

口腔癌與子宮頸癌致癌因子之探討  
Study of Oncogenic Factors of Oral  
Cancer and Cervical Cancer

口腔癌與子宮頸癌致癌因子之探討

指導教授：謝易修副教授

(Yih-Shou Hsieh)

楊繼江副教授

(Chi-Chiang Yang)

研究生：楊玉燕 (Yu-Yen Yang)



中華民國八十九年七月

## 目錄

目錄.....	2
表、圖目錄.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	6
縮寫表.....	8
前言.....	9
研究目的.....	18
材料方法.....	19
設計大綱.....	19
檢體來源及種類.....	19
萃取 DNA.....	21
PCR amplification.....	21
口腔細胞的培養.....	23
檳榔鹼敏感性試驗 (MTT test).....	23
Cell cycle 分析.....	24
結果.....	25
討論.....	29
參考文獻.....	62

## 表、圖目錄

表一：27 例口腔癌檢體病理結果 .....	33
表二：正常口腔對照組檢體病理結果 .....	34
表三：九例新鮮冷凍子宮頸癌組織患者基本資料 .....	35
表四：石蠟包埋子宮頸癌組織切片患者基本資料 .....	36
表五：29 例正常對照組子宮頸刮除細胞檢體患者基本資料 .....	37
表六：PCR programs.....	38
表七：PCR primers sequence .....	39
表八：primers sequence of HPV typing .....	40
表九：年齡與子宮頸癌症級別分布 .....	41
圖一：口腔癌檢體經 PCR 放大後的洋菜瓊脂電泳圖 .....	42
圖二：子宮頸癌檢體經 PCR 放大後的洋菜瓊脂電泳圖 .....	43
表十：子宮頸癌病毒 PCR 結果 .....	44
表十一：子宮頸癌 HPV 各型分布 .....	45
表十二：病毒在各癌症級別的分佈 .....	46
表十三：Cytotoxicity of BF21 treated with various concentration of Arecoline..	47
表十四：Cytotoxicity of BF27 treated with various concentration of Arecoline..	48
圖三：兩株正常口腔頰粘膜細胞 BF cell 對 Arecoline 敏感性試驗曲線圖 .....	49
表十五：Cytotoxicity of OSF1 treated with various concentration of Arecoline..	50
表十六：Cytotoxicity of OSF8 treated with various concentration of Arecoline..	51
表十七：Cytotoxicity of OSF9 treated with various concentration of Arecoline..	52
圖四：三株口腔粘膜下纖維化細胞 OSFcell 對 Arecoline 敏感性試驗曲線圖.....	53
表十八：Cytotoxicity of KB treated with various concentration of Arecoline .....	54
表十九：Cytotoxicity of GNM treated with various concentration of Arecoline .....	55
表二十：Cytotoxicity of TSCCa treated with various concentration of Arecoline .....	56
圖五：三株癌細胞 KB、GNM、TSCCa 對敏感性試驗曲線圖 .....	57
表二十一：Cell cycle phase of Arecoline effects on various cells .....	58
圖六：兩株正常口腔頰粘膜細胞 BF cell 處理 Arecoline 48 小時的細胞週期表現 .....	59
圖七：三株口腔粘膜下纖維化細胞 OSFcell 處理 Arecoline 48 小時的細胞週期表現 .....	60
圖八：三株癌細胞 KB、GNM、TSCCa cell 處理 Arecoline 24 小時的細胞週期表現 .....	61

# 口腔癌與子宮頸癌致癌因子之探討

## 摘要

口腔癌在台灣的罹患人口有逐年攀升的趨勢，根據流行病學調查口腔癌患者多數有嚼食檳榔的習慣，因此檳榔被認為是導致口腔粘膜纖維化及口腔癌的最大因素，而檳榔中則含有大量檳榔鹼 (Arecoline)。本實驗為了解台灣中部地區口腔癌與病毒及檳榔鹼之間的相關性，乃以口腔癌病理切片檢體以 PCR 法分別檢測 HPV、HSV-1、HSV-2、CMV、HHV-8、EBV 等六種病毒特異的 DNA 片段；並以正常口腔細胞 BF (Buccal Mucosal Fibroblast)、口腔粘膜下纖維化細胞 OSF (Oral Submucosal Fibroblast)、和 GNM (Neck Metastasis of Gingiva Carcinoma)、KB (Mouth Epidermal Carcinoma)、TSCCa (Tongue Squamous Cell Carcinoma) 舌鱗狀上皮細胞癌三種口腔癌細胞株比較對檳榔鹼的感受性和對細胞週期的影響。結果在 27 例病理切片檢體中，病毒因子經 PCR 檢測僅有一例發現含有 HSV-1，顯示台灣中部地區口腔癌因為病毒所引起的可能性相當低。而從不同劑量檳榔鹼處理上述細胞的實驗中發現：低濃度的檳榔鹼加速口腔癌細胞增生，DNA 含量增加，高濃度檳榔鹼則抑制癌細胞生長，使細胞週期停滯在 G<sub>2</sub>M 時期。

過去關於子宮頸癌的研究指出，90% 子宮頸癌前期病變 (Cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 含有人類乳突瘤病毒 (Human papillomavirus,

HPV)的 DNA ,其他病毒包括 疹病毒 (Herpes simplex virus,HSV)、巨細胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV)等也常見於子宮頸癌。本研究乃以二十七例子宮頸癌患者切片和二十九例正常之子宮頸刮除細胞 ,利用 PCR 法檢測病毒 HPV、HSV-1、HSV-2、CMV、HHV8 等具特異性的 DNA 片段。實驗結果發現二十七例子宮頸癌切片中 ,十八例測得 HPV,包括九例為 HPV-16 (一例含有 CMV) ,二例為 HPV-18 ,一例為 HPV-16 及 18 同時感染 ,一例為 HPV-45 ,一例為 HPV-35 (含有 CMV , HSV-2) ,三例為未知的 HPV (一例含有 CMV) ;二十九例正常之子宮頸刮除細胞則沒有偵測到任何病毒。由實驗結果得知 :子宮頸癌與 HPV 最具相關性 ,出現比例以 HPV-16 (50%)最高 ,其次為 HPV-18 (11.1%) ; CMV 和 HSV-2 只是致癌的輔助因子 ; HSV-1 與 HHV-8 在子宮頸癌檢體中沒有被偵測到 ,可能和子宮頸癌沒有直接的相關性。

# STUDY OF ONCOGENIC FACTORS OF ORAL CANCER AND CERVICAL CANCER

## *Abstract*

Areca nut chewing has been shown to correlate with the occurrence of oral submucous fibrosis and oral cancer in Taiwan. Arecoline, the main betel nut alkaloid, is considered to be one of the important factors related to oral mucosal lesions. Viral infection is another etiologic factor related to oral cancer. To elucidate the roles of arecoline in the pathogenesis of oral cancer, we investigated the effects of arecoline on cytotoxicity and cell cycle assays of human normal buccal fibroblasts, oral submucosal fibroblasts, and three cancer cell lines (derived from gingiva and mouth floor, respectively). Moreover, 27 oral cancer specimens were collected to detect oncogenic viruses, HPV, HSV-1, HSV-2, CMV, HHV-8, EBV, by polymerase chain reaction technique. Only one specimen revealed the presence of HSV-1. However, arecoline at a concentration lower than 0.8 µg/ml increased cell growth; at a higher concentration, arecoline was cytotoxic and the cell cycle was altered. These results indicate that viral infection is not a predominant etiology of oral cancer in Taiwan. Moreover, arecoline may act as a main effect on the pathogenesis of oral submucous fibrosis as well as oral cancer.

In the past it was found that 90 % cervical intraepithelial neoplasia (CIN) contain human papillomavirus (HPV) DNA. Hence HPV was believed to be closely related with cervical cancer. However, other viral infections, e.g. herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus (CMV) were also common with cervical cancer. Therefore, this study was aimed to investigate the correlation of viral factors with cervical cancer. Twenty seven cervical cancer specimens and twenty nine normal cervical scrapes were collected and tested for the presence of specific HPV, HSV-1, HSV-2, CMV, and HHV-8 (human herpesvirus type 8) DNA by PCR. The results showed that 18 (66.7%) of the 27 cervical specimens were HPV positive, 3 (11.1%) were CMV positive, and 1 (3.7%) was HSV-2 positive. Among the 18 HPV positive, 9 were HPV-16 which include 1 with dual CMV infection; 2 were HPV-18; 1 was HPV-16/18; 1 was HPV-45; 1 was HPV-35/CMV/HSV-2. Of the 29 normal cervical scrapes, none was positive with any of the above viruses. These results suggested that HPV is the most predominant viral factor associated with cervical cancer. CMV and HSV-2 may be cofactors. HSV-1 and HHV-8 shown little or no relation with cervical cancer.

## 縮寫表

HPV : Human papillomavirus

HSV : Herpes simplex virus

CMV : Cytomegalovirus

HHV-8 : Human herpes virus – 8

EBV : Epstein- Burr virus

CIN : Cervical intraepithelial neoplasia

CIS : Carcinoma in situ

ACS : American cancer society

BF : Buccal mucosal fibroblast

OSF : Oral submucosal fibroblast

GNM : Neck metastasis of Gingiva carcinoma

KB : mouth epidermal carcinoma

TSCCa : Tongue squamous cell carcinoma



## *Introduction*

### (一) 子宮頸癌

子宮頸癌是婦女常見的癌症之一，是目前女性死亡病例最多的惡性腫瘤；根據統計全世界每年超過五十萬婦女罹患子宮頸癌，而臺灣地區自民國八十三年起，死亡人數持續上升，直到八十七年度子宮頸癌死亡人數為 1017 人，高居女性癌症死亡原因第四位，並且每年仍持續有二、三千人罹患子宮頸癌，其中約 1000 人因而死亡，所以子宮頸癌的重要性不容忽視。

### 定義與分類

Reagan 在 1953 年提出「分化不良」，將之定義為子宮頸鱗狀上皮細胞不正常增生；到了 1956 年 Reagan 和 Marmonic 又將「分化不良」區分為輕度、中度、重度；1969 年 Govan 等人提出原位癌(Carcinoma in situ)，並將之定義為未分化細胞佔據整個上皮細胞層。1975 年，WHO 定義原位癌為癌細胞佔滿整個上皮細胞層；1967 年，Richard 將侷限於表皮細胞的癌細胞變化分成三等級 CIN 1, 2, 3 (Cervical Intraepithelial neoplasia)<sup>1</sup>。

### (二) 口腔癌

近年來台灣地區十大癌症中口腔癌的發生率和死亡率正在逐年增加

中，民國八十三年尚未進入十大癌症排名，到了八十四年的死亡人數為 902 人，突破癌症十大死因排名第七位；民國八十五年的死亡人數增加為 1042 人，排名進佔第五位，其中 90% 均為男性；而且估計每年新增的口腔癌患者在 1500 人以上，因此，口腔癌越來越不容忽視。

## 定義

在 1988 年美國癌症聯合委員會(AJCC)以及國際抗癌聯合會(UICC)制定口腔癌發生的部位，包括唇、舌、口底、頰粘膜、牙齦、硬顎等，這些部位所形成的口腔癌有 90% 都是鱗狀上皮細胞癌，只有少部分會發展成腺癌；台灣地區則以頰粘膜癌、舌癌居多。癌症早期症狀少有痛感，唾液或痰液中摻有血絲，白斑或紅斑易被患者忽略；繼而發展成有痛感、傷口持久不癒達六個月之久的進行性癌症。

在口腔粘膜下纖維化細胞 (Oral submucosal fibrosis, OSF) 會發生粘膜發炎、慢性的纖維化，近上皮層堆積缺乏彈性的纖維組織，伴有肌肉退化現象；粘膜因失去彈性，而緊貼著牙齒產生摩擦，導致慢性潰瘍和繼發性感染；發生這種口腔粘膜下纖維化三分之一的患者可能轉變成口腔癌<sup>2</sup>，所以 OSF 為一種癌前病灶，在癌症發展上具有相當高的危險性<sup>3</sup>。

顎部轉移牙齦細胞株-GNM 細胞，約 10% 的惡性口腔腫瘤發生於齒齦，並好發於中年男性，開始時為潰瘍或外生性突起於固著性牙齦，侵入顎骨造成齒槽骨破壞，牙齒鬆動，嚴重時造成下顎骨病理性骨折，此種細胞為扁平多角上皮層細胞，胞漿透亮，胞質中央處有圓形細胞核，核漿比例大，核仁較多。

舌鱗狀上皮細胞癌-TSCCa 細胞株，多發生於中、老年男性舌頭側緣的，臨床上多是無痛腫塊或潰瘍，邊緣微隆起或深入浸潤舌頭深部組織而固著，使舌部運動困難、吞嚥及飲食不便。舌癌因舌部組織特性常浸潤較深層組織，且較早發生轉移，預後較差<sup>4</sup>。

## 病因學

過去相關的調查顯示：子宮頸癌的發生可能與物理性因子（如幅射）、化學性因子（如抽煙）、病毒感染（如 HPV、HSV、CMV）有關；因此 ACS (American cancer society) 建議如下：避免太年輕有性經驗或多重性伴侶，使用保險套防止性病的傳染，減少抽煙以免促使細胞 DNA 受損而癌化，以及開始有性行為後，每年一次抹片篩檢可早期發現早期癌，都可以降低婦女罹患子宮頸癌的機率。

