

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—子計畫十：腐植酸及重金屬之基因氧
化傷害研究(3/3)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 95-2745-B-040-004-URD
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學公共衛生系

計畫主持人：胡瓊文

計畫參與人員：大學生-兼任助理：許文豪、黃惠淳

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96年10月28日

目錄

資料內容	頁次
一、研究計畫背景及目的	1
二、研究方法	4
三、結果與討論	6
四、參考文獻	11
五、計畫成果自評	14

一、研究計畫背景及目的

腐植酸之性質與相關疾病

腐植物質是來自於植物體或動物體的殘留物，經由化學作用和生物作用之分解及合成所產生的一種複雜的天然化合物，普遍存在於土壤，植物，井水等。腐植成份大致可分成三種部分：1. 腐植酸(humic acid, HA)，2. 黃腐酸(fulvic acid)及 3. 腐黑質(humin) (Hayes et al., 1989)。長久以來農業學者已經非常肯定腐植質在肥料領域裡之利用價值其中的主要原因包括有提高土壤之安定性、孔隙率、肥沃力對於作物的生長具有正面的效益。研究中更發現到若土壤中腐植質之含量若低於 2%，則土壤無法提供足夠作物生長所必需之腐植成份(Enviromate, 2002)。然而近二十年來，中國大陸與台灣的研究學者指出腐植酸類物質與克山病、大骨節病、甲狀腺腫和烏腳病的致病有明顯相關性 (Zhai et al., 1990; Gaitan et al., 1980; 呂鋒洲等, 1982)。其中以烏腳病而言，雖然許多的研究已證實其烏腳病是由於長期飲用高砷含量之地下水而造成的(曾文賓, 1978; 陳拱北等, 1965)。然而綜觀比較其他國家砷中毒的案例如日本或內蒙古，同樣是砷中毒卻不會造成末梢血管急遽萎縮潰爛進而需要截肢及台灣西南沿海特有的烏腳病。針對造成如此的差異，近年來呂鋒洲教授提出井水中除了含有重金屬離子外，尚含有高量的腐植酸類化合物。腐植酸在紫外線的照射下有螢光出現，是另一個導致烏腳病的因子(呂鋒洲等, 1982; Lu, 1990)。

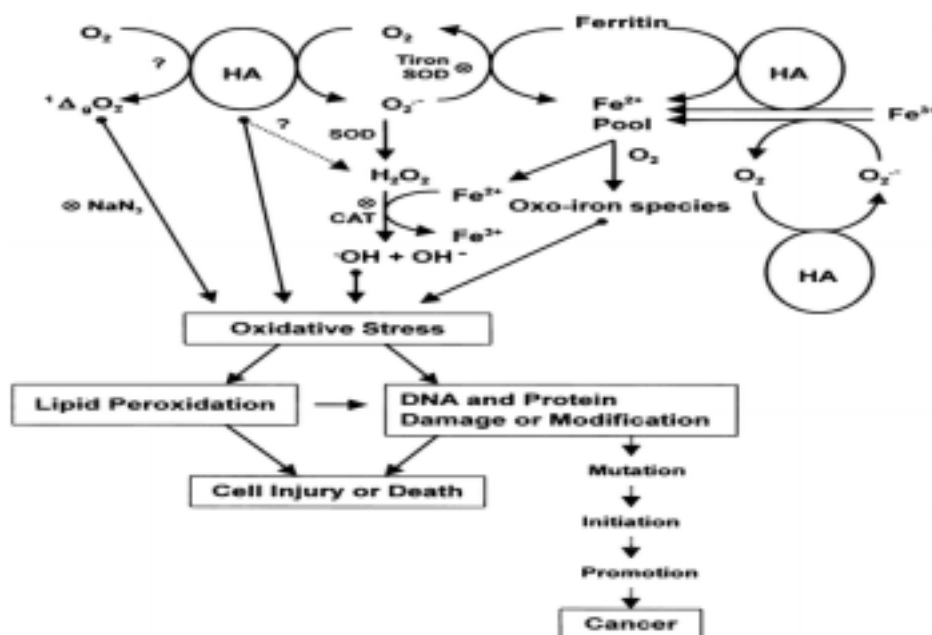
腐植酸與自由基

腐植酸的致病原因其中之一有可能是腐植酸含有多酚類之物質會進而產生自由基，如超氧陰離子 O_2^- (Vaughan et al., 1982)。研究已證實自由基在體內會攻擊核酸、蛋白質和造成脂質過氧化。自由基的生成與老化、癌症及許多慢性疾病已有密不可分的關係 (Dizdaroglu et al., 2002)。針對烏腳病的研究中發現到烏腳病人血清脂質過氧化物偏高，而脂質過氧化物(lipid peroxide)是脂質經過自由基(free radicals)之攻擊後發生脂質過氧化過程(lipid peroxidation)的產物，脂質过氧化物的產生亦是脂質遭受自由基攻擊的一種指標。在 Lu F. J 和 Lu J. Y. (1987) 檢測中 14 位烏腳病地區非烏腳病病人血清脂質過氧化物含量平均是 3.49 ± 1.64 nmol/ml，比正常值高 ($P < 0.01$)；而檢測 27 位烏腳病病人血清脂質過氧化物含量平均是 13.91 ± 14.55 nmol/ml，比正常人和非烏腳病病人血清脂質過氧化物含量高許多 ($P < 0.01$ ； $P < 0.025$)，其中 6 位女性烏腳病患者平均是 5.48 ± 3.97 nmol/ml，21 位男性烏腳病患者平均是 16.32 ± 15.62 nmol/ml，兩者沒有性別上的差異 ($P > 0.05$)。

