腳病地區地下飲用水中螢光物質之再檢討 台灣醫誌 79:1094-1101, 1980.

呂峰洲, Irgolic K.J.,林啟文,林國煌,董大成 烏腳病患區中水中螢光物質之研究 井水內含麥角胺 台灣醫誌 81:1087-1100, 1982.

呂峰洲,沈佩明 烏腳病患者某一井水中的化學致癌物質辟瘟酸酯 台灣醫誌 86:734-742, 1987.

呂峰洲,山村行夫,山內博 台灣烏腳病患一口井水中螢光物質之研究: 腐植物質 台灣醫誌 87:66-75, 1988.

呂峰洲 腐植酸,自由基與烏腳病 國科會生命科學簡訊 17(6): 2003.

<http://biometrics.sinica.edu.tw/nsc/v17-06/article/.php3>.

Anawar HM, Akai J, Mostofa KMG, Safiullah S, Tareq SM (2002) Arsenic poisoning in groundwater Health risk and geochemical sources in Bangladesh. Environment International 27, 597-604.

- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions* 31, 1441-1444.
- Biswas U, Sarkar S, Bhowmik MK, Samanta AK and Biswas S. Chronic toxicity of arsenic in goats: clinicobiochemical changes, pathomorphology and tissue residues. *Small Rumin Res* 2000;38:229-235.
- Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology*. 24(1):65-78, 1981 Aug.
- Carter CA, Doherty MM, Rusnak DW, Nettesheim P, Ferriola PC (1994) Alterations in the localization of F-actin, Fibronectin, and Thrombospondin occur prior to neoplastic transformation in rat tracheal epithelial cells. *Experimental Cell Research* 212, 141-150.
- Chen C.J., Lin L.J. Human carcinogenicity and atherogenicity induced by chronic exposure to inorganic arsenic. In: Niagu, J.O.(Ed.) *Arsenic in the Environment, Part II :Human Health and Ecosystem Effects*. Wiley, New York, pp.109-131, 1994.
- Chen C. H.; Liu J. J. Lu F. J.; Yang M. L.; Lee Yashang; Huang T. S. (2003) The effect of humic acid on the adhesibility of neutrophils (2003) *Thrombosis Res.* 108, 67-76.
- Cheng ML, Ho HY, Chiu TY, Lu FJ (1999) Humic acid-mediated oxidative damages to human erythrocytes: A possible mechanism leading to anemia in blackfoot disease. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 470-477.
- David L, Olive Role of Progesterone Antagonists and New Selective Progesterone Receptor Modulators in Reproductive Health. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 57(11):S55-S63, 2002.
- Dong Z (2002) The molecular mechanisms of arsenic-induced cell transformation and apoptosis. *Environmental Health Perspectives* 110, Suppl 5, 757-759.

- Gau R. J.; Yang H. L.; Chow S. N.; Suen J. L.; Lu F. J (2000) Humic acid suppresses the LPS-induced expression of cell-surface adhesion proteins through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 166:59-67.
- Gau R. J.; Yang H. L.; Suen J. L.; Lu F. J. (2001) Induction of oxidative stress by humic acid through increasing intracellular iron: a possible mechanism leading to atherothrombotic vascular disorder in blackfoot disease. *Biochem. and Biophys. Research Commun.* 283: 743-749.
- Gau RJ, Yang HL, Suen JL and Lu FJ. Induction of oxidative stress by humic acid through increasing intracellular iron: a possible mechanism leading to atherothrombotic vascular disorder in blackfoot disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:743-749.
- Gerhard I, Waibei S, Daniel V, Runnebaum B. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. *Human Reproduction Update.* 4(3):301-309,1998.
- Giri U, Sharma SD, Abdulla M, Athar M (1995) Evidence that in situ generated reactive oxygen species act as potent stage-I tumor promotor in mouse skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 698-705.
- Ho KJ, Liu TK, Huang TS and Lu FJ. Humic acid mediates iron release from ferritin and promotes lipid peroxidation in vitro - a possible mechanism for humic acid induced cytotoxicity. *Mol Toxicol* 2003;77:100-109.
- Ho K. J.; Liu T. K.; Huang T. S.; Lu F. J. (2003) Humic acid mediates iron release from ferritin and promotes lipid peroxidation in vitro- a possible mechanism for humic acid induced cytotoxicity. *Mol. Toxicol.* 77: 100-109.
- Hsei YC, Chang WC, Yang HL (2000) Inhibition of human plasmin activity using humic acids with arsenic. *Science of the total Environment* 273, 93-99.
- Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA and Wu, KY. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using isotope-dilution liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry

- and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:505-510.
- Hu CW, Wang CJ, Chang LW and Chao MR. Clinical-Scale High-Throughput Analysis of Urinary 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine by Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with On-Line Solid-Phase Extraction. *Clin Chem* 2006 (In press).
- Hughes MF (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 133, 1-16.
- Kitchin KT, Ahmad S (2003) Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 137, 3-13.
- Koal T, Deters M, Casetta B, Kaefer V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 805:215-222.
- Lee Yashang; Huang T. S.; Yang M. L.; Huang L. R.; Chen C. H.; Lu F. J. (1999) Peroxisome proliferation, adipocyte determination and differentiation of C3H10T1/2 fibroblast cells induced by humic acid: Induced of PPAR in diverse cells. *J. Cell. Physiol.* 179: 218-225.
- Lu FJ, Yamamura Y and Yamauchi H. Studies on fluorescent compounds in drinking water of blackfoot disease endemic area in Taiwan: humic substances. *J Formos Med Assoc* 1988; 87:66-75.
- Lu FJ, Tsai MH and Ling KH. Studies on fluorescent compound in drinking water of blackfoot disease endemic areas. 1. The toxic effects of fluorescent compound on the chick embryos. *J Formos Med Assoc* 1977;76:58-63.
- Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173-215.
- Milton AH, Smith W, Rahman B, Hasan Z, Kulsum U, Dear K, Rakibuddin M and Ali A. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in Bangladesh. *Epidemiology.* 2005;16:82-86.
- Mondal S, Branlow DW, Heidelberger C (1976) Two-stage chemical oncogenesis in culture of C3H10T1/2 cells. *Cancer Research* 36, 2254-2260.

- Ravanat, J.L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, Al. and Cadet, J. (2002) Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis*, 23, 1911-1918.
- Samuel S, Bernstein LR (2004) Adhesion, Migration, Transcriptional, Interferon-Inducible, and Other Signaling Molecules Newly Implicated in Cancer Susceptibility and Resistance of JB6 Cells by cDNA Microarray Analyses. *Molecular Carcinogenesis* 39, 34-60.
- Santra A, Maiti A, Chowdhury A and Mazumder DN. Oxidative stress in liver of mice exposed to arsenic-contaminated water. *Indian J Gastroenterol* 2000, 19:112-115.
- Slaga TJ (1983) Overview of tumor promotion in animal. *Environ. Health Perspect.* 50, 3-14.
- Tseng C.H., Tseng C.P., Chiou H.Y., Hsueh Y. M., Chong C.K., and Chen C. J. Epidemiologic evidence of diabetogenic effect of arsenic. *Toxic. Lett.* 133:69-76, 2002.
- Yang M. L.; Huang T. S.; Lee Yashang; Chen T. H.; Chen S. Y.; and Lu F. J. (2002) Inhibition of endogenous thyroid hormone receptor-  $\beta$  and peroxisome proliferation-activated receptor- $\alpha$  activities by humic acid in a human-derived liver cell line. *Thyroid* 12:361-371.
- Yang M. L.; Lee Yashang; Huang T. S.; and Lu F. J. (2002) Humic acid extracted from blackfoot disease-endemic well water induces adipocyte differentiation of C3H10T1/2 fibroblast cells: a possible mechanism leading to atherosclerotic-like plaque in blackfoot disease. *Arch. Toxicol.* 76: 48-54.
- Yu X. 2001. Humic Acids from Endemic Arsenocosis areas in inner Mongolia and from the Balckfoot-diseaseareas in Taiwan: A comparative study. *Environmental Geochemistry and Health.* 23:27-42.
- Yu X, B. Zheng and Q. Hong. 1998. Studies on mutagenicity of humic acid samples

collected from arsenosis-affected areas in China. Chinese Journal of Preventive Medicine. 32(2):70-2.; 6:689-695。

Yu X, Lu F, Zheng B, Huang T, Gao R, Liu C, Hong Q (1999) Effects of humic acid on lipid peroxidation in arsenosis prevalent areas. Chinese Journal of Preventive Medicine 33, 26-9.

## 計劃成果自評

綜觀三年研究期間，共計發表 SCI 期刊論文已刊登有 3 篇，分別為 **Chemico Biological Interactions**，**Clinical Chemistry** 以及 **Toxicology Letters** 等，準備中有 6-7 篇。參與 2 次國際會議，並協辦其中一次及口頭報告相關研究成果，多次參與國內各種學術研討會並發表十餘篇壁報論文，而參與研究計畫之大專生與助理亦有十餘人次順利進入各校研究所進修，成果相當不錯。



# 圖表

## A. 腐植酸聚合物及其裂解單體分析

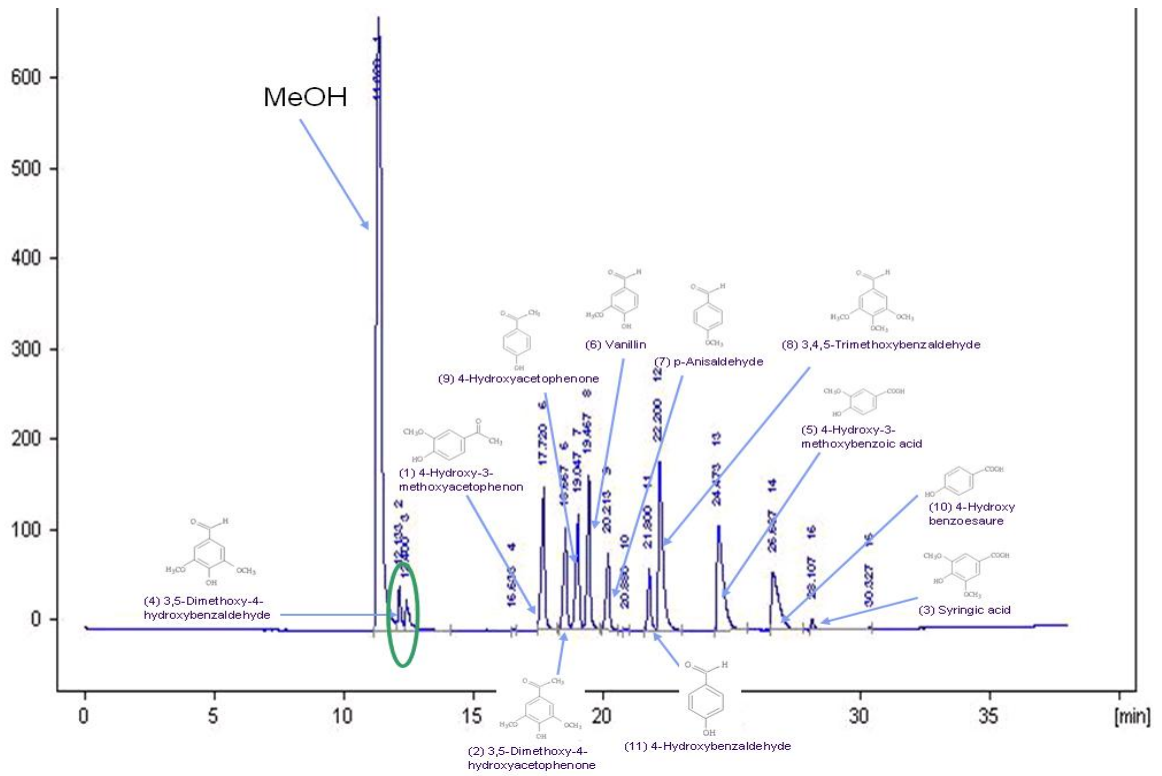


圖 1. 分析最佳條件下，11 種腐質酸單體的滯留順序。

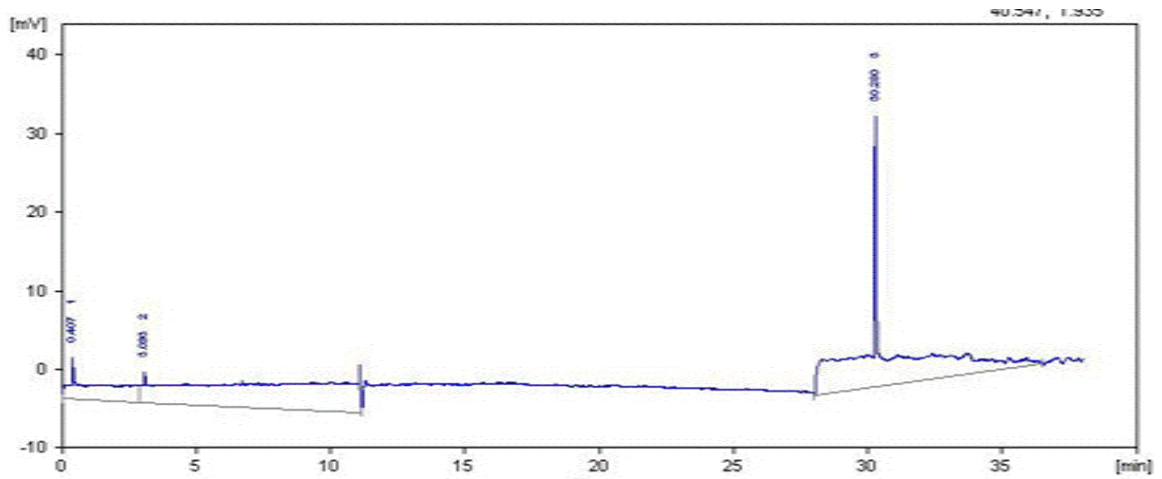


圖 2. Aldrich 腐植酸經裂解後注入電泳系統分析，計算得到約有 67.2% (w/w) 的單體組成，此單體有可能只是 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde。

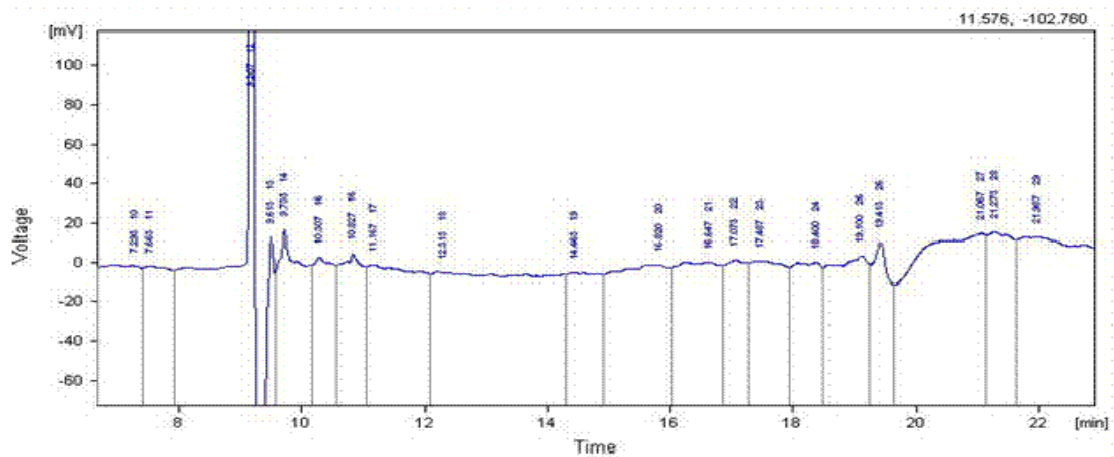


圖 3. 台灣西南沿海土壤樣品酸化沈澱，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體。計算得到約有 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (42.3%) 以及 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid (39.6%)。

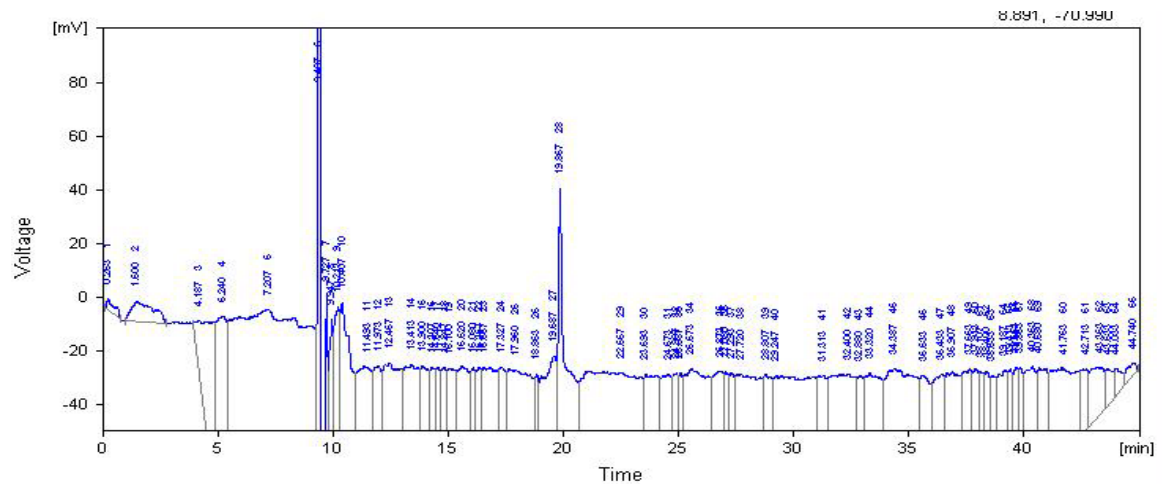


圖 4. 美洲土壤樣品，經酸化沈澱後，再以苯及乙酸乙酯萃取後，減壓乾燥至固體。經計算得到約有 78.9 % (w/w) 的單體組成，此單體可能 4-Hydroxy-3-methoxy-benzoic acid

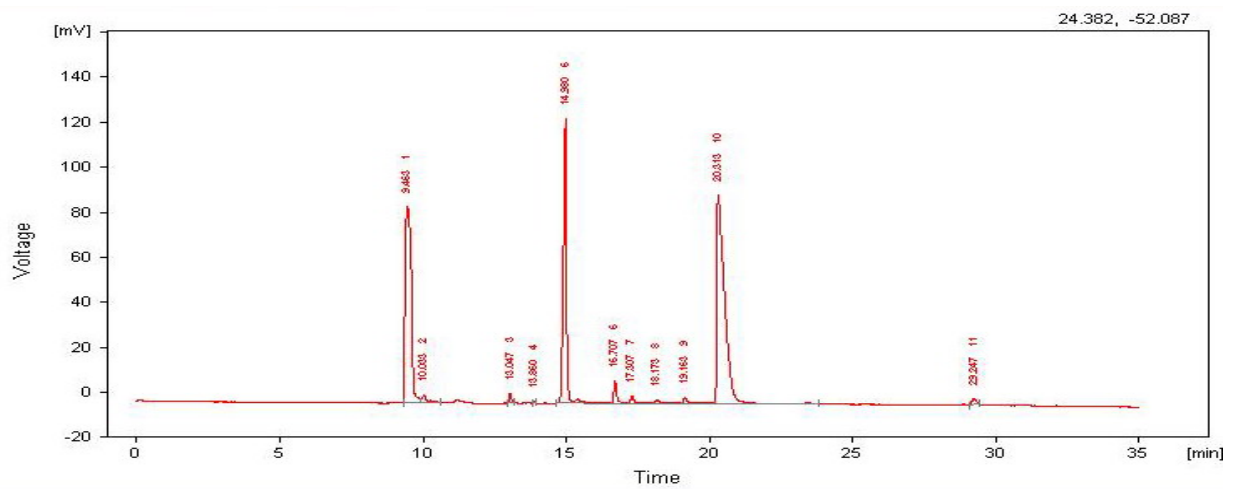


圖 5. 三種添加腐植酸單體樣品：4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon; p-Anisaldehyde; 4-Hydroxybenzoesaure 三種單體標準液添加於消化槽內，經消化萃取後的回收率分別是 90, 86, 94%。

Table 1. Elemental compositions, ash contents, atomic rations, and UV-VIS absorption for humic substance samples

DHM samples*	Elemental analysis									Spectroscopic analysis		
	Element (%)					Atomic ratio			$E_4/E_6$	$E_2/E_3$	$\epsilon_{272}$	
	C	H	O	N	Ash	C/H	O/C	C/N	(L mg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )			
American HA	53.72	4.31	39.68	2.29	1.53	1.04	0.55	27.37	6.95	2.35	0.0096	
ARI-L-HA	50.41	7.83	24.57	17.19	5.35	0.54	0.37	3.42	5.64	3.77	0.0031	
ARI-S-HA	52.66	4.84	36.39	6.11	2.60	0.91	0.52	10.06	6.67	2.64	0.0075	
Taiwan HA	55.37	5.71	37.91	1.01	2.41	0.81	0.51	63.96	6.41	2.84	0.0062	
Taiwan FA	42.77	7.50	45.64	4.09	4.28	0.48	0.80	12.20	9.37	3.98	0.0035	
Synthetic HA1	58.60	6.22	35.14	0.04	1.35	0.79	0.45	1709	6.15	3.17	0.0042	
Synthetic HA2	53.74	6.91	33.47	5.88	2.04	0.65	0.47	10.66	6.08	3.02	0.0049	

表 2：各種腐植酸在 250, 272, 365, 465 及 665 nm 的吸收度值以及相互間比值

樣品	$A_{465 \text{ nm}} / A_{665 \text{ nm}}$	$A_{250 \text{ nm}} / A_{365 \text{ nm}}$	$A_{272 \text{ nm}}$
1	$-0.0166 / -0.0839 = 0.1979$	$0.3651 / 0.0909 = 4.0165$	0.3067
2	$-0.0211 / -0.0862 = 0.24477$	$0.5614 / 0.1082 = 5.2134$	0.4837
3	$-0.0731 / -0.0930 = 0.7860$	$0.0097 / -0.0527 = -0.1840$	-0.0110
4	$-0.0696 / -0.0936 = 0.7435$	$0.1391 / -0.0352 = -3.9517$	0.0779
5	$0.1512 / -0.0575 = -2.6295$	$1.2702 / 0.5142 = 2.3470$	1.1365
6	$0.0244 / -0.0776 = -0.3144$	$0.4811 / 0.1692 = 2.8433$	0.4187
7	$0.1426 / -0.0597 = -2.3886$	$1.2790 / 0.5023 = 2.5462$	1.1292
8	$0.0281 / -0.0768 = -0.3658$	$0.5346 / 0.1790 = 2.9865$	0.4521
9	$0.0066 / -0.0805 = -0.0819$	$0.5120 / 0.1425 = 3.5929$	0.4464
10	$-0.0590 / -0.0913 = 0.6462$	$0.0576 / -0.0259 = -2.2239$	0.0326
11	$0.1427 / -0.0282 = -5.0602$	$1.0211 / 0.3964 = 2.5784$	0.9205
12	$0.0914 / -0.0518 = -1.7644$	$0.8812 / 0.3340 = 2.6383$	0.8165

## B. 螢光菌急毒性分析

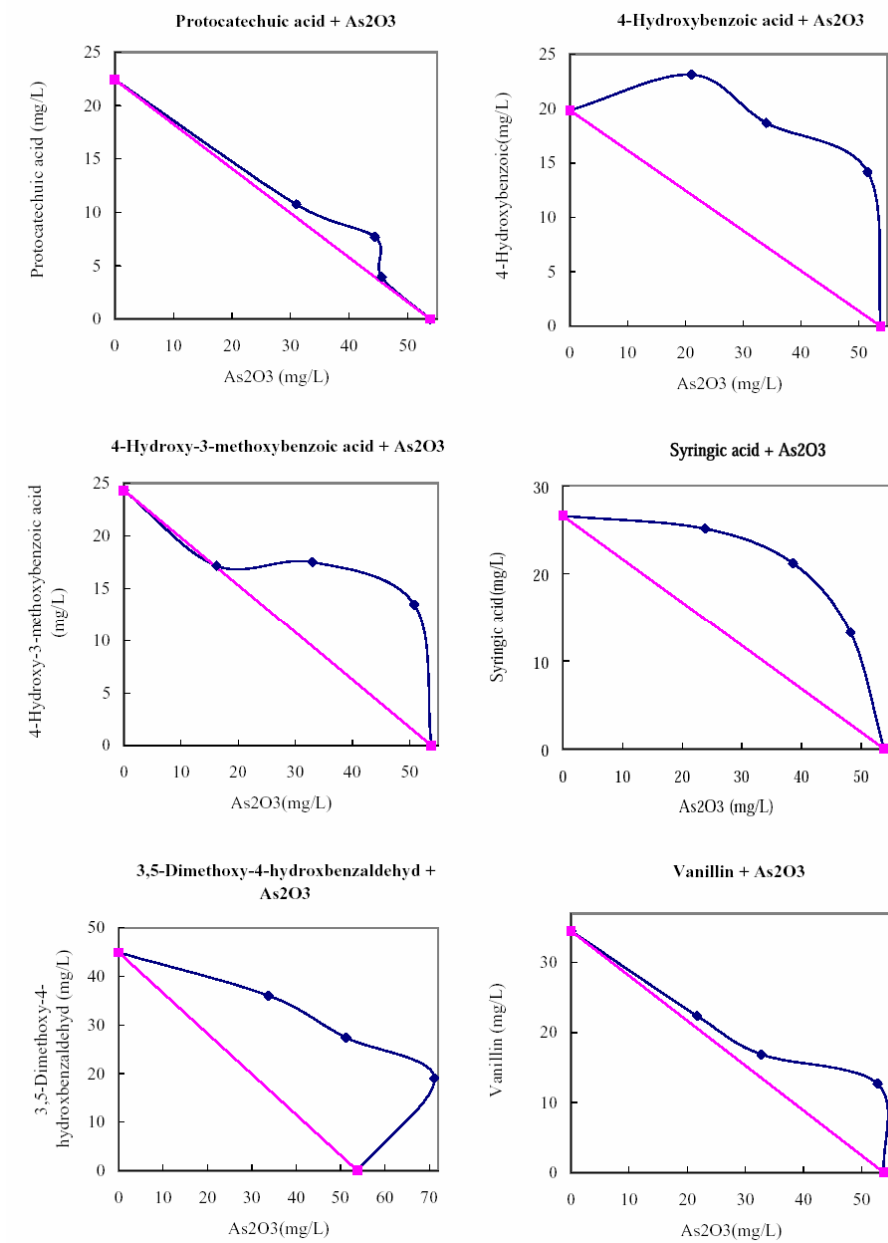


圖 6.各式腐植酸單體與  $As_2O_3$  間之毒性等高線圖(EC50 Isobologram)

