

利用隨機增幅多型性 DNA 偵測亞砷酸鈉誘發淋巴母細胞的 核酸損害

摘 要

根據流病學的研究，證明在長期暴露砷污染下會誘發許多人類的疾病，包括烏腳病、動脈硬化以及多種癌症。雖然有證據顯示，癌症產生和砷有相關，但一些關於砷造成癌化的分子機制仍尚未明瞭。癌症生成是細胞由於基因突變累積的理論已經被廣泛的接受，而亞砷酸鈉也已經被證實可以誘發核酸氧化損害和核酸與蛋白質的交叉連結。本研究中，我們利用隨機增幅多型 DNA 的技術，以 90 條隨機引子來偵測經過亞砷處理的淋巴母細胞對其基因體的效應。結果發現經過亞砷酸處理後最主要隨機增幅多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 型態的改變分別是增加以及減少條紋亮帶的強度。其中以 D11 和 F1 引子所產生的 RAPD 型態在未處理及處理組的基因體之間是具有高的鑑別性。D11 和 F1 引子所產生的序列和人類 *RB1CC1* 及 *PACE4* 基因的序列相似。所純化出來用以檢測亞砷酸鈉所誘發核酸損害之分子標籤以核酸雜合驗證之。為了要檢驗亞砷酸鈉對於 *RB1CC1* 及 *PACE4* 基因表現的影響，我們進行 RT-PCR 和北方墨點法的分析測量其 mRNA 的表現，發現亞砷酸鈉處理的淋巴母細胞可以增加 *RB1CC1* 基因的表現。總結而言，我們的結果證實 RAPD 是一個具潛力的工具在偵測基因體的改變和亞砷酸鈉所引發的癌化現象上，亦是一個很好的分子標籤篩選工具。

Abstract

Epidemiologic studies demonstrated that long-term exposure to arsenic induces many human diseases, including blackfoot disease, atherosclerosis, and cancers. Although evidences show an association between arsenic and cancer, the molecular mechanism is still unclear. It is widely accepted that cancer results from the accumulation of mutations in the genes. Sodium arsenite has been shown to induce oxidative DNA damages and DNA-protein crosslinks. In this study, we used the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay with ninety arbitrary primers to evaluate the effects on the genomic DNA of human lymphoblastoid cells exposed to sodium arsenite. The main changes in RAPD profiles following sodium arsenite treatments were a decrease and an increase in band intensity. Two RAPD primers (D11 and F1) were more discriminated the RAPD profiles between sodium arsenite-treated and control genomic DNA. The sequences of these loci amplified with primers D11 and F1 showed highly similar to human *RB1CC1* and *PACE4* genes. The DNA markers were purified for the molecular detection of sodium arsenite-induced DNA damage by nucleic acid hybridization. To confirm the effect of sodium arsenite on *RB1CC1* and *PACE4* genes, we examined the expression of these two genes by Northern blot and RT-PCR analysis. Sodium arsenite treatment could significantly up-regulate the expression of *RB1CC1* in human lymphoblastoid cells. Taken together, our results demonstrated, for the first time, that RAPD is a good tool for the detection of genomic DNA alternations and direct screening of new molecular markers related to sodium arsenite-induced carcinogenesis

第壹章

前言

一、砷元素及其來源

砷元素的含量在地殼中排名第 20 位，在海水中的含量為第 14 位，人體的含量為第 12 多。砷離子能和氧、氯、硫元素形成無機砷化合物，而在動物中或在植物中則會和碳、氫元素形成有機砷化合物（附圖一），在自然界多以化合物存在 (Mandal et al., 2002)。砷元素及其化合物已經廣泛的被使用在許多領域，包括：農業、畜牧、電力學、工業和純化金屬等方面。無機砷化物常被用來保存木材，而有機砷則常被用來防治蟲害特別是在棉花，由於使用廣且頻繁，所以極有可能經由飲食、飲水或者呼吸到經由砷處理的木材所燃燒出來的煙霧暴露在砷污染下，或者生活在環境中有含極高量的自然砷化合物。

二、砷在醫學上使用的歷史

砷在醫學上使用的歷史可以追溯到兩千四百年前，它不僅被視為一種治療藥物並且也是一種毒藥。古希臘人使用 As_2S_3 和 As_2S_2 當作胃潰瘍的治療藥物，另外砷也被使用在治療鼠疫、瘧疾和治療癌症及促進出汗的治療上。砷化物以及其鹽類在抗菌、抗抽筋、防腐、補血、鎮定等功能上具有關鍵的因素。近年來最重要的發現是砷在治療急性前骨髓性血癌的療效上是非常顯著的，它可以誘發白血球持續細胞凋

亡，至完全的消除血癌，比起傳統的化學療法更不具毒性 (Zhang et al., 1996)。有關砷使用在醫療治療上的歷史概述於下 (附表一)。

三、砷造成的 DNA 受損以及產生癌化現象

根據研究，無機砷的暴露會造成染色體變異 (chromosomal aberrations)、核酸和蛋白的交叉結合 (DNA-protein crosslinks)、姊妹染色體互換 (sister chromatid exchange) 和微核體 (micronuclei) 的形成 (Wang et al., 2002)，這些都是核酸受到損害所造成的具體現象。

砷是自然界中一種人類致突變劑，已經有很充分的流行病學證據可以證明，長期暴露在砷污染下會造成多種惡性腫瘤的形成，例如發生在皮膚、肺部、膀胱及肝臟的惡性腫瘤 (Abernathy et al., 1999)。亞砷酸會造成皮膚上的傷害例如皮膚角化過度 (hyperkeratosis) 的現象，大多數發現的例子當中引發皮膚癌其他的效應如高血壓，和血液循環不良所造成的周圍組織壞疽，如烏腳病。在高劑量下可能會引發神經系統損害，以及造成內分泌失調產生糖尿病，和造成腎臟的近端小管退化、皮質發炎的現象 (Carter et al., 2003； Hughes, 2002)，但是砷是如何誘發癌症的形成的機制則尚未清楚的被研究。

四、砷的代謝與毒性機制

砷經消化道進入時，其吸收取決於溶解度，砷主要經呼吸道，小

量也可經皮膚和粘膜進入人體。無機砷及其化合物經呼吸道、消化道，少量也可經皮膚和粘膜進入人體。它經由吸收進入血液後，95%~99%紅細胞內與血紅素結合，隨血液分佈到全身各個器官中，其中大部分貯存在肝臟、腎、脾、胃腸道壁及肌肉處，從而導致神經系統、肝、腎、消化道、毛細血管損害。元素狀態的砷被氧化成砷酸、亞砷酸形式而被人體吸收，這種過程稱為生物轉換。砷在空氣中幾乎全變成三氧化二砷而從呼吸道吸收，皮膚接觸較多見 (Mandal and Suzuki., 2002)。砷對蛋白質的硫醇基 (-SH) 具有很大的親合力 (附圖二)，在人體中特別是頭髮和富含角質的組織。尤其與丙酮酸氧化酶的硫醇基相結合，成為丙酮酸氧化酶與砷的複合體，使酶失去活性，影響細胞 ATP 代謝，導致細胞死亡。砷還能抑制磷酸酯酶，損害染色體，影響細胞的有絲分裂 (Mandal and Suzuki., 2002)。另外，砷還可影響 6-磷酸葡萄糖脫氫酶 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)，乳酸脫氫酶 (lactate dehydrogenase)、細胞色素氧化酶 (Cytochrome oxidase)，與之形成雙硫醇基，使細胞呼吸及氧化過程減低 (Lagunas., 1980)。由於組織代謝和營養障礙，損害神經細胞，引起中毒性神經衰弱綜合症和多發性神經炎及腎、肝、心等實質臟器病變 (Hughes, 2002)。

五、砷所造成的其它細胞效應

根據前人論述，砷化物能緊密的結合到硫醇基 (-SH) 上，特別是

雙硫醇基上，而雙硫醇基則是非常普遍的接受器結合區域 (receptor-binding domains) 上的結合位點，或是酶的活化位點 (enzymatic-active sites)，造成正常細胞的生理功能紊亂，進而產生細胞凋亡 (apoptosis)、細胞增生、刺激分化以及抑制血管新生的發生 (Miller et al., 2002)。此外，砷化物的代謝產物還會抑制細胞內的核酸修補機制，如 NER (nuclear excision repair) 或 BER (base excision repair)，它會藉由破壞和核酸損害相關的蛋白質或是修補酵素來阻斷修補機制的正常運作，造成核酸受損堆積 (Hartwig et al., 2003)。

六、砷所造成的核酸損害

根據前人研究指出砷所造成的核酸損害，必須在非常高劑量的處理下，被認為不具生理上的意義。但在最近的研究中被證實在低劑量處理砷下，加入核酸修補酵素 formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) 以及 proteinase K (PK) 可以明顯增加核酸雙股斷裂的數量 (Wang et al., 2002)，這個結果顯示砷所造成的核酸損害，以 oxidative DNA adducts 和 DNA-protein cross-links 為主要的形式。然而砷所造成的核酸氧化性傷害，被認為是經過誘發 reactive nitrogen species (RNS) 以及 Reactive oxygen species (ROS) 所造成的 (Wang et al., 1997)。且砷所誘發的 RNS 的途徑似乎是屬於鈣離子依賴性 (calcium dependence)

的途徑（附圖三），因為 NO 合成的抑制因子以及鈣離子調控因子對於砷所誘發的核酸股斷裂是有造成影響的 (Gurr et al., et al, 1998 ; Lynn et al., 1998)。並且砷所誘發的 RNS 及 ROS 不只會造成核酸的損害，還會牽涉到多重癌化的過程，造成各種疾病 (Bau et al., 2002)。

七、利用 RAPD-PCR 偵測核酸損害

隨機引子聚合鏈鎖反應 RAPD (Random amplified polymorphic DNA)的方法是一種 DNA 指紋技術 (Williams et al., 1990)，建立在 PCR 的技術之上，它所用的「引子」是一個短的、隨機的序列，通常為 10 個核苷酸的序列，序列的順序通常由電腦隨機產生出來的。由於 RAPD 所用的隨機「引子」只有 10 個核苷酸的序列，所以隨機引子在基因體上就可以辨識到許多的 loci 並接合上去，如果接合到兩個鄰近的 loci 的話就會產生適當長度的 PCR 產物。假如基因體發生順序改變，使其中某個引子辨識的 locus 發生改變，將使得 PCR 後的產物生成的情形發生變化（附圖四）。通常在電泳膠上 RAPD-PCR profile 會呈現個別上的差異取決於(1)產生/消失引子的接合位點，(2)引子互補完全/互補不完全，(3)引子接合位點間的距離 (Wolf et al., 2004)。RAPD 可以簡單且迅速的偵測到基因體內的改變而不用特別先去知道某段 DNA 序列的資訊 (Williams et al., 1990)，這就是

RAPD-PCR 跟普通 PCR 之間最大的特異點。所以 RAPD 在研究族群、血緣分析、系統發生分析及細菌品系分類上是一個普遍使用的研究方法，最近也常被應用在偵測基因體的變化上面，包括 DNA 序列的重組、核苷酸的增加、刪除、細胞的微粒體的改變都可以偵測 (Ong et al., 1998)。所以說，這個方法有用來研究偵測人類癌細胞的基因體穩定性上面扮演重要的角色，另外也發現一些有意義的指標基因 (Maeda et al., 1999 ; Papadopoulos et al., 2002 ; Singh and Roy., 2001)。

第貳章

研究動機及目的

雖然已有證據顯示，癌症產生和砷有相關，但一些關於砷造成癌化的分子機制仍尚未明瞭。造成癌症的原因已知是由長期的突變所累積而成的，根據前人文獻探討，砷會誘發氧化性的核酸損害和核酸與蛋白質的交叉連結。因此，我們想藉由 RAPD-PCR 這項技術來偵測亞砷酸鈉所誘發人類淋巴母細胞之核酸損害，並藉由分析發生核酸損害之序列，進而針對這些序列所比對到之基因探討與癌症生成之關係。我們希望藉由 RAPD-PCR 這項技術來尋找到可偵測其核酸損害之分子標籤，並藉由核酸雜合技術來驗證其標籤之有效性，已提供未來研究之發展應用。

