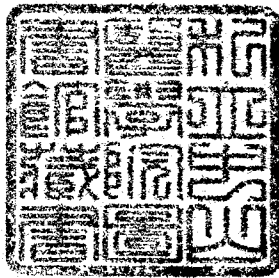


R  
008.8  
0183-1  
C-1

中山醫學院醫學研究所碩士論文

指導教授：陳文貴教授

乙醛與鎘(II)、鉛(II)、鉻(VI)等金屬離子  
對中國倉鼠肺臟細胞複合毒性之探討  
Synergistic Effects between Acetaldehyde and Metal  
Ions in the Cytotoxicity and Genotoxicity of V79 Cells  
*in Vitro*



研究生：郭銘宏 撰  
(Ming-Hom Kuo)

中華民國八十六年六月

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C046101

# 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 醫學研究所  
\_\_\_\_\_ 組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：乙醛與鎘(II), 鉛(II), 鉻(VI)等金屬離子 對中國倉鼠肺臟細胞複合毒性之探討

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： 鄧銘亮 學號：R84123  
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 7 月 4 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。

## 誌 謝

轉眼間，碩士班兩年的生活將告一段落。回首過往學習的點點滴滴，彷彿在學問的領域中，猶如滄海之一粟仍須不斷的充實自我。而這些學習的經歷將會在我的生命旅程中留下深刻的痕跡。

能有一點小的成果，要感謝的人實在太多了。首先得感謝我的指導教授 陳文貴教授，在他殷殷的教誨和細心的指導之下得以完成此論文，同時使我在學識及為人處事上獲益良多，師恩浩蕩，無限感激，特誌卷首敬申謝忱。

文稿初成，承蒙 鍾堅教授、林明芳教授、楊重熙副教授及李衍彰副教授撥冗詳加批閱斧正，並提供寶貴意見，特此致上我由衷的謝意。

特別感謝胡超群講師在實驗上細心的指導，沒有他的幫助，這篇論文是無法完成的。以及鄭敏雄副教授在共軛焦顯微鏡使用之指導與巖正傑講師在實驗技術意見上的提供。實驗期間，感謝游景男及游維哲同學給予我在生命醫學領域上的腦力激盪，使我接觸到更多不同新知。另外，感謝奇美醫院檢驗科的學長姊炎娟、修音、博文、建山、曉在我求學の旅途中，給予無限的關懷與鼓勵。以及感謝給予我精神上不斷激勵的靜方。

最後，感謝我的父母及家人的支持，使我得以專心完成學業。

# 目 錄

	頁次
一. 縮 寫	1
二. 中文摘要	2
三. 英文摘要	4
四. 緒 論	6
五. 實驗材料	16
六. 實驗方法	21
七. 結果分析	26
八. 討 論	38
九. 結 論	44
十. 參考文獻	45
十一. 圖表說明	57
十二. 附 錄	118

一.圖表目錄

(1).表目錄	頁次
表 1:高劑量之氯化鎘及乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.-----	57
表 2:高劑量之氯化鎘及微量之乙醛共同暴露於 V 79 細胞 4 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.-----	58
表 3:低劑量之氯化鎘及乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.-----	59
表 4:低劑量之氯化鎘及微量之乙醛共同暴露 V79 細胞 72 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.-----	60
表 5:高劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 4 小時, 對細胞存活率之影響.-----	61
表 6:不同高劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 4 小時,對 V79 細胞代謝活性之影響.-----	62
表 7:不同高劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 4 小時下, 對 V79 細胞基因突變之影響.-----	63
表 8:低劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 72 小時, 對細胞存活率之影響.-----	64
表 9:不同低劑量之氯化鎘與共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞代謝活性之影響.-----	65
表 10:不同低劑量氯化鎘與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞突變頻率之影響.-----	66
表 11:高劑量之氯化鉛及乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.-----	67

表 12:高劑量之氯化鉛及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.-----	68
表 13:低劑量之氯化鉛及乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.-----	69
表 14:低劑量之氯化鉛及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.-----	70
表 15:不同高劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞細胞存活率之影響.-----	71
表 16:不同高劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 4 小時下, 對 V79 細胞代謝活性之影響.-----	72
表 17:不同高劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 4 小時下, 對 V79 細胞基因突變之影響.-----	73
表 18:不同低劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞細胞存活率之影響.-----	74
表 19:不同低劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞代謝活性之影響.-----	75
表 20:不同低劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞突變頻率之影響.-----	76
表 21:高劑量之重鉻酸鉀及乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.-----	77
表 22:高劑量之重鉻酸鉀及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.-----	78
表 23:低劑量之重鉻酸鉀及微量乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.-----	79

表 24:低劑量之重鉻酸鉀及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.-----	80
表 25:不同高劑量重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞株細胞存活率之影響.-----	81
表 26:不同高劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 4 小時下, 對 V79 細胞代謝活性之影響.-----	82
表 27:不同高劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 4 小時下, 對 V79 細胞基因突變頻率之影響.-----	83
表 28:不同低劑量鉻與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細 胞存活率之影響.-----	84
表 29.不同低劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞代謝活性之影響.-----	85
表 30.不同低劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞突變頻率之影響.-----	86
表 31.在 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑 量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下其預期相對死 率及實際相對致死率之差異.-----	87
表 32. 在 independent joint action model 分析 V79 細胞在高 劑量之金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下其預期致死率 及實際致死率之差異.-----	88
表 33. 在 independent joint action model 分析 V79 細胞在高 劑量之金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下其預期代謝抑 制活性及實際代謝抑制活性之差異.-----	89
表 34.高劑量之氯化鎘與微量之乙醛共同暴露下,比較預期 突變株數目及實際突變株數目之差異.-----	90

表 35.在 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下其預期相對致死率及實際相對致死率之差異-----	91
表 36.在 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下其預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性之差異-----	92
表 37.低劑量之氯化鎘與微量之乙醛共同暴露下比較預期突變株數目及實際突變株數目之差異-----	93
表 38.在 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑量之金屬化合物與乙醛共同暴露下其預期相對致死率及實際相對致死率之差異-----	94
表 39. 在 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑量之金屬化合物與乙醛共同暴露下其預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性之差異-----	95
表 40.高劑量之金屬化合物與乙醛共同暴露下其預期突變株數目及實際突變株數目之差異-----	96
表 41.在 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之金屬化合物與乙醛共同暴露下其預期相對致死率及實際相對致死率之差異-----	97
表 42.在 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之金屬化合物與乙醛共同暴露下其預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性之差異-----	98
表 43.低劑量之金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下其預期突變株數目及實際突變株數目之差異-----	99



(2).圖目錄	頁次
圖 1.不同濃度之乙醛暴露於 V79 細胞, 以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響.-----	100
圖 2.不同濃度之氯化鎘及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞, 以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響.---	101
圖 3.不同濃度之氯化鉛及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞, 以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響-----	102
圖 4.不同濃度之重鉻酸鉀及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞, 以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響.-----	103
圖 5.持續性暴露低濃度之乙醛, 對於細胞存活率之影響.-----	104
圖 6.持續性暴露低濃度之乙醛, 對於細胞突變頻率之影響.----	105
圖 7.持續性暴露低濃度之氯化鎘暴露, 對於細胞存活率之影響.-----	106
圖 8.持續性暴露低濃度之氯化鎘暴露, 對於細胞突變頻率之影響.-----	107
圖 9.持續性暴露低濃度之氯化鉛暴露, 對於細胞存活率之影響-----	108
圖 10.持續性暴露低濃度之氯化鉛暴露, 對於細胞突變頻率之影響-----	109
圖 11.持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀暴露, 對於細胞存活率之影響-----	110
圖 12.持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀暴露, 對於細胞突變頻率之影響-----	111

圖 13.持續性暴露低濃度之氯化鎘暴露, 在複合毒性中對於細胞存活率之影響.-----	112
圖 14.持續性暴露低濃度之氯化鎘暴露, 在複合毒性中對於細胞突變頻率之影響.-----	113
圖 15.持續性暴露低濃度之氯化鉛暴露, 在複合毒性中對於細胞存活率之影響.-----	114
圖 16.持續性暴露低濃度之氯化鉛暴露, 在複合毒性中對於細胞突變頻率之影響.-----	115
圖 17.持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀暴露, 在複合毒性中對於細胞存活率之影響.-----	116
圖 18.持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀暴露, 在複合毒性中對於細胞突變頻率之影響.-----	117
圖 A. 持續性之 HAT 處理 V79 細胞, 其對於細胞突變發生率之影響.-----	118
圖 B.不同濃度之乙醛暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響.-----	119
圖 C.不同濃度之氯化鎘暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響.-----	120
圖 D.不同濃度之氯化鉛暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響.-----	121
圖 E.不同濃度之重鉻酸鉀暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響.-----	122
圖 F1.正常 V79 細胞之細胞型態(200X).-----	123
圖 F2.利用螢光顯微鏡觀察正常之 V79 細胞(200X).-----	123
圖 G1.暴露於乙醛 10mM (4 小時), V79 細胞型態之改變(200	

X)-----	124
圖 G2.利用螢光顯微鏡觀察,暴露於乙醛 10mM(4 小時)之 V79 細胞(200X).-----	124
圖 H1.暴露於氯化鎘 100 $\mu$ M(4 小時),V79 細胞型態之改變 (200X).-----	125
圖 H2.利用螢光顯微鏡觀察,暴露於氯化鎘 100 $\mu$ M(4 小 時)之 V79 細胞(200X).-----	125
圖 I1.暴露於氯化鉛 1mM(4 小時),V79 細胞之細胞型態型態 之改變(200X).-----	126
圖 I2.利用螢光顯微鏡觀察,暴露於氯化鉛 1mM(4 小時) 後之 V79 細胞(200X).-----	126
圖 J1.暴露於重鉻酸鉀 16 $\mu$ M(4 小時),V79 細胞型態之改變 (200X).-----	127
圖 J2.利用螢光顯微鏡觀察,暴露於重鉻酸鉀 16 $\mu$ M(4 小 時)之 V79 細胞(200X).-----	127

## 縮 寫

1. a: additive
2. AA : Acetaldehyde
3.  $\text{CdCl}_2$  : Cadmium Dichloride
4. DMSO: Dimethyl Sulfoxide
5. FV(%): fluorescence value (% of control)
6. HAT: hypoxanthine aminopterin thymidine
7. hprt : hypoxanthine phosphoribosyl transferase
8.  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  : Potassium Dichromate
9. MEM: Minimum essential medium
10. MN: micronuclei
11.  $\text{PbCl}_2$  : Lead Dichloride
12. PBS: Phosphate buffered saline
13. PI : propidium iodide
14. SCE: sister-chromatid exchange
15. 6-TG : 6-thioguanine

## 中 文 摘 要

由於台灣地區地狹人稠，對於環境衝擊耐受之程度較低。因此，本土環境污染不但會破壞生態平衡，更極易對人體健康形成危害。由於人類環境周遭往往不僅只有暴露一種環境毒物，有時會有兩種或兩種以上的環境污染物。為了瞭解這些環境毒物彼此之間對於生物的影響，是否具有交互作用，進而影響細胞的存活或造成細胞基因突變。關於這些環境毒物彼此之間的交互作用，在目前文獻中的研究較少。故本實驗以 V79 細胞(中國倉鼠肺臟細胞)為研究對象，探討乙醛和重金屬化合物對於細胞毒性及基因毒性之複合效應。以下列三種型式來探討；高劑量的短期暴露 4 小時(乙醛 2.5-20.0mM; 氯化鎘 12.5- 200  $\mu$  M; 氯化鉛: 0.25-2.00mM; 重鉻酸鉀: 4- 32  $\mu$  M) 和低劑量長時間暴露 72 小時(乙醛 250 - 1000  $\mu$  M ;氯化鎘: 1.25 - 10.00  $\mu$  M ; 氯化鉛: 12.5- 100.0  $\mu$  M ; 重鉻酸鉀: 3.2- 0.4  $\mu$  M) 及持續性暴露乙醛及此三種重金屬化合物對於 V79 細胞產生之效應。除了研究這兩種毒物單一暴露及兩者複合暴露對於細胞存活率及細胞對 Alamar blue 代謝活性的影響，另外對於 hprt ( hypoxanthine phosphoribosyl transferase)基因突變的效應進行研究。

由結果顯示可知細胞存活率及細胞代謝活性，均隨著毒物劑量的增加而下降( $p < 0.05$ )，而 hprt 基因突變率亦隨之上升( $p < 0.05$ )。在相同細胞毒性濃度時，複合暴露此兩種毒物，除了細胞存活率及細胞代謝活性比單一相同細胞毒性濃度的毒物下降外，hprt 基因突變率更顯著上升。則當此兩類毒物共同暴露時，對 V79 細胞之細胞毒性及基因毒性均有顯著之加成性。最後隨著持續性低劑量的毒物暴

露次數的增加，V79 細胞對於毒物的耐受性明顯增加( $P<0.05$ )，而且細胞突變數目亦顯著增加( $P<0.05$ )。我們也討論到暴露於這些重金屬污染的作業廠工人，若有酗酒的習慣或同時暴露於含有乙醛的環境中，則對於人體有加成性的傷害。

## Abstract

In a crowdly living place, Taiwan is highly populated and is thus sensitively to environmental hazard. Therefore, the emissions of the pollutant not only disrupte the balance of environment, but also cause severe hazard to human being. According to literature, most have studied on the toxicity of single chemical. However, considering the fact that human exposure to multiple paths and varietal chemicals, the biological combination or synergistic/antagonistic effect is necessary to investigate. To understand the interaction between biological system and cytotoxicity or genotoxicity, we have forcused on the chemical mixtures in vitro test.

By exposure V79 cell line in vitro to Acetaldehyde, Cadmium Chloride, Lead Chloride and Potassium Dichromate , a series of test has been used to investigate these agents which act as synergistic / independent or cumulative of each other in producing cytotoxicity or genotoxicity. Three pattern of exposing interval has been proceeded, high dosage in shot interval (4 hours, Acetaldehyde 12.5~20mM, Cadmium Chloride 200  $\mu$ M , Lead Chloride 0.25-2.00mM, Potassium Dichromate 4-3.2  $\mu$  M) and long interval at low dosage (72 hours , Acetaldehyde 250-1000  $\mu$  M ;Cadmium Chloride 1.25~10.00  $\mu$  M , Lead Chloride 12.5~ 100.0  $\mu$  M ; Potassium Dichromate 0.4-32  $\mu$  M). In order to see the cumulative effect of toxic agent, third exposing pattern has been proceeded by introducing the agent from 1 to 3 times to the cell. Each exposure has been left enough time to incubate and rejustify the

cell number.

Our studies has shown that V79 cells reduced its viability and metabolic activity as the dose of exposure increase. One of the claslogenic indicator hprt gene (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) mutation ratio increase , even exposing dose the additive synthetic effect has bound V79 cell exposure to acetaldehyde and these metals . As the elevation continously exposure nùber, the enhancement of V79 cell tolerance has been observed , and the hprt gene mutation ratio also increase. As the acetaldehyde is the major metabolic intermediate of alcohol in human body, the dietary and occupational intake of acetaldehyde have mixed exposure to a number of metalic compounds give rise to the cytotoxicity and genotoxicity.



## 緒 言

近年來，環境毒物所衍生環境污染問題，日益受到全球環保團體重視。由於工業急遽發展，使得有毒物質不斷的進入我們的生活環境之中，這些環境污染物包括有機溶劑、無機及有機化合物以及重金屬等等。根據流行病學及相關的環境毒物的文獻指出，這些環境污染物除了使造成動植物的傷害外，而且會引發人類上器官的各種疾病，並可引起腫瘤，癌症及畸形胚胎等。目前對於環境毒物之研究，大多只各別探討單一物質對生物體之危害與其代謝機轉，但極少對暴露在數種環境毒物下交互作用與加成毒性進行研究。而在現實之環境，生物體往往同時暴露在數種環境毒物中，故本研究特別選取乙醛與一般環境污染中常見之毒性重金屬，探討其交互作用是否具有加成毒性。以下先就本研究所探討的有機溶劑及重金屬化合物的性質和對於人類，動物及培養細胞之效應做一簡單的介紹。本實驗所使用的有機溶劑為乙醛而金屬化合物分別為：氯化錳、氯化鉛及重鉻酸鉀。

### (一). 乙醛(Acetaldehyde)

乙醛可經由許多不同的釋出途徑，造成生物性的傷害及環境污染[1]。例如，經由汽機車廢氣排放，木材及煤礦的燃燒以及其它廢棄物分解而釋放[2]。乙醛為工業製程中使用廣泛之有機溶劑，應用於橡膠，酚類樹脂，染料及攝影顯相劑等製造用途[3]。乙醛的暴露可經由人體內源性系統(Endogenous)將乙醇氧化形成乙醛，或經由

外在環境(exogenous)機會性暴露而接觸[4,5]。

乙醇最初在肝臟代謝可經由 nicotinamideadenine dinucleotide (NAD)-dependent alcohol dehydrogenase(ADH)在細胞質中進行氧化作用。在粒腺體中經由 NAD-dependent alcohol dehydrogenase(ALDH)將乙醛進一步氧化成乙酸[6]。ADH 及 ALDH 除了在肝臟具有高度活性外，這兩種酵素亦分佈在體內其它組織中(例如腎臟、睪丸、腦及小腸)[7,8]。一般人可經由酒精性飲料而攝取乙醇，在肝臟中代謝成乙醛，進而在人體造成許多病理上及生理上的效應[9]。

在 In vitro 和 in vivo 的實驗中發現，乙醛除了具有細胞毒性外，亦具有細胞遺傳毒性，造成 DNA 損傷[10]，如姐妹染色體交換 (Sister-chromatid exchange)，微小核的形成(micronuclei)及染色體異常[11,12]。對於乙醛所造成的致癌機轉目前尚不清楚。但有研究指出，乙醛會與 DNA 產生共價鍵結合，而造成致癌作用的效應。由於乙醛的羰基上所具有的親電性基團(electrophilic group)，可與核酸、蛋白質、磷脂質上的親核性部位(nucleophilic site)快速反應形成鍵結，造成 DNA 結構發生改變，進而引發致突變作用及致癌機轉[13]。Vina(1980)証實，乙醛會與硫氫基複合物(Sulfhydryl compounds)如胱氨酸(cysteine)及還原態的麩胱氨酸(reduced glutathione)形成鍵結物(adduct)[14]。Hemminki 及 Suni(1984)亦指出，乙醛可經由非酵素性反應與含有胞嘧啶(cytosine)及嘌呤(purine)的核苷酸及去氧核苷酸形成鍵結物(adduct)[15]。這些反應造成了 DNA 結構及功能上的傷害，進而導致細胞死亡或發生轉形。此外，乙醛具有啟動子(promoter)之性質，可增強 benzo[a]pyrene 形成腫瘤的頻率[16]。Wonterson (1986)

指出，倉鼠經由吸入性暴露乙醛而產生呼吸道腫瘤[17]。乙醛亦具有胚胎毒性，其會干擾必需氨基酸進入胎盤的主動運輸作用[18]，進而影響 DNA 和 RNA 合成而造成胎兒畸形[19]。

## (二). 鎘(Cadmium)

鎘金屬為稀有元素之一[20]；亦為人體非必需之元素[21]。鎘在工業上使用廣泛，由於塑膠工業在我國十分發達，因此塑膠安定劑的用量十分可觀。而用以製造硬脂酸鎘  $(C_{18}H_{35}COO)_2Cd$  以作塑膠安定劑的原料氧化鎘，用量亦十分龐大。其有關之製造廠，如陶器染料、電鍍合金、鹼性蓄電池的製造、塗料、油漆、煉鋅、電鍍、電子工廠等，都是含鎘工業廢水主要來源[22]。由於鎘在極低的濃度便有極高的毒性並且具有很長的生物半衰期[20,23]，不易由生物體內排除。而且鎘因其化學性安定和易累積轉移的特性，可經由廢水或廢棄物的污染累積到生物體或轉移到自然水域中，進而造成全球的環保問題[20]。

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[23,24]。在這些報告中，鎘被認為與人類肺癌以及前列腺上皮性腫瘤有關[25-27]。鎘對於人體的影響主要在腎臟及骨骼系統，鎘中毒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  $\beta_2$ -microglobulin 及醣解 N-Acetyl- $\beta$ -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[22,28]。鎘亦會造成心血管疾病[29-31]及高血壓[32]。在 In vitro 的實驗方面，鎘會造成細胞毒性(cytotoxicity)[33-35]及細胞基因突變

[36,37]，進而造成細胞死亡及細胞轉形作用(transform-ation)[38]。鎘對於體內一些參與生化代謝的必需重金屬(如 Zn、Cu、Ca)具有置換作用，可能造成細胞內巨分子結構及功能發生改變，導致細胞死亡或癌化[39]。鎘亦會影響細胞間巨分子的交互作用以及修飾 DNA、RNA 和蛋白質的代謝途徑，進而造成細胞的死亡[40]。

### (三). 鉛(Lead)

鉛是人類文明史上應用最早的金屬之一，具有柔軟性及延展性，並具有可塑性及耐腐蝕性且易加工，自古即非常受重視。早期被用來製造釀酒用具和烹飪器具，目前在農業、工業、醫學上的使用極普遍，使得由於使用不當所造成的鉛中毒比率也隨之上升，尤其是長期與鉛接觸的人更具危險性。鉛比其它重金屬存在的範圍更廣，在環境中含量因鉛礦的開採、精煉、熔融及其他工業上的用途而增加[41]。在台灣透過進出口資料之統計與產業界之估算，1992年台灣鉛使用量約在10噸左右，主要用在鉛粉製造、鉛蓄電池、鉛玻璃之製造及鉛字印刷等用途[42]。鉛氧化物可作為PVC安定劑，並使用於農藥、鉛黃、鉬紅、電燈泡、真空管、陶器及釉藥等地方。有機鉛則包括四烷基鉛、醋酸鉛、硬脂酸鉛等，其中以四乙基鉛專用為內燃機油的抗震劑，用量最大，污染也最嚴重[43]。Nrigue等人(1988)指出，鉛釋入環境的主要來源來自使用燃煤為動力的工廠及垃圾焚化廠，而每年約有 $3.9 \times 10^4$ 噸的鉛釋入環境中，造成嚴重的環保問題[44]。

鉛為人體的非必需元素，成人體內總量約為120mg。正常人血

液鉛平均含量約為 17  $\mu\text{g}/\text{dL}$  量，尿液約為 35  $\mu\text{g}/\text{dL}$ 。全血鉛若超過 80  $\mu\text{g}/\text{dL}$ ，尿液超過 150  $\mu\text{g}/\text{dL}$  表示鉛中毒。世界衛生組織(WHO)所建議之職業暴露之血中鉛濃度標準，男性為 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ，女性於生殖年齡期間為 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$  [45]。鉛為相當重要的職業及環境毒物之一，其進入人體的途徑有吸入及食入兩種。主要暴露來源為吸入鉛的粉塵(dust)和燻煙(fume)[46]，有機鉛並可經由皮膚直接吸收進入體中。鉛於高溫熔解時，其表面昇華為鉛蒸氣，並轉變為氧化鉛的煙霧。吸入肺泡的煙霧為直徑數  $\mu$  以下的微粒，大的粉塵則附著在支氣管的上部。由消化器食入的鉛，則與食物一起被吸收入血液中。Finkel 指出，工業上鉛化物的毒性取決於此鉛化物在體液中的溶解度及其粒子大小，粒徑愈小，愈容易被身體吸收而毒性則愈大[47]。Aub 與 Clark 等人均證實，血中有 90% 以上的鉛先與紅血球細胞膜結合，隨著血液而循環全身[48]。而門脈循環中部份的鉛則可為肝細胞所吸收，再由膽汁排入消化道以降低血鉛含量。絕大部份的血中鉛均由腎臟排出[49]。鉛一旦進入體內，80~90% 的鉛均蓄積在骨骼及牙齒中[45]。當血中鉛濃度超過 80  $\mu\text{g}/\text{dL}$  時，則會出現腦病變。鉛會傷害小動脈及微血管造成腦水腫、腦壓增加、神經退化及神經膠質增生，並且伴隨著運動失調、昏迷及痙攣。鉛會造成許旺細胞退化，接著髓鞘脫失並可能引起軸突退化，這種症狀主要發生在職業性暴露者[50]。鉛對生殖系統也具有毒性，造成精子型態異常及不孕[51]。研究報導指出，孕婦於懷孕第十二週左右，血中鉛會經體內其循環系統由胎盤移至胎兒體中。甚至在嬰兒吸取母乳時進入嬰兒體內，可能造成胎兒及嬰兒鉛中毒之危險性[52]。鉛會影響血色素中血鐵質(Heme)的製造，根據 Moore 等人的摘要其主要作用有三：1. 降低 ALA-d ( $\delta$ -aminolevulinic acid dehydrase) 的活性，增進  $\delta$ -氨基-

$\gamma$ -酮戊酸合成酵素( $\delta$ -ALA synthetase)與血基質合氧酵素(heme oxygenase)的作用,而增加ALA的合成與排泄量;2.抑制棕色素氧化酵素(coproporphyrinogen III oxidase),導致尿液中棕色素含量增高;3.抑制骨骼中亞鐵螯合酵素(ferrochelatase)的作用致使 $Fe^{2+}$ 與原紫質的結合被抑制,並使原紫質(protoporphyrin)堆積於紅血球中[53]。鉛中毒亦會造成血球型態異常,引起嗜鹼性斑點紅血球產生及低血色素貧血[54],並且會造成腎小管硬化及腎功能異常而引起腎臟疾病及尿毒症,甚至與高血壓血管病變有密切關聯[49]。

Forni 等人(1980)報告指出,長期暴露鉛的女性工人,其染色體異常數目顯著增加,而且具有高度自發性流產比例[55]。Grandjean (1983)指出,長期暴露鉛的工人,其姐妹染色體交換的比例明顯增加[56]。Hansen (1984)指出,鉛會造成基因突變作用,染色體異常及畸形胚胎[57]。Gebhart (1984)亦指出,鉛會造成數種型式的DNA損傷,包括DNA結構改變、DNA斷裂以及姐妹染色體交換[58]。Tanner(1984)指出,鉛作用如同啟動子(promoter),可能在腎臟的致癌過程中扮演重要的角色[59]。鉛在細胞培養實驗中,亦會造成培養細胞的轉型作用[60]及中國倉鼠V79細胞基因突變[61],並會造成中國倉鼠細胞,動物骨髓細胞或培養中的白血球染色體異常[62,63]。Roy和Rossman(1992)根據其中國倉鼠V79細胞之研究結果,認為鉛可抑制DNA修復功能,進而造成細胞死亡[64]。由以上研究顯示,鉛不但在職業公衛調查上對於人類具有遺傳毒性,而且在培養細胞中亦具有基因毒性。

#### (四). 鉻(Chromium)

鉻(Chromium)為人體必需的微量元素，在葡萄糖及脂肪代謝中扮演重要角色，正常人體內含量極少約低於 6mg。在血液中，鉻主要與蛋白質結合，儲存於皮膚、肺、肌肉及脂肪組織中[65]。可經由尿液及腸道排泄。鉻主要被應用於不銹鋼材料及合金的製造，及以石化燃料為動力的工廠與水泥製造廠為環境污染的主要來源。人主要暴露來源為職業性暴露[66]。

鉻是一種毒性金屬，並且是一種致癌物[67-69]。鉻化物所造成的毒性，在人類所產生的病變包括皮膚潰瘍、鼻中膈穿孔及喉嚨發炎。若沉積在腎小管則會造成腎臟疾病。過量的暴露此金屬，會引起人類及實驗動物呼吸道癌及肺癌，此種致癌作用機轉目前尚不清楚[70-72]。研究指出，六價鉻複合物的毒性比三價鉻複合物來的高，而且  $\text{Cr}^{6+}$  比  $\text{Cr}^{3+}$  更易通過細胞膜。由於  $\text{Cr}^{6+}$  可經由細胞膜上的陰離子通道進入細胞；而  $\text{Cr}^{3+}$  以胞飲作用的方式進入，所以較不易進入細胞內[73]。  $\text{Cr}^{6+}$  在體內的代謝途徑可經由酵素系統或非酵素系統(經由 glutathion-SH)還原成  $\text{Cr}^{3+}$ ，也可經由 microsomal NADPH-Cytochrome P-450 還原成不同種類  $\text{Cr}^{6+}$  中間產物(如  $\text{Cr}^{5+}$ 、 $\text{Cr}^{4+}$ 、free radical 及最終穩定產物  $\text{Cr}^{3+}$ )，而  $\text{Cr}^{3+}$  會與核酸結合而引起致癌作用。鉻酸鹽( $\text{Cr}^{6+}$ )進入粒腺體的方式與進入細胞質相似，一旦進入這些胞器後，便被一連串的酵素系統還原或堆積在胞器內[74-76]。

在 in vivo 及 in vitro 的研究指出， $\text{Cr}^{6+}$  可造成數種不同型式的 DNA 傷害，例如 DNA 單股斷、DNA-DNA 交互聯結、DNA-Protein

交互聯結、Cr-DNA 鍵結物以及產生的自由基與 DNA 產生的鍵結物 [77-80]。Sugiyama 等人指出，經由  $\text{Cr}^{6+}$  暴露的 V79 細胞其會產生 DNA 單股斷裂 [81]。在哺乳類細胞中暴露鉻對染色體所產生的影響，包括造成染色體異常、微小核的產生以及姐妹染色體交換。D. Wild(1978) 等人指出，經由暴露  $\text{Cr}^{6+}$  的老鼠，其會造成染色體斷裂，產生微小核。F.Sarto(1982) 指出，可經由職業性暴露  $\text{Cr}^{6+}$  的工人其淋巴球發現有姐妹染色體交換的情形。除此之外， $\text{Cr}^{6+}$  可造成培養中的哺乳類細胞發生轉型作用，使得細胞型態發生改變 [82]。

#### (五).細胞毒性分析

細胞數目定量的方法有很多種，例如以染料進行傳統的計數，也可以儀器來定量細胞數目。本篇研究以 trypan blue exclusion 試驗、Propidium iodide 試驗及 Alamar blue 試驗做細胞毒性分析。

Propidium iodide (PI) 為一生質性(biomass)染料，其可與 DNA 或 RNA 結合。當其與雙股的 DNA 或 RNA 序列結合時，會大幅度的增加螢光值，所以當培養液中細胞的數目愈多時，其螢光值愈高 [85,86]。而 Alamar Blue (Alamar Biosciences, Sacramento, Calif)，是一種氧化還原的指示劑，其可經由細胞的代謝活性，使顏色由深藍色變成紅色。利用此指示劑可測知細胞經由毒物暴露後，其代謝活性的能力。經由螢光光譜儀測定，可推知細胞存活的狀況 [87,88]。

#### (六).基因毒性分析



然而致癌物或致突變物會造成不同形式的DNA損傷例如鹼基改變( base substitution )，鹼基缺失( base deletion )，鹼基插入( insertion )，DNA結構改變( DNA alteration)，單股或雙股斷裂( single-strand DNA or double -strand DNA break)及股連接( cross-linked )。若這些基因損失沒有被正確的修補，就會引起基因突變或造成細胞死亡。 *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，為一種合成嘧啶核苷酸的捷徑酵素( Salvage enzyme )。此酵素在生化代謝路徑所扮演的角色，可促使次黃嘧啶和鳥糞嘧啶進行磷酸核糖化反應( phosphoribosylation )，而形成GMP和IMP，但它同時也具有將嘧啶類似物，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，便可得到基因的突變株[89,90]。

## 研究動機:

由於台灣地區地狹人稠，對於環境衝擊耐受之程度較低，因此本土環境污染不但會破壞生態平衡，更極易對人體健康形成危害。由於周遭環境中往往不僅只有一種環境毒物，有時會有兩種或兩種以上的環境污染物。而這些環境毒物彼此之間對於生物的影響，是否具有某些交互作用，進而影響細胞的存活或造成細胞轉形作用。目前大多數研究僅探討單一毒物的毒性，對於複合毒性的研究則較少。故本實驗以 V79 細胞(中國倉鼠肺臟細胞)為研究對象，探討乙醛和重金屬化合物對於細胞毒性及基因毒性之複合效應。以下列三種型式來探討; 做高劑量的短期暴露 4 小時(乙醛 2.5-20.0mM; 氯化鎘 12.5- 200  $\mu$  M; 氯化鉛: 0.25-2.00mM; 重鉻酸鉀: 4- 32  $\mu$  M) 和低劑量長時間暴露 72 小時(乙醛 250- 1000  $\mu$  M ; 氯化鎘: 1.25- 10.00  $\mu$  M ; 氯化鉛: 12.5- 100.0  $\mu$  M ; 重鉻酸鉀: 0.4- 3.2  $\mu$  M) 及持續性暴露乙醛及此三種重金屬化合物對於 V79 細胞產生之效應。除了探討這兩種毒物單一暴露及兩者複合暴露對於細胞存活率及細胞對 Alamar blue 代謝活性的影響，另外對於 hprt ( hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 基因突變效應進行研究。

# 實驗材料

## (一).儀器

名稱	廠牌
無菌操作檯 (Lamina Flow)	HIGH TEN
細胞培養箱 (Incubator)	NUAIR™ US AUTO FLOW Temperature 37 °C , RH control 67-99%, CO <sub>2</sub> control 1.5%
離心機 (Centrifuge)	KUBOTA KN-70
光學顯微鏡	Nikon
相位差顯微鏡	Zeiss TELAVAL 31
共軛焦顯微鏡	Zeiss LSM 410
螢光顯微鏡	Zeiss Axivert 135M
細胞螢光光譜儀	Cyto 2300
螢光光譜儀	Cyto 4500
恆溫水浴槽 (Water Bath)	Kodman
血球計數器	Reichert-Jung

## (二) 材料

### 1 消耗性材料

名稱	購買廠商
Tissue Culture Flask (25cm <sup>2</sup> )	TPP
Tissue Culture Flask (75cm <sup>2</sup> )	TPP
無菌過濾膜 (0.22 $\mu$ m)	Millpore
細胞培養盤(24 well)	FALCON
1C.C 無菌吸管	FALCON
15C.C Tube	TPP
Microcentrifuge Tube	BRAND
Dish(35x10mm)	BECTON DICKINSON

## 2. 試藥:

名稱	購買廠商
Minimum Essential Medium	GIBCO BRL
Dulbeccols Phosphate Buffered Saline	GIBCO BRL
Trypan Blue Stain 0.4%	GIBCO BRL
Penicillin-Streptomycin	GIBCO BRL
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL
6-thioguanine	SIGMA
CdCl <sub>2</sub>	SIGMA
PbCl <sub>2</sub>	SIGMA
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	SIGMA
Alamar Blue	Bio-Source
Propidium iodide	SIGMA
HCl( 36.5-38.0% )	J,T Baker Inc.
Dimethyl sulfoxide	SIGMA

### Minimum Essential Medium (MEM) 配製

將 MEM 粉末加入二次水中攪拌均勻(每包 MEM 粉末可配製成 1 公升原液), 然後加入重碳酸鈉(每 1 升加入 2.2 克), 待均勻溶解後以 pH meter 測其 pH 值。以碳酸鈉(NaOH)及鹽酸(1N HCL)來調整其 pH 值。當 pH 值調整至 7.2 時, 將此溶液置於無菌操作台中, 以無菌過濾器過濾。將過濾後之培養液加入胎牛血清(胎牛血清須先預熱至 56 °C, 1 小時; MEM:胎牛血清為 10:1), 以及加入抗生素, 以抑制細菌生長(Penicillin 100  $\mu$  g/ml 及 Streptomycin  $\mu$  g/ml), 最後置於 4 °C 儲存。

### 磷酸鹽緩衝溶液配製(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; PBS)

每包 PBS 粉末以二次水可配製成 1 升的磷酸鹽緩衝溶液, 均勻溶解後以無菌過濾器過濾, 最後置於 4 °C 儲存。

### HAT 培養液配製( hypoxanthine, aminopterin 及 thymidine)

將配製好的 HAT 溶液加入 MEM 培養液中即可。(5x10<sup>-5</sup>M hypoxanthine , 4x10<sup>-7</sup>M aminopterin 及 5x10<sup>-6</sup>M thymidine)

### 6-thioguanine(6-TG)培養液配製

每 100C.C 的 MEM 培養液加入 0.001 克的 6-thioguanine.

