

R
0088
4422

私立中山醫學院營養科學研究所

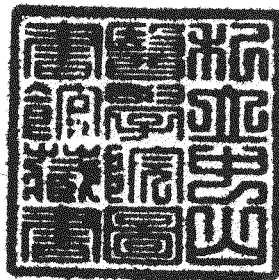
Institute of Nutritional Science
Chung Shan Medical and Dental College

碩士論文

Master Thesis

丙酮醛及維生素 C 對鼯鼠胚胎早期發育之影響

Effects of Methylglyoxal and Vitamin C on the
Development of Mouse Embryos on Early Stage



指導教授: 陳肅霖 博士

Supervisor: Su-Lin Chen, PH.D.

研究生: 黃梨香 撰

Graduate student: Lii-Shung Huang

中華民國八十五年七月

中山醫學院圖書館



C036201

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 營養科學研究所
組 84 學年度第 2 學期所撰 碩士學位論文。

論文名稱：丙酮醛及維生素C對鼯鼠胚胎早期發育之影響

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：陳肅霖

研究生簽名：黃梨香 學號：R8203110
(親筆正楷)

日期：民國 85 年 7 月 28 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄立若未鉤選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：黃梨香 聯絡電話：(04)2320358

地址：台中市北屯區北屯里4鄰青島路四段205號16F

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，
經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格
及口試通過。

口試委員

國立中興大學農學院獸醫系

馮翰鵬 教授

馮翰鵬

台北榮總婦產部主任

吳香蓮 教授

吳香蓮

私立中山醫學院醫學系

周明智 教授

周明智

私立中山醫學院醫學系

李孟智 副教授

李孟智

私立中山醫學院營養科學研究所
(論文指導教授)

陳肅霖 副教授

陳肅霖

中華民國

年

月

學生黃梨香論文題目為丙酮醛及維生素 C 對鼯鼠胚胎
早期發育之影響，其論文已經中山醫學院營養科學研
究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由
其指導教授核閱後無誤。

指導教授：陳肅霖副教授

簽名：陳肅霖

中華民國： 85 年 8 月 2 日

誌 謝

本論文承蒙指導教授 陳肅霖博士悉心指導，稿成復蒙多次詳加批閱，使得以順利完成付梓，感謝之情難以言表。回想三年前，得知自己有此機會進入研究所，重拾學生身份，深感慶幸；且榮幸能成爲陳老師的學生，在學期間，因公、私兩忙致學業常有所延誤，而能得到師長們的諒解；雖如此，卻也能如期完成學位，故非常感謝週遭朋友的精神鼓勵與幫忙。

實驗期間，承蒙鄭自君小姐在實驗過程中的關懷與鼎力協助，使實驗得以順利完成，於此深誌誠摯之謝意；更感謝外子李茂盛及家人的支持與關懷，使我能在無後顧之憂，安心從事此研究工作。

最後感謝所有幫助我的親人與朋友，並感謝護理系郭主任及所有老師的鼓勵與幫忙，願以此微薄之成果與他們共享之。

目 錄

中文摘要.....	1.
英文摘要.....	3
前言.....	5
文獻整理.....	7
一.老鼠胚胎的發育.....	7
二.丙酮醛的背景介紹.....	10
三.維生素 C 的背景介紹.....	12
材料與方法.....	15
一.材料.....	15
(一).實驗動物.....	15
(二).實驗室器械.....	15
(三).使用之藥品.....	17
(四).Basal 培養液配置.....	18
(五).性腺激素之製備.....	19
(六).維生素 C 之製備.....	19
(七).丙酮醛之製備.....	19
二.方法.....	20
(一).誘發超級排卵.....	20
(二).取胚.....	21
(三).輸卵管之洗胚.....	21

(四).鼠胚的培養.....	22
(五).顯微鏡檢及生長記錄.....	22
(六).結果分析及監控.....	23
(七).統計分析	23
結果與討論.....	24
一.控制組鼠胚培養情形.....	24
二.丙酮醛對鼠胚生長之影響.....	26
三.丙酮醛對鼠胚形態之影響.....	28
四.維生素 C 對鼠胚生長之影響.....	29
五.維生素 C 對鼠胚形態之影響.....	31
結論.....	32
參考文獻.....	55

圖表索引

表一.鼠胚體外培養累計總胚胎數.....	33
圖一.排卵與受精.....	34
圖二.胚胎著床前的發育之簡圖.....	35
圖三.腹腔內注射老鼠的人道方法.....	36
圖四.以快速且人道的頸部脫臼法殺死老鼠.....	37
圖五.母老鼠生殖器官的解剖.....	38
圖六.剪下小鼠輸卵管與胚沖洗之關係.....	39
圖七.控制組鼠胚每日生長記錄.....	40
圖八.以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第一日).....	41
圖九.以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第二日).....	42
圖十.以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第三日).....	43
圖十一.以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第四日).....	44
圖十二.以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第五日).....	45
圖十三.以丙酮醛培養鼠胚至囊胚期及孵化之統計圖.....	46
圖十四鼠胚形態觀察(丙酮醛 1mM).....	47
圖十五以維生素 C 對鼠胚進行體外培養(第一日).....	48
圖十六以維生素 C 對鼠胚進行體外培養(第二日).....	49
圖十七以維生素 C 對鼠胚進行體外培養(第三日).....	50
圖十八以維生素 C 對鼠胚進行體外培養(第四日).....	51
圖十九以維生素 C 對鼠胚進行體外培養(第五日).....	52
圖二十以維生素 C 培養鼠胚至囊胚期及孵化之統計圖.....	53
圖二十一鼠胚形態觀察(維生素 C 10mM).....	54

附圖一(A.B.C).控制組鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	63
附圖一(D.E).控制組鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	64
附圖二(A.B.C).丙酮醛在 1mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	65
附圖二(D.E).丙酮醛在 1mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	66
附圖二(F).丙酮醛在 1mM 培養鼠胚每日生長記錄.....	67
附圖三(A.B.C).丙酮醛在 10^{-1} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	68
附圖三(D.E).丙酮醛在 10^{-1} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	69
附圖三(F).丙酮醛在 10^{-1} mM 培養鼠胚每日生長記錄.....	70
附圖四(A.B.C).丙酮醛在 10^{-2} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	71
附圖四(D.E).丙酮醛在 10^{-2} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	72
附圖四(F).丙酮醛在 10^{-2} mM 培養鼠胚每日生長記錄.....	73
附圖五(A.B.C).丙酮醛在 10^{-3} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	74
附圖五(D.E).丙酮醛在 10^{-3} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	75
附圖五(F).丙酮醛在 10^{-3} mM 培養鼠胚每日生長記錄.....	76
附圖六(A.B.C).丙酮醛在 10^{-4} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	77
附圖六(D.E).丙酮醛在 10^{-4} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	78
附圖六(F).丙酮醛在 10^{-4} mM 培養鼠胚每日生長記錄.....	79
附圖七(A.B.C).維生素 C 在 1mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	80
附圖七(D.E).維生素 C 1mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	81
附圖七(F).維生素 C 1mM 培養鼠胚每日生長記錄.....	82
附圖八(A.B.C).維生素 C 10^{-1} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	83
附圖八(D.E).維生素 C 10^{-1} mM 鼠鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	84
附圖八(F).維生素 C 10^{-1} mM 鼠培養鼠胚每日生長記錄.....	85

附圖九(A.B.C).維生素 C 10^{-2} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	86
附圖九(D.E).維生素 C 10^{-2} mM 鼠鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	87
附圖九(F).維生素 C 10^{-2} mM 鼠培養鼠胚每日生長記錄.....	88
附圖十(A.B.C).維生素 C 10^{-3} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	89
附圖十(D.E).維生素 C 10^{-3} mM 鼠鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	90
附圖十(F).維生素 C 10^{-3} mM 鼠培養鼠胚每日生長記錄.....	91
附圖十一(A.B.C).維生素 C 10^{-4} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	92
附圖十一(D.E).維生素 C 10^{-4} mM 鼠鼠胚生長記錄(200 倍放大).....	93
附圖十一(F).維生素 C 10^{-4} mM 鼠培養鼠胚每日生長記錄.....	94

摘 要

丙酮醛為食品梅納反應中最具活性及毒性之物質，而梅納反應為食品製造過程中常見之非酵素性褐變，懷孕婦女及一般人都很容易暴露在此梅納反應的食品環境中，而導致吸收過多之丙酮醛。丙酮醛對原核細胞及真核細胞體外培養的毒性已在許多文獻中獲得證實，但其對胚胎的毒性則尚未有相關的報導，故本篇以性腺激素誘發 ICR(鼯鼠)小鼠超級排卵，使小鼠受孕後，以二細胞期之鼠胚為材料，再以含有不同濃度之丙酮醛培養基培養鼠胚至孵化，逐日記錄其對胚胎生長發育之影響。

根據本實驗結果我們發現，丙酮醛在 10^{-2} mM 時可導致鼠胚生長速度與控制組比較有顯著之差異 ($P < 0.05$)，且丙酮醛對胚胎生長的影響呈現劑量的依存性，丙酮醛於高濃度(1mM)在體外培養四小時即造成胚胎中細胞形態之改變，此時細胞已無明顯之界限，且呈現顆粒狀物質，繼續觀察則出現兩細胞期阻斷之現象。故丙酮醛若累積至具毒性之劑量時會對胚胎造成形態損傷及生長速率之異常。

維生素 C 是一種抗氧化劑，且為自由基之清除者；低劑量下除可抗自由基所產生之畸型效應外，又可預防脂質過度氧化所造成之胚胎毒性；但高劑量下對胚胎仍會造成毒性；而本研究發現維生素 C 之濃度在 10^{-1} mM 以上可導致鼠胚生長速度與控制組比較有顯著之差異 ($P < 0.05$)；而維生素 C (10^{-4} Mm) 在體外培養的第一天可導致鼠胚生長速度增加，低劑量維生素 C 對胚胎有正面的影響，高劑量維生素 C (10^{-1} mM 以上) 對胚胎具有毒性，會導致胚胎萎縮及生長停滯，中、低劑量維生素 C 對胚胎的生長速率及形態皆有正面加強之趨勢，值得更深入探討其對胚胎保護之效果。

關鍵辭：甲基乙二醛、維生素 C、二細胞期胚胎、胚胎毒性

ABSTRACT

Pyruvaldehyde, had been found an important intermediate product of Maillard browning reaction. It is a highly active and mutagenetic compound, Pregnant women and other people easy to expose to that, susceptible a lot of pyruvaldehyde. However studies of the mutagenetic and genotoxicity of pyruvaldehyde has always been focused on Prokaryotic and Eukaryotic cells .

To investigate the suppression of pyruvaldehyde on the development of mouse embryos on preimplantation stage. Two-cell embryos were treated with media containing pyruvaldehyde of different concentration and observed for 5 days.

Growth rate of embryos was depressed in media containing pyruvaldehyde. Microscopic observation indicated that, pyruvaldehyde induced morphological aberation and blocked the development of mouse embryos at concentration above 10^{-2} mM.

Vitamin C acts either as a free radical scavenger or as antioxidant. At low dose, Vitamin C can inhibit lipid peroxidation and embryotoxicity. However, there might be embryotoxicity at higher dose of Vitamin C.

To investigate the suppression of Vitamin C on the development of mouse embryos on preimplantation stage. Two-cell embryos were treated with media containing Vitamin C of different concentration and observed for 5 days

The results show that growth rate of mouse embryos was depressed at Vitamin C higher than 10^{-1} mM. However the development rate of mouse embryos accelerated when the concentration of Vitamin C was lower 10^{-4} mM.

Key words: Pyruvaldehyde, Vitamin C, 2-cell embryos
Embryotoxicity.

前 言

在現今繁榮之社會裏人口素質提高，人口結構趨向精緻化，飲食的講究也隨著時代的進步在改變，由原始之粗食物進展為現代講求之精緻食物，難免對食品過度加工而導致食品中之化學成份進行非生化性反應，產生不利於人體健康之產物，其中丙酮醛即為一例。

在日常生活中，飲食占很重要的部份，而梅納反應(Maillard reaction)為食品製造過程中，常見且重要之非酵素性褐變；而在梅納反應的反應過程中會產生多種之中間產物，其中 Pyruvaldehyde 為活性較強者之一，並已被證實具突變性行(Nagao,*et al*,1986;Kasai,*et al*,1982)；因此在目前情況下，懷孕婦女及一般人都很容易暴露在此梅納反應食品的環境中，因而吸入相當量的丙酮醛；而丙酮醛的毒性已被多篇文獻證實(Brambilla,*et al*,1985;Tucker ,*et al*,1989)。若胎兒在發育過程中長期暴露在丙酮醛裏，則可能影響其正常發展。

維生素 C 是一種抗氧化劑，除 γ 射線、黃嘌呤所致之自由基產生畸型效應具抵抗力(Francis, *et al*,1989, Yoshimura ,*et al*,1993)、預防脂質過度氧化(Nishigori,*et al*, 1986)，又可抑制 Nitroso compound (亞硝化物)的形成，而亞硝基化物為已知之致癌物。但在高劑量下，維生素 C 對胚胎仍會造成毒性 (Pillans, *et al*,1990)，影響其胚胎發育。

而如今知識水準的提高，結婚年齡延後，致高齡產婦增加、生育數減少，加上環境的污染及高科技下的產物，造成畸胎的比率上升(陳，1993)，因而在優生學的講究下，一些科技人員不斷的進行胚胎研究，找出一些不利的因素以避免產生不良的後代而遺憾。

故本實驗之研究目的，係針對二個細胞期可能的傷害做探討，以哺乳類鼯鼠為材料，誘發雌鼠大量排卵，並與雄鼠交配；收集二個細胞期胚胎施以不同濃度之丙酮醛、維生素 C 處理之，觀察胚胎發育至孵化，並記錄其對胚胎形態及發育程度之影響，據以推斷丙酮醛、維生素 C 的胚胎毒性與效應。

文獻整理

一.老鼠胚胎的發育

本研究以老鼠(ICR)為材料，故在此，針對老鼠(C3H)胚胎的發育做文獻整理如下：

(一) 早期分裂: 由兩個細胞到囊胚期

根據 Hogan,*et al.*,(1986)所述，老鼠(C3H)在排卵與受精後，大約24-27小時後(圖一)，會發育到二個細胞中期的胚胎，此時期的胚胎其營養來自卵子形成時所合成的蛋白質與核糖核酸，第二天以後會發育到4-16細胞期之桑椹期(Morula 4-16 cells)；而第三天以後會發育到桑椹期-囊胚期(Morula-Blastocyst)，此時期胚胎外會形成滋胚外層(Trophectoderm)和內細胞團塊(Inner cell mass)，這個分化過程始於胚胎濃縮(Compaction)，當胚胎濃縮時，胚葉細胞會扁平化並增加彼此間的接觸，然後發展出不同的頂部和底部之細胞膜和細胞質的區域。

第四天以後會孵化成沒有透明帶之囊胚(Free Blastocyst without Zona)，繼續形成植入囊胚(Implanting Blastocyst)(圖二)，此時期胚胎外會形成原始內胚層(Primitive Endoderm)；第五天以後會形成卵圓柱體(Egg Cylinder)；第六天以後在原始內胚層內會形成前羊膜空腔(Proamniotic Cavity)，此時期胚胎外會形成賴休德氏膜(Reichert's Membrane)，並與母體藉胎盤外圓錐(Ectoplacental Cone)形成血循並與母親血液交流，繼續形成胚胎軸(Embryonic Axis)；第七天以後，形成早期--中期原始胚胎線(Early-Mid Primitive Streak)，此時期胚胎外已有羊水形成(Amnion)。

(二). 胚胎毒性與畸型

胚胎在發育過程中，常因環境的污染、自由基的產生或工商業中接觸化學物頻繁，導致產下畸型機率增加；有人研究以評估兩棲動物之胚胎於污染之水環境中，會因適應緊迫(Adaptation Stress) 而產生自由基造成胚胎毒性(Melekhova ,*et al*,1994)。

有機物如氫氰鈉(Sodium Nitroprusside, SNP)打入 10.5 天之老鼠胚體羊水中，發現胚胎有形態異常與毒性效應產生；但如加入一種 NO-合成抑制劑(NG-monomethyl-L-arginine, L-NMMA)，則可避免此現象發生(Lee ,*et al*,1994)。

Winn,*et al*,(1995)的研究是以懷孕 9.5 天之 CD-1 老鼠胚胎，用雙苯丙醯尿(Phenytoin)培養，會啓動離體之老鼠胚胎 DNA 氧化作用而造成胚胎毒性，導致神經管縫合遲緩等形態異常，此乃因自由基引起 DNA 氧化作用而造成胚胎毒性；但在加入 Superoxide Dismutase (SOD)或 Catalase 等抗氧化劑後可獲改善。Miranda,*et al*,(1994)的報告指出，Glutathione (GSH)可以降低 ETYA(5.8.11.14-Eicosatetrayonic Acid)對懷孕 9.5 天之 CD-1 老鼠胚胎毒性的影響，由上述可見，自由基可能是導致老鼠胚胎之毒性。

爲了評估氨基酸對胚胎毒性及胎盤轉移情形，Saillenfait,*et al* (1993)以懷孕 10 天之老鼠胚胎，培養在含有氯化鎳之老鼠血清培養液，其中有或沒有加入 L-histidine(2 mM)、L-aspartic acid、glycine(2 or 8 mM)，or L-cysteine (2 mM)，培養 26 小時後，以胚胎存活率、生長與發育、畸型爲指標測試；發現低劑量氯化鎳(0.34 mM)不會影響胚胎發育；但高劑量氯化鎳(0.68 mM)則會造成生長遲滯、腦部與尾狀核畸型；但如高劑量氯化鎳(0.68 mM)與 L-histidine(2 mM)、L-aspartic acid、L-cysteine (2 mM)共同培養，則會降低生長遲滯、腦部損壞之程度。

在 *In vivo* 的實驗裏，以懷孕 10 天之 CD-1 老鼠，以 Methyl Mercuric Chloride (MMC)25 mg/Kg 餵食後，立刻或 24、48、72 小時給與 N-Acetyl-L-cysteine (NAC) 靜脈注射 800 mg/Kg，由 MMC 所引起之胚胎致死效應，可由加入 NAC 者對抗之，且與劑量多寡有關(Ornaghi,*et al*,1993)。

二. 丙酮醛(Pyruvaldehyde)的背景介紹

丙酮醛(Pyruvaldehyde) 又名甲基乙二醛(Methyl Glyoxal)為食品梅納反應(Maillard Reaction)中，甚為常見之中間產物(Hodge, *et al.*1953)。因 α -Dicarbonyl 官能團的共軛雙鍵及甲烷基等所具有的電子供應基(Electron Donor)功能的強化，丙酮醛的羰基甚易參與親核性及親電子性的加成反應(Nucleophilic & Electrophilic Addition)，其中，尤以羰-氨(Carbonyl-Amine)縮合反應更值得注意。此乃因人體的組成份中，含氨基的化合物如蛋白質、核酸等，含量甚多且其生物功能甚為重要。Morita and Kasimura(1991)發現 d-Fructose 6-Phosphate 的羰基會與 DNA 及其單體進行梅納反應而產生發色物質(Chromophores)及熒光物質(Fluorophores)。故丙酮醛對生物的毒性是可預期的。

丙酮醛普遍存於一般生物材質中的活性化物，不僅出現在活體組織內，在某些食品如果汁、啤酒、可樂、醬油、可可、味噌、咖啡(Shibamoto & Hayashi.1985)、麵包、烤洋芋、焦糖(Kasai, *et al.*1982)、油脂食品(Niyati-Shirkhodaee & Shibamoto 1993)等亦常發現。

。由其他文獻指出丙酮醛會造成培養的哺乳動物細胞的DNA-蛋白質交聯(Cross-Links)(Brambilla, *et al.*,1985)、基因突變(Mutation)(Cajelli,*et al.*,1987)、姐妹染色體交換(Sister-Chromatid exchanges,SCES)(Tucker,*et al.*,1989)、染色體變異(Chromosome Abberations,CAs)(Nishi,*et al.*,1989)、產生小核(Micronucleus)(Migliore,*et al.*,1990)等等。Migliore,*et al.*(1990)研究人類淋巴細胞(Human Lymphocytes)中，發現加入丙酮醛會使其染色體變異及產生小核；此外，亦發現丙酮醛的劑量在 0-72 μ g/plate 間，其對 *Samonella typhimurium* TA102 與 TA104 的致突變性與劑量成線性正相關。

Nagao,*et al*,(1986)等報告，發現在大鼠皮下注射丙酮醛具有啓動(Promote)腸道腫瘤的作用。

根據 Kasai and Nishimura(1986) 、 Ueno,*et al*,(1991)指出紫外線過度曝曬所造成的皮膚燒傷、發炎、老化、乃至癌症等，主要係因油脂受到紫外線作用氧化產生甲醛、乙二醛(Glyoxal)、丙烯醛(Acrolein)、Malonaldehyde、及丙酮醛等含羰化合物所致；其中以乙二醛、丙酮醛尤具突變潛力。

Takahashi,*et al*,(1989)亦指出如老鼠(Wister rats)餵以 N-methy-N-nitro-trosoguan-idine，則在胃幽門處產生腺癌的機率提高。Tucker,*et al*,(1989)以中國倉鼠(Chinese Hamster)之卵巢 AUXB1 細胞及人類末梢淋巴細胞之反應，發現:1,2-Dicarbonyls 如 Glyoxal、Methylglyoxal、Kethoxal 等，易誘導 AUXB1 細胞增加發生姐妹染色分體交換及染色體加倍現象。Glyoxal、Ketho-xal 等，只誘導人類末梢淋巴細胞(ERCs)現象。這些 *in vitro* 實驗結果，指出 1,2- Dicarbonyls 在某些食物及飲料中造成遺傳毒性上，也許扮演著重要角色。

研究由 Pyrolysates of Carbohydrates 誘導中國倉鼠 V79 細胞，產生染色體變異(Chromosome Abberations)中，發現 Glyoxal 與 Methylglyoxal 顯著誘導出染色體變異(Yoshisuker,*et al*,1989)。

上述有關活體的毒性試驗，主要以腸道為對象，其前題主要基於腸道細胞受丙酮醛的影響較為直接。而腸道中丙酮醛極易進一步經由吸收進入血液，是否藉由循環系統擴散到骨髓，甚至生殖腺體，或直接造成婦女胚胎早期傷害。有關這方面的研究迄今尚未有相關的報導。

三. 維生素 C(L-Ascorbic acid)的背景介紹

維生素 C 是一種白色結晶，其結構簡單與單醣類有密切相關，植物及大多數動物可用葡萄糖及單醣合成，具有活性者有兩種型式：(a). 左旋抗壞血酸(L-Ascorbic Acid 還原態)及(b). 左旋去氫抗壞血酸(L-Dehydroascorbic Acid 氧化態)，具水溶性、穩定性不佳、容易受破壞，可因熱、光、鹼、氧化酵素、微量銅與鐵存在而加速氧化，在酸性環境或溫度降低時，維生素 C 的氧化會大幅減少；維生素 C 的生化功能為：(趙，1989)

(1). 可形成膠質，此膠質是結締組織之主成份，其原始結構中含有兩種罕見之氨基酸，羥脯氨酸(4-Hydroxylprolin) & 羥離氨酸(5-Hydrolyisine)，分別為脯氨酸(Proline) & 離氨酸(Lysine) 經由羥化(Hydroxylation)形成，所以如維生素 C 缺乏，則 hydroxylation 反應不正常，致無法形成膠質與纖維，造成皮膚損壞、傷口不易癒合、血管變脆、牙齦出血等副作用。

(2). 可參與氧化還原反應，維生素 C 在羥化反應扮演重要角色如下

- a. 色胺酸(Tryptophan)轉化為血清促進素 (Serotonin)，是一種重要的神經傳導物質及血管收縮素。
- b. 可由酪胺酸(Tyrosine) 製造新腎上腺素(Norepinephrin)。

所以如維生素 C 缺乏，病人會有一些血管及神經活動異常。

(3). 維生素 C 與 Adrenal Corticosteron 合成有關

因腎上腺皮質(Adrenal Cortex)含有多量維生素 C，若用腎上腺皮質刺激素(ACTH)刺激或是體內受到感染，則維生素 C 量會減少、Hydrocorticosteron 量增加以應付生理狀況。

維生素 C 是一種重要的抗氧化劑，在保護維生素 A、維生素 E 及多元不飽和脂肪酸避免過度氧化中，極具功能，下列文獻可知：
Pillans, *et al*, 1990 研究發現，以懷孕 11 天之 C3H 母鼠，餵以 3.34 g/Bw 及 6.68g/Bw 之維生素 C，並交叉使用會致畸型劑量之 CP(cyclophosphamind)15 mg/Bw，於服藥後 16 時分析胚胎之腦細胞有否 DNA 斷裂現象(DNA-strand Breaks)，藉記錄死胎體重、形態異常及胚胎死亡率(Fetal Mortality)以評估維生素 C 之效用；結果發現，服用低劑量維生素 C(3.34 g/Bw)者，沒有呈現毒性效應，服用高劑量維生素 C(6.68 g/Bw)者，則有 46%($P < 0.001$) 之胚胎死亡率發生；其死胎體重：加入 CP 這組 < 控制組(678 mg < 967 mg) ($P < 0.001$)；服用高劑量維生素 C(6.68 g/BW)者，對胚胎會造成毒性，而用低劑量(3.34 g/BW)者，對胚胎不會造成毒性，且對 CP 造成毒性有防禦效果；可是，此保護系統與預防腦細胞 DNA-strand breaks 現象無關。

Eriksson *et al*(1991)研究糖尿病鼠中，取胚胎施以 50 m mol/L 之葡萄糖約 48 時培養，發現胚胎有生長遲滯現象及先天性畸型產生。
Anne, *et al*, (1989)的研究發現老鼠胚胎如以 Xanthine/Xanthine Oxidase 培養，其自由基(Free Radical)對胚胎的傷害，可由加入左旋抗壞血酸來改善之。
Yoshimura, *et al*(1993)研究發現黃金鼠胚胎 GHE(Golden Hamster Embryo)，以 γ 射線在 77K & 295 K 劑量照射下會產生自由基，且隨劑量的增加，其自由基產生愈多，但如加入維生素 C 則可抑制此作用。

Nishigori *et al*(1986)以十五天大之雞胚(Chick Embryos)，施以 Hydrocortisone Hemisuccinate Sodium (HC)，發現產生白內障的機率增加(以測 Lipid Peroxide ,LPO 為指標)，即 LPO 增加；如使用抗氧化劑(如維生素 C、維生素 E)，則可預防白內障及 LPO 下降。

因維生素 C 是一種水溶性維生素，一般人常當為健康食品而濫用；而文獻指出高濃度時，對胚胎易造成毒性，且腸道中維生素 C 仍極易經由吸收進入血液，雖然濃度高時由尿中排泄，但過度攝取會有腹瀉、草酸鹽石腎結石現象(端， 1991)；而由循環系統擴散到骨髓，甚至生殖腺體，是直接造成懷孕婦女的胚胎早期傷害、或具有防禦系統，是值得我們進一步研究。

材料與方法

一.材 料

(一).實驗動物

小白鼠品系為 ICR 鼯鼠，購自國科會動物中心，約 3-5 週大的小鼠，放置於中臺醫專動物實驗室飼養。於飼養時間給予充份的水份及飼料，飼料採用福壽牌老鼠實驗動物配合飼料飼養。內含粗蛋白質 23.5%以上、粗脂肪 4.5%以上、粗纖維 6%以下、水份 12%以下、灰份 9%。飼養溫度為 23 °C、濕度為 45-60%，光照時間：黑暗時間為 14 時：10 時，需讓小鼠適應環境 1-2 週後，才開始準備實驗。

(二)、實驗室器械：

A.儀器設備

- 1.電動電子顯示天秤(Mettler Toledo ,Auto-balance, MT AB 104 Switzerland)
- 2.雙眼立體顯微鏡(解剖顯微鏡)(Nickon, Japan)
(double eye stereomicroscope,Nickon, Japan)
- 3.倒立位相差光源顯微鏡
(interted transmitted-light microscope, Nickon, Japan)
- 4.CO2 培養箱(CO2 incubator Heraeus Instument, Germany)
- 5.磁性電動攪拌器(Corning stirrer)
- 6.自動滲透壓測定儀(Osmometer automatic precision system U.S.A)
- 7.無菌操作台(Laminar flow,造鑫公司,R.O.C)

B. 其它物品

1. 解剖剪(Dissection scissors)
2. 口吸管(Mouth pipet)
3. 本生燈
4. 毛細管(Capillar)
5. 四孔培養皿(4 well culture dish ,Nunc).
6. 可丟棄之滅菌過濾瓶 0.2 μ m, (Disposable filterware, Nalgene)
7. 可丟棄注射筒(Disposable sterile syringe)
8. 器官組織培養皿(Organ tissue culture dish 60 \times 15 mm style with center well, Falcon 3037)
9. 可丟棄組織培養皿(Disposable tissue culture dish 35 \times 10 mm Falcon 3001)
10. 可丟棄之滅菌過注射筒過濾器 0.2 μ m, (Disposable sterile syringe filters)

(三).使用之藥品

1. 硫酸鎂(Magnesium Sulfat, Sigma, St. Louis, MD, USA)
2. 氯化鉀(Potassium Chloride, Sigma, St. Louis, MD, USA)
3. 水合氯化鈣(Calcium Chloride Dihydrat Sigma, St. Louis, MD, USA)
4. D 型葡萄糖水(D⁺ glucose, Sigma , St. Louis, MD, USA)
5. 氯化鈉(Sodium Chloride, Sigma, St. Louis, MD, USA)
6. 丙銅酸鈉(Sodium Pyruvat , Sigma, St. Louis, MD, USA)
7. 麩氨酸 L-glutamin(L-2-Aminoglutaramic st. Louis, MD, USA)
8. 酚紅(Phenol red, Merk Darmstadt F.R. Germany)
9. 鹼性磷酸鉀(Potassium Phosphat Monobasic St. Louis, MD, USA)
10. 青黴素-鍊黴素 Penicilline-Streptomycine Gibco NY. USA)
11. 液體礦物油.(Liquid Mineral Oil Sigma St. Louis, MD, USA)
12. 碳酸氫鈉(Sodium Bicarbonate Sigma St. Louis, MD, USA))
13. EDTA(Ethylene Diaminetetra Acetic Acid Disodium Salt Dihydrate Gibco BRL NY. USA)
14. 妊馬血清性腺激素(PMSG Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Sigma St. Louis, MD, USA)
15. 人類絨毛膜促性腺激素(HCG Human Chorionic Gonadotropin , Serono-Rome Italy)
16. 甲基乙二醛(Methylyoxal , Sigma St. Louis, MD, USA)
17. 維生素 C(Ascorbic Acid, 台裕製藥廠 R.O.C)
18. 乳酸鈣(Na-Lactat , Sigma St. Louis, MD, USA)

(四) Basal 培養液配置(根據 Quinn,1995)

Basal medim 培養液成份表

成份	濃度
NaCl	97.6mM
KCl	4.7 mM
KH ₂ PO ₄	0.37mM
MgSO ₄	0.2mM
Na-Lactat	3.05mM
Na-pyrurat	0.33Mm
D -Glucose	2.8mM
NaHCO ₃	25mM
CaCl ₂	2.03mM
EDTA	0.1mM
penicillin-stretomycin	0.001%
Glutamine	1mM

- 1.用以上之基本培養基成份，加入去離子無菌水,用磁性電動攪拌器(stir plat) 攪拌,泡成一公升溶液培養液。
- 2.利用自動滲透壓分析儀(Osmometer Automatic),將先前泡好之培養液滲透壓調整至 $280 \pm 5 \text{ m Osm/Kg}$ 。
- 3.將調整好滲透壓之培養液,以 $0.2 \mu \text{ M}$ 之可丟棄滅菌過濾瓶過濾,保存時應置於 4°C 溫度下。
- 4.配製時先將 CaCl_2 單獨溶於一小燒杯中,待其餘成份溶解後再加入 CaCl_2 , 調整滲透壓至 $285 \pm 5 \text{ m Osm/Kg}$, 以 $0.2 \mu \text{ m}$ 之可丟棄滅菌過濾器過濾, 並置於 4°C 下保存。

5. 培養液使用時,先置於 37°C 培養箱中約16~18小時,使ph值調整至7.4-7.5左右,方可使用。

6. 本配置好之培養液,如超過兩週即丟棄。

(五).性腺激素之製備

預先將性腺激素(PMSG, HCG)以生理食鹽水或蒸餾水稀釋至100 IU/ml,將每次的使用量分裝於小瓶中冷凍於 -20°C ,以待使用。

(六).維生素C之製備

取維生素C(100mg/ml) $176\ \mu\text{l}$ 加入10ml之 Basal Medim 培養液中,以10倍序列稀釋法配至本實驗所需之濃度以備用。

