



中國醫藥大學
基礎醫學研究所
碩士學位論文

環境重金屬汙染物-鎘誘導胰臟胰島 beta 細胞功能
損傷與死亡機制之研究

Studies of the mechanisms of cadmium-induced pancreatic β -cell
dysfunction and death

指導教授：陳雅雯 助理教授

共同指導教授：黃俊發 助理教授

研究生：許景程

中華民國九十九年 06 月

中文摘要

鎘是一種有毒的重金屬並且已經被廣泛地在工業中使用。已有文獻指出鎘容易經由食物鏈(food-chain)進入哺乳動物體內進而累積在很多器官裡並且引起嚴重的毒性。尤其許多研究已經發現在暴露在鎘污染環境之工人的尿液中鎘含量越高，會使胰臟的胰島 beta-細胞功能減弱並且引發糖尿病有關之病症出現。然而，鎘引起的胰臟的胰島 beta-細胞損害的明確作用機制依然不清楚。本研究目的是要探討鎘引起胰臟胰島 beta-細胞功能損傷與細胞凋亡之確切作用機轉；實驗結果發現：給予大鼠胰臟胰島 beta-細胞暴露氯化鎘(CdCl_2)24 小時後，隨著濃度的增加(1~10 μM)，細胞存活率亦顯著的減少。同時，胰島素(Insulin)之分泌也受到抑制。藉由給予螢光探針-2', 7'- dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)，利用流式細胞儀(Flow cytometry)分析發現：胰島 beta-細胞在暴露鎘後會顯著的誘發活性氧物種(Reactive oxygen species, ROS)的產生，並且使細胞膜脂質過氧化(Lipid peroxidation, LPO)堆積。暴露鎘引起胰島 beta-細胞凋亡主要是藉由粒線體調控機制和半胱氨酸蛋白酶依賴路徑，鎘包括引起與細胞凋亡有關之 mRNA(Bcl-2、Bax、P53、Mdm-2)表現，粒線體膜電位去極化、釋放細胞色素 c 從粒線體到細胞質、PARP(poly (ADP-ribose) Polymerase)分裂活化和半胱氨酸蛋白酶(caspase)-3、-7 表現。此外給予胰島 beta-細胞暴露氯化鎘(CdCl_2)亦會引起 JNK、ERK、P38-mitogen activated protein kinase(MAPK)磷酸化表現。而給予 JNK 專一性抑制劑：SP600125，能明顯的回復鎘所引起的細胞凋亡作用。在動物實驗之結果中，我們也發現給予 ICR 鼯鼠餵食 10 mg/kg/day 的氯化鎘(CdCl_2)2 週後，即能顯著的抑制鼯鼠血清中胰島素之含量。而在餵食氯化鎘(CdCl_2)6 週後，亦能造成鼯鼠對葡萄糖的不耐受性增加。總和以上之研究結果指出氯化鎘(CdCl_2)能造成胰島 beta-細胞功能損傷與細胞凋亡之產生，其主要之作用機制是透過：ROS 調控 JNK-MAPK-粒線體依賴性之細胞凋亡路徑。同時，本研究結果提供鎘可能

是引發糖尿病相當重要的環境危險因子之科學証據！

關鍵字: 鎘, 糖尿病, 氧化壓力, 凋亡, 肌裂原活化蛋白激酶



英文摘要

Cadmium is a toxic heavy metal and has been widely used in industry. It has been demonstrated that cadmium was easily accumulated by food-chain in many organs of mammal, and caused severe cytotoxicity. Especially, some studies have been found that cadmium levels of urinary in industrial workers are dose-dependently associated with both impaired pancreatic islet beta-cell function and induced diabetic-related syndromes. However, the precise action mechanisms of cadmium-induced pancreatic beta-cells damage remain unclear. The aims of this study were attempted to elucidate whether cadmium induced dysfunction and apoptosis, and to investigate the precise mechanisms by which cadmium caused cytotoxicity in pancreatic beta-cell. The number of viable cells was reduced after CdCl₂ treatment with pancreatic beta-cell line: RIN-m5F cells for 24h in a dose-dependent manner with a range from 1~10 μM. Lipid peroxidation production and 2',7'-chlorofluorescein fluorescence intensity, as an indicator of reactive oxygen species formation after exposure of RIN-m5F cells to CdCl₂ were significantly increased. Cadmium-induced apoptosis involved a mitochondria-mediated mechanism and caspase-dependent pathway, in that the critical apoptotic events induced by cadmium including: activation of JNK, ERK, and p38 phosphorylation, apoptotic-related mRNA expression, the abilities in disruption of mitochondrial membrane potential and release of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol, and activation of PARP cleavage and caspase cascades. In contrast, blockage of JNK, not ERK and p38, by pharmacological inhibitor (SP600125) could be reversed the cadmium-induced apoptosis. Moreover, it was significant decrease the plasma insulin levels of ICR mice after oral administration with 10 mg/kg/day CdCl₂ for consecutive weeks and cause dysfunction of glucose

regulation(glucose intolerance). Taken together, these results indicated that CdCl₂ is capable of inducing cellular responses to cause pancreatic beta-cell dysfunctional apoptosis through ROS-mediated JNK-mitochondria-dependant apoptosis pathway. Cadmium may be an important environmental risk factor for diabetes progressing.

Keyword: Cadmium, diabetes, oxidative stress, apoptosis, mitogen-activated protein kinases



誌謝辭

兩年的研究生涯，終於劃下了句點。從第一年踏入中國醫藥大學基礎醫學研究所，至第二年畢業之前，迥然不同的兩段生活。最先要感謝的是中國醫藥大學給予我足夠的儀器設備與良好的環境，也感謝中國醫藥大學基礎醫學研究所所上老師的幫忙，讓我在實驗中可以勇於嘗試進而學習到經驗，並且獲益良多。

最後，要感謝我家人，在這兩年中不斷的努力支持與鼓勵，讓我投入我想要研究生生活當中，也順利畢業。謹以此論文與我家人分享。

目錄

目錄	VI
中文摘要	I
英文摘要	III
表目錄	IX
圖目錄	X
第壹章 緒論	1
第壹節 研究背景	1
第貳節 鎘之來源	2
第參節 暴露鎘來源與病變	2
第肆節 糖尿病之病變與類型	5
第伍節 鎘對糖尿病影響與機制	6
第陸節 研究目的	15
第貳章 研究方法	16
第壹節 研究材料	16
第貳節 研究設計與方法	18

第參節	統計方法	29
第參章	研究結果	30
第壹節	氯化鎘(CdCl_2)造成胰島 beta 細胞功能破壞	30
第貳節	氯化鎘(CdCl_2)使胰島 beta 細胞走向細胞凋 亡	30
第參節	氯化鎘(CdCl_2)誘導 ROS 產生自由基造成胰 島 beta 細胞凋亡	31
第肆節	氯化鎘(CdCl_2)誘發胰島 beta-細胞凋亡是透 過粒線體膜電位改變、細胞色素 C (cytochrome c)從粒線體釋放出至細胞質、 PARP(Poly (ADP-ribose) Polymerase)及半胱 氨酸蛋白酶(caspase cascades)活化	31
第伍節	氯化鎘(CdCl_2)造成胰島 beta 細胞功能破壞透 過 JNK 來調控	33
第陸節	氯化鎘(CdCl_2)造成 ROS 產生自由基去調控 JNK 引起粒線體凋亡路徑	34
第柒節	氯化鎘(CdCl_2)造成胰臟胰島 beta 細胞破壞而 造成胰島素分泌與血糖受影響	35

第肆章 討論36

第伍章 結論與建議40

第陸章 參考文獻42

第柒章 附圖49



表目錄

Table 1、儀器設備	16
Table 2、材料與試劑	17
Table 2、實驗試劑 (buffer) 泡製之組成	26



圖目錄

- Figure 1 、鎘誘導近曲小管細胞凋亡機轉4
- Figure 2 、血糖過高時，會產生細胞反應性含氧物
種(ROS)9
- Figure 3 、細胞凋亡(apoptosis)與壞死(necrosis)型態
與病理機制之比較10
- Figure 4 、細胞凋亡主要路徑外在路徑與內在路徑11
- Figure 5 、糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)藉由 JNK
調控胰臟胰島 beta 細胞功能喪失14
- Figure 6 、Cadmium-induced cytotoxicity in pancreatic
beta-cell derived RIN-m5F cells49
- Figure 7 、Cadmium on insulin secretion in pancreatic
beta-cell derived RIN-m5F cells50
- Figure 8 、Flow cytometric analysis showing effects of
cadmium on the cell cycle of RIN-m5F cells51
- Figure 9 、Effect of cadmium on the morphology of
pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells52
- Figure 10 、Induction of apoptosis after exposure to

cadmium.....	54
Figure 11 、 Cadmium on reactive oxygen species (ROS) generation in RIN-m5f cells	55
Figure 12 、 JNK-inhibitor suppress cadmium-induced oxidative damage to membrane lipid by lipid peroxidation (LPO) assay in RIN-m5F cells	56
Figure 13 、 Analysis of mitochondrial membrane potential (MMP) in cadmium-treated RIN-m5F cells	57
Figure 14 、 Effects of cadmium-induced cytosolic cytochrome c release in RIN-m5F cells	58
Figure 15 、 JNK-inhibitor suppress cadmium-induced cytosolic cytochrome c release in RIN-m5F cells.....	59
Figure 16 、 JNK-inhibitor suppress Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) activation in cadmium-treated RIN-m5F cells.....	60
Figure 17 、 JNK-inhibitor suppress caspase-3 and caspase-7 activation in cadmium-treated RIN-m5F cells.....	61

Figure 18 、 Mitogen -activated protein (MAP) kinases are relationship to cadmium-induced cytotoxicity in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells62

Figure 19 、 JNK-inhibitor suppress the cadmium induced Cytotoxicity in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells.....63

Figure 20 、 N-acetyl-L-cysteine (NAC) suppress the cadmium-induced cytotoxicity in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells64

Figure 21 、 N-acetylcysteine(NAC) suppress on the phosphorylation of mitogen -activated protein (MAP) kinases in cadmium-treated RIN-m5F cells.....65

Figure 22 、 JNK-inhibitor suppress on the phosphorylation of JNK in cadmium-treated RIN-m5F cells66

Figure 23 、 Analysis of mitochondrial membrane potential (MMP) in JNK inhibitor compares with N-acetyl-L-cysteine (NAC) RIN-m5F cells67

Figure 24 、 Cadmium induces related apoptotic mRNA

expression in RIN-m5F cells.....68

Figure 25 、 Effects of cadmium-induced plasma insulin
secretion in ICR mice.....69

Figure 26 、 Effects of cadmium-induced blood glucose in
ICR mice70

Figure 27 、 Cadmium-induced the apoptotic effect of
RIN-m5f involved in mitochondrial pathway71



第壹章 緒論

第壹節 研究背景

鎘(Cadmium)是已知廣泛存在之重金屬，是一種銀白色有光澤的金屬，通常在自然界中通常是以氯化鎘、氧化鎘及硫化鎘等化合物存在環境中。大部分的鎘是金屬（如鋅、鉛、或銅）提煉過程中所產生的副產品。鎘在工業上的用途，主要是用來製造鎘電池、染料、電鍍金屬和塑膠製造的穩定劑等。鎘能透過一些途徑進入環境中，燃燒煤、家庭廢棄物、石化燃料，或是其他高溫的工廠製程，例如熔鋅、鉛、銅的礦石時，會產生氧化鎘的小顆粒懸浮於空氣中。當工業上過度的使用且回收處理不當或任意排放有害廢棄場溢出或滲漏出的鎘，亦會進入土壤或者水中導致污染食物或是水源，使得鎘目前也是重要的工業和環境污染物。鎘在環境中不會分解，而土壤中的鎘能夠進入水中或為植物所攝取，魚和動物也會從環境中攝取到鎘。台灣的鎘米事件，是塑膠穩定劑工廠排放廢水至灌溉渠道污染農田所造成。文獻也有指出鎘具腎毒性、肝毒性，會直接或間接地造成哺乳類動物的肝臟、腎臟及內分泌系統的受損。鎘可經由食物、水或者吸入的微粒而進入人體，而在遭受鎘污染地區工作之工人或是該地區之民眾，都會藉由直接或間接透過食物方式為主要的暴露來源，在肝臟、腎臟及生殖系統中蓄積，並且造成許多嚴重的疾病，像是：痛痛病、急性腎衰竭、癌症、引發高血糖病徵及胰臟胰島的傷害...等。有文獻研究指出長期吃入低劑量的鎘會導致鎘在腎臟中累積，引起近端腎小管損傷，因而妨礙鈣的再吸收，導致骨中鈣質流失，因此使得骨骼變脆容易斷裂。近年來已有報告指出尿液中的血糖濃度會隨著給予的鎘劑量濃度增加而上升，即有高血糖及胰島素分泌減少的症狀，糖尿病嚴重威脅人類健康的慢性疾病之一，尤其是在工業化高度發展的地區或城市。在台灣，糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)所造成的死亡近年來已經是國人十大死因之一，且

有越來越嚴重之趨勢！由於對於鎘抑制胰島細胞胰島素(Insulin)分泌及誘發胰島細胞傷害之詳細作用機轉目前仍尚未明確。因此，研究鎘對於胰臟胰島細胞功能破壞與細胞損傷之詳細分子機制是相當重要的。

第貳節 鎘之來源

人類剛出生的時候，體內多數沒有鎘，但通常都隨著年齡的增加而逐漸累積增加。人體內 50 歲左右含鎘量約 20~30mg，大部分都集中在肝臟和腎臟 (謝慶芳, 1990)。鎘是一種銀白色有光澤的金屬，鎘本就存在於地殼之中，因此在岩石和土壤裡可以發現鎘。但在自然界中通常是以氯化鎘、氧化鎘及硫化鎘等化合物存在環境中。大部分的鎘是金屬提煉過程中所產生的副產品。鎘在工業上的用途，主要是用來製造鎘電池和染料，並可作為電鍍金屬和塑膠製造的穩定劑等。它亦存在於某些礦物肥料之中，所以稻米及小麥等穀物中也能找到鎘。鎘能透過一些途徑進入環境中，像是當我們燃燒煤、家庭廢棄物、石化燃料，或是其他高溫的工廠製程時，會產生氧化鎘的小顆粒懸浮於空氣中。鎘亦能從處理家庭或工業廢水而進入水裡。此外，從有害廢棄場溢出或滲漏出的鎘，亦會進入土壤或者水中(Sethi et al., 2006)。鎘在環境中不會分解，而土壤中的鎘能夠進入水中或為植物所攝取，魚和動物也會從環境中攝取到鎘。

第參節 暴露鎘來源與病變

鎘可經由食物、水或者吸入的微粒而進入人體，近幾年來也有研究指出吸菸者逐漸增加，而香菸的煙霧也是鎘的重要暴露來源之一(Bernard and Lauwerys., 1984; Jarup et al., 1998)。鎘在人體主要堆積在肝臟和腎臟，並慢慢從尿和糞便排出。人體中的鎘主要來自食物的攝取(Nishihara, T et al., 1979; Underwood, E. J.,

1977)。人吃到含高劑量鎘的食物或飲水時，會嚴重刺激胃，引起嘔吐和腹瀉。鎘也具有神經毒性、肝毒性且高度干擾內分泌系統的物質(Adachi et al., 2007)。在鎘污染的地區，環境中最主要的鎘污染源則是電鍍廠、蓄電池製造廠及熔接工廠或因採礦工業含鎘之廢水未經適當處理而逕行排水入河川中，導致水源受到了鎘污染，經由食物鏈(植物或是水生動物像是：魚類、牡蠣、海螺等貝類從環境中攝取到鎘)蓄積，最後導致人類食入這些受到鎘污染食物而間接暴露到鎘(Feng et al., 2007; Zhai and Shang, 2007)。而當地的居民因為長期暴露在鎘的環境下造成人體內鎘含量增加(Zielonka, E et al., 1989)，進而導致肝臟、腎臟及呼吸系統皆出現了衰竭、受損的情形，吸重菸者的含鎘量也會顯著增加。研究也顯示出鎘進入身體會停留在肝臟和腎，從尿和糞便慢慢排出身體。大部分鎘以無害的形式存在體內，鎘會取代體內的鋅，造成許多新陳代謝活動無法進行，鋅不足的時候鎘的吸收也會增加。腎臟是鎘最主要的標的器官，而會腎臟中累積，引起近端腎小管損傷(Akesson et al., 2005)，非常低的量就會加快腎臟老化，引起蛋白尿，甚至腎功能指數上升，尤其會加快糖尿病腎病變的惡化速度；鎘也是造成腎結石的原因之一。先前研究也有觀察到鎘在近端腎小管透過內質網壓力誘導凋亡藉由ATF6-CHOP、IRE1-XBP1和IRE1-JNK路徑(Yokouchi et al., 2007) (figure 1)

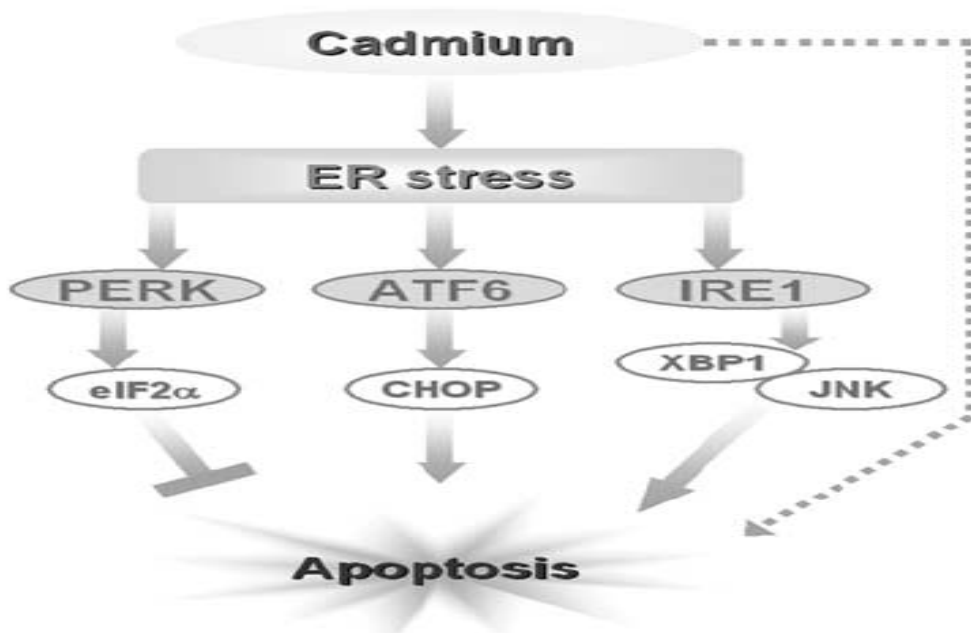


Figure 1、鎘誘導近曲小管細胞凋亡機轉
(M Yokouchi et al., 2007)

也有研究發現到鎘會累積在骨頭上，進而妨礙鈣的再吸收，導致骨中鈣質流失。因此使得病人骨骼變脆容易斷裂、容易變型且疼痛難耐(Staessen et al., 1999)，最有名的例子就是日本富山縣神通川流域所發生的「痛痛病」(Itai-Itai disease)(Hagino et al., 1961)。而台灣則是近幾年來在彰化地區所發生的鎘米事件，乃是塑膠穩定劑工廠排放廢水至灌溉渠道污染農田所致(謝慶芳, 1990)。也有研究指出中樞神經系統(CNS) 也會受到鎘的毒性作用(Gabbiani et al., 1967; Lafuente and Esquifino, 1999)。鎘會增加老鼠腦血管屏障通的滲透性 (Shukla et al., 1987) 並且可以透過嗅覺進入CNS系統引起毒性傷害反應(Clark et al., 1985; Evans and Hastings, 1992)。在新生兒的發展期間，CNS特別脆弱受到損害；鎘被顯示透過胎盤容易傳給胚胎並且在哺乳期間發現暴露於在子宮裡的鎘的孩子的能力相當影響(Korpela et al., 1986; Bonithon-Kopp et al., 1986)。鎘已經被顯示在大腦裡生產自由基可以潛在損壞神經元。此外，鎘也會造成小動脈硬化、循環不良、

骨質疏鬆症、糖尿病、高血壓或低血壓、倦怠、貧血、蛋白尿、噁心、嘔吐、軟骨症、骨骼酸痛、不良於行、慢性骨折、腹瀉、肺氣腫等現象。此外吸菸時吸收的鎘則可能是造成慢性氣管炎甚至肺癌的原因(Shukla et al., 1987)。

第肆節 糖尿病之病變與類型

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)為常見之慢性疾病，是一種身體對於糖類代謝功能不正常而導致血糖過高的疾病，身體會把碳水化合物消化和分解為葡萄糖，葡萄糖是血糖的一種，是我們身體的主要能量來源，之後葡萄糖便會進入血液中和被細胞吸收作為生長和能量的原料。在葡萄糖由血液進入細胞的過程中，我們需要胰島素。胰島素是一種由胰臟分泌的賀爾蒙。進食時，胰臟應當自動地分泌適合分量的胰島素把葡萄糖由血液帶到細胞中。但糖尿病病人的問題就是不能正常地完成這個步驟，當中主要有兩個原因之一病人不能分泌正常分量的胰島素，另一是細胞未能正常地對胰島素作出反應。那麼葡萄糖便會在血液中積聚，並從尿液中流走。故此糖尿病患者會失去大量能量來源。一般分為兩種型態：第一型糖尿病，又稱為胰島素依賴型糖尿病，約佔所有糖尿病患者的 10%，其造成的原因最主要是因自體免疫系統不正常，使免疫細胞攻擊胰臟胰島細胞，導致胰島細胞死亡而無法分泌胰島素，有一些一型糖尿病患者，需要每天服用胰島素來維持生命，一型糖尿病的患者通是是兒童和較年輕的成年人，但任何年齡的人也有機會患病。一型糖尿病 的病徵通常在很短的時間內便會顯現出來。病徵包括口渴、多尿、常常覺餓、體重下降、視力下降和組織脫水，可以導致致死的併發症--糖尿病昏迷症或稱作糖尿病酮症酸中毒(ketoacidosis, DKA)。糖尿病酮症酸中毒(ketoacidosis, DKA)是因為身體大量地使用脂肪作為能量，故大量的酮體聚集在身體內和血液中。第二型糖尿病，又稱為胰島素非依賴型糖尿病，約佔所有糖尿病患者的 90%，第二型的患者通常能夠分泌足夠的胰島素，但因為未知的原因，