### Propidium iodide (PI)配製

其配製濃度，為每毫升的二次水加入 200  $\mu$ g 的 Propidium iodide.

### Alamar blue 溶液配製

以 MEM 培養液將 Alamar blue 原液稀釋十倍即可。

### Trypsin 溶液配製

以 PBS 將 trypsin 原液稀釋十倍即可。

### 乙醛溶液配製

以磷酸鹽緩衝溶液配製成 200mM 乙醛溶液備用。(需新鮮配製)

### 氯化鎘溶液配製

以二次水配製成 10mM 氯化鎘溶液，置於 4 °C 儲存備用。

### 氯化鉛溶液配製

以二次水配製成 50mM 氯化鉛溶液，置於 4 °C 儲存備用。

### 重鉻酸鉀溶液配製

以磷酸鹽緩衝溶液配製成 10mM 重鉻酸鉀溶液，置於 4 °C 儲存備用。

# 實 驗 方 法

## 一. 細胞解凍及儲存

加入 15ml 先準備好的 MEM 培養液(37 °C)至 flask(75cm<sup>2</sup>)中，自液態氮中取出 V79 細胞(2x10<sup>5</sup> 個/ml)，迅速置於 37 °C 水浴槽中至完全解凍後，快速地倒入原先已加入 MEM 培養液的 flask 中。在 5%CO<sub>2</sub> 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(作用 4 -5 分鐘)，加入 MEM 培養液以去除 trypsin 活性。將含有細胞的培養液分裝至離心管中，離心( 800rpm)5 分鐘。接著去除上清液，將含有 DMSO( 3-5% )之培養液和沉澱的細胞均勻混合，取 1.5ml 分裝至細胞儲存管中(2x10<sup>5</sup> 個/ml)。將 tip 先置於-20 °C 冷凍庫中(10-18 小時)，再放入-85 °C 的冷凍庫 4-8 小時後，置於液態氮中保存。

## 二. 正常細胞株篩選

在進行各種細胞實驗之前，通常會利用 HAT( hypoxanthine, aminopterin, thymidine)培養液篩選出正常的細胞株，因 aminopterin 會抑制 De novo pathway，而正常之細胞因含有 HGPRTase (Hypoxanthine Guanine phosphoribosyl transferase)，可走捷徑途徑 (Salvage pathway)合成 nucleotide，而突變細胞株因缺乏 HGPRTase



所以很快便會死亡。利用此方法可加強實驗結果的精確性。

本實驗是以V79細胞作為研究對象，先將 $2 \times 10^5$ 個/ml V79細胞種在含有HAT( $5 \times 10^{-5}$ M hypoxanthine,  $4 \times 10^{-7}$ M aminopterin及 $5 \times 10^{-6}$ M thymidine)的MEM培養液中培養三天，以排除hpprt功能缺損的V79細胞，三天後洗去含有HAT的培養液，用磷酸緩衝液(PBS)洗兩次後，培養於一般MEM培養液中再繼續培養三天。

### 三. 細胞毒性試驗( trypan blue exclusion assay )

加入毒物測試的前一天，在24 well的細胞培養盤中，每個well種 $2 \times 10^5$ 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(做單一暴露或複合暴露)。置入培養箱培養4小時，之後抽出含有毒物之MEM培養液。以PBS重覆洗二次，以除去培養液中之毒物，防止其與細胞進一步作用。將PBS抽出後，以胰蛋白酶( Trypsin /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[83]。

$$\text{Cell number} = (\text{Total cell number} \div 9) \times 1.2 \times 10^4$$

$$\text{Relative cell survival}(\%) = (\text{cell survival number} / \text{control cell number}) \times 100\%$$

註：做複合暴露之前，先建立單一毒物的細胞致死濃度，選取具有相似毒物之致死劑量同時加入V79細胞，進行複合毒性試驗。

#### 四. Propidium iodide (PI)分析試驗

將進行細胞毒性實驗後之細胞培養盤以鋁箔紙包好，置於-30℃冰箱中至少2小時。之後置於50℃水浴中15分鐘（此步驟主要使細胞破裂讓propidium iodide與細胞內核酸結合）。將200 μg/ml之PI溶液取50 μl加入每個well中（最終濃度為40 μg/ml），在暗室中反應60分鐘後，將螢光測定儀(Cyto Fluor 2300)設定基態及激發態波長分別為560nm及645nm，測定螢光值[85,86]。

$$\text{PI fluorescence value (\% of control)} = \frac{(\text{sample fluorescence} - \text{blank fluorescence})}{(\text{control fluorescence} - \text{blank fluorescence})} \times 100\%$$

#### 五. 細胞代謝活性試驗

加入毒物測試的前一天，在細胞培養皿中種入1.5ml的V79細胞細胞懸浮液( $2 \times 10^5$ /ml)。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(做單一暴露或複合暴露)。置入培養箱培養4小時後，換新的MEM培養液。每個細胞培養皿加入0.15ml alamar blue，置入培養箱培養4小時。培養4小時後，將上清液倒入tube中待測螢光。將螢光光譜儀的波長設定基態為560nm以及激發態為590nm，取1ml 上清液和1ml 二次水於比色管中均勻混合進行比色[87,88]。

$$\text{Alamar blue fluorescence value (\% of control)} = \frac{\text{Sample fluorescence value}}{\text{Control fluorescence value}} \times 100\%$$

#### 六. 真核細胞次黃嘌呤-鳥糞嘌呤磷酸核糖基轉移酵素基因 (Hypoxanthine-Guanine phosphoribosyl transferase gene, HPRT gene) 突變之分析

加入毒物測試的前，在細胞培養盤中每個well種入已用HAT的培養液處理過的V79細胞( $2 \times 10^5$  個/ml)。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，置入培養箱培養4小時。培養4小時之後抽出含有毒物之MEM培養液。以PBS重覆洗二次後，加入新鮮的MEM培養。三天後，調整細胞濃度為 $2 \times 10^4$  個/ml。持續培養七天，使突變細胞株能充份表現。培養七天後，調整細胞濃度為 $2 \times 10^4$  個/ml，然後將培養液換成含有6-thioguanine的培養液( $10 \mu\text{g/ml}$ )，再培養6-8天後，計算細胞株數目[89,90]。

#### 七. 持續性暴露毒物對V79細胞之細胞毒性及基因突變株篩選試驗

將 $2 \times 10^5$  個/ml V79細胞種入 $75\text{cm}^2$ 的flask培養7天。7天後將細胞分盤分至三個flask中( $2 \times 10^5$  個/ml)編號分別為A,B,C。將B和C flask暴露於1.25mM的乙醛4小時後，換新鮮MEM培養液培養三天。三天後，C flask再度以1.25mM乙醛暴露4小時後，換上新鮮的MEM培養液培養三天。將A flask分盤，使細胞培養盤中的每個well中含有

$2 \times 10^5$  個/ml的V79細胞。接著進行不同濃度的乙醛暴露後，置於CO<sub>2</sub>培養箱中，4小時後計算細胞存活數目。將細胞培養3天後，調整細胞濃度調整為 $2 \times 10^4$  個/ml，進行基因突變株篩選試驗。同樣的步驟將B和C flask內之V79細胞分盤至細胞培養盤( $2 \times 10^5$  個/ml)，進行不同濃度的乙醛之細胞毒性試驗及基因突變株篩選試驗。

其他毒物如氯化錳、氯化鉛、重鉻酸鉀之持續性暴露對V79細胞之細胞毒性及基因突變株篩選試驗方法與前者相同，其持續性暴露毒物濃度分別為：氯化錳- $6.25 \mu M$ ；氯化鉛- $62.5 \mu M$ ；重鉻酸鉀- $2 \mu M$ 。

#### 八. 統計學分析

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-T test分析其劑量間之差異(P值)。以P值小於0.05為有顯著差異。(2).以independent joint action model分析複合毒性之交互作用。 $P(M)=P(A)+P(B)-P(AB)$ ，P(M)表示預期致死百分比，P(A)表示A毒物致死百分比，P(B)表示B毒物致死百分比[91,92]。(3).我們以Dunnet's test來分析基因複合毒性， $IF(\text{interaction factor})=(OM-\text{control})-(PM-\text{control})$ ， $PM=[(PA-\text{control})+(PB-\text{control})]$ 。OM表示實際突變株數目，PM表示預期突變株數目，PA表示A毒物突變株數目，PB表示B毒物突變株數目。IF小於0表示拮抗作用(antagonism)，大於0表示協同作用(synergism)以及等於0表示加成作用(additive)[93,94]。

## 結果分析

### 一.中國倉鼠肺臟細胞(V79細胞)暴露於乙醛的細胞毒性及 基因毒性之探討

細胞毒性試驗( trypan blue exclusion assay ) :由表5及表8的結果可知，乙醛不論在高劑量短期暴露(20.0-2.5mM,4小時)或低劑量長期暴露(125.0-1000.0  $\mu$ M, 72小時)，V79細胞的存活率均隨著乙醛暴露劑量的增高而下降( $P<0.05$ )。在PI分析試驗方面，在高劑量短期暴露(20.0-2.5mM,4小時)，FV(%)亦隨著乙醛劑量的增高呈現有下降的趨勢而有顯著的意義( $P<0.05$ ) (圖.1)。在持續性暴露乙醛的實驗中，細胞隨著低劑量乙醛暴露次數增加，使得V79細胞對不同劑量乙醛的耐受性提高。例如，已暴露二次乙醛(1.25mM ,4小時)的細胞毒性試驗中，其細胞存活率比暴露一次乙醛的細胞存活率高( $p<0.05$ ); 而且暴露一次乙醛細胞存活率比沒有暴露乙醛的細胞存活率高( $p<0.05$ )[圖.5]。即重覆暴露在低劑量之乙醛下，會增加V79細胞對於高劑量的乙醛之耐受度。

細胞代謝活性試驗:分析結果( 表6及表9 )與細胞毒性相同。在高劑量4小時及低劑量72小時的暴露結果顯示，V79細胞對Alamar blue之代謝活性(FV%)隨著乙醛濃度的增高而下降( $p<0.05$ )。

細胞突變株篩選試驗: 由表5及表8的結果可知，不論在高劑量短期暴露(2.5-20mM,4小時)或低劑量長期暴露(125 - 1000  $\mu$ M, 72小時)，V79

細胞的突變株發生率隨著乙醛濃度的增高而增加( $P < 0.05$ )。持續性暴露乙醛的實驗中，V79細胞隨著低劑量乙醛暴露次數增加的結果，使得V79細胞突變頻率上升。例如，已暴露二次乙醛的細胞突變株篩選試驗中(1.25mM, 4小時)，其突變株發生率比暴露一次乙醛的數目增多( $p < 0.05$ )；而且暴露一次乙醛比沒有暴露1.25mM乙醛的突變株數目顯著增多( $p < 0.05$ ) [圖.6]。

## 二. 中國倉鼠肺臟細胞( V79細胞 ) 暴露於氯化鎘的細胞毒性及基因毒性之探討

細胞毒性試驗( trypan blue exclusion assay ):由表5及表8的結果可知，不論在高劑量短期暴露(12.5- 200.0  $\mu\text{M}$ , 4小時)或低劑量長期暴露(2.5- 10.0  $\mu\text{M}$ , 72小時), V79細胞的存活率隨著氯化鎘劑量的增高而下降( $P < 0.05$ )。在PI分析試驗方面而言，在高劑量短期暴露氯化鎘(25.0- 200.0  $\mu\text{M}$ , 4小時)，其FV(%)會隨著氯化鎘劑量的增高而下降( $P < 0.05$ ) (圖.2)。持續性暴露氯化鎘的實驗中，V79細胞隨著低劑量氯化鎘暴露次數增加，使得V79細胞對不同劑量的氯化鎘的耐受性提高。例如，已暴露二次氯化鎘的細胞毒性試驗中(12.5  $\mu\text{M}$ , 4小時)[圖7]，其細胞存活率比暴露一次氯化鎘的細胞存活率高( $p < 0.05$ )；而且暴露一次氯化鎘的細胞存活率比沒有暴露氯化鎘的細胞存活率高( $p < 0.05$ )。即重覆暴露在低劑量之氯化鎘下，會增加V79細胞對於高劑量的氯化鎘之耐受度。

細胞代謝活性試驗:分析結果(表6及表9)與細胞毒性相同。在高劑量4

小時及低劑量72小時的實驗結果顯示，V79細胞對Alamar blue之代謝活性(FV%)隨著氯化鎘濃度的增高而下降( $p < 0.05$ )。

細胞突變株篩選試驗: 由表5及表8的結果可知，氯化鎘不論在高劑量短期暴露(12.5- 200.0  $\mu$  M ,4小時)及低劑量長期暴露(10.0- 2.5  $\mu$  M ,72小時)，V79細胞的突變株發生率亦隨著氯化鎘濃度的增高而顯著增加( $P < 0.05$ )。持續性暴露氯化鎘的實驗中，V79細胞隨著氯化鎘暴露次數增加的結果，使得V79細胞突變頻率上升。例如，已暴露二次氯化鎘(12.5  $\mu$  M ,4小時)的細胞突變株篩選試驗中，其突變株比暴露一次氯化鎘的數目增多( $p < 0.05$ ); 而且暴露一次氯化鎘比沒有暴露氯化鎘的細胞突變株數目顯著增多( $p < 0.05$ ).[圖.8]

### 三.中國倉鼠肺臟細胞(V79細胞)暴露於氯化鉛的細胞毒性及基因毒性之探討

細胞毒性試驗( trypan blue exclusion assay ):由表15及表18的結果可知，氯化鉛不論在高劑量短期暴露(0.25mM-2.00mM,4小時)及低劑量長期暴露(12.5- 100.0  $\mu$  M ,72小時)，V79細胞的存活率隨著氯化鉛劑量的增高而下降( $P < 0.05$ )。在PI分析試驗方面而言，FV(%)隨著氯化鉛劑量的增高而呈現有意義的下降( $P < 0.05$ )[圖.3]。持續性暴露氯化鉛的實驗中，V79細胞隨著低劑量氯化鉛暴露次數增加，使得V79細胞對氯化鉛的耐受性顯著提高。例如，已暴露二次氯化鉛(0.125mM ,4小時)的細胞毒性試驗中，其細胞存活率比暴露一次氯化鉛的細胞存活率高( $p < 0.05$ ); 而且暴露一次氯化鉛細胞存活率比沒有暴露氯化鉛

的細胞存活率顯著增高( $p < 0.05$ )[圖.9]。即重覆性暴露在低劑量之氯化鉛，會增加V79細胞對於不同較高劑量的氯化鉛之耐受度。

細胞代謝活性試驗:分析結果(表15及表18)與細胞毒性相同。在高劑量4小時及低劑量72小時的實驗結果顯示，V79細胞對Alamar blue之代謝活性(FV %)隨著氯化鉛濃度的增高而下降( $p < 0.05$ )。

細胞突變株篩選試驗:由表15及表18結果可知，不論在高劑量短期暴露(0.25-2mM,4小時)及低劑量長期暴露氯化鉛(12.5- 100.0  $\mu$  M ,72小時)，V79細胞的突變株數目會隨著氯化鉛濃度的增高而增加( $P < 0.05$ )。在持續性暴露氯化鉛的實驗中，V79細胞隨著氯化鉛暴露次數增加的結果，使得V79細胞突變頻率上升。例如，已暴露二次氯化鉛(0.125mM,4小時)的細胞突變株篩選試驗中，其突變株比暴露一次氯化鉛的數目顯著增多( $p < 0.05$ ); 而且暴露一次氯化鉛比沒有暴露氯化鉛的突變株數目增多( $p < 0.05$ )[圖.10]。

#### 四.中國倉鼠肺臟細胞(V79細胞)暴露於重鉻酸鉀的細胞 毒性及基因毒性之探討

細胞毒性試驗(trypan blue exclusion assay):由表25及表28的結果顯示，不論在高劑量短期暴露(4.0- 32.0  $\mu$ M ,4小時)及低劑量長期暴露重鉻酸鉀(0.2-3.2  $\mu$ M ,72小時),V79細胞的存活率隨著重鉻酸鉀劑量的暴露增高而下降( $P < 0.05$ )。在PI分析試驗方面而言，FV(%)隨著重鉻酸鉀劑量暴露的增高呈現有意義的下降( $P < 0.05$ )[圖.4]。在持續性



暴露重鉻酸鉀的實驗中，V79細胞之存活率會隨著低劑量的重鉻酸鉀暴露次數增加，而使得V79細胞對重鉻酸鉀的耐受性顯著提高。例如，已暴露二次重鉻酸鉀( $2.0 \mu\text{M}$ , 4小時)的細胞毒性試驗中，其細胞存活率比暴露一次重鉻酸鉀的細胞存活率高( $p < 0.05$ )；而且暴露一次重鉻酸鉀的細胞存活率比沒有暴露重鉻酸鉀( $2.0 \mu\text{M}$ )的細胞存活率明顯增高( $p < 0.05$ ) [圖.11]。即重覆性暴露在低劑量之重鉻酸鉀，會增加V79細胞對於高劑量的重鉻酸鉀之耐受度。

細胞代謝活性試驗: 分析結果(表26及表29)與細胞毒性相同。在高劑量4小時及低劑量72小時的暴露結果顯示，V79細胞對Alamar blue之代謝活性(FV %)隨著重鉻酸鉀濃度的增高而下降( $p < 0.05$ )。

細胞突變株篩選試驗: 由表27及表30的結果可知，不論在高劑量短期暴露( $4.0 - 32.0 \mu\text{M}$ , 4小時)及低劑量長期暴露重鉻酸鉀( $0.2 - 3.2 \mu\text{M}$ , 72小時)，V79細胞的突變株數目會隨著鉻濃度的增高而增加( $P < 0.05$ )。在持續性暴露重鉻酸鉀的實驗中，V79細胞隨著重鉻酸鉀暴露次數增加的結果，使得V79細胞突變頻率上升。例如，已暴露二次重鉻酸鉀( $2.0 \mu\text{M}$ , 4小時)的細胞突變株篩選試驗中，其細胞突變株比暴露一次重鉻酸鉀的數目增多；而且暴露一次重鉻酸鉀比沒有暴露 $2.0 \mu\text{M}$ 重鉻酸鉀的突變株數目增多 [圖.12]。

## 五. 中國倉鼠肺臟細胞( V79細胞 ) 暴露於乙醛與氯化鎘的複合效應之探討

細胞毒性試驗( trypan blue exclusion assay ): 在進行共同暴露的複合

細胞毒性之前，首先各別建立單一毒物對細胞致死之濃度。在此致死濃度曲線中，選擇一最低的劑量(lowest observed effect level:LOEL)細胞致死率約2.5~7%。我們選取一個對細胞致死率影響很小的乙醛濃度(<7%)，同時與不同濃度的氯化鎘劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)。發現即使是以微量之乙醛，亦可顯著加強不同濃度氯化鎘的細胞毒性(表31及表35)。另外，由表38及表41的結果顯示，不論乙醛與氯化鎘在高劑量4小時及低劑量72小時的共同暴露下，其複合效應的結果大都具有加成性作用。例如，暴露5.0mM的乙醛其細胞存活率為60.3%，及暴露50.0  $\mu$ M的氯化鎘其細胞存活率為60.5%(死亡率分別為39.7%及39.5%)，預期其共同暴露下複合毒性之細胞死亡率為39.5%，而實際結果為63.5%比原先預期結果的細胞死亡率還高。所以我們推測當同時暴露出此兩種毒物時，對V79細胞則具有加成性的毒殺作用。持續性暴露氯化鎘的實驗中，V79細胞隨著低劑量氯化鎘暴露次數增加，使得V79細胞對的氯化鎘及乙醛的耐受性提高。例如，已暴露二次氯化鎘(12.5  $\mu$ M,4小時)的細胞毒性試驗中[圖13]，其細胞存活率比暴露一次氯化鎘的細胞存活率高( $p<0.05$ ); 而且暴露一次氯化鎘之細胞存活率比沒有暴露氯化鎘(12.5  $\mu$ M)的細胞存活率顯著增高( $p<0.05$ )。即重覆暴露在低劑量之氯化鎘下，會增加V79細胞對於高劑量的氯化鎘及乙醛之耐受度。

Propidium iodide分析試驗: 結果與細胞毒性分析相同，我們選取一個對細胞致死率影響很小的乙醛濃度(<7%)，同時與不同濃度的氯化鎘劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)。由表32的結果發現，即使加入微量之乙醛可加強不同濃度氯化鎘的細胞毒性，使V79細胞的細胞死亡率顯著增高。

細胞代謝活性試驗: 結果與細胞毒性分析相同，我們選取一個對細胞致死率影響很小的乙醛濃度(<7%)，同時與不同濃度的氯化鎘劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)。由表33及表36的結果發現，即使加入微量之乙醛可加強不同濃度氯化鎘的細胞毒性，使V79細胞對Alamar blue的代謝活性(FV%)顯著降低(表示細胞死亡率顯著增高)。由表39及表42的結果可知，乙醛與氯化鎘不論乙醛與氯化鎘在高劑量4小時及低劑量72小時的暴露下，其複合效應的結果具有加成作用，使V79細胞之死亡率顯著增高。

細胞突變株篩選試驗: 在V79細胞HGPRT突變株篩選試驗中，由表34及表37的結果顯示，發現即使是以微量之乙醛亦可顯著加強不同濃度氯化鎘的細胞突變的發生率。由表40及表43的結果顯示，乙醛與氯化鎘不論在高劑量4小時或低劑量72小時的共同暴露下，其複合效應不但具有加成作用(additive)而且具有協同作用(synergistic)。比原本單一暴露氯化鎘及乙醛的細胞突變株數目顯著增加。(例如，暴露2.5mM的乙醛細胞突變株數目為29.6個/ $10^5$ ; 暴露25.0  $\mu$ M的氯化鎘細胞突變株數目為20.8個/ $10^5$ ，而同時暴露於25.0  $\mu$ M 氯化鎘及2.5mM乙醛預期的細胞突變株數目為42.6個/ $10^5$ ，而實際細胞突變數目株為48.5個/ $10^5$ )。

持續性暴露氯化鎘的實驗中，不論在單一毒物暴露或複合暴露，V79細胞會隨著氯化鎘暴露次數增加，使得V79細胞突變頻率顯著上升。例如，已暴露二次氯化鎘(12.5  $\mu$ M, 4小時)的細胞突變株篩選試驗中，其突變株比暴露一次氯化鎘的數目增多( $p < 0.05$ ); 而且

暴露一次氯化鎘比沒有暴露 $12.5 \mu\text{M}$ 氯化鎘的突變株數目增多 ( $p < 0.05$ )[圖.14]。

## 六.中國倉鼠肺臟細胞(V79細胞)暴露於乙醛與氯化鉛的 複合效應之探討

細胞毒性試驗(trypan blue exclusion assay): 我們選取一個對細胞致死率影響微量的乙醛濃度( $< 7\%$ )，同時與不同濃度的氯化鉛劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)，發現即使是以微量之乙醛亦可顯著加強不同濃度氯化鉛的細胞毒性(表31及表35)。由表38及表41結果可知，乙醛與在氯化鉛不論在高劑量4小時或低劑量72小時的共同暴露下，其複合效應的結果具有加成作用。例如，暴露 $5.0\text{mM}$ 的乙醛其細胞存活率為 $68.3\%$ ，暴露 $0.05\text{mM}$ 的氯化鉛其細胞存活率為 $80.3\%$ (死亡率分別為 $31.7\%$ 及 $19.7\%$ )，預期其共同暴露下複合毒性之致死率為 $45.2\%$ ，而實際結果為 $61.3\%$ 。比原先預期結果的細胞死亡率還高。所以我們推測當同時暴露出此兩種毒物時，對V79細胞則具有加成性的毒殺作用。

持續性暴露氯化鉛的實驗中，V79細胞隨著低劑量氯化鉛暴露次數增加，使得V79細胞對氯化鉛及乙醛的耐受性提高。例如，已暴露二次氯化鉛( $0.125\text{mM}$ , 4小時)的細胞毒性試驗中，其細胞存活率比暴露一次氯化鉛的細胞存活率高( $p < 0.05$ ); 而且暴露一次氯化鉛細胞存活率比沒有暴露氯化鉛( $0.125\text{mM}$ )的細胞存活率顯著增高

( $p < 0.05$ ) [圖.15]。即重覆暴露在低劑量之氯化錳下，會增加V79細胞對於氯化鉛及乙醛之耐受度。

Propidium iodide 分析試驗: 結果與細胞毒性分析相同。選取一個對細胞致死率影響很小的乙醛濃度( $< 7\%$ )，同時與不同濃度的氯化鉛劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)，由表32的結果發現，即使加入微量之乙醛可加強不同濃度氯化鉛的細胞毒性，使V79細胞之死亡率顯著增高( $p < 0.05$ )。

細胞代謝活性試驗: 結果與細胞毒性分析相同。我們選取一個對細胞致死率影響很小的乙醛濃度( $< 7\%$ )，同時與不同濃度的氯化鉛劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)。由表33及表36的結果發現，即使加入微量之乙醛可加強不同濃度氯化鉛的細胞毒性，使V79細胞對Alamar blue的代謝活性(FV%)顯著降低(表示細胞死亡率顯著增高)。由表39及表42的結果發現，不論乙醛與氯化鉛在高劑量4小時及低劑量72小時的暴露下，其複合效應的結果具有加成作用，使V79細胞之死亡率顯著增高。

細胞突變株篩選試驗: 在V79細胞突變株篩選試驗中，由表34及表37的結果顯示，發現即使是以微量之乙醛亦可顯著加強不同濃度氯化鉛的細胞突變的發生率。由表40及表43的結果顯示，乙醛與氯化錳不論在高劑量4小時或低劑量72小時的共同暴露下，其複合效應的結果不但具有加成作用(additive)而且具有協同作用(synergistic)。比原本單一暴露氯化鉛及乙醛的細胞突變株顯著增加。(例如，暴露2.5mM

的乙醛的細胞突變株數目為24.1個/ $10^5$ ; 暴露0.25mM的氯化鉛細胞突變株的數目為26.1 / $10^5$ 個，而同時暴露於0.25mM氯化鉛及2.5mM乙醛的細胞突變株的預期數目為46.2/  $10^5$ 個，但實際細胞突變株的數目為58.5/  $10^5$ 個)。

在持續性暴露氯化鉛的實驗中，不論在單一毒物暴露或複合暴露，V79細胞隨著氯化鉛暴露次數增加，使得V79細胞突變頻率顯著上升。例如，已暴露二次氯化鉛(0.125mM, 4小時)的細胞突變株篩選試驗中，其突變株比暴露一次氯化鉛的數目增多( $p < 0.05$ ); 而且暴露一次氯化鉛比沒有暴露0.125mM氯化鉛的突變株數目增多( $p < 0.05$ )[圖16]。

