

R
668.8
4095

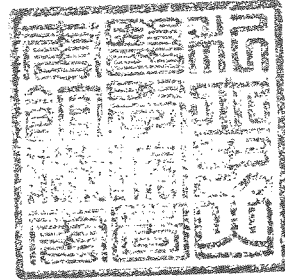
私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

指導教授：林瑞生教授

重金屬對中國倉鼠細胞系之細胞遺傳毒性的研究

Studies of Cytogenotoxic Effects of Heavy Metals
in Chinese Hamster Cells



研究生：李怡靜 撰

中華民國八十五年元月

(JAN,1996)

中山醫學院圖書館



C034329

本論文為中山醫學院授予以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會審查合格及口試通過。

口試委員

台灣大學醫學院藥理學和毒理學
研究所

蕭水銀 教授

蕭水銀

中山醫學院共同學科

陳文貴 教授

陳文貴

台中榮民總醫院教學研究部和
中國醫藥學院藥物化學研究所

王繼平 副教授

王繼平

台灣大學醫學院毒理學研究所

劉興華 副教授

劉興華

中山醫學院藥理學科
(論文指導教授)

林瑞生 教授

林瑞生

中華民國八十五年元月
(JAN., 1996)

誌 謝

終於畢業了。在完成學位的過程中，受到許多人的幫忙與鼓勵，尤其要感謝我的指導教授林瑞生老師。從實驗的設計到論文的完成，林老師不厭其煩的指導與悉心訂正，使本篇論文得以順利完成，在此十分感謝林老師的大力幫忙。

此外亦要感謝在求學期間無時無刻替我加油打氣，同喜共憂的吳佳芳老師及分擔實驗工作的林藩小姐。

另外，極為感謝蕭水銀老師、陳文貴老師、王繼平老師、劉興華老師在百忙中撥空來為我口試，以及不吝賜予修正。

最後僅以此篇論文獻給我的家人及關心我的朋友。

目錄

	頁數
中文摘要 (Chinese Abstract)	1
英文摘要 (English Abstract)	2
綜論細胞遺傳毒性檢驗法 (Summary Discussion of Cytogenotoxic Assays)	3
一、有絲分裂係數 (Mitotic Index) 和藥物濃度之設計 (Select Dose Range)	3
二、染色體構造變異之分析 (Assays for Structural Chromosome Aberrations)	4
三、微小核法 (Micronucleus Assay)	9
四、姐妹染色分體互換的基本原理 (The Principle of Sister Chromatid Exchanges)	10
緒論(Introduction)	13
實驗材料和方法(Material and Methods)	15
一.藥品 名稱和製備(Drugs and Preparation)	15
二.儀器(Instruments)	16
三.細胞(Cells)	17
A.細胞存活率(Viability)	18
B.細胞分裂係數(Mitotic Index)	21
C.細胞微小核(Micronucleus Assay)	24
D.染色體變異法((Chromosome Aberration Assay)	27
E.姐妹染色分體交換法 (Sister Chromatid Exchange Assay)	30
F.統計分析(Statistical Analysis)	34
結果(Results)	35
討論(Discussion)	37
圖表(Figures and Tables)	41
參考文獻(References)	57

中文摘要 (Chinese Abstract)

硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 以濃度相關性方式減低中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese Hamster Ovary Cells ; CHO Cells) 之存活率 (Viability)，其抑制 50 % CHO 細胞存活率 (IC₅₀) 之濃度為 0.015mM。相較之下，硝酸鉛 (Lead Nitrate) 則只稍抑制 CHO 細胞之存活率。在本研究，硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 和硝酸鉛 (Lead Nitrate) 均不增加含微小核 (Micronuclei ; MN) 之雙核 CHO 細胞數。然而，硝酸鉛 (Lead Nitrate) 和硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 均能增加姊妹染色分體之交換率 (Sister Chromatid Exchanges ; SCEs)。硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 所加強之 SCEs 值大約與 Mitomycin C 所造成之 SCEs 值相等，但卻比硝酸鉛 (Lead Nitrate) 所造成之值高 10 倍以上。同時硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 亦能導致染色體變異 (Chromosome Aberrations ; CAs) 頻率之增加，其中包括染色體斷裂 (Breaks)，無中心節 (Acentrics)，染色體間交換 (Interchanges) 及雙中心節 (Dicentrics) 等。除此之外，硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 亦造成分裂係數 (Mitotic Index ; MI) 值下降，但是硝酸鉛 (Lead Nitrate) 卻會使 MI 值增加。綜合上述結果，此二種重金屬鹽類對於 CHO 細胞均具有細胞遺傳毒性 (Cytogenetic Toxicities)，但造成之細胞毒性 (Cytotoxicities) 有所差異，其在 MN、CAs 和 SCEs 等遺傳毒性上之作用程度亦有所不同。此外，本研究亦指出以 SCE 方法來偵檢硝酸鉛 (Lead Nitrate) 和硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 之致突變效應 (Mutagenetic Effect) 為最敏感。

英文摘要(English Abstract)

Cadmium nitrate decreased the viability of Chinese hamster ovary (CHO) cells in a concentration-dependent manner; 50% inhibition (IC_{50}) was achieved at 0.015 mM. In contrast, lead nitrate appeared to be less toxic. Neither cadmium nitrate nor lead nitrate significantly increased frequencies of binucleated CHO cells with micronuclei (MN). However, both cadmium nitrate and lead nitrate could augment sister chromatid exchanges (SCEs). Cadmium nitrate induced SCEs with a potency approximately equal to that of mitomycin C and more than 10 times higher than lead nitrate. Cadmium nitrate also increased chromosome aberrations (CAs), which included breaks, acentrics, interchanges, and dicentrics of chromosomes. In addition, cadmium nitrate induced a decrease in the mitotic index (MI), but lead nitrate increased it. In summary, it appears that both of these two heavy metal salts have cytogenetic toxicities with different degrees of effects on the cytotoxicity, MN, CAs, and SCEs in CHO cells. However, SCE was the most sensitive endpoint for indicating mutagenetic effects of cadmium and lead in the present study.

綜論細胞遺傳毒性檢驗法

(Summary Discussion of Cytogenotoxic Assays)

化學物質誘發哺乳類細胞產生細胞毒性和遺傳毒性之檢驗法：

一、有絲分裂係數(Mitotic Index; MI)和藥物濃度之設計(Select Dose Range)：

有絲分裂係數(MI)是偵測細胞毒性的方法之一，主要是測量細胞有絲分裂的活動力(Mitotic Activity)，所以可以藉此方法觀察整個細胞群活躍的程度。如果有絲分裂係數(MI)高，則表示整個細胞群很活躍，所以有絲分裂進行較快；如果有絲分裂係數(MI)較低，表示細胞群不活躍，所以有絲分裂進行較慢。一般有絲分裂係數(MI)是計數至少 2000 個細胞中所含分裂中期細胞(metaphase)的數目。

$$\text{M.I. (\%)} = \frac{\text{No. of cells in division}}{\text{Total no. of cells}} \times 100$$

MI 亦可用來決定實驗藥物之濃度(Venitt and Parry, 1984)，一般以降低控制組(control)的有絲分裂係數(MI)至 20-25 % 為最高實驗濃度，再另取此最高濃度值之二分之一及四分之一劑量作細胞遺傳毒性分析。如所用之濃度不降低有絲分裂係數(MI)，但其次之劑量使有絲分裂係數(MI)為零時，則選用藥物濃度應比此毒性濃度稍低，再以此值濃度之二分之一，四分之一及八分之一為試驗濃度(例如：假使濃度為 100 μ g/ml 時其毒性為 100 %，濃度為 10 μ g/ml 則不具毒性時其試驗濃度則為 80, 40, 20 及 10 μ g/ml)。

二、染色體構造變異之分析(Assays for Structural Chromosome Aberrations)

A.細胞週期之影響(The Influence of the Cell Cycle)

染色體標本成功製片的關鍵需利用紡錘體抑制劑(如 Colchicine 或 Colcemid)將細胞生長週期積蓄在分裂中期(Metaphase)及以下之處理步驟以利於在顯微鏡下分析染色體；諸如低張溶液可使細胞膨脹，適當比例固定液的使用，避免染色體重疊的噴片技巧及選擇濃度適當的染色劑。

分裂活性細胞會進行一連串的循環，稱為細胞週期(Cell Cycle)。即指分裂形成之細胞至下次分裂的這段期間稱之細胞週期(Cell Cycle)可簡單分為間期(Interphase)以及分裂期(M-phase)。間期(Interphase)又可分為 G₁ 期(G₁ phase)，S 期(S phase)，G₂ 期(G₂ phase)，而分裂期(M-phase)又可分為前期(Prophase)，中期(Metaphase)，後期(Anaphase)以及末期(Telophase)(如圖 A)。在 S phase 時，DNA 進行複製，在 M phase 時，染色體進行分裂，產生二個相同之子細胞。至於 G₁ phase 及 G₂ phase 又稱為 gap phase，許多的代謝反應的進行均發生在這兩個 phase，所以 G₁ phase 及 G₂ phase 並非不活期。在不同種類的哺乳動物細胞，其 Cell Cycle 進行的時間都不會一樣，但在同種動物特定的組織細胞，其細胞週期(Cell Cycle)的時間則無所差異，當 DNA 開始複製時，即是細胞已依序進入 S phase，G₂ phase 及 M phase，而這一連續之過程皆以固定的速度進行著，當細胞進入 G₀ phase 則表示離開 G₁ phase 脫離

了正常細胞週期(Cell Cycle),當細胞週期(Cell Cycle)無法進入 S phase 或細胞因分化而成另一種細胞把分裂的現象給抑制了(如淋巴球細胞),這兩種情況都無法進行正常的細胞週期(Cell Cycle)。

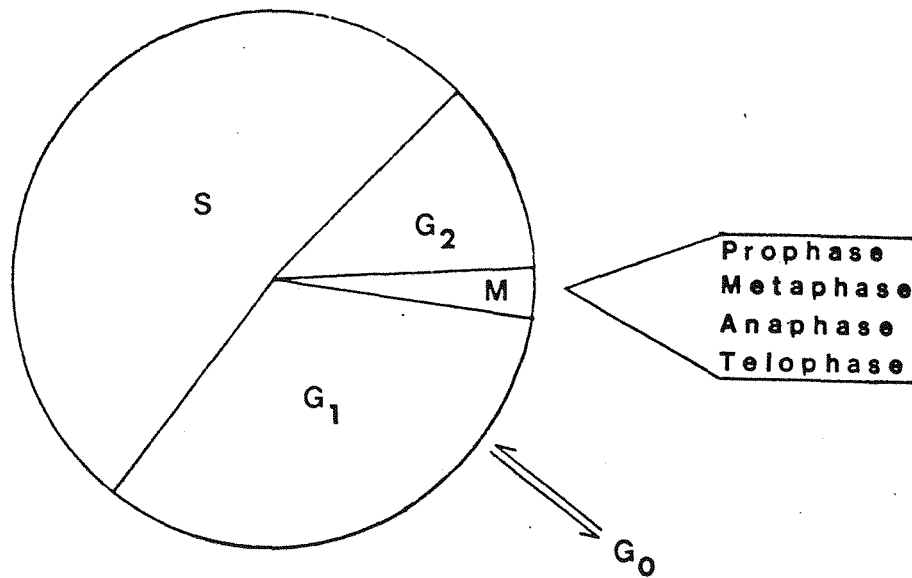


圖 A 顯示各分期在細胞週期所佔之比例，不同細胞其比例分配會有所不同，尤其 G_1 期。注意分裂中期(M-phase)所佔時間相當短，此時染色體可區隔。

細胞週期(Cell Cycle)對影響分析染色體標本的重要性可由下列幾點說明：

- 1) 染色體在 G_1 phase、S phase、 G_2 phase 時其形態呈鬆散狀(Decondensed)，而在前期(Prophase)染色體才開始進行濃縮，只有在中期(Metaphase)時，染色體之兩股分開，染色體都呈緊縮狀態，染色反應也較深，所以此時最易於分析，在後期(Anaphase)染色體分佈在紡錘絲之兩極處，在末期(Telophase)時染色體的表現則無法用光學顯微鏡區分出各別染色體。
- 2) 中期(Metaphase)只占細胞週期(Cell Cycle)的微小部份，在細胞培養的過程中加入適量 Colcemid 或 Colchicine 幾個小時可中止紡錘絲(Mitotic Spindle)的作用，而使進入中期(Metaphase)之細胞停留在此階段。
- 3) 如所使用的細胞屬於不分裂細胞(G_0 Cell)則在加入 Mitogen(Mitosis-Stimulating Agent)可使細胞從 G_0 phase 回到正常細胞週期。使用此類細胞時，試藥可在培養開始或細胞分裂後加入。而後者較佳，因所加入的毒物有時會在 Mitogen 存在下亦會抑制 G_0 進入 G_1 。
- 4) 多數會破壞染色體的化學物質在產生染色體變異前需經歷 S phase，此種化學物質之作用被稱為 S-dependent。有少數化學物質為 S-independent，當細胞在 G_2 phase 時，被加入藥品，可在緊接著的分裂中期產生染色體變異，所以在加入藥物後，通常需再經滿一個細胞週期(Cell Cycle)後，再採收(Harvest)細胞。

