

[illegible]

執行期間：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

計畫主持人：黃天祥

執行單位：台大醫學院 內科

中 華 民 國 91 年 12 月 27 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

腐植酸做為內分泌破壞物的研究 Humic Acids as an Endocrine Disrupting Chemical

計畫編號：NSC 90-2314-B002-270

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主 持 人：黃天祥 台大醫學院 內科

一、中文摘要

腐植酸可與碘結合，可抑制甲狀腺過氧化酶，可抑制肝臟外環去碘酶，可抑制三碘甲素受體與核酸受體反應元素結合，造成甲狀腺激素製告、代謝、作用受抑制，它符合激素破壞物之定義。先前我們的研究皆針對成鼠做研究，而對甲狀腺素最敏感之時期如懷孕—哺乳期及胚胎—新生期則未加以研究，文獻上也無此方面之資料，因此本計劃針對此時期之幼鼠加以檢驗腐植酸之作用。我們給予未懷孕之雌成鼠給予蒸餾水或腐植酸水（墨水）及正常飼料或低碘飼料，交配後繁殖三代，再殺死離奶幼鼠檢查心臟、肝臟、腎臟、肺臟、甲狀腺、睪丸、血液以了解腐植酸之作用，結果顯示腐植酸造成增生性甲狀腺腫、心肌梗塞、Zenker's 變性、血管內膜增生、中膜類纖維素變性及血栓形成間質性腎炎。以上之結果顯示腐植酸是造成烏腳病之病因。

關鍵詞：內分泌破壞化學物，腐植酸，甲狀腺腫

Abstract

Humic acids can bind iodide and reduce its bioavailability, inhibit thyroid peroxidase and hepatic 5'deiodinase; inhibit T_3 receptor's binding to its nuclear response element. Thus, humic acids reduces thyroid hormone synthesis, interferes thyroid hormone metabolism and further inhibits thyroid hormone action. So actually humic acids is an endocrine disrupting chemical (EDC). Previous studies have been focused on humic acid's effects on male adult rats. In

this study, we proposed to investigate the effects of humic acids on fetal, prepubertal and pubertal development. Pregnant Sprague-Dawley rats will be fed with regular or low iodide chow and distilled or humic acid (2 mg/ml) water. Rats weaning from mother were be killed and examined by histological section of liver, kidney, lung, heart, thyroid gland and testis. Our results show HA causes hyperplastic goiter; arterial intimal thickening, medium fibrinoid degeneration and thrombosis formation; myocardial infarction, hemorrhage and Zenker's degeneration; as well as interstitial nephritis. In conclusion, HA is really a EDC and is a causative agent of blackfoot disease.

Keywords: endocrine disrupting chemical, humic acid, goiter

二、緣由與目的

腐植酸廣泛分布於環境中，它是植物的分解產物。雖然其確切結構不明，但其功能基有氫氧基、苯基、Naphthalene 等具有接受及產生離子或自由基的功能。Gaitan 等人發現於哥倫比亞煤礦區的水受腐植質污染而當地盛行甲狀腺腫。經由實驗室檢查及動物實驗，Gaitan 認為腐植質之分解物是甲狀腺腫致因，其機轉可能是抑制甲狀腺過氧化酶導致甲狀腺激素製造減少，由於負性迴饋甲促素分泌增加而造成甲狀腺腫，呂鋒洲等人發現烏腳病地區深井水含有螢光物質而此螢光物質即為腐植質。先前公衛學者林宜長田野調查即發現烏腳病地區盛行甲狀腺腫；後來張天鈞的學童調查也證明此事實（即使已改用自來水），因此本實驗室即致力於腐植酸之代謝、分

