

# 台灣二〇〇二年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作品名稱：重金屬鎘影響細胞生理功能的研究

得獎獎項：生物化學科第三名  
香港第卅五屆聯校科學展覽會

學 校：國立臺南第一高級中學

作 者：吳俊廷

## 作者簡介



我是台南一中的學生，從小我就對科學有濃厚的興趣，很幸運能在成功大學做實驗，並在教授和研究生的指導下完成實驗，這是一個很棒的經驗，讓我真正體驗到書本、理論外的科學，也讓我了解到生物世界之浩瀚，以及生物體之複雜，要做出一個完整的理論，需要長久的時間與許多人的合作，而通往科學的道路越艱辛，就要對科學秉持更強大的信念。感謝陪我走過這半年的父母及教授和研究生。

## 摘要

儘管銻在電子工業上被廣泛運用，但對於暴露在銻化合物所產生的毒害則尚未被詳細的探討。在探討銻對細胞所產生的生理影響中，我們使用了二氧化銻( $\text{GeO}_2$ )和有機銻(Ge-132)。由實驗結果顯示， $\text{GeO}_2$ 會造成人類子宮上皮癌細胞(A431)及巨噬細胞株(Raw264.7)死亡，而 Ge-132 對細胞生長則不造成任何影響，爲了進一步了解銻引起細胞死亡是否是經過細胞凋亡(apoptosis)，我們將銻處理過的細胞進行染色體 DNA 的分析，結果發現細胞中 DNA 染色體沒有斷裂。由先前 Huang 等人於 1999 年的研究結果顯示，砷對細胞所造成的毒性是經由有絲分裂活化酵素(MAPK)傳導路徑，所以爲了解銻誘導細胞死亡的路徑，我們亦分析 MAPK 傳導路徑是否亦參與其中，我們發現  $\text{GeO}_2$ 加入 A431 細胞後，會活化有絲分裂活化酵素中的 ERK，但對 JNK 及 p38 皆無影響，在對蛋白質表現方面，轉錄因子 c-Jun 的蛋白質表現也是隨著  $\text{GeO}_2$ 加入的時間增加而上升。 $\text{GeO}_2$ 加入 Raw 264.7 cell 後，會造成 JNK、ERK 的活化，同樣的轉錄因子 c-Jun 也會增加，由此一結果得知銻對細胞的影響會因細胞的不同而有所差異，爲了分析自由基是否參與砷及銻所造成細胞死亡的過程，我們分析在 A431 細胞中可產生的 NO 的可誘導性 nitric oxide synthase (iNOS)的表現，我們發現氧化銻及砷都會誘導 iNOS 的表現量增加。綜合以上結果，可能顯示氧化銻可能會經由 MAPK 訊息傳遞路徑來促使細胞的死亡，並且 iNOS 亦可能參與此過程。就我們所知，這是第一個提出重金屬所造成的毒害可能會經由 iNOS 來誘導產生的研究。

## Abstract

Despite the extensive use of germanium (Ge) in the electronic industry and optical devices, the potential risks of exposure to germanium compounds have not been evaluated. The effects of germanium on cell physiological functions were studied. We first asked if germanium oxide ( $\text{GeO}_2$ ) or carboxyethylgermanium (Ge-132) could affect cell viability. We found that  $\text{GeO}_2$ , but not Ge-132, reduced cell viability in a dose-dependent manner in epidermoid carcinoma A431 and macrophage Raw 264.7 cells. In order to test whether apoptosis contributes to germanium cytotoxicity, DNA fragmentation was evaluated in A431 and Raw 264.7 cells treated with  $\text{GeO}_2$  or Ge-132, respectively. We found that neither  $\text{GeO}_2$  nor Ge-132 had effect on chromosomal DNA fragmentation. Previous studies by Huang (1999) *et al* indicated that sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ) cytotoxicity is mediated through mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. In order to study the mechanism(s) by which  $\text{GeO}_2$  mediates cell death, we analyzed the signal transduction pathways triggered by  $\text{GeO}_2$ . We found that  $\text{GeO}_2$  stimulated the extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity and transcription factor c-Jun in a time-dependent manner, but not c-Jun amino-terminal kinase (JNK), or p38 MAPK in A431 cells. Treatment of the Raw 264.7 cells with  $\text{GeO}_2$  induced activities of ERK, JNK and c-Jun in a time-dependent manner. Collectively, these results suggested that  $\text{GeO}_2$  effects might be cell type specific. To test whether free radicals were involved in  $\text{NaAsO}_2$  or  $\text{GeO}_2$  mediated cell death, the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which produced the NO free radical, was determined in A431 cells treated with  $\text{NaAsO}_2$  or  $\text{GeO}_2$ . We found that expression of iNOS was induced in a time-dependent manner in  $\text{NaAsO}_2$  or  $\text{GeO}_2$ -treated A431 cells. Taken together, our results indicated that  $\text{GeO}_2$ -induced cell death may be mediated through MAPK signal pathways and that iNOS may contribute to  $\text{NaAsO}_2$  or  $\text{GeO}_2$  mediated cell death. To our knowledge, this is the first report that iNOS may contribute to heavy metal mediated cytotoxicity.

## (一)、前言：

近年來癌症位居國人十大死亡原因之一，因而市面上抗癌的藥物不勝枚舉，但一般消費者根本不可能化驗商品是否有效。我們的研究，即探討一種相當熱門的抗癌藥品——「鎢能抗癌」，對細胞影響。首先推廣「鎢能抗癌」的是日本的淺井一彥博士，他發現「明日葉」可以治療癌症，進一步分析發現明日葉含有鎢化合物的成分。此外，民俗療法中一向奉為仙丹妙藥的靈芝，也富含鎢元素(參考文獻 1)。而日常食品中：蛤(0.9~2.03  $\mu\text{g/g}$ )，鮭魚(1.23  $\mu\text{g/g}$ )，牛奶(1.51  $\mu\text{g/g}$ )，番茄汁(5.76  $\mu\text{g/g}$ )也富含鎢元素(參考文獻 4、5)。但大量的服用鎢，則會致人於死(參考文獻 6)。如果服用高濃度的  $\text{GeO}_2$  (1000ppm)則會造成 50%的死亡率；100ppm 同樣會造成中毒的症狀。(參考文獻 7)。而另一種鎢的化合物  $\text{Ge-132}$ (carboxyethylgermanium sesquioxide)。似乎會抑止癌細胞的生長，並且在一定濃度之下不對細胞產生傷害(參考文獻 8)。我們研究的目的是針對  $\text{Ge-132}$  及  $\text{GeO}_2$  對細胞所產生的細胞毒性，並探討鎢會透過什麼樣的調控機制來影響細胞的生理功能。

## (二) 研究方法與過程

### (1) 人類上皮癌 A431 細胞的培養：

A431 細胞種植在含有 10% fetal bovine serum(FBS) / DMEM 培養液之直徑 10 cm 的培養皿中，培養在內部充滿 5 %  $\text{CO}_2$  及 95 % air，溫度 37°C 的細胞培養箱中，直到長滿(confluence)。以含有 0.05 % EDTA 及 0.025 % trypsin 的磷酸緩衝液(phosphate-buffered saline, PBS)將長滿的細胞收集下來，離心 80 xg，5 min，除去上清液，加入適當培養液做繼代培養(subculture)。

### (2) 老鼠巨噬細胞(Raw 264.7)之培養：

培養液為含有 10 % fetal bovine serum (FBS)的 DMEM。種在 75 $\text{cm}^2$  的細胞培養皿中。細胞培養環境為含有 5%  $\text{CO}_2$ , 95% air, 溫度 37°C 的細胞培養箱，為懸浮型細胞。當細胞長滿時(confluence)，直接敲打培養皿使細胞脫落，直接加入新鮮培養基稀釋，再分裝至新培養皿，以一比五的比例作繼代培養(subculture)，約二天可長滿。

