

R
608.8
3866
c.1

中山醫學院醫學研究所碩士論文

Master Thesis Institute of Medicine Chung Shan Medical
and Dental College

指導教授：陳文貴 教授 (Chen Wen-Kang Professor)

鉛金屬或氯化鉛曝露對生物效應指標之研究

The Study of Exposure Lead Metal or Lead chloride
Comparison with the Mark of Biology Effect



研究生：游景男 (Jiing-Nar You)

中華民國八十六年六月 (June 1997)

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C046087

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 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：鉛金屬或氯化鉛曝露對生物效應指標之研究

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：陳文貴

研究生簽名：游景男 學號：R84119
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 7 月 16 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。

誌謝

夜深人靜，我知燈火欄柵處已不遠了。兩年研究生涯將告一段落，辛勞耕耘的果實是最甜美的。

回往時日，有著多位愛護我的師友從旁協助，才能將此論文得以付梓。首先感謝的是指導老師 陳文貴教授，在學習期間惠于勤奮、嚴謹的研究精神及生活上待人處世的要訣，謹在此致上最誠摯的謝意。真誠感謝 鐘堅教授、林明芳教授及 楊重熙副教授，撥冗審查和口試論文，並提供珍貴的意見，使我受益良多。

對 嚴正傑及 胡超群老師，內心有無法言喻的感激。不論在實驗技術的指導或資料編輯，使我學習到完體的研究方法。更感謝 李衍彰副教授，從撰文到成稿，在旁協助批閱指正，使論文內容更加成熟。

銘心感於苗栗縣衛生局上級長官及公館鄉衛生所同仁，對我兩年來協助，使我無憂進學。由衷感謝同儕 銘宏、維哲及大學部俊發等學弟妹，在實驗上協助及精神上支持。並向所有關心過我的人表示誠心謝誌。

最感激莫過於我父母親及家人的鼓勵以及摯友益民、詩雯、文靜、仲助、和永興陪著我渡過難關。

目錄

	頁次
中文摘要.....	1
英文摘要.....	4
縮 寫.....	7
壹、前言.....	8
貳、材料與方法.....	18
一、實驗設備與材料.....	18
二、實驗方法.....	22
參、結果.....	32
肆、討論.....	38
伍、參考文獻.....	50
陸、圖表說明.....	66

圖表目錄

(一) .鉛暴露對勞工血液中生物效應指標影響

	頁次
表 1:血中鉛濃度與人體之反應.....	67
表 2:原子吸收光譜偵測條件.....	68
表 3:全血標準參考樣品在兩間實驗室所測得鉛元素濃度.....	69
表 4:工人全血樣品在兩間實驗室所測得鉛元素濃度之比對.....	70
表 5:偵測硒元素項目之血清標準參考樣品.....	71
圖 1:血基質合成過程.....	72
圖 2:血鉛區間平均濃度與血紅素平均濃度之相對關係圖.....	73
圖 3:血中鉛濃度與過氧化歧化酶中活性之分佈關係圖.....	74
圖 4:血鉛區間平均濃度與過氧化歧化酶平均濃度之相對關係圖.....	75
圖 5:血鉛區間平均濃度與脂質過氧化產物值(TBARS)平均濃度之相對關係圖.....	76
圖 6.血鉛區間平均濃度與硒元素濃度平均濃度之相對關係圖.....	77

(二). 氯化鉛對 Wistar 雄鼠生物效應指標之影響

	頁次
表1: 老鼠於實驗期間之飲水記錄(組/3天).....	78
表 2: 原子吸收光譜儀偵測條件.....	79
表 3: 標準參考樣品在實驗室所測得鉛元素濃度.....	80
表 4: 餵食含鉛飲水之老鼠血清、器官均質液之鉛濃度.....	81
表 5: 餵食含金屬飲水及對照組之老鼠器官均質液中脂質過氧化物 濃度.....	82
圖 1. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組體重變化比率平均值之關係。 (a)90 天組.....	83
(b)180 天組.....	84
圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清生化值 (a)ALB-血清白蛋白濃度平均值之關係圖.....	85
圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清生化值 (b)BUN-血清尿素氮濃度平均值之關係圖.....	86
圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清生化值 (c)ALP-鹼性磷酸酉每濃度平均值之關係圖.....	87
圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清生化平均值 (d)AST-天門冬氨酸脫氨基轉移酉每濃度平均值之關係圖.....	88
圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照血清生化值 (e)ALT - 丙氨酸氨基轉移酉每濃度平均值之關係圖.....	89
圖 3. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清脂質過氧化產物濃度變 化平均值之關係圖.....	90

(三). 氯化鉛單一及與甲苯複合暴露對中國倉鼠肺臟

(V79) 細胞生物效應指標之影響

頁次

表 1:V79 細胞單一曝露不同劑量氯化鉛與甲苯共同曝露處理 18 小時之比較.....	91
表 2:V79 細胞共同曝露氯化鉛加甲苯(1.92 μM) 處理 18 小時使用 Independ Joint Action Module 是否具協同毒性.....	92
表 3:V79 細胞共同曝露於亞硒酸鈉(4.25 μM)及(8.5 μM)劑量添入氯化鉛處理 18 小時之比較.....	93
表 4:V79 細胞共同曝露不同劑量氯化鉛加甲苯(1.92 μM)比較有無添加亞硒酸鈉(4.25 μM)之差異.....	94
圖 1: 硒複合物在人體與動物之代謝途徑:.....	95
圖 2: 硒元素誘導腫瘤細胞進入自然凋零(Aptposis)之過程:.....	96
圖 3: 甲苯在生物體之轉型途徑:.....	97
圖 4: 次黃嘌呤磷酸核糖甘轉移酶(HGPRT)基因生化代謝路徑所扮演角色.....	98
圖 5: 電子傳遞鏈系統中氧化-還原反應裏 Alamar blue 參與位置.	99
圖 6: 細胞培養實驗流程:.....	100
圖 7-1: Trypan blue test 流程:.....	101
7-2: Alamar blue test 流程:.....	102
圖 8:V79 細胞暴露氯化鉛金屬處理 18 小時後之 CV%及 AMA%之相關性.....	103
圖 9:V79 細胞暴露甲苯處理 18 小時後之 CV%及 AMA%之相關性....	104
圖 9-1:V79 細胞暴露甲苯處理 18 小時後脂質過氧化產物	

(TBARS)程度.....	105
圖 10:V79 細胞暴露亞硒酸鈉處理 18 小時後對 CV%及 AMA%之相 關.....	106
圖 11:V79 細胞單一暴露氯化鉛金屬與甲苯共同暴露處理 18 小 時後比較其相關性.....	107
圖 12:V79 細胞共同暴露氯化鉛及甲苯中添加亞硒酸鈉(4.25 μ M)處 理 18 小時後對 CV%及 AMA%之相關性.....	108
圖片 1-1:未暴露任何毒性物質之 V79 細胞(200X).....	109
1-2:未暴露任何毒性物質之 V79 細胞(400X).....	110
圖片 2:暴露之氯化鉛 772 μ M V79 細胞(400X).....	111
圖片 3:暴露之氯化鉛 1930 μ M V79 細胞(400X).....	112
圖片 4:暴露之甲苯 17.1 μ M V79 細胞(400X).....	113
圖片 5:暴露之氯化鉛 1158 μ M、甲苯 17.1 μ M V79 細胞(400X)..	114

中文摘要

金屬鉛的用途廣泛，許多工業製程或日常用品皆為人體所容易接觸。因此，鉛對生物體之危害也就不容忽視。以往只有研究鉛暴露會改變人體、實驗鼠及細胞內脂質的代謝。增加脂質過氧化之程度，加強氧化性緊迫和產生含氧自由基，取代體內必需離子及使產物變性或反應失調，消耗抗氧化物質，直接或間接導致病變。況且作業環境中所暴露之毒物並非單一種，而經常是數種毒物共同暴露，鉛金屬及甲苯有機溶劑常見於日常用品如燃料油、油漆，或工業製程，如印刷，製模等中。為避免毒性傷害形成，應儘量減少毒性物質暴露之機會，如何精確地評估個體的真實暴露或者建立危害指標，防止傷害進一步擴大，即為相當重要之課題。本研究先了解人體內指標間的相關性，進而設計動物及細胞連貫性實驗模式，來建立適當的生物效應偵測指標技術。

本研究鑑於這些參考指標極為重要，因此分為三部份來探討暴露毒性物質時，指標間變化情形。1. 鉛暴露對勞工血液中生物效應指標影響：分別收集三家鉛暴露工廠工人靜脈血液樣品，探討其鉛金屬濃度與脂質過氧化產物(Thiobarbituric acid reactive substance - TBARS)、過氧化歧化酶(Superoxide dismutase-SOD)、硒(Se)元素濃度及血紅素值(Hemoglobin-HGB)之相關性。2. 氯化鉛對Wistar雄鼠生物效應指標之影響：觀察老鼠在長期投予低濃度鉛金屬後，對其生理及生化反應之影響，包括一般生化值、體重變化、血清及器官均質液中金屬濃度及血清和器官均質液中脂質過氧化產物濃度等，建立鉛金屬之相關指標。3. 氯化鉛單一及與甲苯複合暴露對中國倉鼠肺臟(V79)細胞生物效應指標之影響：毒性物質為氯化鉛、甲苯，觀

察毒物間在交互作用與生物反應下，所產生之化學中間代謝物和產物之間是否具有複合加成毒性或是抑制效應。以 Trypan blue 排出 (Trypan blue exclusion)，計算 V79 細胞存活率 (Cell Viability CV%)，及用 Alamar blue method 測定細胞代謝活性 (The percent of Alamar blue metabolic activation AMA%)，來檢驗上述毒性物質對 V79 細胞之細胞毒性。

第一部份勞工血液中在血紅素平均濃度中，鉛濃度 30 至 40 ug/dL 之區間組相對關係性與另一組低濃度 10 ug/l 以下比較時有顯著差異 (t-test $P < 0.05$)。且在較高鉛濃度 50 至 60 ug/l 區間組與 10 ug/l 以下低鉛濃度區間組比較時也有顯著差異 (t-test $P < 0.05$)。發現鉛濃度在正常參考值 50 ug/dl 以下，紅血球的過氧化歧化酶(SOD)大多分佈在 2000 unit/g hemoglobin。在鉛濃度 30-40 及 50-60 ug/dl 區間兩組，各別與硒元素作相關性比較時均有顯著差異 (t-test $P < 0.05$)。第二部份 Wistar 雄鼠實驗結果顯示長期低濃度之鉛金屬暴露，對老鼠肝腎功能有影響。同時亦因金屬本身之氧化力或其引發自由基反應，使脂質過氧化產物有增加趨勢。最後第三部份 V79 細胞實驗中氯化鉛之 LC_{50} 為 772 μ M、甲苯為 3.39 μ M，在單一暴露下氯化鉛、甲苯隨劑量增加而細胞存活率 (CV%) 降低與對照組相比較有明顯的差異 (t-test $P < 0.05$)。細胞型態在約氯化鉛 1158 μ M 以上及高濃度甲苯 17.1 μ M 對 V79 細胞膜已產生明顯有變化及空泡增加。氯化鉛及甲苯作共同暴露時，以獨立協同反應計算模式 (Independent Joint Action Model IJA) 所得之值得知氯化鉛及甲苯共同暴露時具有協同毒性，而共同暴露在氯化鉛 1158 μ M，甲苯 1.91 μ M 時。另以低劑量 4.25 μ M 亞硒酸鈉添入時有提高細胞存活率趨勢。

最後在本研究觀察人體血液中，鉛濃度越高時，抗氧化硒元素、

過氧化歧化酶及血紅素值均有減少現象。而 V79 細胞綜合以上結果可知氯化鉛及甲苯之合毒性比單一暴露毒性強，而亞硒酸鈉在 4.25 μ M 低劑量下則具有抗氧化效應，提昇細胞存活率，但在高濃度時都無法具抗氧化效應，反而抑制細胞生長。

Abstract

Human can easy to touch the metal of lead which is an industrial product or daily material. Therefore, we can't neglect it's biological effect. According to literature, lead can change the lipid metabolism, enhanced oxidative stress, produced a free radical , and replaced essential metal ion. For example, it causes that degeneration products, disregulative reactions, or antitoxic objects occur in biological system. In addition, It produces damaging effects in the hematopoetical, hematic, renal, reproductive, and gastrointestinal systems, and inhibits the growth of organisms due to its effects on the central nervous system. Particularly, in working phase, people were not only exposure to single compound, but also with chemical materials. For example, they can easily contact with toluene and from fuel oil, printing dye or industrial products as printing, making plates and so on.

In this study, we want to know the toxic of lead in human, thus, we explore three parts to understand what these biological effective marks. Part I: The metal of lead comparison with the worker's blood of the mark of biological effect. For example, we use the detector of metal of biological monitor, exploring the correlation between the concentration of lead and the

products of Lipid Peroxidation (Thiobarbituric acid reactive substance -TBARS), Superoxydative dismutase (SOD), Selenium (Se) and data of Hemoglobin (HGB). Part II: Lead Chloride comparison with the rats of the mark of biological effect. We directly investigate the concentration or the effect of toxic metal in rats. For example ,we measured the body weight of rats, AST, ALT, GOT, GPT, Protein, and Albumin to evaluate the impact of toxic substance to human health. Part III: Lead Chloride and toluene exposure independent or combined comparison with V79 cells of the mark of biological effect .We studied the effect of lead and toluene exposure independent or combined on the Chinese hamster lung cell (V₇₉) . . For example , V79 cells were exposed to lead and toluene for observing their toxic biochemical interaction and biological reaction. Moreover, we use two methods to evaluate cytotoxicity. One is CV% (Cell Viability)—with Trypan blue dye to count survival cells. The other is AMA%(Alamar blue metabolic activation) method to measure the metabolic materials of survival cells.

In part I , the 30-40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ of lead, the concentration of HGB is a significant difference(t-test, $P < 0.05$), In addition, at the 50-60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ of lead it also has a significant difference of the concentration of HGB(t-test, $P < 0.05$). In normal level 50 $\mu\text{g}/\text{dL}$ of lead, we find SOD distributed about 2000 unit/g of HGB in erythrocyte. Furthermore, under of lead (90 $\mu\text{g}/\text{dL}$) it is no significant difference with the products of lipid

peroxidation. Finally, we observe that the concentration of lead increase, the levels of Se 、 SOD 、 HGB decreased limited concentration of lead in human blood. However, the lipid peroxidative products are not significant obtained. Part II, This study use the animal model to investigate the chronic effect of lead exposure. The chronic exposure of lead cause slight hepatic and renal dysfunction , while the lipid peroxidation in serum and organ also showed increase. Finally, part III, our study indicate that lead and toluene show a synergistic cytotoxicity in combine treatment of V79 cell. On the other hand, the toxic growth inhibitory effect is significant by addition of low concentration sodium selenite, but this toxic inhibition is not marketable in high concentration of sodium selenite.

縮寫

MEM : Minimum Essential Medium

Se : Selenium

Pb ; Lead

V79 : Chinese hamster lung cell

PBS : Dulbeccols Phosphate - Buffered Saline

HGPRT: Hypoxanthine - guanine.

Phosphoribosyltransferase

DMSO : Dimethylsulfoxide

HAT : Hypoxanthine Aminopterin Thymidine

SOD : Superoxide dismutase

LPO : Lipid peroxidation

GSH : Glutathione

NAG : N-acetylglycoase

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive substrate

ROS : Reactive oxygen species

HGB : Hemoglobin

CV : Cell viability

壹、前言

鉛是人體非必需微量元素，鉛或其合金化物常用於工業製程中如鉛蓄電池、焊錫、燃料添加物。另外日常用品中殺蟲劑(砷酸鉛)、白漆(矽酸鉛)、金屬表面防護漆(四氧化三鉛-俗稱鉛丹)等，用途相當廣泛。這些鉛金屬或鉛化合物可以經由口、鼻、皮膚等途徑進入人體內⁽¹⁾，長期暴露會造成血液方面病變，腸胃和神經系統失調，產生生殖功能障礙，抑制生化酵素合成，或引發自由基造成細胞氧化性傷害^(2,3,4)。

鉛成為胞內金屬蛋白質複合物方式，是因對細胞內部份氨基酸有強烈結合力，和含硫基的胱氨酸(Cysteins)及麩胱甘月太(Glutathione-GSH)形成鍵結物⁽⁵⁾。對鈣離子通過胞膜通道有抑制作用及取代了鈣對鈣離子調節素(Calmodulin)的調控功能⁽⁶⁾。並且取代 δ -氨基- γ -酮戊酸脫水酶(δ -Aminolevulinate Dehydratase - δ -ALA-D) 氨基中鋅離子⁽⁷⁾和抑制含銅離子之過氧化歧化酶(SOD)⁽⁸⁾，影響細胞內訊息傳遞。在過去研究⁽⁹⁾中發現，鉛離子之致癌性，是間接利用金屬蛋白質複合物與正在基因修補或複製過程的酵素系統交互作用，抑制反應中所需酵素的活性。另外也可能是在細胞中經由取代鈣離子訊息傳遞過程的角色，活化了蛋白激化酶C (Protein Kinase C)誘發細胞轉型作用(Transformation)成不良類型細胞^(6,8)。鉛和紫外光同存在會產生誘發性基因突變，故鉛被認定為弱致突變因子或協同(Singergistic)致突變因子⁽⁹⁾。本研究以三部份來整體了解人體、動物及培養細胞受鉛暴露的影響。

(一). 鉛暴露對勞工血液中生物效應指標影響

鉛對人體之毒性多屬慢性中毒性病變，鉛滯留體內分佈主要在成人骨骼內約佔 95%(小孩佔 70%)，其次為肝臟、腎臟、軟骨組織及血液中，最少是中樞神經系統⁽¹⁰⁾。鉛對生殖功能在男性則會稍微減少了精子數量，也會造成精子活動力明顯減低⁽¹⁰⁾，進而影響卵子受精過程。對於女性則是使卵巢、輸卵管功能受損，無法製出正常成熟卵子受精成胚⁽¹⁰⁾。另外鉛會通過胎盤進入胎兒體內，也會經由母體哺乳途徑沉積於幼兒體內^(10,11)。近年來勞委會規定暴露鉛作業場所之勞工需每年定期健康檢查及做血中鉛濃度測定，並且衛生署嚴格規定鉛濃度高於 40 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (男性)和 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (女性)需依循通報系統告知並予以監控。表 1 為 1977 年世界衛生組織(WHO)公佈的血中含不同鉛濃度會造成人體不同程度傷害⁽³⁾。在文獻上曾提及鉛在血液中半衰期達 36 \pm 5 天之久，且大部分在紅血球內之原紫質中(Protoporphyrins)，鉛接上 δ -氨基- γ -酮戊酸脫水酶(δ -ALA-D)，造成血基質蛋白如血紅素及細胞色素合成路徑受阻而引起貧血方面疾病^(1,12-14)。此外在鉛元素造成氧化性緊迫(Oxidative stress)產生含氧自由基(Reactive Oxygen Species-ROS)^(10,11)，含氧分子與體內一般分子反應後，可經由電子傳遞作用產生繼發性自由基分子，這些分子常與氧分子反應形成過氧自由基分子^(16,17)，接著仍不斷與其他分子反應，激化成具不定的繼發性分子，接著不斷重複上述反應步驟產生更多自由基化合物，攻擊細胞膜產生脂質過氧化產物(TBARS)或氧化大分子如蛋白質、核酸等，可能因此而造成胞膜變性，酵素功能改變或核酸受傷害進而造成老化、突變或致癌現象⁽¹⁶⁻¹⁷⁾。

目前為了免除因毒物代謝或過氧化暴露產生含氧自由基傷害，在

生物體內產生內因性防衛機轉酵素如過氧化氫酶(Catalase)、過氧化歧化酶(SOD)、穀胱甘肽過氧化酶(Glutathione peroxidase)及抗氧化必需微量元素如硒(Se)等^(18, 19, 20, 21, 22, 23)。

本研究運用生物偵測技術方法，來探討體內受毒性物質暴露時產生之代謝機轉。以人體血液為生物檢體來探討下列問題：一·鉛金屬對體內必需微量元素硒濃度影響。二·鉛金屬對人體血球細胞氧化性之指標—血紅素(Hemoglobin -HGB)及脂質過氧化(Lpid peroxidation)傷害程度。三·鉛金屬在體內造成著氧化性緊迫(Oxidative stress)，對過氧化歧化酶(SOD)活性變化之相關性。

(二). 氯化鉛對 Wistar 雄鼠生物效應指標之影響

為避免因工作曝露或環境飲食污染而造成過多之金屬元素累積於人體中，日積月累後對健康形成不良之影響。應該儘量減少因工作或工業污染造成環境中重金屬曝露之機會，同時建立適當的偵測技術，如目前普遍應用於工業安全評估之作業環境測定，勞工定期健康檢查及環保單位對一般生活環境之監測，衛生單位對食品安全衛生之把關等。但是由於個人工作性質、生活習慣及代謝能力之差異，相同的曝露量可能有不同之反應。近年來，在分析儀器與技術日益精進之配合下，直接分析生物檢體中(例如血液、尿液、精液、毛髮、指甲、器官組織、唾液及呼出氣體等)之毒性物質或其代謝物之含量，藉以評估毒性物質健康危害之早期指標，即是『生物偵測』(Biological monitoring)。或是測量因吸收某些化合物而引發之生化反應特質(例如鋅原紫質濃度相對於鉛中毒，Metallothionein濃度相對於重金屬毒性等)稱之為生物效應偵測(Biological effect monitoring)⁽²⁴⁾。

這兩種偵測技術最主要的特點即在直接測量毒性污染物及代謝物在人體內之含量或其引發之生化反應強度，可以立即準確評估該污染物質對健康之危害影響，更能代表生物體的真正反應，並彌補以往僅對外在環境作監控時，忽略總體暴露量或個體差異之不同，而造成毒性效應無法確實掌握之缺憾。

人體非必需微量元素鉛或其化合物存在於許多工業製程中，如鉛蓄電池，焊錫，燃料添加物，殺蟲劑(砷酸鉛)，白漆(矽酸鉛)，金屬表面防護漆(四氧化三鉛)等，用途十分廣泛。文獻報告⁽²⁵⁾已證實鉛對腦、腎、肝及造血系統皆可能造成傷害。鉛的毒性起始效應被認為是對細胞膜的破壞，而自由基反應機制是造成脂質過氧化及磷脂質的降解，並進一步使細胞膜失去完整性，成為器官損傷的重要因素⁽²⁶⁾。

由於鉛對人體會造成多方面之傷害且又廣泛地存在環境中，形成因職業暴露或環境暴露而造成傷害的可能性亦相對增加。雖然衛生署已針對鉛暴露勞工採取定期健康檢查方式，篩檢高血鉛值之工人，予以監控，以降低職業危害程度。但是，鉛元素或其化合物的低限劑量(Lowest Observed Effect Level-LOEL)尚無定論，以往認為是安全的血鉛濃度($\leq 10-20\mu\text{g}/\text{dL}$)目前已有向下修正之趨勢⁽²⁷⁾。同時，在以往探討鉛或其化合物之毒性效應的研究中，大多以腹腔注射給予較高劑量之鉛化合物($10\text{mg}-40\text{mgPb}/\text{Kg. Bw}$)，或是用胃管餵食($50\text{mgPb}/\text{Kg. Bw}$)，實驗期間由數天至 8 週^(25, 28-29)。這些劑量相較於成人每天之平均攝取量($20\mu\text{g}-400\mu\text{gPb}/\text{Person}$)皆高出許多⁽³⁰⁾。因此，有必要對更低濃度之鉛化合物長期暴露之毒性效應，作更進一步之探討。

本研究即有鑑於生物偵測技術在探討毒性物質曝露時，是一個相

當重要的參考指標。因而利用動物實驗模式，觀察老鼠在投予含氯化鉛之飲水後，對其生理功能及生化反應之影響，包括一般生化值如丙氨酸氨基轉移酶(ALT)、天門冬氨酸氨基轉移酶(AST)、鹼性磷酸酶(ALP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)等肝、腎功能指標之變化，體重增加之速率，血清中重金屬濃度之變化，血清及組織均質液中脂質過氧化產物^(25, 31-32)與氯化鉛金屬之相互關係。

(三). 氯化鉛單一及與甲苯複合暴露對 (V79) 中國倉鼠肺臟細胞生物效應指標之影響

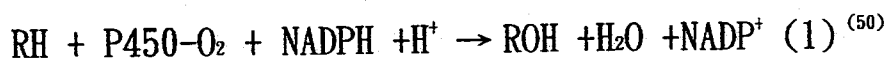
近代工業蓬勃發展，致使周遭環境及人們飽受污染，成為文明產物的受害者。有關研究職業勞工之安全衛生領域中，常見探討各種毒性物質對生物體之危害程度與機制，但極少對數種環境毒物複合暴露下其之間交互作用及生物加成毒性詳作分析與探討。本研究以工業製程最常見鉛金屬及有機溶劑甲苯，作為探討共同暴露效應之毒性物質。並利用硒元素對重金屬毒性具拮抗效應特性⁽³³⁻³⁸⁾，觀察硒元素是否同樣對環境毒物鉛及甲苯所造成之細胞傷害具有毒性拮抗作用。

金屬鉛化物在自然界中可分水溶性(硝酸鉛 lead nitrate，氯化鉛 lead chloride.. 等)及非水溶性(硫化鉛 lead sulfide.. 等)兩種。非水溶性比較水溶性鉛化物之毒性較大，在 in vivo 內可造成免疫系統、血液疾病腎功能及中樞和周圍神經系統的損害。在 in vitro 中則僅需 mM 以上濃度即可抑制去氧核糖核酸聚合酶(DNA polymerase)活性，改變核糖核酸(RNA)合成及核糖核酸聚合酶(RNA polymerases)的鍵結起始位置，降低去氧核糖核酸(DNA)合成⁽³⁹⁾。目前有關鉛複合物直接誘導細胞突變之機轉尚未被找到，在 DNA 序列上

並無測出 DNA 與鉛化物結合之鍵結物，由此可知其機轉應是間接的作用，如擾亂 DNA 合成，或是修補或改變 DNA 相關酵素的功能^(33, 39-40)。

甲苯對大部份非極性物質均有極佳之溶解度，因而被廣泛的使用於油漆、塗料、油墨印刷及表面處理之工業製程中，在化學合成及製藥工廠之中甲苯亦常被當作起始之反應物，且燃料油亦添加一定比例之甲苯(約 15~20%)⁽⁴¹⁻⁴²⁾，在此作業環境之勞工(如加油員、油漆工、印刷工...等)曝露在四周所揮發的甲苯蒸氣可經由呼吸系統或皮膚擴散吸收進入現場作業人員之體內。

甲苯曝露對人體神經系統、肝、腎具有傷害性，在急性甲苯曝露下可能引發免疫反應造成大量免疫球蛋白堆積於腎絲球中，因而引起急性腎炎或另引起巨核球貧血、噁心、頭暈眩、頭痛...等副作用⁽⁴³⁾。曝露在空氣中含為 10000-30000ppm 高濃度之甲苯導致自覺意識喪失，而超過 100 PPM 時就已經影響了行為能力。在過去的研究文獻中指出甲苯會增強神經細胞膜 Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase 活性，改變接合器的結合方式及神經傳導物之含量⁽⁶⁹⁻⁷²⁾。在腦及肝臟組織中，曝露甲苯下會刺激生物體中提高 ROS (Reactive Oxygen Species) 的產生速率，且同時增加脂質過氧化產物(MDA)含量，並消耗了穀胱甘肽(GSH)降低其濃度，^(44-45, 47) 顯示甲苯暴露可增加體內自由基及過氧化物產生。而當組織或細胞膜之脂質部份，受到自由基或過氧化物攻擊時，往往會在碳雙鍵處斷裂進而破壞組織構造，造成細胞膜間內液體流動不穩定性和通道的功能喪失，進一步造成組織或細胞之傷害或壞死^(17, 22)。細胞內的細胞色素 P450 酵素單氧化酶大部份存在於細胞內質網或粒腺體上⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾，單氧化反應之催化作用可用方程式(1)說明：



然而目前甲苯對基因致毒性及造成組織細胞致癌之證據，仍未發現

(11)。

目前在勞工安全法規訂定作業環境中有機溶劑不得超過一時量平均濃度(TWA)100PPM。甲苯具有脂溶性及揮發特性，在人體代謝主要路徑是利用肝中細胞色素P450之單氧化酵素(MAO)將甲苯氧化成苯甲醇或苯甲醛最後氧化成苯甲酸，苯甲酸之酸根再和甘氨酸結合成馬尿酸(Hippuric acid)，最後由尿液中排出。另一途徑中，甲苯經由芳香環氫氧化酵素(Aromatic hydroxylase)將在苯環直接接上氫氧基，或由體內游離之氫氧自由基(OH[·])直接攻擊到芳香環上，而形成Cresol(甲基酚或二甲基酚)，但相對於馬尿酸而言，則此類化合物僅佔甲苯代謝中極低之比率(約2%左右)圖3表甲苯在生物體內代謝途徑⁽⁵¹⁾。

硒為人體之必需元素，但是如攝取過量時，亦會引起硒元素中毒現象，當攝取劑量在5mg/day以上，呼吸道、腸胃道明顯受損，而在高濃度急性暴露含硒元素之煙霧或塵埃時，可造成紅眼、打噴嚏、咳嗽，且呼吸困難、胃腸功能障礙，常期暴露造成肝及腎受損等職業病症狀。然而硒元素缺乏也相對地會造成病理病變，如心臟方面疾病，白內障，囊狀纖維化及老化等現象⁽⁵²⁾，長期攝取硒在最低平日量為0.011mg以下則造成肝、腎損傷，大陸方面有keshan disease的報告。預防方式可口服適量之亞硒酸鈉來預防，但如服用過量時仍亦有致癌性產生⁽⁵³⁾。