(七).丙酮醛之製備

取丙酮醛(6.5m mole, 40% 水溶液) $102.6\ \mu\text{l}$ 加入10ml之 Basal Medim 培養液中,以10倍序列稀釋配至本實驗所需之濃度以備用。

二 方 法

本實驗參考 Hogan, *et al.*, (1986) 之方法略作修正，其步驟包括誘發超級排卵、鼠胚的採取、輸卵管之洗胚、鼠胚的培養、顯微鏡檢及資料收集、結果分析及監控等項，茲分述如下：

(一) 誘發超級排卵：

選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠，以藥物施以誘發超級排卵(Superovulation Induction)其方法為：

1. 週一下午 3-6PM 時以腹腔注射法(圖三)注射 10IU PMSG.
2. 週三下午 3-6PM 時注射 10IU 之 HCG，於注射 10IU 之 HCG 後,立刻將一母鼠與一公鼠置入一籠內(1:1)讓其互相交配。
3. 週四下午 3-6PM 觀察雌鼠是否有陰道塞(Vaginal Plug)，作為判斷交配與否之根據；不同時期的鼠胚，其取出的時間也不同；通常於注射 HCG 後約 40~44 時可以取得二細胞期之鼠胚，因此安排具有陰道塞之雌鼠於週五早上九點取胚。
4. 取胚前一天，將含對照組及不同濃度之丙酮醛或維生素 C 之培養液分別取 50 μ l 兩滴滴於四孔培養皿中，再覆蓋礦物油於培養基上，置於 37°C，5%CO₂ 培養箱中過夜，以調整酸鹼值，待用。

(二).取胚

先將老鼠施以頸椎脫臼法(Cervical Dislocation)(圖四)，再以 75% 酒精消毒腹部。以消毒過的小剪刀及鑷子，打開老鼠的腹腔，將其腹部的毛皮往上掀。

在下腹腔的部位找出子宮，老鼠為雙子宮，延著子宮往上可發現卵巢，輸卵管則介於卵巢與子宮之間，為一螺旋管狀(圖五)。取下輸卵管時應先以鑷子夾住子宮，在其下方剪斷，再延著子宮、輸卵管、卵巢，在卵巢的下方剪斷，避免剪破壺腹膜(Ampulla)，並置於培養皿中(圖六)；以同樣的方法取下另一邊輸卵管。不可將不同隻老鼠的輸卵管置於同一培養皿中。以免干擾每一隻老鼠胚胎數之判定。將剪下的輸卵管置於藏有預先做好酸鹼平衡的培養液之可丟棄培養皿中。

(三).輸卵管之洗胚

將培養皿置於解剖顯微鏡下，取一 30G 針之 1cc 胰島素空針，充滿預熱之磷酸緩衝液(PBS)，先把針頭磨鈍，避免洗胚時插入輸卵管壁；以針頭將輸卵管割破，用鑷子夾住輸卵管，使胚胎順利洗出，沖洗的量不要超出 0.1ml，沖洗的量愈少愈容易找胚，檢視培養皿確認鼠胚已被洗出，如果還未發現鼠胚，亦可用針頭及鑷子將輸卵管逐段剝開，此方法須花費較多的時間，同時也會遺漏一些鼠胚；將另一邊輸卵管內的鼠胚也洗出，再將兩邊輸卵管洗出的鼠胚混合，挑出 2-cell 胚胎平均分配於各個不同濃度培養基中。

如果洗出的鼠胚有超過 25%，不是 2cell 胚胎(其中包括未受精的卵，1-cell 胚胎或超過 2-cell 的胚胎)，則此隻老鼠的鼠胚不可用於實驗；將不合本研究需用的鼠胚剔除，包括未受孕之卵子，1-cell 的胚胎，超過 25% 碎片的胚胎，及超過 2-cell 的胚胎。

(四). 鼠胚的培養

1. 將取出合用的 2-cell 期胚胎，均分成不同濃度之實驗組與控制組，並放入 CO₂ 之培養箱中培養的。
2. 每天定時觀察胚胎發育情形並記錄其不同濃度之胚胎數。

(五). 顯微鏡檢及生長記錄

每天定時將培養皿置於解剖顯微鏡下，觀察各不同濃度之培養皿中胚胎的發育情形，確實記錄其變化；以電子顯微鏡直接將每天每種濃度下之胚胎發育形態拍攝下來並記錄。

(六).結果分析及監控

鼠胚每 24 小時觀察一次，每次培養觀察五天，並記錄不同培養基所有的鼠胚生長情形。觀察的時間應儘可能縮短，以免改變培養液的 pH 值及溫度，影響鼠胚的發育；如果低於 75% 的鼠胚發育至孵化，則此受測試之培養液不合格應丟棄；觀察鼠胚發育時間，比較不同隻老鼠間鼠胚發育的差異，如果發育率低於 50%，則不列入分析。

(七).統計分析

本實驗結果之統計分析，以卡方檢定(Chi-square)分析實驗組與控制組之間是否有差異(p 值設定為 0.05)。

結果與討論

鼯鼠是一種雜交品種的小白鼠，發育良好，且生殖力強；仔鼠於三週齡離乳，採逢機族群配對；其動情週期為四天、平均發情時間為13小時、懷孕期為21天、公母鼠的配種年齡為7週；而本實驗是以二細胞期的鼯鼠胚胎為材料，觀察丙酮醛及維生素C對胚胎早期發育之影響。以不同濃度之丙酮醛及維生素C以體外培養之方式培養早期鼠胚並記錄、照相其生長狀況，共記錄五天；各濃度體外培養之鼠胚總數，見表一。現將實驗結果分述如下

一. 控制組鼠胚培養情形：

圖七為鼠胚於控制組培養基中每日生長狀況之統計長條圖：觀察之第一天為注射HCG後72小時，亦即取2-細胞胚胎後(體外培養)24小時的胚胎發育狀況，其中長到桑椹胚的占5%，4-8細胞期占約70%，而仍有25%停留在二細胞的階段。

觀察的第二天則有約55%已發育至桑椹胚，甚至有8%發育至囊胚期，而仍停留於二細胞期的胚胎則占總數的13%，這些二細胞期的胚胎一直到第五天皆沒有繼續生長，出現二細胞期停滯(2 cell block)的現象。

第三天的胚胎有4%已達孵化階段，48%長至囊胚期，28%為桑椹胚，第四天則有63%發育至囊胚期以上，孵化的有22%，統計至第五天共有66%發育至囊胚期以上，且有34.5%達孵化之程度。其發育之形態則逐日以光學顯微鏡拍照記錄，詳見附圖一(A,B,C,D,E)。

由圖七，可知控制組之鼠胚發育情形與(Hogan,*et al*,1986)所述之步驟雷同；並與(Dubin N,*et al*,1995)所提到之控制組鼠胚發育情形，第一天其控制組之鼠胚 4-16 細胞期占約 100%，第三天控制組之鼠胚已有 91%發育至囊胚；而本實驗控制組之鼠胚其第一天控制組之鼠胚 4-8 細胞期占約 70%，第三天控制組之鼠胚只有 76%發育至囊胚以上，其差異有可能是環境、營養因素引起，亦或培養基之培養液、溫度、PH 值、毒素等所致，且胚胎採體外培養，其影響因素仍需考慮在內。

二.丙酮醛對鼠胚生長之影響

本實驗分別以含有 1mM、 10^{-1} mM、 10^{-2} mM、 10^{-3} mM、 10^{-4} mM 之丙酮醛的培養基培養兩細胞期的鼠胚，逐日記錄各濃度每日生長情形。(詳見附圖二至六之 A.B.C.D.E.F)爲了便於比較，以控制組爲標準，第一日的生長情況以四細胞爲正常發育速度，統計各濃度四細胞期前後的生長數量占總胚胎數之百分比，不同濃度增高的丙酮醛對鼠胚的生長速度有降低的趨勢，1mM, 10^{-1} mM, 10^{-2} mM 三組濃度具有統計上的意義，(P 值 < 0.05)，生長統計圖詳見 (圖八)。

第二日的生長情況以生長至桑椹胚期爲正常發育速度，各濃度在此期前後的生長數量占總胚胎數之百分比詳見(圖九)，不同濃度的丙酮醛對鼠胚的生長速度亦有延滯的趨勢，除 10^{-4} mM 的濃度對胚胎沒有顯著的影響外，其餘濃度皆降低胚胎生長速率且具有統計上的意義(P 值 < 0.001)；而 10^{-3} mM 的濃度對胚胎雖沒有顯著的影響，但 P 值 = 0.04，仍接近有差異。

第三日的生長情況以生長至囊胚期爲正常發育速度，各濃度在此期前後的生長數量占總胚胎數之百分比詳見(圖十)，不同濃度的丙酮醛有延滯鼠胚生長的趨勢，且具有劑量的依存性，1mM, 10^{-1} mM, 10^{-2} mM 三組濃度都能顯著地延滯細胞的生長(P 值 < 0.001)。

第四日已有少部份胚胎孵化，其影響情形與第三日類似(圖十一)。第五日則以達孵化的胚胎為指標，此期生長的趨勢與第三、四日相似， 10^{-3} 、 10^{-4} mM 對胚胎的影響不大， 10^{-2} mM 丙酮醛的孵化率僅 14%，大約為控制組的二分之一，而高濃度幾乎無法達到孵化(圖十二)。

由(圖十三)，不同濃度丙酮醛對二細胞期鼠胚最終達到囊胚及孵化程度的統計圖可明顯看出，隨著濃度的增加，胚胎的發育速率逐漸降低，具有統計上的意義並有劑量的依存性，丙酮醛對胚胎的體外培養在 10^{-2} mM 的濃度以上，對囊胚及孵化皆具有顯著的抑制現象。

由以上結果得知，高濃度之丙酮醛對胚胎會產生抑制作用，且在 10^{-2} mM 的濃度以上有顯著的毒性，而丙酮醛普遍存於一般生物材質中，且為食品梅納反應常見之中間產物，不僅出現在活體組織內，在一般食品中亦常可發現；Nishi Y.*et al.*(1989)研究中國倉鼠之 V79 細胞發現丙酮醛造成染色體變異，亦具有劑量的依存性(劑量 $> 40 \mu\text{g/ml}$)($\doteq 0.55\text{mM}$)，且有顯著的差異。與本研究之濃度趨勢相似，而本實驗之濃度於 10^{-2} mM 即有毒性，是表現在二個細胞期，故濃度較高即產生毒性；中、低濃度之丙酮醛與控制組比較雖沒有顯著的差異，有可能是細胞會分泌酵素將丙酮醛氧化裂解，此外，丙酮醛因化性不穩，極可能在細胞培養過程中，即已降解導致有效劑量偏低，亦是可能原因之一。

三. 丙酮醛對鼠胚形態之影響

丙酮醛對鼠胚形態影響，於高濃度培養時可以明顯看出會造成細胞形態改變(圖十四)，控制組的胚胎於體外培養四小時，胚胎內的細胞於四百倍時，可以看到細胞核，而經高濃度丙酮醛處理過的胚胎，無法看到細胞核且細胞表面凹凸不平，呈現顆粒狀，不會再繼續生長，於二細胞期即發生阻斷情形。中、低濃度時，丙酮醛對胚胎形態影響較不明顯。

Tucker, *et al.* (1989)，以中國倉鼠之卵巢 AOX 細胞測試四種不同之 1,2-dicarbonyls (Glyoxal, Kethoxal, Methylglyoxal, Hydrogen peroxide) 對其細胞之變化，發現有姐妹染色體交換 (SCEs) 及染色體加倍 (ERCs) 現象；且有劑量的依存性，造成染色體加倍以 Kethoxal 之劑量最少 ($75 \mu\text{M}$) 產生最強之反應，而 Glyoxal, Methylglyoxal 及 Hydrogen peroxide 之最低顯著劑量分別為 $200 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ 及 $160 \mu\text{M}$ ；此外，Migliore, *et al.* (1990) 研究丙酮醛對 *Salmonella typhimurium* (TA102 & TA104) 呈現線性劑量反應，其對人類淋巴細胞產生突變之劑量，由 0.5mM 起即有顯著的差異並有劑量的依存性；而本實驗對胚胎形態之影響亦有劑量的依存性而產生不同之變化。

四. 維生素 C 對鼠胚生長之影響

本實驗分別以含有 1mM. 10^{-1} mM. 10^{-2} mM. 10^{-3} mM. 10^{-4} mM 維生素 C 的培養基培養兩細胞期的鼠胚，逐日記錄各濃度每日生長情形統計圖及形態記錄。(詳見附圖七至十一之 A.B.C.D.E.F)

同樣的以控制組為標準，第一日的生長情況以四細胞為正常發育速度，統計各濃度四細胞期前後的生長數量占總胚胎數之百分比，觀察不同濃度的維生素 C 對鼠胚的生長速度的影響，除 1mM 對胚胎發育速率有明顯降低之影響外， 10^{-4} mM 對胚胎發育速率與控制組之鼠胚的發育也有顯著的差異，且具有統計上的意義，而 10^{-1} mM. 10^{-2} mM. 10^{-3} mM 的濃度則使胚胎生長速率略為提高，其生長統計(詳見圖十五)。

第二日的生長情況以生長至桑椹胚期為正常發育速度，各濃度在此期前後的生長數量占總胚胎數之百分比(詳見圖十六)，不同濃度的維生素 C 對鼠胚的生長速度影響的趨勢與第一日相同；但 10^{-4} mM 對胚胎發育速率與控制組之鼠胚的發育沒有顯著的差異，不具有統計上的意義。

第三日的生長情況以生長至囊胚期為正常發育速度，各濃度在此期前後的生長數量占總胚胎數之百分比(詳見圖十七)，1mM 及 10^{-1} mM 濃度的維生素 C 對鼠胚的生長速度有降低的現象，但只有 1mM 濃度的維生素 C 對與控制組之鼠胚的發育有顯著的差異，且具有統計上的意義。而 10^{-4} mM, 10^{-3} mM 二組濃度維生素 C 對鼠胚的生長速度略為提高。

第四日，維生素 C 影響情形與第三日類似，但 1mM 及 10^{-1} mM 濃度的維生素 C 與控制組之鼠胚的發育有顯著的差異，且具有統計上的意義(圖十八)。

第五日以達孵化的胚胎為指標，此期生長的趨勢與第三、四日相似， 10^{-3} mM 仍略提高胚胎的生長速度但統計上無意義， 10^{-1} mM 及 1mM 維生素 C 對孵化率的影響為具統計意義之明顯降低(圖十九)。

由(圖二十)看出，不同濃度維生素 C 對二細胞期鼠胚最終達到囊胚及孵化程度的統計圖可明顯看出，維生素 C 在高於 10^{-1} mM 之濃度，對胚胎的發育速率有降低的現象，而其它濃度對成長至囊胚期則無顯著影響，但 10^{-3} mM、 10^{-4} mM 對鼠胚的孵化有增加的現象。

由以上結果，得知維生素 C 對胚胎的發育，當濃度低時具有正面的影響，而濃度高時則有負面的影響，且具有統計上的意義；維生素 C 是一種抗氧化劑，由細胞內產生之重要物質，可保護由自由基產生之副作用(Pillans,1990)，以懷孕 11 天之 C3H 老鼠施以 CP (cyclophosphamide)誘導胚胎產生 DNA 斷裂現象，如加入維生素 C 可以改善染色體細胞脫軌及降低鼠胚之死亡率，並發現低劑 3.34g/Kg 對胚胎體重、生存力沒有影響，而高劑量 6.68g/Kg 使用下有 45%之胎兒死亡率發生；本實驗亦發現維生素 C 在高於 10^{-1} mM 之濃度，對胚胎的發育速率有降低的現象，但 10^{-3} 、 10^{-4} mM 對鼠胚的孵化則有增加的現象。

五. 維生素 C 對鼠胚形態之影響

維生素 C 對鼠胚形態影響，於高濃度培養時會造成細胞形態改變(圖二十一)，同時期實驗組比較無法看到細胞核且細胞呈現萎縮現象，高濃度(10mM)時並有維生素 C 結晶析出，且不會再繼續分裂，於二細胞期即發生阻斷情形，1mM 時胚胎有一小部份發育，但最終仍呈萎縮，不再生長。而中、低濃度時維生素 C 對發育中的胚胎形態影響不大。

Francis & Yoshimura 研究維生素 C 對自由基產生畸型之對抗效應，發現以黃嘌呤、 γ 射線處理鼠胚所造成之神經管縫合異常、自由基產生之量，如加入維生素 C 可改善之，維生素 C 之劑量為 10 或 100 μ M 與控制組有顯著的差異；但高劑量維生素 C(1000 μ M)下與控制組則沒有顯著的差異。

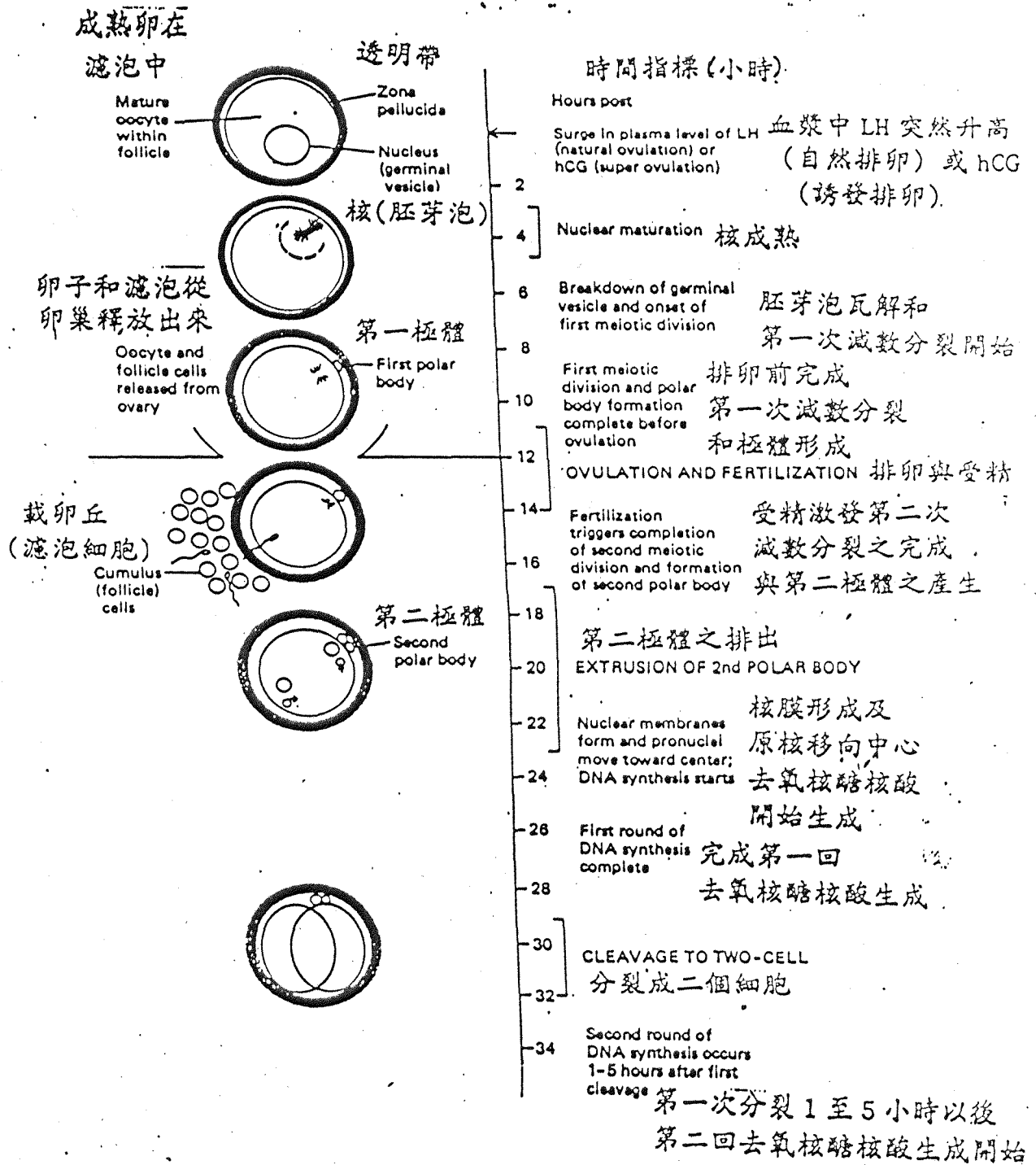
結 論

由於日常生活中必需接觸各種食品，而丙酮醛為食品梅納反應常見之中間產物，但人體的細胞會分泌酵素將其氧化裂解、且丙酮醛化性不穩，會因人體代謝不致於有太大的影響；但如吸入太多，以本研究可看出仍有不利之結果，但其體內多少劑量是致毒性現仍未知，作為下次研究之目標。

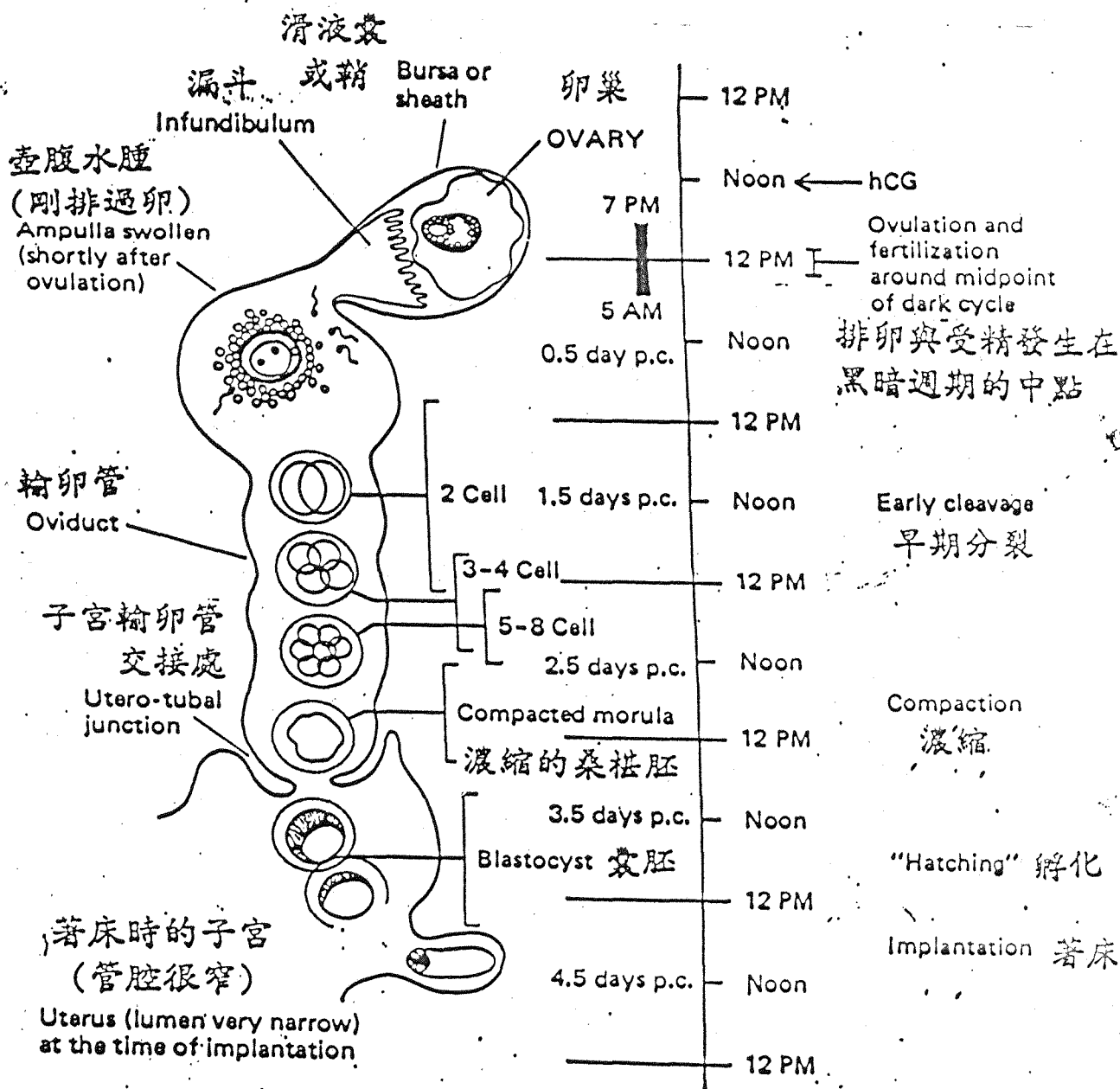
維生素 C 是國人所推崇之保健食品，以為多吃可以增加抵抗力，由本實驗得知，低劑量維生素 C 確實有益於胚胎之生長，高劑量維生素 C 則有害，但維生素 C 是一種水溶性極易由腎臟排除，所以體內之致毒劑量仍需考慮。

表一.鼠胚體外培養累計總胚胎數

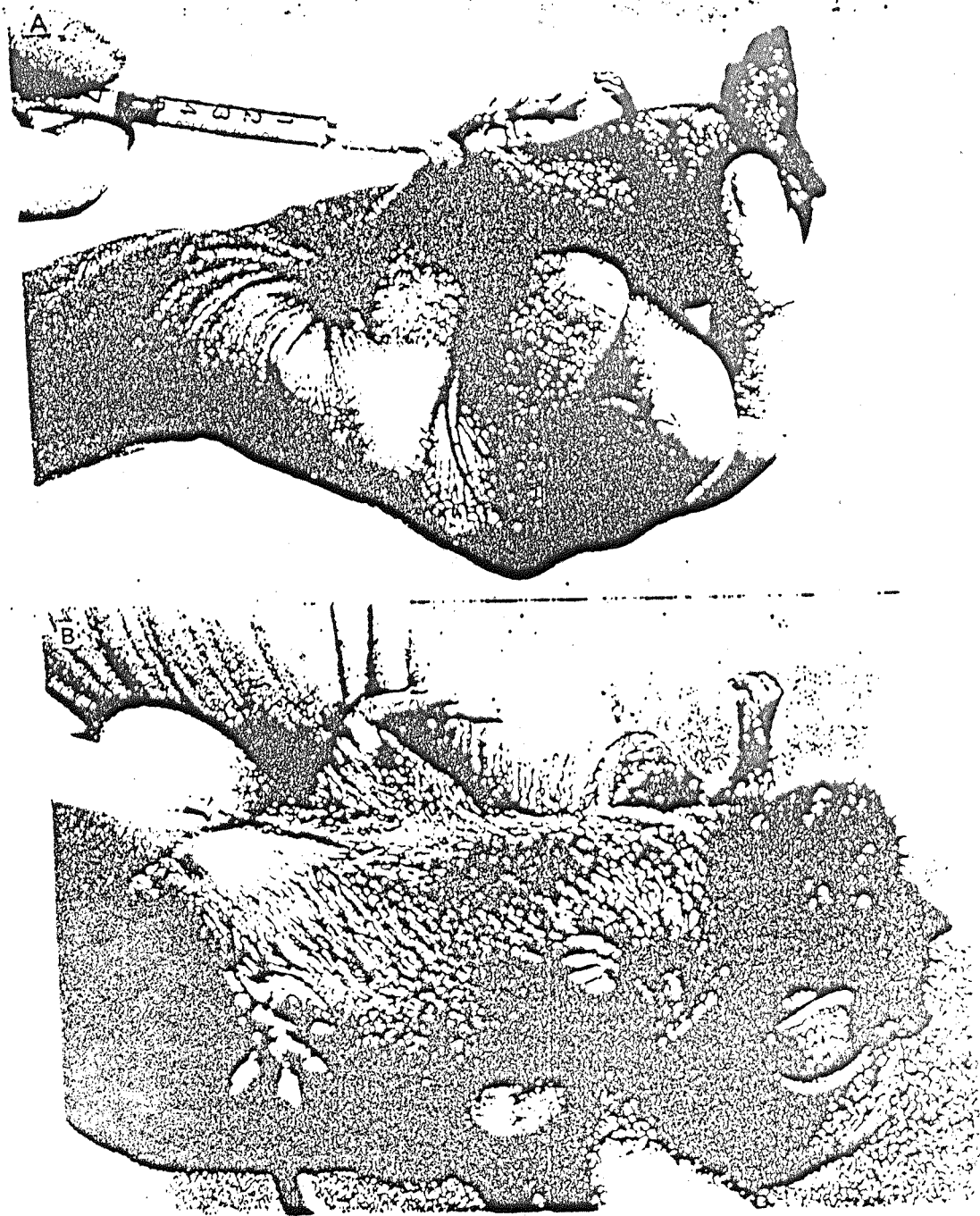
組別	濃度 (mM)	累計總胚胎數
控制組		205
丙酮醛	1	113
	10^{-1}	88
	10^{-2}	99
	10^{-3}	89
	10^{-4}	106
維生素 C	1	104
	10^{-1}	85
	10^{-2}	122
	10^{-3}	93
	10^{-4}	89



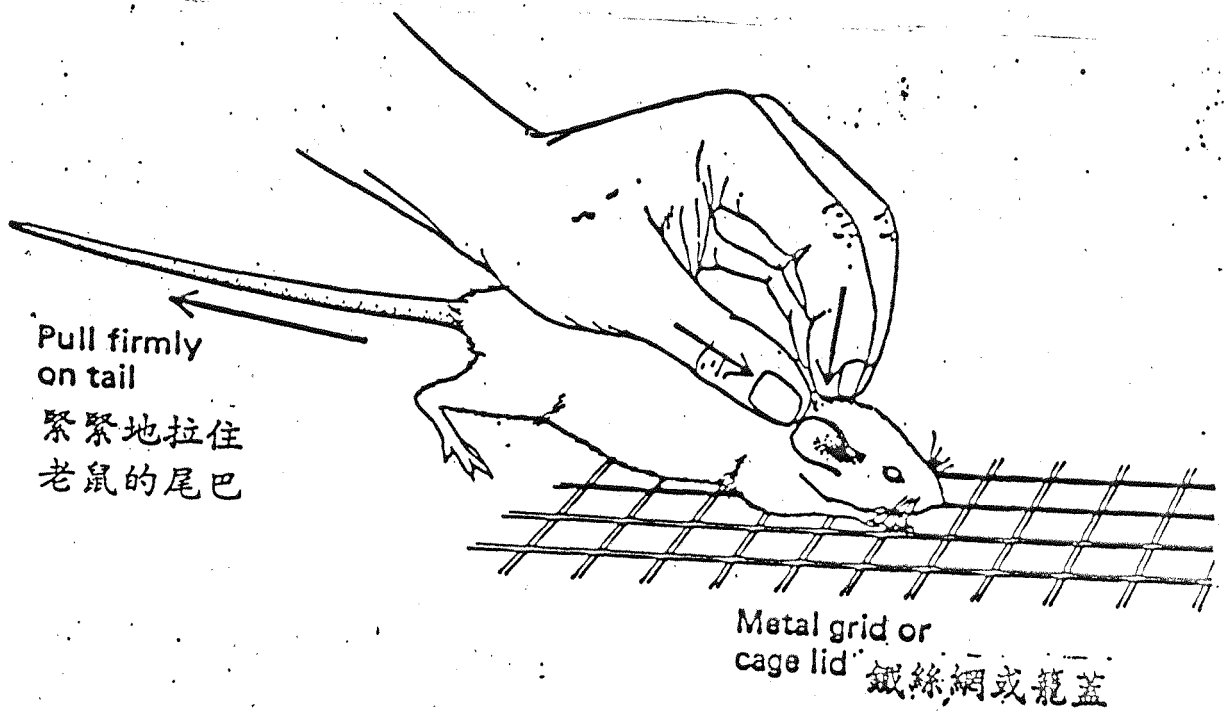
圖一. 排卵與受精 (Hogan, et al, 1986)