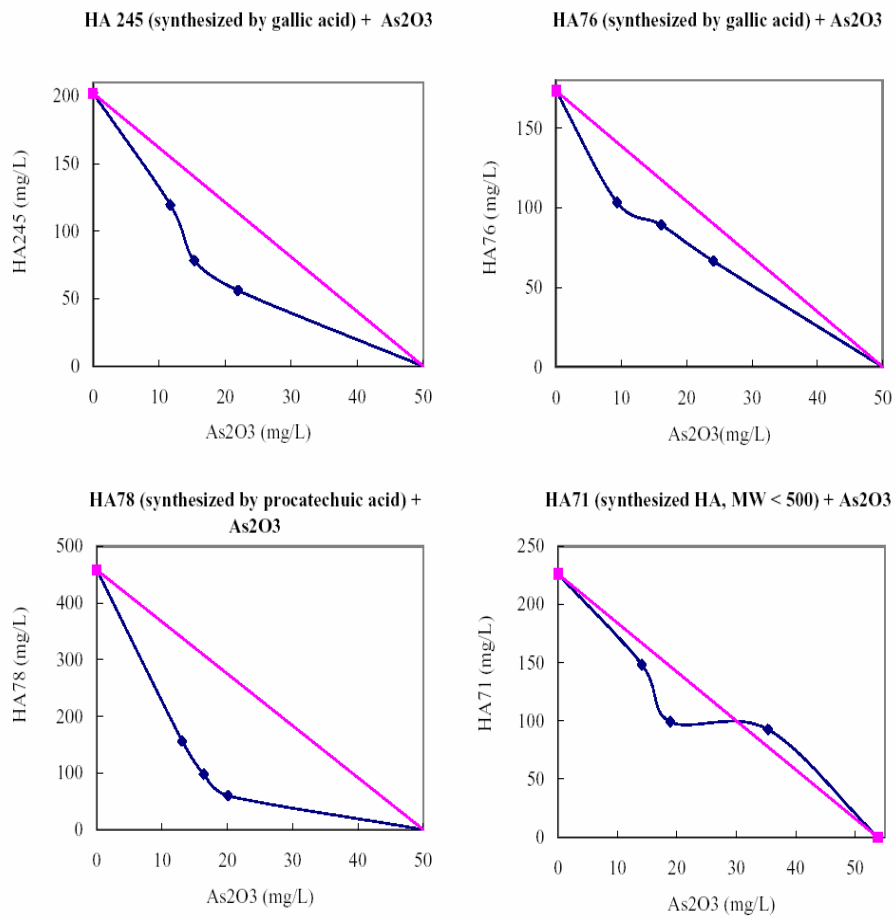


圖 7.各式合成腐植酸與  $As_2O_3$  間之毒性等高線圖(EC50 Isobologram)

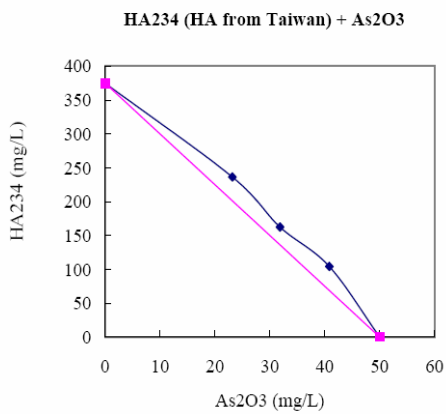
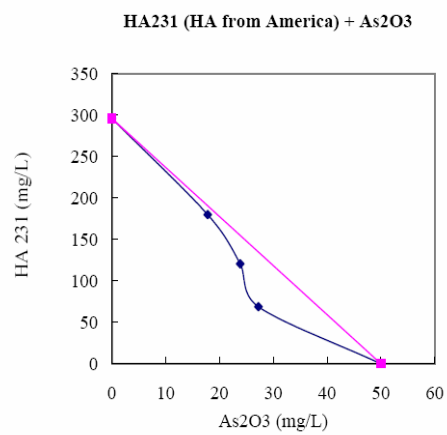
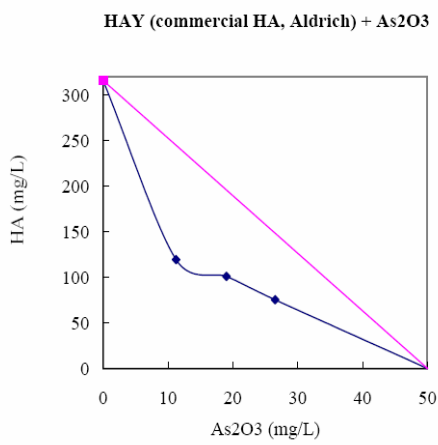
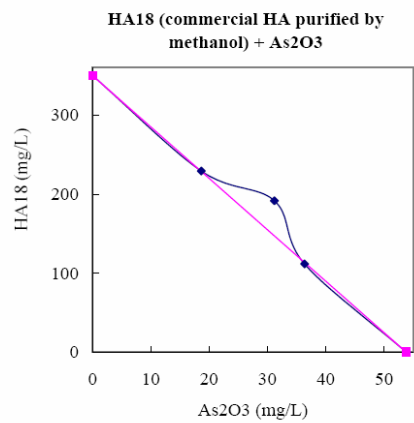
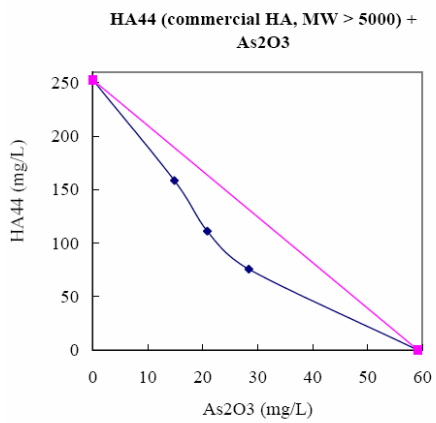


圖 8.各式天然腐植酸與 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 間之毒性等高線圖(EC50 Isobologram)



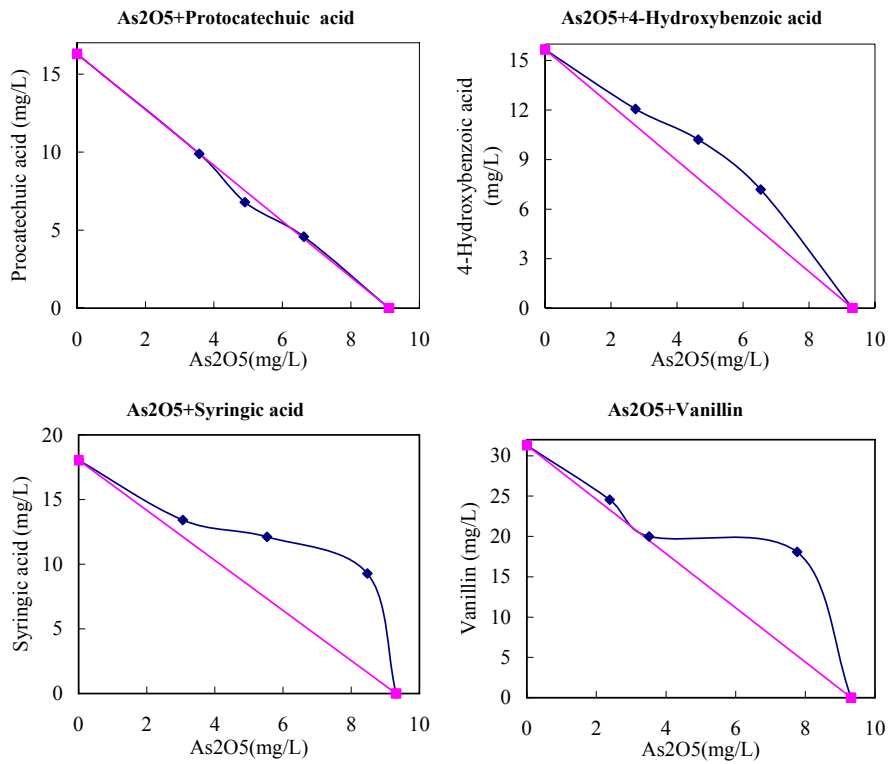


圖 9.各式腐植酸單體與 As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 間之毒性等高線圖(EC50 Isobologram)

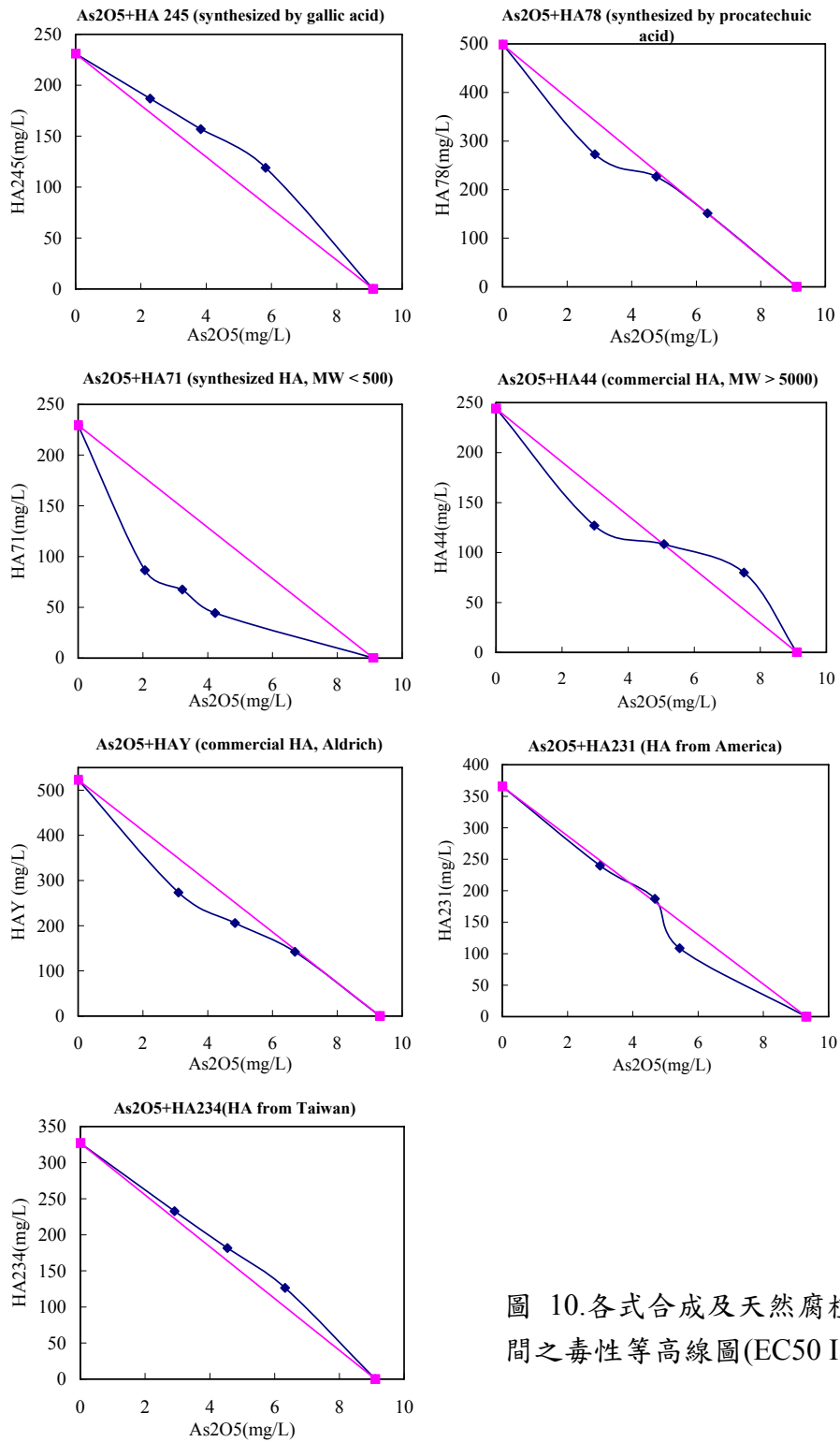


圖 10.各式合成及天然腐植酸與  $As_2O_3$  間之毒性等高線圖(EC50 Isobologram)

表 3、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA100, -S9)

His <sup>+</sup> revertants per plate $\pm$ SD (n $\geq$ 3)			
Agent	Concentration ( g/plate)	TA 100	MI <sup>a</sup>
		Mean $\pm$ SD	
Negative control	0	103 $\pm$ 31	-
Positive control (4-NQO)	0.1	1107 $\pm$ 141*	10.7
<b>Monomer</b>			
4-Hydroxybenzoic acid	0.05	82 $\pm$ 7	0.78
	0.5	90 $\pm$ 5	0.87
Vanillic acid	0.05	73 $\pm$ 8	0.70
	0.5	59 $\pm$ 12	0.57
Syringic acid	0.05	86 $\pm$ 39	0.84
	0.5	86 $\pm$ 14	0.84
Vanillin	0.05	78 $\pm$ 17	0.76
	0.5	94 $\pm$ 4	0.92
Syringaldehyde	0.05	101 $\pm$ 31	0.98
	0.5	78 $\pm$ 13	0.76
Protocatechuic acid	0.05	90 $\pm$ 15	0.87
	0.5	84 $\pm$ 12	0.81
<b>Synthetic humic acids</b>			
HA 245 (synthesized by gallic acid)	0.5	88 $\pm$ 16	0.85
	5	99 $\pm$ 28	0.96
HA76 (synthesized by caffeic acid)	0.5	105 $\pm$ 3	1.02
	5	105 $\pm$ 48	1.02
HA78 (synthesized by procatechuic acid)	0.5	90 $\pm$ 32	0.87
	5	107 $\pm$ 26	1.04
HA71 (synthesized HA, MW < 500)	0.5	89 $\pm$ 44	0.86
		89 $\pm$ 28	0.88
<b>Natural humic acids</b>			
HA (commercial HA, Aldrich)	0.5	92 $\pm$ 14	0.89
	5	124 $\pm$ 33	1.20

HA18 (commercial HA purified by methanol)	0.5	106 ± 13	1.03
	5	73 ± 7	0.71
HA44 (commercial HA, MW > 5000)	0.5	102 ± 22	0.99
	5	91 ± 7	0.88
HA231 (HA from Taiwan)	0.5	143 ± 47	1.39
	5	96 ± 26	0.94
HA234 (HA from America)	0.5	89 ± 32	0.86
	5	92 ± 19	0.89
<b>Arsenic</b>			
As <sup>+3</sup>	0.05	109 ± 44	1.06
	0.1	122 ± 0	1.18
	0.5	73 ± 11	0.71
As <sup>+5</sup>	0.05	105 ± 7	1.02
	0.1	92 ± 34	0.89
	0.5	118 ± 49	1.15
<b>Mutagenicity of binary mixtures</b>			
HA + As <sup>+3</sup>	0.5 + 0.1	98 ± 6	0.96
	5 + 0.5	76 ± 6	0.73
HA + As <sup>+5</sup>	0.5 + 0.1	108 ± 1	1.05
	5 + 0.5	70 ± 23	0.67
HA44 + As <sup>+3</sup>	0.5 + 0.1	74 ± 3	0.72
	5 + 0.5	102 ± 4	0.99
HA44 + As <sup>+5</sup>	0.5 + 0.1	126 ± 21	1.22
	5 + 0.5	89 ± 9	0.86
HA231 + As <sup>+3</sup>	0.5 + 0.1	115 ± 36	1.11
	5 + 0.5	87 ± 21	0.84
HA231 + As <sup>+5</sup>	0.5 + 0.1	74 ± 1	0.71
	5 + 0.5	102 ± 44	0.99
HA234 + As <sup>+3</sup>	0.5 + 0.1	80 ± 30	0.77
	5 + 0.5	96 ± 13	0.93
HA234 + As <sup>+5</sup>	0.5 + 0.1	99 ± 6	0.96
	5 + 0.5	121 ± 1	1.17

表 4、砷及腐植物質的單一及混和致突變性測定(TA98, -S9)

His <sup>+</sup> revertants per plate ± SD (n ≥ 3)			
Agent	Concentration ( g/plate)	TA 98	
		Mean ± SD	MI <sup>a</sup>
Negative control	0	25 ± 2	-
Positive control (4-NQO)	0.1	220 ± 45	8.8
<b>Humic acids</b>			
HA (commercial HA, Aldrich)	0.5	25 ± 6	1
	5	38 ± 5	1.52
HA44 (commercial HA, MW > 5000)	0.5	18 ± 4	0.72
	5	27 ± 6	1.08
HA234 (HA from America)	0.5	37 ± 14	1.48
	5	18 ± 0	0.72
<b>Arsenic</b>			
As <sup>+3</sup>	0.05	8 ± 4	0.32
	0.1	19 ± 10	0.76
	0.5	15 ± 8	0.6
As <sup>+5</sup>	0.05	20 ± 6	0.8
	0.1	42 ± 38	1.68
	0.5	23 ± 9	0.92
<b>Mutagenicity of binary mixtures</b>			
HA + As <sup>+3</sup>	0.5 + 0.1	28 ± 8	1.12
	5 + 0.1	24 ± 7	0.96
HA + As <sup>+5</sup>	0.5 + 0.1	13 ± 6	0.52
	5 + 0.5	24 ± 3	0.96
HA44 + As <sup>+3</sup>	0.5 + 0.1	22 ± 3	0.88
	5 + 0.5	13 ± 3	0.52
HA44 + As <sup>+5</sup>	0.5 + 0.1	21 ± 3	0.84
	5 + 0.5	15 ± 5	0.6
HA234 + As <sup>+3</sup>	0.5 + 0.1	22 ± 2	0.88
	5 + 0.5	17 ± 1	0.68
HA234 + As <sup>+5</sup>	0.5 + 0.1	22 ± 5	0.88
	5 + 0.5	16 ± 6	0.64

- a. Mutation index was obtained as  $MI = x_1/x_0$  where  $x_1$  is the mean of revertant colonies (mutants) at each dose assayed, and  $x_0$  is number of revertants in the negative control. A test compound was considered mutagenic if the number of the His<sup>+</sup> revertants colonies was increased at least twice the value of the corresponding control (mutation index ≥ 2), in at least three dose levels.

表 5、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA98, -S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 98</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	11 ± 5.1	
<b>Positive control (4-NQO)</b>	10	62 ± 28.3	5.60*
<b>Natural humic acids</b>			
HAY (commercial HA, Aldrich)	20	9 ± 2.3	0.82
HAY (commercial HA, Aldrich)	50	9 ± 1.4	0.82
HAY (commercial HA, Aldrich)	100	9 ± 5.3	0.82
<b>Arsenic</b>			
As <sup>+3</sup>	2	10 ± 1.5	0.90
As <sup>+3</sup>	5	6 ± 1.2	0.55
As <sup>+3</sup>	10	9 ± 3.1	0.82
As <sup>+5</sup>	2	10 ± 1.0	0.90
As <sup>+5</sup>	5	13 ± 1.5	1.18
As <sup>+5</sup>	10	8 ± 1.0	0.72
<b>Mutagenicity of binary mixtures</b>			
HAY + As <sup>+3</sup>	20 + 2	16 ± 2.6	1.45
HAY + As <sup>+3</sup>	50 + 5	17 ± 2.1	1.54
HAY + As <sup>+5</sup>	20 + 2	16 ± 2.3	1.45
HAY + As <sup>+5</sup>	50 + 5	9 ± 12.0	0.82

\*統計上顯著高於 Negative control (P < 0.05)

表 6、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA98, +S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 98</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	15 ± 4.2	
<b>Positive control (2AF)</b>	10	805 ± 137.6	53.6*
<b>Natural humic acids</b>			
HAY (commercial HA, Aldrich)	20	16 ± 3.5	1.07
HAY (commercial HA, Aldrich)	50	14 ± 2.9	0.93
HAY (commercial HA, Aldrich)	100	14 ± 2.1	0.93
<b>Arsenic</b>			
As <sup>+3</sup>	2	13 ± 2.8	0.87
As <sup>+3</sup>	5	18 ± 7.8	1.20
As <sup>+3</sup>	10	14 ± 0.6	0.93
As <sup>+5</sup>	2	20 ± 6.7	1.33
As <sup>+5</sup>	5	12 ± 5.7	0.80
As <sup>+5</sup>	10	24 ± 0.7	1.60
<b>Mutagenicity of binary mixtures</b>			
HAY + As <sup>+3</sup>	20 + 2	16 ± 1.5	1.07
HAY + As <sup>+3</sup>	50 + 5	15 ± 3.0	1.00
HAY + As <sup>+5</sup>	20 + 2	19 ± 0.0	1.27
HAY + As <sup>+5</sup>	50 + 5	15 ± 3.2	1.00

\*統計上顯著高於 Negative control (P < 0.05)

表 7、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA100, -S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 100</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	96 ± 4.6	
<b>Positive control (4-NQO)</b>	10	731 ± 44.8	7.61*
<b>Natural humic acids</b>			
HAY (commercial HA, Aldrich)	20	114 ± 1.0	1.19*
HAY (commercial HA, Aldrich)	50	136 ± 22.1	1.42*
HAY (commercial HA, Aldrich)	100	112 ± 18.6	1.16
<b>Arsenic</b>			
As <sup>+3</sup>	2	100 ± 13.5	1.04
As <sup>+3</sup>	5	83 ± 13.7	0.86
As <sup>+3</sup>	10	81 ± 29.7	0.84
As <sup>+5</sup>	2	127 ± 29.9	1.32
As <sup>+5</sup>	5	113 ± 25.3	1.18
As <sup>+5</sup>	10	109 ± 27.0	1.14
<b>Mutagenicity of binary mixtures</b>			
HAY + As <sup>+3</sup>	20 + 2	82 ± 14.7	0.85
HAY + As <sup>+5</sup>	50 + 5	116 ± 26.5	1.21
HAY + As <sup>+3</sup>	20 + 2	126 ± 26.5	1.31*
HAY + As <sup>+5</sup>	50 + 5	102 ± 17.8	1.06

\*統計上顯著高於 Negative control (P < 0.05)



表 8、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA100,+S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 98</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	113 ± 2.1	
<b>Positive control (2AF)</b>	10	224 ± 38.0	1.98*
<b>Natural humic acids</b>			
HAY (commercial HA, Aldrich)	20	163 ± 30.4	1.44*
HAY (commercial HA, Aldrich)	50	155 ± 6.4	1.37*
HAY (commercial HA, Aldrich)	100	118 ± 14.0	1.04
<b>Arsenic</b>			
As <sup>+3</sup>	2	114 ± 15.3	1.00
As <sup>+3</sup>	5	117 ± 33.2	1.03
As <sup>+3</sup>	10	113 ± 21.2	1.00
As <sup>+5</sup>	2	117 ± 4.2	1.03
As <sup>+5</sup>	5	132 ± 27.3	1.17
As <sup>+5</sup>	10	128 ± 18.7	1.13
<b>Mutagenicity of binary mixtures</b>			
HAY + As <sup>+3</sup>	20 + 2	125 ± 34.2	1.11
HAY + As <sup>+5</sup>	50 + 5	119 ± 22.0	1.05
HAY + As <sup>+3</sup>	20 + 2	135 ± 14.6	1.19*
HAY + As <sup>+5</sup>	50 + 5	133 ± 40.8	1.18

\*統計上顯著高於 Negative control (P < 0.05)

表 9、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA98, -S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 98</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	14 ± 7.0	
<b>Positive control (4-NQO)</b>	10	168 ± 33.7	12.0*
<b>Natural humic acids</b>			
HA234 (HA from Taiwan)	50	15 ± 5.0	1.07
HA234 (HA from Taiwan)	20	11 ± 0.6	0.79
HA231 (HA from America)	50	14 ± 1.4	1.00
HA231 (HA from America)	20	17 ± 1.5	1.21

\*統計上顯著高於 Negative control (P < 0.05)

表 10、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA98, +S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 98</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	15 ± 2.8	
<b>Positive control (2AF)</b>	10	608 ± 88.6	40.5*
<b>Natural humic acids</b>			
HA234 (HA from Taiwan)	50	15 ± 4.2	1.00
HA234 (HA from Taiwan)	20	14 ± 2.2	0.93
HA231 (HA from America)	50	14 ± 3.0	0.93
HA231 (HA from America)	20	14 ± 2.2	0.93

\*統計上顯著高於 Negative control (P < 0.05)

表 11、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA100, -S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 100</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	142 ± 16.3	
<b>Positive control (4-NQO)</b>	10	708 ± 6.60	4.99*
<b>Natural humic acids</b>			
HA234 (HA from Taiwan)	50	144 ± 10.5	1.01
HA234 (HA from Taiwan)	20	134 ± 24.0	0.94
HA231 (HA from America)	50	130 ± 20.7	0.92
HA231 (HA from America)	20	139 ± 19.3	0.97

