

R
008.8
0835

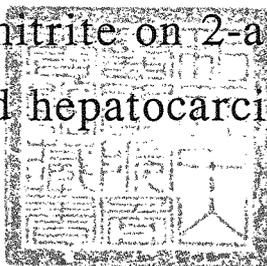
私立中山醫學院醫學研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Medicine,
Chung Shan Medical and Dental College

指導教授：李宣佑博士 (Shuan-Yow Li. PhD)

王朝鐘博士 (Chau-Jong Wang. PhD)

亞硝酸鹽對AAF在鼠體之基因毒性及致肝癌之影響

Effect of sodium nitrite on 2-acetylaminofluorene
genotoxicity and hepatocarcinogenesis in rats



研究生：許振東 (Jeng - Dong Hsu)

中華民國八十二年六月

June, 1993

中山醫學院圖書館



C023716

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審核合格,並口試通過。

考試委員

國立臺灣大學醫學院
生化研究所教授兼所長

林仁混 博士

林仁混

私立中山醫學院
醫學研究所教授兼所長
(本論文指導教授)

李宣佑 博士

李宣佑

私立中山醫學院
生物化學研究所教授兼所長
(本論文指導教授)

王朝鐘 博士

王朝鐘

誌謝

踏入研究所之前，個人很敬佩整天浸泡在實驗室的老師們；而在經過這三年的研究生涯之後，更敬佩他們終生無悔的研究工作。因為我覺得研究的工作實在是很漫長而辛苦的，只有等到有了收穫之後，才會有那一份成就的喜悅，否則只有承受實驗的失敗與痛苦。

三年來的研究生涯，終於有了一些成果；但是，要感謝的人實在太多了，有人是提供有形的幫助，也有是無形的鼓勵，更有人是在精神的引導。在此，我謹獻上我最虔誠的謝意，以表達十二萬分的謝忱。

首先要感謝是二位指導老師。李宣佑老師和王朝鐘老師提供實驗設備與材料，始得順利完成本論文的研究，謹此獻上無盡的謝意。這份師恩，如山之高，如水之長，永記在心。

在研究期間，並蒙生物科、細胞遺傳室和生化科的師長和同仁們，在實驗上的協助與指導；當然更要感謝科室同仁在多方面的大力鼎助，使得本論文如期完成排版及印稿的工作。

最後，要感謝愛妻的支持及體諒，以及小女和小犬的加油與鼓勵，讓我得以完成碩士學位。謹此論文獻給所有曾經幫助我和曾經關愛我的人。

縮 寫 表

- | | | |
|--------------|---|---------------------------------|
| 01. 2-AAF | : | 2-acetylaminofluorene |
| 02. N-OH-AAF | : | N-hydroxy-2-acetylaminofluorene |
| 03. N-NO-AAF | : | N-nitroso-2-acetylaminofluorene |
| 04. SCE | : | sister chromatid exchange |
| 05. BrdU | : | 5-bromodeoxyuridine |
| 06. PBS | : | phosphate buffered saline |
| 07. H & E | : | hematoxylin and eosin |
| 08. LPS | : | lipopolysaccharide |
| 09. AST | : | asparate aminotransferase (GOT) |
| 10. ALT | : | alanine aminotransferase (GPT) |
| 11. GGT | : | r-glutamyltranspeptidase |
| 12. HCC | : | hepatocellular carcinoma |
| 13. PHA-M | : | phytohemagglutinin M |
| 14. DMA | : | dimethylamine |
| 15. NDMA | : | nitrosodimethylamine |
| 16. G6Pase | : | glucose-6-phosphatase |
| 17. ATPase | : | adenosinetriphosphatase |

摘 要

2-Acetylaminofluorene (2-AAF) 加上 sodium nitrite, 在酸性狀態下, 經亞硝化作用產生 N-Nitroso-2-acetylaminofluorene (N-NO-AAF), 過去已經証實其基因毒性和致突變性比 2-AAF 更強。為了預測 N-NO-AAF 在體內之生成, 利用大白鼠同時餵食 AAF 和 NaNO_2 , 來觀察 NaNO_2 對 AAF 在姐妹染色分體交換和腫瘤生成之影響。因此本研究, 將 Wistar 雄性大白鼠分為 5 組: 第 1 組做為對照組, 第 2 組餵以含 0.3% NaNO_2 之飼料, 第 3 組餵以含 0.02% AAF 之飼料, 第 4 組餵以含 AAF+0.2% NaNO_2 之飼料和第 5 組餵以含 AAF+0.3% NaNO_2 之飼料, 為期 6 個月。

實驗結果發現第 3 組、第 4 組和第 5 組的 SCE 交換頻數都高於對照組, 而且都有顯著的差異 ($P < 0.05$); 然而第 4 組與第 5 組和 AAF 組作比較, 則無顯著的差異存在。另外, 在組織病理學方面, 這三組都有肝細胞癌之生成, 而且也發現相對肝臟重量的增加, 以及肝功能標記的上升。因此第 4 組的大白鼠, 在 AAF 加了 NaNO_2 之後和 AAF 組相比較, 有明顯增加腫瘤的大小以及增高血清中 GGT 和 AST 之作用; 但是第 5 組則沒有明顯的增強之作用。

我們認為, 同時餵食 NaNO_2 和 AAF 之後, 可以增加 SCE 交換的頻數, 而且也會誘發肝細胞癌之生成; 但是不同劑量的 NaNO_2 對 AAF 之肝癌生成為何有不同的影響, 則須要做進一步的研究與探討。

Abstract

2-Acetylaminofluorene (AAF) reacts in acidic conditions with nitrous fume yielding N-Nitroso-2-acetylaminofluorene (N-NO-AAF), as previously shown, to exert more genotoxic and mutagenic effects than its parent compound. To predict the endogenous formation of N-NO-AAF, the effects of sodium nitrite on sister-chromatid exchange and tumorigenicity of AAF in rats administered AAF and NaNO_2 were observed. For this study, male Wistar rats were divided into five groups: group I served as the control group; group II treated with NaNO_2 (0.3%); group III was given 0.02% AAF alone; group IV received both AAF and NaNO_2 (0.2%) and group V received both AAF and NaNO_2 (0.3%) in diet for 6 months.

At the end of the experiment, the SCE frequencies of group III, group IV and group V were significantly higher than the control group, but the frequencies were not significantly different among group III, group IV and group V. Additionally, nearly all rats in group III (6/6)

group IV (6/6) and group V (5/6) developed hepatocellular carcinoma in the histopathological examination. Those rats developed tumors were also shown combined with elevatin of relative liver weight, activities of hepatic function markers. The rats received the combination of AAF and NaNO_2 in diet (group IV) with significant enhancement of tumor size and higher activities of GGT and AST in serum compared with AAF treated group, but the group V was not significant enhancement of tumor size compared with AAF treated group.

We concluded that administration of sodium nitrite with AAF may increase the frequency of sister chromatid exchange and induce the formation of hepatocellular carcinoma, but the different effect between group IV and group V was significant for hepatocarcinogenesis. We must make an effort to further study.

目 錄

壹． 前言	1
貳． 材料與方法	
一． 實驗材料	4
二． 實驗動物之分組	5
三． 姐妹染色分體交換實驗	6
四． 酵素分析的方法	9
五． 組織切片	10
六． 鏡檢分類	11
七． 統計分析	13
參． 結果	
一． 姐妹染色分體交換	14
二． 大白鼠體重和肝臟重量的變化	16
三． 酵素分析	17
四． 組織病理學之觀察	17
肆． 討論	
第一節 各項實驗之研究限制	19
第二節 結果與討論	22
表	27
圖	32
參考文獻	43

壹. 前言

過去的研究報告發現，自然環境的食物中含有許多致癌的亞硝基化合物 (N-nitro compounds) (1,2)。同時有研究指出，這些致癌物可以在消化液的酸性狀態下，由於亞硝酸鹽 (nitrites) 和胺類 (amines) 的作用，而在體內形成亞硝酸胺 (nitrosamine)。如此，含有硝酸鹽和亞硝酸鹽的食物，可能是某些癌症的危險因子，尤其是胃和食道的癌症 (3,4)。事實上，已有報告證實亞硝酸胺能在動物的體內形成 (5,6)，並且有證據顯示在致癌物中同時添加亞硝酸鹽，能夠加強腫瘤形成的作用 (7-11)。

2-acetylaminofluorene (2-AAF) 就是屬於芳香胺的一種致癌物，在研究芳香胺 (arylamides and amines) 的代謝和致癌作用中，最常被使用做模型化合物 (model compounds) (12,13)。

2-AAF 在老鼠實驗中是一種有效的致癌物，而它主要的標的組織 (target tissue) 是雄性老鼠 (male rats) 的肝臟。它可以誘導老鼠的肝臟產生病灶 (foci)、新生性結節和肝細胞癌的病變。因此，2-AAF 經常被用來做為老鼠肝癌生成的致癌物 (14-17)。化學致癌物必須經由活化才有作用，而 2-AAF 被 cytochrome P-450 活化之後，形成 N-hydroxy-AAF 的中間產物，再經由數種不同的生化反應，諸如：氮-氫氧化 (N-hydroxylation)，硫酸鹽轉換 (sulfate transfer)，氮-氧-乙醯基轉換 (N-O-acetyl transfer)，去乙醯化 (deacetylation)，或單電子的氧化步驟 (1-electron oxidation step)，而形成

終極致癌反應的中間產物 (圖 1)。其中 N-OH-AF 可直接和 DNA 發生反應，產生 N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene，這也是鼠體加入 2-AAF 之後的主要產物 (圖 2) (18-22)。

台大醫學院的林教授將胺類藥物 phenacetin 轉變為 N-nitrosophenacetin，証實對 *Salmonella typhimurium* 有很高的致突變性，而且對雞胚胎也有很強的致畸變性 (23)。而有趣的是，AAF 和 phenacetin 在芳香環上，含有一個相同的 N-acetyl-amino group，因此假定經由 AAF 的亞硝化作用 (nitrosation) 應該可以產生一種新的亞硝基化合物。如所預期，林教授將 2-AAF 加 sodium nitrite，經亞硝化作用 (nitrosation) 之後，而得到 N-Nitroso-2-acetylaminofluorene (N-NO-AAF)，它是一種新的直接作用的致突變原 (mutagen) 和致畸胎原 (teratogen)，而且能和胺基酸、DNA 作用 (圖 3) (24)。N-NO-AAF 可以誘發 Chinese hamster ovary (CHO) 和 C3H10T 1/2 細胞的 DNA 單股的斷裂以及哇巴因-抗藥性 (ouabain resistance) 的突變 (25)。而 N-NO-AAF 也能高度地活化，以誘發 C3H10T 1/2 細胞 cycle-dependent 的轉形作用 (26)。2-AAF 在許多動物實驗及人類周邊血液實驗中，發現 SCE 交換頻數會增加 (27-33)。而在 Chinese hamster ovary cells 的實驗中，也發現 N-NO-AAF 會增加 SCE 的交換頻數 (34)。

本論文研究之目的在探討以 NaNO_2 與 AAF 同時餵食大白鼠之情況下， NaNO_2 對 AAF 所誘發之姐妹染色體交換頻率以及肝癌生成作用之影響。

實驗結果發現 AAF 組、AAF + NaNO_2 (0.2%) 組和 AAF + NaNO_2 (0.3%) 組的 SCE 平均值都高於對照組，而且有顯著差異；然而 AAF + NaNO_2 (0.2%) 組與 AAF + NaNO_2 (0.3%) 組和 AAF 組作比較，除了第四個月有顯著差異外，在第三、第五和第六個月則無顯著差異的存在。

在組織病理學方面，AAF 組、AAF + NaNO_2 (0.2%) 組和 AAF + NaNO_2 (0.3%) 組都有肝細胞癌的形成，然而 AAF + NaNO_2 (0.2%) 組和 AAF + NaNO_2 (0.3%) 組的肝細胞癌之組織形態分化和 AAF 組的表現相同，但是 AAF 在加了 NaNO_2 之後，低濃度的 NaNO_2 (0.2%) 有促進 AAF 之致癌作用，但高濃度 NaNO_2 (0.3%) 則稍微減輕 AAF 之作用。

貳. 材料與方法

一. 實驗材料

試藥名稱	購買廠牌
01. 2 - Acetylaminofluorene (AAF)	Sigma
02. Sodium nitrite (NaNO_2)	Ferak
03. 5 - Bromodeoxyuridine (BrdU)	Boehringer Mannheim
04. Hoechst 33258	Calbiochem
05. Colcemid	Sigma
06. Giemsa (dye)	E. Merck
07. Phosphate buffered saline (PBS)	
KH_2PO_4	E. Merck
K_2HPO_4	E. Merck
08. Hypotonic solution	
KCl	E. Merck
09. Fixer :	
methanol	E. Merck
acetic acid	E. Merck
10. Formalin 10%	Surgipath
11. Hematoxylin and Eosin stain	E. Merck
12. Alanine aminotransferase kit	E. Merck
13. Asparate aminotransferase kit	E. Merck
14. Gamma-glutamyl transpeptidase kit	Boehringer Mannheim

