

R
008.8
3825
87

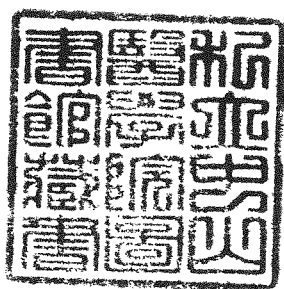
中山醫學院毒理學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Toxicology,
Chung Shan Medical and Dental College

指導教授：陳文貴 教授 (Wen-Kang Chen Professor)

環境中特定有機與無機物質對細胞毒性 交互作用之探討

(The Effects of Organic and Inorganic
Environmental Chemicals on Cell Toxicity)



研究生：游維哲 (Wei-Che Yu) 撰

中華民國八十七年七月 (July 1998)



參考書恕不外借

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 毒理學研究所
_____ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：環境中特定有機與無機物質對細胞毒性交互作用之探討

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：陳文貴

研究生簽名：游維哲 學號：R85508
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 7 月 30 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：游維哲 聯絡電話：_____

地址：高雄市苓雅區興中二路八號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院毒理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：

臺灣大學醫學院
生物化學研究所教授

呂鋒洲 教授

呂鋒洲

清華大學
原子科學研究所教授

鐘 堅 教授

鐘 堅

中山醫學院
公共衛生學系副教授

郭崇義 副教授

郭崇義

中山醫學院
生物化學研究所副教授

李衍彰 副教授

李衍彰

中山醫學院
毒理學研究所教授
(本論文指導教授)

陳文貴 教授

陳文貴

中華民國八十七年六月

學生游維哲論文題目為環境中特定有機與無機物質對細胞毒性交互作用之探討，其論文已經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並經由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：陳文貴 教授

簽名：陳文貴

中華民國八十七年七月

誌 謝

短短兩年的研究生涯，轉眼間已成過去，回首過往無論在實驗上或生活上的點點滴滴，將會深刻印入我心。雖然在研究期間，實驗的失敗挫折，常會使人灰心喪志，但我深信辛苦總是會有代價的。

能夠順利完成此論文要感謝的人實在太多，首先要感謝指導老師陳文貴教授，在學習期間引導我實驗的方向及嚴謹的研究精神，並給予我為人處世的態度。文稿初成，復蒙台大醫學院生物化學研究所 呂鋒洲教授、清華大學原子科學研究所 鐘堅教授及中山醫學院公共衛生學系 郭崇義副教授之撥冗審閱，對本論文細心審查，詳加斧正，並提供諸多寶貴意見，在此致上誠摯謝意。

另外，感謝 李衍彰副教授除了對本論文詳加批閱指正外，在研究的過程中，灌輸我許多實驗上寶貴的建議，特別感謝胡超群老師在實驗上的協助、指導外，也讓我學習到研究以外的生活經驗，感謝張育超醫師的幫助；還有所上的老師們，謝謝您們在課業上的熱心教導，以及使我受惠的師長們，讓我在這兩年的生涯中受益匪淺。

同時實驗室的伙伴們，由衷感謝郭銘宏學長和時時關懷我的游景男學長，對我在實驗上的幫助及技術指導，徐再靜學姐對細胞週期測定之幫忙，而對於同儕彥敏、培湖、志昌、佳芳，還有一群可愛的學弟妹們，林吳、朝祿、方萍、暉真、欽誌、俊發、依潔，謝謝你們在實驗上的協助與關心，並使實驗室裏增添許多歡笑和色彩。同時感謝同窗兩年的同學們，有你們一起同甘共苦走過的日子，並向所有關心過我的人表示誠心誌謝。

最後，謹以此論文獻給我的父母親及家人，感謝您們的支持及精神上的鼓勵，使我得以專心完成學業，並且更要感激一起陪我渡過難關的育英。

游維哲 謹誌於
中山醫學院毒理學研究所
中華民國八十七年七月三十日

目 錄

	頁碼
中文摘要	1
英文摘要	3
緒論	5
實驗材料	12
實驗方法	15
結果分析	27
討論	34
結論	39
參考文獻	40

附圖(表)

圖 1 a,b,c :利用 Trypan blue exclusion assay 探討不同時間與劑量之 氯化鎘與乙醛單一和共同暴露對 V79 細胞毒性影響.....	51-53
圖 2 a,b,c :利用 MTT assay 探討不同時間與劑量之氯化鎘與乙醛單 一和共同暴露對 V79 細胞代謝活性影響.....	54-56
圖 3 :氯化鎘與乙醛單一和共同暴露對 V79 細胞生長情形之影 響.....	57
圖 4 a,b,c :氯化鎘與乙醛單一和共同暴露影響 V79 細胞在細胞週期 之分佈.....	58-60
圖 5 :氯化鎘與乙醛單一和共同暴露對 V79 細胞 DNA 單股斷裂傷 害情形之影響.....	61

圖 6 a,b :氯化鎘與乙醛單一和共同暴露對 V79 細胞脂質過氧化傷害程度之影響.....	62-63
圖 7 :氯化鎘與乙醛單一和共同暴露對 V79 細胞的 mitochondria membrane potential 之傷害影響.....	64
圖 8 :不同濃度之 Glycyrrhizin 暴露於 V79 細胞對 MTT 細胞活性之影響.....	65
圖 9 :不同濃度與時間之 Quercetin 暴露於 V79 細胞對 MTT 細胞活性之影響.....	66
圖 10 :預處理 Glycyrrhizin 對乙醛與氯化鎘共同暴露後其 V79 細胞脂質過氧化傷害程度之影響.....	67
圖 11 :預處理 Quercetin 對乙醛與氯化鎘共同暴露後其 V79 細胞脂質過氧化傷害程度之影響.....	68
圖 12 :預處理 Glycyrrhizin 對乙醛與氯化鎘共同暴露後其 V79 細胞 mitochondria membrane potential 之傷害影響.....	69
圖 13 :預處理 Quercetin 對乙醛與氯化鎘共同暴露後其 V79 細胞 mitochondria membrane potential 之傷害影響.....	70
圖 14 :Quercetin 之化學結構.....	71
圖 15 :Glycyrrhizin 之化學結構.....	72
圖 16 :不同劑量乙醛之 colony assay 照片.....	82
圖 17 :不同劑量氯化鎘之 colony assay 照片.....	82
圖 18 :共同暴露乙醛(1mM)與氯化鎘(10 μ M)之 colony assay 照片.....	83
圖 19 :共同暴露乙醛(2.5mM)與氯化鎘(10 μ M)之 colony assay 照片.....	83

圖 20 :單一與共同暴露乙醛(2.5mM)與氯化鎘(10 μ M)對細胞產生致突變結果照片.....	84
圖 21 :Control 組與 Positive control 組對細胞產生致突變結果照片.....	85
表一:以 Trypan blue exculsion assay 之結果分析對 V79 細胞其預期與實際相對致死率之差異.....	73
表二:以 MTT 之結果分析對 V79 細胞其預期與實際抑制細胞活性之差異.....	74
表三:以 colony assay 分析 V79 細胞在乙醛與氯化鎘單一與共同暴露對細胞毒性之影響.....	75
表四:以 colony assay 之結果分析對 V79 細胞其預期與實際相對致死率之差異.....	76
表五 :以 HPRT 分析 V79 細胞在乙醛與氯化鎘單一與共同暴露對細胞致突變之影響.....	77
表六 :以 HPRT 之結果分析對 V79 細胞其預期與實際產生致突變之差異.....	78
表七 :V79 細胞內之重金屬含量測定.....	79
表八:以脂質過氧化之結果分析對 V79 細胞其預期與實際產生脂質過氧化傷害程度之差異.....	80
表九 :GFAAS 測定鎘元素之基本設定條件.....	81
表十 :GFAAS 分析鎘其昇溫條件及基質修飾劑.....	81

中文摘要

現有對環境毒物、毒性之評估與規範多只針對單一化學物質，鮮少考量在數種環境特定化學物質共同曝露時對人體之危害。而事實上在現實環境中，人體極可能同時暴露與吸收數種環境毒物，而其間對人體之危害亦可能互相拮抗或加強之效應，有必要結合現在對環境毒物了解進一步探討在數種化學物質共同暴露下對生物體所造成之加成毒性機轉。本研究特別選取無機與有機之特定化學物質，一為氯化鎘：環境與勞工作業時常易接觸之有害污染物，另一為乙醛：環境與工業上常見之有機污染物，亦為酒精在生物體中之初步代謝物，以 V79 細胞株探討此二種化學物質，在共同暴露時對細胞與基因毒性之複合效應。本實驗先以 Trypan blue exclusion assay 觀察到單一暴露在氯化鎘 10~50 μ M 或乙醛 1~5mM 下，V79 細胞存活率均在 80% 以上，但在共同暴露下其存活率則降低為 70%，再以 MTT 方法觀察對細胞活性之抑制作用亦有類似的結果。接著利用 colony efficiency assay 觀察長時間下之毒性效應，發現乙醛和氯化鎘共同暴露下有明顯的細胞複合毒性，其致死率為預期致死率的 2 倍，而在 HPRT assay(基因毒性檢驗)下亦表現明顯的複合效應。進一步觀察在單一與共同暴露乙醛和氯化鎘四小時後，對細胞生長的影響，發現細胞生長所受到之抑制作用，單一種暴露比共同暴露有較快之生長回復的現象，再利用 flow cytometry 觀察細胞週期變化，發現與控制組相比，共同暴露乙醛和氯化鎘會嚴重導致細胞週期的改變。又由重金屬含量測定得之，細胞內鎘之含量不會因共同暴露乙醛而有所增加。

以 DNA 單股斷裂測定毒物對細胞 DNA 之傷害程度，顯示乙醛和氯化鎘能造成 DNA 單股斷裂的增加，但在共同處理下，並無明顯

加強 DNA 傷害之程度。在脂質過氧化 MDA 實驗觀察到單一或共同暴露乙醛和氯化鎘會使細胞脂質過氧化程度增加，在共同暴露下乙醛會明顯加強鎘所造成的脂質過氧化程度，並有明顯的複合效應，如以天然物中之 free radical scavenger quercetin 預處理則可抑制 MDA 之產生，而以甘草之主成份 glycyrrhizin 則無；由 rhodamine 123 螢光量在 cytoplasm 之變化則顯示在共同暴露下，對 mitochondria plasma membrane 有明顯的損傷作用，但在預處理 quercetin 和 glycyrrhizin 則會抑制其損傷程度，由以上實驗結果顯示共同暴露乙醛和氯化鎘在許多層面上會對 V79 細胞產生明顯的複合毒性，而天然物 Quercetin 和 Glycyrrhizin 則對乙醛和氯化鎘所造成的細胞傷害，能透過不同的機制達到保護的效果。

Abstract

As one of the most potent hazard inorganic substances in our environment, cadmium has been found to have severe toxic and genotoxic effect in animal both in vivo and in vitro system, and even in human a well. On the other hand, acetaldehyde as the cigarette smoke contained substance and the primary metabolite of ethanol is also an extensive organic chemical widely contaminating the environment. Considering the fact that human exposed to various environmental hazardous substances, the synergistic/antagonistic effect of the mixture of environmental pollutants have to be investigated. The goals of this work focus on the co-effect of both cadmium and acetaldehyde (represented the inorganic and organic active environmental pollutants), respectively to V79 cell line in its toxicity and mutagenesis. In addition, because the oxidative stress is one of the main causes of genotoxicity, the in vitro assay of lipid peroxidation by TBA reaction has also been studied. The evaluation of short-term performance of cell viability was studied using trypan blue exclusion and MTT assay.

In the single exposure to cadmium (10-50 μ M) or acetaldehyde(1-5mM) alone, both retain their viability above 80% compared to the control cell. There is no significant enhancement of cytotoxicity in dual exposure. However, the cloning efficiency assay for long-term observation for cell performance has showed a significant synergistic effect on cytotoxicity. Moreover, by counting the cell number growth within 0-72 hours after dual exposure cells from combined exposure have less recovery ability to normal cell growth after dual exposure. And the cell cycle study by flow cytometry assay has showed that the coexposure of cadmium and

acetaldehyde can retain most cells in the G_0/G_1 states.

The mechanism of the synergistic effect is thought due to the enhancement of acetaldehyde to the cadmium entering the cells. We use the atomic absorption spectrometry is used to measure the cadmium in the cells. Results showed that the addition of acetaldehyde yield no enhancement of the entrance of cadmium to the cell.

Comparing with the single exposure, the HPRT gene expression assay showed that the dual exposure enhance their mutagenesis and also exhibit a synergistic effect in certain dose range (cadmium 5-10 μ M, acetaldehyde 1-5mM). But in the assay for DNA single strand breakage had no significant synergistic response. In lipid peroxidation assay, the addition of acetaldehyde significantly increases the TBA formation of cadmium exposed cells. Finally, when introduce the natural antioxidant quercetin and traditional medicine Glycyrrhizin to the exposed cells, the quercetin showed a more potent inhibition to their cytotoxicity and lipid peroxidation formation, while Glycyrrhizin was not.

緒 論

近年來科技之進展，帶給人類物質文明及生活上的急速成長，但相對的環境污染、職業性危害以及人類健康等問題也日益嚴重。目前對於環境毒物之研究，大部分著重於探討單一物質對生物體之危害與其代謝機轉，忽略事實上現實環境中有毒物質並非單一存在，人體極有可能同時暴露與吸收數種環境毒物，而其間對人體之危害亦可能有互相拮抗或加強之效應，但目前極少數人對暴露在數種環境毒物下交互作用與加成毒性進行研究。根據本研究室過去初步探討有機溶劑與重金屬化合物之間，其交互作用是否具有加成毒性，結果發現有機溶劑與重金屬化合物對於細胞具有加成毒性。因此，本篇想更進一步探討特定的有機物質“乙醛”和無機物質“鎘”對細胞毒性之可能的傷害研究。

另一方面，過去許多研究文獻指出，天然物中某些特定的主成份具有預防及治療的效果，因此，本篇針對廣泛存在於蔬菜和水果中的成份 quercetin 與甘草中的成份 glycyrrhizin 對於乙醛與鎘所誘發的加成毒性，是否具有抑制的效果之探討。

一、鎘 (Cadmium)

鎘金屬為稀有元素之一，亦為人體非必需之元素，在地球上岩石中平均含量為 1.5g/t(1)。近年來由於工業的發達，鎘被廣泛的應用在工業上，而主要的用途是製造各種合金的鑄造，又因其無腐蝕的特性使得電鍍業常使用鎘，其他用在陶瓷業、鍛鐵、器械防鏽(油漆、塗料)以及鋼鐵方面的材料…等，都是造成環境污染的重要來源(2)。鎘因其

化學性安定和易於累積轉移的特性，可經由廢水或廢棄物轉移到自然水域或累積在生物體中，而這些被轉移到自然界中的鎘，不僅傷害到動植物，更嚴重地威脅到人類的健康(3)。因此，除了職業上暴露於鎘所引起的健康效應問題，即使是一般族群也可能有鎘暴露的存在，如由飲食而食入鎘，或是抽煙都會造成低劑量鎘暴露(4)。由於鎘污染所導致的事件中，最有名的便是 1970 年日本富山縣神通川流域所發生的“*Itai-Itai disease*” 俗稱痛痛病(5)。

鎘金屬與其化合物為人體的致毒性物質(6)，並且不易從人體排出體外，其生物半衰期大約為 25-30 年(7)，經由流行病學調查指出，經常暴露於鎘金屬的工人罹患癌症比例較正常人高(8)。過去的文獻指出，Takenaka 等人(9)研究發現將鎘利用吸入性方式對大老鼠(rat)作長時間暴露，其結果產生肺癌發生率高達 70%，並且 Waalkes 等人(10)也發現受到鎘的暴露與前列腺上皮性腫瘤有關，另外 Blakley 等人(11)以及 Waalkes 等人(12)利用口服方式對小老鼠(mice)給予鎘暴露，發現鎘會使造血系統受到破壞，容易導致病毒感染，並減弱對病毒監控之免疫系統。除此，鎘會間接地經由懷孕母體的暴露導致胎盤的壞死，進而造成胎兒的死亡(13)。鎘也會影響腎臟和骨骼系統，鎘中毒的病人會因腎病變造成尿液中產生含大量低分子量蛋白質，如 β_2 -microglobulin 及醣解 N-Acetyl- β -Glucosaminidase(NAGase)等，嚴重者更會因大量的鈣流失而產生骨質疏鬆症，進而導致軟骨症(14,15)。

在細胞培養(in vitro)實驗方面，鎘會造成細胞毒性、基因毒性(genotoxicity)以及致癌性(carcinogenicity)，其可能是經由氧化性傷害，進而導致細胞死亡及細胞轉形作用(trans-formation)(16,17)。另外

有文獻指出，鎘會影響細胞間巨分子的交互作用以及抑制 DNA、RNA 與 protein 的合成(18)，體內一些參與生化反應之酵素亦受到鎘的影響，導致酵素不活化或失去功能。

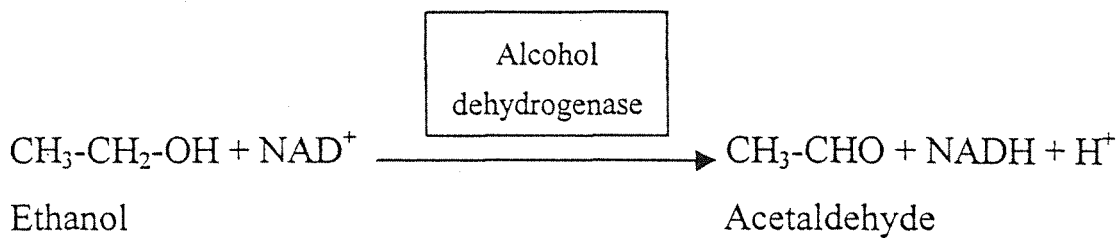
二、乙醛 (acetaldehyde)

乙醛為環境污染物之一，隨著木材的燃燒、煤礦的精煉、香煙的燃燒以及最近利用酒精替代汽油當作替代性能源，各種廢棄物的分解和釋放，產生許多醛類物質，如甲醛(formaldehyde)、乙醛(acetaldehyde)、丙烯醛(acrolein)其中以乙醛所佔的濃度較高(19,20,21)。另外乙醛在工業上廣泛被使用，應用於橡膠製品、酚類樹脂、染料、塗料及攝影顯相劑等(22)。乙醛的暴露除了經由外生性系統(exogenous)即在環境或作業場中受到吸入性或直接接觸產生傷害，另一方面可由內源性系統(endogenous)經由飲料或食物攝取乙醇，產生第一次氧化代謝產物形成乙醛(23)。

乙醛對動物具有致癌性。Wouterson 等人(24)利用吸入方式對倉鼠進行乙醛暴露，發現產生呼吸道腫瘤。此外，Feron 等人(25)指出，乙醛具有啟動子(promoter)之性質，會增加 benzo[a]pyrene 所誘發導致腫瘤(tumor)的形成。乙醛亦具有致畸胎毒性(26)，Sreenathan 等人(27)指出，乙醛會干擾必需氨基酸由胎盤進入胎兒，進而影響 DNA 與 RNA 的合成造成胎兒畸形(28)。

另外，主要在探討內源性系統(endogenous)酒精經肝細胞的胞液(cytosol)中，由 nicotinamideadenine dinucleotide(NAD)-dependent alcohol dehydrogenase(ALD)(ADH)，參與產生最初氧化代謝產物乙醛

及 NADH，其主要機制為(29)



人類組織器官中，除了肝臟具有 ADH 與 ALDH 兩種酵素之高度活性外，在腸胃道、腎臟及骨髓中均有活性存在，因此可能引起許多生理上的影響(30)；臨床上報導指出，慢性酒精中毒者對代謝酒精的能力增加，且血中的乙醛及乙酸濃度也增加，進而造成痛風，最後形成脂肪肝及肝硬化(31)等病徵。由細胞間巨大分子化學結構觀察，乙醛的羧基上具有親電性基團(electrophilic group)，可與核酸、蛋白質、磷脂質上 amino group 的親核性部位(nucleophilic site)進行反應(32)，Lambert 等人(33)指出，此反應會造成 DNA-DNA cross-links，並且 Lam 等人(34)也發現，乙醛會產生 DNA-protein cross-links，這些反應造成 DNA 上結構產生改變，進而引發致突變性的作用及致癌機轉，乙醛可能在反應過程之間產生自由基(free radicals)引發氧化性傷害造成 DNA damage(35)。Gaines 等人(36)在 1977 年即推測，乙醛會經由 Schiff base 與 protein 和 phospholipids 形成鍵結物(adduct)，另外 Hemmiuki 和 Scci(37)證實乙醛經由非酵素性反應與去氧核甘酸形成鍵結物(adduct)，其主要鍵結產物為 N₂-ethyl-guanosine；Vina 等人(38)亦指出乙醛會與硫氫基複合物(sulfhydryl compound)，如胱氨酸(cysteine)及還原態的麩胱氨酸(reduced glutathione)形成 adduct 破壞消耗重要的解毒酵素系統。

三、槲皮素 (Quercetin)

槲皮素(Quercetin)其化學結構(Fig.14)上屬類黃酮(flavonoid)，為天然存在植物中低分子量 Benzo- γ -pyrone 衍生物，廣泛分布於可食的植物中；根據報告一般類黃酮成份大多具有抗發炎(39,40)、抗過敏及抗氧化(41,42)等生物活性，並可在哺乳類中調節多種酵素包括 cytochrome P450、epoxide hydrase、glutathione transferase、DNA 和 RNA polymerases 及 topoisomerase(43,44)。

在 Morel 等人指出 quercetin 除了可保護生物體受自由基傷害，亦可對金屬離子鐵(iron)產生螯合作用抑制經由鐵離子所誘發的酵素反應產生的自由基(45,46,47)；其抗氧化和自由基的捕促能力主要針對 HO^{\cdot} 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 以及 peroxy 和 alkoxy 等自由基 (48,49,50)，及抑制自由基所誘發細胞膜的脂質過氧化。在人類 lymphocytes 中，quercetin 能抑制 H_2O_2 所誘發的 DNA 損傷，包括 DNA strand breakage 和 oxidised pyrimidine bases(51)。在過去研究指出 quercetin 在 *Salmonella*/microsome assay 中(52,53)為有效的致突變物(mutagen)，但在 *E. coli* 中則致突變性表現微弱(54)，而在 *B. subtilis* 中則不具致突變性(55)。在短期 bacterial 和 mammalian 系統，在有氧的狀態下 quercetin 為一個直接作用的致突變物(56,57,58)；對於 quercetin 致癌的研究目前仍有很大的爭議，部分研究顯示 quercetin 長期能導致大白鼠罹患腸癌、膀胱癌和肝癌(59,60)，然而部分研究則顯示相反的結果(61,62)。Sahu 等人(63)指出在有氧的狀態下，quercetin 能誘發 nuclear lipid peroxidation 同時 DNA degradation，而在銅離子或鐵離子存在下則使 lipid peroxidation 和 DNA degradation 現象加劇，其說明存在較高濃度 quercetin 下，quercetin 會受銅離子或鐵離子催化產生自氧化的現象，

導致自由基的產生。

四、甘草甜素(Glycyrrhizin)