硒必需元素在人體之生理性功能，大約可分為三種：

1. 為與砷、鉛等毒性金屬鍵結之拮抗劑。
2. 成為細胞之抗氧化劑，與穀胱甘月太及維他命E相輔相成。
3. 成為活性自由基的清除者，腫瘤的預防因子⁽¹¹⁾。

硒元素以 Selenite(4⁺):NaSeO₃ 形式或另以 selenate(6⁺)NaSeO₄

的型式出現在自然界中⁽⁵⁴⁾。硒元素在胃腸道半衰期達 245 ± 19 天，吸收後以硒甲硫酸(Seneomethionine)型式存在，最後由泌尿系統之近曲小管分泌排出，⁽¹¹⁾圖 1. 中列出硒元素在生物體中代謝循環路徑。代謝動作從 Selenite 的烷化作用中有機亞硒酸鈉複合物開始，主要代謝位置在肝和腎中^(11.54)。

生物體中之代謝途徑可歸納為五個階段：

1. 與穀胱甘月太或其他從亞硒酸鈉之硫化複合物產生反應。
2. 再兩階段的化反應從 H_2Se (Hydrogen selenide)還原了穀胱甘月太硒元素之硫化物，選擇性接上蛋白質或直接與金屬離子結合形成穩定複合物。
3. 一些金屬複合物如 $HgSe$ 等儲存在內質網系統(Reticuloendothelial system)。
4. 再經一連串之甲基化產生斥水性及揮發性的 DMS (Dimethylselenide)及水溶非毒性的 TMS(Trimethyl selenonium ion)。
5. 人體中硒代謝產物中 TMS 佔了 7%，由尿中排出，當 TMS pathway 呈飽和時，就讓累積的 DMS 釋出。

目前硒元素被歸屬於抗氧化元素之一，主要是因為本身為穀胱甘月太過氧化酶(GSH-PX)的組成分子，與穀胱甘月太及保護細胞膜之 vitamin E 共同形成一道自由基侵害保護的牆⁽¹¹⁾，此可分解過氧化氫及脂質過氧化物⁽¹⁾，並有助於生物體避免金屬毒性傷害及抗癌作用，但真正作用機轉目前仍不清楚⁽³⁴⁻³⁸⁾。

硒元素不僅有拮抗金屬毒性效應，也可抑制腫瘤細胞的生長，Mathhew 等人(1986)⁽⁵⁵⁻³⁸⁾研究犬之乳腺腫瘤細胞(CMT-11, CMT-13)，可被低濃度 $0.75\mu g/ml$ 之亞硒酸鈉抑制生長達 75%及 11%，而正

常細胞卻不受影響。在不同種類之腫瘤細胞抑制生長所需給予的亞硒酸鈉濃度也就不同，但正當細胞並不受抑制反而有助長之現象⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾。如再給予添加還原態之穀胱甘肽(GSH)，其抑制效果會更好。對腫瘤細胞之抑制效率程度，Selenodiliglutathione > Sodium selenite >> Selenocystine >> Selenomethion。而其抑制方式應在於增殖分裂時，抑制增殖因子-2(IF-2)的合成，使細胞停留在細胞周期之S後期至G2早期，抑制了RNA及蛋白質合成，使DNA合成也受抑制⁽⁵⁹⁾，然而真正機轉如何發生仍未有證據證明。

另有 Zongian 等人(1996)⁽³⁵⁻³⁷⁾研究指出，亞硒酸鈉在低濃度為10 μ M 以下可助抑制人類神經膠腫瘤細胞之增殖，使之加速進入自然凋零(Aptosis)階段，因DNA活化的ADP-五碳糖轉移酶在氧化過程中，產生氧化性緊迫(Oxidative stress)，加速耗盡NAD/NADH及ATP儲量，造成腫瘤細胞序列性死亡時間縮短。圖2.表示亞硒酸鈉元素誘導腫瘤細胞進入自然凋零(Aptosis)之過程。Rosonald 等人在文獻中指出低劑量(6mg/kg)亞硒酸鈉可損抗鎘對肺細胞毒性損傷、降低損傷之程度，其可活化琥珀酸去氫酉每、乙醯膽鹼脂酉每及鈉/鉀腺核甘三磷酸酉每活性，但在高劑量卻有加成毒性之作用。⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾與亞硒酸鈉複合暴露產生之拮抗效應性，文獻⁽⁶³⁾指出亞硒酸鈉可影響鎘金屬體外排出率，且可加速被鎘金屬傷害的腎加速復原。亞硒酸鈉之拮抗鎘金屬之毒性，主要機轉在於亞硒酸鈉所活化的穀胱甘肽(GSH)可作為螯合劑，清除體內鎘金屬⁽⁶⁶⁾。

在數種環境毒物在交互作用生物加成反應之下，所產生之化學中間型物及鍵結合物，對生物體造成傷害或代謝障礙⁽⁶⁰⁾。而複合物並非都是加成性，須依其物質之物理性質與化學性質而定；鉛與鎘、銅、鐵同屬過渡金屬，其物性與化性相近，致毒性機轉方式亦類同

(22, 33, 61), 可用過渡金屬模式加以探討。與甲苯共同暴露之研究並不多, 真正影響機制並不清楚, 甲苯歸列為低毒性有機溶劑, 其單環芳香族碳氫化合物會傷害細胞膜上之脂質雙層, 並接在厭水端上, 使嵌入細胞膜的蛋白受損, 進而抑制胞膜上多種酵素之功能, 如: Lysosome hydrolyases 等, 改變胞膜的通透性及改變生理功能⁽⁶²⁾, 如鈣離子之流動⁽³⁵⁾及降低細胞呼吸效率及增加脂質過氧化程度⁽⁶⁴⁾, 加上鉛離子所引發的 ROS, 加強了對細胞傷害力⁽⁶²⁻⁶⁴⁾。

本研究以 V79 細胞(Chinese hamster lung cell line)中國倉鼠肺臟細胞株為模本, 它是為穩定性高之哺乳類動物細胞株, 具高效種植率, 及自發性突變頻率在 6-TG(6-thioguanine)耐性試驗下小於 10^{-5} cell/CFU⁽⁹²⁾。其細胞週期為 12 小時, 與中國倉鼠卵巢細胞株(CHO)常被應用在短期實驗(Short-term test) 如測試細胞存活率⁽⁶⁸⁾、基因毒性致突變能力⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾及抗毒性物質效應⁽⁷⁰⁾, 可長期儲凍於液態氮中不易喪失其活性。

Elias 等人(1986)⁽⁶⁸⁾ 研究裏用 V79 細胞作為重金屬曝露 18 小時後見細胞存活率及基因突變如次黃嘌呤磷酸核糖甘轉移酶基因-HGPRT(Hypoxanthine guanine phosphoribosyltranses), 都有明顯細胞存活率降低, 基因突變率增加。在基因突變中, HGPRT 基因屬分子致突變過程中內源性基因系統帶有 HGPRT 酵素活性, 其常用 6-TG 或 8-AZ(8-Azaquanine)的抗性作為致突變性之毒性指標, 通過表現型對 6-TG 的代謝抗性來篩選便可得突變株, 促使 Hypoxanthine 和 Guanosine 的轉化, 而使 purine base 回收使用, 同時它也會把嘌呤類似物如 thioquanosine 磷酸化並轉換成有細胞毒性的核酸。而沒有 HGPRTase 功能的細胞便可以抵抗這個傷害而存活下來, 圖 4 解釋次黃嘌呤磷酸核糖甘轉移酶基因生化代謝路徑。

設計兩項實驗(Alamar blue test , Trypan blue test)驗證氯化鉛、甲苯單一方式與複合共同暴露方式對 V79 細胞存活率之影響及亞硒酸鈉對氯化鉛、甲苯毒性拮抗效應程度。

Alamar blue test :

設計測定人類細胞株、動植物細胞株、細菌、黴菌^(68.70.72)所具有之增殖能力為一細胞生長之合併氧化還原指標。成長中細胞產生之代謝產物與 Alamar blue 結合成還原狀態→顏色由藍紫色轉變為紅色(粉紅色)。其著重反應在呼吸電子傳遞鍵上氧化—還原狀態(圖 5)。

Trypan blue test :

觀察細胞計數存活數量，使用含有甲基藍(methyl blue)成分來染色，除襯托背景顏色，也能區別活細胞與死細胞，因為甲基藍會經由死細胞膜之通道進入細胞質及核內，與 RNA 結合染成深藍色，而活細胞將甲基藍阻於細胞膜外，利用顯微鏡(400X)下用 counting chamber 或 Autocytometer^(68.72)計數細胞個數。

本研究模擬勞工作業環境，以 V79 細胞為暴露對象並以氯化鉛、甲苯、亞硒酸鈉單一暴露及氯化鉛、甲苯複合共同暴露方式驗證毒性物質共同暴露與單一暴露對細胞之毒性效應差異及硒必需元素對細胞毒性之拮抗效應。

貳、實驗材料與方法

(1). 實驗材料

1.1 儀器設備:

品 名	廠 牌
原子吸收光譜儀MODEL 5100PC (含石墨爐式原子化裝置 Zeeman 背景校正系統)	Perkin-Elmer
超音波自動取樣器 USS-100	Perkin-Elmer
螢光光度計 F4500	Hitachi
血球自動分析儀 Sysmes K-1000	三東儀器公司
冷凍離心機 Hettich 16R	Universal
紫外光/可見光分光光譜儀 U300	Hitachi
離心機 KN-70	KUBOTA
製冰機	Sctosman
-85 °C冷凍櫃	Nuazire
4 °C冷藏櫃	Westinghous
無塵操作台CLASS-100	Bio-Hazard
製水系統	Milipore
無菌操作臺 (Lamina Flow)	HIGH TEN
細胞培養箱 (Incubator) Temperature 37 °C, RH control 67-99%	NUAIR™ US AUTO FLOW

品 名	廠 牌
(Humidity), CO2 control 11.5%	
顯微鏡	Nikon
倒立式顯微鏡	Diphote 300, Nikon
恆溫水浴槽 (Water Bath)	Kodman
液態氮瓶	LAI' LIQUID
Hemocytometer	Reichert-Jung
生化分析儀 model 7050	Hitachi

1.2 消耗性材料:

品 名	廠 牌
1.5CC尖底試管(PP質)	BRAND
15CC尖底試管	CORNING
5CC真空採血管	VACCEANINER
10 CC真空採血管	VACCEANINER
真空採血管	VACCEANINER
Tissue Culture Flask (25CM)	TPP
Tissue Culture Flask (75CM)	TPP
無菌過濾膜	MILLPORE

品名	廠牌
(Sterile Vented Filter Unit 0.22uM)	
細胞培養盤(24wells)	FALCON
Microcentrifuge tube 1.5ml	BRAND
dish 35 × 10mm	FALCON 3001
Cryotube 1.8ml	Nunc
軟片：黑白 RX-13	富士

1.3 藥品試劑

品名	廠牌
Nitric acid Ultra pure	德國E. Merk
界面活性劑Ttitonx-100	德國E. Merk
Nitric acid GR級	RDH公司
全標準品SRM1598 BRM Human Serum	Seronom™:Bio-rad
RANSOD Kit試劑組	RANDOX公司
磷氨酸	德國E. Merk
硫酸	德國E. Merk
TBA (Thiobarbituric acid)	日本林藥

(2). 實驗方法:

本研究鑑於這些參考指標極為重要，因此設計出以人體、實驗鼠及培養細胞為樣本分為三部份來整體探討暴露毒性物質時，這些指標間變化情形。第一部份：鉛暴露對勞工血液中生物效應指標影響。第二部份：氯化鉛對Wistar雄鼠生物效應指標之影響。第三部份：氯化鉛單一及與甲苯複合暴露對中國倉鼠肺臟(V79)細胞生物效應指標之影響。以下介紹詳細步驟。

(一). 鉛暴露對勞工血液中生物效應指標影響

分別收集三家鉛暴露工廠工人靜脈血液樣品，探討其鉛金屬濃度與脂質過氧化產物(Thiobarbituric acid reactive substance-TBARS)、過氧化歧化酶(Superoxide dismutase-SOD)、硒(Se)元素濃度及血紅素值(Hemoglobin-HGB)之相關性。

1.1 血液樣品採集

選擇北部與中部三家鉛金屬相關作業工廠員工及行政人員共154位，其中男性115位，女性39位，年齡在18歲至55歲間，以低金屬污染之採血針頭，含肝素抗凝劑之真空採血管抽取約5毫升之全血樣品。為避免採血過程之污染，所有員工均應在抽血前洗淨雙手及手肘部位。全血收集後，儘速帶回醫院分裝檢體後，一部份樣品由本實驗室或附設醫院血清室分析其血鉛濃度。剩餘檢體則由本研究室帶回準備測定其過氧化歧化酶活性，脂質過氧化，血紅素及硒元素濃度。不需立即分析之檢體，均於分裝後冰存於-85℃超低溫冷凍櫃中保存。

1.2 器材清洗

本研究使用於血樣分裝金屬元素偵測之實驗器皿包括玻璃定量瓶，Pipette Tips，1.5cc 尖底離心管，原子吸收光譜儀用之樣品杯皆需 1 : 1 稀釋硝酸溶液浸泡至少一天，取出後以二次蒸餾水浸泡後用超音波振盪清洗，或經由 15% 硝酸溶液熱蒸汽迴流沖洗，直接以二次蒸餾水清洗無塵操作檯內晾乾備用，其它實驗器皿，則依一般清洗流程，浸泡鹼性清潔劑後，以超音波振盪清洗，並用二次水沖洗後，烘乾備用。

1.3. 金屬元素分析：

金屬元素之分析工作，在鉛金屬部份由本研究室暨本校附設醫院檢驗科血清室共同完成，硒元素則由本研究室測定。作業勞工全血檢體送至本研究室後，輕輕搖晃混合，吸取 100 微升之全血置入預先洗淨之 1.5 毫升之尖底離心管中(pp 材質)，並加入 900 微升之稀釋液(0.5% Triton[®]X-100 溶於 0.2% 超純級硝酸水溶液)，充份混合。使樣品溶液中之大型分子如胞膜碎片、脂肪酸、醣類、蛋白質及核酸等能經由界面活性劑 Triton[®]X-100 乳化後形成均勻分佈之溶液，另一方面亦可經藉由硝酸的金屬溶離作用，避免金屬沉積於管壁或吸附於大分子上。

稀釋後之全血樣品，取樣前均由超音波取樣器(Perkin-Elmer USS-100)充份混合後，以自動取樣器之毛吸管定量取 20 微升並添加基質修飾劑包括 200ug 磷酸二氫氮及 20ug 硝酸鎂溶液後，以原子吸收光譜儀(Perkin-Elmer model 5100PC)含石墨爐式原子化裝置及 Zeeman 背景校正系統偵測鉛金屬含量。而硒元素則是取樣 20 微升後，加入基質修飾劑含 5ug 鈮金屬及 15ug 硝酸鎂溶液後以原子吸收光譜儀測定⁽⁷³⁻⁷⁷⁾。原子吸收光譜儀設定石墨爐加熱程序及儀器偵測條

件列於表 2。至於本院附設醫院檢驗科血清室之血鉛偵測流程則是將作業勞工全血樣品充份混合後，吸取 100 微升之全血樣品，置入潔淨之樣品杯中(PE 材質)，並加入 900 微升之稀釋液(0.5% Triton X-100，0.33% 磷酸二氫氨，溶於 0.2% 之超純級硝酸溶液)充份混合後，使樣品溶液分佈均勻。將稀釋後之血樣以自動取樣器吸取 20 微升，以原子吸收光譜儀(Perkin-Elmer model 3110)，含石墨爐式裝置，D2 燈背景校正系統偵測鉛金屬含量。原子吸收光譜儀之設定條件，亦列於表 2。同時，為了確保兩間實驗室血鉛濃度分析數據之品質，除了採用已知濃度之參考物質如 Seronorm™，Bio-Rad® 全血標準品驗證實驗流程外，亦採用實驗室間樣品分析比對程序來控制兩間研究室之分析品質，數據結果分別列於表 3 及表 4。此外，為驗證本研究室對血中硒元素定量之準確度，作者採用標準參考樣品包括牛血清標準品(SRM 1598)、人類冷凍乾燥血清標準品(Second-Generation BRM human serum)，來確認分析之品質，結果詳列於表 5。

1.4 脂質過氧化測定

血液混合均勻(操作過程試管均置於碎冰中處理，延緩血球昇溫)，取全血樣品 75 微升，置入 15 毫升塑膠離心管中，並加入 4 毫升 1/12 N 硫酸溶液及 0.5 毫升 10% 磷鎢酸溶液，振盪混合 5 分鐘後，置入離心機中，以每分鐘 3000 轉速度離心 10 分鐘。離心後，迅速將上清液倒掉，再加入 2 毫升 1/12N 硫酸溶液及 0.3 毫升 10% 磷鎢酸溶液振盪 10 分鐘。再一次離心後，倒掉上清液。試管底部之沉澱物加入呈色劑 TBA(Thiobarbituric acid)醋酸水溶液 1 毫升及 4 毫升二次水，混合均勻後於 95°C 水浴恆溫振盪 60 分鐘使呈

色劑與脂質過氧化之裂解產物丙二醛(Malondialdehyde-MDA)結合形成螢光複合物(TBARS)，待冷卻至室溫，加入 3 毫升正丁醇萃取此螢光複合物。將此上層的含螢光複合物溶液以螢光光度計(F4500 Hitachi)在激發波長 515nm 發散螢光波長 555 nm，偵測螢光強度。同時，亦以已知濃度 MDA 為脂質過氧化產物之標準品，配製不同濃度之檢量線標準品，俾供濃度換算^(14.76)。

1.5 血色素測定

作業勞工全血樣品輕晃充份混合，取 0.5 毫升全血樣品置入 1.5 毫升離心試管(測定之前於低溫狀態下處理)，用血球自動分析儀(Sysmes K-1000 三東儀器公司)測定定量，以取樣器自動取樣 50 微升，利用醋酸溶破紅血球後，透過光譜分析求得血色素之濃度^(13.75.78)。

1.6 過氧化歧化酶含量測定

將某一電化工廠 60 位血鉛濃度分佈均勻之勞工靜脈全血樣品，於採樣後靜置 30 分鐘，使血液內溫度降至室溫後置入低溫冰桶碎冰中儘快送回實驗室處理。將血樣緩和地混合均勻，取樣全血 0.5 毫升置入 1.5 毫升離心試管(PP 材質)，置入冷凍離心機(Freezed centrifugeme-Hettich. UNIVERSAL, 16R)設定 4°C 3000 轉，離心 10 分鐘後，去除上層血清，隨即時使用 3 毫升 0.9% NaCl 沖洗(去除紅血球表面沾黏的雜質抗體等) 4 次，每次均用 3000 轉，10 分鐘 4°C 離心去除上清液後，加二次水至 2.0 毫升，充份混合後置入 4°C 冷藏室 15 分鐘。將紅血球胞膜充份破壞後，取混合液 50 微升，以 RANSOD 試劑組經由紫外光/可見光分光光譜(Hitachi, U3000)，測定其過氧化歧化酶(SOD)之活性，並將前述之血色素測定結果，作為濃度

校正之依據^(19.79-81)。

1.7 數據統計與分析

所有之實驗數據皆輸入電腦，用 Sigma Plot 及 Sigma State's 1.0 版載 windows95 視窗版軟體作圖形繪製及數據統計分析之工作。

(二). 氯化鉛對 Wistar 雄鼠生物效應指標之影響:

觀察老鼠在長期投予低濃度鉛金屬後，對其生理及生化反應之影響，包括一般生化值、體重變化、血清及器官均質液中金屬濃度及血清和器官均質液中脂質過氧化產物濃度等，建立鉛金屬之相關指標。

2.1 器材清洗

鉛金屬元素分析所使用之器材如容量瓶、Pipette tips、原子吸收光譜儀之樣品杯等，使用前均須浸泡 50% 硝酸溶液 1 天以上，然後以二次蒸餾水於超音波洗淨器清洗或者經由 15% 硝酸溶液加熱迴流沖洗後，以二次蒸餾水清洗兩次，於無塵操作檯內晾乾備用。

老鼠斷頭犧牲所需器材，皆預先以 10%EDTA 溶液浸泡或擦拭，並用二次蒸餾水沖洗後，烘乾備用。在實驗進行時，定時用二次蒸餾水沖洗解剖器材，拭淨後使用。

其它實驗所使用之器材，均採購預先洗淨包裝之容器。器材使用後，則以清潔劑浸泡，經過自來水沖洗，超音波洗淨，最後以二次去離子水沖洗，置入烘箱乾燥備用。

2.2 動物飼養及血液樣品採集

分組—選取約 4 ~ 5 週大之 Wistar 品系雄鼠(購自台大動物中心)飼養於 12 小時光照，12 小時黑暗之動物房內，溫度控制在 24

± 3 °C，濕度範圍為 40%~ 60% RH，供給福壽牌粒狀飼料，隨機分為兩大組。分別投予含氯化鉛之飲水或作為對照組之逆滲透水，分組情形如下：

(i) 對照組(Control)—抽取 16 隻老鼠，分為 2 小組，飼料採充份供給，飲水則以逆滲透水定量給予。分別在飼養後第 90 天及 180 天斷頭犧牲。

(ii) 鉛金屬組—抽取 36 隻老鼠，各以 18 隻老鼠為 90 天組及 180 天組老鼠，飼料採充份供給。飲水則依據相關文獻資料⁽³⁰⁾所記載之該金屬所引發人體毒性反應之劑量 2.6 毫克 /1000 毫升時會造成酸性鉛中毒及成人每天平均自飲食中攝入 20 微克到 400 微克的鉛金屬⁽³⁰⁾，經體重換算後，用逆滲透水稀釋金屬溶液定量給予 90 天或 180 天，並再細分為高濃度、中濃度及低濃度三組各為 6 隻老鼠，各組劑量及給藥方式列於表 1。

2.3 動物實驗樣品收集

血液—將禁食後之老鼠，置入乙醚缸中麻醉，以斷頭方式犧牲，收集血液於預先洗淨之 15 毫升塑膠試管中，於 10 °C 下保存兩小時，待血液凝集後，以冷凍離心機在每分鐘 3000 轉速下離心 10 分鐘，取上層血清供生化值檢驗，脂質過氧化物濃度測定及鉛金屬元素含量偵測等使用。

器官—解剖斷頭犧牲後之老鼠，取出其肝、腎器官冷凍保存，待均質化後測其總蛋白質濃度及脂質過氧化產物之變化。

2.4 金屬元素分析

老鼠血清樣品予以充份混合均勻後，吸取 150 微升之血清，置入已預先洗淨之 1.5 毫升尖底離心管中 (pp 材質)，並加入 150 微升之稀釋液 (0.5% Triton® X-100 溶於 0.2% 超純級硝酸溶液)，充份混合後，於室溫下置放至少 60 分鐘，並不時振盪混合。使樣品溶液內之大型分子如脂肪酸、醣類、蛋白質、核酸等均能均勻分佈⁽⁸²⁻⁸³⁾。稀釋後之血清樣品，即可直接在添加基質修飾劑包括磷酸二氫胺及硝酸鎂後，以原子吸收光譜儀偵測其鉛濃度，儀器偵測條件列於表 2。

2.5 脂質過氧化物之測定

取混合均勻之老鼠血清樣品 30 微升，置入 15 毫升塑膠離心管中，並加入 4 毫升 1/12 N 硫酸溶液及 0.5 毫升 10% 磷鎢酸溶液振盪混合 5 分鐘後，置入離心機中，以每分鐘 3000 轉速度離心 10 分鐘。離心後，將上清液倒掉，再加入 2 毫升 1/12 N 硫酸溶液及 0.3 毫升 10% 磷鎢酸溶液，振盪混合 10 分鐘後，再次離心後，倒掉上清液。試管底部之沉澱物加入呈色劑 TBA 醋酸水溶液 1 毫升及 4 毫升二次水，混合均勻後於 95 °C 水浴 60 分鐘後，待冷卻至室溫，加入 3 毫升正丁醇，萃取 TBA 與脂質過氧化產物複合物 (TBARS)⁽⁸⁴⁾。將此複合物以螢光光度計在激發波長 515nm；發散螢光波長 555nm，記錄其螢光強度。

首先先將冰凍之肝、腎器官置於冰浴中解凍，分別稱取 1 克的肝臟或 0.5 克的腎臟，加入 3 毫升或 1.5 毫升的緩衝溶液 (Tris-HCl 10mM, pH 7.6, 含 0.25M Sucrose 及 5mM 2-Mercaptoethanol) 以均質機研磨組織後，直接倒入 5 毫升之塑膠試管中，置入冷凍離心

機於 4℃，每分鐘 10000 轉，離心後，取上清液 25 微升，如前述步驟，依序操作，偵測其器官均質液中脂質過氧化產物之含量。

2.6 總蛋白質之測定

在老鼠器官均質化之過程中，為避免因研磨程度上之差異而造成實驗上的誤差，本研究將組織均質液中的總蛋白質含量予以定量，以提供均質液濃度調整之依據。取混合均勻之組織均質液 10 微升，加緩衝液稀釋到 1 毫升後，將 100 微升之稀釋液倒入 1.5 毫升之尖底離心管中，並加入 1.4 毫升之蛋白質呈色劑 (BCA-1 kit; 20 毫升 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 加入 1000 毫升 Bicinchoninic acid solution) 後，振盪混合均勻，於 37℃ 下培養 30 分鐘後，待降至室溫，即以可見光波長 562nm 偵測吸光值，並對照由不同濃度之牛血清白蛋白與呈色劑反應所繪製之檢量線，求其總蛋白質含量⁽⁸⁵⁻⁸⁶⁾。

2.7 數據統計與圖形繪製

數據統計與圖形繪製，皆是使用 SigmaPlot® for Windows™ (Jandel Scientific) 版本軟體之 t-test 及繪圖功能而完成。

(三). 氯化鉛單一及與甲苯複合暴露對中國倉鼠肺臟

(V79) 細胞生物效應指標之影響

毒性物質為氯化鉛、甲苯，觀察毒物間在交互作用與生物反應，所產生之化學中間代謝物和產物之間是否具有複合加成毒性或是抑

制效應。

3.1 細胞解凍與保存

儲存之 V79 細胞由液態氮氣中取出，迅速放入 37 °C 水浴，使其快速完全解凍後，移至無菌操作台內，將解凍之 V79 細胞移至預先準備好之含有 37 °C MEM 培養液之無菌離心管中，以 800rpm 離心 5 分鐘，去上清液後，與備好之 5ml 之 37 °C MEM 培養液充分混合，培養液移至 25 cm² 之 flask 內培養，轉至 37 °C，5% CO₂ 中培養 18-24 小時後，換新鮮培養液，定時用倒立顯微鏡(Nikon)觀察細胞型態，待於 flask 底層長滿單層細胞後，進行細胞分盤及冰凍保存。

3.2 細胞分盤

單層長滿細胞之 flask 抽出原有的培養液，隨即加入磷酸緩衝溶液(PBS)清洗二次後，(PBS 量：75 cm² flask 7ml、25 cm² flask 3ml) 接著加入胰蛋白酶 Trypsin/EDTA(75 cm² flask 2ml、25 cm² flask 1ml) 作用 5 分鐘單離細胞，然後加入 MEM 培養液分裝到其他新的無菌 flask 內(75 cm² flask 15ml，25 cm² flask 5ml)。

3.3 細胞冰凍：

承續細胞分盤步驟，取細胞混合液，以細胞計數器計算細胞數目後，吸取每毫升培養液含 1×10^6 細胞/ml 到無菌離心管內於 800 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，並加入含 3-5% 之 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 之 1ml 培養液，混合均勻後移到 cryotube 中，cryotube 用棉花包裹再放入密閉保力龍盒內，先暫置 -20 °C 冷凍層待 10-15 小時再轉移放置 -85 °C 冷凍庫中 8 小時後，再移至液態氮桶中儲存。

3.4 細胞培養

V79 細胞來自中山醫學院藥理科提供，培養之細胞試劑，培養液需篩選過無細菌、黴菌，胞漿體等污染才可使用，先將穩定生長之 V79 細胞種在含有 HAT (100uM Hypoxanthine、2uM Aminopterin 及 30uM Thymidine)^(39-40, 68, 72, 87) 的 MEM 培養液中單層培養 3 天，以篩選並去除突變基因之 V79 細胞。3 天後洗去含有 HAT 之培養液，用磷酸緩衝液 (PBS) 洗 2 次後培養於一般 MEM 培養液中再繼續培養 3 天。其 MEM 培養液中含有 10 % 胎牛血清 (FBS) 1.22 % w/v 碳酸氫鈉，2 種抗生素 (Penicillin 100ug/ml) 和 0.03 % (L-glutamine)，培養箱條件設定於含 5 % CO₂，37 °C 培養。實驗流程如(圖 6)。

3.5 統計分析

所有實驗數據輸入電腦，以 Sigma plot 及 Sigma state 視窗版軟體，作圖形繪製及數據統計分析工作。

Student's t-test: 分析單一暴露氯化鉛、甲苯、亞硒酸鈉或複合暴露氯化鉛添加甲苯或氯化鉛、甲苯、亞硒酸鈉共同暴露之各組劑量所得數據與未暴露任何毒物之對照組數據比較差異性。