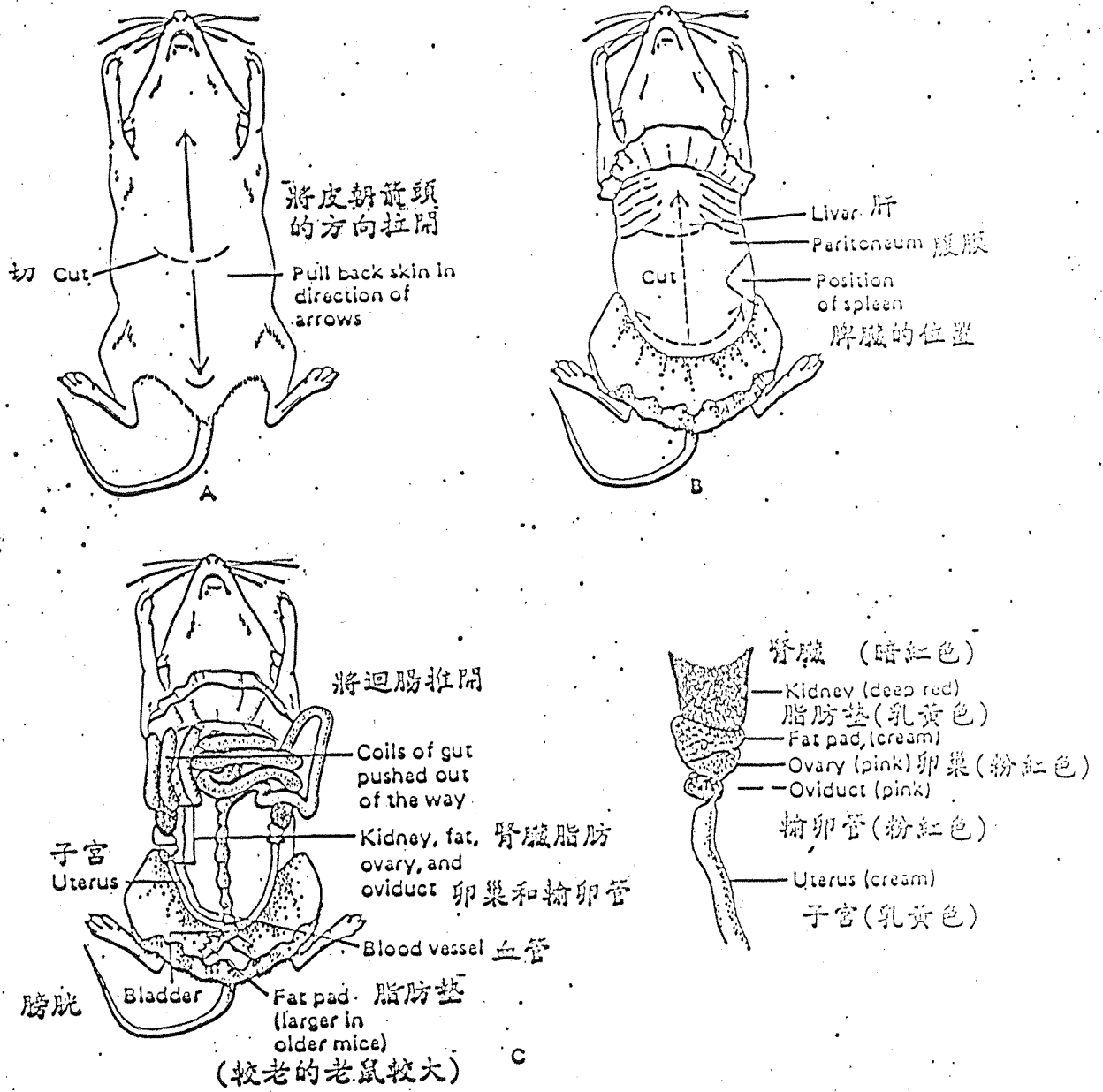
圖二. 胚胎著床前的發育之簡圖(Hogan, et al, 1986)



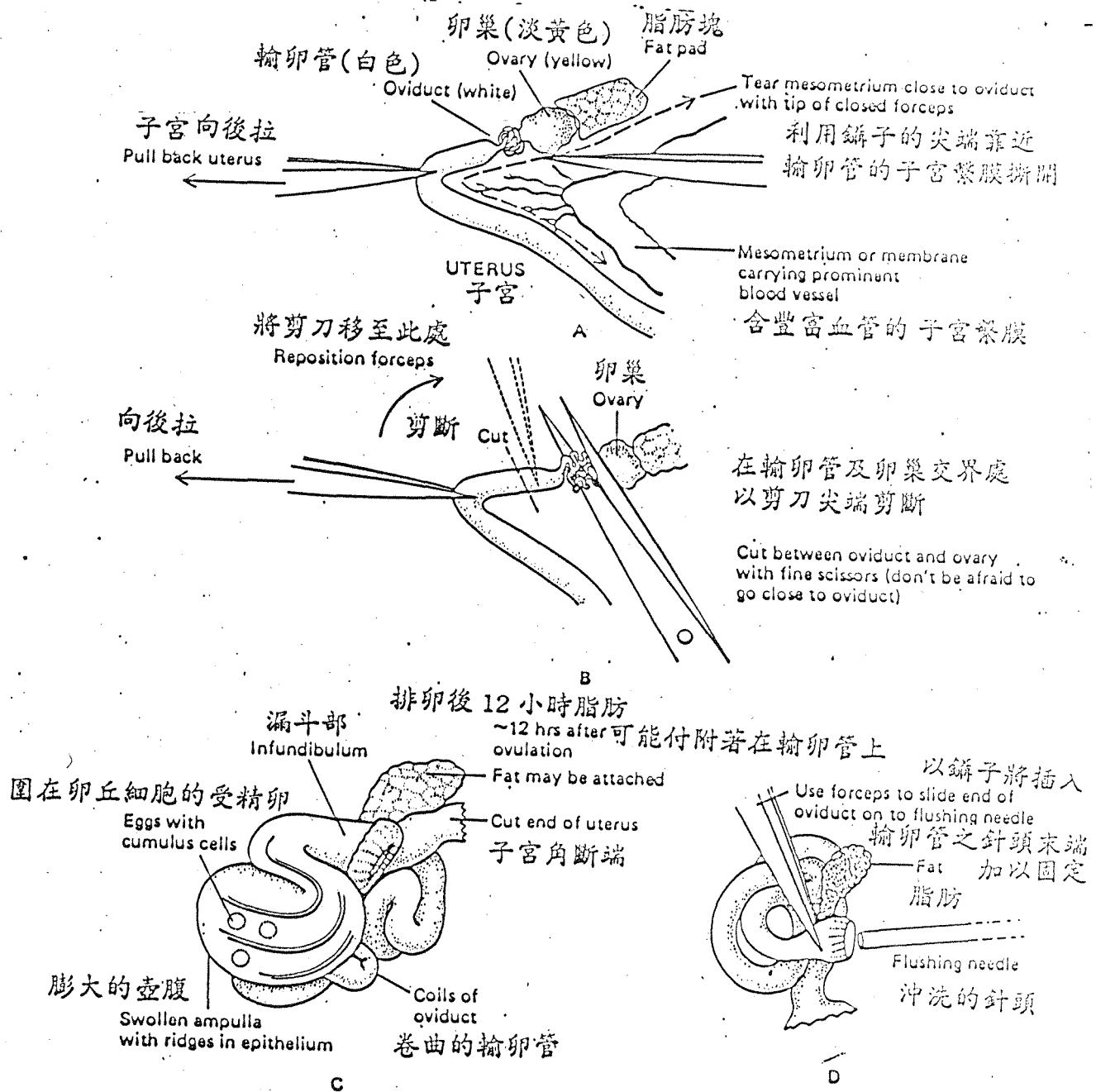
圖三.腹腔內注射老鼠的人道方法 Hogan, *et al.*, (1986)



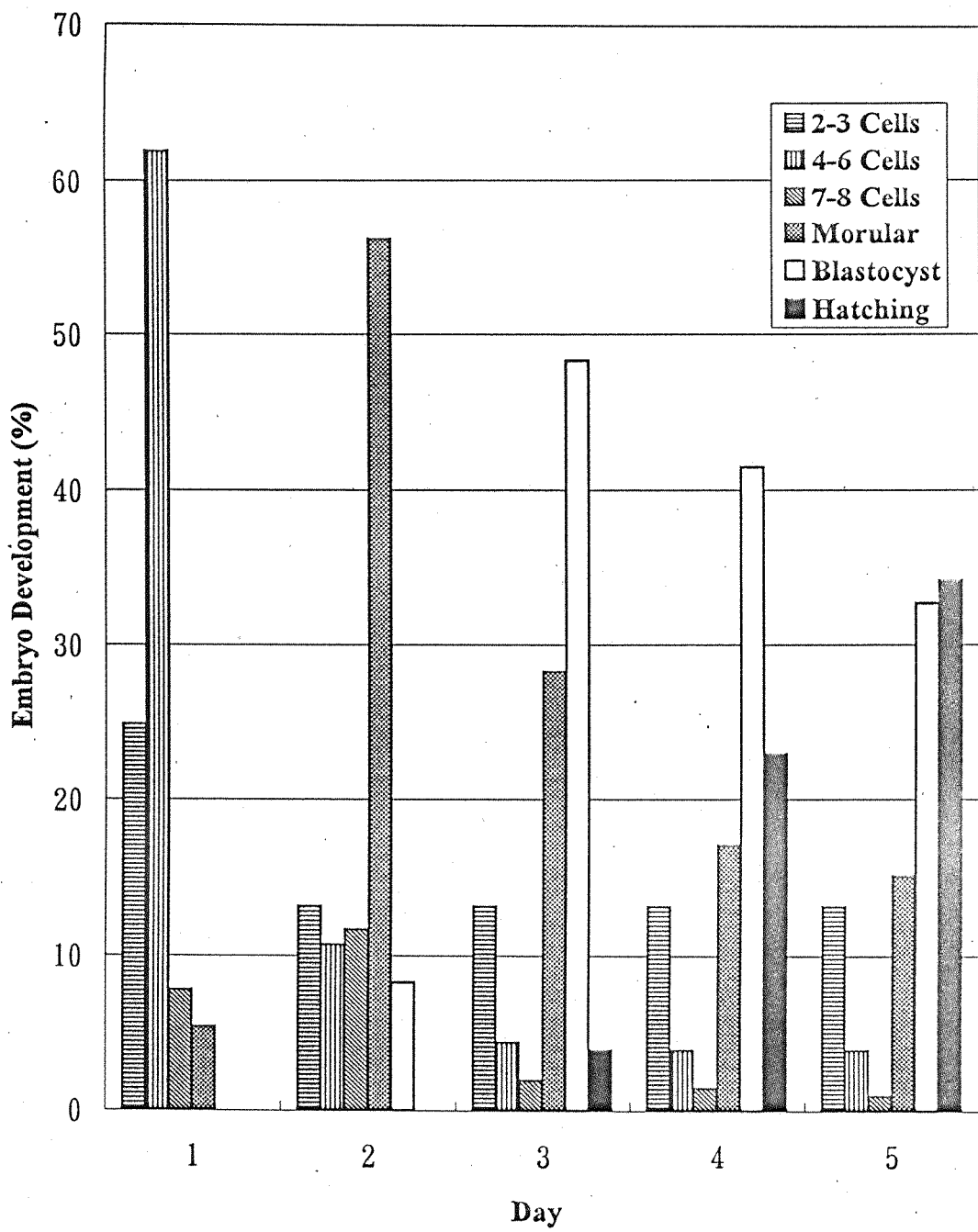
圖四. 以快速且人道的頸部脫臼法殺死老鼠 Hogan, et al, (1986)



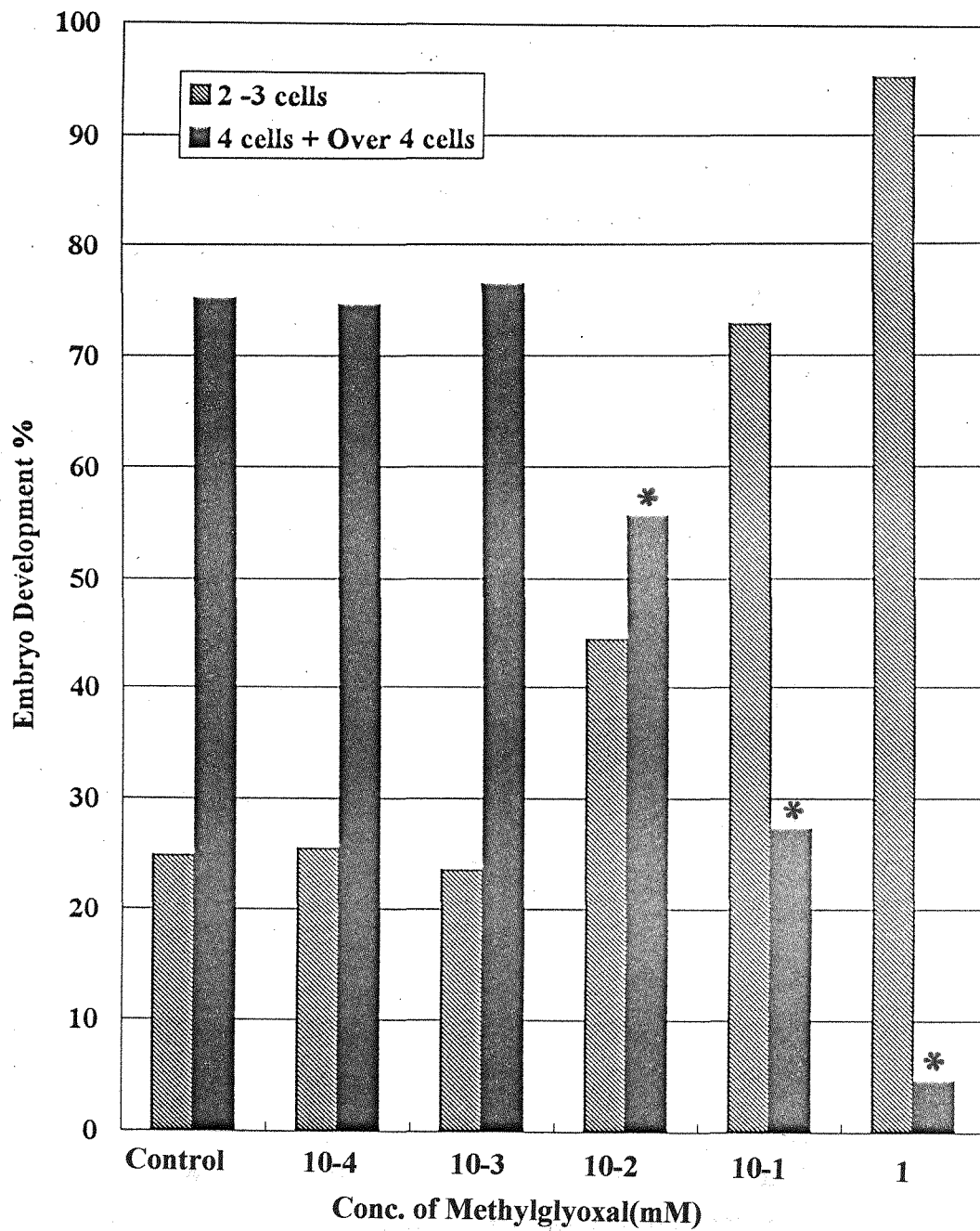
圖五. 母老鼠生殖器官的解剖 (A) 虛線表示切開 (Hogan, et al, 1956) 皮膚的位置, 實線箭頭表示切開皮膚的方向。
 (B). 虛線箭頭表示腹膜拉開的方向
 (C). 將腸道推開以顯露體腔底部的生殖器官



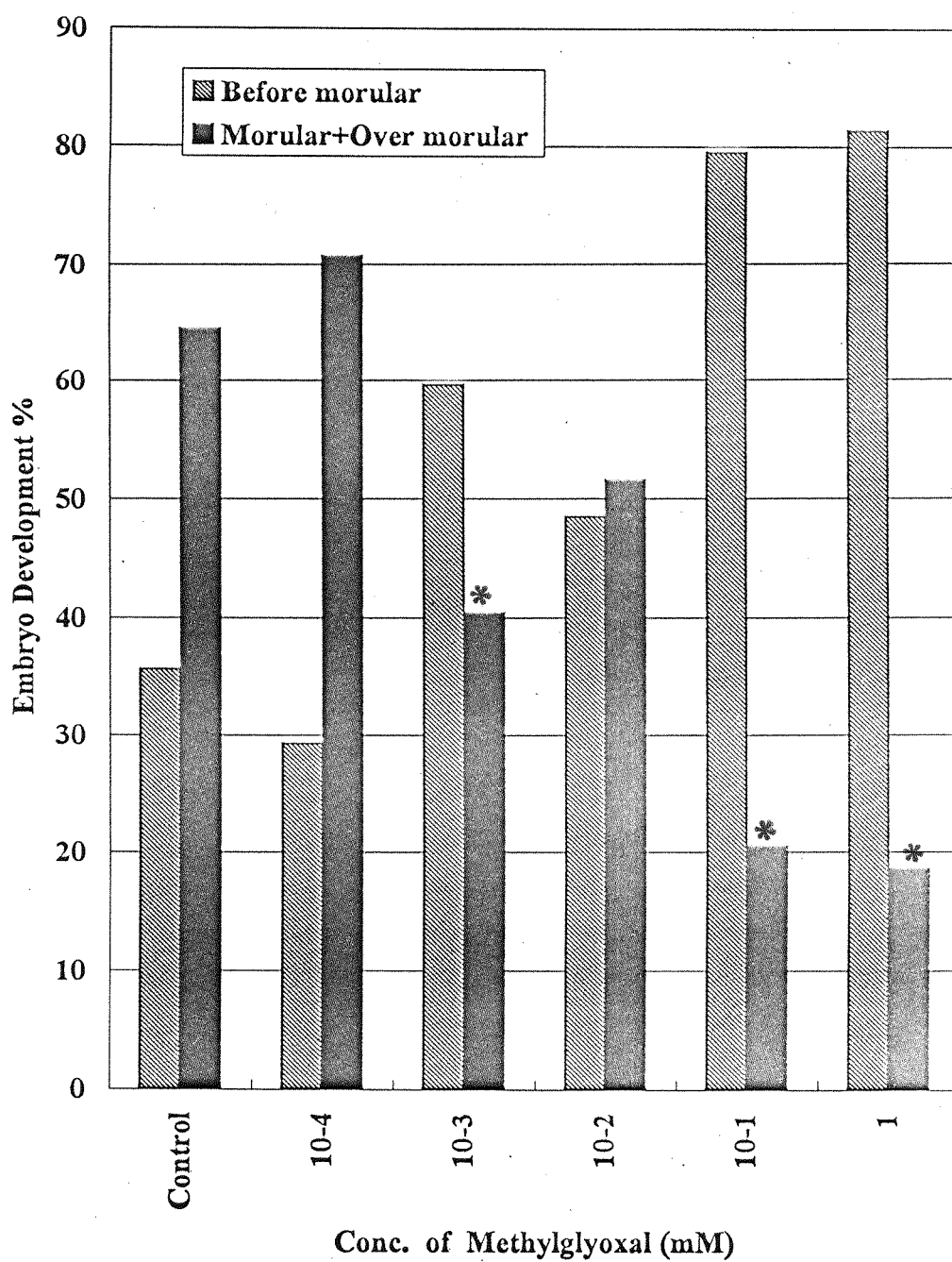
圖六. 剪下小鼠輸卵管與胚沖洗之關係; Hogan, et al, (1986)



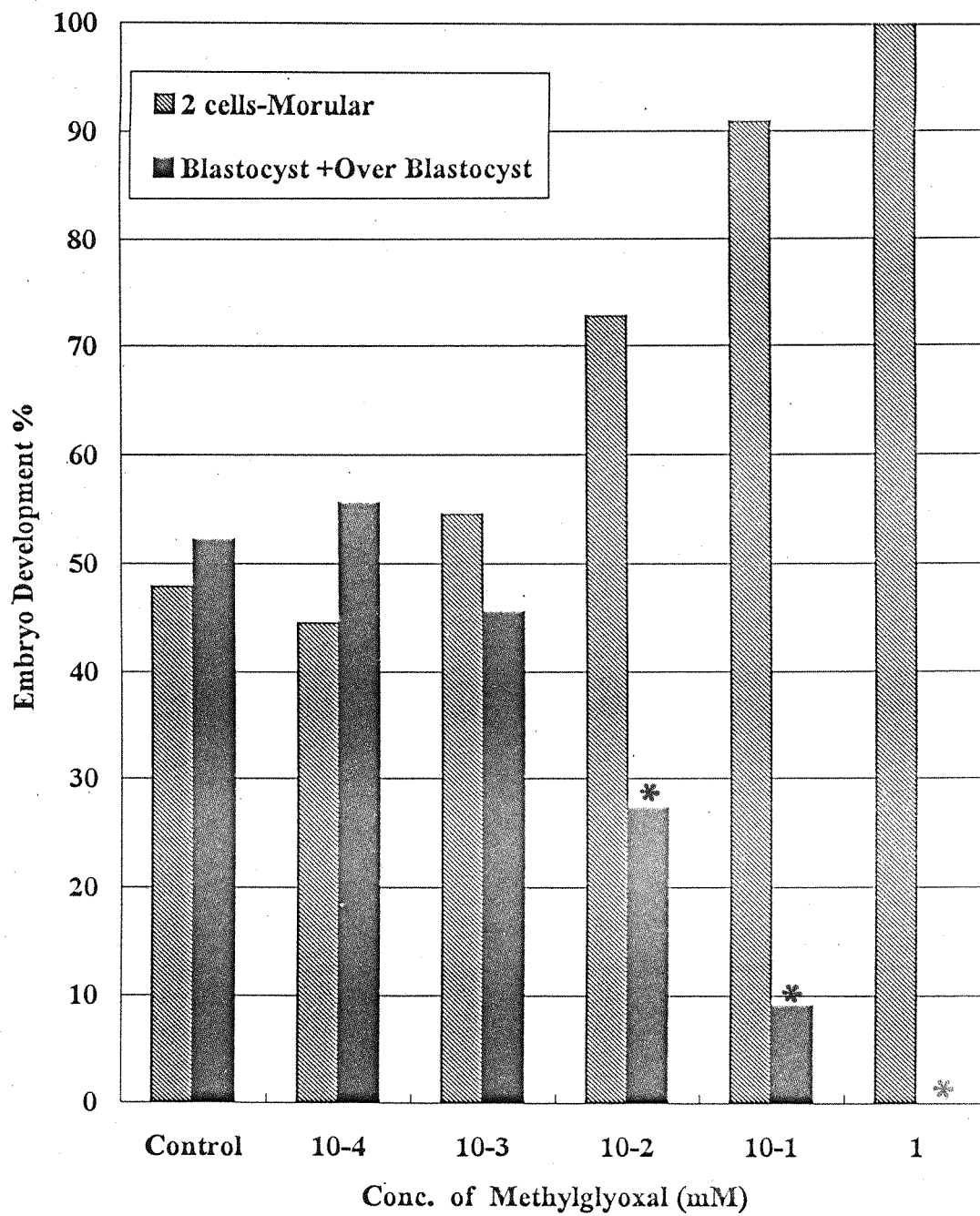
圖七. 控制組鼠胚每日生長記錄



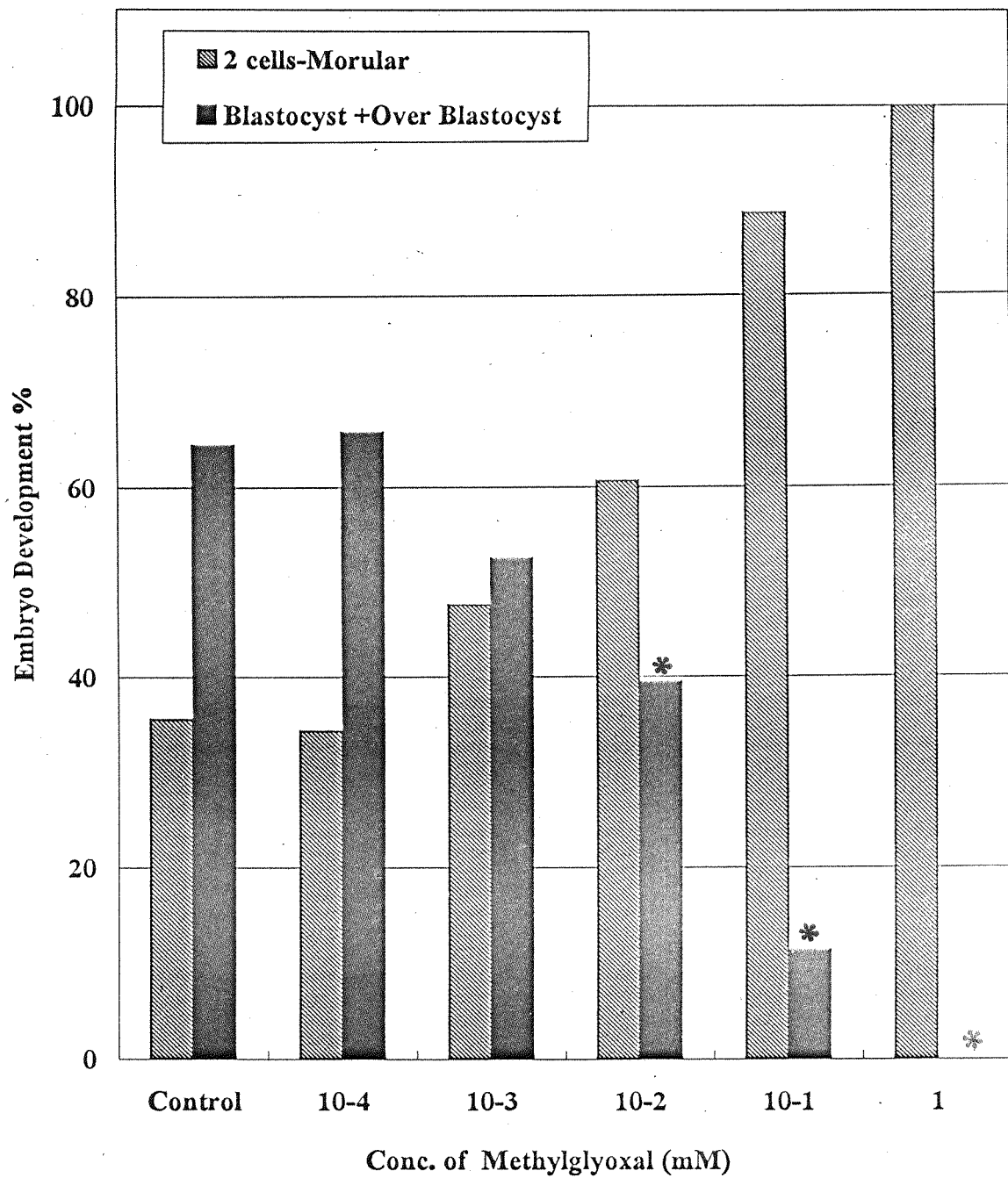
圖八. 以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第一日)
 *: 該組與控制組比較具統計上之意義, $P < 0.05$



圖九. 以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第二日)
 *: 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$

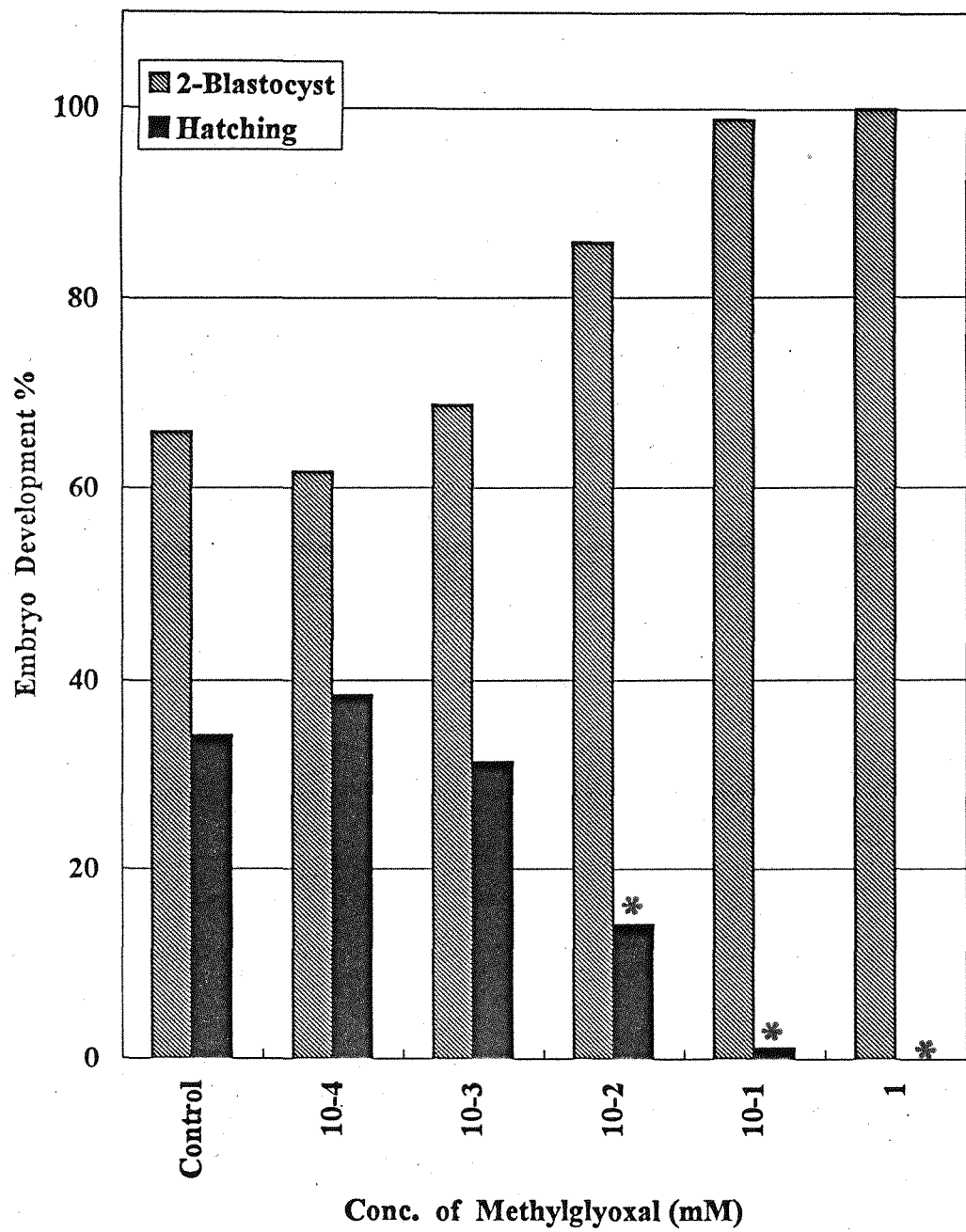


圖十. 以丙酮醛對鼠進行體外培養 (第三日)
 *: 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$

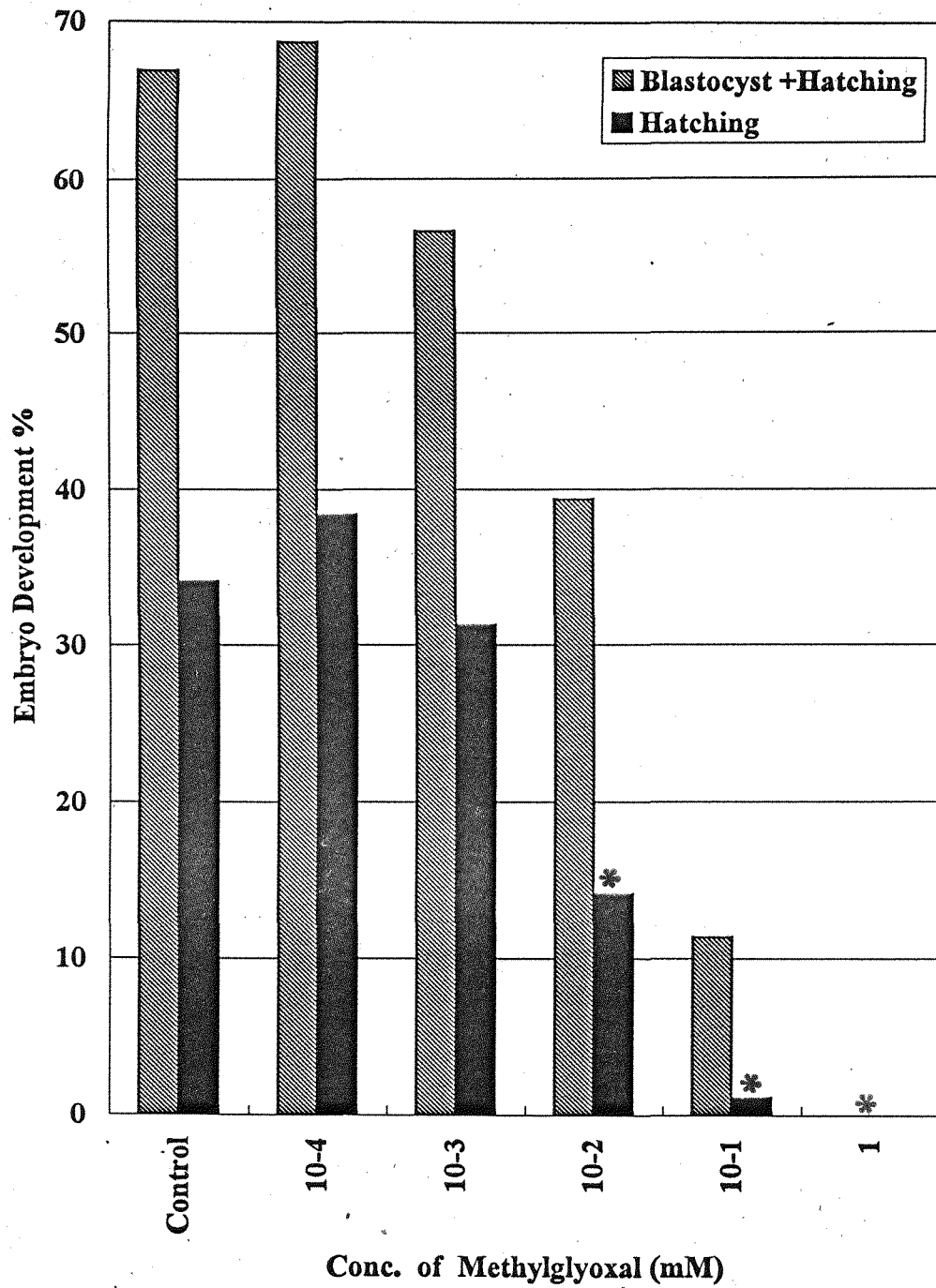


圖十一. 以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第四日)