自過去的許多研究發現子宮頸癌及癌前期病變和人類乳突瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 感染有密切的相關性，而 HPV 主要是透過性行為的接觸傳染，感染五年或十年後引起細胞變化，細胞核出現空泡，有包涵體 (inclusion body) 出現，由輕度增生不良 (mild dysplasia) 演變成中度 (moderate)，重度增生不良 (severe dysplasia)，最後發展變成癌細胞<sup>5</sup>。過去由 90% 得到 CIN 3 (Cervical Intraepithelial neoplasia) 的婦女可測得致癌性的 HPV DNA (如 type 16, 18, 31, 33)<sup>6-9</sup>，正常的婦女則僅 10% 含有致癌性的 HPV DNA，遠低於得到子宮頸癌的婦女，因此感染致癌性的 HPV 可能有較高的機率會發展成子宮頸癌。

在眾多 HPV 類型中，子宮頸癌常見的 HPV 包括 HPV-16 約佔 55%，HPV-18 約佔 9%，HPV-35 約佔 13%，HPV-58 約佔 5%<sup>10-12</sup>，這些不同的 HPV 類型及所佔的比例，會依地區的改變而有所不同<sup>13</sup>。目前子宮頸癌的致癌機轉和 HPV 疫苗的研發，仍在進行中。疹病毒科的 HIV-8 外，其餘病毒 (如 HSV-1、-2、CMV、HHV-6)，都曾被探討與子宮頸癌的相關性<sup>14</sup>，但直至目前尚未證明有直接的相關。

另外在國外已有多篇研究報告<sup>6-10,12-21</sup> 針對該國口腔癌與 HPV 等病毒關係的探討，認為 HPV 與煙、酒同為口腔癌的危險因子，這些報告發現 HPV 存在於口腔癌組織中，或由口腔的乳突瘤和白斑患者身上發現含有 HPV 抗原

<sup>22</sup> , HPV 並可使變形細胞 (transforming cell) 成為惡性表現型 (malignant phenotype) , 而這些病毒都需要其他輔助因子的幫助才具有致癌的能力 ; 而台灣地區直至目前為止僅有 Chang <sup>23</sup> 等人完成口腔癌和 HPV 相關性的調查 17 例 , 口腔癌中 HPV 陽性率為 76.4% ; 其他病毒則並無進一步相關的研究報告。

HPV 病毒屬於乳突多瘤空泡病毒科 (Papovaviridae family) , 在 1995 年七月已有七十七種 HPV 類型被鑑定出來 , 到 1999 年已經被報告超過 100 種類型 , 所感染的疾病包括 : 皮膚疣瘤、菜花、子宮頸癌、口腔上皮細胞增生等。此種病毒為不含封套 (envelope) 的病毒粒 (virion) 直徑約 55-60nm , 殼體 (capsid) 呈正二十面體構造 , 具雙股環狀核酸 , genome 大小約 8000bp , 包括非結構區調控基因的六個早期基因- E1, E2, E4, E5, E6, E7 , 及結構蛋白的二個晚期基因- L1, L2 ; 其中 E1, E2 蛋白參與病毒 DNA 的複製 ; E6 蛋白與抑癌蛋白 p53 結合後 , 使 p53 進入 ubiquitin pathway 被加速分解喪失抑癌功能 ; E7 與抑癌蛋白 pRB 結合干擾細胞週期無法產生負調控作用 ; 此二者為主要 HPV 導致癌病變的重要機轉 <sup>24</sup> 。本研究所使用的 HPV L1 primers MY9 MY11 為 HPV Late 1 gene 中的保守引子 (consensus primer) , 已被許多實驗室利用來偵測 HPV。

疹病毒 (Herpes Simplex virus) 為 疹病毒科 (Herpesviridae) , 其病毒粒大小約 150-200nm , 包含四種結構 : 殼體 (Capsid) 直徑約 100nm , 呈正二

十面體構造，由 162 個殼小體 (Capsomer)形成；病毒核心(core)內有約 77.5nm，為一  $100 \times 10^6 D$  的線形雙股核酸，以  $U_L$  (unique, large) 和  $U_S$  (unique, small) 共價結合組成的重複序列；病毒封套 (envelope) 有突棘 (spike)約 8nm 長，含醣蛋白 (glycoprotein)；在封套和殼體之間，有一由病毒蛋白組成的殼膜間區 (tegument)，其功能目前未知。其中 HSV-1、HSV-2 屬於 Alphaherpesvirinae，為 Simplexvirus 屬的一員，含有 152Kb 的基因體 (genome)。HSV-1 的感染多盛行於經濟水準較低、人口擁擠的開發中國家，人與人之間的直接接觸是高感染的主要原因，感染部位有口咽、三叉神經節，造成唇 疹、齦炎性口炎。HSV-2 常見於生殖道感染，形成皮膚、生殖器 疹，主要透過性行為傳染<sup>16</sup>。過去自癌前期和口腔癌患者檢測，發現含有較高 anti-HSV-1 抗體效價<sup>25,26</sup>。在本研究所使用的 HSV primers 為 DNA polymerase region，三條 primer 一起進行 PCR 反應，可同時檢測 HSV-1、HSV-2 兩種不同型病毒。

巨細胞病毒 (CMV) 也屬於 Herpesviridae 科，與 HHV-6、HHV-7 同為 Betaherpesvirinae 亞科，又稱 HHV-5，基因體約 230K；在落後國家的感染率常大於 90%，多感染初生嬰兒、免疫力不全、移植病患、腫瘤患者等<sup>16</sup>。本研究所使用之 IE2 primers 包含在 CMV 的 Immediately early 2 gene，亦為廣泛使用。

HHV-8 又稱 KSHV ( Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), 於 1994 年<sup>17-18</sup> 首先自 AIDS-KS 組織進行序列分析後, 所發現的一種新的 疹病毒, 後來將此種病毒歸屬於 Gammaherpesvirinae 亞科; HHV-8 的基因體包含一段 140.5Kb long unique coding region 及 800bp 多次重複的 noncoding tandemly repeat units<sup>16</sup>。而 HHV-8 主要發現於愛滋病患者常見的卡波西氏肉瘤中。本研究所使用的 HHV-8 primer 屬於 putative minor capsid region, 亦為廣泛使用之 primer<sup>27</sup>。

EBV 屬 疹病毒科 (Herpesviridae), 可引起感染性單核球增多症 (Infectious mononucleosis)、Burkitt's 淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma) 等疾病。本研究使用之 EBV primer 包含在 EBV 病毒的 Bam HI-W 片段, 每個 EBV genome 約含有 11 次重複的 Bam HI-W 片段, 可使敏感度增加。

另外根據過去研究口腔病變的發生原因極為複雜, 可能和嚼食煙草、檳榔、抽煙、喝酒、微生物感染、基因突變、營養不良、免疫等有關。台灣地區據估計大約有 280 萬嚼食檳榔的人口<sup>28</sup>, 約佔總人口的 13.33%<sup>29</sup>。1995 年針對台灣地區口腔癌患者的流行病學調查發現: 同時有嚼食檳榔、抽煙、喝酒等三種習慣罹患口腔癌的危險機率是一般正常人的 123 倍, 而單一嚼食檳榔的危險機率 (28 倍) 又比抽煙 (18 倍)、喝酒 (10 倍) 高<sup>30</sup>。

以酒精和抽煙對於口腔上皮細胞型態上的研究，發現會導致細胞皺縮，而這種局部的毒性作用，是不具特異性的<sup>31</sup>。抽煙所產生的多環芳香性碳水化合物被認為是主要的前驅致癌因子，在口腔癌患者的微小體(microsomal)內, aryl hydrocarbon hydroxylase 含量較高<sup>32</sup>，以活化多環芳香性碳水化合物。

其次，民眾所嚼食的檳榔果實 (areca nut)又稱為菁仔，含有植物鹼 (alkaloid)、脂肪 (fat)、脂肪酸 (free fatty acid)、多醣類 (polysaccharide)、粗纖維 (crude fiber)、礦物質 (mineral)、多元酚化合物類；植物鹼有 arecoline、arecaidine、guvacoline、guavacine、arecolone、arecaine、arecin 等，而檳榔鹼 (Arecoline) 為檳榔子中含量最高的植物鹼，過去的研究以 HPLC 分析由生檳榔子萃取物中 Arecoline 含量約為 5.5%<sup>33</sup>；Arecoline 是一種中樞神經興奮劑，會引起口水分泌、發生震顫、麻痺<sup>34</sup>等現象；在細菌或細胞實驗被認為具有誘突變性<sup>35-36</sup>；會刺激纖維母細胞增生，和膠原蛋白的合成<sup>37</sup>，其它的檳榔添加物和檳榔中的 tannins 可以使膠原蛋白穩定並對抗膠原蛋白對膠原蛋白的降解作用。Arecoline 在經過亞硝化作用 N-nitrosoguvacoline (NG)、3-methylnitrosamino-propionitrile (MNPN)、3-methylnitrosamino-propion aldehyde (MNPA)等亞硝化產物<sup>38</sup>，其中 MNPN<sup>39</sup>與 MNPA<sup>40</sup>具有誘發實驗動物致癌的作用。

Arecoline 在過去不同實驗中，作用不同口腔細胞，所得到的結果也有所



差異。在 0-10 $\mu$  g/ml 時增強正常頰粘膜細胞<sup>41</sup>、牙齦細胞<sup>42</sup>生長；或作用於正常頰粘膜細胞<sup>43</sup>、牙齦細胞<sup>44</sup>具有細胞毒性、細胞制性(cytostatic)。當以 50-150 $\mu$  g/ml 濃度 arecoline 處理正常頰粘膜細胞七天時，會抑制細胞生長；在 300-500 $\mu$  g/ml 濃度則會導致細胞產生死亡現象<sup>33</sup>；或在 0.2-2 $\mu$  M 濃度時 CHO (Chinese hamster ovary) 細胞的微核(micronucleated)細胞數目會增加並使細胞週期延長(cell cycle prolongation)<sup>45</sup>。

## 研究目的

本研究目的包括 (1) 藉由臨床流行病學危險因子探討的方法，偵測口腔、子宮頸組織感染病毒的情形，並與正常對照組比較，以了解口腔癌、子宮頸癌和病毒因子之間的相關性，和病毒因子與癌組織嚴重程度的關聯。

(2) 在實驗室內以正常、癌前、癌細胞三種不同階段的口腔細胞，處理 Arecoline，觀察細胞對此種化學因子的感受性及對細胞週期的影響。

## *Materials and Methods*

### 設計大綱

(1) 臨床流行病學部分採用 PCR 法，增幅來自二十七例口腔癌、二十七例子宮頸癌臨床檢體中的病毒基因片段，包括 HPV、HSV-1、HSV-2、CMV、HHV- 8、EBV、HPV 型別分析等，十六例正常口腔組織、二十九例正常子宮頸刮除細胞病例則作為對照組成員，以探討口腔癌、子宮頸癌與以上各種病毒之間的關聯性。

(2) 在實驗室內以 MTT 法和流體細胞儀，分析正常、癌前、癌細胞三種口腔細胞對 Arecoline 的感受性和 Arecoline 對細胞週期的影響，以了解口腔癌與 Arecoline 之間的相關性。

### 檢體來源及種類

口腔檢體來源得自中山醫學院附設醫院及秀傳紀念醫院病理部，檢體收集時間為 1995-1999 年之間，包括 27 例 Formalin 處理經石蠟包埋之口腔癌組織切片，及 16 例對照組檢體取自正常的口腔組織切片細胞，每例含厚度 0.5  $\mu$ M 切片三片；以上病理結果如表一、表二。

子宮頸檢體全部得自彰化秀傳紀念醫院婦產部、病理部，包括 9 例新鮮

子宮頸癌組織保存在-80℃，直到進行實驗，收集時間自 1997-1998 年。患者平均年齡 45 歲，臨床癌症分級如表三；另 18 例 為 Formalin 處理，經石蠟包埋之子宮頸癌組織切片，每例含厚度 0.5 μ M 切片三片；患者平均年齡 57 歲，臨床癌症分級如表四，收集時間全部來自 1995 年間。及 29 例對照組檢體，收集時間自 1997-1998 年，取自門診患者正常的子宮頸刮除細胞，放置於 2 ml 保存液儲存在 4℃，患者平均年齡 39 歲，細胞抹片篩檢結果如表五。

口腔細胞由中山醫學院牙科周明勇主任和張育超醫師提供，包括兩株正常頰粘膜口腔細胞 BF (Buccal mucosal fibroblast)，患者均無抽煙，嚼檳榔，喝酒等習慣；及三株口腔粘膜下纖維化細胞 OSF (Oral submucosal fibrosis)，患者均有抽煙，嚼檳榔，喝酒等習慣；及 GNM (Neck metastasis of Gingiva Carcinoma) 頸部轉移牙齦癌細胞、KB (Epidermal cell of mouth) 口腔上皮癌細胞、TSCCa (Tongue squamous carcinoma) 舌鱗狀上皮細胞癌等癌細胞。

## 方法

### 組織切片前處理：

冷凍組織：重約 0.5g，經 homogenizer (SSI Co., CG-49, USA) 磨碎後以 20mg/ml Proteinase K (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) 及 lysis buffer (25mM Tris (ICN Aurora, Ohio, USA), 20mM EDTA (ICN, Claveland,

