

R
008.8
4031-1

中山醫學院醫學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Medicine,

Chung Shan Medical and Dental College

指導教授: 林瑞生 (Ruey-Hseng, Lin) 教授

半導體金屬，硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛，對

V79 中國頰鼠肺細胞之細胞-遺傳毒性的研究

Studies on the cytogenotoxicities of semiconductor
metals, copper nitrate, manganese nitrate, nickel nitrate
and lead nitrate, in V79 Chinese hamster lung cells.



研究生: 李寶珍 (Pao-chen, Lee)

中華民國八十八年六月

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C055148

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在私立中山醫學院大學(學院)醫學研究系所

丙 組 八十七 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：半導體銻、硝酸銻、硝酸錳、硝酸銻和硝酸鉛對V79中國
頸鼠肺細胞之細胞一遺傳毒性的研究

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、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號：)

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，不限地域與時間，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。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：

研究生簽名：李寶珍
(親筆正楷)

學號：R86125
(務必填寫)

日期：民國八十八年六月二十三日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄 106-36 台北市和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 王淑貞。(本授權書諮詢電話：02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

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，請分別在兩種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 www.stic.gov.tw，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 www.ncl.edu.tw。
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，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。
3. 全國博碩士論文全文資料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。

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

台中榮民總醫院教學研究部

王繼平 教授

中國醫藥學院藥物化學研究所

王繼平

中山醫學院生理學科

黃純健 副教授

黃純健

中山醫學院藥理學科

林瑞生 教授

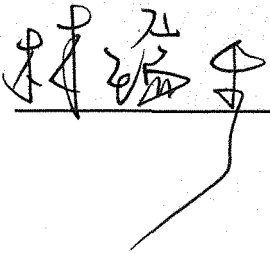
(論文指導教授)

林瑞生

中華民國八十八年六月

學生李寶珍論文題目為半導體金屬，硝酸銅、硝酸錳、
硝酸鎳和硝酸鉛，對 V79 中國頰鼠肺細胞之細胞-遺
傳毒性的研究，其論文已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，並由其指導
教授核閱後無誤。

指導教授：林瑞生 教授

簽名：

中華民國八十八年六月三日

誌謝

二年的時光眨眼即逝，日子過得好快呀！在這二年，不禁感到知識的浩瀚，自己所學之渺小彷彿滄海一粟。此本論文完成之際，心中的喜悅是無法用筆墨來形容，閉上眼睛回想生活點滴，真的是有歡笑、有淚水、有喜、有悲，謝謝曾經幫助我的人，使得此本拙作順利完成，也更讓我有勇氣及信心迎接新的挑戰和人生。

首先要感謝我的指導老師林瑞生教授，他淵博的學問和孜孜不倦的教誨，使我的知識領域更加拓展受益匪淺；同時也由衷感謝王繼平教授和黃純健教授悉心審閱詳加斧正，使得本論文更加完美，在此致上最誠摯的謝意。

此外，我要感謝張祥成同學，由於他的建言，使得原本已就業的我重拾書本，進而有今日的成就。還有晉淑意老師、李樹人先生以及醫學系潘麟鑫學弟，因為他們的協助，使得原本對電腦一竅不通的我有大大的進步，並且不再感到陌生及害怕。另外，我的好朋友政道、武宏、銘文、麗雪、麗娟、彥樺、世鈴、秋燕、阿茶、國豪、雯心、佳芳，謝謝您們在我最沮喪的時候給予我關懷及鼓勵，使我能夠振作精神重新出發。

最後，我要感謝我的家人無怨無悔地犧牲奉獻，在幕後給我最強力的支持與勇氣，讓我專心地完成學業。千言萬語道不盡我對家人的感激，在此，我仍要向您們說聲謝謝！



目錄：

	頁碼
中文摘要 (Chinese abstract).....	2
英文摘要 (English abstract).....	6
緒論 (Introduction).....	10
材料與方法 (Materials and Method).....	21
結果 (Results).....	37
討論 (Discussion).....	47
圖表 (Figures and Tables).....	57
附錄 (Appendix).....	85
1. 微小核分析法 (Micronucleus method)	
2. 細胞存活率分析法 (MTT assay)	
3. 流式細胞分析法 (Flow cytometry)	
參考文獻 (References).....	97

中文摘要 (Chinese abstract)

銅(Copper)、錳(Manganese)、鎳(Nickel)和鉛(Lead)四種重金屬廣泛分佈於自然世界中，所以可由地殼和海洋中釋出。環境之污染亦可能來自半導體工業、電子工業、汽車工業、儀器工業、航空零件和日用品工業。雖然銅和錳亦是人體內微量的元素，但已知含量過高或過低對健康都有所危害。由於半導體的製造在這些年相當盛行，其製造過程中需使用許多化學物質，這些化學物質之毒性除強酸、強鹼溶液、有機溶媒和各種光源被較詳細的研究外，金屬部份則很少有毒性的探討。由於此四種重金屬化合物不僅可用在半導體之連線，亦可用於複合鍍層，例如鎳則常用於印刷電路板及 BGA 之墊層。半導體工業表面看來相當安全和安靜，其實其製造過程中充滿危險性，其廢棄物如隨地棄置亦會造成環境的污染，因此吾人以培養之動物肺細胞為標本來探討四種重金屬鹽之細胞-遺傳毒性。

本研究為體外實驗(In vitro)，將 V79 中國頰鼠肺細胞暴露在適量的銅 (Cu^{2+})、錳 (Mn^{2+})、鎳 (Ni^{2+}) 和鉛 (Pb^{2+}) 鹽溶液中，首先利用微小核法(Micronuclei method) 探討其遺傳毒性(Genotoxicity)和以 MTT 法(MTT assay)探討其細胞毒性(Cytotoxicity)，並且以核分裂指數(NDI)判別其對細胞分裂的影響。然後藉由流式細胞技術(Flow cytometry)觀察其對細胞週期(Cell cycle)之分布比例的影響，以及探討其是否造成 V79 肺細胞進行細胞凋亡 (Apoptosis)？另外，這四種重金屬分別和半導體晶片常用的銻(Antimony)和銦(Indium)二種元素共同作用，探討是否相互加強細胞

毒性和遺傳毒性？並以提高細胞外鈣(Calcium)或鎂(Magnesium)離子的濃度，來研究此四種重金屬之細胞毒性和遺傳毒性的機轉。本研究亦以金屬中毒之解毒劑，D-penicillamine(D-PA)和 Dimercaprol(BAL)，來探討其對銅、錳、鎳和鉛之細胞毒性之影響，以期提供適當的解毒劑。

遺傳毒性之研究結果發現高濃度的 Cu^{2+} (1mM)、 Mn^{2+} (200-300 μM)和 Ni^{2+} (0.3-1mM)才具有統計意義增加 V79 中國頰鼠肺細胞之微小核頻率， Pb^{2+} 則在低濃度(0.1-3 μM)皆能增加微小核數，但不呈劑量-相關性。遺傳毒性之結果顯示 Pb^{2+} 之遺傳毒性較具特異性。當此四種重金屬離子分別加上 In^{3+} 或 Sb^{3+} 時， In^{3+} 之遺傳毒性可被 Ni^{2+} 所降低， Sb^{3+} 則被 Cu^{2+} 所加強而其它金屬離子之交互遺傳毒性則不具統計意義，顯示出半導體重金屬之交互作用十分複雜。於培養液中增加 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的濃度， Ca^{2+} 能夠降低 Pb^{2+} 所增加之微小核數，而 Mg^{2+} 能夠反轉 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 所造成的遺傳毒性，由此顯示 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 對染色體 DNA 的傷害，和干擾 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 之功能有關。

細胞毒性之研究結果顯示，高濃度的 Cu^{2+} (1mM)、 Mn^{2+} (200-300 μM) 和 Ni^{2+} (1mM) 均抑制 NDI 也就是延長細胞分裂時間。MTT 法之結果亦顯示 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 都具有統計意義地降低細胞存活率。另外， Pb^{2+} 在研究濃度範圍內不影響 NDI，但 3 μM 的 Pb^{2+} 具有明顯的細胞毒性。此四種重金屬與 In^{3+} 或 Sb^{3+} 之交互細胞毒性方面，只有 Pb^{2+} 和 Sb^{3+} 共同作用會加強細胞毒性。3mM 和 10mM

Ca^{2+} 可反轉 Mn^{2+} 或 Pb^{2+} 之細胞毒性，3mM Mg^{2+} 對四種金屬離子之細胞毒性均可逆轉，但高濃度時（10mM）則只能反轉 Cu^{2+} 或 Mn^{2+} 之細胞毒性。金屬解毒劑之研究結果顯示 3 μM D-PA 會加強四種金屬之細胞毒性；30 μM BAL 可對抗 Pb^{2+} 所造成的細胞毒性。

以 FACScan 分析 V79 肺細胞之 DNA content，檢視 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 是否造成細胞凋亡？結果並沒有 sub- G_1 出現，所以此四種重金屬離子在本研究條件下不造成 V79 肺細胞之細胞凋亡。此外，發現很有趣的現象是 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和正對照組之 Adriamycin，均使含 G_2/M phase 之細胞數目增加，進一步以 cell cycle distribution analysis 證實 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Adriamycin 確實會在 V79 肺細胞造成 G_2/M phase block。

在細胞型態上，四種重金屬化合物除了 Mn^{2+} 外，其它與對照組比較則無明顯差異。 Mn^{2+} 造成 V79 肺細胞凝縮，形成圓形亮點，另外，可能會與培養液或血清產生作用，在細胞表面及培養皿底面呈現黑色沈澱物。

以上結果顯示 V79 肺細胞短時間暴露在含有半導體重金屬 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 或 Pb^{2+} 的環境時，會發生細胞-遺傳毒性，由於 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 可降低 V79 肺細胞之細胞-遺傳毒性所以推測此四種重金屬離子至少部分干擾鈣和鎂離子之功能而導致 V79 產生細胞-遺傳毒性。此外， Pb^{2+} 之細胞毒性可以 BAL 當解毒劑。半導體金屬間之交互細胞-遺傳毒性呈現十分複雜。 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 可誘導 V79 肺細胞發生 G_2/M phase block，而 Mn^{2+} 明顯改變細胞型態，顯示

四種重金屬之細胞-遺傳毒性具有差異性。既然此四種重金屬離子會在 V79 肺細胞造成細胞-遺傳毒性，所以在工作環境有必要做好妥善的防護措施，以避免危及工作人員之健康及造成環境污染。

English abstract

Copper, manganese, nickel and lead are widely distributed in the biosphere, being released into the atmosphere by degreasing from the earth crusts and the oceans. In addition, these metals are released into the environment by human activities, such as combustion of fossil fuels and other industrial release. Recent studies suggest that semiconductor workers have an increased incidence of worker-related illness. Semiconductor manufacturing is a chemically intensive industry involving many potentially hazardous operations, the relatively high toxicity of compounds routinely handled by employees. The important health effects of major solvents, acids, caustics, reactive gases, metals, energy and dopands were evaluated by many authors, whereas there are few studies on metals-induced cytogenotoxicities in cultured mammalian cells.

In this study, the frequency of micronuclei (MN) was assayed to evaluate the genotoxic effects of Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} in V79 Chinese hamster lung (V79) cells. The cytotoxic effects of the four heavy metals were conducted by using MTT assay, and nuclear division index (NDI) index. In addition, effects of the four heavy metals on cell cycle distribution and apoptosis in V79 lung cells were assayed by flow cytometry. We also

studied the cytogenotoxic interactions of the four heavy metals with Sb^{3+} , In^{3+} , Ca^{2+} or Mg^{2+} , respectively. Since D-PA and BAL are metal chelators and have been widely used as antidotes in cases of heavy metal poisoning, we also studied the effects of D-PA and BAL on metals-induced cytotoxicity in V79 cells.

All of Cu^{2+} , Mn^{2+} and Ni^{2+} at higher concentrations (1mM Cu^{2+} ; 200-300 μM Mn^{2+} ; 0.3-1mM Ni^{2+}) significantly increased MN frequencies in V79 cells in this study. However, Pb^{2+} at lower concentrations of 0.1-3 μM significantly increased MN frequencies, but Pb^{2+} -induced genotoxicity was not in a concentration-dependent manner. The results suggested that Pb^{2+} induced genotoxicity in V79 cells with more specific effect. The results of genotoxic interactions of the four metals with In^{3+} or Sb^{3+} were complication: Ni^{2+} decreased In^{3+} -induced genotoxicity, Cu^{2+} increased Sb^{3+} -induced genotoxicity, but genotoxic interactions between other metals were not significant. In addition, Ca^{2+} decreased Pb^{2+} -induced genotoxicity. Mg^{2+} reversed the genotoxicity of Mn^{2+} or Pb^{2+} to the control level, respectively. It appears that both Mn^{2+} - and Pb^{2+} -induced genotoxicity might relate to interfere the biological functions of Mg^{2+} and Ca^{2+} .

Cu^{2+} (1mM), Mn^{2+} (200-300 μM), and Ni^{2+} (1mM)

significantly decreased NDI, but Pb^{2+} at all concentrations treated didn't significantly decreased NDI. The results of MTT assay also showed that all of Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} at higher concentrations significantly decreased cell viability, but Pb^{2+} at lower concentration of $3 \mu M$ significantly induced cytotoxicity. In addition, just only Pb^{2+} significantly increased Sb^{3+} -induced cytotoxicity. Ca^{2+} at concentrations of 3mM and 10mM significantly antagonized the cytotoxicity of Mn^{2+} or Pb^{2+} , respectively. Mg^{2+} at concentration of 3mM significantly reversed cytotoxicity of the four metals, but 10mM Mg^{2+} only reversed cytotoxicity of Cu^{2+} or Mn^{2+} . The data of metal chelators study showed that $3 \mu M$ D-PA significantly increased all of the four heavy metals induced cytotoxicity, but $30 \mu M$ BAL significantly reduced Pb^{2+} -induced cytotoxicity.

The results of hypoploidy analysis showed that all of Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} didn't induce sub- G_1 V79 cells, the results indicated all of the four metal ions didn't cause apoptosis in V79 cells. However, both Cu^{2+} and Ni^{2+} as adriamycin (positive control) caused G_2/M phase block and increased population of V79 cells with higher granularity. Cell cycle distribution analysis further demonstrated that both Cu^{2+} and Ni^{2+} as adriamycin increased population of V79 cells in G_2/M phase.

There is only Mn^{2+} among the four metal ions as adriamycin markedly changed morphology of V79 lung cells. In addition, Mn^{2+} caused black precipitation, which might react with ingredients of medium or serum.

These results showed that all of Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} induced cytogenotoxicities in V79 cells after two hours exposure. However, both Ca^{2+} and Mg^{2+} significantly decreased their cytogenotoxicity. Accordingly, we suggested that the mechanism of the four metals induced cytogenotoxicity might be partly related interfere with the biological functions of Mg^{2+} and Ca^{2+} . In addition, BAL decreased Pb^{2+} -induced cytotoxicity. Cytogenotoxic interactions between semiconductor metals were complication. Both Cu^{2+} and Ni^{2+} caused G_2/M phase block. Mn^{2+} markedly changed morphology of V79 cells. These results showed that the four heavy metal ions induced cytogenotoxicities in V79 cells is in different properties.

緒論 (Introduction)

1. 銅 (Copper)

原子量 63.54，原子數 29 為微紅色立方體型金屬，氧化狀態有 +1 和 +2 價 (Harrison, 1974)。銅具有延展性，並且為良好的電和熱的傳導物質。

海水、河川、飲用水、土壤和空氣中都含有銅。大約有一半的銅用於電子零件，其也常與銀、鎳、錫和鋅製成合金。其他用途則有電鍍、測垂、暖氣裝置。殺蟲劑中也含有銅鹽，法國、波多黎各以及義大利南部在葡萄藤中噴灑 1-2 % 的硫酸銅溶液可以阻止黴菌的生長 (Pimental and Marques, 1969)。而 CuO_2 為有毒的染料將之塗在船底可以避免藻類的滋生。1% 的 Cupric oleinate (Cuprol) 溶液可用於頭蝨的治療。另外，有報告指出銅化物和金化物於治療風濕性關節炎有相似的療效，但是臨床上很少探討其有效性 (Sorenson, 1982)。

在真核、原核生物體內銅是必須的微量元素，半衰期為四星期，部份酵素執行生理功能時，銅扮演輔因子的角色，例如 ferroxidases, cytochrome oxidase, superoxide dismutase 以及 amine oxidase。因此，銅的恆定對於細胞維持正常功能相當重要。一般而言，成人一天要攝取約 2mg 的銅為適當。倘若攝取大量 (15-75mg) 會導致胃腸阻塞，全身性的作用則有溶血以及肝腎的損壞，吸入銅煙則會造成呼吸傷害和銅煙熱 (metal fume fever)。目前人類還沒有慢性銅中毒的例子。

銅要通過內皮細胞膜屏障需靠細胞膜上 P-type Cu^{2+} -ATPase 的運輸。一旦腸黏膜層之 Cu^{2+} -ATPase 功能缺陷，會造成組織和器官缺銅而引起 Menke's disease (Danks et al., 1972; Danks, 1988)；有些人因先天性代謝不正常，造成肝臟無法製造銅蛋白 (ceruloplasmin) 而無法順利排泄銅而罹患 Wilson's disease。

銅在生化上之毒性機轉至今仍不清楚。研究者將分離的細胞和器官加入過量的 Cupric ions (Cu^{2+})，會造成細胞膜的不穩定 (Chvapil et al., 1972; Forman et al., 1980)。最初，游離的 Cu^{2+} 會和細胞膜上 sulfhydryl groups (SH groups) 結合，然後將 cupric copper 還原成 cuprous，而 sulfhydryl 則伴隨著氧化作用產生 disulfides。當分子氧 (O_2) 出現時，cuprous ions 可進行氧化還原反應形成 cupric form，而 O_2 還原成具有毒性的 O_2^- (Superoxide radical)， O_2^- 可造成脂質過氧化 (lipoperoxidation)。(Kumar et al., 1978; Forman et al., 1980)。也有報告指出當 H_2O_2 和 Ascorbic acid 存在下，銅鹽 (Copper salts) 會損害染色體 (Daune, 1974; Stick et al., 1976)。Sirover 和 Loeb (1976) 指出於 DNA 雙股螺旋合成時，Cupric salts 會降低 nucleotides 的供應。雖然煉銅工和銅礦工肺癌發生率有增加的報告 (Kuratsune et al., 1974)，暴露過量的銅和導致癌症還未證明有正相關，畢竟砷化物同時也參與了作用。銅亦可穿過胎盤的屏障，進入胎兒體中，進而影響胎兒 CNS 系統。另外，人類精子細胞加入金屬銅之後，精蟲的活

動力有明顯的降低。

吃入過量的銅鹽，早期可用 1% potassium ferricyanide 洗胃(Moeschlin, 1965)，形成不溶性的 cupric ferrocyanide，並且需要供給適當的水份、電解質和血液。當有黃疸、血紅素尿和血尿的情形發生時，corticosteroids 則非常有效。急性銅中毒以及 Wilson's disease 病人，可使用 D-pencillamine 治療，其可增加銅在腎臟的排除(Holtzman et al., 1966)。曝露於銅化物導致皮膚過敏時，塗抹 hydrocortisone 軟膏則有很好的療效(Saltzer and Wilson, 1968)。另外，尚有其他螯合劑 triethylene-tetramine 和 dimercaptosuccinate，目前被嘗試用於 pencillamine intolerance 病人 (Walshe, 1973; Aaseth, 1983)。

2. 錳 (Manganese)

原子量 54.94，原子數 25，為灰白色金屬(whitish-grey metal)，氧化狀態有 0、+1、+2、+3、+4、+5、+6 和 +7 價，而最穩定氧化狀態是 +2 價。

錳主要是用於冶金的過程，大約有 90%的錳用在鋼鐵的製造，例如去氧化(deoxidizing)和去硫化(desulfurizing)。其他的用途則有製造錳乾電池、玻璃業和紡織業之漂白劑、亞麻仁油之乾燥劑、當作氧化劑、染料、製革以及肥料中少量元素等。有機錳常添加於汽油中，產生抗震效果。

錳分布很廣，不論是土壤、空氣、水都含有相當含量

的錳，大部分都含在氧化物、碳化物和矽化物之礦物中，甚至食物中之小麥、稻米、茶葉都含有高濃度的錳，而蛋、奶、水果含量較少。

錳在人體是必須的微量元素之一，每個組織和器官含量都不相同，肝和腎含量很高，腦部就很少。胃腸道是主要的排除路徑，大約只有 0.01% 由尿液排出。而大鼠和狗，主要是經由膽酸排除。在人類其半衰期很長，大約 2-5 個星期，而在腦部的半衰期更長，當過量吸收，此金屬可能會聚積於腦部。

錳也是構成 pyruvate carboxylase 和 superoxide dismutase 的成份之一，並且也能夠活化許多 enzyme。有報告指出，錳可以刺激 chondroitin sulfate 合成，所以它是組成軟骨和結締組織中很重要的物質；但是很少有錳缺乏的病歷。在動物實驗中，當錳缺乏會導致骨骼異常及阻礙生長 (Underwood, 1977; Hurley, 1981.)，運動不調 (ataxia) 和內耳缺損 (Hurley, 1976)。Doisy (1973) 提出給予人工不含錳的食物，使體內含錳量過低，其症狀為皮膚炎、頭髮色素改變、延遲頭髮生長以及造成低膽固醇酯血症。

錳和其他金屬相較之下，具較低毒性，人類急性錳中毒的案例很少見，曾有報告指出誤服 K_2MnO_4 導致 methemoglobinemia (Mahomed et al., 1975)。另外，改變人體組織和體液中錳的濃度，會導致一些疾病。例如增加二倍血液的含錳量，則發現會導致冠狀動脈栓塞 (Newberne, 1973)；吸入過量的錳會增加肺病和支氣管炎

的發生率，以及增加細菌和病毒在肺的侵入。當肺吸收過量的錳時，會導致其在腦部聚集，Cotzias et al.(1986a)指出礦工曝露在 MnO_2 之灰塵中，造成慢性錳中毒而導致不可逆的腦部疾病，程度和 Parkinson's disease 相似。Zielhuis et al.(1978)指出，曝露在含有鉛的環境下，會增加血液中錳的濃度，是因為鉛會結合在錳所結合的 porphyrins 而導致。動物實驗指出，當鐵缺乏，錳在 red cells 會和 porphyrin 結合(Diez-Ewald et al.,1968)。

錳導致神經毒性之機轉現今仍沒有定論，但動物實驗猴子、兔子、大鼠等長期暴露錳，則造成基底神經節多巴胺的排空 (dopamine depletion) (Neff et al.,1969 ; Mustafa and Chandra , 1972 ; Bonilla and Diez-Ewald , 1974)。Watanabe et al (1981) 報告，在日本許多錳礦區前列腺癌罹患率有增加的情形。然而，卻沒有相關性的證據證明由於環境中錳污染而導致前列腺癌，亦沒有數據和資料顯示人類暴露過量的錳會導致癌症以及突變與染色體變異。也沒有數據顯示動物和人類吸入或攝入錳會導致畸胎的報告。

慢性錳中毒導致類似 Parkinson's disease 可以使用 dopamine 和 serotonin 治療(Mena et al.,1970)。而金屬螯合劑(chelating agents)則沒有療效。

3. 鎳 (Nickel)

原子量 58.71，原子數 28，為銀白色具有延展性之金屬，氧化狀態有 0、+1、+2、+3 價。

大約有 40% 的鎳用於鋼鐵的製造，也可用於製造其他的合金，例如鑄幣、家中廚房用的器皿，nickel sulfate 可用於電鍍，nickel hydroxide 用於鎳-鎘電池的製造，nickel carbonate 用於許多電子化物，譬如真空管和電晶體。

鎳在食物中含量非常的少，Szadkowski et al. (1969) 發現每支香煙平均含鎳量為 2.2-2.3g，並且鎳在香煙之煙霧佔 10-20%，現今仍不清楚鎳在煙霧中以何種型態存在？但有些數據指示也許是 nickel carbonyl。

