

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *

* 計 畫 *

* : 以彗星試驗評估奈米微粒對生殖細胞的 DNA 結構影響 *

* 名 稱 *

* ***** *

執行計畫學生： 林青弘
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-041-001-B
研 究 期 間： 99 年 07 月 01 日至 100 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授： 鄧燕妮

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執 行 單 位： 嘉南藥理科技大學生物科技系（所）

中華民國 100 年 03 月 03 日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫名稱：以彗星試驗評估奈米微粒對生殖細胞的 DNA 結構影響 *

執行計畫學生：林青弘

學生計畫編號：NSC —2815—C— 041 —001 -B

研究期間：99 年 7 月 1 日至 100 年 2 月底止，計 8 個月

指導教授：鄧燕妮、莊一全

處理方式(請勾選)：☐立即公開查詢

☐涉及專利或其他智慧財產權，☐一年☒二年後可公開
查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學 生物科技系

中華民國 100 年 2 月 23 日

摘要

奈米對於細胞或生物體的生殖方面影響的研究文獻較為缺少，而部份學者認為奈米微粒進入細胞或生物體內是無毒且安全的；但有些學者則認為奈米微粒的毒性取決於奈米材質的種類；部份的研究報告則認為奈米微粒的毒性與奈米顆粒的大小有關。各國的研究結果仍然非常分歧。

近年來不孕症的問題越趨嚴重，男性不孕症的原因可分為遺傳性與非遺傳性因素，非遺傳性因素包括環境因素、生活習慣、生理因素等其中環境汙染等是影響較大的重要因素。由於晚婚所以接觸更多的奈米顆粒的時間相對拉長，是否接觸奈米顆粒的時間越長或是粒徑、濃度不同而影響的程度也不同。若DNA 上有損害，則其破碎的片段會藉由電泳時被拖出細胞，經由染色後在顯微鏡下則呈現出一類似彗星的形狀。不同程度的傷害會造成DNA 拖尾程度的差異，利用其拖尾的程度便可評估細胞DNA damage 的嚴重性。

本研究主要利用MTT assay 檢測何種奈米濃度或顆粒粒徑對於生殖細胞GC1及GC2的有明顯生長抑制，在10 nm 5ug/ml濃度，即有明顯生長抑制的情形發生。以慧星試驗（comet assay）探討奈米微粒對於生殖細胞的DNA 毒性發現低濃度的5ug/ml濃度已有細胞明顯拖尾的情形發生，顯見奈米顆粒確實會造成DNA得損傷。由於流速細胞儀的分析較為敏感，再低濃度0.5ug/ml濃度實已看到細胞凋亡的程度微幅提高，綜合以上的結果，奈米微粒對於睪丸細胞的生長、DNA損傷確實有明顯之影響，至於對於細胞凋亡的程度也有微幅提高，其詳細機轉，有待後續進一步研究。

第一章、緒論

(一) 研究動機與研究問題

根據世界衛生組織對於不孕症定義:夫妻雙方結婚一年,在毫無避孕的狀態下沒有辦法受孕者稱為不孕症,其中50%因素來自男方。造成男性不孕症的原因可分為遺傳性與非遺傳性因素,非遺傳性因素包括環境因素、生活習慣、生理因素等其中環境汙染等是影響較大的重要因素。(Larry et al., 1997) 奈米微粒對於細胞或生物體的影響,部份學者認為奈米微粒進入細胞或生物體內是無毒且安全的;但有些學者則認為奈米微粒的毒性取決於奈米材質的種類;部份的研究報告則認為奈米微粒的毒性與奈米顆粒的大小有關。由於環境中應用的奈米非常多樣化,因此選用了較常見的TiO₂、SiO₂ 兩種奈米,比較正常生殖細胞GC-1、GC-2、TM3、TM4 與經由奈米處理的生殖細胞是否有發生DNA 的損害。利用慧星試驗(comet assay)探討奈米微粒對於生殖細胞的DNA 毒性,擬以MTT assay 檢測何種奈米濃度或顆粒粒徑對於生殖細胞的損害較大,再藉由comet assay 測試由MTT assay所篩選出較多影響的濃度及粒徑的生殖細胞之DNA 損害程度。使用comet assay 可以比較正常的生殖細胞與經由奈米顆粒處理過的生殖細胞DNA 的損傷程度;若DNA 上有損害,則其破碎的片段會藉由電泳時被拖出細胞,經由染色後在顯微鏡下則呈現出一類似彗星的形狀。不同程度的傷害會造成DNA 拖尾程度的差異,利用其拖尾的程度便可評估細胞DNA damage 的嚴重性

(二)文獻回顧與探討

奈米科技是個極具發展潛力的產業(Paull et al., 2003),奈米微粒一般指大小在1-100 nm的顆粒,奈米科技的運用極廣,包括:光電、半導體、醫療、化妝品等,因此其對於人體及生態的影響,以受到各國政府與人民的重視。根據流行病學的研究指出隨著懸浮微粒的增加,呼吸及心血管疾病的死亡率隨之增加。有研究指出動物暴露於濃縮大氣微粒,引起血壓及心跳增加與血中纖維蛋白原升高,顯示微粒及心血管疾病有關,此可能與同質量下細微粒表面積較大,引起的氧化壓力效應有關。氧化壓力可引起表皮細胞或巨噬細胞產生細胞激素,例如IL-6、IL-8、TNF 等,引起呼吸道一連串發炎反應,這方面已藉由體外及動物實驗證實。