另外，在探討烏腳病病人的普遍貧血的原因。Cheng et al. (1999) 研究結果發現腐植酸對紅血球造成氧化性的傷害(oxidative damage)，主要的原因是透過腐植酸氧化紅血球細胞的血色素(hemoglobin)造成脂質的進一步氧化，並且促使血球變形能力的下降以及溶血，這些結果與烏腳病病人貧血現象一致。

Gau et al. (2001) 再繼續著手研究腐植酸是否會刺激人類臍帶靜脈血管內皮細胞產生活性氧化物質 (Reactive Oxygen Species, ROS)。以腐植酸處理人類臍帶靜脈血管內皮細胞後，發現腐植酸確實會刺激該細胞產生 ROS，而且此種刺激作用隨著處理腐植酸的濃度之增加以及處理時間之加長，而使產生 ROS 之現象更加明顯。若加上鐵則 ROS 之形成遠比細胞單獨暴露鐵或腐植酸更加嚴重。而鐵的加成作用可由鐵在促進「氫氧自由基」產生的「Fenton reaction」中扮演催化劑角色解釋。另外實驗中也發現到腐植酸會將細胞外的鐵輸送進入細胞內增加游離鐵的濃度。Ho et al. (2003)進一步探討腐植酸如何使細胞內游離鐵的濃度增加，發現結果如下：

1. 腐植酸在很廣範圍的 pH 值 (pH 4.0-9.0) 的水溶液中都可以把 3 價鐵還原成 2 價之亞鐵，2 價的亞鐵是 Fenton reaction 中產生氫氧自由基之主要催化劑。
2. 腐植酸可以對 linoleic acid 和老鼠肝臟微粒體 (microsomes) 增加脂質過氧化作用，但此種脂質過氧化作用受到 sodium azide (a singlet oxygen scavenger) 或 disodium 4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid (a superoxide scavenger) 之部分抑制，表示脂質過氧化之過程有部分的 singlet oxygen 和 superoxide anion 之參與。
3. 添加腐植酸的反應中會產生 superoxide anion。
4. 腐植酸會把 ferritin 中之鐵還原成亞鐵並且從 ferritin 中釋放出來，此種釋放亞鐵的過程部分受到 superoxide scavenger 之抑制。
5. 從 ferritin 釋放出來之亞鐵，可以加速腐植酸誘導之脂質過氧化作用。由以上的實驗結果可以綜合的說明腐植酸配合由 ferritin 釋放之亞鐵可以擾亂生物體內之氧化還原平衡系統，造成生物體內之氧化壓力，而表現出腐植酸的細胞毒性，此種作用機制可在下圖表示：



圖一、Hypothetical scheme for humic acid (HA)-induced oxidative stress (Ho et al., 2003)

綜觀上述，腐植酸本身以及它再透過「自由基」的中間作用所表現出來的生物毒性，也許可以部分解釋烏腳病區除烏腳病外，尚具有高度流行率之癌症、糖尿病、心血管疾病、高血壓以及甲狀腺腫大等各種疾病之因。

基因氧化傷害指標(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)

在探討烏腳病的治病研究中，不論砷或腐植酸各別的研究都相當多，體外實驗中也都明確的發現到，不論是砷或腐植酸各自都有能力產生自由基，進而對細胞造成氧化傷害。相反的，對於兩者共同暴露下對細胞所造成的影響，相關的研究並不多。然而砷與腐植酸的相互作用卻很值得注意，目前亟待了解兩者並存時是否造成更嚴重之細胞氧化傷害。甚至與其他的重金屬之間的作用，如鐵等可藉由 Fenton reaction 導致氫氧自由基(.OH) 大大增加 (Paciolla et al., 1999; Lu et al., 1988)。

選擇一個具代表性的生物指標來探討自由基對生物體內造成的基因氧化性傷害是非常重要的，其中 8-羥基去氧鳥糞嘌呤核 (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) 的分析備受重視。8-OHdG 是 DNA 鹼基遭受許多自由基中最具反應性之氫氧自由基(.OH) 攻擊下的典型產物之一，此種基因氧化傷害在複製時會導致 G → T 之反轉突變 (Cooke et al., 2000)。且 8-OHdG 佔了所有 DNA 鹼基氧化變異產物的 40%，所以 8-OHdG 在生物體內的含量經常被用來當做生物體內氧化壓力的生物指標 (Kasai, 1997)。

