

臺灣二〇〇四年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學科

作品名稱：長期處理兒茶素對無機砷與氯化鎘之遺傳毒性

學 校：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作 者：湯可維

作者簡介



您好，我的名字叫湯可維，現在就讀於師大附中三年級。我喜歡爬山、游泳、下棋、看電影。國中開始對生物這一門領域有接觸，高一上學期僥倖被錄取為中研院高中資優生培育計劃的一員，讓我有更多的機會接觸生物這神秘的面紗。當然這也幫助我完成了這份心理嚮往許久的研究報告。

從小看 Discovery 常看到美國科學家發表自己研究多年的成果，看到他們滿意的笑容，我也真想有份自己的研究報告。如今我做到了，但是我更發現，不管成果是否滿意，至少這份報告是一步一腳印作出來的，過程真的辛苦，從找資料、設計實驗、顧細胞……等，都點滴在心頭。不過我學會了些許的實驗方法和精神，如：看圖表、前後比對……等，我真的很高興。不過一定還有不足，現在已是國際化時代，多看看大世界是有必要的，如果可以的話，我真的希望能出去跟外國學生作學術交流。

~目錄~

中文摘要	P.2
英文摘要	P.3
一、 前言	P.4
二、 研究方法與過程	P.11
三、 研究結果與討論	P.15
四、 結論與應用	P.23
五、 參考文獻	P.24
六、 附錄	P.26

中文摘要

重金屬對人體傷害的無遠弗屆-人人皆知，根據流行病學的研究指出，長期處在重金屬含量過高之地區，易造成生理病變。比方說，長期生活在砷含量高的環境中，易導致肝臟、周邊血管及神經系的損害，各種癌症的發生機率也大為提高；長期處在含量過高的鎘環境中，易引起不正常的鈣代謝，產生骨質疏鬆症、軟骨症、糖尿、胺基尿酸、尿蛋白、貧血、和肝功能異常的症狀；而目前坊間所看到各類茶品中含有的兒茶素則被發現具有抗氧化、抗突變及清除自由基等功能。故本實驗以人類胃癌細胞(SC-M1)為材料，以微核(micronuclei)偵測技術觀察細胞長期處理兒茶素((-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG)後，對於亞砷酸鈉(sodium arsenite, NaAsO₂)及氯化鎘(cadmium chloride, CdCl₂)所造成的細胞遺傳毒性有何影響。另一方面則利用 SRB 分析法測量細胞存活率，探討長期處理兒茶素後，亞砷酸鈉及氯化鎘對於細胞的毒殺情況是否改變。實驗結果顯示細胞長期處理兒茶素不會造成微核的增加，但是卻會增加細胞的存活率；單獨處理亞砷酸鈉和氯化鎘則都會使細胞中微核明顯的增加，且會降低細胞的存活率；而長期處理兒茶素的細胞對亞砷酸鈉所誘發的微核有抑制作用且會增加細胞對於亞砷酸鈉的耐受度，長期處理兒茶素無法抑制氯化鎘所誘發的微核與細胞毒性。

英文摘要

It is well documented that exposure to heavy metals could cause seriously adverse effects to humans. Epidemiological evidence has shown that illness is frequently observed in residents living long-term in heavy metal contaminated area. For example, long-term exposure of arsenic was associated with increased incidences of liver diseases, peripheral vascular and neurological diseases, as well as cancers. And long-term exposed to cadmium may lead to abnormal metabolism of calcium, osteoporosis, osteomalacia, glucouria, aminoaciduria, proteinuria, anemia and abnormal liver function. Recently, numerous reports have shown that (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the major polyphenol from green tea, have ability to anti-oxidative stress and anti-mutagenesis. In this report, we investigated the effects of EGCG long-term exposure in sodium arsenite and cadmium chloride induces chromosomal damages and cytotoxicity in a gastric cancer cell line, SC-M1. Our present results demonstrated cells long-term exposure to EGCG did not induce micronuclei (MN) formation but induce the growth rate. Sodium arsenite or cadmium chloride alone significantly induced MN formation and cytotoxicity in cells without long-term EGCG exposure. However, long-term treatment of SC-M1 cells with EGCG significantly reduced MN formation and protects the cells from cytotoxicity induced by arsenite. Long-term exposure of EGCG had no effect on MN induction and cell survival in cadmium-treated SC-M1 cells.

一、前言

(一) 研究動機

重金屬對人體傷害的無遠弗屆-人人皆知，根據流行病學的研究指出，長期處在重金屬含量過高之地區，易造成生理病變。比方說，長期生活在砷含量高的環境中，易導致肝臟、周邊血管及神經系的損害，各種癌症的發生機率也大。自由基為提高；而長期處在含量過高的鎘環境中，易引起不正常的鈣代謝，產生骨質疏鬆症、軟骨症、糖尿、胺基尿酸、尿蛋白、貧血、和肝功能異常的症狀。但是處在重金屬危機的生活圈，卻往往不自知，也鮮少有人知道該如何去預防環境中重金屬的危害。

然而，現在廣範成為商品的各式茶類中皆含有兒茶素，且已證實它對人類具有莫大的幫助，其中能清除自由基、保護細胞、抗癌、清除自由基及抗氧化更是引起我的興趣，於是我開始查閱關於兒茶素的資料，並進一步設計以下的實驗。我想看看如果在培養的細胞中長期加入適當的兒茶素，是否可以增加細胞對於砷或者鎘所造成傷害之抗性和保護作用！

(二) 研究目的

- A. 以人類胃癌細胞(SC-M1)細胞為材料，分析兒茶素、亞砷酸鈉(sodium arsenite, NaAsO_2)及氯化鎘(cadmium chloride, CdCl_2)是否會誘引微核(micronuclei, MN)的增加及是否會影響細胞的存活率？
- B. 以人類胃癌細胞(SC-M1)細胞為材料，探討細胞長期處理兒茶素是否會影響亞砷

酸鈉及氯化鎘所誘引之微核及細胞毒殺能力？

(三) 文獻探討

1. 關於兒茶素

兒茶素類為多元酚類(Polyphenol)之一種，具有苦澀味，在茶湯中對滋味的影響頗大。茶中的兒茶素類可分為游離型的三種(包括 Catechin，C；Epicatechin，EC及 Epigallocatechin，EGC)、與沒食子酸(gallic acid)酯化的兩種(Epicatechin gallate，ECG 及 Epigallocatechin gallate，EGCG)，其中以後者(ECg 及 EGCG)含量較多。目前國外已將各種兒茶素由茶湯中分離純化出來作不同方式的運用。兒茶素類可能的利用方式及其他對人體的生理效應整理歸納如下：

1. 優良的抗氧化自由基清除劑：

I. 油脂抗氧化劑：

兒茶素是天然的油脂抗氧化劑，且其抗氧化活性優於 BHA、BHT（人工合成抗氧化劑）及維他命 E。因此頗具有開發潛力。

II. 清除自由基：

兒茶素類可清除人體產生過多的自由基以保護細胞膜的結構，可減緩人體衰老。在中國大陸及日本已有利用兒茶素類發展出抗衰老的藥物。

2. 除臭劑：

由於兒茶素類對除去甲硫醇臭味有良好效果，日本已利用兒茶素類製成商品化之除臭口香糖、香煙濾嘴，以除去抽煙者之口臭。此外日人進行豬、雞及人體試驗顯示餵食兒茶素二週後，排泄糞臭味有顯著減輕，此原因在兒茶素類對腸內產生惡臭細菌有抗菌效果。

