

人工合成腐植酸對人類臍帶靜脈血管內皮細胞之存活率及血液凝固相關因子ET-1、PAI-1及t-PA的影響

楊新玲¹ 許游章¹ 呂鋒洲¹ 蔡鴻德² 楊東川²

中國醫藥學院 營養系 台大醫學院 生化所¹ 中國醫藥學院附設醫院 婦產科部²

背景 烏腳病是一種閉塞性血栓末梢血管病變，流行於台灣西南沿岸地區。烏腳病區井水中高含量的腐植酸 (humic acid, HA) 被認為是烏腳病可能致病因子；但是，烏腳病區地下井水所純化之腐植酸不可避免地皆有金屬離子或其它分子的污染。本研究目的在探討三種人工合成之純腐植酸對人類臍帶靜脈血管內皮細胞之存活率及其分泌之血液凝固相關因子的影響。

方法 本研究利用三種單一酚酸 (protocatechuic acid、venillic acid、ferulic acid) 聚合而成之多酚酸聚合物即人工合成腐植酸 (synthetic humic acid, SHA)，作用於細胞培養之人類臍帶靜脈血管內皮細胞。內皮細胞以 2.3×10^5 個細胞為起始密度，種在含20% 胎牛血清之M199之6-孔盤培養皿中培養24小時後，分別加入不同濃度之人工腐植酸 (0–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，作用24, 48, 72小時後計算細胞數目，測量腐植酸所造成之細胞毒性；且於作用72小時後取上清液，利用酵素免疫分析法 (enzyme link immunosorbent assay, ELISA) 測定內皮細胞之內皮素 (endothelin-1, ET-1)、胞漿素原活化劑之抑制劑 (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) 及組織型胞漿素原活化劑 (tissue plasminogen activator, t-PA) 的分泌量。

結果 本研究發現三種人工合成腐植酸都會抑制內皮細胞生長，造成細胞毒性；且會隨著腐植酸作用時間和濃度的增加，細胞數目越減少毒性越強。本研究亦發現三種人工合成腐植酸作用內皮細胞後，可增加血管收縮素ET-1的分泌量；且ET-1含量隨腐植酸濃度的增加而增加。相同實驗條件下，亦可增加抗溶血因子PAI-1以及減少溶血因子t-PA的分泌量；且PAI-1含量隨腐植酸濃度的增加而增加，而t-PA含量隨腐植酸濃度的增加而減少。三種單一酚酸類則無以上的現象。

結論 人工合成腐植酸作用於人類臍帶靜脈血管內皮細胞，可促進血液凝固的作用；故推測腐植酸作用於血管內皮細胞的各種效應可能是烏腳病造成血栓性血管疾病的致病因子之一。(中台灣醫誌 2000;5:101-8)

關鍵詞

細胞毒性，內皮素，胞漿素原活化劑之抑制劑，人工合成腐植酸，組織型胞漿素原活化劑

前言

烏腳病是發生於台灣西南沿海的地區性流行病，其病理特徵為血栓性血管炎及動脈硬化變病[1]。流行病學的研究指出，烏腳病致病因子與飲用含砷量高的井水有密切關係[2,3]；亦有研究指出，井水中高含量的螢光物質腐植酸被認為是烏腳病可能致病因子[4]。腐植酸是一種多酚類

(phenolic hydroxylic group)大分子多官能基的聚合物，廣泛存在於土壤和水中，是世界上含量最多的天然化合物。有關烏腳病區井水腐植酸作用人類臍帶靜脈血管內皮細胞造成血液凝固及血栓之研究已陸續被發現，其效應包括：1) 促進內皮素 (endothelin-1, ET-1) 的表現及活性[5]；2) 促進胞漿素原活化劑之抑制劑 (plasminogen activator inhibitor, PAI-1) 的生成量及抑制組織型胞漿素原活化劑 (tissue plasminogen activator, t-PA) 的活性[6]；3) 腐植酸長時間作用下，會造成內皮細胞形態變化及細胞死亡[7,8]。以上腐植酸的各種作用，皆可促

聯絡作者：楊新玲

地址：404 台中市北區學士路91號

中國醫藥學院 營養系

收文日期：11/18/1999 修改日期：1/27/2000

接受日期：1/29/2000

進血液凝固及血栓的反應。

但是烏腳病區地下井水所純化出來之腐植酸，其結構除了酚酸聚合物的多苯環外；另含有-COOH，-OH，C=O 等功能基，具有強烈的螯合能力，易與其它金屬(如砷、硒、鉻等)或無機、有機物形成錯合物[9,10]。雖然已有實驗證明井水腐植酸可促進血栓形成及血液凝固的現象；井水中腐植酸不可避免地皆有金屬離子(例如井水中高含量的砷)或其它分子的污染。為了解腐植酸的純度問題，我們決定自己來合成；依據腐植酸的定義，是由酚酸經氧化作用所聚合而成[4]。本實驗中，我們利用三種單一酚酸(proto-catechuic acid, venillic acid 及 ferulic acid) 經氧化作用合成多酚酸聚合物，即人工合成腐植酸(synthetic humic acid, SHA)，測定其對人類臍帶靜脈血管內皮細胞之存活率及其分泌之血液凝固相關因子生成量的影響。

