

R
008.8
1030
88

私立中山醫學院營養研究所
碩士論文

指導教授：林瑞生 教授
陳肅霖 副教授

檳榔塊成分對中國倉鼠卵(CHO)細胞之
細胞-遺傳毒性的研究

Studies of the Cytogenotoxicity of
Ingredients of Betel Quid
on Chinese Hamster Ovary Cells

研究生：晉淑意

中華民國八十八年一月

中山醫學院圖書館



C054592

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 私立中山醫學院 大學(學院) 營養科學 系所
組 八十七 學年度第 一 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱: _____

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號: _____)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名:

研究生簽名: 晉淑意
(親筆正楷)

學號: R84311
(務必填寫)

日期: 民國 八十八 年 一 月 二十 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄台北市 10636 和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 江守田、王淑貞。(本授權書諮詢電話: 02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請經濟部智慧財產局修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在兩種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 www.stic.gov.tw，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 www.ncl.edu.tw。

2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。

3. 全國博碩士論文全文資料整合計畫的宏觀效益：

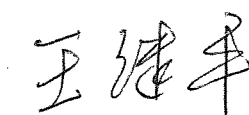
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院營養科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

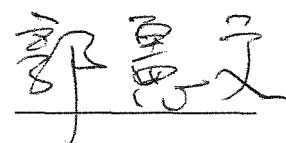
台中榮民總醫院教學研究部研究員和
中國醫藥醫學院藥物化學研究所教授

王繼平 教授



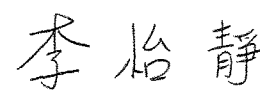
私立中國醫藥醫學院公衛系教授
兼系主任

郭憲文 教授



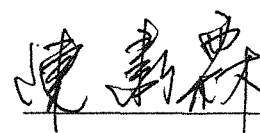
私立中山醫學院藥理學科副教授

李怡靜 副教授



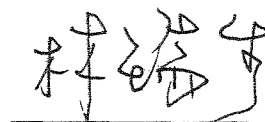
私立中山醫學院營養科學研究所副教授
(論文指導教授)

陳肅霖 副教授



私立中山醫學院藥理學科教授
(論文指導教授)

林瑞生 教授

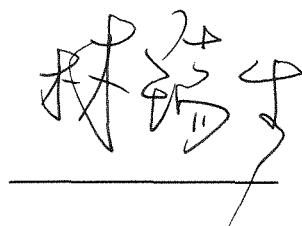


中華民國八十八年一月

學生晉淑意論文題目為檳榔塊成分對中國倉鼠卵(CHO)細胞之細胞-遺傳毒性的研究，其論文已經中山醫學院營養科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：林瑞生 教授

簽名：

Handwritten signature of Lin Ruisheng in black ink, written over a horizontal line.

陳肅霖 副教授

簽名：

Handwritten signature of Chen Sulin in black ink, written over a horizontal line.

中華民國八十八年一月二十日

目錄

頁碼

中文摘要(CHINESE ABSTRACT)	1
英文摘要(ENGLISH ABSTRACT)	3
緒論(INTRODUCTION).....	6
材料和方法(MATERIALS AND METHODS).....	15
結果(RESULTS)	30
討論(DISCUSSION).....	38
圖表(FIGURES AND TABLES).....	43
附錄(APPENDIX)	61
參考文獻(REFERENCES).....	76

誌 謝

交出論文的那一天，終於感受到生命中第一次如釋重負的感覺。畢業了真好！對於曾經協助過我與鼓勵過我的人，我心中充滿了言語無法表達的感激與謝意，更有著想與大家分享成果與喜悅的悸動。

首先感謝三年多來對我細心指導的恩師林瑞生教授，讓原本對「細胞」世界一無所知的我，能有機會從細胞透視生命的本質並進而探索這神祕的微觀世界；同時也要感謝恩師陳肅霖教授，由於他如燈塔般的耐心指引，才能使我從無知的茫然中找到求學與求知的正確方向。此外，令我由衷感激的是王繼平教授、郭憲文教授、李怡靜副教授能在百忙之中撥冗批閱拙作，並提供無數寶貴意見，才使得本論文更臻完美。

實驗能夠順利完成其實是倚靠許多人的幫助，尤其是李怡靜老師、李寶珍學妹及醫學系潘麟鑫同學，由於他們的熱忱與關懷才使實驗成果得以呈現在大家眼前。在工作上則要感謝系主任王進崑教授的寬懷與包容以及歐珠琴學姐的勤務分擔，才能讓我在學業與工作上達到一個平衡點。在我求學期間對於同仁們所造成的不便與工作負擔的增加，只能在此表達最誠摯的歉意。

多年來支撐著我在學業上堅持的最大原動力，主要來自於外子李樹人先生，由於他的犧牲與奉獻，才能讓我不至於在學業、事業與現實生活的壓力下崩潰並進而順利完成學業。同時也要感謝我的父母、公婆、及家人對我兩個善解人意的女兒宜宣、乙青細心的照顧，才能讓我無後顧之憂。對於宜宣、乙青我只有滿懷的歉意，由於學業的關係這兩、三年來我無法親自照料她們，也無法提供她們一個安定的成長環境。使得她們小小年紀就得在祖父母與外公外婆家之間台中、嘉義兩地奔波。無法伴隨她們成長一直是我最大的遺憾，但是看到她們表現的如此乖巧與體貼卻是我最大的欣慰。雖然她們目前還無法體會母親為家庭所做的努力，可是我還希望她們也能分享母親學業完成的喜悅，更希望能體諒我無法盡人母天職的苦衷與心酸。

中文摘要 (Chinese Abstract)

本研究利用微小核法(MN)來探討檳榔塊成分(arecoline、catechin、glycyrrhizin 和 Cu^{2+})在中國倉鼠卵(CHO)細胞之細胞遺傳毒性並探討 CuCl_2 分別與 arecoline、catechin 及 glycyrrhizin 間的交互遺傳毒性。並以 MTT 法探討此四種檳榔塊成分對 CHO 細胞存活率之影響。另外，以核分裂指數(NDI)和細胞型態觀察來探討此四種成分對 CHO 細胞之細胞毒性，亦以流體細胞測定法(flow cytometry)探討此四種成分影響 CHO 細胞之細胞凋亡及細胞週期中各期之分佈情形。

MTT 之研究成果發現 arecoline、catechin、glycyrrhizin 和 CuCl_2 均能抑制 CHO 細胞之存活率，而 CuCl_2 和 arecoline、catechin 或 glycyrrhizin 共存時， CuCl_2 可分別有統計意義的降低此三種成分之細胞毒性。在細胞型態之觀察結果發現只有 catechin 會改變 CHO 細胞之細胞型態，但目前對於 catechin 會改變細胞型態的機制並不十分清楚，有待進一步探討。此外，此四種成分對 CHO 細胞之 NDI 的影響較複雜，arecoline 和 glycyrrhizin 在低濃度加強 NDI，高濃度則抑制；catechin 和 CuCl_2 則增加 NDI。

遺傳毒性的研究結果顯示 arecoline、catechin、glycyrrhizin

及 CuCl_2 均有統計意義的增加 CHO 細胞之微小核數，其中 glycyrrhizin 在 $0.1-3\mu\text{M}$ 之濃度範圍可劑量—相關性地增加 CHO 卵巢細胞之微小核數。交互遺傳毒性之探討發現 CuCl_2 可加強 arecoline 之遺傳毒性，對 catechin 則無此作用，但對 glycyrrhizin 則抑制其之遺傳毒性。這些結果顯示檳榔塊成分間之交互遺傳毒性相當複雜。

細胞凋亡之研究結果顯示，此四種檳榔塊成分均不造成細胞凋亡，亦不影響其細胞體積和細胞之顆粒度，但 arecoline、catechin 和 glycyrrhizin 似有抑制 G_0/G_1 phase 之作用。

結論是 arecoline，catechin，glycyrrhizin 和 CuCl_2 單獨存在時對 CHO 細胞均有細胞毒性和遺傳毒性，但其共存時會呈現複雜的交互作用。

英文摘要 (English Abstract)

Betel chewing is a widespread habit in Taiwan, Southeast Asia and India. According to the statistical data of 1994, we know that the amount of betel quid chewier is about 10-15% of total population on earth, and the consumers of betel quid are still growing. Unfortunately, many investigators have shown that the habit of chewing betel quid is correlated to the high incidence of oral cancer and esophageal carcinoma (Muir and Kirk, 1960; Hirayama, 1986; IARC, 1985). However, the chemical ingredients of betel quid are a complex mixture including arecoline, Cu^{2+} , catechin and glycyrrhizin. Since betel quid chewing exposes the consumer to a mixture of these compounds, a study of cytogenotoxicity of these compounds are important to understand their beneficial and harmful effects. Therefore, in this study, micronucleus (MN) test was employed to measure the genotoxic potential of arecoline, catechin, glycyrrhizin and Cu^{2+} in Chinese hamster ovary (CHO) Cells.

Our results showed that all of the four ingredients of betel quid, arecoline, catechin, glycyrrhizin and Cu^{2+} , significantly elevated the number of micronucleated cells, and glycyrrhizin caused genotoxicity in a concentration-dependent manner. In addition, the genotoxic interactions of Cu^{2+} and arecoline, catechin or glycyrrhizin were complex. Cu^{2+} attenuated the genotoxicity of glycyrrhizin, however, potentiated the genotoxicity of arecoline, but did not affect the genotoxicity of catechin.

In this study, MTT assay, nuclear division index (NDI) and cell morphological change were conducted to study the cytotoxicity of the four ingredients of betel quid in CHO cells.

The results of MTT assay showed that all of the four compounds at high concentrations significantly decreased the viability of CHO cells, but Cu^{2+} attenuated the cytotoxicity of arecoline, catechin or glycyrrhizin, respectively. In observation of cell morphology found that

only catechin could cause the morphological change in CHO cells. On the other hand, the results of NDI were complex, both arecoline and glycyrrhizin increased cell proliferation at lower concentrations, but depressed cell proliferation at higher concentrations. In addition, both catechin and CuCl_2 increased cell proliferation. Finally, the results of flow cytometry showed that any of the four ingredients didn't cause hypoploidy cells, change cellular size, and affect cellular glandularity. Obviously, the four ingredients didn't cause apoptosis in CHO cells.

According to these findings, it is concluded that all the four ingredients of betel quid cause both genotoxicity and cytotoxicity in CHO cells. However, the cytogenotoxic interactions among these ingredients of betel quid are complex.

緒論(Introduction)

一、檳榔果實

檳榔果實(Areca fruit)為棕櫚科植物檳榔(Areca catechu L.)的果實。古代漢方將檳榔果實去除外皮所得之檳榔子(Betel nut)作為止痢、驅蟲、提神、鎮靜、健胃或預防感冒之用(林, 1989)。

二、檳榔果實的化學組成

檳榔果實含有水份、脂肪、多醣類、纖維質、礦物質、酚類化合物及多種植物鹼(表一)(Mujumder et al., 1979)。其中以酚類化合物及植物鹼被認為最具有生理活性(Mujumder et al., 1979 ; Hwang et al., 1992)。

1. 酚類化合物

檳榔中已知的酚類化合物有 catechin dimers , leucocyanidin dimers , leucopleargonodin (Mathew and Govindarajan, 1969)。

2. 植物鹼

檳榔果實中至少含有五種不同結構的植物鹼，分別為 arecoline、arecaidine、guvacoline、gucacine 與 arecolidine (Mujumdar et al.,1979)。其中以 arecoline 的含量最豐富 (王和孫，1993；Wang et al.,1997)。

Table 1. composition of tender and ripe betel nuts

Constituents	Tender nut(%)	Ripe nut(%)
Water extractive	75	20-30
Polyphenols	40	11-18
Alksloids	0-0.1	0.2-0.24
Fat	1-4	10-15
Free fatty acids	1.5-6.7	Drcrease
Polysaccharides	5	25
Crude fiber	1-2	15
N, Mineral matter, Water -soluble ash, Water- insoluble ash	1.1-3.8	Decrease

(Mujumder et al.,1979)

三、檳榔與口腔病變

由於檳榔種植成本低廉又節省勞力，利潤可觀，因此本省種植面積逐年增加，食用檳榔逐漸成為一種流行趨勢，且食用年齡層亦有下降的現象(林，1989)。目前台灣嚼食檳榔的人口約以高達二百八十萬人(黃和許，1993)，平均每人每天約攝食 14-23 顆檳榔(Ko et al.,1992)；雖然許多學者認為咀嚼檳榔對健康有害無益，尤其本省因口腔癌死亡者，有 80%與嚼食檳榔習慣有關(Kwan，1976)，但國人對於檳榔的消耗確有增無減，主要是因為仍無法提出有利的證據來證明檳榔是有害健康的，例如為什麼有些人嚼食檳榔多年，除了牙齒磨損外卻未造成顯著的口腔組織病變。又 1985 年國際癌症研究學會(IARC)指出，現在已有足夠證據證明檳榔和煙草一起咀嚼會導致口腔癌，而單獨咀嚼檳榔是否會導致口腔癌證據仍不夠充分(IARC，1985)，但從流行病學調查及臨床研究則清楚地顯示嚼食檳榔與口腔病變似乎具有相關性。

1. 流行病學調查

國人嚼食檳榔的人口有逐年增加的趨勢且根據衛生署癌症登記中心資料顯示，1979 至 1985 年間國人罹患口腔癌機率提高了 2.5 倍，尤其檳榔盛行地區如高雄與彰化，其口腔癌患者中有咀嚼檳榔

習慣者分別高達 86.2%及 70% (王, 1993), 另外研究也發現, 頰癌與齒齦癌之發生和嚼食檳榔時習慣將檳榔渣置於牙齦與頰黏膜間有關(Dunham et al.,1966)。國外也有類似的研究結果, 如是嚼檳榔的印度, 該國人民罹患口腔癌的機率, 佔全部癌症罹患率的三分之一(WHO, 1984), 如此高比率亦暗示檳榔與口腔病變具有相關性。

2. 臨床症狀

檳榔果實中含有豐富的粗纖維, 長期咀嚼會造成牙齒動搖、磨損、牙齦退縮(蕭, 1990)。檳榔嚼塊中之鹼性成分及石灰會沈積而產生牙結石, 進一步造成牙周發炎。另外, 口腔黏膜在檳榔嚼汁成分的長期刺激下, 可能會引起一連串不同程度的傷害, 如白斑症(leukoplakia)、口腔黏膜下纖維化(oral submucous fibrosis; OSF)等癌前期病變(黃, 1990)。

OSF 為口腔黏膜下纖維異常堆積, 造成張口困難、疼痛、口腔黏膜變白及潰瘍等症狀。研究發現, 檳榔果實中植物鹼 arecoline、arecaidine 會刺激纖維母細胞之增生並使膠原蛋白(collagen)的生成量增加, 尤其後者刺激膠原蛋白的生成能力更勝於前者(Harvey et al.,1986)。另外, 乾燥檳榔子中之 tannins 及(+)-catechin

萃出物被發現會抑制膠原蛋白分解酵素(collagenase)的活性，使分解膠原蛋白的能力下降(Scutt et al.,1987)。綜合以上結果得知，OSF 與嚼食檳榔有密切關係。

四、檳榔塊成分之細胞-遺傳毒性

根據統計顯示，1994 年嚼食檳榔的人數約佔全球人口的 10-15%，並持續在成長當中(Pickwell et al.,1994)。因此，檳榔之安全性受到國內外學者廣泛的重視。檳榔塊的成分相當多其中包含 arecoline, Cu^{2+} , catechin, 和 glycyrrhizin (Nanda and Kapoor, 1971 ; Arjung, 1976 ; Hennings, 1981 ; Stich and Stich, 1982)。

1. arecoline

有報告指出 arecoline 會導致老鼠的骨髓細胞發生染色體變異以及增加姊妹染色體的交換(Panigrahi and Rao,1982 ; 1983)，而且對 CHO 細胞也會有相同的突變作用(Dave et al.,1992)。Sinha 及 Rao 在 1985 年指出 arecoline 會導致老鼠精子細胞型態的不正常及 DNA 合成順序發生錯亂。Sharan 及 Wary (1992)亦報告 arecoline 以及檳榔子的萃取液會導致從人類喉嚨癌所得到的



Hep 2 細胞的 DNA 合成順序發生錯亂。

2. catechin 和 glycyrrhizin

此外, catechin 以及 glycyrrhizin 此二者被發現有抗突變作用。Nagabhushan 和 Bhide(1988)的報告也指出香煙, 香煙衍生物以及醃製肉品在 *Salmonella typhimurium* strain TA98 所造成之突變作用可被 catechu extract 和 catechin 所弱化。Jain 等人(1989)也證明 catechin 會抑制對 *Salmonella typhimurium* strain TA100 的 *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)突變能力。Nishino 等人(1986)的實驗也指出 glycyrrhizic acid (aglycone of glycyrrhizin)會抑制 teleocidin 及 TPA 對老鼠皮膚所造成的促癌化作用(tumor promotion)。他們同時也建議 glycyrrhizic acid 應該要以 glycyrrhizin 的型態服用, 因為 glycyrrhizin 是水溶性的而且會在消化道分解成 glycyrrhizic acid。Abe 等人(1987)也報導出 glycyrrhizic acid 會抑制 B16 細胞的生長及刺激其產生黑色素(melanogenesis)的作用。但 catechin 和 glycyrrhizin 本身如高劑量是否造成遺傳毒性? 尚少有學者提及。

3. copper

銅在週期表中的原子數是 29，原子量是 63.54，位於週期表 Ib 族，氧化狀態是+1 價、+2 價離子(Harrison, 1974)，銅是金屬具有延展性及對於熱和電是一個良好的導體。銅的半衰期是四星期。大約 50%的銅的攝取是經由食物吸收而獲得。此吸收情況在體內會產生恆定狀態。銅在人體內較高密度是在肝臟，主要隨膽汁排泄但少部份由尿液排泄。銅是人體必須的金屬，在人體的許多酵素如 ferroxidases，cytochrome oxidase，superoxide dismutase 及 amine oxidase 都需要銅離子的存在。成人每日的需要量建議是 2mg。若攝取過多的銅鹽類(通常至少 15-75mg)則會造成胃與腸的阻礙。正常情況的人類還未有慢性銅中毒的例子。有報告指出攝取大量銅鹽類會造成溶血、肝臟及腎臟損害。曾有案例報告指出葡萄園的園丁使用含硫酸銅溶液的噴霧劑而造成肺臟病變，但噴霧劑尚含有其他成分所以銅在此些病例所扮演的角色仍不清楚。此外，有些人因先天性代謝不正常而無法順利排泄銅而造成 Wilson's disease。目前只有少數報告涉及銅之遺傳毒性，Sideris 等(1981)指出氯化銅在哺乳類細胞會造成 DNA 合成異常。Singh and Sharma (1981)亦報告大量且長期使用硫酸銅會抑制植物細胞之