甘草甜素(Glycyrrhizin)(Fig.15)為甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)的根部萃取物為 licorice 的主要成份之一，亦為中國傳統使用的中藥成份之一(64,65)，廣泛被用來作為抗發炎(anti-inflammatory)、抗新生(anti-neoplastic)和抗潰瘍(anti-ulcerogenic)生成(66,67)等作用，在臨床上被用作為治療胃潰瘍、過敏、氣喘以及免疫性調節等用途。在 Lin 等(68)研究指出，以 ICR 系小白鼠的動物實驗，暴露在 4 Gy-ray irradiation(69)能顯著抑制脾臟、胸腺(thymus)和睪丸(testes)的重量以及 DNA 合成速率(DNA biosynthetic rate)，而 *Glycyrrhizae* 和 *Glycyrrhizic acid* 能夠使受到 γ -ray irradiation 損傷的器官恢復。在 Sakagami 等(70)則指出 *Glycyrrhizae* 為 Kuei-Pi-Tang 的成份之一，可以有效的調節荷爾蒙和提高免疫力。而在 Kboes 等(71)指出 β -glycyrrhetinic acid 具有類似固醇類的結構式，具有抗炎的功效， β -glycyrrhetinic 並可以抑制 classical complement pathway，且 anticomplementary 的活性必須以 β -form 形式存在，而 α -form 則不活化。

根據過去 glycyrrhizin 抗肝炎的功效，被認為可以抑制 CCl_3 radical 的產生脂質過氧化的起始步驟所造成的肝傷害，而目前 glycyrrhizin 對於發炎反應的調節因子如 neutrophil，其功能包括 reactive oxygen species (ROS)的產生，仍然被研究中(72)。在 Akamatsu 等(73)指出 glycyrrhizin 能明顯降低 neutrophils 所產生的 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ ，但在 cell-free 的系統(xanthine-xanthine oxidase system)中，則無法降低 ROS 的



產生，並進一步指出 glycyrrhizin 不是 ROS 捕捉劑(scavenger)，但可抑制 neutrophili 所產生的 ROS，為良好的發炎反應的調節者。

本實驗針對特定的有機物"乙醛"和無機物"鎘"，進行環境毒物間之交互作用和加成毒性之研究，併用天然存在之物質 Quercetin 和 Glycyrrhizin acid 探討對於毒物傷害之預防作用。實驗過程主要運用 trypan blue dye exclusion、MTT assay 方法對單一和共同暴露作初步細胞毒性及活性分析，並利用長時間的 colony assay 實驗方法探討單一和共同暴露其細胞毒性表現，並以 HPRT assay 觀察其所造成的基因毒性，再進一步探討共同暴露乙醛和氯化鎘下，生長恢復狀態及對細胞週期的影響。另一方面，觀察細胞在單一和共同暴露乙醛和氯化鎘下，細胞內重金屬含量、脂質過氧化(MDA)的情形、單股 DNA 斷裂狀態、plasma membrane 損傷，最後並以測定脂質過氧化和 rhodamine 123 螢光量等實驗方法探討天然物對毒物所造成 MDA 形成及 plasma membrane 損傷是否具有保護作用。

實驗材料

(一)儀器

名稱	廠牌
無菌操作台(Lamina Flow)	HIGH TEN
細胞培養箱(Incubator)	NUAIR™ US AUTO FLOW
離心機(Centrifuge)	KUBOTA KN-70
倒立式顯微鏡	Nikon
光學顯微鏡	Nikon
相位差顯微鏡	Zeiss TELAVAL31
恆溫水浴槽 (Water Bath)	Kodman
血球計數器	Reichert-Jung
冷凍離心機	UNIVERSAL
石墨爐式原子吸收光譜儀(4110 ZL)	PERKIN ELMER
螢光光譜儀(U-3000)	HITACHI
可見光光譜儀(U-2000)	HITACHI
加熱板 (Hotplate)	CORNING

(二) 材料

1. 消耗性材料：

名稱	廠牌
Tissue Culture Flask (25 cm ²)	TPP, FALCON
Tissue Culture Flask (75 cm ²)	FALCON
Tissue Culture Dish (100×20mm style)	FALCON
Tissue Culture Dish (60×15mm style)	FALCON
細胞培養盤 (24 well)	FALCON
無菌過濾膜 (0.2 μm)	Gelman Sciences
Microprep (0.22 μm, 25mm)	PORETICS
15 ml 塑膠離心試管	FALCON
1.5 ml 塑膠離心試管	eppendorf

2. 試藥：

名稱	廠牌
FOETAL CALF SERUM (胎牛血清)	Kibbutz Beit Haemek Israel
Minimum Essential Medium	GIBCO BRL
Dulbeccols Phosphate Buffered Saline	GIBCO BRL
Penicillin-Streptomycin	GIBCO BRL
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL
Trypan Blue Stain 0.4%	GIBCO BRL
6-Thioguanine	SIGMA
CdCl ₂	SIGMA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	SIGMA
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	SIGMA
Glycyrrhizin	SIGMA
Methanesulfonic Acid Ethyl Ester (EMS)	SIGMA
Hypoxanthine	SIGMA
Thymidine	SIGMA
Ribonuclease A	SIGMA
Propidium Iodide (PI)	SIGMA
Quercetin	SIGMA
2-Thiobarbituric(TBA)	SIGMA
Phosphotungstic Acid	SIGMA
n-Butanol	MERCK
Gimsa	MERCK
Acetaldehyde	Fluka
Triton X-100	Schwarz/Mann Biotech
Iso-propanol	Ultra Pure
Methanol	Ultra Pure

實驗方法

一、細胞解凍與儲存

先準備好 5mL 的 MEM 培養液(37°C)至 25 cm² flask 中，自液態氮中取出 V79 細胞(1×10^5 cells)，迅速置於 37°C 水浴槽中至完全解凍後，倒入原先已加入 MEM 培養液的 flask 中。在 37°C、5% CO₂ 培養箱中，培養 18 小時後，換新鮮的 MEM 培養液。

將欲儲存之細胞首先將 flask 中的培養液抽出，以磷酸緩衝液 (PBS) 洗兩次後，用 trypsin 將細胞洗下(待 4~5 分鐘後)，加入 MEM 培養液以去除 trypsin 活性，再將細胞懸浮液移置離心管中，以離心 800rpm、5 分鐘。接著去除上清液，再加入含有 DMSO(3~5%)之培養液與細胞混合均勻，取 1mL 分裝至細胞儲存管中(1×10^5 cells)。將細胞儲存管先置於 -20°C 冷凍庫中(24 小時)，再放入 -85°C 冷凍庫中(8 小時)，最後放入液態氮中保存。

本實驗的 V79 細胞解凍後均不超過十代以上，主要是避免細胞過度老化以干擾實驗結果。

二、HAT 篩選正常細胞株

先將 1×10^5 個細胞種入 25 cm² flask，再加入含 HAT (10^{-4} M hypoxanthine、 4×10^{-7} M aminopterin、 1.6×10^{-5} M thymidine) 的培養液篩選出正常細胞株。細胞的生長會走 *de novo* pathway 和 salvage

pathway 合成 nucleotide，因 aminopterin 會抑制 *de novo* pathway 合成 nucleotide，所以細胞在 hypoxanthine、thymidine 下走 salvage pathway，而正常細胞含有 HGPRTase(Hypoxanthine Guanine phosphoribosyl transferase) 酵素可以代謝 hypoxanthine、thymidine 合成 nucleotide，但是突變細胞株缺乏 HGPRTase 酵素因而兩途徑則無法進行代謝，便造成突變細胞珠的死亡。經培養三天後，以排除 hprt 功能缺損的 V79 細胞，之後再用磷酸緩衝溶液(PBS)洗去含 HAT 的培養液，以一般 MEM 培養液繼續培養。

(I) 乙醛與鎘對中國倉鼠肺臟細胞單一及複合毒性之探討

一、細胞毒性試驗(trypan blue exclusion assay)

受到毒物產生死亡的 V79 細胞會將 dye uptake 呈現藍色，活的細胞則否，最後顯微鏡計算細胞數目。

在 24 wells 的細胞培養盤中，每個 well 種 5×10^4 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液 (PBS) 洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物 (氯化鎘 $10 \sim 50 \mu\text{M}$ ，乙醛 $1 \sim 5\text{mM}$) 做單一暴露與複合暴露。置入 37°C 、5% CO_2 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入 $200 \mu\text{L}/\text{well}$ 胰蛋白酶 (Trysin/EDTA) 處理 5 分鐘，再加入 1mL MEM 培養液均勻混合。每個 well 各取 0.2mL 含有細胞的培養液至另一個細胞培養盤，各加入 0.05mL Trypan blue 染色，做細胞存活率分析。

Relative cell survival(%)=(不同濃度之細胞存活數目/control 組細胞數目) \times 100%

二、MTT 之細胞活性分析

細胞之活性分析係根據 Alley 等之方法(74)，細胞內粒線體為主要表現細胞活性產生能量的來源，存活的 V79 細胞能將 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (tetrazolium salt) 經由粒線體中 dehydrogenase 作用代謝還原成 Formazan Crystal，再將結晶物溶出，來測其吸光值表示細胞活性分析。

在 24 wells 的細胞培養盤中，每個 well 種 5×10^4 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物(氯化鎘 $10 \sim 50 \mu\text{M}$ ，乙醛 $1 \sim 5\text{mM}$)做單一暴露與複合暴露。置入 37°C 、5% CO_2 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入新鮮的 MEM 培養液並含 MTT(0.5mg/mL)試劑，放入培養箱 4 小時，待培養 4 小時後，將上清液去除，再以 1mL 的異丙醇將細胞打破，使藍紫色結晶物溶出，於光波長 563nm 下測其 OD 值。

Relative cell survival(%)=(不同濃度對細胞之吸光值/control 組細胞之吸光值) \times 100%

三、群落之細胞毒性試驗(colony assay)

觀察長時間的細胞毒性表現。取 25 cm² flask 種入 200 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物(氯化鎘 5~20 μM，乙醛 1~5mM)做單一暴露與複合暴露。置入 37°C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入新鮮的 MEM 培養液，放入培養箱培養 7 天。經過 7 天後形成如群落(colony)，將培養液去除，加入 95% methanol 10 分鐘去固定細胞，之後再以 10%的 Gimsa 染色 20 分鐘，在顯微鏡下計算其 colony 的數目(每個 colony 內必須大於 50 個細胞才算)。

Relative cell survival(%)=(不同濃度之細胞 colony 數目/control 組細胞之 colony 數目)×100%

四、真核細胞次黃嘌呤-鳥糞嘌呤磷酸核糖基轉移酵素基因突變之分析

(Hypoxanthine-Guanine phosphoribosyl transferase gene, HPRT gene)

hprt 基因位(loci)的基因突變生物檢定法常被廣泛應用在致突變性的分析。*hprt* 基因屬於分子致突變過程中的內源性系統(endogenous molecular mutagenesis system)，具有 HPRT 酵素的活性，為一種合成嘌呤核苷酸的捷徑酵素(salvage enzyme)。此酵素在生化代謝路徑所扮演的角色，可促使次黃嘌呤和鳥糞嘌呤進行磷酸核糖化反應(phosphoribosylation)，而形成 GMP 和 IMP，但它同時也具有將嘌呤類似物，例如：6-thioguanine(6-TG)磷酸核糖化的能力而代謝成具有細胞毒性的核酸。因此若沒有 HPRTase 酵素活性的細胞，便不會有這種

傷害而存活下來。所以透過細胞表現型的代謝抗性來篩選，便可以得到基因的突變株。(75)

此實驗之前 V79 細胞必須培養在含 HAT 的 MEM 培養液裡培養三天，經過三天後，取 75 cm² flask 種入 1×10^6 個 V79 細胞，培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液 (PBS) 洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，加入配製好不同濃度的毒物 (氯化錳 $5 \sim 15 \mu\text{M}$, 乙醛 2.5mM) 做單一暴露與複合暴露，並且加入一組毒物 EMS 當作 positive control，置入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗二次，加入胰蛋白酶 (Trysin/EDTA) 將細胞洗下分為兩部份：(1) 取 200 個細胞種入 5cm^2 dish，待培養七天後染色，觀察其群落 (colony) 的數目，此為 plating efficiency。(2) 種入 2×10^5 個 V79 細胞於 10cm^2 dish 繼續培養下去，經過三天的培養後，將細胞調至 2×10^5 個繼續培養四天，共持續培養七天後，使突變細胞株能充分表現，之後細胞再調至 2×10^5 個/ 10cm^2 plate 共 6 個 plates，並將培養液換成含有 6-TG ($10 \mu\text{g/mL}$) 的培養液，繼續培養 7 ~ 8 天，最後正常細胞 (hprt gene 正常) 代謝 6-TG 則會導致死亡，突變細胞 (hprt gene 受到 mutant) 不能代謝 6-TG 而使突變細胞存活，產生如群落 (colony) 般，最後加入 95% methanol 10 分鐘去固定細胞，之後再以 10% 的 Gimsa 染色 20 分鐘，在顯微鏡下計算其 colony 的數目 (每個 colony 內必須大於 50 個細胞才算)。

五、細胞生長曲線

同 trypan blue 的方法計算細胞數目。在毒物暴露後，將毒物移除，觀察每天的細胞生長，藉以了解細胞生長是否受到影響。

取 75 cm² flask 種入 1×10^6 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液 (PBS) 洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物 (氯化錳 10 μ M，乙醛 2.5mM) 做單一暴露與複合暴露。置入 37°C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入胰蛋白酶 (Trysin/EDTA) 將細胞洗下，收集細胞約 1×10^5 個/3cm² dish 培養三天，分別在 24、48、72 小時後利用 trypan blue exclusion assay 計算細胞數目觀察細胞生長曲線情形。

六、細胞週期分析測定 (cell cycle)

細胞週期之分析根據 Fried 等(76)。一般細胞週期分為分裂期(G phase)、休眠期(S phase)、或複製期(M phase)等週期，本實驗主要觀察細胞在受毒物傷害後 DNA 的表現狀態，當細胞內 DNA 受到傷害時，細胞週期會停滯在 G₀/G₁ phase 進行修復，當細胞損害太嚴重無法修補則走細胞死亡路徑。

取 75 cm² flask 種入 2×10^6 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液 (PBS) 洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物 (氯化錳 10 μ M，乙醛 2.5mM) 做單一暴露與複合暴露。置入 37°C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入新鮮的 MEM 培養液，放入培養箱分別培養 0、6、12、24、48 小時，待時間到達後加入胰蛋白酶 (Trysin/EDTA) 將細胞洗下，收集細胞約 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個，離心 800 rpm、5 min，去除上清液，

加入 1mL iced 80% ethanol 混合均勻，冰上培養 30 分鐘，之後離心 800 rpm、10 min，再用 1mL PBS 洗二次，最後在 1mL 的細胞懸浮液內分別加入 RNase (50 μ g/mL) 以及 PI (0.5mg/mL)，暗反應下 37°C、30min，利用流式細胞分析儀來分析細胞週期。

七、細胞內重金屬之偵測(利用原子吸收光譜儀測定)

根據 Ochi 等方法之修飾(77)。利用石墨爐式原子吸收光譜儀來偵測，觀察重金屬的含量進入細胞內，與細胞死亡和毒性之關係。

取 25 cm² flask 種入 1×10^6 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的毒物(氯化鎘 10、25 μ M，乙醛 1、2.5mM)做單一暴露與複合暴露。置入 37°C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗三次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入胰蛋白酶 (Trysin/EDTA) 處理 5 分鐘，收集 1×10^6 個 V79 細胞，將細胞懸浮液放置 100mL 的燒杯並添加 1mM HNO₃，蓋上錶玻璃加熱以去除有機物質，待燒至淨乾後以 1% HNO₃ 定量至 5mL，最後利用原子吸收光譜儀來測定。其條件附表九與表十。

八、DNA 單股斷裂之測定(DNA single strand break)

在 24 wells 的細胞培養盤中，每個 well 種 5×10^4 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，並加入 0.1 μ L/mL methyl-³H thymidine (20 Ci/mmol) 培養 24 小時，再去除培養液換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不

同濃度的毒物(氯化鎘 10~50 μ M, 乙醛 1~5 mM)做單一暴露與複合暴露。置入 37°C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，加入胰蛋白酶 (Trysin/EDTA) 將細胞洗下置於 1.5mL tube，之後離心 1000 rpm、15min、4°C 去除上清液，分別加入 300 μ L lysis solution 和 0.12M KCl 作用 1 分鐘，再放入 65°C 水浴槽 10 分鐘，待冷卻後離心 3500 rpm、10min、4°C，將上層液 (supernatant) 放入輻射計數小瓶 (counting vial) 中，加 600 μ L 0.05M HCl 與 3mL 液體閃爍液，另外，下層 (pellet) 再以 1200 μ L 0.05M HCl 溶解後放入 65°C 水浴槽 10 分鐘，放入輻射計數小瓶 (counting vial) 內與 3mL 液體閃爍液，以閃爍計數儀計數輻射量 (dpm)。

supernatant radioactivity / pellet radioactivity + supernatant radioactivity

pellet : 完整之 DNA 含量

supernatant : DNA 單股斷裂之含量

pellet + supernatant : 全部之 DNA 含量

九、脂質過氧化之測定

細胞中脂質過氧化係根據 Yagi 氏等修飾之螢光測定法(78)，脂質為細胞膜的主要成份，其容易受到毒物所誘發的自由基攻擊產生氧化性傷害，嚴重可導致細胞死亡，因此，當細胞上的脂質受到氧化性傷害，會造成 MDA 的形成，實驗利用 MDA 與 TBA 的結合作用，來偵測細胞脂質過氧化的程度。

取 75 cm² flask 種入 7×10^6 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液 (PBS) 洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入

配製好不同濃度的毒物(氯化鎘 $5\sim 50\mu\text{M}$, 乙醛 $1\sim 5\text{mM}$)做單一暴露與複合暴露。置入 37°C 、 5% CO_2 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗二次，之後加入 50mM phosphate buffer 並將細胞刮下收集，此時細胞懸浮液分為兩部分做測試：

第一部分：加入 3% SDS、 0.1N HCl、 10% phosphotungstic acid、 0.7% 2-thiobarbituric acid (TBA)之後，避光處理在 95°C 的沸水下加熱 30 分鐘，再加入正丁醇萃取，最後以 3000 rpm 離心 10 分鐘後取上清液測定。並利用 1,1,3,3-tetramethoxypropane 當作 standard 於 $\text{Ex/Em}=515/555\text{nm}$ 下測定螢光強度得知其濃度。

第二部分：做蛋白質定量，使用 Bio-Red 公司所生產之 kit，以 BSA 當 standard 定量蛋白質含量。最後單位以 nmol/mg 來表示。

十、粒線體膜電位測定

粒線體膜電位變化之影響係藉著測定對 rhodamine 123 之 uptake 程度而定。當細胞中粒線體損傷時，一般即表示細胞受到了傷害，而 mitochondrial damage 初步可由 mitochondrial membrane potential 觀察，其原理為正常的細胞粒線體為產生能量必須有正常 proton concentration gradient 即為 membrane electric potential，形成 electrochemical force 用來形成 ATP 保持 mitochondria 中 Ca^{2+} 的平衡，當細胞中粒線體受損傷，會導致 ATP depletion 及 Ca^{2+} cycle 失去平衡，使帶正電的 rhodamine 123 流入粒線體中，降低 cytosol 中的 rhodamine 123 含量(79)。其方法根據 Imberti 等(80)修飾。

取 25 cm^2 flask 種入 1×10^6 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸

緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，先加入 Rhodamine 123 (1 μ M)於 37 $^{\circ}$ C 下分別培養三十分鐘，再加入配製好不同濃度的毒物(氯化鎘 5、10、20 μ M，乙醛 5mM)做單一暴露與複合暴露。置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS wash 及收集 1 \times 10⁶ 個 V79 細胞，然後以含 0.1% Triton X-100 的 PBS 將細胞 lyse，之後 6000xg 離心。測定上清液中所含 Rhodamine 123 之濃度，於 Ex490nm/Em515nm 測其螢光強度。

Rhodamine 123 (%)=(不同劑量濃度產生之螢光強度/control 組之螢光強度) \times 100%

(II) Glycyrrhizin 與 Quercetin 對乙醛與鎘複合毒性之探討

一、MTT 之細胞活性分析

在 24 wells 的細胞培養盤中，每個 well 種 5 \times 10⁴ 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的藥物(Quercetin 5~80 μ M，Glycyrrhizin 50~500 μ M)。置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培養箱 24 小時，之後抽出含有藥物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗兩次，防止與細胞進一步作用。將 PBS 抽出後，加入新鮮的 MEM 培養液並含 MTT(5mg/mL) 試劑，放入培養箱 4 小時，待培養 4 小時後，將上清液去除，再以 1mL 的異丙醇將細胞打破，使藍紫色結晶物溶出，於光波長 563nm 下測其 OD 值。

二、脂質過氧化之測定

取 75 cm² flask 種入 7×10^6 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，即加入配製好不同濃度的藥物(Quercetin 5~20 μ M, Glycyrrhizin 50~200 μ M)經過一小時培養，再加入毒物(氯化鎘 10 μ M, 乙醛 2.5mM)。置入 37 °C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS 重覆洗二次，之後加入 50mM phosphate buffer 並將細胞刮下收集，再用細胞懸浮液做兩部份測試。一為 MDA 濃度測定，二為蛋白質定量。

三、粒線體膜電位測定

取 25 cm² flask 種入 1×10^6 個 V79 細胞。培養 18 小時後，以磷酸緩衝溶液(PBS)洗去培養液，再換入新鮮的 MEM 培養液後，預先加入藥物(Quercetin 5~20 μ M, Glycyrrhizin 50~200 μ M)經過一小時培養，再加入 Rhodamine 123 (1 μ M)於 37°C 下分別培養三十分鐘，最後加入配製好不同濃度的毒物(氯化鎘 10 μ M, 乙醛 5mM)做單一暴露與複合暴露。置入 37°C、5% CO₂ 培養箱 4 小時，之後抽出含有毒物之 MEM 培養液，以 PBS wash 及收集 1×10^6 個 V79 細胞，然後以含 0.1% Triton X-100 的 PBS 將細胞 lyse，之後 6000xg 離心。測定上清液中所含 Rhodamine 123 之濃度，於 Ex490nm/Em515nm 測其螢光強度。

(II) 統計方法

本實驗的分析結果，(1)以 Sigma Plot 統計學軟體做各項結果分析，並以 Student's t-test 分析其劑量間之差異(P 值)。以 P 值小於 0.05 或 0.01 為有顯著差異。(2)以 independent joint action model 分析複合毒性之交互作用(81,82)。 $P(M)=P(A)+P(B)-P(A\times B)$ ；P(M)表示實際致死百分比，P(A)表示 A 毒物致死百分比，P(B)表示 B 毒物致死百分比； $P(A)+P(B)-P(A\times B)$ 表示預期致死百分比，另外，以 synergistic interaction assay model 來分析基因複合毒性與脂質過氧化之傷害(83,84)。 $N(AB)=N(A)+N(B)-N(C)$ ；N(AB)為實際產生傷害之結果，N(A)表示 A 毒物產生傷害之結果，N(B)表示 B 毒物產生傷害之結果，N(C)表示控制組產生傷害之結果； $N(A)+N(B)-N(C)$ 為預期產生傷害之結果。當實驗結果實際值大於預期值則表示協同作用 (synergism)；小於則表示拮抗作用(antagonism)；等於則表示加成作用(additive)。

結果分析

一、乙醛與氯化鎘對細胞存活之影響

利用 Trypan blue exclusion 初步觀察乙醛與氯化鎘在共同暴露下是否具有加成毒性。本實驗選取不同劑量的氯化鎘 (0、10、25、50、100 和 200 μM) 以及乙醛 (0、1、5、10、15 和 20 mM) 來進行單獨暴露，暴露時間為二、四及六小時，顯示細胞存活率。Fig. 1a、Fig. 1b 結果細胞在處理四小時氯化鎘 10~50 μM 以及乙醛 1~5 mM 劑量後立即以 Trypan blue exclusion assay 觀察到 V79 細胞皆在 80 % 以上之存活率，而在氯化鎘 50 μM 和乙醛 5 mM 以上的濃度則表現出較高的致死率；由 Fig. 1a、Fig. 1b 結果進一步探討氯化鎘及乙醛共同暴露之細胞毒性，劑量選擇細胞存活率 80 % 以上的氯化鎘 10~50 μM 以及乙醛 1~5 mM ，由 Fig. 1c 觀察到以乙醛或氯化鎘的單一暴露與控制組做為對照比較，在共同暴露下結果發現細胞的存活略為降低為 70 %，但並經由 independent joint action model 統計分析後，其結果未有複合毒性上之意義，如表一。