Nohynek 等人認為奈米微粒的對細胞的毒性,主要決定於奈米微粒的材質及化學性質,而奈米粒徑(particle size)不是決定細胞毒性的主要因素(Nohynek et al., 2008)。而Stone等人認為奈米顆粒的大小決定奈米微粒進入體內的毒性,因此Stone 等人則提出低溶解、低毒性的TiO₂、carbon black 和 polystyrene beads 等超微粒

(ultrafine particle) 較微粒 (fine

particles) 的毒性來得強 (Stone et al., 2007)。雖然奈米微粒本身毒性低，由於奈米微粒與細胞中的DNA、RNA 及細胞膜的大小相近，學者擔心奈米微粒吸入人體後，在體內產生散佈與殘存體內等問題。過去研究顯示奈米微粒的暴露，增加肺癌，心臟疾病，氣喘 (asthma) 及死亡率 (increased mortality) 等，由於奈米微粒的粒徑小，一旦被吸入體內後，容易在體內

到處流竄，能穿透體內障壁 (Barriers) 到達血液、淋巴結、脾、心臟等器官 (Oberdorster et al., 2005)，甚至中樞神經系統 (Oberdorster et al., 2004)。TiO₂ 是醫藥及化妝品工業上的重要材料，慢性吸入TiO₂ 會增加肺部毒性反應，而超微粒TiO₂ (粒徑小於100 nm) 則更容易引發肺部的細胞免疫反應 (Ferin et al., 1992; Bermudez et al., 2004)。因此奈米微粒的高表面積效應，被認為是引發細胞毒性的的重要因素之一 (Brown et al., 2001)。胚胎纖維母細胞 (embryo fibroblasts) 暴露於超微粒TiO₂ (小於100 nm) 下的活體外 (in vitro) 研究，發現較暴露TiO₂ 微粒 (大於100 nm) 容易誘發細胞產生微核粒 (micronuclei) 及細胞凋亡現象 (apoptosis) (Rahman et al., 2002)。Donaldson 等人也發現低毒性、低溶解度的奈米材質引發的大鼠肺過敏反應較相同材質的大微粒較為嚴重 (Donaldson et al., 2002; Donaldson et al., 2005)。研究顯示腎臟會堆積大量廢物，體內廢物在腎臟有濃縮之功能，因此L'azou 等人利用不同材質 (carbon black, titanium dioxide) 及不同粒徑的奈米微粒 (TiO₂-15、TiO₂-50 nm)，並且在奈米微粒上標示上不同的物質，以方便奈米微粒進入腎臟細胞後的觀察。研究顯示TiO₂ 對於腎臟細胞具有極高的毒性，並且會在腎臟細胞中堆積 (L'azou et al., 2008)。Nemmar 等人將TiO₂ (1、5 mg/kg) 注射到大鼠24 小時後發現會造成大鼠急性過敏反應及血小板凝集現象 (Nemmar et al., 2008)。Vamanu 等人研究發現TiO₂會增加U937 人類單核球免疫細胞 (human monoblastoid cells) 的細胞壞死及細胞凋亡數，加速細胞死亡 (cell death) (Vamanu et al., 2008)。彗星分析法的發展較早期，染色體變異 (chromosomal aberration, CA)、姊妹染色分體交換 (sister chromatid exchange, SCE)、和微核 (micronuclei, MN) 等細胞遺傳學標記被用來評估致癌物質暴露所致的基因毒性，但有低敏感度和費時的問題。彗星分析法 (comet assay) 是一項檢驗個別細胞DNA 斷裂且相當敏感又簡單的工具。一旦細胞暴露於致癌物或致突變物時，可能會產生DNA 斷裂的象，因此透過彗星分析法 (comet assay) 即可以準確地偵測出來，Ostling 以及Jahanson 在1984 年發現將細胞中的DNA 嵌入低熔點的洋菜膠進行電泳，將會依DNA 所受到的傷害程度呈現不同的圖形。此後彗星試驗因其可定量性、簡易性與高敏感度，成為試驗DNA 傷害程度時常用的方法。(Ostling, Johanson, 1984; Singh et al.,

1988; Klaude et al., 1996; Kassie et al., 2000)1972 年由澳大利亞病理學家John Kerr 首先提出細胞凋亡的概念 (Kerr et al., 1972)。

細胞凋亡一詞，即apoptosis (apo-ptosis)，源自古希臘語，意指花瓣或樹葉的脫落、凋落。主要是強調此過程是一種自然的生理學過程。細胞凋亡是一個主動的，由基因決定的自動結束生命的過程。由於細胞凋亡受到嚴格的，由遺傳機制決定的程序性調控，因此也被稱為程序性細胞死亡 (programmed cell death; PCD)。細胞凋亡是人體細胞去維持生理平衡的基本活性。含有免疫防禦機制且扮演一個抗carcinogenesis(癌化)保護機制的必要的角色，它可經由各種藥劑的誘導去排除損害的細胞或是異常過度增生的細胞。本研究主要利用慧星試驗(圖一)探討奈米微粒對於生殖細胞的DNA 毒性，擬以MTT assay 檢測何種奈米濃度或顆粒粒徑對於生殖細胞的損害較大，再藉由comet assay 測試MTT assay 所篩選出的濃度及粒徑，評估其對生殖細胞之DNA 損害程度。預計本研究成果將對於環境中的奈米顆粒對於生殖細胞的DNA 毒性有進一步的瞭解，以釐清社會對於奈米相關產品使用的疑慮。