材料與方法

藥品

酚酸(proto-catechuic acid、venillic acid、ferulic acid)、XAD-7、Sephadex G-25、HEPES、NaCl、KCl、葡萄糖、過氧化碘、錐藍(trypan blue)及膠原酵素(collagenase)等均購自Sigma Chemical Co. (Deisenhofen, 德國)。內皮素套裝試劑定量(Human ET-1 Immunoassay kit)購自R&D Systems Inc. (Minneapolis, 明尼蘇達洲)。組織型胞漿素原活化劑套裝試劑定量(t-PA Immunoassay kit)及胞漿素原活化劑之抑制劑套裝試劑定量(PAI-1 Immunoassay kit)購自American Diagnostics Inc. (Greenwich, 康乃狄格州)。血管內皮細胞培養液M-199及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)則購自GIBCO (Grand Island, 紐約州)。

人工合成腐植酸的製備

依據Lu等人的方法[11]，腐植酸是由酚酸經氧化作用所聚合而成。取1克三種單一酚酸(proto-catechuic acid、venillic acid 及 ferulic acid) 為材料，加入1克的過氧化碘和100 mL的去離子水，在50°C的水浴中振盪以進行氧化合成反應。反應一天形成褐色溶液後，以3,000轉離心10分鐘取上清液。將此上清液溶於1 N NaOH (pH > 11)，以3,000轉離心10分鐘取

上清液；用0.1 N HCl將其調成pH = 2，再以3,000轉離心10分鐘取沈澱物。加入少量1N NaOH溶解沈澱物，然後通過XAD-7層析管柱使腐植酸吸附在上。再將吸附腐植酸沈澱物重覆以上酸鹼處理步驟三次後，最後調回中性。將此中性的溶液利用層析法(Sephadex G-25)再純化，收集第一個分子量較大吸收波溶液，並以減壓濃縮法製成乾燥粉末。置乾燥箱儲存待用。

人類臍帶靜脈血管內皮細胞初代培養

人類臍帶來自中國醫藥學院附設醫院產房；取得之新鮮臍帶先浸泡在4°C之臍帶緩衝液(0.137 M NaCl, 10 mM HEPES, 4 mM KCl, 10 mM glucose, pH 7.65)。再將臍帶注入37°C預熱過的0.03%膠原酵素，取出臍帶內含血管內皮細胞之溶液，以3,000轉離心10分鐘取沈澱物。沈澱物置入含有20% FBS之M-199培養液中，於5%二氧化碳培養箱中進行細胞培養[12]；24小時後更換新的培養液，並去除紅血球，約培養3到4天至內皮細胞長滿培養皿。最後依實驗所需要之細胞密度，重新種至新培養皿中進行第二代細胞培養。

血管內皮細胞存活率之測定

將第二代培養的血管內皮細胞，取 2.3×10^5 個細胞種在6-孔培養皿中，並加入20% FBS之M-199培養液中培養24小時後；分別加入三種人工合成腐植酸或三種單一分子的酚酸，濃度為0、25、50、100及200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其中以0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 為控制組；反應培養作用24、48及72小時後，加入0.5 mL之0.05% trypsin-0.01% EDTA，37°C下培養作用3分鐘；再加入1 mL的20% FBS之M-199培養液，使內皮細胞呈懸浮狀，並取出100 μL 懸浮狀細胞與100 μL 的0.1% trypan blue混合均勻後，以血球計數器(hema-cytometer)計算細胞數目。

血管收縮因子—ET-1的測定

將第二代培養的血管內皮細胞，取 2.3×10^5 個細胞種在6-孔培養皿中，並加入20% FBS之M-199培養液中培養24小時後；分別加入三種人工合成腐植酸或三種單一分子的酚酸，濃度為0、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其中0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 為控制組；反應培養作用72小時後，收集上清液放入-20°C冰箱待測。套裝試劑中先將96-孔盤加入100 μL 之HRP結合劑，隨後加入100 μL 的待測上清液或標準溶液。37°C下利用