第參章

實驗材料與方法

一、細胞培養

本研究使用人類淋巴母細胞株 (N3 human lymphoblastoid cell)，置於 RPMI 1640 (Invitrogen, USA) 培養液中，其中包含 10% 的 FBS、2 mM 的 L-glutamine 及 1% 的 PSN 抗生素混合液中，培養在 5% CO₂ 和 37 °C 的環境下做繼代培養。

二、亞砷酸的處理

三價的無機砷化合物，亞砷酸鈉溶解在去離子水中，分裝以備使用。把正在成長中的 N3 細胞用離心機離下來，加入 RPMI 培養液中 (5X10⁶ 細胞數溶於 10 毫升的培養液中)。分別加入不同濃度的亞砷酸鈉，並在 37 °C 的環境下培養 2 小時，做去氧核糖核酸的萃取分析或是培養 24 小時做核糖核酸、蛋白質的萃取分析。

三、彗星分析法

鹼性彗星分析法是參考 Singh (1988) 等人的方法。將細胞溶液 (5X10⁵ cells/dish) 置於培養盒中 37 °C，含有 5% CO₂ 培養箱中培養，分別加入不同濃度亞砷酸鈉溶液使其濃度為 10 μM, 80 μM 還有控制

組 0 μM 培養 4 個小時，吸取細胞液，以 1000 rpm 離心 6 分鐘後，再置於 PBS 緩衝溶液，置於 eppendorf tube 中，以 1000 rpm，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心 6 分鐘，加入 1250 μl PBS 緩衝溶液與細胞均勻混合，將 125 μl 細胞溶液與 250 μl 1.5 % low melting point agarose 混合均勻（第二層膠）後置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 乾熱恆溫器中。取 300 μl 1% normal melting point agarose（第一層膠）置於磨砂玻片上，覆上蓋玻片，置於冰上，待 agarose 凝固後移除蓋玻片，取 75 μl 第二層膠置於玻片上，覆上蓋玻片，置於冰上，待 agarose 凝固後移除蓋玻片，放入 lysis buffer (2.5 M, NaCl、100 mM, EDTA- Na_2 、10 mM, Tris、1% sodium lauryl-sarcocinate、1% Triton X-100、10% DMSO, pH 10) 中作用 1 小時，取出置於電泳液 (0.3 M NaOH, 0.001 M EDTA- Na_2 , pH 13) 中，浸泡 20 分鐘，使雙股 DNA 解旋為單股，以 25V, 300mA 進行電泳 15 分鐘，之後以中和液 (0.4 M Tris, pH 7.5) 中和，使單股 DNA 轉變為雙股，再以 75 μl 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidium Bromide 染色，利用 400 X 螢光顯微鏡 (Nikon E400, Japan) 觀察，Kodak M40 拍攝 DNA 受損的情況，最後以專業軟體分析彗星移動 (Tail moment) 的程度。每個處理取 60 個影像計算。

四、去氧核糖核酸的萃取

所有 N3 細胞的去氧核糖核酸，依照 DNeasy tissue kit (Qiagen, America)說明書上的步驟萃取出來。接著藉由測量 OD₂₆₀ 的吸光值決定去氧核糖核酸的濃度。

五、RAPD-PCR 分析

本實驗使用 90 支引子，引子的序列從 Operon (Operon, UK) 的網站下載然後經由商業合成。所使用的去氧核糖核酸的樣本稀釋成 2.5 ng/μl 進行 RAPD 的分析。進行聚合鏈鎖反應所用的 30 μl 混合溶液中包含 10 X 酵素的緩衝溶液、0.2 μM dNTP、5 pmol 隨機引子，1.5 U 的 DNA 聚合酶、25 ng DNA 當作模版。PCR 反應的溫度如下：在 94 °C 反應 0.5 分鐘作為變性，接著 40 °C 下反應 1 分鐘以便引子接合，72 °C 反應 1 分鐘做為模版合成。反應完產生的 PCR 產物 20 μl 混合 loading buffer 用 2% 洋菜膠進行電泳分離 (100 V, 70 分鐘)。電泳完成後，把洋菜膠置於 0.5 μg/ml 濃度的 EtBr 中染色，並且以 UV 光呈現影像。

六、利用 TA cloning 做 RAPD 序列的定序

把 PCR 的片段由洋菜膠切下來，並且把 DNA 由膠中純化出來。接著把純化出來的 DNA 重新利用相同的隨機引子做 PCR。把重新增

幅的片段使用 TA cloning kit 接到載體上，以上步驟可經由說明書得知。重組過後的質體 DNA 可經由 EcoRI 酵素的切割來確認所接進去的片段大小。經過 Clone 的 RAPD 產物經由 DNA 定序機器可得到序列結果，並且利用 BLASTn 和 BLASTx 程式，把序列跟 Genebank 上的資料庫做比對。

七、南方墨點法

把之前作電泳膠分析的 RAPD 產物，在 UV 光呈現影像後。接著把電泳膠用 solution I 清洗兩次各 15 分鐘，沖洗 d_2H_2O 後，置於 solution II 中搖晃兩次各 15 分鐘，目的使的電泳膠上的 DNA 產生變性，然後浸泡 solution III 中兩次 15~30 分鐘，中和變成鹼性的電泳膠。然後利用 2 X SSC 的高鹽溶液所做成的鹽橋把 DNA 轉漬到 Hybond-N nitrocellulose 膜上。照射 UV 燈使 DNA 和 Hybond-N nitrocellulose 膜做緊密的結合，把膜先 pre-hybridized 在 42 °C 兩個小時，接著把 P^{32} -dCTP-label 的 D11-b 序列的 PCR 產物做雜合在 42 °C 一整個晚上。然後把膜在 2 X SSPE, 0.1% SDS 中洗兩次各 20 分鐘，在 1 X SSPE, 0.1% SDS 洗 20 分鐘，把膜封存後把底片在 -80 °C 下做放射線曝光。

八、RNA 的萃取

取一盤細胞 (5×10^6 - 8×10^6 cells)加 PBS 刮下細胞離心，留下 pellet 加 1 ml 的 Trizol reagent (Invitrogen, USA)。放到小 tube 中，置室溫 5 分鐘，接著加入 Chloroform 0.2 ml，用力搖晃 15 秒後避光。放置室溫 15 分鐘，使用離心機在 4°C 、12000 g 下離心 15 分鐘。離心過後取上清液至新的 tube 中（不可取到中間沈澱物），加入相同體積的異丙醇上下倒搖 20 次後在室溫下 5-10 分鐘，接著在 12000 g、 4 - 25°C 下離心 8 分鐘。可看見白色的 pellet 沈澱在管底，去除上清液，以 75°C 的 EtOH 沖洗 1-2 次（把 pellet 衝離底部即可），離心 7500 g、 4 - 25°C 、5 分鐘。去上清液 (EtOH)，pellet 拿到 hood 吹乾，約 15-30 分鐘，至透明狀。溶於 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 中，水浴 55 - 60°C ，10-15 分鐘，以求完全溶解。所有 RNA 的濃度由分光光度計 (Beckman DU 640) 測量其波長 260 nm 的值。定量後，分裝放置 -80°C 冰箱保存。

九、RT-PCR

每個 sample 取出 1-5 μg 的 RNA 依照 First-Strand System kit (Invitrogen, USA) 的步驟，先和 10 mM dNTP、Oligo dT 混合在 65°C 加熱 5 分鐘，放置冰上至少 1 分鐘，然後混合 RT buffer、25 mM MgCl_2 、0.1 M DTT 在 42°C 下加熱 2 分鐘，再加入 RT enzyme 在 42°C 下反應

50 分鐘、70 °C 下 15 分鐘，冷卻至 4 °C 保存。取適量的 cDNA 分別加入 *RBICCI*、*PACE4* 的引子，進行聚合鏈鎖反應 (PCR)。PCR 的產物接著做電泳、染色分析。

十、北方墨點法

萃取出來的 RNA (20 µg per sample) 在 1% 的福馬林電泳膠中進行分離，然後利用 2 X SSC 的高鹽溶液所做成的鹽橋把 RNA 轉漬到 Hybond-N nitrocellulose 膜上。照射 UV 燈使 RNA 和 Hybond-N nitrocellulose 膜做緊密的結合，把膜先 pre-hybridized 在 42 °C 兩個小時，接著把 P³²-dCTP-label 的 *RBICCI* 和 *PACE4* 的 cDNA 的產物做雜合在 42 °C 一整個晚上。然後把膜在 2 X SSPE，0.1% SDS 中洗兩次各 20 分鐘，在 1 X SSPE，0.1% SDS 洗 20 分鐘，把膜封存後把底片在 -80 °C 下做放射線曝光，根據強度做調整，約 4-6 天。

十一、蛋白質的萃取和西方墨點法

將細胞用 PBS 洗二次之後，用刮勺將細胞刮下並移至離心管中，以 1000 rpm、離心 6 分鐘，倒掉上清液並用棉棒將 pellet 及離心管拭乾，將細胞冰至 -80 °C 中保存。在要萃取出蛋白質時，將 pellet 溶於適量的 PBS，利用超音波震碎機震盪，震盪完畢後把離心管的溶液移

至 eppendorf tube，在 10000 rpm、4 °C 下離心 15 分鐘後，保留上清液。接著配置六種不同濃度的 bovine serum albumin (BSA) 做標準曲線來測定蛋白質濃度，分別為：0、0.003125、0.00625、0.0125、0.025、0.05 mg/ml，各加入 Bio-Rad 之蛋白質定量試劑 40 μ l，最後體積控制在 200 μ l。利用 ELISA Reader 在波長 595 nm 下，測 O.D.值，再換算成蛋白質濃度。取定量之蛋白質分裝於 eppendorf tube，冰至於-80 °C 中保存。

將定量分裝的蛋白質與 2 X sample buffer 混合，在 95 °C 下反應 5 分鐘使其變性。把加熱後的 sample 注入電泳膠中，以 100 V 通電 120 分鐘進行 SDS-PAGE 電泳分離。將裁好的 PVDF membrane 先泡在甲醇中 5 分鐘，PVDF membrane 及濾紙浸泡在 transfer buffer 中，裁下電泳膠中所要轉漬的區域，之後將其一同泡於 transfer buffer 中。在轉印石墨板上依 3 張濾紙、PVDF membrane、gel、3 張濾紙的方式排列，接上電極並設定電流（電流 = 濾紙面積 \times 疊數，1 cm² = 1 mA），在 90 分鐘後將 membrane 取出，並浸泡於 5% milk-TBST，搖晃於室溫下 1 hr。以 TBST 清洗 membrane 20 分鐘兩次，加入一級抗體，並置於 4 °C 之下作用一夜。以 TBST 清洗 membrane 30 分鐘三次，加入二級抗體，使其在室溫下作用 1 小時，之後再用 TBST 清洗 30 分鐘三次，然後進行 ECL 反應。將 PVDF membrane 裝於透明塑膠

袋內並置於片夾中，在暗房中操作以底片感光。

第肆章

實驗結果

一、彗星分析法分析亞砷酸處理淋巴母細胞所造成的 DNA 損害

根據前人的研究，處理亞砷酸鈉 4 小時可以造成最強的核酸損害可被偵測出來 (Wang et al, 2002)。於是我們處理不同濃度的亞砷酸鈉 (0、10、80 μM) 4 小時後，收取細胞做鹼性彗星分析。結果發現，濃度 10 μM 亞砷酸鈉處理的人類淋巴母細胞，與未處理細胞之間的 tail moment 有顯著的升高，然而在濃度為 80 μM 的亞砷酸鈉處理下之 tail moment 反而比 10 μM 亞砷酸鈉處理的細胞呈現降低的情形 (圖一)。利用把 Formamidopyrimidine-DNA-glycosylase (Fpg) 酵素以及 Proteinase K 酵素分別加入彗星分析法做處理，Fpg 酵素可以切除氧化性傷害的鹼基序列 (oxidized base) 例如 formamidopyrimidine 及 8-oxoguanine；Proteinase K 則可以把造成核酸蛋白交叉連結 (DNA-protein crosslink) 的蛋白質瓦解釋放，增加核酸的不完整性，而增加彗星分析法之 tail moment 程度。結果顯示在經過 Fpg 酵素以及 Proteinase K 酵素處理過後，Fpg 酵素在 10 μM 亞砷酸鈉處理組跟未處理酵素之對照組比較 Tail moment 增加了 3.7 倍，Fpg 酵素在 80 μM 亞砷酸鈉處理組跟未處理酵素的對照組的 tail moment 相比有 3 倍顯著的上昇，Proteinase K 酵素之 80 μM 亞砷酸鈉處理組跟未處理酵素