第二章、材料與方法

(一) 研究方法及步驟

研究方法以SiO₂、TiO₂ 兩種奈米粒徑來處理下列四種細胞後，以MTT 及comet assay，判斷奈米顆粒對DNA 影響的濃度以及對DNA 的損傷程度。以Flow 檢測細胞是否有發生細胞凋亡，找出細胞凋亡的時間點，再利用Microarray 檢測蛋白的表現進而推測細胞凋亡路徑。使用comet assay 可以比較正常的生殖細胞與經由奈米顆粒處理過的生殖細胞DNA 的損傷程度；若DNA 上有損害，則其破碎的片段會藉由電泳時被拖出細胞，經由染色後在顯微鏡下則呈現出一類似彗星的形狀，此即為稱之彗星分析法的原因。不同程度的傷害會造成DNA 拖尾程度的差異，因此，利用其拖尾的程度便可評估細胞DNA damage 的嚴重性。

實驗材料：四種老鼠的睪丸細胞GC-1、GC-2、TM3、TM4

* TM3 mouse Leydig cell line (ATCC® Number: CRL-1714™)

* TM4 mouse Sertoli cell line (ATCC® Number: CRL-1715™)

* GC-2spd (ts) cell line (Mouse spermatocyte, ATCC® Number: CRL-2196™)

* GC-1 spg cell line (Mouse spermatogonia, ATCC® Number: CRL-2053™)

由於生殖細胞GC-1(spermatocyte cell) 屬於精母細胞、GC-2(spermatogonia cell)屬於精原細胞，而生殖細胞TM3(Leydig cell) 屬於睪丸間質、TM4 (Sertoli cell) 屬於支持性細胞，可藉此四種與造精過程有關的細胞，判斷對奈米顆粒所產生的毒性效應。

實驗方法：

1.MTT assay

原理：MTT assay 是種生物學上常用來測定細胞存活率或增殖作用的方法，其主要依賴活細胞內粒線體中的琥珀酸去氫酶之作用將MTT 之tetrazolium 轉為藍色之產物MTT formazan，堆積於細胞中，當加入DMSO 將其溶解，則可利用測OD 值得知細胞還原MTT 的能力(formazan 形成量)，此吸光值代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故MTT assay 可用作細胞存活率的指標。MTT assay 因為擁有快速、經濟和無放射性元素污染之問題，常被使用為細胞存活率及巨噬細胞吞噬能力之測定。

細胞存活率(%) = 吸光值(sample) / 吸光值(control) × 100 (%)

方法步驟：

將要使用的細胞種在 96 孔盤中貼附，再加入要使用的試劑，等待反應時間過後，再加入MTT 10 µl 等候4 小時，再將液體全部抽出，加入100µl DMSO，用ELISA reader OD550/620 nm。

2. Comet assay

原理：彗星試驗（Comet Assay）又稱單細胞凝膠電泳（SCGE）是一項較新的電泳方法，是一種快速、靈敏、簡便的檢驗DNA 損傷的方法，廣泛的應用於DNA 放射損傷，DNA 交聯的檢測，藥物的遺傳毒性評估，細胞凋零鑑定等工作。單細胞凝膠電泳技術以廣泛應用於單細胞 DNA 損傷的檢測。其實驗原理在於損傷的DNA 在電場中從核內溢出行程與細胞核『頭』部相區別的『尾』部。目前主要用於開頭指標、距離指標、強度指標、尾距指標等四類指標分析實驗結果。

方法步驟：

取 75 μ l (0.5%LMA+0.5%NMA 在PBS) 置放於載玻片上蓋上蓋玻片以製作第一層膠，約5分鐘後除去蓋玻片備用，將經奈米顆粒處理過的生殖細胞混合均勻後取10 μ l 置入1.5 ml 離心管，再加入75 μ l 的5% LMA（第二層膠）混合均勻後，取75 μ l 置於第一層膠上，放置在40C 冰箱凝固約6-7 分鐘後除去蓋玻片，放至lysis buffer（5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, 0.5 M

EDTA, pH=8-10, 1% Triton-x 100）於4°C 中作用60 分鐘後，再將玻片放在Alkaline buffer pH=13 於4°C 中作用20 分鐘後，電泳10 分鐘（條件30 V、300 mA，從負極前進正極），再置入0.4 M Tris-HCl 10 分鐘，再置入甲醇中10 分鐘，取出玻片等乾後，加入20 μ l PI(2.5 μ g/ml)染色。至螢光顯微鏡觀察觀察，照相。判讀標準彗星分析之統計方法如下，選取100 個細胞，使用CometScore 分析，即可得到細胞DNA 的傷害指數。

