

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

提升私校研發能量專案計畫-腐植酸及重金屬的環境化學與  
環境毒物學研究--子計畫六：環境腐植質對於胚胎發育之  
影響及作用機轉的探討(3/3)  
研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型  
計畫編號：NSC 95-2745-B-040-003-URD  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：呂鋒洲  
共同主持人：張雯惠  
計畫參與人員：大學生-兼任助理：薛敬議、葉帝言

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 01 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

提升私校研發能量專案計畫

腐植酸及重金屬的環境化學與環境毒物學研究

子計畫六：環境腐植質對於胚胎發育之影響及作用機轉的探討

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2745 -B040 - 003 - URD -

執行期間：95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

總計畫主持人：呂鋒洲

計畫主持人：呂鋒洲

計畫參與人員：巖正傑

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整

報告

處理方式：可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中華民國九十六年十月三十日

## 目 錄

摘要	p. 3
研究計畫背景及目的	p. 4
研究方法	p. 5-8
結果與討論	p. 8-9
結 論	p. 9-10
參考文獻	p. 10-11
計劃成果自評	p. 12
圖表	p. 13-23

## 摘 要

腐植酸(humic acid)是存在於環境中的酚類聚合物(polymers of phenolic acids)。它們不僅參與環境中一系列與人類生存有關的過程，而且與人類的健康有密切的關係。腐植酸是一種外源性的「安定的自由基物質」，本身又是多陰離子性的聚合物，可以和環境中之金屬及非金屬物質結合，例如鐵、砷甚至多氯聯苯等。而含腐植酸之自來水加氯消毒，亦被環境化學家及毒物學家認為加熱後會產生致癌性之三鹵甲烷。因此，我們當前應當特別重視研究腐植酸在誘發不同地方性疾病的不同致病機理，才能防患腐植酸誘發其他疾病之可能性。

腐植酸或其與砷共同暴露，皆會影響母鼠懷孕生產之結果，造成流產、死胎、早產，以及影響子鼠之發育，進一步探討子鼠器官之基因氧化性傷害，亦獲得類似之結果。基於以上之成果，除了繼續前述指標之觀察外，我們更針對母鼠懷孕期間賀爾蒙之變化及其與試劑暴露或懷孕生產結果之相關性做進一步之討論，而子鼠器官中氧化性傷害之指標亦為重要之研究重點。

結果顯示，在母鼠懷孕期間灌食腐植酸或砷，的確會影響與胚胎發育、分娩等有關之女性賀爾蒙產生變化，而這應該是造成流產、死胎、早產，以及影響子鼠之發育的重要原因之一，其次，包括母鼠與子鼠皆有基因氧化性傷害之出現以及子鼠器官中之抗氧化酵素活性改變等結果，證明氧化性壓力亦為另一重要因素。

## 研究計畫背景及目的

任何化學物質對生物體都可能貽害，視其化學性質、暴露劑量、暴露途徑及作用時間之長短而定。有關化學物質在環境蓄積引起之生物轉化及生物濃縮等效應，如：致腫瘤性、致畸胎性、造成生育能力受損、遺傳基因突變的例子，不勝枚舉。儘管有部分環境因子的毒理機制與預防之道已逐漸為大眾所知；但是環境有害物質何止成百上千，其個別化合物的毒性作用與致病機轉亦各有不同。腐植酸（humic acid）是存在於環境中的酚類聚合物（polymers of phenolic acids）。它們不僅參與環境中一系列與人類生存有關的過程，而且與人類的健康有密切的關係。由於分析設備技術的巨大發展，長期以來，難以解決的腐植酸的測定與分析的問題，逐步得到解決。在這種情況下，腐植酸類物質已成為環境地球化學以及環境毒理學的重要研究對象。近 40 年來，中國大陸和台灣學者在「腐植酸自由基」與克山病、大骨節病、甲狀腺腫和烏腳病的致病的關係的研究證實，飲用水和土壤中過高的腐植酸有利於上述地方性疾病的發生(1)。學者們進一步的研究顯示，環境中的腐植酸降低了硒、碘的生物可利用性。腐植酸是一種外源性的「安定的自由基物質」，本身又是多陰離子性的聚合物，因此腐植酸除加上上述兩種因素外，再與第三種致病因子的結合可能是克山病、大骨節病、甲狀腺腫和烏腳病的病因因素。我們當前應當特別重視研究腐植酸在誘發不同地方性疾病的不同致病機理，才能防患腐植酸誘發其他疾病之可能性。此外，烏腳病地區亦具有高度流行率的癌症（膀胱癌、腎臟癌、肺癌、皮膚癌、肝癌、攝護腺癌等）、糖尿病、心血管疾病、高血壓以及甲狀腺腫大等各種疾病(1-6)。台灣學者先後發現井水中砷含量偏高和腐植酸偏高（1-2, 7-14），因此其環境致病之可能性即相對增加。

# 研究方法

## 1. 腐植酸之來源與製備

The source of humic acids used in this work

Sample	
HA	Purification from commercial HA(Aldrich)
SHA	Synthetic humic acid from Protocatechuic acid
HA 4	Protocatechuic acid monomer
HA 16	Synthetic humic acid from Protocatechuic acid
HA 44	Commercial HA (Aldrich) M.W. > 5K
HA 135	Synthetic humic acid from Protocatechuic acid