二. 實驗動物之分組

本研究選用的動物是體重 120-150 公克 Wistar 大白鼠，係購自台大醫院實驗動物中心，以 Purina Lab Chow 為飼料，蒸餾水不限制飲用。於實驗前一星期觀察其健康情形，選取健康者供其實驗使用，並每兩週量體重一次，為期 6 個月。

第一組：6 隻，對照組，只餵以普通飼料。

第二組：6 隻，餵以含 0.3% NaNO_2 普通飼料。

第三組：6 隻，餵以含 0.02% 2-AAF 飼料。

第四組：6 隻，餵以含 0.02% 2-AAF+0.2% NaNO_2 飼料。

第五組：6 隻，餵以含 0.02% 2-AAF+0.3% NaNO_2 飼料。

從第 3 個月起至第 6 個月止，共抽取頸靜脈血 4 次，做 SCE 的實驗分析，並在第 6 個月全數將大白鼠斷頭取血，分離血清後做酵素分析，並量肝臟重量以及詳細觀察肝臟形態的變化，所有內臟經由 10% 福馬林固定，做成石蠟切片，以 Hematoxylin - Eosin 染色，必要時另作特殊染色如：Masson's 染色，Mucicarmine 染色等，全部標本均做詳細的鏡檢。於實驗期間，若有大白鼠死亡，立即解剖做病理切片，以茲對照。

三. 姐妹染色分體交換實驗

姐妹染色分體交換 (sister chromatid exchange, SCE) 是一種發生在 DNA 層次上的現象, 為染色體在有絲分裂時, 四股 DNA, 亦即二個染色分體間產生交換 (exchange) 的情形 (35), 再利用 5-bromodeoxyuridine (BrdU) 取代 DNA 上的 thymidine 的技術 (36), 以及加上 Hoechst 33258 和 Giemsa 染色的方法 (37), 藉由 BrdU 的存在, 讓 DNA 複製二次, 來觀察細胞分裂中期的細胞, 而計算出 SCE 的交換頻數。據研究指出, 當細胞暴露在致突變物和致癌物的環境中, 時常會增加姐妹染色分體交換的次數 (38-40)。我們知道姐妹染色分體交換 (SCE) 可以表示正常 DNA 修復的一種型式, 而經各種不同物理和化學處理後, 也可以間接評估 DNA 損傷的可能性。因此, 目前它是偵測 DNA damage 的一種有效的方法 (41,42)。

(一) 姐妹染色分體交換 (SCE) (29,43)

1. 細胞培養:

- (01) 從大白鼠 (Wistar) 頸靜脈抽取 2ml 血液, 以 10ml PBS (Phosphate buffered saline) 洗滌 3 次, 離心後取淋巴球細胞層部分進行細胞培養。
- (02) 取無菌培養瓶, 加入 10ml 細胞培養液 RPMI 1640 (GIBCO), 此培養液內含有胎牛血清 (fetal calf serum) 10%, 抗生素 [Penicillin (10000 U/ml) 及 streptomycin (10 mg/ml)] 0.5%, 和 36 mg 的碳酸氫鈉 (NaHCO₃)。
- (03) 在培養瓶中加入 0.6 ml 的細胞分裂刺激素 Phytohemagglutinin M (PHA, GIBCO) 及 0.1 ml lipopolysaccharide (LPS, 50 ug/ml)。

- (04) 將 (1) 處理過的血液樣本，加 0.6 ml 於每一個培養瓶中。
- (05) 把培養瓶放入攝氏 37 度二氧化碳濃度 5% 之細胞培養箱內培養。
- (06) 細胞培養 24 小時之後，加入 0.1 ml 的 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU, 600 ug/ml)，使其最後濃度為 20 μ M；以黑袋子將培養瓶包住，避免見光，再放回細胞培養箱中繼續培養。
- (07) 細胞培養 60 小時後，加入 0.1 ml 秋水仙素 (Colcemid, 10ug/ml)，使其最後濃度為 0.1 ug/ml。
- (08) 細胞培養 62 小時左右，取出培養物，移到離心管內，以 1200 r.p.m. 速度，離心 8 分鐘。
- (09) 離心後，吸出上清液，混合留存之下層沉澱。
- (10) 加入 6 ml 氯化鉀低張溶液 (0.54% KCl)，立即用滴管均勻混合氯化鉀與沈澱物。
- (11) 靜置 15 分鐘後，以 1200 r.p.m. 速度離心 8 分鐘。
- (12) 離心後，吸出上清液，混合留存之下層沉澱。
- (13) 加入 6-8 ml 的固定液 (methanol : acetic acid = 3 : 1 v/v) 後，迅速混合均勻靜置 30 分鐘後，以 1200 r.p.m. 速度，離心 8 分鐘。
- (14) 離心後，吸出上清液，混合留存之下層沉澱。
- (15) 重覆 (13) - (14) 兩次，直到下層沈澱物呈白色，雜質減少即可。
- (16) 取出玻片，準備滴片。
- (17) 在最後一次離心完成後，依沈澱量多少，吸出多餘之上清液，留存 0.5-1 ml 之固定液。
- (18) 以適當距離滴片 (約 70 公分左右)，觀察滴片之結果，調整距離。每一管約滴 2-3 片滴完後置於玻片烘乾器 (slide warmer) 上烘乾。
- (19) 滴好的玻片，放置 2-3 天後再染色，效果較好。

2. 染色 (37) :

- (01) 將玻片浸泡在 Hoechst 33258 溶液 (2.5 mg/50 ml H₂O) 10 分鐘, 染缸必須以鋁箔紙密封, 以免曝光。
- (02) 以蒸餾水洗滌玻片, 滴數滴緩衝溶液, (0.16 M Sodium phosphate + 0.04 M Sodium citrate PH=6.8) 於玻片上, 蓋上蓋玻片, 於中午時間日曬 1.5 ~ 2 hrs。
- (03) 將載玻片浸泡在蒸餾水中, 使蓋玻片滑落, 再放在 65°C 的 2xSSC 中, 水浴 15 分鐘。
- (04) 水浴後, 將玻片浸於蒸餾水中, 除淨 2xSSC。
- (05) 再以 5% Giemsa 染色 10 分鐘, 風乾後, 即可以顯微鏡觀察結果。

3. 顯微鏡觀察及照相 :

- (01) 將染色過的玻片, 置於顯微鏡下, 先以低倍 (100-200x) 檢視, 找到分裂中期 (metaphase) 細胞後, 再轉至高倍 (400-1000x) 觀察, 以確定是否為第二次分裂中期 (metaphase II) 細胞。
- (02) 將底片 (Kodak Technical Pan ESTRA-AH Base) 裝入顯微鏡照相裝置內, 顯微鏡為西德 Zeiss 公司生產之 Axiophot 機型。
- (03) 找到 metaphase II 的細胞後, 檢視染色體數目是否 42 條, 染色對比是否清晰明顯, 一切符合條件後, 則記錄其編號, X 軸, Y 軸坐標, 然後照相。
- (04) 照完相後, 沖片並放大成 3 x 5 inches 大小之照片 (ILFORD), 以利於結果之判讀。

(二) SCE 判讀：

1. 每一組老鼠至少觀察 30 個染色對比清晰之第二次中期細胞，且每個細胞內染色體數目為 42 條，才列入計算。
2. 結果之判讀過程，判讀者皆不知道所判讀的細胞是屬於實驗組或對照組的研究對象，以避免偏差發生。
3. 每組的結果均由二名判讀者重覆判讀。
4. 兩個染色分體間對稱性的交換，計為發生兩次 SCE，染色分體間末端的交換，計為一次 SCE，染色分體間在中心粒部位的交換，則不列入 SCE 的計算 (圖 4)。

四. 酵素分析的方法 (44,45)

測定項目包括 Bilirubin (BUN), Creatinine (CRE) 以及肝功能診斷酵素包括 Asparate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), γ -Glutamyl transpeptidase (GGT) 做為急性肝毒性的分析指標，轉胺酵素的測定 (AST, ALT) 係根據 Reitman - Frankel 方法，將血清加入含 α -ketoglutaric acid 及 asparate (或 alanine) 之緩衝液中反應，形成 oxaloacetic acid (或 pyruvic acid) 然後與 dinitrophenylhydrazine 反應呈色，在 546 nm 下測其吸光。GGT 的活性則根據 Persijin 方法，將血清與 L-gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 及受質 glycylglycine 反應，行成 5-amino-2-nitro-benzoate 然後在 405 nm 比色。

五. 組織切片 (46)

方法：解剖之後，取出大白鼠之肝臟，以 10% 福馬林固定 24 小時，經酒精脫水，包埋後，做成石蠟塊，薄切成 4-6 μm 的組織切片，再進行 H & E stain。

01. H & E stain：脫蠟後，以蘇木紫溶液 (Hematoxylin) 染 2-15 min (時間可長可短視蘇木紫溶液之不同而各異)。
02. 水洗。
03. 以 0.5% HCl 行分辨染色色度之，約 1-5 sec。(若用不必分辨染色度蘇木紫溶液，此一步驟可省略) 然後水洗數分鐘。
04. 浸入氫水 (水 1000ml 中，滴濃氫水兩滴) 至組織呈美麗藍色，約需數秒。
05. 流水中沖洗，至少 15min (若沖洗過夜 4 項可省略)。
06. 染以 0.5% Eosin Y 溶液，數秒至兩分鐘。
07. 依次通過 80%, 90%, 95% alcohol。
08. 移入 100% 酒精，二甲苯 - 100% 酒精 (1:1)，二甲苯 - 木餾油 (4:1)，二甲苯 (I)，二甲苯 (II) 各半分鐘。
09. 以二甲苯使之透明。
10. 封蓋，以顯微鏡觀察，並照像。



六. 鏡檢分類 (47-50)

主要根據 The Rat Liver Tumor Workshop 之報告

1. 變異肝細胞病灶 (Foci of cellular alteration)
 - (1) 亮細胞病灶 (Clear cell foci)
 - (2) 嗜酸性細胞或毛玻璃樣病灶 (Eosinophilic or ground glass foci)
 - (3) 嗜鹼性細胞病灶 (Basophilic foci)
 - (4) 混合細胞病灶 (Mixed cell foci)

病灶是小於一個肝小葉 (lobule) 大小的病變，其主要的變化在於細胞質的色質和構造的外觀；肝臟的結構沒有明顯的散開，受影響的肝細胞板和周圍的肝細胞互相合併，而沒有明顯的界限存在。受影響的肝細胞可能比正常的肝細胞大或小，而且細胞核可能增大或濃染，而且含有大的核仁。嗜酸性細胞病灶通常是細胞質量的增加，而造成整個細胞的增大。嗜鹼性細胞病灶含有嗜鹼性的細胞質，細胞大小比正常的肝細胞大或小。而亮細胞通常是正常的大小或稍微腫大。一般認為嗜鹼性細胞病灶和腫瘤之生成，比其它的變異細胞病灶有明顯的相關。同時也認為病灶在細胞學上的表現和新生性結節細胞的組成相同，因此病灶很可能進一步形成為新生性結節。

2. 新生性結節 (Neoplastic Nodule)

一般新生性結節為球形的病變，經常大於好幾個肝小葉，在結節內正常的肝臟結構會消失，其內的肝細胞由嗜酸性細胞或亮細胞所組成，而嗜鹼性細胞較為少見；細胞大小不一，細胞核腫大而濃染，而且有明顯的核仁，有時可出現有絲分裂的現象。肝竇可能變窄或變寬，肝細胞板由一層以上厚度的肝細胞所組成，其排列不規則，同時會壓迫周圍的肝細胞而有明顯的界限。在動物之致癌生成的實驗中，這種新生性結節是增殖性的病變，它們的出現顯示肝細胞癌生成的可能性會增加。

3. 肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma)

- (1) 良好分化 (well differentiated)
- (2) 中等分化 (moderately differentiated)
- (3) 不良分化 (poorly differentiated)
- (4) 有腺狀的或乳頭狀的形成 (with glandular and/or papillary formation)

肝細胞癌通常被認為是比新生性結節更大而且更不規則的病變，它們可以侵犯肝葉的主要部份，也會壓迫或侵入周圍正常的肝實質細胞。小樑樣的肝細胞癌很像正常的肝臟的構造，可以區分為良好到不良的分化；腫瘤細胞含一層以上細胞的厚度，呈寬的塊狀或板狀，另外有一種組織變異型的肝細胞癌，含有明顯的腺狀或乳頭狀的構造，很像腺癌 (adenocarcinoma)。

4. 膽管纖維化 (Cholangiofibrosis)

這種病變的特徵是膽管明顯的增生，帶有極緻密的纖維間質；而管腔腫大充有漿液物質。這種病變常見於以 4-dimethyl-aminoazobenzene (DAB) 或 2-acetylaminofluorene (2-AAF) 等致癌物餵食老鼠的肝臟之中。

七. 統計分析 (51,52)

1. 由於姐妹染色分體交換頻數在本研究樣本之分佈情形，經常態性檢定 (testing for normality) 之後，發現並非全部呈常態分佈，因此在比較各組的差異時，使用無母數統計的 Wilcoxon rank sum test 來進行分析， α 值設定為 0.05。
2. 生化值的數據方面，在比較各組時只考慮是否有差異性，所以採用 t-test 來進行分析。

