

烏脚病流行區疑膀胱致癌物的初步動物實驗

江漢聲 溫大啓 陳慧敏 呂鋒洲* 孫家棟**

摘要

本研究以烏脚病流行區疑膀胱致癌物砷(As_2O_3)、螢光物質主成份 Phthalate (Diocetyl phthalate, Di(2-ethylhexyl) Ester), Humic Acid (Nitrohumic Acid) 做 Wistar Rats 的餵食實驗, 並和 0.05% BHBN 餵食的正控制組比較, 觀察是否能引起動物膀胱的變化。實驗結果顯示, Phthalate 和 Humic Acid 一起餵食並不會引起動物膀胱的任何變化, 然而如果再加上砷, 則會引起動物膀胱慢性炎症反應和膀胱結石 (3/6; 50%), 但這些變化和正控制組的動物膀胱癌並不相似。

本研究的結論是, 以餵食方式進行動物實驗, 砷、Phthalate、Humic Acid 並不會在 Rat 產生膀胱癌, 然而混合餵食, 會引起 Rat 膀胱慢性炎症和結石的生成, 是否為膀胱癌的前驅變化、或者這些物質是否為膀胱癌的 Promotor, 都須要進一步的實驗來求證。

烏脚病地區膀胱癌的高發率已可從公衛死亡率概算⁽¹⁾, 臨床病例的觀察⁽²⁾, 以及實地的篩檢病例⁽³⁾中證實; 至於可能的病原, 目前的研究多認為來自深井水的飲用⁽⁴⁾, 至於井水中何種物質是致癌物, 則尚未完全瞭解。

長久以來, 井水中含砷被認為是烏脚病的病因⁽⁵⁾, 最近文獻也有慢性砷中毒引起尿路上皮癌的報告^(6,7), 然而動物實驗中尚缺乏直接證據; 此外, 井水中的螢光物質也被懷疑是引起烏脚病的因素⁽⁸⁾, 在我們先前的研究中也曾發現該地井水螢光強度和膀胱癌的流行輿圖相當接近⁽⁹⁾。

根據先前對螢光物質的化學成份分析^(10,11), 螢光物質的主要成份包括 Phthalate 和 Humic Acid, 雖然這兩種成份在以往的動

物實驗中也有致癌的報告⁽¹²⁾, 然而就尿路上皮癌的發生, 並無肯定的研究。所以在本研究的致癌實驗中, 分別以砷、Phthalate 和 Humic Acid 為假設的膀胱致癌物質, 來進行動物致癌實驗。

材料:

本研究以 40 隻 Wistar Rats (雄性) 分四組, 進行比較研究。

使用的致癌材料為:

1. Phthalate + Humic Acid
2. Phthalate + Humic Acid + As_2O_3
3. 0.05% BHBN (正控制組)
4. 一般飼料和飲水 (負控制組)

台北醫學院泌尿科

*台大醫學院生化學科

**台大醫學院病理學科

民國八十年十二月三十一日受理

Phthalate 爲 Di(2-ethylhexyl) Ester 油狀液，均勻混合於飼料之中；Humic Acid 爲 Nitrohumic Acid 粉末，亦均勻混合於飼料中；As₂O₃ 先溶於酸，再測 pH 調成 Buffer，加入飲水中；0.05%BHBN 亦加入飲水之中。