Regression Curve: 分析單一暴露氯化鉛、甲苯、亞硒酸鈉之各該組數據依劑量增加而呈現之負相關性之線性曲線。

獨立協同反應計算模式 (Independent Joint Action Model IJA) 所得之細胞存活率預期值與實際值比較得知氯化鉛及甲苯共同暴露時具有協同毒性 $P(M) = P(A) + P(B) - P(AB)$ ⁽⁴⁵⁾。P(A) = 氯化鉛細胞死亡率實際值。P(B) = 甲苯細胞死亡率實際值。P(M) > 0 則具加成毒性。

參、結果

(一). 鉛暴露對勞工血液中生物效應指標影響

為了驗證實驗分析流程之精確性，我們將已知濃度之全血標準品作為定量樣品，與他組實驗室進行實驗室間比對，在表三數據可以顯現兩間實驗室偵測所得血鉛濃度用 Seronormu 樣品在真實濃度之 100.9% - 103.6% 之間，用 Lyphochek 樣品在真實濃度之 90.0% - 108.6% 之間。此外，工人全血樣品之實驗室比對結果列於表四，兩個實驗室的分析數據比對結果之差異，兩個實驗室的分析數據差異比率在 0.28% - 6.68% 間，顯示進行中的分析品質都相當良好。此外，為驗證實驗室在分析硒元素之準確性，表 5 列出本研究室分析標準參考物質中硒元素含量，偵測所得濃度數值皆在真實濃度之 95-103% 間，表示分析數據之準確度相當高。將血紅素濃度依照不同之血鉛含量予以分組後，顯示在血鉛濃度大於 $30\mu\text{g}/\text{dL}$ 時，血紅素的濃度即呈現上下跳動變化之趨勢(圖 2)。而圖 3 則是紅血球中過氧化歧化酶活性與血鉛濃度關係圖，由圖中可以明顯觀察到血鉛濃度在 $20\mu\text{g}/\text{dL}$ 到 $50\mu\text{g}/\text{dL}$ 間有不穩定高低變動之酵素活性，而血鉛濃度大於 $30\mu\text{g}/\text{dL}$ 以上時，幾乎所有的酵素活性皆有偏低之分佈。待作者進一步將血鉛依濃度高低分組後(圖 4)，可以更清楚地發現過氧化歧化酶之活性在血鉛濃度 $20\mu\text{g}/\text{dL}$ 到 $30\mu\text{g}/\text{dL}$ 間跳升，而且也有顯著差異 ($P < 0.05$)。此外，當血鉛濃度在 $60\mu\text{g}/\text{dL}$ 到 $70\mu\text{g}/\text{dL}$ 間，酵素活性則有下降之趨勢。圖五則是工人血液中脂質過氧化程度與不同血鉛濃度之變化關係圖，當血鉛濃度高於 $20\mu\text{g}/\text{dL}$ 時，脂質過氧化程度則略有上升之趨勢，但無統計上之意義。作者分析血樣中硒元素濃度時

發現當血鉛濃度逐漸上升時，硒元素濃度亦呈現不規則之變化(圖六)，當血鉛濃度在 30-40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 間，硒元素含量降至最低，隨後有回升，在鉛濃度 50-60 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 間達到最高濃度，兩區間組比較時有顯著性差異($p < 0.05$)。

(二). 氯化鉛對 Wistar 雄鼠生物效應指標之影響

本研究選取多項有關金屬毒性的參考指標包括血清之生化值變化，體重增加之情形，血清中的鉛金屬含量，血清或組織均質液中脂質過氧化物之變化。

表 1 列出本研究所用動物之飲水中添加氯化鉛之濃度，同時記錄各組老鼠在實驗期間之飲水情形，數據顯示，不論有無添加氯化鉛之飲水，幾乎在每 3 天的飲用期內皆無太多剩餘。

由各組實驗在飼養期間實驗組之體重與對照組之比值變化曲線圖(圖 1. a, b) 中，發現各組老鼠之體重變化比無明顯改變($p > 0.05$, t-test)。總體而言鉛化合物之給予，並未造成老鼠體重增加速率的顯著影響。圖 2 為老鼠的血清之生化值與對照組老鼠生化值之平均值長條圖，圖形顯示大部份之生化值變化並不是很顯著。在各項生化值偵測結果中，血清白蛋白(ALB)的濃度變化(圖 2. a)，鉛之給予，略有使之濃度升高之趨向，並在部份實驗組有顯著增加($p < 0.01$)，顯示對肝腎功能有些許影響。血清尿素氮(BUN)偵測結果(圖 2. b) 發現鉛高濃度暴露組在 90 天實驗組有增加($p < 0.01$)，但在 180 天實驗組又較對照組低($p < 0.01$)，可能有腎功能受影響之徵兆。血清中鹼性磷酸酶(ALP)，在鉛化合物組(圖 2. c)則有先降後升之情況，但是無顯著差異。圖 2. d 及 2. e 為兩種氨基轉移酶天門冬酸胺基轉移酶 (AST)

及丙胺酸胺基轉移酶(ALT)在實驗組之變化。AST 在鉛投予之老鼠血清中多數皆有明顯之上升($p < 0.01$)，顯示肝功能略有受損。可能有細胞死亡或傷害。ALT 則亦有增加，在 90 天組之高低暴露組則是較明顯($p < 0.05$)。

表 3 為全血標準品在本實驗室之分析結果，數據顯示分析精確度皆在 90.0%至 100.9%間，驗證分析流程都在良好的控制條件下進行。在血清中鉛金屬濃度變化方面，可以由表 4 明顯地觀察到供給氯化鉛飲料組老鼠血清中鉛金屬濃度在 90 天及 180 天組之高、中濃度組皆有明顯增加($p < 0.01$ 或 0.05)但是數值差距不是很大，此外對照組的血清鉛含量有隨著飼養時間延長而增加。將鉛化合物組老鼠及對照組之器官均質液另行採樣，以 10 倍稀釋之比例加入稀釋液後，沿用血清中鉛元素之偵測條件，將均質液中鉛金屬含量予以定量，表 4 亦列出器官均質液中鉛元素之含量，多數實驗組其器官均質液中之鉛含量皆顯著高於對照組($p < 0.01$)，證明鉛已被動物吸收而貯存於器官內。

圖 3 為實驗動物血清中脂質過氧化物之濃度與對照組血清中濃度，鉛暴露組大致上在初期(90 天)在低濃度組及中濃度組有較明顯引發大量過氧化物產生($p < 0.01$ 或 0.05)，而在後期(180 天)時，中濃度組有較明顯之增加($p < 0.05$)，低濃度組反而較初期(90 天)低，而高濃度組雖較初期增加，但是無統計上之意義。由表 5 之數據變化顯示，氯化鉛在肝臟初期作用較緩，但在 180 天時，作用相當明顯，使脂質過氧化物濃度在各暴露組增加約近兩倍($p < 0.01$)。對腎臟而言鉛作用較不明顯，僅有在初期之高暴露組呈現有意義之增加($p < 0.01$)。

(三). 氯化鉛單一及與甲苯複合暴露對中國倉鼠肺臟 (V79) 細胞生物效應指標之影響

A、單一暴露毒性比較：

在進行細胞毒性試驗時，首先各別建立單一毒物對細胞半致死濃度(Median lethal concentration LC_{50})在 LC_{50} 濃度範圍內擇得最高濃度及最低濃度界限。氯化鉛($PbCl_2$)濃度 LC_{50} 為 $772\mu M$ ，在 $193\mu M$ 時稍具有細胞毒性影響(圖 8)，但在 $772\mu M$ 時則明顯有細胞毒性。在 Cell viability(CV %)及 The percent of Alamar blue metabolic activity in response(AMA %)中，圖表顯示細胞存活率明顯降低，與未暴露任何毒物之對照組比較有顯著性差異(t-test, $P < 0.05$)。氯化鉛 $772\mu M$ (圖片 2)在細胞型態上與對照組(圖片 1)比較時 V79 細胞明顯受抑制呈現圓球狀，與正常狀態具有紡錘狀貼壁、外圍具菱角曲線配上明顯光暈、有絲分裂時形成圓形狀截然不同⁽⁵⁸⁾。在氯化鉛 $1930\mu M$ 時 CV %降至 $1/3$ 且 AMA %亦降至 $1/2$ ，在 V79 細胞型態裏其外圍光暈變淡及型態改變(圖片 3)。而以 Trypane blue exclusion 來責成迴歸曲線， $Y = -0.05X + 1.2$ 相關係數 $r = 0.91$ 。依氯化鉛之劑量遞增與 CV %成負相關性。

甲苯(Toluene)方面，在 $1.92\mu M$ 與 $3.39\mu M$ 兩劑量間細胞毒性明顯增強；其細胞存活率 CV %與細胞代謝活性 AMA %中比未暴露對照組降低了約 $1/2 \sim 2/3$ 倍，以 CV %責成之迴歸曲線 $y = -0.11x + 1.1$ ，其相關係數 $r = 0.93$ ，依甲苯之劑量遞增與 CV%成負相關性(圖 9)，並與對照組比較有顯著性差異(t-test $P < 0.05$)，脂質過氧化產物(Thiobarbituric Acid Reactive Substance-TBARS)與甲苯劑量成反比現象(圖 9-1)。在甲苯 $17.1\mu M$ 時與對照組比較有顯著性差異($P < 0.001$)；細胞型態與對照組比較顯示胞膜已被破壞，胞內容物已有

改變且呈現垂死狀態(圖片 4)^(47, 62)。

亞硒酸鈉(Sodium selenite): 硒元素歸納為抗氧化元素⁽³⁴⁻³⁸⁾， LC_{50} 濃度在 21.25 μ M(圖 10，在低濃度亞硒酸鈉 4.25 μ M 時有助長 V79 細胞繁殖現象。隨劑量增加，細胞存活率依劑量而減少。亞硒酸鈉 12.75 μ M 以後之濃度與對照組比較具有顯著性差異(t-test $P < 0.05$)。其迴歸曲線 $y = -0.32x + 6.1$ 相關係數為 $r = 0.94$ 。亞硒酸鈉之劑量遞增與 CV % 成負相關性。

B. 毒物複合共同暴露毒性之比較：

氯化鉛與甲苯複合毒性之程度：

先前之各別建立單一毒物對 V79 細胞之 LC_{50} 劑量。另挑選對細胞致死率影響較輕微之甲苯次低劑量 1.92 μ M，V79 細胞之 CV % 約 80%，同時以不同濃度之氯化鉛劑量($PbCl_2$)加入 V79 細胞 1.2×10^5 cell/ml，結果呈現出甲苯亦可顯著加強影響各不同濃度氯化鉛($PbCl_2$)對細胞之毒性(圖 11、表 2)。氯化鉛($PbCl_2$) 在 1158 μ M 時其 CV % 為 76%，AMA % 為 73%(表 1，以獨立協同反應模式計算(Independent Joint Action module) $P(M) = P(A) + P(B) - P(AB)$ ⁽⁴⁹⁾； $P(M)$ 為預測細胞致死率之值， $O(M)$ 為實際細胞致死率之值， $P(A)$ 及 $P(B)$ 為氯化鉛、甲苯(1.9 μ M) 之實際細胞致死率之值；預測共同暴露複合氯化鉛與甲苯是否具加成毒性，反應狀態(Interaction) = $O(M) - P(M)$ ⁽⁹⁰⁾，如為正值(+) 則表氯化鉛與甲苯是具協同毒性，等於零時為加成毒性，若為負值(-) 則否⁽⁹⁰⁾。在表 2 中大部份為正值(+)，而氯化鉛 772 μ M 添加甲苯 1.92 μ M 在細胞型態(圖片 5)與對照組及氯化鉛 772 μ M(圖片 2)比較起來，除胞膜已明顯被傷害，型態已非典型紡垂狀，內含之空泡增加，光暈變小且暗淡。故我們推測氯化鉛與甲苯之複合毒性對

V79 細胞細胞其有加成性的傷害作用。

C. 硒必需元素拮抗效應：

比較亞硒酸鈉 4.25 μ M 及 8.50 μ M 對 CV % 影響程度：

發現低濃度硒元素具有助細胞抗氧化作用及活化了抗氧化細胞酵素如 GSH-PX、SOD 等之功能^(35, 38, 91)，選擇亞硒酸鈉 4.25 μ M、8.50 μ M 兩濃度(圖 10，取相同細胞代數、細胞數、時間及流程下，加入各種不同濃度之氯化鉛，結果呈現出氯化鉛加亞硒酸鈉 4.25 μ M 時比對照組細胞 CV % 增加 1.03 倍，在氯化鉛 386 μ M 增加 1.04 倍，但在氯化鉛 1544 μ M 卻降至 1/5，而氯化鉛加亞硒酸鈉 8.50 μ M 中與對照組細胞 CV % 比較明顯降了 2/3，故表 3 表示亞硒酸鈉 4.25 μ M 之拮抗效應較好。

亞硒酸鈉 4.5 μ M 拮抗氯化鉛及甲苯效應程度：

在亞硒酸鈉 4.25 μ M 時對 CV % 及 AMA % 效應較好(圖 10、表 3)。故在氯化鉛不同濃度裡加入固定甲苯 1.92 μ M 以期望 4.25 μ M 亞硒酸鈉能發揮拮抗效應，在氯化鉛 1158 μ M 以下每個劑量 CV % 及 AMA % 與(圖 11)比較大部份值均有提高的現象(圖 12、表 4)，超過氯化鉛 1158 μ M 濃度時已無法對受損細胞發揮有限之拮抗效應。

肆、討論

對工作或生活環境中的毒性物質加以監控，使之能維持在安全濃度以下，乃是維護健康之基本條件。但是，由於這些安全容許濃度皆是對大多數人不造成危害之考慮而設定，並未包括由於個體代謝能力之差異，整體暴露概況，生活習慣等不同所引發之雖然曝露於相同劑量卻可能導致之不同程度反應之狀況。因此，如何能更精確地評估個體對某些特定毒性物質的真實暴露量，或者藉此建立危害指標，防止傷害進一步地擴大，即為目前相當重要之課題。近年來，生物偵測 (Biological monitoring) 或生物效應偵測 (Biological effect monitoring) 技術，即在前述考量下，再輔以精密儀器不斷地開發，靈敏度不斷地提高下，而得以蓬勃發展。

研究針對環境鉛金屬暴露所可能引起之貧血及其引起的重金屬觸化反應 (Haber-Weiss reaction) 及過氧化趨動反應 (Fenton reaction): $\text{金屬}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{金屬}^{2+} + \text{O}_2$, $\text{金屬}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{金屬}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$ 產生自由基引發體內過氧化程度增加等生物效應，選擇包括血紅素，硒元素，過氧化歧化酶及鉛金屬濃度等相關效應指標來評估不同程度之鉛濃度暴露下，所引之變化效應^(1. 2. 3. 12. 19. 20. 21. 23)。

(一). 鉛暴露對勞工血液中生物效應指標影響

表二、表三列出偵測血鉛濃度之兩間實驗室分析品質測試結果，可以發現不論在分析技術或數據之可信度上都非常良好，而且數據結果亦有相當之一致性。顯示血鉛偵測技術在兩間研究室已有深厚基礎，QA/QC 系統亦達相當之水準。此外，本研究室亦定量工人血中血紅素(圖 2)，過氧化歧化酶(圖 3, 4)，脂質過氧化(圖 5)及硒元素(圖 6)濃度，並比較各組與血鉛濃度之關係。前人研究發現，鉛金屬已確認在血中紅血球方面會抑制體內血基質(Heme)的生合成，血球容積量，紅血球總量，增加血球被氧化量(提高葡萄糖-6-磷酸去氫酶及麩氨酸過氧化酶活性)造成容易貧血之現象^(1, 13, 20, 78, 92)。但由圖 2 發現，當血鉛高於 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 時，血紅素的濃度有高低間隔出現之傾向。這種現象可能與鉛金屬抑制血基質生合成，同時亦造成體內氧化程度增加，因而引發代償性反應有關，包括抗氧化機制、血基質合成機制等酵素系統之高度活化⁽²⁰⁾，致使血紅素濃度在體內代償機制回復修補能力高於鉛之破壞力時，即有顯著增加，隨後在血紅蛋白增加之回饋抑制下，體內代償機制活性局部或全部下降，而鉛金屬卻在體內逐漸累積，毒性亦逐漸增加，因而導致血紅素合成又受抑制，濃度下降。這些推論，尚待更多的實驗數據予以釐清。

至於和體內氧化反應有關性的過氧化歧化酶，硫代巴比妥反應複合物(TBARS)及硒元素等指標在血鉛濃度 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 以上時，即開始有所變化(圖 2-6)。顯示即使工人暴露在少量鉛濃度環境中，其血鉛濃度僅僅略高於一般人之正常範圍 9 $\mu\text{g}/\text{dL}$ -15 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ^(23, 76)，但工人體內之氧化緊迫(Oxidative stress)卻已有增加的現象。尤其是過

氧化歧化酶的明顯跳升(圖 4, 血鉛 $20\mu\text{g}/\text{dL}$ - $30\mu\text{g}/\text{dL}$)^(2, 12, 19, 79, 81), 是否表示過氧化歧化酶對血鉛濃度變化的敏感範圍在鉛 $20\mu\text{g}/\text{dL}$ - $30\mu\text{g}/\text{dL}$, 尚待進一步實驗驗證。但已知暴露鉛金屬環境會有明顯影響些酵素, 如葡萄糖-6-磷酸去氫酶(G-6-PD)及麩氨酸過氧化酶(GSH-PX), 過氧化歧化酶(SOD), 過氧化氫酶(Catalase)等⁽⁹³⁾和作者實驗數據(圖四)所顯示之符合, 血鉛濃度高於 $30\mu\text{g}/\text{dL}$, 即有使過氧化歧化酶活性低於正常範圍 $1800\text{ Unit}/\text{g Hemoglobin}$ ^(13, 80)的表現。因此, 過氧化歧化酶的活性應可成為評估鉛金屬之生物效應指標之一。

曾有報告指出^(2, 12, 13, 23)脂質過氧化程度在高濃度血鉛工人有明顯正相關之趨勢, 在本篇文章之圖 5 顯示, 當血鉛高於 $20\mu\text{g}/\text{dL}$ 時, 脂質過氧化產物(TBARS)即略有上升之變化但無顯著差異, 或許所偵測血球中 TBARS 僅是脂質過氧化產物之一, 無法真確反應出脂質過氧化程度, 須待進一步探討其含量百分比。隨著血鉛濃度增加, 工人體內之氧化緊迫程度亦隨之升高, 發現硒元素在工人血液樣品中, 隨著血鉛濃度變化而有高低起伏之趨勢。尤其在血鉛濃度開始增加時, 硒元素濃度下降, 在血鉛濃度大於 $40\mu\text{g}/\text{dL}$ 時, 則開始增加, 其原因仍需再進一步探討鉛與硒之間關係。有論文⁽⁹⁵⁾指出在動物飲食中同時添加低濃度的硒元素 (0.15 - 0.50 PPM), 可明顯降低鉛毒性所引發之尿中 δ -氨基酮戊酸之排泄量⁽⁹⁵⁾, 或緩和因飲食中加入鉛 ($20\text{ mg}/\text{kg diet}$)所抑制之腦內琥珀酸去氫酶、乙醯膽鹼酶及 $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ ATPase}$ 之活性⁽⁹⁴⁾。但若添加硒濃度較高(1 PPM)或遲緩 15 天供給, 則會使鉛毒性效應更為加強⁽⁹⁴⁻⁹⁵⁾。此外供給高濃度硒元素會對動物產生毒害效應, 若同時給予低濃度之鉛元素, 則反而會有拮抗的保護作用^(34, 95)。而同時給予較高濃度的鉛與硒元素, 在雞肝臟內有明顯增加紫質含量, 顯示毒性更趨嚴重⁽⁹⁶⁾。至於人體血中鉛與硒元素濃度間相互關係, 有報

告⁽⁹⁷⁾記錄在正常的血中硒元素含量(Se 163.6 ug/L±71.5 ug/L)之族群中，鉛(Pb< 82.6 ug/L±12.4 ug/L)與硒有負相關之關係(r= -0.32 P<0.05)。以上結果顯示硒在人體內之吸收、排泄及代謝與鉛金屬有著相當密切之關係，值得作更進一步來研究在高濃度的鉛暴露工人族群中，硒元素所扮演的角色。然而作者更進一步發現血紅素、過氧化歧化酶活性、硒元素濃度、脂質過氧化產物濃度數值分佈關係時發現當血鉛濃度介 50 ug/dL ~ 60 ug/dL 時，四項指標有著規律之變化，亦即當過氧化歧化酶活性升高時，血紅素及硒元素濃度亦升高^(14.19.21.96.98-99)，而脂質過氧化程度則下降^(2.13.14.23)。是否代表當血鉛濃度超過 50 ug/dl 時，體內代謝系統不同之反應機制，以因應高濃度鉛所帶來之負面影響，則尚待更多研究數據來驗證之。

(二). 氯化鉛對 Wistar 雄鼠生物效應指標之影響

本研究選取多項有關金屬毒性的參考指標包括血清之生化值變化，體重增加之情形，血清中的鉛金屬含量，血清或組織均質液中脂質過氧化物之變化，以建立鉛金屬化合物毒性暴露之相關指標，俾提供生物檢測之參考。

表 1 列出本研究所用動物之飲水中添加氯化鉛之濃度，同時記錄各組老鼠在實驗期間之飲水情形，數據顯示，不論有無添加氯化鉛之飲水，幾乎在每 3 天的飲用期內皆無太多剩餘。由各組實驗在飼養期間實驗組之體重與對照組之比值變化曲線圖(圖 1. a, b) 中，發現各組老鼠之體重變化比無明顯改變(P > 0.05, t-test)。總體而言鉛化合物之給予，並未造成老鼠體重增加速率的顯著影響。圖 2 為老鼠的血清之生化值與對照組老鼠生化值之平均值長條圖，圖形顯示大部份

之生化值變化並不是很顯著，應與給予之劑量皆不高所致，此低濃度而長時間之暴露，亦較符合多數之金屬毒物的危害模式——長時間累積而形成健康之慢性損害。在各項生化值偵測結果中，血清白蛋白(ALB)的濃度變化(圖 2. a)，鉛之給予，略有使之濃度升高之趨向，並在部份實驗組有顯著增加($p < 0.01$)，顯示對肝腎功能有些許影響。血清尿素氮(BUN)偵測結果(圖 2. b) 發現鉛高濃度暴露組在 90 天實驗組有增加($p < 0.01$)，但在 180 天實驗組又較對照組低($p < 0.01$)，可能有腎功能受影響之徵兆。血清中鹼性磷酸酶(ALP)，在鉛化合物組(圖 2. c)則有先降後升之情況，但是無顯著差異，是否對甲狀腺機能或肝腎功能有影響，則尚待進一步證明。圖 2. d 及 2. e 為兩種氨基轉移酶 AST(天門冬酸胺基轉移酶)及 ALT(丙胺酸胺基轉移酶)在實驗組之變化。AST 在鉛投予之老鼠血清中多數皆有明顯之上升($p < 0.01$)，顯示肝功能略有受損，可能有細胞死亡或傷害。ALT 則亦有增加，在 90 天組之高低暴露組則是較明顯($p < 0.05$)，表示肝臟有受到金屬投予之影響⁽¹⁰⁰⁾。歸結前述生化值之變化而言，經由氯化鉛長期低劑量之給予，對實驗動物之肝、腎功能略有影響，使其部份生化值略有升降。但就體重及生化值的數據比較來說，本研究在氯化鉛投予過程中，對老鼠的健康尚不足以構成立即而重大傷害，可協助作者進一步探討鉛暴露之低限劑量及其毒性效應。

表 3 為全血標準品在本實驗室之分析結果，數據顯示分析精確度皆在 90.0%至 100.9%間，驗證分析流程都在良好的控制條件下進行。在血清中鉛金屬濃度變化方面，可以由表 4 明顯地觀察到供給氯化鉛飲料組老鼠血清中鉛金屬濃度在 90 天及 180 天組之高、中濃度組皆有明顯增加($P < 0.01$ 或 0.05)但是數值差距不是很大，此外對照組的血清鉛含量有隨著飼養時間延長而增加，顯示在飼養環境中包括

飼料、墊料、及空氣等，亦含有少量之鉛化合物，被老鼠吸收後貯存於體內。將鉛化合物組老鼠及對照組之器官均質液另行採樣，以 10 倍稀釋之比例加入稀釋液後，沿用血清中鉛元素之偵測條件，將均質液中鉛金屬含量予以定量，表 4 亦列出器官均質液中鉛元素之含量，多數實驗組其器官均質液中之鉛含量皆顯著高於對照組($P < 0.01$)，證明鉛已被動物吸收而貯存於器官內。而血清中鉛元素濃度之所以無法有效地代表金屬暴露量，主要原因除了鉛容易地沉積於骨骼、器官等組織外，在血中的含量亦以在紅血球中分佈佔絕大部份，約 90% ~ 95% 左右⁽¹⁰¹⁾。

為了能建立金屬毒性之早期生物指標或生物效應指標，研究人員初步選擇了脂質過氧化產物為研究目標。由於過渡金屬離子具有相當強之氧化還原活性，同時也是自由基(Free radicals)之可能來源⁽¹⁰²⁾，如銅、鉬、鈷、鎳、鉛、鉻、鎘、鐵等過渡金屬，其中以鐵為最重要之引發自由基連鎖反應之來源。而其它金屬，如鉛金屬濃度與鉛作業工人血中脂質過氧化產物有一定的相關性⁽³²⁾，六價鉻金屬離子本身的強氧化力⁽¹⁰³⁾，Sandhir 和 Gill⁽²⁵⁾則是將老鼠以胃管餵食醋酸鉛 50mg/Kg. Bw 八週後，發現鉛大量地累積在肝臟，同時也造成肝臟中脂質過氧化物顯著增加。因此脂質過氧化產物應該可以評估由金屬離子本身氧化還原所造成多元不飽和脂肪酸之過氧化現象或由金屬離子所引發之自由基連鎖反應所產生之過氧化產物。圖 3 為實驗動物血清中脂質過氧化物之濃度與對照組血清中濃度，說明脂質過氧化物是鉛慢性低劑量暴露所能引發之參考指標之一。就氯化鉛與血清中脂質過氧化物濃度變化情形來探討，鉛暴露組大致上在初期(90 天)在低濃度組及中濃度組有較明顯引發大量過氧化物產生($P < 0.01$ 或 0.05)，而在後期(180 天)時，中濃度組有較明顯之增加($P < 0.05$)，

低濃度組反而較初期(90天)低，而高濃度組雖較初期增加，但是無統計上之意義。表5則是實驗動物肝、腎器官之均質液所測得之脂質過氧化產物濃度與對照組之比值。同時，為了更精確校正因均質程度或取樣之差異而造成誤差，所有數據皆以該均質液之總蛋白質濃度⁽⁸⁵⁻⁸⁶⁾予以調整後應用。由表5之數據變化顯示，氯化鉛在肝臟初期作用較緩，但在180天時，作用相當明顯，使脂質過氧化物濃度在各暴露組增加約近兩倍($p < 0.01$)。對腎臟而言鉛作用較不明顯，僅有在初期之高暴露組呈現有意義之增加($p < 0.01$)。

綜合鉛暴露在實驗動物血清或器官均質液中對脂質過氧化物濃度變化之影響，可以發現鉛雖然可以引發體內之脂質過氧化物增加，但是劑量、暴露時間與毒性效應之間，並無絕對之相關性。進一步探討其原因包括(a)本研究所用之鉛金屬暴露劑量低於參考文獻所用之暴露劑量^(25, 28-30)，目的雖在探討低濃度鉛暴露之生物效應指標，卻可能使個體差異對實驗之影響比重增加。(b)飲食或飲水中不同之鉛金屬化合物濃度，在腸道之吸收效率亦不同，而其影響因子包括腸道酵素活性、其他微量元素如鋅、硒、銅等之濃度，和蛋白質之結合能力等⁽³⁰⁾。(c)長期體內之累積量與個體之實際暴露量(吸收量)，代謝效率，排泄能力等皆有關係^(24-25, 30)。(d)許多微量元素如硒、鋅、銅、錳等，皆是動物體內的抗氧化機制正常運作所必需，而不同濃度鉛之存在則會與這些元素產生程度不同之交互作用，影響彼此的消化吸收進而可能造成抗氧化機制之平衡^(25, 30)。(e)不同的個體或器官在受到外界毒性物質之傷害時，皆會啟動修補功能之反應。尤其是長期而且低濃度之暴露條件下，此修補功能之優劣與反應強弱亦會影響毒性效應之結果。

本研究經由動物實驗驗證，長期低毒性濃度的鉛金屬化合物暴

露，對體內肝腎功能略有影響。同時，在脂質過氧化方面，雖然並無法歸納出暴露劑量、暴露時間與毒性效應間絕對之相關性，但因鉛金屬化合物本身之氧化力或其引發之自由基連鎖反應而有增加之趨勢。在後續研究中，作者將與本院體檢單位合作，繼續收集金屬從業人員之體液樣品，除了探討對脂質過氧化產物之影響，並進一步觀察和體內抗氧化機制如過氧化歧化酶(SOD)，必需微量元素如硒、鋅等之相關性。

(三). 氯化鉛單一及與甲苯複合暴露對中國倉鼠肺臟 (V79) 細胞生物效應指標之影響

人類生活水平的提昇與工業發展有著密切的互動關係，然而在多方得以憑評估下仍有著防範不周的負面影響。在近年職業安全衛生已由早期作業環境測定推展到生物效應檢測之領域，⁽¹⁰⁴⁾並由單一毒物偵測延展至複合毒物測定。

