

R.
008.8
0043

私立中山醫學院醫學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Medicine, Chung Shan

Medical & Dental College.

題目

Methyl methacrylic acid 對哺乳類細胞的毒性研究

一. **Methyl methacrylic acid 對V79 細胞的毒性研究**

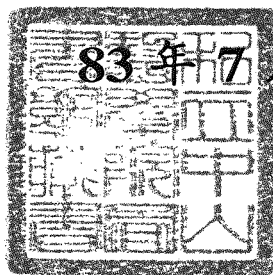
二. **Methyl methacrylic acid 對人類淋巴細胞的毒性研究**

指導教授 周明勇 教授 Ming-Yung Chou

李宣佑 教授 Shuan-Yow Li

研究生 高嘉澤 Chia-Tze Kao

中華民國 83 年 7 月 20 日



本論文為中山醫學院授予醫學(理學)碩士學位之必備條件之一,經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員審查合格及口試通過

口試委員

中央研究院 動物所 教授

詹崑源 博士

詹崑源

私立中山醫學院醫學研究所所長
(論文指導教授)

李宣佑 博士

李宣佑

私立中山醫學院牙醫系主任
(論文指導教授)

周明勇 博士

周明勇

中華民國八十三年七月二十日

誌謝

研究所的訓練讓我學到了基本生物醫學的研究方法，感謝所有協助過我的人，感謝醫研所所長李宣佑教授的指導和江濤副教授的指正，更感謝教而不倦的指導教授周明勇博士給予學生學習過程的教導與支持，使得學生能順利通過研究所的訓練，謹以此誌潦表感激之心。

目錄

摘要	-----	6
----	-------	---

第一章 緒論 (Introduction)	-----	7
-----------------------	-------	---

第二章 材料與方法 (Material and Methods)	-----	9
----------------------------------	-------	---

2-1. 試驗材料	-----	9
-----------	-------	---

2-1.1. 試藥	-----	9
-----------	-------	---

2-1.2. 泡製方法	-----	10
-------------	-------	----

2-1.3. Medium	-----	10
---------------	-------	----

2-1.4. MMA (methyl methacrylic acid)	-----	10
--------------------------------------	-------	----

2-1.5. Hoechst 33258	-----	11
----------------------	-------	----

2-1.6. Fixation solution	-----	11
--------------------------	-------	----

2-1.7. 2 X SSC	-----	11
----------------	-------	----

2-1.8. Buffer solution	-----	11
------------------------	-------	----

2-2. 儀器	-----	12
---------	-------	----

第三章 試驗過程

3-1. 細胞的純化 (cloning of V79 cell)	-----	13
----------------------------------	-------	----

3-2. 多孔培養皿試驗 (Multiwell Test)	-----	15
-------------------------------	-------	----

3-3. 細胞生長抑制試驗 (V79 cell growth inhibitory test)	-----	17
---	-------	----

3-4. 細胞聚落形成試驗 (V79 cell colony formation test)	-----	18
--	-------	----

3-5. 染色體結構異常試驗 (Chromosome aberration test) ----19

3-6 姊妹染色分體交換試驗 (Sister chromatid exchange test) --21

第四章 結果

4-1. 細胞的純化 (cloning of V79 cell) -----23

4-2. 多孔培養皿試驗 (Multiwell Test) -----23

4-3. 細胞生長抑制試驗 (V79 cell growth inhibitory test) ----23

4-4. 細胞聚落形成試驗 (V79 cell colony formation test) ----24

4-5. 染色體結構異常試驗 (Chromosome aberration test) ---24

4-6 姊妹染色分體交換試驗 (Sister chromatid exchange test) --24

第五章 討論 -----26

第六章 圖表 -----32

表一 細胞生長抑制 -----32

表二 細胞聚落形成 -----34

表三 細胞染色體異常 -----36

表四 姊妹染色分體交換 -----37

圖一 多孔培養皿細胞的染色情形-----38

圖二 細胞的形態 -----39

圖三 細胞生長曲線 -----40

圖四 細胞聚落形成	-----41
圖五 細胞染色體異常	-----42
圖六 細胞姊妹染色分體交換	-----43
第七章 參考文獻	-----45

摘要

Methyl methacrylate (MMA) 為樹脂的一種單體, 在日
常的生活用品以及醫療材料如: 骨外科, 牙科和眼科的治療中都被
廣泛的使用。本研究使用中國倉鼠的肺臟纖維母細胞株(Chinese
hamster lung fibroblast cell 簡稱 V79 cell) 來探討 MMA 對
它的細胞毒性。資料經過 paired -t test 分析, 結果發現在細胞生
長抑制方面, V79 細胞在 MMA 大於或等於 9.32×10^{-4} mM 時,
作用三天後, 有被抑制($p < 0.05$)表現; 在 V79 聚落形成能力(
plating efficiency)方面, 結果同上述, 即隨 MMA 濃度與時間的
增加, 聚落數目減少。在染色體異常方面, 染色體斷裂數目, 當作
用48小時後, 隨 MMA 的濃度的增加而有明顯的增加($P < 0.05$
); 姊妹染色分體交換頻率則於 MMA 作用49小時後, 濃度在
 9.32×10^{-2} mM 和 9.32 mM 時, 有明顯的差異性存在(
 $p < 0.05$)。由以上的發現, 我們認為 methyl methacrylate 對於
V79 細胞具有致突變性與遺傳毒性。

第一章 緒論

前言

Methyl methacrylate (MMA) 為樹脂單體 (monomer) 的成分, 澄清無色透明的液體; 溶點 -48°C , 沸點 100.8°C , 在 20°C 下的密度為 0.943 mg/ml , 聚合反應的熱能為 12.9 kcal/mol , 本身具有高揮發性, 是一種很好的溶劑. 雖然目前牙科材料進步, 樹脂的聚合反應可用紫外線或可見光來催化, 但是在臨床牙科的使用上, 仍然利用加入一些起始劑(initiator), 於室溫下, 讓 polymer 粉和 monomer 液發生自然的聚合反應⁽¹⁾. 在日常的生活中, MMA 亦使用於許多物品上, 例如包裝食物的材料(food packing material), 物品的表面處理劑, 油漆和漆器等, 使用範圍非常普遍⁽²⁾. 因 MMA 本身有很高的揮發性, 對於接觸此類材料製作的從業人員, 應該注意是否會對健康造成傷害.

一種生物材料是否可以安全的使用於生物體, 必須經過一些試驗, 根據 美國牙醫協會(ANCI/ADA) 對於樹脂修復材料的生物學上評估⁽³⁾, 包括: 細胞毒性 (cytotoxicity), 溶血作用 (hemolysis),

安氏試驗 (Ame's test), 細胞的轉形變化 (cell transformation) 或口腔內黏膜細胞的 LD50 測試, 粘膜的刺激性和皮膚的毒性. 過去的研究指出, 安氏試驗對於加有大鼠 (rat) 肝細胞代謝酵素 (簡稱 S9) 的試驗, 有些結果呈陽性反應 (Ame's positive), 但有些為陰性反應 (Ame's negative)⁽⁴⁾. 細菌學的研究發現, MMA 對 *Salmonella typhmuri* 是一種突變劑 (mutagen)⁽⁵⁾. 中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cell / CHO) 的培養研究指出, 含或是不含 S9 的條件下與 MMA 作用, 發現隨著 MMA 濃度的增加, 染色體異常和姊妹染色分體交換 (sister chromatid exchange / SCE) 的頻率都隨之增加⁽⁵⁾.

在細胞遺傳學 (cytogenetic) 研究中, CHO 細胞和 V79 細胞為廣被使用的細胞株⁽⁶⁾. 由於 V79 和 CHO 細胞分別具有不同的外形和生長特性, 過去已有研究 MMA 在 CHO 細胞的報告⁽⁵⁾. 對於 MMA 在 V79 細胞的變化則未見報告. 本研究的目的是想瞭解, 當 MMA 作用後, 何種濃度會對 V79 細胞的生長有抑制, 對細胞的染色體是否會產生異常, 以瞭解 MMA 對 V79 的細胞的遺傳毒性.

第二章 材料與方法

2-1 試驗材料

2-1.1 試藥

名稱	廠牌	產地
1. BrdU (5- Bromo-2''-deoxyuridine)	Sigma	USA
2. Colcemid	Gibco	USA
3. DMSO(Dimethylsulphoxide)	Sigma	USA
4. FBS (fetal bovine serum)	Gibco	USA
5. Fixation solution (Methanol : Acetic acid = 3:1)	E. Merck	USA
6. Giemsa Dye	E.Merck	USA
7. Hoechst 33258, C ₂₅ H ₂₄ N ₆ O ₃ HCl	Sigma	USA
8. Hypotonic solution, 0.54% KCl	E.Merck	USA
9. MEM (minimal essential medium)	Gibco	USA
10. Methyl methacrylic acid (MMA)	Fluka	Switzerland
11. PHA (phytahemaaglutinin)	Gibco	USA
12. PSN (penicillin, streptomycin, neomycin)	Gibco	USA

2-1.2 泡製方法

2-1.2.1 Medium preparation

1X MEM	+	FBS 10 %	+	1% PSN
90 ml	+	9 ml	+	1 ml

2-1.2.2 泡製不同濃度MMA

取由Fluka公司製造的 MMA [$\text{CH}_2:\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$], 分子量 100.12, 密度為0.943, 濃度為 99% 的 Stock solution.

1. 2 ml MMA + 1 ml DMSO + 17 ml MEM ----- 9.32×10^2 mM MMA
2. 1 ml of 9.32×10^2 mM MMA+ 9 ml MEM ----- 9.32×10^1 mM MMA
3. 1 ml of 9.32×10^1 mM MMA + 9 ml MEM ----- 9.32×10^0 mM MMA
4. 1 ml of 9.32×10^0 mM MMA + 9 ml MEM ----- 9.32×10^{-1} mM MMA
5. 1 ml of 9.32×10^{-1} mM MMA+ 9 ml MEM ----- 9.32×10^{-2} mM MMA
6. 1 ml of 9.32×10^{-2} mM MMA + 9ml MEM ----- 9.32×10^{-3} mM MMA
7. 1 ml of 9.32×10^{-3} mM MMA+ 9 ml MEM ----- 9.32×10^{-4} mM MMA
8. 1ml of 9.32×10^{-4} mM MMA+ 9 ml MEM ----- 9.32×10^{-5} mM MMA
9. 1ml of 9.32×10^{-5} mM MMA + 9 ml MEM ----- 9.32×10^{-6} mM MMA



2-1.2.3 Hoechst 33258 :588 ug/l of dist, Water

588g/l H₂O ----- 1 mole 1 M

0.588 g/l H₂O ----- 10⁻³ M

0.0588 g/100ml H₂O-----100 ml 10⁻⁴ M

2-1.2.4 Fixation solution

Methanol 3 part + Acetic acid 1part

2-1.2.5. 2X SSC

1. Sodium chloride NaCl 8.75 g
2. Trisodium citrate 4.4 g (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O)
3. add Dist. Water to 500 ml.

2-1.2.6 Buffer solution

0.88 % K₂HPO₄ + 1.01% KH₂PO₄

2-1.3 儀器

1. Lamina flow : Bellco Glass Inc /(USA)

2. Incubator :

Forma Scientific Steri-cult incubator

Temperature 37 °C, RH control 67-99% (humidity),

5% CO₂ controlled, water-jacketed incubator.

3. Incubator TC-1 heat warmer

振盪回數 50 HZ/100/min (Shaking) 60 HZ/120/min.

4. Centrifuge Hitachi (Japan)

Time and speed (x 1000 rpm)

5. UV light : Model UVL-56

black-Ray Lamp, long wave UV-366nm

115volts,60HZ, 0.16 AM

Sau Gabriel CA 91778 USA.

第三章 試驗過程

一·細胞的純化

V79細胞株由中山醫學院細胞遺傳室所提供·首先將 V79 細胞株作純種培養(cloning),方法如下⁽⁷⁾ :

1. 取 1×10^5 個細胞, 接種於培養瓶內, 細胞的培養液為 MEM (minimal essential medium, GIBCO; USA), pH安定劑 BES [N.N-Bis(2-hydroxy ethyl)-2-aminoethan sulfonic acid, Sigma; USA] 及 Na_2HCO_3 , 加上 10% FBS (fetal bovine serum) 和 1% PSN (penicillin , streptomycin, neomycin), 調整培養液的 pH值為 7.2, 將培養瓶放入 37°C 的自動恆溫, 5% CO_2 的培養箱(Forma, USA)培養 48小時 .

2. 取 0.1 ml之含 1×10^3 個細胞懸浮液種到含有 5 ml培養液的直徑 60 mm培養皿內, 前後左右搖動使細胞均勻分佈於培養皿, 培養 7天.

3. 於解剖顯微鏡下觀察有形成聚落的族群, 在 dish 的底部作記

號，於無菌操作台中，再將直徑1 cm 大的滅菌鋼環(ring)底部沾已滅菌之甘油，蓋於所要的聚落上。

4. 以1 ml之 PBS (-) (phosphate buffer saline)中不含鈣和鎂離子，洗 2次後，加入 0.1 ml 0.25% 胰蛋白酶 (trypsin, GIBCO; USA),作用 3分鐘，使 V79 細胞剝離懸浮。

5. 以吸管吸取懸浮液，滴入含有上述 1. 的培養液的培養瓶內，放入培養箱中培養3天。

6. 依染色體製備方法，製作染色體，選取具有較多正常染色體數目之群落中之細胞，作為本試驗的細胞。

二. MMA 濃度的決定

1. 多孔培養皿的試驗⁽⁶⁾

(1). MMA (Fluka, Switzerland)以體積比 (v/v) 的方式泡製, 取 2 ml 的 MMA (stock solution) 溶於1 ml的 DMSO (Sigma, USA) 加入17 ml的培養液(MEM), 依序配製出下列不同濃度的 MMA:

A = 9.32×10^2 mM, B = 9.32×10^1 mM, C = 9.32×10^0 mM,

D = 9.32×10^{-1} mM, E = 9.32×10^{-2} mM, F = 9.32×10^{-3} mM, G

= 9.32×10^{-4} mM, H = 9.32×10^{-5} mM, I = 9.32×10^{-6} mM.

(2). 在兩組 24 孔培養皿的每一小孔內, 分別種入 0.1 ml 之 1×10^5 cell/ml 細胞懸浮液, 培養 1 小時後, 再加入培養液 0.9 ml後繼續培養.

(3). 24小時後, 抽掉培養液依下面方式, 將 MMA 加入到各個培養孔內, MMA濃度(mM)如下:

A 組 : 0, 9.32×10^{-2} , 9.32×10^{-1} , 9.32×10^0 ,
 9.32×10^1 , 9.32×10^2 .

B組 : 0, 9.32×10^{-6} , 9.32×10^{-4} , 9.32×10^{-2} ,
 9.32×10^0 , 9.32×10^2

(4). 加藥 2小時後，於位相差顯微鏡下觀察細胞的變化。然後抽掉含有不同濃度之MMA培養液，以PBS(-)洗二次後，加入新培養液置入自動二氧化碳培養箱中培養。

(5). 48小時後，將皿內的培養液吸出，用 PBS(-) 洗二次，以 Giemsa 染料加入0.01 M 的 phosphate buffer 緩衝液，pH 6.8,稀釋成 10 % 染色液，染色 5-7 分鐘，水洗後於室溫中乾燥。

(6). 由培養皿內，細胞染色的濃淡程度，決定 MMA 的使用濃度。

2. 細胞生長抑制試驗 (cell growth inhibitory test) ⁽⁶⁾

(1). 準備 54 個 35 mm 的培養皿，將之分為控制組 9 個，試驗組 5 組各 9 個。

(2). 同前述方法配製 MMA 的各種濃度。

(3). 將 1×10^4 cell/ml 之細胞懸浮液 0.1ml 種入到各個培養皿內，在 37°C , 5% CO_2 , 98% 溼度的自動恆溫培養箱內培養。

(4). 24 小時後 將培養皿內舊的培養液吸出。控制組的培養皿加入不含 MMA 的培養液，試驗組分別加入不同濃度 9.32×10^0 , 9.32×10^{-1} , 9.32×10^{-2} , 9.32×10^{-4} , 9.32×10^{-6} 等不同濃度之 MMA, 再放入培養箱內培養。

(5). 於加入 MMA 後的第一天，第二天和第三天，每天由控制組和試驗組的培養皿中各取出 3 個，利用 0.25% 胰蛋白酶處理，使細胞懸浮，利用細胞計數器，在不染色的情況下，直接於位相差顯微鏡下計數並計錄各種濃度的細胞數目。

3.細胞附著生存試驗(cell plating efficiency test) ⁽⁷⁾⁽⁸⁾ :

- (1) . 準備 90 個直徑 60 mm 的培養皿，將之分為控制組 15 個，試驗組 5 組各 15 個 .
- (2) . 同上述方法泡製各個不同濃度的 MMA.
- (3) . 每個培養皿分別種入 100 個細胞 . 於 37 °C, 5% CO₂, 98% 濕度的自動恆溫培養箱內培養 24 小時 .
- (4) . 吸掉培養液，分別加入下列不同濃度的 MMA, 9.32 x 10⁰, 9.32 x 10⁻¹, 9.32 x 10⁻², 9.32 x 10⁻⁴, 9.32 x 10⁻⁶ mM, 於作用 1 小時, 3 小時, 6 小時, 12 小時, 和 24 小時後, 將培養液吸掉, 以 PBS (-) 洗 2 次, 再加入新的培養液, 放置於自動恆溫二氧化碳培養箱中培養培養 .
- (5) . 7 天後, 吸掉培養液, 以 PBS(-) 洗 2 次, 用 10% 的 Giemsa 染色液染色水洗之後, 於室溫中自然乾燥細胞 .
- (6) . 利用解剖顯微鏡觀察每個培養皿中之細胞聚落數目, 並計錄之, 每個聚落內的細胞須含有 50 個以上的細胞才認定為一個聚落 .
- (7) . 以控制組所形成的聚落當作 100, 來計算各個不同 MMA 濃度與不同作用時間下所形成的聚落比例 .

4. 細胞染色體試驗：

(1) . 染色體異常 (chromosome aberration) (6,9,10) :

A. 取5個培養瓶(flask), 分成 a,b,c,d,k組, 分別種入 1×10^5 cell/ml, 於 37°C , 5% CO_2 , 98% 濕度的自動恆溫箱內培養 24小時.

B. 同上述方法配製不同濃度的 MMA.

C. 除去培養液, 用 PBS洗二次, 控制組加入不含 MMA的培養液, 試驗組 a,b,c,d 分別加入含 9.32×10^0 , 9.32×10^{-2} , 9.32×10^{-4} , 9.32×10^{-6} mM MMA濃度的培養液培養 24小時 .