5) 在有利情況下，細胞週期(Cell Cycle)的時間是一定的，但在加入藥物之後，G₁ phase 可能被極度延長，甚至可能短暫進入G₀ phase，所以整個 Cell Cycle 的時間就被延長。由於產生明顯染色體變異之細胞經過幾次細胞週期(Cell Cycle)後會死亡，因此細胞染色體變異必須在藥物處理後的第一個中期(Metaphase)觀察染色體的形態，如果藥物造成細胞週期(Cell Cycle)延長時，若照正常時間採收標本，可能此時無法觀察到染色體之異常形態。

B. 染色體變異之分類 (Classification of Chromosome Aberrations)

染色體變異乃指染色體構造的變化可在顯微鏡下觀察到，其可能由於單一染色分體之染色物體物質的遺失而完全斷裂，而遺失的部份在分裂中期時可能以斷片(Fragments)存在，並可能在細胞分裂後形成微小核。斷裂的染色分體亦可能重組而形成單純或複雜的結構變化。大部份的染色體變異由於遺失重要的基因訊號或無法正常做有絲分裂而死亡，但細胞如染色體移位(Translocation)和小部份遺失(Small Deletion)則能正常分裂而存活下來。由於許多染色體變異細胞在分裂後無法存活，所以理想的採收染色體標本時間是在加藥後滿一細胞週期，過早或太慢採收，會低估染色體變異頻率。對於未同步化的細胞(Asynchronous Cells)，則以加藥後一個半週期採收標本最適當。但藥品如造成細胞週期延長，則理想採收標本時間就可能二個或以上之細胞週期。

染色體變異可分類成：(Venitt and Parry,1984)

I. 染色體型(Chromosome Type)：染色體之二條染色分體在同一位置產生變異，其包括：a.間隙(Gap or Achromatic Lesion；g) - 間隙(非染色區)比染色分體直徑短；b.染色體斷裂(Chromosome Break or Terminal Deletion；c) - 在非複製期G₁或G₀期發生，而在複製後的分裂中期被發現，有時斷裂之殘片無法被發現；c.交換：1.二個染色體間交換(Interchange Between Chromosomes；c/c) - 在G₁期形成，往往形成雙中心節(Dicentric)，2.同一個染色體間交換(Interchange Within A Chromosome；c/c) - 往往形成環狀變異(Ring)。

II. 染色分體型(Chromatid-type)：除孤立染色分體斷裂外(Isochromatid Breaks)外，通常只指單一條染色分體變異，其包括：a.間隙(Gap；g) - 非染色區小於染色分體直徑；b.染色分體斷裂(Chromatid Break；c) - 非染色區大於染色分體直徑；c.孤立染色分體斷裂(Isochromatid Break；su)；d.交換(Exchange) - 由於染色分體斷裂後又重新組合而成，構造可能相當複雜：1.二個染色體間交換，可分對稱和非對稱二種，2.同一個染色體間交換(Interchange Within A Chromosome；c/c)，可分單臂和雙臂，3.孤立染色體/染色分體間交換(Isochromatid/Chromatid Interchange；i/c)。

欲準確的鑑定和分類染色體變異之型態，非單看文字說明所能辦得到，首先需經有經驗的細胞遺傳學家的指導，加上一段時間的訓練才辦得到。

三、微小核法(Micronucleus Assay)：

微小核(MNs)的形成是由於染色體成分因延遲而無法在分裂後期(Anaphase)分佈到適當的紡錘體位置以至細胞分裂後無法包含在子細胞主核內。微小核(MN)只出現在其中之一的子細胞中，呈一個或多個小核分佈於細胞質中。微小核(MNs)主要是由不含中心節(Acentric)的染色體碎片所形成(Heddle and Carrano, 1977)。但當細胞分裂時如紡錘絲出了問題會致使整條染色體發生延遲現象(Lagging Chromosomes)而產生較大之MN。細胞紡錘體毒物處理後，往往產生此種較大的微小核(MN)(Yamamoto and Kikuchi, 1980; Lynch et al., 1993)。微小核(MN)可在任何分裂之組織細胞中產生。Schmid(1976)曾廣泛地應用骨髓的嗜多色紅血球(Polychromatic Erythrocytes)來探討微小核(MN)。Heddle et al.(1983)在調查分析MNs法後，建議MNs法可用來探討遺傳毒性。隨著技術上的突破，微小核試驗法現在已被推廣使用於偵測老鼠其它體細胞的細胞遺傳毒性(Tates et al., 1980; Shindo et al., 1983; Adler, 1993; Marrazzini et al., 1994)。尤其Fenech和Morley(1985)以Cytochalasin B抑制M-phase進入G₁ phase而造成雙核細胞後，更增加微小核法之準確性和實用性。

判斷和計數MN之準則：(Heddle, 1973; Countryman and Heddle, 1976; Roberts et al., 1986)

- 1、MN之直徑需小於主核直徑之三分之一
- 2、在顯微鏡下觀察不呈反射現象
- 3、MN的顏色與主核相似或較主核之顏色深
- 4、MN必須在細胞質內，但不能與主核連接在一起
- 5、雙核細胞之二個主核如重疊在一起，則不計數
- 6、雙核細胞內含一個以上之MN時，以一個MN計數

四、姐妹染色分體互換的基本原理(The Principle of Sister Chromatid Exchanges)

姐妹染色分體互換(SCEs)的產生代表 DNA 的複製產物在對等處發生交換，至於姐妹染色分體互換(SCEs)產生的機轉很多，包括重組修補(Recombination Repair)，DNA 在損害處複製的改變(Replication Bypass Model)，或是鄰近兩條複製鏈的非同步 DNA 合成等，儘管確實的機轉還不能確定，但是一般認為姐妹染色分體互換代表 DNA 受傷，經過許多的研究已經確定致變劑(Mutagens)以及大部分的致癌劑(Carcinogens)都會破壞 DNA，並且會增加姐妹染色分體互換(SCEs)的頻率，凡是會破壞 DNA 的物質稱為具有遺傳毒性(Genotoxicity)，因此姐妹染色分體互換(SCE)不失是為一種靈敏度極高的遺傳毒性偵測法。

姐妹染色分體交換(SCE)是讓 5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)進入細胞核內，因為 BrdU 的化學結構與細胞胸腺嘧啶(Thymidine)相似，所以在進行 DNA 複製時，BrdU 便混入 DNA 的結構中。如圖 B 所示，當染色體以 BrdU 取代胸腺嘧啶(Thymidine)進行第一次 DNA 複製後，每一條染色分體的雙股中會有一股含 BrdU，若是我們以符號“T”代表胸腺嘧啶(Thymidine)，以“B”代表 BrdU，則第一次 DNA 複製後，每一條染色分體的 DNA 均為 BT，並沒有不同，但細胞若繼續以 BrdU 取代胸腺嘧啶進行第二次 DNA 複製後，則同一染色體的兩條染色分體中，會有一條染色分體的 DNA 為 BT，而另一條染色分體的 DNA 為 BB，如此同一染色體的兩條染色分體含 BrdU 之 DNA

的股數就有不同，BT 染色分體只有一股 DNA 含 BrdU，BB 染色分體則兩股 DNA 均含有 BrdU。姐妹染色分體對比染色法 (SCEs)(Perry and Wolff,1974)就建立在這個不同點上，此種 BT-BB 染色體要先以染核酸的螢光染色劑 Hoechst 33258 處理，使 Hoechst 33258 與 DNA 結合，再以 365nm 紫外光照射，以 365nm 紫外光處理會使得染色體上的 DNA 產生光解，並且含有 BrdU 的 DNA 比不含 BrdU 的 DNA 更容易於被 365nm 紫外光所分解，所以經 365nm 紫外光處理後，含 BB 染色分體 DNA 的殘量比含 BT 染色分體的殘量少。而吉氏染色液(Giemsa)則會與 DNA 結合，所以 BT-BB 染色分體在經照射 365nm 紫外光後，含 BB 染色分體的染色就比含 BT 染色分體的染色淺。藉由此姐妹染色分體的染色差可在一般光學顯微鏡下計數藥物處理後其染色分體交換的頻率 (Venitt and Parry, 1984)。(如圖 C)

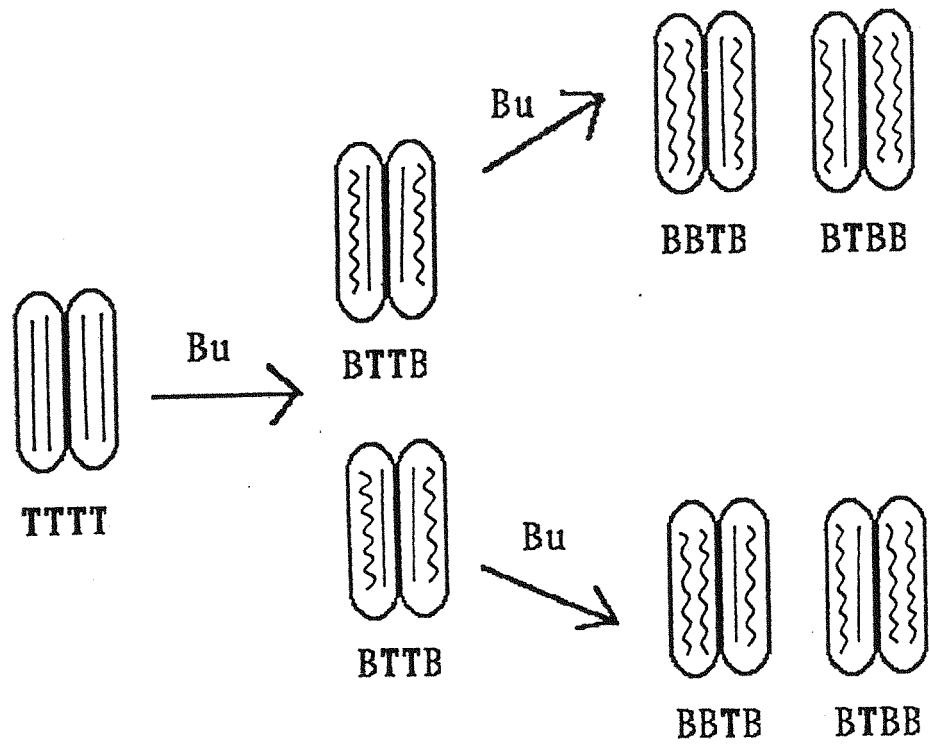


圖 B. 細胞以 5-bromodeoxyuridine 取代 Thymidine 進行 DNA 複製兩次其染色體之示意圖。

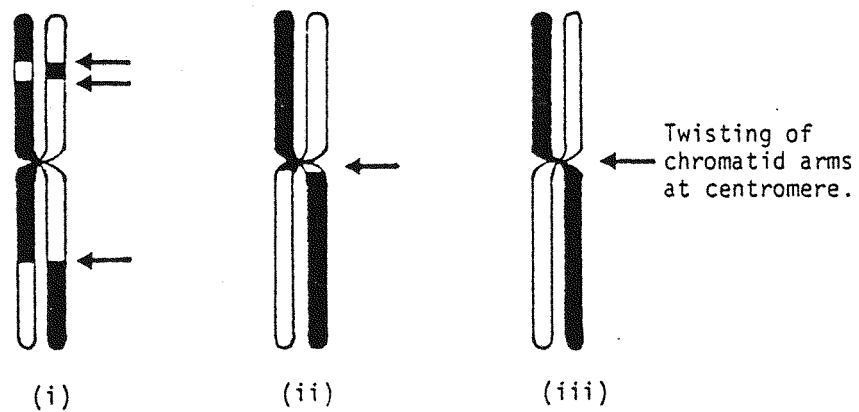


圖 C. 姐妹染色分體交換(SCEs)

