

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：環境科學科

作品名稱：無機砷與硒對染色體傷害之交互作用

得獎獎項：環境科學科佳作

英特爾環境健康與安全獎

儲備代表

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二年級。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。

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。

本實驗以中國倉鼠卵巢細胞(CHO-K1)為材料，利用微核偵測技術(Michronuclei, MN)及姐妹染色分體互換(Sister chromatid exchanges, SCE)之誘引來探討亞硒酸鈉(Sodium selenite, NaSeO_2)及亞砷酸鈉(Sodium arsenite, NaAsO_2)的交互作用(interaction)。實驗結果顯示亞硒酸鈉本身不會造成MN的增加，但讓SCE頻率增加；亞砷酸鈉會誘引增加MN和SCE。亞硒酸鈉前處理不會減少亞砷酸鈉誘引之SCE和MN，但可微微降低亞砷酸鈉抑制雙核細胞(Bunucleated cells, BN)的形成，但是不明顯。本實驗結果未能看出亞硒酸鈉前處理與亞砷酸鈉有明顯的交互作用，但發現亞硒酸鈉會增加SCE頻率，因此亞硒酸鈉做為保健食品值得進一步的關切及探討。

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, arsenic exposure was associated with increased incidences of liver diseases, peripheral vascular and neurological diseases, as well as cancers. In this report we investigated the interaction of selenite and arsenite on micronuclei (MN) and sister chromatid exchange (SCE) induction in Chinese hamster ovary-K1 (CHO-K1) cells. The present results demonstrated that sodium selenite by itself did not induce MN, but it did cause the increase of SCE frequency. Sodium arsenite significantly induced MN and SCE in CHO-K1 cells. Pretreatment of CHO-K1 cells with selenite could not reduce MN and SCE frequency induced by arsenite, but slightly prevent the cells from arsenite-induced inhibition of binucleated cell formation. In the present study, no significant interaction between sodium selenite pretreatment and sodium arsenite was observed. However, sodium selenite was unexpectedly found to enhance SCE frequency in CHO-K1 cells. The application of selenite as health protection agent warrants our concerns and further investigation.

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為提高。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。

我檢閱市面上的健康食品，注意到了很多食品中，都有添加一些物質一如「硒」、「鍺」等等微量的類金屬。在一些文獻上也發現，像硒這樣的類金屬，某些含有保護的作用。我不禁想到，這類微量類金屬是否能抑制砷對細胞所造成的染色體傷害呢？而它們對細胞染色體傷害是否又具有保護作用呢？

於是我開始查關於硒的資料。我想看看如果在培養的細胞中加入適當的硒，是不是可以對砷或者是其他的重金屬造成的傷害有什麼預防保護或者治療的作用！

(二) 研究目的

- A. 以中國倉鼠卵巢(CHO-K1)細胞為材料，分析亞硒酸鈉(Sodium selenite, NaSeO_2)及亞砷酸鈉(Sodium arsenite, NaAsO_2)是否會誘引微核(Micronuclei, MN)及姐妹染色分體互換(Sister chromatid exchanges, SCE)頻率增加?
- B. 以 CHO-K1 細胞為材料，探討亞硒酸鈉前處理是否會影響亞砷酸鈉誘引微核及

SCE 的能力?

(三) 文獻探討

1. 關於硒

硒是生命的重要微量元素，已被聯合國衛生組織確定為人體必須營養素之一。

硒是穀胱甘肽過氧化物酶(Glutathione peroxidase)不可或缺的輔劑，而穀胱甘肽過氧化物酶是分解過氧化物、保護細胞免受氧化及自由基損害的抗氧化酶，因此硒的主要功能與抗氧化及自由基清除有關(Shen et al., 2001)。自由基是帶有未配對電子的原子、離子或分子，為人體代謝過程的產物，這些化學性質活躍的分子，會攻擊細胞膜的不飽和脂肪酸產生過氧化物，進而侵犯核酸、蛋白質和酶，引起一系列具破壞性的連鎖反應。目前已知自由基與許多疾病，如衰老、癌症、心血管疾病、老年性疾病、白內障、肝臟及胰臟疾病等有密切的關連，因此硒的抗氧化活性扮演著重要的保護作用。硒在生物體中會與帶正電荷的有害金屬離子相結合，形成金屬-硒-蛋白質複合物，能把有害的金屬離子排出體外，因此硒的另一項功能便是解毒。硒亦有增進免疫作用，抑制"癌前"細胞惡化轉型的作用，例如 CNN 98/8/22 的報導指出美國國家癌症中心(National Cancer Institute)的研究顯示硒可減少男性攝護腺癌的發生比率 1/2 到 2/3。

但是太過高量的硒亦會造成人體中毒,如指甲變脆與神經疾病。過量的硒亦會增加自由基的產生造成 DNA 的斷裂(Snyder, 1988)。因此從預防的觀點，專家建議硒之

每天最佳攝入量為 100-200 微克。由於硒的抗氧化功效，使硒的知名度及身價也如同飆股般地飛漲，含硒的營養補充劑及健康食品在市面上大行其道，促使人們大量攝取硒。

2. 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)，足見台灣地區的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 SCE 姊妹染色分體互換

〈1〉 SCDS 姊妹染色分體對比染色

讓 5-bromodeoxyuridine (簡稱 Bu, 附錄圖三) 進入細胞內，因為 Bu 的化學構造

很像細胞胸腺嘧啶 (thymidine, 附錄圖四), 所以細胞再進行細胞複製時, Bu 就會進入細胞的結構中, 染色體以 Bu 取代胸腺嘧啶 (thymidine) 進行一次 DNA 複製後, 每一條染色分體 (半邊染色體) 的雙股 DNA 中就會含有一條 Bu。如以符號 T 代表胸腺嘧啶 (thymidine)、以 B 代表 Bu, 則第一次複製後, 每一條染色分體的 DNA 都是 BT, 稱為 M1; 但若繼續以 Bu 取代胸腺嘧啶進行第二次 DNA 複製後, 則同一條染色體的兩條染色分體中, 會有一條的染色分體的 DNA 是 BT, 另一條是 BB, 則稱為 M2; 如此同一條染色體的染色分體的 DNA 含 Bu 的股數就不同。BT 染色分體只有一股 DNA 含 Bu, BB 染色分體則有兩股 DNA 含 Bu, 一條 DNA 中若兩股皆為 BB, 則稱為 M3, SCDS 就是建立在這個不同點上。

