RRPC89030779 (11.P)

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

臺灣烏腳病盛行地區高血壓、糖尿病與心血管疾病之分子流行病學研究

The Molecular Epidemiological Study of Hypertension, Diabetes and Cardiovascular Disease in Blackfoot Disease Hyperendemic Area in Taiwan

計畫編號: NSC 89-2320-B-038-013
執行期限:於88年08月01日至89年07月31日

主持人:薛玉梅教授 台北醫學大學醫學系公共衛生學科

一.中英文摘要

本研究為探討臺灣烏腳病高盛行地區居民高血壓、糖尿病與心血管疾病盛行率與尿液中無機砷甲基化代謝物種比例、血清微量營養元素濃度等因子之間的關係。研究對象乃選擇居住於烏腳病高盛行里，好美、復興、新民三里居民。在78年1至2月進行健康檢查，參加人數共898人。經醫師診斷為糖尿病者86人，高血壓者168人和78名心電圖判讀為缺血性心臟病之居民為病例組，另外選取心電圖正常且無糖尿病、高血壓、心絞痛或疑患心肌梗塞之居民為對照組。從-20℃冰庫中找出符合條件之研究對象的尿液利用高效能液相層析儀連結氫化器及原子吸收光譜儀進行無機砷甲基化代謝物種(三價砷酸、五價砷酸、單甲基砷酸及雙甲基砷酸) 分析及定量。此外，同時從-70℃冰庫中找出符合條件之研究對象的血清利用高效能液相層析儀進行血清微量營養元素 (α-維生素E、α-與β-胡蘿蔔素、蕃茄紅素與維生素A)濃度測定。本研究發現α-維生素E越高者高血壓危險性顯著偏低。維生素A高者糖尿病危險性顯著偏低。調整年齡、性別、抽菸、喝酒、膽固醇與三酸甘油脂之多變項分析結果發現累積砷暴露越高且尿液單甲基砷酸百分比越高者其高血壓危險性顯著偏高，但糖尿病危險性並無顯著關係。

關鍵詞： 砷、物種分析、微量營養素

Abstract

To explore the relationship among serum micronutrients, arsenic methylation capability, and the development of hypertension, diabetes, and cardiovascular disease, 898 residents aged 30 or above were recruited from three arseniasis-hyperendemic villages from January to February 1992. A total of 168 hypertension and 86 diabetes cases were diagnosed by internist, and EKG diagnosed 78 cases as being affected with ischemic heart disease. In addition, age-sex-matched healthy controls were chosen as study subjects. We analyzed arsenic species (arsenate, arsenite, monomethyl-arsonic acid, and dimethy-larsinic acid) in urine using high performance liquid chromatography (HPLC) on line liked to hydride generator and atomic absorption spectrophotometer (HG-AAS), and we also determined the micronutrients (retinol, α-tocopherol, lycopene, α- and β-carotene) of

serum using HPLC. We found that the higher α -tocopherol level, the higher risk of hypertension. The higher retinol level, the higher diabetes risk. On the other hand, we found that the higher cumulative arsenic and urinary monoarsonic acid percent, the higher hypertension risk after age, sex, cigarette smoking, alcohol drinking, cholesterol, and triglyceride adjustment. But, the risk of diabetes did not related.

Keywords： • Arsenic • Arsenic Speciation • Micronutrients

二計畫緣由與目的

慢性砷中毒被認為同時具有致癌性及致動脈粥狀硬化的毒性(1)。烏腳病為台灣西南沿海地區盛行之獨特的周邊血管病變(2)，其與當地深井水中高含砷量有密切關係(3-6)。病理研究顯示烏腳病是嚴重的系統性動脈粥狀硬化(3)，同時伴有乾性壞疽及自發性脫肢(7)。烏腳病病患死於缺血性心臟病以及皮膚癌，膀胱癌，肝癌，和直腸癌有顯著偏高的危險性(4)。

長期無機砷暴露被證實與動脈粥狀硬化症有相關性(4，8)，而且無機砷被認為是動脈粥狀硬化的最可能且最重要的病因(8)。慢性的無機砷暴露對心血管系統有毒性效應。心血管疾病與周邊血管疾病危險性的增加均與砷的暴露有關(8)。除台灣(5)外、智利(9)和墨西哥(10)皆已發現環境中經由飲用水的無機砷暴露，德國葡萄酒工人飲用受砷污染的紅酒導致周邊血管病變(11)。而煉銅礦工人也發現血管功能損傷和雷諾氏症的現象(12)。動脈粥狀硬化是潛在性的病理變化，而烏腳病的誘導期約20-30年，故需要更敏感的方法如都卜勒（Doppler Ultra Sound）超音波測定肢端循環。利用都卜勒超音波檢查手臂與腳踝收縮壓，發現烏腳病盛行地區居民踝臂收縮壓比值(踝/臂指標)比非烏腳病盛行地區居民偏低，顯示烏腳病盛行地區居民不正常微循環，即疑似周邊血管病變的危險性比非烏腳病盛行地區顯著偏高(13-14)。根據踝/臂指標<0.9定義為周邊血管病變，烏腳病盛行地區居民周邊血管病變盛行率與慢性砷暴露指標呈劑量效應關係(15)。