分裂和染色質的整合功能。此外，Trivedy 等人(1997)的報告指出檳榔內含有銅的成分且銅在口腔黏膜下纖維化(oral submucous fibrosis ; OSF)的病理變化扮演一個重要的角色。在產生膠原質(collagen)的纖維母細胞(fibroblast)中甚至在其鄰近的角質細胞(keratinocytes)中都可發現 lysyl oxidase 增加，此過程可能是過量的銅刺激所引起的。

微小核分析法被廣泛的用來確認嚼檳榔者其剝落口腔細胞之遺傳毒性傷害，而嚼檳榔者含有微小核的剝落口腔細胞數也被發現增加(Stich et al.,1982 ; 1986 ; Stich and Rosin, 1984)。因為嚼檳榔塊會讓嚼食者暴露於 arecoline , catechin , glycyrrhizin , Cu^{2+} 混合物中，所以這些化合物之間交互作用為有利或有害有必要加以探討。

五、研究目的：

- 1.用微小核法(MN)來檢驗 arecoline , catechin , glycyrrhizin 和 Cu^{2+} 在 CHO 細胞是否有細胞-遺傳毒性及相互遺傳毒性？
- 2.以核分裂(NDI)及 MTT 法(cell viability)分析這四種檳榔塊成分是否具有細胞毒性？
- 3.用倒立顯微鏡觀察此四種檳榔塊成分在高濃度之細胞型態

(cell morphology)是否有明顯變化？

4.並以流式細胞儀(flow cytometry)探討其對 CHO 細胞之細胞週期(cell cycle)以及細胞凋亡(apoptosis)的影響。

以期對檳榔塊成分之交互細胞毒性和遺傳毒性做更進一步的瞭解。

材料和方法

(Materials and Methods)

藥品和儀器

一、藥品試劑

下列藥品購自 **Sigma** 公司(美國)

- 1.Cytochalasin B
- 2.Adriamycin
- 3.Arecoline
- 4.Catechin
- 5.Glycyrrhizic acid
- 6.MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol2-yl]-2, 5 - diphenyl - tetrazolium bromide)
- 7.Glycine
- 8.RNase
- 9.PI

下列藥品購自 **Gibco** 公司(美國)

- 1.Trypsin (0.25%)
- 2.Dulbecco's phosphate Buffered Saline
- 3.Minimum Essential Medium
- 4.Foetal Bovine Serum
- 5.PSN (Antibiotic mixture)

含 Penicillin
Streptomycin
Neomycin

下列藥品購自 **Merck** 公司(德國)

- 1.Potassium Chloride
- 2.Giemsa
- 3.Fix sol'n (Methanol : Acetic acid = 3 : 1)
- 4.CuCl₂.2H₂O
- 5.DMSO (Dimethyl sulfoxide)
- 6.NaCl
- 7.Ethanol

二、常用藥品及培養液之配置

1. CuCl₂.2H₂O：將 CuCl₂.2H₂O 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
2. Adriamycin：將 Adriamycin 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
3. Arecoline：將 Arecoline 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
4. Catechin：將 Catechin 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。
5. Glycyrrhizin：將 Glycyrrhizin 溶於滅菌的蒸餾水中，並將其分別稀釋至所需的最終濃度。

6. Sorensen's glycine buffer: 取 0.1M 的 NaCl 加 30ml 的蒸餾水，再加 0.1M glycine，用 1M NaOH 調 pH 至 10.5，最後加蒸餾水至 50ml。

7. MEM

取出可配製一公升 MEM 的粉末，加入碳酸氫鈉(NaHCO_3) 2.2g 溶於一公升之去離子水中，調 pH 值至 7.25 後，過濾滅菌。

8. Cytochalasin B (Cyt-B)

將 Cyt-B 溶於滅菌的 DMSO 中，使其濃度為 2mg/ml 並以 HBSS 稀釋成 0.5mg/ml。

9. 0.075mM KCl (低張溶液)

取 0.54g KCl 溶於 100ml 之蒸餾水中。

10. 5 μ l RNase

將 10 μ g/ μ l 溶於二次水稀釋成 50 μ g/c.c.

11. 10 μ l PI

將 0.5mg/c.c. 溶於 PBS 稀釋成 5 μ g/c.c.

三、儀器

1.無菌操作台(Lamina Flows) :

- a.廠牌 : Bellco
- b.型號 : 8001-74000
- c.出產地 : Canada

2.培養箱(Incubator) :

- a.廠牌 : Nadaire
- b.型號 : IR AUTOFLOW
- c.出產地 : U. S. A.

3.離心機(Centrifuge) :

- a.廠牌 : Hettich - Zentrifugen
- b.型號 : ROTANTA/R
- c.出產地 : Tuttlingen

4.烘片機(Slide Warmer) :

- a.廠牌 : Fisher Scientific
- b.型號 : 77
- c.出產地 : U. S. A.

5.水浴機(Shaker Bath 130) :

- a.廠牌 : Firstek
- b.型號 : B 202 - Tr
- c.出產地 : U. S. A.

6.細胞計數器(Hemocytometer) :

Reichert-Jung

7.光學顯微鏡(Microscope) :

- a.廠牌：Nikon
- b.型號：Microphot - FAX
- c.出產地：Japan

8.電子天平

- a.廠牌：Mettler
- b.型號：AE 240
- c.出產地：Canada

9.倒立顯微鏡：

- a.廠牌：Nikon
- b.型號：phase contrast 2 ELWD 0.3
- c.出產地：Japan

10.酸鹼測定儀：

- a.廠牌：WTW
- b.型號：PH 537
- c.出產地：Germany

11.迴轉式振盪器

- a.廠牌：Firstek Scientific
- b.型號：S101D
- c.出產地：Taiwan

12.Microplate Reader

- a.廠牌：Metertech
- b.型號：Σ960
- c.出產地：Taiwan

13. Flow cytometer

- a. 廠牌：Becton-Dickinson
- b. 型號：FACS-Calibur
- c. 出產地：U.S.A

四、照相器材及試劑

- 1. 底片顯影劑：Kodak T-max
- 2. 照片顯影劑：Dektal
- 3. 照片及底片定影劑：Kodak T fixer
- 4. 底片：Kodak
- 5. 照片：Ilford
- 6. 放大機：
 - a. 廠牌：Meopta
 - b. 型號：Opemus 6
 - c. 出產地：Japan

實驗步驟及方法

一、細胞培養(Cell Culture)：

*中國倉鼠卵細胞(CHO)細胞其細胞週期約 12 個小時

利用細胞計數器(Hemocytometer)取得 5×10^5 個 CHO 細胞置入每個培養皿中



培養在含 10% 小牛血清(Fetal bovine serum ; FCS)及 1% Antibiotic mixture (Penicillin, Streptomycin, Neomycin ; PSN)的 5ml 培養液(Minimum Essential Medium ; MEM)中



放入含有 5% CO₂ 並保持濕潤的 37°C 培養箱



培養 24 小時



加入各種不同濃度的藥物

於不含血清及 PSN 的培養液中



作用 2 個小時



移去原培養液並以 PBS 溶液清洗細胞 2 次



加入新鮮且含血清的培養液以探討 CHO 細胞之細胞存活率、微小核數和利用流體細胞儀分析細胞週期和細胞凋亡

二、細胞微小核法(Micronucleus Assay ; MN) : (Fenech and Morley, 1985)^{xxxvi}

1. 細胞 : 5×10^5 個 CHO 細胞

2. 藥品 :

Arecoline (0.03-10 μ M)

Catechin (1-3 μ M)

Glycyrrhizin (0.1-3 μ M)

CuCl₂ (30-300 μ M)

Cytochalasin B (0.5mg/ml)

Trypan blue (0.4%)

Trypsin (0.25%)

KCl (75mM)

Fix sol'n (methanol : acetic acid = 3 : 1)

3% Giemsa (pH6.4)

3. 儀器 : Microscope

4. 處理流程 :

5×10^5 個 CHO 細胞

↓

培養 24 小時

↓

加入不同濃度藥物

及 30 μ M Cyt-B 於不含血清之培養液培養

↓

作用 2 小時

↓
移去原培養液並用 PBS 清洗細胞 2 次
↓
加入 30 μ M Cyt-B 及含血清之培養液培養
↓
培養 18 個小時
↓
細胞經 0.25% Trypsin 處理
↓
收集懸浮細胞

5. Micronucleus 之製備：

懸浮的細胞以 1200 rpm 離心 8min
↓
以 75mM KCl 處理 6min 並將細胞懸浮液均勻
↓
以 1200 rpm 離心 8min
↓
倒掉上清液
↓
沿管壁加入 5ml 固定液懸浮均勻並靜置 30min
↓
以 1200 rpm 離心 8min
↓
移去上清液並加入 5ml 固定液處理 5min

↓
以 1200 rpm 離心 8min
↓
倒掉上清液並加入 3ml 固定液處理 3min
↓
以 1200 rpm 離心 8min
↓
加入少許固定液並與細胞混合均勻
↓
將混合液輕輕滴在已置於烘片機上烘乾的玻璃片上
↓
待玻片乾後，以 3% 吉氏染色劑(Giemsa)染色 5min
↓
在顯微鏡下連續觀察 1000 個雙核細胞中所含 MN(如 Fig.1)之數目

三、細胞存活率 (Cell Viability) : (Plumb, et al., 1989)

1. 細胞 : 1×10^4 個 CHO 細胞

2. 藥品 :

Arecoline $3 \mu\text{M}$

Catechin $10 \mu\text{M}$

Glycyrrhizin $3 \mu\text{M}$

CuCl_2 $300 \mu\text{M}$

MTT $50 \mu\text{l}$

DMSO - Sorensen's glycine buffer = 8 : 1

3. 儀器：

ELISA

4. 處理流程：

1×10^6 個 CHO 細胞



種入 96-well microplate



培養 24 小時



加入不同濃度藥物

於不含血清之培養液培養



作用 2 小時



移去培養液



加入含血清之培養液培養



培養 18 個小時



收集細胞

5.細胞的數據分析：

細胞去除培養液



加入配好的 200 μ l MTT 溶液



放置一小時



吸除 MTT 溶液

加入 200 μ l DMSO-Sorensen's glycine buffer 溶液



於迴轉式振盪器搖盪 10 分鐘，溶出 formazan



放入 ELISA 儀器在 570nm 波長偵測



收集數據

四、流體細胞儀分析法(Flow Cytometer)：(Ormerod, 1994)

1.細胞：1 \times 10⁶個 CHO 細胞

2.藥品：

Arecoline 3 μ M

Catechin 10 μ M

Glycyrrhizin 3 μ M

CuCl₂ 300μM

PBS

Ethanol

Trypsin 0.25%

3. 儀器：

Flow Cytometer

4. 處理流程：

1×10⁶ 個 CHO 細胞



培養 24 小時



加入不同濃度藥物

於不含血清之培養液培養



作用 2 小時



移去原培養液並用 PBS 清洗細胞 2 次



加入含血清之培養液培養



培養 18 個小時



細胞經 0.25% Trypsin 處理



收集懸浮細胞

5.細胞的製備：

懸浮細胞



以 1200rpm 離心 5min



移去上清液並加入 1ml PBS 溶液清洗



以 1200rpm 離心 5min



移去上清液並加入 1ml PBS 溶液清洗



以 1200rpm 離心 5min



移去上清液並加入 300 μ l PBS 溶液和 700 μ l Alcohol 溶液固定



放置 -20 $^{\circ}$ C 24 小時



上機分析細胞

6. 上機前處理

以 1200rpm 離心 5min



放入冰浴



D-PBS 洗(或 Triton-x)



以 1200rpm 離心 5min，去上清液



加 985 μ l PBS

5 μ l RNase

10 μ l PI



以 1c.c. 針筒取出細胞懸浮液，然後以 200 目絹布過濾



放入包錫箔的 Eppendorf 試管中

五、統計分析(Statistical Analysis)：

細胞存活率(Viability)，微小核(MN)之結果以 mean \pm S.E.M. 呈現，實驗組和對照組之間的統計意義差別以 Student's t-test 或先以 one way analysis of variance (ANOVA) 分析，然後以 Dunnet's test 來評估，以 $p < 0.05$ 作為顯著性差異之判斷水準。

結果(Results)

一、微小核(MN)

1. arecoline、catechin、glycyrrhizin 和 CuCl_2 對在 CHO

細胞所造成之遺傳毒性：

由 Table 2 的結果顯示，正對照組之 $0.1\mu\text{M}$ adriamycin (42.2 ± 2.2) 具有顯著統計差異增加微小核頻率。與對照組 (12.3 ± 1.1) 相比較：arecoline 在 $1\mu\text{M}$ (33.6 ± 2.9) 和 $3\mu\text{M}$ (27.0 ± 2.6)； CuCl_2 在高濃度： $100\mu\text{M}$ (34.4 ± 2.6) 和 $300\mu\text{M}$ (31.4 ± 2.7)；catechin 在高濃度： $3\mu\text{M}$ (28.6 ± 2.3) 和 $10\mu\text{M}$ (28.9 ± 2.8)；以及 glycyrrhizin 在 $0.1\mu\text{M}$ (22.3 ± 1.0)、 $0.3\mu\text{M}$ (29.2 ± 2.1)、 $1\mu\text{M}$ (35.5 ± 2.9) 和 $3\mu\text{M}$ (36.6 ± 5.2) 均和 adriamycin 一樣具有顯著統計差異地增加 CHO 細胞之 MN 數，且 glycyrrhizin 以濃度相關性誘發遺傳毒性。

2. CuCl_2 和其它檳榔塊成分在 CHO 細胞之交互遺傳毒性：

a. CuCl_2 與 Arecoline 之交互作用：

如 Table 3 所顯示，arecoline 在 $0.3\mu\text{M}$ 下其所產生之微小核數為 12.0 ± 1.2 與對照組 (10.5 ± 1.4) 相比較並無顯著

統計差異， $30\mu\text{M CuCl}_2$ (15.0 ± 0.7)也無顯著統計差異之 MN 數。當 $30\mu\text{M CuCl}_2$ 與 $0.3\mu\text{M arecoline}$ 相加所形成之 MN 為 21.8 ± 2.1 ，與對照組相比較有顯著統計差異地增加微小核數；與 arecoline alone 相比較也有顯著統計差異的增加 MN 數。

b. CuCl_2 與 Catechin 之交互作用：

如 Table 3 所顯示，catechin 在 $1\mu\text{M}$ 下其所產生之微小核數為 13.5 ± 1.0 與對照組(10.5 ± 1.4)相比較無顯著統計差異的增加；而 $30\mu\text{M CuCl}_2$ 與 $1\mu\text{M catechin}$ 相加所形成之 MN 數為 15.5 ± 1.2 ，與對照組或 catechin alone 相比較並無顯著統計差異的增加微小核數。

c. CuCl_2 與 Glycyrrhizin 之交互作用：

如 Table 3 顯示，glycyrrhizin 在 $0.1\mu\text{M}$ 下其所產生之微小核數為 24.8 ± 1.9 與對照組(10.5 ± 1.4)相比較有顯著統計差異的增加；當 $30\mu\text{M CuCl}_2$ 與 $0.1\mu\text{M glycyrrhizin}$ 相加所形成之 MN 數為 14.5 ± 1.8 ，與 glycyrrhizin 組相比較有顯著統計差異的降低微小核數。

二、核分裂的指數(NDI)

1. Arecoline, Catechin, Glycyrrhizin 和 CuCl_2 對 CHO

細胞之 NDI 的影響

- a. 在 CHO 細胞中，不同濃度 arecoline ($0.03-10\mu\text{M}$)之 NDI 值：由 Fig.8 的結果顯示，arecoline $0.03\mu\text{M}$ 之 NDI 值為 1.99 ± 0.02 與對照組(1.76 ± 0.01)相比較呈有顯著統計差異的增加核分裂的指數，而 arecoline $10\mu\text{M}$ 之 NDI 值為 1.69 ± 0.01 與對照組(1.76 ± 0.01)相比較呈有顯著統計差異的抑制核分裂的指數；而 arecoline $0.3\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 和 $3\mu\text{M}$ 的 NDI 值分別為 1.79 ± 0.01 、 1.77 ± 0.01 和 1.78 ± 0.01 與控制組相比較均無顯著統計差異。
- b. 在 CHO 細胞中，不同濃度 catechin ($1-10\mu\text{M}$)之 NDI 值：由 Fig.9 的結果顯示，catechin $3\mu\text{M}$ (1.85 ± 0.01)及 catechin $10\mu\text{M}$ (1.84 ± 0.01) 之 NDI 值與對照組 (1.76 ± 0.01) 相比較均能呈現有顯著統計差異的增加核分裂的指數；catechin $1\mu\text{M}$ (1.77 ± 0.01)與控制組相比較並無顯著統計差異的影響 NDI 值。
- c. 在 CHO 細胞中，不同濃度 glycyrrhizin ($0.1-3\mu\text{M}$)之 NDI

值：

由 Fig.10 的結果顯示，glycyrrhizin 0.1 μ M、0.3 μ M 和 1 μ M 之 NDI 值分別為 1.86 \pm 0.01、1.85 \pm 0.01 和 1.87 \pm 0.01 與對照組(1.76 \pm 0.01)相比較均有顯著統計差異的增加核分裂的指數，而 glycyrrhizin 3 μ M 之 NDI 值為 1.70 \pm 0.01 與對照組相比較則呈有顯著統計差異的抑制核分裂指數。

d. 在 CHO 細胞中，不同濃度 CuCl₂ (30-300 μ M) 之 NDI 值：

由 Fig.11 的結果顯示，100 μ M CuCl₂ 之 NDI 為 1.87 \pm 0.01 與對照組(1.76 \pm 0.01)相比較呈有顯著統計差異的增加核分裂的指數，而 30 μ M CuCl₂ 與 300 μ M CuCl₂ 之 NDI 值與對照組相比較均無顯著統計差異的影響 NDI 值。

2.CuCl₂和其它檳榔塊成分在 CHO 細胞之 NDI 的交互作用

a. 在 CHO 細胞中，不同濃度 CuCl₂ 與 arecoline 交互作用之

NDI 值：

由 Fig.12 的結果顯示，0.3 μ M arecoline 之 NDI 值為 1.92 \pm 0.01 與對照組(1.98 \pm 0.01)相比較並無顯著統計差異的影響 NDI 值。而 30 μ M CuCl₂+0.3 μ M arecoline (1.99 \pm