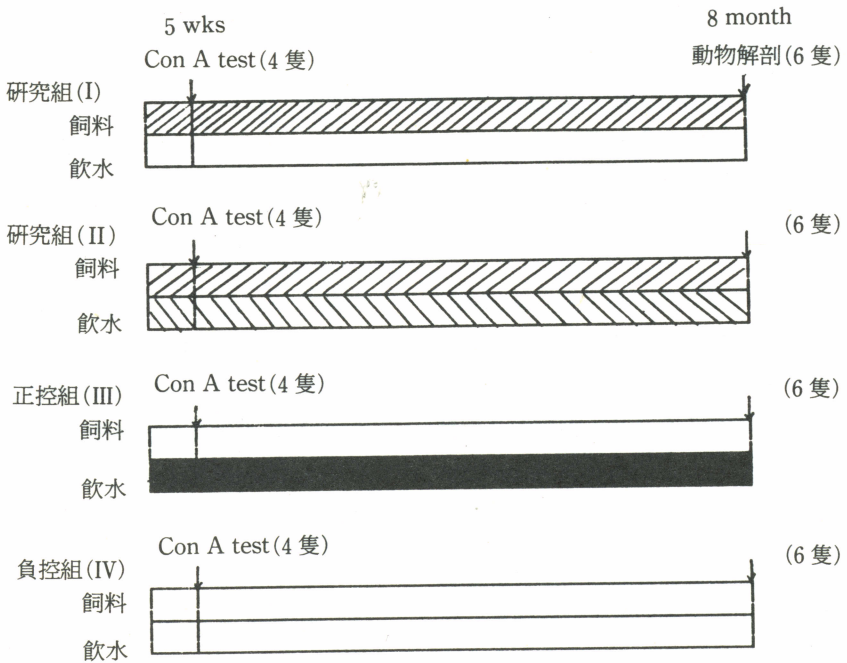
方法：

四組老鼠餵食和解剖程序如圖(一)爲 I 研究組 (一)：飼料中加入 Phthalate 和 Humic Acid，一般飲水。II 研究組 (二)：飼料中加入 Phthalate 和 Humic Acid，飲水中加入 As₂O₃。III 正控制組：一般飼料，飲水中加入

0.05%BHBN。IV 負控制組：一般飼料和一般飲水。Rat 每 2 隻一籠，每組 8 隻，餵食中仔細稱重，並觀察任何外觀的變化，在 5 星期後每組解剖 4 隻做 Concanavalin 凝集反應試驗⁽¹³⁾；其他所有動物在餵食 8 個月後，以乙醚麻醉殺死並解剖，取下膀胱進行病理檢查。

結果：

1. 膀胱黏膜細胞的早期變化(膀胱黏膜細胞 Con A 凝集反應)(表一)：Rats 餵食各種物質五星期之後第一次解剖，每組四隻進行 Con A 反應的結果顯示，第一組和負控制組相

