

R
008.8
4211

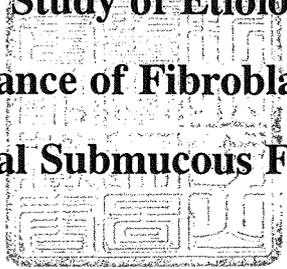
私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

指導教授：許明德 博士 李天翎 博士

利用體外培養口腔黏膜下纖維化之
纖維母細胞以探討其於纖維化中
之可能變化與重要性

The In Vitro Study of Etiologic Changes and
Their Importance of Fibroblasts Isolated from
Oral Submucous Fibrosis



研究生：彭瓊瑋 撰

中華民國八十五年十二月

中山醫學院圖書館



C039011

簽署人須知

1. 依著權法定的規，任何單位以網路、光碟與微縮等方式的整合國內學術資料，妥均須先將各項專得著作財產權授與他人，請分別在三種利用方式的同意欄內銜選並填妥。
2. 所將權授與他人，請分別在三種利用方式的同意欄內銜選並填妥。
3. 在國交元，科、面自碩方年論的整資料電台，金支代義權全在已，裝面去本地。
4. 依著權法定的規，任何單位以網路、光碟與微縮等方式的整合國內學術資料，妥均須先將各項專得著作財產權授與他人，請分別在三種利用方式的同意欄內銜選並填妥。
5. 在國交元，科、面自碩方年論的整資料電台，金支代義權全在已，裝面去本地。

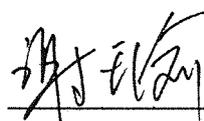
研究生姓名： 彭瑋瑋 聯絡電話： (04) 3819368

地址： 台中市文心南二路390號5F之1

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

口試委員

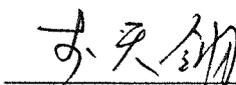
高雄醫學院口腔衛生研究所 謝天渝 博士



中山醫學院口腔醫學研究所 許明德 博士
(論文指導教授)



中山醫學院醫學研究所 李天翎 博士
(論文指導教授)



中華民國八十五年十二月

學生彭瓊琿論文題目為利用體外培養口腔黏膜下纖維化之纖維母細胞以探討其於纖維化中之可能變化與重要性，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： 許明德副教授

簽名：許明德

李天翎副教授

簽名：李天翎

中華民國 85 年 1 月 6 日

誌 謝

終於走到這一天了。

無法形容這段半工半讀的日子裡在物質與精神上所遭遇到的艱難。但很幸運地，因為許多人的協助，使我得以順利通過考驗。

感謝許明德教授對我的提攜以及李天翎教授的包容與耐心教導，並感謝謝天渝所長的審查指正。實驗過程中，有許多攝影工作是免疫室再靜幫忙完成的，而資料處理上亦得楊世煌先生協助，在此特別謝謝他們。還有實驗室的夥伴們：秀鈴、翠蓮、銘衡以及麗秋學姐，若不是他們的熱心與無私，我的工作將無法如期完成。實驗之初，亦受電顯室廖克剛教授，楊明鈴老師及廖孟琴小姐的關照，在此一併謝謝他們。

最後，感謝一直為我擔心的父母親以及讓我無後顧之憂的婆婆，並謝謝外子建寧的支持與陪伴。我也要向長久以來未能好好照顧的寶貝女兒敏俐說聲抱歉。然而我深信，黎明已經來臨；屬於我們一家人的新生活，才正要展開！

----謹以此論文獻給我摯愛的家人。

彭瓊琿

1996. 12. 24

目錄

壹.中文摘要	3
貳.英文摘要	6
參.前言	10
肆.文獻回顧.	14
一.OSF 在流行病學方面的研究	14
二.Arecoline 對纖維母細胞之影響 暨 OSF 在細胞學方面之探討	16
三.肌性纖維母細胞	18
四.TGF-beta	19
五.採用立體膠原基墊培養細胞之原因	20
伍.實驗假設及設計	21
陸.材料與方法	24
一.儀器與配備：附錄一	73
二.藥品與試劑配製法：附錄二	74
三、初代細胞之建立及繼代培養 (Cell culture)	24
四.立體膠原基墊培養	25
五.實驗方法	26
5-1.生長曲線 (Growth curve)	26
5-2.膠原基質收縮速率 (Contraction rate of collagen gel)	26
5-3.TGF-beta 的影響 (The effect of TGF-beta)	26

5-4. Arecoline 的影響 (The effect of arecoline)	
5-4-1. 生長方面 -----	27
5-4-2. 膠原收縮方面 -----	27
5-5. 免疫螢光法 (Immunoflourescence) -----	28
5-5-1. 細胞本身的比較 -----	28
5-5-2. 組織切片的比較 -----	28
5-6. 電泳 (Electrophoresis) -----	29
5-7. 統計 -----	29
柒. 結果 -----	30
一. 生長曲線的比較 -----	30
二. 膠原收縮速率的比較 -----	31
三. TGF-beta 的影響 -----	34
四. Arecoline 的影響 -----	39
五. 免疫螢光染色 -----	45
六. 電泳 -----	56
捌. 討論 -----	59
玖. 結論 -----	62
拾. 參考文獻 -----	63
拾壹. 附錄 -----	73

壹. 中文摘要：

口腔黏膜下纖維化 (Oral submucous fibrosis, 簡稱 OSF) 是一種持續性惡化的口腔病變，亦有可能是口腔癌的前期病灶之一。患者因上皮萎縮、結締組織膠原增生，而有疼痛、開口不能及吞嚥困難等現象。依據各種流行病學資料顯示，此種疾患之發生與嚼食檳榔有極為密切的關係。

台灣吃檳榔的風氣相當普遍。而檳榔鹼中之主成份 arecoline，業經實驗證明可能引發膠原增生及纖維化。然而其致病機轉詳情則仍然未明。

纖維化之發生可視為受傷組織過度修復的發炎反應的症狀之一，因此牽涉到許多血球細胞及細胞激動素 (Cytokines)。其中被認為最有關聯者為單核球細胞/巨噬細胞 (Monocyte/macrophage) 所分泌的 transforming growth factor- β (TGF- β)。

組織收縮 (Tissue contraction) 為許多生理及病理過程之重要步驟。此種非肌肉性之組織收縮，其收縮力來源可能為其組織內之纖維母細胞 (Fibroblast) 轉化成類似平滑肌細胞之肌性纖維母細胞 (Myofibroblast)。而已知將纖維母細胞培養於由膠原纖維所構成之立體基質中，細胞會重組膠原基質 (Collagen gel) 並產生收縮，故可為非肌肉性組織收縮提供一極佳之仿生物體模型。

本研究即以取自 OSF 病人口腔病灶培養出來的纖維母細胞（以下簡稱為 OSF 細胞）和源自正常齒齦（Human gingiva fibroblast；HGF）及正常幼兒包皮（Foreskin fibroblast；皮膚細胞）之纖維母細胞相對照，觀察其生長曲線及膠原收縮速率之異同。同時針對其分化之外表型特徵，如細胞支架（Cytoskeleton）與細胞外間質（Extracellular matrix，ECM）蛋白作免疫螢光染色（Immunofluorescence staining）比較，並以電泳（Electrophoresis）分析定量。最後添加 arecoline、TGF- β ，觀察其對細胞的生長及膠原收縮之影響，試圖找出 OSF 致病機轉中之關連性。

結果發現：在三種來自不同組織的纖維母細胞中，OSF 細胞之生長速率最慢，齒齦細胞則最快。而於膠原收縮實驗中，齒齦細胞收縮最快，皮膚細胞次之；OSF 膠原則自始至終表現出一種穩定而後續之收縮。

免疫螢光染色顯示，OSF 病變組織中非但具有較多比例之細胞表現 α -smooth muscle actin，且在其細胞間質中 type IV collagen、laminin 表現亦繁。以電泳分析比較可看出 OSF 細胞具特殊蛋白。

TGF- β 雖可增強正常細胞之反應，但對 OSF 細胞的效用卻不明顯。而 arecoline 則在 $10 \mu\text{g/mL}$ 以下可促進正常細胞之生長。

由本研究可推論：

1. 造成 OSF 組織內細胞外間質堆積的原因，並不在於其纖維母細胞生長速率的快慢。
2. OSF 細胞本身已發展出特有之收縮型態。至少在本實驗中所加諸的外來之刺激，其收縮均無顯著之改變。
3. OSF 細胞中具 α -smooth muscle actin 表現之細胞在比例上表現較多。
4. ECM 影響著細胞的各種生理表現：OSF 為一種病態組織，因此其 ECM 表現與正常者不同。
5. 由電泳分析蛋白成分之比較，顯示 OSF 細胞存有特殊蛋白。
6. OSF 細胞於體內可能已經產生其他變化或轉化。
7. 低濃度 arecoline 能促進正常纖維母細胞之生長。然其對膠原收縮並無直接作用；可能如前人所述，其影響在於增加膠原蛋白之沈積。
8. 有關 arecoline、TGF- β 和纖維母細胞之間的交互作用，其於生物體內之機轉相當複雜，尚待進一步實驗闡明。

(關鍵詞 口腔黏膜下纖維化，arecoline，TGF- β ，肌性纖維母細胞)

貳. 英文摘要：

Oral submucous fibrosis (OSF) is recognized as a precancerous lesion, which is characterized by inflammation and fibroelastic changes in the lamina propria and juxtaepithelial region. Patients may complain the incapability of mouth opening, difficulty in swallowing, and a burning sensation while eating spicy food. Epidemiological investigations reveal that OSF is highly related with betel nut-chewing habits.

Betel nut chewing is widely popular in Taiwan. It was evidenced that one of the major alkaloids of betel nut, arecoline, promotes collagen synthesis and fibrosis. However, the detailed mechanism(s) or the pathogenesis has not been well established.

Fibrosis is considered as one type of pathological excess of a normal wound healing process, in which various kinds of leukocytes and cytokines are involved. Among which the most important one is TGF- β (Transforming growth factor

β), a cytokine primarily released by monocytes/macrophages.

Tissue contraction, in which fibroblasts are suggested to be capable of transforming into myofibroblasts, is indispensable in many physiological and pathological processes. Fibroblasts reorganize collagen fibrils and contract the gels when they are suspended in collagen lattices, hence collagen gel contraction is considered to be a feasible model to study the tissue contraction.

This present study tries to make a comparison between OSF and the control fibroblasts obtained from gingiva and foreskin. The parameters included the growth curve, the gel contraction rate and the effects of TGF- β or arecoline. Furthermore, cytoskeleton and ECM (Extracellular matrix) proteins were also analyzed by immunofluorescence and electrophoresis.

Results showed that OSF had the slowest growth rate among the three different types of fibroblasts. In gel contraction, gingiva fibroblasts contracted

most rapidly. Whereas, OSF gels always revealed steady and consistent contraction rates.

OSF fibroblasts stained more intensely for α -smooth muscle actin. Moreover, laminin and type IV collagen were also found to be more predominant in the ECM of OSF tissue. Electrophoresis analysis illustrated that OSF fibroblasts expressed some unidentified proteins which are different from that of normal fibroblasts.

To sum up, it is demonstrated in present study that:

- 1.OSF fibroblasts assumes the lowest growth rate among the three fibroblast subtypes studied .
- 2.OSF gels have their own characteristic contraction pattern which seems to be unaffected regardless in the absence or in the presence of exogenous stimulations.
- 3.When compared with normal control fibroblasts, more OSF fibroblasts express intense α -smooth muscle actins indicating that they might have been modified into myofibroblasts.

4. ECM plays an important role in cell growth and differentiation. Different ECM expressions are revealed by OSF when compared with normal fibroblasts.
5. Few interesting proteins unique to OSF fibroblasts present in their extracts remain to be explored.
6. In terms of the lacking of responsiveness to exogenous stimuli, OSF fibroblasts might be considered as being in a pathological condition in which they had already been activated in vivo.
7. Arecoline when given below a concentration of $10\mu\text{g}/\text{mL}$ stimulates the growth of normal fibroblasts, but not the gel contraction. It is probably that arecoline acts on the collagen synthesis as described in literature.
8. The interactions among arecoline, $\text{TGF-}\beta$, and fibroblasts are extremely complicated in vivo. Further investigations are definitely needed in order to clarify the mechanism.

參.前言：

口腔黏膜下纖維化 (Oral submucous fibrosis, 以下簡稱 OSF)，乃是指口腔任何部位的黏膜 (甚至咽喉) 發生潛藏的、慢性的纖維化轉變。患處於近上皮層呈現發炎反應，伴有結締組織本體層彈力纖維組織改變以及上皮萎縮等現象 (1)。患者主訴吃辛辣食物時有燒灼痛感，漸漸不良於開口而致咀嚼、說話、吞嚥困難。疼痛波及喉、耳，而且可能因歐氏管硬化而喪失聽力。黏膜因失去彈性而壓迫牙齒，導致慢性潰瘍和繼發性感染 (2)。尤有甚者，若 OSF 持續惡化，極有可能轉化成口腔癌，因此某些學者認為 OSF 是一種癌前病灶 (3)，在癌症的發展上具有相當高的危險度 (4)。

有關口腔黏膜下纖維化之可能誘因有許多，根據文獻曾報告過的，包括基因組成突變、致癌物的刺激、病毒的感染、營養不良或失衡、免疫系統的變化、和自體免疫的引發等等

(2)。然而根據近年來流行病學資料顯示，嚼食檳榔之習慣與口腔黏膜下纖維化的發生有極密切的關聯性 (5-10)。

嚼食檳榔之習慣在台灣相當普遍 (11)。根據關學婉等人 1976 年的報告指出，台灣發現之口腔惡性病變患者中，約 53.4% 與吃檳榔之習慣有關 (12)。而根據高雄醫學院 1991 年所作的調查顯示，估計全台 2000 萬人口中，約有 200 萬人於過去或現在均有嚼食檳榔之習慣，盛行率高達 10%。而於口腔黏



膜下纖維化流行率最高的印度，其吃檳榔之盛行率雖然不過在 1.3%~2.5% 之間，但因其人口上億，所以患者數目也相當可觀 (13)。

檳榔的吃法雖各有不同，然而其最重要之共通主要配料均為檳榔果實 (Betel nuts) (6)。其檳榔鹼中的主成份 arecoline，於體外實驗中已証實能刺激纖維母細胞，導致膠原合成增多 (9)。而在體內實驗中，有將檳榔果實萃取物溶於 Dimethyl sulfoxide (DMSO)，塗抹於老鼠口腔黏膜者，亦發現可引致纖維化 (14)。然而其發生之詳細機轉則仍然未明。

而不論身體任何組織之纖維化，其病理變化均極為相似。纖維化可視為一種組織過度修復之過程；傷口癒合時，先後有許多發炎細胞浸潤至此，此等白血球分泌 cytokines，吸引纖維母細胞，內皮細胞，與其他白血球潛行至此，又藉著新加入細胞所分泌之 cytokines，而使修復反應得以擴展並持續進行。其中與纖維化有關之 cytokine，主要乃是由 monocyte/macrophage 分泌而來，其中尤以 TGF- β 最為重要 (15, 16)。

“組織收縮”乃是正常的組織重整 (Tissue remodelling)、傷口修復及疤痕形成之重要過程 (17)，與纖維母細胞特化成肌性纖維母細胞 (Myofibroblast) 有關 (18, 19)。肌性纖維母細胞之特色為除了保持正常纖維母細

胞合成及分泌膠原蛋白的活性外，其細胞質內又顯現豐富之 α -smooth muscle actin，此乃平滑肌細胞所特有之分化特徵，是以肌性纖維母細胞亦可像平滑肌細胞般地收縮（20-24）。由於 OSF 患者會有張口不能的徵狀，表示在病灶組織中，可能發展出某種阻力（resistance）、張力（tension）或是收縮力；使得過度堆積的胞外間質產生收縮，抑或此種收縮一旦被引發，即造成類似強直的僵硬（rigidity）和缺乏彈性（inelasticity）。於此一假設中最有可能牽設到的細胞變化，便是本來無收縮性的纖維母細胞，在受到某種刺激後，其外表型轉化成有收縮能力的肌性纖維母細胞。

而將細胞分佈於膠原基質中，觀察其收縮情形，則可為形態發育，傷口癒合及疤痕收縮等提供極佳之仿生體研究模型（25，26）。此種細胞培養方法有一更大之好處，便是可以用來測量細胞的收縮能力，此為傳統的單層細胞培養所無法提供。

而就細胞之生長速率而言，1987年 Meghji 等人卻指出，OSF 患者與正常者之頰黏膜纖維母細胞相較其生長速率並無差異，添加 arecoline 亦然（27）。1995年 van Wyk 等人則推測 OSF 之產生過多膠原，其原因並非由細胞增生所致（28）。

本研究之目的，意欲了解：

1. 於組織或口腔病理之層面-- OSF 患者病灶部位之纖維母細胞於外表型上，與正常組織內纖維母細胞相較，是否有較高比率之纖維母細胞轉化成肌性纖維母細胞。
2. 於離體之細胞培養之層面--比較三種細胞於平面與膠原基墊培養中，其生長速率、收縮能力及其它外表型分化表徵 (Markers) 之差異。
3. 於藥物處理反應之層面--分別以具促進纖維化之生長因子 TGF- β ，及檳榔鹼中之主要成份 arecoline 來處理細胞，然後比較 OSF 與正常纖維母細胞對此處理之反應是否不同。

若 OSF 細胞於上述三項實驗中，均與正常之纖維母細胞有顯著差異，則表示正常纖維母細胞受到刺激轉化成肌性纖維母細胞，在組織纖維化過程中之地位相當重要；反之，若正常與 OSF 纖維母細胞之間並無明顯差異，則表示 OSF 纖維化之病因，可能與纖維母細胞的外表型轉化並無直接關係，而需重新思考及驗證其他可能之致病途徑。

