

R
600.8
U436

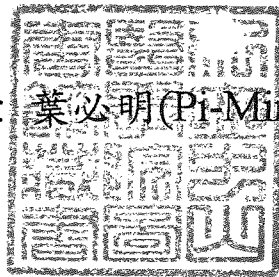
中山醫學院醫學研究所碩士論文
Master Thesis ,Institute of Medicine ,
Chung Shan Medical and Dental College

指導教授：李宣佑 博士 (Shuan -Yow Li ,Ph.D)

含砷量高飲水地區皮膚癌病患人類淋巴球染色體變異之研究

Chromosomal Studies of Skin Cancer Patients in Areas
Where High-Arsenic Well Water was used for drinking

研究生：葉必明 (Pi-Ming Yeh)



中華民國八十五年一月

January , 1996

中山醫學院圖書館



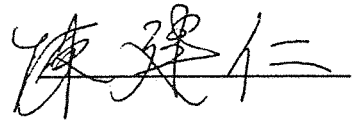
C034327

本論文為中山醫學院授予理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

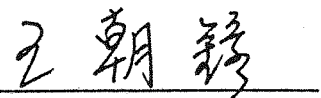
台大醫學院流行病研究所教授

陳建仁 博士



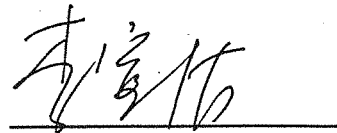
中山醫學院生物化學研究所教授

王朝鐘 博士



中山醫學院醫學研究所教授
(論文指導教授)

李宣佑 博士



中華民國八十五年一月

學生：葉必明，論文題目：含砷量高飲水地區皮膚癌病人類淋巴球染色體變異之研究，其論文已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，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李宣佑

簽名：李宣佑

中華民國八十五年二月十三日

致 謝

抱著「不入虎穴，焉得虎子」的心情進入細胞遺傳室，跟隨李教授宣佑學習。首先，感謝李教授能接納一切都需重頭開始學習的我，並且很快的指引我研究的方向，教導我實驗的精神與技術。他令我印象最深刻的一句話是：「有一分證據，說一分話；而且要有充份的文獻探討來佐證。」這種腳踏實地，努力不懈的態度相信是李教授成功的秘訣，也是我學習的榜樣。整個學習的過程還要感謝劉老師蓉錦、許益祥、王老師治中、蔡姐錦珠、謝姐淑卿、王老師怡鈞、洪老師惠媚及溫保英、楊淑卿、吳蜜琪、施文惠、楊惠雯等人，以及公衛系一群可愛的夥伴們在各方面所給予的協助，使這次的研究能順利的進行。

非常感謝台大公共衛生流行病研究所所長陳教授建仁首肯讓我加入這次研究的行列，口試當天親眼目睹大師的丰采，和藹親切的笑容，胸懷天下的氣度令我終生難忘。相信這也是陳教授能有許多大型的研究計劃與許多共同參與研究者的原因。

同時，非常榮幸的是能請生化所所長王教授朝鐘參加我的口試，感謝他對我論文精闢的建議，與獨特的見解，他敏捷的思緒，與做不完的研究題材都是我所崇拜的。我三位口試委員教授的共同成功特質是：“早出晚歸，不分假日，全心研究，家庭幸福美滿”這也是我努力的目標。

在我研究繁忙的時刻，非常感謝護理系系主任(袁主任素娟與郭主任碧照)與系上同仁的包容與協助。最後，感謝我的老公幫我完成統計的分析，與各方面的支持與協助，及兩個小寶貝在許多假日和夜晚陪我在研究室做實驗，感謝你們的配合與歡笑。還要感謝無時無刻都在關心我的爸爸和媽媽。

這次研究的完成是大家力量的結合，再一次感謝大家，並謹記這次的經驗存著感恩的心繼續努力！

目錄:	
要摘-----	1
第一章:前言(Introduction)-----	3
第二章:材料與方法(Material and Methods)-----	12
1.個案之選取	
2.培養液名稱及製備	
3.藥品名稱及製備	
4.儀器	
5.實驗方法與步驟	
(1)各種藥品處理時間表	
(2)細胞的培養(Cell Culture)	
(3)細胞的收穫(Cell Harvest)	
6.統計方法	
第三章:結果(Result)-----	23
第四章:討論(Discussion)-----	29
附表-----	38
圖表-----	39
參考文獻-----	76

Abstract

Many studies in recent years have shown that the occurrence frequency of malignant neoplasms among residents of the black-foot disease endemic area is higher than that of the general population in Taiwan.

Those researchers used sociodemographic method to understand the correlation between arsenic and skin cancer. In this study, we use cytogenetic method as the followings :

- 1.human lymphocyte chromosomal breakage frequency and sites
- 2.sister chromatid exchange(SCE) frequency
- 3.micronuclei(MN) frequency

To further understand the relationship between arsenic and skin cancer. We selected 32 skin cancer patients and 32 healthy residents in the endemic area of high-arsenic artesian well water in Taiwan.

The results showed that *in chromosomal breakage frequency* ,**1.Arsenic treatment** : The healthy residents' frequency of chromatid breakage is significantly higher among arsenic treated than among untreated. But skin cancer patients' frequency of chromatid breakage between untreated and arsenic treated has no significant difference. It may be that skin cancer patients had exposed arsenic for a long time and produced something like arsenic-resistant glutathione S-transferase pi(GST pi) that is involved in the mechanism of arsenic detoxification.

2.Bleomycin treatment : Skin cancer patients' frequency of chromatid breakage is significantly higher than the healthy residents'.

3.Arsenic & Bleomycin treatment : Skin cancer patients' frequency of chromatid breakage is significantly higher than the healthy residents'.From the above two points we concluded that bleomycin can induce chromosomal breakage which appears to be the difference between skin cancer patients and the healthy residents.

In the sites of chromosomal breakage : The highest frequency of chromatid breakage was found in the group of arsenic & bleomycin treatment. In average the sites of the chromatid break are over 10 times/person ; in the healthy residents : 2q ,3q , 4q , 5q ; in skin cancer patients : 1p , 1q , 2p , 2q , 3p, 3q , 4q , 5q , 6q , 7q , 8q ; the highest chromatid break site is at chromosome 4q for both the healthy residents and the skin cancer patients.

In the frequency of sister chromatid exchange : The frequency of sister chromatid exchange proportionally increase according to the concentration of the arsenic in health residents and skin cancer patients.

In the frequency of micronuclei :

There is no significant difference between untreated and 1uM arsenic treated health residents. But there is significant difference between untreated and 1uM arsenic treated skin cancer patients.

Therefore , we concluded that there is important relationship between arsenic and skin cancer. But since arsenic is a trace element in our daily life and it needs long time to accumulate arsenic to get sick , it is easy to be ignored. In this study , we not only find the sites of chromatid breakage induced by arsenic but also use the human model to further understand the relationship between arsenic and skin cancer.

研究摘要

近年來許多研究顯示，長期飲用含砷的飲水會導致腫瘤的發生；陳等自 1985 年研究台灣烏腳病地區居民罹患惡性腫瘤的情形比台灣一般民眾罹患惡性腫瘤的情形高出許多。Chiou et al., 1995 年：在台灣烏腳病盛行地區追蹤七年，利用社會人口統計學的方法研究人體癌症發生與攝入無機砷之間的相關性，結果顯示：烏腳病患者在調整後累積砷暴露下，罹患癌症的情形有增高的趨勢。Hsueh et al., 1995 年以台灣烏腳病盛行地區居民為研究對象，肝功能不好及營養狀況差會影響無機砷的代謝，也進一步造成皮膚癌的發生。

於是，在烏腳病盛行地區取樣當地皮膚癌患者(非惡性黑色素腫瘤且無烏腳病者)32 位，及健康居民(無癌症且無烏腳病)32 位，抽取血液進行分析，想進一步利用：1. 染色體斷裂頻率及斷裂位置 2. 姊妹染色體交換頻率 3. 微小核出現的頻率，來瞭解砷與皮膚癌的相關性。

結果顯示：1. 染色體斷裂頻率方面：(1) 對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目以 arsenic 加 bleomycin 組最多，bleomycin 組次之，arsenic 組第三，untreated 組最少；(2) 對照組方面：untreated 組為 2.93 個/人，arsenic 組為 7.59 個/人，兩組之間有顯著差異($p < 0.01$)；(3) 皮膚癌患者：untreated 組為 2.46 個/人，arsenic 組為 6.31 個/人，兩組之間在 90% 顯著水準下有顯著差異；但在 95% 下卻沒有顯著差異($p > 0.05$)；(4) bleomycin 處理方面：對照組為 106.33 個/人，皮膚癌患者為 178.92 個/人，兩者之間有顯著差異($p < 0.01$)；(5) arsenic 加 bleomycin 組方面：對照組為 145.74 個/人，皮膚癌患者為 239.46 個/人，兩者之間有顯著差異($p < 0.01$)；(6) 對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目均顯示：arsenic 加 bleomycin 組比 bleomycin 組多，在 90% 顯著水準下有顯著差異；但在 95% 下卻沒有顯著差異。

2. 染色體斷裂位置方面：以 arsenic 加 bleomycin 組染色體斷裂頻率最高, 平均值超過 10 個/人之染色體部位, 對照組為: 2q、3q、4q、5q; 皮膚癌患者為: 1p、1q、2p、2q、3p、3q、4q、5q、6q、7q、8q; 而對照組與皮膚癌患者皆以染色體 4q 位置斷裂數目最多。

3. 姊妹染色體交換頻率方面：對照組與皮膚癌患者姊妹染色體交換頻率都隨著加入砷的濃度增加而增加。姊妹染色體細胞生長指數方面兩組都顯得沒有差異。

4. 微小核出現的頻率方面：對照組方面 untreated 組與 arsenic 1uM 組之間沒有差異；而皮膚癌患者方面 untreated 組與 arsenic 1uM 組之間於 93% 顯著水準下有顯著差異。

綜合以上的結果，我們可以瞭解砷對造成皮膚癌確實有不可忽略的重要性，但是，在日常生活中砷都以微量的狀態存在，而且要長時間慢性的累積才會發病，因此，往往容易被忽視，本篇研究除了發現砷最常引起染色體斷裂的位置，也進一步以人體實驗性的方式證實了砷與皮膚癌之間的相關性。

第一章:前言

一.研究背景:

1985年陳等研究台灣烏腳病盛行地區居民罹患惡性腫瘤與當地飲用含高砷量井水之相關性，研究顯示：與台灣的一般人口做比較，標準死亡率(SMR:standardized mortality rate)和累積死亡率(CMR:cumulative mortality rate)在烏腳病盛行地區的膀胱、腎、皮膚、肺、肝和直腸癌有顯著升高的情形。在男性皮膚癌的SMR是534，在女性皮膚癌的SMR是652。

在烏腳病盛行地區飲用水的砷含量，陳等1962年研究顯示：深層井水：0.35-1.14 ppm，中間值：0.78 ppm；淺層井水：0.00-0.30 ppm，中間值：0.04 ppm。Lo(1977)：在烏腳病盛行地區表層土壤樣本砷含量為5.3mg/kg - 11.2mg/kg,中間值為7.2mg/kg。當地農作物及魚也有顯著高砷含量，居民每天約攝入砷1mg。

陳等(1985年)：台灣烏腳病盛行地區男性與女性皮膚癌年齡別累積死亡率與台灣地區的相比較年齡愈大則差別愈大且前者有升高的趨勢，當地飲用含高砷量深井水(0.78ppm)皮膚癌的SMR大於飲用低砷量淺井水(0.04ppm)之SMR。

二. 砷與癌症之相關性

砷是廣泛分布在大自然並主要藉由水輸送至環境中。高砷井水(High-arsenic artesian well water) 已證實與皮膚癌及烏腳病有關，此種病為獨特的周邊血管疾病主要局限於台灣的西南沿岸。在 1985 年陳等研究在當地居民的內在器官癌症佔有非常高的死亡率並且明顯的與當地飲用高砷深井水有關。

Hsueh 等人(1995 年)以台灣烏腳病盛行地區居民為研究對象，結果顯示：當地居民罹患皮膚癌的盛行率與飲用當地含高砷深層井水中所含之年累積砷暴露量與每 p.p.m.(parts per million)含砷平均值之間有顯著的劑量與反應關係。慢性肝功能不好之 B 型肝炎表面抗原帶原者罹患皮膚癌之盛行率有升高的趨勢。經常大量以曬乾的甜馬鈴薯為主食者與砷所誘發的皮膚癌盛行率增高之間也有顯著的相關。因此，肝功能及營養狀況會影響無機砷的代謝也進一步造成皮膚癌的發生。

Chiou 等人(1995 年):在台灣烏腳病盛行地區追蹤七年研究體內癌症發生與攝入無機砷之間的相關性，利用社會人口統計學的方法進行定期健康檢查，家庭訪視問卷調查，檢查戶政事務所資料，國家死亡證明及癌症中心的連線。研究顯示長期暴露在含砷的井水與罹患肺癌，膀胱癌，及各部位的癌症有劑量與反應之間的相關性。合併將調整後的年齡、性別與抽煙情形經由 Cox's 比例機會迴歸分析顯示：烏腳病患者在調整後累積砷暴露下，罹患癌症的情形有增高的趨勢。

多變項調整後迴歸係數指出每增加井水中砷含量 0.1 ppm，則年齡別調整後死亡率每年每十萬人口 增加情形如下，在男性及女性的各種癌症：肝癌:6.8 和 2.0，鼻咽癌:0.7

和 0.4, 肺癌:5.3 和 5.3, 皮膚癌:0.9 和 1.0, 膀胱癌 3.9 和 4.2, 腎臟癌 1.1 和 1.7(Chen et al.,1990)。

估算美國暴露在環境中各種不同的致癌因子下而死亡的情形：飲水中含砷(1.6L/day) 2.5ug/L(U.S. estimated average), 危險度 1/1000;50ug/L(U.S. water standard), 危險度 21/1000, 皮膚癌和砷攝入量的因果關係已被成立(Smith et al.,1992)。

Lyon(1980 年)證實無機砷的攝入體內會導致皮膚癌,而且吸入無機砷會導致肺癌。砷的無機型式比有機型式要更加有毒性,無機砷可以 arsenate(As(V))或 arsenite(As(III))來表現。雖然,As(III)是比較毒,但 As(V)在人體中被甲基化解毒前被還原為 As(III)(Squibb et al.,1983)。

慢性暴露在砷的結果會造成:肝臟受損,腎表面的病變,周圍血管疾病,並且增加皮膚、肺部、膀胱和肝臟的癌症發生率(Goyer,1986; Chen et al., 1988; Smith et al., 1992; Bates et al., 1992)。許多研究表示砷對人類及老鼠細胞會造成:染色體異常,姊妹染色分體交換(SCE:sister chromatid exchange)增加,以及微小核(MN:micronuclei)出現增加(Lee et al.,1988;Muller et al.,1986)。

最近,有許多研究顯示砷對基因毒性作用可能與氧化基有關:

- (1)砷和許多自由基誘導物質已經顯示可以促進血基質氧化西每的產生(Applegate et al.,1991)。
- (2)加入自由基清除酵素如:superoxide dismutase 可以減少因砷引起的姊妹染色分體交換的頻率。(Nordenson and Beckman,1991)。
- (3)口服藥物有無機砷的代謝產物,如: dimethylarsinic acide, 透過氧化還原反應產生活化氧自由基而誘發肺部特定 DNA 的損傷(Yamanaka et al.,1989,1990)。

Arsenic compound 會阻斷蛋白質中的 sulfhydryl groups, 並且妨礙 DNA 複製和修補(Squibb and Fowler,1983;Rossman et al., 1980); DNA ligases 包含必要的 sulfhydryl group,而它是砷用的目標(Target)(Soderhall and Lindahl,1987; Li and Rossman, 1989)。

砷也顯示可以降低 histone H1 磷酸化, 誘發在 histones 內 deacetylation 和 demethylation, 並導致凝縮不佳的染色體(Gurley et al.,1980;Arrigo,1983;Gurr et al.,1993)。Wang and Huang (1994)研究顯示:活化的氧分子成份與砷誘發 XRS-5 Cells(X-ray sensitive Chinese Hamster Ovary) 產生 MN(micronuclei)有關。

砷對基因造成毒性原因:(1)當生物體內缺乏 catalase and glutathione peroxidase 時會造成高的過氧化氫累積,(2)當生物體內分解過渡金屬能力太低時會形成氫氧自由基(Joenje and Gille,1992)。

三.Bleomycin sulfate(Blenoxane)對染色體之作用:

