

行政院國家科學委員會 89 年度專題研究計畫成果報告

垃圾掩埋場復育過程中鼠類肝臟氧化酶活性變化之研究

**The differentiation of the activities of microsomal oxidases of the
rodents in the remediation land-fill 2/2**

NSC 89-2621-B002-029

執行期間: 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人:徐爾烈

協同主持人:吳中興

研究執行人: 吳尹文 林鶯熹

執行單位: 國立台灣大學 昆蟲學系

中華民國 八十九年

中文摘要:

1999年8月至2000年7月於山豬窟垃圾掩埋場共捕獲鼠類213隻，其中以溝鼠95隻最多，約佔45%，小黃腹鼠35隻、屋頂鼠20隻、錢鼠57隻、月鼠6隻。於福德坑垃圾掩埋復育場共捕獲鼠類70隻，其中以小黃腹鼠50隻最多，約佔71%，溝鼠15隻，錢鼠5隻。於山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠平均重量為 149.29 ± 43.34 (N=95)，體重與肝臟比是20.8，小黃腹鼠平均重量為 142.43 ± 33.75 (N=35)，體重與肝臟比是23.29。於福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠平均重量為 111.9 ± 23.33 (N=15) 體重與肝臟比是21.23，小黃腹鼠平均重量為 130.67 ± 14.61 (N=50)，體重與肝臟比是18.97。對照組大白鼠之平均重量為 256.50 ± 25.84 (N=8)，體重與肝臟比是27.61。山豬窟垃圾掩埋場與福德坑垃圾掩埋場之溝鼠肝臟與體重之比例都大於對組者之大白鼠。福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶Cytochrome P-450平均含量為 1.93 ± 0.36 nmole/mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶Cytochrome P-450 平均含量為 1.36 ± 0.42 nmole/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酶Cytochrome P-450 平均含量為 0.74 ± 0.11 nmole/mg，三者之間有明顯差異。溝鼠之肝臟氧化酶Cytochrome b5平均含量為 1.26 ± 0.37 nmole /mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶Cytochrome b5 平均含量為 0.71 ± 0.24 nmole/mg，福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶Cytochrome b5 平均含量為 1.41 ± 0.33 nmole /mg，對照組大白鼠之肝臟氧化酶Cytochrome b5 平均含量為 0.60 ± 0.12 nmole/mg。福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶aldrin epoxidase平均比活性為 1.74 ± 0.61 nmole/min/mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶aldrin epoxidase平均比活性為 1.11 ± 0.24 nmole/min/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酶aldrin epoxidase 平均比活性為 0.31 ± 0.06 nmole/min/mg。福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶PCMA-N-demethylase平均活性為 2.45 ± 0.67 nmole/min/mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶PCMA-N-demethylase平均活性為 2.11 ± 0.26 nmole/min/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酶PCMA-N-demethylase 平均活性為 1.38 ± 0.41 nmole/min/mg。根據本研究結果發現，雖然福德坑垃圾掩埋場已於民國83年封閉，進行復育工作，與1998，1999及2000年之研究結果相較，由捕獲之鼠隻其肝臟之氧化酵素仍皆高於對照組之鼠隻，較在山豬窟垃圾掩埋場捕獲之鼠隻為高。故已進行復育之福德坑垃圾掩埋場目前似仍有誘發溝鼠肝臟氧化酵素之因子。以Indole-3-carbinol 酵素誘發試驗中發現可誘發野生溝鼠氧化酶3.2-48倍，低於對照組之4.5-57倍。

Abstract:

There were 213 and 70 rats captured from San-Ju-Ku(SJK) and Fu-Der-Kung (FDK) landfills respectively during Aug. 1999 to June 2000. The Norway rats (*Rattus norvegicus*) were the most in SJK 45% among the capture. But *Rattus losea* was the most in FDK 71% among the capture. The ratio of body weight to liver weight for Norway rat was 20.8, 21.3 and 27.61 from SJK, FDK and control rats. The liver microsomal cytochrome P-450 contents in Norway rat were 193 ± 0.36 n mole/mg, 365.42 ± 0.39 n mole/mg and 0.74 ± 0.81 n mole/mg trapped from FDK, SJK landfills and control group respectively. The cytochrome b5 contents in Norway rat were 1.26 ± 0.67 nmole/mg, 0.71 ± 0.24 nmole/mg and 0.60 ± 0.12 nmole/mg trapped from FDK, SJK landfills and control group respectively. The specificity of liver microsomal aldrin epoxides in Norway rat were 1.74 ± 0.61 nmole/min/mg, 1.11 ± 0.24 nmole/min/mg and 0.31 ± 0.06 nmole /min/mg trapped from FDK, SJK landfills and control group respectively. The specificity of liver PCMA-N-demethylase microsomal contents in Norway rat were 2.45 ± 0.69 nmole /min/mg, 2.11 ± 0.26 nmole/min/mg and 1.38 ± 0.41 nmole/mg trapped from FDK, SJK landfills and control group respectively. Indole-3-carbinol was investigated on the induction of cytochrome P-450 dependent monooxygenase enzyme complex in this experiment. Cytochrome P-450 dependent monooxygenase activities showed a great inducibility in Norway rat to 3.2-48 fold and 4.5-57 fold in the wild rat and laboratory rat respectively. Based on the results of the study, we concluded that the rats can reflect the exposure to environmental pollution accurately. Even though the FDK landfill has been closed for seven years but the rat that appear in this environment still affected by the unknown pollutants.