0.01)與 arecoline alone 相比較也無顯著統計差異的影響
NDI 值。

b. 在 CHO 細胞中，不同濃度 CuCl_2 與 glycyrrhizin 交互作用
之 NDI 值：

由 Fig.13 的結果顯示， $0.1\mu\text{M}$ glycyrrhizin 之 NDI 值為 2.06 ± 0.01 與對照組 (1.98 ± 0.01) 相比較呈有顯著統計差異的影響 NDI 值。而 $30\mu\text{M}$ $\text{CuCl}_2 + 0.1\mu\text{M}$ glycyrrhizin (2.01 ± 0.01) 與 glycyrrhizin alone 相比較也無顯著統計差異的影響。

三、細胞存活率

1. arecoline 、 catechin 、 glycyrrhizin 、 CuCl_2 和 adriamycin 對 CHO 細胞之影響

Table 1 顯示， $3\mu\text{M}$ arecoline、 $10\mu\text{M}$ catechin、 $3\mu\text{M}$ glycyrrhizin、 $300\mu\text{M}$ CuCl_2 、 $0.1\mu\text{M}$ adriamycin 與對照組在 CHO 細胞之存活率分別為： 0.72 ± 0.03 、 0.78 ± 0.03 、 0.75 ± 0.02 、 0.98 ± 0.02 、 0.91 ± 0.04 和 1.17 ± 0.01 。表示 $3\mu\text{M}$ arecoline、 $10\mu\text{M}$ catechin、 $3\mu\text{M}$ glycyrrhizin、 $300\mu\text{M}$ CuCl_2 及 $0.1\mu\text{M}$

adriamycin 會具有顯著統計差異的抑制 CHO 細胞之存活率。

300 μ M CuCl₂ 分別和 3 μ M arecoline、10 μ M catechin、3 μ M glycyrrhizin 相加其 CHO 細胞存活率分別為 0.79 \pm 0.02、0.96 \pm 0.01 和 0.81 \pm 0.01。此結果和 3 μ M arecoline (0.72 \pm 0.03)，10 μ M catechin (0.78 \pm 0.03)，3 μ M glycyrrhizin (0.75 \pm 0.02) 單獨存在之結果分別相比 CHO 細胞存活率有顯著統計差異的上升，也就是 300 μ M CuCl₂ 可降低 3 μ M arecoline，10 μ M catechin 和 3 μ M glycyrrhizin 對 CHO 細胞之細胞毒性。

四、細胞型態 (cell morphology)

本實驗所得之細胞型態 Fig.1 是在電子顯微鏡下 640X 所拍攝，其餘照片是在倒立顯微鏡下在 phase 2 以 200X 所拍攝。

Fig. 2 顯示對照組之 CHO 細胞；其細胞呈紡錘狀吸附於培養皿，細胞質明顯擴展開，細胞核清晰可見，圓球亮點細胞為正處於分裂的細胞。

Fig. 3 顯示經 3 μ M arecoline 處理之 CHO 細胞：與對照組相比型態並無明顯改變，其細胞質明顯擴展開，細胞核清晰可見，並可見處於分裂的明亮細胞。

Fig. 4 顯示經 10 μ M catechin 處理之 CHO 細胞：與對照組相比少部份細胞型態呈發泡狀，細胞質與細胞核已無法分辨，但仍可見正處於分裂的細胞。

Fig. 5 ; 6 ; 7 分別顯示經 3 μ M glycyrrhizin , 300 μ M CuCl₂ 和 0.1 μ M adriamycin 處理之 CHO 細胞：與對照組相比型態並無明顯改變，細胞質明顯擴展開，細胞核清晰可見，細胞亦正常分裂。

五、流體細胞儀之研究結果

證明 arecoline、catechin、glycyrrhizin 和 CuCl₂ 的細胞毒性後，進一步地探討所引起的細胞死亡是否經由細胞凋亡的途徑。Fig.14 所示，3 μ M arecoline、10 μ M catechin、3 μ M glycyrrhizin 和 300 μ M CuCl₂ 處理 CHO 細胞二小時，以 PI 做 DNA 染色後，均無典型的細胞凋亡指標(hypodiploidy cell；低套染色體細胞)出現，這些檳榔塊成分亦均不影響 CHO 細胞之體積(Fig.16)和細胞內容物之顆粒度(Fig.17)。以 ModFitLT 分析細胞週期之各期之分佈情形(Fig.15)，如 Table 4 所示，arecoline、catechin、glycyrrhizin 和 CuCl₂ 加藥組在細胞週期所佔之 G₀/G₁ phase 百分比(%)分別是 40.7，42.95，

43.24, 37.5; 在 S phase 所佔的百分比(%)分別是 43.45, 40.75, 40.41, 45.92; G₂/M phase 所佔的百分比(%)分別是 15.85, 16.48, 16.35, 16.59 分別和對照組相比(G₀/G₁ phase : 38.16; S phase : 44.28; G₂/M phase : 17.57); 似乎 3 μ M arecoline、10 μ M catechin、3 μ M glycyrrhizin 和 0.1 μ M adriamycin 有 G₀/G₁ phase block 的現象。

討論(Discussion)

在本研究四種檳榔塊成分 arecoline、catechin、glycyrrhizin 和 CuCl_2 在高濃度均能降低 CHO 細胞的存活率，而 CuCl_2 可分別降低 arecoline、glycyrrhizin 或 catechin 之 CHO 細胞毒性。但核分裂指數 (NDI) 之研究結果則較複雜：arecoline ($10\mu\text{M}$) 和 glycyrrhizin ($3\mu\text{M}$) 在高濃度則抑制 NDI，但低濃度則增加 NDI；catechin 在 $3\text{-}10\mu\text{M}$ 濃度則增加 NDI； Cu^{2+} 則在 $100\mu\text{M}$ 時可增加 NDI。arecoline 在低濃度可促進細胞分裂，但高濃度則抑制之作用和其他學者之報告有一致性。Wang and Lee (1996) 發現檳榔果實之酚類化合物粗萃取物當其濃度達 $100\mu\text{g/ml}$ 時可抑制 CHO 細胞增生的效果。張等 (1998) 發現 arecoline 在低濃度 $0.1\mu\text{g/ml}$ ， $1.0\mu\text{g/ml}$ ， $10\mu\text{g/ml}$ 會促進牙齦纖維母細胞 (human gingival fibroblasts) 的增加，而 arecoline 濃度在 $100\mu\text{g/ml}$ 時會抑制牙齦纖維母細胞的生長。此外，觀察細胞型態變化的結果顯示只有高濃度的 catechin ($10\mu\text{M}$) 可明顯的改變 CHO 細胞型態。這些研究結果顯示以不同的方法來探討細胞毒性其結果有所差異，但這四種檳榔塊成分在高濃度下具有細胞毒性是可確定的。

檳榔與口腔癌的發生密切相關。其扮演的角色可能為致癌劑(謝，

1991)或為腫瘤的促進者。在本研究此四種檳榔塊成分均有顯著統計差異地在 CHO 細胞誘導微小核出現。arecoline 在培養細胞具有遺傳毒性之報告亦被其他學者所提出。Trivedi 等(1993)指出 arecoline 會有統計意義地在 CHO 細胞增加其染色體斷裂(chromosome aberrations)頻率和姊妹染色分體交換(SCEs)頻率，而且 arecoline 之此種遺傳毒性可被 nicotine 所加強。Dave 等(1992)在比較 arecoline 和檳榔子萃取物在 CHO 細胞之遺傳毒性後，亦認為 arecoline 為造成遺傳毒性之主成分。

雖然 Cu^{2+} 與 cancer 並沒有正相關 (Howell,1958; Linder,1983)，但在本研究 CuCl_2 對於 CHO 細胞有明顯的遺傳毒性。其他學者亦報告 Cu^{2+} 具有遺傳毒性，Bhunya (1996)利用 micronucleus test 評估 copper sulphate 可能對小雞產生的 clastogenic 反應，其實驗結果顯示 CuSO_4 對 chick (in vivo) 具有細胞遺傳毒性。Agarwal et al. (1990)的研究亦發現 CuSO_4 在大白鼠 (in vivo) 的骨髓細胞造成染色體斷裂(chromosome break)。Sideris 等(1981)的研究也發現 Cu^{2+} 會導致 DNA 的合成順序發生錯誤。Patishvili 等(1987)將 Cu^{2+} 注射入腹水癌細胞，結果發現 Cu^{2+} 可嵌在 DNA 的雙股螺旋構造中。所以 Cu^{2+} 是一種潛在

的突變因子。

回顧文獻可發現有些報告指 glycyrrhizin 和 catechin 有抗腫瘤和抗突變之作用。Nishino 等(1984)發現 glycyrrhizin 可減少 7,12-dimethyl-benzo (2) anthracene 和 teleocidin 在小白鼠產生皮膚癌。Sasaki 等(1989)亦發現 glycyrrhizin 藉著阻礙 cell cycle 在 G_0/G_1 phase 來抑制人類肝癌細胞的增長。Ohtsuka 等(1995)亦發現 Sho-saiko-to 之成分 glycyrrhizin 可降低 AF-2 在 *Salmonella typhimurium strain TA 100* 之致突變性。Abe 等人(1987)也報導出 glycyrrhizic acid 會抑制 B16 細胞的生長及刺激其產生黑色素(melanogenesis)的作用。此外，Nagabhusan 和 Bhide (1988)指出 catechu 萃取物和 catechin 不但不具突變性，且可減弱香煙和煙燻肉之萃取物在 *Salmonella typhimurium strain TA 98* 之致突變性。Jain 等(1989)亦報告 catechin 可對抗 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine 在 *Salmonella typhimurium strain TA 100* 之致突變性。然而在本研究，catechin 和 glycyrrhizin 對 CHO 細胞均具有遺傳毒性，相似的報告亦被其他的學者所提出。Bandyopadhyay 等(1986)報告 catechin 可在 *Salmonella strain* 造成突變並在培養細胞造成染色體斷裂。Giri

等(1987)以 catechin 餵食雄性小白鼠(Male Mice)後發現可增加小白鼠骨髓細胞之姊妹染色分體交換率(SCEs)。顏(1998)的研究指出 catechin 會使 CHO 細胞之 SCEs 頻率顯著的提高，且與濃度有正相關。這些 catechin 和 glycyrrhizin 之研究結果會相矛盾，可能和採用之標本，方法，劑量不同有關。我們亦大膽的推測 catechin 和 glycyrrhizin 在較高劑量具有遺傳毒性，但和其它突變物質共存時卻具有抗突變作用。就像 CuCl_2 在本研究單獨存在時，具有遺傳毒性，但可降低 glycyrrhizin 之遺傳毒性。Cai 和 Cherian (1996)亦報告 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 可降低 γ -射線在兔子淋巴球所造成之染色體斷裂(CA)之作用。另外， CuCl_2 可加強 arecoline 之遺傳毒性，Rahman 等(1992)亦報告 CuCl_2 可加強 quercetin 對小牛胸腺 DNA 的破壞。然而在本研究 CuCl_2 不影響 catechin 之遺傳毒性。總之檳榔塊成分之交互遺傳毒性可能相當複雜，尚需更進一步釐清。

在本研究 arecoline, catechin 和 glycyrrhizin 雖似有 G_0/G_1 phase 抑制之作用，但四種檳榔塊成分均不形成 Sub G_1 細胞，也不影響其細胞大小和細胞顆粒度。所以此四種成分在本實驗條件下不造成細胞凋亡，其降低 CHO 細胞之存活率仍使 CHO 細胞壞死而來。

結論：

1. arecoline, catechin, glycyrrhizin 和 CuCl_2 這四種檳榔塊成分均具有細胞毒性和遺傳毒性。其在較低濃度均能促使 CHO 細胞分裂，所以此四種檳榔塊成分在適當濃度下均可能促使 OSF 形成。2. 四種檳榔塊成分在高濃度會減少 CHO 細胞存活率，此種細胞毒性仍直接使細胞壞死而不是經由細胞凋亡。此種直接造成細胞壞死的作用，在 *in vivo* 可能更進一步的造成發炎反應。3. 比較四種檳榔塊成分誘發遺傳毒性之效能，其由高而低之順序分別為：arecoline 相當於 glycyrrhizin, catechin 次之， CuCl_2 最低。既然此四種成分在低濃度就誘發遺傳毒性所以均可能和口腔癌有關。4. 此外， CuCl_2 可減少 arecoline, catechin 或 glycyrrhizin 之細胞毒性，亦可降低 glycyrrhizin 遺傳毒性，但加強 arecoline 之遺傳毒性，對 catechin 之遺傳毒性則沒影響，所以其細胞-遺傳毒性之交互作用相當複雜，檳榔塊佐料之加入，何者有益或有害？尚需更進一步的釐清。

圖表 (Figures and Tables)

Table 1. Effects of arecoline (Arec), catechin (Cate), glycyrrhizin (Gly) and CuCl₂ on cell viability in CHO cells.

Treatment	Concentration (μ M)		O. D.	% Control
Control	—		1.17 \pm 0.01	100
Adrimycin	0.1		0.91 \pm 0.04 ^a	78
Arecoline	3		0.72 \pm 0.03 ^a	62
Catechin	10		0.78 \pm 0.03 ^a	67
Glycyrrhizin	3		0.75 \pm 0.02 ^a	64
CuCl ₂	300		0.98 \pm 0.02 ^a	84
CuCl ₂ + Arec	300	3	0.79 \pm 0.02 ^b	68
CuCl ₂ + Cate	300	10	0.96 \pm 0.01 ^c	82
CuCl ₂ + Gly	300	3	0.81 \pm 0.01 ^d	69

^a P<0.05 as compared with control (Dunnet's test).

^b P<0.05 as compared with 3 μ M arecoline alone (Student's t-test).

^c P<0.05 as compared with 10 μ M catechin alone (Student's t-test).

^d P<0.05 as compared with 3 μ M glycyrrhizin alone (Student's t-test).

Data are shown as mean \pm S.E.M.

Table 2. Effects of Arecoline, Catechin, Glycyrrhizin and CuCl₂ on micronucleus formation in CHO cells

Treatment	Concentration (μ M)	Number of binucleated cells / 1000 binucleated cells
Control	—	12.3 \pm 1.1
Adriamycin	0.1	42.2 \pm 2.2*
Arecoline	0.03	11.8 \pm 0.8
	0.3	12.8 \pm 1.7
	1	33.6 \pm 2.9*
	3	27.0 \pm 2.6*
	10	14.2 \pm 1.6
Catechin	1	18.2 \pm 1.9
	3	28.6 \pm 2.3*
	10	28.9 \pm 2.8*
Glycyrrhizin	0.1	22.3 \pm 1.0*
	0.3	29.2 \pm 2.1*
	1	35.5 \pm 2.9*
	3	36.6 \pm 5.2*
CuCl ₂	30	17.9 \pm 1.3
	100	34.4 \pm 2.6*
	300	31.4 \pm 2.7*

*P<0.05 as compared with control.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n=4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

Table 3. Mutual interactions between CuCl_2 with other ingredients of betel quid, arecoline (Arec), catechin (Cate), glycyrrhizin (Gly), respectively, in inducing genotoxicity in CHO cells.

Treatment	Concentration (μM)		Number of binucleated cells / 1000 binucleated cells
Control	—		10.5 \pm 1.4
Adriamycin	0.1		29.8 \pm 3.0 ^a
Arec	0.3		12.0 \pm 1.2
Cate	1		13.5 \pm 1.0
Gly	0.1		24.8 \pm 1.9 ^a
CuCl_2	30		15.0 \pm 0.7
CuCl_2 +Arec	30	0.3	21.8 \pm 2.1 ^b
CuCl_2 +Cate	30	1	15.5 \pm 1.2
CuCl_2 +Gly	30	0.1	14.5 \pm 1.8 ^c

^a $P < 0.05$ as compared with control (Dunnet's test).

^b $P < 0.05$ as compared with 3 μM arecoline alone (Student's t-test).

^c $P < 0.05$ as compared with 10 μM glycyrrhizin alone (Student's t-test).

Data are shown as mean \pm S.E.M.

n=4-8 from 2-3 replicate cultures for each treatment group.

Table 4. Changes of cell cycle distribution induced by adriamycin, arecoline, catechin, glycyrrhizin and CuCl₂ in CHO cells.

Treatment	Concentration (μ M)	Cell cycle (%)		
		G ₀ /G ₁ phase	S phase	G ₂ /M phase
Control	—	38.16	44.28	17.57
Adriamycin	0.1	41.7	41.25	17.05
Arecoline	3	40.7	43.45	15.85
Catechin	10	42.95	40.75	16.48
Glycyrrhizin	3	43.24	40.41	16.35
CuCl ₂	300	37.5	45.92	16.59

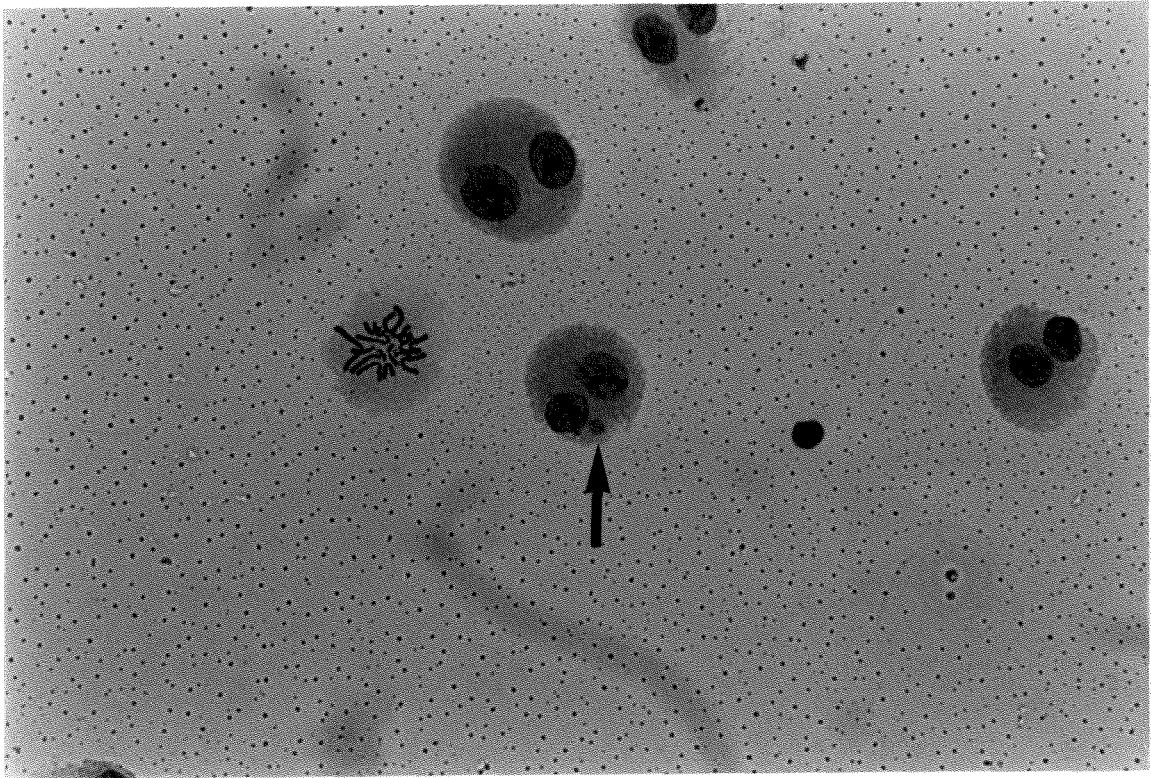


Fig. 1. Cytochalasin B caused binucleated cells, arrow indicated the binucleated cell with one micronucleus (640X).