\*統計上顯著高於 Negative control (P < 0.05)

表 12、砷及腐植物質其單一及混和致突變性測定(TA100, +S9)

<b>His<sup>+</sup> revertants per plate (n ≥ 3)</b>			
<b>Agent</b>	<b>Concentration (µg/plate)</b>	<b>TA 100</b>	
		<b>Mean ± SD</b>	<b>MI<sup>a</sup></b>
<b>Negative control</b>	0	92 ± 21.3	
<b>Positive control (2AF)</b>	10	181 ± 25.1	1.97*
<b>Natural humic acids</b>			
HA234 (HA from Taiwan)	50	93 ± 15.5	1.01
HA234 (HA from Taiwan)	20	112 ± 19.0	1.22*
HA231 (HA from America)	50	85 ± 21.1	0.92
HA231 (HA from America)	20	96 ± 36.6	1.04

### C. 促癌作用評估

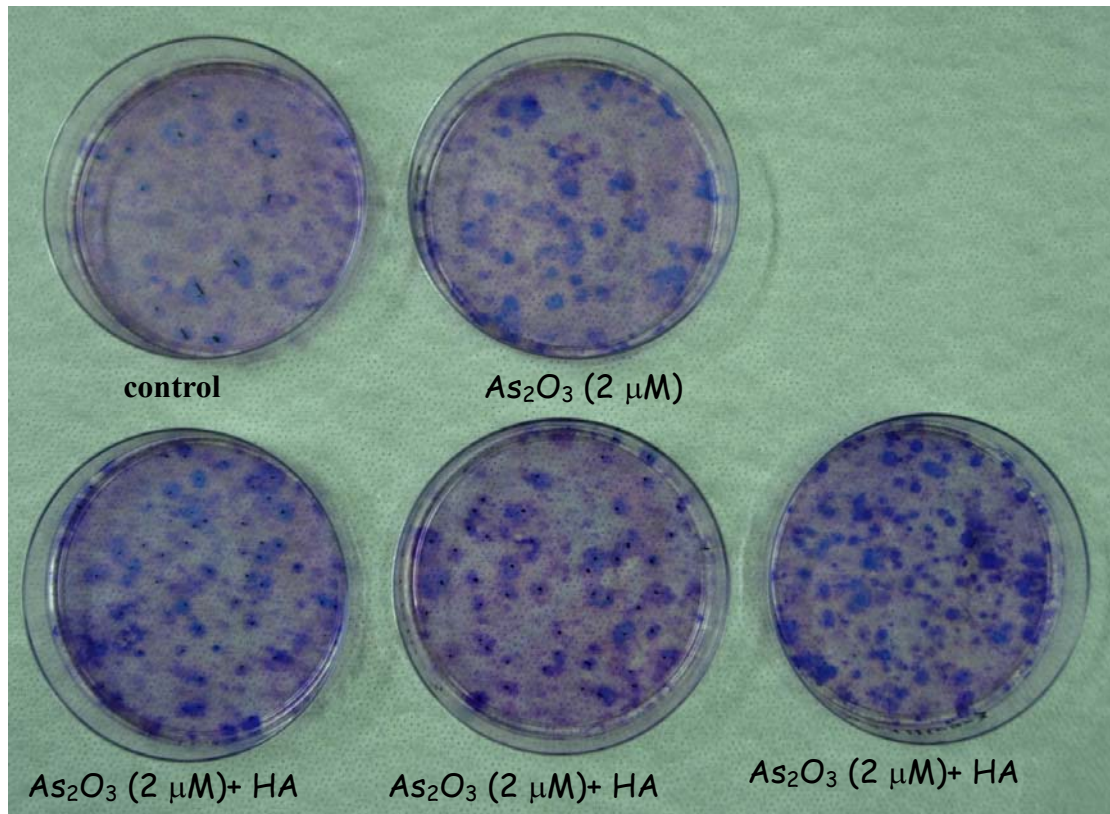


Fig.11 Transformation assay. Foci formation of JB6 Cl41 cells were performed by the treatment of various concentration of arsenic and HA as indicated for 24 h, then the cells were wash with PBS and cultured in MEM supplemented with 5 % serum for 6 weeks. (A and B) Cells were fixed and stained by Giemsa solution for visualization of foci.

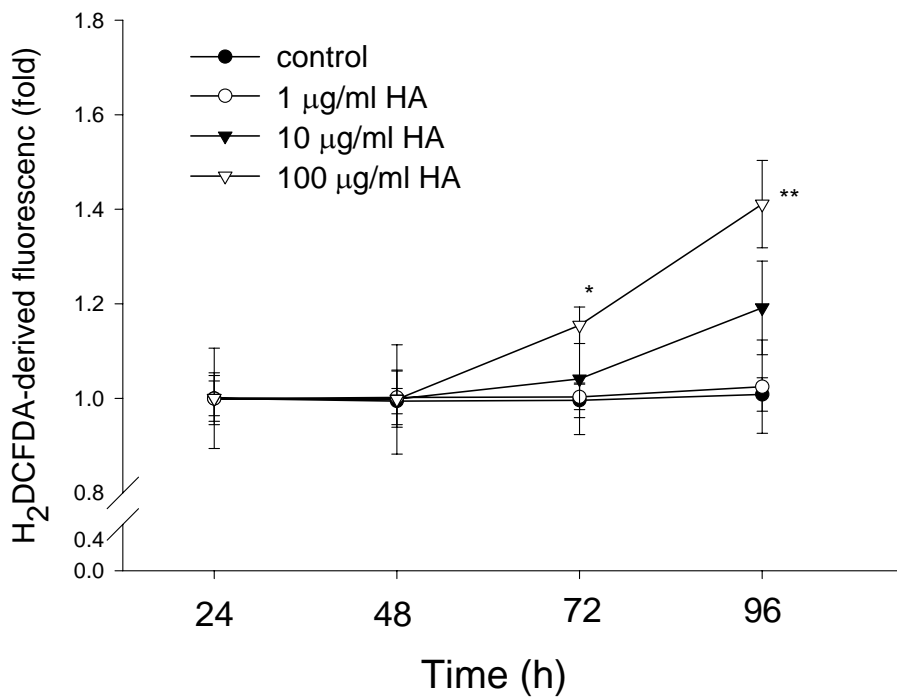


Fig.12 Effect of HA on intracellular ROS production. Time course of ROS formation with administration of HA in culture of JB6 Cl41 cells. To determine the intracellular content of peroxides, JB6 cells were loaded with  $10 \mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min after the treatment of HA for indicated time, and the fluorescence was measured by flow cytometer. The values (%) are expressed in relation to untreated cells. \* $p < 0.05$ , and \*\* $p < 0.01$ , compared with control cells.

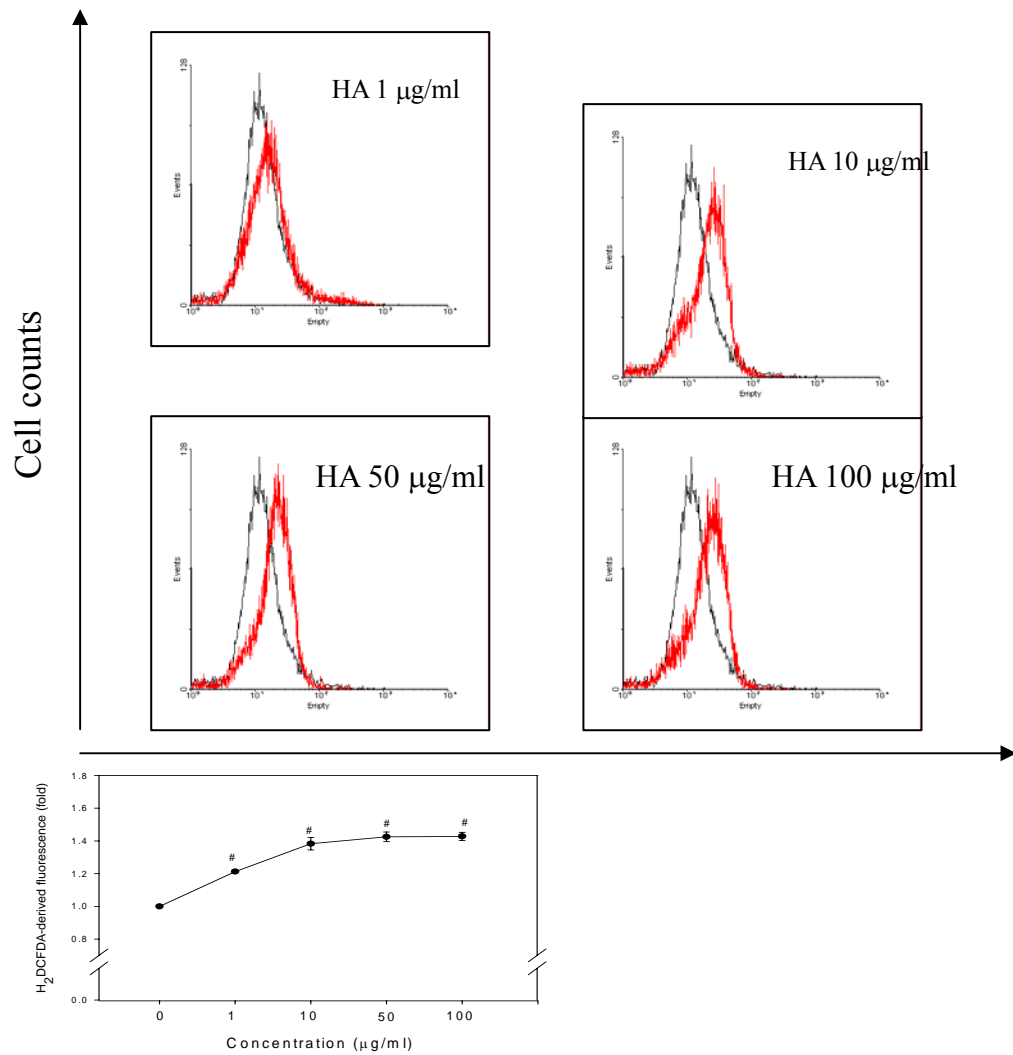


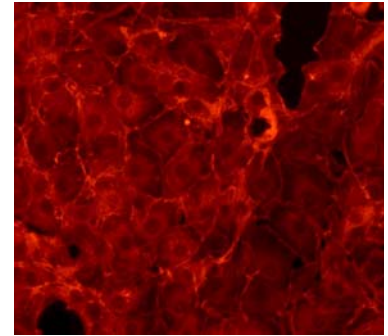
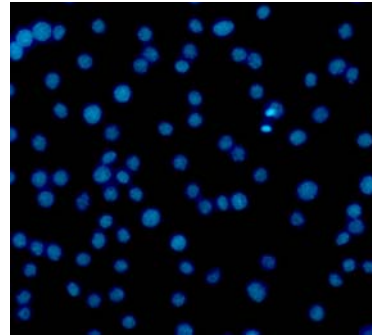
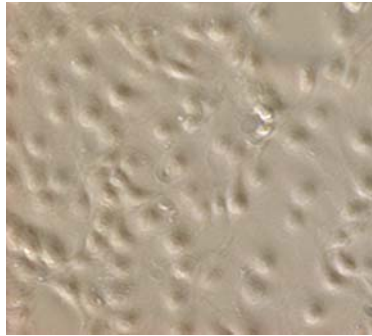
Fig 13 Effect of pretreated- HA on the intracellular ROS production. The cells were treated with indicated concentrations of HA (*red*) for 48 h, and then the cells were washed twice with PBS and incubated for another 48 h. To determine the intracellular content of ROS, JB6 Cl41 cells were loaded with 10 µM H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min after the treatment of HA for indicated time, and the fluorescence was measured by flow cytometer. (A-D) Raw data obtained from example of cell distribution according to their H<sub>2</sub>DCFDA-derived fluorescence in untreated cultures (*black*). (E) The values (%) are expressed in relation to untreated cells. The values (mean ± S.D.) are expressed in relation to untreated cells, which was arbitrarily set at one. #*p* < 0.001, compared with control cells.

Phase contrast

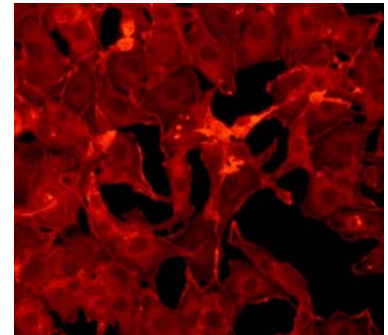
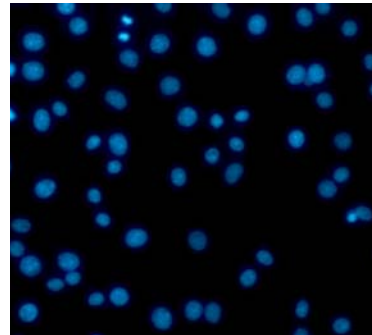
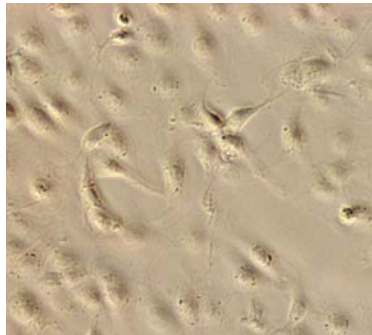
DAPI

F-actin

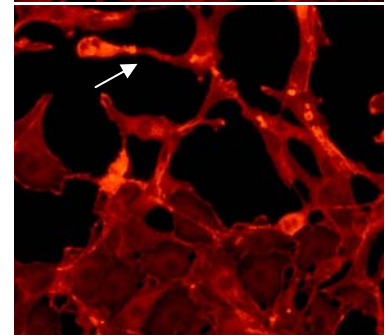
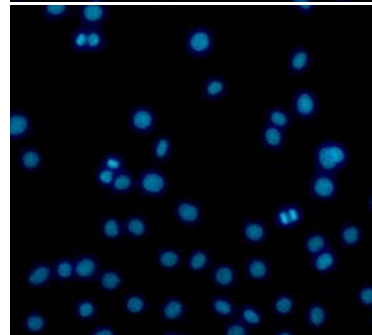
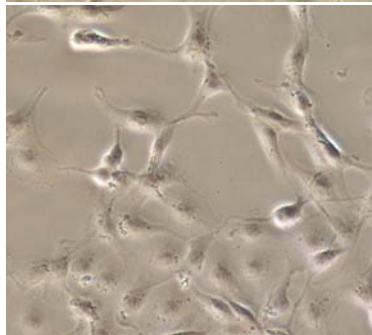
Normal



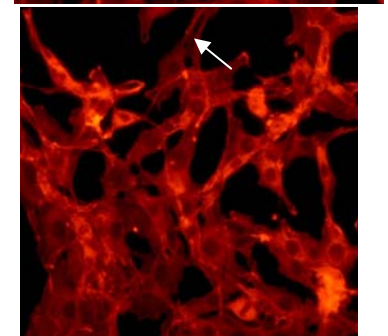
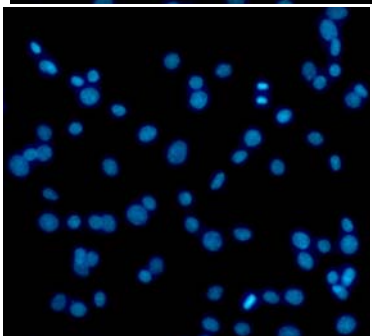
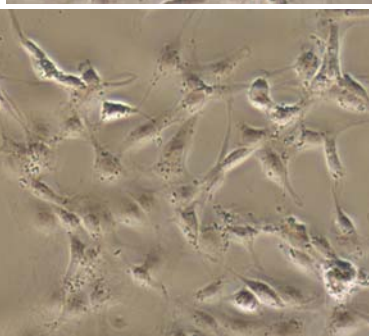
HA  
10  $\mu\text{g/ml}$



HA  
50  $\mu\text{g/ml}$



HA  
100  $\mu\text{g/ml}$



TPA  
20 ng/ml

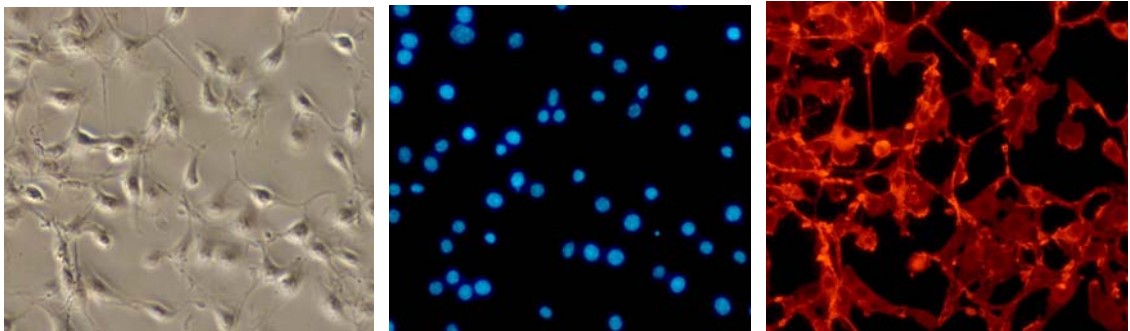


Fig.14. Effect of pretreated -HA on the morphology of JB6 Cl41 cells. JB6 Cl41 cells were treated with indicated concentration of HA or 20 ng/ml TPA for 48 h. Then the cells were washed twice with PBS and incubated for another 48 h. The cytoskeleton changes were analyzed by TRITC-conjugated phalloidin F-actin staining, which displayed *red* fluorescence (right column) and nuclear morphology was analyzed by DAPI nuclear staining, which displayed *blue* fluorescence (middle column). In addition, morphology of cells was observed by phase contrast microscopy (200×)(left column) ( → filopodia).

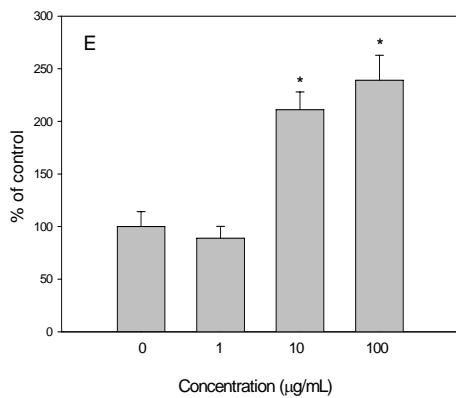
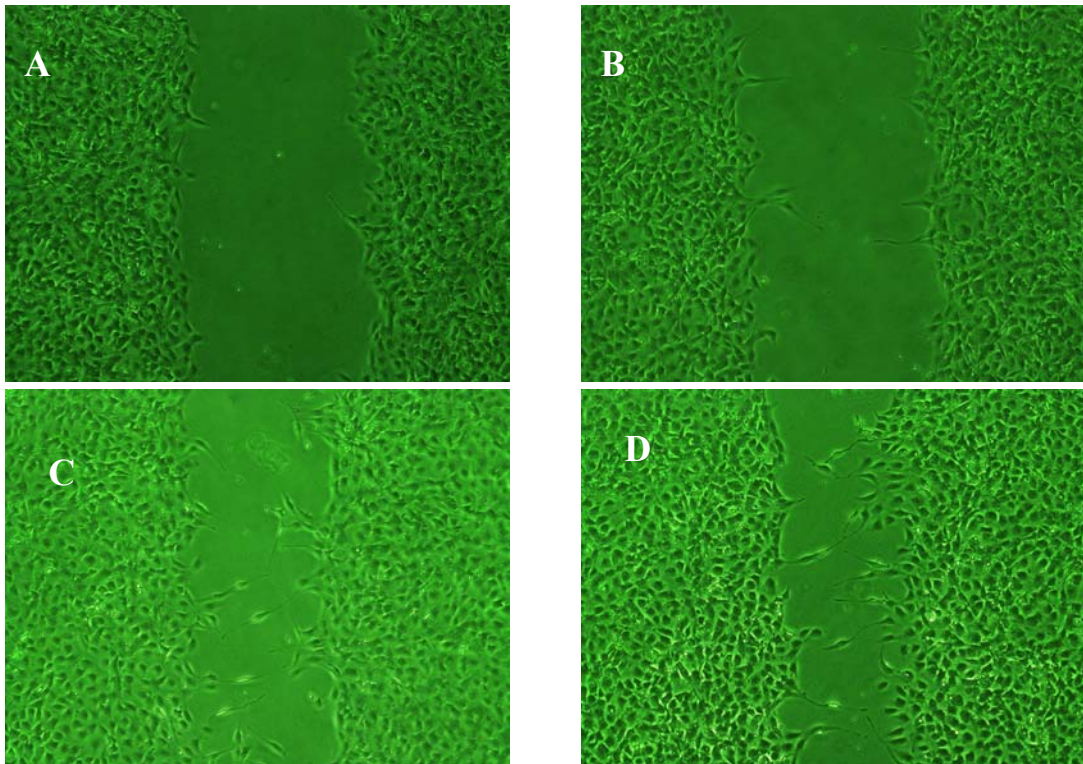


Fig.15 Effect of pretreated -HA on the migration of JB6 Cl41 cells. JB6 Cl41 cells were treated with various concentration of HA for 48 h. Then the culture were wounded by scratching the monolayer of cells with a p200 eppendorf pipet tip, and medium were again changed and incubated for another 48 h. Wounds were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS, stained with 1% crystal violet and photographed at 40 x magnification. Wounds were photographed at 40 x magnification.



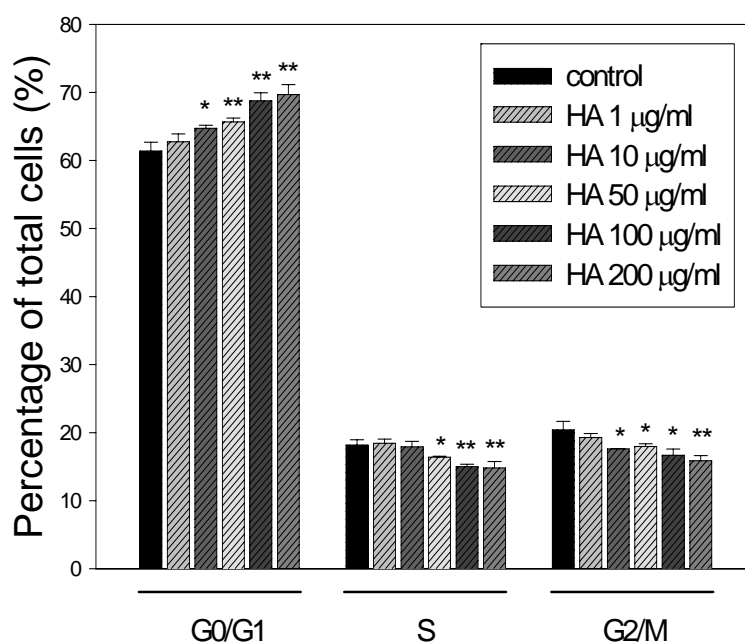


Fig. 16. Effect of pretreated -HA on cell cycle progression of JB6 Cl41 cells. JB6 Cl41 cells were treated with indicated of HA or solvent (control) for 48 h. Then the cells were washed twice with PBS and incubated for 48 h and then stained with propidium iodide (PI) for DNA content analysis. The percentage of JB6 Cl41 cells at the G0/G1, S or G2/M phase in the average of three separate experiments was calculated. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared to control.