鎳被認為是一些動物所必須的元素，但在人類還未被證實。人和動物的白蛋白(albumin)是鎳主要的輸送蛋白(transport protein)。鎳也被發現在 nickeloplasmin、nickel-containing α -macroglobulin 以及 ultrafiltrable serum fraction (Sunderman Jr.,1977)。在 ultrafiltrable serum fraction 也發現到 nickel-histidine complex (Lucassen and Sarkar,1979)以及與 albumin 結合也包括 albumin-nickel-histidine complex (Glennon and Sarkar,1982)。

在雞、豬和大鼠曾有鎳缺乏的病理現象被報告 (Nielsen and Sauberlich,1970; Sunderman Jr. et al.,1972; Anke et al.,1974; Nielsen and Ollerich, 1974; Schnegg and Kirchgessner, 1975, 1976)包括生長停滯、貧血和降低 enzyme 的活化。

鎳化物在動物實驗中是致癌物 (carcinogenic)，但於人類呼吸道癌所扮演的角色仍受到爭議。有報告指出，鎳化物會導致 Syrian hamster embryo cells 轉型 (Costa et al.,

1981a)。於體外實驗，將 hamster embryo cells 曝露於結晶性可溶性鎳鹽，造成 DNA 斷裂、DNA 蛋白交互連結和突變 (Miyaki et al., 1979; Ciccarelli et al., 1981; Robison and Costa, 1982) 以及在人類淋巴球細胞會增加姊妹染色分體的互換 (Saxholm et al., 1981; Newman et al., 1982)。鎳導致腫瘤的發生和其化合物的溶解度有關，低溶解度會增加誘導腫瘤的能力。在動物實驗中，吸入低溶解度之鎳化物，會導致鼻粘膜和肺的發炎反應。鎳工曝露在含鎳的環境下，易得皮膚炎、氣喘。有報告指出，曝露在低溶解度之鎳化物中，特別是 oxide 和 subsulfide 會導致肺癌與鼻竇炎。鎳工曝露於含鎳的粉塵中，導致肺塵埃沈著症 (Zislin et al., 1969; Jones and Warner, 1972)。曝露在大量 nickel carbonyl 會導致急性中毒 (NAS, 1975)，剛開始症狀較輕微，例如噁心、頭痛、呼吸困難以及胸痛，這些症狀很快會消失，但經過 12 小時至 5 天肺部的症狀就會出現，咳嗽和呼吸困難是常見的症狀以及瀰漫性間質性肺炎合併腦和其他器官之全身作用，可能導致死亡。鎳化物對於皮膚的傷害不一定在鎳工才發生，通常只要直接接觸鍍鎳的物品就會產生，例如鎳幣、手錶、廚具....等，症狀為癢、紅斑丘疹、有灼熱感，進而產生水泡、癬苔變化。

慢性鎳中毒可使用 sodium diethyldithiocarbamate，其他螯合劑很少有作用，有時在一些案件中會使中毒更惡化。

4. 鉛 (Lead)

在化學週期表屬於IVa族，原子量207.19，原子數82，為銀白色質軟之金屬，氧化狀態有0，+2和+4價，大部分無機鉛是+2價。

鉛可用於鉛蓄電池的生產(60%)、鹼性電池的製造(14%)、油漆和染料(6.6%)以及不同種類的半成品。不溶性的鉛有50%以上，用於汽車工業之鉛蓄電池和鹼性電池之製造。Tetramethyllead (TML) 和 tetraethyllead (TEL) 是很重要的有機鉛，廣泛添加於燃料中以增加抗震效果，但近年來TEL和其它有機鉛於汽車燃料的添加有逐漸減少的趨勢。

進入人體的鉛，約90%的鉛貯存在骨頭，半衰期約20年；小部份貯存在血液和軟組織半衰期約20天。其主要由尿液(約80%)和胃腸道排除，小部份由乳汁、汗液、毛髮以及指甲排除。

低K、Ca和Fe的食物會增加鉛的吸收，低蛋白的食物可能會增加鉛中毒(Six and Goyer,1970; Goyer and Mahaffey,1972)。有一些疾病依生理狀態不同而不同，包括性別不同和鐵缺乏，可能會影響FEP (free erythrocyte protoporphyrin) 含量；譬如相同的PbB (Blood of lead) 含量，男性FEP含量則較女性少(Zielhuis,1977)。

人類暴露於鉛的環境下，可能會造成染色體變異(chromosomal aberrations)，但還未被定論，因為仍有其它干擾因子例如鋅和鎘(Schwanitz et al.,1975; Bauchinger et al.,1976)。Forni et al. (1976) 報告 11

位受試者暴露於鉛的環境下，和受測前比較結果發現不正常的染色體有顯著的增加（abnormal chromatid metaphases）。然而這不能代表 in vivo 的真正狀態，由於變異的都是染色體的型態，換句話說在 DNA 合成細胞培養時之後產生變異，表示這些可能是培養所引起的變異，所以現今還沒有很好的證據證實鉛影響人類的染色體。在人類也沒有證據證明其為致癌物，但在一些動物實驗報告指出相當大量鉛會導致良性和惡性腫瘤。然而 Cooper 和 Gaffey（1975）流行病學研究報告，在電池工廠工作者死亡率並沒有增加，但在熔礦提煉的工人稍微增加惡性腫瘤的數目。儘管有充分的動物實驗數據，但 IARC（1979）工作小組認為人是暴露於金屬鉛，而動物之癌症是由可溶性鉛鹽所造成，所以不認為鉛是人類之致癌物。

鉛和其它金屬之交互作用很少被了解，在 tetraogenesis 實驗（Ferm, 1969）鉛和鎳有相加作用（synergistic）；而鋅則能拮抗鉛的作用（Cheh and Neilands, 1973）。

急性鉛中毒通常症狀為胃腸絞痛，小孩大部分伴隨著腦部症狀，但罕見於成人。慢性鉛中毒的症狀是貧血，由於鉛可抑制 δ -胺基左旋糖酸（ δ -aminolevulinic acid； δ -ALA）dehydrase 以及 heme synthetase 而抑制血基質的合成（heme synthesis），因而增加紅血球的原紫質（protoporphrin）、FEP（free erythrocyte protoporphrin）和 ZPP（zinc protoporphrin）以及 δ -ALA，接著增加尿液 δ -ALA 和 coproporphrin 排除，以及降低血紅素含量。

所以鉛中毒時必須偵測血中含鉛量，以及尿中 FEP、ALA 和 coproporphyrin 之含量，測定 FEP 對診斷小量性鉛中毒特具意義。其它測試方法尚有偵測血紅素 (hemoglobin) 和血紅素細胞的嗜鹼性顆粒 (basophilic granulation) 含量可作為參考資料。

當鉛中毒時，首先要移除暴露源，金屬螯合劑可以治療急性或慢性鉛中毒，譬如 BAL (British antilewisite)、calcium-EDTA (monocalcium ethylenediaminetetraacetic acid) 及 D-penicillamine。而 calcium-EDTA 是最常用也是最有效之解毒劑，並且它比 BAL 的副作用要少得多。

由於半導體的製造在這些年相當盛行，其製造過程中需使用許多化學物質，這些化學物質之毒性除強酸、強鹼溶液和有機溶媒有詳細的研究外，金屬部份則很少有毒性的探討。由於此四種重金屬化合物不僅可用在半導體之連線，亦可用於複合鍍層，例如鎳則常用於印刷電路板及 BGA 之墊層。半導體工業表面看來相當安全和安靜，其實其製造過程中充滿危險性。此四種重金屬不只使用在半導體工業亦廣泛存在於其它工業製品和日常用品，它們可能經由工作的暴露或環境污染由消化道或呼吸道進入人體。

雖然可以經由身體的排除系統加以代謝及排泄，但速率卻很緩慢而囤積於體內，所以其對人體之危害必須詳加研究。由於此四種重金屬之細胞-遺傳毒性尚有所爭議，所以本研究以下列四個方向加以探討，以期對此四種重金屬之細胞-遺傳毒性、毒性機轉和解毒劑做更進一步的了解。

1. 使用微小核 (MN) 法來檢驗 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+}

在 V79 肺細胞之遺傳毒性。另外，探討其和半導體晶片常用的類金屬 In^{3+} 或 Sb^{3+} 之交互遺傳毒性，並進一步探討 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 反轉此四種重金屬之遺傳毒性的能力。

2. 以核分裂 (NDI) 及 MTT 法分析此四種半導體重金屬對 V79 肺細胞之細胞毒性，並探討其和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 In^{3+} 或 Sb^{3+} 之交互細胞毒性，以及探討重金屬之解毒劑 (D-PA 及 BAL) 緩解此四種重金屬之細胞毒性的效力。
3. 流式細胞儀 (Flow cytometry) 法分析此四種重金屬對 V79 肺細胞之細胞週期的分佈以及細胞凋亡之影響。
4. 在倒立顯微鏡下觀察此四種重金屬在高濃度下對 V79 肺細胞型態之影響。

材料和方法(Materials and Methods)

壹、藥品和儀器

一、藥品試劑

A、下列藥品購自 Sigma 公司(美國)

- 1.Cytochalasin B
- 2.Adriamycin
- 3.Copper nitrate
- 4.Manganese nitrate
- 5.Ribonuclease A (RNase A)
- 6.3-[4,5-Dimethylthiazol 2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)
- 7.Glycine
- 8.Propidium iodine (PI)
- 9.D-penicillamine (D-PA)
- 10.Dimercaprol (BAL)

B、下列藥品購自 Gibco 公司(美國)

- 1.Trypsin (0.25%)
- 2.Dulbecco's phosphate Buffered Saline
- 3.Minimum Essential Medium
- 4.Fetal Bovine Serum
- 5.PSN (Antibiotic mixture)

含 Penicillin

Streptomycin

Neomycin

C、下列藥品購自 Merck 公司(德國)

1. Potassium Chloride
2. Giemsa
3. Fix sol'n (Methanol : Acetic acid = 3 : 1)
4. Lead nitrate
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
6. Sodium chloride
7. Ethanol absolute
8. Calcium chloride
9. Magnesium chloride

D、下列藥品購自 Aldrich 公司(美國)

1. Nickel nitrate
2. Antimony chloride
3. Indium chloride

二、常用藥品及培養液之配製

1. Copper nitrate : 取適量 copper nitrate ($30 \mu\text{M}$ - 1mM) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
2. Manganese nitrate : 取適量 manganese nitrate (30 - $300 \mu\text{M}$) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
3. Nickel nitrate : 取適量 nickel nitrate ($30 \mu\text{M}$ - 1mM) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
4. Lead nitrate : 取適量 lead nitrate (0.1 - $3 \mu\text{M}$) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終

濃度。

5. Adriamycin：取適量 adriamycin ($0.3-1 \mu\text{M}$) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
6. Indium chloride：取適量 indium chloride ($0.1 \mu\text{M}$) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
7. Calcium chloride：取適量 calcium chloride ($3-10\text{mM}$) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
8. Magnesium chloride：取適量 magnesium chloride ($3-10\text{mM}$) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
9. BAL：取適量 BAL ($30 \mu\text{M}$) 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
10. Antimony chloride：取適量 antimony chloride ($0.1 \mu\text{M}$) 溶於滅菌的 DMSO 中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
11. D-PA：取適量 D-PA ($3 \mu\text{M}$) 溶於滅菌的 DMSO 中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
12. Sorensen's glycine buffer：取 0.1M 的 NaCl 加 30ml 的蒸餾水，再加 0.1M glycine，用 1M NaOH 調 pH 至 10.5 ，最後加蒸餾水至 50ml 。
13. MEM

取出可配製一公升 MEM 的粉末，加入碳酸氫鈉

(NaHCO₃) 2.2g 溶於一公升之去離子水中，調 pH 值至 7.25 後，過濾滅菌。

14. Cytochalasin B (Cyt-B)

將 Cyt-B 溶於滅菌的 DMSO 中，使其濃度為 2mg/ml 並以 HBSS 稀釋成 0.5mg/ml，其最終反應濃度為 3 μ g/ml。

15. 75mM KCl (低張溶液)

取 0.54g KCl 溶於 100ml 之蒸餾水中。

16. 5 μ l RNase

將 10 μ g/ μ l 溶於二次水稀釋成 0.05 μ g/ μ l

17. PI

將 0.5mg/c.c. 溶於 PBS 稀釋成 5 μ g/c.c.

三、 儀器

1. 無菌操作台 (Laminar Flow Biological Safety Cabinet) :

- a. 廠牌 : Bellco
- b. 型號 : 8001-74000
- c. 出產地 : Canada

2. 培養箱 (Incubator) :

- a. 廠牌 : Nadaire
- b. 型號 : IR AUTOFLOW
- c. 出產地 : U. S. A.

3. 離心機 (Centrifuge) :

- a. 廠牌 : Hettich – Zentrifugen

- b. 型號：ROTANTA/R
 - c. 出產地：Tuttlingen
4. 烘片機(Slide Warmer)：
- a. 廠牌：Fisher Scientific
 - b. 型號：77
 - c. 出產地：U. S. A
5. 水浴機(Shaker Bath 130)：
- a. 廠牌：Firstek
 - b. 型號：B 202 – Tr
 - c. 出產地：U. S. A.
6. 細胞計數器(Hemocytometer)：
- Reichert-Jung
7. 光學顯微鏡(Microscope)：
- a. 廠牌：Nikon
 - b. 型號：Microphot – FAX
 - c. 出產地：Japan
8. 電子天平(Electrical balance):
- a. 廠牌：Mettler
 - b. 型號：AE 240
 - c. 出產地：Canada
9. 倒立顯微鏡 (Inverse microscope):
- a. 廠牌：Nikon
 - b. 型號：phase contrast 2 ELWD 0.3
 - c. 出產地：Japan
10. 酸鹼測定儀 (pH meter)：

- a. 廠牌：WTW
- b. 型號：PH 537
- c. 出產地：Germany

11.迴轉式振盪器 (Roating Plate Form Shaker):

- a. 廠牌：Firstek Scientific
- b. 型號：S101D
- c. 出產地：Taiwan

12.微量光度計 (Microplate Reader) :

- a. 廠牌：Metertech
- b. 型號： Σ 960
- c. 出產地：Taiwan

13.流式細胞分析儀 (Flow cytometer) :

- a. 廠牌：Becton – Dickinson
- b. 型號：FACS – Calibur
- c. 出產地：Japan

四、 照相器材及試劑

- 1.底片顯影劑：Kodak T-max
- 2.照片顯影劑：Dektal
- 3.照片及底片定影劑：Kodak T fixer
- 4.底片：Kodak
- 5.照片：Ilford
- 6.放大機：
 - a. 廠牌：Meopta
 - b. 型號：OPEMUS 6
 - c. 出產地：Japan

貳、實驗步驟及方法

一、細胞培養(Cell Culture)：

*中國頰鼠肺細胞(V79 細胞)其細胞週期約 12 個小時
利用細胞計數器(Hemocytometer)取得 5×10^5 個 V79 肺
細胞置入每個培養皿中

↓

培養在含 10%小牛血清(Fetal bovine serum ; FCS)及
1% Antibiotic mixture (Penicillin, Streptomycin,
Neomycin ; PSN)的 5ml 培養液(Minimum Essential
Medium ; MEM)中

↓

放入含有 5% CO₂ 並保持濕潤的 37°C 培養箱

↓

培養 24 小時

↓

加入各種不同濃度的藥物
於不含血清及 PSN 的培養液中

↓

作用 2 個小時

↓

移去原培養液並以 PBS 溶液清洗細胞 2 次

↓

加入新鮮且含血清的培養液以下列方法探討各重金屬
對 V79 肺細胞之微小核數、細胞存活率和細胞週期和
細胞凋亡之影響

二、 細胞微小核法(Micronucleus Assay ; MN) :

1. 細胞 : 5×10^5 個 V79 肺細胞

2. 藥品 :

Copper nitrate (30 μ M-1mM)

Manganese nitrate (30-300 μ M)

Nickel nitrate (30 μ M-1mM)

Lead nitrate (0.1-3 μ M)

Calcium chloride (3-10mM)

Magnesium chloride (3-10mM)

Indium chloride (0.1 μ M)

Antimony chloride (0.1 μ M)

Adriamycin (0.3-1 μ M)

Cytochalasin B (0.5mg/ml)

Trypan blue (0.4%)

Trypsin (0.25%)

KCl (75mM)

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

3% Giemsa (pH6.4)

3. 儀器 : Microscope

4. 處理流程 :

5×10^5 個 V79 肺細胞

↓

培養 24 小時

↓

加入不同濃度藥物

及 30 μ l Cyt-B 於不含血清及 PSN 之培養液培養

↓

作用 2 小時

↓

移去原培養液並用 PBS 清洗細胞 2 次

↓

加入 30 μ l Cyt-B 及含血清之培養液培養

↓

培養 18 個小時

↓

細胞經 0.25% Trypsin 處理

↓

收集懸浮細胞

5. Micronucleus 之製備：

懸浮的細胞以 1200rpm 離心 8min

↓

以 75mM KCl 處理 3min 並將細胞懸浮液均勻

↓

以 1200rpm 離心 8min

↓

倒掉上清液

↓

沿管壁加入 5ml 固定液懸浮均勻並靜置 30min

↓

以 1200rpm 離心 8min

↓

移去上清液並加入 5ml 固定液處理 5min

↓

以 1200rpm 離心 8min

↓

倒掉上清液並加入 3ml 固定液處理 3min

↓

以 1200rpm 離心 8min

↓

加入少許固定液並與細胞混合均勻

↓

將混合液輕輕滴在已置於烘片機上烘乾的玻片上

↓

待玻片乾後，以 3% 吉氏染色劑(Giemsa)染色 5min

↓

在顯微鏡下連續觀察 1000 個雙核細胞中所含 MN 之數目

三、細胞存活率(Viability)：

1. 細胞： 1×10^4 個 V79 肺細胞/each well

2. 藥品：

Copper nitrate (1mM)

Manganese nitrate (300 μ M)

Nickel nitrate (1mM)

Lead nitrate (3 μ M)

Calcium chloride (3-10mM)

Magnesium chloride (3-10mM)

Indium chloride (0.1 μ M)

Antimony choride (0.1 μ M)

D-PA (3 μ M)

BAL (30 μ M)

MTT (50 μ l)

DMSO - Sorensen's glycine buffer (8 : 1)

3. 儀器：

ELISA

4. 處理流程：

1 \times 10⁴ 個 V79 肺細胞/each well 於 96-well microplate

↓

培養 24 小時

↓

加入不同濃度藥物

於不含血清及 PSN 之培養液培養

↓

作用 2 小時

↓

移去培養液

加入含血清之培養液培養

↓

培養 18 個小時

↓

收集細胞

5. 細胞的數據分析：

細胞去除培養液

↓

每個 well 加入配好的 200 μ l MTT 溶液

↓

放置一小時

↓

吸除 MTT 溶液

每個 well 加入 200 μ l DMSO-Sorenen's glycin buffer
溶液

↓

於迴轉式振盪器搖盪 10 分鐘

↓

放入 ELISA 儀器在波長 570nm 偵測 O.D. 值

↓

收集數據

四、 流體細胞儀分析法(Flow Cytometry)：

1. 細胞：5 \times 10⁵ 個 V79 肺細胞

2. 藥品：

Adriamycin (0.3-1 μ M)

Copper nitrate (1mM)

Manganese nitrate (300 μ M)

Nickel nitrate (1mM)

Lead nitrate (3 μ M)

PBS

Ethanol absolute

Trypsin (0.25%)

RNase (50 µg / c.c.)

PI (5µg / c.c.)

3. 儀器：

Flow cytometer

4. 處理流程：

5×10^5 個 V79 肺細胞

↓

培養 24 小時

↓

加入不同濃度藥物

於不含血清及 PSN 之培養液培養

↓

作用 2 小時

↓

移去原培養液並用 PBS 清洗細胞 2 次

↓

加入含血清之培養液培養

↓

培養 18 個小時

↓

細胞經 0.25% Trypsin 處理

↓

收集懸浮細胞

5. 細胞的製備：

懸浮細胞

↓

以 1200rpm 離心 5min

↓

移去上清液並加入 1ml PBS 溶液清洗

↓

以 1200rpm 離心 5min

↓

移去上清液並加入 1ml PBS 溶液清洗

↓

以 1200rpm 離心 5min

↓

移去上清液並緩緩加入 300 μ l PBS 溶液使之分散均勻，

再加入 700 μ l Ethanol absolute 溶液固定

↓

放置 -20 $^{\circ}$ C 24 小時

↓

準備上機分析細胞

6. 上機前處理

將細胞分散均勻，並以 1200rpm 離心 5min

↓

放入冰浴

↓

D-PBS 洗 (或 Triton-X)

↓

以 1200rpm 離心 5min, 去除上清液後, 加入 1ml D-PBS
製成細胞懸浮液

↓

以 1c.c. 針筒抽出細胞懸浮液, 然後以 300 目絹布過濾

↓

抽取 985 μ l PBS

加 5 μ l RNase

10 μ l PI

↓

放入包錫箔的 Eppendorf 中

↓

放置於細胞培養箱 (37°C , 30 分鐘)

7. 上機分析細胞 (Flow cytometer): 收集 15000 個細胞, 由螢光強度得知 DNA 含量

開機 :

↓ 須時五分鐘暖機 (加 PBS、漂白水)

↓ 檢查氣閥、過濾氣泡排除

↓ 改 Sample 為 PBS buffer

↓ 按 Prime 待至 Standby 重複 2 次

↓ 執行 High Speed-- "Run" 2 分鐘

↓ 即可上機分析細胞

關機 :

↓ 3ml 的 5% 漂白水至架上, 右位吸 2ml, 再至中位

High-Run5 分鐘

↓按 Standby 留置架上 (約含 1ml DI water)

↓待 5 分鐘後關機

五、 統計分析(Statistical Analysis)：

細胞存活率(Viability)，微小核(MN)之結果以 mean ± S.E.M. 呈現，而實驗組和對照組之間的統計意義差別以 Student's t-Test 或先以 one way analysis of variance (ANOVA) 分析，然後以 Dunnett's Test 來評估，以 $p < 0.05$ 時作為顯著差異的判斷準則。

結果 (Results)

一、微小核 (MN)：

1. 在 V79 中國頰鼠肺細胞，硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛所誘導之微小核數：

圖 1、2、3 和 4 的結果顯示， Cu^{2+} (1mM)、 Mn^{2+} (200 和 300 μM)、 Ni^{2+} (300 μM 和 1mM) 及 Pb^{2+} (0.1-3 μM) 與控制組比較，都具有統計意義地增加微小核頻率，表示此四種半導體重金屬在這些濃度下，對 V79 肺細胞會產生遺傳毒性。

正對照組 Adriamycin (如圖 5 所示)，其為癌症之化療藥，主要機轉是插在雙股 DNA 中而抑制 RNA 的合成，進而影響核酸的合成和功能。當濃度為 0.3 μM 時，會大量增加 V79 肺細胞的微小核數目，但 1 μM 時反而使微小核數減少，此可能較高濃度之 adriamycin 使突變細胞加速死亡所造成。

2. 硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛分別和氯化銻與氯化銻之交互遺傳毒性：

A. 圖 6 結果顯示 0.1 μM In^{3+} (MN: 27.50 \pm 0.87) 與對照組 (MN: 10.75 \pm 2.06) 比較具有統計意義增加 V79 肺細胞之微小核頻率。1mM Cu^{2+} 、300 μM Mn^{2+} 、1mM Ni^{2+} 及 3 μM Pb^{2+} 分別加上 0.1 μM In^{3+} 之微小核數分別為 29.75 \pm 2.29、24.75 \pm 3.04、21.00 \pm 3.24 和 27.50 \pm 3.97 與 In^{3+} 單獨組 (MN: 27.50 \pm 0.87) 比較， Ni^{2+} 具有統計意義減少 In^{3+} 之遺傳毒性， Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 亦可降低 In^{3+} 所增加之微小核頻率但不具統計意義， Cu^{2+} 亦

不影響 In^{3+} 之遺傳毒性。

B. 圖 6 結果顯示 $0.1 \mu\text{M Sb}^{3+}$ (MN: 18.50 ± 2.18) 與對照組 (MN: 10.75 ± 2.06) 比較具有統計意義增加 V79 肺細胞之微小核頻率。 1mM Cu^{2+} 、 $300 \mu\text{M Mn}^{2+}$ 、 1mM Ni^{2+} 及 $3 \mu\text{M Pb}^{2+}$ 分別加上 $0.1 \mu\text{M Sb}^{3+}$ 之微小核數為 29.00 ± 3.79 、 22.75 ± 2.50 、 19.50 ± 2.60 和 24.25 ± 2.06 與 Sb^{3+} 單獨組 (MN: 18.50 ± 2.18) 比較， Cu^{2+} 具有統計意義增加 Sb^{3+} 所增加微小核數，其餘三者對 Sb^{3+} 遺傳毒性之影響不具統計意義。