### (3) 數細胞(A431)數：

將培養好的 A431 細胞(10cm dish)抽掉 MDGM，加入 trypsin 2ml，搖晃混合均勻，抽掉，再加入 trypsin 2ml 放入細胞培養箱( 5%  $\text{CO}_2$ , 95% air, 37°C )15 min 後，取出並用力敲打培養皿，直到所有細胞脫落。抽出至離心管，並加入 MDGM 8 ml。混合均勻後吸取 10  $\mu\text{l}$  至微量離心管，並加入 10  $\mu\text{l}$  的 trypan blue 染劑，再次混合均勻，取 10  $\mu\text{l}$  至數細胞蓋玻片上，在顯微鏡下數細胞數。

#### (4)數細胞(Raw264.7)數：

將培養好的 Raw 264.7(10cm dish)抽出 DMEM 至離心管中，用細胞刮勻刮下細胞，裝在離心管中，混合均勻，取 10  $\mu$ l 至數細胞蓋玻片上，在顯微鏡下數細胞。

#### (5)DNA 斷裂分析

將  $1.5 \times 10^6$  個細胞培養於 10 cm 之培養皿於一定時間後收集上清液至 15 ml 離心管，再以 trypsin 將細胞由培養皿脫落下來並移至同一支 15 ml 離心管，於 3000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，以 5 ml PBS 緩衝液清洗細胞 1 次，以 3000rpm 離心 10 分鐘並去除上清液，再以 1 ml PBS 緩衝液打散細胞後，轉移至 1.5 ml 之微量離心管。再次以 1500rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，細胞沉澱物以 100  $\mu$ l lysisbuffer 處理並充分打散，再次於 5400rpm 下離心 5 分鐘，收集上清液至同一管微離心管，此時加入 20  $\mu$ l 之 SDS (10%) 及 50  $\mu$ l 之 Rnase (20mg/ml)，於 37°C 下進行隔夜反應，最後加入 150  $\mu$ l 醋酸氨(10M)和 1.2 ml 之 100%酒精(4°C)，將 DNA 隔夜沉澱。之後將 DNA 以 12000rpm 離心 10 min，移除上清液並以 15  $\mu$ l TE buffer 將 DNA 溶解，加 1  $\mu$ l 之 loading dye，跑 1% 洋菜膠電泳，於 30 伏特下跑 8 hrs，最後以 ethidium bromide 染 DNA 約 10 min，在 UV light box 下即可看到 DNA 片段。

#### (溶液配置)

##### \*Lysis solution：

NP40	1 ml
EDTA	0.76 g
Tris-HCl	0.79 g
去離子水	100 ml
並調整 pH 值至 7.5	

##### \*10% (SDS)：

SDS	10 g
去離子水	100 ml

##### \*Rnase A (20mg/ml)

Rnase A	20 mg
去離子水	1 ml

於水煮沸 15 min，存放於 -20°C。

##### \*Proteinase K (20 mg/ ml)：

Proteinase K	20 mg
去離子水	1 ml

##### \*Ammonium acetate (10M)

Ammonium acetate	77.08 g
去離子水	100 ml

(6) Cell lysate 的製備：

將長滿 10-cm Petri dish 的 A431 細胞，以冰涼的 1x PBS 清洗兩次，加入 1 ml 之 RIPA 將細胞收集下來，以 tip 來回抽吸數次，於 4°C 下以 3500 xg 離心 5 min，取出上清液即為 cell lysate，儲存於 -70°C。

(溶液配置)：

\*Lysis buffer (RIPA)

1M Tris-HCl (pH 7.5)	25 ml
NaCl	4.38 g
IGEPAL CA-630	5 ml
Sodium deoxycholate	2.5 g
Add H <sub>2</sub> O to 500 ml	

\*Modified lysis buffer (RIPA)

在使用 RIPA 前，每 ml 加入

0.5 M Sodium orthovanadate	2 $\mu$ l
0.1 M EGTA	20 $\mu$ l
5 mg/ml aprotinin	2 $\mu$ l
0.1M PMSF	10 $\mu$ l

(7) 蛋白質濃度測定：

根據 Lowry 等人的方法(參考文獻)，配製六種濃度的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)：0, 0.025, 0.0625, 0.125, 0.1875 及 0.25 mg/ml 為標準品。將標準品及稀釋後待測樣品備妥，每管均加入 2 ml alkaline copper 溶液(由 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0.1 N NaOH：1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O：2% Na-K-tartrate 以 100：1：1 比例混合而成) 均勻混合，在室溫下靜置 20 min，每管再加入 0.2 ml 1 N Foline-Ciocalteris phenol reagent 震盪混合後靜置 30 min，以 Hitachi U2001 紫外光-可見光分光光譜儀 (spectrophotometer) 紀錄 660 nm 之吸光值，此偵測活動需在 30 min 內完成。利用標準品濃度與其吸光度做迴歸直線，得一標準曲線圖，由此圖可以換算樣品蛋白質濃度。

(溶液配置)

\*2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0.1 N NaOH solution：

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 g
1 N NaOH	100 ml

加水(MQ)到體積為 1L，置於室溫保存。

\*1 % CuSO<sub>4</sub> solution：

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.6 g
---------------------------------------	-------

加水 (MQ)到體積為 100 ml，置於室溫保存。

\*2 % Na-K-tartrate solution :

tartrate · 4H<sub>2</sub>O 2.6 g

加水(MQ)到體積為 100 ml , 置於室溫保存。

(8)西方點墨法(Western blotting) :

A.硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳法(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE) :

(1) SDS-PAGE 的準備 :

\*製備 gel 的各種溶液 :

-- a 溶液 : 30g acrylamide, 0.8g bis acrylamide 加水至 100ml

-- b 溶液 : Tris buffer : 12.1g Tris 加水至 100ml, pH6.8

-- c 溶液 : Tris buffer : 12.1g Tris 加水至 100ml, pH6.8

-- d 溶液 : 10g SDS 加水至 100ml

-- 10% A.P.(ammonium persulfate) : 0.2g ammonium persulfate 加水至 2ml

-- TEMED

\*小片 14% 堆積凝膠(14% stacking gel)之溶液組成 :

-- a 溶液 0.248ml

-- b 溶液 0.185ml

-- c 溶液 0.015ml

-- d 溶液 1.043ml

\*小片 14%分離凝膠(14% separating gel)之溶液組成 :

-- a 溶液 2.3ml

-- b 溶液 1.87ml

-- d 溶液 0.05ml

-- H<sub>2</sub>O(MQ) 0.82ml

-- 10%ammonium persulfate 16.7  $\mu$ l

-- TEMED 3.4  $\mu$ l

\*製備 gel :

加入製備 separating gel 之 a、b、d 溶液及 H<sub>2</sub>O(MQ)混合均勻，再加入 10% ammonium persulfate 及 TEMED 混合之，要盡量避免氣泡之產生，倒入已準備好之玻璃槽內，再加入水(MQ)平鋪於凝膠上使其平整，待 gel 凝結後，除去水層，加入混合好之 stacking gel 並同時將一個十齒梳狀模板插入，待其凝結後即完成 SDS-PAGE 的準備。

(2)方法 :

