

R  
008.8  
1158  
87

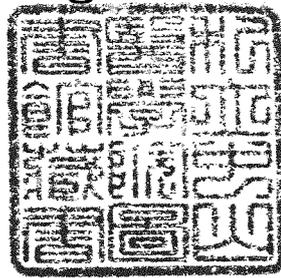
私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

指導教授：林瑞生 教授

半導體金屬對 V79 中國頰鼠肺細胞之細胞遺傳  
毒性的研究

Studies on the Cytogenotoxicity of  
Semiconductor metals in V79 Chinese hamster  
lung cells



研究生：張惠敏 撰

中華民國八十七年六月

中山醫學院圖書館



C050014

參考書恕不外借

# 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醫學研究所  
組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士學位論文。

論文名稱：半導體金屬對V79中國頰鼠肺細胞之細胞遺傳毒性的研究

同意 本國網路或  
 不同意 本國網路或  
具科，並重製  
不有學並重製  
同著委與製  
著作員台發  
財產科學  
權之技術  
論及網路  
文資料及  
提要中心  
，授予國家  
圖書館、本  
人畢業後  
業錄於該  
校及行政  
院之單位  
光碟

同意 本資微佰至  
 不同意 本資微佰至  
人料縮小之  
具中小之  
不有心中  
同著，製  
著作得作  
財產不之本  
權地研究  
之域報因  
論時涉再  
文間、及  
全與獎專  
資數代等  
料以表智  
，授予行  
政院國  
家科發  
學行資  
委，料  
員並等  
會得值  
科享該  
學該台  
術中幣  
伍延

同意 本業人  
 不同意 本業人  
具學以  
不有校各  
同著圖種  
著作書方  
財產館重  
權為製  
之學，不  
論及研  
文研時  
全之目  
資之與  
料的地  
，授予教  
育部指  
定製一  
份為限  
繳或為  
送或為  
圖述之  
書目的  
館及再  
本授權

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：林瑞生

研究生簽名：張東亞 學號：R85125  
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 12 月 19 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，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. 依著權法定的規，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，妥當先將專著財產權授與人，請分別在三種利縮等式的同欄內銜選並填妥。
2. 依著權法定的規，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，妥當先將專著財產權授與人，請分別在三種利縮等式的同欄內銜選並填妥。
3. 依著權法定的規，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，妥當先將專著財產權授與人，請分別在三種利縮等式的同欄內銜選並填妥。
4. 依著權法定的規，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，妥當先將專著財產權授與人，請分別在三種利縮等式的同欄內銜選並填妥。
5. 依著權法定的規，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，妥當先將專著財產權授與人，請分別在三種利縮等式的同欄內銜選並填妥。

-----  
研究生姓名：張忠誠 聯絡電話：-----  
地址：新加坡新加坡區瑞里一街6號  
-----

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必要條件之一，經中山醫學院醫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

國立台灣大學醫學院  
藥理學暨毒理學  
研究所教授

蕭水銀 博士

蕭水銀

國立台灣大學醫學院  
毒理學研究所副教授

劉興華 博士

劉興華

私立中山醫學院藥理學  
暨醫學研究所教授  
(論文指導教授)

林瑞生 教授

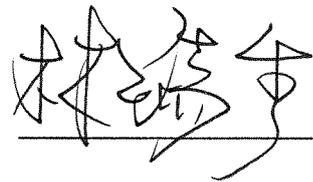
林瑞生

中華民國八十七年六月四日

學生張惠敏 論文題目為半導體金屬對 V79 中國頰鼠肺  
細胞之細胞遺傳毒性的研究，其論文已經中山醫學院醫學  
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：林瑞生 教授

簽名：

Handwritten signature of Lin Ruisheng in black ink, written over a horizontal line.

中華民國八十七年六月十九日

## 誌 謝

學位的取得，是由許多人的幫助及包容堆積而成，而學習是一段艱辛的過程，其中的困難只有自己能體會，兩年來在課業上及論文上受到林瑞生老師悉心的指導及校正，心中不勝感激，另外也感謝蕭水銀老師及劉興華老師對論文的指正及建議，使得論文能順利完成。

在學期間，感謝李怡靜老師在實驗上的教導及幫助，以及劉生明老師、孟琴、俊吉在精神上的支持及鼓勵，使自己能在起落的情緒中一路走來，而對於待人處事能有一番新的見解及體認。

最後最感謝的是我的家人尤其是我的父母，從小到大即使在最艱困的環境中，他們仍堅持給我最理想的學習環境，讓我能完成學業，取得藥生、藥師甚至是廢水處理執照，也支持我完成自己的理想，取得碩士學位，讓我能擁有充足的資源走出校園，所以感謝所有曾經幫過我的師長及朋友，在此一併致上最大的謝意。

# 目 錄

頁數

中文摘要 (Chinese Abstract).....	1
英文摘要 (English Abstract).....	4
細胞周期和微小核分析法 (The Cell Cycle and .... Micronucleus Assay)	7
緒論 (Introduction).....	24
材料和方法 (Materials and Methods).....	30
結果 (Results).....	41
討論 (Discussion).....	48
圖表 (Figures and Tables).....	55
參考文獻 (References).....	74

## 中文摘要 (Chinese Abstract)

隨著人類文明的進步，半導體成品已和人類生活息息相關，所以近年來半導體工業得快速發展。半導體產品因使用目的不同而成分會有所不同，其中銻 (In)、銻 (Sb)、鎵 (Ga)、鍺 (Ge) 均被使用於晶片中。半導體工業表面上看起來相當安靜且安全，但其晶片在製造過程需使用許多有害的化學物質，如管理不善將危及現場操作人員的健康和污染環境，因此半導體的從業人員可能因工作環境之不良而增加曝露這些半導體金屬的機會，但半導體金屬成分對人類細胞或其他哺乳動物細胞之細胞毒性及遺傳毒性除砷被大量研究並確認為人類致癌物和銻稍被研究外其餘尚少被研究。

本研究利用微小核法 (MN) 來探討半導體金屬成分，銻 (In)、銻 (Sb)、鎵 (Ga)、鍺 (Ge) 在 V79 中國頰鼠肺細胞 (V79 Chinese hamster lung cells) 之細胞遺傳毒性並觀察這些金屬間的交互作用及對細胞型態之影響，另外藉由 D-Penicillamine (D-PA)，Dimercaprol (BAL)，SOD 和 Catalase 的加入來觀察是否會降低半導體金屬所產生的遺傳毒性，以探討半導體金屬致細胞遺傳毒性的機轉是否和蛋白質硫氫基 (Sulfhydryl) 之抑制和/或氧自由基 (ROS)

之形成有關？亦探討 D-PA 和 BAL 當半導體金屬中毒之解毒劑的可能性。

細胞毒性之研究結果發現在 Cyt-B 存在下 Ga, Sb, In 抑制 V79 肺細胞存活率之作用可被加強，其中以 Sb 的抑制最為明顯，相較之下 In 只稍微但具統計意義地抑制 V79 肺細胞之存活率。在 Cyt-B 不存在下，只 Ga 和 Sb 抑制 V79 肺細胞之存活率，而 Ge 不管 Cyt-B 是否存在均不影響 V79 肺細胞之存活率。在細胞型態之觀察中發現 Ga 及 Sb 會改變 V79 肺細胞之細胞型態。由於 Cyt-B 已知可影響細胞骨架之形成而降低細胞存活率，所以推測 Cyt-B 可能是加強 Ga 和 Sb 對細胞骨架之傷害而造成 V79 肺細胞存活率下降。

關於遺傳毒性方面，Sb 和 In 在 0.01-3 $\mu$ M 之濃度範圍可劑量-相關性地增加 V79 中國頰鼠肺細胞之微小核數，但 Ge (3-300 $\mu$ M) 和 Ga (1-100 $\mu$ M) 均不呈現有統計意義的遺傳毒性。交互遺傳毒性之探討發現 Ge 可對抗 Sb 和 In 之遺傳毒性，Ga 則加強 Sb 之遺傳毒性，但 Ga 對 In 則無此作用。此外，Sb (0.03-0.1 $\mu$ M) 和 In (0.03-0.1 $\mu$ M) 並不會相互加強遺傳毒性，由此顯示半導體金屬間之交互遺傳毒性相當複雜。

拮抗劑之研究結果顯示，SOD 及 Catalase 可減少 In 及 Sb 所

增加 V79 肺細胞之微小核數，而低濃度 (1-3 $\mu$ M) 的 BAL 亦可降低 In (0.3 $\mu$ M) 及 Sb (0.3 $\mu$ M) 所增加的微小核數。1 $\mu$ M D-PA 可降低 In (0.3 $\mu$ M) 所增加之微小核數，但對 Sb (0.3 $\mu$ M) 則無此對抗作用。綜合上述的結果，Sb 和 In 之遺傳毒性可被 SOD, Catalase, 低濃度的 BAL 及 D-PA 所緩解，所以推測 Sb 和 In 其致遺傳毒性的作用可能和自由基之形式及含硫氫基酵素受抑制有關，且 Sb 和 In 之遺傳毒性可被 Ge 降低但其機轉尚未清楚，故 Sb 和 In 造成遺傳毒性之機轉為多方面而非單一機轉所能解釋。

由於 Sb 和 In 在相當低濃度 ( $\geq 0.1 \mu$ M) 便具遺傳毒性，此和大多數致突變性金屬相當不同 (需 10  $\mu$ M-10m M)。所以對半導體工業之暴露工人可能相當具危險性。Ge 和 Ga 雖不具遺傳毒性，但 Ga 具細胞毒性且有報告指出 Ge 和 Ga 在人類有腎毒性，在懷孕之類鼠造成畸形胎，在職業工人或實驗動物造成肺氣腫和呼吸道疾病，所以亦不能忽視其對半導體工人之危險性。

## 英文摘要 (English Abstract)

The semiconductor industry has experienced rapid growth since its origin 46 years ago with the invention of the transistor. Semiconductor manufacturing is a chemically intensive industry involving many potentially hazardous materials such as organic solvents, strong acids, strong caustics, metals, reactive gases, and dopants. There are a large number of intermetallic compounds from group III- group V that have been made and could be used in semiconductor devices, circuit chips and other components used in the electronics industry. These compounds not only include binary compound, but also could include ternary and higher compounds of these elements. Workers in semiconductor industry exposed to the reactants and products of the group III-V intermetallics when the apparatus used in the processes are opened to add materials or remove products. There is also exposure when large crystals are cut into smaller wafers with diamond- bladed saws. These wafers are also washed, lapped and polished during the preparation process. It should be noted that the genotoxic effects of those intermetallic compounds. Although the metalloid arsenic (As) has been studied in detail, while information on genotoxic effects of Ge, Ga, In, Sb and other intermetallics in cultured mammalian cells is not enough available.

In the present study, the frequency of micronuclei (MN) and trypan blue exclusion were assayed to evaluate the cytogenotoxic effects of semiconductor metals (Ge, Ga, In, and Sb) in V79 Chinese hamster lung cells (V79 lung cells). The effects of semiconductor metals on cellular morphology and viability of V79 lung cells were conducted with or without 3  $\mu$ g/ml cytochalasin B (Cyt-B). The frequency of MN was

also assayed to explore the genotoxic interactions among the four semiconductor metals. In order to shed more light of the mechanism of semiconductor- induced genotoxicity and antidotes for semiconductor metal poisoning, we investigated the effects of D- penicillamine (D-PA), dimercaprol (BAL), superoxide dismutase (SOD), and catalase on semiconductor- induced genotoxicity as qualified as by MN.

Without Cyt-B, both Ga and Sb significantly decreased the viability of V79 lung cells as compared with control. However, Cyt-B potentiated the inhibitory effects of Ga, In and Sb on viability of V79 lung cells. Ge didn't affect the viability of V79 lung cells with or without Cyt-B. On the other hand, both Ga and Sb markedly affected the cellular morphology of V79 lung cells. Cyt-B is known to interfere cytoskeletal formation, and then induce cytotoxicity. Accordingly, we tentatively assumed that Cyt-B might potentiate the inhibitory effects of Ga and Sb on cytoskeletal formation of V79 lung cells and then caused more severe cytotoxicity.

Among the four semiconductor metals, both In and Sb at concentrations of 0.01-3  $\mu$  M significantly increased MN frequency in a concentration- dependent manner in V79 lung cells, but both Ge (3-300  $\mu$  M) and Ga (1-100  $\mu$  M) didn't induce any significant genotoxicity. In the periodic table of the elements, both antimony and arsenic belong the same GrV<sub>A</sub> elements, and a chemico- toxicological similarity to arsenic is often found when referring to antimony and its toxicology. Accordingly, antimony is suspected to be a carcinogen although it is not clear whether antimony is carcinogenic to man. To our knowledge, there are no reports about In- induced genotoxicity in mammalian calls, we first found that In induced genotoxicity in V79 lung cells. In addition, Ge attenuated genotoxic effects of Sb and In. Ga potentiated Sb- induced genotoxicity,

but did not affect In induced genotoxicity. However, the genotoxic interactions between Sb and In didn't appear significant difference. Obviously, the genotoxic interactions among those semiconductor metals are very complication.

All concentrations of SOD and catalase tested alone did not induce genotoxicity, but BAL and D-PA at higher concentrations (BAL  $\geq 10 \mu\text{M}$ ; D-PA  $\geq 3 \mu\text{M}$ ) tested alone induced significant genotoxicity. However, both SOD and catalase significantly inhibited the genotoxic effects of In and Sb. Similarly, BAL at lower concentrations of 1-3  $\mu\text{M}$  produced the antigenotoxic effects. On the other hand, 1  $\mu\text{M}$  D-PA only attenuated the genotoxic effect of In. The results appear the mechanism of the genotoxicity of In and Sb are partly attributed to be their reaction with SH moieties in the molecules and oxygen radical production. In this study, Ge also attenuated the genotoxic effects of In and Sb by undetailed mechanisms. These findings show that the mechanism of the genotoxicity of In and Sb might be complex and not based on a single mechanism.

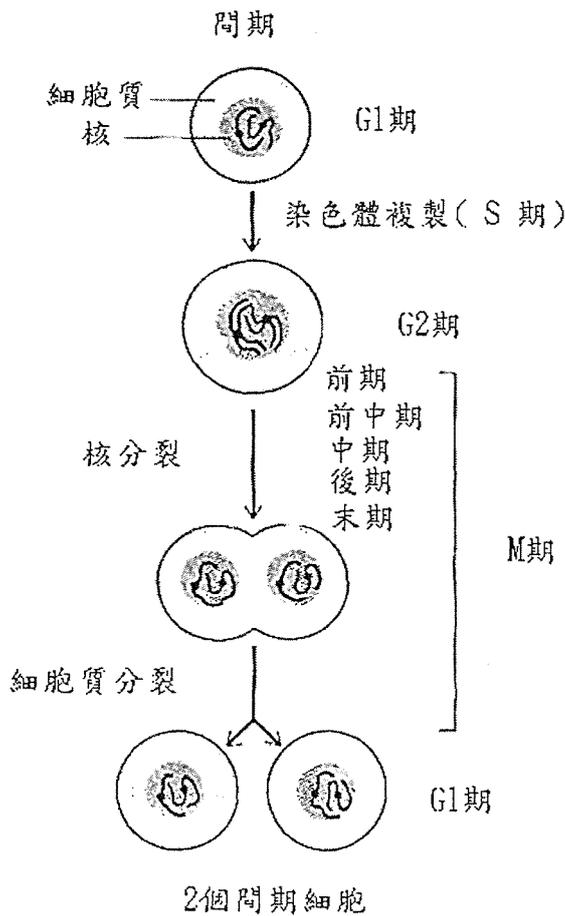
Both In and Sb caused pneumoconiosis and pulmonary fibrosis following long-term exposure in workers. In this study, both In and Sb were effective in inducing genotoxicity at very low concentrations ( $\geq 0.1 \mu\text{M}$ ) in V79 lung cells. Accordingly, both In and Sb may be especially hazardous to the workers who exposure to the semiconductor process environment. On the other hand, both Ge and Ga didn't cause significant genotoxic effects in this study or other reports. However, some authors reported that both Ge and Ga caused nephrotoxicity in human, and induced teratogenesis in pregnant hamster. We can't neglect the risk of semiconductor workers who exposed to Ge and Ga.

# 細胞周期和微小核分析法( The Cell Cycle and Micronucleus Assay )

## A、 細胞周期( The Cell Cycle )

對具有分裂能力的細胞，由分裂而成的細胞至下次分裂開始的期間被稱為細胞周期( Cell Cycle )，細胞周期可簡單分為間期( Interphase )，以及分裂期( M phase )。間期又可分為 G<sub>1</sub>期( G<sub>1</sub> phase )，S期( S phase )，G<sub>2</sub>期( G<sub>2</sub> phase )，分裂期又可細分為前期( Prophase )，中期( Metaphase )，後期( Anaphase )以及末期( Telophase )。

如圖一所示，細胞絕大部分的時間都處於間期( Interphase )，此時期的細胞會很活躍的生長並合成所需的物質。在此期內 G<sub>1</sub> phase 和 G<sub>2</sub> phase 是介於 M phase 與 S phase 之間，故又稱為 gap phase。在 G<sub>1</sub>期，其位於 M phase 之後 S phase 之前，所以在此期參與 DNA 合成的酉每活性會增加，且每條染色體只含一條染色分體( Chromatid )，G<sub>1</sub>期約佔整個間期的 30-50%。S 期為細胞進行 DNA 合成與染色體複製的時期，其約佔整個間期的 35-40%。G<sub>2</sub>期則介於 S 期之後 M 期之前，在此期間蛋白質的合成會大量增加，且每條染色體含有 2 條染色分體，約佔整個間期的 10-20%。

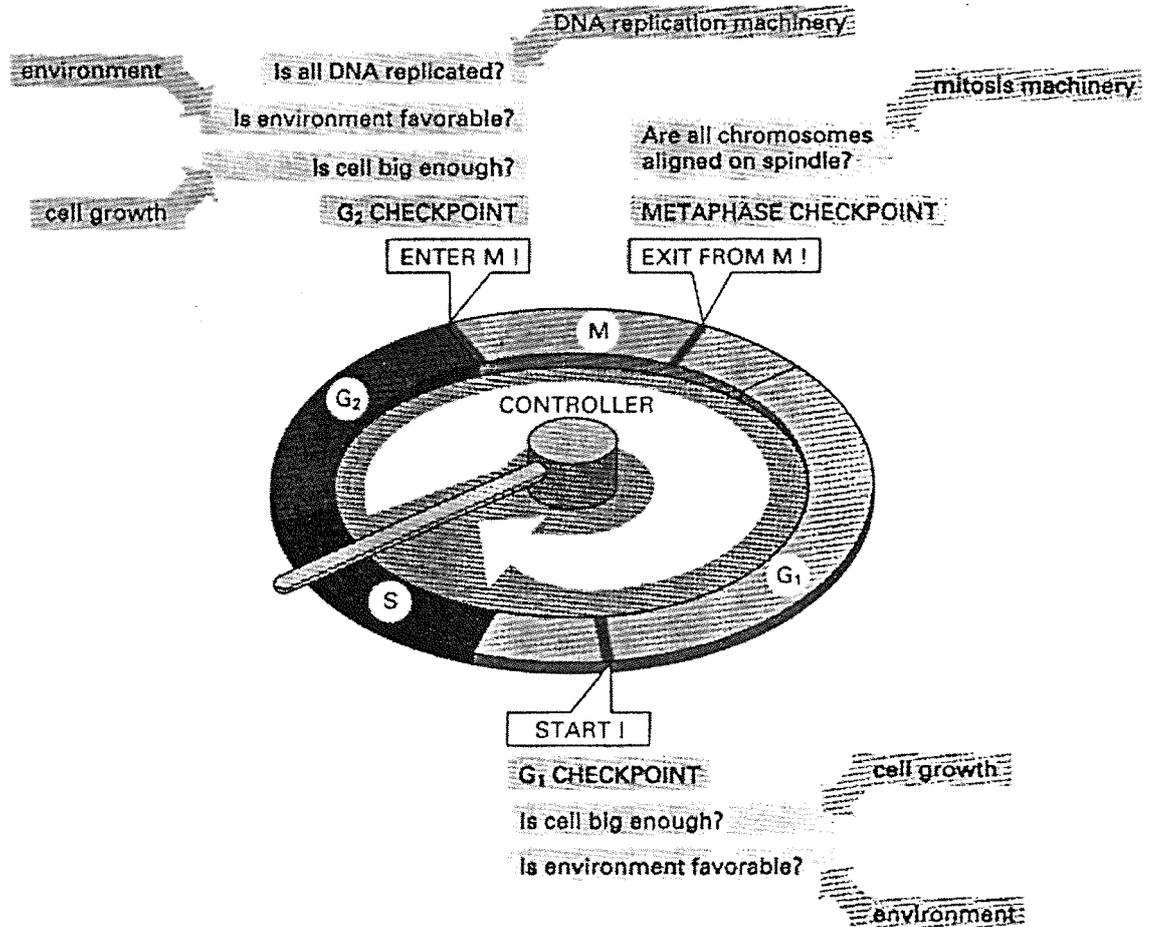


圖一. 顯示在  $G_1$  期每條染色體只含一條染色分體，在經過染色體複製  $S$  期之後，細胞周期則進入  $G_2$  期，在此時期內每條染色體含有 2 條染色分體 (Albert et al., 1989)。

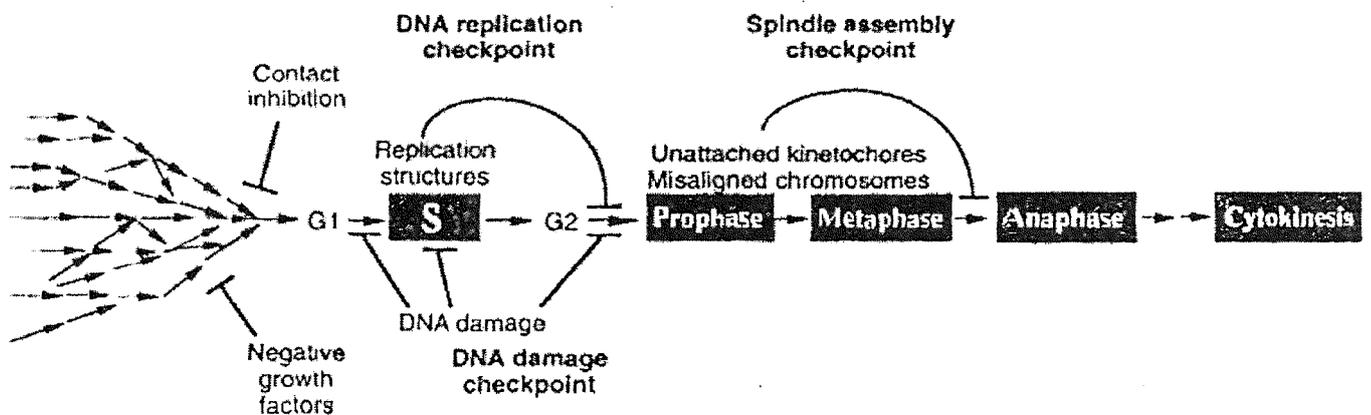
一般來說，不同種類的哺乳動物細胞其細胞周期進行的時間均會不同，當細胞由  $G_1$  期依序進入  $S$  期， $G_2$  期以及分裂期 (M phase) 時，此

