

可可鹼遺傳毒性之探討

高中組生物科學第一名

台灣省立新竹女子高級中學

作者：呂思嫻

指導教師：劉月梅

一、研究動機

近年來，隨著癌症人口的激增，及一些食物中天然存在或加工過程中衍生出的致突變物質之陸續發現，人們開始注意到含黃樟素，Pyrrolizidine 生物鹼，alkaloid 生物鹼等食物的致癌性和致突變性。而可可鹼 (theobromine, 3,7-dimethylxanthine)，咖啡因 (caffeine)，茶葉素 (theophylline)，為 alkaloid 生物鹼的三種主要化合物。只要是嗜好可樂或巧克力甜食的人，就免不了和可可鹼有長時間且高頻率的接觸，這不禁令人對可可鹼是否造成遺傳物質的傷害，感到好奇。

二、研究目的

以中國倉鼠卵巢細胞株(Chinese Hamster Ovary cell, CHO-K1)為材料，用姊妹染色分體互換(sister chromatid exchange, SCE)，染色體異常 (Chromosome aberration, CA)等短期偵測法 (short-term assays) 在非活性化條件下，配合估算細胞存活率，進行體外 (in vitro) 的實驗，共同評估可可鹼之遺傳毒性。

三、材料與方法

(一)化學藥品及溶液配方

略

(二)細胞株及培養

CHO-K1細胞週期12~14小時，染色體大且數目僅18~22條，易於觀察，並且在分裂中期時會自動懸浮於培養液中，可用搖盪法收集。培養的過程均是在37°C 5% CO₂之飽和溼度培養箱，使用McCoy's 5A培養液，含10%之胎牛血清，麩胺酸0.22%，碳酸氫鈉及抗生素（青黴素，100units/ml，鏈黴素100 μg/ml）。

(三)細胞毒性的測定

18小時(O/N)培養後的細胞，分別加入可可鹼水溶液，使最終濃度分別為100 μM，200 μM，300 μM，400 μM。埋24小時後，更換新鮮培養液，再經48小時，取出，用細胞計數器計數。

(四)姊妹染色分體互換之製備，對比染色及觀察分析：

1. 製備：

18小時(O/N)培養後的細胞，加入可可鹼水溶液，使其最終濃度為0，50，100，200，300，400 μ M，並加入溴去氧嘧啶(BrdU)使其最終濃度為10 μ g/ml，共同避光培養26小時。之後，加入2醯胺秋水仙素0.2 μ g/ml處理2小時，使細胞停於中期。取出細胞用0.5% kcl (※現配) 泡置，最後用固定液稀釋之，再取懸浮液一滴，滴在95% alc浸泡過拭淨的玻片上，使細胞散開。

2. 染色：

玻片上各滴2滴螢光染劑，蓋片，於55°C加熱板上照356nm黑紫外光30min，用蒸餾水沖去蓋玻片，再加5% 吉氏染劑，20min後退染。

3. 觀察分析：

製好之玻片在光學顯微鏡下，隨機選擇30個M₂期細胞，統計互換的總次數，每細胞求出平均互換頻率，並以student's t test分析數據。

(五)染色體異常測試之製備、觀察分析

1. 製備

同(四)

2. 染色

同(四)，但不加螢光染劑。

3. 觀察及分析

每片隨機選擇100個M₂細胞，統計每個細胞中染色體異常的型態和數量。

四、實驗結果

(一)可可鹼的細胞毒性

CHO-KI細胞於處理可可鹼24小時後的存活率隨濃度增加而有降低的趨勢(見圖一)。但在本實驗的最高濃度下(400 μ M)，仍還有70%的存活率，可見在此情況下，可可鹼對CHO-KI細胞的毒殺性不算強，因此利用此濃度轉回來探討對CHO-KI細胞誘引SCE的能力。

(二)可可鹼對CHO-KI細胞SCE頻率的影響

如表一和圖二所顯示，可可鹼於實驗的最大濃度400 μ M下所誘引的頻率，達對照組的1.5倍，且各組P值均小於0.001，因此可可鹼對CHO-KI細胞產生SCE有肯定、顯著的影響。

