

無機砷對遺傳物質危害之研究

易玲輝^{1,2} 李德章¹

無機砷廣泛分布於自然界中，並經由工業及農業的使用而釋放到生活環境裡。在某些狀況下，人類會暴露在含有極高濃度無機砷的環境中。流行病學調查顯示，砷暴露會增加人類罹患肺癌、皮膚癌及肝癌的機率。但是，動物實驗中卻無法驗證砷化物的致癌性。

一般而言，大多數致癌劑同時亦為致突變劑。但無機砷不論在細菌或哺乳類細胞中均無法誘引點突變(point mutation)。然而，無機砷卻在許多體外系統中，會誘發染色體異常(chromosome aberrations)、姐妹染色分體互換(sister chromatid exchanges)、細胞轉形(cell transformation)及基因擴張(gene amplification)等現象。此外，若將無機砷處理在 G2 期的人類成纖維細胞，會造成細胞休止在 G2 期、干擾細胞分裂、抑制紡錘絲形成及在下一次分裂時誘發核內再複製(endoreduplication)的產生。這些結果顯示，砷可能與 okadaic acid 的作用類似。Okadaic acid 是經由抑制蛋白質去磷酸酶的活性而導致核內再複製的產生。最近的研究亦證明無機砷在人類成纖維細胞會導致細胞分裂期的延長、異倍體(aneuploidy)和染色體不穩定性。

無機砷不但本身會誘發細胞遺傳學上的變異，而且會協力增加紫外線、DNA 交連劑(DNA crosslinking agents)及烷基化劑等物質的細胞遺傳毒性。無機砷的協力遺傳毒性可能導因於其抑制 DNA 的修補或複製。最近的研究結果顯示無機砷處理會改變紫外線所誘發的鹼基突變頻率，這顯示無機砷可能會於 DNA 複製時干擾 TT 及 CT 雙元體上突變之形成。

因為染色體異常的發生與癌症發展過程中的起始(initiation)、促進(promotion)及演進(progression)有密切的關係。因此，要瞭解無機砷所誘發之細胞遺傳學上的變異與其致癌性之間的關係，應有更深入的研究。

關鍵詞：砷，遺傳毒性，協力遺傳毒性，致癌性

前 言

無機砷廣泛分布於自然界中，並經由工業及農業上的使用而釋放到生活環境裡。人類可

經由空氣、飲水、食物及飲料，將砷攝取進入體內。在某些狀況下，人們會暴露在含有極高濃度無機砷的環境中，而造成呼吸器官、腸胃道、心臟血管、神經系統及造血系統嚴重的傷害。在臺灣西南沿海地區，烏腳病的發生被認為與長期攝取含砷井水有關[1]。最近之流行病學調查更指出，在烏腳病流行地區，砷暴露明顯增加當地居民皮膚癌、肺癌、肝癌及前列腺癌的發生率[2]。雖然砷化物被公認為人類致癌劑[3,4]，卻無法於實驗動物驗證其致癌性[3]。

¹ 中央研究院生物醫學科學研究所

² 國防醫學院生命科學研究所

聯絡人：李德章

聯絡地址：臺北市研究院路二段 128 號

收稿日期：85 年 3 月

接受日期：85 年 6 月

砷化物有多種形式，然以無機三價砷化物和五價砷化物為危害人體健康的主要物種。一般而言，三價砷化物的毒性遠大於五價砷化物。由於五價砷化物的化學結構近似磷酸，因此在細胞內可與磷酸競爭而干擾許多正常的代謝途徑，或可取代磷酸進入大分子如 DNA 中，進而造成毒性。然而磷酸含量在生物體內極為豐富，可減少五價砷酸的毒性。三價砷化物則已知為硫醇劑(sulfhydryl group)[5]，可與許多蛋白質或酵素之硫醇基形成穩定鍵結，影響這些分子的生化活性。在體內三價和五價砷化物可以互相轉換。但是這些作用機制仍無法直接說明砷暴露所引發之疾病。