As: arsenic trioxide(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

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

## 3. 重要研究工作內容

### (1) 老鼠胚胎暨小鼠發育毒性試驗

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

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

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

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

C. 母鼠預先暴露腐植酸與砷，懷孕中止觀察胚胎之發育

在母鼠懷孕之前先預處理暴露腐植酸與砷 4 週後，採集母鼠陰道抹片，觀察細胞型態若為 P 或 E phase 即給予交配。隔天再度採集陰道抹片，觀察有無精蟲若有，將給與交配後一天定為第一天。於受精後第 9 天，進行解剖，檢測其懷孕成功率、胎胎的數目、黃體數目等。

胚胎取出後以解剖顯微鏡觀察其外部結構是否正常，並在培養箱中培養 1-2 天觀察其發育情形。

## 生化分析

1. **8-OHdG 含量**：取適量之器官樣品交由「基因氧化性傷害子計畫」分析。所取得之細胞或動物器官組織需先 DNA 萃取出並進而消化。然而這些步驟過程中經常會導致人為氧化而造成人為的 8-OHdG 生成。因此本研究將加入不同濃度之抗氧化劑(Desferrioxamine)，以求在各種生物樣本 DNA 萃取的最佳方法，避免 DNA 在萃取過程中有人為氧化發生。消化過後之 DNA 細胞樣本需經固相萃取之步驟以純化細胞樣本。固相萃取採用 Sep-pak 之 C18 cartridge (100mg/ml)，經過 1ml 之 Methanol 及水活化過後，便倒入消化過後之細胞樣本。最後以 40% Methanol 沖提出。再將富含 8-OHdG 及 dG 之沖提液濃縮後回溶至 5% acetonitrile/0.1% formic acid 準備以 LC-MS/MS 分析。
2. **抗氧化能力評估**：取適量之器官樣品分別加入 Tris-HCL buffer 或 5% trichloroacetic acid 均質液研磨後，測其組織中 SOD、Catalase、GSH peroxidase 及 GSH redustase 之濃度。
3. **懷孕與胚胎發育相關賀爾蒙之分析 (16-17)**：

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

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

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

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

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

## 結果與討論

1. 母鼠於受孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物。為評估劑量之毒性影響及基因氧化性傷害，將待胎鼠出生後，持續觀察其成長狀況及稱體重並按時於初生時、體重 3 克(或出生 5 天)、體重 5 克(或出生 10 天)及出生達 21 天時分批犧牲取樣。這些對小鼠成長速率之影響會和每胎仔鼠數目(表 1-2)、母鼠哺育情形以及藥物皆有影響，為克服部份影響因素，每種試劑組合多有 4-5 胎母鼠以上之試驗，以盡量有客觀之觀察。合成之腐植酸(HA16)+As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 卻一連造成 4 隻以上之母鼠死胎或流產，經腐植酸劑量減半後才有小鼠產出，但死亡率較高(表 1)。
2. 目前正依據前述實驗之經驗，持續餵食懷孕母鼠，並於懷孕第 20 天中止懷孕，取出胚胎觀察其發育情形，並取樣供後續染色觀察或生化分析使用，而不同來源之腐植酸(HA, HA135 及 SHA)單獨抑或是和砷共同暴露，即造成部份之母鼠死亡，死胎或流產，(表 2)。
3. 為進一步探討其原因，亦提供樣品給「基因氧化性傷害子計畫」來探討基因傷害(表 3)。我們也自行分析器官內抗氧化能力及作病理切片，目前已先完成部份抗氧化能力分析(圖 1-4)。
4. 懷孕與胚胎發育相關賀爾蒙之分析結果顯示(圖 5-8)，單獨餵食 HA 之母鼠在懷孕後期(給藥滿 11 天)血液中之 hCG(圖 5)含量明顯高於各組

( $p<0.05$ )，而 Estradiol (圖 6) 在懷孕中期(給藥滿 6 天)在單獨餵食砷之母鼠血液中偏低 ( $p<0.05$ )，但是在後期(給藥滿 11 天)之各給藥組皆較控制組為高 ( $p<0.05$ )。單獨暴露砷及與 HA 共同暴露在懷孕中期(給藥滿 6 天)讓 Progesterone (圖 7) 濃度較控制組有明顯上升之現象 ( $p<0.05$ )，但是到後期除了 HA 組稍高於控制組外，其他兩組皆較低。至於 Prolatin (圖 8) 之濃度則是給藥組在懷孕後期(給藥滿 11 天)皆較控制組為低，單獨暴露砷及與 HA 共同暴露組則呈現有意義之下降 ( $p<0.05$ )。此外，在預先給藥暴露而在懷孕第 9 天中止懷孕取出胚胎觀察結果並未發現有外觀發育不良或畸型之現象。若進一步將配種生出之小鼠保留部分繼續於飲水中給予藥物 (HA 500mg/L or As 10 mg/L)，待其成熟後將暴露相同藥物之小鼠配種，持續觀察至第三子代，則可發現飲用腐植酸或是腐植酸加砷之母鼠受孕能力下降 (受孕比例：control 100%；HA 21.7%；As 13.3%；HA+As 30%)，其詳細機轉是否與賀爾蒙變化有關尚待進一步實驗證實。