的對照組的 tail moment 相比則增加了 5.2 倍(圖二)。此現象顯示在 80 μM 處理下的核酸傷害大部份是屬於氧化性鹼基以及核酸蛋白交叉連結的形式，而不像 10 μM 處理的核酸傷害是屬於直接股斷裂性的傷害(圖三)。

二、RAPD-PCR 偵測亞砷酸對淋巴母細胞所造成 DNA 序列的傷害

當分別加入不同濃度的亞砷酸鈉 (0、10、80 μM)處理後，可由慧星分析發現在 10 μM 已經有產生 DNA 股斷裂的情形發生，濃度為 80 μM 的亞砷酸處理則顯示出強烈的氧化性傷害以及核酸蛋白交叉連結的損害。於是接著我們利用 RAPD-PCR 這個方法，希望能看到一些特定的序列因為核苷酸被改變而產生對 RAPD-PCR 反應的影響，例如：因為劑量處理而產物的量增加、減少或性質的改變。在本實驗中，我們一共篩選了 90 條 RAPD 的引子，在第一次的篩選中我們淘汰大部份沒有變化的引子，選出其中比較具有辨識力的 10 條引子序列，在經過多次的實驗：引子 D11 (GTCCCGACGA)和引子 F1 (ACCGCGAAGG)有亞砷酸鈉處理表現 RAPD-PCR 產物條帶圖譜的差異性，大部分的差異屬於產物條帶濃度增加或是降低，其中還有少數則是屬於產物條帶消失(表二)，從這差異性條帶中挑選其中幾條進行詳細的分析。如 D11 上的 A、B 和 F11 上的 A、B 條帶。由 D11

引子所增幅出來的片段我們可以觀察到 A 條紋在處理亞砷酸鈉劑量 10 μ M、80 μ M 時，增幅的產物變的比未處理組多，而在 B 條紋上面則是未處理亞砷酸鈉的產物比較多（圖四）。而在 F1 所增幅出來的片段序列中，可觀察到 A 產物是呈現隨著劑量而遞減的情況，B 產物在劑量為 10 μ M 時產物為最低。我們把這些條帶由電泳膠中切取純化出來，再利用相同的引子重新增幅一次，接著把純化出來的序列接到 TA cloning 載體上，利用轉殖成功的大腸桿菌作大量複製，並將載體純化後，利用載體所附的引子作定序分析。

三、亞砷酸鈉處理改變 DNA 序列之定序

亞砷酸鈉處理造成 RAPD-PCR 與對照組間有差異之產物條帶經過定序後，把所得到的序列資訊與 NCBI 的基因庫做可能基因的比對，得到 D11A 的序列與人類第十號染色體上 RP11-162A23 clone 上，可能包含未知的基因；D11B 則是與人類第八號染色體上與 RP11-1152K2 clone 及 CTD-3214K23 clone 重疊，經過比對附近有無基因後，發現其序列與 *RBICCI* (RB1-inducible coiled-coil 1) 基因上第 20 個 intron 完全相同。在 F1A 序列的比對，發現其序列與 RP11-299G20 clone 重疊，與人類 *PACE4* (paired basic amino acid cleaving system 4) 基因的第 12 個 intron 完全相同；F1B 序列的比對結果顯示，其序列

與人類第二十一號染色體上 B780G18 clone 及第四號染色體上 B380B14 clone 序列重疊 (表三)。

四、以南方墨點法測試 RAPD-PCR 的序列專一性

把 D11 引子所增幅出來的 PCR 產物，經由電泳膠分析以後，轉漬到 H-bond 膜上面，以純化出來的 D11B 序列當作雜合探針與膜做雜合，結果發現其訊號位置與電泳膠上的 D11B 位置一致，並無其他雜訊之出現，且發現 RAPD-PCR 的產物及南方墨點法的結果呈現隨亞砷酸鈉處理劑量升高，其訊號皆呈現降低的趨勢 (圖五)。

五、利用南方墨點法測試酵素切割點 DNA 序列的改變

為了證實核酸序列有沒有因為加亞砷酸鈉處理而產生突變，造成序列上的改變，我們以 EcoRI、HaeIII 酵素去處理 genomic DNA 觀察到序列上的變化所造成切割點上的改變，進而利用 RAPD-PCR 所檢測到的序列當探針以南方墨點法與核酸限制酶切割過後的 genomic DNA 做雜合，結果顯示有無加亞砷酸鈉處理下之 EtBr 染色，及南方墨點法的結果都沒有顯著的差異 (圖六)。

六、*RBICCI* 基因之 mRNA 表現的改變

針對所比對出來的 *RBICCI* 基因，在 D11B 序列附近的 exon 做

引子設計，進行 RT-PCR 及北方墨點法分析，結果發現隨著不同劑量亞砷酸鈉處理，RT-PCR 在砷濃度為 160 μM 下產物量達到最高與控制組相比可達兩倍之多，*RBICCI* 在 RT-PCR 的結果隨著亞砷酸鈉處理劑量的增高，其 PCR 的產物有增加的趨勢 (圖七)，而在北方墨點法的分析上，發現在劑量 10 μM 的亞砷酸處理下 mRNA 的表現量就呈現明顯上升的情況，在 160 μM 的處理下 mRNA 的表現量為最多，約增加一倍之多 (圖八)，根據 RT-PCR 以及北方墨點法的結果，推測 *RBICCI* 的 mRNA 有隨著亞砷酸鈉的處理增加其表現。

第五章

實驗討論

一、砷造成 DNA 傷害之型態

最近的研究顯示在砷化物處理的細胞經過核酸修補酵素以及核酸蛋白交叉連結酵素處理之後，砷化物可以在合理的生理濃度下偵測到細胞的核酸受損 (Bau et al., 2002)。氧化性的核酸傷害以及核酸及蛋白質的交叉連結，可能為亞砷酸造成主要的核酸傷害，這和我們慧星分析的結果是一樣的。根據研究氧化性傷害主要是集中在 guanine 的核苷酸上，造成的主因則是 ROS 及 RNS 的產生 (Whiteman et al., 1999)，並且亞砷酸所誘發的氧化自由基似乎是屬於鈣離子依賴的途徑。除此之外，砷還會影響細胞內核酸修補酵素的作用，使得內在的核酸損害累積 (Wang et al., 1997)。

二、RAPD-PCR 在偵測核酸序列改變之探討

RAPD-PCR 是一種類似 DNA 指紋技術，主要是計算電泳膠上的產物條帶的數量及性質變化 (Malkhosyan et al., 1998)，由整個基因體尋找其變化性，並且可藉由此方法，找出可能的核酸序列修飾的分子標籤。造成產物條帶數量的變化是由新生或消失引子的接合位點而產生的，數量的變化推測有可能是因模版產生部分與引子形成

mismatch，進而造成產物彼此競爭的結果 (Harris, 1999)。利用 RAPD-PCR 去增幅未知的基因體核酸序列，主要的優點是可以快速篩選出產生基因體改變的序列，這個方法適用在任何生物體上面，它在偵測核酸損害，以及 DNA 突變包括點突變、重組序列上，是常用且有效的方法。

因基因體修飾而影響 RAPD-PCR 的結果主要是透過以下的途徑 (1)改變引子 annealing 的位置，(2)改變引子接合到模版 DNA 的能力，(3)改變相對增幅片段的總數 (Welsh et al., 1995)。假如改變後的位點剛好落在模版與引子的接合位點，可能會造成條帶的新增加或消失 (lose/gain of band)，如果改變後是位在模版與引子的接合位點之間，像 deletion 或 insertion 可能會造成 shift of band，但是如果是引子接合位點間單一核苷酸的改變，則無辦法被這個方法所偵測到 (Maeda et al., 1999)。雖然 RAPD-PCR 有許多的優點，但重現性稍差，許多學者指出，使用不同的 PCR 機器以及不同的 DNA 聚合酶皆會產生不一樣的 PCR 產物結果 (Schierwater et al., 1993)。影響 RAPD-PCR 結果的變因包括 (1)使用酵素的種類、不同活性的定義、所使用緩衝液的 pH 值，(2)使用 DNA 模版的品質，不同的抽取方法、不同時間點的萃取，(3)annealing 和 extension 溫度的上升梯度，皆會影響其結果的再現性 (Papadopoulos et al., 2002)。我們的實驗中，也發現有再現

性不足的情況，我們第一次用 90 條引子篩選出有變化的 37 條引子，再由 37 條引子當中選出 10 條有可能性的引子去做第二次篩選的動作，結果發現只有其中兩條引子可以高頻率檢測出亞砷酸鈉處理所造成染色體組之差異（表一），這兩條引子重複 4 次實驗後發現每次皆可以檢測出處理亞砷酸鈉的差異，不過每次所呈現變化的 pattern 並不完全相同，但每次主要增幅出來的片段是相似的，於是我們認為，這兩條引子可能有選擇性的檢測出亞砷酸鈉對人類淋巴母細胞產生的核酸損害。

根據 Wolf 等人 (2004) 的討論指出 RAPD-PCR 已經普遍被使用在區別環境毒物的分子標籤上。各種的毒性物質包括 benzo{a} pyrene (Atienzar et al., 1999)、mitomycin-C (Becerril et al., 1999)、copper (Atienzar et al., 2001) 及 UV radiation (Atienzar et al., 2000)，所誘發的核酸損害或是結構重組都已經被 RAPD-PCR 研究測試過，有另一派學者則是利用 RAPD-PCR 來比較正常細胞與癌症細胞基因體之間的差異，藉此篩選出有鑑別癌細胞與正常細胞的引子（附表二），雖然 RAPD-PCR 不能提供直接的訊息得知經過修飾而改變的位點的重要性，但是分析這些改變的位點提供可能性的證據，得知他們可能參與癌症的生成 (Singh et al., 2004)。癌症細胞的突變屬於長期核酸序列的改變所累積造成，比偵測基因毒性物質處理更容易顯示染色體組的

變化，因此我們初步認為亞砷酸鈉短時間處理淋巴母細胞所造成的核酸損害，在 RAPD-PCR 引子的篩出率可能比鑑別癌細胞與正常細胞間差別來得小，本研究 RAPD-PCR 對亞砷酸鈉造成染色體組修飾改變之篩出率約 $\leq 2.2\%$ 。

三、所比對 RAPD-PCR 序列之探討

在 Singh 等人 (2004) 的文獻討論到，發現有差異的條帶序列所比對到之基因跟化學毒物所誘發之突變有密切的關係。比對其中幾段因亞砷酸鈉處理造成 RAPD-PCR 有差異的條帶序列後，發現 D11B 這段序列位於人類第八號染色體上 *RB1CC1* (RB1-inducible coiled-coil 1) 基因的第 20 個 intron，F1A 序列則在人類 *PACE4* (paired basic amino acid cleaving system 4) 基因的第 12 個 intron 上。*RB1CC1* 是抑癌基因 *RB1* 之重要的調節因子，當細胞中的 *RB1CC1* 大量表現時，*RB1* 之表現量也會同步增加 (Chano et al., 2002)，*RB1* 又和細胞週期調控相關，*RB1CC1* 位於核內，因具有 leucine zipper motif 和 coiled-coil 結構，被推測是 *RB1* 的轉錄因子 (Chano et al., 2002)，在 Chano 等人 (2002) 的報告中指出，許多乳癌病人組織中發現 *RB1CC1* 基因的突變，有大片段的缺失發生在 *RB1CC1* 的蛋白質，推測 *RB1CC1* 基因的突變與乳癌的形成相關。*RB1CC1* 之 RT-PCR 及北方墨點法結

果可以顯示出，經過亞砷酸鈉處理過後的人類淋巴母細胞，可以誘發 RB1CC1 之 mRNA 的表現，相反的在 RAPD-PCR 之結果中卻發現此段序列之複製數量上卻比未加亞砷酸鈉處理之細胞為少，不過這段序列是位於基因的 intron 上無法解釋它和 mRNA 之表現程度有必然直接之關係，目前並沒有相關的文獻探討，所以對於所以這其中之關係，仍未解答清楚。