對於生物體內中 8-OHdG 之定量，在過去已發展許多分析方法來準確定量，包括高效液相層析儀配合電化學偵測(HPLC-ECD)，氣相層析質譜儀(GC-MS)，液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 及酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-link immunosorbent assay，簡稱 ELISA)(Cadet et al., 1997)。其中以 HPLC-ECD 此方法最普遍，然而此方法的準確度經常受到生物樣品中所含之生物基質(biomatrix)影響並且樣品分析通常非常耗時(Pilger et al., 2002)。至於 GC-MS 而言，此種分析方法的優點在於偵測極限非常低，然而在分析過程中經常造成樣品的人為氧化而導致含量高估(Dizdaroglu et al., 2002)。ELISA，由於操作容易且樣品處理分析不耗時，在近來廣受歡迎。但 ELISA 分析方法亦遭到與 HPLC-ECD 相同的問題，亦即特異性較低，易受生物基質影響而導致誤判(Shimoi et al., 2002)。最近由於質譜儀的快速發展，學者開始運用 LC-MS/MS 在 8-OHdG 及類似之基因氧化傷害分析上。由於此分析方法其特異性及敏感性高、樣品前處理簡單加上可配合使用同位素稀釋法(isotope dilution)，所以此方法可說是當前最精準的定量方法(Koc and Swenberg, 2002)。在我們近期的研究中，比較 isotope dilution LC-MS/MS 與 ELISA 兩種方法，同時分析遭受多環芳香烴化合物 (PAHs) 暴露工人之尿液樣本。發現到唯有 isotope dilution LC-MS/MS 能精確的偵測樣品中的 8-OHdG，進而有效評估基因氧化傷害(Hu et al., 2004)。所以利用 isotope dilution LC-MS/MS 分析方法來探討腐植酸本身或與其他金屬共存所引起之氧化傷害，應能更精確探知腐植酸在氧化傷害上所扮演的角色。

研究計畫目的

本子計畫將配合群體計畫研究之架構，針對腐植酸造成動物體內氧化壓力的改變作一探討。本計畫預計執行期限為三年。茲將研究目的簡述如下：

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

二、研究方法

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

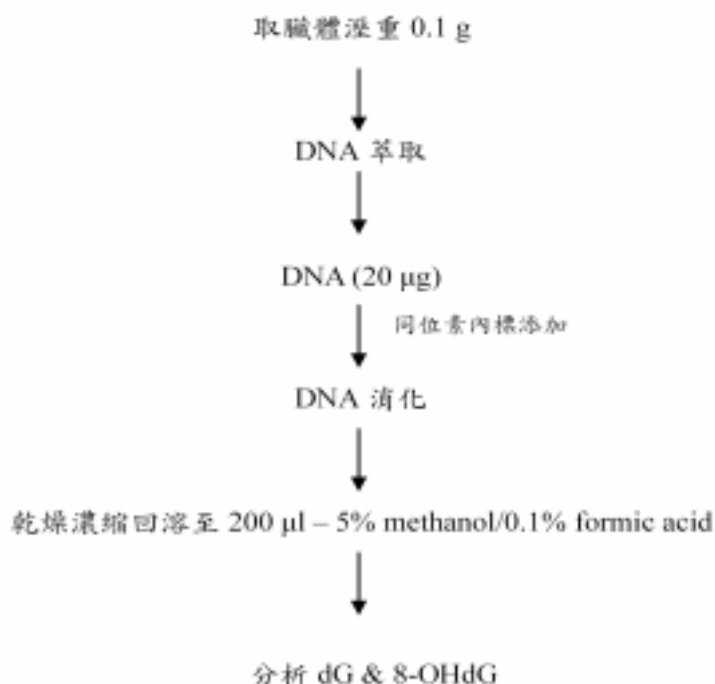
本研究將開發以液相層析串聯質譜儀配合同位素稀釋法(isotope dilution LC-MS/MS)定量生物樣本中 8-OHdG 之含量。此方法首重於以同位素 $^{15}\text{N}_5$ 標示之 8-OHdG (內標準品) 之合成，以利於運用同位素稀釋法精準分析樣本 8-OHdG。其合成方法主要是利用 $^{15}\text{N}_5$ -dG 和 H_2O_2 並加入 ascorbic acid 作催化劑。取 2 mg 之 $^{15}\text{N}_5$ -dG 溶於 50 ml-0.1M K_2HPO_4 水溶液中，並調整 pH=7.0。加入 8.8 mg ascorbic acid，再加入 200 μl 的 35% H_2O_2 於 37 $^\circ\text{C}$ 水浴下強烈攪拌 30 min。每隔 30 min 即重複加入 ascorbic acid 及 H_2O_2 一次，共八次。至此同位素 $^{15}\text{N}_5$ 標示之 8-OHdG(內

標準品)之合成完成。新合成之 $^{15}\text{N}_5$ 標示之 8-OHdG 將以固相萃取方式予以純化。濃縮乾燥稱重備用 (Hu et al., 2004)。

2. 生物樣本 8-OHdG 分析程序建立

此分析方法程序將首先用於分析未經腐植酸或砷暴露之動物尿液與器官組織 8-OHdG 的含量，以求建立各種生物樣本 8-OHdG 分析方法。尿液 8-OHdG 分析，尿液只需以 5% methanol/0.1% formic acid 稀釋 10 倍後加以同位素內標即可上機分析。而臟器中 8-OHdG 之定量則需經 DNA 萃取、酵素水解等流程即可上機分析而臟器中 8-OHdG 之定量流程，如圖二所示：

1. 樣品前處理：所取得之細胞或動物器官組織需先萃取出 DNA 並進而消化。然而這些步驟過程中經常會導致人為氧化而造成人為的 8-OHdG 生成。因此本研究將參考 Ravanat et al. (2002) 所提出之建議，加入不同濃度之抗氧化劑 (Desferrioxamine)，以求在各種生物樣本 DNA 萃取的最佳方法，避免 DNA 在萃取過程中有人為氧化發生。
2. 新開發之「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」：本實驗所有生物樣本(尿液或動物臟器)係利用本研究新開發之「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」分析之。其相關細節詳述於研究成果與討論。本研究中所使用的貴重儀器 LC-MS/MS 由國家衛生研究院環境衛生與職業醫學研究組提供。其組成由一個 PE 200 之自動取樣器及二個 PE 200 micro pump 所組成 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)連接一三段式四極棒串聯質譜儀(API 3000, Applied Biosystem)。

