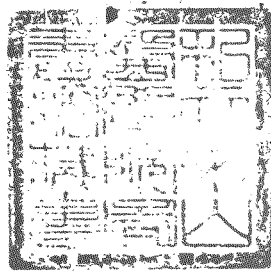


R
008.8
4482

私立中山醫學院醫學研究所碩士論文
Master Thesis , Institute of Medicine ,
Chung Shan Medical and Dental College

指導教授：李宣佑博士 (Shuan-Yow Li, Ph.D)

B型肝炎病毒感染之細胞遺傳毒性
Cytogenetic Toxicity of Hepatitis B Virus Infections



研究生：黃金仲 (Chin-Chung Huang)

中華民國八十二年六月
June, 1993



本論文為中山醫學院授予醫學碩士學位之
必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩
士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中央研究院

詹崑源 教授




私立中山醫學院醫學系

李孟智 副教授



私立中山醫學院醫學研究所
(論文指導教授)

李宣佑 教授



中華民國八十二年六月

致謝
Acknowledgement

謹以此書獻給
愛我與我所愛的人

金仲
1993.6.12.

摘要

B型肝炎病毒感染是全球性的嚴重問題，特別在疫區台灣，其帶原者幾佔全人口的15~20%。每年有三千餘慢性肝炎肝硬化的死亡例。且十分之一的帶原者亦將轉成慢性病變。何以有些帶原者會轉為慢性肝炎肝硬化，而有些則否？其差異性何在？頗值探討。本實驗乃以染色體層次觀察B型肝炎病毒感染之細胞遺傳毒性。

依血清學標記、姊妹染色分體交換、染色體斷裂和微核出現率比較其異同。將案例分做正常組、帶原組、和慢性肝炎組。每組各10人，共30例。培養其末梢血液淋巴球來做各項實驗。

早在1974年，Harnden報告，病毒（像Rous sarcoma病毒、SV-40等）為一強烈的致裂劑。其後陸續有Kato（1977），Brown & Crossen（1976），Sandberg（1977）等人就染色體斷裂與姊妹染色分體交換的關係詳加研究。有些斷裂劑、致變劑或致癌劑可以使二者均增加。但，有些使斷裂增加而交換並不增加；或使交換增加而斷裂並不增加。

當病毒侵入人體時，引起炎症反應，產生氧化基（free radical），導致基因損傷，而誘發癌化作用、其它疾病、甚至老化。至於微核出現率，代表染色體之機體損傷。任何引起紡錘絲形成紊亂，或引起染色體斷裂的原因，均可產生微核現象。

病毒感染引發宿主細胞之DNA再生作用和代謝障礙，然後，誘發染色體數目或構造上的畸變。

細胞遺傳學方法可以藉致變劑引發斷裂現象，來觀察DNA的修復能力。實驗結果顯示，有關姊妹染色分體交換，正常組為9.313（SCE/cell）；帶原組8.983；而慢性肝炎組為7.963。可知三組之間在統計上無差異；表示B型病毒感染對引起染色分體交換並無特異性。

微核的實驗結果，我們計算一千個雙核細胞中，出現單一微核的比率。
(micronuclei in 1000 binucleated cell) 其發生率〔 $\bar{x} \pm s(\%)$ 〕為：正常組
 2.800 ± 2.440 ；帶原組 3.100 ± 1.729 ；慢性肝炎組 4.200 ± 2.552 。由以上數據
顯示，其相互間平均值差未大於1.65 S.D.，故 $P > 0.05$ ，因而無統計上差異
。雖然此結果與中國大陸就各種肝疾病微核檢出率的報告有出入（有差異）
；原因在於雙方實驗所採用的慢性肝炎病人，其臨床症狀的嚴重度有明顯不
同，因而微核出現率不同。

有關染色體斷裂方面，每一案例計算其40個細胞所出現的斷裂數（break
per cell-b/c）。統計出現頻率結果，在以化學藥物Bleomycin處理前後，各組
均有明顯增加。正常組為85/526（增加6.19倍）；帶原組為110/1325（增加
12.05倍）；慢性肝炎組為48/1526（增加31.79倍）。比較之下，帶原組較正
常組增加2.519倍（1325/526）；慢性肝炎組為正常組之2.900倍（1526/526
）。以Mann-Whitney two sample rank test和paired t-test算之，帶原組與正
常組之間固無顯著差異（ $P < 0.061$ ），但慢性肝炎組與正常組之間則有統
計學上差異（ $P < 0.048$ ）。可見慢性肝炎組之斷裂率有明顯增加，代表其
DNA修復能力甚差，此與其疾病之臨床預後(prognosis)相吻合。亦即因慢性
病程中不斷發生和累積的染色體斷裂，使疾病惡化。而感染B型肝炎後，個
體之間是否會呈慢性化，也許與“體質特異性”有關。此“體質特異性”實
即染色體基因變化之差異。

目錄

第一章 緒論(Introduction)	1
第二章 材料與方法	6
2.1 實驗材料	6
2.1.1 試藥	6
2.1.2 泡製法	7
2.1.3 Fixation solution	7
2.1.4 R P M I -1640 medium	8
2.1.5 2 X S S C	8
2.1.6 儀器	8

2.2	實驗方法	10
2.2.1	姊妹染色分體交換 (SCE) 之實驗步驟	11
2.2.2	染色體斷裂 (Breakage) 之實驗步驟	12
2.2.3	微核 (Micronucleus MN) 出現率之實驗步驟	13
2.2.4	生化肝功能試驗及 B 型肝炎血清標記之實驗法	13
第三章 實驗過程		16
3.1	Blood culture for SCE	16
3.2	Blood culture for Break	18
3.3	Blood culture for MN (Micronucleus)	19
第四章 結果		20
4.1	姊妹染色體交換 (SCE)	20
4.2	染色體斷裂 (Chromatid break)	21
4.3	微核出現率 (Micronucleus)	21

第五章 討論	23
參考文獻	30
圖表	35
圖一 B型肝炎之臨床病程	35
圖二 B型肝炎病毒及關連抗原	35
表甲 B型肝炎病毒血清學標誌之診斷意義	36
表乙 30 案例之性別年齡一覽表	37
表一 191 例死因統計	38
表二 Liver function tests and serological markers of Hepatitis B of 30 cases . .	39
表三 Frequency of sister chromatid exchange (SCE) in normal individuals, HB carriers , and chronic Hepatitis B p't. Forty cells were analyzed for each subject	40
表四 各組 SCE 出現率檢驗結果	42
表五 各組斷裂 (Break) 檢驗結果	43
表六 斷裂之統計 (Mann-Whitney test)	45
表七 Rank sum test	46
表八 微核 (Micronucleus) 出現率檢驗結果	47
表九 各組微核細胞率檢驗結果	48
表十 各組微核細胞率檢驗結果 (中國大陸)	48
附錄	49

第一章

緒論 (Introduction)

肝炎乃肝臟之發炎性疾病。目前已知引起人類肝炎之病毒有五：[Morag C. Timbury 1991, Song 1986]

1. Hepatitis	A	Virus	HAV
2. Hepatitis	B	Virus	HBV
3. Hepatitis	C	Virus	HCV
4. Hepatitis	D	Virus	HDV
5. Hepatitis	E	Virus	HEV

有關B型肝炎，其感染主要經由皮膚接觸到血液製品，如輸血、藥癮者共用注射針等。病毒亦可見於不同之體液，一旦污染及口腔或生殖器官之血液或分泌物時，也有感染之虞。

B型肝炎之潛伏期平均約三個月（40~180天），症狀包括倦怠、發燒、胃腸炎和黃疸。急性B型肝炎有90%可完全恢復，約1%死亡於猛爆性肝

炎、約10%變成慢性或持續性帶原者（carrier）[Song, 1988; Suzuki Hiroshi 1981]。

H B V為雙層之“ Dane particle ”，外表即B型肝炎表面抗原（HBsAg），核心部分為核心抗原（HBcAg），而核心乃H B V之基龍（genome），是部分雙鏈D N A的單分子。另有e抗原（HBeAg），見於部分血清HBsAg陽性病人（圖一）。

由於H B V很難藉細胞培養來分離，所以其診斷主要基於血清學標記之檢查。其方法有：[Morag C. Timbury 1991; Song, 1988, Suzuki Hiroshi 1981]

1. Immunodiffusion 免疫擴散法
2. Counter immunoelectrophoresis 相反免疫電泳法
3. Complement fixation 補體固著法
4. Hemagglutination 血球凝集法
5. Latex agglutination 乳液凝集法
6. Radioimmunoassay 放射線免疫分析法
7. Enzyme immunoassay (E I A) 酵素免疫分析法

根據中央研究院宋瑞樓院士的報告[Song, 1988]，台灣地區20~29歲人口對B型肝炎的感染率高達90%，H B sAg陽性的帶原者也高達17~25%（三百萬人以上）。顯見台灣為B型肝炎高傳染疫區。為此，行政院衛生署於民國73年成立肝炎防治委員會，展開10年計劃加強對B型肝炎防治工作。

去年台灣地區十大死亡原因統計結果[衛生署，1992]，慢性肝病及肝硬化高居第六位。根據本人79年統計驗屍191例，肝疾患（包括慢性肝炎，肝

硬化，肝癌）亦居第2位（28/191）（表一）佔14.7%。而肝硬化、肝癌之主要誘因，與B型肝炎有密切的關係[Song, 1988]。所以，防治B型肝炎傳染，就等於防治肝硬化與肝癌。

（以台灣三百萬B型肝炎帶原者計，十分之一為終身帶原者，亦即有三十萬人將成為肝硬化與肝癌。而每年約有三千餘肝癌死亡病例。）（圖二）

B型肝炎病毒血清學標誌之診斷意義見表甲。

腫瘤細胞會引起染色體缺陷，其中許多是恆久的變化。而像Rous sarcoma virus, S V -40等病毒也是所謂的“強烈斷裂劑”（strong clastogens）[Harnden D G, 1974]可以導致染色體異常。當病毒侵入人體時，引起炎症反應（inflammatory reaction）產生oxygen free radical，造成基因（gene）損傷，不僅能引起癌症，亦能引發其它疾病和老化[Wang, 1990]。

B型肝炎既能導致肝硬化與肝癌，則其病毒是否會引起染色體之一過性或永久性的變化？病毒是否酷愛侵犯（攻擊）某些特定染色體？為本實驗所欲深入探討的問題。

本實驗乃以病患末梢血液，詳加探究其姊妹染色體分體交換（SCE）、斷裂（Breakage）、和微核出現率（Micronucleus）之變化情形。

姊妹染色分體交換（Sister chromatid exchange, SCE）一般認為代表DNA受傷[Jan, 1987]。經多年的研究，已確定致變劑（mutagens）以及大部份的致癌劑（carcinogen）都會破壞DNA，並且會增高SCE的發生頻率。凡是會破壞DNA的物質稱為具有遺傳毒性（genetic toxicity），因此SCE是偵測遺傳毒性的方法之一。

S C E 與下列有關（有正相關） [Jan, 1987]

1. D N A breakage
2. Chromosome aberration
3. Cytotoxicity
4. Frequency of gene mutation
5. Cell transformation
6. Carcinogenicity

染色體斷裂（chromosome break）正常狀況下發生頻率很低，但可以種類繁多之斷裂劑（clastogen）：如離子化射線、病毒感染、virus infection、及化學物chemicals（mutagens or carcinogens）來誘發 [Thomson M. W; 1991]。

斷裂頻率高，表示 D N A 的修復機轉愈差。（The higher the number of chromosomal break, the poorer the D N A repair mechanism），所以染色體斷裂數可用於衡量 D N A 修復容量（D N A - repair capacity）的指標。而修復機轉的缺陷，更容易引起癌化作用（carcinogenesis），更傾向於誘發惡性腫瘤 [Li, 1990]。

微核（Micronucleus）是染色體斷片或細胞分裂後期、未能納入子核的落後染色體，在子細胞質中形成的陽性染色質體。因此，任何影響紡錘絲形成、引起染色體斷裂的因素，都可造成微核細胞率升高。而淋巴細胞微核率（簡稱微核細胞率）測定較染色體檢測方法簡便 [Tsai, 1991]。

病毒感染可引起宿主細胞 D N A 複製和代謝障礙，誘發染色體畸變。有人指出肝炎病毒可導致染色體非整合倍體增多等畸變。在細胞分裂過程中

，由於致變劑（mutagen）的作用，可使染色體斷片或整條染色體形成微核
，因此微核的出現率反映了機體染色體損傷的程度 [Tsai, 1991; Hogstedt B,
1984; Heddle A, 1978; Miram P, 1985] 。

第二章

材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 試藥

名稱	購買廠牌
1. Bleomycin	Bristol Lab. Syracuse, N. Y.
2. BrdU (5 - Bromo-2'-deoxyuridine)	S I G M A
3. Buffer $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ $NaH_2PO_4SSC (NaCl + C_6H_5Na_3O_7)$	M E R C K
4. Colcemid solution	G I B C O
5. Cytochalasin B	S I G M A
6. Fixation (methanol : acetic acid = 3 : 1)	E. Merck
7. F C S : Fetal calf serum	G I B C O B R L.