3. 硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛分別和氯化鈣與氯化鎂之交互遺傳毒性：

圖 7 結果顯示 V79 肺細胞單獨加入 10mM Ca^{2+} 再以 Cyt-B 處理後細胞全部死亡，無法計算雙核細胞以及微小核細胞之數目，而 3mM Mg^{2+} (MN: 9.50 ± 1.66) 單獨存在時未具遺傳毒性。 $300 \mu\text{M Mn}^{2+}$ (MN: 23.50 ± 2.90) 和 $3 \mu\text{M Pb}^{2+}$ (MN: 19.50 ± 1.94) 分別與對照組 (MN: 8.25 ± 1.25) 比較具有統計意義增加 V79 肺細胞之微小核頻率。當 2 種金屬分別加上 10mM Ca^{2+} 或 3mM Mg^{2+} 後， Pb^{2+} 之遺傳毒性可被 Ca^{2+} 所降低 (Pb^{2+} : 19.50 ± 1.94 ; $\text{Pb}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$: 11.67 ± 2.02)， Mn^{2+} 之遺傳毒性則不受 Ca^{2+} 所影響 (Mn^{2+} : 23.50 ± 2.90 ; $\text{Mn}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$: 21.25 ± 1.11)。此外， Mg^{2+} 則可分別完全的反轉 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 之遺傳毒性 (對照組: 8.25 ± 1.25 ; $\text{Mg}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$: 7.00 ± 1.41 ; $\text{Mg}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$: 7.50 ± 1.44)。

二、核分裂指數 (NDI)

1. Adriamycin 對 V79 中國頰鼠肺細胞之 NDI 的影響：

由表 1 顯示正對照組 Adriamycin 0.3 和 $1 \mu\text{M}$ 之 NDI 值分別為 1.51 ± 0.01 和 1.06 ± 0.01 與對照組 (1.84 ± 0.02) 比較具有顯著統計差異並且呈 dose-dependent 抑制核分裂指數，並且亦呈濃度相關性抑制雙核細胞之數目。

2. 半導體金屬，硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛，對 V79 中國頰鼠肺細胞之 NDI 的影響：

A. 由表 2 的結果顯示，不同濃度的 Cu^{2+} ($30 \mu\text{M}$ - 1mM) 之 NDI 值：

$30 \mu\text{M}$ (1.85 ± 0.02)、 $100 \mu\text{M}$ (1.82 ± 0.01)、 $300 \mu\text{M}$ (1.85 ± 0.01)、 1mM (1.47 ± 0.01) 之 NDI 值與對照組 (1.81 ± 0.01) 比較， 30 - $300 \mu\text{M}$ Cu^{2+} 並無顯著統計差異的影響 V79 肺細胞之 NDI 值， 1mM Cu^{2+} 則具統計差異抑制 NDI。此外， 1mM Cu^{2+} 亦具統計意義地降低雙核細胞之數目。

B. 由表 2 的結果顯示，不同濃度的 Mn^{2+} ($30 \mu\text{M}$ - $300 \mu\text{M}$) 之 NDI 值：

$30 \mu\text{M}$ (1.88 ± 0.02)、 $100 \mu\text{M}$ (1.83 ± 0.02)、 $200 \mu\text{M}$ (1.79 ± 0.01) 及 $300 \mu\text{M}$ (1.49 ± 0.02) 之 NDI 值與對照組 (1.94 ± 0.01) 比較， 30 - $100 \mu\text{M}$ Mn^{2+} 並無顯著統計差異的影響 V79 肺細胞之 NDI 值， 200 - $300 \mu\text{M}$ Mn^{2+} 則具有統計差異並呈 dose-dependent 抑制核分裂指數。此外， $300 \mu\text{M}$ Mn^{2+} 亦具統計意義地降低雙核細胞之數目。

C. 由表 2 的結果顯示，不同濃度的 Ni^{2+} ($30 \mu\text{M}$ - 1mM) 之 NDI 值：

$30 \mu\text{M}$ (1.82 ± 0.01)、 $100 \mu\text{M}$ (1.82 ± 0.01)、 $300 \mu\text{M}$

M(1.81 ± 0.01)、1mM(1.68 ± 0.01)之 NDI 值與對照組(1.81 ± 0.01)比較，30-300 μ M Ni^{2+} 並無顯著統計差異的影響 V79 肺細胞之 NDI 值，1mM Ni^{2+} 則具統計差異抑制核分裂指數。此外，1mM Ni^{2+} 亦具統計意義地降低雙核細胞之數目。

D. 由表 2 的結果顯示，不同濃度的 Pb^{2+} (0.3-3 μ M)之 NDI 值：

0.3 μ M(1.83 ± 0.01)、0.3 μ M(1.79 ± 0.01)、1 μ M(1.77 ± 0.03)及 3 μ M(1.81 ± 0.02)之 NDI 值與對照組(1.85 ± 0.01)比較都無明顯統計差異影響核分裂指數。此外，這四種濃度對雙核細胞之數目均無差異性。

三、細胞存活率 (Viability)

1. 硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛對 V79 肺細胞存活率之影響：

本研究在加藥 2 小時後，將藥洗掉，換上新培養液後，做不同時間點的觀察各組細胞之 O.D. 值（代表細胞存活率）。0 小時：Control: 0.35 ± 0.02 ， Cu^{2+} : 0.37 ± 0.02 ， Mn^{2+} : 0.36 ± 0.01 ， Ni^{2+} : 0.30 ± 0.01 ， Pb^{2+} : 0.29 ± 0.01 ；4 小時：Control: 0.56 ± 0.04 ， Cu^{2+} : 0.46 ± 0.02 ， Mn^{2+} : 0.48 ± 0.02 ， Ni^{2+} : 0.43 ± 0.02 ， Pb^{2+} : 0.41 ± 0.02 ；8 小時：Control: 0.63 ± 0.03 ， Cu^{2+} : 0.55 ± 0.02 ， Mn^{2+} : 0.51 ± 0.02 ， Ni^{2+} : 0.51 ± 0.02 ， Pb^{2+} : 0.51 ± 0.03 ；16 小時：Control: 1.06 ± 0.06 ， Cu^{2+} : 0.79 ± 0.05 ， Mn^{2+} : 0.66 ± 0.04 ， Ni^{2+} : 0.71 ± 0.02 ， Pb^{2+} : 0.85 ± 0.04 （圖 8）。這些數據顯示 Cu^{2+} (1mM)、 Mn^{2+} (300 μ M)、 Ni^{2+} (1mM)和 Pb^{2+} (3 μ M)抑

制 V79 肺細胞存活率之作用隨時間之不同而有所變化。給藥後 0 小時偵測 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 與對照組比較就具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率， Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 則無統計差異；4 小時 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 與對照組比較具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率， Mn^{2+} 則無統計差異；8 小時則四種半導體重金屬 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 細胞存活率分別與對照組比較都具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率，此四種金屬離子抑制 V79 肺細胞存活率之作用，可持續到加藥後 16 小時，此數據可知 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 最快產生細胞毒性， Cu^{2+} 次之， Mn^{2+} 最慢，但四者之細胞毒性均可持續很久。

2. 氯化鈣與硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛在 V79 肺細胞之交互細胞毒性：

表 4 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (0.669 ± 0.020)、300 μM Mn^{2+} (0.580 ± 0.042)、1mM Ni^{2+} (0.557 ± 0.031) 和 3 μM Pb^{2+} (0.383 ± 0.013) 與對照組 (0.812 ± 0.049) 比較，和表 5 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (0.609 ± 0.042)、300 μM Mn^{2+} (0.596 ± 0.050)、1mM Ni^{2+} (0.581 ± 0.059) 和 3 μM Pb^{2+} (0.415 ± 0.019) 與對照組 (0.732 ± 0.032) 比較，均具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率。3mM Ca^{2+} (0.715 ± 0.027) 和 10mM Ca^{2+} (0.658 ± 0.052) 均不影響 V79 肺細胞之存活率。當四種金屬分別加上 3mM Ca^{2+} 或 10mM Ca^{2+} ， Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 之細胞毒性可被 Ca^{2+} 有意義地降低 (Mn^{2+} : 0.580 ± 0.042 ， $\text{Mn}^{2+} + 3\text{mM } \text{Ca}^{2+}$: 0.904 ± 0.059 ； Mn^{2+} : 0.596 ± 0.050 ， $\text{Mn}^{2+} + 10\text{mM } \text{Ca}^{2+}$: 0.856 ± 0.050 ； Pb^{2+} :

0.383 ± 0.013 , $Pb^{2+} + 3mM Ca^{2+}$: 0.722 ± 0.029 ; Pb^{2+} : 0.415 ± 0.019 , $Pb^{2+} + 10mM Ca^{2+}$: 0.736 ± 0.046), 但 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 之細胞毒性卻不受 3 和 10mM Ca^{2+} 所影響 (Cu^{2+} : 0.669 ± 0.020 , $Cu^{2+} + 3mM Ca^{2+}$: 0.736 ± 0.042 ; Cu^{2+} : 0.609 ± 0.042 , $Cu^{2+} + 10mM Ca^{2+}$: 0.495 ± 0.070 ; Ni^{2+} : 0.557 ± 0.031 , $Ni^{2+} + 3mM Ca^{2+}$: 0.604 ± 0.032 ; Ni^{2+} : 0.581 ± 0.059 , $Ni^{2+} + 10mM Ca^{2+}$: 0.655 ± 0.043)。

3. 氯化鎂與硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛在 V79 肺細胞之交互細胞毒性：

表 6 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (0.836 ± 0.046)、300 $\mu M Mn^{2+}$ (0.710 ± 0.037)、1mM Ni^{2+} (0.896 ± 0.040) 和 3 $\mu M Pb^{2+}$ (0.874 ± 0.039) 與對照組 (1.124 ± 0.097) 比較，和表 7 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (0.924 ± 0.035)、300 $\mu M Mn^{2+}$ (0.528 ± 0.001)、1mM Ni^{2+} (0.826 ± 0.031) 和 3 $\mu M Pb^{2+}$ (0.826 ± 0.015) 與對照組 (1.066 ± 0.044) 比較，均具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率。而 3mM Mg^{2+} (1.109 ± 0.028) 和 10mM Mg^{2+} (0.994 ± 0.044) 均不影響 V79 肺細胞之存活率。當 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 分別加上 3mM Mg^{2+} 處理後，3mM Mg^{2+} 可完全反轉此四種半導體重金屬所造成的細胞毒性 (Cu^{2+} : 0.836 ± 0.046 , $Cu^{2+} + 3mM Mg^{2+}$: 1.108 ± 0.054 ; Mn^{2+} : 0.710 ± 0.037 , $Mn^{2+} + 3mM Mg^{2+}$: 0.882 ± 0.058 ; Ni^{2+} : 0.896 ± 0.040 , $Ni^{2+} + 3mM Mg^{2+}$: 1.070 ± 0.063 ; Pb^{2+} : 0.874 ± 0.039 , $Pb^{2+} + 3mM Mg^{2+}$: 1.109 ± 0.071)；在高濃度 10mM Mg^{2+} 只能反轉 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 之細胞毒性 (Cu^{2+} : 0.924 ± 0.035 , $Cu^{2+} + 10mM Mg^{2+}$: 1.092

± 0.047 ; Mn^{2+} : 0.528 ± 0.001 , $\text{Mn}^{2+} + 10\text{mM Mg}^{2+}$: 0.767 ± 0.073) , 但對 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 卻沒有影響 (Ni^{2+} : 0.826 ± 0.031 , $\text{Ni}^{2+} + 10\text{mM Mg}^{2+}$: 0.851 ± 0.055 ; Pb^{2+} : 0.826 ± 0.015 , $\text{Pb}^{2+} + 10\text{mM Mg}^{2+}$: 0.896 ± 0.037) 。

4. 氯化銻或氯化銻與硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛在 V79 肺細胞之交互細胞毒性：

表 8 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (0.996 ± 0.078)、 $300 \mu\text{M Mn}^{2+}$ (1.049 ± 0.058)、 1mM Ni^{2+} (1.027 ± 0.052)、 $3 \mu\text{M Pb}^{2+}$ (1.001 ± 0.026) 和 $0.1 \mu\text{M In}^{3+}$ (1.028 ± 0.029) 與對照組 (1.257 ± 0.047) 比較，和表 9 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (0.998 ± 0.084)、 $300 \mu\text{M Mn}^{2+}$ (1.048 ± 0.057)、 1mM Ni^{2+} (0.936 ± 0.025)、 $3 \mu\text{M Pb}^{2+}$ (0.959 ± 0.014) 和 $0.1 \mu\text{M Sb}^{3+}$ (0.860 ± 0.050) 與對照組 (1.318 ± 0.094) 比較，均具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率。而四種重金屬分別加入或不加 $0.1 \mu\text{M In}^{3+}$ 比較下皆不具有統計差異 (Cu^{2+} : 0.996 ± 0.078 , $\text{Cu}^{2+} + \text{In}^{3+}$: 1.080 ± 0.046 ; Mn^{2+} : 1.049 ± 0.058 , $\text{Mn}^{2+} + \text{In}^{3+}$: 1.063 ± 0.050 ; Ni^{2+} : 1.027 ± 0.052 , $\text{Ni}^{2+} + \text{In}^{3+}$: 0.985 ± 0.050 ; Pb^{2+} : 1.001 ± 0.026 , $\text{Pb}^{2+} + \text{In}^{3+}$: 1.048 ± 0.047) 。但 Sb^{3+} 會加強 Pb^{2+} 細胞毒性 (Pb^{2+} : 0.959 ± 0.014 , $\text{Pb}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$: 0.692 ± 0.040) ，而 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mn^{2+} 之細胞毒性不受 Sb^{3+} 所影響 (Cu^{2+} : 0.998 ± 0.084 , $\text{Cu}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$: 0.977 ± 0.068 ; Ni^{2+} : 0.936 ± 0.025 , $\text{Ni}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$: 0.817 ± 0.034 ; Mn^{2+} : 1.048 ± 0.057 , $\text{Mn}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$: 0.963 ± 0.051) 。

5. BAL 與硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛在 V79 肺細胞

之交互細胞毒性：

表 10 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (1.037 ± 0.051)、 $300 \mu\text{M}$ Mn^{2+} (0.933 ± 0.079)、1mM Ni^{2+} (0.855 ± 0.038)、 $3 \mu\text{M}$ Pb^{2+} (0.769 ± 0.018)與對照組(1.285 ± 0.065)比較，均具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率。 $30 \mu\text{M}$ BAL 則不影響細胞存活率(Control: 1.285 ± 0.065 , BAL: 1.207 ± 0.054)。當四種金屬分別加上 $30 \mu\text{M}$ BAL, Pb^{2+} 之細胞毒性可被 BAL 有意義的降低(Pb^{2+} : 0.769 ± 0.018 , $\text{Pb}^{2+} + 30 \mu\text{M}$ BAL: 1.109 ± 0.068)，但 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 之細胞毒性卻不受 BAL 所影響(Cu^{2+} : 1.037 ± 0.051 , $\text{Cu}^{2+} + \text{BAL}$: 1.176 ± 0.060 ; Mn^{2+} : 0.933 ± 0.079 , $\text{Mn}^{2+} + \text{BAL}$: 1.034 ± 0.038 ; Ni^{2+} : 0.855 ± 0.038 , $\text{Ni}^{2+} + \text{BAL}$: 0.980 ± 0.078)。

6. D-PA 與硝酸銅、硝酸錳、硝酸鎳和硝酸鉛在 V79 肺細胞之交互細胞毒性：

表 11 之結果顯示 1mM Cu^{2+} (1.012 ± 0.078)、 $300 \mu\text{M}$ Mn^{2+} (0.711 ± 0.046)、1mM Ni^{2+} (0.926 ± 0.038)和 $3 \mu\text{M}$ Pb^{2+} (0.922 ± 0.024)與對照組(1.223 ± 0.057)比較，均具有統計意義的抑制 V79 肺細胞之存活率。 $3 \mu\text{M}$ D-PA 單獨存在下，具有細胞毒性(Control: 1.223 ± 0.057 , $3 \mu\text{M}$ D-PA: 0.807 ± 0.022)。當 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 分別加入 $3 \mu\text{M}$ 後，此四種金屬之細胞毒性均被 $3 \mu\text{M}$ D-PA 所加強(Cu^{2+} : 1.012 ± 0.078 , $\text{Cu}^{2+} + \text{D-PA}$: 0.790 ± 0.042 ; Mn^{2+} : 0.711 ± 0.046 , $\text{Mn}^{2+} + \text{D-PA}$: 0.538 ± 0.023 ; Ni^{2+} : 0.926 ± 0.038 , $\text{Ni}^{2+} + \text{D-PA}$: 0.715 ± 0.049 ; Pb^{2+} : 0.922 ± 0.024 , $\text{Pb}^{2+} + \text{D-PA}$: 0.701 ± 0.049)。

四. 流式細胞儀之分析結果

以 MTT assay 證明 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 的細胞毒性後，吾人進一步探討此四種半導體金屬引起的細胞死亡是否經由細胞凋亡的途徑？ Cu^{2+} (1mM)、 Mn^{2+} (300 μM)、 Ni^{2+} (1mM) 和 Pb^{2+} (3 μM) 處理 V79 肺細胞 2 小時後洗去金屬鹽，並換上新鮮培養液繼續培養 16 小時，以 PI 做 DNA 染色後，均無典型的細胞凋亡指標 (hypoploidy cell；低套染色體細胞) 出現 (Fig.9)，並且沒有顯著差異影響 V79 肺細胞之正散射光分佈 (代表細胞體積大小) (Fig.10) 和但 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 如 adriamycin 可增加側散射光分佈 (代表細胞內顆粒度) (Fig.11)。以 ModFit LT 分析細胞週期之分佈情形 (Fig.12)，如 Table.12 所示， Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 加藥組在細胞週期 G_0/G_1 phase 所佔之百分比分別為 13.11、29.87、20.41 和 27.02；在 S phase 所佔之百分比分別為 24.37、49.55、20.73 和 50.05； G_2/M phase 所佔之百分比分別為 62.52、20.58、58.86 和 22.93，與對照組 (G_0/G_1 phase：27.61；S phase：52.01； G_2/M phase：20.83) 以及正對照組 1 μM adriamycin (G_0/G_1 phase：15.54；S phase：27.19； G_2/M phase：57.28) 相比 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 對 V79 肺細胞之細胞週期，似乎沒有明顯的改變；但 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 則如正對照組 1 μM ADM 有 G_2/M phase block 的現象。

五. 細胞之型態

微小核細胞 (Fig.13) 是在一般光學顯微鏡下 400 倍所拍攝。細胞型態是在倒立顯微鏡以 phase 3 (400 倍) 所

拍攝。Fig.14 為對照組之 V79 肺細胞，細胞呈紡錘—多角狀吸附在培養皿上，細胞質明顯擴展，細胞核清晰分明，圓球量點為正處分裂的細胞。Fig.15 為加入 1mM Cu^{2+} 之 V79 肺細胞，細胞質明顯擴展，核大且清晰，也有處於分裂狀態之細胞。Fig. 16 為加入 300 μM Mn^{2+} 之 V79 肺細胞，大部分細胞外觀較圓，呈紡錘狀者較少，細胞間以偽足相連之現象亦較多。錳可能與血清或培養液之某種物質作用，形成不溶性的沈澱物，不論在培養皿或細胞中皆可觀察到黑色不透明的情形，有的可明顯看出細胞質和細胞核，有的則因沈澱物使其不明顯。Fig.17 和 Fig.18 分別為 1mM Ni^{2+} 和 3 μM Pb^{2+} 與對照組相較，無明顯的不同，細胞質明顯擴展開來，細胞核也清晰分明，並亦有處於分裂的細胞。Fig.19 為加入正對照組 (1 μM ADM) 之 V79 肺細胞，細胞較不具紡錘狀，但細胞核清晰，且細胞間以偽足相連的情形增加，可能是因為藥物使細胞嚴重受損，因而需要其它細胞支援，以致型態上有所改變，但仍有處於分裂狀態之細胞。

討論 (Discussion)

本研究結果顯示，半導體重金屬硝酸銅 (300 μ M 和 1mM)、硝酸錳 (200 和 300 μ M) 和硝酸鎳 (300 μ M 和 1mM) 於高濃度下皆增加 V79 肺細胞之微小核頻率，而硝酸鉛 (0.1-3 μ M) 在低濃度下，便具統計意義增加微小核數，但不呈劑量-相關性。此四種重金屬對細胞造成遺傳毒性的報告亦被其他學者所提出。Bhunya 和 Jena (1996) 研究指出口服或 i.p. 注射 Copper sulphate (CuSO_4) 於小雞體內，皆會造成紅血球染色體變異 (Chromosome aberrations, CA)，口服只增加骨髓紅血球微小核數，而 i.p. 注射之後骨髓及週邊血液之紅血球的微小核頻率皆增加，因此認為 CuSO_4 對於小雞是具有強力的遺傳毒性。Joarder 和 Sharma (1990) 二位學者比較無機錳化合物， MnSO_4 和 KMnO_4 ，在小鼠體內的遺傳毒性。口服投予不同劑量的 MnSO_4 和 KMnO_4 給小鼠三週之後，在骨髓細胞觀察到染色體變異以及微小核數皆具統計意義的增加，其認為口服無機錳化合物，在胃之酸性條件下 MnSO_4 直接而 KMnO_4 間接產生 Mn^{2+} ，而 Mn^{2+} 對染色體組成具有高度親和力。Shamy (1993)，於人類淋巴球加入 nickel sulfate 處理之後發現微小核數目具有統計意義的增加，因此建議鎳為突變物及致癌物。其他學者則發現 NiCl_2 可增加小鼠骨髓細胞之微小核數 (Dhir et al., 1991)； α - Ni_3S_2 使 polychromatic erythrocytes 微小核數增加 (Arrouijal et al., 1990)。Jagetia 和 Aruna (1998) 投予不同劑量的硝酸鉛於小鼠，發現骨髓中之 micronucleated polychromatic

erythrocytes (MPCE) 以及 micronucleated normochromatic erythrocytes (MNCE) 均呈現統計意義的增加，但不呈劑量-相關性。他們亦發現雄性小鼠骨髓細胞之微小核數目比雌性來得多，顯示硝酸鉛對於雄性小鼠較易產生遺傳毒性。Tachi et al. (1985) 將 Lead acetate 單一劑量或重複 i.p. 注射於小鼠體內，結果發現骨髓細胞中有顯著染色體變異的情形（大部分為 chromatid gaps，而染色體斷裂和無中心節則很少發生）以及增加微小核頻率，但沒有發現染色體交換及多重斷裂，意味 lead acetate 是很弱的突變物。Lin et al. (1994) 指出硝酸鉛在 CHO 細胞不會增加微小核和染色體變異的頻率，但卻會增加姊妹染色分體交換 (SCE) 的次數，其認為以姊妹染色分體交換法偵測突變劑之遺傳毒性較靈敏。由本實驗結果和上述學者們的報告，顯示此四種金屬化合物不管在體內實驗或體外實驗，以不同的鹽類在不同的細胞均造成遺傳毒性，更能證明這四種重金屬化合物確實會導致遺傳毒性。另外，在本研究，硝酸鉛在 V79 肺細胞可增加微小核頻率，此點和 Lin et al. (1994) 觀察到硝酸鉛在 CHO 細胞不增加微小核頻率相反，可見不同細胞對金屬離子之反應會有所不同，因其對金屬離子之吸收系統、結合系統和修復系統均可能有所不同，所以結果會有所差異。所以欲證實金屬離子之遺傳毒性需做多方面的探討，包括不同細胞的標本、不同的偵測技術和實驗設計。