參 . 結 果

一 . 姐妹染色分體交換

如表 1 所示，第 3 個月對照組 SCE 的平均值為 8.97，而 NaNO_2 組 SCE 的平均值為 8.80；兩組之間沒有顯著差異 ($P=0.9822$)。而 AAF 組 SCE 的平均值為 12.40，AAF+ NaNO_2 (0.2%) 組 SCE 的平均值為 12.40，AAF+ NaNO_2 (0.3%) 組 SCE 的平均值為 11.97；三組的平均值都有增加，其交換頻數顯著高於對照組， P 值各為 0.0010、0.0054 和 0.0082，都小於 0.05，皆有顯著差異。然而後兩組和 AAF 組之間則無顯著差異， P 值各為 0.6297 和 0.4403，皆大於 0.05。

第 4 個月對照組 SCE 的平均值為 8.37，而 NaNO_2 組 SCE 的平均值為 8.80；兩組之間沒有顯著差異 ($P=0.6667$)。而 AAF 組 SCE 的平均值為 13.40，AAF+ NaNO_2 (0.2%) 組 SCE 平均值為 10.63，AAF+ NaNO_2 (0.3%) 組 SCE 的平均值為 11.10；三組的交換頻數顯著高於對照組， P 值各為 0.0002、0.0194 和 0.0365，都小於 0.05，皆有顯著差異。然而後兩組和 AAF 組作比較也有顯著差異， P 值各為 0.0223 和 0.0478，都小於 0.05。

第 5 個月對照組 SCE 的平均值為 9.23，而 NaNO_2 組 SCE 的平均值為 9.53；兩組之間沒有顯著差異 ($P=0.8172$)。而 AAF 組 SCE 的平均值為 13.33，AAF+ NaNO_2 (0.2%) 組 SCE 的平均值為 13.90，AAF+ NaNO_2 (0.3%) 組 SCE 的平均值為 14.37；三組的交換頻數顯著高於對照組，P 值皆為 0.0001，小於 0.05，有顯著差異。然而後兩組和 AAF 組之間則無顯著差異，P 值各為 0.7091 和 0.5477，皆大於 0.05。

第 6 個月對照組 SCE 的平均值為 9.33，而 NaNO_2 組 SCE 的平均值為 8.53；兩組之間沒有顯著差異 ($P=0.3490$)。而 AAF 組 SCE 的平均值為 14.57，AAF+ NaNO_2 (0.2%) 組 SCE 的平均值為 14.23，AAF+ NaNO_2 (0.3%) 組 SCE 的平均值為 14.53；三組的交換頻數顯著高於對照組，P 值各為 0.0001、0.0003 和 0.0001。然而後兩組和 AAF 組之間則無顯著差異，P 值各為 0.8241 和 0.7055，都大於 0.05。

對照組和 NaNO_2 組 SCE 的平均值從第 3 個月至第 6 個月沒有顯著的增加，而且每個月之間也沒有顯著差異存在 ($P>0.05$)。

AAF 組 SCE 的平均值從第 3 個月的 12.40 至第 6 個月的 14.57，雖然有些增加，但是每個月之間仍是沒有顯著的差異存在 ($P>0.05$)。

AAF+NaNO₂ (0.2%) 組第 4 個月 SCE 的平均值為 10.63, 從第 5 個月 SCE 的平均值為 13.90, 第 6 個月 SCE 的平均值為 14.23; 顯示在後兩個月時 SCE 的平均值有增加, 而且後兩個月的 SCE 平均值和第 4 個月之間有顯著的差異存在 (P<0.05)。

AAF+NaNO₂ (0.3%) 組第 4 個月 SCE 的平均值為 11.10, 從第 5 個月 SCE 的平均值為 14.37, 第 6 個月 SCE 的平均值為 14.53; 顯示在後兩個月時 SCE 的平均值有增加, 而且後兩個月的 SCE 平均值和第 4 個月之間有顯著的差異存在 (P<0.05)。

二. 大白鼠體重和肝臟重量的變化

如圖 5 所示, 除了 AAF 組和 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組在第 4 個月後有體重減輕的現象之外, 另外三組則有體重增加的現象。在大白鼠體重變化方面, NaNO₂ 組與 AAF 組和對照組之間有顯著差異 (P<0.001)。而 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組與 AAF+NaNO₂ (0.3%) 組和 AAF 組之間則無顯著差異存在。圖 6 表示各組相對肝臟重量的比例關係。如表 2 所示, 對照組相對肝臟的重量平均值為 2.65, NaNO₂ 組的平均值為 2.29, 兩組之間有顯著差異 (P<0.001), 而 AAF 組的平均值為 10.58, 和對照組之間有顯著差異 (P<0.001)。AAF+NaNO₂ (0.2%) 組相對肝臟的重量平均值最高, 為 17.96, 和 AAF 組比較, 顯然有明顯增加, 而且兩組有顯著差異 (P<0.05)。然而 AAF+NaNO₂ (0.3%) 組的平均值為 6.08, 和 AAF 組相比較, 顯然有減輕的現象, 而且兩組有顯著差異 (P<0.001)。

三． 酵 素 分 析

如表 3 所示，BUN 和 CRE 在各組之間沒有顯著的差異存在。而表 4，顯示 AST 在各組間也沒有統計上的意義。在 ALT 方面，AAF 組和對照組有顯著差異 ($P < 0.001$)；AAF+NaNO₂ (0.3%) 組和 AAF 組之間也有顯著差異 ($P < 0.005$)。在 GGT 方面，AAF 組和對照組之間有顯著差異 ($P < 0.001$)；AAF+NaNO₂ (0.3%) 組和 AAF 組之間也有顯著差異 ($P < 0.05$)。

四． 組 織 病 理 學 之 觀 察

1． 肉 眼 病 灶 檢 視

從表 5 所示，對照組和 NaNO₂ 組的肝臟皆呈正常之外觀；其餘三組的肝臟幾乎都有結節樣的外觀，切面下呈灰白色的多發性結節 (圖 7)，較大的肝癌則可發現明顯的出血和壞死的現象。另外同時可以見到有一些囊狀的病變；切開之後，內含淡綠色像膽汁樣的水狀液體。

2． 組 織 病 理 之 觀 察

從表 5 所示，AAF 組、AAF+NaNO₂ (0.2%) 組和 AAF+NaNO₂ (0.3%) 組都含有病灶 (foci)、新生性結節 (neoplastic nodule) 和肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) 的病變。大部分的病灶和新生性結節皆由嗜酸性細胞所組成 (圖 8)，有的則由亮細胞所組成 (圖 9)，嗜鹼性細胞則較少見。而肝細胞癌則大部分為分化良好

的癌細胞，極似正常肝細胞。核大而圓，細胞質多而呈粒狀嗜伊紅性，往往排成小樑樣的形狀（圖10）；有的則呈腺狀構造（圖11），經 mucicarmine 染色，呈陽性反應。少部分為分化不良的肝細胞癌，排列較不規則，小樑構造很難分辨，癌細胞大小也較不一致，有時可見到許多不正常的核分裂（圖12），甚至有巨大的多核性癌細胞（圖13）。同時這三組也伴有膽管擴張和膽管纖維化（cholangiofibrosis）的現象（圖14），經 Masson's 染色，呈陽性反應，顯示膽管周圍組織有明顯的纖維化。

AAF 組中有 4 隻先後在第 5 個月死亡，經解剖之後，發現都有肝細胞癌的形成。其中的一隻在口腔左側頰部發現有一灰白色腫瘤，經切片下証實為鱗狀上皮癌（圖15），並非肝細胞癌之轉移。

AAF+NaNO₂ (0.2%) 組中有一隻死於第 3 個月，經解剖之後，只發現有新生性結節，而無肝細胞癌的發現。另外一隻死於第 4 個月，經解剖後，則發現有肝細胞癌的形成；並且在腹膜有許多小結節，經切片下証實為肝細胞癌的轉移（圖16）。

AAF+NaNO₂ (0.3%) 組全部 6 隻養到第 6 個月，解剖後只發現 5 隻有肝細胞癌的形成。

肆. 討論

第一節 各項實驗之研究限制

一. 姐妹染色分體交換實驗之研究限制

1. 樣本數：

由於姐妹染色分體交換實驗相當花時間及精神，從第三個月起至第六個月止，每個月抽取大白鼠的頸靜脈血，以觀察每個月其 SCE 的變化。而本實驗共分 5 組，每組有 6 隻大白鼠，共計有 30 隻，其樣本數不多；而且 SCE 交換頻數在本研究樣本分佈情形，經常態性檢定之後，發現每一組並非呈常態分佈，因此在比較各組之間的差異時，採用無母數統計的 Wilcoxon rank sum test 來進行分析，以避免樣本有非常態分佈之問題。

2. 細胞數：

本實驗每組至少數 30 個染色對比清晰之第二次中期細胞，是否足以表示該組大白鼠 SCE 的情形，值得加以探討。

3. 染色體數目：

在每個月的 SCE 的研究，常可以見到染色體數目之異常的情形發生，而且愈到最後（尤其在第 6 個月），其染色體數目之異常愈多，可能是癌症之生成而造成染色體數目的異常。不過，本研究之細胞染色體數目，皆一律觀察 42 條的染色體，才列入計算；因此所造成之誤差是微乎其微。

4. 血液樣本：

血液樣本是否足以表示大白鼠的 SCE 情形，值得加以探討。我們也有直接從 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組中的一隻大白鼠，做肝癌細胞的純化，試圖建立肝癌細胞株，以觀察其 SCE 的情形；但是由於人力及時間的限制，有待做進一步的研究及分析，也許能更直接探討肝細胞癌與 SCE 交換頻數之間的關係。

二. 酵素分析之研究限制

1. 樣本數：

由於肝功能試驗是在第 6 個月將大白鼠殺死的同時取血，因此每個實驗組若有大白鼠死亡時，將會影響試驗的數值；如 AAF 組到第 6 個月時只剩下 2 隻，而 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組到第 6 個月時剩下 4 隻。另外三組的大白鼠則完全存活到第 6 個月時才給予殺死。

2. 試驗方法：

一般肝功能試驗的方法是針對人類而設計，因此，以大白鼠的血液去做各項的檢查時，其生化值可能會有些偏差，但是由於我們是以各實驗組的生化值數據和對照組作比較，看看是否有統計上的意義而已，所以可能不會造成很大的誤差。

三．組織病理學之研究限制

1．樣本數：

由於組織病理所取的樣本是大白鼠的內臟器官，而且也可以在死後馬上採取內臟用 10% 福馬林來固定，所以不像肝功能試驗會影響樣本數，但是對於實驗組中大白鼠肝細胞癌形成的隻數，可能多少有一些影響；如 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組有 1 隻死於第 3 個月，經解剖之後，只發現有新生性結節，而無肝細胞癌的形成。

2．致癌過程：

組織病理只能觀察到病灶、新生性結節和肝細胞癌形成的結果，而沒有辦法觀察到以上病變形成的過程。因此，我們無法探討實驗組中那一組先有病變的形成；但是，有一點我們可以知道，大部分大白鼠在實驗中的死亡都和肝細胞癌的形成有關；如 AAF 組中有 4 隻先後在第 5 個月死亡，經解剖之後，都有肝細胞癌的形成。而 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組有 1 隻死於第 4 個月，經解剖之後，也有肝細胞癌的形成。

第二節 結果討論

一. 姐妹染色分體交換

雖然致癌物作用的危險位置 (critical site) 仍是未知，但是很可能是肇始於基因物質的改變而造成腫瘤的形成。大多數的致癌物，如 2-AAF，可以造成基因損傷；並且可以在分裂中期觀察到染色體的異常和姐妹染色分體交換 (SCE) 的現象。過去的報告指出，2-AAF 在動物實驗及人類的周邊血液中，可以增加 SCE 交換的頻數 (27-33)。而本實驗也證明從第 3 個月至第 6 個月 AAF 的 SCE 均高於對照組，而且有顯著的差異 ($P < 0.05$)，雖然體外合成的 N-NO-AAF 是一種直接作用的致突變原，而且其致癌毒性比 2-AAF 更強，也增加 SCE 的交換頻數 (24, 26, 34)。而 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組和 AAF+NaNO₂ (0.3%) 組的 SCE 平均值也高於對照組，而且也有顯著的差異 ($P < 0.05$)。然而 AAF+NaNO₂ (0.2%) 組與 AAF+NaNO₂ (0.3%) 組和 AAF 組作比較，除了第 4 個月有顯著差異之外，在第 3、5、6 個月則無顯著差異的存在。而第 4 個月的 AAF+NaNO₂ (0.3%) 組和 AAF 組之間剛好介於統計顯著性的邊緣 ($P = 0.0478$)。