Ohio, USA)), 在 50 °C, 60 分鐘; 95 °C, 10 分鐘加溫處理後, 準備 DNA 萃取。

**組織切片** : 先加入 0.5ml Xylene (MERCK, Darmstadt, Germany) 放置室溫 30 分鐘, 12000rpm 離心 (高速離心機 -HerolabCo., MicroCen 13, Germany) 5分鐘, 吸去上層液體丟棄, 重複以上步驟一次, 再加 0.5ml 100% Ethanol (MERCK, Darmstadt, Germany), 12000rpm 離心 5 分鐘, 吸去上層液體丟棄, 乾燥, 重複冷凍組織的處理方法。

**對照組檢體** : 子宮頸刮除細胞以 1X PBS (GIBCO BRL, Grand Island NY, USA) wash 後, 以 20mg/ml Proteinase K 及 lysis buffer 在 50 °C, 60 分鐘; 95 °C, 10 分鐘加溫後, 準備 DNA 萃取。

## 萃取 DNA

將檢體加無菌 dd-H<sub>2</sub>O 至 0.5ml, 再加 0.5ml Phenol (AMRESCO 0945, Solon, Ohio, USA), 0.1ml Chloroform: isoamylalcohol=24:1 (AMRESCO X205, Solon, Ohio, USA) vortex 均勻, 經 12000rpm 離心 5 分鐘, 小心取上層液到新的 eppendorf tube 加入 0.1ml 2M, pH5.2 的 Sodium Acetate (ICN 195496, Aurora, Ohio, USA) 加 0.5 ml 100% Ethanol, 混合均勻, 放置 4 °C, 30 分鐘, 接著 12000rpm, 離心 10 分鐘, 倒掉上層液丟棄, 加 0.5ml 70% Ethanol, 然後 12000rpm, 離心 5 分鐘, 倒掉上層液丟棄, 乾燥備用或放置

-20 冰箱 (SANYO Co., Medical Freezer, Japan)保存。

## PCR amplification

將乾燥的DNA加 20 $\mu$ l 無菌 dd-H<sub>2</sub>O, 混合均勻, 取 2 $\mu$ l 加入 20 $\mu$ l PCR 混合液中。PCR 混合液含: 10X Taq polymerase buffer (20mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, Promega, Madison, WI, USA), 2.5U Taq polymerase (Promega, Madison, WI), 200 pmol primers (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 2.5mM dNTP (PROTECH SB23, Cambridge, England), 總體積共 20 $\mu$ l, 最後加入 50 $\mu$ l Mineral oil (Sigma 400-5, St. LOUIS, MO, USA), 放入 PCR Thermal cycler (Hybaid Co., OmniGene, England)。PCR program 如表四; PCR primers sequence 如表五。

電泳分析取 10 $\mu$ l PCR 產物和 2 $\mu$ l loading dye 混合均勻, 加到 2% Agarose (AMRESCO 0710-500C-PTM, Solon, Ohio, USA) gel well 中, 以 100 伏特進行電泳分析(迷你電泳槽 - Cosmo Bio Co., Mupid 2, Japan), 0.05% Ethidium Bromide (AMRESCO 0449-256, Solon, Ohio, USA) 染色, 在 UV transilluminator (FOTO DYNE, FOTO/UV21, WI, USA) 下觀察, 所有檢體先以  $\alpha$ -globin PCR 篩選, 確定陽性結果後, 方才進行病毒 PCR 反應。

結果判讀若 HPV PCR 為陽性結果則再進行 PCR 分型, 分型所需的 primers sequence<sup>20-21,46-47</sup> 如表八, PCR program 同 HPV-PCR, 進行

35cycles。陽性對照組：HPV 取自 Pro. Lee of Andrology Lab.,UBC,Canada；  
CMV 及 HSV-1、HSV-2 取自台中榮總病毒室以免疫螢光抗體染色法確定陽  
性之培養檢體；EBV 則購自國家衛生研究院細胞庫含 EBV 的 Raji 細胞株編  
號 CCRC 60116。統計數據分析：以 EPI INFORM 6 程式，Chi square test 或  
Fisher's exact test 進行分析。

## 口腔細胞的培養

BF cell 培養於含 10%BCS DMEM，5%CO<sub>2</sub>, 37℃ 培養箱。OSF cell：  
培養於 10%BCS-DMEM, 5%CO<sub>2</sub>, 37℃。GNM cell 培養於 10%BCS-RPMI,  
5%CO<sub>2</sub>, 37℃，培養第二天細胞生長緩慢，第三天迅速增加，對數增值期內  
群體倍增時間為 31 小時。KB cell 培養於 10% BCS-DMEM, 5%CO<sub>2</sub>, 37℃。  
TSCCa cell 培養於 10%BCS-RPMI, 5%CO<sub>2</sub>, 37℃，TSCCa 細胞為扁平多角上  
皮細胞，培養第二天細胞數迅速上升，對數增值期內群體倍增時間為 34 小時。

## 檳榔鹼敏感性試驗 (MTT test)：

方法以 1X10<sup>3</sup>/ml cell 置於 96 well microplate，培養隔夜，加入  
0.4-400μg/ml 檳榔鹼(Sigma, Louis, MO, USA)分別處理 12、24、48 小時，然  
後丟棄上清液，加入 MTT (Sigma, St.LOUIS, MO, USA)(final con. 0.5mg/ml)  
於 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培養四小時，再以 DMSO (Sigma, St. LOUIS, MO, USA)溶

解細胞，於波長 570nm 讀取吸光值(Metertech 960 ,台灣)。所得數值以

SigmaPlot 4.0 計算細胞存活率。

**Cell viability % = 處理 Arecoline 細胞吸光值/陰性對照組細胞吸光值 x 100%**

## Cell cycle 分析

細胞前處理在無菌操作台內操作， $4 \times 10^5$ /ml 細胞置於直徑 6 公分培養皿，培養隔夜，加入 0.4- 400 $\mu$ g/ml Arecoline，處理時間依五種細胞株生長速率而異，如 KB、GNM、TSCCA 等細胞為 24 小時，BF、OSF 等細胞為 48 小時，以 1X Trypsin -EDTA 拍下細胞，在倒立顯微鏡下確定細胞已悉數脫落後，1,200rpm 離心(Kubota KN- 70, Japan) 5 分鐘，丟棄上清液，混合均勻之後，沿管壁徐徐加入冰冷的 80% Ethanol 固定細胞，混合均勻，在 4 隔夜保存，丟棄上清液，加 1ml 1X PBS 含 Proidium Iodide (Sigma, St. Louis, MO, USA)(final con. 0.5mg/ml)和 RNase (Amersham, UK) (final con. 0.5mg/ml)混合均勻，並避光置於室溫一小時，以 Flow cytometry (Becton Dickinson Fascalibur, USA) 測量，Mod Fit LT 分析。



## *Results*

### 病毒性因子

#### 口腔癌

二十七例病理切片檢體中，以 PCR 法偵測 HPV、HSV-1、HSV-2、CMV、HHV-8、EBV 等病毒，結果發現只有一例含有 HSV-1 (如圖一 A)，十六例口腔對照組則完全測不到以上各種病毒，圖一 B 所示為  $\alpha$ -globin PCR 結果，確定 PCR 過程並無抑制作用造成偽陰性。

#### 子宮頸癌

二十七例子宮頸癌檢體中，有十八例 (66.6%) 測得含有 HPV DNA ( $P < 0.001$ )，其中包括九例冷凍組織及九例石蠟包埋切片組織，九例冷凍組織中 (如表十)，包括三例為 HPV 16 (33.3%)、二例為 HPV 18 (22.2%)、一例為 HPV 16、18 (11.1%) 同時被偵測到，一例為 HPV 35 (11.1%)，一例為 HPV 45 (11.1%)，一例 (11.1%) 則以本實驗所設計的九組不同 primer 無法鑑定出型別 (表十一)。有三例 (11.1%) 測得 CMV DNA ( $P > 0.05$ )，1 例 (3.7%) 含有 HSV-2 ( $P > 0.05$ )；但都測不到 HSV-1、HHV-8 的 DNA。十八例石蠟包埋切片組織檢體中，除了 HPV 外，完全測不到 CMV、HSV-1、HHV-8 等病毒 (表十)，而其中九例的 HPV PCR 陽性檢體中 (表十一)，其中包含六例為 HPV 16，另外三例則無法鑑定型別。二十九例細胞學檢查正常之子宮頸刮除細胞對照組，則完全偵測不到以上各種病毒核酸 (表十)。HPV 各型病毒與 CMV、

HSV-2 在不同級別子宮頸癌的分布，以 stage I 十二例及 HPV16 佔九例較為明顯 (表十二)。HPV、CMV、HSV-2 檢測電泳如圖二 A、B、C，HPV 測得陽性後區分型別之電泳如圖二 E，及以 HPV plasmid 連續五倍稀釋所測得的 PCR 敏感度，自 0.1ng-6.4fg 均為陽性。

## 化學性因子

### 口腔癌

本研究所使用的 MTT test 乃利用活細胞內活化的 dehydrogenase 會將 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 的 tetrazolium ring 分開，使顏色由黃變紫，在 570nm 下所測得的吸光值，可代表細胞增生或毒性作用的結果。

BF21、BF27 正常口腔頰粘膜細胞在 12、24、48 小時以 0.4-400  $\mu$  g/ml 檳榔鹼處理後，所得之細胞存活率的結果 (表十三、十四) 以曲線圖 (圖三) 表示。結果可見檳榔鹼在高濃度 (25-400  $\mu$  g/ml) 對 BF21 細胞具較明顯抑制生長作用，尤其以 48 小時抑制作用最強，但對 BF27 細胞的抑制作用稍減；在低濃度 (0.4-0.8  $\mu$  g/ml) 時的檳榔鹼則對兩株細胞皆具促進生長作用，尤其對 BF21 促進細胞生長作用顯著，但對 BF27 作用 48 小時則稍具抑制作用。

OSF1、OSF8、OSF9 口腔粘膜下纖維化細胞，在 12、24、48 小時以 0.4-400

$\mu$  g/ml 檳榔鹼處理後細胞存活率的結果 (表十五、十六、十七) 及曲線圖 (圖四), 其中 OSF1、OSF8 兩株細胞在 48 小時受到檳榔鹼的抑制作用最強, OSF9 細胞則以 12 小時最強, 其餘則抑制作用較差; 此三株口腔粘膜下纖維化的癌前細胞在低濃度的檳榔鹼處理時, 亦具有促進增生的作用。

三株癌細胞 KB、GNM、TSCCa 細胞, 在 12、24、48 小時以 0.4-400  $\mu$  g/ml 檳榔鹼處理後細胞存活率的結果 (表十八、十九、二十) 與曲線圖 (圖五), 在高濃度檳榔鹼處理時, 對此三株癌細胞具極強的抑制作用, 低濃度時則同時具有促進增生的作用。

另外本研究中所使用的細胞週期測定, 乃以 Propidium Iodide 將細胞 DNA 染色帶有紅色螢光(emission 610nm), 利用流式細胞儀 Argon-ion laser (氬離子雷射) 照射, 測定被激發的螢光強度, 以分析細胞在  $G_1$  phase (hypodiploid) (2n)、S phase (DNA synthesis) (2-4n)、 $G_2M$  phase (4n) 之 DNA content 不同含量。當 BF21 細胞處理高濃度的檳榔鹼 48 小時 (圖六), 可見其對細胞週期的影響: 在檳榔鹼濃度 100  $\mu$  g/ml 時,  $G_2M$  phase 增加 (200、400  $\mu$  g/ml 時無法測得足量細胞數), 25 及 50  $\mu$  g/ml 時則與對照組相似, 變化不大; 低濃度時 S phase 普遍增加 (0.7  $\mu$  g/ml 為  $G_0G_1$  phase 增加除外), 而 BF27 細胞與 BF21 細胞不同, 在高濃度時 S phase 增加 (200  $\mu$  g/ml 除外), 低濃度 0.6-0.8  $\mu$  g/ml 之間的 S phase 亦增加, 但在 0.4、0.5  $\mu$  g/ml 時與對照組相比並無差異。

粘膜下纖維化細胞 OSF1 細胞，在高濃度檳榔鹼 48 小時處理後 (圖七)，細胞週期呈現 G<sub>2</sub>M phase 上升的情形 (25 μ g/ml 則為 S phase 增加)，低濃度則在 0.5、0.7 及 0.8 μ g/ml 時 S phase 增加。而 OSF8 細胞則不論在高、低濃度時 G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> phase 皆全面增加。OSF9 細胞在高濃度時 S phase 漸漸上升，低濃度時則僅見 S phase 稍微增加。

三株癌細胞 KB、GNM、TSCCa 在處理檳榔鹼 24 小時後，可見 KB 細胞在高濃度時 S phase 增加 (25、50、400 μ g/ml)，在 100 μ g/ml 及 200 μ g/ml 濃度時 G<sub>2</sub>M phase 大量的增加；低濃度則全為 S phase 增加 (圖八)。GNM 細胞在高濃度時呈現 S phase 增加，低濃度則在 G<sub>2</sub>M phase 有些微增加。TSCCa 細胞在高濃度 50 及 100 μ g/ml 時 S phase 增加，200 及 400 μ g/ml 時則為 G<sub>2</sub>M phase 稍微增加；低濃度時的細胞週期表現與對照組相似，變化不大。