3.Flow Cytometry

原理：流式細胞技術(Flow cytometry)是由流體液柱（Fluid stream）約束待測顆粒或細胞，使其一顆一顆地排列流經偵測區，該區是雷射與液柱之交會處，帶有螢光標記之微顆粒暴露於雷射光束時，因受雷射之激發而釋放出一定波長的光，將這些光信號轉為電流信號後，即可對微顆粒進行計數或偵測，並且擁有快速檢測的能力。為了控制待測顆粒，使其能依序排列的通過偵測區，因此，必須對樣品液柱進行約束，而約束待測顆粒的方法除了毛細管(Capillary)外，於1999 年時，David P. Schrum et al.於玻璃晶片

上製作十字型微槽道，利用電力聚焦(Electrokinetic focusing)的方式驅動邊鞘流(Sheath flow)，用此約束樣品濃度為particles/ml 的液柱，並使用兩個光電倍增管同時分別偵測螢光及散射光信號，依散射光信號大小來分辨直徑1 μ m 含螢光及直徑2 μ m 不含螢

光之不導電乳膠顆粒，同時也偵測螢光信號來對有螢光標記之直徑 $1\mu\text{m}$ 顆粒進行計數。

4. Microarray

原理：生物晶片（biochip），是指在玻璃、塑膠或矽片等材質上，再以微小化技術整合微機電、光電、生化、化學、分子生物學及醫學工程等領域，用來執行醫療檢測、新藥開發、環境檢測及化學合成等用途的精密微小設備。北方墨點法也是傳統上觀察基因表現的方法，但是一次只能觀察一個基因或少數基因，然而生物晶片正好補足北方墨點法的缺點，可以一次

觀察群組型基因，並且經由自動化分析、處理大量樣本，可以節省不少的時間與人力。生物晶片依所放物質的不同，分成三種：基因晶片（gene-chip，又稱為DNA-chip 或 cDNA

Microarray）、實驗室晶片（lab-on-a-chip）、蛋白質晶片（protein-chip）。在晶片上放基因，其為基因晶片；把實驗室功能微小化放在晶片上，其為實驗室晶片；在晶片上放上蛋白質，就是為蛋白質晶片，其中基因晶片的技術發展較為成熟（Yershov et al., 1996）。

方法步驟：

將membrane 取出放在8-well tray，再將1X Blocking Buffer 加入每個well 中，勿產生氣泡。1 ml / membrane。置於shaker 上gentle 搖晃，室溫培養30 min。將Blocking Buffer 倒掉後，每個well 加入1~1.5 ml 的檢體，蓋好蓋子overnight，4 °C gentle shaker。將檢體倒掉，用2 ml/ membrane 的1X Wash Buffer I 清洗3 次每次5 分鐘，每次清洗都要將Wash Buffer I 用suction清除乾淨。再用2 ml 的1X Wash Buffer II 清洗2 次每次5 分鐘，將Wash Buffer 倒掉後，每個well 加入1 ml Biotin-Ab，overnight，4 °C。將檢體倒掉，用2 ml / membrane 的1X Wash Buffer I 清洗3 次每次5 分鐘，每次清洗都要將Wash Buffer I 用suction 清除乾淨。再用2 ml 的1X

Wash Buffer II 清洗2 次每次5 分鐘，將Wash Buffer 倒掉後，每片membrane 加入1.5 ml HRP-Streptavidin solution(1:1000)，overnight，4 °C。將Streptavidin 倒掉，用2 ml / membrane的1X Wash Buffer I 清洗3 次每次5 分鐘，每次清洗都要將Wash Buffer I 用suction 清除乾淨。再用2 ml 的1X Wash Buffer II 清洗2 次每次5 分鐘，將membrane 取出滴乾殘存液體後放到乾tray 或小平板上，加入Detection Buffer，避光反應2 分鐘。Membrane 上的殘液盡量滴乾，將membrane 放在kit 內附的塑膠片後，將membrane 用冷光儀偵測訊號。

第三章、結果

1. MTT assay

使用MTT assay方法檢測GC-1、GC-2、TM3、TM4 四株細胞經由奈米微粒處理後細胞的影響，由圖(1)(2)(3)(4)可得知100nm對細胞影響較不顯著，反觀10nm的處理則呈現dose dependent的現象，可得奈米粒徑大小為是否引起細胞毒性的指標。100nm與10nm的TiO₂對生殖細胞的毒性影響有顯著差異，粒徑較大的100nm較不易對生殖細胞產生毒性作用，反觀10nm的粒徑對生殖細胞因為粒徑過小的影響，使生殖細胞出現明顯的細胞凋亡情形。由此結果可得知，無害的奈米材料，會因為粒徑過小而造成生殖細胞因為濃度過高而凋亡。

2. Comet assay

由圖5可得知 Comet assay 的分析圖可將損傷的 DNA 碎片呈現於電泳膠體內的細胞拖尾，經由染色後在顯微鏡下則觀察出類似彗星的形狀，不同濃度的毒性傷害會造成DNA拖尾程度的差異，利用其拖尾的程度便可評估 GC-1 生殖細胞的 DNA damage 的嚴重性，0.5ug/ml 的 10nm TiO₂ 在 MTT assay 雖然沒有明顯細胞凋亡的情形，但是利用 Comet assay 分析的結果可以清楚觀察到生殖細胞內 DNA 明顯損傷，細胞處理濃度越高，DNA 的碎片拖尾越是嚴重。此結果證明，奈米的粒徑大小會造成生殖細胞的DNA毒性損傷。