## 結論

1. 砷和腐植物質間之交互作用及和毒性作用間之相關性也需要更進一步之探討，由實驗數據顯示，砷和腐植酸確實有毒性相加作用，而自由基是其中一項重要影響因子。
2. 探討腐植物質毒性作用之標的器官與影響程度，以及對致畸胎等之影響。目前已完成初步工作，也得到許多資訊，例如不同來源之腐植酸和三氧化二砷共同暴露或單獨暴露會造成流產，未來將朝更細部之毒性致病機轉探討。
3. 在胚胎發育期間暴露砷和腐植酸會明顯提高母鼠體內及小鼠臟器內 8-OHdG 含量，未來可進一步探討基因傷害之影響程度與可能機轉。

4. 在母鼠懷孕期間灌食亦或預先暴露腐植酸或砷(短期或長期)，的確會影響與胚胎發育、分娩等有關之女性賀爾蒙產生變化，而這應該是造成流產、死胎、早產，受孕能力下降以及影響子鼠之發育的重要原因之一。

## 參考文獻

1. 呂峰洲 腐植酸,自由基與烏腳病 國科會生命科學簡訊 17(6):2003.  
<http://biometrics.sinica.edu.tw/nsc/v17-06/article/.php3>.
2. Tseng C.H., Tseng C.P., Chiou H.Y., Hsueh Y. M., Chong C.K., and Chen C. J. Epidemiologic evidence of diabetogenic effect of arsenic. Toxic. Lett. 133:69-76, 2002.
3. 廖勇柏,陳建仁,李文宗,徐書儀 台灣地區癌症死亡率與發生率電子地圖的建構及使用 台灣衛誌 22(3):227-236, 2003.
4. Chen C.J., Lin L.J. Human carcinogenicity and atherogenicity induced by chronic exposure to inorganic arsenic. In:Niagu, J.O.(Ed.) Arsenic in the Environment, Part II :Human Health and Ecosystem Effects. Wiley, New York, pp.109-131, 1994.
5. 王少芬,魏建模,楊詔凱,楊末雄 地下水的砷污染 烏腳病和其他相關的健康問題 化學 61(3):351-362, 2003.
7. 呂峰洲,楊重光,林國煌,嘉南烏腳病患區飲用地下水之理化性質 台灣醫學會雜誌 74:596-605, 1975.
8. 呂峰洲,蔡孟慧,林國煌,烏腳病地區飲水中螢光物質之研究 第一版,雞胚胎毒性研究 台灣醫學會雜誌 76:58-63, 1977.

9. 呂峰洲, 蔡孟慧, 林國煌, 烏腳病地區飲水中螢光物質之研究 第二版, 螢光物質之分離與其鑑定 台灣醫學會雜誌 76:209-217, 1977.
10. 呂峰洲, 蔡孟慧, 林國煌, 烏腳病地區飲水中螢光物質之研究 第三版, 螢光物質之分離與其鑑定 台灣醫學會雜誌 77:68-76, 1978.
11. 呂峰洲, 林信源, 許隆隆, 林國煌 烏腳病地區地下飲用水中螢光物質之再檢討 台灣醫誌 79:1094-1101, 1980.
12. 呂峰洲, Irgolic K.J., 林啟文, 林國煌, 董大成 烏腳病患區中水中螢光物質之研究 井水內含麥角胺 台灣醫誌 81:1087-1100, 1982.
13. 呂峰洲, 沈佩明 烏腳病患者某一井水中的化學致癌物質辟瘟酸酯 台灣醫誌 86:734-742, 1987.
14. 呂峰洲, 山村行夫, 山內博 台灣烏腳病患一口井水中螢光物質之研究: 腐植物質 台灣醫誌 87:66-75, 1988.
15. Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology*. 24(1):65-78, 1981 Aug.
16. Gerhard I, Waibei S, Daniel V, Runnebaum B. Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. *Human Reproduction Update*. 4(3):301-309, 1998.
17. David L, Olive Role of Progesterone Antagonists and New Selective Progesterone Receptor Modulators in Reproductive Health. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 57(11):S55-S63, 2002.

## 計劃成果自評

綜觀三年研究期間，共計參與並協辦 1 次國際會議並口頭報告相關研究成果，參與國內學術研討會並發表 2 篇壁報論文，而參與研究計畫之大專生亦有 3 人次順利進入各校研究所進修。此外，研究成果證明腐植酸與砷的確會影響與胚胎發育、分娩等有關之女性賀爾蒙產生變化，而這應該是造成流產、死胎、早產，受孕能力下降以及影響子鼠之發育的重要原因之一，相關數據亦在整理撰寫準備投稿 1-2 篇 SCI 論文。