(i) 三個 SCEs

(ii) 近中心節之一個 SCE

(iii) 姐妹染色分體臂在中心節處扭轉，所以沒 SCE

緒論 (Introduction)

由於金屬普遍存在我們的生活環境中，所以研究可能是致突變物 (Mutagens) 和致癌物 (Carcinogens) 之金屬對人類健康而言是很重要的，金屬在自然環境中之分佈隨著人類大量之工業活動而改變，此種改變造成生活環境中之金屬濃度增高至令人注意之地步，此情況不僅導致一般人之曝露機會增加，亦對從事某些特定職業之工作人員造成嚴重傷害，尤其鎘 (Cadmium) 和鉛 (Lead) 在人類之文明史中一直是廣被使用之重金屬，所以更引起注意。

雖然對於鎘 (Cadmium) 和鉛 (Lead) 所造成之致突變效應 (Mutagenic Effect) 已有其他學者研究，然而在這些研究的發現中仍有許多爭論與存疑，例如 Bauchinger 和 Schmid (1972 年) 發現對於 CHO 細胞以不同濃度之醋酸鉛 (Lead Acetate) 加以處理，並無法造成染色體變異 (Chromosome Aberrations) 數目之增加，Schmid et al. (1972) 亦發現對人類淋巴球 (Human Lymphocytes) 以不同濃度之醋酸鉛 (Lead Acetate) 處理，亦不導致 CAs 值增加，然而亦有報告指出醋酸鉛可在人類淋巴球增加 CAs (Beek and Obe, 1974; Obe et al., 1975)。此外，Wulf (1980) 亦報告硫酸鉛可在人類淋巴球增加 SCEs。至於鎘 (Cadmium) 在活體外哺乳類細胞遺傳毒性之研究，Paton 和 Allison (1972) 在人類淋巴球 (Human Lymphocytes) 及 Umeda 和 Nishimura (1979) 在 FM3A 細胞以氯化鎘 (Cadmium Chloride) 加以處理，並無發現有染色分體 (Chromatid) 之斷裂 (Break)，然而 Shiraishi et al. (1972) 發現人類淋巴球 (Human

Lymphocytes) 能在 Cadmium Sulfide 之誘導下產生染色體變異 (Chromosome Aberrations), Bohr 和 Bauchinger (1976) 在 CHO 細胞加入 Cadmium Sulfate 處理後亦觀察到相似之染色體變異 (Chromosome Aberrations)。

由以上之證據顯示無機鎘鹽 (Inorganic Cadmium Salts) 和無機鉛鹽 (Inorganic Lead Salts) 在哺乳類系統中所造成之致突變活性 (Clastogenic Activity) 可能和所參與反應之陰離子 (Anion) 及特定測試系統之使用有所關聯, 在本研究中有一系列之短期 (Short-Term) 分析方法被採用, 包括細胞之存活率 (Viability)、分裂係數 (Mitotic Index ; MI)、微小核 (Micronuclei ; MN)、染色體變異 (Chromosome Aberrations ; CAs) 和姐妹染色分體交換率 (Sister Chromatid Exchanges ; SCEs) 均被用來測試硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 和硝酸鉛 (Lead Nitrate) 對 CHO 細胞所造成之細胞毒性 (Cytotoxicity) 和遺傳毒性 (Genotoxicity)。由於本研究結合多種實驗指標 (Index), 所以希望對於硝酸鉛和硝酸鎘是否造成細胞遺傳毒性 (Cytogenotoxicity) 能提供最可信之結果。

實驗材料和方法 (Materials and Methods)

一、藥品名稱和製備 (Drugs and Preparation)

硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 和硝酸鉛 (Lead Nitrate) 溶在滅菌蒸餾水中硝酸鎘之最終濃度 (mM) 為 1.0×10^{-4} 、 3.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-3} 、 3.0×10^{-3} ，硝酸鉛則為 1.0×10^{-3} 、 3.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-2} 、 3.0×10^{-2} ，Mitomycin C (MMC ; Sigma) 亦溶在滅菌蒸餾水中，其最終濃度為 3.0×10^{-4} mM。

其餘化學試劑之濃度和廠牌如下：

Trypsin (0.25 %) : Gibco

Trypan blue (0.4 %) : Sigma

Colcemid (0.1mg/ml) : Gibco

Potassium chloride(75mM) : Merck

Fix sol'n (Methanol : Acetic Acid = 3 : 1) : Merck

Cytochalasin B (3mg/ml) : Sigma

Giemsa (3 %、10 %，PH6.4) : Merck

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (10mg/ml) : Sigma

bis Benzimide (Hoechst No.33258) (5mg/ml) : Sigma

PSN Antibiotic mixture : Gibco

①5mg Penicillin

②5mg Streptomycin

③10mg Neomycin

①②③溶於 1ml 之 0.85% saline

PBS : Merck

① 4.09g NaCl 及 1.49g KCl

② 6.8g KH_2PO_4 及 7.10g Na_2HPO_4

①② 溶於 500ml 之水溶液(pH 6.8)

2XSSC : Merck

4.411 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 及

8.766g NaCl 溶於 500ml 之水溶液(pH 6.8)

Buffer : Merck

0.88g K_2HPO_4 及 1.01g KH_2PO_4 溶於 500ml 之水溶液
(pH 6.8)

Sigma: Sigma chemical company, U.S.A.

Merck: E. Merck, Germany

Gibco: Gibco BRL, U.S.A.

二、儀器 (Instruments)

無菌操作台 (Lamina Flow) : Bellco Glass (Canada) CO_2 W 。
(U.S.A.)

培養箱(Incubator) : NUAIRE™ IR AUTOFLOW CO_2 water-
Jacketed Incubator , Temperature -
37°C , Humidity - 60-98 % , CO_2 control- 5
% 。 (U.S.A.)

離心機(Centrifuge) : Hettich Rotanta/R (U.S.A.)

UV 照射燈 [Long Wave Ultraviolet (365nm)] : Spectroline
Model ENF-280C (U.S.A.)

烘片機 (Slide Warmer) : Fisher (U.S.A.)

水浴機(Shaker Bath 130) : Kodman (U.S.A.)

細胞計數器(Hemocytometer) : Reichert-Jung (U.S.A.)

高級研究用光學顯微鏡 (Microscope) : Nikon Microphot-FXA
(JAPAN)

三、細胞 (Cells)

中國倉鼠卵巢細胞系 Chinese Hamster Ovary (CHO) cells :
細胞週期 (Cell Cycle) 約為 12 hrs.

用細胞計數器 (Hemocytometer) 取得 5×10^5 個 CHO 細胞



培養在含 10 % 小牛血清 (Fetal bovine serum ; FCS) 以及
penicillin / streptomycin (50 units/ml) 的培養液 (Eagle's
minium essential medium ; EMEM) 中



然後放入 37°C 之培養箱中通入 5 % CO₂ 並保持濕潤



培養 24hrs

培養皿中換成不含血清之培養液分別加入各種不同濃度之金屬
鹽試藥及 3.0×10^{-4} mM MMC

↓ 藥物作用 2hrs 後

以含血清之培養液清洗細胞 (連續 3 次)

↓

加入含血清之培養液繼續培養以探討下列細胞毒性或遺傳毒性

↓

- A. Viability
- B. MI
- C. MN
- D. CAs
- E. SCEs

A. 細胞存活率 (Viability)

a. 細胞： 5×10^5 CHO cells

b. 藥品：硝酸鎘 (Cadmium Nitrate)

硝酸鉛 (Lead Nitrate)

Mitomycin C (MMC)

Trypsin (0.25 %)

Trypan blue (0.4 %)

c. 儀器：Microscope

Hemocytometer

d. 藥物的處理時間：

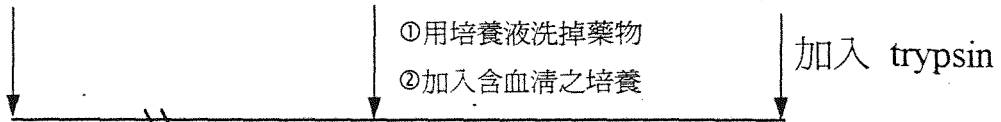
Time course：

5×10^5 CHO cell

26 hrs:

42 hrs:

trypsinization



24 hrs : ①用 PBS(-)洗二次後改用

不含血清之培養液

②加入藥物或 MMC (100 μ l)

e. 細胞的製備：

細胞經 trypsinization (0.25 % trypsin)



以 0.4 % trypan blue 處理 (resuspend)

5-10 min



以 Hemocytometer 分為幾個區域在顯微鏡下計數總細胞數以

及死細胞數(死細胞被染色呈深藍黑色，活細胞不被染色)，細胞存活率按下列公式計數，結果則以負對照組當 100%，求出其比值，並由濃度抑制曲線圖 (Concentration-Inhibition Curve) 中求出 CHO 細胞存活率之 50% 抑制濃度 (IC₅₀)。

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{Total cells} - \text{dead cells}}{\text{Total cells}} \times 100\%$$

B. 細胞分裂係數 (Mitotic Index ; MI)

a. 細胞 : 5×10^5 CHO cells

b. 藥品 : 硫酸鎘 (Cadmium Nitrate)

硫酸鉛 (Lead Nitrate)

Mitomycin C (MMC)

Trypsin (0.25 %)

Colcemide ($1 \mu\text{g/ml}$)

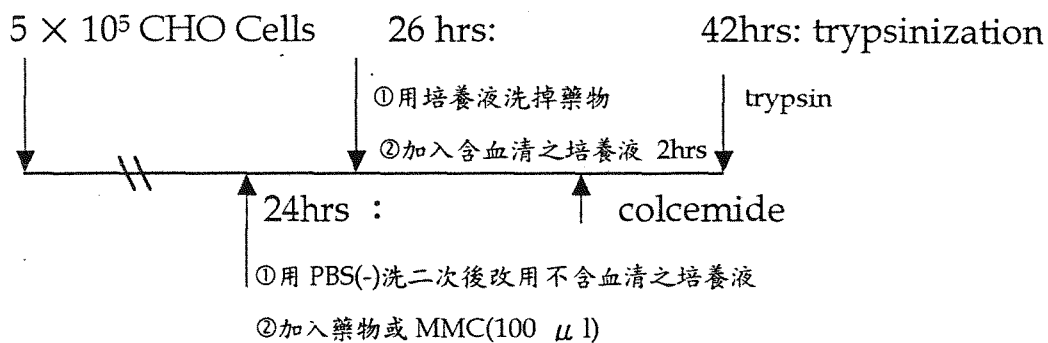
KCl (75mM)