身體不能有效地使用胰島素，這個情況叫作胰島素阻抗性。第二型的病徵需在較多的時間來形成，不像第一型只要很短的時間便出現病徵。有些患者甚至沒有病徵。病徵包括了疲倦、噁心、多尿、多渴、瘦、視力下降、肥胖、高血壓，高血脂等疾病，常受感染，和傷口較難痊癒。目前在台灣地區臨床方面發現到許多青少年營養過剩而導致肥胖，故第二型糖尿病患者的年紀有所下降，並且在國人十大死因之中，有許多疾病皆與糖尿病息息相關。

第伍節 鎘對糖尿病影響與機制

近幾年來的發現工業化所造成的環境污染因素佔著很重要的原因。例如流行病學研究已指出重金屬中砷與第二型糖尿病的發生有很大的關連性(Tseng et al., 2000)，另一重金屬汞具有神經毒性之物質，累積含量過多會引起器官的傷害。實驗動物在懷孕初期或胎兒時期暴露到高劑量的甲基汞，其子代出生後會造成神經功能及行為的缺陷(Rice and Barone, 2000)，但近幾年來發現暴露低劑量的汞也是可能誘發糖尿病的重要因素之一(Chen et al., 2006)。研究已證明新生兒老鼠口服鎘的相對低的劑量導致葡萄糖自動平衡功能異常如分解肝糖，增加血葡萄糖和提升的集中肝織物的糖質新生。鎘會經由食物鏈蓄積而進入到哺乳動物體內，在胰臟中累積而使動物產生糖尿病的徵狀(Merali et al., 1980)。另外暴露重金屬鎘的環境下較易罹患胰臟癌(Schwartz et al., 2000)，胰臟癌與第二型糖尿病也已被發現有所關聯，(Everhart et al., 1995)。根據流行病學統計，人在空腹時血糖異常患者及糖尿病患者尿液中鎘濃度較正常人高(Schwartz et al., 2003)，是因為鎘會影響葡萄糖的代謝平衡而造成血液中血糖濃度上升導致高血糖症引起糖尿病(Han et al., 2003)。近年來研究發現到許多細胞可以藉由氧化壓力調控高血糖危害，像神經、腎臟細胞和血管內皮，使得胰臟的 beta-細胞被認為引起高血糖的藉由氧化壓力重要角色，因為血糖過高時，會造成細胞反應性含氧物種(Reactive

oxygen species ; ROS)的增加(Ha and Lee., 2000) (figure 2)，當體內的 ROS 或自由基(free radical)累積過多時，即形成所謂的氧化壓力(Oxidative stress)會造成細胞走向凋亡的路。

自由基(free radicals)是一種活性氧化物(Reactive oxygen species ; ROS)泛指以氧為中心的自由基(free radical)與其代謝產物。其中包括:過氧化氫(hydrogen peroxide, H₂O₂)、超氧陰離子自由基(superoxide anion, O₂⁻)、氫氧自由基(hydroxyl radical, OH)等，及能產生自由基的活性氧物質，如：單重態氧(singlet oxygen ; O₂)等(R.A.Jacob, 1995)，稱為活性氧化物。符合自由基定義的不只是以氧為主的氧自由基(oxygen-derived free radicals)，其他還包括以氮為主的活性氮(reactive nitrogen species ; RNS)即是含有氮原子的自由基之一氧化氮(nitric oxide, NO)(Ohshima H et al., 19999)

自由基(free radicals)為一種可單獨存在，且具有一個或一個以上未配對電子(unpaired electron)的分子(Halliwell B, 1994)或原子，使得電子軌域上具一個不成對電子的物質，在極不穩定的情況下活性氧物質極欲擺脫多餘的電子以求穩定，容易由周圍環境中擷取穩定結構的電子，已達其穩定狀態。由於自由基的不穩定特性，因此極易與其他分子碰撞而形成二次反應(secondary reaction)，繼而產生連鎖反應(chain reaction)，造成更多的自由基之產生，因此很容易與其他生物體中的分子作用，而影響細胞的功能。在正常的生理功能下，細胞需要藉助活性氧化物的特性來執行一些生理功能，例如：活化的巨噬細胞及嗜中性白血球需藉由產生大量 ROS 以達到殺死外來病原體的目的(Nathan CF and Root RK,1977)，有些活性氧化物被發現具有調控生理反應的功能，例如：Nitric oxide(NO)調控平滑肌的放鬆(Stern J and Ippoliti C, 2003)，此之，ROS 也可以作為訊息傳導物質(signaling molecule)，因此在生物體中含有少量自由基時並不會產生負面的影響。許多文獻指出 ROS 會造成細胞傷害(Johnson RC et al., 2000)，但近年來愈來

愈多的研究證實，在細胞可調控的情況下，低濃度 ROS 可能具有誘發或調節一些生理功能包括細胞增生(proliferation)(Huang ZZ et al., 1998)、分化(differentiation)(Rogers MV et al., 1994)、發育(development)、附著(adhesion)、蛋白質合成、分泌與轉移(Gamaley IA and Klyubin IV, 1999)，但在多數的情況下，不必要的自由基會經由細胞自發性產生或外界環境進入細胞中，這些活性極強的分子會攻擊 DNA、蛋白質、脂質等細胞構造，對生物整體的影響可能造成老化、癌症、心血管疾病及免疫系統功能降低等。推測 ROS 調控這些作用的機制，可能經由活化細胞內特殊的訊息傳遞分子(signaling molecule)或轉錄因子(transcription factor)所導致(Mielke K et al., 2000)。

而氧化壓力長期影響的結果會造成許多病變，例如糖尿病(Heath et al., 2005)、細胞死亡有兩種型態，細胞凋亡(Apoptosis)與細胞壞死(necrosis)。細胞凋亡與壞死會在同時發生在一群細胞，也可以分為早期與晚期兩個時期。在細胞凋亡早期，細胞會先產生核皺縮、染色體濃縮、DNA 斷裂，但其胞器仍是完整的。到了晚期，細胞膜會皺縮成不規則狀，最後形成凋亡小體，細胞仍是完整的(Matsuda H et al., 1996; Searle J et al., 1982)。而細胞壞死早期，細胞內之胞器會脹大，例如：粒線體成不正常腫大，細胞膜也會破裂，到晚期細胞膜也破裂，因而釋放一些發炎物質而引起局部發炎反應，傷害到鄰近的細胞與組織；到了晚期細胞膜也發生破裂(Nakagawa T et al., 2000) (figure 3)。目前已知造成細胞凋亡(Apoptosis)有三種路徑：(1) 外因性路徑(Extrinsic pathway)之細胞表面接體(cell surface death receptor)(2) 內因性路徑(Intrinsic pathway)(Li et al., 1998)之粒線體(mitochondria)(3) 內因性路徑(Intrinsic pathway)(Li et al., 1998)之內質網壓力(endoplasmic reticulum ; ER stress)(Raffray M and Cohen GM,1997;Budihardjo I et al.,1999)。(figure 4)而細胞凋亡最後的訊息傳遞都會是匯集到 caspase 蛋白來執行細胞自我凋亡。

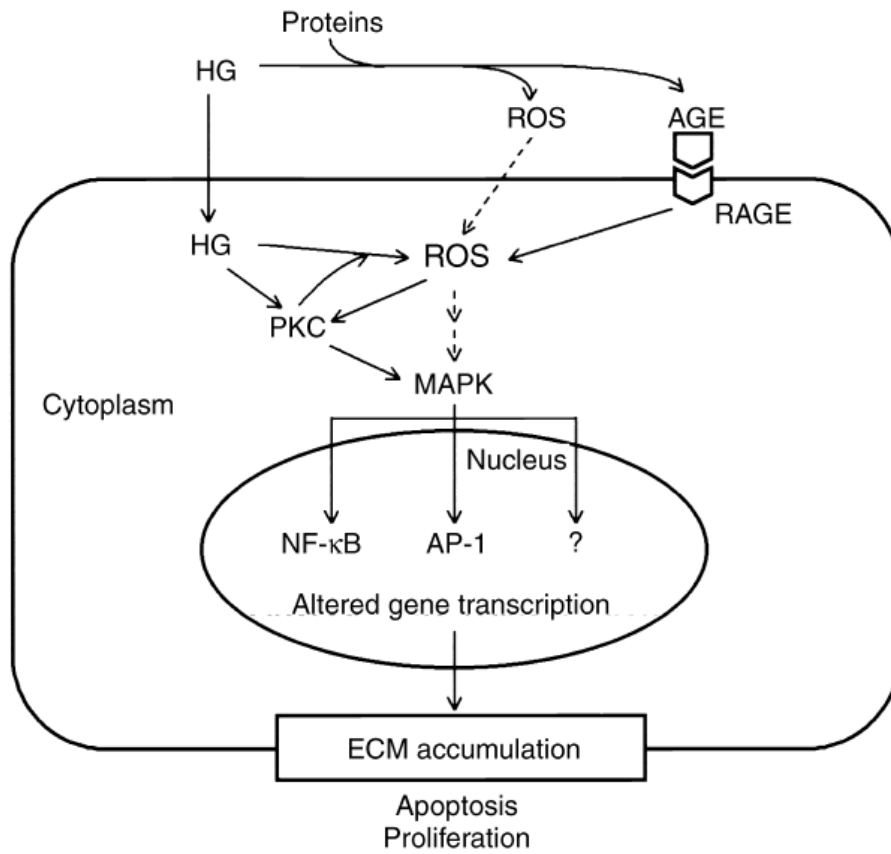


Figure 2、血糖過高時，會造成細胞反應性含氧物種(ROS)的增加
(Ha and Lee., 2000)

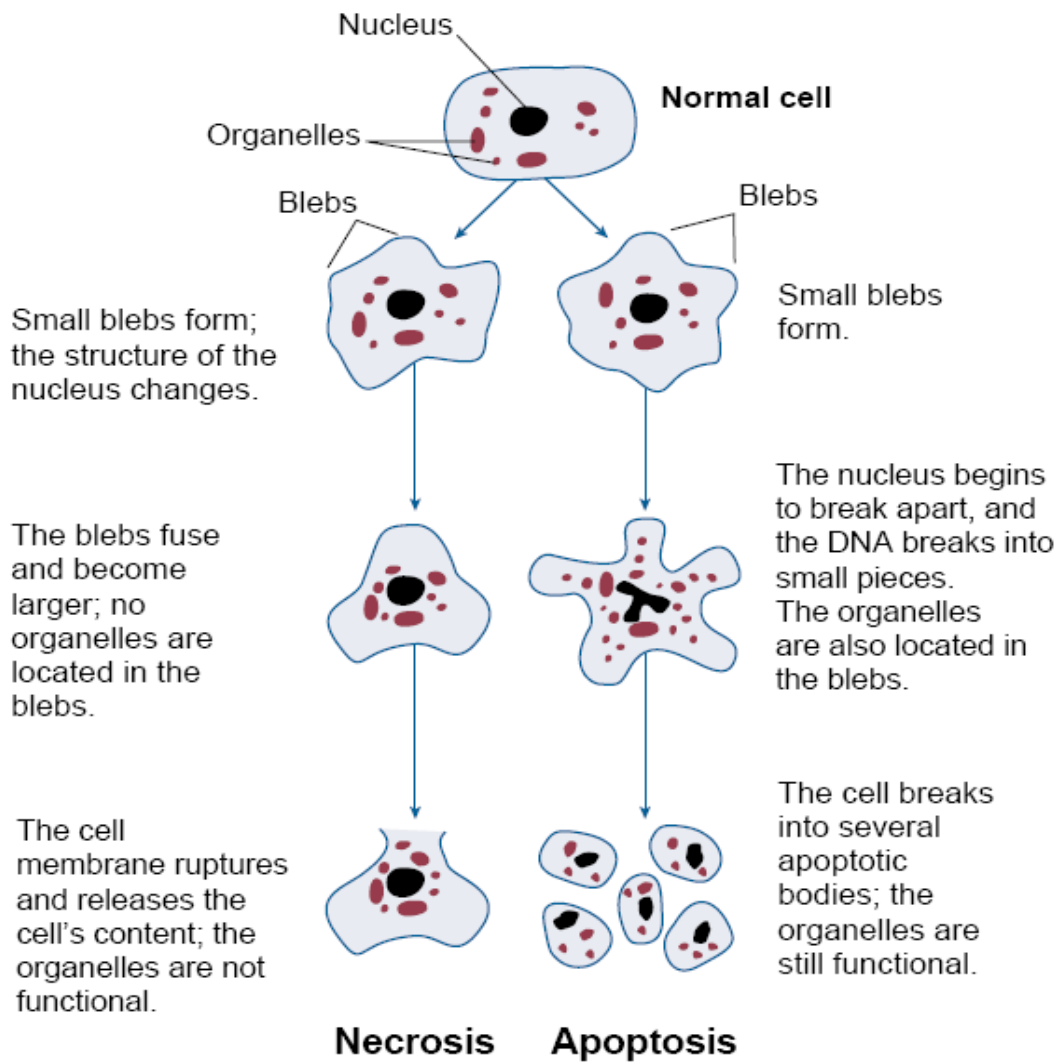
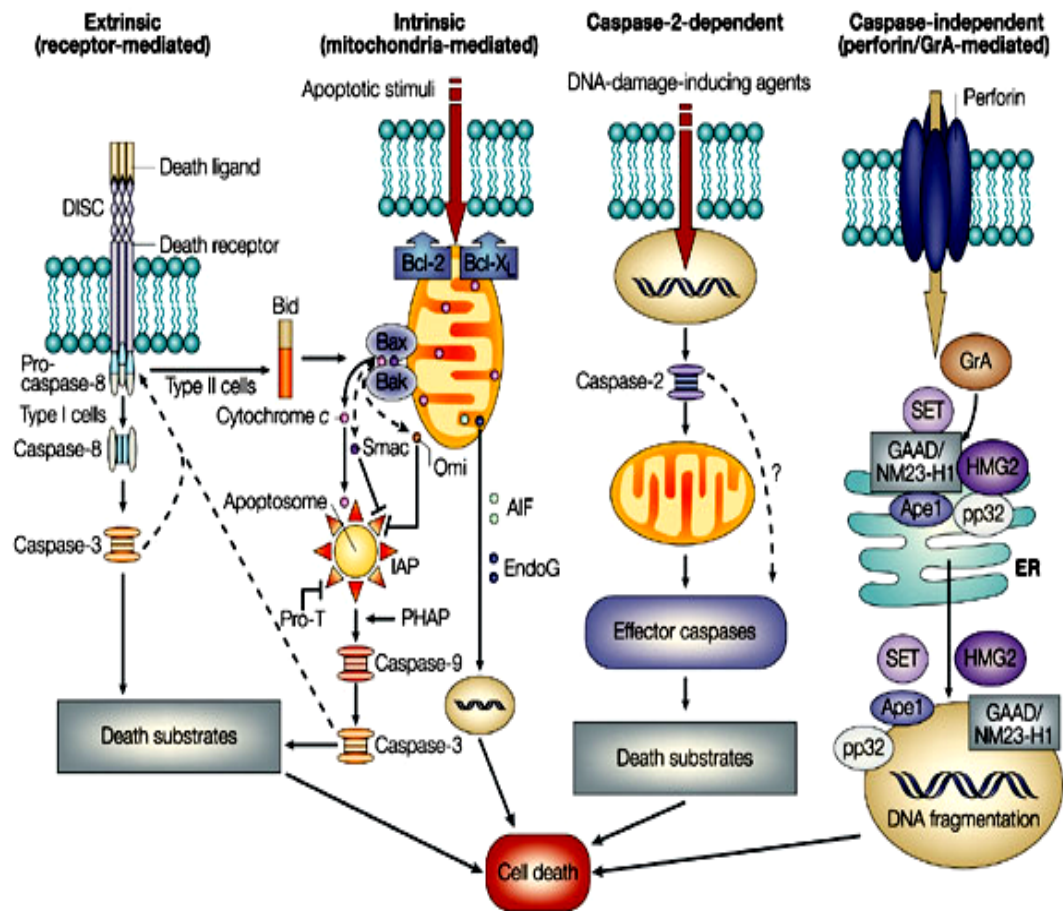


Figure 3、細胞凋亡(apoptosis)與壞死(necrosis)型態與病理機制之比較

(Goodlett and Horn., 2001)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 4、細胞凋亡主要路徑外在路徑與內在路徑

(Orrenius et al., 2003)

外在路徑又稱為死亡受體所調控之細胞凋亡路徑(death receptor-mediated apoptotic pathway)，主要為經由活細胞表面的死亡受體，如細胞激素(cytokine)、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor)與 death receptor 結合。第一型 TNF-alpha 受體與之需要 TNFR 1 相關死亡結構蛋白質(TRADD)與 Fas 相關蛋白質上的死亡結構(FADD)這兩個調控傳遞分子，而此複合物結合 procaspase-8，使其成活化態 caspase-8，活化態的 caspase-8 可直接活化 caspase-3 或者透過分解 Bid 蛋白，產

生的 truncated Bid(tBid)再來刺激粒線體釋放細胞色素 c (cytochrome c)到細胞質。cytochrome c 與 Apaf-1 及 caspase-9 組成 apoptosome，進而活化 caspase-3 而導致細胞凋亡(Li et al., 1998)。

內因性路徑中粒線體路徑是受 Bcl-2 家族蛋白所調控，大致可分為 anti-apoptotic protein(Bcl-2, Bcl-xL)(Yang et al., 1997)，pro-apoptotic protein(Bax, Bak)。內因性路徑其一為粒線體凋亡路徑，細胞凋亡起始發生於 DNA 損傷後才發生，此反應乃依賴細胞核轉錄因子 p53 來進行(Schuler et al., 2000)，正常的細胞狀態下 p53 是位於人體第 17 對染色體上的基因，是一種癌症抑制基因(tumor suppressor gene)，它可以修補細胞內損壞的 DNA，或是殺死不健全的細胞，因此 p53 在細胞週期中佔有相當重要的位子，當 DNA 受到傷害時 p53 會活化 p21，使細胞週期停在 G0/G1 期，並去做修補 DNA 的動作，若是不健全的細胞中，則會導向細胞凋亡。但在多數的癌症細胞中發現，p53 基因發生突變(mutation)或是缺失(deletion)，使此路徑受到影響，無法抑制細胞週期進行、誘導凋亡，反而導致癌細胞不斷增長，因此 p53 對於細胞週期的影響也十分重要，誘發 p53、Bax 與 Bcl-2 同源蛋白後，這些蛋白會在外層粒線體膜聚集並凝集化，會造成粒線體的膜電位改變(去極化)而使膜電位之減少(Green, 2000)，或開啟了電位依賴陽離子通道，進而釋出 cytochrome c(Goldstein et al., 2000)到細胞質與凋亡蛋白酶活化因子-1(Apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)、caspase-9 及 ATP(Hengartner, 2000; Cecconi and Gruss, 2001; Acehan et al., 2002) 組成 apoptosome，而活化態的 caspase-9 切斷 procaspase-3 進而活化 caspase-3(Acehan et al., 2002)，活化態的 caspase-3 也會作用切斷下游蛋白，最後導致細胞凋亡(Li et al., 1997)。其二為內質網調控細胞凋亡路徑，內質網為一個控制蛋白質合成、摺疊、成熟或執行分泌型蛋白轉譯後修飾很重要的胞器，蛋白必須在此正確的摺疊及組合，才能被送到細胞內其他胞器或是細胞表面。當內質網的恆定受到內在或外在因素影響時，就會產生內質網壓力(endoplasmic

reticulum stress) (Lee, 1992)，此時細胞內的蛋白 GRP78 和 GRP94 表現增加，而此兩種蛋白的功能是與未折疊完全的蛋白結合以紓緩內質網的壓力 (Reddy et al., 2003)。然而，若是內質網壓力無法改善，細胞則會啟動細胞凋亡路徑 (Masud et al., 2007)。下圖為細胞凋亡的訊息傳遞路徑 (Gupta et al., 2006)。

此外細胞週期與凋亡也息息相關，因為抑制細胞週期的進行可使細胞無法產生分裂、增生，因而停止生長。最終的細胞反應，則是交由 p53 來執行。細胞週期可分為四期：(Zieske JD et al., 2004; Wei H-C, 2006)

G1(Gap1)期：細胞開始正常代謝並且生長，並產生 RNA 及蛋白質，細胞體積會增加，G1 期的染色體數目是 2N，而在進入 S(synthesis)時期之前會檢查染色體 (chromosome)DNA 是否受到破壞以進行修補(repair)的工作，此時期需要花十至十二小時，此為合成前期。

S(Synthesis)期：於 S 期中，細胞會複製其 DNA，細胞會擁有兩套完整的 DNA。讓細胞得以分裂成兩個子細胞，各自具備一套完整的 DNA。然而在細胞真的可以進行分裂前，其仍需要進入細胞週期中的第三階段。

G2 (Gap2) 期：細胞進入 G2 其需要花三至四小時，染色體從 2N 變 4N，除了繼續生長並且合成蛋白質之外，在細胞要進入 M 期之前會負責檢查染色體 DNA 的複製是否完整以利進行有絲分裂(mitosis)。

M (Mitosis) 期：此時期只有一小時，會停止細胞生長及蛋白質合成，由一個母細胞變成兩個子細胞，複製完成的染色體會各自分配至子細胞內，使子細胞內的染色體與母細胞完全一樣，新細胞在此期完成。

細胞週期具有三個檢查點(checkpoint)：G1/S 檢查點、intra-S 檢查點與 G2/M 檢查點。這些檢查點主要用來確認進入下一時期之前，是否一切準備就緒，若產生錯誤的訊息，如 DNA 或紡錘絲產生損害，將無法通過檢查點而細胞週期停止 (cell cycle arrest)。此時細胞將進行修復，修復完成才進入下一時期，若無法修復的錯誤，細胞將會走向細胞凋亡(apoptosis)。(Nigg EA, 1995; Hulleman E et al., 2001; Smith ML et al., 1996)

此外，高血糖會活化 mitogen -activated protein (MAP) kinases 路徑(Gabriella et al., 2005)，而研究已經證明氯化鎘(CdCl_2)毒性與誘導氧化壓力的有關 (Kim, S et.al., 2005; Monroe, R. K et al., 2006)，並且 Kajimoto 和 Kaneto 已經進一步觀察到胰臟胰島 B 細胞功能破壞造成糖尿病之原因包含了氧化壓力與隨後引起活化的 c-Jun N-terminal kinase (JNK)路徑(Kajimoto and Kaneto, 2004) (figure 5)。雖然氧化壓力 ROS 與 mitogen -activated protein (MAP) kinases 對於氯化鎘(CdCl_2)有關但尚未證實兩者之間的調控。

