

氟化物對於哺乳動物之細胞的影響

第 工 報 :

■ 鄭敏雄 ■

氟化鈉對於 Mk 2, Mc Coy, HeLa

及 L-929 細胞株

增殖的影響



SUMMARY

Since the addition of fluorine to the public drinking water has played a very important role in the prevention of dental caries, it now becomes a major public health problem. To examine the effect of sodium fluoride (NaF) on cell multiplication, the four following cell strains were investigated in tissue culture being added 0 ppm (control group), 1 ppm, 10 ppm and 50 ppm NaF in the medium; the strain MK 2 of adult rhesus monkey kidney cells; the strain McCoy of human synovial cells; the strain HeLa (Calf) of cervical carcinoma of human uterus, and the strain L-929 of mouse fibroblasts. The result of cultivation for 7 days indicated that: (1). no significant difference of cell proliferation between the group of containing 1 ppm NaF in the medium and the control group, and (2). while the other groups containing the higher concentration of sodium fluoride showed some various inhibitory effects; the higher concentration of sodium fluoride the more inhibition.

緒 言

氟化物之開始應用於醫學，應追溯到十九世紀中葉時 Erhardt (1874) 就曾推薦兒童及孕婦服用含有氟化鉀的錠劑¹⁾。而至 1901 年 Eager J. M. 最初提出有關 Denti Di Chiaie²⁾ 即所謂斑狀齒 (Mottled enamel) 的論文報告以後，各國學者紛紛展開追查其病因的研究，經過十幾年後，Cooch (1914), McKay (1929), Bunting (1928), Smith (1931), Dean & Elvove (1935) 及 Volker & Songnaoe (1940) 等先後發表了其調查研究業績，才確認了地方性飲用水中天然所含有的多量氟素是引起斑狀齒的原因，並且發現了其適量的氟素對於兒童齲齒的發生率有抑制的作用。故自 1945 年美國的 Grand Rapids 等城市首先實施在自來水中添加 1 ppm 的氟化鈉的所謂 Water fluoridation 而有成效後^{1,3)}，此法即為許多國家所仿效採用。氟化物還應用於兒童齒面塗氟 (Topical application)，或製成氟化食鹽，氟化洗口劑等；至今氟化物的運用已成為公共衛生學上預防齲齒的有效方法之一。但是氟化物也有其毒性，使用不當也會引起中毒⁴⁾，所以我們對於氟化物的一切性狀應有充分的瞭解；可是目前對於氟化物不明白的問題還很多，尤其是氟化物在人體內新陳代謝中對於各種細胞是否會有何影響？等問題實非繼續探討不可。故著者擬以組織培養法逐次進行有關氟化物對於細胞影響的研究。本篇僅先就氟化鈉對於一些細胞株於短時間內增殖影響的實驗結果提出報告。盼能對於牙科醫學有所貢獻並期拋磚引玉以引起國人學者對於預防齲齒的興趣，重視及發展。

實驗材料與實驗方法

A. 實驗材料：

(1) 使用之細胞株：有四種，即

MK 2 細胞株：印度獼猴的腎臟皮質由來之細胞。

McCoy 細胞株：人的滑液膜由來之細胞。

HeLa (Calf) 細胞株：人的子宮頸癌由來之細胞。

L-929 細胞株：Mouse 的纖維芽細胞。

(2) 培養液及被檢藥劑：

培養液為 Eagle's MEM (Nissan ⊕) + 10% Calf serum (高雄縣農會獸疫血清製造所)。

Calf serum 先經 56°C，30 分鐘的「非働化」(inactivation) 處理，再經過 Millipore filter 的濾過滅菌後才使用。

Sodium fluoride (NaF, Fisher Scientific Co. Lot no. 783365)，於每次實驗開始當天，先溶解於 Eagle's MEM 溶液，濾過滅菌後，再加入於培養液中，使成最終濃度為 0 ppm (對照群)，1 ppm，10 ppm 以及 50 ppm 四群。

(3) 實驗培養用試管

使用短試管，其口徑為 15 mm，長為 90 mm，附有容量為 1 ml 的精確刻度者。每次實驗每群至少需要 10 支的短試管。

B. 實驗方法：

採用簡易同型培養法 (The simplified replicate tissue culture method by Katsuta et al) 5-9)。其步驟如下：

1. 細胞的分散：

母培養：細胞平常維持保存培養於TD-40的培養瓶內，培養液為Eagle's MEM+10% Calf serum，放在37°C的恆溫器內靜置培養。細胞附着於玻璃面。

首先將母培養TD-40乙瓶中之舊培養液倒掉，加入0.05% Trypsin (Difco 1:250)+0.02% EDTA in PBS (-)的溶液，於37°C的恆溫器內靜置5~10分鐘後，細胞即遊離分散，經1000rpm，3分鐘的遠心沈澱處理後，吸掉上清液，再加入新的培養液，以吸管輕輕地攪拌成均勻的細胞懸濁液 (Cell suspension)。