## 七. 中國倉鼠肺臟細胞(V79細胞) 暴露於乙醛與重鉻酸鉀的複合效應之探討

細胞毒性試驗( trypan blue exclusion assay ): 我們選取一個對細胞致死率影響微量的乙醛濃度(<7%)，同時與不同濃度的重鉻酸鉀劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)。由表31及表35的結果發現，即使是以微量之乙醛暴露亦可顯著加強不同濃度重鉻酸鉀的細胞毒性。另一方面，由表38及表41的結果顯示，乙醛與重鉻酸鉀不論在高劑量4小時或低劑量72小時的共同暴露下，複合效應的結果具有加成作用。例如，暴露5.0mM乙醛其細胞存活率為67.6%，暴露8  $\mu$  M 重鉻酸鉀其細胞存活率為66.3%(死亡率分別為

32.4及33.7%)，，預期其共同暴露下複合毒性之死亡率為55.2%，而實驗結果為61.7%。比原先預期結果的細胞死亡率還高。所以我們推測當同時暴露此兩種毒物時，對V79細胞則具有加成毒殺作用。

在持續性暴露重鉻酸鉀的實驗中，不論在單一毒物暴露或複合暴露，均使得V79細胞會隨著低劑量的重鉻酸鉀暴露次數增加，而使得V79細胞對重鉻酸鉀及乙醛的耐受性提高。例如，已暴露二次重鉻酸鉀(2.0  $\mu$  M, 4小時)的細胞毒性試驗中，其細胞存活率比暴露一次重鉻酸鉀的細胞存活率高( $p < 0.05$ ); 而且暴露一次重鉻酸鉀的細胞存活率比沒有暴露重鉻酸鉀的細胞存活率高( $p < 0.05$ ) [圖17]。即重覆暴露在低劑量之氯化錳下，會增加V79細胞對於高劑量的重鉻酸鉀及乙醛之耐受度。

Propidium iodide分析試驗: 結果與細胞毒性分析相同，我們選取一個對細胞致死率影響很小的乙醛濃度(<7%)，同時與不同濃度的重鉻酸鉀劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)。由表32的結果發現，即使暴露微量之乙醛亦可加強不同濃度重鉻酸鉀的細胞毒性，使V79細胞死亡率顯著增高( $p < 0.05$ )。

細胞代謝活性試驗: 結果與細胞毒性分析相同，我們選取一個對細胞致死率影響很小的乙醛濃度(<7%)，同時與不同濃度的重鉻酸鉀劑量加入V79細胞(高劑量處理4小時;低劑量處理72小時)。由表33及表36的結果發現，即使暴露微量之乙醛亦可加強不同濃度重鉻酸鉀的細胞毒性，使V79細胞對Alamar blue的代謝活性(FV%)顯著降低(表示細胞死亡率顯著增高)。由表39及表42的結果顯示，不論乙醛與重鉻酸

鉀在高劑量4小時及低劑量72小時的暴露下，其複合效應的結果具有加成性作用使V79細胞之死亡率顯著增高。

細胞突變株篩選試驗：在V79細胞突變株篩選試驗中，由表34及表37的結果顯示，發現即使是以微量之乙醛亦可顯著加強不同重鉻酸鉀濃度的細胞突變的發生率。由表40及表43的結果顯示，乙醛與氯化鎘不論在高劑量4小時及低劑量72小時的共同暴露下，其複合效應的結果不但具有加成作用(additive)而且具有協同作用(synergistic)。比原本單一暴露重鉻酸鉀及乙醛的細胞突變株顯著增加。(例如，暴露2.5mM乙醛的細胞突變株數目為20.3個/ $10^5$ ；暴露4  $\mu$ M重鉻酸鉀的細胞突變株的數目為5.4個/ $10^5$ ，而同時暴露4  $\mu$ M重鉻酸鉀及2.5mM乙醛細胞突變株的預期數目為22.1個/ $10^5$ ，而實際細胞突變株數目為43.5個/ $10^5$ )。

在持續性暴露重鉻酸鉀的實驗中，V79細胞隨著重鉻酸鉀暴露次數增加的結果，不論在單一毒物暴露或複合暴露均使得V79細胞突變頻率顯著上升。例如，已暴露二次重鉻酸鉀(2.0  $\mu$ M,4小時)的細胞突變株篩選試驗中，其細胞突變株比暴露一次重鉻酸鉀的數目增多；而且暴露一次重鉻酸鉀比沒有暴露2.0  $\mu$ M重鉻酸鉀的突變株數目增多[圖.18]。



## 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。根據流行病學之文獻指出，鎘、鉛、鉻等金屬與乙醛均對於生物及環境有很高的毒性。而且對哺乳動物而言，鎘、鉛、鉻和乙醛等毒物被証實為一種致癌原及致突變物。這裡我們探討單一毒物暴露及複合毒性效應，對於 V79 細胞產生的細胞毒性及遺傳毒性之影響：

一. 乙醛與氯化鎘複合毒性效應，對於 V79 細胞產生的細胞毒性及遺傳毒性之探討：

生物體可經由乙醇(Enthanol)第一次氧化代謝作用形成乙醛。在長期酗酒者其血液中，乙醛濃度比正常人高出許多。而且也會經由周遭環境污染而進入人體[2,5]。根據文獻指出，乙醛會造成數種型式的 DNA 傷害(如：姐妹染色體交換及微小核的產生)，亦會造成細胞癌化作用及染色體異常[10-12]。Lambert(1985)推測，乙醛最初會與鹼基中巨分子的 amino group 產生交互作用，形成 Schiff bases 進一步形成 DNA 和 DNA 交錯連結(DNA-DNA cross linked)[95]。而且在 Lam 等(1986)之研究中則進一步證明，除了上述作用外亦會和蛋白質中的 amino group 及 thio group 作用，造成 DNA 和蛋白質交錯連結(DNA-Protein cross linked)[96]。而這些鍵結物及不正常之 DNA 和 DNA 交錯連結及 DNA 和蛋白質交錯連結的形成會影響到 RNA 和蛋白質的合成，產生不正常的氨基酸或功能缺失的蛋白質。由本實驗結果顯示，乙醛對於 V79 細胞具有細胞毒性，其所造成細胞死

亡的機轉目前尚不清楚。hprt (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 基因突變的產生為 DNA 損傷的敏感指標之一，並且可監測乙醛對 V79 細胞所造成的基因毒性。由表 5 及表 6 結果顯示，隨著乙醛濃度的增加使得 hprt 基因突變株發生率顯著增加( $p < 0.05$ )。在有關持續性暴露低濃度乙醛的實驗結果可知(圖 5 及圖 6)，隨著暴露次數的增加，V79 細胞對於較高乙醛劑量存活率增加( $p < 0.05$ )，而且細胞突變發生率亦顯著增加( $P < 0.05$ )。顯示經由低劑量的乙醛暴露後，存活下來的 V79 細胞對於較高乙醛劑量耐受性增加但對於細胞的遺傳毒性亦明顯增加。

對於鎘造成細胞死亡的機轉目前尚不清楚，Kunimoto 等人(1986)研究指出，鎘會損害細胞膜的構造與功能，影響細胞膜之通透性抑制鈉-鉀幫浦的活性進而影響物質進出細胞內外，造成細胞死亡[97]。在 In vitro 的實驗中發現，鎘會抑制 E. coli 的 DNA polymerase I 及人類  $\beta$  DNA polymerase 的活性，並且造成 E. coli 和人類淋巴球單股 DNA 斷裂及 DNA 的傷害[98]。Ochi 等人(1989)研究指出，在氯化鎘的暴露之下，可誘導 V79 細胞產生過氧化( prooxidant)作用，產生自由基造成細胞的單股 DNA 斷裂及 DNA 和蛋白質交錯連結(DNA-Protein cross linked)，並抑制細胞生長，DNA 合成與修飾作用，進而造成細胞染色體異常[99]。Lakkadetal(1986)研究指出，鎘對於硫氫基(Sulfhydryl ligands)具有親和性，所以鎘可能與紡錘體蛋白質(Spindle Forming Protein)上的硫氫基(Sulfhydryl group)產生交互作用，影響正常的細胞分裂的功能[100]。在本次實驗所選取的劑量及實驗分析下，由表 1,3,5,8 結果顯示氯化鎘具有細胞毒性，並與乙醛彼此間對於 V79 細胞之毒性具有顯著的複合效應。而且由表

1,3,7,10 結果可知，氯化錳亦具有基因毒性，當其與乙醛彼此間的交互作用，使得 V79 細胞 hprt 基因突變株顯著增加。表 40 及 43 顯示，當氯化錳與乙醛共同暴露時，對 V79 細胞的基因毒性不但具有加成作用(additive)而且具有協同作用(synergistic)。除此之外，由持續性暴露低濃度氯化錳的結果可知(圖 7 及圖 8)，隨著低濃度氯化錳暴露次數的增加，V79 細胞對於較高的氯化錳劑量耐受性增加( $p < 0.05$ )，而且細胞突變發生率亦顯著增加( $P < 0.05$ )。顯示經由低劑量的氯化錳暴露後，存活下來的 V79 細胞對於較高氯化錳劑量耐受性增加，但對於細胞的遺傳毒性亦明顯增加。

## 二. 乙醛與氯化鉛複合毒性效應，對於 V79 細胞產生的細胞毒性及遺傳毒性之探討：

根據研究指出，鉛會引起細胞株的致突變作用，造成細胞染色體異常以及畸形胚胎的形成。亦造成不同型式的 DNA 傷害[59,60]。Popenoe(1979)在 *in vitro* 實驗中發現，氯化鉛會抑制 DNA  $\beta$  polymerase [101]。以及 Frenkel 等人(1987)指出鉛會抑制 Hela 細胞株之 polymerase  $\alpha$  及 RNA polymerase II 的作用[102]，影響 DNA 複製的進行。而且鉛會與三級結構之核酸和蛋白質上磷酸根產生共價結合，造成 DNA 結構改變[103]。Zelikoff(1988)指出，鉛對於基因毒性效應，而並非直接地造成 DNA 損傷。例如造成 DNA 斷裂或 DNA-Protein 連結。換句話說，鉛離子會降低 DNA 合成的精確性[104]。Hartwig(1990)認為鉛會干擾 DNA 修復過程，因為鉛可能與修復酵素如聚合酵素(polymerase)或連接酵素(ligase)產生交互作用，抑制斷裂

的 DNA 再接合作用，進而抑制 DNA 修復作用[105]。除此之外，鉛亦會與鈣[106]及硒[107]產生交互作用影響細胞生化代謝，而且鉛也能當作啟動子(promoter)作用，進而造成致癌作用[108]。

由實驗結果得知(表 11,13,15,18)，氯化鉛對於 V79 細胞具有細胞毒殺作用，並會抑制對 Alamar blue 的代謝作用(表 12,14,16,19)。而且氯化鉛具有遺傳毒性而且暴露劑量與反應結果成線性關係( $p < 0.05$ )。當氯化鉛與乙醛這兩類毒物同時暴露於 V79 細胞，會加速增加細胞死亡的數目(表 15 及表 18)，而殘存的細胞其突變頻率比單一毒物暴露時顯著增加(表 17 及表 20)。表 40 及 43 顯示，當氯化鉛與乙醛共同暴露時，對 V79 細胞的基因毒性不但具有加成作用(additive)而且具有協同作用(synergistic)。在持續性暴露低濃度氯化鉛結果可知(圖 9 及圖 10)，隨著暴露次數的增加，V79 細胞對於較高的氯化鉛劑量耐受性增加( $p < 0.05$ )，而且細胞突變發生率亦顯著增加( $P < 0.05$ )。顯示經由低劑量的氯化鉛暴露後，存活下來的 V79 細胞對於較高氯化鉛劑量耐受性增加，但對於細胞的遺傳毒性亦明顯增加。

### 三. 乙醛與重鉻酸鉀複合毒性效應，對於 V79 細胞產生的細胞毒性及遺傳毒性之探討：

文獻指出，鉻是一種毒性金屬，並且是一種致癌物。其對於細胞的毒殺作用及致癌機轉，目前尚不清楚[67,69]。六價鉻( $\text{Cr}^{6+}$ )可能與細胞膜上的特定部位(ligand)結合，影響細胞膜的通透性造成細胞毒性[109]。而六價鉻造成基因毒性可能的機轉：(1).干擾核酸的生物

合成，(2).使得基因結構發生改變造成 DNA 損傷，(3).降低 DNA 合成的精確性，複製錯誤的鹼基[82]。Cr<sup>6+</sup>會與不同的 DNA 模板及不同的 DNA 聚合酵素結合(病毒、細菌和哺乳動物的聚合酵素)，使得 DNA 合成中止或複製錯誤的鹼基，進一步造成細胞死亡或細胞基因發生突變[110,111]。六價鉻(Cr<sup>6+</sup>)可經細胞膜的陰離子通道進入細胞。在細胞中經由一連串反應轉變成 Cr<sup>5+</sup>、Cr<sup>3+</sup>及自由基等中間產物。其中 Cr<sup>3+</sup>會與核酸結合，主要與氮鹼基的親核性部位產生交互作用(例如磷酸基團、氮原子及氧原子)。由於 G-C region 比 A-T region 含有較多的親核性位置，所以 Cr<sup>6+</sup>易和鳥糞嘌呤與胞嘧啶的配對區域(G-C region)結合，造成 DNA 結構的改變(DNA alteration)[112,113]。由於 Cr<sup>3+</sup>會攻擊 DNA 造成 DNA-DNA 連結(cross-linked)[114]，並且會誘導倉鼠細胞 DNA 序列發生點突變。Cr<sup>6+</sup>亦造成 DNA 損傷，經由改變 DNA 的物理及化學性質，造成多核酸鏈斷裂及 DNA 結構發生改變[112]，進而造成細胞死亡或細胞基因突變。由表 21,23,25,28 結果顯示，重鉻酸鉀不但具有細胞毒性，並與乙醛彼此間具有顯著的複合效應，造成 V79 細胞加成性死亡。而且由表 21,23,27,30 結果可知，重鉻酸鉀亦具有基因毒性。當其與乙醛彼此間的交互作用，使得 V79 細胞 hprt 基因突變株發生率顯著增加。顯示重鉻酸鉀和乙醛共同暴露時，對 V79 細胞的基因毒性表 40 及 43 顯示，當重鉻酸鉀與乙醛共同暴露時，對 V79 細胞的基因毒性不但具有加成作用(additive)而且具有協同作用(synergistic)。在持續性暴露低濃度重鉻酸鉀的結果可知(圖 11,12)，隨著暴露次數的增加，V79 細胞對於較高的重鉻酸鉀劑量耐受性增加，而且細胞突變發生率亦顯著增加(P<0.05)。顯示經由低劑量的重鉻酸鉀暴露後，存活下來的 V79 細胞對於較高氯化鎘劑量耐受性增加，但對於細胞的

遺傳毒性亦明顯增加。

由本研究中我們再次驗證過去文獻中所指出的  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{6+}$  重鉻酸鉀等金屬化合物和乙醛兩類毒物，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。除此之外，若持續性暴露於這些毒物之中，即使在低濃度的暴露下亦對細胞造成傷害。

## 結 論

我們觀察到乙醛和氯化鎘、氯化鉛、重鉻酸鉀共同暴露時，對細胞毒性及基因毒性有顯著的加成性作用。間接推測暴露於這些重金屬污染的作業廠工人，若有酗酒的習慣或同時暴露於含有乙醛的環境中將對人體有加成性的傷害。

## 參 考 文 獻

1. 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.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Tobacco Smoking (1985) International Agency for Research on Cancer, Lyon.
3. Sherman DIN, Williams R. (1994) Liver damage : mechanisms and management British Medical Bulletin. 50: No1, 124-138.
4. Dellarco, V.L. (1988) A mutagenicity assessment of acetaldehyde exposure. Mutation Research., 195:1-20.
5. Eriksson, C.J.P. (1983) Human blood acetaldehyde concentration during ethanol oxidation (Update 1982), Pharmacology Biochemistry and Behavior., 18, Suppl. 1, 141-150.
6. von Wartbrug, J.P. (1980) in: M. Sandler (Ed.), Acetaldehyde, Psychopharmacology of Alcohol, Raven, New York, pp. 137-147.
7. Meier-Tackmann, D., G. C. Korenkke, D.P. Agarwal and H.W. Goedde (1985) Human placenta aldehyde dehydrogenase (subcellular distribution and properties), Enzyme, 33: 153-161.
8. Messiha, F.S. (1983) Subcellular distribution of oxidoreductases in genital organs of the male rat, Neurobehav. Toxicol. Teratol ., 5, 241-243.
9. Lindros, K.O. (1978) Acetaldehyde-its metabolism and role in the actions of alcohol, Res. Adv. Alcohol Durg Prob., 4, 111-176.
10. Lam, C.W., Casanova, M. and Heck, H.D. A. (1986) Decreased extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure. Fundamental & Applied Toxicology., 6:541-550.



11. Lambert, B. and He, S.-M. (1988) DNA and chromosome damage induced by acetaldehyde in human lymphocytes in vitro. *Annals NY Acad. Sci.*, 534:369-376.
12. Dulout, F. and Furnus, C.C. (1988) Acetaldehyde-induced aneuploidy in cultured Chinese hamster cells. *Mutagenesis*, 3:207-211.
13. Tuma, D.J., and M.F. Sorrell (1985) Covalent binding of acetaldehyde to hepatic proteins: role in alcoholic liver injury, *Progr. Clin. Biol. Res.*, 183,3-17.
14. Vina, J., J.M. Estrella, C. Guerri and F.J. Romero (1980) Effect of ethanol on glutathione in isolated hepatocytes. *Biochemical Journal*, 188:549-552.
15. Hemminki, K., and R. Suni (1984) Sites of reaction of glutaraldehyde and acetaldehyde with nucleotides. *Archives Toxicology*, 55:186-190.
16. Woutersen, R.A., L.M. Appelman, V.J. Feron and C.A. Van Der Heijden (1984) Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats, II. Carcinogenicity study: interim results after 15 months, *Toxicology*, 31,123-133.
17. Feron, V.J., A. Kruyssen and R.A. Woutersen (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.
18. Fisher, S.E., M. Atkinson and D.H. Van Thiel (1984) Selective fetal malnutrition: the effect of nicotine, ethanol, and acetaldehyde upon in vitro uptake of an alpha-aminoisobutyric acid by human placenta, *Dev. Pharmacol. Ther.*, 7, 229-238.
19. Eriksson, C.J.P. (1983) Human blood acetaldehyde concentration during ethanol oxidation (Update 1982), *Pharmacology Biochemistry & Behavior.*, 18, Suppl. 1, 141-150.

20. M. Lyons-Alcantara, J.V. Tarazona, C. Mothersill. (1996). The differential effects exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. *Cell Biology and Toxicology*. 12:29-38.
21. Waalkes, M.P., T.P. and Barter, R.A. (1992) Toxicological principles of metal carcinogenesis with emphasis on cadmium. *Critical Reviews Toxicology*. 22:175-201.
22. 邱弘毅、葉錦瑩、薛玉梅、陳建仁 (1994 年). 台灣地區砷、汞、鎘及其化合物之用途和用量調查研究. *中華衛誌*: Vol.13, No.2 : 113-125.
23. Friberg, L., Kjellstrom, T., and Nordberg, G. (1986) Cadmium. In *Handbook on the Toxicology of Metals*. 130-184. Elsevier, Amsterdam.
24. IRAC. (1993) Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *IRAC Monogr. Eval. Carcinogen. Risks Human*, 58:119-238. Lyon: IRAC Scientific Publications.
25. Schilder, R.J., Hall, L., Monkes, A., Handel, L.M., Fornace, A.J. Jr., (1990) Metallothionein gene expression and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *International journal of cancer*, 45, 416-422.
26. Takenaka, S., Oldiges, H., Konig, H., Hochrainer, D., and Oberdorster, G. (1993) Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in Wistar rats. *INCI* 70:367-373.
27. Waalkes, M.P., Kovatch, R., and Rehm, S. (1991) Effect of chronic dietary zinc deficiency on cadmium toxicity and carcinogenesis in male Wistar rat. *Toxicology Applied Pharmacology*. 108:448-456.
28. Samuel Blumenthal, Donna Lewand, Susan K. K. Krezoski, and David H. Petering. (1996) Comparative effect of  $Cd^{2+}$  and Cd-Metallothionein on culture kidney tubule cells. *Toxicology & applied pharmacology*, 136:220-228.

29. Revis, N.W., Zinsmeister, A.R. and Bull, R. (1981) Atherosclerosis and hypertension induction by lead and cadmium ions: an effect prevented by calcium ion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 78, 6494-6498.
30. Carroll, R.E. (1966) The relationship of cadmium in the air to cardiovascular disease death rates. *Journal of the American Medical Association*, 198:267-269.
31. Atsushi Mishima, Toshiyuki Kaji, Chika Yamamoto. (1995) Zinc-induced tolerance to cadmium cytotoxicity without metallothionein induction in culture bovine aortic endothelial cells. *Toxicology Letter* 75:85-92.
32. Schroeder, H.A. and Vinton, W.H. (1962) Hypertension induced in rats by small dose of cadmium. *American Journal of Physiology*, 202:515-518.
33. Sciavolino, P.J., Lee, T.H. and Vilcek, J. (1992) Overexpression of metallothionein confers resistance to the cytotoxic effect of TNF with cadmium in MCF-7 breast carcinoma cells. *Lymphokine Cytokine Research*, 11(5):265-270.
34. Molfatt, P., Marion, M. and Denizeau, F. (1992) Cadmium-2-acetylaminofluorene interaction in isolated rat hepatocytes. *Cell Biology & Toxicology*, 8, No.4, 277-290.
35. Wahba, Z.Z., Coogan, T.P., Rhodes, S.W. and Waalkes, M.P. (1993) Protective effects of selenium on cadmium toxicity in rats: Role of altered toxicokinetic and metallothionein. *Journal of Toxicology & Environmental Health*, 38: 171-182.
36. Nocentini, S. (1987) Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic Acid Research*, 21: 359-365.
37. Jungman, J., Reins, H.A., Schobert, C. (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin dependent proteolysis. *Nature*, 361:369-371.

38. Collins, J.F., Brown, J.P. (1992) On the carcinogenicity of cadmium by the oral route. *Regul. Toxicol. Pharmacol*, 16:57-72.
39. Furst, T. (1981) Bioassay of metals for carcinogenesis: Whole animals. *Environ. Health Perspect.*, 40:83-91.
40. Kasahara, K., Fujiwara, Y., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T. and N. Saijo, N. (1991) Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer lines to cisplatin. *Cancer Research*, 51,3237-3242.
41. Jerome ON. Sturnine drugs and medicinal exposure to lead: A historical outline. In: Herbert, L. Needleman, M. D. eds. *Human Lead Exposure*. CRC press, Inc. 1992, 94-19.
42. Drasch GA, Bohm J, Baur C (1987) Lead in human bones: Investigations on an occupationally non-exposed population in southern Bavaria (FRG), I. Adults. *Sci Total Environ* 64:303-315.
43. Tola, S., et.al. (1971) Occupational lead exposure in Finland, *Work-Environmental-Heal* 8: 81.
44. Nriagu JO, Pacyna JM (1988) Quantitative assessme of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* ,333:134-139.
45. 何敏夫 (1994) *Clinical Chemistry Principles & Experiments*. 680-681.
46. Waldron HA. *Lecture Notes on Occupational Medicine*. Blackwell Scientific publications. 1990;4:12-18.
47. Finkel, A.J. (1983) *Industrial Toxicology*, John Wright PSG Inc., Massachusetts, p:63.
48. Klarkson, T.W., Kench, J.E. (1985) Uptake of lead by human erythrocytes in vitro, *Biochem. J.* 69:432-439.

49. 李卓倫(1984)鉛的毒物學探討,公共衛生雜誌,Vol 12, No 1, p:114-122.
50. Ernhardt, C. B., Landa, B., and Schnell, N. B. (1981) Subclinical levels of lead and developmental deficits-A multivariate follow-up reassessment. *Pediatrics* 67:911-919.
51. IARC (1980) Monograph on the evaluation of the Carcinogenic Risks of chemicals to Humans. Some Metals and Metallic Compounds. Vol.23. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
52. Mahathey KR, Anest JL, Roberts J, Murphy RS(1987) National estimates of blood lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med.*,316:573-579.
53. Moore, M.R., Meredith, P.A., Goldberg, A: Lead and heme synthesis, in Singhal, R. L., Thomas, J.A.(eds.):Lead Toxicity, Baltimore, Urban and Schwarzenberg, (1980),p:79-117.
54. WHO(1977)Lead. Environmental Health Criteria 3. Geneva: World Health Organization.
55. Forni, A. (1980) Chromosomal effects of lead: A critical review, *Rev. Environ. Health*, 3:114-129.
56. Grandjean, P., H.C. Wulf and E. Niebuhr (1983) Sister chromatid exchange in response to variations in occupational lead exposure, *Environ Res.*, 32: 199-204.
57. Hansen K. Stern RM (1984) A survey of metal-induced mutagenicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Environ Chem* 9:87-91.
58. Gebhart E (1984) Chromosome damage in individuals exposed to heavy metals. *Toxicol Environ Chem* 8:253-265.
59. Tanner, D.C., and M.M. Lipsky (1984) Effects of lead acetate on N-(4'-fluoro-4-biphenyl)acetamide-induced renal carcinogenesis in the

- rat, *Carcinogenesis*, 5: 1109-1113.
60. Dunkel, V.C., R.J. Pienta, A. Sivak, and K. Traul (1981) Comparative transformation of Balb/3T3 cells. Syrian hamster embryo cells and Rauscher murine leukemia virus-infected Fischer 344 embryo cells to chemical carcinogens, *J. Natl. Cancer Inst.*, 67:1303-1315.
61. Celotti, L., D. Furlan, L. Seccati and A.G. Levis (1987) Interactions of nitrioloacetic acid (NTA) with Cr(VI) compounds in the induction of gene mutations in cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 190:35-39.
62. Tachi, K., S. Nishimae and K. Saito (1985) Cytogenetic effects of lead acetate on rat bone marrow cells, *Arch. Environ. Health*, 40: 144-147.
63. Nayak, B.N., M. Ray, T.V. Persaud and M. Nigli (1989) Relationship of embryotoxicity and genotoxicity of lead nitrate in mice, *Exp. Pathol.*, 36:65-73.
64. Roy NK, Rossman TG (1992) Mutagenesis and comutagenesis by Lead compounds. *Mutat. Res.*, 298:97-103.
65. 何敏夫(1994) *Clinical Chemistry Principles & Experiments*. p : 679.
66. 劉宗榮, 康熙洲, 郭明良, 翁祖輝(1996) *基礎毒理學*, 藝軒出版社, p : 351-352.
67. IARC Monogr. (1987) Some anti-thyroid and related substances, nitrofurans, and industrial chemicals. *Eval Carcinog Risks Chem Hum Suppl* 7:165-168.
68. Debetto, P. and Luciani, S. (1988) Toxic effect of chromium on cellular metabolism. *Sci. Total Environ.*, 71: 365-377.
69. Standeven, A.M. and Wetterhahn, K.E. (1989) Chromium(VI) metabolism and toxicity: uptake, reduction, and DNA damage. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8, 1275-1283.

70. Sidney A. Katz (1991) The Analytical Biochemistry of Chromium , Environ Heal Persp, 92:13-16.
71. Richard P. Wedeen and Lifen Qian (1991) Chromium-Induced Kidney Disease, Environ Heal Persp, 92:71-74.
72. Alcedo JA, Wetterhahn Ke.(1990) Chromium toxicity and carcinogenesis Int Rev Exp Pathol 31: 85-108.
73. Buttner, B., and D. Beyersmann (1985) Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate. Xenobiotica. 15:735-741.
74. Ryberg, D. and Alexander, J.(1984) Inhibitory action of hexavalent chromium (CrVI) on the mitochondrial respiration and a possible coupling to the reduction of Cr(VI). Biochem. Pharmacol., 33, 2461-2466.
75. Garcia, J.E. and Jennette, K.W. (1981) Electron-transport cytochrome P-450 system is involved in the microsomal metabolism of the carcinogen chromate. J. Inorg. Biochem., 14: 281-295.
76. Joshua W. Hamilton and Karen E. Wetterhahn (1986) Chromium(VI)-induced DNA damage in chick embryo liver and blood cells *in vivo*, Carcinogenesis., 7, 12: 2085-2088.
77. Tsapakos, M.J., Hampton, T.H. and Wetterhahn, K.E.(1983) Chromium (VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. Cancer Res., 43:5662-5667.
78. Cupo, D.Y. and Wetterhahn, K.E.(1984) Repair of chromate-induced DNA damage in chick embryo hepatocytes. Carcinogenesis., 5: 1705-1708.
79. Sugiyama, M., Wang, X.-W and Costa, M.(1986) Comparison of DNA lesions and cytotoxicity induced by calcium chromate in human, mouse, and hamster cell lines. Cancer Res., 46:4547-4551.
80. Sugiyama M, Tsuzuki K, Ogura R.(1991) Effect of ascorbic acid on

DNA damage, cytotoxicity, glutathione reductase, and formation of paramagnetic chromium in Chinese hamster V-79 cells treated with sodium chromate(VI). *J Biol Chem* 266:3383-3386.

81. Sugiyama M., Ando, A., Nakao, K., Ueta, H., Hidaka, T., and Ogura R. (1989) Influence of vitamin B2 on formation of chromium(V), alkali-labile sites, and lethality of sodium chromate(VI) in Chinese hamster V79 cells. *Cancer Res.* 49:6180-6184.
82. V. Bianchi and A.G. Levis (1984) Mechanisms of chromium genotoxicity., *Toxicol. Environ. Chem*, 9:269-293.
84. Lee, T.C., Ko, J.L. and Jan, K. Y. (1989) Differential cytotoxicity of sodium arsenite in human fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Toxicology.* 56:289-299.
85. Nieminen A.L., Gorge G.J., Bond J.M., Lemasters J.J. (1992) A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 115:147-155.
86. C.T. Lawrence., Lemasters J.J. (1994) A cytotoxicity assay for tumor necrosis factor employing a multiwell fluorescence scanner. *Analy. Biochem*, 220:149-153.
87. Novak, S.M., Hindler, J. and Bruckner, D.A., (1993) Reliability of Two Novel Methods, alamar and E test, for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J.C. Microbiol.* 31(11): 3056-3057.
88. Shahan, T.A., Siegel, P.D., Sorenson, W.G., Kushner, W.G. and Lewis, D.M. (1994) A sensitive New Assay for tumor Necrosis Factor. *J. Immuno. Methods*, 175:181-187.
89. Klungland, A., Bjoras, M., Hoft. E. and Seeberg. E. (1994) Increased removal of 3-alkyladenine reduces the frequencies of hprt mutations induced by methyl- and ethylmethane sulfonate in Chinese hamster fibroblast cells. *Nucleic Acid Research.* 22:1670-1674.
90. O'Neill J.P. Brimer, P.A. A quantitative assay of mutation at the



- hgprt locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*. 45:91-101.
91. Bliss CI. (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol.* ;26:585-615.
92. G. Zarogian and R.A. Voyer (1995) Interactive cytotoxicities of selected organic and inorganic substances to brown cells of *Mercenaria mercenaria*. *Cell Biology and Toxicology*, 11:263-271.
93. S. P. Katsifis, P. L. Kinney, S. Hosselet, F.J. Burns, N.T. Christie (1996) Interaction of nickel with mutagens in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Mutation Research* , 359:7-15.
94. Zarogian G, Anderson S, Voyer RA. (1992) Individual and combined cytotoxic effects of cadmium, copper, and nickel on brown cells of *Mercenaria mercenaria*. *Marine Environ Res.*, 24:328-37.
95. Lambert, B., Y. Chen, S.M. He and M. Sten (1985) DNA cross linkeds in human leukocytes treated with vinyl acetate and acetaldehyde in vitro, *Mutation Res.*, 146:301-303.
96. Lam. C.W., M. Casanova and H. D'A. Heck (1986) Decreased extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure., *Fundamental & Applied Toxicology*, 6:541-550.
97. Kunito M, Miyasaka K, Miura T (1986) Changes in membrane properties of rat red blood cells by cadmium accumulating in the membrane fraction. *Biochemical Journal* , 99:397-406.
98. Miyake, M., Murata, I., Osabe, M. and Ono, T. (1979) Biochemistry Biophysical Research Communications. 77,854-860.
99. Ochi, T., Ishiguro, T. and Ohsawa, M. (1983) Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*,

122:169-175.