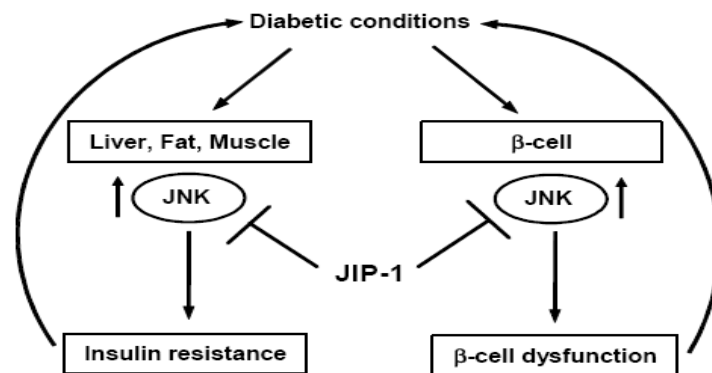


Figure 5、糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)藉由 JNK 調控胰臟胰島 beta

細胞功能喪失

(Kajimoto and Kaneto, 2004)

第陸節 研究目的

重金屬是一個很常見的環境污染物。例如工業排放出來含鎘廢水、日常生活所使用的含鎘油漆染料、電池等等，使人們直接或間接暴露到鎘。然而，環境中最主要的鎘污染源則是電鍍廠、蓄電池製造廠及熔接工廠或因採礦工業含鎘之廢水未經適當處理而逕行排水入河川中，導致水源受到了鎘污染，經由食物鏈(植物或是水生動物像是：魚類、牡蠣、海螺等貝類從環境中攝取到鎘)蓄積，最後導致人類食入這些受到鎘污染食物而間接暴露到鎘(Feng et al., 2007; Zhai and Shang, 2007)。過去研究文獻指出，鎘是具有神經毒性、肝毒性、腎毒性的金屬，會造成哺乳類動物的肝臟、腎臟及內分泌系統的受損，同時也會造成呼吸系統(肺臟功能)的傷害，也疑似是致癌物質，對發育中胎兒來說可能是有毒物質。

此外，像是發生在日本的「痛痛病」(Itai-Itai disease)及台灣彰化縣的鎘米事件，都是由鎘污染所引起的嚴重環境問題。近幾年來由於吸菸者逐漸增多，而香菸的煙霧也是主要暴露來源之一(Bernard and Lauwerys., 1984; Jarup et al., 1998)。然而，我們對於鎘如何使胰臟胰島 beta 細胞分泌胰島素功能損傷、是否會造成胰臟胰島 beta 細胞死亡以及可能的相關分子機制尚不清楚。

第貳章 研究方法

第壹節 研究材料

Table 1. 儀器設備

可見光/紫外光分光光度計	UV/Visible spectrophotometer DU-800, Beckman Coulter, USA
即時聚合酶連鎖反應器	Applied Biosystems 7300 ; ABI prism 7300, Applied Biosystems, CA, USA
多功能酵素免疫分析儀	Triad LT, Dynex Technologies, Inc, UK
高速離心機	X-22 Series Benchtop Centrifuge, Beckman Coulter, USA
細胞培養箱	Nuaire, USA
流式細胞儀	FACSCalibur, Becton Dickinson, USA
光學顯微鏡	Motic, Japan
無菌操作臺	造鑫, Taiwan
ELISA reader	
SDS-PAGE 電泳槽套組	Bio-RAD, USA
Vortex-genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES, NY, USA

Table 2. 材料與試劑

Cell line	RIN-m5f 大鼠胰臟胰島 beta 細胞株
RPMI 1640	GIBCO
Fetal Bovine Serum	GIBCO, USA
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, CA, USA
ECL kit	Perkinelmer, Boston, MA, USA
細胞培養皿	FALCON
Glycine	Amresco, OH, USA
Methanol	景明化工, Taiwan
Propidium iodide	Invitrogen, CA, USA
BCATM protein assay kit	Pierce, IL, USA
Protein marker	Amersham, USA
TEMED	Amresco, OH, USA
Ammonium persulfate	Amresco, OH, USA
Dimethyl Sulfoxide	Sigma, MI, USA
Developer and Fixer	Kodak, Boston, MA, USA
TRIzol	Invitrogen, CA, USA
DEPC	Invitrogen, CA, USA
RNA	Invitrogen, CA, USA
Isopropanol	J.T Baker, NJ, USA
Chloroform	J.T Baker, NJ, USA
PVDF	Minipore, USA
Annexin V-FITC Apoptosis Detectopn Kit	BioVision, CA, USA
Anti-phospho-JNK	Cell Signaling

Anti-JNK	Cell Signaling
Anti-cytochrome c	Biologend
Anti- phospho -ERK	Cell Signaling
Anti-ERK	Cell Signaling
Anti- phospho -P38	Cell Signaling
Anti-P38	Cell Signaling
Anti- α -tublin	Santa Cruz
Anti-rabbit IgG	Santa Cruz
Anti-mouse IgG	Santa Cruz

第貳節 研究設計與方法

一、實驗設計

使用體外細胞培養模式來模擬在環境中受到鎘暴露下對於引起胰臟胰島 beta 細胞胰島素分泌和利用功能的破壞、細胞毒性產生與誘發細胞凋亡(apoptosis) 並且探求其詳細之分子作用機制和動物實驗暴露鎘對胰島素分泌降低而造成血糖增加。

二、實驗方法及步驟

1、細胞培養(cell-culture):

採用大鼠胰臟胰島 beta 細胞株(RIN-m5f)給予細胞培養液(RPMI 1640 medium with 1% penicillin/streptomycin and 10% Fetal bovine serum)來進行培養。先將 RPMI 每包泡製完成後加入 2.2 克的碳酸氫鈉(sodium bicarbonate)並以 1N 鹽酸 (HCL)將 PH 調整至 7.2，最後以用過濾器(filter)過濾後加入包含了 10%胎牛血

清(Fetal bovine serum)，5ml 盤尼希林 (penicillin)即可使用，RIN-m5f 細胞培養在培養箱內環境 37°C，5% CO₂，一星期培養一次。

細胞繼代培養

細胞分盤，首先將每盤培養皿中細胞培養液吸出 3.5ml 至 50ml 離心管，加入 3ml 的 phosphate buffer saline(PBS)(0.02%KH₂PO₄、0.8NaCl 及 0.2165NaHPO₄)緩衝液沖洗後吸去，再加入 1ml Trypsin(10 倍 trypsin 以 PBS 稀釋濃度成 1 倍)沖洗下來至 50ml 離心管，為一種胰蛋白酶，能幫助細胞脫離培養皿底部，離心管於常溫離心 1000rpm，3 分鐘後，將上清液去除，再加入適當細胞培養液後沖散，以 10⁵ 個細胞/24 well，2x10⁶/6 well，1ml 細胞原液/10cm 培養皿為培養密度種入培養皿中。

2、細胞存活率測定(Measurement of cell viability):

MTT assay 是一種生物學上常用以測定細胞存活率或增殖作用的方法，主要依賴活細胞內的粒線體的琥珀酸去氫酶(succinate dehydrogen)之作用將 MTT 中的 tetrazolium，MTT formazan 堆積細胞中，當加入 DMSO(dimethyl sulfoxide)將其溶解，則可利用測吸光值及可以知道細胞還原 MTT 的能力，此吸光值代表了粒線體的活性，即活細胞存活率。

細胞在給予暴露不同劑量之氯化鎘(CdCl₂)24 小時後，吸取上清液後加入 MTT assay (colourimetric assay utilizing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)，以每 9ml 細胞培養液(RPMI 1640 細胞培養液含 1% 盤尼希林和胎牛血清)加入 1ml MTT 稀釋 10 倍後，每 well 加入 100μl 暴露 2 小時後吸取上清液再加入 DMSO(dimethyl sulfoxide)每 well 300μl 使細胞內 MTT 產物 Formazan 溶出，再以每 well 取 100μl 至另 96 well-plate 後利用 ELISA reader 測 570nm 之吸光值推算出細胞存活率。

3、胰島素分泌檢測(Insulin secretion studies):

細胞在給予暴露不同劑量之氯化鎘(CdCl_2)後，收取細胞培養液來偵測胰島素含量之變化。本實驗將使用胰島素實驗分析套組(Mercodia, Uppsala, Sweden)來檢測胰島素之濃度。本套組利用ELISA原理，利用胰島素的抗體血清與待測樣品的胰島素作用，使用呈色劑呈色，將Enzyme Conjugate buffer全加入 Enzyme Conjugate 11x 中混合成Enzyme Conjugate buffer，將6 瓶standard 中的Calibrator 0-5 與血漿sample 分別取25 μl 加入到kit 附的96 孔盤內，每格加入Enzyme Conjugate buffer 50 μl ，避光搖2 小時，再用1 倍的wash buffer 洗過甩乾，反覆wash 6次，加入substrate TMB 200 μl ，避光搖15 分鐘，最後加入stop solution 50 μl ，搖5 秒後，拍至變色，使用多功能酵素免疫分析儀 (Triad LT, Dynex)測450nm 之吸光值，代入標準曲線經計算後可得胰島素濃度測定吸光值即可推算出待測樣品的中胰島素的濃度。

4、細胞脂質過氧化(Lipid peroxidation, LPO)測定：

脂質過氧化物 (lipid peroxide) —丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、(4-hydroxyalkenals, 4-HAE).是脂質經過自由基 (free radicals) 之攻擊後發生脂質過氧化過程 (lipid peroxidation) 的產物；而脂質過氧化過程是不飽和脂肪酸被氧化及被破壞的反應，脂質过氧化物的產生是脂質遭受自由基攻擊的一種指標。

細胞在給予暴露不同劑量之氯化鎘(CdCl_2)24小時後，加入20mM Tris-HCl buffer 100 μl 後將細胞收集到1.5ml試管中。取20 μl 之待測樣品於96-Well中，加入65 μl R1 reagent (10.3 mM N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile)及15 μl 37% HCl，於45 $^{\circ}\text{C}$ 反應60分鐘後利用ELISA Reader-測定590nm 吸光值，並與標準樣品-MDA作比較，即可得知脂質過氧化之變化情形。

5、測定活性氧化物質(reactive oxygen species):

利用螢光探針 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)進行活性過氧化物檢測的試劑盒。DCFH-DA 本身沒有螢光，可以自由穿過細胞膜，進入細胞內後，可以被細胞內的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透細胞膜，從而使探針很容易被裝載到細胞內。細胞內的活性過氧化物可以氧化無螢光的 DCFH 生成有螢光的 DCF (Dichlorofluorescein) 檢測 DCF 的螢光就可以知道細胞內活性氧的層次。

ROS 染劑: 1 μ l DCFH-DA working sol'n + 500 μ l PBS diluted ; DCFH-DA stock sol'n : 20mM ; working sol'n : 200 μ M

細胞在給予暴露不同劑量之氯化鎘(CdCl_2)不同時間至 12-well plate 後，將細胞懸浮液吸取至離心管中，加入 PBS 清洗 plate 上的細胞一次後，以 1500rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液後，再加入 3ml PBS 清洗細胞，以 1500rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，配製 ROS 染劑—DCFH-DA (1 μ l H₂DCF-DA working sol'n/500 μ l PBS)，每管 sample 加入 500 μ l 配製後的 ROS 染劑；此外，需有一管 blank 不加藥也不加染劑，只加入 500 μ l PBS，之後將 sample 置於 37°C 水浴槽，避光反應 30 分鐘後，transfer 至 FACS 管中，利用流式細胞儀(Flow cytometry)來偵測並分析細胞內活性氧化物質的生成情形。

6、粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential):

Mitochondria 在細胞凋亡的過程中扮演重要的角色，其中早期證據之一在於粒線體膜電位的改變，去極化的過程(depolarization)會增加粒線體膜的通透性並使膜內的蛋白，如 Cytochrome C, AIF, Smac/DIABLO 等分子釋放到細胞質中，並引發 Pro-caspase-9 的活化，caspase-9 再活化下游的 Pro-caspase-3、7，因而造成一連串凋亡的反應。

粒線體膜電位探針 DiOC₆(3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide)是一種可穿透

細胞膜，可專一性的結合並累積在細胞粒線體中，其在細胞內外的分部可反應出細胞膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可顯示粒線體膜電位改變情形，可發射出綠色螢光(green-fluorescent)之陽離子(cationic dye)親脂性染劑；在不需固定細胞或其他處理的情況下可以即時、快速的偵測活細胞內粒線體膜電位的改變。粒線體膜功能不良(mitochondrial dysfunction)通常伴隨早期細胞凋亡發生，而細胞粒線體膜電位的改變也因此當做早期凋亡偵測上的指標。

MMP 試劑：1 μ l DiOC₆ stock sol'n + 50 μ l PBS diluted；DiOC₆ stock sol'n：20mM；working sol'n：1mM

細胞粒線體膜電位之偵測則是細胞在給予暴露不同劑量之氯化鎘(CdCl₂)至12-well plate後，先將細胞懸浮液吸到離心管中，加入PBS清洗plate上的細胞一次後，以1500rpm離心5分鐘，倒掉上清液後，再加入3ml PBS清洗細胞，1500rpm離心5分鐘，去除上清液，配製MMP染劑—DiOC₆ (1 μ l DiOC₆ working sol'n/500 μ l PBS)，每管sample加入500 μ l配製後的DiOC₆染劑，此外，需要有一管blank不加藥也不加染劑，只加入500 μ lPBS，之後將sample置於37°C水浴槽避光30分鐘後，transfer至FACS管中，利用流式細胞儀(Flow cytometry)來測定粒線體膜電位的變化情形。

7、蛋白質定量：

將以知濃度為 2 mg/mL 的牛血清白蛋白 (bovin serum albumin, BSA) (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) 溶液以二次水連續兩倍稀釋六次，得到標準溶液濃度範圍包含 0、0.125、0.25、0.5、1 和 2 mg/ml，並做出標準曲線。將已稀釋完成之標準溶液及待測樣本溶液，各取 10 μ l 加入 96 孔盤，而取 2 μ l 樣品和加二次水 8 μ l 的 5 倍稀釋。將 BSA Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) 所附之 A 溶液與 B 溶液以 50:1 之比例均勻混合後，在各孔加入 150 μ l 之混合溶液。將 96 孔盤外包裹沾濕蒸餾水之擦水手紙避免蛋白質溶液蒸發，於 37°C，5%CO₂

培養箱(incubator)內環境靜置 30 分鐘。各孔顏色會由淺綠色轉變成深紫色，其顏色深淺與蛋白質濃度呈正比，使用多功能酵素免疫分析儀 (Triad LT, Dynex) 以 ELISA reader 讀取吸光值 570 nm 下測定吸光值，利用標準曲線推算出樣本溶液之正確濃度。

8、即時聚合酶連鎖反應(Real-time Polymerase Chain Reaction ;

Real-time PCR):

SYBR Green 是一種結合於小溝中的雙鏈 DNA 結合染料。與雙鏈 DNA 結合後，其螢光大大增強。這一性質使其用於 PCR 擴增產物的檢測。SYBR Green I 的最大吸收波長約為 497nm，發射波長最大約為 520nm。在 PCR 反應體系中，加入過量 SYBR 螢光染料，SYBR 螢光染料特異性地摻入 DNA 雙鏈後，發射螢光信號，而不摻入鏈中的 SYBR 染料分子不會發射任何螢光信號，從而保證螢光信號的增加與 PCR 產物的增加完全同步。

將 6 孔培養皿中加入 250 μ l TRIzol，均勻搖晃，全部吸至 1.5ml ependroff 離心管中，離心後取上清液至另 ependroff。再加入 50 μ l 氯仿(chloroform)輕輕上下晃動 30 次，之後在離心，取上清液至新的 eppendrof 內，再加入 2-propanol 250 μ l，上下混 3~5 次後再離心，去上清液後在加入 250 μ l 75%酒精後再離心抽乾，加入 DEPC 20 μ l 以 60 $^{\circ}$ C 煮 10 分鐘後測 RNA 濃度。測完後加入 1 μ l random primer 上機 70 $^{\circ}$ C 5 分鐘後再加入 dNTP、RNA transverse buffer、RNA transverse enzyme 和 RNase 混合後於 37 $^{\circ}$ C 反應將 RNA 轉 cDNA，轉好的 cDNA 至 PCR 96 well plate 加入含有 DEPC、sense primer、antisense primer 和 SYBR PCR reagent(Invitrogen, USA)離心後至 ABIPrism 7900HT(PE, Applied Biosystems)進行即時定量 PCR 反應，利用 CT 值求出 mRNA 的相對量，觀察 mRNA 含量變化。

9、測量細胞週期sub-G1 DNA含量(Measurement of sub-G1 DNA

Content):

當Propidium iodide (PI) 進入細胞後，能與細胞核內的DNA 與RNA結合，藉由細胞在各生長時期DNA 含量不同的因素，我們可以得知細胞所處的生長階段，又因為PI 也會和細胞核內的RNA 結合，因此我們在製備PI solution 時會加入RNase，分解細胞核中的RNA，以避免干擾PI 對DNA 的測定。正常人體細胞的細胞週期，在G0/G1 時期具有2套染色體 (2N)，G2/M 時期具有4 套染色體 (4N)，而S時期介於G0/G1 與G2/M 之間，因此其染色體含量也為兩者之間。當細胞產生細胞凋亡時，細胞內的酵素被活化，因而使DNA 片段化，而使染色體含量少於2N，所以在G0/G1 前有Sub-G1 的波峰出現，藉由流式細胞儀分析圖，不但可以判斷整個細胞生長階段，也可以用來當作是否產生細胞凋亡的指標。

利用6-well plate培養暴露不同時間點細胞，收下細胞後以1500rpm離心10分鐘後去除上清液，再0.5ml HBS，以1500rpm離心10分鐘，兩次離心後，接著以70%酒精(1ml)固定細胞5分鐘，將樣本放置4°C冰箱中保存。在準備以流式細胞儀(Flow cytometry)分析樣本前，由4°C冰箱取出樣本，再以1500rpm離心10分鐘，去除上清液後，再0.5ml HBS，以1500rpm離心10分鐘一次，去除上清液後，使細胞懸浮含有Propidium iodide (PI) (40µl/ml)50µl及Rnase A(100µl/ml)5µl的HBS中，室溫避光環境下反應30分鐘後，以流式細胞儀(Flow cytometry)以488nm激發，PI釋放波長為675nm，故以紅色濾鏡(FL-2)偵測，最後以WINMDI 2.8軟體分析細胞中sub-G1 phase染色體所佔的比例，估計細胞凋亡情況。

10、Annexin V-Cy3 assay:

Annexin V是一種Ca²⁺依賴的磷脂結磷脂結合蛋白(35-36 kDa)，對磷脂絲氨酸(phosphatidylserine ;PS)具高度親和性，當細胞進行細胞凋亡(apoptosis)時,細胞膜的磷脂絲氨酸會外翻(原本只存在內膜)到外膜，而外翻的PS會被Annexin V辨識並結合，所以在偵測細胞有無凋亡時可用此種蛋白作為辨識的工具。為了區別

活細胞不會造成磷脂絲氨酸(phosphatidylserine ;PS)外翻和壞死細胞(necrotic cells)，我利用 6-carboxyfluorescein diacetate(6-CFDA)與annexin V-Cy3 來區分在螢光顯微鏡(fluorescence microscopy)，因為非螢光的 6-CFDA會進入活細胞只有活細胞可以經由脂酶(esterases)代謝成綠色螢光 6-carboxylfluorescein (6-CF)。而壞死細胞(necrotic cells)只會呈現紅色螢光(AnnexinV-Cy3)，凋亡細胞會呈現綠色螢光(6-CF)與紅色螢光(AnnexinV-Cy3)。

利用6-well plate培養暴露不同時間點細胞，以14000rpm 離心20分鐘後去上清液，加入Annexin V 與 6-CFDA (500 μ l)後放置室溫5分鐘，在transfer至poly-L-lysine-coated slide 玻片上，最後以落射螢光顯微鏡(epifluorescence microscopy) 激發波/ 藍光過濾片(blue-free filter ; BFF)450-490nm/515nm 下觀看細胞染色情況。

11、Hoechst 33258 staining:

Hoechst 33258 為bis-benzimidazole 螢光染劑的一種，可結合於雙股DNA 之 minor grooves 上。可以判斷DNA大致上的性質如DNA的斷裂、Apoptosis。

利用 6-well plate 培養暴露不同時間點細胞，收下細胞後以 2000rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，再以 PBS 將細胞懸浮，以 2000rpm 離心 10 分鐘，接著以 4%福馬林(500 μ l)固定細胞 5 分鐘，再以 2000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，以適量 PBS 懸浮細胞利用細胞離心機進行離心，以 350rpm 離心 10 分鐘，將細胞離心至載玻片上，接著小心以 PBS 沖洗玻片，再利用福馬林固定細胞 15 分鐘後，以 PBS 小心沖洗玻片，利用細胞通透液(permeabilization buffer)反應 10 分鐘，再次以 PBS 沖洗玻片，加入 Hoechst 33258(0.5 μ /ml)，再避光環境下反應 30 分鐘後，以 PBS 沖洗玻片，最後以封片膠將玻片固定進行螢光顯微鏡下觀看。

12、西方墨點法(western blot):

西方墨點法的基本原理就是利用抗原抗體免疫反應的方法，可用於偵測某種特定的蛋白質，樣本混合物先經過 polyacrylamide 電泳分離，然後轉印到 PVDF(polyvinylidene difluoride memberane)(最常用)，接著以標記的抗體結合。

細胞在給予暴露不同劑量之氯化鎘(CdCl_2)不同時間後，將含有暴露藥物之細胞培養液移除，並用PBS清洗後加入Cell lysis buffer，之後將其收集到1.5ml之試管中，經由 4°C 高速離心後收取上清液(Total protein)。使用蛋白質含量分析套組—BCA kit將蛋白質定量(以ELISA reader 讀取吸光值570 nm)。取固定量的蛋白量與loading buffer混合後，製成待測樣品。以聚丙烯醯胺膠體電泳法(SDS-PAGE)來將蛋白質分離。依待測蛋白不同，使用不同比例的running gel。加入待測樣品後，經適當時間 protein marker展開後即停止電泳。電泳結束後，取適當大小之PVDF(polyvinylidene difluoride memberane)將蛋白質轉印其上。將轉印後的PVDF以5%脫脂奶粉的TBST在室溫下搖1小時，以牛奶蛋白將轉印膜上蓋住非專一性的蛋白結合位。接著將PVDF浸泡在含一抗的TBST中， 4°C 作用1小時後，再與二抗反應1小時。最後以 enhanced chemiluminescence (ECL) 冷光感應試劑作用後，於暗房壓片及沖片，觀察是否有蛋白片段出現。最終可依線條上的強弱和粗細，推測不同條件處理下，對該蛋白相對量的影響。