取相當於 50  $\mu$ g 蛋白質量的細胞溶解液，加入十分之一體積的 5 x sample buffer 混合均勻，將微量離心管於 95~100°C 沸水中處理 5 分鐘使其中的蛋白質變性後，將樣品注入 stacking gel 的樣品槽，再放入電泳樣品槽中，內外槽皆倒入 running 緩衝液，以每小片凝膠 30mA 電流經 30~50 分鐘，待指示劑中的染料移離凝膠時，



即取出凝膠。

(溶液配置)

\*running buffer：

Tris	15.15g
Glycine	72.1g
SDS	5g

加水(MQ)使體積為 5L，待溶解後至於 4℃ 保存。

\*5x sample buffer：

Tris	0.757g
Glycerol	5ml
SDS	0.20g
DTT	0.77g

bromophenol blue： 10mg

加水(MQ)至體積為 10ml，以 12N HCl 調為 pH6.8，置於-20℃ 保存。

B.蛋白質電泳 semi-dry 轉漬法(transfer)：

將已完成的 SDS-PAGE 凝膠取下，利用 SemiPhor™ 儀器以 semi-dry 的原理進行轉漬，其方法如下：將經過甲醇(處理 5 分鐘)，水(處理 5 分鐘)即轉漬緩衝液(處理 15 分鐘)前處理過的 PVDF 膜，置於兩片轉漬緩衝液浸濕的 3M 濾紙上方，再將凝膠放到 PVDF 膜上，最後再用另外兩片轉漬緩衝液浸濕的 3M 濾紙覆蓋，壓出氣泡，裝設好裝置後，於 4℃ 下以 200mA 的電流(小於 10V)轉漬 1 小時。轉印後的 PVDF 膜可免疫染色。

(溶液配置)

\*轉漬緩衝液(blotting buffer)：

Tris	16.5g
Glycine	78.4g

加水(MQ)4.4L，置於 4℃ 保存，1.1L 的 methanol 於使用前再加入。

C.封阻步驟(blocking)：

轉印完成的 PVDF 膜置於適量的封阻緩衝液，輕輕搖動反應，在 4℃ 下過夜或室溫下 1 小時，以阻斷非特異性結合。

(溶液配置)

\*清洗緩衝液(washing buffer)：

1x 磷酸緩衝液(PBS)	2L
Tween 20	2ml(0.1%)

混合均勻後置於 4℃ 保存

\*封阻緩衝液(blocking buffer)：

non-fat milk powder 2.5g(5%)

加清洗緩衝液 50ml 溶解使用。

#### D.免疫染色法：

將浸泡 PVDF 膜的 blocking buffer 去除，以 washing buffer 洗數次（二十分鐘 2 次，十分鐘 2 次，五分鐘 2 次），以去除非特異性結合。再加入以 washing buffer 稀釋的一級抗體，4℃ 下過夜反應，反應完後以 washing buffer 洗數次（二十分鐘 2 次，十分鐘 2 次，五分鐘 2 次），再加入以 washing buffer 稀釋具過氧化酵素連結的二級抗體，室溫下反應 1 小時。反應完後以 washing buffer 洗數次（二十分鐘 2 次，十分鐘 2 次，五分鐘 2 次），以去除非特異性結合。最後利用 ECL 方法呈色：加入 lumion1 和反應促進劑與 PVDF 膜上的過氧化酵素於室溫下反應 1 分鐘，產生的螢光物質，可利用螢光專用 X 光軟片壓片，可得到清晰的結果，此方法靈敏度很高。

一級抗體	二級抗體
p-ERK 1/2(1 : 2500)	goat anti-rabbit IgG(1 : 2000)
p-JNK(1 : 250)	goat anti-rabbit IgG(1 : 1000)
iNOS(1 : 1000)	goat anti-mice IgG(1 : 2000)
p-p38(1 : 1000)	goat anti-rabbit IgG(1 : 500)
p21(1 : 2000)	goat anti-mice IgG(1 : 2000)

### (三)、研究結果與討論：

#### 研究結果：

##### 一、探討 NaAsO<sub>2</sub>，GeO<sub>2</sub>，及 Ge-132 對 A431 及 Raw264.7 細胞存活之影響

首先將細胞重新做繼代培養，由圖一可知，在經過 24 小時之後，細胞數明顯的開始增加，而且 Raw264.7 細胞生長速度比 A431 快，接著將長滿的 A431 細胞加入 NaAsO<sub>2</sub>(10~50  $\mu$  M)，48 小時之後，發現隨著 NaAsO<sub>2</sub> 濃度的增加，會促使細胞明顯的死亡(圖二)。除此，當 A431 細胞分別加入濃度為 10、100、1000  $\mu$  g / ml 的 GeO<sub>2</sub>，作用 48 小時後，在顯微鏡下可觀察到高濃度處理的細胞，漂浮的細胞甚多，細胞表面出現破洞。數細胞數後，細胞數隨濃度增加遞減(圖三)，顯示 GeO<sub>2</sub> 確實有細胞毒性。Ge-132 以同樣濃度加入細胞，作用 48 小時後，從外觀上看不出任何變化，數細胞數的結果顯示 Ge-132 不會使細胞死亡(圖三)。GeO<sub>2</sub> 對 Raw264.7 細胞毒性方面，和 GeO<sub>2</sub> 對 A431 細胞的影響是類似的，即在 GeO<sub>2</sub> 處理 Raw264.7 不同濃度下，皆會造成細胞的死亡(圖四)，但 Ge-132 卻無影響(data not shown)，由以上結果顯示 GeO<sub>2</sub> 與砷一樣皆會促使 A431 及 Raw264.7 細胞死亡。

## 二、探討 $\text{GeO}_2$ 造成細胞死亡的機制

### (1) DNA 斷裂分析

將細胞加入 10、100、1000  $\mu\text{g/ml}$  的  $\text{GeO}_2$  和  $\text{Ge-132}$  作用 48 小時後抽取 DNA 分析，結果顯示染色體 DNA 不會斷裂(圖五)，所以  $\text{GeO}_2$  和  $\text{Ge-132}$  不會造成細胞凋亡(apoptosis)。

### (2) $\text{GeO}_2$ 對有絲分裂活化酵素的影響

由之前的研究結果得知  $\text{NaAsO}_2$  也會造成細胞的死亡(圖二)，並且  $\text{NaAsO}_2$  會促使 A431 細胞中 MAPK 的活化(參考文獻)，所以我們進一步來探討  $\text{GeO}_2$  是否也會經由 MAPK 訊息傳遞路徑來條控其對細胞生理功能的影響。將 A431 細胞處理 1mg/ml 的  $\text{GeO}_2$  在不同的時間點 15、30 min、1、3、6、12、24、48 hrs，隨著  $\text{GeO}_2$  處理的時間增加，會活化 ERK，並在  $\text{GeO}_2$  作用 0.5 小時的時候，ERK 被活化的程度即達到最大，並且活化情形可持續至 6 小時(圖六.A)，但在 MAPK 成員中的 JNK 及 p38 皆不會受到  $\text{GeO}_2$  的影響(data not shown)。而在  $\text{GeO}_2$  對 Raw264.7 細胞中 MAPK 訊息傳遞路徑的影響，由圖七.A、B 可知，隨著  $\text{GeO}_2$  作用時間增加 ERK 及 JNK 皆會被活化，但 p38 卻不會(data not shown)。