3. 抗菌、抗病毒及改變人體腸內微生物之分佈：

對於引起人類皮膚病的多種病菌，兒茶素類亦有很強的抑制作用。日本臨床試驗以提煉出的兒茶素類來治療濕癬(Cobdyloma，一種在陰部皮膚粘膜之皮膚病)，有很好的療效，目前該項實驗尚在進行中。

紅茶中提煉出的多元酚類對流行性感冒病毒(Influenza virus)有極強的不活化作用，此點在動物細胞體外培養試驗中已獲證實，但若細胞已被病毒感染後才接觸兒茶素類，則抗病毒之效果很差。由此推論兒茶素類的抗病毒功效係屬於預防性質，並建議應在感冒流行期間喝茶以預防感染。

4. 防齲作用：

茶葉具防齲作用，一般多認為是茶中「氟」的功能，當然氟元素可以取代牙齒中羥磷灰石的羥基成為氟磷灰石，使牙釉質對酸的侵蝕具有強抵抗力。然而兒茶素類能強烈抑制生齲菌(*Streptococcus mutans*)，臨床上也證明兒茶素類可明顯減少菌斑及牙周指數，但對口腔中其他微生物沒有影響。

5. 抑制血壓上昇：

根據人體試驗報導：健康人每日攝取 500 毫克兒茶素類，經三個月測定其飲食前後之血壓，發現攝取後的擴張壓與收縮壓都顯著下降，因此證明長期攝取兒茶素類有抑制血壓上昇的功用。

6. 抑制血糖上昇：

兒茶素類對部份的醣分解酵素(如 α -amylase 及 sucrase)有抑制作用，因此當人體攝取醣類時能抵制醣類的分解，降低血糖。

7. 抑制血液中膽固醇濃度上昇：

日人竹尾忠一以動物試驗證實含 0.5~0.1% EGCG 之食物能降低血漿中總膽固醇、游離膽固醇、LDL 膽固醇及三甘油脂之量，同時增加好的 HDL 膽固醇含量。中國大陸曾對 120 位高血脂病人進行試驗顯示具有抑制血小板凝集，並有治療動脈硬化的效果。

8. 抗癌及抗突變：

很多研究報告顯示茶抽出液或茶多酚有抗癌及抗突變的活性，其作用原理都僅限於推論階段。唯獨值得注意的是針對日本靜岡縣某地區的調查，該地區胃癌的死亡率比全國低很多，其原因為該地為日本著名的茶區，其居民每日都飲用大量的。茶多酚在體外 50-100 ppm 下有阻止 Pyroli 菌的增殖，以 34 名帶 Pyroli 菌的帶原者有每日給予 700 毫純兒茶素（約 10 杯）茶攝取

一個月，幾乎所人的菌數都減少，其中有 6 名真除。因此相信兒茶素類對某些癌症有抑制作用。由於引起人類致癌因子非常複雜，有關此點尚待進一步研究。抗突變在微生物已有許多試驗獲得證實，在人體尚無具體報告。

9. 抗輻射及紫外線：

由調查發現二次大戰時居住廣島遭受原子彈輻射感染的日本人移居產茶區長期飲茶後，比未移居產茶區者其壽命較長，且健康狀況亦較好。同一時期法國與前蘇聯之研究者證實茶中之多元酚類對銻 90 (Sr90) 的小白鼠有防護效果，認為兒茶素類有防輻射之功能。在中國大陸於進行放射治療時有以茶濃縮液作為白血球增加劑使用。又根據動物試驗中發現兒茶素類能抗 UV-B 所引發之皮膚癌。

2 . 關於鎘

鎘，一種以二價形態，少量存在於鋅鉛礦物中及地表土壤內的元素，在工業上常使用做金屬防銹劑、電鍍、電池電極、塑膠製品中的色素添加劑及製造塑膠的穩定劑，於電視機、收音機、鎳鎘電池、和半導體中也都含有鎘。經由受鎘污染的食物鏈及空氣、汽機車排放出的廢氣及燃燒之香煙，鎘便自消化道、呼吸道進入生物體內，累積於肝、腎、心、肺及肌肉組織中(Nomiyama et al., 1981)。鎘在進入器官後產生多量之超氧陰離子(superoxide anion radical) (Manca et al., 1991)經由 superoxide dismutase (SOD)的作用還原成過氧化氫(H_2O_2)導致脂質過氧化作用(lipid peroxidation)致使由不飽和脂肪酸組成的細胞膜發生破裂，而使細胞受到傷害。

日常生活中，許多毒物在不知不覺中入侵我們的身體。當你吸入 20 根香煙時，便有約 1.5 μg 的鎘進入體內，並可能導致肺氣腫(emphysema)的產生(Lewis et al., 1972)。1946 年，日本富山縣居民受飲用水遭鎘污染之苦，流行著痛痛病(Itai-Itai disease)，即為鎘引起不正常的鈣代謝，產生骨質疏鬆症、軟骨症、糖尿、胺基尿酸、尿蛋白、貧血、和肝功能異常的症狀。1974 年，台灣桃園縣觀音鄉大潭村的「鎘米事件」，仍舊記憶猶新。1993 年，國際癌症研究機構(IARC)將鎘歸類為人類肺臟及前列腺的致癌物。

3. 關於砷

砷是一種分布十分廣泛的類金屬。在地表岩石之中，砷的濃度由低於 1 ppm 到數百 ppm 不等，而砷在地殼中的平均含量為 2 ppm (Wells and Elliot, 1971; Wullstein and Snyder, 1971)。在日本、紐西蘭(Sabadell,1975)和美國(Brannock, 1948)都有報告指出溫泉中溶有高量的砷化合物。在智利、台灣及英國，某些地區飲用水的砷甚至高達 1100 ppb (Fowler,1977)。砷亦可藉由金屬的提煉及煤燃燒的過程而釋放到大氣中。因此人們可藉由空氣、飲水、食物等將砷攝入體內，而各種砷化物中，又以三價和五價形式的無機砷化合物對人體危害最大。國際癌症組織(International Agency for Research on Cancer, IARC)認為食入無機砷可導致皮膚癌，而吸入無機砷可導致肺癌，因此已於 1980 年將砷列入人類致癌物(IARC, 1980)。

對砷的長期暴露會導致肝臟、周邊血管及周邊神經系的損害(Goyer, 1986; Chen et al., 1988a)，並增加皮膚癌、膀胱癌、肝癌的發生率(Chen et al., 1988b; Bates et al.,

1992)。在台灣部分地區居民長期飲用含有砷的井水，也導致周圍血管障礙而使四肢組織壞死的疾病，稱為烏腳病。許多研究發現烏腳病之盛行率與井水中的砷濃度呈高度的相關性(Tseng, 1977; Chen et al., 1988)，足見台灣地區砷污染已影響到台灣人民的生活品質。