*: 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$



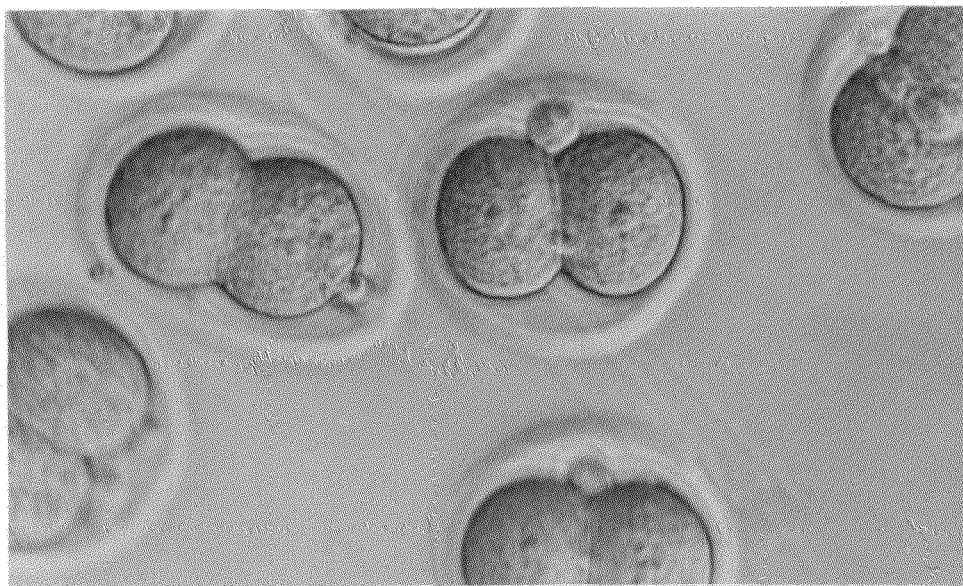
圖十二. 以丙酮醛對鼠胚進行體外培養(第五日)
 *: 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$



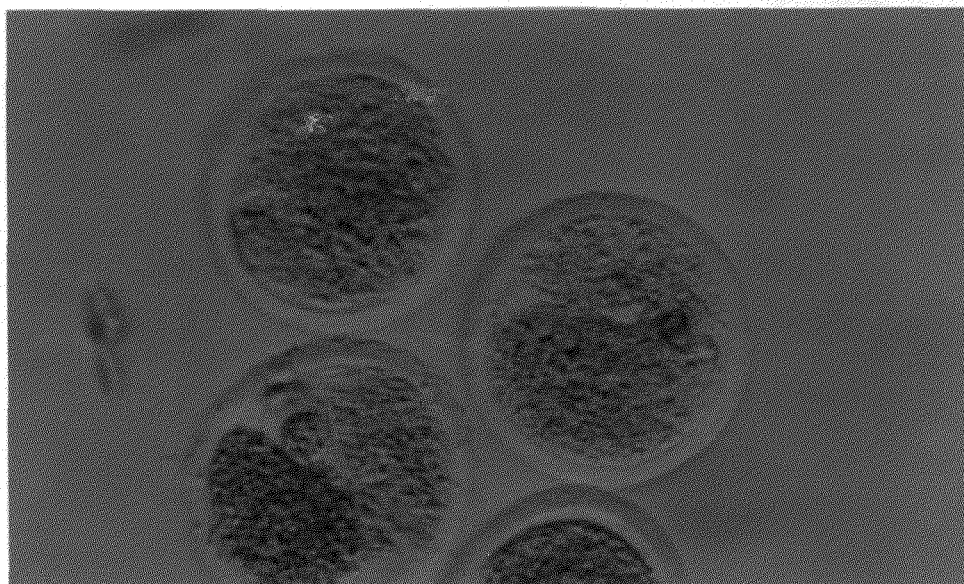
圖十三.以丙酮醛培養鼠胚至囊胚期及孵化之統計圖
* : 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$

圖十四. 鼠胚形態觀察 A. 控制組數鼠胚於體外培養四小時後之形態 (放大400倍) 丙酮醛 1mM 於體外培養四小時後之形態 (放大400倍) C. 丙酮醛 1mM 於體外培養五天後之形態 (放大400倍)

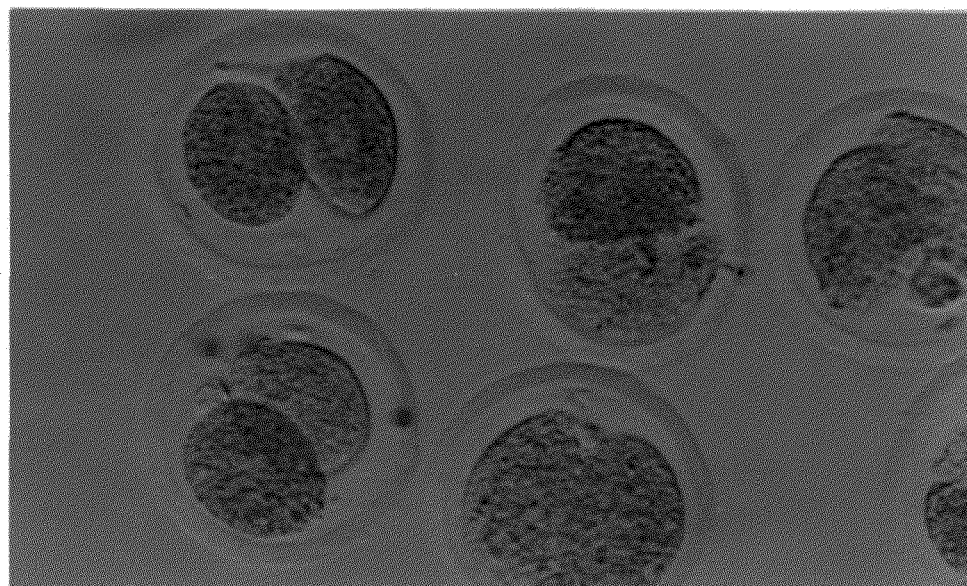
A.

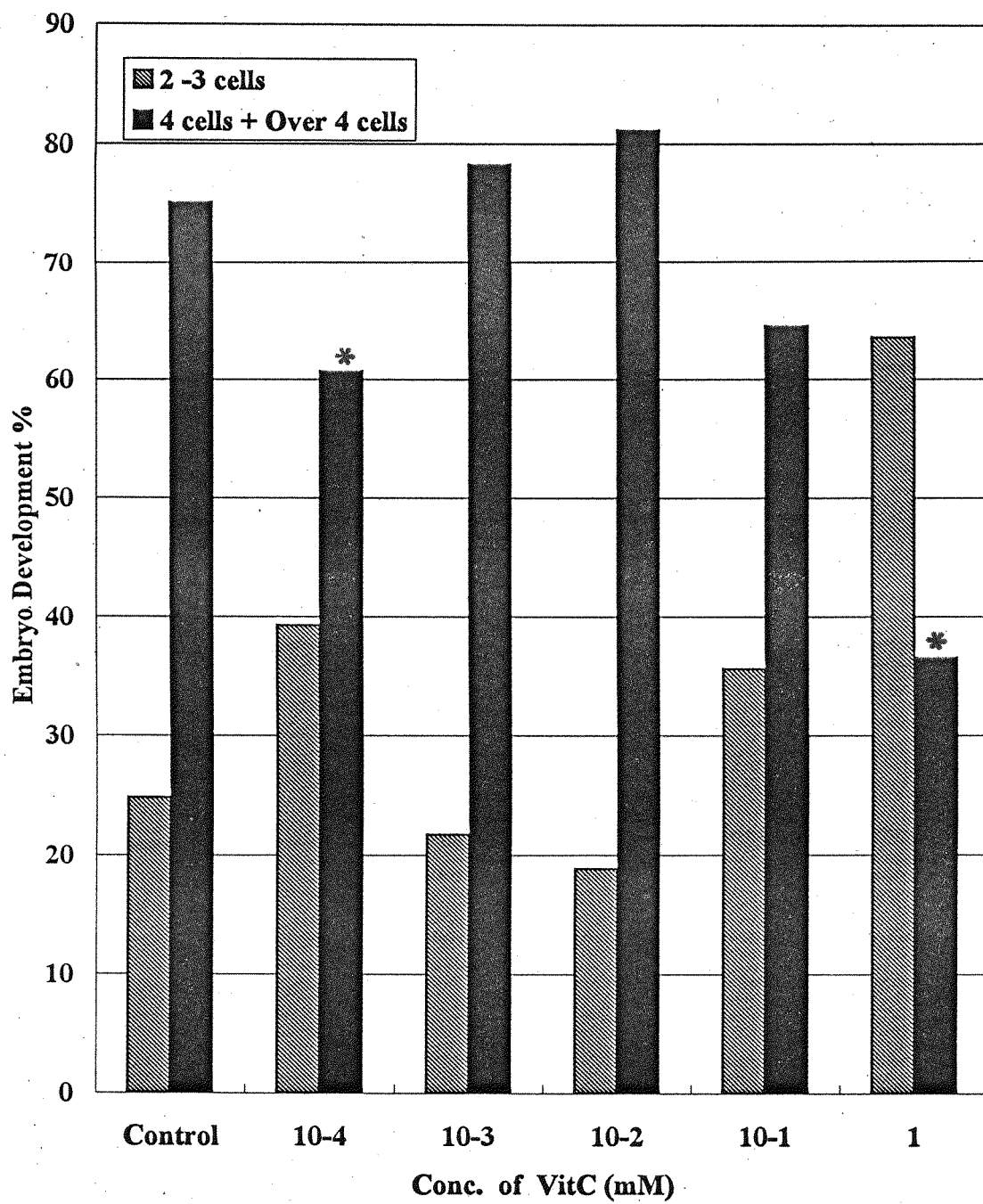


B.



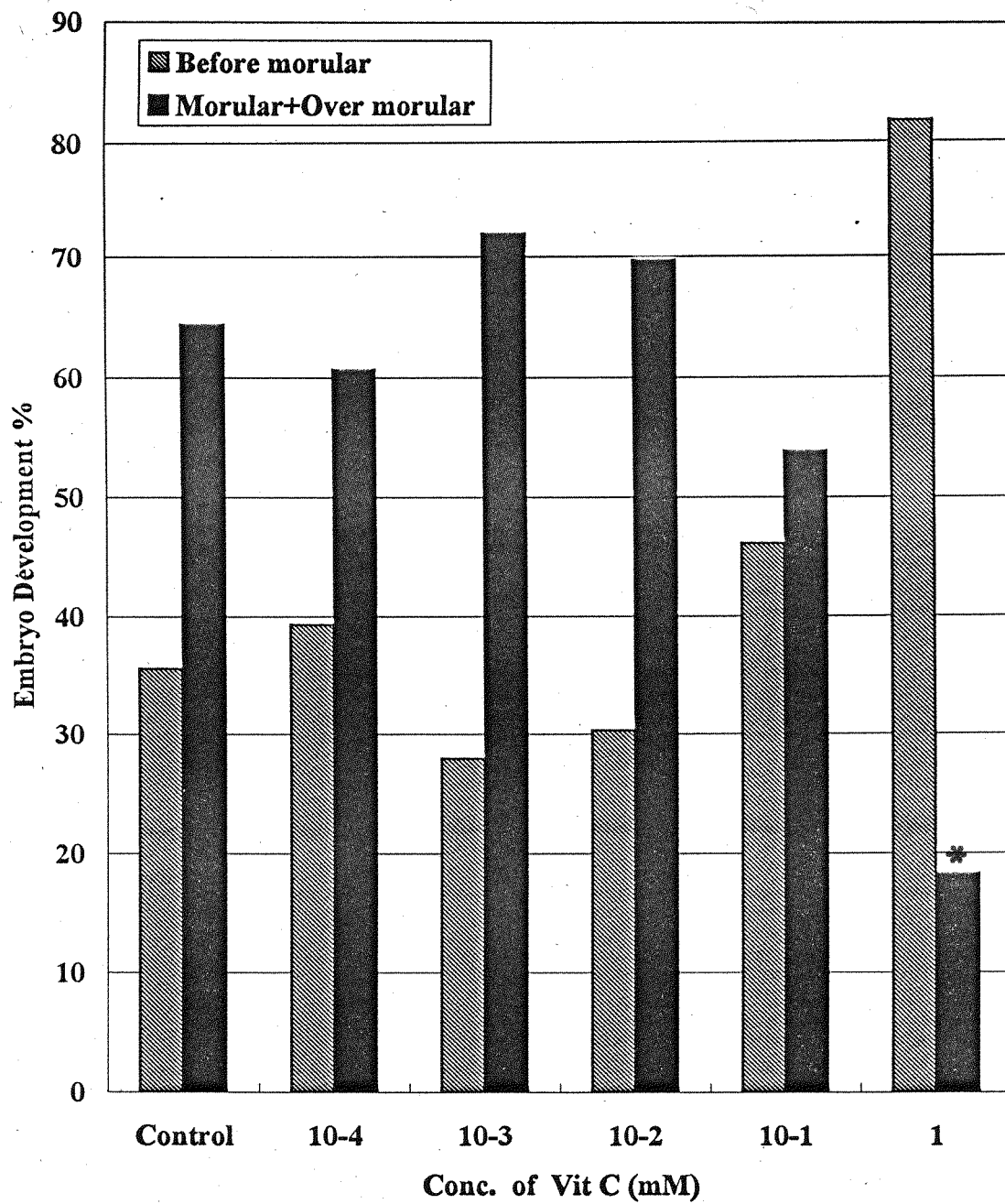
C.





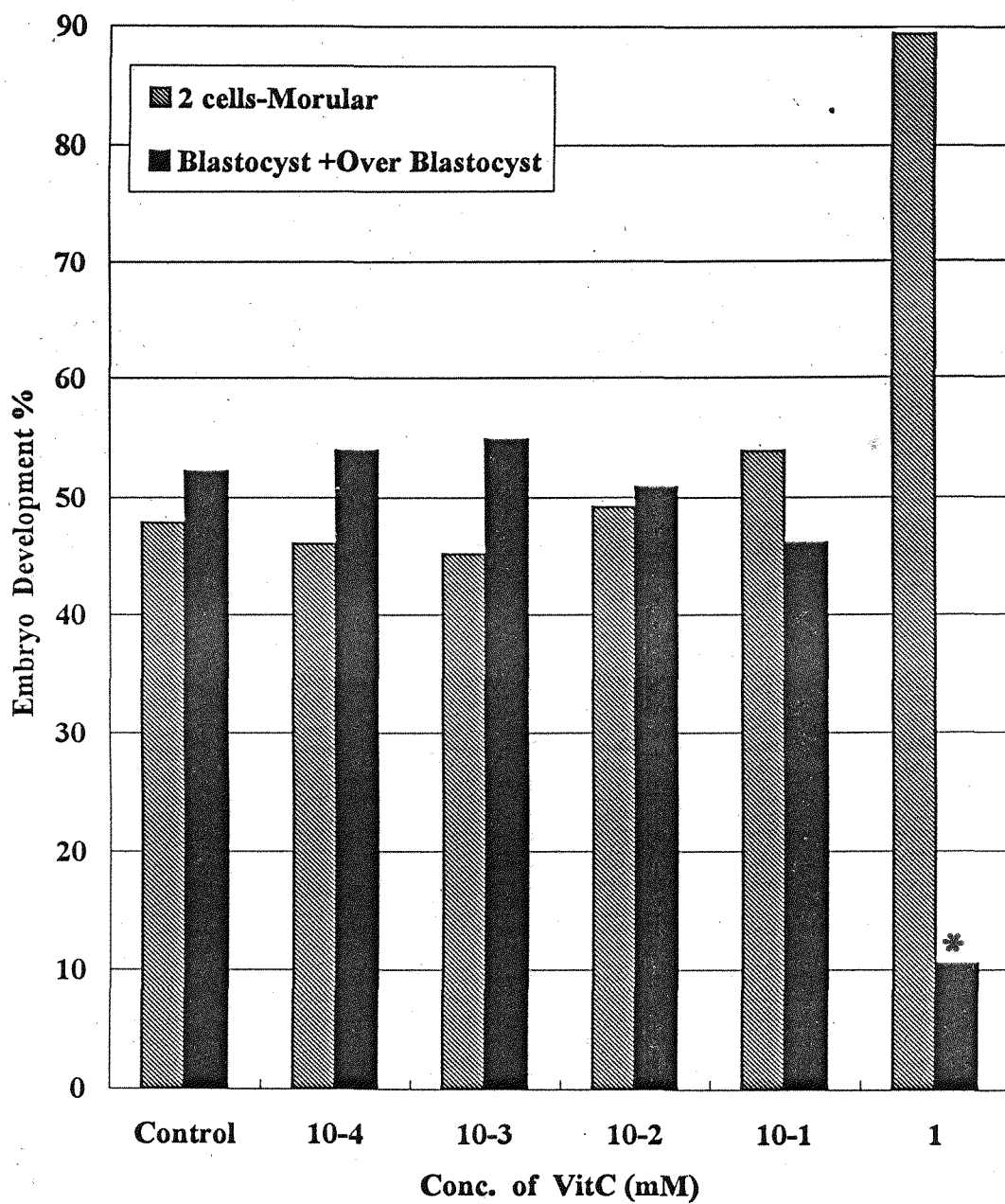
圖十五. 以維生素C對鼠胚進行體外培養 (第一日)

*: 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$



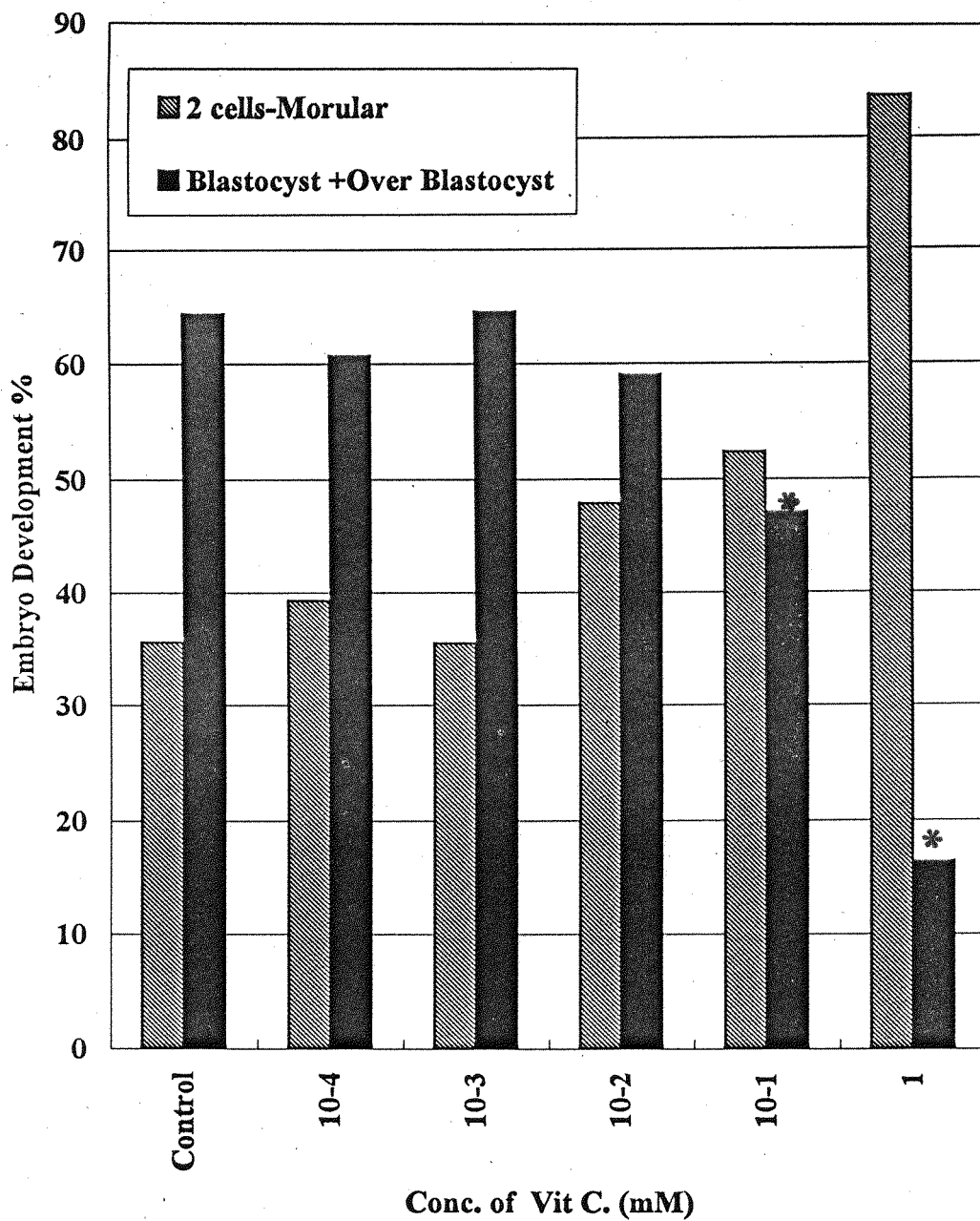
圖十六.以維生素C對鼠胚進行體外培養(第二日)

*:該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$



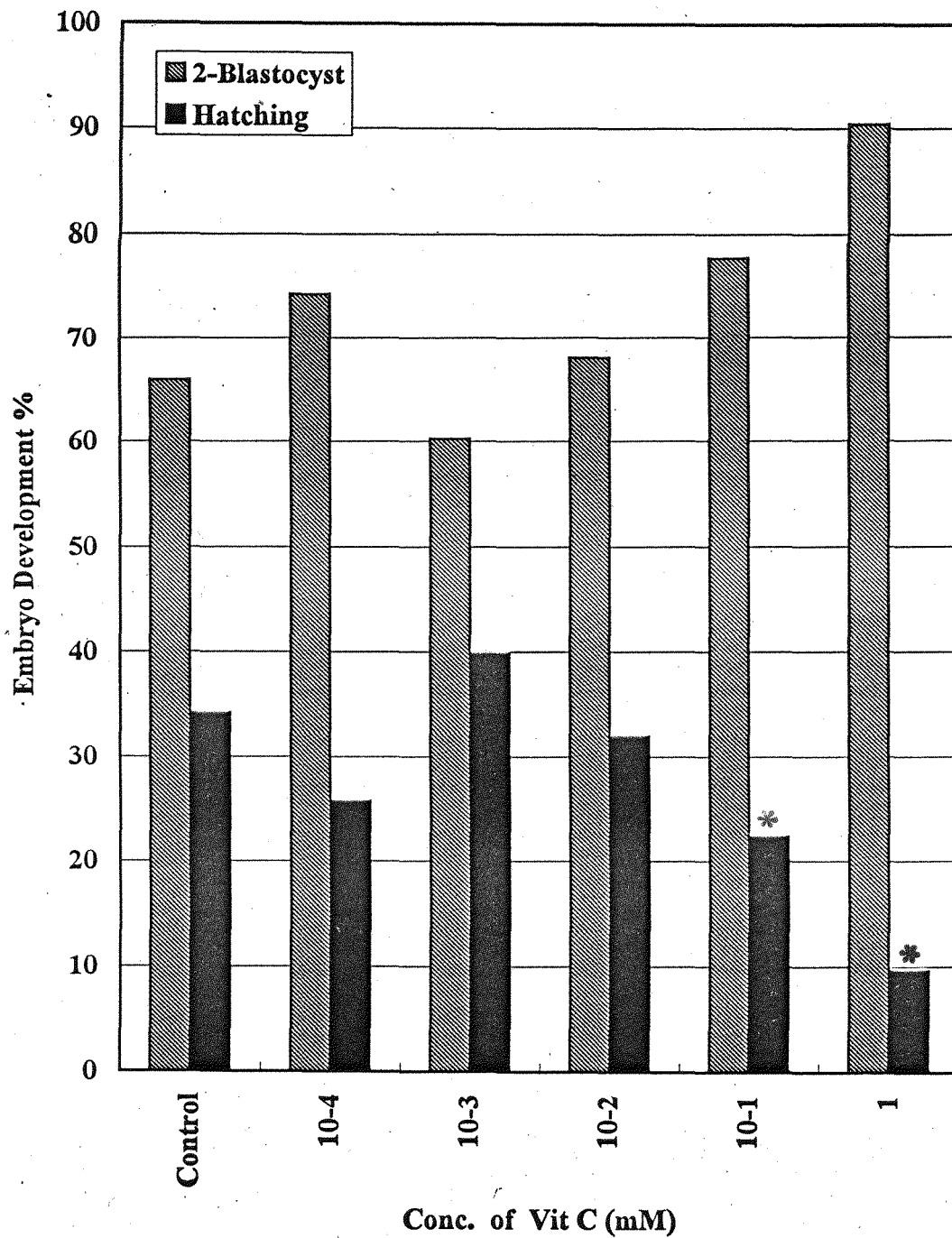
圖十七.以維生素C對鼠胚進行體外培養(第三日)

*:該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$



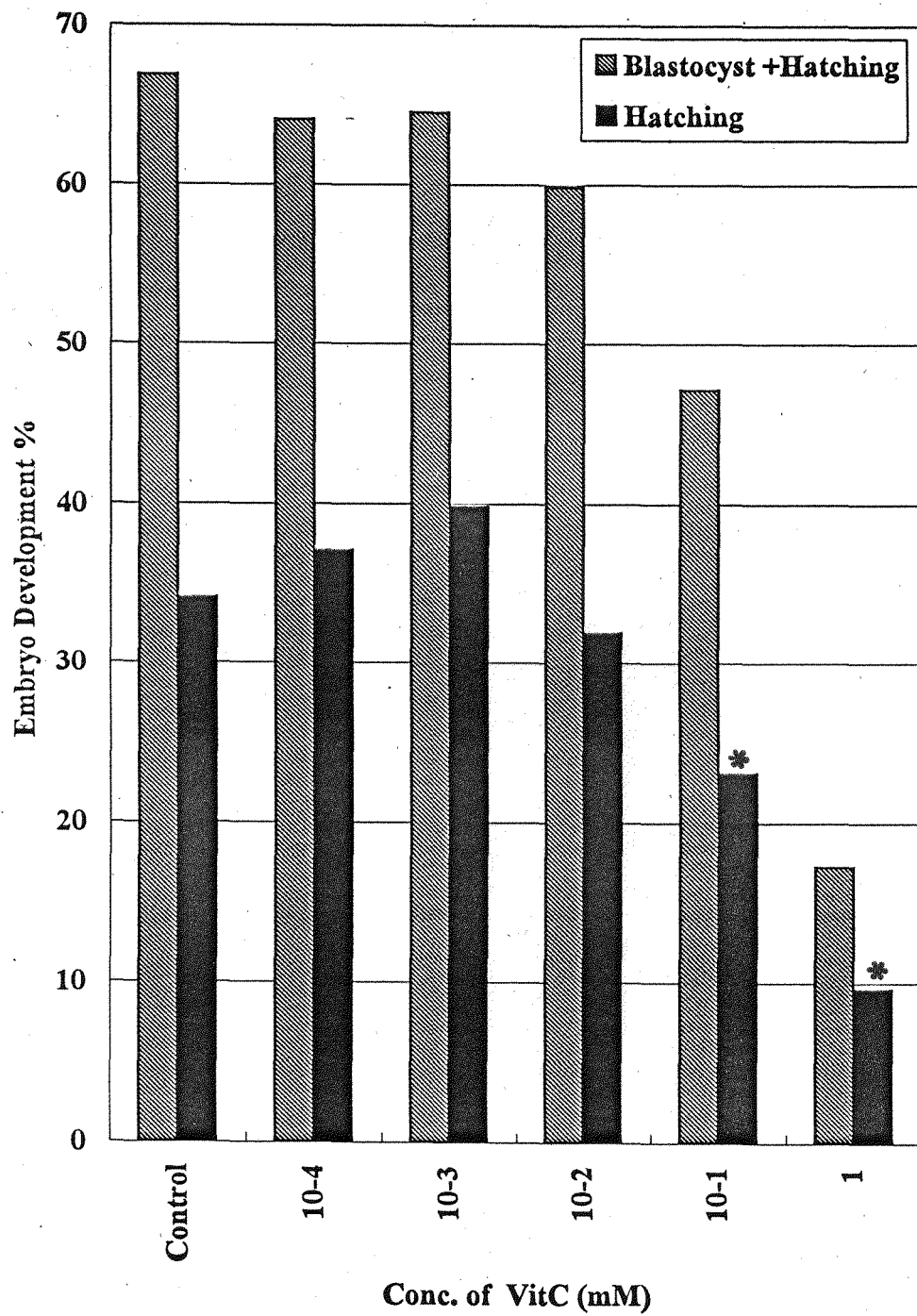
圖十八. 以維生素C對鼠胚進行體外培養(第四日)

*: 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$



圖十九. 以維生素C對鼠胚進行體外培養(第五日)

*: 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$

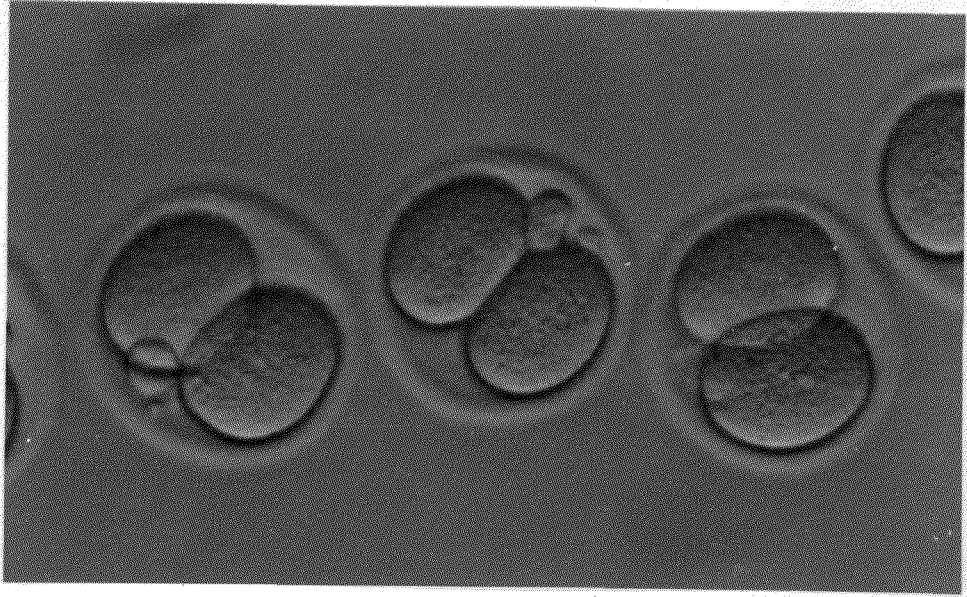


圖二十.以維生素C培養鼠胚至囊胚期及孵化之統計圖

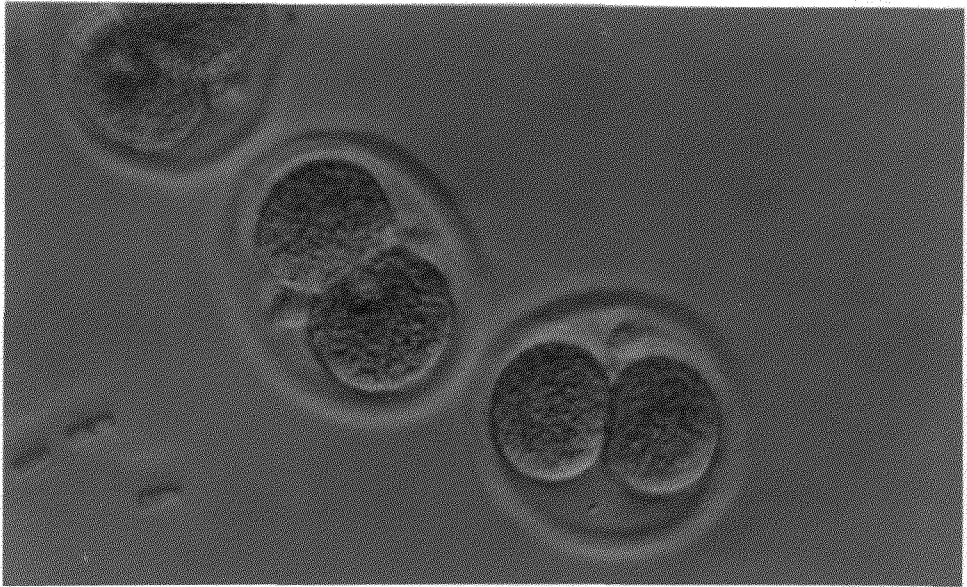
* : 該組與控制組比較具統計上之意義, $p < 0.05$

圖二十一. 鼠胚形態觀察 A. 控制組數鼠胚於體外培養四小時後之形態 (放大400倍) B. 維生素C 10mM 於體外培養四小時後之形態 (放大400倍) C. 維生素C 10mM 於體外培養五天後之形態 (放大400倍)

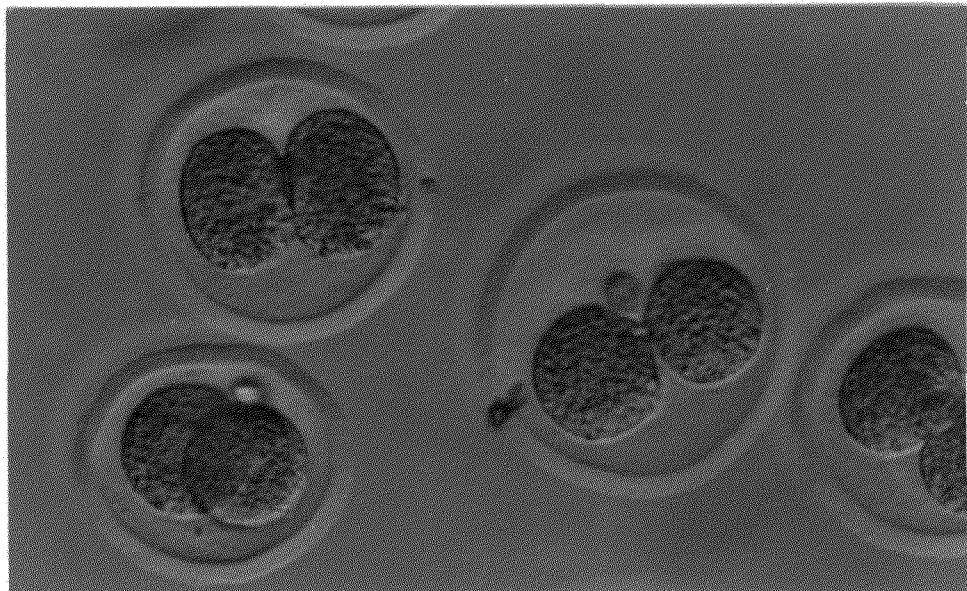
A.