過去研究指出無機砷暴露與缺血性心臟病死亡率有顯著相關 (3，6)。最近研究指出缺血性心臟病死亡率與長期砷暴露指標-累積砷暴露呈劑量效應關係(16)。因職業暴露於砷的煉銅礦(17)、掃煙囪(18)和玻璃製造(19)工人以及智利(20)和日本(21)，經由飲用水的無機砷暴露，其冠狀動脈血管疾病死亡率皆顯著偏高。

無機砷誘發之烏腳病與缺血性心臟病的原因可能是經由直接對內皮細胞(endothelial cells)，平滑肌細胞，和巨噬細胞的粥狀硬化過程(atherogenic process)引起(22)，且/或經由動脈粥狀硬化危險因子例如高血壓(23)和糖尿病(24)間接形成。

過去研究指出烏腳病盛行地區糖尿病盛行率與累積砷暴露之間呈劑量效應關係(24)。最近研究發現瑞典煉銅礦(25)及玻璃工人(26)之職業砷暴露與糖尿病危險性顯著相關。西孟加拉砷暴露的皮膚角化症(keratosis)病患糖尿病的盛行率隨著砷暴露量的增加有顯著的增加(27)。Jensen等在1998年對40位職業砷暴露的工人進行糖化血紅素(glycosylated haemoglobin)的檢測發現，砷暴露者全血中糖化血紅素的量是5.4 %比沒有砷暴露者的4.4 %顯著偏高(28)。動物實驗中，以hydroxylamine和arsenic一起注入小白鼠體內，發現葡萄糖誘發之胰島素 (glucose-induced insulin)的分泌顯著減少，而且鼠體之β細胞也有退化及壞死的現象(29)。Douen等實驗發現，大白鼠脂肪細胞 (adipocytes)吸收葡萄糖 (D-glucose)的能力會被三價砷酸(phenylarsine oxide, PAO) 所抑制(30)。另有實驗發現，PAO可以抑制大白鼠脂肪細胞與骨骼肌經胰島素刺激所產生之葡萄糖運送 (insulin-stimulated glucose transport)(31)。雖然在動物實驗及流行病學研究中，都能證實無機砷的暴露與糖尿病的發生有顯著的相關，但無機砷引發糖尿病的

機轉到目前為止並不十分清楚。

1960年代流行病學研究指出烏腳病盛行地區居民高血壓的盛行率 (32) 比臺灣其他鄉鎮 (33) 顯著偏高。最近研究亦指出烏腳病盛行地區居民年齡、性別標準化高血壓盛行率比非烏腳病盛行地區居民顯著偏高1.5倍 (23)。且與慢性砷暴露指標(飲用深井水年數、飲用水中平均砷濃度與累積砷暴露)呈劑量效應關係 (23)。智利Antofagasta曾長期暴露於高砷飲水之居民，發現40歲以下的慢性砷中毒皮膚炎的病患，其動脈高血壓的盛行率高於未罹患皮膚炎者 (34)。罹患門脈性高血壓的德籍62歲女性，因長期使用砷治療牛皮癬，而發生典型慢性砷中毒的皮膚症狀 (35)，這位非肝硬化性病人的肝門靜脈，有管腔內阻塞及內皮細胞增生現象，作者認為這些都是使用砷藥所導致的病理特徵。8位長期使用三價砷酸溶液(Fowler氏溶液)治療牛皮癬的病人，全部都併發非肝硬化性門脈高血壓(36)。Jensen等在1998年對40位職業身暴露的工人所進行的研究中也發現，砷暴露的工人平均收縮壓為125 mmHg也顯著的比非暴露組的117 mmHg偏高（28）。無論如何，無機砷引發高血壓的機轉到目前為止尚未十分清楚。