Fig.17A

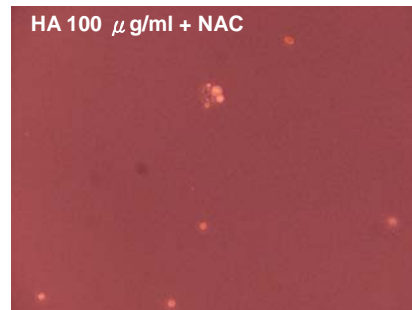
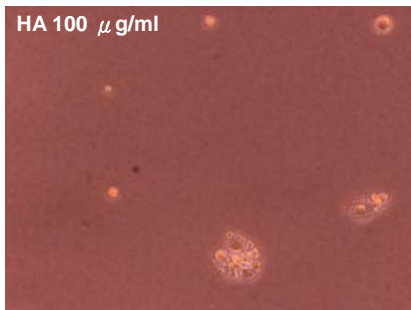
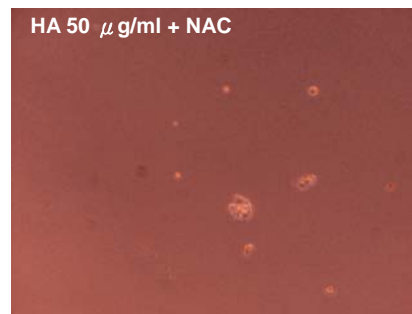
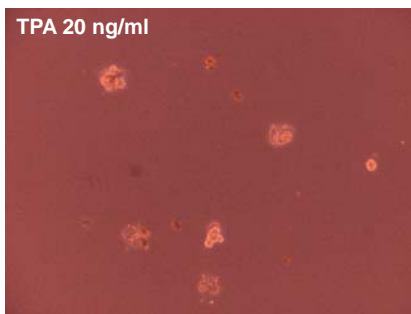
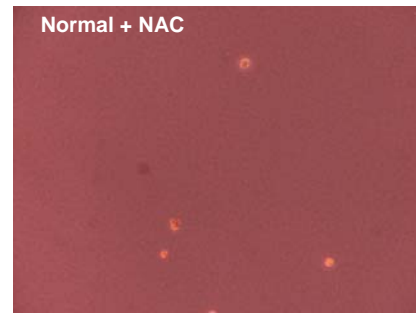
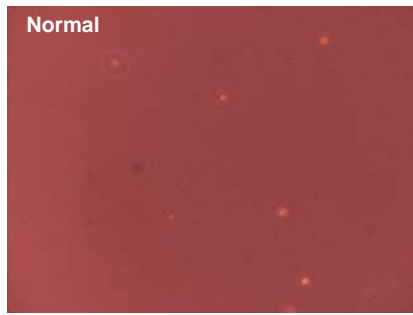


Fig.17B

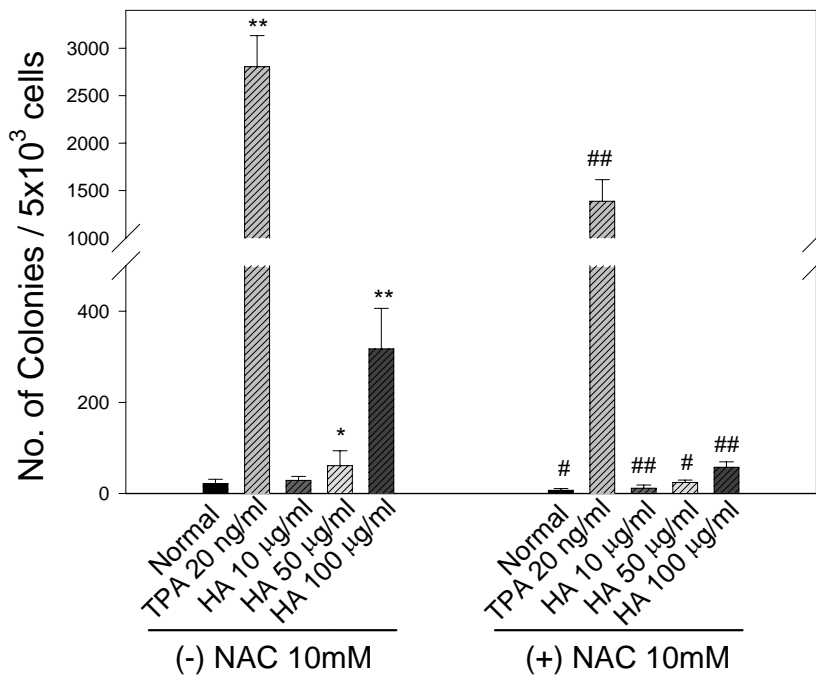
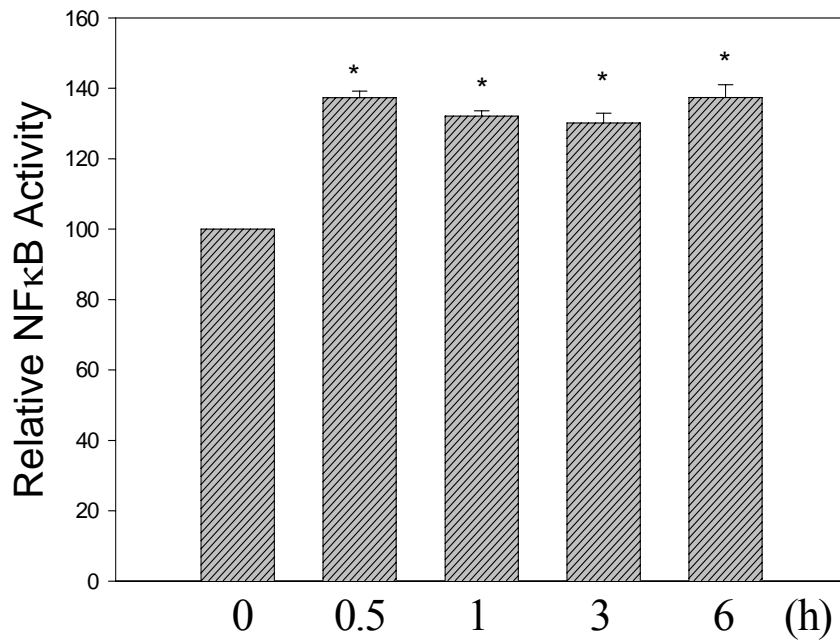


Fig.17. Anchorage-independent growth assay. The JB6 Cl41 cells were pretreated with or without 10 mM NAC for 30 min then exposed to TPA (20 ng/ml) or different concentrations of HA for 48 h. The cells were harvested and seeded at a density of  $5 \times 10^3$  into 0.33% soft agar over a 0.5% agar bottom layer. Cells were grown at 37 °C in 95% air plus 5% CO<sub>2</sub>. (A) Photographs were taken 21 days postseeding under a phase contrast microscope. Original magnification was x 200. (B) Colony with more than eight cells was counted 21 days after seeding. The average results  $\pm$  S.D. from three separate repair experiments are shown. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to normal; #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , compared to groups without treatment of 10 mM NAC respectively.



**Fig. 18. The effect of HA on NF-κB transcription activity in JB6 cells.** Cells were treated with HA 100 μg/ml for 48 h. Then the cells were washed twice with PBS and incubated for indicated times and nuclear extracts were analyzed for NF-κB activity using biotin-labeled oligonucleotides containing an AP-1 and NFκB consensus site. The labeled DNA-protein complex was analyzed by ELISA-based DNA binding assays and detected by chemiluminescence. \* $P < 0.01$ , compared with the HA untreated group (control). Results are from three independent experiments.

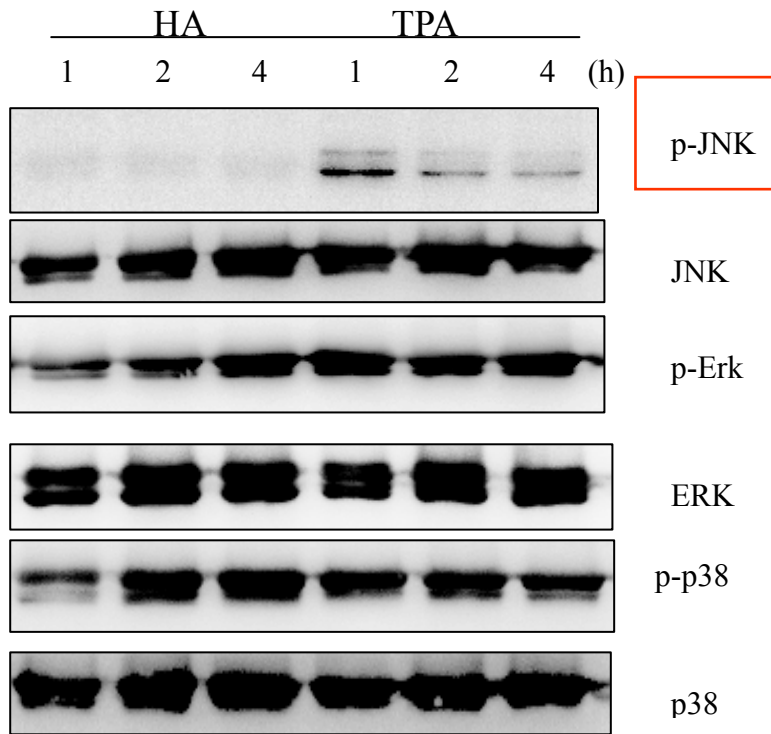


Fig.19 Effect of HA and TPA on MAPKs activation. Total cell lysates of JB6 Cl41 cells treated with HA or TPA for indicated times were extracted, and the phosphorylated JNK, ERK, and p38 MAPK (active form) were analyzed by SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against MAPKs and its active form.

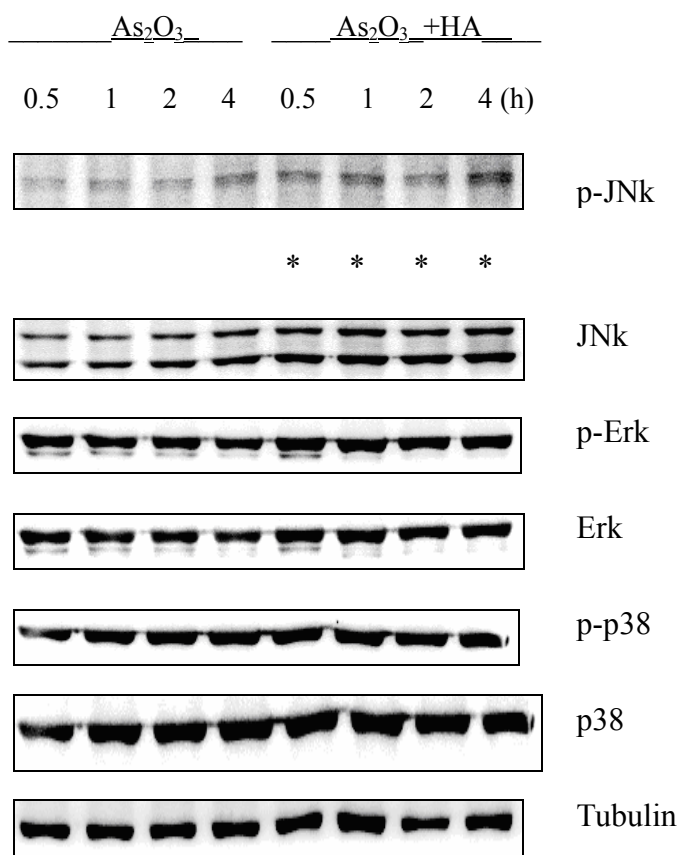


Fig.20 Effect of arsenic oxide and co- administrated with HA on MAPKs activation. Total cell lysates of JB6 Cl41 cells treated with arsenic or co-administration of arsenic oxide and HA for indicated times were extracted, and the phosphorylated JNK, ERK, and p38 MAPK (active form) were analyzed by SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against MAPKs and its active form.

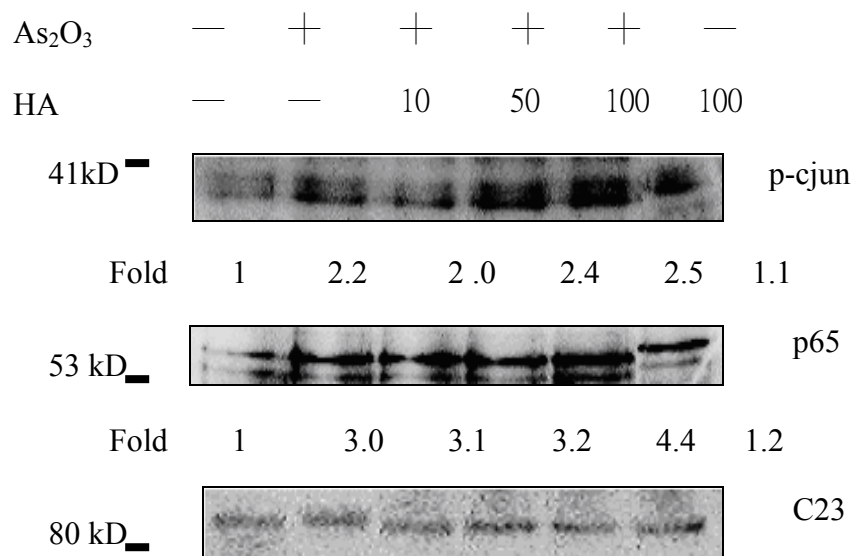


Fig.21. Effect of arsenic oxide and co- administrated with HA on MAPKs activation. Total nuclear lysates of JB6 Cl41 cells treated with arsenic or co-administration of arsenic oxide and HA for 4 h were extracted, and the p-cJun and p65 were analyzed by SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against p-c-Jun, p65 and C23 (as internal control).

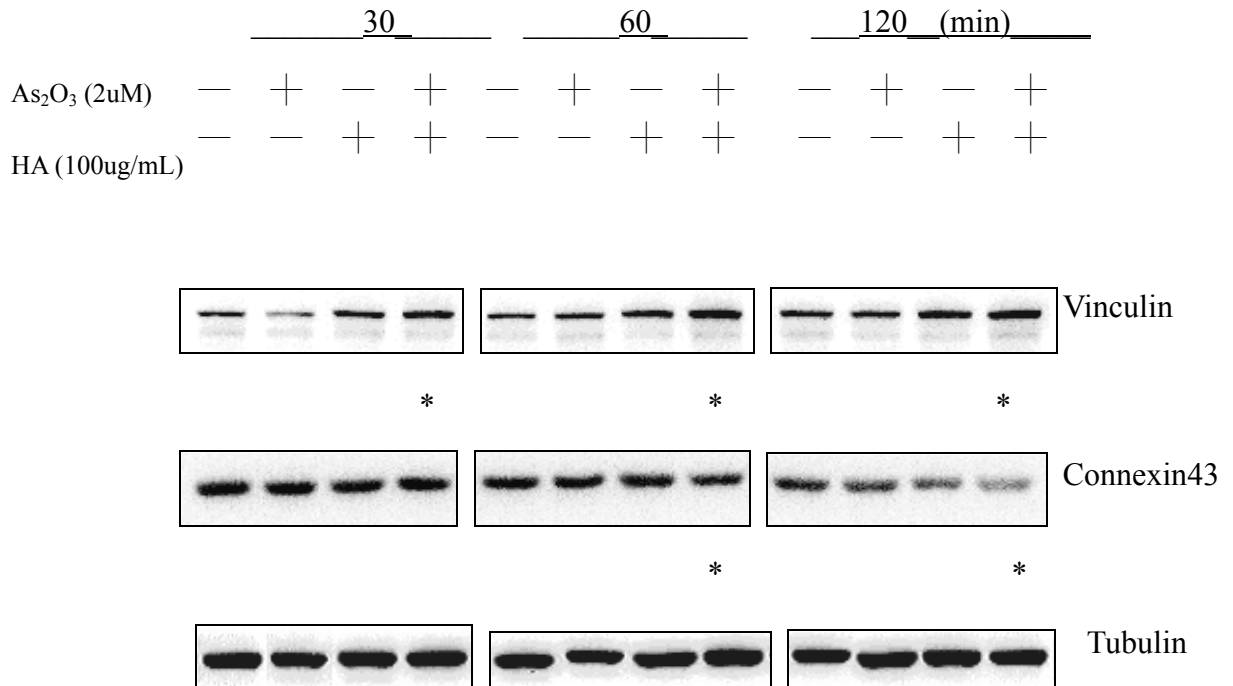
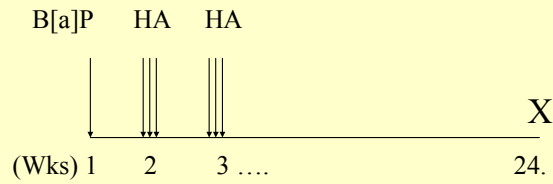


Fig.22 Effect of arsenic oxide, HA and co- administration on the expression of vinculin and connexin 43. Total cell lysates of JB6 Cl41 cells treated with arsenic, HA, and co- administration for 24 h were extracted, and the proteins were analyzed by SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against vinculin and connexin 43.



## Animal study



(B[a]P, benzo[a]pyrene)

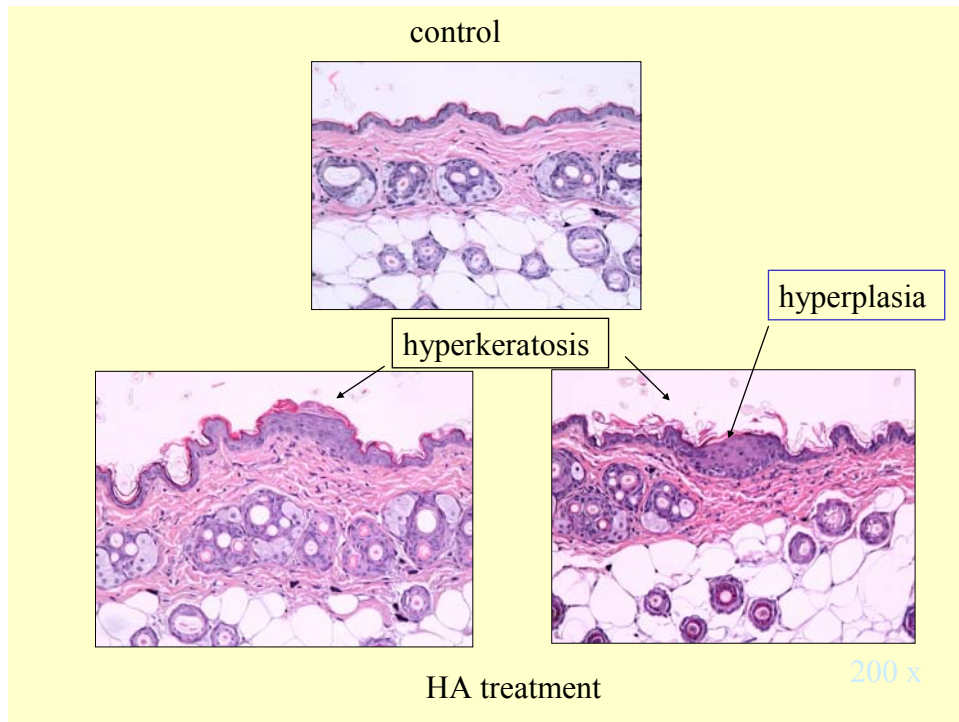


Fig.23 Effect of HA on epidermal hyperplasia in mice. Mice dorsal patches were treated with benzoapyrene and HA as indicated. Skin biopsies were processed for hematoxylin and eosin staining. Section of the skin from a control animal treated with solvent (upper). Section of the skin from an animal treated with HA showing hyperplasia.

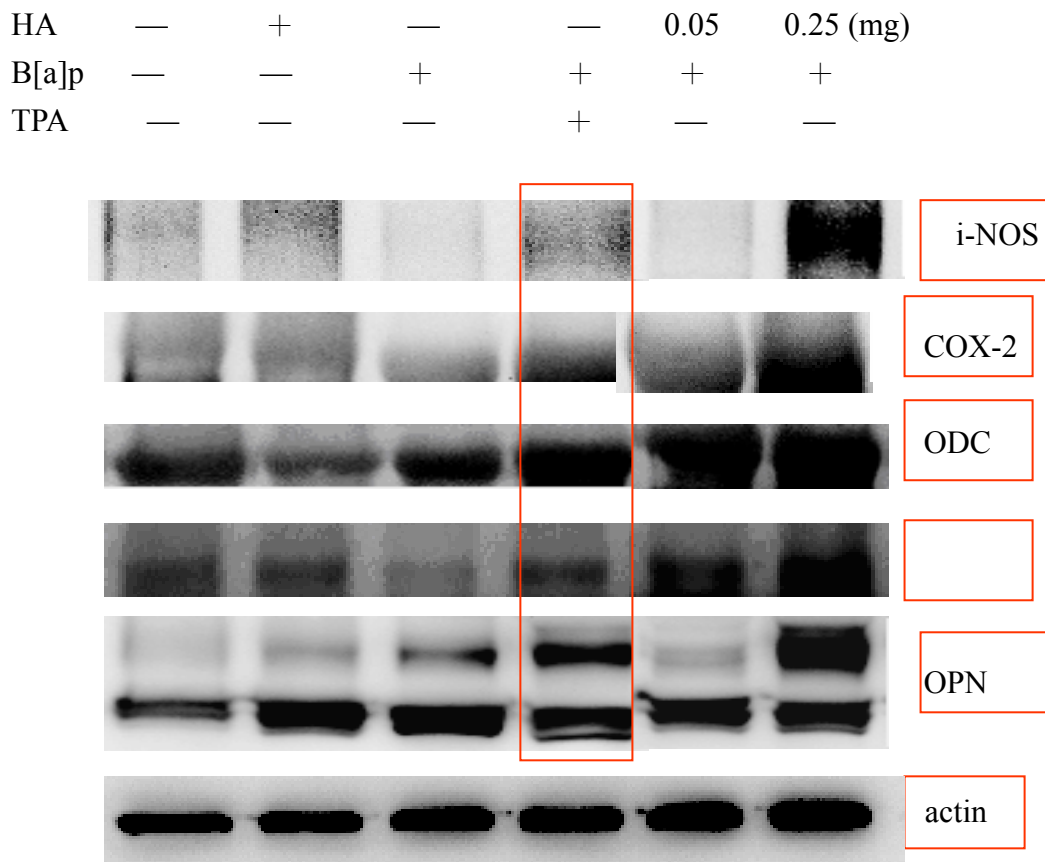


Fig.24 Effect of HA on the expression of epidermis COX-2, iNOS, ODC, PCNA, OPN in mice.

The mice were sacrificed and the epidermis was removed for immunoblotting analysis against anti-iNOS, anti-COX-2, anti-ODC, anti-PCNA, and anti-OPN. The data are presented from one mouse per group and each lane contained 80  $\mu$ g protein. Other rats in each group showed patterns of protein expression similar to the representation.

## D. 致畸胎評估

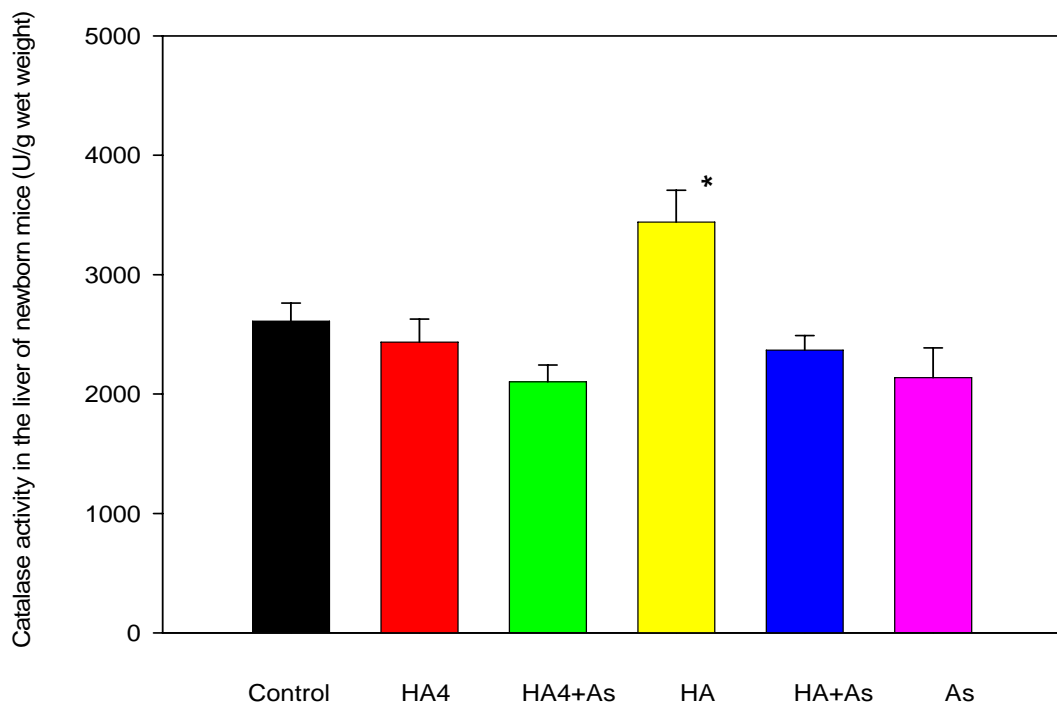


圖 25. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $As_2O_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 Catalase 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物(\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

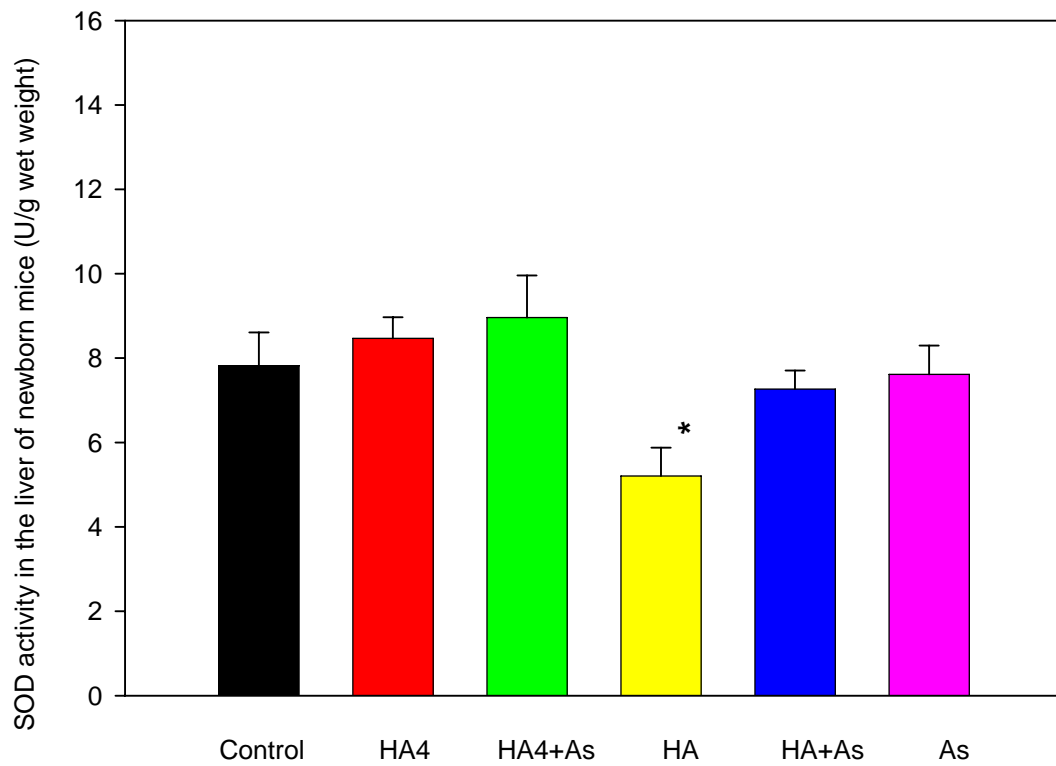


圖 26. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 SOD 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物 (\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