## *Discussion*

子宮頸癌和口腔癌分別為台灣女性、男性重要的癌症，與其他研究報告結果比較來看，不同地域的發生率和致癌原因也有所差異。根據過去國內外流行病學的調查顯示 HPV 為引起子宮頸癌的重要因素，有的研究報告兩者之間的相關性高達 99.7%<sup>56</sup>，曾被報告過的型別包括 type 16、18、31、33、52、58<sup>28</sup>、35、39<sup>29</sup>、45、51、56、69、66、68<sup>30</sup>等，目前已知超過三十種以上的 HPV 會引起生殖道感染，因此這些也被稱為生殖道致癌性的 HPV (oncogenic genital HPV)<sup>48</sup>。而其它的感染因子也被懷疑可能扮演協同因子的角色，因而促進被 HPV 感染的細胞產生癌化作用，如本文所探討的其他幾種病毒。而過去被利用於證實病毒存在的方法有 ISH (In-situ hybridization)、immunohistochemical staining、PCR、dot blot、Southern blot，其中以 PCR 法將 DNA 增幅最被廣為接受。因此本實驗選用 PCR 法檢測病毒，結果顯示在 27 例子宮頸癌中 HPV 佔 66.6%，顯示 HPV 與子宮頸癌的密切關係 ( $p < 0.001$ )；這種被認為高危險性的 HPV16，佔其中一半，分別分布在各種不同癌症級別中，所以 HPV 的型別可能與癌症嚴重程度無關；而且 9 例石蠟包埋切片有 6 例 (66.7%) 被測得為 HPV16，另外 3 例 (33.3%) 無法測得型別，可能是因為 formalin 處理和石蠟包埋後，會影響 DNA 的保存所致；冷凍組織中只有一例無法測得型別，其餘則均可測得不同型別。其它病毒如所測得 CMV 佔 11.1%，HSV-2 則只佔 3.7%，顯示 CMV、HSV-2 兩種病毒可能只是子宮

頸癌致癌的輔助因子，而非主要的子宮頸癌致癌因子，而在其它的研究報告中也指出 HSV-2 會增加 HPV 在子宮頸癌的致癌機率<sup>49</sup>。另外 HSV-1 和 HHV-8 在本實驗的所有檢體中，均未被偵測到，顯示此二種病毒可能和子宮頸癌沒有直接的相關。

至於病毒和口腔癌的關係，在過去的各种研究結果差別很大，歸咎原因可能是由於危險因子因地域級人口族群之不同，分析技術受到干擾、不同的試劑或臨床條件的不同所影響<sup>50</sup>。本實驗部分所採用的為五年內經福馬林處理、石蠟包埋的口腔切片檢體，而只有一例口腔癌測得 HSV-1，在前所敘述的子宮頸癌石蠟包埋檢體部分，也僅有 50% (9/18) 測得 HPV，且可測得的 HPV 均為 type 16；因此本實驗所採用的 PCR 法，檢測病毒的陽性比例較低，也許是因為受到福馬林和石蠟包埋影響所致。其他可能的因素包括檢體中所含的病毒量太低，以致於 PCR 40 cycles 後仍然偵測不到，不過本研究以 0.1ng HPV plasmid DNA 連續五倍稀釋，進行 40 個 PCR 循環後，偵測的敏感度自 0.1ng 至 6.4fg (圖二 F)，所以應該不是上述原因造成；還有本實驗所使用的 HPV late 1 region 引子，雖然是屬於 HPV DNA 的保留區，但可能嵌入細胞中的並不是這一段結構基因，所以無法測出 HPV 存在。本計劃亦曾以 topoisomerase I 處理<sup>57</sup>，企圖打開可能纏繞的 supercoil DNA，但結果並無差異。因此由本研究口腔檢體病毒檢測的結果中，顯示台灣中部地區的口腔癌與病毒之間相關性極低，意即病毒可能不是造成口腔癌的主要元兇。

由過去檳榔鹼的研究發現，arecoline 對於 BF、OSF 細胞具有 dose-dependent proliferation 的作用，在 100  $\mu$  g/ml 會抑制細胞生長；0.1-10  $\mu$  g/ml 的 arecoline 會增加 BF 細胞的雙股多核酸 (double-stranded polynucleic acid)，大於 50  $\mu$  g/ml 以上的 arecoline 具細胞毒性，在 400  $\mu$  g/ml 時則不具基因毒性<sup>51</sup>；0.1-10  $\mu$  g/ml 低濃度的 arecoline 可維持 OSF 細胞正常生長，100  $\mu$  g/ml 則會有抑制生長的作用<sup>52</sup>；檳榔萃取物在 50-150  $\mu$  g/ml 可抑制 BF 細胞生長<sup>42</sup>，300-500  $\mu$  g/ml 則造成 BF 細胞死亡<sup>33</sup>，處理 3-540  $\mu$  g/ml 被認為具有致癌性<sup>53</sup>；BF 細胞可能由於 arecoline 抑制纖維母細胞的吞噬作用 (phagocytosis)，使 collagen、fibronectin 降解減少產生大量堆積，影響軟結締組織的構型，使組織纖維化<sup>54</sup>。這些結果顯示低濃度的檳榔鹼促進細胞增生，反之高濃度抑制細胞生長。Nair 等人在 1985 年發表自咀嚼檳榔的唾液中所測得的 arecoline 濃度最高約為 140  $\mu$  g/ml<sup>55</sup>，而相信真正進入細胞中作用的實際濃度應該低於 140  $\mu$  g/ml。由本研究檳榔素 MTT 和 cell cycle 實驗結果分析來看，低濃度的 arecoline (0.4-0.8  $\mu$  g/ml) 均可促進 BF、OSF、KB、GNM、TSCCa 等細胞生長速率，在高濃度 arecoline (25-400  $\mu$  g/ml) 則具有細胞個體差異，所以每一株細胞對 arecoline 的感受性皆不同，但細胞週期的改變也不具一致性，唯獨對於三株癌細胞均具有促進 S phase (DNA synthesis) 的作用，此一結果可能因為癌細胞株已是穩定的細胞株，而 BF、OSF 細胞皆是 primary culture 的細胞，並來自不同患者的口腔粘膜細胞之故。

綜合本研究結果，子宮頸與口腔雖同為粘膜性組織，但致癌的機轉與致癌原因並不相同，病毒因子似乎與子宮頸癌較具相關性，但口腔癌則較不相關。而子宮頸癌中以 HPV 的比例最高，而 HPV 會使細胞變形和增加致癌的可能性；至於其他的病毒如 HSV-2、CMV 則不具統計意義 ( $p>0.05$ )，可能不是直接參與致癌機轉，而是 HPV 致癌過程中的輔助因子之一。另外病毒導致台灣地區口腔癌的可能性很低，可能是由於嚼食檳榔和抽煙、喝酒等因素共同的作用；由於檳榔所含之檳榔鹼會刺激口腔細胞增生，使口腔粘膜下纖維化，而進入癌前期的口腔病變。



表一：27 例口腔癌檢體病理結果

檢體編號	病理報告
OC1 *	Squamous cell carcinoma
OC2	Squamous cell carcinoma, keratinized
OC3	Squamous cell carcinoma
OC4	Squamous cell carcinoma, well defferentiated
OC5	Squamous cell carcinoma
OC6	Verrucous carcinoma
OC7	Squamous cell carcinoma, keratinized
OC8	Squamous cell carcinoma
OC9	Squamous cell carcinoma, well defferentiated
OC10	Squamous cell carcinoma
OC11	Epidermoid carcinoma
OC12	Epidermoid carcinoma
OC13	Epidermoid carcinoma
OC14	Epidermoid carcinoma
OC15	Epidermoid carcinoma
OC16	Epidermoid carcinoma
OC17	Epidermoid carcinoma
OC18	Epidermoid carcinoma
OC19	Epidermoid carcinoma
OC20	Epidermoid carcinoma
OC21	Epidermoid carcinoma
OC22	Epidermoid carcinoma
OC23	Epidermoid carcinoma
OC24	Epidermoid carcinoma
OC25	Epidermoid carcinoma
OC26	Epidermoid carcinoma
OC27	Epidermoid carcinoma

OC \* : oral cancer tissue

表二：正常口腔對照組檢體病理結果

檢體編號	病理報告
ON1	Pyogenic granuloma
ON2	Fibrous hyperplasia of gingiva
ON3	Pyogenic granuloma
ON4	Acute and chronic inflammation
ON5	Angiofibromatous epulis
ON6	Pyogenic granuloma
ON7	Ulcer
ON8	Chronic inflammation
ON9	Mucocele
ON10	Leukoplakia
ON11	Leukoplakia
ON12	Fibrosis
ON13	Leukoplakia
ON14	Leukoplakia
ON15	Fibroma
ON16	Squamous papilloma

ON : normal tissue of oral

表三：九例新鮮冷凍子宮頸癌組織患者基本資料

No.	Age	Cancer Stage
F1	51y	CIS
F2	41y	IIb
F3	40y	Ia
F4	41y	Ib
F5	30y	Ib
F6	38y	CIS
F7	41y	IV
F8	66y	Ib
F9	58y	Ib

F : frozen tissue of cervical cancer

表四：石蠟包埋子宮頸癌組織切片患者  
基本資料

No.	Age	Cancer Stage
SC 1#	51y	I
SC 2	65y	I
SC 3	75y	I
SC 4	51y	II
SC 5	49y	I
SC 6	54y	II
SC 7	41y	I
SC 8	69y	I
SC 9	63y	II
SC 10	52y	I
SC 11	49y	I
SC 12	46y	I
SC 13	49y	III
SC 14	86y	I
SC 15	46y	I
SC 16	40y	I
SC 17	69y	I
SC 18	76y	I

SC# : paraffin embedded tissue of cervical cancer

表五：29 例正常對照組子宮頸刮除細胞檢體患者基本資料

No.	Age	Cytology
N1	30y	Class I
N2	43y	Class I
N3	21y	Class I
N4	26y	Class I
N5	37y	Class I
N6	44y	Class I
N7	42y	Class I
N8	38y	Class I
N9	42y	Class I
N10	32y	Class I
N11	36y	Class I
N12	37y	Class I
N13	40y	Class I
N14	39y	Class I
N15	46y	Class I
N16	49y	Class I
N17	38y	Class I
N18	35y	Class I
N19	37y	Class I
N20	54y	Class I
N21	50y	Class I
N22	56y	Class I
N23	34y	Class I
N24	44y	Class I
N25	34y	Class I
N26	46y	Class I
N27	32y	Class I
N28	34y	Class I
N29	39y	Class I

N : normal cervical scrape

表六：PCR programs

Virus	Region	Product length	PCR program			
HPV	Late 1	450bp	95	1',55	1',72	1';X40
CMV	IE2	240bp	95	1',50	1',72	1'X;40
HSV-1	DNA polymerase	469bp	96	1',67	2',72	3';X40
HSV-2	DNA polymerase	391bp	96	1',67	2',72	3';X40
HHV8	putative minor capsid	233bp	95	1',55	1',72	1';X40
EBV	Bam HI-W fragment	296bp	95	1',58	1',72	1';X40

表七：PCR primers sequence

Virus	Primers
β-globin	PC04: 5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3'
	GH20:5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
HPV	MY9: 5'- CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'
	MY11:5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'
CMV	IE2-1:5'-TCCTCCTGCAGTTCGGCTTC-3'
	IE2-2:5'-TTTCATGATATTGCGCACCT-3'
HSV-1	a:5'-ATGGTGAACATCGACATGTACCG-3'
	b:5'-CCTCCCCTTCG-TCCTCGTCCTCC-3'
HSV-2	a:5'- ATGGTGAACATCGACATGTACCG-3'
	c:5'-CCTCCTTGTCGAGGCCCCGAAAC-3'
HHV-8	KS1:5'-AGCCGAAAGGATTCCACCAT -3'
	KS2:5'-TCCGTGTTGTCTACGTCCAG-3'
EBV	a: 5'-TCGCGTTGCTAGGCCACCTT-3'
	b: 5'-CTTGGATGGCGGAGTCAGCG-3'

表八：primers sequence of HPV typing

Sense :	MY9 5'- CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	Product length
Antisense:	HPV6: 5'-ATCCGTA ACTACATCTTCCACATACACCAA-3'	358bp
	HPV11: 5'-ATCTGTGTCTAAATCTGCTACATACTAA-3'	356bp
	HPV16: 5'-GTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGA-3'	432bp
	HPV18: 5'-TGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCA-3'	108bp
	HPV31: 5'-TGTTTGTGCTGCAATTGCAAACAGTGATAC-3'	254bp
	HPV33: 5'-TTTATGCACACAAGTAACTAGTGACAGTAC-3'	111bp
	HPV35: 5'-GTCTGTGTGTTCTGCTGTGTCTTCTAGTGA-3'	360bp
	HPV45: 5'-ACACAAAATCCTGTGCCAAGTACATATGAC-3'	402bp
	HPV58: 5'-ATTATGCACTGAAGTAACTAAGGAAGGTAC-3'	364bp



表九：年齡與子宮頸癌症級別分布

	Age	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-86	Total
Stage		2	11	6	5	2	1	27
CIS		1		1				2
I		1	8	3	4	2	1	19
II			1	2	1			4
III			1					1
IV			1					1

圖一：口腔癌檢體經 PCR 放大後的洋菜瓊脂電泳圖。10 $\mu$ l 的擴增產物在 1.2% agarose gel 以 100V 電泳、ethidium bromide 染色，UV 下觀察。OC8-12 為口腔癌檢體編號 8-12 (A) ，在二十七例口腔癌檢體中，僅只一例測得 HSV-1，各檢體之  $\alpha$ -globin (B) 均為陽性，以確定 PCR 過程。