(三)可可鹼對CHO-KI細胞染色體異常的影響

由表二和圖三中顯示，在不同濃度下的可可鹼處理下，有染色體異常的細胞數，

並沒有明顯上升或下降的趨勢，而染色體的異常種類卻有。chromosome type大致有隨濃度輕微增加的趨勢，在其中又以雙中結較為顯著。

五、 討 論

- (一)可可鹼明顯誘引SCE頻率增加，這和前人的報告相符合。從Renner & Munzer於1982測中國倉鼠的骨髓細胞，1985年Tarka等人用human lymphocytes，1986年Brusick等人用CHO cell，到1988年，Staruric對methylxanthines的報告中，可可鹼無論在體或體外，使用何種細胞，SCE頻率與濃度成正相關。
- (二)目前對SCE真正的作用機制不甚明瞭，但可確定的是，有SCE，表DNA曾受到傷害，造成它的複製產物在對等處交換，故一般認為SCE和DNA複製中的修補過程有關。在levi等人於1978年的報告指出，methylxanthines類的化合物可有效抑制ADP-ribosyl transferase和Polymerase作用。在Creissen & Shall 1982年的報告中又指出，上述二種為DNA修補過程中必備的酶，故SCE的增加，應與可可鹼對此二酵素的抑制有關。
- (三)至於在CA的實驗中，它的影響並不顯著。但由於在濃度增高時，CA有從chromatid type 轉成 chromosome type 的趨勢，於是進行一項額外的測試，結果發現可可鹼是一種 S-dependent 的致變劑，因為在G₂期才加入可可鹼水溶液處理造成95%的 chromatid type 染色體異常。這項結果又和Kilman & Natarajan於1984年提出的S-dependent 致變劑均可誘引高頻率的SCE相吻合。
- (四)可可鹼誘引高頻率的SCE，卻對CA和細胞存活率影響不大，這顯示了 SCE和CA產生的原因及其作用可能不同，另一方面，又將有關可可鹼遺傳毒性的報告和咖啡因，共同歸納整理成表五，期同藉由性質相近的同類化合物，在同種試驗所得的結果，比較出其中一致性，以佐證對可可鹼遺傳毒性的推測。表五中可看出，即使可可鹼和咖啡因的化學結構和藥理作用極相似，但就遺傳毒性上的表現，有某方面大相逕庭。尤其在SCE和CA兩項，結果完全相反。因此只能推論：可可鹼和咖啡因同具遺傳毒性的潛力，但咖啡因在CPBS預測中的致癌潛力，實不能冒然套用在可可鹼上，需要進一步實驗求證。

六、 結 論

在日常生活中，人們攝食可可鹼是如此頻繁！一個愛吃巧克力的人，可能一天內不自覺就攝入數百毫克的可可鹼。儘管本實驗濃度設定小於實際上人體濃度，可可鹼攝入後的影響，是以老鼠的細胞進行實驗；我們既不能否定體內或體外，純可可鹼水溶液與油脂共同攝入，以及人和動物間所造成的差別，但我們更不可忽視可可鹼於本

次實驗結果中的意義：它的確有造成遺傳毒性的潛力。

圖表：

表一、可可鹼 (theobromine) 對誘引 CHO-K1 細胞姐妹染色分體互換之影響

Theobromine (μ M)	SCE/cell (MEAN \pm S. D.)	P值
0	8.79 \pm 0.05	*
50	10.51 \pm 0.28	P < 0.001
100	11.65 \pm 0.40	P < 0.001
200	13.32 \pm 0.11	P < 0.001
400	13.36 \pm 0.43	P < 0.001

註：(1) SCE之平均值至少包含二次實驗數據，每次均計算30個M₂細胞觀察時採 Blind-Code 以減少人為誤差。

(2) P 值採用 Student's t test。

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

\bar{X}_1 ：表實驗組的SCE平均值
 N_1 ：表實驗組的實驗次數
 S_1 ：表實驗組的標準差

\bar{X}_2 ：表對照組的SCE平均值
 N_2 ：表對照組的實驗次數
 S_2 ：表對照組的標準差

表二、可可鹼 (theobromine) 對誘引 CHO-K1 細胞染色分體異常之影響

Incidences/100metaphase cells						
Theobromine (μ M)	Aberrant metaphases	Chramatid-type		Chromosome-type		
		break	exchange	break	ring	disentric
0	1	0	0	0	0	1
100	8	6.5	0	1	0	2
200	9	2	0	1.5	2.5	3.5
300	12	3.5	0	3	3.5	4
400	13.5	4	0	2.5	5	3.5

註：以上均二次實驗數據之平均值，每次均計算100個M₂細胞

表三、可可鹼對 CHO-K1 細胞的細胞毒性

theobromine (μ M)	cell number (*10 ⁶)	percentage of survival
0	15.74	100
100	13.81	87.78
200	14.13	89.79
300	12.49	79.32
400	11.74	72.88

表四、可可鹼 (theobromine) 和咖啡因 (caffeine) 在飲食中的毒性比較。
(in Sprague-Dawley rats)

	Effects			
	Food consumption	Body weights	Thymus weights	Other phenomena
theobromine (0.8%)	76.9%	69.6%	44.2%	thymic atrophy and spermatogenic cell de- struction
caffeine (0.5%)	57.2%	63.3%	73.3%	scattered vacuolar degeneration of spermatogenic cell