無機砷的遺傳毒性

無機砷在細菌或哺乳動物細胞之鈉/鉀-腺苷三磷酸水解酵素(Na^+/K^+ -ATPase)及次黃嘌呤磷酸核糖基轉化酵素(hprt)二個基因位置上均不會造成突變的產生(6)。但在小鼠淋巴瘤細胞 L5178Y ($tk^{+/-}$) 系統中，無機砷卻可在胸腺嘧啶磷酸酵素(tk)基因造成微量但統計上有意義的突變率(7)。由於 L5178Y ($tk^{+/-}$) 細胞所測試的突變部分來自 DNA 大片段的重組(rearrangement)或丟失(deletion)，因此無機砷所造成的遺傳物質傷害，可能是由於染色體變異而非點突變(point mutation)。已有許多報告已證明無機砷會增加姊妹染色分體互換率，誘發染色體異常，包括斷裂(gap)、斷裂(break)及交換(exchange)(6, 8, 9)，及造成基因擴張(gene amplification)(10)，且在相同濃度範圍內，無機砷可同時誘發上述之染色體異常及細胞轉形(11)，顯示砷所誘發之細胞轉形與染色體變異有密切關係。然而目前尚無直接證據證明無機砷會直接造成 DNA 斷裂。

無機砷的協力遺傳毒性

由於無機砷無法在實驗動物誘引腫瘤，因此無機砷亦被認為是助癌物(cocarcinogen)。無機砷的助癌作用與其協力遺傳毒性有密切關係。過去數年的研究結果顯示無機砷會協力增加紫外線、DNA 交連劑、烷基

化劑等致癌劑所誘發之細胞毒殺性(cytotoxicity)、染色體異常及基因突變頻率，但對姊妹染色分體的互換率則無影響[8]。因人類所處的環境極為複雜，砷對其它致癌劑或致變劑的協力遺傳毒性，實不容忽視。但無機砷的協力遺傳毒性機制仍有待研究。

紫外線所誘發之致突變率在經砷處理後，約可增加兩倍以上。利用反轉錄-聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)及雙去氧核苷酸(dideoxy)定序法來分析這些突變株，可發現約有一半的突變株維持類似的突變形式，但在 TT 及 CT 雙元體位置上的突變率，經砷處理後明顯增加[12]。這些結果說明砷化物的協力致突變性，非導因於與 DNA 的直接作用，而可能是干擾參與 DNA 複製及修補的蛋白質和酵素，造成影響 DNA 複製的準確性及修補的效率，使得突變形式改變。最近的研究指出砷化物可抑制 DNA 連接酵素(ligase)的活性。此外砷化物的協力遺傳毒性只見於分裂增殖的細胞，而不在靜止不分裂的細胞表現，此結果顯示砷化物對細胞的作用與細胞週期的進行有密切的關係。

無機砷誘引異倍體 (aneuploidy)

無機砷處理會造成細胞分裂期(mitosis)的延長，而這種干擾細胞分裂進行的結果，會導致異倍體的產生。若將 $5\text{ }\mu\text{M}$ 三價無機砷處理 24 小時的 HFW 細胞，以連續稀釋的方式，讓存活的單一細胞長成一個細胞群落(colony)。將這些群落進行單株培養後，再分析其染色體數目。在初步分析的所有對照組細胞株中，均具有正確的雙套染色體數目及形態；但在砷處理組細胞株中，約有 20% 為異倍體細胞，其染色體數目不足 46 條。因為這些細胞是由單一細胞增殖而來，此結果可說明，在砷處理後所存活的細胞中會有異倍體的產生。異倍體的產生與癌症的發展有極密切的關係。染色體數目的改變，可能會造成細胞生長及分化的失控[13]。一旦細胞因此克服生長的限制，便可到達不朽(immortalization)的狀態，而造成細胞轉形甚至腫瘤的產生。

無機砷對 G2 期細胞的影響

異倍體的誘發，可能是細胞在 G2 期受到干擾，使細胞無法正常進入分裂期，或在染色體分離時，紡錘絲失去功能，造成無分離(nondisjunction)；染色體的斷裂，也會在細胞分裂後造成異倍體的產生。Gurr 等人[14]曾指出，將砷處理在 G2 期的中國倉鼠卵巢細胞，會抑制蛋白質合成、改變染色體形態、造成染色體的斷裂及改變細胞內染色體數目。因此，異倍體的誘發應與無機砷在 G2 及細胞分裂期的影響有關。