Bleomycin 是一種具毒性抗生素類之抗腫瘤劑,可切斷 DNA 而阻斷 DNA,RNA,及蛋白質之合成,而誘發 DNA 結構之不安定性。對鱗狀細胞癌治療有效;造成皮膚及粘膜傷害但對骨髓破壞並不很大;另外,也可以引起嚴重的肺合併症,如:肺浸潤,和纖維化。

李等人(1990年)以十位 Fragile X 病人和十位健康控制組,培養血液淋巴球研究 bleomycin 誘發染色體斷裂的差異性,結果顯示:染色體斷裂的頻率 Fragile X 病人明顯的高出正常人。作者表示 Fragile X 病人可能更容易傾向於染色體變異及致癌,也更容易傾向於腫瘤的誘發。

因此，本篇研究也利用 bleomycin 誘發染色分體的斷裂來進一步瞭解飲用含高砷井水導致的皮膚癌患者與正常人染色體之間有何差異？

四.砷性角化症:

此症是由於砷化物(包括有機砷及無機砷)的慢性毒性作用而引起。特點是疣狀或斑塊狀角質肥厚(過度角化)。好發於手掌、足蹠及手指，也可見於其他部位之皮膚。偶侵犯黏膜及內臟器官:55%可發生癌症性轉變，而 16%併發內臟癌症。

此症可因職業性接觸或吸入砷化物所致或治療之目的而服用含砷藥物引起。發生率頗高，在臨床慢性疾病長期應用砷化物治療後，約有 40%患者可出現手掌或足掌角化病灶。

組織病理變化:早期與老人性角化不易區別。晚期病理所見與 Bowen 氏病相同，區別兩者之唯一特點是砷性角化症之顯著空泡(vacuolization)，當轉變為鱗狀細胞癌時與單純之鱗狀細胞癌不同者有下列數點:(1)顯著的空泡;(2)高度的細胞核縮集(pyknosis)現象，及(3)空泡化以外的不良角化極顯著。

烏腳病(**black-foot disease**)是台灣西南部一種地方性疾病。其症狀徵候及病理變化與砷性角化症相同。由於下肢小血管及中血管有栓塞性血管炎的病變，下肢呈現色素沉著，角化，慢性潰瘍及壞死等。原因已被証實與當地居民飲用井水所含砷化物有關。

皮膚表皮癌可分為:

- (1)基底細胞癌(basal cell epithelioma)
- (2)鱗狀細胞癌(squamous cell epithelioma)
- (3)惡性黑色素細胞癌(malignant melanoma)

在本研究皮膚癌樣本中只包括基底細胞癌及鱗狀細胞癌，不包括惡性黑色素細胞癌。

惡性變化(癌)之診斷通常根據四項標準:(1)非典型的細胞出現(2)侵入的破壞性增殖，(3)增殖之迅速性，(4)轉移(metastasis)之發生。當診斷癌症時至少應具備上述四項標準；但也有例外，例如:接合部黑色素母斑(junction nevus)中之所謂 Dubreuilh 之黑色症(melanosis)通常可呈現非典型的細胞及侵入性增殖現象，但增殖極慢，有些病例經過幾十年仍然無變化，僅極少數部份病例有轉移之發生。

五.染色體斷裂與癌症之相關性:

腫瘤抑制基因(Tumor-suppressor gene)失去活性是造成人類各種腫瘤病理變化的主要步驟，因為兩個對偶基因(allelic copies)的失去活性而形成腫瘤。

Wei Cui， Kemp 等人(1994)研究顯示: 缺乏轉型生長因子(TGF-beta 1:transforming growth factor-beta 1)會促使良性腫瘤有高危險性轉變為惡性腫瘤。

近年來許多研究發現在人類的染色體上有許多易脆位置(fragile sites)，這些位置會受遺傳因子與環境因子的影響而產生斷裂(Glover et al.,1984; Smeets et al.,1986; Yunis,et al.,1987)。
。在正常情況下，這些易脆位置出現斷裂的頻率非常低；但若在細胞的培養液加入某些藥劑處理，則將大大提升易脆位置的表現頻率，例如:bleomycin(Puvirk, and Austine,1991)。

Moles 等人(1993):證明基底細胞癌(BCCs:basal cell carcinoma)和鱗狀細胞癌(SCCs:squamous cell carcinoma)這兩種腫瘤都有 ras 和 p53 mutation。Gailani 等人(1992):發現在家族性遺傳(familial)和自發性(sporadic)BCCs: 有染色體缺失 9q22-31。Goudie 等人(1993):SCCs 缺失染色體 9q22-31 及在第 9 對染色體有異型接合子缺失(LOH:loss of heterozygosity)。Anthony (1994)研究顯示:BCCs 高頻率缺失在 9q; 意味 9q 有類似腫瘤抑制基因存在。而 SCCs 則顯示出廣泛性的染色體缺失, 如: 9q, 13q, 17p, 17q, 和 3p。

Michelle M.LeBeau and Janet D. Rowley(1984)表示癌症與染色體斷裂部位之相關性, 詳見(附表一)。

六.姊妹染色分體交換介紹:

(SCE:sister chromatid exchange)

染色體可以染成半邊深、半邊淺的對比染色。姊妹染色分體之間會有互換的情形，互換的頻率可以作為高等生物細胞內遺傳物質受傷的指標；也可用來研究細胞週期進展的快慢。

SCDS(sister chromatid differential staining):姊妹染色分體對比染色是怎樣產生的呢？一般是讓 5-bromodeoxy-uridine(簡稱:Bu)進入細胞內，因為 Bu 的化學構造很像細胞胸腺嘧啶(thymidine)，所以，細胞在進行 DNA 複製時，Bu 就魚目混珠的混入 DNA 的結構中。以符號 T 代表胸腺嘧啶，以 B 代表 Bu，則第一次 DNA 複製後，每一條染色分體的 DNA 都是 BT，沒有不同；但是，若細胞繼續以 Bu 取代胸腺嘧啶進行第二次 DNA 複製後，則同一條染色體的兩條分體中，會有一條染色分體的 DNA 為 BT，而另一條為 BB。如此，同一條染色體的兩條染色分體的 DNA 含 Bu 的股數就有不同。BT 染色分體只有一股 DNA 含 Bu，BB 染色分體則兩股 DNA 都含有 Bu；SCDS 就是建立在這個「不同」的點上。

這種 BT-BB 染色體若先以染核酸的螢光染料，如: Hoechst 33258、acridine orange 或 4'-6-diamidino-2-phenylindole(簡稱 DAPI)作用，在置於螢光顯微鏡下觀察。一般認為這是因為含 Bu 的 DNA 會抑制螢光的產生，所以，BT 染色分體螢光較亮，而 BB 染色分體螢光較暗。其實，普通光學顯微鏡也可以用來觀察 SCDS。

SCE 的產生代表 DNA 之複製產物在對等處發生交換，一般認為 SCE 代表 DNA 受傷。研究顯示致變劑(mutagens)

以及大部份的致癌劑(carcinogens)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

七.微小核(MN:micronuclei)

是細胞受某物質傷害大小的指標。利用 cytochalasin B 阻斷細胞分裂，使細胞停留在核分裂而細胞未分裂的雙核時期，此時會有 MN 的產生。某物質對細胞傷害越大雙核細胞中之 MN 產生越多。

八.研究動機：

由於前人的研究主要是以流行病學及社會人口統計學的方法研究台灣烏腳病盛行地區砷與皮膚癌之相關性，因此，本篇研究想進一步利用細胞遺傳學的方法，如：

- 1.染色體斷裂頻率及斷裂位置
- 2.姊妹染色體交換頻率
- 3.微小核出現的頻率，

來瞭解

- 1.以上三項皮膚癌患者與正常人之間是否有差異？
- 2.以 bleomycin 誘發染色體斷裂是否可以顯現出皮膚癌患者與正常人之間是否有差異？
- 3.以 bleomycin 加 arsenic 來誘發染色體斷裂是否會增加斷裂的頻率？皮膚癌患者與正常人之間是否有差異？
- 4.砷的劑量增加是否姊妹染色體交換頻率也隨著增加？
- 5.加砷處理後微小核出現的頻率是否有增加？
皮膚癌患者與正常人之間是否有不同？

第二章 材料與方法

2.1: 實驗樣本:

(1) 研究世代(烏腳病高盛行居民世代)

烏腳病高盛行居民世代係於 1988 年 10 月至 1989 年月建立(陳建仁教授)。此世代選自烏腳病盛行率最高之嘉義縣布袋鎮好美，復興，新民三里，烏腳病盛行率分別為每千人口 13.62，9.60 及 10.30 人。研究世代成員以年齡 30 歲以上之居民為主，共計 1571 人。每一年進行一次健康檢查及追蹤問卷調查，並於 1989 年，1991 年以及 1993 年進行三次皮膚科檢查。

(2) 皮膚癌之診斷

由皮膚科專科醫師進行臨床診斷，分成波文氏(Bowen's disease)，第二型砷角化症(Type B arsenic keratosis)，基底細胞癌(basal cell carcinoma)，鱗狀細胞癌(squamous cell carcinoma)，以及混合型(mixed type)五類，並記錄皮膚病變所在位置。

(3) 皮膚癌個案之選取

本研究以新發生皮膚癌之病患為個案，以第一次皮膚科檢查(1989 年)沒有任何癌症病灶，而於第二次(1991 年)或第三次(1993 年)被檢查出有皮膚癌症病變者為新發生個案，共計 32 人。

(4)健康對照組之選取

烏腳病高盛行居民世代中之健康居民(無癌症且無烏腳病)，以病例比對照 1:1 比例。每個皮膚癌個案隨機選取 1 名年齡、性別、診斷日期配對之健康對照，並以在三個月之內未接受輸血、放射線治療為優先。

(5)生物檢體之採集

利用加抗凝血劑(肝素，heparin) 真空採血器，抽取 15ml 血液。作為周邊淋巴細胞之染色體異常，姊妹子染色體交換及微小核實驗用。血液抽取後保存於攝氏 4 度溫度下經由快遞送回實驗室，在 24 小時內進行周邊淋巴細胞之培養。

2.2: 培養液:

RPMI-1640(GIBCO):15% FCS , 1% PSN , 84% RPMI-1640
M-medium(GIBCO):4.5% FCS , 1% PSN , 94.5%M-medium

2.3: 藥品名稱及製備:

BrdU(5'-Bromo-2'-Deoxyuridine)	(SIGMA)
33258 Hoechst	(SIGMA)
2 xSSC(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O:4.411gm 加 加去離子水 500ml)	NaCl:8.766gm (MERCK)
Cytochalasin B	(SIGMA)
Bleomycin(最終濃度 15ug)	(FLUKA)
Na.AsO ₂ (最終濃度 0.5 , 1 , 2ug)	(MERCK)
FCS(Fetal Calf Serum)	(GIBCO BRL)
Fixation Solution (methanol :acetic acid=3:1)	(E.MERK)
Heparin Sodium (B Braun Melsungen AG)	
Hypotonic Solution (0.54% KCl)	(E.MERK)
PHA(Phytohemagglutinin) M form	(GIBCO)
PSN(Penicillin, Streptomycin, Neomycin)	(GIBCO)
GIMESA	(MERCK)
Wright Stain	(FISHER)

2.4: 儀器:

Laminal Flow : Bellco Glass Inc. (USA)

Incubator(培養箱):

Forma Scientific Steri-cult Incubator

Temperature:37 度 C , Humidity 60-98% , CO₂ 5%

Water-Jacketed Incubator

Centrifuge(離心機):

Time and Speed (8 min x 1200 rpm) (HITACHI)

Slide Warmer (烘片機) (FISHER)

2.5: 實驗方法與步驟:

2.5.1: 各種藥品的處理時間及濃度經預試之處理

實驗項目↓	培養時間 →	0123---8--	--24hrs--	---44hrs-	--63--66--68--72hrs
一. 染色體 斷裂	1.Lym. 2.Lym+As 3.Lym+ Bleomycin 4.Lym+As+ Bleomycin	以 M-medium 培養			63hrs:加 15ugbleo- mycin; 66hrs:加 0.1 ml. Colcemid ; 66.5hrs:加 0.1ml.EB 68-72hrs:harvest
二. 姊妹染色分 體交換	1.SCE 2.SCE+As0.5uM 3.SCE+As1.0uM 4.SCE+As2.0uM	以 RPMI-1640 培養	SCE 組加 0.1cc BrdU (避光)		64-68 hrs harvest; harvest 前 30 分鐘 加 0.1ml. Colcemid
三. 微小核	1.MN 2.MN+As	以 RPMI-1640 培養		MN 加 Cyt.B 0.1ml.	62-66 hrs harvest

2.5.2 細胞的培養(Cell Culture)

每位個案抽取 15 ml. 周邊血液加 0.3 ml. heparin

↓ 靜置 30 分鐘

取含 buffy coat (lymphocytes) 之血液 5 ml.

↓ 培養 10 瓶

一. 染色體斷裂(Chromosome Break)

1.Lym. : 9.3 ml. M-medium+ 0.5 ml Blood +0.2 ml. PHA

2.Lym.+As.1uM : 9.1 ml. M-medium +As.1uM
+0.5 ml.Blood+0.2 mlPHA

3. Lym.+Bleo.15ug : 9.25 ml.M-medium+Bleomycin 15ug
+0.5 ml.Blood+0.2 ml.PHA
4. Lym.+As.+Bleo. : 9.05 ml.M-medium+As.1uM+Bleomycin 15ug
+0.5 ml.Blood+0.2 ml.PHA

二.SCE(sister chromatids exchange):

- I. Untreated 組: 9.2 ml.RPMI-1640+0.5 ml.Blood+0.2 ml.PHA
- II. 加 As.0.5uM 組: 9.1 ml.RPMI-1640+As.0.1 ml.(stock 50uM)
+0.5 ml.Blood +0.2 ml.PHA
- III. 加 As.1.0uM 組: 9.0 ml.RPMI-1640+As.0.2 ml.(stock 50uM)
+0.5 ml.Blood +0.2 ml.PHA
- IV. 加 As.2.0uM 組: 8.9 ml.RPMI-1640+As.0.4 ml.(stock 50uM)
+0.4 ml.Blood +0.2 ml.PHA

三.MN(micronuclei) :

- 1.MN : 9.2 ml. RPMI-1640+0.5 ml.Blood +0.2 ml.PHA
- 2.MN+As1uM : 9 ml.RPMI-1640+As 1uM+0.5 ml.Blood+0.2 ml.PHA



置於培養箱(Incubator , 37 度 C, 5 % CO₂)

↓ 24 小時

每瓶 SCE 加 BrdU 0.1 ml.

↓ 20 小時

每瓶 MN 加 cytochalasin B 0.1 ml.