B.



C.



參 考 文 獻

陳肅霖,(1995),加入及儲藏條件對百香果汁中 methyglyoxal 含量及 *Salmonella typhimurium* TA100 致突變性之影響,國科會專題研究計劃 (NSC83-0412-B-005)成果報告。

陳哲堯,謝豐舟,謝燦堂:(1993),畸胎學,當代周產期醫學·合記圖書出版社·台北:1-7,

端木樑,李建雄,翁郁嘉,黃淑姿:(1991)營養消化與吸收,生物化學·藝軒圖書出版社·台北:843-847,

趙政君譯:(1986),水溶性維生素,實用營養學·華杏出版股份有限公司·台北, 249-257

Aeschbacher H.U.,Chappuis Ch. Manganel M,and Aeschbacher. R
(1981).Investigation of Maillard products in bacterial mutagenicity test systems .Prog.Fd.Nutr.Sci Vol.5 pp:279-294

Ambroso J.L.,Harris C.,(1993).Chloroquine embryotoxicity in the postimplantation rat conceptus in vitro.Tetratology,48(3)213-216

Asai. H.,Kumeno K.,Yamaizum.Z.,Nishimura,S.,Nagao M.,Fujita Y. Sugimura T. Nukaya H, and Kosuge T(1982).Mutagenicity of methylglyoxal in coffee Gann 73:681-683

Baisier,W.M.,and Labuza,T.P.,(1992),Maillard browning kinetics in a Liquid model system.J.Agric.Food Chem .,40(5):707-713

Brambilla G,Sciaba L.,Fagging P.,Finollo R.,Bassi A.M.,Ferro M.,and Marinari U.M.,(1985) . Methylglyoxal-induced DNA.protein cross-links and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells. Carcinogenesis,6:683-688

Cajielli E.,Canonerno R.,Martelli A.,and, Brmbilla,G (1987)Methylglyoxal induced mutation to 6-thioguanine resistance in V-79 cells.Mutation research, 190:47-50

Chambers BJ;Klein NW;Conrad SH;Ruppenthal GC;and others(1995) Reproduction and sera embryotoxicity after immunization of monkeys with the laminin peptides YIGSR,RGD,and IKVAV.Proc Natl Acad Sci USA 18;92(15):6818-22

deMan,,J.M., (1990),Protein,from "Principles of Food Chemistry ",2nd ed.,Van Nostrand Reinhold Int.Ltd.,New York.

Doumulin J.C, Menheere P.P, Evers J.L, Kleukers A.P, Pieters M.H, Bras M., Geraedts J.P, (1991), The effects of endotoxins on gametes and perimplantation embryos and tured in vitro. Hum.Reprod (5):730-34

Dubin N.H, Bornstein D.R., Gong Y., (1995), Use of endotoxin as a positive (toxic) control in the mouse embryo assay. Journal of assisted reproduction and genetics, 12(2):147-152

Eriksson U.J. ; Borg A.H. (1991) Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. Diabetologia 34:325-331

Fennema, O.R., (1985), Water and Ice, from "Food Chemistry", 2nd ed., edited by Fennema, O.R., Marcel Decker Inc..

Francis A.J, Anderson D, Jenkinson P.C. and Parke D.V.W. (1989). The protective effects of L-ascorbic acid and DL-tocopherol on cultured rat embryos treated with xanthine/ xanthine oxidase Mutation Research 214:137-145

Hayashi, T., and Shibamoto, T., (1985) Analysis of methyl glyoxal in foods and beverages. J. Agric. Food Chem., 33:1090-1093.

Hodge, J.E., (1953), Chemistry of browning reactions in model systems .J.Agric.Food Chem., 1:928-943

Hogan B, Costantini F, Lacy E (1986). Manipulating the mouse embryo .A laboratory manual pp 19-110

Ian G.,Daya R.V.(1992).Tetratogenic and maromolecular synthesis inhibitory effects of Trimethylamine on mouse embryos in culture. J.Toxicology and Envir.Health,36,27-41

Kasai H.,Kumeno K.,Yamaizumi Z.,Nishimura S.,Nagao M.,Fujita Y.,Sugimura T.,Nukya H.,and Kosuge .,T.,(1982),Mutagenicity of methyl glyoxal in coffee.Gann,73:681-683

Kasai H.,and Nishimura,S.,(1986).Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical forming agents. Environ Health .Perspect,67:111-116

Lee Q,and Juchau M(1994) Dymorphogenic effects of nitric oxide(NO)and NO-synthase inhibition:studies with intra-amniotic injections of sodium nitroprusside and NG-monomethyl-L-arginine. Teratology 49(6):452-64

Melekhova OP.,(1994):The evaluation of the embryotoxicity of the aqueous enviroment;Izv Akad Nauk Ser Biol.,Jul-Aug;(4):661-666

Migliore L.,Ventura L.,Barale R.,Loprieno N.,Castellino S.,and Pulci R.,(1989),Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastrointestinal epithelium of rats treated with formaldehyde . Mutagenesis 4(5)327-334

Miliore L.,Barale R.,Bosco E.,Giorgelli F.,Minunni M.,Scarppato R.,and Loprieno N.,(1990).Genotoxicity of methylglyoxal:cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and in mice.Carcinogenesis,11:1503-1507

Miranda A, Wiley M, and Wells, P (1994) :Evidence for embryonic peroxidase-catalyzed bioactivation and glutathione-dependent cytoprotection in phenytoin teratogenicity; modulation by eicosatetraenoic acid buthioine sulfoximine in murine embryo culture, Department of pharmacology, Toxicol Appl Pharmacol University of Toronto, Ontario, Canada 124(2);230-41

Morita, J., and Kashimura, N., (1991), The Maillard reaction of DNA with d-fructose 6-phosphate. *Agric. Biol. Chem.*, 55(5):1359-1466

Nagao M., Fujita Y., Wakabayashi K., Nukaya H., Kosuge T., and Sugimura T., (1986) Mutagens in coffee and other beverages, *Environ. Health Perspect*, 16:89-91

Nau H., (1993), Embryotoxicity and taratogenicity of topical retinoic acid. *Skin Pharmacol*, 6, Supply 1p, 35-44

Nishigori. H., Lee. J. W. Yamauchi Y. and Iwatsuru M. (1986) The alteration of lipid peroxide in glucocorticoid-induced cataract of developing chick embryos and the effect of ascorbic acid; *Current Eye Research*. Jan 5(1):37-40

Nishi, Y., Miyakawa, Y., and Kato, K (1989), Chromosome aberrations induced by pyrolysates of carbohydrates in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.*, 227:117-123

Niyati-Shirkhodae F., and Shibamoto T., (1993). Gas chromatographic analysis of glyxal and methylglyoxal formed from lipid and related compounds upon ultraviolet irradiation *J. Agric. Food Chem.*, 41:227-230

Oehninger S., Blackmore P., Mahony M., and Hodgen G (1995). Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics* 12(1); 41-47.

Ornaghi F; Ferrini S; Prati M; Giavini E (1993); The protective effects of N-acetyl-L-cysteine against methyl-mercury embryotoxicity in mice, *Research and Development Division, Zambon Research S.p.a., Bresso, Milan, Italy* *Fundam Appl Toxicol* ;May; 20(4);437-45

Phillans, P I, Ponzi S.F, and Parker M.I. (1990). Effects of ascorbic acid on the mouse embryo and on cyclophosphamide-induced cephalic DNA strand breaks in vivo, *Arch Toxicol* 64:423-425

Phillips S.A., and Thornalley P.J. (1993), The formation of methylglyoxal from triose phosphates investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur.J.Biochem.*, 212:101-105

Quinn P, (1995), Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate *Journal of assisted reproduction and genetics*, 12(2):97-105

Saillenfait A; Payan J; Sabate J; Langonne I; and others (1993): Specific amino acids modulate the embryotoxicity of nickel chloride and its transfer to the rat embryo in vitro, *Toxicol Appl Pharmacol Canada* 123(2);299-308

Shibamoto, T, Hayashi, T, (1985), Analysis of methylglyoxal in foods and beverages. *J.Agric.Food Chem.* 33:1093

Takahashi,M.,Okamiya,H.,Furukawa,F.,Toioda,K.,Sato,H.,Imaida,K. and Hayashi,Y.,(1989),Effects of glyoxal and methyglyoxal administration on gastric carcinogenesis in Wistar rats after initiation with N-methy-N-nitro-N-nitrosoguanidine,Carcinogenesis,10:1925-1927

Tucker,J.D.,Taylor,R.T.,Christensen,M.L.,Strout,C.L.,Hanna,M.L.,and Carrano,A.V.,(1989),Cytogenetic response to 1,2-dicarbonyls and hydrogen peroxide in Chinese hamster ovary AUXB1 cells. and human peripheral lymphocytes.Mutat.Res.,224:269-279

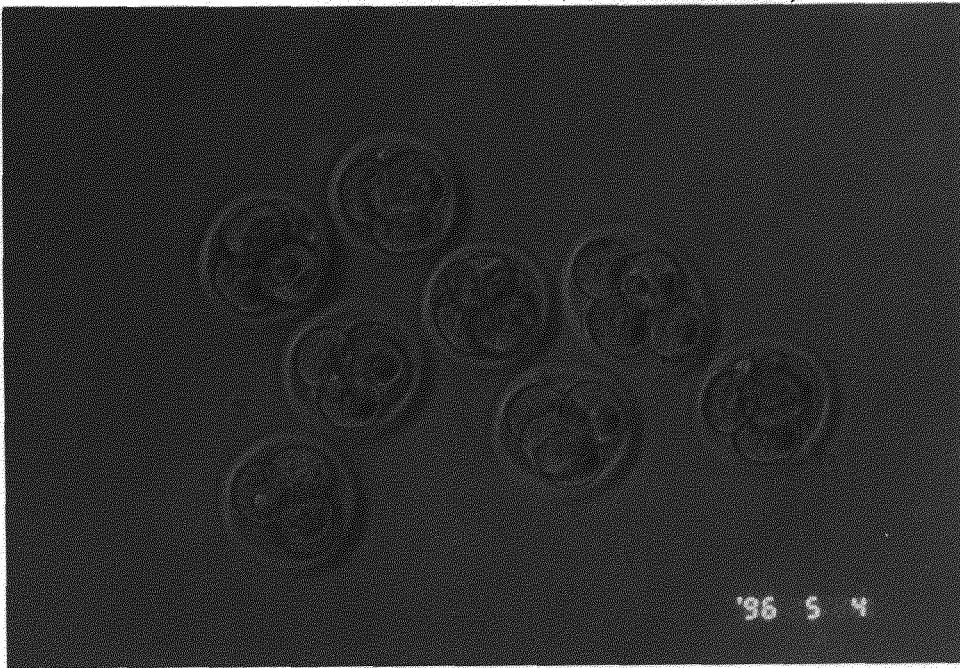
Ueno, H.,Nakamuro,K.,Sayato,Y.,and Okada,S.,(1991).DNA lesion in rat hepatocytes induced by in vitro and vivo exposure to glyoxal.Mutat.Res., 260:115-119

Weenen,H.,and Tjan,S.B.,(1992)Analysis,Structure,and Reactivity of 3-Deoxyglucosone,from "Flavor Precursors".217-231.American Chemical Society.

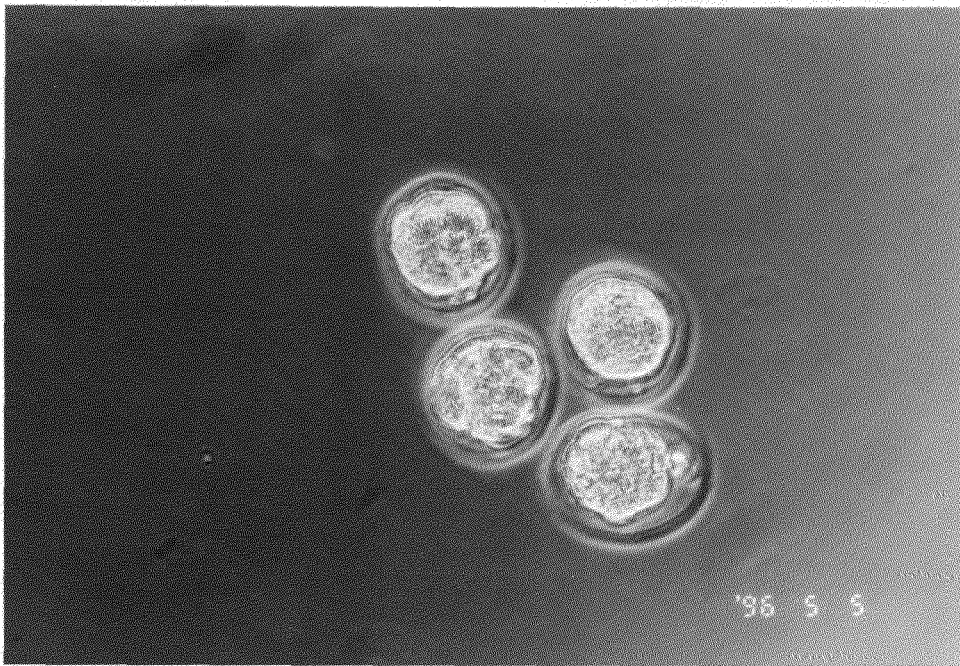
Winn LM;Wells PG(1995).Phenytoin-initiated DNA oxidation in murine embryo culture,and embryo protection by the antioxidative enzymes superoxide dismutase and catalase:evidence for reactive oxygen species mediated DNA oxidation in the molecular mechanism of phenytoin; Faculty of pharmacy,University of Toronto,Ontario, Canada Mol Pharmacol Jul;48(1);112-20

Yoshimura T. Matsuno K, Miyazaki T, Suzuki K. and Watanabe M. (1993). Electron spin resonance studies of free radicals in gamma-irradiated golden hamster embryo cells: Radical formation at 77 and 295 K, and radioprotective effects of vitamin C at 295 K. Radiation Research. 136(3):361-5

附圖一.控制組鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖一之 A.
第一日

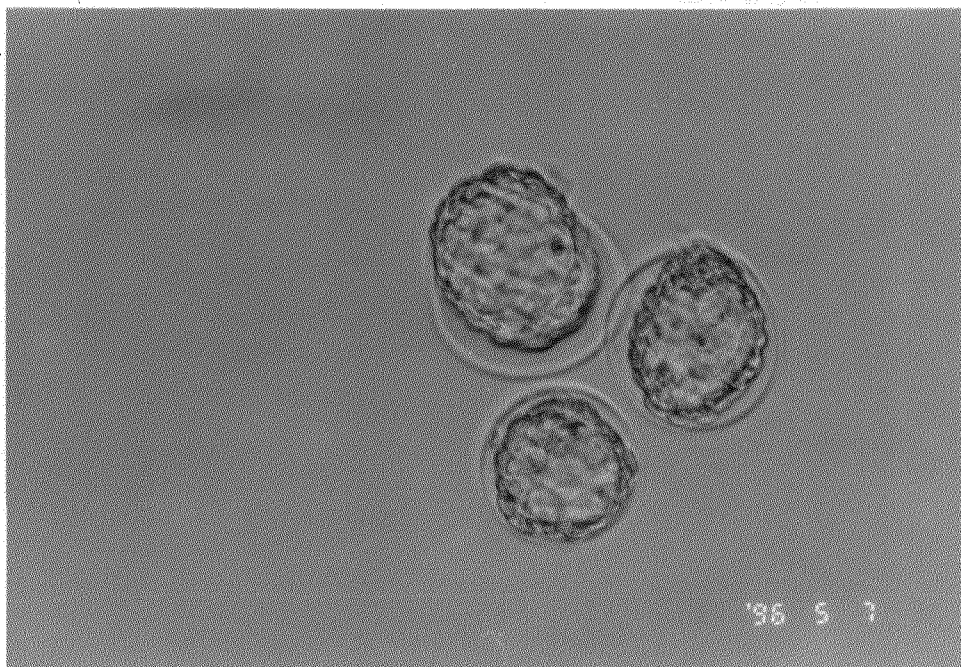


附圖一之 B.
第二日



附圖一之 C.
第三日

附圖一.控制組鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖一之 D.
第四日

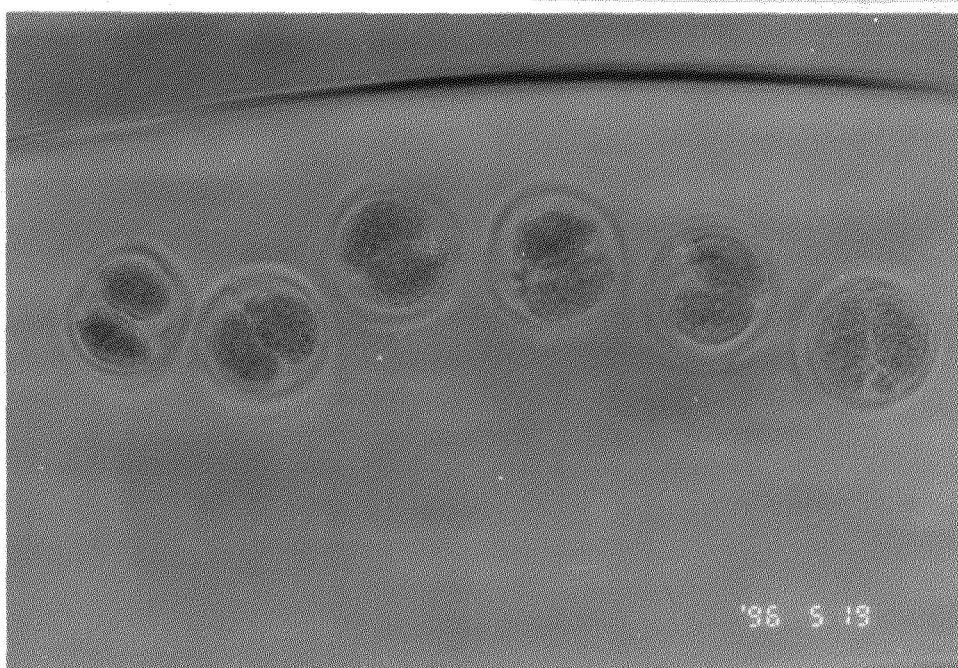


附圖一之 E.
第五日

附圖二. 丙酮醛 1mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖二之 A.
第一日

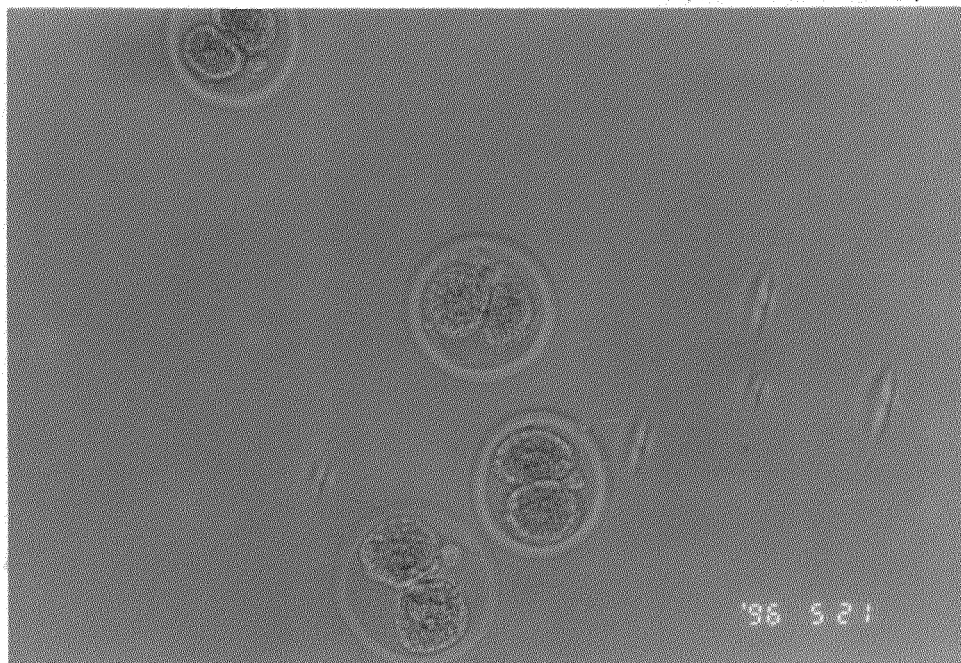


附圖二之 B.
第二日

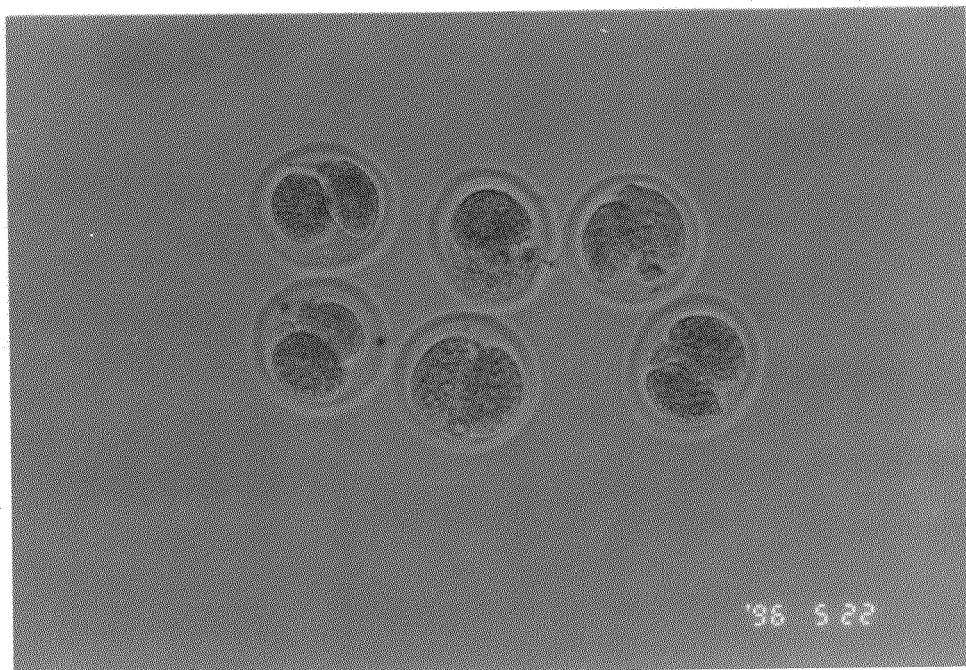


附圖二之 C.
第三日

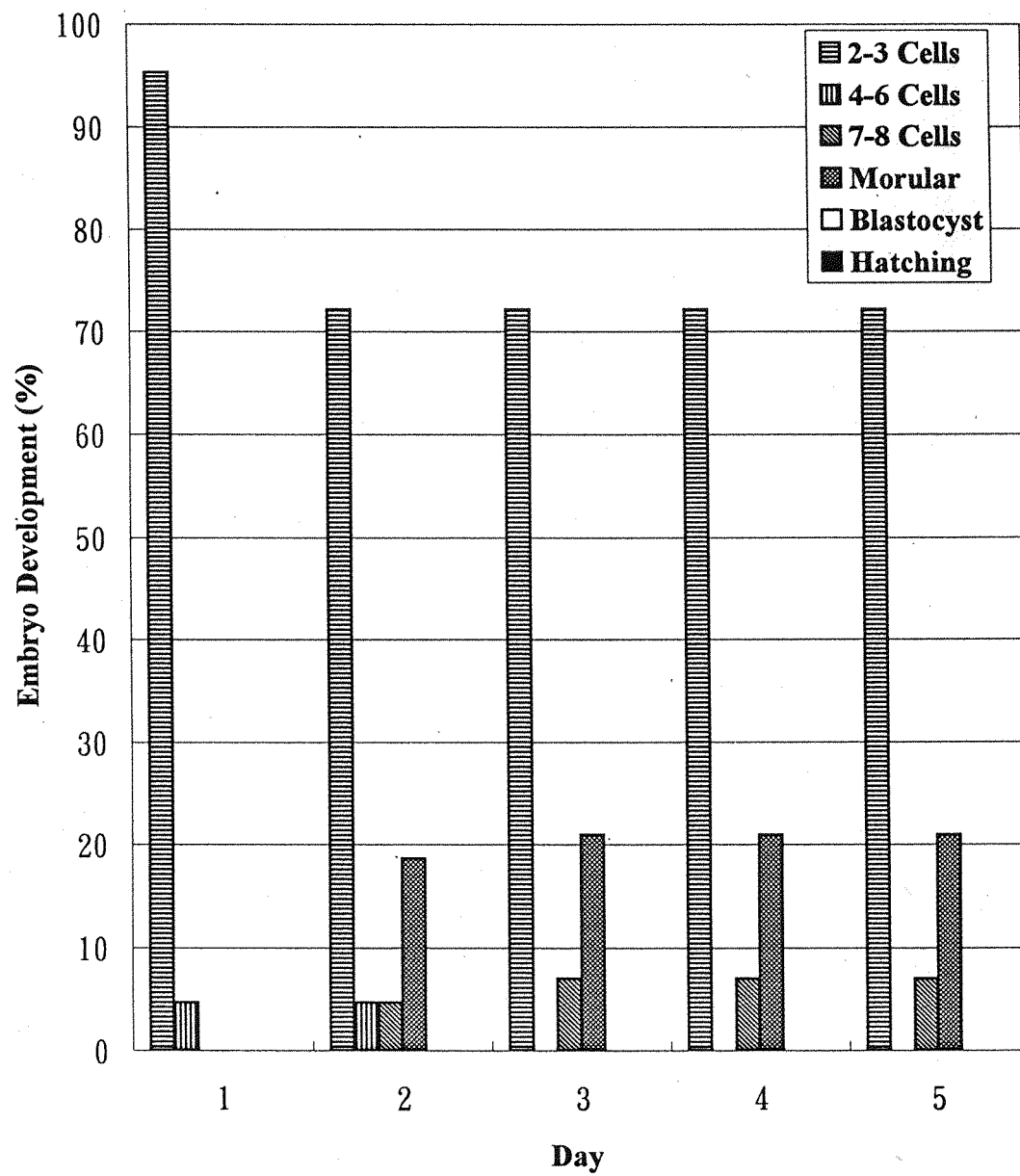
附圖二 . 丙酮醛 1mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖二之 D.
第四日