(四) 實驗原理

1. 微核的形成及其意義

微核的形成如附錄圖一表示，在細胞分裂的後期(anaphase)，有一部份的染色體裂片，甚或是整個染色體的掉落，而在進入下一個細胞間期(interphase)的時候，單獨形成一個小核，此小核體積約為細胞核的三分之一到十六分之一，稱為微核(Micronuclei, MN)。

微核的發生必須要經過細胞的分裂，所以無論是否給予誘發(inducer)，一個不會分裂的細胞是不可能產生微核的。微核存在細胞中的時間並不長，因其會被細胞中的溶解酵素所分解。但若我使用 Cytochalasin B (CB)來抑制細胞質的分裂，則核仍然會分裂，但卻不會分成兩個細胞，因此我可以累積經過一次細胞分裂的雙核細胞(BN)，並計算其中的微核個數如附錄圖二。

這些染色體的斷裂或是脫落，是導因於各種不同的基因毒害物(Genotoxic substance)，而微核發生的頻率與個數，和染色體或染色分體產生變異呈正相關，而其致癌性也和其造成的染色體傷害有關。

2. 關於 Sulforhodamine B 分析法 (SRB assay)：

Sulforhodamine B 是一個具有磺酸基的陰性蛋白質，在弱酸性環境下可與細胞內蛋白質中的鹼性氨基酸結合，使用弱鹼溶液萃取細胞內的 SRB 並測量其吸光值，藉由 SRB 的含量即可得知細胞內的蛋白質含量，並以此代表細胞存活率。

二、 研究過程或方法

(一) 細胞株及其培養：

本實驗採用人類胃癌細胞(SC-M1)細胞株進行長期實驗，此細胞為林文昌老師提供。SC-M1 細胞培養於 DMEM 培養液中，內含 10%胎牛血清(FCS)、0.03%麩胺酸(Glutamine)、0.2%碳酸氫鈉及抗生素(青黴素 100 units/ml、鏈黴素 100 $\mu\text{g/ml}$)，並加入不同濃度的兒茶素(0, 0.1, 0.5 μM)長期培養於 37°C、5% CO₂、濕度 100%之細胞培養箱。

(二) 細胞計數：

細胞長滿以後，將培養液倒掉，用生理食鹽水洗兩次，吸去生理食鹽水後每個培養皿加入 1 ml 的 1X 胰蛋白酶(T/E)溶液，置於 37°C 培養箱中作用 3 分鐘後取出輕微拍打培養皿數下以利細胞脫離管壁，之後再放入培養箱 2~3 分鐘。爾後每個培養皿加入 9ml 含有血清培養基終止酵素作用。將細胞懸浮均勻後，取 10 μl 滴在血球計數板上，在一般顯微鏡下觀察，並計算細胞之數目。

(三) 種細胞：

自 75T 培養瓶(75T Flask)中，使用 T/E 溶液使 SC-M1 細胞脫離瓶壁：微核偵測法方面取出 5×10^4 顆細胞種於 60-mm 培養皿(60-mm dish)中；SRB 分析方面種 2000 顆細胞於 96-well 培養皿的每個 well 中；6-well 培養皿中每個 well 種 1×10^5 個細胞；以上實驗進行的同時，每種實驗皆須分成三組加入兒茶素，使其濃度分別為兒茶素 0、0.1 以及 0.5 μM ，置於培養箱 18~24 小時之後再下藥處理，以便進行 MN、SRB 和細胞生長曲線等實驗。

(四) 藥物處理：

實驗一：兒茶素長期處理對 SC-M1 細胞生存的影響

將實驗分做四盤。每盤含有六個 well 的細胞，將不同濃度之兒茶素細胞(0, 0.1 以及 0.5 μM)分別加入每盤中兩個 well 的細胞裡。之後每天取一盤計數細胞，為期共四天，再進行細胞生長曲線之分析，並觀察處理不同濃度兒茶素的細胞的型態。

實驗二：以 SRB 呈色法分析亞砷酸鈉及氯化鎘分別與兒茶素共同處理

SC-M1 細胞之細胞存活率

〈1〉亞砷酸鈉與兒茶素共同處理

將 96-well 的培養皿分成三區，將長期處理兒茶素 0, 0.1 以及 0.5 μM 的三組 SC-M1 細胞各分至三個區塊內 24 小時後，各組再分別處理 0, 2.5, 5, 10 以及 20 μM 亞砷酸鈉，72 小時後進行 SRB 呈色法分析。

〈2〉氯化鎘與兒茶素共同處理

將 96-well 的培養皿分成三區，將長期處理兒茶素 0, 0.1 以及 0.5 μM 的三組 SC-M1 細胞各分至三個區塊 24 小時後，各組再分別處理 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 以及 20 μM 氯化鎘，72 小時後進行 SRB 呈色法分析。

實驗三：亞砷酸鈉及氯化鎘分別與兒茶素共同處理對 SC-M1 細胞微核之誘引

〈1〉亞砷酸鈉與兒茶素共同處理

將長期處理 0, 0.1 以及 0.5 μM 兒茶素的三組 SC-M1 細胞各分至三個培養皿 24 小時後，各組再分別處理 0, 5 以及 10 μM 亞砷酸鈉，24 小時後進行微核分析。

〈2〉氯化鎘與兒茶素共同處理

將長期處理 0, 0.1 以及 0.5 μM 兒茶素的三組 SC-M1 細胞各分至三個培養皿 24 小時後，各組再分別處理 0, 1.5 以及 3 μM 氯化鎘，24 小時後進行微核分析。

(五) 微核偵測法(Micronucleus Test)：

細胞經不同金屬化合物處理後，轉換至含有 1 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B (CB) 之培養液中繼續培養 24 小時，利用 CB 來抑制完成一次核分裂的細胞但細胞質不分裂，以累積經過一次分裂所形成的雙核細胞，再用生理食鹽水(PBS)沖洗一次後，0.5% 氯化鉀低張溶液處理 3 分鐘，續以甲醇-醋酸 20:1 (v/v) 混合液固定細胞 8 分鐘後風乾，次日使用 5% 吉氏染料(Giemsa)染色 10 分鐘。染色後的細胞(附錄照片七)置於光學顯

微鏡下觀察(目鏡 15×，物鏡 60×)；每種樣品計數 1000 個雙核細胞(Binucleated cells, BN)及其所含之總微核數，以推算出微核所佔之千分比。