一.Chromosome

Break 組

經培養

68-72 小時

收穫

二.SCE 組

培養 64-68

小時收穫

三.MN 組

培養 62-66 小時

收穫

2.5.3：收穫細胞與染色體之製備：

一. Chromosome Break 組

在收穫前 2 小時將 0.1ml colcemid(0.05ug/ml)
加入各培養瓶中,1 小時 30 分鐘前加 0.1ml EB



將各組培養的細胞分別倒入離心管



離心 8 分鐘, 1500 rpm

倒掉上清液



加入 10ml 的 0.54%KCl 低張溶液



靜置 18 分鐘



離心 8 分鐘, 1500 rpm

倒掉上清液, Mix 均勻沉澱物



緩緩加入 8ml 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)並 Mix 均勻



靜置 30 分鐘



離心 8 分鐘

倒掉上清液, 並 Mix 均勻



加入 8ml 固定液



靜置 10 分鐘



離心 8 分鐘

倒掉上清液, 並 Mix 均勻



加入 8ml 固定液



靜置 5 分鐘



離心 8 分鐘

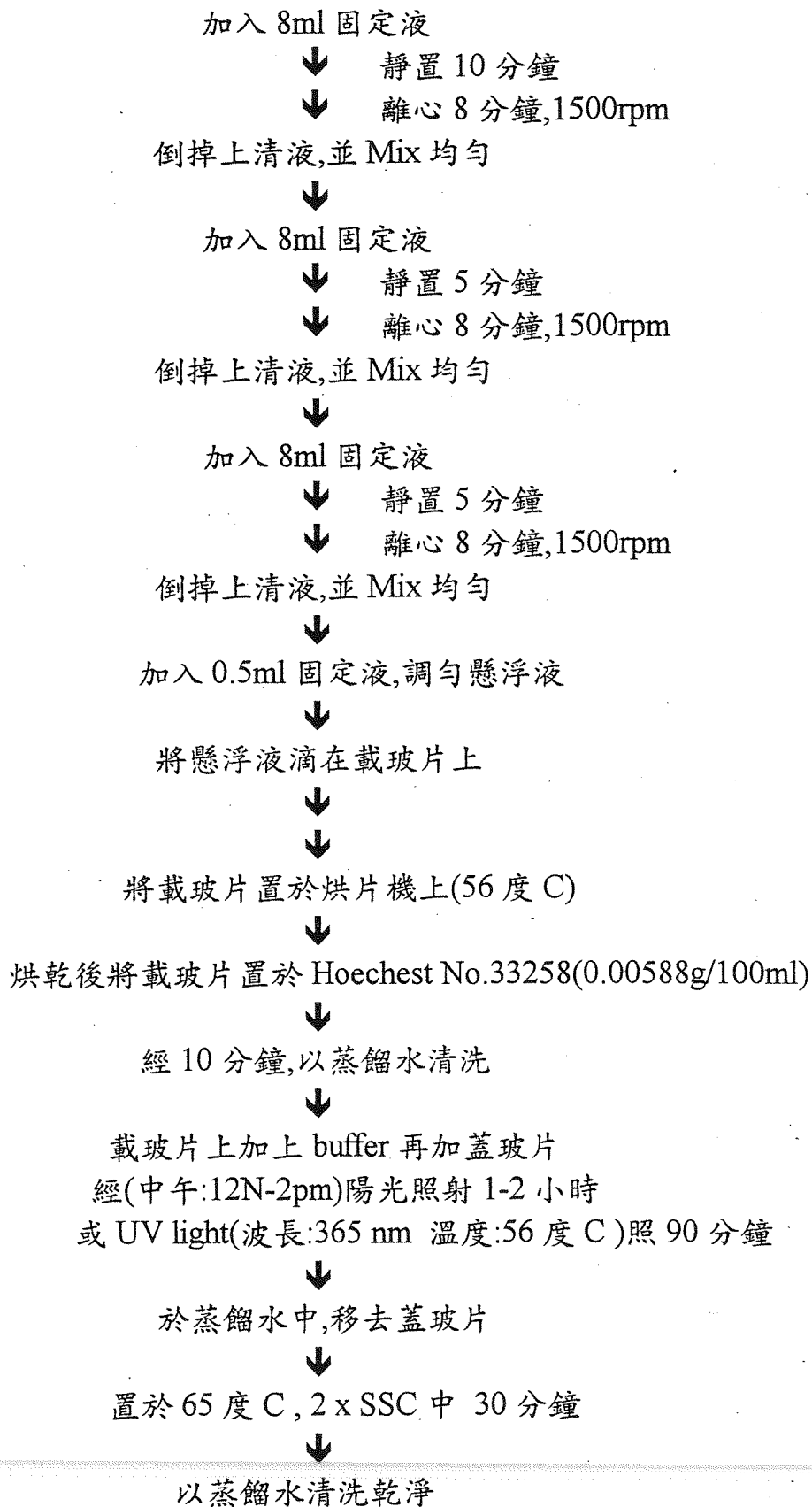
倒掉上清液, 並 Mix 均勻



加入 8ml 固定液
↓ 靜置 5 分鐘
↓ 離心 8 分鐘
倒掉上清液,並 Mix 均勻
↓
加入 0.5ml 固定液,調勻懸浮液
↓
將懸浮液滴在載玻片上
↓
將載玻片置於烘片機上(56 度 C) 24 小時
↓
以 Trypsin-Giemsa Staining 方法染色
(使用 Wright's Stain)

二.姊妹染色體交換

在收穫前 30 分鐘於各培養液中,
各加入 0.1ml(0.05ug/ml) colcemid
↓
各組培養細胞分別倒入離心管
↓ 離心 8 分鐘,1500rpm
倒掉上清液,並 Mix 均勻沉澱物
↓
加入 10ml 的 0.54%KCl 低張溶液
↓ 靜置 18 分鐘,
↓ 離心 8 分鐘,1500rpm
倒掉上清液,並 Mix 均勻沉澱物
↓
緩緩加入 8ml 固定液(甲醇 : 冰醋酸=3:1)
↓ 靜置 30 分鐘
↓ 離心 8 分鐘,1500rpm
倒掉上清液,並 Mix 均勻
↓



以 Giemsa Staining 方法進行染色
2% Giemsa 染 17 分鐘



置於烘片機中烘乾

三.微小核組

經 62-66 小時培養後倒入離心管



離心 8 分鐘,1500rpm

倒掉上清液,Mix 均勻



加入 8ml 0.54% KCl 靜置 1 分鐘



離心 8 分鐘,1500rpm

緩緩加入 8ml 固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)



靜置 30 分鐘



離心 8 分鐘,1500rpm

倒掉上清液,並 Mix 均勻



加入 0.5ml 固定液,並 Mix 均勻



以近距離 1-2cm 滴懸浮液至載玻片上



置於架上自然風乾

2.5.4. 染色體的觀察與分析:

一. 染色體斷裂組:

在顯微鏡下採隨機方法觀察染色體分散良好的中期細胞(Metaphase),每一種處理均記錄 100 個 metaphases。我們依照 1985 年國際人類細胞遺傳命名系統(ISCN: international system for human cytogenetic nomenclature)的標準來記錄染色體的斷裂點(breakpoint)。如有難以分析之染色體變異,則予以照相並排列其核型(karyotype)。

二. 姊妹染色分體交換組:

在顯微鏡下採隨機方式觀察姊妹染色分體交換情形,每一種處理均記錄 40 個分散良好的 M2 期中期細胞(metaphases)並記錄 M₁, M₂, M₃ 在 100 個 metaphases 中所佔比例,計算出複製係數=(1xM₁+2xM₂+3xM₃)除以 100。在實驗條件相同的情形下複製係數越高者表示該族群的細胞週期進行比較快。

三. 微核計數:

微核為除了細胞核外,存在細胞質內的微小核,每個研究對象計數 1000 個細胞,並將具有微核之細胞照相保存。

2.5.5.統計方法:

本實驗以 ANOVA(Analysis of Variance)方法分析這些不同條件處理下的染色體斷裂頻率、染色體交換頻率、及微小核是否有差異。

第三章 結果

一. 染色體斷裂數目之比較:

(一) 染色體斷裂數目平均值:

統計分析每位個案觀察 100 個 metaphase 所含斷裂數目，由(表一)可以看出對照組染色體斷裂數目平均值：以 arsenic 加 bleomycin 組最多為 145.74 個/人，漸次遞減為 bleomycin 組: 106.33 個/人，arsenic 組: 7.59 個/人，及 untreated 組: 2.93 個/人。

由(表二)可以看出皮膚癌患者染色體斷裂數目平均值：以 arsenic 加 bleomycin 組最多為 239.46 個/人，漸次遞減為 bleomycin 組: 178.92 個/人，arsenic 組: 6.31 個/人，及 untreated 組: 2.46 個/人。

在對照組及皮膚癌患者皆顯示 arsenic 加 bleomycin 之處理組斷裂數目最多，次多為加入 bleomycin 之處理組，第三為加入 arsenic 組，以未做任何處理組染色體斷裂數最少。

(二) 對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目之比較:

進一步利用變異數分析，比較對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目有無差異，結果如(表十一)顯示：

1. 在未加任何處理之對照組與皮膚癌患者之間染色體斷裂數目沒有差異。

2. 只有加 arsenic 處理之對照組與皮膚癌患者之間染色體斷裂數目也沒有差異。
3. 在加入 bleomycin 處理組之對照組與皮膚癌患者之間染色體斷裂數目在 99% 顯著水準下卻有顯著的差異。
4. 在 arsenic 加 bleomycin 組之對照組與皮膚癌患者之間染色體斷裂數目在 99% 顯著水準下也有顯著的差異。

由此可以瞭解加入 arsenic 及 bleomycin 確實可以誘發皮膚癌患者染色體斷裂，使得對照組與皮膚癌患者之間有更明顯的差異。

但是，bleomycin 處理組與 arsenic 加 bleomycin 處理組之間是否有差異呢？經變異數分析結果顯示(表十二):

1. 對照組在 bleomycin 組與 arsenic 加 bleomycin 組之間於 90% 顯著水準下有差異，但在 95% 顯著水準下沒有差異。
2. 皮膚癌患者在 bleomycin 組與 arsenic 加 bleomycin 組之間於 90% 顯著水準下有差異，但在 95% 顯著水準下沒有差異。

(三) 未處理組與其他三種處理之間有無差異性：

《對照組方面》

1. arsenic 組與 untreated 組之間有顯著差異($p < 0.05$)
2. bleomycin 組與 untreated 組之間有顯著差異($p < 0.05$)
3. arsenic 加 bleomycin 組與 untreated 組之間有顯著差異($p < 0.05$)

《皮膚癌患者方面》

1. arsenic 組與 untreated 組之間沒有顯著差異($p > 0.05$)
2. bleomycin 組與 untreated 組之間有顯著差異($p < 0.05$)
3. arsenic 加 bleomycin 組與 untreated 組之間有顯著差異($p < 0.05$)

二. 染色體斷裂位置之分析:

由(表三)(表四)可以瞭解對照組平均每個人 100 個 metaphases 中在各對染色體斷裂的頻率超過 10 個斷裂數目的: 在 arsenic 加 bleomycin 組: 有 2q, 3q, 4q, 5q; 其中以 4q: (14.59) 個/人 最多, 其次為 2q: (11.95) 個/人, 5q: (11.23) 個/人; 而在 bleomycin 組、arsenic 組、以及 untreated 組則沒有超過 10 個的。

由(表五)(表六)可以瞭解皮膚癌患者平均每個人 100 個 metaphases 中在各對染色體斷裂的頻率超過 10 個斷裂數目: 在 arsenic 加 bleomycin 組: 有 1p, 1q, 2p, 2q, 3p, 3q, 4q, 5q, 6q, 7q, 8q; 其中以 4q: (18.67) 個/人 最多, 其次為 5q: (17.25) 個/人。在 bleomycin 組有 1p, 1q, 2q, 3q, 4q, 5q; 其中以 4q: (16.17) 個/人 最多, 其次為 5q: (13.58) 個/人。而在 arsenic 組及 untreated 組則沒有平均值超過 10 個/人。

三. 姊妹染色體交換方面:

觀察分析每位個案 40 個 M₂ 期 metaphase 姊妹染色體交換頻率, 並以隨機取樣方式觀察 100 個 metaphase 中 M₁、M₂、M₃ 期所佔的比例, 以 $(M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3) \div 100$ 算出細胞生長指數。

(一)姊妹染色體交換頻率平均值

《對照組方面》：(表七)

- 1.Untreated 組：7.54 SCE/metaphase
 - 2.加 As. 0.5uM 組：8.51 SCE/metaphase
 - 3.加 As. 1uM 組：9.60 SCE/metaphase
 - 4.加 As. 2uM 組：11.32 SCE/metaphase
- 有漸次增加的情形。

《皮膚癌患者方面》：(表八)

- 1.Untreated 組：7.98 SCE/metaphase
 - 2.加 As. 0.5uM 組：8.75 SCE/metaphase
 - 3.加 As. 1uM 組：8.99 SCE/metaphase
 - 4.加 As. 2uM 組：9.33 SCE/metaphase
- 有漸次增加的情形。

(二) Untreated 組與其他三組之間有無差異：

姊妹染色體交換頻率隨著 arsenic 加入濃度的增加而逐漸增加，進一步利用變異數分析以瞭解 untreated 組與其他三組之間有無差異，結果顯示：

《對照組方面》(表十五)

- 1.Untreated 組與加 As.0.5uM 組之間無差異，
- 2.但 Untreated 組與加 As.1uM 及 Untreated 組與加 As.2uM 之間有差異($p < 0.05$)。

《皮膚癌患者方面》(表十六)

Untreated 組與其他三種處理組之間皆無差異。

(三)姊妹染色體生長指數平均值方面：

《對照組方面》：(表七)

- 1.Untreated 組：2.07
 - 2.加 As. 0.5uM 組：2.11
 - 3.加 As. 1uM 組：2.01
 - 4.加 As. 2uM 組：2.03
- 顯得沒有差異。

《皮膚癌患者方面》：(表八)

- 1.Untreated 組：2.10
 - 2.加 As. 0.5uM 組：1.92
 - 3.加 As. 1uM 組：1.86
 - 4.加 As. 2uM 組：1.86
- 顯得沒有差異。

姊妹染色體生長指數平均值無論是對照組方面或是皮膚癌患者方面都顯得沒有太大差異，進一步用變異數分析以瞭解 Untreated 組與其他三組之間有無差異，結果顯示：無論是對照組方面(表十七)或是皮膚癌患者方面(表十八)都顯得沒有差異。

四.微小核出現頻率：

在顯微鏡下觀察每個人 1000 個雙核細胞核內出現在細胞質中微小核的數目。

(一)對照組平均值：(表九)

- 1.Untreated 組： 6.18 個/人
- 2.加 As. 1 μ M 組： 6.55 個/人

(二)皮膚癌患者平均值：(表十)

- 1.Untreated 組： 4.71 個/人
- 2.加 As. 1 μ M 組： 7.57 個/人

微小核由平均值來看在對照組方面 untreated 組與 arsenic 1 μ M 組之間沒有差異。進一步利用變異數分析(表二十一),瞭解在對照組方面 Untreated 組與 Arsenic1 μ M 之間確實沒有差異,而在皮膚癌患者方面於 93% 顯著水準下有顯著差異。但是,比較在同一種處理下 Control 組與 Skin Cancer 組之間有無差異,結果顯示(表二十二)無差異。

第四章：討 論

一. 染色體斷裂數目之分析：

(一) 染色體斷裂數目平均值之比較：

對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目以 arsenic 加 bleomycin 組最多, bleomycin 組次之, arsenic 組第三, untreated 組最少。由此可以看出各種處理對染色體的影響程度, 以 arsenic 加 bleomycin 處理對染色體的影響程度最大。

(二) 砷的作用方面：

對照組方面: untreated 組為 2.93 個/人, arsenic 組為 7.59 個/人, 兩組之間有顯著差異($p < 0.01$); 皮膚癌患者: untreated 組為 2.46 個/人, arsenic 組為 6.31 個/人, 兩組之間在 90% 顯著水準下有顯著差異; 但在 95% 下卻沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。

這兩種處理在對照組與皮膚癌患者之間沒有顯著差異($p > 0.05$)。由此, 可以看出加砷處理後對染色體斷裂確實會造成影響, 而且加砷處理前後對正常人染色體斷裂頻率所造成的差異性比皮膚癌患者加砷前後所造成的差異性來的大, 原因可能是皮膚癌患者體內已長期有砷的累積造成皮膚癌的發生, 因此, 對砷比較不敏感, 所以, 皮膚癌患者單獨加砷處理與未處理之間的差異性沒有對照組明顯。

Lo 等人 1992 年研究顯示：由 SA7(一種對砷有抗藥性的 Chinese hamster ovary cell line) 中所純化出的 glutathione S-transferase(GST)是屬於 pi 族(family)，它可以分解 glutathione 與 ethacrynic acid(一種 GST 的抑制劑)的結合，GST pi 的 N 端氨基酸序列有 80%與老鼠(rat)的 GST P 及人類的 GST-pi 的序列完全相同。結果顯示 GST-pi 可能參與對砷的解毒作用。

Shimizu 等人 1995 年分析人類皮膚鱗狀細胞癌與正常人皮膚中盤塊狀 GST-pi 的表現，在 Northern blot 分析結果顯示：鱗狀細胞癌的 GST-pi 表現明顯的比正常人皮膚的表現高；而在免疫組織學上的分析 GST-pi 的表現在鱗狀細胞癌患者主要在細胞的細胞質，一些則在細胞核可觀察到，而在正常人的表皮細胞上層且在細胞核中沒有發現。結果顯示 GST-pi 與癌化的過程有關。

因此，皮膚癌患者單獨加砷處理與未處理之間的差異性沒有對照組明顯，是否意味著皮膚癌患者體內由於長時間砷的累積，也產生類似 GST-pi 的物質，仍有待進一步的證實，所以，加砷處理前後並沒有差異。

arsenic 是屬於長期慢性的毒性，且本實驗設計為配合採樣當地居民飲水含砷量，因此，只有加入微量(1 μ M) Arsenic；所以，在 arsenic 組染色體斷裂數目不多，而且在正常人與皮膚癌患者之間染色體斷裂數目沒有顯著差異($p > 0.05$)。