D. 在收集細胞(harvest)前 2小時, 加入 0.2 ml, 10ug/ml的秋水仙素(colcemid)於每個培養瓶內, 使其最終濃度為 0.2 ug/ml.

E. 利用0.25% trypsin(胰蛋白酶)使細胞懸浮, 放到離心管內, 於1500 rpm 速度下離心8分鐘 .

F. 除去上層液, 加入 0.075M KCl 5 ml, 作用15分鐘 .

G. 離心，除去上層液，加入固定液 (methanol : acetic acid = 3: 1) 6 ml 作用 30分鐘，再離心，去上層液。

H. 依上述 G 的步驟，分別讓固定液再作用 10, 5, 5 分鐘後，離心，噴片。

I. 將片子放於 45⁰ C 的烘盤下，烘乾一夜，用 10% Giemsa 染色 5-7分鐘，乾燥，於顯微鏡(Photo III, Zeiss , West Germany)觀察染色體。

J. 選擇分散清澗的染色體，予以照相。

K. 根據 S. Venitt ⁽⁶⁾ 的染色體異常分類：

定義：裂隙(gap): 染色體上沒有染色部份的大小，不大於染色分體之間的寬度。

斷裂(break): 染色體沒有染色部份的大小，大於染色分體之間的寬度。

以每個分裂期細胞(metaphase)具有相同染色體數目的細胞為標準，經顯微照相後，計數100個分裂期細胞的染色體異常數目。

(2) . 姊妹染色分體交換試驗 (6,9,10)

A. 取5個培養瓶(flask), 分成 a,b,c,d和k組, 分別種入 1×10^5 cell/ml, 於 37°C , $5\% \text{CO}_2$, 98% 濕度的自動恆溫培養箱內培養 24小時.

B. 同前述方法配製不同濃度的 MMA.

C. 除去培養液, 用 PBS(-)洗 2次, 控制組加入不含 MMA 的新培養液, 試驗組 a,b,c,d, 分別加入 9.32×10^0 , 9.32×10^{-2} , 9.32×10^{-4} , 和 9.32×10^{-6} mM MMA 濃度的培養液, 培養 24小時.

D. 加入 0.2 ml BrdU (5-bromodeoxyuridine) 於每個培養瓶內, 放入暗袋 暗置於培養箱內, 培養 25 個小時.

E. 於收集細胞染色體前 2小時, 加入 0.1 ml 的秋水仙素.

F. 同上述染色體製備方法作出染色體.

G. 於滴片後, 將片子放在 10^{-4} M, Hoechst 33258 (2.94 mg/50ml) 的溶液內 10 分鐘.

H. 取出片子, 放在 265 mm UV 光的箱內, 照射 2小時,

此時片子須於緩衝溶液 ($0.88\% \text{K}_2\text{HPO}_4 + 1.01\% \text{KH}_2\text{PO}_4$) 下保濕照光。

I. 將片子置於2 倍 SSC ($\text{NaCl} + \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 的溶液內，於 65°C 的加熱箱內，加熱50分鐘，取出，烘乾，以10%的 Giemsa 染色7分鐘。

J. 依 S.Venitt⁽⁶⁾的方法，選取每個分裂期細胞的染色體數目相同的細胞，計算100個分裂期細胞的染色分體交換次數，利用 paired t test 方法統計分析差異。

第四章 結果

一. 細胞的純化

篩取由細胞純化後的 V79 細胞其染色體數目為22的聚落,作為本研究的細胞樣本.

二. 多孔培養皿試驗

在控制組和低於 9.32 mM MMA濃度的組(well),均有紫色的染色出現,代表在這濃度下的細胞有存活(圖一).由此決定本試驗加入 MMA的最高濃度為 9.32 mM.加入 MMA後, V79細胞外形的變化(圖二),圖二A為控制組未加MMA的細胞.圖二B為加入 9.32×10^{-2} mM MMA後的情形,細胞的外形較控制組細胞外形變得較短,即紡垂形轉變為較橢圓形.圖二C為加入 9.32×10^2 mM 的 MMA,此狀況下的細胞大多已死亡懸浮.

三. V79細胞生長抑制試驗

試驗組與控制組相比較,當 MMA濃度大於或等於 9.32×10^{-4} mM時,細胞的生長有明顯的被抑制 ($p < 0.05$); 從加藥後到第二天(即 Day 2 到 Day 3),細胞生長增加的量,濃度高的(9.32×10^0 mM)由

(12×10^4 個細胞增加到 35×10^4 個)為比正常組(由 33×10^4 個 增加到 67×10^4 個)或是低濃度(9.32×10^{-6} mM)組由 (27×10^4 個 增加到 62×10^4 個)似乎增加較多;而 Day 3 到 Day 4, 細胞生長增加的量,所有的組則相近 (Table 1, 圖三).

四. V79細胞附著生存試驗

V79 細胞對不同濃度和時間的作用, 呈隨著時間的增加和濃度的增加, 聚落的形成漸減少. 濃度高的(9.32×10^0 mM)組, 於加藥作用1小時後, 相對的附著生存率為控制組的 63.6%, 而作用24小時後, 只為 17.4%; 9.32×10^{-1} mM 組於加入MMA後1小時後開始減少為 81.7%, 而作用24小時後, 只為 21.7%; 9.32×10^{-2} mM組於加入MMA後3小時後開始減少為 75%, 而作用24小時後, 只為 47.8%; 9.32×10^{-4} mM組於加入MMA後3小時後開始減少為 91.7%, 而作用24小時後, 只為 39.1%; 9.32×10^{-6} mM組於加入MMA後12小時後開始減少為 70%, 而作用24小時後, 只為 60.9%.(Table 2, 圖四, 圖四-a).

五. 染色體異常試驗

本試驗中, MMA作用後, V79細胞的染色體出現的情形只見到

有裂隙和染色分體斷裂的狀況，未見其他類形的異常。控制組的染色體異常只見到裂隙，試驗組除 9.32×10^{-6} mM 組除外，其餘均有裂隙和斷裂的出現。當濃度高於 9.32×10^{-4} mM 時，作用48小時後，染色體異常結構的數目有明顯的增加趨勢($p < 0.05$) (圖五, Table 3.)。

六. 染色分體交換試驗

濃度為 9.32×10^{-4} 和 9.32×10^{-6} mM 組與控制組對於姊妹染色分體交換的頻率不具有統計學上的差異。當濃度高於 9.32×10^{-2} mM 以上時，作用49小時後，姊妹染色分體交換的頻率才具有統計學上的意義(圖六, Table 4)。

第五章 討論

MMA單體本身不溶於水,因此利用DMSO作為輔助溶劑。Stenchever⁽¹¹⁾等人指出,如果DMSO的濃度大於1%時會對細胞的生長產生延遲的現象。本研究在 MMA 濃度為 9.32×10^0 mM時 DMSO的最終濃度為0.05%,已小於1%。在24孔皿的試驗結果,Giemsa 的染色程度發現 9.32×10^1 mM 以上 MMA濃度,細胞均已死亡。因此採用 9.32×10^0 mM MMA 為試驗的最高濃度。對於 MMA 製作的從業人員而言,接觸 MMA 屬於長期的接觸,因此在藥物的作用時間長短考慮上,採取至少讓細胞生長都經過 1.5 個以上的細胞生長週期⁽⁶⁾。

Zeiger⁽¹²⁾等在試管外的研究指出,在含或是不含 S9的 TA100, TA1535, TA97或 TA98細胞,於 10.0 ug/plate MMA濃度下培養,都不會造成細胞的突變。Chang⁽¹³⁾的研究發現,當 MMA的劑量在 0.125-1.000 μ l/ml 時,對於 L5178Y/TK^{+/-} 的老鼠(mouse)的淋巴細胞具有致突變性,Chang 認為突變的頻率和劑量之間具有相關性。

Borzelleca⁽¹⁵⁾ 等使用 MMA 濃度高達 2000 ppm 的水給大鼠 (rat) 連續喝 2 年，結果並沒有因藥物引起的病變出現 (compound related lesion)。在動物皮膚的塗抹研究，Oppenheimer⁽¹⁶⁾ 等發現，每週塗抹 MMA 3 次，連續 4 個月，在這些動物的皮膚上並沒有局部腫瘤的產生。但是在老鼠和大鼠的皮下植入經過聚合後的 MMA，Lavorgna⁽⁷⁾ 等和 Laskin⁽¹⁸⁾ 等則發現會有局部的纖維肉瘤 (fibrosarcoma) 產生。

Chang⁽¹³⁾ 在中國倉鼠的卵巢細胞 (CHO cell) 與 MMA 的濃度研究指出，在含有 S9 的情況下，MMA (500-1250 µg/ml) 會對 CHO 細胞產生一種異常的反應，此反應與劑量有相關性 (dose related)。當 S9 不存在下，MMA (750-3000 µg/ml) 也會增加細胞染色體異常現象。Anderson⁽¹⁴⁾ 等研究 Rat bone marrow 的細胞染色體變異，認為 MMA 不具有劑量相關的關係。本研究在 MMA 的濃度 9.32×10^0 mM (9.34×10^2 µg/ml) 時，作用 3 天後，發現對 V79 細胞的生長產生抑制作用；作用 48 小時後，染色體異常和姊妹染色分體交換頻率均有增加，結果與 Chang 的結果相近。

Carolyn⁽¹⁹⁾等指出MMA造成細胞染色體斷裂位置是在染色分體上,對於細胞染色體數目是沒有改變的。一般而言,染色體的異常分類可分為結構上和數目上的異常⁽⁶⁾。結構上的異常會出現裂隙(gap),斷裂(break),雙中心結(dicentric)和圓形染色體(ring)等。數目上的異常以出現多套體(hyperdiploid)時較為有意義。染色體的斷裂可以來自自發性或是致突變劑的誘導;斷裂的時機可能在有絲分裂或無絲分裂中的G1, S, G2細胞週期;斷裂的機制乃由於DNA上有某些傷害的產生,而這些傷害的來源可能是因為化學藥物,UV光或是輻射線的作用,形成密啶雙體(pyrimidine dimer), Base alkylation等。DNA在進行合成作用中,傷害的為位置可能會進行修補或是錯誤修補,如果修補失敗,在染色體結構上即出現異常。染色體斷裂的情形,如果是發生在DNA合成後之時期,斷裂的頻率會減少。染色體的斷裂可能只有1個染色分體斷裂或是2個染色分體的斷裂,前者稱之為chromatid type,後者稱之為 chromosome type⁽⁶⁾。

大部份的化學藥物作用產生的形式為 chromatid type⁽⁶⁾。本研究發現V79細胞染色體斷裂屬於 chromatid type。數目的變化未出現

有多套體。由於本研究未作染色體的層帶染色(banding), 因此無法判斷是否同一隻染色體發生異常, 此有待再研究。

在100個分裂細胞的研究中, 當濃度為 9.32×10^0 mM (9.34×10^2 $\mu\text{g/ml}$) 時, 作用48小時後, V79細胞染色體斷裂數目有 16個, Morre⁽²⁰⁾ 等的研究結果指出, 當MMA濃度為 2800 $\mu\text{g/ml}$ 時, 作用24小時後, 在 200個 CHO分裂細胞的分析中, 出現 45個染色體異常, 二者結果相似。

姊妹染色分體的交換, 乃是由於5-bromodoxyacridine進入到細胞內, 因其化學結構類似細胞的胸腺密啶(thymidine, 簡稱 T), 所以在細胞進行複製時, BU 就混入到DNA的結構中, 此時染色體以 BU取代 T, 進行一次的DNA複製, 之後每一條染色分體的雙股DNA中會有一股含有BU, 即形成BT. 如果細胞繼續以BU取代T, 進行第二次的複製, 則同一條染色體中的染色分體DNA會形成BT和BB. 以核酸的螢光染料H33258作用, 會在螢光顯微鏡下發現, 含BT的染色分體呈現亮的反應, 而含有BB的染色分體呈現暗的反應^(20,21). 利用染色分體交換的頻率可以研究高等生物細胞內遺傳物質受傷的一種指標。

MMA與 CHO細胞作用，隨著 MMA 濃度的增高，姊妹染色分體交換的頻率增加⁽²²⁾。Morre⁽²²⁾等發現，尤其當 MMA 的濃度為 5 mg/ml 時，染色體異常數目增加最多。Bigatti⁽²³⁾以人類的淋巴瘤細胞株和 polymethyl methacrylate bone cement (PMMA)作用，結果顯示二者之間並沒有統計學上的差異。Carolyn⁽¹⁹⁾等的報告，認為 MMA 和 CHO 細胞作用會增加 SCE 的頻率；而對於染色體數目則沒有改變。Marez⁽²⁾等對於 MMA 和 CHO 細胞的作用，不論是否含有 S9 的條件下，MMA 作用 24 小時後，在加 Brdu 25 小時，SCE 交換的頻率都呈明顯的增加。本研究 MMA 與 V79 細胞作用，不含 S9 的情況下，當 MMA 濃度達 9.32×10^{-2} mM 以上時，MMA 作用 24 小時後，在加 Brdu 25 小時，姊妹染色分體交換的頻率在統計學上，亦有明顯的增加。

結語

本研究結果顯示 MMA 對於 V79 細胞的生長，聚落的形成都隨時間的增加產生與濃度相關的抑制作用，對於染色體異常的結果發現，MMA 對 V79 細胞作用後，會使得染色體斷裂數目增加，姊妹染色體交換的頻率增加，此結果與 MMA 作用於 CHO 細胞的結果相似。因此，我們認為 MMA 對於 V79 細胞具有細胞遺傳毒性與致突變性。至於 MMA 作用在人類正常細胞的變化，以及從業人員長期接觸後的反應和受傷的細胞在分子基因學上的變化，將會是要再研究的問題。

第六章 圖與表

Table 1. The growth of V79 cell treated with MMA^a

Concentration (mM)	Day 1.	Day 2.	Day 3.	Day 4.
0	10 ± 0.85	33 ± 2.08	67 ± 2.05	124 ± 8.18
9.32 x 10 ⁻⁶	-	27 ± 2.49	62 ± 2.83	112 ± 5.31
9.32 x 10 ⁻⁴	-	23 ± 2.86	53 ± 3.68	98 ± 9.39 *
9.32 x 10 ⁻²	-	21 ± 2.05	54 ± 2.87	104 ± 4.54 *
9.32 x 10 ⁻¹	-	18 ± 1.69	48 ± 0.94	80 ± 2.62 *
9.32 x 10 ⁰	-	12 ± 3.26	35 ± 3.09	67 ± 2.49 *

a : Mean ± SD x10⁴ cells for three plate in each different concentration

* : significant at p<0.05, compared with control group.

Table 1-1 . Teh cell growth data of V79 cells after treated with different concentration of MMA in each 57 plates.

<u>Group</u>	<u>Day 1.</u>	<u>Day 2.</u>	<u>Day 3.</u>	<u>Day 4.</u>
control	10	36	65	134
	9	31	67	114
	11	32	70	125
Mean \pm SD	10.3 ± 0.85	33.4 ± 2.08	67.3 ± 2.05	124.3 ± 8.18
9.32×10^{-6}		28	64	112
		30	58	106
		24	64	119
Mean \pm SD		27.3 ± 2.49	62 ± 2.83	112 ± 5.31
9.32×10^{-4}		27	53	99
		20	49	110
		24	58	87
Mean \pm SD		23 ± 2.86	53 ± 3.68	98 ± 9.39
9.32×10^{-2}		19	55	103
		24	51	110
		21	58	99
Mean \pm SD		21 ± 1.69	48 ± 0.94	80 ± 2.62
9.32×10^{-1}		16	47	84
		20	49	78
		19	49	79
Mean \pm SD		18 ± 1.69	48 ± 0.94	80 ± 2.62
9.32×10^0		12	38	65
		16	31	71
		8	37	67
mean \pm SD		12 ± 3.26	35 ± 3.09	67 ± 2.49

unit of cell number : $\times 10^4$ in each plate

unit of concentration : mM

Table 2. The plating efficiency of V79 cell treated with MMA.

Concentration (mM)	1 hr	3 hr	6 hr	12hr	24hr
0	100%	100%	100%	100%	100%
0.00000932	100%	100%	100%	70%	60.9%
0.000932	100%	91.7%	84.6%	70%	39.1%
0.0932	100%	75%	84.6%	55%	47.8%
0.932	81.7%	75%	76.9%	50%	21.7%
9.32	63.6%	58.3%	61.6%	30%	17.4%

Table 2-1 . The colony formation number fo V79 cells treated with different concentration of MMA in each plate.^a

group	1 hr	3 hrs	6 hrs	12 hrs	24 hrs
control	10	12	12	15	15
	9	14	13	14	13
	11	11	10	16	17
mean \pm SD	10 \pm 0.82	12 \pm 1.25	12 \pm 1.25	15 \pm 0.82	15 \pm 1.63
0.00000932	12	15	10	9	7
(mM)	9	10	16	13	10
	9	12	10	8	11
mean \pm SD	10 \pm 1.41	12 \pm 2.05	12 \pm 2.83	10 \pm 2.16	9 \pm 1.70
0.000932	10	11	10	12	5
(mM)	9	12	10	10	6
	11	10	11	11	6
mean \pm SD	10 \pm 0.82	11 \pm 0.82	10 \pm 0.47	10 \pm 1.24	5 \pm 0.47
0.0932	10	9	10	8	7
(mM)	8	7	9	9	6
	12	11	11	7	8
mean \pm SD	10 \pm 1.63	9 \pm 1.63	10 \pm 0.82	8 \pm 0.82	7 \pm 0.82
0.932	8	9	9	7	3
(mM)	9	9	8	5	4
	8	9	10	9	2
mean \pm SD	8 \pm 0.47	9 \pm 0.00	9 \pm 0.87	7 \pm 1.63	3 \pm 0.82
9.32	6	6	7	4	2
(mM)	5	6	9	3	1
	7	8	5	5	3
mean \pm SD	6 \pm 0.82	7 \pm 0.82	7 \pm 1.63	4 \pm 0.82	2 \pm 0.82

a: Mean \pm SD.

unit : colony/plate

Table 3. Chromosome aberrations of V79 cell after treated with MMA.^a

Concentration (mM)	Total cell count	Break	Gap	Total	aberration
0	100	0	5	5	0.05 ± 0.22
0.00000932	100	0	30	30	0.30 ± 0.54 *
0.000932	100	4	19	23	0.23 ± 0.49 *
0.0932	100	8	25	33	0.33 ± 0.55 *
9.32	100	16	26	42	0.42 ± 0.57 *

a: Metaphase cells with aberration were scored from 100 well spread metaphases, value are Mean ± SD.

* : Significant at p<0.05, compared with control group.