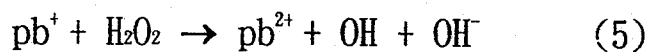
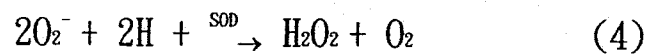
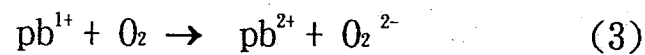
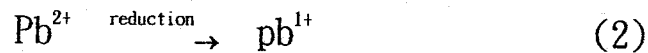
本篇研究是模擬作業工廠之勞工，共同暴露於鉛金屬、甲苯有機溶劑⁽³⁶⁻³⁸⁾之環境下。況且鉛與鎘、銅、鐵等同為過渡金屬元素，在物性及化性相似之考量^(17, 22, 61)應用了Ikeda等人(1989)⁽¹⁰⁵⁾設計研究之模式，進行該篇實驗，來證明鉛金屬、甲苯，各以單獨暴露及共同暴露交互作用後，產生之結合複合物、新產物或殘餘物對V79細胞暴露是否會對細胞毒性造成加成或抑制。另再添加硒元素⁽³⁶⁻³⁸⁾對細胞存活率之影響來瞭解是否會拮抗氯化鉛及甲苯之毒性。

鉛及甲苯用途最為廣泛，常見在日常生活用品及工廠中如塗料、油漆、燃料油、印刷等工業製程，而硒元素則散佈於四周土壤、水、空氣、食物(如穀類)⁽⁹⁴⁾等。低劑量亞硒酸鈉，對細胞具有活化及抗

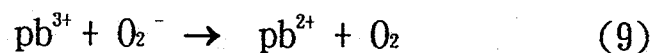
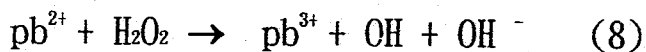
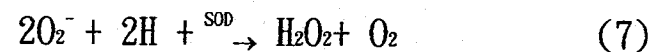
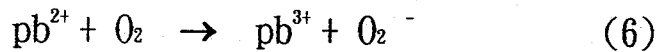
氧作用，^(66-72, 94) 本研究中亞硒酸鈉 12.75 μ M 以上濃度卻對細胞存活及代謝活性有抑制影響(圖 10、表 3)。

鉛金屬毒性機制並非直接傷害細胞，而是鉛在生物效應中，和氧化歧化酶(SOD)與脂質過氧化產物(LPO)指標反應，因此推測有超氧化自由基($O_2^{\cdot-}$)與過氧化氫(H_2O_2)參與，且鉛離子也與鐵、銅等過渡金屬一般，以催化劑之角色參與 Fenton reaction 而產生大量 ROS

^(17, 22, 85, 111) 以下為催化反應式⁽¹⁰⁶⁾。



或



氧化歧化酶(SOD)在(4)及(7)反應式中促使得 H_2O_2 的增加，卻因鉛離子之因素，加速(5)及(8)之反應，使 OH^{\cdot} 自由基增多，阻礙了觸酶(Catalase)將 H_2O_2 分解成 H_2O 及 O_2 ，進而讓 OH^{\cdot} 自由基攻擊細胞，破壞胞膜⁽³⁸⁻³⁹⁾。

鉛離子可誘發 L-glutamate 的增加，而再度產生含氧自由基，造成氧化緊迫(oxidative stress)且耗盡胞內穀胱甘肽氨基酸 Glutathione (GSH) 及胞膜內之硫氫基群(Sulfhydryl group-SH)，使得增加脂質過氧化程度，並抑制了環狀腺核甘單磷酸酶每

(Cyclic Adenylate cyclase CAMPase)的功能⁽¹⁰⁷⁾。使之在人類神經細胞上或其他細胞導致細胞毒害作用，CV %及AMA %隨氯化鉛劑量成反比(圖 7)，在低劑量氯化鉛 193uM、386uM 之短期暴露，細胞存活率(CV %)及細胞代謝活性反應(AMA %)率並不隨劑量增加而成比例之影響。可能原因如水溶性氯化鉛(PbCl₂)複合物進入細胞較慢，且加入 MEM 培養液時形成非水溶性磷酸鉛沉澱物，消滅了鉛毒性⁽⁸⁷⁾。還有可能是活化 PKC 及胞內酵素功能，使之存活率提高，但也有可能為細胞受低劑量毒性，本身調節代償作用以維持細胞生理功能或是自然凋零(Apoptosis)之前兆⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾。

在 Lin(1994)研究中指出^(40,87)氯化鉛(PbCl₂)可延遲細胞分裂使之停留在 G2 期，且不僅影響體內 DNA 合成，也會抑制 DNA、RNA 及蛋白質合成。在 Nirual 和 Andrea^(40,87,109)證實，氯化鉛並無直接激發基因突變的毒性，但在配合 UVC 的作用具有基因輔助突變的能力，加強了鏈鏈斷裂程度；並抑制了各種聚合酶(Polymerase)或連接酶(Ligase)的修補功能。

在 CarLp 等(1989)⁽⁶²⁾文獻中指出甲苯在 *in vitro* 實驗中，雖列為低毒性之有機溶劑但在 >1000ppm 大量暴露時仍造成神經細胞不可逆傷害。在神經細胞方面在突觸接合體上會將磷脂醯乙醇胺(phosphatidylethanolamine-PE) 甲基化成磷脂醯膽鹼(phosphatidyl choline)，破壞膜上脂質雙層，並接在膜嵌入蛋白質之斥水端，使之受損，另在其他種類細胞會抑制，多種膜上酵素，如磷脂質 N-甲基轉移酶(Phospholipid N-methyl transferase)及會改變生理功能，如通透性、胞膜變形，但它對基因極少致突變性^(41-43, 51, 110)。細胞存活率及細胞代謝活率和脂質過氧化產物(Thiobarbituric Acid Reactive Substance-TBARS) 與甲苯劑量成

反比現象(圖 9, 9-1)。本研究以 3.39 μ M 以後劑量最為明顯，使胞內之粒線體增加，空泡增加⁽¹¹¹⁾。甲苯難溶解水溶液中，故步驟中需先加入甲苯再添入 1.2 $\times 10^5$ cells/mL 細胞培養液，使 V79 細胞能充分接觸到甲苯，此方式是否會影響細胞存活率，需要求得進一步資料來討論。

共同暴露對生物體之影響在於暴露物質之物性及化性，在 MEM 培養液中添加約 17.3ng/l 亞硒酸鈉來增進細胞存活率⁽⁹⁰⁾，而 Fico(1986)及 David(1988)等人實驗中證明 0.1 μ g/mL~0.75 μ g/mL 低濃度亞硒酸鈉有此現象(圖 10、表 3)，但 10 PPM 以上高濃度卻具抑制效應⁽³⁴⁻³⁸⁾。文獻亦指出高濃度亞硒酸鈉之添加會加強氯化鉛在 Broiler chickens 上的毒性，使之貧血更嚴重⁽³⁴⁾。在另 Ganther(1992)等人研究中指出在低濃度約 80ppm 添加砷濃度約 5ppm 對腫瘤細胞有顯著抑制作用，而在高濃度亞硒酸鈉約 0.5~1mg Se/kg 添加入高劑量砷(As) 0.5~2mg As/kg 時，卻有急性之複合毒性產生⁽³⁶⁻³⁷⁾。而在 Charkabortyw (1987)等人也指出低劑量之亞硒酸鈉會拮抗醋酸氯化鉛以防染色體受損⁽³⁸⁾，可活化依硒性麩氨酸(Depend-Se Glutathione)增加其濃度，使之成為類似氯化鉛之螯合劑來拮抗之⁽³⁸⁾。故本篇依 David(1988)試驗中⁽⁵⁹⁾挑選 4.25 μ M 低濃度亞硒酸鈉來拮抗不同濃度氯化鉛在 CV% 有似乎有拮抗成效，因而增加了 CV% 值。

在氯化鉛與甲苯方面，鉛金屬元素為慢性毒物金屬，而甲苯也為低毒性有機溶劑。本研究挑選低劑量之甲苯添加入不同濃度氯化鉛，表 I 中在氯化鉛 1158 μ M 劑量，單一氯化鉛與氯化鉛加甲苯相較之下，則具有複合加成毒性。就如低毒性溶劑中苯乙烯(Styrene)及甲苯(Toluene)在以低劑量共同暴露時比單一暴露在尿中更容易出現 r-麩胺基胜轉移百每(Gamma-glutamyl transpeptidase)，葡萄糖

(Glucose)及蛋白質尿(proteinurea)升高現象，且馬尿酸濃度也增加⁽¹¹²⁾。以 1.91 μ M 甲苯液加到不同氯化鉛濃度時，在此亞硒酸鈉 4.25 μ M，在氯化鉛 193 μ M~1158 μ M 仍發揮了抗氧拮抗作用，與氯化鉛加甲苯組比較仍有較高存活率，但在氯化鉛 1544 μ M 以後之劑量可能因氯化鉛濃度之劑量已超過耐受劑量破壞細胞內核酸及酵素功能，使得亞硒酸鈉 4.25 μ M 低劑量無法發揮拮抗效用^(40,87) (表 4)。

Trypan blue 試驗與 Alamar blue 代謝活性反應試驗，兩者可相互印證，在圖 7 至圖 12 結果近乎一致，唯要考量細胞代數，試驗一致性及種植細胞均勻度^(68-70,91)。

氯化鉛劑量越高與其 V79 細胞之細胞存活率(CV %)及細胞代謝活性反應(AMA %)率成反比關係，表示對細胞具傷害性，並與甲苯共同暴露複合時，使用獨立協同反應模式計算(IJA)⁽⁸⁹⁾，可知氯化鉛、甲苯共同暴露複合具加成性毒性，影響細胞正常功能；添加低劑量亞硒酸鈉 4.5 μ M 具拮抗鉛、甲苯共同暴露複合之加成性毒性效應，但高劑量亞硒酸鈉則有傷害性；欲進一步了解鉛離子對細胞直接傷害之機轉，則須作進一層的研究加以確認。

伍、參考文獻

1. 劉宗榮. 康照洲. 郭明良. 翁祖輝(民. 85). 基礎毒理學(第一版 338-357). 台北市: 藝軒出版社。
2. Stohos, S. J., and Bacchi, D., (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, **18**. (1102), 321-336。
3. Goyer, Ra. (1986) Toxic effect of metal (598-605). IN. Doull, J., Kloassen, C. D., Amdur, M., (eds). *Casarett and Doull Toxicology*. 3rd, ed. New York, Macmillian.
4. Nirmal, k. Roy., and Rossman, G. Toby., (1992) Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutation research*, **298**, 97-103。
5. Degawa, M., and Arai, H., (1994) Ionic lead, a unique metal ions as an inhibitor for cytochrome P450IA₂(CYP1A₂) expression in the rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, **200**, 1086-1092.
6. Long, G. J., Rosen, J. F., and Schanne, F. A., (1994) Lead activation of protein kinase C from rat brain. *J. Bio. Chem*, **269**, 834-837.
7. Finell, V. N., Clauder, D. S., Karaffa, M. A., and Petering, H. G., (1975) Interaction of Zinc and lead on diaminolevulinic acid dehydrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **65**, 303-308.
8. MarKovac, J., and Goldstein, G. W., (1988) Picomolar

- concentration of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature*, **334**, 71-73.
9. Hartwing, S.R., and Beyersmann, D., (1990) Indirect mechanism of lead induced genotoxicity in culture mammalian cells. *Mutation Res*, **241**, 75-82.
 10. Andrew, C.T., and James, G.W., (1996) Unraveling the Chronic toxicity of lead :An Essential priority for Environmental Health. *Environmental Health perspectives*, **1104** supplement, 141-146.
 11. Thomas, W.C., Lars, F., and Polly, R.S., (1988) Biological Monitoring of exposure to Inorganic lead(170-197) . In Gunnar, F.N., (eds). *Biological Monitoring of Toxic Metals*. New York, Plenum Press.
 12. Wasserman, G., Grazian. J.H., (1992) Independent effects of lead exposure and iron deficiency anemia on development outcome at age 2 years. *Journal of Pediatrics*, 695-703.
 13. Christie, A., Knudsen, A., and Tappel, L.L., (1996) Multiple Antioxidants protect against Heme protein and Lipid oxidation in kidney tissue . *Free Radical Biology & Medicine*, **120(2)**, 165-173.
 14. Scandhir, R., and Gillk, D., (1995) Effect of lead on lipid peroxidation in liver rats. *Biological trace element*

research ,48 (1), 91-97.

15. Harris, M.L., Schiller, H.J., Reilly, P.M., Donowitz, M., and Grisham, M., (1992) Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease Consequence or epiphenomenon .Pharmac Ther, 53, 375-408.
16. Frankel, k. (1992) Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. Pharmac Ther, 53, 127-166.
17. Imlay, J. A., And Iinn, N., (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240, 1302-1309.
18. Skoczynska, A., and Smolik, R., (1993) Lipid abnormalities in rates given small dose of lead .Archives of Toxicology, 67(3), 200- 204.
19. Carine, M., and Maroine, R., (1994) Importance of Se-Glutathione per oxidase, Catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against Oxidative Stress .Free Radical Biology & Medicine, 17(3), 249-258.
20. Bary, H., And John, M., and Gutteridge, C., (1996) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. Methods in Enzymology, 186, 1-85.
21. Sunderman F.W. Ir(1986) Acta Pharmacol Toxicol, 59(Suppl7), 248-255.

22. Imlay, J. A., Chin, S. M., and Linn, S., (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and vitro. *Science*, **240**, 640-642.
23. Lageesson, V., and Andrasko, L., (1975) Direct determination of Pb and Cd in whole blood and urine by Flameless AAS. *Clin Chem*, **25**, 19-48.
24. 林德賢, (民. 83)" 職業性錳暴露之生物偵測方法研究", 行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所, 1-215。
25. Sandhir R., and Gill K. D. (1995) *Biol. Trace. Ele. Resear*, **48**, 91-97.
26. Plaa G. L., and Witschi H. (1976) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **16**, 125-141.
27. Baghurst, P. A., McMichael, A. J., and Wig, N. R., (1992) *N. Engl. J. Med.*, **327**, 1279-1286.
28. Dhirh, Roy A. K., and Sharma, A., (1990) *Mutation Research*, **242** (3), 305-312.
29. Bell, C. E., Baldwin, L. A., and Kosteci, P. T., (1993) *Ecotoxicology Environmental Safety*, **26**(3), 280-284.
30. Friberg, L. Nordberg, G. F. and Voule, V. B. (1986) Lead. In: *Handbook on The Toxicology of Metals. Vol II. ELSEIVIER.*
31. Sunderman F. W. Ir. (1986) *Acta Pharmacol Toxicol*, **59**(Suppl7), 248-

32. Lin, S. J. Lin T. H. (1994) *Acta Environ Health.*, **49(4)**, 256-259.
33. Skoczyuska, A., and Smolik, R., (1994) The effect of combined exposure to lead and cadmium on serum Lipids and Lipid peroxides levels in rats. *International Journal of Occupational Medicine & Environmental Health*, **7(3)**, 263-71, .
34. Khan, M. Z., and Szarek, J., Krasnodebska, D., and Koncicki, A., (1993) Effects of concurrent administration & lead and Selenium on Some hematological and biochemical parameters of broiler chickens. *Acta Veterinary Hungarica*, **11(1-2)**, 123-37, .
35. He, R., and Bao, K. G. , (1994) Effects of Selenium and DTPA on cadmium excretion in rats. *Chinese Journal of preventive Medicine*, **8(2)**, 97-99.
36. ZP, C., and Ganther, H., (1996) Biological activities of trimethyl Selenonium as influenced by arsenate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **46(3)**, 215-22.
37. ZP, C., and Ganther, H., (1990) Activity of methylated forms of Selenium in lanai prevention. *Cancer Research* , **50(4)**, 1206-1211.
38. Chakraborty. I., Sharma. A., and Talukder. G. , (1987) Antagonistic and synergistic effects of lead and Selenium in *Raffus norvegicus*. *Toxicology letters*, **37(1)**, 21-6.

39. Eclikoff, J. T., Ci, J. H., and Hartwig, A., (1988) Genetic Toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis*, **9**(10), 1727-1732.
40. Virmal, K. R., and Rossman, T. G., (1992) Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutation Research*, **298**, 97-113.
41. Cohr, K. H., and Stokholm, J., (1979) A toxicological Review Scand. J. Work. *Environ. Health*, **5**, 71-90.
42. Elofsson, S. A., Gamberale, F., Hindmarsh T., Iregeren A., and Isaksson, I. K., (1980) Exposure to organic solvents Scand. J. Work Environ Health, **6**, 239-273.
43. Snyder, R., (1987) 1.2 Toluene (39-63). Snyder, R., eds. *Ethel Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents*. New York. Elsevier Publishers B. V.
44. Cara, J. M., James, D. A., Dams, J. R., and Stephen, C. B., (1993) Free Radical Induction in the Brain and liver products of Toluene Catabolism. *Biochemical pharmacology*, **46**(1), 103-110.
45. Cara, J. M., Carlp, L., and Stephen, C. Bondy., (1991) Effects of Toluene and its Metabolites on Cerebral Reactive Oxygen Species Generation. *Biochemical pharmacology*, **42** (4), 879-882.
46. Moni, K. M., Kiefer, P. F., and Wiebel, F. J., (1994) Toxicity of monocyclic and polycyclic nitroaromatic compounds in a panel of mammalian test cell lines. *Toxicology letters*, **72**, 53-57.

47. Euler, G. K. F., and Bondy, S. C., (1990) Ganglioside GM Prevents and reverses toluene-induced increases in membrane fluidity and calcium levels in rat brain synaptosomes. *Brain Research*, **508**, 210-214.
48. Cheng, K. C., and Schenkman, J. B., (1983) Purification and Characterization of two constitutive forms of Rats liver Microsomal Cytochromes P450. *J. Biol. Chem*, **257**, 378-2385.
49. Black, S. D., and Coon, M. J. (1987) P450 Cytochromes structure and function. *Adv. Enzymal. Results. Areas. Mol. Biol*, **60**, 35-87.
50. White, R. E., (1986) Active Site Mechanisms of Liver- microsomal Cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys*, **246**, 19-32.
51. Carlsson. A., (1982) Exposure to Toluene uptake, Distribute Ion and Elimination in Man, *J. Work Environs. Health*, **8**, 43 -55.
52. Fox, J. M., and Mth, F., (1992) *Clin. Pharmacol*, **14**, 275-283.
53. Heinz, G. H., Pendleton, G. W., and Krynitsky, A. S., (1996) *Arch Environ. Contam. Toxicol*, **19**, 374.
54. Gerald, F., Combs, J. R., and Stehaine, B. C., (1986) The Role of Selenium(1-13). Academic press London.
55. Mi, E. F., Poirier, K. A., and Watrach, A. M., (1986) Differential effects of Selenium on Normal and Neoplastic Canine Mammary

- cells. *Cancer Research*, **46**, 3384-3388.
56. Matthew, J. K., and John, A. M., (1992) Influence of Intracellular Glutathione on Selenite mediated Growth Inhibition of Canine Mammary tumor cells. *Cancer Research*, **52**, 1091-1095.
57. Kuchan, M. J., and Milner, J. A., (1991) Influence of Supplemental glutathione on selenite mediated growth inhibition of Canine mammary cells. *Cancer Letters*, **57**, 181-186.
58. Matthew, J. K., Maxine, F. S., and John, A. M., (1990) Consequences of Selenite Supplementation on the growth and metabolism of cultures of Canine mammary cells. *J. Nutr. Biochem*, **1**, 478-483.
59. David, G. M., and Robert, C. B., (1988) Selenium Distribution in Mammary Epithelial cells Reveals its possible Mechanism of Inhibition of cell Growth. *Anticancer Research*, **8**, 51-64.
60. Rybak, L. P. (1992) Healing :the Effects of Chemicals *otolaryngology-Head & Neck Surgery*. **106(6)**, 667-86.
61. Schaich, K. M., (1992) Metals and lipid oxidation. contemporary issue . *lipid*, **27(3)**, 209-218.
62. Carl, P. L., and Robert, A. S., (1989) Effect of Toluene on Pat Synaptosomal Phospholipid Methylation and Membrane Fluidity. *Biochemical pharmacology*, **3-8(22)**, 4005-4011.

63. Gvon, E., Fuxe, K., and Bondy, S.C. (1990) Ganglioside GM₁ Prevents and reverse Toluene-induced increases in membrane fluidity and calcium levels in rat brain synaptosomes. *Brain Research*, **508**, 210-214.
64. Suleiman, A. S., (1987) Petroleum hydrocarbon toxicity in vitro effect of n-alkanes benzene and Toluene on pulmonary alveolar macrophages. *Arch Toxically*, **59**, 402-407.
65. Bell, R.R. and Magdi, M.R., and Vanik, I. S., (1997) Selenium and Cadmium Induced Pulmonary Functional Impairment and Cytotoxicity. *Toxicology Letters*, **90**, 107-104.
66. Rana, S.V.S., and Seeams, Verma. (1996) Protective effects of GSH, Vitamin E and Selenium on lipid peroxidation in Cadmium fed rats. *Biological Trace Element Research*, **51**, 161-168.
67. Nehru, B., and Iyer, A., (1994) Effect of selenium on lead - induced neurotoxicity in different brain region of adult rats. *Journal of environment pathology. Toxicology & oncology*, **13(4)**, 256-8.
68. Elias, E., Poirot, O., and Schneider, O., (1986) Cellular Uptake, Cytotoxic and Mutagenic Effects of Insoluble Chromic Oxide. In V79 Chinese hamster Cells. *Mutation Research*, **16**, 159-170.
69. Fusco, J.C., Ockey, C.H., and Margaret F., (1986) Molecular analysis of x-ray induced mutants at the HPRT locus in V79

- Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biolo*, **49**(6), 1011-1020.
70. Yukiaki Kuroda. (1996) Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in culture Chinese hamster V79 cell lines. *mutation Research*, **361**. 179-186.
71. Squatrito, P.C., Connor, J.P., and Buller, R.E., (1995) Comparison of a Novel Redox Dye Cell Growth Assay to the ATP. Bioluminescence Assay. *Gynecologic oncology*. **58**(1), 101-105.
72. Barry, L. T., and Soper, B.D., (1995) Ca²⁺-mediated damage to rabbit gastric mucosal cells: modulation by nitric oxide. *European Journal of pharmacology Environmental Toxicology and pharmacology Section*, **293**, 259-266.
73. Pleban, P. A., and K. H. (1979) Person determination of pb in whole blood and urine Zeeman Effect Flameless AAD. *Clin Chem lett*, 935-945.
74. Stoeplere, M., (1978) Automated Blood Lead Determination by Electrothermal AAS. *Clin Chem Clin Biochem*, 1658-1664.
75. 李瑤玲 劉嘉斌 (民 82)鉛蓄電池工場作業員血中鉛濃度與血液常規檢查之關係. 公共衛生季刊, In Press.
76. Skoczynska, A., and Smolik, R., (1994) The effect of combined exposure to lead and cadmium on serum lipid and lipid peroxide level in rats. *International Journal of occupational medicine & environmental health*, **7**(3), 263-271.

77. Solliway, B.M., Schaffer, A., (1996) Effects of exposure to lead on selected biochemical and hematological variables. *Pharmacology & Toxicology*, 78(1), 18-22.
78. Irene, C.P., and Trivier, J.Marc., (1992): Age-correlated modification of Copper-Zinc superoxide dismutase and Glutathione Related enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*, 38(1), 66-70.
79. Xu, B., and Chia, Se., (1993) Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reproductive Toxicology*, 7(6), 613-8.
80. Brooke, T., and Mossman, P. S., (1996) Transfection of a manganese-containing superoxide dismutase gene into hamster tracheal epithelial cells ameliorates asbestos-mediated cytotoxicity. *Free radical biology & medicine*, 21 (2), 125-131.
81. Khan, M.Z., and Szarek, J., (1994) Effects of concurrent oral administration of lead, selenium or minion on hepatic porphyrin levels in broiler chickens during sub-acute toxicosis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin-Reihe B*, 41(2), 77-82.
82. WHO (1980) Recommended Health-Based Limits in Occupational Exposure to Heavy Metals, Report of a WHO Study Group, Tech. Rep. Ser. No. 647 WHO, Geneva.

83. Berman, E. (1980) In: Toxic Metals and Their Analysis. Heyden & Son, London, .
84. Yagi, K. (1984) *Methods Enzymol.*, 105, 328-331.
85. Smith, P. K. (1985) *Anal Biochem*, 150, 76-82.
86. Lowry, O. H., (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-372.
87. Andrea, H., Regina, S., and Detamar, B., (1990) indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 241, 75-82.
88. Candice, A. W., Barry, L. T., (1997) Role of glutathione in Nitric Oxide-mediated injury to rat gastric mucous cell. *European Journal of pharmacology*, 319, 333-344.
89. Oogian, G. Z., and Voyer, R. A., (1995) Interactive cytotoxicities of selected organic and inorganic substance to brown cell of *Mercenia mercenaria*. *Cell biology and toxicology*. 11, 263-271.
90. Freshney, R. I., (1994) Chapter 13 Characterization. In Freshney, R. I. (eds) *Culture of Animal cells* (310-430) Inc 3th Edition. New York, Wiley liss.
91. Ruey, H. Cin., and Ching, H. Lee., (1994) Studies on cytotoxic and genotoxic effects of Cadmium Nitrate and Lead Nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Environmental and Molecular*

92. Greene, Ls., (1995) Asthma and oxidant stress ;nutritional , environmental, and genetic risk factors. [review] Journal of the American college of nutrition , 14(4), 317-324.
93. Nehru, B., and Iyer, A., (1994) Effect of Selenium on lead-induced neurotoxicity in different brain regions of adult rats. Journal of environmental pathology. Toxicology & Oncology, 13 (4), 265-268.
94. Gerald, F., and Combs, Jr., (1986) Chap 6 Biochemical function of selenium (205-247). In Combs, Jr., (eds). The role of selenium in nutrition. New York, Academic press.
95. Tandon, Sk., and Dhawan, M., (1992) Influence of selenium supplementation during chelation of lead in rats. Indian journal of physiology & pharmacology, 36(3), 201-204.
96. Xu, B., and Chia, Se., (1994): concentrations of cadmium, lead selenium and zinc in human blood and seminal plasma. Biology trace element research, 40(1), 49-57.
97. Szulinski, S., and Szulinska, G., (1994) Studies on the chronic toxicity of a mixture of lead , cadmium and iron given to white drinking water. Roczniki panstwowego zakladu higieny, 45 (3), 225-230.
98. Nehru, B., and Iyer, A., (1994) Effect of selenium on lead

- induced neurotoxicity in different brain regions of adult rats. *Journal of environmental pathology Toxicology & oncology*, 13 (4), 265-268.
99. Lin, S. J., and Lin, T. H., (1994) Lipid peroxidation in works exposed to lead. *Acta Environ Health*, 49(4), 256-259.
100. 杜啟安(民 74)臨床生化基論. 新竹市:黎明書店
101. Carson, B.L. Ellis III, H.V. and McCann, J.L. (1986) Lead. In: *Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans*. Lewis Publishers, Inc..
102. Rice-Erns, C.A. Diplock, A.T. and Symons, M.C.R. (1991) Transition Metal complexes as sources of Radicals. In: *Techniques in Free Radical Research. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular biology vol. 22*. Editor by Burdon, R.H. and Von Knippenberg, P.H.. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER. Netherlands.
103. Friberg, L. Nordberg, G.F. and Voule, V.B. (1986) Chromium. In: *Handbook on The Toxicology of Metals. Vol II*. ELSEVIER.
104. 胡超群(民 83)甲苯之生物檢測與肝微粒體酵素系統中之代謝. 中山醫學研究所碩士論文.
105. Ikeda, T., Katakura, Y., Kishi, R., and Miyake, H., (1993) Acute neurobehavioral effects of co-inhalation of Toluene and n-hexane on schedule controlled behavior in rats. *Environmental*

106. 張瓊瑤(民 84)硝酸氯化鉛對中國倉鼠 CHO 細胞突變機制的影響. 清華大學. 生命科學研究所碩士論文.
107. Tang, H. W., and Yan, H. L., (1996) Lead cytotoxicity in primary cultured rat Astrocytes and Schwann cells. *Journal of Applied Toxicology*, *16(3)*, 187-196.
108. Gregory, J. L., John, F. R., and Francis A. X. Schanne. (1993) Lead activation of protein kinase C form rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*. *269(2)*, 834-837.
109. Naarala, J. T., Loikkanen, J. J., Ruotsalainen, M. H., and Savolainen, K. M., (1995) Lead amplifies glutamate-induced oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, *19(5)*, 689-693.
110. Svensson, G. G., and Nise, G., (1984) Pituitary hormone secretion in occupational. Toluene exposure, Am Abstract, In: Eustace I. E, (eds.) XXI International Congress on Occupational Health (312-368). Dublin Ltd, ETA Publications.
111. Korska, R. Z., Sokal, J. A., and Gorny, R., (1992) Toxic effects of combined exposure to toluene and m-xylene in animals III. Subchronic inhalation Study. *Polish Journal of Occupational Medicine & Environmental Health*, *5(1)*, 27-33.
112. Chakrabarti, S., and Tuchweber, B., (1987) Studies of

nephrotoxicity due to mixed exposure to styrene and Toluene.

Toxicology letters, **39(1)**, 27-34.