### (3) $\text{GeO}_2$ 對轉錄因子 c-Jun 及其他蛋白質表現的影響

因為  $\text{GeO}_2$  會活化 MAPK 訊息傳遞路徑，所以接下來我們要探討的是 MAPK 下游的物質，有哪些會參與調控  $\text{GeO}_2$  所誘發的細胞死亡。首先我們針對 c-Jun 轉錄因子來做分析，由圖六(B)及圖七(C)得知， $\text{GeO}_2$  皆會使 A431 及 Raw cell 中的 c-Jun 表現量增加，且隨著處理時間的增加，A431 cell 中的 c-Jun 明顯增加(圖六 B)。所以我們想要了解的是在 c-Jun 表現量增加後，會不會促使某些基因被活化，例如負責產生 NO 的 iNOS 或者是參與調控細胞週期的 p21 蛋白質，是否也會被  $\text{GeO}_2$  誘導。由實驗結果顯示在 A431 cell 中， $\text{GeO}_2$  確實會誘導 iNOS， $\text{GeO}_2$  處理 30 分鐘後即達最大量(圖六 C)，另外， $\text{NaAsO}_2$  與  $\text{GeO}_2$  一樣，亦會使 iNOS 表現增加，但是  $\text{GeO}_2$  並沒有對 Raw cell 中的 iNOS 產生影響(data not shown)。

從上述結果得知， $\text{GeO}_2$  在不同的細胞，其所活化的 MAPK 路徑不同，且其所誘導細胞的死亡路徑亦有可能會不一樣。

## 討論：

根據研究論文指出(圖八)，外來的因子作用再細胞上所引發一連串的反應幾乎全部都經過 Ras/Raf/MAPK 這條路徑，故確認  $\text{GeO}_2$  會使細胞死亡後，我們著眼於研究 MAPK，發現 A431 cell 中的 ERK 被活化，而 Raw cell 中的 JNK、ERK 被活化，則進一步研究更下游的 c-Jun 轉錄蛋白，此蛋白是參與控制著基因的表現，實驗後發現 c-Jun 也被活化，另外，在 A431 cell 中，iNOS 的表現亦會受到  $\text{GeO}_2$  所誘導，此表示細胞中 NO 的量也可能隨之增加，綜合在 A431 細胞中的實驗結果我們推測  $\text{GeO}_2$  誘導 iNOS 的增加可能是經由 MAPK 訊息傳遞路徑，促使 c-Jun 轉錄蛋白增加而活化 iNOS 基因表現，在 iNOS 表現增加後，導致 NO 產量上升，造成細胞死亡，而另一方面，雖然在 Raw264.7 細胞中  $\text{GeO}_2$  同樣會使細胞死亡，

但卻不會使 iNOS 表現增加，故  $\text{GeO}_2$  所造成細胞死亡的機制在不同細胞中其所參與的分子是不同的，對於  $\text{GeO}_2$  如何使 Raw264.7 細胞死亡(既然 iNOS 的表現不會受到  $\text{GeO}_2$  的影響)，至目前為止並不清楚，不過  $\text{GeO}_2$  會促使 Raw264.7 細胞中 JNK 的活化，但在 A431 細胞中不會，所以，在 Raw cell 中  $\text{GeO}_2$  有可能是透過 JNK 的活化去影響某些物質的表現或活化，而造成細胞的死亡。

在  $\text{NaAsO}_2$  對 A431 細胞的影響探討中，它會活化 ERK、JNK、p38 和 c-Jun，並造成細胞死亡，我們也再次確認過此結果，更進一步，從實驗中亦發現  $\text{NaAsO}_2$  會誘導 A431 細胞中 iNOS 表現的增加。所以推測  $\text{NaAsO}_2$  和  $\text{GeO}_2$  造成細胞的死亡，其調控機制可能是透過相同的訊息傳遞路徑。雖然砷與銻不屬於同一族的元素，但在元素週期表上相鄰且同樣為類金屬，我們推測他們很可能有相同的細胞毒性。

本實驗所使用之銻的二種化合物，一為銻的氧化物( $\text{GeO}_2$ )，另一為有機銻  $\text{Ge-132}$ (carboxyethylgermanium sesquioxide,  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{Ge}_2\text{O}_7$ )，我們還不太清楚它的化學性質和它作用於細胞時是用哪一部位在反應，雖然此二種化合物中的銻均為四價，但作用於細胞的結果  $\text{GeO}_2$  會使細胞死亡，但  $\text{Ge-132}$  不會，其影響明顯不同，所以，雖然均為銻的化合物，但二者在生物上有不同的性質。然而， $\text{GeO}_2$  在半導體工業裡應用甚廣，對人體有傷害，應小心防範。而有機銻有上千種，很可能每一種對細胞的影響皆不同，在自然界中就存在少許物質含有銻，如：靈芝，大蒜等，但我們還無法確認它以什麼形式存在，所以對細胞及人體的影響還無法確認。另外，新發明的銻藥物也含有有機銻，我們必須經過精密的實驗後方能使用之。

#### (四)、結論與應用：

由探討銻對細胞生理功能影響的實驗中，我們已了解下列幾點：

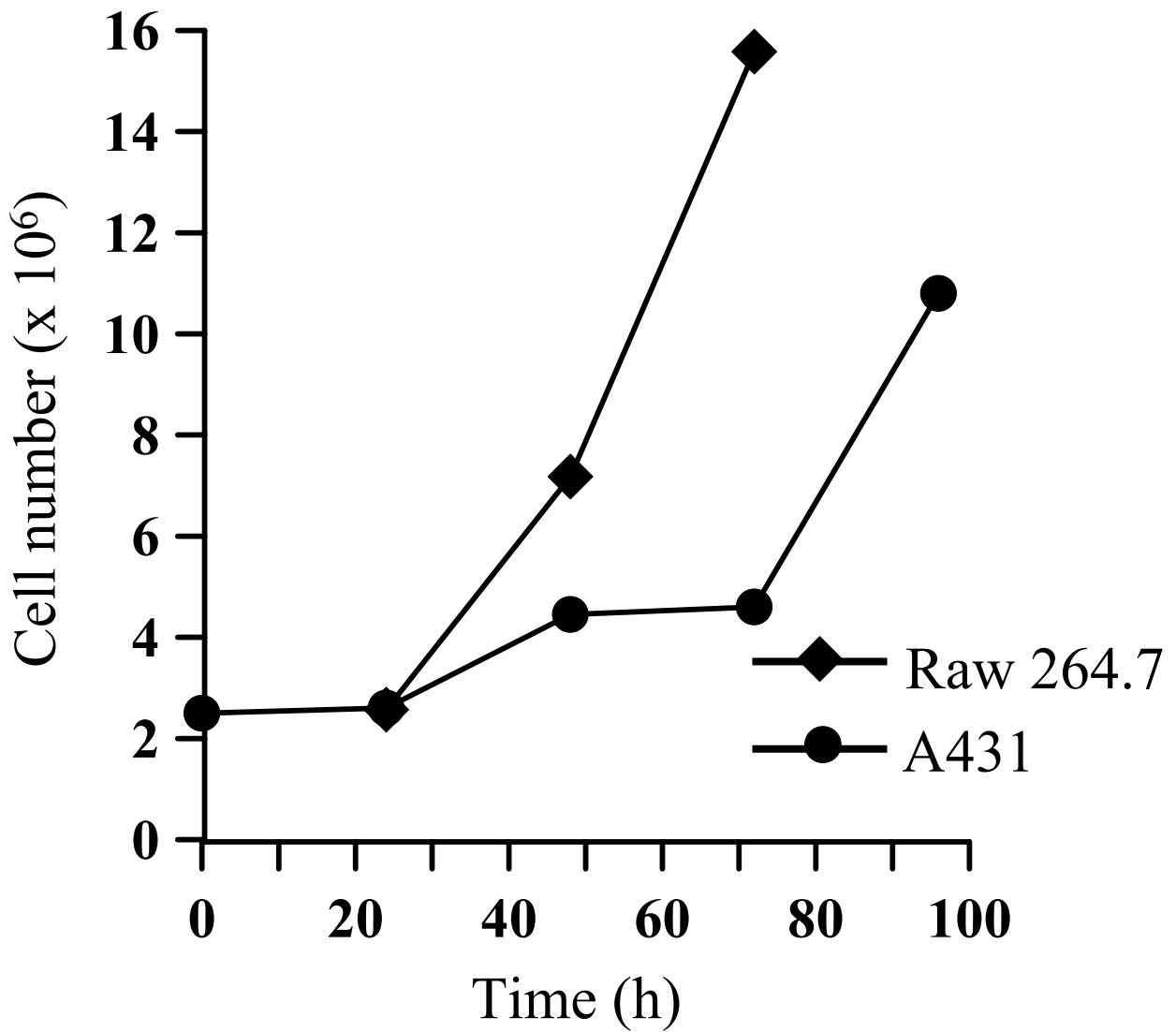
1. 不同形態之銻化合物，其對細胞毒性是有所不同的。
2.  $\text{GeO}_2$  對細胞的毒性其所條控的機制會因細胞種類的不同而有所差異。
3. 銻對細胞的毒性其調控機制與砷類似，代表銻也有可能與砷一樣對人體產生相同的毒性。
4. 重金屬所產生的細胞毒性很可能會經由 iNOS 的活化來誘導產生。