(三)Bleomycin 處理方面：

對照組為 106.33 個/人,皮膚癌患者為 178.92 個/人,兩者之間有顯著差異($p < 0.01$)。由此可以看出人類染色體中存在有許多易脆位置(fragile sites)經由 bleomycin 處理後,可以更清楚的表現出正常人與皮膚癌患者之間的差異性。李等人(1990)以十位 Fragile X 病人和十位健康對照組,培養血液淋巴球研究 bleomycin 誘發染色體斷裂的差異性,結果顯示:染色體斷裂的頻率 Fragile X 病人明顯的高出正常人。作者表示 Fragile X 病人可能更容易傾向於染色體變異及致癌,更容易傾向於腫瘤的誘發。

因此,我們可以瞭解皮膚癌患者染色體斷裂頻率在 bleomycin 的誘發下明顯的高出正常人,與造成皮膚癌的發生是有相關性的。

(四)Arsenic 加 Bleomycin 處理方面：

對照組為 145.74 個/人,皮膚癌患者為 239.46 個/人,兩者之間有顯著差異($p < 0.01$)。由此可以看出除了 bleomycin 可以誘發染色體斷裂外,加入砷後所造成的差異性更加明顯。Lyon(1980 年)證實無機砷的攝入體內會導致皮膚癌。在此,更進一步說明砷對造成皮膚癌所造成的影響。

(五)對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目均顯示:

arsenic 加 bleomycin 組染色體斷裂數目平均值比 bleomycin 組多,在 90% 顯著水準下有顯著差異;但在 95% 下卻沒有顯著差異。由此可以看出 bleomycin 的作用

相當的強，造成這兩種處理之間沒有顯著的差異，但是，以平均值來看 arsenic 加 bleomycin 組染色體斷裂數目平均值比 bleomycin 組多。

比較正常人與皮膚癌患者之間染色體斷裂數目有無差異？無論是平均值或是變異數分析(表十一)均顯示：(1) bleomycin 組及(2) arsenic 加 bleomycin 組在正常人與皮膚癌患者之間染色體斷裂數目有顯著差異($p < 0.01$)。探究其原因如下：

1. 在人類染色體中存在有許多易脆位置(fragile sites)，這些位置會受遺傳因子或環境因子的影響而發生斷裂(Sutherland, 1985; Smeets 等人, 1986)。在正常的情況下，染色體出現斷裂的頻率非常低；但是，若在細胞的培養液中加入某些藥劑處理，則將大大提升易脆位置的表現頻率，例如：bleomycin(Puvirk, and Austine, 1991)。因此，在未加藥物處理組染色體斷裂的頻率最低，而加入 bleomycin 組與 arsenic 加 bleomycin 組的斷裂頻率最高，且能顯現出皮膚癌患者與正常人之間的差異性。

2. Wei Cui, Kemp 等人(1994)研究顯示：缺乏轉型生長因子 beta (TGF-beta 1 : transforming growth factor-beta 1)會促使良性腫瘤有高危險性轉變為惡性腫瘤。因為 TGF-beta 1 是上皮細胞生長的抑制因子(Masui, et al., 1986)，所以，TGF-beta 1 產物的減少是促成腫瘤惡化速率增加的原因，因為它失去抑制生長的反應。

Blessing 等人(1995)將與 TGF-beta 相關分子 BMP-4 (bone morphogenetic protein-4)的 cDNA 轉植基因至老鼠中，再以 TPA(ester 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate)誘發 BMP-4 轉植基因的表現發現可以阻斷皮膚增生及炎症的情形，進而使乳頭瘤及鱗狀細胞瘤無法形成。

Glick 等人(1994)研究顯示缺失 TGF-beta 1 gene 導致鱗狀細胞癌的快速進行。

因此，由本實驗染色體斷裂情形可以進一步證實皮膚癌患者染色體斷裂的頻率比正常人高，而且，砷對造成皮膚癌的相關性也可由此證實。

二. 染色體斷裂位置之分析:

染色體斷裂的位置相當的分散，但是，皮膚癌患者(表六)與對照組(表四)arsenic 加 bleomycin 組斷裂最多的位置都在 4q 的位置，而 4q 上有 raf 2 的 Oncogene，是否這位置的斷裂與長期飲用含砷的水而導致皮膚癌有相關性則需要做進一步的研究分析。其次，皮膚癌患者與對照組斷裂頻率平均值 10 個/人以上共同的位置在 2q、3q、5q，而在 5q 上有 c-fms Oncogene。另外，皮膚癌患者斷裂頻率平均值 10 個/人以上而對照組沒有超過的有：1p、1q、2p、3p、6q、7q、8q。

皮膚癌患者與對照組之 bleomycin 組染色體斷裂最多的位置同樣是在 4q 的地方；對照組之 arsenic 組與 untreated 組染色體斷裂最多的位置在 3p 的地方，次多為 4q 的位置；皮膚癌患者之 arsenic 組染色體斷裂最多的位置在 3p 的地方，次多為 2q、4q 的位置；皮膚癌患者之 untreated 組染色體斷裂最多的位置在 2q、4q，次多為 3p、8q。

並將對照組及皮膚癌患者染色體最常斷裂位置整理成表，以瞭解斷裂位置與致癌基因及癌症之相關性，請參考表二十三。

BCCs(basal cell carcinoma)和 SCCs(squamous cell carcinoma)都是由 Keratinocyte 分化出的腫瘤(Yuspa et al.,1991),這兩種腫瘤中都有 ras 和 p53 腫瘤抑制基因的變異(Moles et al., 1993)。在家族性遺傳或自發性 BCCs 顯示在染色體 9q 的位置有缺失,主要缺失在 9q22-31 的位置(Gailani et al.,1992),SCCs 缺失染色體在 9q22-31 及失去染色體 9 的異型接合子(LOH : loss of heterozygosity of chromosome 9)(Goudie et al.,1993)。Anthony(1994)研究顯示: BCCs 高頻率缺失在 9q, 意味 9q 有類似腫瘤抑制基因存在;而 SCCs 則顯示出廣泛性的染色體缺失,如: 9q、13q、17p、17q 和 3p。

在本實驗也是呈現廣泛性的染色體缺失,而染色體斷裂頻率較高的位置則在 4q 及 5q 的位置, Luc Thiberville 等人(1995 年)以支氣管癌症病人之上皮細胞作組織切片發現:有染色體 3p21、5q21 和 9q21 的缺失。許多研究顯示人類第 4 對染色體包含有腫瘤抑制基因,它可以抑制許多腫瘤的形成, Thomas 等人(1995 年)研究顯示人類主要的膀胱癌有明顯的第 4 對染色體對偶基因的缺失,主要部位在 p arm 的 marker D4S1608 和 D4S404, 以及 q arm 的 marker D4S426 和 D4S408。因此,在本研究發現染色體容易斷裂的位置是否與砷誘發的皮膚癌有相關性,則可以做進一步的探討。

三.姊妹染色體交換分析：

(一) 姊妹染色體交換頻率：

對照組與皮膚癌患者的姊妹染色體交換頻率隨著 arsenic 加入濃度的增加而逐漸增加，(Fig.2-3)顯示砷(arsenic)的濃度越高對染色體交換頻率的影響越大。由(表十五)顯示對照組之 arsenic 0.5uM 組與 untreated 組之間無差異，arsenic 1uM 與 untreated 組之間有差異($p < 0.05$)，arsenic 2uM 組與 untreated 組之間有差異($p < 0.05$)，但是，(表十六)皮膚癌患者三種濃度砷的處理與 untreated 組之間在 95%顯著水準下卻無差異，探究其原因可能是因為：原因可能是皮膚癌患者體內已長期有砷的累積造成皮膚癌的發生，因此，對砷比較不敏感，所以，皮膚癌患者加砷處理與未處理之間的差異性沒有對照組明顯。

這一點正與染色體斷裂方面：皮膚癌患者在只有加入砷處理前後的差異性沒有對照組的差異性顯著的結果相互吻合。

(二) 姊妹染色體生長指數：

無論是平均值或是統計分析皆顯示各項之間無差異(表十七)、(表十八)，顯示細胞的生長複製在不同的環境下仍能保持一定穩定的狀態。

四.微小核之分析：

由(表三十七)可以看出在控制組方面加入砷後並沒有差異，而在皮膚癌患者方面加入砷後與未處理組相比較卻有差異。顯示：皮膚癌患者微小核的出現會受到砷的加入而有差異，而正常人卻不會受到砷的影響。Wang and Huang(1994)以 CHO-K1(Chinese hamster ovary) cell line 及 XRS-5(X-ray sensitive CHO)cell line 作研究：發現加入砷處理後 XRS-5 cell 所產生的微小核數目為 CHO-K1 cell 所產生的微小核數目的 4 倍，而且 XRS-5 cell 比 CHO-K1 cell 的 catalase activity 低 6 倍；而 catalase 可以有效的降低由 arsenite 所誘發的微小核。砷在細胞的代謝過程中會產生過氧化氫(Yamanaka et al.,1991)。因此，缺乏 catalase 的細胞會在 Oxidative Stresses 之後累積更多的過氧化氫(Vuillaume et al.,1992)，而有較多的微小核產生。

Balasubramaniyan 等人(1994)以子宮頸癌與正常人的 glutathione 含量、catalase 及 superoxide dismutase 的活性做比較，結果顯示：在腫瘤組織第 II, III, IV 期的 glutathione 含量、catalase 及 superoxide dismutase 的活性有顯著下降的情形($p < 0.001$)，而在癌症第 III 和第 IV 期病人的 glutathione peroxidase 及 glutathione reductase 活性顯著的比正常的對照組來的低。而且在癌症第 II 期以前組織中 lipid peroxides 的含量和 glutathione -S-transferase 活性顯著的比正常人高。由這些觀察可以瞭解子宮頸癌症病人體內抗氧化狀態損傷的情形。

在本研究中皮膚癌患者加砷前後微小核的數目有顯著的差異，而正常人加砷前後微小核的數目卻沒有顯著的差異，這是否意味著皮膚癌患者體內的 catalase 較少，所以

加入砷處理後皮膚癌患者的微小核有明顯的增加，與未加砷處理的微小核數目比較有明顯的差異。而正常人體內的 catalase 在正常的範圍內，因此，加砷處理後的微小核數目與未加砷處理的微小核數目比較沒有差異。

五.結論：

由以上染色體斷裂頻率、姊妹染色體交換頻率以及微小核數目之比較分析可以瞭解：砷的處理對染色體斷裂確實會造成影響，高濃度的砷能誘發染色體潛在的變異性特質，而造成染色體交換的頻率增加以及微小核的數目增加。因此，由本研究瞭解：砷對人體造成皮膚癌確實有其影響力，而且，在本研究發現經處理後染色體斷裂頻率較高的位置，值得我們將來做進一步的探討。

Michelle M. LeBeau and Janet D. Rowley (1984) 表示癌症與染色體斷裂部位之相關性:

(附表一)

Chromosome													
Number	2	3	X	6	7	8	9	10	11	12	16	17	20
Fragile Site	q13	p14	q27	p23	p11	q22	p21	q23	q13	q13	p12	p12	p11
Oncogene	Fos Myc	Rat	Ras	Myb Ras	ErbB Myc	Mos	Abl		Ras	Ras		ErbA	Src
Chromosome													
Aberration	t(2,8)	del(3p)	t(6,9)	del(7q)t(8;21)	t(9;22)				del(11p)+12	del(16q)t(15;17)			
			del(6q)	t(8;14)	t(6;9)				t(11;14)	inv(16)	i(17q)		
			+6	+8	t(9;11)				t(11q)				del(20q)
			t(6;14)						del(11q)				
Disease	BL	Lung Ca	ANLL ALL Lymphoma Ovarian Ca	ANLL	AML BL ANLL	CML ANLL			WILMS NHL ANLL	CLL	AMMOL		MPD APL CML-BC

Diagram of chromosomes containing known fragile sites; the chromosome number, fragile site, oncogene, karyotypic aberrations and associated neoplastic diseases are indicated below the chromosome. The arrowheads to the left of each chromosome indicate the bands carrying the *fragile site* (>) or *cellular oncogene* (>); the arrow(s) to the right of a chromosome identify specific bands involved in consistent translocations or deletion observed in patients having the disorders list. Additional symbols (*, #, +) link the aberration to a disease. BL, blast crisis; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; APL, acute promyelocytic leukaemia; MPD, myeloproliferative disorder. p indicates the short arm and q the long arm of the chromosome; t, del and inv indicate translocation, deletion and inversion.

一.染色體斷裂數目之比較:

(一)對照組(Case Control) : (27人)

統計分析每位個案觀察100個metaphase所含斷裂數目

(表一) 對照組染色體斷裂數目(個/100 metaphases/人)

Culture treatment	untreated	Arsenic	Bleomycin	Arsenic + Bleomycin
L0491	2	3	175	193
L0871	1	3	16	45
L2401	4	5	123	186
L3223	4	2	120	102
M0004	4	14	152	202
M0261	2	9	337	418
M1882	2	10	91	76
M3662	0	2	273	255
M3783	1	11	78	156
M3891	6	20	137	272
M4622	1	19	53	68
M4881	3	6	43	91
M4941	4	11	51	150
M5172	2	23	48	65
M5301	2	3	65	62
M5791	1	1	52	49
M6092	3	8	153	146
M6661	2	7	60	104
N0071	2	6	86	118
N0211	7	3	60	87
N0212	3	2	104	165
N0622	4	2	141	150
N0661	2	4	56	123
N0731	2	3	114	116
N1341	11	13	123	255
N3061	4	5	70	118
N3062	0	10	90	163
總計	79	205	2871	3935
平均值	2.93	7.59	106.33	145.74

(二)皮膚癌患者組(Skin Cancer) (13 人)

(表二) 皮膚癌患者組染色體斷裂數目(個/100 metaphases/人)

Culture treatment	untreated	Arsenic	Bleomycin	Arsenic + Bleomycin
L0311	0	5	194	241
L1391	2	4	169	262
L1581	2	1	212	212
L1591	3	2	198	233
L2862	3	4	113	137
M0251	2	28	163	191
M0281	2	10	93	171
M0731	1	1	240	227
M1282	1	0	283	373
M2491	3	7	312	439
M2651	2	3	96	131
M5551	3	14	116	291
N0621	8	3	137	205
總 計	32	82	2326	3113
平 均 值	2.46	6.31	178.92	239.46

二. 染色體斷裂位置之分析:

Bleo.=Bleomycin , A & B=Arsenic & Bleomycin

(表三) 對照組染色體斷裂位置及斷裂頻率:(22 人)

個 案及處理	位置	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	
L0491																						
Untreated						1			1													
+Arsenic						2			1													
+Bleo.	11	9	8	12	11	10			20	1	9	3	11	1	11	2	7		5	1	6	
+A & B	9	10	3	17	7	15		3	16	4	16	1	8	1	7	1	7		12	1	4	
L0871																						
Untreated						1																
+Arsenic					1				1		1											
+Bleo.	2		2	2	1	1		1	1										1			1
+A & B	2	3	1	2	2	4			4		6	2	4		1		4		2			1
M0004																						
Untreated		1				1			1													
+Arsenic	2	2			1	1			1		1	1	2									2
+Bleo.	12	12	5	14	6	8	1	20	3	12	4	12	2	7			8		2	1	2	
+A & B	15	7	8	22	16	16	2	12	1	21	1	12	1	13			8	2	7	1	5	
M0261																						
Untreated			1										1									
+Arsenic		1	1	1					1						2							1
+Bleo.	14	19	19	24	14	14	3	34	1	22	9	14		13	2	11			5	3	17	
+A & B	15	16	24	38	26	20	5	39	1	21	8	21	5	18	7	20	3	6	2	13		
M1882																						
Untreated						1													1			
+Arsenic		1	1	1	3	1			1	1									1			
+Bleo.	3	6	4	5	7	5			5		9	2	6	1	3	1	7		4		5	
+A & B	2	6	4	5	7	6			6	1	11		4	2	2		2		2	1		
M3662																						
Untreated																						
+Arsenic									1				1									
+Bleo.	23	15	15	22	9	16	3	24	4	11	5	14	2	9	1	12	5	5	4	11		
+A & B	13	9	16	17	14	15	1	17	1	23	3	12	3	16	1	7	3	7	2	7		