肆. 文獻回顧：

一. OSF 在流行病學方面的研究：

OSF 之發生以印度人（包含移居海外的印度人）最多，偶而亦有發生於歐洲人之例子（2）。許多研究均顯示，嚼食檳榔與 OSF 有關。Seedat 和 van Wyk（1988）兩氏曾對南非境內壹百萬名印度裔人作調查，發現近 39000 人有嚼食檳榔子之習慣，而其中 18000 人以上有 OSF 之症狀（29）。Sinor 與 Gupta（1990）兩氏曾以印度某地之 60 名 OSF 患者與同數之對照組配對比較，結果顯示無論檳榔配方中加入石灰或是菸草、檳榔子實乃最爲重要之致病原因（6）。歷史上，嚼食檳榔之習慣由來已久，遍佈印度、斯里蘭卡、東南亞、印尼、太平洋諸島及中國等地（12）。究其原因，乃是檳榔樹本爲南亞和太平洋諸島極爲普遍之土產（30）。

在台灣，首先有 Su 於 1954 年以“Idiopathic scleroderma of the mouth”之名報告了三個 OSF 之病例（31）。之後蕭、關兩氏以台大醫院 35 名 OSF 患者和正常者作比較，發現大多數患者爲男性（男：女 = 34：1）（32），且其中 60% 之 OSF 患者均有嚼食檳榔之習慣；此結果與 Joshi（33）、Desa（34）、Sirsat 及 Khanolkar（35）所報告者（50% 以上爲女性）大相逕庭。另黃湧澧等

人亦於 1993 年提出研究報告：99% 之 OSF，77.6% 之口腔白斑症（Leukoplakia），與 78.8% 之口腔癌患者均有嗜嚼檳榔之習慣（36）。

OSF 之爲害除了造成患者之痛苦外，主要在於其乃屬一種潛在的癌前病灶。Murti 等人於印度某地追蹤 66 位 OSF 患者共長達 17 年，發現有 7.6% 的病例演變成口腔癌（4）。

Seedat、van Wyk 兩氏調查 178 位嚼食檳榔者和 124 位醫院門診 OSF 患者，發現 OSF 病患群之年齡較諸未發病群爲輕，且其嚼食年限較短。而醫院患者中，10 位已伴有口腔癌之發生。此結果除了印證 OSF 的惡性轉變傾向外，同時也暗示 OSF 患者可能潛存某種“基因”之影響因子，使其對某些危險因子（Risk factors）感受更爲敏銳（37）。

二. Arecoline 對纖維母細胞之影響

暨 OSF 在細胞學方面之探討

有關 OSF 發病原理的研究，均指向纖維母細胞之生長能力、膠原合成增加、破壞延後，以及膠原蛋白之類型或比例之改變等數個方向。

依據 Meghji 等人的報告，加入 arecoline 固然可以增加其生長速率，然而 OSF 纖維母細胞與正常者之反應相較仍無顯著差別（27）。其後 van Wyk 等人指出，加入 arecoline 非但不能促進其生長速率，於高濃度時反而可能抑制細胞之生長（28）。

檳榔子之萃取物或其膺鹼能夠增加促進膠原之形成（9，27，38），而 Tannin、Flavanoid catechin 等成份則可能在膠原胜肽鍵間形成交聯，故爾抑制膠原蛋白酵素之分解（39）。另有研究結果顯示，OSF 細胞之 lysyl oxidase 活性較正常細胞為高，phagocytosis 的能力則較正常者為低（40）。上述之多種細胞特性之變化，皆有可能從正面的合成增加與負面的代謝減慢而造成 ECM 內之膠原堆積。

至於 ECM 中各種膠原的變化情形，根據 van Wyk 等對 OSF 之 ECM 所作電子顯微鏡觀察顯示：

OSF 組織與正常組織其 type I collagen 之分佈與形態並無相異，然 OSF 之 type I collagen 總量增加，且在其

本體層有濃密之纖維團塊（41）。

其後 Reichart 等以免疫染色法作 OSF 和正常組織之比較，發現 OSF 患者其 type III procollagen 及 type VI collagen 均減少。已知 type III collagen 具有控制纖維成長之作用，type VI collagen 則可賦與膠原纖維束彈性。由此可瞭解 OSF 患者其口腔黏膜變硬的原因（42）。

另黃、謝等曾以電泳法分析 OSF 之組成膠原蛋白，發現其與正常組織雖無統計學上之差異，然而 type V collagen/type I collagen 之比值，則有隨疾病進行而增加之趨勢（43）。

三.肌性纖維母細胞

纖維母細胞可因其形態、更新速率、胞膜受器之不同而分為許多亞型（44-47）。生長速率與分化程度不同的細胞各自組織成群，此點與造血系統有異曲同工之妙（48）。

近年來以利用 cytoskeleton 蛋白的表現，做為細胞分化的特殊表徵（Markers），得以確認許多表現型不同之細胞。而牽涉到膠原基質收縮者，乃是一種表現高量 α -smooth muscle actin 之纖維母細胞，亦即肌纖維母細胞

（Myofibroblast）（49）。茲將其命名由來解釋如下：

肌動蛋白（Actin）會因時、空不同而表現出不同比例之同質異構體（50），於正常或病態之肉芽組織收縮過程中，會出現一種過渡表徵之纖維母細胞亞型，其微纖維束

（Microfilament bundles）之組成與平滑肌細胞類似，富含 α -smooth muscle actin，因之將其稱為肌性纖維母細胞

（17、18、20-24）。根據 Eddy 等人之研究，肌性纖維母細胞雖具有 α -smooth muscle actin，卻不具 smooth muscle myosin，亦無基底層所具有之 laminin，因此可判斷其確實屬於一種分化成“類”肌細胞之非平滑肌細胞（17）。van de Berg 曾將肌纖維母細胞與纖維母細胞加以比較，發現前者生長速率較為緩慢，然其所含 actin 濃度則較後者為高（20）。

四. TGF- β

TGF- β 乃為一種多功能之 cytokine (51)。其於哺乳動物中具有 3 種同質異構體，亦即 TGF- β 1、- β 2、以及 - β 3 (52)。其中影響纖維化最明顯者即為 TGF- β 1 (53)。TGF- β 1 之調控則牽涉到轉錄後 (Post-transcriptional) 之分子層次：如 mRNA 之穩定性、活化遲滯型 (Latent form) TGF- β 1，和控制受器之表現等 (54)。TGF- β 具雙相性質；隨其本身濃度、細胞密度、以及作用部位之差異而有不同之表現 (55)。根據 Border 所述：於修復過程開始時，血小板釋放 TGF- β 1 及 PDGF (Platelet derived growth factor) 至受傷組織中。同時 ECM 中的 TGF- β 1 亦被活化。TGF- β 1 對嗜中性白血球、T 細胞、單核球及纖維母細胞均具有極強之化學吸引力。當此等細胞接觸到患部高濃度之 TGF- β 1 時，單核球即開始分泌 FGF、TNF、IL-1 等，而纖維母細胞亦會加強其 ECM 蛋白之合成。TGF- β 1 本身會誘導患部細胞以及浸潤過來的細胞產生更多之 TGF- β 1 (53)。終能促進纖維母細胞的生長 (56)，造成膠原及胞膜受器之合成增加 (57，58)，並減低蛋白酵素之作用 (59，60)。

整個修復過程中，或因接受訊息不同，或由於負迴饋等因素，TGF- β 1 扮演了起始與終結之角色 (61)。若過量產生或滯留，將會引起組織之病態纖維化 (53)。

五. 採用立體膠原基墊培養細胞之原因

將纖維母細胞種於膠原基墊中，較之平面培養，可使其更接近於生物體內之表現（62）。細胞於基墊中呈現出伸展、雙極化的細長梭狀形狀（63，64），同時纖維母細胞亦能與其周圍之膠原基墊作用，重組細胞外間質，而產生膠原基質收縮。此現象與傷口癒合、纖維化、疤痕收縮以及形態變化之過程十分類似（25，26）。因此，立體膠原基墊成爲研究纖維化及結締組織重整之極佳仿生物體模型（65）。

基質收縮與纖維母細胞數目、基質蛋白成份，以及餵養血清濃度等皆有關連（66）。

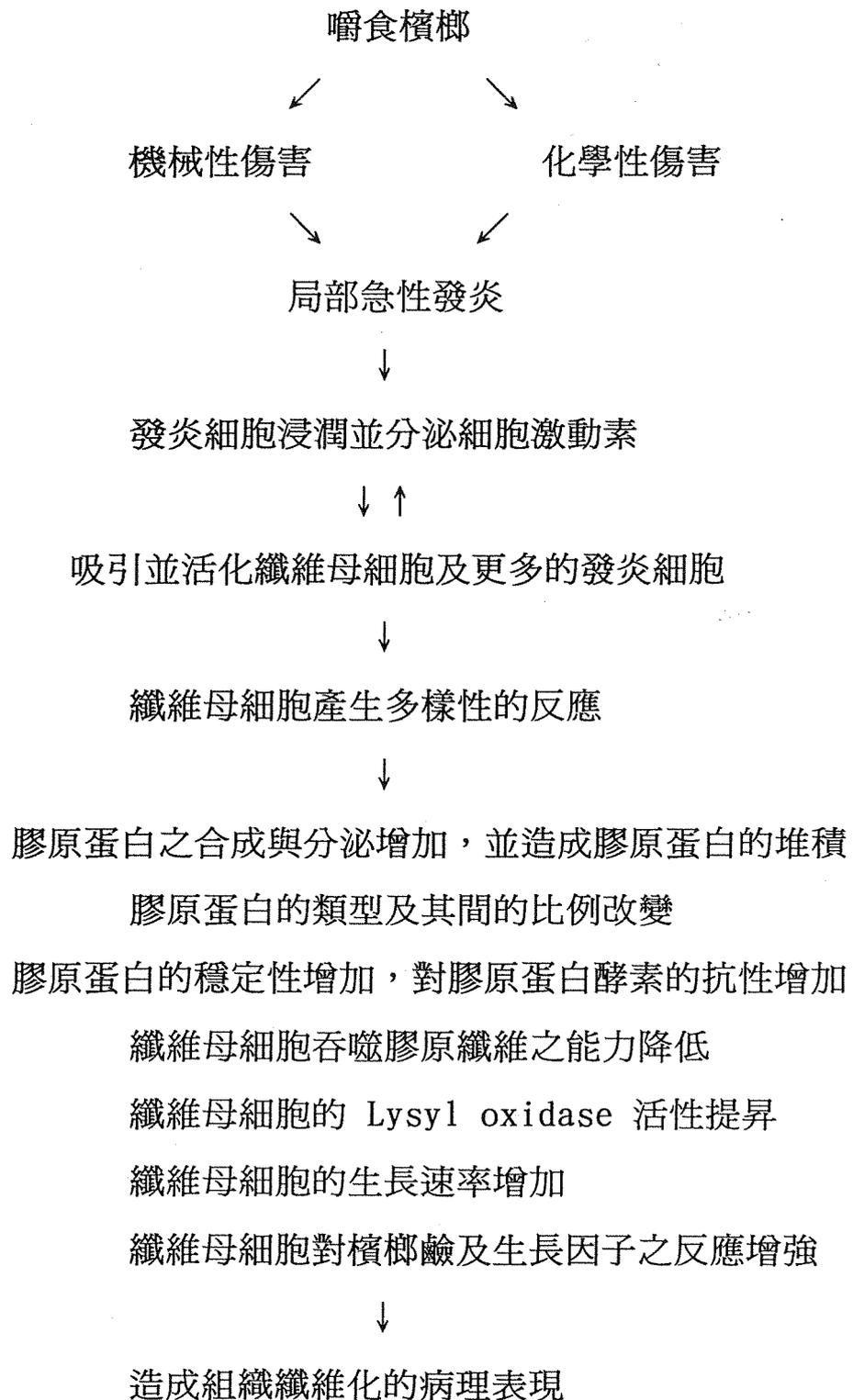
而應用此模型分析許多來自不同組織之細胞，亦可發現其依細胞亞型不同，而呈現出不同之收縮速率（67，68）。

本實驗即欲以此立體培養方法，比較 OSF 細胞與齒齦纖維母細胞、包皮纖維母細胞之膠原基質收縮表現，以及其對不同餵養液之反應。

伍. 實驗假設與設計

綜合文獻報告中所提及的因嚼食檳榔所造成之一系列細胞病變，大致可整理出如下的簡單病程演變圖（Natural history）。本圖中纖維母細胞產生的七項多樣性反應，彼此之間並無時間上的先後順序。此外由本圖亦可約略看出，截至目前為止，大多數之研究均集中在生化方面（Biochemical），而甚少討論到此種病程在生物物理（Biophysical）上之可能影響。

OSF 病程演變圖 (Natural history)



假設：

纖維母細胞因受到某些因子的直接（如 TGF- β ）或間接（如 arecoline）的影響，而使其外表型轉化為肌性纖維母細胞，使其細胞內有較多的 α -smooth muscle actin 及其所形成的壓力微纖維束的結構增加，而有較強且持續的收縮能力。

實驗設計：

在上述的病程演進途徑中，尋找不同的切入點：

1. 在病理切片上，比較 OSF 與正常組織間肌性纖維母細胞的比例及結構上的改變；
2. 在生體外細胞培養上，比較 OSF 與正常纖維母細胞其生長速率及收縮能力的差異；
3. 在藥物處理的反應上，比較 OSF 與正常纖維母細胞對 TGF- β 1 與 arecoline 之反應是否不同。

陸. 材料與方法：

一、儀器與配備：附錄一

二、藥品與試劑配製法：附錄二

三、初代細胞之建立及繼代培養 (Cell culture)

OSF 及正常齒齦樣本均來自口腔外科，包皮樣本則來自小兒外科手術。組織塊先經含 5% PSA 之 DMEM 浸洗消毒；一次 5分鐘，共兩次。於10公分直徑的培養皿上將組織塊切碎，加入胎牛血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) 1cc，加蓋。上下顛倒，放入37°C、5% CO₂培養箱 (Incubator) 中過夜。第二天待碎塊皆附著於培養皿上，再將其翻正回來，加入含 10% FBS 之 DMEM (Complete DMEM; cDMEM)。此後每隔3~4天更換培養液，直到長滿時。以 0.25% trypsin/1mM EDTA，於 37°C 作用15分鐘來拆細胞，將其轉至 T75 培養瓶中作繼代培養。實驗則以第5~11代細胞來進行。

四.立體膠原基墊培養 (Cultivation in 3-dimensional collagen lattices)

每份基質由 0.4cc 膠原基質溶液製成。

以20個基質爲例，所需膠原基質溶液總體積共8cc，其組成比例如下：

0.1N NaOH	0.4cc
10x MEM	0.4cc
DMEM	2.4cc
Vitrogen 100	3.2cc

細胞懸浮液 (Cell suspension) 1.6cc

取15cc 離心管。配製時先加入 0.1N NaOH、10x MEM 及 DMEM，再加入 Vitrogen 100。搖動離心管，使其內容物先充分混合。之後以37°C 水浴 (Water bath) 5分鐘。此舉可增加膠原基墊的凝稠度，避免細胞沈底。最後加入 cell suspension，搖勻之後即可分裝於各槽。

五、實驗方法

5-1. 生長曲線 (Growth curve)

將細胞種於6槽培養板，每槽內有 2×10^5 個細胞。每隔 24 小時任選3個樣本，拆細胞，然後分別置於血球計上算細胞數。待所有時點之細胞平均數目收集完整之後，以取樣時點為橫軸、細胞總數之對數為縱軸作圖，畫出其生長曲線。並計算其族群倍增時間。

5-2. 膠原基質收縮速率

(Contraction rate of collagen gel)

將膠原基質種於24槽培養板。每槽內含 2×10^5 個細胞及基質。待基質凝固，即餵以 10% cDMEM + vitamin c ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$)。48小時後游離基質，依0、1、2、4、8、12、24、48、
、
、
小時測量基質收縮後之直徑變化。

5-3. TGF- β 1 之影響 (The effect of TGF- β 1)

將細胞如前所述種於膠原基質中。24小時後以 DMEM 清洗兩次，再餵以含 1% FBS、1% PSA 及 vitamin c ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 之 DMEM，並加入 TGF- β 1，使其濃度達到 $0.02\text{ng}/\text{mL}$ 。再置於培養箱內48小時後，游離基質並測量其收縮速率。

5-4. Arecoline之影響 (The effect of arecoline)

5-4-1. 生長方面

將細胞接種於6槽培養板，每槽中含 1.3×10^5 個細胞。24小時之後更換培養液，分別以含0、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arecoline之 10% cDMEM 於培養箱作用2小時後，以 DMEM 洗過，同樣再餵以 10% cDMEM。每天重覆更換培養液。此實驗每隔24小時任選其中2個樣本計算細胞數目。

5-4-2. 膠原收縮方面

將膠原基質種於24槽培養板，每槽中含 2×10^5 個細胞。以 10% cDMEM + vitamin c 餵養24小時後，改餵以含 1% FBS、1% PSA及 vitamin c ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 之 DMEM，並加入 arecoline，調成 0、1、5、10、30、50、70、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之濃度。再經過48小時，游離基質，測量其收縮速率。記錄終止時，將其取出，再以 acridine orange 染色之（稀釋200倍，置於暗室中染色10分鐘）。

5-5. 免疫螢光法 (Immunofluorescence)

5-5-1. 細胞本身之比較

將15mm直徑之圓形玻片置入12槽培養板，每槽接種 5×10^4 個細胞。48小時後以 PBS 洗淨，用 -20°C methanol 於室溫下固定15分鐘。然後再以 PBS 洗過，加入 1% BSA 於室溫下靜置30分鐘，藉以去除非專一性受器。之後使用鼠抗 tubulin、vimentin、 β -actin、 α -smooth muscle actin、phalloidin 以及 myosin (Sm) 等一級抗體，使其於 37°C 下作用2小時。二級抗體則使用與 FITC 結合之抗鼠 G 種免疫球蛋白抗體 (Anti-mouse IgG)，亦於 37°C 下作用2小時。對照染色使用與 TRITC 接合之 WGA (Wheat germ agglutinin)。最後以去離子水洗淨，封片，置於螢光顯微鏡下觀察。