二、乙醛與氯化鎘對細胞活性之影響

本實驗利用 MTT 方法來測試細胞活性，觀察在單一和共同暴露下細胞活性之傷害程度。在不同劑量的氯化鎘 (0、10、25、50、100 和 200 μM) 及乙醛 (0、1、5、10、15 和 20 mM) 單獨暴露二、四及六小時，觀察細胞活性。由 Fig. 2a 及 Fig. 2b 之結果觀察到隨著暴露氯化鎘及乙醛劑量的增加細胞活性隨之降低；由 Fig. 2a、Fig. 2b 之結果進一步探討在氯化鎘及乙醛共同暴露下對 V79 細胞活性之抑制作用，

劑量選擇氯化鎘 10~50 μM 以及乙醛 1~5 mM，由 Fig. 2c 觀察到乙醛 (5 mM) 以及氯化鎘 (10~50 μM) 共同暴露下，降低 40% ~60% 之細胞活性，並且經由 independent joint action model 統計分析後，其結果具有複合毒性上之意義，如表二。

三、乙醛與氯化鎘對 colony 產生之影響

本實驗利用 colony 增殖的現象做為長時間細胞生長實驗的觀察，細胞受到乙醛與氯化鎘單一以及共同暴露四小時後，移除含毒物之培養液，更換正常培養液培養七天，細胞會形成如群落般的 colony。由實驗結果發現，與控制組比較在乙醛 (1、2.5、5 mM) 單一暴露下，隨著劑量的提高，colony 的數量亦隨之降低，在高劑量 5mM 的乙醛暴露下，colony 的數量為控制組的 20%。而單一氯化鎘的暴露則可以觀察到從 (10、15、20 μM) 其 colony 的數量與控制組相比降低 90% ~60%。由表三可知，經由此方法在乙醛 (1、2.5 mM) 與氯化鎘 (5、10、15 μM) 的低劑量下做共同暴露的結果，便有很明顯的細胞複合毒性，並且由表四經過 independent joint action model 統計分析結果發現，其實際相對致死率大於預期相對致死率約 2 倍。因此，利用 colony 的觀察可以明顯發現到複合毒性的產生。

四、乙醛與氯化鎘之基因毒性分析(HPRT gene mutant)

在 V79 細胞 HPRT 突變株篩選試驗中，由表五結果顯示，在單一劑量的乙醛與氯化鎘對於細胞產生的突變率而每 1×10^6 個細胞才有 0~4 個的突變株，但是在乙醛 (2.5 mM) 以及氯化鎘 (5~15 μM) 共同暴露下每 1×10^6 個細胞產生的突變株與單一暴露比較，突變株增加為

10~20 個，其中以乙醛 2.5 mM 乙醛複合 10 μ M 氯化鎘突變株最多，並以 EMS 為 positive control，由此結果表示乙醛及氯化鎘共同暴露下，對 V79 細胞具有複合基因毒性上之意義，如表六。

五、乙醛與氯化鎘對細胞生長曲線之影響(cell growth)

正常 V79 細胞生長狀態為 12~14 小時分裂一次，經單一與共同暴露乙醛 (2.5 mM) 以及氯化鎘 (10 μ M) 四小時後，移除含毒物之培養液，在新鮮的培養液下培養三天，結果由 fig. 3 觀察得知，單一暴露的乙醛 (2.5 mM) 以及氯化鎘 (10 μ M) 隨著時間的增加細胞亦隨之增加，其生長曲線相似，但是與正常細胞生長曲線相比較卻有明顯受到抑制作用。另外在共同暴露乙醛 (2.5 mM) 與氯化鎘 (10 μ M) 此兩種劑量下，發現到細胞生長受到抑制作用更加明顯，並且在 0~24 小時當中，細胞個數並無明顯之增加，而在 24 小時開始至 72 小時間，細胞生長速率才逐漸恢復，可觀察到隨著時間的增加細胞亦隨之增加。因此，共同暴露下會加強對細胞生長產生抑制作用。

六、乙醛與氯化鎘對細胞週期之分析(cell cycle)

本實驗 fig 4a, 4b, 4c 可以觀察到單一暴露在乙醛(2.5mM)和氯化鎘(10 μ M)下，會造成細胞損傷，導致細胞週期改變，但在 48 小時時，細胞週期恢復至與控制組相似，而共同暴露乙醛(2.5mM)和氯化鎘(10 μ M)在 12~48 小時有 hypodiploid 的產生，表示 DNA 有傷害的情況，並且在 48 小時時細胞週期的分佈仍未恢復與控制組相似。

七、細胞內重金屬含量之分析

由表七所示，控制組與乙醛（1 mM、2.5 mM）等未暴露氯化鎘之 V79 細胞內所偵測出的重金屬鎘之含量非常微量，而在細胞單一暴露氯化鎘部分，隨著培養液中氯化鎘（10 μ M、25 μ M）濃度升高進入到細胞內的重金屬含量亦隨之增加（由 104.3 ng/10⁶ cells 到 134.4 ng/10⁶ cells），但是共同暴露的結果發現到以（1 mM、2.5 mM）劑量的乙醛加入氯化鎘（10 μ M）其細胞內鎘含量分別為 103.58 ng/10⁶ cells 以及 102.76 ng/10⁶ cells，另外如氯化鎘（25 μ M）加入 1 mM 及 2.5mM 之乙醛，其細胞內鎘含量則為 139.16 ng/10⁶ cells 以及 136.28 ng/10⁶ cells 均無明顯差異，顯示在本實驗之劑量下，細胞內鎘之含量不會因共同暴露乙醛而有所增加。

八、乙醛與氯化鎘誘發 DNA 單股斷裂之測定 (DNA single strand break)

以 DNA 單股斷裂程度當作乙醛與氯化鎘 DNA 造成傷害之指標。如 fig5 所示，單一處理乙醛（5 mM）與氯化鎘（10、25、50 μ M）對細胞造成 DNA 單股斷裂情形均比 control 組有明顯增加，並隨著劑量增加而增加，但是在共同處理乙醛（1 mM、5 mM）與氯化鎘（10~50 μ M）並無明顯的加強 DNA 單股斷裂程度。因此，乙醛與氯化鎘對 DNA 單股斷裂具有交互作用的影響。

九、乙醛與氯化鎘誘發脂質過氧化之分析 (lipid peroxidation)

以 MDA 生成濃度當做脂質過氧化的指標，如 Fig. 6a 所示，單一或共同處理乙醛（1 mM、5 mM）與氯化鎘（10、25、50 μ M）發現 V79 細胞在乙醛（5 mM）與氯化鎘（10 μ M）的劑量下可誘發最高量之 MDA。另外，進一步由 fig. 6b 所示，單一處理乙醛（5 mM）與氯

化鎘 (5、10、20 μM) 與控制組相比所生成 MDA 的濃度隨著劑量增加而增加，在共同處理乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (5、10、20 μM) 產生 MDA 的程度顯著增加，並由統計結果發現(表八)，在乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10 μM) 實際產生脂質過氧化程度比預期值相差 0.32nmol/mg，大於其他劑量 (約 0.2 nmol/mg)；亦具有明顯的複合效應。

十、乙醛與氯化鎘誘發粒線體去極化之影響

粒線體膜電位之變化係藉著滯留細胞質中 rhodamine123 之螢光強度測定亦表示粒線體的損傷或是 plasma membrane 受損導致。由 Fig. 7 所示，單一處理乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (5、10、20 μM) 與控制組相比較發現細胞質中 rhodamine123 之螢光強度並無明顯的變化影響，但是在共同處理乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (5、10、20 μM) 卻有明顯的增加，而在乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (5 μM) 到乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10 μM) 細胞質中之螢光強度迅速的增加至 control 的 2 倍左右。所以乙醛與氯化鎘複合暴露後加強細胞內粒線體對 plasma membrane 之傷害。

十一、Glycyrrhizin 與 Quercetin 對細胞活性之影響

由 fig. 8 表示，不同濃度之 Glycyrrhizin (10、50、100、200、500 μM) 處理 V79 細胞經過 24 小時後發現，處理 Glycyrrhizin 的濃度在 (10、50、100 μM) 有 90% 以上的細胞活性，另外，Glycyrrhizin 的濃度在 (200、500 μM) 仍有 80% 以上的細胞活性。由 fig. 9 表示，不同濃度之 Quercetin (5、10、20、40、80 μM) 處理 V79 細胞在 4、24 小時後

觀察發現，Quercetin 的濃度 (5、10、20、40、80 μM) 在 4 小時時有 90 % 以上的細胞活性，在 24 小時後仍有 80 % 以上的細胞活性，並且兩者曲線相似。因此，本實驗選取保留細胞活性 90 % 之劑量 Glycyrrhizin (50、100、200 μM) 以及 Quercetin 的濃度 (5、10、20 μM)，探討以上劑量是否對乙醛與氯化鎘所產生之傷害具有抑制作用。

十二、Glycyrrhizin 與 Quercetin 對乙醛與氯化鎘誘發脂質過氧化之影響

由 fig. 10 所表示，預處理 Glycyrrhizin (50、100、200 μM) 的濃度 1 小時，再與乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10 μM) 共同暴露於細胞 4 小時發現，細胞受到乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10 μM) 產生脂質過氧化的程度並未隨著 Glycyrrhizin 濃度的增加而減少。由 fig. 11 所表示，預處理 Quercetin (5、10、20 μM) 的濃度 1 小時，再與乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10 μM) 共同暴露於細胞 4 小時發現，在 Quercetin (10 μM) 的濃度下對乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10 μM) 誘發脂質過氧化抑制作用最好，降低約 20 %，而在 Quercetin (20 μM) 的濃度下卻只抑制約 15 %，Quercetin (5 μM) 的濃度沒有觀察到抑制作用。因此，Quercetin 具有抑制細胞受到乙醛與氯化鎘誘發脂質過氧化的能力。

十三、Glycyrrhizin 與 Quercetin 對乙醛與氯化鎘誘發粒線體去極化之影響

由 fig. 12-13 結果顯示，細胞未預先處理 Glycyrrhizin 或 Quercetin 而只單一或共同暴露乙醛和氯化鎘，結果發現乙醛和氯化鎘共同暴露會導致細胞質中 Rhodamine 123 的量提高，表示其 plasma membrane 受到損傷，在預先處理不同濃度 Glycyrrhizin (50、100、200 μM) 和

Quercetin (5、10、20 μM) 1 小時，再進行乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10 μM) 共同暴露於細胞 4 小時，結果可以觀察到 Glycyrrhizin 和 Quercetin 能抑制細胞質中 Rhodamine 123 的增加，表示可以預防細胞受到乙醛與氯化鎘產生 plasma membrane 的傷害，其中 Quercetin 的保護效果為 Glycyrrhizin 的 2 倍以上。

討 論

乙醛一方面可因在工業製程中大量使用而被人體所接觸吸收，另一方面可經由攝取酒精性飲料，在體內代謝形成；根據過去文獻指出，重金屬鎘對於生物以及環境有很高的毒性，根據現實環境中人體極有可能同時暴露與吸收數種環境毒物。因此，本研究主要在細胞層面上探討乙醛與氯化鎘共同暴露 4 小時下，對 V79 中國倉鼠肺臟細胞所造成毒性之效應，並以 independent joint action model 以及 synergistic interaction assay 分析在共同暴露下是否具有複合效應。

首先利用 Trypan blue exclusion 的方法，觀察到單一暴露的乙醛 (1~5 mM) 與氯化鎘 (10、25、50 μ M) 之劑量其細胞存活率在 80% 以上 (fig 1a, fig 1b)，並進一步 MTT 的試驗觀察細胞活性，結果在相同的劑量下發現有相似之結果 (fig 2a, fig 2b)，因此實驗選取細胞存活率 80% 以上之劑量進行共同暴露，利用 Trypan blue exclusion 立即觀察細胞毒性，沒有產生複合之細胞毒性，由 fig 1c 以及表一得知。另外再由 fig 2c 以及表二得知，經過 MTT 的試驗發現只有在乙醛 (5 mM) 與氯化鎘 (10、25、50 μ M) 的共同暴露下，細胞活性有明顯之下降 ($p < 0.01$)。

由 independent joint action model 分析其實際抑制細胞活性大於預期抑制細胞活性，而由 Trypan blue exclusion 的實驗方法只能觀察到細胞急性死亡與存活的表現，在短時間下是無法展現具複合毒性。但是由 MTT 的試驗結果，細胞在代謝 MTT 所表現出的細胞活性，卻有產生明顯的複合毒性效應。進一步由 colony efficiency 的試驗，長時間下

觀察到細胞在低劑量的乙醛 (1 mM、2.5 mM、5 mM) 與氯化鎘 (5、10、15、20 μ M) 共同暴露下便有很明顯的複合毒性產生，實際值大於預期值的 2 倍。因此，在低劑量下共同暴露雖然仍有加成毒性，但不會立即表現複合毒性，經過長時間下即可觀察到複合毒性的表現。

過去的研究已證實乙醛與金屬鎘均具有會造成細胞毒性、基因致突變性以及染色體的改變 (84,85,86) 之毒性效應。並且 Andrea 等人 (87) 指出鎘可增加經 UV 照射後產生的致突變性。Wontersen 指出 (25) 乙醛具有啟動子 (promoter) 之性質，可增加 benzo[a]pyrene 形成腫瘤的頻率。而本實驗中以 HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 基因突變的產生作為 DNA 損傷的指標之一。由表五的結果可知乙醛與氯化鎘的共同暴露會導致基因致突變性的增加，其具有複合作用。

Zalcour 等人 (88,89,90) 指出，鎘會抑制 DNA 複製和降低人類 β DNA polymerase 的活性，並且抑制 DNA repair pathway，如： O^6 -alkylguanine-DNA-alkyltransferase 和 nucleotide-excision repair。而 Mapoles 等人報導 (91)，乙醛會導致 CHO 細胞生長受抑制。而由本實驗 fig 3 得知，單一暴露的乙醛與氯化鎘，會抑制 V79 細胞的生長，而在共同暴露部份，其細胞生長的結果更加明顯的受到抑制，本研究進一步觀察 fig 4a, 4b, 4c 細胞週期的狀態，可以發現單一暴露乙醛與氯化鎘，至 48 小時後其細胞週期與控制組相似，更加證明單一暴露其細胞生長之情形；而共同暴露乙醛與氯化鎘，在 12 小時後 hypodiploid 部份產生片斷的 DNA，其表示細胞受到損傷，可能具有 Apoptosis 的現象產生，並且在 48 小時時觀察到細胞週期的分佈仍未恢復，同樣地在共同暴露部份也可以發現到其細胞生長的狀態，因此

共同暴露會導致細胞內 DNA 上的傷害增加，進而改變細胞週期的分佈，促進細胞死亡的現象。

雖有文獻指出(92)，經過長時間(30 days)給予氯化鎘，並同時給予 ethanol 導致內源性系統(endogenous)產生乙醛，會增加重金屬鎘在老鼠(rat)肝臟中的累積量。由實驗表七得知，在短時間(4 hrs)對 V79 細胞共同暴露乙醛與氯化鎘下，不會因為乙醛的加入而影響鎘離子進入細胞內之濃度。許多文獻指出，DNA 單股斷裂(DNA single strand break)可作為 DNA damage 之指標。由本實驗 fig 5 結果發現，單一暴露於乙醛與氯化鎘均有 DNA 單股斷裂的增加之傾向，但是在共同暴露時，卻沒有加強 DNA 單股斷裂的情形。最近 Katherine 等人(93)指出，乙醛會誘發 DNA-protein cross-links，在具有 protein 沉澱下，可能因此而干擾 DNA 單股斷裂的測定。

生物體自生性或外來物的誘發下，所產生的活性氧化物質(reactive oxidation species)，假若不能被體內解毒酵素系統(GSH、catalase、SOD)所清除，其細胞極易被自由基(free radical)所攻擊，導致細胞膜上產生脂質過氧化，甚至攻擊在 DNA 上，產生基因突變或是造成 DNA damage (94)。過去的文獻已指出重金屬鎘在 In vitro 或 In vivo 實驗中證實會引起氧化性傷害，產生脂質過氧化 (95)。另外，Olivares 等人(96)報導，乙醛亦會導致人類肝細胞 (cell line) 脂質過氧化的程度增加，如文獻所示本實驗(fig 6a, fig 6b)乙醛與氯化鎘均可誘發 V79 細胞之脂質過氧化程度上昇，並且在共同暴露乙醛(5 mM)與氯化鎘(5~20 μ M)發現具有加成(additive)以及協同作用(synergism)的增加，但是在較高劑量下沒有產生複合之效應，其可能

原因尚待進一步探討。

正常狀態下細胞會將 Rhodamine 123 uptake 至 mitochondria 之 matrix 中，此時因 Rhodamine 123 大量累積 mitochondria 中，cytosol 中螢光量較低，但如果在毒物傷害下，mitochondria 會因膜傷害而將使 Rhodamine 123 大量流入細胞質中，導致細胞質中 Rhodamine 123 的大量增加。由本實驗 Fig.7 可發現單一乙醛(5 mM)與氯化鎘(5、10、20 μ M)的暴露不會導致粒線體膜電位改變，而影響 Rhodamine 123 之螢光物質的減少。但是在共同暴露下，會使得 Rhodamine 123 此螢光物質在 cytosol 內大量增加，表示 plasma membrane 受到了損傷導致；最近有 Yang(97)等人研究觀察到氯化鎘會誘發 ROS 的產生，導致細胞脂質過氧化的生成，使得 Rhodamine 123 之螢光物質大量進入到 cytoplasm。此外 Rahn 等人(98)也證實乙醛會造成 plasma membrane 的損傷而影響 Rhodamine 123 的 uptake 狀態。

本實驗證明了乙醛與氯化鎘對 V79 細胞的毒性與傷害探討後，另外選取天然物中較易攝取或常用中藥之主成份 quercetin 和 glycyrrhizin，針對先前複合毒性的結果，利用 MTT 的方法測定，選取 Glycyrrhizin(50、100、200 μ M)和 Quercetin(5、10、20 μ M)觀察乙醛和氯化鎘多種劑量下共同暴露，其對 V79 細胞脂質過氧化的形成與粒線體和 plasma membrane 損傷之影響。由脂質過氧化實驗中，發現在乙醛(5 mM)與氯化鎘(10 μ M)所產生的脂質過氧化程度較其它共同暴露劑量嚴重，因此選用此劑量做為本實驗共同暴露之主要劑量。在本實驗 Fig.10 中，Glycyrrhizin 並未對共同暴露乙醛與氯化鎘所誘發的 MDA 濃度產生抑制作用，而在 Quercetin 的預處理部分則明顯可以觀察到

MDA 的產生受到抑制作用；在 Akamatsu 等(54)亦指出，Glycyrrhizin 能明顯降低 neutrophili 所產生的 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ ，而 cell-free 的系統中，則無法降低 ROS 的產生顯示 Glycyrrhizin 雖然能抑制 neutrophili 內生性 ROS 之形成，其並非 ROS 捕捉劑(scavenger)，故無法消除由外來毒物所誘發活性氧化物質之傷害，但如果以常用之 free radical scavenger 的 Quercetin 處理，則對共同暴露後脂質過氧化之形成有明顯的抑制效果，Quercetin(10 μM)可降低 20 %的脂質過氧化。在 Fig 12-13 中可以觀察到在預處理 Quercetin 和 Glycyrrhizin 的實驗組可對乙醛(5mM)和氯化鎘(10 μM)共同暴露所造成的 plasma membrane 損傷情形具有抑制作用，而又以 Quercetin(10、20 μM)的保護作用最好。

由本研究再次驗證過去文獻中所指出，乙醛與氯化鎘這兩種毒物，在單一暴露下具有細胞毒性及基因毒性；更進一步發現當這兩類環境污染物共同暴露時，對於細胞毒性及基因毒性具有顯著的加成性作用及協同性作用。且複合毒性的產生並非立即呈現於細胞急性死亡與存活，而是細胞生長受到抑制、脂質產生傷害或者可能因細胞內解毒之酵素系統遭到損傷等，漸漸造成基因突變或是產生 DNA damage。

結 論

本研究觀察到 V79 細胞共同暴露乙醛與氯化鎘下，會對細胞造成複合毒性之產生，但其毒性作用並非在短時間所表現，而是透過自由基 (free radical) 的產生，誘發細胞脂質過氧化及導致 plasma membrane 的損傷，進一步在長時間下造成複合毒性的效應，產生細胞死亡。同時在細胞生長情形與細胞週期恢復狀態觀察到共同暴露部份比各別單一暴露有較嚴重的改變，並且在長期基因表現的層面上，會導致基因致突變率的增加。因此，間接推測當作業場中之工人，若有酗酒之習慣極易透過內源性系統產生乙醛，又在作業環境中受到重金屬傷害，其兩者暴露的結果，即產生複合效應之毒害；亦表示當人類同時暴露或吸收數種毒物，可能具有其更嚴重的傷害。

另外，以天然物中之 free radical scavenger quercetin 預處理可以抑制乙醛與氯化鎘在共同暴露下所產生的脂質過氧化，而甘草之主成份 glycyrrhizin 則否，但在預處理 quercetin 與 glycyrrhizin 則會抑制 mitochondria plasma membrane 的損傷程度。因此，天然物 quercetin 能透過降低自由基產生，減少乙醛與氯化鎘所造成的細胞傷害，而 glycyrrhizin 亦可透過不同機制達到保護的效果。

参 考 文 献

1. Waalkes, M. P. and Barter, R. A. (1992). Toxicological principles of metal carcinogenesis with emphasis on cadmium. *Criti. Revi. Toxicol.* 22:175-201.
2. IRAC. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *IRAC Monogr. Eval. Carcinogen. Risks Human*, 58:119-238. Lyon:IRAC Scientific Publications.
3. Louis W. Chang and Tsuguyoshi Suzuki. (1996). Cadmium. *Toxicology of metals* 231-245.
4. Moreau, T., Orssaud, G., Lellouch, J. and Calude, J. R. (1983). Blood cadmium levels in a general male population with special reference to smoking. *Arch Environ. Health.* 38:163-167.
5. Nomiya, K. (1980). Recent progress and perspectives in cadmium health effects studies. *Sci. Total Environ.* 14, 199-232.
6. Jean, M., M. G. and Alfredo, S. M. (1992). Determination of Cadmium in Urine Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with probe atomization and Deuterium background correction. *J. Anal. At. Spectrom.* 7:1079-1083.
7. Friberg, L., Elinder, C. G., Kjellstrom, T. and Nordberg, G. F. (1986). Cadmium and Health: A toxicology and epidemiological appraisal, Vol. I and II, CRC Press, Boca Raton, FL.
8. Friberg, L., Kjellstrom, T. and Nordberg, G. F. (1986). In Handbook of the Toxicology of Metals, 2nd ed., Vol. II, Friberg, L., Nordberg, G.F., and Vouk, V., Eds, Elsevier, Amsterdam, 130.
9. Takenaka, S., Oldiges, H., Konig, H., Hochrainer, D. and Oberdorster, G. (1983). Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in rats. *J.*

Natl. Cancer Inst. 70, 367-373.