一連續的過程皆以一定的速度進行，當細胞分裂之後要進入  $G_1$  期前會經過 check point，若能通過 check point 細胞則順利的進行另一次細胞周期，若細胞無法通過 check point 則細胞會自然凋亡 (apoptosis) 脫離細胞周期停止於  $G_0$  phase (圖二.A)。細胞周期之 check points 能控制細胞周期進行的次序和時間以及確定 DNA 複製以及染色體分離是否精確，當細胞受傷害時，check points 會讓細胞周期停止進行使它有足夠時間修復，並加強修復基因之表現。當基因體不穩定可能使 check points 消失而造成正常細胞癌化。在細胞周期中大致可分為 3 類 check points，分別為控制 DNA 複製的 check point，反應 DNA 受傷的 check points (又分  $G_1/S$  check point，

S phase check point 和  $G_2/M$  check point) 和控制紡錘絲組合的 check point (圖二. B)。譬如，當 DNA 受到損害時， $G_1/S$  check point 會使細胞停留於  $G_1$  期，使 S 期緩慢下降，並誘導修補基因修補 DNA。



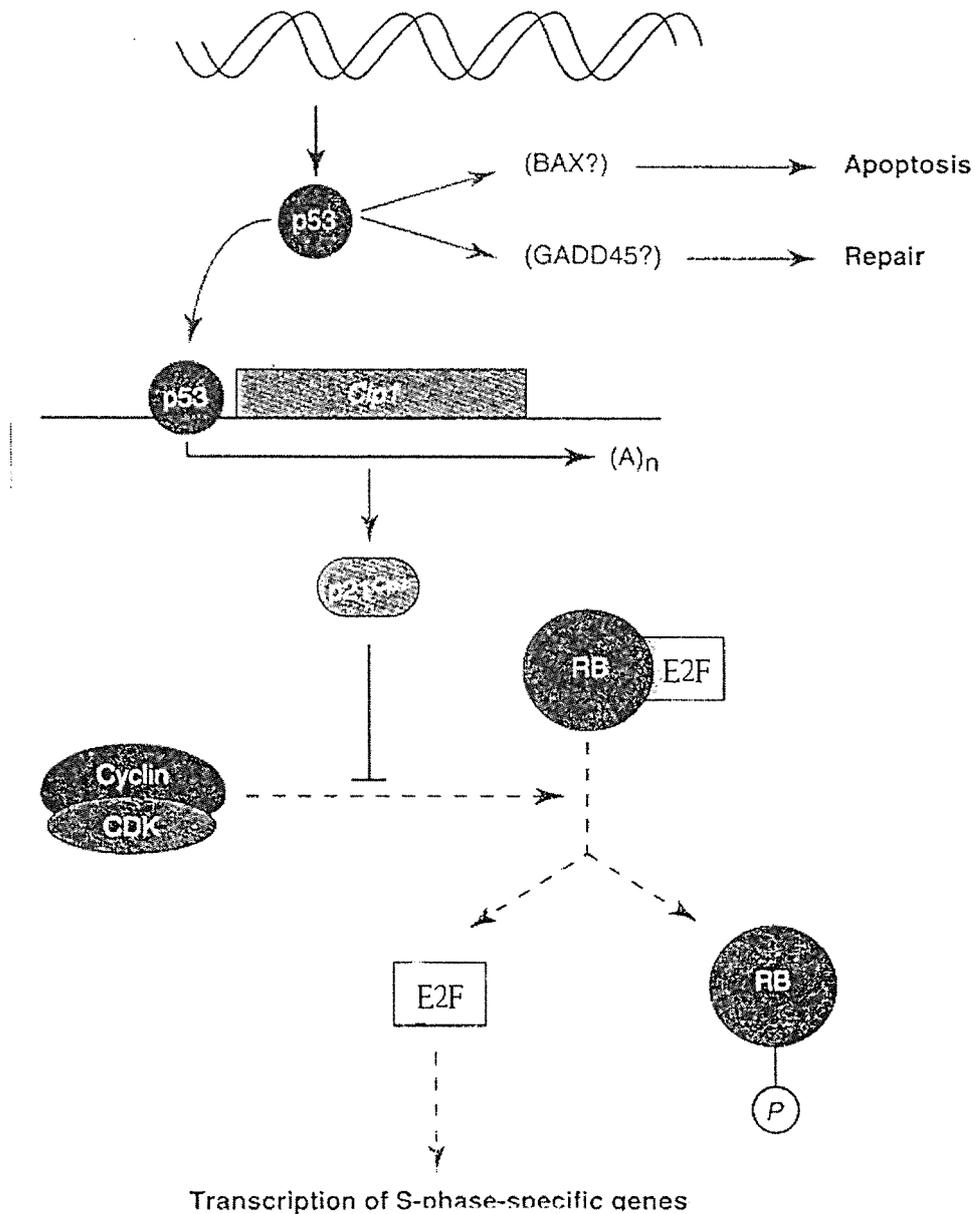
圖二 A. 顯示細胞周期進行中染色體之變化，脊椎動物之細胞如不增殖時，會由  $G_1$  進入  $G_0$  期 (Alberts et al., 1994)。



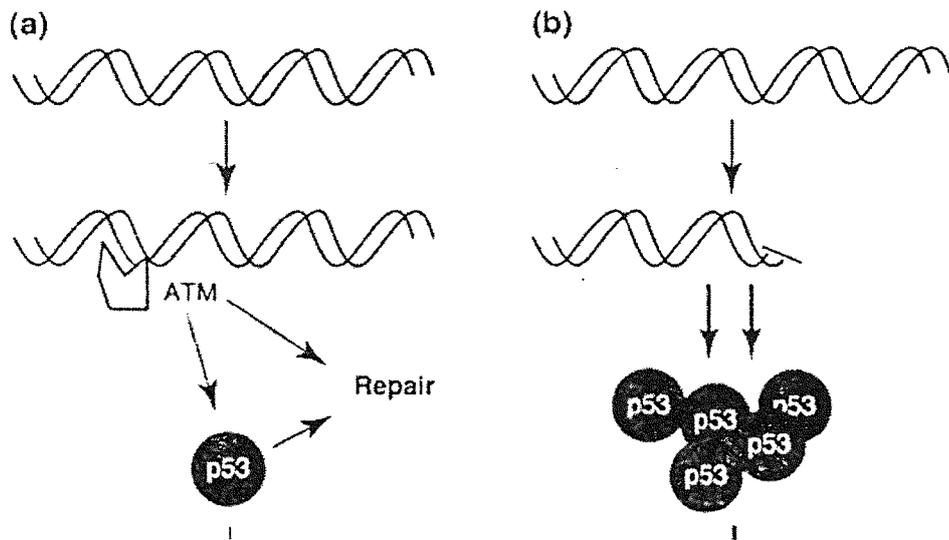
圖二 B. 顯示控制細胞周期進行的 check points 和其相關位置：分別有 DNA 受傷 check points ( $G_1/S$  point, S phase point 和  $G_2/M$  check point), 紡錘體組合 check point (M/A) (Elledge SJ, 1996)。

一般來說，當 DNA 受損，控制  $G_1/S$  check point 進行的基因蛋白有 3 種，分別是 ATM (ataxia telangiectasia Mutatel; Painter et al., 1980), p53 (Yin et al., 1992), p21 (Brugarolas et al., 1995)。當 DNA 受損時會誘導 ATM 增加而使得腫瘤抑制基因 p53 的大量出現，p53 再去促進 p21 的表現，p21 和 CDK 結合後使得控制細胞進入 S 期的 Cyclin-CDK 複合物無法形成，以致轉錄因子 E2F 無法從 RB-E2F 複合物釋出使轉錄基因無法活化，最後造成細胞無法進入 S 期而停止於  $G_1$  期。p53 亦可能經由活化 Bax 蛋白和 ICE 蛋白酉酶的表現造成 apoptosis，或經由活化 GADD45 蛋白的表現而進行 DNA 的修復(圖

二.C)。至於DNA受損細胞誘導ATM蛋白表現而活化S check point 或G<sub>2</sub>/M check-point，目前所知和 p53 無關。如圖二.D 所示，當DNA破壞太嚴重時，p53 蛋白不須經由 ATM 而是經由另外機轉大量釋出而造成 apoptosis( Enoch and Norbary, 1995 )。

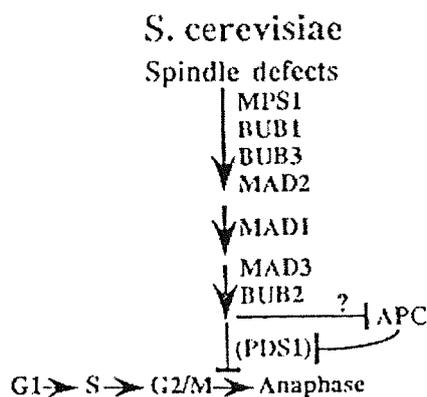


圖二.C. 顯示當 DNA 受損後與 p53 相關的各種反應機制 ( Enoch T et al., 1995 )。



圖二.D. 顯示當細胞受損時， p53 蛋白經 ATM 機制 (a) 或不經 ATM 機制 (b) 所造成細胞周期停止及細胞漸近性死亡( Enoch T et al., 1995 )。

另一控制細胞周期之 check point 則位於紡錘絲組合時期，其是藉由 MAD1, MAD2, MAD3 ( mitotic arrest defective, Li et al., 1991 ) 及 BUB1, BUB2, BUB3( budding uninhibited by benimidazole )來調節的。當紡錘體異常時，這些蛋白質能延緩細胞周期進入後期，首先 MPS1( Roberts et al., 1994 )被活化，然後一連串的活化相關蛋白而細胞停止進入後期( 圖二. E )。



圖二.E. 顯示在 *S. cerevisiae* 中紡錘絲組合 (spindle assembly) 時期，其 check point 之調節機制( Elledge SJ, 1996 )。

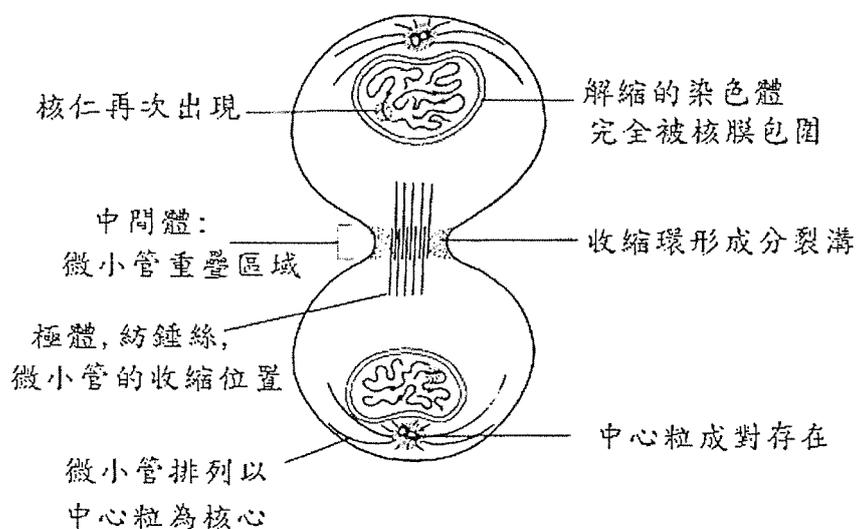
染色體在 G<sub>1</sub> phase, S phase, G<sub>2</sub> phase 時其型態成鬆散狀 (Decondensed), 在細胞分裂期的前期, 染色體開始進行濃縮, 紡錘絲出現。在中期時, 染色體以著絲點 (Kinetochore) 與紡錘絲 (Spindle fiber) 相連, 並排在赤道板上, 而染色體成緊縮的狀態, 在後期染色體分佈在紡錘絲的兩極, 最後在末期染色體開始鬆開, 並完成子細胞的重組, 而細胞質分裂 (Cytokinesis) 是將細胞分割成兩半的過程, 它是同時發生於後期或末期, 有時也可能發生於更後面的階段, 所以當細胞經 G<sub>1</sub> 期, S 期, G<sub>2</sub> 期, 分裂期以及細胞質分裂的過程之後, 就完成了細胞周期形成兩個子細胞。

## B、藥物對細胞周期之影響

在細胞周期中, 某些藥物可能造成細胞周期的改變, 其可能的影響有:

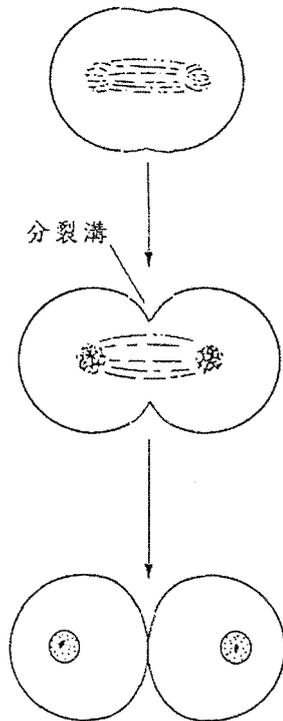
1. 在分裂期的中期染色體以著絲點 (Kinetochore) 與紡錘絲 (Spindle fiber) 相連, 排列在赤道板 (equatorial plate) 上, 且染色體之兩股分開, 染色體呈緊縮狀態, 染色也較深, 易於分析, 所以在細胞培養的過程中加入適量的 colcemid 或 colchicine 幾個小時, 其會和微小管 (microtubule) 結合, 而終止紡錘絲的作用, 使染色體無法分離也不能移動到細胞的兩極, 造成進入中期 (Metaphase) 之細胞停留在此時期。

2. 細胞質分裂( cytokinesis )的過程是將分裂的細胞分隔成 2 個子細胞，其必須要靠母細胞中線處所形成的收縮溝( contractile furrow )，此溝不斷加深，直到整個細胞分成 2 半，在此時會有一束稱為收縮環的微絲( microfilament )出現，環繞整個細胞，所以可能是收縮環的微絲( microfilaments )負責使收縮溝逐漸深陷，而分裂成 2 個子細胞( 圖三，圖四 )。



圖三. 顯示分裂溝之形成和細胞質分裂 (Alberts et al., 1989)。

圖四. 顯示細胞質分裂的情形 (Sadava et al., 1993)。



3. 1969 年 Schreder 把 Cytochalasin B 添加至正在形成收縮環的藻類上 (Niltella)，發現微絲環被分解掉，而收縮溝也因此無法形成，所以，Cytochalasin B 會中斷微絲 (Microfilaments) 的組合而阻斷細胞質分裂 (cytokinesis) 的進行。

4. 多數會破壞染色體的化學物質在染色體變異前需經歷 S phase，此種化學物質之作用

被稱為 S-dependent，有少數化學物質為 S-independent，當細胞在  $G_2$  期時，被加入藥品，可在緊接著的分裂中期產生染色體變異，所以在加入藥物後通常需再經滿一個細胞周期後，再採收細胞。

5. 在正常情況下，細胞周期的時間是一定的，但加入藥物之後， $G_1$  期可能被延長，甚至可能短暫進入  $G_0$  期，所以整個細胞周期的時間就被延長。

在哺乳動物細胞中藉由化學藥劑的加入可能會引起染色體結構的改變 (Chromosomal structural aberrations)，其可能是由於單一染色體之染色體物質的遺失而完全斷裂，而遺失的部份在分裂中期時可能以斷片 (Fragments) 存在，並可能在細胞分裂後形成微小核，由於許多染色體變異細胞在分裂後無法存活，所以理想細

胞採收的時間是在加藥後滿一個細胞周期過早或太慢採收，會低估染色體變異的頻率，對於未同步化的細胞(Asynchronous cells)，則加藥一個半週期採收細胞為最適當。但藥品如造成細胞周期延長，則理想採收標本時間就可能為2個或2個以上之細胞周期。

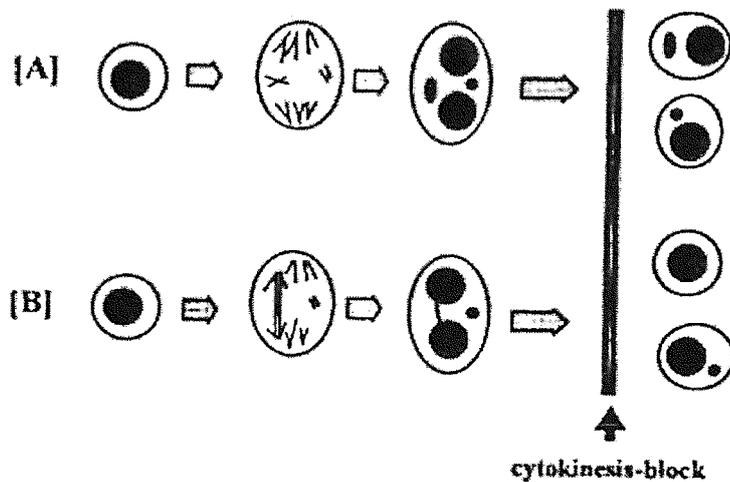
## C、微小核分析法( Micronucleus assay )

### 一、微小核之形成( Micronucleus formation )

微小核( MN )的形成是由於細胞在分裂的後期( Anaphase )染色體成份因延遲而無法分佈到適當的紡錘體位置，以致於在細胞分裂後無法包含在子細胞的主核內( Heddle, 1973 )。在細胞分裂的過程中，MN 只出現在一個子細胞中，成一個或多個微小核分佈於細胞質中。藉由 DNA 含量測定可知微小核由不含中心節( Acentric )的染色體碎片所形成( Heddle and Carrano, 1977 )。另外，細胞經由紡錘體毒物處理後，產生較大微小核的結果得知在細胞分裂時，若紡錘絲出了問題會導致整條染色體發生延遲的現象( Lagging Chromosomes )而產生較大的 MN。( Yamamoto and Kikuchi, 1980; Lynch et al., 1993 )。由於微小核的技術簡單快速，所以 Heddle ( 1983 )在調查分析 MN 法後，建議微小核法可用來探討遺傳毒性。

由於 DNA 受損的細胞至少需經過一次細胞分裂才能表現 MN，也就是染色體受損細胞不經細胞分裂無法呈現微小核，而微小核之判讀和分裂細胞所佔的比率有關，當細胞分裂不同步時( 如 75%分裂和 100%分裂，或分裂一次和分裂二次 )均影響微小核的判讀。Fenech

和 Morley( 1985a )就提出當 DNA 受損的細胞經過一次以上的分裂時微小核出現的頻率會減少。因細胞分裂不同步且無法確認細胞是否經過分裂，所以微小核之判讀就不可靠，除非確知微小核之判讀均來自第一次分裂的細胞。故 Fenech 和 Morley( 1985a, b, c )提出 cytokinesis-block( CB )法，使 DNA 受損的細胞進行第一次有絲分裂時受 Cytochalasin B 抑制，使細胞質分裂受到影響而形成雙核細胞，但其並不干擾核分裂，藉此可判讀雙核細胞中之 MN，所以 CB/MN 的分析解決原本 MN 法無法確認細胞是否經過分裂的問題，也提高了 MN 法的準確性及實用性( 圖五 )。



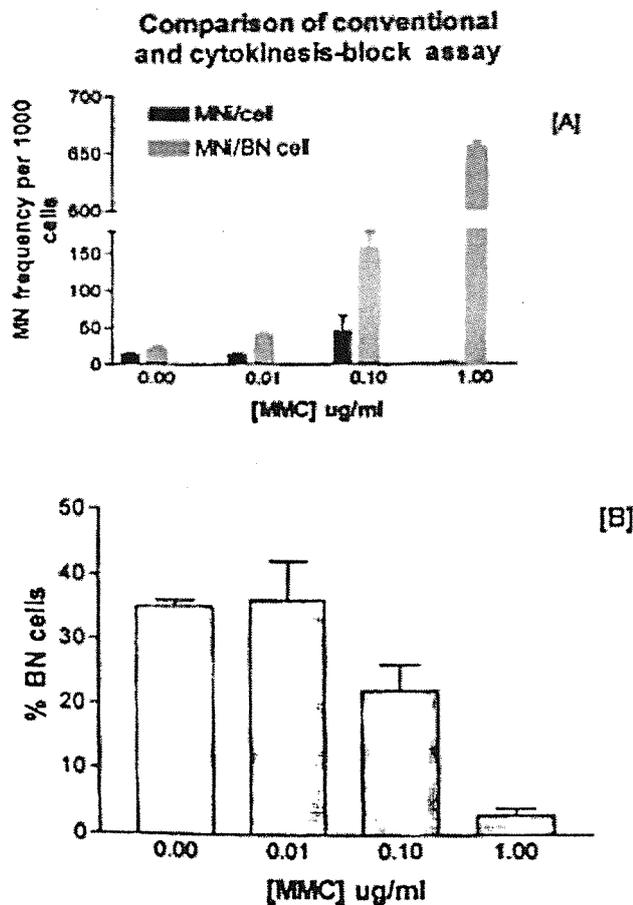
圖五. A. 顯示無中心節之染色體斷片( acentric fragment )和整個染色體延遲( lagging whole chromosome )經細胞裂後所形成的微小核。B . 顯示含 dicentric bridges 的雙核細胞經細胞分裂後所形成的微小核。由此可知在雙核細胞中每個微小核出現的頻率是最後分裂成為單核細胞的 2 倍 (Fenech, 1997)。