5-5-2. 組織切片的比較

樣本經 4% paraformaldehyde 固定20分鐘，再經 OCT compound 包埋40分鐘後，以液態氮冷凍，切片(玻片事先覆以 2% gelatin，以免切片脫落)。與上述染色流程相同，抗體則使用抗鼠 α -smooth muscle actin、 β -actin、cytokeratin、type IV collagen、laminin 等抗體。而膠原基質收縮記錄之最後一日，將其取出，冷凍切片。同 5-5-1 中之方法染 α -smooth muscle actin。

5-6. 電泳 (Electrophoresis)

1. 樣本的製備

取一盤長滿的T75培養瓶，拆細胞、計數。計數完成後離心，將沉澱物先加入 cell extraction buffer,再以5000Xg 離心5分鐘，分開可溶 (soluable) 及不可溶 (pellet) 兩部份，分別加入4x sample buffer。最後以95°C 水浴加熱5分鐘，待冷卻即可用（原則上須以 4x reducing sample buffer : cell extraction buffer = 1:3 比例配成之溶液將細胞濃度調成 10^4 /uL）。

2. 電泳裝置及操作過程

製備 7.5% 的 seperating gel 以及 4%的 stacking gel。所用的製膠板規格為120mm×70mm×1.5mm。每一溝槽中等量放入20 μ L 樣本。而後將整體裝置放入電泳缸中，加入1x electrolyte buffer，接電極，於室溫下以100伏特定電壓跑1-1.5 小時。中止電泳後，取出膠片，放入 Coomassie blue 染料中，再以醋酸脫色即可觀察。

5-7. 統計

以 one-way ANOVA 分析資料。

柒.結果：

一、生長曲線的比較

如圖1 (Fig.1) , 可看出齒齦細胞之生長最快, 其次為皮膚細胞; 而 OSF 細胞於整個生長過程中則呈現極為緩慢之增加。根據 Kovacs 與 Fleishmater 之方法 (69) 計算其族群倍增時間 (PDT; population doubling time) , 公式如下:

$$PDT = 48 \text{ 小時} / \text{No. of division}$$

$$\text{No. of division} = (\log N_1 - \log N_0) / \log 2$$

N_0 = 開始培養時之活細胞數目

N_1 = 培養48小時後之活細胞數目

結果三種細胞之 PDT 分別為: 齒齦細胞17小時, 皮膚細胞28小時, OSF 細胞45小時。

此外, 若以達到飽滿狀態時之細胞數目作觀察, 則可發現 OSF 細胞僅能增值至齒齦細胞數目之約15%; 或僅能達皮膚細胞之約40%的程度而已。

二、膠原收縮速率的比較

使膠原基質收縮的狀況，似乎可分成兩個階段：即在膠原基質被游離後的頭12小時，所有基質產生極為快速的收縮，可稱為快速收縮期。如齒齦細胞於最初12小時內，即已顯示98%以上之收縮。皮膚細胞則於快速收縮後，呈現一段較平穩之過程，可稱為穩定收縮期。之後至96小時，其收縮速率又增加。

至於 OSF 細胞，則由始至終表現出一種極為穩定之收縮速率。於120小時記錄終了時，其呈現之膠原收縮總量較其他兩組為多。請參考圖2 (Fig.2)。

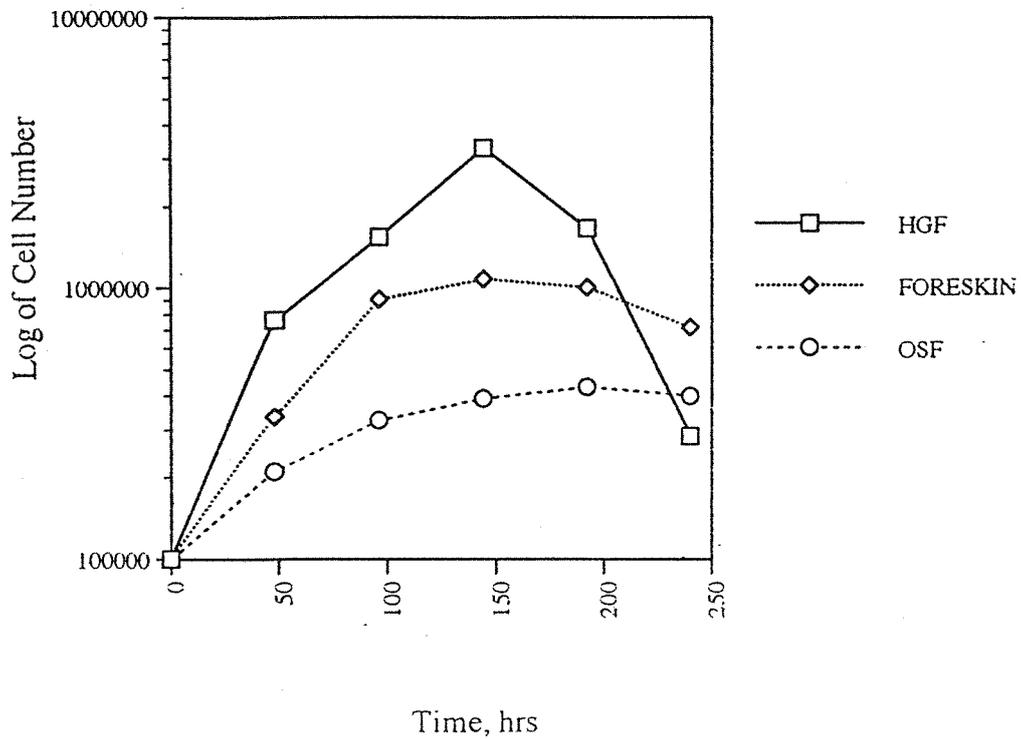


Fig.1: 取自 OSF 及其他部位之纖維母細胞的生長曲線之比較

每時點記錄為所選之 3 個樣本的細胞平均數目。將資料輸入電腦，以時間 (hr) 為橫軸，細胞數目之對數 (log) 為縱軸作圖。整個過程歷時 240 小時，中途不換培養液。由圖中可看出 OSF 生長速率最為緩慢。

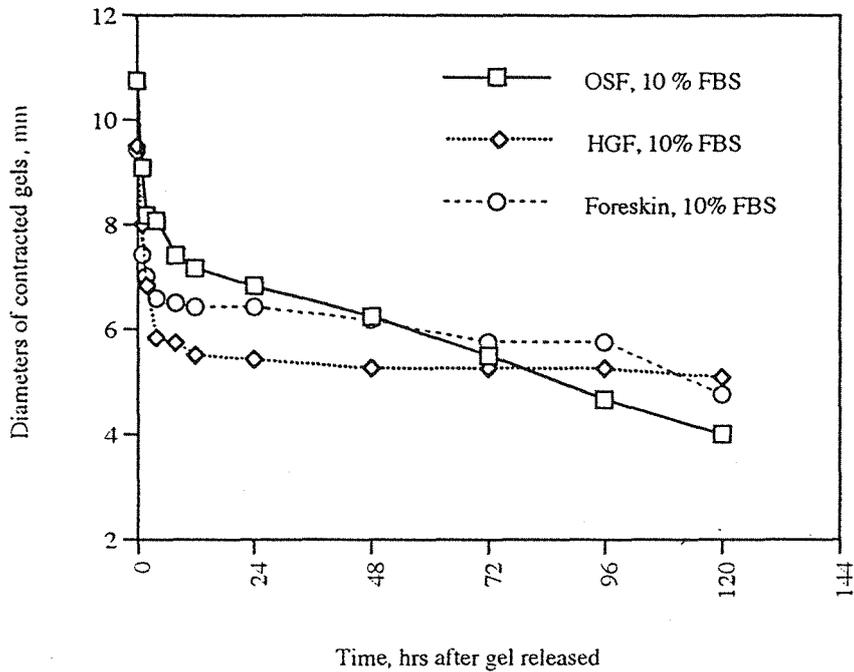


Fig.2: 取自 OSF 及其他部位之纖維母細胞的膠原收縮速率之比較

膠原大小以其平均直徑為準，記錄其最長徑及最短徑之平均數 (mm)。每種細胞於各種不同濃度測試中皆有 3 個膠原樣本。計算每時點此 3 個樣本之平均，以此為縱軸參數，橫軸則表示膠原基質被游離之後的時間 (hr)。過程歷時 120 小時，不更換培養液。圖中可見 OSF 膠原呈現穩定而持續的收縮。

三、TGF- β 1的影響

血清濃度可影響齒齦細胞膠原之收縮速率及最終收縮量。添加 TGF- β 1 反應更爲劇烈。然而使用 0.02ng/ μ L、0.08 ng/ μ L 並未得到劑量依存性之關係。由圖3a, 3b (Figs.3a、3b) 可發現，不論於何種培養液中，齒齦細胞仍保有其特殊之收縮型態：即12小時之後，膠原收縮逐漸呈現平穩狀態。

皮膚細胞亦呈現與齒齦細胞類似之結果。

血清濃度亦會影響 OSF 細胞之收縮。OSF 之膠原收縮基本上亦保有其收縮型態。惟添加 TGF- β 1，所得到的收縮曲線與添加 10%FBS 者幾乎一致。附圖4a, 4b (Figs.4a、4b)。

此等反應與齒齦細胞對 TGF- β 1之反應差異極大。

TGF- β 1 單獨作用時，此兩種細胞均可達到與添加 10%FBS 相當程度的收縮。但於齒齦細胞，膠原可繼續收縮，產生比加 10%FBS 更大之膠原收縮量。然而於 OSF 細胞，TGF- β 1 至多可使其收縮到與添加 10%FBS 相當之程度，卻無法產生更大的收縮。此種現象之產生，是由於 OSF 細胞表面之 TGF- β 1 受器數目減少、活性降低，抑或是親和力降低，仍需進一步探討。