近來，綜合一些學者的研究發現，心臟血管疾病的發生其主要作用是因低密度脂蛋白的氧化促使動脈粥狀硬化的形成（37）。而一些微量營養素，包括α-維生素E(α-tocopherol) (38)、β-胡蘿蔔素(β-carotene) (39)、維生素C(ascorbic acid) (40)等，皆發現其有抗氧化的功能、抑制非氧原子的氧化作用、避免低密度脂蛋白的氧化、且減少動脈粥狀硬化的形成。氧衍生的自由基（oxygen-derived）被認為與糖尿病的發生及併發症的形成有關。自由基促成胰臟β細胞之自體免疫破壞，因而導致胰島素依賴型糖尿病（insulin dependent diabetes mellitus, IDDM）的產生（41）。糖尿病導致小血管及大血管病變併發症是因高血糖、胰島素抗性（insulin resistance）隨後誘發血管粥狀硬化（atherosclerosis）的產生，這些過程中自由基扮演重要角色（41-44）。但是自由基對非胰島素依賴型糖尿病的致病機轉的研究甚少。依賴型糖尿病的病理過程中尚有許多如抗氧化物等其他危險因子扮演重要角色。近年研究發現飲食中補充維他命E可以延緩老鼠胰島素依賴型糖尿病的發生（45）。高血清維生素E被認為與降低非胰島素依賴型糖尿病有關（46）。芬蘭男性降低非胰島素依賴型糖尿病的危險性與血中抗氧化劑維生素E與胡蘿蔔素之間有顯著相關，但在調整心血管疾病危險因子後則此相關性不存在（47）。流行病學研究顯示飲食中攝取較低的抗氧化物和血漿抗氧化物濃度偏低與高血壓、動脈粥狀硬化、心肌梗塞與中風（48-50）有顯著相關。隨機分派、雙盲，交差設計的臨床試驗中發現口服抗氧化物補充劑（內含硫酸鋅200 mg，維生素C 500 mg，維生素E 600 mg和胡蘿蔔素30 mg）八週後顯著地降低血壓（51）。此外，在中國大陸微量元素缺乏鄉村地區六年追蹤研究計畫中服用複方維生素補充劑者比未服用者心血管疾病死亡率與高血壓的盛行率顯著偏低（52）。最近我們的研究指出烏腳病盛行地區居民在調整年齡、性別與累積砷暴露後，血清中的胡羅蔔素偏低與皮膚癌的發生率(53)、缺血性心臟病（54）與周邊血管疾病（55）盛行率顯著相關。血清中微量營養素是否與該地區高血壓與糖尿病盛行率有關？尚待進一步探討。

人體攝取無機砷後，其代謝過程相關複雜。無機砷進入體內，五價砷在血液中還原成三價砷 (56)後，在肝臟中進行甲基化反應。人體攝取無機砷後，最主要的代謝物為dimethylarsinic acid (DMA) 和monomethylarsonic acid (MMA) (57)。DMA的毒性較低 (58)，而且很快地排至尿液中(59)。動物實驗的研究指出，在小白鼠及兔子體中methyl transferase被抑制後，會影響砷的甲基化而造成體內砷滯留的現象(60)。由此結果可能可以證實無機砷的甲基化為哺乳動物中之解毒機轉。尿液中無機砷，單甲基砷酸和雙甲基砷酸所佔比例被用來作為甲基化代謝能力的指標(61)。雖然無機砷甲基化的機轉尚未完全明瞭，但似乎很清楚地知道甲基化是發生在肝臟

而且是酵素參與的反應。肝臟功能不良(麩氨基硫枯竭)顯著地改變了尿液中所排泄的無機砷甲基化代謝物的比例(62)。所以肝臟疾病也許會影響人體內 (62)或大白鼠體內 (63) 三價砷的甲基化反應。在最近研究中我們發現慢性B型肝炎表面抗原帶原且肝功能異常者顯著地增加皮膚癌的盛行率 (64)。此外，又發現累積砷暴露量越高且無機砷甲基化代謝能力較差者皮膚癌發生率顯著偏高 (53)。烏腳病盛行地區的居民被發現營養狀況甚差 (65)。在最近研究中我們亦發現以食用曬乾蕃薯簽為主食的年數作為營養狀況不良的指標，則皮膚癌盛行率和食用曬乾蕃薯簽為主食的年數之間呈現劑量效應關係 (64)。動物實驗報告指出，飲食中低methionine, choline和蛋白質的不良營養狀況時會抑制methyl transferase (66)，而造成較低的甲基化能力，因而減弱砷的解毒能力(67)。烏腳病盛行地區的居民高血壓及糖尿病盛行率是否與無機砷甲基化代謝能力有關? 營養狀況與無機砷甲基化代謝能力和高血壓及糖尿病盛行率之間是否有交互作用? 均需進一步探討。本研究欲利用本人近年研究室中所建立之血清中微量營養素濃度測定方法，另由清華大學楊末雄教授協助已在本研究室中建立完成之尿液無機砷甲基化代謝物種分離及濃度定量方法，進一步進行烏腳病盛行地區居民無機砷誘發糖尿病、高血壓與心臟血管疾病之分子流行病學研究。