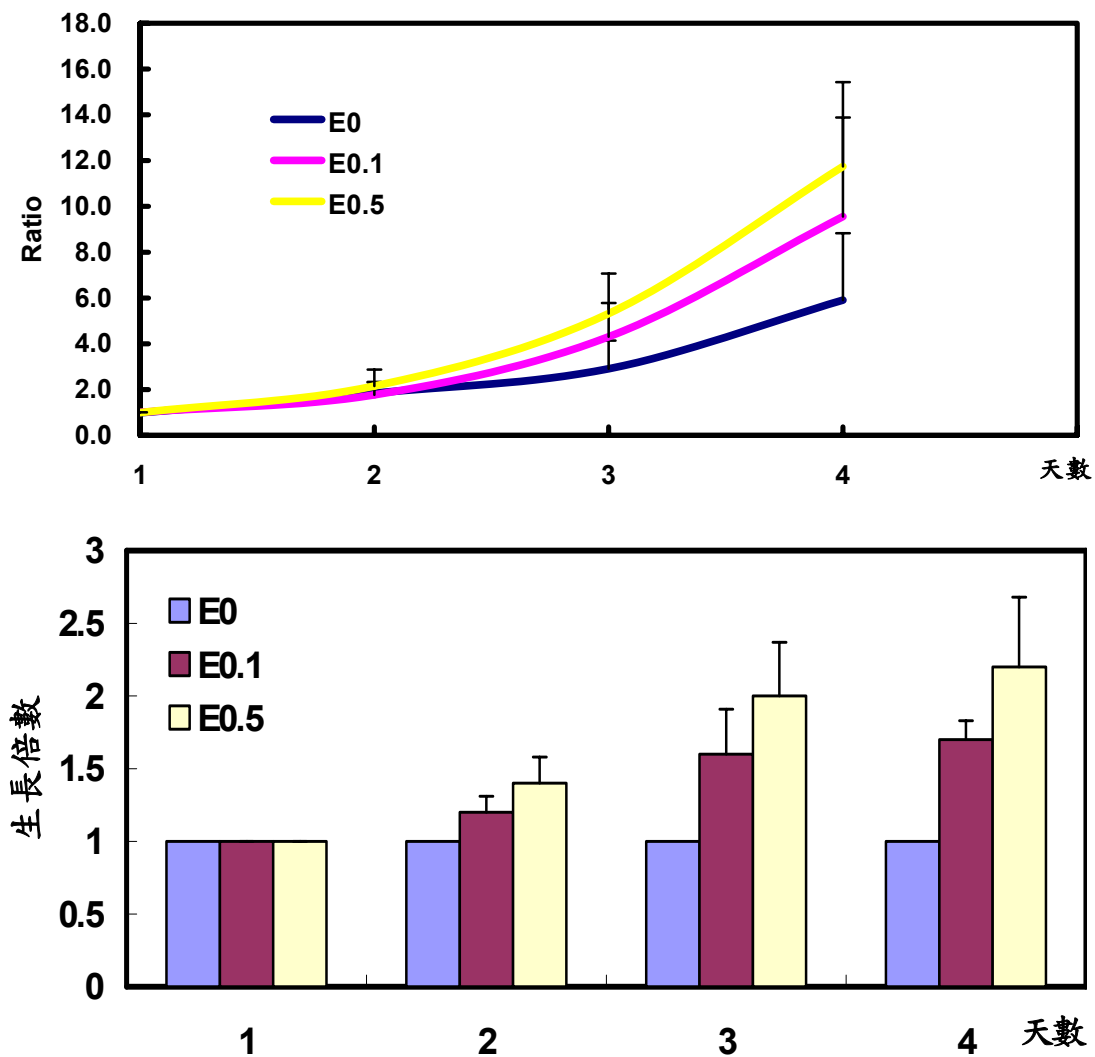
(六) Sulforhodamine B 呈色法 (SRB assay)：

以 SRB 呈色法(Skehan et al., 1990)分析兒茶素對於亞砷酸鈉及氯化鎘造成的細胞毒殺是否具有抗性。將細胞種植於 96-well 培養皿中，每孔種植 2000 顆細胞(100 μ l 培養液)，經過 1 天，再以不同濃度亞砷酸鈉或氯化鎘處理 72 小時後，利用 SRB 呈色法分析：分析時，每孔加入 50 μ l 的 50% TCA(即每孔含有 10% TCA)用以固定細胞，置放於 4℃ 1 小時後，用二次水清洗 5 次，待完全乾燥後每孔加入 100 μ l 的 0.4% SRB (w/v，溶於 1%醋酸)染色 30 分鐘，以 1% 醋酸清洗五次，待完全乾燥後以 100 μ l 的 10 mM unbuffered Tris-base 溶液將 SRB 萃取出來，搖振 15 分鐘後在 ELISA reader 測量 540 nm 的吸光值，以未處理亞砷酸鈉或氯化鎘的吸光值當作 100%細胞存活率，計算各處理之存活百分比。

三、 研究結果與討論

實驗一：

將實驗分做四盤。每盤有六個 well，將不同濃度之兒茶素細胞(0, 0.1 以及 0.5 μM ，命名為 E0, E0.1 以及 E0.5 細胞)分別加入每盤的兩個 well 裡，之後每天取一盤計數細胞數目。結果如下所示。



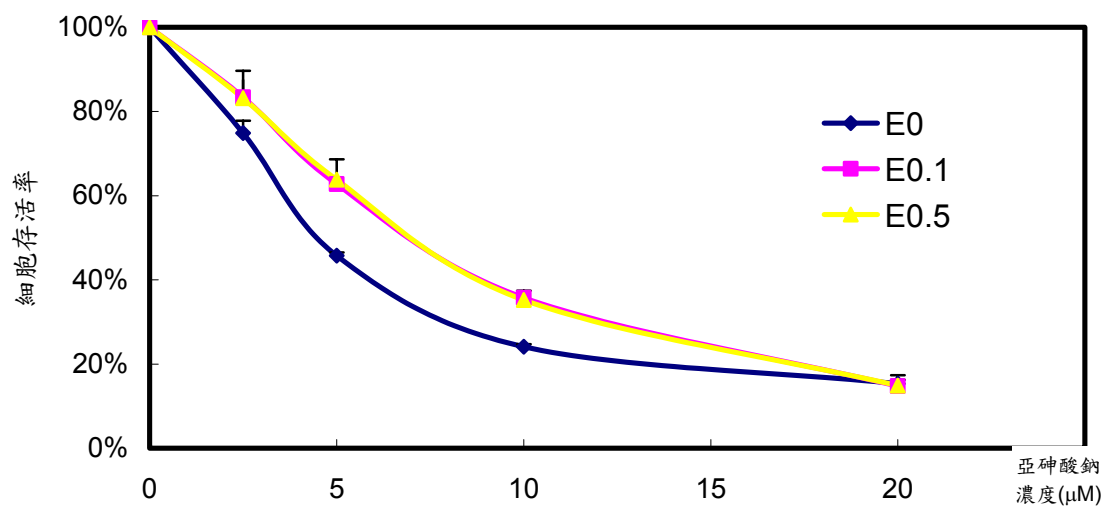
圖一 兒茶素對 SC-M1 細胞生長的影響

在實驗一中，我可以看到第一天及第二天時，E0, E0.1 以及 E0.5 三組細胞生長

曲線並沒有差太多，但是到了第三天、第四天，E0.1 及 E0.5 細胞的生長曲線皆將近 E0 細胞的兩倍，研判細胞長期處理兒茶素能增加其生存的能力；而在附錄圖中可以看到 SC-M1 細胞在長期處理不同濃度兒茶素下，並不會改變其細胞的型態。所以綜合前述可知，長期處理 0, 0.1 以及 0.5 μM 的兒茶素不會對 SC-M1 細胞的生長造成損害。

實驗二之一：

將 96-well 培養皿分成三區，將長期處理 0, 0.1 以及 0.5 μM 兒茶素的三組 SC-M1 細胞各分至三個區塊內 24 小時後，各組再分別處理 0, 2.5, 5, 10 以及 20 μM 的亞砷酸鈉，72 小時後進行 SRB 分析其細胞存活率。結果如下所示。