陸、圖表

表 1. 血中鉛濃度與人體之反應

血中鉛濃度 (ug/dl)	人 體 反 應	影響之人群
> 10	紅血球 ALA 去氫酶受抑制	成人與小兒
20-35	紅血球原紫質 (FEP) 上升	成人與小兒
30-40	紅血球核甘三磷酸酶 (ATP ase) 受抑制	成人與小兒
40	尿中 ALA 增加 尿中 CP 增加 貧血	成人與小兒 成人 小兒
40-50	週邊性神經病變	成人
50	貧血	成人
50-60	輕微腦障礙	小兒
60-70	輕微腦障礙	成人
60-70	鉛腦症	小兒
> 80	鉛腦症	成人

ALA = δ -Aminolevulinic acid : CP = Coproporphyrin:
PEP = Free Erythrocyte Protoporphyrin

表 2. 原子吸收光譜儀偵測條件

Instrumental Parameters	Lead		Selenium
	Our Laboratory	Hospital	Our Laboratory
Lamp	Hollow Cathode Lamp	Hollow Cathode Lamp	Electrodeless discharge Lamp
Lamp Current	10 mA	10 mA	210 mA
Energy/Wave Length	69/283.3 nm	69/283.3 nm	66/196 nm
Matrix modifier	200ug phosphate/ 20ug magnesium nitrate	50ug phosphate	15ug magnesium nitrate/ 5ug palladium
Spectral Band Width	0.7 nm low	0.7 nm low	2.0 nm low
Mode	AA/BG (Zeeman)	AA/BG (D ₂ lamp)	AA/BG (Zeeman)
Measurement Type	Peak Area	Peak Area	Peak Area
Integration Time	5 s	5 s	5 s
Calibration Curve Fit	Linear	Linear	Linear
Sample Volume	20ul	20ul	20ul
Sheath gas	Ar	Ar	Ar
Furnace Program			
Dry 1			
Temperature(°C)	110	110	110
Ramp/Hold(sec)	1/20	1/20	1/20
Gas Flow(ml/min)	250	250	250
Dry 2			
Temperature(°C)	130	130	130
Ramp/Hold(sec)	10/30	10/30	10/30
Gas Flow(ml/min)	250	250	250
Pyrolysis			
Temperature(°C)	800	800	1000
Ramp/Hold(sec)	10/20	10/20	10/20
Gas Flow(ml/min)	250	250	250
Atomize			
Temperature(°C)	1600	1600	1900
Ramp/Hold(sec)	0/5	0/5	0/5
Gas Flow(ml/min)	0	0	0
Clean Out			
Temperature(°C)	2400	2400	2400
Ramp/Hold(sec)	1/5	1/5	1/5
Gas Flow(ml/min)	250	250	250

Condition Reference: Modified by Running the THGA (Transversely Heated Graphite Atomized) Graphite Furnace: Techniques and Recommended Condition (Perkin-Elmer Corp.)

表 3. 全血標準參考樣品在兩間實驗室所測得鉛元素濃度 (10-Fold Dilution)¹

Sample	Certified Value	Values in This Work (mean \pm SD)	
		Our laboratory	Hospital
Whole Blood II (Seronorm)	394	397.7 \pm 5.7 ² (100.9%) ⁴	408.4 \pm 8.6 ² (103.6%) ⁴
Whole Blood 1 Control (Lyphochek)	72 (61-82) ³	64.8 \pm 3.7 (90.0%) ³	78.2 \pm 3.4 (108.6%) ³
2	245 (208-282)	235.6 \pm 8.3 (96.2%) ³	258.6 \pm 11.5 (106.5%) ³
3	554 (471-637)	542.1 \pm 11.4 (97.9%) ³	539.8 \pm 14.6 (97.4%) ³

1. Results in ug/L, sample are 1:9 diluted with different diluent.
2. Results of Determination are Average from 10 Times Replication.
3. Acceptable Range.
4. Average Accuracy Comparison with Certified Values.

表 4. 工人全血樣品在兩間實驗室所測得鉛元素濃度之比對 (10-Fold Dilution)¹

Sample No.	Concentration of lead in whole blood (mean \pm SD)		
	Our laboratory	Hospital	Ratio of variety(%) ³
1	564.8 \pm 5.7 ²	567.7 \pm 8.6 ²	0.51
2	463.2 \pm 7.7	461.9 \pm 10.1	0.28
3	637.4 \pm 7.3	653.2 \pm 15.4	2.48
4	429.1 \pm 3.7	440.3 \pm 3.4	2.61
5	550.4 \pm 11.8	556.6 \pm 16.9	1.13
6	394.3 \pm 11.5	389.1 \pm 8.3	1.34
7	498.0 \pm 6.6	517.9 \pm 9.5	4.00
8	676.4 \pm 11.4	721.6 \pm 14.6	6.68

1.Results in ug/L ,sample are 1:9 diluted with different diluent.

2.Results of Determination are Average from 3 Times Replication.

3.Ratio of variety= $\left| \frac{\text{Pb concentration determination by hospital} - \text{Pb concentration determination by our laboratory}}{\text{Pb concentration determination by our laboratory}} \right| \times 100\%$

表 5.偵測硒元素項目之血清標準參考品：(5-fold dilution)¹

Sample	Certified Value	Values in this Work
SRM 1598	43.6 ± 3.6	41.3±2.2 ²
Bovine serum		(95.0%) ⁴
“Second-Generation “	95	98.1 ± 5.9
BRM human serum	(90.9 - 100.0) ³	(103%)

1.Result in ug/L , sample are 1:4 diluted with diluent.

2.Result of determination are average from 10 times replication .

3.Acceptable range .

4.Average accuracy comparison with certified values.

在粒線體中進行之步驟

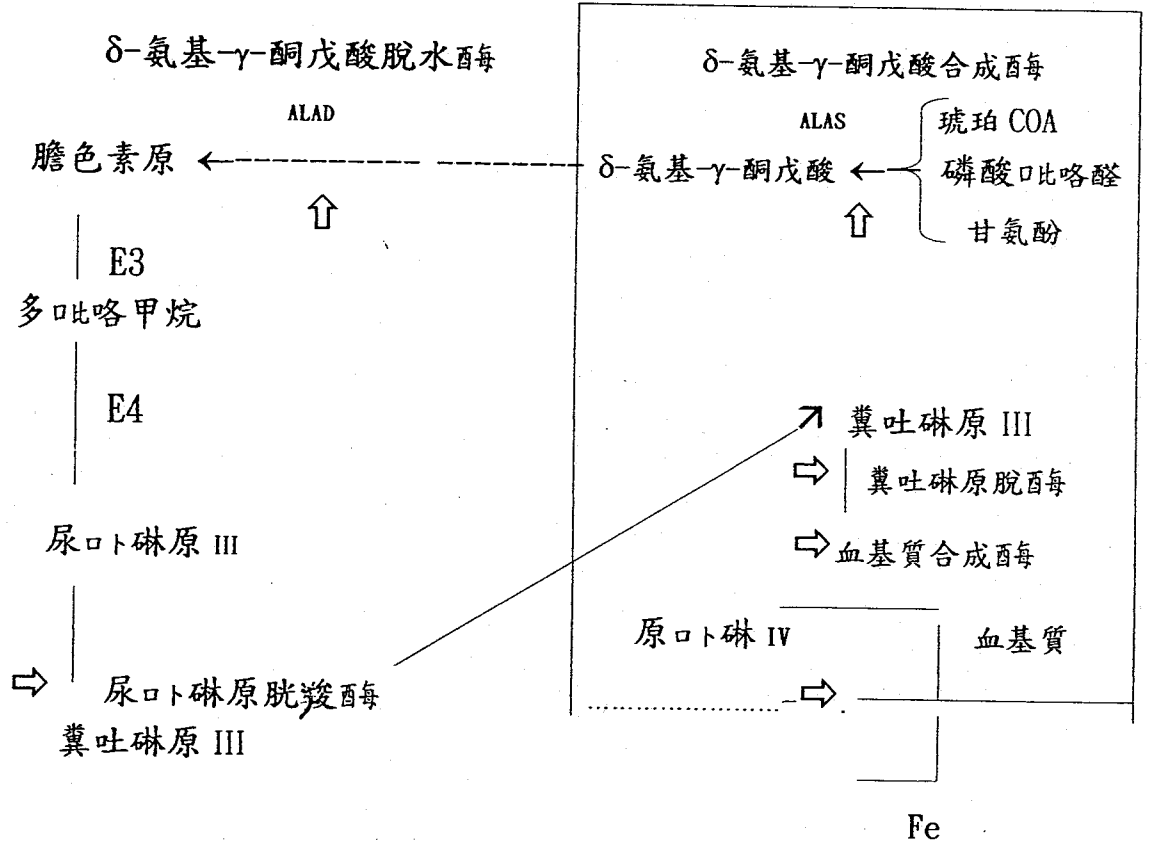


圖 1. 血基質合成過程, 在實線方框的反應在粒線體中進行, 粗箭頭標示之反應為鉛的抑制作用部位(編自 Jaworski, 1978)

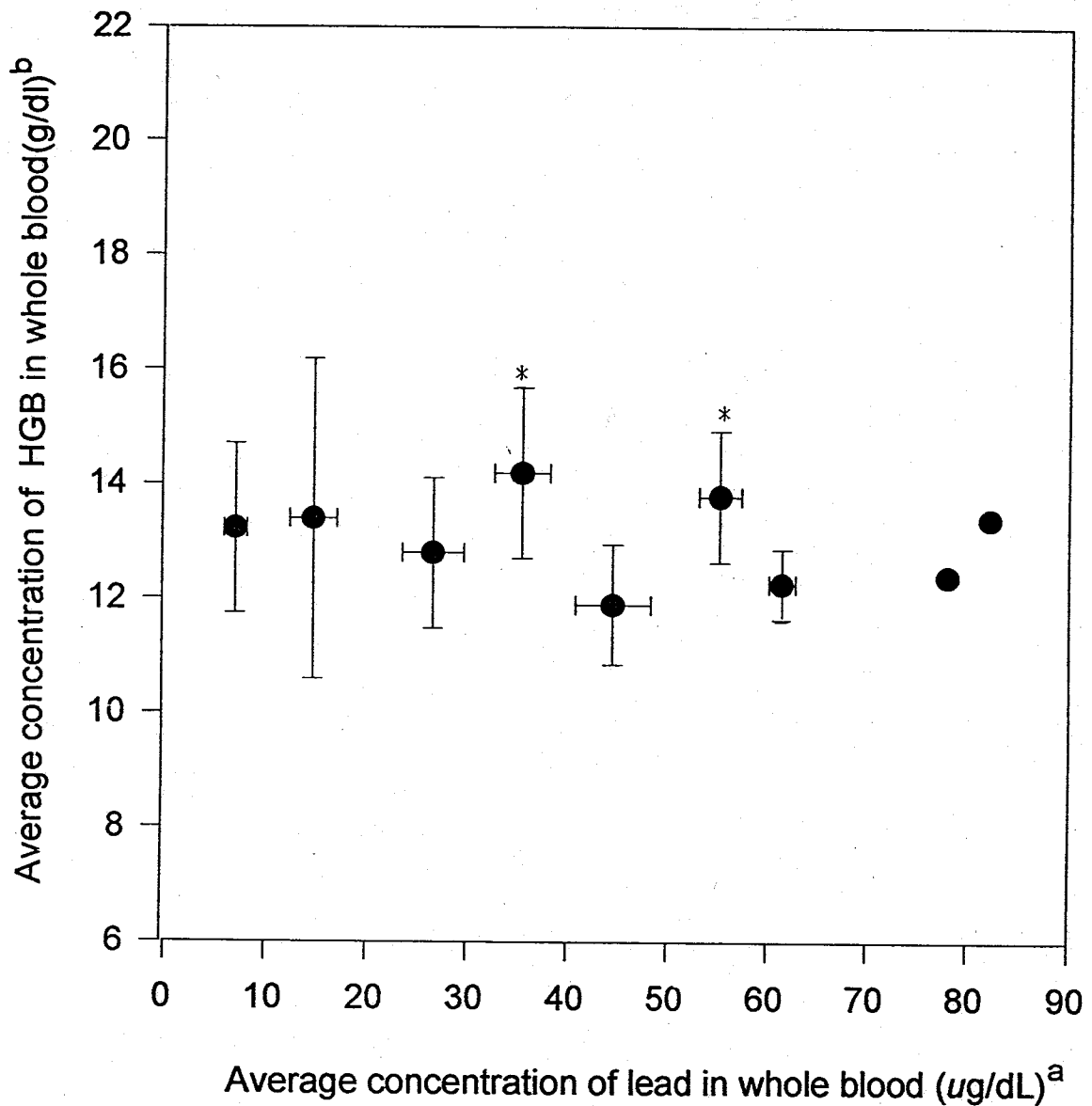


圖 2. 血鉛區間平均濃度與血紅素平均濃度之相對關係圖

- (a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內(10 ug/dL) 血鉛數值平均濃度。
- (b) 血紅素平均濃度 = 相同區間之血鉛樣品中血紅素濃度平均值。
- (c) * 表與血鉛 60-70 區間濃度比較有顯著差異(t-test $P < 0.05$)。

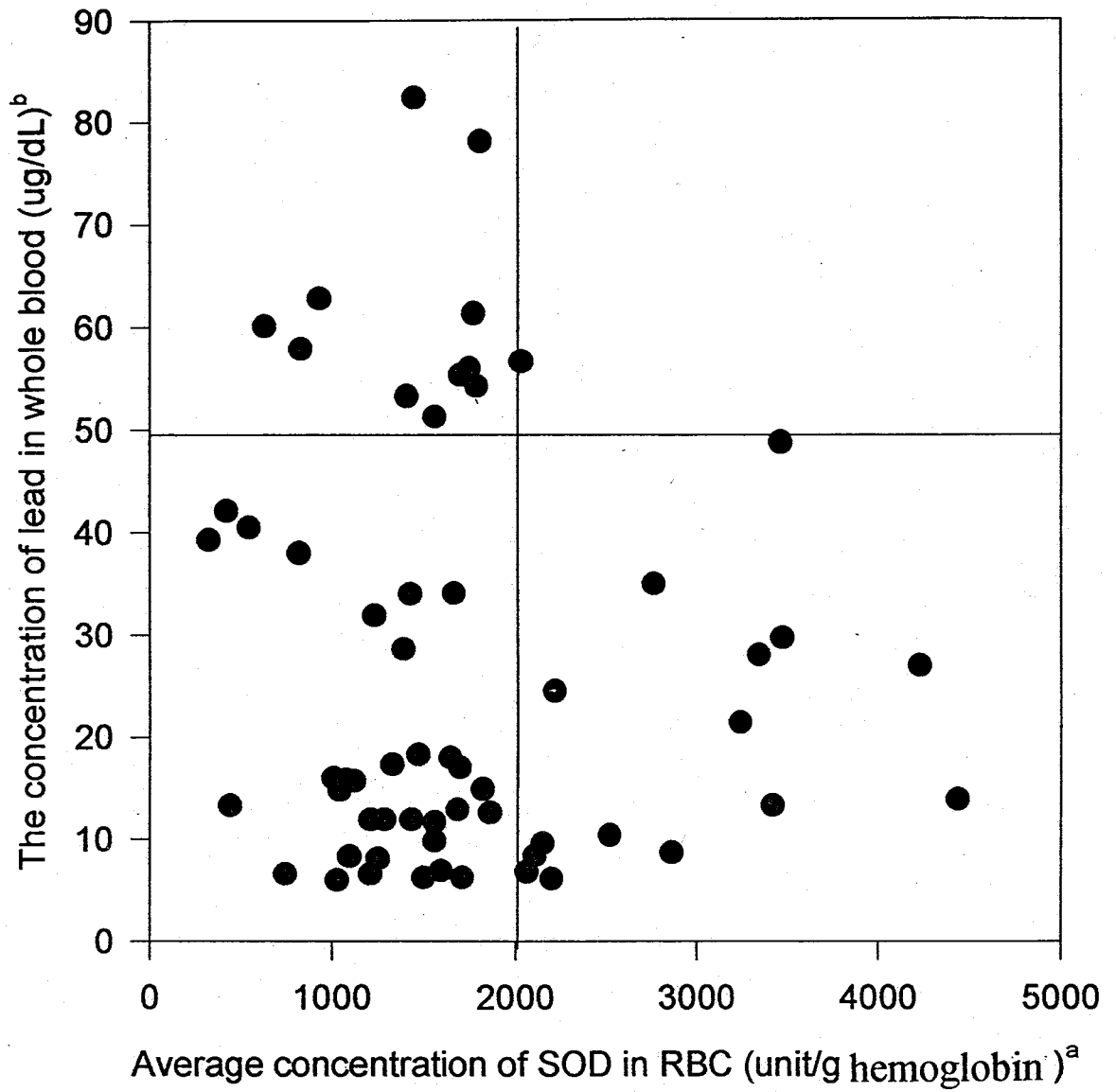


圖 3. 血中鉛濃度與過氧化歧化酶中活性之分佈關係圖。

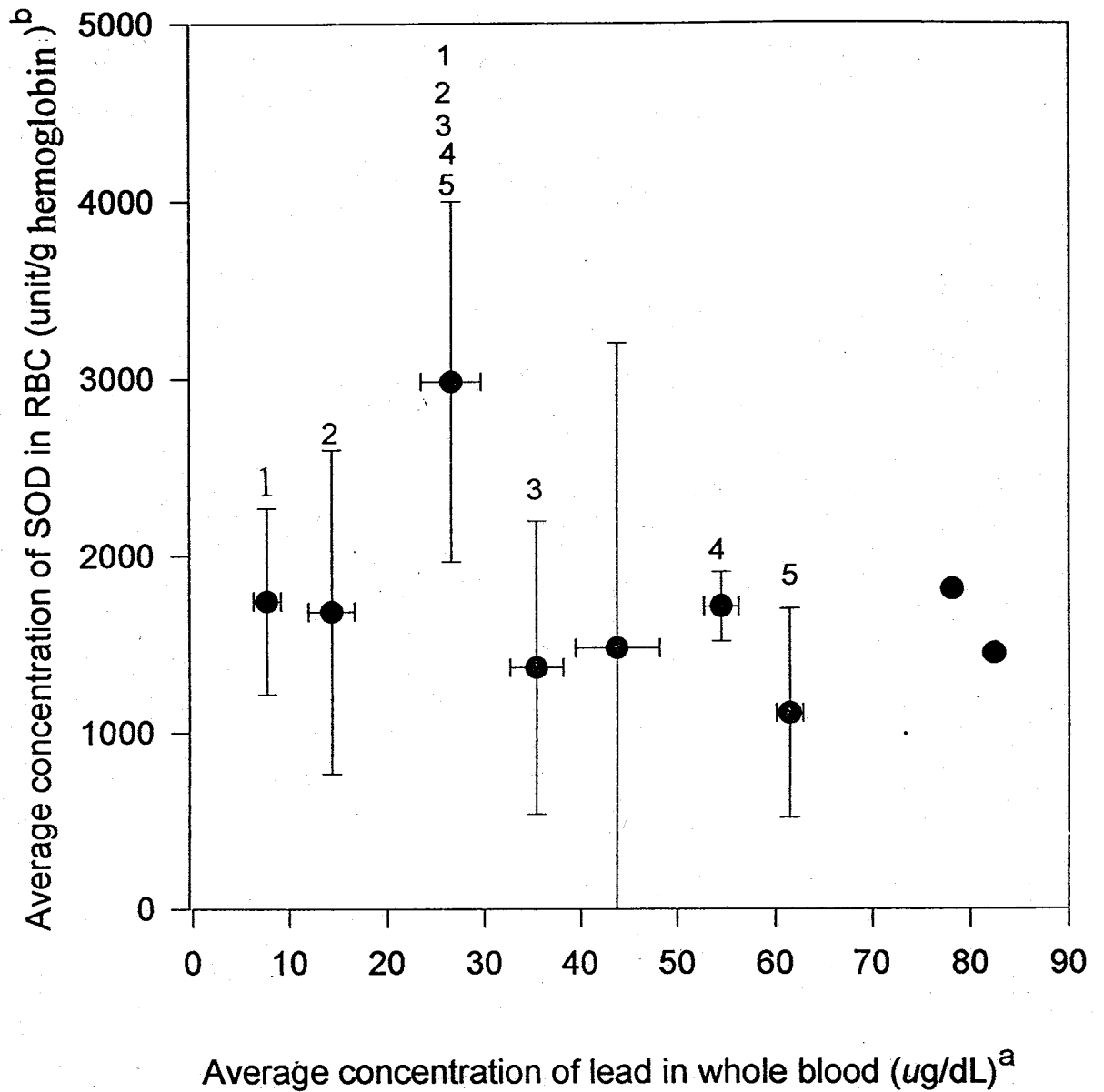


圖 4. 血鉛區間平均濃度與過氧化歧化酶平均濃度之相對關係圖

(a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內(10 ug/dL) 血鉛值平均濃度。

(b) 過氧化歧化酶平均濃度 = 相同區間之血鉛樣品中過氧化歧化酶濃度之平均值。

(c) 1. 2. 3. 4. 5 表相同數字組比較有顯著差異 (t-test $P < 0.05$)。

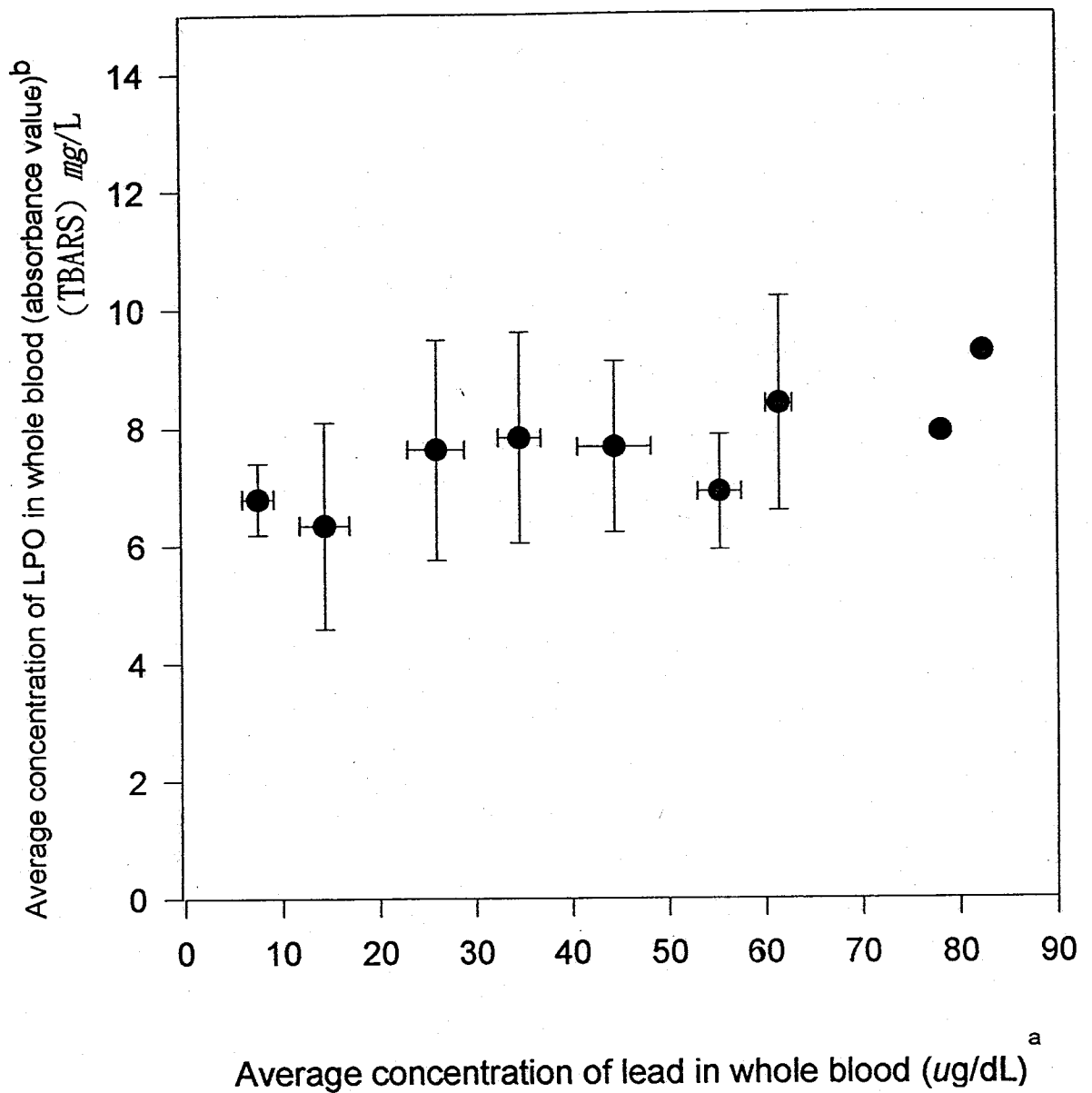


圖 5. 血鉛區間平均濃度與脂質過氧化產物值(TBARS)平均濃度之相對關係圖。

(a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內(10 ug/dL) 血鉛數值平均濃度。

(b) 脂質過氧化產物值平均濃度 = 相同區間之血鉛樣品中過氧化產物濃度平均值。

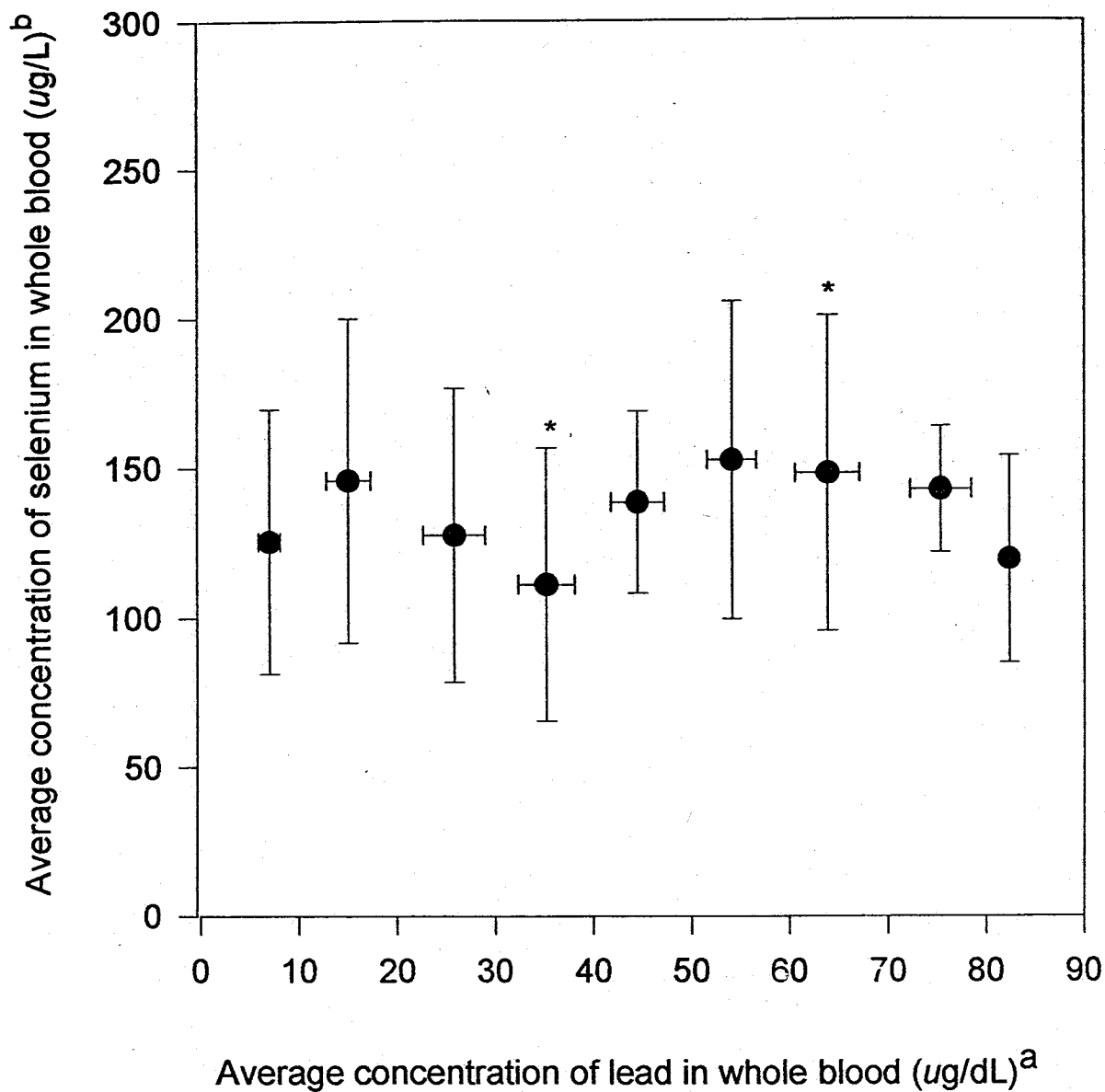


圖 6. 血鉛區間平均濃度與硒元素濃度平均濃度之相對關係圖。

(a) 血鉛區間平均濃度 = 單位區間內(10 ug/dL) 血鉛數值平均濃度。

(b) 硒元素濃度 = 相同區間之血鉛樣品中硒元素濃度平均值。

(c) * 表兩組比較有顯著差異(t-test $P < 0.05$)。

表 1. 老鼠於實驗期間之飲水記錄(組/3天)

組別\給水記錄	3天給水量 (毫克/組)	金屬添加量 (毫升/組)	3天平均剩餘量 (毫升/組)
對照組	1350	0	52±26
鉛高濃度組(180天)	1000	4.10	76±48
鉛高濃度組(90天)	1000	4.10	59±35
鉛中濃度組(180天)	1000	1.64	29±16
鉛中濃度組(90天)	1000	1.64	31 ± 11
鉛低濃度組(180天)	1000	0.82	43 ± 34
鉛低濃度組(90天)	1000	0.82	56 ± 47

表 2. 原子吸收光譜儀偵測條件

Instrumental Parameters	
Lamp	Hollow Cathode Lamp
Lamp Current	10 mA
Energy/Wave Length	69/283.3 nm
Matrix modifier	200ug phosphate/ 20ug magnesium nitrate
Spectral Band Width	0.7 nm low
Mode	AA/BG (Zeeman)
Measurement Type	Peak Area
Integration Time	5 s
Calibration Curve Fit	Linear
Sample Volume	20ul
Sheath gas	Ar
Furnace Program	
Dry 1	
Temperature(°C)	110
Ramp/Hold(sec)	1/20
Gas Flow(ml/min)	250
Dry 2	
Temperature(°C)	130
Ramp/Hold(sec)	10/30
Gas Flow(ml/min)	250
Pyrolysis	
Temperature(°C)	800
Ramp/Hold(sec)	10/20
Gas Flow(ml/min)	250
Atomize	
Temperature(°C)	1600
Ramp/Hold(sec)	0/5
Gas Flow(ml/min)	0
Clean Out	
Temperature(°C)	2400
Ramp/Hold(sec)	1/5
Gas Flow(ml/min)	250

Condition Reference: Modified by Running the THGA (Transersely Heated Graphite Atomized) Graphite Furnace: Techniques and Recommended Condition (Perkin-Elmer Corp.)