布與甲狀腺生理作用做廣泛之研究。

首先我們發現腐植酸確可抑制過氧化酶（未發表），又腐植酸可與碘離子結合，給合率達 85%，可因此造成碘生物活用率降低。此外腐植酸可抑制外環去碘酶之活性，減少四碘甲素轉換成三碘甲素，因而減少甲狀腺激素之活化。動物實驗（大鼠及小鼠）也證明以腐植酸飼養四個月可使動物出現碘缺乏之血清變化，另可直接傷害甲狀腺濾泡細胞使甲狀腺激素製造減少。利用 I-125 標記腐植酸發現腐植酸經吸收後主要分布於肝、腎、甲狀腺、心血管，這與公衛調查烏腳病地區好發疾病器官之分布是一致的。最近我們更進一步研究腐植酸造成甲狀腺腫的分子機轉，發現腐植酸經由細胞攝取被送至細胞核內，而在此抑制三碘甲素受體與細胞核之結合，造成甲狀腺激素之抗性。由此看來腐植酸確是激素破壞物（Endocrine disrupting chemical, EDC）。即化學物影響身體維持體液平衡及發育的激素之製造、釋放、輸送、代謝、結合、作用或排泄。我們先前之研究都著重於成鼠，但對於甲狀腺激素影響個體最為明顯的時間如懷孕—哺乳期及胚胎—新生期並未加以探討，此計劃主要係針對此二時段之影響加以檢驗。

三、結果與討論

我們將未懷孕雌鼠（F₁）約四週大，開始餵食 rat chow 及 distilled water（D 群控制組），rat chow 及腐植酸水（2 mg/ml）（C 群腐植酸組），低碘 chow 及 distilled water（B 群，低碘組），低碘 chow 及腐植酸水（A 群，低碘腐植酸組）。其結果如下列組織圖示（Fig Page 1~8）。

由上述結果，我們發現長期食用腐植酸可導致

- （1）甲狀腺：增生性甲狀腺腫（hyperplastic goiter）濾泡細胞增生，但濾泡內膠體物（colloid）染色較淡且不平均，含碘及甲狀腺素減少，有些濾泡呈空泡化病變。
- （2）心血管：心肌小動脈之內膜增生，血栓形成，部分小動脈之中膜（medium）呈類纖維素變性（fibrinoid degeneration），心肌呈局部梗塞、出血，部分心肌纖維呈 Zenker's

degeneration。

- （3）腎：間質性腎炎。近腎盂處間質組織有炎症細胞浸潤包括嗜中性球及單核球，局部小動脈周圍亦見炎症細胞，腎小管腔內可見嗜中性球及壞死上皮細胞，腎小動脈周圍炎症細胞浸潤。

由以上之結果可見腐植酸確是內分泌環境破壞物，且組織學之變化也與烏腳病地區流行病學調查之結束一致，換言之，烏腳病之血管變化無法排除是腐植酸引起的，因本實驗不含任何砷、鐵等礦物質。

四、計畫成果自評

本計劃又再次喚起烏腳病病因之爭論，我以為井水砷濃度雖與烏腳病之盛行率有很好相關性，但並無動物實驗可證明砷造成烏腳病。而腐植酸卻有很多 in vitro, in vivo 之文獻證明二者之關係。本實驗也確證腐植酸對心血管之作用。我認為腐植酸應是烏腳病之病因而砷為加強物（enhancer）。

五、參考文獻

01. Huang TS, Lu FJ: Iodide binding by humic acid. *Environ Toxicol Chem* 1991;10:179-184.
02. Huang TS, Lu FJ: Inhibition of hepatic thyroxine 5'-mono deiodinase by humic acids. *Environ Toxicol Chem* 1993;12:1267-1271.
03. Huang TS, Lu FJ, Tsai CW: Effects of humic acids on thyroidal function. *J Endocrinol Invest* 1994;17:781-791.
04. Huang TS, Lu FJ, Tsai CW: Distribution of absorbed humic acids in rats. *Environ Geochem Health* 1995;17:1-4.
05. Yang ML, Huang TS, Lee Y, Chen TH, Chen SY, Lu FJ: Inhibition of endogenous thyroid hormone receptor- β and peroxisome proliferator-activated receptor- α activities by humic acid in a human-derived liver cell line. *Thyroid* 2002;12:361-371.
06. Kavlock RJ: Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere* 1999;39:1227-1232.
07. Goldman JM, Laws SC, Balchak SK,