8. Giemsa (dye)	E . Merck
9. Heparin sodium	B Braun Melsungen A G
10. 33258 Hoechst $C_{25} H_{24} N_6 O \cdot 3 HCl$	S I G M A
11. Hypotonic solution : 0.54% <i>KCl</i>	E . Merck
12. <i>M</i> -medium	G I B C O
13. <i>PHA C</i> (phytohemagglutinin) <i>M</i> form	G I B C O
14. <i>P S N</i> (penicillin , streptomycin , neomycin)	G I B C O
15. <i>R P M I</i> -1640	G I B C O

2.1.2 泡製法

<i>Hoechst33258</i> : 588 μ g/l of <i>D.W.</i>	
588g/l H_2O \rightarrow 1mole	1 <i>M</i>
0.588g/l H_2O \rightarrow	10^{-3} <i>M</i>
0.0588g/100ml H_2O \rightarrow 100ml	
0.00588g/100ml H_2O \rightarrow	10^{-4} <i>M</i>
5.88mg/100ml H_2O \rightarrow	10^{-4} <i>M</i>
0.00886g/150ml H_2O \rightarrow	10^{-4} <i>M</i>
0.00294g/50ml H_2O	

2.1.3 Fixation solution

Methanol 3 + Acetic acid 1

2.1.4 R P M I -1640 medium

	<i>RPMI - 1640</i>		<i>FCS10%</i>		<i>PSN1%</i>
	100ml	+	10ml	+	1ml
or	200ml	+	20ml	+	2ml

2.1.5 2 X S S C

1. Sodium chloride NaCl 8.75g
2. Trisodium citrate 4.4g ($C_6 H_5 N a_3 O_7 \cdot 2 H_2 O$)
3. 加Dist. $H_2 O$ 直到500ml

2.1.6 儀器

1. Lamina Flow : Bellco Glass Inc. (U S A)
2. Incubator :
Forma Scientific Steri-cult incubator
temperature 37 $^{\circ}C$,RH control 67 - 99% (Humidity)
 $C O_2$ control 5%
Water -Jacketed incubator
3. Incubator T C -1 電熱器
振盪回數 50Hz/100/min (shaking) 60Hz/120/min
4. Centrifuge (離心機) Hitachi
Time and Speed (x 1000 rpm)

5. Fisher : slide warmer

6. U V light : Model U V L -56 ,
black-Ray Lamp , long wave U V -366 N M .

115 volts , 60Hz , 0.16Am

Sau Gabriel C A 91778 U S A

2.2 實驗方法

本實驗以正常人、B型肝炎帶原者、以及慢性B型肝炎病患等三組之淋巴球培養，探究其姊妹染色分體交換、斷裂、和微核出現率之差異。

為避免年齡影響染色體畸變，三十位採樣案例之年齡分佈以20~40歲為主，只有數例例外。年齡分佈見表乙。

三十位案例乃內科門診所蒐集者（81年7月至9月）。

1. 臨床上，無任何肝炎症狀，且生化血液檢查（包括肝功能試驗GOT、GPT、Alk-p test、r-gt、 α -Fetoprotein等），以及6種肝炎血清學標記HBsAg、Anti-Hbs、HbeAg、Anti-Hbe、Anti-Hbc、HbcIgM、和C型肝炎抗體Anti-HCV均正常者，為10例正常對照組。
2. 臨床上無肝炎症狀、且肝功能試驗均正常、除HBsAg陽性外，其餘肝炎血清標記均陰性者，為B型肝炎帶原者組，10例。
3. 臨床上有肝炎症狀、且肝功能試驗超過正常範圍達半年以上，HBsAg亦為陽性者，為10例慢性B型肝炎組[Scheuer,1988]。

血液之採集培養：

抽取三十位受檢者空腹八小時以上之末梢靜脈血10c.c.，其中7c.c.以Heparin潤濕靜置過夜，則血液中層會形成環狀之Buffy coat，即富含淋巴球之白血球液層。



2.2.1 姊妹染色分體交換 (SCE) 之實驗步驟

分取 Buffy coat 0.6c.c. 置於 30ml 或 50ml 小缸瓶中，各加上 10ml RPMI-1640 培養液；再加上 0.15ml PHA (phytohemagglutinin) 和 PSN 各 0.1ml，然後置於 incubator 中培養。PHA 乃自 red bean 所抽取物，可以使紅血球凝集，和刺激淋巴球的細胞分裂 (使 lymphocyte 轉變成 blast cell-lymphoid cell，自 $G_0 \rightarrow G_1$)

培養 24 小時後，各加 BrdU 0.1ml (20 μ M)，裝於黑袋子內，以避免 BrdU 因光分解而變化 (complete avoidance of light - photolysis of BrdU)。經 44 小時，即在 Harvest 之前一小時，再各加 0.1ml Colcemid (秋水仙素)，使細胞分裂停留在中期 (metaphase)，然後 Harvest，將 medium 由小缸瓶倒入試管中。離心 (1200/rpm for 8 min)，spindown，線一樣倒去上清液。加入低張溶液 hypotonic solution 6ml (0.54% KCl 2 drops) 使細胞膨大，經 12 至 14 分鐘，離心 8min (1200/rpm)，倒液。旋以 fixation 每次 2 drops，各 30'，10'，5' 等，可多洗幾次，使細胞真正停止分裂。fixation 液乃 Methanol : Acetic Acid = 3 : 1，離心 8min，再倒液，然後噴片於 slide 上。fixation 可使細胞膜膨脹易破；經噴片後，細胞膜破裂，染色體即散佈開來，此即所謂染色體展開 (chromosomal spread)。

噴片既妥，繼以 Hoechst 33258 處理 10 分鐘。Hoechst 33258 為染核酸的螢光染料，會與 DNA 結合，隨後置於鐵盤上，潤濕紙上，rinsed in dist water。再以含 0.16 M 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 0.04 \text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ 的 Buffer 將 slide 全部浸滿，並蓋上 cover glass。復於 UV light (紫外燈) 下照射 1 小時。紫外光易使染色體上的 DNA 產生光分解，因姊妹染色體上 DNA 殘量的多少而產生鮮明對比，用吉氏染液 (Giemsa stain) 即能顯出對比。

UV light 照射後，拿回 rinsed in dist. H_2O 直到 cover glass 掉，置於 65

℃ 2 X S S C , pH7.0 , 15 至 30 分鐘 , 放在 hot plate 上烘乾。即可以吉氏染色 (staining with 2% Giemsa / buffer , 即 4c.c.Giemsa + 200c.c. buffer) , 約染色 10 分半鐘。染色後顯微鏡下觀察之。

每一案例 , 計算其 40 個中期細胞 (Metaphase cell) 的姊妹染色體交換數目。依各組染色體 (A,B,C,D,E,F,G) 之 S C E 分別記錄及統計分析。

2.2.2 染色體斷裂 (Breakage) 之實驗步驟

培養三十案例之末梢淋巴球。培養液 (medium) 以 M - medium , 不含 folic acid 、 thymidine 、 和 hypoxanthine (G I B C O) , 另加 4.5% fetal calf serum 、 1% P S N 、 2% P H A 。

M - medium 旨在使染色體在加藥後易於斷裂。

本實驗是使用 M - medium 培養 , 並加斷裂劑 Bleomycin , 視其結果之變化差異。

培養案例的末梢淋巴球 , 以 M - medium 經 96 小時。培養之一組在 Harvest 之前五小時各加 Bleomycin 30 μ g/ml , 而在 Harvest 最後一個小時 , 培養細胞各加 Colcemid 0.05 μ g/ml , 使細胞分裂中止。繼之加低張溶液 0.54KCl , 及以 3 methanol + 1 Acetic acid Fix 三次以上 , 噴片 , 復以 Giemsa stain , (10% Giemsa for 7 ~ 8') 鏡下觀察。以任意選擇 100 個 Metaphase , 照相 , 而染色分佈斷裂頻率 (frequency of chromatid break) 以每個細胞之染色分體斷裂數 b/c (break per cell) 加以比較。

2.2.3 微核 (Micronucleus MN) 出現率之實驗步驟

經Heparin處理的0.4ml末梢淋巴球，接種於10ml R P M I - 1640中，並加P H A 0.15ml培養44小時。再加上cytochalasin B，經18小時，不加秋水仙素，常規H arvest。以0.075 M之KCl低張溶液常溫下處理1min，shaking，不必pipeting，經甲醇Methanol：冰醋酸Acetic acid (3:1) 固定，而後滴片，(噴片不宜太高，以免核膜破裂) 自然乾燥後，Giemsa染色。

微核計數方法：[Tsai, 1991]

選擇細胞核疏鬆發生轉化的淋巴母細胞計數。根據大小、形狀、及著色特徵辨識微核。微核位於細胞質內，與主核著色一致或稍淡，直徑小於主核的1/3。每案例計數1000個淋巴母細胞，求微核細胞數和微核細胞率。本實驗僅計算雙核細胞 (binucleated cell) 出現單一微核 (1 MN) 之數目。

2.2.4 生化肝功能試驗及B型肝炎血清標記之實驗法

抽取30案例空腹靜脈血3 c.c.，離心，取Serum約30 μ g，以Kone (芬蘭自動分析儀器，single channel，multi-test) 一次可做22項。約需40 min ~ 1 hrs，包括肝功能試驗和其它電解質檢查。

試劑方面，應用M A S (Medical Analysis System Inc.) 生產的種種enzyme和buffer先預備妥當，電腦設定所欲檢查項目，並且放入Control組 (Control serum有2：一為normal，一為abnormal，均為M A S購入)，作為standard及比較。然後置入案例的血清30 μ g (其量依檢查多寡而不同)，即可自動操作，約需40分鐘有結果。

本報告有關30案例之肝功能檢查，包括：

1. S G O T (Serum Glutamate Oxalate Transferase) 血清麩胺酸草酸氨基轉化酶
2. S G P T (Serum Glutamate Puruvate Transferase) 血清麩胺酸丙酮酸氨基轉化酶
3. A L P (Alkaline Phosphatase) 鹼性磷酸鹽酶
4. T B (Total Bilirubin) 總膽紅素
5. G G T (γ - G T) 丙麩胺轉氨酶
6. A F B (Alpha - Fetoprotein) 甲胎兒蛋白

至於 B 型肝炎血清標記方面，試劑均採用國產的「永進生物科技股份有限公司」（新竹科學園區）製造的酵素免疫法檢驗試劑（E I A，Enzyme Immunoassay），藉酶標示之三明治免疫檢驗法（Sandwich principle：antibody-antigen-antibody），以 One step 進行人類血清或血漿中 B 型肝炎血清抗原抗體之測定。

本實驗案例依血清學抗原抗體標記分類，所謂的「B 型肝炎帶原者」，指的是「無症狀、健康帶 HBsAg 者」（asymptomatic healthy carrier），依 WHO 認為，乃血清中 HBsAg 繼續存在 6 個月以上時屬之 [Scheuer, 1988; Song, 1988]。

所謂慢性肝炎者，乃肝功能異常超過半年、且 HBsAg 繼續存在、或兼有 HBeAg 存在者屬之 [Scheuer, 1988]。

爲了鑑別診斷，實驗案例又抽取三分之二檢驗其 C 型肝炎抗體（Anti-HCV），均爲陰性結果。（除第 25 例併有 B 型及 C 型肝炎感染者外）。

30 案例中，男性 19 人，女性 11 人，年齡分佈爲 14 ~ 61 歲，（平均爲： $1174/30 = 39.133 \pm 10.225$ ），且全部均爲土生土長之臺灣人。採血時間均集中於 1992 年 9 月。正常組、B 型肝炎帶原者、及慢性肝炎，每組各 10 案例。

有關肝功能方面：正常人組 10 例都在正常範圍之內。B 型肝炎帶原者組，亦大多正常。第 11 例之 GPT，第 17 例之 GOT、GPT 雖超過正常值，但不久即回復正常範圍。又第 17 例慢性酒精中毒男性，r-gt 值甚高。

慢性肝炎組，其 GOT、GPT 值均超過正常範圍達半年以上；第 21 例、與第 28 例，且偶有急性發作。有關各組之 GOT、GPT 值概況，見表二所示。

有關 B 型肝炎血清學標記，正常人組均爲陰性。B 型肝炎帶原組其 HBsAg 均爲陽性，第 16、17、20 例之 HBeAg 且爲陽性（高傳染力）。慢性肝炎組，除第 29、30 例（脂肪肝）外，HBsAg 均爲陽性；第 27 例之 HBsAg 和 Anti-HBs 爲陽性，顯示正值血清轉換期（Seroconversion）。各組之血清學標記亦請參考表二。

第三章

實驗過程

3.1 Blood culture for S C E

抽血 10ml peripheral blood + 0.2ml heparin

↓ 取 buffy coat 0.5 ~ 0.6ml (lymphocyte)

{ *Adult* : 0.6cc.
 Child : 0.4cc.

+ 10ml R P M I - 1640

↓

+ P H A 0.5ml (phytohemagglutinin)

↓ overnight 配合時間算好

Add BrdU 各 0.1ml 後裝於黑袋子內避光

↓ 44hrs

Add 0.1ml Colcemid

↓ 30' ~ 1hr

Harvest

↓

Revert (將 medium 由燒杯倒入試管中)

↓

離心 8 min Spindown (倒去上清液)

↓

加入 hypotonic solution 6ml (0.54% *KCl* 2 drops)

↓ 12' ~ 14'

離心 8 min Spindown (離心及倒液)

↓

fixation 約 2 drops (1)30' (2)10' (3)5' 可多洗幾次 (使真正停止作用，
Methanol : Acetic Acid = 3:1)

↓

離心 8 min Spindown

↓

噴片 (再置於 hot plate，直到乾燥，收起來放於 37 °C incubator)

↓

dipped in D W

↓

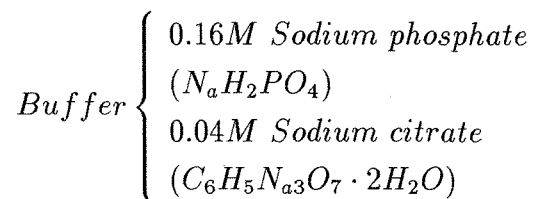
treat \bar{c} 33258 Hoechst 10min (放置於小缸皿，小缸用錫箔紙密裝)

↓

rinsed in dist. water 置於鐵盤上，潤濕紙上

↓

mounted \bar{c} buffer 並蓋上 cover glass



↓
Exposed to light at noon 1.5 ~ 2hrs (或照 U V light 1hr)
↓
拿回後 rinsed in dist. water , 直到 cover glass 掉
↓
置於 65 °C 2 X S S C PH : 7.0 15' ~ 30' 置於 hot plate 上烘乾
↓
Staining with 2% Giemsa / buffer (4cc. Giemsa , 200cc. buffer) 10'15" ~ 11'30"
↓
鏡檢 , 攝影 , 計數

3.2 Blood culture for Break

M - medium (4.5% F B S +1% P S N) 10ml + P H A 0.15ml+peripheral lymphocytes 0.6ml

↓
在 Harvest 前 5hrs Add Bleomycin 30 μ g/ml
在 Harvest 前 30' Add Colcemid

↓
Harvest
↓
+ Hypotonic solution (0.54% KCl 2 drops)

↓
Fixation 3 times 以上

↓

噴片在Slide上

↓

Giemsa stain (10% Giemsa for 7' ~ 8')

↓

observation

3.3 Blood culture for MN (Micronucleus)

R P M I - 1640×10ml+ P H A 0.15ml+peripheral lymphocytes 0.4ml

↓ culture 44hrs

Add Cyt B (cytochalasin B , to prevent cytokinesis in mitogen-stimulated human peripheral blood lymphocytes (PBLs)in culture there by producing binucleated PBLs.)