壹、前言

以生物體監測環境品質的概念，首先由德國生態學家 Kolkwitz 及 Marsson 於 1908-1909 年提出，在指標生物學說提出後近九十年間，已衍生出許多不同學派，有單純就生物因子來監測，分析環境品質，也有學者綜合生物、物理、化學等因子加以分析。無論何種學派，以指標生物作為監測陸地和水域環境的方法，在經過不斷的修正及科學上的應證後，已逐漸為各國所重視(Travis, 1992)。因為傳統藉由精密儀器偵測環境的方法，所費相當昂貴，且只能偵測特定種類的化學物質含量，忽略了污染物在整體環境中的毒性、流動性及生物蓄積性(bioaccumulation)(Frank, 1995)。故以動物作為生物蓄積的研究，可彌補直接取樣無生命物質分析的不足。美國國家研究委員會(NRC)也曾提出利用指標生物監測環境品質的優點：(1)指標生物和人類食用類似的食物和水源。(2)指標生物和人類對於環境中有毒化學物質具有類似之反應。(3)指標生物對化學物質之病理反應通常較人類迅速(Glickman *et al.*, 1991)。

台灣地區自民國 73 年推動垃圾處理計劃以來，各鄉鎮市普遍興建垃圾處理場，現有之垃圾處理場計有三百餘座。行政院環保署環境保護年鑑 1993 年指出，目前台灣地區的垃圾處理方式以掩埋法為主，約佔 92.44%。其中預定於民國 85 年底達使用年限應封閉的高達 127 座。部份掩埋場或因原廠址選定及設計不佳，或因缺乏事先完整的計劃，以至於封閉後對地下水、地面水、土壤及空氣等均造成嚴重的二次污染(梁，1993)，不但對環境及生活造成負面的影響，更是一直為國人所詬病的問題。故若能將封閉之掩埋場作一完善的綠化復育，相信不僅能扭轉人們對掩埋場之憂懼現象，並能創造土地再利用之新模式(例如公園、遊憩區、高爾夫球場…等)。大型垃圾掩埋場中各種廢棄物甚多，其中不乏對環境造成高度污染的物質，例如多氯聯苯(PCBs)、多環芳香物(RAHs)、鎘(Cadmium)…等污染物。故在復育的過程中，必須對其環境品質的變化留下紀錄，以預估何時始能符合人類之活動而無害。垃圾掩埋場內之污染物的存在與消退固可藉由精密儀器偵測得知，如羅在 1997 年的研究中，曾以氣態紅外線光譜儀及氣體色曾分析儀測定山豬窟垃圾掩埋場之氣體排放情形(羅，1997)。但大型掩埋場中污染物成份複雜至極，欲全盤了解所費不貲且曠日費時。在各種監測環境品質方法中，藉助指標生物是一個合乎科學要求且所費較少的選擇。

至於指標生物的實際應用情形，國內截至目前的研究，多著重於水域環境的監測。莊等人曾於 1985-1986 藉助日本的經驗，以生物方法對新店溪之水質進行

判定工作(莊, 1996)。楊等人曾調查內外雙溪、基隆河、景美溪...等水域之水棲昆蟲群聚組成, 以 Hilsenhot 之科級生物指標法(FBI)等方法監測各採樣區之水質(楊, 1994), 至今已獲令人滿意之成果。翁等人在 1994 年進行淡水河污染與魚類單氧酵素之研究, 發現多環芳香物環境污染物會增高吳郭魚及鯉魚肝內細胞色素 P-450 及單氧酵素活性, 證明吳郭魚單氧酵素系統應可發展成監測台灣水域污染物之一種指標生物(翁, 1994)。相對於水域環境, 針對陸域環境所做的研究相當少。李於 1994-1996 年間, 曾進行高澎地區鼠隻體內含鉛量與環境鉛之相關性研究, 結果顯示小型哺乳動物體內鉛之蓄積確實與環境鉛暴露有密切相關, 相當適合作為評估環境鉛污染情形的指標生物(李, 1996)。

國外的研究範圍則相當廣泛, Bromenshenk 等人將蜜蜂用於陸地環境的監測(Bromenshenk *et al.*, 1995)。Ostrowski 等人以寵物狗(pet dog)監測人類居住環境, 觀察一鉛電池回收廠附近地區, 住家飼養之寵物狗體內血鉛濃度, 發現寵物狗體內血鉛濃度高於另一未受污染地區(Ostrowski *et al.*, 1990)。Feyk 等人曾分析鳥類肝臟細胞色素 P-450-1A 之活性變化, 以判定環境之污染程度(Feyk *et al.*, 1995)。