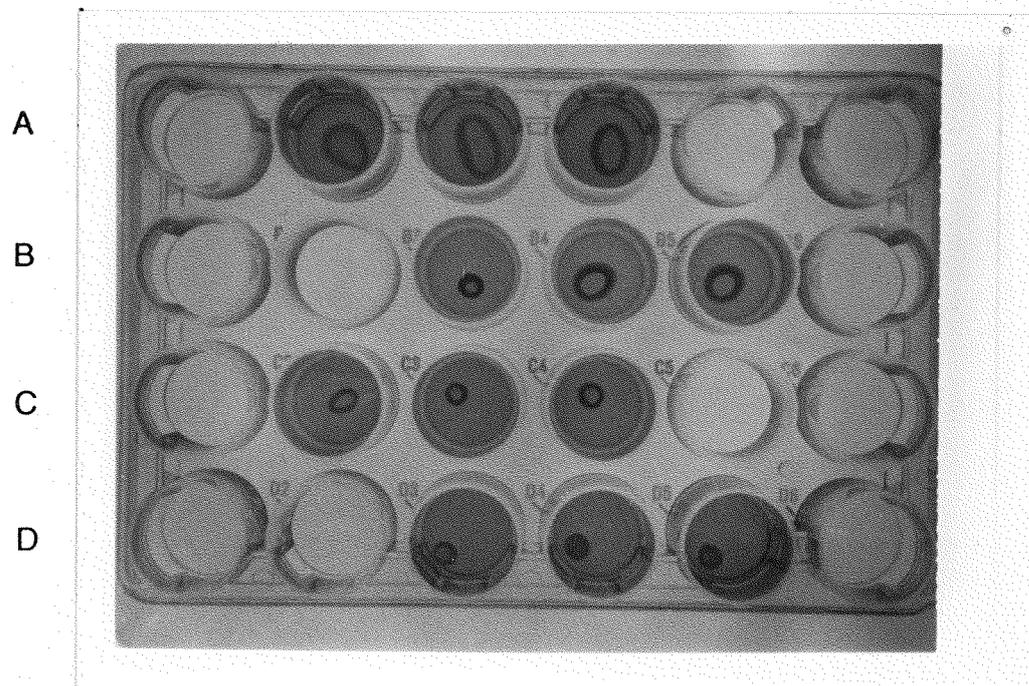


Fig.3a: 齒齦細胞膠原收縮後 120 小時

A.1%FBS

B.10%FBS

C.0.02 ng/ μ L TGF- β 1

D.0.08 ng/ μ L TGF- β 1

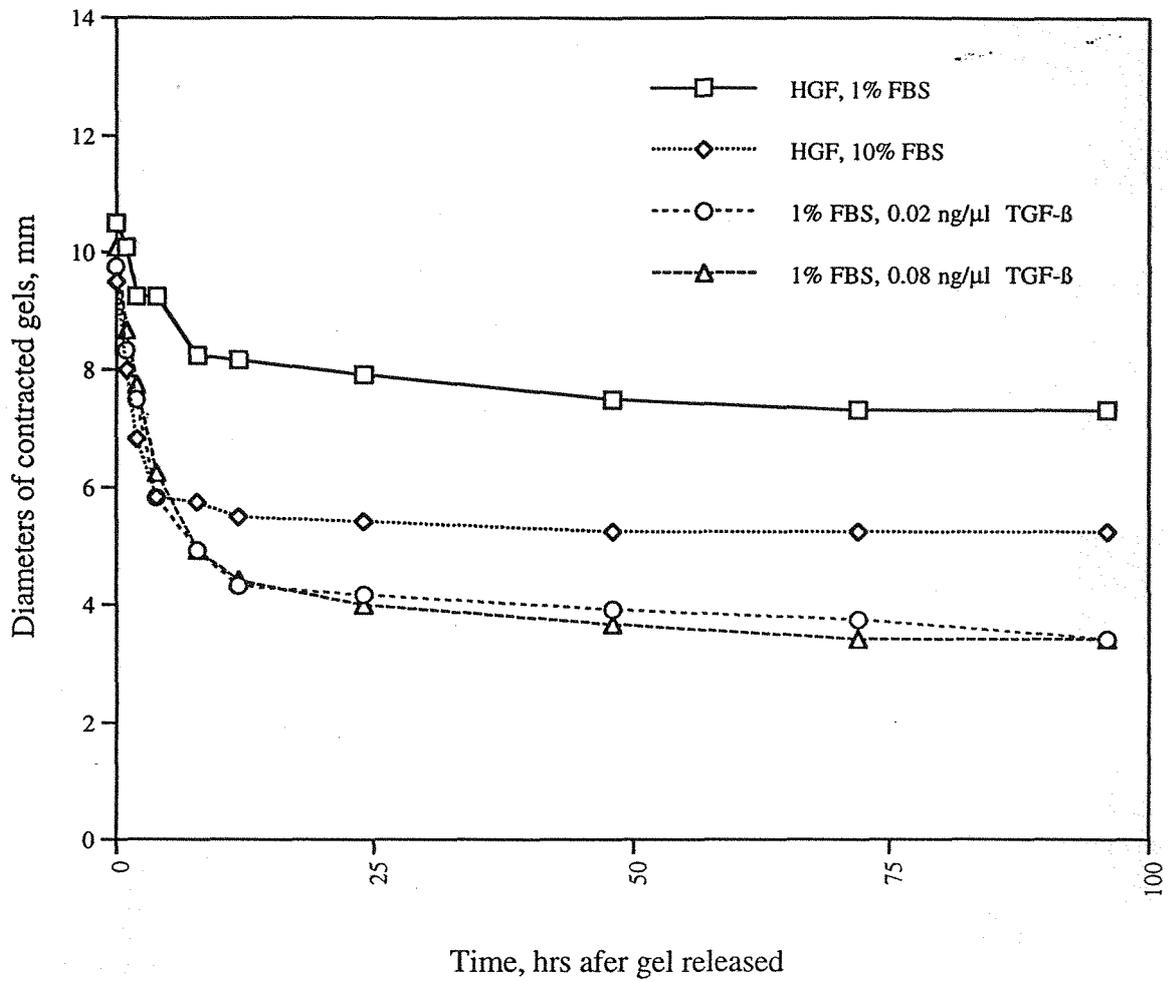


Fig.3b: FBS 及 TGF-β1 對齒齦細胞膠原收縮的效果

以圖 3a 所述之四種不同培養液作用於齒齦細胞膠原，可見 TGF-β1 增加正常細胞膠原之收縮速率及收縮量。

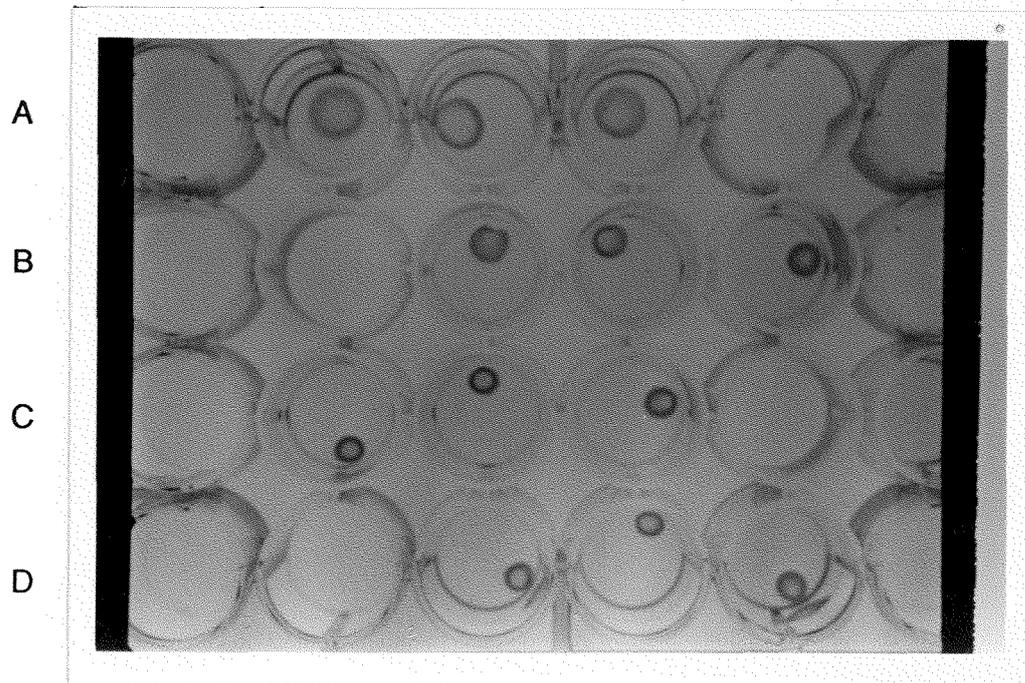


Fig.4a:OSF 細胞膠原收縮後 220 小時

A.0% FBS

B.1% FBS

C.10% FBS

D.0.02 ng/ μ L TGF- β 1

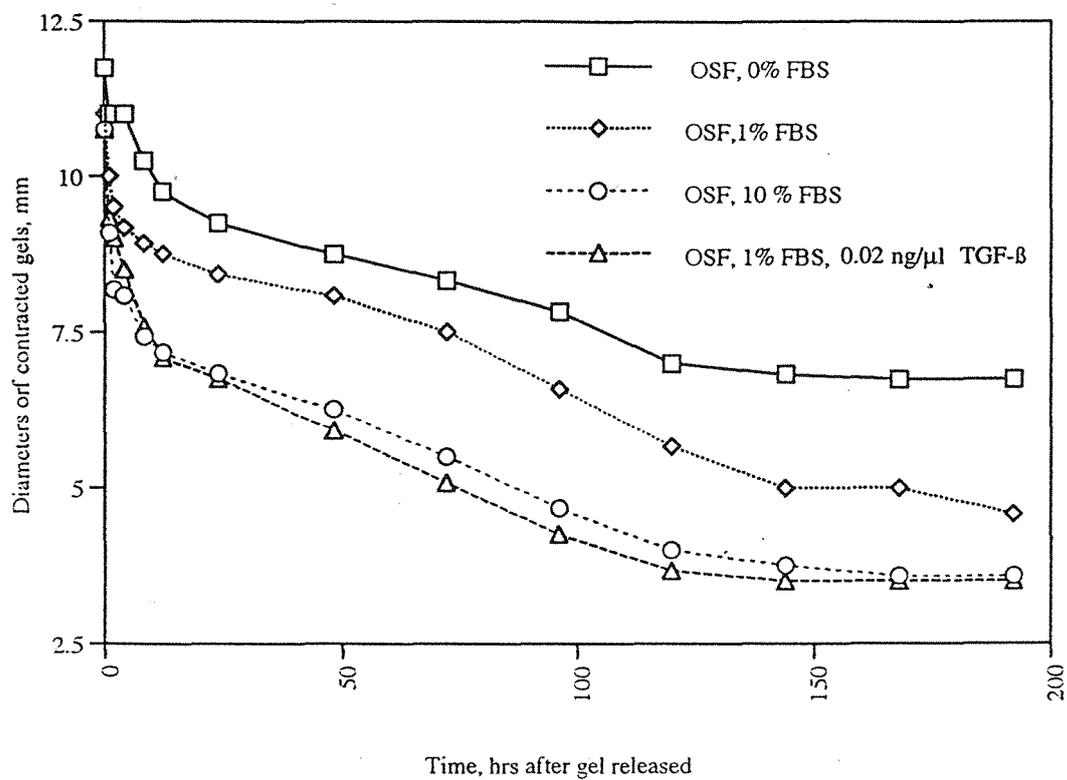


Fig.4b: FBS 及 TGF-β1 對 OSF 膠原收縮的效果

以圖 4a 中之不同培養液作用於 OSF 膠原，顯示 OSF 細胞對 TGF-β1 之反應並不敏感。

四、Arecoline的影響

Arecoline 對 OSF 細胞之生長速率並無任何明顯之促進效應。如圖5a (Fig.5a) 所示，高濃度之 arecoline 反而有抑制細胞生長或細胞毒性的作用。至於在膠原收縮方面， $10\ \mu\text{g/mL}$ 以下不影響最終收縮量。然而高濃度之 arecoline 卻明顯的具細胞毒性，幾乎在24小時後，即可完全抑制膠原收縮，見圖5b (Fig.5b)。圖6 (Fig.6) 中可發現於 $100\ \mu\text{g/mL}$ 下其引起細胞核斷裂 (Fragmentation) 之情況。

至於皮膚細胞，則 arecoline 可增加其生長速率。但當濃度高達 $100\ \mu\text{g/mL}$ 時，其生長速率卻與10% FBS 培養者相近。附圖7a (Fig.7a)。膠原收縮的表現則如 OSF 細胞般， $10\ \mu\text{g/mL}$ 以上之 arecoline 對其反而有抑制作用。附圖7b (Fig.7b)。

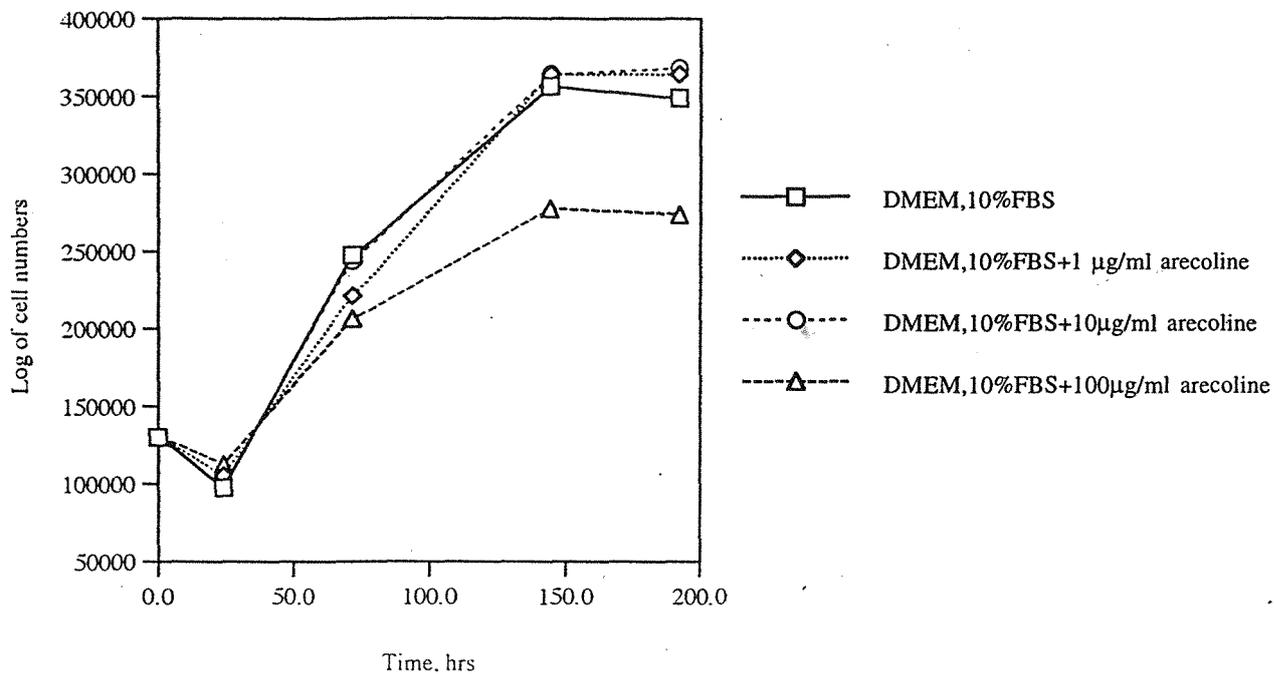


Fig.5a: Arecoline 對 OSF 細胞生長曲線的影響

以 arecoline 每天處理 2 小時。記錄開始給藥後 192 小時之細胞生長曲線。約在 72 小時之後即可看出 100µg/mL arecoline 對 OSF 細胞的抑制傾向。

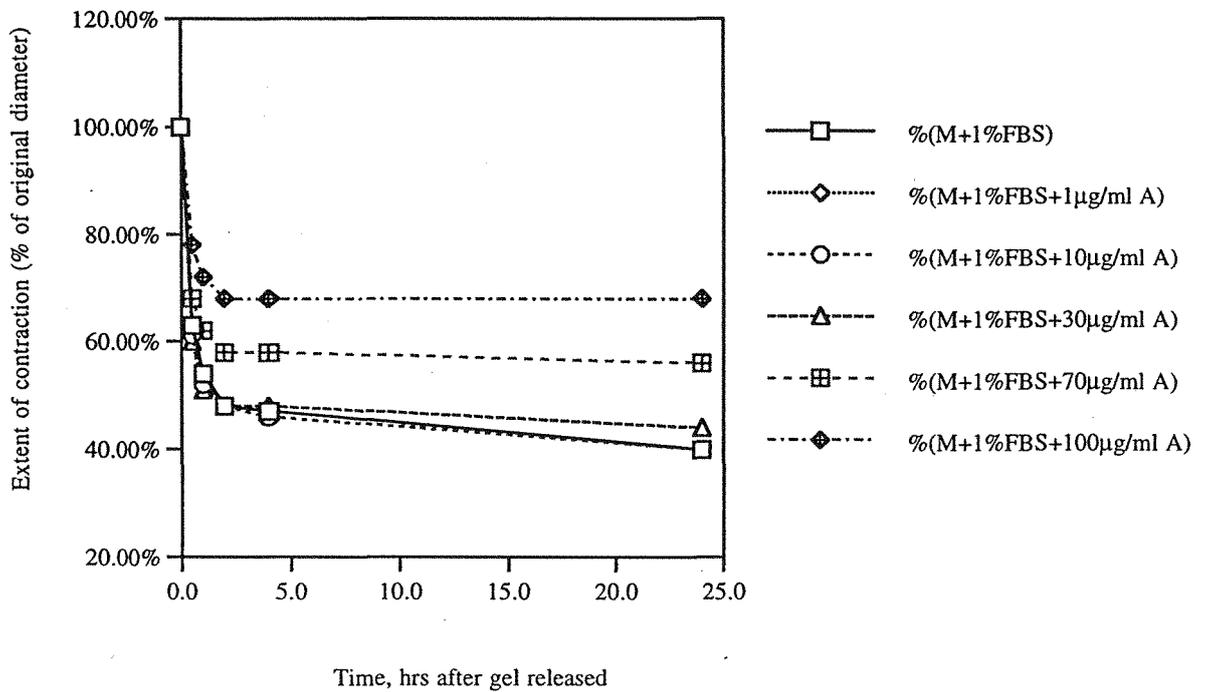


Fig.5b: Arecoline 對 OSF 膠原收縮的影響

以不同濃度之 arecoline 作用於 OSF 膠原。記錄過程中不換培養液。每種細胞於不同給藥濃度皆有 2 個樣本，求其平均以爲當時點膠原收縮直徑。以取樣時點爲橫軸，縱軸則爲該時點膠原直徑與零時點膠原直徑之百分比值。由圖中可看出，arecoline 於 10μg/mL 以上即對 OSF 膠原收縮產生抑制。

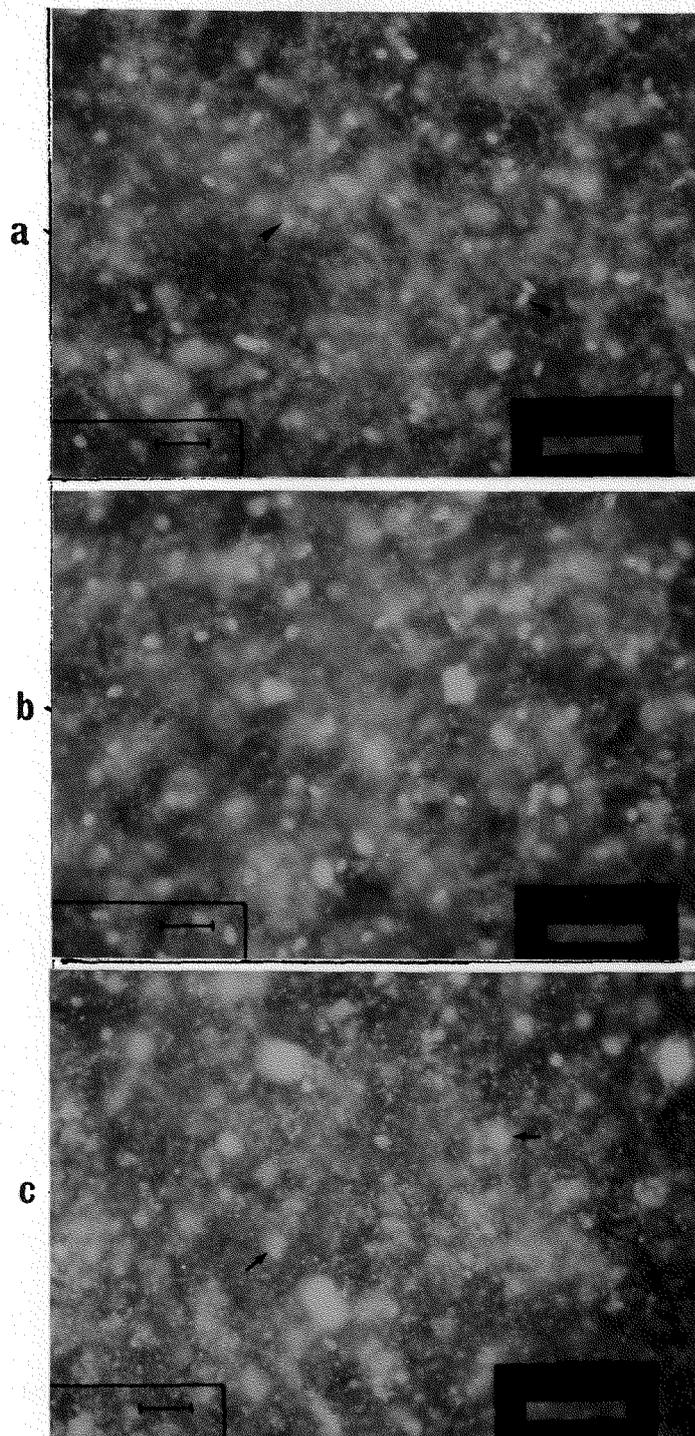


Fig.6: Arecoline 對細胞核的影響

以 Fig.5b 中不同濃度之 arecoline 作用於 OSF 膠原。收縮 192 小時之後以 acridine orange 作細胞核染色，然後以波長 488nm 之濾光鏡觀察，藉此比較不同濃度 arecoline 對細胞核的影響。