個 案及處理	11		12		13	14	15	16	16	17	17	18	18	19	20	20	21	22	X	X	總 計
	p	q	p	q	q	q	q	p	q	p	q	p	q	q	p	q	q	q	p	q	
L0491																					
Untreated																					2
+Arsenic																					3
+Bleo.	2	2		12	3	4	3		2		1		3							5	175
+A & B	3	4	4	8	8	4	3	1	2				4			1			4	5	193
L0871																					
Untreated																					1
+Arsenic																					3
+Bleo.				1			1		1										1		16
+A & B				1	2		3						1								45
M0004																					
Untreated									1												4
+Arsenic																			1		14
+Bleo.	1	2	2	6	4						1									5	152
+A & B		4	1	6	8	2	4				1		3						2	1	202
M0261																					
Untreated																					2
+Arsenic					1		1														9
+Bleo.	4	12	4	17	12	7	10	3	6		7		2			4			1	10	337
+A & B	1	11	6	10	14	6	18	2	13	1	10		9		1	2				6	418
M1882																					
Untreated																					2
+Arsenic																					10
+Bleo.	1	3	1	2	2	1	3		1				1							3	91
+A & B		3		4	3	1	1						2						1		76
M3662																					
Untreated																					0
+Arsenic																					2
+Bleo.	1	12		8	11	11	5	1	3		2		5						1	3	273
+A & B	4	11	1	12	10	6	4		4		1		5			1			1	8	255

個 位置 案及處理	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	
M3783																					
Untreated										1											
+Arsenic		1			1	1				2				1		1					
+Bleo.	4	5	2	7	1	7		7	1	6		8		2		2		1	1	4	
+A & B	12	10	4	10	12	16		13	1	9	3	7		8	1	3		5	2	5	
M3891																					
Untreated	2	1				2											1				
+Arsenic	3	2	3	1	4	1		3		1		1				1					
+Bleo.	12	10	6	11	8	14	2	10	1	9		10	3	5		8	2	3	1	1	
+A & B	17	26	11	18	13	18	3	25		20	5	18	1	18		9	3	6	1	4	
M4941																					
Untreated					2									1							
+Arsenic	1	1			3	1		1				1		1				1			
+Bleo.	4	2	1	3	7	2		3	1	7		6	1	2			1				3
+A & B	5	9	4	17	13	11	2	20		6	1	11	5	5		5	3	4		2	
M5172																					
Untreated		1				1															
+Arsenic	1	1	1	2	1	2	2	2		2		4		1						1	1
+Bleo.	4	5	3	1	3	2		7	1	6	2		1	1	1	2		1			2
+A & B	7	7	4	3	4	4	1	4	1	5	1	3		2		3		3	1		2
M5301																					
Untreated					1									1							
+Arsenic			1	1																	
+Bleo.	5	7	3	5	5	6	1	5	1	3		6		3	1	2		1			2
+A & B	5	5	6	1	4	2	2	7	1	7		1		1		5		1			5
M5791																					
Untreated					1																
+Arsenic																					
+Bleo.	2	1	2	3	4	3	1	9		4		1	1	2		3	1				4
+A & B	4	4	1	2	4	3		6	1	5	1	2		2		2					3

個 位置 案及處理	11	11	12	12	13	14	15	16	16	17	17	18	18	19	20	20	21	22	X	X	總 計
	p	q	p	q	q	q	q	p	q	p	q	p	q	q	p	q	q	q	p	q	
M3783																					
Untreated																					1
+Arsenic		2							1											1	11
+Bleo.	1	1	1	2	4	1	5												1	4	78
+A & B	1	7	2	5	7	3	3			1										6	156
M3891																					
Untreated																					6
+Arsenic																					20
+Bleo.	2	4	2	4	4	1	2			1										1	137
+A & B	1	16	3	9	6	7	4			1	1							1		7	272
M4941																					
Untreated							1														4
+Arsenic																			1		11
+Bleo.	2	2		2		1														1	51
+A & B		13		5	6				2											1	150
M5172																					
Untreated																					2
+Arsenic					1	1															23
+Bleo.	1			2	2		1														48
+A & B	1	2	1	2	2	1	1														65
M5301																					
Untreated																					2
+Arsenic		1																			3
+Bleo.		2		2	2		2													1	65
+A & B		2	1	1	2	1	1													1	62
M5791																					
Untreated																					1
+Arsenic																		1			1
+Bleo.		2		4	4		1														52
+A & B		1		2	2	1							1							2	49

個 位置 案及處理	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q
M6092																				
Untreated		1		1		1														
+Arsenic		3	1		1	1											1			
+Bleo.	7	2	6	13	10	8	3	12	1	6	5	11	2	6	1	11	2	4	1	6
+A & B	3	7	5	14	17	6	1	11	3	6	1	11	1	7	3	10	2	3	1	1
M6661																				
Untreated		1				1														
+Arsenic		1			1	1				1										1
+Bleo.	6	4	6	6	4	4		7		6	3	2		1				1		1
+A & B	5	5	5	9	6	7		12	1	7		3	2	8	1	4			2	3
N0071																				
Untreated						1												1		
+Arsenic		1			2							1		1	1					
+Bleo.	1	7	4	3	13	7	3	10		7	1	3	1	5		1		1		
+A & B	9	11	4	13	7	10		11	1	8	1	1	3	6		2	1	1		8
N0211																				
Untreated	1				3	1		2												
+Arsenic					3															
+Bleo.	3	5	1	6	3	2		12		11		2		2		2		2		5
+A & B	2	2	3	7	5	7		8	1	12		9		4		5	1	5		1
N0212																				
Untreated			1	1				1												
+Arsenic	1																			1
+Bleo.	6	9	2	6		7	2	10		10	3	6	3	8		6	1	2		3
+A & B	11	13	14	13	8	12		17	1	11		12	2	4	2	8	1	6	1	3
N0622																				
Untreated	1							1		1							1			
+Arsenic					1												1			
+Bleo.	2	9	10	13	5	8	2	19	2	6	3	9	2	3	4	9	2	4		
+A & B	9	5	3	12	11	6		14	1	7	2	2	5	9		9	2	9		7

個 案及處理	位置 11 p	11 q	12 p	12 q	13 q	14 q	15 q	16 p	16 q	17 p	17 q	18 p	18 q	19 q	20 p	20 q	21 q	22 q	X p	X q	總 計
M6092																					
Untreated																					3
+Arsenic								1													8
+Bleo.	3	7	3	5	5		3	1	1			2			1				1	4	153
+A & B	2	7	1	6	5	4	2					1	1	1					1	2	146
M6661																					
Untreated																					2
+Arsenic					1														1		7
+Bleo.	1	1			1	1	1						1							3	60
+A & B	1	2	1	7	1	1	1			1		2							1	6	104
N0071																					
Untreated																					2
+Arsenic																					6
+Bleo.	1	1	2	2	3	2	1		1										1	5	86
+A & B	1	4		7	2	3	3		1												118
N0211																					
Untreated																					7
+Arsenic																					3
+Bleo.		1			1		1						1								60
+A & B		1		3	3	2	2		1				1							3	87
N0212																					
Untreated																					3
+Arsenic																					2
+Bleo.		2	1	2	6	5	1														3 104
+A & B	1	2		8	6	2	1		1				1						2	2	165
N0622																					
Untreated																					4
+Arsenic																					2
+Bleo.	1	6	1	6	6	3	3		1				1	1							141
+A & B		6	1	11	2	6		1	1	1	1		3			1				3	150

個 案及處理	位置	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q
N0661																					
Untreated						1											1				
+Arsenic	1		1									1									
+Bleo.	3	4	1	7	1	7	1	10		3		4		2	1				1		3
+A & B	5	9	7	4	7	9	1	18	2	7		7		4	2	5	1	3			1
N1341																					
Untreated					6	1		1		1											
+Arsenic	1		1		7			1				1							1		
+Bleo.	6	7	6	10	10	8		15		9		9	1	5	1	5	3	5			7
+A & B	13	20	11	23	17	15		25	1	20	2	21		12	2	10	1	7	2	10	
N3061																					
Untreated	1	1			1																1
+Arsenic					1	1		2						1							
+Bleo.	5	5		3	6	5		5	1	6	2	6		8		2					1
+A & B	5	8	4	6	11	7		12	1	8		6	1	11		4		2	1	2	
N3062																					
Untreated																					
+Arsenic		1		1	1	1		1						1				1			
+Bleo.	6	5	7	8	7	5		9	1	4		7	2	6		4	3				2
+A & B	9	12	5	10	7	12	1	24		11	2	14		10	1	6	2				3

個 案及處理	11		12		13	14	15	16		17	18	18	19	20	20	21	22	X	X	總 計
	p	q	p	q	q	q	q	p	q	p	q	p	q	p	q	q	q	p	q	
N0661																				
Untreated																				2
+Arsenic					1															4
+Bleo.		3		1		2			1										1	56
+A & B		6	1	6	7	4	3			1		1						1	1	123
N1341																				
Untreated					1		1													11
+Arsenic																			1	13
+Bleo.		2	1	2	4	2	1					1						1	2	123
+A & B	1	9		5	10	1	2		2		1		3					4	5	255
N3061																				
Untreated																				4
+Arsenic																				5
+Bleo.	1	3			3	1	1											3	3	70
+A & B	1	3	3	3	10	1	5					1							2	118
N3062																				
Untreated																				0
+Arsenic						1												1	1	10
+Bleo.		1		1	3	2				1		2						1	3	90
+A & B	1	5		8	4	1	4		1									3	7	163

(表四) 對照組各染色體斷裂頻率總計及平均值，共 22 人

個 案及處理	位置	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	
總計																						
Untreated		5	6	2	2	20	7	0	7	0	3	0	1	0	2	0	4	1	0	0	0	1
+Arsenic		10	15	10	8	32	11	2	16	1	8	1	18	0	8	1	4	2	2	2	2	5
+Bleo.		141	148	113	184	135	149	23	254	19	166	42	147	23	104	15	103	20	47	12	86	
+A & B		177	204	147	263	218	221	22	321	24	247	34	189	32	168	21	138	25	91	18	90	
平均值																						
Untreated		0.23	0.27	0.09	0.09	0.91	0.32	0	0.32	0	0.14	0	0.05	0	0.09	0	0.18	0.05	0	0	0.05	
+Arsenic		0.45	0.68	0.45	0.36	1.45	0.50	0.09	0.73	0.05	0.36	0.05	0.82	0	0.36	0.05	0.18	0.09	0.09	0.09	0.23	
+Bleo.		6.41	6.72	5.14	8.36	6.14	6.77	1.05	11.6	0.86	7.55	1.91	6.68	1.05	4.73	0.68	4.68	0.91	2.14	0.55	3.91	
+A & B		8.05	9.27	6.68	11.95	9.91	10.05	1	14.6	1.09	11.2	1.55	8.59	1.45	7.64	0.95	6.27	1.14	4.14	0.82	4.09	

個 案及處理	位置	11p	11q	12p	12q	13q	14q	15q	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19q	20p	20q	21q	22q	Xp	Xq
總計																					
Untreated		0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+Arsenic		0	3	0	0	4	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	3
+Bleo.		22	69	18	81	80	44	45	4	17	0	14	0	19	1	0	5	0	0	11	57
+A & B		19	119	26	129	120	57	65	4	28	2	18	0	38	1	2	5	0	1	20	68
平均值																					
Untreated		0	0	0	0	0.05	0.05	0.05	0	0.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+Arsenic		0	0.14	0	0	0.18	0.09	0.05	0	0.09	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.18	0.14
+Bleo.		1	3.14	0.82	3.68	3.64	2	2.05	0.18	0.77	0	0.64	0	0.86	0.05	0	0.23	0	0	0.50	2.59
+A & B		0.86	5.41	1.18	5.86	5.45	2.59	2.95	0.18	1.27	0.09	0.82	0	1.73	0.05	0.09	0.23	0	0.05	0.91	3.09

Bleo.=Bleomycin A & B=Arsenic & Bleomycin

(表五) 皮膚癌患者染色體斷裂位置及斷裂頻率 12 人

個 案及處理	位置	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q
L0311																					
Untreated																					
+Arsenic		1		1					2												
+Bleo.		10	14	7	22	9	9	1	16	3	11	6	12		9	3	6	3	5		3
+A & B		10	17	14	7	17	17	1	20	7	19	2	11	5	12		16		9	2	9
L1391																					
Untreated			1																		
+Arsenic						1							1								
+Bleo.		11	13	5	7	10	10	1	10	3	10	2	8	3	5	2	9	1	6	2	7
+A & B		12	19	8	19	17	10	2	25	7	18	4	19	5	6	3	10	3	12	2	13
L1581																					
Untreated				1											1						
+Arsenic						1															
+Bleo.		15	13	10	13	12	12	5	20	3	13	4	9	1	14	1	7	1	5	2	5
+A & B		17	19	4	14	19	10	2	12	3	13	7	15	4	15	1	12		2	2	6
L1591																					
Untreated							1								1		1				
+Arsenic			2																		
+Bleo.		10	12	12	15	10	14	1	26	1	21	3	9		10		11		8	1	4
+A & B		11	14	16	22	12	11	3	22	4	16	3	11	3	10	2	9		8	1	8
L2862																					
Untreated									1			1									
+Arsenic				1		1									1						
+Bleo.		10	10	4	11	4	4		12	1	3	2	4	1	6		6		3	1	2
+A & B		5	7	7	8	8	8	2	10	3	11	2	13	1	6	1	5		9		2
M0251																					
Untreated							1	1													
+Arsenic			1	1	3	10	3	1	2		2						1	1			1
+Bleo.		9	11	6	7	8	17	1	12	2	11	1	15	2	5		8	1	6		
+A & B		11	9	14	9	14	13		18		21	2	13	3	10	1	5	1	3	3	7

個 案及處理	位置 11 p	11 q	12 p	12 q	13 q	14 q	15 q	16 p	16 q	17 p	17 q	18 p	18 q	19 q	20 p	20 q	21 q	22 q	X p	X q	總 計
L0311																					
Untreated																					0
+Arsenic								1													5
+Bleo.	5	7	1	4	5	5	11			1	2		1			1				2	194
+A & B	1	8		5	9	2	9		2		2		4						1	3	241
L1391																					
Untreated						1															2
+Arsenic					1								1								4
+Bleo.	3	5		7	6		4	1	1		3		2	1					4	7	169
+A & B	5	7	1	8	8	2	3	1	2		2		2						1	6	262
L1581																					
Untreated																					2
+Arsenic																					1
+Bleo.	5	11	3	6	8	1	6		2				1						2	2	212
+A & B	2	7		9	1	1	3		1		1		2			1			2	5	212
L1591																					
Untreated																					3
+Arsenic																					2
+Bleo.	1	8	1	7	3		2		1		2		1						1	3	198
+A & B	5	3	2	6	13	2	3		1				1						1	10	233
L2862																					
Untreated	1																				3
+Arsenic					1																4
+Bleo.	1	3	2	8	5	2			2				3							3	113
+A & B	1	5		7	4	2	2		2		1		1						1	3	137
M0251																					
Untreated																					2
+Arsenic				1																1	28
+Bleo.	1	6		8	7	6	3		1		1		2		1				3	2	163
+A & B	3	6	1	4	8	1	3		2		1		1			1				3	191

個 位置 案及處理	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	
M0281																					
Untreated		1		1																	
+Arsenic		3		1	1					1				1							
+Bleo.	9	5	4	11	2	5	1	12		4	4	5	4	6	1	1			2	2	3
+A & B	14	10	4	9	8	12		25		12	3	12	1	11		12			6	1	5
M0731																					
Untreated				1																	
+Arsenic																					
+Bleo.	17	14	8	13	8	21	4	19	3	25	3	7	4	9	1	13			10	3	6
+A & B	16	14	7	17	18	14	4	19	7	15	2	14		5	4	7			5	5	12
M1282																					
Untreated																					
+Arsenic																					
+Bleo.	15	14	9	17	20	12	3	28		21	5	16	8	11	1	10	2	10	4	9	
+A & B	29	21	15	22	17	15	3	24	7	26	6	27	4	13	2	23	2	13	1	9	
M2491																					
Untreated				1				1									1				
+Arsenic			1	1				1		1		1					1				
+Bleo.	9	21	16	21	18	19	8	20	6	20	6	16	7	14	2	14	5	10	5	6	
+A & B	18	22	19	26	30	23	11	31	5	25	5	32	10	19	4	16	5	15	3	9	
M2651																					
Untreated	1				1																
+Arsenic		1		1											1						
+Bleo.	7	4	1	3	5	6		12		9	2	2	3	5		5	2	2	1	6	
+A & B	11	10	7	10	8	8	2	8	1	9		9	1	8	2	3		7	1	2	
N0621																					
Untreated				1	2			2		1							1				
+Arsenic				1																	
+Bleo.	4	5	8	7	6	8		7	2	15	5	7	1	5	3	6	1	4	2	5	
+A & B	9	13	8	14	10	8	2	10	2	22	1	10	3	10	1	11	5	5		3	