因此，很顯然地可以看出 2-AAF 在加了不同濃度的 NaNO₂ 之後，和 2-AAF 相比較並沒有明顯增加 SCE 交換頻數，而且也沒有顯著差異。

Giri 在最近的研究報告 (53) 中指出兩種食物染料 Indigo carmine 和 Fast green 都可以增加 mice 骨髓細胞 SCE 的交換頻數，但是在加了 NaNO_2 之後卻降低了 SCE 的交換頻數，顯示這兩種染料和 NaNO_2 在 SCE 的表現有拮抗的反應 (antagonistic response)。也許 AAF 和 NaNO_2 在體內合成時，在胃部酸性的條件下，也有拮抗的反應，而沒有明顯增加 SCE 的交換頻數，至於是否如此，則有待進一步的研究與探討。

二. 大白鼠體重和肝臟重量的變化

AAF 組和 AAF+ NaNO_2 (0.2%) 組在第 4 個月後體重有減輕的現象，可能和肝細胞癌的形成有關；由於此時肝細胞癌可能已經形成，而造成大白鼠瘦弱的體質，以致於大白鼠體重有逐漸減輕之現象。然而 AAF+ NaNO_2 (0.3%) 組在解剖時，發現肝臟的腫瘤並不如上述兩組那樣大，表示腫瘤的形成較慢，因此這組大白鼠的體重無減輕的現象。

至於相對肝臟重量方面，以 AAF+ NaNO_2 (0.2%) 組的平均值最高，為 17.96，和 AAF 組的 10.58 相比較，顯然有明顯的增加，而且兩組之間有顯著的差異 ($P < 0.05$)。因此低濃度的 NaNO_2 (0.2%) 對 AAF 之致癌有促進之作用。然而 AAF+ NaNO_2 (0.3%) 組的平均值為 6.08，和 AAF 組相比較，則有降低的現象，而且兩組之間有顯著的差異 ($P < 0.001$)。因此高濃度的 NaNO_2 (0.3%) 對 AAF 之致癌有減輕之作用。

三． 酵素分析的變化

- 1 . BUN : 是肝臟新陳代謝的產物，當肝細胞有病變時或膽管發生阻塞時，BUN 時常會逆流進入血液中，而導致黃疸的發生，造成檢驗數值的增高。但是在本實驗中，在各組之間沒有顯著差異的存在。
- 2 . CRE : 用於顯示腎臟腎絲球的過濾速度，可以檢定腎臟的功能。但是在本實驗中，在各組之間沒有顯著差異的存在。
- 3 . AST : 亦即 GOT，和 ALT 同為測量肝細胞受損的指標 (54,55)。不過，AST 除了存在於肝臟中之外，也存在於腦部、心臟及血管等器官或細胞；因此，AST 的數值偏高時，表示這些部位有可能發生病變。但是在本實驗中，在各組之間沒有顯著差異的存在。
- 4 . ALT : 亦即 GPT，它主要存在於肝細胞中，當肝臟受到傷害時，ALT 就會釋放到血液中。在本實驗中，AAF 組和對照組有顯著差異 ($P < 0.001$)，顯示在肝細胞癌形成時，對於周圍正常肝細胞的壓迫，而造成 ALT 數值的上升。在添加 NaNO_2 及 AAF 之組其 ALT 比單獨 AAF 處理組有顯著上升 ($P < 0.05$)。
- 5 . GGT : 是一種肝、膽分泌的酵素，可做為診斷肝細胞癌早期病變的指標 (56-58)，在肝細胞變性或有損傷時，這種酵素也會上升 (59,60)。而在本實驗中，AAF 組和對照組有顯著差異 ($P < 0.001$)，顯示在肝細胞癌形成時，對於周圍正常肝細胞的損傷，而造成 GGT 數值的上升。

四．組織病理學之探討

對照組和 NaNO_2 組的肝臟皆呈正常的外觀，而且在鏡下也顯示正常之肝小葉的構造。而 Mereto 等 (61) 在最近的研究報告中指出，單獨給予 NaNO_2 時，老鼠的肝臟在使用組織生化標記 GGT, ATPase 和 G6Pase 的染色下，可見病灶 (foci) 的出現；可能因為本實驗所使用的劑量較低的緣故，所以沒有病灶的發生。

AAF 組、AAF+ NaNO_2 (0.2%) 組和 AAF+ NaNO_2 (0.3%) 組的大白鼠都含有病灶、新生性結節和肝細胞癌的病變。Teebor 和 Becker (62) 利用 2-AAF 來誘導老鼠肝臟產生病灶和新生性結節；而新生性結節是肝細胞癌的早期病變 (48,63,64)，因此這三組有肝細胞癌的肝臟都全部合併有新生性結節。組成新生性結節的肝細胞，三組之中以嗜酸性細胞最多，其次是亮細胞，而嗜鹼性細胞最少，和 Peraino 等 (65,66) 的報告相同。而 Bannasch (63) 和 Willams 等 (67) 則指出，當新生性結節欲形成肝細胞癌之前，其肝細胞之組成由嗜酸性細胞和亮細胞逐漸減少，而嗜鹼性細胞則逐漸增加，而本實驗之中，這三組所見的病變其組織形態分化也是如此。但是，AAF 在加了 NaNO_2 之後，低濃度的 NaNO_2 (0.2%) 有促進 AAF 之致癌作用；其肝癌形成之後肝臟重量的平均值最高。然而高濃度的 NaNO_2 (0.3%) 則有減輕 AAF 之致癌作用；其肝癌形成之後肝臟重量的平

均值卻低於 AAF 組。誠如林教授最近的一篇報告指出，老鼠的胃並不像人類，並非是處在酸性的狀態；因此，採用餵食的方式，DMA (dimethylamine) 能否高度的發生亞硝化作用仍是未知的 (68)。所以很顯然的，在餵食 0.19% DMA 和 0.3% NaNO_2 之後，並不能在肝臟組織中產生足以誘發肝細胞癌之 NDMA (nitrosodimethylamine) 的濃度。也許，AAF 和 DMA 的情形也是相同，在大白鼠的胃中並不能高度的發生亞硝化作用；但是，因為 AAF 本身就有致癌生成之作用，所以在加了不同濃度的 NaNO_2 之後，仍有肝細胞癌之生成。另外一個可能原因是誘發肝癌時間太長，在末期所見的結果已是沒有差別的肝癌現象，若能提早在早期觀察肝癌化現象（如用 γ - GT foci 等），或許能看出 NaNO_2 +AAF 組與 AAF 單獨處理組之差別。只是，我們無法了解，不同濃度的 NaNO_2 會造成不同的結果，是否高濃度的 NaNO_2 和 AAF 有拮抗作用，而減少肝癌形成的數目及大小，至於是否如此，則有待深入的研究。

Table 1. Data on sister chromatid exchanges induced by NaNO₂ and AAF with or without NaNO₂ in peripheral lymphocytes of rats.

Treatment ^a	SCEs / cell (Mean ± S.D.) ^b			
	third month	fourth month	fifth month	sixth month
Control	8.97 ± 3.74	8.37 ± 3.87	9.23 ± 3.23	9.33 ± 3.21
NaNO ₂ (0.3%)	8.80 ± 3.49	8.80 ± 3.25	9.53 ± 3.50	8.53 ± 3.27
AAF (0.02%)	12.40 ± 4.08*	13.40 ± 5.01*	13.33 ± 4.11*	14.87 ± 5.69*
AAF + NaNO ₂ (0.2%)	12.40 ± 5.01*	10.63 ± 2.87*#	13.90 ± 3.55*	14.23 ± 5.22*
AAF + NaNO ₂ (0.3%)	11.97 ± 4.57*	11.10 ± 4.58*#	14.37 ± 4.84*	14.53 ± 5.04*

a. In these experiment, control rats were on synthetic basal diet while experimental rats received the AAF with or without NaNO₂ in the diet for 6 months.

b. Mean ± S.D. of six animals (30 cells / animals)

*, P < 0.05 compared with control group.

#, P < 0.05 compared with AAF treated group.

Table 2. Effect of NaNO₂ on relative liver weight , body weight and mortality in AAF-treated rats.

Treatment ^a	Relative liver wt. ^b	% of body wt. change ^c	Mortality
Control	2.65 ± 0.06 ^d	270 ± 17	0 / 6
NaNO ₂ (0.3%)	2.29 ± 0.07*	178 ± 12*	0 / 6
AAF (0.02%)	10.58 ± 0.68*	136 ± 36*	4 / 6
AAF + NaNO ₂ (0.2%)	17.96 ± 3.46#	142 ± 26	2 / 6
AAF + NaNO ₂ (0.3%)	6.08 ± 0.47##	175 ± 18	0 / 6

a. In these experiment, control rats were on synthetic basal diet while experimental rats received the AAF with or without NaNO₂ in the diet for 6 months.

b. Relative liver wt. = (liver wt./body wt.) x 100%.

c. % of body wt. change = [(final wt. - initial wt.) / initial wt.] x 100%

d. Mean ± SD ; see mortality for n value.

*. P < 0.001 compared with control group.

#. P < 0.05, ## P < 0.001 compared with AAF treated group.

Table 3. Effect of NaNO₂ on the level of serum BUN and CRE in AAF-treated rats.

Treatment ^a	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)
Control	21.5 ± 0.6 ^b	0.63 ± 0.04
NaNO ₂ (0.3%)	18.7 ± 0.6	0.57 ± 0.02
AAF (0.02%)	25.5 ± 5.5	0.65 ± 0.05
AAF + NaNO ₂ (0.2%)	40.8 ± 9.9	1.10 ± 0.42
AAF + NaNO ₂ (0.3%)	22.4 ± 0.9	0.63 ± 0.04

a. See legend to Table 2.

b. Mean ± SD ; See mortality of Table 2. for n value.

Table 4. Effect of NaNO₂ on the hepatic function markers in AAF-treated rats.

Treatment ^a	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (IU/L)
Control	315 ± 32	76 ± 5 ^b	0.5 ± 0.2
NaNO ₂ (0.3%)	238 ± 24	64 ± 7	0.8 ± 0.4
AAF (0.02%)	284 ± 34	229 ± 74*	164.0 ± 55.0*
AAF + NaNO ₂ (0.2%)	864 ± 488	288 ± 150	375.0 ± 141.0
AAF + NaNO ₂ (0.3%)	348 ± 56	140 ± 23 [#]	55.9 ± 15.3 ^{##}

a. See legend to Table 2.

b. Mean ± SD ; See mortality of Table 2. for n value.

*, P < 0.001 compared with control group.

[#]. P < 0.05, ^{##} P < 0.01 compared with AAF treated group.

Table 5. Main pathological changes in the liver of rats.

Treatment ^a	Pathological Changes			
	Foci	Neoplastic Nodule	HCC	Cholangiofibrosis
Control	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
NaNO ₂ (0.3%)	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
AAF (0.02%)	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
AAF + NaNO ₂ (0.2%)	6 / 6	6 / 6	5 / 5 ^b	6 / 6
AAF + NaNO ₂ (0.3%)	6 / 6	6 / 6	5 / 6	6 / 6

a. See legend to Table 2.

b. One rat died in the third month, no evidence of HCC is found.

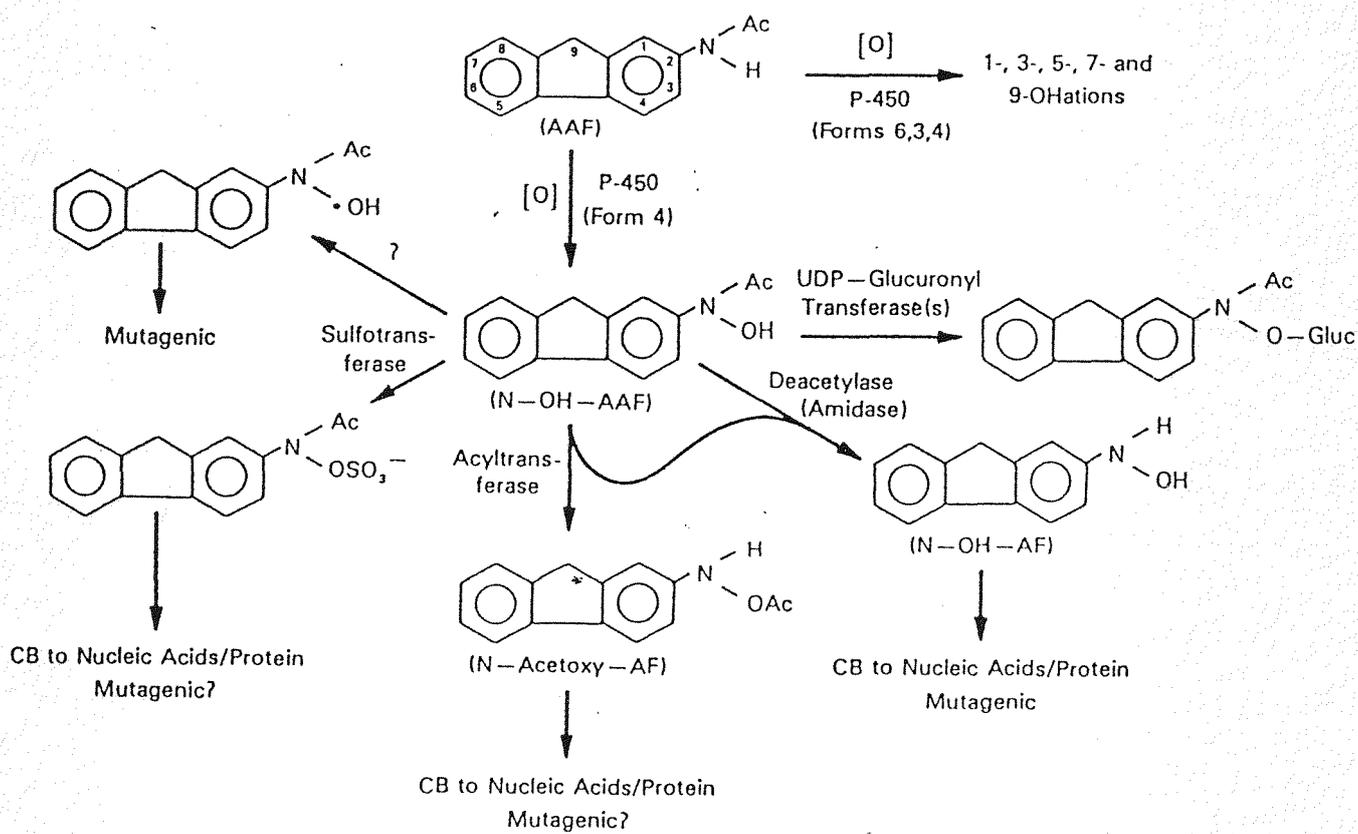


Fig. 1 : Bioactivation of 2-acetylaminofluorene.