↓ 18hrs

Harvest (不必加 Colcemid)

↓

+ KCl , shaking 1min (不必pipeting)

↓

Fixation 30' (shaking)

↓

噴片 (不必太高 , 以免膜破裂)

↓

Staining c̄ 10% Giemsa for 1' ~ 2'

第四章

結果

30 案例之肝功能試驗及血清學標記，詳見表二。本實驗統計方法採用 Mann- Whitney U Test[Bruce E, Wampold, 1990]。

4.1 姊妹染色體交換 (SCE)

有關三組 SCE 實驗結果請參見表三。

從實驗結果觀察，正常人組之平均姊妹染色體交換率為 9.313%，B 型肝炎帶原者為 8.938%，而慢性肝炎之平均交換率 7.963%，顯示三者之間無明顯差異，統計學上無意義。亦即姊妹染色體交換率與 B 型肝炎病毒感染無必然之因果關係和影響（表四）。

4.2 染色體斷裂 (Chromatid break)

實驗結果請參見表五。在未加Bleomycin之前的control對照組，其斷裂率（以每一中期細胞之斷裂數表示之，即b/c - break per cell）為：正常人組0.85 b/c，B型肝炎帶原組：1.10 b/c，慢性肝炎：4.80 b/c。自然斷裂率與B型肝炎病毒感染之間，並無呈正比例的關係。但在加入Bleomycin之後，斷裂率分別為：5.26 b/c；13.25 b/c；15.26 b/c；即正常人組增加6.19倍，B型肝炎帶原組增加12.05倍，慢性肝炎組增加31.79倍，B型肝炎帶原組斷裂率之增加率，幾乎為正常人組之2.519倍；慢性肝炎組為正常人組之2.900倍。以Mann-Whitney two-sample rank test和paired t-test作統計分析（見表六和表七），帶原組和正常組之間無顯著差異（ $P < 0.061$ ）。但是，慢性肝炎組與正常組相較，則有統計學上差異（ $P < 0.048$ ）。足見B型肝炎病毒之感染，可誘發染色體斷裂，即DNA修復能力之降低。（impairment of DNA of repair capacity）

4.3 微核出現率 (Micronucleus)

計算1000個雙核細胞（binucleated cell）中，出現單一細小微核的數目。另有三核，四核等多核或出現二個以上之微核（ ≥ 2 MN）者，均不予計算在內。

微核計數詳見表八及表九。

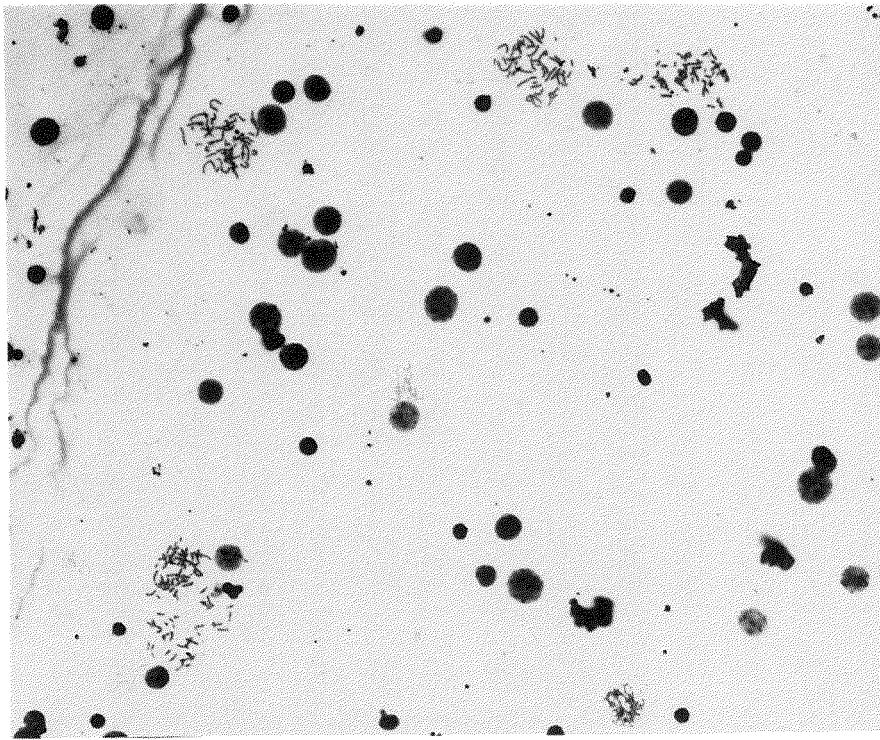
正常組：微核出現率為0~9，統計一千個細胞共有單一微核28個。（平均值為 $2.800 \pm 2.440\%$ 。）

帶原組：微核1~6個，共有31個。（平均值為 $3.100 \pm 1.729\%$ 。）

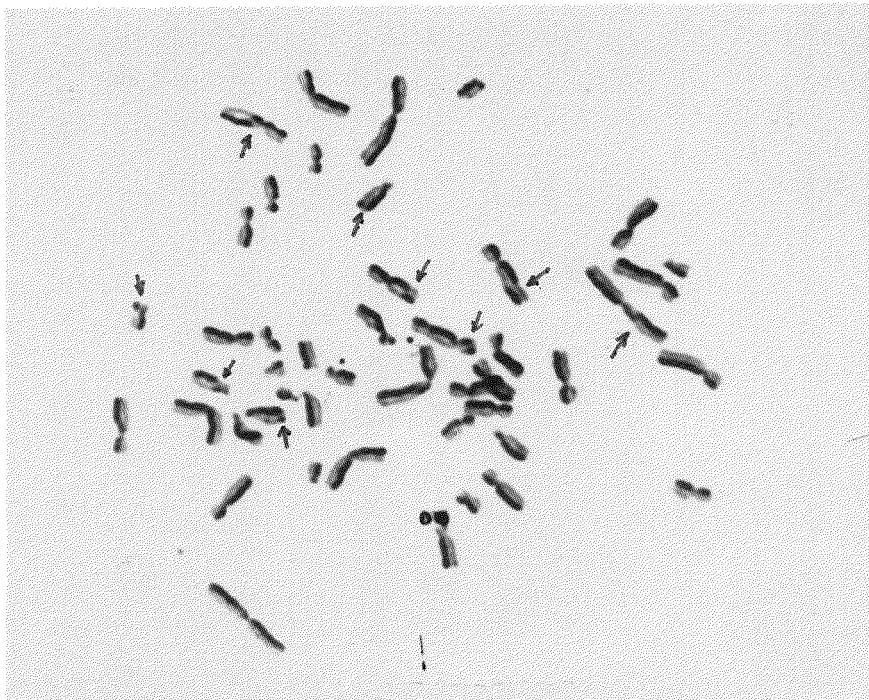
慢性肝炎組：微核1~10個，共有42個。（平均值為 $4.200 \pm 2.552\%$ 。）

根據以上資料，很容易可以看出三組的平均值的差，均小於相關的標差（S . D . standard deviation），足以說明對 $P > 0.05$ 而言，沒有統計學上的意義（not statistically significant）。

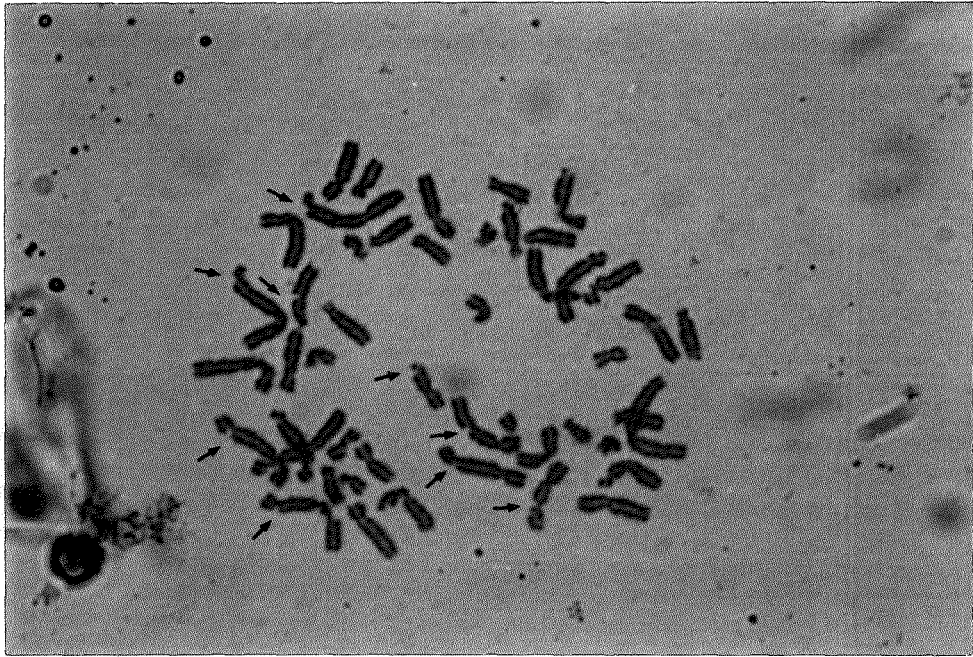
因此，就微核出現率而言，三組間並無差異存在。



6 metaphase cells (100x)

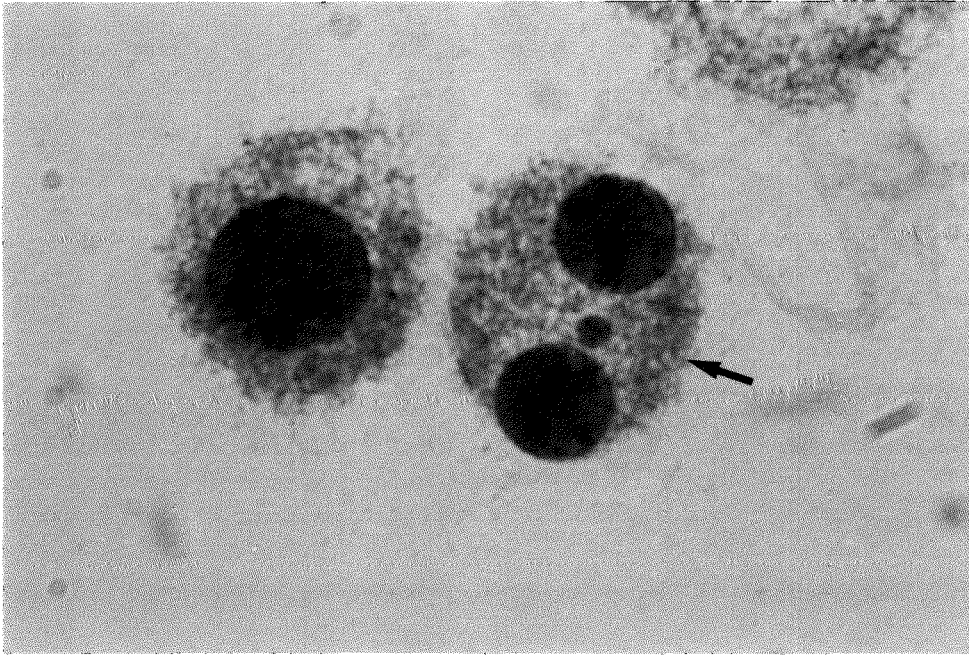


SCE

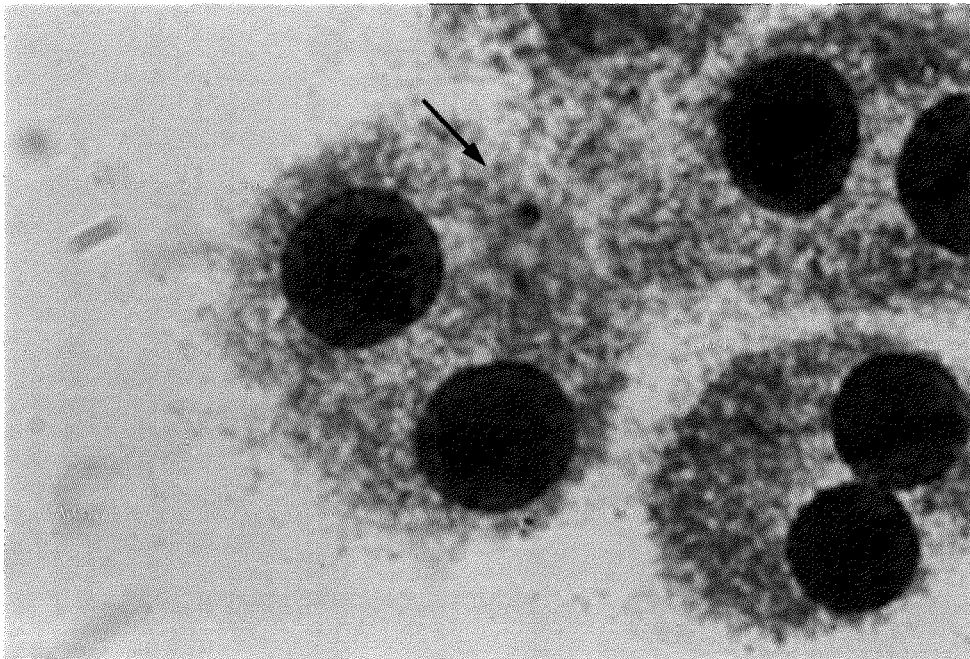


Chromatid Break





Micronucleus



第五章

討論

Taylor 於 1958 年首先發現有姊妹染色分體交換現象 (SCE)。自從以 5-Bromodeoxyurine (BrdU) 和同位素氘 H^3 -thymidine 取代 DNA 的胸腺嘧啶 (thymidine) 後, SCE 的研究更是一日千里。SCE 的產生代表 DNA 之複製產物在對等處發生交換, 雖然 SCE 在分子生物學上的解釋還不清楚, 但是一般認為 SCE 代表 DNA 受傷。SCE 之容易偵測更提供探索染色體突變行爲 (mutagenic activity) 莫大方便。