研究目的：

1. 探討烏腳病盛行地區居民糖尿病及高血壓盛行率與慢性砷暴露指標(居住烏腳病盛行地區年數，飲用深井水年數與累積砷暴露)的相關性。
2. 探討烏腳病盛行地區居民糖尿病及高血壓盛行率與尿液中無機砷甲基化代謝物種(三價砷酸、五價砷酸、單甲基砷酸、雙甲基砷酸)比例的相關性。
3. 探討烏腳病盛行地區糖尿病及高血壓盛行率與血清中微量營養元素(β-胡蘿蔔素、維生素A與α-維生素E)含量的相關性。
4. 探討烏腳病盛行地區糖尿病及高血壓盛行率與血清中微量營養元素(β-胡蘿蔔素、維生素A與α-維生素E)含量以及尿液中無機砷甲基化代謝物種 (三價砷酸、五價砷酸、單甲基砷酸與雙甲基砷酸)比例間之交互作用。

三.結果與討論

表一為烏腳病高盛行地區研究對象血清中三種微量營養元素(維生素A、維生素E與β-胡蘿蔔素)之分佈狀況。女性血清中的維生素A與維生素E顯著較男性偏低，而β-胡蘿蔔素卻比男性顯著偏高。糖尿病病患血清中維生素E的含量顯著高於無糖尿病者，其他營養素並無顯著不同。高血壓病患與無高血壓者血清中三種微量營養素含量並無顯著差異。無高血壓且有糖尿病者之維生素E的含量顯著高於無高血壓且無糖尿病者以及有高血壓且無糖尿病者。

表一 研究對象血清中微量營養元素(維生素A、維生素E、蕃茄紅素、β-胡蘿蔔素)的分佈情況

變項名稱		維生素A(μg/ml)		維生素E(μg/ml)	β-胡蘿蔔素(μg/dl)
		人數	平均值±標準誤差	平均值±標準誤差	平均值±標準誤差
總人數		403	0.67±0.01	5.02±0.15	8.09±0.60
性別					
男		175	0.72±0.02**	5.41±0.23*	3.97±0.71**
女		228	0.63±0.02**	4.73±0.20*	11.26±0.86**
年齡					
≤46		132	0.71±0.03	4.62±0.27	5.81±0.76
46-54		133	0.68±0.03	5.27±0.27	9.10±1.22
>54		138	0.62±0.02	5.18±0.24	9.31±1.07
高血壓					
無		326	0.67±0.02	5.08±0.17	8.05±0.68
有		77	0.67±0.03	4.79±0.36	8.26±1.30
糖尿病					
無		367	0.67±0.02	4.90±0.16**	8.03±0.63
有		35	0.64±0.05	6.28±0.56**	7.68±1.83
高血壓且糖尿					
無	無	299	0.67±0.02	4.92±0.17 a,*	7.95±0.71
有	無	68	0.66±0.04	4.83±0.39 b,*	8.41±1.43
無	有	26	0.62±0.06	6.90±0.64	7.87±2.29
有	有	9	0.71±0.09	4.50±0.96	2.15±0.76

a: 利用變異數分析檢定無高血壓且無糖尿病者與無高血壓且有糖尿病者

b: 利用變異數分析檢定有高血壓且無糖尿病者與無高血壓且有糖尿病者

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$

表二為高血壓危險因子之多變項對數複迴歸分析。在調整年齡、性別、維生素E、肥胖指數、膽固醇、三酸甘油脂、抽煙、喝酒後，隨著累積砷暴露量越高且單甲基砷酸百分比越高者高血壓危險對比值

顯著增加；在調整其他危險因子後，肥胖指數越高者高血壓之危險對比值顯著偏高；在調整其他危險因子後，血清中α-維生素E的濃度越高，高血壓的危險對比值顯著越低。

表二 高血壓危險因子之多變項對數複迴歸分析*

變項名稱	危險對比值 (95%信賴區間)
性別	
男	1.00
女	0.92 (0.57-1.46)
年齡	
(每增加一歲)	1.07 (1.05-1.09)**
累積砷暴露與單甲基砷酸百分比	
≤15.9 ≤11.34	1.00
≤15.9 >11.34	1.09 (0.54-2.19)
>15.9 ≤11.34	1.23 (0.70-2.19)
>15.9 >11.34	1.92 (1.05-3.52)*
維生素E (μg/ml)	
≤2.82	1.00
2.82-4.51	1.02 (0.53-1.94)
>4.51	0.61 (0.35-1.08)+
肥胖指數	
<25	1.00
25-29	1.91 (1.30-2.82)*
>29	3.44 (1.81-6.54)*

*: 調整膽固醇、三酸甘油脂、抽煙、喝酒
*: p<0.05, +: 0.05<p<0.1

表三為調整高密度脂蛋白/膽固醇後高血壓危險因子之多變項對數複迴歸分析。調整年齡、性別、維生素E與累積砷暴露後，隨著肥胖指數增加，高血壓危險對比值顯著增加。以血清中維生素E濃度低於中位值(4.51 μg/ml)且累積砷暴露高於中位值(15.0 ppm · 年)之危險性為1.00，維生素E濃度高於中位值且累積砷暴露高於中位值者高血壓危險對比值為0.52；維生素E濃度低於中位值且累積砷暴露低於中位值者其高血壓危險對比值顯著偏低，其值為0.37；維生素E濃度高於中位值且累積砷暴露低於中位值者高血壓危險對比值顯著偏低，其值為0.21。所以在調整年齡、性別、肥胖指數後，高血壓的相對危險性隨著維生素E濃度的增加以及累積砷暴露量減少而顯著降低。