10. Waalkes, M. P., Rehm, S., Riggs, C. W., Bare, R. M., Devor, D. E., Poirier, L. A., Wenk, M. L., Henneman, J. R. and Balaschak, M.S. (1988). Cadmium carcinogenesis in male Wistar [Crl: (WI)BR] rats: dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. *Cancer Res.* 48, 4658-4663.
11. Blakley, B. R. (1986). The effect of cadmium on chemical- and viral-induced tumor production in mice. *J. Appl. Toxicol.* 6, 425-429.
12. Waalkes, M. P., Rehm, S., Riggs, C. W., Bare, R. M., Devor, D. E., Poirier, L. A., Wenk, M. L. and Henneman, J. R. (1989). Cadmium carcinogenesis in male Wistar[Crl: (WI)BR]rats : dose-response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site. *Cancer Res.* 49, 4282-4288.
13. Waalkes, M. P., Rehm, S., Sass, B. and Ward, J. M. (1992). In *Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity*, Nordberg, G.F., Alessio, L., and Herber, R.F.M., Eds; IARC Sci. Pub., International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 401.
14. Samuel, B., Donna, L., Susan, K. K. and David, H. P. (1996). Comparative effect of Cd²⁺ and Cd-Metallothionein on culture kidney tubule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136:220-228.
15. Waalkes, M. P. and Rehm, S. (1992). Carcinogenicity of oral Cadmium in the male Wister (WF/NCr) rat: effect of chronic dietary zinc deficiency. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19, 512-520.
16. Jungman, J., Reins, H. A., Schobert, C. (1993). Resistance to cadmium mediated by ubiquitin dependent proteolysis. *Nature.* 361: 369-371.
17. Nocentini, S. (1987). Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic*

Acid Res. 21:359-365.

18. Kasahara, K., Fujiwara, Y., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T. and Saijo, N. N. (1991). Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res.* 51, 3237-3242.
19. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Allyl Compounds Aldehydes, Epoxides and Peroxides. (1985). International Agency for Research on Cancer, Lyon.
20. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Tobacco Smoking. (1985). International Agency for Research on Cancer, Lyon.
21. Watson, A. Y., Bates, R. R. and Kennedy, D. (eds) Air Pollution, The Automobile, and Public Health. National Academy Press, Washington, DC. 1988.
22. Sherman DIN, Williams R. (1994). Liver damage : mechanism and management *British Medical Bulletin.* 50:No11, 124-138.
23. Wartbrug, J. P. : Acetaldehyde, *Psychopharmacology of Alcohol*, M. Sandler(Ed.); Raven: New York, 1980; pp. 137-147.
24. Woutersen, R. A., Appelman, L. M., Feron, V. J. and Heijden, C. A. (1984). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats, II. Carcinogenicity study : interim results after 15 months. *Toxicology.* 31, 123-133.
25. Feron, V. J. and Woutersen, R. A. (1982). Respiratory tract tumors in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo[a]pyrene or diethylnitrosamine. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18, 13-31.
26. O'Shea, K. S. and Kaufman, M. H. (1981). Effects of acetaldehyde on neuroepithelium of early mouse embryos. *J. Anat.* 132, 107-118.

27. Sreenathan, R. N., Singh, S. and Padmanabhan, R. (1984). Implications of the placenta in the acetaldehyde induced intrauterine growth retardation. *Drug Alcohol Depend.* 13, 199-204.
28. Dreosti, I. E., Record, I. R. and Manuel, S. J. (1981). The effects of ethanol and acetaldehyde on DNA synthesis in growing cells and on fetal development in the rat. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 5, 357-362.
29. Nils, H., Hannele, J. S., Riitta, H. and Mikko, S. (1997). High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: Methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis.* 18(9): 1739-1743.
30. Julkunen, R. J. K. and Lieber, C. S. (1985). First pass metabolism of ethanol: agastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol. *Life Sci.* 6, 567-573.
31. Blot, W. J. (1992). Alcohol and cancer. *Cancer Res.* 52 (suppl.), 2119-2123.
32. Tuma, D. J. and Sorrell, M. F. (1985). Covalent binding of acetaldehyde to hepatic proteins: role in alcoholic liver injury. *Progr. Clin. Biol. Res.* 183, 3-17.
33. Lambert, B., Chen, Y. and Sten, M. (1985). DNA cross-links in human leucocytes treated with vinyl acetate and acetaldehyde in vitro. *Mutation Res.* 146, 301-303.
34. Lam, C. W., Casanova, M. and Heck, H. D. (1986). Decreased extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure. *Fund. Appl. Toxicol.* 6, 541-550.
35. Vicki, L. D. (1988). A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutation Res.* 195, 1-20.
36. Gaines, K. C., Salhany, J. M. and Tuma, D. J. (1977). Reaction of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins. *FEBS Lett.*

- 75, 115-119.
37. Hemminki, K. and Suni, R. (1984). Sites of reaction of glutaraldehyde and acetaldehyde with nucleosides. *Arch. Toxicol.* 55, 186-190.
 38. Vina, J., Estrella, J. M., Guerri, C. and Romero, F. J. (1980). Effect of ethanol on glutathione in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 188, 549-552.
 39. Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M. J., Bilio, A. J. and Bonomo, R. (1991). In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O_2^- . *Free Radic. Biol. Med.* 11, 1-8.
 40. Huguet, A. I., Manez, S. and Alcaraz, M. J. (1990). Superoxide scavenging properties of flavonoids in non-enzymic system. *Z Naturforsch.* 45c, 19-24.
 41. Bors, W. and Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic. Res. Commun.* 2, 289-294.
 42. Nagre, S. A., and Salvayre, R. (1992). Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 101-106.
 43. Middleton, E., The flavonoids: Trends Pharmacol Sci. August, 335-338, 1984.
 44. Ono, K. and Nakane, H. (1990). Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J. Biochem.* 108, 609-613.
 45. Morel, G., Lescoat, P., Cogrel, O., Sargent, N., Padeloup, P., Brissot, P. C. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45, 13-19.
 46. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.

- Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956.
47. Isabelle, M., Gerard, L., Pascale, C., Odile, S., Nicole, P., Pierre, B., Pierre, C. and Josiane, C. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, guercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45(1):13-19.
 48. Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J. and Yong, J. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 19-21.
 49. Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants : determination of radical-scavenging efficiencies. *In : Methods in Enzymology* (Eds. Packer L and Glazer AN), 186, 343-355. Academic Press, San Diego.
 50. Robak, J., and Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37, 837-841.
 51. Duthie, S. J., Collins, A. R., Duthie, G. G., Dobson, V. L. (1997). Guercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutation Res.* 393, 223-231.
 52. Bjeldanes, L. F. and Chang, G. W. (1977). Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science.* 197, 577-578.
 53. Brown, J. P. and Dietrich, P. S. (1979). Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella/mammalian microsome test; Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat bacteria and other sources. *Mutation Res.* 66, 223-240.
 54. Hardigree, A. A. and Epler, J. L. (1978). Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial systems. *Mutation Res.* 58, 231-239.
 55. MacGregor, L. T. and Wehr, C. M. (1981). Bone marrow and

- peripheral blood erythrocyte micronucleus frequencies in mice exposed to plant flavonoids, Paper presented at the 13th Annual Meeting of the American Environmental Mutagen Society.
56. Brown, J. P. (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinines and related compounds. *Mutation Res.* 75, 243-277.
 57. Nagao, M., Morita, N., Yahagi, T. and Sugimura, T. (1981). Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environ. Mytagen.* 3, 401-419.
 58. Ochiai, M., Nagao, M., Wakabayashi, K. and Sugimura, T. (1984). Superoxide dismutase acts as an enhancing factor for quercetin mutagenesis in rat-liver cytosol by preventing its decomposition. *Mutation Res.* 129, 19-24.
 59. Erturk, E., Hatcher, J. F., Nunoya, T., Pamukcu, A. M. and Bryan, G. T. (1984). Hepatic tumors in Sprague-Dawley and Fisher-344 female rats exposed chronically to quercetin or its glycoside rutin. *Cancer Res.* 25, 95
 60. Pamukcu, A. M., Yalciner, S., Hatcher, J. F. and Bryan, G. T. (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen, present in bracken fern. *Cancer Res.* 40, 3468-3472.
 61. Hirose, M., Fukushima, S., Sakata, T., Inui, M., and Ito, N. (1983). Effects of quercetin on two-stage carcinogenesis of rat urinary bladder. *Cancer Lett.* 21, 23-27.
 62. Takanashi, H., Aiso, S. and Hirono, I. (1983). Carcinogenicity test of quercetin and kaempferol in rats by oral administration. *J. Food. Safety.* 5, 55-60.
 63. Sahu, S. C. and Washington, M. C. (1991). Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer*

Lett. 58, 75-79.

64. Zhang, Y. H., Isobe, K., Nagase, F. (1993). Glycyrrhizin as a promotor of the late signal transduction of interleukin-2 production by splenic lymphocytes. *Immunology.* 79, 528
65. Kondo, Y., Takano, F., (1994). Nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages enhanced with glycyrrhizin. *Biol Pharm Bull.* 17, 759.
66. Finney, R. S. H., Tarnoky, A. L. (1960). *J. Pharm Pharmacol.* 12, 49-58.
67. Inoue, H., Mori, T., Shibata, S., Koshihara, Y. (1989). *Br. J. Pharmacol.* 96, 204-210.
68. Logeman, W., Lauria, F., Cudkowicz, G., Fransceschini, J. (1960). *Nature.* 187, 607-608.
69. Lin, I. H., Hau, D. M., Su, M. J., Chen, W. C. (1996). Effects of glycyrrhizae and glycyrrhizic acid on radiation injury in mice. *American journal of Chinese Medicine.* 24, 279-288.
70. Sakagami, H., Sagaya, K., Atsumi, A., Fujinaga, S., Sato, T., Takeda, M. (1993). Stimulation by PSK of interleukin-1 production by human peripheral blood mononuclear cell. *Anticancer Res.* 13, 671-676.
71. Kroes, B. H., Beukelman, C. J., Van Den Berg, A.J.J., Wolbink, H. and Labadie, R. P. (1997). Inhibition of human complement by β -glycyrrhetic acid. *Immunology.* 90, 115-120.
72. Suzuki, H., Ohta, Y., Takino, T., Fujisawa, K., Hirayama, C., Shimizu, N., Aso, Y. (1977). *Igakuno Ayumi.* 102, 562.
73. Akamatsu, H., Komuta, J., Asada, Y., Niwa, Y. (1991). Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Med.* 57, 119-121.

74. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monkds, A. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 599-601.
75. Chang, C. C., Cazzellazzi, M., Glover, T. W. and Trosko, J. E. (1978). Effect of harmon and nor-harmon on spontaneous and ultraviolet light induced mutagenesis in cultured Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 38, 4527-4533.
76. Walker, P. R. and Sikorska, M. (1993). Relationship between Apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: Roles of protein kinase C, tyrosine phosphorylation, and AP1. *Exper. Cell Res.* 207, 142-151.
77. Ochi, T., Takahashi, K. and Ohsawa, M. (1987). Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutation Research.* 180, 257-266.
78. Yogi, K. (1987). Lipid peroxidation and human diseases. *Chem. Phys .Lipids.* 45, 337-351.
79. Charles, A. T., John, M. F. (1994). Methods in toxicology : Part B In vitro toxicity indicators, Academic Press, 23-32.
80. Imberti, R., Nieminen, A. L., Herman, B. and Lemasters, J. J. (1993). Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butyl hydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 265, 392-399.
81. Bliss, C. I. (1939). The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl. Biol.* 26, 585-615.
82. Zaroogian, G. and Voyer, R. A. (1995). Interactive cytotoxicities of selected organic and inorganic substances to brown cells of mercenaria. *Cell Biology and Toxicology.* 11, 263-271.

83. Reif, A. E. (1984). Synergism in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 73(1):25-39.
84. Katsifis, S. P., Kinney, P. L. and Christie, N. T. (1996). Christie. Interaction of nickel with mutagens in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Mutation Research*. 359, 7-15.
85. Grafstrom, R. C. (1990). In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis. *Mutation Research*. 238, 175-184.
86. Ochi, T. and Ohsawa, M. (1983). Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and single-strand scission of DNA by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Research*. 111, 69-78.
87. Ochi, T., Mogi, M., Watanabe, M., and Ohsawa, M. (1984). Induction of chromosome aberrations in cultured Chinese hamster cells by short-term treatment with cadmium chloride. *Mutation Research*. 137, 103-109.
88. Andrea, H. and Detmar, B. (1989). Comutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells. *Biological Trace Element Research*. 21, 359-365.
89. Singh, N. P. and Khan, A. (1995). Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mutation Research*. 337, 9-17.
90. Hartwig, A. (1994). Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.* 102(suppl. 3), 45-50.
91. Mapoles, W. E. and Wartburg, J. P. (1987). Acute aldehyde syndrome and chronic aldehydism. *Mutation Research*. 186, 249-259.
92. Geeta, S., and Kiran, D. G. (1991). Effect of ethanol on cadmium-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochemical Pharmacology*. 42(suppl.), pp. S9-S16.

93. Katherine, L. O., Cherr, G. N. and Keen, C. L. (1996). The effects of some redox-active metals and reactive aldehydes on DNA-protein cross-links in vitro. *Toxicology*. 110, 1-8.
94. Stadtman, E. R., and Berlett, B. S. (1997). Reactive Oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 485-494.
95. Yang, J. L., Chao, J. I. and Lin, J. G. (1996). Reactive oxygen species may participate in the mutagenicity and Mutation Spectrum of cadmium in Chinese hamster ovary-K1 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1360-1367.
96. Olivares, I. P., Bucio, L., Souza, V. Carabez, A. and Gutierrez-Ruiz, M. C. (1997). Comparative study of the damage produced by acute ethanol and acetaldehyde treatment in a human fetal hepatic cell line. *Toxicology*. 120, 133-144.
97. Yeng, C. F., Shen, H. M., Shen, Y. and Ong, C. N. (1997). Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environ. Health. Perspect.* 105(7):712-716.
98. Rahn, C. A., Bombick, D. W. and Doolittle, D. J. (1991). Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity. *Fundament and Applied Toxicology*. 16, 435-448.

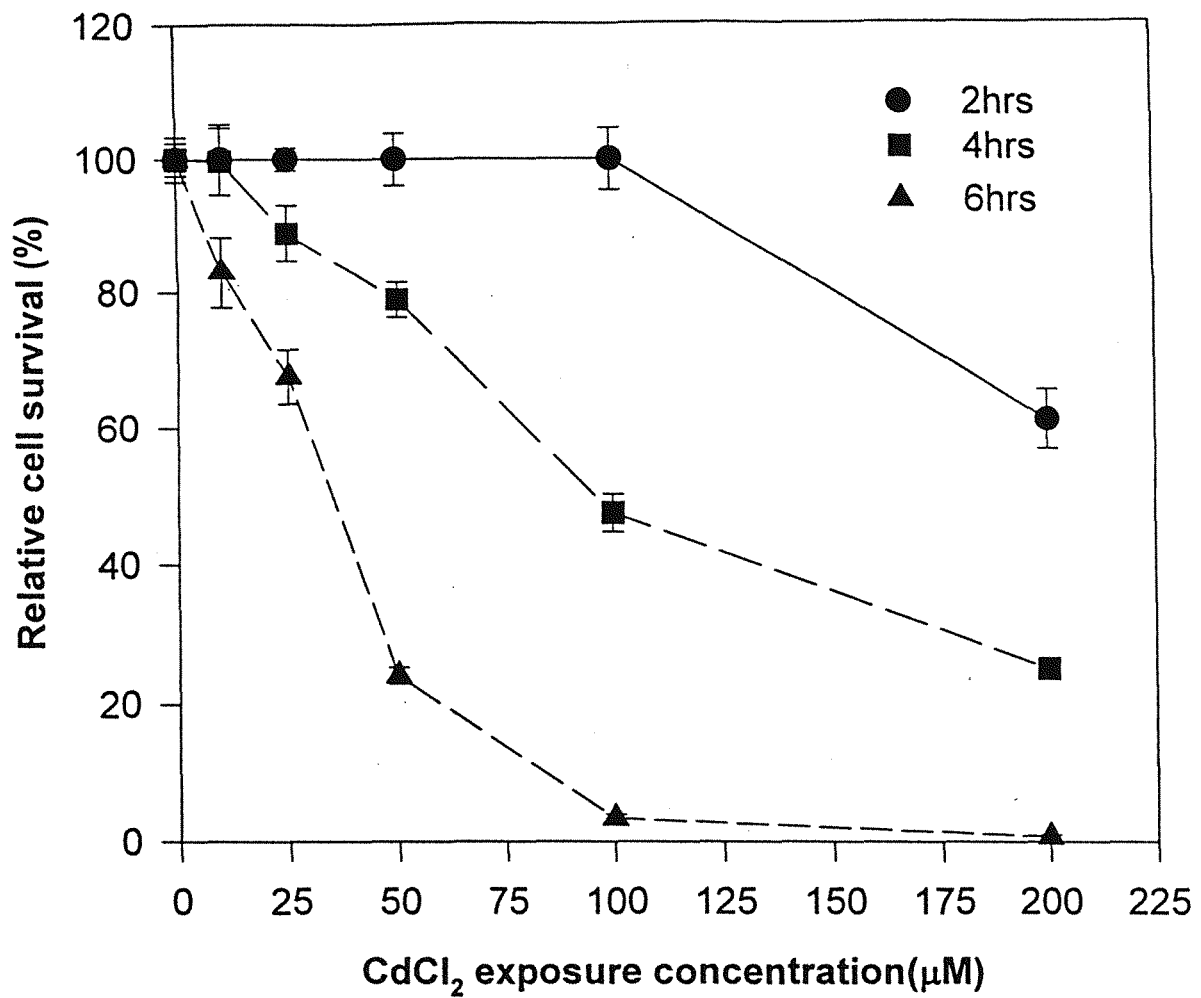


Fig1a. 由 Trypan blue exclusion assay 探討不同劑量之氯化鎘在 2、4、6 小時後，對 V79 細胞之毒性影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

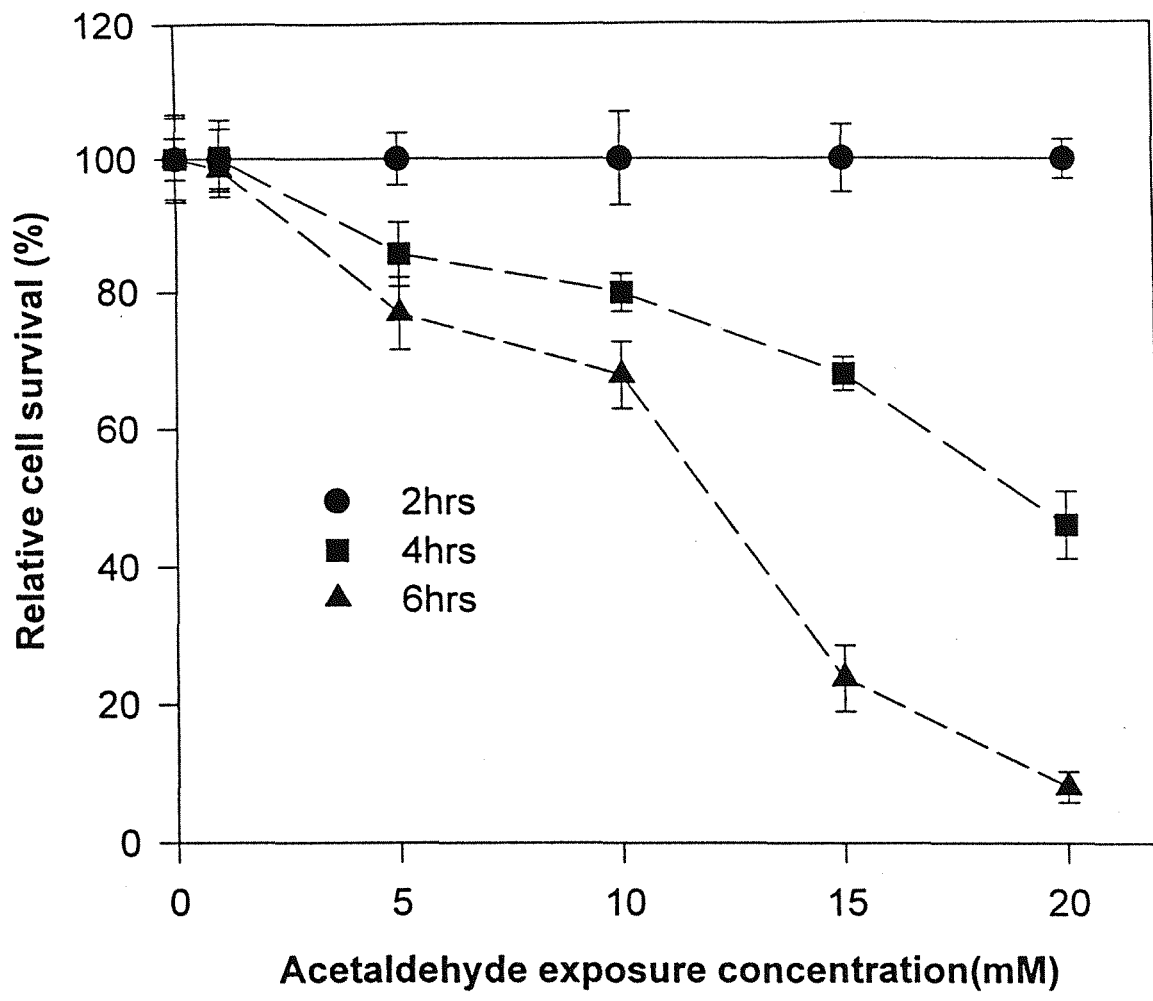


Fig1b. 由 Trypan blue exclusion assay 探討不同劑量之乙醛在 2、4、6 小時後，對 V79 細胞之毒性影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

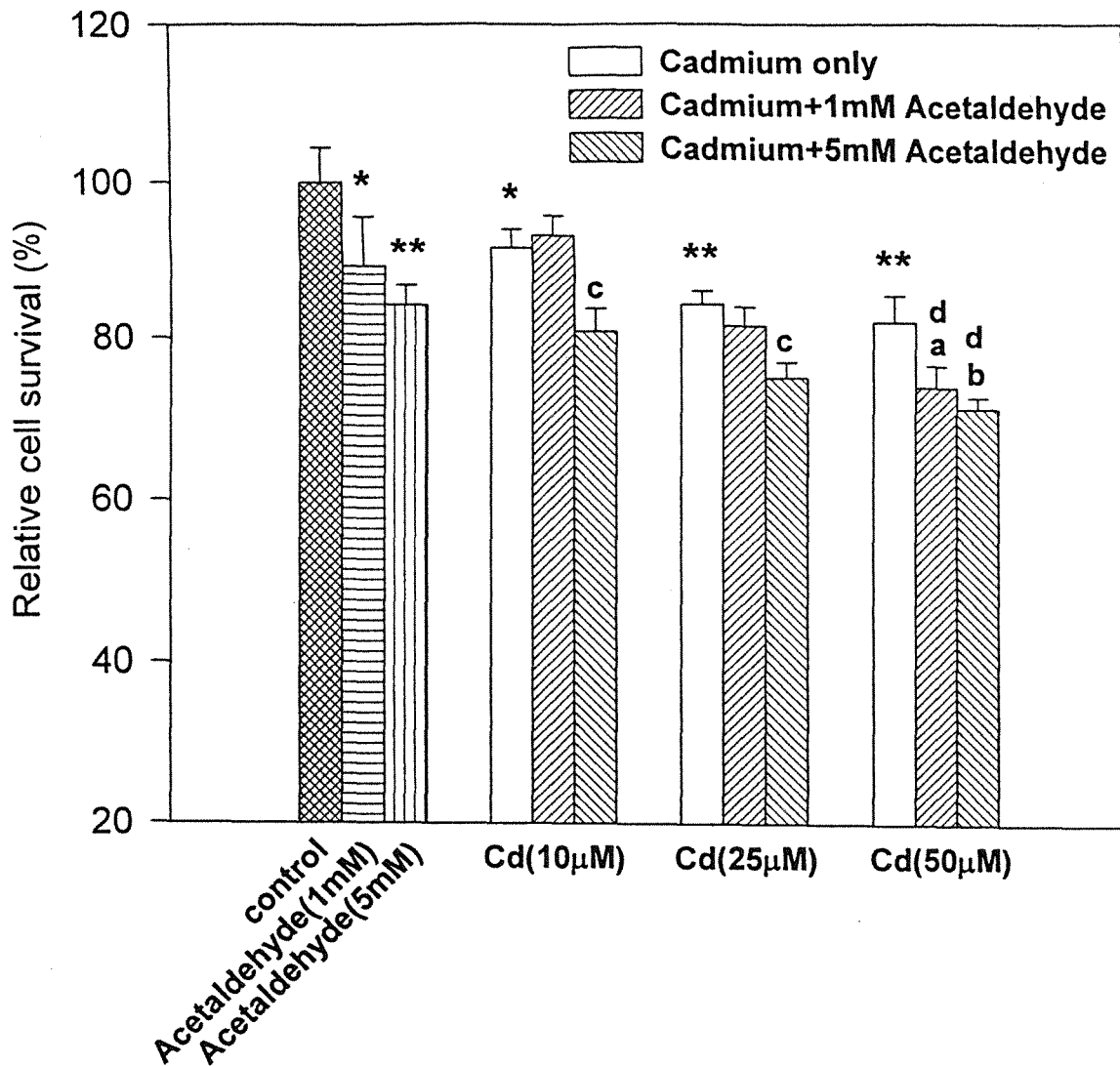


Fig1c.不同劑量之乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露於 V79 細胞 4 小時，對 Trypan blue exclusion 細胞毒性試驗之影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