細胞毒性之研究結果顯示硝酸銅 (1mM)、硝酸錳 (300 μ M)、硝酸鎳 (1mM) 和硝酸鉛 (3 μ M) 皆具有統計意

義的抑制細胞存活率。其它學者亦提出類似的報告。Bumgardner et al. (1993) 研究含銅之牙材合金造成口腔齒齦受損和免疫反應之關係，其將銅鹽加於 T cell 和 B cell 24 小時後觀察 IL-2 和 IgG 的變化，結果發現銅使二種細胞之存活率皆下降，並且改變細胞增生以及調整可溶性免疫物質 (IL-2) 產生，進而影響 IgG 之免疫反應，造成多種病理現象。Schmalz et al. (1997) 也探討牙科材料模子所含之金屬 Cu、Zn、Pd、Ni、Sn、Co 和 In 對於人類 fibroblast-keratinocyte co-culture 之影響，由於牙材對黏膜會產生刺激，所以研究者也利用 immunoassay 偵測這些金屬對 PGE₂ 釋放之情形，結果發現 Cu 和 Ni 皆使細胞存活率下降分別為 14-25% 及 87%，並且 Cu 增加 PGE₂ 釋放達 6-25 倍。Floquet et al. (1997) 也指出將銅合金加入培養的細胞中，利用 colony forming method 觀察到 Cu 導致細胞存活率下降。Sokol et al. (1996) 比較大鼠吃入正常含銅量和含銅過量的食物，結果發現吃入過量銅之大鼠，其肝細胞之存活率具有統計意義減少，並且也增加脂質過氧化 (lipid peroxidation)。Kishimoto et al. (1992) 將 copper sulfate (CuSO₄) 加入 human vascular endothelial (HVE) 和 Human fibroblasts (HAIN-55)，發現二種細胞株的細胞存活率、細胞生長以及 DNA 合成皆被 Cu²⁺ 呈濃度-相關性抑制，並且 Cu²⁺ 也改變細胞型態，另外也觀察到 Cu²⁺ 對 HVE 之細胞毒性大於 HAIN-55，因此推測 Cu²⁺ 可能導致血管內皮傷害，因而產生心血管疾病。Fischer 和 Skreb (1980) 指出 MnCl₂ 使細胞內乳酸脫氫

酵素 (lactic dehydrogenase) 釋放增加而活化醱解 (glycolytic) 作用，因此降低有絲分裂的速率，並呈劑量-相關性抑制細胞增生， Mn^{2+} 對該細胞產生群落的能力和 DNA 合成速率則呈時間及劑量-相關性的抑制。Desole et al. (1997) 報告 Mn^{2+} 會抑制 PCI2 細胞存活率 (MTT assay) 以及造成 apoptosis (TUNEL technique)，而抗氧化劑 N-acetylcystein 和 ascorbic acid 可對抗這些結果，所以主張 Mn^{2+} 過量導致 parkinsonism 是經由含氧自由基 (ROS) 造成神經毒性。Forgacs et al. (1998) 將硫酸鎳加入小鼠 Leydig cells，使用 MTT 方法偵測細胞毒性，結果高濃度 1mM Ni^{2+} 可減少細胞存活率，但 250 μ M Ni^{2+} 卻不影響。Sierra 和 Tiffany-Castiglioni (1991) 指出 glutamine synthase (GS) 是 astroglial enzyme，在腦中促使 glutamate 和 ammonia 合成 glutamine，其欲證明低劑量之 Pb^{2+} 可直接降低 GS 活性，所以每星期給予三次含 0、0.25、0.5、1 μ M lead acetate 於培養大鼠之星狀細胞中，經 7、14、21 天之後偵測細胞存活率 (Trypan blue dye exclusion)、細胞數 (Cell number) 以及 GS 之活性，結果 Pb^{2+} 呈時間和劑量-相關性抑制細胞存活率，並且呈劑量-相關性抑制 GS 活性，顯示低劑量 Pb^{2+} 可使 astroglia 之功能受損。綜合論之 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 可在不同細胞產生細胞毒性，但 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 均需較高濃度才產生細胞毒性， Pb^{2+} 則在低濃度就產生細胞毒性，可能 V79 肺細胞對 Ni^{2+} 不吸收，而 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 為基本元素，所以細胞對之有較高之耐受性， Pb^{2+} 可經由 Ca^{2+} 之吸收機轉而

進入細胞而呈現較強的細胞毒性。

在本研究硝酸銅 (1mM)、硝酸錳 (300 μ M)、硝酸鎳 (1mM) 和硝酸鉛 (3 μ M) 會抑制 V79 肺細胞存活率，吾人更進一步探討 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 對其細胞毒性之影響。結果顯示 3mM 和 10mM Ca^{2+} 可反轉 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 之細胞毒性。3mM Mg^{2+} 則可反轉此四種重金屬之細胞毒性；而 10mM Mg^{2+} 只能對抗 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 之細胞毒性。也因此結果，更進一步探討 10mM Ca^{2+} 和 3mM Mg^{2+} 分別和 Mn^{2+} 或 Pb^{2+} 在 V79 肺細胞之交互遺傳毒性。結果單獨加入 10mM Ca^{2+} 培養的細胞很快地全部死亡，故無法偵測微小核數目，此可能 Cyt-B 和 Ca^{2+} 相加所造成，值得更進一步研究。此外， Ca^{2+} 只能對抗 Pb^{2+} 之遺傳毒性，對 Mn^{2+} 則無影響。然而加入 3mM Mg^{2+} 和對照組相比不具遺傳毒性，並且對 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 之遺傳毒性皆可降低。其他學者亦提出 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 可降低重金屬之細胞-遺傳毒性的報告。Lipetz 和 Douglass (1975) 指出 Ca^{2+} 在人類細胞可降低可溶性 Pb^{2+} 之細胞毒性。Blackwell et al. (1997) 亦在啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 發現 Mg^{2+} 可降低 Mn^{2+} 之細胞毒性，由於 Mg^{2+} 存在之下，酵母菌之 Mn^{2+} 含量顯著降低，所以其推測 Mg^{2+} 可能調節二價陽離子之主動運輸，因此降低 Mn^{2+} 對於啤酒酵母菌之細胞毒性。Conway et al. (1987) 指出提高細胞外液 Mg^{2+} 濃度能夠抑制 Ni^{2+} 在 CHO 細胞所造成之 DNA 斷裂 (DNA strand break)、DNA-蛋白質交互連結 (DNA-protein crosslinks)、姊妹染色分體交換 (sister chromatid exchanges) 和細胞轉型 (cell

transformation)。Hong et al. (1997) 亦指出 Nickel subsulfide 在 CHO 和 BALB/3T3 cell 增加微小核數以及造成 DNA-蛋白質交互連結之作用可被 Mg^{2+} 所反轉。 Mg^{2+} 亦可降低 nickel subsulfide 抑制 BALB/3T3 fibroblasts 之作用以及減少細胞內 Ni^{2+} 蓄積的量。不只如此， Ni^{2+} 於 H_2O_2 及 Ascorbic acid 存在下，將 deoxyguanosine 轉變呈 8-hydroxy-deoxyguanosine 之作用亦可被 Mg^{2+} 所抑制，所以其建議 Mg^{2+} 可經減少細胞內 Ni^{2+} 含量或含氧自由基的產生而降低 Ni^{2+} 之細胞-遺傳毒性。總之在本研究 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 所以能降低重金屬之細胞-遺傳毒性，亦可能和降低重金屬進入 V79 肺細胞有關。此外， Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 為基本元素，所以亦可能活化修護酵素 (repair enzyme) 而減少重金屬之細胞-遺傳毒性。

由於半導體的製造從矽晶到晶片的製造過程中，需使用到多種金屬，所以半導體工作人員，可能接觸到多種金屬，所以本論文亦探討常用之半導體類金屬 In^{3+} 和 Sb^{3+} 與此四種重金屬對 V79 肺細胞之交互細胞-遺傳毒性。結果顯示 In^{3+} 和 Sb^{3+} 都具有細胞-遺傳毒性，但 In^{3+} 之細胞毒性不受這四種重金屬所影響， Pb^{2+} 則會加強 Sb^{3+} 的細胞毒性。在交互遺傳毒性方面， Cu^{2+} 和 Sb^{3+} 共同作用時，會加強微小核的產生， Ni^{2+} 則可降低 In^{3+} 之遺傳毒性。所以半導體類金屬和重金屬間之交互細胞-遺傳毒性呈現相當複雜。

金屬中毒時，最常使用的解毒劑為螯合劑 (chelating agents)，通常其具有 2 個以上的負電性基 (electronegative

group) 分子，所以能與陽離子金屬原子形成穩定的複合物，再由體內排出。Dimercaprol (BAL)能與金屬直接螯合，防止金屬和硫氫基 (SH group) 之酵素結合，而避免干擾正常細胞之功能。Penicillamine 為 penicillin 水溶性分解物，D form(右旋)較 L form(左旋)異構物效果好且不具毒性。本實驗結果得知 30 μ M BAL 不具細胞毒性，並且可對抗 Pb^{2+} 之細胞毒性。3 μ M D-PA 不僅具有細胞毒性，並且會加強此四種重金屬抑制 V79 肺細胞之存活率的作用。雖然大部分報告都指出 BAL 和 D-PA 能夠解金屬之中毒，並且 D-PA 亦可用於 Cu^{2+} 中毒或風濕性關節炎，但在本研究結果顯示只有 Pb^{2+} 之細胞毒性可被 BAL 所降低。回顧參考文獻顯示，BAL 或其衍生物拮抗重金屬毒性之結果相當分歧。Aaseth et al. (1987) 指出 Cu^{2+} 中毒或 Wilson's disease 使用 2,3-dimercaptopropan-1-sulphonate (DMPS) 可能會增加銅所導致的溶血作用，可能因為二種化學物質交互作用，增加含氧自由基的形成而增加銅鹽的溶血作用。Chisolm 和 Thomas (1985) 則發現將 DMPS 投予於 Pb^{2+} 中毒的小孩後，能減少血液含鉛量 (PbB)，且 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 尿排除之量會增加(但不改變血漿中 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 的濃度)，由於 DMPS 不改變肝、腎和血液之功能，所以這些學者認為治療無症狀的鉛中毒既安全又有效。另外也有報告指出 BAL、meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA)能夠降低 PbB，治療 Pb^{2+} 中毒 (Abu et al.,1987；Graziano et al.,1992)。綜合這些報告和本研究之結果顯示，BAL 或其衍生物降低 Pb^{2+} 之毒性是可被確認。D-PA

雖被用來治療 Cu^{2+} 中毒，但在本研究 D-PA 未具此效果，反而加強 Cu^{2+} 和其它重金屬之細胞毒性。其他學者亦報告 D-PA 加 CuSO_4 可抑制分裂劑促進人類淋巴球 (Akamatsu et al., 1994) 和人類纖維母細胞 (Matsubara and Hirohata, 1988) 增生之作用，Lee et al. (1998) 亦報告 D-PA 可加強 phenylmercury acetate 在人類淋巴球之細胞毒性。D-PA 加強其它重金屬之細胞毒性之機轉目前尚未清楚，可能 D-PA 和重金屬形成具細胞毒性的金屬錯合物或其它未知的機轉。總之 D-PA 治療 Cu 中毒或類風濕性關節炎需小心評估，尤其和其它藥共用時。

本研究在流式細胞分析法的研究結果顯示 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 在導致遺傳-細胞毒性之劑量下，均未形成 sub- G_1 細胞，換句話說不會誘導 V79 肺細胞凋亡。此外，細胞大小和細胞型態的觀察，亦未見到細胞凋亡的特徵，但 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 均類似 ADM 可改變 V79 肺細胞內之顆粒度以及造成 G_2/M phase 抑制現象。由於 ADM 為 Anthracycline antibiotics，其插在雙股 DNA 之間，所以可抑制 DNA dependent RNA polymerase 而抑制 RNA 的合成，最後可能導致細胞分裂相關蛋白質的合成被抑制或其它未知之機轉而使細胞停留在 G_2/M phase。一般細胞停留在 G_2/M phase 可能活化 P^{53} 而造成細胞凋亡。Shiao et al. (1998) 報告 Nickel acetate 可在 CHO 細胞增加 G_2/M phase 比例，並活化 P^{53} 活性，以及造成 DNA-ladder，也就是 Ni^{2+} 可導致 CHO 細胞凋亡。根據這些報告，吾人尚須更進一步的探討這四種金屬離子是否造成 V79 肺細胞的

凋亡？尤其是 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} ；包括改善 Hypoploidy 分析法（如加 Triton X-100 或以其他固定液取代乙醇），採用更靈敏的 TUNEL 分析法或 Annexin V-FITC 分析法。

結論：

重金屬 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 確實會在 V79 肺細胞造成遺傳毒性和細胞毒性，但 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 造成細胞-遺傳毒性之濃度遠較 Pb^{2+} 為高，顯示 Pb^{2+} 造成 V79 肺細胞之細胞-遺傳毒性的作用較具特異性。此外， Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 因造成 G_2/M phase block 而影響細胞週期的分佈，且增加含高顆粒度之 V79 肺細胞數。 Mn^{2+} 則導致細胞型態明顯改變。由此可知這四種重金屬離子均可造成細胞-遺傳毒性，但有差異性存在。D-PA 在本實驗不但無法降低此四種重金屬之細胞毒性反而加重之，所以臨床上用 D-PA 治療 Cu^{2+} 中毒和風濕性關節炎之安全性？有待長期的評估。BAL 只能解除 Pb^{2+} 之細胞毒性由此可知 Pb^{2+} 造成細胞毒性之部份機轉是經由與細胞內成份之硫氫基結合，進而干擾許多酵素之功能造成細胞之傷害。 Ca^{2+} 能降低 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 之細胞毒性， Mg^{2+} 對 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 之細胞毒性均可降低。此外， Ca^{2+} 可降低 Pb^{2+} 之遺傳毒性， Mg^{2+} 則可降低 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 之微小核頻率至與對照組相似，所以推測 Ca^{2+} 與 Mg^{2+} 可能減少 V79 肺細胞吸收 Mn^{2+} 和 Pb^{2+} 或經由活化修護酵素（repair enzyme）而減少其細胞-遺傳毒性。另外，此四種重金屬與其它半導體常用類金屬 In^{3+} 或 Sb^{3+} 之交互細胞-遺傳毒性研究之結果十分複雜， Ni^{2+} 可降低 In^{3+} 之遺傳毒性， Cu^{2+} 則可加強 Sb^{3+} 之遺傳毒性， In^{3+} 之細胞

毒性不受任何四種金屬所影響，相對的 Sb^{3+} 之細胞毒性被 Pb^{2+} 所加強。總之， Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 均具有細胞-遺傳毒性，所以不論是製備這些金屬化合物的工廠，亦或從事這類物質的加工人員，應事先做好妥善的防護措施，並且定期偵測工作人員血中金屬之含量或相關金屬中毒指標，以預防職業上之傷害以及致癌的危險。

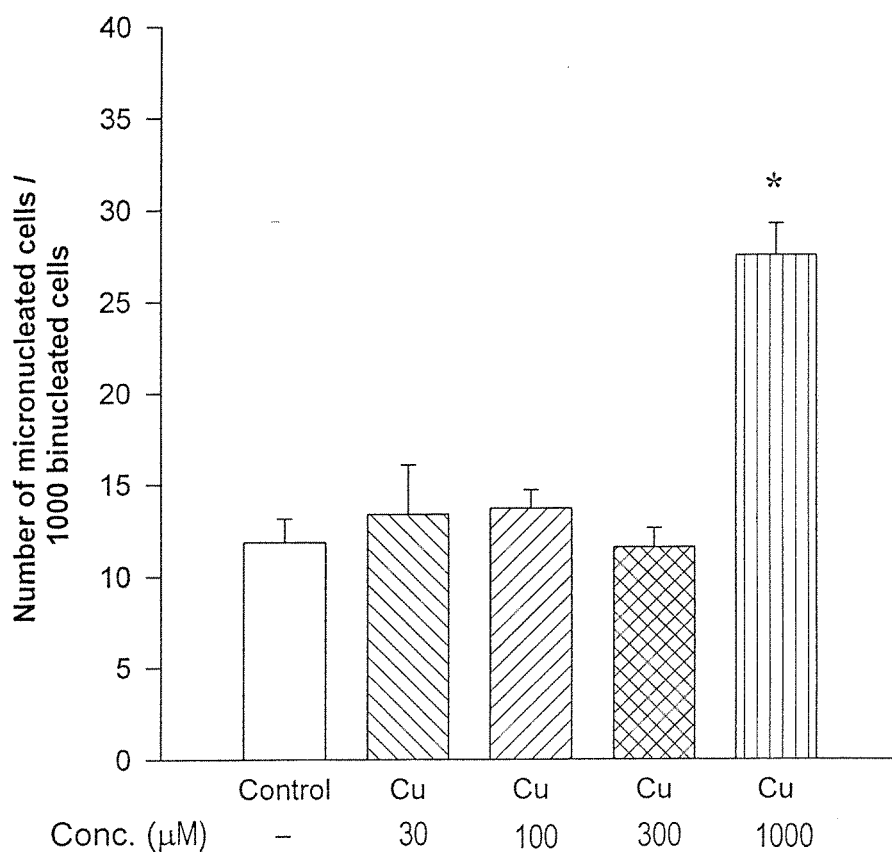


Fig. 1. Effect of copper nitrate (Cu^{2+}) on micronucleus induction in V79 Chinese hamster lung cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

* $p < 0.05$ as compared with control.

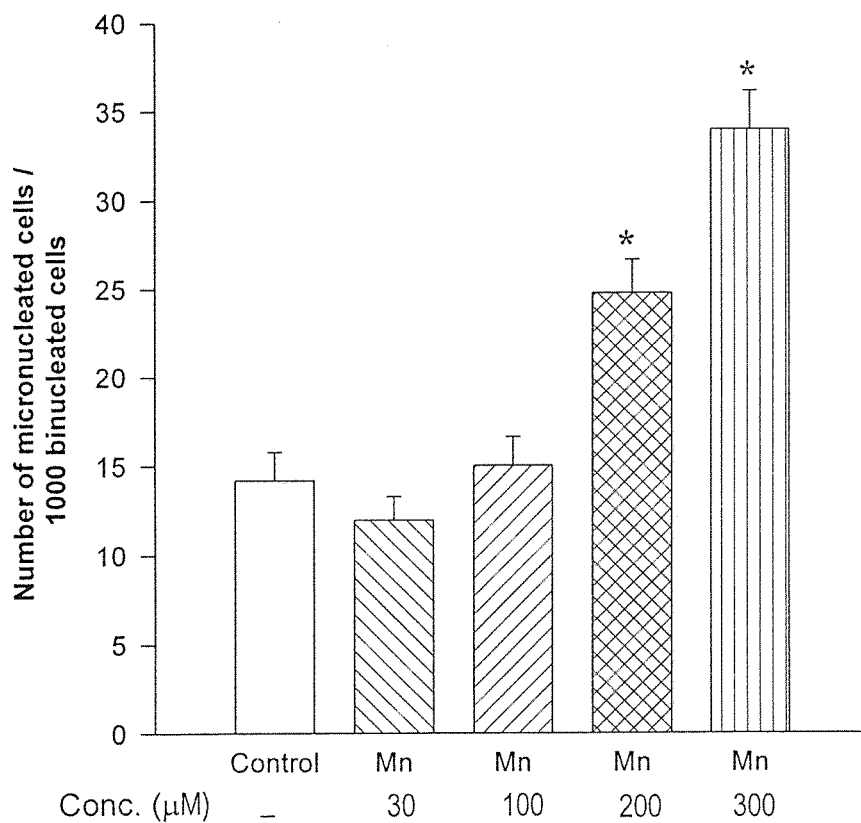


Fig.2. Effect of manganese nitrate (Mn^{2+}) on micronucleus induction in V79 Chinese hamster lung cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

* p < 0.05 as compared with control.

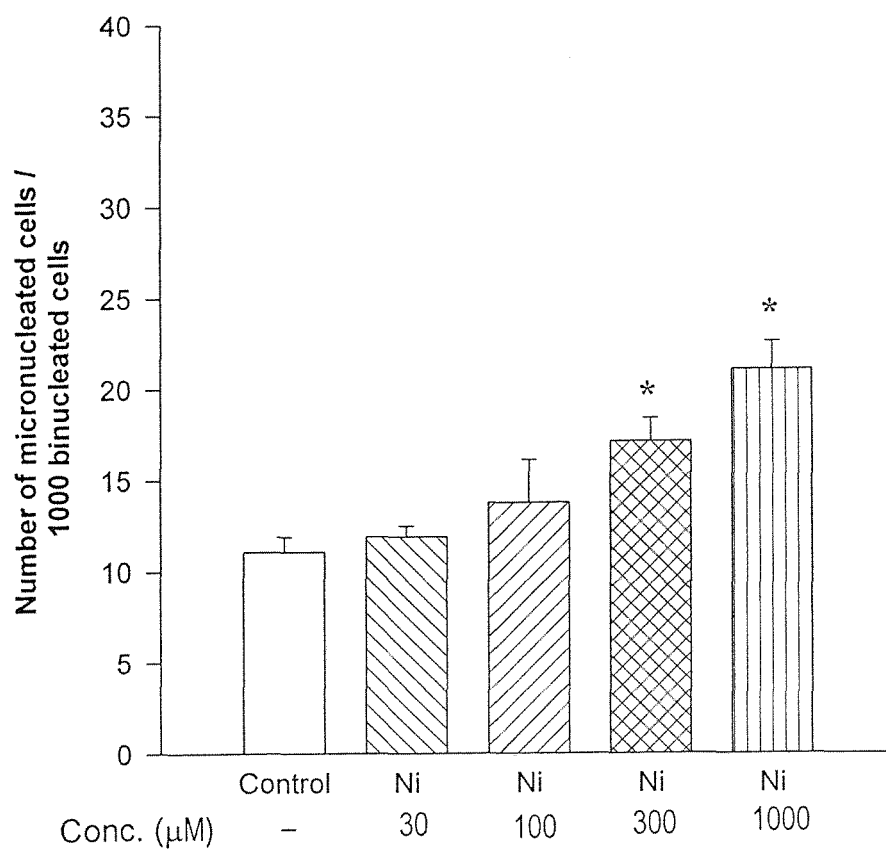


Fig. 3. Effect of nickel nitrate (Ni^{2+}) on micronucleus induction in V79 Chinese hamster lung cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

* p < 0.05 as compared with control.

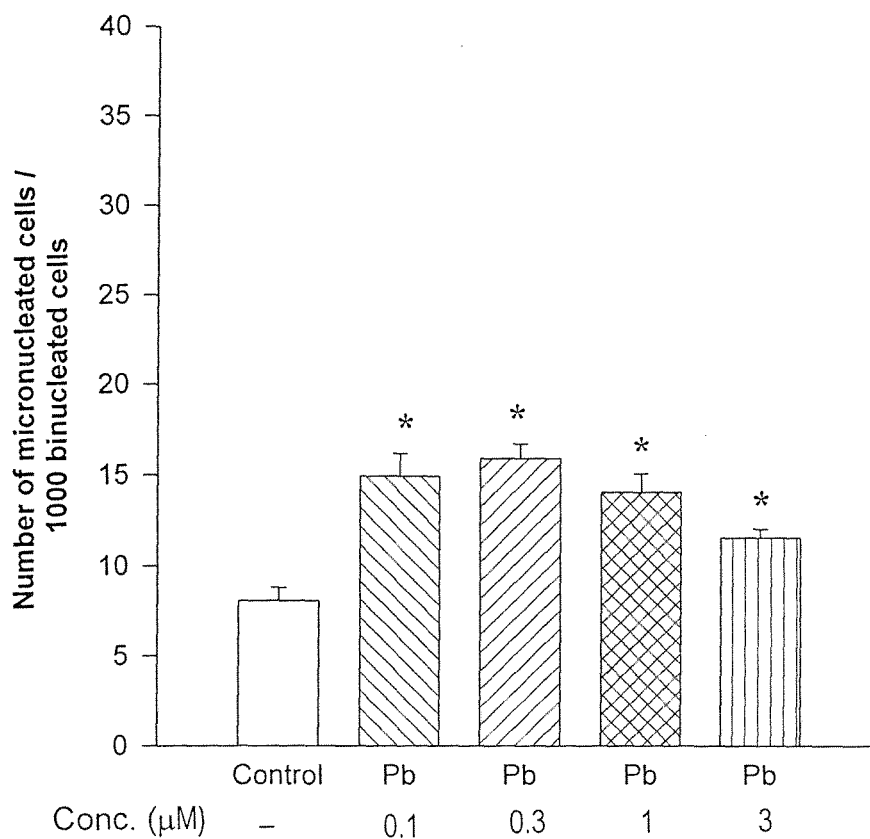


Fig.4. Effect of lead nitrate (Pb^{2+}) on micronucleus induction in V79 Chinese hamster lung cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

* p < 0.05 as compared with control.