附圖二之 E.
第五日



附圖二之F. 丙酮醛 1mM培養鼠胚每日生長記錄

附圖三. 丙酮醛 10^{-1} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖三之 A.
第一日

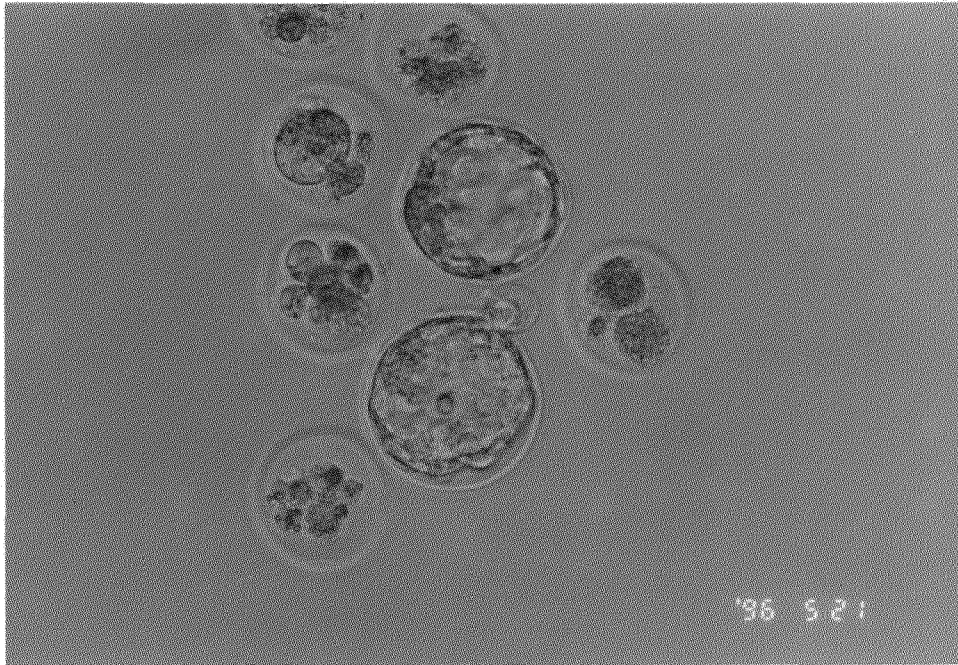


附圖三之 B.
第二日

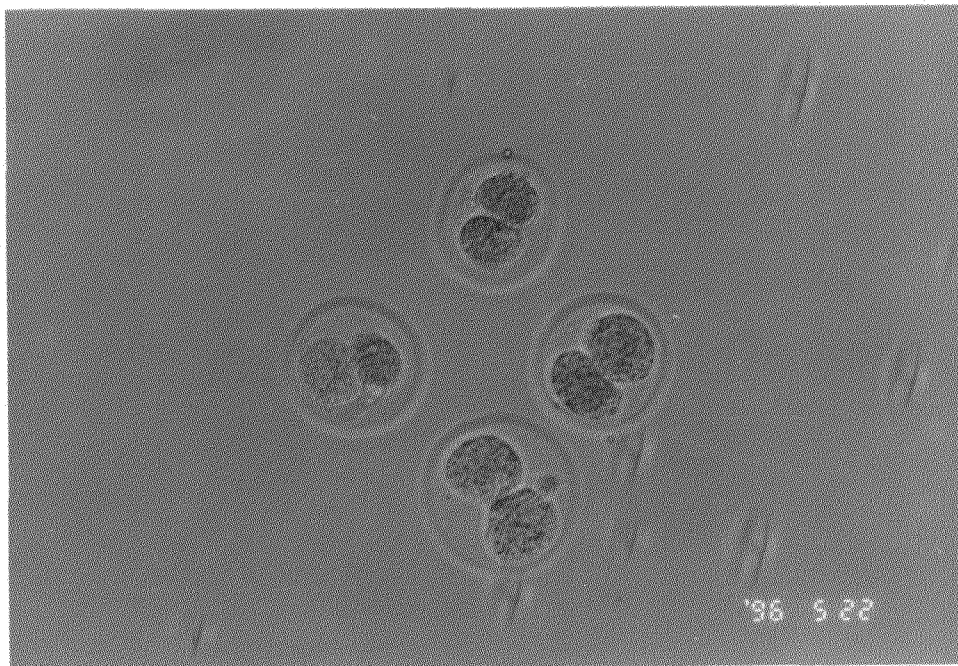


附圖三之 C.
第三日

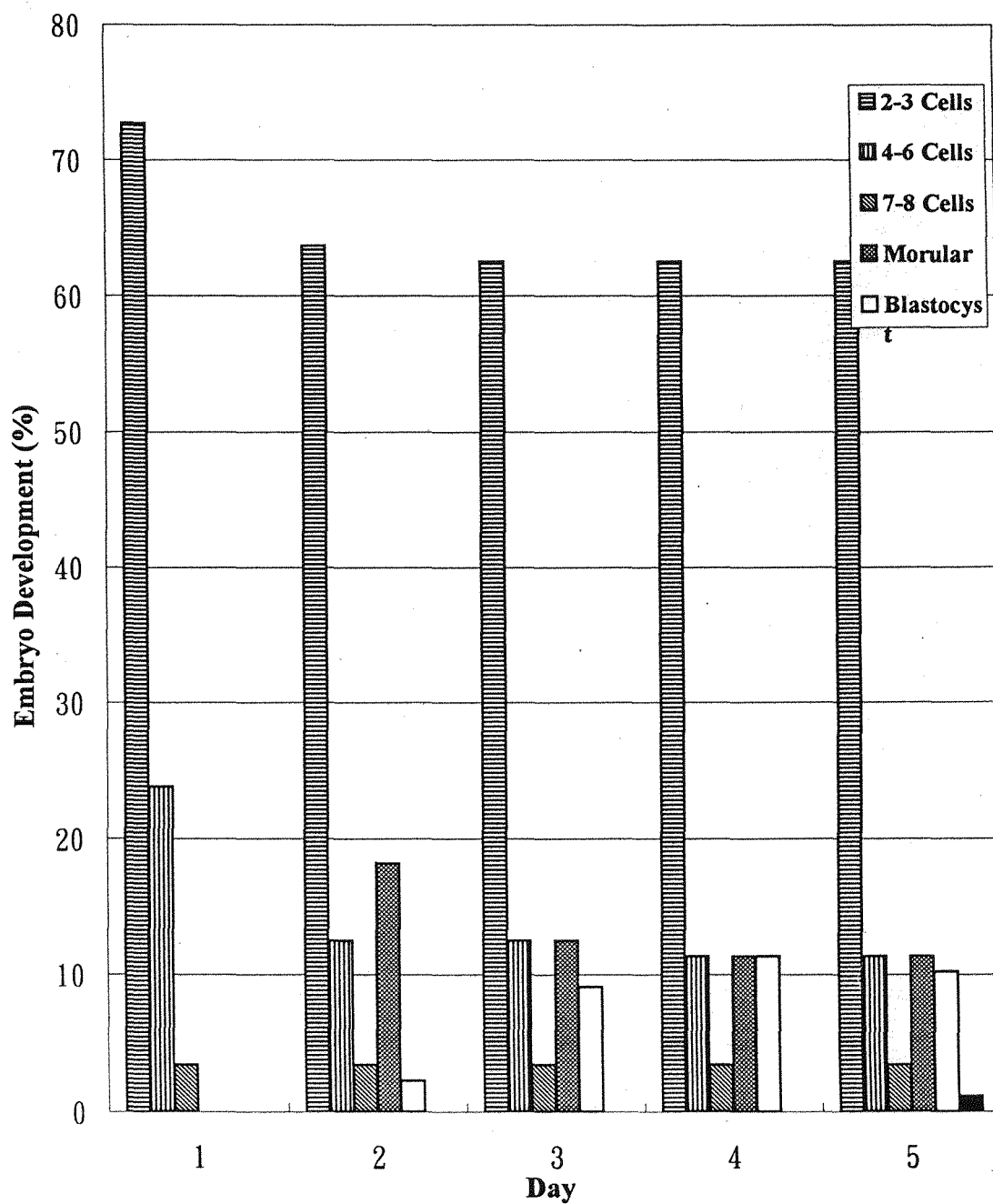
附圖三. 丙酮醛 10^{-1} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖三之 D.
第四日



附圖三之 E.
第五日



附圖三之F. 丙酮醛 10^{-1} mM培養鼠胚每日生長記錄

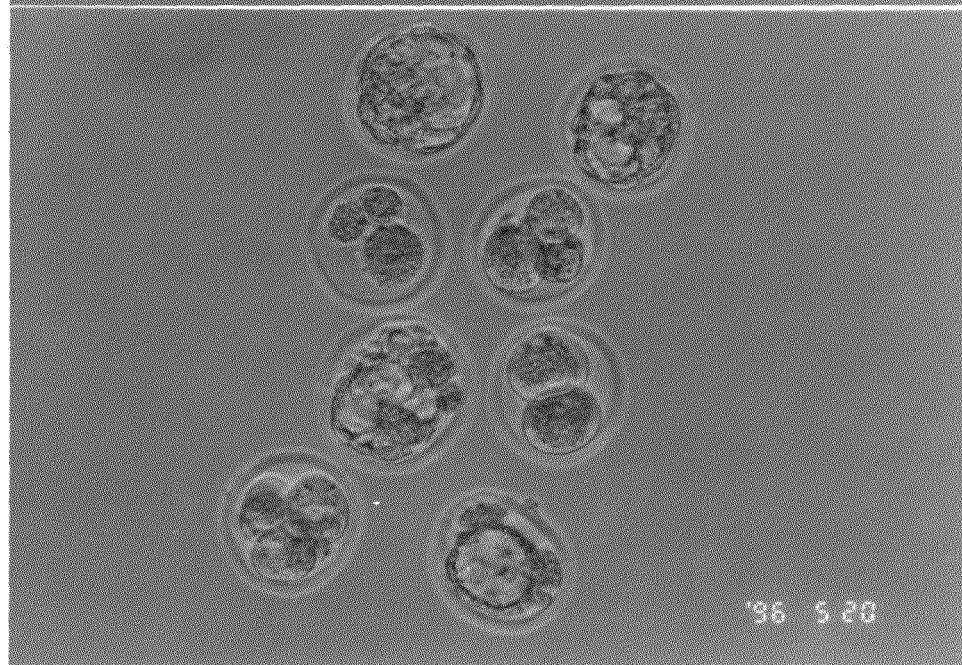
附圖四 . 丙酮醛 10^{-2} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖四之 A.
第一日



附圖四之 B.
第二日

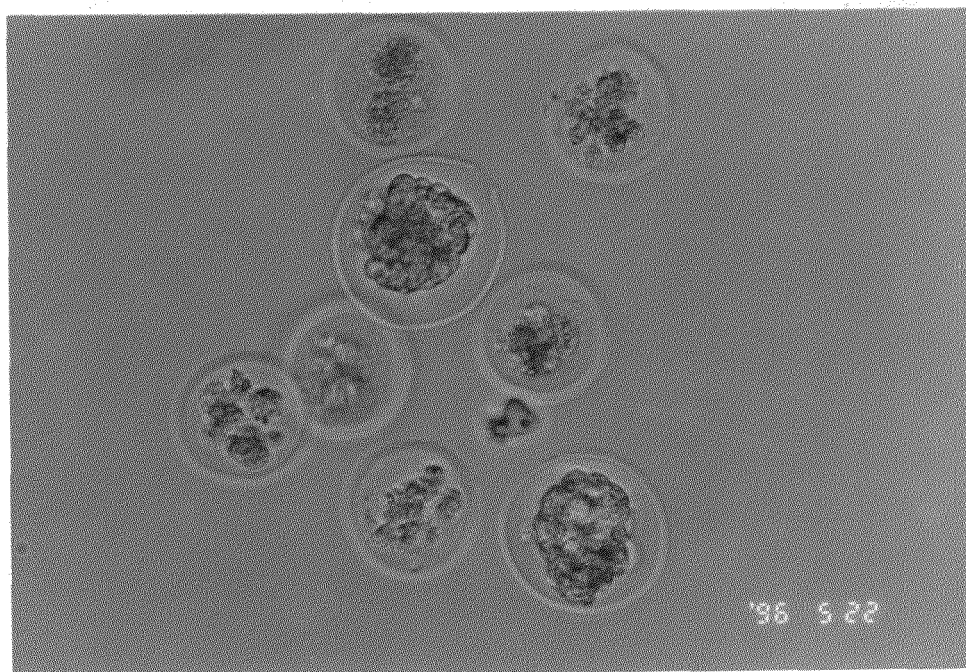


附圖四之 C.
第三日

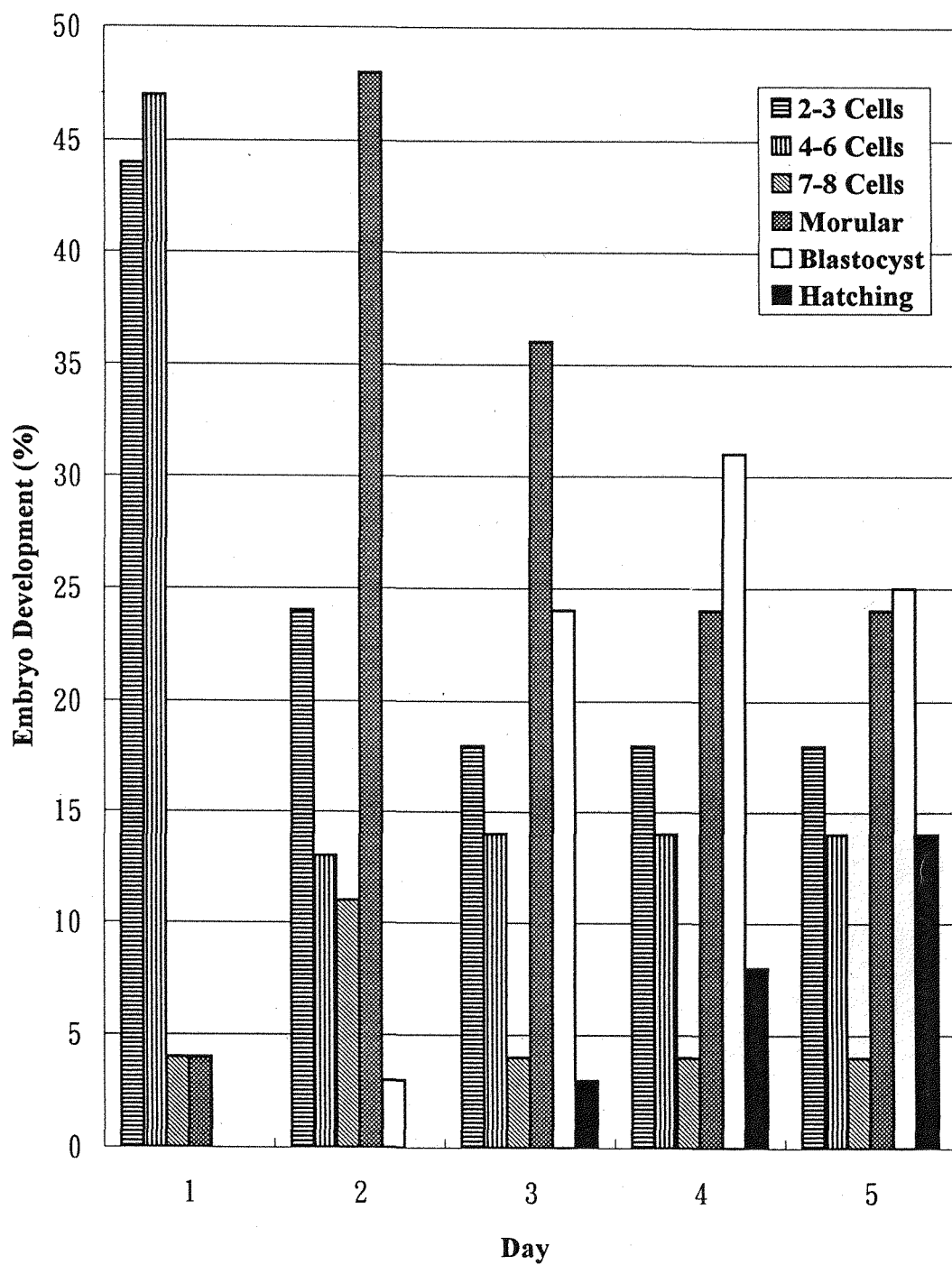
附圖四 . 丙酮醛 10^{-2} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖四之 D.
第四日



附圖四之 E.
第五日

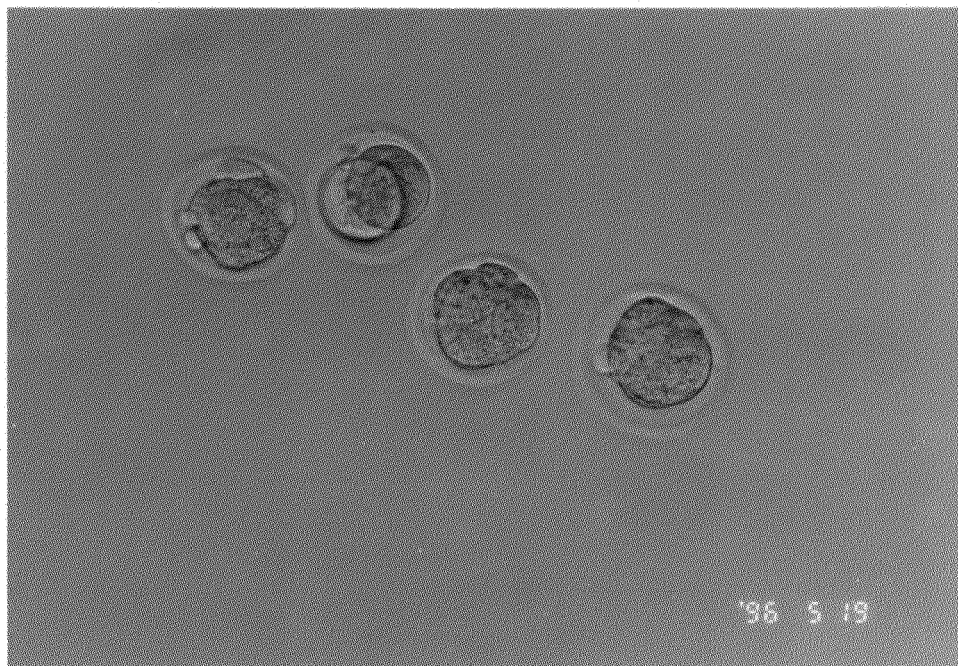


附圖四之F. 丙酮醛 10^{-2} mM培養鼠胚每日生長記錄

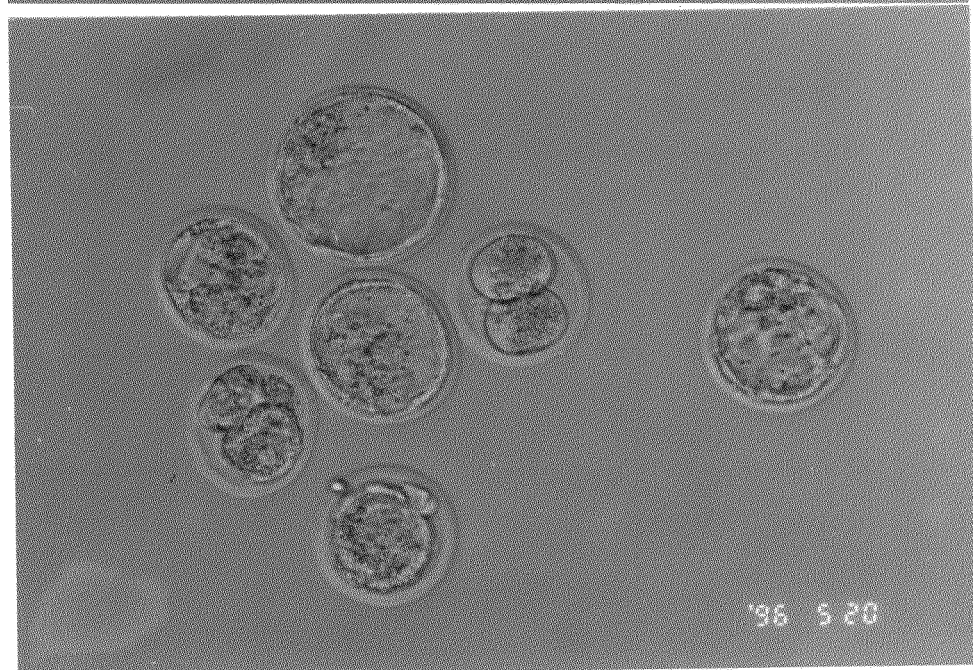
附圖五. 丙酮醛 10^{-3} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大圖)



附圖五之 A.
第一日



附圖五之 B.
第二日

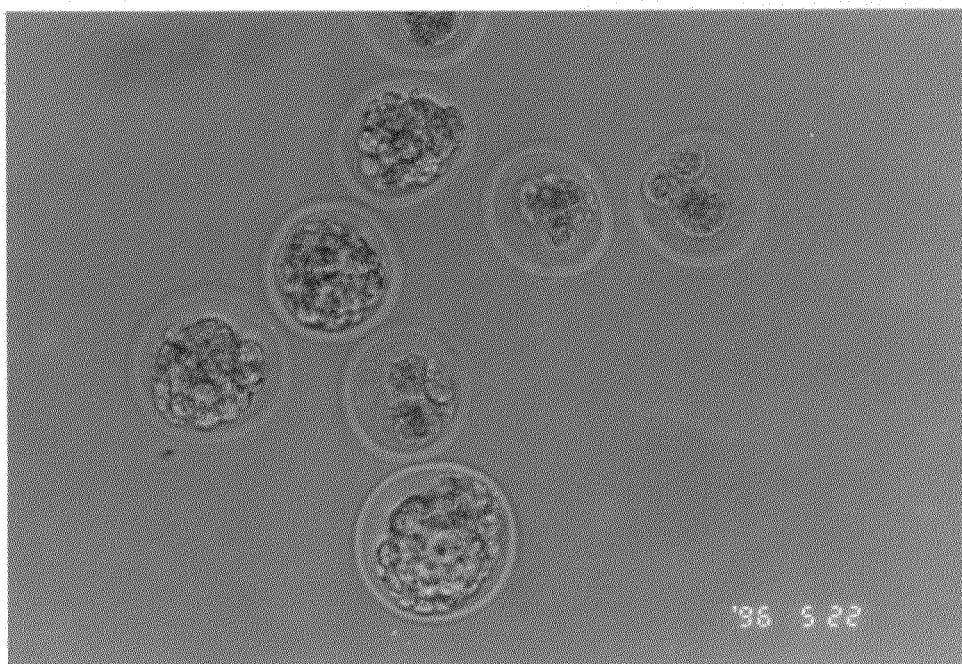


附圖五之 C.
第三日

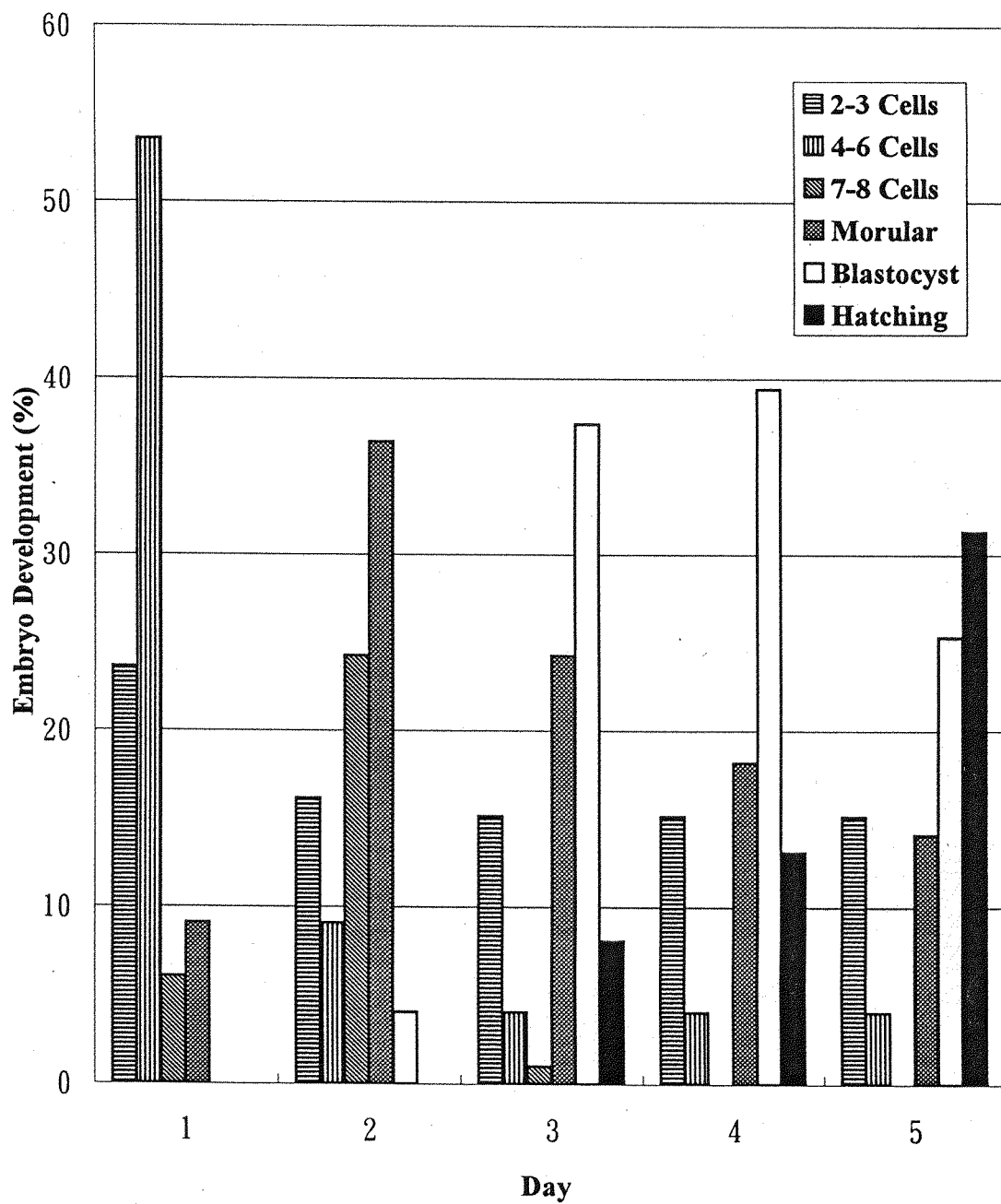
附圖五. 丙酮醛 10^{-3} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖五之 D.
第四日



附圖五之 E.
第五日



附圖五之F. 丙酮醛 10^{-3} mM培養鼠胚每日生長記錄

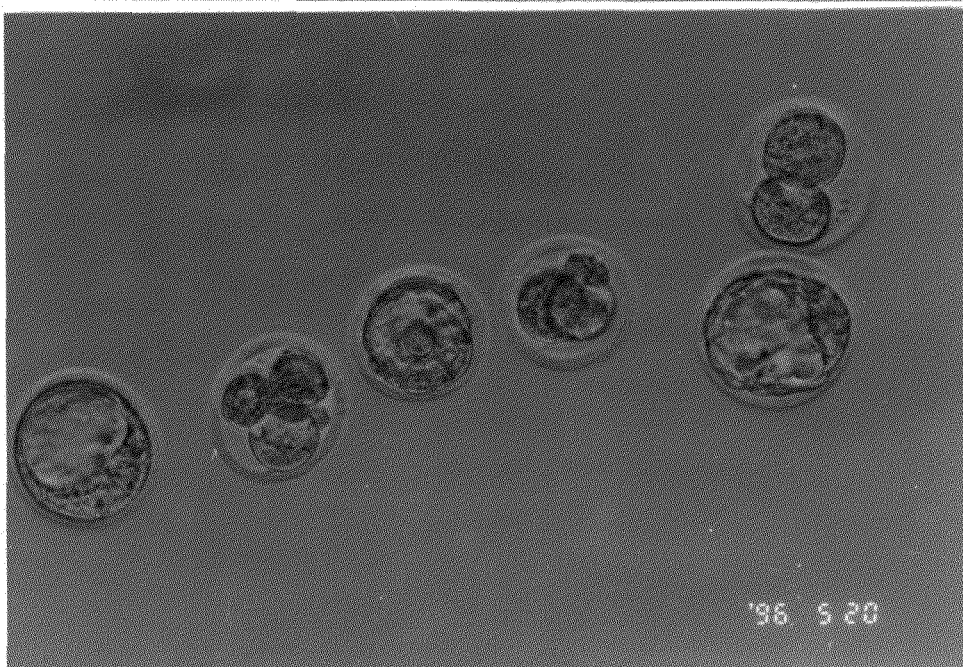
附圖六. 丙酮醛 10^{-4} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大圖)



附圖六之 A.
第一日

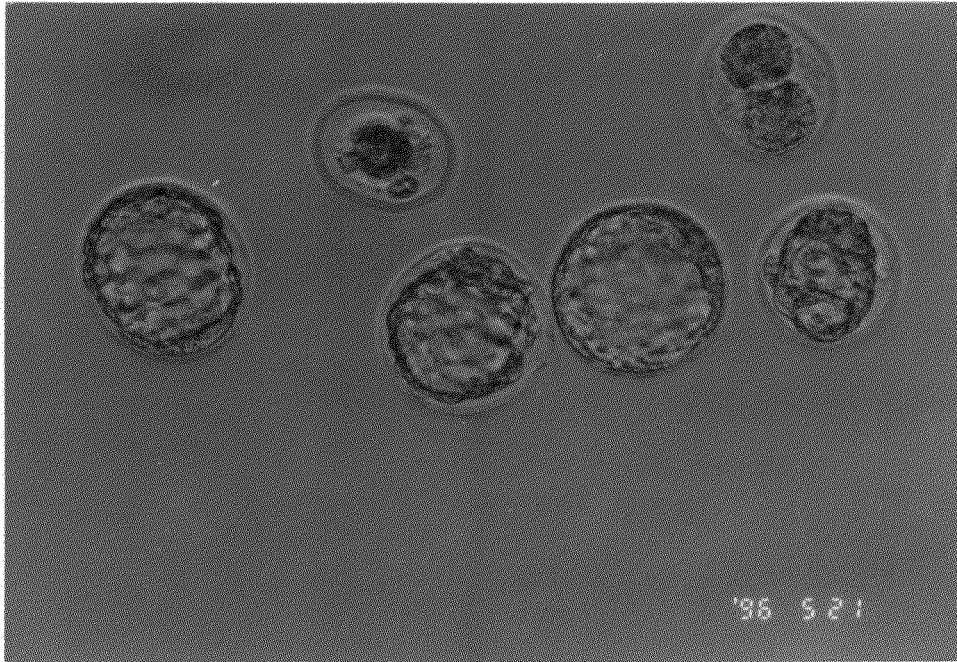


附圖六之 B.
第二日

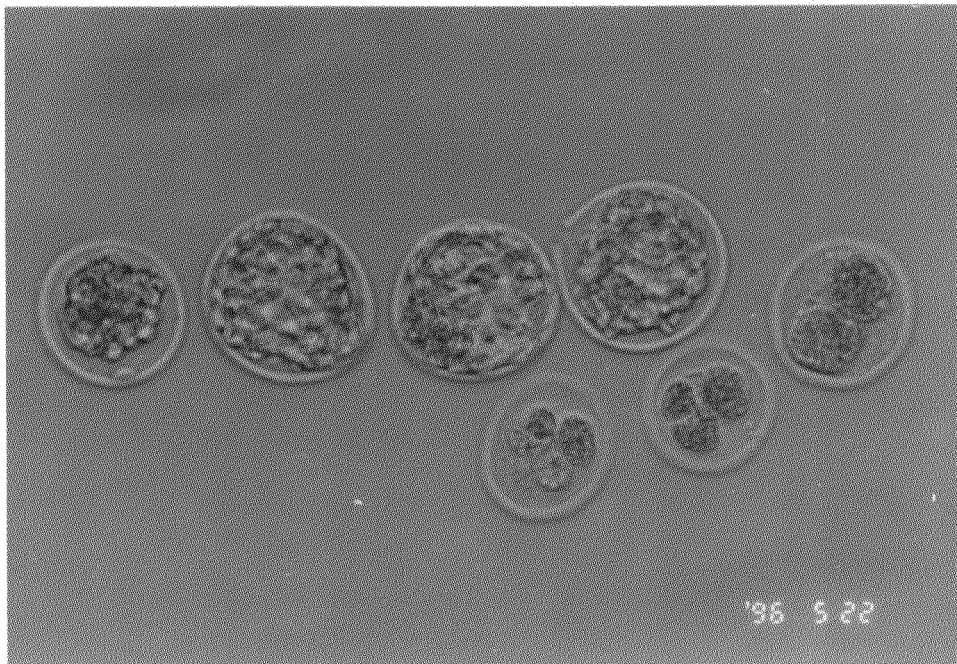


附圖六之 C.
第三日

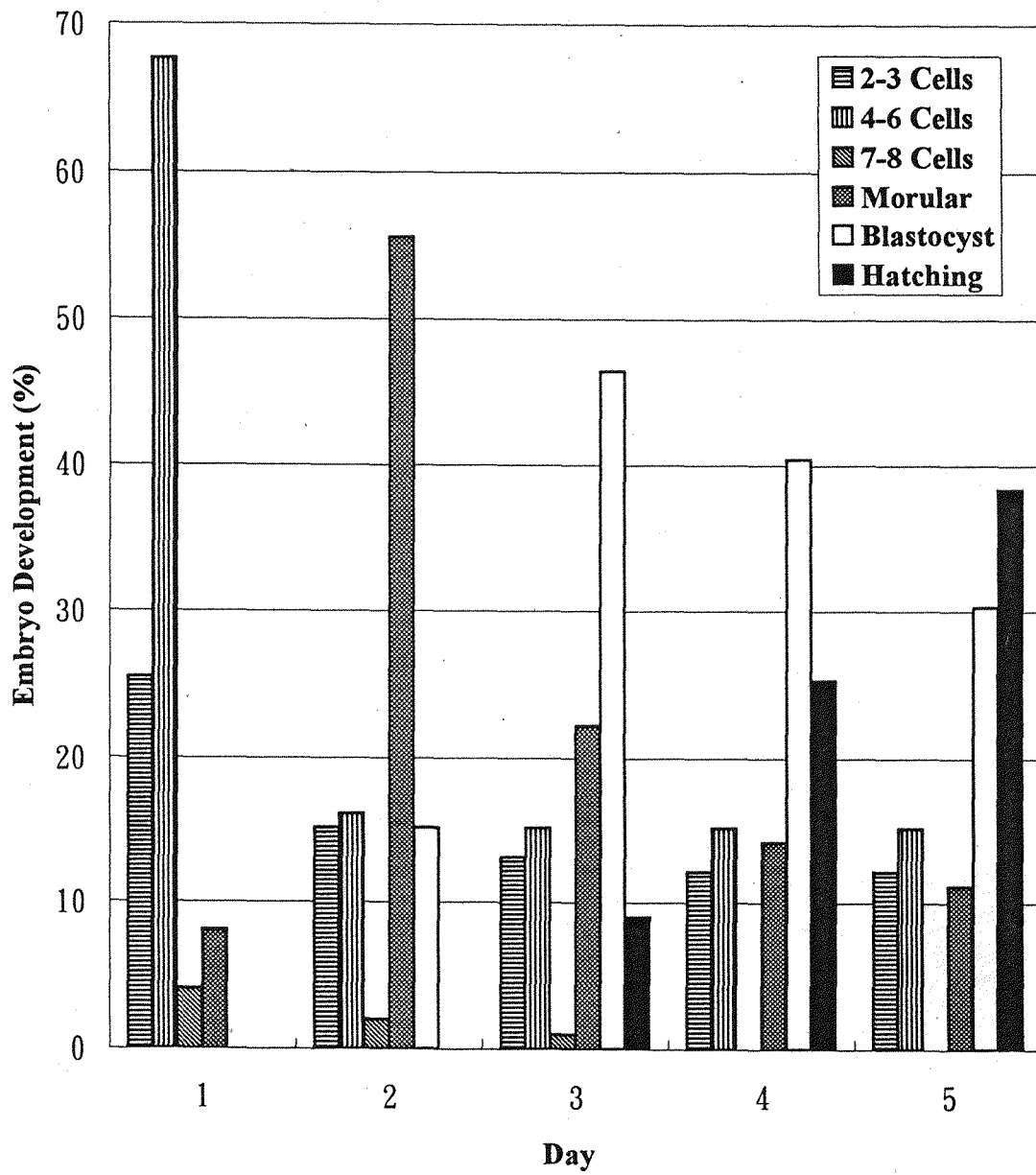
附圖六 . 丙酮醛 10^{-4} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖六之 D.
第四日