表三 高血壓危險因子之多變項對數複迴歸分析*

變項名稱	危險對比值 (95%信賴區間)
性別	
男	1.00
女	1.27 (0.67-2.39)
年齡	
(每增加一歲)	1.03 (0.99-1.07)
維生素E與累積砷暴露	
≤4.51 且 >15.0	1.00 §
>4.51 且 >15.0	0.52 (0.24-1.15)
≤4.51 且 ≤15.0	0.37 (0.15-0.91)*
>4.51 且 ≤15.0	0.21 (0.07-0.62)**
肥胖指數	
<25	1.00 §
25-29	1.42 (0.73-2.76)
>29	3.82 (1.31-11.17)*

*: 調整高密度脂蛋白/膽固醇
*: p<0.05, **: p<0.01, †: 0.05<p<0.1
§: 趨勢檢定, p<0.05

表四為糖尿病危險因子之多變項對數複迴歸分析。在調整膽固醇、三酸甘油脂、抽煙、喝酒、肥胖指數與維生素A後，隨著年齡增加糖尿病危險對比值顯著增加，而女性比男性有顯著偏高的糖尿病危險對比值；在調整年齡、性別、維生素A後，隨著累積砷暴露量越高且單甲基砷酸百分比越高者糖尿病危險對比值增加，但未達統計上顯著性；在調整其他危險因子之後，血清中維生素A的濃度增加，糖尿病危險對比值減少，但未達統計上顯著性；在調整其他危險因子之後，肥胖指數越高者，糖尿病的危險對比值顯著增加。

表四 糖尿病危險因子之多變項對數複迴歸分析*

變項名稱	危險對比值 (95%信賴區間)
性別	
男	1.00
女	2.10 (1.06-4.15)*
年齡	
(每增加一歲)	1.05 (1.02-1.08)**
累積砷暴露與單甲基砷酸百分比	
≤16.5 ≤11.44	1.00
≤16.5 >11.44	0.98 (0.39-2.47)
>16.5 ≤11.44	1.43 (0.69-2.98)
>16.5 >11.44	1.42 (0.64-3.13)
維生素A (μg/ml)	
≤0.45	1.00
0.46-0.61	1.18 (0.63-2.20)
>0.61	0.90 (0.50-1.64)
肥胖指數	
<25	1.00
25-29	1.63 (0.99-2.69)+
>29	1.80 (0.77-4.19)

*: 調整膽固醇、三酸甘油脂、抽煙、喝酒
*: p<0.05, +: 0.05<p<0.1

表五為調整高密度脂蛋白/膽固醇後糖尿病危險因子之多變項對數複迴歸分析。隨著年齡每增加一歲，女性比男性顯著增加糖尿病危險對比值。以血清中維生素A濃度低於中位值(0.61 μg/dl)且累積砷暴露高於中位值(15.0 ppmx 年)者之危險性為1.00，維生素A濃度高於中位值且累積砷暴露高於中位值者糖尿病危險對比值為0.84，維生素A濃度低於中位值且累積砷暴露低於中位值者糖尿病危險對比值為0.72，維生素A濃度高於中位值且累積砷暴露低於中位值者糖尿病危險對比值為0.59，所以糖尿病的相對危險性隨著維生素A濃度的增加以及累積砷暴露量減少而有降低的趨勢，但是並未達統計上顯著水準；以血清中維生素E濃度低於中位值(4.07 μg/ml)且累積砷暴露高於中位值(15.0 ppm · 年)者之危險性為1.00，維生素E濃度高於中位值且累積砷暴露高於中位值者糖尿病危險對比值為2.19，維生素E濃度高於中位值且累積砷暴露低於中位值者糖尿病危險對比值為1.71，維生素E濃度低於中位值且累積砷暴露低於中位值者糖尿病危險對比值為0.65，所以糖尿病的相對危險性隨著累積砷暴露量的增加以及維生素E濃度減少而有降低的趨勢，但是並未達統計上顯著水準。