註：可可鹼和咖啡因分別混入已磨成粉的 Purina Rat Chow 飼料，使其濃度分別為 0.8% 和 0.5% 連續餵食 Sprague-Dawley rats 七個星期

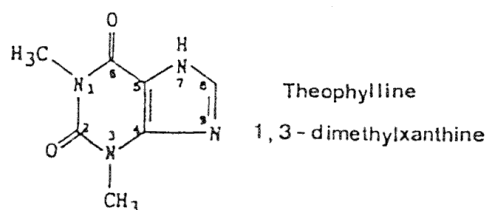
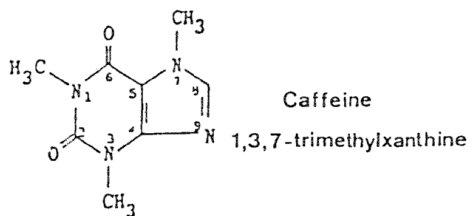
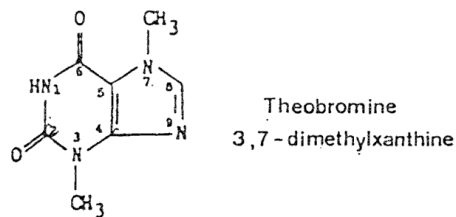
表五、可可鹼 (theobromine) 和咖啡因在遺傳毒性 (genotoxicity) 上之比較

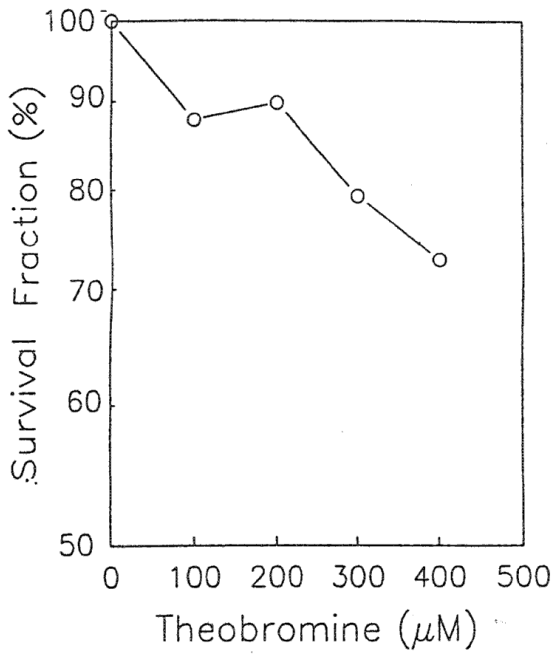
	theobromine	caffeine
Ames salmonella (mutation assay)	- Brusinck et al., 1985	- Rosenkranz, 1987
Mouse lymphoma L5178 Y TK ^{+/+} assay	+ Galloway et al., 1985	+ Clive, 1985
Cell transformation in vitro in Balb ^c -3T3 cells	- Rundell et al., 1985	+ Sivak, 1981
Aberrations in human lymphocytes	+ Weinstein et al., 1975	+ Weinstein et al., 1975
Aberrations in CHO cell	+ Palliti & Becchetit, 1977	+ Palliti et al., 1977
SCE in CHO cells	+ Palliti et al., 1977	- Palliti et al., 1977
SCE in human lymphocytes	+ Tarka et al., 1985	+ Latt et al., 1981
Micronucleus in Chinese hamsters bone-marrow cell	+ Renner & Munzer, 1982	- Matter & Grauwiler, 1974
Dominant lethal tests in Sprague-Dawley rats	- Carl et al., 1983	NI

註：(1)"+"表 positive, "-"表 negative, "NI"表 no information available.