我們發現 F1A 這段序列位於人類第 15 號染色體上之 *PACE4* (paired basic amino acid cleaving system 4) 基因的第 12 個 intron 上，它是一種類似枯草菌素酵素 (subtilisin-like) 之內分泌蛋白酶 (Mains et al., 1997)，屬於前蛋白轉換酶 (proprotein convertase) 家族，目前在人類總共發現有 7 種不同前蛋白轉換酶包括 furin、PC1/3、PC2、PACE4、PC4、PC6 和 PC8/LPC/PC7，它藉著轉化前蛋白質使其生成具生物活性的分子來調節神經內分泌細胞分泌途徑，並作為前荷爾蒙轉化酶 (Steiner, 1998)，在許多反轉錄病毒中 PACE4 對於修飾病毒套膜 (envelope) 上之糖蛋白質，也扮演很重要的角色，包括 HIV 套膜之糖蛋白質 (Inocencio et al., 1997)。它可藉著修飾多種蛋白質，包括胞外基質分解酵素來影響腫瘤的活動，Cheng 等人(1997)的文章中提到人類前蛋白轉化酶基因在乳癌組織中可以被偵測到其高量表現，而在正常乳腺組織中則無法被偵測到，許多的證據指出過度表現 *PACE4* 基

因與肺癌、乳癌、皮膚癌的形成有關 (Fu et al., 2003)。實驗中，我們也針對 *PACE4* 基因的 cDNA 之序列做成引子測試經過亞砷酸鈉處理淋巴母細胞後之 *PACE4* mRNA 之表現，也同時針對其蛋白質表現進行研究，進行西方墨點法染上以 *PACE4* 多株抗體，結果未偵測出 *PACE4* 的表現，推測 *PACE4* 基因在淋巴母細胞的表現可能非常少量而無法被偵測到。

四、南方墨點法在研究 RAPD-PCR 序列之探討

Kethidi 的研究中(2003)在篩選出 RAPD-PCR 產物作為分子標籤以後，他將篩選出來的序列以南方墨點法分析此序列在 RAPD-PCR 電泳中的專一性，發現此序列也專一性的出現在與電泳膠上相同的位置 (Kethidi et al., 2003)。在我們的結果中以序列 D11B 當探針，也在相同的位置出現專一的訊號，並且無其他雜訊，表示 D11B 這段序列的專一性非常高。在其他文獻中也有探討到不同的結果，以 A 序列當探針卻同時雜合到 A 及 B 序列 (Xamena et al., 1999)，這顯示 RAPD-PCR 所篩選出來之分子標籤還是有其專一性不足的問題。

總結我們所得到之結果，在彗星分析法中證實亞砷酸鈉所誘發之核酸損害確實有明顯之效應，並且在高濃度處理下所誘發之核酸損害之氧化性傷害以及核酸與蛋白交叉連結，傷害比例有明顯增加的情

形。在 RAPD-PCR 之結果中證實可以偵測出亞砷酸鈉所誘發淋巴母細胞所造成基因體修飾改變，D11 及 F1 兩個隨機引子能偵測出亞砷酸鈉所誘發之核酸損害。其中在分析得到之序列結果之後，發現位置分佈在 *RBICCI* 基因上以及 *PACE4* 基因之 intron 上，可能是 intron 上所造成之修飾率較高之結果，另有未知兩段序列有可能在未知基因上。*RBICCI* 基因在我們的結果中得知亞砷酸鈉處理可以誘發其 mRNA 之表現，前人對於砷與 *RBICCI* 基因及 *PACE4* 基因之間並無相關研究，在未來研究發展可以朝此方向探討。

第陸章

參考文獻

- Abernathy, C. O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian H. V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., and Waalkes, M. (1999). Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ. Health Perspect.* *107*, 593-597.
- Atienzar, F. A., Cheung, V. V., Jha, A. N., and Depledge, M. H. (2001). Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* *59*, 241-250.
- Atienzar, F. A., Comradi, M., Evenden, A. J., Jha, M. H., and Depledge, M. H. (1999). Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo{ α }pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* *18*, 2275-2282.
- Atienzar, F. A., Cordi, B., Donkin, M. E., Evenden, A. J., Jha, A. N., and Depledge, M. H. (2000). Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmate*. *Aquat. Toxicol.* *50*, 1-12.
- Becerril, C., Ferrero, M., Sanz, F., and Castano, A. (1999). Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagenesis* *14*, 449-456.
- Carter, D. E., Aposhian, H. V., and Gandolfi A. J. (2003). The metabolism

- of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: a toxico-chemical review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *193*, 309-334.
- Chano, T., Ikegawa, S., Kontani, K., Okabe, H., Baldini, N., and Saeki, Y. (2002). Identification of RB1CC1, a novel human gene that can induce RB1 in various human cells. *Oncogene* *21*, 1295-1298.
- Chano, T., Kontani, K., Teramoto, K., Okabe, H., and Ikegawa, S. (2002). Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancers. *Nat. Genet.* *31*, 285-288.
- Cheng, M., Watson, P. H., Paterson, J. A., Seidah, N., Chretien, M., and Shiu, R. P. C. (1997). Pro-Protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int. J. Cancer* *71*, 966-971.
- Fu, Y., Campbell, E. J., Shepherd, T. G., and Nachtigal M. W. (2003). Epigenetic regulation of prprotein convertase PACE4 gene expression in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res.* *1*, 569-576.
- Gurr, J. R., Liu, F., Lynn, S., Jan, K. Y. (1998). Calcium-dependent nitric oxide production is involved in arsenite-induced micronuclei. *Mutat. Res.* *416*, 137-148.
- Hartwig, A., Blessing, H., amd Walter, S. I. (2003). Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology* *193*, 161-169.
- Harris, S. A. (1999). RAPDs in systematics— a useful methodology? *Molecular systematics and plant evolution* *57*, 211-228.
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* *133*, 1-16.

- Inocencio, N. M., Sucic, J. F., Moehring, J M., Spence, M. J., Moehring T. J. (1997). Endoprotease activities other than furin and PACE4 with a role in Processing of HIV-1 gp160 glycoproteins in CHO-K1 cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 1344-1348.
- Kethidi, D. R., Roden, D. B., Ladd, T. R., Krell, P. J., Retnakaran, A., and Feng Q. (2003). Development of SCAR markers for the DNA-Based Detection of the Asian Long-Horned Beetle, *Anoplophora gkabripennis* (Motschulsky). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *52*, 193-204.
- Lagunas, R. (1980). Sugar-arsenate esters: thermodynamics and biochemical behavior. *Arch. Biochem. Biophys.* *205*, 67-75.
- Lynn, S., Shiung, J. N., Gurr J. R., and Jan, K. Y. (1998). Arsenite stimulates poly(ADP)-ribosylation by generation of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* *24*, 442-449.
- Maeda, T., Jikko, A., Hiranuma, H., and Fuchihata, H. (1999). Analysis of genomic instability in squamous cekk carcinoma of the head and neck using the random amplified polymorphic DNA method. *Cancer Lett.* *138*, 183-188.
- Mains R. E., Berard, C. A., Denault, J. B., Zhou, A., Johnson, R. C., and Leduc, R. (1997). PACE4 : a subtilisin-like endoprotease with unique properties. *Biochem. J.* *321*, 587-593.
- Malkhosyan, S., Yassuda, Soto, J. L., Sekiya, T., Yokota, J., and Perucho, M. (1998). Molecular karyotype (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unbiased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 10170-10175.
- Mandal, B. K., and Suzuki, K. T. (2002). Arsenic round the world: a

- review. *Talanta* 58, 201-235.
- Miller, W. H., Schipper, H. M., Lee J. S., and Waxman, S. (2002). Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide. *Cancer Res.* 62, 3893-3903.
- Ong, T. M., Song, B., Qian, H. W., Wu, Z. L., and Whong, W. Z. (1998). Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis* 19, 233-235.
- Papadopoulos, S., Benter, T., Anastassiou, G., Pape, M., Gerhard, S., Bornfeld, N., Ludwig, W. D., and Dorken, B. (2002). Assessment of genomic instability in breast cancer and uveal melanoma by random amplified polymorphic DNA analysis. *Int. J. Cancer* 99, 193-200.
- Schierwater, B., and Ender, A. (1993). Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Res.* 21, 4647-4648.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Singh, K. P., and Roy, D. (2001). Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene* 296, 33-43.
- Singh, K. P., and Roy, D. (2004). Somatic mutations in stilbene estrogen-induced Syrian hamster kidney tumors identified by DNA fingerprinting. *J. Carcinog.* 3, 4.
- Steiner, D. F. (1998). The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 31-39.
- Wang, T. C., Huang, J. S., Yang, V. C., Lan, H. J., Lin, C. J., and Jan, K. Y.

- (1994). Delay of the excision of UV light-induced DNA adducts is involved in the coclastogenicity of UV light plus arsenite. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 367-372.
- Wang, T. S., Shu, Y. F., Liu, Y. C., Jan, K. Y., and Huang, H. (1997). Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology* 121, 229-237.
- Wang, T. S., Hsu, T. Y., Chung, C. H., Wang, A. S. S., Bau, D.T., and Jan, K.Y. (2002). Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 321-330.
- Welsh, J., Rampino, N., McClelland, and Perucho, M. (1995). Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. *Mutat. Res.* 338, 215-229.
- Whiteman, M., Spencer, J. P., Jenner, A., and Halliwell, B. (1999). Hypochlorous acid-induced DNA base modification: potentiation by nitrite: biomarkers of DNA damage by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 572-576.
- Williams, J. G. K., Kubel Livak, K. J., Rafalskiik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Wolf, De. Hans., Blust, Ronny., and Backeljau, Thierry. (2004). The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat. Res.* 566, 249-262.
- Xamena, A. L., Cabre, O., Creus, A., Marcos, R., and Velazquez, A. (1999). Analysis of genomic damage in the mutagen-sensitive *mus-201* mutant of *Drosophila melanogaster* by arbitrarily primed PCR

(AP-PCR) fingerprinting. *Mutat. Res.* 435, 63-75.

Zhang, P., Wang, S. Y., and Hu, X. H. (1996). Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin. J. Hematol.* 17, 58-62.

附表一、砷在醫療用途上的歷史

Year	Key events
400 BCE	Hippocrates used realgar (As_2S_2) and orpiment (As_2S_3) as remedies for ulcers
50 AD	Dioscorides used orpiment as a depilatory
14 th century	Angelus Salva used arsenic against the plague
16 th century	Jean de Gorris used arsenic as a sudorific
17 th century	Lentilius and Friccius used arsenic as a treatment for malaria
18 th century	Arsenic preparations were used therapeutically: Aiken's Tonic Pills, Andrew's Tonic, Arsenauro, Gross' Neuralgia Pills, Cholor-Phosphide of Arsenic, Sulphur Compound Lozenges These were still in circulation at the end of the 19th century
19 th century	Arsenic was a mainstay of the materia medica Fowler's Solution (potassium arsenite) was praised for its success in treating asthma, chorea, eczema, Hodgkin's disease, pemphigus, pernicious anemia, and psoriasis
20 th century	Ehrlich discovered an organic arsenical (salvarsan) that cured syphilis and was used to treat trypanosomiasis Used in traditional Chinese medicine for hundreds of years arsenic derivatives are still used to devitalize the pulp of diseased teeth and in regimens for psoriasis, rheumatic diseases, and syphilis

(Miller et al., 2002)