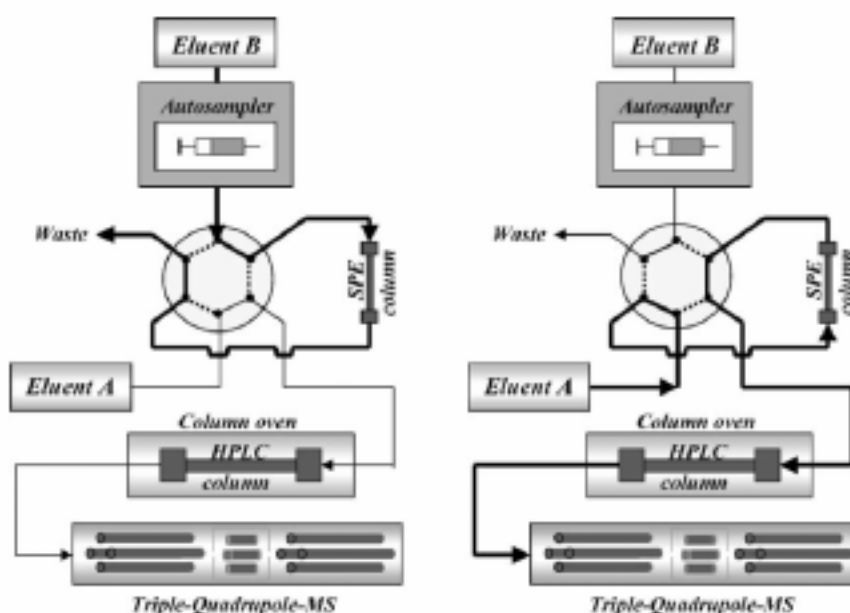


圖二、臟器中 8-OHdG 定量流程圖

三、結果與討論

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

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



圖三、On-line SPE-LC-MS/MS 系統示意圖 (Koal et al., 2004)

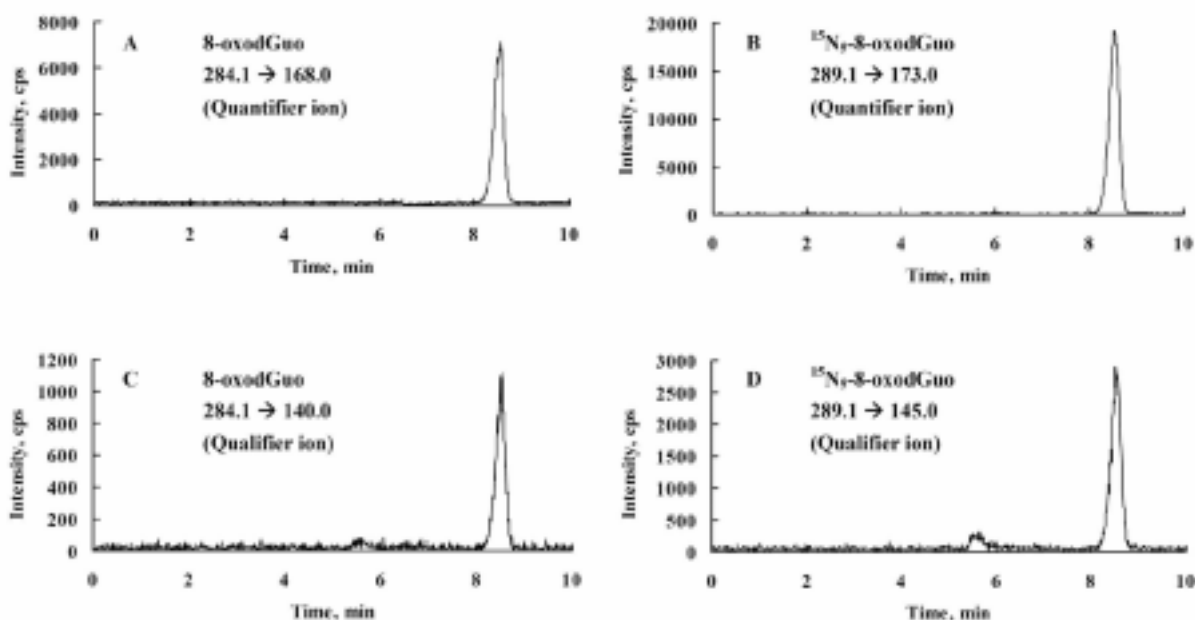
本研究已成功建立「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」(On-line SPE-LC-MS/MS)於尿液 8-OHdG 之分析。其相關研究成果已發表於知名國際期刊(Clinical Chemistry, 2006, 52, 1381-1388; SCI, Impact Factor= 5.454)。此分析方法具高敏感度及特異性。此方法之偵測極限為 5.7 ng/l (2.0 fmol on column)而 inter- and intraday 變異性 < 5%。尿液樣本經適度稀釋再加入同位素內標後不需前處理即可上機分析，分析時間只需 10 min，可大大節省分析之時間與耗材且能快速連續處理大量樣本。另外因所需尿液量甚少(~20 μ l)，亦可減少樣本儲存時所需空間。未來甚至可廣泛運用在臨床檢驗分析上。其分析條件及層析圖譜分別列於如下表及圖。

表一、On-line SPE-LC-MS/MS 分析程序

Table 1. Timetable for the column-switching procedure.