未來將進一步觀察在加了  $\text{GeO}_2$  和  $\text{NaAsO}_2$  或其他重金屬的狀況下，在 MAPK 訊息傳遞路徑上游像 MEK、Raf 等蛋白質是否也會被活化，如果這些重金屬都能活化某一蛋白，則表示此蛋白對重金屬所調控的細胞毒性有重要影響，並且能從化學性質推測別的化合物是否會有相同的影響，甚至能討論重金屬如何與這個蛋白結合。在應用方面，本研究提供了一個探討重金屬如何造成細胞毒性相關機轉的模式並且提出了一個研究未知藥物對細胞影響的流程，讓我們對如何進行生化分析，研究有一個大略的認識。此外，這個實驗也告訴我們，對於一種藥物，經常得作各方面的分析，才能確定這種藥物對人體的影響。也就是說對於市面上

未經處方籤的藥物，我們不應該輕易嘗試。

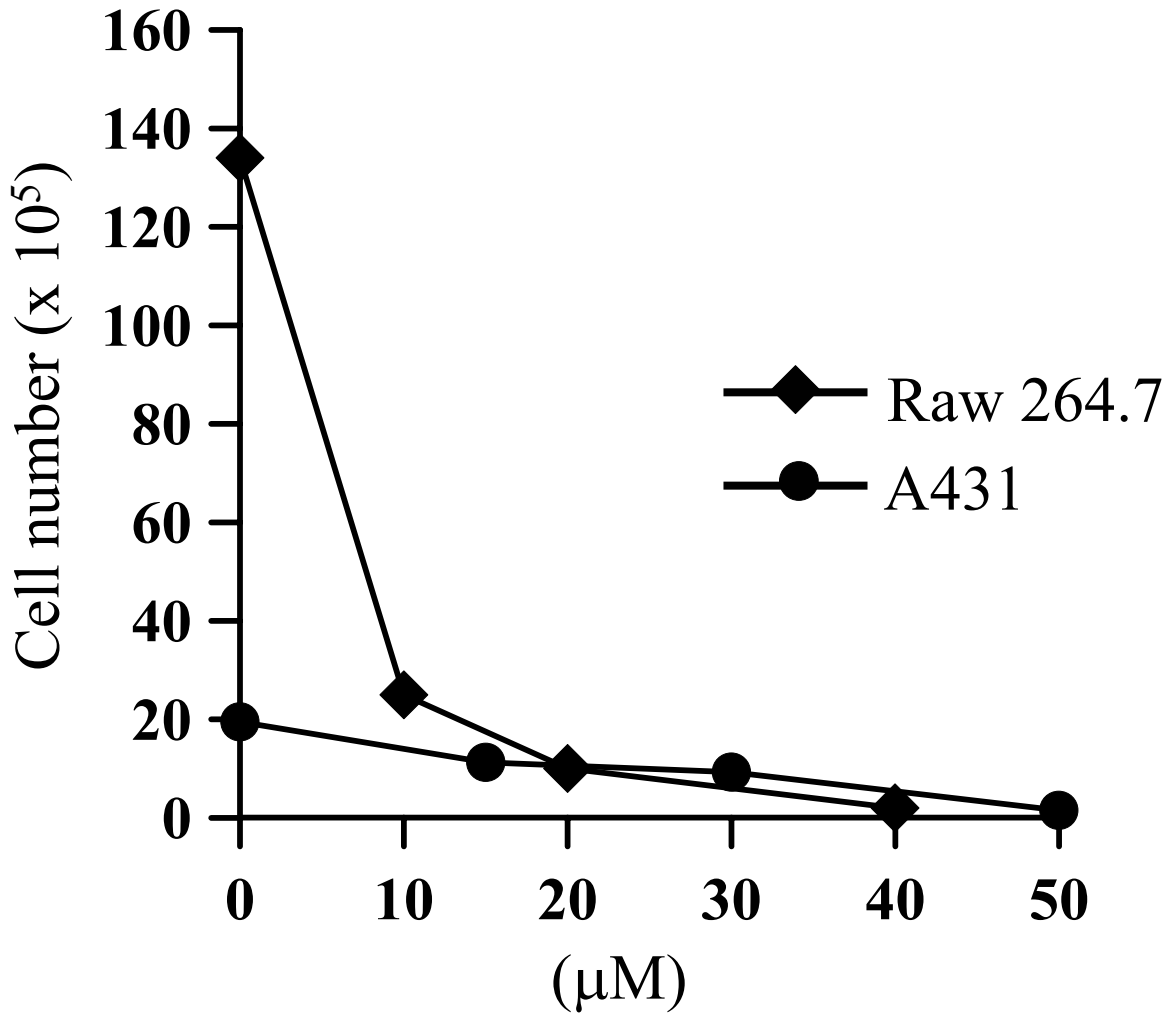
### (五)參考文獻：

1. 李志行，國立文化大學實業計劃研究所碩士論文，植物中鎘之定量研究，1984
2. 黃暉升 (H. S. Huang)，國立成功大學基礎醫學研究所博士論文，磷脂過氧化物氬氨基硫過氧化酵素，1999
3. 李芝嫻，國立成功大學微生物免疫學研究所碩士論文，Ha-ras 致癌基因在 NIH3T3 細胞株中所誘導的細胞計畫性死亡，1997
4. V.B. Vouk, Handbook On the Toxicology of Metals, 2nd ed, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp.255-266, 1986.
5. H.A. Schroeder, J.J. Blaass, 1967, Arsenic, germanium, tin and vanadium in mice: effects on growth, survival and tissue levels, J.Nutr.92, 245-252.
6. N.Nagata, T.Yoneyama, K.Yanagida, K.Ushio, S.Yanagihara, O.Matsubara, Y.Eishi, 1985, Accumulation of germanium in the tissues of a long term user of a germanium preparation died of acute renal failure, J.Toxicol.Sci.10, 333-341.
7. B.Venugopal, T.D. Luckey, Metal Toxic in Mammals, Vol.2, Plenum Press, New York, 1978
8. M.Kanisawa, H.A. Schroeder, Life-term studies on the effects of trace elements on spontaneous tumors in mice and rats, Cancer Res.29, 892-895.