圖二：子宮頸癌檢體經 PCR 放大後的洋菜瓊脂電泳圖。F1-F9 為二十七例子宮頸癌檢體中的新鮮冷凍組織，分別於 HPV (A)、CMV (B)、HSV-2 (C) 等病毒發現陽性反應，各檢體之  $\alpha$ -globin (D) 均為陽性；(F) 為 HPV 18 plasmid 連續稀釋，40 cycles PCR 所測得之敏感性：M 為 100bp ladder，Lane 1 為 0.1ng, lane 2 20pg, lane 3 4pg, lane 4 0.8pg, lane 5 160fg, lane 6 32fg, lane 7 6.4fg。HPV 陽性的檢體經特異的分型用引子擴增 (E)，以 2% agarose gel 電泳、ethidium bromide 染色，UV 下觀察：16,18 為 HPV16 及 18；18 為 HPV18；33,35 為 HPV33,35；45 為 HPV45。

表十：子宮頸癌病毒 PCR 結果

Virus	Frozen tissue	Paraffin	Total	Control
	n=9	embedded tissue n=18	n=27	n=29
HPV (+)/(-)	9	9	(18)/(9)(66.6%)(P<0.001)	0
CMV(+)/(-)	3	0	(3)/(24)(11.1%)(P>0.05)	0
HSV-1(+)/(-)	0	0	(0)/(27)(0%)	0
HSV-2(+)/(-)	1	0	(1)/(26)(3.7%)(P>0.05)	0
HHV-8(+)/(-)	0	0	(0)/(27)(0%)	0

表十一：子宮頸癌 HPV 各型別分布

HPV type	Frozen tissue n=9	Paraffin embedded tissue n=9	Total n=18
HPV16	3(33.3%)	6(66.7%)	9(50%)
HPV18	2(22.2%)	0	2(11.1%)
HPV16,18	1(11.1%)	0	1(5.6%)
HPV35	1(11.1%)	0	1(5.6%)
HPV45	1(11.1%)	0	1(5.6%)
Unidentified	1(11.1%)	3(33.3%)	4(22.2%)

表十二：病毒在各癌症級別的分佈

Stage	HPV		HPV 16	18	16,18	35	45	Unidentified	CMV	HSV2
	No. of Case +	—								
CIS	2		1				1		1	
I	12	7	5	2		1		4	2	1
II	3	1	3							
III		1								
IV	1				1					
Total	18	9	9	2	1	1	1	4	3	1

表十三：Cytotoxicity of BF21 treated with various concentration of Arecoline

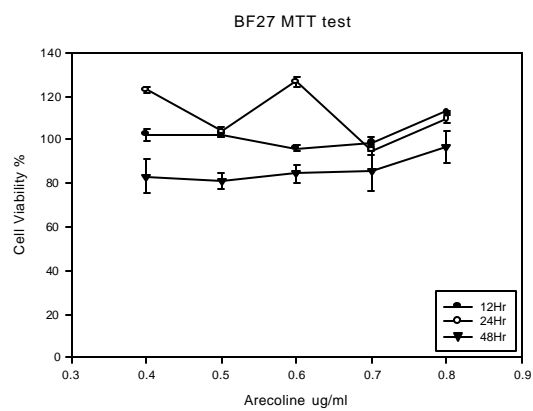
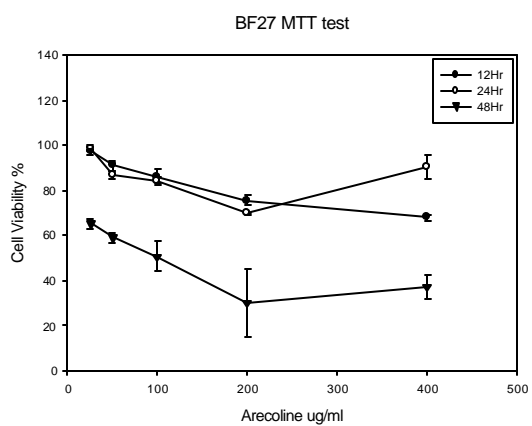
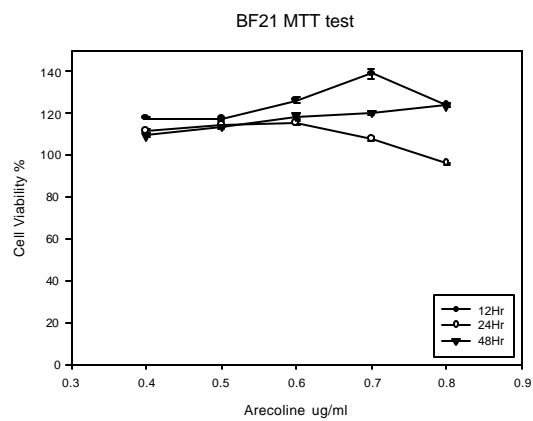
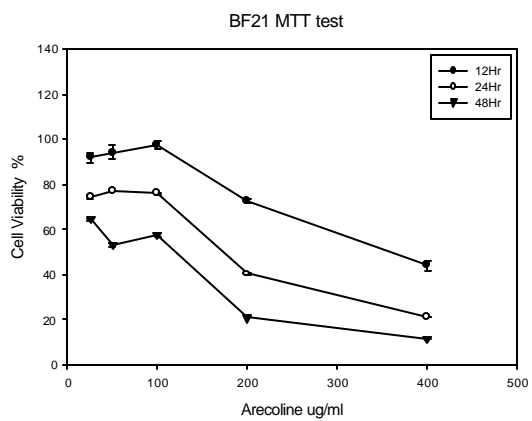
Time	12Hr		24Hr		48Hr	
	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %
Conc. $\mu$ g/ml						
Control	0.266 $\pm$ 0.008	100	0.270 $\pm$ 0.033	100	0.367 $\pm$ 0.018	100
400	0.117 $\pm$ 0.020	43.98	0.057 $\pm$ 0.004	21.11	0.043 $\pm$ 0.010	11.72
200	0.194 $\pm$ 0.007	72.93	0.109 $\pm$ 0.011	40.37	0.077 $\pm$ 0.003	20.98
100	0.260 $\pm$ 0.012	97.74	0.205 $\pm$ 0.003	75.93	0.212 $\pm$ 0.019	57.77
50	0.251 $\pm$ 0.024	94.36	0.209 $\pm$ 0.014	77.41	0.195 $\pm$ 0.013	53.13
25	0.245 $\pm$ 0.018	92.11	0.201 $\pm$ 0.024	74.44	0.237 $\pm$ 0.009	64.58
Control	0.128 $\pm$ 0.011	100	0.161 $\pm$ 0.015	100	0.180 $\pm$ 0.020	100
0.8	0.159 $\pm$ 0.010	124.22	0.155 $\pm$ 0.010	96.27	0.223 $\pm$ 0.006	123.89
0.7	0.178 $\pm$ 0.028	139.06	0.174 $\pm$ 0.011	108.07	0.217 $\pm$ 0.013	120.56
0.6	0.162 $\pm$ 0.015	126.56	0.186 $\pm$ 0.017	115.53	0.214 $\pm$ 0.032	118.89
0.5	0.150 $\pm$ 0.005	117.19	0.184 $\pm$ 0.009	114.29	0.205 $\pm$ 0.024	113.89
0.4	0.151 $\pm$ 0.005	117.97	0.180 $\pm$ 0.010	111.80	0.197 $\pm$ 0.014	109.44

表十四：Cytotoxicity of BF27 treated with various concentration of Arecoline

Conc. μg/ml	Time	12Hr		24Hr		48Hr	
		Absorbance	Survival	Absorbance	Survival	Absorbance	Survival
		Rate %		Rate %		Rate %	
Control		0.078 ± 0.003	100	0.083 ± 0.006	100	0.195 ± 0.003	100
400		0.053 ± 0.005	67.94	0.075 ± 0.031	90.36	0.073 ± 0.014	37.44
200		0.059 ± 0.006	75.64	0.058 ± 0.003	69.87	0.059 ± 0.004	30.26
100		0.067 ± 0.011	85.89	0.070 ± 0.007	84.34	0.099 ± 0.017	50.77
50		0.071 ± 0.007	91.02	0.072 ± 0.010	86.75	0.115 ± 0.007	58.97
25		0.076 ± 0.005	97.44	0.082 ± 0.010	98.80	0.127 ± 0.006	65.13
0.8		0.088 ± 0.002	112.82	0.091 ± 0.009	109.64	0.189 ± 0.020	96.92
0.7		0.077 ± 0.007	98.71	0.079 ± 0.013	95.18	0.167 ± 0.024	85.64
0.6		0.075 ± 0.005	96.15	0.105 ± 0.011	126.51	0.165 ± 0.011	84.62
0.5		0.080 ± 0.004	102.56	0.086 ± 0.015	103.61	0.158 ± 0.009	81.03
0.4		0.080 ± 0.009	102.56	0.102 ± 0.009	122.89	0.162 ± 0.021	83.08



圖三：兩株正常口腔頰粘膜細胞 BF cell 對 Arecoline 敏感性試驗曲線圖



表十五：Cytotoxicity of OSF1 treated with various concentration of Arecoline

Conc. μg/ml	Time	12Hr		24Hr		48Hr	
		Absorbance	Survival	Absorbance	Survival	Absorbance	Survival
		Rate %		Rate %		Rate %	
Control		0.730 ± 0.017	100	1.071 ± 0.010	100	0.885 ± 0.060	100
400		0.606 ± 0.024	83.01	0.524 ± 0.006	48.93	0.332 ± 0.019	37.51
200		0.618 ± 0.013	84.66	0.795 ± 0.038	74.23	0.408 ± 0.021	46.10
100		0.632 ± 0.001	86.58	0.884 ± 0.009	82.54	0.497 ± 0.019	56.16
50		0.618 ± 0.015	84.66	0.853 ± 0.023	79.65	0.542 ± 0.027	61.24
25		0.635 ± 0.008	86.99	0.892 ± 0.013	83.29	0.622 ± 0.025	70.28
Control		0.192 ± 0.061	100	0.405 ± 0.020	100	0.438 ± 0.016	100
0.8		0.165 ± 0.010	85.94	0.403 ± 0.038	99.51	0.481 ± 0.020	109.82
0.7		0.175 ± 0.049	91.15	0.421 ± 0.025	103.95	0.495 ± 0.014	113.01
0.6		0.187 ± 0.020	97.40	0.449 ± 0.019	110.86	0.510 ± 0.010	116.44
0.5		0.190 ± 0.041	98.96	0.442 ± 0.047	109.14	0.486 ± 0.015	110.96
0.4		0.208 ± 0.053	108.33	0.431 ± 0.010	106.42	0.471 ± 0.007	107.53

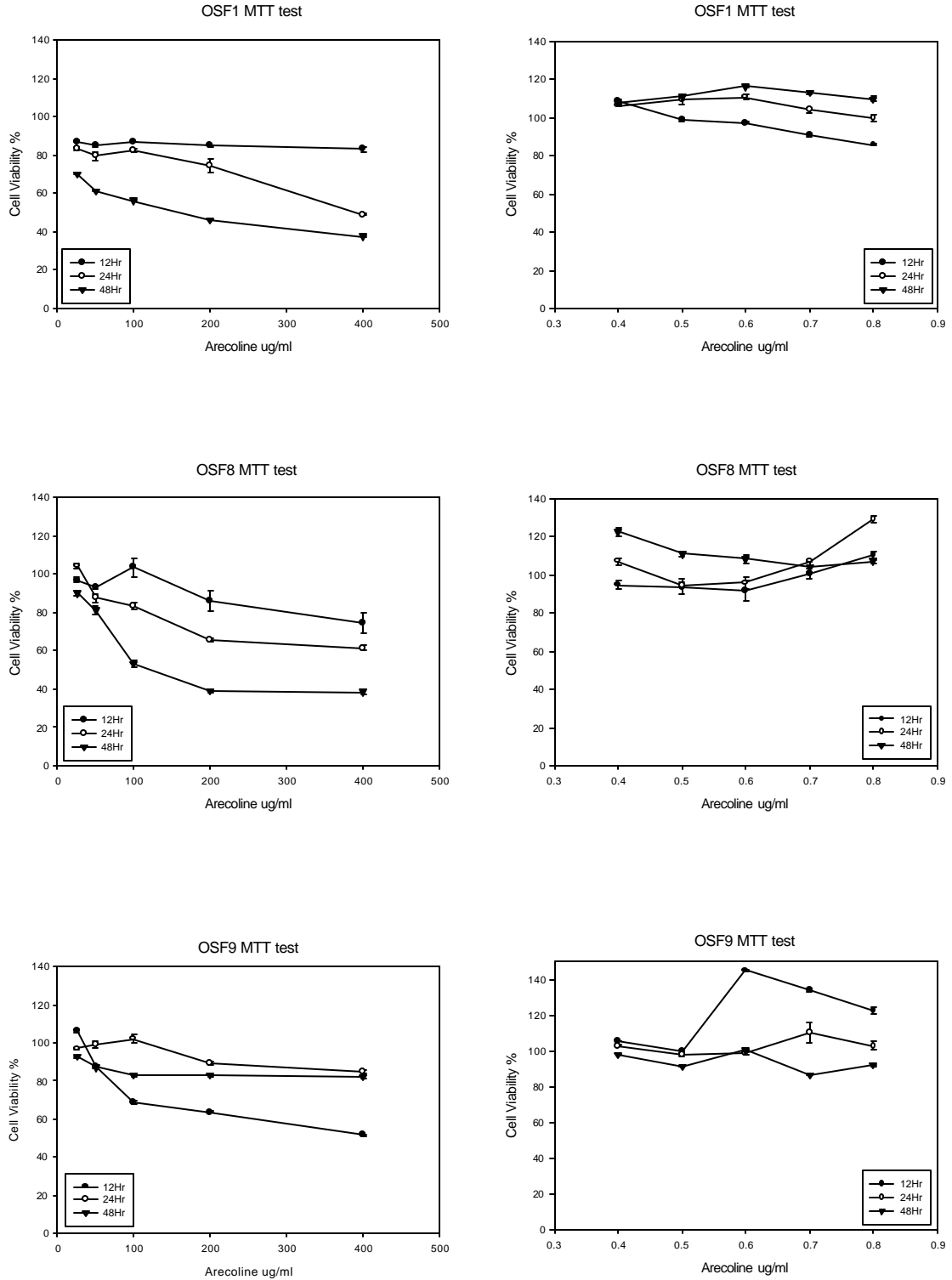
表十六：Cytotoxicity of OSF8 treated with various concentration of Arecoline