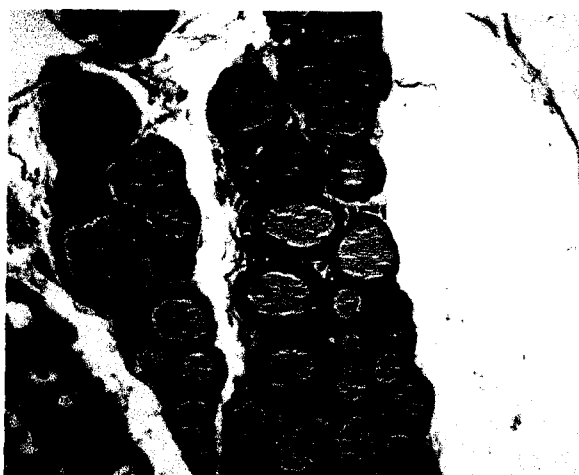
Cooper RL, Kavlock RJ: Endocrine disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical Rev Toxicol* 2000;30:135-196.



L723 (D-1-F)

對照組；餵飼正常飼料及正常水之試驗小鼠甲狀腺組織顯微結構。

H & E stain , 40X

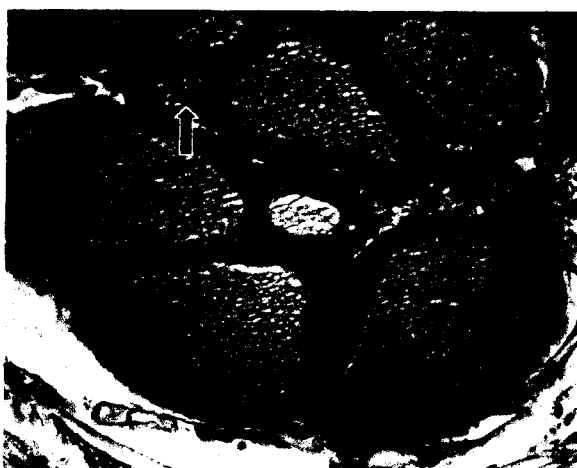


L723 (D-1-F)

對照組；餵飼正常飼料及正常水之試驗小鼠甲狀腺組織顯微結構。

甲狀腺腺囊(thyroid follicle)細胞飽滿，腺囊周圍由單層扁平上皮細胞或立方上皮細胞圍繞成圓形結構，腺囊腔內充滿粉紅色膠體物(thyroid colloid)且染色均勻。

H & E stain , 200X



L803 (C-1-M)

餵飼正常飼料及黑水之試驗小鼠甲狀腺組織顯微結構。

甲狀腺腺囊(thyroid follicle) 立方上皮細胞(箭頭所指)

甲狀腺膠體物(thyroid colloid)如星號所指。

H & E stain , 400X



L872 (C-2-M)

餵飼正常飼料及黑水之試驗

小鼠甲狀腺組織顯微結構。

甲狀腺腺囊(thyroid follicle)細胞飽滿，腺囊周圍由單層扁平上皮細胞或立方上皮細胞圍繞成圓形結構，腺囊腔內充滿粉紅色膠體物(thyroid colloid)且染色均勻。

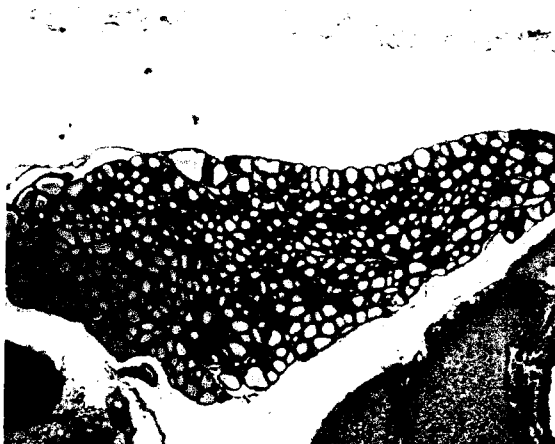
H & E stain ， 100X



L872 (C-2-M)