100. Lakkad BC, Nigam SK, Karnik AB, Thakore KN, Chatterjee BB (1984) Effect of cadmium chloride on cell division and chromosomes in Chinese hamster ovary cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36: 342-349.
101. Popenoe, E.A., and M.A. Schmaeler (1979) Interaction human polymerase  $\beta$  with ions of copper, lead, and cadmium, *Arch. Biochem. Biophys.*, 196: 109-120.
102. Frenkel, G.D., and C. Middleton (1987) Effect of lead acetate on DNA and RNA synthesis by intact HeLa cells, isolated nuclei and purified polymerases., *Biochem. Pharmacol.*, 36: 265-268.
103. Zelikoff, J.T., J.H. Li, A. Hartwig, X.W. Wang, M. Costa and T.G. Rossman (1988) Genetic toxicology of lead compounds, *Carcinogenesis*, 9: 1727-1732.
104. Sirover, M.A., and L.A. Loeb (1976) Infidelity on DNA synthesis in vitro: screening for potential mutagens or carcinogens., *Science*, 194:1434-1436.
105. Hartwig, A., R. Schlepegrell and D. Beyersmann (1990) Indirect mechanism of lead induced genotoxicity in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.*, 241: 75-82.
106. Deknuddt, G.H., and G.B. Gerber (1979) Chromosome studies in human lymphocytes after in vitro exposure to metal salts, *Toxicology*, 10: 67-75.
107. Beckman, L., I. Nordenson and S. Nordstrom (1982) Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden, VIII. Three year follow up of chromosomal aberrations in workers exposed to lead, *Hereditas*, 96:261-264.
108. Shirai, T., M. Ohshima, A. Matsuda, S. Tamano and N. Ito (1984) Promotion of 2-(ethylnitrosamino)ethanol-induced renal

- carcinogenesis in rats by nephrotoxic compounds: Positive results with folic acid, basic lead acetate and N-(2,3-dichlorophenyl) succinimide, but not with 2,3-dibromo-1-propanol phosphate, *J. Natl. Cancer Inst.*, 62: 901-909.
109. Witmer, C.(1991) Panel Discussion : mechanism and health effect of chromium, *Environ. Health Persp.*, 92: 87-89.
110. V. Bianchi, L. Celotti, G. Lanfranchi, F. Majone, G. Marin, A. Montaldi, G. Sponza, G. Tamino, P. Venier, A. Zantedeschi and A.G.Levis(1983) *Mutat. Res.*, 117: 279.
111. L.K. Tkeshelashvili, C. W. Shearman, R.A. Zakour, R.M. Koplitz and L.A. Loeb(1980) *Cancer Res.*,40:2455.
112. G.Tamino, L.Peretta and A.G.Levis(1981) *Chem. Biol.Inter.*,37:309.
113. A.J. Fornace, D.S. Seres, S.F. Lechner and C.C. Harris(1981) *Chem. Biol. Inter.*, 36:345.
114. G.Rainaldi, C.M. Colella, A. Piras and T. Mariani (1982) *Chem. Biol. Inter.*,42: 45.

## 圖 表 說 明

表 1. 高劑量之氯化鎘及乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時，對於細胞存活率及突變頻率之影響。

CdCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells		V79 cells(add 1.25mM AA)	
	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>
0.0 μM	100.0±1.5	1.5±0.8	95.7±1.8	8.4±1.3
12.5 μM	85.3±2.5*	23.7±2.7*	80.3±2.6*	32.5±3.2*
25.0 μM	78.2±2.9*	48.3±2.6*	63.3±3.8*	57.5±2.9*
50.0 μM	64.6±2.9*	76.0±3.6*	47.5±1.6 *	88.2±2.6*
100.0 μM	48.1±2.5*	86.2±2.7*	38.5±2.8 *	113.1±4.2*
200.0 μM	38.0±1.6*	101.8±3.6*	23.6±2.7 *	132.0±6.3*

註: control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組，並求其平均值。

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05).

AA : Acetaldehyde

表 2. 高劑量之氯化鎘及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.

CdCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells	V79 cells (add 1.25mM AA)
	FV(%)	FV(%)
0.0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 2.6	96.8 $\pm$ 2.1
12.5 $\mu$ M	96.3 $\pm$ 3.4	94.2 $\pm$ 2.4
25.0 $\mu$ M	85.3 $\pm$ 1.6*	86.2 $\pm$ 3.6*
50.0 $\mu$ M	79.3 $\pm$ 2.9*	72.1 $\pm$ 1.1*
100.0 $\mu$ M	52.3 $\pm$ 1.1*	45.3 $\pm$ 3.2*
200.0 $\mu$ M	34.5 $\pm$ 2.6*	24.3 $\pm$ 0.6*

註: control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組, 並求其平均值。

FV(%) : fluorescence value (% of control)

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ ).

AA : Acetaldehyde

表 3. 低劑量之氯化鎘及乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.

CdCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells		V79 cells(add 125 μM AA)	
	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>
0.00 μM	100.0±1.7	1.8±0.6	96.9±2.1	12.9±1.2
1.250 μM	87.1±3.3*	13.7±2.4*	72.1±3.8*	34.6±2.6*
2.500 μM	73.0±3.6*	24.9±2.6*	59.3±3.3*	51.4±3.1*
5.000 μM	59.5±3.0*	39.6±3.6*	42.5±2.0*	69.9±3.2*
10.000 μM	45.3±2.2*	54.0±4.1*	31.1±2.6*	88.1±2.6*

註: control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組, 並求其平均值。

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05).

AA : Acetaldehyde

表 4. 低劑量之氯化鎘及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時，對於 Alamar blue 代謝活性之影響。

CdCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells	V79 cells (add 125 μMAA)
	FV(%)	FV(%)
0.00 μM	100.0±1.2	98.2±1.6
1.25 μM	93.3±2.4*	94.6±2.1
2.50 μM	85.7±1.2*	76.2±0.4*
5.00 μM	70.3±2.6*	56.4±2.3*
10.00 μM	42.3±1.6*	29.6±0.7*

註: control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組，並求其平均值。

FV(%) : fluorescence value (% of control)

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05).

AA : Acetaldehyde

表 5. 高劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 4 小時, 對細胞存活率之影響.

Acetaldehyde Dose	Relative cell survival (%)	CdCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival (%)	co-exposure AA& CdCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival (%)
0.00mM	100.0±0.7	0.0 μM	100.0±0.7	0.00mM	100.0±0.7
1.25mM	93.2±3.5	12.5 μM	97.4±5.5	AA1.25mM+ CdCl <sub>2</sub> 12.5 μM	71.0±4.3*
2.50mM	73.0±2.1*	25.0 μM	84.4±1.1*	AA2.50mM+ CdCl <sub>2</sub> 50.0 μM	46.0±2.7*
5.00mM	60.3±2.2*	50.0 μM	60.5±1.4*	AA5.0mM + CdCl <sub>2</sub> 100.0 μM	28.8±1.8*
10.00mM	45.3±0.5*	100.0 μM	43.4±1.1*	AA10.0mM + CdCl <sub>2</sub> 200.0 μM	13.0±1.6*
20.00mM	38.8±2.3*	200.0 μM	35.4±0.9*	---	---

註: 1. 乙醛與氯化鎘均選取相似之細胞致死劑量的濃度, 同時加入 V79 細胞, 比較單一毒物與複合毒物暴露對細胞存活率之影響。

2. control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3. 每組試驗均做 4 組, 並求其平均值。

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之 ( $P < 0.05$ )

5. ---: 表示 no test



表 6. 不同高劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 4 小時下，對 V79 細胞代謝活性之影響。

Acetaldehyde Dose	FV(%)	CdCl <sub>2</sub> Dose	FV(%)	Co-exposure A.A& CdCl <sub>2</sub> Dose	FV%
0.00mM	100.0±0.8	0.0 μM	100.0±0.8	0.0 μM	100.0±0.8
1.25mM	87.5±5.5*	12.5 μM	89.3±3.0*	A A1.25mM+ CdCl <sub>2</sub> 12.5 μM	76.1±9.3
2.50mM	78.7±1.3*	25.0 μM	79.2±1.9*	AA2.50mM+ CdCl <sub>2</sub> 25.0 μM	46.9±5.2*
5.00mM	57.7±1.5*	50.0 μM	61.2±1.3*	AA5.00mM+ CdCl <sub>2</sub> 50.0 μM	30.5±0.8*
10.00mM	46.9±1.6*	100.0 μM	48.5±1.8*	AA 10.00mM+ CdCl <sub>2</sub> 100.0 μM	15.1±2.5*
20.00mM	28.3±3.8*	200.0 μM	24.4±4.6*	—	—

註:1.乙醛與氯化鎘均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對細胞代謝活性之差異。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)。

4.FV(%): fluorescence value (% of control)

5.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

6.---: 表示 no test

表 7.不同高劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 4 小時下, 對 V79 細胞基因突變之影響.

Acetaldehyde Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	$\text{CdCl}_2$ Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	Co-exposure A.A& $\text{CdCl}_2$ Dose	Mutant number $1 \times 10^5$
0.00mM	3.9 $\pm$ 1.3	0.00mM	3.9 $\pm$ 1.3	0.00mM	3.9 $\pm$ 1.3
0.65mM	10.3 $\pm$ 1.2*	6.25 $\mu\text{M}$	8.5 $\pm$ 1.6	AA0.625mM+ $\text{CdCl}_2$ 6.25 $\mu\text{M}$	29.4 $\pm$ 1.3*
1.25mM	23.0 $\pm$ 1.7*	12.50 $\mu\text{M}$	14.2 $\pm$ 1.8*	AA1.25mM+ $\text{CdCl}_2$ 12.50 $\mu\text{M}$	39.0 $\pm$ 1.5*
2.50mM	29.6 $\pm$ 1.8*	25.00 $\mu\text{M}$	20.8 $\pm$ 1.9*	AA 2.50mM+ $\text{CdCl}_2$ 25.0 $\mu\text{M}$	52.4 $\pm$ 1.7*
5.00mM	36.4 $\pm$ 1.6*	50.00 $\mu\text{M}$	26.3 $\pm$ 0.7*	AA 5.0mM+ $\text{CdCl}_2$ 50.0 $\mu\text{M}$	63.7 $\pm$ 1.6*
10.00mM	39.2 $\pm$ 0.7*	100.00 $\mu\text{M}$	31.0 $\pm$ 1.5*	AA 10.0mM+ $\text{CdCl}_2$ 100.0 $\mu\text{M}$	75.6 $\pm$ 2.4*
20.00mM	46.0 $\pm$ 1.1*	200.00 $\mu\text{M}$	37.9 $\pm$ 2.1*	---	---

註:1.乙醛與氯化鎘均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對突變頻率之影響.

2. control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)。

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

5.---: 表示 no test

表 8. 低劑量之氯化鎘與乙醛共同暴露 72 小時, 對細胞存活率之影響.

Acetaldehyde Dose	Relative cell survival (%)	CdCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival (%)	Co-exposure A.A&CdCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival (%)
0.0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 1.1	0.00 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 1.1	0.00 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 1.1
125.0 $\mu$ M	95.3 $\pm$ 2.5	1.25 $\mu$ M	93.4 $\pm$ 2.3	AA125 $\mu$ M + CdCl <sub>2</sub> 1.25 $\mu$ M	75.3 $\pm$ 3.2*
250.0 $\mu$ M	86.1 $\pm$ 2.2*	2.50 $\mu$ M	82.5 $\pm$ 1.1*	AA 250 $\mu$ M+ CdCl <sub>2</sub> 2.50 $\mu$ M	61.3 $\pm$ 2.8*
500.0 $\mu$ M	78.2 $\pm$ 1.7*	5.00 $\mu$ M	72.3 $\pm$ 2.5*	AA 500 $\mu$ M+ CdCl <sub>2</sub> 5.00 $\mu$ M	48.4 $\pm$ 2.6*
1000.0 $\mu$ M	65.7 $\pm$ 3.5*	10.00 $\mu$ M	61.2 $\pm$ 2.3*	---	---

註:1. 乙醛與氯化鎘均選取相似之細胞致死劑量的濃度, 同時加入 V79 細胞, 比較單一毒物與複合毒物暴露對細胞存活率之影響.

2. control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3. 每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)。

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

5. ---: 表示 no test

表 9.不同低劑量之氯化鎘與共同暴露 72 小時下，對 V79 細胞代謝活性之影響。

Acetaldehyde Dose	FV%	CdCl <sub>2</sub> Dose	FV%	Co-exposure A.A.&CdCl <sub>2</sub> Dose	FV%
0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.9	0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.9	0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.9
125 $\mu$ M	95.2 $\pm$ 1.2*	1.25 $\mu$ M	93.2 $\pm$ 1.3*	CdCl <sub>2</sub> 1.25 $\mu$ M +A.A 125 $\mu$ M	82.3 $\pm$ 1.3*
250 $\mu$ M	89.4 $\pm$ 1.3*	2.50 $\mu$ M	85.3 $\pm$ 2.9*	CdCl <sub>2</sub> 2.50 $\mu$ M +A.A 250 $\mu$ M	70.9 $\pm$ 2.0*
500 $\mu$ M	80.3 $\pm$ 2.5*	5.00 $\mu$ M	76.2 $\pm$ 2.3*	CdCl <sub>2</sub> 5.00 $\mu$ M +A.A 500 $\mu$ M	50.4 $\pm$ 1.7*
1000 $\mu$ M	70.8 $\pm$ 2.5*	10.00 $\mu$ M	64.5 $\pm$ 3.1*	---	---

註:1.乙醛與氯化鎘均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與

共同毒物暴露對細胞代謝活性之差異。

2. control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組,並求其平均值(n=4)。

4.FV(%): fluorescence value (% of control)

5.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

6.--: 表示 no test

表 10.不同低劑量氯化鎘與乙醛共同暴露 72 小時下,對 V79 細胞突變頻率之影響.

Acetaldehyde Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	CdCl <sub>2</sub> Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	Co-exposure A.A&CdCl <sub>2</sub> Dose	Mutant number $1 \times 10^5$
0 $\mu$ M	1.2 $\pm$ 0.7	0 $\mu$ M	1.2 $\pm$ 0.7	0 $\mu$ M	1.2 $\pm$ 0.7
62.5 $\mu$ M	3.7 $\pm$ 0.9*	0.63 $\mu$ M	6.7 $\pm$ 1.2*	CdCl <sub>2</sub> 0.625 $\mu$ M +A.A 62.5 $\mu$ M	21.4 $\pm$ 2.3*
125 $\mu$ M	10.2 $\pm$ 2.2*	1.25 $\mu$ M	13.1 $\pm$ 3.3*	CdCl <sub>2</sub> 1.25 $\mu$ M +A.A 125 $\mu$ M	30.3 $\pm$ 2.5*
250 $\mu$ M	17.4 $\pm$ 2.1*	2.50 $\mu$ M	22.8 $\pm$ 1.9*	CdCl <sub>2</sub> 2.50 $\mu$ M +A.A 250 $\mu$ M	47.3 $\pm$ 3.4*
500 $\mu$ M	26.6 $\pm$ 3.6*	5.00 $\mu$ M	29.3 $\pm$ 2.7*	CdCl <sub>2</sub> 5.00 $\mu$ M +A.A 500 $\mu$ M	62.4 $\pm$ 2.8*
1000 $\mu$ M	41.2 $\pm$ 2.7*	10.00 $\mu$ M	48.5 $\pm$ 2.5*	---	---

註:1.乙醛與氯化鎘均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對突變頻率之影響。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組,並求其平均值(n=4)

4.\*:表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

5.---:表示 no test

表 11.高劑量之氯化鉛及乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時,對於細胞存活率及突變頻率之影響.

PbCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells		V79 cells(add 1.25mM AA)	
	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>
0.000mM	100.0±3.1	1.5±0.8	95.7±2.8	7.5±2.3
0.125mM	96.3±2.4	15.7±2.6*	92.6±2.6	26.4±3.2*
0.250mM	90.1±1.5*	22.4±2.5*	82.1±1.9*	40.6±3.2*
0.500mM	76.3±2.4*	33.4±0.9*	59.7±2.4*	55.6±2.9*
1.000mM	62.6±0.6*	50.3±2.1*	46.3±2.1*	69.7±2.6*
2.000mM	38.3±2.5*	76.8±2.6*	28.4±2.5*	88.1±2.5*

註: control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)

\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

AA : Acetaldehyde

表 12. 高劑量之氯化鉛及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.

PbCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells	V79 cells (add 1.25mMAA)
	FV(%)	FV(%)
0.000mM	100.0±1.2	97.6±1.6
0.125mM	95.3±3.1	96.2±2.9
0.250mM	90.4±2.6	85.2±3.1*
0.500mM	74.5±4.1*	62.1±0.8*
1.000mM	56.4±4.4*	45.3±2.2*
2.000mM	47.1±1.7*	34.3±0.9*

註:

control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組, 並求其平均值。

FV(%) : fluorescence value (% of control)

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ ).

AA : Acetaldehyde

表 13. 低劑量之氯化鉛及乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時，對於細胞存活率及突變頻率之影響。

PbCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells		V79 cells(add 125 μM AA)	
	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>
0.00 μM	100.0±1.7	1.8±0.6	96.9±2.1	12.9±1.2
12.5 μM	89.5±3.9*	9.3±0.6*	76.7±2.3*	20.6±2.4*
25.0 μM	76.7±2.4*	29.3±1.3*	58.4±1.5*	55.7±4.5*
50.0 μM	62.4±3.2*	34.8±2.2*	47.6±2.0*	70.6±2.4*
100.0 μM	49.7±2.1*	58.7±1.6*	36.9±2.6*	93.1±2.7*

註:

control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組，並求其平均值(n=4)

\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

AA : Acetaldehyde



表 14. 低劑量之氯化鉛及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時，對於 Alamar blue 代謝活性之影響。

PbCl <sub>2</sub> Dose	V79 cells	V79 cells (add 125 μMAA)
	FV(%)	FV(%)
0.0 μM	100.0±1.2	98.2±1.6
12.5 μM	95.4±2.6	97.2±3.9
25.0 μM	86.1±1.4*	80.6±0.8*
50.0 μM	65.3±1.2*	53.7±1.9*
100.0 μM	42.8±0.9*	35.7±1.5*

註:

control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組，並求其平均值(n=4)

FV(%) : fluorescence value (% of control)

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

AA : Acetaldehyde

表 15.不同高劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下，對 V79 細胞細胞存活率之影響。

Acetaldehyde Dose	Relative cell survival %	PbCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival %	Co-exposure A.A& PbCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival %
0.00mM	100.0±0.8	0.00mM	100.0±0.8	0.00mM	100.0±0.8
1.25mM	95.3±3.1	0.125mM	98.6±3.4	PbCl <sub>2</sub> 0.125mM +A.A 1.25mM	90.3±2.3*
2.50mM	84.1±4.4*	0.250mM	90.6±2.2*	PbCl <sub>2</sub> 0.25mM +A.A 2.50mM	66.9±2.4*
5.00mM	68.3±3.2*	0.500mM	80.3±4.1*	PbCl <sub>2</sub> 0.50mM +A.A 5.00mM	36.9±1.5*
10.00mM	52.6±3.1*	1.000mM	59.6±5.4*	PbCl <sub>2</sub> 1.00mM +A.A 10.00mM	20.5±2.8*
20.00mM	43.5±2.3	2.000mM	42.1±2.0	---	--

註: 1. 乙醛與氯化鉛均選取相似之細胞致死劑量的濃度，同時加入 V79 細胞，比較單一毒物與複合毒物暴露對細胞存活率之影響。

2. control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3. 每組試驗均做 4 組，並求其平均值。

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之( $P < 0.05$ )。

5.--: 表示 no test

表 16.不同高劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 4 小時下，對 V79 細胞代謝活性之影響。

Acetaldehyde Dose	FV %	PbCl <sub>2</sub> Dose	FV %	Co-exposure A.A& PbCl <sub>2</sub> Dose	FV %
0.00mM	100.0±1.3	0.00mM	100.0±1.3	0.00mM	100.0±1.3
1.25mM	94.6±5.5	0.125mM	96.3±3.1	PbCl <sub>2</sub> 0.125mM +A.A 1.25mM	86.9±10.1
2.50mM	78.7±4.3*	0.250mM	87.9±5.2*	PbCl <sub>2</sub> 0.25mM +A.A 2.50mM	48.9±4.3*
5.00mM	57.7±7.5*	0.500mM	63.6±3.8*	PbCl <sub>2</sub> 0.50mM +A.A 5.00mM	31.5±2.7*
10.00mM	46.9±5.6*	1.000mM	50.8±4.1*	PbCl <sub>2</sub> 1.00mM +A.A10.00mM	18.2±2.3*
20.00mM	28.3±3.8*	2.000mM	27.6±3.4*	---	---

註: 1.乙醛與氯化鉛均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對細胞代謝活性之差異。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)。

4.FV(%): fluorescence value (% of control)

5.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

6.---: 表示 no test

表 17. 不同高劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 4 小時下, 對 V79 細胞基因突變之影響.

Acetaldehyde Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	PbCl <sub>2</sub> Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	Co-exposure A.A. & PbCl <sub>2</sub> Dose	Mutant number $1 \times 10^5$
0.00mM	1.8±0.3	0.000mM	1.8±0.3	0.000mM	1.8±0.3
---	---	---	---	PbCl <sub>2</sub> 0.0625mM + A.A 0.625mM	24.3±2.1*
1.25mM	18.2±1.4*	0.125mM	20.1±1.6*	PbCl <sub>2</sub> 0.125mM + A.A 1.25mM	41.3±1.8*
2.50mM	24.1±1.1*	0.250mM	26.1±2.1*	PbCl <sub>2</sub> 0.25mM + A.A 2.50mM	60.3±2.3*
5.00mM	30.1±1.3*	0.500mM	31.7±2.1*	PbCl <sub>2</sub> 0.50mM + A.A 5.00mM	72.3±2.1*
10.00mM	35.2±2.3*	1.000mM	42.7±2.4*	PbCl <sub>2</sub> 0.10mM + A.A 10.0mM	84.2±3.1*
20.00mM	48.2±1.9*	2.000mM	59.7±3.5*	---	---

註: 1. 乙醛與氯化鉛均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中, 比較單一毒物與共同毒物暴露對突變頻率之影響。

2. control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3. 每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

5.--: 表示 no test

表 18.不同低劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下，對 V79 細胞細胞存活率之影響。

Acetaldehyde Dose	Relative cell survival %	PbCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival %	Co-exposure A.A& PbCl <sub>2</sub> Dose	Relative cell survival %
0 μM	100.0±1.1	0 μM	100.0±1.1	0 μM	100.0±1.1
125 μM	93.4±3.4	12.5 μM	99.4±2.0	PbCl <sub>2</sub> 1.25 μM +A.A125 μM	88.7±3.1*
250 μM	83.3±1.6*	25.0 μM	96.5±3.0	PbCl <sub>2</sub> 2.50 μM +A.A 250 μM	76.2±4.0*
500 μM	75.5±2.2*	50.0 μM	82.9±3.4*	PbCl <sub>2</sub> 5.00 μM +A.A500 μM	52.3±2.5*
1000 μM	68.0±1.9*	100.0 μM	74.1±3.2*	PbCl <sub>2</sub> 10.0 μM +A.A1000 μM	40.6±3.2*

註: 1.乙醛與氯化鉛均選取相似之細胞致死劑量的濃度，同時加入 V79 細胞，比較單一毒物與複合毒物暴露對細胞存活率之影響。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組，並求其平均值。

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之(P<0.05)

5.--: 表示 no test

表 19.不同低劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下，對 V79 細胞代謝活性之影響。

Acetaldehyde Dose	FV %	PbCl <sub>2</sub> Dose	FV %	Co-exposure A.A& PbCl <sub>2</sub> Dose	FV %
0 μM	100.0±0.9	0 μM	100.0±0.9	0 μM	100.0±0.9
125 μM	95.2±3.2	12.5 μM	94.1±2.2*	PbCl <sub>2</sub> 12.5 μM +A.A125 μM	90.1±3.5*
250 μM	89.4±2.3*	25.0 μM	87.4±2.1*	PbCl <sub>2</sub> 25.0 μM +A.A 250 μM	75.3±2.3*
500 μM	80.3±4.5*	50.0 μM	72.6±2.1*	PbCl <sub>2</sub> 50.0 μM +A.A 500 μM	42.1±2.1*
1000 μM	70.8±2.5*	100.0 μM	62.2±3.1*	PbCl <sub>2</sub> 100.0 μM +A.A1000 μM	23.7±2.3*

註: 1.乙醛與氯化鉛均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對細胞代謝活性之差異。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)。

4.FV(%): fluorescence value (% of control)

5.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

6.--: 表示 no test

表 20.不同低劑量之氯化鉛與乙醛共同暴露 72 小時下，對 V79 細胞突變頻率之影響。

Acetaldehyde Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	PbCl <sub>2</sub> Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	Co-exposure A.A& PbCl <sub>2</sub> Dose	Mutant number $1 \times 10^5$
0 $\mu$ M	1.5 $\pm$ 0.7	0 $\mu$ M	1.5 $\pm$ 0.7	0 $\mu$ M	1.5 $\pm$ 0.7
62.5 $\pm$ 1.M	3.8 $\pm$ 0.8	6.25 $\mu$ M	8.4 $\pm$ 1.8	PbCl <sub>2</sub> 6.25 $\mu$ M +A.A 62.5 $\mu$ M	21.2 $\pm$ 1.8*
125 $\mu$ M	7.2 $\pm$ 1.4*	12.5 $\mu$ M	17.6 $\pm$ 1.5*	PbCl <sub>2</sub> 12.5 $\mu$ M +A.A 125 $\mu$ M	32.2 $\pm$ 2.7*
250 $\mu$ M	11.6 $\pm$ 1.1*	25.0 $\mu$ M	27.8 $\pm$ 1.4*	PbCl <sub>2</sub> 25.0 $\mu$ M +A.A 250 $\mu$ M	46.3 $\pm$ 3.4*
500 $\mu$ M	27.4 $\pm$ 1.6*	50.0 $\mu$ M	40.6 $\pm$ 1.6*	PbCl <sub>2</sub> 50.0 $\mu$ M +A.A 500 $\mu$ M	75.4 $\pm$ 1.3*
1000 $\mu$ M	39.6 $\pm$ 2.4*	100.0 $\mu$ M	63.4 $\pm$ 3.8*	---	---

註: 1. 乙醛與氯化鉛均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中, 比較單一毒物與共同毒物暴露對突變頻率之影響。

2. control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3. 每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

5.---: 表示 no test

表 21. 高劑量之重鉻酸鉀及乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響。

K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	V79 cells		V79 cells(add 1.25mM AA)	
	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>	Relative cell survival(%)	Mutant number 1x10 <sup>5</sup>
0.0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 1.5	1.2 $\pm$ 0.6	94.2 $\pm$ 3.3	7.2 $\pm$ 1.5
4.0 $\mu$ M	91.2 $\pm$ 2.3*	7.6 $\pm$ 1.2*	88.2 $\pm$ 2.5*	12.3 $\pm$ 2.4*
8.0 $\mu$ M	80.3 $\pm$ 2.1*	15.6 $\pm$ 2.4*	74.3 $\pm$ 1.6*	36.3 $\pm$ 2.4*
16.0 $\mu$ M	53.1 $\pm$ 2.4*	24.3 $\pm$ 2.1*	42.6 $\pm$ 1.9*	57.3 $\pm$ 1.8*
32.0 $\mu$ M	36.6 $\pm$ 2.6*	31.2 $\pm$ 2.5*	25.4 $\pm$ 2.7*	63.4 $\pm$ 2.4*

註:

control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)

\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

AA : Acetaldehyde



表 22. 高劑量之重鉻酸鉀及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 4 小時, 對於 Alamar blue 代謝活性之影響.

K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	V79 cells	V79 cells (add 1.25mM AA)
	FV(%)	FV(%)
0.0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 1.2	97.6 $\pm$ 1.6
4.0 $\mu$ M	92.4 $\pm$ 2.6*	88.3 $\pm$ 2.3*
8.0 $\mu$ M	79.3 $\pm$ 3.4*	66.4 $\pm$ 1.3*
16.0 $\mu$ M	54.1 $\pm$ 3.2*	43.6 $\pm$ 3.1*
32.0 $\mu$ M	38.6 $\pm$ 0.9*	22.4 $\pm$ 2.3*

註:

control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組, 並求其平均值。

FV(%) : fluorescence value (% of control)

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05).

AA : Acetaldehyde

表 23 .低劑量之重鉻酸鉀及微量乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時, 對於細胞存活率及突變頻率之影響.

K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	V79 cells		V79 cells(add 125 $\mu$ MAA)	
	Relative cell survival(%)	Mutant number 1 $\times$ 10 <sup>5</sup>	Relative cell survival(%)	Mutant number 1 $\times$ 10 <sup>5</sup>
0.0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 1.1	1.8 $\pm$ 0.8	96.9 $\pm$ 2.1	5.2 $\pm$ 1.2
0.4 $\mu$ M	92.3 $\pm$ 3.9*	6.9 $\pm$ 1.1*	88.6 $\pm$ 3.6*	22.3 $\pm$ 2.4*
0.8 $\mu$ M	84.6 $\pm$ 2.1*	12.5 $\pm$ 1.8*	72.3 $\pm$ 2.2*	35.3 $\pm$ 2.2*
1.6 $\mu$ M	71.3 $\pm$ 2.4*	25.4 $\pm$ 2.1*	57.5 $\pm$ 2.1*	51.7 $\pm$ 1.8*
3.2 $\mu$ M	52.3 $\pm$ 2.5*	41.2 $\pm$ 2.3*	25.6 $\pm$ 3.2*	78.3 $\pm$ 2.5*

註:

control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)

\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

AA : Acetaldehyde

表 24. 低劑量之重鉻酸鉀及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞 72 小時，對於 Alamar blue 代謝活性之影響。

K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	V79 cells	V79 cells (add 125 μMAA)
	FV(%)	FV(%)
0.0 μM	100.0±1.2	98.4±1.6
0.4 μM	95.3±3.3*	87.2±1.5*
0.8 μM	79.5±2.0*	73.1±0.9*
1.6 μM	72.5±1.8*	59.3±2.4*
3.2 μM	50.3±2.3*	42.8±2.2*

註:

control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

每組試驗均做 4 組，並求其平均值。

FV(%) : fluorescence value (% of control)

\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ ).

AA : Acetaldehyde

表 25.不同高劑量重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞株細胞存活率之影響.

Acetaldehyde Dose	Relative cell survival %	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	Relative cell survival %	Co-exposure A.A& K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	Relative cell survival %
0.0 mM	100.0±0.6	0 μM	100.0±0.6	0 μM	100.0±0.6
1.25 mM	96.3±2.4	2.0 μM	94.3±2.2*	Cr 2.0 μM +A.A 1.25mM	89.2±5.3*
2.50 mM	82.3±2.2*	4.0 μM	78.9±2.3*	Cr 4.0 μM +A.A 2.50mM	55.7±3.1*
5.00mM	67.6±2.1*	8.0 μM	66.3±2.6*	Cr 8.0 μM +A.A 5.00mM	38.3±2.6*
10.00mM	56.3±3.2*	16.0 μM	52.6±2.3*	Cr 16.0 μM +A.A 10.00mM	20.6±2.6*
20.00 mM	43.2±2.3*	32.0 μM	36.5±1.6*	Cr 32.0 μM +A.A20.00mM	13.3±1.2*

註: 1.乙醛與重鉻酸鉀均選取相似之細胞致死劑量的濃度, 同時加入 V79 細胞, 比較單一毒物與複合毒物暴露對細胞存活率之影響。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值。

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之( $P < 0.05$ )

5.--: 表示 no test

表 26.不同高劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露4小時下,對V79細胞代謝活性之影響.