這種 BT-BB 染色體若先以染核酸的螢光染料 (如: Hoechst 33258) 作用, 再置於螢光顯微鏡下觀察則呈現一深一淺的 SCDS 現象。一般認為這是含 Bu 的 DNA 會抑制螢光的產生, 所以 BT 染色分體螢光較亮, 而 BB 染色分體螢光較暗。這種螢光染色法的最大缺點是螢光很快就衰退了, 而且螢光顯微鏡也不像光學顯微鏡那樣普遍, 所以我用的是可以用普通光學顯微鏡觀察的方法。

在實驗過程中之所以使用黑紫光是因為殺菌用的紫外光波長集中在 260nm, 而蓋玻片能擋住 290 以下波長的光, 又 Hoechst 33258 與 DNA 的結合體對 360nm 波長的光吸收率最強。因此若使用一般的殺菌光則要較長的時間, 並且紫外光對人的傷害力比 356nm 的黑紫外光大。故選用黑紫光。而在照完黑紫光、染好吉氏染料後會產生深淺對比的原因是: 實驗證明黑紫光處理會使染色體上的 DNA 產生光分解,

並含 Bu 的 DNA 比不含 Bu 的 DNA 更容易被黑紫光分解，經黑紫光處理後 BB 染色分體的 DNA 殘量比 BT 染色分體上的 DNA 殘量少。吉氏染料會和 DNA 結合，所以 BB-BT 染色體在照黑紫光之後，BB 染色分體著色就比 BT 染色分體要淺。可是如果在照黑紫光之前 BT-BB 染色體直接用吉氏染料染色則無 SCDS。(附錄圖五)

〈2〉 SCE 的特性

- A. SCE 的產生代表 DNA 之複製產物在對等處發生交換。雖然 SCE 在分子生物學上的解釋還不清楚，但是一般認為 SCE 代表 DNA 受傷。經研究已確定的致變劑及大部分的致癌劑都會破壞 DNA 而且會使 SCE 的發生率提高，凡是會破壞 DNA 的物質稱為具有遺傳毒性，因此 SCE 是偵測遺傳毒性的方法之一
- B. SCE 與 DNA 斷裂、細胞毒性、基因突變率、致癌性、細胞轉型 (cell transformation) 率等成正相關
- C. 對於需要經過 DNA 複製才能表現出作用的致變劑 SCE 的敏感度要比傳統的染色體異常的檢查法大的多。
- D. 一條染色體或一個細胞內所有染色體上 SCE 的數目很容易辨認，計算出來也很容易。
- E. SCE 偵測常使用中國倉鼠卵巢細胞 (CHO)，原因是細胞週期短 (12~14 小時)，染色體大而且長、數目又不多 (20 條左右)。

3. 細胞分裂週期之估算

欲以 SCDS 觀察 SCE 時，須經兩個細胞週期才能看到深淺分明的效果。因 CHO-K1 細胞週期約 12 小時，故加入 BrdU 後須再培養 24 小時。RI 值稱為複製係數， $RI = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) \div 100$ ，在相同條件下 RI 值越高表示細胞週期越快。另外，若以加入 BrdU 到收細胞的時間除以 RI 值則可算出細胞分裂一次的平均時間 (Population doubling time, PDT)。

二、 研究過程或方法

(一) 細胞株及其培養：

本實驗採用中國倉鼠卵巢細胞(CHO-K1)細胞株購自 American Type Culture Collection 公司。CHO-K1 以 McCoy' s 5A 培養液培養，培養液內含 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 $\mu\text{g/ml}$)，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 0.5ml 的 1X 胰蛋白酶(T/E)溶液，置於 37°C 培養箱中作用 3 分鐘。每個培養皿加入 9.5ml 含有血清培養基終止酵素作用。將細胞懸浮均勻後，取 30 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 CHO-K1 細胞脫離瓶壁，取出 2×10^4 或 3×10^5 個細胞種於 60-mm 培養皿(60-mm dish)中，置於培養箱中 18~24 小時之後下藥處理，再分別進行 MN 或 SCE。

(四) 藥物處理：

實驗一：亞硒酸鈉及亞砷酸鈉單獨處理對微核之誘引

取適量的亞硒酸鈉及亞砷酸鈉溶解於水中，再稀釋成不同濃度。亞硒酸鈉濃度 0, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 nM；亞砷酸鈉濃度 0, 5, 10, 20, 50 μ M，分別加至 60-mm 培養皿中處理 24 小時後進行微核分析。

實驗二：亞硒酸鈉及亞砷酸鈉共同處理對微核之誘引

〈1〉改變亞硒酸鈉濃度

將 CHO-K1 細胞分兩組先處理不同濃度的亞硒酸鈉溶液 (0、100、500、1500nM) 24 小時。再各處理 0 及 10 μ M 亞砷酸鈉 24 小時後，進行微核分析。

〈2〉改變亞砷酸鈉濃度

將 CHO-K1 細胞分兩組先處理 0 及 1000 nM 的亞硒酸鈉 24 小時。再各處理不同濃度之亞砷酸鈉 (0、5、10、20 μ M) 24 小時後，進行微核分析。

實驗三：亞砷酸鈉單獨處理對 SCE 之誘引

取適量的亞砷酸鈉溶解於水中，再稀釋成不同濃度 0,2,5,10,20 μ M。分別加至 60-mm 培養皿中且同時加入 Bu 處理 24 小時後分析 SCE 頻率。

實驗四：亞硒酸鈉及亞砷酸鈉共同處理對 SCE 之誘引

將實驗分做八盤，分為兩組 a、b 分別加入亞硒酸鈉(0, 1000, 2000, 3000 nM)24 小時，其中 b 組再各加入亞砷酸鈉 10 μ M。同時八盤各加 Bu，處理 24 小時後分析 SCE 頻率。

(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 μ 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 5 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 \times ，物鏡 60 \times)；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) 姊妹染色分體交換之檢定(SCE)：