## 二、Cytokinesis-block( CB )之優缺點

### I. 藉由 CB/MN 法的益處：

#### 1. 提高 MN 的敏感度及精確度

藉由 CB/MN 可以確認只經過一次分裂之細胞，所以由雙核細胞所含的 MN 數而得到的 MN 比率遠較單核細胞法(如 Stathmokinetic techniques 或 DNA synthesis labelling assay)中所求的比值要精確(圖六)。



圖六. A. 在人類淋巴球之  $G_1$  期加入 Mitomycin-C (MMC) 並比較在單核細胞(黑色柱狀圖, 普通分析法)及雙核細胞(灰色柱狀圖, CB 分析法)中之微小核和 MN 之劑量相關性。 B. 藉由雙核細胞所佔之比

率來分析細胞分裂的情形。由此可知普通法低估 MMC 所造成之基因損害，特別在抑制核分裂之高劑量時 (Fenech, 1997)。

2. 提供核分裂的指標( Nuclear division index, NDI )

細胞經化學處理後，除偵測 MN 外，並可藉由 CB/MN 法計數單核細胞數，雙核細胞數及多核細胞出現的頻率，可得知化學物質對細胞分裂的影響。細胞標本在加入 Cyt-B 一定時間後，計算單核、雙核和多核細胞之頻率，然後按 Eastmond and Tucker (1989) 所建議之公式便可算出 NDI。

$$NDI = ( MI + 2MII + 3MIII + 4MIV ) \div N$$

MI-IV 表示一核到四核細胞數，

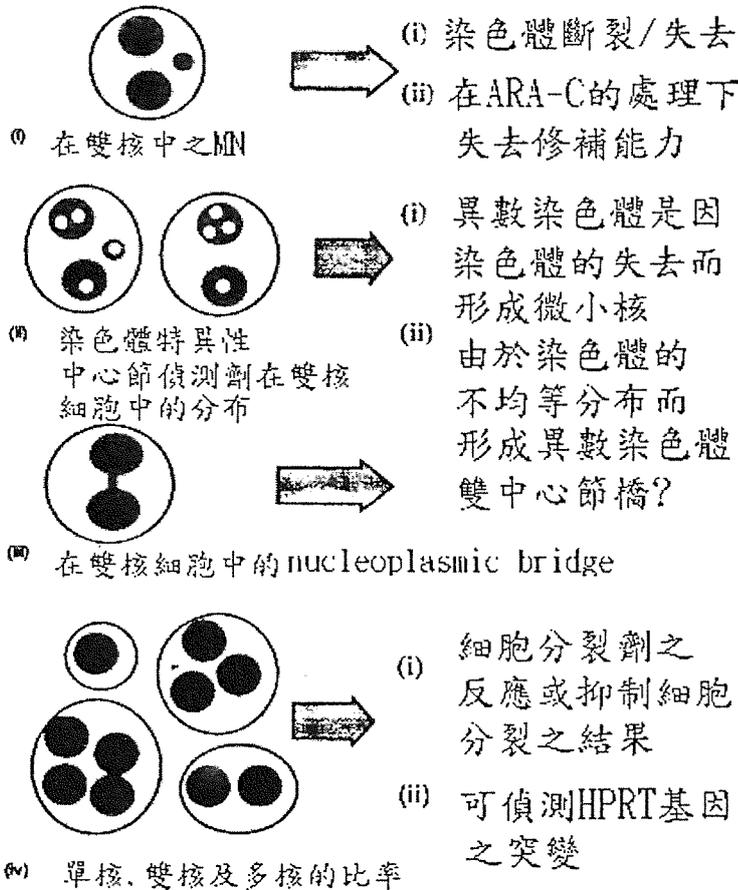
N 則表示所觀測之所有細胞數。

3. CB/MN 法亦能藉由 Chromosome-specific centromeric probes 的加入來偵測 dicentric bridges，亦可加入 antikinetochore antibodies 或 chromosome specific centromeric probes 來確認 MN 是否為 whole chromosome 亦能藉此判斷二個子核內染色體不平衡是因染色體遺失( chromosome )或染色體分離不等( non-disjunction )，另外對化學物質或紫外線所造成的鹽基破壞( base lesions )或 DNA 鍵結( DNA adducts )亦可配合加入 cytosine arabinoside( ARA -C )抑制 DNA 修補能力( excision repair )而造成 MN( 當 DNA 修補能力受抑制時，鹽基受損會造成染色體分體甚至整個染色體斷裂 )加以偵測，CB 計數亦可探討細胞之 HPRT 基因是否突變( 圖八 )?

## 細胞質分裂抑制技術

### 細胞層次的觀察

### 基因毒性的意義



圖八. 顯示 Cytokinesis-block 所能應用之研究項目 (Fenech, 1997)。

## II. 藉由 CB/MN 法的弊處:

1. Cyt-B 可和細胞質之高分子量複合物結合而劑量相關性的抑制 actin polymerisation 和 microfilament assembly, 所以不同細胞均需選擇理想的 Cyt-B 濃度來產生最大的 cytokinesis-block 是重要的課題( Surrall'es et al., 1992 )。

2. 在人類 T 淋球細胞、老鼠脾臟淋巴球細胞、老鼠纖維原細胞、中國倉鼠纖維原細胞及人類纖維原細胞中，Cyt-B 濃度維持在  $1-6 \mu\text{g/ml}$  內並不會劑量相關的誘導 MN 的出現( Fenech and Morley, 1985a; Wakata and Sasaki, 1987; Prosser, 1988; Linholm, 1991 )。但在一些癌細胞( 如 EL4 和 BW5147, T-cell lymphoma lines )則對於 Cyt-B 相當敏感易造成 DNA 斷片而形成 MN。
3. 含 3 和 4 核之細胞其 MN 指數往往高於雙核細胞 10 倍以上時，可能由於整個染色體延遲的頻率很高而非 Cyt-B 的作用，因為多核細胞不可能有正確紡錘絲的排列來進行細胞核分裂。
4. 若致基因毒性的物質也會和 Cyt-B 一樣具有抑制 microfilament assembly，如加入 Cyt-B 可能會加強此種化學物質之遺傳毒性( 雖然目前尚無證據顯示抑制 microfilament assembly 會影響微小管之構造而造成，但在染色體延遲這種情況下最好不須加 Cyt-B 也可達到 cytokinesis-block 的效果 ( Migliore, 1994; Schultz and Onfelt, 1994 )。

### 三、微小核法的應用( The application of micronuclei assay )

Schmid 曾廣泛的應用骨髓的嗜多色紅血球( Polychromatic Erythrocytes )來探討微小核，因 Polychromatic erythrocytes ( PCEs )之細胞質中含有高量的 RNA，所以可藉由 Giemsa 和 May-Gruenwald 染色，染成青到紫色，而可和被染成紅到黃色之 mature normochromatic cells ( NCEs )區分，每個玻片計算 2000 個紅血

球細胞，在含有 1000 個 PCEs 之區域內計算所有 NCEs 數目，兩者間一般正常比率為 1:1，但當 PCEs 數目增加，表示骨髓細胞生長受到刺激，若 PCEs 數目下降時，顯示骨髓細胞生長受到抑制。此法主要可判讀 PCEs 中微小核的數目（每隻動物需計算 1000-2000 PCEs）。所以 Heddle (1983) 建議 MNs 法可用來探討遺傳毒性，由於技術上的突破，加上微小核可在任何分裂之組織細胞產生，所以 MNs 法漸漸被使用來偵測老鼠其他體細胞的遺傳毒性，尤其在 Fenech 和 Morley (1985a) 以 CB 法產生雙核細胞後，CB/MN 法更廣泛的被使用，其可藉由特異性 antibodies 的加入來偵測化學作用劑所產生的 chromosome dicentric bridges，辨認其是由整條染色體 (whole chromosome) 或由片斷染色體 (fragment chromosome) 所產生的微小核，或染色體分離不等 (non-disjunction)。亦能藉由 ARA-C 之加入來判斷致突變劑是否損害細胞之 excision repair。此外，可觀察細胞分裂的比率，HPRT gene 是否變異？以及微小核和細胞凋亡 (apoptosis) 之關聯性。近年來甚至有學者設計電腦程式自動判讀微小核，以增加其便利性。最後，CB/MN 法如能配合其他分子細胞遺傳法 (molecular cytogenetic methodologies) 將可精確的探知形成微小核之機轉。

#### 四、判斷和計數 MN 的準則 (The criteria of the scoring of micronuclei):

1. MN 之直徑需小於主核直徑之三分之一
2. 在顯微鏡下觀察不呈反射的現象
3. MN 的顏色與主核相似或較主核鮮明

4. MN 必須在細胞質內，但不能與主核相連在一起
  5. 雙核細胞之兩個主核如重疊在一起，則不計數
  6. 雙核細胞如含一個以上 MN 時，以一個 MN 計數
- \*\* 雙核細胞，微小核細胞如圖 A 所示。

## 緒論( Introduction )

隨著人類文明的進步，半導體成品已和人類生活息息相關，所以近年來半導體工業得快速發展。半導體產品因使用目的不同而成份會有所不同，其中銻(In)、銻(Sb)、鎵(Ga)、鍺(Ge)均被使用於晶片中。半導體工業表面看起來相當安靜且安全，但其晶片在製造的過程需使用許多有害的化學物質，如管理不善將危及現場操作人員的健康和污染環境，因此半導體的從業人員可能因工作環境之不良而增加曝露這些半導體金屬之機會，但這半導體金屬成分對人類細胞或其他哺乳動物細胞之細胞毒性及遺傳毒性及彼此間的交互遺傳毒性作用尚少被研究。所以這些半導體金屬之物理性、化學性和毒性應受到注意。以下就這些半導體金屬做簡單介紹。

### 一、銻 ( Antimony )

在週期表中銻的原子數 51，原子量 121.76，位於 VA 族在砷的下方，所以有許多特徵與砷相似。其具有 3 價及 5 價化合物，在自然中，銻會與 sulfur 形成 stibnite( $Sb_2S_3$ )及或和其他物質形成金屬礦(ores)(Bureau of Mines., 1979)。在工業用途中，銻通常會與鉛及銅形成金屬合金，若與酸處理則會釋出 stibine ( $SbH_3$ ) gas。銻亦常被使用在油漆、製陶電池和防火材料等製造業上。近年來銻在半導體晶片中也扮演了重要的角色。在臨床上，有機銻(Stibophan)被使用在抗利什曼原蟲的驅蟲藥(Ciplea et al., 1966; Arfaa et al., 1967; Ress et al., 1980)。若急性曝露銻化

合物可能會引起頭髮脫落、皮膚乾燥及體重下降等現象，尤其在腎上腺、甲狀腺、腎會出現很高的濃度，若長期處於銻化合物曝露的環境中，銻可能會引起局部的毒性，像皮膚搔癢、長膿、肺有肺塵疾( Pneumoconiosis )等現象( Potkonjak and Pavlovich 1983 )。另外，在老鼠實驗中也發現長期吸入銻化合物其發生肺腫瘤的比率很高( Leffler et al., 1984 )。

一般來說3價銻的毒性高過5價銻，5價銻是經腎由尿液排出，因不與紅血球結合，所以排出的速率很快，而3價銻與gluthathione結合後經腸肝循環再經膽汁由糞便排出，且3價銻主要與紅血球結合，所以在血漿的含量是很低的。一般認為銻的生物活性與砷相似，在許多酉每中與含有sulfhydryl group的親和力很高。若長期經職業曝露銻可藉由尿液及血液測量銻的含量，當服用過量的銻時可藉洗胃或催吐來排除或給予解毒劑Dimercaprol。

## 二、銻( Indium )

銻原子數49，原子量114.8，位於週期表ⅢA族，具有1價、2價及3價離子，通常被使用在銲接、電鍍及合金上，由於其低抗電阻性，近年來廣被用於半導體的生產上，而其低放射性衍生物也被應用在器官的掃描及腫瘤的治療上( Stern et al., 1966 )。一般說來銻經由食物或一般生活環境而被攝入的情形相當少，通常是經由職業環境的曝露而被吸收。

銻在身體組織的分佈大部分取決於金屬化合物的形式，像ionic indium會經由transferrin輸送累積在腎臟，嚴重時會導致

腎衰竭，而 colloidal indium oxide 被帶入網狀內皮系統，而造成肝臟、脾臟的傷害。銦離子主要藉由尿液排出，其在肝、腎所產生毒性之機轉可能是經由改變網狀內質網及酉每的活性所造成的，因在 *in vivo* 的情形下，給予老鼠  $\text{InCl}_3$ ，其會在腎出現高濃度且 ALAD 被抑制( Wood and Fowler, 1982 )。

在臨床上 In-111 常被用來診斷癌症( Present, 1988 )，甚至被嘗試抗腫瘤( Adamson, 1975 )，病人有嚴重性休克之報告。在動實驗有報告顯示銦化合物具神經毒性( Castronovo and Wagner, 1971; Fower, 1983 )，會產生肺傷害( Yoshikawa and Hasegawa, 1971 )及使小鼠、兔子之 hemoglobin 和 neutrophil 含量會減少( Down, 1959; Yoshikawa and Hasegawa, 1971 )，但是關於銦產生的毒性仍尚未完全被建立，仍有待進一步的探討。

### 三、鍺( Germanium )

鍺的原子數 32，原子量 72.59，位於週期表 IVA 族和鉛同族，在地殼上含量為 7ppm，而電子型態介於金屬與非金屬之間，鍺離子具有 2 價及 4 價，但在自然界中以 4 價存在的形式較多。在 1945 年時鍺常被使用於電晶體( transistors )，兩極真空管( diodes )，整流器( rectifiers )，而在 70 年代鍺逐漸被矽取代，直到最近由於鍺具有很強的導電性質所以被用來改善金屬合金電阻以及光纖系統，另外亦發現一些有機鍺化合物像 spirogermanium 及 carboxyethylgermanium sequioxide 能增強免疫機能而對抗動物及人類的腫瘤，使得鍺逐漸被探討。

一般說來，食物中的蚌、鮭魚、鯖魚以及藥用植物等均含豐

富的鍺，所以通常鍺主要是經由食物或處於工業環境中藉由吸入而被攝取，有機鍺化合物能快速被吸收主要是藉由腎排出 (Schroeder, 1967)。其半衰期約 1-4 天，經由 iv 的鍺主要在肝、腎、脾、胃腸道出現較高的濃度，口服或 ip 注射鍺分別在脾 (Schroeder, 1967) 或腎和脾 (Mehard, 1975)。在臨床上顯示服用鍺的病患如中毒死於腎衰竭時在其脊椎、腎、腦及骨骼肌中也會出現高濃度 (Nagata, 1985)。小白鼠吸入高濃度的鍺會造成氣管黏膜壞死，支氣管炎和間質性肺炎。

鍺化合並無致癌性而有機鍺在動物及人類的試驗中發現具有抗腫瘤的性質，因在 50 組初生的 Long-Evans 老鼠中分別在水中添加 Sodium germanate 一段時間後發現並無增加癌症發生率，但與控制組比較發現當老鼠體內達到 5ppm 的 Sodium germanate 時能明顯降低腫瘤的發生 (Kanisawa and Schoeder, 1969)。另外，在老鼠中給予鎘所誘導的染色體斷裂、微小核的形成、姊妹染色體的交換，均能被氧化鍺所對抗 (Han, 1992)。少數的有機及無機鍺被認為在人體中有抗 neoplastic 的活性，一般來說，除了 tetrahydrate germane 外，鍺的毒性是很低的，鍺並無致癌性，甚至發現其能抑制癌症的發生，像 Spirogermanium 等有機鍺化合物能毀壞癌細胞 (Schien and Slavik, 1980)。在懷孕中的動物中發現高濃度的鍺被胚胎吸收的比率增加，實驗也顯示只有 Dimethylgermanium oxide 會產生畸胎 (Caujolle et al., 1965)，所以鍺在人體中所產生的毒性是較低且安全的。

#### 四、鎘( Gallium )

鎘位於週期表第ⅢA族和銦同族，目前亦為製造半導體晶片的重要物質之一含鎘砷之晶片為最常用的半導體材料。由於Harris( 1983 )提出鎘主要與血漿中的 transferrin 結合，且由尿液排出，所以當血漿中的 transferrin 被飽和時，鎘就會產生毒性。故可溶性鎘化合物以靜脈注射給藥時在體內分佈和造成急性中毒與飽和血漿蛋白有關。而不溶性鎘化合物像  $Ge_2O_3$  若以吸入方式給予時則會在肺部引起局部毒性。

鎘某些性質在生物體內被認為與鐵相似，其能與鐵運送蛋白 transferrin( Tf )結合( Harris et al., 1983 )以依賴性及非依賴性 Tf receptor 運輸系統進入細胞內( Chitambar et al., 1992 )。在白血病( Leukemic )細胞中發現其能抑制細胞攝取鐵及阻斷 ribonucleotide reductase 的活性而抑制細胞的生長( Chitambar et al., 1986 )。

在臨床上  $Ga(NO_3)_3$  目前被用來當作化學治療劑配合其他抗癌藥治療淋巴瘤及膀胱癌( Warrell et al., 1983 )。但少數接受治療之病人，呈現腎毒性及耳毒性。

此四種半導體金屬之人類毒性和其他動物毒性稍被了解，但比起鎘、汞、鉻、鉛…等重金屬來，仍有許多地方尚待研究。而且半導體金屬銦、銻、鍺、鎘其細胞遺傳毒性及其機轉，彼此間之交互作用，大多數未被研究，所以本研究利用微小核法來探討半導體金屬成分，銦、銻、鍺、鎘在 V79 中國頰鼠肺細胞之細胞遺傳毒性並觀察這些金屬間的交互作用，並藉由 Catalase 及 SOD 的加入來探討其致遺傳毒性的機轉是否和氧自由基有關？且因

D-penicillamine( D-PA )和 dimercaprol( BAL )廣泛地被使用在金屬中毒，所以利用 D-PA 及 BAL 來探討其是否能降低半導體金屬所產生的遺傳毒性？期望本研究結果能對此四種半導體金屬之細胞毒理作用提供較完整的資料。

## 材料和方法( Materials and Methods )

### 藥品和儀器

#### 一、藥品試劑

##### A. 下列藥品購自 Sigma 公司 (美國)

1. Trypan blue
2. Cytochalasin B
3. Catalase
4. SOD
5. D-penicillamine (D-PA)
6. Dimercaprol (BAL)

##### B. 下列藥品購自 Gibco 公司 (美國)

1. Trypsin (0.25%)
2. Dulbecco's phosphate Buffered Saline
3. Minimum Essential Medium
5. Foetal Bovine Serum
6. PSN (Antibiotic mixture):
  - 含 Penicillin
  - Streptomycin
  - Neomycin

##### C. 下列藥品購自 Aldrich 公司 (美國)

1. Germanium (IV) oxide
2. Gallium (III) sulfate
3. Indium (III) chloride

#### 4. Antimony Chloride

### D. 下列藥品購自 Merck 公司 (德國)

1. Potassium Chloride

2. Giemsa

3. Fix sol'n (Methanol: Acetic acid=3: 1)

## 二、常用藥品及培養液之配製

### 1. 氧化鍺 ( $\text{GeO}_2$ ):

將  $\text{GeO}_2$  溶在滅菌的 0.001N NaOH 中，並以 0.005N HCl 調整 pH 值至 8，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。

### 2. 硫酸鎂 [ $\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3$ ]:

將  $\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3$  溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。

### 3. 氯化銦 ( $\text{InCl}_3$ ):

將  $\text{InCl}_3$  溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。

### 4. 氯化銻 ( $\text{SbCl}_3$ )

將  $\text{SbCl}_3$  溶於滅菌的 DMSO 中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。

### 5. MEM

取出可配製 1 公升 MEM 的粉末，加入碳酸氫鈉 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 2.2g 溶於 1 公升之去離子水中，調 pH 值至 7.25 後，過濾滅菌。

### 6. Cytochalasin B (Cyt-B):

將 Cyt-B 溶於滅菌的 DMSO 中，使其濃度為 2mg/ml 並以 HBSS 稀

釋成 0.5mg/ml。

7. 0.075M KCl (低張溶液):

取 0.54g KCl 溶於 100 ml 之蒸餾水中。

### 三、儀器

1. 無菌操作台( Lamina Flows ):

- a. 廠牌: Bellco
- b. 型號: 8001-74000
- c. 出產地: Canada

2. 培養箱( Incubator ):

- a. 廠牌: NADAIRE
- b. 型號: IR AUTOFLOW
- c. 出產地: U. S. A

3. 離心機( Centrifuge ):

- a. 廠牌: HETTICH- Zentrifugen
- b. 型號: ROTANTA/R
- c. 出產地: Tuttlingen

4. 烘片機( Slide Warmer ):

- a. 廠牌: Fisher Scientific
- b. 型號: 77
- c. 出產地: U. S. A

5. 水浴機( Shaker Bath 130 ):
  - a. 廠牌: FIRSTEK
  - b. 型號: B 202- Tr
  - c. 出產地: U.S.A
6. 細胞計數器( Hemacytometer ):

Reichert-Jung
7. 光學顯微鏡( Microscope ):
  - a. 廠牌: Nikon
  - b. 型號: Microphot- FAX
  - c. 出產地: Japan
8. 電子天平:
  - a. 廠牌: METTLER
  - b. 型號: AE 240
  - c. 出產地: Canada
9. 倒立顯微鏡:
  - a. 廠牌: Nikon
  - b. 型號: phase contrast 2 ELWDO.3
  - c. 出產地: Japan
10. 酸鹼測定儀:
  - a. 廠牌: WTW
  - b. 型號: PH 537
  - c. 出產地: Germany

#### 四、照相器材及試劑

1. 底片顯影劑: Kodak T-max
2. 照片顯影劑: Dektal
3. 照片及底片定影劑: Kodak T fixer
4. 底片: Kodak
5. 照片: Ilford
6. 放大機:
  - a. 廠牌: Meopta
  - b. 型號: OPEMUS 6
  - c. 出產地: Janpan

## 實驗步驟及方法

### 一、細胞培養：

\* 中國頰鼠肺 (V79) 細胞其細胞週期約 12 個小時

利用細胞計數器 ( Hemacytometer ) 取得  $5 \times 10^5$  個 V79 細胞置入  
每個培養皿中

↓

培養在含 10% 小牛血清 ( Fetal bovine serum; FCS ) 及 1%  
Antibiotic mixture ( Penicillin, Streptomycin,  
Neomycin; PSN ) 的 5ml 培養液 ( Minimum Essential Medium; MEM )  
中