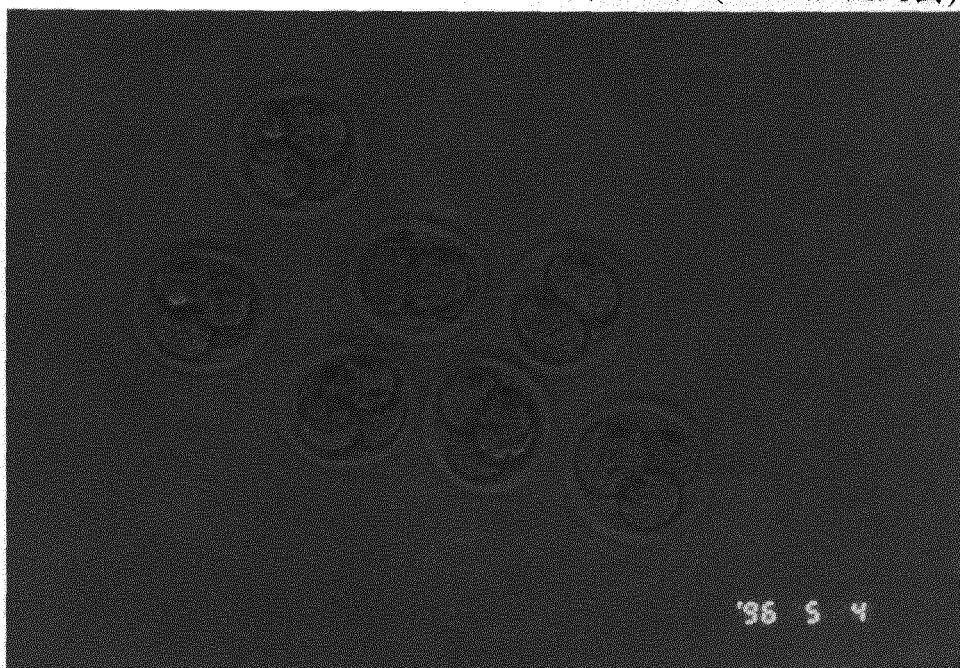


附圖六之 E.
第五日



附圖六之F. 丙酮醛 10^{-4} mM鼠胚每日生長記錄

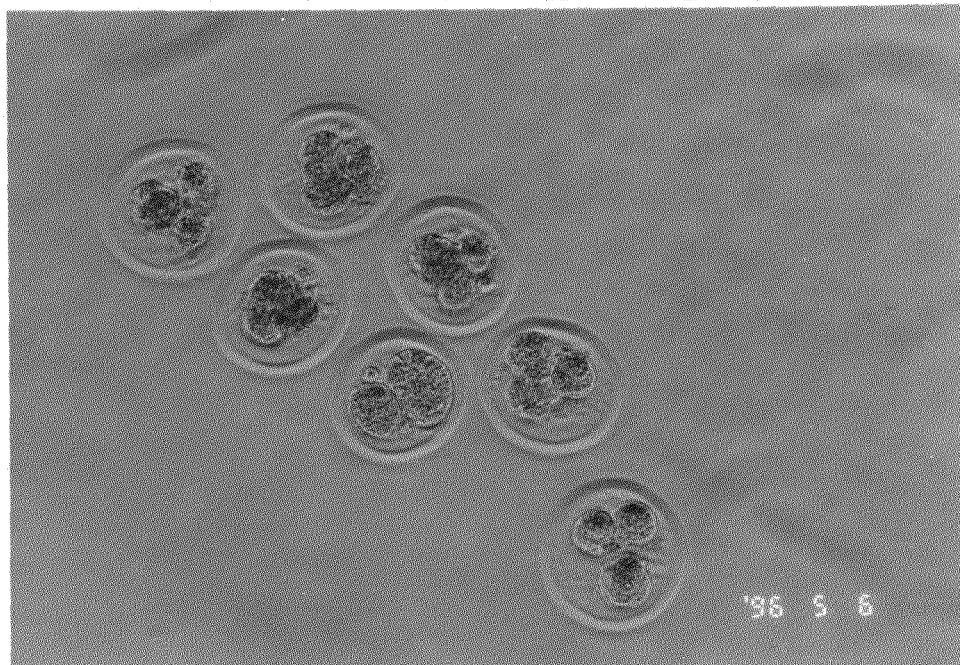
附圖七. 維生素 C 1mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖七之 A
第一日

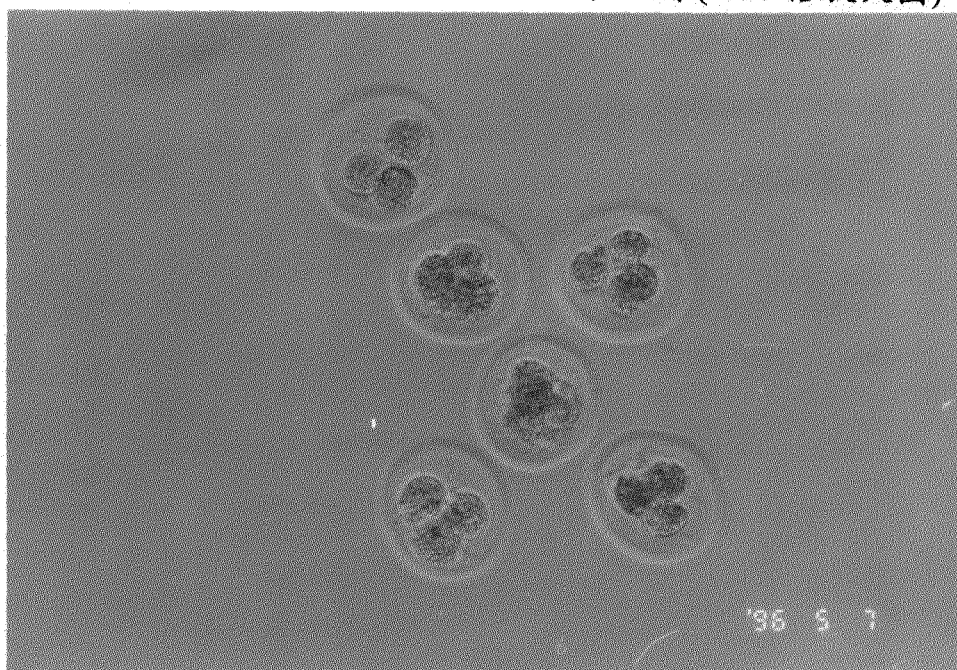


附圖七之 B.
第二日

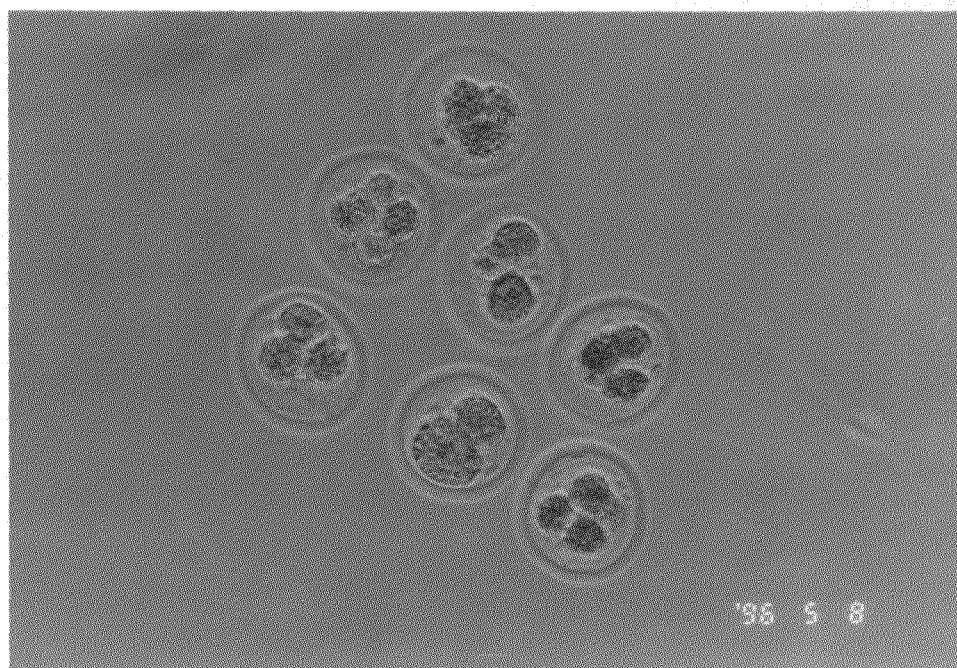


附圖七之 C.
第三日

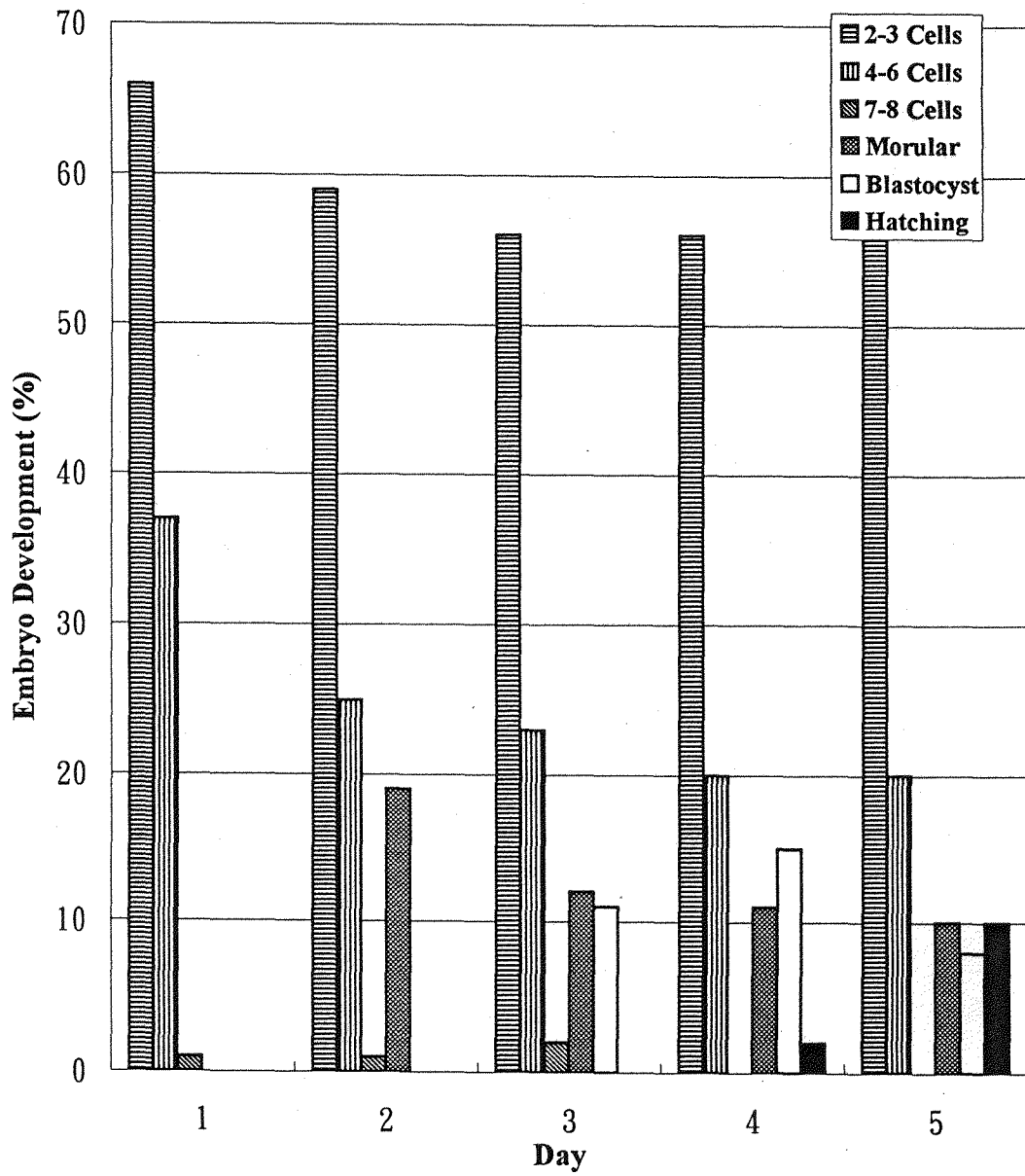
附圖七. 維生素 C 1mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大圖)



附圖七之 D.
第四日

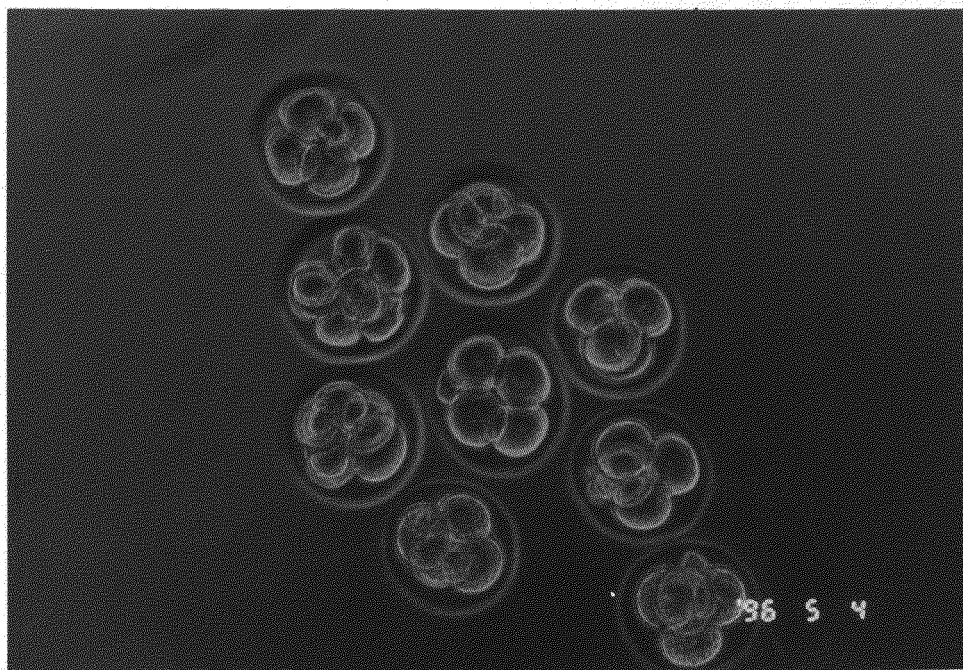


附圖七之 E.
第五日



附圖七之F. 維生素C 1mM培養鼠胚每日生長記錄

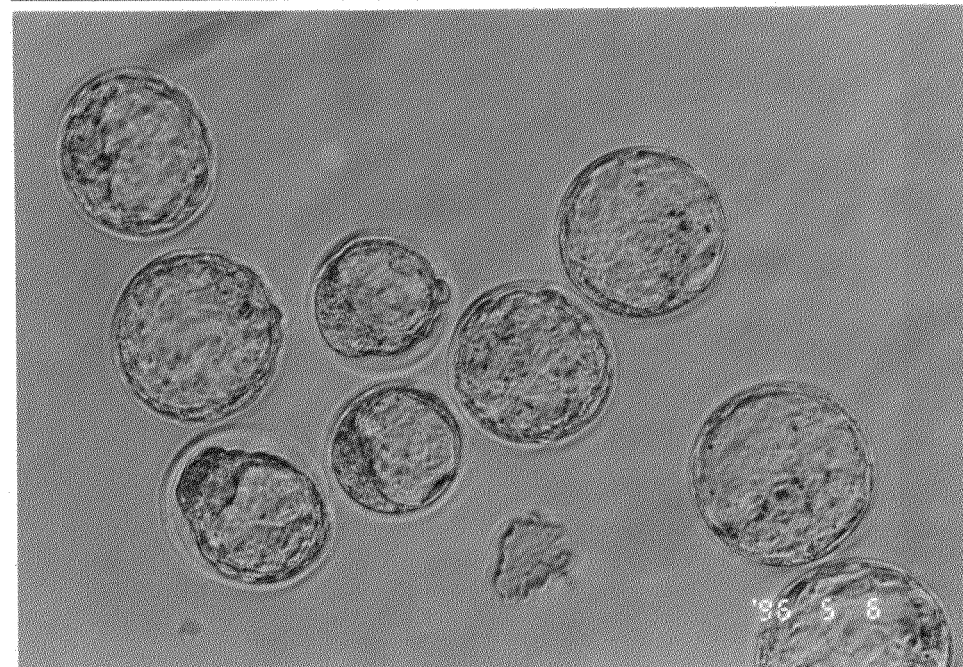
附圖八. 維生素 C 10^{-1} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖八之 A
第一日

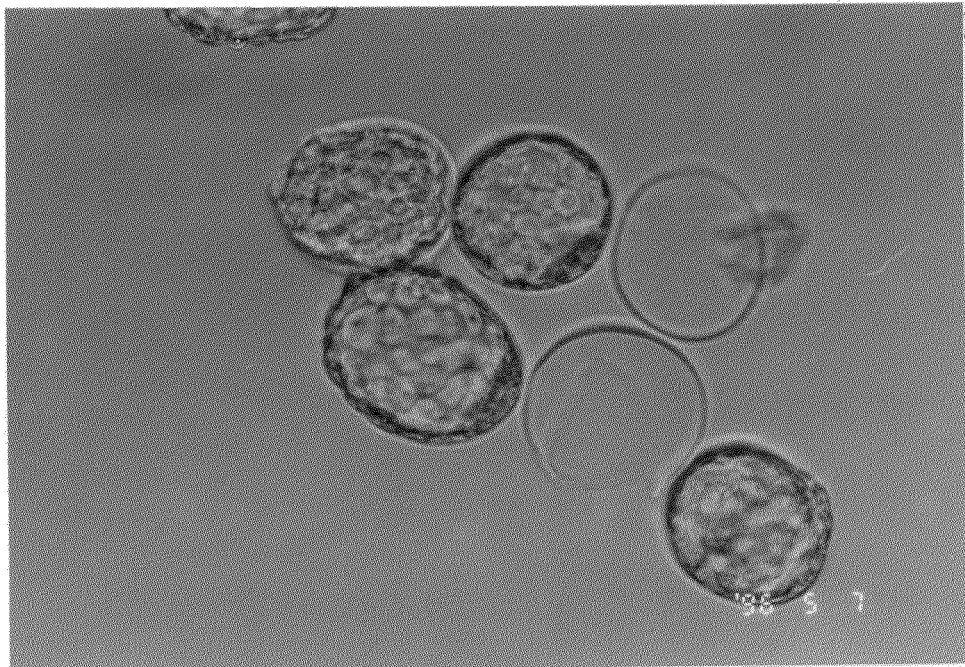


附圖八之 B.
第二日

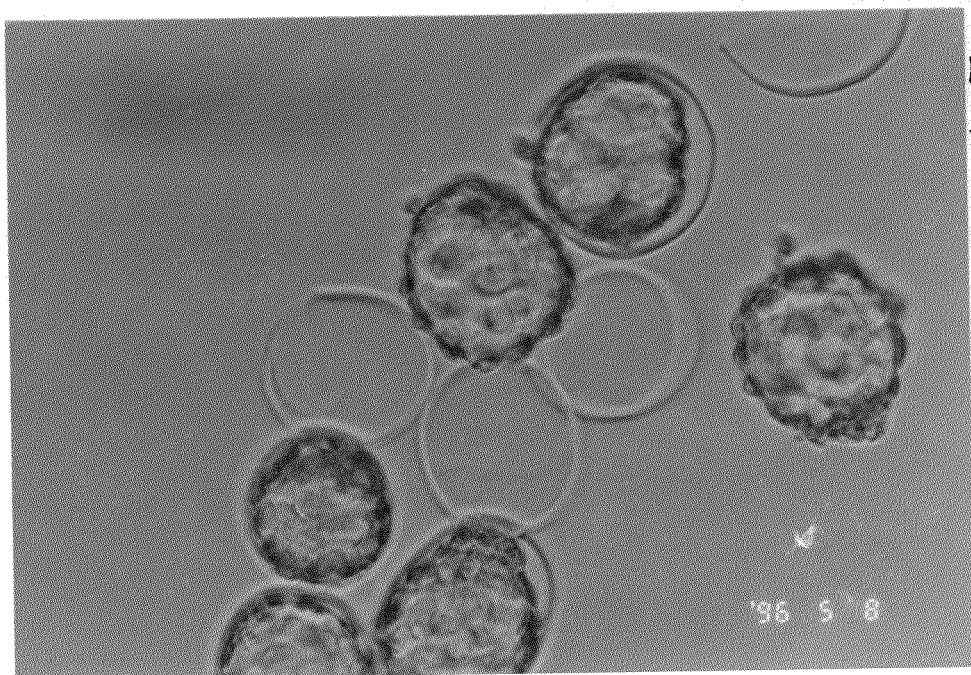


附圖八之 C.
第三日

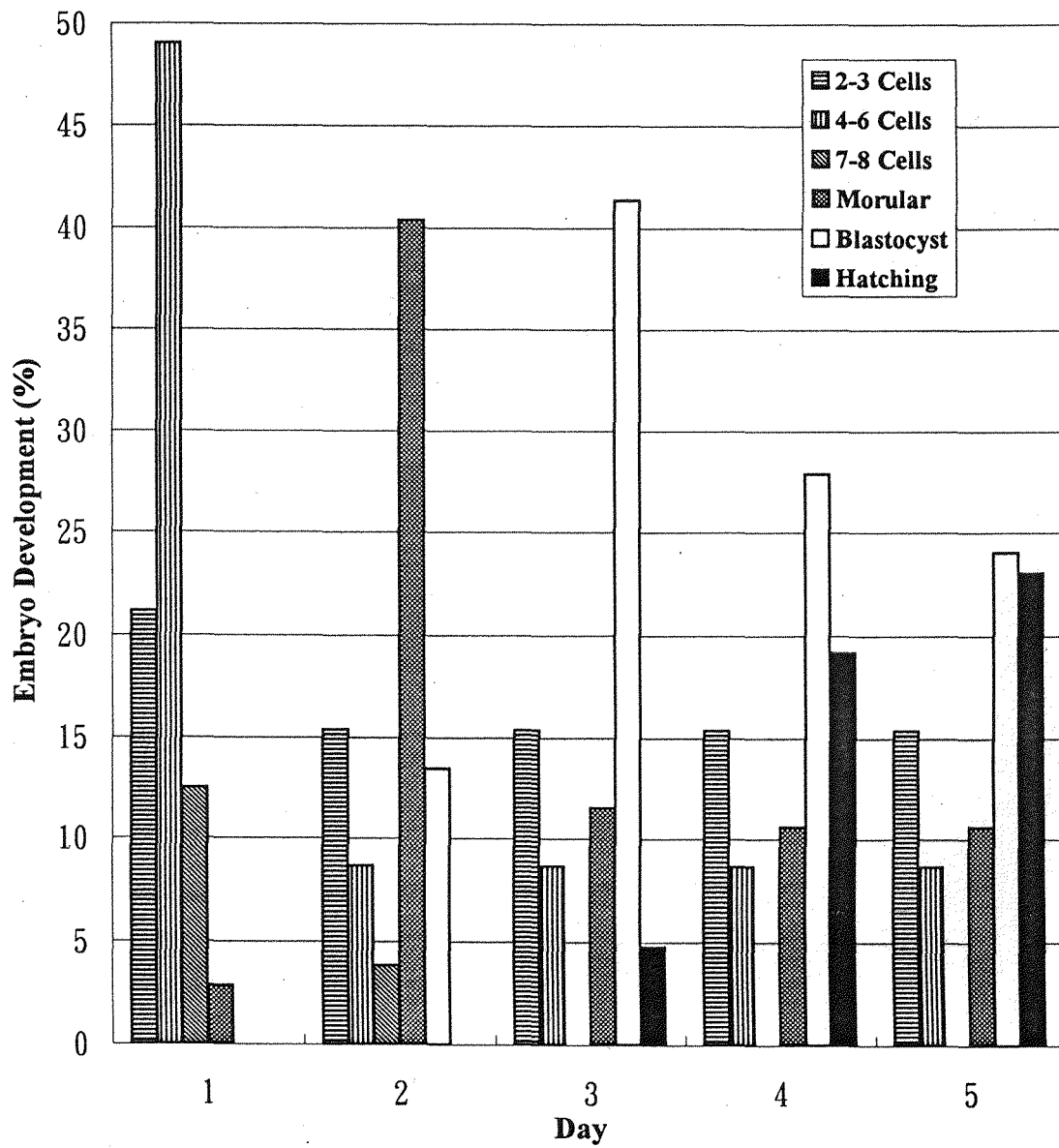
附圖八. 維生素 C 10^{-1} mM 鼠胚生長記錄(200 倍放大圖)



附圖八之 D.
第四日

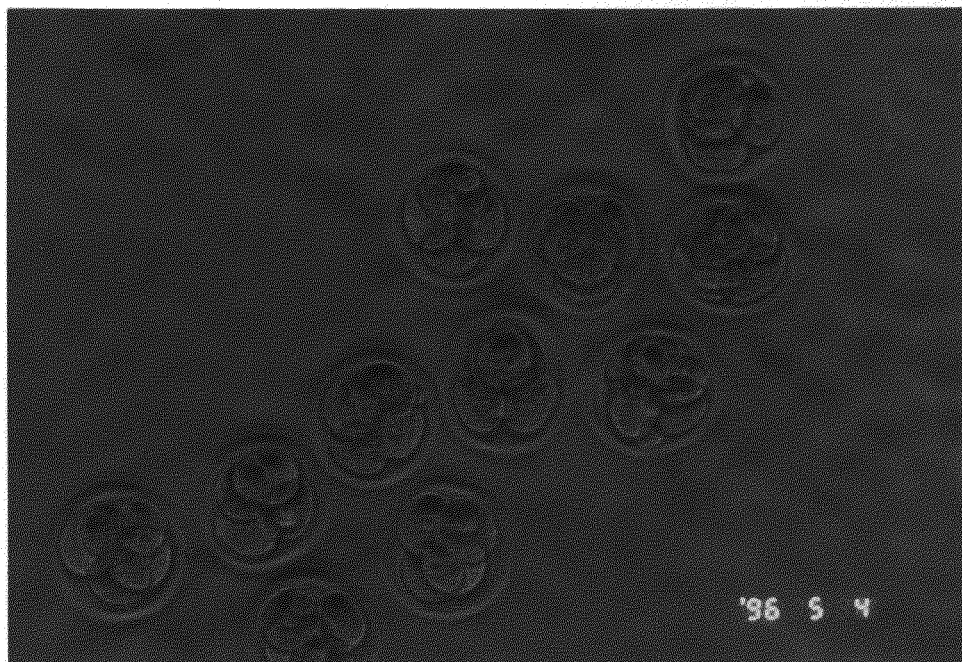


附圖八之 E.
第五日

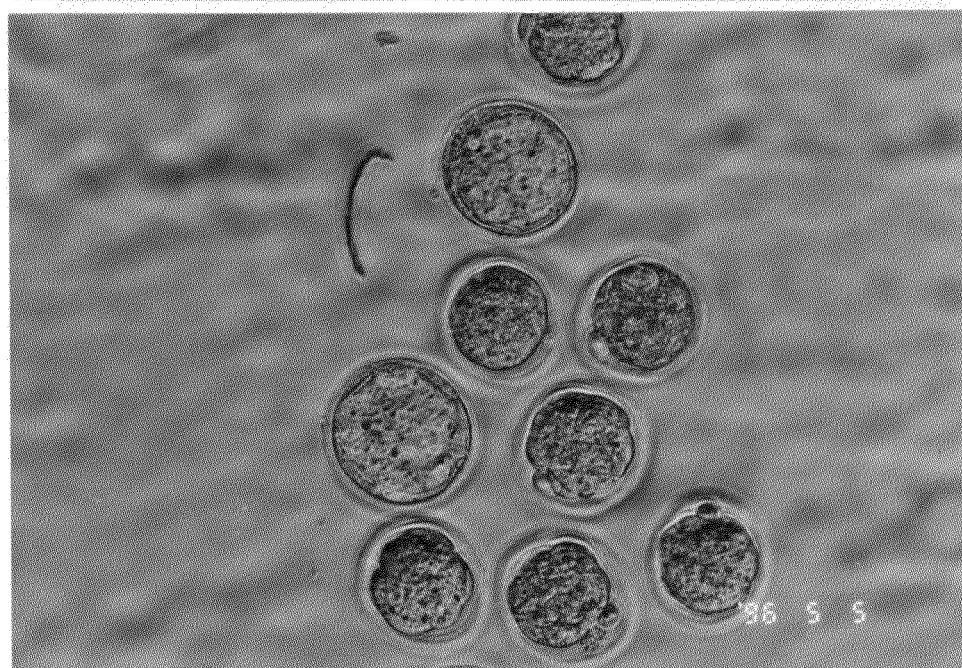


附圖八之F. 維生素C 10^{-1} mM 培養鼠胚每日生長記錄

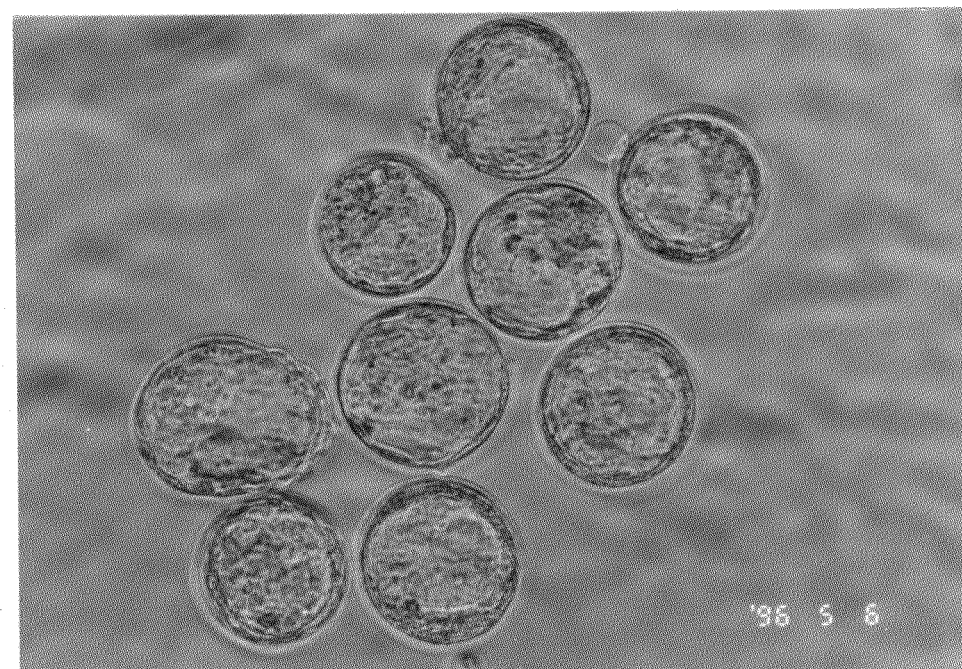
附圖九. 維生素 C 10^{-2} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖九之 A
第一日