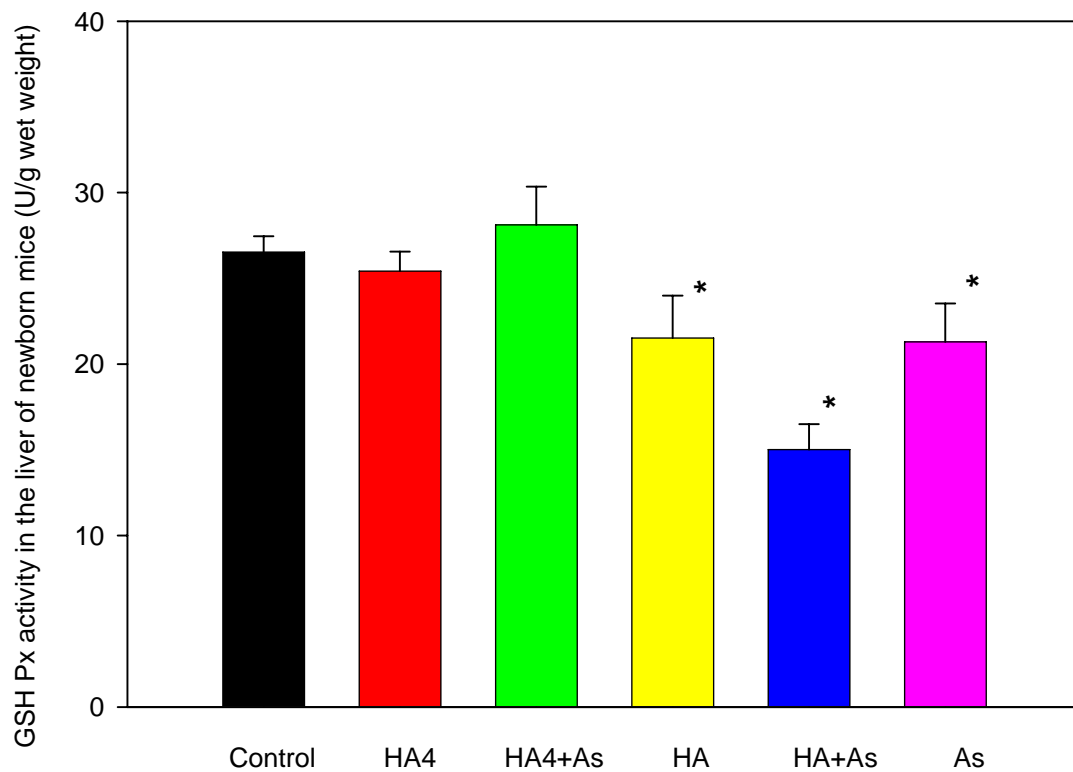


圖 27. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $As_2O_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 GSH peroxidase 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物 (\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

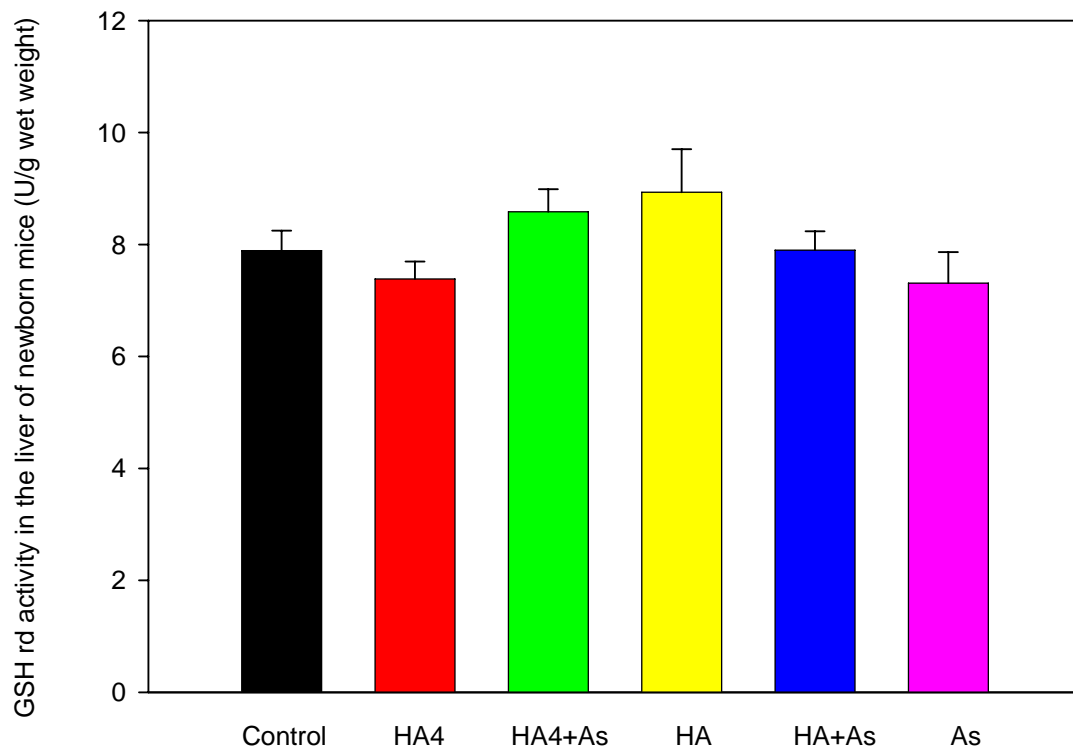


圖 28. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 GSH reductase 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物 (\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

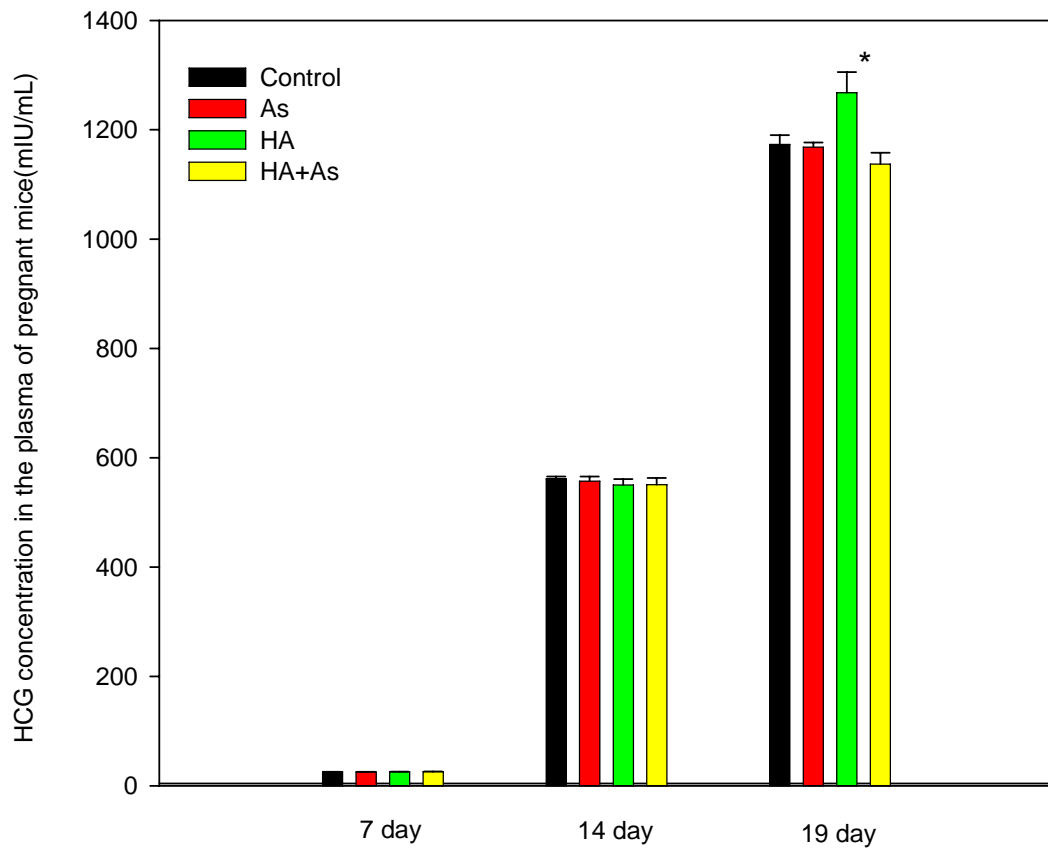


圖 29 不同懷孕時期（第 7, 14, 及 19 天）之母鼠血液中 hCG 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。

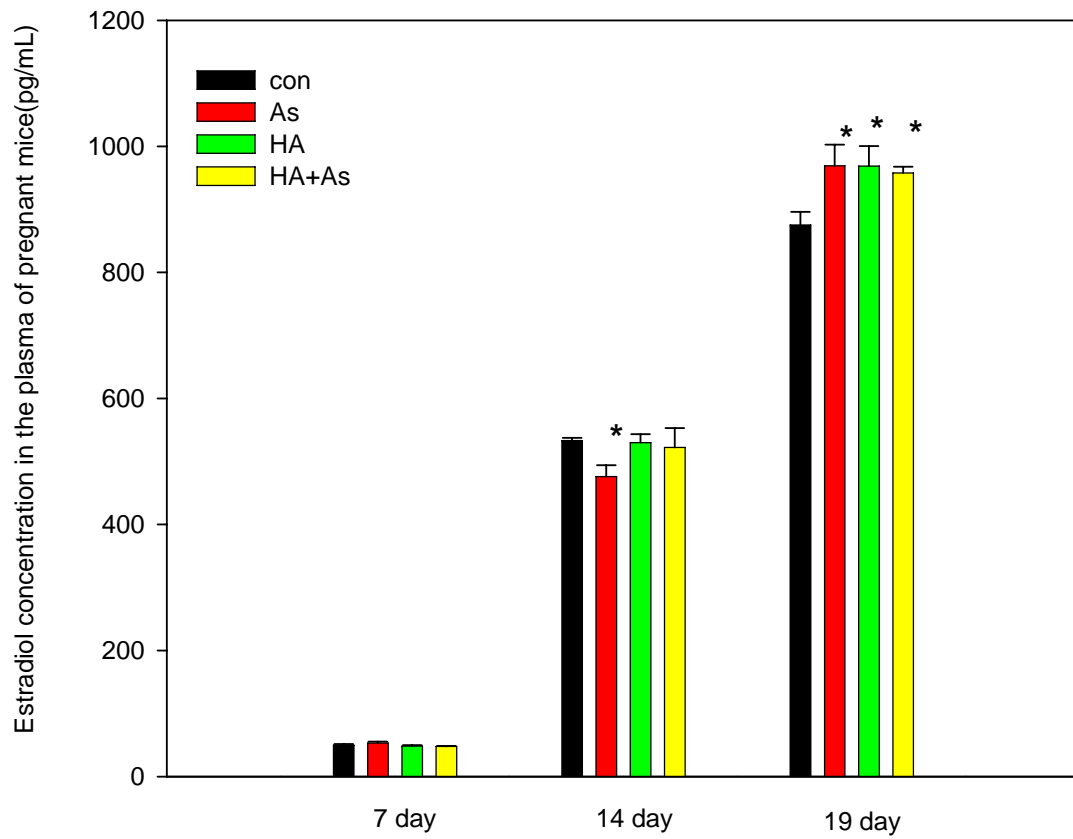


圖 30. 不同懷孕時期（第 7, 14, 及 19 天）之母鼠血液中 Estradiol 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。



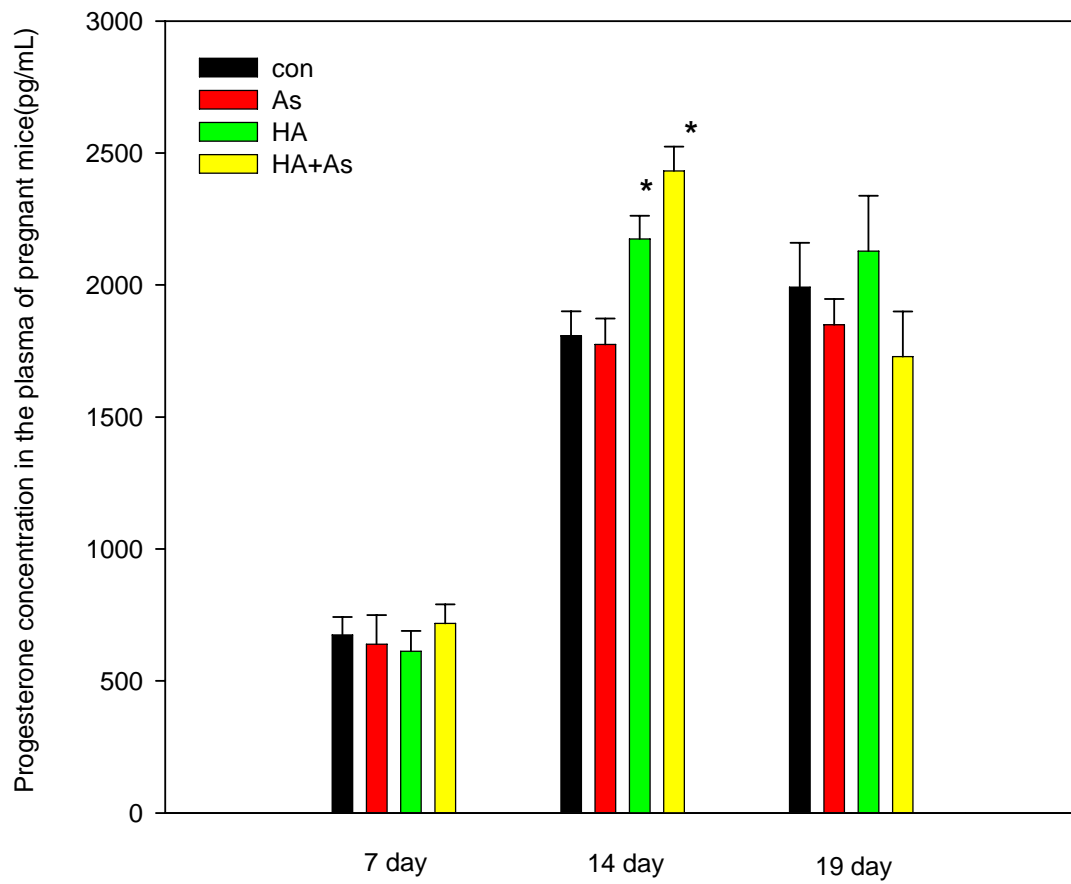


圖 31. 不同懷孕時期（第 7, 14, 及 19 天）之母鼠血液中 Progesterone 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。

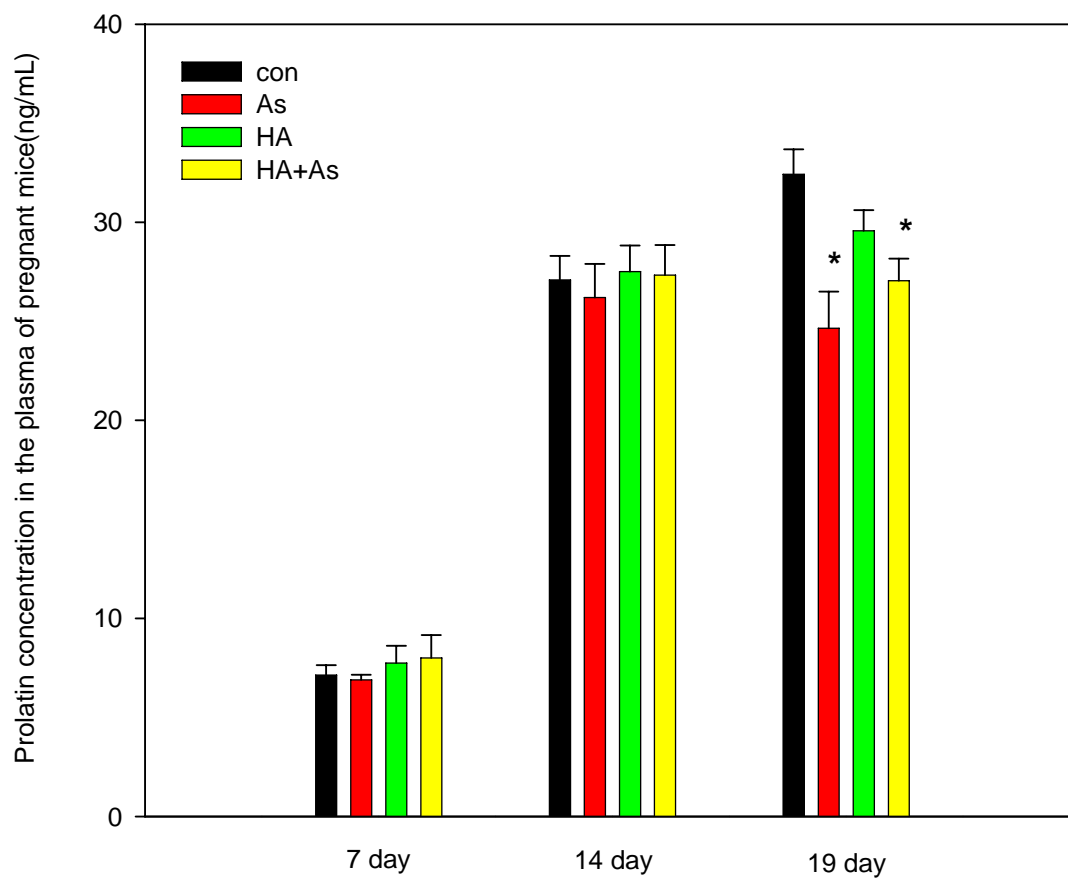


圖 32. 不同懷孕時期（第 7, 14, 及 19 天）之母鼠血液中 Prolatin 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。

表 13. 母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物其平均每胎子鼠數目與存活率

處理方式	平均仔胎數 (總子鼠數/總 母鼠數)	存活率(出 生存活數/ 總出生數)	20 天平均體重	備註
Control	10.375	0.98	10.332	
saline	12.33	1	9.483	
HA 125mg/Kg BW	11.67	1	10.674	
HA 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	13	0.846	5.917	
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	10	1	13.51	
HA16 125mg/Kg BW	12	0.979	14.164	
HA16 125mg/Kg BW +As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	0	0	0	皆於懷孕期 間有流產及 難產
HA16 62.5mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	9.5	0.684	13.835	
HA44 125mg/Kg BW	10.75	0.93	14.782	
HA44 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	14.5	0.966	9.727	
HA4 125mg/Kg BW	14.67	1	12.256	
HA4 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	7	1	11.065	

表 14. 母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入暴露不同來源之腐植酸與三氧化二砷對母鼠及胚胎之影響

Group	母鼠死亡率%	母鼠早產率%	母鼠流產率%	平均胎鼠數
Control	0	0	0	10.2 (0.80)
HA125mg/Kg BW	0	40	0	11.6 (0.51)
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	0	0	20	8 (2.08)
HA125mg/Kg BW+ As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	0	50	0	8.5 (1.94)
SHA125mg/Kg BW	0	0	0	12.5 (0.5)
SHA125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	25	25	25	11.5 (1.5)
HA135 125mg/Kg BW	0	0	0	13 (1.15)
HA135 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	50	0	0	14 (2.0)

## E. 糖尿病致病機轉評估

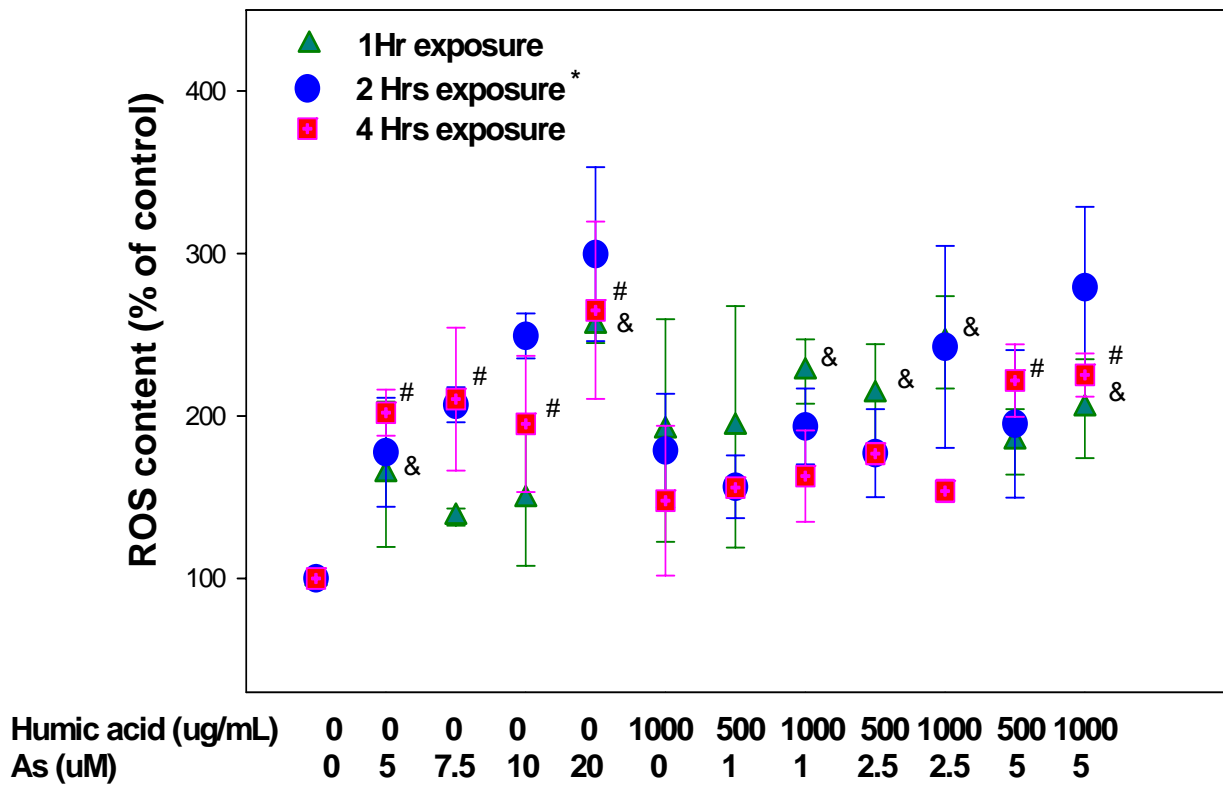


圖 33. HIT-T15  $\beta$  cell 暴露於不同濃度組合之腐植酸 (HAY) 及  $As_2O_3$  1-4 小時之細胞含氧自由基。將細胞( $2 \times 10^5$ /well)培養於 24 well culture plate 加入不同濃度試藥(腐植酸 HA 或砷  $As_2O_3$ )後於  $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$  中反應 1-4 h 後，分別以 DCFDA 測其細胞含氧自由基之變化。(\*, #, &,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

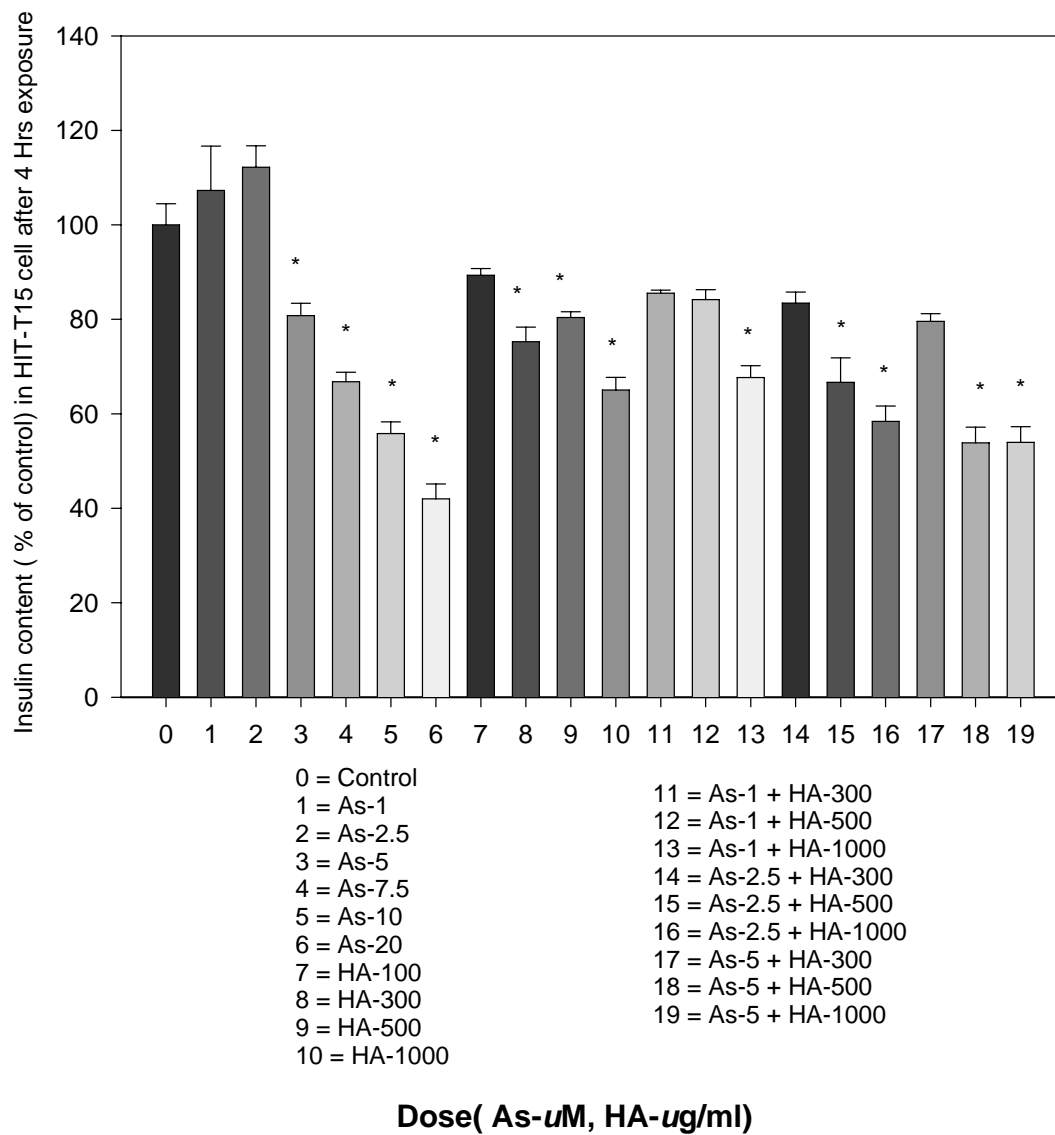


圖 34. HIT-T15  $\beta$  cell 暴露於不同濃度組合之腐植酸 (HA) 及  $As_2O_3$  4 小時之細胞胰島素分泌量。將細胞( $4 \times 10^5$ /well)培養於 6 well culture plate 加入不同濃度試藥(腐植酸 HA 或砷  $As_2O_3$ )後於  $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$  中反應 4 h 後, 分別以 ELISA kit 測其細胞胰島素分泌量之變化。(\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