## 圖表

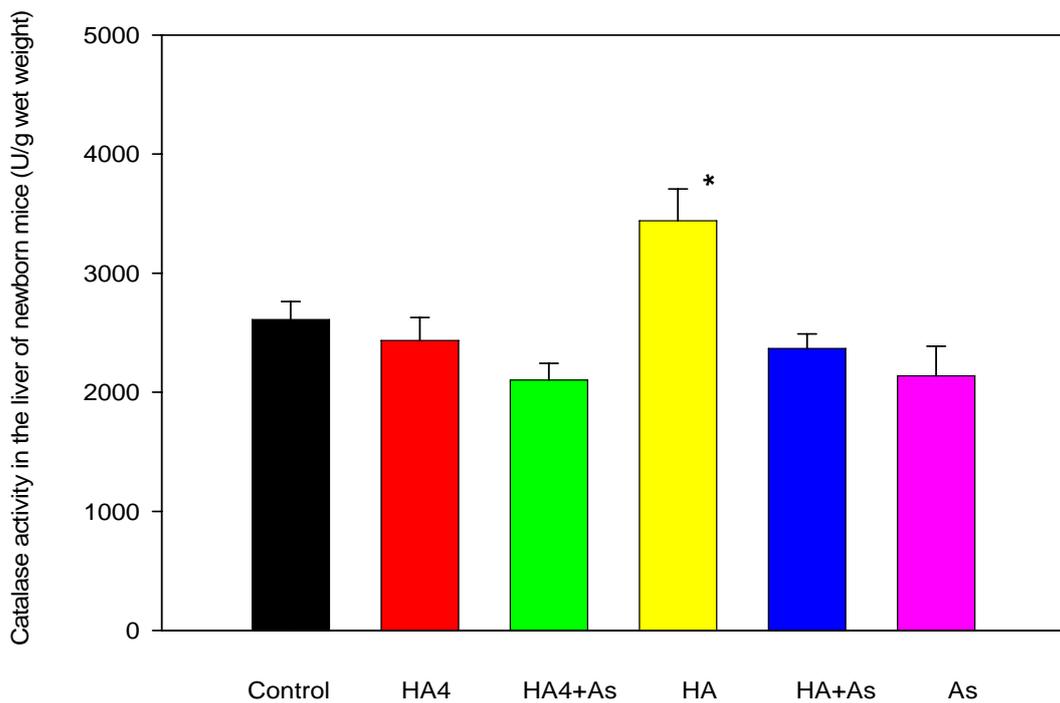


圖 1. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $As_2O_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 Catalase 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物 (\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

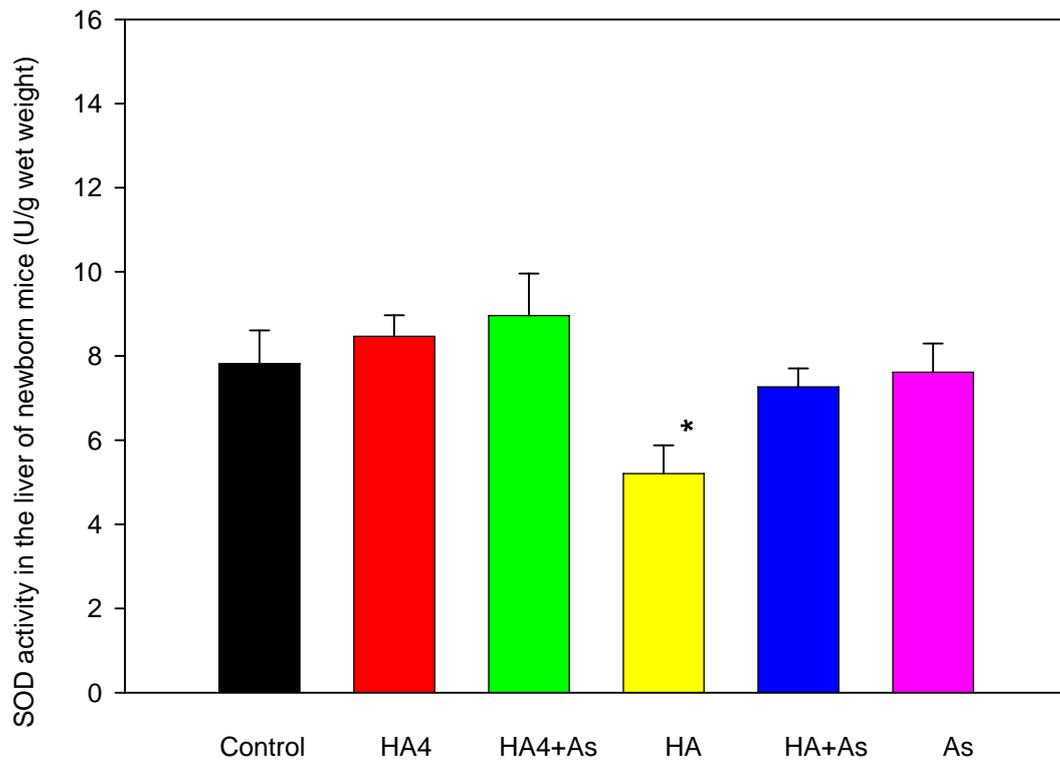


圖 2. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 SOD 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物 (\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