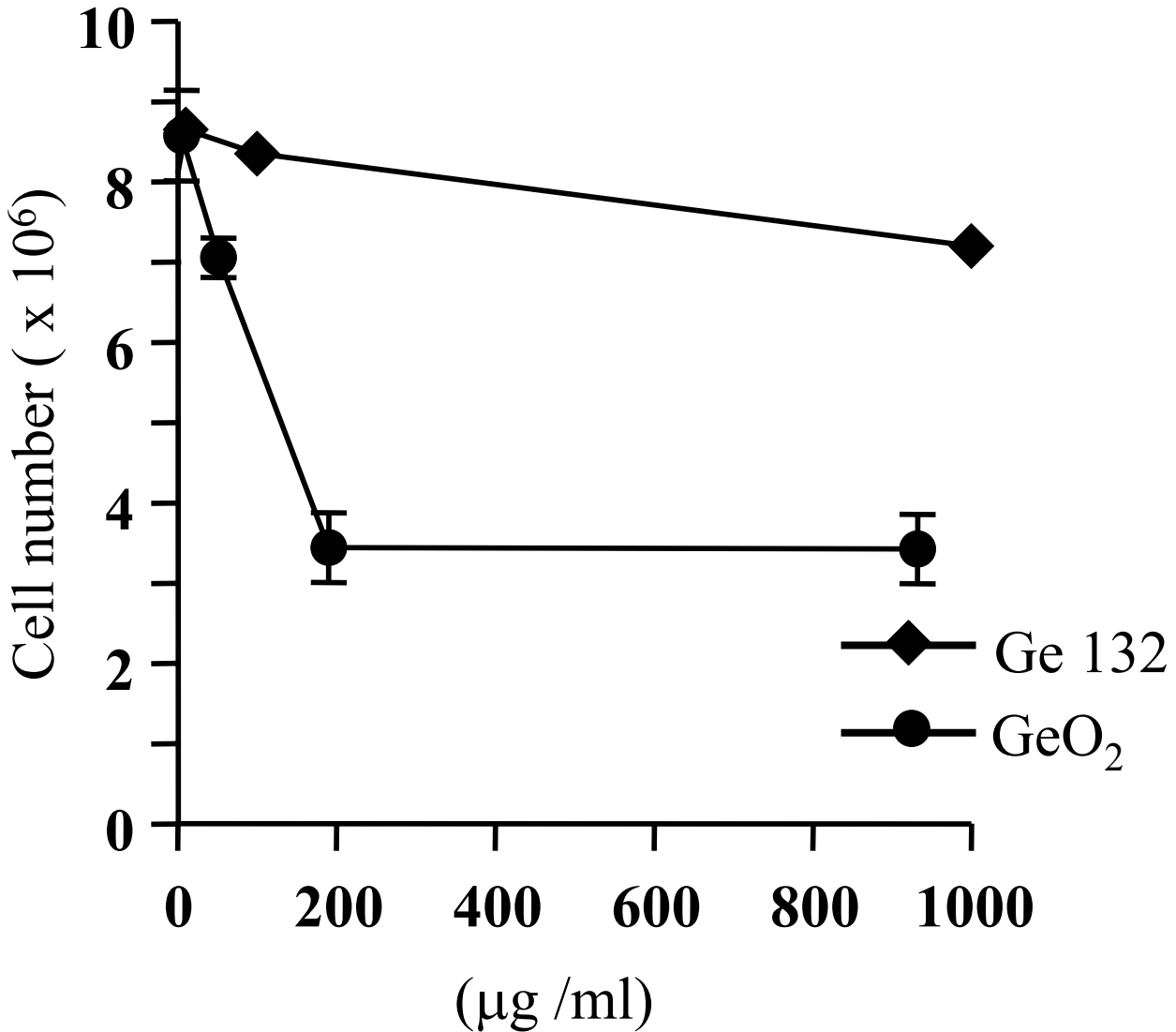


圖一 A431及Raw 264.7細胞的生長速度

圖示免疫細胞Raw 264.7的生長速度比子宮頸上皮癌細胞A431快。



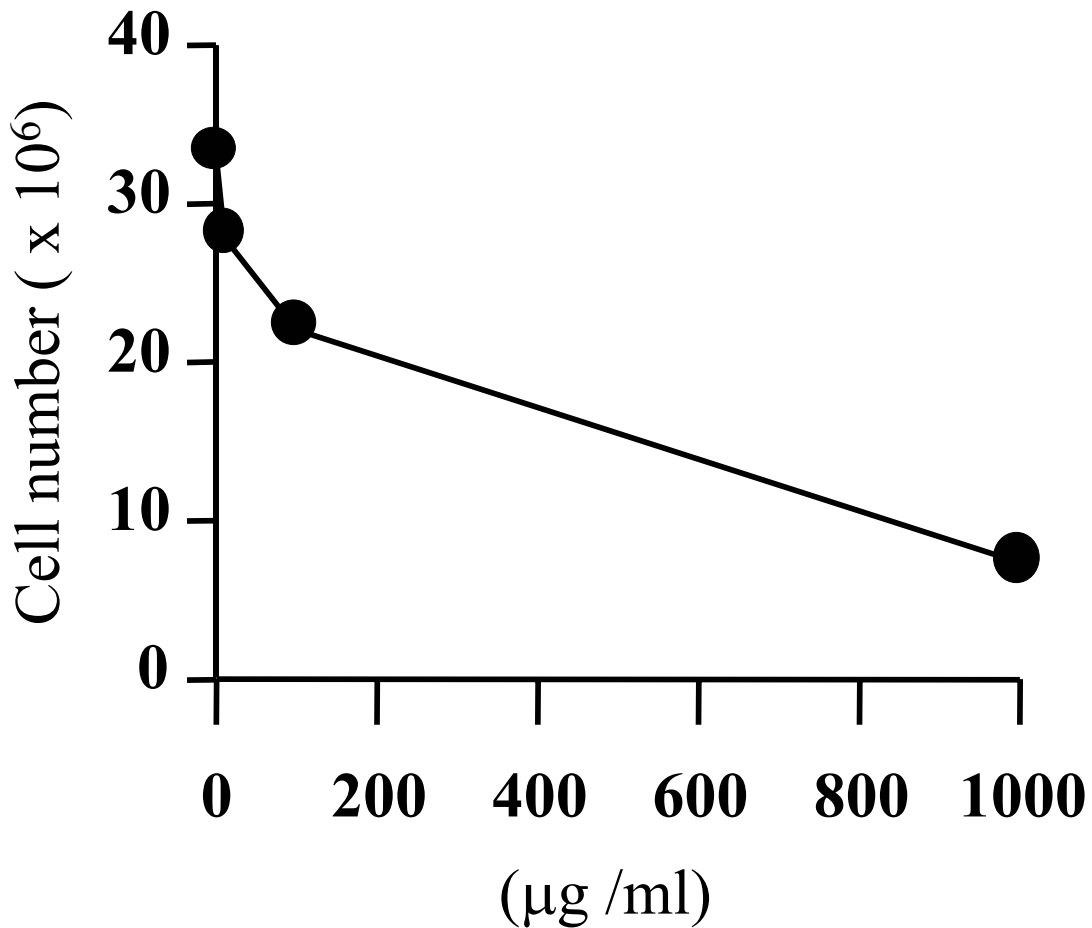
**圖二 三價砷對A431及Raw 264.7細胞存活的影响**  
將細胞處理不同濃度的砷 (10~50  $\mu\text{M}$ ) 48小時之後，計算細胞的存活情形，可知隨著砷的濃度增加會促使A431及Raw 264.7細胞明顯的死亡。