個 案及處理	位置 11 p	11 q	12 p	12 q	13 q	14 q	15 q	16 p	16 q	17 p	17 q	18 p	18 q	19 q	20 p	20 q	21 q	22 q	X p	X q	總 計	
M0281																						
Untreated																						2
+Arsenic		1				1														1		10
+Bleo.		3	1	2	2		2						1								1	93
+A & B	1	2	1	6	4	1	5		2				1								3	171
M0731																						
Untreated																						1
+Arsenic									1													1
+Bleo.	2	9	3	10	7	4	9	1			1		1								5	240
+A & B	3	8	3	5	10	3	1		1				3						1	1	3	227
M1282																						
Untreated		1																				1
+Arsenic																						0
+Bleo.	4	15	3	13	2	4	4	3		1	1		1	1	1					3	12	283
+A & B	7	16	5	13	14	5	13		3		2		1		1					2	12	373
M2491																						
Untreated																						3
+Arsenic				1																		7
+Bleo.	4	13		16	10	4	4		1		3		2			2				2	8	312
+A & B	10	16	8	20	9	9	6	1	9	1	6		3		2					3	8	439
M2651																						
Untreated																						2
+Arsenic																						3
+Bleo.		2		6	5		2	1					1							1	3	96
+A & B		2		5	4	1	3				3		3							3		131
N0621																						
Untreated													1									8
+Arsenic					1																1	3
+Bleo.	2	7		6	2	4	4		1		1		4			1					4	137
+A & B	4	14		10	6	5	5		2	1	3		1							1	6	205

(表六)皮膚癌患者各染色體斷裂頻率總計及平均值，
共(12人)

個 案及處理	位置	1p	1q	2p	2q	3p	3q	4p	4q	5p	5q	6p	6q	7p	7q	8p	8q	9p	9q	10p	10q	
總計																						
Untreated		1	2	1	4	3	2	1	4	0	1	1	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0
+Arsenic		1	7	4	7	14	3	1	5	0	4	0	2	0	3	0	2	1	0	0	0	1
+Bleo.		126	136	90	147	112	137	25	194	24	163	43	110	34	99	14	96	16	71	23	56	
+A & B		163	175	123	177	178	149	32	224	46	207	37	186	40	125	21	129	16	94	21	85	
平均值																						
Untreated		0.08	0.17	0.08	0.33	0.25	0.17	0.08	0.33	0	0.08	0.08	0	0	0.17	0	0.25	0	0	0	0	0
+Arsenic		0.08	0.58	0.33	0.58	1.17	0.25	0.08	0.42	0	0.33	0	0.17	0	0.25	0	0.17	0.08	0	0	0	0.08
+Bleo.		10.5	11.3	7.50	12.3	9.33	11.4	2.08	16.2	2	13.6	3.58	9.17	2.83	8.25	1.17	8	1.33	5.92	1.92	4.67	
+A & B		13.6	14.6	10.3	14.8	14.8	12.4	2.67	18.7	3.83	17.3	3.08	15.5	3.33	10.4	1.75	10.8	1.33	7.83	1.75	7.08	

個 案及處理	位置	11p	11q	12p	12q	13q	14q	15q	16p	16q	17p	17q	18p	18q	19q	20p	20q	21q	22q	Xp	Xq	
總計																						
Untreated		1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
+Arsenic		0	1	0	2	3	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
+Bleo.		28	89	14	93	62	30	51	6	9	2	14	0	20	2	1	5	0	0	16	52	
+A & B		42	94	21	98	90	34	56	2	27	2	21	0	23	0	0	5	0	1	16	62	
平均值																						
Untreated		0.08	0.08	0	0	0	0.08	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0	0	0	0	0	0	0
+Arsenic		0	0.08	0	0.17	0.25	0.08	0	0	0.17	0	0	0	0.08	0	0	0	0	0	0	0	0.25
+Bleo.		2.33	7.42	1.17	7.75	5.17	2.50	4.25	0.50	0.75	0.17	1.17	0	1.67	0.17	0.08	0.42	0	0	1.33	4.33	
+A & B		3.50	7.83	1.75	8.17	7.50	2.83	4.67	0.17	2.25	0.17	1.75	0	1.92	0	0	0.42	0	0.08	1.33	5.17	

三.姊妹染色體交換頻率：

觀察分析每位個案 40 個 M2 期 metaphase 姊妹染色體交換頻率，並以隨機取樣方式觀察 100 個 metaphase 中 M1、M2、M3 期所佔的比例，以 $(M1+2 \times M2+3 \times M3) \div 100$ 算出細胞生長指數。

總數：SCE/40metaphases；(平均值)：SCE/metaphase

(表七)對照組姊妹染色體交換頻率(28人)

處理 編號	Untreated 總數(平均值)	+ As.0.5uM	- As.1uM	+ As.2uM
L0271	163(4.08)	178(4.45)	184(4.60)	236(5.90)
細胞生長指數	2.02	2.06	1.85	1.79
L0391	399(9.98)	390(9.75)	420(10.50)	453(11.33)
細胞生長指數	1.97	1.90	1.87	1.85
L0491	212(5.30)	253(6.33)	238(5.95)	169(4.23)
細胞生長指數	1.68	2.12	2.01	1.34
L0871	306(7.65)	335(8.38)	377(9.43)	337(8.43)
細胞生長指數	2.07	2.11	2.01	2.03
L2401	159(3.98)	218(5.45)	206(5.15)	177(4.43)
細胞生長指數	1.65	1.94	1.86	2.44
M0004	363(9.08)	321(8.03)	302(7.55)	352(8.80)
細胞生長指數	2.13	1.77	1.90	1.82
M0261	295(7.38)	344(8.60)	407(10.18)	595(14.88)
細胞生長指數	1.84	1.79	1.72	1.33
M3783	156(3.90)	289(7.23)	318(7.95)	496(12.4)
細胞生長指數	1.40	1.99	1.91	1.57
M3891	441(11.03)	528(13.2)	872(21.8)	1203(30.08)
細胞生長指數	2.14	2.07	1.99	1.89
M4881	339(8.48)	412(10.30)	620(15.5)	977(24.43)
細胞生長指數	1.87	1.76	1.87	2.24
M4941	211(5.28)	321(8.03)	514(12.85)	500(12.50)
細胞生長指數	2.10	2.28	1.95	2.00
M5172	179(4.48)	256(6.40)	250(6.25)	328(8.20)
細胞生長指數	2.13	2.28	2.27	2.00
M5301	696(17.40)	836(20.90)	846(21.15)	952(23.8)
細胞生長指數	2.20	2.11	2.29	2.20
M5521	409(10.23)	464(11.60)	452(11.30)	506(12.65)
細胞生長指數	2.48	2.19	2.12	2.23

處理 編號	Untreated 總數(平均值)	+ As.0.5 μ M	+ As.1 μ M	+ As.2 μ M
M5791	415(10.38)	381(9.53)	339(8.48)	385(9.63)
細胞生長指數	2.16	2.45	2.43	2.23
M6661	281(7.03)	335(8.38)	382(9.55)	311(7.78)
細胞生長指數	2.18	2.24	2.11	2.17
N0071	274(6.85)	250(6.25)	239(5.98)	242(6.05)
細胞生長指數	1.70	2.08	1.91	2.15
N0211	229(5.73)	206(5.15)	256(6.40)	265(6.63)
細胞生長指數	2.17	2.23	2.41	2.72
N0212	364(9.10)	448(11.20)	459(11.48)	596(14.90)
細胞生長指數	2.18	2.28	2.14	2.08
N0622	279(6.98)	321(8.03)	308(7.70)	294(7.35)
細胞生長指數	2.22	2.15	1.98	1.96
N0661	207(5.18)	334(8.35)	390(9.75)	509(12.73)
細胞生長指數	1.79	1.70	1.71	1.66
N0731	289(7.23)	240(6.00)	254(6.35)	289(7.23)
細胞生長指數	2.48	2.55	2.36	2.45
N1331	305(7.63)	308(7.70)	330(8.25)	283(7.08)
細胞生長指數	2.27	2.34	2.40	2.27
N1341	345(8.63)	356(8.90)	460(11.50)	712(17.80)
細胞生長指數	2.18	2.24	2.19	2.16
N2291	253(6.33)	279(6.98)	262(6.55)	328(8.20)
細胞生長指數	2.14	1.93	2.12	2.12
N3061	269(6.73)	240(6.00)	241(6.03)	244(6.10)
細胞生長指數	1.95	2.28	1.67	1.94
N3062	257(6.43)	268(6.70)	345(8.63)	488(12.20)
細胞生長指數	2.54	2.45	1.60	1.77
N3112	350(8.75)	418(10.45)	476(11.90)	444(11.10)
細胞生長指數	1.90	1.81	1.65	1.63
姊妹染色體交 換總平均值	302 次/人 (7.54)次/cell	340 次/人 (8.51)次/cell	384 次/人 (9.60)次/cell	453 次/人 (11.32)次/cell
細胞生長指數 總平均值	2.07	2.11	2.01	2.03

(表八) 皮膚癌患者姊妹染色體交換頻率(11人)

處理 編號	Untreated 總數(平均值)	+ As.0.5 μ M	+ As.1 μ M	+ As.2 μ M
L0311	429(10.72)	613(15.32)	687(17.17)	593(14.83)
細胞生長指數	1.73	1.83	1.50	1.90
L1391	298(7.45)	266(6.65)	230(5.75)	307(7.68)
細胞生長指數	1.80	1.92	1.86	1.86
L1591	257(6.43)	271(6.78)	332(8.30)	294(7.35)
細胞生長指數	1.95	2.04	1.86	2.37
L2862	473(11.83)	590(14.75)	522(13.05)	726(18.15)
細胞生長指數	2.04	1.92	1.88	1.71
M0251	293(7.33)	324(8.10)	335(8.38)	344(8.60)
細胞生長指數	2.03	1.95	1.94	1.79
M0281	429(10.73)	439(10.98)	470(11.75)	417(10.43)
細胞生長指數	2.07	1.83	1.93	2.04
M0731	274(6.85)	260(6.50)	286(7.15)	266(6.65)
細胞生長指數	2.01	1.80	1.73	1.28
M1282	216(5.40)	248(6.20)	308(7.70)	327(8.18)
細胞生長指數	1.88	1.80	1.77	1.79
M2491	323(8.08)	320(8.00)	237(5.93)	302(7.55)
細胞生長指數	2.36	1.96	1.66	1.78
M2651	247(6.18)	228(5.70)	237(5.93)	236(5.90)
細胞生長指數	2.63	2.13	2.43	2.59
M5551	269(6.73)	292(7.30)	309(7.73)	292(7.30)
細胞生長指數	2.17	2.09	1.89	1.89
姊妹染色體交 換總平均值	324.6 次/人 (7.98)次/cell	350 次/人 (8.75)次/cell	359 次/人 (8.99)次/cell	373 次/人 (9.33)次/cell
細胞生長指數 總平均值	2.10	1.92	1.86	1.86

四.微小核出現頻率：

在顯微鏡下觀察 1000 個雙核細胞核內出現在細胞質中微小核的數目。

(一)對照組微小核的數目(11 人)

(表九)對照組微小核的數目

編號	Untreated	+ As 1uM	編號	Untreated	+ As 1uM
L0491	4	7	M6092	15	10
L2401	6	8	M6661	8	5
L3223	6	7	N0211	4	2
M3891	3	5	N0731	5	3
M4622	9	11	N1331	2	5
M4941	6	9			
	總計	總計		平均值	平均值
	<i>Untreated</i>	<i>+ As 1uM</i>		<i>Untreated</i>	<i>+ As 1uM</i>
	68	72		6.18	6.55

(二)皮膚癌患者：(7 人)

(表十)皮膚癌患者微小核的數目

編號	Untreated	+ As 1uM	編號	Untreated	+ As 1uM
L0311	5	7	M1282	2	4
L0631	2	8	N0621	4	8
L1591	8	10	N3112	7	12
M0731	5	4			
	總計	總計		平均值	平均值
	<i>Untreated</i>	<i>+ As 1uM</i>		<i>Untreated</i>	<i>+ As 1uM</i>
	33	53		4.71	7.57

五.統計分析：

(一)染色體斷裂數目之比較

(表十一)對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
<u>Untreated</u> 對照組	27	2.93	2.30	— 0.95 	0.67	0.51	28.4	無差異
皮膚癌 患者	13	2.46	1.90	1.87				
<u>Arsenic</u> 對照組	27	7.59	6.00	— 3.7 	0.53	0.60	19.0	無差異
皮膚癌 患者	13	6.31	7.60	6.3				
<u>Bleomycin</u> 對照組	27	106.3	70.4	— 122 	-3.07	0.0054	24.0	99%下 有差異
皮膚癌 患者	13	178.9	69.9	— 24				
<u>Arsenic+</u> <u>Bleomycin</u> 對照組	27	145.7	82.9	— 154 	-3.22	0.0039	22.6	99%下 有差異
皮膚癌 患者	13	239.5	87.7	— 33				

(表十二)染色體斷裂頻率於 Bleomycin 組與 Arsenic+Bleomycin 組有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
對照組				— 81				95%下無差異，但 90%下有差異
Bleomycin	27	106.3	70.4		-1.88	0.066	50.7	
Arsenic+Bleomycin	27	145.7	82.9	3				
皮膚癌患者				— 125				95%下無差異，但 90%下有差異
Bleomycin	13	178.9	69.9		-1.95	0.064	22.9	
Arsenic+Bleomycin	13	239.5	87.7	4				

(表十三) 對照組 Untreated 組與其他三種處理之間有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
Untreated	27	2.93	2.30	-7.18 	-3.78	0.0006	33.5	有差異
Arsenic	27	7.59	6.00	-2.2				
Untreated	27	2.93	2.30	-131.28 	-7.63	0.0000	26.1	有差異
Bleomycin	27	106.3	70.4	-76				
Untreated	27	2.93	2.30	-175.64 	-8.95	0.0000	26.0	有差異
A.+B.	27	145.7	82.9	-110				

(表十四) 皮膚癌患者 Untreated 組與其他三種處理之間有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
Untreated	13	2.46	1.90	-8.54 	-1.77	0.10	13.0	95%無差異 但於 90% 下有差異
Arsenic	13	6.31	7.60	0.8				
Untreated	13	2.46	1.90	-218.73 	-9.10	0.0000	12.0	有差異
Bleomycin	13	178.9	69.9	-134				
Untreated	13	2.46	1.90	-290.01 	-9.74	0.0000	12.0	有差異
A.+B.	13	239.5	87.7	-184				

(二)姊妹染色體交換之統計分析：

(表十五)對照組姊妹染色體交換頻率 Untreated 組與其他三種處理之間有無差異，平均值：SCE/metaphase

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
Untreated	28	7.54	2.79	-2.57	-1.21	0.23	53.0	無差異
+As.0.5uM	28	8.51	3.19	0.64				
Untreated	28	7.54	2.79	-3.98	-2.15	0.037	46.0	有差異
+As.1uM	28	9.60	4.23	-0.13				
Untreated	28	7.54	2.79	-6.40	-2.91	0.0060	37.0	有差異
+As.2uM	28	11.31	6.26	-1.10				

(表十六)皮膚癌患者姊妹染色體交換頻率 Untreated 組與其他三種處理之間有無差異，平均值：SCE/metaphase

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
Untreated	11	8.12	2.38	-3.28	-0.51	0.62	17	無差異
+As.0.5uM	11	8.75	3.41	2.0				
Untreated	11	8.12	2.38	-3.60	-0.67	0.51	17	無差異
+As.1uM	11	8.98	3.58	1.90				
Untreated	11	8.12	2.38	-4.08	-0.90	0.38	16	無差異
+As.2uM	11	9.33	3.79	1.70				

(表十七)對照組 SCE 生長指數未處理組與其他三種處理有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
Untreated	28	2.055	0.261	-0.187	-0.85	0.40	52.9	無差異
+As.0.5uM	28	2.111	0.226	0.075				
Untreated	28	2.055	0.261	-0.090	0.66	0.51	53.6	無差異
+As.1uM	28	2.011	0.240	0.179				
Untreated	28	2.055	0.261	-0.103	0.68	0.50	51.9	無差異
+As.2uM	28	2.001	0.321	0.211				

(表十八)皮膚癌患者 SCE 生長指數未處理組與其他三種處理有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
Untreated	11	2.061	0.255	-0.055	1.51	0.16	13.9	無差異
+As.0.5uM	11	1.934	0.115	0.310				
Untreated	11	2.061	0.255	-0.015	1.95	0.067	19.8	無差異
+As.1uM	11	1.859	0.231	0.419				
Untreated	11	2.061	0.255	-0.119	1.18	0.25	18.5	無差異
+As.2uM	11	1.909	0.343	0.42				