*, **表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異 (*: p<0.05, **: p<0.01)

a, b 表示與同組單一劑量之乙醛比較，其結果有顯著之差異 (a: p<0.05, b: p<0.01)

c, d 表示與同組單一劑量之氯化鎘比較，其結果有顯著之差異 (c: p<0.01, d: p<0.05)

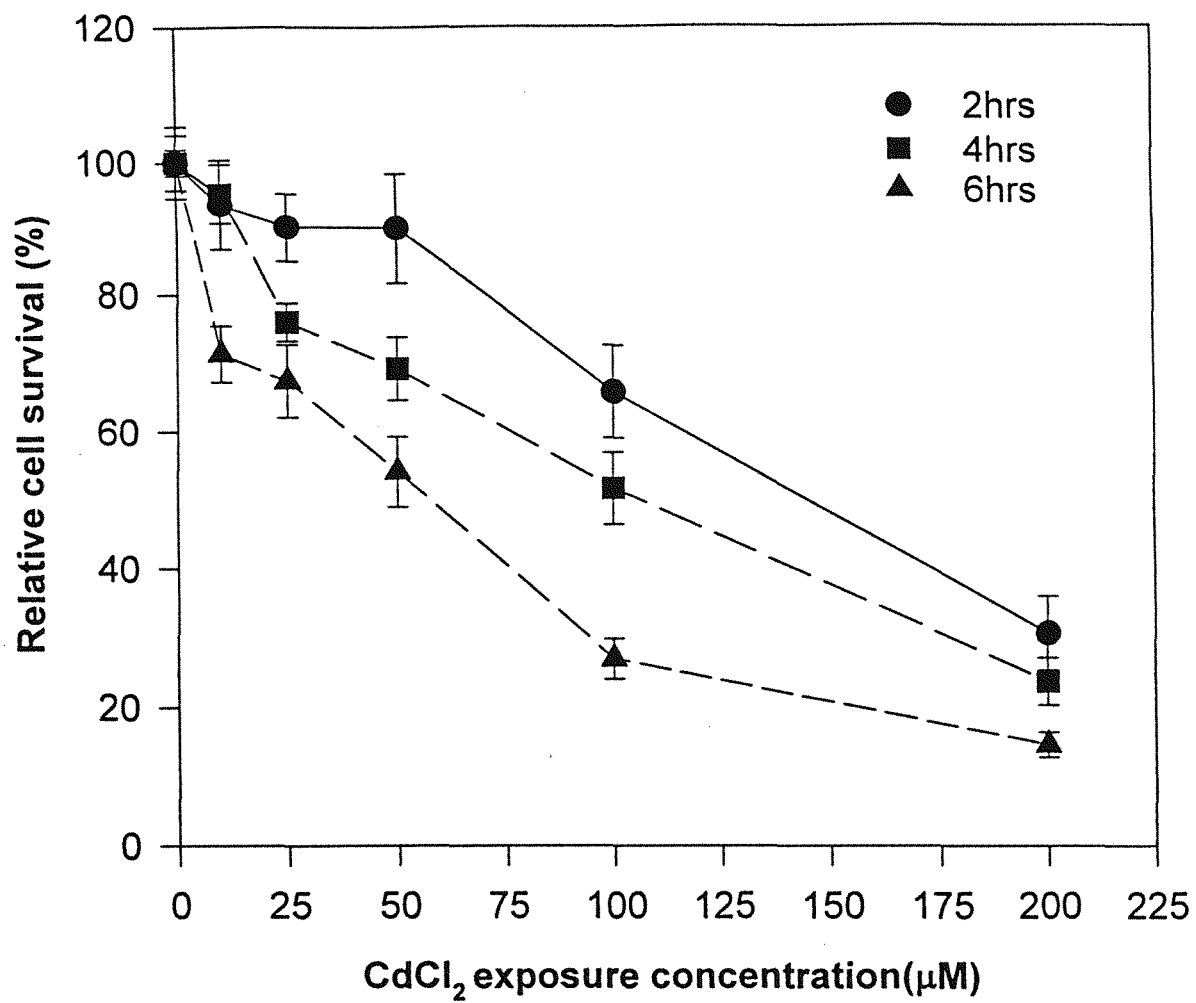


Fig2a. 由 MTT assay 探討不同劑量之氯化鎘在 2、4、6 小時後，對 V79 細胞之活性影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

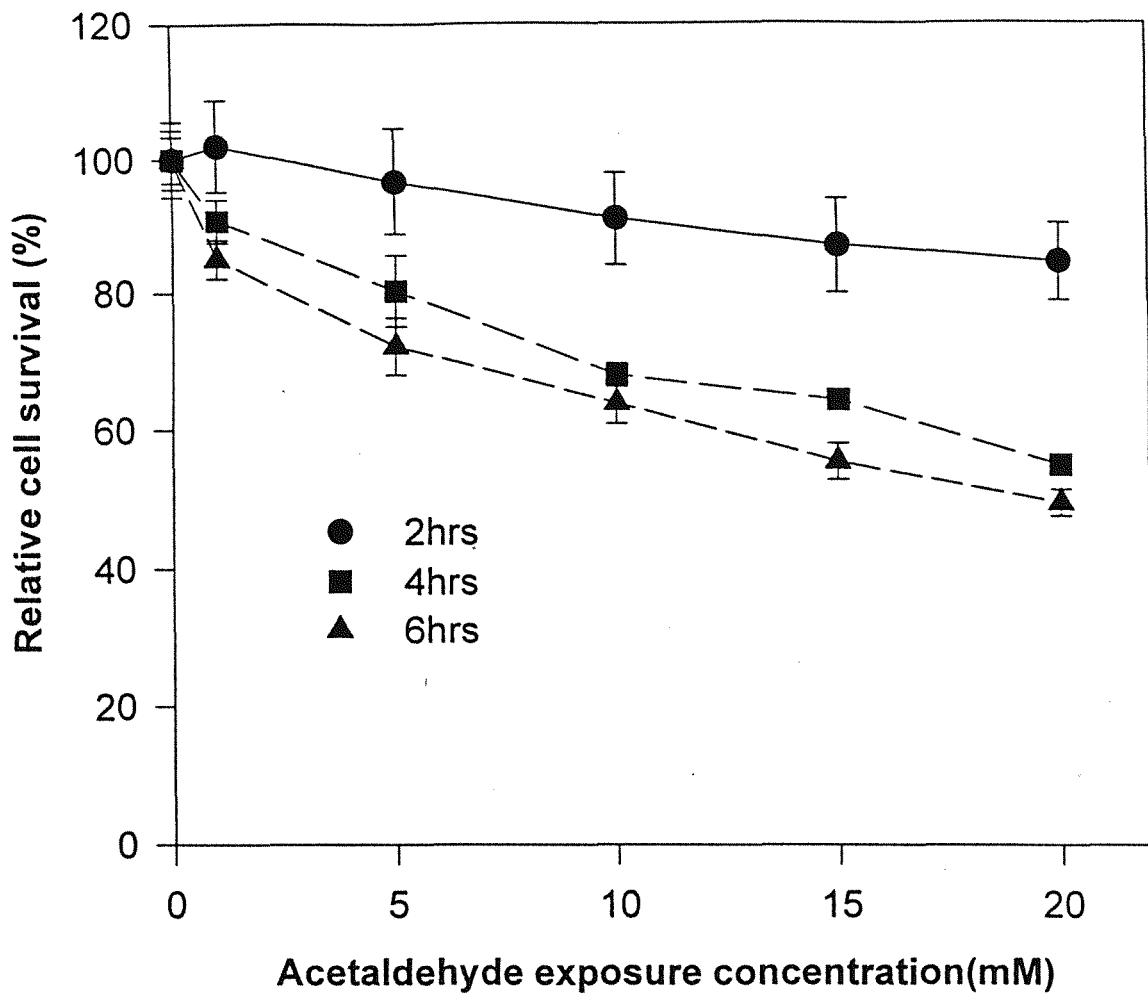


Fig2b.由 MTT assay 探討不同劑量之乙醛在 2、4、6 小時後，對 V79 細胞之活性影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

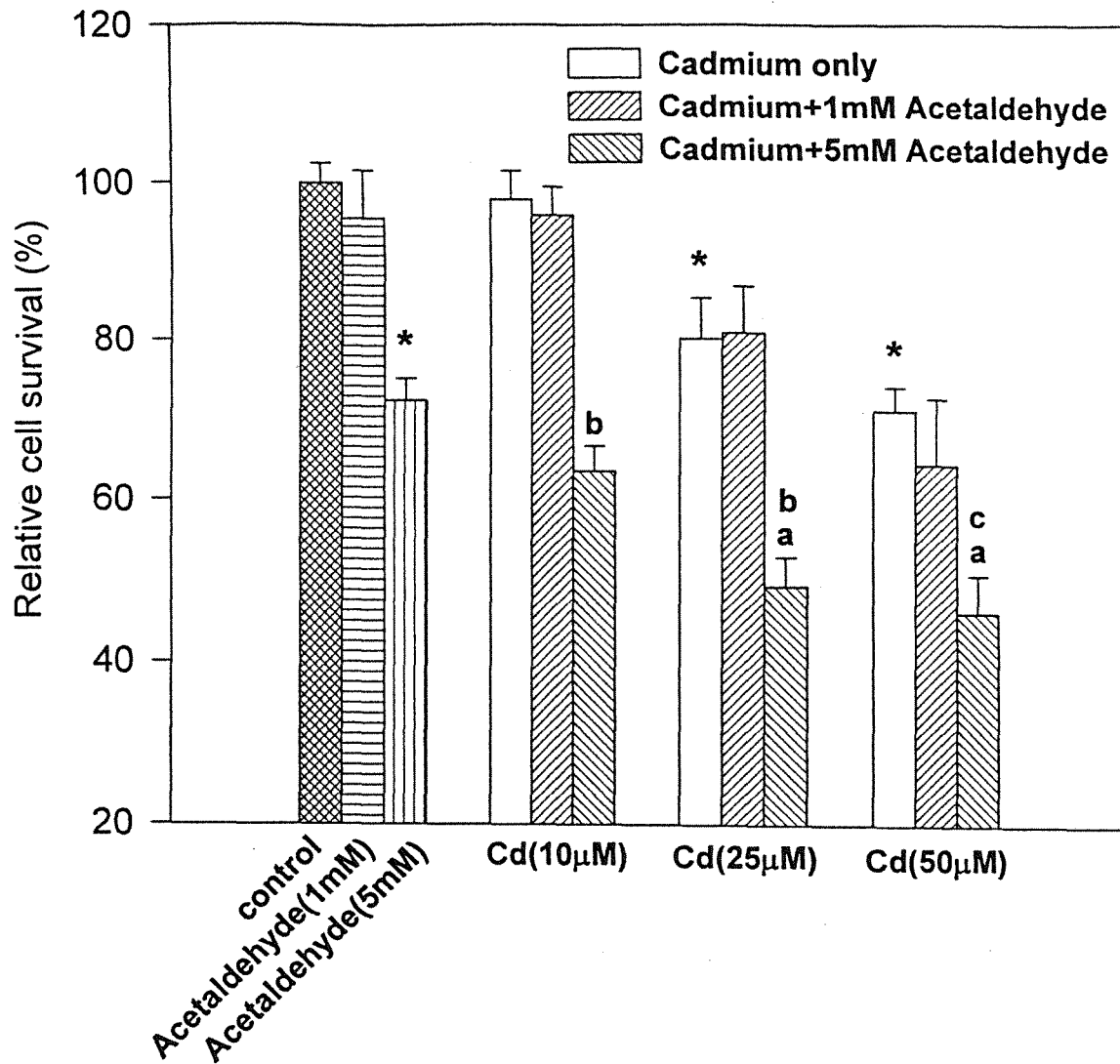


Fig2c. 不同劑量之乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露於 V79 細胞 4 小時，對 MTT 細胞活性試驗之影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(: p<0.05)

a 表示與同組單一劑量之乙醛比較，其結果有顯著之差異(a: p<0.01)

b, c 表示與同組單一劑量之氯化鎘比較，其結果有顯著之差異(b: p<0.01, c: p<0.05)

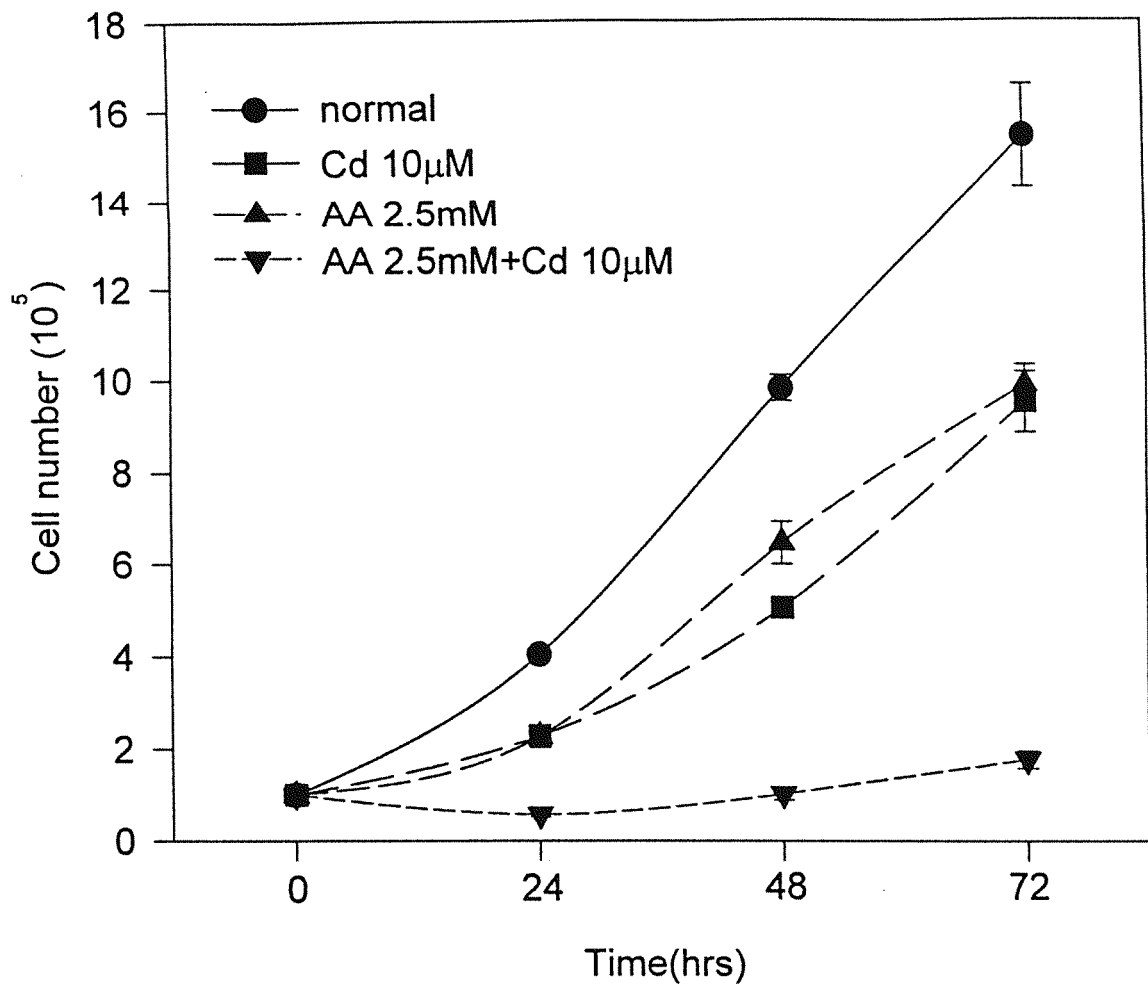


Fig3.乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，對 V79 細胞生長情形之影響。(Trypan blue exclusion assay)

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

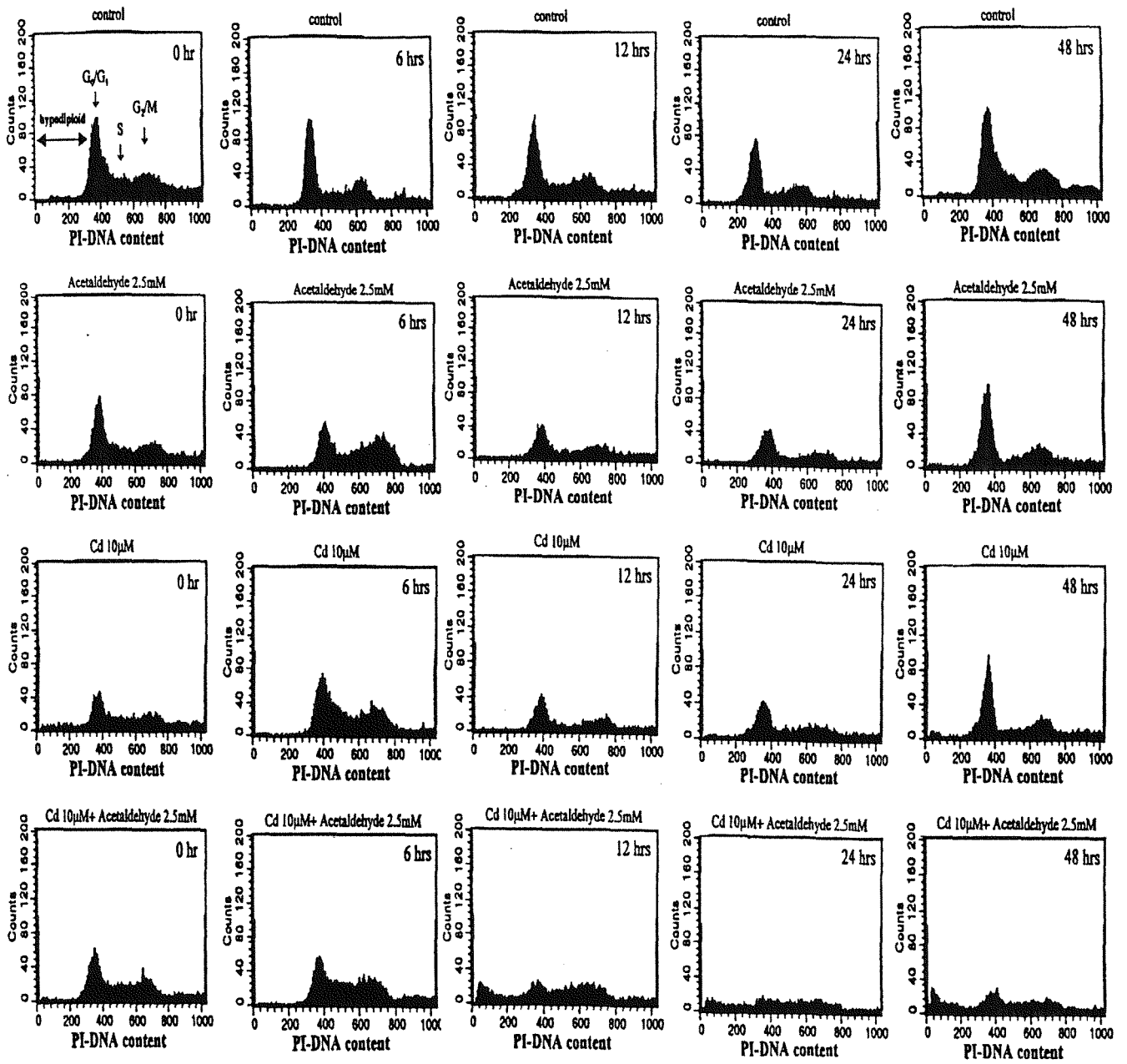


Fig 4a. 乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，影響 V79 細胞在細胞週期(G_0/G_1 , S, G_2/M , hypodiploid)之分佈。

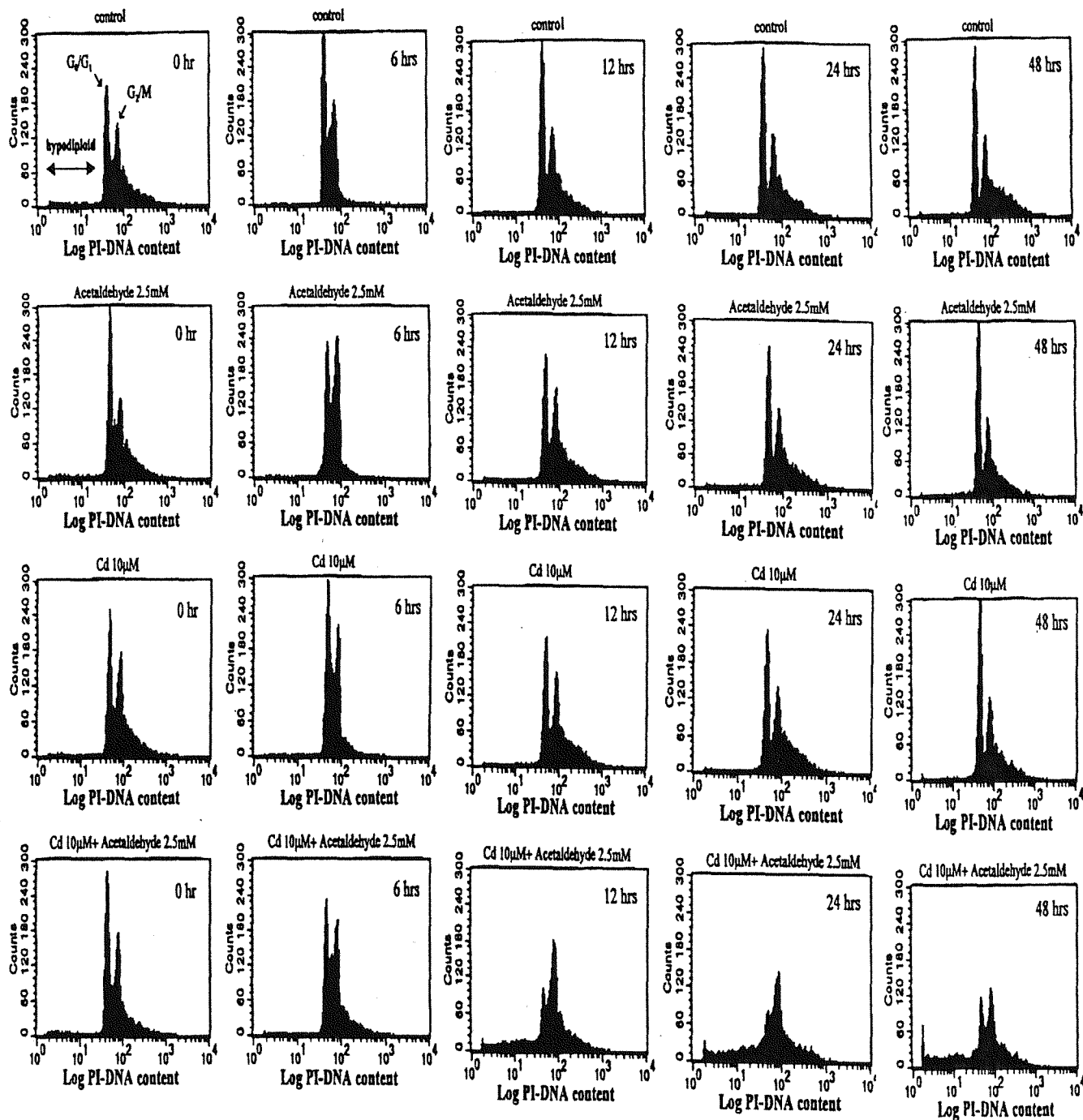


Fig 4b. 乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，影響 V79 細胞在細胞週期(G₀/G₁ , S , G₂/M , hypodiploid)之分佈。