旋轉台溫和地搖動培養皿，反應1小時；倒掉內含的溶液且用清洗液（磷酸緩衝液含有0.05% Tween-20）連續沖洗六次；再加入100 μL 含 tetram-ethyl-benzidine 的受質溶液，暗處作用30分鐘。以酵素免疫分析儀測定 ET-1 的含量，波長設定在450 nm。

抗溶血因子—PAI-1 的測定

內皮細胞的培養及加入腐植酸之方法及濃度同上。最後收集反應作用72小時的細胞上清液放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，等待測定 PAI-1 的生成量。套裝試劑中先將96-孔盤加入100 μL 的待測上清液或標準溶液，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下利用旋轉台溫和地搖動培養皿，反應16至18小時；倒掉內含的溶液且以清洗液連續沖洗四次。加入100 μL 含有 biotin 結合劑之 anti-human PAI-1 單株抗體，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下反應16至18小時；再倒掉內含的溶液且用清洗液連續沖洗四次。立刻加入100 μL 的 HRP 結合劑，在20 $^{\circ}\text{C}$ 下反應1小時；再倒掉內含的溶液且用清洗液連續沖洗四次。立刻加入200 μL 含 orthophenylenediamine 的受質溶液，暗處作用30分鐘。最後加入50 μL 的3M H_2SO_4 以終止反應。以酵素免疫分析儀測定 PAI-1 的含量，波長設定在490 nm。

溶血因子—t-PA 之測定

內皮細胞的培養及加入腐植酸之方法及濃度同上。最後收集反應作用72小時的細胞上清液放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，等待測定 t-PA 的含量[6]。套裝試劑中先將96-孔盤加入100 μL 的待測上清液或標準溶液，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下利用旋轉台溫和地搖動培養皿，反應16至18小時。然後加入200 μL 含有 peroxidase 結合劑之 anti-tPA 單株抗體，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下利用旋轉台溫和地搖動培養皿，反應2至3小時，倒掉內含的溶液且用清洗液連續沖洗四次；立刻加入200 μL 含 orthophenylenediamine 的受質溶液，暗處作用30分鐘。最後加入50 μL 的3M H_2SO_4 以終止反應。以酵素免疫分析儀測定 t-PA 的含量，波長設定在490 nm。

統計分析

實驗結果均以平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) 表示 (n = 2-3)。同時以 SPSS 系統進行變異性分析 (ANOVA)，並以 Duncan's multiple range test 作組間差異比較，*p* 值小於0.05 代表有顯著差異。

結果

人工合成腐植酸對血管內皮細胞生長的影响

本實驗將探討人工合成腐植酸對血管內皮細胞之細胞毒性。由結果得知(圖1)，控制組(腐植酸濃度0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 為內皮細胞培養24、48以及72小時後，每盤培養皿細胞數目由 2.3×10^5 生長到 2.6×10^5 、 3.5×10^5 及 4.2×10^5 。實驗組加入三種人工合成腐植酸濃度由25至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，細胞數目隨著腐植酸作用時間和濃度的增加而細胞數目漸漸減少；尤其以三種人工合成腐植酸200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用24、48以及72小時，細胞數目最高可降減少到 1.6 至 2.2×10^5 、 1.6 至 2.4×10^5

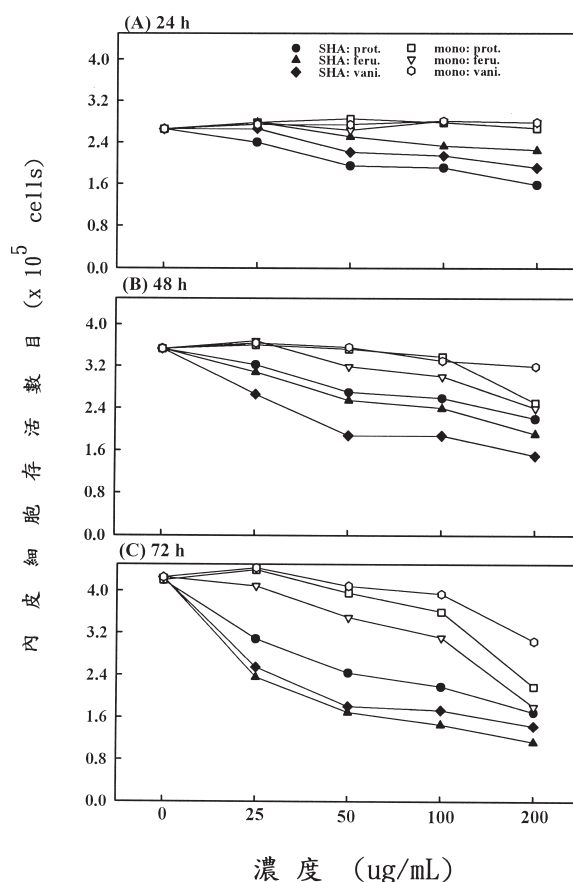


圖1、三種人工合成腐植酸對血管內皮細胞生長的影响。將 2.3×10^5 個細胞種在含有20% FBS之 M199 培養液之6-孔盤培養皿中，培養24小時後加入不同濃度的人工合成腐植酸(25-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及單一酚酸，分別作用血管內皮細胞(a) 24 小時、(b) 48 小時及(c) 72 小時。數據以平均值表示 (n = 2)。prot. = protocatechuic acid ; feru. = ferulic acid ; vani. = venillic acid。