鼠為啮齒目動物, 在台灣共有十四種分布於不同的海拔高度, 平地常見的種類有溝鼠(*Rattus norvegicus*)、屋頂鼠(*Rattus rattus*)、月鼠(*Mus formosanus*)、錢鼠(*Suncus murinus*)、小黃腹鼠(*Rattus losea*)...等(王, 1984)。鼠類因具有下列優點, 十分適合作為陸域環境之指標生物(Chandikumar *et al.*, 1989):(一)消化系統構造與人類相似。(二)生活環境與人類相似。(三)分布廣泛。(四)平均壽命短, 繁殖力強。(五)易於捕捉。(六)可連續不斷對棲息環境採樣, 是一完整之採樣體(Beardsley *et al.*, 1978)。正因為鼠類具有前述的特點, 各國已逐漸開始重視以鼠類作為陸域環境指標生物的研究。Chandikumar 等人曾觀察 cotton rat(*Sigmodon hispidus*)肝臟細胞色素 P-450 活性變化和環境污染物的相關程度, 以奧克拉亥馬州一處廢棄礦區內捕獲之鼠隻為實驗組, 另以未受污染類似地區內捕獲鼠隻為對照組, 發現礦區內捕獲鼠隻體內細胞色素 P-450 含量較未受污染類似地區內捕獲鼠隻為高(Chandikumar *et al.*, 1991)。Beardsley 曾以英國境內一受嚴重工業性污染農田內捕獲之田鼠為樣本, 分析其組織內鎘、鋅、鉛等重金屬濃度, 結果發現鼠隻肝、腎、腦中重金屬濃度, 均較另一未受污染類似農田內之鼠隻為高(Beardsley *et al.*, 1978)。另 Way 等人蒐集休士頓市區與鄉村地區之溝鼠樣本, 分析其含鎘、鉛之濃度, 結果發現市區溝鼠之肝、腎、

骨中有較高鎘與鉛之蓄積，且骨鉛之蓄積隨鼠齡(體長分)遞增(Way and Schroder, 1982)。Dieter 等人曾調查德國境內一處受 PCDD(polychlorinated dibenzo-p-dioxins)屋污染之地區，依照其污染程度分為五小區，分別在各區內採集鼠隻。結果發現捕獲鼠隻體內肝臟氧-去乙基酵素(O-deethylase)活性大小與各區土壤中 PCDD 含量大小呈正相關。此結果說明了鼠類肝臟氧化酵素系統相當適合作為陸域環境污染程度的指標(Schrenk, 1991)。

動物體對於外來性(exogenous)物質或內生性(endogenous)物質，都必須經過繁複的酵素處理步驟。一般來說，動物的解毒酵素系統多依循同一規則，即藉由增加外來物之水溶性，使外來物較易以排泄作用排出體外(Hodgson, 1987)。其進行代謝的過程，又可分為以下二階段：(一)初級代謝反應(Phase I)：包括氧化作用(oxidation)、還原作用(reduction)、水解作用(hydrolysis)、硫化作用(sulfation)、去烷基化作用(dealkylation)…等。其目的是將親水性的官能基接到外來物的分子上，使其水溶性增加而較易排出體外。(二)次級代謝反應(Phase II)：包括抱合作用(conjugation)及合成作用(synthesis)，其目的是將初級代謝反應之代謝物與體內之葡萄糖、磷酸化合物…等結合在一起，形成水溶性結合物，以促進排泄作用(Wilkinson, 1983)。

多功能氧化酵素是初級代謝反應中最重要的酵素，幾乎所有的合成化學物質或天然物質都可被其氧化，其活性大多集中在平滑內質網(smooth endoplasmic reticulum)。萃取時將組織研磨液離心，以獲得微粒體沉澱物(microsome pellet)，酵素活性大多集中在此微粒體沉澱物中。多功能氧化酵素之主要組成為細胞色素 P-450 單氧酵素系統(cytochrome P-450-dependent monooxygenase system)，擔任催化反應的工作(Conney, 1967)。細胞色素 P-450 單氧酵素系統主要位於肝細胞之內質網(Terriere, 1984)。其主要之成份包括細胞色素 P-450、細胞色素如 cytochrome b5、NADPH-cytochrome C reductase 等。細胞色素 P-450 可以說是整個單氧酵素系統中最重要的一部份。在還原狀態下，細胞色素 P-450 可以和一氧化碳形成複合物，於波長 450nm 處有最大吸光值，故因此定名。也根據此種特性，測試一氧化碳差異光譜之分析方法，是測定細胞色素 P-450 含量的重要依據(Omura and Sato, 1964)。

本研究是以福德坑垃圾掩埋場及山豬窟垃圾掩埋場為對象。其中福德坑垃圾掩埋場已於民國 83 年封閉，封閉時覆以 0.5-1.0M 之最終覆土，並行簡易之植生，但由於掩埋時間不同，封閉時間亦異，故形成之林相不同，但全區都具有相當高

的植物覆蓋度(劉, 1997)。目前台北市政府計劃將土地再利用規劃為環保公園用地。山豬窟垃圾掩埋場則於民國 83 年 6 月 18 日啟用, 以銜接福德坑垃圾掩埋場封閉後之垃圾處理工作。本場又可分為三個部份, 一為掩埋完成區、二為掩埋區、三為施工區。本研究定期於文山區福德坑垃圾掩埋場及南港區山豬窟垃圾掩埋場內採集鼠隻, 以採得之溝鼠(*Rattus norvegicus*)作為指標生物, 經解剖後取出肝臟, 測定其肝臟氧化酵素細胞色素 P-450、細胞色素 b5 之含量及各種單氧酵素包括阿特靈環氧酵素(Aldrin epoxidase)、PCMA 氮-去甲基酵素(PCMA *N*-demethylase)及 PNA 氧-去甲基酵素(PNA *O*-demethylase)等活性變化情形, 並與室內馴化之挪威鼠品系肝臟氧化酵素活性作比較, 以了解垃圾掩埋場在復育過程中, 鼠類受污染曝露的程度, 進而推斷垃圾掩埋場在復育完成後, 何時始能適合人類於其中活動而無害。