SCE 很可能與有絲分裂或減數分裂時之交換 (crossing over) 現象有關, 即在兩同源染色體 homologs 之聯會配合對 pairing 的緊密度相關。

染色體畸變 (chromosomal aberration) 分爲數目異常與構造變化兩種。雖然會造成 SCE 現象的物質不一定會引起染色體畸變。但是, 許多誘發 SCE 的物質也會發生染色體斷裂 (Break) 的可能。

SCE 與 DNA 斷裂、染色體異常率、細胞毒性、基因突變頻率、細胞轉型 (cell transformation) 率、致癌性等, 在統計學上有正相關。

用於分析染色體的細胞, 在培養基中必須能生長及快速分裂。能滿足此

條件又易獲取的細胞是白血球（紅血球無核無染色體）。為製備短期的培養細胞時，先採取末梢靜脈血，並加入肝素（heparin）以防止凝血，然後靜置過夜使血沉澱分層，白血球聚集在某區域，形成Buffy coat，置於組織培養基（tissue culture medium），加入植物血球凝集素（phytohemagglutinin）促使細胞分裂增殖。一般經72小時後，培養的細胞即快速分裂增殖，此時，加入濃度非常稀的秋水仙素（colcemid）溶液，其有與紡錘體細管的細管素（tubulin）結合的特性，因而干擾紡錘體的正常作用，也能阻止中節的分裂。亦即加入colcemid後，有絲分裂停在中期（metaphase），即在培養基中有多量處於中期的細胞。加入少量低張溶液，細胞即腫漲破裂，釋出著絲點完好無損的染色分體（chromatids），經固定、在載玻片上展開、及各種染色法後，即可鏡檢、照相、及定核型。

在中期（metaphase），染色體收縮最厲害、最濃染且移位至細胞的赤道面排列時，此期間的染色體最易研究，因此時的染色體最濃染。

近年來在先進國家中，遺傳毒理學受到相當的重視，主要的原因是一般認為癌症甚至老化與人體的遺傳物質受傷有關。一般認為SCE代表DNA受傷，會破壞DNA的物質即可增高SCE的發生頻率。此類物質稱為具有遺傳毒性（genetic toxicity），因此，SCE是偵測遺傳毒性的方法之一，以SCE來檢查環境中的遺傳毒物，是普遍採用的方法[Jan, 1987; Wang P, 1992]。

至於病毒virus，一如其它的致變劑mutagens和致癌劑carcinogens，也是會導致遺傳毒性的原因之一。有關病毒誘發SCE形成和染色體畸變，遠在1974年Harnden報告，病毒為強烈的致裂劑（strong clastogen）。例如有名的oncogen viruses，（像Rous sarcoma virus，SV40，和其它等等）。我們如果比較它所引起的SCE以及Break，下面數據可提供參考：

Stich和Kato在1977年偵測結果，以adenovirus type 2感染中國灰鼠細胞

(chinese hamster cell) 和人類細胞，發現其 S C E 頻率並無增加。而這種 virus 在以前認為會誘發培養細胞極高的染色體破壞[Kato H, 1977]。

Brown 和 Crossen (1976) 實驗發現，以 Rauscher leukemia virus 感染老鼠胚胎之滋養母細胞 (mouse embryonal fibroblast)，對於感染病毒的這些培養細胞有很高的 S C E 誘發頻率。雖然不會引起染色體破壞[Brown R. L, 1976]。

相反的，Kato 和 Sandberg 1977 年發現，Herpes simplex virus 感染人類的 fibroblast，則會引起染色體畸變，卻不會增加 S C E 的發生頻率。這兩位學者後來發現 Raus sarcoma virus 也有相同的結果[Kato H, 1977]。

1975 年 Marshak 報告，以 S V 40 誘發非等倍體人類細胞的基因突變 (gene mutation in aneuploid human cells)，而對於 Chinese hamster cells 會增加其染色體畸變之頻率 [Marshak M.I., 1975]。Nichols 在 1978 年指出 [Nichols, 1978]，當培養細胞變成腫瘤抗原陽性 (tumor-antigen positive) 時，人類雙倍體纖維母細胞 (human diploid fibroblast) 之 S C E 即明顯增加。這些現象解釋為：會誘發細胞之染色體畸變而 S C E 並不增加、或 S C E 頻率增加但不引起染色體畸變，代表此二現象具有不同的病毒性機轉 (cells with induced chromosome abnormalities without increase S C E s and the reverse, present the possibility that the two phenomena have different viral mechanism)。

就此而言，必須注意的，幾種哺乳類細胞種系，U V - light 對於 S V 40 一轉型灰鼠細胞可以幫助誘發病毒和 S C E s 的產生。有關病毒合成和 S C E 形成之間的關係，鼠類細胞暴露於數種物質之下，來加以探討。

至於化學藥物引起 S C E 和染色體畸變，更是不勝枚舉。除了 Bleomycin 和 maleic hydrazide 外，1979 年 Wolff 和 Carrano 報告，可以誘發染色體畸變

而不影響 S C E 的化學物有：ethidium bromide , cytosine arabinoside , chloramphenicol , 和 cycloheximide 。而有些非致裂劑 (non-clastogens) 則可以增加 S C E 。如：caffine , hydroxyurea , theophylline , theobromine , 和 actinomycin D [Wolff. S. Carrano A V, 1979] 。因此，會影響 S C E 和染色體畸變的誘導物 (inducers) 可以分類如下：

1. 對 S C E 和染色體畸變二者均很強的誘導物。
2. 含有誘導 S C E 的非致裂劑的物質。
3. 強烈致裂劑，但只有很低或缺乏 S C E 誘導活性。

不過，只要誘導物都攻擊 D N A 相同位置，就可以產生 S C E 或染色體畸變之相同症狀 [14] 。而如果該物質能夠作用在 D N A 構造上許多不同位置的話，就會同時誘發 S C E 增加以及染色體畸變。

我們所做的 S C E 實驗結果，三組之 S C E /cell 分別為：正常組 9.313 ；帶原組 8.938 ；慢性肝炎組 7.963 ；在統計學上無差異。甚至疾病組比正常組的 S C E 為低 (9.313 > 8.938 > 7.963) 而三組之平均 S C E 為 8.738 ；較國際上之平均 S C E 值為高。 (5.6 per metaphase) [14] (本校實驗室之正常控制組平均 S C E 值則為 4.5 per metaphase) 是否實驗步驟中，所加 BrdU 超量？或避光不全而有 photolysis 光分解？致 S C E 誘發增加。

至於染色體斷裂 (Break) ，實驗室中之平均斷裂值為 0.02 per metaphase ，則 S C E 與 Break 出現頻率之比為 280:1 ，可見一般狀況下，染色體斷裂是很少發生的。由於斷裂代表 D N A 的修復能力 (repair capacity) ，斷裂愈多顯示修復能力愈差， (the higher chromosomal break , the poorer the repair capacity of D N A) [Li, 1990] 所以我們可以由斷裂數的多寡來推論染色體所受到的毒性程度，以及其 D N A 的修復能力。

在自然狀況下，隨著年齡增加，斷裂也會增加[Eeva Therman, 1985]。其它，如放射線（radiation）、紫外光、化學物質、和病毒等，都可以誘發染色體斷裂。

斷裂的研究，對於曾受原子彈傷害的長崎、廣島民衆，其淋巴球有明顯高頻率的染色體畸變[Awa A A, 1974]。染色體可見有dicentrics, acentrics, reciprocal translocation, inversion, rings, 和deletion等現象。

Gebhart (1970)則報告許多藥物，特別是抗癌藥物，對淋巴球染色體所發生的影響[Gebhart E, 1970]。

裂罅（gap）代表染色體上面一般較薄弱、淡染的區域，並不一定會造成斷裂或永久性的染色體傷害，因此在計算斷裂數時，必須予以區別[Eeva Therman, 1985]。

有關染色體斷裂研究，所應注意者有：

1. 對於培養細胞的分析，正常對照組也應從相同個體來做，同時培養。如果不可能，也應相同性別與年齡。
2. 區分裂罅（gap）和斷裂（break），前者細看，有藕斷絲連情形。
3. 染色體玻片之製成與染色等，無論對照組或處置組，應同時由同一研究者來操作，以免偏差。
4. 研究時，應詳細擬定計劃，區分何者是分析對象，何者屬於異常範圍。界定何者為畸型細胞或染色體。
5. 實驗分析，宜由有經驗的專業細胞遺傳學家行之，避免由兼差、缺乏經驗的助手來負責。

本實驗乃以抗癌藥物Bleomycin (Blenoxane) 來誘發染色體斷裂。Bleomycin的主要作用是插入到DNA鍵，並將其單鍵 (Single-strand) 切斷，而對 G_2 相位的細胞產生特異的抑制效果。目前認為，Bleomycin可能先螯住鐵離子 (Fe^{+2}) 來供應電子到氧分子上。待形成過氧化物 (superoxide) 和OH的自由基團 (free radical) 開始攻擊及切斷DNA鍵。總之，臨床上公認它對 G_2 相位末期有極大的特異性。當然，隨著用量的增加，它也可以作用在 G_1 相位近末期、S相位早期及M期的細胞。

本實驗得到一令人鼓舞的發現。由Bleomycin處理前後觀察，斷裂率在正常組增加6.19倍 (85/526)；帶原組增加12.05倍 (110/1325)；慢性肝炎組增加31.79倍 (48/1526)。以Mann-Whitney two-sample rank test和paired t-test作統計分析 (表六和表七)，帶原組與正常組之間無顯著差異 ($P < 0.061$)，但是，慢性肝炎組與正常組相較，則有統計學上差異 ($P < 0.048$)。

帶原組在加入Bleomycin之後，其斷裂率比正常組增加2.519倍；慢性肝炎組則較正常組增加2.900倍。這些數據顯示，HBV的感染，的確會造成染色體斷裂的增加，亦即其DNA的修復能力有明顯降低。此與B型肝炎帶原者及慢性肝炎病人，其臨床預後 (prognosis) 有一致性。可能這種反復不斷的斷裂，呈現惡性循環；日積月累的傷害，在其慢性的病程中，造成不良的日漸惡化的炎症反應，而終於導致肝硬化與肝癌。至於帶原組，何以只有十分之一會成為終身帶原者 (十分之九在經過一段時間之後，即自行產生Anti-HBs抗體而痊癒) 是否個人的體質因素 (individual difference, constitutional character)，此「體質因素」實際上要歸因於染色體畸變的個人差異。

有關微核出現率方面，本實驗顯示，和SCE一樣，三組之間並無統計學上的差異 (表九)。此項結果，與中國大陸蔡慧芬 (1991年) 的報告有出入。其各項肝病 (急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、肝癌) 之微核細胞率均

較正常對照組高，且有統計差異（表十）。可能的原因是，中國大陸所採用的慢性肝炎組，其病情遠較本實驗的慢性肝炎病患來得嚴重，因而實驗結果不同。本實驗室據此再做三位肝癌病例之微核計數，顯示實驗之各項控制步驟及過程並無技術上問題。

本篇實驗何以僅用B型肝炎帶原者與慢性肝炎組，而不採用急性肝炎病例乃因帶原組為台灣之嚴重問題，盛行率佔全人口15~20%；且臨床上病程緩慢，歷經一、二十年，而造成慢性肝炎、肝硬化、甚至肝癌。所以，探究其染色體變化是十分有價值的。不若急性肝炎瞬息萬變之炎症反應所帶來的不穩定變化。

本實驗結果，鼓舞我們繼續研究進一步觀察更多的案例；研究肝炎病毒是否酷愛侵襲人類的某一特定的染色體基因，其病因癥結如何？甚至可以利用分子科技的方法，求取探針（probe），應用於疾病之診斷、治療、與預防。

參考文獻

- [1] Awa A A : (1974) Cytogenetic and oncogenic effects of ionizing radiations of the atomic bombs. In : German J (ed) Chromosomes and Cancer. Wiley, Newyork, pp 637-674
- [2] Basanti Chatterjee : Constitutive heterochromation polymorphismand chromosome damage in viral hepatitis. Mutation Research. 210 (1989) 49-57
- [3] Brown RL Crossen PE (1976) Increased incidence of sister chromatid exchanges in Rauscher leukemia virus infected mouse embryo fibroblasts Exp Cell Res 103 : 418-420
- [4] Bruce E. Wampold, Clifford J. Drew : Theory and Application of Statistics 1990.
- [5] Eeva Therman : Human Chromosomes, Structure, behavior, effects, 2nd edn. 1985, P78-85
- [6] Erich Gebhart : Sister Chromatid Exchange (SCE) and Structure Chromosome Aberration in Mutagenicity Testing, Hum Genet (1981) 58:235-254.
- [7] Evans H. J. : 1982, Sister chromatid exchanges and disease states in man. in Sister Chromatid Exchange (Woff, S, ed.) pp.183-228, John Wiley & Sons, New York.
- [8] Gebhart E (1970) The treatment of human chromosomes in vitro : Results. In : Vogel F, Röhrborn G (ed) Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer , Newyork, pp367-382