餵飼正常飼料及黑水之試驗

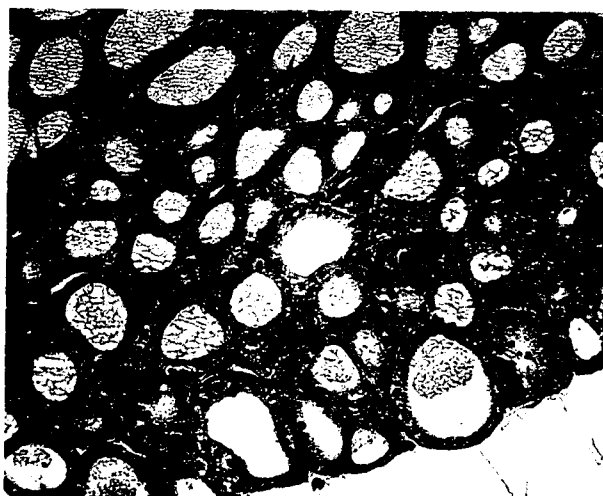
小鼠甲狀腺組織顯微結構。同上圖之高倍相。H & E stain ， 400X



L778 (A-1-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠甲狀腺組織顯微病變。

甲狀腺腺囊(thyroid follicle)細胞增生，腺囊腔內膠體物(thyroid colloid)染色較淡且分佈不均勻，有些腺囊腔內因膠體物含量少而呈空泡化病變。H & E stain，40X。

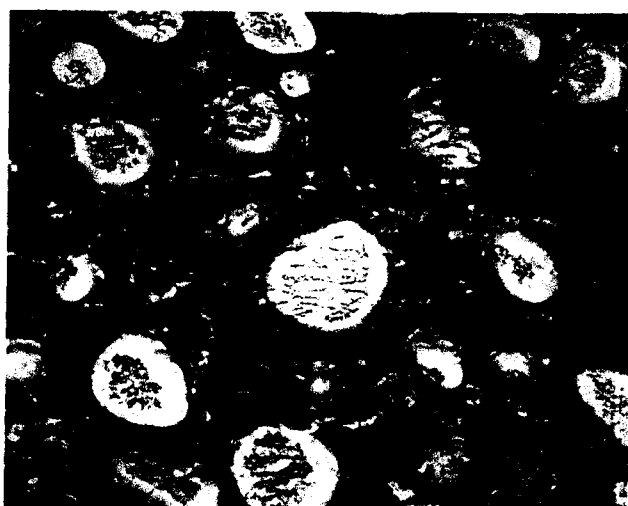


L778 (A-1-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠甲狀腺組織顯微病變。

增生性甲狀腺腫(Hyperplastic goiter)

甲狀腺腺囊(thyroid follicle)細胞增生，腺囊腔形狀大小不一，腺囊腔內膠體物(thyroid colloid)染色較污藍且分佈不均勻，有些腺囊腔內因膠體物含量少而呈空泡化病變，少部份腺囊腔內無 thyroid colloid 之存在。H & E stain，200X。



L718(B-1-M)

餵飼低碘飼料及普通水之試驗小鼠甲狀腺組織顯微病變。

增生性甲狀腺腫(Hyperplastic goiter)。

甲狀腺腺囊(thyroid follicle)細胞增生，腺囊腔內膠體物(thyroid colloid)含量少而呈空泡化病變，腺囊立方上皮細胞之高度增加。H & E stain，400X。



L718(B-1-M)

餵飼低碘飼料及普通水之試驗

小鼠心肌組織顯微結構。

正常心肌組織顯微結構。

H & E 40X



L718(B-1-M)

餵飼低碘飼料及普通水之試驗

小鼠心肌組織顯微結構。

正常心肌組織小動脈(箭頭)之
顯微結構。

H & E 40X



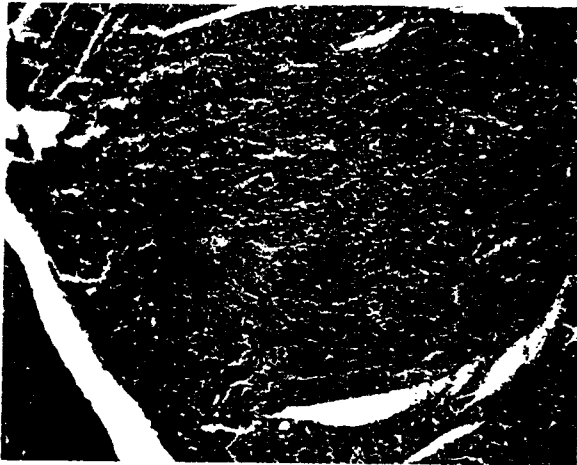
L792 (C-2-M)