(表十九)比較 SCE 交換頻率在同一種處理下 Control 組與 Skin Cancer 組有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
<u>Untreated</u> 對照組	28	7.54	2.79	-2.43 	-0.65	0.52	21	無差異
皮膚癌 患者	11	8.12	2.38	1.28				
<u>As.0.5uM</u> 對照組	28	8.51	3.19	-2.76 	-0.20	0.84	17	無差異
皮膚癌 患者	11	8.75	3.41	2.3				
<u>As.1uM</u> 對照組	28	9.60	4.23	-2.18 	0.46	0.65	21	無差異
皮膚癌 患者	11	8.98	3.58	3.4				
<u>As.2uM</u> 對照組	28	11.31	6.26	-1.4 	1.21	0.24	30	無差異
皮膚癌 患者	11	9.33	3.79	5.3				

(表二十)比較 SCE 生長指數在同一種處理下 Control 組與 Skin Cancer 組有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
<u>Untreated</u> 對照組	28	2.055	0.261	-0.198 	-0.06	0.95	18	無差異
皮膚癌 患者	11	2.061	0.255	0.186				
<u>As.0.5uM</u> 對照組	28	2.111	0.226	0.065 	3.22	0.0028	34	有差異
皮膚癌 患者	11	1.934	0.115	0.289				
<u>As.1uM</u> 對照組	28	2.011	0.240	-0.022 	1.83	0.084	19.0	無差異
皮膚癌 患者	11	1.859	0.231	0.325				
<u>As.2uM</u> 對照組	28	2.001	0.321	-0.161 	0.77	0.45	17	無差異
皮膚癌 患者	11	1.909	0.343	0.35				

(三)MN 微小核之統計分析

(表二十一)比較 Untreated 組與+Arsenic 1uM 組有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
對照組 Untreated	11	6.18	3.57	-3.2 	-0.26	0.79	19.0	無差異
+As1uM	11	6.55	2.84	2.52				
皮膚癌 患者 Untreated	7	4.71	2.29	-5.95 	-2.03	0.067	11.3	在 95%下 無差異， 但在 93% 下有顯著 差異
+As1uM	7	7.57	2.94	0.2				

(表二十二)比較同一種處理 Control 組與 Skin Cancer 組
有無差異

項目 組別	個數	平均值	標準差	95% 信賴區間	T-Test			有無差異
					T	P	DF	
Untreated 對照組	11	6.18	3.57	-1.5 	1.06	0.30	16.0	無差異
皮膚癌 患者	7	4.71	2.29	4.41				
+As. 1uM 對照組	11	6.55	2.84	-4.08 	-0.73	0.48	12.6	無差異
皮膚癌 患者	7	7.57	2.94	2.0				

(表二十三)參考 Mitelman,1991 年;Yunis,et al.,1984、1987 年文獻，將對照組及皮膚癌患者染色體最常斷裂位置整理成表，瞭解染色體斷裂位置與致癌基因及癌症之相關性：

band	皮膚癌患者 A.& B.處理	對照組 A.& B.處理	Cancer Chromosomes with known breakpoints	Oncogene Location	Mutagen fragile site
1p	*(13.58)個/人		neuroblastoma ;breast adenocarcinoma;ALL ; neuroblastoma	L-myc	FdU;MTX Apc
1q	*(14.58)個/人				Apc;Aza ; Bus
2p	*(10.25)個/人		NHL;ALL;B-CLL ; Leiomyoma	N-myc	Apc;FdU; MTX
2q	*(14.75)個/人	** (11.95)	ANLL		Apc
3p	*(14.83)		malignant fibrous histio- cytoma;SCLC;ALL; breast adenocarcinoma; familial renal carcinoma; mixed salivary gland tumor;rhabdomyosarco- ma		Apc;Aza; Ca;FdU; MTX
3q	*(12.42)	*(10.05)	Lennert's lymphoma; CML;MPS;ANLL;NHL		
4q	*** (18.67)	*** (14.59)	bilineal ALL/ANLL	raf 2	
5q	** (17.25)	** (11.23)	refractory anemia;MDS; ALL;ANLL;ALL-M3	c-fms	
6q	*(15.5)		ovary adenocarcinoma; B-PLL;ALL;OPA;PLL; ANLL-M5b	ros;slk; myb;c-ras	
7q	*(10.42)		Leiomyoma;ANLL; MDS	met;kit	Apc;MTX ;Ca;FdU
8q	*(10.75)		MPT;ANLL-M2	c-mos	Apc;MTX ;FdU

a. 本表所列乃是該位置之斷裂平均值(個/100 metaphase/人)出現超過 10 個或 10 個以上者以 * 代表之，**=本組斷裂第二多者

***= 本組斷裂最多者

b.A.&B.=Arsenic and Bleomycin

c.縮寫:

ALL= Acute Lymphocytic Leukemia

ANLL=Acute non-Lymphocytic Leukemia

B-CLL=B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia

B-PLL= B-cell Prolymphocytic Leukemia

CML= Chronic myelomonocytic Leukemia

MDS=Myelodysplastic Syndrome

NHL=Non-Hodgkin's Lymphoma

OPA=Ovarian Papillary Adenocarcinoma

RAEB=Refractory Anemia with Excess of Blasts

SCLC=Small Cell Lung Cancer

d.藥品縮寫:

Apc=Aphidicolin ; Aza=5-azacytidine ; BrdU=Bromodeoxyuridine ;

Bus=busulfan ; Ca=Caffeine ; MTX=Methotrexate

(表二十四)總整理表， S.E.=標準誤

染色體斷裂組	組別	對照組(27人) 平均值 ±S.E.	皮膚癌(13人) 平均值 + S.E.	對照組與皮膚癌之間有無差異	
	1.Untreated		2.93 ± 0.44	2.46 ± 0.53	無差異
2.加 Arsenic		7.59 ± 1.2	6.31 ± 2.1	無差異	
3.加 Bleomycin		106.3 ± 14	178.9 ± 19	有差異(p < 0.01)	
4.加 Arsenic & Bleomycin		145.7 ± 16	239.5 ± 24	有差異(p < 0.01)	
姊妹染色體交換組	組別	對照組(28人) 平均值 ±S.E.	皮膚癌(11人) 平均值 ±S.E.	與 untreated 組之間有無差異	
	1.Untreated	7.54 ± 0.53	8.12 ± 0.72	對照組	皮膚癌
	2.加 Arsenic 0.5uM	8.51 ± 0.60	8.75 ± 1.0	無差異	無差異
	3.加 Arsenic 1.0uM	9.60 ± 0.80	8.98 ± 1.1	有差異 p < 0.05	無差異
	4.加 Arsenic 2.0uM	11.31 ± 1.2	9.33 ± 1.1	有差異 p < 0.01	無差異
微小核組	組別	對照組(11人) 平均值 + S.E.	皮膚癌(7人) 平均值 + S.E.	與 untreated 組之間有無差異	
	1.Untreated	6.18 ± 1.1	4.71 ± 0.87	對照組	皮膚癌
	2.加 Arsenic 1.0uM	6.55 ± 0.86	7.57 ± 1.1	無差異	有差異 p < 0.07

Fig.1 對照組與皮膚癌患者染色體斷裂數目平均值比較圖形

(個/100metaphases/人)

Culture treatment	untreated	Arsenic	Bleomycin	Arsenic + Bleomycin
對照組	2.63	6.75	153.97	207.25
皮膚癌	2.62	6.73	155.11	208.72

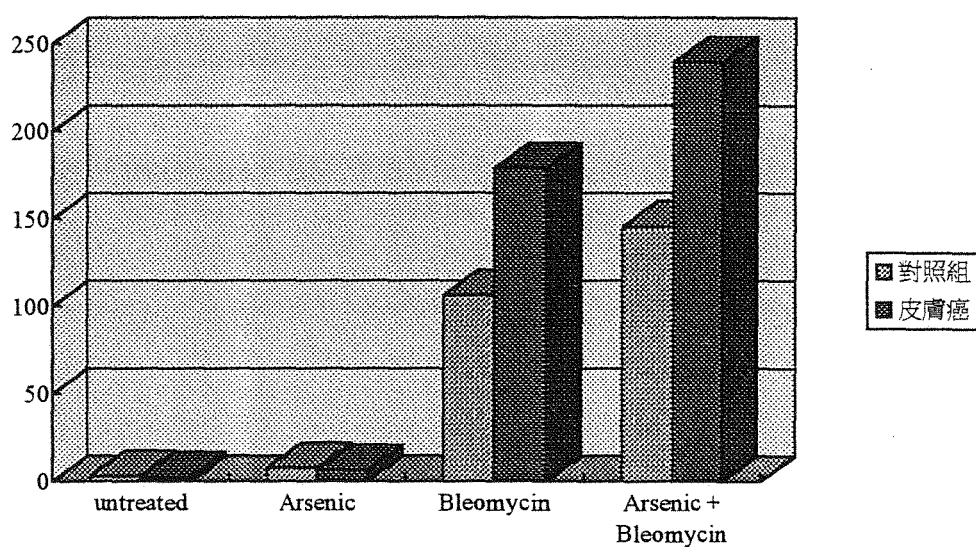
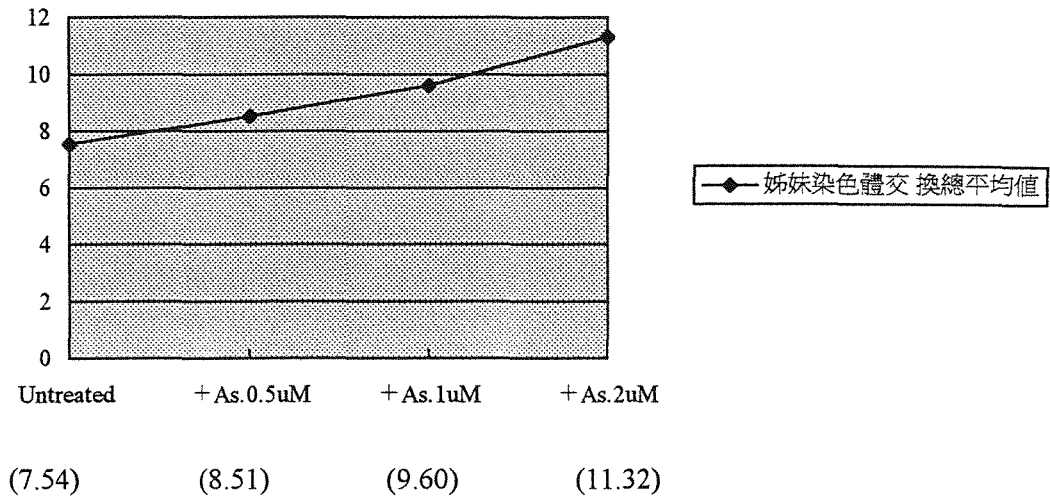


Fig.2 對照組姊妹染色體交換頻率圖形(28人)

(一)平均值曲線圖

(SCE 數)



(二)散點狀相關圖

(SCE 數)

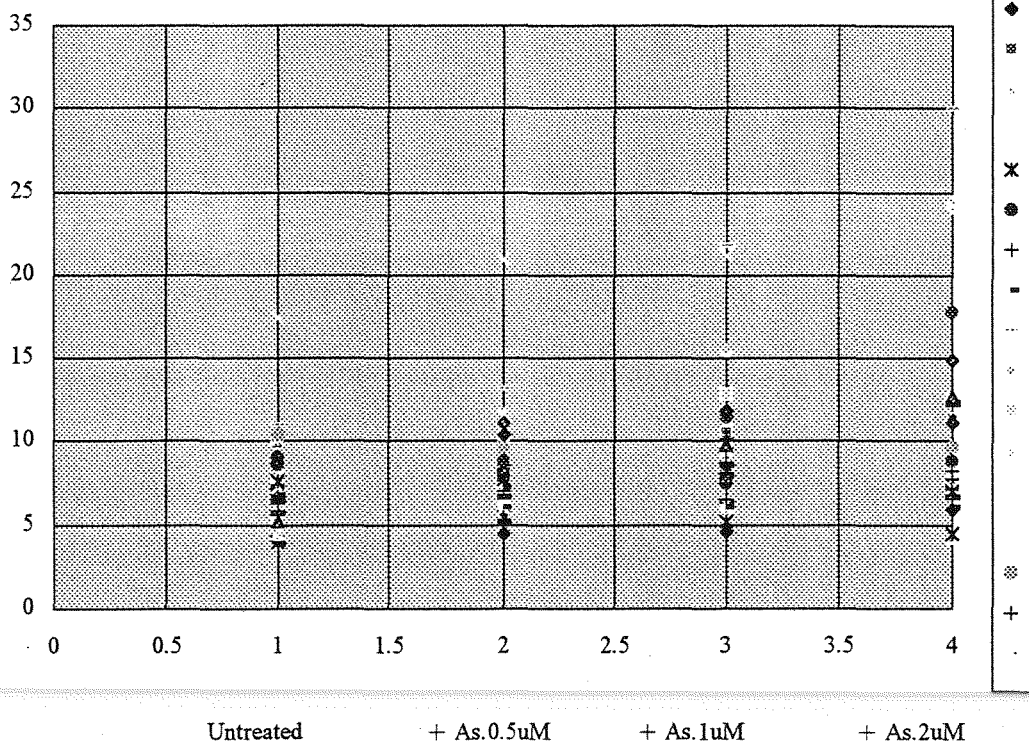
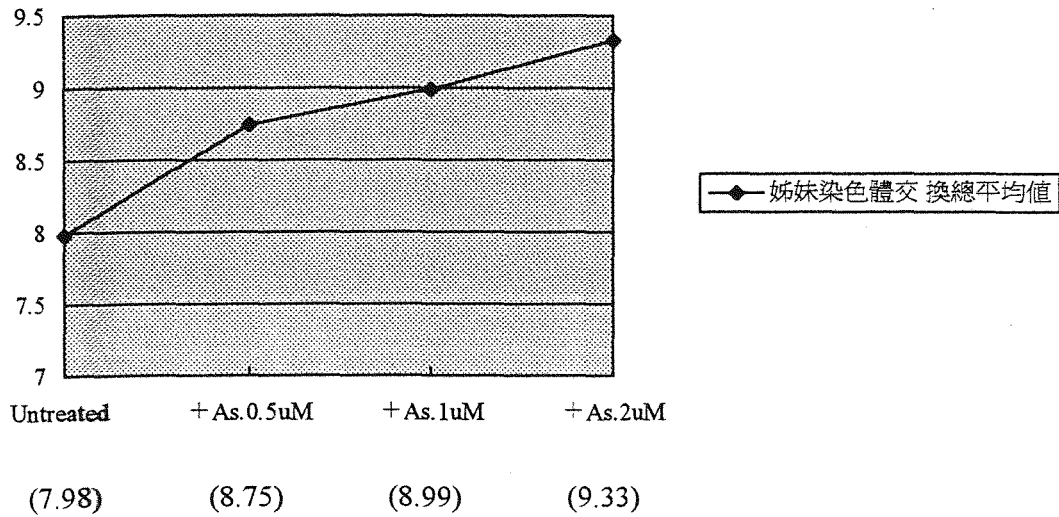


Fig.3 皮膚癌患者姊妹染色體交換頻率圖形(11人)

(一)平均值曲線圖

(SCE 數)



(二)散點狀相關圖

(SCE 數)