a. $0\mu\text{g}/\text{mL}$. “ \blacktriangleright ” 處可見細胞核明亮且圓，具極性。

b. $10\mu\text{g}/\text{mL}$

c. $100\mu\text{g}/\text{mL}$. “ \rightarrow ” 處可見細胞核斷裂之情況。

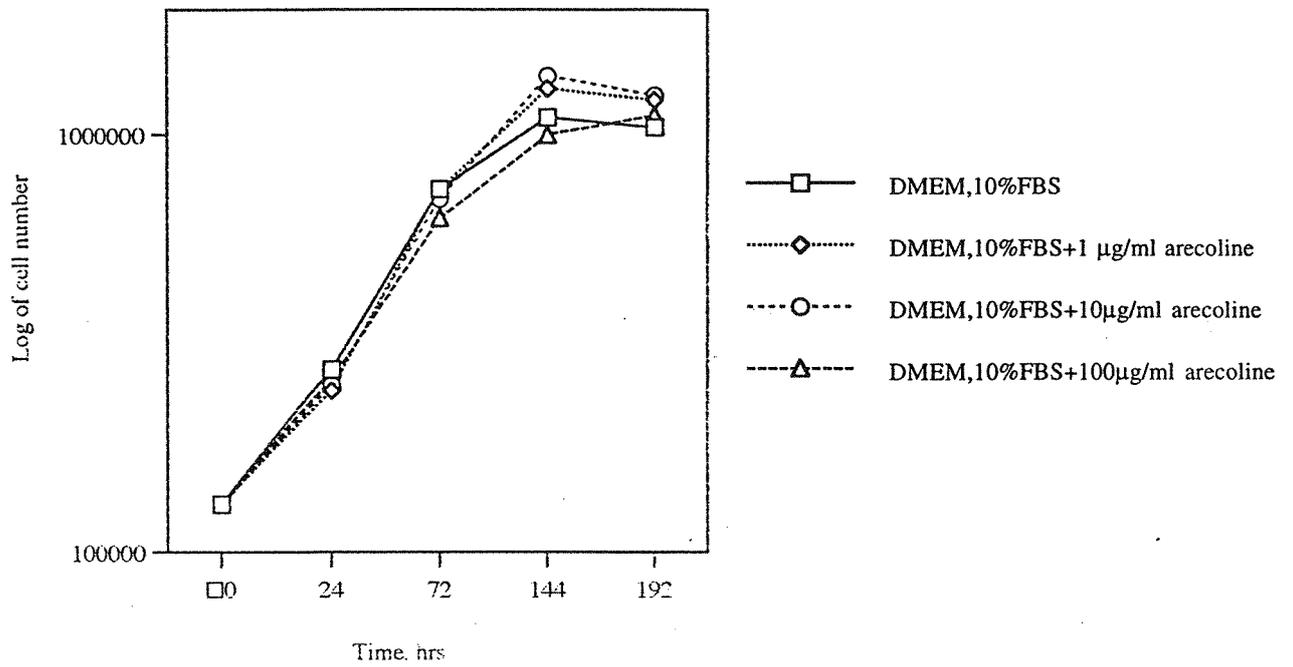


Fig.7a: Arecoline 對皮膚細胞生長速率的影響

於 144 小時，可見 10µg/mL 及 100µg/mL 之 arecoline 對皮膚細胞有促進其生長的作用。

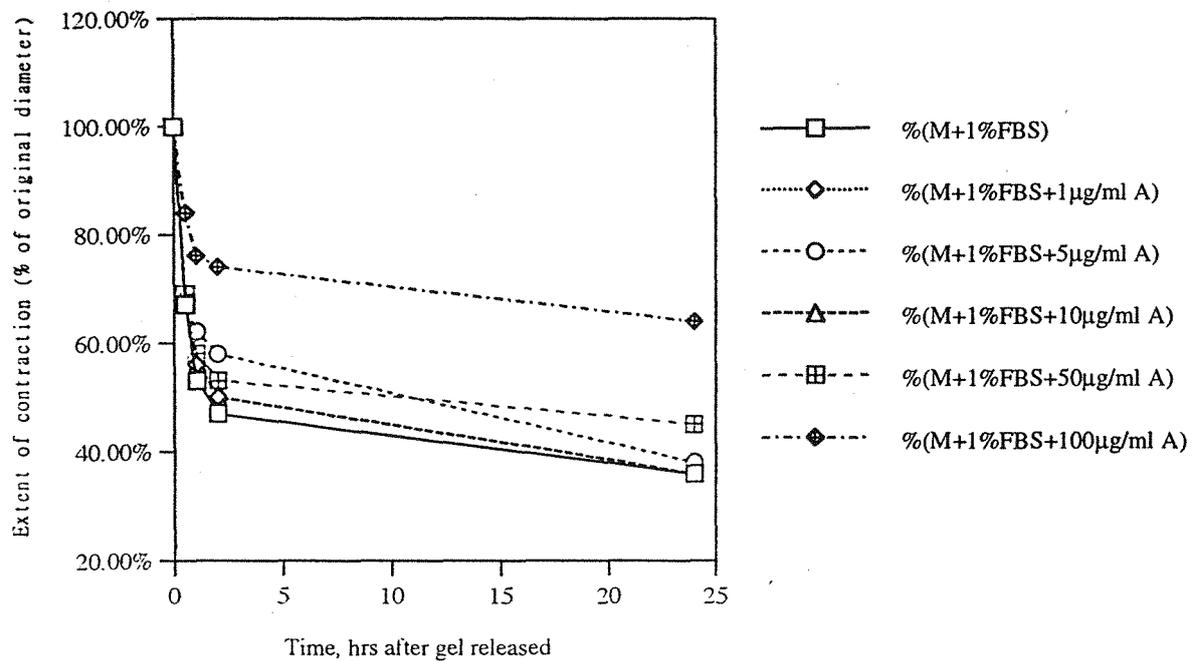


Fig.7b: Arecoline 對皮膚細胞膠原收縮的影響

10μg/mL 以上之 arecoline 對皮膚細胞膠原即有抑制其收縮之作用。

五、免疫螢光染色

1. α -Sm actin 於3組細胞未見有明顯之相異處，附圖8 (Fig.8)。至於 β -actin、phalloidin、vimentin、tubulin 以及 myosin (Sm) 等亦未發現有任何差異，附圖9、10 (Fig.9、10)。
2. 最終收縮直徑較小之膠原，與其他較大之膠原相比較時，發現前者具 α -Sm actin 表現之細胞比例較多，附圖11 (Fig.11)。
3. 附圖12-17 (Fig.12-17) 為 OSF 與齒齦組織切片之染色結果。此兩組於 β -actin 之表現上並無不同。然而於 α -Sm actin、cytokeratin、laminin、type IV collagen 等各項染色上則可觀察出：此類 cytoskeleton 與 ECM 蛋白於 OSF 結締組織中之表現量較齒齦結締組織為豐。

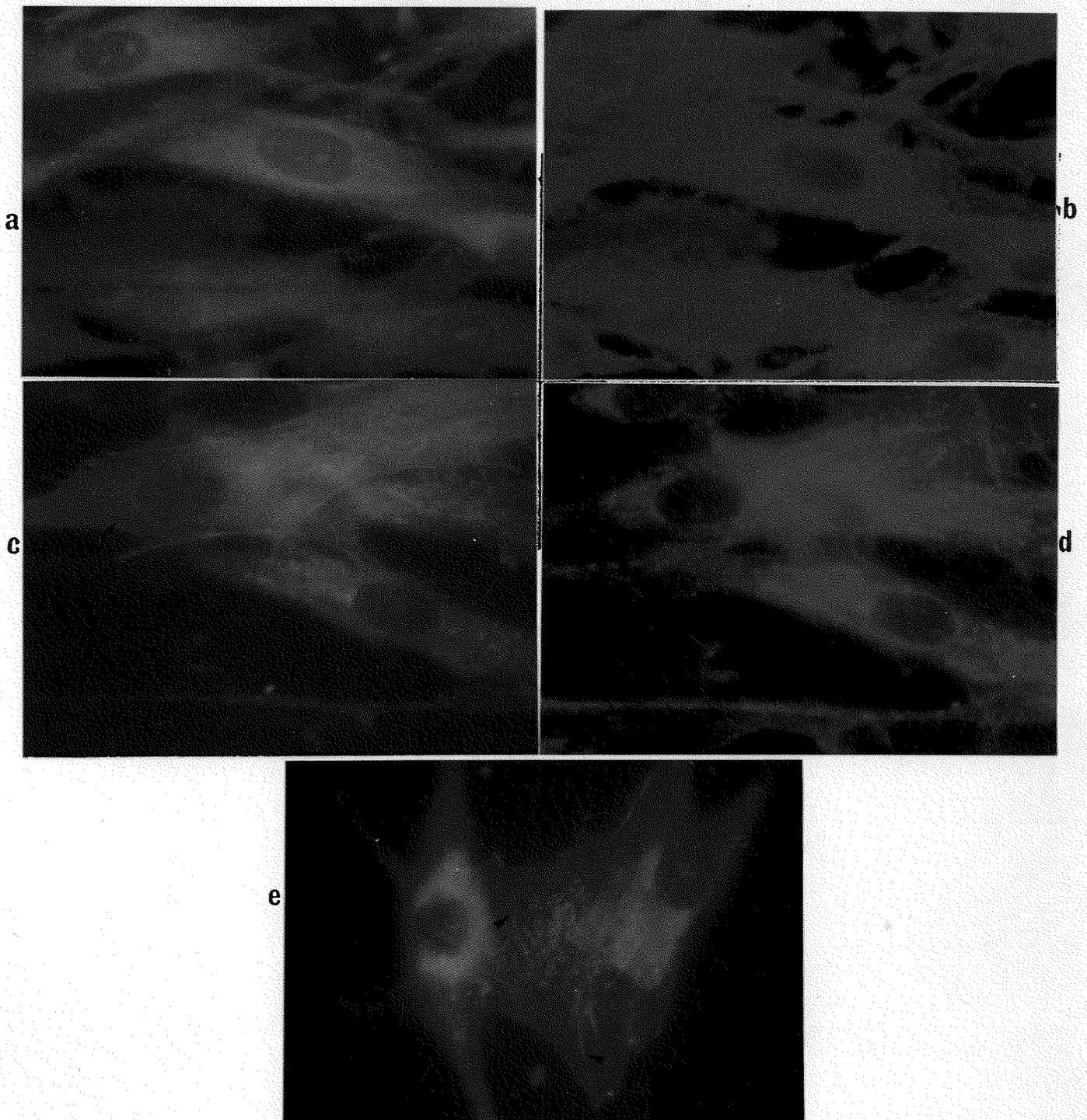


Fig.8: α -smooth muscle actin 於不同纖維母細胞中之表現

- a. 齒齦細胞. b 為 a 之 TRITC 對照染色。
 c. 皮膚細胞. d 為 c 之 TRITC 對照染色。 “ \rightarrow ”所指細胞可見束狀條紋，然其背景細胞則反應微弱。
 e. OSF 細胞。 “ \blacktriangleright ”所指處可見些微束狀構造形成。

此三種細胞皆可見到 α -smooth muscle actin 之表現，然而卻不一定表現出活動狀態之絲狀 (filament type) actin。放大倍數為 1000x，ASA 400。

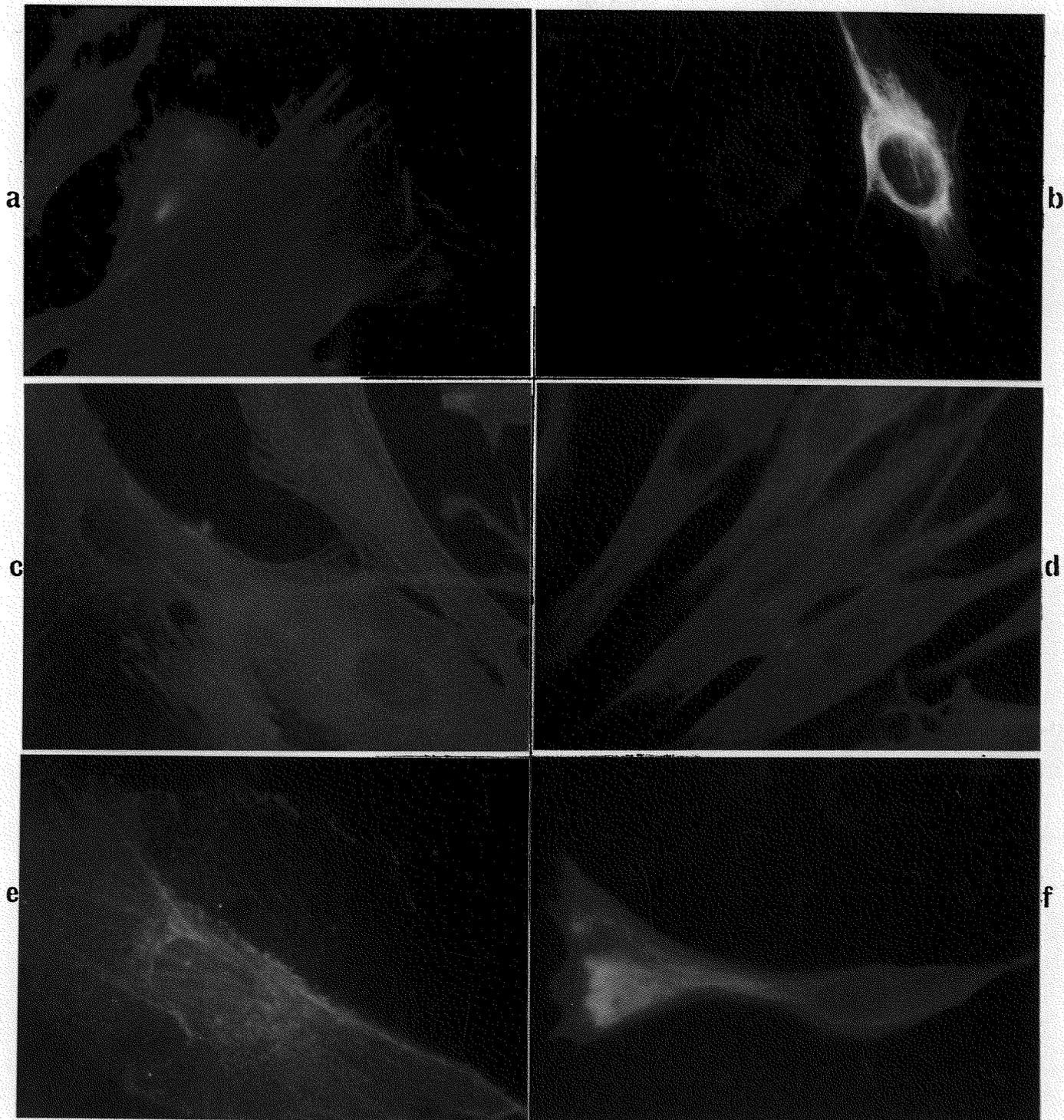


Fig.9: β -actin , vimentin 於不同纖維母細胞中之表現

a. 齒齦細胞. β -actin b. 齒齦細胞. vimentin

c. 皮膚細胞. β -actin d. 皮膚細胞. vimentin

e. OSF 細胞. β -actin f. OSF 細胞. vimentin

以上皆可見其典型束狀結構。

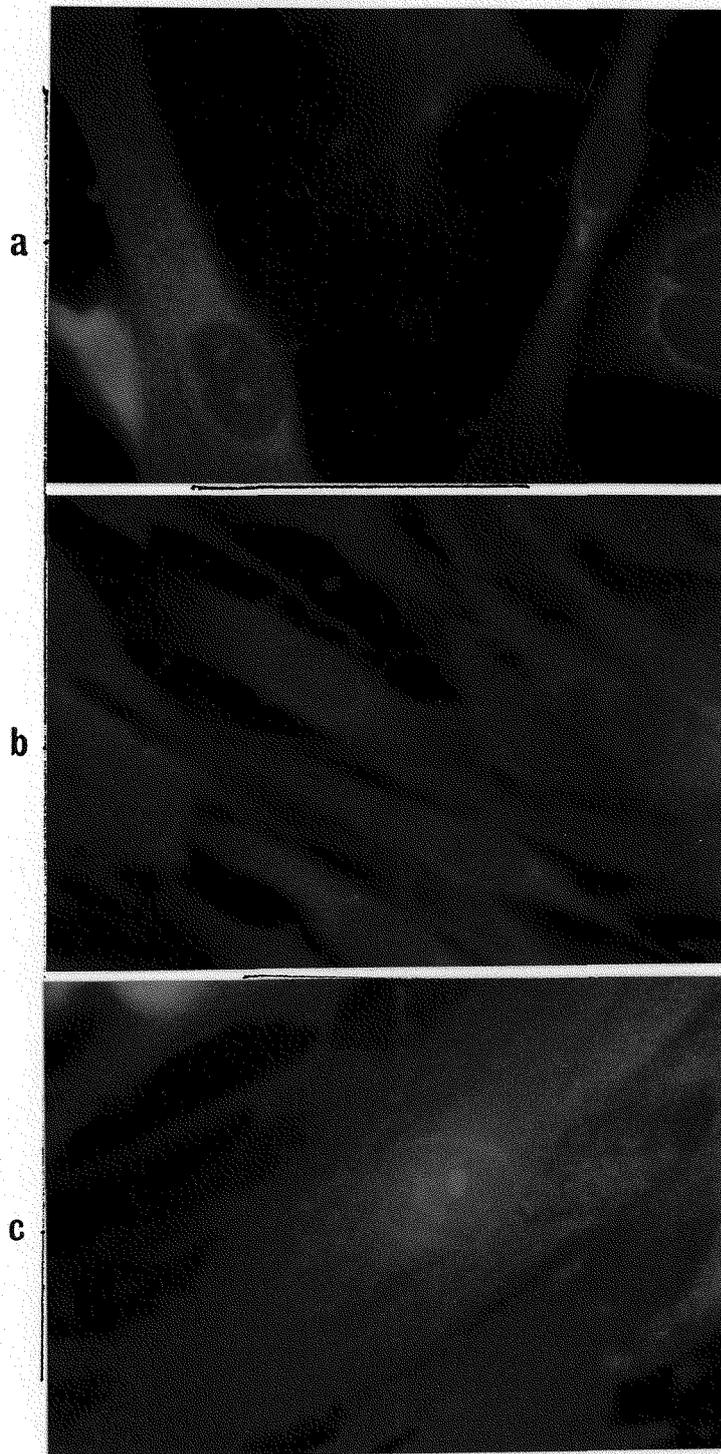


Fig.10: myosin 於不同纖維母細胞中之表現

a. 齒齦細胞. myosin

b. 皮膚細胞. myosin

c. OSF 細胞. myosin

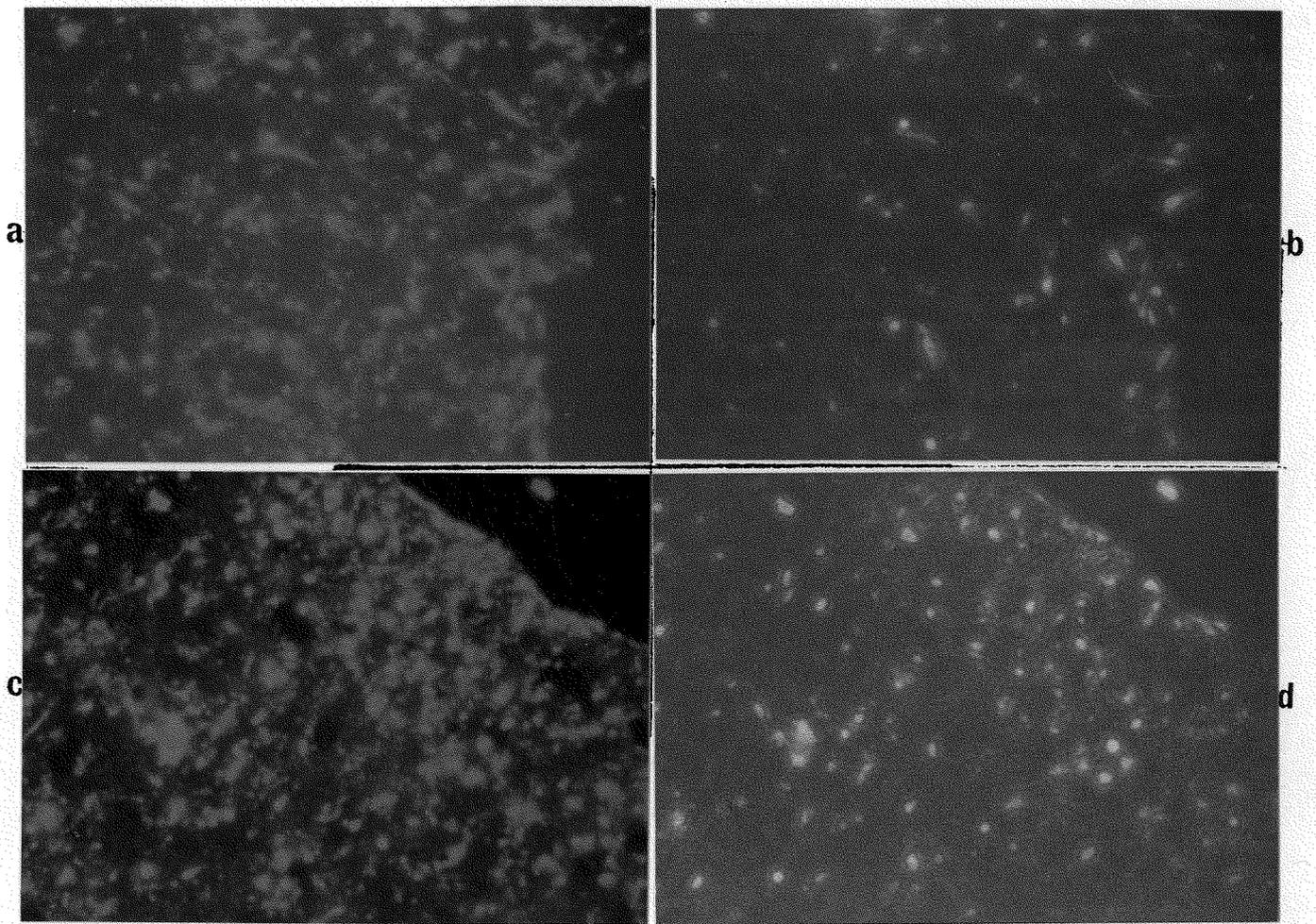


Fig.11: 收縮膠原中 α -smooth muscle actin 的表現

收縮 48 小時之齒齦細胞膠原。(100x)