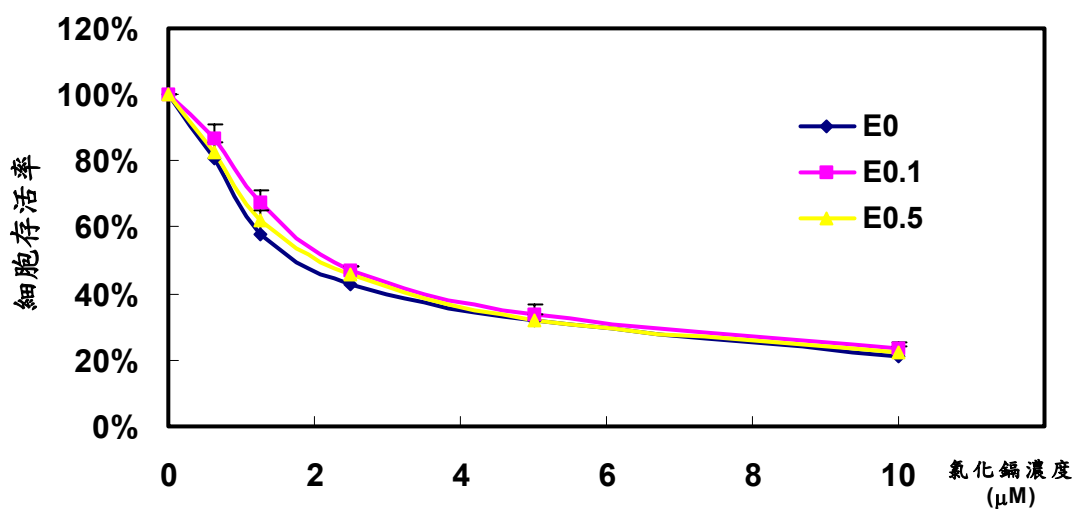
圖二 亞砷酸鈉對長期處理兒茶素之細胞存活率的影響

結果顯示三組細胞生長曲線皆隨著亞砷酸鈉濃度增高而下降；亞砷酸鈉對 E0, E0.1 以及 E0.5 細胞之 IC_{50} 值分別為 4.8 ± 0.2 , 6.9 ± 0.7 以及 6.9 ± 0.4 μM 。研判三組細

胞皆隨著亞砷酸鈉毒性的增加而細胞存活率下降，而長期處理兒茶素比未處理的細胞對亞砷酸鈉有較高的忍受度。而在加入 20 μM 亞砷酸鈉時研判對細胞的毒性已太強，所以不管有無處理兒茶素皆無太大的差別。

實驗二之二：

將 96-well 培養皿分成三區，將長期處理 0, 0.1 以及 0.5 μM 兒茶素的三組 SC-M1 細胞各分至三個區塊內 24 小時後，各組再分別處理 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 以及 10 μM 的氯化鎘，72 小時後進行 SRB 分析其細胞存活率。結果如下所示。

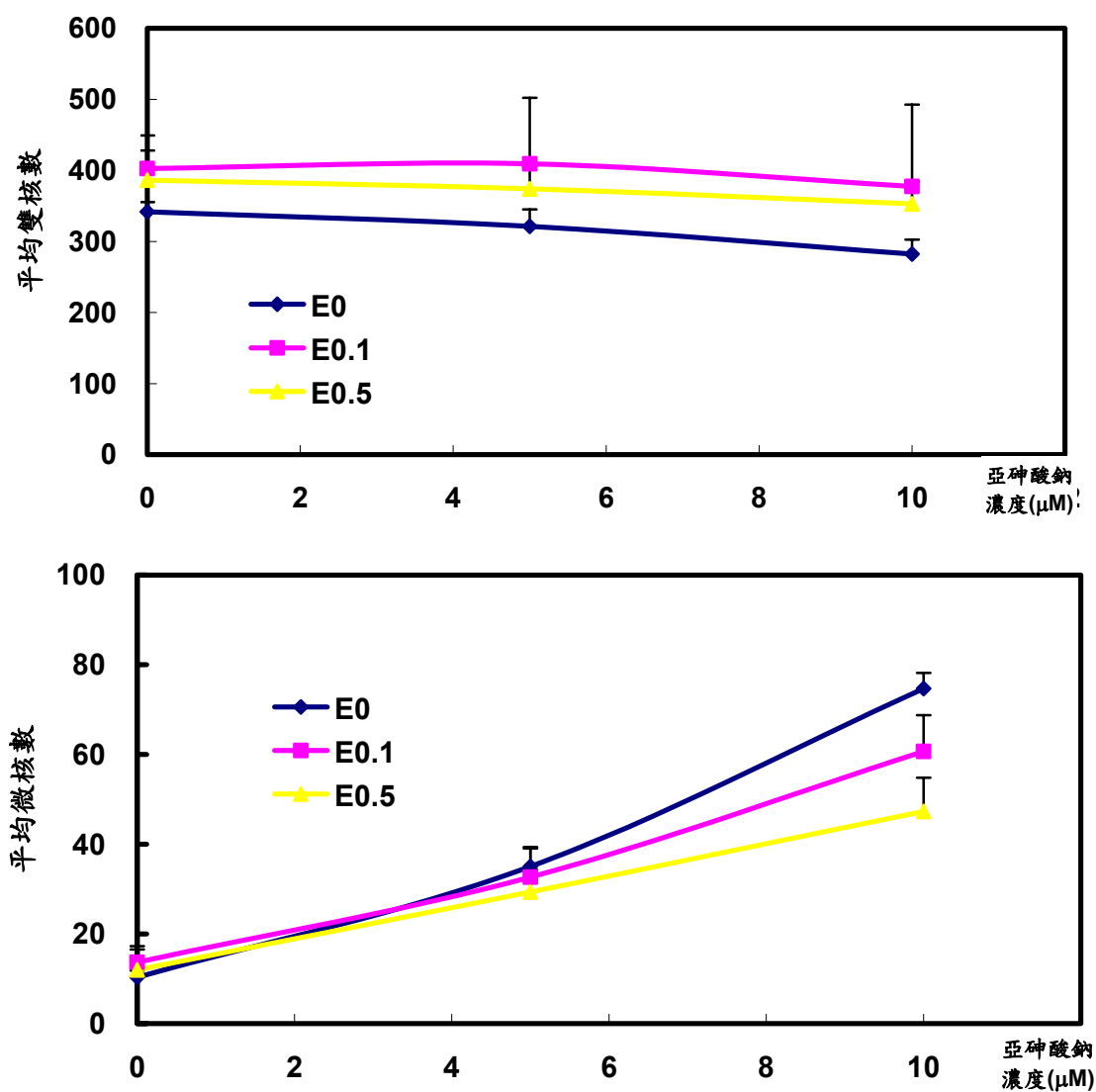


圖三 氯化鎘對長期處理兒茶素之細胞存活率的影響

結果顯示三組細胞生長曲線皆隨著氯化鎘濃度增高而下降；氯化鎘對 E0, E0.1 以及 E0.5 細胞之 IC_{50} 值分別為 2.1 ± 0.1 , 2.6 ± 0.2 以及 2.3 ± 0.1 μM 。研判三組細胞皆隨著氯化鎘濃度的增加而細胞生長曲線下降，而長期處理兒茶素的細胞與未長期處理兒茶素的細胞相比，對氯化鎘的耐受度並無明顯改變。