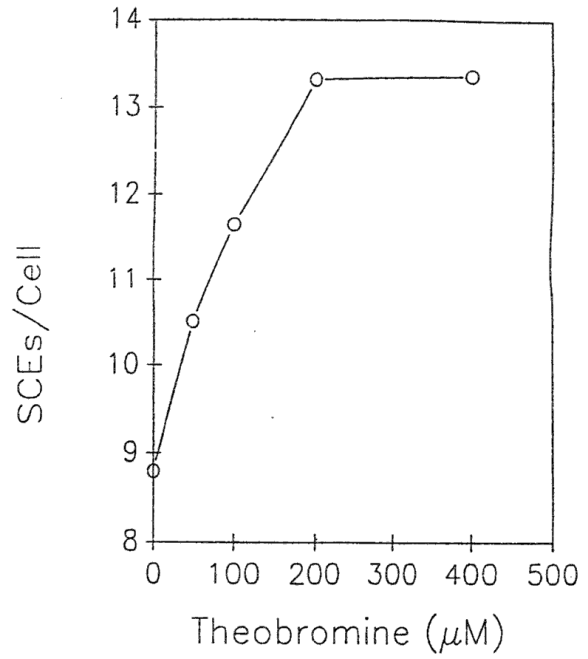
(2)有關茶葉素 (theophylline) 的資料少而不全故未一併列入整理

表六、Methylxanthine 三種主要化合物之化學結構式比較

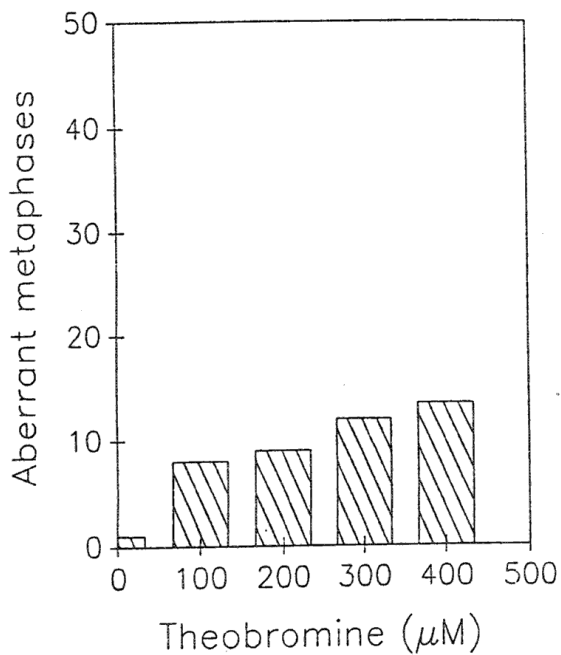




圖一、可可鹼對 CHO-K1 細胞的細胞毒性



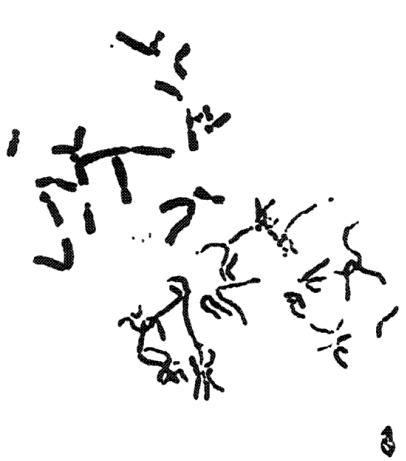
圖二、可可鹼對 CHO-K1 細胞姊妹染色分體互換之影響



圖三、可可鹼對誘引 CHO-K1 細胞染色體異常之影響



圖四、M2期 CHO-K1 細胞姊妹染色分體互換對比染色



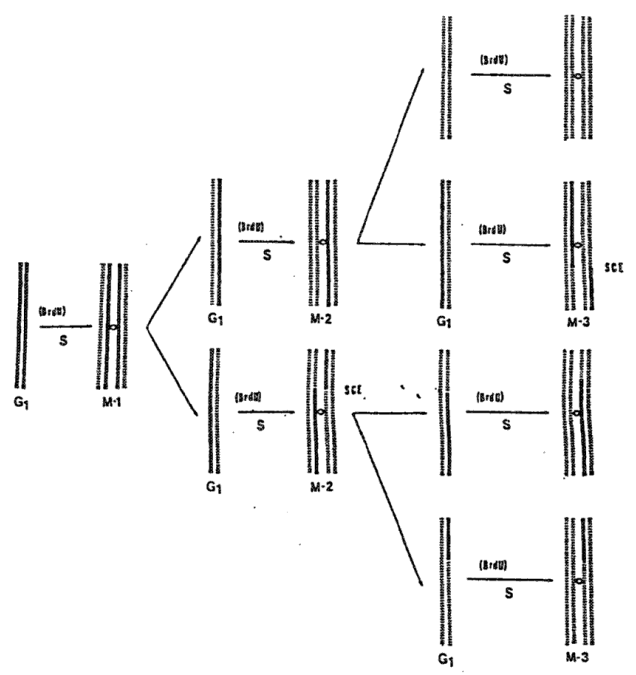
圖五、M2期 CHO-K1 細胞姊妹染色
分體互換對比染色
(染色質濃縮得不好)



圖六、染色體異常 (chromatid break)



圖七、染色體異常 (dicentric)



註：粗實線者，表染色體 DNA 上無 Brdu 的染色分體；細平行線組者，表染色體 DNA 上的胸腺嘧啶 (Thymidine) 由 Brdu 取代進行複製的染色分體。

圖八、SCD機制解和說明：

評語

本作品使用中國倉鼠卵巢細胞株 (CHO-K1) 為材料觀察姊妹染色體互換，染色體異常等偵測法來分析可可鹼 (Theobromine) 之遺傳毒性及細胞毒性，發現可可鹼在 50~400 μ m 濃度具誘發姊妹染色體互換，造成遺傳毒性之潛力，本著作具創新及學術價值。