10^5 及 1.0 至 1.8×10^5 。然而，三種單一分子的酚酸類，則不會或稍為抑制濃度細胞生長；其中只有在三種單一酚酸類在高濃度下 ($200 \mu\text{g/mL}$) 作用 72 小時，細胞數目較有顯著減少；並且在無色指示劑的培養液中，會轉變成褐色，推測三種單一分子酚酸類作用時間長時會自動氧化產生聚合作用，因而造成細胞數目顯著減少。因此，三種人工合成腐植酸會抑制內皮細胞生長；且會隨著腐植酸作用時間和濃度的增加，細胞數目越少毒性越強。

人工合成腐植酸對內皮細胞 ET-1 合成量的影響

ET 為最近幾年來新發現的血管收縮因子，其中 ET-1 主要為血管內皮細胞所合成 [13,14]。本實驗將探討人工合成腐植酸對血管內皮細胞之 ET-1 合成量的影響。由結果得知 (圖 2)，控制組 (腐植酸濃度 $0 \mu\text{g/mL}$) 為內皮細胞培養 72 小時後，ET-1 的合成量為 $2.2 \text{ ng}/10^5$ 個細胞。實驗組

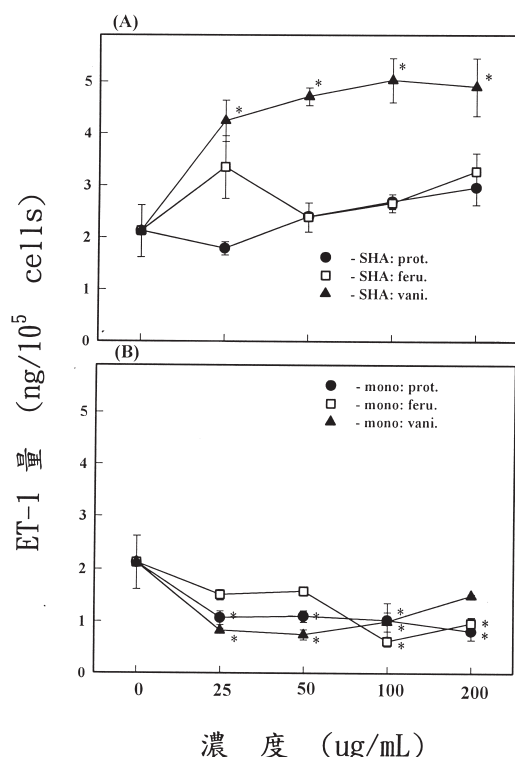


圖 2、人工合成腐植酸對內皮細胞產生血管收縮因子 - ET-1 量的影響。將 2.3×10^5 個細胞種在含有 20% FBS 之 M199 培養液之 6-孔盤培養皿中，培養 24 小時後加入不同濃度的人工合成腐植酸及單一酚酸，作用血管內皮細胞 72 小時的影響。數據以平均值 ± 標準偏差表示 ($n = 3$)。* $p < 0.05$ 。

加入三種人工合成腐植酸濃度由 25 至 $200 \mu\text{g/mL}$ 後，ET-1 合成量會隨腐植酸濃度的增加而增加；尤其在三種人工合成腐植酸 $200 \mu\text{g/mL}$ 時，ET-1 合成量最高可到 2.5 至 $4.2 \text{ ng}/10^5$ 個細胞。然而，三種單一分子酚酸類反應作用 72 小時，則 ET-1 合成量則不會增加；反而稍為減少到 0.7 至 $1.1 \text{ ng}/10^5$ 個細胞。因此，三種人工合成腐植酸會增加 ET-1 合成量，且會隨著腐植酸作用濃度的增加而增加。

人工合成腐植酸對 PAI-1 與 t-PA 合成量的影響

血管內皮細胞會分泌抗溶血因子 - PAI-1 及溶血因子 - t-PA [15]；其中 PAI-1 的活化會抑制 t-PA 的活性 [16]。由結果得知 (圖 3)，控制組 (腐植酸濃度 $0 \mu\text{g/mL}$) 為內皮細胞培養 72 小時後，內皮細胞 PAI-1 的合成量為 $380 \text{ ng}/10^5$ 個細