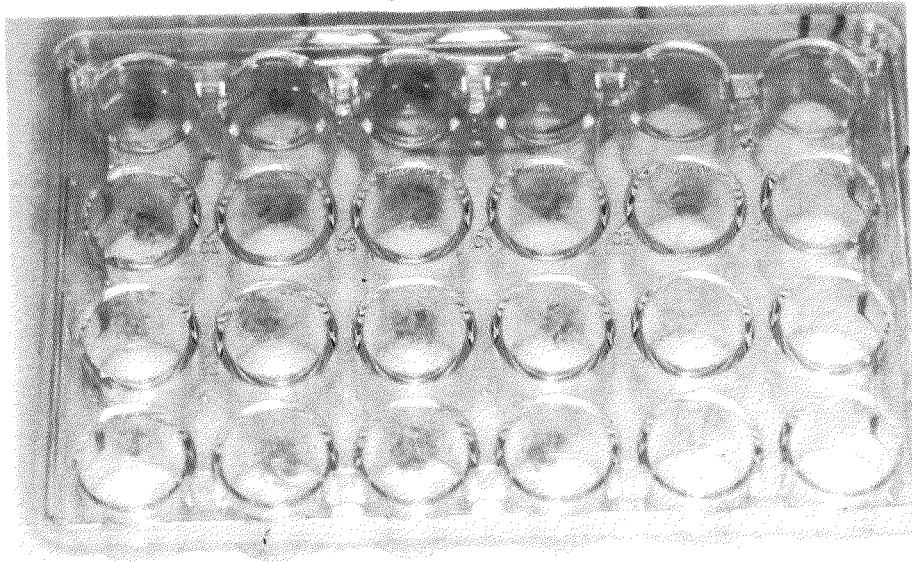
**Table 4. Sister chromatid exchanges (SCE) of V79 cell
after treated with MMA^a**

Concentration ug/ml	Total metaphase count	Total SCE number	Mean \pm S.D / metaphase
0	100	268	2.68 \pm 1.66
0.00000932	100	293	2.93 \pm 2.03
0.000932	100	308	3.08 \pm 2.33
0.0932	100	520	5.20 \pm 3.62 *
9.32	100	627	6.27 \pm 4.31 *

a: Metaphase cells with aberration were scored from 100 well spread metaphases, value are Mean \pm SD.

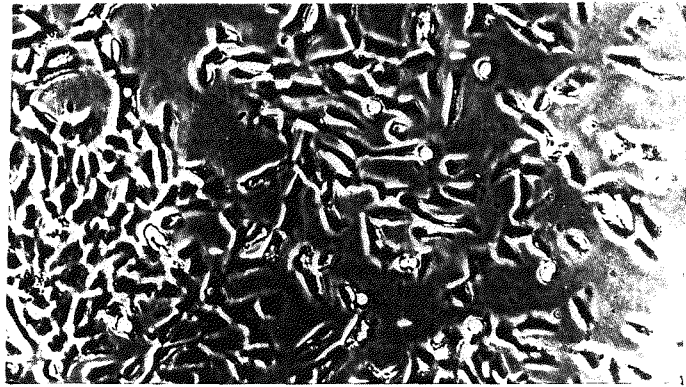
* : Significant at $p < 0.05$, compared with control group.

彩圖 FUJI DEC 93

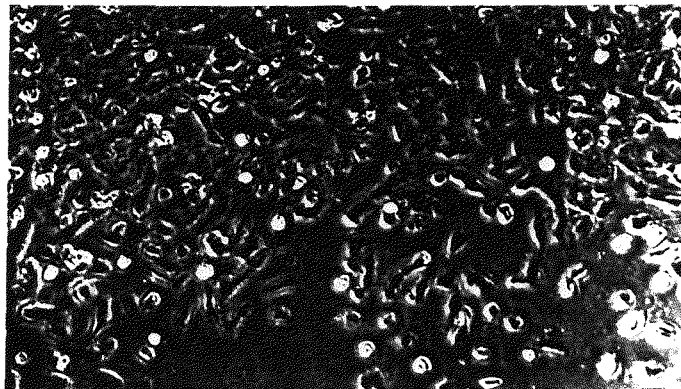


圖一. 不同濃度的 MMA 作用於 V79 細胞,
Giemsa 染色. 由左至右的濃度如下:
0, 0.00000932, 0.000932, 0.0932, 9.32, 932 mM.

A



B



C

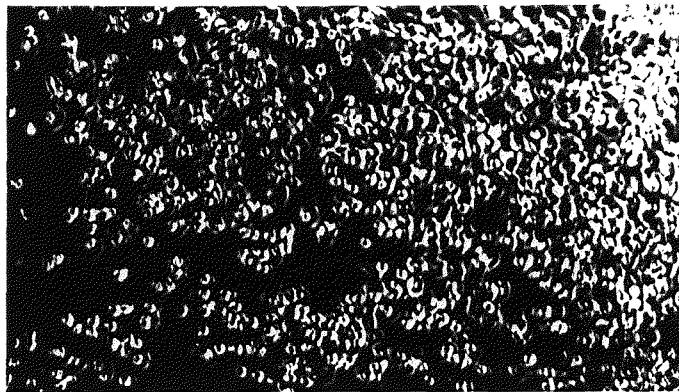


圖 二. V79 細胞的形態
A. 控制組 B. 0.0932 mM組 C. 932 mM組
(位相差顯微鏡 200X)

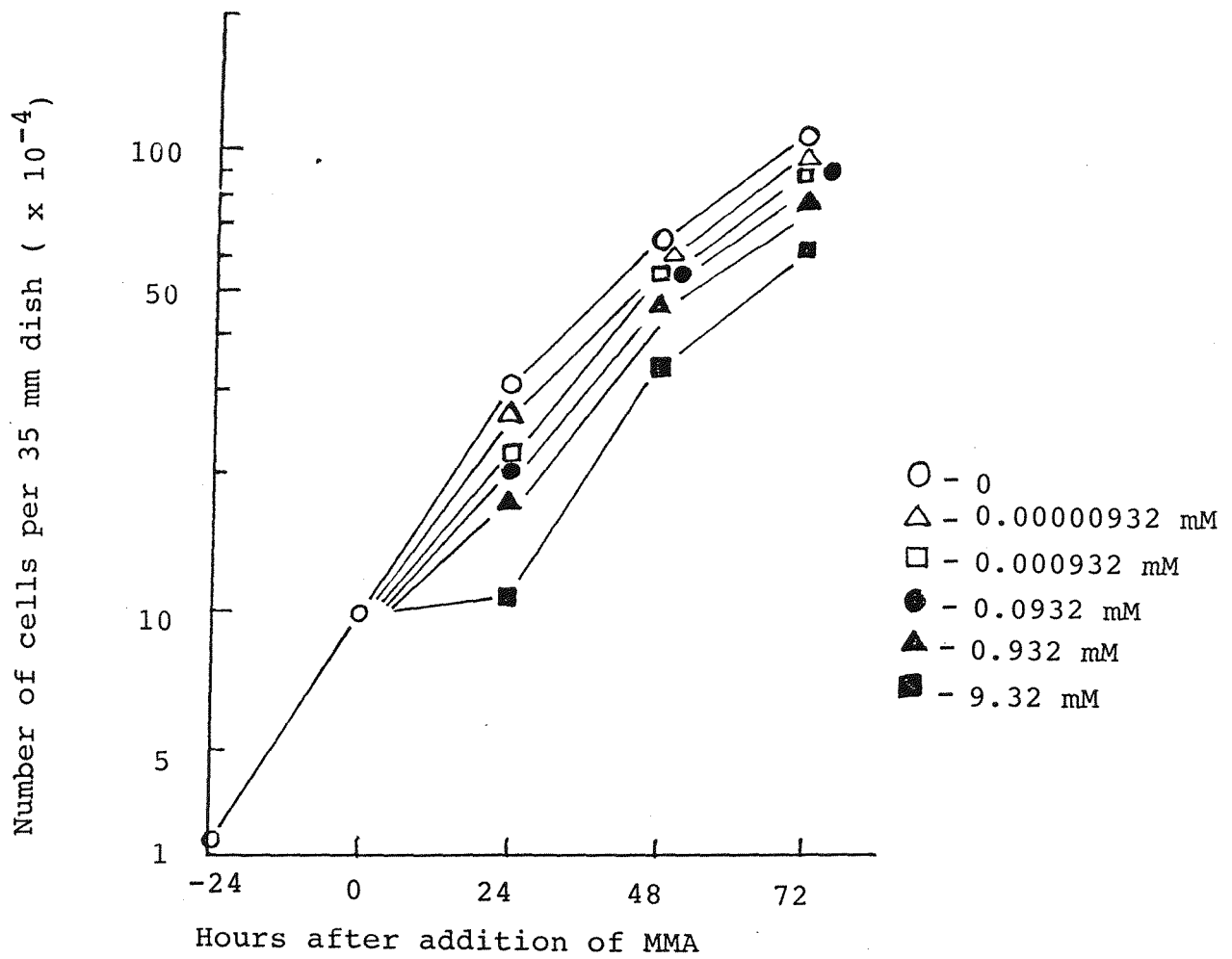
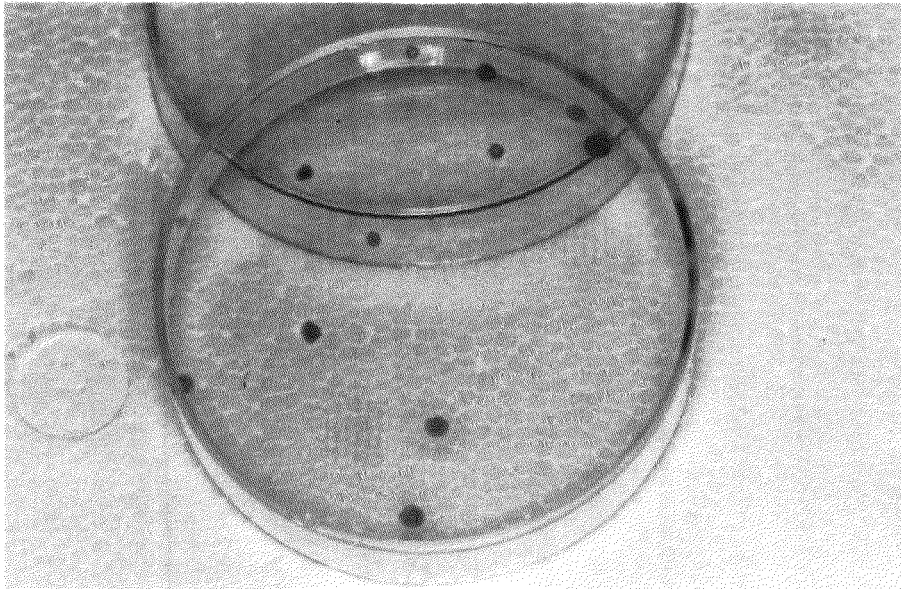


Figure 3. The cell growth of V79 after treated with different concentration of MMA.

圖三. MMA 作用於 V79 細胞後的細胞生長曲線圖.

彩寶 FUJI DEC 93



圖四. 於細胞聚落形成試驗中 V79 細胞聚落的形成情形

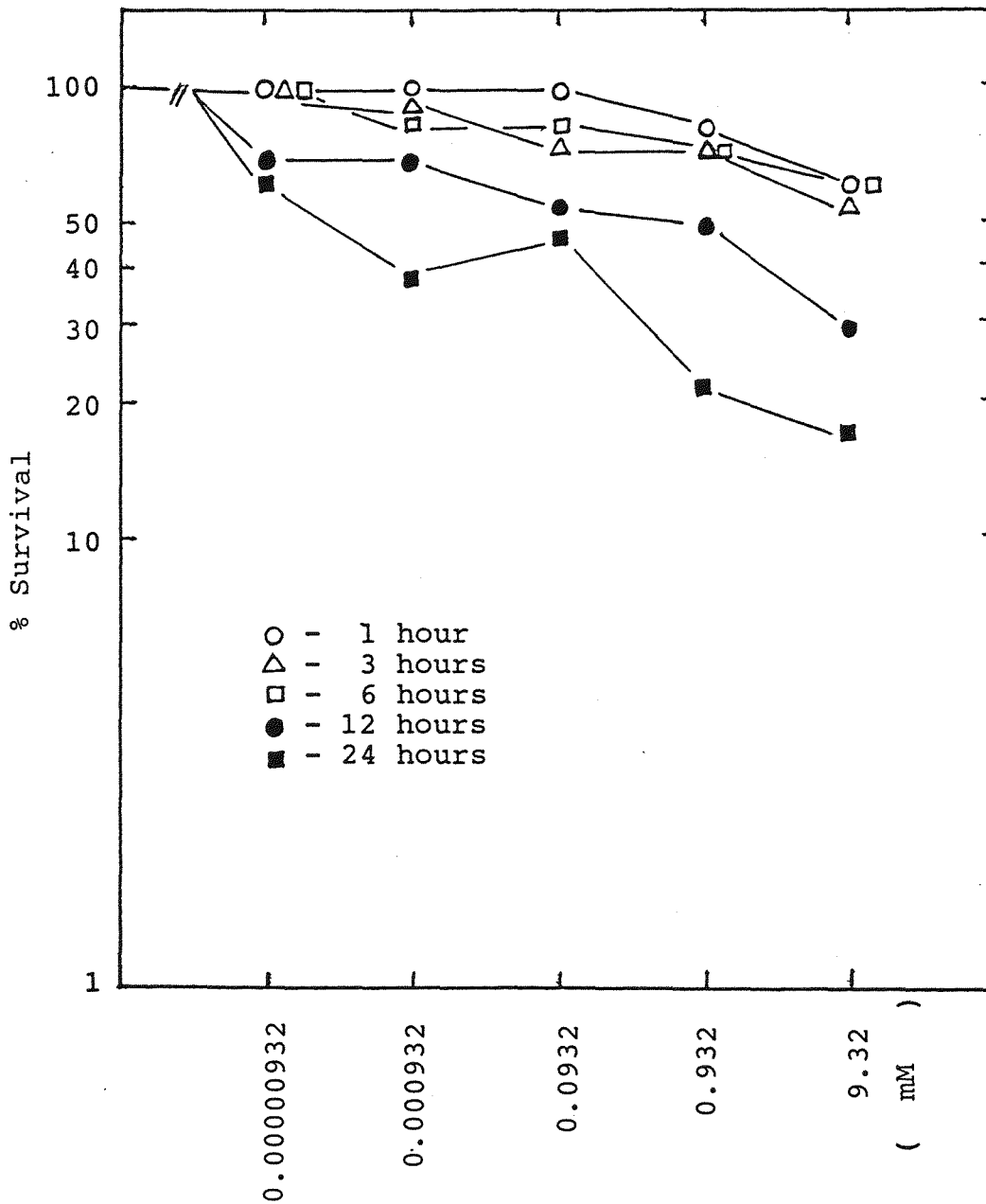
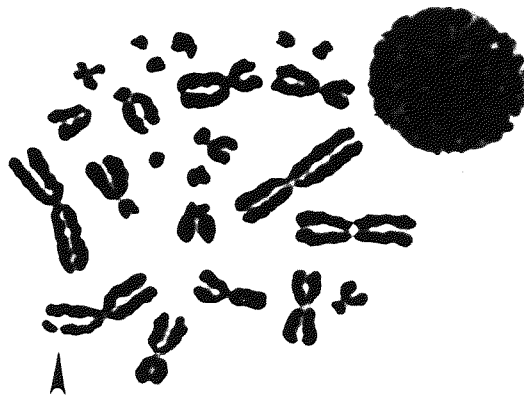
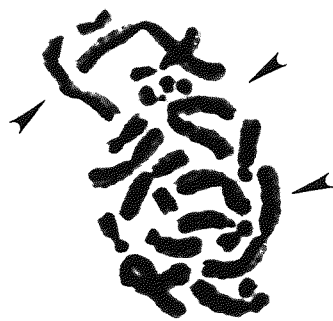


Figure 4-a. The relative plating efficiency of V79 cell treated with MMA.



圖五. V79 細胞的染色體
A. 正常染色體 B. 異常染色體
箭頭處為斷裂位置 (Zeiss 顯微鏡 1000X).



圖六 細胞姊妹染色分體交換情形
箭頭處為交換位置 (Zeiss 顯微鏡 1000X) .

Topic I. The Cytotoxicity of Methyl Methacrylic Acid in Cultured V79 Cells

Abstract :

Methyl methacrylate (MMA), a liquid monomer, is used as a chemical intermediate in the manufacture of plexiglass and other acrylic products and as bone cement in orthopedic and dental prosthesis. Cytotoxicity of MMA on cultured Chinese hamster lung fibroblast V79 cell was performed. The data were analysed by paired t-test. The cell growth were inhibited above 9.32×10^{-4} mM concentration of MMA employed in this study , and the colonies forming ability were dose and time dependently decreased with MMA employment and period of treatment. In chromosomal aberration study, as the MMA concentration increased from 9.32×10^{-6} to 9.32×10^0 mM, the number of chromosomal aberrations was increased. The frequency of sister chromatid exchange was significantly difference ($p < 0.05$) at 9.32×10^{-2} and 9.32×10^0 mM concentration of MMA. The results of this study show that MMA do have cytotoxicity to V79 cells.

Key words:

Methyl methacrylate, Chromosomal aberration,
Cytotoxicity

第七章 參考文獻

REFERENCE

1. Philips RW. Science of Dental Materials. 9th, ed, An HBJ international edition, USA., pp.172-209,1992.
2. Marez T., Shirli P., Hildebrand HF., Hagreneoer JM. Increased frequency of sister chromatid exchange in workers exposed to high dose of methyl methacrylate. *Mutagenesis*, 6 :127-129,1991.
3. Smith DC, Williams DF. Biocompatibility of Dental Material. Vol.3 .CRC press., Florida., pp.122-155,1982.
4. Waegemakers TH, Bendil MPM. Non mutagenicity of 27 aliphatic acrylate esters in the Salmonella microsome test. *Mutat. Res.*, 137:95-102,1984.
5. Poss O, Thilly WG, Waden DA. Methyl metharylate is mutagen for Salmonella Typhimurinm. *J Bone Joint Surg.* 61:1203-1207,1979.
6. Venitt S, Arry JM. Mutagenicity testing a practical approach. 1st ed., CRC press., England, pp. 187-232,1984.

7. Freshney RI. Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technic. 1st ed., YS press. USA.,pp.129-143,205-209.
8. Lin SS, Chou MY. Effect of eugenol on cultured Don-6 cells. Chin Dent J., 4:1-7,1985.
9. Chou MY. Chromosome aberration and sister chromatid exchange induced by eugenol in Chinese hamster ovary cells. Chin Dent J.,6:182-190, 1987.
10. 日本組織學會, 染色體異常試驗法,於"組織培養技術" 第一版,日本組織培養學會編.,朝倉書店.,東京.pp:149-153.1982.
11. Stenchever MA, Hopkins AL, Sipes J. Dimethyl sulfoxide and related compounds some effects on human fibroblasts in vitro. Proc. Soc. Biol. Med., 126:270-273,1967.
12. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Salmonella mutagenicity test : III. Result from the testing of 255 chemicals. Envir. Mutag. 9 (suppl. 9) 1987.
13. Chang PC. Toxicology and carcinogenesis studies of Methyl methacrylate (CAS No. 80-62-6) in F3441N Rats and B3C6F1 Mice (inhalation studies).NTP technical report series No.314., National Toxicology Program., Research triangle

Park., NC. 1986.