**圖三 GeO<sub>2</sub>及Ge 132對A431細胞存活的影响**

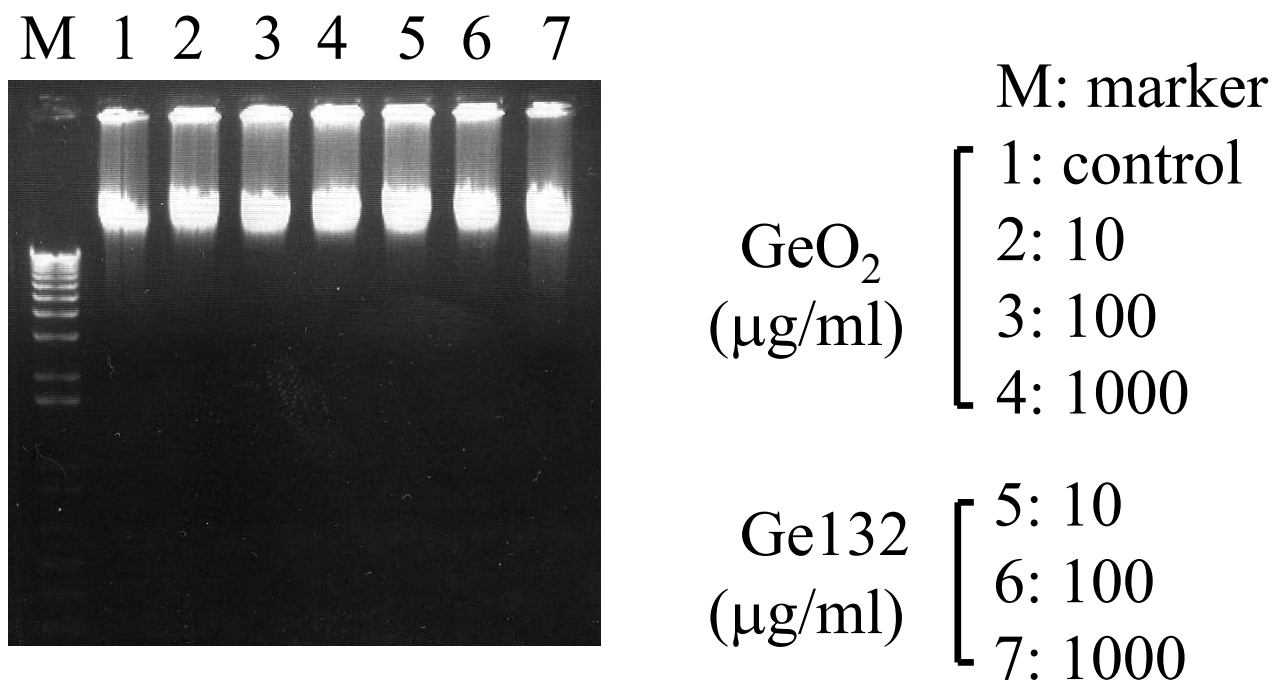
將細胞處理不同濃度的氧化鋇 (GeO<sub>2</sub>, 100~1000 μg/ml) 或有機鋇 (Ge 132, 100~1000 μg/ml) 48小時之後，計算細胞的存活情形，可知隨著氧化鋇的濃度增加會促使細胞明顯的死亡，但有機鋇則無明顯的影响。





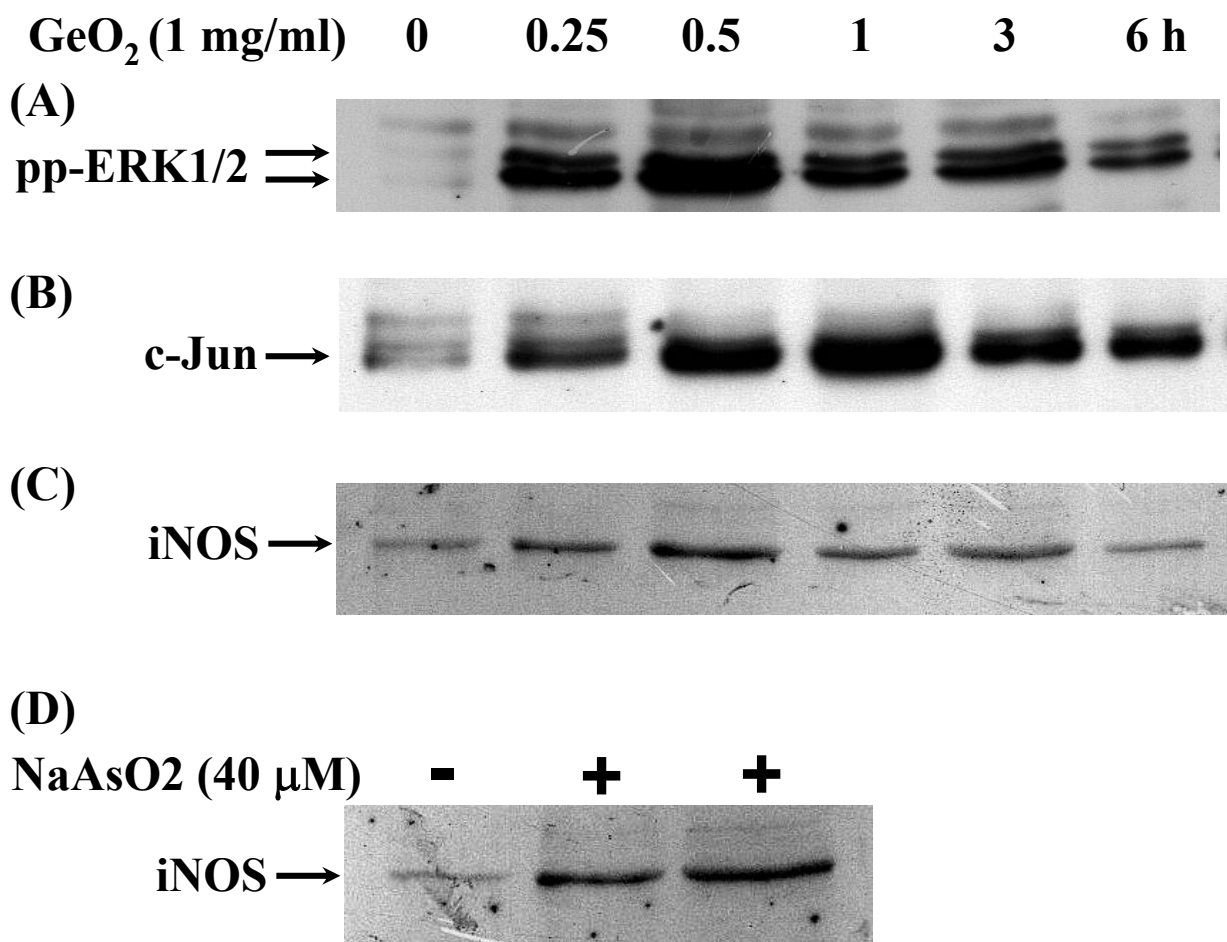
**圖四 GeO<sub>2</sub>對Raw 264.7細胞存活的影响**

將細胞處理不同濃度的氧化鋇 (GeO<sub>2</sub>, 100~1000 μg/ml) 48小時之後，計算細胞的存活情形，可知隨著氧化鋇的濃度增加會促使細胞明顯的死亡。