Time	12Hr		24Hr		48Hr	
	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %
Conc. $\mu$ g/ml						
Control	0.098 $\pm$ 0.003	100	0.096 $\pm$ 0.008	100	0.190 $\pm$ 0.009	100
400	0.073 $\pm$ 0.014	74.49	0.059 $\pm$ 0.012	61.46	0.073 $\pm$ 0.010	38.42
200	0.084 $\pm$ 0.014	85.71	0.063 $\pm$ 0.005	65.63	0.072 $\pm$ 0.006	38.89
100	0.101 $\pm$ 0.013	103.06	0.080 $\pm$ 0.012	83.33	0.101 $\pm$ 0.014	53.16
50	0.091 $\pm$ 0.003	92.86	0.084 $\pm$ 0.019	87.50	0.154 $\pm$ 0.017	81.05
25	0.095 $\pm$ 0.003	96.94	0.100 $\pm$ 0.013	104.17	0.171 $\pm$ 0.009	90.00
0.8	0.108 $\pm$ 0.007	110.20	0.124 $\pm$ 0.011	129.17	0.204 $\pm$ 0.010	107.37
0.7	0.099 $\pm$ 0.006	101.02	0.103 $\pm$ 0.005	107.29	0.198 $\pm$ 0.002	104.21
0.6	0.090 $\pm$ 0.014	91.84	0.092 $\pm$ 0.024	95.83	0.206 $\pm$ 0.020	108.42
0.5	0.092 $\pm$ 0.011	93.88	0.091 $\pm$ 0.010	94.79	0.211 $\pm$ 0.012	111.05
0.4	0.093 $\pm$ 0.007	94.90	0.103 $\pm$ 0.014	107.29	0.233 $\pm$ 0.022	122.63

表十七：Cytotoxicity of OSF9 treated with various concentration of Arecoline

Conc. μ g/ml	Time	12Hr		24Hr		48Hr	
		Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %
Control		0.099 ± 0.019	100	0.133 ± 0.009	100	0.276 ± 0.028	100
400		0.051 ± 0.012	52.52	0.113 ± 0.008	84.96	0.227 ± 0.026	82.25
200		0.063 ± 0.009	63.64	0.119 ± 0.006	89.47	0.229 ± 0.010	82.97
100		0.068 ± 0.012	68.69	0.136 ± 0.020	102.26	0.229 ± 0.022	82.97
50		0.087 ± 0.013	87.88	0.132 ± 0.018	99.25	0.241 ± 0.021	87.32
25		0.105 ± 0.014	106.06	0.129 ± 0.006	96.99	0.256 ± 0.015	92.75
Control		0.071 ± 0.013	100	0.131 ± 0.006	100	0.277 ± 0.031	100
0.8		0.087 ± 0.028	122.54	0.135 ± 0.033	103.05	0.255 ± 0.017	92.06
0.7		0.095 ± 0.014	133.8	0.144 ± 0.007	109.92	0.240 ± 0.018	86.64
0.6		0.103 ± 0.009	145.07	0.130 ± 0.003	99.24	0.278 ± 0.004	100.36
0.5		0.071 ± 0.014	100	0.128 ± 0.002	97.71	0.253 ± 0.011	91.34
0.4		0.075 ± 0.004	105.63	0.135 ± 0.006	103.05	0.272 ± 0.006	98.19

圖四：三株口腔粘膜下纖維化細胞 OSF cell 對 Arecoline 敏感性試驗曲線圖



表十八：Cytotoxicity of KB treated with various concentration of Arecoline

Conc. μ g/ml	Time	12Hr		24Hr		48Hr	
		Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %
Control		0.289 ± 0.055	100	0.298 ± 0.051	100	0.391 ± 0.023	100
400		0.249 ± 0.029	86.16	0.250 ± 0.040	83.89	0.258 ± 0.015	66.15
200		0.254 ± 0.029	87.89	0.262 ± 0.015	87.92	0.261 ± 0.044	66.92
100		0.272 ± 0.017	94.12	0.277 ± 0.018	92.95	0.266 ± 0.033	68.21
50		0.299 ± 0.016	103.46	0.303 ± 0.030	101.68	0.291 ± 0.053	74.62
25		0.297 ± 0.019	102.76	0.324 ± 0.034	18.72	0.320 ± 0.046	82.05
Control		0.235 ± 0.014	100	0.385 ± 0.032	100	0.681 ± 0.016	100
12.5		0.272 ± 0.017	115.74	0.309 ± 0.010	80.26	0.595 ± 0.032	87.37
6.25		0.251 ± 0.008	106.81	0.346 ± 0.018	89.87	0.671 ± 0.046	98.53
3.125		0.254 ± 0.011	108.09	0.364 ± 0.019	94.55	0.673 ± 0.003	98.83
1.563		0.262 ± 0.006	111.49	0.400 ± 0.012	103.90	0.695 ± 0.068	102.06
0.78		0.253 ± 0.022	107.66	0.409 ± 0.025	106.23	0.681 ± 0.026	100
0.39		0.259 ± 0.016	110.21	0.410 ± 0.014	106.49	0.662 ± 0.046	97.21
Control		0.344 ± 0.025	100	1.072 ± 0.069	100	1.562 ± 0.321	100
0.8		0.415 ± 0.018	120.64	1.048 ± 0.074	97.76	1.873 ± 0.285	119.91
0.7		0.406 ± 0.024	118.08	0.946 ± 0.033	88.25	1.941 ± 0.689	124.26
0.6		0.390 ± 0.032	113.37	0.968 ± 0.082	90.30	1.677 ± 0.207	107.36
0.5		0.372 ± 0.048	108.14	0.999 ± 0.078	93.19	1.700 ± 0.282	108.83
0.4		0.356 ± 0.016	103.49	1.001 ± 0.030	93.38	1.573 ± 0.314	100.70

表十九： Cytotoxicity of GNM treated with various concentration of Arecoline

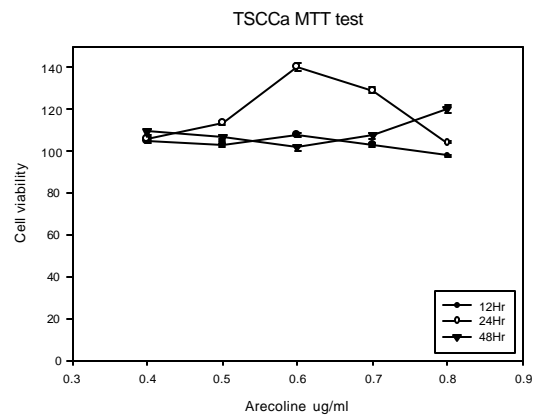
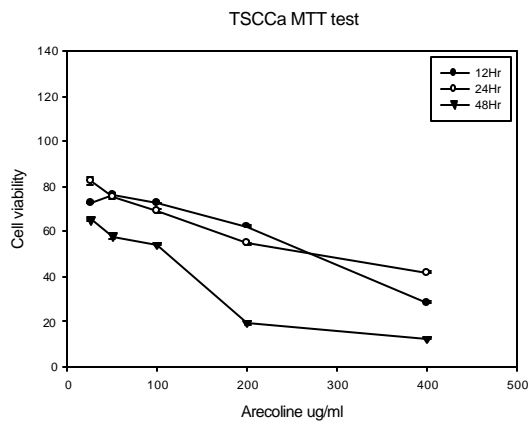
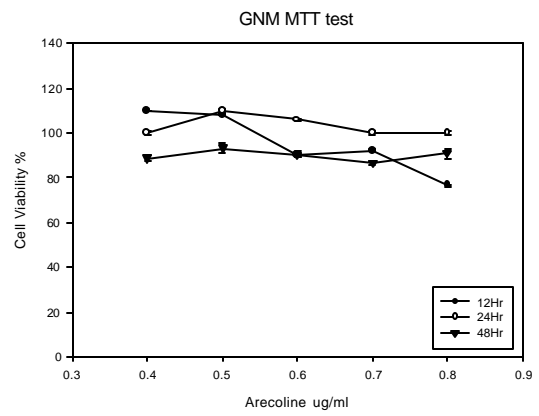
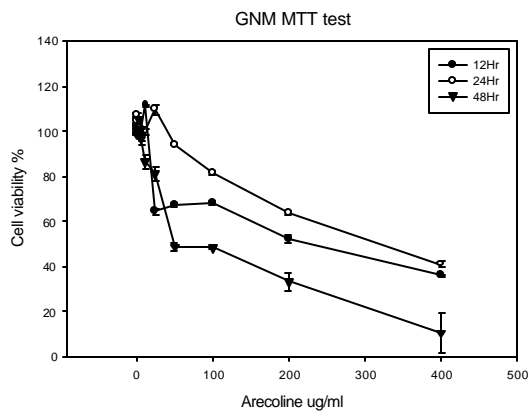
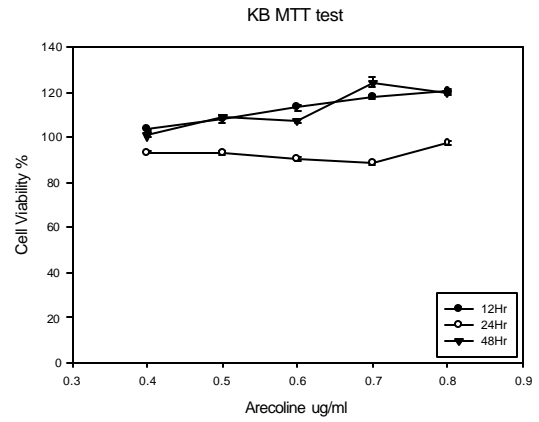
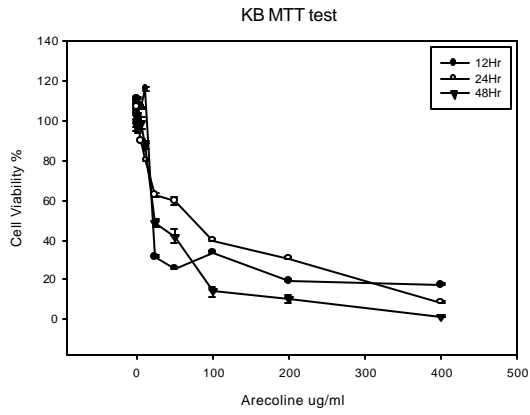
Time	12Hr		24Hr		48Hr	
	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %
Conc. μ g/ml						
Control	0.197 ± 0.011	100	0.143 ± 0.011	100	0.525 ± 0.004	100
400	0.071 ± 0.007	36.04	0.059 ± 0.012	41.26	0.056 ± 0.035	10.67
200	0.103 ± 0.008	52.28	0.091 ± 0.008	63.64	0.176 ± 0.016	33.52
100	0.135 ± 0.008	68.53	0.117 ± 0.010	81.82	0.255 ± 0.001	48.57
50	0.133 ± 0.013	67.51	0.135 ± 0.006	94.41	0.258 ± 0.007	49.14
25	0.127 ± 0.011	64.47	0.157 ± 0.022	109.79	0.427 ± 0.012	81.33
Control	0.119 ± 0.010	100	0.331 ± 0.005	100	0.415 ± 0.010	100
12.5	0.133 ± 0.005	111.76	0.331 ± 0.007	100	0.360 ± 0.033	86.75
6.25	0.121 ± 0.002	101.68	0.326 ± 0.013	98.49	0.402 ± 0.024	96.87
3.125	0.125 ± 0.004	105.04	0.339 ± 0.005	102.42	0.437 ± 0.013	105.30
1.563	0.122 ± 0.009	102.52	0.350 ± 0.011	105.74	0.417 ± 0.005	100.48
0.78	0.123 ± 0.004	103.36	0.347 ± 0.019	104.83	0.421 ± 0.006	101.45
0.39	0.118 ± 0.004	99.16	0.356 ± 0.006	107.55	0.410 ± 0.006	98.80
Control	0.051 ± 0.009	100	0.120 ± 0.020	100	0.179 ± 0.009	100
0.8	0.039 ± 0.003	76.47	0.120 ± 0.021	100	0.163 ± 0.020	91.06
0.7	0.047 ± 0.005	92.16	0.120 ± 0.014	100	0.155 ± 0.009	86.59
0.6	0.046 ± 0.008	90.20	0.127 ± 0.009	105.83	0.162 ± 0.014	90.50
0.5	0.055 ± 0.002	107.84	0.132 ± 0.020	110.0	0.167 ± 0.018	93.30
0.4	0.056 ± 0.001	109.80	0.120 ± 0.012	100	0.159 ± 0.013	88.83