Table 3. 實驗試劑 (buffer) 泡製之組成

<u>sample buffer (5x)</u>	7.81 ml stacking buffer (0.5mM Tris-HCl ,PH=6.8) 2.5 g SDS 14.36 ml glycerol 6.25 ml beta-mercaptoethanol 2 mg bromophenol blu 加二次水至 50ml
---------------------------	---

<u>lysis buffer :</u>	<p>50mM Tris pH7.5</p> <p>150mM NaCl</p> <p>10mM EDTA</p> <p>1% NP-40</p> <p>0.25% deoxycholate</p>
<u>RIPA buffer</u>	<p>1ml lysis buffer</p> <p>50mM PMSF</p> <p>50mM Na₃VO₄</p> <p>10μg/ml Aprotinin</p> <p>1mM NaF</p>
<u>TBS-T (20X) :</u>	<p>48.46g Tris</p> <p>0.5M EDTA</p> <p>58.44g NaCl (PH=7.5)</p> <p>加二次水至 1L。</p>
<u>Running buffer(10x)</u>	<p>30.2g Tris-base</p> <p>140g Glycine</p> <p>10g SDS</p> <p>加二次水至 1L。</p>
<u>Transfer buffer(10x)</u>	<p>30g Tris</p> <p>144g Glycine</p> <p>加二次水至 1L。</p>

<p>SDS-PAGE</p>	<p>5% Stacking gel (5ml) 3.4ml H₂O 0.83ml 30% acrylamide mix 0.63ml 1.0 M Tris(pH6.8) 0.05ml 10% SDS 0.05ml 10% ammonium persulfate 0.005ml TEMED</p>
<p>8% Separating gel (5ml)</p>	<p>11.5ml H₂O 6.7ml 30% acrylamide mix 6.3ml 1.0 M Tris(pH6.8) 0.025ml 10% SDS 0.025ml 10% ammonium persulfate 0.015ml TEMED</p>
<p>12% Separating gel (5ml)</p>	<p>8.2ml H₂O 10.0ml 30% acrylamide mix 6.3ml 1.0 M Tris(pH6.8) 0.25ml 10% SDS 0.25ml 10% ammonium persulfate 0.01ml TEMED</p>
<p>1X Phosphate Buffer Saline(PBS)</p>	<p>16g NaCl</p>

(2L)	1.6g KH ₂ PO ₄ 5.7952g Na ₂ PO ₄ 0.4g KCl
------	---

第參節 統計方法

統計分析(Statistics):

實驗數據以平均值±標準偏差 (Mean±S.E.) 表示，而每組實驗數目皆在三次以上。實驗組別相互間之差異以 ANOVA followed by Dunnett 加以評估，P<0.05 者表示具統計學上的差異。



第參章 研究結果

第壹節 氯化鎘(CdCl_2)造成胰島 beta 細胞功能破壞

胰島素(Insulin)是由胰臟胰島beta細胞所分泌，正常情況下在高血糖會促使beta細胞會分泌胰島素(Insulin)達到降低血糖(Blood glucose)作用。而氯化鎘(CdCl_2)是否會影響胰島beta-細胞分泌胰島素功能失調及引起細胞毒性之產生。由實驗結果發現：給予RIN-m5F細胞株暴露氯化鎘(CdCl_2)24小時後，胰島beta-細胞胰島素分泌降低與細胞存活率都隨濃度明顯地降低，而在氯化鎘(CdCl_2)濃度 $3\mu\text{M}$ 開始有明顯統計意義 (Figure 1 and 2)，確實氯化鎘(CdCl_2)會造成胰臟胰島beta細胞功能異常與細胞毒性產生。

第貳節 氯化鎘(CdCl_2)使胰島beta細胞走向細胞凋亡

細胞死亡有分細胞凋亡(apoptosis)和細胞壞死(necrosis)，而氯化鎘(CdCl_2)會讓胰島beta-細胞死亡，那是否經是造成細胞凋亡(apoptosis)。因此，本研究利用了三個實驗去證實其經由凋亡路徑。第一實驗是利用Sub-G1去觀察，當細胞進行凋亡時，DNA會成片段所以小於 $2n$ (兩套染色體)，去跑流式細胞儀(Flow cytometry)發現到在G0/G1之前Sub-G1有明顯地細胞數目增加相對於控制組(control)(figure 3)。第二個試驗是用annexin V Cy3(紅色螢光)與6-CFDA(6-carboxyfluorescein diacetate)去染色看細胞發螢光的比較(figure 4)，當細胞進行凋亡時細胞膜內(phosphatidylserine, PS)會從細胞膜內外翻至外以至於annexin可以與phosphatidylserine結合，實驗結果觀察到在給予氯化鎘(CdCl_2)annexin紅色螢光有明顯地表現，而給予JNK抑制劑(SP600125)綠色螢光有明顯地

表現。最後實驗是使用Hoechst33258去觀察細胞凋亡，當細胞凋亡時細胞核會濃縮現象(nuclear condensation)及凋亡小體(apoptotic body)出現，利用Hoechst33258染劑可以明顯地看到細胞凋亡之細胞核成圓形狀，給予氯化鎘(CdCl_2)確實會造凋亡小體(apoptotic body)出現(figure 5)。結果皆可給予JNK抑制劑(SP600125)後回復。

第參節 氯化鎘(CdCl_2)誘導ROS產生自由基造成胰島beta細胞凋亡

現在已經證明許多疾病透過ROS(reactive oxygen species)的產生去攻擊造成細胞死亡。因此去探討在給予beta-細胞暴露氯化鎘(CdCl_2)後是否會誘發ROS的產生，在給予氯化鎘(CdCl_2)劑量 $5\ \mu\text{M}$ 和 $10\ \mu\text{M}$ 隨時間增加至兩小時有明顯增加自由基的產生(figure 6)。

而脂質經過自由基 (free radicals) 之攻擊後發生脂質過氧化過程 (lipid peroxidation) 的產物；而脂質過氧化過程是未飽和脂肪酸被氧化及被破壞的反應，脂質过氧化物的產生是脂質遭受自由基攻擊的一種指標，造成LPO (lipid peroxidation) 產生。所以更進一步觀察氯化鎘(CdCl_2)引起膜類脂質過氧化產生損害藉由脂質過氧化分析。由實驗結果觀察到隨氯化鎘(CdCl_2)劑量增加確實會造成malondialdehyde (MDA) (lipid peroxidation) 增加(figure 7)。而這些氯化鎘(CdCl_2)所引起氧化性壓力損傷可以被JNK抑制劑(SP600125)給回復。由以上這些實驗結果確實證實氯化鎘(CdCl_2)會使自由基產生攻擊細胞造成細胞死亡。

第肆節 氯化鎘(CdCl_2)誘發胰島beta-細胞凋亡是透過粒線體膜電位改變、細胞色素 C (cytochrome c)從粒線體釋放出

至細胞質、PARP(Poly (ADP-ribose) Polymerase)及半胱氨酸

蛋白酶(caspase cascades)活化

造成凋亡(apoptosis)路徑，一條是外在路徑，是藉由受體去影響下游路徑，而另一條路徑是通過粒線體去調控凋亡(apoptosis)。粒線體在細胞凋亡的過程專扮演重要的角色，其中在於粒線體膜電位的改變，因此我們利用流式細胞儀(flow cytometry)去觀察給予RIN-m5F細胞暴露氯化鎘(CdCl_2) 對粒線體膜電位的影響。給予氯化鎘(CdCl_2)劑量 $5\mu\text{M}$ 與 $10\mu\text{M}$ 暴露8小時後可以看到RIN-5F細胞粒線體有顯著性去極化，而氯化鎘(CdCl_2)暴露之前先給予JNK抑制劑(SP600125)劑量 $10\mu\text{M}$ 暴露1小時能反轉結果(Figure 8)。

當氯化鎘(CdCl_2)造成粒線體膜電位去極化會增加粒線體膜的通透性並使膜內的蛋白，如細胞色素 C (cytochrome c)分子從粒線體釋放到細胞質中，並引發一系列凋亡蛋白的活化，所以我測量是否細胞色素 C (cytochrome c)在cytosol表現量增加。給予氯化鎘(CdCl_2)劑量 $5\mu\text{M}$ 與 $10\mu\text{M}$ 暴露在RIN-m5F細胞4、6、8和12小時後，利用西方墨點法去觀察細胞色素 C (cytochrome c)在細胞質的蛋白表現量，發現到氯化鎘(CdCl_2)在8小時細胞質細胞色素 C (cytosolic cytochrome c)釋放表現量有明顯的蛋白增加(Figure 9)，而給予JNK抑制劑(SP600125) 後有明顯地被抑制(Figure 10)。

進一步去探討氯化鎘(CdCl_2)引發凋亡(apoptosis)一些蛋白例如poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP)。PARP(poly (ADP-ribose) Polymerase)是細胞凋亡核心成員半胱氨酸蛋白酶(caspase)的切割底物。因此,它在凋亡中發揮著重要作用。PARP分子量為 116kDa (precursor form)，被切割成為 85kDa (cleaved form)和 24kDa 而造成無法修補，給予胰島beta-細胞暴露氯化鎘(CdCl_2) $5\mu\text{M}$ 與 $10\mu\text{M}$ 劑量下8小時與12小時後去觀察，發現到在12小時cleaved form有明顯蛋白表現增加，而給予JNK抑制劑(SP600125)後則能反轉此結果(Figure 11)。

由於在細胞存活率實驗已證實氯化鎘(CdCl_2)確實會造成 beta 細胞死亡，因此，本實驗進一步去觀察造成凋亡的半胱氨酸蛋白酶 (caspase)的蛋白質表現。給予氯化鎘(CdCl_2) 劑量 $5\mu\text{M}$ 和 $10\mu\text{M}$ 暴露於 16 小時和 24 小時後觀察前半胱氨酸蛋白酶-3 (procaspase-3)和前半胱氨酸蛋白酶-7 (procaspase-7)的蛋白表現 (figure 12)，發現前半胱氨酸蛋白酶-7(procaspase-7)在 16 小時隨濃度增加前半胱氨酸蛋白酶-7(procaspase-7)的 cleaved form 有明顯增加使前半胱氨酸蛋白酶-7(pro-caspase-7)活化而前半胱氨酸蛋白酶-3(procaspase-3)在 24 小時蛋白質表現量有明顯地減少，而給予 JNK 抑制劑(SP600125)證明氯化鎘(CdCl_2)確實會使半胱氨酸蛋白酶(caspase)蛋白活化造成凋亡(apoptosis)。

第五節 氯化鎘(CdCl_2)造成胰島 beta 細胞功能破壞透過 JNK 來調控

MAPK路徑中JNK與P38會使細胞走向凋亡，而ERK會造成細胞增生，Kajimoto和Kaneto已經進一步觀察到胰臟胰島B細胞功能破壞造成糖尿病之原因與引起活化的MAPK中c-Jun N-terminal kinase (JNK)路徑有關(Kajimoto and Kaneto, 2004)。所以對於氯化鎘(CdCl_2)會造成RIN-m5F細胞死亡與胰島素(Insulin)分泌被抑制的機制是否藉由MAP Kinase去影響細胞死亡與胰島素分泌，因此，接下來實驗利用Mitogen -Activated Protein (MAP) Kinases的各別抑制劑 SP600125 $10\mu\text{M}$ (JNK抑制劑), SB203580 $10\mu\text{M}$ (P38抑制劑)和PD98059 $10\mu\text{M}$ (ERK抑制劑)在暴露氯化鎘(CdCl_2)24小時之前給予，以便去對RIN-m5F細胞存活率探討。由實驗結果得知：只有SP600125 $10\mu\text{M}$ (JNK抑制劑)有明顯地回復氯化鎘(CdCl_2)所引起之細胞毒性，而ERK及P38抑制劑則無明顯之效果，而同時，JNK抑制劑(SP600125)也能回復胰島beta-細胞在暴露後所引起胰島素分泌功能損傷 (figure 14)，其餘否(figure 13)。

第陸節 氯化鎘(CdCl_2)造成ROS產生自由基去調控JNK引起

粒線體凋亡路徑

由之前得知氯化鎘(CdCl_2)確實會造成胰島的beta-細胞RIN-m5F存活率降低而死亡(figure 1)，而由得知氯化鎘(CdCl_2)會造成ROS(figure 6)，那ROS是否有參與氯化鎘(CdCl_2)誘導胰島的beta細胞RIN-m5F死亡路徑。由實驗結果證實氯化鎘(CdCl_2)會隨濃度增加而胰島的beta細胞RIN-m5F存活率明顯地降低，而給予抗氧化劑N-acetyl-L-cysteine (NAC)可使細胞存活率增高(figure 15)。

先前文獻已證實得知氯化鎘(CdCl_2)會經由活化mitogen-activated protein (MAP) kinases路徑去調控細胞凋亡的產生。同時，金屬鎘亦會藉由產生ROS而造成哺乳類細胞的傷害。然而，鎘所引起胰島beta-細胞凋亡的產生是否與MAPK有所關聯，到目前仍是不清楚的。因此，為了進一步觀察鎘是否藉由ROS去活化mitogen-activated protein (MAP) kinases，我們西方墨點法來分析MAPK相關蛋白-JNK、ERK、P38之磷酸化表現。由實驗結果觀察到暴露氯化鎘(CdCl_2)隨劑量增加JNK、ERK和P38磷酸化蛋白質表現量也隨增加，而給予抗氧化劑-NAC則磷酸化程度明顯地被抑制下來，確實證實了ROS會引起mitogen-activated protein (MAP) kinases的磷酸化蛋白質表現(figure 16)。

既然ROS會影響mitogen-activated protein (MAP) kinases路徑，而ROS會造成細胞死亡。而之前結果我已經證實mitogen-activated protein (MAP) kinases的各別抑制劑：SP600125 10 μM (JNK抑制劑), SB203580 10 μM (P38抑制劑)和PD98059 10 μM (ERK抑制劑)中只有SP600125 10 μM (JNK抑制劑)有明顯地增加在鎘所引起之毒性作用下的細胞存活率(figure 13)。

用西方墨點法(western blot)的實驗分析也發現SP600125 10 μM (JNK抑制劑)能顯著地抑制胰島beta-細胞暴露鎘後，所引起JNK-MAPK磷酸化的表現(figure

17) , 減緩粒線體膜電位的去極化, 細胞色素C的釋放及抑制PARP、caspase-3/-7 蛋白的表現。此外, 在給予RIN-m5F細胞暴露氯化鎘(CdCl_2)後會明顯地誘發ROS的產生(利用流式細胞儀分析), 而給予抗氧化劑NAC則能有效的抑制ROS產生, 但是, 若給予SP600125 $10\mu\text{M}$ (JNK抑制劑)則無法抑制ROS產生(figure 18)。由這實驗可以證實在胰島beta-細胞暴露鎘情況下是經由ROS去調控JNK-MAPK-粒線體依賴路徑造成細胞凋亡(Apoptosis)。

內因性路徑其一為粒線體凋亡路徑, 此反應乃依賴細胞核轉錄因子p53來進行(Schuler et al., 2000), 誘發p53引起下游路徑造成細胞凋亡(Apoptosis)。當細胞受到傷害時會誘發p53結合上的Mdm2造成去磷酸化離開, 而導致p53抑制了細胞週期, 另一會使Bad去磷酸化結合Bcl-2, 使得Bcl-2表現下降, 而導致Bax-Bax表現增加成為通道。因此利用即時聚合酶連鎖反應(Real-time Polymerase Chain Reaction ; Real-time PCR)去觀察胰島beta-細胞暴露氯化鎘(CdCl_2)後對於Bcl-2、p53、Bax和Mdm2之mRNA表現(figure 19)。由實驗證實Bcl-2隨氯化鎘(CdCl_2)劑量增加有明顯地降低mRNA表現, 相反之p53與Mdm2明顯地增加mRNA表現。

第柒節 氯化鎘(CdCl_2)造成胰臟胰島beta細胞破壞而造成胰島素分泌與血糖受影響

在細胞實驗確實可證實氯化鎘(CdCl_2)可以造成胰臟胰島beta細胞功能損傷。因此, 我們進一步利用動物實驗去確認細胞實驗結果。雄性ICR鼯鼠給予暴露氯化鎘(CdCl_2) 10 mg/kg/day 1、2、4與6週去觀察血漿中胰島素(plasma insulin)分泌量(figure 20), 另一實驗則是給予雄性鼯鼠口服氯化鎘(CdCl_2) 10mg/kg/day 六週後, 進行口服葡萄糖耐受性測試(OGTT)(figure 21)。由動物實驗證實氯化鎘(CdCl_2)隨時間增加確實會造成血漿中胰島素(plasma insulin)分泌降低與造成實驗鼯鼠葡萄糖不耐受性(glucose intolerance)的增加。

第肆章 討論

鎘 (Cadmium) 在工業使用上主要是用來製造鎳鎘電池和染料(含鎘油漆)，並可作為電鍍金屬和塑膠製造的穩定劑等。鎘污染環境最主要的來源是由工廠將含大量鎘之工業廢水任意排放而進入溪流中，污染了人類的農業灌溉或日常生活的飲用水來源，亦有從有害廢棄場溢出或滲漏出的鎘，會進入土壤或者水中(Sethi et al.,2006)。鎘在環境中不會分解，可經由食物鏈的生物蓄積效應累積在人類所攝食的動、植物或是飲用水中，經由食入的方式進入人體，在人體主要堆積在肝臟、腎臟、骨骼和脂肪組織中。人吃到含高劑量鎘的食物或飲水時，會嚴重刺激胃，引起嘔吐和腹瀉。鎘也具有神經毒性、肝毒性且高度干擾內分泌系統的物質(Adachi et al.,2007; Rikans and Yamono, 2000; Yamanaka et al., 1998)。在鎘污染的地區，當地的居民因為長期暴露在鎘的環境下，患者的肝臟、腎臟及呼吸系統皆出現了衰竭、受損的情形 (Akeson et al.,2005)。此外，鎘也會影響體內鈣離子的再吸收，導致骨中鈣質流失，因此使得病人骨骼變脆容易斷裂、容易變型且疼痛難耐(即所謂的「痛痛病」(Itai-Itai disease))(Hagino et al., 1961; Inaba et al., 2005; Staessen et al., 1999)。而台灣則是近幾年來在彰化地區所發生的鎘米事件，乃是塑膠穩定劑工廠排放廢水至灌溉渠道污染農民用來灌溉農田所使用的灌溉水所致(謝慶芳, 1990)。

在先前的研究報告已指出，鎘會蓄積在胰臟中並且使實驗動物血糖調控不正常、降低血清中胰島素及肝臟中肝糖(glycogen)的含量等糖尿病相關的病徵出現(Bell et al., 1990; Merali and Singhal, 1980)。同時，也有研究指出：長期在精煉工廠工作的工人，其血糖濃度較一般正常人高出許多且血漿中胰島素的含量也較正常人來的低 (Lei et al., 2006)，而產生糖尿病機率也高。糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)是一種身體對於糖類代謝功能不正常而導致血糖過高的疾病，一般分為兩種型態：第一型糖尿病，又稱為胰島素依賴型糖尿病(Insulin-dependent DM)；第二型糖尿病，又稱為胰島素非依賴型糖尿病(Insulin-independent DM)。不論是哪一類型的糖尿病，都會造成患者身體血糖調控的不正常，對葡萄糖的不耐受性增

加，長時間的影響下，會導致身體併發其他許多慢性疾病的產生。但從近幾年來的研究發現：工業化所造成的毒性重金屬污染物為誘發糖尿病發生的重要因素之一。舉例來說，流行病學的研究已指出砷(Arsenic, As)與第二型糖尿病的發生有很大的關連性(Tseng et al., 2000)；處理低劑量的汞(Mercury, Hg)也是可能誘發糖尿病的重要因素之一(Chen et al., 2006)。不過近年來在動物實驗中也發現，鎘會經由食物鏈蓄積而進入到哺乳動物體內，在胰臟中累積而使動物產生糖尿病的徵狀(Merali and Singhal, 1980)；有研究報導指出在暴露重金屬鎘的環境下較易罹患胰臟癌，胰臟癌與第二型糖尿病也已被發現有所關聯(Everhart et al., 1995; Schwartz and Reis, 2000)。此外，目前也有一些流行病學的研究結果指出：根據統計，空腹血糖異常患者(impaired fasting glucose)及糖尿病患者尿液中鎘濃度較正常人高(Schwartz et al., 2003)；而鎘會干擾葡萄糖的代謝平衡，使血液中的血糖濃度上升，造成高血糖症(hyperglycemia)，進而提高引發糖尿病發生的機率(Han et al., 2003)，可得知鎘會造成胰臟胰島beta細胞功能破壞而導致死亡。死亡有分兩種一種是凋亡(apoptosis)，另一種是壞死(necrosis)。所以為了分別細胞是凋亡(apoptosis)還是壞死(necrosis)，選擇了三種實驗方法來證實經由凋亡(apoptosis)分別是利用流式細胞儀(Flow cytometry)去觀察Sub-G1期細胞週期(figure 6)、Annexin V去觀察當細胞進行凋亡(apoptosis)時細胞內磷脂絲氨酸(phosphatidylserine ;PS)從細胞膜內外翻至細胞膜外，但壞死(necrosis)並不會(figure 7)，最後以Hoechst 33258在螢光顯微鏡(fluorescence microscopy)下觀察染劑亮度增加(figure 8)。以上三種實驗均可證實經由凋亡(apoptosis)。

細胞凋亡路徑一種為經由粒線體膜電位不平衡而引發下游一些蛋白質引起凋亡的內在路徑，另一種則是經外在路徑由細胞膜上的死亡訊息傳遞，進而導致細胞走向凋亡。粒線體在細胞凋亡調控中扮演了很重要的角色，有學者發現細胞在進行凋亡前，粒線體膜電位會發生改變，導致膜上一種MPTP(mitochondrial permeability transition pore)的巨大通道打開，膜電位不平衡而調控這些粒線體的