3. Flow Cytometry

由圖6可得知不同粒徑的奈米微粒，在相同濃度下對細胞並未在早期產生損傷或引發細胞凋亡，但在Comet assay卻證實後其細胞內基因會因為奈米而產生損傷，並走向細胞凋亡，因此證實奈米微粒對細胞的影響為一長久且深切的傷害。

第四章、討論

本研究在奈米微粒的影響下生殖細胞 DNA 損傷的程度以及是否會造成，藉由統計分析出奈米顆粒的大小及濃度在日常的生活之中潛在的不孕症產生影響。本研究藉由 MTT assay 將四種不同的生殖細胞(GC-1、GC-2、TM3、TM4)，用兩種奈米(SiO₂ 及 TiO₂)分別以奈米粒徑大小以及不同濃度的處理之後能夠得知奈米粒徑對於生殖細胞的存活率或增殖能力有影響，再藉由 comet assay 得知何種奈米粒徑大小或是不同濃度的奈米對於生殖細胞的DNA 影響較為劇烈，或是Flow Cytometry 測試不同粒徑大小的奈米對於生殖細胞的細胞凋亡是否有直接的影響，不同程度的傷害會造成DNA 拖尾程度的差異，因此，利用其拖尾的程度便可評估細胞DNA damage 的嚴重性。

本研究從初期MTT assay的結果就已經證實細胞培養在奈米微粒中，會產生因不同濃度及不同粒徑而發生的不同死亡率，再經由Comet assay實驗證明從低濃度到高濃度的奈米粒徑來作為實驗對象，可得到不同層度的細胞內基因損傷的梯度影響。

第五章、結論

由於生殖細胞GC-1(spermatocyte cell) 屬於精母細胞、GC-2(spermatogonia cell)屬於精原細胞，而生殖細胞TM3(Leydig cell) 屬於睪丸間質、TM4 (Sertoli cell) 屬於支持性細胞，可藉此四種與造精過程有關的細胞，判斷對奈米顆粒所產生的毒性效應。利用MTT assay 檢測何種奈米濃度或顆粒粒徑對於生殖細胞GC1及GC2的有明顯生長抑制，在10 nm 5ug/ml濃度，即有明顯生長抑制的情形發生。以慧星試驗 (comet assay) 探討奈米微粒對於生殖細胞的DNA 毒性發現低濃度的5ug/ml濃度已有細胞明顯拖尾的情形發生，顯見奈米顆粒確實會造成DNA得損傷。由於流速細胞儀的分析較為敏感，再低濃度0.5ug/ml濃度實已看到細胞凋亡的程度微幅提高，綜合以上的結果，奈米微粒對於睪丸細胞的生長、DNA損傷確實有明顯之影響，至於對於細胞凋亡的程度也有微幅提高，其詳細機轉，有待後續進一步研究。

參考文獻

- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, et al. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* 2004;77(2):347-357.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;175(3):191-199.
- Donaldson K, Brown D, Clouter A, et al. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med.* 2002;15(2):213-220.
- Donaldson K, Mills N, MacNee W, Robinson S, Newby D. Role of inflammation in cardiopulmonary health effects of PM. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;207(2):483-488.
- Ferin J, Oberdorster G, Penney DP. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;6(5):535-542.
- Ferin J, Oberdorster G. Polymer degradation and ultrafine particles: potential inhalation hazards for astronauts. *Acta Astronaut.* 1992;27:257-259.
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989;119(2):203-210.
- Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2000;463(1):13-31.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* 1996;363(2):89-96.
- L'Azou B, Jorly J, On D, et al. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol.* 2008;5:22
- Larry IL, Stuart S. Infertility in the male. Third edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis,

1997;173-174.

Nemmar A, Melghit K, Ali BH. The acute proinflammatory and prothrombotic effects of pulmonary exposure to rutile TiO₂ nanorods in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(5):610-619.

Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*. 2005;2:8.

Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. 2004;16(6-7):437-445.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;123(1):291-298.

Paull R, Wolfe J, Hebert P, Sinkula M. Investing in nanotechnology. *Nat Biotechnol*. Oct 2003;21(10):1144-1147.

Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(4):490-495.

Rahman Q, Lohani M, Dopp E, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Perspect*. 2002;110(8):797-800.

Sakai H, Ito E, Cai RX, et al. Intracellular Ca²⁺ concentration change of T24 cell under irradiation in the presence of TiO₂ ultrafine particles. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1201(2):259-265.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-191.

Stone V, Johnston H, Clift MJ. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience*.

2007;6(4):331-340.

Vamanu CI, Cimpan MR, Hol PJ, Sornes S, Lie SA, Gjerdet NR. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicol In Vitro*. 2008;22(7):1689-1696.

Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(10):4913-4918.