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

^a 50 mL/L methanol-1 mL/L FA.
^b 500 mL/L methanol-1 mL/L FA.
^c 850 mL/L methanol-1 mL/L FA.

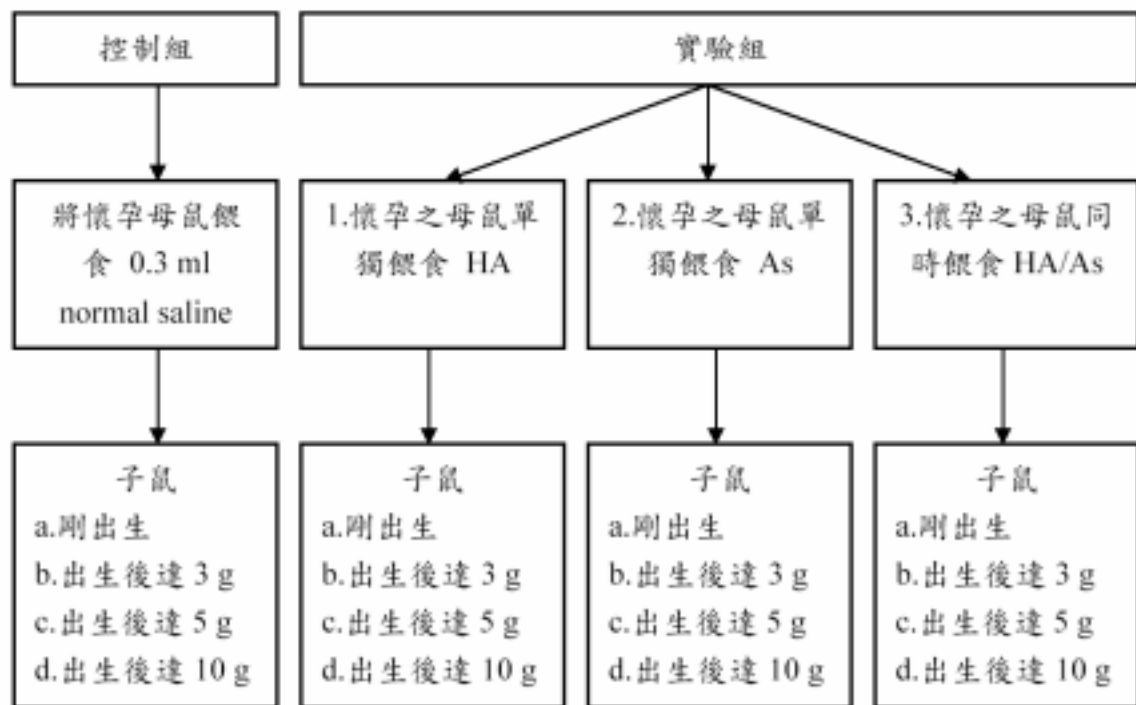


圖四、尿液 8-OHdG 之 on-line SPE-LC-MS/MS 層析圖譜 (Hu et al., 2006)

2. 腐植酸與砷所造成之基因氧化傷害

我們運用已建立完成之 on-line SPE-LC-MS/MS 分析方法於動物臟器 8-OHdG 含量測定。我們所分析的動物臟器是由子計劃 6 (致畸胎計劃) 中所提供。實驗設計如下圖所示：將已懷孕之 ICR Mice 母鼠分為控制組與實驗組。對於控制組之母鼠，在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天)，以灌胃管方式每天注入 0.3 ml normal saline。而實驗組部份，母鼠同在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天)，以灌胃管方式每天注入腐植酸或砷 (HA 劑量：20 mg/ml-0.25ml/40mg B.W.; As 劑量：2 mg/ml-0.25ml/40mg B.W.)。其中腐植酸(Humic acid)為經實驗室溶於鹼不溶酸純化

而得[溶鹼(1N NaOH)不溶酸(1N HCl)]。待實驗組母鼠產下小鼠哺乳結束後(約 21 天),仍給予實驗組母鼠以飲用水的方式持續暴露(劑量: 1.單獨餵食腐植酸組 HA 劑量: 500 ppm 2.單獨餵食砷組 As 劑量: 20 ppm 3.同時餵食腐植酸和砷組 HA 劑量:500 ppm、As 劑量: 20 ppm)。母鼠在犧牲前會放入代謝籠收集尿液,最後分析其尿液及肝臟之 8-OHdG 含量。控制組及實驗組所產下之小鼠依成長大小分批犧牲(共包括剛出生、出生後達 3g、5g 及 10g 四組),並分析其臟器之 8-OHdG 含量。