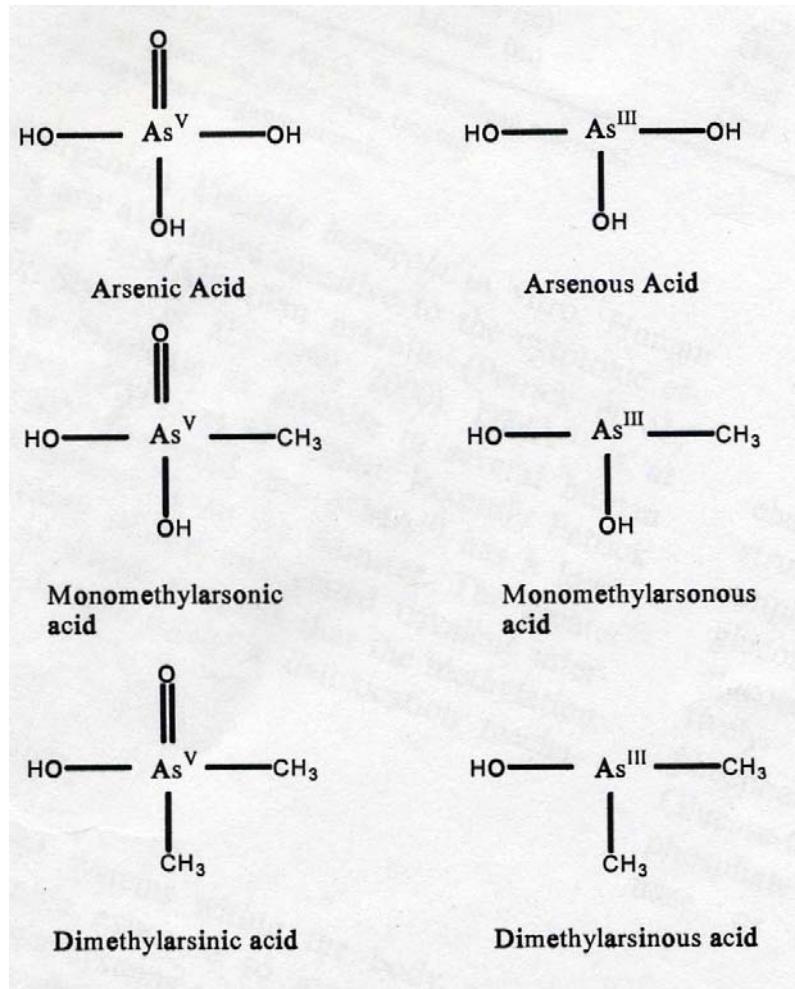
附表二、RAPD-PCR 在偵測基因體變化上之應用

偵測化學毒物對核酸之受損 參考文獻

Benzo {a} pyrene	Atienzar et al., 2002
Copper	Atienzar et al., 2001
Ultraviolet	Atienzar et al., 2000
Azoxymethane	Luceri et al., 2000
Mitomycin C	Becerril et al., 1999
2-acetylaminofluorene	Xamena et al., 1999

偵測癌細胞之基因體變化 參考文獻

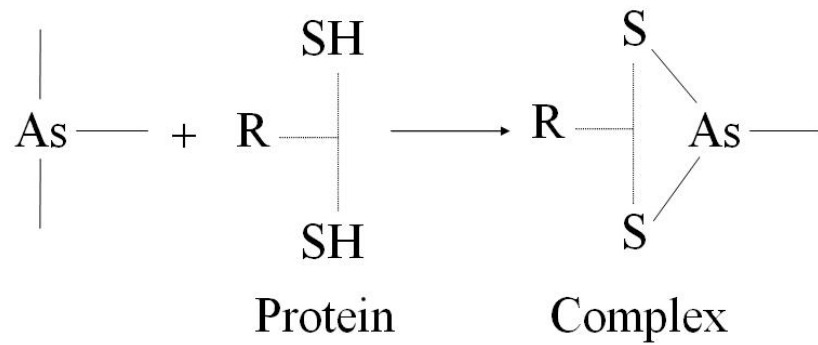
Kidney tumors	Singh et al., 2004
Breast cancer	Papadopoulos et al., 2002
Uveal cancer	Papadopoulos et al., 2002
Breast tumors	Singh et al., 2001
Squamous cell carcinoma	Maeda et al., 1999
Colorectal cancer	Malkhosyan et al, 1998
Lung cancer	Ong et al, 1998
Brain tumors	Sil-Afroze et al., 1998



(Hughes, 2002)

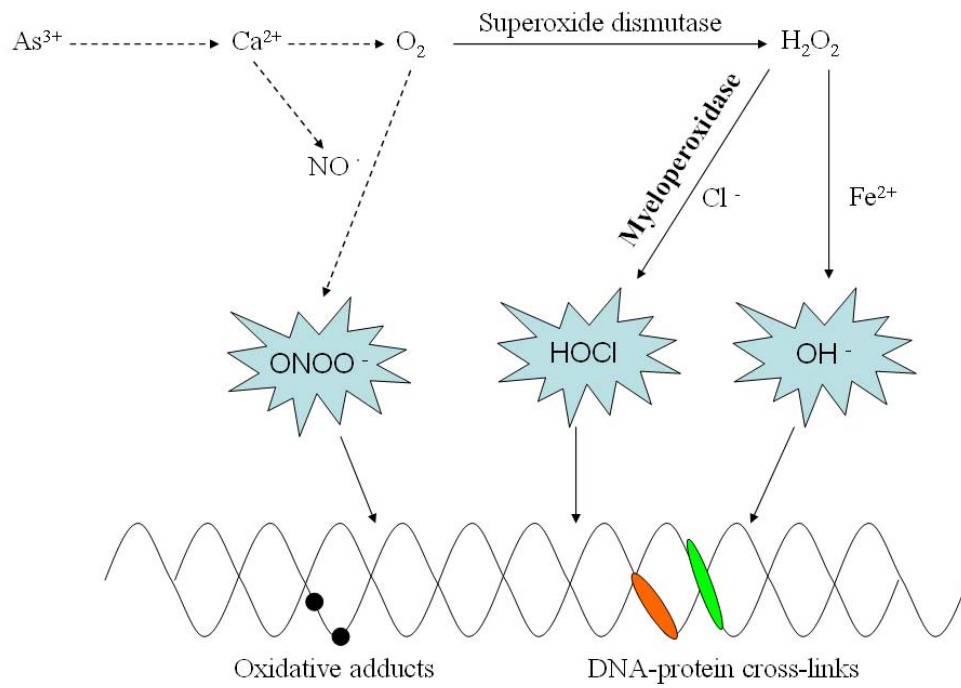
附圖一、有機砷化合物分子式

Arsenic blocks dithiol group



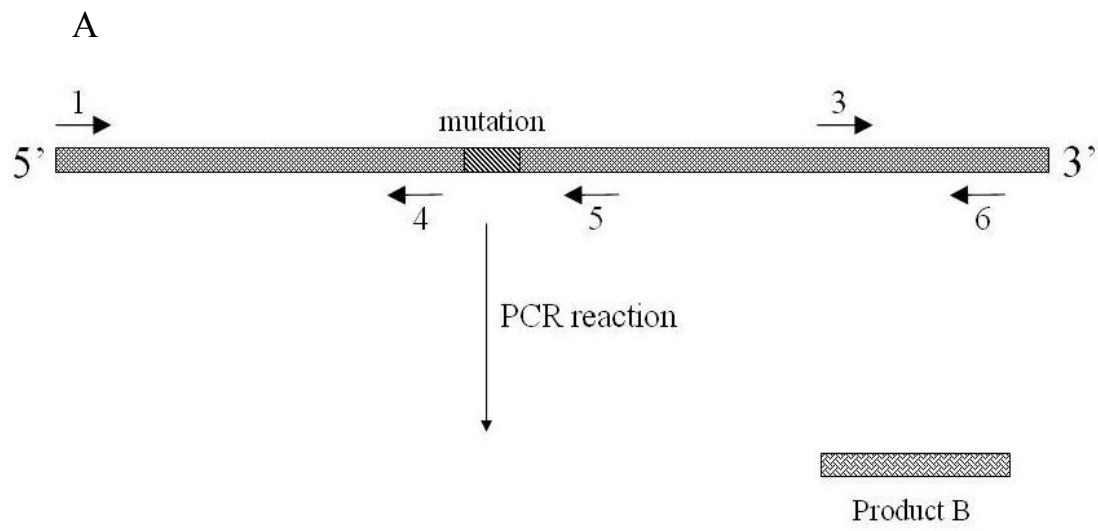
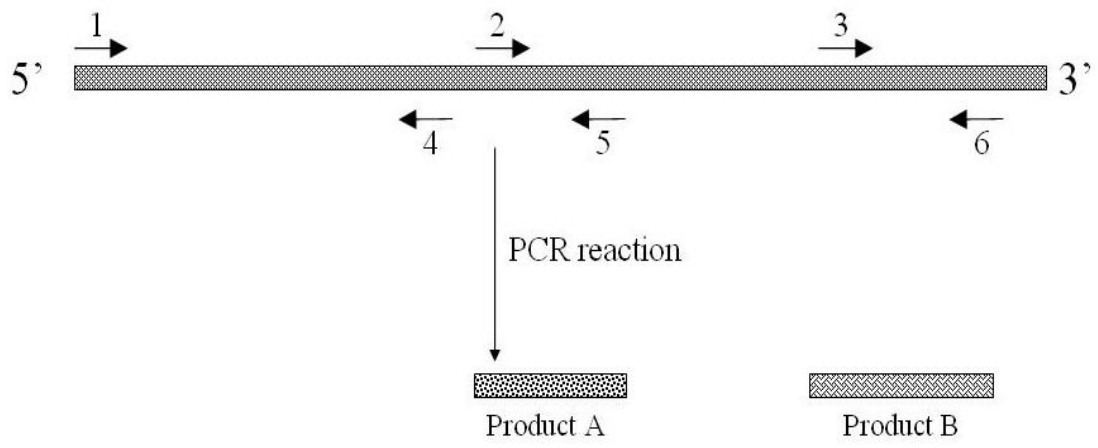
(Badal et al., 2002)

附圖二、砷與蛋白質硫醇基 (-SH)作用機制



(Bau et al., 2002)

附圖三、砷誘發自由基釋放造成核酸損害可能機制



B

附圖四、RAPD-PCR 偵測核酸損害之原理

表一、RAPD-PCR所使用的引子

Primer	Sequence(5'→3')	Product Number	Differences
A1	CAGGCCCTTC	Smear	
A2	TGCCGAGCTG	-	-
A3	AGTCAGCCAC	6	-
A4	AATCGGGCTG	14	-
A5	AGGGGTCTTG	10	-
A6	GGTCCCTGAC	11	-
A7	GAACGGGTG	10	-
A8	GTGACGTAGG	7	-
A9	GGGTAACGCC	11	-
A10	GTGATCGCAG	14	-
A11	CAATCGCCGT	6	-
A12	TCGGCGATAG	9	-
B1	CAGCACCCAC	Smear	
B2	TCTGTGCTGG	9	-
B3	TTCCGAACCC	8	-
B4	AGCCAGCGAA	9	-
B5	GACCGCTTGT	10	-
B6	AGGTGACCGT	10	-
B7	CAAACGTCCG	7	-
B8	GTTGCGATCC	7	-
B9	GTTTCGCTCC	9	-
B10	TGATCCCTGG	12	-
B11	CATCCCCCTG	8	-
B12	GGACTGGAGT	12	-
C1	TGGGCCCTTC	15	-
C2	TGCTCTGCC	Smear	
C3	GGTGACGCAG	9	-
C4	GTCCACACGG	7	-
C5	TGGGGGACTC	15	-
C6	CTGCTGGGAC	11	-
C7	GTAGACCCCT	12	-
C8	CCTTGACGCA	9	-
C9	TTCCCCGCT	9	-
C10	TCCGCTCTGG	8	-
C11	GGA GGGTGT	11	-
C12	TTTGCCCGGA	8	-
D1	AGGGAACGAG	7	-
D2	CCACAGCAGT	6	-
D3	ACCCCGAAG	4	-
D4	GGACCCTTAC	8	-
D5	TTCGAGCCAG	4	-
D6	GTGAGGCGTC	5	-
D7	GGGGTCTTT	9	-
D8	CCGCATCTAC	7	-
D9	GATGACCGCC	11	-
D10	GAACGGACTC	10	-
D11	GTCCGACGA	8	+
D12	TGGACCGGTG	6	-