14. Anderson E, Longstaff E, Ashby J. An assessment of the carcinogenic and mutagenic potential of methyl methacrylate. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 48:A29, 1976.
15. Borzelleca J, Larson P, Hennigar J, Huf E, Crawford E, Smith R. Studies on the chronic oral toxicity of monomeric ethyl acrylate and methyl methacrylate. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 6:29-32, 1964.
16. Oppenheimer B, Oppenheimer I, Danishefsky AS, Eirich F. Further studies of polymer as carcinogenic agents in animal. *Cancer Res.*, 15:333-336, 1955.
17. Lavorgna J, Burstone N, Schiller A, Harris W. The carcinogen of plastics used in orthopedic surgen. An assessment of incidence on rats and the possible relevance to man. *Clin. Orhtop. Relat. Res.*, 88:223-225., 1972.
18. Laskin D, Robinson J, Weinman J, Experimental production of sarcomas by methyl methacrylate implants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87:329-332. 1954.
19. Carolyn LD, Karen HB, Martha MM. Micronucleus

chromosome aberration and small colony TK mutant analysis
to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse
Lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 222:191-203,1989.

20. Buy CH, Osinga J. The mechanism of differential sister
chromatid fluorescence as studied with the GC specific DNA
ligand mithramycin. *Exp. Cell. Res.*, 125:105-119,1980.

21. 詹崑源 . 姊妹染色分體對比染色 . 科學發展月刊,
Vol.16, No.8, 1109-1121, 1988.

22. Morre MM, Amtower A, Oerr CI, Brock KH, Dearfield KL.
Cytotoxicity of acrylaic acid, methyl acrylate, ethyl acrylate,
methyl methacrylate and ethyl methacrylate in L5178Y mouse
lymphoma cells. *Envir. Mol. Mutagen.*, 11:49-63,1988.

23. Begatti MP, Amberti L, Cannas M, Rossi E. Lack of SCE
induction by polymethyl methacrylate bone cement in human
lymphocyte cultured in vitro. *Mutat. Res.*, 227:11-24,1989.

第二篇 Methyl methacrylic acid 對人類淋

巴細胞的毒性研究

摘要	-----51
第一章 緒論 (Introduction)	-----52
第二章 材料與方法 (Material and Methods)	-----55
2-1. 試驗材料	-----55
2-1.1. 試藥	-----55
2-1.2. 泡製方法	-----55
2-1.3. Medium	-----56
2-1.4. MMA (methyl methacrylic acid)	-----56
2-1.5. Hoechst 33258	-----56
2-1.6. Fixation solution	-----57
2-1.7. 2 X SSC	-----57
2-1.8. Buffer solution	-----57
2-2. 儀器	-----58
第三章 試驗過程	
3-1. 染色體結構異常試驗 (Chromosome aberration test)	---59

3-2. 血清有無對加藥後染色體異常之試驗 (chromosomal aberration test with or without serum)	-----62
3-3. 姊妹染色分體交換試驗 (Sister chromatid exchange test)	---62

第四章 結果

4-1. 染色體結構異常試驗 (Chromosome aberration test)	-----65
4-2. 血清有無對加藥後染色體異常之試驗 (chromosomal aberration test with or without serum)	-----65
4-3. 姊妹染色分體交換試驗 (Sister chromatid exchange test)	--65

第五章 討論	-----66
--------	---------

第六章 圖表	-----71
--------	---------

表一 淋巴細胞在不同濃度MMA作用後,染色體異常之數目-71

表二 淋巴細胞在含與不含血清和不同濃度MMA作用後,染色體異常之數目 -----72

表三 淋巴細胞在不同濃度MMA作用後,姊妹染色分體交換之數目 -----73

圖一 淋巴細胞染色體異常 -----74

圖二 淋巴細胞姊妹染色分體交換 -----75

第七章 參考文獻	-----77
----------	---------

摘要

由第一部份的試驗得知Methyl methacrylic acid (MMA) 對V79細胞具有細傳毒性.因此在體外(in vitro), 我們利用人類淋巴細胞為材料, 直接和MMA接觸作用. 觀察其細胞的染色體變化. 結果得到當的濃度大於 0.932 mM時, 染色體間隙, 染色分體斷裂和姊妹染色分體交換的數目都呈明顯增加($p<0.05$). 我們推論MMA對於人類的淋巴細胞可能具有致突變性 (mutagenicity).

第一章 緒論

整形外科手術所使用的生物相容性材料壓克力樹脂，其主要的成份為 Polymethyl methacrylic(簡稱 PMMA, CAS No.9011-4-7),這種材料使用於整形外科手術，至今已有30年以上⁽¹⁾。在牙科義齒床製造和樹脂填補材料中，亦有使用到這種單體 (monomer)，其成份為 methyl methacrylic acid 簡稱 MMA。在眼科治療中，軟形鏡片 (soft intraocular lenses)的成份也是屬於這種單體⁽²⁾。單體的成份，除醫療方面的使用外，於日常生活中使用的食物包裝材料，建築用的油漆等，也都含有 MMA的成份⁽³⁾。

早期在牙科使用義齒床的材質屬於自動聚合的材料，它與光聚合的材料比較，發現在聚合後，自動聚合的材質會有少許的單體殘存⁽⁴⁾。有更多的報告指出，單體會使牙科技工和牙醫師產生過敏性反應。Stevenson⁽⁵⁾和 Moody⁽⁶⁾提出單體會造成牙醫師的手過敏，濕疹和接觸性皮膚炎。Stoy⁽⁷⁾的報告則指出牙科技工接觸到單體後，會產生局部的皮膚炎。Hollander和 Kenedy研究牙醫師手部的皮膚，以 Patch

test檢測手部殘存的自動聚合樹脂，發現有強烈的陽性反應⁽⁸⁾。Pegum 和 Medhurt指出，整形外科醫師的手有皮膚炎，乃是由於單體會穿過所戴之手套之故，他將之稱為"rubber-glove-dermatitis"⁽⁹⁾。

在體外細胞的試驗發現，MMA會造成中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cell簡稱CHO)⁽¹⁰⁾與中國倉鼠肺臟纖維母細胞 (Chinese lung fibroblast cell 簡稱 V79)⁽¹¹⁾的染色體異常和姊妹染色分體交換的頻率增加。Morre 等研究L5178Y老鼠(mice)的淋巴瘤細胞與 Acrylic, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate 和 ethyl methylacrylate的基因毒性，發現細胞的突變率會隨濃度的增加而增加(dose-related)⁽¹²⁾。Dorre等的研究中，發現MMA會造成L5178Y細胞株產生小核(microneuclear)和染色體異常⁽¹³⁾。試管培養細胞株和 MMA 作用，在含或是不含S9(rat的肝代謝酶)的培養下，發現染色體異常和姊妹染色分體交換的頻率都呈明顯的增加⁽³⁾。

由於本身具有揮發性，在法國訂定的最高閾值限制值(threshold limit)為在空氣中100p.p.m($410\mu\text{g}/\text{m}^3$)⁽³⁾。Chang 等的研究指出，將雄性和雌性老鼠(mice)置於密閉室內，讓它們吸入500-1000ppm(2050-410000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的蒸氣，於102週之後，並沒有發現腫瘤的出現，

只於呼吸系統上皮發現到發炎，退化和增生的現象⁽¹⁴⁾。Tensy 等研究發現，在116 ppm (47560 μ g/ml) 的蒸氣，每日 7小時，每週 5日，連續 6個月讓雄性大鼠(rat)吸入，結果發現氣管上皮的纖毛發生剝落，上皮微絨毛數目減少⁽¹⁵⁾。而 Merez 等發現壓克力工廠工作，接觸 MMA 的工人，其染色分體互換的頻率有明顯的增加⁽³⁾。

水中加入MMA給予老鼠(mice)飲用的研究，Borelleca 等指出，2000ppm MMA 濃度給老鼠飲用2年，結果並沒有發現由引起的器官組織傷害出現⁽¹⁶⁾。在皮膚塗抹試驗中，Oppenheimer 等指出在老鼠的皮膚每週 3日，連續個 4月塗抹MMA，結果發現在塗抹區並沒有局部腫瘤的出現⁽¹⁷⁾。經過聚合的樹脂，經皮下植入後，發現在老鼠(rat和mice)植入區部位有局部的纖維瘤出現^(18,19)。

本篇的研究動機乃基於，牙醫師與技工在工作上，甚至病人，常會接觸到 MMA 材料，而過去的研究報告，對於 MMA 和正常人類淋巴細胞的直接作用結果則很少。因此想了解MMA與正常的人類淋巴細胞作用後，細胞的染色體異常情形，以了解MMA對於人類的淋巴細胞是否為一致突變劑(mutagen)。

第二章 材料與方法

2-1 試驗材料

2-1.1 試藥名稱

	廠牌	產地
1. BrdU (5- Bromo-2''-deoxyuridine)	Sigma	USA
2. Colcemid Solution	Gibco	USA
3. DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma	USA
4. FBS (fetal bovine serum)	Gibco	USA
5. Fixation solution (Methanol : Acetic acid = 3:1)	E. Merck	USA
6. Giemsa Dye	E.Merck	USA
7. Hoechst 33258, C ₂₅ H ₂₄ N ₆ O ₃ HCL	Sigma	USA
8. Hypotonic solution, 0.54% KCL	E.Merck	USA
9. Methyl methacrylic acid (MMA)	Fluka	Switzerland
10. PHA (phytahemaaglutinin)	Gibco	USA
11. PSN (penicillin, streptomycin, neomycin)	Gibco	USA
12. RPMI-1640 medium	Gibco	USA

2-1.2 泡製方法

2-1.2.1 Medium preparation

RPMI-1640 + FBS 10 % + 1% PSN
90 ml + 9 ml + 1 ml

2-1.2.2 泡製不同濃度MMA

取由Fluka公司製造的 MMA [$\text{CH}_2:\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$], 分子量 100.12, 密度為0.943, 濃度為 99% 的 Stock solution.

1. 2 ml MMA + 1 ml DMSO + 17 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^2 mM MMA
2. 1 ml of 9.32×10^2 mM MMA+ 9 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^1 mM MMA
3. 1 ml of 9.32×10^1 mM MMA + 9 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^0 mM MMA
4. 1 ml of 9.32×10^0 mM MMA + 9 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^{-1} mM MMA
5. 1 ml of 9.32×10^{-1} mM MMA+ 9 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^{-2} mM MMA
6. 1 ml of 9.32×10^{-2} mM MMA + 9ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^{-3} mM MMA
7. 1 ml of 9.32×10^{-3} mM MMA+ 9 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^{-4} mM MMA
8. 1ml of 9.32×10^{-4} mM MMA+ 9 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^{-5} mM MMA
9. 1ml of 9.32×10^{-5} mM MMA + 9 ml RPMI-1640 ----- 9.32×10^{-6} mM MMA

2-1.2.3 Hoechst 33258 :588 ug/l of dist, Water

588g/l H ₂ O ----- 1 mole	1 M
0.588 g/l H ₂ O -----	10 ⁻³ M
0.0588 g/100ml H ₂ O-----100 ml	10 ⁻⁴ M
0.00588 g/100 ml H ₂ O	10 ⁻⁴ M
5,88 mg/100 ml H ₂ O	10 ⁻⁴ M
0.00886 g/150 ml H ₂ O	10 ⁻⁴ M
0.00294 g/50 ml H ₂ O	

2-1.2.4 Fixation solution

Methanol 3 x + Acetic acid 1x

2-1.2.5. 2X SSC

1. Sodium chloride NaCl 8.75 g
2. Trisodium citrate 4.4 g (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O)
3. add Dist. Water till 500 ml.

2-1.2.6 Buffer solution

0.88 % K₂HPO₄ + 1.01% KH₂PO₄

2-1.3 儀器

1. Lamina flow : Bellco Glass Inc (USA)

2. Incubator :

Forma Scientific Steri-cult incubator

Temperature 37 °C, RH control 67-99% (humidity),

5% CO₂ controlled, water-jacketed incubator.

3. Incubator TC-1 heat warmer

振盪回數 50 HZ/100/min (Shaking) 60 HZ/120/min.

4. Centrifuge Hitachi (Japan)

Time and speed (x 1000 rpm)

5. UV light : Model UVL-56

black-Ray Lamp, long wave UV-366nm

115volts,60HZ, 0.16 AM

Sau Gabriel CA 91778 USA.

第三章材料與方法

3-1.樣本的收集與培養液的配製

樣本的來源為取自中山醫學院5名健康的男學生，平均年齡 20-30歲，每位抽取10 ml的全血，作淋巴細胞的培養。方法如下⁽²⁰⁾：

1.用10 ml的注射筒，內加 0.2 ml的抗凝血劑(heparin)，抽取周邊血液各10 ml，混合均勻之後，豎立靜置3小時，至注射筒內的血液上層澄清。

2. 培養液的配製：將 RPMI-1640培養液加入10-15%的牛血清(fetal bovine serum)及1% penicillin, streptomycin和 neomycin.

3.準備培養瓶，內裝的9.4 ml培養液，將上述的注射筒輕輕的搖動，將針頭轉折成倒V形，慢慢的將上層液推出0.6 ml注入培養瓶內，混合均勻之後，放到含有 5%CO₂, 98%溼度的 37⁰ C自動恆溫箱內培養。

3-2. MMA 作用於人類正常淋巴細胞的染色體異常試驗

1. 同上述 3-1 步驟 1-3, 在步驟 3, 將之分為試驗組 a,b,c,d 試管和對照組 k 試管。各試管內分別加入 0.15 ml Phyto-hemagglutinine (簡稱 PHA) 及培養液, 血液, 培養 24 小時。

2. 配製不同濃度的, 方法如下:

MMA (Fluka, Switzerland) 以體積比 (v/v) 的方式泡製, 取 2 ml 的 MMA 溶於 1 ml 的 DMSO (Sigma, USA) 加入 17 ml 的培養液 (RPMI-1640), 依序泡出下列不同濃度的 MMA:

A = 9.32×10^2 mM, B = 9.32×10^1 mM, C = 9.32×10^0 mM, D = 9.32×10^{-1} mM, E = 9.32×10^{-2} mM, F = 9.32×10^{-3} mM.

3. 由培養箱中取出培養瓶, 在 1500 rpm 速度下離心 8 分鐘。

4. 除去上層液, k 瓶加入不含藥物的新培養液, 試驗組 a,b,c,d 瓶則依續加入 9.32×10^1 , 9.32×10^0 , 9.32×10^{-1} , 9.32×10^{-2} mM 的 MMA, 再置入培養箱內培養 45 小時。

5. 於採收細胞 (harvest) 前 30 分鐘, 加入 0.2 ug/ml 的秋水仙

素(colcemid)於各個培養瓶內，混合均勻。

6.將培養瓶內容物倒入離心試管，於1500 rpm速度下離心8分鐘，除去上層液。

7.取0.075 M (56%)的 potassium chloride (KCl)10 ml，加入各個試管內，在37°C度的水浴下作用10分鐘。

8.置於1500 rpm速度下離心8分鐘，除去上層液。

9. 加入10 ml的固定液(Fixer, Methanol : Acetic acid = 3:1)作用30分鐘，於1500 rpm速度下離心8分鐘，除去上層液。

10.加入的10 ml固定液作用10分鐘，離心8分鐘，除去上層液。

11.加入的10 ml固定液作用5分鐘，離心8分鐘，除去上層液。

12.加入的10 ml固定液作用5分鐘，離心8分鐘，除去上層液。

13.準備玻璃片(Slide)，作染色體漬片之製作。

14.將漬有染色體的玻片，置放於56-60°C的乾燥箱，乾燥12小時以上。

15.用10% Giemsa 的染料染色5分鐘，再乾燥。

16.於顯微鏡下，觀察計數100個分裂細胞(metaphase)的染色體異常結果，所有結果均以顯微照相後判斷結果。

染色體的異常判斷，根據 S. Venitt⁽¹⁹⁾的染色體異常分類：

定義：裂隙(gap):染色體上沒有染色部份的大小，不大於染色分體之間的寬度，

斷裂(break):染色體沒有染色部份的大小，大於染色分體之間的寬度。

3-2. MMA作用在含或不含血清培養的淋巴細胞試驗

方法同上述的步驟，唯一差別是在步驟3-1-2.培養液的製備，一組加有含10% FBS的血清，而另一組則不加血清。MMA的試驗濃度 9.32×10^0 mM，觀察其染色體的變化。

3-3. MMA與人類正常淋巴細胞作用的姊妹染色分體交換試驗

(19):

1. 採血方法和淋巴細胞的培養，如同上述3-1步驟。
2. 於加入 MMA後的 24小時，加入50 uM的 BrdUra (5-bromodeoxyuridine)於各個培養瓶內，將之暗置於5% CO₂，98%溼度，37°C的自動恆溫培養箱內培養 40小時。
3. 於收集染色體前 30分鐘，加入的 0.2 ug/ml秋水仙素 0.1ml，於各個培養瓶內。
4. 將培養瓶內容物倒入離心試管，於1500 rpm速度下離心

8分鐘，除去上層液。

5.取0.075M (56%)的potassium chloride (KCl)10 ml，加入各個試管內，在37°C度的水浴下作用 10分鐘。

6.置於1500 rpm速度下離心 8 分鐘，除去上層液。

7. 加入10 ml的固定液(Fixer, Methanol : Acetic acid = 3:1)作用30分鐘，於1500 rpm速度下離心8分鐘，除去上層液。

8.加入的10 ml固定液作用10分鐘，離心8分鐘，除去上層液。

9.加入的10 ml固定液作用 5分鐘，離心 8分鐘，除去上層液。

10.加入的10 ml固定液作用 5分鐘，離心 8分鐘，除去上層液。

11.準備玻璃片(Slide)，作染色體潰片之製作。

15.將潰有染色體的玻片，置放於 56-60°C的乾燥箱，乾燥12小時以上。

16. 染色，配製 10^{-4} M的 H33258溶液，取5.88 ng/100 ml的蒸餾水，將已製作完成之玻片，放入該溶液，暗置10分鐘。

17. 取出玻片放在含有 K_2HPO_4 0.88 gm, $K_2H_2PO_4$ 1.01 gm的緩衝溶液內，利用UV光距離13公分下，照射2小時。

18.取出玻片，放在含有 saline/sodium citrate (2倍SSC緩衝液0.03M)內,65°C下,15分鐘。

19.取出玻片，洗淨乾燥12小時。

20.用10% Giemsa染料，染色5-7分鐘。

21. 於顯微鏡下觀察照相後,根據S. Venitt的方法⁽²⁰⁾,計數100個分裂細胞的姊妹染色分體交換次數。以 Paired t test統計差異性。

第四章 結果

4-1. 在含或不含血清的培養液試驗中，

100個分裂細胞染色體異常的平均數目，當藥物作用45時後，以不含血清組(0.22)的異常數大於含有血清組(0.10)。(表一)