實驗三之一：

將 9 盤培養皿分成三組分別加入長期處理不同濃度兒茶素(0, 0.1 以及 0.5 μM) 的細胞，24 小時後分別加入 0, 5 以及 10 μM 的亞砷酸鈉於三組細胞中，藥物處理 12 小時後進行微核分析實驗。結果如下所示。



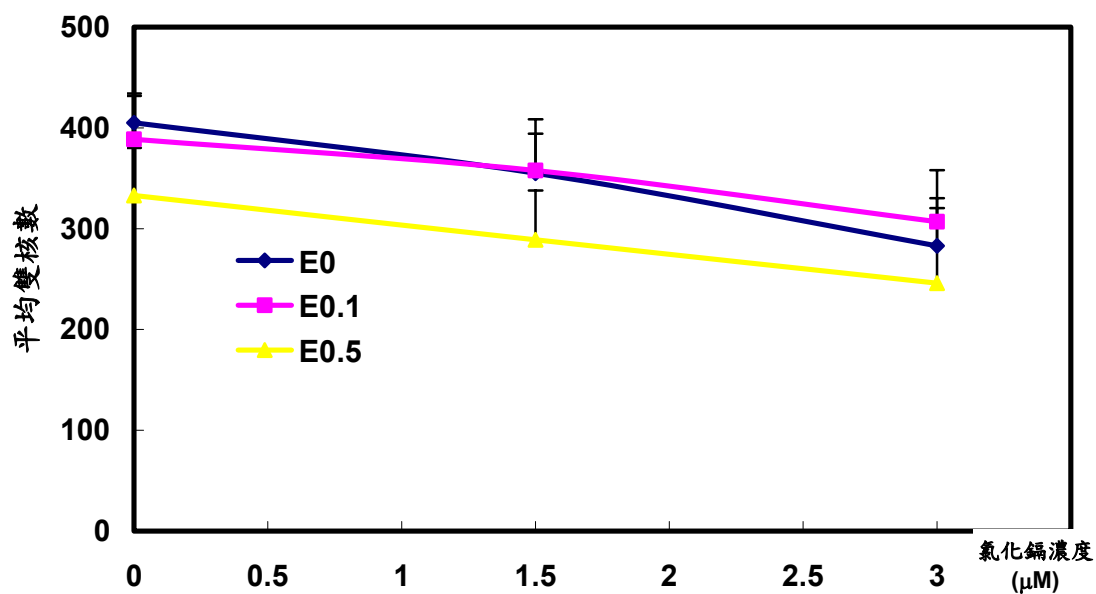
圖四 亞砷酸鈉對長期處理兒茶素細胞雙核(上)及微核(下)形成的影響

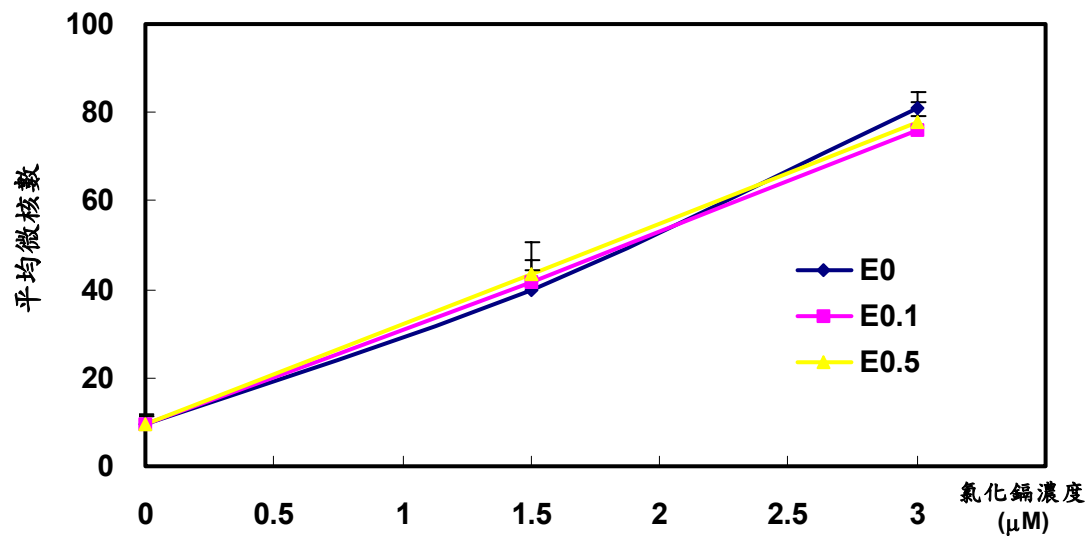
在實驗二之一中 BN 方面，E0 細胞的 BN 數大致維持 300 至 350 間；E0.1 細胞

的 BN 數大致維持在 400 左右；E0.5 細胞的 BN 數大致維持在 380 左右。MN 方面，E0 細胞隨著亞砷酸鈉濃度增高，所誘發的 MN 數目增加，可見亞砷酸鈉對細胞染色體的傷害隨其濃度的增加而增加；而 E0.1 以及 E0.5 細胞的 MN 數起初與 E0 細胞相比沒什麼太大的變化，但是加了 10 μM 亞砷酸鈉時，E0.1 細胞的 MN 數比 E0 細胞下降了 10 左右；E0.5 細胞的 MN 數比 E0 細胞則下降了 20 左右，即兒茶素濃度的增加，其誘引的 MN 數有下降的趨勢，因此研判長期處理兒茶素的細胞對亞砷酸鈉造成的 DNA 損害有一定的抗性，且隨濃度增加其保護效果亦增加。

實驗三之二：

將 9 盤培養皿分成三組分別加入長期處理不同濃度兒茶素(0, 0.1 以及 0.5 μM)的細胞，24 小時後分別加入 0, 1.5 以及 3 μM 的氯化錳於三組細胞中，藥物處理 12 小時後進行微核分析實驗。結果如下所示。





圖五 氯化鎘對長期處理兒茶素細胞雙核(上)及微核(下)形成的影響

實驗三之二結果顯示 E0 以及 E0.1 細胞的 BN 數大致維持在 400 左右，而 E0.5 細胞則維持在 300 左右；MN 數方面三條曲線皆有明顯的增加，不過曲線之間差異度不大，研判隨著氯化鎘濃度的增加，確實會增加細胞染色體變異，不過不管是長期處理 0.1 或 0.5 μM 的兒茶素，皆無法有效的增加細胞對氯化鎘造成染色體變異的抗性。

(四) 結論與應用

本實驗是利用微核的偵測及 SRB 呈色分析來觀察細胞長期處理兒茶素對亞砷酸鈉及氯化鎘所造成的染色體傷害及細胞毒性是否有抗性。微核的產生是因為 DNA 的斷裂或脫落所導致的，而會出現微核有兩種可能原因，一個是修補的機制不良，其二是受到較多量的傷害。