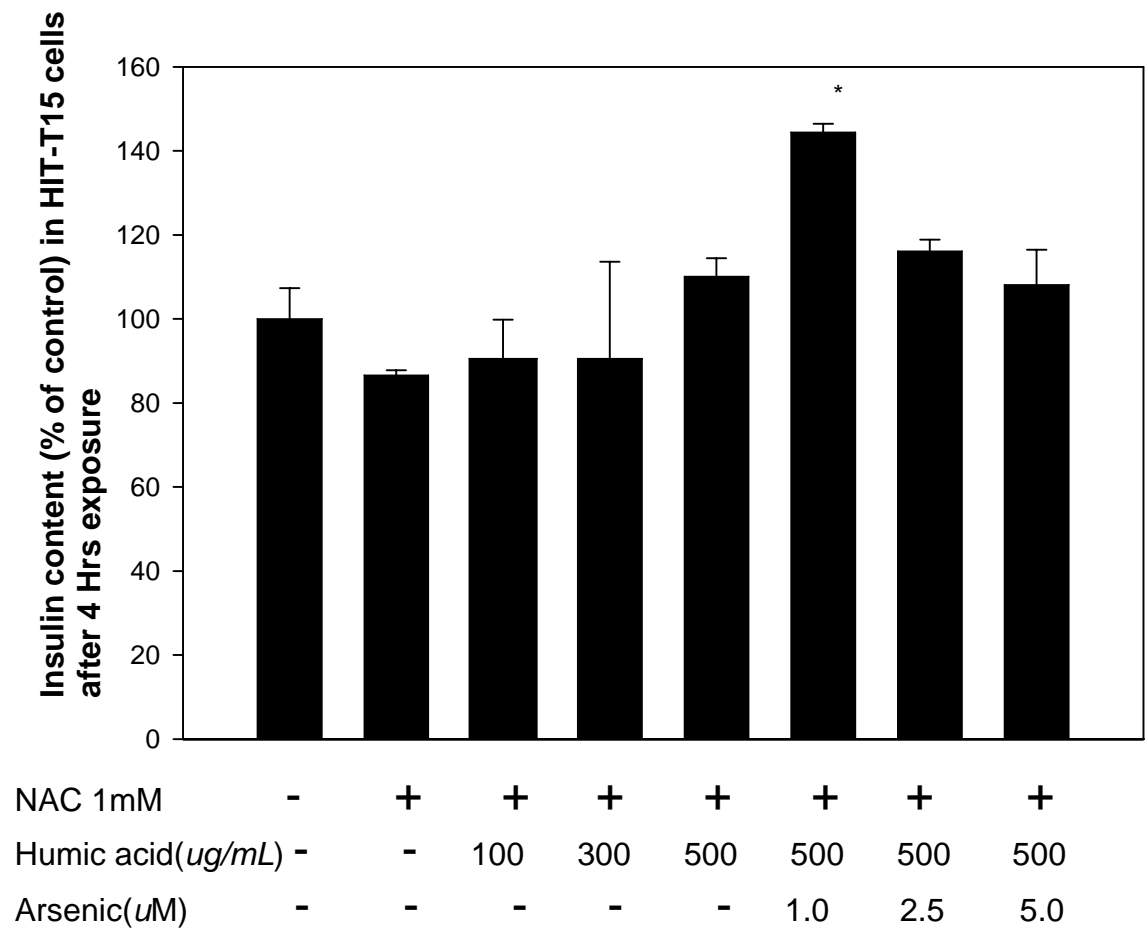


圖 35. HIT-T15  $\beta$  cell 預先暴露於抗氧化物 NAC 30 分鐘後，再共同暴露於不同濃度組合之腐植酸 (HA) 及  $As_2O_3$  4 小時之細胞胰島素分泌量。將細胞 ( $4 \times 10^5$ /well) 培養於 6 well culture plate 加入 1 mM 之 NAC 30 分鐘後再加入不同濃度試藥(腐植酸 HA 或砷  $As_2O_3$ ) 後於  $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$  中反應 4 h 後，分別以 ELISA kit 測其細胞胰島素分泌量之變化。(\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

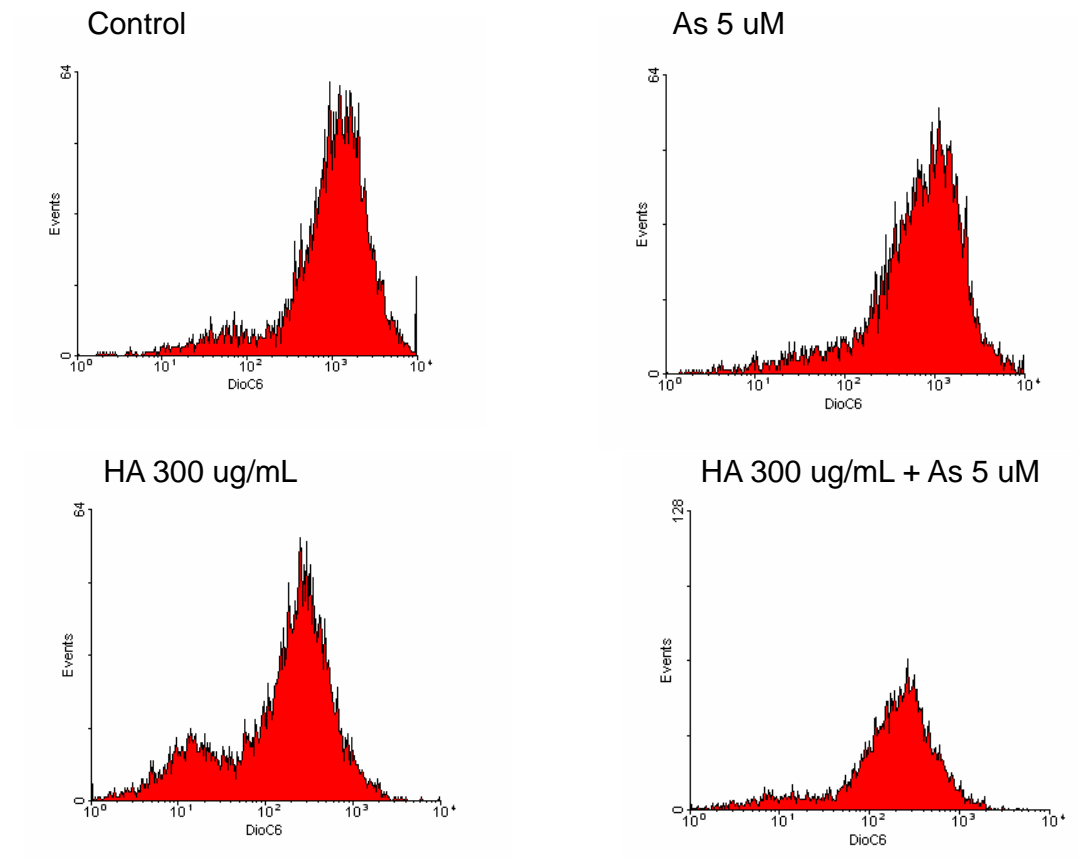
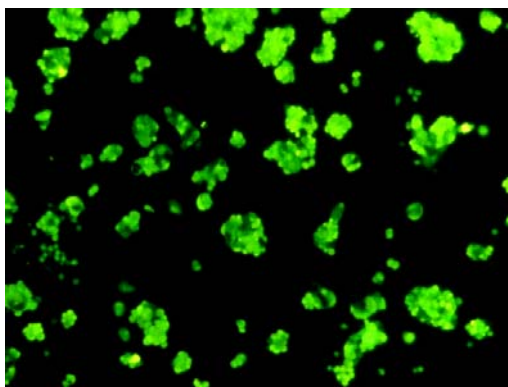


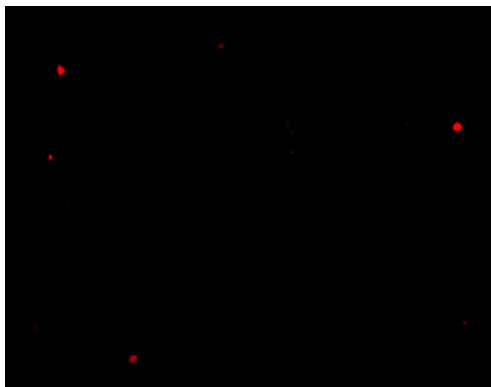
圖 36. HIT-T15  $\beta$  cell 暴露於不同濃度組合之腐植酸 (HA) 及  $As_2O_3$  2 小時之粒線體膜電位之變化。將細胞( $5 \times 10^5$ /well)培養於 6 well culture plate 加入 40 nM 之 DiOC6 30 分鐘後再加入不同濃度試藥(腐植酸 HA 或砷  $As_2O_3$ )後於 37°C, 5%  $CO_2$  中反應 2 h 後, 分別以流式細胞儀測其粒線體膜電位之變化。



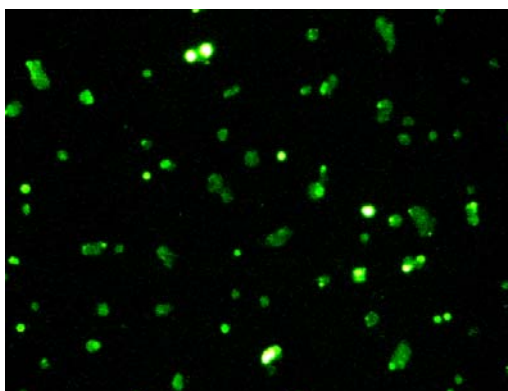
A Control



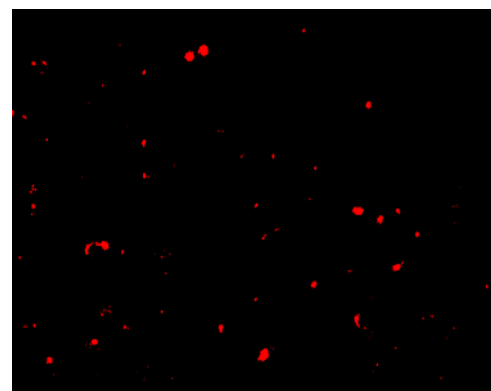
B



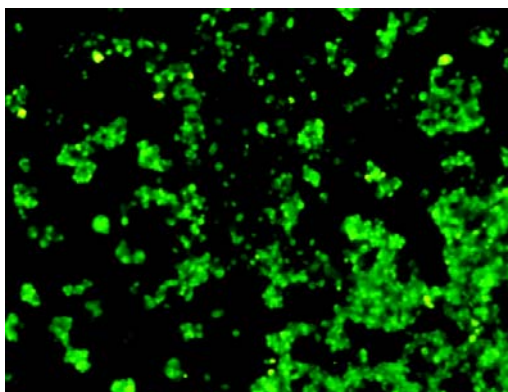
C As 2.5  $\mu$ M



D



E HA 100  $\mu$ g/mL



F

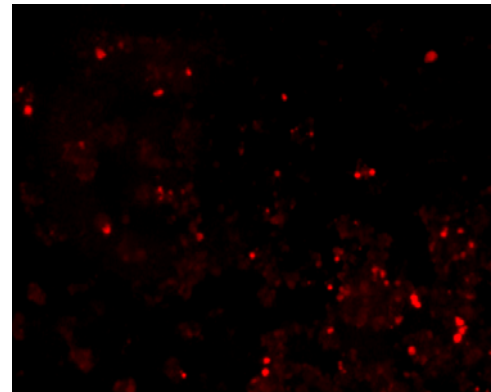
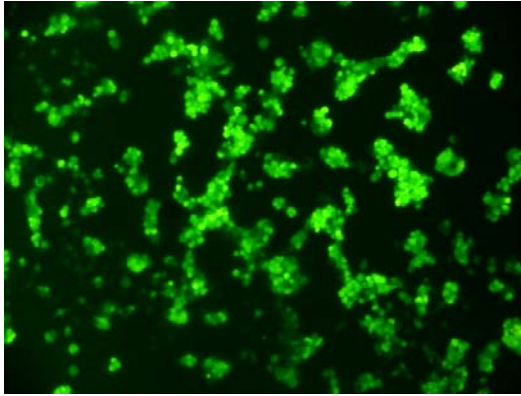
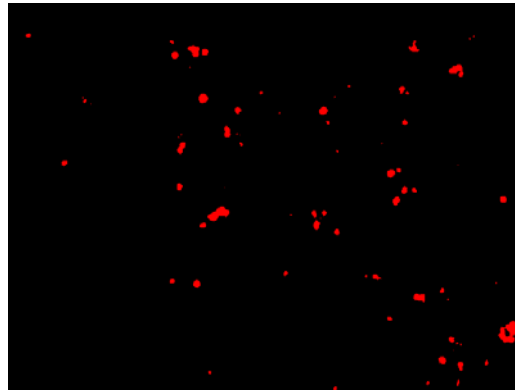


圖 37-1. HIT-T15  $\beta$  cell 暴露於不同濃度組合之腐植酸 (HA) 及  $As_2O_3$  24 小時之細胞死亡型態。將細胞( $5 \times 10^5$ /well)培養於 6 well culture plate 加入不同濃度試藥(腐植酸 HA 或砷  $As_2O_3$ )後於  $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$  中反應 24 h 後，分別以 Annexin V-CY3 stain (live cell:green; apoptosis :green/red)

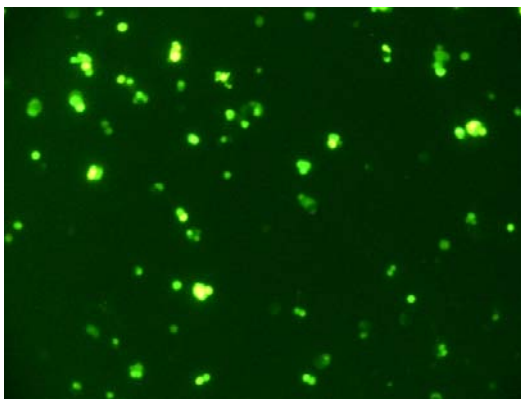
G HA 300 ug/mL



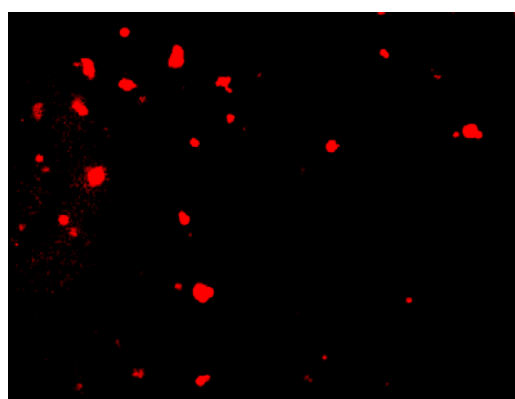
H



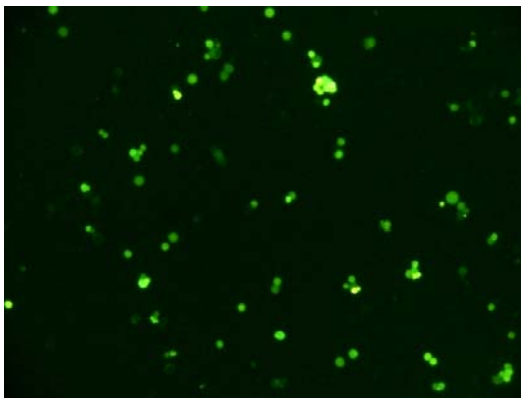
I HA 100 ug/mL+ As 2.5  $\mu$ M



J



K HA 300 ug/mL+ As 2.5  $\mu$ M



L

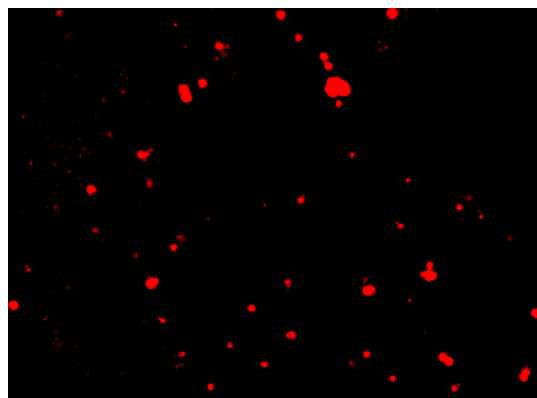


圖 37-2. HIT-T15  $\beta$  cell 暴露於不同濃度組合之腐植酸 (HA) 及  $As_2O_3$  24 小時之細胞死亡型態。將細胞( $5 \times 10^5$ /well)培養於 6 well culture plate 加入不同濃度試藥(腐植酸 HA 或砷  $As_2O_3$ )後於  $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$  中反應 24 h 後，分別以 Annexin V-CY3 stain (live cell:green; apoptosis :green/red)

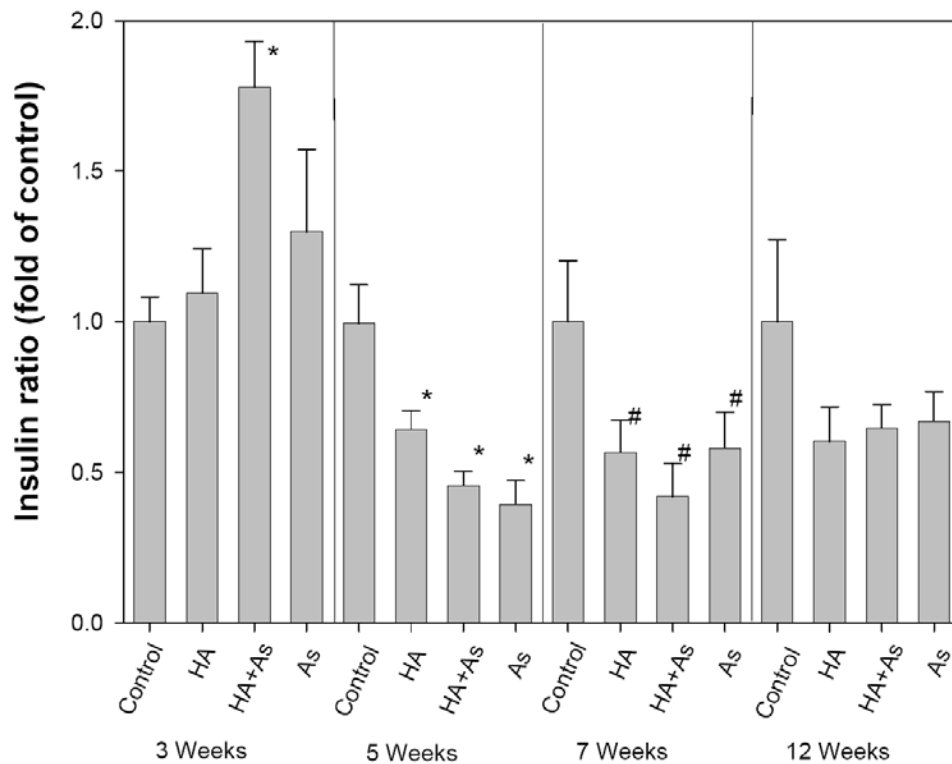


Figure 38. Effect of HA and As on the insulin secretive function of ICR mice. The animals were received 500mg/L humic acid, 10mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, or both of them in drinking water for 12 weeks. Blood was collected from orbital vascular plexus at 3, 5, 7 and 12 weeks, and then the amount of insulin in the plasma was assayed according to the manufacturer's instruction of rat insulin ELISA kit. The values (fold of control) are expressed in relation to control animals. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n =8). \* p < 0.05 as compared with control; # p < 0.1 as compared with control.

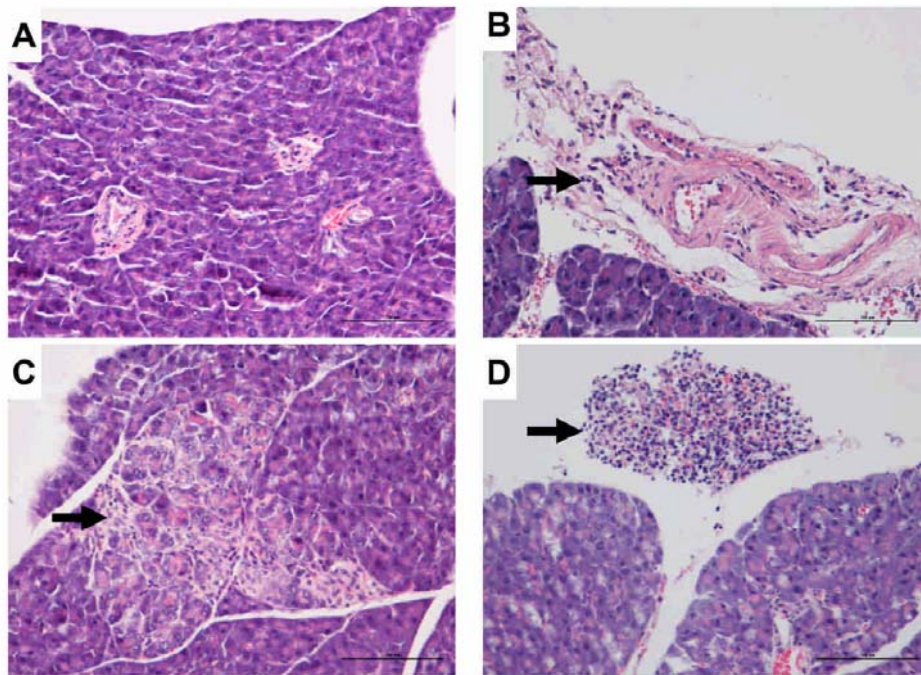


Figure 39. Photomicrographs of the pancreas of ICR mice after HA and As exposure.

The animals were received 500mg/L humic acid, 10mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, or both of them in drinking water for 5 weeks. A portion of the pancreas was fixed overnight in a 10 % neural formaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue slices were subjected to hematoxylin and eosin staining and histological study by light microscopy (200X). (A) Control group, no pathological lesions were found. (B) HA group, there were mild lymphocytes and plasma cells within the interstitial area (denoted by black arrow). (C) As group, there were mild accumulation of inflammatory cells into the periductal and interstitial areas and acinar cells atrophy and loss (denoted by black arrow). (D) HA+As group, there were mild accumulation of inflammatory cells into the peri-pancreatic area (denoted by black arrow).