表一(續)、RAPD-PCR所使用的引子

Primer	Sequence(5'→3')	Product Number	Differences
E1	CTCACCGTCC	7	-
E2	TGTCTGGGTG	7	-
E3	AAAGCTGCGG	9	-
E4	TGTCATCCCC	9	-
E5	AAGCCTCGTC	11	-
E6	TGCGTGCTTG	11	-
E7	GACGGATCAG	8	-
E8	CACACTCCAG	11	-
E9	TTCCCCCAG	8	-
E10	TGAGTGGGTG	9	-
E11	GTTGCCAGCC	Smear	-
E12	ACTTCGCCAC	8	-
F1	ACCGCGAAGG	10	+
F2	GGACCCAACC	5	-
F3	GTCGCCGTCA	6	-
F4	TCTGGTGAGG	8	-
F5	TGAGCGGACA	5	-
F6	ACCTGAACGG	9	-
F7	TTGGCACGGG	11	-
F8	GTGTGCCCCA	7	-
F9	CTCTGGAGAC	16	-
F10	GGTCTACACC	16	-
F11	AGCGCCATTG	12	-
F12	CACCGTATCC	6	-
G1	GGGGTGACGA	12	-
G2	CTTCCCAAG	14	-
G3	CATCCGTGCT	16	-
G4	AGGGCGTAAG	18	-
G5	TTCCACCGG	9	-
G6	GAGAGCCAAC	7	-
G7	CTGGGGACTT	12	-
G8	ACCCGGTCAC	10	-
G9	CCCAAGTCC	10	-
G10	GGTGCGGGAA	12	-
G11	CCAGATGCAC	11	-
G12	GTGACATGCC	12	-
H1	TCAGGGAAGT	11	-
H2	AAGACCCCTC	10	-
H3	AGATGCAGCC	9	-
H4	TCACCACGGT	13	-
H5	CTTCACCCGA	10	-
H6	CACCAGGTGA	11	-

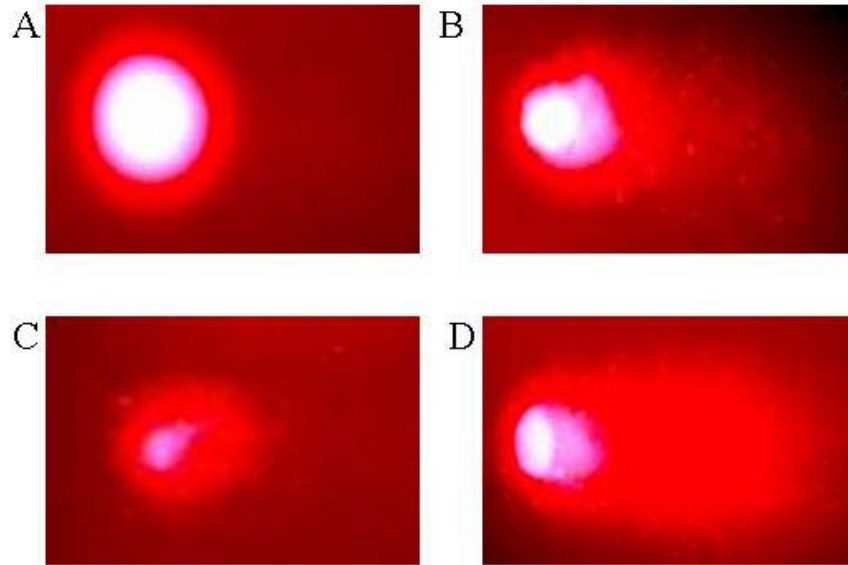
表二、亞砷酸鈉處理人類淋巴母細胞之RAPD-PCR產物條帶圖譜比較

	Primer	D11		F1	
	As ³⁺ (μ M)	10 ^a	80	10	80
Appearance of bands		0	0	0	0
Disappearance of bands		0	1	1	1
Decrease in band intensities		2	1	11	9
Increase in band intensities		7	3	0	0
Total bands		9	9	12	11

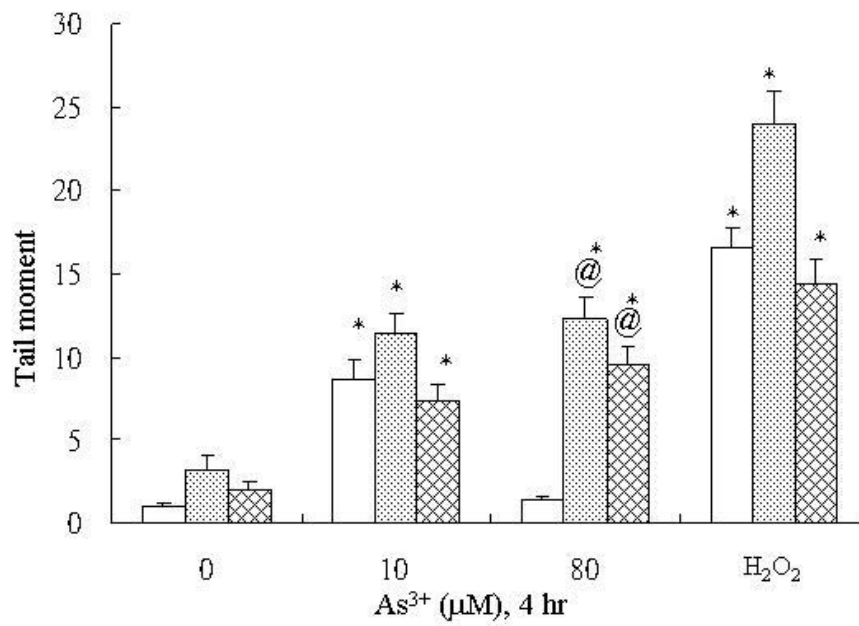
^a 不同濃度的亞砷酸鈉處理與沒有處理之間的比較

表三、DNA序列比對之結果

Clone	NCBI definition	Location.	Gene
D11A	Clone RP11-162A23	Chr. 10	Unknown
D11B	Clone RP11-1152K2	Chr. 8	RB1CC1 intron 20
F1A	Clone RP11-299G20	Chr. 15	PACE4 intron 12
F1B	Clone B780G18	Chr. 21	Unknown
	Clone B380B14	Chr. 4	Unknown

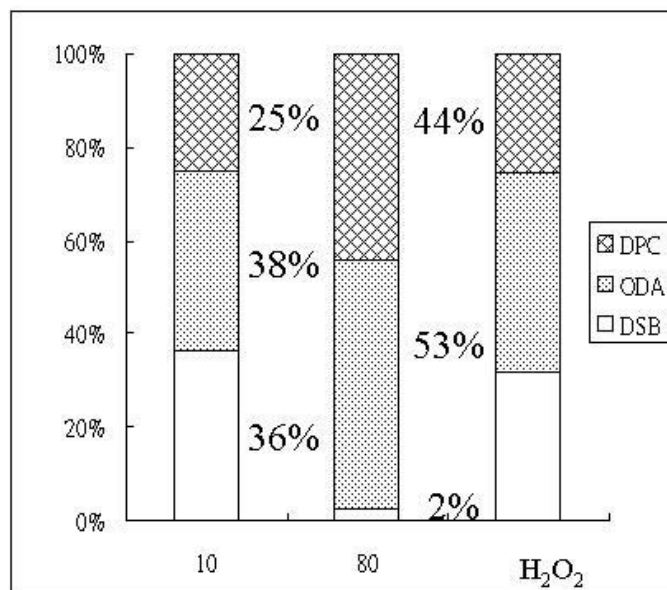


圖一、人類淋巴母細胞羣星分析之典型影像。圖(A)無亞砷酸鈉處理之對照組。圖(B)加亞砷酸 $10\ \mu\text{M}$ 處理4小時。圖(C)加亞砷酸 $80\ \mu\text{M}$ 處理4小時。圖(D)加雙氧水 $10\ \mu\text{M}$ 處理5分鐘。



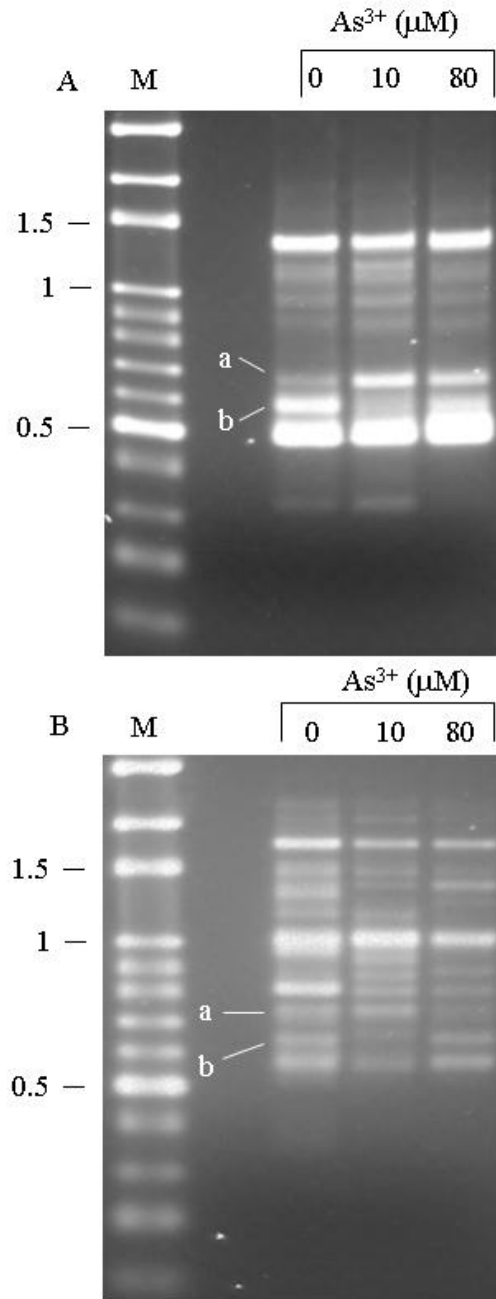
圖二、亞砷酸鈉造成人類淋巴母細胞之DNA傷害圖譜。Tail moment越高，所偵測到之核酸受損越嚴重。結果是由兩次獨立實驗所測得，每次每個實驗組取60個樣本之數值。*P < 0.001與組內不同濃度處理比較。@P < 0.001與不同酵素處理比較。

□ : Untreated enzyme ▨ : FPG ▩ : Proteinase K

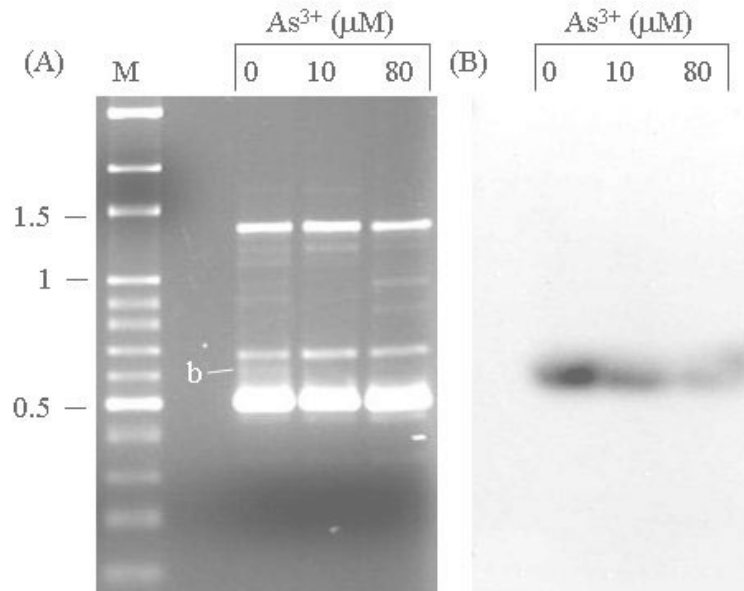


As³⁺ (μM), 4 hr

圖三、亞砷酸鈉造成人類淋巴母細胞之不同型態DNA傷害分布圖。
 濃度10 μM處理組DSB、ODA、DPC傷害分布大致差不多，
 在濃度為80 μM處理下ODA、DPC的傷害分部有明顯增加。