表五 糖尿病危險因子之多變項對數複迴歸分析*

變項名稱	危險對比值 (95%信賴區間)	危險對比值 (95%信賴區間)
性別		
男	1.00	1.00
女	2.91(1.04-8.10)*	3.18(1.13-8.93)*
年齡		
(每增加一歲)	1.06(1.00-1.14)†	1.07(1.00-1.14)†
維生素A與累積砷暴露		
≦0.61 且 >15.0	1.00	
>0.61 且 >15.0	0.84(0.26-2.74)	
≦0.61 且 ≤15.0	0.72(0.18-2.89)	
>0.61 且 ≤15.0	0.59(0.13-2.78)	
維生素E與累積砷暴露		
≦4.07 且 >15.0		1.00
>4.07 且 >15.0		2.19(0.61-7.80)
>4.07 且 ≤15.0		1.71(0.38-7.82)
≦4.07 且 ≤15.0		0.65(0.10-4.11)

*: 調整高密度脂蛋白/膽固醇、肥胖指數

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, †: $0.05<p<0.1$

四.計畫成果自評

本研究成果發現烏腳病盛行地區已停止飲用深井水約三十年，而高血壓危險對比值隨累積砷濃度與單甲基砷酸百分比增加而顯著增加。此顯示砷代謝能力較差者可能高血壓危險性偏高。本研究亦發現血清中α-維生素E較低者有顯著偏高的高血壓危險性，血清中維生素A較低者糖尿病危險性偏高。由此研究結果應建議烏腳病盛行地區居民多攝取蔬菜水果，將可減少高血壓與糖尿病危險性。

五.參考文獻

1.World Health Organization. Environmental Health Criteria. 1981; 18: Arsenic. World Health Organization, Geneva.

2.Wu HY, Chen KP, Tseng WP, and Hsu CL.Epidemiologic studies on blsckfoot disease : I. Prevalence and incidence of this disease by age, sex, year, occupation and geographical distribution. Memmoir College Med Natl Taiwan Univ 1961;7:33-50.

3.Chen CJ:Blackfoot disease. Lancet 1990;336:442.

4.Chen CJ, Wu MM, Lee SS, Wang JD, Cheng SH and Wu HY. Atherogenicity and carcinogencity of high-arsenic artesian well water multiple risk factors and related malignant neoplasms of blackfoot disease. Arteriosclerosis 1988; 8:452-60.

5.Tseng WP. Effects and dose-response relationship of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. Environ Health Perspect 1977; 19: 109-19.

6.Wu MM, Kuo TL, Hwang YH, and Chen CJ. Dose-response relation between arsenic concentration in well water and mortality from cancer and vascular disease. Am J Epidemiol 1989;130:1123-31.

7.Tseng WP, Chen WY, Sung JL, and Chen JS. A clinical study of blackfoot disease in Taiwan: An endemic peripheral vascular disease. Memmoir College Med Natl Taiwan Univ 1961;7:1-18.
8.Chen CJ, Lin LT. Human carcinogenicity and atherogenicity induced by chronic exposures to inorganic arsenic.Arsenic in the Environment: part II : Human Health and Ecosystem Effects. Edited by Jerom O. Nriagu. John Wiley & Sons, Inc 1994, pp109.
9.Zaldivar R. A morbidity condition involving cardiovascular, broncho-pulmonary, digestive and neural lesions in children and young adults after dietary arsenic exposure. Zentralbl. Bakteriol. 1980; 170:445-6.
10.Cebrian ME.1987. Some potential problems in assessing the effects of chronic arsenic poisoning in North Mexico. In:Preprints of papers presented at the American Chemical Society, Division of Environmental Chemistry, 194th Meetinting, pp.114-6.
11.Grobe JW. Peripheral circulatory disorders and acrocyanosis with arsenic(in German). Berufs. Dermatosen. 1976; 24:78-84.
12.Lagerkvist BE, Linderholm H and Nordberg GF. Arsenic and Raynaud's phenomenon: Vasospastic tendency and excretion of arsenic in smelter workers before and after the summer-vacation.Int Arch Occup Environ Health 1988; 60: 361-4.
13.Tseng CH, Chong CK, Chen CJ, Lin BJ, Tai TY. Abnormal peripheral microcirculation in seemingly normal subjects living in blackfoot-disease-hyperendemic villages in Taiwan. Int J Microcirc 1995; 15: 21-27.
14.Tseng CH, Chen CJ, Lin BJ, Tai TY. Abnormal response of ankle pressure after exercise in seemingly normal subjects living in blackfoot disease-hyperendemic villages in Taiwan. Vascular Surgery. 1994; 28(4): 607-617.
15.Tseng CH, Chong CK, Chen CJ, Tai TY. Dose-response relationship between peripheral vascular disease and ingested inorganic arsenic among residents in blackfoot disease endemic villages in Taiwan. Atherosclerosis 1996;120:125-133.
16.Chen CJ, Chiou HY, Chiang MH, Lin LJ, Tai TY. Dose-response relationship between ischemic heart disease mortality and long-term arsenic exposure. Arterioscher Thromb Vasc Biol 1996; 16: 504-510.
17.Welch K, Higgins I, Oh M and Burchfiel C. Arsenic exposure, smoking, and respiratory cancer in copper smelter workers. Arch Environ Health 1982;37:325-35.
18.Gustavsson P, Gustavsson A, and Hogstedt C. Excess mortality among Swedish chimney sweeps. Br J Ind Med 1987;44:738-43.
19.Wingren G, and Axelson O. Mortality in the Swedish glassworks industry. Scand J Work Environ Health 1987;13:412-6.
20.Zaldivar R. A morbid condition involving cardiovascular, broncho-pulmonary, digestive and neural lesions in children and young adults after dietary arsenic exposure. Zentralbl Bakteriol 1980;170:44-56.
21.Tsuda T, Nagira T, and Yamamoto M. An epidemiological study on cancer in certified arsenic poisoning patients in Toroku. Ind Health 1990;28:53-62.
22.Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. N Engl J Med. 1986;314:488-500.
23.Lai MS, Hsueh YM, Chen CJ, Shyu MP, and Tai TY. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. Am J Epi 1994; 139: 384-92.
24.Chen CJ, Hsueh YM, Lai MS, Shyu MP, Chen SY, Wu MM, Kuo TL, Tai TY. Increased Prevalence of hypertension and long- term arsenic exposure. Hypertension 1995; 25(1):53-60.
25.Rahman M, Axelson O. Diabetes mellitus and arsenic exposure: a second look at case-control data from a Swedish cooper