貳、材料方法

一、鼠隻採集

(一)採集時間:自民國八十八年八月至八十九年七月。

(二)採集地點:定期於福德坑、山豬窟兩垃圾場之固定地點進行採集, 以下簡單介紹福德坑及山豬窟兩垃圾掩埋場:

1. 福德坑垃圾掩埋場:

(1)位置:台北市文山區。

(2)面積:總面積約為 65 公頃, 掩埋面積約為 37 公頃。

(3)地形:四周環山谷地, 山勢由北而南漸次而降, 坡度平緩。東側鄰近景美溪。

(4)掩埋日期:自民國七十四年開始啟用至民國八十三年封閉。

(5)復育情形:封閉後進行復育工作, 覆以 0.5-1.0M 之最終覆土, 並行簡易之植生, 但由於掩埋時間不同, 封閉時間亦異, 故形成之林相不同, 但全區都具有相當高的植物覆蓋度。

(6)採集鼠隻地點:管理大樓週邊約一公里範圍。

2. 山豬窟垃圾掩埋場:

(1)位置:位於台北市南港區

(2)面積:總面積約為 65 公頃, 掩埋面積約為 30 公頃。

(3)地形:南高北低之長條形山谷，下游出口位於場址北側。

(4)掩埋日期: 民國八十三年啟用，以銜接福德坑垃圾掩埋場封閉後之垃圾處理工作。

(5)預定使用年限:七至十年。

(6)採集鼠隻地點:本場又可分為三個部份，一為掩埋完成區、二為掩埋區、三為施工區。本研究採集鼠隻地點為掩埋完成區。

(三)供試鼠源:

自民國八十六年八月起，定期於福德坑、山豬窟兩垃圾場之固定地點進行採集，每月進行一次，一次為期三天。以甘薯塗花生醬作為誘餌，在兩垃圾場中各放置三十個捕鼠籠。捕鼠籠長 27.5cm、寬 16.5cm、高 13.5cm。

(四)解剖鼠隻:

將採得之鼠隻分類鑑定，以乙醚麻醉約三分鐘至死，測其身長、尾長及體重，解剖後截取其肝臟供試。若肝臟在解剖後未立即利用，可先保存於-70℃冰箱中。

二、供試藥劑

(一) 蛋白質含量測定:

Coomassie brilliant blue G-250 : 購自 Sigma 公司。

Bovine Serumalbumin , BSA : 購自 Sigma 公司。

(二) 細胞色素含量測定:

Sodium hydrosulfite : 購自 Sigma 公司。

β -Nitrocinamide adenine dinucleotide , reduced form , β -NADH : 購自 Sigma 公司。

(三)多功能氧化酶活性測定:

β -Nitrocinamide adenine dinucleotide phosphate , NADP : 購自 Sigma 公司。

D-Glucose-6-phosphate : 購自 Sigma 公司。

D-Glucose-6-phosphate dehydrogenase , G-6-P-DH: 購自 Sigma 公司。

P-Chloro-N-methylaniline : 購自 Sigma 公司。

P-dimethylaminobenzaldehyde : 購自東京化成工業株式會社。

Aldrin : 購自東京化成工業株式會社。

Dieldrin : 購自東京化成工業株式會社。

Anhydrous sodium sulfate : 購自和光純藥工業株式會社。

N-Hexane : 購自 ALPS 化學公司。

Ethoxyresorufin : 購自 Sigma 公司。

P-Nitroanisole , PNA : 購自東京化成工業株式會社。

Resorufin : 購自 Sigma 公司。

Indole-3-carbinol: 購自 Sigma 公司。

(四)其他供試藥劑

Phosphate acid : 購自石津製藥工業株式會社。

Methyl cellosolve : 購自 RDH 化學公司。

(五)儀器

離心機 : Sigma-202MK

超高速離心機 : Beckman L7

光譜儀 : Sequoia-Turner 340

水浴機 : Hotech 830

比色儀 : Hitachi 557

氣相層析儀 : Varin model 3700

三、方法

(一) 酵素備製:

截取 0.5g 之肝臟，以預冷之 1.15%氯化鉀溶液洗淨後置於 15ml 之組織勻漿管(Tissue homogenizer)，內含預冷 10ml 之 0.1M 、 pH7.5 磷酸鈉緩衝液(Sodium phosphate buffer)研磨 20 秒，研磨液經兩層紗布過濾，此為粗酵素(Crude enzyme)來源，粗酵素需立即使用。

將粗酵素以超高速離心機 10000g 離心 15 分鐘，一些大分子之物質如碎片(Cell debris)，細胞核(Nuclei)，粒線體(Mitochondria)即行沉澱，取上清液(Supernatant)以 100000g 離心 1 小時後得到微粒體沉澱(Microsomal sediment)，以上述之緩衝溶液使得這些微粒體沉澱再懸浮(Resuspended)，

此為微粒體酵素(Microsomal enzyme)之來源，以上所有程序需在 0-4° C 的環境下完成(Yu, 1982)。

(二) 蛋白質含量測定:

為方便計算及比較各種酵素的比活性(Specific activity)，每組試驗均必須測定其均質液中蛋白質含量:

1. 標準蛋白質含量曲線測定(Protein standard curve):

以小牛血清蛋白 (Bovin Serum Albumin (BSA))為標準蛋白質，配製成一系列不同濃度(含 0.5-10 ug / 0.1ml)之溶液，每次取 0.1ml 蛋白質溶液及 3 ml 蛋白質反應試劑(馬可藍氏溶液)，總體積為 3.1 ml。置於光譜儀(Sequoia-Turner 340)於波長 595 nm 時測其吸光值，試驗進行三重覆，依此數值換算成蛋白質濃度和吸光值的迴歸校正直線方程式(Bradford, 1976)。