Fix sol'n (75 % methanol : 25 % acetic acid = 3 : 1)

c. 儀器 : Microscope

d. 藥物的處理時間 :

Time course :



e.細胞的製備：

細胞經 trypsinization (0.25 % trypsin)

↓ 1200rpm 離心 8min

以 75mM KCl 處理 8 min (resuspend)

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

↓

緩緩加入 7ml Fix sol'n (methanol : acetic acid ; 3 : 1) 處理
30 min

↓ 1200rpm 離心

加入 Fix sol'n 5ml , 處理 5 min

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

↓

加入 Fix sol'n 5ml , 處理 3min

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液



加入 0.5ml Fix sol'n, 小心充份混合使成懸浮液



將混合液滴在濕玻片上



將玻片置於烘片機上 (56°C), 待其乾燥



以 3% 吉氏染色劑 (Giemsa) 染色 6 min



在 400x 顯微鏡下連續計數 4000 個細胞中 metaphase 所占數目，並以下列公式計算出細胞分裂係數 (MI)：每個處理組，均操作三次。

$$MI (\%) = \frac{\text{No. of cell in division}}{\text{Total no. of cells}} \times 100$$

C. 細胞微小核法(Micronucleus Assay ; MN)(Fenech and Morley,1985)

a.細胞： 5×10^5 CHO cells

b.藥品：硝酸鎘 (Cadmium Nitrate)

硝酸鉛 (Lead Nitrate)

Mitomycin C (MMC)

Cytochalasin B (Cyt B)($3 \mu\text{g/ml}$)

Trypsin (0.25 %)

KCl (75mM)

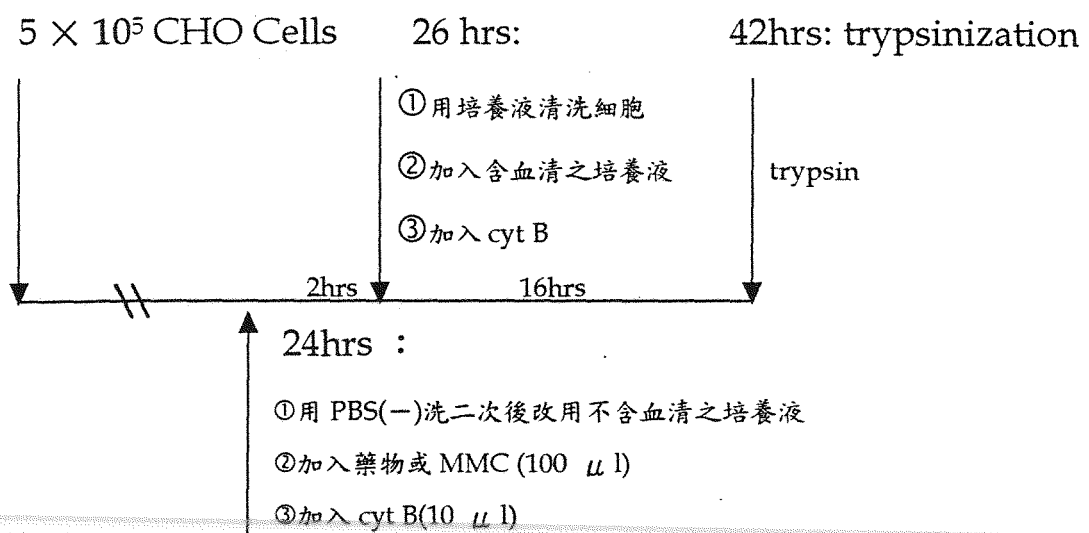
Fix sol'n (methanol : acetic acid = 3 : 1)

3 % Giemsa (pH 6.4)

c.儀器： Microscope

d.藥物的處理時間：

Time course :



e. Micronucleus 之製備：

細胞經 trypsinization (0.25 % trypsin)

↓ 1200rpm 離心 8min

以 75mM KCl 處理 1min (resuspend)後，

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

↓

緩緩加入 7ml 固定液，處理 30min (靜置)

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

↓

加入 5ml 固定液，處理 5min

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

↓

加入 5ml 固定液處理 3min

↓ 1200rpm 離心 8min

加入 0.5ml 固定液小心充分混合使成懸浮液

↓

將混合液輕輕滴於乾玻片上

↓

待玻片乾後，以 3% 吉式染色劑 (Giemsa) 染色 6 min



在 1000X Microscope 下連續觀察 1000 個雙核細胞中所含 MN 之數目，每個處理組均至少操作三次。

D. 染色體變異法 (Chromosome Aberrations Assay ; CAs)

a. 細胞 : 5×10^5 CHO cells

b. 藥品 : 硝酸鎘 (Cadmium Nitrate)

硝酸鉛 (Lead Nitrate)

Mitomycin C (MMC)

Trypsin (0.25 %)

Colcemide (0.1mg/ml)

KCl (75mM)

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

3 % Giemsa

PBS (-)

c. 儀器 : Microscope

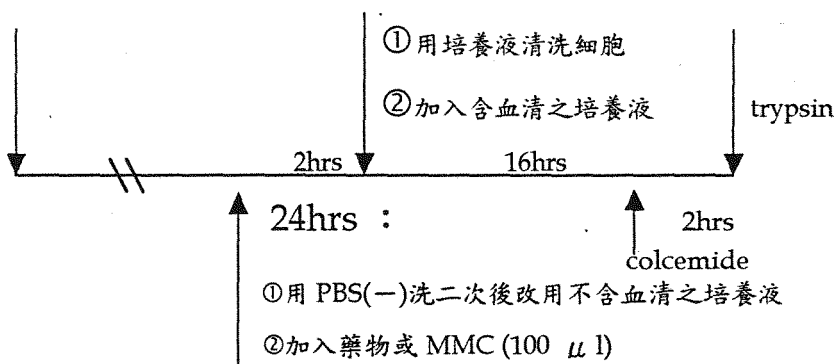
d. 藥物的處理時間 :

Time course

5×10^5 CHO Cells

26 hrs:

42hrs: trypsinization



e. Chromosome Aberration (CAs)之製備：

細胞經 trypsinization (0.25 % trypsin)

↓ 1200rpm 離心 8min

以 75mM KCl 處理 8min

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

緩緩加入 7ml 固定液，

處理 30min (靜置)

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

加入固定液 5ml 處理 5min

↓ 1200rpm 離心 8min

倒掉上清液

加入固定液 5ml 處理 3min

↓ 1200rpm 離心 8min

加入 0.5ml 固定液，小心充分混合使成懸浮液

↓

將含 0.2ml 懸浮液之滴管與玻片呈 45° 角，用力滴下使細胞破碎



待玻片乾後，以 3% Giema 染色 6 min



每個處理組觀察 100 個 metaphases (50 個 metaphases/culture) 分析其
染色體變異情形。

E. 姐妹染色分體交換法 (Sister Chromosome Exchange Assay ;
SCEs)

a. 細胞 : 5×10^5 CHO Cells

b. 藥品 : 硝酸鎘 (Cadmium Nitrate)

硝酸鉛 (Lead Nitrate)

Mitomycin C (MMC)

5-Bromo-2'-dideoxyuridine (BrdU)(10 μ g/ml)

Colcemide (0.1mg/ml)

KCl (75mM)

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

Bisbenzimidazole (Hoechst No.33258)

PBS : ①NaCl + KCl

②KH₂PO₄ + Na₂HPO₄

c. 儀器 : 1. UV 照射燈 (365nm)

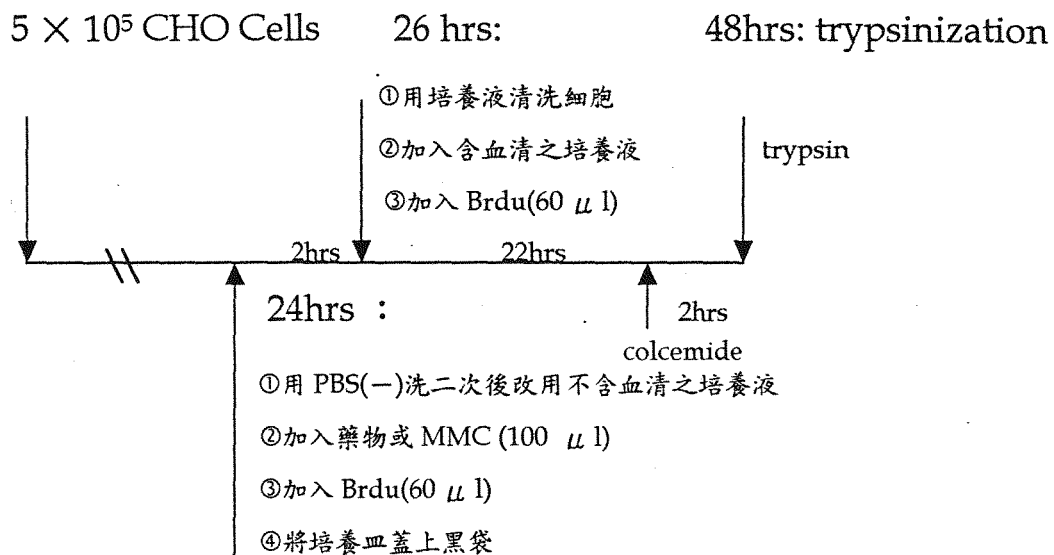
2. 烘片機 Slide warmer

3. 水浴機 Shaker bath 130

4. Microscope

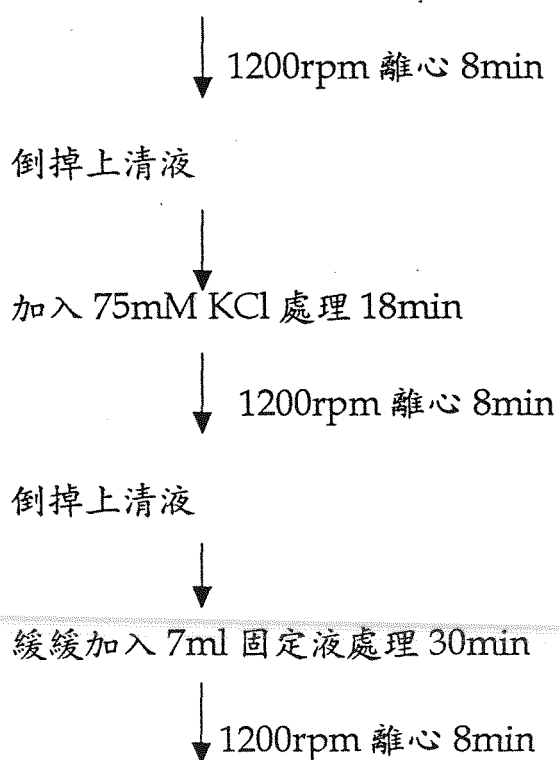
d. 藥物的處理時間：

Time course :



e. SCEs 之置備：(I, II)