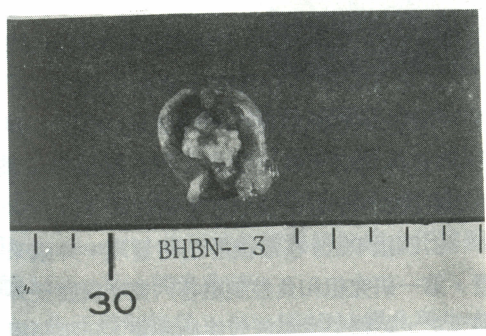


- Phthalate+Humic Acid 於飼料
- As₂O₃ 於飲水中
- 0.05% BHBN 於飲水中
- 一般飼料、一般飲水

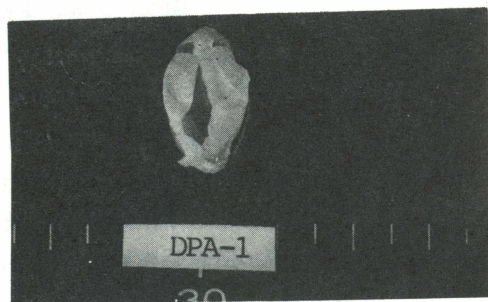
圖一 四組動物實驗流程。

表一 四組動物在五星期餵食後膀胱黏膜細胞的Con A凝集反應

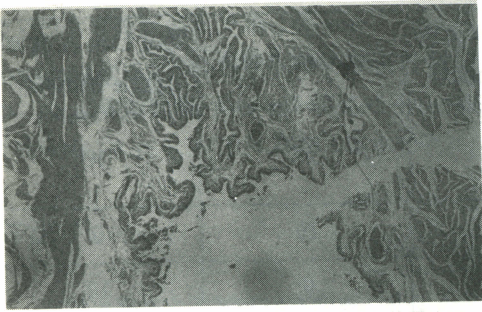
試液 \ 組別	10ul Con A處理	10 ul Con A處理 但加 α -Mm抑制	20ul Con A處理	20ul Con A處理 但加 α -Mm抑制
Cell suspension (ul)	10	10	10	10
PBS (ul)	20	10	10	0
α -Mm (ul)	0	10	0	10
Con A (ul)	10	10	20	20
Number of cell agglutination per cells observed				
Phthalate + Humic Acid	2/110	0/86	0/70	0/74
Phthalate + Humic Acid + As ₂ O ₃	4/200	0/200	3/200	3/200
0.05% BHBH	13/200	3/200	6/200	3/200
Normal water and diet	0/145	0/105	0/100	0/100



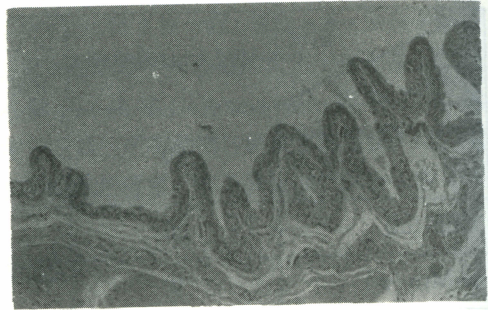
圖二 正控制紅鼠BHBH長出發膀胱癌。



圖三 第二研究組餵食phthalate, Humic Acid和Arsenic老鼠膀胱黏膜變厚，內有炎性反應；50%老鼠有結石生成，但無癌症發生。



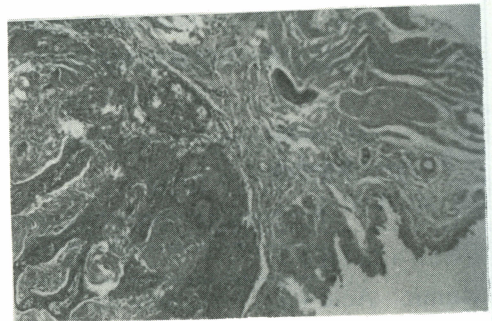
圖四 負控制組膀胱黏膜組織切片正常，無癌症組織或炎性反應。



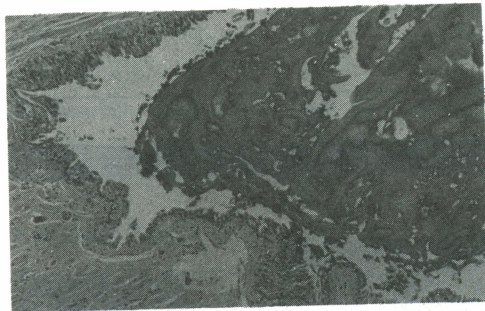
圖五 第一研究組，只餵食Phthalate和Humic Acid膀胱黏膜組織切片正常，無癌組織或炎性反應。



圖六 正控制組餵食BHBN，三隻均有第一級至第二級的移行上皮癌生成。



圖七 正控制組中有兩隻老鼠生成膀胱鱗狀上皮癌並出現典型的Pearl。



圖八 第二研究組中有三隻老鼠的膀胱黏膜發生慢性炎症反應，在膀胱內亦有結石發生。

近，並無膀胱黏膜細胞的凝集反應；正控制組（第三組）餵食 0.05% BHBN 則出現明顯膀胱黏膜細胞的凝集反應，這個反應可為 α -Mm 所抑制，根據 Kakizoe⁽¹³⁾ 和我們先前的研究⁽¹⁴⁾，這種 Con A 引起的膀胱細胞凝集反應為膀胱癌的早期徵候；第二組（飲水中加入砷）則發現膀胱黏膜細胞有變化發生，但凝集反應不

像 BHBN 所引起的反應那麼明顯。

2. 四組 Rats 在最後解剖時發現，外觀來看，第一研究組和負控制組各六隻老鼠膀胱外觀正常，黏膜平滑無任何疾病跡象，正控制組六隻 Rats，每隻膀胱均變大，切面來看長出多發的膀胱癌（圖二），第二研究組的 Rats 六隻膀胱外觀看來均變大，切面看來黏膜變厚、表