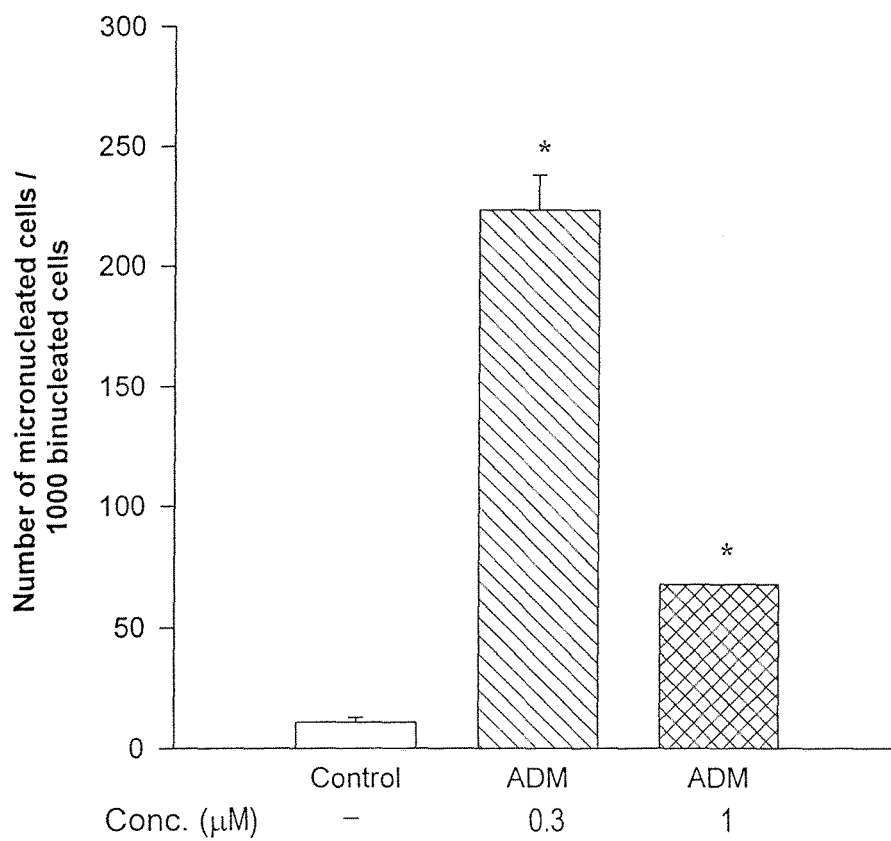


Fig. 5. Effect of Adriamycin (ADM) on micronucleus induction in V79 Chinese hamster lung cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

* p < 0.05 as compared with control.

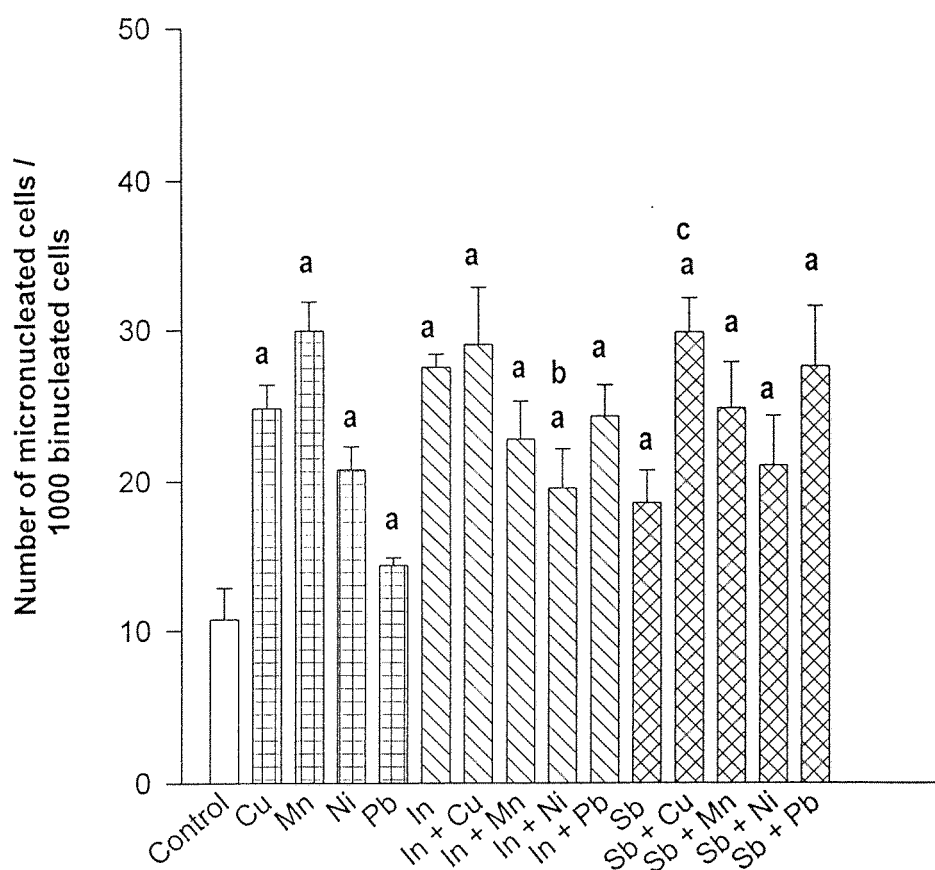


Fig. 6. Synergistic effects of Cu^{2+} (1mM), Mn^{2+} (300 μM), Ni^{2+} (1mM) and Pb^{2+} (3 μM) with In^{3+} (0.1 μM) or Sb^{3+} (0.1 μM) on V79 Chinese hamster lung cells. Metal ions-induced genotoxicity in V79 lung cells was assay by MN method. Data are shown as mean \pm S. E. M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

^a p < 0.05 as compared with control. (Student's t-Test)

^b p < 0.05 as compared with In^{3+} alone. (Student's t-Test)

^c p < 0.05 as compared with Sb^{3+} alone. (Student's t-Test)

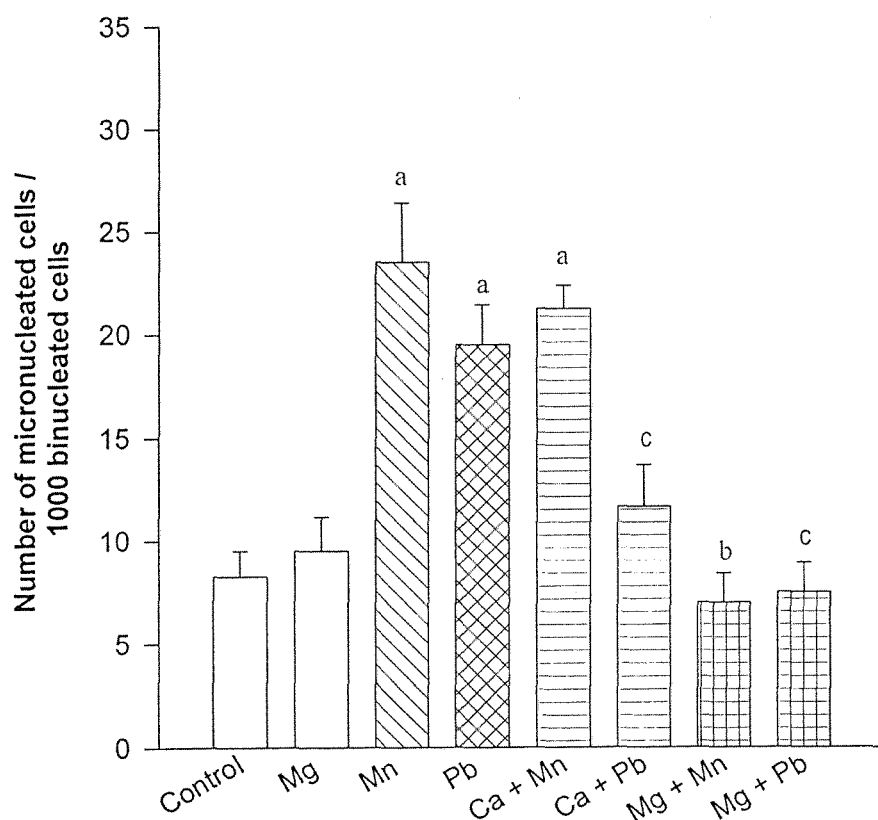


Fig.7. Effects of Ca^{2+} (10mM) or Mg^{2+} (3mM) on heavy metal ions ($300 \mu\text{M Mn}^{2+}$ and $3 \mu\text{M Pb}^{2+}$)–induced genotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

^a p < 0.05 as compared with control. (Student's t-Test)

^b p < 0.05 as compared with Mn^{2+} alone. (Student's t-Test)

^c p < 0.05 as compared with Pb^{2+} alone. (Student's t-Test)

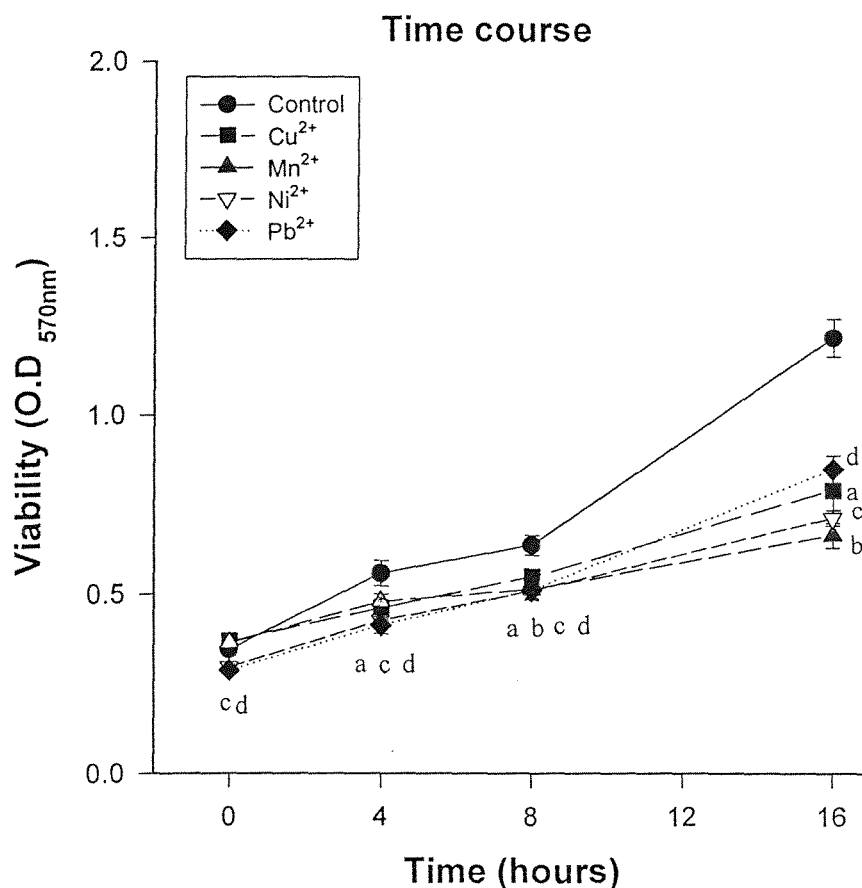


Fig.8. Time-course observation on cytotoxic effect of Cu²⁺(1mM), Mn²⁺(300 μ M), Ni²⁺ (1mM) and Pb²⁺ (3 μ M) in V79 Chinese hamster lung cells after 2hrs exposure. The viability of V79 lung cells was assay by MTT method.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

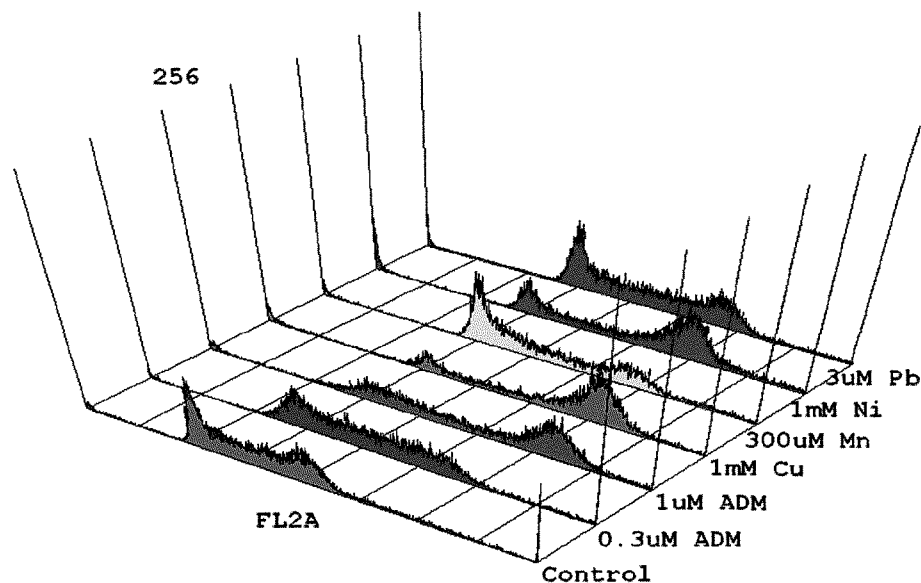
^a p < 0.05 as Cu²⁺ compared with control at the same time point, respectively. (Student's t-Test)

^b p < 0.05 as Mn²⁺ compared with control at the same time point, respectively. (Student's t-Test)

^c p < 0.05 as Ni²⁺ compared with control at the same time point, respectively. (Student's t-Test)

^d p < 0.05 as Pb²⁺ compared with control at the same time point, respectively. (Student's t-Test)

A.



B.

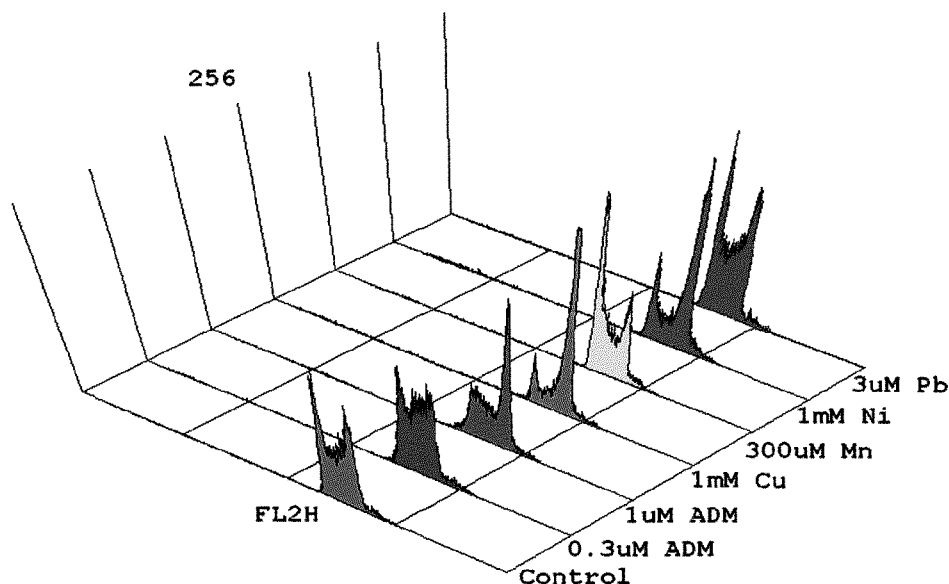


Fig. 9. DNA histograms from V79 cells treated with adriamycin (0.3 and 1 μ M), Cu^{2+} (1mM), Mn^{2+} (300 μ M), Ni^{2+} (1mM) and Pb^{2+} (3 μ M) for two hours. Panel A. DNA histograms of FL2A for cell cycle analysis. Panel B. DNA histograms of FL2H for hypoploidy analysis. Note, none of these chemicals induced hypoploidy cells. The horizontal axis represented the fluorescent intensity of DNA contents while the vertical axis represent the relative cell numbers. The results are representative of three experiments.

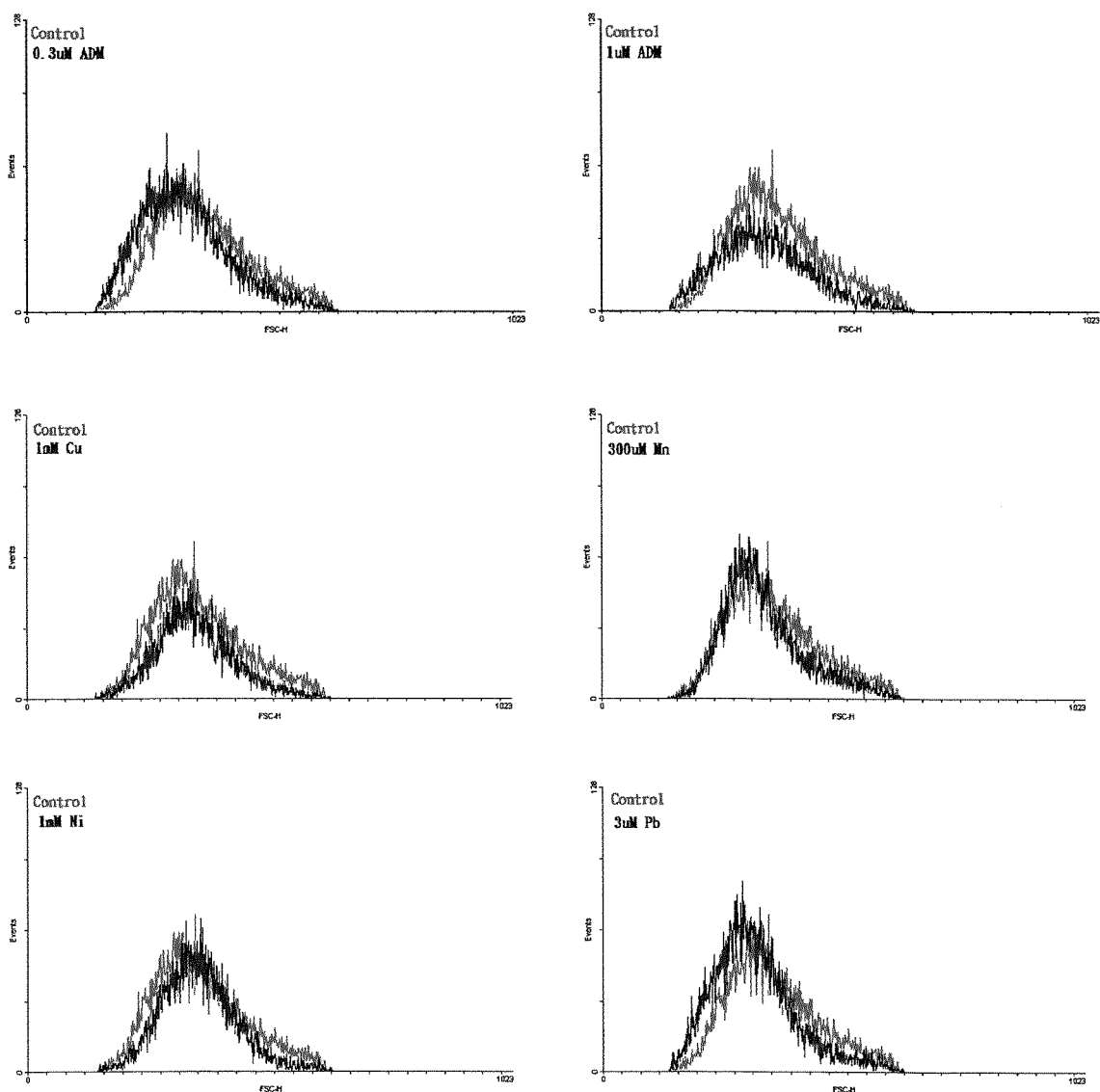


Fig.10. No marked change in forward light scatter (FSC-H) properties of V79 cells treated with adriamycin (0.3 and 1 μ M), Cu^{2+} (1mM), Mn^{2+} (300 μ M), Ni^{2+} (1mM) and Pb^{2+} (3 μ M) for two hours. The results indicate these heavy metals do not change cell size. The results are representative of three experiments.

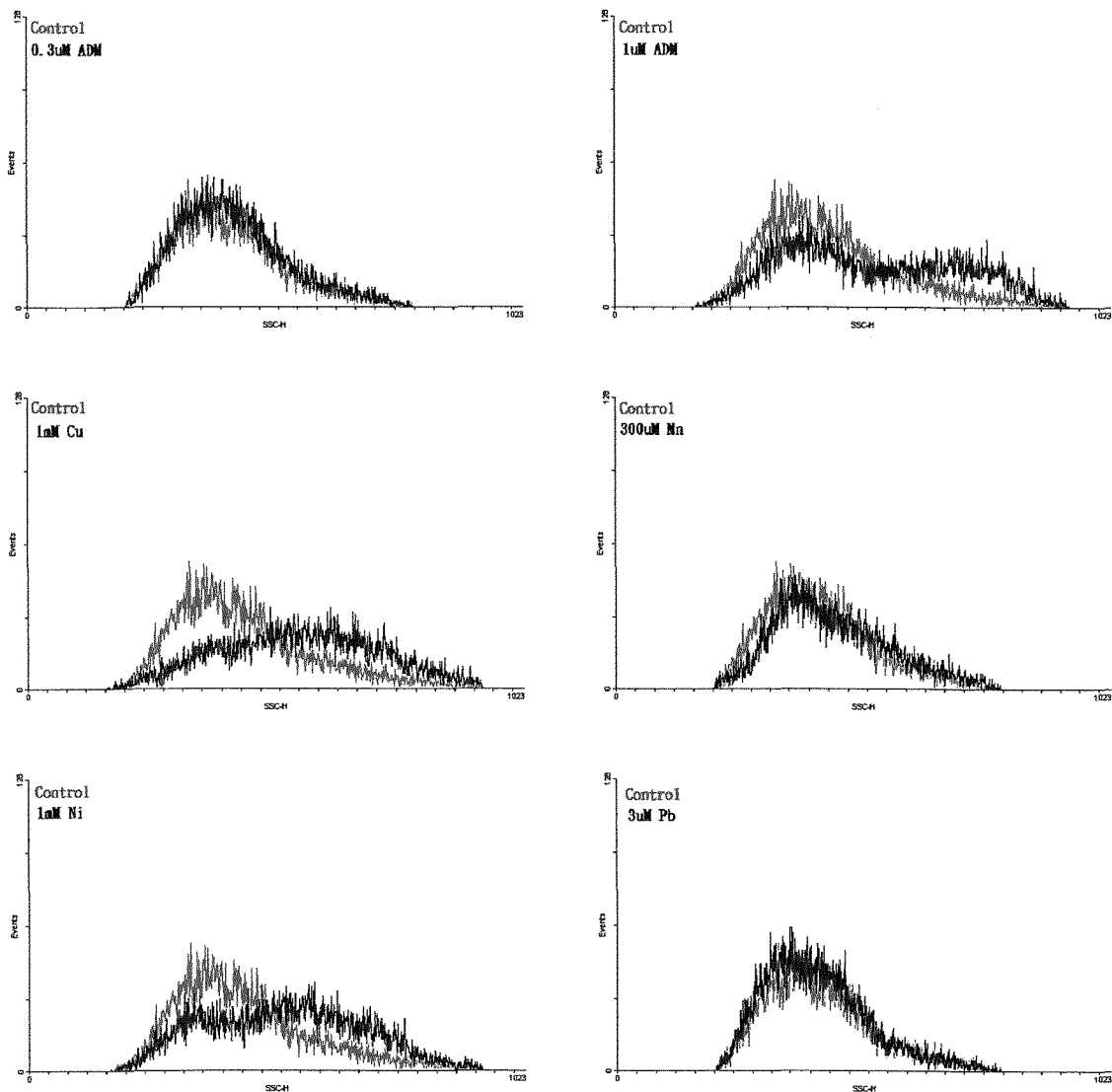


Fig.11. Changes in side light scatter (SSCH) properties of V79 cells treated with adriamycin (0.3 and 1 μ M), Cu^{2+} (1mM), Mn^{2+} (300 μ M), Ni^{2+} (1mM) and Pb^{2+} (3 μ M) for two hours. The results indicate adriamycin, Cu^{2+} and Ni^{2+} change cell granularity. The results are representative of three experiments.