最近我們利用人類成纖維細胞(HFW)為材料，來研究無機砷對人類細胞的遺傳毒性及對細胞分裂的影響。HFW 為一株正常的人類細胞，具有正常而穩定的染色體組成，且在經過數次繼代培養之後，會老化死亡，為研究遺傳物質變異的好材料。若將 G2 期的 HFW 細胞處理砷(50 ~ 200 μ M) 2 小時，會造成細胞停滯在 G2 期，這些細胞若移至不含砷的培養基中繼續培養，經過 48 小時，仍無法進行細胞分裂[15]。另一方面，在砷處理的 G2 期細胞中，除了分裂前期(prophase)外，無法觀察到典型的分裂中期(metaphase)、晚期(anaphase)、及末期(telophase)的圖像，只可見與乙醯甲基秋水仙鹼(colcemid)處理極類似的過度捲縮染色體[15]。

另一方面可用免疫螢光染色法觀察紡錘絲的形成。在正常分裂中期的細胞中，紡錘絲位於細胞兩極。乙醯甲基秋水仙鹼為已知的紡錘絲形成抑制劑，經其處理之 G2 期 HFW 細胞，沒有紡錘絲的形成。但將秋水仙素自培養基中移除 2 小時後，可見紡錘絲迅速再形成。而在無機砷處理之 G2 期 HFW 細胞中，不但紡錘絲無法形成，甚至在砷移除後 2 - 10 小時亦無法觀察到紡錘絲再形成。這些結果說明在此濃度範圍內，無機砷處理的 G2 期細胞，會造成 G2 期進行的停滯及延緩細胞分裂的進行，並在細胞分裂期中影響染色體的分離(chromosome segregation)及抑制紡錘絲的形成[15]。

這些經過高濃度無機砷處理 G2 期細胞，在下一細胞分裂期中，可觀察到極高

比例的核內再複製(endoreduplication)的產生[15]。核內再複製的產生原因，至今不明，僅知與細胞分裂期受干擾有關。許多臨床研究發現，核內再複製的產生與腫瘤形成過程中超雙倍體(hyperdiploidy)的形成有關[16, 17]。染色體數目上的改變是腫瘤演進期(progression)的特徵(18)，因此無機砷所誘發之核內再複製可能導致此階段染色體不穩定性的產生。

無機砷對蛋白質磷酸化的干擾

在細胞分裂時，已知蛋白質去磷酸酵素參與複製染色體的分離過程。若以蛋白質去磷酸酵素的抑制劑，okadaic acid，來處理細胞，會造成細胞休止在分裂期、染色體形態異常、紡錘絲形成受阻及染色體分離的抑制，而導致核內再複製的產生[19, 20]。此現象與砷處理之細胞極為類似。而事實上，在砷處理之 G2 期細胞中，其絲胺酸/蘇胺酸蛋白質去磷酸酵素(serine/threonine protein phosphatase)的活性顯著降低[15]，顯示砷可能藉由抑制蛋白質去磷酸酵素的活性，擾亂細胞分裂期中蛋白質磷酸化的狀態，進而影響染色體的分離及細胞分裂的進行，而導致異倍體及核內再複製的產生。

無機砷與自由基之誘發

目前對無機砷導致遺傳物質傷害的機制，並不十分清楚。近年來，許多研究指出無機砷或其代謝產物，可能會經由干擾細胞內氧化還原反應的平衡，而誘發自由基的產生，包括過氧化氫(H_2O_2)、活性氧化物(active oxygen species)、及過氧化游離基(peroxyl radical)等物質的堆積[21-24]，進而造成細胞的過氧性傷害。無機砷誘引的姐妹染色體互換或微核即可被抗氧化劑抑制。自由基的產生可能參與金屬離子所造成的 DNA 傷害及染色體異常的過程，與許多化學物質的致變性及致癌性有密切關係[25, 26]。此外，自由基的誘發會導致細胞內致癌基因的活化[27]，而使細胞癌化。