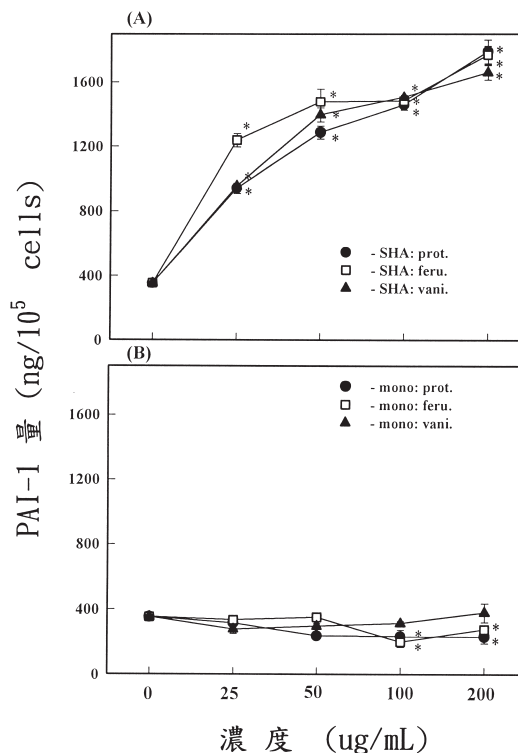


圖 3、人工合成腐植酸對內皮細胞產生抗溶血因子 - PAI-1 量的影響。將 2.3×10^5 個細胞種在含有 20% FBS 之 M199 培養液之 6-孔盤培養皿中，培養 24 小時後加入不同濃度的人工合成腐植酸及單一酚酸，作用於血管內皮細胞 72 小時的影響。數據以平均值 ± 標準偏差表示 ($n = 3$)。* $p < 0.05$ 。

胞。實驗組加入三種人工合成腐植酸濃度由25至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 後, PAI-1 合成量會隨腐植酸濃度的增加而增加; 尤其在三種人工合成腐植酸200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時, PAI-1 合成量最高可到1,600 至1,800 $\text{ng}/10^5$ 個細胞。由結果得知 (圖 4), 控制組 (腐植酸濃度 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 為內皮細胞培養 72 小時後, t-PA 的合成量為為 4.8 $\text{ng}/10^5$ 個細胞。實驗組加入三種人工合成腐植酸濃度由25至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 後, t-PA 合成量會隨腐植酸濃度的增加而減少; 尤其在三種人工合成腐植酸200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時, t-PA 合成量最高可減少到1.9 至 4.3 $\text{ng}/10^5$ 個細胞。然而, 三種單一分子酚酸類反應作用 72 小時, 則 t-PA 合成量則無減少。因此, 三種人工合成腐植酸會增加 PAI-1 及減少 t-PA 合成量; 且會隨著腐植酸作用濃度的增加而增加 PAI-1 或減少 t-PA 合成量。

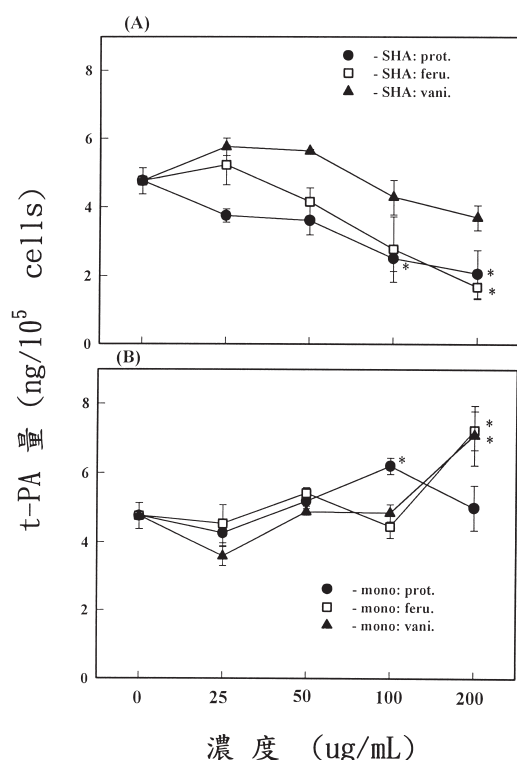


圖 4、人工合成腐植酸對內皮細胞產生溶血因子—t-PA 量的影響。將 23×10^5 個細胞種在含有 20% FBS 之 M199 培養液之 6-孔盤培養皿中, 培養 24 小時後加入不同濃度的人工合成腐植酸及單一酚酸, 作用血管內皮細胞 72 小時的影響。數據以平均值 \pm 標準偏差表示 ($n = 3$)。* $p < 0.05$ 。