Acetaldehyde Dose	FV %	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	FV %	Co-exposure A.A& K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	FV %
0.00mM	100±1.1	0.0 μM	100±1.1	0.00mM	100±1.1
1.25mM	92.4±5.5	2.0 μM	90.3±8.7	Cr 2.0 μM +A.A 1.25mM	78.7±8.3*
2.50mM	78.7±1.3*	4.0 μM	69.8±1.9*	Cr 4.0 μM +A.A 2.50mM	43.4±3.2*
5.00mM	57.7±1.5*	8.0 μM	52.6±1.2*	Cr 8.0 μM +A.A 5.00mM	24.4±2.3*
10.00mM	41.9±1.6*	16.0 μM	37.2±1.5*	Cr 16.0 μM +A.A 10.00mM	11.3±4.3*
20.00mM	28.3±3.8*	32.0 μM	22.6±2.4*	---	---

註: 1.乙醛與重鉻酸鉀均選取具有相似之細胞致死率同時加入V79細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對細胞代謝活性之差異。

2.control組之V79細胞數目為 $2.5 \times 10^5$ 個/ml。

3.每組試驗均做4組,並求其平均值(n=4)。

4.FV(%): fluorescence value (% of control)

5.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

6.---: 表示 no test

表 27.不同高劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 72 小時下,對 V79 細胞突變頻率之影響.

Acetaldehyde Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	$K_2Cr_2O_7$ Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	Co-exposure A.A& $K_2Cr_2O_7$ Dose	Mutant number $1 \times 10^5$
0.00mM	1.8±0.5	0 $\mu M$	1.8±0.5	0 $\mu M$	1.8±0.5
1.25mM	8.1±1.3*	2.0 $\mu M$	4.8±0.6	Cr 2.0 $\mu M$ +A.A 1.25mM	21.5±1.8*
2.50mM	20.3±1.7*	4.0 $\mu M$	5.4±0.3	Cr 4.0 $\mu M$ +A.A 2.5mM	45.3±1.5*
5.00mM	31.5±2.4*	8.0 $\mu M$	11.3±0.8*	Cr 8.0 $\mu M$ +A.A 5.0mM	50.9±1.4*
10.00mM	45.7±2.3*	16.0 $\mu M$	26.4±2.5*	Cr 16.0 $\mu M$ +A.A 10.0mM	71.4±1.2*
20.00mM	61.3±2.8*	32.0 $\mu M$	52.4±2.3*	---	---

註: 1.乙醛與重鉻酸鉀均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對突變頻率之影響。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組,並求其平均值(n=4)

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

5.---: 表示 no test

表 28.不同低劑量鉻(chromium)與乙醛(acetaldehyde) 共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞細胞存活率之影響.

Acetaldehyde Dose	Relative cell survival %	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	Relative cell survival %	Co-exposure A.A& K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	Relative cell survival %
0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.8	0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.8	0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.8
125 $\mu$ M	96.9 $\pm$ 4.2	0.4 $\mu$ M	98.8 $\pm$ 1.8	Cr 0.4 $\mu$ M +A.A125 $\mu$ M	88.7 $\pm$ 3.1*
250 $\mu$ M	94.4 $\pm$ 1.5	0.8 $\mu$ M	93.8 $\pm$ 2.5	Cr 0.8 $\mu$ M +A.A 250 $\mu$ M	80.6 $\pm$ 4.0*
500 $\mu$ M	85.9 $\pm$ 2.5*	1.6 $\mu$ M	80.2 $\pm$ 2.5*	Cr 1.6 $\mu$ M +A.A500 $\mu$ M	41.5 $\pm$ 2.5*
1000 $\mu$ M	69.6 $\pm$ 2.8*	3.2 $\mu$ M	70.9 $\pm$ 1.6*	Cr 3.2 $\mu$ M +A.A1000 $\mu$ M	34.6 $\pm$ 3.2*

註: 1.乙醛與重鉻酸鉀均選取相似之細胞致死劑量的濃度, 同時加入 V79 細胞, 比較單一毒物與複合毒物暴露對細胞存活率之影響。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值。

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之(P<0.05)

5.--: 表示 no test

表 29.不同低劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 72 小時下,對 V79 細胞代謝活性之影響.

Acetaldehyde Dose	Viability %	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	Viability %	Co-exposure A.A& K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Dose	Viability %
0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.9	0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.9	0 $\mu$ M	100.0 $\pm$ 0.9
125 $\mu$ M	95.2 $\pm$ 3.2	0.4 $\mu$ M	97.2 $\pm$ 4.1	Cr 0.4 $\mu$ M +A.A 125 $\mu$ M	92.6 $\pm$ 3.5*
250 $\mu$ M	92.1 $\pm$ 2.3	0.8 $\mu$ M	90.3 $\pm$ 1.9*	Cd 0.8 $\mu$ M +A.A 250 $\mu$ M	79.2 $\pm$ 1.3*
500 $\mu$ M	85.3 $\pm$ 1.5*	1.6 $\mu$ M	83.2 $\pm$ 2.2*	Cd 1.6 $\mu$ M +A.A 500 $\mu$ M	60.2 $\pm$ 2.7*
1000 $\mu$ M	70.8 $\pm$ 2.5*	3.2 $\mu$ M	72.6 $\pm$ 4.3*	---	---

註: 1.乙醛與重鉻酸鉀均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對細胞代謝活性之差異。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)。

4.FV(%): fluorescence value (% of control)

5.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

6.--: 表示 no test



表 30.不同低劑量之重鉻酸鉀與乙醛共同暴露 72 小時下, 對 V79 細胞突變頻率之影響.

Acetaldehyde Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	$K_2Cr_2O_7$ Dose	Mutant number $1 \times 10^5$	Co-exposure A.A& $K_2Cr_2O_7$ Dose	Mutant number $1 \times 10^5$
0 $\mu M$	1.5 $\pm$ 0.8	0 $\mu M$	1.5 $\pm$ 0.8	0 $\mu M$	1.5 $\pm$ 0.8
62.5 $\mu M$	7.6 $\pm$ 0.6*	0.2 $\mu M$	6.8 $\pm$ 1.3*	Cr 0.2 $\mu M$ +A.A 62.5 $\mu M$	15.3 $\pm$ 0.4*
125 $\mu M$	11.3 $\pm$ 1.1*	0.4 $\mu M$	8.4 $\pm$ 0.7	Cr 0.4 $\mu M$ +A.A 125 $\mu M$	22.3 $\pm$ 1.0*
250 $\mu M$	18.4 $\pm$ 2.2*	0.8 $\mu M$	12.3 $\pm$ 1.4*	Cr 0.8 $\mu M$ +A.A 250 $\mu M$	41.2 $\pm$ 2.2*
500 $\mu M$	29.2 $\pm$ 2.0*	1.6 $\mu M$	22.4 $\pm$ 2.1*	Cr 1.6 $\mu M$ +A.A 500 $\mu M$	59.6 $\pm$ 2.3*
1000 $\mu M$	48.1 $\pm$ 1.3*	3.2 $\mu M$	35.1 $\pm$ 2.4*	---	---

註: 1.乙醛與重鉻酸鉀均選取具有相似之細胞致死率同時加入 V79 細胞中,比較單一毒物與共同毒物暴露對突變頻率之影響。

2.control 組之 V79 細胞數目為  $2.5 \times 10^5$  個/ml。

3.每組試驗均做 4 組, 並求其平均值(n=4)

4.\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異(P<0.05)。

5.---: 表示 no test

表 31. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，其預期相對致死率及實際相對致死率之差異

Mixture	Observed Relative mortality (%)	Predicted Relative mortality (%)	Interaction
25 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	36.7 $\pm$ 4.1	26.0 $\pm$ 4.3	>+
50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	52.5 $\pm$ 2.2	39.5 $\pm$ 4.3	>+
100 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	61.5 $\pm$ 3.2	54.0 $\pm$ 3.7	>+
200 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	72.4 $\pm$ 3.1	63.7 $\pm$ 3.2	>+
0.25 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	17.9 $\pm$ 3.6	13.8 $\pm$ 5.4	+
0.50 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	40.3 $\pm$ 3.9	27.0 $\pm$ 5.7	>+
1.00 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	53.7 $\pm$ 3.7	40.1 $\pm$ 5.2	>+
2.00 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	71.6 $\pm$ 4.0	59.0 $\pm$ 5.8	>+
16.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM Aa*	57.4 $\pm$ 2.4	50.0 $\pm$ 4.6	>+
32.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM Aa*	74.6 $\pm$ 3.1	65.5 $\pm$ 4.7	>+

以 trypan blue exclusion 試驗分析預期死亡率活性及實際死亡率

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 32. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，其預期致死率及實際致死率之差異

Mixture	Observed mortality (%)	Predicted mortality(%)	Interaction
100 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	47.6 $\pm$ 3.5	36.0 $\pm$ 4.2	> +
200 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	53.0 $\pm$ 3.1	64.9 $\pm$ 4.6	> +
0.50 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	23.6 $\pm$ 2.7	18.1 $\pm$ 3.8	+
1.00 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	42.9 $\pm$ 2.4	35.2 $\pm$ 3.8	> +
2.00 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	57.4 $\pm$ 2.5	46.2 $\pm$ 3.6	> +
8.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA*	27.4 $\pm$ 3.0	20.2 $\pm$ 3.7	> +
16.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA*	40.3 $\pm$ 2.7	32.9 $\pm$ 3.6	> +
32.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA*	54.8 $\pm$ 2.5	48.9 $\pm$ 3.7	> +

以 Propidium iodide 試驗分析預期死亡率活性及實際死亡率。

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 33. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，其預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性之差異

Mixture	Observed inhibit ratio(%)	Predicted inhibit ratio(%)	Interaction
50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	27.9 $\pm$ 2.8	23.3 $\pm$ 5.1	+
100 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	54.7 $\pm$ 4.1	50.7 $\pm$ 4.4	>+
200 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	75.7 $\pm$ 2.7	68.5 $\pm$ 4.5	>+
0.25 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	14.8 $\pm$ 3.3	11.8 $\pm$ 3.5	+
0.50 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	37.9 $\pm$ 1.2	27.3 $\pm$ 4.7	>+
1.00 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	54.7 $\pm$ 2.5	45.0 $\pm$ 5.0	>+
2.00 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA*	65.7 $\pm$ 1.5	54.0 $\pm$ 2.9	>+
8.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA *	33.6 $\pm$ 1.8	22.6 $\pm$ 4.1	>+
16.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA *	56.4 $\pm$ 3.3	47.2 $\pm$ 4.0	>+
32.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA *	77.6 $\pm$ 2.6	62.3 $\pm$ 2.5	>+

以 Alamar blue 試驗分析預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性。

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 34. 高劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，比較預期突變株數目及實際突變株數目之差異

Mixture	Observed Mutant number $1 \times 10^5$	Predicted Mutant number $1 \times 10^5$	Interaction factor
25.0 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	56.0 $\pm$ 3.0	53.7 $\pm$ 3.0	+
50.0 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	86.7 $\pm$ 2.7	81.4 $\pm$ 3.9	+
100.0 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	111.6 $\pm$ 4.3	91.6 $\pm$ 3.1	>+
200.0 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	130.5 $\pm$ 6.4	107.2 $\pm$ 3.0	>+
0.250 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	39.1 $\pm$ 3.3	26.9 $\pm$ 3.6	>+
0.500 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	54.1 $\pm$ 3.0	37.9 $\pm$ 2.6	>+
1.000 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	68.2 $\pm$ 2.7	54.8 $\pm$ 3.2	>+
2.000 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	86.2 $\pm$ 2.6	81.3 $\pm$ 3.6	+
8.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA	35.1 $\pm$ 2.5	20.4 $\pm$ 2.9	>+
16.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA	56.1 $\pm$ 1.9	29.1 $\pm$ 2.6	>+
32.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA	62.2 $\pm$ 2.5	36.0 $\pm$ 3.0	>+

$$IF(\text{interaction}) = (\text{OM-control}) - [(\text{A-control}) + (\text{B-control})]$$

A negative IF denotes antagonism, a positive IF denotes synergism and a zero IF denotes additive.

表 35. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，其預期相對致死率及實際相對致死率之差異

Mixture	Observed Relative mortality (%)	Predicted Relative mortality (%)	Interaction
1.25 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	27.9 $\pm$ 4.2	15.6 $\pm$ 4.6	>+
2.50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	40.7 $\pm$ 3.7	29.3 $\pm$ 4.8	>+
5.00 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	57.5 $\pm$ 2.6	43.5 $\pm$ 4.4	>+
10.00 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	68.5 $\pm$ 3.1	57.6 $\pm$ 3.9	>+
12.5 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	23.3 $\pm$ 2.9	13.3 $\pm$ 5.0	+
25.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	41.6 $\pm$ 2.3	25.7 $\pm$ 4.0	>+
50.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	52.4 $\pm$ 2.6	39.5 $\pm$ 4.2	>+
100.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	63.1 $\pm$ 3.1	52.8 $\pm$ 3.8	>+
0.8 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ M AA*	27.7 $\pm$ 2.5	18.0 $\pm$ 3.4	>+
1.6 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ M AA*	42.5 $\pm$ 2.4	30.9 $\pm$ 3.5	>+
3.2 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ M AA*	74.4 $\pm$ 3.4	49.3 $\pm$ 3.6	>+

以 trypan blue exclusion 試驗分析預期死亡率活性及實際死亡率

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 36. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，其預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性之差異

Mixture	Observed inhibit ratio(%)	Predicted inhibit ratio(%)	Interaction
2.50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	24.8±1.3	15.8±2.6	> +
5.00 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	44.6±2.6	31.5±3.5	> +
10.00 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	70.4±1.4	59.4±2.8	> +
25.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA *	19.4±1.4	14.2±2.7	> +
50.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	46.3±2.2	35.0±4.0	> +
100.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	64.3±1.9	57.4±2.5	> +
0.4 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ MAA *	12.8±1.9	6.2±4.0	> +
0.8 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ MAA*	26.9±1.5	22.1±3.1	> +
1.6 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ MAA*	40.7±2.7	27.5±2.9	> +
3.2 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ MAA*	57.2±2.5	49.3±3.3	> +

以 Alamar blue 試驗分析預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性。

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 37. 低劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，比較預期突變株數目及實際突變株數目之差異

Mixture	Observed Mutant number $1 \times 10^5$	Predicted Mutant number $1 \times 10^5$	Interaction factor
1.25 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA *	32.5±2.7	20.4±2.7	>+
2.50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	49.3±3.2	31.6±2.9	>+
5.00 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	67.8±3.3	46.3±3.8	>+
10.00 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	86.0±2.7	60.7±4.3	>+
25.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	53.9±4.6	38.6±1.9	>+
50.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	68.8±2.5	44.1±2.6	>+
100.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ M AA*	91.3±2.8	68.0±2.1	>+
0.4 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ M AA*	20.5±2.5	8.5±1.8	>+
0.8 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ M AA*	33.5±2.3	14.1±2.3	>+
1.6 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ M AA*	49.9±1.9	27.0±2.5	>+
3.2 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +125 $\mu$ M AA*	76.5±2.6	42.8±2.7	>+

IF(interaction)=(OM-control)-[(A-control)+(B-control)]

A negative IF denotes antagonism, a positive IF denotes synergism and a zero IF denotes additive.



表 38. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑量之重金屬化合物與乙醛共同暴露下，其預期相對致死率及實際相對致死率之差異

Mixture	Observed Relative mortality (%)	Predicted Relative mortality (%)	Interaction
25 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +2.5mM AA*	54.0 $\pm$ 2.8	38.4 $\pm$ 2.6	> +
50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +5.0mM AA*	71.2 $\pm$ 1.9	63.5 $\pm$ 2.8	> +
100 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +10.0mM AA *	84.0 $\pm$ 1.7	80.3 $\pm$ 1.6	> +
0.25 mM PbCl <sub>2</sub> +2.5mMAA*	33.1 $\pm$ 2.5	23.8 $\pm$ 5.0	> +
0.50 mM PbCl <sub>2</sub> +5.0mMAA*	63.1 $\pm$ 1.6	45.2 $\pm$ 5.3	> +
1.00 mM PbCl <sub>2</sub> +10.0mMAA*	79.5 $\pm$ 2.9	68.7 $\pm$ 2.3	> +
4.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +2.5mMAA*	44.3 $\pm$ 3.2	35.1 $\pm$ 3.3	> +
8.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +5.0mMAA*	61.7 $\pm$ 2.7	55.2 $\pm$ 3.4	> +
16.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +10.0mMAA*	79.4 $\pm$ 2.7	70.4 $\pm$ 4.0	> +

以 trypan blue exclusion 試驗分析預期死亡率活性及實際死亡率

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 39. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在高劑量之重金屬化合物與乙醛共同暴露下，其預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性之差異

Mixture	Observed inhibit ratio(%)	Predicted inhibit ratio(%)	Interaction
25 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +2.5mM AA*	51.3 $\pm$ 5.3	37.8 $\pm$ 2.6	> +
50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +5.0mM AA*	69.5 $\pm$ 1.1	64.7 $\pm$ 2.3	> +
100 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +10.0mM AA*	84.9 $\pm$ 2.6	77.3 $\pm$ 2.7	> +
0.25 mM PbCl <sub>2</sub> +2.5mMAA*	51.1 $\pm$ 4.5	30.8 $\pm$ 7.0	> +
0.50 mM PbCl <sub>2</sub> +5.0mMAA*	68.5 $\pm$ 3.0	63.3 $\pm$ 8.6	+
1.00 mM PbCl <sub>2</sub> +10.0mMAA*	81.8 $\pm$ 2.6	76.2 $\pm$ 7.2	+
4.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +2.5mMAA*	56.6 $\pm$ 3.4	44.9 $\pm$ 2.8	> +
8.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +5.0mMAA*	75.6 $\pm$ 2.5	69.6 $\pm$ 2.5	> +
16.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +10.0mM AA*	88.7 $\pm$ 4.4	84.5 $\pm$ 2.7	+

以 Alamar blue 試驗分析預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性。

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 40. 高劑量之重金屬化合物與乙醛共同暴露下，比較預期突變株數目及實際突變株數目之差異

Mixture	Observed Mutant number $1 \times 10^5$	Predicted Mutant number $1 \times 10^5$	Interaction factor
6.25 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +0.65mM AA	25.5±1.8	11.0±2.4	>+
12.5 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +1.25mM AA	35.1±2.0	29.4±2.8	>+
25.0 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +2.5mM AA	48.5±2.1	42.6±2.9	>+
50.0 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +5.0mM AA	59.8±2.1	54.9±2.2	>+
100.0 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +10.0mM AA	71.7±2.7	65.4±2.1	>+
0.125 mM PbCl <sub>2</sub> +1.25mMAA	39.5±1.9	34.7±2.1	>+
0.250 mM PbCl <sub>2</sub> +2.50mMAA	58.5±1.6	46.2±2.4	>+
0.500 mM PbCl <sub>2</sub> +5.00mMAA	70.5±1.5	61.2±2.5	>+
1.000 mM PbCl <sub>2</sub> +10.00mMAA	82.4±1.3	74.3±3.3	>+
2.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1.25mM AA	19.7±1.9	9.3±1.5	>+
4.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +2.50mM AA	43.5±1.6	22.1±1.8	>+
8.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +5.00mM AA	49.1±1.5	39.2±2.6	>+
16.0 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +10.00mM AA	75.6±1.3	68.5±3.4	>+

$$IF(\text{interaction}) = (OM\text{-control}) - [(A\text{-control}) + (B\text{-control})]$$

A negative IF denotes antagonism, a positive IF denotes synergism and a zero IF denotes additive.

表 41. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之重金屬化合物與乙醛共同暴露下，其預期相對致死率及實際相對致死率之差異

Mixture	Observed Relative mortality	Predicted Relative mortality	Interaction
1.25 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	24.7 $\pm$ 3.4	11.0 $\pm$ 3.7	>+
2.50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +250 $\mu$ MAA*	38.7 $\pm$ 3.0	30.6 $\pm$ 2.9	>+
5.00 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> +500 $\mu$ MAA*	51.6 $\pm$ 2.8	43.5 $\pm$ 3.4	>+
12.5 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +125 $\mu$ MAA*	11.3 $\pm$ 3.3	7.1 $\pm$ 4.2	+
25.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +250 $\mu$ MAA*	23.8 $\pm$ 4.2	19.6 $\pm$ 3.7	+
50.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +500 $\mu$ M AA*	47.7 $\pm$ 2.7	37.4 $\pm$ 4.3	>+
100.0 $\mu$ M PbCl <sub>2</sub> +1000 $\mu$ MAA*	59.4 $\pm$ 3.4	49.6 $\pm$ 4.1	>+
0.8 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +250 $\mu$ MAA*	19.4 $\pm$ 4.1	11.2 $\pm$ 3.1	>+
1.6 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +500 $\mu$ MAA*	58.5 $\pm$ 2.6	31.1 $\pm$ 3.7	>+
3.2 $\mu$ M K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +1000 $\mu$ MAA*	65.4 $\pm$ 3.3	50.7 $\pm$ 3.4	>+

以 trypan blue exclusion 試驗分析預期死亡率活性及實際死亡率

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 42. 以 independent joint action model 分析 V79 細胞在低劑量之重金屬化合物與乙醛共同暴露下，比較預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性之差異

Mixture	Observed inhibit ratio(%)	Predicted inhibit ratio(%)	Interaction
1.25 $\mu\text{M}$ CdCl <sub>2</sub> +125 $\mu\text{M}$ AA*	17.7 $\pm$ 1.6	11.3 $\pm$ 2.2	>+
2.50 $\mu\text{M}$ CdCl <sub>2</sub> +250 $\mu\text{M}$ AA*	29.1 $\pm$ 2.2	23.7 $\pm$ 2.7	>+
5.00 $\mu\text{M}$ CdCl <sub>2</sub> +500 $\mu\text{M}$ AA*	49.6 $\pm$ 1.9	38.8 $\pm$ 3.6	>+
25.0 $\mu\text{M}$ PbCl <sub>2</sub> +250 $\mu\text{M}$ AA*	24.7 $\pm$ 2.5	21.9 $\pm$ 3.4	+
50.0 $\mu\text{M}$ PbCl <sub>2</sub> +500 $\mu\text{M}$ AA*	57.9 $\pm$ 2.3	41.7 $\pm$ 5.1	>+
100.0 $\mu\text{M}$ PbCl <sub>2</sub> +1000 $\mu\text{M}$ AA*	76.3 $\pm$ 2.5	56.0 $\pm$ 4.2	>+
0.8 $\mu\text{M}$ K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +250 $\mu\text{M}$ AA*	19.4 $\pm$ 1.6	11.2 $\pm$ 3.2	>+
1.6 $\mu\text{M}$ K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +500 $\mu\text{M}$ AA*	58.5 $\pm$ 2.8	31.1 $\pm$ 3.0	>+

以 Alamar blue 試驗分析預期代謝抑制活性及實際代謝抑制活性。

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

additive : +

more than additive : > +

\*p<0.05

表 43. 低劑量之重金屬化合物與微量之乙醛共同暴露下，其預期突變株數目及實際突變株數目之差異

Mixture	Observed Mutant number $1 \times 10^5$	Predicted Mutant number $1 \times 10^5$	Interaction factor
0.63 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ +62.5 $\mu\text{M}$ MAA	20.2 $\pm$ 2.4	8.0 $\pm$ 1.7	>+
1.25 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ +125 $\mu\text{M}$ MAA	29.1 $\pm$ 2.6	20.9 $\pm$ 4.0	>+
2.50 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ +250 $\mu\text{M}$ MAA	45.1 $\pm$ 3.5	37.8 $\pm$ 3.6	>+
5.00 $\mu\text{M}$ $\text{CdCl}_2$ +500 $\mu\text{M}$ MAA	61.2 $\pm$ 2.9	53.5 $\pm$ 4.6	>+
6.25 $\mu\text{M}$ $\text{PbCl}_2$ +62.5 $\mu\text{M}$ MAA	19.7 $\pm$ 1.9	9.2 $\pm$ 2.1	>+
12.5 $\mu\text{M}$ $\text{PbCl}_2$ +125 $\mu\text{M}$ MAA	30.7 $\pm$ 2.8	21.8 $\pm$ 2.2	>+
25.0 $\mu\text{M}$ $\text{PbCl}_2$ +250 $\mu\text{M}$ MAA	44.8 $\pm$ 3.5	36.4 $\pm$ 1.9	>+
50.0 $\mu\text{M}$ $\text{PbCl}_2$ +500 $\mu\text{M}$ AA	73.9 $\pm$ 1.4	65.0 $\pm$ 2.4	>+
0.4 $\mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ +125 $\mu\text{M}$ MAA	20.8 $\pm$ 1.3	16.7 $\pm$ 1.5	>+
0.8 $\mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ +250 $\mu\text{M}$ MAA	39.7 $\pm$ 2.3	27.7 $\pm$ 2.6	>+
1.6 $\mu\text{M}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ +500 $\mu\text{M}$ MAA	58.1 $\pm$ 2.4	48.6 $\pm$ 2.9	>+

$$\text{IF}(\text{interaction}) = (\text{OM-control}) - [(\text{A-control}) + (\text{B-control})]$$

A negative IF denotes antagonism, a positive IF denotes synergism and a zero IF denotes additive.

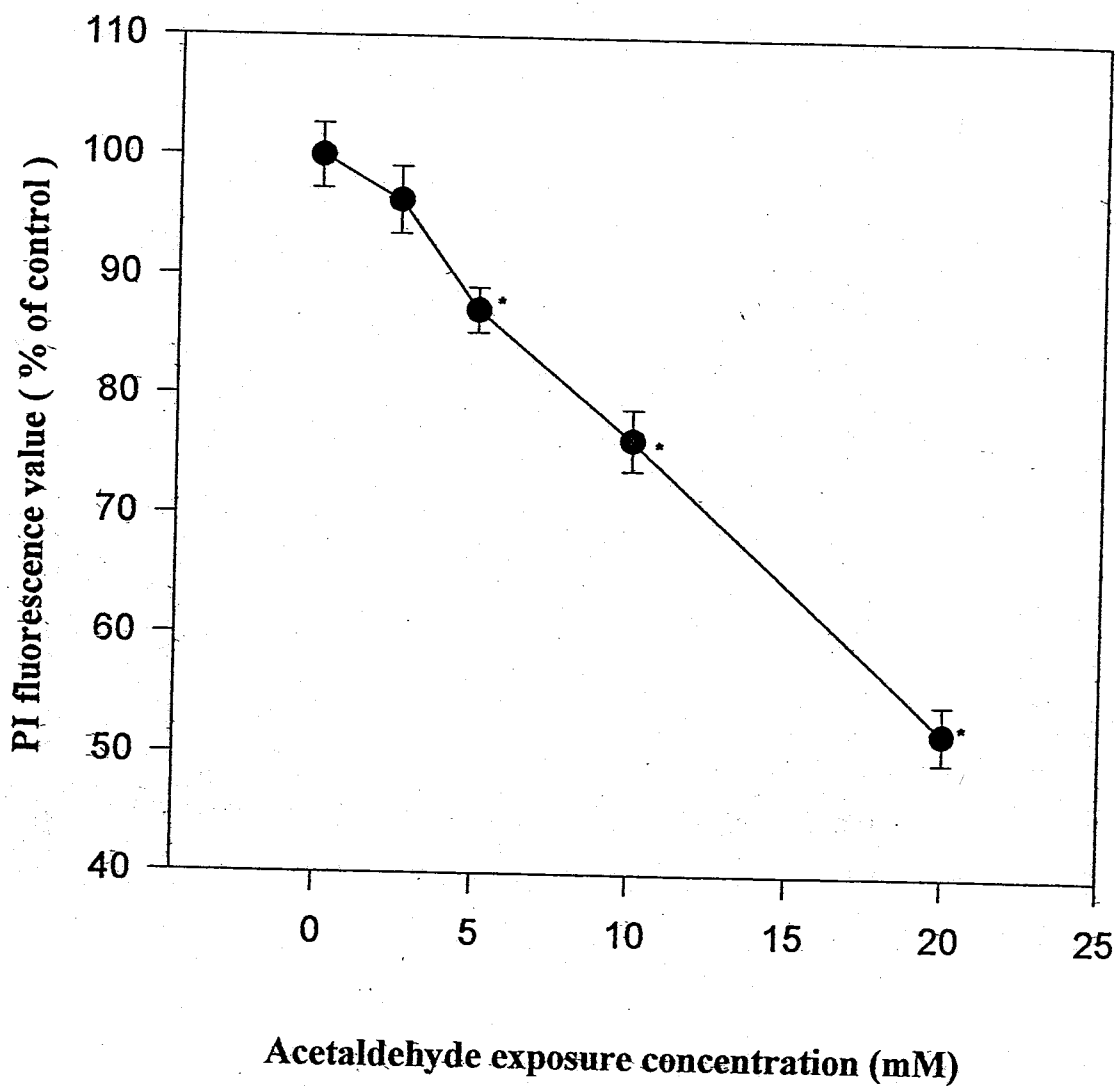


圖 1. 不同濃度之乙醛暴露於 V79 細胞，以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05)。

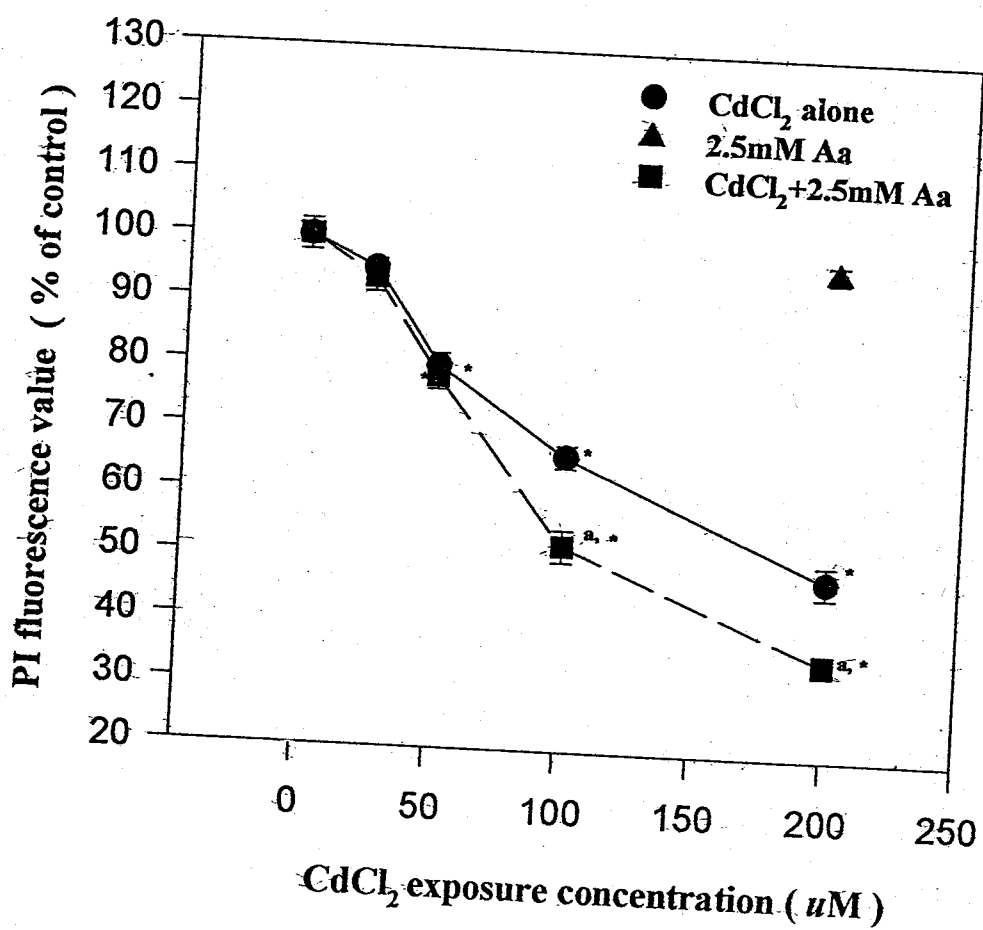


圖 2.高劑量之氯化鎘及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞，以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響。\*：表示劑量其結果具有顯著之差異(p<0.05)。a：表示具有加成毒性。