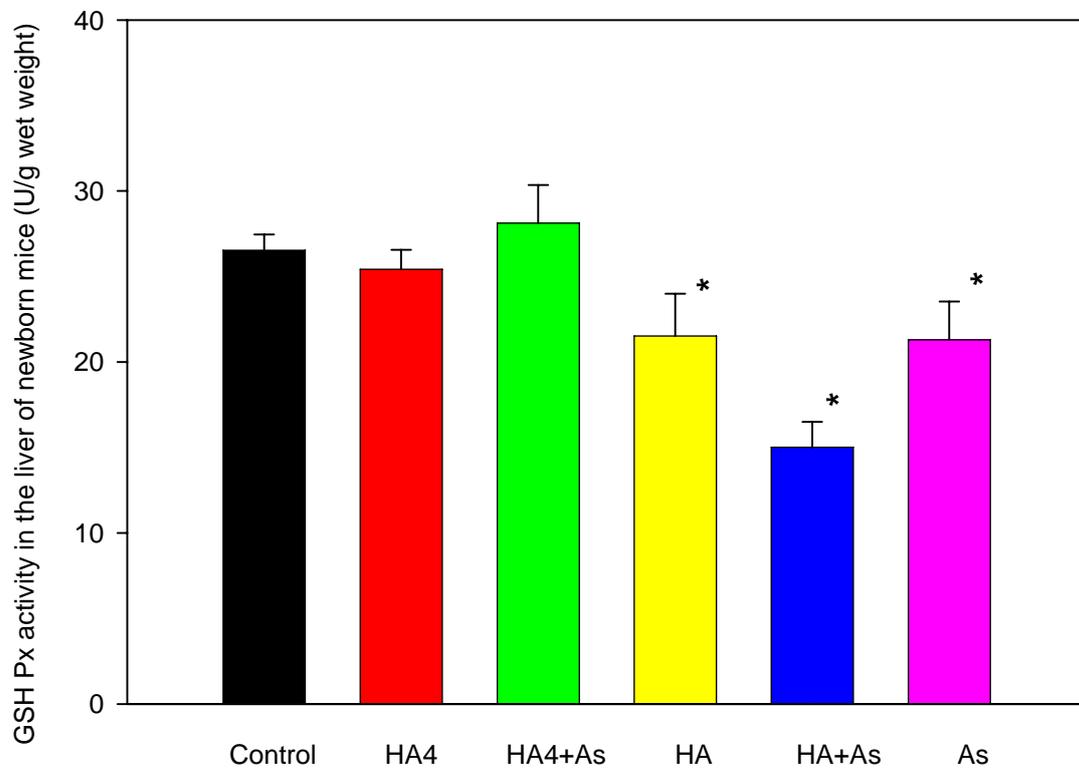


圖 3. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $As_2O_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 GSH peroxidase 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物 (\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

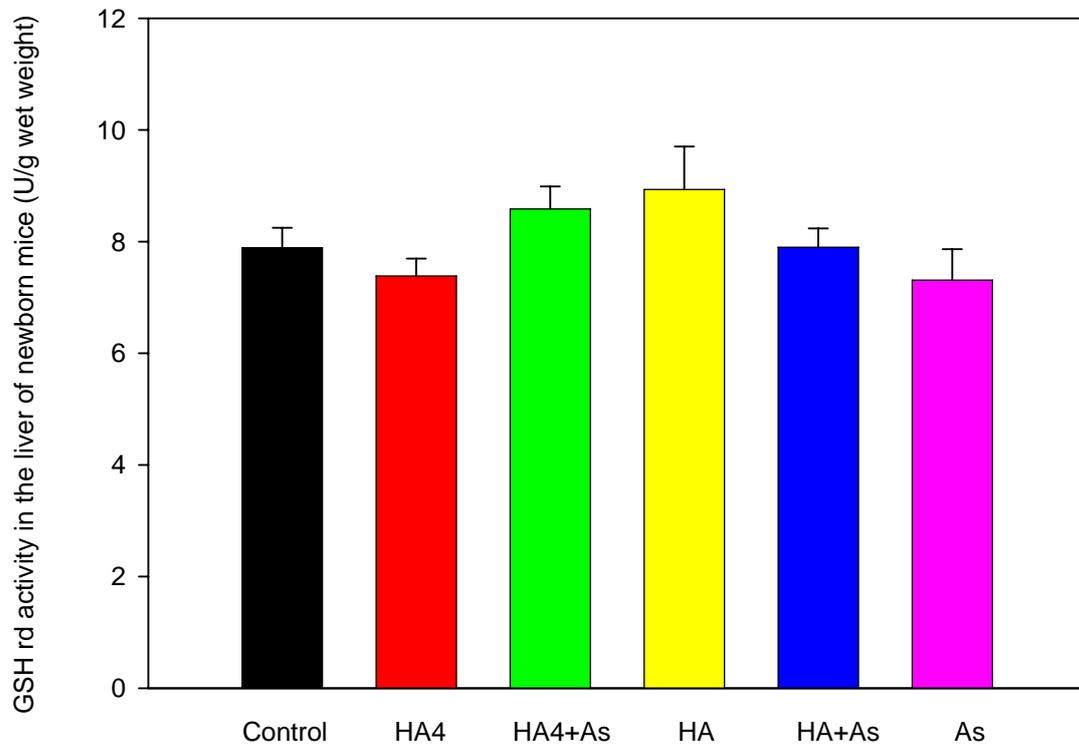


圖 4. 胚胎發育期受到腐植酸 (HA) 和砷 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) 共同暴露之新生小鼠測其肝臟中 GSH reductase 之濃度。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入不同來源之腐植酸或砷等藥物 (\*,  $p < 0.05$ , compared with control group)。