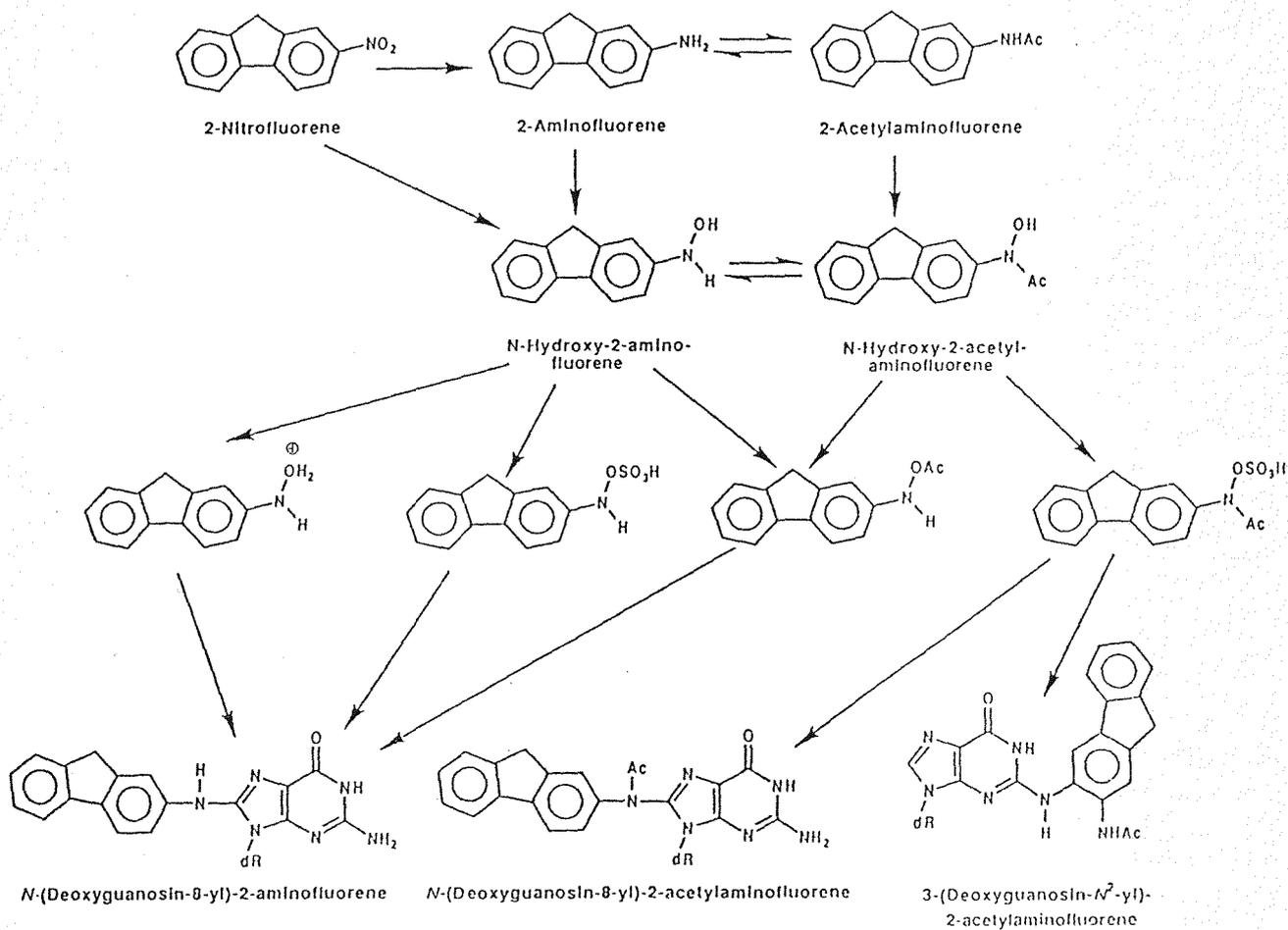


Fig. 2 : Main products of 2-aminofluorene, 2-acetylaminofluorene and 2-nitrofluorene.

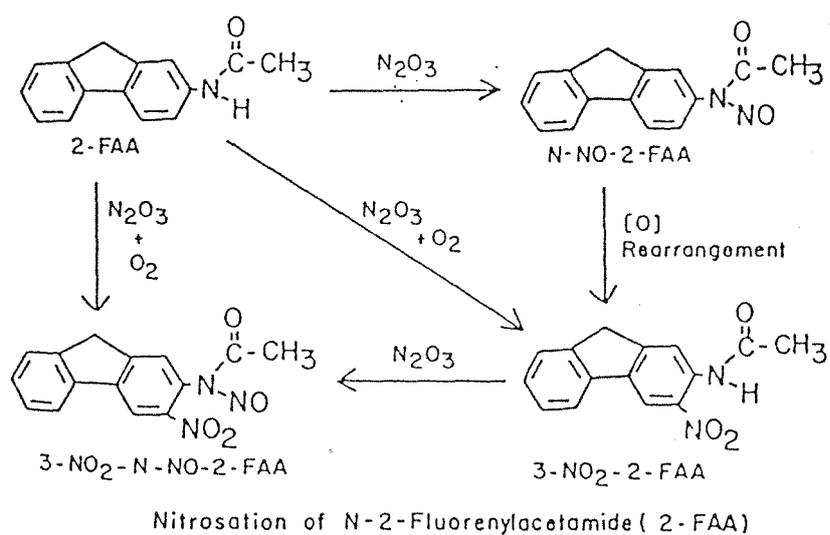


Fig. 3 : Nitrosation of N-2-AAF with nitrous fume in glacial acetic acid yields N-nitroso and 3-nitro derivatives. (24)

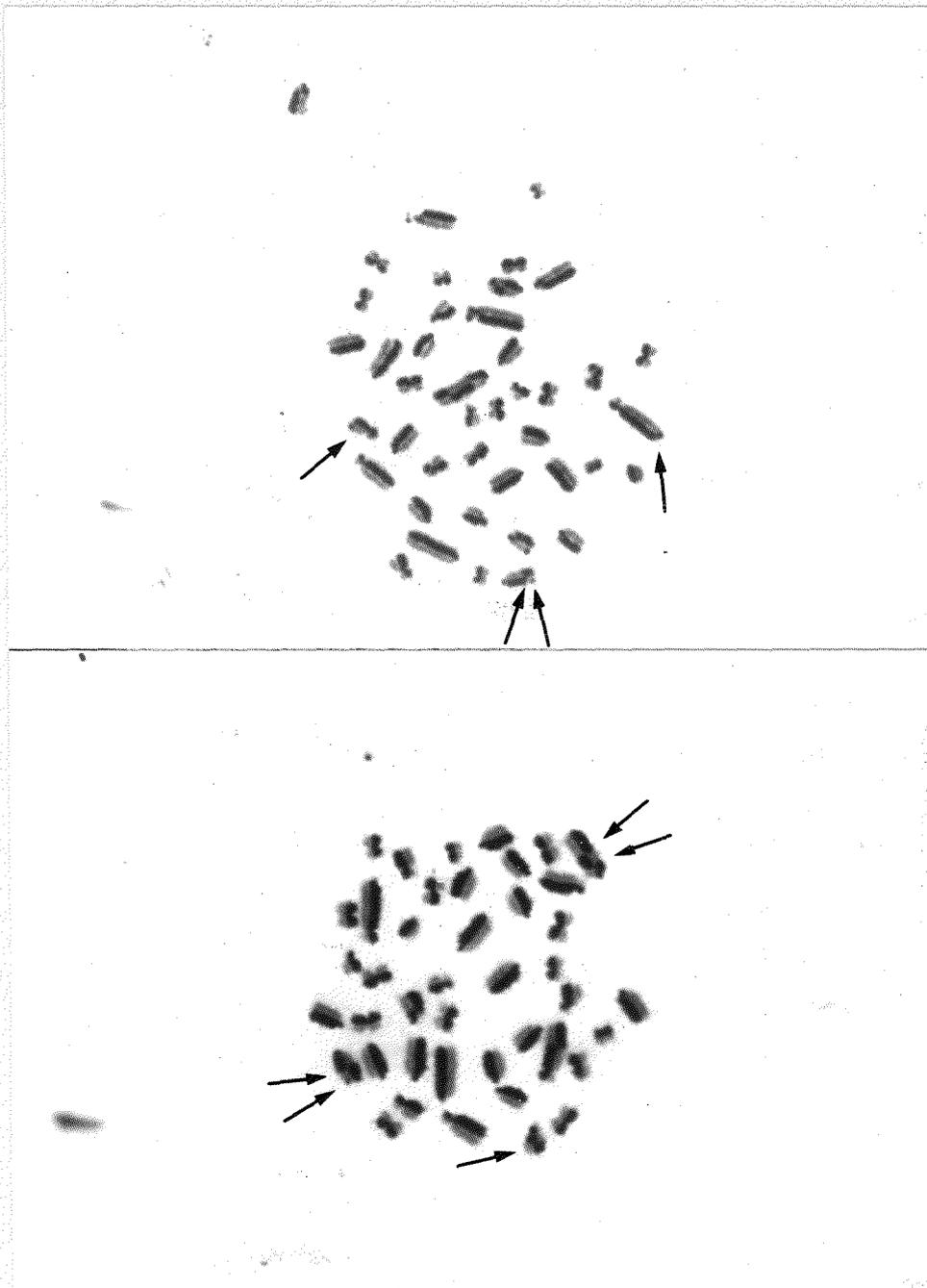


Fig. 4 : Induction of sister chromatid exchanges in the peripheral lymphocyte of rat by AAF+NaNO₂ (0.3%). Slides of metaphase chromosomes were stained with Hoechst 33258, exposed to light and 2x SSC, and then stained with Giemsa.

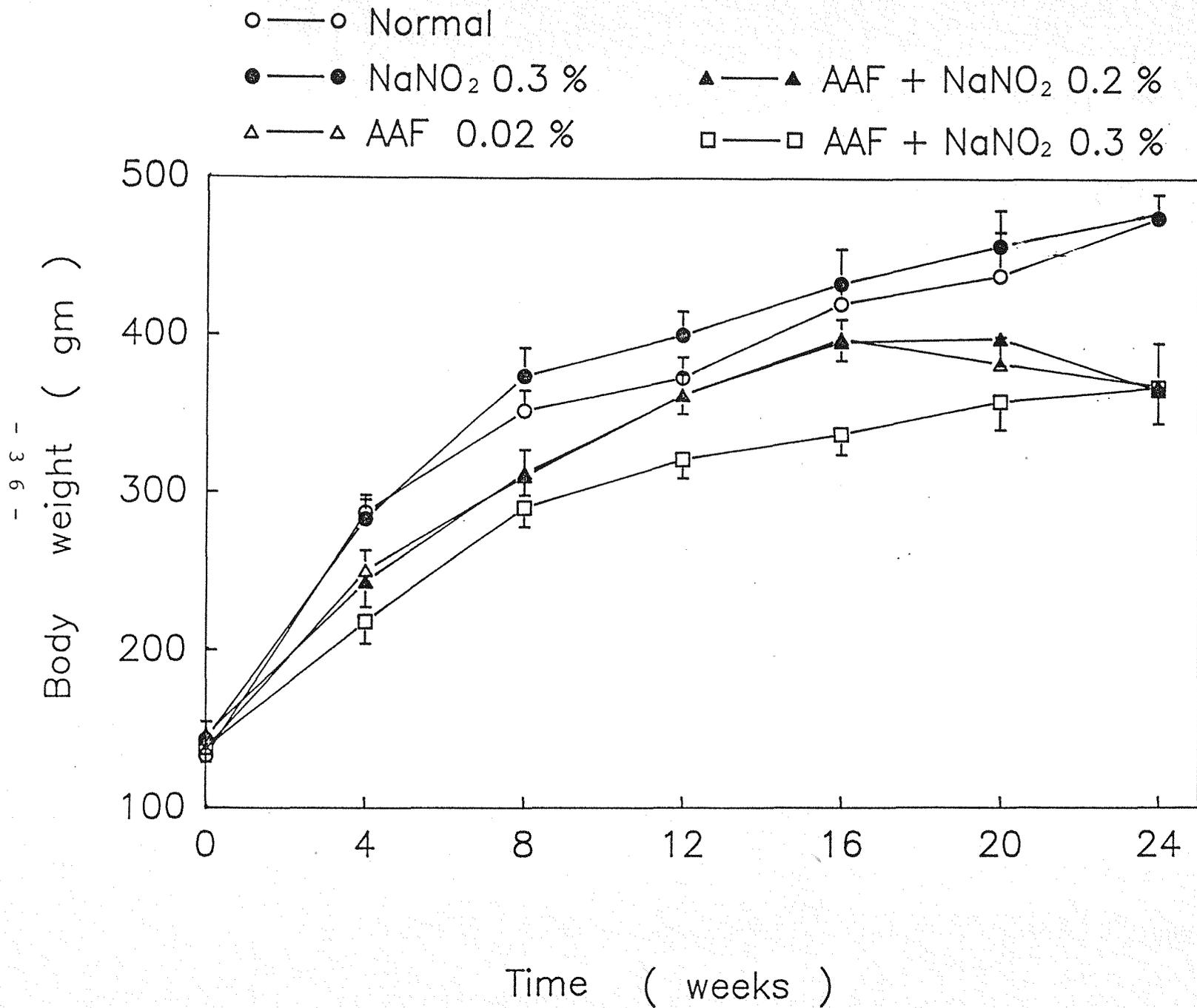


Fig. 5 : Effect of NaNO₂ on body weight in AAF-treated rats.