物質釋放，所以利用了DiOC₆是一種可穿透細胞膜，可專一性的結合並累積在細胞粒線體中，其在粒線體膜內外的分布可反應出粒線體膜內外的電位差，其螢光強度的改變就可顯示粒線體膜電位改變情形，可發射出綠色螢光 (green-fluorescent) 之陽離子(cationic dye)親脂性染劑，暴露鎘確實增加了螢光表現，也就是說增加了粒線體膜電位去極化 (figure 11) 而導致粒線體中的蛋白質會大量的釋放至細胞質中 (figure 12)，參與caspase-9,-3,-6,-7的活化和引起其他細胞凋亡的機制，使細胞走向凋亡的路徑。除此之外近幾年來有許多疾病與ROS有相當大關係，粒線體也是細胞中ROS的主要來源，ROS已經被證實影響了含有不同時期的細胞凋亡路徑，例如像誘導粒線體膜通透性、釋放粒線體死亡放大因子、活化caspase與DNA傷害 (Inoue et al., 2004; Le Bras et al., 2005) 誘使cytochrome c 從粒線體釋放於細胞質與活化caspases, p53 (Ueda et al., 2002)。已經有許多證實胰臟胰島細胞b-細胞可能與暴露氧化壓力造成ROS攻擊有關 (Kajimoto and Kaneto, 2004)，因為給予抗氧化酵素如catalase和glutathione peroxidase有明顯使ROS表現降低 (Tiedge et al., 1997)。我們首先觀察活性氧化物質 (ROS) 對人胰臟胰島beta細胞功能，由於細胞內的GSH可保護細胞免於活性氧物質對細胞造成的氧化傷害，而產生毒性的自由基 (Free radicals) 代謝的功能，一旦細胞內的GSH減少，將會造成使細胞暴露於氧化壓力下，而導致細胞內活性氧化物質大量產生，最後引起細胞DNA受損而死亡，已經有許多證實ROS可以造成氧化壓力與影響多種生理和病理過程 (Inoue et al., 2004)。當氯化鎘 (CdCl₂) 刺激胰臟胰島beta細胞造成氧化物質上升與受大量的鈣離子釋放出來及膜的通透性改變時，導致粒線體膜電位下降，促使許多粒線體內的物質釋放出來至細胞質當中，其中包括許多促凋亡的蛋白質釋放，例如：(1)cytochrome c、(2)caspase、(3)AIF、(4)Endo G、(5)Smac/DIABLO等，這些蛋白質可直接或間接促使細胞產生凋亡之情形以誘導下游一連串caspase的反應因而走向凋亡，並且Kajimoto和Kaneto已經進一步觀察到胰臟胰島beta-細胞功能破壞造成糖尿病之原因包含了氧化壓力與隨後引起活化的c-Jun N-terminal kinase (JNK) 路徑 (Kajimoto and Kaneto, 2004)。

但是 ROS 與 mitogen-activated protein (MAP) kinases 兩者之間關係尚未清楚，而在我們研究發現到利用 MTT assay 證實氯化鎘(CdCl_2)可以誘導胰臟胰島 beta-細胞死亡(figure 1)導致功能破壞與利用流式細胞儀(Flow cytometry)去觀察細胞凋亡透過 ROS 調控粒線體依賴性細胞死亡路徑(figure 9)包含用 Isulin ELISA 看到氯化鎘(CdCl_2)抑制胰島素分泌(figure 2)、誘導細胞死亡、增加脂質過氧化層次(figure 10)、活化 mitogen-activated protein (MAP) kinases 中 JNK、ERK 與 p38 磷酸化，但唯有 mitogen-activated protein (MAP) kinases 中 JNK 會去調控氯化鎘(CdCl_2)對胰臟胰島 beta-細胞死亡，其他並不會影響 (figure 3)，在於粒線體會經由 Bcl-2 調控，利用 real-time PCR 去觀看 Bcl-2 mRNA 表現與當 DNA 受到傷害時會活化 p53 磷酸化與 Mdm2 去磷酸化(figure 20)。由於凋亡(apoptosis)會造成膜電位去極化導致粒線體膜通透性增加使釋放 cytochrome c 從粒線體裡移至細胞質，所以利用 RIN-m5F 細胞給予氯化鎘(CdCl_2)結果確實發現到粒線體膜電位去極化以致於粒線體膜通透性增加使釋放 cytochrome c 從粒線體裡移至細胞質、下游活化 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)蛋白質(figure 14)降解 caspase 3 蛋白酶(figure 15)。

而給予 N-acetyl-L-cysteine(NAC)抗氧化劑或是 JNK 抑制劑(SP600125)可以抑制氯化鎘(CdCl_2)造成細胞凋亡，由我實驗之前結果發現到是 mitogen-activated protein (MAP) kinases 中唯有 JNK 磷酸化才可以藉由氯化鎘(CdCl_2)去誘導胰臟胰島 beta-細胞凋亡，而我們實驗也證實 ROS 也會造成胰臟胰島 beta-細胞凋亡，給予氯化鎘(CdCl_2)也可以誘導 ROS 產生，至於 ROS 與 JNK 有何關聯可以從我們實驗利用流式細胞儀(Flow cytometry)發現到是 ROS 去調控下游 JNK 磷酸化造成胰臟胰島 beta-細胞凋亡(figure 19)。總結，我們可以推斷出環境中含有暴露氯化鎘(CdCl_2)污染可能是造成糖尿病重要風險因子會導致 ROS 產生去造成 JNK 磷酸化去調控凋亡(apoptosis)中之粒線體路徑(figure 23)，最後造成胰臟胰島 beta-細胞凋亡而無法分泌胰島素(insulin)。

第五章 結論與建議

台灣洗腎人口約有 5、6 萬人，其中糖尿病人即占 4 成，國衛院為探討糖尿病與腎病變的流行病學，於 2003 年起針對台北、桃園、台中、台南、高雄地區，36 家社區診所的 30 至 70 歲罹患第二型糖尿病人，進行約四年追蹤研究，樣本數約 1100 人；結果發現，糖尿病病人罹患初期腎病變盛行率高達 27.4%，平均每四名糖尿病患，就有一人發生初期腎病變。

近幾年來也有研究指出吸菸者逐漸增加，而香菸的煙霧也是主要暴露來源之一(Bernard and Lauwerys., 1984; Jarup et al., 1998)。根據國衛院最新研究顯示抽菸的糖尿病人，出現腎病變的風險增加 8 倍之多，目前台灣洗腎人口共約 5 至 6 萬人。造成糖尿病患洗腎的危險因素中，抽菸占了重要的角色。

另外國家衛生研究院證實抽菸會造成心梗塞、中風，因為抽菸會使血管的滲透性不好，容易出現動脈硬化，而且抽菸會使血液循環功能不正常，以及不能過濾蛋白質，導致蛋白尿得由腎臟過濾，因而容易導致腎病變；所以，糖尿病人應有健康的生活習慣，不要抽菸，且應多增進認知對疾病的照護品質，可使糖尿病人罹患腎病變的機率下降。

早期的動物實驗中發現，鎘也可能累積在胰臟中並且使實驗動物血糖顯著增加、降低血清中胰島素及肝臟中肝糖(glycogen)的含量等糖尿病的徵狀(Bell et al., 1990; Merali and Singhal, 1980)。而最近的研究也指出：長期在精煉工廠工作的工人，其血液中的血糖濃度較一般正常人高(類似高血糖症狀)且血漿中胰島素的量也有顯著的降低(Lei et al., 2006)。基於這些研究結果，讓我們推測鎘可能是引發糖尿病病徵的重要危險因子之一。然而，我們實驗中證實了氯化鎘(CdCl_2)會造成胰臟胰島 beta 細胞受到傷害，並抑制細胞的增生，造成 p53 的表現使細胞週期停止於 G0/G1 期，而也証實鎘在粒線體路徑中的主要 Bcl-2 表現量減少及過透

粒線體膜電位去極化而導致細胞色素 C (cytochrome c) 從粒線體釋放於細胞質，下游活化 caspase-3 和-7，並且導致 PARP 的裂解都可以證實內在路徑的活化。之前文獻已指出氯化鎘(CdCl_2)會造成 mitogen-activated protein (MAP) kinases 中 JNK 會磷酸化(Kajimoto and Kaneto, 2004)，確實於我們實驗中，唯有 mitogen-activated protein (MAP) kinases 中 JNK 才會去調控粒線體凋亡路徑。ROS 表現量上升也會直接作用於粒線體上，導致細胞走向粒線體凋亡路徑。因此鎘會藉由抑制細胞週期的進行使得細胞增生、分裂停止，並藉由活化粒線體凋亡路徑及 ROS 增加，導致胰臟胰島細胞 RIN-m5f 走向細胞凋亡。並且經由我們實驗也證實氯化鎘(CdCl_2)是先由 ROS 釋放出再去影響 mitogen-activated protein (MAP) kinases 中 JNK，最後再由 JNK 磷酸化去調控粒線體依賴性之細胞凋亡路徑。

綜合以上，鎘會經由 ROS-JNK-MAPK 路徑造成胰島 beta-細胞功能損傷以及細胞凋亡的情形發生。因此我們推論鎘在環境中，可能是造成糖尿病發生的重要危險因子之一。



第陸章 參考文獻

- 謝慶芳 (1990) 土壤中鎘含量與水稻植物體不同部位鎘濃度變化之研究 台中區農業改良場研究彙報 29:11-27
- Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, and C. W. Akey (2002), "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation", *Mol Cell* 9 (2):423-432.
- Adachi, K., T. Dote, E. Dote, G. Mitsui, and K. Kono (2007), "Strong acute toxicity, severe hepatic damage, renal injury and abnormal serum electrolytes after intravenous administration of cadmium fluoride in rats", *J Occup Health* 49 (3):235-241.
- Akesson, A., T. Lundh, M. Vahter, P. Bjellerup, J. Lidfeldt, C. Nerbrand, G. Samsioe, U. Stromberg, and S. Skerfving (2005), "Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure", *Environ Health Perspect* 113 (11):1627-1631.
- Bell, R. R., J. L. Early, V. K. Nonavinakere, and Z. Mallory (1990), "Effect of cadmium on blood glucose level in the rat", *Toxicol Lett* 54 (2-3):199-205.
- Bernard, A., and R. Lauwerys (1984), "Cadmium in human population", *Experientia* 40 (2):143-152.
- Bonithon-Kopp, C., G. Huel, T. Moreau, and R. Wendling (1986), "Prenatal exposure to lead and cadmium and psychomotor development of the child at 6 years", *Neurobehav Toxicol Teratol* 8 (3):307-310.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang (1999), "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis", *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-290.
- Cecconi, F., and P. Gruss (2001), "Apaf1 in developmental apoptosis and cancer: how

- many ways to die?" Cell Mol Life Sci 58 (11):1688-1697.*
- Chen, Y. W., C. F. Huang, K. S. Tsai, R. S. Yang, C. C. Yen, C. Y. Yang, S. Y. Lin-Shiau, and S. H. Liu (2006), "The role of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling in low-dose mercury-induced mouse pancreatic beta-cell dysfunction in vitro and in vivo", *Diabetes 55 (6):1614-1624.*
- Evans, J., and L. Hastings (1992), "Accumulation of Cd(II) in the CNS depending on the route of administration: intraperitoneal, intratracheal, or intranasal", *Fundam Appl Toxicol 19 (2):275-278.*
- Everhart, J., and D. Wright (1995), "Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis", *Jama 273 (20):1605-1609.*
- Feng, S., S. E. Plunkett, K. Lam, S. Kapur, R. Muhammad, Y. Jin, M. Zimmermann, P. Mendes, R. Kinser, and H. J. Roethig (2007), "A new method for estimating the retention of selected smoke constituents in the respiratory tract of smokers during cigarette smoking", *Inhal Toxicol 19 (2):169-179.*
- Gabbiani, G., D. Baic, and C. Deziel (1967), "Toxicity of cadmium for the central nervous system", *Exp Neurol 18 (2):154-160.*
- Goldstein, J. C., N. J. Waterhouse, P. Juin, G. I. Evan, and D. R. Green (2000), "The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant", *Nat Cell Biol 2 (3):156-162.*
- Goodlett, C. R., and K. H. Horn (2001), "Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system", *Alcohol Res Health 25 (3):175-184.*
- Gupta, S., A. Agrawal, S. Agrawal, H. Su, and S. Gollapudi (2006), "A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis", *Immun Ageing 3:5.*
- Han, J. C., S. Y. Park, B. G. Hah, G. H. Choi, Y. K. Kim, T. H. Kwon, E. K. Kim, M. Lachaal, C. Y. Jung, and W. Lee (2003), "Cadmium induces impaired glucose

- tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes*", *Arch Biochem Biophys* 413 (2):213-220.
- Hengartner, M. O. (2000), "The biochemistry of apoptosis", *Nature* 407 (6805):770-776.
- Hulleman, E., and J. Boonstra (2001), "Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix", *Cell Mol Life Sci* 58 (1):80-93.
- Inoue, M., E. F. Sato, M. Nishikawa, K. Hiramoto, A. Kashiwagi, and K. Utsumi (2004), "Free radical theory of apoptosis and metamorphosis", *Redox Rep* 9 (5):237-247.
- Ip, S. W., H. C. Wei, J. P. Lin, H. M. Kuo, K. C. Liu, S. C. Hsu, J. S. Yang, Dueyang Mei, T. H. Chiu, S. M. Han, and J. G. Chung (2008), "Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells", *Anticancer Res* 28 (2A):833-842.
- Jarup, L., M. Berglund, C. G. Elinder, G. Nordberg, and M. Vahter (1998), "Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate", *Scand J Work Environ Health* 24 Suppl 1:1-51.
- Kajimoto, Y., and H. Kaneto (2004), "Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction", *Ann NY Acad Sci* 1011:168-176.
- Kim, S. D., C. K. Moon, S. Y. Eun, P. D. Ryu, and S. A. Jo (2005), "Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis", *Biochem Biophys Res Commun* 328 (1):326-334.
- Korpela, H., R. Loueniva, E. Yrjanheikki, and A. Kauppila (1986), "Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes", *Am J Obstet Gynecol* 155 (5):1086-1089.
- Lafuente, A., and A. I. Esquifino (1999), "Cadmium effects on hypothalamic activity

- and pituitary hormone secretion in the male", Toxicol Lett 110 (3):209-218.*
- Le Bras, M., M. V. Clement, S. Pervaiz, and C. Brenner (2005), "Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death", Histol Histopathol 20 (1):205-219.*
- Lee, A. S. (1992), "Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family", Curr Opin Cell Biol 4 (2):267-273.*
- Lei, L. J., T. Y. Jin, and Y. F. Zhou (2006), "[The effects of cadmium on the levels of insulin in smelters]", Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi 24 (1):3-6.*
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan (1998), "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis", Cell 94 (4):491-501.*
- Mari, M., A. Colell, A. Morales, C. von Montfort, C. Garcia-Ruiz, and J. C. Fernandez-Checa "Redox Control of Liver Function in Health and Disease", Antioxid Redox Signal.*
- Masud, A., A. Mohapatra, S. A. Lakhani, A. Ferrandino, R. Hakem, and R. A. Flavell (2007), "Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis", J Biol Chem 282 (19):14132-14139.*
- Matsuda, H., F. R. Strelbel, T. Kaneko, L. C. Stephens, L. L. Danhauser, G. N. Jenkins, N. Toyota, and J. M. Bull (1996), "Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma", Anticancer Res 16 (3A):1117-1121.*
- Merali, Z., and R. L. Singhal (1980), "Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats", Br J Pharmacol 69 (1):151-157.*
- Monroe, R. K., and S. W. Halvorsen (2006), "Cadmium blocks receptor-mediated*

- Jak/STAT signaling in neurons by oxidative stress*", *Free Radic Biol Med* 41 (3):493-502.
- Nakagawa, T., and J. Yuan (2000), "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis", *J Cell Biol* 150 (4):887-894.
- Nigg, E. A. (1995), "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle", *Bioessays* 17 (6):471-480.
- Nishihara, T. (1979), "Growth and sporulation of auxotrophs of *Bacillus subtilis* in a medium with limited nutrients", *Microbiol Immunol* 23 (8):727-734.
- Okuda, B., Y. Iwamoto, H. Tachibana, and M. Sugita (1997), "Parkinsonism after acute cadmium poisoning", *Clin Neurol Neurosurg* 99 (4):263-265.
- Pande, B. N., E. Kryszyska-Traczyk, Z. Prazmo, C. Skorska, J. Sitkowska, and J. Dutkiewicz (2000), "Occupational biohazards in agricultural dusts from India", *Ann Agric Environ Med* 7 (2):133-139.
- Raffray, M., and G. M. Cohen (1997), "Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?" *Pharmacol Ther* 75 (3):153-177.
- Rice, D., and S. Barone, Jr. (2000), "Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models", *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:511-533.
- Rikans, L. E., and T. Yamano (2000), "Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity", *J Biochem Mol Toxicol* 14 (2):110-117.
- Schuler, M., E. Bossy-Wetzler, J. C. Goldstein, P. Fitzgerald, and D. R. Green (2000), "p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release", *J Biol Chem* 275 (10):7337-7342.
- Schwartz, G. G., D. Il'yasova, and A. Ivanova (2003), "Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III", *Diabetes Care* 26 (2):468-470.

- Schwartz, G. G., and I. M. Reis (2000), "Is cadmium a cause of human pancreatic cancer?" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (2):139-145.
- Searle, J., J. F. Kerr, and C. J. Bishop (1982), "Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance", *Pathol Annu* 17 Pt 2:229-259.
- Sethi, P. K., and D. Khandelwal (2006), "Cadmium exposure: health hazards of silver cottage industry in developing countries", *J Med Toxicol* 2 (1):14-15.
- Shukla, G. S., J. Chiu, and B. A. Hart (2000), "Cadmium-induced elevations in the gene expression of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung and alveolar epithelial cells", *Toxicology* 151 (1-3):45-54.
- Smith, M. L., and A. J. Fornace, Jr. (1996), "Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis", *Mutat Res* 340 (2-3):109-124.
- Staessen, J. A., H. A. Roels, D. Emelianov, T. Kuznetsova, L. Thijs, J. Vangronsveld, and R. Fagard (1999), "Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group", *Lancet* 353 (9159):1140-1144.
- Thatcher, R. W., R. McAlaster, and M. L. Lester (1984), "Evoked potentials related to hair cadmium and lead in children", *Ann N Y Acad Sci* 425:384-390.
- Tiedge, M., S. Lortz, J. Drinkgern, and S. Lenzen (1997), "Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells", *Diabetes* 46 (11):1733-1742.
- Tseng, C. H., T. Y. Tai, C. K. Chong, C. P. Tseng, M. S. Lai, B. J. Lin, H. Y. Chiou, Y. M. Hsueh, K. H. Hsu, and C. J. Chen (2000), "Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in

- arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan*", *Environ Health Perspect* 108 (9):847-851.
- Tuchweber, B., and G. Gabbiani (1967), "Effect of sodium pyrophosphate on experimental soft-tissue calcification and hypercalcemia", *Can J Physiol Pharmacol* 45 (6):957-964.
- Williams, W. R., S. Kagamimori, M. Watanabe, T. Shinmura, and N. Hagino (1983), "An immunological study on patients with chronic cadmium disease", *Clin Exp Immunol* 53 (3):651-658.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang (1997), "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked", *Science* 275 (5303):1129-1132.
- Yokouchi, M., N. Hiramatsu, K. Hayakawa, A. Kasai, Y. Takano, J. Yao, and M. Kitamura (2007), "Atypical, bidirectional regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response", *Cell Death Differ* 14 (8):1467-1474.
- Zhai, M., and Q. Shang (2007), "[Research advance of environmental cadmium exposure on human health damage]", *Wei Sheng Yan Jiu* 36 (2):255-257.
- Zielonka, V. S., and D. Gmyrek (1989), "[Neuropsychiatric disorders in newborn infants with very low birth weight (VLBW infants)--before and following introduction of modern perinatal medicine. 1. Overview of the problem, criteria for quality of survival, major CNS disorders (major handicap)]", *Kinderarztl Prax* 57 (6):255-261.
- Zieske, J. D., C. M. Francesconi, and X. Guo (2004), "Cell cycle regulators at the ocular surface", *Exp Eye Res* 78 (3):447-456.

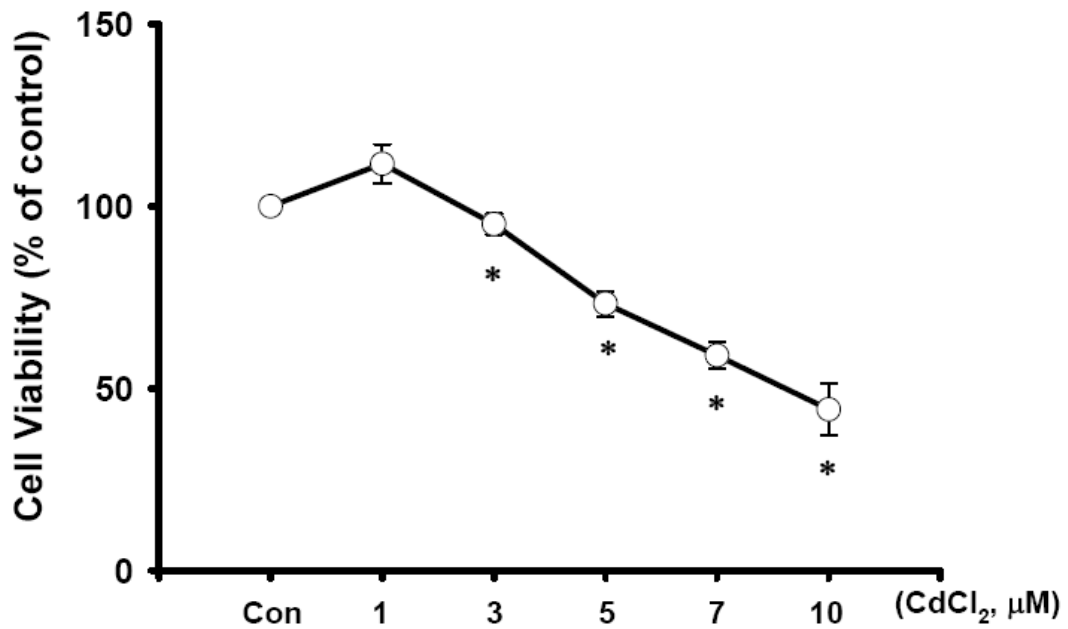


Figure 6. Cadmium-induced cytotoxicity in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 1, 3, 5 and 10 µM) for 24h by MTT assay. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control.