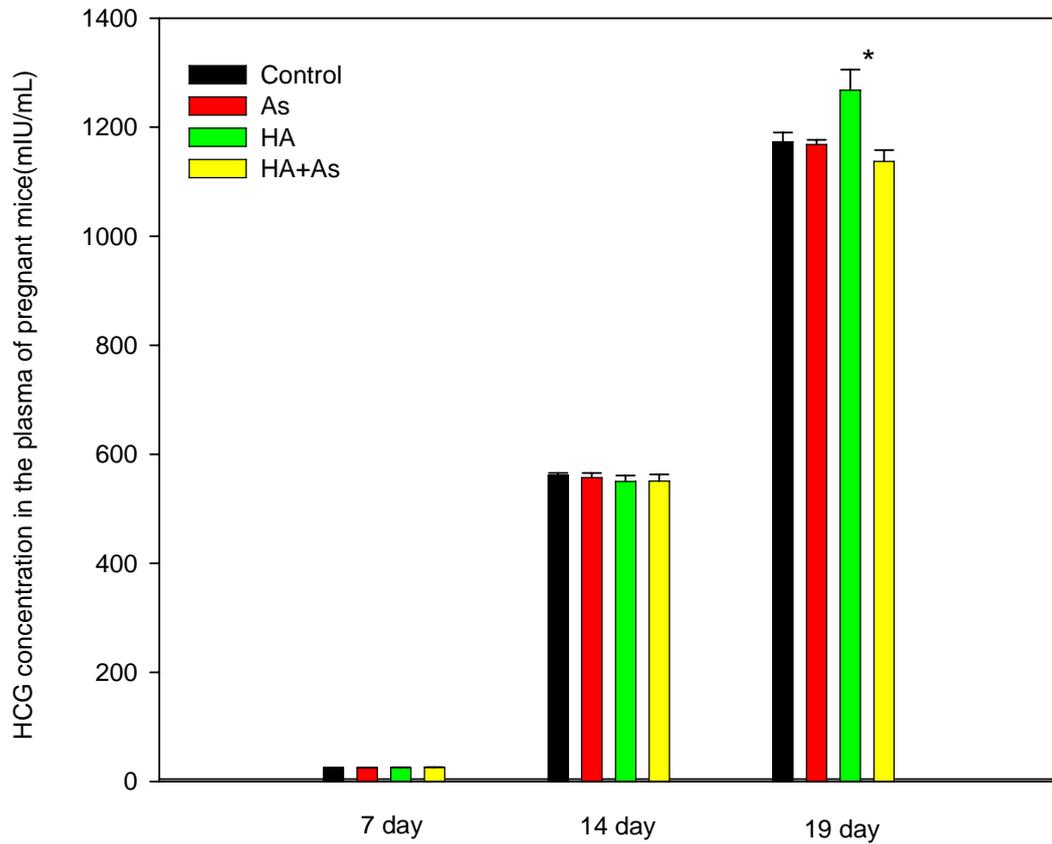


圖 5 不同懷孕時期（第 7, 14, 及 19 天）之母鼠血液中 hCG 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。