面不規則突起，有三隻在膀胱內生成形結晶塊結石(圖三)。就病理切片來看，第一研究組和負控制的膀胱粘膜正常，移行上皮細胞層數和細胞分化均無變化(圖四、五)；正控制組六隻 Rats 都有多發、第一級至第二級的移行上皮癌，並向黏膜下層生長，尚未侵入至肌肉層(圖六)，其中有兩隻併有鱗狀上皮癌，並出現典型的 Peral(圖七)。至於第二研究組中有三隻老鼠的膀胱黏膜發生慢性炎症反應，並在膀胱內形成結石(圖八)。

討論：

1. 本研究初步看來，砷(As_2O_3)、Phthalate(Dioctyl phthalate, Di-(2-ethylhexyl) Ester), Humic Acid (Nitrohumic acid), 在 Rat 餵食實驗來看，都不像膀胱的直接致癌物質，在本實驗的早期篩檢，從 Con A 凝集反應測試並未看出餵食這些物質之後膀胱黏膜細胞會有早期癌的凝集反應；而在最後的解剖來看，所有餵食這些物質的動物，都沒有長出像正控制組以 0.05%BHBN 餵食所引起的膀胱癌。

2. 但如果將砷、Phthalate、Humic Acid 一齊餵食 Rat，雖然無法致癌，但在最後解剖動物時卻發現膀胱有炎症反應，六隻中有三隻並有結石的生成；回顧 Con A 細胞凝集反應，也有不同於負控制組的情形，這個現象，很可能是較輕度的膀胱組織變化先兆。如果烏脚病流行區井水中含螢光物質(Phthalate+Humic Acid)和砷，長期飲用之後，可能會造成動物膀胱黏膜組織的慢性炎症反應，也可能造成結石⁽¹⁵⁾；這種情況，可能假設為膀胱癌的 Promotor⁽¹⁴⁾；也可能假設為膀胱癌由正常細胞 Metaplaia 的先兆⁽¹⁶⁾。

3. 正控制組為 0.05%BHBN 餵食所生成的膀胱癌為多發、表淺(尚未至肌肉層)膀胱癌，其中兩隻併有鱗狀上皮癌和 Pearl 生成，這種膀胱癌從發生學原理判斷，比較接近是慢

性炎症所引發細胞變性的癌症生成⁽¹⁷⁾。

4. 本實驗所得到的結果，有許多新發現尚待進一步的求證：

(1) Phthalate 在文獻中的動物實驗曾引發膀胱結石，本實驗中單獨給 Phthalate, Rat 膀胱並無任何變化，是否有劑量或時間上尚不夠引起炎症反應。

(2) 如果給 Phthalate 後再加上 Arsenic 則引起 Rat 膀胱的強烈變化，證明 Arsenic 可促進炎症反應的生成，而更進一步的角色和 Cancer Promotor 的可能則需再重覆、多面性實驗。

(3) 這些疑致癌物質在 Rat 所引起的膀胱變化是否為 Specie-Specific? 在劑量和時間不同的情況下，是否會有不同的結果產生？這些物質是否為致癌物質(如 BHBN)的 Promotor? 以上的問題則必須在後續進一步的動物實驗中做成結論。

參考文獻

1. Chen CJ, Chuang YC, Lin TM et al: Malignant neoplasm among residents of a blackfoot disease endemic area in Taiwan: High arsenic artesian well water and cancer. *Cancer Res* 45; 5895-5899, 1985.
2. Su. IJ, Chen WJ, Huang MH et al: High risk of transitional cell carcinoma of urinary tract in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Chinese Oncol Soc* 1 (4); 29-36, 1985.
3. Chiang HS, Hong CL, Guo HR et al: Comparative study on the high prevalence of bladder cancer in the blackfoot disease endemic area in Taiwan. *J Formosan Med Assoc* 87; 1074-80, 1988.
4. Chen CJ, Wu MM, Lee SS et al: Atherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well-water. *Arteriosclerosis* 8; 452-460,