I. 細胞經 Trypsinization (0.25 % Trypsin)



倒掉上清液



加入固定液 5ml 處理 5min



1200rpm 離心 8min

加入固定液 5ml 處理 3min



1200rpm 離心 8min

加入固定液 0.5ml 與懸浮液充分混合



將混合液滴在玻片上



將標本置於烘片機 (56 °C) 上乾燥



24hrs

以螢光+吉氏染色法(Perry and Wolff, 1974)染色

II. 玻片以 Hoechst 33258 (5 μ l/ml)/PBS (pH6.7); 避光處理 10min



水洗玻片



玻片放置在 2X SSC 溶液中，以水浴法 (65 °C) 處理 40min



水洗玻片



將玻片以 PBS (pH6.7) 浸潤，再以 365nm 波長之 UV 照射 10min



水洗玻片



以 10 % Giemsa 染色 10min



在 1000X 顯微鏡下尋找擴展良好含 20-22 個染色體之第二分裂中期細胞(M₂)加以分析姐妹染色分體交換頻率

每個處理組分析 100 個 2nd metaphases (50 metaphases/culture) 結果以 mean ± SE (SCEs per metaphase or SCEs per chromosome) 呈現。

F. 統計分析(Statistical Analysis)

細胞存活率(Viability)，細胞分裂係數(MI)，微小核(MN)，和姐妹染色分體交換率(SCEs)之結果以 mean \pm SE 呈現，並以 one-way analysis of Variance (ANOVA)，緊隨以 Dunnet's test 和負對照組之結果做統計分析，染色體變異(CAs)之結果則以卡氏分析法和負對照組之結果比較分析。

結果 (Results) :

A. 細胞存活率 (Viability) :

硝酸鎘(Cadmium Nitrate), 硝酸鉛(Lead Nitrate)和 MMC 對 CHO 細胞存活率之影響如圖一所示, 硝酸鎘(Cadmium Nitrate) (1.0×10^{-4} - 3.0×10^{-2} mM) 呈濃度相關性的抑制 CHO 細胞存活率, 但硝酸鉛(Lead Nitrate) (1.0×10^{-3} - 3.0×10^{-2} mM) 只降低 18.5-19.6 % 之 CHO 細胞存活率, 正控制組的 MMC 亦僅輕微的抑制 20.4 % 之 CHO 細胞存活率。

B. 細胞分裂係數(MI) :

如圖二和圖三所示, 硝酸鎘(Cadmium Nitrate)從 3.0×10^{-4} 至 1.0×10^{-2} mM 均能使 MI 值有意義地降低, 但硝酸鉛(Lead Nitrate) 在濃度 1.0×10^{-3} mM 和 3.0×10^{-3} mM 卻有意義地增加 MI 值。

C. 微小核(MN) :

如表一所示, 任何試驗濃度之硝酸鎘(Cadmium Nitrate)和硝酸鉛(Lead Nitrate)均未有意義的增加雙核細胞中微小核(圖四)之數目, 但 MMC 則顯著增加之。

D. 染色體變異(CAs)

如表二和圖五至九所示硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 在濃度 (mM) 1.0×10^{-3} 和 3.0×10^{-3} 和 MMC 相似產生突變性，這種致突變性包括染色體斷裂(Breaks；圖五)，雙中心節(Dicentric；圖六)，無中心節(Acentric；圖七)，染色體間交換(interchange；圖七)，染色體粉碎(pulverization；圖八)及內重複製(Endoreduplication；圖九)但 Pulverization 及 Endoreduplication 不包含在 CAs 分析範圍內，硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) 的其他濃度 (mM) 1.0×10^{-4} 和 3.0×10^{-4} 及硝酸鉛(Lead Nitrate)之各種濃度對 CAs 並無顯著改變，但所出現染色體變異情況與負控制組(Control)有所不同(表二)。

E. 姐妹染色分體交換率(SCEs)

如表三及圖十至十三所示，硝酸鎘 (Cadmium Nitrate) (3.0×10^{-4} 至 3.0×10^{-3} mM)及硝酸鉛(Lead Nitrate) (3.0×10^{-3} 至 3.0×10^{-2} mM)均會有意義地增加 SCEs 之值。事實上，硝酸鎘 (Cadmium Nitrate)與 MMC 在濃度均為 3.0×10^{-4} mM 時，其所造成 SCEs 值相當，而硝酸鉛則需更高之濃度($\geq 3.0 \times 10^{-3}$ mM)才能有意義地提升 SCEs 之值，由以上結果顯示硝酸鎘(Cadmium Nitrate)引起 SCEs 之效力大於硝酸鉛(Lead Nitrate) (約大於 10 倍)

討論(Discussion)：

在本研究中，硝酸鎘(Cadmium Nitrate)和硝酸鉛(Lead Nitrate)兩者均能降低 CHO 細胞的存活率(Viability)，但是抑制的形態卻不相同，硝酸鎘(Cadmium Nitrate)以濃度相關的型式(Concentration-Related Fashion)降低 CHO 細胞的存活率，但硝酸鉛(Lead Nitrate)所顯示的只是稍微的抑制。然而以 Trypan Blue 來研究細胞的存活率，可能無法正確的估計細胞族群的反應，所以有必要更進一步以較精確的檢測方式來研究，例如 Cloning Efficiency。有關 MI 值的研究，我們發現硝酸鎘(Cadmium Nitrate)能抑制 MI 值，鎘離子之此種結果與先前 Lakkad et al.(1986)在 CHO 細胞以及 Zhang 和 Yang(1994)在 *Hordeum Vulgare* 之研究有相似的結果，既然鎘(Cadmium)對硫氫基(Sulfhydryl Ligands)有較高的親和性(Vanlina et al. 1978; Lin-Shiau and Fu; 1980)所以如 Lakkad et al. (1986)所主張鎘(Cadmium)與形成紡錘體(Spindle)之蛋白質(Spindle Forming Protein)的硫氫基(Sulfhydryl Group)之交互作用可能是造成鎘(Cadmium)影響細胞分裂之原因。相較而言，較低濃度之硝酸鉛(Lead Nitrate)卻能導致明顯增加 MI 值，此和 Columbano et al. (1983)之報告有相似結果，其發現硝酸鉛(Lead Nitrate)可促使在

大鼠肝臟細胞(Hepatic Cell)之 MI 值增加，然而 Hessler(1975)提出報告指出氯化鉛(Lead Chloride)對某些藻類能延緩其細胞分裂。對這種不同的結果我們認為部份可能是因參與反應的陰離子和所使用之試驗系統不同所造成。

在遺傳毒性(Genotoxicity)方面之研究，只有高濃度($\geq 1.0 \times 10^{-3}$ mM)之硝酸鎘(Cadmium Nitrate)能引起明顯之染色體變異(CAs)，且其變異主要為染色分體形態(Chromatid Type)。此與 Rohr 和 Bauchinger(1976)以 0.1mM 硫酸鎘(Cadmium Sulfate)處理 CHO 細胞，以及 Gasiorek 和 Bauchinger(1981)以 0.01mM 和 1mM 醋酸鎘(Cadmium Acetate)處理人類淋巴球細胞(Human Lymphocyte)所得之研究報告相吻合。此外，Lakkad et al. (1986)提出氯化鎘 (Cadmium Chloride)($\geq 0.1 \mu\text{g/ml}$) 能使 CHO 細胞之 CAs 值增加，此種結果顯示在體外實驗，鎘所造成之染色體變異(CAs)似乎與陰離子無關。

雖然 Berces et al.(1993)報告鎘離子在人類淋巴球可增加微小核數，Jagetia 和 Adiga(1994)在小白鼠骨髓細胞之研究亦得到相似之結果。但在本研究中，硝酸鎘和硝酸鉛兩者在微小核(MN)實驗之觀察並無類似反應，雖然微小核(MN)的形成是由染色體斷裂(Chromosome Break)

和紡錘體異常(Spindle Dysfunction)所造成的，但在本研究中發現微小核(MN)和染色體變異(CAs)之間無一致性，此種結果可由 Carrano 和 Heddle (1973)所提出：並非所有染色體變異均能以微小核(Micronuclei)之形式表現出來，以及 Wakata 和 Sasaki (1987)所提出：單一之微小核(Micronucleus)並非僅由單一延遲性染色體或染色體片段(Lagged Chromosome or Chromosome Fragment)所形成來加以解釋。就本實驗所採用之各種遺傳毒性試驗加以比較，硝酸鉛和硝酸鎘為較強之 SCEs 活性誘導物(Active Inducers)而其誘發 MN 和 CAs 遺傳毒性之作用則較弱。

本研究顯示 SCEs 仍是重金屬造成遺傳性改變之最敏感指標，Wulf (1982)亦提出一般化學物質造成 SCEs 增加之劑量較引起染色體變異(CAs)之劑量低。在本研究，事實上硝酸鎘(Cadmium Nitrate)誘發 SCEs 之能力與 Mitomycin C (MMC)相似，且遠比硝酸鉛(Lead Nitrate)更具效力。Mitomycin C 是已知的生物功能烷基化劑(Biofunctional Alkylating Agent)，其能和 DNA 產生交叉連結，因而影響核酸(Nucleic Acid)之合成和功能(Crooke and Bradner,1976)。現在亦知鎘對 DNA 氮鹼基亦具有親和力(Goodgame et al,1975)。基於以上之論點，我們

推論硝酸鎘(Cadimium Nitrate)和 Mitomycin C 相似，具有直接與 DNA 作用之能力，因此導致高頻率之 SCEs 值。

雖然目前對於金屬導致細胞遺傳毒性(Cytogenetic Toxicity)之機制尚有爭議，但鉛(Lead)能與三級結構之核酸和蛋白質上磷酸根產生共價結合反應是被確定的(Bremmer,1974;Goyer et al.,1970;Holtzman et al.,1984)。此外，氯化鉛(Lead Chloride)不僅曾被指出在體外實驗下能影響 DNA 合成的準確度(Sirover and Loeb,1976)亦被指出能抑制體內之 DNA，RNA 和蛋白質之合成 (Skreb and Habazin-Novak,1975;Degawa et al.,1993)。Roy 和 Rossman(1992)根據其在中國倉鼠 V79 細胞之研究結果認為鉛可抑制 DNA 的修復。

鎘(Cadmium)對硫氫基(Sulphydryl Ligands)具較高之親和力(Lin-Shiau and FU,1980;Vanlina et al.,1978)，此特性使鎘(Cadmium)能和蛋白質及核酸產生交互作用 (Goodgame et al.,1975;Jacobson and Turner,1980;Morselt et al.,1983)。除此之外，Tokushige et al.(1984)提出鎘(Cadmium)能強烈抑制鈉幫浦($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase)之活性，鎘(Cadmium)對細胞膜構造和功能之毒性亦在 Sorensen et al.(1985)和 Kunimoto et al.(1986)之報告中被指出。以上這些鎘(Cadmium)和鉛(Lead)之特性可能是其導致細胞遺傳毒性之因素。

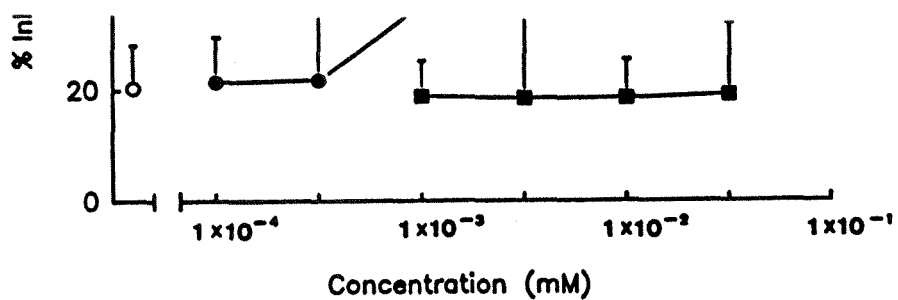


Fig. 1. Concentration-inhibition curves of cadmium nitrate and lead nitrate on viability of CHO cells in the absence of metal salt represents 100%(control) ●—●, Cadmium nitrate; ■—■, lead nitrate; ○, Mitomycin C (3.0×10^{-4} mM). Data are show as mean \pm S.E.