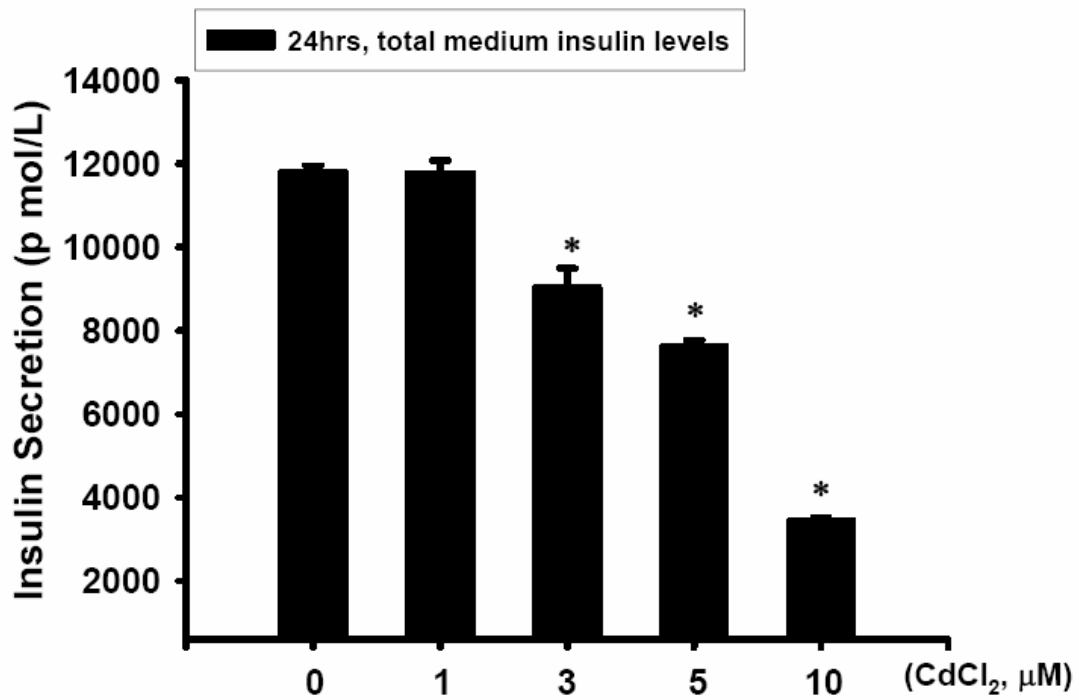


Figure 7. Cadmium on insulin secretion in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 1, 3, 5 and 10 μM) for 24 h by insulin assay. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control.

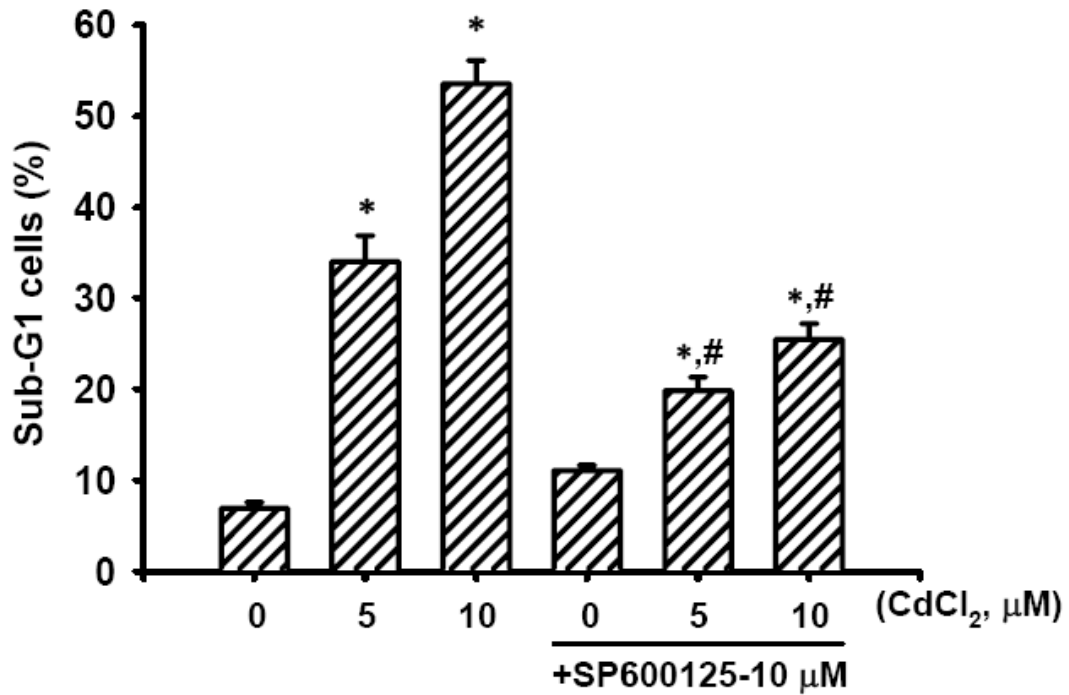


Figure 8.Flow cytometric analysis showing effects of cadmium on the cell cycle of RIN-m5F cells.

RIN-m5F Cells were treated with or without cadmium (5 and 10 μM) for 24 h in the presence or absence of JNK inhibitor (SP600125, 10 μM). Cells with genomic DNA fragmentation (sub-G1 DNA content). All data are presented as means ± SEM for three independent experiments with triplicate determinations. *P < 0.05 as compared with control. #P < 0.05 as compared with cadmium alone.

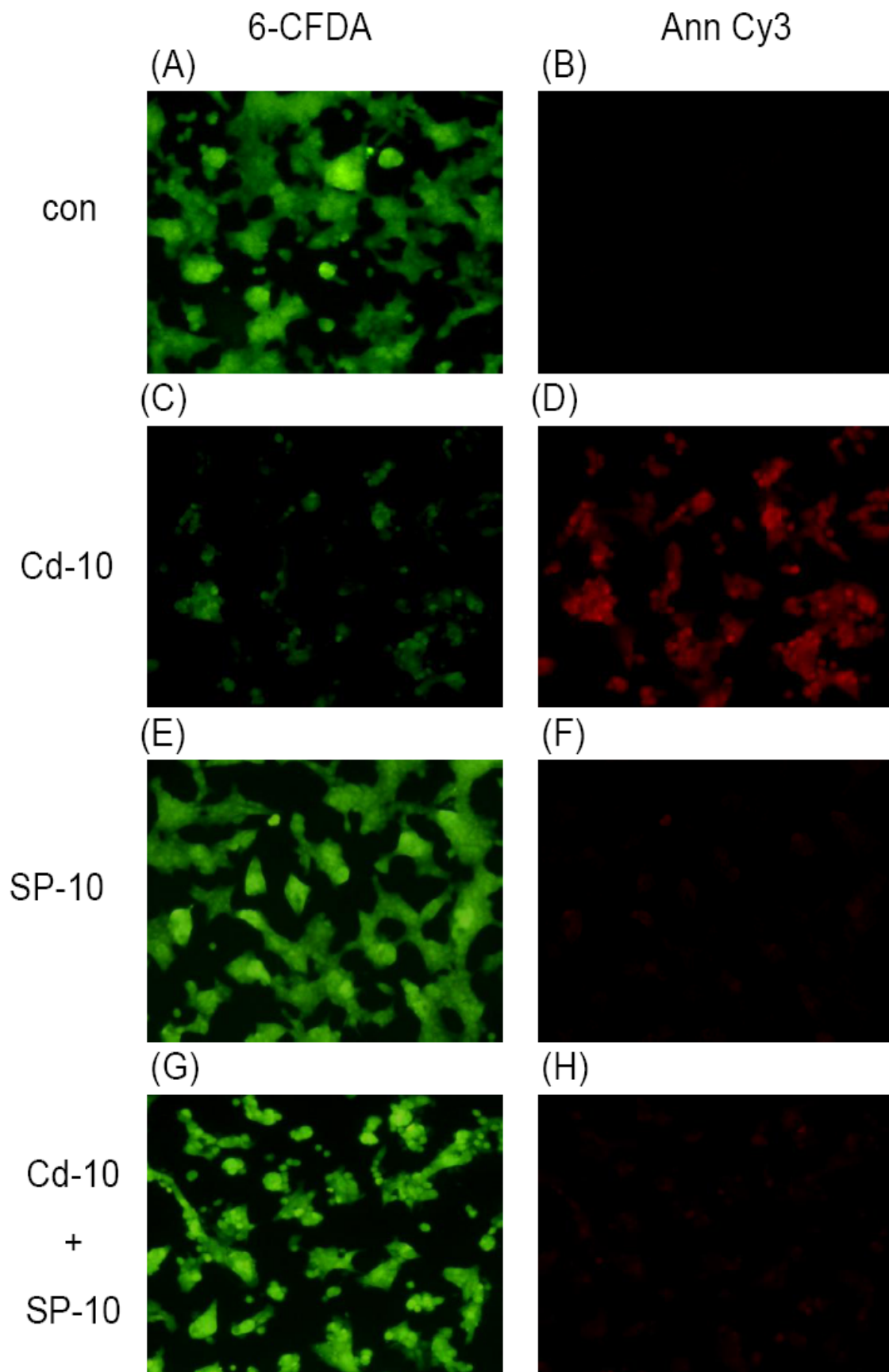
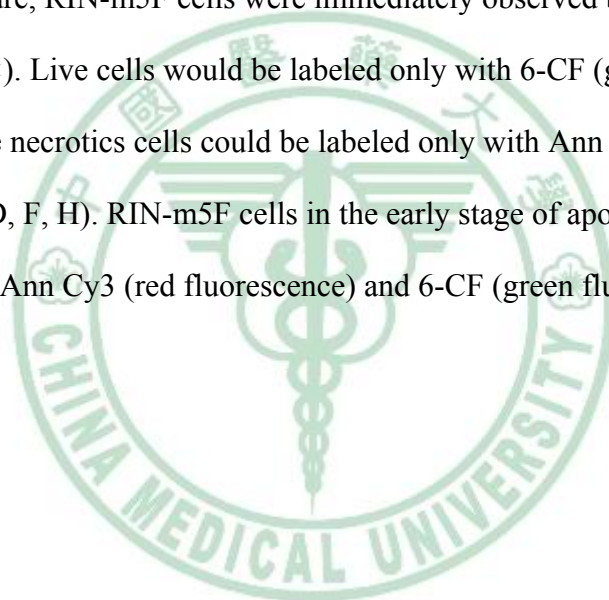


Figure 9. Effect of cadmium on the morphology of pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed to different concentrations of cadmium for 24 h, (A and B) Control, (C and D) cadmium (10 μ M), (E and F) JNK inhibitor(SP600125, 10 μ M), (G and F) RIN-m5F cells were exposed with cadmium (10 μ M) in the presence of JNK inhibitor(SP600125, 10 μ M). Apoptosis cells could be differentiated from necrotic cells by incubated with Ann Cy3 and 6-CFDA simultaneously. After labeled at room temperature, RIN-m5F cells were immediately observed by fluorescence microscopy (200 \times). Live cells would be labeled only with 6-CF (green fluorescence, A, C, E, G), while necrotics cells could be labeled only with Ann Cy3 (red fluorescence, B, D, F, H). RIN-m5F cells in the early stage of apoptosis would be labeled with both Ann Cy3 (red fluorescence) and 6-CF (green fluorescence).



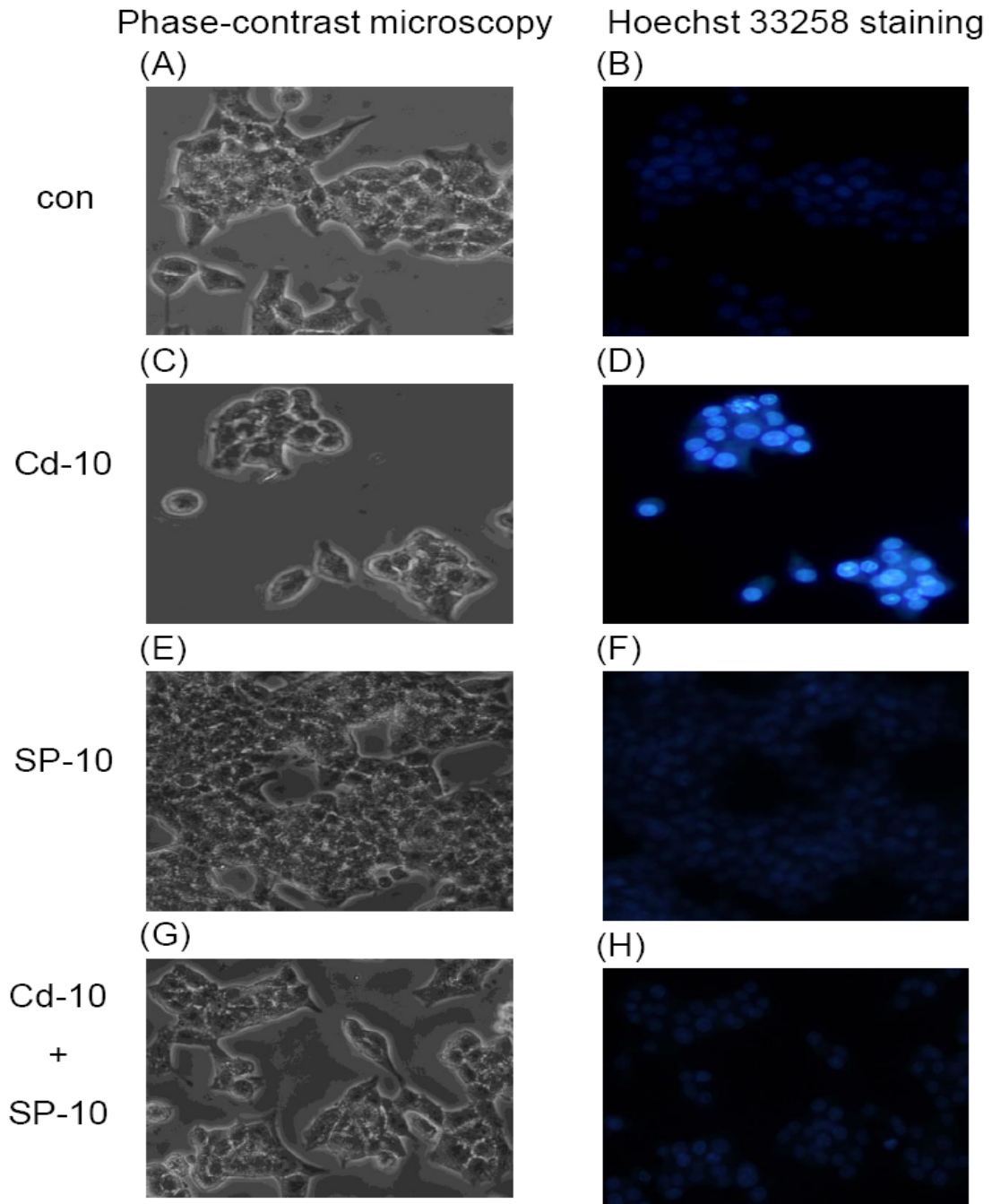


Figure 10. Induction of nuclear condensation after exposure to cadmium.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5 and 10 μ M) in the presence or absence of JNK inhibitor (SP600125, 10 μ M) by phase-contrast microscopy (left side) and Hoechst staining (right side)

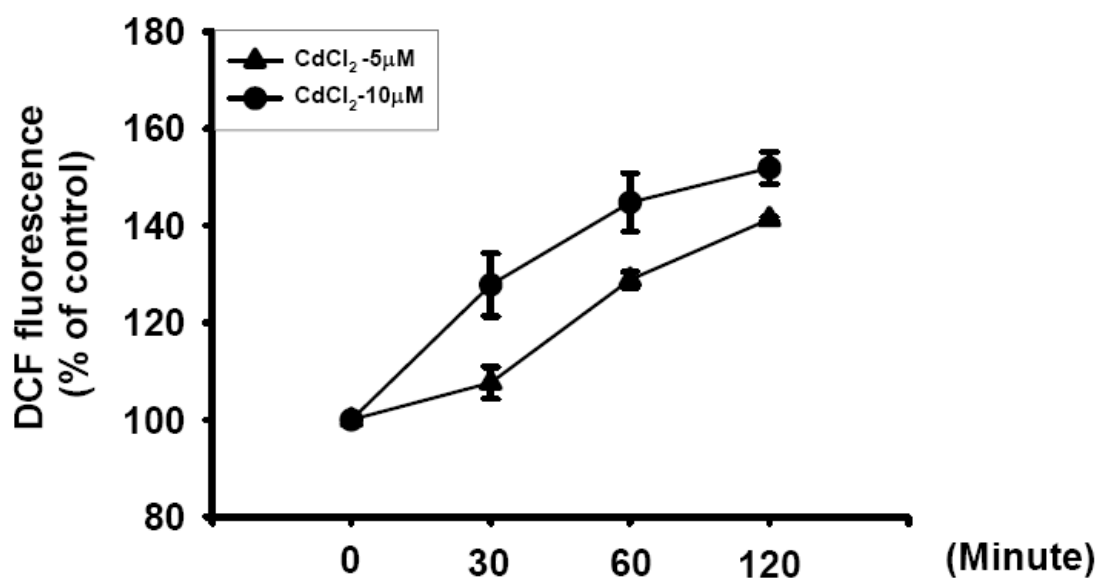


Figure 11. Cadmium on reactive oxygen species (ROS) generation in RIN-m5f cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (5, and 10 μM) for 30, 60, and 120 min, and ROS were determined by flow cytometry. All data are presented as means ± SEM for three independent experiments with triplicate determinations.

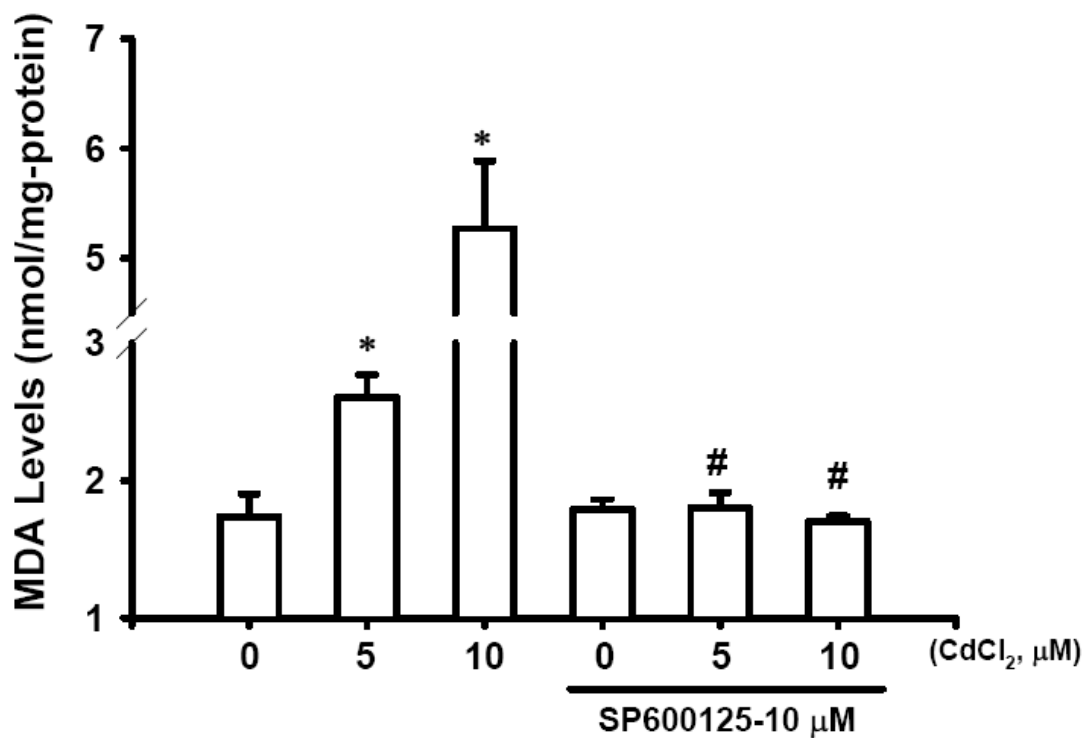


Figure 12. JNK-inhibitor suppress cadmium-induced oxidative damage to membrane lipid by lipid peroxidation (LPO) assay in RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5 and 10 μM) in the presence or absence of JNK inhibitor (SP600125, 10 μM) by flow cytometry. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control. #P<0.05 as compared with CdCl₂ alone.

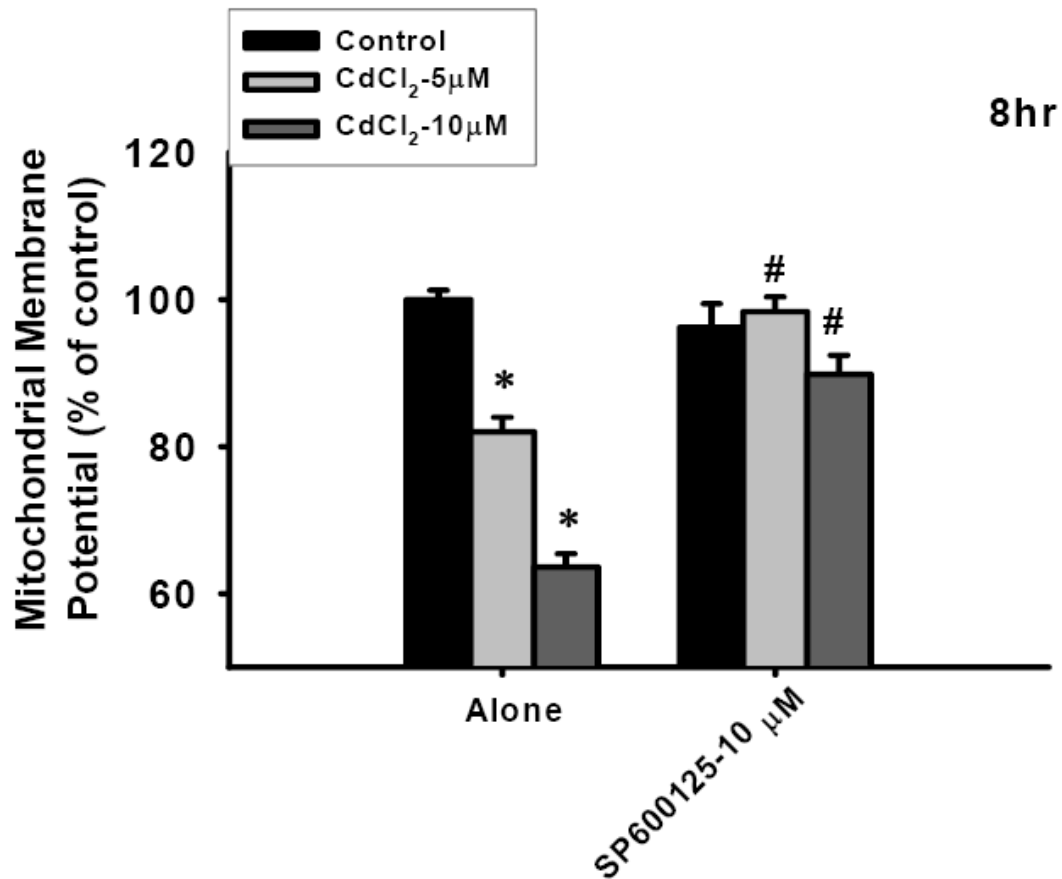


Figure 13. Analysis of mitochondrial membrane potential (MMP) in cadmium-treated RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, and 10 μM) in the presence or absence of JNK inhibitor (SP600125, 10 μM) for 8 h, and MMP was determined by flow cytometry. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control. #P<0.05 as compared with CdCl₂ alone.