↓

放入含有 5%  $CO_2$  並保持濕潤的  $37^\circ C$  培養箱

↓

培養 24 小時

↓

加入各種不同濃度的金屬於不含血清的培養液中

↓

作用 2 個小時

↓

移去原培養液並以 PBS 溶液清洗細胞 2 次

↓

加入新鮮且含血清的培養液以探討 V79 細胞之細胞存活率和微小  
核數

## A. 細胞存活率( Viability )

1. 細胞:  $5 \times 10^5$  V79 細胞

2. 藥品:

氧化鍺( Germanium oxide ) ; 30-300  $\mu$ M

硫酸鎵( Gallium sulfate ) ; 10-100  $\mu$ M

氯化銦( Indium chloride ) ; 3-0.3  $\mu$ M

氯化銻( Antimony chloride ) ; 3-0.3  $\mu$ M

Cytochalasin B( 0.5mg/ml )

Trypan blue( 0.4% )

Trypsin( 0.25% )

3. 儀器:

Microscope

Hemacytometer

烘片機

4. 處理流程:

$5 \times 10^5$  V79 細胞

↓

培養 24 小時

↓

加入不同濃度藥物

及 30  $\mu$ l Cyt-B 於含或不含血清及含 PSN 之培養液培養

↓

作用 2 個小時

↓

用 PBS 清洗細胞 2 次

↓

加入 30  $\mu$ l Cyt-B 及含血清之培養液培養

↓

培養 18 個小時

↓

細胞經 0.25% Trypsin 處理

↓

收集懸浮細胞

#### 5. 細胞的製備:

將細胞懸浮均勻並加入 0.4% Trypan blue 處理

↓

靜置 5min

↓

以 Hemocytometer 在倒立式顯微鏡下計數總細胞數以及死細胞數 (死細胞被染色成深藍黑色, 活細胞不被染色), 而細胞存活率則按下列公式計數。

$$\text{Viability}(\%) = \frac{\text{全部細胞總數} - \text{死細胞數}}{\text{全部細胞數}} \times 100\%$$

## B. 細胞微小核法( Micronucleus Assay ; MN )

1. 細胞:  $5 \times 10^5$  V79 細胞

2. 藥品:

氧化鍺( Germanium oxide ) ; 3-300  $\mu$ M

硫酸鎔( Gallium sulfate ) ; 1-100  $\mu$ M

氯化銦( Indium chloride ) ; 300-0.01  $\mu$ M

氯化銻( Antimony chloride ) ; 300-0.01  $\mu$ M

Cytochalasin B ( 0.5mg/ml )

Trypan blue ( 0.4% )

Trypsin ( 0.25% )

KCl ( 75mM )

Fix sol'n ( methanol : acetic acid = 3:1 )

3% Giemsa ( pH6.4 )

3. 儀器: Microscope

4. 處理流程:

$5 \times 10^5$  V79 細胞

↓

培養 24 小時

↓

加入不同濃度藥物

及 30  $\mu$ l Cyt-B 於不含血清及 PSN 之培養液培養

↓

作用 2 個小時

↓

移去原培養液並用 PBS 清洗細胞 2 次

↓

加入 30  $\mu$ l Cyt-B 及含血清之培養液培養

↓

培養 18 個小時

↓

細胞經 0.25% Trypsin 處理

↓

收集懸浮細胞

#### 5. Micronucleus 之製備：

懸浮的細胞以 1200rpm 離心 8min

↓

以 75Mm KCl 處理 6min 並將細胞懸浮均勻

↓

以 1200rpm 離心 8 min

↓

倒掉上清液

↓

沿管壁加入 5ml 固定液懸浮均勻並靜置 30min

↓

以 1200rpm 離心 8 min

↓

移去上清液並加入 5ml 固定液處理 5min

↓

以 1200rpm 離心 8 min

↓

倒掉上清液並加入 3ml 固定液處理 3min

↓

以 1200rpm 離心 8 min

↓

加入少許固定液並與細胞混合均勻

↓

將混合液輕輕滴在已置於烘片機上烘乾的玻片上

↓

待玻片乾後，以 3% 吉式染色劑 (Giemsa) 染色 5 min

↓

在顯微鏡下連續觀察 1000 個雙核細胞中所含 MN 之數目

## 統計分析 (Statistical Analysis)

細胞存活率 (Viability)，微小核 (MN) 之結果以 mean±SE 呈現，而實驗組別相互之間以 Student's t-test 來評估，當  $p < 0.05$  時則具統計意義。

## 結果 (Results)

### A、細胞存活率

1. 當  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 不存在下，Ge，Ga，In，Sb 對 V79 肺細胞之影響：

圖一顯示，V79 肺細胞在 Ga 30、 $100 \mu\text{M}$  下其存活率分別為  $90.6 \pm 1.52\%$ ， $88.6 \pm 1.30\%$ ，在 Sb 0.3、1、 $3 \mu\text{M}$  存在下，則分別為  $58 \pm 0.79\%$ ， $64.5 \pm 1.96\%$ ， $35.5 \pm 1.82\%$ 。表示 Ga 及 Sb 會具統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率，而 Ge (30-300 $\mu\text{M}$ )，及 In (0.3-3 $\mu\text{M}$ ) 與對照組相較，並不抑制 V79 肺細胞之存活率。

2. 當  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 存在下，Ge，Ga，In，Sb 對 V79 肺細胞之影響：

圖二顯示，V79 肺細胞 Ga 在 30、300 $\mu\text{M}$  存在下其存活率分別為  $88.2 \pm 1.37\%$ ， $52.3 \pm 3.45\%$ 。在 In 1、3  $\mu\text{M}$  存在下，為  $94.3 \pm 0.61\%$ ， $94 \pm 0.68\%$ ，在 Sb 0.3、1、3  $\mu\text{M}$  下，則為  $6.98 \pm 0.64\%$ ， $0.8 \pm 0.18\%$ ， $6.5 \pm 1.71\%$ 。表示 Ga、In、Sb 均具統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率，其中以 Sb 的抑制為最明顯，而 In 僅呈輕微的抑制但具統計意義，而 Ge (30-300  $\mu\text{M}$ ) 存在下之結果與對照組相較則不具統計意義。

3. 綜合比較圖一和圖二結果：

如圖三顯示，除 Ge 外，Ga (30-300  $\mu\text{M}$ )，In (1-3  $\mu\text{M}$ )，Sb (0.3-3  $\mu\text{M}$ ) 抑制 V79 肺細胞存活率之作用可被 Cyt-B ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) 具統計意義的加強。

## B、細胞型態

### 一、未加入半導體重金屬之 V79 肺細胞：

1. 圖四顯示不含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞
  - a. 細胞呈紡錘-多角狀吸附於 flask (如細箭標記所示)。
  - b. 細胞質明顯擴展開 (如空心三角標記所示)。
  - c. 細胞核清晰可見 (如實心三角標記所示)。
2. 圖五顯示含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞
  - a. 全部細胞呈圓球狀之亮點吸附於 flask。

### 二、加入 $300 \mu\text{M}$ Ge 之 V79 肺細胞：

1. 圖六顯示不含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞
  - a. 與圖四相比較細胞型態並無改變。
2. 圖七顯示含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞
  - a. 與圖五相比較細胞型態並無改變。

### 三、加入 $100 \mu\text{M}$ Ga 之 V79 肺細胞：

1. 圖八顯示不含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞  
與圖四相比較，少部份細胞型態呈：
  - a. 細胞呈發泡狀 (如細箭標記所示)。
  - b. 細胞質與細胞核已無法分辨 (如空心三角標記所示)。
  - b. 圓球狀亮點之細胞為正處於分裂的細胞(如實心三角標記所示)。

## 2. 圖九顯示含 $3 \mu\text{g/ml}$ Cyt-B 之 V79 肺細胞

與圖五相比較，少部份細胞型態呈：

- a. 細胞呈發泡狀(如細箭標記所示)。
- b. 細胞質與細胞核已無法分辨 (如空心三角標記所示)。
- c. 大部分細胞呈圓球狀之亮點吸附於 flask (如實心三角標記所示)。

## 四、加入 $1 \mu\text{M}$ In 之 V79 肺細胞：

1. 圖十顯示不含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞
  - a. 與圖四相比較細胞型態並無不同。
2. 圖十一顯示含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞
  - a. 與圖五相比較細胞型態並無不同。

## 五、加入 $0.3 \mu\text{M}$ Sb 之 V79 肺細胞：

1. 圖十二顯示不含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞  
與圖四相比較大部分之細胞型態呈：
  - a. 細胞呈紡錘-多角狀吸附於 flask (如細箭標記所示)。
  - b. 細胞質並無明顯的擴展 (如空心三角標記所示)。
  - c. 細胞核並不明顯 (如實心三角標記所示)。
2. 圖十三顯示含  $3 \mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之 V79 肺細胞  
與圖五相比較大部分之細胞型態呈：
  - a. 細胞呈紡錘-多角狀吸附於 flask (如細箭標記所示)。
  - b. 細胞質並無明顯的擴展(如空心三角標記所示)。
  - c. 細胞核並不明顯(如實心三角標記所示)。
  - d. 圓球狀亮點之細胞很少。

## C、微小核 (MN)：

一、在中國頰鼠 V79 肺細胞中，半導體金屬氧化鍺、硫酸鎵、氯化銦及氯化銻於雙核細胞中所誘導之微小核數：

由圖十四的結果顯示 Ge (3-300  $\mu\text{M}$ ) 及 Ga (1-100  $\mu\text{M}$ ) 下與控制組相比較其均未能有意義的增加雙核細胞中微小核的數目，而正對照組之 Mitomycin C (MMC) 為已知的生物功能烷基化劑 (Biofunctional Alkylating Agent)，其能和 DNA 產生交叉連結，因而影響核酸 (Nucleic Acid) 之合成和功能 (Crooke and Bradner, 1976)，進而造成 DNA 斷裂。MMC 在 V79 肺細胞雖不大量但具統計意義增加微小核頻率。與對照組相比較，Sb 和 In 對 V79 肺細胞會產生遺傳毒性。在此實驗中，Sb 和 In 於 0.01-0.3  $\mu\text{M}$  下能劑量-相關性的增加 V79 肺細胞之 MN 數。當濃度高於 0.3  $\mu\text{M}$  時則會造成細胞毒性，使得 MN 數呈劑量相關性的減少。

二、在中國頰鼠 V79 肺細胞中，四種半導體金屬之遺傳毒性的相互作用：

### A. Ge 與 In 之交互作用

如圖十五顯示，Ge 於 30、100、300  $\mu\text{M}$  下其所產生之微小核數分別為  $11.85 \pm 1.03$ ， $10.63 \pm 0.92$ ， $12.5 \pm 2.21$  與控制組 ( $9.73 \pm 0.49$ ) 相比較未能有意義的增加，但 0.1  $\mu\text{M}$  ( $14.9 \pm 0.88$ ) 及 1  $\mu\text{M}$  ( $14.34 \pm 1.04$ ) 之 In 則呈有意義的增加 MN 數，當 Ge 於 100 及 300  $\mu\text{M}$  下，均能減少 0.1  $\mu\text{M}$  及 1  $\mu\text{M}$  In 所形成之 MN (前者分別為  $10.67 \pm 1.90$ ， $10.5 \pm 1.28$ ；後者分別為  $10.00 \pm 1.5$ ， $10.7 \pm 1.14$ )。

## B. Ge 與 Sb 之交互作用

由圖十六顯示，Ge 在 30，100，300  $\mu\text{M}$  其微小核數目分別為  $11.33 \pm 1.05$ ， $10.63 \pm 0.92$ ， $10.33 \pm 0.67$  與控制組  $10.29 \pm 0.56$  相比較並未呈有意義的增加，而 Sb 於 0.1 及 1  $\mu\text{M}$  下其能明顯且具統計意義的增加 MN 數 ( $17.71 \pm 0.46$ ， $17.00 \pm 0.61$ )，當 Ge 於 100 及 300  $\mu\text{M}$  下，其分別能減少 0.1  $\mu\text{M}$  Sb 及 1  $\mu\text{M}$  所形成之 MN (前者分別為  $11.67 \pm 1.20$ ， $10.00 \pm 1.00$ ；後者分別為  $10.25 \pm 2.62$ ， $10.00 \pm 1.95$ )。

## C. Sb0.03 $\mu\text{M}$ 與 In 之交互作用

由圖十七顯示，In 在 0.03，0.1  $\mu\text{M}$  及 Sb 在 0.03  $\mu\text{M}$  下其微小核數分別為  $15.44 \pm 1.32$ ， $16.23 \pm 0.89$ ， $18.5 \pm 1.64$  與控制組  $10.32 \pm 0.50$  相比較呈有意義的增加，而 0.03  $\mu\text{M}$  之 Sb 分別與 0.1 及 0.03  $\mu\text{M}$  In 交互作用其微小核數分別為  $19.45 \pm 1.75$ ， $16.4 \pm 1.22$  與單獨之 0.03  $\mu\text{M}$  Sb 相比較並不具統計意義。

## D. Sb0.1 $\mu\text{M}$ 與 In 之交互作用

由圖十八顯示，In 在 0.03，0.1  $\mu\text{M}$  及 Sb 在 0.1  $\mu\text{M}$  下其微小核數分別為  $15.44 \pm 1.32$ ， $16.23 \pm 0.89$ ， $16.96 \pm 0.65$  與控制組  $10.32 \pm 0.50$  相比較呈有意義的增加，而 0.1  $\mu\text{M}$  之 Sb 分別與 0.03 及 0.1  $\mu\text{M}$  In 交互作用其微小核數分別為  $17.58 \pm 3.56$ ， $17.87 \pm 1.57$  與單獨之 0.1  $\mu\text{M}$  Sb 相比較並不具統計意義。

### E. Ga 分別與 In 及 Sb 之交互作用

由表一的結果顯示，Ga 在 3，30  $\mu\text{M}$  下其微小核數分別為  $11.0 \pm 1.00$ ， $11.5 \pm 0.65$  與控制組  $10.4 \pm 0.48$  相比較並不具統計意義，而 1  $\mu\text{M}$  之 In 及 0.1  $\mu\text{M}$  Sb 的微小核數分別為  $15.8 \pm 0.46$ ， $15.6 \pm 0.52$  呈統計意義的增加，當 3 和 30  $\mu\text{M}$  Ga 分別與 1  $\mu\text{M}$  In 作用時其微小核數分別為  $14.0 \pm 1.00$ ， $14.5 \pm 1.44$ ，與單獨之 1  $\mu\text{M}$  In 比較並未顯著增加，但當 3 和 30  $\mu\text{M}$  Ga 與 0.1  $\mu\text{M}$  之 Sb 作用時，其微小核數分別為  $20.5 \pm 1.70$ ， $19.5 \pm 2.50$  則具統計意義的增加。

D、在 V79 肺細胞中半導體金屬所產生之 MN 藉由拮抗劑的加入觀察其反應：

#### a. SOD 與 Sb 及 In 作用所產生之反應

由表二的結果顯示，0.3  $\mu\text{M}$  之 Sb 及 In 其能有意義的增加 V79 肺細胞之微小核數 ( $19.5 \pm 0.44$ ， $18.4 \pm 0.67$ )，而 SOD 在 75 及 150  $\mu\text{M}$  單獨存在下並不會增加微小核數 ( $10.3 \pm 1.31$ ， $9.0 \pm 1.29$ )，且能有意義的減少 0.3  $\mu\text{M}$  之 Sb 及 In 所產生之微小核數 ( $10.8 \pm 1.10$ ， $8.5 \pm 0.64$ ， $12.0 \pm 1.82$ ， $13.8 \pm 1.10$ )。

#### b. Catalase 與 Sb 及 In 作用所產生之反應

由表三的結果顯示，0.3  $\mu\text{M}$  之 Sb 及 In 其能有意義的增加 V79 肺細胞之微小核數 ( $19.5 \pm 1.61$ ， $18.1 \pm 0.42$ )，而 Catalase 在 75 及 150  $\mu\text{M}$  單獨存在下並不會增加微小核數 ( $9.0 \pm 0.81$ ， $8.0 \pm 0.40$ )，且能有意義的減少 0.3  $\mu\text{M}$  之 Sb 及 In 所產生之微小核數 ( $17.3 \pm 0.94$ ， $13.3 \pm 0.75$ ， $11.0 \pm 0.57$ ， $14.8 \pm 1.75$ )。

### c. Dimercaprol (BAL) 與 Sb 及 In 作用所產生之反應

由表四的結果顯示，0.3  $\mu\text{M}$  之 Sb 及 In 其能有意義的增加 V79 肺細胞之微小核數 ( $18.6 \pm 0.58$ ,  $18.5 \pm 0.27$ )，而 BAL 在 1 及 3  $\mu\text{M}$  下並不會增加微小核數 ( $10.5 \pm 0.95$ ,  $9.75 \pm 0.75$ )，但在 10 及 30  $\mu\text{M}$  下會造成微小核數增加 ( $14.3 \pm 1.76$ ,  $16.7 \pm 2.4$ )，然而 BAL 在 1 及 3  $\mu\text{M}$  下會有意義的減少 0.3  $\mu\text{M}$  之 Sb 及 In 所產生之微小核數 ( $12.3 \pm 1.25$ ,  $12.5 \pm 0.95$ ,  $9.7 \pm 0.62$ ,  $8.5 \pm 1.84$ )。

### d. D-Penicillamine (D-PA) 與 Sb 及 In 作用所產生之反應

由表五的結果顯示，0.3  $\mu\text{M}$  之 Sb 及 In 其能有意義的增加 V79 肺細胞之微小核數 ( $18.3 \pm 0.64$ ,  $17.6 \pm 0.76$ )，而 D-PA 在 1  $\mu\text{M}$  下並不會增加微小核數 ( $9.1 \pm 0.63$ )，但在 3, 10 及 30  $\mu\text{M}$  下會造成微小核數增加 ( $11.7 \pm 1.65$ ,  $16.5 \pm 2.60$ ,  $17.0 \pm 1.00$ )，然而 D-PA 在 1  $\mu\text{M}$  下會有意義的減少 0.3  $\mu\text{M}$  之 In 所產生之微小核數 ( $14.1 \pm 0.70$ )，但無法減少 0.3  $\mu\text{M}$  Sb 所產生之微小核數 ( $17.3 \pm 1.10$ )。

## 討論 (Discussion)

在本實驗中，Ga 和 Sb 在不含 Cyt-B 下兩者均能降低 V79 細胞的存活率，而 Ga 和 Sb 降低 V79 細胞存活率之作用可被 Cyt-B 強烈加強。In 在不含 Cyt-B 之 V79 細胞其對細胞存活率並無影響，但在加入 Cyt-B 後會稍微但呈統計意義地抑制 V79 細胞之存活率，但 Ge 之作用不受 Cyt-B 影響。Cyt-B 已知可抑制 actin polymerization 之速率 (Brehner and Korn, 1980)，其在此研究可加強 Ga, Sb 和 In 之細胞毒性，由此可推測 actin polymerization 和細胞存活率有關。而 Ga, Sb 和 In 抑制細胞存活率之機轉可能部份抑制 actin polymerization 之活化因子 (如  $Ca^{2+}$ ) 而來。Altman et al. (1993) 提出老鼠之 hybridoma 細胞經過一段時間生長後給予 mM 之 tert-butyl hydroperoxide 或 ferrous iron 再利用兩種細胞存活率分析法 trypan blue 和 fluorometric 來做比較，Altman 根據研究結果認為以 trypan blue 法判定死細胞染色程度的定義有時並不明確，往往高估細胞存活率，故其認為判定細胞存活率以 fluorometric 分析法為較好的選擇。所以在此實驗中以 Trypan Blue 來研究細胞之存活率，可能無法正確估計細胞的反應，所以有必要以更進一步的方法來檢測。

關於細胞型態方面之研究，由於細胞骨架主要是由三種絲狀蛋白所組成 (1) 微絲 (Microfilaments) 是由肌動蛋白組成 (Actin)，其會與連結蛋白 (linking protein) 連結排列成堅固的交叉網路，此肌動蛋白絲狀網路也可經由細胞膜固著蛋白 (membrane anchoring protein) 的作用附著在細胞膜上，以提供

細胞膜機械性的支持。此外亦可和細胞膜上特定部位的 transmembrane protein 連結，形成細胞-細胞連黏 (cell-cell adhesion) 之連黏帶 (adhesion belt) 以及細胞-基質連黏 (cell-matrix adhesion) 之局部接觸 (focal contacts)，使得細胞之動蛋白絲狀網路可與其他的細胞或構造連結。(2) 微管 (Microtubules) 是由  $\alpha$  及  $\beta$  微管蛋白 (tubulin) 以頭尾相接的方式形成原絲 (protofilament)，其可形成細胞運輸之網路，經由接觸蛋白如 dynein 可使微管向細胞中央移動，經 kinesin 則可使微管向周圍移動，微管亦是形成膜性細胞成分的網路如可維持內質網伸長的管狀排列，且在細胞分裂時可伴隨染色體的組成而形成紡錘體。(3) 中間絲 (Intermediate filaments) 其可與細胞膜上的 transmembrane protein 連結形成細胞-細胞連黏 (cell-cell adhesion) 之胞橋小體 (Desmosome) 及細胞基質黏連 (cell-matrix adhesion) 之半胞橋小體 (hemidesmosomes)，而中間絲亦可與 ankyrin 連結而固著在膜上形成離子通道蛋白 (ion channel protein)。由於上述之絲蛋白與固著及接合蛋白連結於細胞膜上且互相附著而形成了細胞內動態之三度空間的鷹架，此鷹架一直處於不斷組成與拆解的狀態中，所以細胞骨架可維持適當之細胞架構，促細胞運動及幫助細胞質液運輸 (Goodman et al., 1994, Alan et al., 1991)。

在本研究由於 Cytochalasin B 能阻斷微絲的聚合 (polymerization) 所以會影響細胞-細胞連黏之連黏帶 (Adhesion belt) 以及細胞-基質連黏之局部接觸 (focal contracts)，所以細胞在 Cyt-B 加入後會形成圓球狀之亮點。Li (1987) 曾提出 Paraquat 會劑量相關性的傷害老鼠 3T3 之細胞骨架，且認為此種傷害可能是