先加亞硒酸鈉處理 24 小時後，再加亞砷酸鈉和 Bu 繼續處理 24 小時後，在收細胞前兩小時加入 colcemid 0.2 μ g/ml，使細胞停在分裂中期。以 PBS 清洗兩次，然後加入 5 ml 0.5% KCl，讓細胞適度膨脹後加入固定液 (甲醇:冰醋酸=3:1,V/V 現配)，離心後倒去上清液，重複兩次上述步驟。再以固定液稀釋細胞懸浮液至適當濃度，

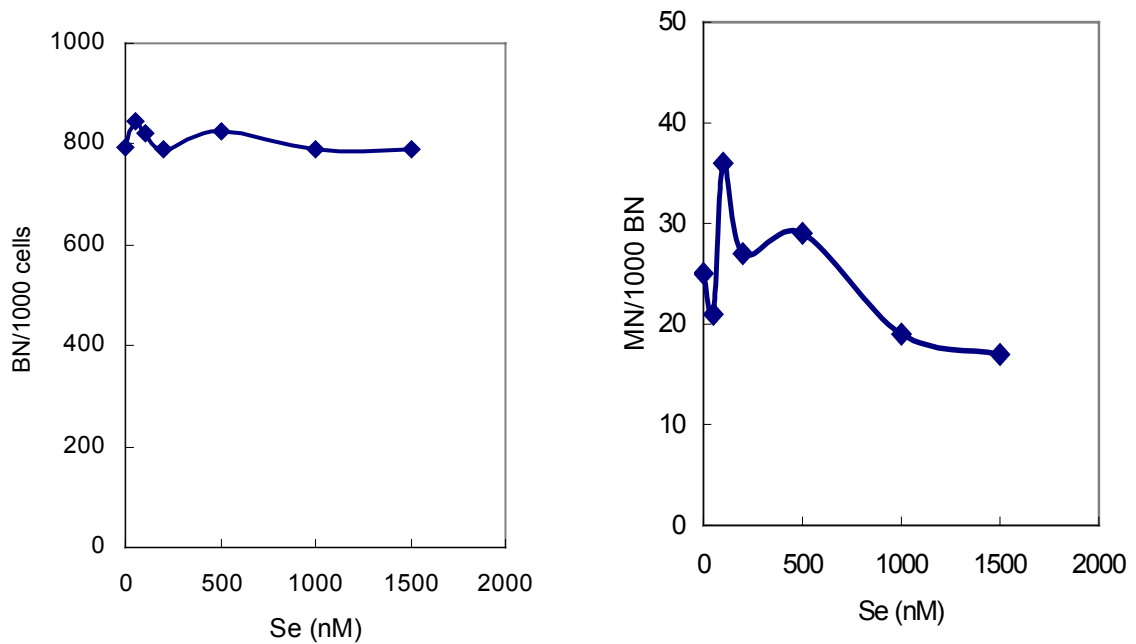
取一滴滴在載玻片上，風乾後加入 2 滴 Hoechst 33258 (10 $\mu\text{g/ml}$)，蓋上蓋玻片後在 55°C 下照黑紫外光 20 min。之後再將玻片置於蒸餾水中去蓋玻片，以 5% Giemsa 吉氏染料染色，風乾後計算 SCE 之頻率。每一處理計算 30 個細胞，一個細胞內大約有 19-21 個染色體，將每條染色體的互換次數相加，取 30 個細胞的平均值。

三、 研究結果與討論

(一) 結果

實驗一：

A、加入亞硒酸鈉濃度分別為 0, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 nM，計算 BN 與 MN 數量。

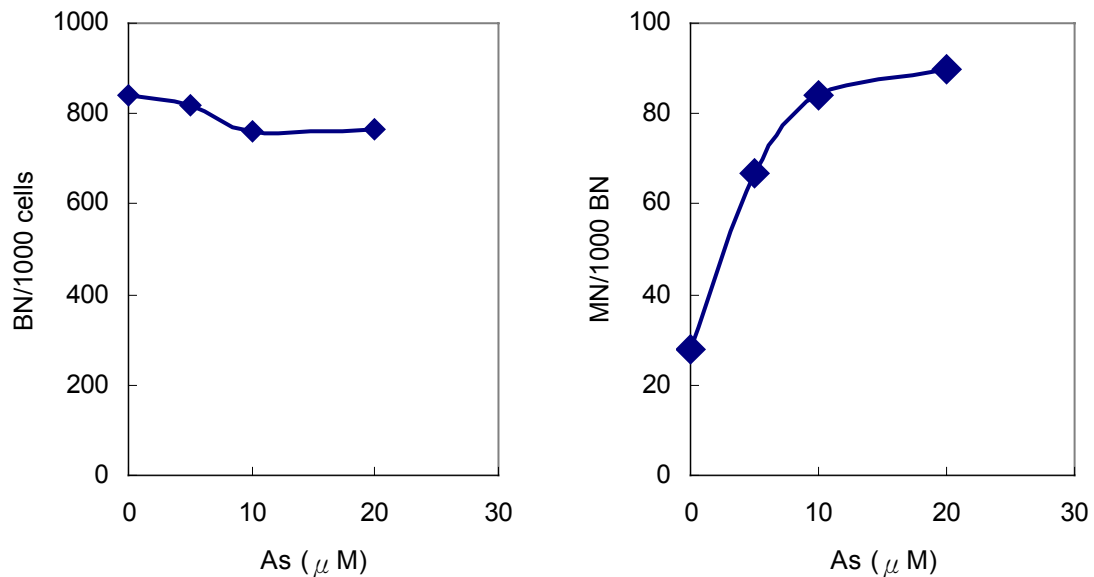


圖一 亞硒酸鈉在不同濃度下 BN 及 MN 的表現

本實驗所使用的亞硒酸鈉濃度，其 MN 數量大致在 20-30 之間，而 BN 數量大致在 790-840 之間，並無明顯上升或下降的趨勢（圖一）。研判可能在此濃度範圍內不會使細胞產生 MN 增加，亦證明亞硒酸鈉在此濃度範圍內不會改變細胞的週期，