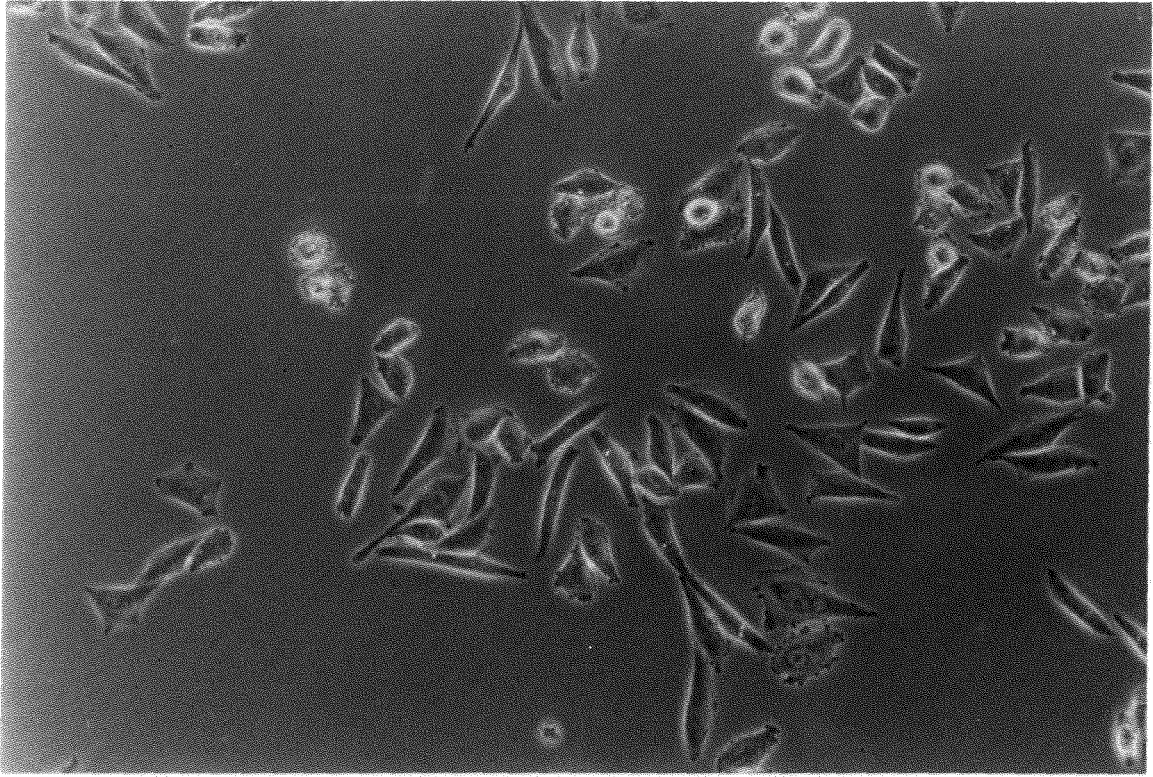


Fig. 2. CHO cell morphology of control group (200X).

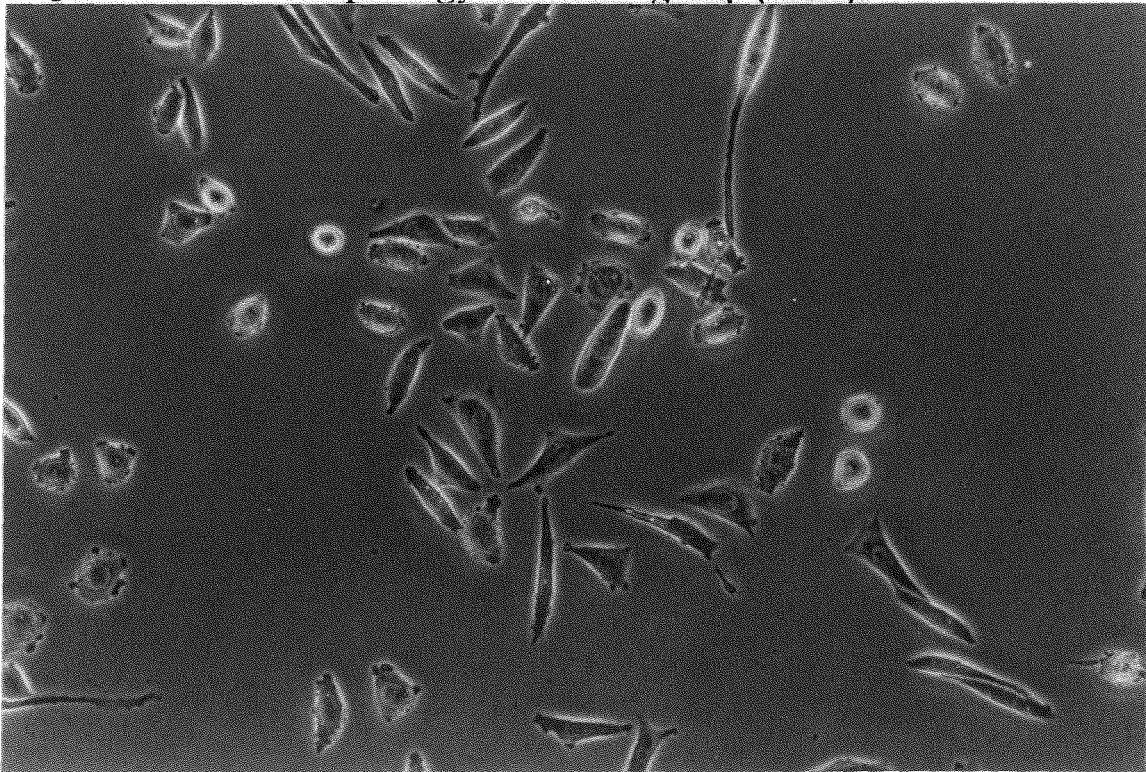


Fig. 3. Effect of 3 μ M arecoline on cell morphology in CHO cells (200X).

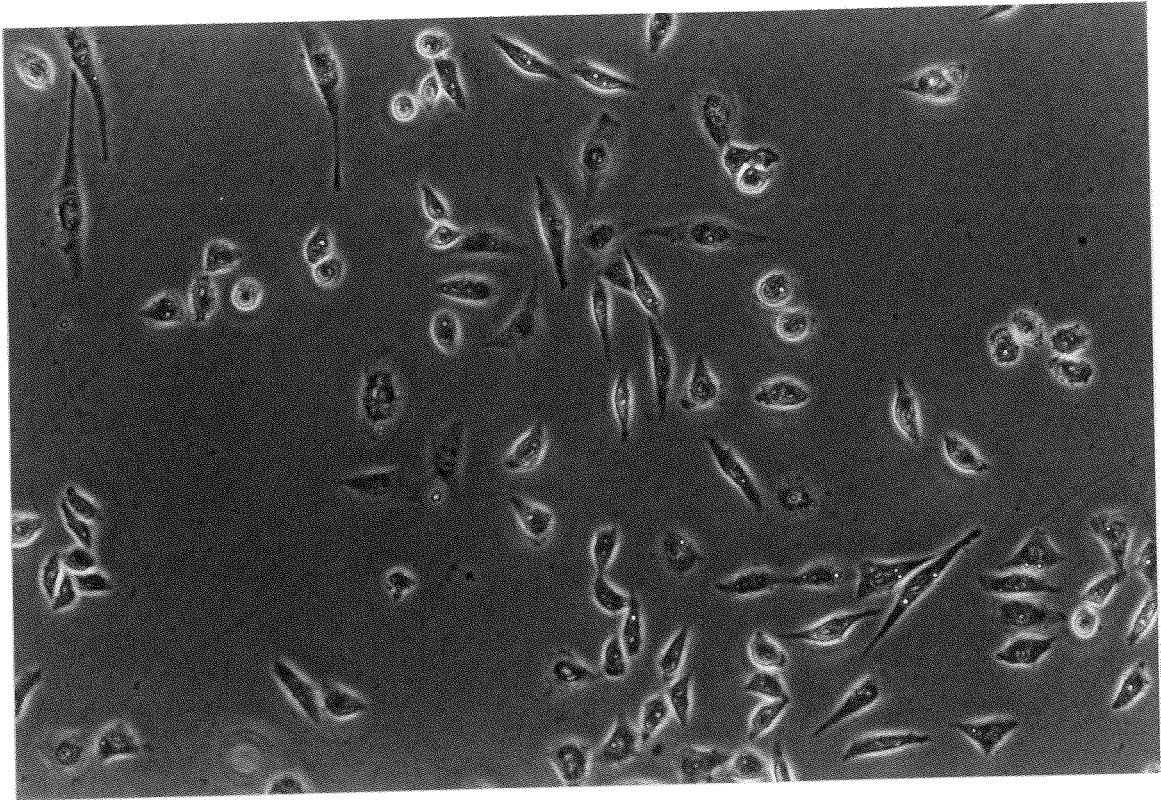


Fig. 4. Effect of 10 μ M catechin on cell morphology in CHO cells (200X).

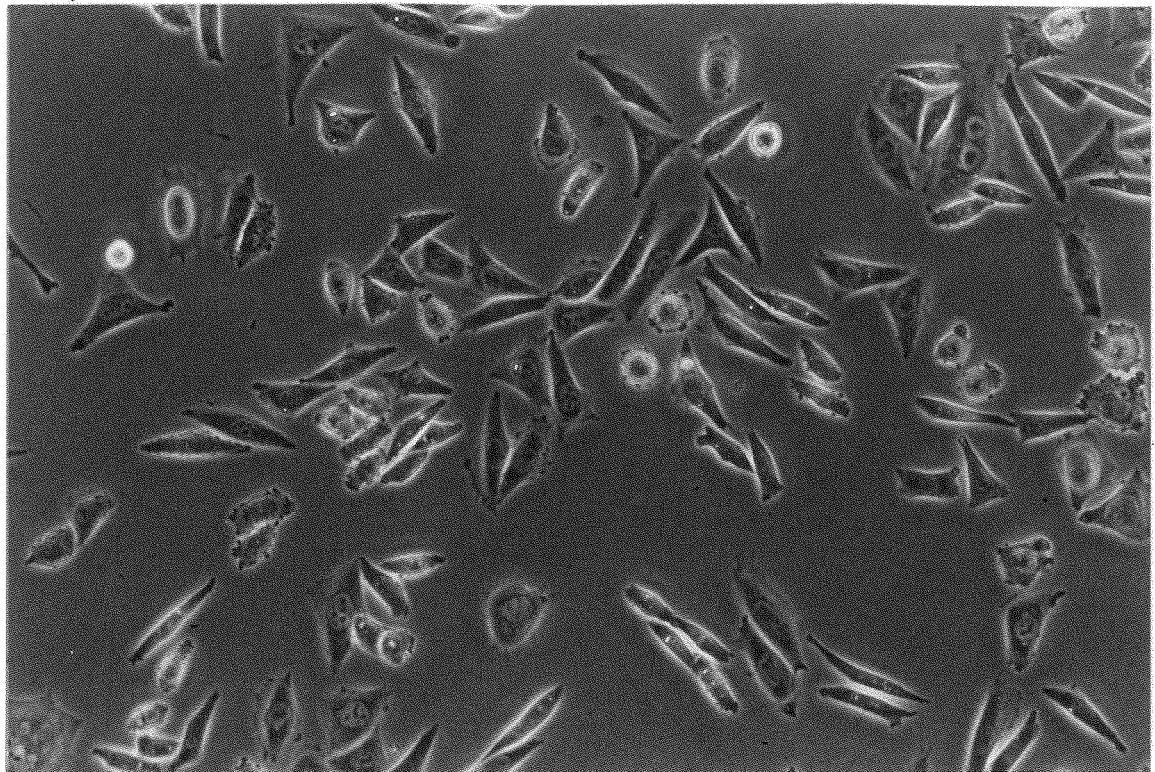


Fig. 5. Effect of 3 μ M glycyrrhizin on cell morphology in CHO cells (200X).

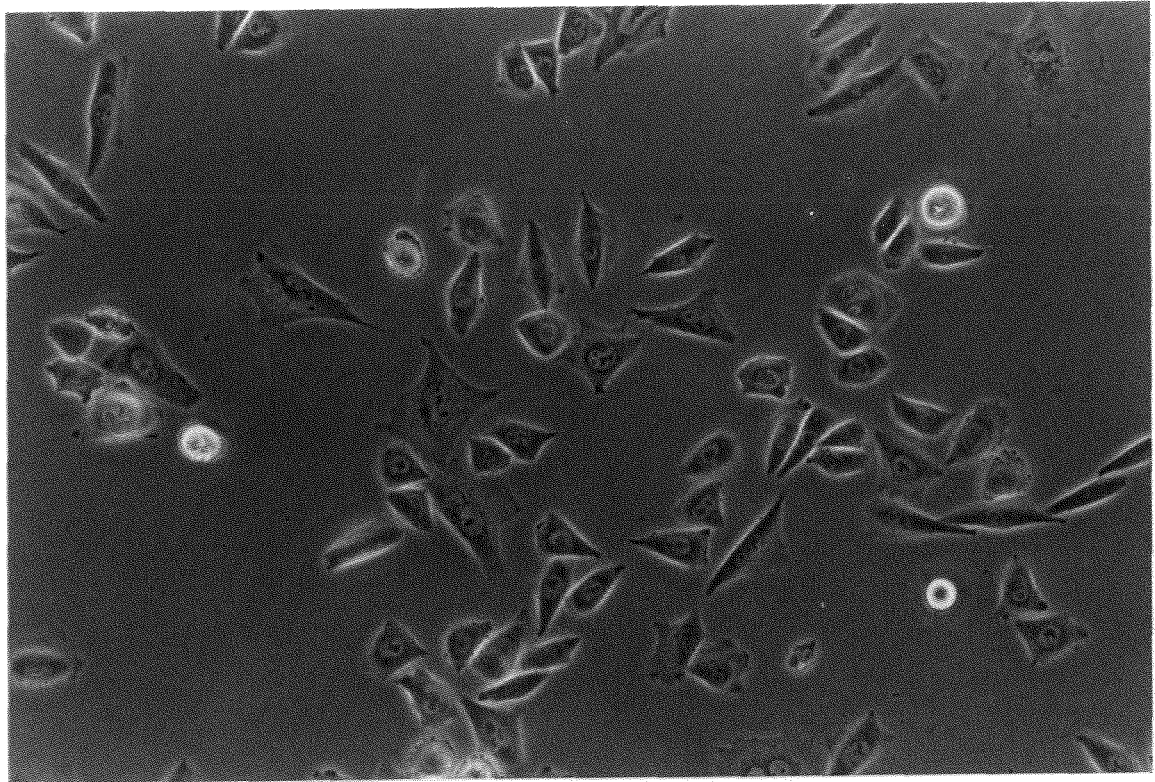


Fig. 6. Effect of 300 μ M CuCl₂ on cell morphology in CHO cells (200X).

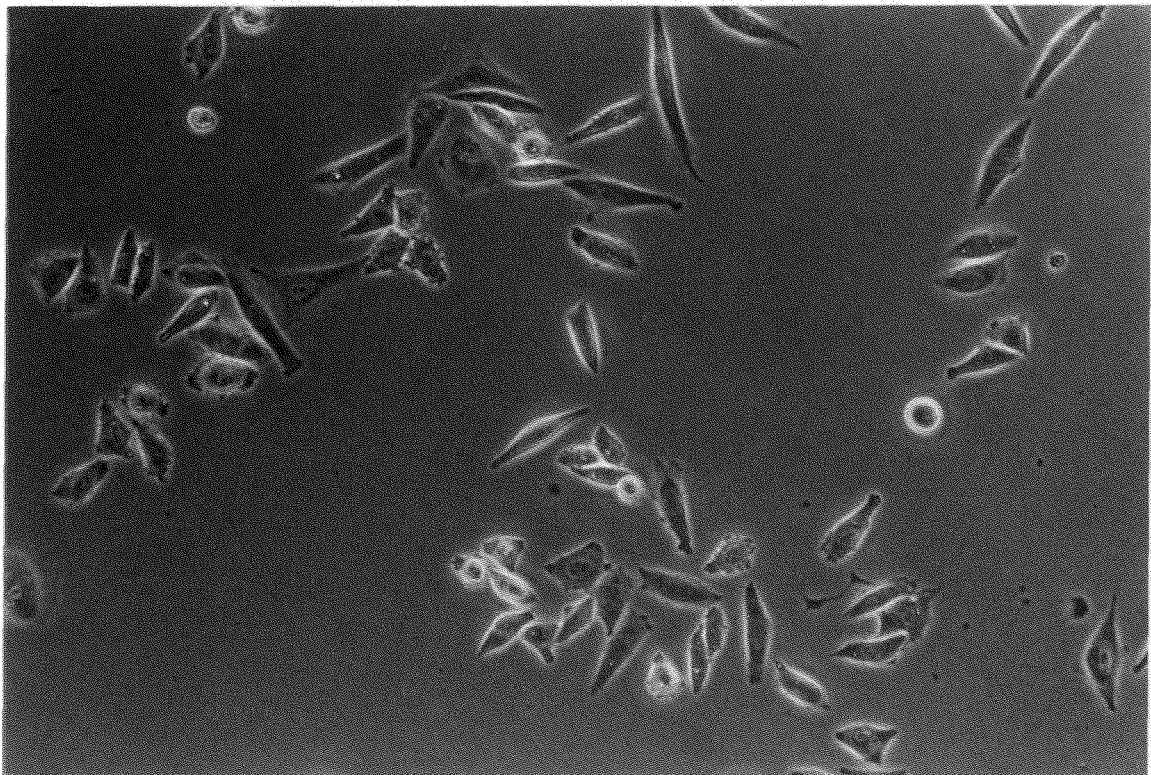


Fig.7. Effect of 0.1 μ M adriamycin on cell morphology in CHO cells (200X).