造成細胞毒性的主要機轉。所以在本實驗中，加入 Ga 及 Sb 之細胞其細胞骨架 (Cytoskeleton) 明顯改變且與加入 Cyt-B 的正常細胞比較，推測細胞質的不明顯可能是由於 Ga 及 Sb 破壞微管及微絲，其中以微管的傷害為最大使得細胞質之運輸網路受到影響最後造成細胞存活率明顯下降。另外，活動性高之細胞型態會擴展開來，活動力降低時 actin filaments 聚集組合呈直線束狀 (Lazarides and Revel, 1979)，而 Sb 不管 Cyt-B 是否存在均明顯呈現此種作用 (圖十二，十三)，所以 Sb 可能是四種金屬離子抑制 V79 細胞運動活性最強者，但仍需以細胞免疫螢光法，或細胞免疫化學法再做進一步的探討。

關於遺傳毒性方面的研究，由利用半導體金屬對 V79 細胞暴露所誘導微小核出現的結果顯示，我們發現 Sb 能劑量相關性的增加 MN 數。相似之銻遺傳毒性亦被其他學者所報告，Kuroda (1991) 提出 Sb 會增加 V79 細胞 SCE 的頻率，Gurnani et al. (1992) 觀察到 V79 細胞以  $\text{SbCl}_3$  (1.3, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  或  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  (0.09, 0.17, 0.34  $\mu\text{g/ml}$ ) 處理，其會增加 SCE 出現的頻率，以及 Gurnani et al. (1992) 報告將老鼠強行灌入  $\text{SbCl}_3$  在 6, 12, 18 或 24 小時後發現在老鼠骨髓細胞中其染色體結構發生異常且染色體斷裂的頻率成劑量相關性的增加。Gebel et al. (1997) 亦發現 Sb 會增加人類淋巴球之 SCE 頻率。另外，Hantson et al. (1996) 在感染利什曼症 (leishmaniosis) 的患者給予全部劑量為 42.5g 的 meglumine antimoniate ( $\text{C}_7\text{H}_{18}\text{NO}_8\text{Sb}$ ) 來治療，取其淋巴球 (Lymphocytes) 細胞加以培養，發現其染色體結構並無發生異常且 SCE 的頻率也無增加，但是 MN 數卻是明顯的增加，銻化合物因此被認為會干擾有絲

分裂時染色體之排列而造成子細胞中染色體數目的改變，並非直接的使染色體結構發生變化。除此之外，Groth et al. (1986) 觀察到 Sb 會在雌性大白鼠造成肺腫瘤，另外在實驗動物及從事冶煉工作者的研究中發現銻化合物能引起肺腫瘤，但必須提出的是這些實驗動物及冶煉工作者同樣的也暴露其他化合物，特別是砷已知其具有高度的致癌性。例如 Watt (1983) 提出在實驗的母鼠給予 1.6 或 4.3mg/m<sup>3</sup> 工業用的 SbCl<sub>3</sub> (含 0.02%的砷)，結果會增加肺腫瘤特別是在高劑量下，所以我們不容忽視與銻同時存在的金屬化合物可能對人體潛藏的危機。綜合觀之，Sb 對人類是否為致癌物尚未十分清楚，但 Sb 在實驗標本造成遺傳毒性，又會造成肺癌。此外，其和砷同屬 GrV<sub>A</sub> 類金屬，化性和毒性又十分接近 (Gebel et al., 1997)。所以 Sb 對人類可能是致癌物。此研究 In 亦濃度相關的增加 MN 數目。到目前為止，尚無 In 在哺乳類細胞造成遺傳毒性的報告，吾人是首次發現 In 會在哺乳類細胞造成遺傳毒性。其他有關 In 之毒性報告如 Yoshikawa (1971) 報告 In 會造成肺損害及 Bustamante (1997) 提出 InCl<sub>3</sub> 在 1, 10 或 100 μM 下與老鼠胸腺細胞 (thymocytes) 共同培養 6 小時之後發現 InCl<sub>3</sub> 會誘導老鼠胸腺細胞有 DNA ladder 出現。此外，Ge (3-300 μM) 及 Ga (1-100 μM) 兩者並不會造成 V79 細胞 MN 數目的增加，此與 Kuroda (1991) 提出之報告相似，其發現 0.5mM GaCl<sub>3</sub> 及 Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 在 Salmonella 突變分析中和 0.25-2 μM GaCl<sub>3</sub> 及 1-8 μM Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 在 V79 肺細胞中 SCE 出現的頻率並未增加。另外，Li et al. (1992) 提出在 HGPRT 突變分析中 dibutylgermanium dichloride 會使 CHO 細胞產生 50% 的致死量為 2.33 mM，而在高於 1.55 mM 下則會增加突變性，但在淋

巴球細胞中濃度高於 0.25 mM 下仍未出現毒性作用，但抗體卻減少成為控制組的一半。而 Lee et al. (1998) 在人類淋巴球亦未發現 Ge (0.05-5  $\mu$ M) 具有遺傳毒性。所以，Ge 在高濃度 (>1m M) 才可能具有突變性，但是 GeO<sub>2</sub> 溶解度相當低所以本研究無法做到此高濃度。由於 Ga 與 In 在週期表中均屬第 III 族，但在細胞存活率的實驗中 Ga 的細胞毒性明顯高過 In，而在遺傳毒性上 In 所造成微小核的增加卻高過 Ga，所以推測可能是由於加入 Ga 之 V79 肺細胞其細胞骨架受到傷害而造成細胞死亡，此外關於 In 造成之遺傳毒性的增加是否與 DNA 修復系統被抑制有關？仍需再做探討。

由於半導體從業人員可能同時接觸不同的半導體金屬，所以藉由不同金屬的加入來觀察其對於 V79 細胞可能產生的變化。由實驗中可發現 Ge (300-100  $\mu$ M) 能減少 Sb (0.1-1  $\mu$ M) 及 In (0.1-1  $\mu$ M) 所形成 V79 細胞之微小核頻率 (圖十五、十六)，此與 Han et al. (1992) 報告老鼠給予 0.7, 1.4 或 2.7mg/kg 之 CdCl<sub>2</sub> 其在老鼠骨髓細胞 (bone marrow cells) 所產生的微小核數增加及染色體的斷裂可被 0.1 或 0.5mg/ml/kg 之 GeO<sub>2</sub> 所減少，另外 Cd<sup>2+</sup> 所造成的老鼠精蟲細胞型態之改變及人類淋巴球細胞之 SCE 頻率的增加均可被 GeO<sub>2</sub> 所對抗的研究報告相似。而 Lee et al. (1998) 亦指出 GeO<sub>2</sub> 可在人類淋巴球細胞降低醋酸苯基汞所增加之 MN。所以 Ge 不但不具遺傳毒性，且可降低其他金屬之遺傳毒性。而 Sb 及 In (圖十七、十八) 兩者在 V79 細胞不會互相加強微小核數，Ga 對 In 沒作用但加強 Sb 之遺傳毒性 (表一)，數據顯示半導體金屬間之交互作用相當複雜仍需再作進一步的探討。

一般來說，當氧受到藥物、金屬的刺激或有氧呼吸及分泌

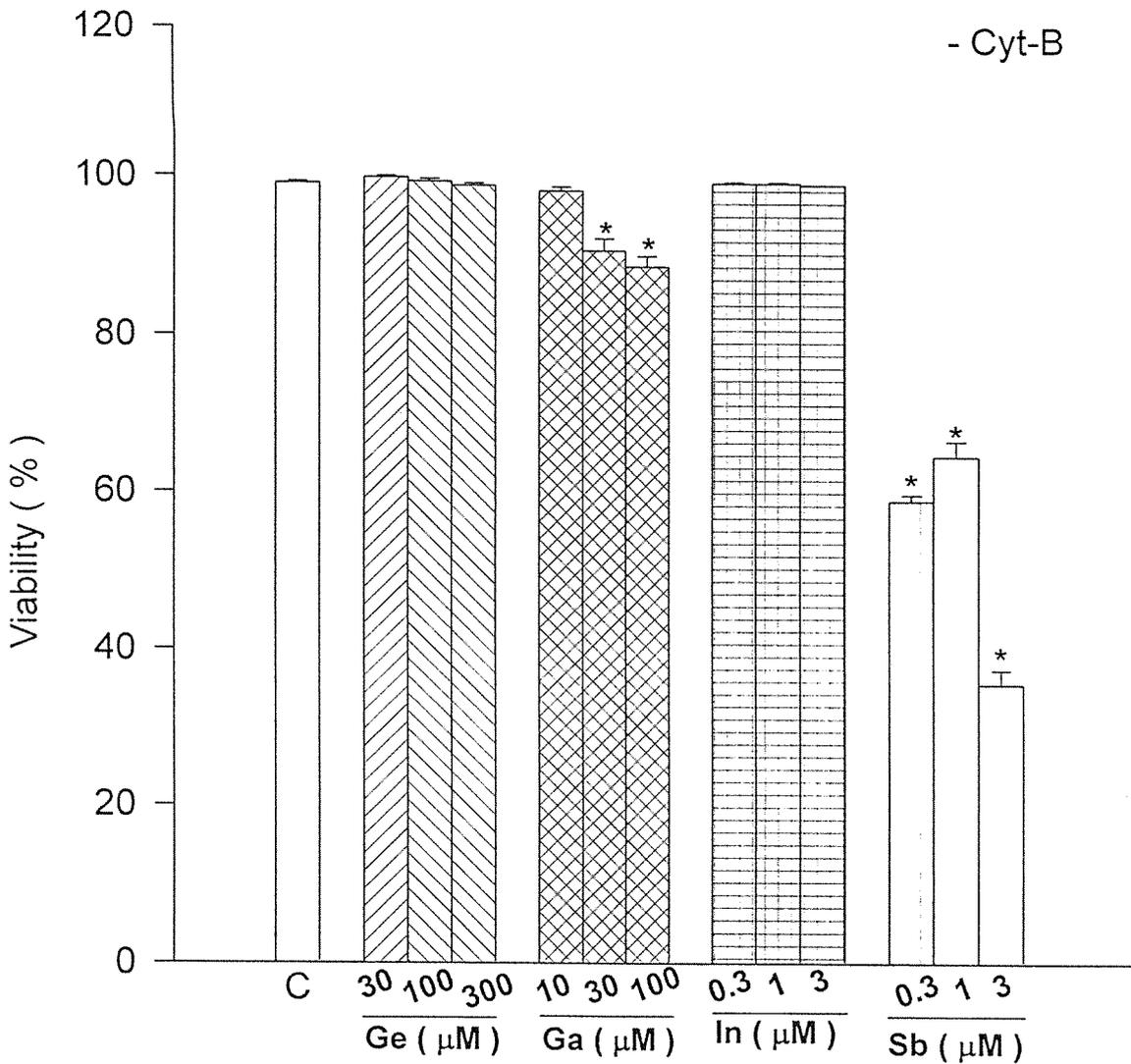
代謝的過程後可能會形成  $O_2^{\cdot-}$ ， $H_2O_2$ ， $OH^{\cdot}$ ...等自由基， $O_2^{\cdot-}$ 等自由基可使膜性構造物（如細胞膜、核膜、粒腺體膜等）上的脂質過氧化，因而使結構改變，功能發生障礙，而降低細胞內解毒系統的能力及酵素活性，SOD 能使  $O_2^{\cdot-}$  轉變成  $H_2O_2$ ，以免  $O_2^{\cdot-}$  在細胞內堆積，另外  $H_2O_2$  可被 Catalase 轉變成  $H_2O$ ，減少  $H_2O_2$  對細胞的傷害。在本研究 Sb 及 In 所產生的微小核能被 SOD 及 Catalase 所對抗（表二、表三）。此與 Trimenstein (1995) 所提將心肌細胞暴露在 1-1000  $\mu M$  potassium antimonyl tartrate (PAT) 中結果發現 PAT 成劑量及時間相關性的誘導細胞脂質過氧化及造成細胞毒性之報告相似，亦與 Sandra (1995) 提出 In 能改變膜生理特性及促進  $Fe^{2+}$  誘導脂質過氧化之報告相似。由於 SOD 和 Catalase 是和 Sb, In 一齊加，那麼 SOD 和 Catalase 是否以硫氫基和 Sb, In 結合而降低其遺傳毒性而不是經由捕捉自由基？根據 Lee et al. (1998) 之報告，和硫氫基高度結合之苯基汞在人類淋巴球所誘發之遺傳毒性無法被另加之 SOD 和 Catalase 所對抗，所以吾人排除這種可能性，所以 SOD 和 Catalase 可能被 V79 肺細胞所吸收後在適當機會捕捉自由基。總之，Sb 及 In 可能是經由自由基而造成細胞的傷害。

螯合劑 (chelating agents) 為金屬中毒最普遍及有效的解毒劑，這類化合物通常具有 2 個以上的負電性基 (electronegative group) 分子，其能與陽離子性金屬原子形成穩定的複合物，易由體內排出，Dimercaprol (BAL)，又稱 British antilewisite，其能直接與金屬螯合，防止金屬與含硫氫基 (SH group) 之酉每結合，而避免干擾到正常細胞功能。Penicillamine 為 Penicillin 的水溶性分解產物，D 型 (右旋) 異構物較 L 型 (左旋) 不具毒性且效果

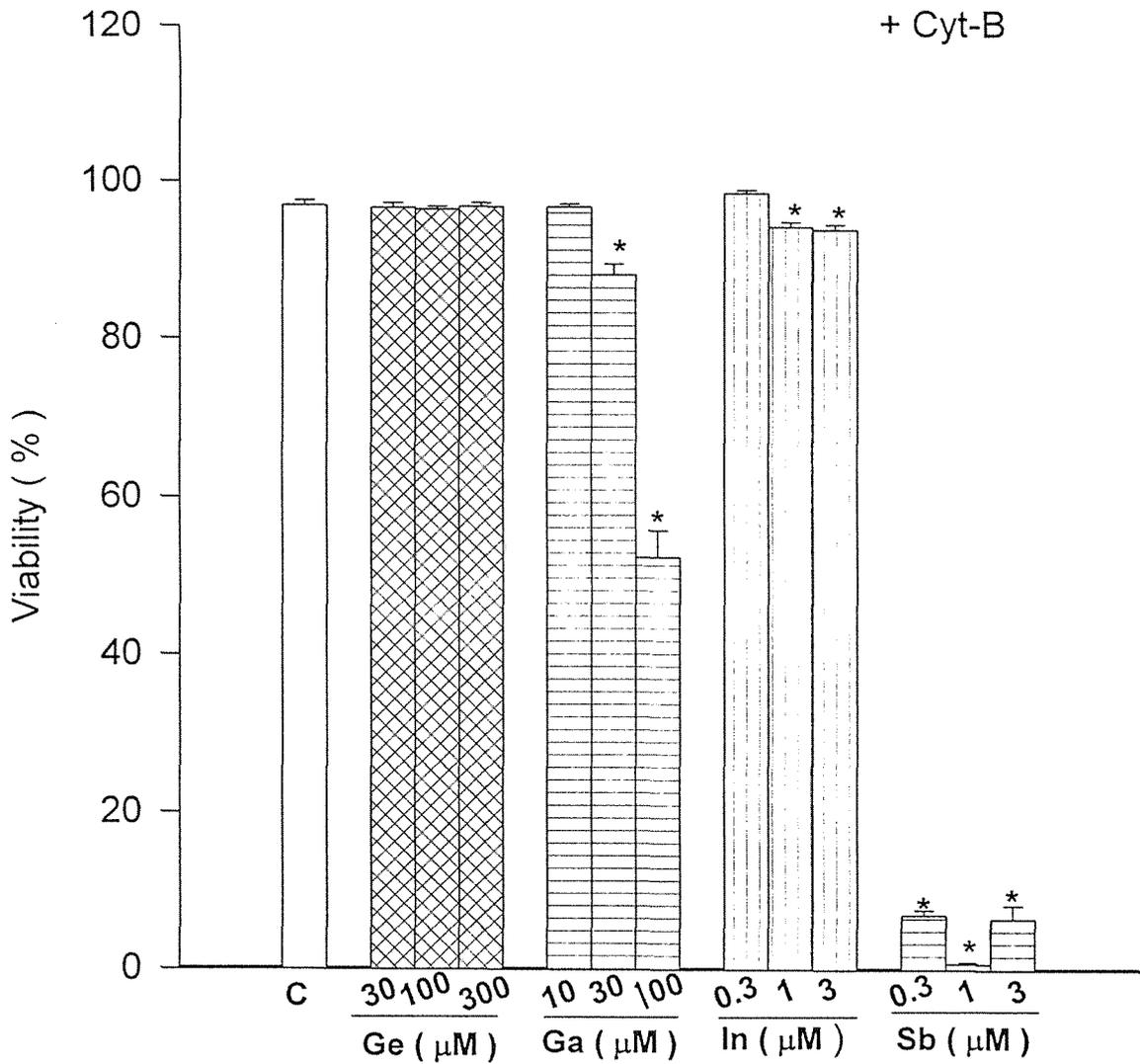
較好，由於大部分重金屬能表現生物毒性，主要是和組織內之硫氫基 (Sulfhydryl group; SH) 結合，由於硫氫基是許多酉每系統的活性基本結構，所以會干擾許多酉每系統應有的功能。故 D-penicillamine (D-PA) 和 Dimercaprol (BAL) 常被用來作為重金屬的解毒劑 (Lyle, 1981; Aposhian, 1989; Domingo et al., 1992; Li et al, 1994)，在本研究中可知 D-PA 及 BAL 單獨在高濃度下 ( $10-30 \mu\text{M}$ ) 會增加 V79 細胞之 MN 數，故無法緩解 Sb 及 In ( $0.3 \mu\text{M}$ ) 所產生的 MN 數，但 BAL 在低濃度下 ( $1-3 \mu\text{M}$ ) 不但不具遺傳毒性且可降低 Sb 及 In 所增加之 MN 數，但 D-PA 只在  $1 \mu\text{M}$  時能降低 In 所產生之 MN 數，但是卻無法緩解 Sb 所產生的 MN 數(表五、六)。根據此結果推測可能是由於 BAL 具有 2 個硫氫基而 D-PA 只具 1 個硫氫基，所產生的拮抗能力不同所致。

結論: Sb 和 In 在 V79 細胞均具遺傳毒性，由於 SOD 和 Catalase 可降低其遺傳毒性，所以其致遺傳毒性之機轉可能和自由基有關。BAL 亦可降低 Sb 和 In 之遺傳毒性所以和含硫氫基酵素受抑制有關。另外，Ge 亦可降低 Sb 和 In 之遺傳毒性，其機轉目前尚未清楚。所以，Sb 和 In 造成遺傳毒性之機轉應是多方面的而非單一機轉可以解釋。由於 Sb 和 In 在相當低濃度 ( $\geq 0.1 \mu\text{M}$ ) 便具遺傳毒性，此和大多數致突變性金屬相當不同 (需  $10 \mu\text{M}-10\text{mM}$ )。所以對半導體工業之暴露工人可能相當具危險性。Ge 和 Ga 雖不具遺傳毒性，但 Ga 具細胞毒性且有報告指出 Ge 和 Ga 在人類有腎毒性 (Schauss, 1991)，在懷孕之豚鼠造成畸形胎 (Ferm and Carpenter, 1970)，在職業工人或實驗動物造成肺氣腫和呼吸道疾病 (Fadeev, 1980; Arts, 1990)，所以亦不能忽視其對半導體工人之危險性。