不會影響細胞生長分裂，即表示在此濃度範圍內的亞硒酸鈉不會增加自由基而造成 DNA 的斷裂，故此後實驗則先以此濃度範圍作為標準。

B、加入亞砷酸鈉濃度分別為 0, 5, 10, 20, 50 μM ，計算其 BN 與 MN 數量。



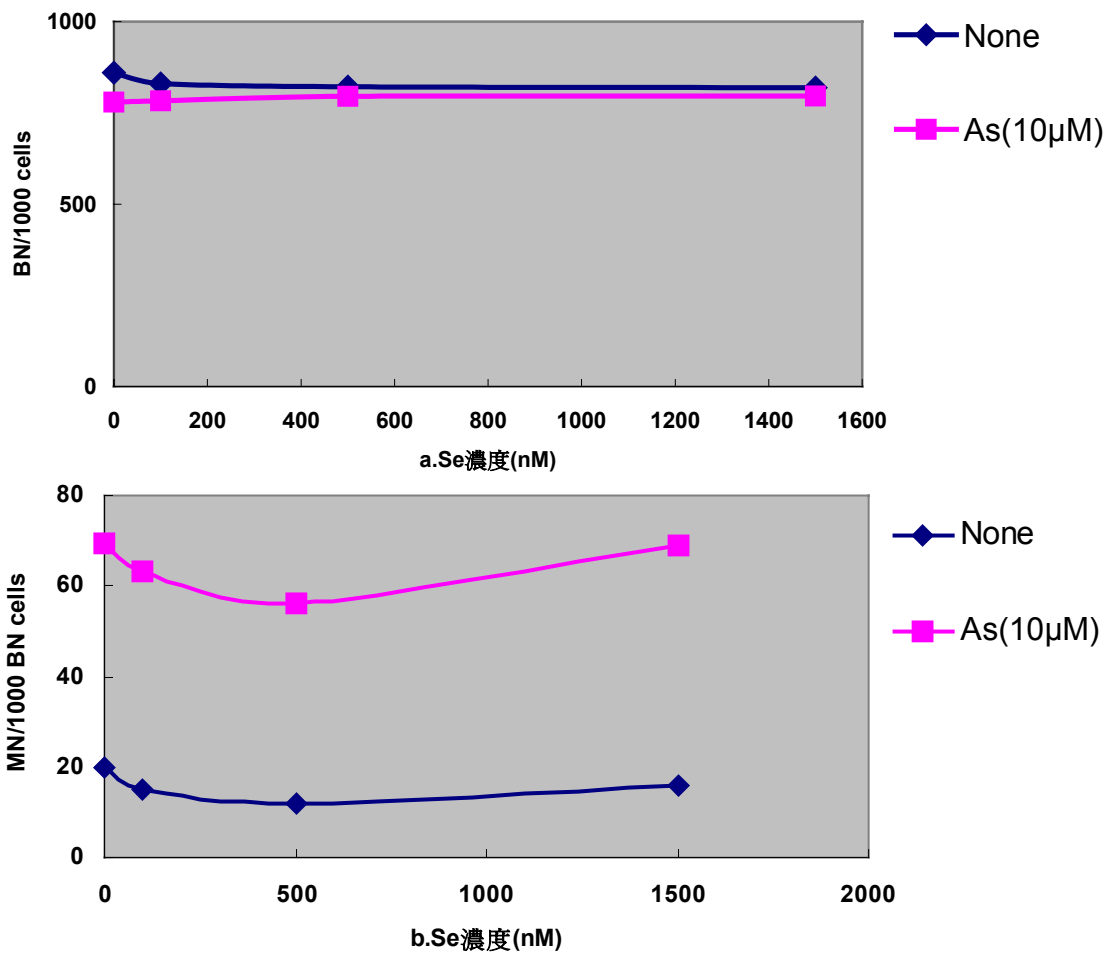
圖二 亞砷酸鈉在不同濃度下 BN 和 MN 的表現

亞砷酸鈉濃度由 0 增至 20 μM 時，BN 數量大致維持在 800 左右，但 MN 數量則隨著濃度上升而上升。在亞砷酸鈉濃度為 50 μM 那一盤，已無法計得 1000 個細胞，故雙核數少之又少，微核數更是無法計數（圖二）。研判提高到此濃度的亞砷酸鈉由

於毒性過高，極易造成實驗誤差。且在此濃度範圍內 MN 數就有明顯增高，證明本實驗所下濃度對細胞已有一定的細胞毒性。

實驗二之一：

在每個 dish 分兩組 a、b 分別先加入亞硒酸鈉濃度 0, 100, 500, 1500nM，24hr 後在實驗二之一 b 中加入亞砷酸鈉濃度 10 μ M。