- 1988.
5. Tseng WP, Chu HM, How SW, et al. Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Nat Cancer Inst* 40; 453-463, 1968.
 6. Nomura Y, Nojri A, Kudo S et al: two cases of transitional cell carcinoma of urinary tract on patients with chronic arsenic poisoning. *J Kumanoto Med Society* 60; 13-24, 1986.
 7. Koh E, Kondon N, Kaihara H et al; Ureteral tumor with multiple Bowen's disease forty-two years after exposure to arsenic. *Eur Urol* 16; 398-400, 1989.
 8. Lu FJ, Liu TM: Fluorescent compounds in drinking water of blackfoot disease endemic areas: animal experimental model. *J Formosan Med Assoc* 85; 358, 1986.
 9. Lu FJ, Guo HR, Chiang HS et al: Relationships between the fluorescent intensity of well water and incidence rate of bladder cancer. *J Chinese Oncol Soc* 2 (3), 14-23, 1986.
 10. 呂鋒洲，沈佩明：烏脚病患區某一井水中的化學致癌物質：辟腐酸脂。 *J Formosan Med Assoc* 86: 734-742, 1982.
 11. Lu FJ: Fluorescent humic substances and blackfoot disease in Taiwan. *Applied Organometallic Chemistry* 4; 191-195, 1990.
 12. Douglas GR, Hugengaltz AP, Blakey DH: Genetic toxicology of phthalate esters: mutagenic and other genotoxic effects. *Environmental Health Perspectives* 65; 255-262, 1986.
 13. Kakizoe T, Kawachi T, Okasa M: Concanavalin A agglutination of bladder cells of rats treated with bladder carcinogens; A rapid new test to detect bladder carcinogens. *Cancer Letters* 5 (1978) 285-290.
 14. Chiang HS, Lu FJ, Chen CC, et al: BHBN induced animal bladder cancer and early screening method. *J Chinese Oncol Soc* 6 (4); 20-26, 1990.
 15. Chin TY, Tyl RW, Popp JA et al: Chemical urolithiasis I. characteristics of bladder stone induction by terephthalic acid and Dimethyl terephthalate in weanling Fischer-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 58; 307-321, 1981.
 16. Fukushima S, Murasaki G, Hirose M et al; Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Acta Pathol Jpn* 32; 243-250, 1982.
 17. Mostofi FK: Pathological aspects and spread of carcinoma of the bladder. *JAMA* 206; 1764-1769, 1968.

Preliminary Result of Animal Experiment with Suspicious Carcinogen in Blackfoot Disease Endemic Area

Han-Sun Chiang, Ta-Chi Wen, Huei-Min Chen,
Fung-Jou Lu* and Chia-Tung Shun**

ABSTRACT

In order to understand the carcinogenesis of urinary bladder in Blackfoot Disease Endemic Area, this study is performing a series of animal experiments. Three kinds of chemical compound-Phthalate (Diocetyl phthalate, Di (2-ethylhexyl) Ester), Humic Acid (Nitro humic Acid) and Arsenics (As_2O_3)-which had been considered as the suspicious bladder carcinogen in the BFD-endemic area in the previous investigation, was used to feed Wistar Rats in different groups. The results could be compared to the negative and positive control group, the rats of positive group were fed with 0.05% BHBN (N-butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine).

In our preliminary result, phthalate and humic acid can not induce any pathological change on the urinary bladder of rats, however, if we put the Arsenic together to feed rats, it will cause remarkable inflammatory change of the bladder epithelium with bladder stone formation (3/6, 50%). This inflammatory reaction is not similar to that of the bladder cancer induced by 0.05% BHBN in the rats of positive control. The result of this study may conclude that Arsenic, Phthalate and Humic Acid will not induce bladder cancer on rats by the method of feeding. There is still an inflammatory change with bladder stone formation when all of these compounds is put together to feed the rats. Whether this inflammatory change is precancerous reaction, or these compounds might play a role of cancer promotor is needed for further experiment.

Department of Urology, Taipei Medical College, Taipei, Taiwan, R. O. C.

*Department of Biochemistry, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R. O. C.

**Department of Pathology, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, R. O. C.

Received for Publication: December 31, 1991