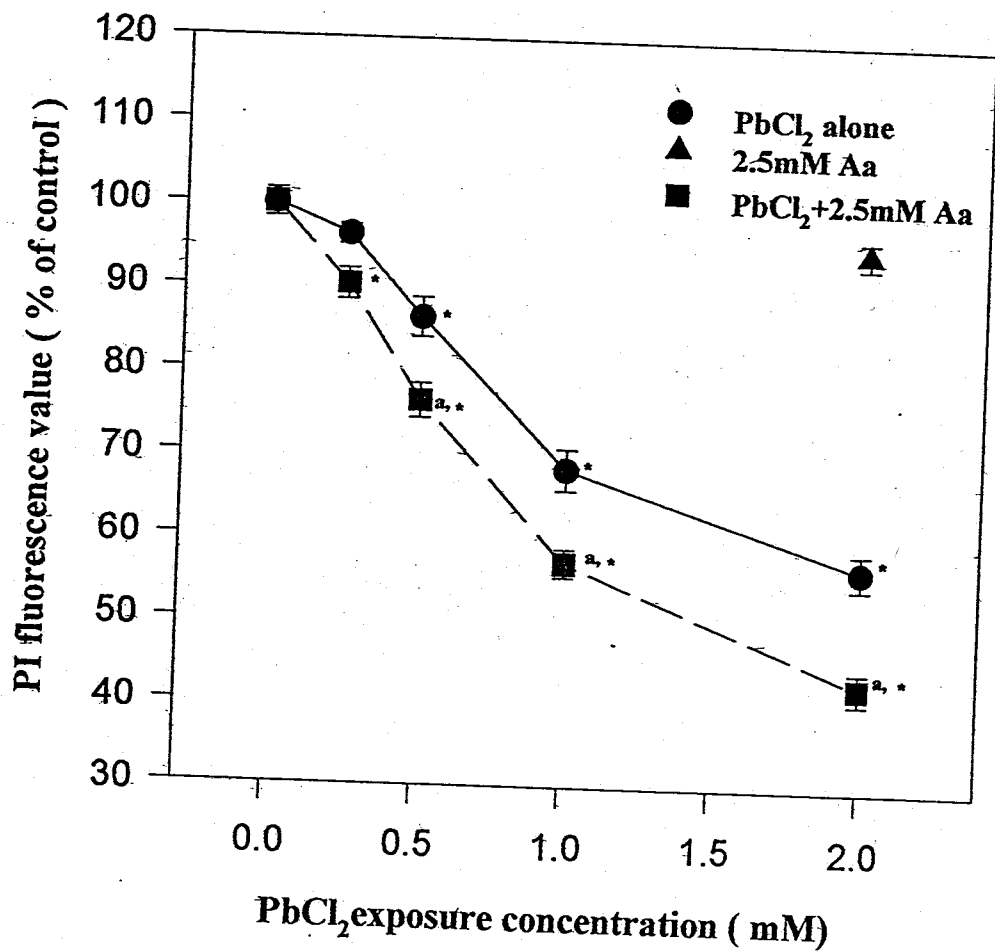


圖 3. 高劑量之氯化鉛及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞，以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05)。a：表示具有加成毒性。

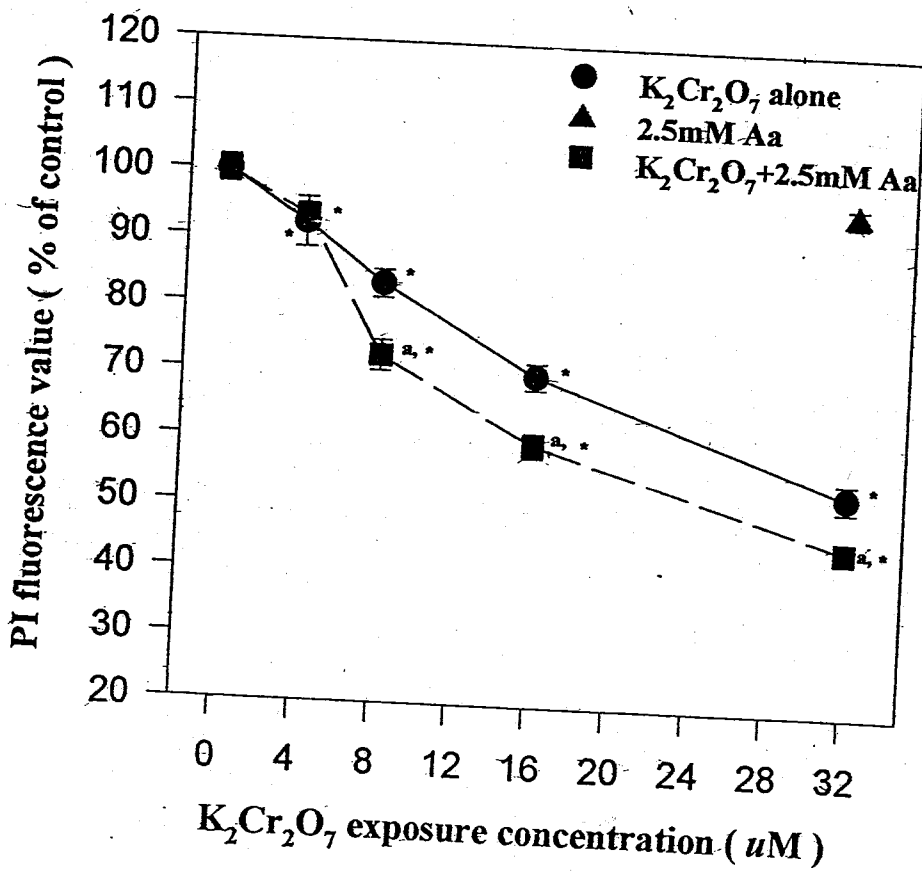


圖 4. 高劑量之重鉻酸鉀( $K_2Cr_2O_7$ )及微量之乙醛共同暴露於 V79 細胞, 以 Propidium iodide 試驗分析其對於細胞存活率之影響。\*: 表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。 a: 表示具有加成毒性。

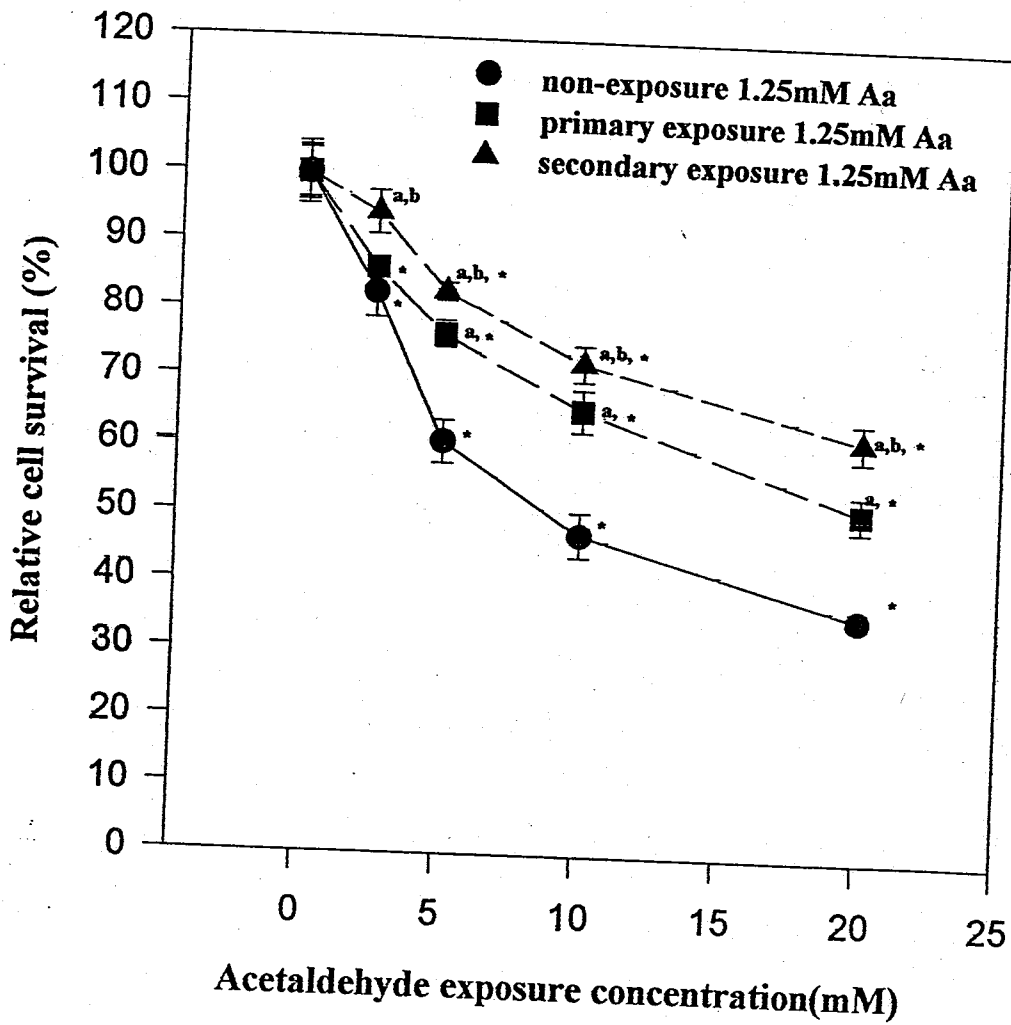


圖 5.持續性暴露低濃度之乙醛，對於細胞存活率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。a：表示與 non-exposure Aa 具有有顯著之差異( $p < 0.05$ )；b：表示與 primary exposure Aa 具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。

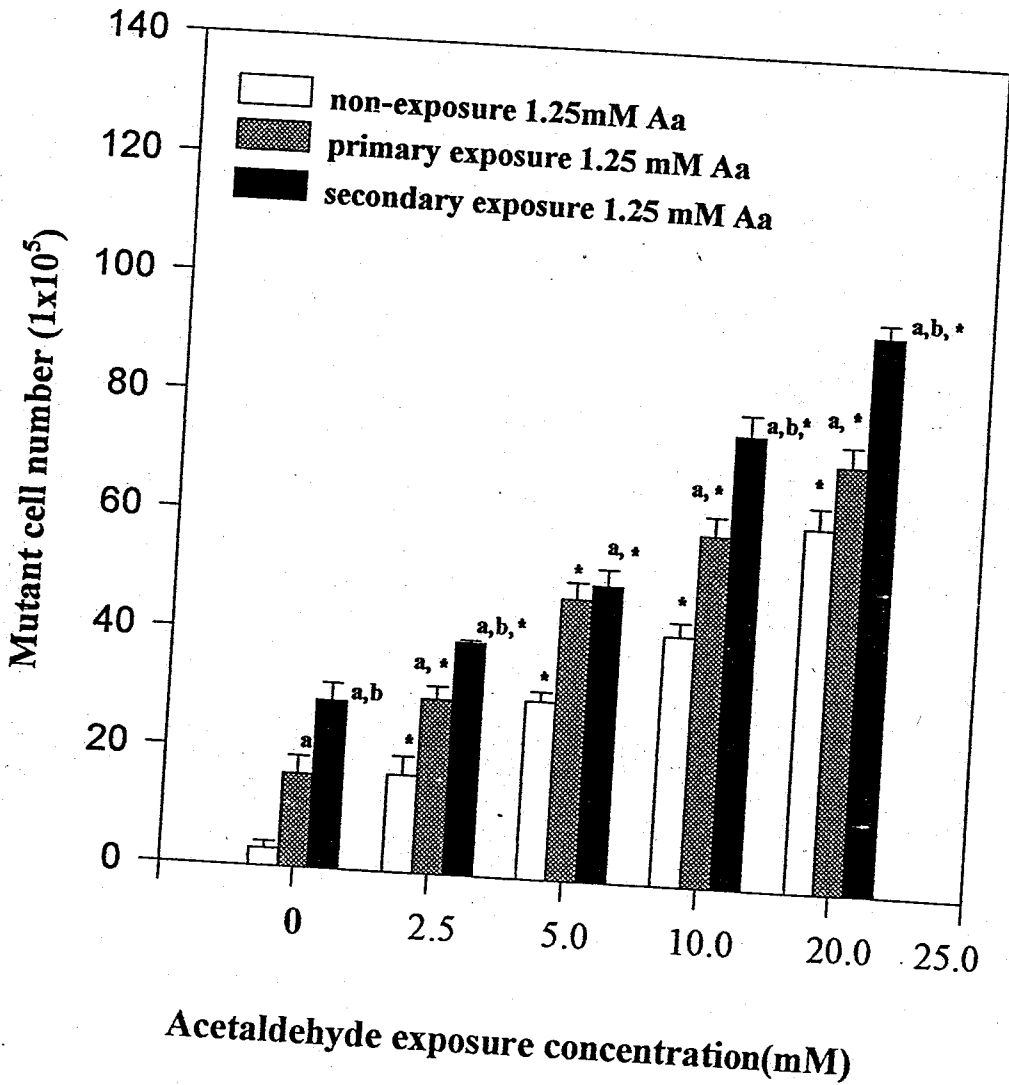


圖 6. 持續性暴露低濃度之乙醛，對於細胞突變頻率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異 ( $p < 0.05$ )。a：表示與 non-exposure Aa 具有有顯著之差異 ( $p < 0.05$ )；b：表示與 primary exposure Aa 有有顯著之差異 ( $p < 0.05$ )。

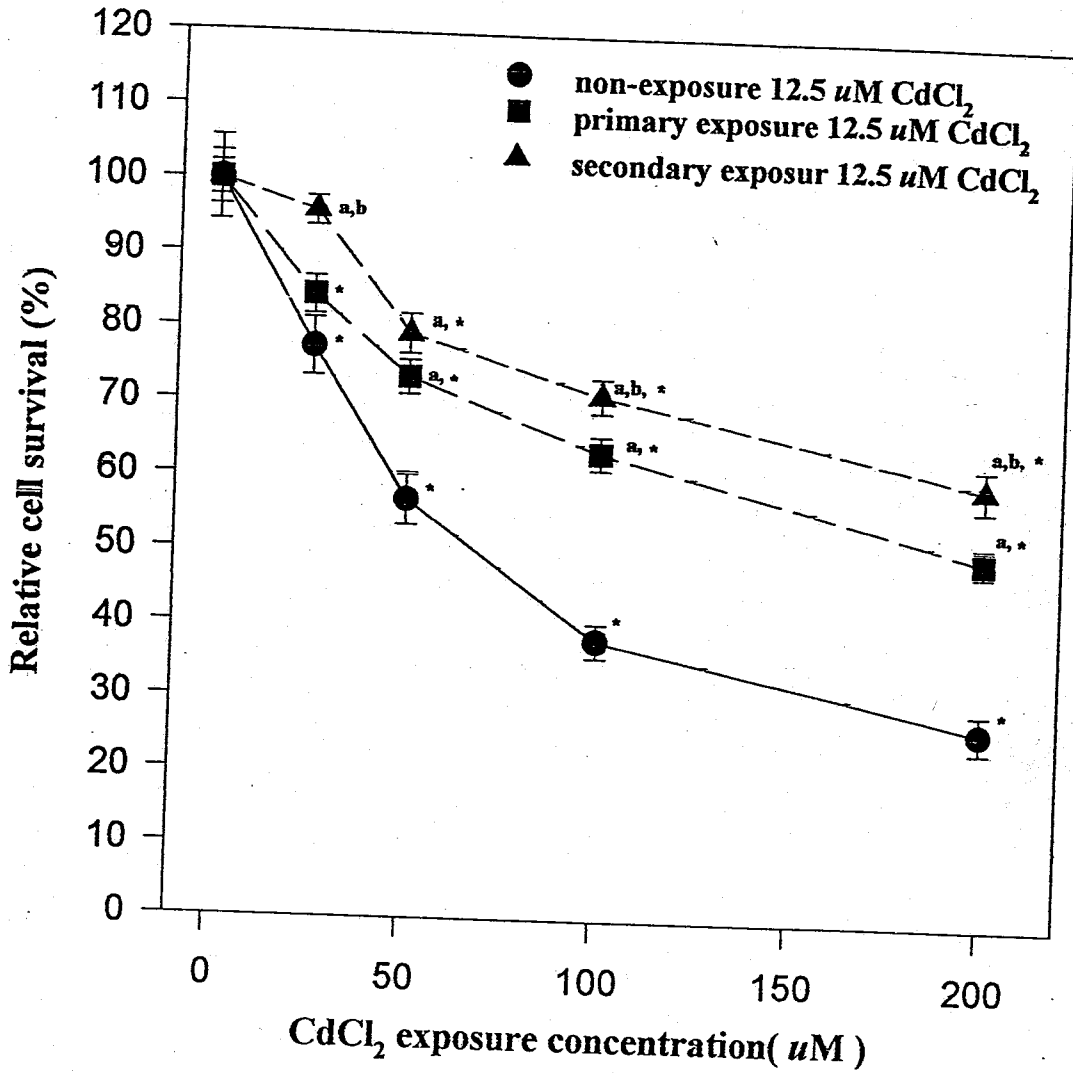


圖 7.持續性暴露低濃度之氯化鎘( $\text{CdCl}_2$ )，對於細胞存活率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。a：表示與 non-exposure  $\text{CdCl}_2$  具有顯著之差異( $p < 0.05$ )；b：表示與 primary exposure  $\text{CdCl}_2$  具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。

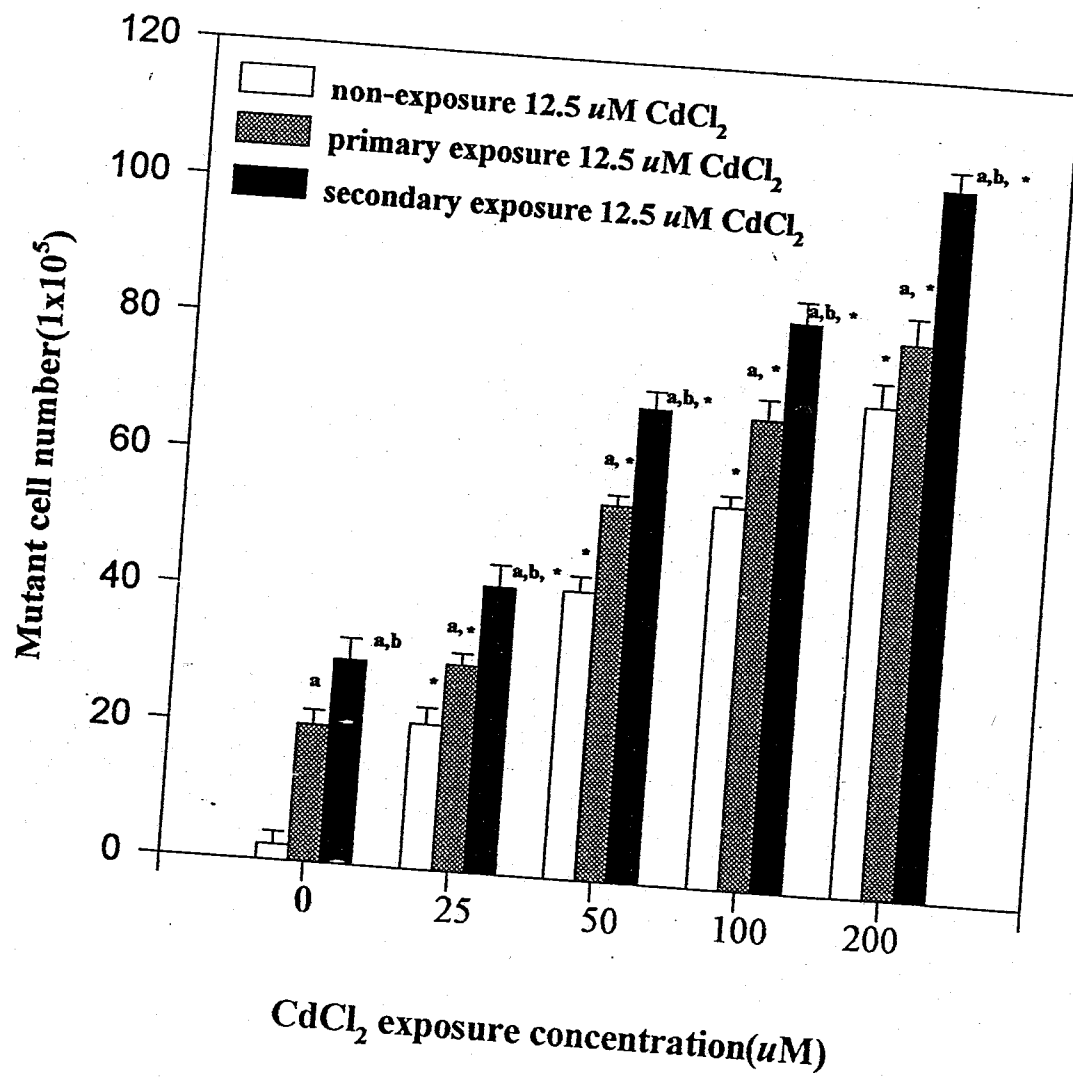


圖 8.持續性暴露低濃度之氯化鎘(CdCl<sub>2</sub>)暴露，對於細胞突變頻率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05)。a：表示與 non-exposure CdCl<sub>2</sub> 具有顯著之差異(p<0.05)；b：表示與 primary exposure CdCl<sub>2</sub> 具有顯著之差異(p<0.05)。

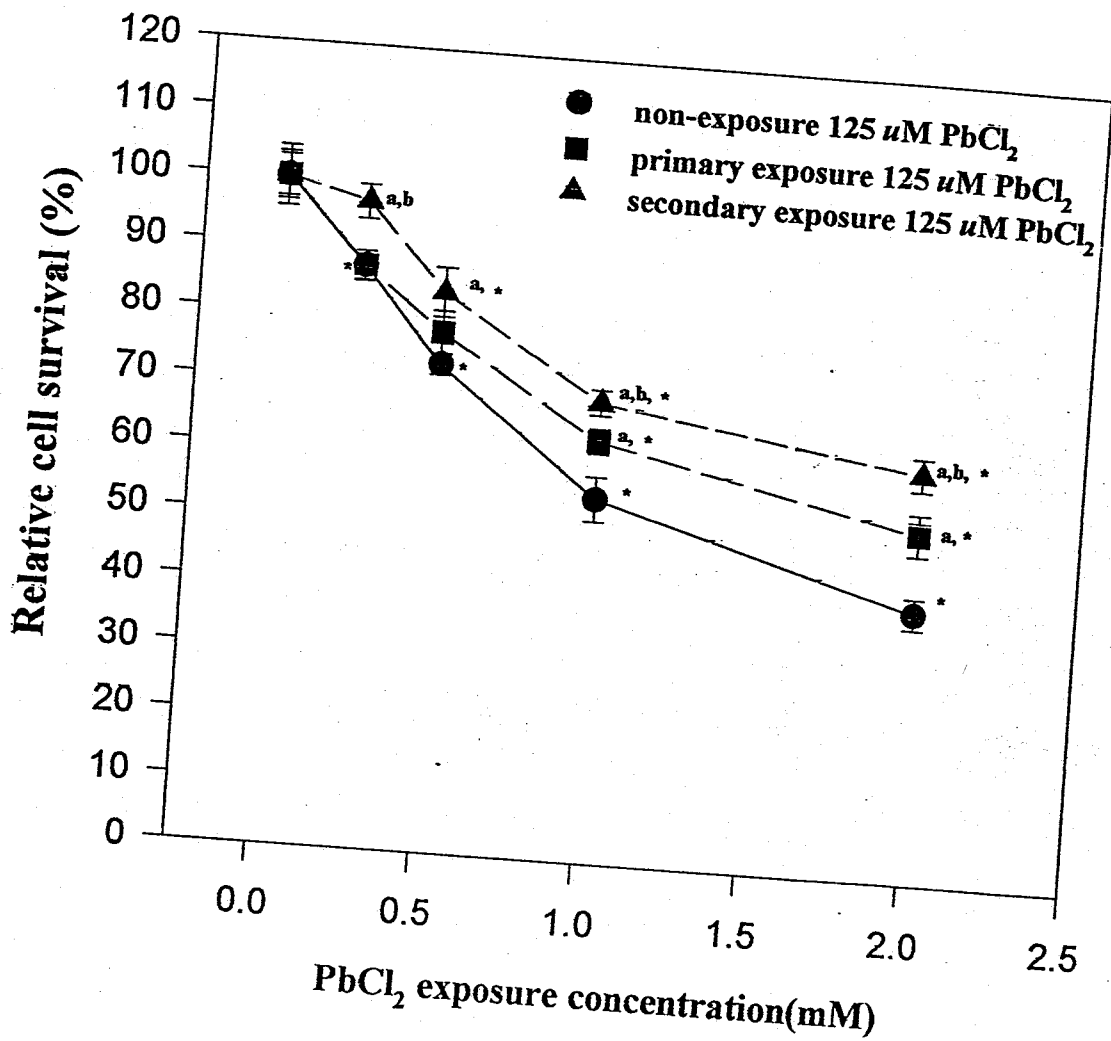


圖 9.持續性暴露低濃度之氯化鉛(PbCl<sub>2</sub>)，對於細胞存活率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異(p<0.05)。a：表示與 non-exposure PbCl<sub>2</sub> 具有有顯著之差異(p<0.05)；b：表示與 primary exposure PbCl<sub>2</sub> 具有顯著之差異(p<0.05)。

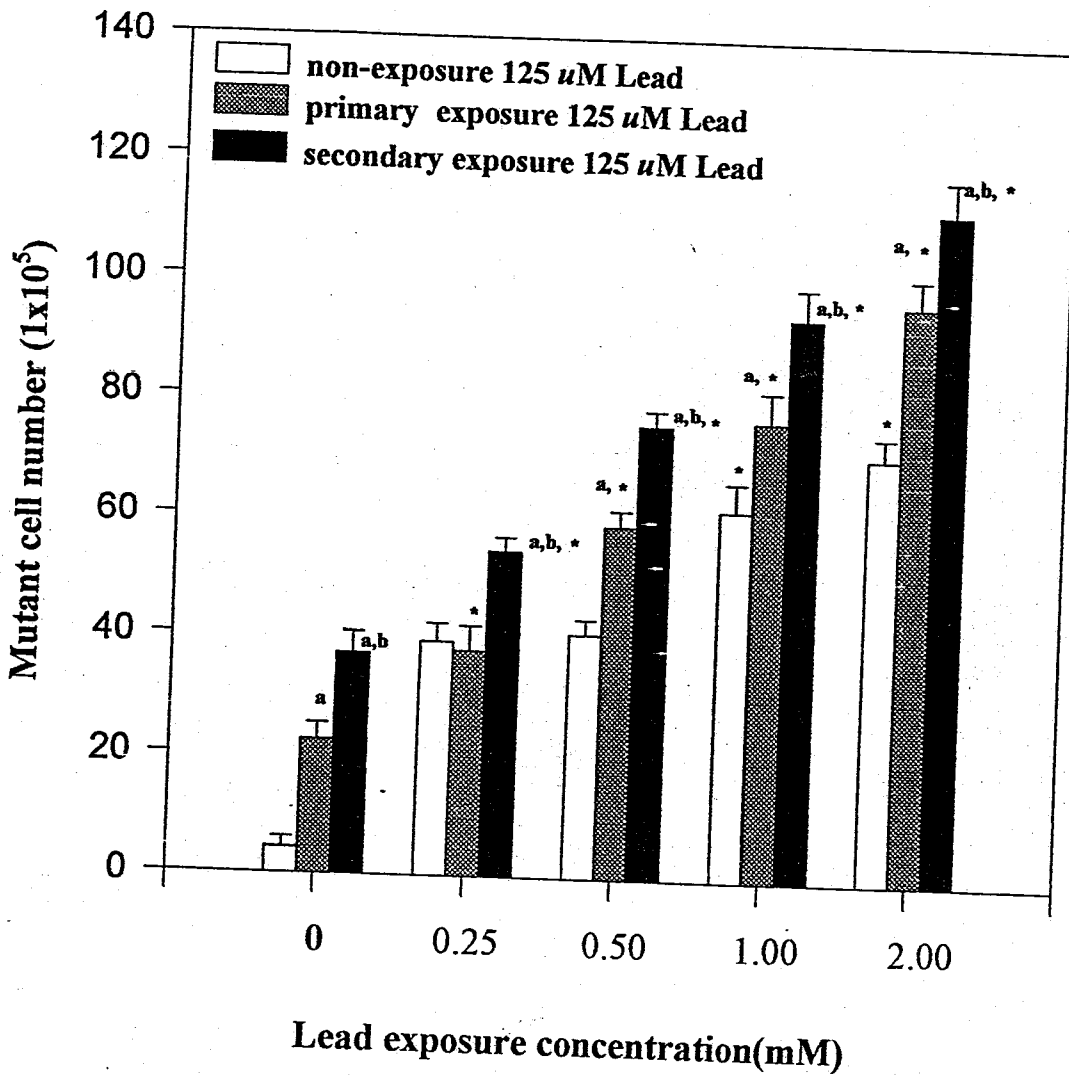


圖 10. 持續性暴露低濃度之氯化鉛( $\text{PbCl}_2$ )暴露，對於細胞突變頻率之影響。 $*$ ：表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。 $a$ ：表示與 non-exposure  $\text{PbCl}_2$  具有有顯著之差異( $p < 0.05$ )； $b$ ：表示與 primary exposure  $\text{PbCl}_2$  具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。