2. 粗製液之蛋白質含量測定:

取 0.1ml 酵素粗製液與 3ml 蛋白質反應試劑(馬可藍氏溶液)，總體積為 3.1ml。其測定同標準蛋白質含量曲線測試法，置於光譜儀(Sequoia-Turner 340)於波長 595 nm 時測其吸光值，試驗進行三重覆，依標準蛋白質含量迴歸直線求出蛋白質含量。

(三)細胞色素含量測定方法

1. 細胞色素 P-450 含量測定:

沿用 Omura 和 Sato(1964)一氧化碳差異光譜法測定。取 4ml 之酵素溶液，加入 1 mg 之 sodium dithionite 均勻搖晃後，各取 2ml 分置於兩個比色管，放入 Hitachi 557 UV-visible spectrophotometer 中，先進行波長 400nm~500nm 之基線校正。校正後取出比色管，在通風櫃中緩慢而穩定地通入一氧化碳氣泡，再放入 spectrophotometer 中，進行 400nm~500nm 的掃描。記錄樣品在 450 nm 及 490 nm 下之吸收值與最大吸收值所在波長，將所得值代入下列公式(Hodgson, 1987):

$$\text{P-450 content} = (A_{450} - A_{490}) \times 1000 / (\epsilon \times b \times a)$$

ϵ : 消光係數(91)

b : 光徑長度(1cm)

a : 微粒體濃度(mg/ml)

2. 細胞色素 b5 含量測定:

沿用Omura和Sato(1964)差異光譜法測定。取4ml之酵素溶液，各取2ml分置於兩個比色管，放入Hitachi 557 UV-visible spectrophotometer中，先進行波長400nm~500nm之基線校正。校正後取出比色管，加入少量的solid NADH，均勻搖晃二分鐘，再放入spectrophotometer中，進行400nm~500nm的掃描。記錄樣品在424nm及409nm下之吸收值與最大吸收值所在波長，將所得值代入下列公式(Hodgson, 1987)：

$$b5 \text{ content} = (A_{424} - A_{409}) \times 1000 / (\epsilon \times b \times a)$$

ϵ ：消光係數

b：光徑長度

a：微粒體濃度

(四)多功能氧化酵素活性測定方法：

1. NADPH 生成系統(NADPH generating system)之製備：

進行氧化酵素反應之初需先製備氧化酵素之重要輔基 NADPH；而一份 0.3ml 之 NADPH 生成系統之組成有：0.1ml(1.8 μ mol)之 NADP，0.1ml(18 μ mol)之 G-6-p，0.02ml(1 單位活性)之 G-6-p-dehydrogenases 與 0.08ml 之 0.1M、pH7.5 磷酸鈉緩衝液(Yu, 1982)，此生成系統於酵素反應前 3 分鐘先行製備完成。

2. Aldrin epoxidase (阿特靈環氧酵素)比活性測定：

以Aldrin作為測定酵素之受質(Substrate)，在4毫升之反應系統中，包括1毫升之酵素溶液，2.6ml之0.1M、PH 7.5之磷酸緩衝液，一份 NADPH生成系統，250n mole阿特靈(溶於0.1 ml methyl cellosolve)當作受質。此反應系統於34° C振盪水浴反應15分鐘，加入10毫升之正己烷(n-Hexane)終止反應。每組試驗進行三次重覆，充分振盪後靜置一段時間或過夜，此時反應物阿特靈及產物地特靈均存在於正己烷中，取出上層液的正己烷，加入無水硫酸鈉(Anhydrous sodium sulfate)以脫去殘於水份，正己烷中之產物地特靈以氣相層析儀測定(Yu, 1982)。選用氣相層析儀的電子捕捉偵測器(ECD)之設定條件為：氮氣流速30 ml/min，管柱溫度為170° C，注射室溫度為200° C，偵測器為250° C，所用管柱為5%QF1預填之玻璃管柱。

2. PCMA-*N*-demethylase(PCMA-氮-去甲基酵素) 比活性測定:

在4毫升的反應系統中應包括1毫升的酵素溶液，2.6ml之0.1M、PH7.5 磷酸鹽緩衝液，一份NAPDH生成系統，3 μ mole *p*-Chloro-*N*-methyl-aniline(溶於1ml methyl cellosolve)。此反應系統於34° C振盪水浴反應15分鐘，加入2毫升含6% *p*-dimethylaminobenzaldehyde(溶於3 N硫酸中)溶液以終止反應(Yu, 1982)。以離心機10000g於4° C 離心15分鐘，以吸管吸出上層液，測定波長445nm的吸光值，以測定產物 *p*-Chloroaniline的生成量，每組試驗進行三次重覆。