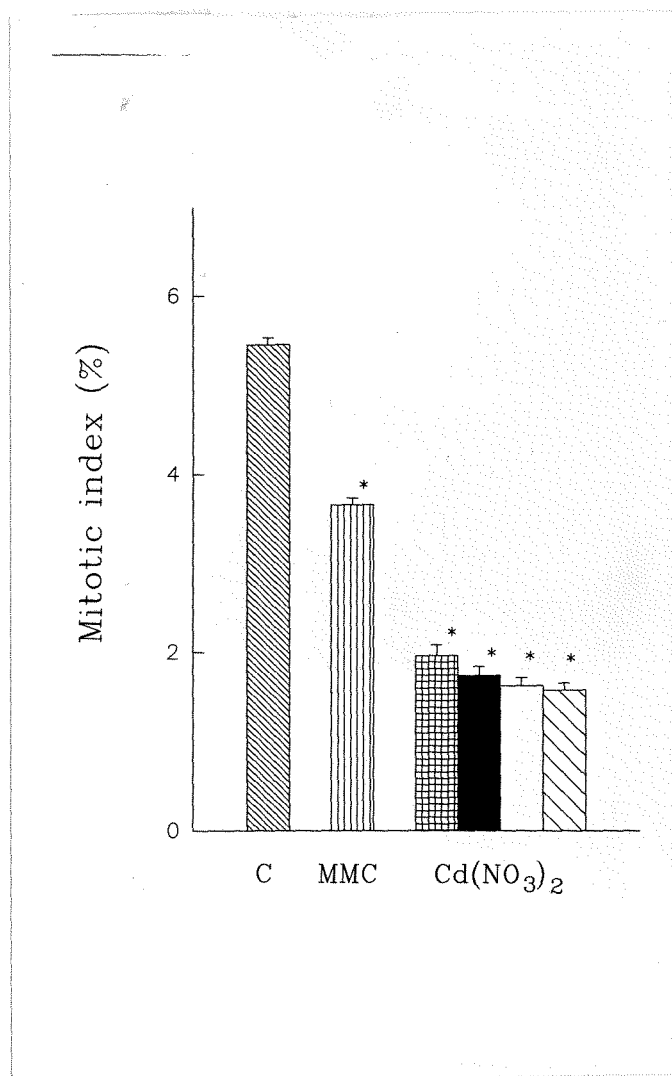


Fig2. Effects of 0.3 μ M mitomycin C (MMC) and 0.1-3.0 μ M cadmium nitrate [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$] on mitotic index (MI) in CHO cells.

■, control; ▨, MMC; ▩, 0.1 μ M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$; ■, 0.3 μ M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$; □, 1 μ M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$; ▨, 3 μ M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$

Data are shown as mean \pm S.E.

* $P < 0.05$ as compared with control.

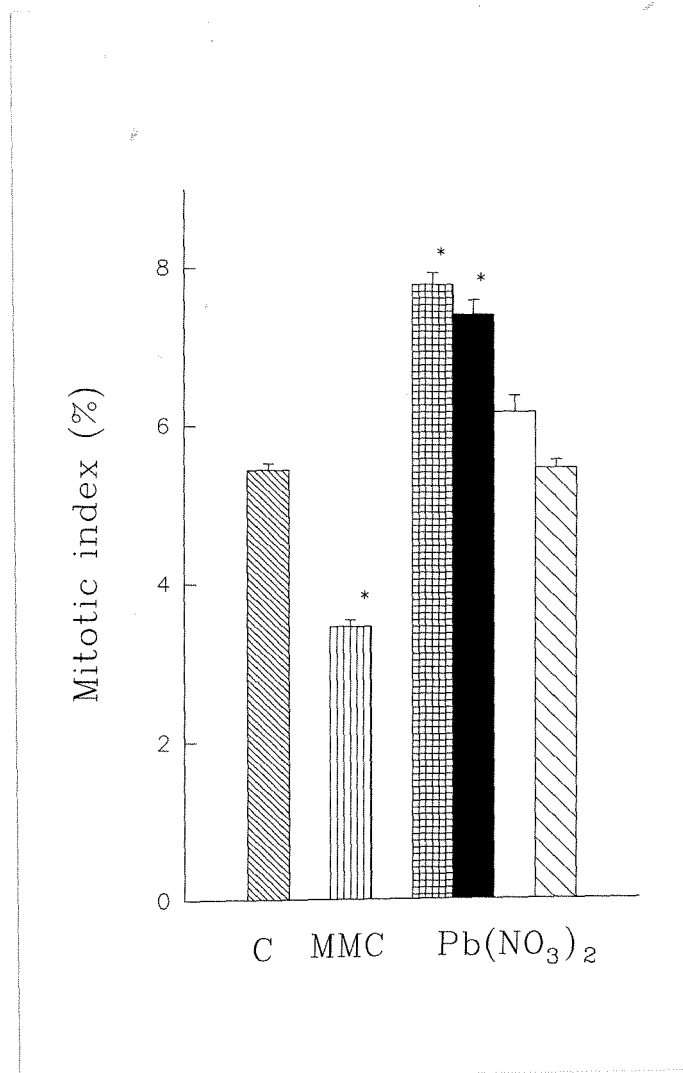


Fig.3. Effects of 0.3 μ M mitomycin C(MMC) and 1-30 μ M lead nitrate [Pb(NO₃)₂] on mitotic index(MI) in CHO cells.
 ■, control; ▨, MMC; ▩, 1 μ M Pb(NO₃)₂; ■, 3 μ M Pb(NO₃)₂; □, 10 μ M Pb(NO₃)₂; ▨, 30 μ M Pb(NO₃)₂.

Data are shown as mean \pm S.E.
 * P < 0.05 as compared with control.

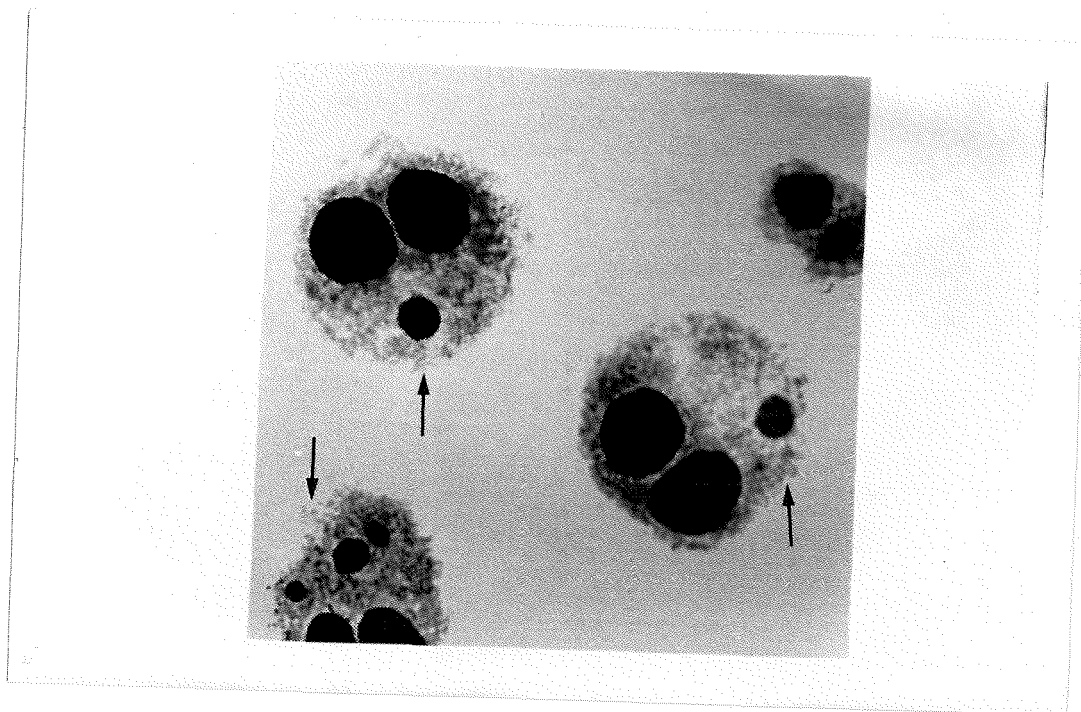


Fig.4. Photomicrograph illustrating binucleated CHO cells with micronucleus or micronuclei (arrows) induced by $0.3 \mu\text{M}$ mitomycin C. 1000X.

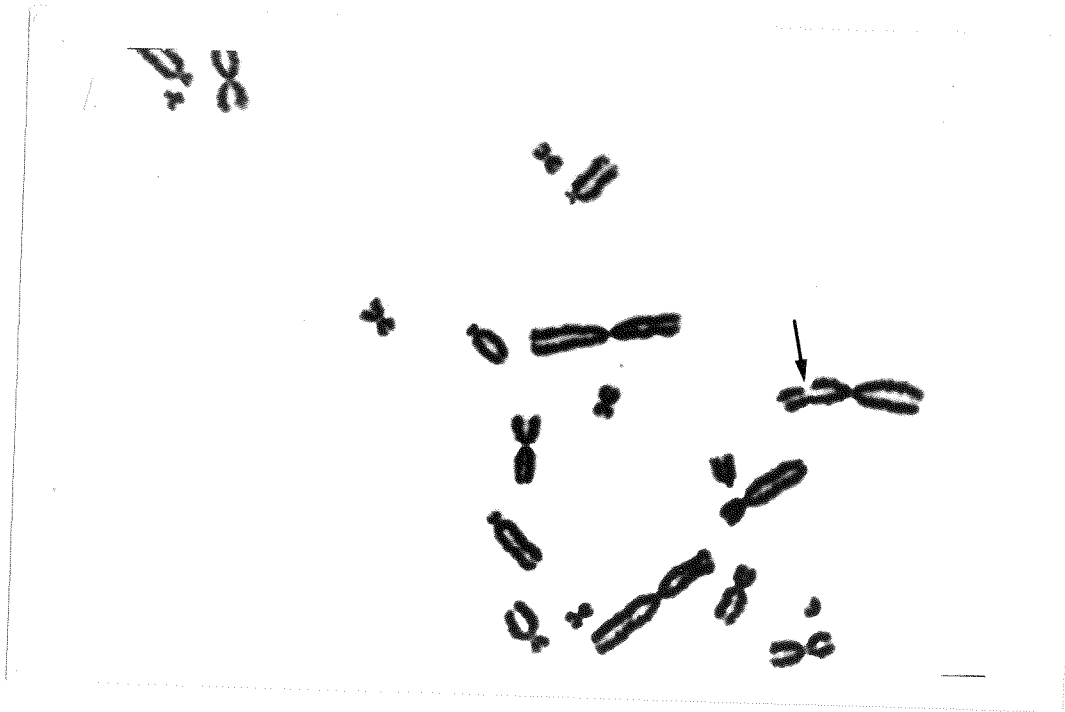


Fig.5. Photomicrograph illustrating chromatid break (arrow) induced by $1 \mu\text{M}$ cadmium nitrate in CHO cell following a 2hrs treatment. 1000X.