圖五、實驗設計

控制組及實驗組各組母鼠其肝臟及尿液中 8-OHdG 含量的分析結果如表二所示。母鼠在單獨餵食腐植酸的情況下相較於控制組其肝臟以及尿液中 8-OHdG 有明顯增加($p < 0.05$)。過去有許多體外實驗指出腐植酸其本身可形成一個穩定的自由基(Lu et al., 1988),亦會促使細胞累積鐵,增加細胞內游離鐵的含量進而增加細胞內的氧化壓力(Ho et al., 2003)。腐植酸會刺激血管內皮細胞活性含氧物質(ROS)的生成而造成血管內皮細胞的氧化壓力傷害(Gau et al., 2001)。本實驗以動物實驗證實以腐植酸直接餵食母鼠會造成動物體內嚴重的基因氧化傷害。另外母鼠在單獨餵食砷的情況下,母鼠肝臟以及尿液中 8-OHdG 相較於控制組亦有明顯增加($p < 0.05$)。先前研究以含砷的飲水餵食老鼠(3.2 mg/l),發現老鼠肝臟中 glutathione (GSH)的含量明顯增加,顯示砷會增加老鼠肝臟的氧化壓力(Santra et al., 2000)。本實驗藉由母鼠肝臟以及尿液中 8-OHdG 分析結果也同樣證實砷的暴露會導致基因的氧化性傷害。母鼠在同時餵食腐植酸與砷時肝臟中 8-OHdG 含量除了相較於控制組明顯增加外($p < 0.05$),其 8-OHdG 含量相較於單獨餵食腐植酸的母鼠在統計上亦達到顯著($p < 0.05$)。這似乎顯示腐植酸與砷同時存在時會加強母鼠的基因氧化傷

害。過去研究發現以腐植酸與砷同時注射小白鼠時，小白鼠的組織傷害遠比只注射腐植酸的小白鼠來得嚴重，指出砷與腐植酸同時存在的毒性有加強作用(李 and 呂, 1997)。本實驗藉由 8-OHdG 定量分析的結果證實腐植酸與砷同時存在時會加強老鼠的基因氧化傷害。

表二、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 ⁶ dG)	21.96 ± 2.92	33.48 ± 4.26*	46.77 ± 11.04*	51.3 ± 7.54*
組別	Control(n=4)	HA(n=4)	As(n=4)	HA/As(n=4)
尿液(ng/ml)	2.15 ± 1.59	6.59 ± 2.33*	9.04 ± 2.91*	7.00 ± 4.77*

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

表三、剛出生子鼠肝臟與腎臟中 8-OHdG 含量(8-OHdG/10⁶dG)

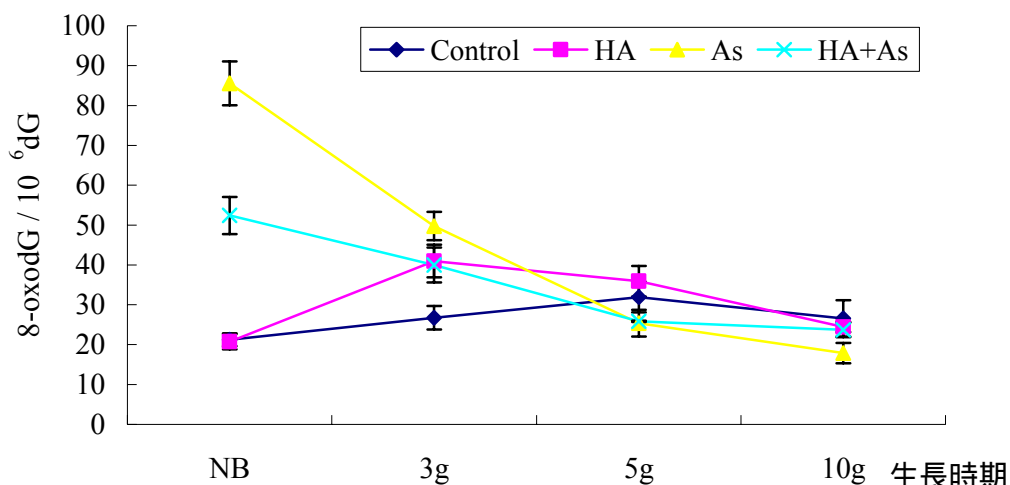
組別	Control(n=4)	HA(n=4)	As(n=4)	HA/As(n=4)
肝臟	21.21 ± 2.76	20.74 ± 3.36	85.57 ± 9.55*	52.42 ± 8.09*
組別	Control(n=4)	HA(n=4)	As(n=4)	HA/As(n=4)
腎臟	22.45 ± 1.81	24.41 ± 6.09	27.97 ± 3.39*	27.23 ± 1.78*

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

對應控制組與實驗組母鼠所產下子鼠，其各組剛出生子鼠肝臟及腎臟 8-OHdG 含量分析結果，如表三所示。母鼠在懷孕期間單獨餵食腐植酸時其剛出生子鼠肝臟及腎臟 8-OHdG 含量相較於控制組無明顯增加，顯示腐植酸似乎不會透過胎盤對子鼠造成基因氧化傷害。先前有研究發現烏腳病患地區地下飲用水所含螢光物質會對雞胚胎造成畸形發育(Lu et al., 1977)，然而本實驗以純化過後的市售腐植酸及老鼠作為實驗對象，結果顯示母鼠暴露腐植酸的情況下未對其子鼠造成嚴重基因氧化傷害，也沒有發現到任何致畸胎的效應。相反地，母鼠在懷孕期間單獨餵食砷及同時餵食砷與腐植酸的狀況下，其剛出生子鼠肝臟、腎臟 8-OHdG 含量相較控制組卻有明顯增加(p<0.05)。顯示砷似乎可透過胎盤進而對子鼠造成基因氧化傷害。先前流行病學研究中，孕婦若暴露於高砷的狀況下，會提高流產、死胎或是新生兒死亡的風險(Milton et al., 2005)。我們的研究結果也許可提供部分線索來說明高砷地區有較高流產、死胎或是新生兒死亡的風險。另外在表三中，母鼠單獨餵食砷其子鼠肝臟 8-OHdG 含量比腎臟 8-OHdG 含量高 3 倍之多，顯示肝臟所受到的基因氧化傷害遠比腎臟來得嚴重。這可能是由於肝臟為砷主要累積的器官(Biswas et al., 2000)而導致。