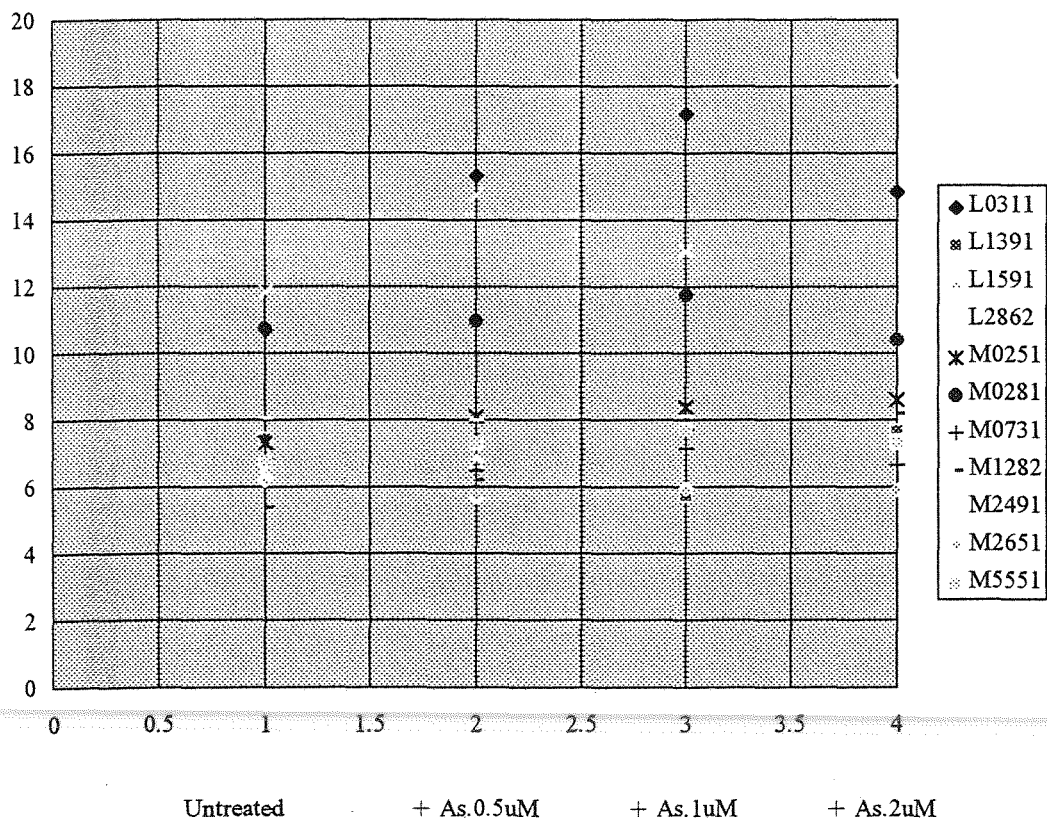


Fig.4 染色體斷裂情形(箭頭表示斷裂位置)

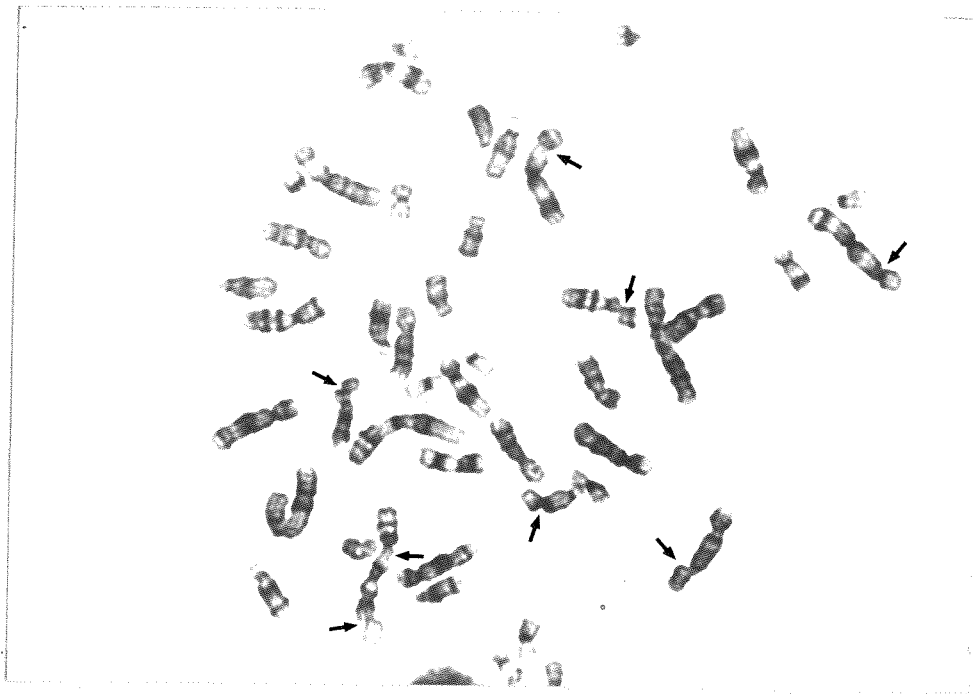
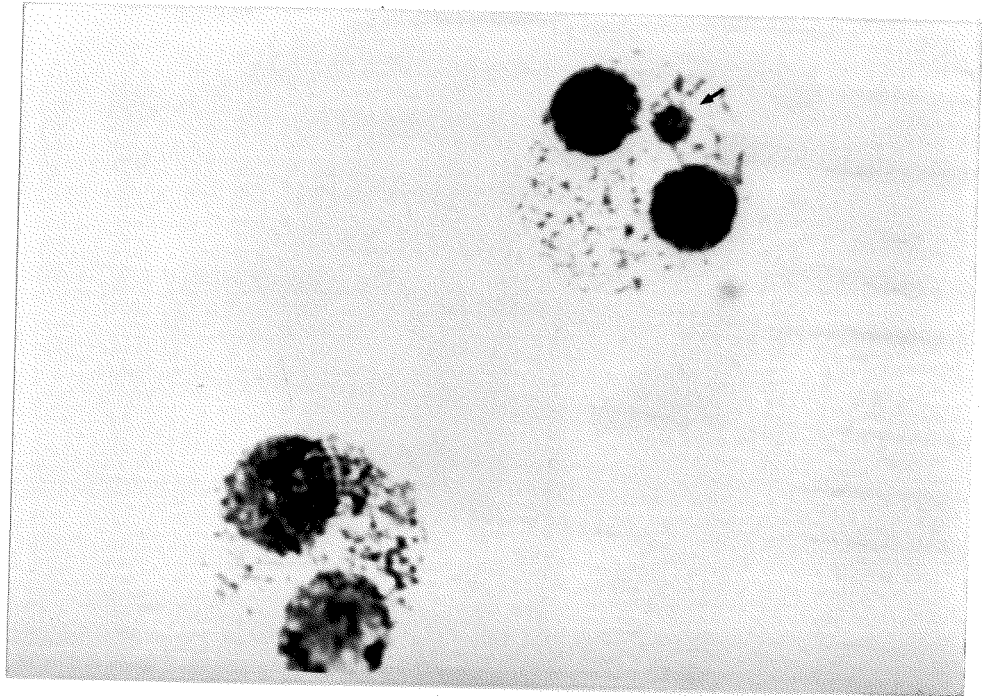


Fig.5 姊妹染色體交換情形(箭頭表示姊妹染色體交換位置)



Fig.6 微小核出現情形(箭頭所指為微小核)



參考文獻:

- Allan H. Smith, Claudia Hopenhayn-Rich, Michael N. Bates, Helen M. Goeden, Irva Hertz-Picciotto, Heather M. Duggan, Rose Wood, Michael J. Kosnett, and Martyn T. Smith. (1992) Cancer Risk from Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives* Vol. 97, pp. 259-267.
- Anthony G. Quinn, Stephen Sikkink, and Jonathan L. Rees (1994) Basal Cell Carcinomas and Squamous Cell Carcinoma of Human Skin Show Distinct Patterns of Chromosome Loss. *Cancer Research* 54, 4756-4759.
- Applegate, L.A., Luscher, P. and Tyrrell, R.M. (1991) Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.*, 51, 974-978.
- Balasubramaniyan N., Subramanian S., Govindasamy S., (1994) Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix. *Cancer Letters*. 87(2):187-92.
- Bates, M. N., Smith, A. H. and Hopenhayn-Rich, C. (1992) Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am. J. Epidemiol.*, 135, 462-476.
- Blessing M., Nanney L.B., King L.E., Hogan B.L. (1995) Chemical skin carcinogenesis is prevented in mice by the induced expression of a TGF-beta related transgene. *Teratogenesis, Carcinogenesis, & Mutagenesis*. 15(1):11-21.
- Chen, C.J., Kuo, T.L. and Wu, M.M. (1988) Arsenic and cancers (letter). *Lancet*, i, 414-415.
- Chen, K.P., and Wu, H.Y. (1962) Epidemiologic studies on blackfoot disease. 2. A study of source of drinking water in relation to the disease. *J. Formosan Med. Assoc.*, 61: 611-618.
- Chien-Jen Chen, Ya-Chien Chung, Tong-Ming, and Hsin-Yin Wu. (1985) Malignant Neoplasms among Resident Area in Taiwan: High-Arsenic Artesian Well Water and Cancers. *Cancer Research*, 45, p. 5895-5899.
- Chien-Jen Chen, Tsung-Li Kuo, Meei-Maan Wu. (1988) Arsenic and Cancers, *The Lancet*, February 20, p. 414-415.
- Chien-Jen Chen and Chih-Jen Wang. (1990) Ecological Correlation between Arsenic level in Well Water and Age-adjusted Mortality from Malignant Neoplasms. *Cancer Research*, 50, 5470-5474.
- Chiou H.Y., Hsueh Y. M., Liaw K.F., Horng S.F., Chiang M.H., Pu Y.S., Lin J.S.N., Huang C.H., and Chen C.J. (1995) Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan. *Cancer Res.*, 55, 1296-1300.

- Gailani, M.R., Bale, S.J., Leffell, D.J., DiGiovanna, J.J., Peck, G.L., Poliak, S., Drum, M. A., Pastakia, B., McBride, O.W., Kase, R., Greene, M., Mulvihill, J.J., and Bale, A.E. (1992) Development defects in Gorlins syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell*, 69:111-117.
- Glick A.B., Lee M.M., Darwiche N., Kulkarni A.B., Karlsson S., Yuspa S.H. (1994) Targeted deletion of the TGF-beta 1 gene causes rapid progression to squamous cell carcinoma. *Gene & Development*. 8(20):2429-40 .
- Glover T.W., Berger C., Coyle J., Echo B. (1984) DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosome. *Hum. Genet.* ,12,185-189.
- Goudie, D.R., Yuille, M.A., Leversha, M.A., Furlong, R.A., Carter, N.P., Lush, J., Affara, N.A., and Ferguson-Smith, M.A. (1993) Multiple self-healing squamous epitheliomata (ESS1) Mapped to chromosome 9q22-q31 in families with common ancestry. *Nat. Genet.*, 3:165-169,.
- Goyer, R.A. (1986) Toxic effects of metals. In Klaassen, C.D., Amdur, M.D. and Doull J. (eds), *Casarett and Doull's Toxicology*. Macmillan, New York ,pp.582-635.
- Gurley, L.R., Waters, R.A., Jett, J.H. and Tobey, R.A. (1980) Response of CHO cell proliferation and histone phosphorylation to sodium arsenite. *J. Toxicol. Environ. Health*, 6, 87-105.
- Gurr, J.R., Lin, Y.C., Ho, I.C., Jan, K.Y. and Lee, T.C. (1993) Induction of chromatid breaks and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase. *Mutat. Res.*, 319, 135-142.
- Hsueh Y.M., Cheng G.S., Wu M.M., Yu H.S., Kuo T.L. and Chen C.J. (1995) Multiple risk factors associated with arsenic-induced skin cancer: effects of chronic liver disease and malnutritional status. *British J. of Cancer*, 71, 109-114.
- IARC. IARC Monography on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man : Some Metals and Metallic Compounds, Vol. 23. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, 1980.
- Joenje ,H. and Gille, J.J.P. (1992) Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hypoxia. *Mutat. Res.*, 275, 405-414.
- Lee, T.C., Jan, K.Y. and Wang , T.C. (1988) Induction of sister-chromatid exchanges by arsenic in primary rat tracheal epithelial cell. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica*, 27, 105-110.
- Li, J.H. and Rossman, T.G. (1989) Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol. Toxicol.*, .2, 1-9.

- Lo J.F., Wang H.F., Tam M. F., and Lee T.C.(1992) Glutathione S-transferase Pi in an arsenic-resistant Chinese hamster ovary cell line.*Biochem.J.*288, 977-981.
- Lo,M.C. (1978) The arsenic content of farm products and fishes in areas where high arsenic well water was used for agriculture and pisciculture. *In* :Report on Black Disease Research, Vol.6 ,pp.28-46.Taichung:Taiwan Provincial Department of Health .
- Luc Thiberville,Peter Payne,et al.,(1995)Evidence of Cumulative Gene Losses with Progression of Premalignant Epithelial Lesion to Carcinoma of the Bronchus.,*Cancer Research* 55,5133-5139,November 15.
- Michelle M. LeBeau and Janet D.Rowley , (1984) Heritable fragile sites in cancer. *Nature* Vol.12 , pp.607-608.
- Mitelman F.(1991) Catalog of chromosome aberrations in cancer, 4th Ed : A John Wiley and Sons Inc, New York,.
- Moles, J-P., Moyret, C.,Guillot, B.,Jeanteur ,P.,Guilhou, J-J.,Theillet,C.,and Bass-et-Seguin,N.(1993) p53 gene mutation in human epithelial skin cancer.*Oncogene* ,8:583- 588.
- Muller,W.U.,Streffer ,C.and Fischer-Lahdo,C.(1986) Toxicity of sodium arsenite in mouse embryos *in vitro* and its influence on radiation risk.*Arch.Toxicol.*,59,172-175.
- Nordenson,I.and Beckman ,L.(1991)Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals ? *Hum.Hered.*,41,71-73.
- Rossmann,T.G.,Stone,D.,Molina,M.and Troll, W.(1980)Absence of arsenite mutagenicity in *E.coli* and Chinese hamster ovary cells.*Environ.Mutagen.*,2,371-379.
- Shimizu K., Toriyama F., Yoshida H.(1995) The expression of placental-type glutathione S-transferase(GST-pi) in human cutaneous squamous cell carcinoma and normal human skin.*Virchows Archiv.*425(6) : 589-92.
- Shuan-Yow Li and Jen-Kun Lin (1990) Differential bleomycin susceptibility in cultured lymphocytes of fragile X patients and normal individuals.*Human Genetics* 85:267-271.
- Smith, A.H.,Hopenhayn-Rich.,Bates,M.N.,Goeden,H.M.,Hert-Picciotto,I.,Duggan Wood,R.,Kosnett,M.and Smith,M.T.(1992) Cancer risks from arsenic from drinking water.*Environ.Health Perspect.*,97 ,259-267.
- Smeets DCFM, Scheres JMJC, Hustinx TWJ(1986) The most common fragile site in man is 3p14. *Human Genetic* 72:215-220.
- Soderhall,S. and Lindahl,T.(1987) DNA ligase of eukaryotes.*FEBS Lett.*,67, 1-8.
- Squibb,K.S.,and Fowler, B.A.(1983) The toxicity of arsenic and its compounds. *In* Fowler, B.A.(ed.),Biological and Environmental Effects of Arsenic. Elsevier ,

- Amsterdam , pp.233-269.
- Thomas J.Polascik ,Paul Cairns,Wayne Y.H.et al.,(1995)Distinct Regions of Allelic Loss on Chromosome 4 in Human Primary Bladder Carcinoma.*Cancer Research*55 ,5396-5399,November 15.
- T.S.Wang and H.Huang(1994)Active oxygen species are involved in the induction of micronuclei by arsenite in XRS-5 cells.*Mutagenesis* vol.9 no.3 pp.253-257.
- Wei Cui,Christopher J.Kemp,Elizabeth Duffie,Allan Balmain ,and Rosemary J. Akhurst(1994)Lack of Transforming Growth Factor-B1 Expression in Benign Skin Tumors of p53 null Mice Is Prognostic for a High Risk of Malignant Conversion.*Cancer Research* 54,Nov. 15,5831-5836.
- Wei,Z.,Keng,P.C.and Chou,W.G.(1992)Differential gene expression in wild-type and X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell lines.*Mutat. Res.*,274 ,237-245.
- Yamanaka, K.,Hasegawa, A.,Sawamura,R. and Okada, S.(1989)Dimethylated arsenic induce DNA strand breaks in lung via the production of active oxygen in mice. *Biochem.Biophy.Res. Commun.*, 165,43-50.
- Yamanaka, K.,Hoshino,M., Okamoto,M.,Sawamura,R.,Hasegama,A. and Okada ,S.(1990)Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxy radical.*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168,58-64.
- Yunis J.J. ,Soreng A.L. : Constitutive fragile sites and cancer .*Science* 1984 ; 226 : 1190-1204.
- Yunis J.J.,Soreng A.L.,Bowe A.E.:Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens.*Oncogene* 1987;1:59-69.

《 授 權 書 》

本人所撰(著) 八十四 學年度第一學期

私立中山醫西學院

大學

醫西醫研究所 碩 士學位論文(論文名稱: 含砷量高飲水地區皮膚癌

體變異之研究
癌病患人類淋巴球染色

之提要 同意 不同意
開放供學術利用。

姓名: 葉木必明

立書人: 地址: 台中市永成街91號

身分證統一編號: Q220096412

聯絡電話: (04) 3710214

中華民國 八十五年 二月 十四 日