4. PNA *O*-demethylase(氧-去甲基酵素)比活性測定:

p-nitroaniline (PNA)做為活性測定 *O*-Demethylase 活性之受質，在3 ml 之反應液中包含0.2 ml 酵素溶液，2.4 ml Tris-HCL 緩衝液(0.1 M, PH 7.8)，0.1 ml 氯化鎂(0.2 M)溶液，4 μ mole PNA(於0.1 ml 0.5%乙醇)，0.3 ml NADPH 生成系統(組成為1.8 μ mole NADP, 9 μ mole glucose 6-phosphate 及1 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase)。此反應系統於30° C 振盪水浴中反應30分鐘，加入1 ml 鹽酸(1N)溶液以終止反應。加入5 ml 氯仿振盪後於10000g 離心15分鐘，取3 ml 下層液(氯仿層)，加入3 ml 氫氧化鈉(0.5N)溶液，經振盪後於10000g 離心15分鐘。取上層液(氫氧化鈉層)，於波長400 nm 測吸光值，經 *p*-nitrophenol, $Y(O.D.) = -0.00791 + 20163.34 X (M)$ 之校正迴歸直線，以決定產物(*p*-nitrophenol)之生成量(Yu, 1982)。

(五)、Indole-3-carbinol 氧化酶活性誘發研究：每一供試鼠，以餵食器強迫餵食200mg，48小時後按上述方法測定肝臟氧化酶之活性。

參、結果與討論:

一、採得鼠隻種類及數量:

本研究於山豬窟垃圾掩埋場共捕獲鼠類213隻，其中以溝鼠95隻最多，佔45%，小黃腹鼠35隻、屋頂鼠20隻、錢鼠57隻、月鼠6隻。於福德坑垃圾掩埋場共捕獲鼠類70隻，其中以小黃腹鼠50隻最多，佔71%，溝鼠15隻。錢鼠6隻。福德坑垃圾掩埋場已復育7年，故回歸自然狀態，喜親近

人居之溝鼠比例大幅自1998年之91%降至21%。而野鼠之種類小黃腹鼠佔71%最多。

表一、1999年8月至2000年7月山豬窟垃圾掩埋場捕鼠記錄

鼠之種類	隻數	平均體重 (克)	平均肝重 (克)	體重/肝重
溝鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	95	149.29±43.34	7.17±2.13	20.8
小黃腹鼠 <i>Rattus losea</i>	35	142.43±33.75	6.11±1.08	23.3
屋頂鼠 <i>Rattus rattus</i>	20	113.36±27.26	6.38±1.43	17.8
小月鼠 <i>Mus formosanus</i>	6	19.68± 2.17	1.82±0.23	10.8
錢鼠 <i>Suncus murinus</i>	57	----	----	----
總 數	213			

表二、1999年8月至2000年7月福德坑垃圾掩埋復育場捕鼠記錄

鼠之種類	隻數	平均體重 (克)	平均肝重 (克)	肝重/體重 %
溝鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	15	111.91±23.33	5.27±1.48	21.23
小黃腹鼠 <i>Rattus losea</i>	50	130.67±18.97	6.89±1.53	18.97
屋頂鼠 <i>Rattus rattus</i>	0	----	----	----
小月鼠 <i>Mus formosanus</i>	0	----	----	----
錢鼠 <i>Suncus murinus</i>	5	----	----	----
總 數	70			

二、溝鼠平均重量比較：

本研究以溝鼠為主要實驗對象，於山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠平均重量為 149.29 ± 43.34 (N=95)。於福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠平均重量為 111.91 ± 23.33 (N=15)，平均重量在統計上並無差異(表一、表二)。對照組大白鼠之平均重量為 256.50 ± 25.84 (N=8)。

三、Cytochrome P-450 含量測定：

分析福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素Cytochrome P-450 平均含量為 1.93 ± 0.36 nmole/mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素Cytochrome P-450 平均含量為 1.36 ± 0.42 nmole/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酵素Cytochrome P-450 平均含量為 0.74 ± 0.11 nmole/mg。

表三、1999年8月至2000年7月3山豬窟垃圾掩埋場與福德坑垃圾掩埋復育場溝鼠之Cytochrome P-450含量測定差異

溝鼠之來源	Cytochrome P-450含量n mole/mg protein。
福德坑	1.93 ± 0.36
山豬窟	1.36 ± 0.42
大白鼠	0.74 ± 0.11

四、Cytochrome b5 含量測定：

分析福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素Cytochrome b5 平均含量為 1.26 ± 0.37 nmole/mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素Cytochrome b5 平均含量為 0.71 ± 0.24 nmole/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酵素Cytochrome b5 平均含量為 0.60 ± 0.12 nmole/mg(表四)。

表四、1999年8月至2000年7月3山豬窟垃圾掩埋場與福德坑垃圾掩埋復育場溝鼠之Cytochrome b5含量測定差異

溝鼠之來源	Cytochrome b5含量 n mole/mg。
福德坑	1.41±0.33
山豬窟	0.71±0.24
大白鼠	0.60±0.12

五、Aldrin epoxidase (阿特靈環氧酵素比)活性測定：

分析福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素aldrin epoxidase平均活性為 1.74 ± 0.61 nmole/min/mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素aldrin epoxidase平均活性為 1.11 ± 0.24 nmole/min/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酵素aldrin epoxidase平均活性為 0.31 ± 0.06 nmole/min/mg(表五)。

表五、1999年8月至2000年7月山豬窟垃圾掩埋場與福德坑垃圾掩埋復育場溝鼠之aldrin epoxidase比活性測定差異

溝鼠之來源	Aldrin Epoxidase 比活性 n mole/mg protein/min.
福德坑	1.74±0.61
山豬窟	1.11±0.24
大白鼠	0.31±0.06