歷經十餘次的實驗，人為誤差在所難免，但以下幾點仍是我初步的結論：

1. 細胞長期處理兒茶素，隨著兒茶素濃度的增高能增加細胞生存的能力。
2. 處理亞砷酸鈉時，細胞存活率隨著亞砷酸鈉濃度增高而下降，而長期處理兒茶素則能增加細胞對於亞砷酸鈉的耐受度。
3. 處理氯化鎘時，細胞存活率隨著氯化鎘濃度增高而下降，而長期處理兒茶素亦無法保護氯化鎘所造成的細胞毒性。
4. 長期處理兒茶素對於亞砷酸鈉所造成的細胞遺傳毒性具有一定程度的抑制作用。
5. 長期處理兒茶素對於氯化鎘所造成細胞遺傳毒性沒有明顯的抑制作用。

(五)、參考資料及其他

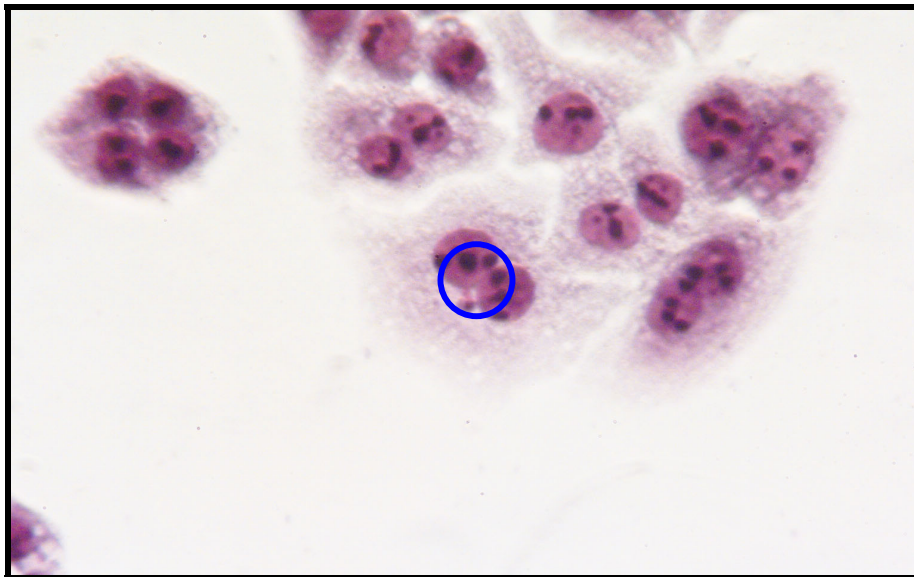
1. 行政院茶業改良場推廣中心，茶業專訊第 27 期
2. Brannock WW, Fix PF, Gianella VP and White DE (1948): Preliminary geochemical results at Steamboat Springs, Nevada, EOS Trans Am Geophys Union, 29:211~226
3. Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C (1992): Aesenic ingestion and internal cancers: a review. Am. J. Epidemiol., 135:462~476
4. Chen C.J Kou TL, WU MN (1988a): Arsenic and cancers (letter). Lancet, I:414~415
5. Chen CJ, Wu MN, Lee SS, Wang JD, Cheng SH, WU HY (1988b): Artherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water. Arteriosclerosis, 8:452~460
6. Flower BA (1977): Toxicology of environment arsenic, in: R.A. Goyer and M.A. Mehlman (eds.) Washington Hemisphere, Advances in modern Texicol. 2: 79~122
7. Goyer RA (1986): Toxicological effects of metals. In Klaassen CD Amedur MD and Doull J(eds), Lasarett and Doull's Texicology pp.582~635
8. IARC (1980): Carcinogenesis of arsenic and arsenic compounds, IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 23:37~141
9. IARC (1980): Some metals and metallic compounds, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of chemicals to Man Vol.23. International Agency for Research on cancer, Lyon
10. Manca, D., Ricard, A. C., Trottier, B., and Chevalier, G. (1991) Studies on lipid

peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 67:303-323

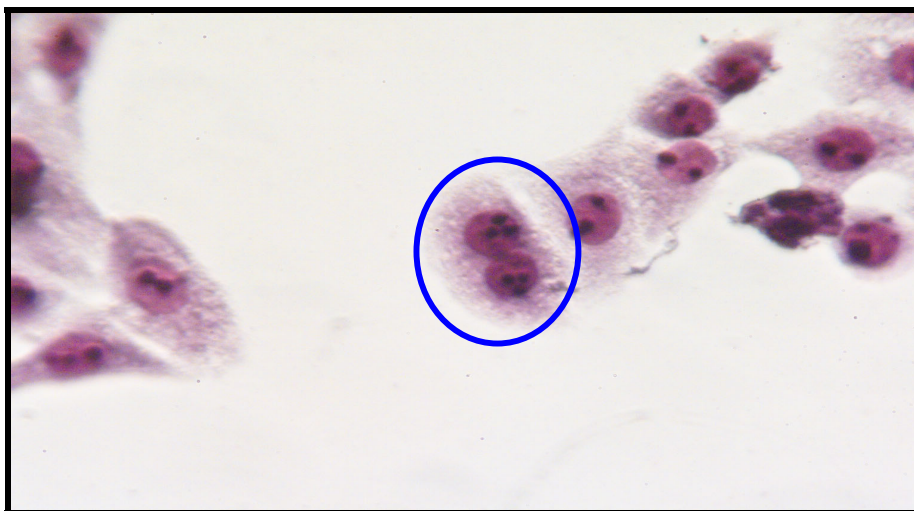
11. Nomiyama, K., Nomiyama, H., Akahori, F, and Masaoka, T. (1981) In: Recent Studies on Health effects of Cadmium in Japan, pp 59-104. Environment Agency, Tokyo.
12. Sabadell JE, Axtmann RC (1975): Heavy metal contamination from geothermal sources, *Environ. Health Perspect.* 12: 1~8
13. Wullstein LH, Snyder K (1971): Arsenic pollutants in the ecosystem, in: Proceedings of the second international clean air congress, National Society For Clean Air, Washington, D.C., 295 ~ 301
Tseng WP (1977): Effects and dose-response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ. Health Perspect.*, 19: 9~19