smelter. Occupational & Environmental Medicine. 1995; 52(1): 773-4.
26.Rahman M, Wingren G, Axelson O. Diabetes mellitus among Swedish art glass works – an effect of arsenic exposure? Scandinavian Journal of Work, Environment & Health. 1996; 22(2): 146-9.
27.Rahman M, Tondel M, Ahmad SA, Axelson O. Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. American Journal of Epidemiology. 1998; 148(2): 198-203.
28.Jensen GE, Hansen ML. Occupational arsenic exposure and glycosylated hemoglobin. Analyst. 1998; 123(1): 77-80.
29.Boquist L, Boquist S, Ericsson I. Structural beta cell changes and transient hyperglycemia in mice treated with compounds inducing inhibited citric acid cycle enzyme activity. Diabetes. 1988; 37(1): 89-98.
30.Douen AG, Jones MN. The action of phenylarsine oxide on the stereospecific uptake of D-glucose in basal and insulin-stimulated rat adipocytes. Biochimica et Biophysica Acta 1988; 968(1): 109-18.
31.Henrisksen EL, Holloszy JO. Effects of phenylarsine oxide on stimulation of glucose transport in rat skeletal muscle. American Journal of Physiology. 1990; 258: C648-53.
32.Tseng WP. Outcome of untreated hypertensives in an agricultural population: a 15-year follow-up study. J Formos Med Assoc 1980;79:556-563.
33.Tsi HC,Yen TS,Wang LT, Cheng JT, Tseng WP, Chen CM. An epidemiologic study of the cardiovascular diseases among the inhabitants of a fishing village in Taiwan. Report 1: Blood pressure and hypertension. J Formos Med Assoc 1966;65:249-258.
34.Zaldivar R. A morbid condition involving cardio-vascular, broncho-pulmonary, digestive and neural lesions in children and young adults after dietary arsenic exposure. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. B170: 44-56.
35.Meran J, Creutzig A, Specht S, Schurmeyer T, Brunner G, Fabel H. Portal hypertension and chronicarsenic exposure: a differential diagnostic challenge. Wiener Medizinische Wochenschrift. 1989; 139(24): 580-4.
36.Neven F, Fevery J, Van Steenbergen W, Sciot R, Desmet V, De Groote J. Arsenic and non-cirrhotic portal hypertension: a report of eight cases. Journal of Hepatology. 1990; 11: 80-5.
37.Richard MH and Harinder SG.Antioxidents and the prevention of coronary heart disease. Arch Intern Med 1995; 155:241-6.
38.Burton GW, Ingold Ku. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxident. Ann N Y Acad Sci1989;570:7-22.
39.Krinsky NI, Deneke SM. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. J Natl Cancer Inst 1982; 69:205-210.
40.Gey KF. On the antioxidant hypothesis with regard to arteriosclerosis. Bibl Nutr Dieta 1986;37:53-91.
41.Oberley LW. Free radicals and diabetes. Free Radic. Biol. Med. 1988; 5: 113-124.
42.Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press, 2nd ed. 1989.
43.Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes. 1991; 40: 405-12.
44.Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran-Celetano J, Schwaery GT, Loscalzo J, Vita JA. Dietary antioxidants preserve endotheium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabits. Proc Natl Acad 1993;90:1180-84.
45.Flschner I, Maruta K, Burkart V, Kawai K, Kolb H, Kiesel U. Effects of radical scavengers on the development of experimental diabetes. Diabetes Research. 1990; 13: 67-73.
46.Salonen JT, Nyyssönen K, Tyuomainen T-P, Mäenpää PH, Korpela H, Kaplan GA, Lynch JL,Helmrich SP, Salonen R. Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E

concentrations: a four year follow-up study in men. British M edical Journal. 1995;311:1124-27.