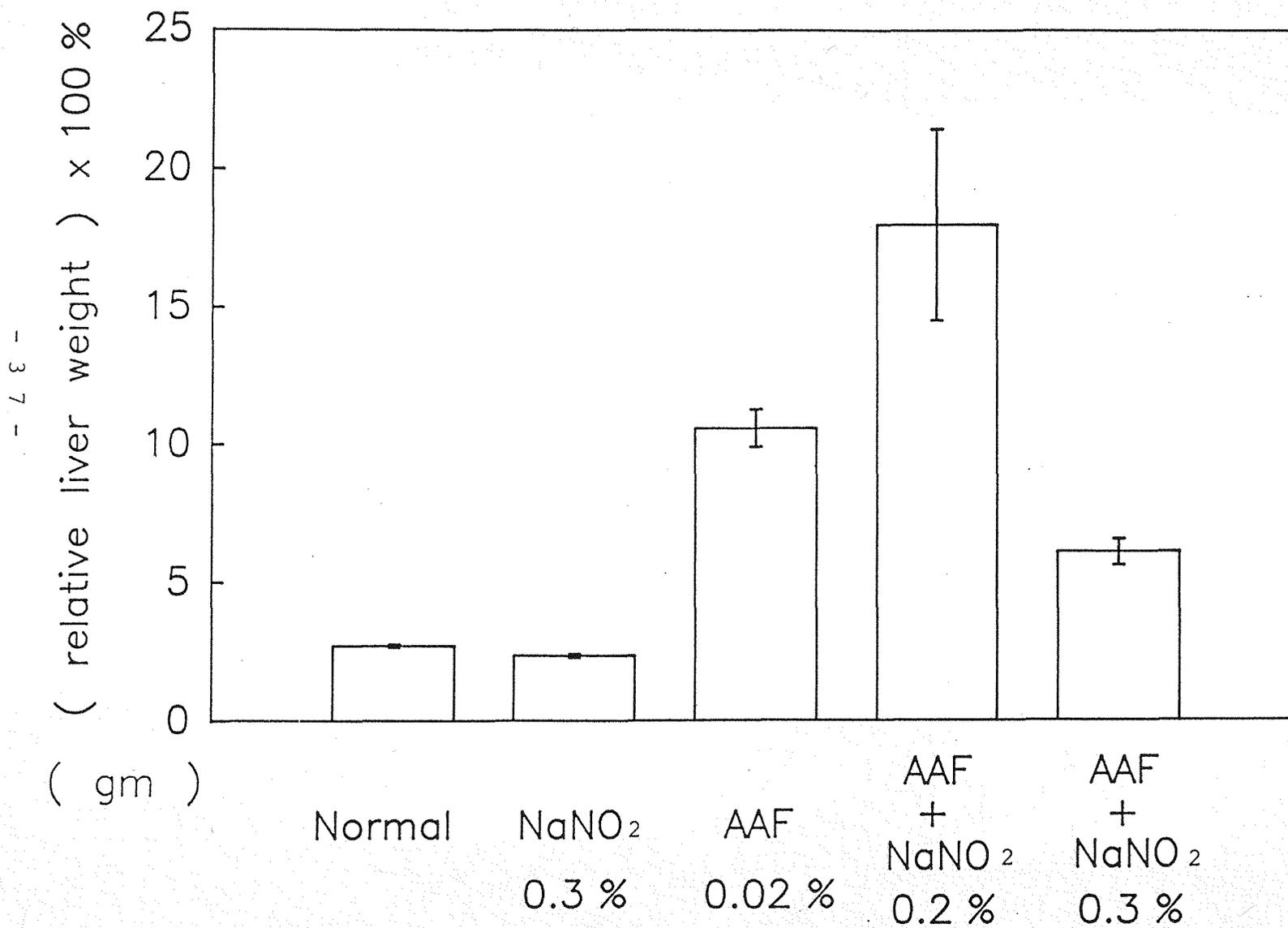


Fig. 6 : Effect of NaNO₂ on relative liver weight in AAF-treated rats.



Fig. 7 : Gross appearance of multinodular liver cell carcinoma with focal necrosis. Rat was fed AAF+ NaNO_2 (0.2%).

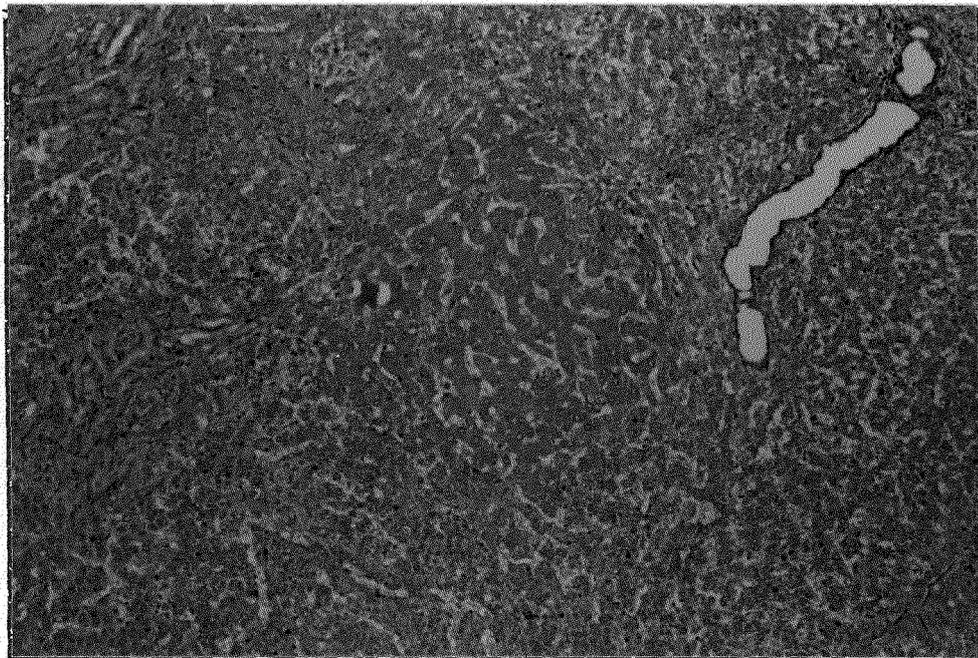


Fig. 8 : Eosinophilic foci consists predominantly of eosinophilic cells in a trabecular pattern. Rat was fed AAF+ NaNO_2 (0.2%). H&E, X200.

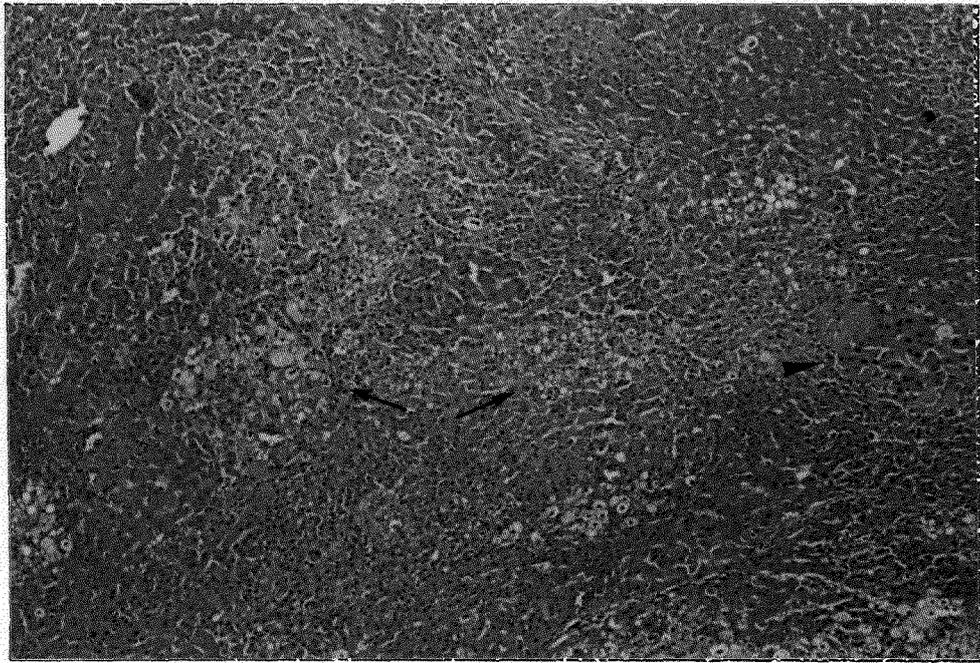


Fig. 9 : Mixed cell foci composed of clear cells (→) and eosinophilic cells (▲) with crowded arrangement. Rat was fed AAF+NaNO₂ (0.2%). H&E, X100.

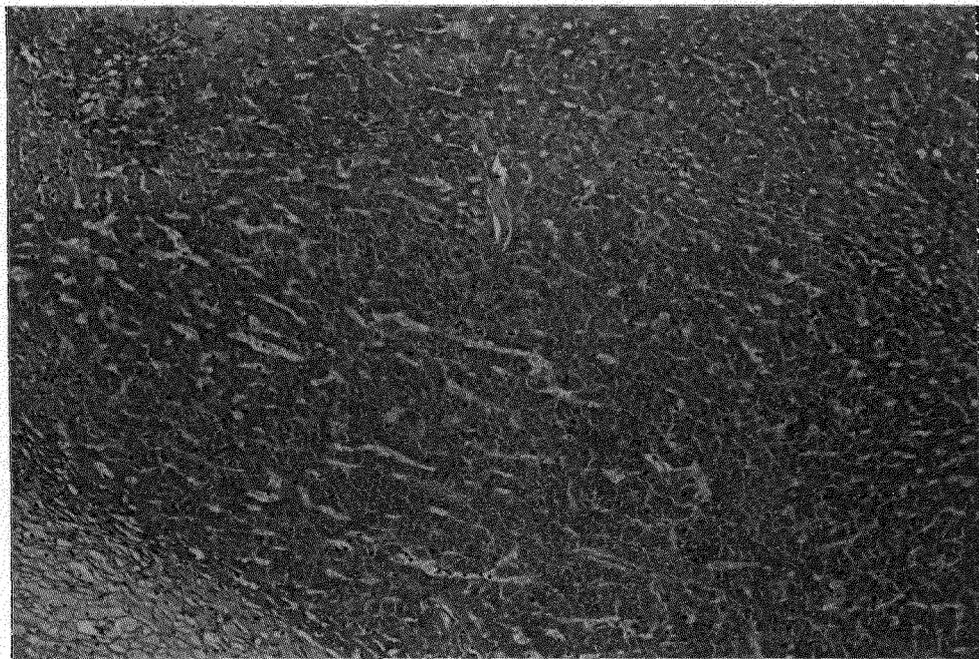


Fig. 10 : Well differentiated hepatocellular carcinoma made up of basophilic cells arranged in a trabecular pattern. Rat was fed AAF. H&E, X100.