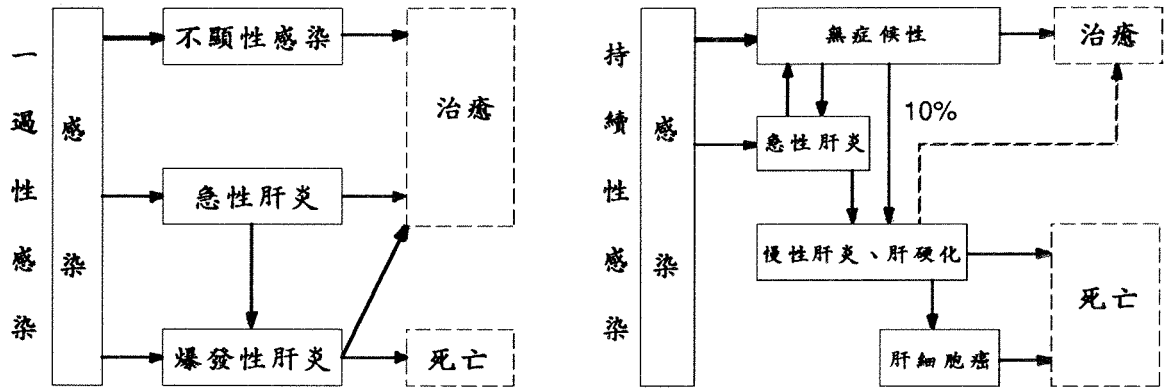
- [9] Gregory L. Erexson : Diaziquone-induced Micronuclei, in cytochalasin B-blocked mouse peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*. 178 (1987) 117-122
- [10] Harnden D G (1974) *Viruses, chromosomes, and tumors : The interaction between viruses and chromosomes* : In : German J (ed) *Chromosomes and cancer*, Wiley and Sons, New York, London, Sidney.
- [11] Heddle A. et al; Sensitivity of five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res* 1978 ; 38:9283.
- [12] Hogstedt B. Micronuclei in lymphocytes with p reserved cytoplasm, A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutat Res* 1984 ; 130:63.
- [13] Jan, Kun-Yung "Sister chromatid differential staining (SCDS)" , *Journal of Scientific development*, VOL. 16, NO. 8, p.1109-1121, Taiwan, 1987.
- [14] J. Maki-Paakkanen and H. Norppa : Induction of micronuclei by vinyl acetate in mouse bone marrow cells and cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 190 (1987) 41-45
- [15] J. Ashby and R. Mohammed : Slide preparation and Sampling as a major source of virabity in the mouse micronucleus assay. *Mutation Research*. 164 (1986) 217-235
- [16] K. Iijima et al : Bleomycin-induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in Down lymphocyte cultures. *Hum. Genet* (1984) 66 :57-61.
- [17] Kato H. Sandberg AA : (1977) Effects of Herpes simplex virus on sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 109 : 423-427

- [18] Kato H : Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BudR-labeling method. *Int Rev Cytol* 49 : 55-97 (1977)
- [19] Knunttila S, Mäli-Paakkanen J : An increased frequency of chromosomal changes and SCE's in cultured blood lymphocytes of 12 subjects vaccinated against smallpox. *Hum Genet* 41 : 89-96
- [20] Li, Shuan Yow : Differential bleomycin susceptibility in cultured lymphocytes of fragile X patients and normal individuals, *Hum Genet* (1990) 85:267-271.
- [21] M. Ribotta et al : Changes in nucleolar transcriptional activity in Hepatitis B virus-associated Chronic liver diseases *Path. Res. Pract.* 188,101-105 (1992).
- [22] Miram P, German J : Evidence for chromosome instability in vivo in blood syndrome increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. *Hum Genet* 1985 ; 71:187.
- [23] Morag C. Timbury : *Medical virology*, 1991, p.125-136.
- [24] M. Vekemans : Chromosomal breakage in normal and fragile X subjects using low folate culture conditions. *Journal of Medical Genetics*, 1983, 404-407.
- [25] Marshak MI. Varshaver NB. Shapiro NI (1975) Induction of gene mutations and chromosomal aberrations by simian virus 40 in cultured mammalian cells. *Mutat Res.* 30 : 383-396
- [26] Nichols WW. Bradt CI. Toji LH, (1978) Induction of sister chromatid exchanges by transformation with simian virus 40. *Cancer Res* 38 : 960-964
- [27] Okio Hino : Features of two Hepatitis B virus (HBV) DNA integrations suggest mechanism of HBV integration, *Journal of Virology*, June 1989, p.2638-2643.

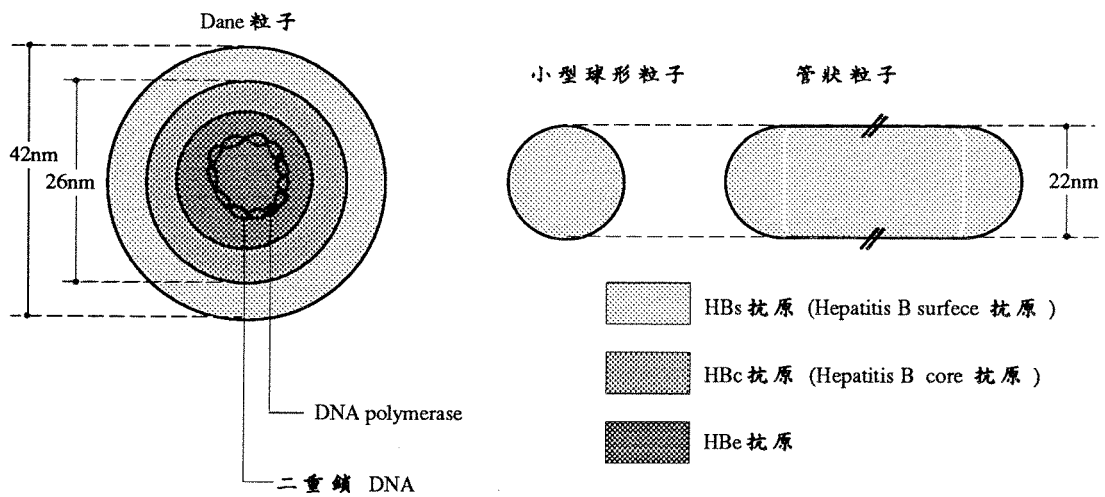
- [28] Perry, P. and H. J. Evans : 1975, Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, *Nature*, 258, 121-125.
- [29] Song, Zui-Lo, "Hepatitis B Viral infection" *Taiwan medical journal*, Vol. 30 No.10 p.933-937. 1988, Taiwan.
- [30] Suzuki Hiroshi, "Viral Hepatitis" *National Tokyo University Hospital*, 1981, p.1-21.
- [31] Scheuer P J. : *Chronic Hepatitis, in liver biopsy interpretation*, 4th edn. London Bailliere Tindall, 1988.
- [32] Sheila Sherlock & James Dooley : *Diseases of the Liver and Biliary System*, 9th edn. 1993.
- [33] Sen, Pramila : Kinetics and extent of repair of Bleomycin-induced chromosome damage in quiescent normal human fibroblasts and human mononuclear blood cells. *Cancer Research*. 44, (1984) 591-596
- [34] Shim, Jeom-Soon : Sister-chromatid exchanges in 52 Korean women living in the vicinity of an industrial complex. *Mutation Research*. 224 (1989) 511-515
- [35] Tsai, Huey-Fan "Detection & Clinical explanation of micronuclei in peripheral lymphocytes", *China Medical Journal*, 1991, p289-290, China Mainland.
- [36] Thompsom M.W, McInnes R.R, Willard H. F; "Clinical Cytogenetics" in "Genetics in Medicine", 5th edn. 1991, W.B. Saunders Company, P.204-205.
- [37] Theodore Colton, Sc.D. : *Statistics in Medicine*, p.221-222.
- [38] Takashi Tokino : Chromosome deletions associated with Hepatitis B virus integration. *Virology* 185, 879-882 (1991).
- [39] Wang, Tsao-Chung, *Cancer Biology*, 1990, Taiwan.
- [40] Wang, Guang-Hua : The reverse transcriptase of Hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* Vol. 71, 663-670, 1992.

- [41] Wang, Peilin : A genetic study of human interferon- α -induced repair of DNA damage in hepatitis B patients. Mutation Research. 262 (1991) 125-128
- [42] Wolff. S. Carrano A V (1979) Report of the workshop on the utility of sister chromatid exchange. Mutation Research. 64 : 53-56
- [43] Wang, P et al : A study of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of hepatitis B patients with *HB_sAg* positive and their children, Acta Genet Sin. 13 : 144-149, 1992
- [44] 衛生署:1992年臺灣地區十大死亡原因統計
- [45] 楊志良:生物統計學新論, p.67-90.

圖一. B型肝炎之臨床病程



圖二. B型肝炎病毒(HB病毒)及其關連抗原



表甲. B型肝炎病毒血清學標誌之診斷意義

1. HBsAg(+), Anti-HBs(-), Anti-HBc(-), HBV 早期感染, (無症狀)
2. HBsAg(+), Anti-HBs(-), Anti-HBc(+). 急性B型肝炎
3. HBsAg(+), Anti-HBs(-), Anti-HBc IgG(+) 慢性帶HBsAg狀態 (肝炎, 肝硬化, 肝細胞癌, 及無症狀健康帶原者)
4. HBsAg(-), Anti-HBs(-), Anti-HBc(+)
 - (a) Anti-HBc 低價: 感染於很久以前發生, 而 Anti-HBs 已降至查不出之低價或從來都查不出。
 - (b) Anti-HBc 高價: 剛把HBsAg除去。但是 Anti-HBs 尚未出現, 即是剛恢復期。所謂 Anti-HBc window。
5. HBsAg(-), Anti-HBs(+), Anti-HBc(-)。HBV 已除去而帶有抗體
6. HBsAg(+), HBeAg(+): HBV 複製旺盛。傳染力高, 肝炎有惡化可能。
7. HBsAg(+), Anti-HBe(+): 雖尚有HBsAg, 但HBV 停止複製, 肝炎再燃機會降低。

表乙、30 案例之性別年齡一覽表

黃招香	F	44	陳世豪	M	20	王昆峰	M	40
鄭呂綢	F	57	簡賴颯	F	37	林賢三	M	46
陸台鳳	M	33	陳景秋	M	42	吳燈城	M	36
王怡鈞	M	30	陳秋冬	M	59	簡清郎	M	37
黃金仲	M	44	游忠義	M	35	賴慶義	M	33
陳詩煌	M	46	邱紋玉	F	22	蕭春貴	F	32
李義榮	M	46	邱創德	M	61	胡場	M	41
蘇瑞英	F	42	張淑霞	F	37	黃文昭	F	14
莊榮銘	M	42	許偉洋	M	33	許月霞	F	41
鄭新嬌	F	38	吳桂香	F	45	李榮彬	M	41

Age : 14~61 yrs (Average : 1174/30=39.133±10.225)
 Male : 19 Female : 11
 Nativity : All are Taiwanese

1992 年臺灣地區十大死亡原因 (行政院衛生署公佈)

1. 惡性腫瘤
2. 腦血管疾病
3. 意外事故及不良影響
4. 心臟疾病
5. 糖尿病
6. 慢性肝病及肝硬化
7. 肺炎
8. 腎炎腎癥候羣及腎變性疾病
9. 高血壓疾病
10. 支氣管炎、肺氣腫及氣喘

表一. 191例死因統計

HCVD	62	32.4%	Cervical Ca.	2	1.0%
Liver D.	28	14.7%	Bone tumor	2	1.0%
CVA	19	9.9%	Septicemia	2	1.0%
TB	19	9.9%	Prostatic Ca.	1	0.5%
GI Ca.	17	8.9%	N.P.C.	1	0.5%
DM	11	5.7%	Leukemia	1	0.5%
Lung Ca.	9	4.7%	Breast Ca.	1	0.5%
URI	8	4.1%	Ovarian Ca.	1	0.5%
Meningitis	2	1.0%	Prematurity	1	0.5%
Renal Failure	2	1.0%	SLE	1	0.5%

表二 .Liver function tests and serological markers of Hepatitis B of 30 cases
 Male: 19 Female: 11
 Age: 14-61 (average : 1174/30 = 39.133±10.225)
 Nativity: all are Taiwanese
 Date of sampling: 1992, 9. 1