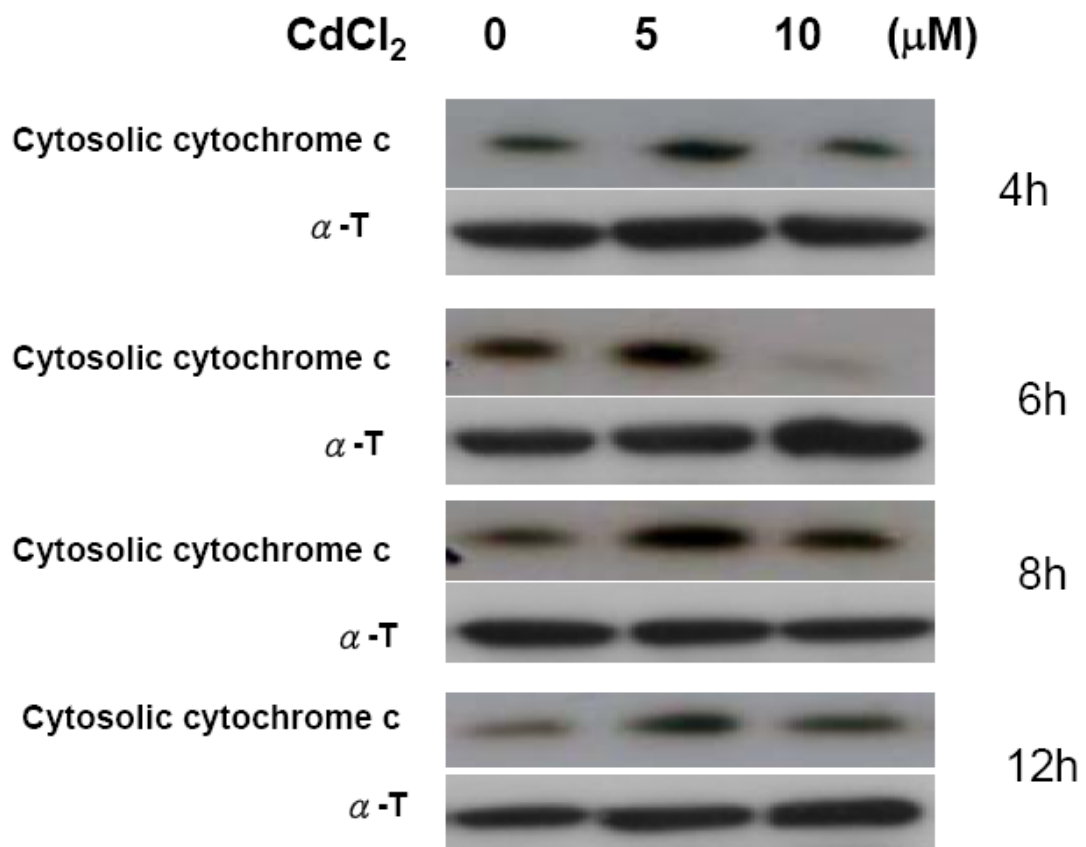


Figure 14. Effects of cadmium-induced cytosolic cytochrome c release in RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium for various dose-depend (0, 5, 10 μM), and proteins expression of cytosolic cytochrome c was determined by western blot analysis. Data are representative of three independent experiments

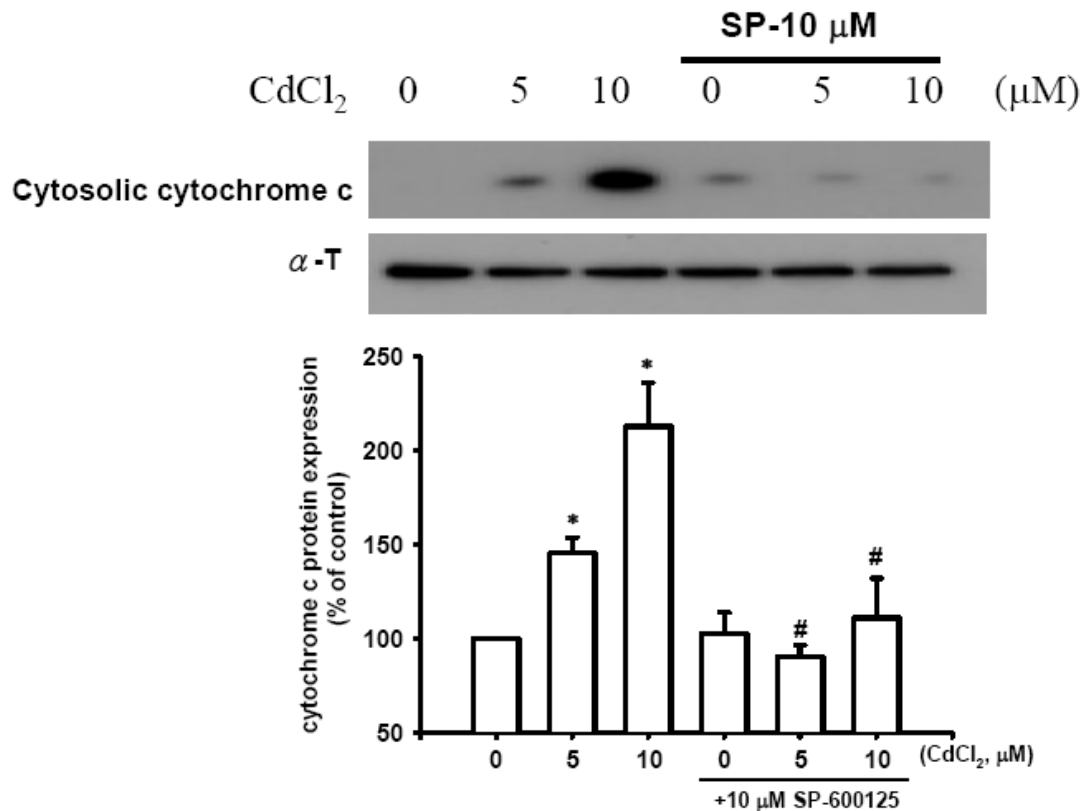


Figure 15. JNK-inhibitor suppress cadmium-induced cytosolic cytochrome c release in RIN-m5F cells.

(A) Upper data was RIN-m5F cells were exposed with cadmium for various dose-depend (0, 5, 10 μ M) in the presence or absence of the JNK inhibitor (SP600125, 10 μ M) to investigate proteins expression of cytosolic cytochrome c was determined by western blot analysis. Data are representative of three independent experiments
 (B) Below data was Quantitative cytochrome c protein expression. Data are presented as means \pm S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control. #P<0.05 as compared with CdCl₂ alone.

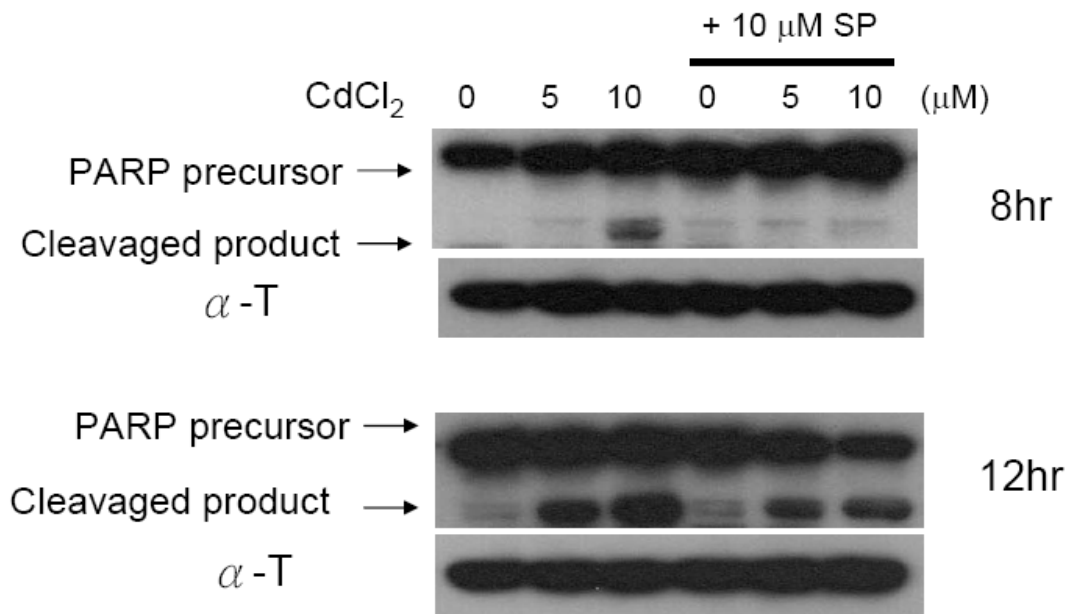


Figure 16. JNK-inhibitor suppress Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in cadmium-treated RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, 10 μM) in the presence or absence of the JNK inhibitor (SP600125, 10 μM) for 8 h and 12 h to investigate proteins expression of PARP and cytochrome c release was analyzed by western blot. Data are representative of three independent experiments.

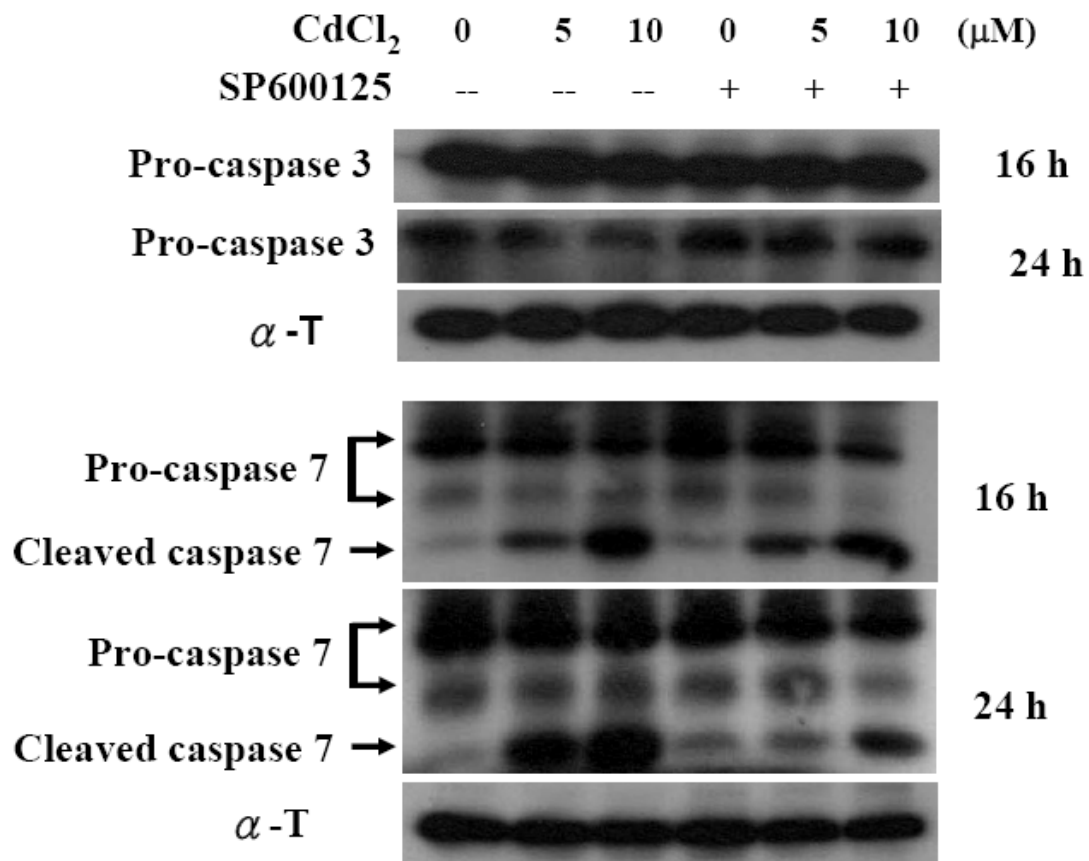


Figure 17. JNK-inhibitor suppress caspase-3 and caspase-7 activation in cadmium-treated RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, 10 μ M) in the presence or absence of the JNK inhibitor (SP600125, 10 μ M) for 16 h and 24 h to investigate proteins expression of caspase 3 and caspase-7 phosphorylation were determined by western blot analysis. Data are representative of three independent experiments.

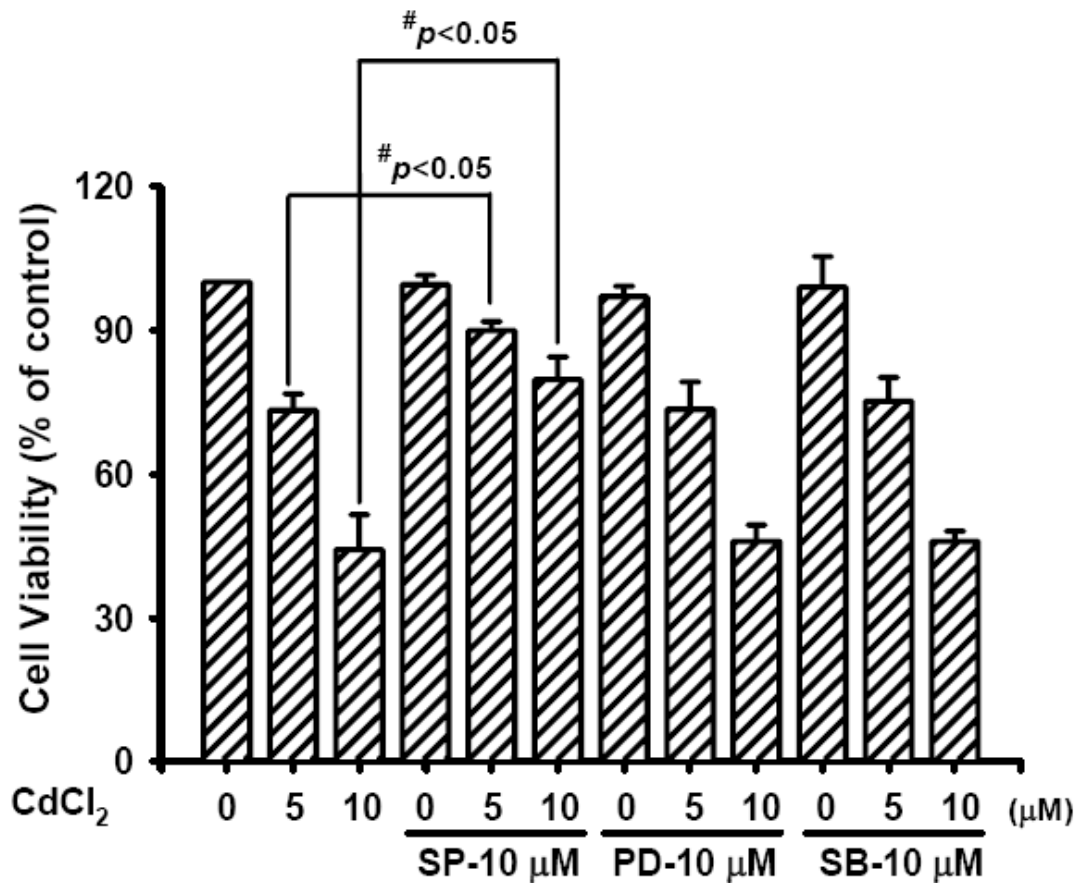


Figure 18. Mitogen -activated protein (MAP) kinases are relationship to cadmium-induced cytotoxicity in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, 10 μM) in the presence or absence of JNK inhibitor (SP600125, 10 μM), P38 inhibitor (SB203580, 10 μM) and ERK inhibitor (PD98059, 10 μM) for 24h by MTT assay. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. #P<0.05 as compared with control.

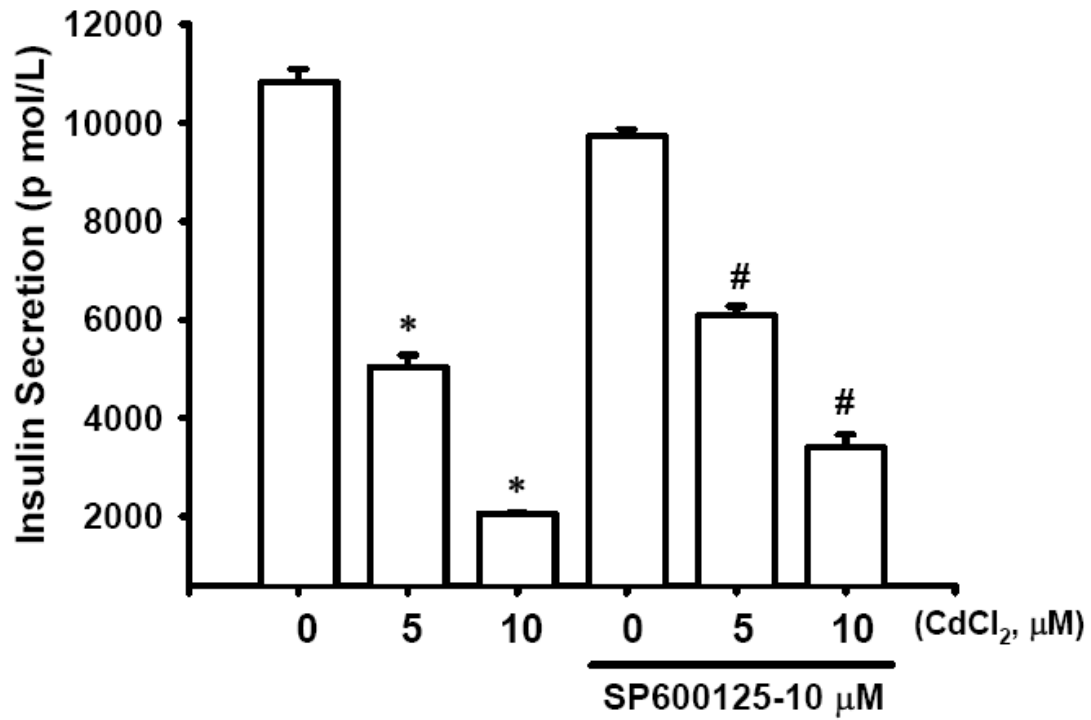


Figure 19. JNK-inhibitor suppress the cadmium induced insulin secretion in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, 10 μM) in the presence or absence of JNK inhibitor (SP600125, 10 μM) for 24h by insulin assay. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control. #P<0.05 as compared with CdCl₂ alone.

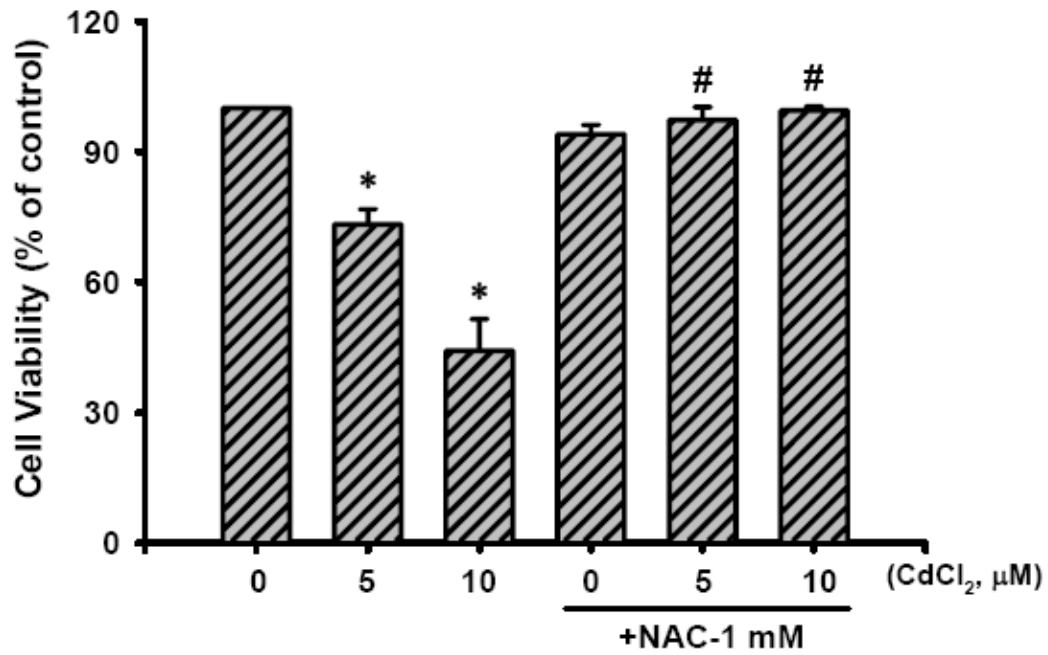


Figure 20. N-acetyl-L-cysteine (NAC) suppress the cadmium-induced cytotoxicity in pancreatic beta-cell derived RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, 10 μM) in the presence or absence of N-acetyl-L-cysteine (NAC, 1 mM) for 24h by MTT assay. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control. #P<0.05 as compared with CdCl₂ alone.