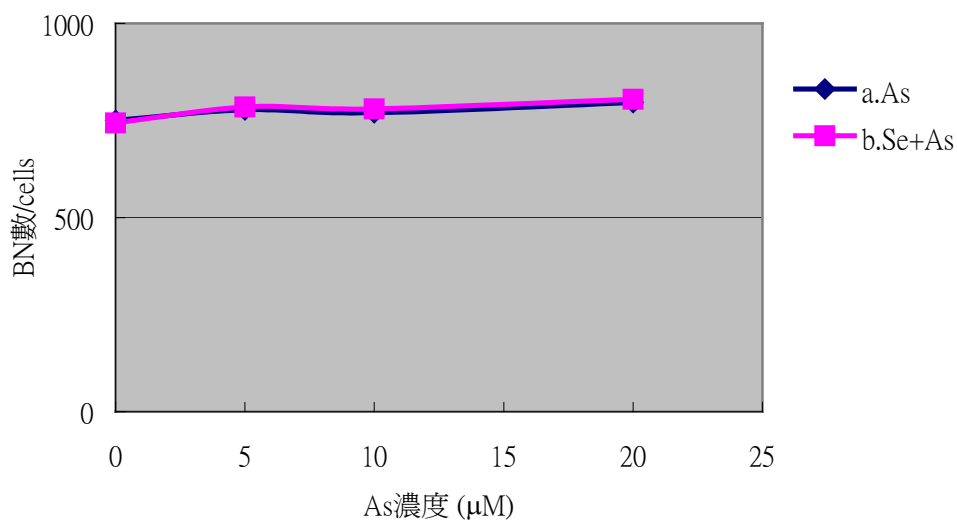


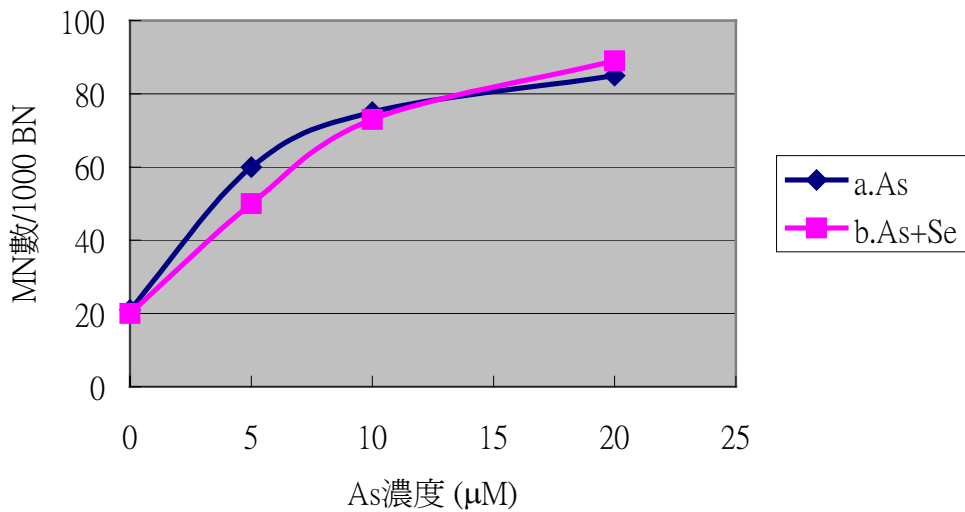
圖三 亞砷酸鈉在不同濃度的亞硒酸鈉前處理下 BN 及 MN 的表現

在實驗二之一 a 中，BN 數量大致維持在 830 左右，而 MN 數也大致呈現平衡狀態，約在千分之 20 左右。在實驗二之一 b 中，加了亞砷酸鈉後整個階層雖有微微的下降 50 左右，但是不明顯，BN 數大致維持在 780 左右，MN 數則大致維持平衡的狀態，約在千分之 60 左右，且整條變化幅度也不大，而 MN 整個階層卻上升了 50 左右，但是大趨勢不變，研判亞砷酸鈉在此濃度不會造成 DNA 斷裂，而亞砷酸鈉會。

實驗二之二：

實驗二之二中，細胞分 a、b 兩組，b 加入濃度為 1000 nM 的亞砷酸鈉，24hr 後 a、b 均加入亞砷酸鈉濃度為 0, 5, 10, 20 μM 。(圖四)





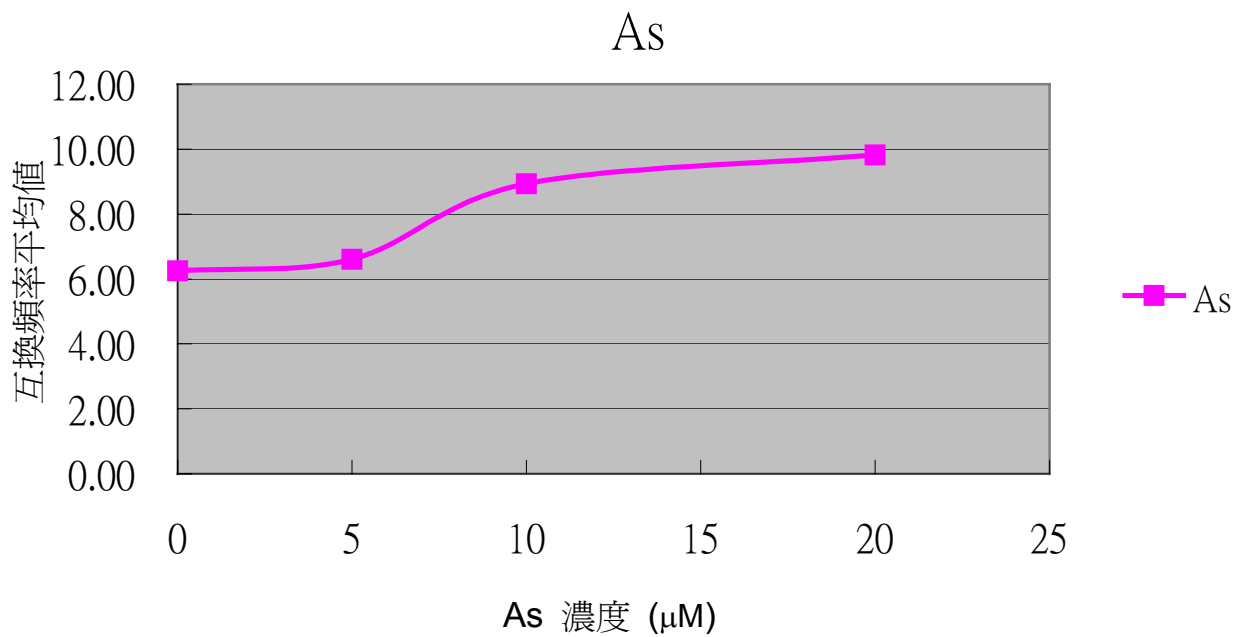
圖四 亞砷酸鈉單獨處理和亞砷酸鈉與亞硒酸鈉共同處理, BN 及 MN 的表現

實驗二之二 a 結果顯示高濃度的亞砷酸鈉會造成 MN 數的明顯上升但 BN 數維持平衡，大致維持在 770 左右；實驗二之二 b 結果顯示加入亞硒酸鈉後 MN 數趨勢與未加亞硒酸鈉時相同且沒有較低，研判亞硒酸鈉不會降低亞砷酸鈉對細胞造成的 DNA 斷裂次數；而 BN 仍是平衡狀態，維持在 744~796 間，研判亞硒酸鈉不影響細胞週期。

(為了確定實驗一、二的結果，所以實驗三、四又採用敏感度較高的 SCE 來做實驗觀察，並驗證前面的實驗。)