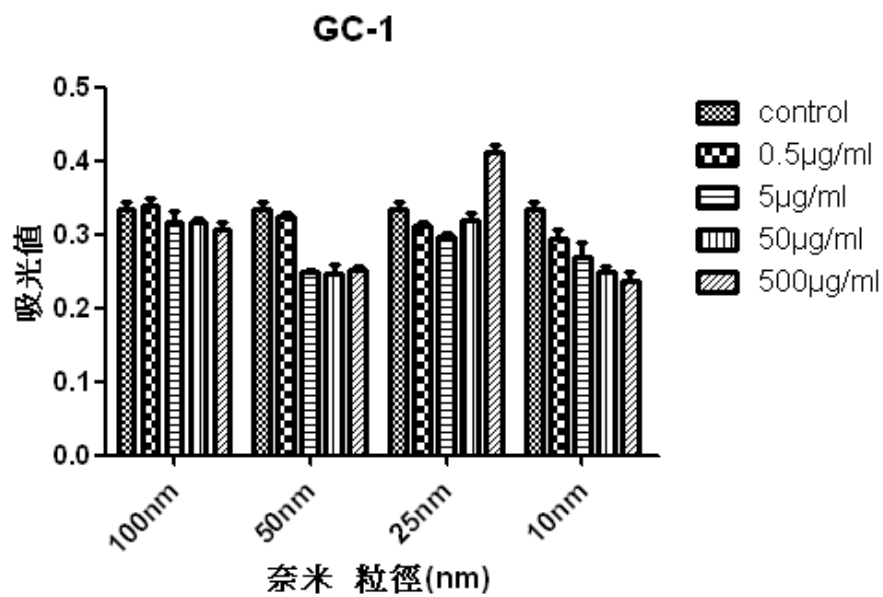


圖1.GC-1處理 TiO_2 四種粒徑(100nm、50nm、25nm、10nm)24小時，MTT分析細胞存活率

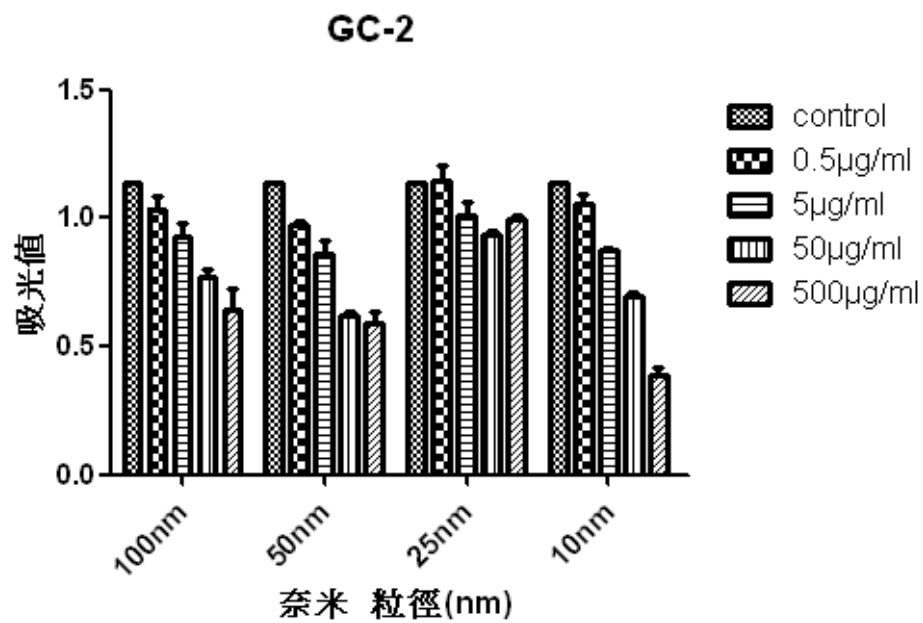


圖2.GC-2處理 TiO_2 四種粒徑(100nm、50nm、25nm、10nm)24小時，MTT分析細胞存活率

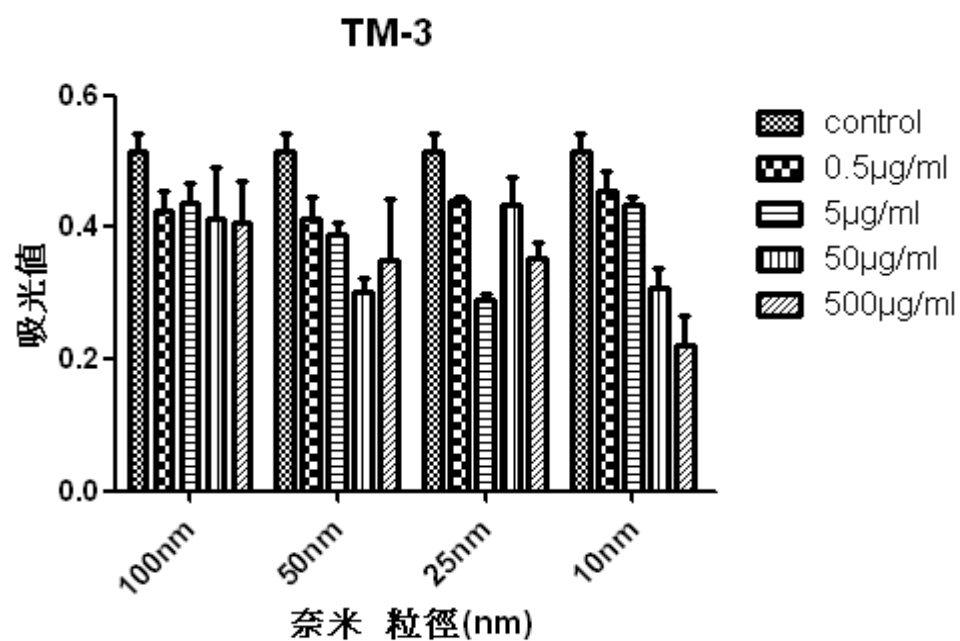


圖3.TM3處理 TiO_2 四種粒徑(100nm、50nm、25nm、10nm)24小時，MTT分析細胞存活率

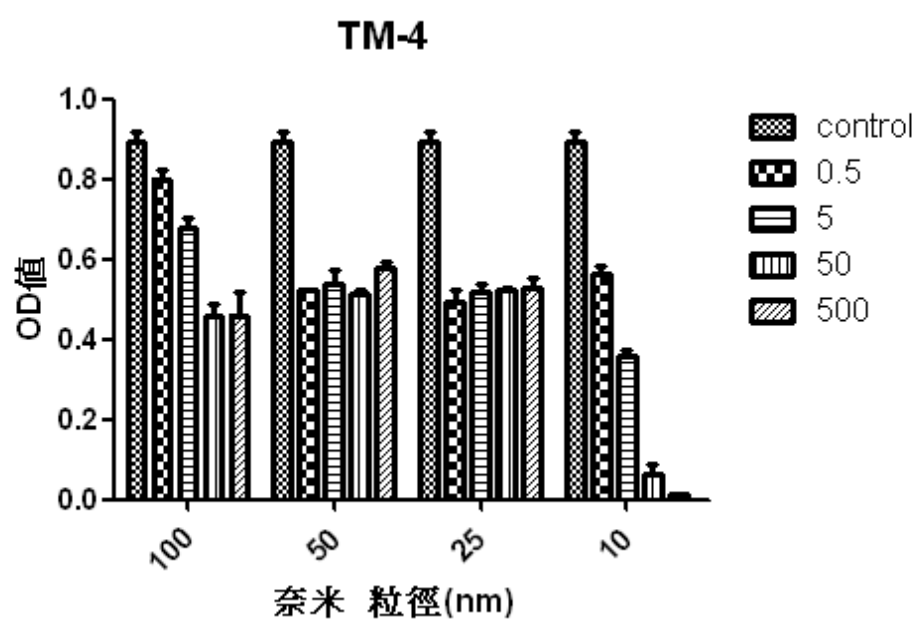


圖4.TM4處理 TiO_2 四種粒徑(100nm、50nm、25nm、10nm)24小時，MTT分析細胞存活率

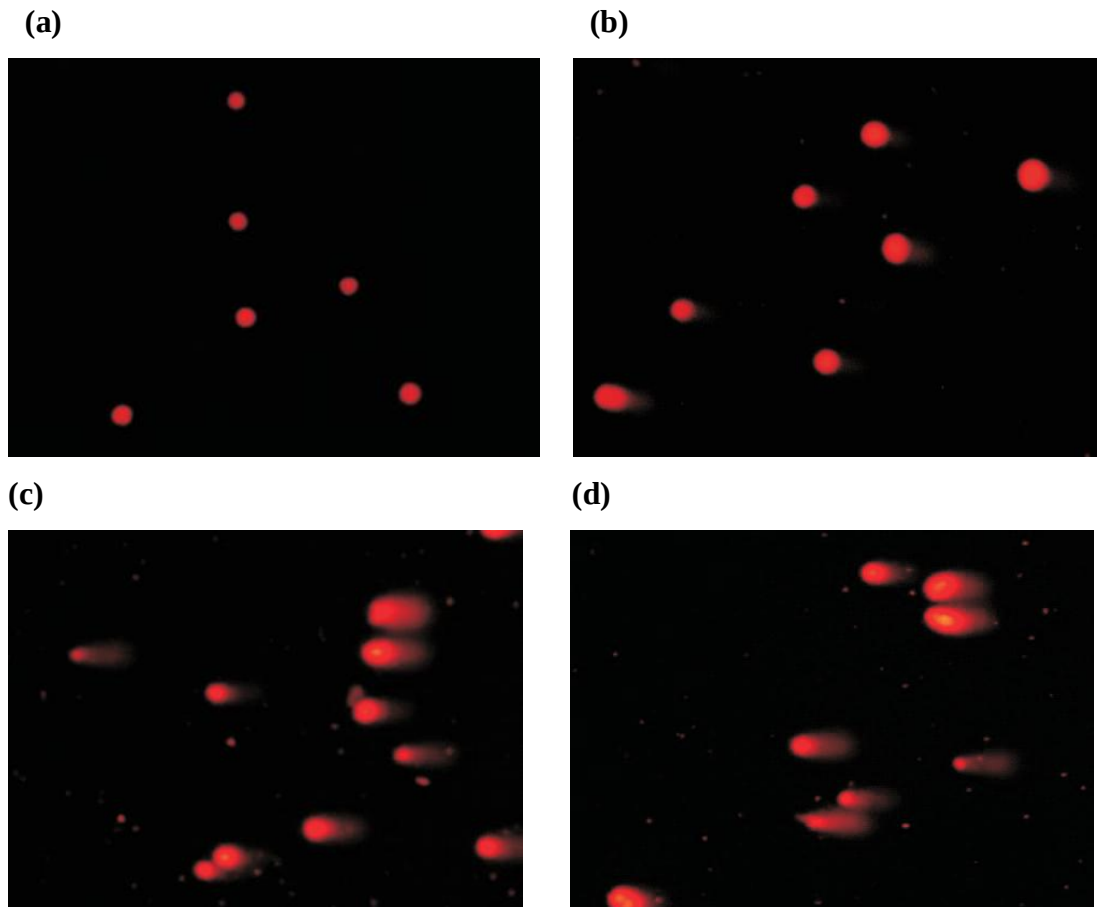