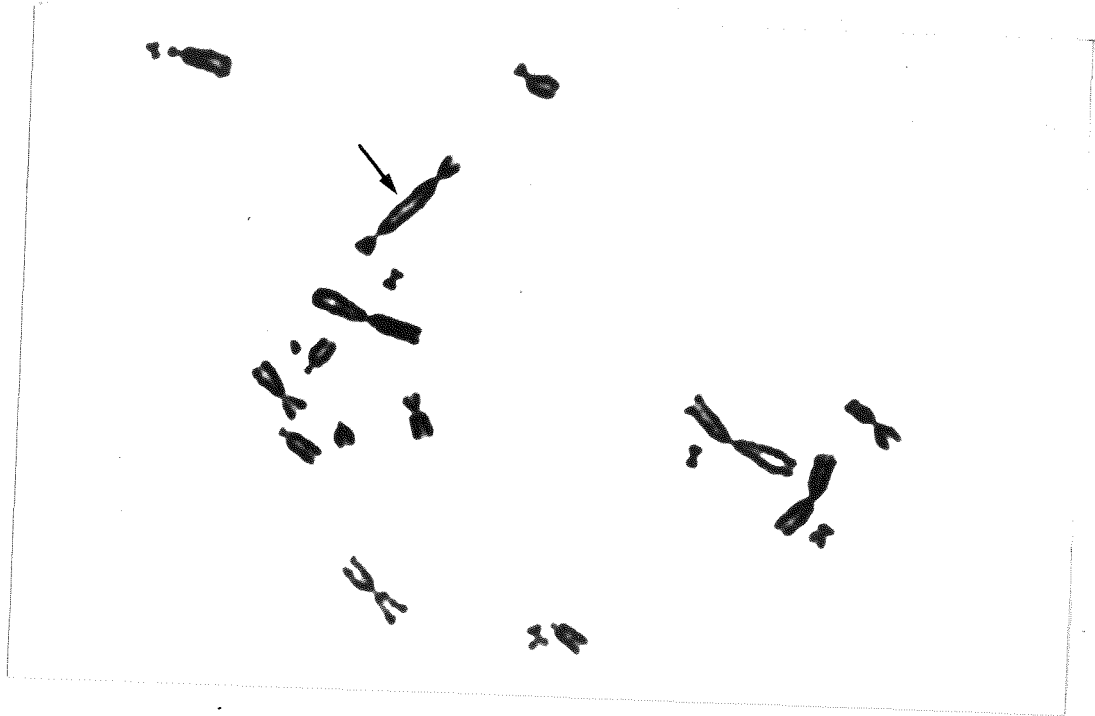


Fig.6. Photomicrograph illustrating dicentric (arrow) induced by $1 \mu\text{M}$ cadmium nitrate in CHO cell following a 2 hrs treatment. 1000X.



Fig.7. Photomicrograph illustrating acentric and interchange (arrows) induced by 1μ M cadmium nitrate in CHO cell following a 2 hrs treatment. 1000X.

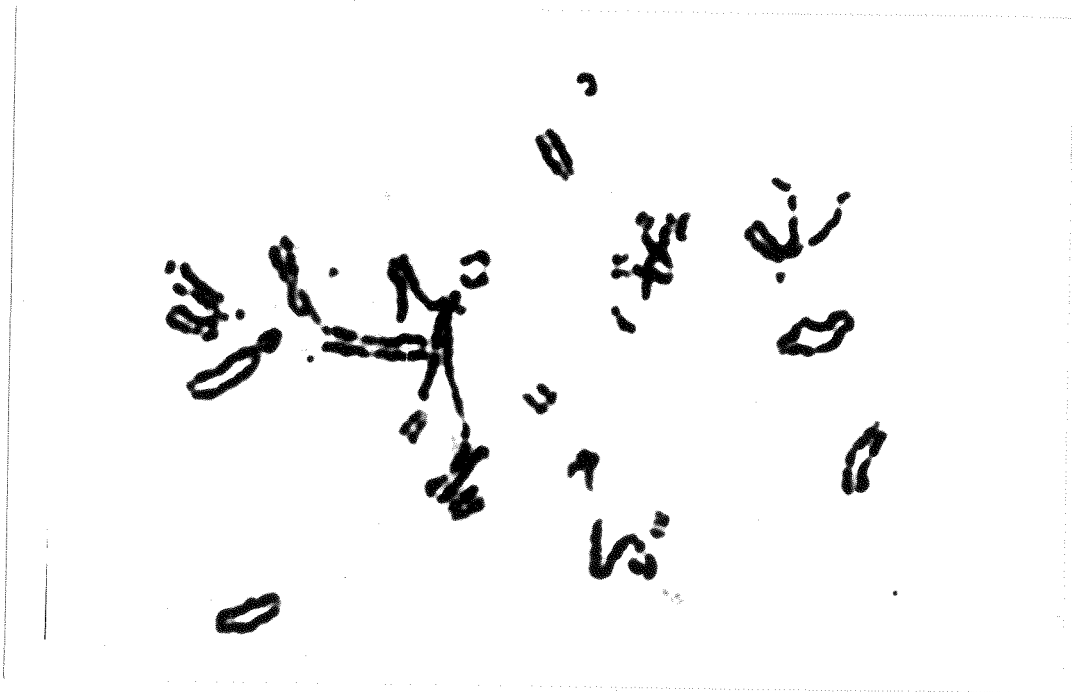


Fig.8. Photomicrograph illustrating pulverization induced by 1μ M cadmium nitrate in CHO cell following a 2 hrs treatment. 1000X.

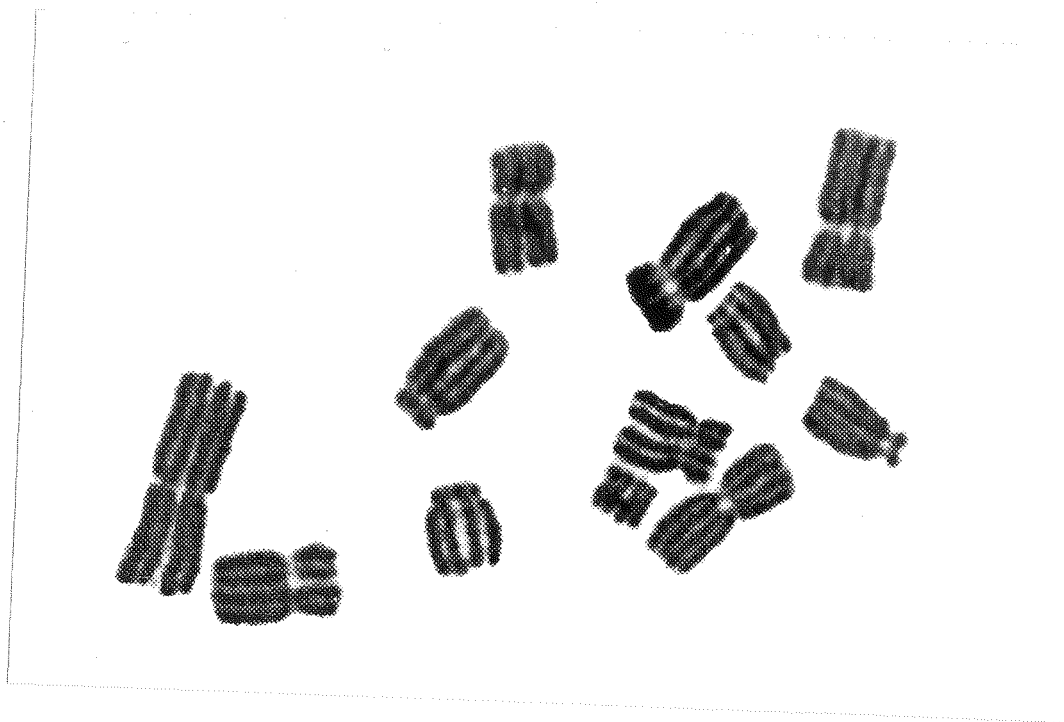


Fig.9. Photomicrograph illustrating endoreduplications induced by 3μ M cadmium nitrate in CHO cell . Endoreduplication is a specialised type of doubling of chromosomal material, in which cells pass directly from G_2 into the next S-phase without undergoing mitosis or G_1 . The appearance of endoreduplicated mammalian cells is very striking, as the chromosomes are in pairs of identical copies. 1000X.



Fig.10. Photomicrograph illustrating sister chromatid exchanges of control in CHO cell. 1000X.



Fig.11. Photomicrograph illustrating sister chromatid exchanges induced by 0.3μ M Mitomycin C in CHO cell. 1000X.

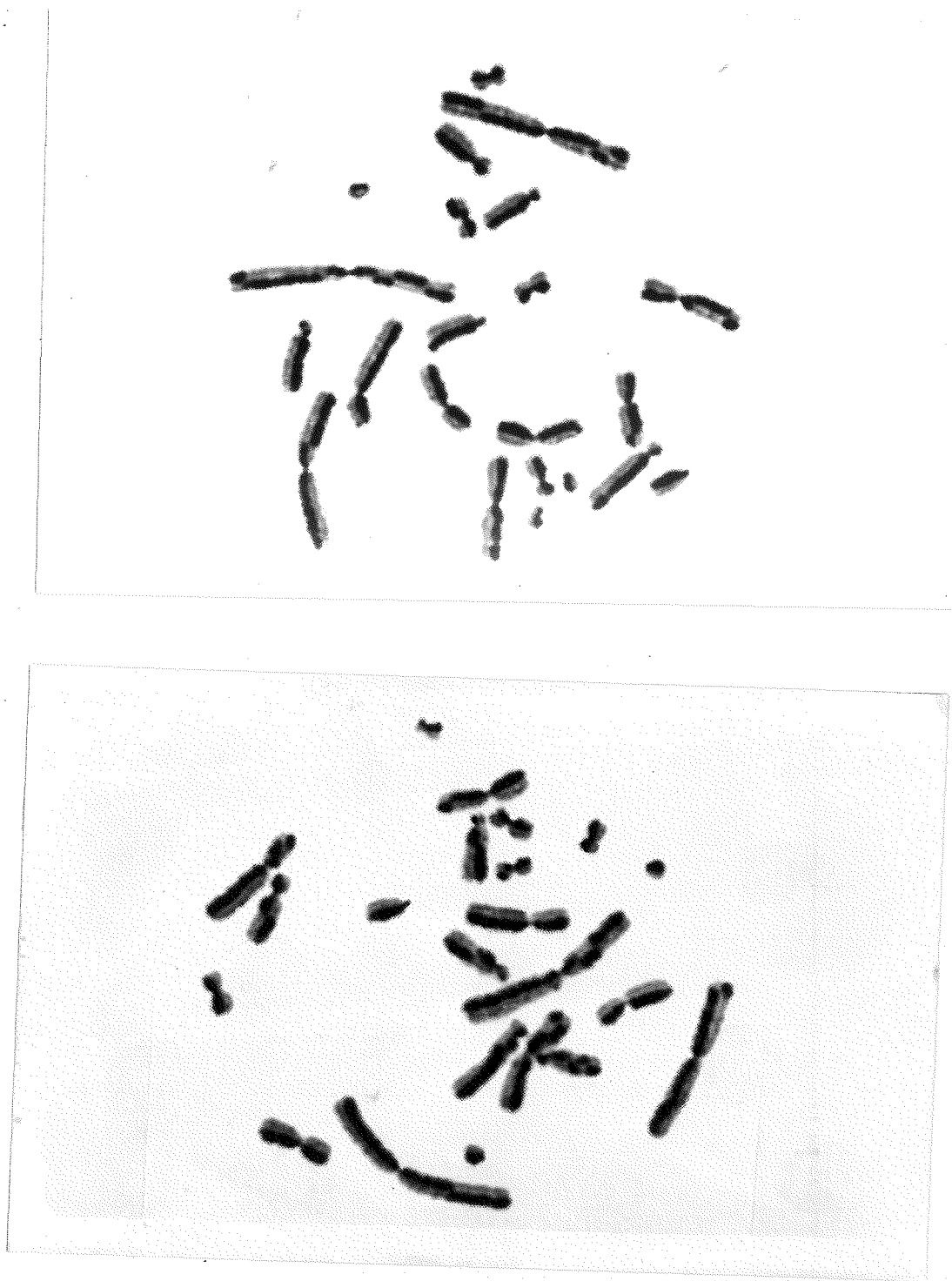


Fig.12. Photomicrographs illustrating sister chromatid exchanges induced by cadmium nitrate (A panel : $1 \mu M$, B panel: $3 \mu M$) in CHO cell. 1000X.