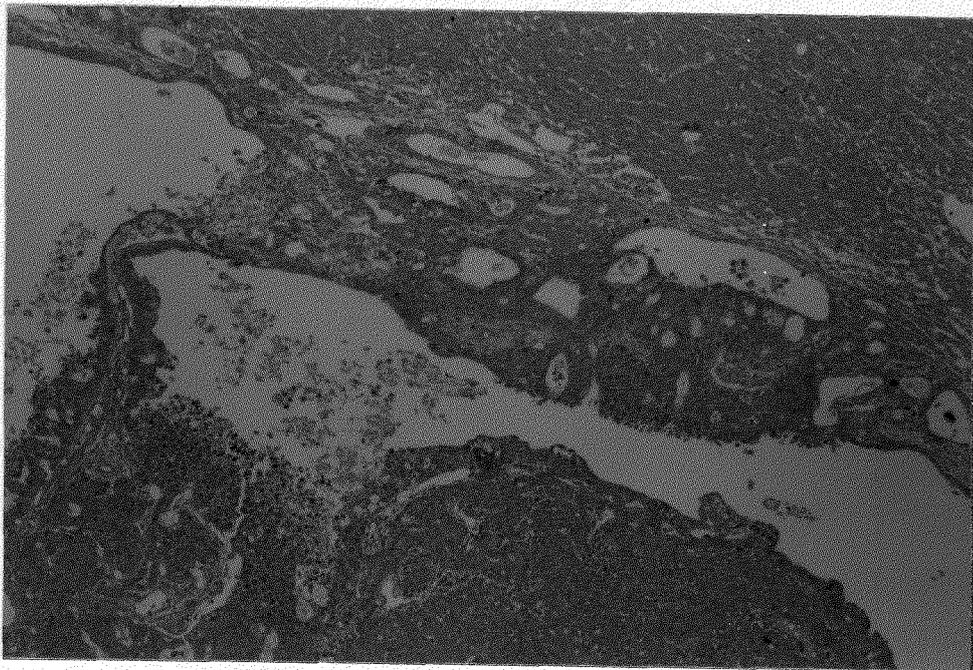


Fig. 11 : Well differentiated hepatocellular carcinoma. Portion of tumor with glandular formation. Rat was fed AAF+NaNO₂ (0.2%). H&E, X100.

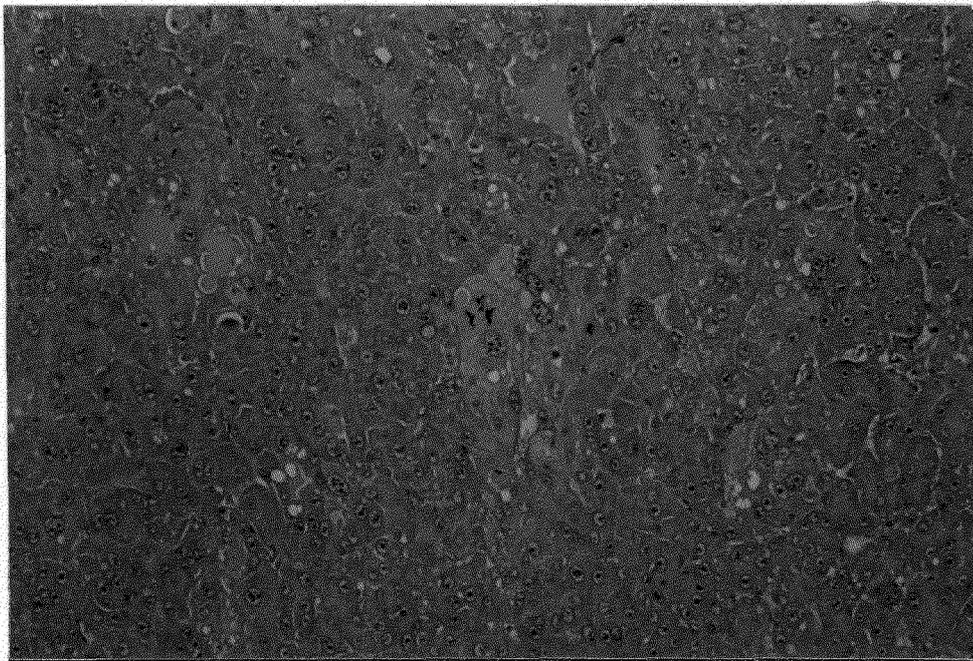


Fig. 12 : Moderately differentiated hepatocellular carcinoma. Basophilic tumor cells with pleomorphic, hyperchromatic nuclei and abnormal mitotic figures. Rat was fed AAF+NaNO₂ (0.2%). H&E, X400.

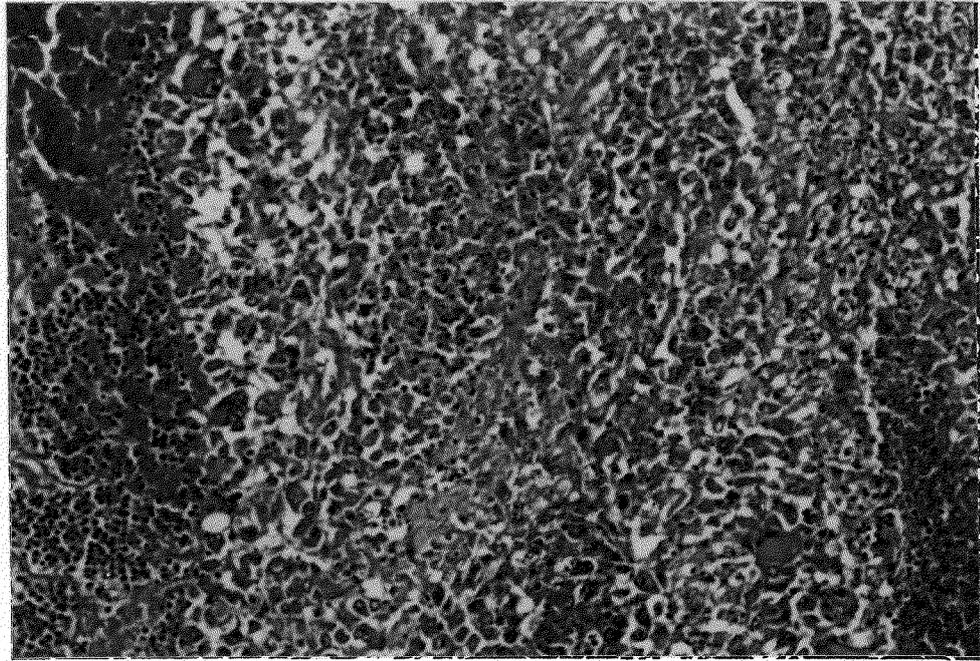


Fig. 13 : Poorly differentiated hepatocellular carcinoma consists of numerous bizarre tumor giant cells. Rat was fed AAF. H&E, X200.

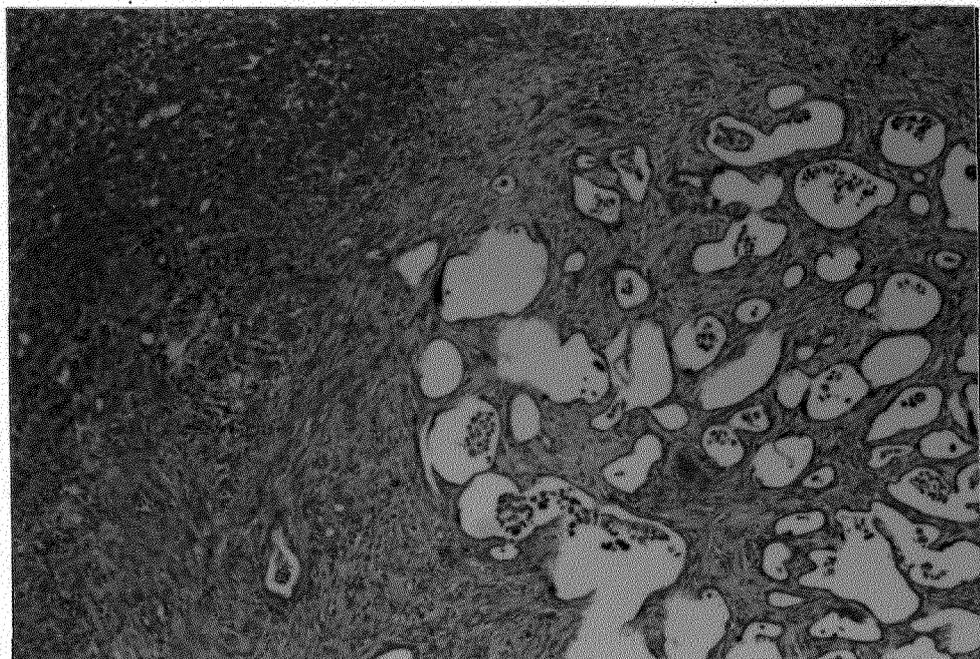


Fig. 14 : Cholangiofibrosis was characterized by marked proliferation of bile ducts within a fibrous stroma. Rat was fed AAF+NaNO₂ (0.2%). H&E, X100.

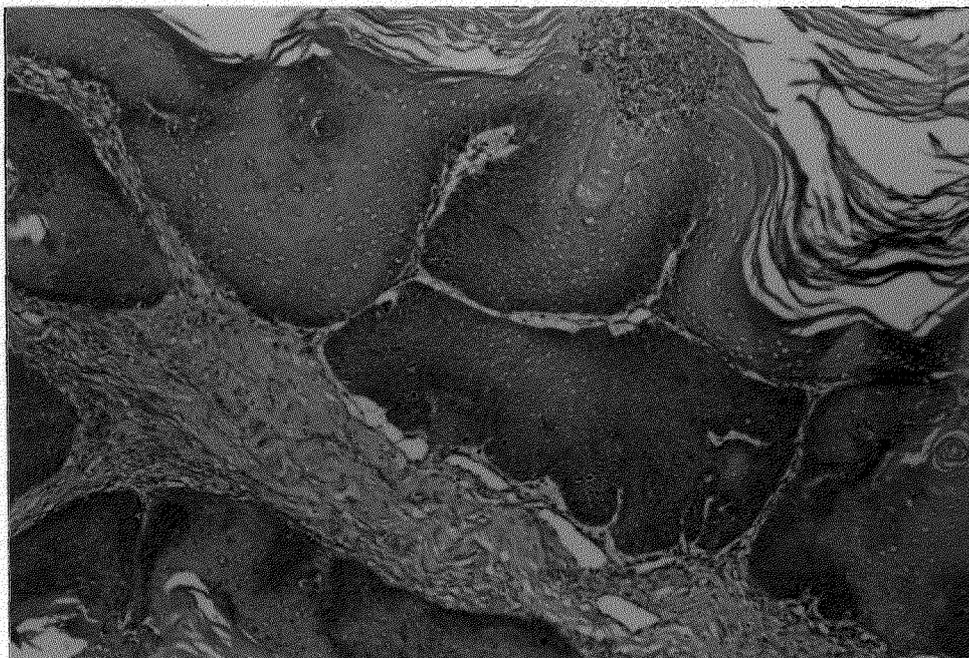


Fig. 15 : Well differentiated squamous cell carcinoma is found in the left buccal mucosa of a rat. Rat was fed AAF. H&E, X100.

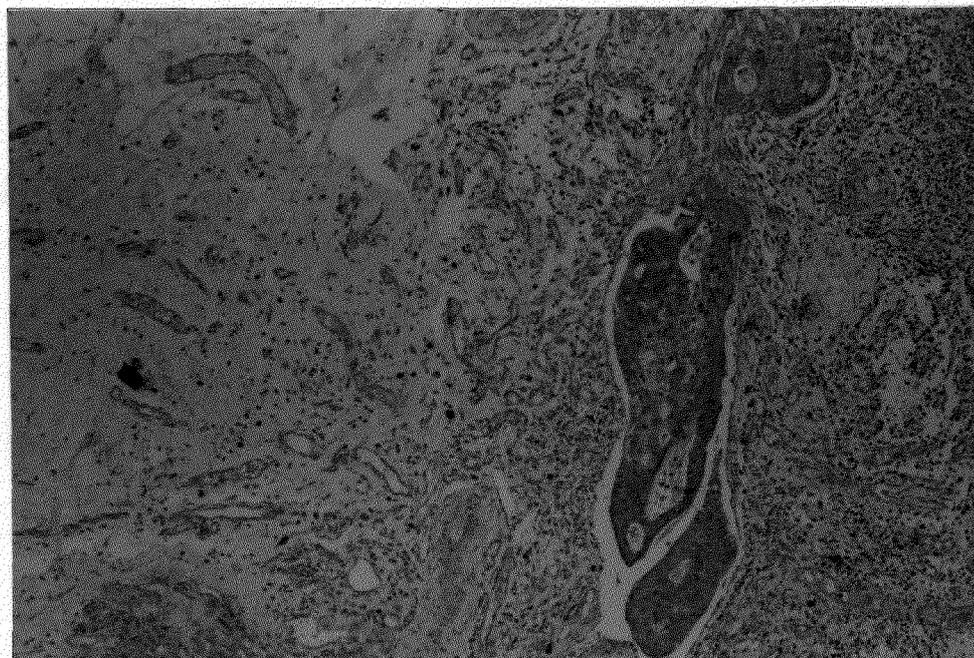


Fig. 16 : Metastatic hepatocellular carcinoma with glandular formation in the lymphatic of omentum. Rat was fed AAF+NaNO₂ (0.2%). H&E, X100.