除剛出生子鼠外，另有三組子鼠(出生後達 3g、5g 及 10g 三組)。各組子鼠肝臟 8-OHdG 含量在不同生長時期的變化情形，如圖六所示。我們意外發現，實驗組中母鼠單獨餵食砷及同時餵食砷與腐植酸，其子鼠肝臟 8-OHdG 含量隨著年紀

增長而減少。相同趨勢在子鼠腎臟中也看的到，顯示子鼠體內基因氧化傷害會隨著年紀的增長而自動慢慢修復。



圖六、子鼠肝臟 8- OHdG 含量在不同生長時期的變化情形

3. 不同腐植酸來源所造成之基因氧化傷害

本實驗另選擇三種不同之腐植酸分別是: 1. Proto-catechuic acid:是具代表性的腐植酸單體之一。此單體是酚酸(phenolic acid)之一種，是 lignin 的典型的分解物，也發現存在於煤炭中; 2. ”HA-unpurified”是由 Aldrich 公司購買所得，是一般市售之腐植酸其分子量大於 5000; 3. “HA” 是一般市售之腐植酸再經實驗室純化[溶鹼(1N NaOH)不溶酸(1N HCl)]所得。實驗簡述如下: 將已懷孕之 ICR Mice 母鼠分為控制組與實驗組。對於控制組之母鼠，在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天)，以灌胃管方式每天注入 0.3 ml normal saline. 而實驗組部份，母鼠同在懷孕開始第 8 天~第 18 天(共 11 天)，以灌胃管方式每天注入不同來源之腐植酸 (HA 劑量: 20 mg/ml-0.25ml/40mg B.W)。控制組及實驗組所產下之小鼠依成長大小分批犧牲，並分析其臟器之 8-OHdG 含量。共包括剛出生、出生後達 3g、出生後達 5g 三組。結果如表四所示。我們發現到針對剛出生、出生達 3g、出生達 5g 等不同大小之小鼠，只要其母鼠在懷孕期間曾受過腐植酸單體(Proto-catechuic acid)或市售未經純化之腐植酸(分子量大於 5000)餵食注入，皆明顯造成小鼠肝臟中 8-OHdG 的增加(8-OHdG 含量皆明顯高於控制組， $P < 0.05$)。而母鼠在懷孕期間餵食經純化過後之腐植酸(HA)其所產下之小鼠並沒有類似的現象。結果顯示似乎單體 Proto-catechuic acid 及這些未純化之腐植酸因本身含有大量會誘導活性含氧物質(ROS)生成的物質(例如多酚類)較易透過胎盤對子鼠造成基因氧化傷害。而經純化過後之腐植酸

(HA), 在純化的過程中有可能將這些會誘導活性含氧物質(ROS)生成的物質移除或破壞, 剩下穩定大分子的部份較不易透過胎盤, 進而降低對小鼠肝臟基因氧化傷害的程度。此結果證實不同來源的腐植酸對基因的氧化傷害程度也不相同。

表四、不同腐植酸造成之基因氧化傷害(8-OHdG/10⁶dG)

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

註: * p 值<0.05 各實驗組與控制組比較後之結果

四、參考文獻

李豐、呂鋒洲 (1997)。螢光腐植酸與砷所引起動物組織的病理變化。台灣醫學會雜誌。 6, 689-695。

呂峰洲、林信德、許隆隆 (1982)。烏腳病地區地下飲用水中螢光物質之再檢討。烏腳病之研究報告。 12, 1-15。

陳拱北、吳新英 (1965)。台灣烏腳病之流行病學之研究-4, 疾病經過與宿主、環境等要素之關係。臺灣醫學會雜誌。 64, 456-469。

曾文賓 (1978) 烏腳病與砷之效果與量反應關係。烏腳病之研究報告。 7, 1-10。

Biswas, U., Sarkar, S., Bhowmik, M.K., Samanta, A.K. and Biswas, S. (2000) Chronic toxicity of arsenic in goats: clinicobiochemical changes, pathomorphology and tissue residues. Small Rumin Res, 38, 229-235.

Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J.L. (1997) Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 131, 1-87.

Cheng, M.L., Ho, H.Y., Chiu, T.Y. and Lu, F.J. (1999) Humic acid-mediated oxidative damage to human erythrocytes: A possible mechanism leading to anemia in blackfoot disease. Free Radic Biol Med, 27, 470-477.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Herbert, K.E. and Lunec, J. (2000) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine –source, significance and supplements. Free Radic Res, 32, 381-397.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. and Rodriguez, H. (2002) Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 32, 1102-1115.

Enviromate T.M (2002) Effects of humic acid on animals and humans literature review and current research. <http://www.enviromateinc.com/humateanimals.htm>.

Gaitan, E., Medina, P., DeRouen, T.A. and Sun Zia, M. (1980) Goiter prevalence and bacterial contamination of water supplies. *J Clin Endocrinol Metab*, 51, 957-962.