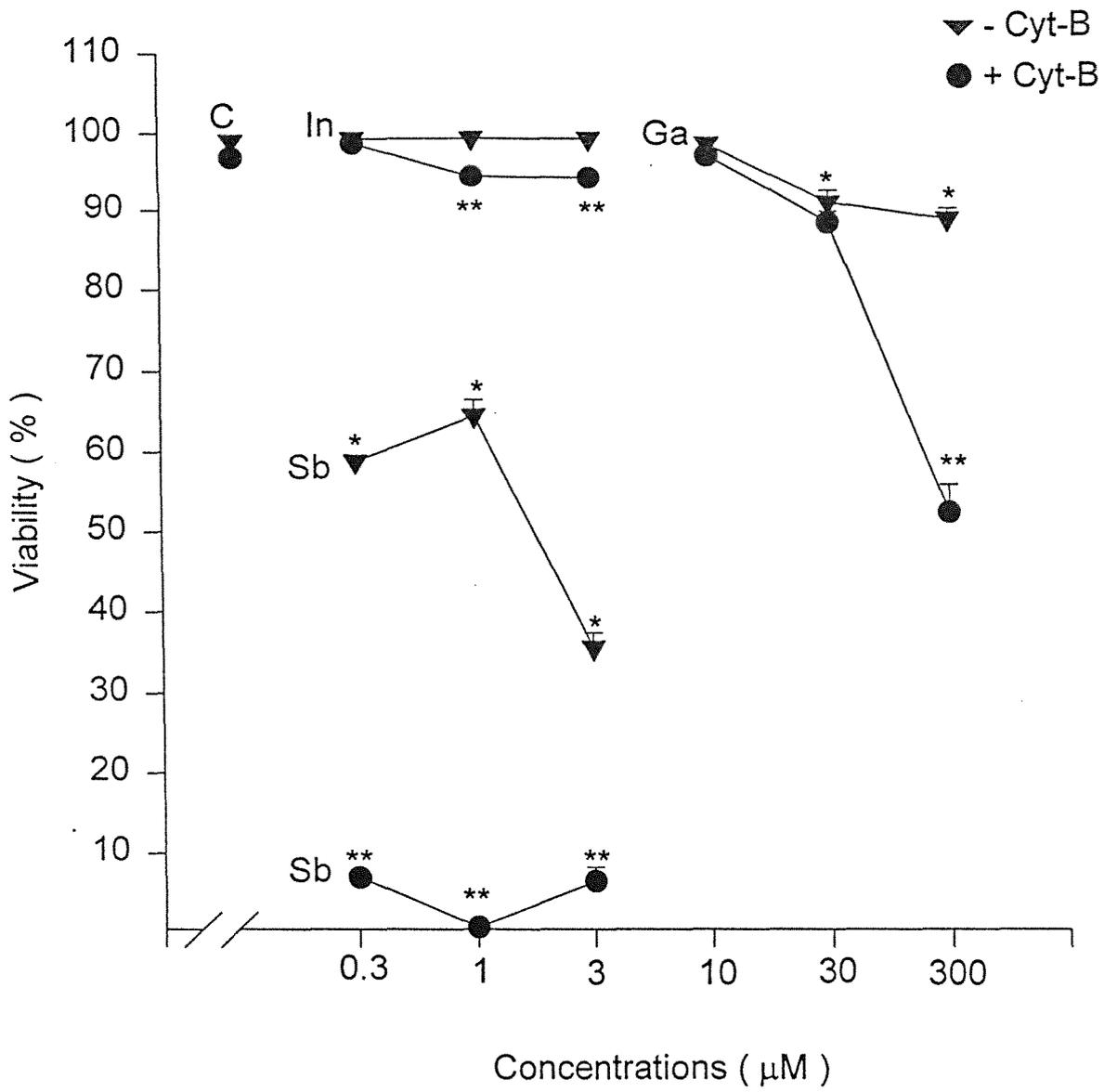
圖 A. 雙核細胞, 微小核細胞



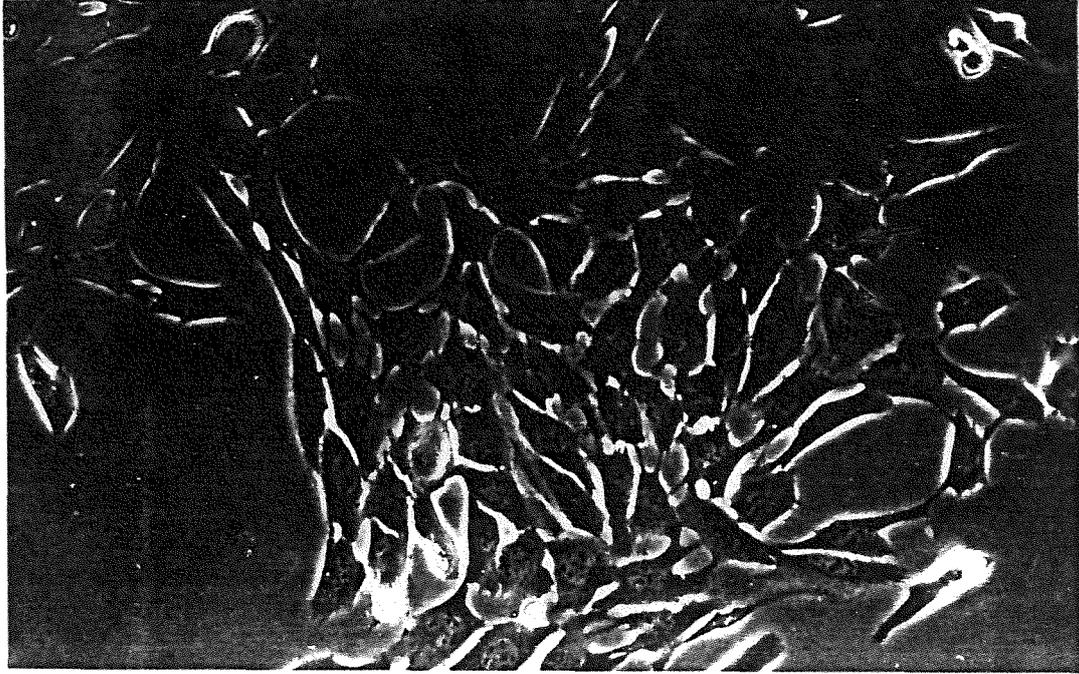
圖一. 半導體金屬氧化鍺 (Germanium oxide), 硫酸鎵 (Gallium sulfate), 氯化銦 (Indium chloride), 氯化銻 (Antimony chloride) 在 Cyt-B 不存在下對 V79 肺細胞之存活率的影響. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \* $P < 0.05$  as compared with control.



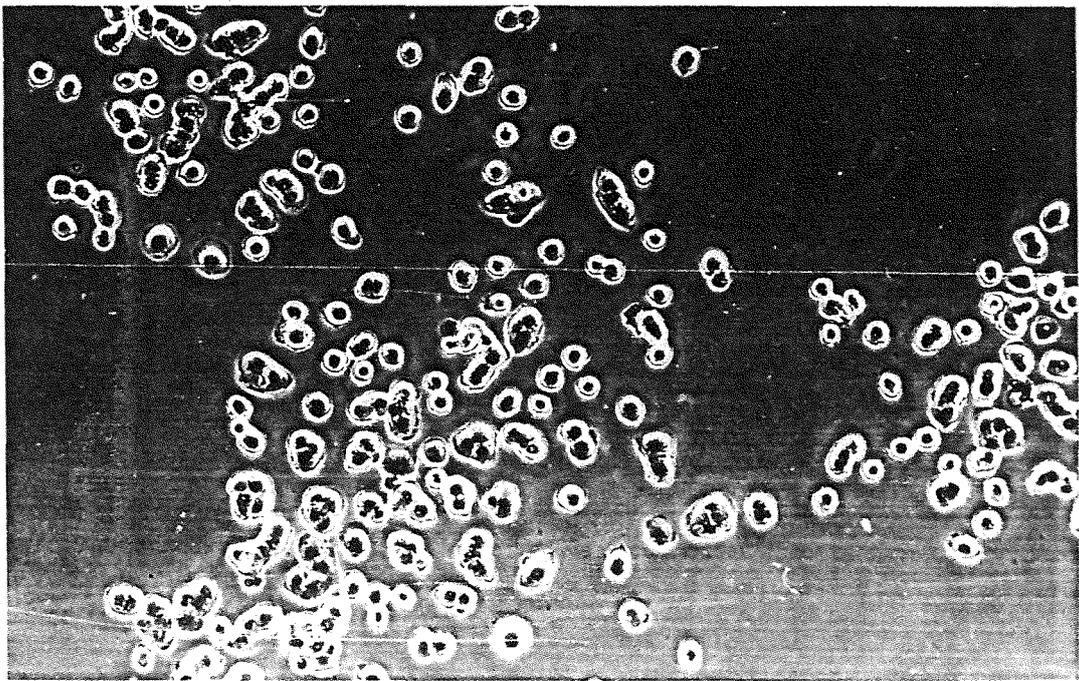
圖二. 半導體金屬氧化鍺 (Germanium oxide), 硫酸鎵 (Gallium sulfate), 氯化銦 (Indium chloride), 氯化銻 (Antimony chloride) 在 Cyt-B 存在下對 V79 肺細胞之存活率的影響. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.. \* $P < 0.05$  as compared with control.



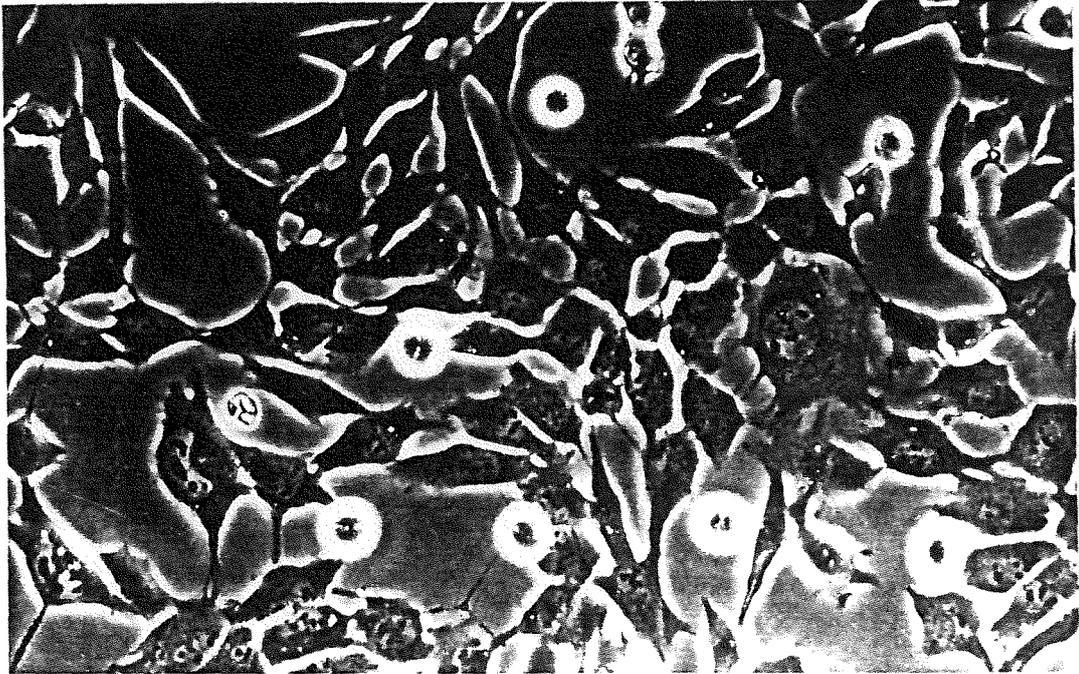
圖三. 比較半導體金屬氧化鍺 (Germanium oxide), 硫酸鎵 (Gallium sulfate), 氯化銦 (Indium chloride), 氯化銻 (Antimony chloride) 在 3μg/ml Cyt-B 存在或不存在下對 V79 肺細胞之細胞存活率的影響. Data are shown as mean ± S. E. . \*P < 0.05 as compared with control , \*\*P < 0.05 as compared with Cyt-B absent group.



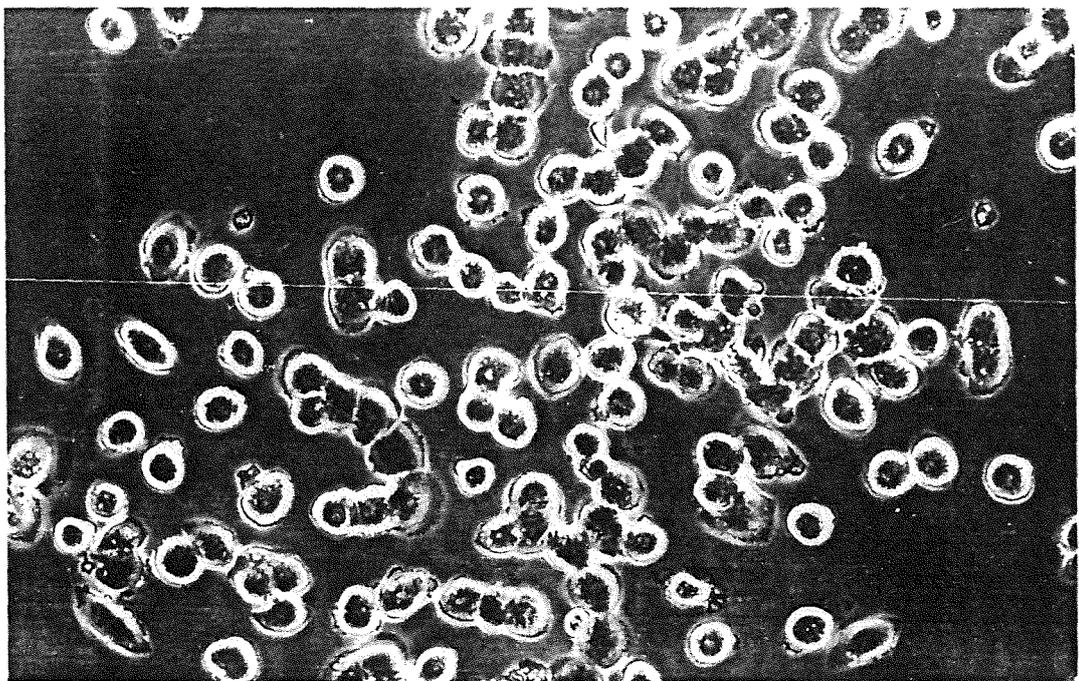
圖四. 加藥前之對照組 V79 肺細胞.



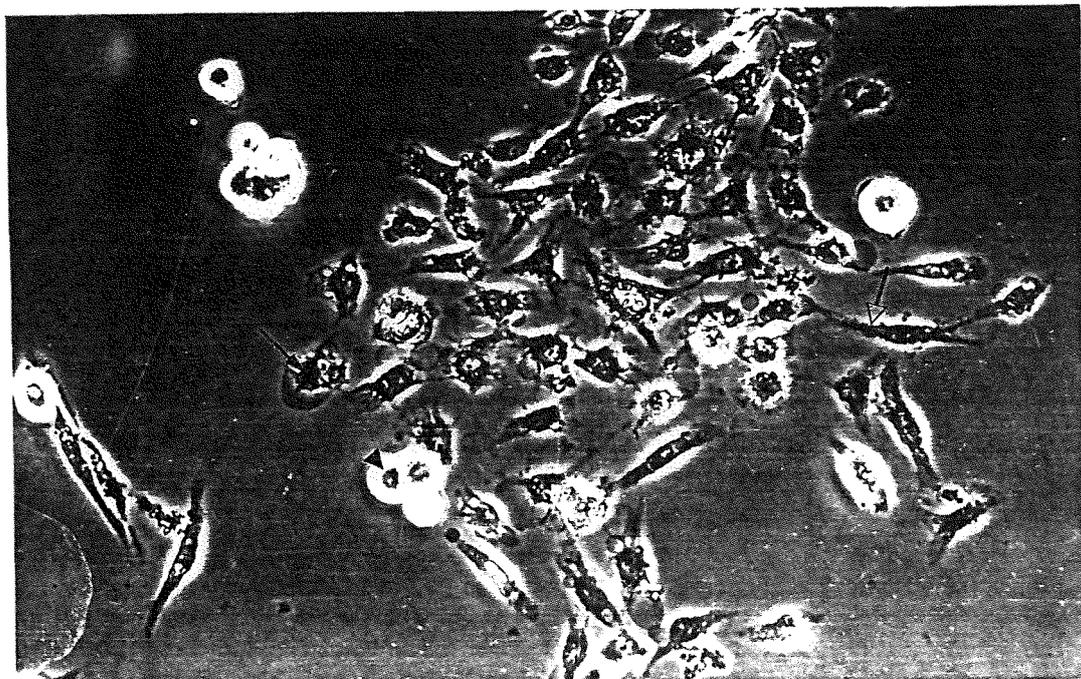
圖五. 加入  $3\mu\text{g/ml}$  Cyt-B 之對照組 V79 肺細胞.



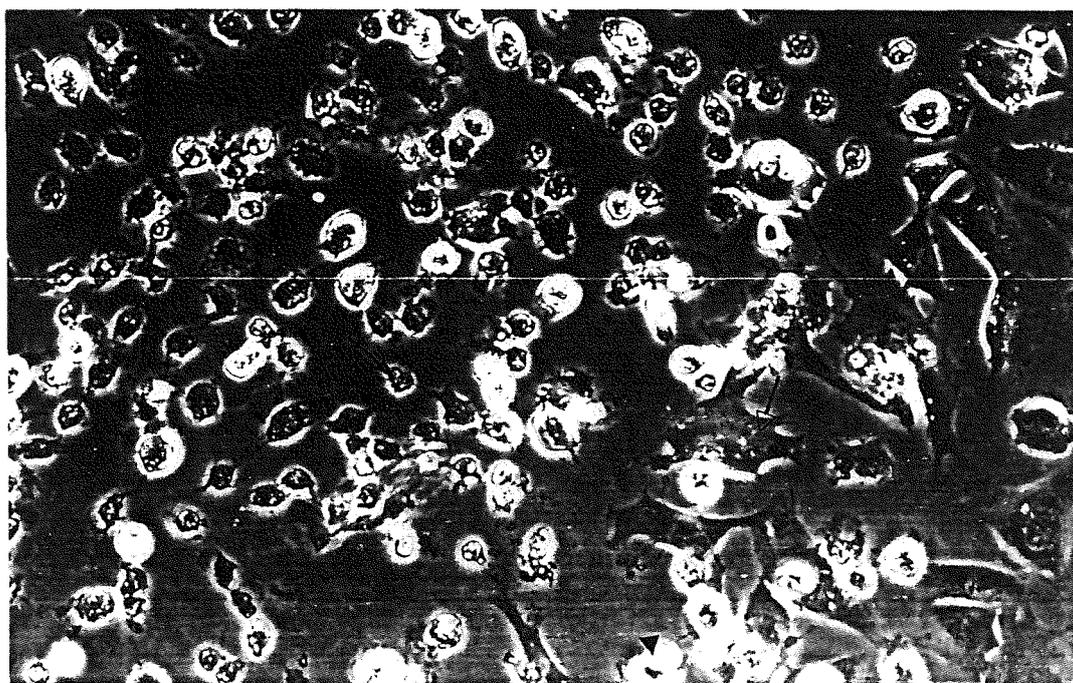
圖六. 加入 300  $\mu\text{M}$  Ge 之 V79 肺細胞.



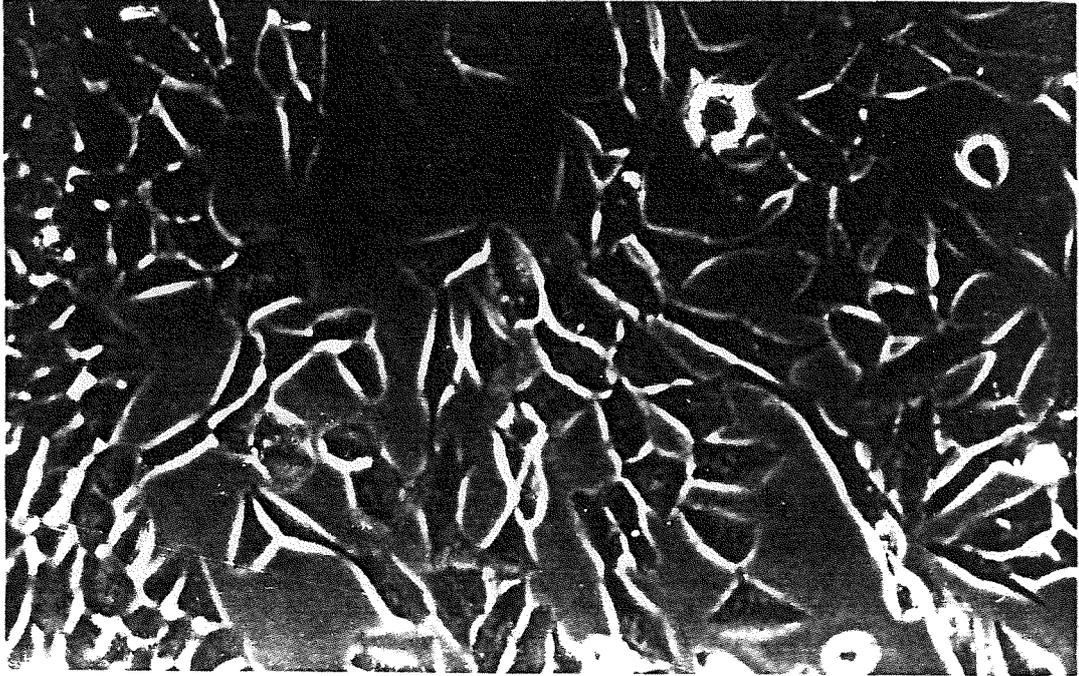
圖七. 加入 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cyt-B 和 300  $\mu\text{M}$  Ge 之 V79 肺細胞.



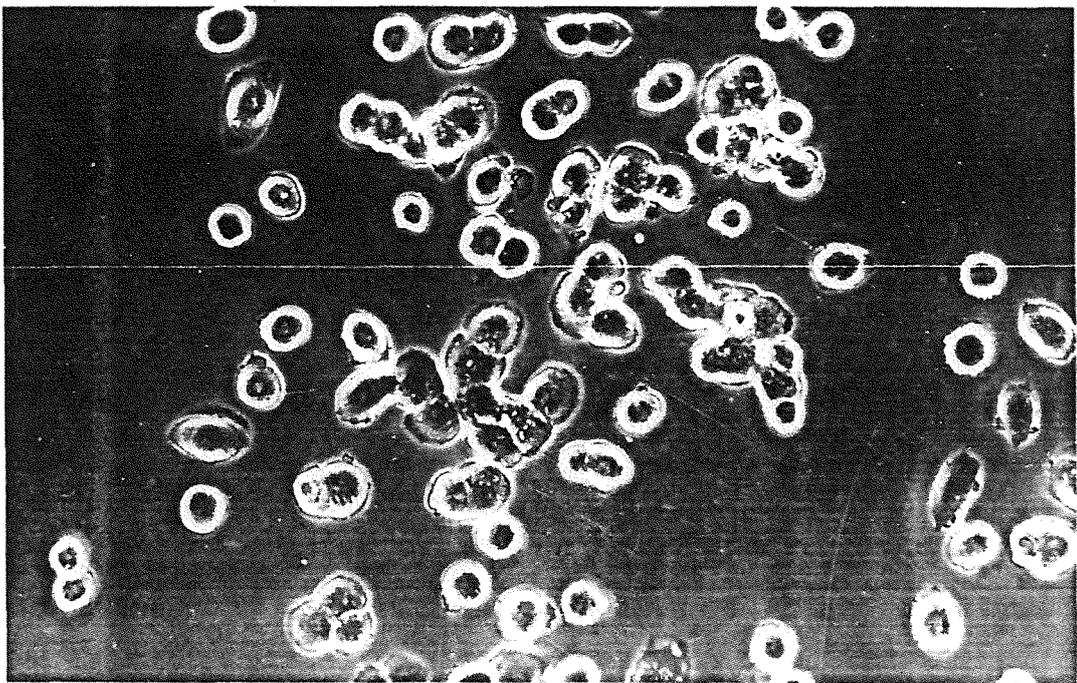
圖八. 加入  $100\ \mu\text{M}$  Ga 之 V79 肺細胞.