4-2. 不同濃度的 MMA 作用於淋巴細胞，

當藥物作用45時後，發現隨著濃度的增高(9.32×10^{-2} ----- 9.32×10^1 mM)，染色體異常的平均值也隨之增高(0.080----0.172)。

在4-1,4-2的結果中，染色體出現的異常情形，只發現有間隙(gap)和斷裂(break)的情況，並未見有其它種情況的出現如：雙中心節，環形染色體，多套體等。

4-3. 不同濃度的 MMA 作用於淋巴細胞，其姊妹染色分體交換的情形，發現與正常對照組比較，當藥物作用64時後，濃度大於 9.32×10^{-2} mM時，姊妹染色分體交換的數目有明顯的差異性存在 ($p < 0.05$)。

第五章 討論

將細胞培養加入藥物作用的試驗方法，加藥的時機有二種方法：一、在一開始即加入藥物使之作用。二、在經過 24 小時的培養後，才加入藥物使之作用⁽²⁰⁾。本研究採用的方法屬於後者。在細胞培養中加入化學藥物，可能會造成細胞週期延緩(cell cycle delay)的情形，因此為確信藥物的作用有效果，於加藥作用後，會將細胞的培養時間延長2個或更長的週期之後，才觀察結果⁽²⁰⁾。在組織培養方法中，培養液內含的血清濃度約在10%-20%之間，如果血清的濃度過高時，將會抑制成纖維母細胞(fibroblast)的生長⁽²¹⁾。本研究所採用之血清濃度位於上述標準之內，因此確信試驗結果不會有影響。關於MMA加入到培養液後，是否會因血清的存在而影響它與淋巴細胞之作用，由表一發現染色體異常的平均數，以不含血清組(0.30)大於含血清組(0.17)，MMA是否會和血清結合而減小它與細胞之作用，仍須再研究。

PHA為一種 red kidney bean 學名 Phaseolus

vulgaris的抽取物，它可以刺激淋巴細胞量的增生⁽²²⁾。即 PHA作用24小時之後，可以增加淋巴細胞DNA的合成⁽²⁰⁾。因此利用PHA的刺激，可用以研究人類染色體的變化，以作為診斷的工具⁽²²⁾。

在染色體結構異常的試驗中，本研究的結果所見到為染色體間隙與斷裂的情形，並未見其它種變異，此與Venitt等指出細胞經化學藥物作用後，造成細胞染色體異常的結果相同⁽²⁰⁾。染色體斷裂可發生在細胞分裂週期G₁,S,G₂時期的任一時期，如果發生在G₂期時，則會有單染色分體斷裂，如果發生在S期時，則會有雙染色分體斷裂的情形⁽²³⁾。推論本研究的結果可能是在G₂時期發生斷裂。本研究MMA作用時間48小時以上，染色體異常的數目隨著濃度的增高而增加，結果與第一篇V79動物細胞的試驗結果相同，亦與CHO細胞在MMA濃度由750 μ g/ml-3000 μ g/ml時，染色體異常數目呈計量相關(dose related)的結果相同⁽²³⁾。

姊妹染色分體交換(簡稱SCE)的產生，代表DNA的複製產物在對等處發生交換，雖然SCE在分子生物學上的解釋尚未清楚，但一般認為的頻度代表DNA的受損。過去許多研究已證明，致突變劑(mutagen)以及大多數的致癌劑(carcinogen)都會損壞

DNA，並增加 SCE的發生頻率⁽²⁵⁾。本研究在 SCE的結果顯示，MMA作用64小時後，隨 MMA的濃度的增加，SCE的頻率也隨之增加，當濃度大於 9.32×10^{-1} mM時，與對照組比較，均呈明顯的差異($p < 0.05$)。Poss等認為MMA在34mM時，對於TM677 *Salmonella typhimurium* 細菌是一種致突變劑⁽²⁴⁾。Zeiger等研究認為大於10.0ug/plate的濃度時，MMA對於TA100,TA1535,TA97或TA98細胞為致突變劑⁽²⁸⁾。Chang 的研究指出，MMA濃度在0.125-1.000 $\mu\text{g/ml}$ 時，對於 L5178Y/TK^{+/-} 的老鼠淋巴瘤細胞是一種致突變劑⁽²⁹⁾。Bigatti 等研究指出 PMMA 作用於人類淋巴細胞後，並未有任何差異性變化，但對於細胞的增生指數 (proliferation index)有增加，作者認為是 PMMA對於細胞具有毒性的結果⁽¹⁾。

SCE的數目在正常人的頻率會隨細胞的種類不同而有不同，其範圍在2-20個，平均約有5-8個互換⁽²⁶⁾。SCE不受性別差異的影響，但會受到年齡的影響，發生最大的年齡範圍是在30-40歲之間⁽²⁷⁾。本研究的樣本年齡分佈的範圍是在20-30歲，對照組的數目也落在上述正常範圍內。MMA由於本身不溶於水，因此以

DMSO作爲溶解的輔助劑，本試驗參與試驗的最高濃度爲 9.32×10^1 mM，此時DMSO的濃度在0.5%以下，此與Stenchever 等認爲 MMA濃度高於1%以上時，會對細胞的世代之產生有影響的結果似乎不相衝突⁽³⁰⁾。

由於樹脂在聚合時會有2-5%的單體殘存未發生聚合，在聚合後殘留的會立即釋出⁽³¹⁾。在牙科義齒床的使用上，因製作到配戴大多已經過一段時間，理論上應不至於造成毒性反應。有些報告指出，於外科手術使用此材料作爲骨釘之後，會在病患的體內產生毒性⁽³¹⁾。Rijke 和 Johnson指出MMA的半生期，在試管中，20°C下，在全血內的時間是3小時⁽³¹⁾。MMA在血液中的代謝及在血液中可能發生的動力學機轉(kinetic mechanism)至今仍未有文獻報告，此仍有待再研究。

結語

MMA 具有高揮發性，由過去的研究報告以及本試驗的結果均顯示，當 MMA 濃度在 9.32×10^{-1} mM (93.4 $\mu\text{g/ml}$) 以上時，作用 48 小時後，會對人類淋巴細胞具有細胞遺傳毒性及致突變性，因此建議從事於接觸到這類材料的專業人員，應注意到工作環境以及自我的保護，以爲持健康。

第六章 表格

Table 1. The mean value of chromosome aberration of 100 metaphase after methyl methacrylic acid^a treated on normal human lymphocytes cultured with or without serum^b.

Chromosome aberration	Mean Value	
	Serum(+)	Serum(-)
Gap	0.07	0.08
Break	0.10	0.22

a: MMA concentration is 9.32 mM, treatment time is 48 hours.

b: 10 % fetal bovine serum.

Table 2. The chromosome aberration of methyl methacrylic acid treated on normal human lymphocytes.

CONCENTRATION	TOTAL METAPHASE ^a	GAP	BREAK	MEAN VALUE ^b
0	500	13	4	0.034
9.32 x10 ⁻² mM	500	18	32	0.080
9.32 x10 ⁻¹ mM	500	24	41	0.130 *
9.32 x10 ⁰ mM	500	28	49	0.154 *
9.32 x10 ¹ mM	500	31	55	0.172 *

a: 100 metaphase of five sample.

b: total aberration number/ total metaphase.

* : p<0.05 significantly difference, compared with control group.

Table 3. The sister chromatid exchange of methyl methacrylic acid treated on normal human lymphocytes.^a

Concentration	Total metaphase	SCEs/cell \pm SE	P ^b
o	500	2.98 \pm 2.21	
9.32 x10 ⁻² mM	500	3.47 \pm 2.67	
9.32 x10 ⁻¹ mM	500	3.59 \pm 2.27	< 0.05 *
9.32 x10 ⁰ mM	500	3.90 \pm 2.68	< 0.05 *
9.32 x10 ¹ mM	500	6.59 \pm 2.87	< 0.05 *

a : five student's blood

b : Paired t test

* : significantly difference, compared with control group.



圖一· 淋巴細胞染色分體斷裂情形 (箭頭所指之處)



圖二· 淋巴細胞染色分體交換情形 (箭頭所指之處)

Topic II. The chromosome aberration study on methyl methacrylic acid treated human lymphocytes.

Abstract :

Methyl methacrylic acid (MMA) is a component of several products. It is used in the medical field, too. In vitro, as many investigations showed MMA do have cytotoxicity to animal cells. In this study, human lymphocytes cultured in vitro are used to assess the ability of methyl methacrylic acid to induce chromosome aberration and sister chromatid exchange (SCE). Under the condition used in this study, methyl methacrylic acid do produce chromosome gaps, chromatid breaks and increase the number of sister chromatid exchange in phyto-hemagglutinin stimulated human lymphocytes. As the concentration of methyl methacrylic acid increased, chromosome aberration increased. To human lymphocytes, methyl methacrylic acid seems to be a mutagen.

Key words :

methyl methacrylic acid, chromosome aberration, mutagen

第七章 參考文獻

REFERENCE

1. Begatti MP, Amberti L, Cannas M, Rossi E. Lack of SCE induction by polymethyl methacrylate bone cement in human lymphocyte cultured in vitro. *Mutat. Res.*, 227:11-24,1989.
2. Chirila TV, Walder LN, Constable IJ, Tompson DE, Barrett ED. Cytotoxic effects of residual chemicals from polymeric biomaterials for artificial soft intraocular lenses. *J Cat Refra Surg.* 17(2): 152-162,1991.
3. Marez T., Shirli P., Hildebrand HF., Hagenroer JM. Increased frequency of sister chromatid exchange in workersexposed to high dose of methyl methacrylate. *Mutagenesis*, 6(2) :127-129,1991.
4. Fister AA, Woodside NY. Allergic sensitization of the skin and oral mucosa to acrylic denture materials. *JAMA*, 18:238-241,1954.
5. Stevenson WJ. Methyl methacrylate dermatitis. *Contact Point.* 18:171,1941.

6. Moody WL. Severe reaction from acrylic liquid. Dent Dig. 47:305,1941.
7. Stoy PJ. Denture sore mouth with particular reference to acrylic. J Irish Dent A.7: 13, 1952.
8. Hollander C, Kennedy RM. Dermatitis caused by autopolymerizing acrylic restorative material. Dent Diag. 57:213,1951.
9. Pegum IS, Medhurt FA. Contact dermatitis from penetration of rubber gloves by acrylic monomer. British Med J., 2: 141-143, 1971.
10. Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C., Chromosome aberration and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells evaluation of 108 chemicals. Envi Molecu Mutagen. 10:1-175.1987.
11. 高嘉澤,黃翠賢,廖保鑫,江濤,林世珍,李宣佑,周明勇.Methyl methacrylic acid 對 V79 細胞的研究,Chin Dent J, Vol 14, no.1, 1995(in press).
- 12.Morre MM, Amtower A, Oerr Cl, Brock KH. Dearfield KL. Cytotoxicity of acrylaic acid, methyl acrylate, ethyl acryalte, methyl methacrylate and ethyl methacrylate in L5178Y mouse

lymphoma cells. *Envir. Mol. Mutagen.*, 11:49-63,1988.

13. Carolyn LD, Karen HB, Martha MM. Micronucleus chromosome aberration and small colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse Lymphoma cells.

Mutat. Res., 222:191-203.1989.

14. Chang PC, Eustis SL, Huff JE, Haseman JK, Ragan H. Two year inhalation carcinogenesis studies of methyl methacrylate in rat and mice, inflammation and degeneration of nasal epithelium. *Toxicology*, 52:237-252,1988.

15. Tensy M, Hohenleitner F, White D, Oberly D, Landin W, Kendall F. Chronic biological effects of methylacrylate vapor III, Histopathology, blood chemistries and hepatic and ciliary function in the rat. *Envir Res.* 21: 117-122,1980.

16. Borzelleca J, Larson P, Hennigar J, Huff E, Crawford E, Smith R. Studies on the chronic oral toxicity of monomeric ethyl acrylate and methyl methacrylate. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 6:29-32, 1964.

17. Oppenheimer B, Oppenheimer I, Danishefsky AS, Eirich F.

Further studies of polymer as carcinogenic agents in animal.
Cancer Res., 15:333-336, 1955.

18. Lavorgna J, Burstone N, Schiller A, Harris W. The carcinogen
of plastics used in orthopedic surgen. An assessment of
incidence on rats and the possible relevance to man. Clin.
Orhtop. Relat. Res., 88:223-225., 1972.

19. Laskin D, Robinson J, Weinman J, Experimental production of
sarcomas by methyl methacrylate implants. Proc. Soc. Exp.
Biol. Med., 87:329-332. 1954.

20. Venitt S, Arry JM. Mutagenicity testing a practical approach.
1st ed., CRC press., England, pp. 187-232, 1984.

21. Pretlow II TG, Pretlow TP. Cell Seperation Methods and
Selected Application. Vol.5, Acadmic Press, New York. pp.1-
30, 1987.

22. Moorhesd PS, Nowell PC, Mellman WJ. Chromosome
preparations of leukocytes cultured from human peripheral
bloods. Exp Cell Res, 20:613-616, 1960.

23. Therman E. Human Chromosones : Structure, Behavior,

- Effects. 1st ed, Springer-Verlag Inc Press, New York. pp:1-60,1980.
24. Poss O, Thilly WG, Waden DA. Methyl metharylate is mutagen for *Salmonella Typhimurim*. *J Bone Joint Surg.* 61:1203-1207,1979.
25. Tice RR, Lanbert B, Morimoto K, Hollaender A. A review of the international symposium on sister chromatid exchanges : Twenty five years of experimental research. *Environ Mutagen*, 6:737-752,1984.
26. Carano AV, Minkler JL, Stetka DG, Moore II DH. Variation in the baseline sister chromatids exchange frequency in human lymphocytes. *Environ Mutagen*, 2:325-327, 1980.
27. deArce MA. The effect of donor sex and age on the number of sister chromatid exchanges in human lymphocytes growing in vitro. *Hum Genet*, 57:83-85,1981.
28. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, *Salmonella* mutagenicity test : III. Result from the testing of 255 chemicals. *Envir. Mutag.* 9 (suppl. 9) 1987.

29. Chang PC. Toxicology and carcinogenesis studies of Methyl methacrylate (CAS No. 80-62-6) in F3441N Rats and B3C6F1 Mice (inhalation studies).NTP technical report series No.314., National Toxicology Program., Research triangle Park., NC. 1986.
30. Stenchever MA, Hopkins AL, Sipes J. Dimethyl sulfoxide and related compounds some effects on human fibroblasts in vitro. Proc. Soc. Biol. Med., 126:270-273,1967.
31. Rijke M, Johnson RA. On the fate of methyl methacrylate in blood. J Biol Med Mater Res, 11:211-221,1977.

第八章 附錄

發表於中華牙醫學雜誌之論文

中華牙醫學會

高嘉澤先生惠鑒：

尊著「Methyl methacrylic acid 對 V79 細胞的毒性研究」

經本刊審查，認為頗具學術價值，預定於中華牙醫學會雜誌第十四卷第一期（民國八十四年八月）發表。出版後，本會除致贈該期刊物三本外，並贈送抽印本五十份。抽印本若需增印，請於校稿時通知本刊，增印成本費由作者負擔。

專此 敬頌

研安

中華牙醫學會雜誌社

編輯委員會 敬啟



聯絡處：台北市忠孝東路二段一二〇號七樓
新華路三段五二號四樓

電話：五九六一、五三九〇（兩線）
二六八一、一三四二

中華民國 八十二年 六月 十五日

題目

Methyl methacrylic acid對 V79 細胞的毒性研究
(The Cytotoxicity of Methyl Methacrylic Acid in Cultured V79 Cells)

簡題

MMA cytotoxicity

作者

高嘉澤	DDS.	中山醫學院牙醫系	講師
黃翠賢	DDS.		講師
廖保鑫	MD.		講師
江濤	PhD.		副教授
林世珍	PhD.		副教授
李宣佑	PhD.		教授
周明勇	PhD.		教授

負責人

高嘉澤 (Kao. Chia Tze)
台中市中港路一段23號 (中山醫學院附設醫院 牙科部)

Chung Shan Medical and Dental College Hospital,
23, section 1, Taichung Kang Road, Taichung, Taiwan. ROC.
Tel : 04-2015111 Ext. 2528.

摘要

Methyl methacrylate (簡稱 MMA) 為樹脂的一種單體, 在日常生活用品以及醫療材料如: 骨外科, 牙科和眼科的治療中都被廣泛的使用. 本研究使用中國倉鼠的肺臟纖維母細胞株 (Chinese hamster lung fibroblast cell 簡稱 V79 cell) 來探討 MMA 對它的細胞毒性. 資料經過 paired -t test 分析, 結果發現在細胞生長抑制方面, V79 細胞在 MMA 大於或等於 9.32×10^{-4} mM 時, 有被抑制 ($p < 0.05$) 表現; 在 V79 聚落形成能力 (plating efficiency) 方面, 結果同上述, 即隨濃度的增加, 聚落數目減少. 在染色體異常方面, 染色體斷裂數目隨 MMA 的濃度的增加而有明顯的增加 ($P < 0.05$); 姊妹染色分體交換頻率則於 MMA 的濃度在 9.32×10^{-2} mM 和 9.32×10^0 mM 時, 有明顯的差異性存在 ($p < 0.05$). 由以上的發現, 我們認為 methyl methacrylate 對於 V79 細胞具有致突變性與毒性.