表二十：Cytotoxicity of TSCCa treated with various concentration of Arecoline

Conc. μg/ml	Time	12Hr		24Hr		48Hr	
		Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %	Absorbance	Survival Rate %
Control		0.109 ± 0.009	100	0.108 ± 0.008	100	0.271 ± 0.011	100
400		0.031 ± 0.004	28.44	0.045 ± 0.004	41.67	0.034 ± 0.006	12.55
200		0.068 ± 0.005	62.39	0.059 ± 0.005	54.63	0.053 ± 0.010	19.56
100		0.079 ± 0.002	72.48	0.075 ± 0.007	69.44	0.147 ± 0.007	54.24
50		0.083 ± 0.005	76.15	0.081 ± 0.004	75.00	0.157 ± 0.013	57.93
25		0.079 ± 0.001	72.48	0.089 ± 0.012	82.41	0.177 ± 0.006	65.31
Control		0.202 ± 0.026	100	0.265 ± 0.052	100	0.403 ± 0.032	100
0.8		0.198 ± 0.014	98.01	0.277 ± 0.034	104.53	0.485 ± 0.049	120.35
0.7		0.208 ± 0.024	102.97	0.342 ± 0.075	129.06	0.435 ± 0.045	107.94
0.6		0.218 ± 0.025	107.92	0.372 ± 0.096	140.38	0.412 ± 0.047	102.23
0.5		0.209 ± 0.039	103.47	0.301 ± 0.054	113.58	0.431 ± 0.033	106.95
0.4		0.212 ± 0.229	104.95	0.281 ± 0.050	106.04	0.441 ± 0.032	109.43



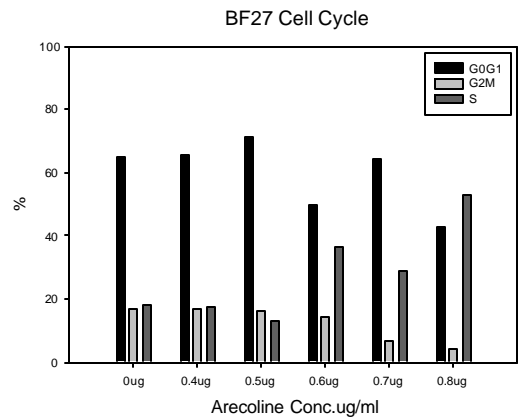
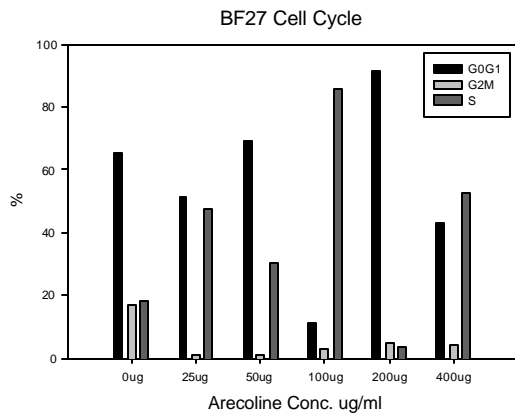
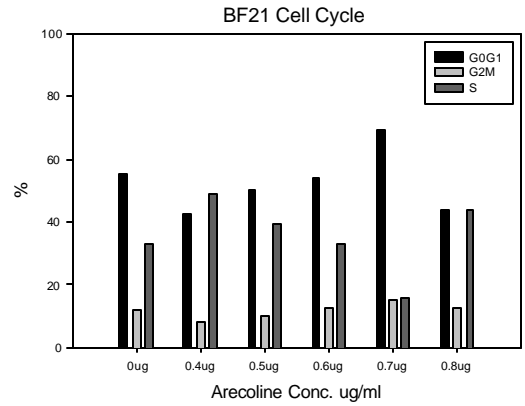
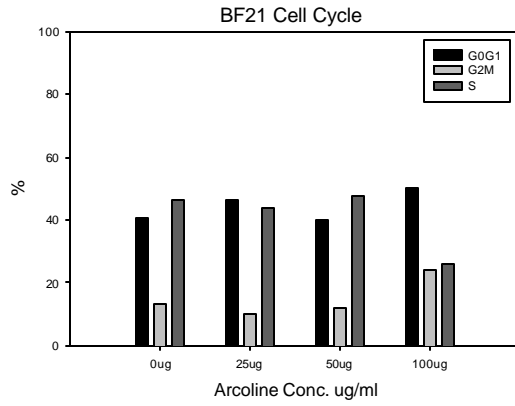
圖五：三株癌細胞 KB、GNM、TSCCa cell 對 Arecoline 敏感性試驗



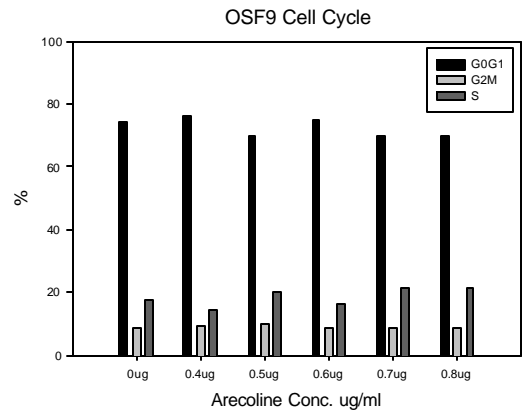
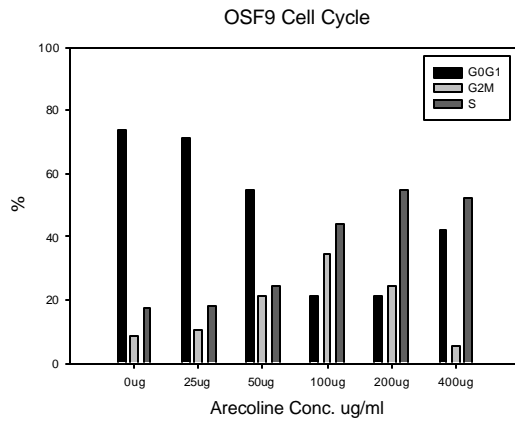
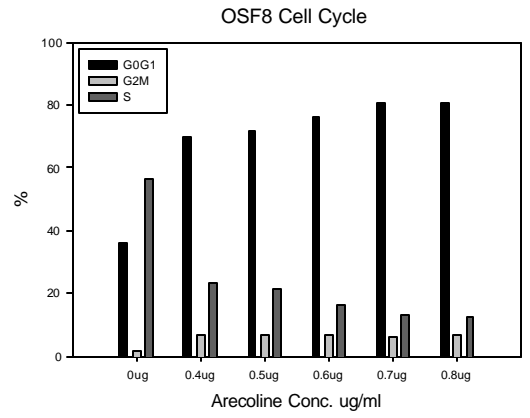
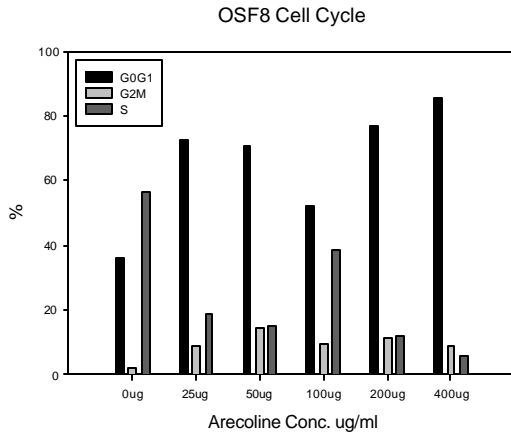
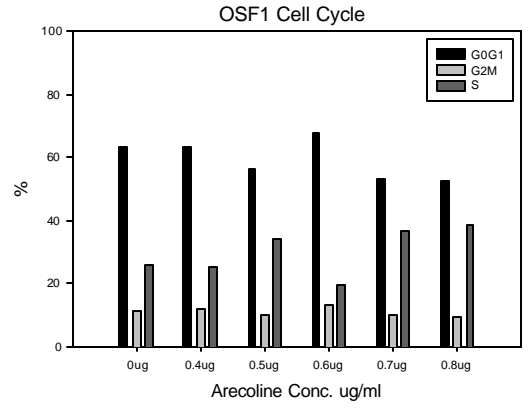
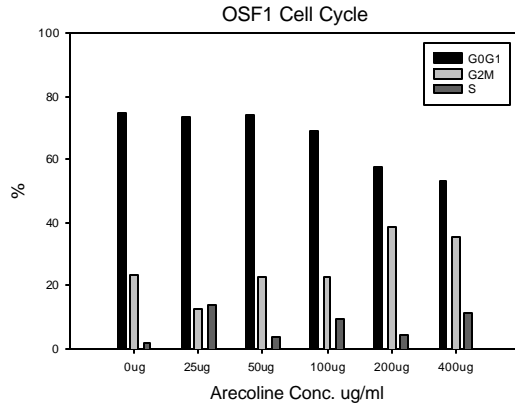
**表二十一：Cell cycle phase of Arecoline effects on various cells**

Cells	Phase	400	200	100	50	25	0	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0
BF21	G0G1%	----	----	49.97	40.01	46.12	40.65	43.87	69.37	54.08	50.18	42.58	55.08
	G2M	----	----	23.89	12.07	10.21	12.97	12.47	15.03	12.64	10.33	8.39	12.09
	S	----	----	26.14	47.91	43.67	46.38	43.66	15.60	33.28	39.49	49.04	32.83
BF27	G0G1	43.07	91.53	11.47	68.90	51.36	65.05	42.72	64.22	49.55	71.20	65.70	65.05
	G2M	4.16	5.04	3.03	0.91	1.07	16.96	4.07	6.82	14.01	15.90	17.08	16.96
	S	52.77	3.43	85.51	30.19	47.57	17.99	53.21	28.97	36.44	12.90	17.17	17.99
OSF1	G0G1	53.28	57.38	68.63	73.89	73.25	74.68	52.26	53.26	67.69	56.05	62.94	63.39
	G2M	35.47	38.48	22.32	22.59	12.76	23.51	9.16	9.98	13.09	10.08	11.86	11.00
	S	11.26	4.14	9.05	3.52	13.99	1.81	38.58	36.77	19.22	33.88	25.2	25.61
OSF8	G0G1	85.28	76.54	52.30	70.58	72.67	36.17	80.52	80.52	76.43	71.75	69.75	36.17
	G2M	8.78	11.32	9.43	14.27	8.80	1.88	7.10	6.49	6.98	6.81	6.86	1.88
	S	5.94	12.14	38.27	15.14	18.52	56.55	12.38	12.99	16.59	21.45	23.38	56.55
OSF9	G0G1	42.30	21.12	21.56	54.66	71.56	74.04	69.81	70.00	74.79	70.03	76.17	74.04
	G2M	5.34	24.39	34.59	21.22	10.21	8.46	8.86	8.69	8.70	10.05	9.18	8.46
	S	52.35	54.49	43.85	24.12	18.23	17.50	21.33	21.31	16.50	19.92	14.65	17.50
KB	G0G1	28.9	12.61	3.1	33.34	41.43	52.97	46.99	39.65	49.08	33.39	42.31	67.96
	G2M	32.25	51.28	82.65	22.93	25.77	21.73	23.58	25.28	22.55	23.68	23.15	22.5
	S	38.84	36.11	14.26	43.73	32.8	25.29	29.43	35.07	28.37	42.93	34.54	9.55
GNM	G0G1	2.56	4.17	15.15	45.95	57.05	55.28	50.88	51.46	49.36	50.21	57.0	52.67
	G2M	10.37	11.97	26.7	22.06	21.87	12.36	25.1	22.35	21.86	15.98	18.03	16.65
	S	87.07	83.87	58.15	31.99	21.08	32.36	24.02	26.19	28.78	33.81	24.97	30.69
TSCCa	G0G1	50.48	55.51	49.81	54.28	63.89	57.26	62.08	60.39	58.66	61.28	62.98	57.26
	G2M	31.70	17.83	11.57	10.80	7.81	9.40	7.87	7.09	5.86	9.18	7.69	9.40
	S	17.82	26.66	38.62	34.9	28.30	33.34	30.05	32.52	35.48	29.53	29.33	3.34