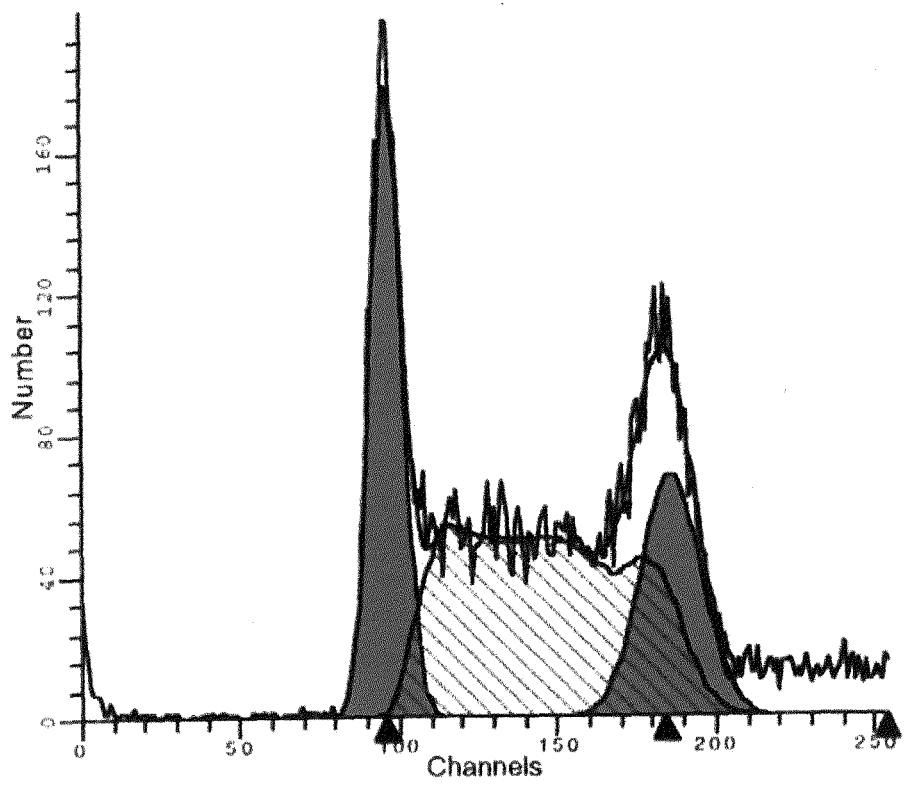


Fig.12. DNA cell cycle analysis program (ModFitLT) to analyze the percentage of G_0/G_1 phase (first red peak), S phase (downward-hatched peak) and G_2/M phase (second red peak) in each cell cycle.

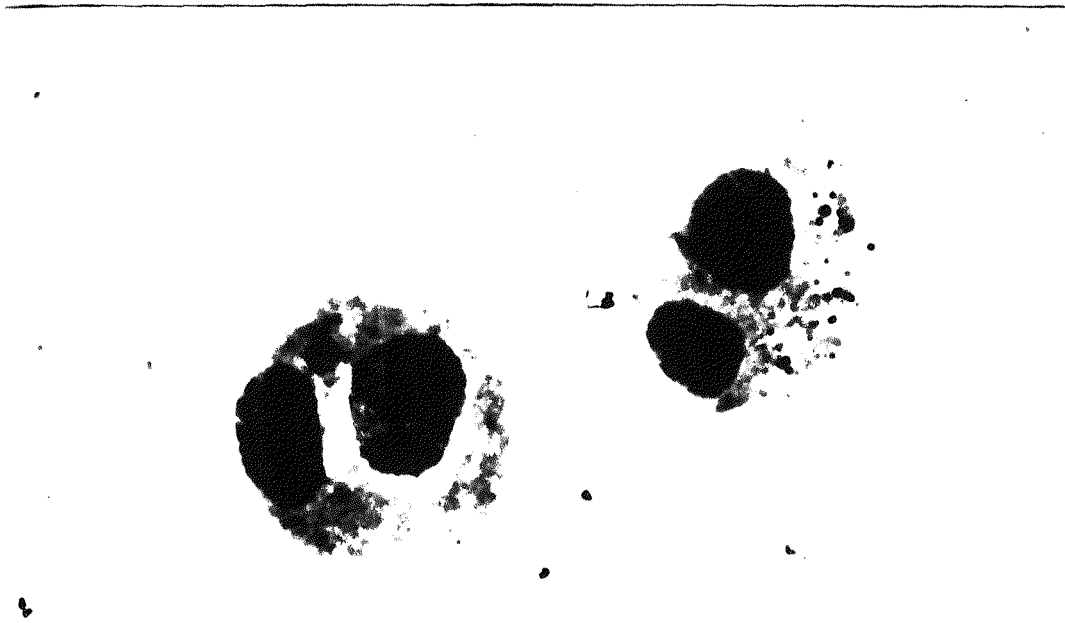


Fig.13. Cytochalasin B caused binucleated cells, arrow indicated the binucleated cell with one micronucleus (400X).

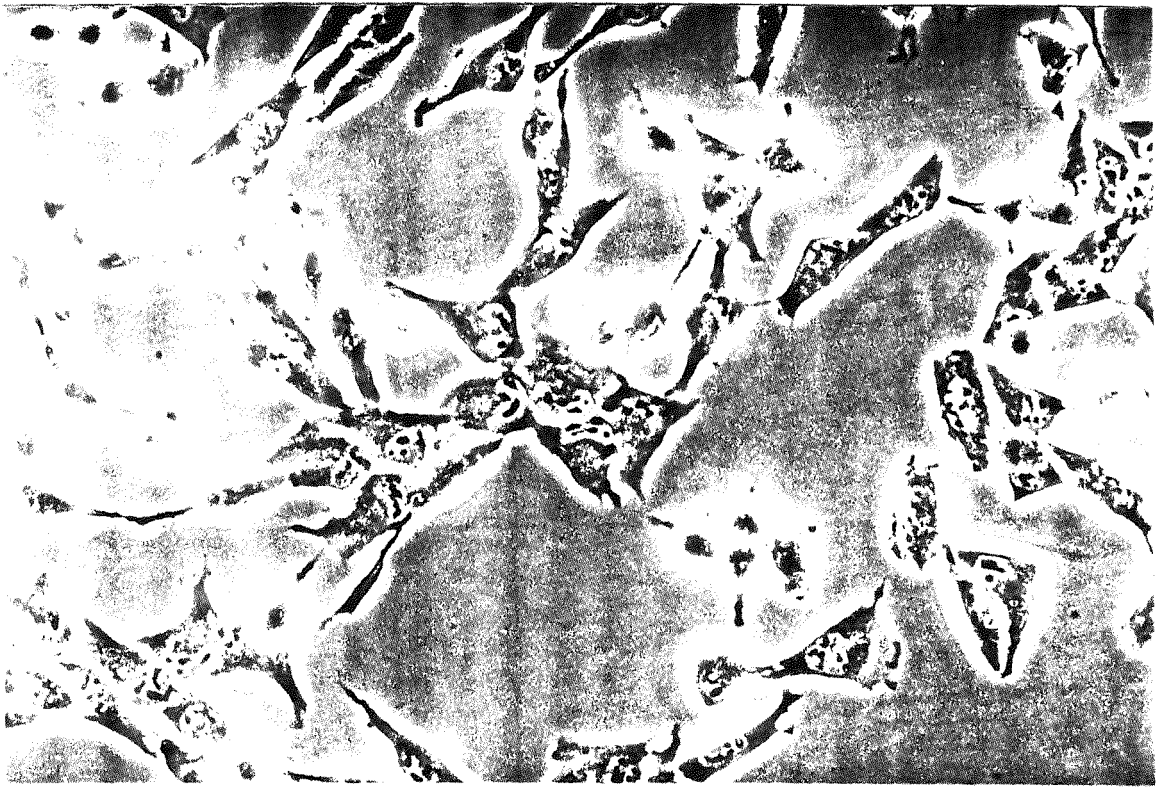


Fig.14. V79 cells morphology of control group (400X).

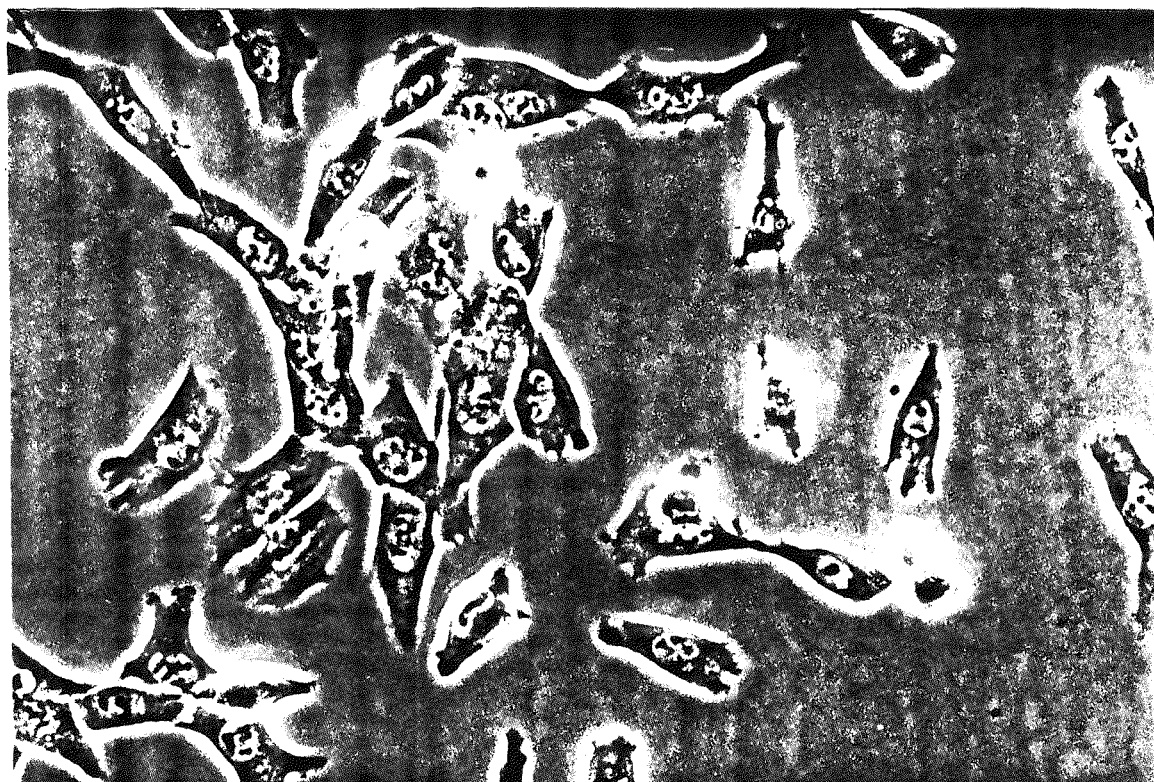


Fig.15. Effect of 1mM Cu²⁺ on cell morphology in V79 lung cells

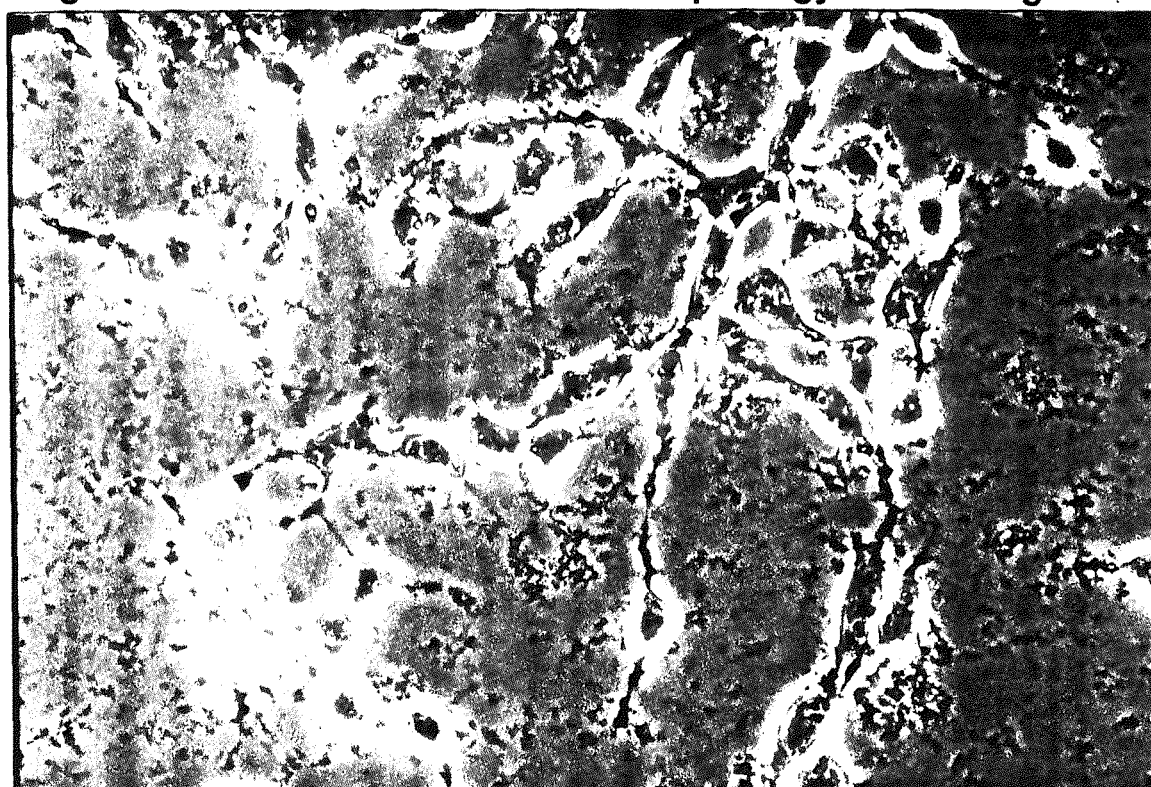


Fig.16. Effect of 300 μM Mn²⁺ on cell morphology in V79 lung cells (400X).

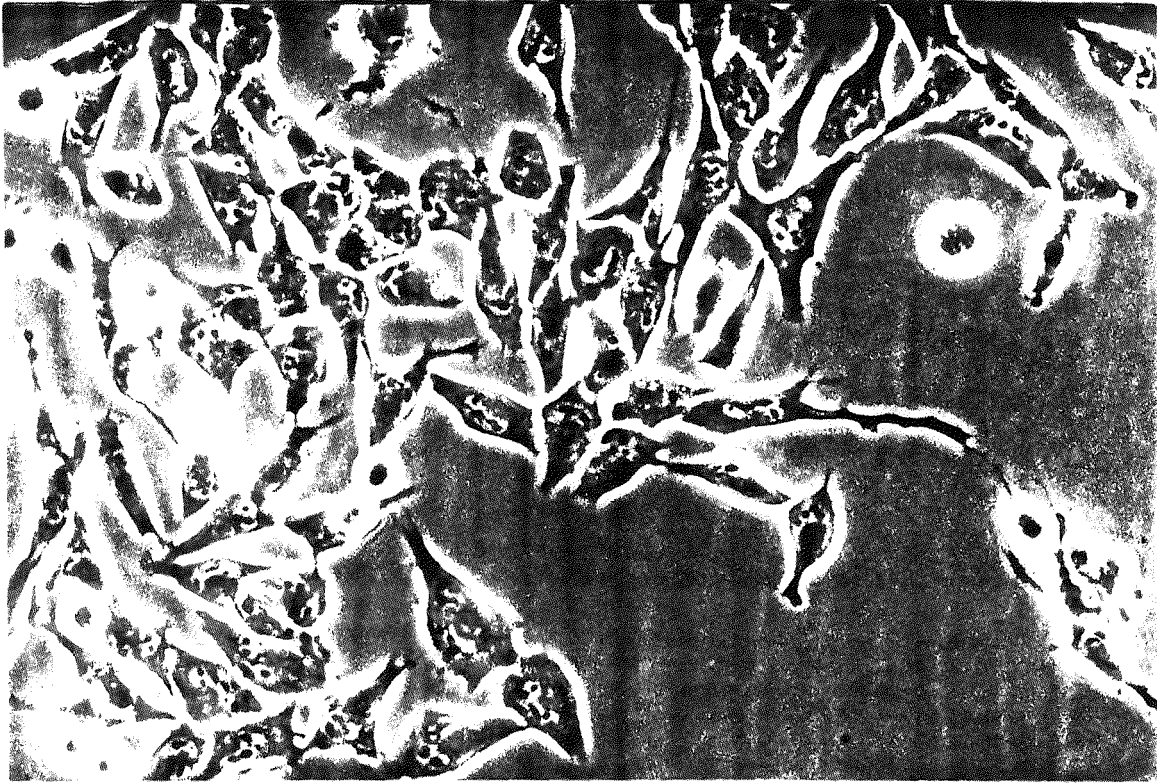


Fig.17. Effect of 1mM Ni²⁺ on cell morphology in V79 lung cells (400X).

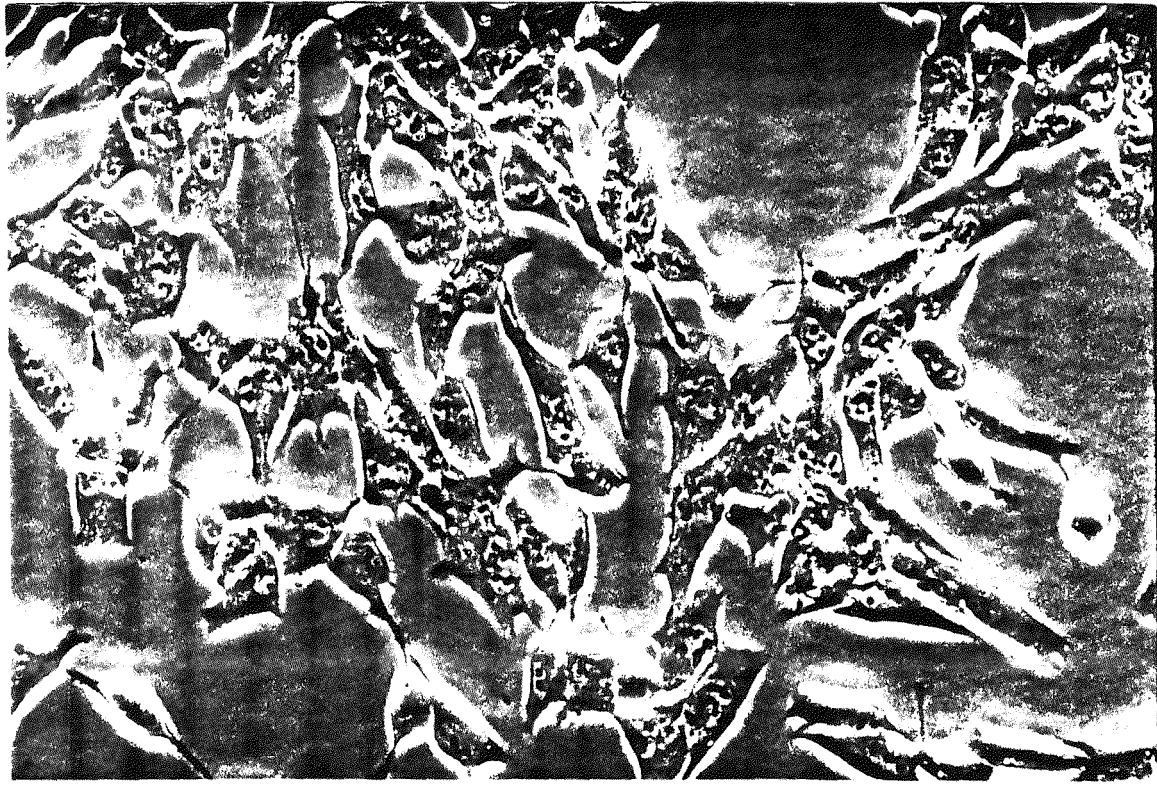


Fig.18. Effect of 3 μM Pb²⁺ on cell morphology in V79 lung cells (400X).

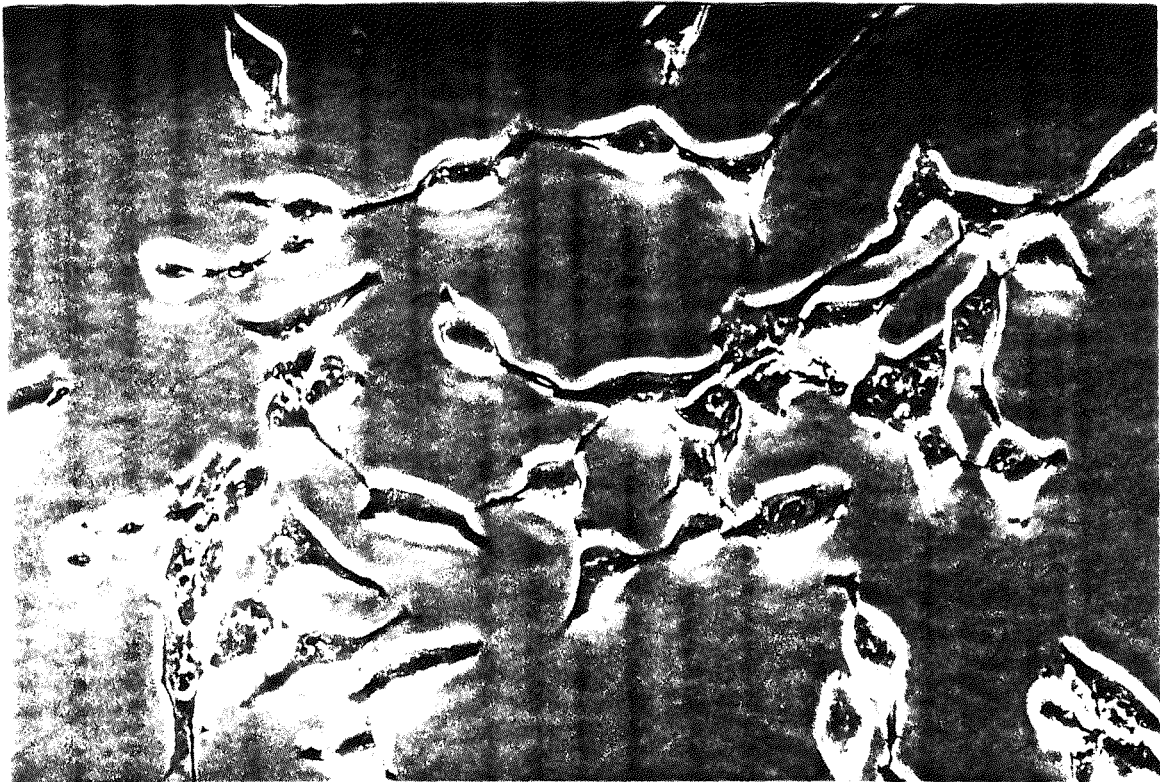


Fig.19. Effect of 1 μ M adriamycin on cell morphology in V79 lung cells (400X).

Table 1.
Effect of adriamycin on cell cycle kinetics in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (μ M)	Cell cycle kinetics / 500 Cells				NDI
		1 nucleus	2 nucleus	3 nucleus	4 nucleus	
Control	—	103.67 \pm 6.65	379.33 \pm 6.24	9.50 \pm 0.92	7.50 \pm 0.76	1.84 \pm 0.02
ADM	0.3	262.67 \pm 3.32	222.17 \pm 2.98*	12.83 \pm 0.95	2.67 \pm 0.61	1.51 \pm 0.01*
ADM	1	473.00 \pm 2.98	23.67 \pm 2.88*	2.00 \pm 0.63	1.00 \pm 0.26	1.06 \pm 0.01*

NDI (nuclear division index) = $(1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / 500$

Data are shown as mean \pm S. E. M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

* p < 0.05 as compared with control. (Dunnett's Test)

Table 2.