參 考 文 獻

01. Hotchkiss, L. and Cassens, R. G. (1987) Nitrate, nitrite and nitroso compounds in foods. *Fd. Technol.*, Champaign 41, 127.
02. Spiegelhalter, B., Eisenbrand, G. and Preussmann, R. (1980) Occurrence of volatile nitrosamines in food : a survey of the West German market. In *N-Nitroso Compounds : Analysis, Formation and Occurrence*. Edited by Walker, E. A., Gričič, L., Castegnaro, M., Borzsonyi, M. and Davis, M. IARC Scient. Publ. no. 31, P. 467. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
03. US National Research Council (1981) *The Health Effects of Nitrate, Nitrite and N-Nitroso Compounds*. National Academy Press, Washington, DC.
04. Yang, C. S. (1980) Research on esophageal cancer in China : a review. *Cancer Res.*, 40, 2633.
05. Yamamoto, M., Ishiwata, H., Yamada, T., Yoshihira, K. and Tanimura, A. (1987) Studies in the guinea-pig stomach on the formation of N-Nitrosomethylurea, from methylurea and sodium nitrite, and its disappearance. *Fd. Chem. Toxic.*, 25 (9), 663-668.
06. Yamamoto, K., Nakajima, A., Eimoto, H., Tsutsumi, M., Maruyama, U., Denda, A., Nii, W., Mori, Y. and Konishi, Y., (1989) Carcinogenic activity of endogenously synthesized N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in rats administered bis (2-hydroxypropyl) amine and sodium nitrite. *Carcinogenesis*, 10, 1607-1611.
07. Bergman, F. and Wahlin, T. (1981) Tumor induction in Syrian hamsters fed a combination of aminopyrine and nitrite. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A.* 89, 241-245.

08. Lijinsky, W. (1984) Induction of tumors in rats by feeding nitrosatable amines together with sodium nitrite. *Fd. Chem. Toxic.*, 22, 715-720.
09. Ernst, H., Ohshima, H., Bartsch, H., Mohr, U., and Reichart, P. (1987) Tumorigenicity study in Syrian hamsters fed areca nut together with nitrite. *Carcinogenesis*, 8, 1843-1845.
10. Robbiano, L., Carlo, P., Finollo, R. and Brambilla, G. (1990) DNA damage induced in rats by oral administration of chlordiazepoxide plus sodium nitrite or of N-Nitrosochlordiazepoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 102, 186-190.
11. Lijinsky, W., Taylor, H. W., Snyder, C. and Nettesheim, P. (1973) Malignant tumors of liver and lung in rats fed aminopyrine or hepatamethyleneimine together with nitrite. *Nature*, 244, 176-178.
12. Miller, J. A. (1970) Carcinogenesis by chemicals : An overview. G. H. A. Clowes Memorial Lecture, *Cancer Res.*, 30, 559-567.
13. Miller, E. C. (1978) Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals, *Cancer Res.*, 38 : 1479 - 1496
14. Weisburger, J. H. and Weisburger, E. K. (1973) Biochemical formation and pharmacological, toxicological and pathological properties of hydroxylamines and hydroxamic acids. *Pharmacol. Rev.*, 25, 1-66.
15. Kriek, E. (1974) Carcinogenesis by aromatic amines. *Biochem. Biophys. Acta.*, 355, 177-203.

16. Miller, E. C. and Miller, J. A. (1981) Search for the ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer (Phila.)*, 47, 2327-2345.
17. Miller, E. C., Miller, J. A. and Enomoto, M. (1964) The comparative carcinogenicities of 2-acetylaminofluorene and its N-hydroxy metabolite in mice, hamsters, and guinea pigs. *Cancer Res.*, 24, 2018-2031.
18. DeBaun, J. R., Miller, E. C. and Miller, J. A. (1970) N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase: its role in carcinogenesis and protein (methion-S-yl)-binding in rat liver. *Cancer Res.*, 30, 577-595.
19. Weisburger, J. H., Yamamoto, R. S., Williams, G. M., et al. (1972) On the sulfate ester of N-hydroxy-N-2-fluorenylaceta-mide as a key ultimate hepatocarcinogen in the rat, *Cancer Res.*, 32, 491-500.
20. Poirier, M. C., Williams, G. M. and Yuspa, S. H. (1980) Effect of culture conditions, cell type and species of origin on the distribution of acetylated and deacetylated deoxyguanosine C-8 adducts of N-acetoxy-2-acetylaminofluorene. *Mol. Pharmacol.*, 18, 581-587.
21. Rayshell, M., Ross, J. and Werbin, H. (1983) Evidence that N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene cross links DNA to protein by a free radical mechanism. *Carcinogenesis*, 4, 501-507.
22. Smith, B. A., Springfield, J. R. and Gutmann, H. R. (1986) Interaction of the synthetic ultimate carcinogens, N-sulfonyl and N-acetoxy-2-acetylaminofluorene, and of enzymatically activated N-hydroxy-2-acetylaminofluorene with nucleophiles, *Carcinogenesis*, 7, 405-411.

23. Lin, J. K., Yen, H. W. and Lin-Shiau, S. Y. (1984) N-Nitrosophenacetin: its synthesis, mutagenicity and teratogenicity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 72, 863-869.
24. Lin, J. K. and Kuo, M. L. (1988) N-Nitroso-N-2-fluorenylacetamide : a new direct-acting mutagen and teratogen *Mutation Res.*, 201, 117-126.
25. Kuo, M. L. and Lin, J. K. (1989) The relationship between DNA damage and mutation frequency in mammalian cell lines treated with N-nitroso-N-2-fluorenylacetamide. *Mutation Res.*, 212, 231-239.
26. Lin, J. K. and Kuo, M. L. (1990) Induction of ouabain - resistance mutation and cycle - dependent transformation of C3H10T 1/2 cells by N-nitroso-2-acetylaminofluorene. *Mutation Res.*, 230, 35-43.
27. Kligerman, A. D., Erexson, G. L. and Wilmer, J. L. (1985) Induction of sister - chromatid exchange (SCE) and cell - cycle inhibition in mouse peripheral blood B lymphocytes exposed to mutagenic carcinogens / in vivo. *Mutation Res.*, 157, 181-187.
28. Exilie - Frigere, M. F., et al. (1984) Interactions of caffeine and phenobarbital on sister chromatid exchanges in rat liver epithelial cell lines treated with 2 - acetylaminofluorene and N-acetoxy-2-acetylaminofluorene. *Cell Biology International Reports.* 8, 329-335.
29. Kligerman, A. D., Erexson, G. L. and Wilmer, J. L. (1984) Development of rodent peripheral blood lymphocytes culture system to detect cytogenetic damage in vivo. *Basic Life Science.*, 29, 569-584.

30. Parodi, S., et al. (1983) Lack of correlation between the capability of inducing sister chromatid exchange in vivo and carcinogenic potency, for 16 aromatic amines and azo derivatives. *Mutation Res.*, 108 (1-3), 225-238.
31. Rutten, A. A., Wilmer, J. W. (1986) Effect of cigarette - smoke condensate and norharman on the induction of SCEs by direct and indirect mutagens in CHO cells. *Mutation Res.*, 172 (1), 61-67.
32. Sawada, S., Yamanaka, T., et al. (1991) chromosome aberrations, micronuclei and sister - chromatid exchange (SCE) in rat liver induced in vivo by hepatocarcinogens including heterocyclic amines. *Mutation Res.*, 251 (1), 59-69.
33. Willems, M. I. and W. K. de Raat. (1985) Mutagenicity of urine and faeces after treatment of rats with known genotoxins, *Carcinogenesis*, 6 (7), 967-976.
34. Lin, J. K. and Tseng, S. F. (1992) Chromosomal aberrations and sister - chromatid exchanges induced by N-acetoxy-2-acetylaminofluorene and their modifications by arsenite and selenite in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.*, 265, 203-210.
35. World Health organization. (1985) Guidelines for the study of genetic effects in human population. Geneva pp. 45-54.
36. Latt, S. A. (1973) Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3395-3399.
37. Perry, P. and Wolff, S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 251, 156-158.

38. Sofuni, T., Matsuoka, A., Sawada, M., Ishidate, M., Jr., Zeiger, E., and Shelby, M. D. (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture, *Mutation Res.*, 241, 175-213.
39. Latt, S. A., et al. (1981) Sister - chromatid exchanges : a report of the gene - tox program. *Mutation Res.*, 87, 17-62.
40. Perry, P. and Evans, H. J. (1975) Cytological detection of mutagen - carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 121-125.
41. Schwartz, S., Astemborski, J. A., Budacz, A. P., Boughman, J. A., Wasserman, S. S. and Cohen, M. M. (1990) Repeated measurement of spontaneous and clastogen - induced sister - chromatid exchange, *Mutation Res.*, 234, 51-59.
42. Oestreicher, U., Stephan, G. and Glatzel, M. (1990) Chromosome and SCE analysis in peripheral lymphocytes of persons occupationally exposed to cytostatic drugs handled with and without use of safety covers, *Mutation Res.*, 242, 271-277.
43. Perry, P. E., Thomson, E. J. (1984) The methodology of sister chromatid exchanges. In : *Handbook of mutagenicity test procedures* 2nd edition. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. Elsevier Science Publishers BV, pp. 495-529.
44. Reitmans, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum GOT and GPT. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 57-60.

45. Persijin, I. P. and van der Slik, K. (1976) A new method for the determination of serum gamma - glutamyltranspeptidase. *J. Clin. Biochem.*, 14, 42-48.
46. HAAS E (1980) 50 diagnostic special stains for surgical pathology.
47. Squire, R. A. and Levitt, M. H. (1975) Report of a workshop on classification of hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res.*, 35, 3214-3223.
48. Institute of Laboratory Animal Resources (1980) Histologic typing of liver tumors of the rat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 64, 179-206.
49. Bulter, W. H. (1979) Experimental liver injury. In MacSween, R. N. M., Anthony, P. P. and Scheur, P. (eds) *Pathology of the Liver*. P. 55. (London : Churchill Livingstone)
50. Williams, G. M. (1980) The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochim. Biophys. Acta.*, 605, 167-189.
51. Wastell, D. G. (1987) Guidelines on the use and presentation of statistical methods. *J. Dent.* 15, 2-5.
52. Wampold, B. E. and Drew, C. J. (1990) *Theory and application of statistics*. McGRAW - HILL publishing company.
53. Giri, A. K. and Mukherjee, A. (1990) Sister chromatid exchange induced by secondary and tertiary amine containing dyes and in combination with nitrite in vivo in mice. *Cancer Letters*, 52, 33-37.

54. Molander, D. W. and Friedman, M. M. (1956) Transaminase levels in experimental liver injury. Clin. Res.Proc., 4,39.
55. DeRitis. F., Coforti, M. and Giost, G. (1972) Serum transaminase activities in liver disease. Lancet, 1, 685-687.
56. Ogawa, K., Solt, D. B. and Farber, E. (1980) Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte population in liver carcinogenesis. Cancer Res., 40, 725-733.
57. Goldfarb, S. and Pugh, T. D. (1981) Enzyme histochemical phenotypes in primary hepatocellular carcinomas. Cancer Res., 41, 2092-2095.
58. Peraino, C., Richards, W. L. and Stevens, F. J. (1983) Multistage-hepatocarcinogenesis. Environ. Health Perspect., 50, 1-53.
59. Fiala, S. and Fiala, E. S. (1973) Activation by chemical carcinogens of gamma-glutamyltranspeptidase in rat and mouse liver. J. Natl. Cancer Inst., 51, 151-158.
60. Hanigan, M. H. and Pitot, H. C. (1985) Gamma-glutamyltranspeptidase-its role in hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis, 6, 165-172.
61. Mereto, E., Campart, G. B., Ghia, M. and Petrogalli, F. (1990) Oral administration of chlordiazepoxide plus sodium nitrite investigated for tumor initiating activity in the rat liver. Cancer Letters, 53, 61-65.

62. Teebor, G. W. and Becker, F. F. (1971) Regression and persistence of hyperplastic nodules induced by N-2-fluorenylacetamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 31, 1-3.
63. Bannasch, P. (1976) Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. *Cancer Res.*, 36, 2555-2562.
64. Farber, E. (1976) Hyperplastic areas, hyperplastic nodules, and hyperbasophilic areas as putative precursor lesions. *Cancer Res.*, 36, 2532-2533.
65. Peraino, C., Staffeldt, E. F., Haugen, D.A., Lombard, L. S., Stevens, F. J. and Fry, R. J. M. (1980) Effects of varying the dietary concentration of phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis. *Cancer Res.*, 40, 3268-3273.
66. Reuber, M. D. (1965) Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0.025 percent N-2-fluorenyldiacetamide. *J. Natl. Cancer Inst.* 34, 697-724.
67. Willams, G. M., Klaiber, M., Parker, S. E., and Farber, E. (1976) Nature of early appearing, carcinogen-induced liver lesions resistant to iron accumulation. 57, 157-165.
68. Lin, J. K. and Ho, Y. S. (1992) Hepatotoxicity and hepatocarcinogenicity in rats fed squid with or without exogenous nitrite. *Fd. Chem. Toxic.*, 30, 695-702.