六、PCMA-*N*-demethylase(PCMA-氮-去甲基酵素)比活性測定：

分析福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素PCMA-*N*-demethylase平均比活性為2.45± 0.67 nmole/min/mg。山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酵素PCMA-*N*-demethylase平均活性為2.11± 0.26nmole/min/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酵素PCMA-*N*-demethylase平均活性為1.38± 0.41 nmole/min/mg(表六)。

表六、1999年8月至2000年7月山豬窟垃圾掩埋場與福德坑垃圾掩埋復育場溝鼠之PCMA-*N*-demethylase 比活性測定差異

溝鼠之來源	PCMA- <i>N</i> -demethylase 比活性 n mole/mg protein/min.
福德坑	2.45±0.67
山豬窟	2.11±0.26
大白鼠	1.38±0.41

表七、以Indole 3-carbinol 誘發鼠肝臟氧化酶之結果

氧化酵素 種類	酵素活性增加倍數	
	山豬窟溝鼠	大白鼠(Wister)
Aldrin epoxidase	3.2	4.48
Biphenyl hydroxylase	6.9	9.67
MR-O-demethylase	30.0	42.0
ER-O-demethylase	48.0	57.6
PCMA-N-demethylase	19.1	26.7
CytoP-450 content	3.8	5.3
CytoP-450 reductase b5	2.5	3.5

由捕鼠之記錄中發現，在山豬窟垃圾掩埋場及復育中的福德坑垃圾掩埋場皆捉到溝鼠，且其食性較廣，以溝鼠為試驗材料較具代表性。1999年8月至2000年7月於山豬窟垃圾掩埋場共捕獲鼠類較1997及1998年為少。一則因垃圾掩埋場較以前完整，二因焚化爐之啟用垃圾量減少，山豬窟垃圾掩埋場因仍在在使用，有機廢棄物也多以溝鼠最多，約佔45%。福德坑垃圾掩埋場，大都完成復育，以小黃腹鼠隻最多約佔71%。在二垃圾場雖然環境條件不同但統計上溝鼠之體重量並無明顯差別。體重與肝臟比統計上在統計上無顯著差異。福德坑垃圾掩埋場捕獲溝鼠之肝臟氧化酶Cytochrome P-450平均含量高於山豬窟垃圾掩埋場捕獲溝鼠及對對照組。 11 ± 0.24 nmole/min/mg。對照組大白鼠之肝臟氧化酶aldrin epoxidase平均比活性為 0.31 ± 0.06 nmole/min/mg。根據本研究結果發現，雖然福德坑垃圾掩埋場已於民國83年封閉，進行復育工作，與1998，1999及2000年之研究結果相較，由捕獲之鼠隻其肝臟之氧化酵素仍皆高於對照組之鼠隻，較在山豬窟垃圾掩埋場捕獲之鼠隻為高。故已進行復育之福德坑垃圾掩埋場目前似仍有誘發溝鼠肝臟氧化酵素之因子。以Indole-3-carbinol 酵素誘

發試驗中發現可誘發野生溝鼠氧化酶3.2-48倍，低於對照組之4.5-57倍。

Yamamoto等(1995)以Wistar 雄鼠餵飼含0.2%抗氧化劑butylated hydroxytoluene (BHT)之飼料30天，對鼠之生長無關，但其肝臟重量顯然較餵飼不含抗氧化劑之飼料者為重，但對脂肪氧化酵素之活性沒有影響。Swales 及 Caldwell(1997)認為應用鼠肝細胞研究毒理學及代謝不亞於使用整隻動物進行研究，新分離的肝細胞其總cytochrome P450量與肝臟所得相等，未來可以鼠肝細胞研究毒理學及代謝替代全鼠肝臟。Reicks及Crankshaw (1996)研究發現 diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS), 及 allyl methyl sulfide (AMS)等大蒜成分餵飼老鼠後15小時後 p-nitrophenol (pNP) hydroxylase活性分別降低31%, 54%, 65%, 然而benzphetamine N-demethylase 及 ethoxyresorufin O-deethylase之活性並未改變。Mair及Casida(1991), Schoket 及 Vincze 1985. 證實小白鼠多功能氧化酵素與(MFO)可以多種殺草劑代謝有關。Knaak等 (1996)認為多功能氧化酵素及有機磷殺蟲劑代謝相關。Sohn 及Fiala(1995)飢餓之鼠隻會增加肝臟cytochrome P450 by 32%, 活性 270% aniline hydroxylase, 270% N-nitrosodimethylamine demethylase, 及 320% azoxymethane hydroxylase 肝臟之 benzo[a]pyrene (BP) hydroxylase 及 glutathione-S -transferase 分別減少 39% 及 21%, 然而NADPH cytochrome c reductase 及 UDP glucuronyltransferase 未受影響故影響肝臟酵素除了環境因子，食物、有毒物外，生理的影響也頗大，在利用生物作為污染指標時必須考慮各種影響因子。