前言

Methyl methacrylate (簡稱 MMA) 為樹脂單體 (monomer) 的成分, 特性如下: 為一澄清無色透明的液體; 物理性質: 溶點 -48°C , 沸點 100.8°C , 在 20°C 下的密度為 0.943 mg/ml , 聚合反應的熱能為 12.9 kcal/mol , 本身具有高揮發性, 是一種很好的溶劑。雖然目前牙科材料進步, 樹脂的聚合反應可用紫外線或可見光來催化, 但是在臨床牙科的使用上, 仍然利用加入一些起始劑 (initiator), 於室溫下, 讓 polymer 粉和 monomer 液發生自然的聚合反應⁽¹⁾。在日常的生活中, MMA 亦使用於許多物品上, 例如包裝食物的材料 (food packing material), 物品的表面處理劑, 油漆和漆器等, 使用範圍非常普遍⁽²⁾。因 MMA 本身有很高的揮發性, 對於接觸此類材料製作的從業人員, 應該注意是否會對健康造成傷害。

一種生物材料是否可以安全的使用於生物體, 必須經過一些試驗, 根據 ANCI/ADA 對於樹脂修復材料的生物學上評估⁽³⁾, 包括: 細胞毒性 (cytotoxicity) 研究, 溶血作用 (hemolysis), 安氏試驗 (Ame's test), 細胞的轉形變化 (cell transformation) 或口腔內的 LD50 測試, 粘膜的刺激性和皮膚的毒性。過去的研究指出, 安氏試驗對於加有大鼠 (rat) 肝細胞代謝酶 (簡稱 S9) 的細胞培養試驗, 有些結果呈陽性反應 (Ame's positive), 但有些為陰性反應 (Ame's negative)⁽⁴⁾。細菌學的研究發現, MMA 對 *Salmonella Typhmurium* 是一種突變劑 (mutagen)⁽⁵⁾。中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cell 簡稱 CHO) 的試管培養研究指出, 含或是不含 S9 的條件下與 MMA 作用, 發現隨著 MMA 濃度的增加, 染色體異常和姊妹染色體交換 (sister chromatid exchange 簡稱 SCE) 的頻率都隨之增加⁽⁵⁾。

在細胞遺傳學(cytogetic)研究中, CHO 細胞和 V79 細胞為廣被使用的細胞株⁽⁶⁾. 由於 V79 和 CHO 細胞分別具有不同的外形和生長特性, 過去已有研究 MMA 和 CHO 的報告⁽⁵⁾. 對於 MMA 和 V79 細胞的變化則未見報告. 本研究的目的是想瞭解, 當 MMA 作用後, 何種濃度會對 V79 細胞的生長有抑制, 對細胞的染色體是否會產生異常, 以瞭解 MMA 對 V79 的細胞毒性.

材料與方法

一. 細胞的純化

V79細胞株由中山醫學院細胞遺傳室所提供. 首先將 V79 細胞株作純種培養(cloning), 方法如下⁽⁷⁾ :

1. 取 1×10^5 個細胞, 接種於培養瓶內, 細胞的培養液為 MEM (minimal essential medium, GIBCO; USA), BES [N.N-Bis(2-hydroxy ethyl)-2-aminoethan sulfonic acid, Sigma; USA] 及 Na_2HCO_3 , 加上 10% FBS (fetal bovine serum) 和 1% PSN (penicillin , streptomycin, neomycin), 調整培養液的 PH值為 7.2, 將培養瓶放入 37°C 的自動恆溫, $5\% \text{CO}_2$ 的培養箱(Forma, USA)培養 48小時 .

2. 取 0.1 ml 之含 1×10^3 個細胞懸浮液種到含有 5 ml 培養液的直徑 60 mm 培養皿內, 前後左右搖動使細胞均勻分佈於培養皿, 培養 7天.

3. 於解剖顯微鏡下觀察有形成聚落的族群, 在 dish 的底部作記號, 於無菌操作台中, 再將直徑 1 cm 大的滅菌鋼環(ring)底部沾已滅菌之甘油, 蓋於所要的聚落上 .

4. 以1 ml之 PBS (-) (phosphate buffer saline)中不含鈣和鎂離子, 洗 2次後, 加入 0.1 ml 0.25% 胰蛋白酶 (trypsin, GIBCO; USA), 作用 3分鐘, 使 V79 細胞剝離懸浮。

5. 以吸管吸取懸浮液, 滴入含有上述 1. 的培養液的培養瓶內, 放入培養箱中培養3天。

6. 依染色體製備方法, 製作染色體, 選取具有較多正常染色體數目之群落中之細胞, 作為本試驗的細胞。

二. MMA 濃度的決定

1. 多孔培養皿的試驗⁽⁶⁾

(1). MMA (Fluka, Switzerland) 以體積比 (v/v) 的方式泡製, 取 2 ml 的 MMA (Fluka, stock solution) 溶於 1 ml 的 DMSO (Sigma, USA) 加入 17 ml 的培養液 (MEM), 依序配製出下列不同濃度的 MMA:

A = 9.32×10^2 mM, B = 9.32×10^1 mM, C = 9.32×10^0 mM,
D = 9.32×10^{-1} mM, E = 9.32×10^{-2} mM, F = 9.32×10^{-3} mM, G
= 9.32×10^{-4} mM, H = 9.32×10^{-5} mM, I = 9.32×10^{-6} mM.

(2). 在兩組 24 孔培養皿的每一小孔內, 分別種入 0.1 ml 之 1×10^5 cell/ml 細胞懸浮液, 培養 1 小時後, 再加入培養液 0.9 ml 後繼續培養。

(3). 24小時後, 抽掉培養液依下面方式, 將 MMA 加入到各個培養孔內, MMA 濃度 (mM) 如下:

A 組 : 0, 9.32×10^{-2} , 9.32×10^{-1} , 9.32×10^0 ,
 9.32×10^1 , 9.32×10^2 .

B 組 : 0, 9.32×10^{-6} , 9.32×10^{-4} , 9.32×10^{-2} ,
 9.32×10^0 , 9.32×10^2

(4). 加藥 2小時後, 於位相差顯微鏡下觀察細胞的變

化。然後抽掉含有不同濃度之MMA培養液，以PBS(-)洗二次後，加入新培養液置入自動二氧化碳培養箱中培養。

(5). 48小時後，將皿內的培養液吸出，用 PBS(-) 洗二次，以 Giemsa 染料加入0.01 M 的 phosphate buffer 緩衝液，PH 6.8,稀釋成 10% 染色液，染色 5-7 分鐘，水洗後於室溫中乾燥。

(6). 由培養皿內，細胞染色的濃淡程度，決定 MMA 的使用濃度。

2. 細胞生長抑制試驗 (cell growth inhibitory test) ⁽⁶⁾

(1). 準備 54 個 35 mm 的培養皿，將之分為控制組 9 個，試驗組 5 組各 9 個。

(2). 同前述方法配製 MMA 的各種濃度。

(3). 將 1×10^4 cell/ml 之細胞懸浮液 0.1ml 種入到各個培養皿內，在 37°C , 5% CO_2 , 98% 溼度的自動恆溫培養箱內培養。

(4). 24 小時後 將培養皿內舊的培養液吸出。控制組的培養皿加入不含 MMA 的培養液，試驗組分別加入不同濃度 9.32×10^0 , 9.32×10^{-1} , 9.32×10^{-2} , 9.32×10^{-4} , 9.32×10^{-6} 等不同濃度之 MMA, 再放入培養箱內培養。

(5). 於加入 MMA 後的第一天，第二天和第三天，每天由控制組和試驗組的培養皿中各取出 3 個，利用 0.25% 胰蛋白酶處理，使細胞懸浮，利用細胞計數器，在不染色的情況下，直接於位相差顯微鏡下計數並計錄各種濃度的細胞數目。

3. 細胞附著生存試驗 (cell plating efficiency test) ⁽⁷⁾⁽⁸⁾ :

(1). 準備 90 個直徑 60 mm 的培養皿，將之分為控制組 15 個，試驗組 5 組各 15 個。

(2). 同上述方法泡製各個不同濃度的 MMA。

(3). 每個培養皿分別種入 100 個細胞。於 37°C , 5% CO_2 , 98% 濕度的自動恆溫培養箱內培養 24 小時。

(4). 吸掉培養液，分別加入下列不同濃度的 MMA, 9.32×10^0 , 9.32×10^{-1} , 9.32×10^{-2} , 9.32×10^{-4} , 9.32×10^{-6} mM, 於

作用1小時，3小時，6小時，12小時，和24小時後，將培養液吸掉，以PBS(-)洗2次，再加入新的培養液，放置於自動恆溫二氧化碳培養箱中培養培養。

(5). 7天後，吸掉培養液，以PBS(-)洗2次，用10%的Giemsa染色液染色水洗之後，於室溫中自然乾燥細胞。

(6). 利用解剖顯微鏡觀察每個培養皿中之細胞聚落數目，並計錄之，每個聚落內的細胞須含有50個以上的細胞才認定為一個聚落。

(7). 以控制組所形成的聚落當作100，來計算各個不同MMA濃度與不同作用時間下所形成的聚落比例。

4. 細胞染色體試驗：

(1). 染色體異常 (chromosome aberration) ^(6,9,10)：

A. 取5個培養瓶(flask)，分成a,b,c,d,k組，分別種入 1×10^5 cell/ml，於 37°C ，5% CO_2 ，98%濕度的自動恆溫箱內培養24小時。

B. 同上述方法配製不同濃度的MMA。

C. 除去培養液，用PBS洗二次，控制組加入不含MMA的培養液，試驗組a,b,c,d分別加入含 9.32×10^0 ， 9.32×10^{-2} ， 9.32×10^{-4} ， 9.32×10^{-6} mM MMA濃度的培養液培養24小時。

D. 在收集細胞(harvest)前2小時，加入0.2 ml，10ug/ml的秋水仙素(colcemid)於每個培養瓶內，使其最終濃度為0.2 ug/ml。

E. 利用0.25% trypsin(胰蛋白酶)使細胞懸浮，放到離心管內，於1500 rpm速度下離心8分鐘。

F. 除去上層液，加入0.075M KCL 5 ml，作用15分鐘。

G. 離心，除去上層液，加入固定液 (methanol : acetic acid = 3: 1) 6 ml 作用30分鐘，再離心，去上層液。

H. 依上述G的步驟，分別讓固定液再作用10, 5, 5

分鐘後，離心，噴片。

I. 將片子放於 45°C 的烘盤下，烘乾一夜，用 10% Giemsa 染色 5-7 分鐘，乾燥，於顯微鏡(photo III, Zeiss, West Germany) 觀察染色體。

J. 選擇分散清澗的染色體，予以照相。

K. 根據 S. Venitt⁽⁶⁾ 的染色體異常分類：

定義：裂隙(gap): 染色體上沒有染色部份的大小，不大於染色分體之間的寬度。

斷裂(break): 染色體沒有染色部份的大小，大於染色分體之間的寬度。

以每個分裂期細胞(metaphase)具有相同染色體數目的細胞為標準，經顯微照相後，計數 100 個分裂期細胞的染色體異常數目

(2) . 姊妹染色分體交換試驗^(6,9,10)

A. 取 5 個培養瓶(flask)，分成 a, b, c, d 和 k 組，分別種入 1×10^5 cell/ml，於 37°C ，5% CO_2 ，98% 濕度的自動恆溫培養箱內培養 24 小時。

B. 同前述方法配製不同濃度的 MMA。

C. 除去培養液，用 PBS(-) 洗 2 次，控制組加入不含 MMA 的新培養液，試驗組 a, b, c, d，分別加入 9.32×10^0 ， 9.32×10^{-2} ， 9.32×10^{-4} ，和 9.32×10^{-6} mM MMA 濃度的培養液，培養 24 小時。

D. 加入 0.2 ml BrdU (5-Bromodeoxy uridine) 於每個培養瓶內，放入暗袋暗置於培養箱內，培養 25 個小時。

E. 於收集(Harvest)細胞染色體前 2 小時，加入 0.1 ml 的秋水仙素。

F. 同上述染色體製備方法作出染色體。

G. 於滴片後，將片子放在 10^{-4} M, H33258 (2.94 mg/50ml) 的溶液內 10 分鐘。

H. 取出片子，放在 265 mm UV 光的箱內，照射 2 小時，此時片子須於緩衝溶液 ($0.88\% \text{K}_2\text{HPO}_4 + 1.01\% \text{KH}_2\text{PO}_4$) 下保濕照光。

I. 將片子置於2 倍 SSC ($\text{NaCl} + \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 的溶液內 ,於65 °C的加熱箱內,加熱50分鐘,取出, 烘乾, 以10%的 Giemsa 染色7分鐘 .

J. 依 S.Venitt⁽⁶⁾的方法, 選取每個分裂期細胞的染色體數目相同的細胞, 計算100個分裂期細胞的染色分體交換次數, 利用 paired t test 方法統計分析差異.

結果

一. 細胞的純化

篩取由細胞純化後的 V79 細胞其染色體數目為22的聚落,作為本研究的細胞樣本.

二. 多孔培養皿試驗

在控制組和低於 9.32×10^0 mM MMA濃度的組(well),均有紫色的染色出現,代表在這濃度下的細胞有存活(圖一).由此決定本試驗加入MMA的最高濃度為 9.32×10^0 mM.加入MMA後,V79細胞外形的變化(圖二),圖二A為控制組未加MMA的細胞.圖二B為加入 9.32×10^{-2} mM MMA後的情形,細胞的外形較控制組細胞外形變得較短,即紡垂形轉變為較橢圓形.圖二C為加入 9.32×10^2 mM 的MMA,此狀況下的細胞大多已死亡懸浮.

三. V79細胞生長抑制試驗

試驗組與控制組相比較,當MMA濃度大於或等於 9.32×10^{-4} mM時,細胞的生長有明顯的被抑制 ($p < 0.05$); 從加藥後到第二天(即 Day 2 到 Day 3),細胞生長增加的量,濃度高的(9.32×10^0 mM)由 12×10^4 個細胞增加到 35×10^4 個)為比正常組(由 33×10^4 個 增加到 67×10^4 個)或是低濃度(9.32×10^{-6} mM)組由 (27×10^4 個 增加到 62×10^4 個)似乎增加較多;而 Day 3 到 Day 4,細胞生長增加的量,所有的組則相近 (Table 1, 圖三).

四. V79細胞附著生存試驗

V79 細胞對不同濃度和時間的作用,呈隨著時間的增加和濃度的增加,聚落的形成漸減少.濃度高的(9.32×10^0 mM)組,於加藥作用1小時後,相對的附著生存率為控制組的 63.6%,而作用24小時後,只

為 17.4%； 9.32×10^{-1} mM 組於加入MMA後1小時後開始減少為 81.7%，而作用24小時後，只為 21.7%； 9.32×10^{-2} mM組於加入MMA後3小時後開始減少為 75%，而作用24小時後，只為 47.8%； 9.32×10^{-4} mM組於加入MMA後3小時後開始減少為 91.7%，而作用24小時後，只為 39.1%； 9.32×10^{-6} mM組於加入MMA後12小時後開始減少為 70%，而作用24小時後，只為 60.9%。(Table 2, 圖四, 圖四-a).

五. 染色體異常試驗

本試驗中，MMA作用後，V79細胞的染色體出現的情形只見到有裂隙和染色體斷裂的狀況，未見其他類形的異常。控制組的染色體異常只見到裂隙，試驗組除 9.32×10^{-6} mM 組除外，其餘均有裂隙和斷裂的出現。當濃度高於 9.32×10^{-4} mM 時，染色體異常結構的數目有明顯的增加趨勢($p < 0.05$) (圖五, Table 3.).

六. 染色體交換試驗

濃度為 9.32×10^{-4} 和 9.32×10^{-6} mM組與控制組對於姊妹染色體交換的頻率不具有統計學上的差異。當濃度高於 9.32×10^{-2} mM 以上時，姊妹染色體交換的頻率才具有統計學上的意義(圖六, Table 4).

討論

MMA單體本身不溶於水,因此利用DMSO作為輔助溶劑. Stenchever⁽¹¹⁾等人指出,如果DMSO的濃度大於1%時會對細胞的生長產生延遲的現象. 本研究中DMSO的最終濃度在MMA濃度為 9.32×10^0 mM時,已小於1%,因此對於V-79細胞的生長應該不會有影響.在24孔皿的試驗結果,Giemsa的染色程度發現 9.32×10^1 mM以上MMA濃度,細胞均已死亡.因此採用 9.32×10^0 mM MMA為試驗的最高濃度.對於MMA製作的從業人員而言,接觸MMA屬於長期的接觸,因此在藥物的作用時間長短考慮上,採取至少讓細胞生長都經過1.5個以上的細胞生長週期⁽⁶⁾.

Zeiger⁽¹²⁾等在試管外的研究指出,在含或是不含S9的TA100,TA1535,TA97或TA98細胞,於10.0 ug/plate MMA濃度下培養,都不會造成細胞的突變. Chang⁽¹³⁾的研究發現,當MMA的劑量在0.125-1.000 ul/ml時,對於L5178Y/TK^{+/-}的老鼠(mouse)的淋巴細胞具有致突變性,Chang認為突變的頻率和劑量之間具有相關性.

Borzelleca⁽¹⁵⁾等使用MMA濃度高達2000 ppm的水給大鼠(rat)連續喝2年,結果並沒有因藥物引起的病變出現(compound related lesion).在動物皮膚的塗抹研究,Oppenheimer⁽¹⁶⁾等發現,每週塗抹MMA 3次,連續4個月,在這些動物的皮膚上並沒有局部腫瘤的產生.但是在老鼠和大鼠的皮下植入經過聚合後的MMA,Lavorgna⁽⁷⁾等和Laskin⁽¹⁸⁾等則發現會有局部的纖維肉瘤(fibrosarcoma)產生.

Chang⁽¹³⁾ 在中國倉鼠的卵巢細胞(CHO cell)與 MMA 的濃度研究指出, 在含有 S9 的情況下, MMA(500-1250 ug/ml)會對 CHO 細胞產生一種異常的反應, 此反應與劑量有相關性(dose related). 當 S9 不存在下, MMA (750-3000 µg/ml) 也會增加細胞染色體異常現象. Anderson⁽¹⁴⁾ 等研究 Rat bone marrow 的細胞染色體變異, 認為 MMA 不具有劑量相關的關係. 本研究在 MMA 的濃度 9.32×10^0 mM (9.34×10^2 µg/ml) 時, 發現對 V79 細胞的生長產生抑制作用, 染色體異常和姊妹染色分體交換頻率均有增加, 結果與 Chang 的結果相近.

Carolyn⁽¹⁹⁾ 等指出 MMA 造成細胞染色體斷裂位置是在染色分體上, 對於細胞染色體數目是沒有改變的. 一般而言, 染色體的異常分類可分為結構上和數目上的異常⁽⁶⁾. 結構上的異常會出現裂隙(gap), 斷裂(break), 雙中心結(dicentric) 和圓形染色體 (ring) 等. 數目上的異常以出現多套體(hyperdiploid)時較為有意義. 染色體的斷裂可以來自自發性或是致突變劑的誘導; 斷裂的時機可能在有絲分裂或無絲分裂中的 G1, S, G2 細胞週期; 斷裂的機制乃由於 DNA 上有某些傷害的產生, 而這些傷害的來源可能是因為化學藥物, UV 光或是輻射線的作用, 形成密啶雙體(pyrimidine dimer), Base alkylation 等. DNA 在進行合成作用中, 傷害的為位置可能會進行修補或是錯誤修補, 如果修補失敗, 在染色體結構上即出現異常. 染色體斷裂的情形, 如果是發生在 G2 時期, 斷裂的頻率會減少. 染色體的斷裂可能只有 1 個染色分體斷裂或是 2 個染色分體的斷裂, 前者稱之為 chromatid type, 後者稱之為 chromosome type⁽⁶⁾.

大部份的化學藥物作用產生的形式為 chromatid type⁽⁶⁾. 本研究發現 V79 細胞染色體斷裂屬於 chromatid type. 數目的變化未出現有多套體. 由於本研究未作染色體的層帶染色(banding), 因此無法判斷是否同一隻染色體發生異常, 此有待再研究.