餵飼正常飼料及黑水之試驗小

鼠心肌組織顯微病變。

心肌呈局部梗塞、出血病變。(箭
頭)

H & E 40X

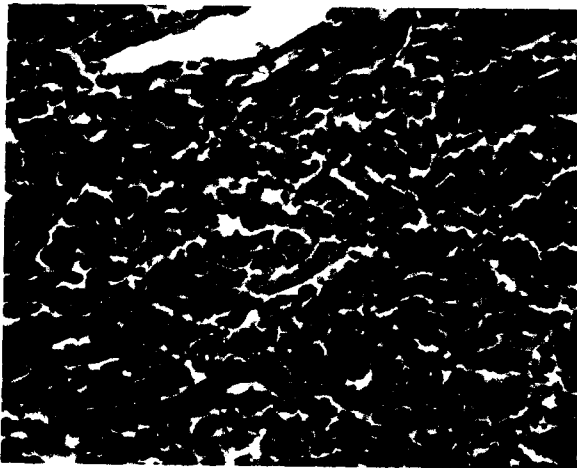


L792 (C-2-M)

餵飼正常飼料及黑水之試驗小鼠心肌組織顯微病變。

上圖高倍相，心肌梗塞區之心肌細胞失去正常結構內充滿紅血球及增生小血管。(箭頭)

H & E stain 100X

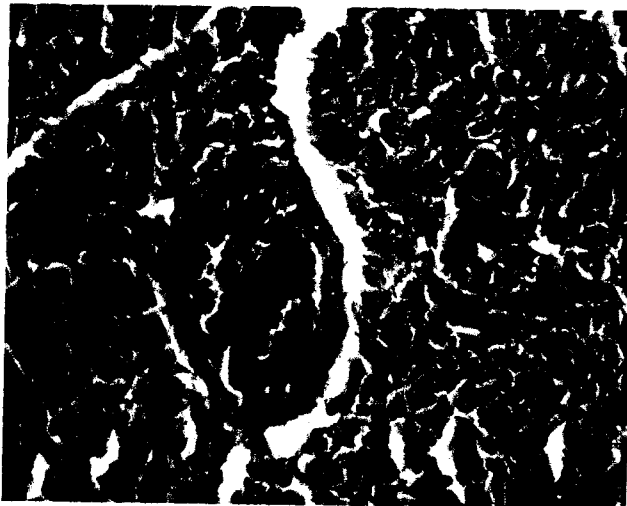


L792 (C-2-M)