A. NORMAL INDIVIDUAL													
NO	SGOT	SGPT	ALP ^x	T.B [*]	r-gt	AFP ^Δ	AGE	SCE/40 Cells	HbsAg	Anti-Hbs	HbeAg	Anti-Hbe	
°SBN-1	17	23	68	0.8	26	(-)	44	328/8.200	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-2	19	28	112	0.8	46	(-)	57	303/7.575	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-3	28	35	46	0.6	18	(-)	33	338/8.450	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-4	13	32	32	0.4	5	(-)	30	310/7.750	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-5	19	32	78	0.9	18	(-)	44	248/6.200	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-6	12	27	60	0.65	31	(-)	46	501/12.525	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-7	22	34	108	0.6	48	(-)	46	554/13.915	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-8	14	31	54	0.65	21	(-)	42	339/8.475	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-9	12	16	116	0.65	15	(-)	42	394/9.850	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-10	13	14	62	0.8	7	(-)	38	405/10.125	(-)	(-)	(-)	(-)	
B. HB CARRIER													
SBN-11	23	49	86	0.9	17	(-)	20	203/5.075	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-12	21	15	88	0.6	11	(-)	37	467/11.675	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-13	33	38	90	1.0	21	(-)	42	208/5.200	(+)	(-)	(-)	(-)	
SBN-14	20	25	90	0.9	16	(-)	59	412/10.300	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-15	27	23	67	0.5	14	(-)	35	305/7.625	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-16	11	17	60	0.65	15	(-)	22	319/7.975	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-17	38	66	130	0.4	240	(-)	61	480/12.000	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-18	12	8	66	0.65	16	(-)	37	522/13.050	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-19	22	23	107	0.9	25	(-)	33	213/5.325	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-20	18	14	102	0.5	9	(-)	45	446/11.150	(+)	(-)	(+)	(-)	
C. CHRONIC HEPATITIS													
SBN-21	55	120	104	1.0	22	(-)	40	369/9.225	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-22	31	43	84	0.8	36	(-)	46	311/7.775	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-23	29	45	81	1.0	31	(-)	36	249/6.225	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-24	37	24	82	0.9	14	(-)	37	442/11.050	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-25	35	43	56	1.2	5	(-)	33	290/7.250	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-26	42	82	65	0.7	63	(-)	32	401/10.025	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-27	35	56	78	0.7	16	(-)	41	293/7.325	(+)	(+)	(-)	(-)	
SBN-28	288	543	140	1.2	97	(-)	14	321/8.025	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-29	28	56	68	0.8	27	(-)	41	246/6.150	(+)	(-)	(-)	(-)	
SBN-30	58	70	86	1.0	47	(-)	41	263/6.575	(+)	(-)	(-)	(-)	

x (ALP): Alkaline phosphatase * (T.B): Total bilirubin Δ (AFP): α-fetoprotein
 ° (SBN): SCE, Breakage & Micronucleus

表三 . Frequency of sister chromatid exchange (SCE) in normal individuals, HB carriers, and chronic Hepatitis B p't. Forty cells were analyzed for each subject

§ Normal individuals

Subjects	Chromosome groups							
	A	B	C	D	E	F	G	Total
黃招香 SCE	82	39	160	25	8	7	7	328
SCE/cell	2.050	0.975	4.000	0.625	0.200	0.175	0.175	8.200
鄭呂網 SCE	80	41	114	38	12	10	8	303
SCE/cell	2.000	1.025	2.850	0.950	0.300	0.250	0.200	7.575
陸台鳳 SCE	125	36	101	48	15	10	3	338
SCE/cell	3.125	0.900	2.525	1.200	0.395	0.250	0.075	8.450
王怡鈞 SCE	86	47	70	46	7	10	6	310
SCE/cell	2.150	1.175	1.750	1.150	0.175	0.250	0.150	7.750
黃金仲 SCE	57	36	101	45	7	1	1	248
SCE/cell	1.425	0.900	2.525	1.125	0.175	0.025	0.025	6.200
陳詩煌 SCE	127	80	183	64	18	16	13	501
SCE/cell	3.175	2.000	4.075	1.600	0.450	0.400	0.325	12.525
李義榮 SCE	155	87	193	64	37	17	6	559
SCE/cell	3.875	2.175	4.825	1.600	0.925	0.425	0.150	13.975
蘇瑞瑛 SCE	109	45	132	27	7	14	5	339
SCE/cell	2.725	1.125	3.300	0.675	0.175	0.350	0.125	8.475
莊榮銘 SCE	126	62	134	42	13	10	7	394
SCE/cell	3.150	1.550	3.350	1.050	0.325	0.250	0.175	9.850
鄭新嬌 SCE	113	62	141	48	18	15	8	405
SCE/cell	2.852	1.550	3.525	1.200	0.450	0.375	0.200	10.125
Total SCE	1060±29.28	535±18.45	1329±38.40	447±13.00	142±9.130	110±4.78	64±3.204	3725±95.07
SCE/cell	2.650	1.338	3.323	1.118	0.355	0.275	0.160	9.313

§ HB carrier

	A	B	C	D	E	F	G	Total
陳世豪 SCE	58	22	92	22	5	3	1	203
SCE/cell	1.450	0.550	2.300	0.550	0.125	0.075	0.025	5.075
簡賴彪 SCE	123	59	191	48	18	9	7	467
SCE/cell	3.075	1.475	4.775	1.200	0.450	0.225	0.175	11.675
陳景秋 SCE	64	30	89	32	1	0	2	208
SCE/cell	1.600	0.750	2.225	0.800	0.025	0.000	0.050	5.200
陳秋冬 SCE	120	47	162	56	11	11	5	412
SCE/cell	3.000	1.175	4.050	1.400	0.275	0.275	0.125	10.300
游忠義 SCE	80	32	129	43	14	4	3	305
SCE/cell	2.000	0.800	3.225	1.075	0.350	0.100	0.075	7.625
邱紋玉 SCE	87	56	115	40	8	6	7	319
SCE/cell	2.175	1.400	2.875	1.000	0.200	0.150	0.175	7.975
邱創德 SCE	107	50	139	52	12	4	9	480
SCE/cell	2.675	1.250	3.475	1.300	0.300	0.100	0.225	12.000
張淑霞 SCE	143	71	210	54	19	13	12	522
SCE/cell	3.575	1.775	5.250	1.350	0.475	0.325	0.300	13.050
許偉洋 SCE	50	19	87	40	7	5	5	213
SCE/cell	1.250	0.475	2.175	1.000	0.175	0.125	0.125	5.325
吳桂香 SCE	129	61	162	50	22	15	7	446
SCE/cell	3.225	1.525	4.050	1.250	0.550	0.375	0.175	11.150
Total SCE	961±32.736	447±17.876	1376±43.298	437±10.646	117±6.667	70±4.807	58±3.327	3575±123.017
SCE/cell	2.403	1.118	3.440	1.093	0.293	0.175	0.145	8.938

表三 . (Continued)

§ Chronic Hepatitis B

Subjects	Chromosome groups							
	A	B	C	D	E	F	G	Total
王昆峰 SCE	104	51	155	29	17	7	6	369
SCE/cell	2.600	1.275	3.875	0.725	0.425	0.175	0.150	9.225
林賢三 SCE	86	44	128	28	10	11	4	311
SCE/cell	2.150	1.100	3.200	0.700	0.250	0.275	0.100	7.775
吳燈城 SCE	66	24	118	35	4	0	2	249
SCE/cell	1.650	0.600	2.950	0.875	0.100	0.000	0.050	6.225
簡清郎 SCE	123	74	143	61	21	13	7	442
SCE/cell	3.075	1.850	3.575	1.525	0.525	0.325	0.175	11.050
賴慶義 SCE	70	42	113	37	10	11	7	290
SCE/cell	1.750	1.050	2.825	0.925	0.250	0.275	0.175	7.250
蕭春貴 SCE	110	59	163	47	11	7	5	401
SCE/cell	2.750	1.475	4.075	1.175	0.275	0.175	0.125	10.025
胡場 SCE	94	34	108	27	14	10	6	293
SCE/cell	2.350	0.850	2.700	0.675	0.350	0.250	0.150	7.325
黃文昭 SCE	91	52	119	28	14	13	4	321
SCE/cell	2.275	1.300	2.975	0.700	0.350	0.325	0.100	8.025
許月霞 SCE	60	26	119	27	4	1	9	246
SCE/cell	1.500	0.650	2.975	0.675	0.100	0.025	0.225	6.150
李榮彬 SCE	57	31	123	23	13	10	6	263
SCE/cell	1.425	0.775	3.075	0.575	0.325	0.250	0.150	6.575
Total SCE	861±22.437	437±15.755	1289±18.508	342±11.660	118±5.287	83±4.596	56±1.955	3185±66.081
SCE/cell	2.153	1.093	3.223	0.855	0.295	0.208	0.140	7.963

S.D : Standard deviation

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - n\bar{x}^2}{n-1}}$$

表四. 各組 SCE 出現率檢驗結果

組別	例數	Total SCE (\pm SD)	SCE/cell
正常人組	10	3,725 \pm 95.070	9.313
帶原者組	10	3,575 \pm 123.017	8.938
慢性肝炎組	10	3,185 \pm 66.081	7.963

From the data on the above , it is easy to see that all the differences among the means are less than the corresponding standard deviation (S.D). This imply that there is not statistically significant for $P > 0.05$

表五 . 各組斷裂 (Break) 檢驗結果

p't No.	M Medium		P-value ^c
	-Bleomycin ^b	+Bleomycin	
<i>Normal individual</i>			d.
SBN-01	4	20	P < 0.001
SBN-02	12	52	
SBN-03	10	53	
SBN-04	2	144	
SBN-05	1	29	
SBN-06	13	62	
SBN-07	18	60	
SBN-08	12	16	
SBN-09	10	58	
SBN-10	3	32	
Total	85	526	
<i>HB carrier</i>			
SBN-11	10	202	
SBN-12	7	79	
SBN-13	2	26	
SBN-14	8	184	
SBN-15	0	69	
SBN-16	3	257	
SBN-17	6	14	
SBN-18	3	144	
SBN-19	2	302	
SBN-20	69	48	
Total	110	1,325	

d. By Rank Sum Test, 見表七 .

表五 . (Continued)

<i>Chronic hepatitis</i>		
SBN-21	6	34
SBN-22	1	123
SBN-23	2	46
SBN-24	10	26
SBN-25	3	194
SBN-26	3	191
SBN-27	9	518
SBN-28	2	198
SBN-29	8	78
SBN-30	4	118
Total	48	1,526
<hr/>		
P-value	P < 0.001	
<hr/>		

- a. Each untreated or bleomycin-treated sample consisted of 100 metaphases so b/c was calculated by dividing the total number of breaks in a sample by 100.
 - b. - and + indicate the absence and the presence of bleomycin (30 µg/ml) , respectively.
 - c. P-value based on the Mann-Whitney U-test among 3 groups of cases.
- * A treatment of 30 µg/ml bleomycin for 5 hrs before cell harvest was the standard protocol for this study. as previous reports by Dr. Li (1990)

表六 . 斷裂之統計 (Mann-Whitney test)

(a)

$$\begin{aligned}
 T_1 &= 84.5 & N_1 = N_2 = 10 \\
 U_A &= N_1 N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - T_1 \\
 &= 100 + 55 - 84.5 \\
 &= 70.5 \\
 U_B &= N_1 N_2 - U_A \\
 &= 100 - 70.5 \\
 &= 29.5 \\
 U &= 29.5
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 E(U) &= 50 & V(U) &= \frac{100(21)}{12} = 175 \\
 Z &= \frac{29.5 - 50}{\sqrt{175}} & Z &= \frac{-20.5}{13.23} = -1.55 & \Rightarrow P < 0.061
 \end{aligned}$$

(b)

$$\begin{aligned}
 T_1 &= 83 & N_1 = N_2 = 10 \\
 U_A &= 72 \\
 U_B &= 28 & \Rightarrow U = 28 \\
 Z &= \frac{-22}{13.23} \\
 &= -1.66 & \Rightarrow P < 0.048
 \end{aligned}$$

* Mann-Whitney U test (The two-independent sample design)

$$\begin{aligned}
 U_A &= N_1 N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - T \\
 U_B &= N_1 N_2 - U_A \\
 E(U) &= \frac{N_1 N_2}{2} \\
 V(U) &= \frac{N_1 N_2 (N_1 + N_2 + 1)}{12} \\
 Z &= \frac{U - E(U)}{\sqrt{V(U)}} \\
 U &= \text{minimum of } U_A \text{ and } U_B
 \end{aligned}$$

表七. Rank sum test

(a)				(b)			
Normal individual		HB carrier		Normal individual		Chronic Hepatitis	
20	3	202	18	20	2	34	5
50	7	79	13	52	7	123	14
53	8	26	4	53	8	46	6
144	15.5	184	17	144	16	26	3
29	5	69	12	29	4	194	18
62	11	257	19	62	11	191	17
60	10	14	1	60	10	518	20
16	2	144	15.5	16	1	198	19
58	9	302	20	58	9	78	12
132	14	48	6	132	15	118	13
84.5		125.5		83		127	

$P > 0.05$ "Not statistically significant" by Rank Sum Test.

註： $n_1=n_2=10$

∴ 在 78~132 之外的值才有意義 ($P < 0.05$)

即 < 78 , > 132 才算 significant.

表八. 微核 (Micronucleus) 出現率檢驗結果

	binucleated normal	binucleated with 1MN	2MN
SBN-01	996	4	
SBN-02	998	2	
SBN-03	998	2	
SBN-04	997	3	
SBN-05	991	9	
SBN-06	997	3	
SBN-07	998	2	
SBN-08	999	1	
SBN-09	1000	0	
SBN-10	998	2	
Total		28	
SBN-11	998	2	
SBN-12	997	3	
SBN-13	999	1	
SBN-14	996	4	
SBN-15	997	3	
SBN-16	1000	0	
SBN-17	996	4	
SBN-18	996	4	
SBN-19	996	4	
SBN-20	994	6	
Total		31	
SBN-21	997	2	1
SBN-22	997	3	
SBN-23	995	4	1
SBN-24	997	3	
SBN-25	994	6	
SBN-26	999	1	
SBN-27	994	6	
SBN-28	999	1	
SBN-29	997	3	
SBN-30	989	10	1
Total		39	

表九. 各組微核細胞率檢核結果

組別	例數	微核細胞範圍 (個)	微核細胞率 $\bar{x} \pm s(\%)$	P
正常人組	10	0~9	2.800±2.440	
帶原者組	10	1~6	3.100±1.729	
慢性肝炎組	10	1~10	4.200±2.552	

The result is the same as the case on the above , "Not statistically significant" for $P > 0.05$

[Statistically significant for $P > 0.05 \Leftrightarrow$ difference between means > 1.65 S.D.]