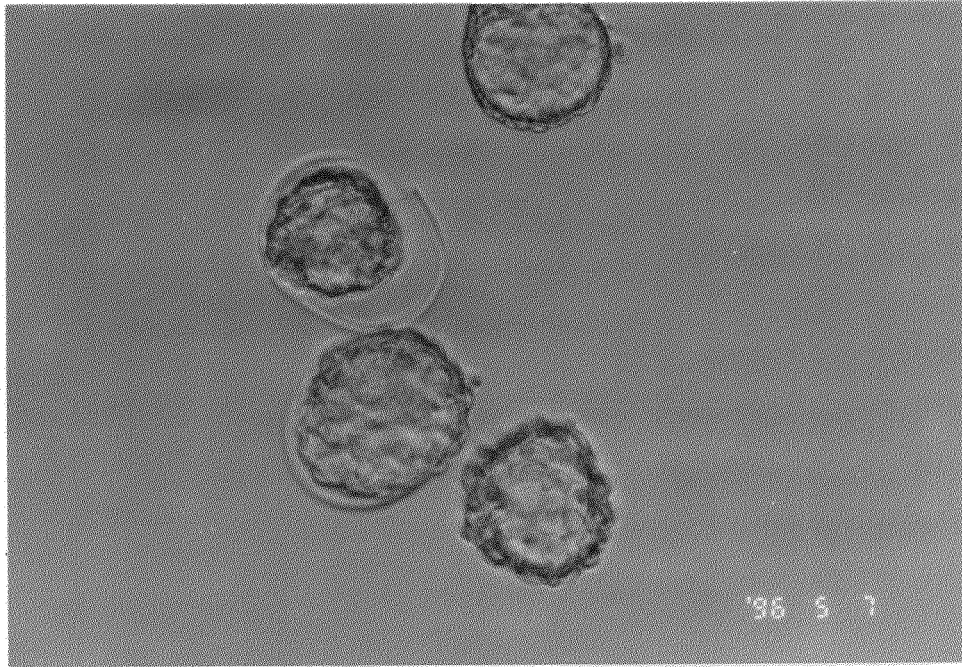


附圖九之 B.
第二日

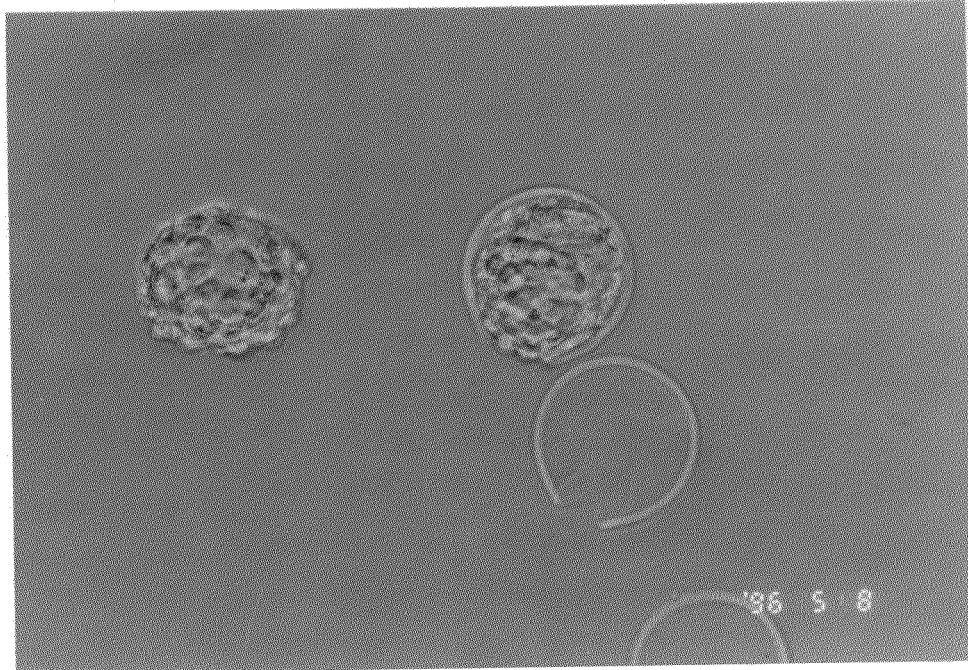


附圖九之 C.
第三日

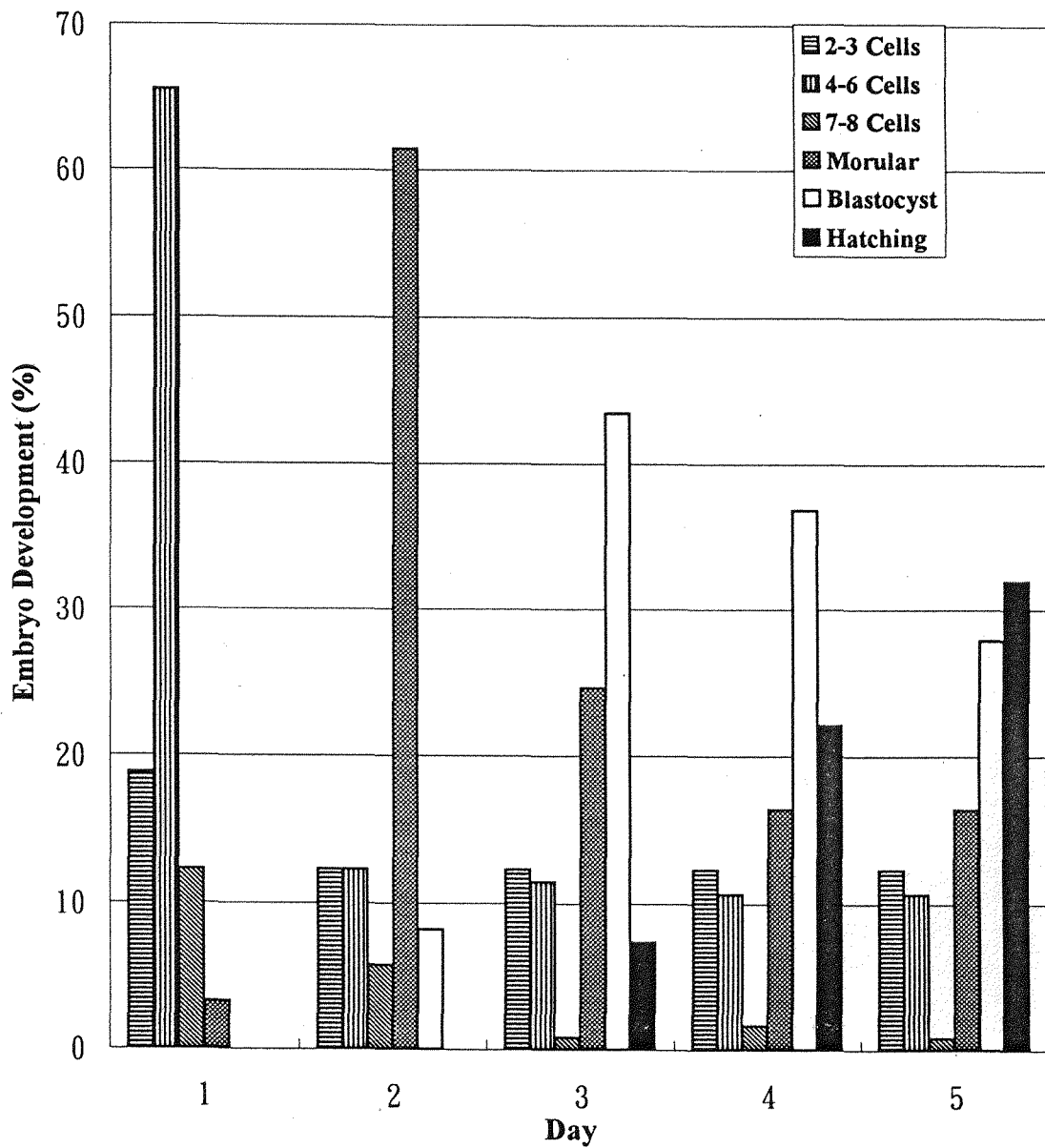
附圖九. 維生素 C 10^{-2} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖九之 D
第四日

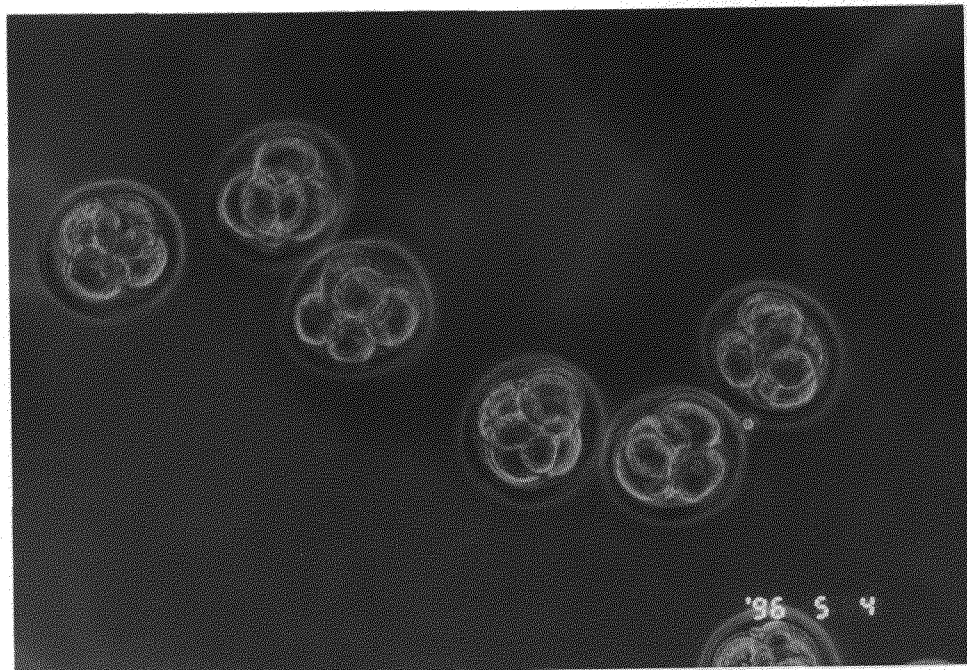


附圖九之 E.
第五日

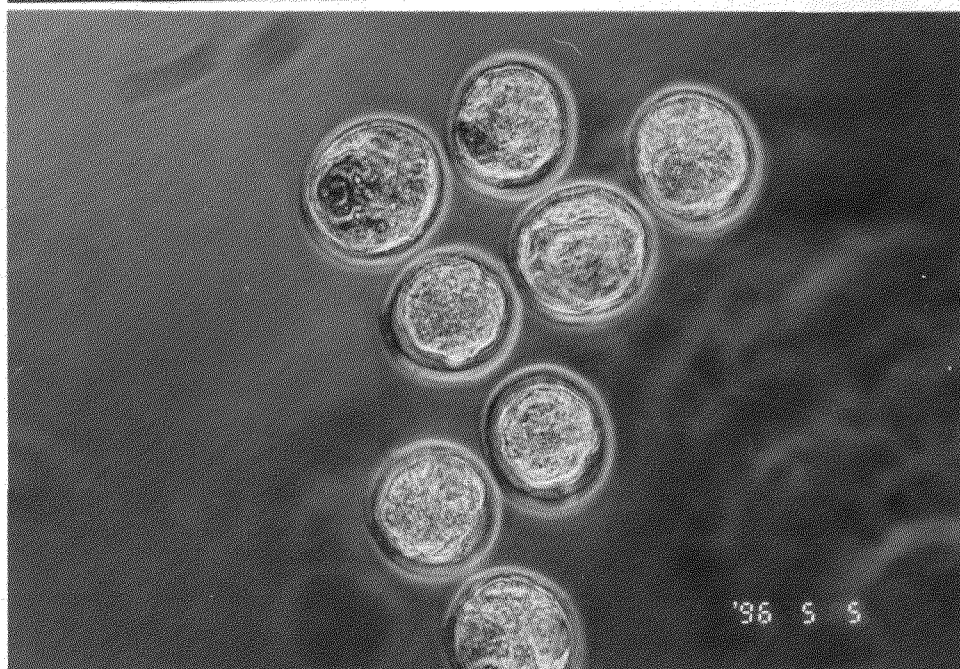


圖九之F. 維生素C 10^{-2} mM培養鼠胚每日生長記錄

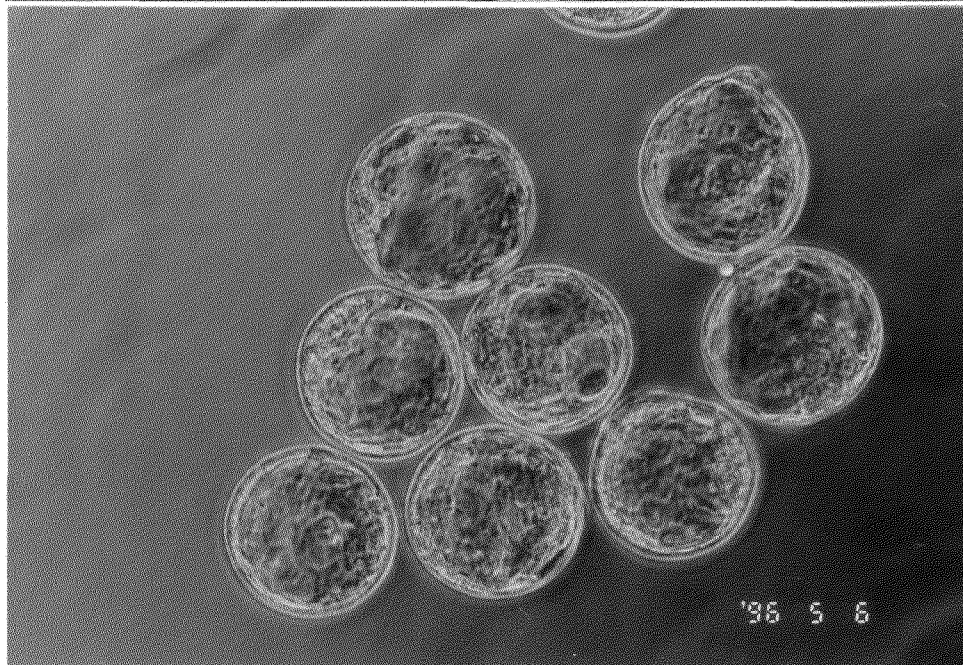
附圖十. 維生素 C 10^{-3} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖十之 A.
第一日



附圖十之 B.
第二日

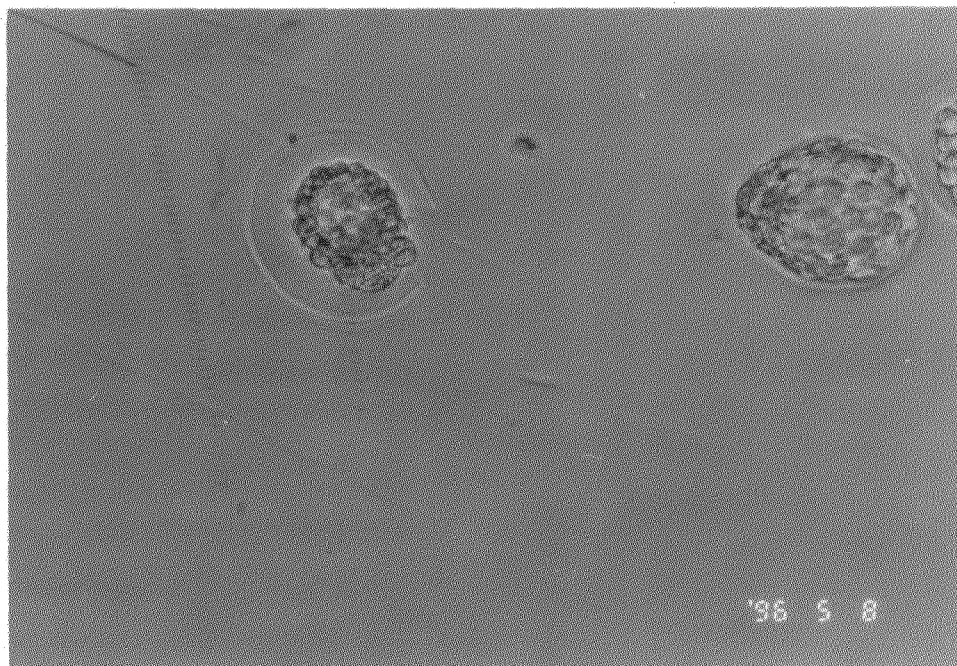


附圖十之 C.
第三日

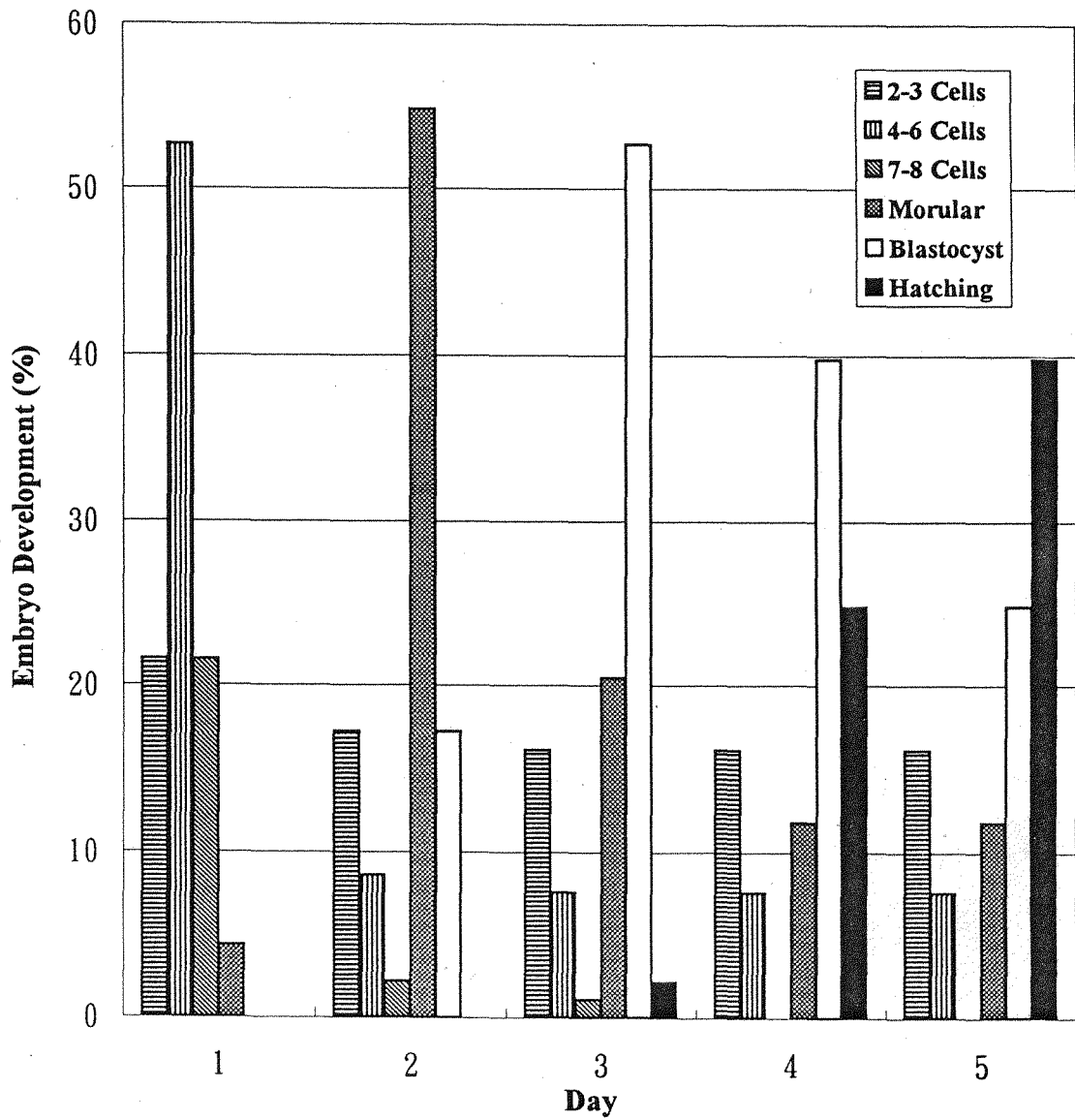
附圖十. 維生素 C 10^{-3} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖十之 D.
第四日

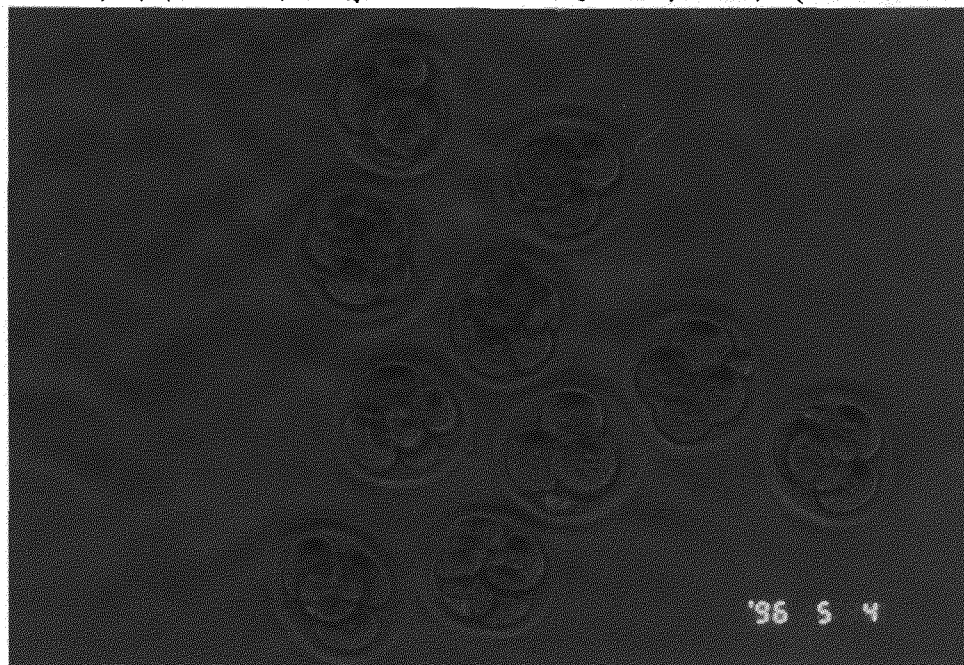


附圖十之 E.
第五日

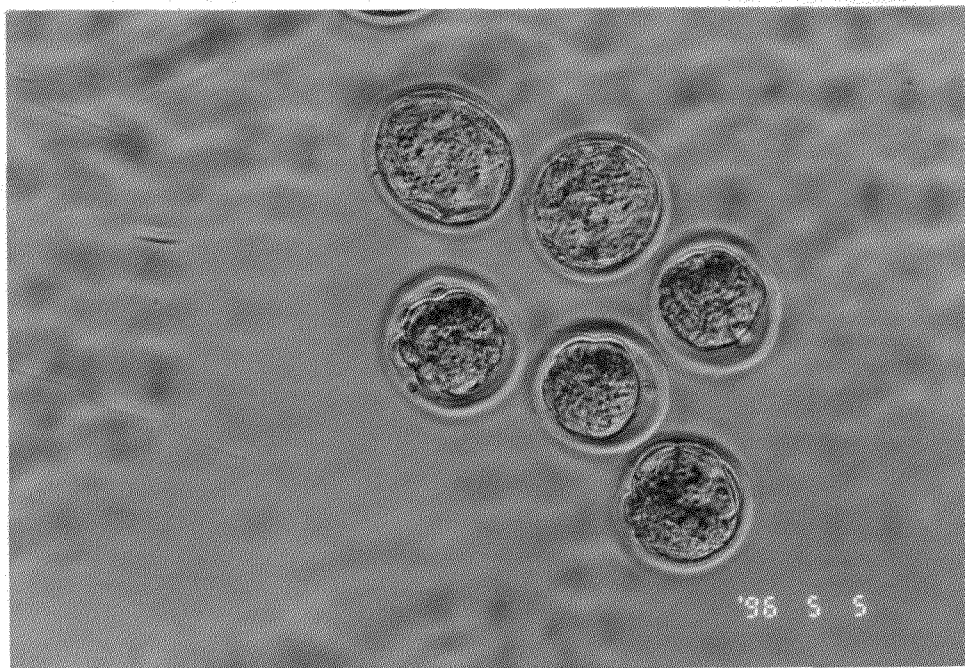


附圖十之F. 維生素C 10^{-3} mM培養鼠胚每日生長記錄

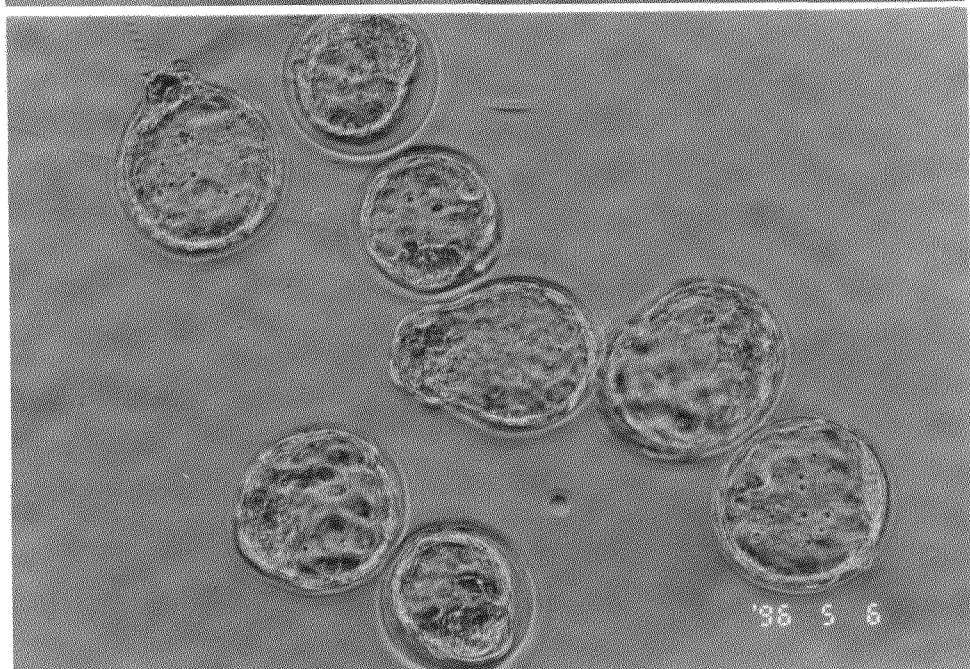
附圖十一. 維生素 C 10^{-4} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖十一之
A. 第一日



附圖十一之
B. 第二日

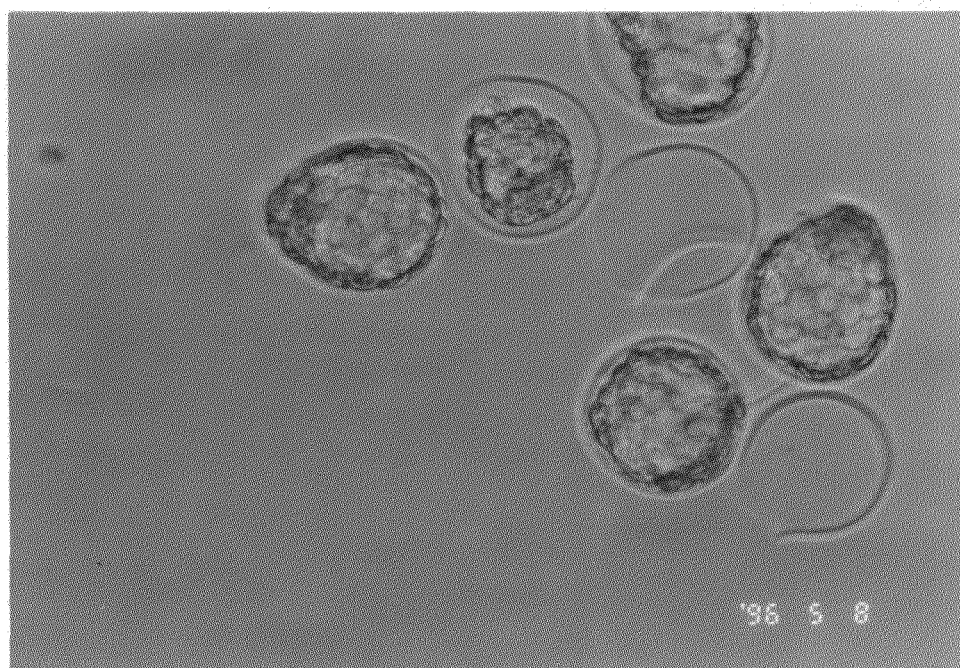


附圖十一之
C. 第三日

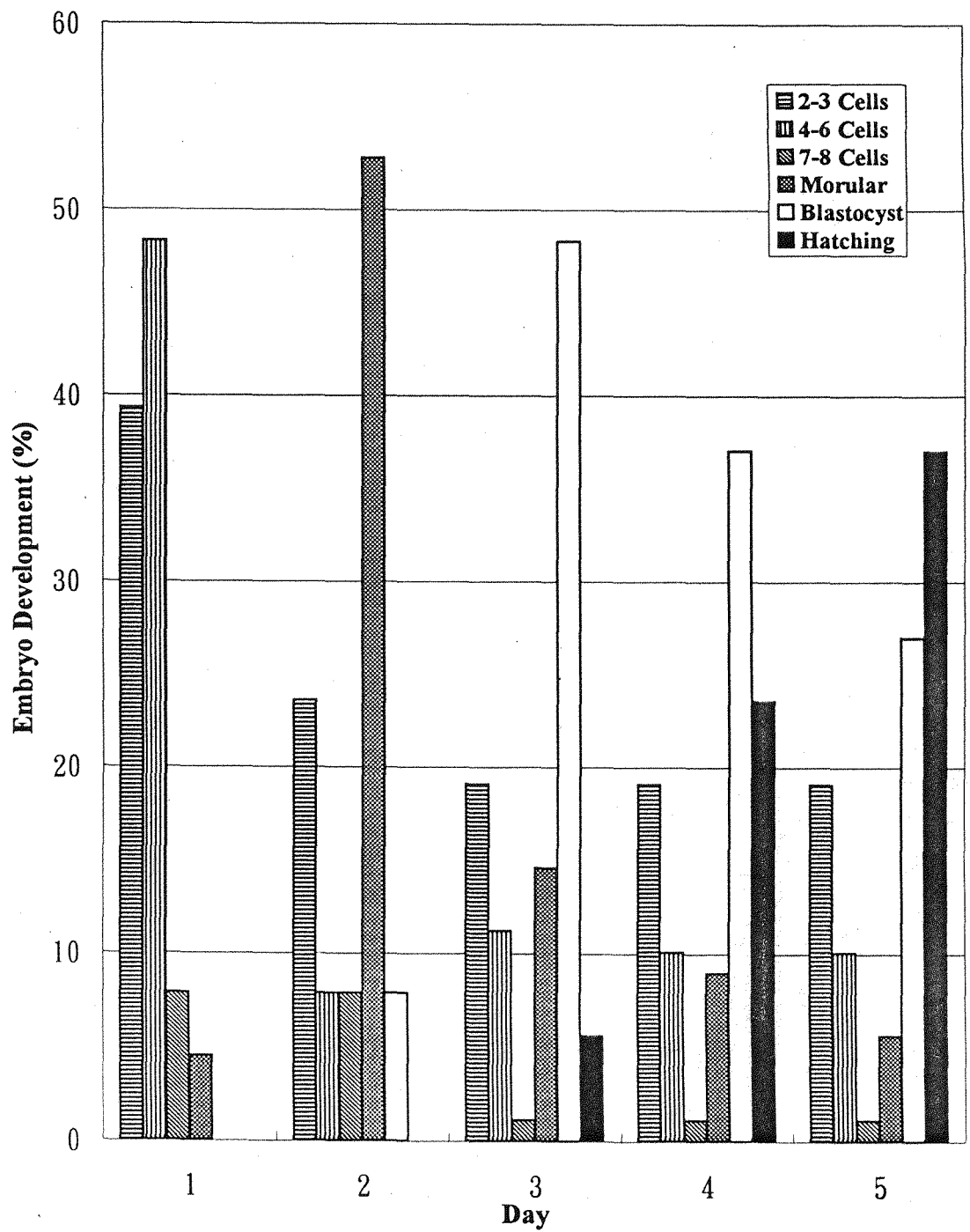
附圖十一. 維生素 C 10^{-4} mM 鼠胚生長記錄 (200 倍放大圖)



附圖十一之
D. 第四日



附圖十一之
E. 第五日



附圖十一之F. 維生素C 10^{-4} mM培養鼠胚每日生長記錄