## F. 基因氧化性傷害評估

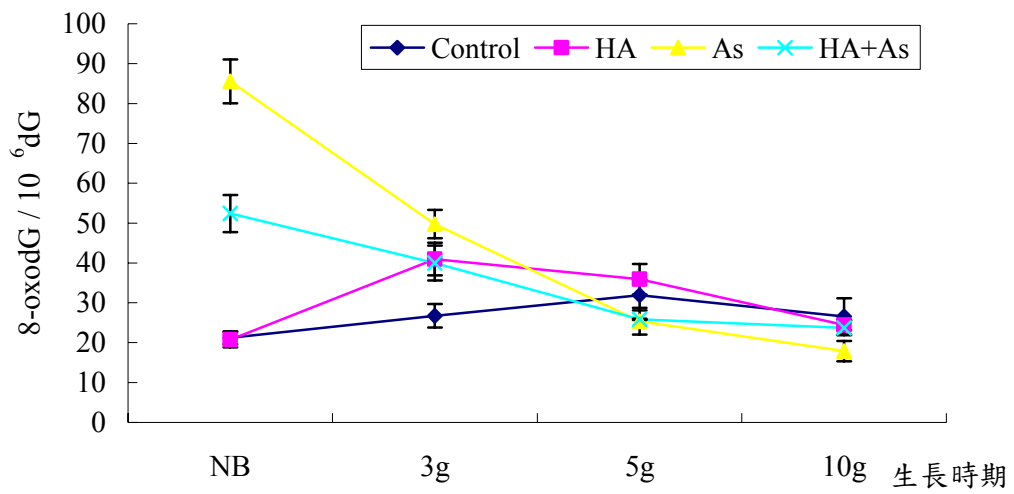


圖 40、子鼠肝臟 8- OHdG 含量在不同生長時期的變化情形

表 15、母鼠肝臟與尿液中 8-OHdG 含量

組別	Control(n=5)	HA (n=4)	As(n=4)	HA/As(n=5)
肝臟 (8-OHdG/10 <sup>6</sup> dG)	21.96 ± 2.92	33.48 ± 4.26*	46.77 ± 11.04*	51.3 ± 7.54*
組別	Control(n=4)	HA(n=4)	As(n=4)	HA/As(n=4)
尿液(ng/ml)	2.15 ± 1.59	6.59 ± 2.33*	9.04 ± 2.91*	7.00 ± 4.77*

註：\*：ANOVA test: p 值<0.05 各實驗組與控制組比較後之結果

表 16、剛出生子鼠肝臟與腎臟中 8-OHdG 含量(8-OHdG/10<sup>6</sup>dG)

組別	Control(n=4)	HA(n=4)	As(n=4)	HA/As(n=4)
肝臟	21.21 ± 2.76	20.74 ± 3.36	85.57 ± 9.55*	52.42 ± 8.09*
組別	Control(n=4)	HA(n=4)	As(n=4)	HA/As(n=4)
腎臟	22.45 ± 1.81	24.41 ± 6.09	27.97 ± 3.39*	27.23 ± 1.78*

註：\*：ANOVA test: p 值<0.05 各實驗組與控制組比較後之結果

表 17、不同腐植酸造成之基因氧化傷害(8-OHdG/10<sup>6</sup>dG)

	Control	Proto-catechuic acid	HA-unpurified	HA
剛出生 (n=3)	22.11 ± 3.01	52.34 ± 3.14*	57.85 ± 4.51*	24.32 ± 3.17
出生達 3g (n=3)	25.08 ± 2.57	81.05 ± 4.32*	180.5 ± 5.89*	31.06 ± 5.29
出生達 5g (n=3)	23.29 ± 2.39	41.34 ± 2.99*	67.45 ± 3.28*	25.21 ± 3.58

註：\* p 值<0.05 各實驗組與控制組比較後之結果

## G. 動物急毒性評估

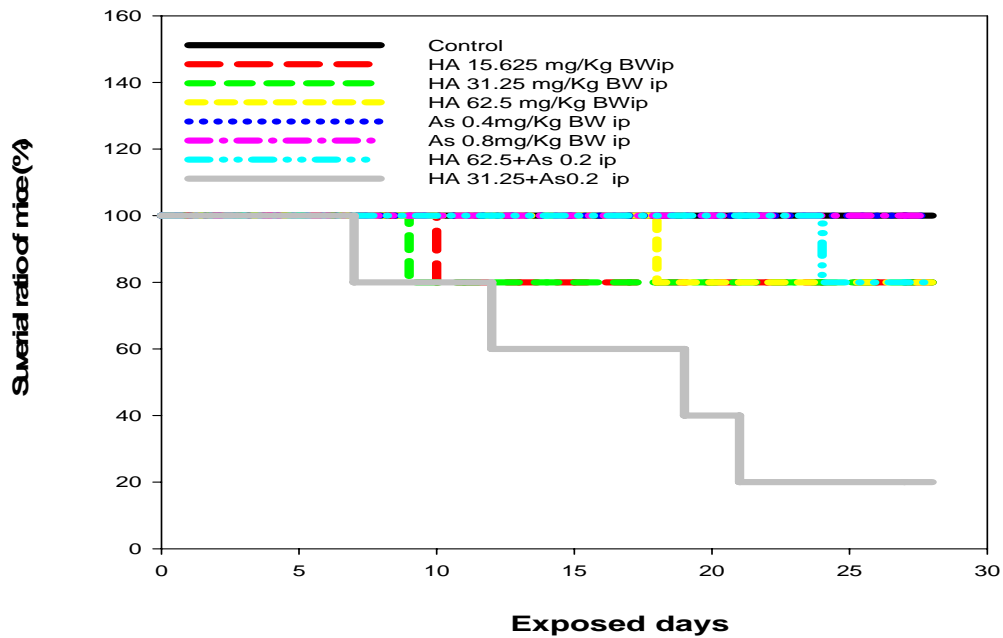
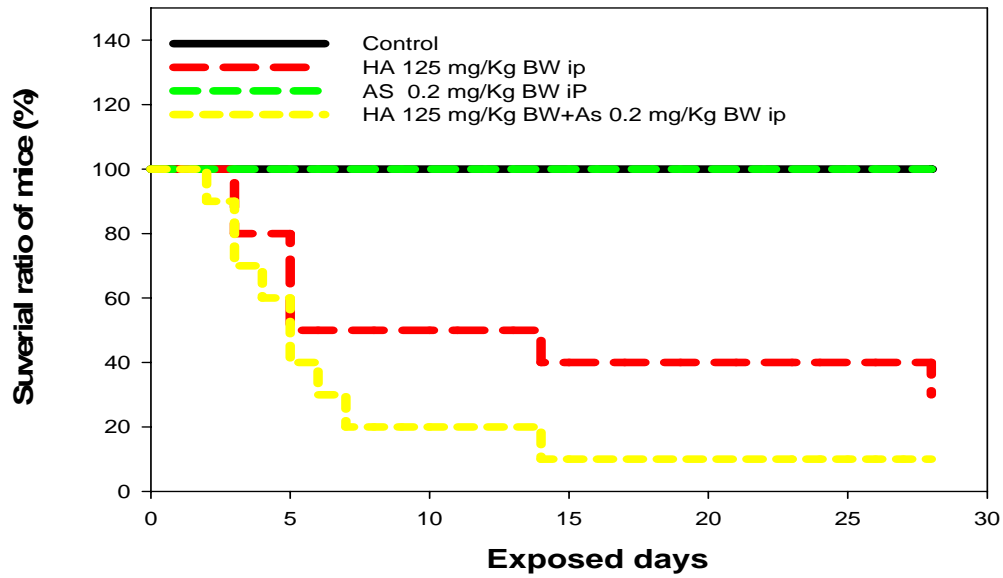


圖 41. 腐植酸和砷對小白鼠之急毒性評估，採用 6-8 週之 ICR 小鼠以每組 5-10 隻之數量連續 28 天腹腔注射不同劑量之腐植酸(HA)和砷( $As_2O_3$ )，計算其存活率。



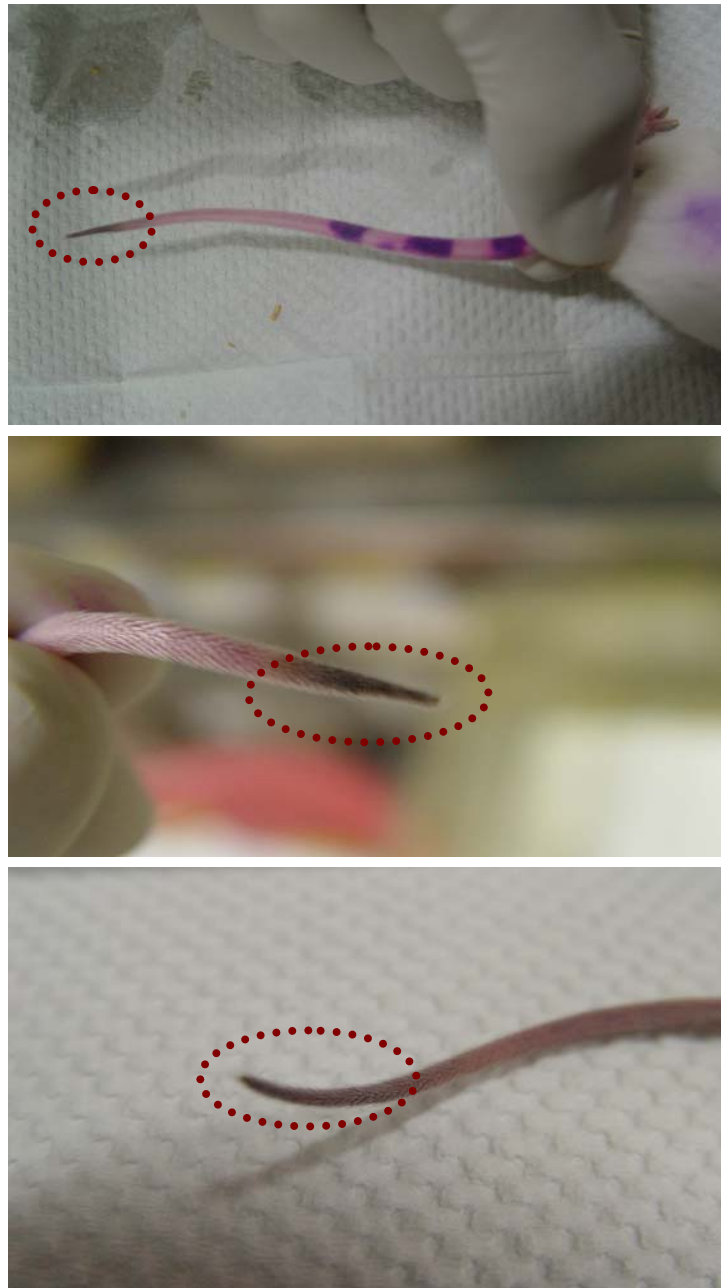
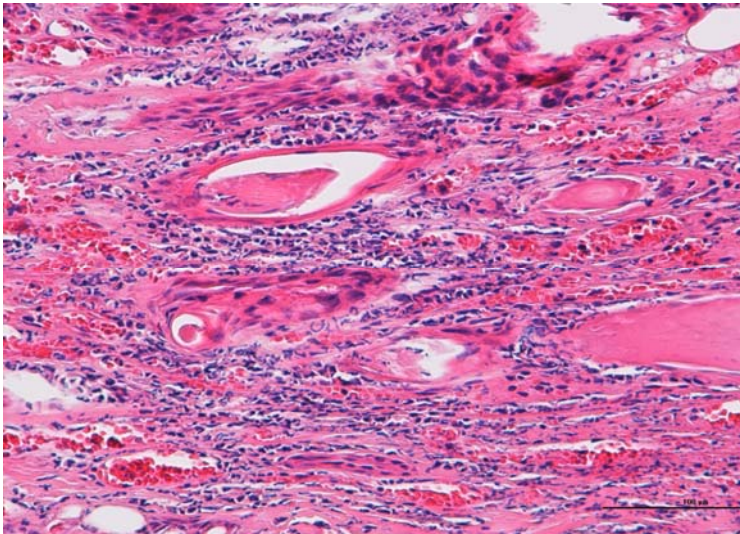
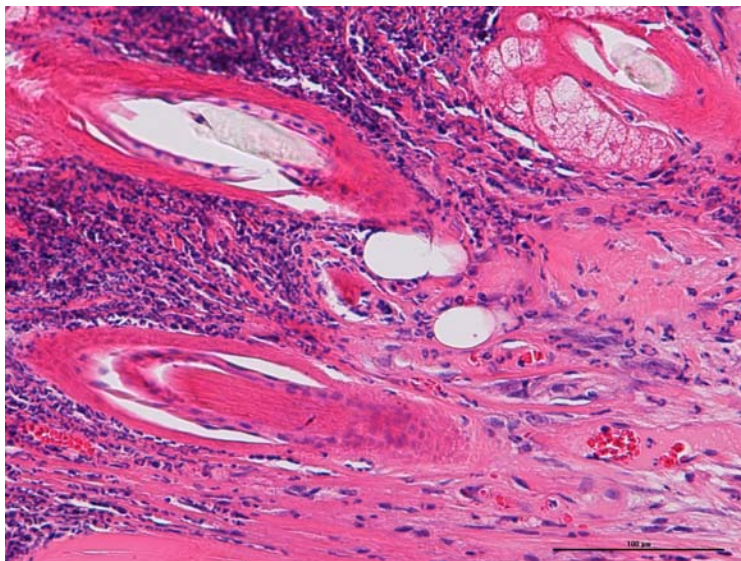


圖 42. 腐植酸和砷對小白鼠之急毒性評估，採用 6-8 週之 ICR 小鼠以每組 5-10 隻之數量連續 28 天腹腔注射高劑量之腐植酸 (HA, 125mg/Kg BW)，觀察到尾部末梢之疑似病變。



Humic acid ip 5mg/40g BW day (5 days)



Humic acid ip 3.75mg/40g BW day (5 days)

Fig 43. ICR 小鼠腹腔注射 humic acid 後可以誘發末梢組織病之組織病理變化

## 附件 1 壁報論文

### **2006.3** 臺北 生醫年會

The combination treatment of As(III) with humic acid effectively inhibited the growth stimulation effect of As(III) on SIHA cells.

Hung-Chih Ting<sup>1</sup>, Wen-Kang Chen<sup>2</sup>, Shu-Huei Lin<sup>2</sup>, Wen-Fei Fong<sup>2</sup>, Cih-Ping Guo<sup>2</sup>, Cheng-Chieh Yen<sup>3</sup>, Chao-Chin Hu<sup>2</sup>, Fung-Jou Lu<sup>2</sup> and Wen-Huei Chang<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medicine, <sup>2</sup>School of Applied Chemistry, <sup>3</sup>Department of Occupational Safety and Health, Chun Shan Medical University, Taichung, Taiwan

#### Abstract

As(III) exposure is associated with an increased incidence of a number of diseases, including vascular conditions such as Blackfoot disease, diabetes, hypertension, and cancers such as those of the lung, bladder, and skin. With respect to its vascular effects, As(III) has been shown to be anti-angiogenic at higher doses such as those used in the treatment of cancer, whereas it has also been shown that lower, environmentally relevant doses of As(III) are in fact pro-angiogenic and tumorigenic. Here, we reported that the combination treatment of As(III) with humic acid (HA) effectively inhibited the growth stimulation effect of As(III) on human cervical cancer cells, SIHA. DNA fragmentation and flowcytometry analysis showed that the combination of As(III) and HA successfully inhibited cell growth, even at the growth-stimulation doses of As(III). Previous study showed the toxicity of As(III) occurs through the generation ROS. HA strongly interact with both inorganic and organic agents, thus might participate redox regulation. Thus, we would like to investigate the mechanism of how HA enhance the sensitivity of SIHA cells to As(III)-induced apoptosis in the future.

### 2006.3 臺北 生醫年會

Humic acid effectively enhanced *in vitro* growth inhibition effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on HeLa cells.

Hung-Chih Ting<sup>1</sup>, Wen-Kang Chen<sup>2</sup>, Wen-Fei Fong<sup>2</sup>, Shu-Huei Lin<sup>2</sup>, Cih-Ping Guo<sup>2</sup>, Cheng-Chieh Yen<sup>3</sup>, Chao-Chin Hu<sup>2</sup>, Fung-Jou Lu<sup>2</sup> and Wen-Huei Chang<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medicine, <sup>2</sup>School of Applied Chemistry, <sup>3</sup>Department of Occupational Safety and Health, Chun Shan Medical University, Taichung, Taiwan

#### Abstract

Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) has been implicated as a promising anticancer agent for leukemia and some solid tumors. Recent studies showed that As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> could perform apoptotic, antiproliferative, antiviral and antimetastatic effects. Furthermore, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-treated cells demonstrated lesser capacity of invasion than those of untreated cells. However, chronic exposure to low-dose As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> could stimulate growth of tumors and promote angiogenesis. The reverse effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> needed consideration in practice. Here, we report that the combination treatment of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with humic acid (HA) effectively enhanced *in vitro* growth inhibition effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on HeLa cells, compared with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> treatment alone. In addition, the adverse effects (such as the growth-stimulating of cancer cells) by low concentration treatment vanished in the combination group. HA treatments neither resulted in cytotoxicities nor altered the cell cycle of HeLa cells, but the combination of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with HA significantly retarded the cell population at G<sub>2</sub>/M phase. The combination of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with HA also influenced DNA integrity. As shown by agarose electrophoresis, almost all DNA broken into pieces in these groups. The expression of various regulators in cell cycle as well as at apoptosis should be investigated and compared in the future.

### 2006.3 臺北 生醫年會

#### PROMOTION OF NEOPLASTIC TRANSFORMATION BY HUMIC ACID IN THE MOUSE EPIDERMAL JB6 CELLS

Tsui-Hwa Tseng<sup>1#</sup>, Wei-Jiunn Lee<sup>2\*</sup>, Cheng-Chieh Yen<sup>3</sup>, Kuan-Miao Liu<sup>1</sup>, Chin-Wei Liao<sup>1</sup> and Fung-Jou Lu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Applied Chemistry, College of Health Management, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Biotechnology, College of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

<sup>3</sup>School of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

Humic acid (HA) is a group of high molecular weight macromolecules consisting of complex polymeric aromatic structures. HA has been implicated as a possible etiological factor for black foot disease as well as cancer of bladder, liver and skin. In this study, we evaluate the promotion effect of HA on the transformation in mouse epidermal JB6 cells that have been used to identify the tumor-promoting activity of various compounds. Our preliminary assay demonstrated that treatment JB6 cells with HA at the concentration of 10 and 100 µg/ml inhibited the growth of cells significantly. However, the *in vitro* wound-healing assay showed that JB6 cells with the treatment of HA for 48 h increased the migrating growth. In addition, HA developed cell spread and decreased the cell-cell-contact of JB6 cells after treatment for 96 h. In transformation colony assay, we found that HA promoted the transformation of JB6. Finally, the transformation involving proteins and signals are analyzed.

## **Toxic Effects of Humic acid and Arsenic : The Relations with the Pathogenesis of Diabetes Mellitus**

Cheng-Chieh Yen<sup>1,2</sup>, Ya-Wen Chen<sup>1</sup>, Chin-Hwa Hunag<sup>1</sup>,  
Shin-Hwa Liu<sup>1</sup>, Wen-Huei Chang<sup>3</sup>, Wen-Kang Chen<sup>2,3</sup>, Fung-Jou Lu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institutes of Toxicology, College of Medicine, National Taiwan University.

Department of <sup>2</sup>Occupational Safety and Health and <sup>3</sup>Applied Chemistry, College of Health care and Management, Chung Shan Medical University

Diabetes mellitus is the fourth cause of death in Taiwan and the diabetic incidence among residents living in the blackfoot disease (BFD) endemic area has been found to be higher than other areas. Epidemiologic and geochemical studies disclosed the presence of a high concentration of humic acid and arsenic in artesian well water from these BFD areas.

In this study, we examined the effects of humic acid (HA) and trivalent arsenic (As) on HIT-T15  $\beta$  cell and ICR mice. The increased fluorescence in DCFDA-stained cells suggests the involvement of reactive oxygen species (ROS) in HA, As or both induced biological effects. In addition, insulin secretions were also suppressed by HA, As or both treated cells and which can be reversed by cotreatment of N-Acetyl-L -Cysteine(NAC). In addition, the blood glucose (glucose tolerance test) at 1 and 2 hours of the mice that were fed with humic acid (HA) and trivalent arsenic (As) are higher than normal mice. We propose that HA, As or both initiates oxidative damage to  $\beta$  cell and suppressed the secretion of insulin, which may play a role in the pathogenesis of diabetes mellitus in the BFD area.

**HUMIC ACID AND ARSENIC REDUCE INSULIN SECRETION :**

**THE RELATIONS WITH THE PATHOGENESIS OF DIABETES**

**MELLITUS IN VIVO AND IN VITRO EXPERIMENTATION**

Cheng-Chieh Yen<sup>1,2</sup>, Ya-Wen Chen<sup>1</sup>, Chin-Hwa Hunag<sup>1</sup>,  
Shin-Hwa Liu<sup>1</sup>, Wen-Huei Chang<sup>3</sup>, Wen-Kang Chen<sup>2,3</sup>, Fung-Jou Lu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institutes of Toxicology, College of Medicine, National Taiwan University.

Department of <sup>2</sup>Occupational Safety and Health and <sup>3</sup>Applied Chemistry, College of Health care and Management, Chung Shan Medical University

Diabetes mellitus is the fourth cause of death in Taiwan and the trends if diabetes mortality is increasing steadily. The diabetic incidence among residents living in the blackfoot disease (BFD) endemic area has been found to be higher than other areas of Taiwan. Epidemiologic and geochemical studies disclosed the presence of a high concentration of humic acid (approximately 200 ppm) and arsenic (approximately 0.1~1.8 ppm) in artesian well water from these BFD areas.

In this study, we examined the effects of humic acid (HA) and trivalent arsenic (As) on HIT-T15  $\beta$  cell and ICR mice. Insulin secretions were suppressed by HA, As or both treated cells or mice. The increased fluorescence in DCFDA-stained cells suggests the involvement of reactive oxygen species (ROS) in HA, As or both induced biological effects, and which can be reversed by cotreatment of N-Acetyl-L-Cysteine(NAC). We propose that HA, As or both initiates oxidative damage to  $\beta$  cell and suppressed the secretion of insulin, which may play a role in the pathogenesis of diabetes mellitus in the BFD area.

**ADVERSE EFFECTS OF HUMIC ACID AND ARSENIC ON  
PREGNANCY OUTCOMES**

Fung-Jou Lu<sup>1</sup>, Cheng-Chieh Yen<sup>2</sup>, Wen-Huei Chang<sup>1</sup>, Wen-Kang Chen<sup>1,2</sup>

Department of <sup>1</sup> Applied Chemistry and <sup>2</sup> Occupational Safety and Health, College of Health care and Management, Chung Shan Medical University

Epidemiologic and geochemical studies disclosed the presence of a high concentration of humic acid (approximately 200 ppm) and arsenic (approximately 0.1~1.8 ppm) in artesian well water from these BFD areas. There have demonstrated arsenic's ability to have profound detrimental effects on the developing embryo in avian and mammalian species. In addition, the humic acid from the waters of the BFD area were mutagenic and it forms a bridged complex with arsenic and other metals in the presence of a polyvalent cation.

In this study, we examined the teratogenicity and reproductive effects of humic acid (HA) and trivalent arsenic (As) on ICR mice. Female mice were p.o. HA (commercially HA or synthetic HA) 、As or both between Day 9~18 of pregnancy, and adverse pregnancy outcomes in term of spontaneous 、stillbirth 、low birth weight and DNA damage were significantly higher in some exposed groups than those in control group.

**2007 環境分析化學研討會**

周怡君，陳貞安，張瓊娥，許文豪，巖正傑，胡瓊文，趙木榮\*，“運用沙門菌回復突變測試法(Ames test)於腐植酸與砷之致突變性研究”，2007 環境分析化學研討會，行政院環境保護署環境檢驗所。



## **2006 16<sup>th</sup> AEHS**

### **Acute toxicity of binary mixtures of arsenic and humic substances to the luminescent bacteria *Vibrio fischeri***

Mu-Rong Chao, Jhen-Hao Yang\*, Shan-An Jhou, Cheng-Chieh Yen and Chiung-Wen Hu

Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

#### **Introduction**

Arsenic is often present in the environment in mixtures and it is a naturally occurring element that has been known through the ages as the king of poisons. The toxicity of arsenic may be affected by the presence of natural organic matter, such as humic substances (HSs), which are produced by the degradation of dead organic materials. HSs are ubiquitous in the environment and consist of a variety of molecular structures such as alcyaromatic, quinoid, and aliphatic structures in the core and amino-acid-like or carbohydrate-like structures and carbonyl, carboxyl, phenyl, and hydroxyl groups in the periphery. HSs have a strong affinity toward metal cations and therefore can serve as effective chelators for numerous metal ions, which may alter the toxicity and bioavailability of heavy metals in aquatic system. However, little information was available in the literature on the toxicity of binary mixtures of arsenic and HSs. In this study, *Vibrio fischeri* a bioluminescent marine bacterium, was used to evaluate combined toxicity of arsenite ( $\text{As}^{3+}$ ) with HSs.

## Materials and methods

We used two types of HSs including humic acids (HAs), synthetic humic acid (SHA), and other six monomers of SHA (i.e. protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, syringic acid, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde and vanillin) in this study. Humic acids (HAs) were obtained from a commercial product of Aldrich, a product extracted from the well water in Blackfoot disease areas of Taiwan and a product isolated from the soil collected in America. Three kinds of SHA used were respectively synthesized by gallic acid, procatechuic acid and gallic acid. The arsenite solution of 1000 mg/L was freshly prepared by dissolving in deionized water and then adjusted to a salinity of 2% using a concentrated salt solution. The HSs working solution of 1000 mg/L were prepared by dissolving into 2% salt solution. *Vibrio fischeri* was used to evaluate combined toxicity of arsenite ( $\text{As}^{3+}$ ) with HSs. Firstly, an estimated median effective concentration (EC50) and confidence interval were determined for each test compound. The combination effects of these compounds were then evaluated by graphic isobologram analysis (Fig. 1). The response obtained from chemical  $Z_2$  alone is on the y axis, and the response from chemical  $Z_1$  alone is plotted on the x axis. When there is no interaction between the chemicals, the responses from dose comprised of varying proportions of chemicals  $Z_2$  and  $Z_1$  will fall on a straight line connecting the response for 100% chemical  $Z_2$  to 100% chemical  $Z_1$ . If there is “antagonism” between the chemicals, responses to combinations of the chemicals will lie below and to the left of this line and “synergistic” responses will lie above and to the right of line.

## Results

The effect of binary mixtures of  $\text{As}^{3+}$  and HSs/monomers were shown in Fig. 2-4. The EC50 values of  $\text{As}^{3+}$ , monomer, SHA and HAs were calculated to be 50-59, 20-45, 173-460 and 253-375 mg/L, respectively. As shown in Fig. 2 and Fig. 3, the interactions between most monomers and  $\text{As}^{3+}$  were shown to be antagonistic, except for protocatechuic acid, whilst the interactions between all three SHA and  $\text{As}^{3+}$  were synergistic. As for the interactive effect between HAs and  $\text{As}^{3+}$  on bioluminescence of *V. fischeri* was synergistic, except for HAs from Taiwan (Fig. 4).

## Discussion

This study showed that the interactions of arsenic with HAs polymers (synergistic) were very different to that of with monomers (antagonistic). HAs have been proposed to be an excellent chelating agent. Previous studies have shown that when metals (i.e. iron and copper) are bound to HA, they could efficiently generate reactive oxygen species such as the hydroxyl radical, which is a very potent and toxic oxidizing species. A similar phenomenon could occur when arsenic is bound to HAs polymers in this study. Our results suggested that humic acid could create a chemical system that can activate metals and alter arsenic toxicity in the aquatic environments.