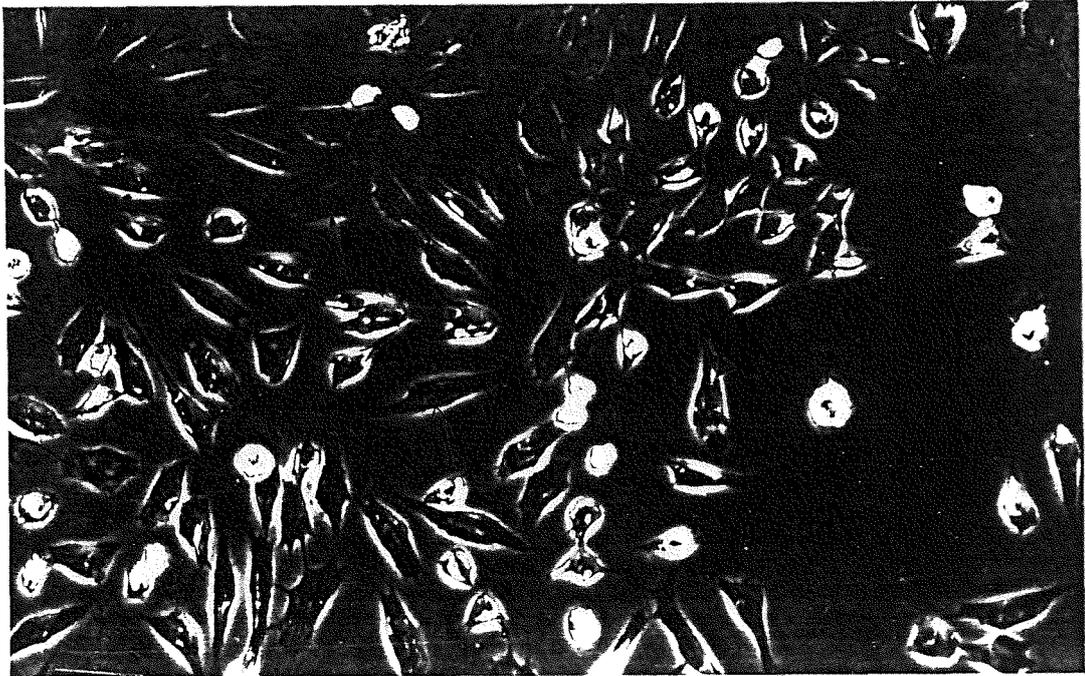
圖九. 加入  $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Cyt-B 及  $100\ \mu\text{M}$  Ga 之 V79 肺細胞.



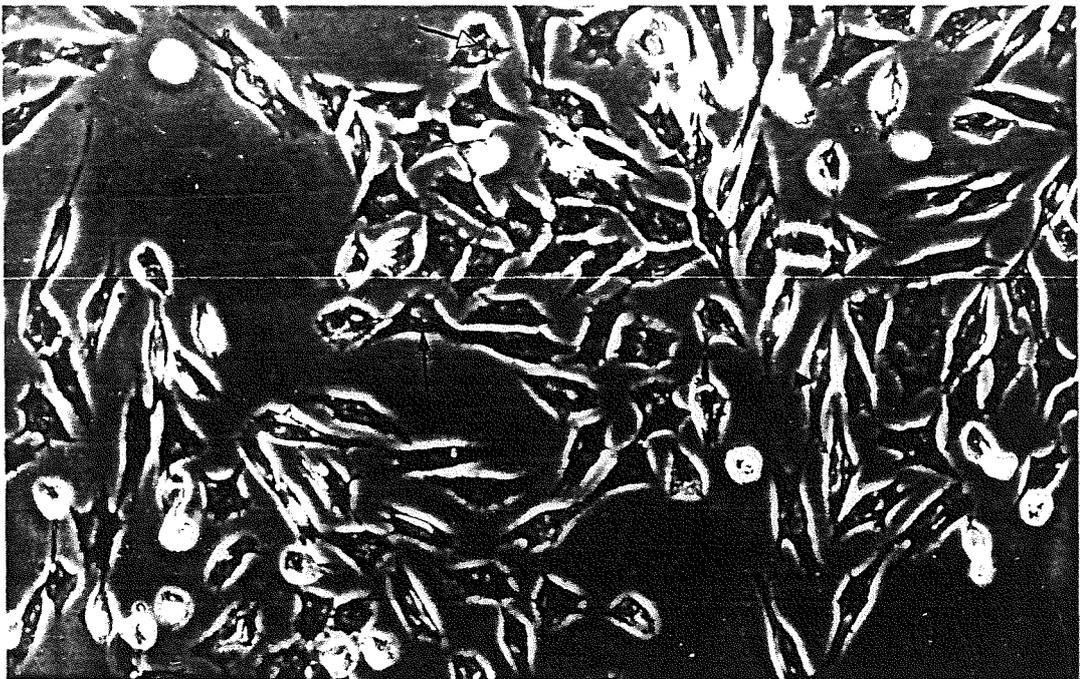
圖十. 加入  $1\mu\text{M}$  In 之 V79 肺細胞.



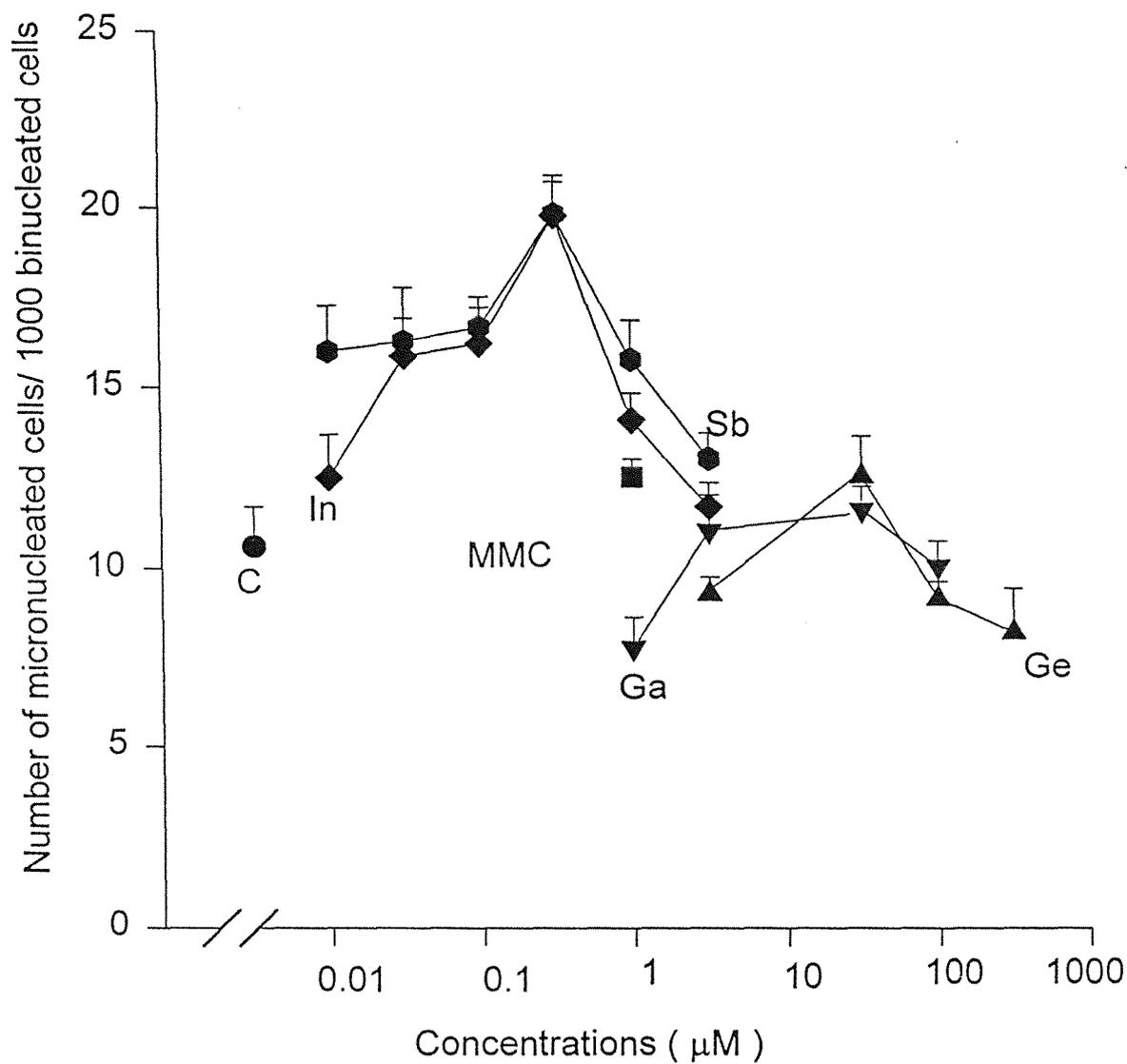
圖十一. 加入  $3\mu\text{g/ml}$  Cyt-B 及  $1\mu\text{M}$  In 之 V79 肺細胞.



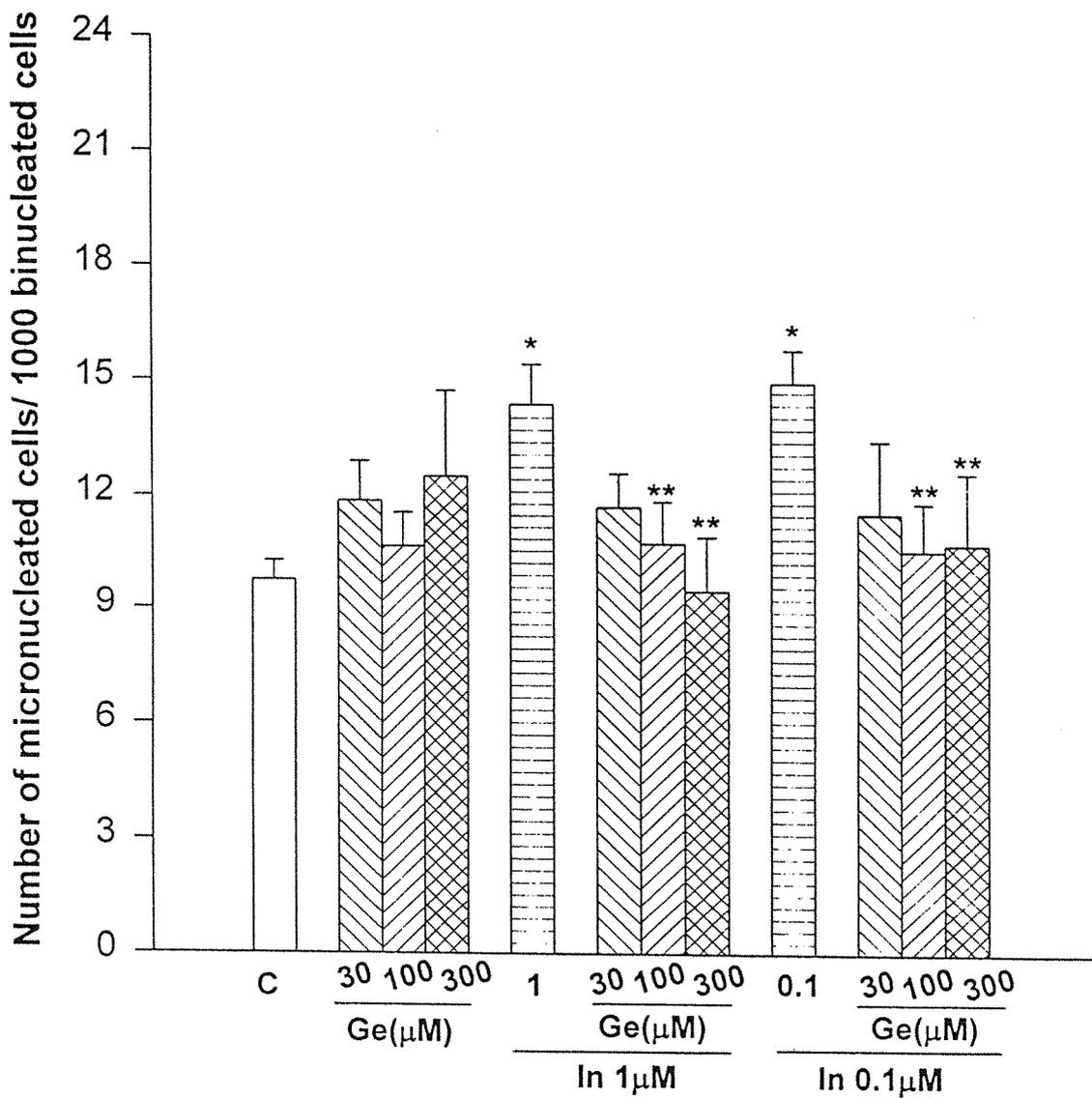
圖十二. 加入  $1\mu\text{M}$  Sb 之 V79 肺細胞.



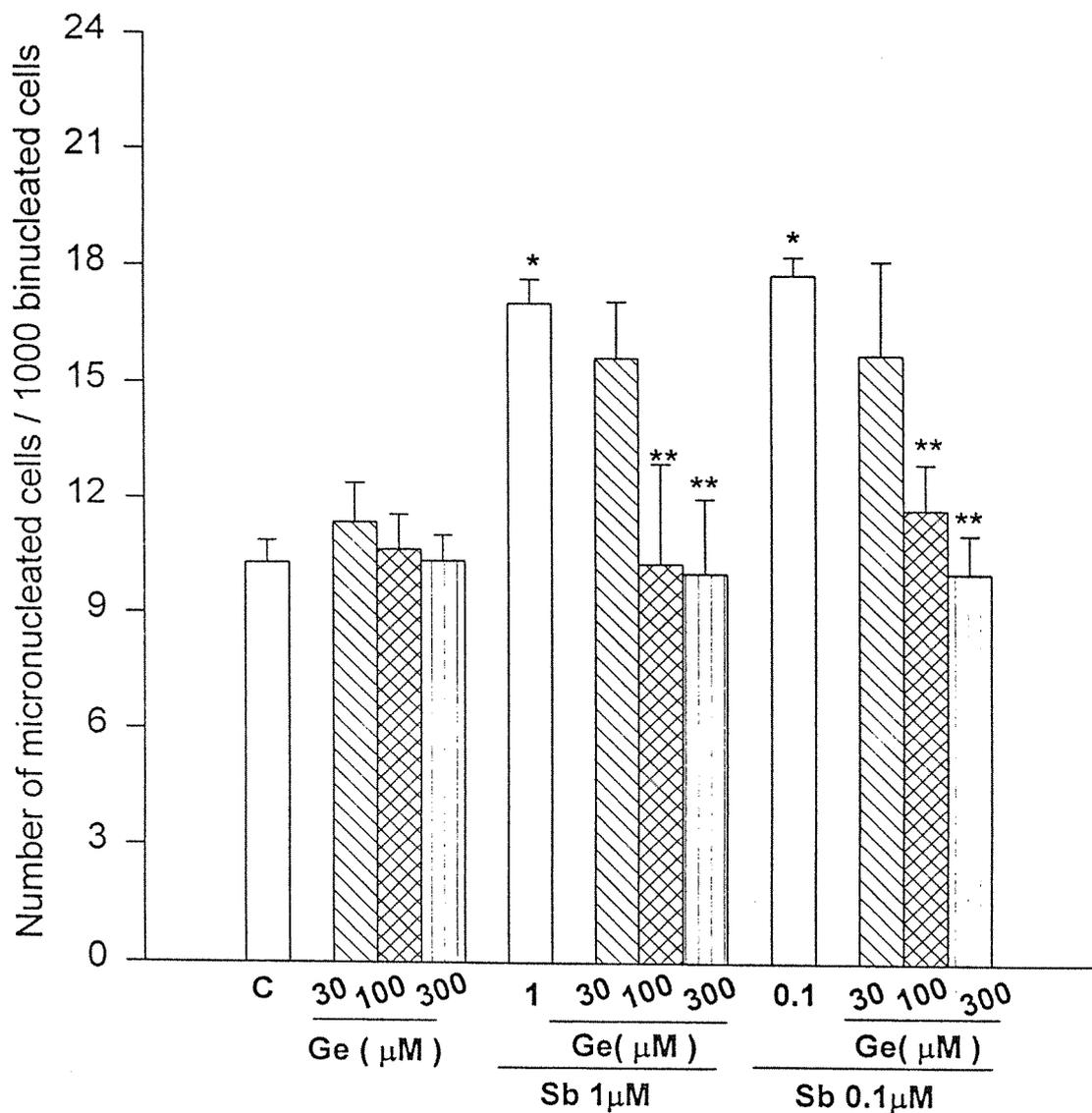
圖十三. 加入  $3\mu\text{g/ml}$  Cyt-B 及  $1\mu\text{M}$  Sb 之 V79 肺細胞.



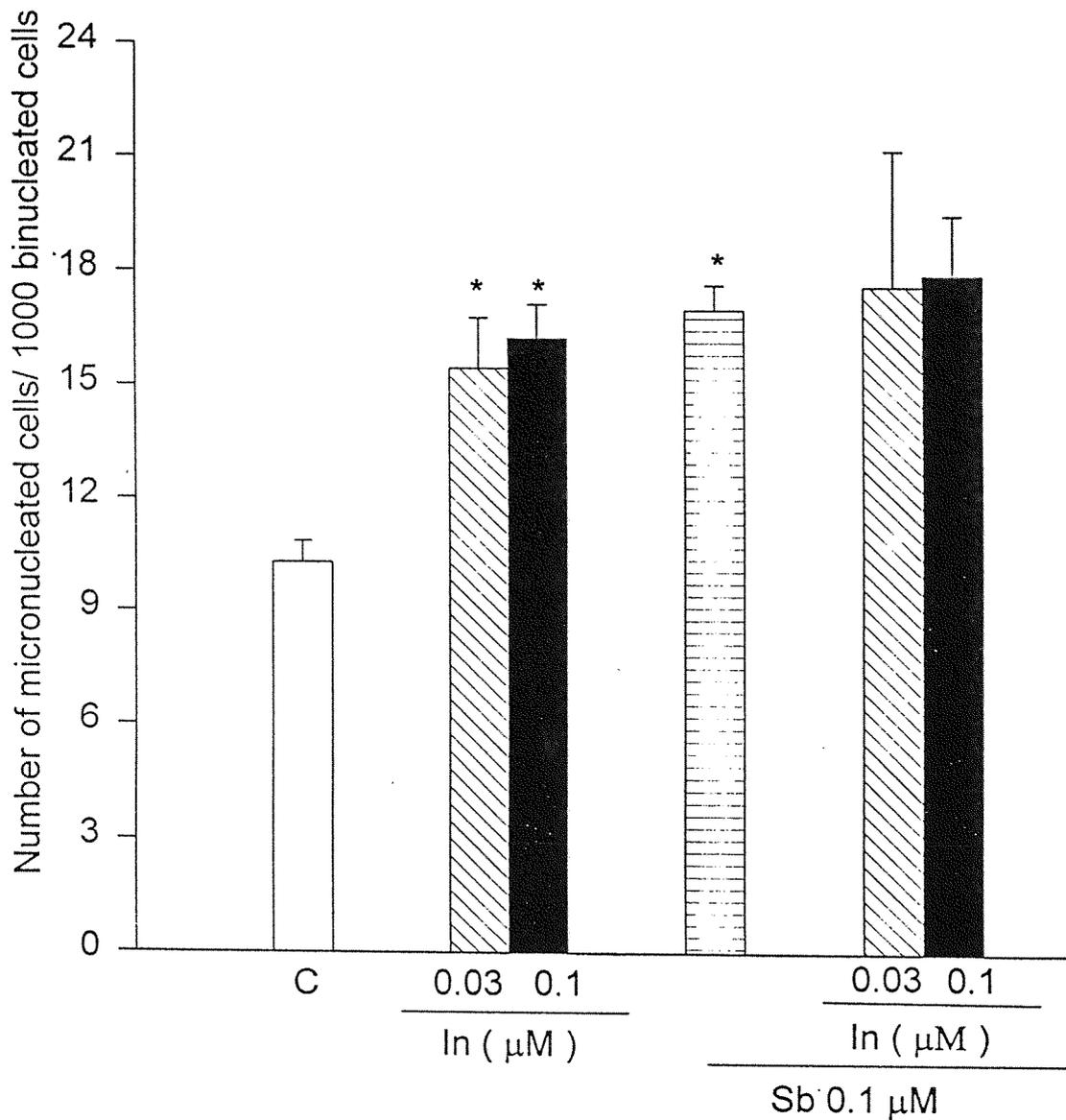
圖十四. 在 V79 肺細胞中半導體金屬氧化鍺 (Germanium oxide), 硫酸鎵 (Gallium sulfate), 氯化銦 (Indium chloride), 氯化銻 (Antimony chloride) 於雙核細胞中所誘導之微小核數. Data are shown as mean  $\pm$  S.E..



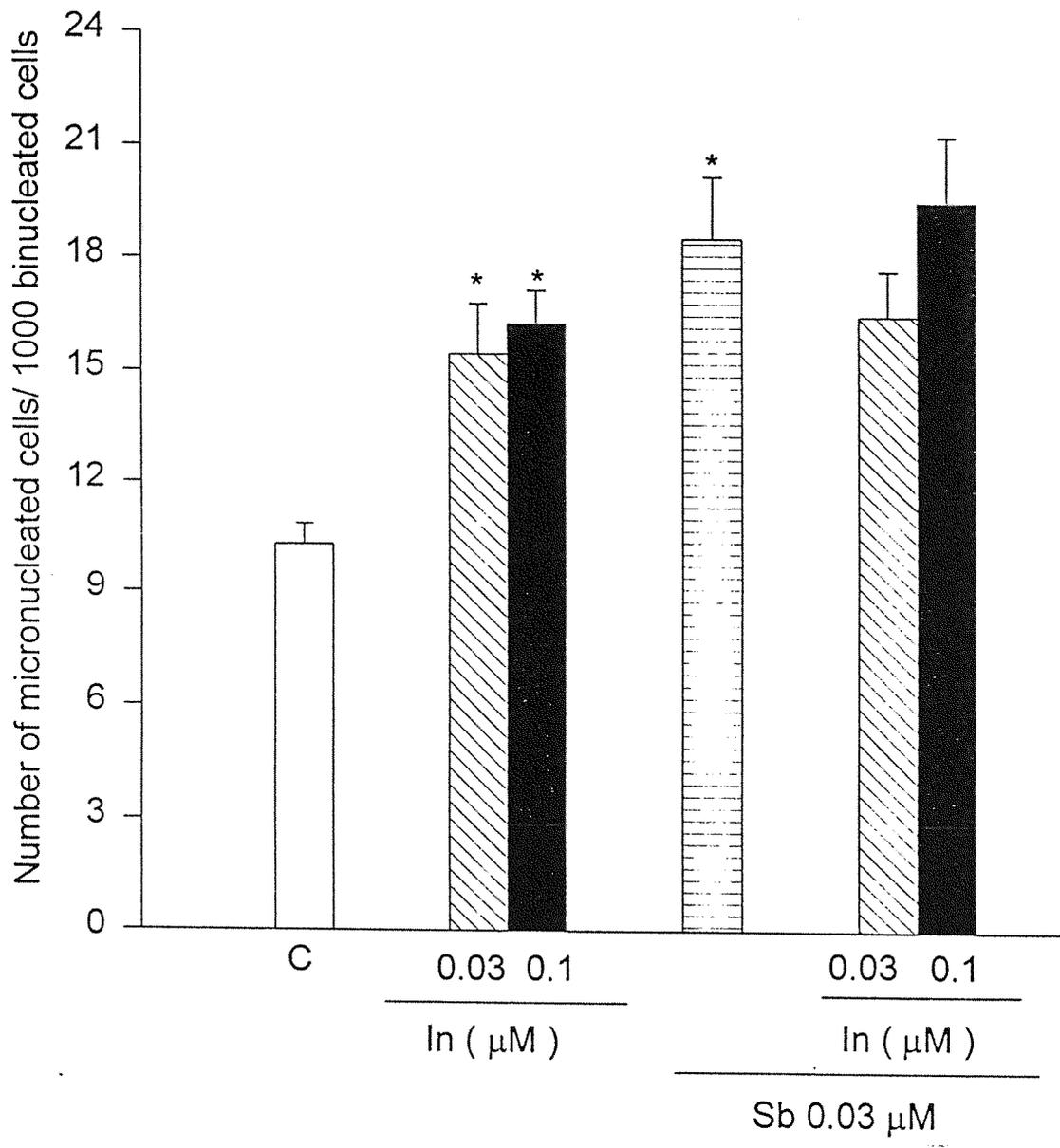
圖十五. 在 V79 肺細胞中 30-300 μM 之氧化鍺 (Germanium oxide) 對 1 及 0.1 μM 氯化銦 (Indium chloride) 所誘導之微小核的反應. Data are shown as mean ± S.E.. \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with 1 and 0.1 μM indium chloride alone.