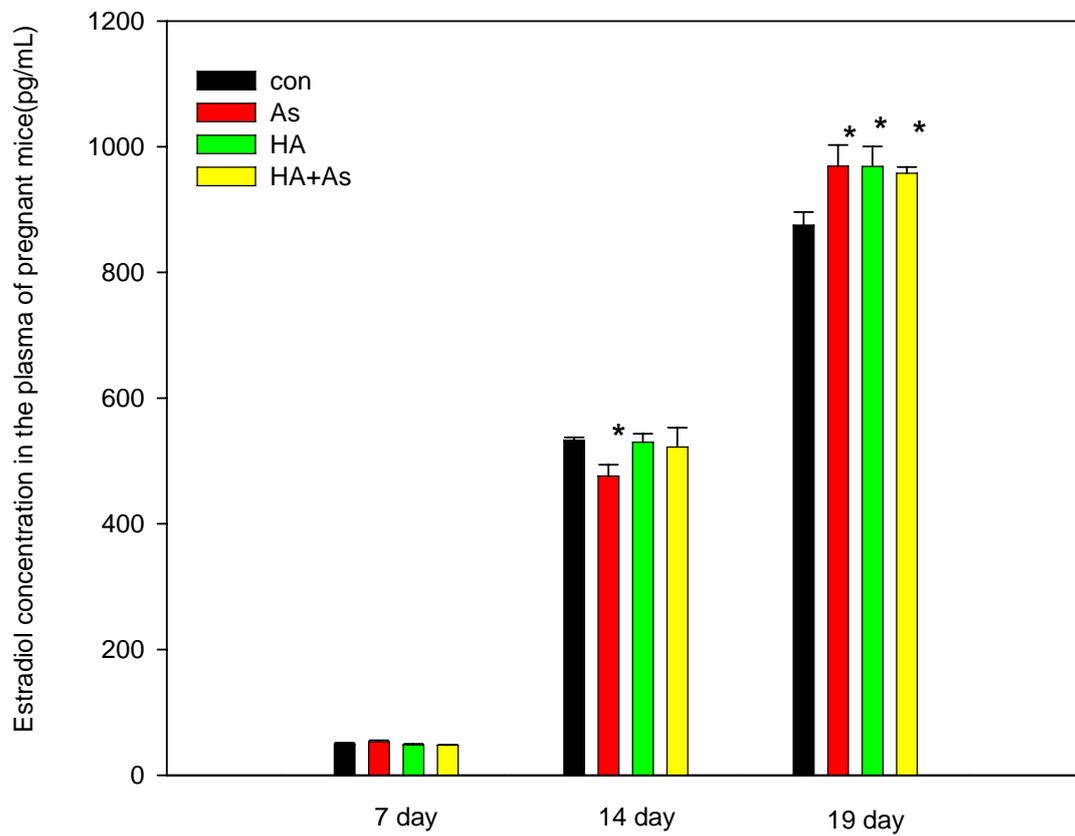


圖 6 不同懷孕時期(第 7, 14, 及 19 天)之母鼠血液中 Estradiol 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。

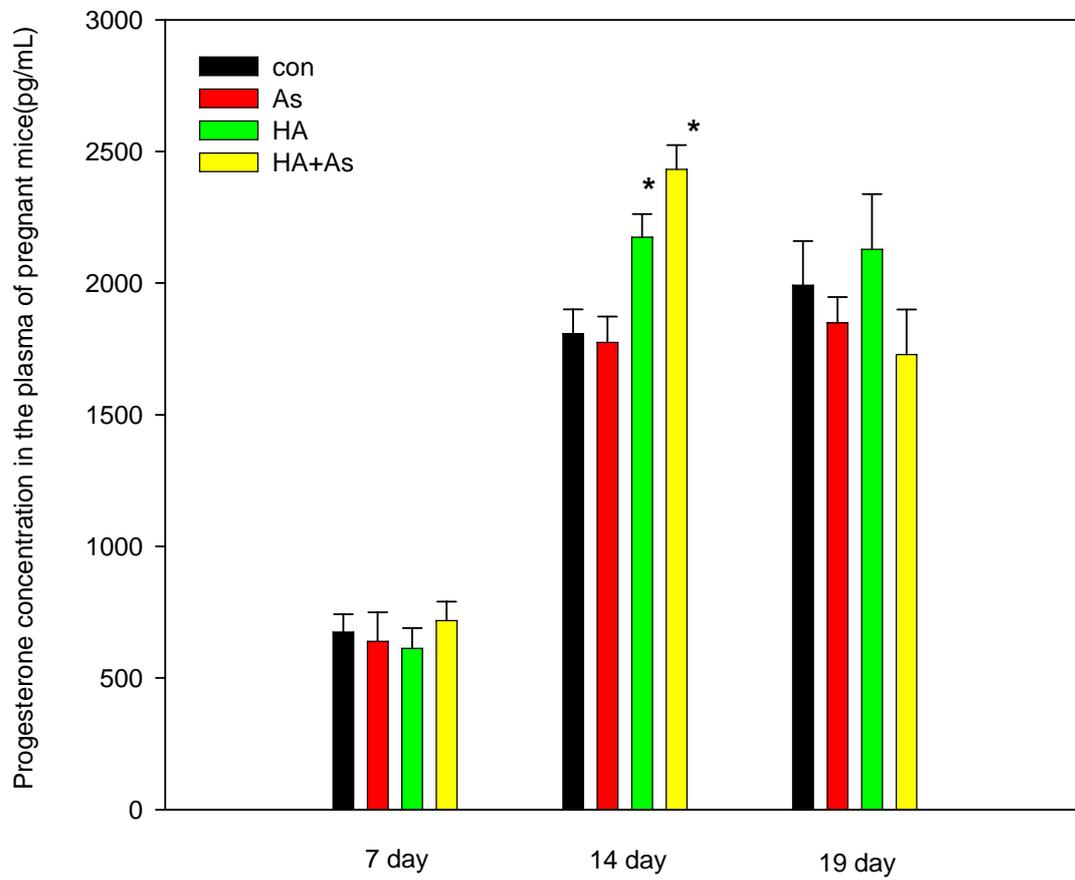


圖 7 不同懷孕時期（第 7, 14, 及 19 天）之母鼠血液中 Progesterone 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。