肆、參考文獻

- 王仁澤、林大楨。1993。毒物化學及實驗。高立圖書有限公司。845頁。
- 王正雄。1994。家鼠防治概論。中華環境有害生物防治協會。148頁。
- 李鏡梯。1996。高澎地區鼠隻體內含鉛量與環境鉛之相關性研究。高雄醫學院公共衛生學研究所碩士論文。58頁。
- 翁祖輝。1994。淡水河污染與魚類單氧苷之研究。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。11頁。
- 梁振凱。1993。垃圾掩埋場封閉後二次公害之研究。國立台灣大學環境工程研究所碩士論文。169頁。
- 莊進源。1986。以生物方法對新店溪水質之判定研究報告。行政院衛生署環境護局。25頁。
- 楊平世。1995。內外雙溪之水棲昆蟲生態及監測水質指標生物研究。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告。36頁。
- 劉秀媚。1997。臺灣原生地被植物應用於垃圾場復育工作之探討—以臺灣北部地區為例。國立台灣大學環境工程研究所碩士論文。99頁。
- 羅陽青。1998。以氣態紅外線及氣體色層分析儀測定垃圾掩埋場，水稻田和溼地溫室氣體排放。國立台灣大學環境工程研究所碩士論文。192頁。
- Beardsley, A., M. J. Vagg., P. H. Beckett, and B. F. Sansom. 1978. Use of the field vole (*M. atrestis*) for monitoring potentially harmful elements in the environment. *Environ. Pollute.* 16:65-71.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bromenshenk, J. J., G. C. Smith, and V. J. Watson. 1995. Assessing ecological risks in terrestrial systems with honeybee. pp. 9-29 in Butterworth, F. M., and L. D.

Lynda, eds. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum press. New York.

Butterworth, F. M. 1995. Introduction to biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. pp. 1-8 *in* Butterworth, F. M., and L. D. Lynda, eds. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum press. New York.

Chandikumar, S. E., W. Q. Charles, and B. Mark. 1989. Induction of hepatic cytochrome P-450 activity in wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*) by phenobarbital and 3-Methylcholanthrene. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42:716-720.

Chandikumar, S. E., W. Q. Charles, and W. C. Anthony. 1991. Evaluation of ultrastructural hepatic response to environmental toxicants in wild cotton rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47:321-328.

Conney, A. H. 1967. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacological Reviews*. Vol. 19. No. 3. pp. 317-355.

Feyk, L. A., P. G. John, and H. L. George. 1995. The caffeine breathe test. pp. 229-245 *in* Butterworth, F. M., and L. D. Lynda, eds. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum press. New York.

Guengerich, F. P. 1991. Bioactivation of aflatoxin B1 by human liver microsome: role of cytochrome P-450 3-A enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 108. No. 3. pp. 436-447.

Hodgson, E. 1987. Metabolism of toxicants. pp. 51-83. *in*: E. Hodgson, and E. L. Patricia, eds. *Modern Toxicology*. Elsevier Science Publishing Co. New York.

Knaak, J. B. ; M. A. Al-Bayati, ; O.C. Raabe, ; J.N. Blancato, 1996. Use of a multiple pathway and multiroute physiologically based pharmacokinetic model for

- predicting organophosphorus pesticide toxicity. ACS symposium series ; 0097-6156 ; 643. Biomarkers for agrochemicals and toxic substances applications and risk assessment c. p. 206-228..
- Mair, P & J. E. Casida, 1991. Diallylate, triallylate, and sulfallate herbicides: identification of thiocarbamate sulfoxides, chloroacroleins, and chloroallylthiols as mouse microsomal oxidase and glutathione S-transferase metabolites. *J-Agric-Food-Chem.* 39 (8):1504-1508..
- Omura, T., and R. Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biochemistry. Chem.* 239(7):2370-2378.
- Ostrowski, S., E. W. Gunter, and T. D. Matte. 1990. Blood lead and zinc protoporphyrin levels in donkeys and mules near a secondary lead smelter in Jamaica, 1987-1988. *Vet. Hum. Toxicol.* 32:53-56.
- Reicks, M. M. ; D. L. Crankshaw, 1996. Modulation of rat hepatic cytochrome P-450 activity by garlic organosulfur compounds. *Nutr-cancer.* v. 25 (3) 1241-248..
- Ryan, D. E., and W. Levin. 1990. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Therap.* 45:153-239.
- Schoket B., I. Vincze 1985. Induction of rat hepatic drug-metabolizing enzymes by substituted urea herbicides. *ACTA Pharma, et Toxicol.* 56:283-288.
- Schrenk, D., P. L. Hans., B. Hermann., W. Thomas., H. Hanspaut, and W. B. Karl. 1991. Induction of hepatic p450-dependent monooxygenase in feral mice from a PCDD/PCDF-contaminated area. *Chemosphere.* Vol. 22. No. 11. pp. 1011-1018.
- Sohn, O. S. ; E. S. Fiala, 1995. Effects of dietary restriction and fasting on selected rat liver enzymes of xenobiotic metabolism and on AOM-induced DNA guanine methylation in rat liver and colon. *Nutr-cancer.* v. 23 (1):3-22..
- Swales, N.J.; J. Caldwell, 1997: Phase 1 and 2 metabolism in freshly isolated hepatocytes and subcellular fractions from rat, mouse, chicken and ox livers. *Pestic-sci.* v. 49(3) p. 291-299..

- Terriere, L. C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 29:71-88.
- Travis, C. C. 1992. Use of Biomarkers in Assessing Impacts of Chemical Pollutants. Plenum Press. New York. 284 pp.
- Way, C. A., and G. D. Schroder. 1982. Accumulation of lead and cadmium in wild populations of commensal rat(*Rattus norvegicus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11:407-411.
- Wilkinson, C. F. 1983. Role of mixed-function oxidases in insecticide resistance. pp. 175-206 in G. P. Georgion and T. Sato, eds. *Pest Resistance to Insecticides*. Plenum Press. New York.
- Yu, S. J. 1982. Induction of microsomal oxidases by host plants in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*(J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.* 17:59-67.