Gau, R.J., Yang, H.L., Suen, J.L. and Lu, F.J. (2001) Induction of oxidative stress by humic acid through increasing intracellular iron: a possible mechanism leading to atherothrombotic vascular disorder in blackfoot disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 743-749.

Hayes, M.H.B., Maccarthy, P., Malcolm, R.L., and Swift, R.S. (1989) Humic substances II : in search of structure, Hayes, M.H.B., Maccarthy, P., Malcolm, R.L., and Swift, R.S. (eds), 3-31, John Wiley & Sons, New York.

Ho, K.J., Liu, T.K., Huang, T.S. and Lu, F.J. (2003) Humic acid mediates iron release from ferritin and promotes lipid peroxidation in vitro- a possible mechanism for humic acid induced cytotoxicity. *Arch Toxicol*, 77, 100-109.

Hu, C.W., Wu, M.T., Chao, M.R., Pan, C.H., Wang, C.J., Swenberg, J.A. and Wu, K.Y. (2004) Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using isotope-dilution liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18, 505-510.

Hu, C.W., Wang, C.J., Chang, L.W. and Chao, M.R. (2006) Clinical-Scale High-Throughput Analysis of Urinary 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine by Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with On-Line Solid-Phase Extraction. *Clin Chem*, 52, 1381-1388.

Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res*, 387, 147-163.

Koal, T., Deters, M., Casetta, B. and Kaefer, V. (2004) Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr, B* 805, 215-222.

Koc, H. and Swenberg, J.A. (2002) Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *J Chromatogr, B* 778, 323-343.

Lu, F.J. (1990) Fluorescent humic substances and blackfoot disease in Taiwan. *Appl*

Organomet Chem, 4, 191-195.

Lu, F.J. and Lu, J.Y. (1987) Serum lipid peroxides in patients with blackfoot disease. (Full text in Chinese) J Formos Med Assoc, 86, 76-80.

Lu, F.J., Yamamura, Y. and Yamauchi, H. (1988) Studies on fluorescent compounds in water of a well in Blackfoot disease endemic areas in Taiwan: Humic substances. J Formos Med Assoc, 87, 66-75.

Lu, F.J., Tsai, M.H. and Ling, K.H. (1977) Studies on fluorescent compound in drinking water of blackfoot disease endemic areas. 1. The toxic effects of fluorescent compound on the chick embryos. J Formos Med Assoc, 76:58-63.

Milton, A.H., Smith, W., Rahman, B., Hasan, Z., Kulsum, U., Dear, K., Rakibuddin, M. and Ali, A. (2005) Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in Bangladesd. Epidemiology, 16, 82-86.

Paciolla, M.D., Davies, G., and Jansen, S.A. (1999) Generation of hydroxyl radicals from metal-loaded humic acids. Environ Sci Technol, 33, 1814-1818.

Pilger, A., Ivancsits, S., Germadnik, D. and Rüdiger, H.W. (2002) Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr, B 778, 393-401.

Ravanat, J.L., Douki, T., Duez, P., Gremaud, E., Herbert, K., Hofer, T., Lasserre, L., Saint-Pierre, C., Favier, Al. and Cadet, J. (2002) Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. Carcinogenesis, 23, 1911-1918.

Santra, A., Maiti, A., Chowdhury, A. and Mazumder, D.N. (2000) Oxidative stress in liver of mice exposed to arsenic-contaminated water. Indian J Gastroenterol, 19, 112-115.

Shimoi, K., Kasai, H., Yokata, N., Toyokuni, S. and Kinae, N. (2002) Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 11, 767-770.

Vaughan, D. and Ord, G. (1982) An in vitro effect of soil organic matter fractions and synthetic humic acids on the generation of superoxide radicals. Plant Soil, 66, 113-116.

Zhai, S.S., Kimbrough, R.D., Meng, B., Han, J.Y., Levoid, M., Hou, X. and Yin, X.N. (1990) Kashin-Beck disease: a cross-sectional study in seven villages in the Peoples Republic of China. J Toxicol Environ Health, 30, 239-259.

五、計畫成果自評

本子計畫歷時三年，研究成果尚稱豐碩。如下表所示目前計有發表了 1 篇 SCI 期刊及 1 篇國際會議論文。另有一篇正在撰寫中。主要的研究成果是(1)成功建立「連線固相萃取」搭配「同位素稀釋-LC-MS/MS 分析法」(On-line SPE-LC-MS/MS)於 8-OHdG 之分析。此分析方法具高敏感度及特異性。(2)同時利用此 8-OHdG 分析方法我們以動物模式首次證實單獨腐植酸的暴露會明顯造成基因的氧化傷害。而腐植酸與砷同時存在時會加強基因氧化傷害的程度。(3)另外腐植酸亦會透過胎盤進一步影響到子代，然而影響的程度會受腐植酸的來源而改變。

(1) Chiung-Wen Hu, Chien-Jen Wang, Louis W. Chang and Mu-Rong Chao. "Clinical-scale high-throughput analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction". Clin Chem, 2006, 52, 1381-1388.

(2) Shang-Fu Tsai, Chiung-Wen Hu, Cheng-Chieh Yen and Mu-Rong Chao. "Oxidative DNA damage induced by humic acid/arsenic as measured by isotope dilution LC-MS/MS with on-line solid-phase extraction". Environmental Pollution and Human Health: 2006 Arsenic, Humic acid and Blackfoot Disease International Conference, Oral Presentation.

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