討論

本研究探討人工合成腐植酸作用在人類臍帶血管內皮細胞, 誘導造成內皮細胞的各種相關毒性。內皮細胞是血管最內層直接接觸血流的單層細胞, 其主要藉由分泌及合成一些抗凝因子及促血栓因子來調節血管及血液方面的功能 [17]; 許多刺激劑 (例如 thrombin、內毒素及腫瘤壞死因子), 可經由促進細胞內自由鈣離子增加及蛋白質酵素 C 的活化作用, 而造成內皮細胞上凝血因子的分泌 [18]。在過去的實驗中我們發現, 烏腳病區純化之井水腐植酸可造成內皮細胞的多種毒性 [6,19,20]; 有關井水腐植酸如何造成毒性, 我們提出兩種可能的機制 [8]: 1) 井水腐植酸與細胞膜作用, 造成細胞膜損傷 (包括血管內皮細胞等), 可產生許多生理效應; 且細胞膜對鈣離子的通透性增加, 使細胞膜內鈣離子濃度增加。鈣離子為二級訊息傳遞物質, 可活化蛋白質酵素 C 或其它鈣離子依賴性酵素, 造成血液凝固及血栓之相關因子之合成與分泌。2) 井水腐植酸可直接作用及損壞許多造成血液凝固、血栓的相關因子 (例如 protein C 及 plasmin) 或是流行於烏腳病區特定疾病之各種相關因子等, 因而造成多樣性疾病。以電磁共振光譜分析發現腐植酸存在有自由基 [9]; 且我們的最新研究顯示, 腐植酸作用紅血球後, 會產生脂質及蛋白質氧化作用, 且紅血球發生形態變化 (形成 echinocyte, 即膜向外凸長出突棘), 最後造成溶血作用 [21]。故腐植酸誘導自由基的產生及作用可能是腐植酸造成上述細胞毒性的主要原因。

過去實驗顯示, 不論井水腐植酸或人工合成腐植酸皆可損壞及抑制血漿中血纖維蛋白溶酶素 (plasmin) [22,23] 及蛋白質 C [24,25]; 腐植酸誘導產生自由基的直接作用被認為是可能的因素。前述井水腐植酸會擾動內皮細胞膜, 使細胞外鈣離子進入細胞內, 因而造成血液凝固及血栓之相關因子之合成與分泌, 其詳細機制尚不清楚; 腐植酸誘導產生高反應力自由基, 造成細胞膜通透性改變是可能的因素。由於井水中腐植酸不論如何分離純化, 不可避免地皆有金屬離子或其它分子的污染; 擾動細胞膜的毒性來自井水腐植酸中污染金屬離子及小分子 (尤其是井水中高含量的砷)。流行病學的研究結果指出, 井水中高含量的砷與烏腳病具正相關; 砷毒性也可能來自過氧化作用, 可產生各種活性氧化物 [26]。故本研究利用三種人工合成腐植酸, 作用血管內皮細胞發現: 1) 抑制細胞生長, 造成細胞毒性; 2) 增加

血管收縮素—ET-1的分泌量；3) 增加抗溶血因子—PAI-1 以及減少溶血因子—t-PA 的分泌量。人工合成腐植酸確實具有井水腐植酸之相關毒性；腐植酸確實是造成細胞毒性的主因而非其他因素造成。

細胞內訊號傳遞系統(signal transduction) 對腐植酸造成血液凝固及血栓相關因子的分子機制扮演重要角色；對細胞而言，長時間鈣離子堆積或自由基作用會造成細胞死亡，此即所謂細胞毒性。細胞內鈣離子濃度增加，造成細胞死亡其主要機制包括：擾動細胞骨架(perturbation of cytoskeletal organization)、損害粒線體的功能(impaired mitochondrial function)、活化磷脂酵素(phospholipase activation)、活化蛋白酶(enzyme activation)及活化核酸內切酵素(endonuclease activation) 等 [8]。過去的研究指出，自由基作用會造成細胞壞死(necrosis)或細胞凋亡(apoptosis)[27]。故人工合成腐植酸會造成內皮細胞死亡(圖1)；推測主要也是經由鈣離子堆積或自由基的作用。

內皮素為最近幾年來新發現的血管收縮因子，其中ET-1主要為內皮細胞所合成 [14]。內皮素較屬paracrine 性質的荷爾蒙，因為血液中的ET 量很低 [28]，而培養的血管內皮細胞分泌較高。文獻報告指出，內皮素對心臟血管方面的效應包括增強天竺鼠的血管收縮能力 [29]；皮下注射內皮素於人體，會導致微血管網的血管收縮，且發生部份血管壁產生漏出現象 [30]；一般而言，內皮素均會刺激血管壁平滑肌細胞的增生及過度收縮，很可能導致高血壓及動脈硬化 [11]。本篇研究發現，腐植酸會使內皮細胞培養液中的內皮素增加(圖3)，且隨著添加腐植酸濃度的升高而增加。故推測腐植酸使內皮素產生增加，可能與烏腳病流行地區高心臟血管疾病的致病因有很大的關係。