表十. 各組微核細胞率檢測結果 (蔡, 中國大陸 1991)

組別	例數	微核細胞範圍 (個)	微核細胞率 $\bar{x} \pm s(\%)$	P
健康人	13	2~7	3.308±1.284	—
急性黃疸型肝炎	10	3~7	5.400±1.430	—
CAH	15	5~25	12.267±5.298	$< 0.01 \Delta$ $< 0.01 \blacktriangle$
肝硬化	8	4~30	12.375±8.551	$< 0.01 \Delta$ $< 0.01 \blacktriangle$
肝癌	9	11~54	19.444±13.324	$< 0.01 \Delta$ $< 0.01 \blacktriangle$

Δ 和急性黃疸型肝炎比較 \blacktriangle 和健康人比較 肝癌組與 CAH 及肝硬化組比較, P值均 < 0.05 。

附 錄

Cytogenetic Toxicity of Hepatitis B Virus Infections

Chin-Chung Huang , Ching-Chyuan Su , Huey-Wen Young ,
Shuan-Yow Li

Institute of Medicine, Cytogenetics Laboratory,
Chung Shan Medical and Dental College, Taichung,
Taiwan, Republic of China

Summary

As compared with serological markers, sister chromatid exchange, chromosomal break, and micronucleus to normal individuals, studied in cultured lymphocytes from 10 hepatitis B carriers and 10 chronic hepatitis B patients, the results showed that the frequency of chromatid breaks was significantly higher among chronic hepatitis B patients than among normal individuals, while the SCE and micronucleus revealed not statistically significant. Since chromatid break represented DNA-repair capacity, we can observe the influence of viral infection in chronic inflammatory process of hepatitis B.

Introduction

HBV infection is a serious world-wide problem, especially in the epidemic area of Taiwan, where the HB carrier occupied 15 ~ 20% of whole population (Song, 1989). More than 3 thousand people died for chronic hepatitis every year, and one tenth of carriers transfer to chronic inflammatory process in outcome. These suffered from chronic hepatitis B (CHB) but those didn't, the variability was worth investigating. That is why we research in a chromosomal level to evaluate the cytogenetic toxicity of HBV infection.

Viruses were reported to act as strong clastogens (Harnden 1974), like Rous sarcoma virus and SV-40 etc. For comparison with the induction of SCE and breakage, various data

were detected (Kato 1977, Brown & Crossen 1976, Sandberg 1977). When the diseased viruses were entering human body, an inflammatory reaction occurred, to produce oxygen free radicals, in consequence of gene damage which induced carcinogenesis, other diseases, and even aging (Wang, Cancer Biology 1990).

The phenomenon of micronucleus indicates an organic chromosomal injury, while any reason causes aberration of spindle formation or chromosomal breakage can induce the occurrence of micronucleus (Tsai, 1991, Hogstedt B. 1984, Heddle A. et al 1978, Miram P, German J. 1985).

Viral infection can cause DNA replication and metabolic disorder of host cells, then induce chromosomal aberrations. Cytogenetic methods can supply reasonably good estimates of defective DNA repair because chromosomes will show the DNA breakage induced by mutagens if there is no repair (Li, 1990). We treated cultures of peripheral lymphocytes from HB carriers, chronic hepatitis patients, and normal individuals. The present studies showed that breakage of CHB are more susceptible than normal controls.

Materials and methods

Cultured peripheral lymphocytes were used in 3 groups of sampling cases; normal individuals, HB carriers, and CHB. Ten subjects in each group. Totally 30 cases were studied via OPD of our medical department. Age distribution

was within 20 to 40 years old so as to avoid the age influence on chromosomal aberration. We took the fasting peripheral blood of each case to evaluate the liver functions and the serological markers of hepatitis B. The definition of each group was under the criteria of liver diseases by Sheila Sherlock & James Dooley(1993).

Sister chromatid exchange (SCE) estimation

Lymphocytes from patients and controls were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum, 2% PHA, and 1% PSN. Cells were harvested after 72h. BrdU(bromodeoxyuridine, Sigma) was present at 20 μ M for the final 48h. All cultures containing BrdU were kept in the dark to avoid photolysis of BrdU-containing DNA. Forty cells were analyzed for SCE frequency in each subject.

Chromatid breakage estimation

Lymphocytes were cultured for 96 hr. (M medium—without folic acid, thymidine, and hypoxanthine (GIBCO) but supplemented with 4.5% fetal calf serum, 1% PSN, and 2% PHA). Cultures were treated with bleomycin 30 μ g% , as indication of previous studies by Li 1990, for 5h. before cell harvest. During the last hour, the cells were treated with colcemid 0.05 μ g/ml to accumulate mitoses prior to harvest for conventional air-dried preparations. All slides were coded and stained with 10% Giemsa without banding. Each sample was microscopically scored with 100 random metaphases. Chromatid breaks were recored and pictures taken for all experiments . The frequency of chromatid breaks in each sample was expressed as breaks per cell(b/c) for ease of comparison.

Micronucleus estimation

Heparinized peripheral lymphocytes, added 2% PHA, cultured in RPMI-1640 medium for 44 h. then treated with cytochalasin B for 18 h. routinely harvested without adding colcemid, and fixed with methanolacetic acid solution, dripped to slides, dried and Giemsa stained, estimate the rate of micronuclei in 1000 binucleated cells.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the Mann-Whitney two-sample rank test and paired t-test.

Results

Table I shows the liver function tests and serological markers of hepatitis B of 3 different groups.

The frequency of sister chromatid exchange, lists as table II & III , showed the SCE /cell for 40 cells were 9.313 in normal individuals; 8.938 in HB carrier;and 7.963 in CHB. From the data on the above, it is easy to see that all the differences among the means are less than the corresponding standard deviation(S.D.). This imply that there is not statistically significant for $P > 0.05$. So, it seemes non-specific difference among the diseased livers and normal controls.

The results of micronucleus estimation lists as table IV , according to the rate of micronuclei in 1000 binucleated cells, revealed the occurrence rate [$\bar{x} \pm s(^{\circ}/_{\circ\circ})$] in 3 different groups are 2.800 \pm 2.440;3.100 \pm 1.729;and 4.200 \pm 2.552. The result is the same as the case of SCE estimation described above, not statistically significant for $P > 0.05$.(statistically significant for $P > 0.05 \longleftrightarrow$ difference between means > 1.65 S.D)

Finally, recordings on frequency of chromatid breaks per cell(b/c) in normal individuals, HB carriers, and CHB were listed as ta-

ble V . It is obviously to see a great deal of break increasing before and after treatment with bleomycin. In normal controls, 85/526; HB carriers, 110/1325; and CHB, 48/1526.

As compared with bleomycin (+) value, HB carriers showed 2.519 times than normal individuals(1325/526), and CHB group is 2.900(1526/526) times as compared with normal controls. Thereafter, statistical analysis was carried out using the Mann-Whitney two sample rank test and paired t-test(Table VI). There is no difference between HB carriers and normal individuals($P < 0.061$), but the group of chronic hepatitis patients has a statistical significance as compared with normal controls($P < 0.048$).

Discussion

Since Taylor first discovered the SCE phenomenon in 1958, substituted thymidine of DNA with BrdU (5-Bromodeoxyuridine) and tritium-thymidine (H^3 -thymidine) promoted the research of SCE Very fast. The SCE indicated DNA injuries, exchanged DNA replicating products at allelic, or crossing over during mitosis or meiosis. We are very easy to detect the mutagenic activity by means of SCE estimation . SCE closely related to DNA breakage, chromosomal aberration, cytotoxicity, frequency of gene mutation, cell transformation and carcinogenesis etc. Though the SCE detection is oftenly non-specific in various status, it is worth performing via its simplicity to observe the possibility of DNA injury . In our studies, no statistical significance of SCE estimation means there is no significant difference about the frequency of SCE occurrence among the subjects of 3 groups. The real relation between genetic toxicity and viral infection needs further investigation.

The micronucleus study revealed the same conclusion like the SCE consequence among the total 30 cases. Although we got a different result as compared with reports of Tsai in China mainland (1991), the method and procedure maintained routinely, after we check 3

more cases of hepatoma patients(Table VII). It could be explained the severity of CHB cases was extremely different between our 2 studies, which gained different data. The findings described in the present report have been leading our group to set out another further experiment for more cases.

About the chromatid breakage induced by bleomycin, the consequence was much satisfied and encouraged. 2.519x of HB carriers and 2.900x of CHB, explained statistically significant difference related to the DNA repair capacity between viral infections and normal controls. The poor capacity of DNA repair of HB carriers and CHB cases was coincident with the prognosis of the disease clinically. Maybe the malefic, circular and irreversible breaks of chromosome induce a deteriorating inflammatory reaction during the chronic progressive course. The individual difference of chromatid breakage among the subjects tells us the constitutional character is somewhat chromosomal etiology.

References

- [1] Bruce E. Wampold, Clifford J. Drew " Theory and Application of statistics " , 1990.
- [2] Evans H.J : 1982, " Sister chromatid exchanges and disease states in man in Sister chromatid exchanges (Woff S. ed.) " pp 183-228 John Wiley & Sons, Newyork.
- [3] Erich Gebhart " Sister chromatid exchange and Structural chromosomal aberration Mufagenicity Testing " , Hum Genet (1981) 58:235-254 .
- [4] Hogstedt B. " Micromuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. " mutat. Res. 1984 130:63.
- [5] Heddle A. et al " Sensitivity of five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. " Cancer Res. 1978, 38 : 9283

- [6] Jan Kun Yung " Sister chromatid differential staining (SCDS) " *Journal of Scientific development*, VOL.16, No.8, p.1109-1121. Taiwan.
- [7] Li, Shuan-Yow, " Differential bleomycin susceptibility in cultured lymphocytes of fragile X patients and normal individuals. " *Hum Genet* (1990) 85:267-271
- [8] Harnden D G (1974) " Viruses, chromosomes, and tumors : The interaction between viruses and chromosomes " In : German J(ed) *chromosomes and cancer*, Wiley and Sons, Newyork London Sidney.
- [9] Morag C. Timbury : *Medical Virology* 1991, p. 125-136
- [10] Miram P, German J " Evidence for chromosome instability in vivo in blood syndrome increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. " *Hum Genet* 1985 ; 71:187
- [11] Perry, P and H.J. Evans : 1975. " Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, " *Nature*, 258, 121-125
- [12] Schuer PJ. *Chronic hepatitis, in liver biopsy interpretation*, 4th edn. London Bailliere Tindall, 1988.
- [13] Sheila Sherlock & James Dooley : *Diseases of the Liver and Biliary System*, 9th edn. 1993.
- [14] Song, Zui-Lo " Hepatitis B viral infection, " *Taiwan medical journal*, VOL.30, No.10 p.933-937, 1988, Taiwan.
- [15] Suzuki Hiroshi " *Viral Hepatitis*, " 1981, p1-21, National Tokyo University Hospital.
- [16] Su Chin-Jan : *Medical Genetics*, 1979, p121-122 Taiwan.
- [17] Theodore Colton Sc. D. : *Statistics in Medicine* p.221-222.
- [18] Tsai, Huei-Fan " Detection & Clinical explanation of micronuclei in peripheral lymphocytes. " *China Medical Journal*, 1991, p289-290, China mainland.
- [19] Wang Tsao-Chung : *Cancer Biology*, 1990, Taiwan.

Table I .Liver function tests and serological markers of Hepatitis B of 30 cases

Male: 19 Female: 11

Age: 14-61 (average : 1174/30 = 39.133±10.225)

Nativity: all are Taiwanese

Date of sampling: 1992, 9. 1

<i>A. NORMAL INDIVIDUAL</i>													
NO	SGOT	SGPT	ALP ^x	T.B [*]	r-gt	AFP ^Δ	AGE	SCE/40 Cells	HbsAg	Anti-Hbs	HbeAg	Anti-Hbe	
°SBN-1	17	23	68	0.8	26	(-)	44	328/8.200	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-2	19	28	112	0.8	46	(-)	57	303/7.575	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-3	28	35	46	0.6	18	(-)	33	338/8.450	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-4	13	32	32	0.4	5	(-)	30	310/7.750	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-5	19	32	78	0.9	18	(-)	44	248/6.200	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-6	12	27	60	0.65	31	(-)	46	501/12.525	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-7	22	34	108	0.6	48	(-)	46	554/13.915	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-8	14	31	54	0.65	21	(-)	42	339/8.475	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-9	12	16	116	0.65	15	(-)	42	394/9.850	(-)	(-)	(-)	(-)	
SBN-10	13	14	62	0.8	7	(-)	38	405/10.125	(-)	(-)	(-)	(-)	
<i>B. HB CARRIER</i>													
SBN-11	23	49	86	0.9	17	(-)	20	203/5.075	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-12	21	15	88	0.6	11	(-)	37	467/11.675	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-13	33	38	90	1.0	21	(-)	42	208/5.200	(+)	(-)	(-)	(-)	
SBN-14	20	25	90	0.9	16	(-)	59	412/10.300	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-15	27	23	67	0.5	14	(-)	35	305/7.625	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-16	11	17	60	0.65	15	(-)	22	319/7.975	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-17	38	66	130	0.4	240	(-)	61	480/12.000	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-18	12	8	66	0.65	16	(-)	37	522/13.050	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-19	22	23	107	0.9	25	(-)	33	213/5.325	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-20	18	14	102	0.5	9	(-)	45	446/11.150	(+)	(-)	(+)	(-)	
<i>C. CHRONIC HEPATITIS</i>													
SBN-21	55	120	104	1.0	22	(-)	40	369/9.225	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-22	31	43	84	0.8	36	(-)	46	311/7.775	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-23	29	45	81	1.0	31	(-)	36	249/6.225	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-24	37	24	82	0.9	14	(-)	37	442/11.050	(+)	(-)	(-)	(+)	
SBN-25	35	43	56	1.2	5	(-)	33	290/7.250	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-26	42	82	65	0.7	63	(-)	32	401/10.025	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-27	35	56	78	0.7	16	(-)	41	293/7.325	(+)	(+)	(-)	(-)	
SBN-28	288	543	140	1.2	97	(-)	14	321/8.025	(+)	(-)	(+)	(-)	
SBN-29	28	56	68	0.8	27	(-)	41	246/6.150	(+)	(-)	(-)	(-)	
SBN-30	58	70	86	1.0	47	(-)	41	263/6.575	(+)	(-)	(-)	(-)	

x (ALP): Alkaline phosphatase * (T.B): Total bilirubin Δ (AFP): α-fetoprotein
 ° (SBN): SCE, Breakage & Micronucleus