餵飼正常飼料及黑水之試驗小鼠心肌組織顯微病變。

心肌局部梗塞區內可見殘留心肌細胞之肌纖維斷離、橫紋消失；箭頭標示為增生之小血管。

H & E stain 200X



L778 (A-1-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠心肌組織顯微病變。

心肌小動脈之內膜增生、血栓形成。H & E stain 400X



L785 (A-2-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠心肌組織顯微病變。

心肌小動脈內膜增生中膜呈類纖維素變性。

H & E stain 200X

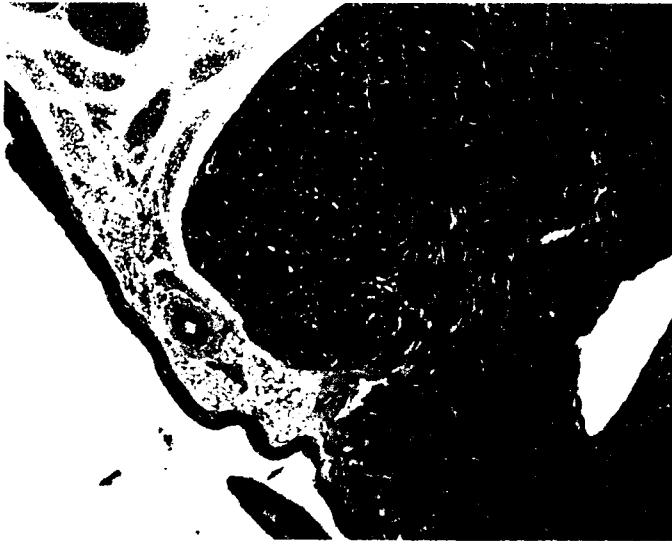


L785 (A-2-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠心肌組織顯微病變。

心肌小動脈內膜增生中膜呈類纖維素變性。

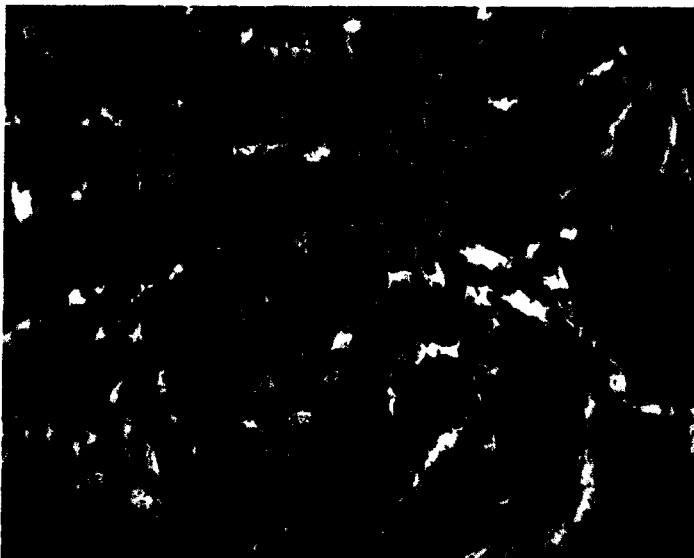
H & E stain 400X



L723 (D-1-F)

對照組；餵飼正常飼料及正常水之試驗小鼠腎臟組織顯微結構。

H & E stain , 40X



L723 (D-1-F)

對照組；餵飼正常飼料及正常水之試驗小鼠甲狀腺組織顯微結構。

✦ 為腎小球 ⇨ 為腎小管 H & E stain , 400X



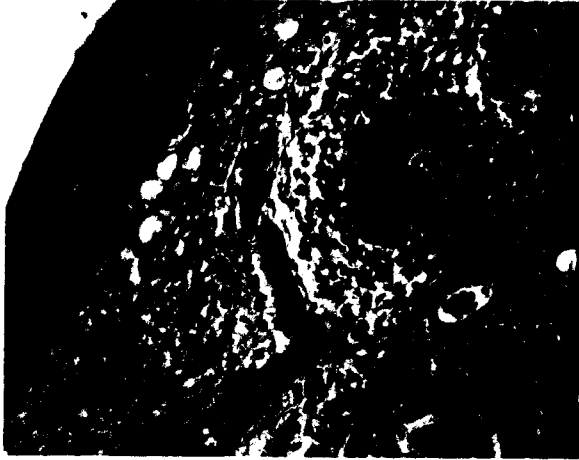
L776 (A-1-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠腎臟組織顯微病變。

間質性腎炎

近腎盂處間質組織有些量炎症細胞浸潤，低倍率下該區域染色性較深。(箭頭)

H & E stain 40X

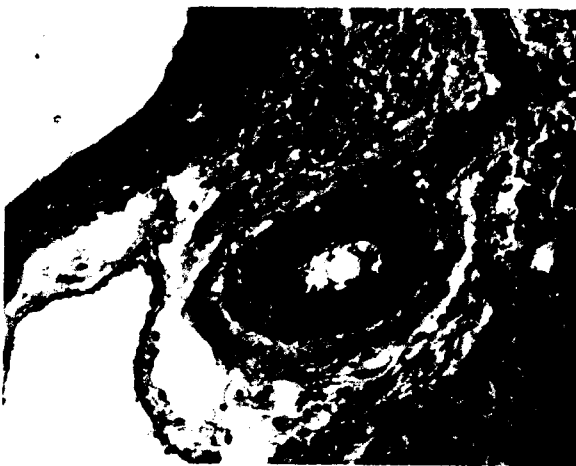


L776 (A-1-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠腎臟組織顯微病變。

腎臟：近腎盂處間質組織有些量炎症細胞浸潤，包括嗜中性球及單核球；局部腎小動脈周圍可見炎症細胞。部份腎小管腔內可見嗜中性球及壞死上皮細胞。

H & E stain 200X



L776 (A-1-M)

餵飼低碘飼料及黑水之試驗小鼠腎臟組織顯微病變。

腎臟：近腎盂處腎小動脈周圍可見炎症細胞浸潤。H & E stain 400X