另外有研究指出，內皮細胞會合成和分泌t-PA 及 PAI-1 [15]；且 t-PA、PAI-1 的合成與鈣離子及蛋白質激酶C 活性相關 [31,32]，皆經由二級訊息的途徑。其中 PAI-1 的活化會抑制t-PA 的活性 [16]，若 PAI-1 分泌的量大於 t-PA 時，即會促進血液凝固現象 [33]。由圖3 和圖4 得知，經

腐植酸作用內皮細胞後，可使細胞合成 PAI-1 增加及 t-PA 合成量減少，這些結果顯示腐植酸都會促進血液凝固的現象；而且這些可能因細胞內鈣離子的濃度增加及蛋白質激酶C 活化而造成 [8]。

總結，以人工合成腐植酸作用於人類臍帶靜脈血管內皮細胞，可促進 ET-1 增加、細胞合成 PAI-1 增加及 t-PA 合成量減少，最後造成細胞死亡，走向促進血液凝固之途徑；故推測腐植酸作用血管內皮細胞的各種效應可能是烏腳病造成血栓性血管疾病的致病因子之一。

誌謝

本實驗承蒙中國醫藥學院附設醫院醫學研究部計畫(DMR-87-048) 經費補助，特此誌謝。並感謝中國醫藥學院附設醫院產房提供臍帶。

參考文獻

1. Yeh S, How SW. A pathological study on the blackfoot disease in Taiwan. *Rep Inst Patbol Natl Taiwan University* 1963;14:25-73.
2. Lu FJ, Yang CK, Ling KH. Physico-chemical characteristics of drinking water in blackfoot endemic areas in Chia-I and Tainan Hsiens. *Taiwan I Hsueh Hui Tsa Chih* 1975;74:596-605.
3. Lu FJ. Fluorescent humic substances and blackfoot disease in Taiwan. *Appl Organ Chem* 1990;4:1991-5.
4. Lu FJ, Huang TS, Lin YS, et al. Peripheral vasculopathy in rats induced by humic acids. *Appl Organomet Chem* 1994;8:223-8.
5. Chiu HC, Shih SR, Lu FJ, et al. Stimulation of endothelin production in cultured human endothelial cells by fluorescent compounds associated with blackfoot disease. *Thromb Res* 1993;69:139-51.
6. Yang HL, Chiu HC, Lu FJ. Effects of humic acid on the viability and coagulant properties of human umbilical vein endothelial cells. *Am J Hematol* 1996;51:200-6.
7. Jewell SA, Bellomo G, Thor H, et al. Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 1982;217:1257-9.
8. Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, et al. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. [Review] *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:281-5.
9. Lu FJ, Yamamura Y, Yamauchi H. Studies on fluorescent compounds in water of a well in