表 3. 標準參考樣品在實驗室所測得鉛元素濃度 (10-Fold Dilution)^a

Sample (mean ± SD)	Certified Value	Values in This Work
Whole Blood II (Seronorm)	394	397.7 ± 5.7 ^b (100.9%) ^d
Whole Blood 1 Control (Lyphochek)	72 (61-82) ^c	64.8 ± 3.7 (90.0%)
2	245 (208-282)	235.6 ± 8.3 (96.2%)
3	554 (471-637)	542.1 ± 11.4 (97.9%)

a. 單位為 $\mu\text{g/L}$ 。

b. 數據為操作 10 次之平均值。

c. 可接受之數值範圍。

d. 實驗所得之平均值與標準品驗證濃度之百分比。

表 4. 餵食含鉛飲水之老鼠血清、器官均質液之鉛濃度

組別	血 清 ($\mu\text{g/L}$)	器官均質液	
		肝 [§] ($\mu\text{g/g liver}$)	腎 [§] ($\mu\text{g}/0.5\text{g kidney}$)
對照組 0 天	0.34±0.04	-	-
90 天	0.58±0.06 ^a	N. D. (≤ 0.15) ^{*d}	1.97±0.95 ^f
180天	0.84±0.09 ^{b,c}	0.25±0.10 ^e	2.34±2.94 ^g
鉛高濃度 90 天	0.88±0.14 ^a	8.65±1.27 ^d	33.64±12.76 ^f
鉛高濃度 180天	0.98±0.10 ^b	6.02±1.69 ^e	15.12±7.96 ^g
鉛中濃度 90 天	0.83±0.18 ^a	8.12±3.69 ^d	15.41±11.34 ^f
鉛中濃度 180天	1.08±0.17 ^c	8.16±13.24	8.45±1.78 ^g
鉛低濃度 90 天	0.72±0.28	5.83±4.07 ^d	7.96±3.64 ^f
鉛低濃度 180天	0.89±0.15	1.92±0.87 ^e	5.45±3.84

*: 濃度小於偵測極限(Detection Limit)，以偵測極限濃度代替。偵測極限乃是以10次空白值平均值之標準差乘以3求得。

a, c, d, e, f, g: 實驗組與對照組有顯著差異($p < 0.01$)

b: 實驗組與對照組有差異($p < 0.05$)

§: 稱取 1 克的肝臟或 0.5 克的腎臟，加入 3 毫升或 1.5 毫升的緩衝溶液(Tris-HCl 10mM, pH 7.6, 含 0.25M Sucrose 及 5mM 2-mercaptoethanol) 以均質機研磨組織。

表 5. 餵食含金屬飲水及對照組之老鼠器官均質液中脂質過氧化物濃度

器官\組別	對照組	低濃度組	中濃度組	高濃度組
肝臟(mg/L g Liver) [§]				
鉛 90 天	13.32±1.75 ^a	15.41±2.01	19.95±1.72 ^a	14.37±3.39
180 天	13.10±1.79 ^b	23.79±4.17 ^b	22.76±3.16 ^b	31.04±5.68 ^b
腎臟(mg/L 0.5g Kidney) [§]				
鉛 90 天	18.70±3.49 ^c	18.84±2.71	21.09±1.62	24.17±2.13 ^c
180 天	18.95±5.02	17.68±2.26	17.92±2.30	16.07±0.75

a, b, c: 實驗組與對照組有顯著差異(p<0.01)

§: 稱取 1 克的肝臟或 0.5 克的腎臟, 加入 3 毫升或 1.5 毫升的緩衝溶液(Tris-HCl 10mM, pH 7.6, 含 0.25M Sucrose 及 5mM 2-mercaptoethanol) 以均質機研磨組織。

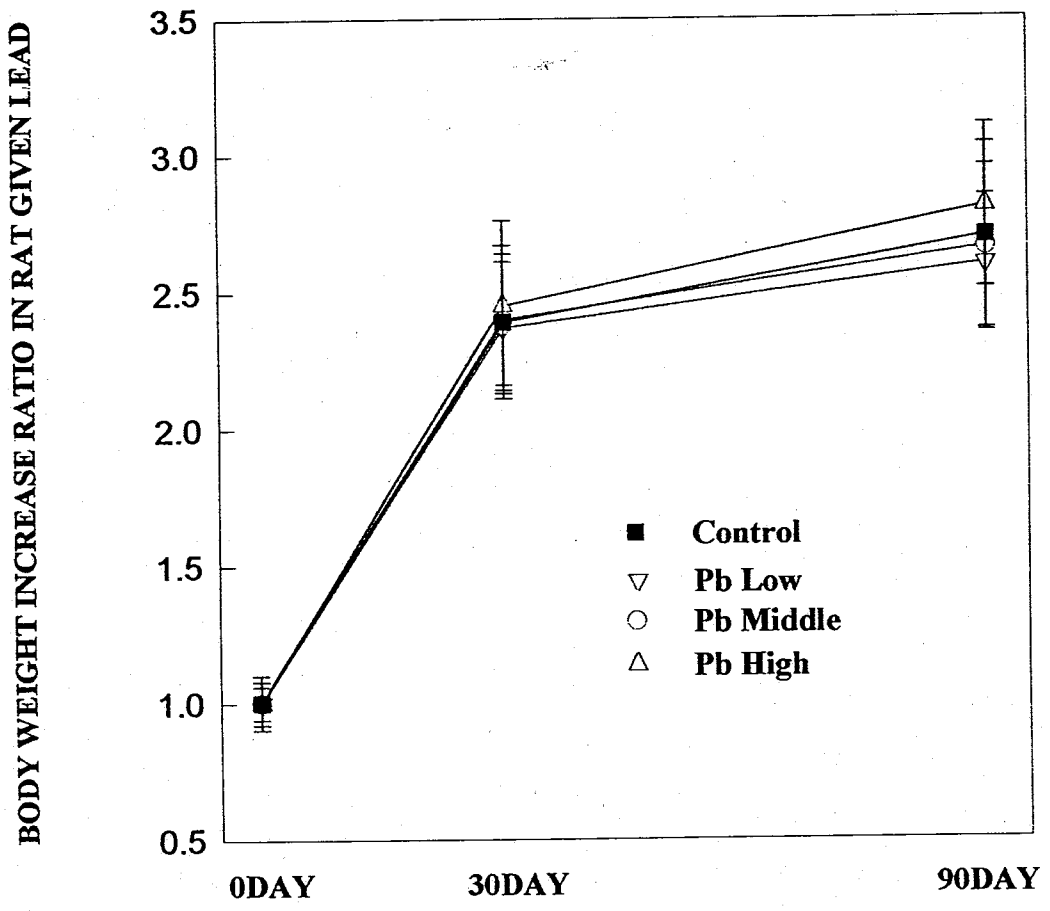


圖 1. 餵食鉛金屬飲水老鼠
 (a) 90 天組
 每對照組體重變化比率平均值之關係。

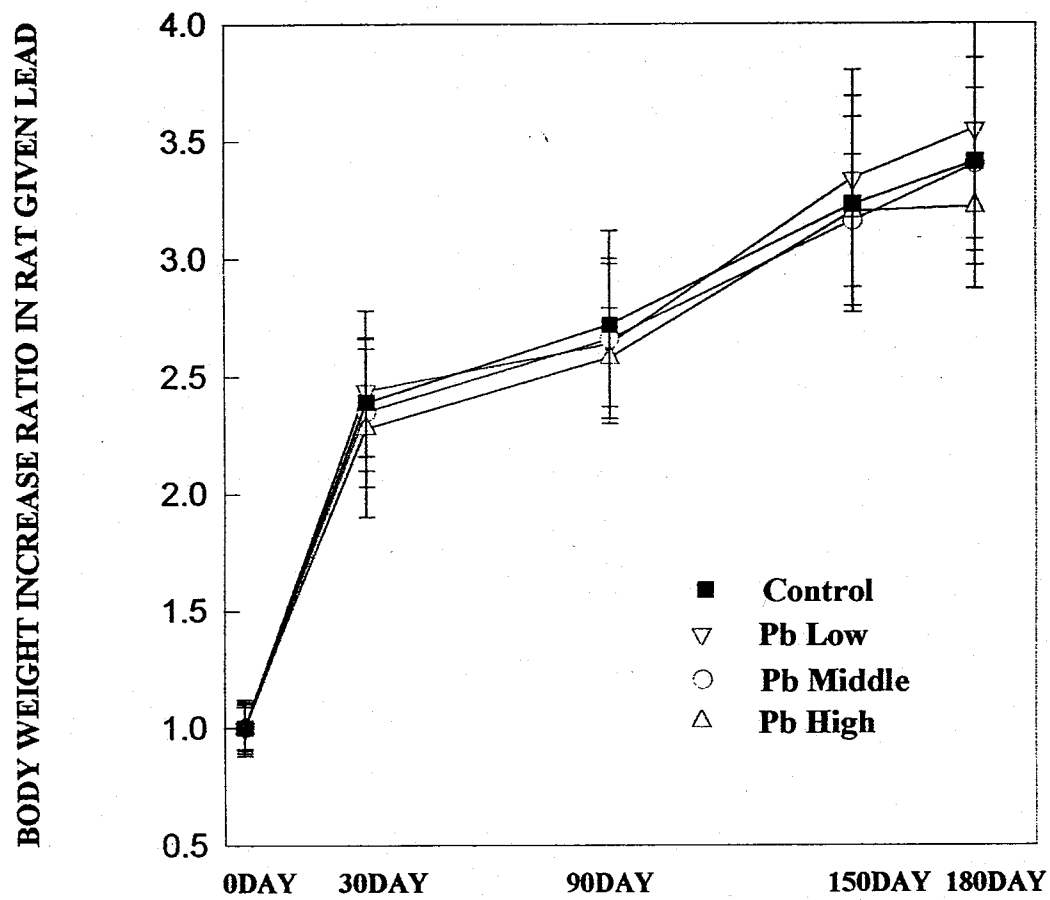


圖 1. 餵食鉛金屬飲水老鼠
 (b) 180 天組
 每對照組體重變化比率平均值之關係。

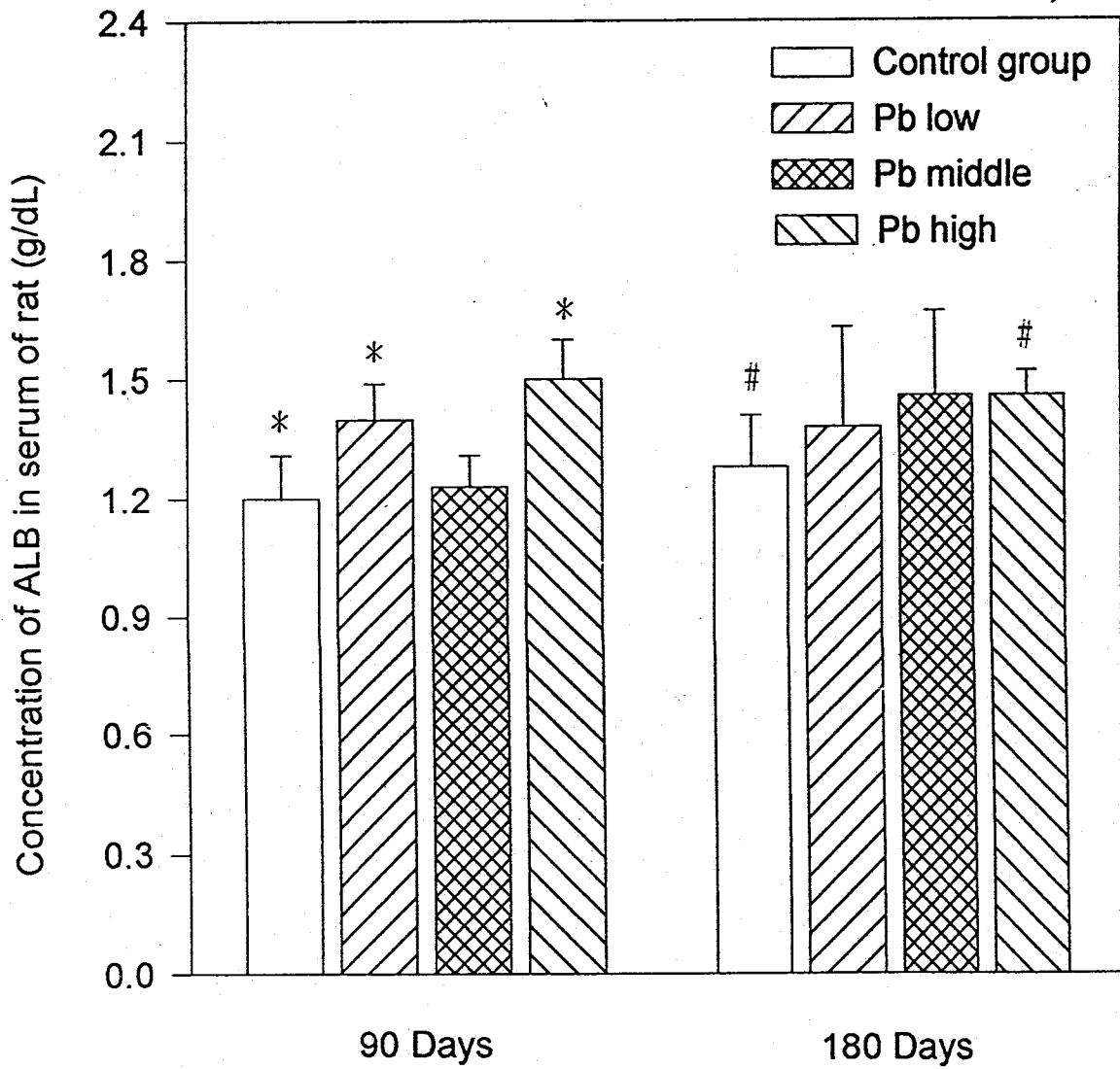


圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清生化值
 (a)ALB-血清白蛋白濃度平均值之關係圖
 * $p < 0.01$ (t-test) # $p < 0.01$ (t-test)

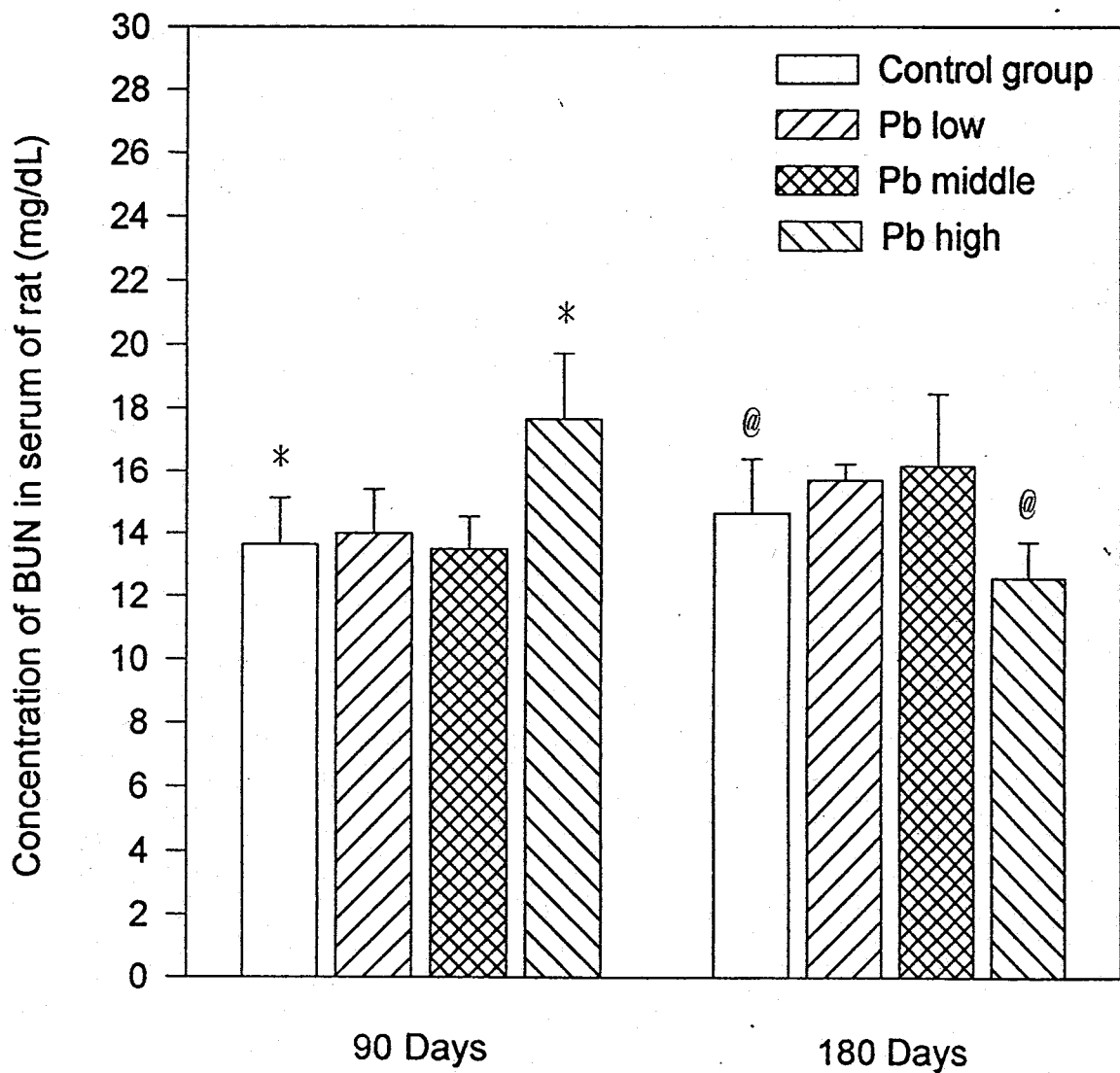


圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清生化值
 (b)BUN-血清尿素氮濃度平均值之關係圖
 * $p < 0.01$ (t-test) @ $p < 0.05$ (t-test)

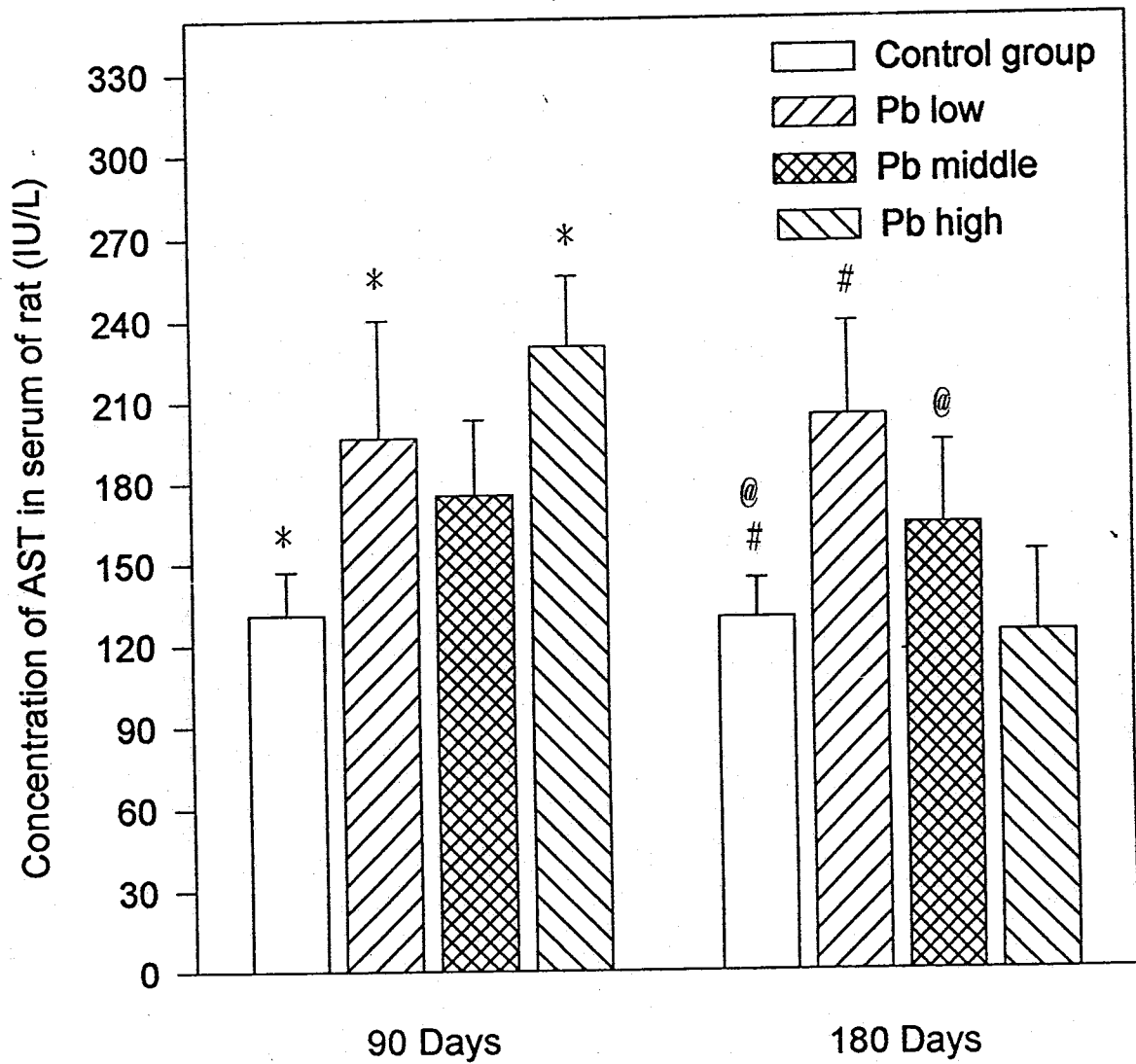


圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清生化平均值
(d)AST-天門冬氨酸 氨基轉移酶每濃度平均
值之關係圖

*p<0.01 (t-test) @p<0.05 (t-test)

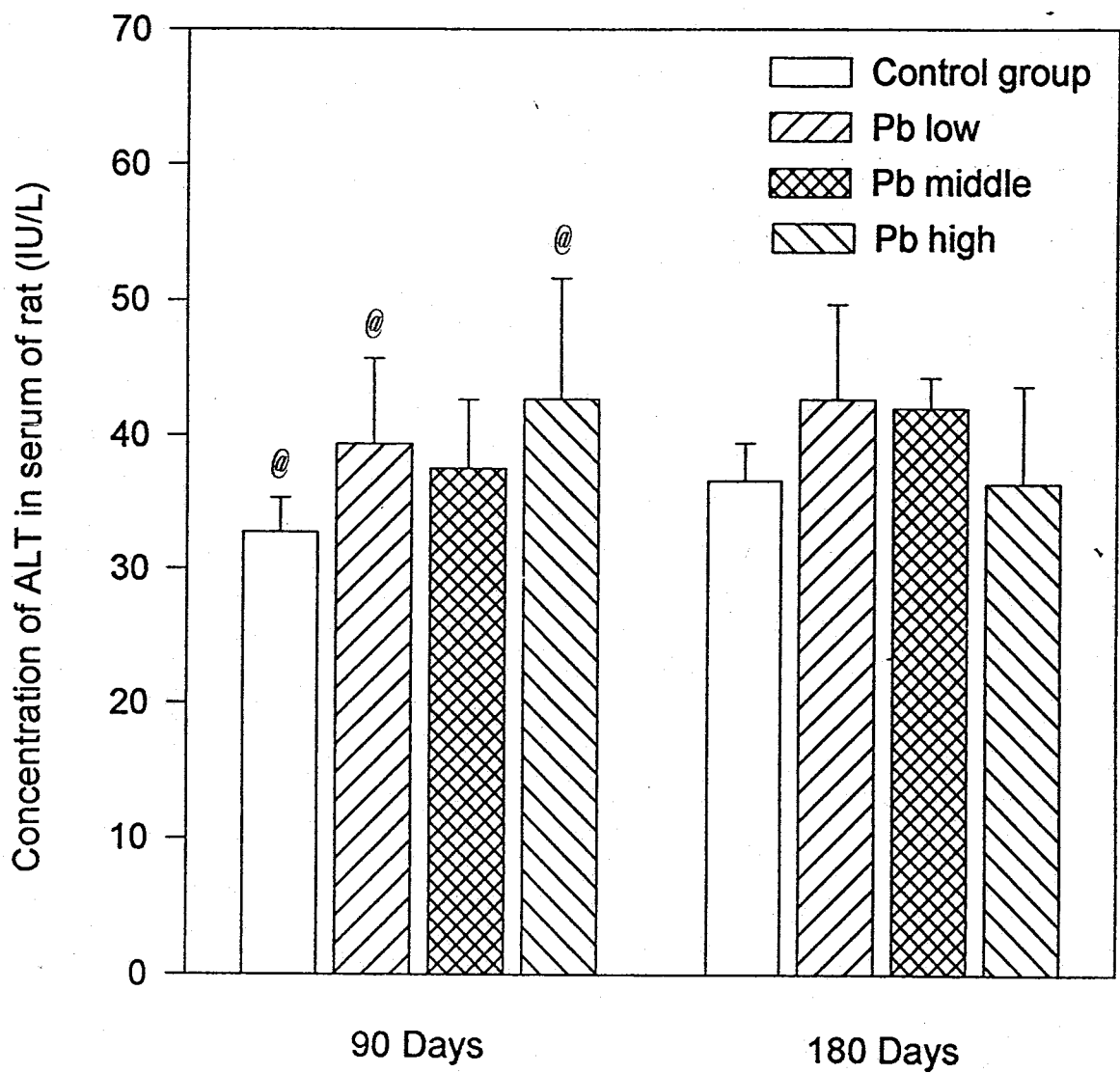


圖 2. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照血清生化值
 (e)ALT - 丙氨酸氨基轉移酶濃度平均值之關係圖
 * $p < 0.01$ (t-test) @ $p < 0.05$ (t-test)

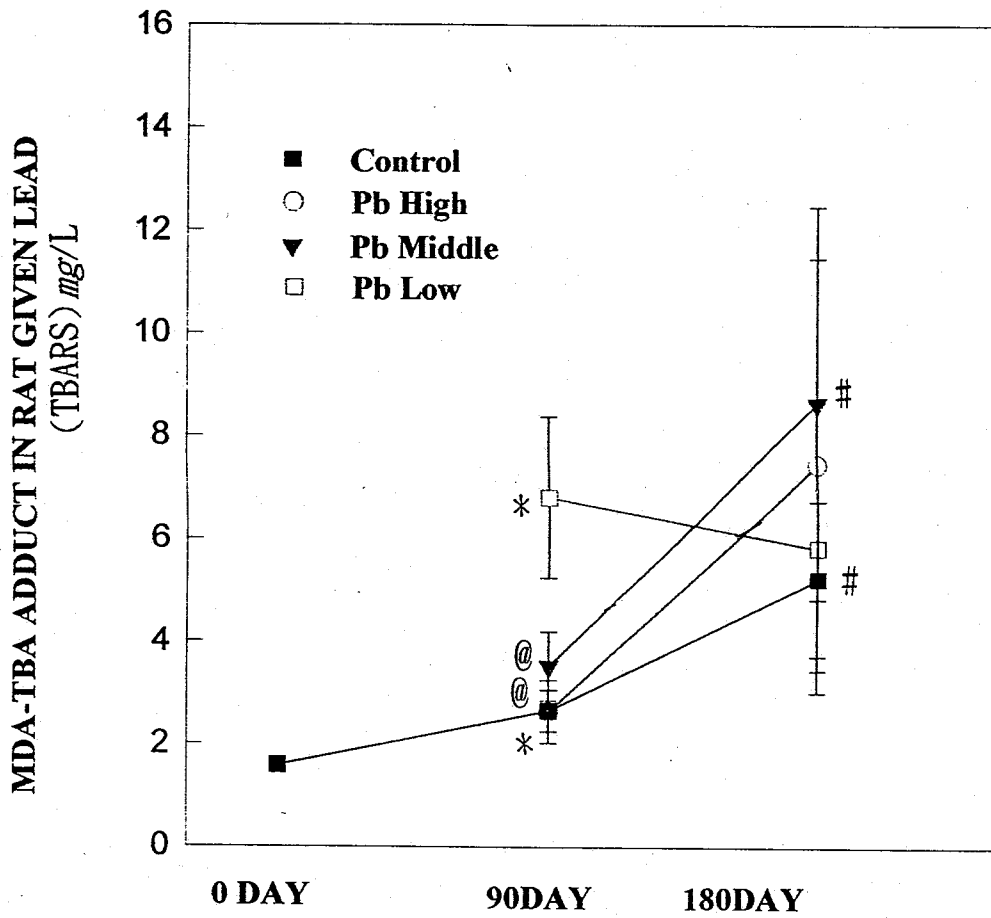


圖 3. 餵食鉛金屬飲水老鼠與對照組血清脂質過氧化產物濃度變化平均值之關係圖
 * P < 0.01 # P < 0.05 @ p < 0.05 (t-test)

Table I. V79 細胞單一暴露不同劑量氯化鉛與共同暴露氯化鉛加
 甲苯_(1.92uM) 處理 18小時對於細胞代謝活性反應百分比值
 (AMA %) 及細胞存活率(CV%)之相關性

d Pb DOS (uM)	V79 cell		V79 cell (add Toluene 1.9 uM)	
	CV(%) _b	AMA(%) _a	CV(%) _b	AMA(%) _a
O ^c	100 ± 6.0	100 ± 4.0	100 ± 6.0	100 ± 4.0
193	98 ± 14	96 ± 7.0	65 ± 5.4*	82 ± 1.5
386	105 ± 3.8	98 ± 11	60 ± 4.4*	85 ± 2.9
772	46 ± 13*	62 ± 4.0 *	41 ± 4.0 &	61 ± 7.9*
1158	82 ± 13	89 ± 4.0	47 ± 7.7*	61 ± 12*
1544	73 ± 13	76 ± 5.4	45 ± 4.0 *	68 ± 12*
1930	55 ± 13	63 ± 2.7 *	42 ± 4.0 &	62 ± 8.4*
2316	37 ± 2.0 &	N	28 ± 5.0 &	N
2702	27 ± 6.0 &	N	17 ± 3.6 &	N
#Toluene (17.1uM)	0.4 ± 0.1 &	N	0.4 ± 0.1 &	N

註: a:細胞代謝活性反應百分比值 b:細胞存活率 d:為氯化鉛之劑量
 e:未暴露任何毒性物質之對照組
 *:與e組比較具有顯著差異(t-test p<0.05)
 &:與e組比較具有顯著差異(t-test p<0.01)
 #:暴露於甲苯(17.1uM) 之對照組
 N:表未測
 數據均以 平均值 ± SD 表示之,每一劑量有肆個重複樣品

Table II V79 細胞共同暴露氯化鉛加甲苯_(1.92 μ M) 處理 18小時下
 使用獨立協同反應計算模式^b 比較實際細胞致死率及
 預測細胞致死率是否具有協同毒性

共同暴露毒物	實際 細胞致死率(%)	預測 ^d 細胞致死率(%)	交互 ^c 作用
氯化鉛 + T ^a			
193 (μ M)	35	22	+
386	40	16	+
772	53	34	+
1158	55	42	+
1544	58	56	+
1930	59	63*	<+
2316	78*	70*	+
2702	83*	78*	+

註: *: 與對照組比較有顯著差異 (P < 0.05)

a: 添加 甲苯_(1.92 μ M) .

b: Independent Joint Action(IJA)

$$P(M) = P(A) + P(B) - P(A \times B)$$

d: P(M) 為預測細胞致死率

P(A): 氯化鉛細胞致死率 ; P(B): 甲苯細胞致死率

c: + 表氯化鉛及甲苯具協同毒性效應 .