Effects of heavy metals, copper nitrate (Cu^{2+}), manganese nitrate (Mn^{2+}), nickel nitrate (Ni^{2+}) and lead nitrate (Pb^{2+}) on cell cycle kinetics in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (μM)	Cell cycle kinetics / 500 Cells				NDI
		1 nucleus	2 nucleus	3 nucleus	4 nucleus	
Control	—	127.87 \pm 20.24	354.00 \pm 4.16	14.02 \pm 2.75	7.09 \pm 2.30	1.81 \pm 0.01
Cu^{2+}	30	63.12 \pm 4.13	379.63 \pm 5.50	14.04 \pm 1.18	16.57 \pm 1.06	1.85 \pm 0.02
	100	77.63 \pm 3.09	368.27 \pm 3.21	16.25 \pm 1.28	11.52 \pm 0.83	1.82 \pm 0.01
	300	70.69 \pm 2.58	374.26 \pm 4.49	16.88 \pm 2.47	11.68 \pm 1.26	1.85 \pm 0.01
	1000	337.48 \pm 4.87	181.37 \pm 4.86*	8.30 \pm 1.17	2.47 \pm 0.45	1.47 \pm 0.01*
Control	—	90.37 \pm 5.62	379.23 \pm 2.69	19.22 \pm 2.41	16.05 \pm 1.76	1.94 \pm 0.01
Mn^{2+}	30	83.47 \pm 3.17	374.63 \pm 3.92	17.84 \pm 2.29	13.42 \pm 1.40	1.88 \pm 0.02
	100	107.20 \pm 10.03	379.41 \pm 9.32	11.02 \pm 1.44	3.80 \pm 0.85	1.83 \pm 0.02
	200	140.49 \pm 4.90	352.91 \pm 4.06	11.54 \pm 0.73	2.72 \pm 0.82	1.79 \pm 0.01*
	300	281.15 \pm 6.11	211.67 \pm 6.47*	8.70 \pm 0.93	3.51 \pm 0.99	1.49 \pm 0.02*
Control	—	127.00 \pm 18.02	364.69 \pm 6.71	10.48 \pm 1.80	3.69 \pm 0.76	1.81 \pm 0.01
Ni^{2+}	30	85.82 \pm 9.42	385.15 \pm 2.27	11.53 \pm 1.17	5.10 \pm 1.36	1.82 \pm 0.01
	100	113.63 \pm 3.12	382.12 \pm 3.93	6.57 \pm 0.77	2.69 \pm 1.00	1.82 \pm 0.01
	300	115.48 \pm 4.74	383.30 \pm 5.73	5.72 \pm 0.81	0.84 \pm 0.31	1.81 \pm 0.01
	1000	236.68 \pm 6.82	273.07 \pm 5.86*	12.49 \pm 1.58	5.28 \pm 1.19	1.68 \pm 0.01*
Control	—	106.49 \pm 12.56	376.20 \pm 11.60	12.34 \pm 2.02	7.11 \pm 1.37	1.85 \pm 0.01
Pb^{2+}	0.1	143.08 \pm 6.27	342.71 \pm 7.51	13.63 \pm 1.51	11.75 \pm 1.56	1.83 \pm 0.01
	0.3	158.70 \pm 3.17	328.65 \pm 3.28	13.43 \pm 0.96	10.22 \pm 0.67	1.79 \pm 0.01
	1	156.29 \pm 29.47	324.29 \pm 27.08	12.46 \pm 1.31	10.80 \pm 1.85	1.77 \pm 0.03
	3	130.33 \pm 20.75	351.89 \pm 18.79	13.66 \pm 2.24	7.78 \pm 1.65	1.81 \pm 0.02

NDI (nuclear division index) = $(1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / 500$

Data are show as mean \pm S.E.M.

n = 4 for 3 replicate cultures for each treatment group.

* p < 0.05 as compared with control. (One way ANOVA)

Table 3. Effects of heavy metals, copper nitrate (Cu^{2+}), manganese nitrate (Mn^{2+}), nickel nitrate (Ni^{2+}) and lead nitrate (Pb^{2+}) on cell viability in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (μM)	Cell viability (O.D.)
Control	—	0.91±0.02
Cu^{2+}	30	0.78±0.04*
	100	0.75±0.06*
	300	0.64±0.03*
	1000	0.57±0.02*
Control	—	0.74±0.05
Mn^{2+}	30	0.75±0.04
	100	0.47±0.05*
	200	0.51±0.03*
	300	0.51±0.03*
Control	—	0.91±0.03
Ni^{2+}	30	0.86±0.05
	100	0.94±0.04
	300	0.87±0.03
	1000	0.74±0.02*
Control	—	0.76±0.02
Pb^{2+}	0.1	0.72±0.02
	0.3	0.65±0.03*
	1	0.65±0.02*
	3	0.55±0.01*

Data are show as mean \pm S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

* p < 0.05 as compared with control. (One way ANOVA)

Table 4. Effect of calcium ion (Ca^{2+}) on heavy metal ions-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell viability (O.D.)	% Control
Control	—	0.812 ± 0.049	100
Cu^{2+}	1	0.669 ± 0.020^a	82.39
Mn^{2+}	0.3	0.580 ± 0.042^a	71.43
Ni^{2+}	1	0.557 ± 0.031^a	68.60
Pb^{2+}	0.003	0.383 ± 0.013^a	47.17
Ca^{2+}	3	0.715 ± 0.027	88.05
$\text{Cu}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	1+3	0.736 ± 0.042	90.64
$\text{Mn}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	0.3+3	0.904 ± 0.059^{ab}	111.33
$\text{Ni}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	1+3	0.604 ± 0.032	74.38
$\text{Pb}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	0.003+3	0.722 ± 0.029^c	88.92

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's test)

^b P < 0.05 as compared with Mn^{2+} alone. (Student's t-Test)

^c P < 0.05 as compared with Pb^{2+} alone. (Student's t-Test)

Table 5. Effect of calcium ion (Ca^{2+}) on heavy metal ions-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell viability (O.D.)	% Control
Control	—	0.732 ± 0.032	100
Cu^{2+}	1	0.609 ± 0.042^a	83.20
Mn^{2+}	0.3	0.596 ± 0.050^a	81.42
Ni^{2+}	1	0.581 ± 0.059^a	79.37
Pb^{2+}	0.003	0.415 ± 0.019^a	56.69
Ca^{2+}	10	0.658 ± 0.052	89.89
$\text{Cu}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	1+10	0.495 ± 0.070^a	67.62
$\text{Mn}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	0.3+10	0.856 ± 0.050^b	116.94
$\text{Ni}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	1+10	0.655 ± 0.043	89.48
$\text{Pb}^{2+} + \text{Ca}^{2+}$	0.003+10	0.736 ± 0.046^c	100.55

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's test)

^b P < 0.05 as compared with Mn^{2+} alone. (Student's t-Test)

^c P < 0.05 as compared with Pb^{2+} alone. (Student's t-Test)

Table 6. Effect of magnesium ion (Mg^{2+}) on heavy metals-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell viability (O.D.)	% Control
Control	—	1.124 ± 0.097	100
Cu^{2+}	1	0.836 ± 0.046^a	74.38
Mn^{2+}	0.3	0.710 ± 0.037^a	63.17
Ni^{2+}	1	0.896 ± 0.040^a	79.72
Pb^{2+}	0.003	0.874 ± 0.039^a	77.76
Mg^{2+}	3	1.109 ± 0.028	98.67
$Cu^{2+}+Mg^{2+}$	1+3	1.108 ± 0.054^b	98.58
$Mn^{2+}+Mg^{2+}$	0.3+3	$0.882 \pm 0.058^{a,c}$	78.47
$Ni^{2+}+Mg^{2+}$	1+3	1.070 ± 0.063^d	95.20
$Pb^{2+}+Mg^{2+}$	0.003+3	1.109 ± 0.071^e	98.67

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's Test)

^b P < 0.05 as compared with Cu^{2+} alone. (Student's t-Test)

^c P < 0.05 as compared with Mn^{2+} alone. (Student's t-Test)

^d P < 0.05 as compared with Ni^{2+} alone. (Student's t-Test)

^e P < 0.05 as compared with Pb^{2+} alone. (Student's t-Test)

Table 7. Effect of magnesium ion (Mg^{2+}) on heavy metals-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell Viability (O.D.)	% Control
Control	—	1.066 ± 0.044	100
Cu^{2+}	1	0.924 ± 0.035^a	86.68
Mn^{2+}	0.3	0.528 ± 0.001^a	49.53
Ni^{2+}	1	0.826 ± 0.031^a	77.49
Pb^{2+}	0.003	0.826 ± 0.015^a	77.49
Mg^{2+}	10	0.994 ± 0.044	93.25
$Cu^{2+}+Mg^{2+}$	1+10	1.092 ± 0.047^b	102.44
$Mn^{2+}+Mg^{2+}$	0.3+10	$0.767 \pm 0.073^{a,c}$	71.95
$Ni^{2+}+Mg^{2+}$	1+10	0.851 ± 0.055^a	79.83
$Pb^{2+}+Mg^{2+}$	0.003+10	0.896 ± 0.037^a	84.05

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's Test)

^b P < 0.05 as compared with Cu^{2+} alone. (Student's t-Test)

^c P < 0.05 as compared with Mn^{2+} alone. (Student's t-Test)

Table 8. Effect of indium ion (In^{3+}) on heavy metal ions-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell viability (O.D.)	% Control
Control	—	1.257 ± 0.047	100
Cu^{2+}	1	0.996 ± 0.078^a	79.24
Mn^{2+}	0.3	1.049 ± 0.058^a	83.45
Ni^{2+}	1	1.027 ± 0.052^a	81.70
Pb^{2+}	0.003	1.001 ± 0.026^a	79.63
In^{3+}	0.0001	1.028 ± 0.029^a	81.78
$\text{Cu}^{2+} + \text{In}^{3+}$	1+0.0001	1.080 ± 0.046^a	85.92
$\text{Mn}^{2+} + \text{In}^{3+}$	0.3+0.0001	1.063 ± 0.050^a	84.57
$\text{Ni}^{2+} + \text{In}^{3+}$	1+0.0001	0.985 ± 0.050^a	78.36
$\text{Pb}^{2+} + \text{In}^{3+}$	0.003+0.0001	1.048 ± 0.047^a	83.37

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's Test)

Table 9. Effect of antimony ion (Sb^{3+}) on heavy metal ions-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell viability (O.D.)	% Control
Control	—	1.318 ± 0.094	100
Cu^{2+}	1	0.998 ± 0.084^a	75.72
Mn^{2+}	0.3	1.048 ± 0.057^a	79.51
Ni^{2+}	1	0.936 ± 0.025^a	71.02
Pb^{2+}	0.003	0.959 ± 0.014^a	72.76
Sb^{3+}	0.0001	0.860 ± 0.050^a	65.25
$\text{Cu}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$	1+0.0001	0.977 ± 0.068^a	74.13
$\text{Mn}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$	0.3+0.0001	0.963 ± 0.051^a	73.07
$\text{Ni}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$	1+0.0001	0.817 ± 0.034^a	61.99
$\text{Pb}^{2+} + \text{Sb}^{3+}$	0.003+0.0001	0.692 ± 0.040^{ab}	52.50

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's Test)

^b P < 0.05 as compared with Sb^{3+} alone. (Student's t-Test)

Table 10. Effect of Dimercaprol (BAL) on heavy metal ions-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell viability (O.D.)	% Control
Control	—	1.285 ± 0.065	100
Cu ²⁺	1	1.037 ± 0.051 ^a	80.70
Mn ²⁺	0.3	0.933 ± 0.079 ^a	72.61
Ni ²⁺	1	0.855 ± 0.038 ^a	66.54
Pb ²⁺	0.003	0.769 ± 0.018 ^a	59.84
BAL	0.03	1.207 ± 0.054	93.93
Cu ²⁺ +BAL	1+0.03	1.176 ± 0.060	91.52
Mn ²⁺ +BAL	0.3+0.03	1.034 ± 0.038 ^a	80.47
Ni ²⁺ +BAL	1+0.03	0.980 ± 0.078 ^a	76.26
Pb ²⁺ +BAL	0.003+0.03	1.109 ± 0.068 ^b	86.30

Data are shown as mean ± S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's Test)

^b P < 0.05 as compared with Pb²⁺ alone. (Student's t-Test)

Table 11. Effect of D-penicillamine (D-PA) on heavy metal ions-induced cytotoxicity in V79 Chinese hamster lung cells.

Treatment	Concentration (mM)	Cell viability (O.D.)	% Control
Control	—	1.223 ± 0.057	100
Cu ²⁺	1	1.012 ± 0.078 ^a	82.75
Mn ²⁺	0.3	0.711 ± 0.046 ^a	58.14
Ni ²⁺	1	0.926 ± 0.038 ^a	75.72
Pb ²⁺	0.003	0.922 ± 0.024 ^a	75.39
D-PA	0.003	0.807 ± 0.022 ^a	65.99
Cu ²⁺ +D-PA	1+0.003	0.790 ± 0.042 ^{ab}	64.60
Mn ²⁺ +D-PA	0.3+0.003	0.538 ± 0.023 ^{ac}	44.00
Ni ²⁺ +D-PA	1+0.003	0.715 ± 0.049 ^{ad}	58.46
Pb ²⁺ +D-PA	0.003+0.003	0.701 ± 0.049 ^{ae}	57.32

Data are shown as mean ± S.E.M.

n = 8 for 2-3 replicate cultures for each treatment group.

^a P < 0.05 as compared with control. (Dunnett's Test)

^b P < 0.05 as compared with Cu²⁺ alone. (Student's t-Test)

^c P < 0.05 as compared with Mn²⁺ alone. (Student's t-Test)

^d P < 0.05 as compared with Ni²⁺ alone. (Student's t-Test)

^e P < 0.05 as compared with Pb²⁺ alone. (Student's t-Test)

Table 12. Changes of cell cycle distribution induced by adriamycin (ADM), copper nitrate (Cu^{2+}), manganese nitrate (Mn^{2+}), nickel nitrate (Ni^{2+}) and lead nitrate (Pb^{2+}) in V79 lung cells when these drugs treatment for two hours.

Treatment	Concentration	Cell cycle (%)		
		G_0/G_1 phase	S phase	G_2/M phase
Control	—	27.61	52.01	20.38
ADM	0.3 μM	18.68	63.72	17.61
ADM	1 μM	15.54	27.19	57.28
Cu^{2+}	1mM	13.11	24.37	62.52
Mn^{2+}	300 μM	29.87	49.55	20.58
Ni^{2+}	1mM	20.41	20.73	58.86
Pb^{2+}	3 μM	27.02	50.05	22.93

附錄 (Appendix)

壹、微小核分析法 (Micronucleus assay)

一、同步細胞之製備

一般而言，每一個細胞在其生命週期 (life cycle) 中基本上有兩個時期，即分裂中間期 (interphase, 不分裂) 和分裂期 (division, 產生兩個子細胞)。不同種類的生物細胞，進行一次細胞週期所需的時間都有所差異，而 G_1 期則為控制細胞週期時間長短之關鍵。 G_0 期的細胞則已脫離細胞週期，一旦環境改變， G_0 細胞則進入 G_1 期開始進行細胞週期的成長。以哺乳動物細胞為例，假若它在培養液中生長一代需要 16 小時，則在每一細胞週期中不同時期所需的時間分別為 $G_1=5$ 小時， $S=7$ 小時， $G_2=3$ 小時， $M_1=1$ 小時。一般而言，同種生物各細胞之 S 、 G_2 及 M 各期所需的時間差異不大，只有 G_1 的變化最大，依細胞的生理狀況而定，可能為幾天、數月或長達數年之久。而成熟之神經細胞或骨骼細胞通常都不分裂，細胞皆處於 G_0 期；培養的細胞如細胞密度過高產生接觸性抑制 (contact inhibition) 而抑制細胞生長，此時細胞停留在 G_0 期。

細胞週期的研究，可藉同步化細胞 (synchronized cells) 的培養而大為簡化，即所有細胞在細胞週期所處的時期都相同。有許

多方法可用來進行同步培養，其中最簡便的方法是利用有絲分裂選擇法 (mitotic selection)。動物細胞在培養時，若正在細胞分裂，其形狀是成圓形而且會鬆鬆地附著在培養玻璃器皿的壁上；但是細胞分裂間期則呈扁平狀，會緊密地附著在培養器皿上，藉著用力搖動就可使正在有絲分裂的細胞脫離器皿表面，蒐集後加以培養如此就可得到高達 99% 都在進行有絲分裂的細胞。另外也可在培養液中加入適當濃度的 DNA 合成抑制劑，例如 5-bromodeoxyuridine，可使細胞停留在 G_1 期；倘若把該抑制劑去除後，細胞又可進行細胞週期而進入 S 期，如此反覆二次亦可得到相當高比率的同步細胞。

二、未同步細胞之採收方法

一批實驗有時需要大量的細胞進行研究，有絲分裂選擇法之使用在此則顯得不恰當；倘若加入 DNA 合成抑制劑可能會引起染色體結構的改變，影響實驗數據的判讀。所以有時必須使用未同步化的細胞 (Asynchronized cells) 進行實驗，所以採收的時間便相當重要。

大多數突變藥物為 S-dependent，換句話說就是藥物需經歷 S phase 才造成染色體變異。少數藥物為 S-independent，藥物可加在處於 G_2 phase 的細胞，然後在分裂中期產生染色體變異。因此未

同步化的細胞採收時間通常至少為加藥後滿一個細胞週期，太早或太慢採收往往會低估藥物對染色體變異的頻率。

正常情況下，細胞週期所需的時間是一定的，但有時加入藥物之後 G_1 phase 可能被延長，甚至可能短暫進入 G_0 phase，使細胞週期被延長，此時最適當的採收細胞時間為加藥後一個半週期。

三、Cytokinesis block (CB)

偵測遺傳毒性有許多方法，例如染色體變異、姊妹染色分體交換、微小核等方法，而微小核是最簡單且快速的方法，所以廣泛用於突變研究上。微小核是由於化學物質造成染色體斷裂或干擾紡錘體的功能，於有絲分裂中失去無中心節的染色體片段或整個的染色體所形成，其出現在分裂細胞的細胞質中。

自從 Fenech 和 Morley (1985) 首次使用 Cytochalasin-B (Cyt-B) 抑制肌動蛋白聚合 (actin polymerization)，阻止細胞質分裂 (cytokinesis)，而區別出未分裂的細胞 (mononucleated cell) 和經過一次有絲分裂的細胞 (binucleated cell) 或者是經過二次或多次有絲分裂的細胞 (polynucleated cell with three、four or more nuclei) 之後，使得無法確認細胞是否經過分裂的問題因此解決，提高微小核法的準確度即可信度，並且更加簡便且快速地偵測出化學物質對細胞造成的改變，故此法又稱為抑制細胞質分裂之微小核法

(Cytokinesis-block micronucleus assay , CBMN assay)
(Fenech , 1993)。Cyt-B 的作用為中斷微絲 (microfilament) 的組合，而阻斷細胞質分裂 (cytokinesis) 的進行而形成雙核細胞。所以加入適量濃度的 Cyt-B 是非常重要的關鍵。1992 年 Surralles 等學者報告指出 CBMN 法最常使用的 Cyt-B 濃度為 $3 \mu\text{g/ml}$ ，但現今研究顯示培養之人類淋巴球細胞 $6 \mu\text{g/ml}$ 是更有效抑制細胞質分裂的濃度 (Littlefield et al., 1989) 並且比 $3 \mu\text{g/ml}$ 處理更能產生高百分比的雙核細胞 (percentages of binucleated cells , %BN) (Van Hummelen and Kirsch-Volder , 1990 ; Surralles et al., 1992 ; Ellard and Parry , 1993)，所以現今全血或分離出的淋巴球大都採用 $6 \mu\text{g/ml}$ 的濃度，不過有些實驗者仍延用 1985 年 Fenech 和 Morley 所使用的濃度 $3 \mu\text{g/ml}$ 。而本實驗使用中國頰鼠 V79 肺細胞，經測試之後 $3 \mu\text{g/ml}$ Cyt-B 比其它濃度更能產生較高的 %BN，於是採用此濃度進行實驗。

微小核之判斷：

1. 微小核必須在細胞質內，並且與主核分開。
2. 雙核細胞之二個主核必須分開，倘若重疊則不予計數。
3. 微小核之直徑必須小於主核直徑的三分之一。
4. 微小核在顯微鏡下觀察，不呈反射現象。

5. 微小核的顏色應與主核相似或更明亮。

6. 雙核細胞中若含多個微小核，本實驗中仍以一個計數。

微小核法除了可探討化學物質對 DNA 傷害造成遺傳毒性之外，並且可藉由 CBMN assay 偵測化學物質對細胞分裂之影響，其方法為連續計算 500 個細胞中含單核、雙核及多核細胞之數目，然後按 Eastmond 和 Tucker (1989) 建議的 NDI 公式便可求出。

$$NDI = (1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / N$$

M_{1-4} 表示一核到四核的細胞數

N 表示所有觀察的細胞數

貳、 細胞存活率分析法 (3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ; MTT assay)

探討細胞存活率有許多方法，例如群落的生長能力(colony forming method)，trypan blue exclusion，fluorometric，counting with haemocytometer chamber，electronic particle counter 以及 MTT assay 等等。

Clonogenic assay 是反應能增殖細胞所佔的比例，但在一些特殊實驗亦被定義為存活率。Trypan blue exclusion 有時因人為誤差以及判斷死細胞染色程度之定義並不明確，而往往高估細胞存活率。Counting with haemocytometer chamber 和 electronic particle counter 是最簡單且最直接的方法，其缺點為很難區別活的或死的細胞，並不適合於大量檢品。MTT assay (Microculture tetrazolium assay)仍利用活細胞粒腺體之 dehydrogenase 將 tetrazolium 還原成藍紫色 formazan 之性質來偵測細胞存活率。

現今最常被研究者使用偵測細胞存活率或者細胞毒性的方法是 MTT assay (colorimetric method)，由於活細胞之酵素作用使 tetrazolium 被還原成藍紫色之 formazans，在反應終點偵測吸光值則可得知細胞存活率。所以在恆定條件下，可準確地偵測藥物對細胞之影響。但本法亦受到下列因素影響：培養細胞的數目、MTT-

formazan 反應時間、細胞株的種類、Cell culture 之環境改變、glucose 供給、培養液之 pH 值...都會影響 tetrazolium salt 的還原反應，以及吸光值而造成誤差，所以 MTT 法需避免這些誤差的產生。

一般討論細胞內 tetrazolium salts 之還原反應，都過分強調為粒線體 dehydrogenase 所致 (Gerlier, 1986; Chen et al., 1990; Cory et al., 1991; Hussain et al., 1993; Shi et al., 1993)，尤其是 succinic dehydrogenase 以及粒線體在呼吸鏈中 ubiquinone (Marshall, 1995) 之電子轉移。其實細胞內只要能供應電子之成份，皆有可能參與 MTT 之還原反應，例如 NADH、NADPH... 等等。

由於 MTT 和 MTT-formazan 二者均可溶於 DMSO，並且波長 350-700nm 都可偵測得到，為了獲得最正確的吸光值，一般而言細胞密度低或高 pH 值，使用吸收光譜最好為 560-570 nm；細胞密度高或低 pH 值，最佳的吸收光譜為 510 或 570nm。(Plumb et al., 1989; Alley et al., 1988)

參、流式細胞分析法 (Flow cytometry)

流式細胞分析儀 (FACS Calibur)，是利用流注的方法，測量細胞各種物理和化學質性；例如細胞大小、形狀、細胞質的顆粒度、蛋白質、氧化還原狀態、DNA 和 RNA 含量、核酸序列、接受器、表面電位、pH 值.... 等等。

本研究主要利用流式細胞技術探討銅、錳、鎳和鉛四種重金屬於 V79 肺細胞是否造成細胞凋亡以及改變細胞的週期，在此加以介紹。

一、細胞凋亡 (Apoptosis) 與細胞壞死 (Necrosis)

1. Apoptosis :

細胞凋亡，是細胞有程序性的死亡，為有機體正常的調節機制之一，其目的在維持組織的恆定。當細胞老化需移除，或者 DNA 受損，以及環境因子的刺激皆可能發生。當 DNA 受損，會啟動一些抑癌基因 (suppressorgenes) 表現，例如：bcl-2、c-myc、ras 和 p53... 等等，使細胞走向有程序的死亡，而不導致腫瘤的產生。

細胞凋亡會導致細胞形狀和分子性質改變。由於細胞快速水解，使細胞縮小變圓，染色質濃縮，並且在核膜周圍聚集成團狀。接著細胞核裂解形成許多片段，此時可應用均質的螢光染料將 DNA 著色，例如：4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)、Hoechst