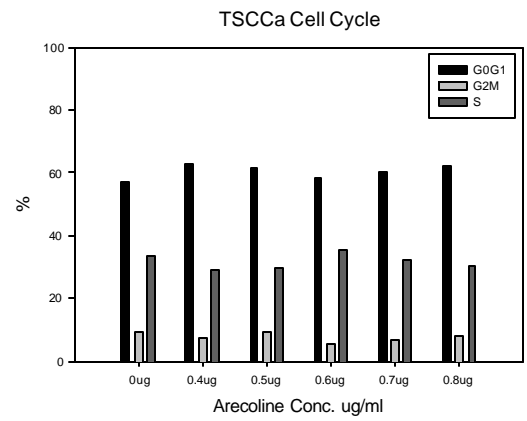
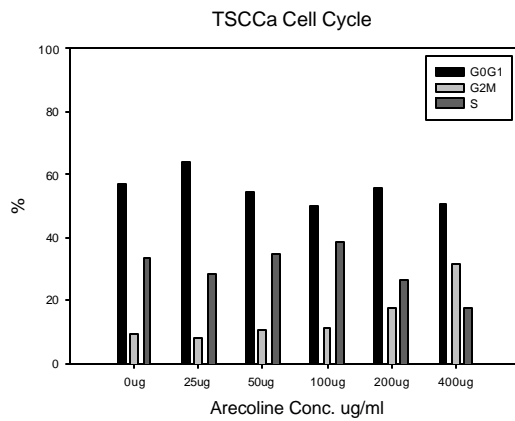
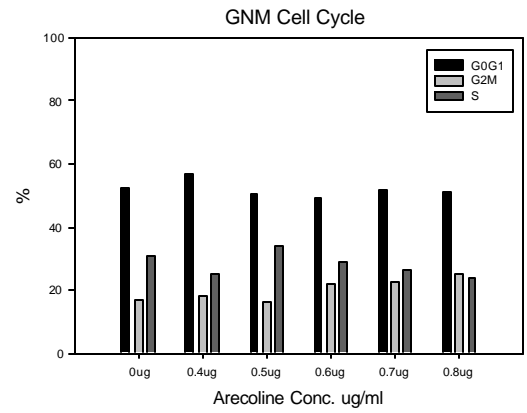
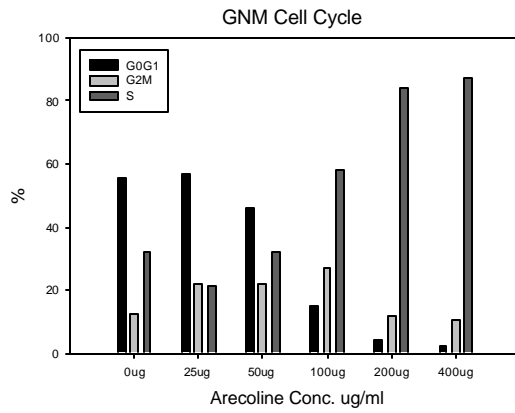
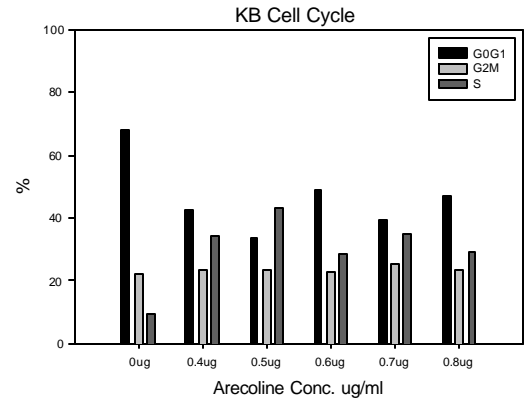
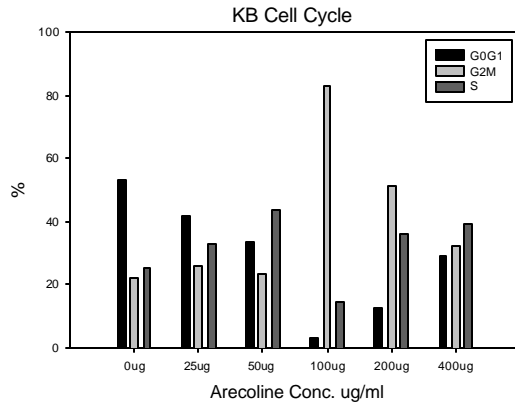
圖六：兩株正常口腔頰粘膜細胞 BF cell 處理 Arecoline 48 小時的細胞週期表現



圖七：三株口腔粘膜下纖維化細胞 OSF cell 處理 Arecoline 48 小時的細胞週期表現



圖八：三株癌細胞 KB、GNM、TSCCa cell 處理 Arecoline 24 小時的細胞週期表現



## References

1. 陳瑞堅.子宮頸癌侵襲前診療. 醫學繼續教育. 1993; 3 卷 1 期:99-101.
2. Paymaster JC. Cancer of the buccal mucosa: Clinical study of 650 cases in Indian patients. *Cancer* 1956;9:431-435.
3. Pillai R, Balaram P, Reddiar KS. Pathogenesis of oral submucous fibrosis. Relationship to risk factors associated with oral cancer. *Cancer*1992; 69:2011- 2020.
4. 莊濤洺：舌癌之病理學研究。台灣醫學會雜誌. 1981;80:479-492.
5. 陳庵君.子宮頸癌的診斷與治療. 醫學繼續教育. 1991 ; 1 卷 6 期:102-104.
6. Morrison EA, Ho GF, Vermund SH, Goldberg GL, Kadish AS, Kelley KF, Burk RD. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 1991; 49: 6-13.
7. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N. The causal link between HPV and invasive cervical cancer: a population case-control study in Columbia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 743-749.
8. Munoz N, Bosch FX, Shan KV, Meheus A . HPV and cervical neoplasia: Review of case-control and cohort studies. *The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer* pp 251-261. IARC publication no. 119. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer, 1992.
9. Peng HQ, Liu SL, Mann V, Rohan T, Rawls W. HPV types 16 and 33, herpes simplex virus

- type 2, and other risk factors in cervical cancer in Sechuan Province, China. *Int J Cancer* 1991; 47: 711-716.
10. Isabell Lombard, Anne Vincent-Salomon. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:2613-2619.
  11. Chris SJ, Steve G and David J. Evaluating cervical cancer screening programmes for developing countries. *Int J Cancer* 1997; 72:210-216.
  12. Wang C, Liao BS. Cervical intraepithelial neoplasia of the uterus: A clinical reappraisal. *Chang Gung Med J* 1980; 3:179-185.
  13. Bosch FX, Manos M, Munos N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillo mavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
  14. Shen CY, Ho MS, Chang SF, Yen MS, NG HT, Huang ES, Wu CW. High rate of concurrent genital infection with human cytomegalovirus and human papillomavirus in cervical cancer patients. *J Infec Dis* 1993;168:449-452.
  15. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al: Epidemiologic evidence showing that humanpapillomavirus infection causes cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-964.
  16. Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical Virology:Herpes Simplex Viruses.

- p375-410. Churchill Livingstone Press, New York,1997.
17. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of Herpesvirus-like DNA. *Science* 1994; 266: 1865-1869.
  18. Boshoff C, Whitby D, Hatzioannou T, Fisher C, Walt JV, Hatzakis A, Weiss R, Schulz T. Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus in HIV-negative Kaposi's sarcoma. *Lacnet* 1995; 345:1043-1044.
  19. Webster R.G., Granoff A. Encyclopedia of Virology. Academic Press,1994.16.
  20. Jacobs MV,de Roda Husman, AM, AJC van den Brule, PJF Snijders, CJLM Meijer, JMM Walboomers. Group-specific differentiation between high risk and low risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes.*J Clin Microbiol* 1995;33:901-905.
  21. Williamson AL, Brink NS, Dehaeck CM, Ovens S, Soeters R, Rybicki EP. Typing of human papillomavirus in cervical carcinoma biopsies from Cape Twon.*J Med Virol* 1994;43:231-237.
  22. Loning TH, Reichart P, Staquet MJ, Becker J, Thivolet J. Occurrence of papillomavirus structural antigens in oral papillomas and leukoplakias. *J Oral Pathol* 1984;13:463-465.
  23. Chang F, Syrjanen S, Kellokoski J, Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med* 1991; 20:305-317.
  24. Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical Virology: Papillomaviruse. PP569-611.



Churchill Livingstone Press, New York,1997.

25. Kumari TV, Harikumar T, Prabha B, Vivekanandan S, Vasudevan DM. Detection of antibodies against herpes simplex virus in patients with oral cancer. *Indian J Cancer* 1984;19:137-140.
26. Silverman NA, Alexander CJ, Hollinshed AC, Cheretein PB. Correlation of tumor burden with in vitro lymphocyte reactivity and antibodies to herpes simplex virus in patients with oral cancer. *Cancer* 1970;37:135-140.
27. Boshoff C, Weiss R. Kaposi's sarcoma- associated Herpesvirus. *Adv Cancer Res* 1998;75:57-86.
28. 黃萬傳,許文菊.台灣檳榔之生產與消費.1993.第一屆嚼食檳榔對健康影響國際研討會.
29. 黃萬傳,許文菊 1993,台灣檳榔之生產與消費,第一屆嚼食檳榔對健康影響國際研討會,高雄
30. Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:450-453.
31. Valentine JA, Scott J, West CR, St. Hill CA. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol* 1985;14:654-656.
32. Trell E, Bjorlin G, Andreasson L, Korsgaard R, Mattiasson I. Carcinoma of the oral cavity in relation to aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility, smoking and dental status. *Int J*

*Oral Surg* 1981;10:93-97.

33. van Wyk CW, Oliver A, de Miranda CM, van der Bijl P, Grobler-Rabie AF. Observations on the effects of areca nut extracts on oral fibroblast proliferation. *J Oral Pathol Med* 1994;23:145-8.
34. Mujumder AM, Kapadi AH, Pends GS. Chemistry and pharmacology of betel nut catechu Linn. *J Plant Crops* 1979; 7:69-92.
35. 孫璐西.王進崑.高閻仙.檳榔嚼塊之興奮成分.1995. 第一屆嚼食檳榔對健康影響國際研討會.
36. Ashby J, Styles JA, Boyland E. Betel nut, Arecaidine, and oral cancer. *Lancet* 1979;1 :112.
37. Kuttan R, Donnelly PV, Di Ferante N. Collagen treated with (+) catechin becomes resistant to the action of mammalian collagenase. *Experientia* 1981; 37:221-223.
38. Wenke G, Hoffmann D. A study of betel quid carcinogenesis. 1. On the in vitro N-nitrosation of arecoline. *Carcinogenesis* 1983;4:169-72.
39. Nishikawa A, Prokopczyk B, Rivenson A, Zang E, Hoffmann D . A study of betel quid carcinogenesis--VIII. Carcinogenicity of 3(methylnitrosamino) propionaldehyde in F344 rats.*Carcinogenesis* 1992 Mar;13:369-372.
40. Wenke G, Rivenson A, Hoffmann D. A study of betel quid carcinogenesis. 3. 3-(Methylnitrosamino)-propionitrile, a powerful carcinogen in F344 rats. *Carcinogenesis* 1984;5:1137-1140.

41. Meghji S, Scutt A, Harvey W, Canniff JP. An in-vitro comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. *Arch Oral Biol* 1987;32:213-215.
42. Chen CC, Huang JF, Tsai CC. In vitro production of interleukin-6 by human gingival, normal buccal mucosa, and oral submucous fibrosis fibroblasts treated with betel-nut alkaloids. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* 1995;11:604-614.
43. Jeng JH, Kuo ML, Hahn LJ, Kuo MY. Genotoxic and non-genotoxic effects of betel quid ingredients on oral mucosal fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1994 ;73:1043-1049.
44. Jeng JH, Lan WH, Hahn LJ, Hsieh CC, Kuo MY. Inhibition of the migration, attachment, spreading, growth and collagen synthesis of human gingival fibroblasts by arecoline, a major areca alkaloid, in vitro. *J Oral Pathol Med* 1996 ;25:371-375.
45. Lee CH, Lin RH, Liu SH, Lin-Shiau SY. Mutual interactions among ingredients of betel quid in inducing genotoxicity on Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 1996;367:99-104.
46. Lorincz AT. Diagnosis of human papillomavirus by the new generation of molecular DNA assays. *Clinical Immunology Newsletter* 1992; 8: 123-128
47. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chamber JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos M. Genital Human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472-477.
48. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman ME, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH,

- Moreno V, Kurman RJ, Shah K.V. Human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
49. Hildesheim A, Mann V, Brinton LA, Szklo M, Reeves WC, Rawls WE. Herpes simplex virus type 2: a possible interaction with human papilloma virus types 16/18 in the development of invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 1991;49:335- 340.
50. Santoro V, Pozzuoli ML, Colella G. Role of human papilloma virus in precancerous and cancerous lesions of the oral cavity. *Minerva Stomatol* 1997;46:595-601.
51. Chang YC, Tai KW, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. Cytotoxic and non- genotoxic effects of arecoline on human buccal fibroblasts in vitro. *J Oral Pathol Med* 1998;27:68-71.
52. Van Wyk CW, Oliver A, Hoal-van Helden EG, Grobler-Rabie AF. Growth of oral and skin fibroblasts from patients with oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med* 1995;24:349- 353.
53. Sundqvist K, Liu Y, Erhardt P, Nair J, Bartsch H, Grafstrom RC. Areca-nut toxicity in cultured human buccal epithelial cells. *IARC Sci Publ* 1991;105:281-285.
54. Tsai CC, Ma RH, Shieh TY. Deficiency in collagen and fibronectin phagocytosis by human buccal mucosal fibroblasts invitro as a possible mechenism for oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med* 1999;28:59-63.
55. Nair J, Ohshima H, Friesen M, Croisy A, Bhide SV, Bartsch H. Tobacco-specific and betel nut-specific N-nitroso compounds: occurrence in saliva and urine of betel quid chewers

and formation in vitro by nitrosation of betel quid. *Carcinogenesis* 1985;6:295-303.

56. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ,

Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.

57. Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, Marra G, Major EO, Neel JV, Boland CR. JC virus

DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1999;96:7484-7489.