圖十六. 在 V79 肺細胞中 30-300 μM 之氧化鍺 (Germanium oxide) 對 1 及 0.1 μM 氯化銻 (Antimony chloride) 所誘導之微小核的反應. Data are shown as mean ± S. E. . \*P < 0.05 as compared with control. \*\*P < 0.05 as compared with 1 and 0.1 μM antimony chloride alone.



圖十七. 在 V79 肺細胞中 0.03  $\mu\text{M}$  之氯化銻 (Antimony chloride) 對 0.1 及 0.03  $\mu\text{M}$  氯化銲 (Indium chloride) 所誘導之微小核的反應。 Data are shown as mean  $\pm$  S. E. . \* $P < 0.05$  as compared with control.



圖十八. 在 V79 肺細胞中 0.1 μM 之氯化銻 (Antimony chloride) 對 0.1 及 0.03 μM 氯化銦 (Indium chloride) 所誘導之微小核的反應. Data are shown as mean ± S. E. . \*P < 0.05 as compared with control.

表一. 在 V79 肺細胞中硫酸鎔 (Gallium sulfate) 對氯化銦 (Indium chloride) 及氯化銻 (Antimony chloride) 所誘導之微小核反應.

Treatment	Concentration ( $\mu\text{M}$ )			Number of binucleated cells / 1000 binucleated cells
	Ga	In	Sb	
C	—	—	—	$10.4 \pm 0.48$ (7-16)
Ga	3	—	—	$11.0 \pm 1.00$ (10-12)
	30	—	—	$11.5 \pm 0.65$ (8-15)
In	—	1	—	$15.8 \pm 0.46$ (14-18)*
Sb	—	—	0.1	$15.6 \pm 0.52$ (12-19)*
Ga+In	3	1	—	$14.0 \pm 1.00$ (13-15)
Ga+In	30	1	—	$14.5 \pm 1.44$ (11-18)
Ga+Sb	3	—	0.1	$20.5 \pm 1.70$ (16-24)**
	30	—	0.1	$19.5 \pm 2.50$ (17-22)**

\* $P < 0.05$  as compared with control.

\*\* $P < 0.05$  as compared with antimony chloride alone.

Data are shown as mean  $\pm$  S.E..

n = 4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

Number in parentheses are the range of micronucleated cell number.

表二. 在 V79 肺細胞中 SOD 對 0.3 $\mu$ M 氯化銦 (Indium chloride) 及 氯化銻 (Antimony chloride) 所誘導之微小核反應.

Treatment	Concentration			Number of binucleated cells/ 1000 binucleated cells
	Sb ( $\mu$ M)	In ( $\mu$ M)	SOD ( $\mu$ g/ml)	
C	—	—	—	8.0 $\pm$ 0.73 ( 6-13 )
Sb	0.3	—	—	19.5 $\pm$ 0.44 ( 18-22 )*
In	—	0.3	—	18.4 $\pm$ 0.67 ( 15-22 )*
SOD	—	—	75	10.3 $\pm$ 1.31 ( 8-13 )
	—	—	150	9.0 $\pm$ 1.29 ( 6-12 )
Sb+SOD	0.3	—	75	10.8 $\pm$ 1.10 ( 9-14 )**
	0.3	—	150	8.5 $\pm$ 0.64 ( 7-10 )**
In+SOD	—	0.3	75	12.0 $\pm$ 1.82 ( 8-16 )**
	—	0.3	150	13.8 $\pm$ 1.10 ( 11-16 )**

\*P<0.05 as compared with control.

\*\*P<0.05 as compared with antimony chloride or indium chloride alone.

Data are shown as mean $\pm$ S.E..

n = 4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

Number in parentheses are the range of micronucleated cell number.

表三. 在 V79 肺細胞中 Catalase 對 0.3 $\mu$ M 氯化銦 (Indium chloride) 及氯化銻 (Antimony chloride) 所誘導之微小核反應.

Treatment	Concentration			Number of binucleated cells/ 1000 binucleated cells
	Sb ( $\mu$ M)	In ( $\mu$ M)	Catalase ( $\mu$ g/ml)	
C	—	—	—	7.9 $\pm$ 0.67 ( 5-13 )
Sb	0.3	—	—	19.5 $\pm$ 1.61 ( 15-22 )*
In	—	0.3	—	18.1 $\pm$ 0.42 ( 15-22 )*
Catalase	—	—	75	9.0 $\pm$ 0.81 ( 7-11 )
	—	—	150	8.0 $\pm$ 0.40 ( 7-9 )
Sb+Catalase	0.3	—	75	17.3 $\pm$ 0.94 ( 16-20 )**
	0.3	—	150	13.3 $\pm$ 0.75 ( 12-15 )**
In+Catalase	—	0.3	75	11.0 $\pm$ 0.57 ( 10-12 )**
	—	0.3	150	14.8 $\pm$ 1.75 ( 12-19 )**

\*P<0.05 as compared with control.

\*\*P<0.05 as compared with antimony chloride or indium chloride alone.

Data are shown as mean  $\pm$  S.E..

n = 4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

Number in parentheses are the range of micronucleated cell number.

表四. 在 V79 肺細胞中 Dimeracapol (BAL) 對 0.3 $\mu$ M 氯化銦 (Indium chloride) 及氯化銻 (Antimony chloride) 所誘導之微小核反應.

Treatment	Concentration ( $\mu$ M)			Number of binucleated cells/ 1000 binucleated cells
	Sb	In	BAL	
C	—	—	—	7.9 $\pm$ 0.67 (6-13)
Sb	0.3	—	—	18.6 $\pm$ 0.58 (15-22)*
In	—	0.3	—	18.5 $\pm$ 0.27 (15-22)*
BAL	—	—	1	10.5 $\pm$ 0.95 (8-12)
	—	—	3	9.75 $\pm$ 0.75 (8-11)
	—	—	10	14.3 $\pm$ 1.76 (11-17)*
	—	—	30	16.7 $\pm$ 2.4 (12-20)*
Sb+BAL	0.3	—	1	12.3 $\pm$ 1.25 (9-15)**
	0.3	—	3	12.5 $\pm$ 0.95 (10-14)**
	0.3	—	10	16.0 $\pm$ 1.78 (11-19)
	0.3	—	30	15.0 $\pm$ 1.47 (12-18)
In+BAL	—	0.3	1	9.7 $\pm$ 0.62 (8-11)**
	—	0.3	3	8.5 $\pm$ 1.84 (5-13)**
	—	0.3	10	19.0 $\pm$ 1.29 (16-22)
	—	0.3	30	17.5 $\pm$ 1.65 (13-21)

\*P<0.05 as compared with control.

\*\*P<0.05 as compared with antimony chloride or indium chloride alone.

Data are shown as mean  $\pm$  S.E..

n = 4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

Number in parentheses are the range of micronucleated cell number.

表五. 在 V79 肺細胞中 D-Penicillamine (D-PA) 對 0.3 $\mu$ M 氯化銦 (Indium chloride)及氯化銻 (Antimony chloride) 所誘導之微小核反應.

Treatment	Concentration ( $\mu$ M)			Number of binucleated cells/ 1000 binucleated cells
	Sb	In	D-PA	
C	—	—	—	7.4 $\pm$ 0.67 ( 5-11 )
Sb	0.3	—	—	18.3 $\pm$ 0.64 ( 15-22 )*
In	—	—	0.3	17.6 $\pm$ 0.76 ( 15-20 )*
D-PA	—	—	1	9.1 $\pm$ 0.63 ( 6-10 )
	—	—	3	11.7 $\pm$ 1.65 ( 8-15 )*
	—	—	10	16.5 $\pm$ 2.60 ( 11-22 )*
	—	—	30	17.0 $\pm$ 1.00 ( 16-18 )*
Sb+D-PA	0.3	—	1	16.3 $\pm$ 0.88 ( 15-20 )
	0.3	—	3	16.5 $\pm$ 1.50 ( 12-18 )
	0.3	—	10	17.3 $\pm$ 0.75 ( 15-18 )
	0.3	—	30	17.7 $\pm$ 0.33 ( 16-18 )
In+D-PA	—	0.3	1	14.1 $\pm$ 0.70 ( 11-18 )**
	—	0.3	3	15.8 $\pm$ 1.00 ( 12-20 )
	—	0.3	10	19.5 $\pm$ 2.50 ( 15-26 )
	—	0.3	30	20.3 $\pm$ 2.20 ( 14-24 )

\*P<0.05 as compared with control.

\*\*P<0.05 as compared with antimony chloride or indium chloride alone.

Data are shown as mean  $\pm$  S.E..

n = 4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

Number in parentheses are the range of micronucleated cell number.

## 參考文獻

Adamson RH, Canellos GP, Sieber SM (1975): Studies on the antitumor activity of gallium nitrate (NSC-15200) and other group III a metal salts. *Cancer Chemotherapy Reports-Part1* 59(3): 599- 610.

Alan S, James S L (1989): The cell, in: *Histology*, Gower, London, pp. 19- 22.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, James D, Watson (1989): Cell growth and division, in: *Molecular biology of the cell*, Garland, New York, pp. 728- 738.

Alberta B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, James D, Watson (1993): The cell- division cycle, in: *Molecular biology of the cell*, Garland, New York, pp. 863- 910.

Altman S A, Randers L, Rao G (1993): Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Progr* 9 (6): 671- 674.

Aposhian HV, Aposhian M (1989): Newer developments in arsenic toxicity. *J Am Cell Toxicol* 8: 1297- 1305.

Arfaa F, Tohid E, Ardelan A (1967): Treatment of urinary bilharziasis in a small focus with sodium antimony dimercaptosuccinate (astiban). *Am J Trop Med Hyg* 16: 300- 303.

Art JH, Renzel PG, Falke HE, Beems RB (1990): Acute and subacute inhalation toxicity of germanium metal powder in rats. *Food Chem Toxicol* 28: 571- 579.

Brenner SL, Korn EP (1980): The effects of cytochalasins on actin polymerization and actin ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J Biol Chem* 255: 841- 844.

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ (1995): Radiation induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377: 522-557.

Bureau of Mines (1979): Mineral commodity Summaries U S Government Printing office, Washington, DC.

Bustamante J, Dock L, Vahter M, Fowler B, Orrenius S (1997): The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes. *Toxicology* 118: 129-136.

Castronovo FP and Wagner HN (1971): Factors affecting the toxicity of the element indium. *Brit J Exp Pathol* 52: 543- 549.

Caujolle F, Caujolle D, Cros S, Dao-Huy-Giao M, Moutasa F, Tollon Y, Caylus J (1965): Toxicity and teratogenic action of dimethyl germanium oxide and acetone in chick embryos. *Bull Trav Soc Pharmacol Lyon* 9: 221- 235.

Chitambar CR, Sax D (1992): Regulatory effects of gallium on transferrin-independent iron uptake by human leukemic HL 60 cells. *Blood* 80(2): 505- 511.

Chitambar CR, Seligman PA (1986): Effects of different transferrin forms on transferrin receptor expression iron uptake and cellular proliferation of human leukemic HL60 cells. Mechanisms responsible for the specific cytotoxicity of transferrin- gallium. *J Clin Invest* 78(6): 1538- 1546.

Ciplea A, Bubuianu G, Felberg Raiciulescu N, Munteanu M, Todoran F (1966): Clinical study of a focus of trichinellosis in Bucharest, with special reference to kalio-stibio- tartaric treatment. *Fiziol Norm Patol* 12(6): 549-553 (In Rumanian; Information from Biol ).

Crooke ST, Bradner WT (1976): Mitomycin C: A review. *Cancer Treat Rev* 3: 121- 139.

Domingo JL, Bosque MA, Llobet JM, Corbella J (1992): Amelioration by BAL (2,3-dimercapto-1-propranol) and DMPS (sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid) of arsenite developmental toxicity in mice. *Ecotox Environ Safe* 23: 274- 281.

Down WL, Scott JL, Steadman LT, Maynard EA (1959): The toxicity of indium, University of Rochester Atomic Energy Project Report No. UR 558. University of Rochester, Rochester, NY, pp. 57.

Eastmond DA, Tucker JD (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 13: 34- 43.

Elledge SJ (1996): Cell Cycle Checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 274: 1665-1673.

Enoch T, Norbury C (1995): Cellular responses to DNA damage: cell- cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci* 20: 427- 430.

Fadeev AZ (1980): Materials on substantiation of MAC for gallium arsenide in the air of workplaces. *Gig Tr Prof Zabol* 3: 45-47.

Fenech M (1997): The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 392: 11-18.

Fenech M, Morley A (1985a): The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat Res* 148: 99- 105.

Fenech M, Morley A (1985b): Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 43: 233-246.

Fenech M, Morley A (1985c): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147: 29- 36.

Ferm VH, Carpenter SJ (1970): Teratogenic and embryopathic effects of indium, gallium, and germanium. *Toxicol Appl Pharm* 16: 166- 170.

Fowler BA, Kardish R, Woods JS (1983): Alteration of hepatic microsomal structure and function by acute indium administration. *Ultrastructural Morphometric and Biochemical Studies. Lab Invest* 48: 471- 478.

Gebel T, Christensen S, Dunklberg H (1997): Comparative and environmental genotoxicity of antimony and arsenic. *Anticancer Res* 17: 2603- 2608.

Goodman, Steven R (1994) Cell adhesion and the extracellular matrix, in: *Medical cell biology*, J B Lippincott Company Publishing, Washington, pp. 185-191.

Groth DH, Stettler LE, Burg JR, Busey WM, Grant GC, Wong L (1986): Carcinogenic effects of antimony trioxide and antimony ore concentrate in rats. *J Toxicol Env Health* 18(4): 607- 626.

Gurnani N, Sharma A, Talukder G (1992): Comparison of the clastogenic effects of antimony trioxide in mice in vivo following acute chronic exposure. *Biometals* 5: 47- 50.

Gurnani N, Sharma A, Talukder G (1992): Cytotoxic effects of antimony trichloride in vivo. *Cytobios* 70: 131- 136.

Han C, Wu G, Yin Y, Shen S (1992): Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity of cadmium chloride in various genotoxic assays. *Food Chem Toxicol* 30: 521-524.

Hantson P, L'eonard ED, Crutzen-Fayt MC, Le'onard A, Vandercam B, Delaere B, Mahieu P (1996): Cytogenetic observations following meglumine antimoniate therapy for visceral leishmaniasis. *Pharmacotherapy* 16(5): 869- 871.

Harris WR, Pecoraro VL (1983): Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry* 22(2): 292-299.

Heddle JA (1973): A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res* 18(2): 187- 190.

Heddle JA, Carrano AV (1977): The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat Res* 44: 63- 69.

Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF (1983): The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat Res* 123: 61- 118.

Kanisawa M, Schroeder HA (1969): Life-term studies on the effects of trace elements on spontaneous tumors in mice and rats. *Cancer Res* 29: 892- 895.

Kuroda K, Endo G, Okamoto A, Young S, Yoo YS, Horiguchi S (1991): Genotoxicity of beryllium, gallium and antimony in short-term assays. *Mutat Res* 264: 163- 170.

Lazarides E, Revel JP (1979): The molecular basis of cell movement. *Sci Am* 240: 100- 113.

Lee CH, Lin RH, Lin SH, Lin-Shiau SY (1998): Effect of germanium oxide and other chemical compounds on phenylmercury acetate-induced genotoxicity in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 31: 157- 168.

Leffler P, Gerhardsson L, Brune D, Nordberg GF (1984): Lung retention of antimony and arsenic in hamster after the intratracheal instillation of industrial dust. *Scand J Work Env Hea* 10(4): 245- 251.

Li AP, Dahl AR, Hell JO (1992): In vitro cytotoxicity and genotoxicity of dibutyltin dichloride and dibutylgermanium dichloride. *Toxicol Appl Pharm* 64: 482- 485.

Li R, Murray AW (1991): Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66(3): 519- 531.

Li W, Chien PK, Furst A (1994): Evaluation of three antidotes on arsenic toxicity in the common earthworm (*Lumbricus terrestris*). *J Appl Toxicol* 14: 181- 183.

Li W, Zhao Y, Chou IN (1987): Paraquate- induced cytoskeletal injury in cultured cells. *Toxicol Appl Pharm* 91: 96- 106.

Linhholm C, Norrpa H, Hayashi M, Sorsa M (1991): Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 260: 369- 375.

Lyle WH (1981): Penicillamine in metal poisoning. *J Rheumatol* 8(7): 96- 99.

Lynch AM, Parry JM (1993): The cytochalasin-B micronucleus/ kinetochore assay in vitro: Studies with 10 suspected aneugens. *Mutat Res* 287: 71- 86.

Mehard CW, Volcani BE (1975): Evaluation of silicon and germanium retention in rat tissues and diatoms during cell and organelle preparation for electron probe microanalysis. *J Histochem Cytochem* 23(5): 348- 358.

Migliore L, Pistelli L, Papa S, Andreassi MG, Balata T, Benassi S (1994): Induction of binucleation in human lymphocytes by 14 synthetic isoindolone derivative related to cytochalasin. *Mutat Res* 313: 89- 97.

Nagata N, Yoneyama T, Yanagida K, Ushio K, Yanagihara S, Matsubara O, Eishi Y (1985): Accumulation of germanium in the tissues of long-term user of germanium preparation died of acute renal failure. *J Toxicol Sci* 10(4): 333- 341.

Painter RB, Young BR (1980): Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 77(12): 7315- 7317.

Potkonjak V, Pavlovich M (1983): Antimoniosis: a particular form of pneumoconiosis I Etiology, Clinical and X- ray findings. *Int Arch Occ Env Hea* 51: 199- 207.

Presant CA, Profitt RT., Turner AF., Williams LE., Winsor D, Werner JL, Kennedy P, Wiseman C, Gala K, Mckenna RJ. (1988): Successful imaging of human cancer with indium-111-labeled phospholipid vesicles. *Cancer* 62(5): 905- 911.

Prosser JS, Moquet JE, Lloyd DC, Edwards AA (1988): Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 199: 37- 45.

Rees PH, Keating MI, Kaeger PA, Hockmeyer WT (1980): Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Lancet* 2: 226- 229.

Roberts BT, Farr KA, Hoyt MA (1994): The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase. *Mol Cell Biol* 14: 8282- 8291.

Sadava D (1993) Specific events in the cell cycle, in: *Cell biology Oranelle Structure and Function*, Jone B, Bartleet , pp. 469 .

Sandra V, Verstraeten, Patricia I, Oteiza (1995):  $Sc^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$ ,  $In^{3+}$ ,  $Y^{3+}$  and  $Be^{2+}$  promote changes in membrane physical properties and facilitate  $Fe^{2+}$ -initiated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 322(1): 284- 290.

Schauss AG (1991): Nephrotoxicity and neurotoxicity in humans from organogermanium compounds and germanium dioxide. *Biol Trace Element Res* 29: 267- 280.

Schein PS, Slavik M, Smythe T, Hoth D, Smith F, Mcdonald JS, Woolley PV (1980): phase I clinical trials of spirogermanium. *Cancer Treat Rep* 64: 1051- 1056.

Schroeder HA, Balassa JJ (1967): Arsenic, germanium, tin and vanadium in mice: effects on growth, survival and tissue levels. *J Nutr* 92(2): 245- 252.

Schultz N, Onfelt A (1994): Vido time-lapse study of mitosis in binucleate V79 cells: chromosome segregation and cleavage. *Mutagenesis* 9(2): 117- 123.

Stern HS, Goodwin DA, Schieffel U, Kramer H (1966): <sup>113</sup>In for blood pool and brain scanning. *Nucleonics* 25: 62- 65.

Surrall'es J, Carbonell E, Marcos R, Degrassi F, Antoccia A, Tanzarella C (1992): A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 7(6): 407- 410.

Tirmenstein MA, Plews P I, Walker CV, Woolery MD, Wey HE, Toraason MA (1995): Antimony-induced oxidative stress and toxicity in cultured cardiac myocytes. *Toxicol Appl Pharm* 130: 41- 47.

Wakata A, Sasak MS (1987): Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat Res* 190: 51- 57.

Warrell RPJ, Coonley CJ, Straus DJ, Young CW (1983): Treatment of patients with advanced malignant lymphoma using gallium nitrate administered as a seven-day continuous infusion. *Cancer* 51(11): 1982- 1987.

Watt, WD (1983): Chronic inhalation toxicity of antimony trioxide: Validation of the threshold limit value. Ph.D. Dissertation, Wayne State University. Detroit, MI.

Woods JS, Fowler B A (1982): Selective inhibition of renal ALA dehydratase by indium. Biochemical and ultrasructural studies. *Exp Mol Pathol* 36: 306- 315.

Yamamoto KI, Kikuchi Y (1980): A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res* 71: 127- 131.

Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM (1992): Wild- type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. Cell 70: 937- 948.

Yoshikawa H, Hasegawa T (1971): Experimental indium poisoning. Igaku to Seibutsugaku Med Biol 93: 45-58.