除癌症外，無機砷的慢性暴露也會引起

全身性的病變，如動脈粥狀硬化、腦中風、糖尿病和周圍神經病變等。這些病變的發生亦與細胞內過量產生活性氧化物或氧自由基分子有極密切的關係。因此無機砷如何促使細胞內活性氧化物或氧自由基分子的增加，將為日後重要的研究課題。

結 論

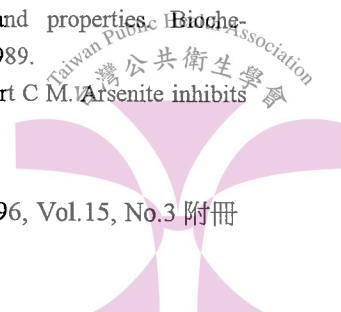
綜合上述實驗結果，可知無機砷會干擾細胞分裂時的生理、生化反應，而造成細胞週期進行的休止、異倍體細胞及核內再複製的產生。這些生理、生化反應包括抑制紡錘絲的形成及降低蛋白質去磷酸酵素的活性。究竟無機砷如何干擾這些反應的進行，目前仍不清楚。已知三價無機砷會經由與蛋白質上的硫醇基作用而導致蛋白質變性或酵素活性受抑制。而構成紡錘絲的單元體，微小管(tubulin)，為富含硫醇基的蛋白質[28]。蛋白質去磷酸酵素的反應中心也含有硫醇基[29]，因此，無機砷很可能經由與硫醇基的作用而使這些物質失去生理功能。另一方面，無機砷也被證實會抑制 ubiquitin 相關之蛋白質分解(ubiquitin dependent protein degradation)的活性[30-32]。因細胞分裂是一連串非常嚴謹的訊號傳遞過程，訊號的傳遞由蛋白質磷酸化的程度及代謝的時機來控制。而這些過程需要蛋白質去磷酸酵素及與 ubiquitin 的參與。無機砷也有可能經由干擾蛋白質磷酸化的程度及相關蛋白質的代謝，而造成細胞分裂期的異常。無機砷也會干擾呼吸作用[33]或糖解反應(glycolysis)[34]的進行，造成細胞內能量不足，因此而干擾細胞週期的進行。

因人類暴露的環境極為複雜，無機砷本身之致癌性及其協力遺傳毒性在砷的毒理上都極為重要。染色體異常、核內再複製及異倍體的產生與細胞轉形或腫瘤的形成均有密切關係。因此無機砷在癌症發展過程中，不論是起始、促進或演進均扮演重要角色。更深入詳盡的研究，才能對砷化物所誘發之細胞遺傳上的變異與其致癌性間的關係有更透徹的瞭解。

參考文獻

- 1.Chen KP and Wu HY. Epidemiological studies on blackfoot disease, a study of source of drinking water in relation to the disease. *J Formosan Med Assoc* 61: 611-618, 1962.
- 2.Chen CJ and Wang CJ. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasm. *Cancer Res* 50: 5470-5474, 1990.
- 3.IARC Carcinogenesis of arsenic and arsenic compounds, IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks in Human. 23: 37-141, 1980.
- 4.IARC Arsenic and arsenic compounds, IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks in Human. *Supplement* 7: 100-103, 1987.
- 5.Aposhian HV. Biochemical toxicology of arsenic. *Rev Biochem Toxicol* 10: 265-299, 1989.
- 6.Lee TC, Oshimura M and Barrett JC. Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis* 6: 1421-1426, 1985.
- 7.Oberly TJ, Piper CE and McDonald DS. Mutagenicity of metal salts in the L5178Y mouse lymphoma assay. *J Toxicol Environ* 9: 367-376, 1982.
- 8.Lee T C, Huang RY and Jan KY. Sodium arsenite enhances the cytotoxicity of, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 148: 83-89, 1985.
- 9.Lee TC, Lee KCC, Tzeng JY, Huang RY and Jan KY. Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA cross-linking agents. *Environ Mutag* 8: 119-128, 1986.
- 10.Lee TC, Tanaka N, Lamb PW, Gilmer TM and Barrett JC. Induction of gene amplification by arsenic. *Sciences* 241: 79-81, 1988.
- 11.Barrett JC, Lamb PW, Wang TC, and Lee TC. Mechanism of arsenic-induced cell transformation. *Biol Trace Elem Res* 21: 421-429, 1989.