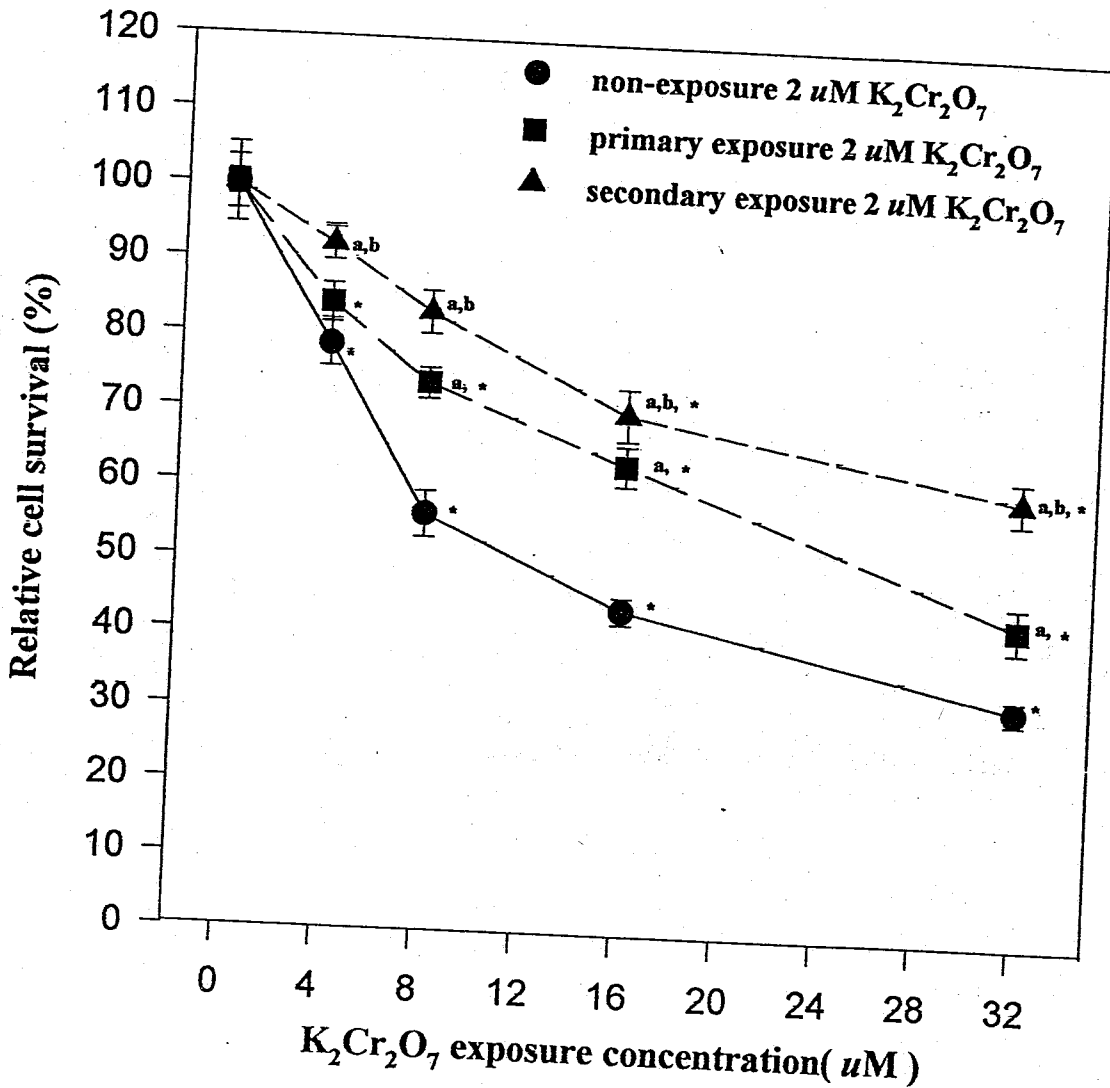


圖 11. 持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀( $K_2Cr_2O_7$ )，對於細胞存活率之影響。\*：表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。a：表示與 non-exposure  $K_2Cr_2O_7$  具有有顯著之差異( $p < 0.05$ )；b：表示與 primary exposure  $K_2Cr_2O_7$  具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。

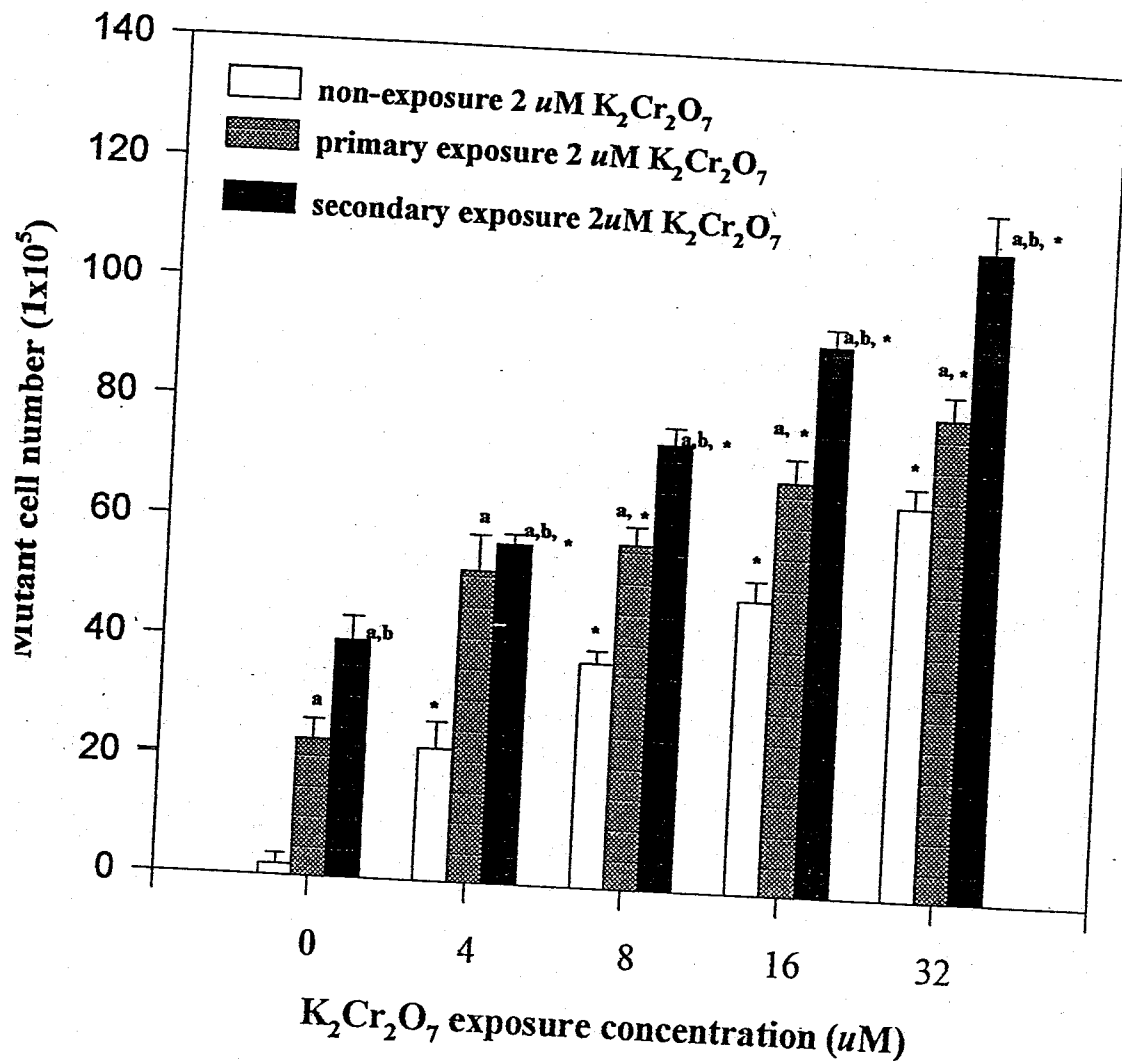
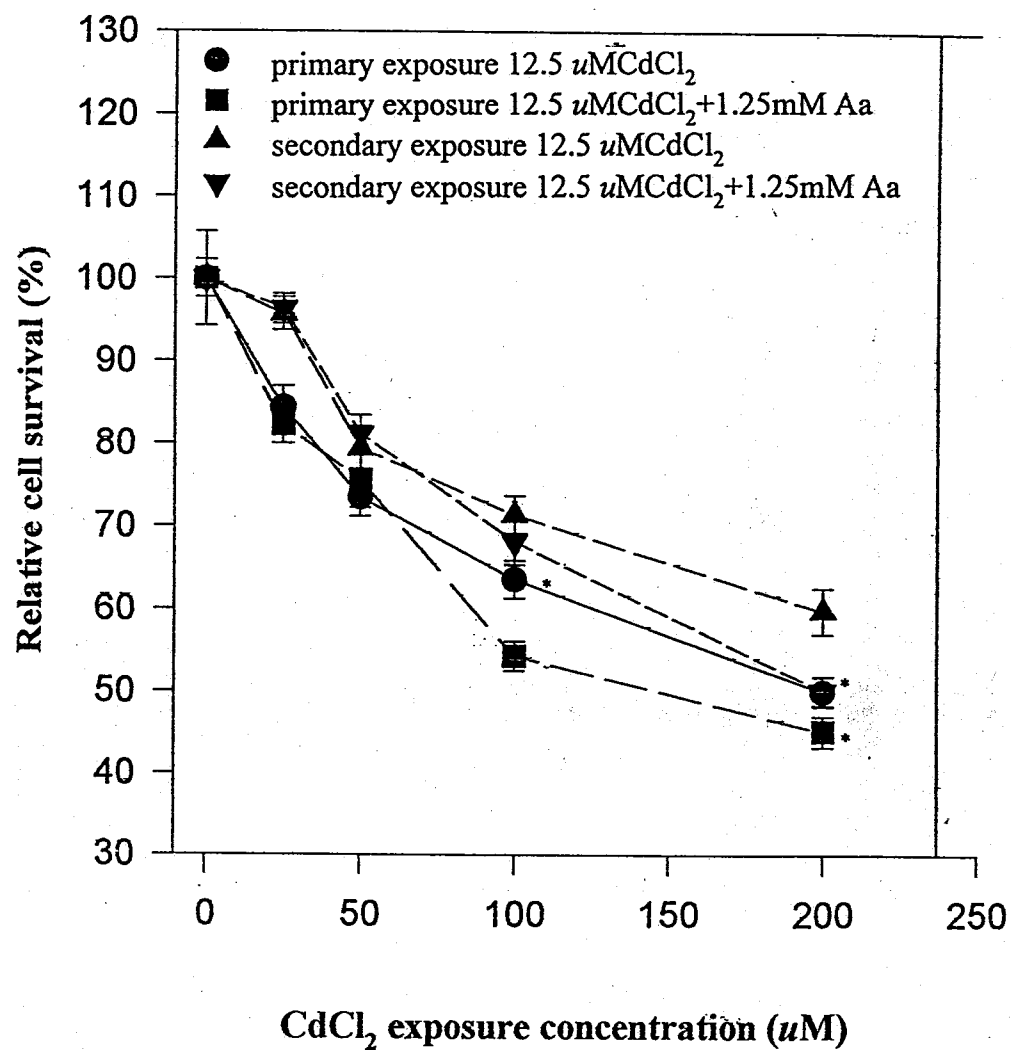


圖 12. 持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )暴露, 對於細胞突變頻率之影響。\* : 表示劑量間其結果具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。a : 表示與 non-exposure  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  具有顯著之差異( $p < 0.05$ ); b: 表示與 primary exposure  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。



**CdCl<sub>2</sub> exposure concentration (uM)**

圖 13.持續性暴露低濃度之氯化鎘暴露，在複合毒性中對於細胞存活率之影響.\*: 表示具有顯著之差異(p<0.05).

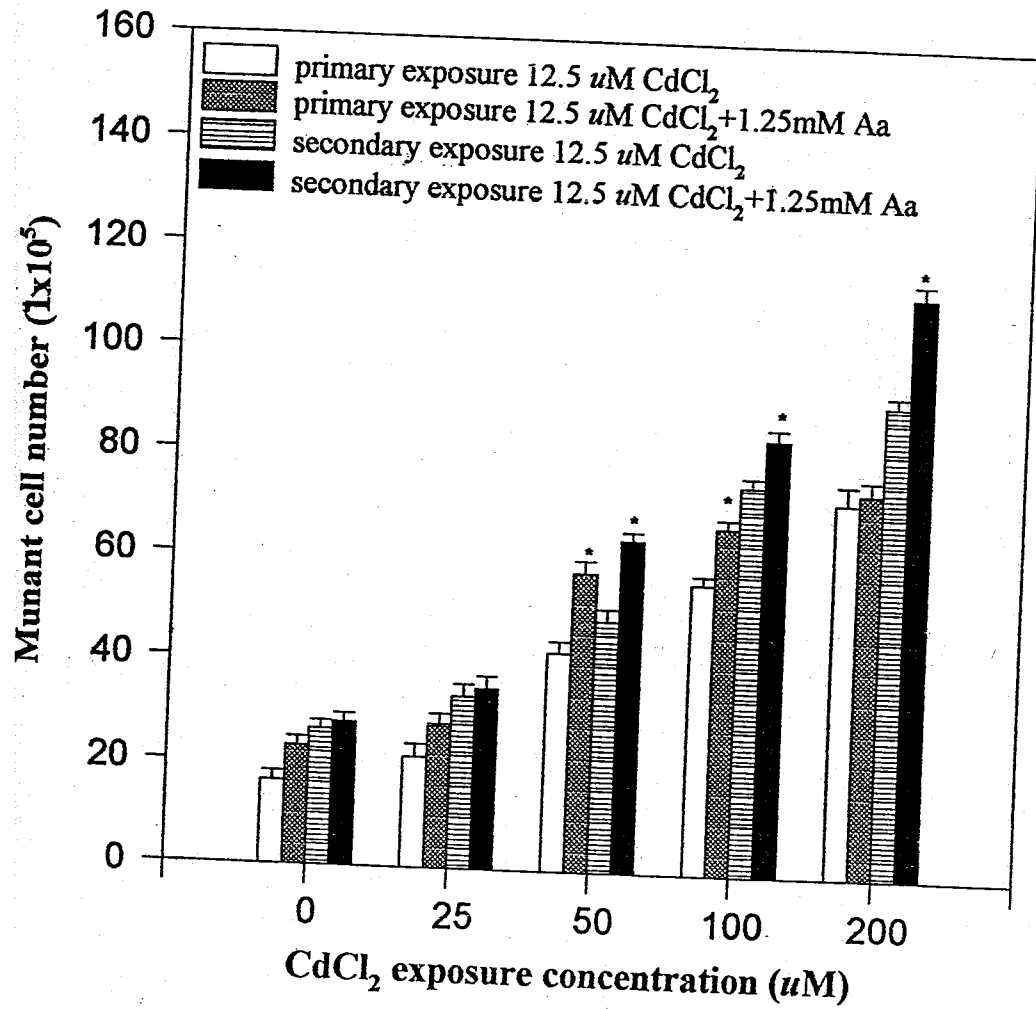


圖 14.持續性暴露低濃度之氯化鎘暴露，在複合毒性中對於細胞突變頻率之影響.\*：表示具有顯著之差異(p<0.05).

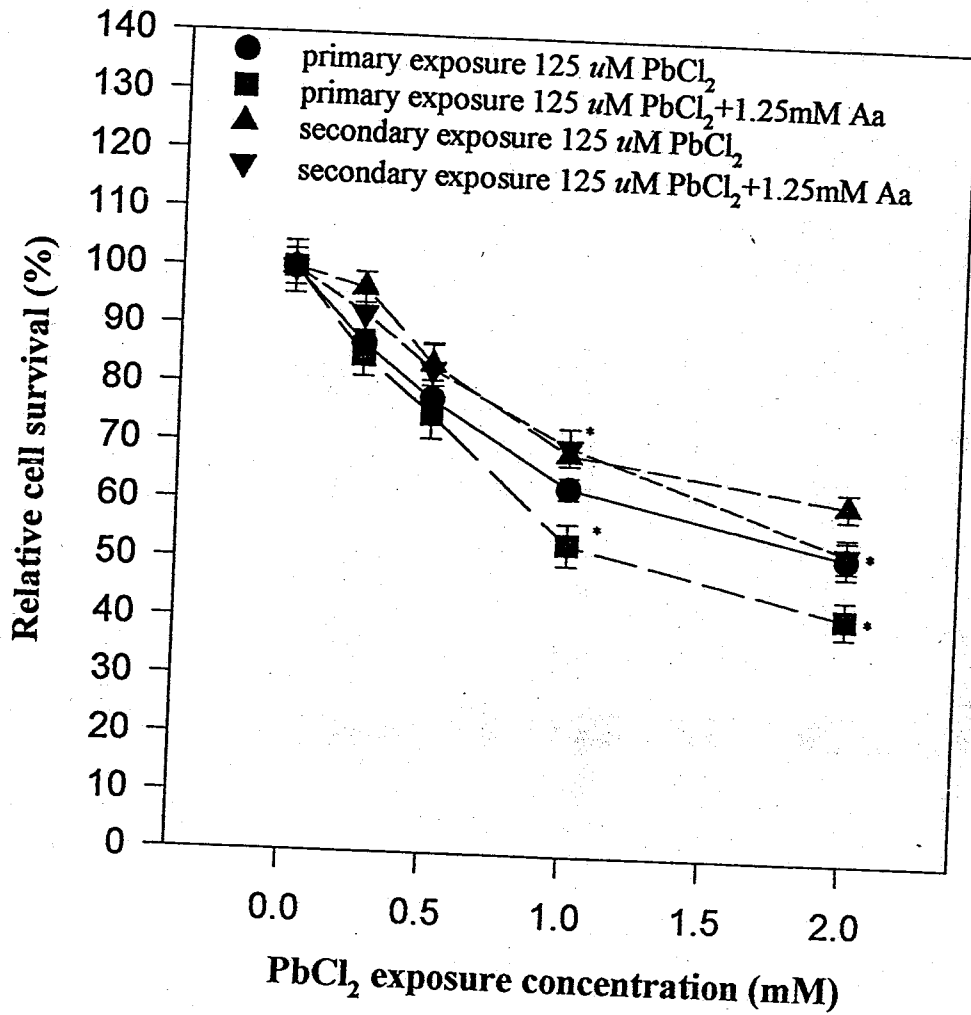


圖 15.持續性暴露低濃度之氯化鉛暴露，在複合毒性中對於細胞存活率之影響.\*: 表示具有具有顯著之差異( $p < 0.05$ ).

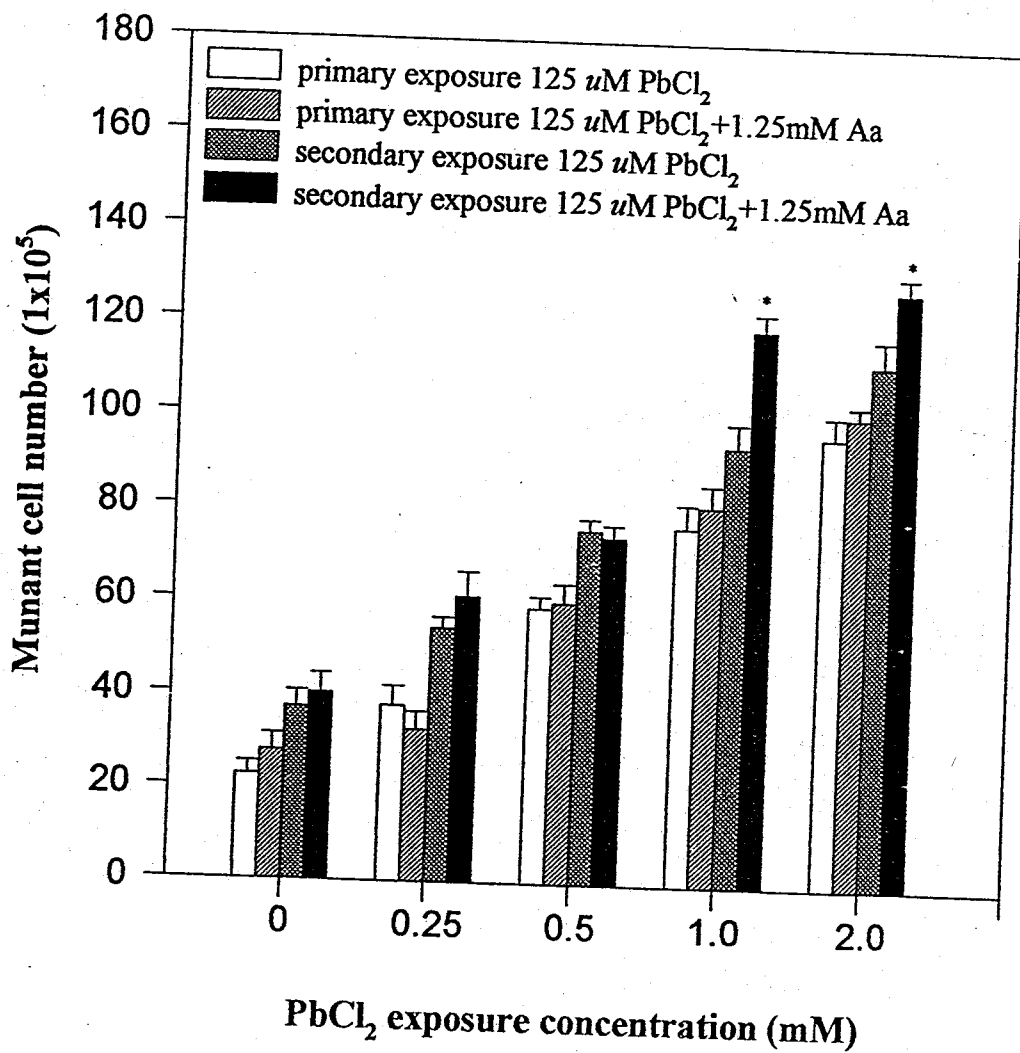


圖 16.持續性暴露低濃度之氯化鉛暴露，在複合毒性中對於細胞突變頻率之影響。\*：表示具有具有顯著之差異( $p < 0.05$ )。

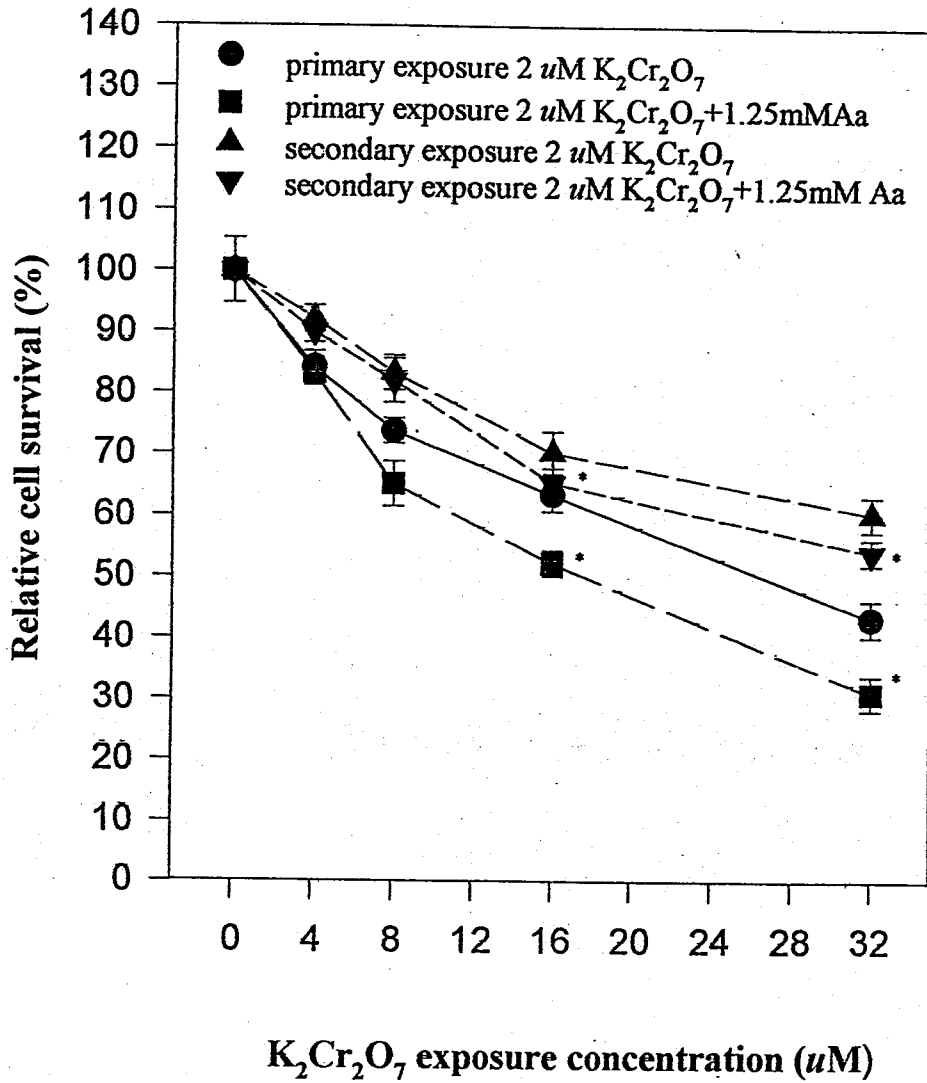


圖 17.持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀暴露，  
在複合毒性中對於細胞存活率之影響.\*: 表  
示具有顯著之差異( $p < 0.05$ )

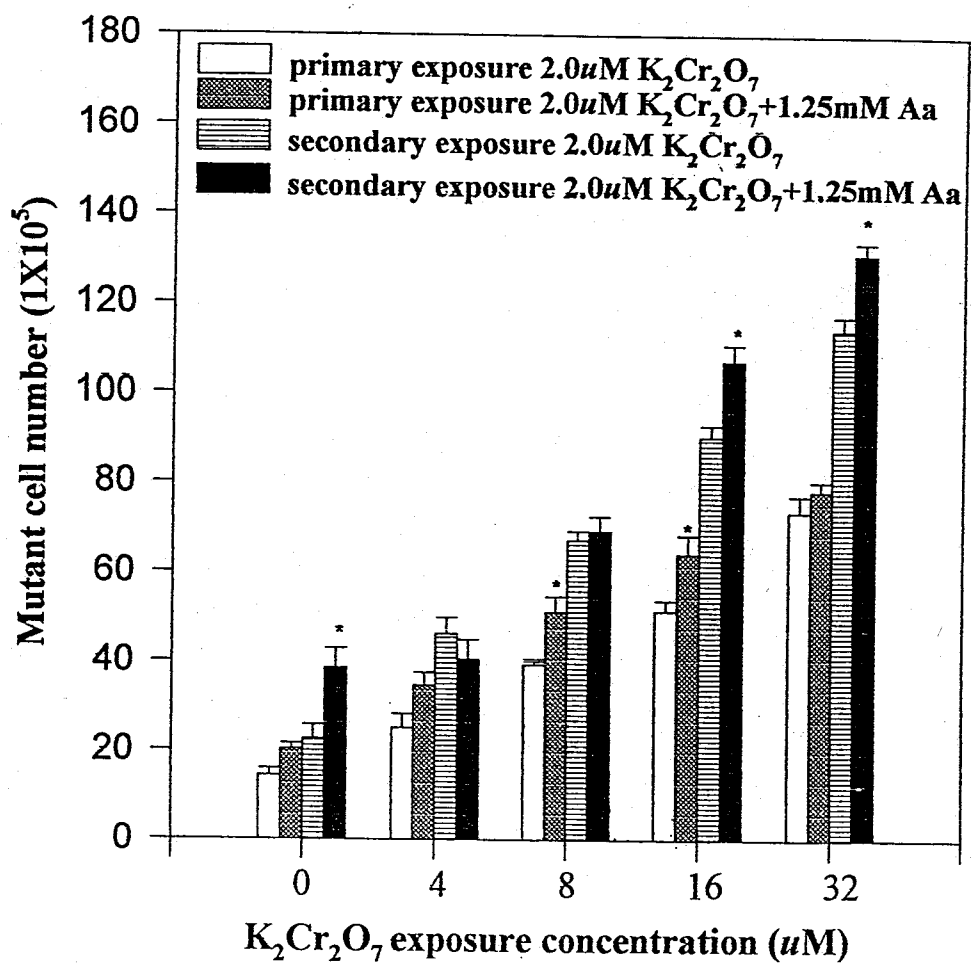


圖 18.持續性暴露低濃度之重鉻酸鉀暴露，  
 在複合毒性中對於細胞突變頻率之影響。\*：  
 表示具有顯著之差異(p<0.05)。



附

錄

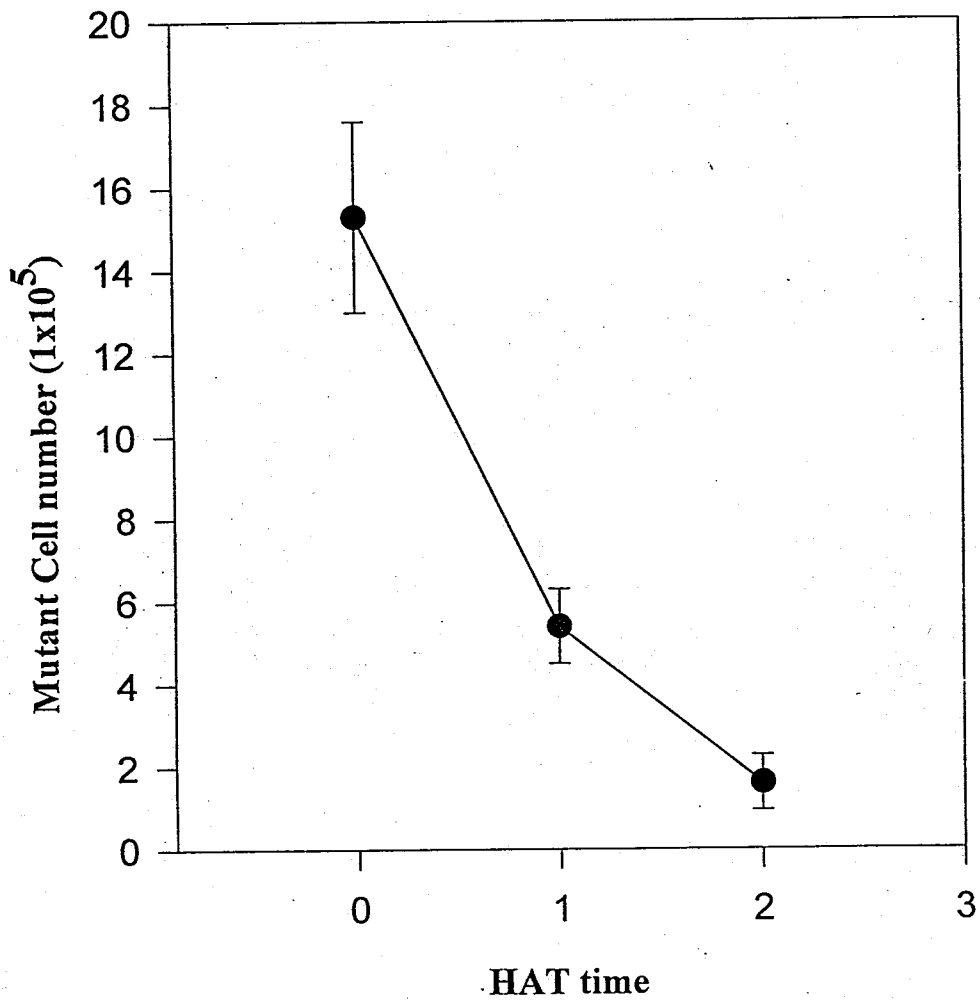


圖 A. 持續性之 HAT 處理 V79 細胞, 其對於細胞突變發生率之影響.