在 100 個分裂細胞的研究中, 當濃度為 9.32×10^0 mM ($9.34 \times$

10^2 ug/ml) 時，V79細胞染色體斷裂數目有 16個，Morre⁽²⁰⁾ 等的研究結果指出，當MMA濃度為 2800 μ g/ml 時，在 200個 CHO分裂細胞的分析中，出現 45個染色體異常，二者結果相似。

姊妹染色分體的交換，乃是由於5-Bromodoxyacridine進入到細胞內，因其化學結構類似細胞的胸腺密啶(thymidine, 簡稱 T)，所以在細胞進行複製時，BU 就混入到DNA的結構中，此時染色體以 BU取代 T，進行一次的DNA複製，之後每一條染色分體的雙股DNA中會有一股含有BU，即形成BT。如果細胞繼續以BU取代T，進行第二次的複製，則同一條染色體中的染色分體DNA會形成BT和BB。以核酸的螢光染料H33258作用，會在螢光顯微鏡下發現，含BT的染色分體呈現亮的反應，而含有BB的染色分體呈現暗的反應^(20,21)。利用染色分體交換的頻率可以研究高等生物細胞內遺傳物質受傷的一種指標。

MMA與CHO細胞作用，隨著MMA濃度的增高，姊妹染色分體交換的頻率增加⁽²²⁾。Morre⁽²²⁾等發現，尤其當MMA的濃度為5 mg/ml 時，染色體異常數目增加最多。Bigatti⁽²³⁾以人類的淋巴瘤細胞株和 polymethyl methacrylate bone cement (簡稱PMMA)作用，結果顯示二者之間並沒有統計學上的差異。Carolyn⁽¹⁹⁾等的報告，認為MMA和CHO細胞作用會增加SCE的頻率；而對於染色體數目則沒有改變。Marez⁽²⁾等對於MMA和CHO細胞的作用，不論是否含有S9的條件下，SCE交換的頻率都呈明顯的增加。本研究MMA與V79細胞作用，不含S9的情況下，當MMA濃度達 9.32×10^{-2} mM 以上時，姊妹染色分體交換的頻率在統計學上，有明顯的增加，結果與上述其他作者研究結果相似。

結 語

本研究結果顯示 MMA 對於 V79 細胞的生長，聚落的形成都產生與濃度相關的抑制作用，對於染色體異常的結果發現，MMA 對 V79 細胞作用後，會使得染色體斷裂數目增加，姊妹染色分體交換的頻率增加，此結果與 MMA 作用於 CHO 細胞的結果相似。因此，我們認為 MMA 對於 V79 細胞具有細胞毒性與致突變性。至於 MMA 作用在人類正常細胞的變化，以及從業人員長期接觸後的反應和受傷的細胞在分子基因學上的變化，將會是要再研究的問題。

Table 1. The growth of V79 cell when treated with MMA^a

Concentration (mM)	Day 1.	Day 2.	Day 3.	Day 4.
0	10 \pm 0.85	33 \pm 2.08	67 \pm 2.05	124 \pm 8.18
9.32 x 10 ⁻⁶	-	27 \pm 2.49	62 \pm 2.83	112 \pm 5.31
9.32 x 10 ⁻⁴	-	23 \pm 2.86	53 \pm 3.68	98 \pm 9.39 *
9.32 x 10 ⁻²	-	21 \pm 2.05	54 \pm 2.87	104 \pm 4.54 *
9.32 x10 ⁻¹	-	18 \pm 1.69	48 \pm 0.94	80 \pm 2.62 *
9.32 x10 ⁰	-	12 \pm 3.26	35 \pm 3.09	67 \pm 2.49 *

a : Mean \pm SD x10⁴ for three plate in each different concentration

* : significant at p<0.05, compared with control group.

Table 2. The plating efficiency of V79 cell treated with MMA.

Concentration (mM)	1 hr	3 hr	6 hr	12hr	24hr
0	100%	100%	100%	100%	100%
0.00000932	100%	100%	100%	70%	60.9%
0.000932	100%	91.7%	84.6%	70%	39.1%
0.0932	100%	75%	84.6%	55%	47.8%
0.932	81.7%	75%	76.9%	50%	21.7%
9.32	63.6%	58.3%	61.6%	30%	17.4%

Table 3. Chromosome aberrations of V79 cell after treated with MMA.^a

Concentration (mM)	Total cell count	Break	Gap	Total	aberration	
0	100	0	5	5	0.05 ± 0.22	
0.00000932	100	0	30	30	0.30 ± 0.54	*
0.000932	100	4	19	23	0.23 ± 0.49	*
0.0932	100	8	25	33	0.33 ± 0.55	*
9.32	100	16	26	42	0.42 ± 0.57	*

a: Metaphase cells with aberration were scored from 100 well spread metaphases, value are Mean ± SD.

* : Significant at p<0.05, compared with control group.

**Table 4. Sister chromatid exchanges (SCE) of V79 cell
after treated with MMA^a**

Concentration ug/ml	Total metaphase count	Total SCE number	Mean \pm S.D / metaphase
0	100	268	2.68 \pm 1.66
0.00000932	100	293	2.93 \pm 2.03
0.000932	100	308	3.08 \pm 2.33
0.0932	100	520	5.20 \pm 3.62 *
9.32	100	627	6.27 \pm 4.31 *

a: Metaphase cells with aberration were scored from 100 well spread metaphases, value are Mean \pm SD.

* : Significant at $p < 0.05$, compared with control group.

Topic I. The Cytotoxicity of Methyl Methacrylic Acid in Cultured V79 Cells

Abstract :

Methyl methacrylate (MMA), a liquid monomer, is used as a chemical intermediate in the manufacture of plexiglass and other acrylic products and as bone cement in orthopedic and dental prosthesis. Cytotoxicity of MMA on cultured Chinese hamster lung fibroblast V79 cell was performed. The data were analysed by paired t-test. The cell growth were inhibited above 9.32×10^{-4} mM concentration of MMA employed in this study , and the colonies forming ability were dose and time dependently decreased with MMA employment and period of treatment. In chromosomal aberration study, as the MMA concentration increased from 9.32×10^{-6} to 9.32×10^0 mM, the number of chromosomal aberrations was increased. The frequency of sister chromatid exchange was significantly difference ($p < 0.05$) at 9.32×10^{-2} and 9.32×10^0 mM concentration of MMA. The results of this study show that MMA do have cytotoxicity to V79 cells.

Key words:

Methyl methacrylate, Chromosomal aberration,
Cytotoxicity

REFERENCE

1. Philips RW. Science of Dental Materials. 9th, ed, An HBJ international edition, USA., pp.172-209,1992.
2. Marez T., Shirli P., Hildebrand HF., Hagreneoer JM. Increased frequency of sister chromatid exchange in workers exposed to high dose of methyl methacrylate. *Mutagenesis*, 6(2) :127-129,1991.
3. Smith DC, Williams DF. Biocompatibility of Dental Material. Vol.3 .CRC press., Florida., pp.122-155,1982.
4. Waagemakers TH, Bendil MPM. Non mutagenicity of 27 aliphatic acrylate esters in the Salmonella microsome test. *Mutat. Res.*, 137:95-102,1984.
5. Poss O, Thilly WG, Waden DA. Methyl metharylate is mutagen for Salmonella Typhimurim. *J Bone Joint Surg.* 61:1203-1207,1979.
6. Venitt S, Arry JM. Mutagenicity testing a practical approach. 1st ed., CRC press., England, pp. 187-232,1984.
7. Freshney RI. Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technic. 1st ed., YS press. USA., pp.129-143,205-209.
8. Lin SS, Chou MY. Effect of eugenol on cultured Don-6 cells. *Chin Dent J.*, 4(1):1-7,1985.
9. Chou MY. Chromosome aberration and sister chromatid exchange induced by eugenol in Chinese hamster ovary cells. *Chin Dent J.*, 6(4):182-190, 1987.
10. 日本組織學會, 染色體異常試驗法, 於"組織培養技術" 第一版, 日本組織培養學會編., 朝倉書店., 東京. pp:149-153.1982.
11. Stenchever MA, Hopkins AL, Sipes J. Dimethyl sulfoxide and related compounds some effects on human fibroblasts in vitro. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 126:270-273,1967.

12. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Salmonella mutagenicity test : III. Result from the testing of 255 chemicals. *Envir. Mutag.* 9 (suppl. 9) 1987.
13. Chang PC. Toxicology and carcinogenesis studies of Methyl methacrylate (CAS No. 80-62-6) in F3441N Rats and B3C6F1 Mice (inhalation studies).NTP technical report series No.314., National Toxicology Program., Research triangle Park., NC. 1986.
14. Anderson E, Longstaff E, Ashby J. An assessment of the carcinogenic and mutagenic potential of methyl methacrylate. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 48:A29, 1976.
15. Borzelleca J, Larson P, Hennigar J, Huf E, Crawford E, Smith R. Studies on the chronic oral toxicity of monomeric ethyl acrylate and methyl methacrylate. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 6:29-32, 1964.
16. Oppenheimer B, Oppenheimer I, Danishefsky AS, Eirich F. Further studies of polymer as carcinogenic agents in animal. *Cancer Res.*, 15:333-336, 1955.
17. Lavorgna J, Burstone N, Schiller A, Harris W. The carcinogen of plastics used in orthopedic surgen. An assessment of incidence on rats and the possible relevance to man. *Clin. Orhtop. Relat. Res.*, 88:223-225., 1972.
18. Laskin D, Robinson J, Weinman J, Experimental production of sarcomas by methyl methacrylate implants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87:329-332. 1954.
19. Carolyn LD, Karen HB, Martha MM. Micronucleus chromosome aberration and small colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse Lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 222:191-203.1989.
20. Buy CH, Osinga J. The mechanism of differential sister chromatid fluorescence as studied with th GC specific DNA ligand mithramycin. *Exp. Cell. Res.*, 125:105-019,1980.

21. 詹崑源 . 姊妹染色分體對比染色 . 科學發展月刊,
Vol.16,No.8,1109-1121,1988.
22. Morre MM, Amtower A, Oerr Cl, Brock KH. Dearfield KL.
Cytotoxicity of acrylaic acid, methyl acrylate, ethyl acryalte,
methyl methacrylate and ethyl methacrylate in L5178Y mouse
lymphoma cells. *Envir. Mol. Mutagen.*, 11:49-63,1988.
23. Begatti MP, Amberti L. Cannas M. Rossi E. Lack of SCE
induction by polymethyl methacrylate bone cement in human
lymphocyte cultured in vitro. *Mutat. Res.*, 227:11-24,1989.

中 華 牙 醫 學 會

高嘉澤先生惠鑒：

尊著「Methyl Methacrylic Acid 對人類淋巴細胞染色體異常之研究」

經本刊審查，認為頗具學術價值，預定於中華牙醫學會雜誌第十三卷第二期（民國

83年十二月）發表。出版後，本會除致贈該期刊物一本外，並贈送抽印本五十份。

抽印本若需增印，請於校稿時通知本刊，增印成本費由作者負擔。

專此 敬頌

研安

中華牙醫學會雜誌社

編輯委員會 敬啓



聯絡處：台北市忠孝東路二段一二〇號七樓
新址：南京路三段五二號四樓

電話：三九六一五三九〇（兩線）
二八六一一三四二

中 華 民 國 八 十 三 年 八 月 四 日

題目

Methyl methacrylic acid對人類淋巴細胞染色體異常之研究
(The Chromosome Aberration of Methyl Methacrylic Acid Treated on
Human Lymphocytes)

簡題

MMA cytotoxicity

作者

高嘉澤	DDS.	中山醫學院牙醫系	講師
黃翠賢	DDS.		講師
黃明發	MD.		講師
江濤	PhD.		副教授
林世珍	PhD.		副教授
李宣佑	PhD.		教授
周明勇	PhD.		教授

負責人

高嘉澤 (Kao. Chia Tze)
台中市中港路一段23號 (中山醫學院附設醫院 牙科部)

Chung Shan Medical and Dental College Hospital,
23, section 1, Taichung Kang Road, Taichung, Taiwan. ROC.
Tel : 04-2015111 Ext. 2528.

Methyl methacrylic acid 對人類淋巴細胞的毒性研究

摘要

由第一部份的試驗得知Methyl methacrylic acid (MMA) 對V79細胞具有細胞毒性.因此在體外(in vitro), 我們利用人類淋巴細胞為材料, 直接和MMA接觸作用. 觀察其細胞的染色體變化. 結果得到當的濃度大於 0.932 mM時, 染色體間隙, 染色分體斷裂和姊妹染色分體交換的數目都呈明顯增加($p<0.05$). 我們推論MMA對於人類的淋巴細胞可能具有致突變性 (mutagenicity).

前言

整形外科手術所使用的生物相容性材料壓克力樹脂，其主要的成份為 Polymethyl methacrylic(簡稱 PMMA, CAS No.9011-4-7),這種材料使用於整形外科手術，至今已有30年以上⁽¹⁾.在牙科義齒床製造和樹脂填補材料中，亦有使用到這種單體(monomer)，其成份為 methyl methacrylic acid 簡稱 MMA. 在眼科治療中，軟形鏡片(soft intraocular lenses)的成份也是屬於這種單體⁽²⁾.單體的成份，除醫療方面的使用外，於日常生活中使用的食物包裝材料，建築用的油漆等，也都含有 MMA 的成份⁽³⁾.

早期在牙科使用義齒床的材質屬於自動聚合的材料，它與光聚合的材料比較，發現在聚合後，自動聚合的材質會有少許的單體殘存⁽⁴⁾.有更多的報告指出，單體會使牙科技工和牙醫師產生過敏性反應. Stevenson⁽⁵⁾和 Moody⁽⁶⁾提出單體會造成牙醫師的手過敏，濕疹和接觸性皮炎. Stoy⁽⁷⁾的報告則指出牙科技工接觸到單體後，會產生局部的皮膚炎. Hollander 和 Kenedy 研究牙醫師手部的皮膚，以 Patch test 檢測手部殘存的自動聚合樹脂，發現有強烈的陽性反應⁽⁸⁾. Pegum 和 Medhurt 指出，整形外科醫師的手有皮膚炎，乃是由於單體會穿過所戴之手套之故，他將之稱為"rubber-glove-dermatitis"⁽⁹⁾.

在體外細胞的試驗發現，MMA 會造成中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell 簡稱 CHO)⁽¹⁰⁾與中國倉鼠肺臟纖維母細胞(Chinese lung fibroblast cell 簡稱 V79)⁽¹¹⁾的染色體異常和姊妹染色體交換的頻率增加. Morre 等研究 L5178Y 老鼠(mice)的淋巴瘤細胞與 Acrylic, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate 和 ethyl methylacrylate 的基因毒性，發現細胞的突變率會隨濃度的

增加而增加(dose-related)⁽¹²⁾。Dorre等的研究中，發現MMA會造成L5178Y細胞株產生小核(microneuclear)和染色體異常⁽¹³⁾。試管培養細胞株和MMA作用，在含或是不含S9(rat的肝代謝酶)的培養下，發現染色體異常和姊妹染色分體交換的頻率都呈明顯的增加⁽³⁾。

由於本身具有揮發性，在法國訂定的最高閾值限制值(threshold limit)為在空氣中100p.p.m($410\mu\text{g}/\text{m}^3$)⁽³⁾。Chang等的研究指出，將雄性和雌性老鼠(mice)置於密閉室內，讓它們吸入500-1000 ppm的蒸氣，於102週之後，並沒有發現腫瘤的出現，只於呼吸系統上皮發現到發炎，退化和增生的現象⁽¹⁴⁾。Tensy等研究發現，在116 ppm的蒸氣，每日7小時，每週5日，連續6個月讓雄性大鼠(rat)吸入，結果發現氣管上皮的纖毛發生剝落，上皮微絨毛數目減少⁽¹⁵⁾。而Merez等發現壓克力工廠工作，接觸MMA的工人，其染色分體互換的頻率有明顯的增加⁽³⁾。

水中加入MMA給予老鼠(mice)飲用的研究，Borelleca等指出，2000ppm MMA濃度給老鼠飲用2年，結果並沒有發現由引起的器官組織傷害出現⁽¹⁶⁾。在皮膚塗抹試驗中，Oppenheimer等指出在老鼠的皮膚每週3日，連續個4月塗抹MMA，結果發現在塗抹區並沒有局部腫瘤的出現⁽¹⁷⁾。經過聚合的樹脂，經皮下植入後，發現在老鼠(rat和mice)植入區部位有局部的纖維瘤出現^(18,19)。

本篇的研究動機乃基於，牙醫師與技工在工作上，甚至病人，常會接觸到MMA材料，而過去的研究報告，對於MMA和正常人類淋巴細胞的直接作用結果則很少。因此利用第一篇所獲得的結果，即MMA對V79細胞具有毒性的濃度，來了解MMA與正常的人類淋巴細胞作用後，細胞的染色體異常情形，以了解MMA對於人類的淋巴細胞是否為一致突變劑(mutagen)。

材料與方法

3-1. 樣本的收集與培養液的配製

樣本的來源為取自中山醫學院5名健康的男學生，平均年齡20-30歲，每位抽取10ml的全血，作淋巴細胞的培養。方法如下⁽²⁰⁾：

1. 用10ml的注射筒，內加0.2ml的抗凝血劑(heparin)，抽取周邊血液各10ml，混合均勻之後，豎立靜置3小時，至注射筒內的血液上層澄清。

2. 培養液的配製：將RPMI-1640培養液加入10-15%的牛血清(fetal bovine serum)及1% penicillin, streptomycin和neomycin(簡稱PSN)。

3. 準備培養瓶，內裝的9.4ml培養液，將上述的注射筒輕輕的搖動，將針頭轉折成倒V形，慢慢的將上層液推出0.6ml注入培養瓶內，混合均勻之後，放到含有 5%CO₂, 98%溼度的 37°C自動恆溫箱內培養。

3-2. MMA 作用於人類正常淋巴細胞的染色體異常試驗

1. 同上述 3-1步驟 1-3，在步驟 3，將之分為試驗組

a,b,c,d 試管和對照組k試管。各試管內分別加入0.15ml Phyto-hemagglutinine (簡稱PHA)及培養液，血液，培養24小時。

2. 配製不同濃度的，方法如下：

MMA (Fluka, Switzerland)以體積比 (v/v) 的方式泡製，取 2 ml 的 MMA 溶於1 ml的 DMSO (Sigma, USA) 加入 17 ml的培養液RPMI-1640)，依序泡出下列不同濃度的 MMA：

A = 9.32×10^2 mM, B = 9.32×10^1 mM, C = 9.32×10^0 mM, D = 9.32×10^{-1} mM, E = 9.32×10^{-2} mM, F = 9.32×10^{-3} mM.