實驗三：

依序加入亞砷酸鈉濃度 0,5,10,20 μM，計算 SCE。



圖五 亞砷酸鈉單獨處理 SCE 的表現

表一 亞砷酸鈉單獨處理

As 濃度(μM)	0	2	5	10
M1	3	10	14	46
M2	97	90	86	54
M3	0	0	0	0
RI	1.97	1.90	1.86	1.54
PDT	13.2	13.7	14.0	16.9

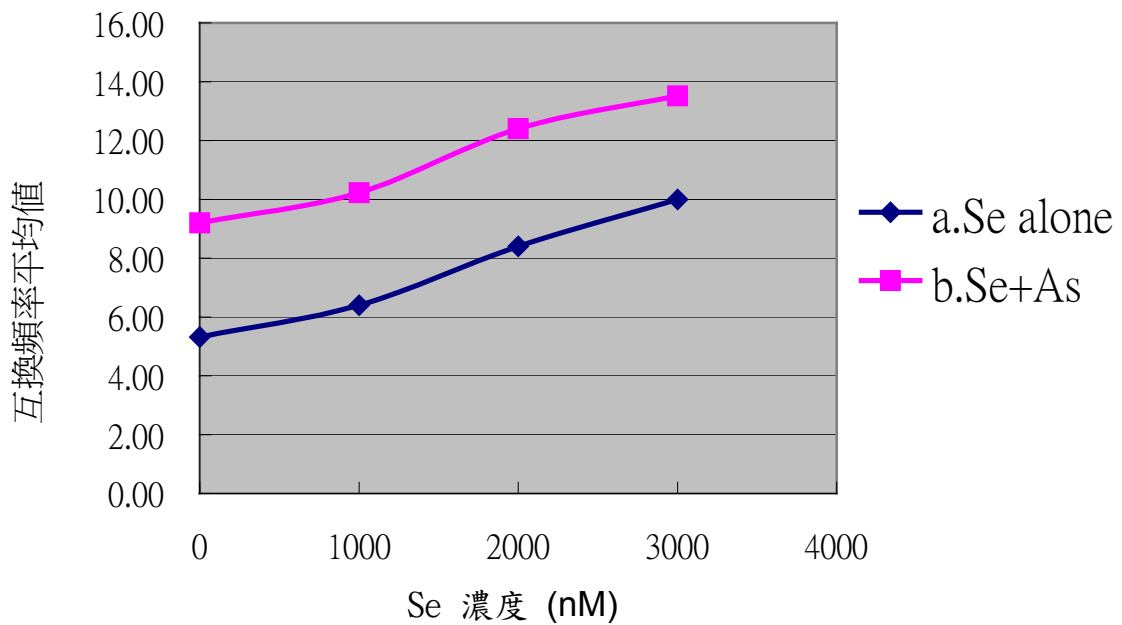
隨著亞砷酸鈉濃度增加，SCE 平均數也跟著增加，可見亞砷酸鈉在所下濃度範圍內會造成 DNA 複製產物對等處發生的互換頻率增加，且 M2 越來越少 M1 越來越多，PDT 也越來越大(表一)，造成細胞週期研遲，可見在此濃度範圍對細胞已有一

定成度的傷害。而當亞砷酸鈉 20 μM 時由於細胞週期延遲太嚴重，所以不計數。

實驗四：

把每個 dish 分兩組 a、b 分別先加入亞硒酸鈉濃度 0, 100, 500, 1500nM，24hr 後

在實驗四 b 中加入亞砷酸鈉濃度 10 μM 。計觀察其 SCE。



圖六 亞硒酸鈉單獨處理和亞硒酸鈉與亞砷酸鈉共同處理, SCE 的表現

表二 亞硒酸鈉單獨處理

Se 濃度(nM)	0	1000	2000	3000
M1	3	6	10	15
M2	97	94	90	85
M3	0	0	0	0

RI	1.97	1.94	1.9	1.85
PDT	13.2	13.4	13.7	14.1

表三 亞硒酸鈉和亞砷酸鈉共同處理

Se 濃度(nM)	0	1000	2000	3000
M1	27	28	34	39
M2	73	72	68	61
M3	0	0	0	0
RI	1.73	1.72	1.7	1.61
PDT	15.0	15.1	15.3	16.1

在實驗四中，我可以看到隨著濃度升高的亞硒酸鈉會讓 SCE 的頻率上升，也就是亞硒酸鈉可能會讓細胞受到傷害，不如預期中有保護作用。而和亞砷酸鈉共同處理時，頻率也比單獨處理亞硒酸鈉時高出許多，可看出亞砷酸鈉對細胞有一定的毒性(圖六)。至於 M1,M2,M3 的部分，我發現在實驗四 a 當亞硒酸鈉的濃度增加時，M2 仍維持 90 左右，且 PDT 值仍是 13.5 小時左右，研判亞硒酸鈉在此範圍對細胞週期的影響不大。而在實驗四 b 中，M2 數量逐漸減少，M1 數量逐漸上升，但是不明顯，而 PDT 細胞週期逐漸增大(表二、三)，平均比未加入亞砷酸鈉時多出兩小時。研判亞砷酸鈉會使細胞週期產生延遲現象。

四、 結論與應用

本實驗是利用微核的偵測來觀察亞硒酸鈉對重金屬所造成的染色體傷害是否有保護作用。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. 亞硒酸鈉在 0-1500 nM 的濃度時不會誘引|增加 MN 且不影響 BN。
2. 亞砷酸鈉不影響 BN，但是會誘引| MN。
3. 亞硒酸鈉不會降低亞砷酸鈉誘引|的微核數。
4. 亞砷酸鈉會造成 SCE(DNA 複製產物對等處發生的互換頻率)增加且會造成 PDT 增加，對 DNA 有一定的傷害。
5. 亞硒酸鈉本身就會造成 SCE(DNA 複製產物對等處發生的互換頻率)增加，可見其對細胞有一定程度的傷害，故探測亞硒酸鈉對亞砷酸鈉造成的細胞傷害是否具有保互作用，並不如我當出所預期。