<+ 表氯化鉛及甲苯不具協同毒性效應 .

每一劑量有肆個重複樣品

Table III. V79 細胞共同暴露於亞硒酸鈉(4.25 μ M)及(8.5 μ M)劑量
 添入氯化鉛處理 18小時對於細胞存活率(CV%)之程度

^c Pb DOS(μ M)	V79 cell (Se 4.25 μ M)	V79 cell (Se 8.5 μ M)
	CV(%) _a	CV(%) _a
O ^b	100 \pm 1.5	100 \pm 1.5
193	103 \pm 5.0	38 \pm 9.0*
386	104 \pm 4.0	39 \pm 1.5*
772	89 \pm 8.0	20 \pm 1.7&
1158	72 \pm 9.0	18 \pm 2.1&
1544	68 \pm 9.0*	22 \pm 1.2&
1930	47 \pm 4.0*	17 \pm 1.7&
#Toluene (17.1 μ M)	14 \pm 1.3&	14 \pm 1.3&

註: a: Cell Viability(CV%)
 b: 未暴露任何毒性物質之對照組
 c: 為氯化鉛之劑量
 *: 與b組比較具有顯著差異(t-test p<0.05)
 &: 與b組比較具有顯著差異(t-test p<0.01)
 #: 暴露於甲苯(17.1 μ M)之對照組
 數據均以平均值 \pm SD 表示之,每一劑量有肆個重複品

Table IV V₇₉ 細胞共同暴露不同劑量氧化鉛與甲苯(1.9 uM) 比較有無添加亞硒酸鈉(4.5uM)之差異性

Pb ^d DOS(uM)	V79 cell (Toluene 1.91uM)		V79 cell (Se 4.25uM + Toluene 1.9 uM)	
	CV (%) _a	AMA (%) _b	CV (%) _a	AMA (%) _b
O ^c	100 ± 6.0	100 ± 4.0	100 ± 6.0	100 ± 4.0
193	65 ± 5.4*	82 ± 1.5	112 ± 13	79 ± 6.9
386	47 ± 7.7*	85 ± 2.9	78 ± 13	79 ± 4.2
772	60 ± 4.4 *	61 ± 12*	63 ± 5.6*	79 ± 7.2
1158	45 ± 4.0*	68 ± 12*	49 ± 3.0*	76 ± 8.2
1544	42 ± 4.0*	62 ± 8.4*	41 ± 7.0*	67 ± 3.3*
1930	41 ± 4.0*	62 ± 8.4*	40 ± 3.0*	53 ± 5.0*
2316	28 ± 5.0&	N	21 ± 6.0&	23 ± 6.0&
2702	17 ± 3.6&	N	N	N
#Toluene (17.1uM)	7.0 ± 2.0&	5.0 ± 0.1 &	7.0 ± 2.0 &	5.0 ± 0.1&

註: : a:細胞代謝活性反應百分比值 b:細胞存活率 d:為氧化鉛之劑量
c:未暴露任何毒性物質之對照組
*:與c組比較具有顯著差異(t-test p<0.05)
&:與c組比較具有顯著差異(t-test p<0.01)
#:暴露於甲苯(17.1uM) 之對照組
N:表未測
數據均以平均值 ± SD 表示之,每一劑量有肆個重複樣品

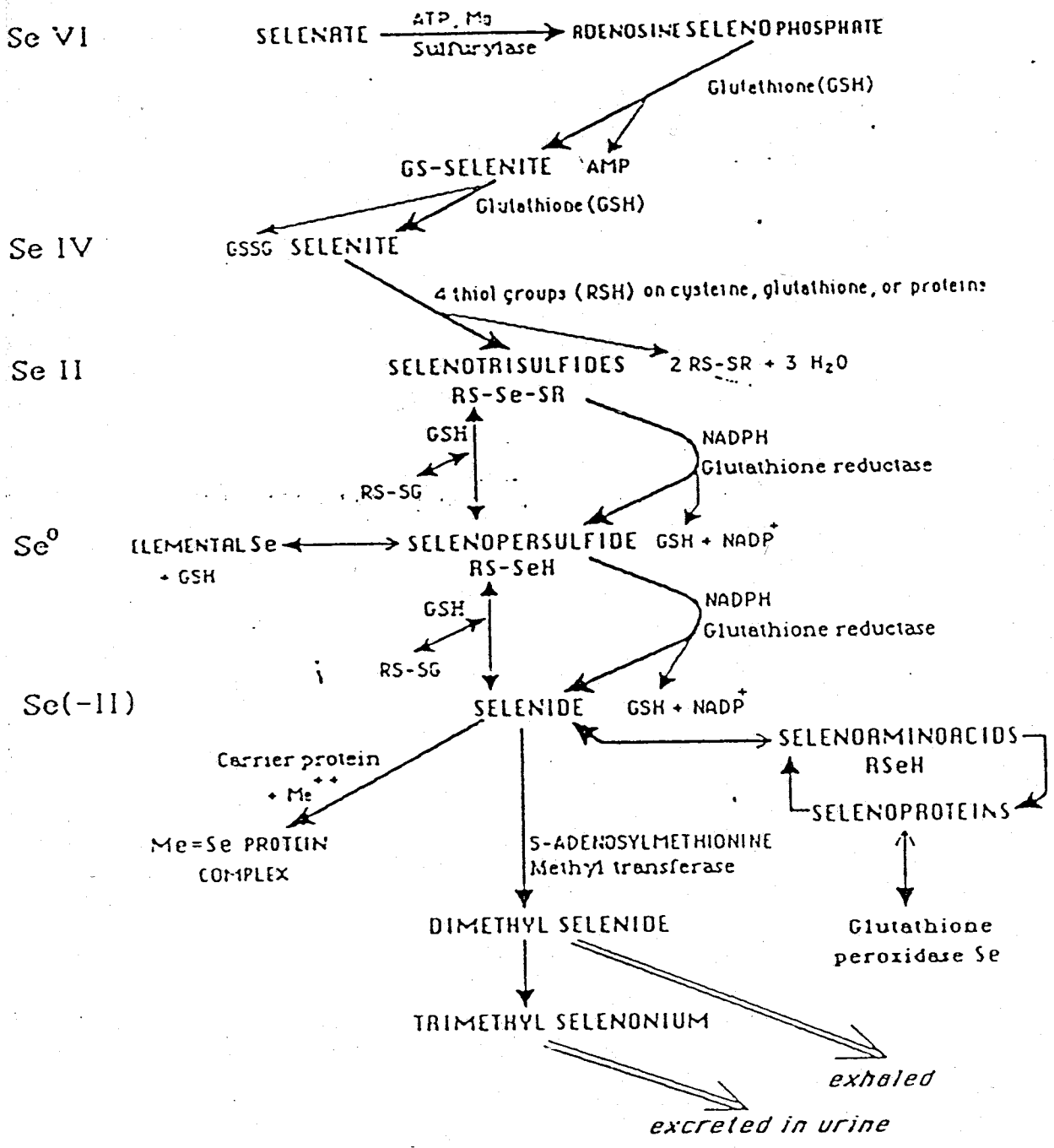


圖 1. 硒複合物在人體與動物之代謝途徑：

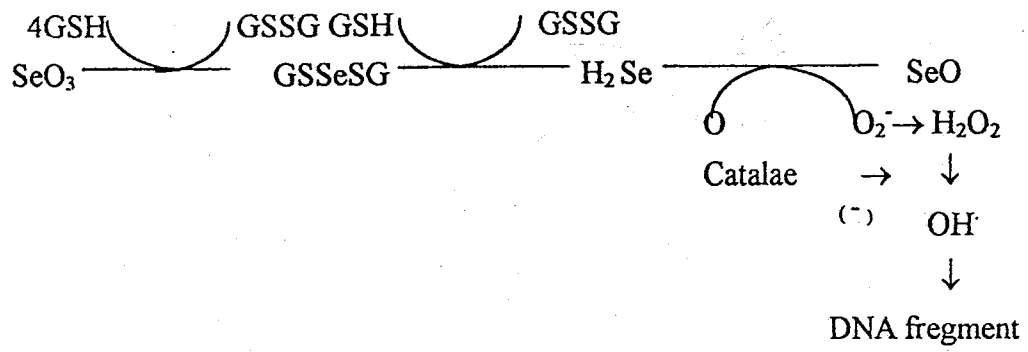


圖 2. 硒元素誘導腫瘤細胞進入自然凋零(Aptosis)之過程:

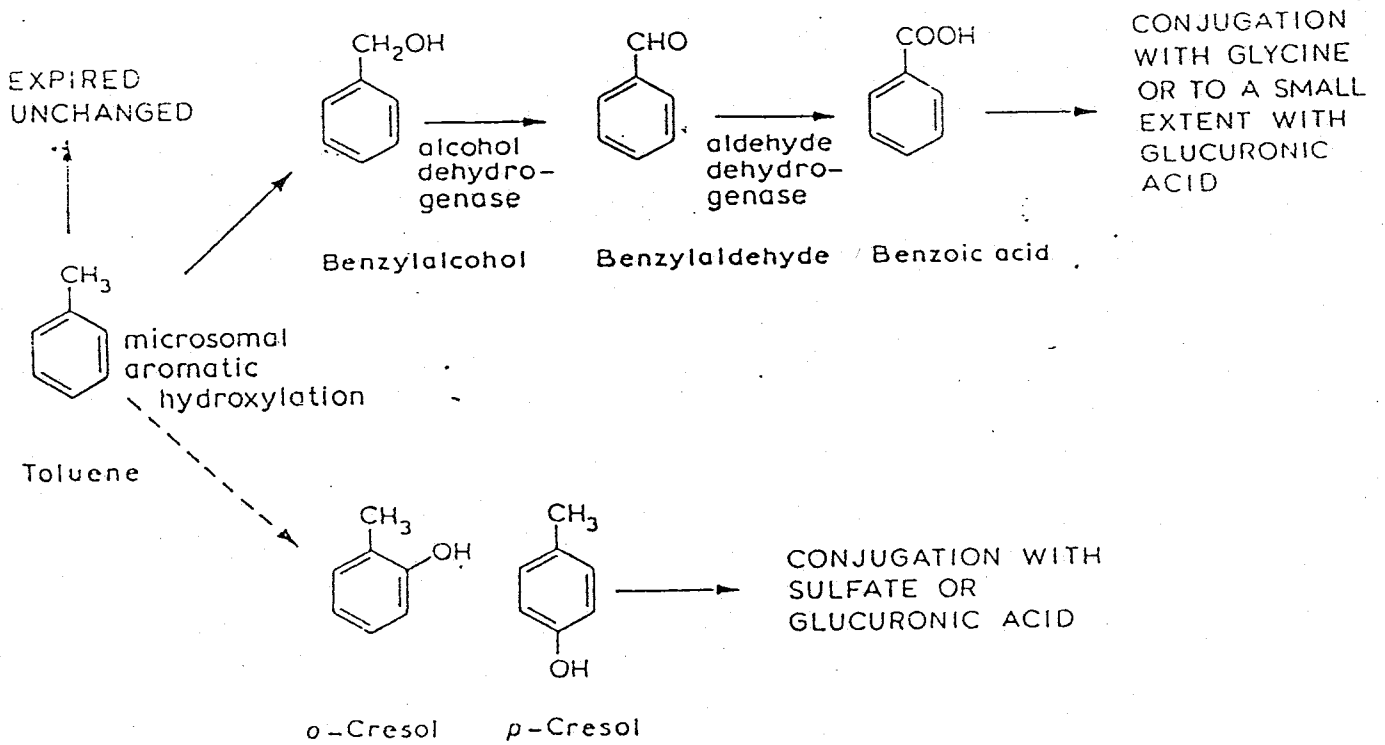
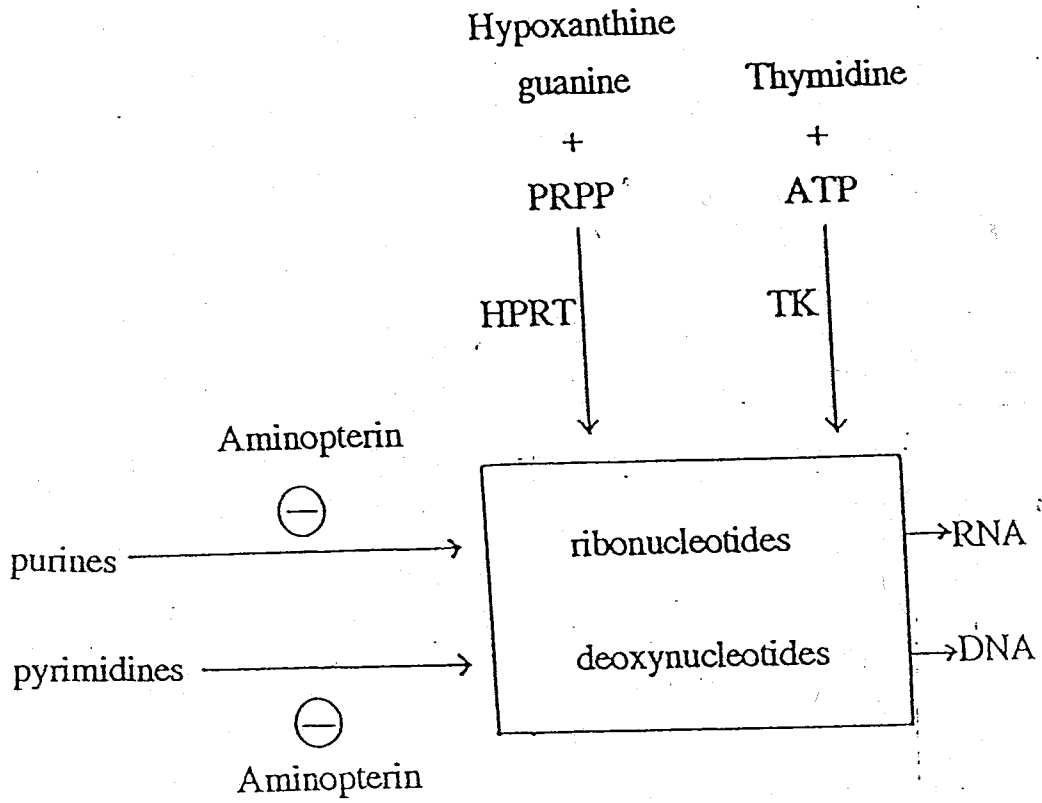


圖 3. 甲苯在生物體之轉型途徑:

salvage pathway



main synthetic pathway

圖 4. 次黃嘌呤磷酸核糖甘轉移酶(HGPRT)基因生化代謝路徑所扮演之角色:

Half reaction	E° (MU) PH 7.0 25 °C	
Alamar blue _(OX) + 2H + 2e ⁻	Alamar blue _(Red)	+380 (1)
Cytochromes + e ⁻	Cytochromes _(Red)	+ 290 (2)
MTT + 2H ⁺ + 2e ⁻	MTT	-110 (3)
FMN + 2H ⁺ + 2e ⁻	FMNH ₂	- 210 (4)
FAD + 2H ⁺ + 2e ⁻	FMDH ₂	- 220 (5)
NAD + 2H ⁺ + 2e ⁻	NADH + H ⁺	- 320 (6)
NADP + 2H ⁺ + 2e ⁻	NADPH + H ⁺	- 320 (7)

圖 5 Alamar blue 反應在呼吸電子傳遞鏈上氧化—還原狀態反應方程式。

在另一指示劑 MTT (3) 反應式, 其由 FMNH₂(4)、FADH₂(5)、NADA(6)、NADPH(7) 來還原, 並非從 cytochromes 還原, 而 Alamar blue 不僅從上述, 也從 Cytochromes 來, 由氧分子及 Cytochrome oxidase (cyta3) 為中間介質, 還原時移走氧分子由氫原子來取代。也可替代氧分子角色給氧化還原酶利用氧分子, 當為一電子受質。

Fluorescence 為 530-560nm 為 Emission 態
590nm 為 Excitation 態
Absorbance 為 570-600nm

實驗流程

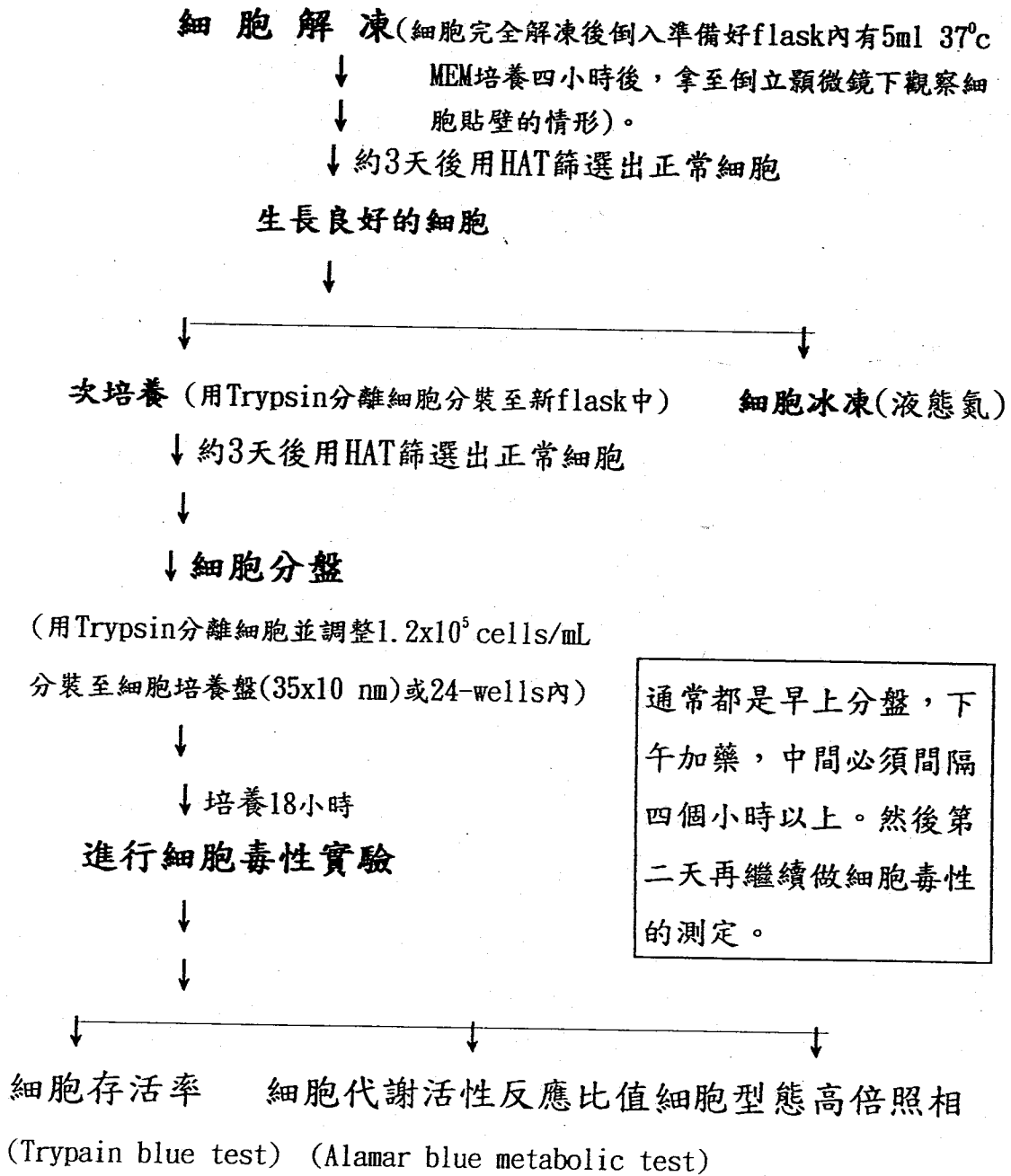


圖 6. 細胞培養實驗流程:

細胞存活率計數實驗 (Trypan blue test)

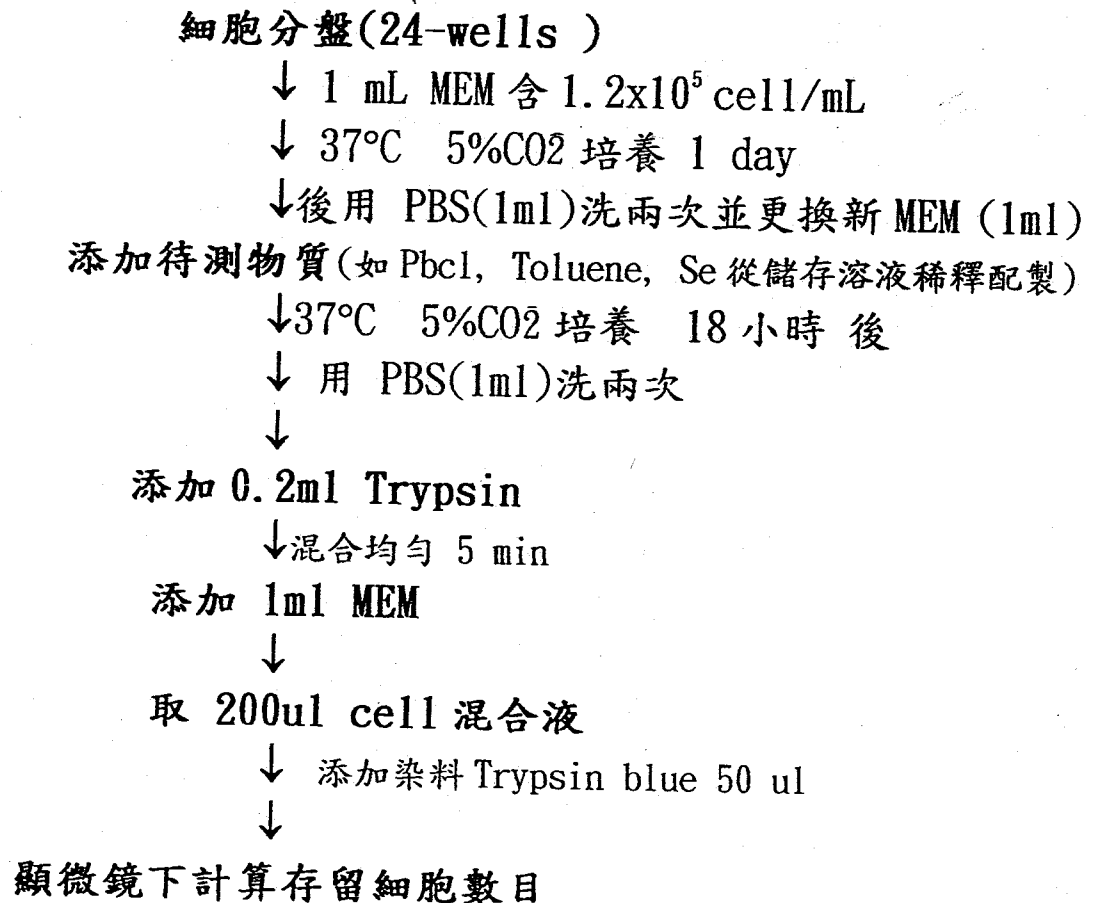


圖 7-1: Trypan blue test 流程:

細胞代謝活性反應實驗 (Alamar blue test)