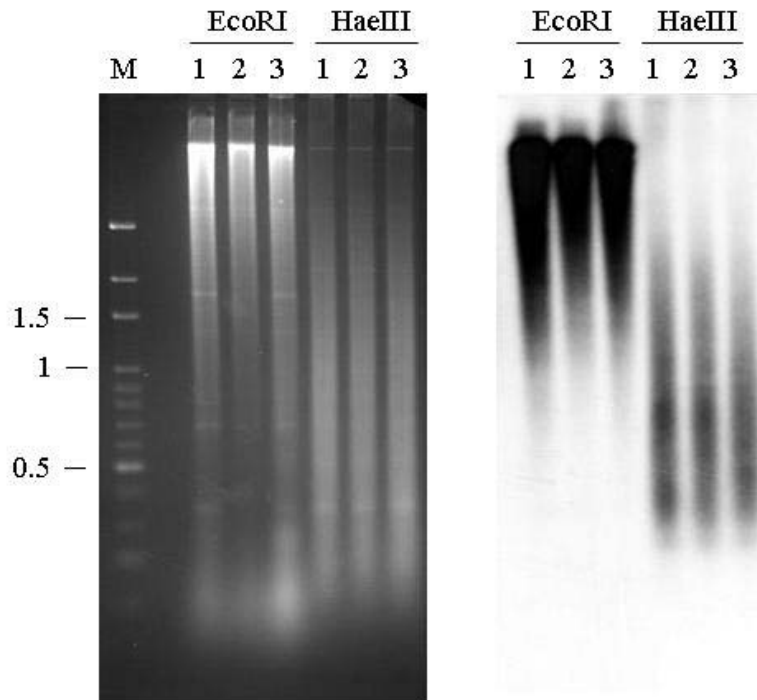


圖四、亞砷酸鈉處理對產物條帶圖譜之影響。
圖(A)使用D11引子，圖(B)使用F1引子
進行RAPD-PCR分析

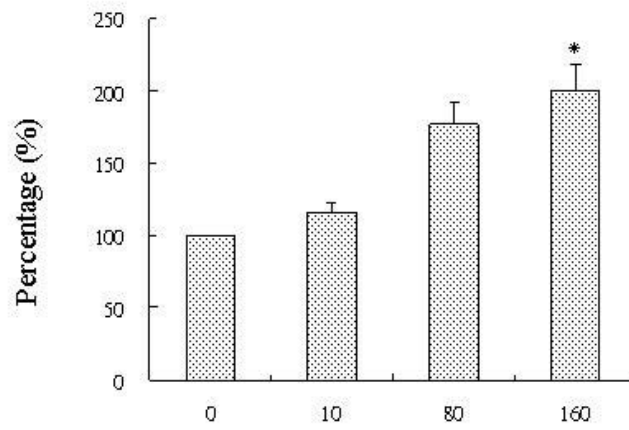
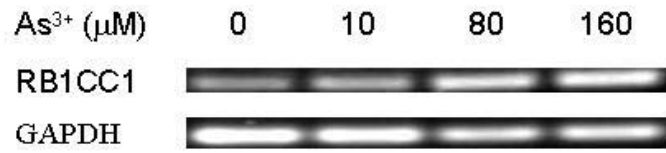


圖五、RAPD-PCR序列專一性之測試。以D11引子所產生的b序列為探針，做南方墨點法之分析，發現此序列專一出現在其位置，並且與電泳膠上b序列的變化一致。

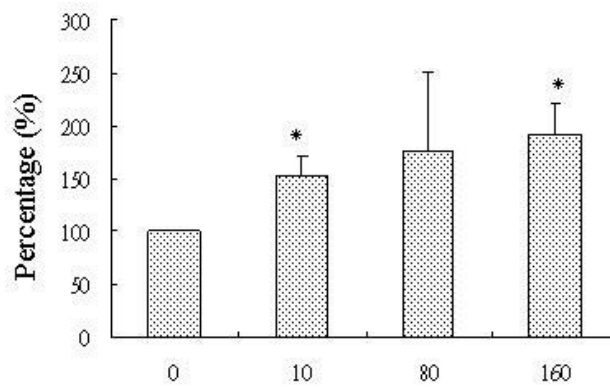
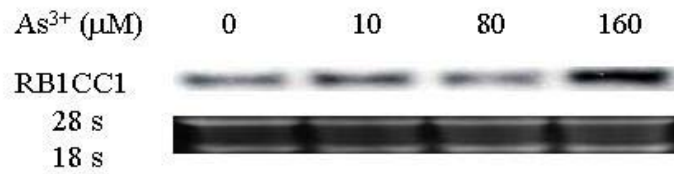




圖六、分析RFLP之切點變化之圖譜。將砷處理0、10、80 μM 劑量之淋巴母細胞Genomic DNA分別以EcoRI、HaeIII酵素做切割，電泳後以D11引子所產生的b序列為探針發現對照組及處理組間並無明顯的差異。
(Lane 1 : 0 μM As³⁺, Lane 2 : 10 μM As³⁺, Lane 3 : 80 μM As³⁺)



圖七、亞砷酸鈉處理之mRNA表現。處理不同濃度的亞砷酸鈉24小時後，以RT-PCR測得RB1CC1之mRNA表現。結果顯示mRNA的表現有因為處理亞砷酸鈉而增加。
*P < 0.05與不同濃度處理比較，n = 3。



圖八、亞砷酸鈉處理之mRNA表現。處理不同濃度的亞砷酸鈉24小時後，以北方墨點法測得RB1CC1之mRNA表現的結果。顯示其mRNA的表現有因為處理砷而增加。
*P < 0.05與不同濃度處理比較，n = 3。

附錄一：藥品配置

Cell culture

RPMI 1640 full medium

RPMI Medium 1640	500 mL
Fetal Bovine Serum	50 mL
L-Glutamine-200 mM	5 mL
PSN Antibiotic Mixture	5 mL

10 X Phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl	80.0 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ HPO ₄	2.4 g

Adjust the final volume to 1 liter with d₂H₂O

Comet assay

Stock lysis buffer

NaCl	146.1 g
EDTA-Na ₂	37.2 g
NaOH	8.5 g
Lauryl sarcosinate	10 g

Add d₂H₂O stir to dissolve

Adjust pH value to 10

Adjust the final volume to 890 mL with d₂H₂O

Working lysis buffer

Stock lysis buffer	133.5 mL
DMSO	15.0 mL
Triton X-100	1.5 mL

Electrophoresis buffer (pH 13)

NaOH	18 g
EDTA-Na ₂	0.8 g

Adjust the final volume to 2 L with d₂H₂O

Neutralisation buffer

Tris base	96.8 g
-----------	--------

Adjust the pH to 7.5 and add d₂H₂O to 2 L

Northern Blot

20 X SSC buffer

NaCl	175.32 g
Sodium citrate	191.16 g

Adjust the final volume to 1 L with d₂H₂O

10 X MOPS buffer : pH 7.0

MOPS	41.8 g
Sodium acetate	4.1 g
EDTA	3.72 g

Adjust the pH to 7.0 and add d₂H₂O to 1 L

※0.045 μm 膜過濾，4°C 保存

20 X SSPE

NaCl	175.32 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27.6 g
EDTA-Na ₂	7.4 g
Adjust the final volume to 1 L with d ₂ H ₂ O	

50 X Denhardt's

Ficoll (Type 400. Pharmacia)	5 g
Polybvinylpyrrolidone	5 g
Bovine serum albumin (BSA)	5 g
Adjust the final volume to 500 mL with d ₂ H ₂ O	

ssDNA

Salmon sperm DNA	10 mg
------------------	-------

Add d₂H₂O to 1 mL, mix sperm DNA in water and autoclave.

Prehybridization solution : (blocking)

Working	Stock	10 mL	20 mL
5 X SSPE	20 X SSPE	2.5 mL	5 mL
10 X denhardt's	50 X denhardt's	2 mL	4 mL
100 µg/ml ssDNA	10 mg/ml ssDNA	100 µl	200 µl
50% formamide	100% formamide	5 mL	10 mL
2% SDS	20% SDS	1 mL	2 mL

TE buffer : pH7.4

Tris-HCl	48.44 g
EDTA-Na ₂	37.22 g

Adjust the pH to 7.4 and add d₂H₂O to 1 L

Solution I

20 X SSC 200 mL

20 % SDS 5 mL

Adjust the final volume to 2 L with d₂H₂O

Solution II

20 X SSC 5 mL

20 % SDS 5 mL

Adjust the final volume to 1 L with d₂H₂O

Southern blot

Solution I

HCl, 12 N 5.2 mL

Add d₂H₂O to 250 mL, final conc. 0.25 N

Solution II

NaCl 29.2 g

NaOH 10 g

Adjust the final volume to 500 mL with d₂H₂O

Solution III

NaCl 87.6 g

Tris base 30.3 g

d₂H₂O 400 mL

HCl, 12 N 21.25 mL

Adjust the final volume to 500 mL with d₂H₂O

Western Blot

0.5 M Tris-HCl (pH 6.7)

Tris base 60.55 g

d₂H₂O 800 mL

adjust pH value to 6.7, add d₂H₂O to 1 L

1.5 M Tris-HCl (pH 8.9)

Tris base 181.65 g

d₂H₂O 800 mL

adjust pH value to 8.9, add d₂H₂O to 1 L

SDS-PAGE

10 % Separating Gel	2 gels	4 % Stacking Gel	
Acrylamide / Bis 37.5 : 1	5 ml		1 ml
Tris 1.5 M pH 8.9	5 ml	Tris 0.5 M pH 6.7	1.25 ml
d ₂ H ₂ O	9.6 ml		7.54 ml
10 % SDS	200 μl		100 μl
10 % APS	200 μl		100 μl
TEMED	20 μl		10 μl
Total	20 ml		10 μl

5 X Tris-glycine

Trise base 15.1 g

Glycine 94 g

d₂H₂O 800 mL

20% SDS 25 mL

Adjust the final volume to 1 L with d₂H₂O

PBST 0.05 %

Tween 20 200 μL

1 X PBS 400 mL

5 X Transfer buffer

Trise base 15.1 g

Glycine 94 g

Add d₂H₂O to 1 L

※使用前稀釋 5 倍並添加 10% methanol 使用

附錄二：與 NCBI 資料庫比對之結果

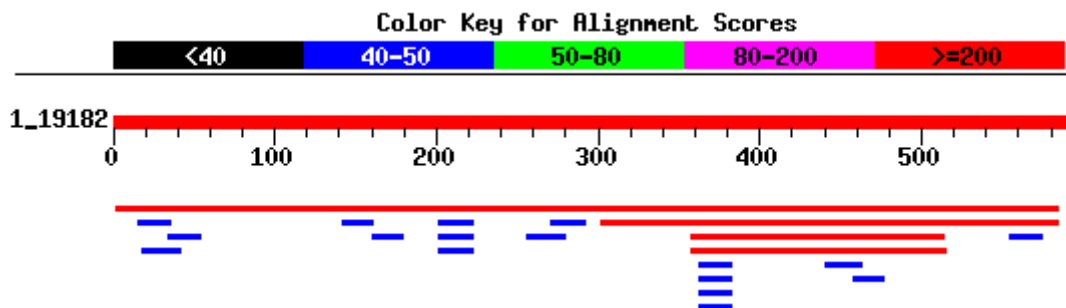
D11A

```

1  GTCCCGACGA GATTTGGTGG GGGAGGGTCT GACGCCCCAG GACCGAAAAA CAAAATCTAC
61  CTCTCAAGTG GGGACCCAC ACGATCACGT CTGCCAATGC AGGGCGGCCT TGAATTAGGC
121 GAGGCTCAAT CTAACGAAAA AGAAAGCGGT GGGGAGGTGA AGGGATCCCA AAAAGCCCTC
181 GTGTGCGGGA GCTTCACCAG GGTGGAAGAG GGTGAGGCCA GTTTGTACC TTTCTCTGAT
241 AAGAAAGCTG TCTCTCGGA GGGGACCTCA CAAACAATTC TGATTTACTT GATGCTTAAA
301 TCATGAGTCT TAAATGTCTG CCTCATGGGC TTCTCGTGCG AACCGGGGAG CTGTTTTTAA
361 AGCCAGTGGG GTGGAATGTC CTTTCACTAA GCCGTTCTGC AAAGTCCAG TGTGGTTCTC
421 TAAGGACTTC GCTGCCGTCG AGACGCGCAG CGGATGCCGC TGCTTGCCGC GGCGGAGAAG
481 CTACGCCGCT GCGCCTTCGG TTCACCTTGC CCCATTAAA GAGTTAGTTA GACAGCTCCA
541 AACGCCAGCT GGCCGAGAGA CTTCTGGGA AAAAGTGCTG TCGTCCGGGA C
    
```

[Taxonomy reports](#)

Distribution of 21 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 23396205 gb AC012391.10 Homo sapiens chromosome 10 clon....	1104	0.0
gi 41149235 ref XM_291716.4 Homo sapiens similar to NK-ty...	517	e-144
gi 1033539 emb Z61161.1 HS46G9F H.sapiens CpG island DNA ge...	291	8e-76
gi 1033540 emb Z61162.1 HS46G9R H.sapiens CpG island DNA ge...	252	7e-64