- Blackfoot disease endemic areas in Taiwan: humic substances. *Taiwan I Hsueh Hui Tsa Chib* 1988;87:66-75.
10. Huang TS, Lu FJ. Iodide binding by humic acid. *Environ Toxicol Chem* 1991;10:179-84.
 11. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, et al. Pressor effects of circulation endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9797-800.
 12. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
 13. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, et al. Primary structure, synthesis and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6964-7.
 14. Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett* 1988; 231:440-4.
 15. Hajjar KA, Hamel NM, Harpel PC, et al. Binding of tissue plasminogen activator to cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1987;80:1712-9.
 16. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. [Review] *Blood* 1987;69:381-7.
 17. Brox JH, Osterud B, Bjorklid E, et al. Production and availability of thromboplastin in endothelial cells: the effects of thrombin, endotoxin and platelets. *Br J Haematol* 1984;57:239-46.
 18. Torres-Duarte A, Amezcua JL. Thromboxane and prostacyclin generation by human umbilical veins after thrombin. *Prostaglandins* 1991;42:571-8.
 19. Yang HL, Lu FJ, Wung SL, et al. Humic acid induces expression of tissue factor by cultured endothelial cells: regulation by cytosolic calcium and protein kinase C. *Thromb Haemost* 1994;71:325-30.
 20. Yang HL, Hseu YC, Lu FJ, et al. Humic acid reduces protein-C-activating cofactor activity of thrombomodulin of human umbilical vein endothelial cells. *Br J Haematol* 1998;101:16-23.
 21. Hseu YC, Lu FJ, Engelking LR, et al. Humic acid-induced echinocyte transformation in human erythrocytes: characterization of morphological changes and determination of the mechanism of damage. *J Toxicol Environ Health (Part A)* 2000;60:101-16.
 22. Lu FJ, Lee YS. Humic acid: inhibitor of plasmin. *Sci Total Environ* 1992;114:135-9.
 23. Lu FJ, Shih SR, Liu TM, et al. The effect of fluorescent humic substances existing in the well water of blackfoot disease endemic areas in Taiwan on prothrombin time and activated partial thromboplastin time *in vitro*. *Thromb Res* 1990;57:747-53.
 24. Yang HL, Tu SC, Lu FJ, et al. Plasma protein C activity is enhanced by arsenic but inhibited by fluorescent humic acid associated with blackfoot disease. *Am J Hematol* 1994;46:264-9.
 25. Yang HL, Chou HT, Lu FJ. The inhibition of plasma protein C activity induced by synthetic humic acid. *Mid Taiwan J Med* 1998;3:160-5.
 26. Lynn S, Shiung JN, Gurr JR, et al. Arsenite stimulates poly (ADP-ribosylation) by generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998;24:442-9.
 27. Brown DG, Klirner L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1990;88:1071-4.
 28. Suzuki N, Matsumoto H, Kitada C, et al. Immunoreaction endothelin-1 in plasma detected by a sandwich-type enzyme immunoassay. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13(suppl):151-2.
 29. Moravec CS, Reynolds EE, Stewart RW, et al. Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:14-8.
 30. Brain SD, Crossom DC, Buckley TL, et al. Endothelin-1: demonstration of potent effects on the microcirculation of humans and other species. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13(suppl):147-9.
 31. Slivka SR, Loskutoff DJ. Regulation of type I plasminogen activator inhibitor synthesis by protein kinase C and cAMP in bovine aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1991;1094:317-22.
 32. Niedbala MJ, Stein-Picarella M. Role of protein kinase C in tumor necrosis factor induction of endothelial cell urokinase-type plasminogen activator. *Blood* 1993;81:2608-17.
 33. Van-Hinbergh VW, Sprenger ED, Kooistra T. Effect of thrombin on the production of plasminogen activators and PA inhibitor-1 by human foreskin microvascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 1987;57:148-53.

Effects of Synthetic Humic Acid on the Viability and Coagulant Factors: ET-1, t-PA and PAI-1 of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Hsin-Ling Yang, You-Cheng Hseu, Fung-Jou Lu¹, Horng-Der Tsai², Tung-Chuan Yang²

Department of Nutrition and ²Department of Obstetrics and Gynecology, China Medical College, Taichung, ¹Department of Biochemistry, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

Background. Blackfoot disease is a thrombotic peripheral vascular disease causally related to humic acid (HA) found in the drinking water of wells along the southwestern coast of Taiwan. To better define the causative chemical components of the endemic artesian well water, synthetic humic acid (SHA) was used to investigate effects on the viability and coagulant properties of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Methods. Three SHAs of well defined phenolic derivatives, including monomeric protocatechuic acid, vanillic acid and ferulic acid, were incubated with the HUVECs. The cells were maintained at 2.3×10^5 cell/well in 6-well plates and cultured in M-199 medium containing 20% fetal bovine serum for 24 hr before treatment. Cell viability of each confluent monolayer was checked before and after treatment with various concentrations of the three SHAs (25–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 24 hr, 48 hr and 72 hr, respectively, using trypan blue and examined using phase contrast microscopy. The amount of endothelin-1 (ET-1) antigen, tissue plasminogen activator (t-PA) antigen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) antigen in the endothelial cells containing medium after 72 hr of treatment was determined using a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. SHA was found to inhibit the growth and viability of subconfluent HUVECs in both dose and time dependent conditions. Furthermore, after 72 hr of treatment a dose dependent effect occurred when SHA stimulated HUVEC to produce ET-1 and PAI-1, and to reduce t-PA.

Conclusions. These results suggest that the biological effects of SHA on HUVECs may lead to local procoagulant states or thrombotic disorders and that vascular endothelial cell damage may contribute partly, at least, to the thrombotic disorders of blackfoot disease. (*Mid Taiwan J Med* 2000;5:101-8)

Key words

cytotoxicity, endothelin-1, plasminogen activator inhibitor, synthetic humic acid, tissue plasminogen activator

Received: November 18, 1999.

Revised: January 27, 2000.

Accepted: January 29, 2000.9

Address reprint requests to: Hsin-Ling Yang, Department of Nutrition, China Medical College, No 91, Hsueh-Shih Road, Taichung 404, Taiwan, R.O.C.