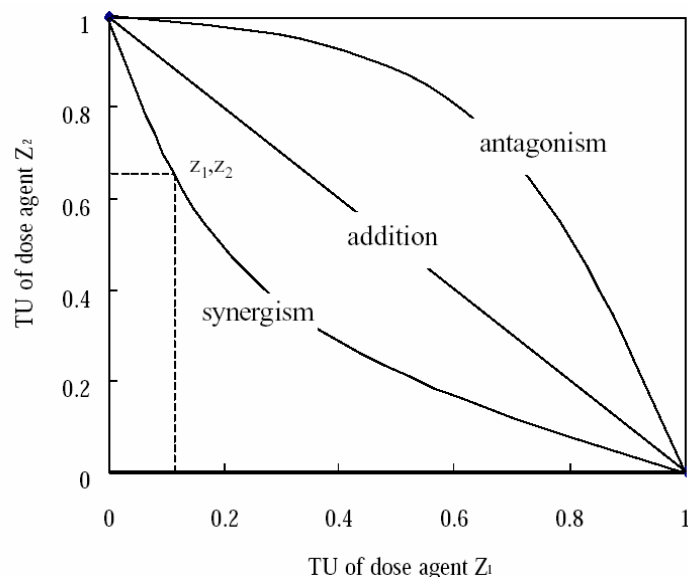


Fig. 1 Simplified isobologram

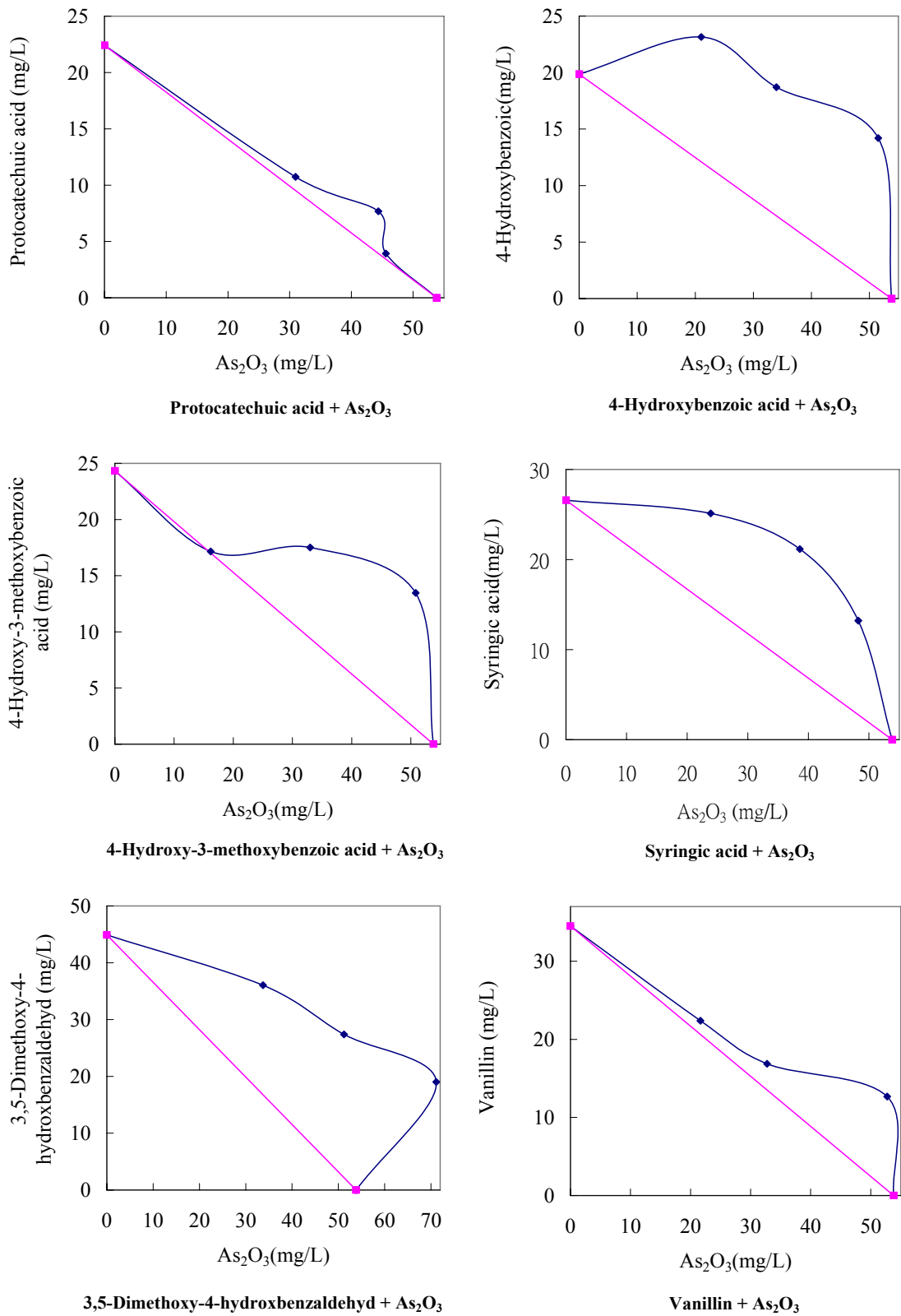


Fig. 2. Isobologram for effects of monomers and arsenite on the bioluminescence of

*Vibrio fischeri*.

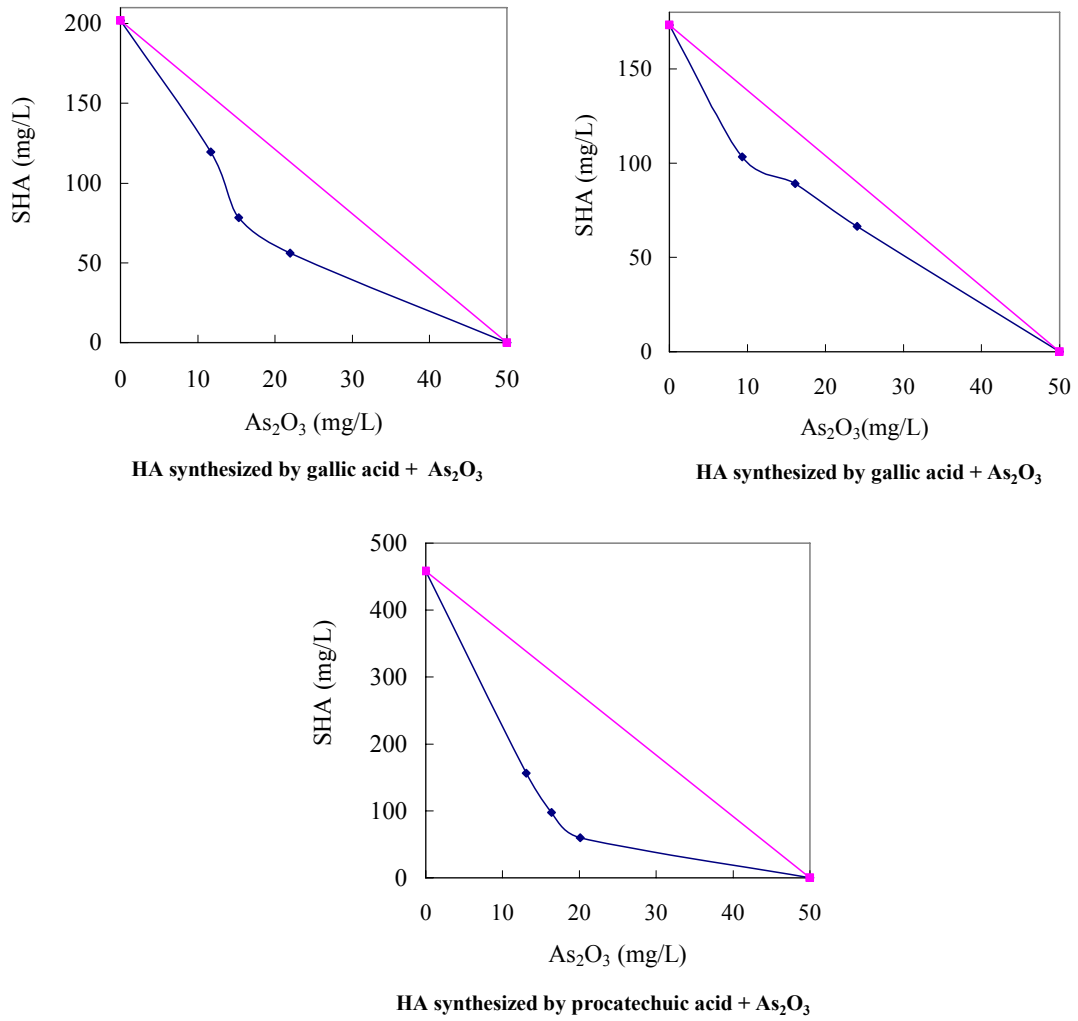


Fig. 3. Isobologram for effects of SHA and arsenite on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*.

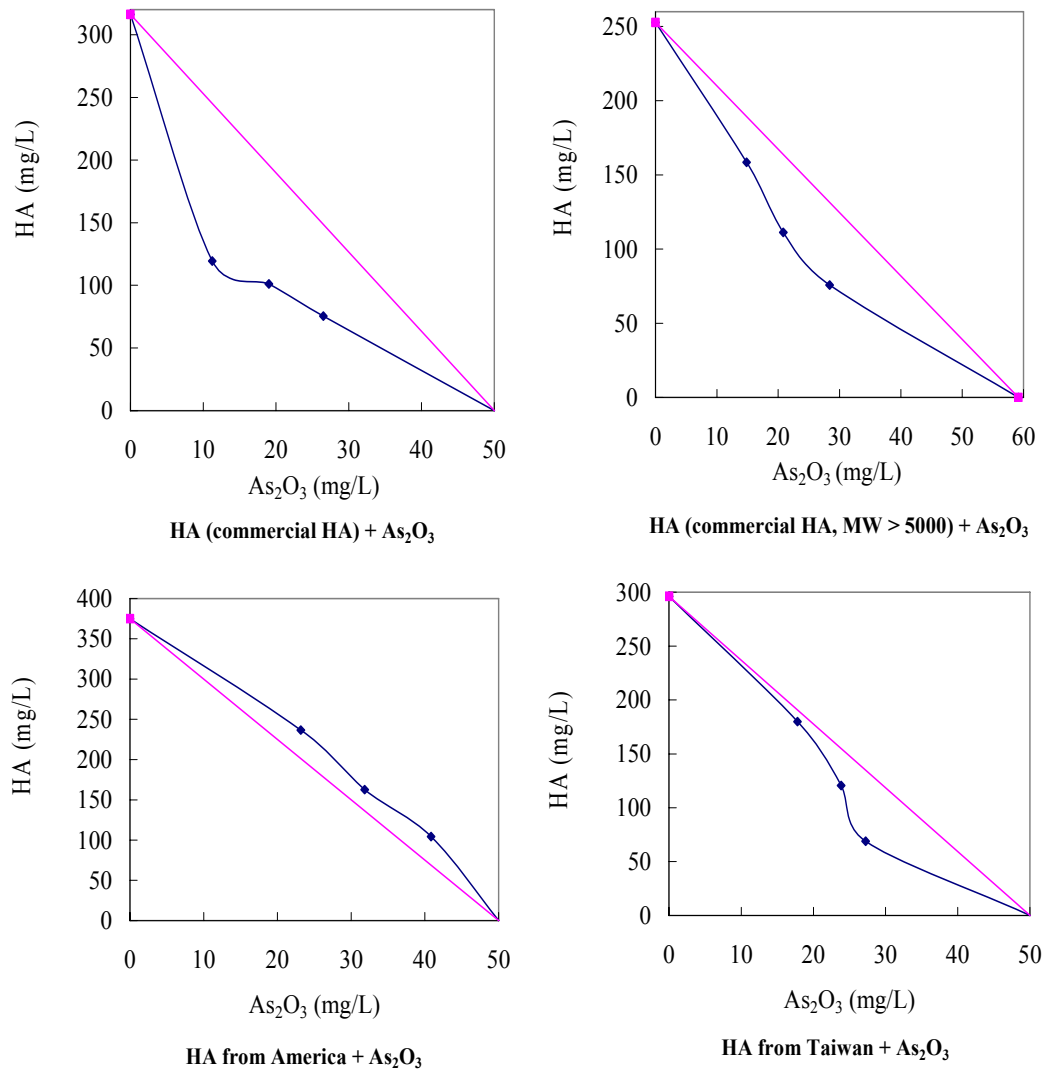


Fig. 4. Isobologram for effects of HAs and arsenite on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*.

環境污染與人體健康~ 2006 砷、腐植酸與烏腳病國際研討會

腐植酸的毒理研究 ( 120 分鐘)

主持人： 呂鋒洲 講座教授

中山醫學大學應用化學系

日期與時間： 2006/10/20 (五) 下午 : - :

地點： 中原大學國際會議廳

(桃園縣中壢市中北路 200 號)

<u>題</u> <u>目</u>	<u>演</u> <u>講</u> <u>者</u>	<u>時</u> <u>間</u> (min)
1. Humic acids and blackfoot disease	<b>Fung-Jou Lu</b> Professor School of Applied Chemistry, Chung Shan Medical University	30
2. The possible pathogenic mechanisms of humic acid-induced the peripheral vasculopathy of blackfoot disease in Taiwan	<b>Hsin-Ling Yang</b> Professor Institute of Nutrition, China Medical and Drug University	30
3. The role of free radicals in humic acid/arsenic induced mouse pancreatic $\beta$ cell dysfunction in vitro and in vivo	<b>Cheng-Chieh Yen</b> Assistant professor Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University	12
4. Adverse effects of humic acid and arsenic on pregnancy outcomes of mice	<b>Cheng-Chieh Yen</b> Assistant professor Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University	12
5. Promoting neoplastic transformation of mouse epidermal JB6 C141 cell and keratosis of CD-1 mice skin by	<b>Tsui-Hwa Tseng</b> Professor School of Applied Chemistry, Chung Shan Medical	12

humic acid	University	
6. Oxidative DNA damage induced by humic acid/arsenic as measured by isotope dilution LC-MS/MS with on-line solid-phase extraction	<b>Chiung-Wen Hu</b> Assistant professor Department of Public Health, Chung Shan Medical University	12
7. Chemical characterization of humic acids	<b>Jian-Lian Chen</b> Assistant professor Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University	12

## 附件 2 投稿中之論文

1. Chiung-Wen Hu, Cheng-Chieh Yen and Mu-Rong Chao. “Oxidatively damaged DNA in liver of mice exposed to humic acid with/without arsenic”. In preparation.

2. Mu-Rong Chao, Cheng-Chieh Yen, Fung-Jou Lu and Chiung-Wen Hu. Toxicity of binary mixtures of humic substances and arsenic to the bacterial bioluminescence assay. Submitted to *Journal of Hazardous Materials*.

3. Cheng-Chieh Yen, Fung-Jou Lu, Wen-Kang Chen. VEGFA was involved in the tumor promotion effects of humic acid and arsenic in vivo and in vitro studies. In preparation.

4. Fung-Jou Lu, Cheng-Chieh Yen, Wen-Kang Chen. Adverse effects of humic acid and arsenic on pregnancy outcomes. In preparation.



## Clinical-Scale High-Throughput Analysis of Urinary 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine by Isotope-Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with On-Line Solid-Phase Extraction

Q: A

CHIUNG-WEN HU,<sup>1</sup> CHIEN-JEN WANG,<sup>2</sup> LOUIS W. CHANG,<sup>2</sup> and MU-RONG CHAO<sup>3\*</sup>

**Background:** Quantification of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) in urine or blood is used to assess and monitor oxidative stress in patients. We describe the use of on-line solid-phase extraction (SPE) and isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for automated measurement of urinary 8-oxodGuo.

**Methods:** Automated purification of urine was accomplished with a switching valve and an Inertsil ODS-3 column. After the addition of <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-labeled 8-oxodGuo as an internal standard, urine samples were analyzed within 10 min without sample purification. This method was applied to measure urinary 8-oxodGuo in a group of healthy persons (32 regular smokers and 35 nonsmokers). Urinary cotinine was also assayed by an isotope-dilution LC-MS/MS method.

**Results:** The lower limit of detection was 5.7 ng/L on column (2.0 fmol). Inter- and intraday imprecision (CV) was <5.0%. Mean recovery of 8-oxodGuo in urine was 99%–102%. Mean (SD) urinary concentrations of 8-oxodGuo in smokers [7.26 (3.14) μg/g creatinine] were significantly higher than those in nonsmokers [4.69 (1.70) μg/g creatinine; *P* < 0.005]. Urinary concentrations of 8-oxodGuo were significantly correlated with concentrations of cotinine in smokers (*P* < 0.05).

Q: B

**Conclusions:** This on-line SPE LC-MS/MS method is sufficiently sensitive, precise, and rapid to provide high-throughput direct analysis of urinary 8-oxodGuo without compromising quality and validation criteria. This method could be applicable for use in daily clinical practice for assessing oxidative stress in patients.

© 2006 American Association for Clinical Chemistry

Reactive oxygen species in living cells have been suggested to be associated with aging, cancer, and some degenerative diseases because they cause oxidative damage to nucleic acids, proteins, and lipids (1). Reactive oxygen species include both oxygen-centered radicals and nonradical compounds. 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo; so-called 8-OHdG)<sup>4</sup> is the most abundant DNA lesions formed by the addition of the hydroxyl radical to the C-8 position of guanine in DNA. The detection of this lesion is considered important because of its abundance and mutagenic potential, and its concentration could be a good indicator of reactive oxygen species and a potential biomarker of carcinogenesis *in vivo* (2,3). Damaged DNA may be repaired by the nucleotide excision repair pathway, and the resulting repair product, 8-oxodGuo, in urine is not affected by diet and cell turnover (4). Moreover, urinary 8-oxodGuo may also originate from the hydrolysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) in the nucleotide pool by the 8-oxodGTPase enzyme, the so-called MTH1 protein (5,6).

Departments of <sup>1</sup>Public Health and <sup>3</sup>Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.

<sup>2</sup>Division of Environmental Health and Occupational Medicine, National Health Research Institutes, Kaohsiung, Taiwan.

\* Address correspondence to this author at: Department of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, No. 110, Sec. 1, Chien-Kuo N Road, Taichung, Taiwan 402. Fax 886-4-2324-8194; e-mail mrchao@csmu.edu.tw.

Received November 15, 2005; accepted April 18, 2006.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2005.063735

<sup>4</sup>Nonstandard abbreviations: 8-oxodGuo, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; ECD, electrochemical detection; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; LC-MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; SPE, solid-phase extraction; BMI, body mass index; FA, formic acid; LOQ, limit of quantification; and LOD, limit of detection.



## Promoting neoplastic transformation of humic acid in mouse epidermal JB6 Cl41 cells

Fung-Jou Lu<sup>a</sup>, Tsui-Hwa Tseng<sup>a,\*</sup>, Wei-Jiunn Lee<sup>b</sup>, Cheng-Chieh Yen<sup>c</sup>,  
Yu-Fang Yin<sup>a</sup>, Chin-Wei Liao<sup>a</sup>, Kuan-Miao Liu<sup>a</sup>

<sup>a</sup> School of Applied Chemistry, Chung Shan Medical University, No. 110, Section 1, Chien-Kuo N. Road, Taichung 402, Taiwan

<sup>b</sup> Institute of Biochemistry and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

<sup>c</sup> School of Occupational Safety and Health, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

Received 9 June 2006; received in revised form 19 July 2006; accepted 20 July 2006

Available online 31 July 2006

### Abstract

Humic acid (HA), a group of high-molecular weight polymer, resulting from the decomposition of organic matter has been implicated as a possible etiological factor for Blackfoot disease and cancer. In this study, we evaluate the promotion effect of HA on the transformation in mouse epidermal JB6 clone 41 (JB6 Cl41) cells that have been used to identify the tumor promoting activity of various compounds. Our preliminary assay demonstrated that JB6 Cl41 cells with the treatment of HA at the concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$  for 72 and 96 h significantly increased reactive oxygen species (ROS) as compared to the untreated control. In addition, the 48 h cultured cells with HA pretreatment for 48 h also increased ROS as compared to the untreated control. HA-pretreated cells develop highly scattered and spindle-shaped cells with few observable cell–cell contacts, and contain more filopodia. *In vitro* wound-healing assay showed that JB6 Cl41 cells with HA pretreatment increased the migrating growth. Furthermore, transformed foci of JB6 Cl41 cells following the HA pretreatment were observed after 6 weeks culture. In anchorage-independent growth assay, we found that HA promoted the colony formation and that colonies were inhibited by antioxidant *N*-acetyl cysteine (NAC). Our results suggest that HA may promote the transformation of epidermal cells and that this process is mediated by the generation of ROS.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Humic acid; Promotion; Transformation

### 1. Introduction

Humic acid (HA) is a group of high-molecular weight polymers that result from the decomposition of organic matter, particularly dead plants. It consists of a mixture of closely related complex aromatic polymers and exists

abundantly in peat, soil, well water, and other sources. HA has been implicated as a causal factor of Blackfoot disease (BFD) [1–4], which an endemic peripheral vascular disease prevailing on the southwest coast of Taiwan [5], and Kashin–Beck disease, which is a chronic osteoarthritic disorder with necrosis of chondrocytes prevailing in Mainland China [6]; as well as other diseases, including goiter and cancer [7,8]. In addition, HA has been found to induce oxidative damage, growth retardation and apoptosis in human fibroblast and that may play a role in the pathogenesis of BFD [9]. It has

\* Corresponding author. Tel.: +886 4 24730022;

fax: +886 4 23248189.

E-mail address: tht@csmu.edu.tw (T.-H. Tseng).



## The diabetogenic effects of the combination of humic acid and arsenic: In vitro and in vivo studies

Cheng-Chieh Yen<sup>a,c,\*</sup>, Fung-Jou Lu<sup>b</sup>, Chun-Fa Huang<sup>c</sup>, Wen-Kang Chen<sup>a,b</sup>,  
Shing-Hwa Liu<sup>c</sup>, Shoei-Yn Lin-Shiau<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Occupational Safety and Health, College of Health Care and Management, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

<sup>b</sup> School of Applied Chemistry, College of Health Care and Management, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

<sup>c</sup> Institute of Toxicology, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

<sup>d</sup> Institute of Pharmacology, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

Received 10 October 2006; received in revised form 18 March 2007; accepted 14 May 2007

### Abstract

Black foot disease (BFD) is a peripheral arterial occlusive disease found among the inhabitants of the southwest coast of Taiwan. Moreover, within the BFD-endemic areas, diabetes mellitus occur at significantly higher rates than in other areas of Taiwan. A high concentration of humic acid (HA), and arsenic (As) are present in the artesian well water from BFD-endemic area. The aim of this paper is to study the diabetogenic effect of the combination of HA and AS. Treatment of HIT-T15 cells with HA, As, or both of them resulted loss of cell viability, apoptosis, depletion of ATP, increment of oxidative stress, activation of caspase 3, and dysfunction of insulin secretion. In addition, the plasma insulin of ICR mice, which were exposed to HA and As in drinking water for 12 weeks, was decreased in the 5, 7, and 12 weeks, and increased at early stage of exposure (3 weeks). The results reported herein reveal that HA and As exert HIT-T15 cell dysfunction and inhibited insulin secretive effects. In addition, the sub-acute peri-pancreatitis and islet damage caused by the infiltration of inflammatory cells after exposure of HA and As in drinking water for 5 weeks. Our study has important implications in the diabetogenic effect of the HA and AS which may be mediated by ROS and further information of the toxicity mechanisms will provide under our progressive studies.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Humic acid; Arsenic; Diabetogenic effect; Insulin; HIT-T15 cells; Oxidative stress

### 1. Introduction

Diabetes mellitus is a complex syndrome characterized by elevated blood glucose level. Most of the causes of diabetes mellitus are still unknown. Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disease in which

antibodies to the beta cells of the islets progressively destroy the beta cells leading to an absolute deficiency of insulin (Le Roith et al., 2003). In the absence of insulin, hepatic glucose production will continue unabated, leading to hyperglycemia. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a genetic disorder with strong environmental influences such as obesity, aging, stress of life, some viral infection, medications and chemicals (Tseng et al., 2002). The disorder is defined as a dual defect; with insulin resistance being detected early followed by dysfunction of the pancreatic beta cells. Clinical examples of this process are seen in patients with impaired

\* Corresponding author at: Department of Occupational Safety and Health, College of Health Care and Management, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan. Tel.: +886 4 24730022x11822; fax: +886 4 23248194.

E-mail address: [ycj@csmu.edu.tw](mailto:ycj@csmu.edu.tw) (C.-C. Yen).

## 附件 4 人才培育

周珊安	台灣大學	職業醫學與工業衛生研究所乙組
楊鎮壕	成功大學	環境醫學研究所甲組
陸堯正	陽明大學	公共衛生研究所甲組
鍾宛瑾	台灣大學	毒理學研究所
	中山醫學大學	生物醫學科學系碩士班
	長庚大學	天然藥物研究所
林靖華	成功大學	環境醫學研究所乙組
	慈濟大學	藥理暨毒理學研究所
李宥萱	成功大學	環境醫學研究所乙組
	中國醫藥大學	職業安全衛生學系碩士班乙組
	高雄醫學大學	職業安全衛生研究所
盧怡珠	長庚大學	基礎醫學研究所
周湘芸	中山醫學大學	毒理學研究所
王儀婷	陽明大學	生醫光電研究所
夏德玲	交通大學	奈米科技研究所
陳柏翰	交通大學	生物科技系碩士班
王勇勝	雲林科技大學	防災與環境工程研究所

市北師 自然科學教育所化學組

葉帝言 台灣大學 毒理學研究所

莊文貞 中山醫學大學 毒理學研究所