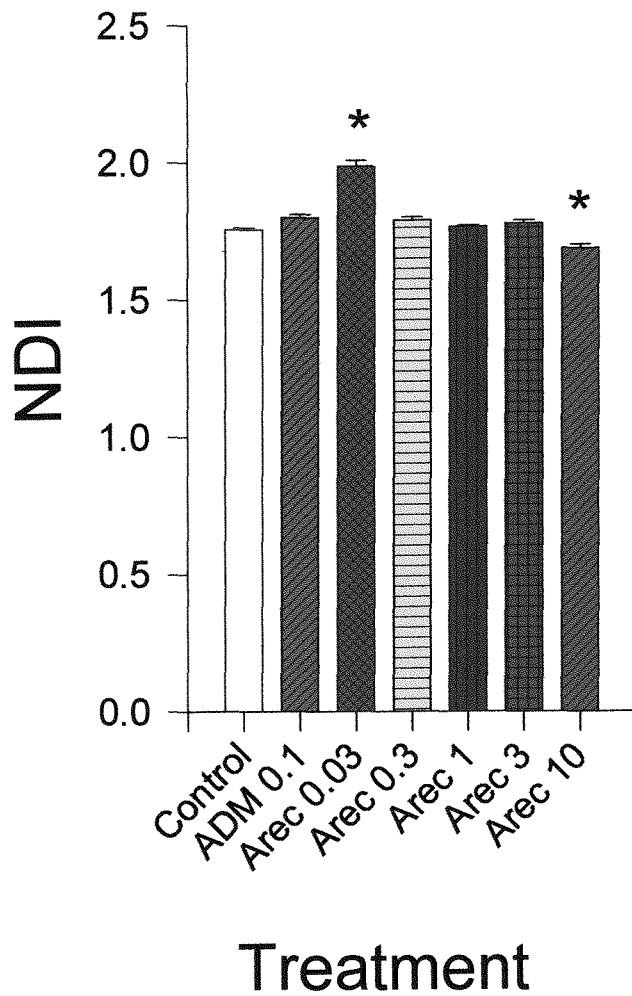


Fig. 8. Effects of 0.03-10 μ M arecoline (Arec) and 0.1 μ M adriamycin (ADM) on nuclear division index (NDI) in Chinese hamster ovary cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

*P<0.05 as compared with control.

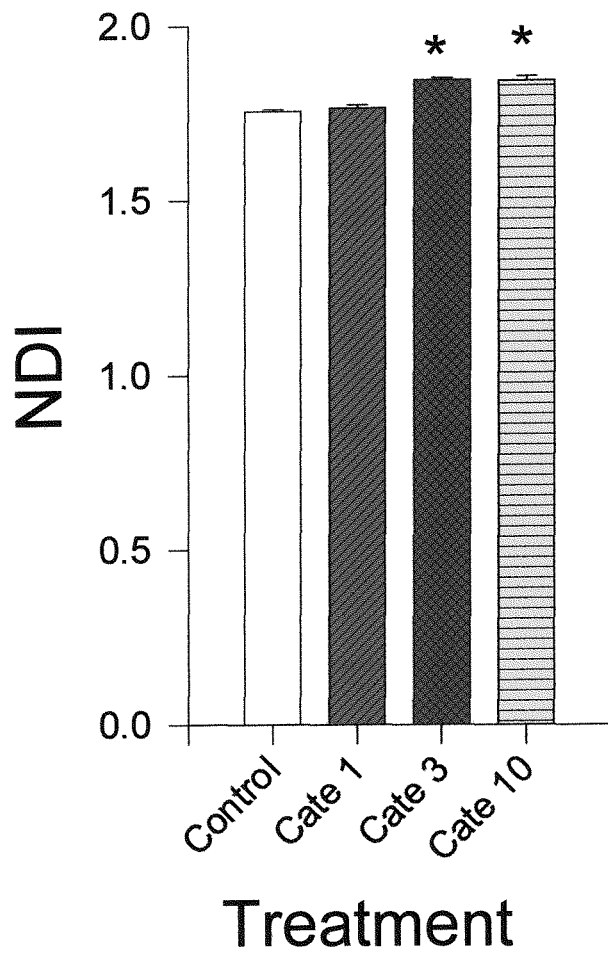


Fig. 9. Effects of 1-10 μ M catechin (Cate) on nuclear division index (NDI) in Chinese hamster ovary cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

* $P < 0.05$ as compared with control.

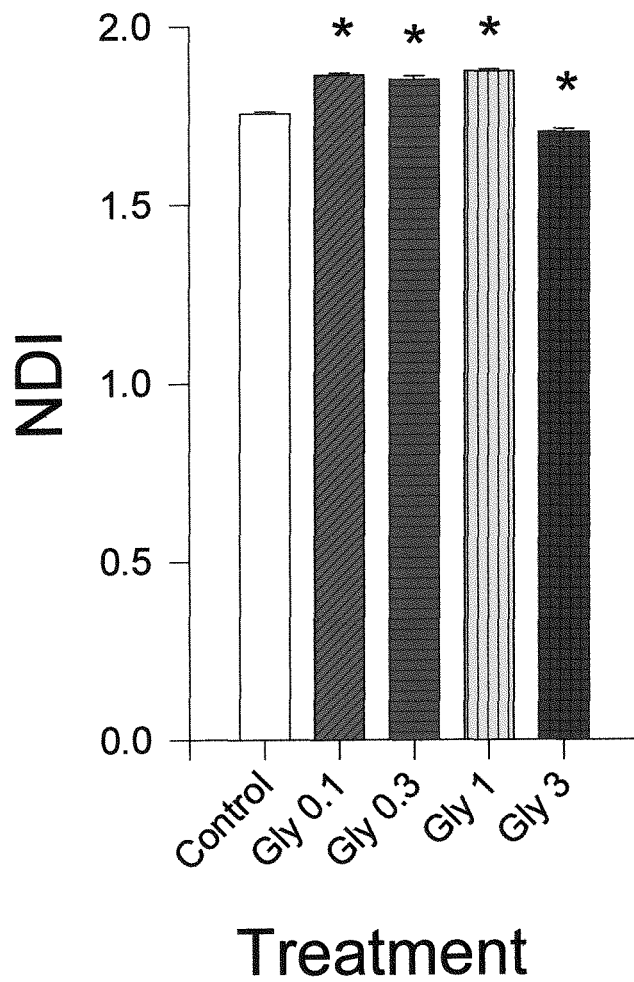


Fig. 10. Effect of 0.1-3 μ M glycyrrhizin (Gly) on nuclear division index (NDI) in Chinese hamster ovary cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

***P<0.05 as compared with control.**

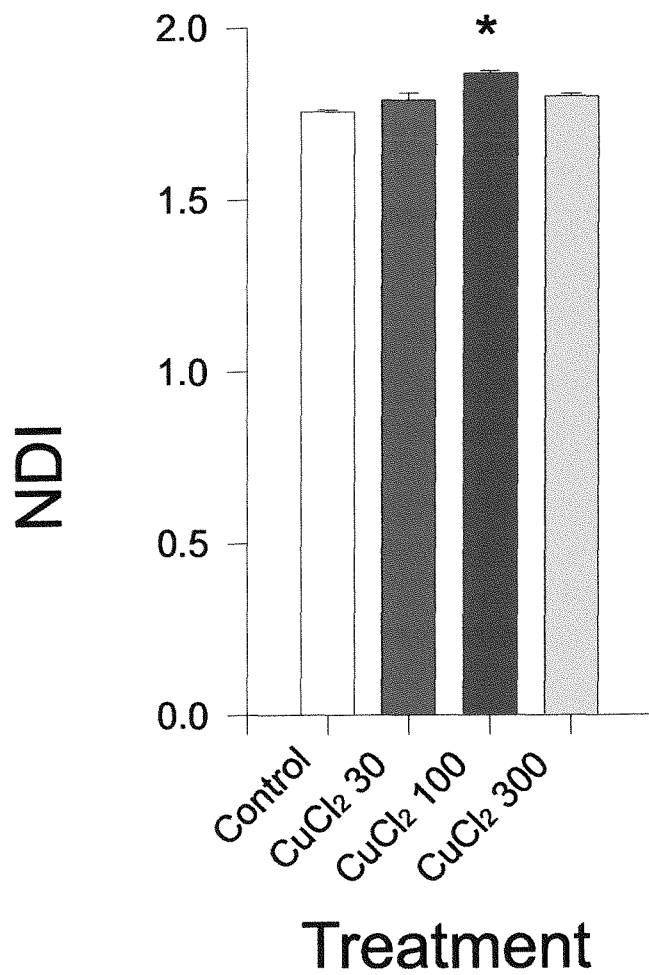


Fig. 11. Effect of 30-300 μM CuCl_2 on nuclear division index (NDI) in Chinese hamster ovary cells.

Data are shown as mean \pm S.E.M.

*** $P < 0.05$ as compared with control.**

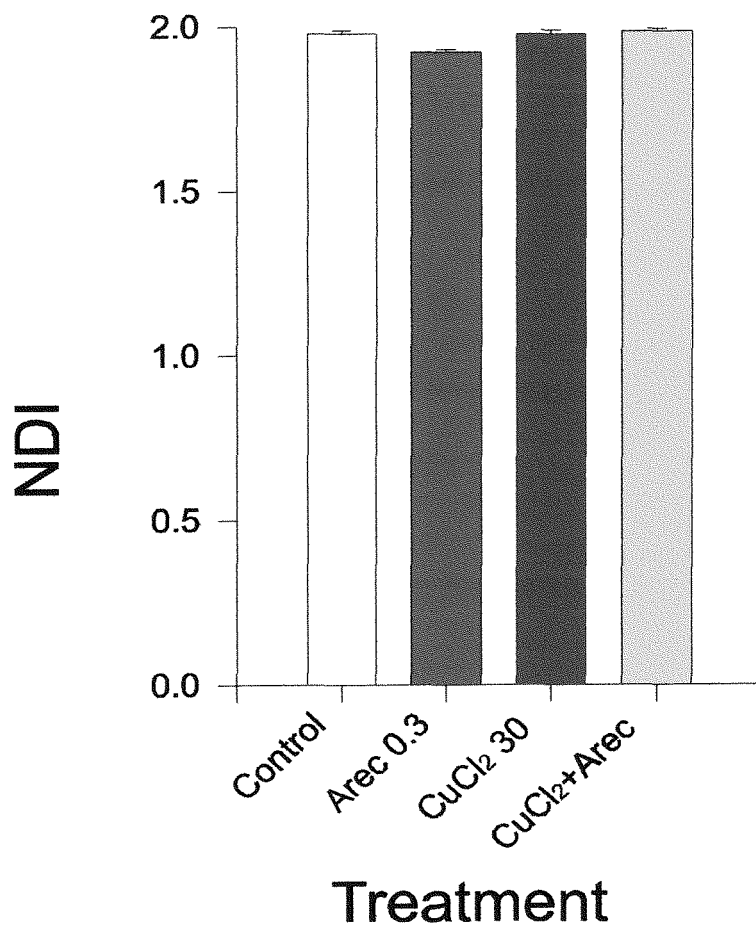


Fig. 12. A interaction of 30 μM copper chloride (CuCl_2) with 0.3 μM arecoline (Arec) on nuclear division index (NDI) in Chinese hamster ovary cells.

Data are show as mean \pm S.E.M.

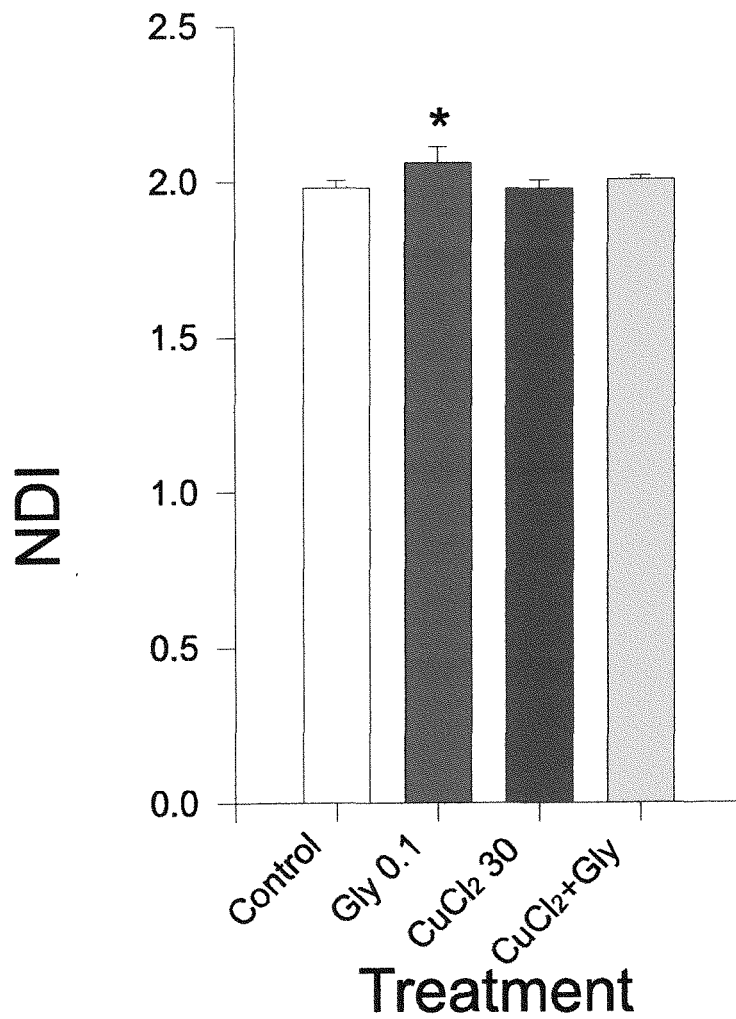
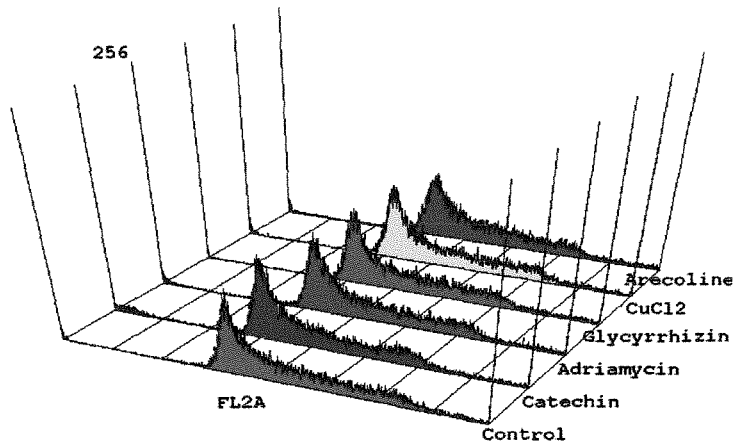


Fig. 13. A interaction of 30 μM copper chloride (CuCl_2) with 0.1 μM glycyrrhizin (Gly) on nuclear division index (NDI) in Chinese hamster ovary cells.

Data are show as mean \pm S.E.M.

A.



B.

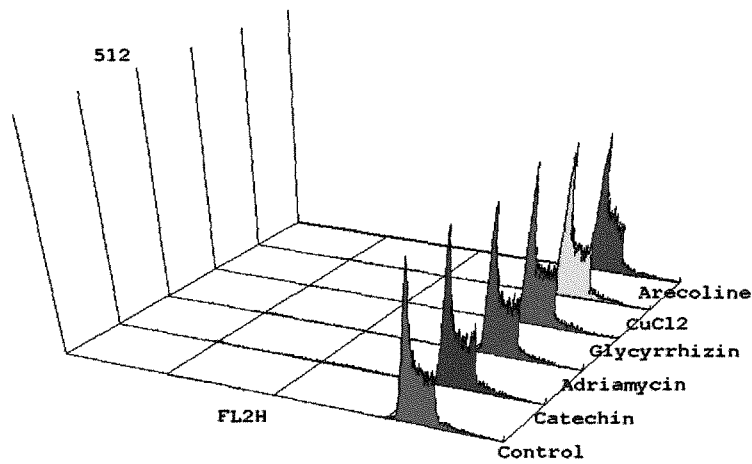


Fig. 14. DNA histograms from CHO cells treated with adriamycin(0.1 μM), arecoline (3 μM), catechin (10 μM), glycyrrhizin (3 μM) and CuCl_2 (300 μM). Panel A. DNA histograms of FL2A for cell cycle analysis. Panel B. DNA histograms of FL2H for hypoploidy analysis. Note, none of these chemicals induced hypoploidy cells. The horizontal axis represented the fluorescent intensity of DNA contents while the vertical axis represented the relative cell numbers. The results are representative of three experiments.

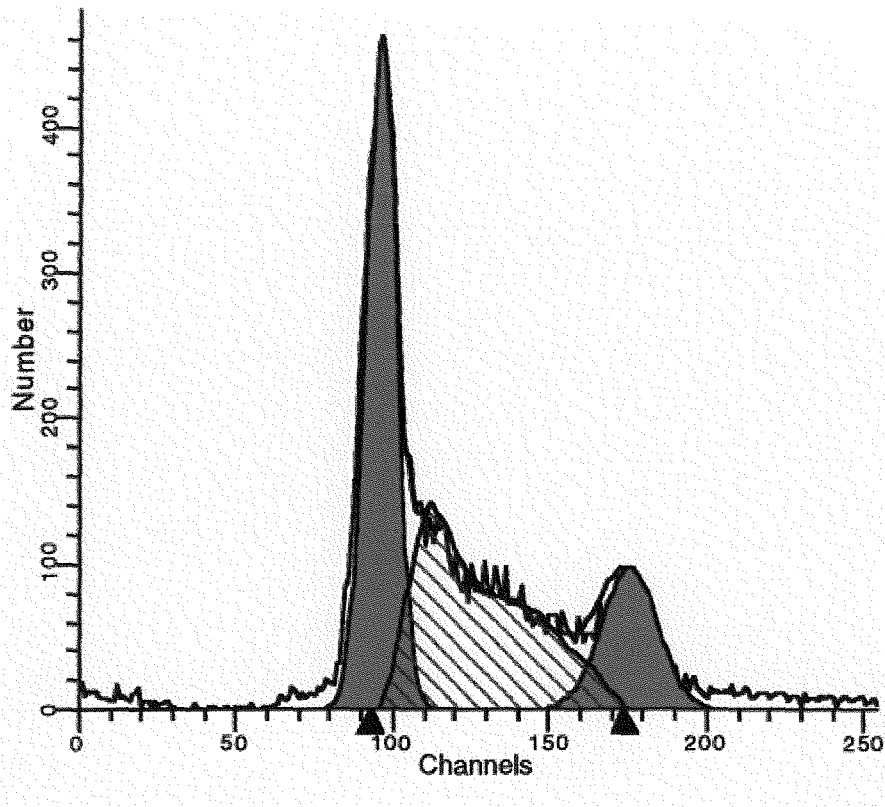


Fig. 15. DNA cell cycle analysis program (ModFitLT) to analyze the percentage of G_0/G_1 phase (first red peak), S phase (downward-hatched peak) and G_2/M phase (second red peak) in each cell cycle.