a.b.分別為 10% FBS 處理之同一膠原切片(最終收縮直徑為 5mm), 其於 TRITC 與 FITC 染色之對照圖片。

c.d.則為 0.08ng/mL TGF- β 1 處理者(最終收縮直徑為 3mm)。

結果顯示, 膠原收縮較多者, 其含 α -smooth muscle actin 之細胞比例增加。

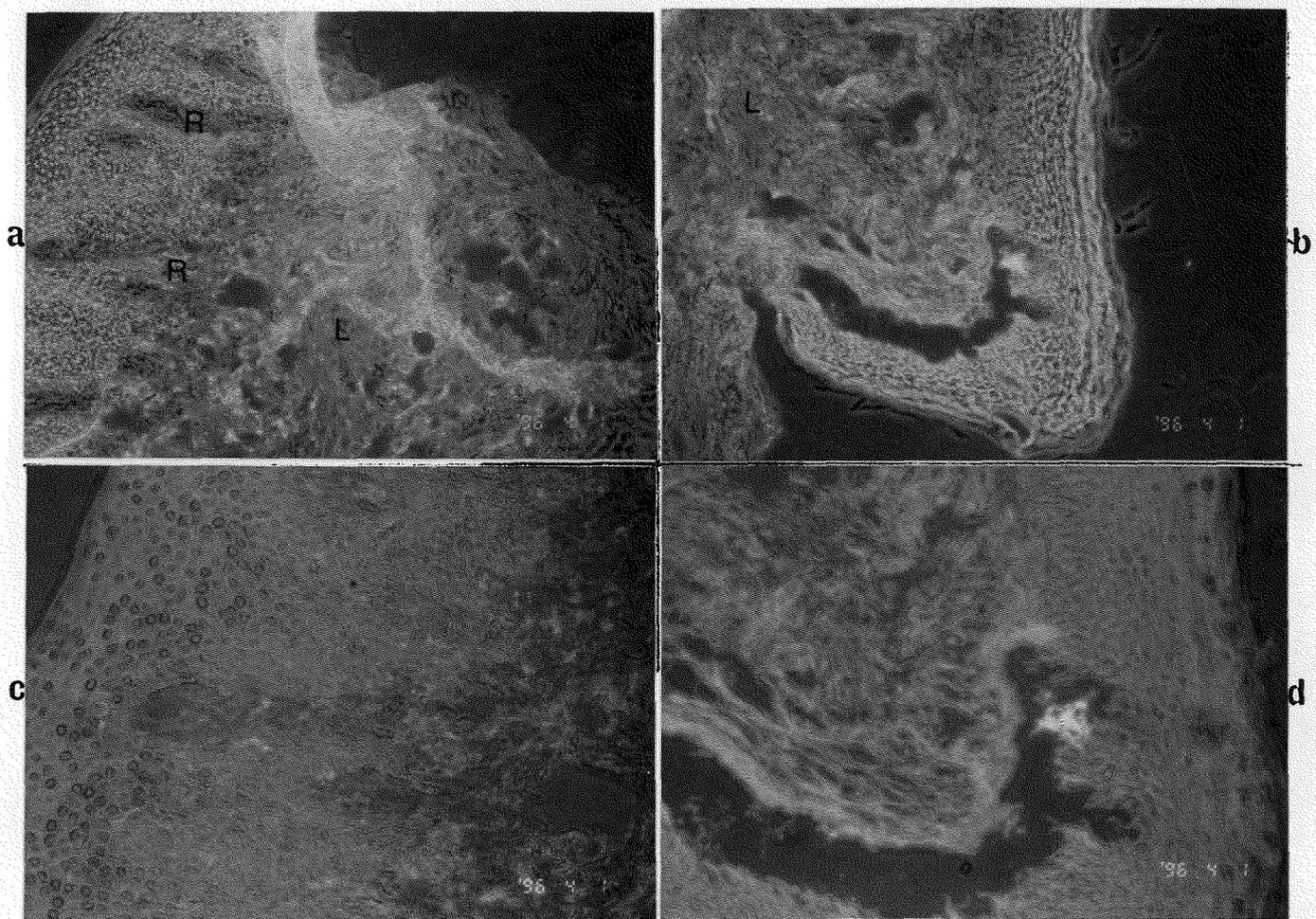


Fig.12: β - actin 在組織切片中之表現

a. 齒齦組織.100x

b. OSF.100x

c. 齒齦組織.200x

d. OSF.200x

“L”所指為 lamina propria。

“R”所指為 rete peg，而 OSF 上皮則已萎縮。

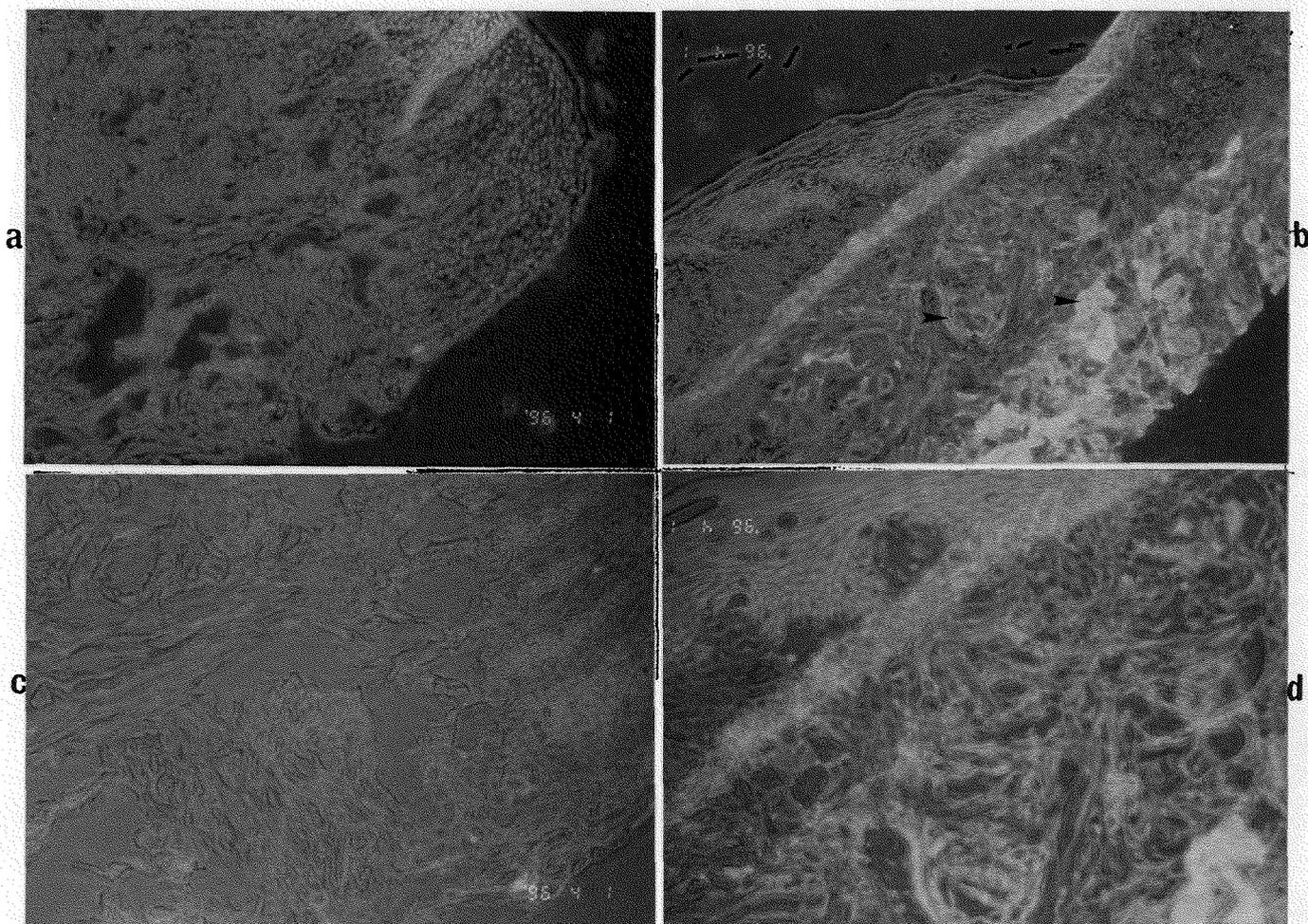


Fig.13: α -smooth muscle actin 在組織切片中之表現

a. 齒齦組織.100x

b. OSF.100x

c. 齒齦組織.200x

d. OSF.200x

“ \blacktriangleright ”處顯示 α -smooth muscle actin 抗體於 OSF 結締組織細胞中有較多,較強烈的反應。

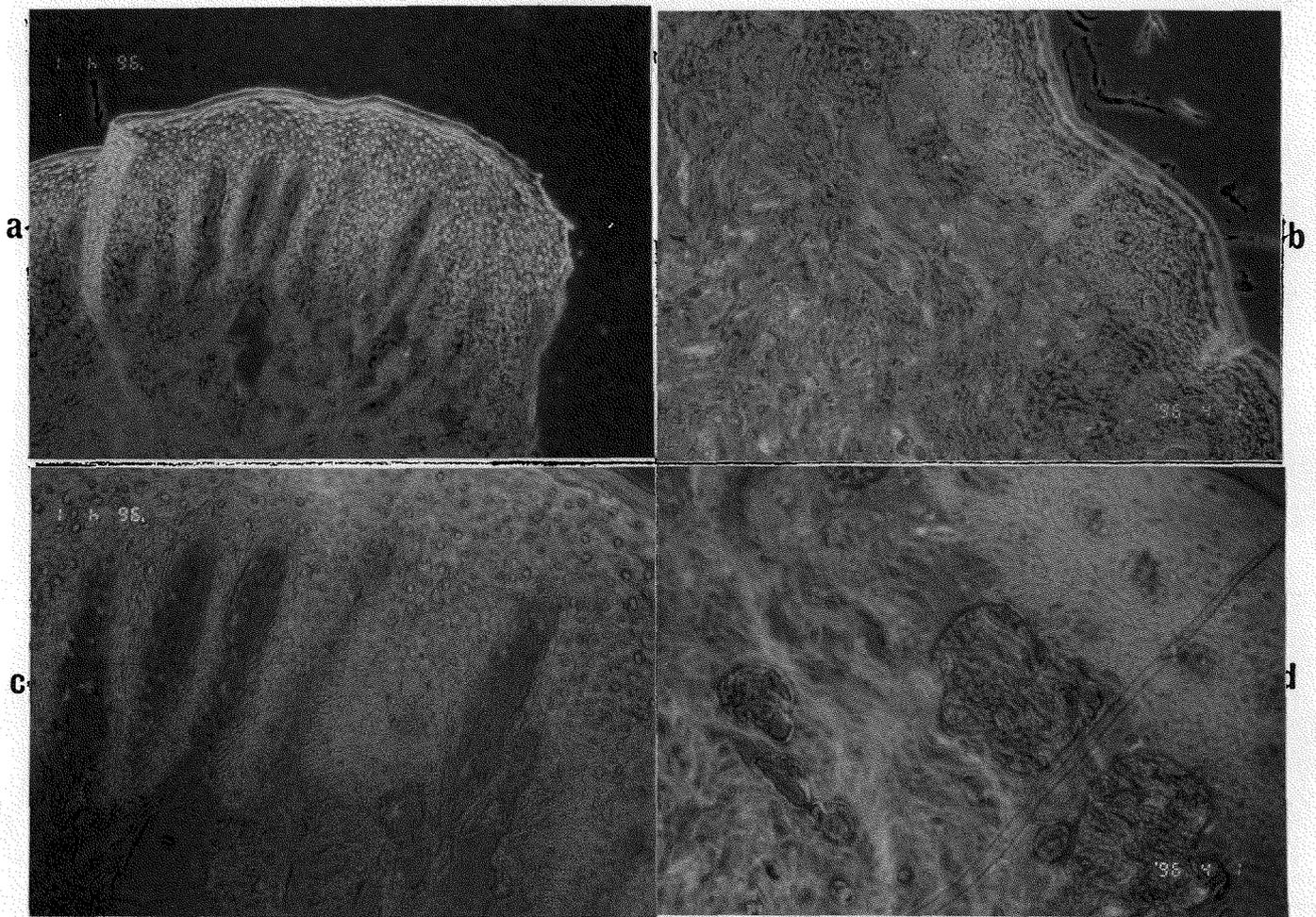


Fig.14: keratin 在組織切片中之表現

a-d 為 AE1 之染色結果。(AE1: antibody specific to cytokeratin in epithelial cells)

a. 齒齦組織.100x

b. OSF,100x

c. 齒齦組織.200x

d. OSF,200x

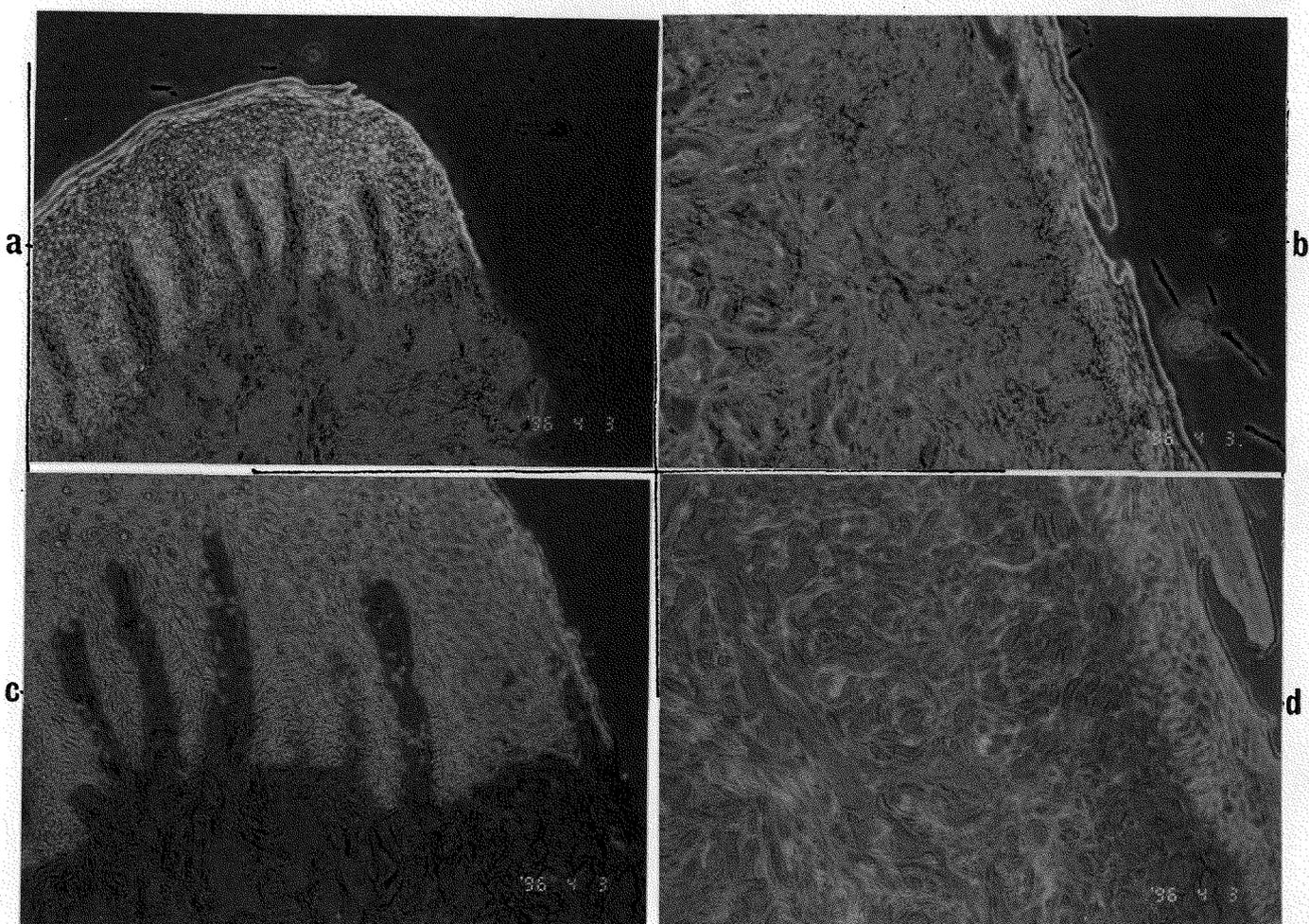


Fig.15: keratin 在組織切片中之表現

a-d 為 AE3 之染色結果。(AE3: antibody specific to cytokeratin in epithelial cells)