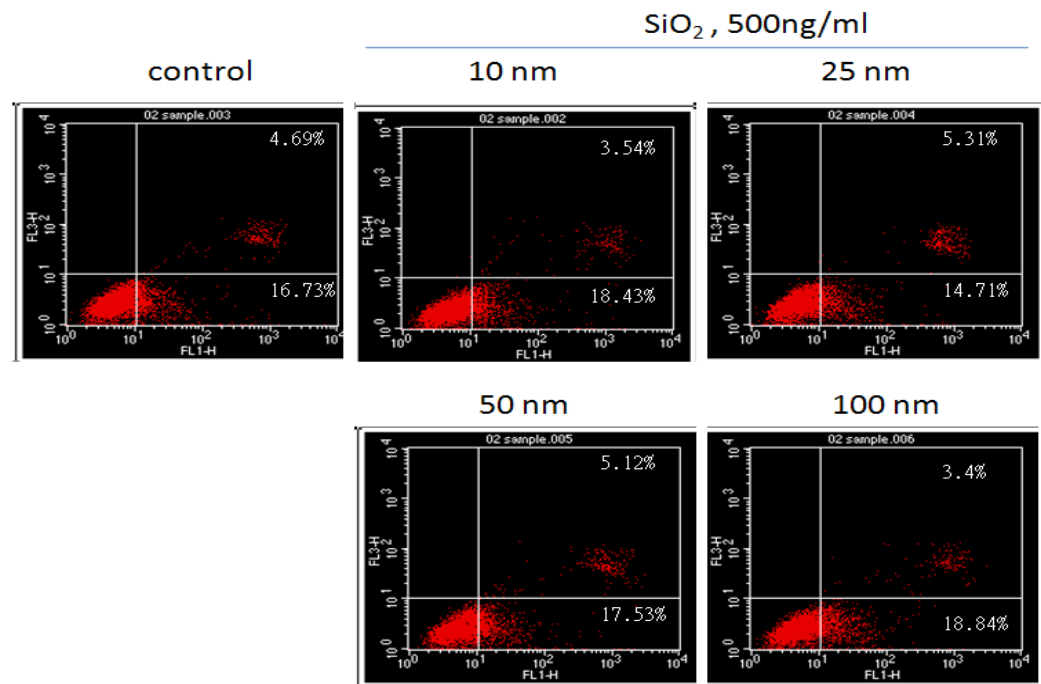


圖5. (a)Negative- GC-1細胞的Control組，(b)0.5ug/ml-GC-1細胞處理10nm 0.5ug的TiO₂ 24小時，(c)5ug/ml-GC-1細胞處理10nm 5ug/ml的TiO₂ 24小時，(d)50ug/ml-GC-1細胞處理10nm 50ug/ml的TiO₂ 24小時

7-AAD



Annexin V-FITC

圖6. 10nm、25nm、50nm及100nm的SiO₂高濃度(500 ng/ml)暴露4hrs，皆會小幅提高細胞的early apoptosis和death程度。

國家衛生研究院<http://www.atcc.org/Default.aspx?base>

(七)需要指導教授指導內容

1. 參與研究的態度培養
2. 文獻資料的導讀
3. 實驗技術操作的指導，包括：comet assay 技術、流式細胞技術、生殖細胞培養等技術
4. 實驗結果分析判讀統整與檢討
5. 實驗結果整理、統計、呈現及報告的撰寫

大專學生參與專題研究計畫

指導教授初評意見表

一、學生潛力評估：

1. 本學生-林青弘對研究具有高度的熱忱，主動找教師進行研究相關的探討
2. 本學生在學業成績表現在中上程度，已具備進行研究工作的基本能力與知識
3. 本學生主動積極參與研究工作，具有高度培訓的潛力，未來可會成為優秀生物科技人才。

二、對學生所提研究計畫內容之評述：

本學生的研究內容、材料及相關技術均已在本研究室成熟，包括：相關專業知識、生殖細胞

培養等技術，若能積極進行此研究工作，應可達到預定的目標。

三、指導方式：

本人擬指導的部份包括以下幾方面：

1. 參與研究的態度培養：對於大專生訓練，正確的研究態度的養成，重於實際實驗結果的呈現。
2. 實驗技術操作的指導：comet assay 技術、流式細胞技術、生殖細胞培養等技術

3.文獻資料的導讀

4.實驗結果分析判讀統整與檢討

5.實驗結果整理、統計、呈現及報告的撰寫

承諾指導教授簽名：鄧燕妮 100 年 2 月23日