33342、Propidium iodide (PI) ...等等觀察其變化。之後，細胞核的片段游離在細胞質中，與許多完整的胞器共存，稱之為凋亡小體 (apoptotic bodies)。通常凋亡的細胞稍呈酸性 (pH 6.4)，有時細胞內 Ca^{2+} 濃度會增加， Na^+/K^+ pump 有的很完整，並且也會活化許多酵素，例如：DNases、Proteases 及 Transglutaminase。最後凋亡的細胞會被鄰近細胞所吞噬，所以不會有炎症反應。

早期 DNA 裂解會產生約 50-300 kb 大小不同的 nucleosomal 和 oligonucleosomal 片段，其會在進一步裂解成 180 bp 之片段，經電泳跑膠後，可清楚觀察到如同梯子狀的連續線條，稱之為梯狀圖譜 “DNA ladder”。由於 DNA 裂解所以凋亡細胞的 DNA 含量較少，於流式細胞偵測法中，則可觀察到前散射光 (forward angle light scatter, FSC；代表細胞大小) 變小，側散射光 (side angle light scatter, SSC 又稱 right angle light scatter；代表細胞顆粒度) 先增加後減少，並且在直方圖中 G_0/G_1 峰之前會出現一個較 G_0/G_1 峰低的 sub- G_1 峰。另外也可藉助一些 kits 操作，例如 Annexin V-FITC、TUNEL...等，利用螢光呈色的不同而區別出凋亡和壞死的細胞。

1. Necrosis :

由於細胞遭受很大的傷害，或者過量的細胞毒殺劑重覆投予所造成。壞死的細胞通常呈酸性，並且會增加細胞內 Ca^{2+} 濃度以及失

去 Na^+/K^+ pump。細胞壞死早期粒腺體和細胞發生腫脹，接著細胞膜破裂，使細胞質的內容物釋出，包括許多蛋白質分解酵素 (proteolytic enzyme)，因此造成發炎反應，有時會導致疤 (scar) 的產生。

細胞壞死時，DNA 也會產生裂解，但其片段並不像 apoptosis 呈現梯狀圖譜，而是呈個別分開的不連續條紋。在流式細胞偵測法中並不會有 sub- G_1 峰出現，而是在 G_0/G_1 phase 之前呈現許多雜質，也就是細胞的碎片。

二、螢光染料之使用選擇

凋亡和壞死的細胞，不論是細胞型態或生化功能都有所不同，所以可藉這些差異性選擇適合的螢光染料於流式細胞法偵測之。在此介紹一些常用的螢光染料及判斷凋亡或壞死細胞之方法。

1. Trypan blue 和 PI (propidium iodide)

由於凋亡的細胞仍具有完整的細胞膜，所以可以 Trypan blue 或 PI 當染料，加入經短時間培養後，可將死細胞染上，但活細胞不能，如此不僅可區別活的和壞死之細胞，亦可偵測細胞存活率。而 PI 是流式細胞偵測法最常用之染料，常用濃度為 $10\text{-}20\ \mu\text{g/ml}$ 。

2. FDA (fluorescein diacetate)

其為酯解酵素 (esterases)，FDA 進入活細胞後產生水解，並

且形成高度螢光和具有電位的物質，使活細胞呈現綠色螢光。亦可同時使用 FDA 和 PI 二種染料，經培養後，活的細胞呈綠色螢光 (fluorescein)，而死細胞呈紅色 (PI)。

3. HO342 (Hoechst 33342)

HO342 可穿過活細胞之細胞膜將 DNA 染色，此法常配合 PI 染料進行染色，如此更可明顯區別活的、凋亡和壞死之細胞，在細胞分佈圖中可觀察到活細胞呈藍色螢光 (HO342)，死細胞則呈紅色 (PI)，不易染色者為凋亡細胞。

4. Rh123(rhodamine 123)

由於凋亡細胞仍具有完整的胞器，所以粒腺體仍維持負性膜電位之功能，此時可選用陽離子染料 Rh123，其能將活細胞染上呈綠色螢光，此法亦可配合 PI 同時偵測，活的細胞呈綠色螢光 (Rh123)，死細胞則呈紅色螢光 (PI)。

5. AO (Acridine Orange)

標記 lysosome 可用 AO 染色，其可將活細胞之 lysosome 染上呈現紅色螢光。另外，AO 亦可和核酸之交互作用，被用來區別單股 RNA (single-stranded; ss) 和雙股 DNA (double-stranded; ds) 之含量，插在 dsDNA 之 AO 受藍光激發後可放出綠色螢光，而 ss 則呈紅色螢光。由於凋亡的細胞較易 denature，所以會呈現強烈紅色螢光，可和呈現強烈綠色螢光的非凋亡細胞區別。

6. TUNEL (Terminal deoxynucleotidly transferase-mediated 2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate nick end labelling)

由於細胞進行凋亡時會活化許多酵素，例如 endonuclease 會導致 DNA 斷裂。利用 TUNEL 法，藉 TdT 或 DNA 聚合酵素 (DNA polymerase) 催化，將 3'-OH 端和 dUTP biotin 或 dUTP digoxigenin 結合，然後以含螢光劑之抗體加以標記，最近更改善成直接以 FITC-dUTP 標記斷裂之 DNA。此法如加上 PI 做雙染色，就能區分正常細胞、壞死細胞、凋亡細胞和二度壞死細胞(2nd necrosis)。

7. Annexin V-FITC (Annexin V-fluorescein isothiocyanat)

正常細胞具有完整的酵素系統，所以能夠產生能量維持細胞膜 lipid 之方位，例如磷脂絲氨酸 (Phosphatidylserine ; PS) 存在細胞內層。凋亡的細胞無法產生能量，所以無法維持 PS 的方位，導致外移。Annexin V 和 PS 具有很強之結合力，可區別正常細胞及凋亡細胞，配合 PI 進行雙染，又可進一步將凋亡細胞區別為正在進行 apoptosis 或已進行到 secondary necrosis 二種細胞群。

References

- Aaseth, J., Ribarov, S. and Bochev, P. (1987): The interaction of copper (Cu^{2+}) with the erythrocyte membrane and 2,3-dimercaptopropanesulphonate in vitro: a source of activated oxygen species. *Pharmacol. Toxicol.* 61, 250-253.
- Aaseth, J. (1983): Recent advance in the therapy of metal poisonings with chelating agents. *Hum. Toxicol.*, 2, 257-272.
- Abu Melha A., Ahmed, N.A. and el Hassan A.Y. (1987): Traditional remedies and lead intoxication. *Trop. Geogr. Med.* 39, 100-103.
- Akamatsu, T., Matsubara, T., Saegusa, Y. And Mizuno, K. (1994): Inhibition of mitogen-induced response of human peripheral blood mononuclear cells by bucillamine, a new antirheumatic sulfhydryl drug. *Rheumatol. Int.* 13, 197-201.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A. and Monks, A. (1988): Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589-601.
- Anke, M., Grün, M., Dittrich, G., Gropell, B. and Hennig, A. (1974) : In: *Trace Element Metabolism in Animals-2*, pp. 715-718, Hoekstra, W. G. and Mills, C.F. (Eds). University Park Press, Baltimore.
- Arrouijal, F.Z., Hildebrand, H.F., Vophi, H. and , Marzin D. (1990): Genotoxic activity of nickel subsulphide $\alpha\text{-Ni}_3\text{S}_2$. *Mutagenesis.* 5, 583-589.
- Bauchinger, M., Schmid, E., Einbrodt, H.J. and Dresp, J. (1976): Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res.*, 40, 57-62.
- Bhunya, S.P. and Jena, G.B. (1996): Clastogenic effects of copper sulphate in chick in vivo test system. *Mutat. Res.* 367, 57-63.
- Blackwell, K.J., Tobin, J.M. and Avery, S.V. (1997): Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology & Biotechnology.* 47, 180-184.
- Bonilla, E. and Diez-Ewald, M. (1974): Effect of L-DOPA on brain concentration of dopamine and homovanillic acid in rats after chronic manganese chloride administration. *J. Neurochem.*, 22, 297-299.

Bumgardner, J.D., Lucas, L.C., Alverson, M.W. Jr. and Tilden, A.B. (1993): Effects of copper-based dental casting alloys on two lymphocyte cell lines and the secretion of interleukin 2 and IgG. *Dent. Mater.* 9, 85-90.

Cheh, A. and Neilands, J.B. (1973): Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinatase dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 1060-1063.

Chen, C-H., Campbell, P.A. and Newman, L.S. (1990): MTT colorimetric assay detects mitogen responses of spleen but not blood lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 93, 249-255.

Chisolm, J.J.Jr. and Thomas, D.J. (1985): Use of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in treatment of lead poisoning in children. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235, 665-669.

Chvapil, M., Ryan, J.N. and Zukoski, C.F. (1972) : The effect of zinc and other metals on the stability of lysosomes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140, 642-646.

Cicarelli, B.B., Hampton, T.H. and Jennette, K.W. (1981): Nickel carbonate induces DNA-protein crosslinks and DNA strand breaks in rat kidney. *Cancer Lett.*, 12, 349-354.

Conway, K., Wang, X.W., Xu, L.S. and Costa, M. (1987): Effect of magnesium on nickel-induced genotoxicity and cell transformation. *Carcinogenesis.* 8, 1115-1121.

Cooper, W.C. and Gaffey, W.R. (1975): Mortality of lead eorks. *Journal of Occupational Medicine.* 17, 100-107.

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A. and Cory, J.G (1991): Use of an aqueous soluble cell activation growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207-212.

Costa. M., Abbracchio, M.P. and Simmons-Hansen, J. (1981a): Factors influencing the phagocytosis, neoplastic transformation, and cytotoxicity of particulate nickel compounds in tissue culture systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 60, 313-323.

Cotzias, G.C., Horiuchi, K., Fuenzalida, S. and Mena, I. (1968a): Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology*, 18, 376-382.

Danks, D. M. (1988): Copper deficiency in humans. *Annu. Rev. Nutr.* 8, 235-257

Danks, D. M., Campbell, P. E., Walker-Smith, J., Stevens, B. J., Gillespie, J. M., Blomfield, J. And Turner, B. (1972): Menkes' kinky-hair syndrome. *Lancet* i, 1100-1103

Daune, J. (1974) : In: *Metal Ions in Biological Systems*, Vol 3, pp. 2-43, Sigel, H. (Ed.). Marcel Dekker, New York.

Desole, M.S., Sciola, L., Delogu, M.R., Sircana, S., Migheli, R. and Miele, E. (1997): Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 31, 169-176.

Dhir, H., Agarwal, K., Sharma, A. and Talukder, G. (1991): Modifying role of *Phyllanthus emblica* and ascorbic acid against nickel clastogenicity in mice. *Cancer Lett.* 59, 9-18.

Diez-Ewald, M., Weintraub, L.R. and Crosby, W.H. (1968): Interrelationship of iron and manganese metabolism. *Soc. Exp. Biol. Med.*, 129, 448-451.

Doisy, E.A. (1973): In: *Trace Substances in Environmental Health-VI*, pp. 193-199, Hemphill, D.D. (Ed.). University of Missouri Press. Columbia.

Eastmond, D.A and Tucker, J.D. (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

Ellard, S. and Parry, M. (1993): A modified protocol for the cytochalasin B in vitro micronucleus assay using whole blood or separated lymphocyte cultures. *Mutagenesis.* 8, 317-320.

Fenech, M. (1993): The cytokinesis block microculeus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*, 285, 35-44.

Fenech, M. and Morley, A.A (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147, 29-36.

Fenech, M. and Morley, A.A. (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147, 29-36.

Ferm, V.H. (1969): The syneratogenic effect of lead and cadmium. *Experientia*, 25, 56-57.

Fischer, A.B. and Skreb, Y. (1980): Cytotoxicity of manganese for mammalian cells in vitro –comparisons with lead, mercury and cadmium. Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene–1–Abt–Originale B, Hygiene. 171, 525-537.

Floquet, I., Lefevre, A., Kempf, B. and Hildebrand, H.F. (1997): Cytocompatibility of dental alloys containing palladium. Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale. 98 Suppl 1:66-68.

Forgacs, Z., Paksy, K., Lazar, P. and Tatrai, E. (1998): Effect of Ni²⁺ on the testosterone production of mouse primary Leydig cell culture. J. Toxicol. Env. Health. 55, 213-224.

Forman, S.J., Kumar, K.S., Redeker, A.G. and Hockstein, P. (1980) : Hemolytic anemia in Wilson disease: clinical finding and biochemical mechanisms. Am. J. Hematol., 9, 269-275.

Forman, S.J., Kumar, K.S., Redeker, A.G. and Hockstein, P. (1980) : Hemolytic anemia in Wilson disease: clinical finding and biochemical mechanisms. Am. J. Hematol., 9, 269-275.

Forni, A., Cambiaghi, G. and Secchi, G.C. (1976): Initial occupational exposure to lead: Chromosome and Biochemical findings. Arch. Environ. Health, 31, 73-78.

Geriler, D. and Thomasset, N. (1986): Use of MTT colorimetric assay to measure cell activations. J. Immunol. Methods 94, 57-63.

Glennon, J.D. and Sarkar, B. (1982): Nickel(II) transport in human blood serum. Studies of nickel(II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with L-histidine. Biochem. J., 203, 15-23.

Goyer, R.A. and Mahaffey, K.R. (1972): Susceptibility to lead toxicity. Environ. Health Perspect., 2, 73-80.

Graziano, J.H., Lolocono, N.J., Moulton, T., Mitchell, M.E. Slavkovich, V. and Zarate, C. (1992): Controlled study of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid for management of childhood lead intoxication. J. Pediatr. 120, 133-139.

Holtzman, N.A., Elliott, D.A. and Heller, R.H. (1966) : copper intoxication. Report of a case with observations on ceruloplasmin. N.Engl.J.Med., 275, 347-352.



Hong, Y.C., Paik, S.R., Lee, H.J., Lee, K.H. and Jang, S.M. (1997): Magnesium inhibits nickel-induced genotoxicity and formation of reactive oxygen. *Environ. Health Persp.* 105, 744-748.

Hurley, L.S. (1976) : Un: Trace Elements in Human Health and Disease, Vol II. Essential and Toxic Elements, pp. 301-314, Prasad, A.S. (Ed.). Academic Press, New York.

Hurley, L.S. (1981): Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. *Physiol. Rev.*, 61, 249-295.

Hussain, R.F., Nouri, A.M.E. and Oliver, R.T.Q. (1993): A new approach for measurement of cytotoxicity using a colorimetric assay. *J. Immunol. Methods* 160, 89-96.

IARC (1979) : Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, IARC Monographs, Supplement I. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Jagetia, G.C. and Aruna, R. (1998): Effect of various concentrations of lead nitrate on the induction of micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 415, 131-137.

Joarder, M. and Sharma, A. (1990): Comparison of clastogenicity of inorganic Mn administered in cationic and anionic forms in vivo. *Mutat. Res.* 240, 159-163.

Jones, J.G. and Warner, C.G. (1972): Chronic exposure to iron oxide, chromium oxide, and nickel oxide fumes of metal dressers in a steelworks. *Br. J. Ind. Med.*, 29, 169-177.

Kishimoto, T., Fukuzawa, Y., Abe, M., Hashimoto, M., Ohno, M. and Tada, M. (1992): Injury to cultured human vascular endothelial cells by copper (CuSO_4). *Nippon Eiseigaku Zasshi-Japanese Journal of Hygiene.* 47, 965-970.

Kumar, K.S., Rowsé, C. and Hochstein, P. (1978) : Copper-induced generation of superoxide in human red cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 587-592.

Kuratsune, M., Tokudome, S., Shriakusa, T., Yoshida, M., Tokumiksu, Y., Hayano, T. and Seita, M. (1974): Occupational lung cancer among copper smelters. *Int. J. Cancer*, 13, 552-558.

Lee, C.H., Lin, R.H, Liu, S.H. and Lin-Shiau, S.Y. (1998): Effects of germanium oxide and other chemical compound phenylmercury acetate-

induced genotoxicity in cultured human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 157-162.

Lin, R.H., Lee, C.H., Chen, W.K. and Lin-Shiau S.Y. (1994): Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 23, 143-149.

Lipetz, J. and Douglass, O.B. Jr. (1975): The relation of soluble lead to toxicity: an in vitro analysis. *Chemico-Biological Interactions.* 11, 117-122.

Littlefield, L.G., Sayer, A.M. and Frome, E.L. (1989): Comparison of dose-responses parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis.* 4, 265-270.

Lucassen, M. and Sarkar, B. (1979): Nickel(II)-binding constituents of human blood serum. *J. Toxicol. Environ. Health.* 5, 897-905.

Maehara, Y., Kusumoto, T., Kusumoto, H., Anai, H. and Sugimachi, K. (1988): Sodium succinate enhances the colorimetric reaction of the in vitro chemosensitivity test: MTT assay. *Oncology.* 45, 434-436.

Mahomedy, M.C., Mahomedy, H.Y., Canhan, S.A.P., Downing, W.J. and Yeal, E.D. (1975): Methaemoglobinaemia following treatment dispensed by eitch doctors. Two cases of potassium permanganate poisoning. *Anaesthesia,* 30, 190-193.

Matsubara, T. and Hirohata, K. (1988): Suppression of human fibroblast proliferation by D-pencillamine and copper sulfate in vivo. *Arthritis Rheum.* 31, 964-972.

Mena, I., Court, J., Fuenzalida, S., Papavasiliou, P.S. and Cotzias, G.C. (1970): Modification of chronic manganese poisoning. Treatment with L-dopa or 5-OH tryptophane. *N. Engl. J. Med.,* 282, 5-10.

Miyaki, M., Akamatsu, N., Ono, T. and Koyama, II. (1979): Mutagenicity of metal cations in cultured cells from Chinese hamster. *Mutat. Res.,* 68, 259-263.

Moeschlin, F. (1965): *Poisoning, Diagnosis and Treatment.* Grune, New York.

Mustafa, S.J. and Chandra, V.S. (1971): Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.,* 18, 931-933.

NAS (1975) : Nickel. National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C.

Neff, N.H., Barrett, E.R. and Costa, E. (1969): Selective depletion of caudate nucleus dopamine and serotonin during chronic manganese dioxide administration to squirrel monkeys. *Experientia*, 25, 1140-1141.

Newberne, P.M. (1973) : In: *Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants: Manganese*, pp. 77-82. National Academy of Sciences, Washington, D.C.

Newman, S.M., Summitt, R.L. and Nunez, L.J. (1982): Incidence of nickel-induced sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.*, 101, 67-75.

Nielsen, F.H. and Ollerich, D.A. (1974): Proceedings: Nickel: a new essential trace element. *Fed. Proc.*, 33, 1767-1772.

Nielsen, F.H. and Sauberlich, H.E. (1970): Evidence of possible requirement for nickel by the chick. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 134, 845-849.

Pimentel, J.C. and Marques, F. (1969) : "Vineyard sprayer's lung" : a new occupational disease. *Thorax*, 24, 678-688.

Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B. (1989): Effect of pH dependent of MTT-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49, 4435-4440.

Robison, S.H. and Costa, M. (1982): The induction of DNA strand breakage by nickel compounds in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett.*, 15, 35-40.

Saltzer, E.I. and Wilson, J.W.W. (1968): Selectivity of fluorouracil in treatment of actinic keratoses. *Arch. Dermatol.*, 98, 166-177.

Saxholm, H.J.K., Reith, A. and Brøgger, A. (1981): Oncogenic transformation and cell lysis in C3H/10T 1/2 cells and increased sister chromatid exchange in human lymphocytes by nickel subsulfide. *Cancer Res.*, 41, 4136-4139.

Schmalz, G., Arenholt-Bindslev, D., Hiller, K.A. and Schweikl, H. (1997): Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur. J. Oral Sci.* 105, 86-91.

Schnegg, A. and Kirchgessner, M. (1975): Changes in hemoglobin content, erythrocyte count and hematocrit in nickel deficiency. *Nutr.*

Metab., 19, 268-278.

Schnegg, A. and Kirchgessner, M. (1976): Absorption and metabolic efficiency of iron in nickel deficiency. *Int. Z. Vitam. Ernaehrungsforsch.*, 46, 96-99.

Schwanitz, G., Gebhart, E., Rott, H.D., Schaller, K.H., Essing, H.G., Lauer, O. and Prestele, H. (1975): Chromosome investigations in subjects with occupational lead exposure (author's trans). *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 100, 1007-1011.

Shamy, M.Y. (1993): Effect of nickel sulfate alone and with ultraviolet light on micronuclei frequency in cultured human lymphocytes. *J. Egyptian Public Health Association*. 68, 525-538.

Shi, Y., Kornovski, S., Savani, R. and Turley, E.A. (1993): A rapid, multiwell colorimetric assay for chemotaxis. *J. Immunol. Methods* 164, 149-154.

Shiao, Y.H., Lee, S.H. and Kasprzak, K.S. (1998): Cell cycle arrest, apoptosis and p⁵³ expression in nickel (II) acetate-treated Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*. 19, 1203-1207.

Sierra, E.M. and Tiffany-Castiglioni, E. (1991): Reduction of glutamine synthetase activity in astroglia exposed in culture to low levels of inorganic lead. *Toxicology*. 65, 295-304.

Sirover, M.A. and Loeb, L.A. (1976): Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science*, 194, 1434-1436.

Six, K.M. and Goyer, R.A. (1970): Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J. Lab. Clin. Med.*, 76, 933-942.

Sokol, R.J., McKim, J.M. Jr. and Devereaux, M.W. (1996): Alpha-tocopherol ameliorates oxidant injury in isolated copper-overloaded rat hepatocytes. *Pediatr. Res.* 39, 259-263.

Sorenson, J. R. J. (1982) : *Inflammatory Diseases and Copper*. Humana Press, New Jersey.

Stick, H.F., Karim, J., Koropatnick, J. and Lo, L. (1976): Mutogenic action of ascorbic acid. *Nature (London)*, 260, 722-724.

Sunderman, F.W. Jr. (1977): Perspectives on Legionnaires' Disease in relation to acute nickel carbonyl poisoning. The Henry M. Scharf Lecture

on current affairs. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 7, 187-200.

Sunderman, F.W. Jr., Nomoto, S., Morang, R., Nechay, M.W., Burke, C.N. and Nielsen, S.W. (1972): Nickel deprivation in chicks. *J. Nutr.*, 102, 259-267.

Surrallés, J., Carbonell, E., Marcos, R., Degrassi, F., Natoccia, A. and Tanzarella, C. (1992): A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*. 7, 407-410.

Surrallés, J., Carbonell, E., Marcos, R., Degrassi, F., Natoccia, A. and Tanzarella, C. (1992): A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*. 7, 407-410.

Szadkowski, D., Schultze, H., Schaller, K.-H. and Lehnert, G. (1969): Ecological significance of the heavy metal content of cigarettes. Lead, cadmium and nickel analyses of tobacco as well as gas and particle phases. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, 153, 1-8.

Tachi, K., Nishimae, S. and Saito, K. (1985): Cytogenetic effects of lead acetate on rat bone marrow cells. *Arch. Environ. Health*. 40, 144-147.

Underwood, E.J. (1977): Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Academic Press, New York.

Van Hummelen, P. and Kirsch-Volders, M. (1990): An improved method for the in vitro micronucleus test using human lymphocytes. *Mutagenesis*. 5, 203-204.

Walshe, J.M. (1973): Copper chelation in patients with Wilson's disease. A comparison of penicillamine and triethylene tetramine dihydrochloride. *Q.J. Med.*, 42, 441-452.

Watanabe, H., Mishina, T., Ohe, H., Araki, H. and Nakao, M. (1981): A clustering of prostatic cancer in an area with many manganese mines. *Tohoku J. Exp. Med.*, 135, 441-442.

Zielhuis, R.L. (1977): Second international workshop permissible levels for occupational exposure to inorganic lead. *International Archives of Occupational & Environmental Health*. 39, 59-72.

Zielhuis, R.L., del Castillo, P., Herber, R.F.M. and Wibowo, A.A.E. (1978): Levels of lead and other metals in human blood: suggestive relationships, determining factors. *Environ. Health Perspect.*, 25, 103-

109.

Zislin, D.M., Ganjuskina, S.M., Dubilina, E.S. and Tjusnjakova, N.V. (1969): The residual volume of the lungs in complex assessment of the functional status of the respiratory system in initial and suspected pneumoconiosis. Gig. Tr. Prof. Zabol., 13, 26-29 (In Russian)