六、附錄

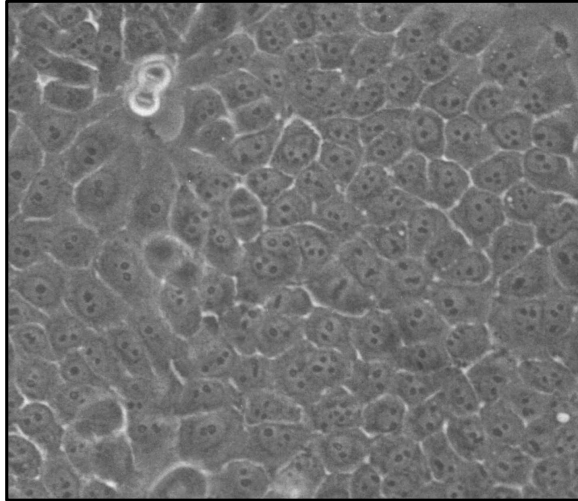
(一) 附錄照片：



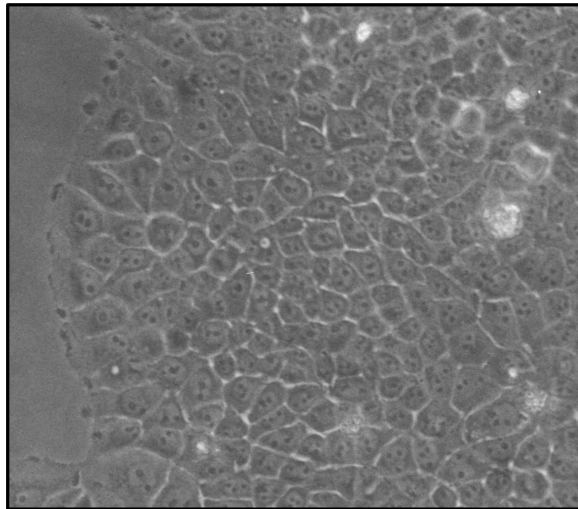
附錄照片一 左邊為雙核細胞， 右邊為單核細胞。



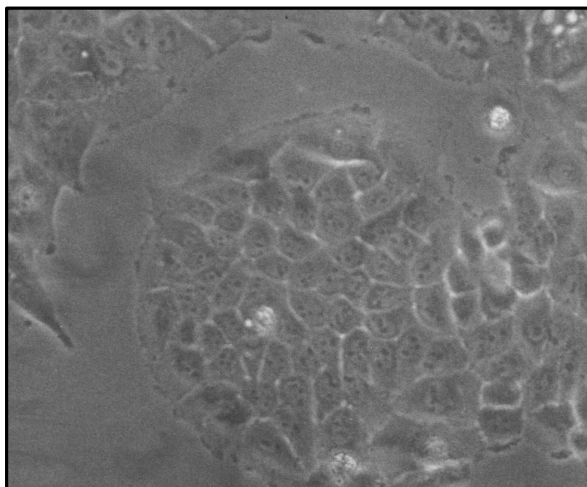
附錄照片二 藍色圓圈內為微核。



E0 cells

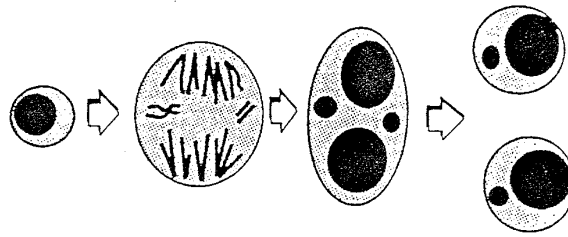


E0.1 cells



E0.5 cells

(二) 附錄圖表:

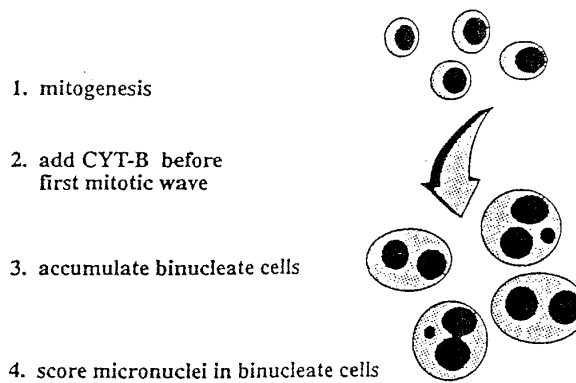


The origin of micronuclei from lagging whole chromosomes and acentric chromosome fragments at

Michael F. Fenech • CSIRO Division of Human Nutrition, Adelaide SA, 5000, Australia.

Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, edited by Gerd P. Pfeifer, Plenum Press, New York, 1996.

附錄圖一 微核形成示意圖

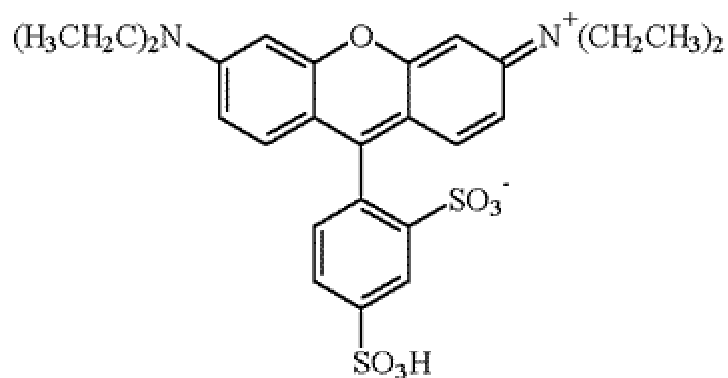


The basic elements of the cytokinesis-block micronucleus assay. CYT-B, cytochalasin-B.

Michael F. Fenech • CSIRO Division of Human Nutrition, Adelaide SA, 5000, Australia.

Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, edited by Gerd P. Pfeifer, Plenum Press, New York, 1996.

附錄圖二 雙核形成示意圖



附錄圖三 SRB 化學結構

(三) 研究設備器材

1. 實驗儀器：

光學顯微鏡(附錄照片一)、倒立相位差顯微鏡(附錄照片二)、細胞培養箱(附錄照片三)、Pipet aid(附錄照片四)、Pipet man(附錄照片五)、顯微數位相機、無菌操作檯(附錄照片六)、微量天秤。

2. 化學藥品：

A. 吉氏染劑(Giemsa stain)、氯化鉀(KCl)、磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、氯化鈉(NaCl)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、甲醇(CH_3OH)、冰醋酸(CH_3COOH)、氯化鎂(MgCl_2)、硫酸鎂(MgSO_4)、氯化鈣(CaCl_2)、EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)、Cytochalasin B(CB)、DMEM、碳酸氫鈉(NaHCO_3)、青黴素(penicillin)、鏈黴素(streptomycin)、麩胺酸 (Glutamine)、

胰蛋白酶(Trypsin)、FCS (Fetal calf serum)、DMSO、SRB、TCA、Tris Base

B. 亞砷酸鈉(NaAsO_2 , Merck)、氯化鎘(CdCl_2 , Merck)、氯化銅(CuCl_2 , Merck)、

三氧化鉻(CrO_3 , Merck)、氯化鎳(NiCl_2 , Merck)、氯化錫(SnCl_2 , Merck)、氯

化銻(SbCl_3 , Merck)、兒茶素(Epigallocatechin gallate)

3. 溶液配方：

A. DMEM 培養液：

DMEM medium	500ml
FCS (Fetal calf serum)	50ml
3% Glutamine	5ml
P/S (10000 units/ml Penicillin, 10000 g/ml streptomycin)	5ml
NaHCO_3	3.7g

B. Sorensen's Buffer (SB)

磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)	17.86 g/l
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	9.072 g/l
溶液 pH = 6.8	

C. PBS (Phosphate buffered saline)

KCl	0.2 g/l
NaCl	8.0 g/l
KH_2PO_4	0.2 g/l
Na_2HPO_4	1.1 g/l

D. Trypsin-EDTA 溶於 PBS

Trypsin	0.05%
EDTA	0.02%

E. 吉氏染劑(現配)

Giemsa stain	5%
Sorensen's buffer	95%