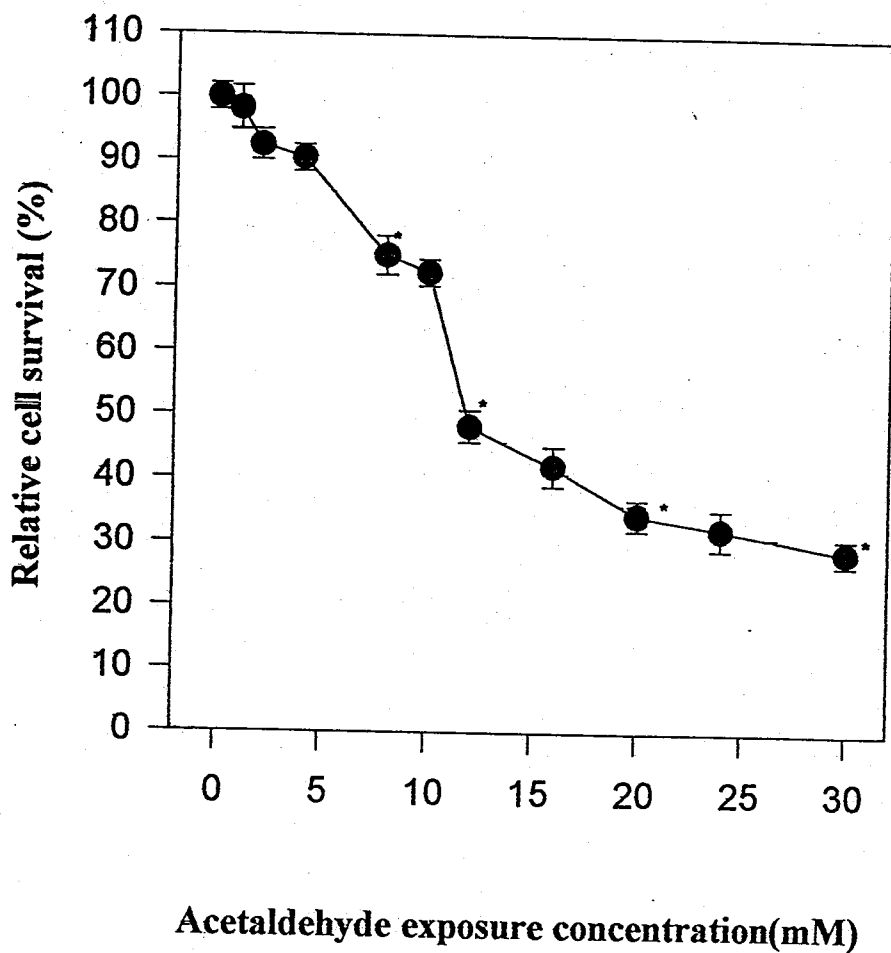


圖 B.不同濃度之乙醛暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響. \*: 表示具有顯著之差異 ( $p < 0.05$ ).

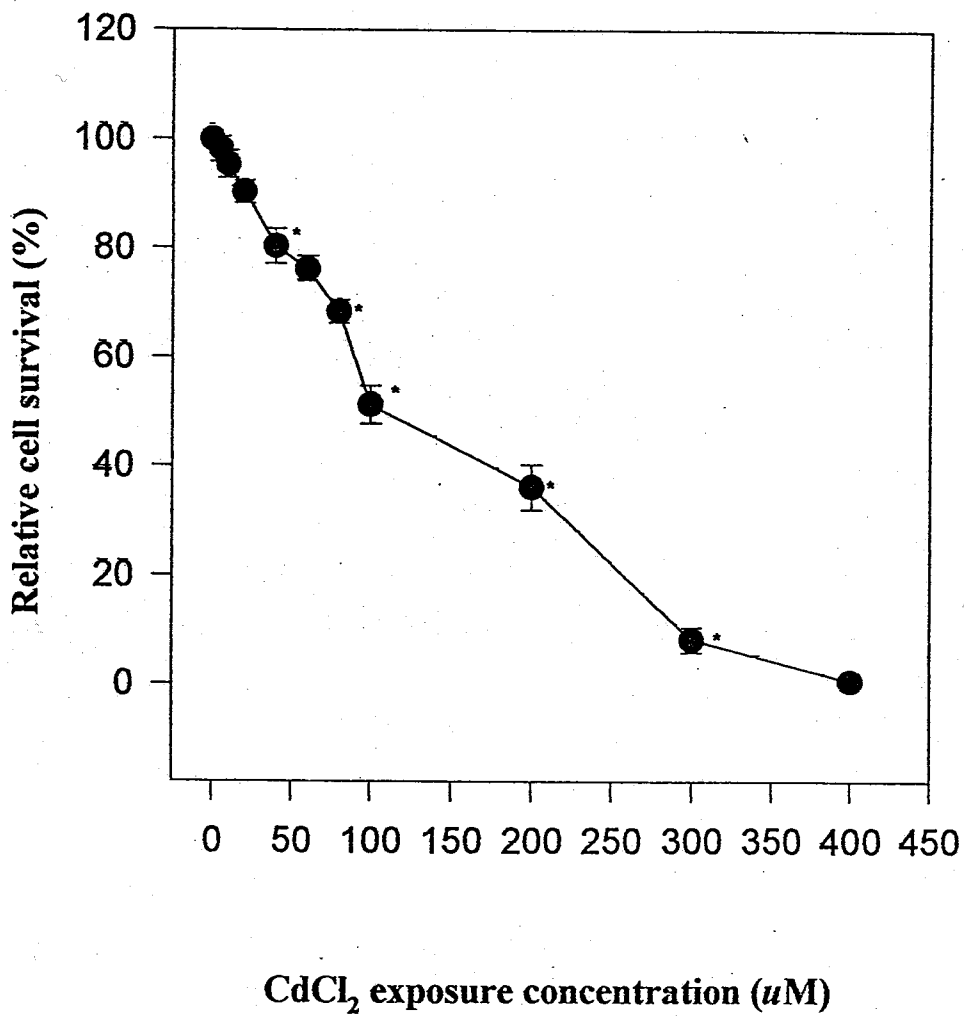


圖 C.不同濃度之氯化鎘暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響.\*: 表示具有顯著之差異(p<0.05).

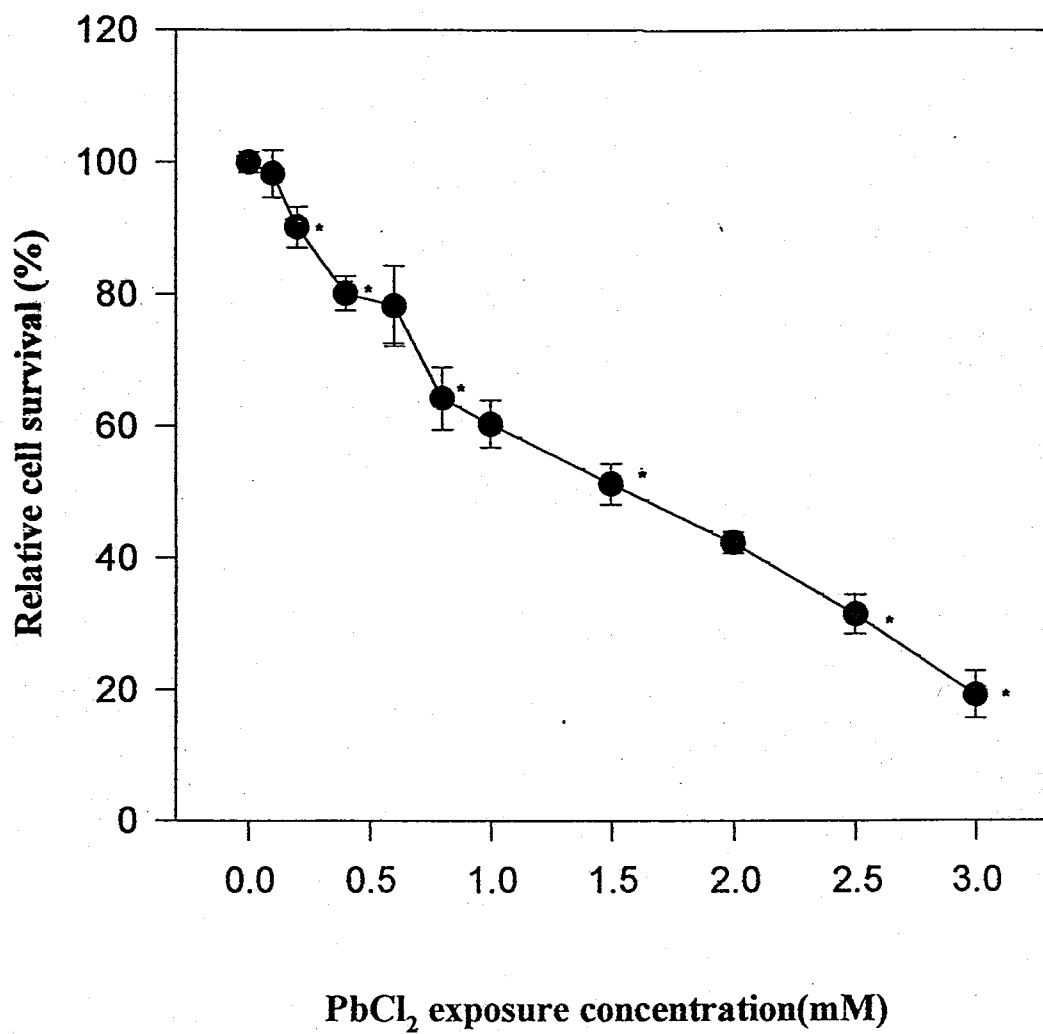


圖 D.不同濃度之氯化鉛暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響. \*: 表示具有顯著之差異(p<0.05).

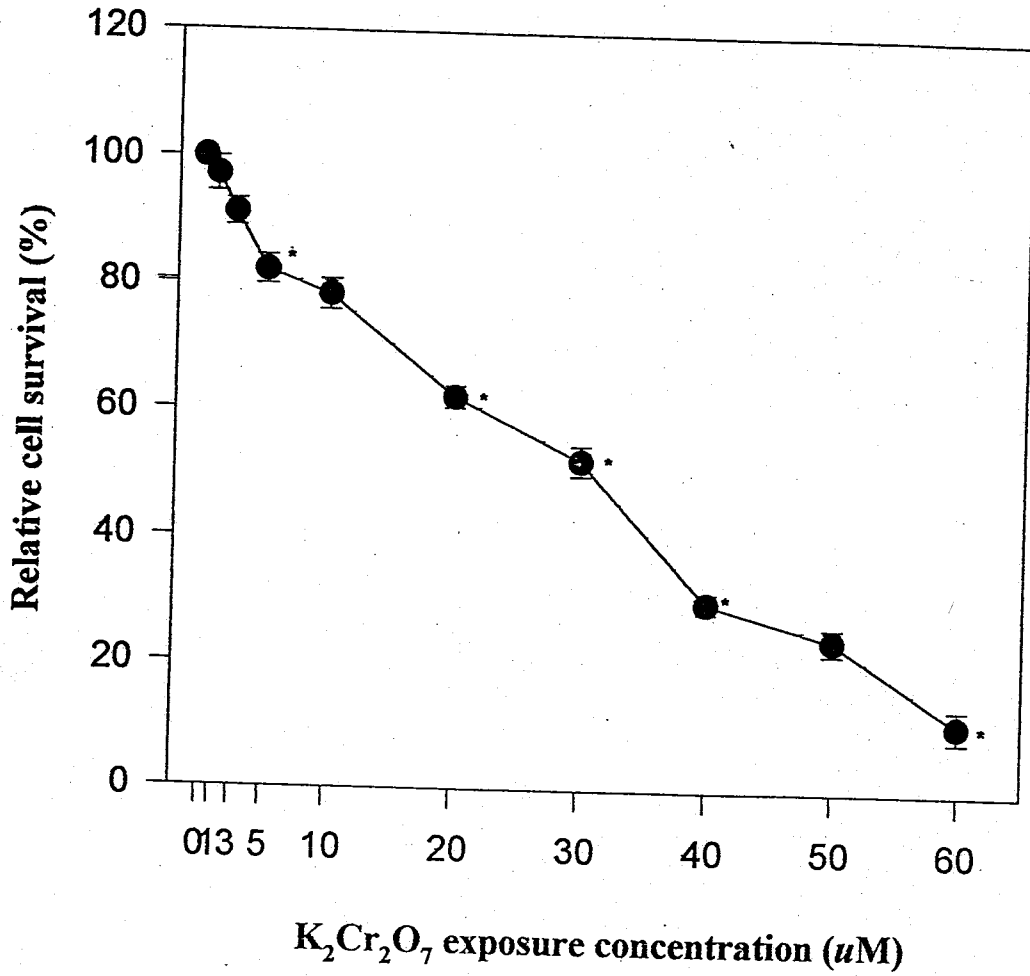


圖 E. 不同濃度之重鉻酸鉀暴露於 V79 細胞, 其對於細胞存活率之影響. \*: 表示具有顯著之差異 ( $p < 0.05$ ).

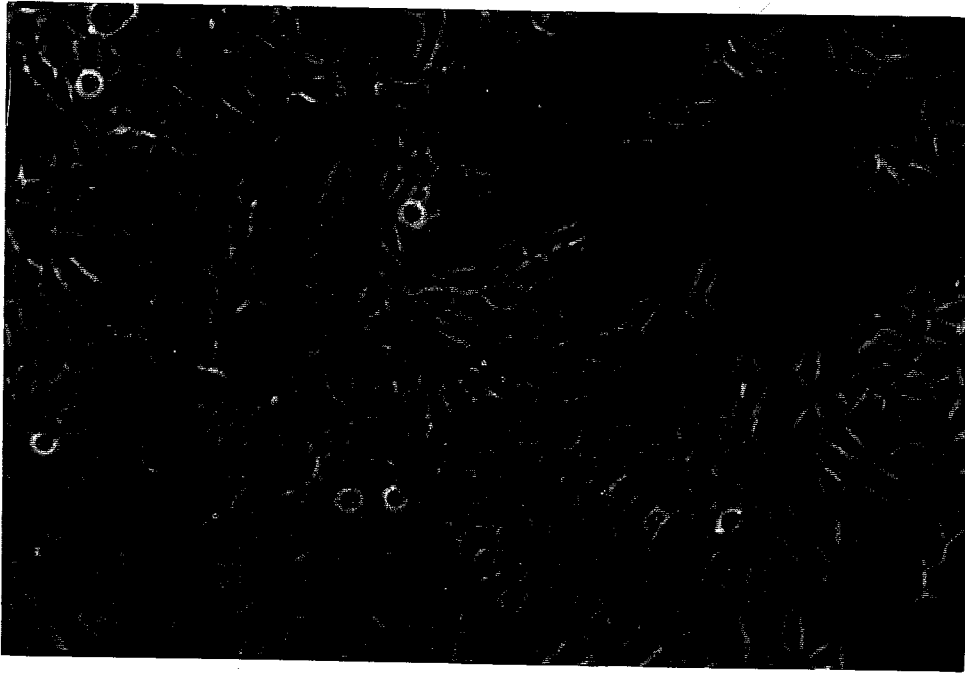


圖 F1.正常 V79 細胞之細胞型態(200X).

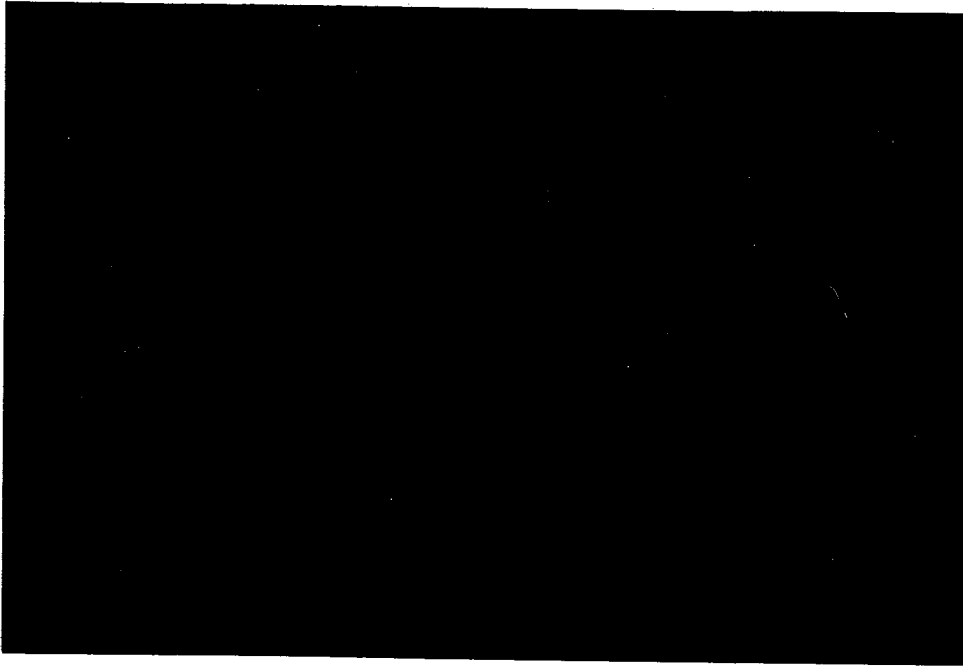


圖 F2.利用螢光顯微鏡觀察正常之 V79 細胞  
(200X).

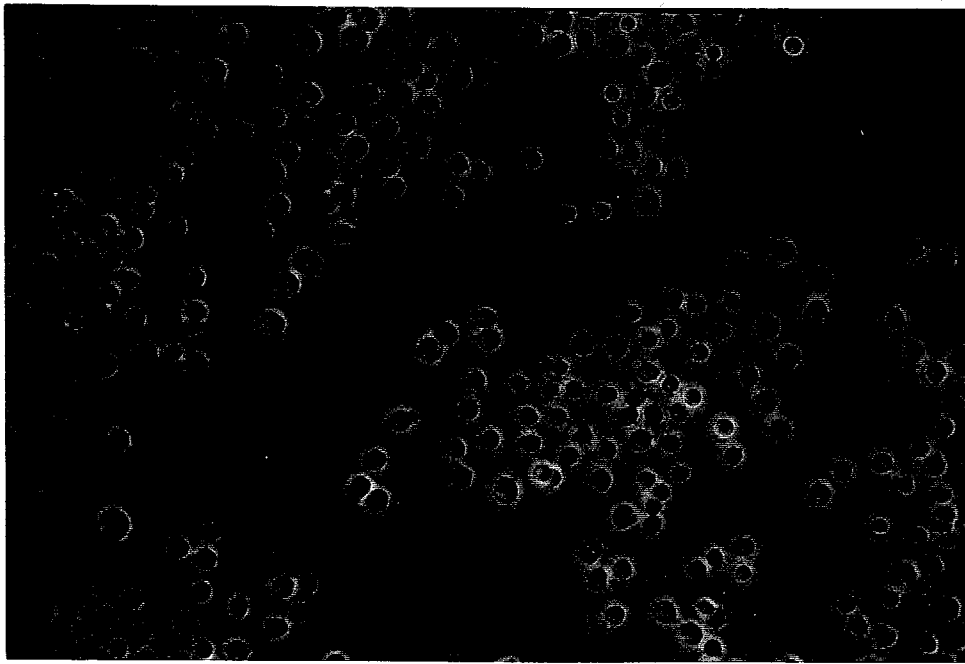


圖 G1.暴露於乙醛 10mM (4 小時), V79 細胞型態之改變(200X)

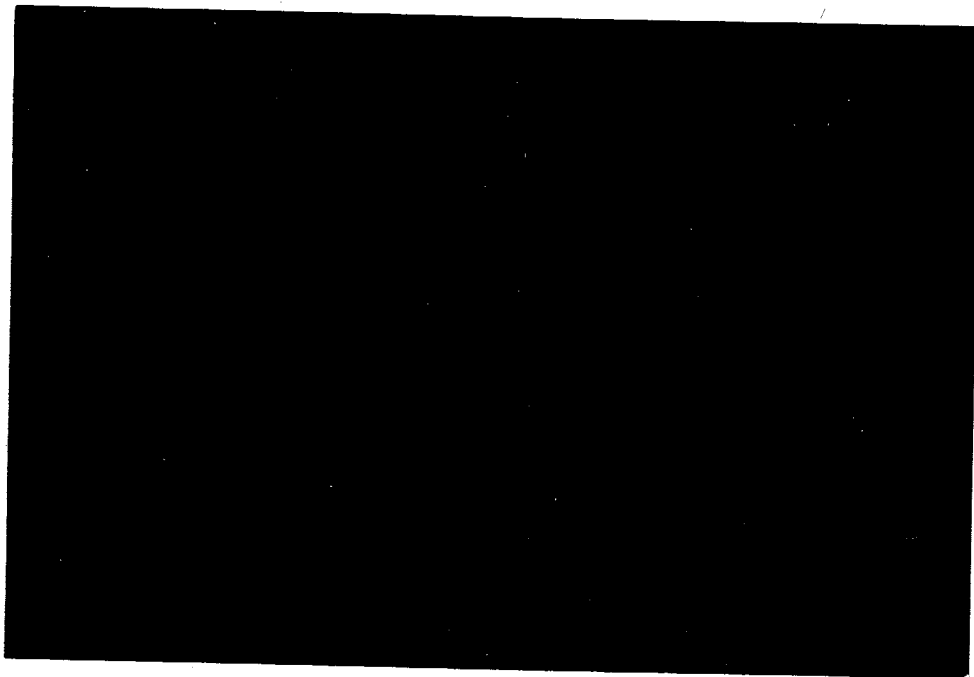


圖 G2.利用螢光顯微鏡觀察, 暴露於乙醛 10mM (4 小時)之 V79 細胞(200X).



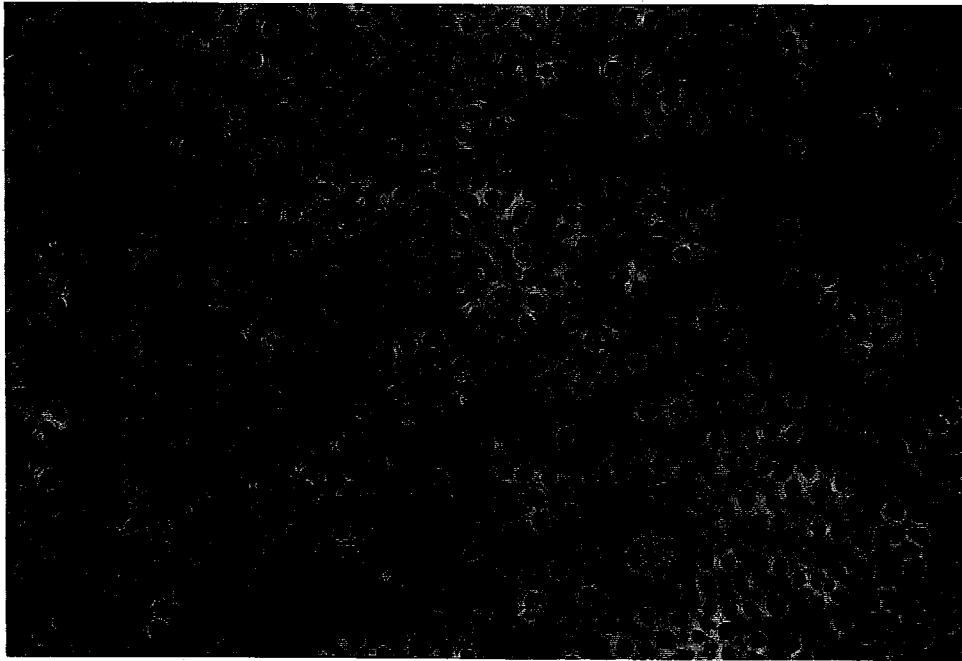


圖 H1.暴露於氯化鎘  $100 \mu\text{M}$ (4 小時), V79 細胞型態之改變(200X).

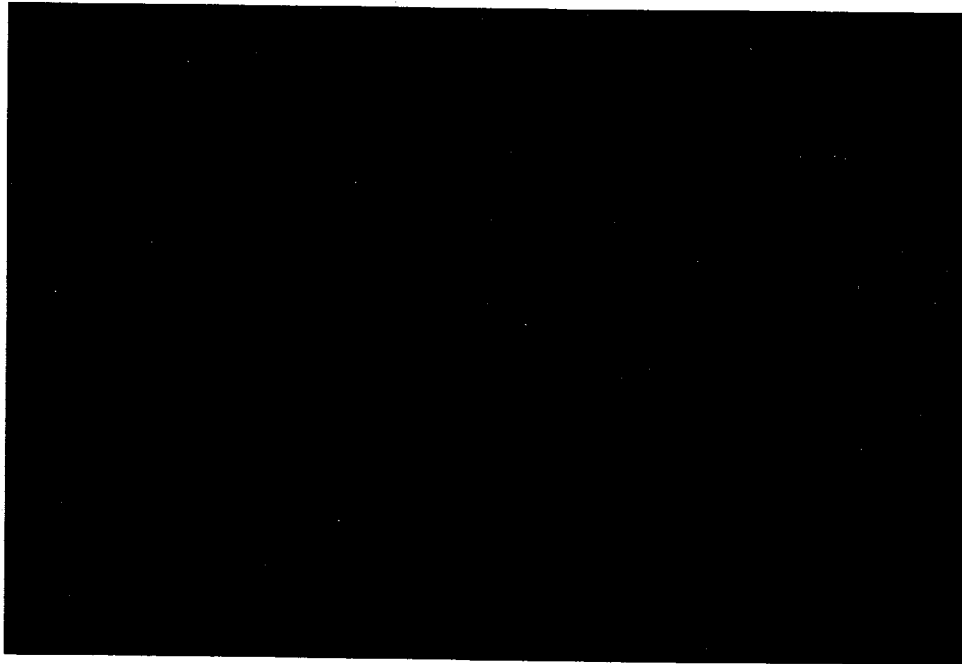


圖 H2.利用螢光顯微鏡觀察, 暴露於氯化鎘  $100 \mu\text{M}$ (4 小時)之 V79 細胞(200X).

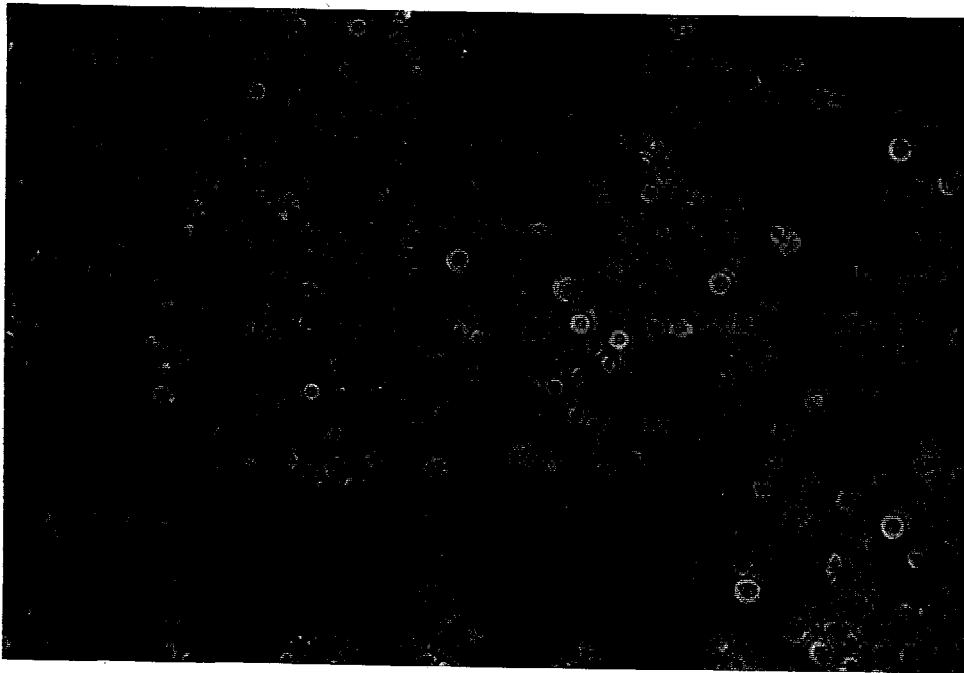


圖 I1.暴露於氯化鉛 1mM(4 小時), V79 細胞之  
細胞型態型態之改變(200X).

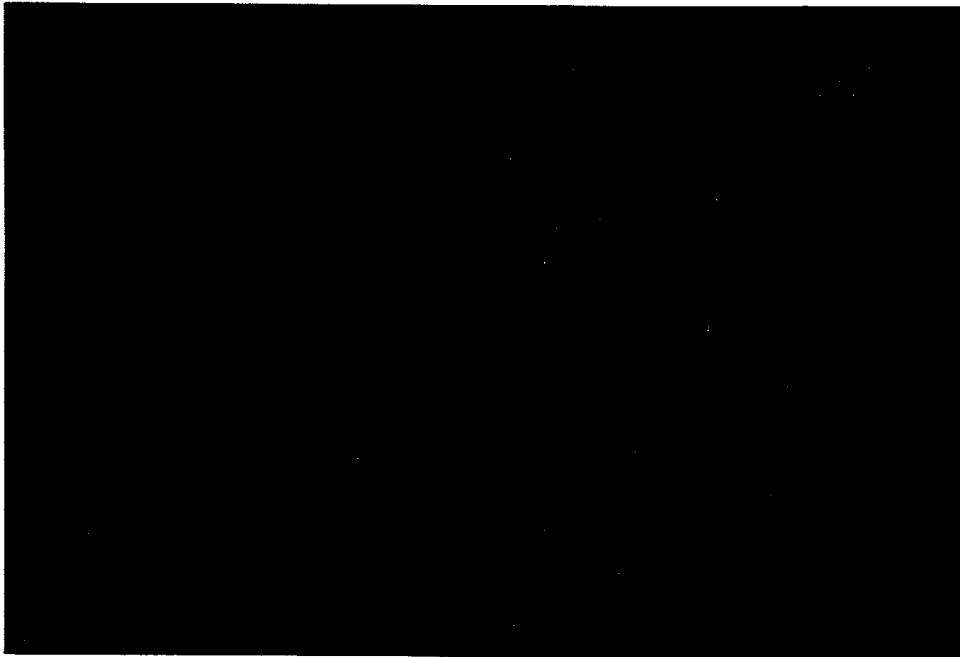


圖 I2.利用螢光顯微鏡觀察, 暴露於氯化鉛  
1mM(4 小時)後之 V79 細胞(200X).



圖 J1.暴露於重鉻酸鉀  $16 \mu\text{M}$ (4 小時),V79  
細胞型態之改變(200X).

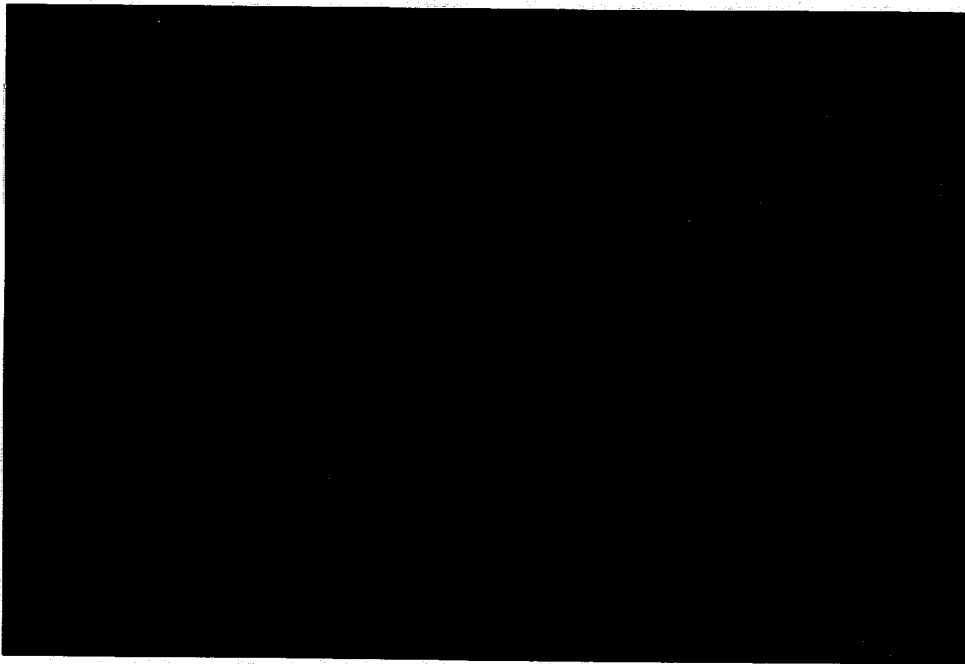


圖 J2.利用螢光顯微鏡觀察,暴露於重鉻酸鉀  
 $16 \mu\text{M}$ (4 小時)之 V79 細胞(200X).