D11B

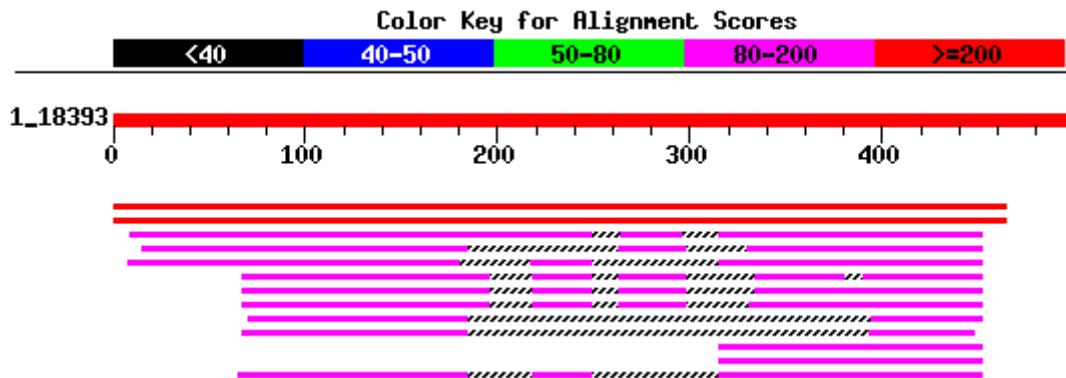
```

1  GTCCCGACGA GCATATATGG ACCTTAAGGC GGGATCTTAA AGGTAGTTTG GACCAATGTT
61  GGCCGTGTAG GTCATGATAA ATGATTACAT TTGTAGACAT TTTTGTGTCT TGATGTCAGC
121 AAGGGTTGCT CAGTGAGTTT TGGCATGCAT ACATTCCAGA GATGTATAGA AATTCTAGTT
181 ACTTACAACA TTTTGGAAAG AGACCTGTAA CCACATGCTA GGAAAGTTTA ATTACTTCTA
241 AATTCCTCAG CGTTCTGCCT CCAGATGGCC TGTTTGATGG TCACCAGGTG TCTTTGCTTG
301 CTGCATTATA CTTCTAACCT CTGCCTTCCA GGCTCAAGTG ATCTTCCCAC CTCAGACTTC
361 CGAGTAGCTG GGACCATAGG CGCTTGCCAT TATGCCCAGC TAATTTTTTTG TATTTTTTGGT
421 AGAGATGGGG TTTCACCATT TTGCCCAGGC TGGAGATTTT AAATCTTTTTT GGTTTTTTTTG
481 TTGTTGTTTC TCGGGAC

```

[Taxonomy reports](#)

Distribution of 5637 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 21217407 gb AC113139.2 Homo sapiens chromosome 8, clone....	912	0.0
gi 16604037 gb AC090814.2 Homo sapiens chromosome 8, clone....	912	0.0
gi 6066122 emb AL117327.5 HSJ421I20 Human DNA sequence from.	178	7e-42
gi 13129399 gb AC079865.14 Homo sapiens 12 BAC RP11-745I6	165	1e-37
gi 12964305 emb AL359262.9 Human DNA sequence from clone R...	159	6e-36
gi 28411646 dbj AP006210.1 Homo sapiens genomic DNA, chrom.....	153	4e-34
gi 14018250 emb AL157396.9 Human DNA sequence from clone R...	153	4e-34
gi 4003393 dbj AB020873.1 Homo sapiens genomic DNA of 9q32.....	153	4e-34

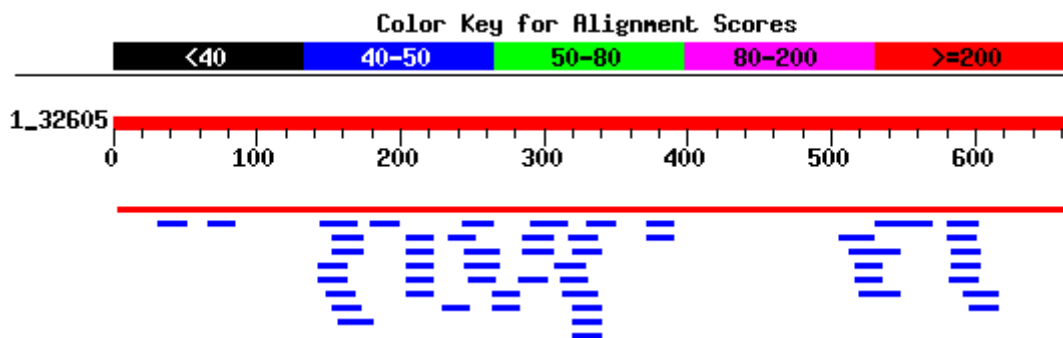
F1A

```

1 ACCGCGAAGG GGTGCATGGA ATGATCCTGT CTGGACACTT GGAGCCCCCT CTGAGGCTTG
61 GTGCATCCTG TCAGTGGCCT CATCAGTTGA AGGGACCTGG TTGGTGAGGA GGCCTCCTCC
121 CCGTGTGGTC CCGTCTCCCT GCCTTGGGAG GTGGGTCAGG GACAGCAGCA GCAAGGCTCT
181 CCTTGGGAGT GTGGTTATTG GGCCTGCTGC TGCTCTGCGT TTCTTTAAAT GCCCTGTGGT
241 GTCAGAGCTT TGA CTGACTGACTG CTGCAGGCTT CTCCTGGGCT TGTGCCACAG GGCCCTCCCA
301 CCTGCAGTGC CCAGAGCTCT CTTTTTCTCT TCTGTGAGCT GCCTTGCCTG TTCGTAGTCT
361 TGGCCCGTAT TTCTGCTGAA ATGTTGTCTT ACAGTTTTGT TGAAGCGCTT TATTCTGGAT
421 AGAGTATCTT TTCTCAGACT GTGACTTAAC TTTTCACCTT AATTGTGGGA TTTTATTGT
481 ACGCAAATTG TGAATCTAAG TGCAATCTAA TGCATCATT TTTTCCATTA CGGTTTGTGC
541 TTTTGTGTTT AANAAATTCT TCCCTTCCTT AAGTCACGAA TATGTTTTCT CCTGTATGTT
601 TCTTACATGT TTGAAGTGTT CCCTTTCACG TGTANTTCTT CATNANAATG TNAAAAANTCA
661 TCTAT
  
```

[Taxonomy reports](#)

Distribution of 53 Blast Hits on the Query Sequence



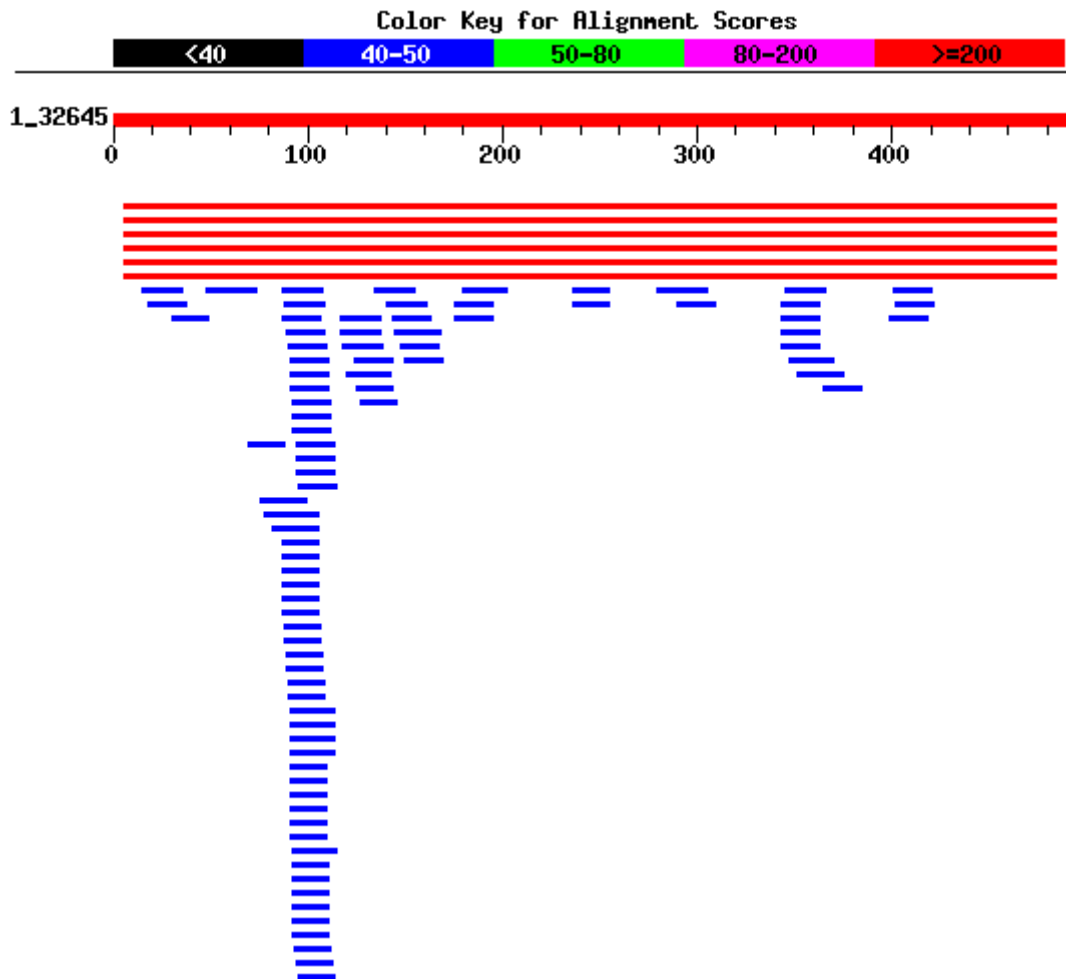
Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 17136154 gb AC023024.6 Homo sapiens, clone RP11-299G20,....	1225	0.0
gi 3258613 gb AC004687.1 AC004687 Homo sapiens chromosome 1...	46	0.090
gi 21304339 emb AL670227.7 Mouse DNA sequence from clone R.....	46	0.090
gi 46358321 emb BX890600.8 Zebrafish DNA sequence from clo...	44	0.35
gi 22094212 gb AC112656.4 Homo sapiens X BAC RP11-555H23 (...	44	0.35
gi 37537509 dbj BS000242.1 Pan troglodytes chromosome 22 c.....	44	0.35

F1B

```
1 ACCGCGAAGG GACATCAATT AAATGAGCAT ATAACAAAAT CAAAGGGTTT GGCCCTTATG
61 AGATAGATGA TTTATTTAAA TCTTTAGATA CTAAAAATAA AAATATATTA TTGTACGTTA
121 AGGCACATTT ATTCATATTT ATATTGAGAA GTGAAAAATA AATATGATAA GCCAGTGTTG
181 TTTAATTGAA GTTTTTATTG ATTAGTTTTC GTCTAATCAT GTCTTGCCTC ATCCTGATCT
241 ACCTTTTATC CCAAGACCAA AGCTAACCCA TTATTTTCAGT TTCCTGTGAG TCAGATCCTG
301 ATCTAAACCT GAGAGCTGAC TTTTAGCTAA AATTGAACAG AGATTTGGGG AATTTATAGT
361 GCTTAAATTT AAGTAGATGA AAGCAACTAC CTACAACCAA TATTTCTGCT TCCATAATTT
421 ATTATGGGCC TATGAAGACC AAGAAGATTA TGTCTAAAT GATTATTGTC CTTGACCATA
481 TCCTTCGCGG T
```

[Taxonomy reports](#)

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 7717279 emb AL163227.2 HS21C027 Homo sapiens chromosome ...	950	0.0
gi 7263186 gb AF241725.1 AF241725 Homo sapiens 21 map 21q21.....	950	0.0
gi 3046280 gb AC004068.1 AC004068 Homo sapiens chromosome 4....	950	0.0
gi 37537414 dbj BS000147.1 Pan troglodytes chromosome 22 c...	918	0.0
gi 37537339 dbj BS000072.1 Pan troglodytes chromosome 22 c...	918	0.0
gi 37537338 dbj BS000071.1 Pan troglodytes chromosome 22 c...	918	0.0