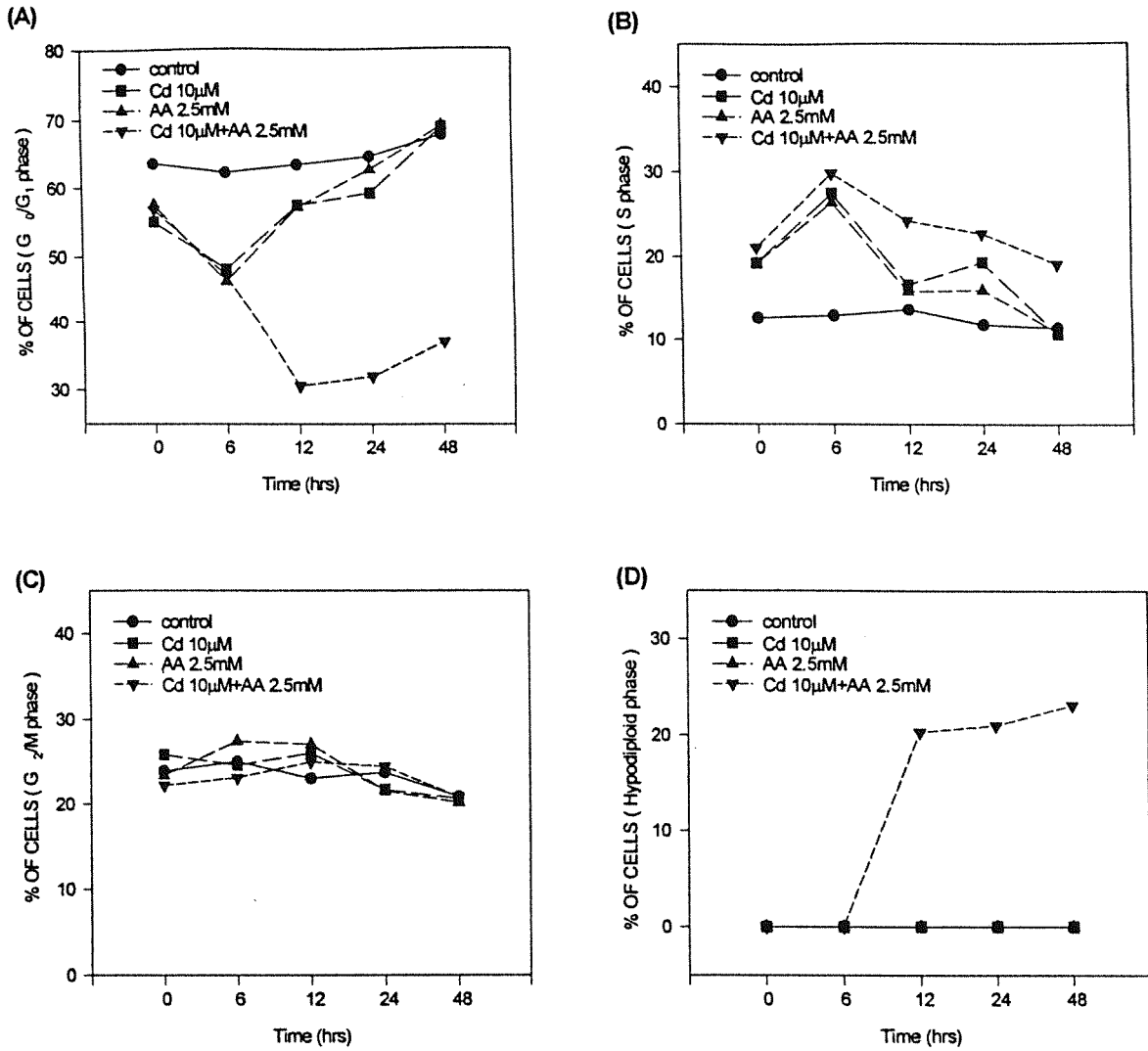


Fig 4c. 乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，影響 V79 細胞在細胞週期(G₀/G₁ , S , G₂/M , hypodiploid)之分佈。

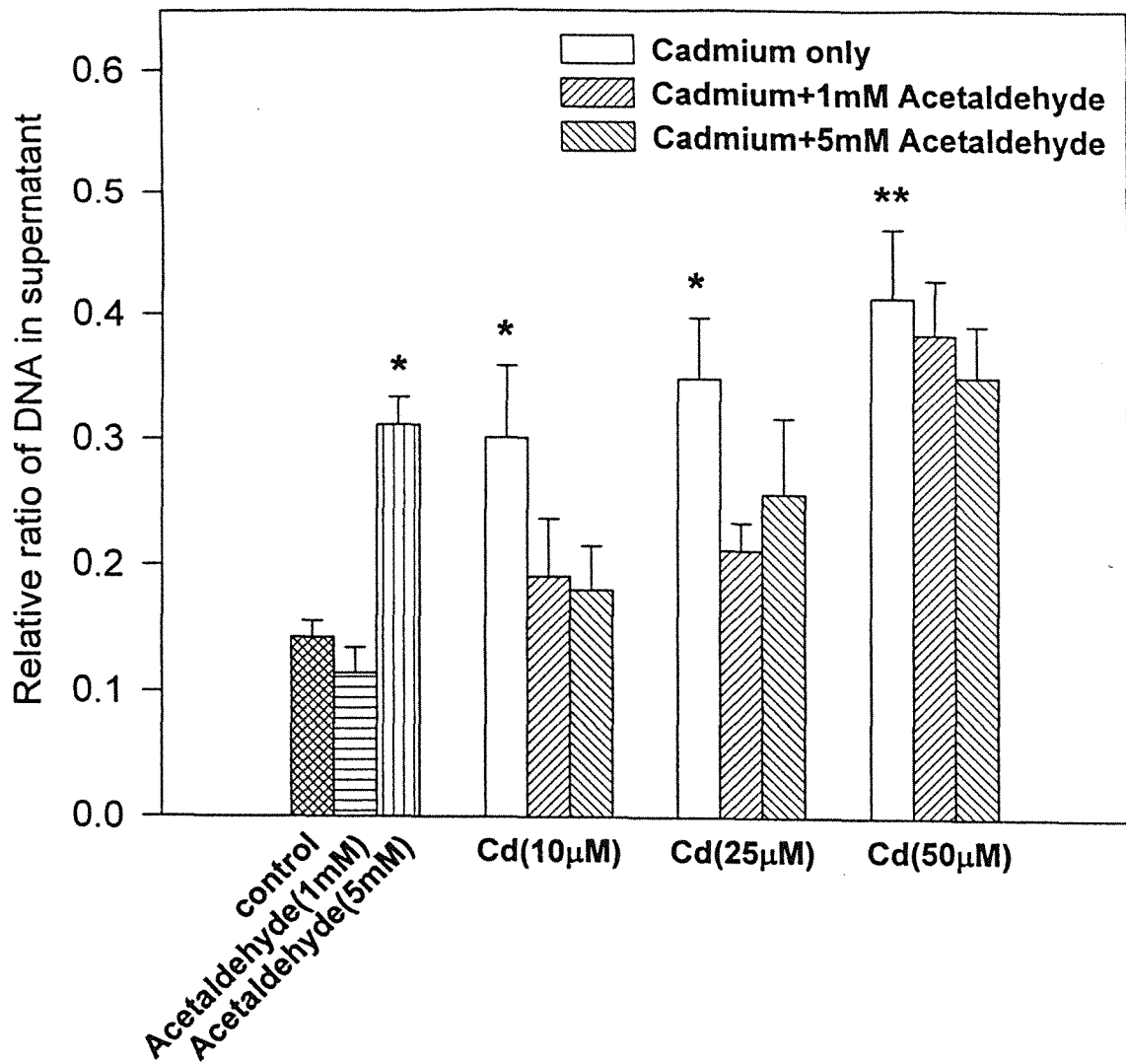


Fig5. 乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，對於 V79 細胞 DNA 單股斷裂傷害情形之影響。(DNA single strand break)

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

*, **表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(*: p<0.05, **: p<0.01)

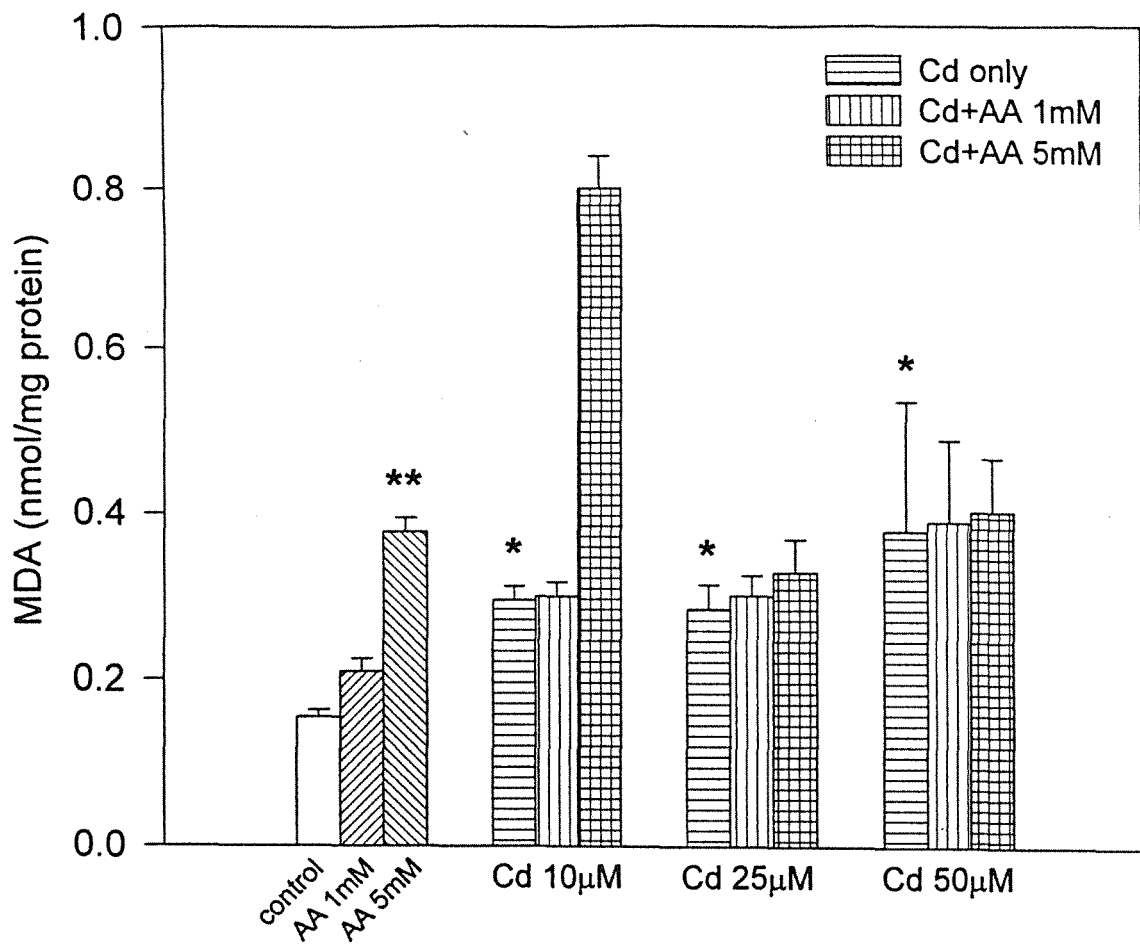


Fig6a. 乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，對於 V79 細胞脂質過氧化傷害程度之影響。(lipid peroxidation)

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

*, **表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(*: p<0.05, **: p<0.01)

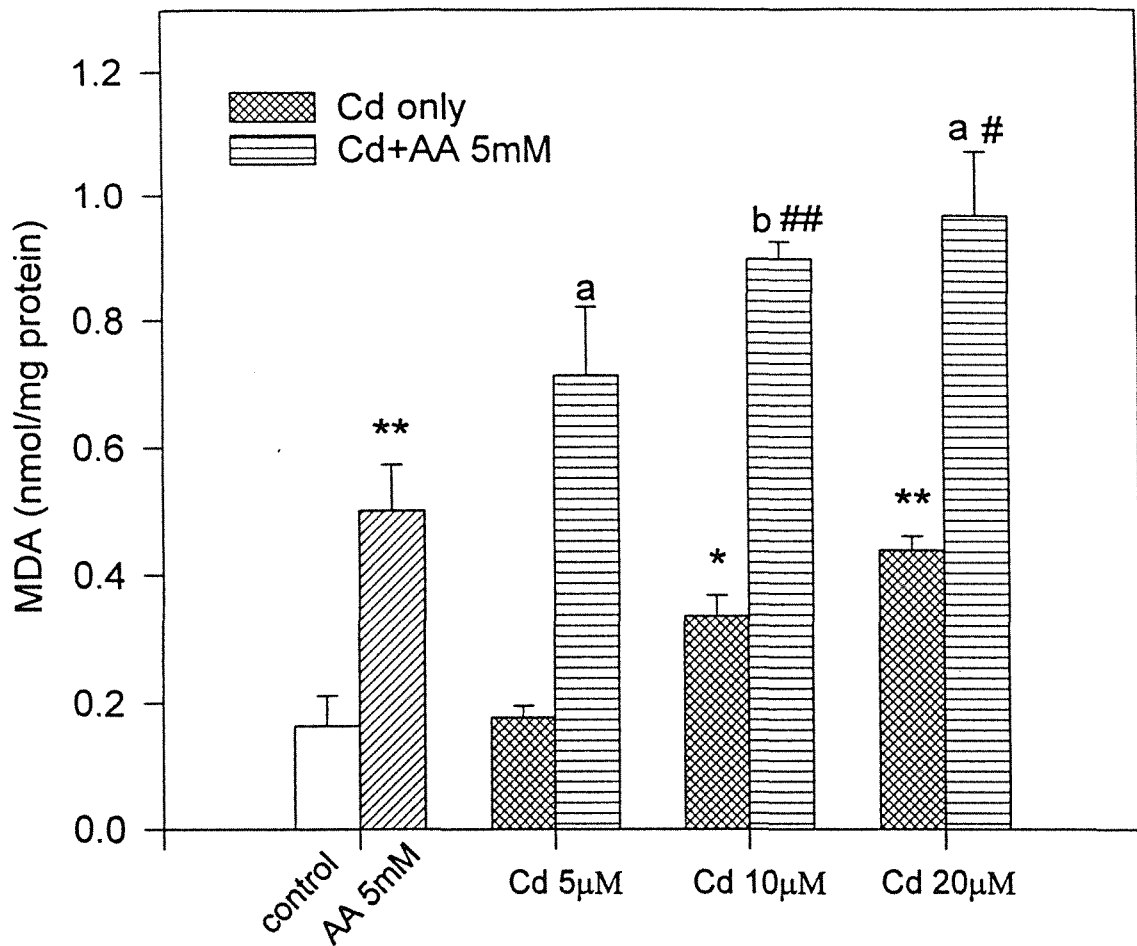


Fig6b. 乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，對於 V79 細胞脂質過氧化傷害程度之影響。(lipid peroxidation)

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

*, **表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(*: p<0.05, **: p<0.01)

#, ##表示與同組單一劑量之乙醛比較，其結果有顯著之差異(#: p<0.05, ##: p<0.01)

a, b 表示與同組單一劑量之氯化鎘比較，其結果有顯著之差異(a: p<0.05, b: p<0.01)

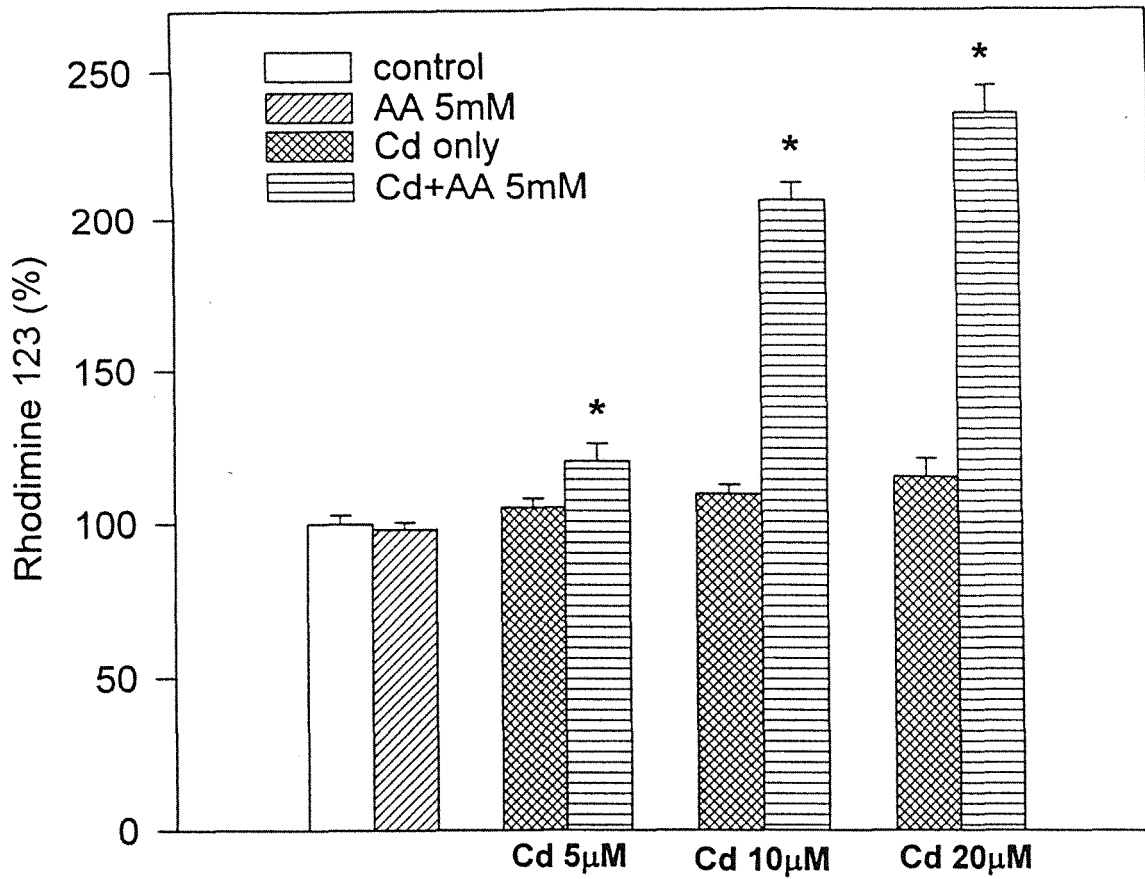


Fig7.乙醛與氯化鎘在單一與共同暴露 4 小時後，對於 V79 細胞的 mitochondria membrane potential 之傷害影響。

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

表示與同組單一劑量之乙醛或氯化鎘做比較，其結果均有顯著之差異(: p<0.01)

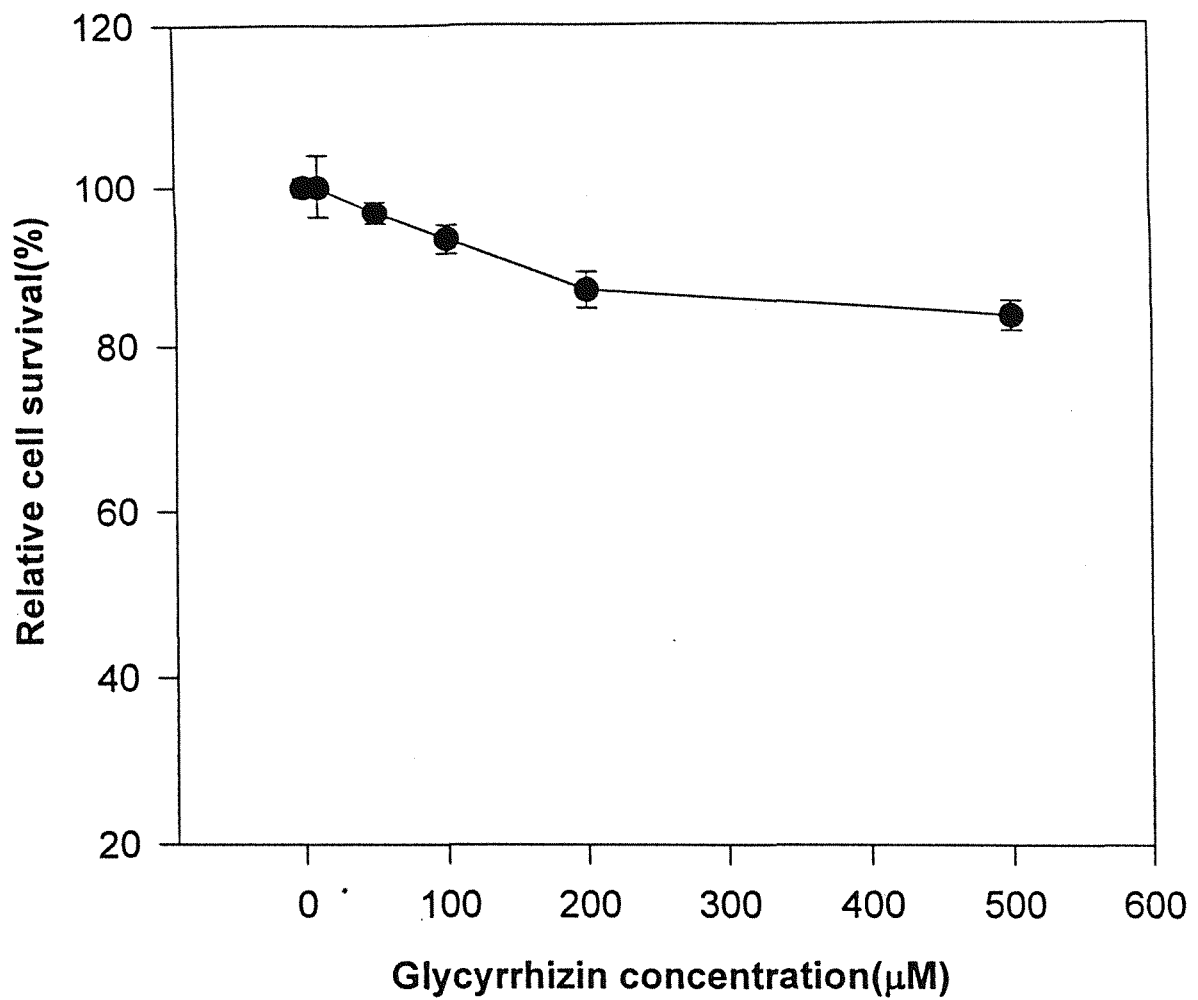


Fig8.不同濃度之 Glycyrrhizin 暴露於 V79 細胞 24 小時後，對其 MTT 細胞活性之影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