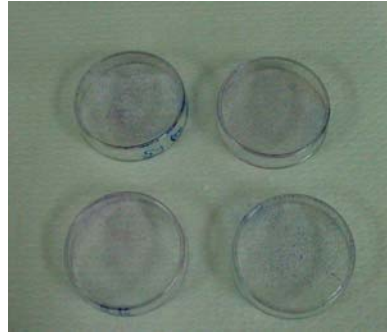
五、 參考資料及其他

1. Wells JD, Elliott JF (1971): Geochemical reconnaissance of the Cortez-Buckhorn area, Southern Cortez mountains, Nevada. U.S. Geol, Surr. Bull.,1312P: 1~18
2. 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
3. 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
4. Sabadell JE, Axtmann RC (1975): Heavy metal contamination from geothermal sources, Environ. Health Perspect. 12: 1~8
5. 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
6. Bates MN, Smith AH, Hopenhayn-Rich C (1992): Aesenic ingestion and internal cancers: a review. Am. J. Epidemiol., 135:462~476
7. Chen C.J Kou TL, WU MN (1988a): Arsenic and cancers(letter). Lancet, I:414~415
8. 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
9. Goyer RA (1986): Toxicological effects of metals. In Klaassen CD Amedur MD and Doull J(eds), Lasarett and Doull· s Texicology pp.582~635

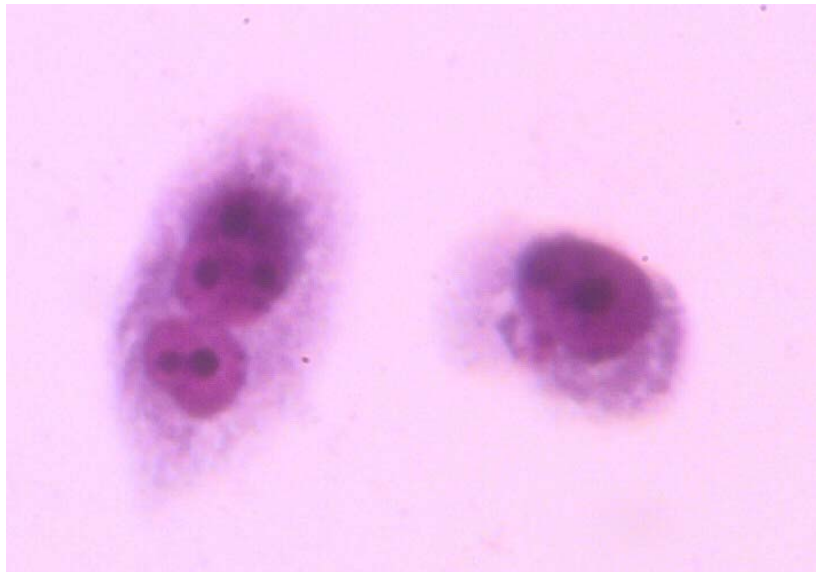
10. IARC (1980): Carcinogenesis of arsenic and arsenic compounds, IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 23:37~141
11. IARC (1980): Some metals and metallic compounds, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of chemicals to Man Vol.23. International Agency for Research on cancer, Lyon
12. 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

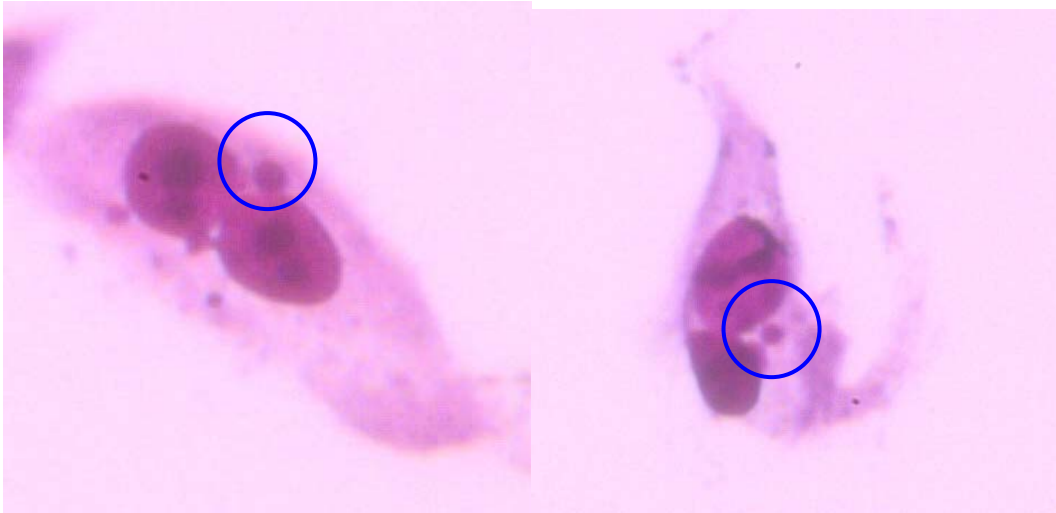
(一) 附錄照片:



附錄照片一 染色後的細胞



附錄照片二：左邊為雙核細胞(BN)，右邊為單核細胞。

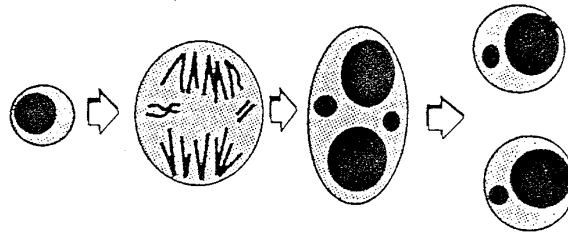


附錄照片三：藍色圓圈內是微核（MN）。



附錄照片四：藍色圓圈內是姐妹染色分體互換

(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.

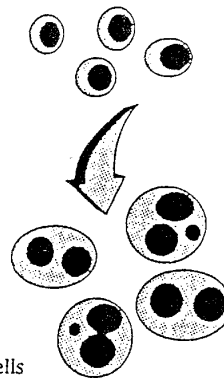
附錄圖一 微核形成示意圖

1. mitogenesis

2. add CYT-B before
first mitotic wave

3. accumulate binucleate cells

4. score micronuclei in binucleate cells

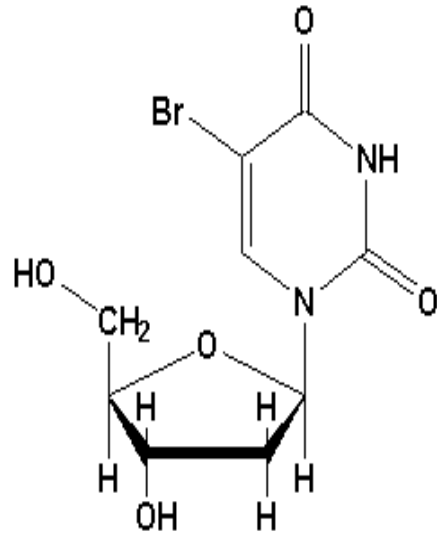


The basic elements of the cytokinesis-block micronucleus assay. CYT-B, cytochalasin-B.