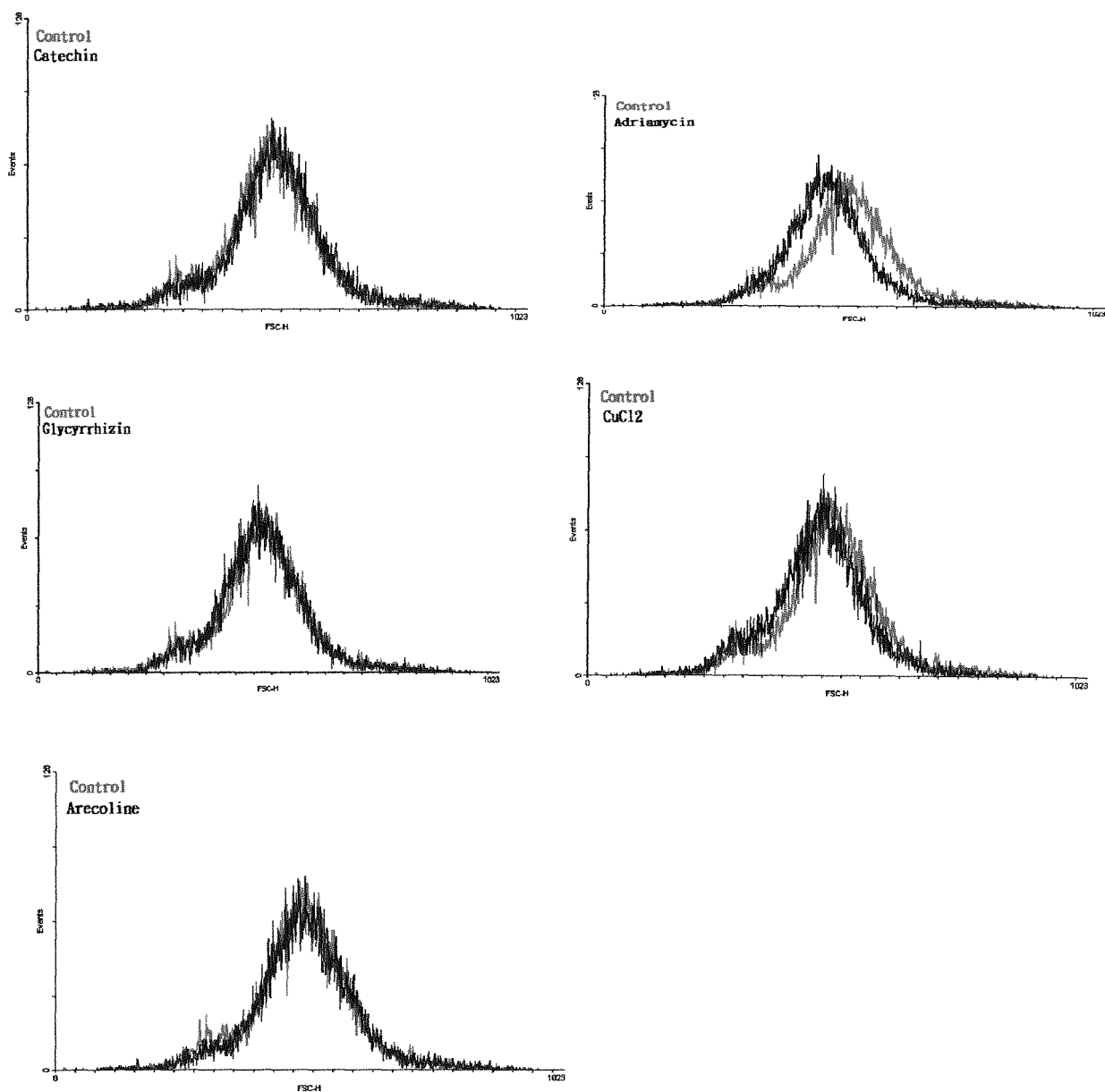


Fig. 16. No change in forward light scatter (FSC-H) properties of CHO cells treated with adriamycin (0.1 μM), arecoline (3 μM), catechin (10 μM), glycyrrhizin (3 μM) and CuCl_2 (300 μM). The results indicate these ingredients of betel quid do not change cell size. The results are representative of three experiments.

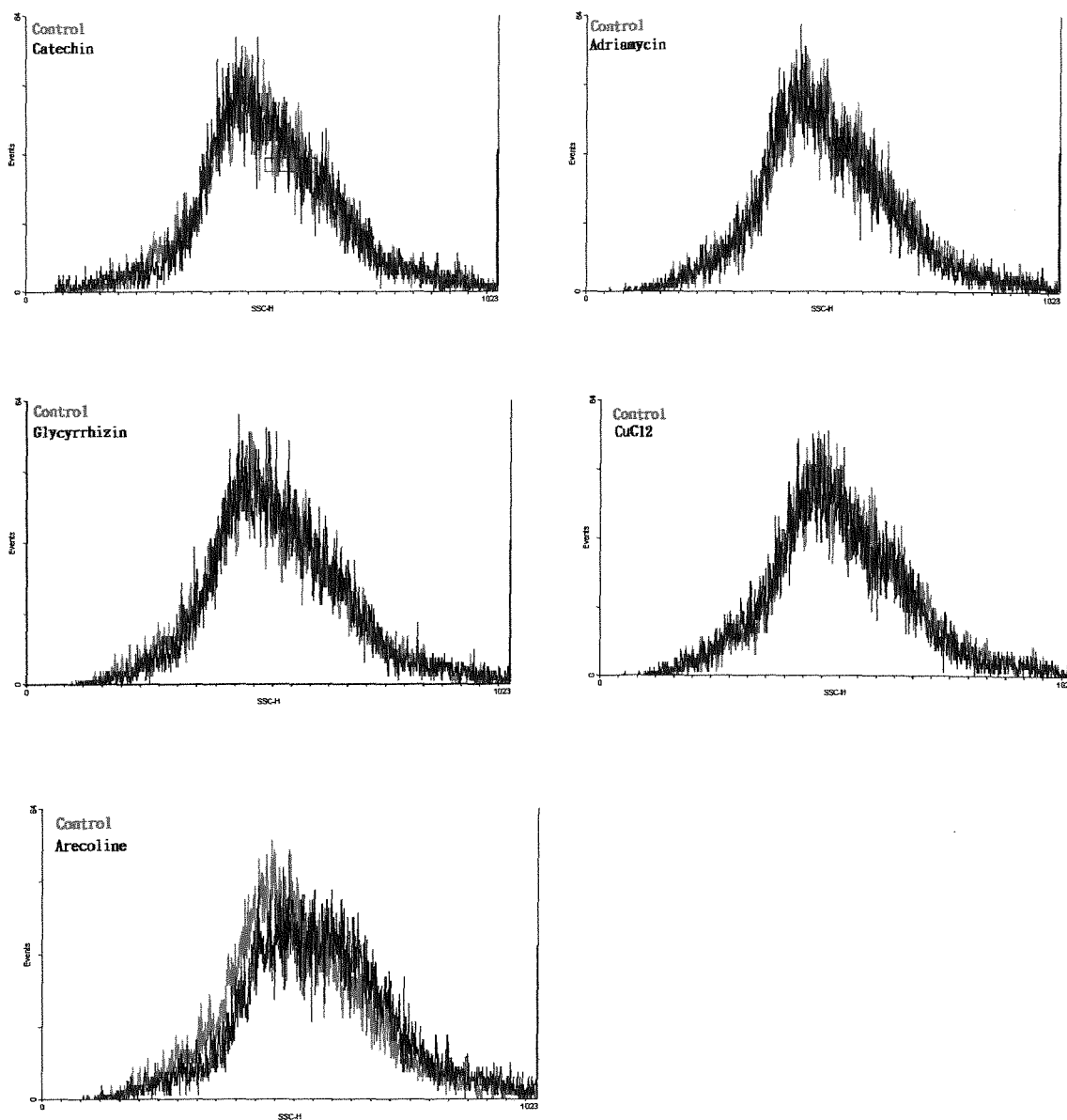


Fig. 17. No changes in side light scatter (SSCH) properties of CHO cells treated with adriamycin (0.1 μM), arecoline (3 μM), catechin (10 μM), glycyrrhizin (3 μM) and CuCl_2 (300 μM). The results indicate these chemicals do not change cell granularity. The results are representative of three experiments.

附錄(Appendix)

細胞-遺傳毒性分析法之簡介

(Glance at the analysis of cytogenotoxicity)

壹、細胞-遺傳毒性檢驗法

(Cytogenotoxic Assays)

要檢驗化學物質是否會誘發哺乳類動物細胞產生遺傳毒性，最常被用到的方法有三種：染色體構造變異分析法(Assay for Structural Chromosome Aberrations; CA) SCEs 和微小核法(Micronucleus Assay, MN)至於偵測細胞毒性最近常用 MTT 法；CA，MN 和 MTT 法其內容將分述如後：

一、染色體構造變異分析法

(Assay for Structural Chromosome Aberrations)

A.細胞週期的影響(The Influence of the Cell Cycle)

能不能正確而有效的利用 Colchicine 或 Colcemid 之類的紡錘體抑制劑來將細胞生長週期留滯在分裂中期(Metaphase)，幾乎可以說是染色體標本玻片製作的成功與否的關鍵。為求染色體分析能在顯微鏡下順利的進行，還有許多特定的步驟須得謹慎的好好處理，例如使用適宜的低張溶液來使細胞膨脹卻又不至於讓細胞脹破、固定液的比例也要適當、噴片的技術更要純熟以免染色體有重疊的情形發生以及選擇濃度適當的染色劑。

細胞週期(cell cycle)對染色體標本分析的影響其重要性可由下列幾點說明：

1. 染色體在 G_1 phase、S phase、 G_2 Phase 時由於其形態是呈鬆散狀 (Decondensed)，所以很難直接觀察得到。而在

前期(Prophase)時由於染色體才剛開始進行濃縮，亦不利於觀察。唯有在中期(Metaphase)時，由於染色體已呈緊縮狀態，兩股分離的狀態已然形成，而且染色後顏色比較深，所以此時最利於觀察與分析，至於到了後期(Anaphase)時成對染色體會互相分離並集中在細胞兩極之處，此時亦不利於觀察。最後到末期(Telophase)時，染色體已開始不以緊縮狀態出現，此時就更難使用光學顯微鏡區分出各個個別的染色體了。

2. 由於中期(Metaphase)在整個細胞週期(Cell cycle)中所佔的時間實在不多，所以需得在細胞培養過程中加入適量的 Colcemid 或 Colcichine，再經過幾個小時的培養後即可中止紡錘絲(Mitotic spindle)的作用，如此一來已進入中期(Metaphase)的細胞便會被迫停留在此階段。
3. 如果所使用的細胞已經離開了細胞週期而進入了 G_0 phase，則可加入 Mitogen (Mitosis Stimulating Agent)則可使 G_0 cell 從 G_0 phase 中再回到正常的細胞週期。當所使用的細胞是這屬於 G_0 cell 時，可以在培養開始細胞分裂後加入試藥。不過這些有毒性的試藥有時亦會干擾 Mitogen 的作用，使經 G_0 cell 無法順利返回細胞週期，所以最好是在細胞分裂後才加入試藥。
4. 許多會破壞染色體的化學物質，需得經歷細胞的 S phase，也就是參與了細胞 DNA 複製的過程才會造成染色體異變，這類的化學物就被稱為是 S-dependent。當然也有少數的化學物質是 S-independent，這類的化學物質可在細胞的 G_2 Phase 時加入，然後在接下來的分列中期產生染色體變異。因此在加入藥物之後，通常得再經過一個完整的細胞週期(Cell Cycle)後才可以採收這些細胞。
5. 在正常的情況下，進行一次細胞週期(Cell Cycle)所需的時間幾乎是不會有太大的變動。可是若有藥物的作用，那整個細胞週期(Cell Cycle)的規律性就會有所變化，比如說 G_1 Phase 可以會延長或者細胞會暫時進入 G_0 Phase 中，因此整個細胞週期的時程就會被延誤。細胞若有產生明顯的染色體變異那在經過幾次的細胞週期(cell cycle)後可能就會造成細胞死亡，

因此想要觀察染色體變異就必須要在使得細胞週期延長，所以若照正常的時間來採收的標本有可能會發生所採收的標本根本就無法拿來做為觀察染色體之異常型態之用，因此在實驗的過程中需反覆的監看細胞週期的實際變化情形再決定出最好的採收樣本的時間。

B、染色體變異之分類

(Classification of Chromosome Aberrations)

一般來說，所謂的染色體變異所指的通常是在顯微鏡下就可觀察到的染色體構造的異常現象。造成染色體變異的因素有可能是因為單一染色分體中的染色物質某部份遺漏或完全斷裂而形成的。這些被遺漏或斷裂的部份在分裂中期時往往會以斷片(Fragments)的型態存在，並可能會在細胞分裂之後以小顆粒的形狀出現在細胞中，這些小顆粒就稱之為微小核(Micronucleus)。斷裂的染色分體也有可能發生重組進而形式單純的或更加複雜的結構變化，不過大部分的染色體變異結果往往都會因重要的基因訊號遺失或者是不法繼續進行正常的有絲分裂而造成細胞的死亡。只有幸運的少數細胞因只是簡單的染色體移位或者是小部份遺失(Small Deletion)因此可以正常分裂而存活下來。正由於大多數發生染色體變異的細胞在分裂之後無法存活，所以在加藥後滿一個細胞週期的時候是採收染色體標本的最佳時機，過早或者是太慢採收細胞往往會影響到染色體變異頻率估計的準確度。至於未同步化的細胞(Asynchronous Cells)，其理想的標本採收期是以加藥之後一個半週期時最為適當。但是如果藥品造成了細胞週期延長，那可能就得要等二個或二個以上的週期後再來採收會比較適當。

染色體變異的分類(Venitt and Parry, 1984)

I、染色體型(Chromosome Type)：

染色體之二條染色分體發生變異的地方是在同一處，包括了下列幾型：

1. 間隙(Gap or Achromatic Lesion ; g)

間隙(非染色區)的直徑比染色分體的直徑小。

2. 染色體斷裂 (Chromosome Break or Terminal Deletion ; c)

染色體發生斷裂的情況同常是在非複製期的 G_1 phase 或 G_0 phase 時就發生，不過得在被複製後分裂中期才容易被觀察到。至於斷裂之殘片則無法被觀察到。

3. 交換(Exchange)

a. 二個染色體間交換 (Interchange Between Chromosomes ; C/C)

在 G_1 phase 時形成，常常會形成雙中節的染色體。

b. 同一個染色體內部互換 (Interchange within A Chromosome ; C/C)

這種類型的交換往往會使染色體產生環狀變異(Ring)。

II、染色分體型(Chromatid-type)

這類型的變異除了孤立染色分體斷裂外 (Isochromatid Breaks) 外，通常只是單一條染色分體變異，包括了下列幾型：

1. 間隙(Gap ; g)

非染色區の間隙部位的直徑比染色分體的直徑還要小。

2. 染色分體斷裂(Chromatid Break ; C)

非染色區的直徑比染色分體的直徑來的大

3. 孤立染色分體斷裂(Isochrmatid Break ; Su)

4. 交換(Exchange)

成因乃是因為染色分體斷裂之後，又重新組合而來，所以其構造就較不單純。可細分為三種：

a. 二個染色體間交換，有對稱與非對稱兩種結果。

b. 同一染色體間交換 (Interchange Within A Chromosome ; C/C)，有單臂及雙臂之分。

c. 孤立染色體/染色分體間交換 (Isochromatid/Chromatid Interchange ; i/c)

二、微小核法(Micronucleus Assay)

微小核(MNs)的成因是由於染色體中某些部份在分裂後期時，因延遲無法在紡錘體上就定位，導致細胞分裂完成後被包含入子細胞的主核之內，結果這些染色體碎片就集結成團而形成微小核(MNs)。因此微小核指出現其中一個子細胞中，並以一個或多個小核的型態分散在細胞質中。因此，微小核(MNs)的主要成分就是一些不含中心節(Acentric)的染色體碎片(Heddle and Carrano, 1977)。如果細胞在分裂期的時候紡垂絲因某些原因失去了作用，那往往會使得整條染色體發生延遲得現象(Lagging Chromosomes)而產生較大的 MN。因此若使用有毒藥物來破壞或干擾細胞內紡錘體的功能，往往就可以產生這種大型的 MNs (Yamamoto and Kikuchi, 1980 ; Lynch et al., 1993)。只要細胞在進行分裂，就有可能會有 MNs 的產生，因此利用 MNs 的方法可以研究許多細胞的遺傳毒性。在 1976 年，Schmid 就大量的利用骨髓中的嗜多色紅血球(Polychromatic Erthrocytes)來探討微小核(MNs)的特性，此外 Heddle et al., (1983)在詳細的研究與分析之後，亦附合了 MNs 法可以廣泛的用來探討遺傳毒性的這個論點，且隨著科技的進展與技術的突破，MNs 法的應用領域也就更為廣泛，如用來偵測老鼠其他體細胞的細胞遺傳毒性(Tates et al., 1980 ; Shindo et al., 1983 ; Adler, 1993 ; Marrazzini et al., 1994)。現在更進展到可以使用 Cytochalasin B 來抑制細胞由 M-phase 進入 G₁ phase 而造成雙核細胞(Fenech and Morley ; 1985)，微小核法的準確性與實用性做更進一步的的進展。

1.判斷和計數 MN 的準則：(Heddle, 1973 ; Countryman and Heddle, 1976 ; Roberts et al., 1986)

- (1).MN 的直徑必須小於主核的三分之一
- (2).MN 在顯微鏡下不可呈反射現象
- (3).MN 的顏色與主核的顏色類似或更鮮明
- (4).MN 必須包含在細胞質內，但不可與主核連結在一起
- (5).雙核細胞的兩個主核必須明顯的分離，如果有重疊則不可拿來計數
- (6).雙核細胞不管含有多少個 MN，都以一個 MN 來計數

2.核分裂的指數(Nuclear division index, NDI)

細胞經化學處理後，除偵測 MN 外，並可藉由 MN 法計數單核細胞數，雙核細胞數及多核細胞出現的頻率，可得知化學物質對細胞分裂的影響。細胞標本在加入 Cyt-B 一定時間後，計算單核、雙核和多核細胞出現之頻率，然後按 Eastmond and Tucker (1989) 所建議之公式便可算出 NDI。

$$\text{NDI} = (\text{MI} + 2\text{MII} + 3\text{MIII} + 4\text{MIV}) \div \text{N}$$

MI - IV 表示一核到四核細胞數，

N 則表示所觀測之所有細胞數。

三、MTT (Microculture Tetrazolium Assays) 技術之

探討

用簡便的方法測定的細胞存活數量是尚有許多難題尚未解決。這些問題同時來自於實際與理論上的考量。舉例來說，有些簡單而直接的技术諸如：用 haemocytometer chambers 或用 electronic particle counters 來直接計算細胞，這種方法較不適合用於大量檢體。此外，可能無法辨別細胞的死活。事實上，最近的一些論文引發了吾人對 viability 的定義產生了質疑。就如費時費力的 colonogenic assays，此種分析方法能反映出細胞分裂能力的比率，但以某些角度來說則對存活率之定義過於苛求。

最近，利用還原 tetrazolium salts 來測細胞的分裂增殖的 colorimetric methods 已經以數種商業 kits 的型式被推廣，這些方法依賴一個概念，這概念是 tetrazolium salts 被有代謝活性的細胞還原成 formazans。由於 formazans 呈色相當濃，這些鹽類就有作為 colorimetric reagents 的潛力，用來定量有代謝活力的細胞的數目。這些方法簡示如 Fig. A (Marshall, 1995)^{lxvi}。

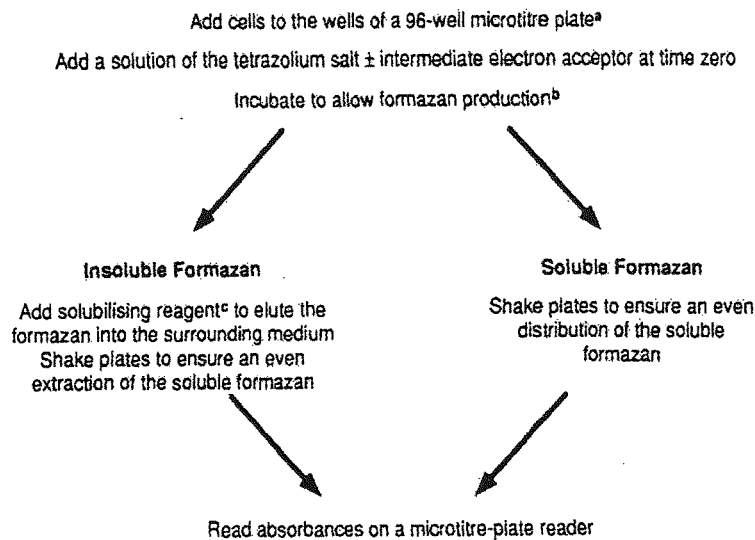


Fig. A—A flow diagram of a typical MTA.