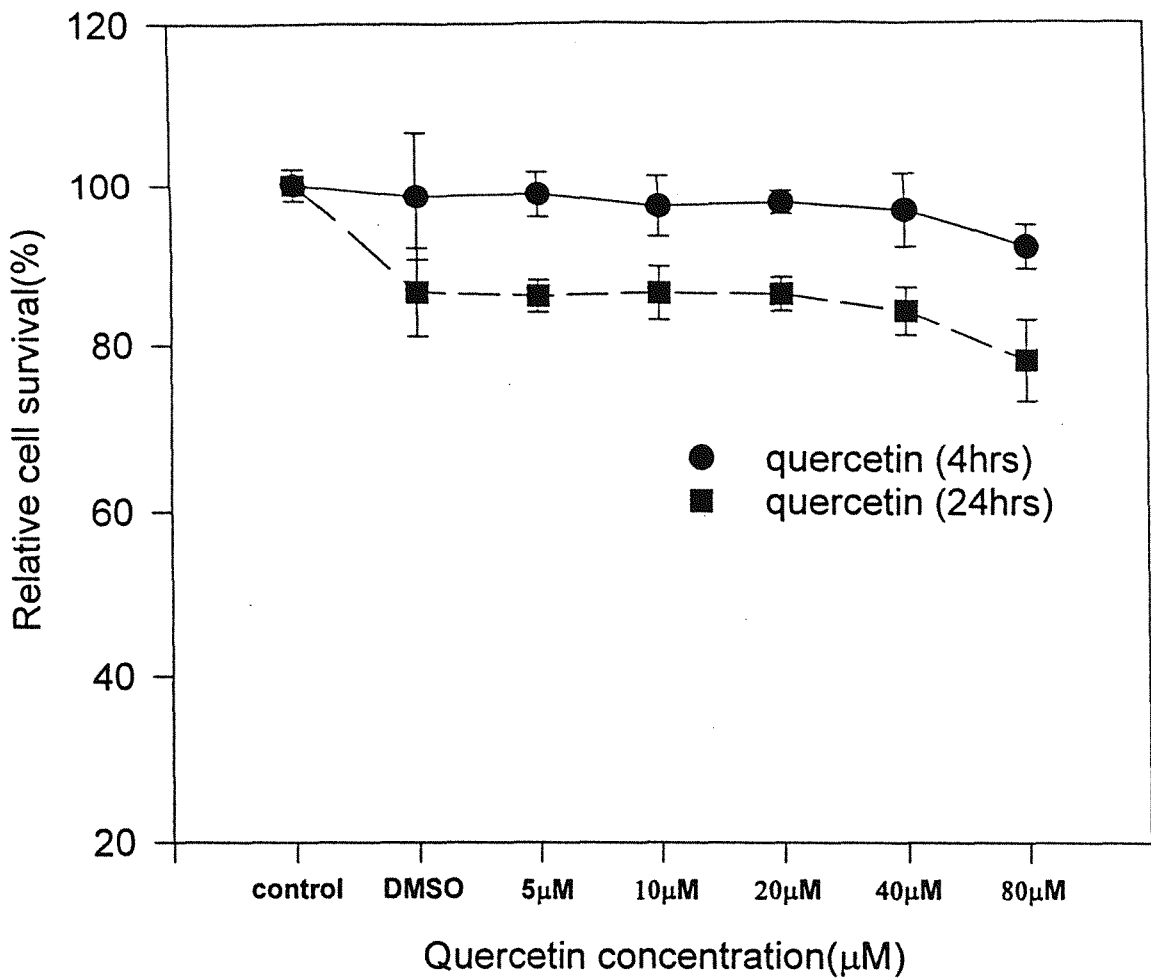


Fig9.不同濃度與時間之 Quercetin 暴露下，對於 V79 細胞活性之影響。

每個劑量 4 重覆，求其平均值(n=4)

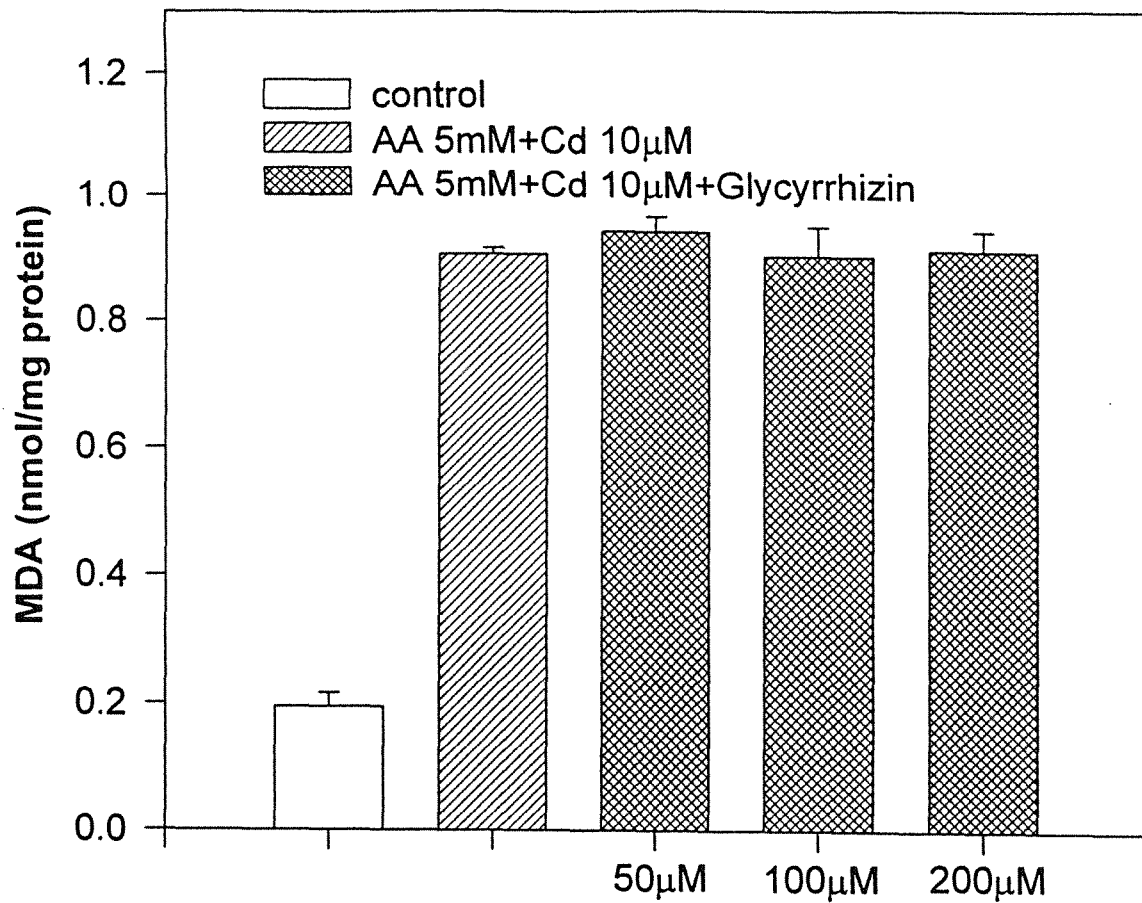


Fig10. 預處理 1 小時不同濃度之 Glycyrrhizin 對乙醛與氯化鎘共同暴露 4 小時後，其 V79 細胞脂質過氧化傷害程度之影響。(lipid peroxidation)

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

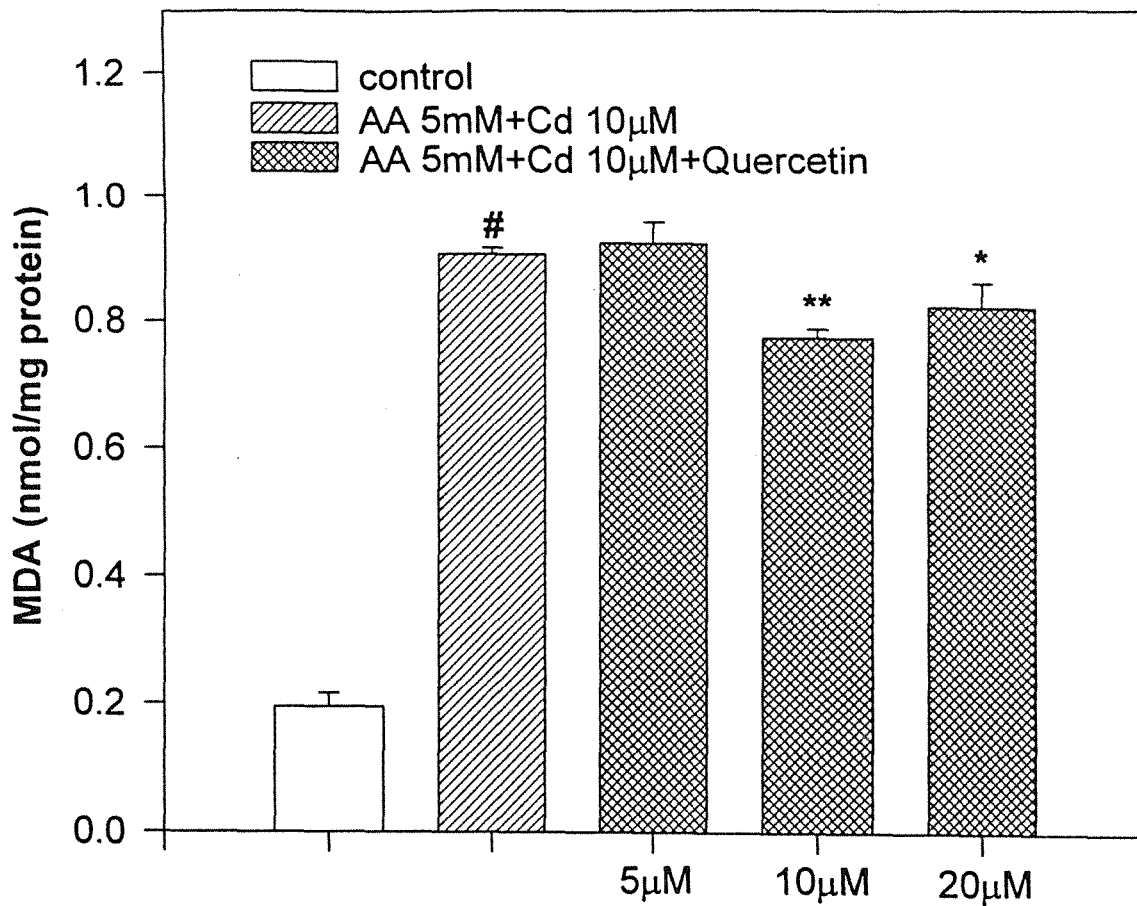


Fig11.預處理 1 小時不同濃度之 Quercetin 對乙醛與氯化鎘共同暴露 4 小時後，其 V79 細胞脂質過氧化傷害程度之影響。(lipid peroxidation)

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

#表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(#: p<0.01)

*,**表示與乙醛及氯化鎘共同暴露相比較，其結果有顯著之差異(*: p<0.05, **: p<0.01)

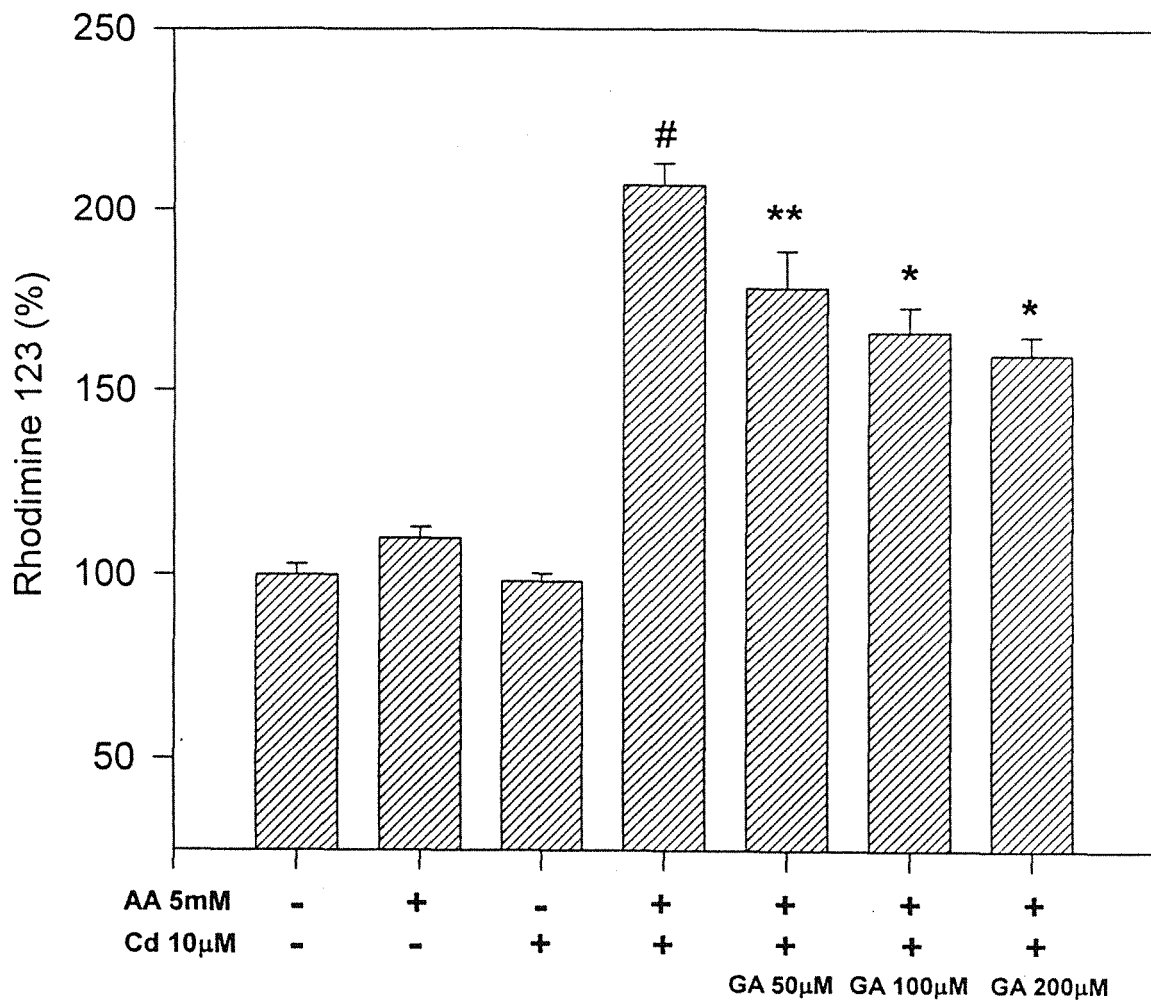


Fig12.預處理 1 小時不同濃度之 Glycyrrhizin 對乙醛與氯化鎘共同暴露 4 小時後，其 V79 細胞的 mitochondria membrane potential 之傷害影響。

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

#表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(#: p<0.01)

*,**表示與乙醛及氯化鎘共同暴露相比較，其結果有顯著之差異(**: p<0.05, *: p<0.01)

GA:表示 Glycyrrhizin

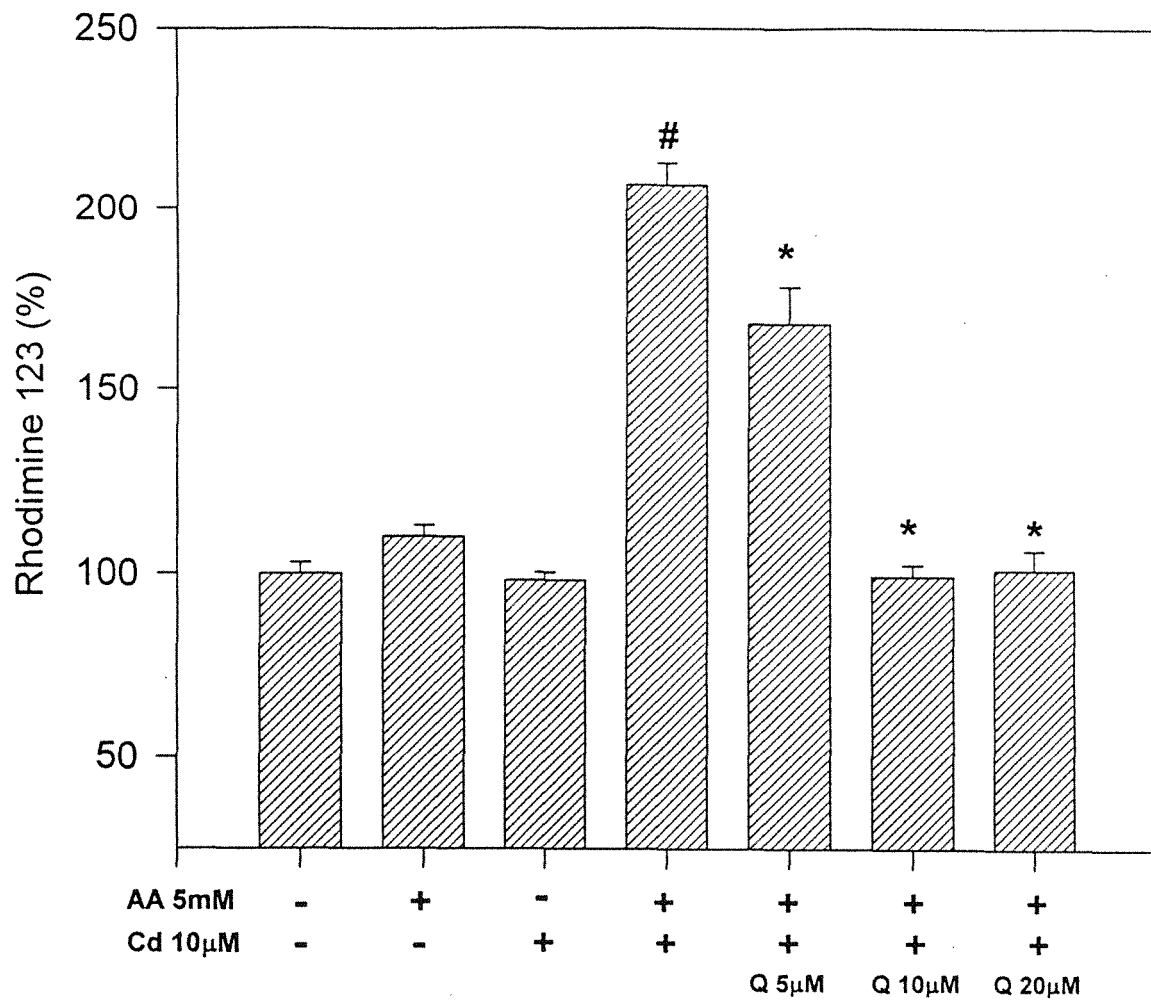


Fig13.預處理 1 小時不同濃度之 Quercetin 對乙醛與氯化鎘共同暴露 4 小時後，其 V79 細胞的 mitochondria membrane potential 之傷害影響。

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

#表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(#: p<0.01)

*, **表示與乙醛及氯化鎘共同暴露相比較，其結果有顯著之差異(*: p<0.01)

Q:表示 Quercetin

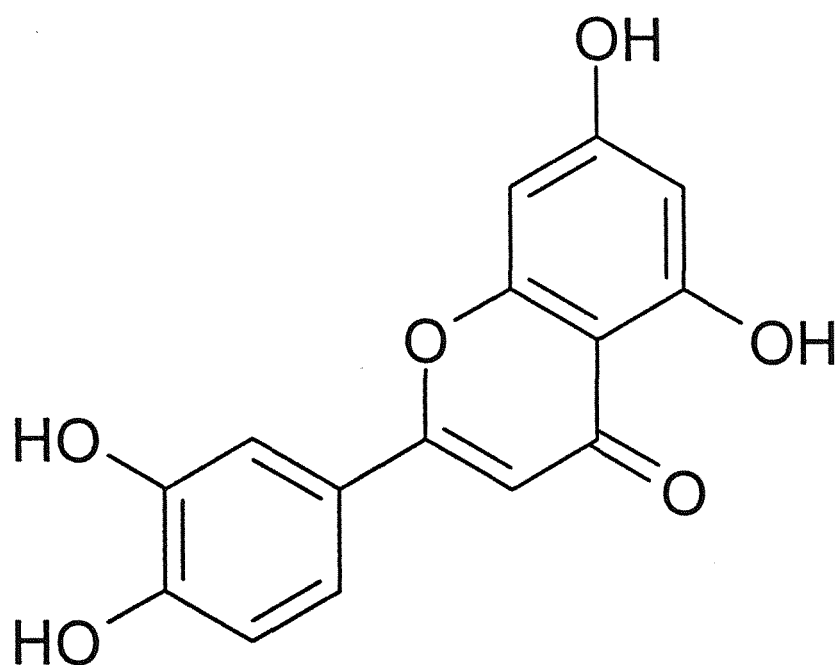


Fig 14. Structure of Quercetin

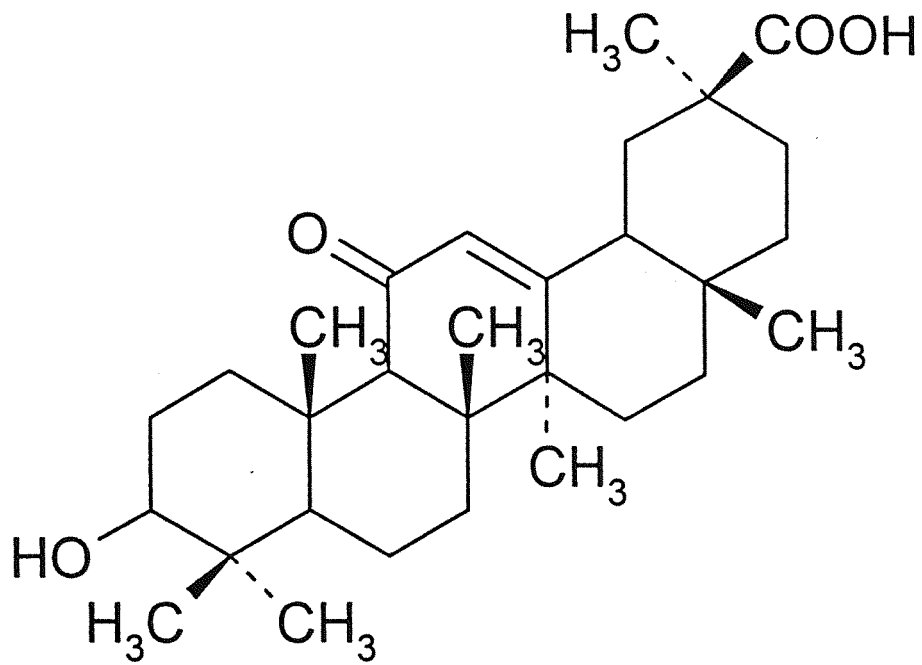


Fig 15. Structure of Glycyrrhizin

表一 以 independent joint action model 分析在氯化鎘與乙醛共同暴露下，對 V79 細胞預期及實際相對致死率之差異。

Dose	Observed Relative mortality (%)	Predicted Relative mortality (%)	Interaction
AA 1mM + CdCl ₂ 10 μ M	6.5 ± 2.5	18.1 ± 6.9	—
AA 1mM + CdCl ₂ 25 μ M	17.9 ± 2.4	24.3 ± 6.7	—
AA 1mM + CdCl ₂ 50 μ M	25.5 ± 2.7	26.2 ± 7.3	—
AA 5mM + CdCl ₂ 10 μ M	18.8 ± 2.9	22.6 ± 3.5	—
AA 5mM + CdCl ₂ 25 μ M	24.5 ± 2.0	28.5 ± 3.0	—
AA 5mM + CdCl ₂ 50 μ M	28.1 ± 1.4	30.3 ± 4.2	—