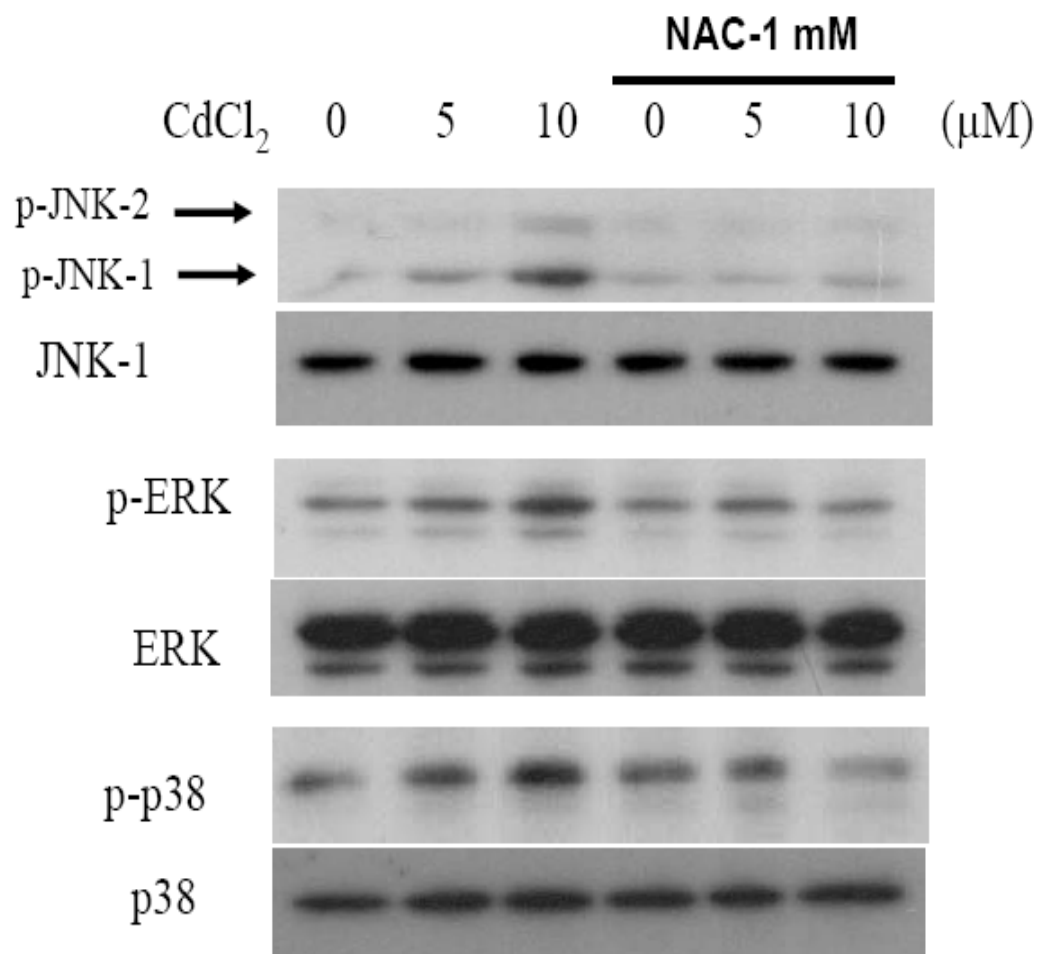


Figure 21. N-acetyl-L-cysteine(NAC) suppress on the phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in cadmium-treated RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were treated with CdCl₂ (0, 5, and 10 μM) in the presence or absence of N-acetyl-L-cysteine (NAC, 1 mM) for 30 min, and JNK, ERK1/2, p38 phosphorylation was analyzed by western blot. Data are representative of three independent experiments.

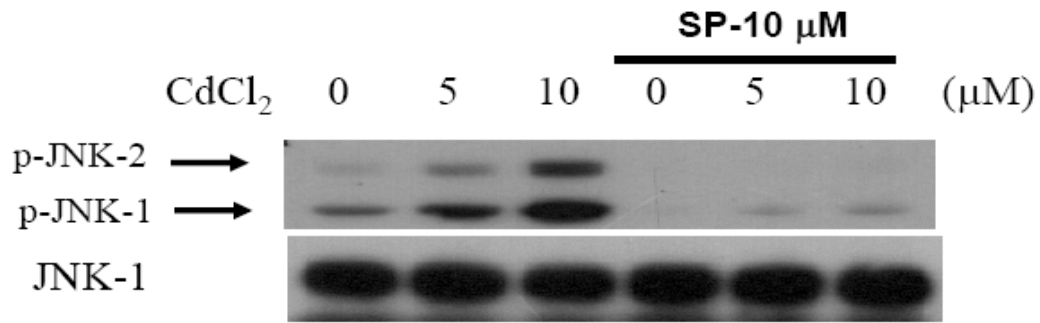
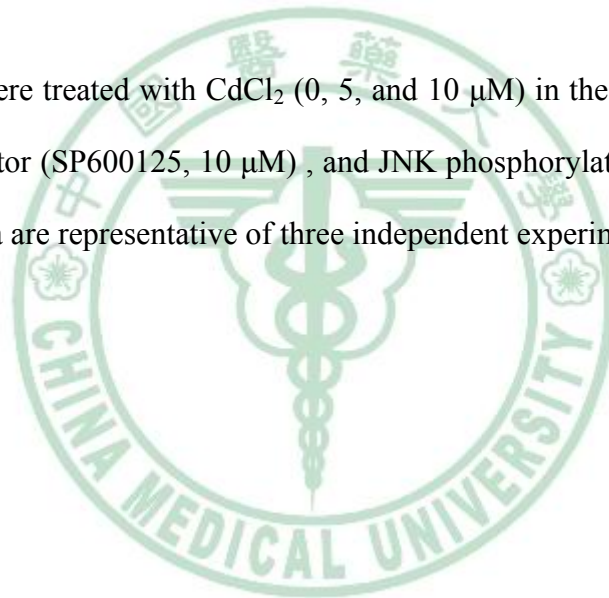


Figure 22. JNK-inhibitor suppress on the phosphorylation of JNK in cadmium-treated RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were treated with CdCl₂ (0, 5, and 10 μM) in the presence or absence of the JNK inhibitor (SP600125, 10 μM), and JNK phosphorylation was analyzed by western blot. Data are representative of three independent experiments.



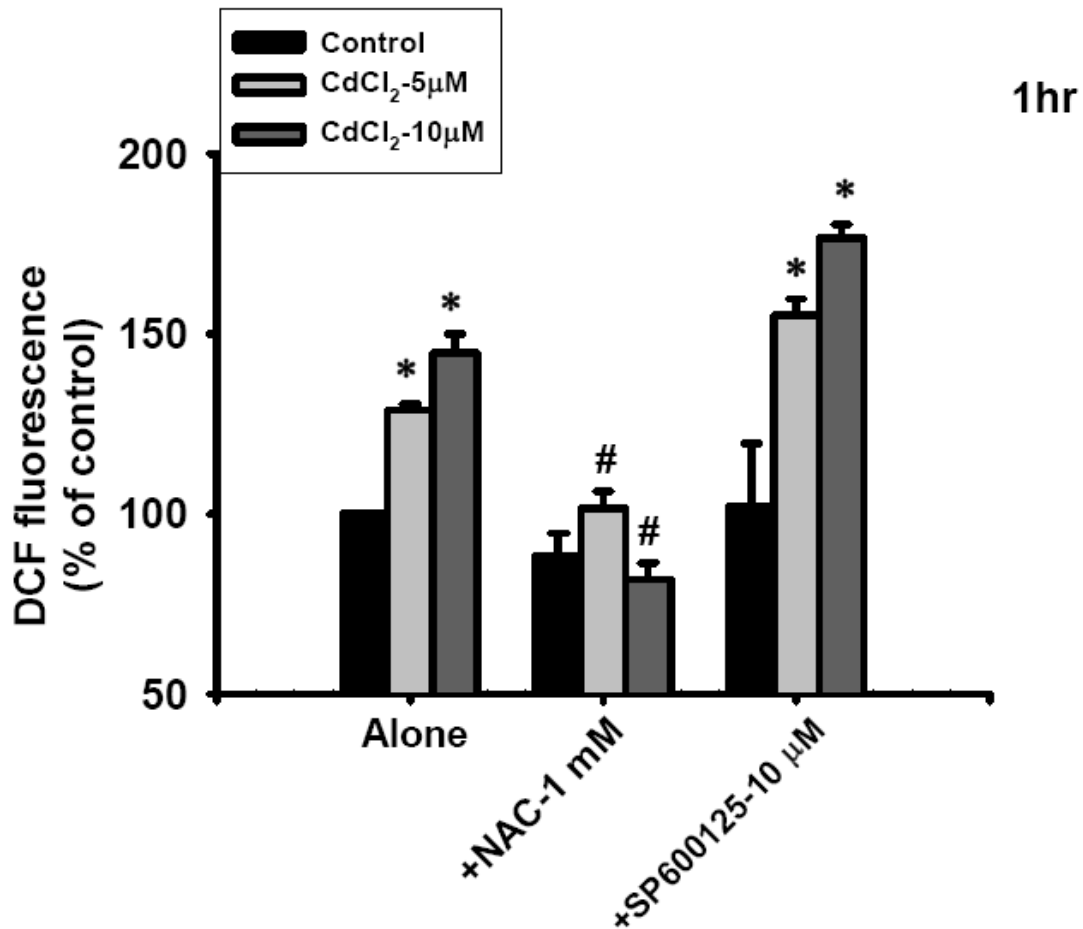


Figure 23. Analysis of mitochondrial membrane potential (MMP) in JNK inhibitor compares with N-acetyl-L-cysteine (NAC) RIN-m5F cells.

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, and 10 μM) in the presence of the JNK inhibitor (SP600125, 10 μM) and N-acetyl-L-cysteine (NAC, 1 mM) for 1hr, and MMP was determined by flow cytometry. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control. #P<0.05 as compared with pretreat NAC.

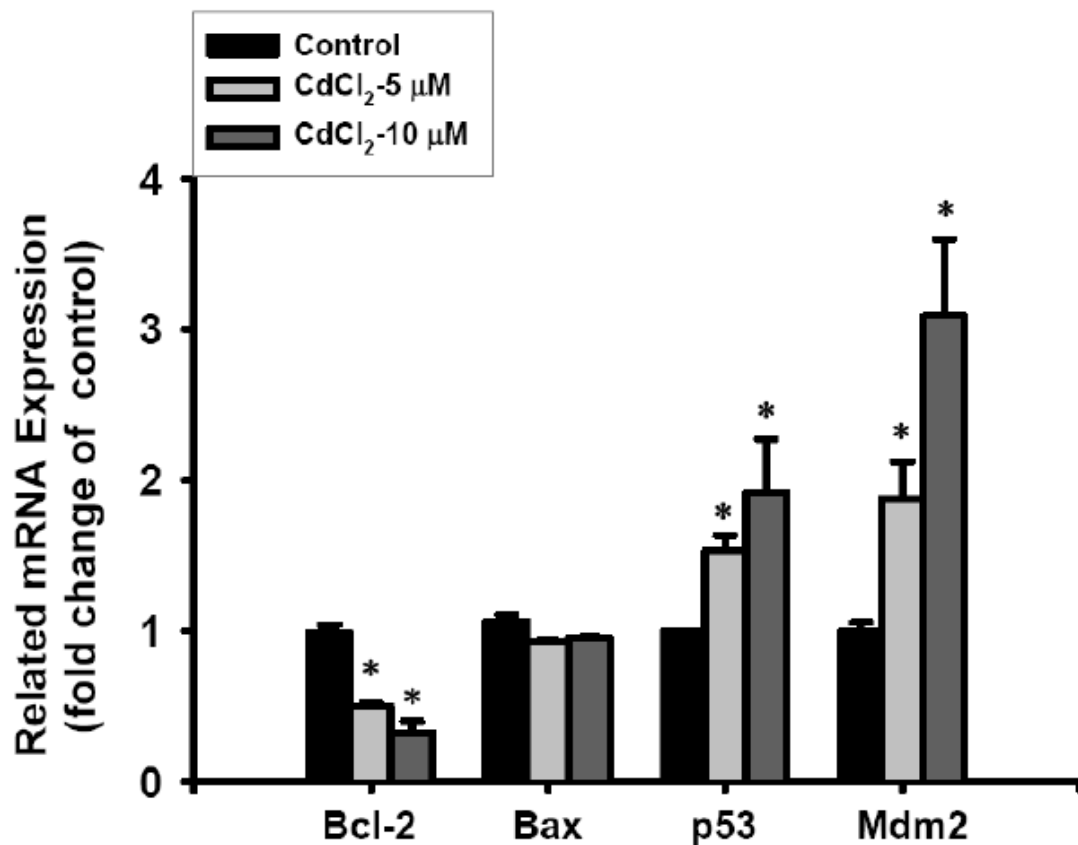


Figure 24. Cadmium induces related apoptotic mRNA expression in RIN-m5F

RIN-m5F cells were exposed with cadmium (0, 5, 10 μM) to investigate Bcl-2, Bax, p53 and Mdm2 mRNA were determined by real-time PCR. Data are presented as means ± S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control.

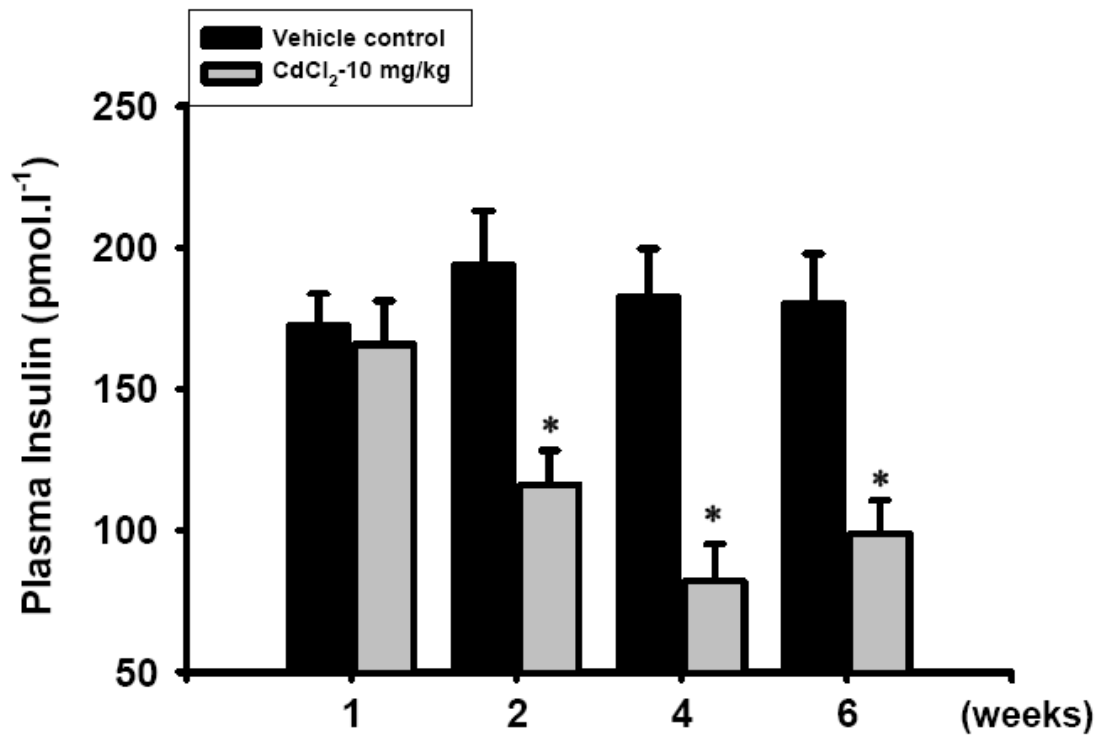


Figure 25. Effects of cadmium-induced plasma insulin secretion in ICR mice.

ICR mice were exposed with cadmium (10 mg/kg) for 1, 2, 4 and 6 weeks to investigate plasma insulin secretion by insulin assay. Data are presented as means \pm S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. *P<0.05 as compared with control.

OGTT

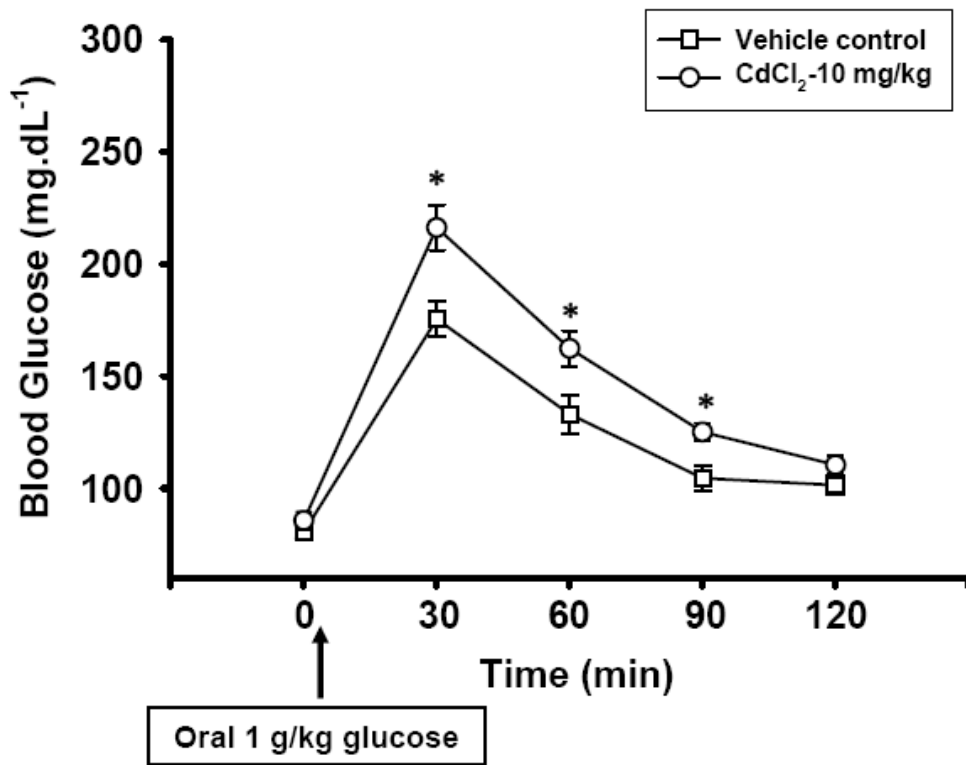


Figure 26. Effects of cadmium-induced blood glucose in ICR mice.

ICR mice were treated with glucose (1 g/kg) at first, and ICR mice were exposed with cadmium (10 mg/kg) for 30, 60, 90 and 120 minute to investigate blood glucose level. Data are presented as means \pm S.E. for four independent experiments with triplicate determinations. * $P < 0.05$ as compared with control.

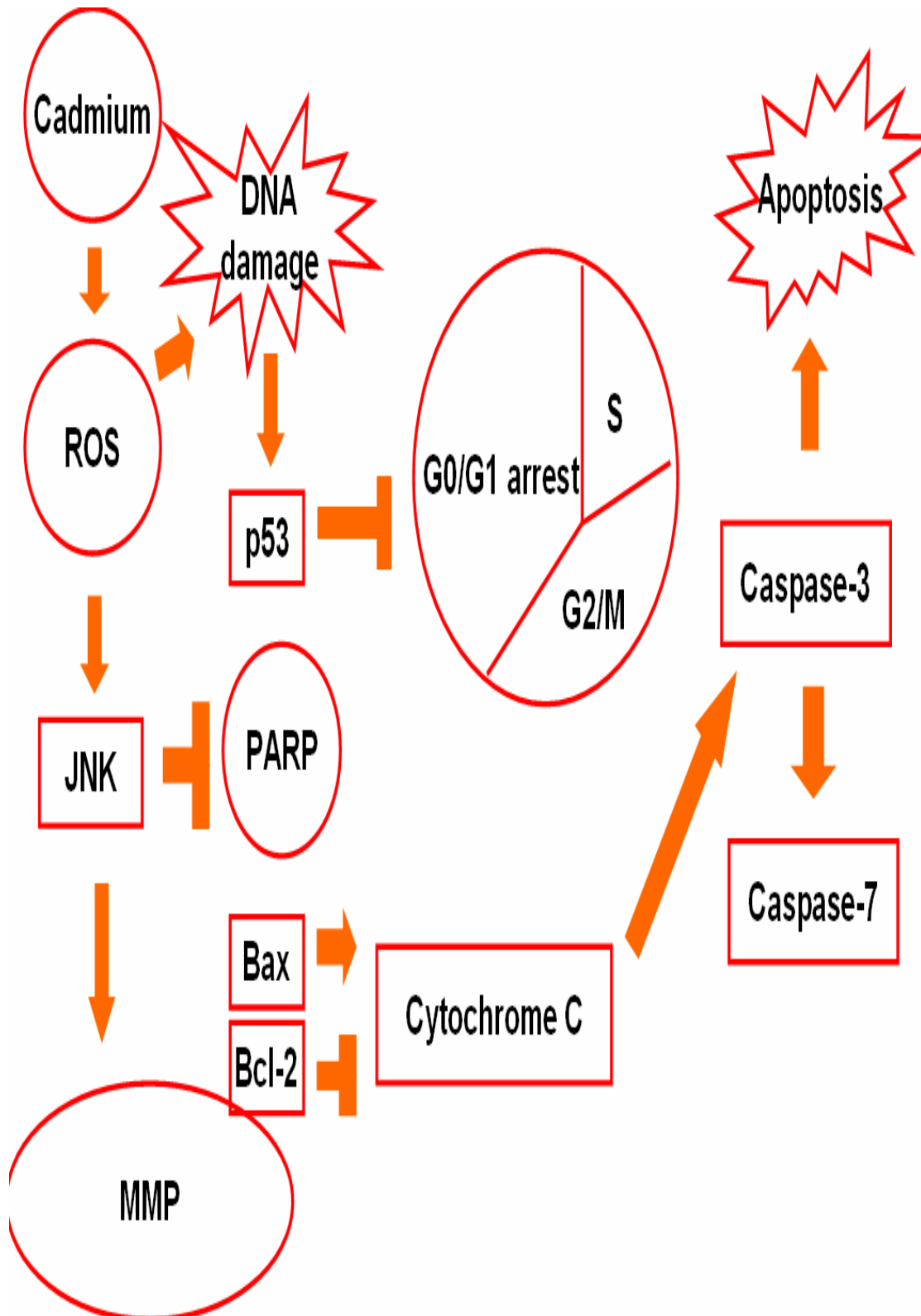


Figure 27. Cadmium-induced the apoptotic effect of RIN-m5f involved in mitochondrial pathway.