Table II . Frequency of sister chromatid exchange (SCE) in normal individuals, HB carriers, and chronic Hepatitis B p't. Forty cells were analyzed for each subject

§ Normal individuals

Subjects	Chromosome groups								
	A	B	C	D	E	F	G	Total	
SBN-1	SCE	82	39	160	25	8	7	7	328
	SCE/cell	2.050	0.975	4.000	0.625	0.200	0.175	0.175	8.200
SBN-2	SCE	80	41	114	38	12	10	8	303
	SCE/cell	2.000	1.025	2.850	0.950	0.300	0.250	0.200	7.575
SBN-3	SCE	125	36	101	48	15	10	3	338
	SCE/cell	3.125	0.900	2.525	1.200	0.395	0.250	0.075	8.450
SBN-4	SCE	86	47	70	46	7	10	6	310
	SCE/cell	2.150	1.175	1.750	1.150	0.175	0.250	0.150	7.750
SBN-5	SCE	57	36	101	45	7	1	1	248
	SCE/cell	1.425	0.900	2.525	1.125	0.175	0.025	0.025	6.200
SBN-6	SCE	127	80	183	64	18	16	13	501
	SCE/cell	3.175	2.000	4.075	1.600	0.450	0.400	0.325	12.525
SBN-7	SCE	155	87	193	64	37	17	6	559
	SCE/cell	3.875	2.175	4.825	1.600	0.925	0.425	0.150	13.975
SBN-8	SCE	109	45	132	27	7	14	5	339
	SCE/cell	2.725	1.125	3.300	0.675	0.175	0.350	0.125	8.475
SBN-9	SCE	126	62	134	42	13	10	7	394
	SCE/cell	3.150	1.550	3.350	1.050	0.325	0.250	0.175	9.850
SBN-10	SCE	113	62	141	48	18	15	8	405
	SCE/cell	2.852	1.550	3.525	1.200	0.450	0.375	0.200	10.125
Total	SCE	1060±29.28	535±18.45	1329±38.40	447±13.00	142±9.130	110±4.78	64±3.204	3725±95.07
	SCE/cell	2.650	1.338	3.323	1.118	0.355	0.275	0.160	9.313

§ HB carrier

Subjects	Chromosome groups								
	A	B	C	D	E	F	G	Total	
SBN-11	SCE	58	22	92	22	5	3	1	203
	SCE/cell	1.450	0.550	2.300	0.550	0.125	0.075	0.025	5.075
SBN-12	SCE	123	59	191	48	18	9	7	467
	SCE/cell	3.075	1.475	4.775	1.200	0.450	0.225	0.175	11.675
SBN-13	SCE	64	30	89	32	1	0	2	208
	SCE/cell	1.600	0.750	2.225	0.800	0.025	0.000	0.050	5.200
SBN-14	SCE	120	47	162	56	11	11	5	412
	SCE/cell	3.000	1.175	4.050	1.400	0.275	0.275	0.125	10.300
SBN-15	SCE	80	32	129	43	14	4	3	305
	SCE/cell	2.000	0.800	3.225	1.075	0.350	0.100	0.075	7.625
SBN-16	SCE	87	56	115	40	8	6	7	319
	SCE/cell	2.175	1.400	2.875	1.000	0.200	0.150	0.175	7.975
SBN-17	SCE	107	50	139	52	12	4	9	480
	SCE/cell	2.675	1.250	3.475	1.300	0.300	0.100	0.225	12.000
SBN-18	SCE	143	71	210	54	19	13	12	522
	SCE/cell	3.575	1.775	5.250	1.350	0.475	0.325	0.300	13.050
SBN-19	SCE	50	19	87	40	7	5	5	213
	SCE/cell	1.250	0.475	2.175	1.000	0.175	0.125	0.125	5.325
SBN-20	SCE	129	61	162	50	22	15	7	446
	SCE/cell	3.225	1.525	4.050	1.250	0.550	0.375	0.175	11.150
Total	SCE	961±32.736	447±17.876	1376±43.298	437±10.646	117±6.667	70±4.807	58±3.327	3575±123.017
	SCE/cell	2.403	1.118	3.440	1.093	0.293	0.175	0.145	8.938

S.D : Standard deviation

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - n\bar{x}^2}{n-1}}$$

Table II . (Continued)*§ Chronic Hepatitis B*

Subjects	Chromosome groups								
	A	B	C	D	E	F	G	Total	
SBN-21	SCE	104	51	155	29	17	7	6	369
	SCE/cell	2.600	1.275	3.875	0.725	0.425	0.175	0.150	9.225
SBN-22	SCE	86	44	128	28	10	11	4	311
	SCE/cell	2.150	1.100	3.200	0.700	0.250	0.275	0.100	7.775
SBN-23	SCE	66	24	118	35	4	0	2	249
	SCE/cell	1.650	0.600	2.950	0.875	0.100	0.000	0.050	6.225
SBN-24	SCE	123	74	143	61	21	13	7	442
	SCE/cell	3.075	1.850	3.575	1.525	0.525	0.325	0.175	11.050
SBN-25	SCE	70	42	113	37	10	11	7	290
	SCE/cell	1.750	1.050	2.825	0.925	0.250	0.275	0.175	7.250
SBN-26	SCE	110	59	163	47	11	7	5	401
	SCE/cell	2.750	1.475	4.075	1.175	0.275	0.175	0.125	10.025
SBN-27	SCE	94	34	108	27	14	10	6	293
	SCE/cell	2.350	0.850	2.700	0.675	0.350	0.250	0.150	7.325
SBN-28	SCE	91	52	119	28	14	13	4	321
	SCE/cell	2.275	1.300	2.975	0.700	0.350	0.325	0.100	8.025
SBN-29	SCE	60	26	119	27	4	1	9	246
	SCE/cell	1.500	0.650	2.975	0.675	0.100	0.025	0.225	6.150
SBN-30	SCE	57	31	123	23	13	10	6	263
	SCE/cell	1.425	0.775	3.075	0.575	0.325	0.250	0.150	6.575
Total	SCE	861±22.437	437±15.755	1289±18.508	342±11.660	118±5.287	83±4.596	56±1.955	3185±66.081
	SCE/cell	2.153	1.093	3.223	0.855	0.295	0.208	0.140	7.963

Table III . Results of SCE estimation

Group	No.of cases	Total SCE (\pm SD)	SCE/cell
Normal individual	10	3,725 \pm 95.070	9.313
HB carrier	10	3,575 \pm 123.017	8.938
Chronic hepatitis	10	3,185 \pm 66.081	7.963

From the data on the above , it is easy to see that all the differences among the means are less than the corresponding standard deviation (S.D). This imply that there is not statistically significant for $P > 0.05$

Table IV . Results of micronucleus estimation

Group	No.of cases	Range of micronucleus	$\bar{x} \pm s$ (%)	P
Normal individual	10	0~9	2.800 \pm 2.440	
HB carrier	10	1~6	3.100 \pm 1.729	
Chronic hepatitis	10	1~10	4.200 \pm 2.552	

The result is the same as the case on the above , "Not statistically significant" for $P > 0.05$

[Statistically significant for $P > 0.05 \iff$ difference between means > 1.65 S.D]

TableIV . (continued) Micronucleus in 30 cases

	binucleated normal	binucleated with 1MN	2MN
SBN-01	996	4	
SBN-02	998	2	
SBN-03	998	2	
SBN-04	997	3	
SBN-05	991	9	
SBN-06	997	3	
SBN-07	998	2	
SBN-08	999	1	
SBN-09	1000	0	
SBN-10	998	2	
Total		28	
SBN-11	998	2	
SBN-12	997	3	
SBN-13	999	1	
SBN-14	996	4	
SBN-15	997	3	
SBN-16	1000	0	
SBN-17	996	4	
SBN-18	996	4	
SBN-19	996	4	
SBN-20	994	6	
Total		31	
SBN-21	997	2	1
SBN-22	997	3	
SBN-23	995	4	1
SBN-24	997	3	
SBN-25	994	6	
SBN-26	999	1	
SBN-27	994	6	
SBN-28	999	1	
SBN-29	997	3	
SBN-30	989	10	1
Total		39	

Table V . Recordings on frequency of chromatid breaks per cell (b/c) in normal individuals , HB carriers , and chronic hepatitis patients.^a

p't No.	M Medium		P-value ^c
	-Bleomycin ^b	+Bleomycin	
<i>Normal individual</i>			
SBN-01	4	20	d. P < 0.001
SBN-02	12	52	
SBN-03	10	53	
SBN-04	2	144	
SBN-05	1	29	
SBN-06	13	62	
SBN-07	18	60	
SBN-08	12	16	
SBN-09	10	58	
SBN-10	3	32	
Total	85	526	
<i>HB carrier</i>			
SBN-11	10	202	
SBN-12	7	79	
SBN-13	2	26	
SBN-14	8	184	
SBN-15	0	69	
SBN-16	3	257	
SBN-17	6	14	
SBN-18	3	144	
SBN-19	2	302	
SBN-20	69	48	
Total	110	1,325	

d. By Rank Sum Test , see **Table VI** .

Table V . (Continued)

<i>Chronic hepatitis</i>		
SBN-21	6	34
SBN-22	1	123
SBN-23	2	46
SBN-24	10	26
SBN-25	3	194
SBN-26	3	191
SBN-27	9	518
SBN-28	2	198
SBN-29	8	78
SBN-30	4	118
Total	48	1,526

P-value $P < 0.001$

- a. Each untreated or bleomycin-treated sample consisted of 100 metaphases so b/c was calculated by dividing the total number of breaks in a sample by 100.
 - b. - and + indicate the absence and the presence of bleomycin (30 $\mu\text{g/ml}$), respectively.
 - c. P-value based on the Mann-Whitney U-test among 3 groups of cases.
- * A treatment of 30 $\mu\text{g/ml}$ bleomycin for 5 hrs before cell harvest was the standard protocol for this study. as previous reports by Dr. Li (1990)

Table VI . By Mann-Whitney Test

(a)

$$\begin{aligned}
 T_1 &= 84.5 & N_1 = N_2 = 10 \\
 U_A &= N_1 N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - T_1 \\
 &= 100 + 55 - 84.5 \\
 &= 70.5 \\
 U_B &= N_1 N_2 - U_A \\
 &= 100 - 70.5 \\
 &= 29.5 \\
 U &= 29.5
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 E(U) &= 50 & V(U) &= \frac{100(21)}{12} = 175 \\
 Z &= \frac{29.5 - 50}{\sqrt{175}} & Z &= \frac{-20.5}{13.23} = -1.55 & \Rightarrow P < 0.061
 \end{aligned}$$

(b)

$$\begin{aligned}
 T_1 &= 83 & N_1 = N_2 = 10 \\
 U_A &= 72 \\
 U_B &= 28 & \Rightarrow U = 28 \\
 Z &= \frac{-22}{13.23} \\
 &= -1.66 & \Rightarrow P < 0.048
 \end{aligned}$$

* Mann-Whitney U test (The two-independent sample design)

$$\begin{aligned}
 U_A &= N_1 N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - T \\
 U_B &= N_1 N_2 - U_A \\
 E(U) &= \frac{N_1 N_2}{2} \\
 V(U) &= \frac{N_1 N_2 (N_1 + N_2 + 1)}{12} \\
 Z &= \frac{U - E(U)}{\sqrt{V(U)}} \\
 U &= \text{minimum of } U_A \text{ and } U_B
 \end{aligned}$$

Table VI . (Continued)

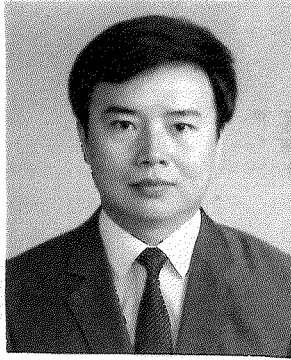
(a)				(b)			
Normal individual		HB carrier		Normal individual		Chronic Hepatitis	
20	3	202	18	20	2	34	5
50	7	79	13	52	7	123	14
53	8	26	4	53	8	46	6
144	15.5	184	17	144	16	26	3
29	5	69	12	29	4	194	18
62	11	257	19	62	11	191	17
60	10	14	1	60	10	518	20
16	2	144	15.5	16	1	198	19
58	9	302	20	58	9	78	12
132	14	48	6	132	15	118	13
84.5		125.5		83		127	

P > 0.05 " Not statistically significant" by Rank Sum Test.

Table VII . Break & Micronucleus of 3 cases of Hepatoma p't.

case	Break		micronucleus	
	-Bleomycin	+Bleomycin	Normal binucleated	1MN
1	6	31	997	3
2	3	122	1000	0
3	4	40	998	2

Totally the micronuclei of 3 cases were 1.666 ± 2.263 ; it was easy to see there was no statistical significance between a hepatoma p't and normal controls. (2.800 ± 2.440)



黃金仲醫師

Chin-Chung Huang MD.
& Master of Cytogenetics

台灣桃園人 1949年生

中山醫學院醫學系畢業

中山醫學院醫學研究所碩士班畢業

高等檢定考試律師類科及格

桃園地方法院檢察署特約法醫

少年法庭榮譽觀護人

桃園縣醫師公會監事

私立桃園救濟院、救國團張老師電話、

桃園家扶中心特約義診醫師

日本醫師會獎學金國立東京大學研修

衛生署社會服務績優醫師

家庭醫學會專科醫師

81年全國好人好事代表，榮獲八德獎

蒙李登輝總統、行政院長郝柏村接見

著有：

保健與自療法、完美醫生、病毒性肝

炎、杏園隨筆、病者有其醫等書