47.Reunanen A, Knekt P, Aaran RK, Aromaa A. Serum antioxidants and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus. European Journal of Clinical Nutrition. 1998; 52(2): 89-93.

48.Eicholer M, Stahelin HB , Gey KF . Inverse correlation between essential antioxidants in plasma and subsequent risk to develop cancer , ischemic heart disease and stroke .EXS 1992;62:398-410

49.Gey KF , Stachelin HB , Eicholzer M. Poor plasma status of carotene and vitamine C is associated with a higher mortality from ischemic heart disease and stroke : Basel prospective study . Clin Invest 1993 ;71:3-6

50.Gale CR , Martyn CN , Winter PD , Cooper C . Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in cohort of elderly people . Br Med J 1995 ; 310: 1563-6

51.Helen F .Galley , Judith THORTON , Peter D . HOWDLE , BARRY E . WALKER and Nigel R WEBSTER . □ombination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure . Clinical Science 1997 , 92:361-365(Printed in Great Britian)

52.Steven D. Mark , Wen Wang , Joseph F . Fraumeni , Jr., Jun-Yao Li, Philip R. Taylor , Guo-Qing Wang , Wande Guo , Sanford M . Dawsey , Bing Li , and Willian J.Blot . Lowered Risks of Hypertension and Cerebrovascular Disease after Vitamin/Mineral Supplementation . American J. of Epi. 1996 , 143(7):658-664

53.Hsueh YM, Chiou HY, Huang YL, Wu WL, Huang CC, Yang MS, Lue LC, Chen GS, Chen CJ. Serum B-carotene, arsenic methylation capability, and incidence of skin cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prev 1997; 6:589-596.

54.Hsueh YM, Wu WL, Huang YL, Chiou HY, Tseng CH, Chen CJ. Low serum carotene level and increased risk of ischemic heart disease related to long-term arsenic exposure. Atherosclerosis 1998; 141 : 249-257.

55.Yu-Mei Hsueh , Chin-Hsiao Tseng , Ya-Li Huang , Hung-Yi Chiou , Wen-Lin Wu , Ling-Ying Shih , Mo-Hsiung Yang , Chuan-Chieh Huang , Chien-Jen Chen . Low Arsenic Methylation Capability , Low Serum Carotene Level and Arsenic-induced Peripheral Vascular Disease .Circulation . Submitted 1998.

56.Bertolero F, Marafante E, Edel Rade J, Pietro R, Sabbioni E. Biotransformation and intracellular binding of arsenic in tissues of rabbits after intraperitoneal administration of As-74 labeled arsenite.Toxicology 1981;20:35-44.

57. Tam GKH., Charbonneaw SM., Bryce F., Pomroy C. and Sandi E. Metabolism of inorganic arsenic (^{74}As) in humans following oral Ingestion. Toxicology and Applied harmacology1979; 50: 319-322.

58. Marafante E., Vahter M. The effect of methyl-transferase inhibition on the metabolism of [^{74}As] arsenite in mice and rabbits. Chem Biol Interaction 1984; 50: 49-57.

59.Vahter M., Marafante E. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arssenatein mice and rabbits. Chem Biol Interact 1983; 47: 29-44.

60.Vahter M., Marafante E. and Dencker L. Tissue distribution and retention of 74As-dimethyl-arsenic acid in mice and rats. Environ Contam Toxicol 1984; 13: 259-264.

61.Marafante E,Vahter M and Envall J:The role of the methylation in the detoxification of arsenate in the rabbit. Chem Biol Interact 1985; 56: 225-238.

62.Buchet J.P., Geubel A., Pauwels S., Mahieu P. and Lauwerys R. The influence of liver disease on the methylation of arsenite in human.Arch Toxicol 1984; 55: 151-154.

63.Buchet J.P. and Lauwerys R. Study of factors influence the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. Toxicol Appl Pharm 1987; 91: 65-74.

64.Hsueh Y.M., Cheng G.S., Wu M.M., Yu H.S., Kuo T.L., and Chen C.J. Multiple risk factors associated with arsenic-induced skin cancer: effects of chronic liver disease and malnutritional status. Br. J. Cancer, 1995; 71:109-114.
65.Blackwell RQ. Estimated total arsenic ingested by residents in the endemic black foot area. J Formosan Med Assoc 1961; 60: 1143.
66.Marafante E. The effect of dietary and chemically induced methylation deficiency on the metabolism of arsenate in the rabbit. Acta pharmacol Toxicol 1986; 59: Suppl 7:35-8.
67.Vahter M. and Marafante E. Effect of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformantion of arsenite in the rabbit. Toxicology Letters 1987; 37: 41-46.