Fig.13. Photomicrographs illustrating sister chromatid exchanges induced by lead nitrate (A panel : $10 \mu M$, B panel: $30 \mu M$) in CHO cell. 1000X.

TABLE I. Effects of Cadmium Nitrate and Lead Nitrate on Micronuclei
in CHO cells

Treatment	Concentration (mM)	Number of micronucleated cells / 1000 binucleated cells
Control	-	10.25 ± 0.35 (7-11)
Mitomycin C	3.0 × 10 ⁻⁴	25.68 ± 0.74* (22-34)
Cadmium Nitrate	3.0 × 10 ⁻⁴	10.29 ± 1.03 (7-13)
	1.0 × 10 ⁻³	10.20 ± 1.29 (7-13)
	3.0 × 10 ⁻³	10.25 ± 1.03 (6-13)
	1.0 × 10 ⁻²	10.14 ± 0.46 (7-13)
Lead Nitrate	1.0 × 10 ⁻³	10.40 ± 0.68 (7-14)
	3.0 × 10 ⁻³	10.14 ± 0.72 (8-13)
	1.0 × 10 ⁻²	10.25 ± 0.74 (6-14)
	3.0 × 10 ⁻²	10.20 ± 0.82 (7-13)

* P < 0.05 as compared with control.

Data are shown as mean ± S.E..

Number in the parenthesis are the range of micronucleated cell number.

TABLE II . Effects of Cadmium Nitrate and Lead Nitrate on Chromosome Aberrations in CHO Cells.

Treatment	Concentration (mM)	Chromosome aberrations ^a							% Aberrant cells
		Chromatid breaks	Chromosome breaks	Acentrics	Dicentrics	Interchanges	Rings		
Control	—	2	1	1	—	—	—	3	
Mitomycin C	3.0×10^{-4}	9	3	2	2	2	—	12*	
Cadmium Nitrate	1.0×10^{-4}	2	—	1	—	—	2	4	
	3.0×10^{-4}	2	1	1	1	—	—	4	
	1.0×10^{-3}	19	1	1	4	2	—	16*	
Lead Nitrate	3.0×10^{-3}	15	2	2	4	2	—	13*	
	1.0×10^{-3}	2	—	—	2	1	—	3	
	3.0×10^{-3}	1	1	1	1	—	1	4	
	1.0×10^{-2}	2	1	1	1	—	—	4	
	3.0×10^{-2}	3	1	—	1	—	—	3	

* P < 0.05 as compared with control.

a. Total 100 well spread metaphase from each treatment dose were counted for chromosome aberrations.

TABLE I . Effects of Cadmium Nitrate and Lead Nitrate on Sister Chromatid Exchanges in CHO Cells.

Treatment	Concentration (mM)	No. of chromosome	No. of SCE	SCE per chromosome (mean \pm S.E.)	SCE per cell (mean \pm S.E.)
Control	—	2118	750	0.354 \pm 0.003	7.50 \pm 0.07
Mitomycin C	3.0 \times 10 ⁻⁴	2102	1460	0.695 \pm 0.004 *	14.39 \pm 0.9 *
Cadmium Nitrate	1.0 \times 10 ⁻⁴	2326	750	0.322 \pm 0.003	7.48 \pm 0.06
	3.0 \times 10 ⁻⁴	2118	1530	0.722 \pm 0.007 *	16.36 \pm 0.14*
	1.0 \times 10 ⁻³	2132	1536	0.720 \pm 0.008 *	15.35 \pm 0.16*
	3.0 \times 10 ⁻³	2086	1502	0.720 \pm 0.007 *	15.60 \pm 0.12*
Lead Nitrate	1.0 \times 10 ⁻³	2114	740	0.350 \pm 0.004	7.30 \pm 0.08
	3.0 \times 10 ⁻³	2086	1092	0.523 \pm 0.004 *	10.90 \pm 0.08*
	1.0 \times 10 ⁻²	2132	1858	0.871 \pm 0.008 *	18.57 \pm 0.16*
	3.0 \times 10 ⁻²	2118	1714	0.809 \pm 0.006 *	17.13 \pm 0.13*

* P < 0.005 as compared with control.

REFERENCES

- Adler ID (1993): Synopsis of the in vivo results obtained with the 10 known or suspected aneugens tested in the CEC collaborative study. *Mutat Res* 287:131-137.
- Bauchinger M, Schmid E (1972): Chromosome analysis of cultures of Chinese hamster cells after treatment with lead acetate. *Mutat Res* 14:95-100.
- Beek B, Obe G (1974): Effect of lead acetate on human leucocyte chromosome in vitro experientia 30:1006-1007.
- Berces J, Otos M, Szirmai S, Crane-Uruena C, Koteles GJ (1993): Using the micronucleus assay to detect genotoxic effects of metal ions. *Environ Health Persp* 101 Suppl 3:11-13.
- Bremmer I (1974): Heavy metal toxicities. *Rev Biophys* 7:75-124.
- Carrano AV, Heddle JA (1973): The fate of chromosome aberrations. *J Theor Biol* 38:289-304.
- Columbano A, Ledda GM, Sirigu P, Perra T, Pani P (1983): Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate. *Am J Pathol* 110:83-88.
- Countryman P, Heddle J (1976): The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 41:321-332.
- Crooke ST, Bradner WT (1976): Mitomycin C: A review. *Cancer Treat Rev* 3:121-139.

- Degawa M, Arai H, Miara S, Hashimoto Y (1993): Preferential inhibitions of hepatic P450IA₂ expression and induction by lead nitrate in the rat. *Carcinogenesis* 14:1091-1094.
- Fenech M, Morley AA (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147:29-36.
- Gasiorek K, Bauchinger M (1981): Chromosome changes in human lymphocytes after separate and combined treatment with divalent salts of lead, cadmium and zinc. *Environ Mutagen* 3:513-518.
- Goodgame DM, Jeeves I, Reynolds CD, Skapski AC (1975): Heavy metal pyrimidine nucleotide interaction: X-ray structure of a cadmium derivative of cytidine 5'-monophosphate. *Nucleic Acids Res* 2:1375-1380.
- Goyer RA, May P, Cates MM, Krigman MR (1970): Lead and protein content of isolated intranuclear inclusion bodies from kidneys of lead-poisoned rats. *Lab Invest* 22:245-251.
- Heddle JA (1973): A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res* 18:187-190.
- Heddle JA, Carrano AV (1977): The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat Res* 44:63-69.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF (1983): The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat Res* 123:61-118.
- Hessler A (1975): The effects of lead on algae. I. *Mutagenesis*

experiments on platymonas subcordiformis
(Chlorophyta:Volvocales). Mutat Res 31:43-47.

Holtzman D, Devries C, Nguyen H, Olson J, Bensch K (1984):
Maturation of resistance to lead encephalopathy: Cellular and
subcellular mechanisms. Neurotoxicology 5:97-124.

Jacobson KB, Turner JE (1980): The interaction of cadmium and
certain other metal ions with proteins and nuclei acids.
Toxicology 16:1-37.

Jagetia GC, Adiga SK (1994): Cadmium chloride induces dose-
dependent increases in the frequency of micronuclei in mouse
bone marrow. Mutat Res 306:85-90.

Kunimoto M, Miyasaka K, Miura T (1986): Changes in membrane
properties of rat red blood cells by cadmium accumulating in
the membrane fraction. J Biochem 99:397-406.

Lin-Shiau SY, FU WM (1980): Effects of divalent cations on
neuromuscular transmission in the chick. Eur J Pharmacol
64:259-269.

Lakkad BC, Nigam SK, Karnik AB, Thakore KN, Chatterjee BB (1986):
Effect of cadmium chloride on cell division and chromosomes
in Chinese hamster ovary cells. Bull Environ Contam Toxicol
36:342-349.

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

Marrazzini A, Bettic, Bernacchi F,Barrai I,Barale R (1994):
Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to

known and suspected spindle poisons. *Mutagenesis* 9:505-515.

Morselt AFW, Copuis Peereboom-Stegeman JMJ, Jongstra-Spaapen EJ, James J (1983): Investigation of the mechanism of cadmium toxicity at cellular level I. A light microscopical study. *Arch Toxicol* 52:91-97.

Obe G, Beek B, Dudin G (1975): Some experiment on the action of lead acetate on human leucocytes in vitro. *Mutat Res* 29:283.

Paton GR, Allinson AC (1972): Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat Res* 16:332-336.

Perry PE, Wolff S (1974): New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158.

Roberts C, Morgan G, Holt P (1986): A critical comparison of the micronucleus yield from high and low LET irradiation of plateau-phase cell populations. *Mutat Res* 87:143-188.

Rohr G, Bauchinger M (1976): Chromosome analysis in cell cultures of the Chinese hamster after application of cadmium sulfate. *Mutat Res* 40:125-130.

Roy NK, Rossman TG (1992): Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat Res* 298:97-103.

Schmid E, Bauchinger M, Pitruck S, Hall G (1972): Cytogenetic action of lead in human peripheral lymphocytes in vitro and in vivo. *Mutat Res* 16:401-406.

Schmid W (1976): Principles and methods for the detection, Hollaender A(ed.), Plenum Publishing Corporation, New York.

In chemical Mutagens.4:31-65.

Shindo Y, Hirano F, Maeda H, Takeda U (1983): The micronucleus test with mouse spleen cells. *Mutat Res* 121:53-57.

Shiraishi Y, Kurahashi H, Yoshida TH (1972): Chromosomal aberrations in cultured human leucocytes induced by cadmium sulfide. *Proc Jpn Acad* 48:133-137.

Sirover MA, Loeb LA (1976): Metal activation of DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 70:812.

Skreb Y, Habazin-Novak V (1975): Reversible inhibition Of DNA, RNA and protein synthesis in human cells by lead chloride. *Toxicology* 5:167-174.

Sorensen EM, Acosta D, Nealon DG (1985): Effect of cadmium and calcium on the fluidity of plasma membranes. *Toxicol Lett* 25:319-326.

Tates AD, Neuteboom I, Hofker M (1980): A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. *Mutat Res* 74:11-20.

Tokushige A, Higashino H, Searle BM, Tamura H, Kino M, Bogden JD, Aviv A (1984): Cadmium effect on the Na⁺-K⁺ATPase system in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 6:20-26.

Umeda M, Nishimura N (1979): Inducibility of chromosomal alterations by metal compounds in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 67:221-229.

Vanlina EN, Anikieva ID, Kogan IG(1978): Effect of cadmium ion on cell division in the root meristem of *Crepis capillaris* L. *Tsitol Genet* 12:497.

Venitt S, Parry JM(1984): Mutagenicity testing

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

Wulf HC (1980): Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to nickel and lead. *Danish Med Bull* 27:40-42.

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

Zhang Y, Yang X (1994): The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum Vulgaris*. *Mutat Res* 312:121-126.

授 權 書

本人所撰(著) 八十四學年度第一學期私立中山醫

學院 醫學

醫學研究所 碩 博

士學位論文(論文明稱)

重金屬對中國倉鼠
細胞系之細胞遺傳
毒性之研究

之提要 同意 不同意
開放供學術利用。

姓名：李怡靜

立書人：地址：台中市大度街二段113号

身分證統一編號：L220932970

聯絡電話：(04)3896190-12411

中華民國 85年 2月 3日