^a When responses to treatment of the cells with potential stimulators or cytotoxic agents are to be investigated, the cells are preincubated in the wells with the agent, prior to addition of the tetrazolium salt.

^b Incubation times vary from 30 min to overnight.

^c Most tetrazolium salts form insoluble formazans which may crystallize after long incubation periods. A range of solubilizing reagents have been used for the additional step required to elute the formazan.

概括的說，將 tetrazolium salt 加入養在 96-well microtitre plate 的細胞中再把所產生的 formazan 以 microtitre plate reader 測量。這個系統，提供一個高效能的方法並可取代 ^3H -thymidine 回收法。

Formazan 的形成

a. Tetrazolium salts

自從第一個 tetrazolium salt 也就是 triphenyl tetrazolium chloride (Peckman et al., 1894) 被合成之後，如 Fig. B (Marshall, 1995) 所示其 R' ， R'' 及 R''' 可被取代而被陸續合成很多類似物 (Altman, 1976; Nineham, 1955)。他們都是 tetrazoles 的四級衍生物，但是到目前為止只有 monotetrazoliums 被拿來使用在 MTT。Tetrazolium salts 可以很容易被還原，其 heterocyclic tetrazolium ring 很容易被打開，所形成的產物就是 formazan (Fig. B)。

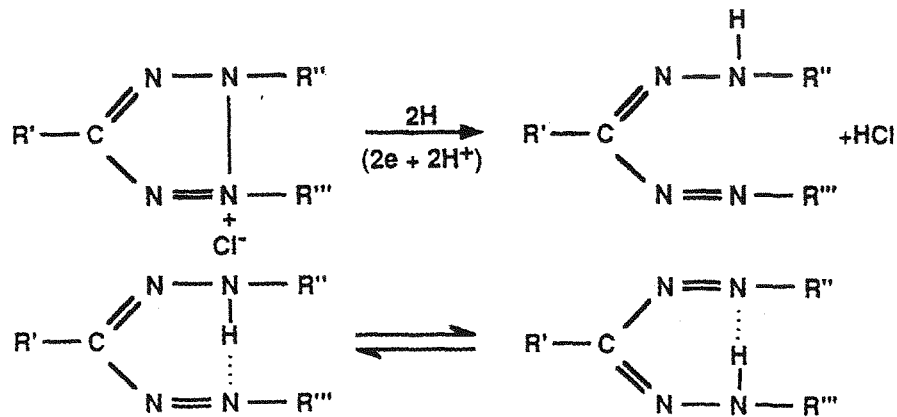


Fig. B—The basic structure of a tetrazolium salt and its reduction to its coloured formazan. Note that the name tetrazolium is based upon the presence of 4 N atoms in the 5-membered ring system, one of which is positively charged (quaternary). R', R'' and R''' are substituents which vary greatly from one tetrazolium salt to another. For a detailed discussion of variants of these salts and their chemical nomenclature see Altman.⁸ For biological applications, the anions of the cationic salts shown in this figure are often chloride or bromide.

Upon reduction, the tetrazolium ring is opened and the quaternary amine is converted to a tertiary amine. A second tertiary amine which formed one of the bonds to the quaternary amine, becomes bonded to a hydrogen atom. Hunter & Roberts^{10,11} showed that formazans existed as internally coordinated hydrogen bonded structures with two resonance hybrids, with quasiaromatic 6-membered rings. The position of the tautomeric equilibrium is influenced by the electrophilicity of R'' and R'''. This is reviewed in Seidler.¹²

目前常用的 Tetrazolium salts 算是穩定性很好，是水溶性且顏色呈現白到黃的變化，這些化合物最重要的特性就是經過溫和的還原反應後所產生的 formazan 顏色很深，可以 DMSO 等溶媒溶出，再以 ELISA reader 測 O. D.。

b. Tetrazolium salts 的還原

Formazan 是由 tetrazolium salts 溫和還原反應而來 (Fig. B)，強烈的還原反應會導致 formazan 結構的崩解 (Altman, 1976)。雖然如 Fig. B 所顯示，還原反應常常被描述為是加氫反應，但其實它的真正原理是增加電子，至於同時質子的轉移只是附帶的反應。還原反應能被還原劑如 sodium dithionite 或 ascorbic acid 和細胞內部電子提供系統所引發。而 tetrazolium salts 常被視為人造的電子接受者。在活細胞內的 MTT 的還原被視為化學動力學的一級反應，而且也符合 Michaelis Kinetics (Gerlier et al., 1986)。經常地，當我們討論細胞內的 tetrazolium salts 的還原反應時，在只有很少或沒有證據情況下，過分的強調粒腺體去氫酶所扮演的角色 (Chen et al., 1990; Cory et al., 1991; Gerlier, 1986; Hussain et al., 1993; Shi et al., 1993; Berg et al., 1990; Monner, 1988; Jost et al., 1992)；尤其 succinic dehydrogenase 以及粒腺體內呼吸鏈中接在 ubiquinone [CoQ, Fig. C (Marshall, 1995)] 後之電子攜帶者的角色。然而，當詳細考量到 MTT 的還原生化反應時，明顯地還有其他細胞內的系統會供應電子給 tetrazolium salts。

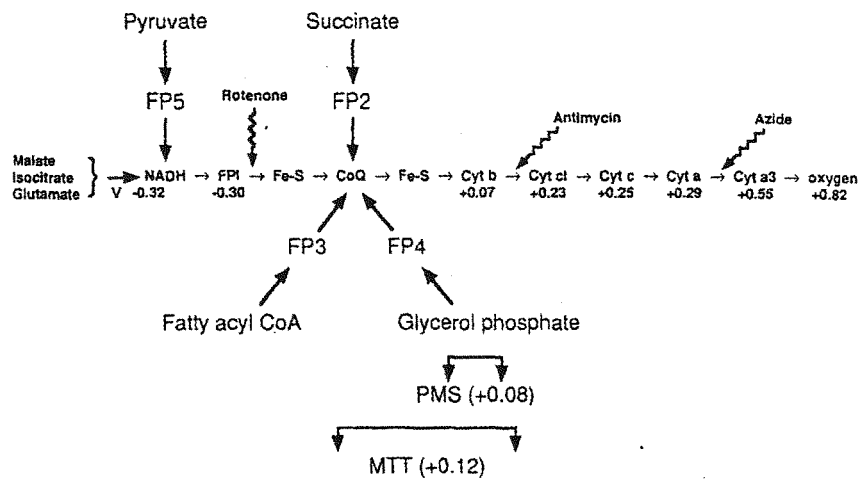


Fig.C—Mitochondrial respiratory chain showing (→) entry points of electrons from different dehydrogenase substrates, (⊥) points of action of commonly used inhibitors, and approximate regions over which MTT or PMS may divert the electron flow. Standard redox potentials (V) at selected points in the pathway are also indicated. The lowest (-0.32 V) is that of the strong electron donor NADH and the highest ($+0.82$) is that for oxygen, the strongest electron acceptor. Note that there are large discrepancies in the redox potentials quoted for a particular compound in the literature²⁸ and that these values are obtained for standard conditions which may be different from those encountered locally within the cell. FP: flavoprotein.

在細胞中很多種的去氫酶會產生 NADH 因此能夠透過 NADH 去氫酶的作用將電子導入呼吸鏈中(Fig. C)。Succinate 去氫酶可能是促使電子進入呼吸鏈的路徑中最被詳細研究(Altman, 1976)；因為此酶緊密結合在粒線體的內膜。早期對於 liver homogenates (Slater, 1963)的研究，指出此系統能產生電子而造成 MTT 還原成 formazan。接下來，其他學者利用此代謝途徑去設計比色法的化學敏感性測試，並且也發展出稱為 succinate dehydrogenase inhibition (SDI) test (Kondo et al.,1966 ; Anai et al.,1987 ; Maehara et al.,1988 ; Nakashima et al.,1989 ; Yamaue et al.,1991)。然而，有些研究(Yamashoji et al., 1992 ; Denizot et al.,1986 ; Colangelo et al.,1992)似乎過分強調此代謝途徑為 formazan 產物電子的來源。其實 NADH 及 NADPH 二者均能促使 formazan 的形成，而特異的非粒線體去氫酶亦參與反應(Pearse, 1972)。此外，培養細胞環境的改變如葡萄糖和培養液 pH 值的改變均會影響 formazan 的形成而造成誤差，所以利用 MTT 法測細胞存活率需避免此些誤差出現。

貳、細胞凋亡(Apoptosis)

細胞死亡的方式有兩種：一種稱為細胞壞死(Necrosis)；另一種稱為細胞程式性凋亡(Apoptosis)。經由細胞壞死方式，細胞會先腫脹(Swelling)。細胞死亡後會破碎成小碎片(Debris)，細胞內的溶解性酵素會被釋出，一些有毒物質亦隨之被釋放出來，常引起發炎反應，而造成附近的細胞或組織傷害(Wyllie et al.,1980)；而細胞凋亡則不會導致上述反應。細胞凋亡(Apoptosis)是有機體正常調節的機制之一，它是一種主動的生理過程，細胞會按照自身的設定的程序進行，直到凋亡細胞被鄰近或巨嗜細胞所吞噬，其目的在維持機體或組織的恆定，多數真核細胞在不被機體需要、或受到嚴重傷害、或環境中因子刺激時，皆可能進行細胞凋亡。

一、細胞凋亡之原因(The cause of apoptosis)

細胞凋亡在正常的生理活動中扮演重要的角色，如：成熟組織的萎縮而使細胞喪失，各種老化細胞的移除(Savill et al.,1989)等。進行細胞凋亡時最特別的型態特徵是細胞核染色質的凝集，染色質會發生濃縮聚集的情形(Kerr et al.,1972)，並呈新月狀靠在核膜邊(Wyllie et al.,1980)，然後細胞變小皺縮(Shrinkage)，細胞膜有發泡現象，染色體受 endonuclease 作用而斷裂，從細胞膜分離出的小泡，內含片段的染色體，而形成凋亡小體(Apoptotic bodies)。若是在生物體內，則凋亡小體將會被巨噬細胞或鄰近細胞吞食。能引發細胞凋亡的原因有很多，包括：輻射線暴露、藥物作用，或是由細胞膜上的受體接受到訊息而誘發，細胞凋亡主要就是反應在這些逆境壓力所引起的細胞傷害而減少對生物體損害的方式。對細胞的傷害又可分為幾種(Wyllie,1997)：

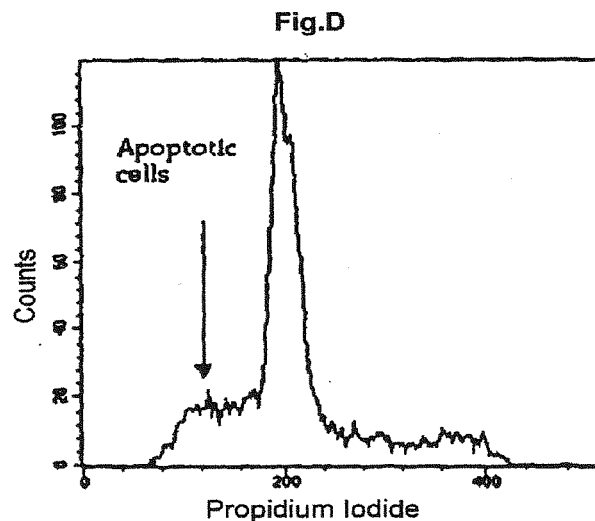
1. DNA 傷害：細胞凋亡因 DNA 傷害引起是相當快速的，當 DNA 產生傷害，會啟動 p53 的活化，而引起細胞週期的停滯，以避免不正常的 DNA 被複製，但過度的 DNA 傷害則使 p53 啟動細胞凋亡的發生。
2. 細胞膜傷害：細胞膜的傷害會引起第二信使 Ceramide 的傳遞，Ceramide 可能經過 MAPK 或 JNK 的途徑傳遞訊息而引起細胞凋亡(Dermon et al.,1995；Hengartner et al.,1994)。

3. 粒線體傷害：粒線體的傷害會引起粒線體膜的去極化，由於膜上有許多和細胞凋亡有關的蛋白質，如 Bcl-2、Bax，且膜的傷害也會導致一些原細胞凋亡因子(Pro-apoptotic factor)，如 ced4 的釋出，所以可能經過訊息傳遞後，活化 Caspase 而引起細胞凋亡。除此之外 T 細胞活化 Fas，或病毒的侵入皆可引起細胞凋亡的發生。

二、凋亡細胞的計數法(Enumeration of Apoptotic Cells)

在此介紹三種研究方法，至於研究方法的選擇，則一般視研究目的、研究細胞種類與實驗成本預算而定。其實。無論使用哪一種研究方法，研究者往往仍必須提出形態學或分子生物學(DNA Ladder)的證據，來證實凋亡程序確實發生在所研究的細胞中。

如果研究目的只在乎凋亡細胞的計數，例如篩檢藥劑對細胞生理的影響，可考慮用一簡便、快速且省錢的方法。酒精固定法是一般頗受國內學者歡迎的方法，因它適用於大多數的細胞株，而且所使用的試劑皆是一般實驗室常備的溶液。利用 Hypodiploidy Analysis 來研究凋亡細胞時，最重要的一點在於如何得到清晰的 Sub-G₁ 峰(如 Fig. D)，所以研究者必須嘗試不同的固定劑，不同的清潔劑與使用濃度、時間、使得 Sub-G₁ 與 G₀/G₁ 的重疊現象減至最低。如果使用方法一得不到清晰的 Sub-G₁ 峰，可考慮在 DNA 染色前，將細胞浸潤在高濃度的檸檬酸中，約三十分鐘，以使小片段 DNA 滲出細胞外。如果研究目的在於探討凋亡程序與生命週期的關係，則可考慮使用 TUNEL-PI 雙參數分析。TUNEL 方法所提供的數據，由於



具有較高的特異性，對於確認細胞是否進程序性凋亡，說明力比

單一參數 Hypoploidy Analysis 要強。如果研究目的試想了解凋亡過程早、中期的細胞變化，並且想了解從凋亡到細胞壞死的動態變化，可以考慮使用 Annexin V-PI 研究法。此法限於研究活細胞，對於必須經過酵素處理，故固定處理的樣品並不適合。

a. 低套染色體分析(Hypoploidy Analysis)

1. 先將 PBS、乙醇及樣品放在冰桶中冷卻。
2. 製備單細胞懸浮液。若為 Attached Cells 先以 PBS 潤洗，再以 Trypsin 酵素處理以 detach 細胞，切記不可作用過度，以 5ml 含血清(5% FCS)之培養液收取細胞，並均勻地打散細胞懸浮液。調整細胞濃度大約成 2×10^6 cells/ml。取樣 1ml 細胞懸浮液，加入 5ml PBS 來清洗細胞。
3. 以 300 X g 低速離心 5 分鐘，吸除上清液，留約 50 μ l 的 PBS，避免碰及細胞。加入 150 μ l PBS，振盪以打散細胞。
4. 一邊振盪，同時一滴一滴地加入 800 μ l 冰冷的乙醇，在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中置放至少 30 分鐘以上。
5. 以 400 X g 離心 5 分鐘，吸除上清液，避免碰及沈澱之細胞。加入 0.5ml 0.1% Triton X-100 / PBS 振盪混合細胞，在室溫下暗室中作用 30 分鐘。
6. 以 400 X g 離心 5 分鐘，儘量吸除上清液。
7. 加入 680 μ l 的 PBS，將沈澱細胞均勻地打散，再加入 100 μ l PI solution, 20 μ l RNase A Stock (終濃度 PI 50 μ g/ml and RNase A 50 μ g/ml)，並輕搖混和。
8. 在室溫下暗室中作用 15-30 分鐘。
9. 臨上機前混勻樣品，並以 35 μ m cell strainer cap or 35 μ m nylon mesh 過濾樣品。最好在兩小時內上機分析，如不馬上分析樣品，以錫箔紙包住儲放在 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中。

b. TUNEL Analysis

i. 固定細胞

1. 將 $1 \sim 2 \times 10^6$ 的細胞懸浮在 0.5ml 的 PBS 中。
2. 將細胞懸浮液加入含 1% (w/v) paraformaldehyde 的

PBS 5 ml，然後放在冰上 15 min。

3. 將細胞以 300 X g 離心 5min，然後將上清液移除掉。
4. 以 5ml 的 PBS 沖洗細胞，並以 300 X g 離心來集結細胞。重複上述沖洗及離心的步驟一次。
5. 將細胞懸浮液於 0.5ml 的 PBS 中
6. 將細胞懸浮液加入 5ml 的冰溫 70% (v/v) ethanol 中
7. 將細胞暫存於-20°C 70% (v/v)的 ethanol 中備用。將細胞放入冰中或冷凍庫終至少 30min。