3.由培養箱中取出培養瓶，在1500rpm速度下離心 8 分鐘。

4.除去上層液，k瓶加入不含藥物的新培養液，試驗組 a,b,c,d瓶則依續加入 9.32×10^1 , 9.32×10^0 , 9.32×10^{-1} , 9.32×10^{-2} mM 的 MMA，再置入培養箱內培養45小時。

5.於採收細胞(harvest)前30分鐘，加入 0.2 ug/ml的秋水仙素(colcemid)於各個培養瓶內，混合均勻。

6.將培養瓶內容物倒入離心試管，於1500rpm速度下離心8分鐘，除去上層液。

7.取0.075M (56%)的 potassium chloride (KCl)10 ml，加入各個試管內，在37°C度的水浴下作用10分鐘。

8.置於1500rpm速度下離心 8 分鐘，除去上層液。

9. 加入10ml的固定液(Fixer, Methanol : Acetic acid = 3:1)作用30分鐘，於1500rpm速度下離心 8分鐘，除去上層液。

10.加入的10ml固定液作用 10分鐘，離心 8分鐘，除去上層液。

11.加入的10ml固定液作用 5分鐘，離心 8分鐘，除去上層液。

12.加入的10ml固定液作用 5分鐘，離心 8分鐘，除去上層液。

13.準備玻璃片(Slide)，作染色體潰片之製作。

14.將潰有染色體的玻片，置放於56-60°C的乾燥箱，乾燥

12小時以上。

15.用10% Giemsa的染料染色5分鐘，再乾燥。

16.於顯微鏡下，觀察計數100個分裂細胞(metaphase)的染色體異常結果，所有結果均以顯微照相後判斷結果。

染色體的異常判斷，根據 S. Venitt⁽¹⁹⁾的染色體異常分類：

定義：裂隙(gap):染色體上沒有染色部份的大小，不大於兩染色分體之間的寬度，

斷裂(break):染色體沒有染色部份的大小，大於兩染色分體之間的寬度。

3-2. MMA作用在含或不含血清培養的淋巴細胞試驗

方法同上述的步驟，唯一差別是在步驟3-1-2.培養液的製備，一組加有含10% FBS的血清，而另一組則不加血清。MMA的試驗濃度 9.32×10^0 mM，觀察其染色體的變化。

3-3. MMA與人類正常淋巴細胞作用的姊妹染色分體交換試驗⁽¹⁹⁾.

- 1.採血方法和淋巴細胞的培養，如同上述3-1步驟。
- 2.於加入 MMA後的 24小時，加入50 uM的BrdUra (5-bromodeoxyuridine)於各個培養瓶內，將之暗置於5% CO₂，98%溼度，37°C的自動恆溫培養箱內培養 40小時。
- 3.於收集染色體前 30分鐘，加入的 0.2 ug/ml秋水仙素 0.1ml，於各個培養瓶內。
- 4.將培養瓶內容物倒入離心試管，於1500rpm速度下離心 8分鐘，除去上層液。
- 5.取0.075M (56%)的potassium chloride (KCl)10 ml，加入各個試管內，在37°C度的水浴下作用 10分鐘。
- 6.置於1500rpm速度下離心 8 分鐘，除去上層液。
- 7.加入10ml的固定液(Fixer, Methanol : Acetic acid = 3:1)作用30分鐘，於1500rpm速度下離心8分鐘，除去上層液。
- 8.加入的10ml固定液作用10分鐘，離心8分鐘，除去上層

液 .

9.加入的10ml固定液作用 5分鐘, 離心 8分鐘, 除去上層

液 .

10.加入的10ml固定液作用 5分鐘, 離心 8分鐘, 除去上層

液 .

11.準備玻璃片(Slide), 作染色體潰片之製作 .

15.將潰有染色體的玻片, 置放於 56-60°C的乾燥箱, 乾燥
12小時以上 .

16. 染色, 配製 10^{-4} M的 H33258溶液, 取5.88ng/100ml的
蒸餾水, 將已製作完成之玻片, 放入該溶液, 暗置10分鐘 .

17. 取出玻片放在含有 K_2HPO_4 0.88gm, $K_2H_2PO_4$ 1.01gm
的緩衝溶液內, 利用UV光距離13公分下, 照射2小時 .

18.取出玻片, 放在含有saline/sodium citrate (2倍SSC緩
衝液0.03M)內, 65°C下, 15分鐘 .

19.取出玻片, 洗淨乾燥12小時 .

20. 用10% Giemsa染料, 染色5-7分鐘 .

21. 於顯微鏡下觀察照相後, 根據S. Venitt的方法⁽²⁰⁾, 計數
100個分裂細胞的姊妹染色分體交換次數 . 以 Paired t test統計差
異性 .

結果

4-1. 在含或不含血清的培養液試驗中，

100個分裂細胞染色體異常的平均數目，以不含血清組(0.22)的異常數大於含有血清組(0.10)。(表一)

4-2. 不同濃度的 MMA 作用於淋巴細胞，

發現隨著濃度的增高(9.32×10^{-2} ---- 9.32×10^1 mM), 染色體異常的平均值也隨之增高(0.080---- 0.172)。

在4-1,4-2的結果中，染色體出現的異常情形，只發現有間隙(gap)和斷裂(break)的情況，並未見有其它種情況的出現如：雙中心節，環形染色體，多套體等。

4-3. 不同濃度的 MMA 作用於淋巴細胞，其姊妹染色分體交換的情形，發現與正常對照組比較，當濃度大於 9.32×10^{-2} mM 時，姊妹染色分體交換的數目有明顯的差異性存在 ($p < 0.05$)。

第五章 討論

將細胞培養加入藥物作用的試驗方法，加藥的時機有二種方法：一、在一開始即加入藥物使之作用。二、在經過 24小時的培養後，才加入藥物使之作用⁽²⁰⁾。本研究採用的方法屬於後

者。在細胞培養中加入化學藥物，可能會造成細胞週期延緩(cell cycle delay)的情形，因此為確信藥物的作用有效果，於加藥作用後，會將細胞的培養時間延長2個或更長的週期之後，才觀察結果⁽²⁰⁾。在組織培養方法中，培養液內含的血清濃度約在10%-20%之間，如果血清的濃度過高時，將會抑制成纖維母細胞(fibroblast)的生長⁽²¹⁾。本研究所採用之血清濃度位於上述標準之內，因此確信試驗結果不會有影響。關於MMA加入到培養液後，是否會因血清的存在而影響它與淋巴細胞之作用，由表一發現染色體異常的平均數，以不含血清組(0.30)大於含血清組(0.17)，MMA是否會和血清結合而減小它與細胞之作用，仍須再研究。

PHA為一種 red kidney bean 學名 Phaseolus vulgaris的抽取物，它可以刺激淋巴T細胞量的增生⁽²²⁾。即 PHA作用 24小時之後，可以增加淋巴細胞 DNA的合成⁽²⁰⁾。因此利用PHA的刺激，可用以研究人類染色體的變化，以作為診斷的工具⁽²²⁾。

在染色體結構異常的試驗中，本研究的結果所見到為染色體間隙與斷裂的情形，並未見其它種變異，此與Venitt等指出細胞經化學藥物作用後，造成細胞染色體異常的結果相同⁽²⁰⁾。染色體斷裂可發生在細胞分裂週期 G₁,S,G₂時期的任一時期，如果發生在 G₁期時，則會有單染色分體斷裂，如果發生在 S期時，則會有雙染色分體斷裂的情形⁽²³⁾。推論本研究的結果可能是在G₁時期發生斷裂。本研究染色體異常的數目隨著濃度的增高而增加，結果與第一篇 V79動物細胞的試驗結果相同，亦與 CHO細胞在 MMA濃度由 750ug/ml-3000ug/ml時，染色體異常數目呈計量相關(dose related)的結果相同⁽²³⁾。

姊妹染色分體交換(簡稱SCE)的產生，代表 DNA的複製產物在對等處發生交換，雖然 SCE在分子生物學上的解釋尚未清楚，但一般認為的頻度代表 DNA的受損。過去許多研究已證明，致突變劑(mutagen)以及大多數的致癌劑(carcinogen)都會損壞

DNA，並增加 SCE 的發生頻率⁽²⁵⁾。本研究在 SCE 的結果顯示，隨 MMA 的濃度的增加，SCE 的頻率也隨之增加，當濃度大於 9.32×10^{-1} mM 時，與對照組比較，均呈明顯的差異 ($p < 0.05$)。Poss 等認為 MMA 在 34mM 時，對於 TM677 *Salmonella typhimurium* 細菌是一種致突變劑⁽²⁴⁾。Zeiger 等研究認為大於 10.0ug/plate 的濃度時，MMA 對於 TA100, TA1535, TA97 或 TA98 細胞為致突變劑⁽²⁸⁾。Chang 的研究指出，MMA 濃度在 0.125-1.000 ug/ml 時，對於 L5178Y/TK^{+/+} 的老鼠淋巴瘤細胞是一種致突變劑⁽²⁹⁾。Bigatti 等研究指出 PMMA 作用於人類淋巴細胞後，並未有任何差異性變化，但對於細胞的增生指數 (proliferation index) 有增加，作者認為是 PMMA 對於細胞具有毒性的結果⁽¹⁾。

SCE 的數目在正常人的頻率會隨細胞的種類不同而有不同，其範圍在 2-20 個，平均約有 5-8 個互換⁽²⁶⁾。SCE 不受性別差異的影響，但會受到年齡的影響，發生最大的年齡範圍是在 30-40 歲之間⁽²⁷⁾。本研究的樣本年齡分佈的範圍是在 20-30 歲，對照組的數目也落在上述正常範圍內。MMA 由於本身不溶於水，因此以 DMSO 作圍溶解的輔助劑，本試驗參與試驗的最高濃度為 9.32×10^{-1} mM，此時 DMSO 的濃度在 0.5% 以下，此與 Stenchever 等認為 MMA 濃度高於 1% 以上時，會對細胞的世代之產生有影響的結果似乎不相衝突⁽³⁰⁾。

由於樹脂在聚合時會有 2-5% 的單體殘存未發生聚合，在聚合後殘留的會立即釋出⁽³¹⁾。在牙科義齒床的使用上，因製作到配戴大多已經過一段時間，理論上應不至於造成毒性反應。有些報告指出，於外科手術使用此材料作為骨釘之後，會在病患的體內產生毒性⁽³¹⁾。Rijke 和 Johnson 指出 MMA 的半生期，在試管中，20°C 下，在全血內的時間是 3 小時⁽³¹⁾。MMA 在血液中的代謝及在血液中可能發生的動力學機轉 (kinetic mechanism) 至今仍未有文獻報告，此仍有待再研究。

結語

MMA 具有高揮發性，由過去的研究報告以及本試驗的結果均顯示具有細胞毒性及致突變性，因此建議從事於接觸到這類材料的專業人員，應注意到工作環境以及自我的保護，以爲持健康。

Table 1. The mean value of chromosome aberration of 100 metaphase after methyl methacrylic acid^a treated on normal human lymphocytes cultured with or without serum^b.

Chromosome aberration	Mean Value	
	Serum(+)	Serum(-)
Gap	0.07	0.08
Break	0.10	0.22

a: MMA concentration is 9.32 mM.

b: 10 % fetal bovine serum.

Table 2. The chromosome aberration of methyl methacrylic acid treated on normal human lymphocytes.

CONCENTRATION	TOTAL METAPHASE ^a	GAP	BREAK	MEAN VALUE ^b
0	500	13	4	0.034
9.32 x10 ⁻² mM	500	18	32	0.080
9.32 x10 ⁻¹ mM	500	24	41	0.130 *
9.32 x10 ⁰ mM	500	28	49	0.154 *
9.32 x10 ¹ mM	500	31	55	0.172 *

a: 100 metaphase of five sample.

b: total aberraton number/ total metaphase.

* : p<0.05 significantly difference, compared with control group.

Table 3. The sister chromatid exchange of methyl methacrylic acid treated on normal human lymphocytes.^a

Concentration	Total metaphase	SCEs/cell \pm SE	P ^b
o	500	2.98 \pm 2.21	
9.32 x10 ⁻² mM	500	3.47 \pm 2.67	
9.32 x10 ⁻¹ mM	500	3.59 \pm 2.27	< 0.05 *
9.32 x10 ⁰ mM	500	3.90 \pm 2.68	< 0.05 *
9.32 x10 ¹ mM	500	6.59 \pm 2.87	< 0.05 *

a : five student's blood

b : Paired t test

* : significantly difference, compared with control group.

The chromosome aberration study on methyl methacrylic acid treated human lymphocytes.

Abstract :

Methyl methacrylic acid (MMA) is a component of several products. It is used in the medical field, too. In vitro, as many investigations showed MMA do have cytotoxicity to animal cells. In this study, human lymphocytes cultured in vitro are used to assess the ability of methyl methacrylic acid to induce chromosome aberration and sister chromatid exchange (SCE). Under the condition used in this study, methyl methacrylic acid do produce chromosome gaps, chromatid breaks and increase the number of sister chromatid exchange in phyto-hemagglutinin stimulated human lymphocytes. As the concentration of methyl methacrylic acid increased, chromosome aberration increased. To human lymphocytes, methyl methacrylic acid seems to be a mutagen.

Key words :

methyl methacrylic acid, chromosome aberration, mutagen

REFERENCE

1. Begatti MP, Amberti L, Cannas M, Rossi E. Lack of SCE induction by polymethyl methacrylate bone cement in human lymphocyte cultured in vitro. *Mutat. Res.*, 227:11-24,1989.
2. Chirila TV, Walder LN, Constable IJ, Tompson DE, Barrett ED. Cytotoxic effects of residual chemicals from polymeric biomaterials for artificial soft intraocular lenses. *J Cat Refra Surg.* 17(2): 152-162,1991.
3. Marez T., Shirli P., Hildebrand HF., Hagreneoer JM. Increased frequency of sister chromatid exchange in workersexposed to high dose of methyl methacrylate. *Mutagenesis*, 6(2) :127-129,1991.
4. Fister AA, Woodside NY. Allergic sensitization of the skin and oral mucosa to acrylic denture materials. *JAMA*, 18:238-241,1954.
5. Stevenson WJ. Methyl methacrylate dermatitis. *Contact Point.* 18:171,1941.
6. Moody WL. Severe reaction from acrylic liquid. *Dent Dig.* 47:305,1941.
7. Stoy PJ. Denture sore mouth with particular reference to acrylic. *J Irish Dent A.*7: 13, 1952.
8. Hollander C, Kennedy RM. Dermatitis caused by autopolymerizing acrylic restorative material. *Dent Diag.* 57:213,1951.
9. Pegum IS, Medhurt FA. Contact dermatitis from penetration of rubber gloves by acrylic monomer. *British Med J.*, 2: 141-143, 1971.
10. Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C., Chromosome aberration and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells evaluation of 108 chemicals. *Envi Molecu Mutagen.* 10:1-175.1987.
11. 高嘉澤,黃翠賢,廖保鑫,江濤,林世珍,李宣佑,周明勇. Methyl

- methacrylic acid 對V79細胞的研究,Chin Dent J, Vol 14, no.1, 1995(in press).
12. Morre MM, Amtower A, Oerr CI, Brock KH, Dearfield KL. Cytotoxicity of acrylaic acid, methyl acrylate, ethyl acryalte, methyl methacrylate and ethyl methacrylate in L5178Y mouse lymphoma cells. *Envir. Mol. Mutagen.*, 11:49-63,1988.
 13. Carolyn LD, Karen HB, Martha MM. Micronucleus chromosome aberration and small colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse Lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 222:191-203.1989.
 14. Chang PC, Eustis SL, Huff JE, Haseman JK, Ragan H. Two year inhalation carcinogenesis studies of methyl methacrylate in rat and mice, inflammation and degereration of nasal epithelium. *Toxicology*,52:237-252,1988.
 15. Tensy M, Hohenleituer F, White D, Oberly D, Landin W, Kendall F. Chronic biological effects of methylacrylate vapor III, Histopathology, blood chemistries and hepatic and ciliary function in the rat. *Envir Res.* 21: 117-122,1980.
 16. Borzelleca J, Larson P, Hennigar J, Huf E, Crawford E, Smith R. Studies on the chronic oral toxicity of monomeric ethyl acrylate and methyl methacrylate. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 6:29-32, 1964.
 17. Oppenheimer B, Oppenheimer I, Danishefsky AS, Eirich F. Further studies of polymer as carcinogenic agents in animal. *Cancer Res.*, 15:333-336, 1955.
 18. Lavorgna J, Burstone N, Schiller A, Harris W. The carcinogen of plastics used in orthopedic surgen. An assessment of incidence on rats and the possible relevance to man. *Clin. Orhtop. Relat. Res.*, 88:223-225., 1972.
 19. Laskin D, Robinson J, Weinman J, Experimental production of

- sarcomas by methyl methacrylate implants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87:329-332. 1954.
20. Venitt S, Arroyo JM. Mutagenicity testing a practical approach. 1st ed., CRC press., England, pp. 187-232, 1984.
 21. Pretlow II TG, Pretlow TP. Cell Separation Methods and Selected Application. Vol.5, Academic Press, New York. pp.1-30, 1987.
 22. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral bloods. Exp Cell Res, 20:613-616, 1960.
 23. Therman E. Human Chromosomes : Structure, Behavior, Effects. 1st ed, Springer-Verlag Inc Press, New York. pp:1-60, 1980.
 24. Poss O, Thilly WG, Waden DA. Methyl methacrylate is mutagen for Salmonella Typhimurium. J Bone Joint Surg. 61:1203-1207, 1979.
 25. Tice RR, Lambert B, Morimoto K, Hollaender A. A review of the international symposium on sister chromatid exchanges : Twenty five years of experimental research. Environ Mutagen, 6:737-752, 1984.
 26. Carano AV, Minkler JL, Stetka DG, Moore II DH. Variation in the baseline sister chromatids exchange frequency in human lymphocytes. Environ Mutagen, 2:325-327, 1980.
 27. deArce MA. The effect of donor sex and age on the number of sister chromatid exchanges in human lymphocytes growing in vitro. Hum Genet, 57:83-85, 1981.
 28. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Salmonella mutagenicity test : III. Result from the testing of 255 chemicals. Envir. Mutag. 9 (suppl. 9) 1987.
 29. Chang PC. Toxicology and carcinogenesis studies of Methyl methacrylate (CAS No. 80-62-6) in F3441N Rats and B3C6F1

Mice (inhalation studies).NTP technical report series
No.314., National Toxicology Program., Research triangle
Park., NC. 1986.

30. Stenchever MA, Hopkins AL, Sipes J. Dimethyl sulfoxide and related compounds some effects on human fibroblasts in vitro. Proc. Soc. Biol. Med., 126:270-273,1967.
31. Rijke M, Johnson RA. On the fate of methyl methacrylate in blood. J Biol Med Mater Res, 11:211-221,1977.