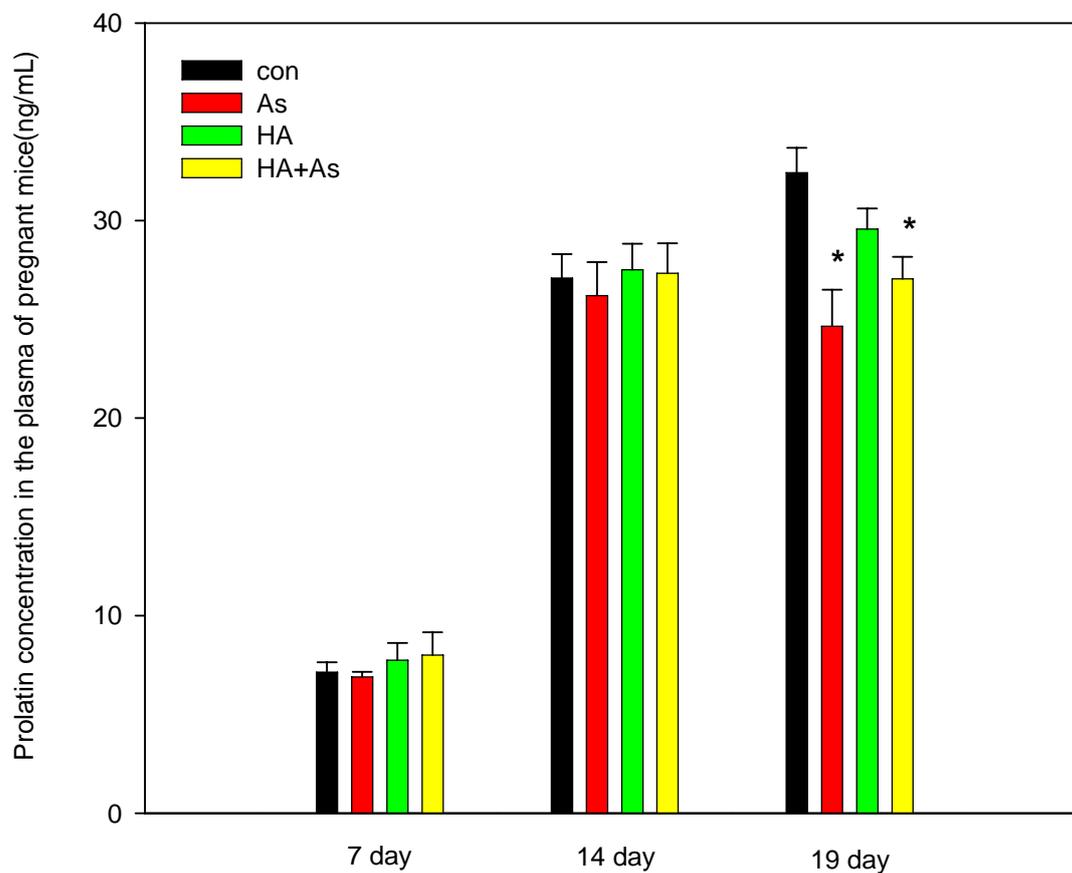


圖 8 不同懷孕時期(第 7, 14, 及 19 天)之母鼠血液中 Prolatin 濃度之變化。母鼠於懷孕後第八至十八天(共 11 天)以灌胃管之方式每天注入腐植酸或砷等藥物 (\*  $p < 0.05$ , compared with control group)。

Table1. Development of infant which were exposed to HA or As from day 8–18  
During embryonic stage

Treatment of pregnancy mice	Average newborn per female mice	Ratio of live births(live birth of newborn/total newborn)	Average body weight of infants after 20 day	
Control	10.375	0.98	10.332	
saline	12.33	1	9.483	
HA 125mg/Kg BW	11.67	1	10.674	
HA 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	13	0.846	5.917	
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	10	1	13.51	
HA16 125mg/Kg BW	12	0.979	14.164	
HA16 125mg/Kg BW +As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	0	0	0	Abortion, stillborn, or death
HA16 62.5mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	9.5	0.684	13.835	
HA44 125mg/Kg BW	10.75	0.93	14.782	
HA44 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	14.5	0.966	9.727	
HA4 125mg/Kg BW	14.67	1	12.256	
HA4 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	7	1	11.065	

Table 2. Adverse pregnancy outcomes of female mice which were exposed to HA or As from day 8-18 by P.O. during pregnancy

Treatment of pregnancy mice	Ratio of death (%)	Ratio of preterm delivery(%)	Ratio of abortion(%)
Control	0	0	0
HA125mg/Kg BW	0	40	0
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	0	0	20
HA125mg/Kg BW+ As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	0	50	0
SHA125mg/Kg BW	0	0	0
SHA125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	25	25	25
HA135 125mg/Kg BW	0	0	0
HA135 125mg/Kg BW + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 12.5 mg/Kg BW	50	0	0

表 3、母鼠肝臟與尿液中 8-OHdG 含量

組別	Control(n=5)	HA(n=4)	As(n=4)	HA/As(n=5)
肝臟(8-OHdG / 10 <sup>6</sup> dG)	21.96±2.92	33.48±4.26*	46.77±11.04*	51.3±7.54*
組別	Control(n=3)	HA(n=3)	As(n=4)	HA/As(n=4)
尿液(ng/ml)	2.15±1.59	6.59±2.33*	9.04±2.91*	7.00±4.77*

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

表 4、剛出生子鼠肝臟與腎臟中 8-OHdG 含量(8-OHdG / 10<sup>6</sup>dG)

組別	Control(n=3)	HA(n=3)	As(n=3)	HA/As(n=3)
肝臟	21.21±2.76	20.74±3.36	85.57±9.55*	52.42±8.09*
組別	Control(n=3)	HA(n=3)	As(n=3)	HA/As(n=3)
腎臟	22.45±1.81	24.41±6.09	27.97±3.39*	27.23±1.78*

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