- a. 齒齦組織.100x
- b. OSF,100x
- c. 齒齦組織.200x
- d. OSF,200x

齒齦組織之上皮層有極為鮮明之 keratin 抗體反應。OSF 之上皮反應較弱，然而其結締組織中之細胞卻含有相當數量的 keratin。

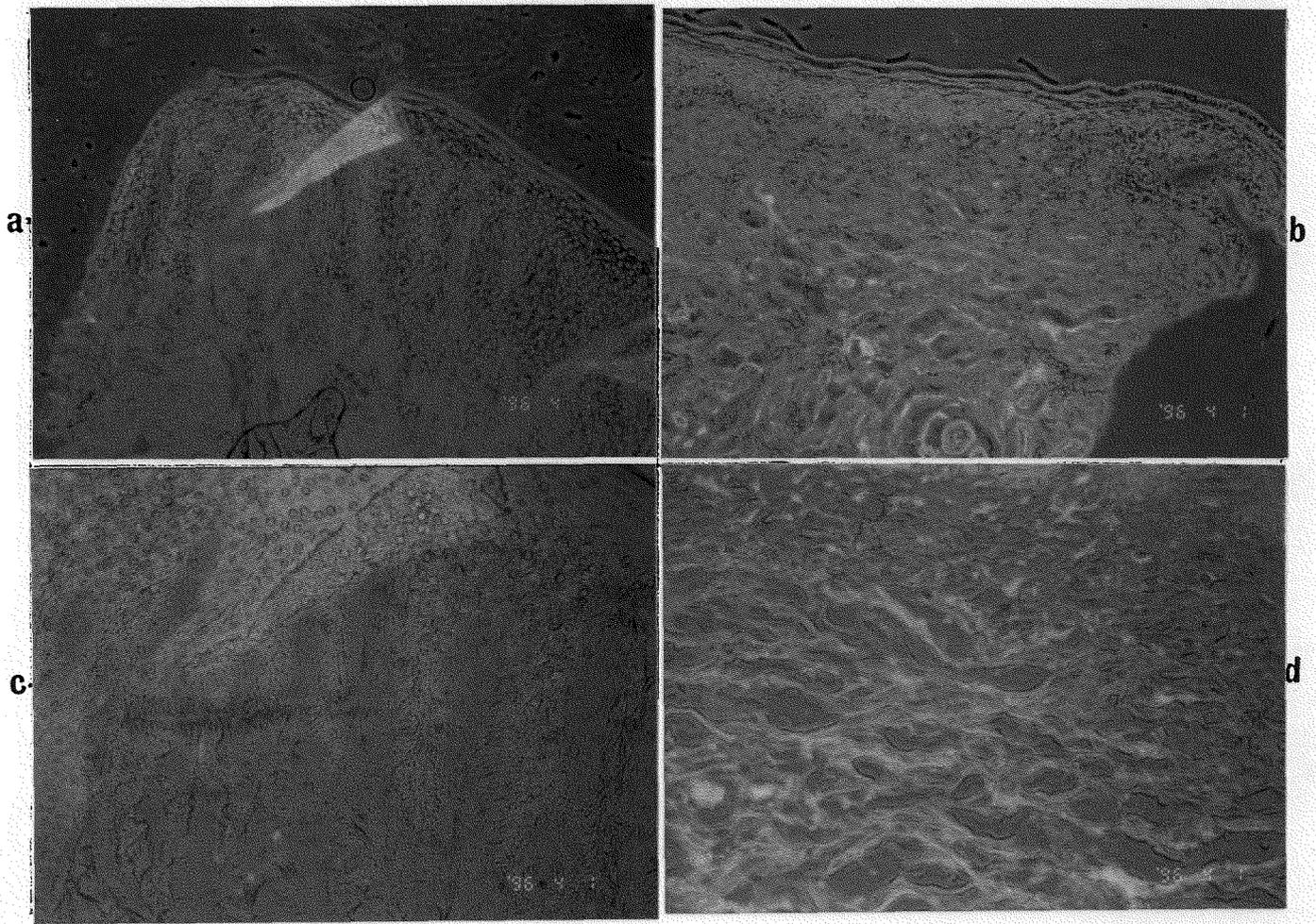


Fig.16: laminin 在組織切片中之表現

a. 齒齦組織.100x

b. OSF.100x

c. 齒齦組織.200x

d. OSF.200x

laminin 於齒齦組織幾乎僅見於上皮及基底層，然而於 OSF 結締組織卻可見到許多。

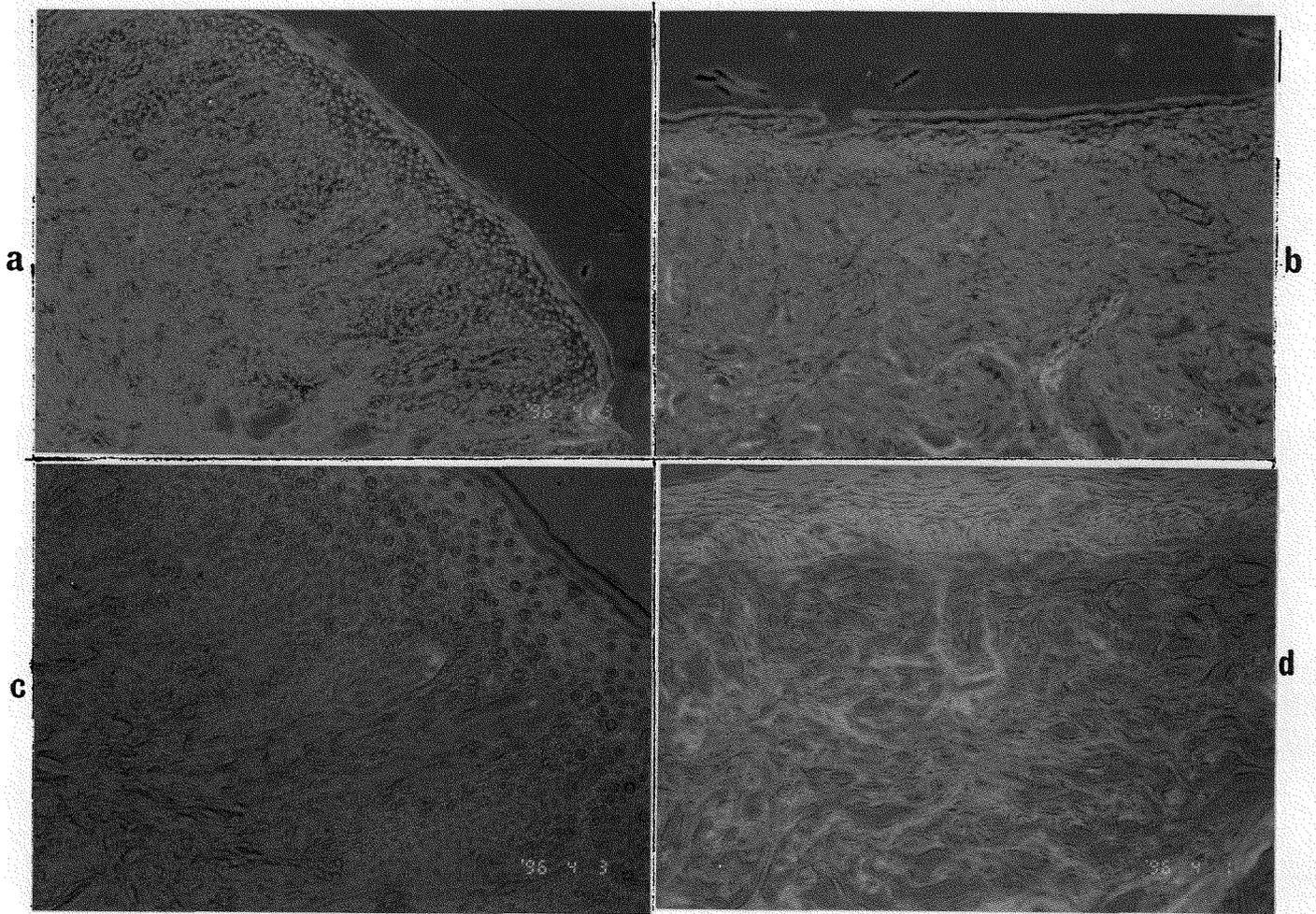


Fig.17: type IV collagen 在組織切片中之表現

a. 齒齦組織.100x

b. OSF.100x

c. 齒齦組織.200x

d. OSF.200x

六. 電泳

於此實驗中共有三種 OSF 細胞、兩種皮膚細胞，以及一種齒齦細胞之細胞株 (Cell line)，分別以 OSF-1、OSF-2、OSF-3、Foreskin-1、Foreskin-2、HGF 來表示。

比較 OSF-1、Foreskin-1及 HGF，則 OSF-1 出現一特殊蛋白，附圖18 (Fig.18)。而 OSF-3 與 OSF-2、Foreskin-2 亦有不同表現，見圖19 (Fig.19)。

結果顯示，OSF 細胞與正常細胞確存有某些不同之蛋白成份。但即使是同一種細胞，依其來源不同，其表現亦不盡相同。

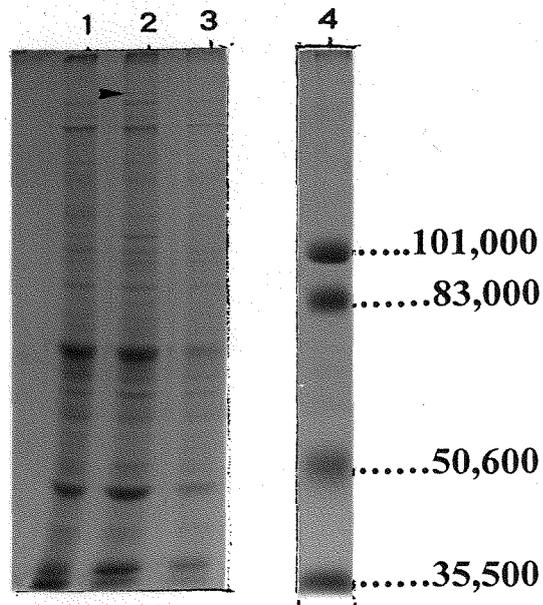


Fig.18:纖維母細胞所含蛋白成份之比較 (seperating gel: 7.5%)

1. Foreskin-1, pellet
2. OSF-1, pellet。 “▶”處可見 OSF-1 出現特殊蛋白。
3. HGF, pellet
4. Standard, 分子量標示於右。

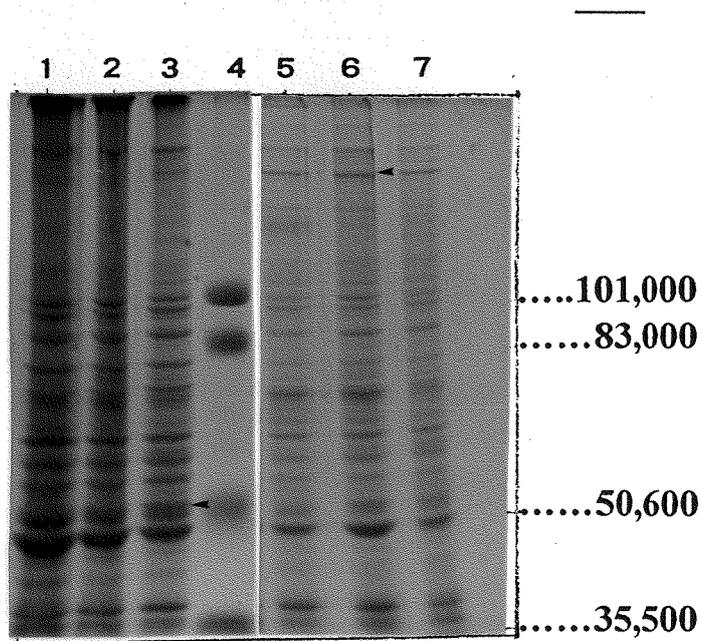


Fig.19:纖維母細胞所含蛋白成份之比較

1. Foreskin-2, soluble
2. OSF-2, soluble
3. OSF-3, soluble
4. Standard
5. Foreskin-2, pellet
6. OSF-2, pellet
7. OSF-3, pellet

“>”處顯示 OSF 與其他細胞株之不同。

捌. 討論：

本實驗發現，OSF 纖維母細胞之生長較正常細胞緩慢。然而根據馬、謝的報告，OSF 細胞似乎具有較優越之生長能力（70）；而國外諸如 Meghji、van Wyk 等均指出，OSF 細胞與正常細胞之生長能力並無軒輊。此種差異或許乃是因其樣本來源、細胞病程、分化程度之不同所造成。另有研究發現，myofibroblast 之生長較正常細胞為緩（20）。

即使 OSF 細胞未具生長優勢，本研究卻發現其於膠原收縮上表現穩定且持續之收縮能力。此種現象，或許可解釋為何停止刺激來源仍無法改善 OSF 之原因（71）。而隨著血清濃度之增加其收縮能力亦增，顯示血清中含有某些因子可影響膠原收縮。

TGF- β 1 對正常細胞可刺激其收縮；但對 OSF 細胞則反應不明顯。推論此 OSF 細胞可能屬一種已被活化過之細胞，其於樣本採集時正處於不反應期，或亦有可能此細胞本身已經轉化，此時縱使再加入 TGF- β 1，亦不能增加 OSF 細胞之反應。類似之推論報告曾見於硬皮症之研究（72、73）。至於正常細胞膠原收縮不因 TGF- β 1 劑量而改變者，可證明即使在極低的 TGF- β 1 濃度下，細胞亦已呈現受器飽和狀態（Receptor saturation）。

本實驗發現 arecoline 對 OSF 細胞之生長速率並無影響，於高濃度反而有抑制細胞之作用；此結果與 van Wyk 等人吻合。然而 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下之 arecoline 對正常細胞卻有促進生長之作用。而其濃度達到 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，則不見有抑制細胞生長之現象。此結果顯示 OSF 細胞對 arecoline 之反應亦已降低。至於膠原收縮方面，則 OSF 與正常細胞皆不受 arecoline 之影響。濃度超過 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上反而可抑制基質收縮，且呈現劑量依存性之關係。

由此觀之，arecoline 之作用，可能為直接刺激正常纖維母細胞生長，或是可促進膠原增生。然而生物體內之機轉極為複雜。Arecoline 於生體內之真正作用，或許可刺激血球細胞，藉其產生之 cytokine 而間接作用於 fibroblast 上。而纖維化的發生，應屬一種長期的、反覆的、累積的，並且經過多種因素協同作用之結果。故 arecoline、TGF- β 和纖維母細胞活動之間的關聯，尚須其它進一步之實驗闡明。

α -Smooth muscle actin 於正常或病態細胞中皆會因時因地而表現。特別於平面培養之狀況下， α -Smooth muscle actin 可能多呈球狀型，故未必可觀察到其束狀結構。Foo 等曾經提出以 F/G 比例來評估 myofibroblast 之方法

(74)。惟於膠原中之反應，卻可印證 α -smooth muscle actin 與收縮之相關性。至於本實驗中 myosin (Sm) 染色結

果與 Eddy 等所報告者不同，則不排除所用 myosin 之純度差異效應。

組織切片之觀察中，OSF 表現有較多含 α -smooth muscle actin 之細胞，其它細胞支架結構及 ECM 蛋白之表現亦不相同。Keratin 爲一種 intermediate filament，主要爲上皮細胞所特有（75）；Type IV collagen、laminin 則爲上皮基底層與肌肉基底的組成蛋白（76）。然而於 OSF，其表現則較繁且多分佈於結締組織中。ECM 扮演著細胞之間的溝通角色（77）。除維持組織架構及細胞極性外，對細胞移動、型態分化、傷口癒合及基因表現均屬不可或缺（78、79）。OSF 乃是一種病徵，因而具有異常之 ECM 表現。其它如上皮萎縮等現象亦早有報告（1），此等均屬癌前病灶之表徵。

根據電泳結果顯示，OSF 細胞存有特殊蛋白。然而究竟是哪些蛋白可爲 OSF 之分化表徵，則有待進一步研究。

玖. 結論：

由上實驗可得以下結論：

1. OSF 細胞株於生長上並不佔優勢，然其已發展成特有之膠原收縮型態。而於體內，OSF 之 cytoskeleton 及 ECM 蛋白表現皆較強。
2. Arecoline 刺激正常纖維母細胞之生長。其亦可能增加膠原蛋白之合成。
3. TGF- β 增加正常纖維母細胞之膠原收縮能力。
4. Arecoline、TGF- β 與纖維母細胞之關係，尚待進一步研究。

拾. 參考文獻：

1. Pindborg JJ and Sirsat SM. Oral submucous fibrosis. *Oral Surg* 1966; 2:764.
2. Pillai R, Balaram P and Reddiar KS. Pathogenesis of oral submucous fibrosis. *Cancer* 1992; 69:8:2011-20.
3. Pindborg JJ. Oral cancer and precancer. Bristol: John Wright. 1980; 107-13.
4. Murti PR, Bhonsle RB, Pindborg JJ, Daftary DK, Gupta PC and Mehta FS. Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dent Oral Epidemiol* 1985; 13:340-1.
5. Reichart PA, Mohr U, Srisuwan S, Geerlings H, Theetranont C and Kang-wanpong. Precancerous and other oral mucosal lesions related to chewing, smoking and drinking habits in Thailand. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15:152-60.
6. Sinor PN, Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB, Daftary DK, Mehta FS and Pindborg JJ. A case-control study of oral submucous fibrosis with special reference to the etiologic role of areca nut. *J Oral Pathol* 1990; 19:94-8.
7. Pindborg JJ, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK and Mehta FS. Oral submucous fibrosis as a precancerous condition. *Scand J Dent Res* 1984; 92:224.
8. Bhonsle RB, Murti PR, Daftary DK, Gupta PC, Mehta FC, Sinor PN,