12. Yang JL, Chen MF, Wu CW and Lee TC. Posttreatment with sodium arsenite alters the mutational spectrum induced by ultraviolet light irradiation in Chinese hamster ovary cells. *Environ Mol Mutag* 20: 156-164, 1992.
13. Tsutsui T, Maizumi H, McLachlan JA and Barrett JC. Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: A possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Res* 43:3814-3821, 1990.
14. Gurr JR, Lin YC, Ho IC, Jan KY and Lee TC. Induction of chromatid breaks and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase. *Mutat Res* 319: 135-142, 1993.
15. Huang RN, Ho IC, Yih LH and Lee TC. Sodium arsenite induces chromosome endoreduplication and inhibits protein phosphatase activity in human fibroblasts. *Environ Mol Mutag* 25: 188-196, 1995.
16. Muleris M, Delattre O, Olschwang S, Dutrillaux AM, Remvikos Y, Salmon RJ, Thomas G and Dutrillaux B. Cytogenetic and molecular approaches of polyploidization in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 107-118, 1990.
17. Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Remvikos Y, Zafrani B and Prieur M. Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res Treat* 19: 245-255, 1991.
18. Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC and Rabinovitch PS. Flocytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: Prospective endoscopic surveillance of a cohort [see comments] *Gastroenterology*. 102: 1212-1219, 1992.
19. Ghosh S and Pawletz N. Okadaic acid inhibits sister chromatid separation in mammalian cells. *Exp Cell Res* 200: 215-217, 1992.
20. Ghosh S, Pawletz N and Schroeter D. Effects of okadaic acid on mitotic HeLa cells. *J Cell Sci* 103: 117-124, 1992.
21. Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura R and Okada S. Dimethylated arsenics induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 43-50, 1989.
22. Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Ryoji S, Hasegawa A and Okada S. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxyl radical. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 58-64, 1990.
23. Blair PC, Thompson MB, Bechtold M, Wilson RE, Moorman MP and Fowler BA. Evidence for oxidative damage to red blood cells in mice induced by arsine gas. *Toxicology* 63: 25-34, 1990.
24. Lee TC and Ho IC. Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodium arsenite. *Arch Toxicol* 69: 498-504, 1995.
25. Klein C B, Frenkel K and Costa M. The of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 4: 592-604, 1991.
26. Kasprzak KS. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity *Chem Res Toxicol* 4: 604-615, 1991.
27. Cerutti P, Shah G, Peskin A and Amstad P. Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci* 663: 158-166, 1992.
28. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. *Molecular biology of the cell*, pp. 549-668. New York: Garland Press, 1983.
29. Guy GR, Cairn J, Ng SB and Tan YH. Inactivation of a redox sensitive protein phosphatase during the early events of tumor necrosis factor/interleukin 1 signal transduction. *J Biol Chem* 268: 2141-2148, 1993.
30. Klemperer N S, Berleth ES and Pickart CM. A novel, arsenite-sensitive E2 of the ubiquitin pathway: purification and properties. *Biochemistry* 28: 6035-6041, 1989.
31. Klemperer NS and Pickart C M. Arsenite inhibits



- two steps in the ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J Biol Chem* 264: 19245-19252, 1989.
32. Berleth E S, Kasperek E M, Grill SP, Braunscheidel JA, Graziani LA and Pickart CM. Inhibition of ubiquitin-protein ligase (E3) by mono- and bifunctional phenylarsenoxides. *J Biol Chem* 267: 16403-16411, 1992.
33. Rein K, Borrebaek B and Bremer J. Arsenite inhibit oxidation in isolated rat liver mitochondria *Biochim Biophys Acta* 574: 487-494, 1979.
34. Seymour CB and Mothersill C. The effects of glycolysis inhibitors on the radiation response of CHO-K1 cells. *Radiat Environ Biophys* 27: 49-57, 1988.