以 trypan blue exclusion 試驗分析預期相對致死率及實際相對致死率
Independent joint action model : $P(M)=P(A)+P(B)-P(A \times B)$

— : 表無複合毒性

AA:表示 acetaldehyde

表二 以 independent joint action model 分析在氯化鎘與乙醛共同暴露下，對 V79 細胞其預期及實際抑制細胞活性之差異。

Dose	Observed Relative mortality (%)	Predicted Relative mortality (%)	Interaction
AA 1mM + CdCl ₂ 10 μ M	4.0±3.6	6.4±6.0	—
AA 1mM + CdCl ₂ 25 μ M	18.8±5.8	23.1±7.9	—
AA 1mM + CdCl ₂ 50 μ M	35.2±8.3	31.7±6.7	—
AA 5mM + CdCl ₂ 10 μ M	36.3±3.2	29.0±3.9	>+
AA 5mM + CdCl ₂ 25 μ M	50.5±3.6	41.7±5.9	>+
AA 5mM + CdCl ₂ 50 μ M	55.6±3.9	48.2±3.1	>+

以 MTT 試驗分析預期抑制細胞活性及實際抑制細胞活性

Independent joint action model : $P(M)=P(A)+P(B)-P(A \times B)$

— : 表無複合毒性

>+ : 表有複合毒性

AA:表示 acetaldehyde

表三 氯化鎘與乙醛共同暴露 4 小時下，對 V79 細胞毒性之影響：
(colony assay)

Item \ Dose	V79 cells	V79 cells (add 1mM AA)	V79 cells (add 2.5mM AA)	V79 cells (add 5mM AA)
CdCl ₂ (μ M)	Relative cell survival(%)	Relative cell survival(%)	Relative cell survival(%)	Relative cell survival(%)
0	100 \pm 2.0	96.7 \pm 8.9	74.4 \pm 2.5*	19.23 \pm 2.0*
5	100 \pm 3.8	96.9 \pm 5.4	68.5 \pm 6.1 ^{a,b}	—
10	94.9 \pm 3.9**	77.4 \pm 4.9 ^{a,b}	36.2 \pm 2.0 ^{a,b}	—
15	81.8 \pm 3.1*	46.4 \pm 6.9 ^{a,b}	11.5 \pm 3.5 ^{a,b}	—
20	60.0 \pm 3.5*	—	—	—

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

—：表示 no detection

*,**表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(*:p<0.01,**:p<0.05)

a 表示與同組單一劑量之乙醛比較，其結果有顯著之差異(a:p<0.01)

b 表示與同組單一劑量之氯化鎘比較，其結果有顯著之差異(b:p<0.01)

AA:表示 acetaldehyde

表四 以 independent joint action model 分析在氯化鎘與乙醛共同暴露下，對 V79 細胞其預期相對致死率及實際相對致死率之差異。

Dose	Observed Relative mortality (%)	Predicted Relative mortality (%)	Interaction
AA 1mM + CdCl ₂ 5 μ M	3.1 ± ND	3.3 ± ND	—
AA 1mM + CdCl ₂ 10 μ M	22.6 ± 4.9	8.2 ± ND	>+
AA 1mM + CdCl ₂ 15 μ M	53.6 ± 6.9	20.9 ± 9.6	>+
AA 2.5mM + CdCl ₂ 5 μ M	31.5 ± 6.1	25.6 ± 4.5	—
AA 2.5mM + CdCl ₂ 10 μ M	63.8 ± 2.0	29.4 ± 4.7	>+
AA 2.5mM + CdCl ₂ 15 μ M	88.5 ± 3.5	39.1 ± 4.1	>+

以 colony 試驗分析預期相對致死率及實際相對致死率

Independent joint action model : $P(M)=P(A)+P(B)-P(A \times B)$

ND : non-detectable response

— : 表無複合毒性

>+ : 表有複合毒性

AA:表示 acetaldehyde

表五 以 HPRT 分析 V79 細胞在氯化鎘與乙醛共同暴露下，對細胞致突變之影響。

Dose	Plating efficacy (%)	Mutant cells (numbers/10 ⁶ cells)
Control	100.0±3.9	0
CdCl ₂ 5 μM	84.4±4.7	0
CdCl ₂ 10 μM	46.8±5.4*	4
CdCl ₂ 15 μM	30.2±3.9*	2
AA 2.5mM	71.9±5.0**	3
AA 2.5mM+CdCl ₂ 5 μM	34.2±2.1 [#]	11
AA 2.5mM+CdCl ₂ 10 μM	7.1±1.0 [#]	18
AA 2.5mM+CdCl ₂ 15 μM	2.7±0.6 [#]	14
EMS 600μg/ml	93.2±1.6	173

*，**表示與 control 組比較，其結果有顯著之差異(*：p<0.01，**：p<0.05)

#表示與同組單一劑量之乙醛或氯化鎘比較，其結果有顯著之差異(#：p<0.01)

AA:表示 acetaldehyde

表六 在氯化鎘與乙醛共同暴露下，對 V79 細胞其預期及實際產生致突變數目之差異。

Dose	Observed Mutant number (1×10^6)	Predicted Mutant number (1×10^6)	Interaction
AA 2.5mM + CdCl ₂ 5 μ M	11	3	>+
AA 2.5mM + CdCl ₂ 10 μ M	18	7	>+
AA 2.5mM + CdCl ₂ 15 μ M	14	5	>+

以 Synergistic interaction assay model 分析預期產生致突變數目及實際產生致突變數目之差異

$$N(AB) = N(A) + N(B) - N(C)$$

N(AB)：表實際產生致突變數目，

N(A)+N(B)-N(C)：表預期產生致突變數目，

N(A)：表 A 毒物產生致突變數目，N(B)：表 B 毒物產生致突變數目，

N(C)：表 control 產生致突變數目。

>+：表有複合毒性傷害

AA:表示 acetaldehyde

表七 V79 細胞內之重金屬含量測定

treatment	Cd (ng/10 ⁶ cells)
control	ND
Acetaldehyde 1mM	ND
Acetaldehyde 2.5mM	ND
CdCl ₂ 10 μ M	104.30±2.72
CdCl ₂ 10 μ M + Acetaldehyde 1mM	103.58±4.69
CdCl ₂ 10 μ M + Acetaldehyde 2.5mM	102.76±4.90
CdCl ₂ 25 μ M	134.40±8.21
CdCl ₂ 25 μ M + Acetaldehyde 1mM	139.16±4.94
CdCl ₂ 25 μ M + Acetaldehyde 2.5mM	136.28±8.53

每個劑量 3 重覆，求其平均值(n=3)

ND：表示 lower than detection limit

表八 在氯化鎘與乙醛共同暴露下，對 V79 細胞其預期及實際產生脂質過氧化傷害程度之差異。

Dose	Observed Relative mortality (nmol/mg)	Predicted Relative mortality (nmol/mg)	Interaction
AA 5mM + CdCl ₂ 5 μ M	0.71 ± 0.17	0.51 ± 0.07	>+
AA 5mM + CdCl ₂ 10 μ M	0.90 ± 0.03	0.67 ± 0.08	>+
AA 5mM + CdCl ₂ 20 μ M	0.97 ± 0.12	0.78 ± 0.07	>+

以 Synergistic interaction assay model 分析預期產生脂質過氧化傷害程度及實際產生脂質過氧化傷害程度之差異

$$N(AB) = N(A) + N(B) - N(C)$$

N(AB)：表實際產生 MDA 之值，

N(A)+N(B)-N(C)：表預期產生 MDA 之值，

N(A)：表 A 毒物產生 MDA 之值，N(B)：表 B 毒物產生 MDA 之值，

N(C)：表 control 產生 MDA 之值。

>+：表有複合毒性傷害

AA:表示 acetaldehyde

表九 GFAAS 測定鎘元素之基本設定條件

設定條件	鎘元素
波長(wavelength)	228.8nm
柵寬 slit width)	0.7nm
燈管電流(lamp current)	4mA
能量(energy)	51
攜帶氣體(carrier gas)	Ar,250ml/min
原子化攜帶氣體 (carrier gas on atomization)	Ar,0ml/min
訊號計算(signal calculation)	Peak area
石墨管注射量(injection volume)	20 μ l
背景校正(background correction)	Zeeman correction

表十 使用石墨爐原子吸收光譜儀分析鎘(Cd)其昇溫條件及基質修飾劑

程式階段 (step)	設定溫度(°C) (temperature)	昇溫時間(sec) (Ramp time)	維持時間(sec) (Hold time)
乾燥(dry 1)	110	1	20
乾燥(dry 2)	130	5	30
灰化(pyrolysis)	800	10	20
原子化 (atomized)	1300	0	5
清除(clean-out)	2450	1	3

Cd:基質修飾劑(Matrix Modifier):0.05mgNH₄H₂PO₄+0.003mgMg(NO₃)₂

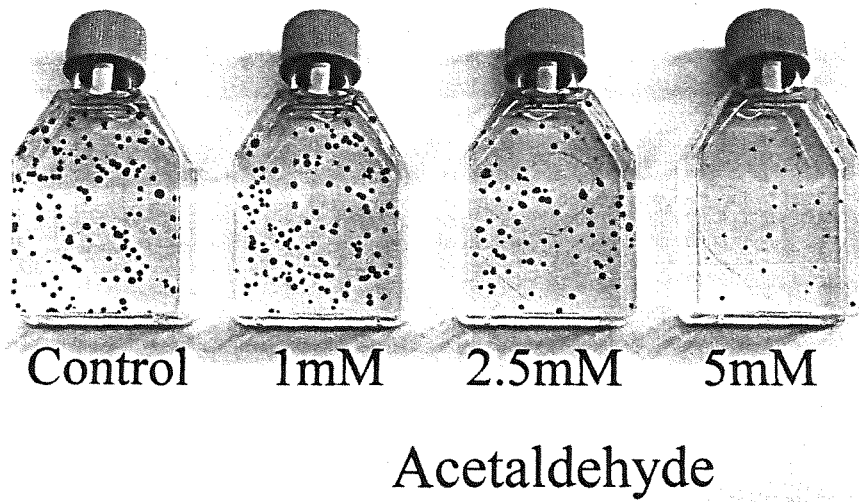


Fig 16. 單一暴露不同劑量之乙醛

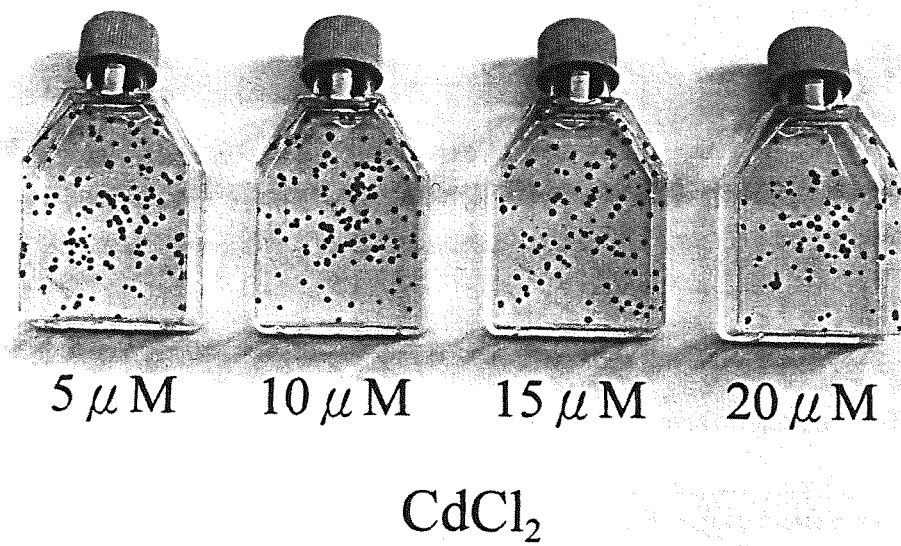


Fig 17. 單一暴露不同劑量之氯化鎘

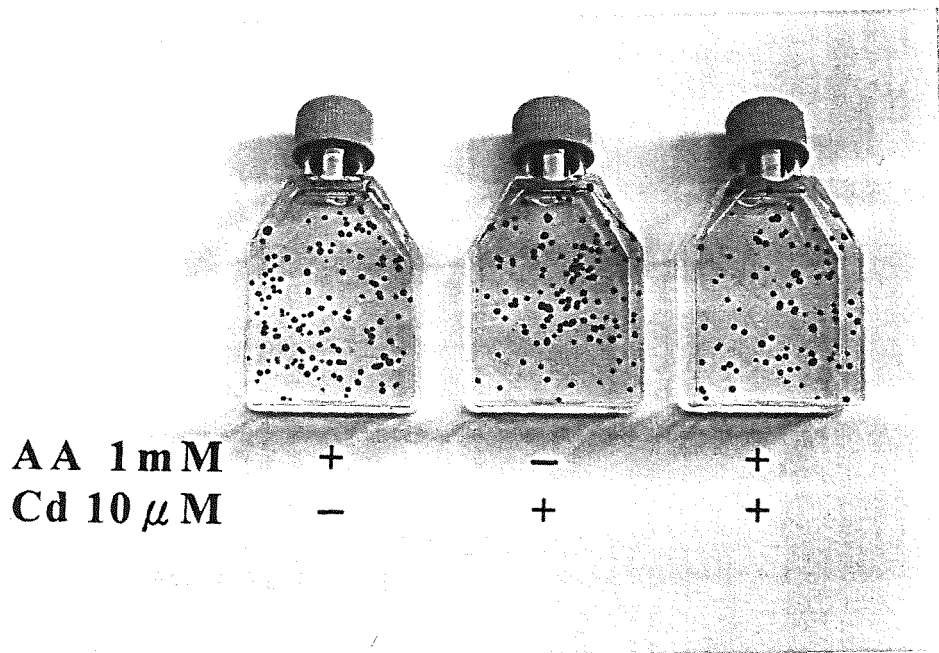


Fig 18. 共同暴露乙醛 1 mM 及氯化镉 10 μM 之 colony assay

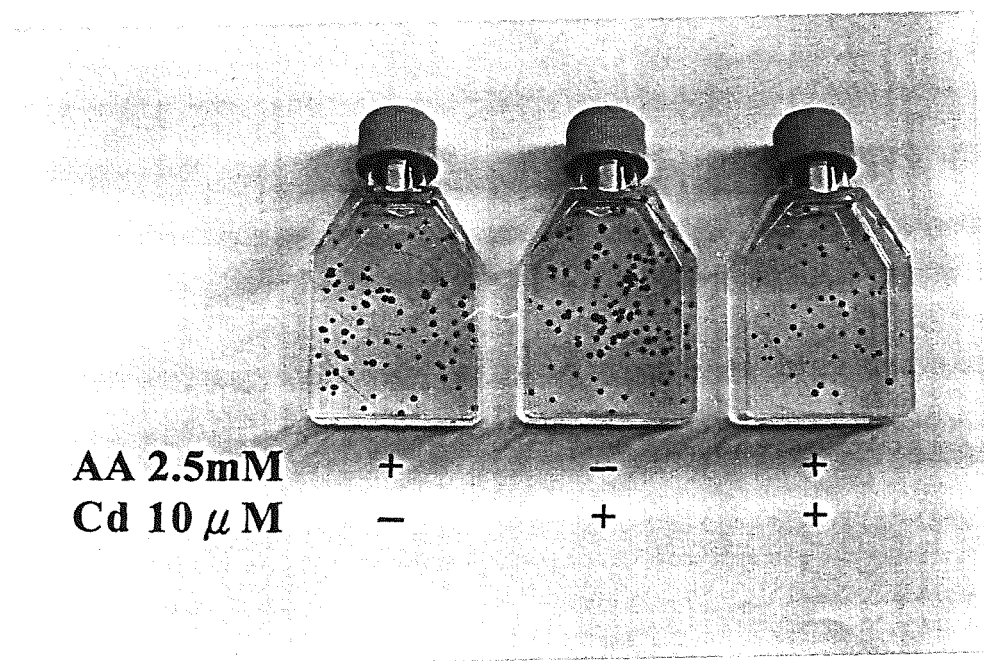
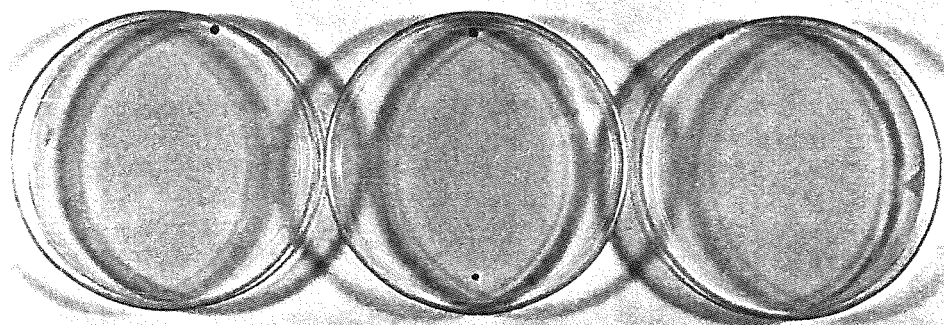
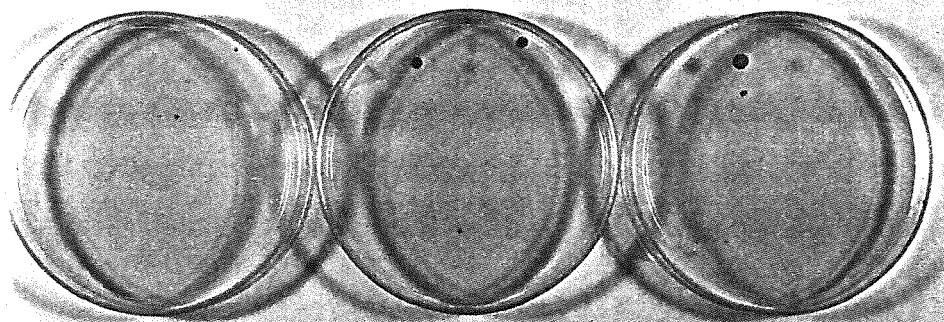


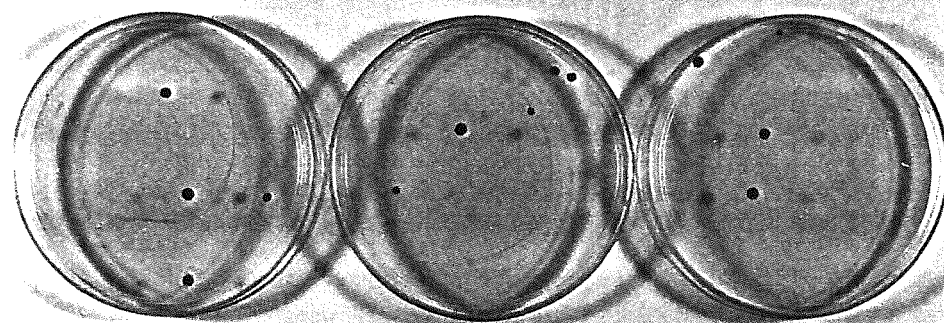
Fig 19. 共同暴露乙醛 2.5 mM 及氯化镉 10 μM 之 colony assay



Acetaldehyde 2.5 mM



Cd 10 μM



Acetaldehyde 2.5 mM
Cd 10 μM

Fig 20. 乙醛(2.5 mM)與氯化鎘(10 μM)在單一和共同暴露下對 V79 細胞產生致突變之結果。

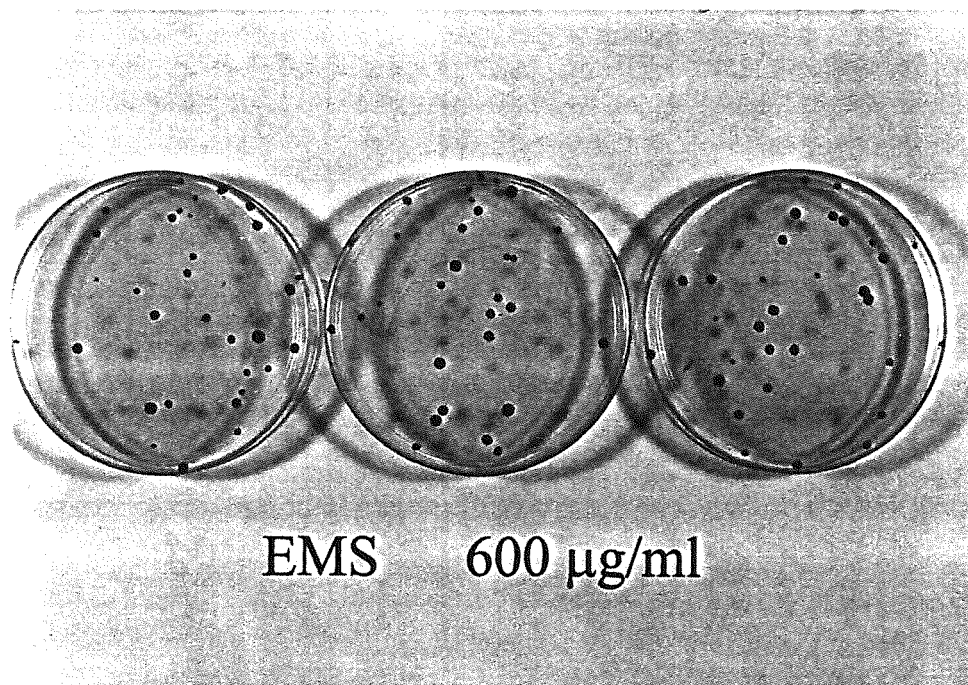
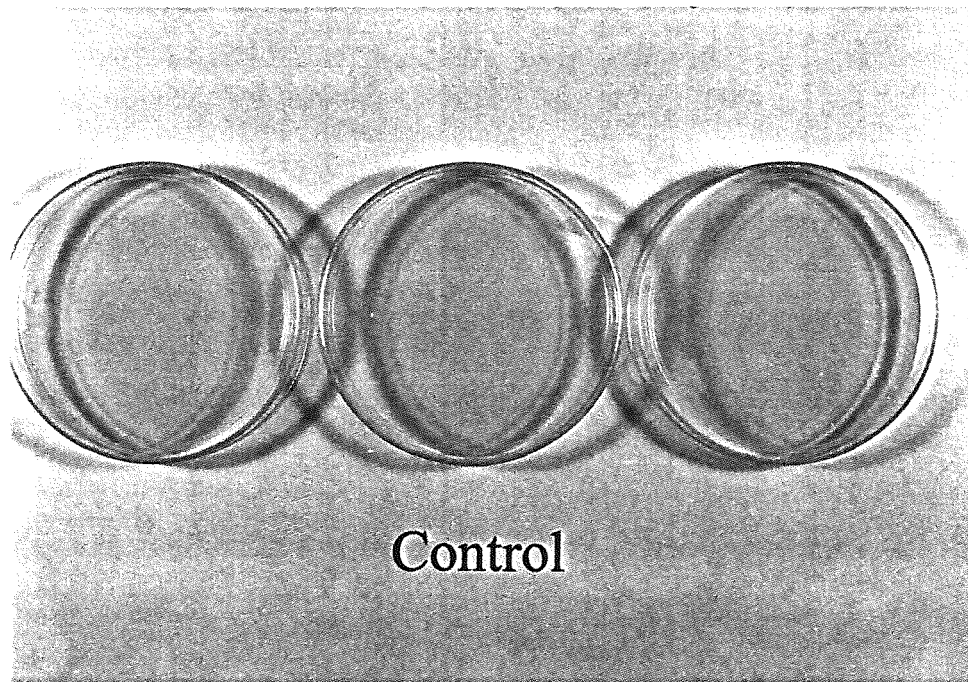


Fig 21. Control 組與 Positive control 組對 V79 細胞產生致突變之結果。