- Irani PR and Pindborg JJ. Regional variations in oral submucous fibrosis in India. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15:225-9.
9. Canniff JP and Harvey W. The etiology of oral submucous fibrosis: the stimulation of collagen synthesis by extracts of areca nut. *Int J Oral Surg* 1981; 10:Suppl 1:163-7.
10. Canniff JP, Harvey W and Harris M. Oral submucous fibrosis: I. Its pathogenesis and management. *Br Dent J* 1986; 160:429-34.
11. IARC. Betel quid and areca-nut chewing. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Monographas. 1986; 37:141-291.
12. Kwan HW. A statistical study on oral carcinomas in Taiwan with emphasis on the relationship with betel nut chewing: a preliminary report. *J Formosan Med Assoc* 1976; 75:497-505.
13. Ko YC, Chiang TA, Chang ST and Hsieh SF. Prevalence of betel quid chewing habit in Taiwan and related sociodemographic factors. *J Oral Pathol Med* 1992; 21:261-4.
14. Lai DR, Chen HR, Lin LM and Huang YL. Dimethyl sulphoxide extract of betel quid inducement of oral submucous fibrosis on the buccal mucosa of Wistar rats. *Proceeding of The 1st Asia-Pacific Workshop for Oral Mucosal Lesions*. 1992; Abs 28, Nagoya, Japan.
15. Kovacs EJ and Dipietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB* 1994; 8:854-61.
16. Davidson JM. Wound repair. In: Gallin JI, Goldstein IM,

- Synderman R, eds. Inflammation: basic principles and clinical correlates, 2nd ed. New York: Reven Press. 1992; 809-19.
17. Eddy RJ, Petro JA and Tomasek JJ. Evidence for the nonmuscle nature of the "myofibroblast" of granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 1988; 130:2:252-60.
 18. Gabbiani G, Ryon GB and Majno G. Prescence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27:549.
 19. Rungger-Brandle E and Gabbiani G. The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathologic processes. *Am J Pathol* 1983; 110:359-92.
 20. Van de Berg JS, Rudolph R, Poolman WL and Disharoon DR. Comparative growth dynamics and actin concentration between cultured human myofibroblast from granulating wounds and dermal fibroblasts from normal skin. *Lab Invest* 1989; 61:532-538.
 21. Oda D, Gown AM, Van de Berg JS and Stern R. The fibroblast-like nature of myofibroblasts. *Exp Mol Pathol* 1988; 49:316-29.
 22. Darby I, Skalli O and Gabbiani G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63:21-9.
 23. Desmouliere A, Rubbia-Brandt L, Abdiu A, Walz T, Macieira-Coelho A and Gabbiani G. α -Smooth muscle actin is expressed

- in a subpopulation of cultured and cloned fibroblasts and is modulated by γ interferon. *Exp Cell Res* 1992a; 201:64-73
24. Jahoda CAB, Reynolds, Chaponnier C, Forester JC and Gabbiani G. Smooth muscle α -actin is a marker for hair follicle dermis in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991; 99:627-36.
25. Bell E, Ivarsson B and Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc natn Acad Sci U.S.A.* 1979; 76:1274-8.
26. Stopak D and Harris AK. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. *Devl Biol* 1982; 383-98.
27. Mehji S, Scutt A, Harvey W and Canniff JP. An in-vitro comparison of human fibroblasts from normal and oral submucous fibrosis tissue. *Archs Oral Biol* 1987; 32:3:213-5.
28. Van Wyk CW, Oliverier A, Hoal-Van Helden EG and Grobler-Rabio AF. Growth of oral and skin fibroblasts from patients with oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:349-53.
29. Seedat HA and van Wyk CW. Betel nut chewing and submucous fibrosis (SF) in Durban, South Africa. *SA Med J* 1988; 74:11: 568-71.
30. Maher R, Lee AJ, Warnakulasuriya KAAS, Lewis JA and Johnson NW. Role of areca nut in the causation of oral submucous fibrosis: a case-control study in Pakistan. *J Oral Pathol Med* 1994; 23:65-69.

31. Su IP. Idiopathic scleroderma of the mouth. Arch Otolaryngol 1954; 59:330-2.
32. Shiau YY and Kwan HW. Submucous fibrosis in Taiwan. Oral Surg 1979; 47(5):453-457.
33. Joshi SG. Submucous fibrosis of palate and pillars. Indian J Otolaryngol 1953; 4:1-4.
34. Desa JV. Submucous fibrosis of the palate and cheek. Ann Otol Rhinol Laryngol 1957; 66:1143-59.
35. Sirsat SM and Khanolkar VR. Submucous fibrosis of palate and pillars of the fauces. Indian J Med Sci 1962; 16:189-97.
36. Huang YL, Tsai CC, Lai DR, Lin LM, Lei CH and Ko YC. Betel quid chewing in the causation of oral precancerous lesions and oral cancer- A case-control study. Symposium on Betel Quid Chewing and Its Health Effect. 1993; 43-4.
37. Seedat HA and van Wyk CW. An analysis of the betel nut and dietary habits of chewers without and with submucous fibrosis (SF) and with concomitant oral cancer. SA Med J 1988; 74: 572-5.
38. Harvey W, Scutt A, Maghji S and Canniff JP. Stimulation of human buccal mucosa fibroblasts in vitro by betel nut extracts. Arch Oral Biol 1986; 31:45-9.
39. Kuttan R, Donnely PV and Di Ferrante N. Collagen treated with(+) catechin becomes resistant to the action of mammalian collagenase. Experientia 1981; 37:221-3.

40. Ma RH. In vitro comparison of the fibroblasts from normal oral mucosa and oral submucous fibrosis. (PhD dissertation), 1995.
41. Van Wyk CW, Seedat HA and Phillips VM. Collagen in submucous fibrosis: An electron-microscopic study. J Oral Pathol Med 1990; 19:182-7.
42. Reichart PA and van Wyk CW, Becker J, Schuppan D. Distribution of procollagen type III, collagen type VI and tenascin in oral submucous fibrosis (OSF). J Oral Pathol Med 1994; 23:394-8.
43. Huang IY and Shieh TY. Collagen content and types in oral submucous fibrosis. Kaohsiung J Med Sci 1989; 5:162-71.
44. Roberts WE and Chamberlain JG. Scanning electron microscopy of the cellular elements of rat periodontal ligament. Arch Oral Biol 1978; 23:587-9.
45. McCulloch CAG and Melcher AH. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. Am J Anat 1983; 167:43-8.
46. Bordin S, Page PC and Narayanan AS. Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: Isolation and characterization of one phenotype. Science 1984; 223:171-3.
47. Bordin S and Page PC. Role of platelet factors and serum complement in growth of fibroblasts with high affinity clq complement receptors. In vitro 1988; 24:719-26.
48. McCulloch CAG and Bordin S. Role of fibroblast subpopulations

- in periodontal physiology and pathology. J periodont Res 1991; 26:144-54.
49. Suppino AP, Schnuh W and Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: Expression of cytoskeletal proteins as a marker of phenotypic modulations. Lab Invest 1990; 63:144-61.
50. Herman IM. Actin isoforms. Curr Opin Cell Biol 1993; 5:48-55.
51. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM and Assoian RK. Transforming growth factor- β : Biological function and chemical structure. Science 1986;
52. Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK and Massagué J. Distinct transforming growth factor- β (TGF- β) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- β . J Biol Chem 1990; 265:20533-38.
53. Border WA and Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. The New England J med 1994; 331:19:1286-92.
54. Kim SJ, Park K, Koeller D, Kim KY, Wakefield LM Sporn MB, and Roberts AB. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor- β 1 gene. J Biol Chem 1992; 267:13702-7.
55. Centrella M, McCarthy TL and Canalis E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. J Biol Chem 1987; 262:6:2869-74.

56. Keski-Oja J and Moses HL. Growth inhibitory polypeptides in the regulation of cell proliferation. *Med Biol* 1987; 65:1:13-20.
57. Igotz RA and Massague J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261:9:4337-45.
58. Igotz RA and Massague J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action. *Cell* 1987; 51:189-97.
59. Laiho M, Saksela O and Keski-Oja J. Transforming growth factor- β induction of type -1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem* 1987; 262:36:17467-74.
60. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P and Heath JY. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987; 6:7:1899-1904.
61. Ruoslahti E and Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; 64:867-9.
62. Nakagawa S, Pawelek P and Ginnell F. Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. *Exp Cell Res* 1989; 182:572-82.
63. Elsdale TR and Bard JBL. Collagen substrata for studies of cell behavior. *J Cell Biol* 1972; 41:298-311.

64. Tomasek JJ and Akiyama SK. Fibroblast-mediated collagen gel contraction does not require fibronectin $\alpha 5\beta 1$ integrin interaction. *Anat Rec* 1992; 234:153-60.
65. Guidry C. Fibroblast contraction of collagen gels requires activation of protein kinase C. *J Cell Physiol* 1993; 155:358-67.
66. Guidry C and Grinnell F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J Cell Sci* 1985; 79:67-81.
67. Bellows CG, Melcher AH and Aubin JE. Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva, and bone suggest functional differences between cell types. *J Cell Sci* 1981; 50:299-314.
68. Murphy KH and Daniel JC. Human periodontal ligament in vitro: Cell culture passage effect on collagen gel contraction. *J Periodont Res* 1987; 22:342-7.
69. Kovacs CJ and Fleishmater R. Properties of scleroderma fibroblasts in cultures. *J Invest Dermatol* 1974; 63:456-60.
70. Ma RH and Shieh TY. Increased lysyl oxidase activity in culture medium of oral submucous fibrosis-- A precancerous lesion due to betel nut chewing in Taiwan. *Symposium on Betel Quid Chewing and Its Health Effect*. 1993; 23-4.
71. Seedat HA and van Wyk CW. Oral submucous fibrosis in ex-betel nut chewers: A report of 14 cases. *J Oral Pathol* 1988; 17: 226-9.

72. Majewski S, Hunzelmann N, Schirren CG, Mauch C, Aumailley M and Krieg T. Increased adhesion of fibroblasts from patients with scleroderma to extracellular matrix components: In vitro modulation by IFN- γ but not by TGF- β . *The J Invest Dermatol* 1992; 86-91.
73. Takehara K, Soma Y, Igarashi A, Kikuchi K, Moro A and Ishibashi Y. Response of scleroderma fibroblasts to various growth factors. *Arch Dermatol Res* 1991; 283:461-4.
74. Foo ITH, Naylor IL, Trimmons MJ and Trejdosiewicz LK. Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol* 1992; 67:6:727-33.
75. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD, eds. *Molecular biology of the cell*, 3rd ed. Garland, New York & London. 1994; 988-91.
76. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD, eds. *Molecular biology of the cell*, 3rd ed. Garland, New York & London. 1994; 798-799.
77. Schuppan D, Herbst H and Milani S. Matrix synthesis and molecular networks in hepatic fibrosis. In: Zern MA, Reid L, eds. *Extracellular matrix: Its chemistry, biology and pathology*. Marcel Decker. 1993; 201-4.
78. Thiery JB and Duband IL. Cell migration in the vertebrate embryo: Role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation. *Ann Rev Cell Biol* 1985; 1:91-113.
79. Nathan C and Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; 113:981-6.

拾壹. 附錄：

附錄一、儀器與配備

1. Incubator: NAPCO/ 5410
2. Laminar Flow: HOLTEN/ HB2448
3. Phase Contrast Microscope: NIKON/ TMS
4. Water Bath: DS LAB/ DSB-1000
BARNSTEAD/ THERMOLYNE 17600
5. Vortex: SCIENTIFIC INDUSTRIES/ VORTEX-GENIE 2
6. Centrifuge: KUBOTA/ 2010
DENVER INSTRUMENT/ IWAKI
7. Immunofluorescence Microscope: NIKON/ DIAPHOT 300
ZEISS/ AXIOPHOT
8. Camera: NIKON/ F-601
ZEISS/ 45 60 70 01
9. Cryosection: LEICA/ JUNG CM 1800
10. Shaker: HYBAID/ HB-SHK 1
11. Electrophoresis: BIO-RAD/ PAC 3000
12. Pipetman: GILSON
13. Pipet-aid: DRUMMOND
14. METTLER TOLEDO/ AB104
15. BECKMAN/ ϕ 32 pH METER

附錄二、藥品與試劑配製法

一、

1. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) : GIBCO-BRL
per liter (with dd-H₂O)

DMEM Powder 1PK

NaHCO₃ 3.7g/L

adjust pH value to 7.2

sterilized by filtration through a 0.2 μm filter.

2. PSA (PEN-STREP-AMPHO SoL.) : BIOLOGICAL INDUSTRIES

Penicillin: 10000 units/ml

Streptomycin: 10mg/ml

Amphotericin B: 0.025mg/ml

3. FBS (Fetal Bovine Serum) : BIOLOGICAL INDUSTRIES

4. 10% cDMEM

per 100ml

PSA 1ml

FCS 1ml

DMEM 98ml

5. Trypsin/EDTA: GIBCO-BRL

0.25% Trypsin, 1mM EDTA

二、

1. Vitrogen 100: COLLAGEN CORPORATION

collagen concentration: 3.0 mg/ml

2. MEM (Minimum Essential Medium) : GIBCO-BRL

per liter (with dd-H₂O)

MEM powder 1Pk

NaHCO₃ 2.2g/l

adjust the pH value to 7.2

sterilized by filtration through a 0.2 μm filter.

三、

TGF- β 1: UBL

先配 BSA sol'n

1. 秤40mg BSA溶於10mL 4mM HCl

2. 取10 μ L (1) 溶於990 μ L 4mM HCl = 40 μ g BSA/ μ L

----sol'n (A)

再稀釋 TGF- β 1原液

3. 取450 μ L of sol'n (A)

4. 與 TGF- β 1原液50 μ L mix

5. =1000ng/500 μ L = 2ng/ μ L

----stocking sol'n; sol'n (B)

6. 1% FBS + 1% PSA + DMEM + vit c

----sol'n (C)

7. 5 μ L (B) + 995 μ L (C) = 0.01 ng/ μ L

10 μ L (B) + 990 μ L (C) = 0.02 ng/ μ L

20 μ L (B) + 980 μ L (C) = 0.04 ng/ μ L

40 μ L (B) + 960 μ L (C) = 0.08 ng/ μ L

四、

Arecoline (Methyl-1,2,5,6-
Tetrahydronicotinate
Hydrobromide) : SIGMA

(A) Stocking solution

10mg Arecoline dissolved in 10ml dd-H₂O

conc. = 1mg/ml

sterilized by filtration.

(B) 1% FBS + 1% PSA + DMEM + vit c

Ex: 1000 μ l per well

0 μ g/ml: 1000 μ l (B)

1 μ g/ml: 999 μ l (B) + 1 μ l (A)

10 μ g/ml: 990 μ l (B) + 10 μ l (A)

100 μ g/ml: 900 μ l (B) + 100 μ l (A)

五、

五-1.

1. BSA (Bovine Serum Albumin) : SIGMA

2. PBS (Phosphate Buffer Saline) : GIBCO-BRL

per liter (with dd-H₂O)

PBS powder 1PK

adjusted pH value to 7.2

sterilized by filtration through a 0.2 μ m filter.

All of them were purchased from SIGMA.

dilute with 1% BSA in PBS.

五-2.

1. Monoclonal Anti- α -Smooth Muscle Actin 1: 250
2. Monoclonal Anti-Myosin (Sm) 1:500
3. Monoclonal Anti- β -Actin 1:500
4. Monoclonal Anti-vimentin 1:40
5. Monoclonal Anti- β -Tubulin 1:1000
6. Anti-Mouse IgG----FITC labeled 1:50
7. Phalloidin----TRITC labeled 1:60
8. WGA (Lectin from Tritium Vulgaris · wheat germ)
---- TRITC labeled 1:60
9. Monoclonal Anti-Laminin 1:500
10. Monoclonal Anti-Collagen Type IV 1:500
11. Anti-Cytokeratin 1:50

All of them were purchased from SIGMA.
dilute with 1% BSA in PBS.

六、

1. Cell Extraction Buffer:

1% Triton X-100

1% Sodium Deoxycholate

in 0.05M Tris Buffer

pH= 7.5

2.4X Sample Buffer:

Tris-Base: 1.52g

Glycerol: 20ml

Deionized Water: 35ml

adjusted pH to 6.8 with concentrated HCL, then add

SDS 4.0g

Mercaptoethanol 10ml

Bromophenol Blue 0.002g

dilute to a final volume of 200ml with deionized
water,

aliquot and freeze.

3.10X Electrode Buffer:

Tris Base 30.3g

SDS 10g

Glycine 144g

dilute to 1X conc. with dd-H₂O.

4. Staining Solution:

Commassive Blue R-250 0.625g

Methanol 250ml

Acetic Acid 50ml

bring up to 500 ml with dd-H₂O.

5. Prestained SDS-PAGE Standards, low range: BIO-RAD

6. SDS-PAGE 的製備

seperating gel: 7.5%。每片至少需7.2ml。

若以10ml總體積計算，內含：

40%Acrylamide/Bis 1.875ml

distilled water 3.025ml

10%SDS 100ul

0.75M Tris 5ml

TEMED 7.5ul

20mg/mlAP 192.5ul

stacking gel:4%

5ml中，含：

40%Acrylamide/Bis 0.5ml

distilled water 7.4ml

10%SDS 100ul

0.5M Tris, pH6.8 1.25ml

TEMED 7.5ul

20mg/mlAP 192.5ul

All of these reagents were purchased from BIO-RAD.