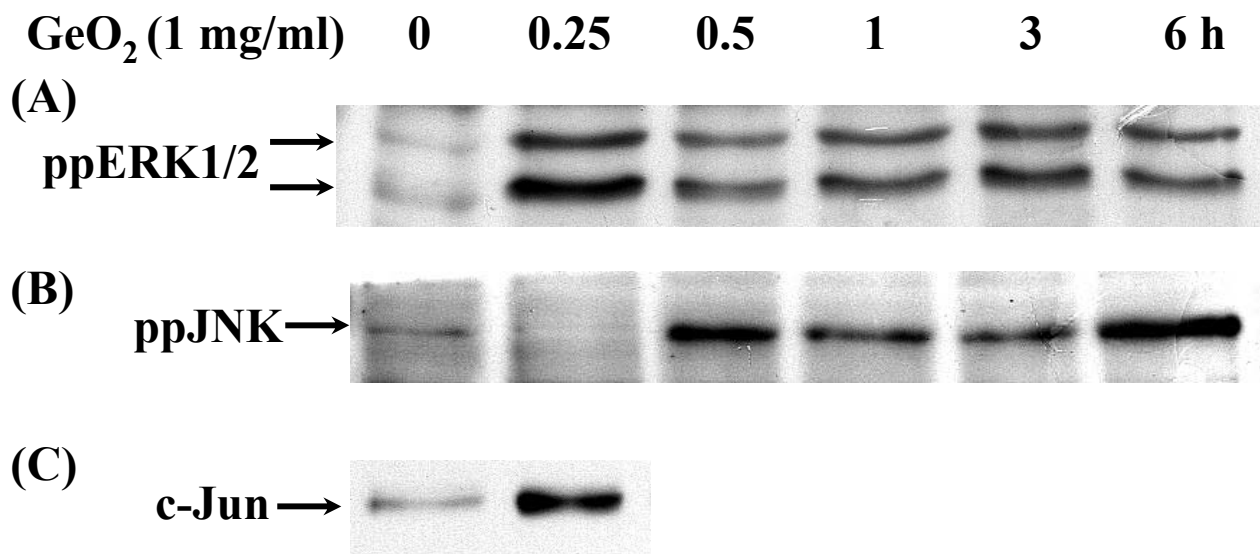
**圖五 GeO<sub>2</sub>及Ge 132對A431細胞中染色體DNA斷裂的影響**

將細胞處理不同濃度的氧化鍺 (GeO<sub>2</sub>, 100~1000 µg/ml) 及有機鍺 (Ge 132, 100~1000 µg/ml) 48小時之後，以電泳膠分析DNA是否斷裂，由結果顯示鍺並不會造成DNA的斷裂。



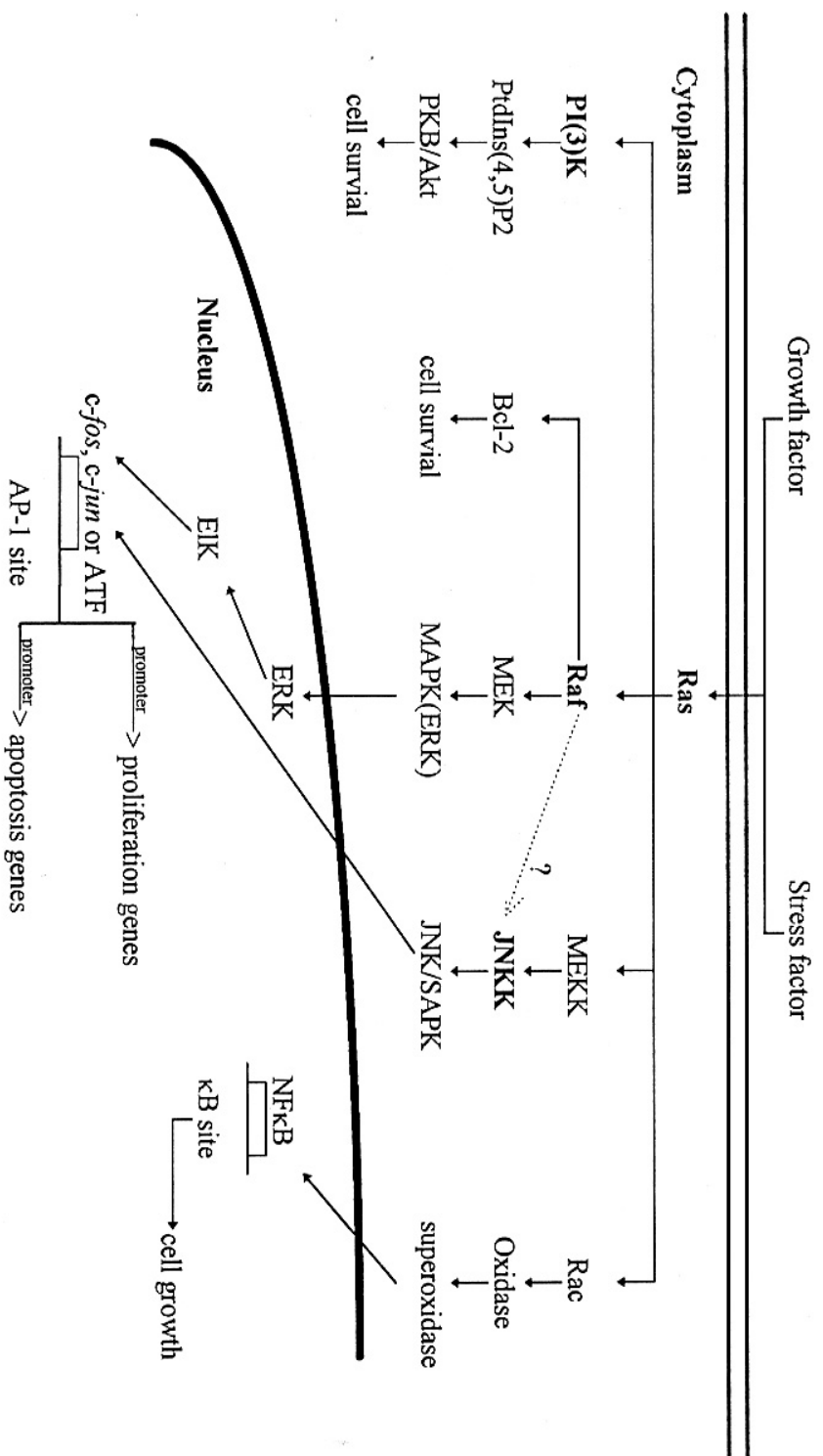
**圖六 GeO<sub>2</sub>對A431細胞中ERK活化及c-Jun, iNOS蛋白質表現的影響**

將細胞處理氧化鍺不同時間 (0~6 小時) 會造成ERK (A) 的活化及c-Jun (B), iNOS (C) 表現量的增加。同樣的，砷也會促進iNOS (D) 的表現。



**圖七 GeO<sub>2</sub>對Raw 264.7細胞中ERK, JNK活化及c-Jun蛋白質表現的影響**

將細胞處理氧化鋇不同時間 (0~6 小時)會造成ERK (A), JNK (B)的活化及c-Jun (C)表現量的增加。



圖八 Ras 訊息傳遞路徑 (參考文獻3)

## 評 語

- (1) 實驗對  $G_2O_2$  及 Ge-132 對人體子宮癌細胞及巨噬細胞株 (Raw264.7) 影響之探討得到明確之結果：無機錯致上述細胞死亡、有機錯 ( $G_2I32$ ) 則無影響。
- (2) 以  $G_2O_2$  對細胞凋亡的機制，從染色體 DNA 的分析，進而探討細胞分裂酵素中的 ERK，再探討對細胞死亡相關之 NOS 表現深入探討方法頗有創意，結果明確，值得鼓勵。
- (3) 標題不宜用重金屬，因砷並非重金屬，若改為”錯對細胞死亡機制之探討”更為確切。