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

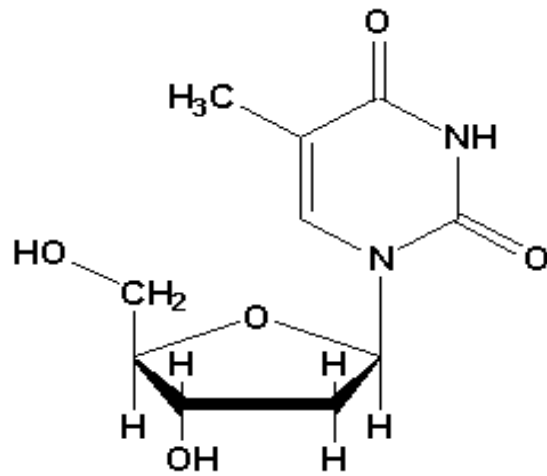
Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, edited by Gerd P. Pfeifer, Plenum Press, New York, 1996.

附錄圖二 雙核形成示意圖



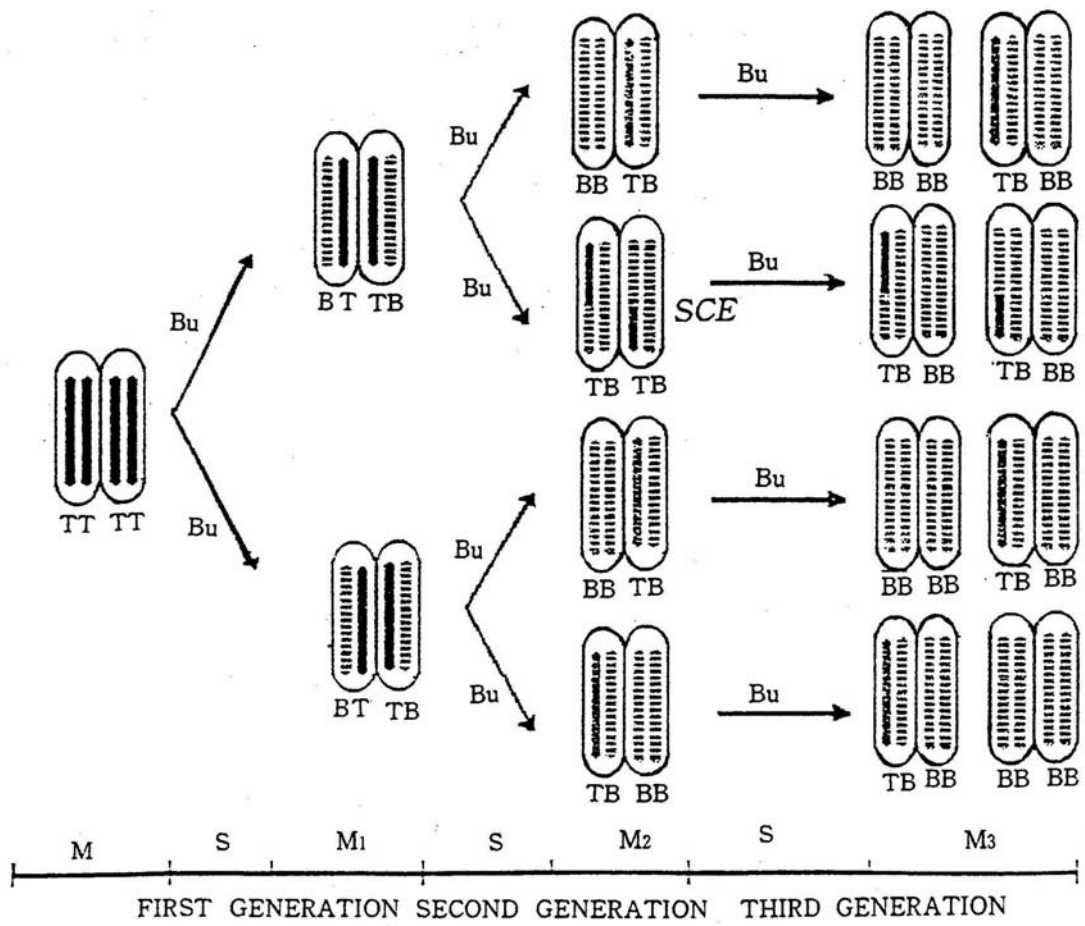
5-Bromodeoxyuridine (BrdUrd)

附錄圖三 BUdR , 5-bromodeoxyuridine, 5-溴脫氧尿苷



Thymidine

附錄圖四 胸腺嘧啶



附錄圖五 SCDS 與 SCE 示意圖

(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)、McCoy's 5A、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
- 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)、Sodium selenite (Na_2SeO_3 , Sigma)

3. 溶液配方：

A. McCoy' s 5A 培養液：

McCoy' s 5A medium	500ml
FCS (Fetal calf serum)	50ml
3% Glutamine	5ml
P/S (10000 units/ml Penicillin, 10000 單位/ml streptomycin)	5ml
5.5%NaHCO ₃	20ml

B. Sorensen' s Buffer (SB)

磷酸二氫鈉(NaH ₂ PO ₄)	17.86 g/l
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO 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 ₂ PO ₄	0.2 g/l
Na ₂ HPO 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%

F. HBSS 溶液

KCl	0.4 g/l
NaCl	8.0 g/l
KH ₂ PO ₄	0.06 g/l
Na ₂ HPO ₄	0.048 g/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.187 g/l

評語

對於砷硒對生理作用之研究有接近大學之程度，唯研究課題與環境科學之關係必須加強才符合參與環境組之意義。