在某些生物系統中，在將細胞染色來作為 apoptosis 的偵測之前，先將細胞存於 70% (v/v)的 ethanol 中，並置於-20°C之冰箱中至少 12-18 小時會得到最佳的結果。細胞若存放在-20°C 中，可以維持幾天甚至幾個月都不會壞。

ii 染色步驟

1. 將小瓶搖晃使 positive 及 negative control 細胞重新懸浮在液體中。從 control cell suspensions (大約每 1ml 中含 1×10^6 個細胞) 中取出 1ml，然後放入 12x75mm flow cytometry 離心管中。將這個 control cells 懸浮液以 300 X g 離心 5min 並小心地將 70% (v/v) ethanol 吸除要注意不要攪動到 Cell pellet。
2. 以 1ml 的 Wash Buffer 來將每一個試管中的 control cells 重新懸浮在液體中。以上述的步驟離心然後吸除上清液。
3. 將步驟 2 的 Wash Buffer 處理方法重複一次。
4. 將每一個試管中的 control cell 懸浮於 50 μ l 的 DNA Labeling Solution 中。DNA Labeling Solution 的製備如下：

DNA Labeling Solution	1 Assay
Reaction Buffer	10.00 μ l
TdT Enzyme	0.75 μ l
Br - dUTP	8.00 μ l
Distilled H ₂ O	32.25 μ l
Total Volume	51.00 μ l

5. 將含有細胞的 DNA Labeling Solution 放在 37°C 的 temperature controlled bath 中，每隔 15min 將細胞拿出來搖晃一下，使細胞重新懸浮在液體中。對 control cell 來說亦可將之放在 20~25°C 中隔夜的方式來代替上述步驟。對於包含在這個 kit 中除了 control cell 之外的其他樣品來說，在 37°C 中培養的時間可依研究者的需求及所用的設備方法而調整。
6. 在培養期的最後要加入 1.0ml 的 Rinse Buffer 到每一個試管中，並以 300 X g 離心 5min。然後將上清液吸除。
7. 以 1.0 ml 的 Rinse Buffer 重複步驟 6 的 cell rinsing 方法，然後離心後再吸除上清液。
8. 加入 0.1ml 的 Antibody Solution，將 cells pellet 製成懸浮液。(Antibody Solution 的製備方法如下：)

Autibody Solution	1 Assay
FITC Labeled Anti-BrdU	5.00 μ l
Rinse Buffer	95.00 μ l
Total Volume	100.00 μ l

1. 將含有細胞的 FITC Labeled Anti-BrdU Antibody Solution 置於黑暗中培養 30min(室溫)。
2. 將 0.9ml 的 PI/RNase A staining solution 加入含有 0.1 ml Antibody Solution 的試管中。如果細胞的濃度太低，可將 PI/RNase A staining solution 的量降為 0.5ml。
3. 在室溫下將細胞置於黑暗中培養 30min。
4. 以 flow cytometry 來分析 PI/RNase A staining solution。在染色三小時內進行分析。如果在分析前將細胞放置隔夜，細胞的品質可能會開始惡化。

c. Annexin V-PI Analysis

Annexin V-FITC 可用來定量某一族群細胞中，進入凋亡程序細胞所佔的百分比。進入凋亡程序細胞的早期變化之一，是以原本存在細胞膜內層之 Phosphotidyl Serine (PS)，會移位至細胞膜外層，以 Annexin V-FITC 標示外露的 PS，再合併以 Propidium

Iodide (PI)進行壞死細胞的染色，可區分三種細胞。凋亡細胞可被 Annexin V-FITC 染成綠色，但對 PI 拒染(因期細胞膜完整)；二度壞死的細胞則同時會染上 Annexin V-FITC 與 PI，因其細胞膜已破損；而無法染上 Annexin V-FITC 或 PI 的則是不受影響的活細胞。

實驗步驟：

1. 將細胞以 PBS 沖洗兩次，然後將細胞以 1×10^6 cell/ml 的濃度懸浮於 1×的 binding buffer 中。
2. 將 100 μ l 的細胞懸浮液(1×10^5 個細胞)移至一個 5ml 的培養試管中。
3. 加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 及 10 μ l 的 PI。
4. 輕輕的將細胞振盪後，在室溫(20~25 $^{\circ}$ C)下將細胞在黑暗中培養 15min。
5. 加入 400 μ l 的 1× Binding Buffer 到試管中，以 flow cytometry 在一小時內分析。

参考文献 (References)

Abe H, Ohya N, Yamamoto KF, Shibuya T, Arichi S, Odashima S (1987): Effect of glycyrrhizin and glycyrrhonic acid on growth and melanogenesis in cultured B16 melanoma cells. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23: 1549-1555.

Adler ID (1993): Synopsis of the in vivo results obtained with the 10 known or suspected aneugens tested in the CEC collaborative study. *Mutat. Res.* 287: 131-137.

Agarwal K, Sharma A, Talukder G (1990): Clastogenic effects of copper sulphate on the bone marrow chromosomes of mice in vivo. *Mutat. Res.* 243: 1-6.

Altman FP (1976): Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem cytoc.* 9: 1-56.

Anai H, Maehara Y, Kusumoto H, Sugimachi K (1987): Comparison between succinate dehydrogenase inhibition test and subrenal capsule assay for chemosensitivity testing. *Oncology.* 81: 115-117.

Arjungi KN (1976): Areca nut: A review. *Arzneimittel-Forsch.* 26(5): 951-956.

Rahman A, Fazal F, Greensill J, Ainley K, Parish JH, Hadi SM (1992): Strand scission in DNA induced by dietary flavonoids: role of Cu (I) and oxygen free radicals and biological consequences of scission. *Mol. Cell. Biochem.* 111: 3-9.

Bandyopadhyay TS, Li YC, Giri AK, Saminathan B (1986): Genotoxicity of `Katha` - An ingredient of betel leaf preparation. *Food Chem.Toxicol.*

Berg K, Hanson MB, Nielsen SE (1990): A new sensitive bioassay for precise quantification of interferon activity as measured via the mitochondrial dehydrogenase function in cells (MTT - method), *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 98: 156-162.

Bhunya SP, Jena GB (1996): Clastogenic effects of copper

sulphate in chick in vivo test system. *Mutat. Res.* 367: 57-63.

Chen C-H, Campbell PA, Newman LS (1990): MTT colorimetric assay detects mitogen responses of spleen but not blood lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 93: 249-255.

Colangelo D, Guo HY, Connors KM, silverstro L, Hoffman RM (1992): Non-colorimetric measurement of cell activity in 3-D Histoculture using MTT: the pixel image analysis of formazan crystals. *Anal. Biochem.* 205: 8-13.

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991): Use of an aqueous soluble cell activation growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3: 207-212.

Countryman P, Heddle J (1976): The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41: 321-332.

Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC (1995): Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature.* 377 (6548): 446-8.

Dave BJ, Trivedi AH, Adhvaryu SG (1992): In vitro genotoxic effects of areca nut extract and arecoline. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 118 (4): 283-288.

Denizot E, Lang R (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277.

Dunham LJ, Muir CS, Hamner JE (1966): Epithelial atypia in hamster cheek pouches treated repeatedly with calcium hydroxide. *Brit. J. Cancer* 20: 588-593.

Eastmond DA, Tucker JD (1989): Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13: 34-43.

Fenech M, Morley AA (1985): Measurement of micronuclei

in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29-36.

Gerlier D, Thomasset N (1986): Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* 94: 57-63.

Giri AK, Banerjee TS, Talukder G, Sharma A (1987): Induction of sister chromatid exchange and dominant lethal mutation by 'Katha' (Catechu) in male mice. *Cancer Lett.* 36: 189-196.

Harvey W, Scutt A, Meghji S, Canniff JP (1986): Stimulation of human buccal mucosa fibroblasts in vitro by betel nut alkaloid. *Arch. Oral Biol.* 31 (1): 45-49.

Heddle JA (1973): A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.* 18: 187-190.

Heddle JA, Carrano AV (1977): The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat. Res.* 44: 63-69.

Heddle JA, Hite M, Kirhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF (1983): The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat. Res.* 123: 61-118.

Hengartner MO (1994): Programmed cell death. A rich harvest. *Current. Biology.* 4 (10): 950-952.

Hennings G (1981): Biochemical, pharmacological and toxicological evaluation of Medicine, International Congress and Symposium Series. No.47: p79.

Howell JS (1958): The effect of copper acetate on p-dimethyl amino azobenene carcinogenesis in rat, *Brit. J. Cancer* 12: 594-608.

Hussain RF, Nouri AME, Oliver RTQ (1993): A new approach for measurement of cytotoxicity using a colorimetric assay. *J. Immunol. Methods* 160: 89-96.

Hwang LS, Wang CK, Shen MJ, Kao LS (1992): Phenolic

compounds of Piper betel flower as flavoring and neuronal modulation Ho CT, Lee CY, Huang MT, Eds. ACS. Sym. Ser. 506, p. 200-213.

IARC (1985): Betel-quid and areca-nut chewing. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol.37. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer p.141-202.

Plumb JA, Milroy R, Kaye SB (1989): Effects of pH dependent of MTT-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Res. 49: 4435-4440.

Jain AK, Shimoi K, Nakamura Y, Kada T, Hara T, Tomita I (1989): Crue tes extracts decrease the mutagenic activity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanid in vitro and in intragastric tract of rats. Mutat. Res. 210: 1-8.

Jost L M, Kirwood JM, Whiteside TL (1992): Improved short and long-term XTT – based colormetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumour cells. J. Immunol. Methods 147: 153-165.

Kerr JF, Searle J (1972): The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. J. Pathol. 108 (1): 55-58.

Ko YC, Chiang TA, Chang SJ, Hsieh SF (1992): Prevalence of betel quid chewing habit in Taiwan and related sociodemographic factors. J.Oral Pathol.Med. 21: 261-264.

Kondo T, Imamura T, Ichihashi H (1966): In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. Gann. 57(2): 113-121.

Kwan HW (1976): A statistical study on oral carcinomas in Taiwan with emphasis on the relationship with betel nut chewing: A preliminary report. J. Formosan Med. Assoc. 75: 497-505.

Linder MC (1983): Changes in the distribution and metabolism of copper in cancer: a review. J. Nutr. Growth Cancer 1: 27-38.

Lynch AM, Parry JM (1993): The cytochalasin-B micronucleus/kinetochore assay in vitro: Studies with 10 suspected anagens. *Mutat. Res.* 287: 71-86.

Fenech M, Morley AA (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29-36.

Maehara Y, Kusumoto T, Kusumoto H, Anai H, Sugimachi K (1988): Sodium succinate enhances the colorimetric reaction of the in vitro chemosensitivity test: MTT assay. *Oncology* 45: 434-436.

Marrazzini A, Bettic, Bernacchi F, Barrai I, Barale R (1994): Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons. *Mutagenesis* 9: 505-515.

Mathew AG, Govindarajan VS (1969): The nature of the complex proanthocyanidins. *Phytochemistry*. 8: 1543-1547.

Monner D (1988): An assay for growth of mouse bone marrow cells in microtiter liquid culture using the tetrazolium salt MTT, and its application to studies of myelopoiesis. *Immunol. Lett.* 19: 261-268.

Mujumder AM, Kapadi AH, Pendes GS (1979): Chemistry and pharmacology of betel nut *Areca catechu* Linn. *J. Plant Crops*. 7: 69-92.

Nagabhushan M, Bhide SV (1988): Antimutagenicity of catechin against environmental mutagens, *Mutagenesis*. 3: 293-296.

Nakashima T, Umewa T, Maehara Y, Sugimachi K (1989): Succinate dehydrogenase inhibition test for evaluating head and neck tumors. *Oncology* 46: 162-168.

Nanda RS, Kapoor K (1971): Fluoride content of piper betel and its constituents. *Indian J. Med. Res.* 59: 1966-1969.

Nineham AW (1955): The chemistry of formazans and tetrazolium salts. *Chem. Rev.* 55: 355-483.

Nishino H, Yoshioka K, Iwashima A, Takizawa H, Konishi S, Okamoto H, Okabe H, Shibata S, Fugiki H, Sugimura T (1986): Glycyrrhetic acid inhibits tumor-promoting activity of teleocidin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in two stage mouse skin carcinogenesis Jpn. J. Cancer Res. 77: 33-38.

Nishino H, Kitagawa K, Iwashima A (1984): Antitumor-promoting activity of glycyrrhetic acid in mouse skin tumor formation induced by 7, 12-dimethyl-benz[a]-anthracene plus teleocidin. Carcinogenesis. 5: 1529-1530.

Ohtsuka M, Fukuda K, Yano H, Kojiro M (1995): Effects of Nine Active Ingredients in Chinese Herbal Medicine Sho-saiko-to on 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide Mutagenicity. Jpn. J. cancer Res. 86: 1131-1135.

Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH (1994): The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. Brit. J. Cancer 69: 93-100.

Panigrahi GB, Rao AR (1983): Influence of caffeine on arecoline-induced SCE in mouse bone-marrow cells in vivo. Mutat. Res. 122: 347-353.

Pearse AGE (1972): Histochemistry, theoretical and applied Vol. 2 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 536-566.

Peckman H von, Rung P (1894): Oxydation der formazylverbindungen I. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27: 323-324.

Peckman H von, Rung P (1894): Oxydation der formazylverbindungen II. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27: 2920-2930.

Pickwell SM, Schimelpfening S, Palinkas LA (1994): Bebelmania. Betel quid chewing by Cambodian women in the United States and its potential health effects. Western J. Med. 160 (4): 326-330.

Roberts C, Morgan G, Holt P (1986): A critical comparison of the micronucleus yield from high and low LET irradiation of plateau-phase cell populations. Mutat. Res. 87: 143-188.

Sasaki K, Murakami T, Oga A, Takahashi M and Okita K (1989): Effects of glycyrrhizin on cell proliferation and α -fetoprotein production of human hepatoma cell line HuH-7. *Biotherapy*.3: 1515-1518.

Scutt A, Meghji S, Canniff JP, Harvey W (1987): Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia*. 43: 391-393.

Sharan RN, Wary KK (1992): Study of unscheduled DNA synthesis following exposure of human cells to arecoline and extracts of betel nut in vitro. *Mutat. Res*. 278: 271-276.

Shi Y, Kornovski S, Savani R, Turley EA (1993): A rapid, multiwell colorimetric assay for chemotaxis. *J Immunol. Methods* 164: 149-154.

Shindo Y, Hirano F, Maeda H, Takeda U (1983): The micronucleus test with mouse cells. *Mutat. Res*. 121: 53-57.

Sider EG, Petraki M, Kalfas C (1981): Cu^{2+} , an environmental mutagenic agent. *Mutat. Res*. 185:303.

Sinha A, Rao AR (1985): Induction of shape abnormality and unscheduled DNA synthesis by arecoline in the germ cells of mice. *Mutat. Res*. 158: 189-192.

Slater TF (1963): Studies on a succinate-neotetrazolium reductase system of rat liver. *Biochem. Bioph. Acta*. 77: 365-382.

Slater TF, Sawyer B, Strauli U (1963): Studies on succinate - tetrazolium reductase synthesis III. Points of 4 different tetrazolium salts. *Biochem. Bioph. Acta*. 77: 383-393.

Stich HF, Rosin MP (1984): Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention, *Cancer Lett*. 22: 241-253.

Stich HF, Stich W (1982): Chromosome-damaging activity of saliva of betel nut and tobacco chewers. *Cancer Lett*.17: 125-134.

Stich HF, Rosin MP, Brunnemann KD (1986): Oral lesions, genotoxicity and nitrosamines in betel quid chewers with no obvious increase in oral cancer risk. *Cancer Lett.* 31: 15-25.

Stich HF, Stich W, Parida BB (1982): elevated frequency of micronucleated cell in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. *Cancer Lett.* 17: 125-134.

Tates AD, Neuteboom I, Hofker M (1980): A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. *Mutat. Res.* 74: 11-20.

Trivedi AH, Dave BJ, Adhvaryu SC (1993): Genotoxic effects of nicotine in combination with arecoline on CHO cells. *Cancer Lett.* 74 (1-2): 105-110.

Venitt S, Parry JM (1984): Mutagenicity testing. p.187-188.

Wang CK, Lee WH (1996): Separation, characteristics and biological activities of phenolics in areca fruit. *J. Agr. Food Chem.* 44: 2014-2019.

Wang H, Cao G, Prior RL (1997): Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.* 45: 304-309.

WHO (1984): Meeting Report Control of oral cancer in developing countries. *Bull. WHO* 62: 817-830.

Wojcik A, Aghamohammadis S, Aillaud M, Bosi A, Dai G, Oliveri G, Salone B, Savage JR, Shodley JD, Streffer C (1996): Adaptive response to ionizing radiation-induced chromosome aberrations in rabbit lymphocytes: Effect of pre-exposure to zinc, and copper salts. *Mutat. Res.* 369: 233-241.

Wyllie AH (1997): Apoptosis: an overview. *Brit. Med. Bull.* 53 (3): 451-465.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.

Yamamoto KI, Kikuchi Y (1980): A comparison of diameters

of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons.71(1):127-131.

Yamashoji S, Nashimoto F, Usuda M, Kubota H, Ishiki K (1993): Application of the chemiluminescent assay to colorimetric assay. J. Immunol. Methods 159: 253-259.

Yamaue H, Tanimura H, Tsunoda T (1991): Chemosensitivity testing with highly purified fresh human tumour cells with the MTT colorimetric assay. Eur. J. Cancer 27: 1258-1263.

王東堯(1993): 口腔癌專輯—談口腔檳榔癌.防癌雜誌 6: 26-27.

王進崑和孫璐西(1993): 檳榔嚼塊中酚類化合物分析。中國農業化學會誌, 31 (5): 623-632.

林有信 (1989): 檳榔的栽培管理。興農雜誌, 244:18-22

林煒煜 (1989): 位居首席的高經濟作物—檳榔之產銷分析。興農雜誌. 244: 9-13.

張育超(1998): 檳榔植物鹼對人類牙齦纖維母細胞之影響.中華牙誌 17(1): 23-29.

黃湧灃(1990): 嚼食檳榔與齒牙磨耗. 中華民國牙醫學會雜誌.9: 27.

黃萬傳.許文菊(1993):.台灣檳榔之生產與消費.第一屆嚼食檳榔對健康影響國際研討會。

蕭裕源(1990): 嚼食檳榔與齒牙損耗.中華民國牙醫學會雜誌.9: 29.

謝天渝(1991): 檳榔與口腔癌。防癌之聲, 57:5-7。

顏秀君(1998): 檳榔果實酚類化合物粗萃取物經鹼處理後水層產物之化學變化、除臭性及其毒性探討。pp: 36.碩士論文.中山醫學院.