細胞型態照相

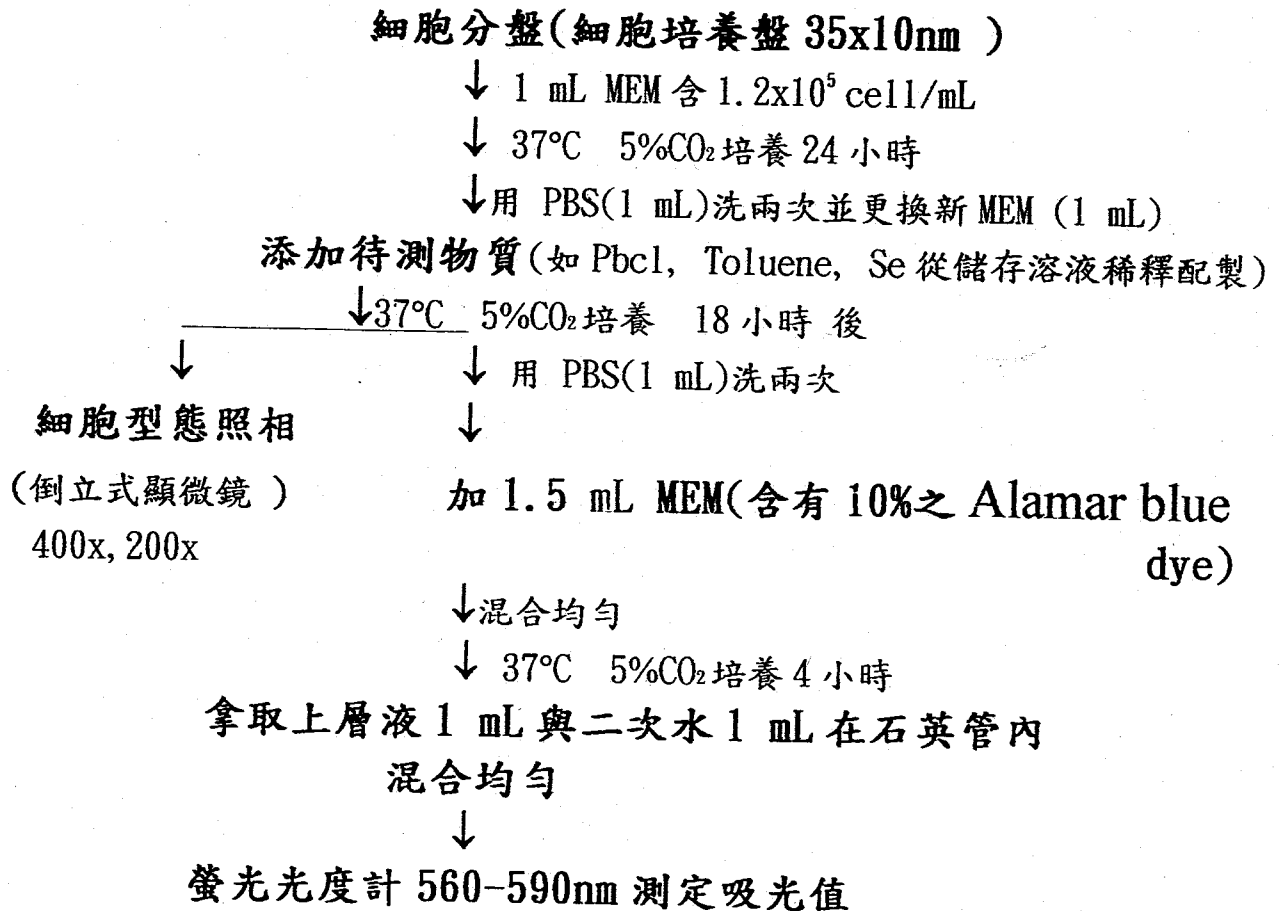


圖 7-2: Alamar blue test 流程:

pb^c

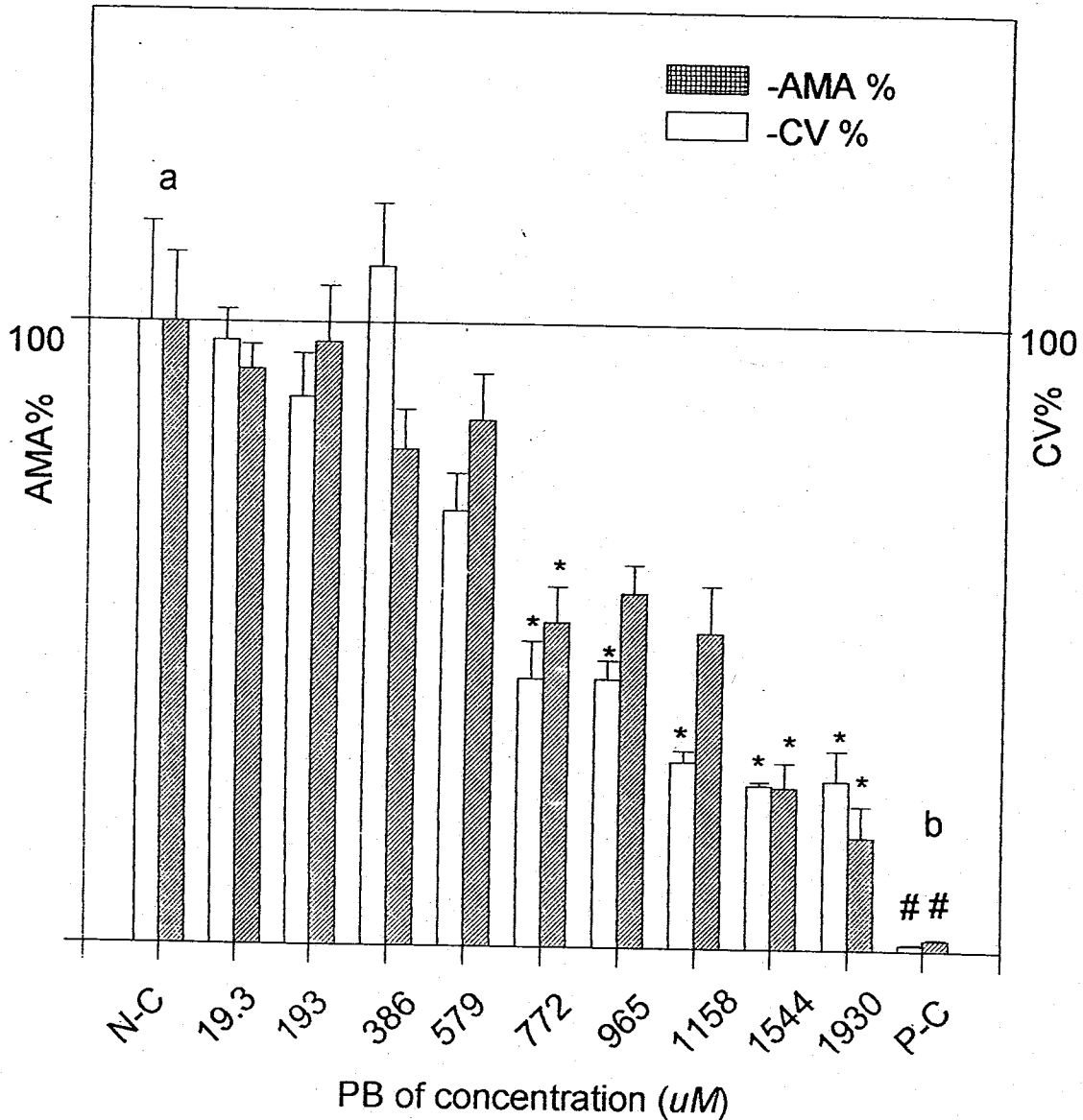


圖.8、

^cV79 細胞暴露氯化鉛金屬處理 18 小時後之 CV% 及 AMA% 之相關性。
迴歸曲線 $Y = -0.05 X + 1.19$ $r = 0.91$

a: 未暴露任何毒性物質之對照組 b: 暴露甲苯 $17.1 \mu M$ 之對照組。

*: 與 a 組比較有明顯差異 (t-test $p < 0.05$)

#: 與 a 組比較有明顯差異 (t-test $p < 0.01$)。

數據以平均值 \pm SD . 每一劑量有肆重複樣品。

Toluene

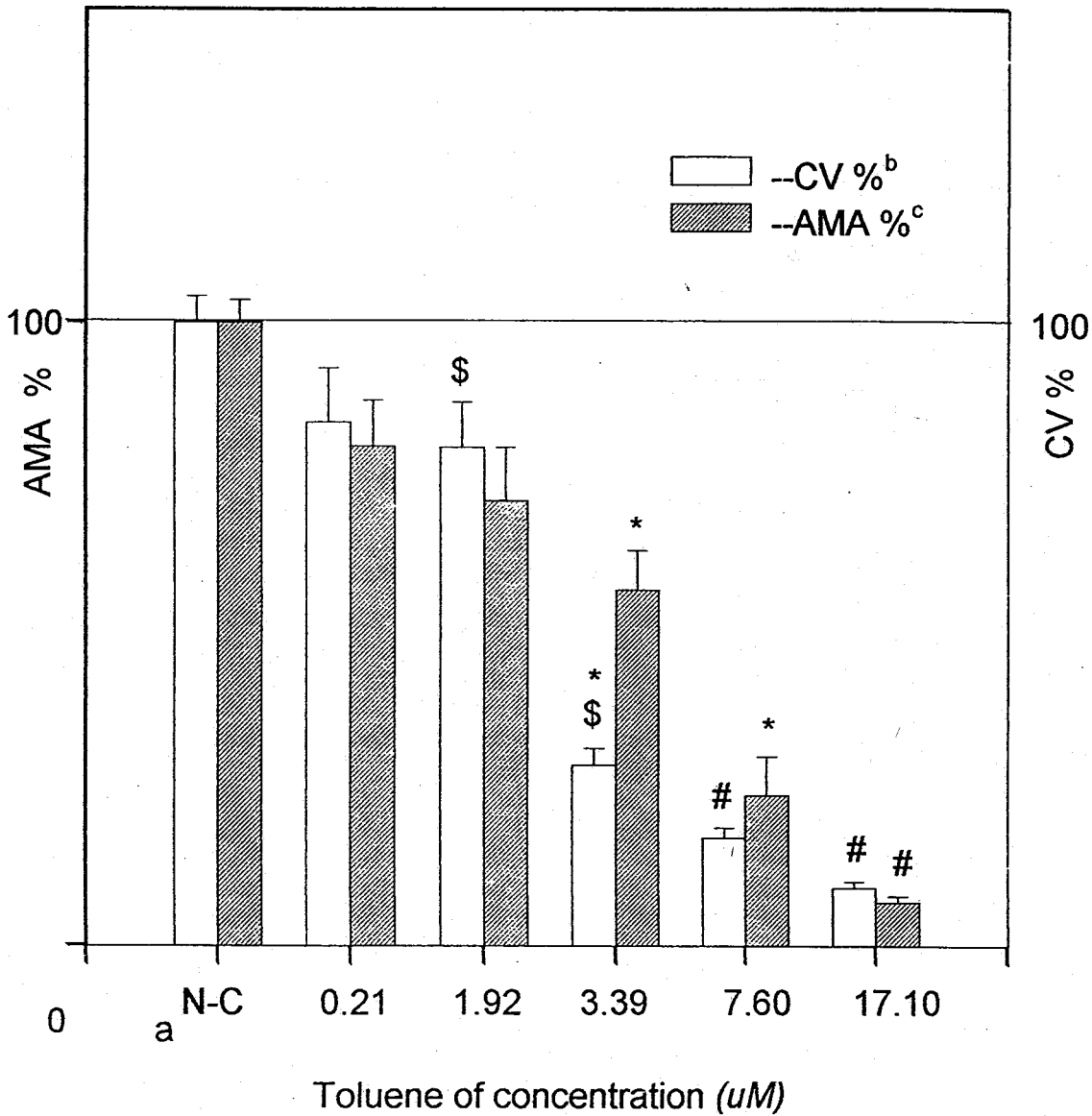


圖. 9、

V79 細胞暴露甲苯處理 18 小時後之 CV% 及 AMA% 之相關性。

迴歸曲線 $Y = -0.10X + 1.23$ $r = 0.94$

a: 未暴露任何毒性物質之對照組添加 PBS 150 ul

b: CV % = cell Viability %。

c: RCS% = The percent of Alamar blue metabolic activate response %

*: 與 a 組, \$: 兩組間比較有顯著差異 (t-test $p < 0.05$)

#: 與 a 組比較有顯著差異 (t-test $p < 0.01$)。

數據以 平均值 \pm SD . 每一劑量有肆重複樣品。

Toluene

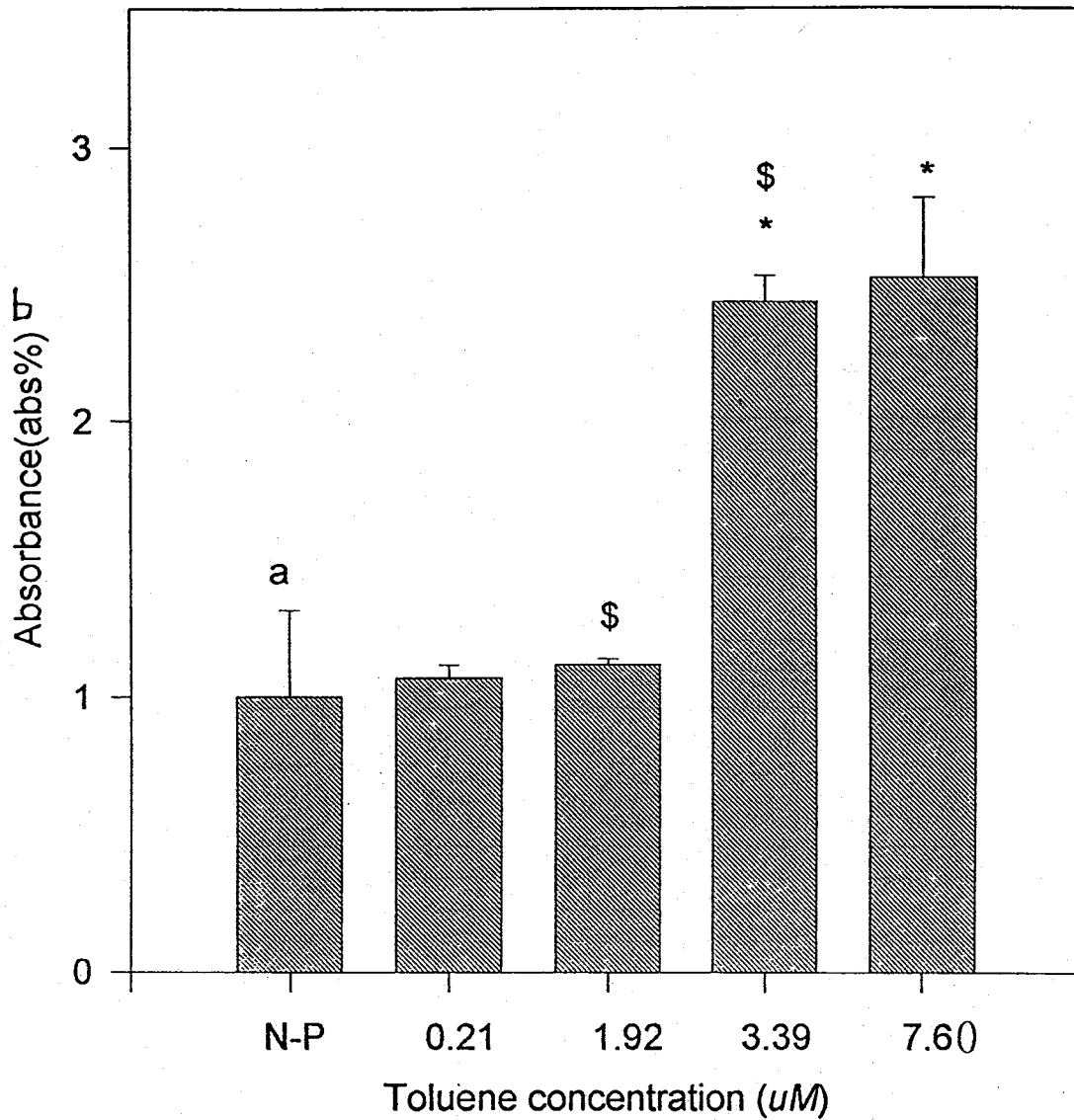


圖. 9-1、

V79 細胞暴露甲苯處理 18 小時後產生脂質過氧化(MDA)程度。

a: 未暴露任何毒性物質之對照組添加 PBS 150 ul

b: $ABS \% = \text{暴露甲苯 MDA 之吸光值} / \text{a 組 MDA 之吸光值} \times 100$ 。

*: 與 a 組比較有顯著差異(t-test $p < 0.05$)

\$: 為兩組數值比較有顯著差異(t-test $p < 0.05$)。

數據以平均值 \pm SD . 每一劑量有肆重複樣品。

Selenium

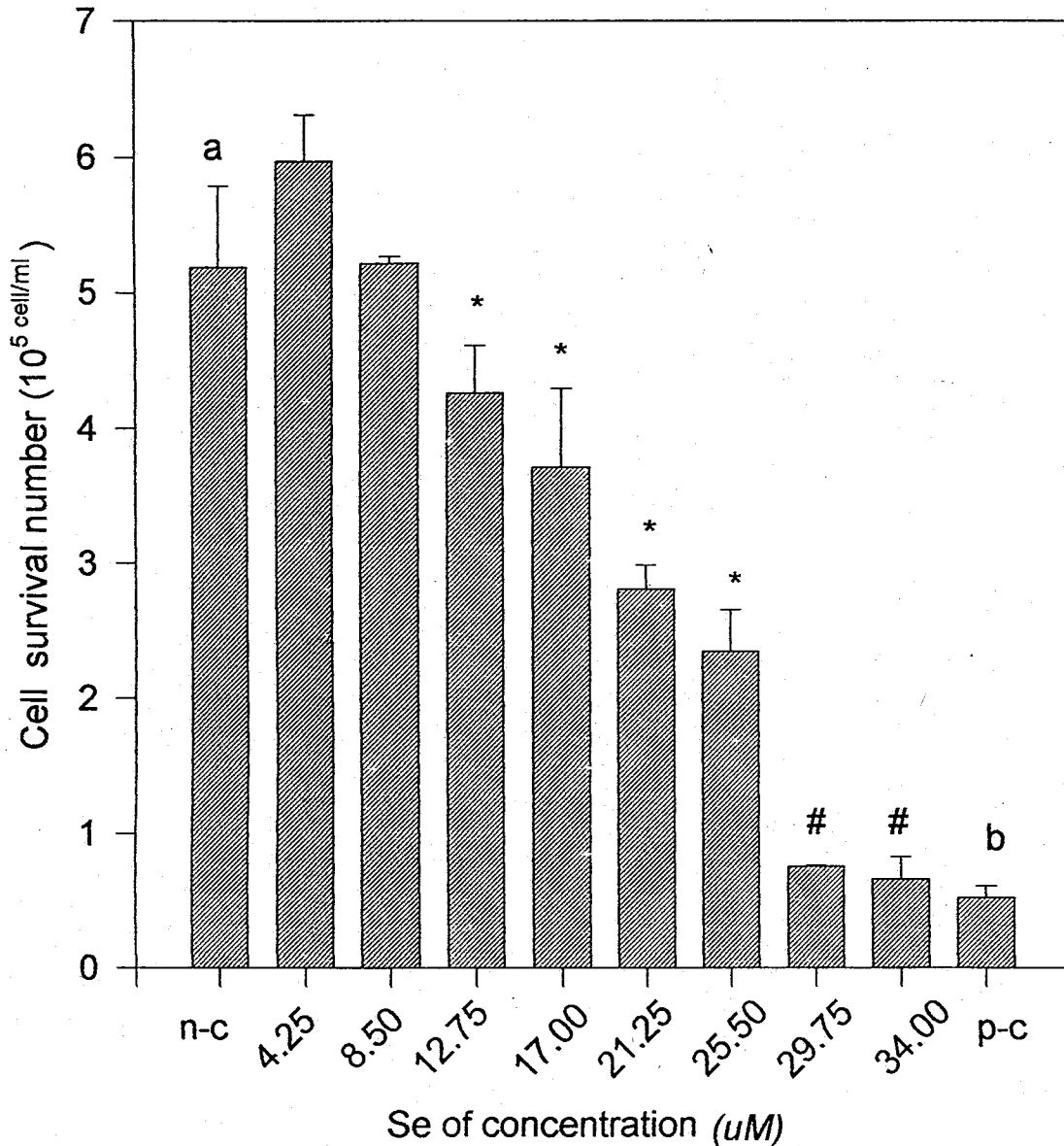


圖. 10、

V79 細胞暴露亞硒酸鈉處理 18 小時後之 CV % 值。

迴歸曲線 $Y = -0.33 X + 6.09$ $r = 0.94$

a: 未暴露任何毒性物質之對照組另添加 PBS 150 ul。

b: 暴露甲苯 17.1 μM 之對照組。

*: 與 a 組比較比較有明顯差異 (t-test $p < 0.05$)

#: 與 a 組比較比較有明顯差異 (t-test $p < 0.01$)

數據以平均值 \pm SD 表示。每一劑量有肆重複樣品。

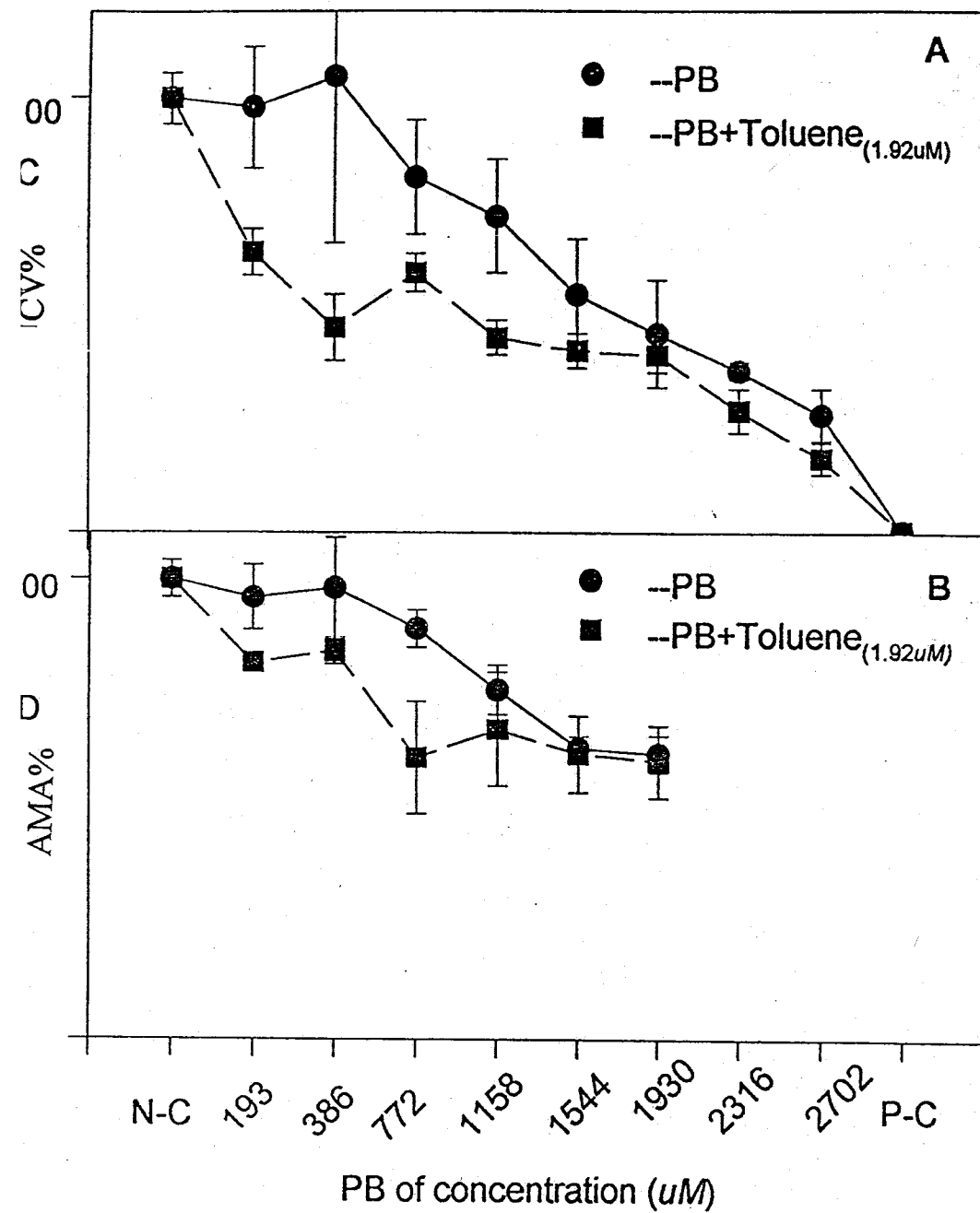


圖. 11、V79 細胞單一暴露氯化鉛與甲苯共同暴露處理 18 小時後比較其差異性。

A: PB 及 PB+ Toluene (1.9uM) 以 CV% 比較.

B: PB 及 PB+ Toluene (1.9uM) 以 AMA% 比較

C: CV %= cell Viability %

D: AMA% =The percent of Alamar blue metabolic activate response %

PTS

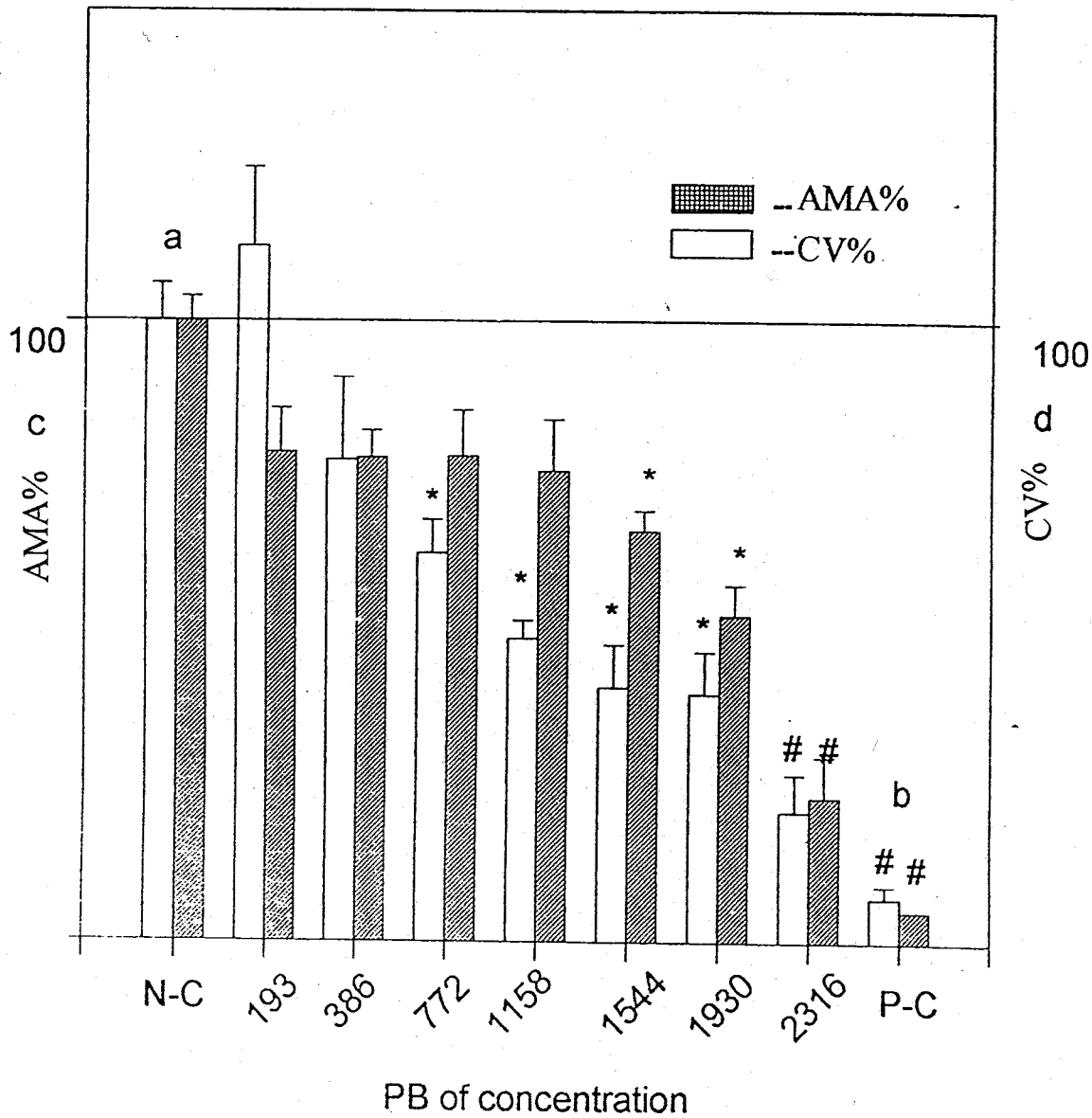


圖. 12、

V79 細胞共同暴露氯化鉛及甲苯中添加亞硒酸鈉(4.250M)處理 18 小時後對 CV% 及 AMA% 之相關性。

a: 未暴露任何毒性物質之對照組添加 PBS 150 ul

b: 暴露甲苯 17.1 μM 之對照組。

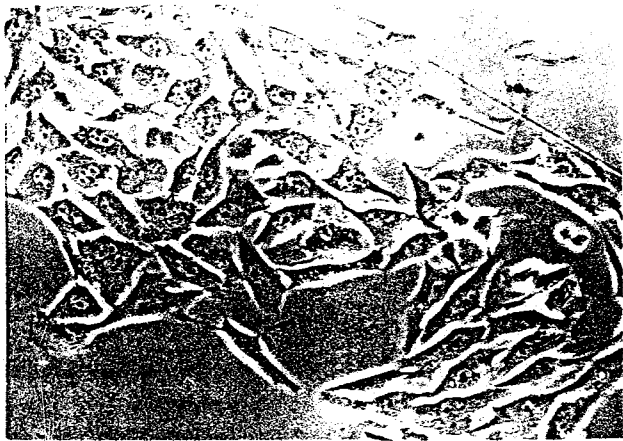
*: 與 a 組比較有明顯差異(t-test p<0.05)

#: 與 a 組比較有明顯差異(t-test p<0.01)。

數據以平均值 ± SD 表示. 每一劑量有肆重複樣品。



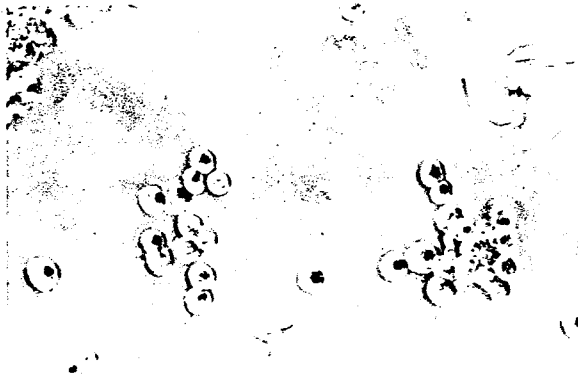
圖片 1-1. 未暴露任何毒性物質之 V79 細胞(200X)



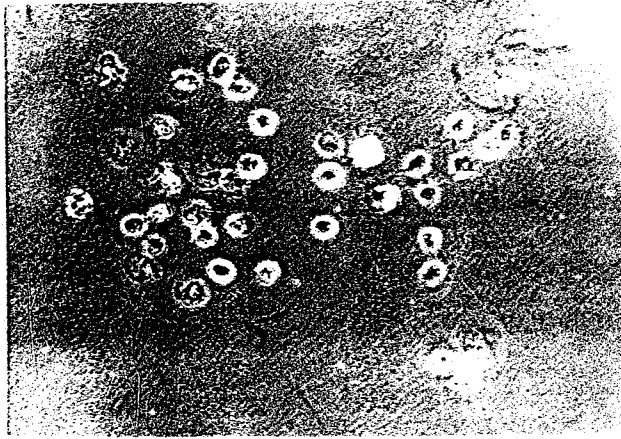
1-2. 未暴露任何毒性物質之 V79 細胞(400X)



圖片 2. 暴露之氯化鉛 772uM V79 細胞(400X)



圖片 3. 暴露之氯化鉛 1930uM V79 細胞(400X)



圖片 4. 暴露之甲苯 17.1uM V79 細胞(400X)



圖片 5. 暴露之氯化鉛 1158 uM、甲苯 1.71uM V79 細胞(400X)