2. 分注：

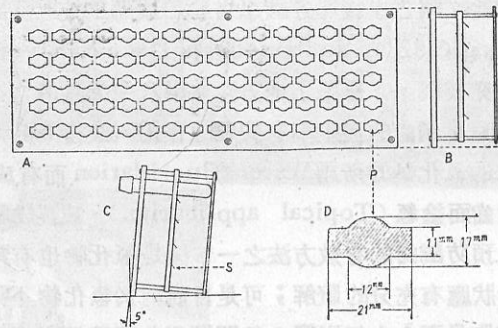
以吸管將細胞懸濁液做等量地分注到所需的各短試管內，再加入所需濃度的NaF培養液，使每支短試管內為盛有1.5ml含有細胞的培養液。短試管以與水平面成5°的傾斜放置在試管架上 (如Fig. 1)，於37°C的恆溫器內施予靜置培養一星期。

3. 細胞數的計算及換添新的培養液：

在實驗開始當天任意拿出三支分注後已含有細胞及培養液的短試管，加入枸橼酸及結晶紫溶液的處理後，以Hemocytometer來計算細胞核的數目，再將此三數值平均之即代表每群之細胞接種數 (Inoculum size)。於第二、第四及第七培養日，亦分別由各群中拿出三支短試管，同樣的經過如上的處理後計算出細胞平均數以代表各該群當天細胞的增殖數。其他未計數的各群短試管，則分別在第二、第四及第六培養日將舊的培養液更新。

NaF對於細胞增殖率是否有影響，即實驗群與對照群之間或各群間細胞的增殖率是否有顯著的差別，以統計學的二元分類法 (Two-Factor Analysis of Variance)^{9,10}來檢定。即根據每群於第二、第四及第七培養日細胞計數所得之數值而求出變異數分析 (The analysis of variance)，寫為F₀，附記於各圖表 (Fig 2~5) 之下方，再與F分配表之F值相比較方。而F₀值為特殊因素即Rows間變動的均方 (Mean square，又稱變異數)與所剩實驗誤差變異數之比。

Fig. 1. The metal rack for short test tubes and short tubes with flattened surfaces: (Redrawn after Katsuta et al. '57)



- p: Perforations in metal plates for inserting tubes.
s: Plate springs for fixing tubes.
- A) Upper view of the rack in the position of keeping tubes vertically. There are eighty perforations for inserting tubes.
 - B) Side view of the rack. The uppermost plate (left) is somewhat longer than the bottom plate (right).
 - C) Side view of the rack, placed at the angle of 5°.
 - D) Enlarged design of the perforation. Either of short test tubes or short tubes with flattened surfaces can be inserted.

實驗結果

實驗一 NaF對於MK 2細胞株增殖的影響

MK 2細胞於繼植 (Subculture) 後第三天開始進行實驗。接種細胞數 (Inoculum size) 為每支短試管盛有1.5ml的培養液內含有42,000個細胞。NaF的濃度分為0 ppm (對照群)，1 ppm，10 ppm以及50 ppm四群。實驗結果如Fig. 2所示。即對照群一星期內細胞的增殖率為10.9倍。含有1 ppm NaF該實驗群與對照群之間細胞的增殖率沒有差別。而含有10 ppm及50 ppm NaF兩群則比對照群都有很顯著的抑制作用。

實驗二 NaF對於Mc Coy細胞株增殖的影響

本實驗接種細胞數為每支短試管有42,000個細胞。NaF的濃度也分為0 ppm，1 ppm，10 ppm及50 ppm四群。實驗結果如Fig. 3所示。對照群一星期內細胞的增殖率為8.8倍。含有0 ppm，1 ppm及10 ppm三群間細胞的增殖情形雖似乎略有不同，但其差異並不是有意差 (Not significant)。而含有50 ppm NaF的實驗群比對照群則有很顯著的抑制作用。

實驗三 NaF 對於 HeLa (Calf) 細胞株增殖的影響

本實驗中所含有的 NaF 的濃度與前兩實驗相同。接種細胞數為每支短試管有 19,000 個細胞。實驗結果如 Fig. 4 所示。對照群一星期細胞的增殖率為 32.6 倍。含有 1 ppm 該實驗群與對照群之間細胞增殖情形幾乎相同。其他各群自第四培養日起細胞的增殖就漸漸地減慢，至第七培養日則顯示很明顯的差別，而 NaF 的濃度越高時，其對於細胞增殖的抑制作用也越大。

實驗四 NaF 對於 L-929 細胞株增殖的影響

本實驗是在日本東京大學醫科學研究所癌細胞學部所進行。NaF 的濃度分為 0 ppm, 50 ppm 及 100 ppm 三種。實驗結果如 Fig. 5 所示。對照群一星期細胞的增殖率為 30 倍。兩實驗群都顯示很大的抑制作用，尤其是含有 100 ppm NaF 該群其第七培養日時的細胞數僅為接種細胞數的 4.6 倍而已。亦即 NaF 的濃度越高時，其對於細胞增殖的抑制作用也越大。

討 論

氟化物對於齒質的作用，已因斑狀齒發現後一連串的研究而有深切的瞭解²⁾；致於氟素對於其他細胞器官是否會有影響，此為 Water fluoridation 實施前後所最令人顧慮之點。曾獲諾貝爾獎的瑞典生化學家 Theorell (1959)，曾提出警告說在自來水中如含有 $0.53 \times 10^{-4} M$ (1 ppm) 的氟素時，已是非常接近抑制數種酵素作用所需的濃度，又由於個人對於氟化物感受性也有些差異，所以他認為在自來水中添加 1 ppm NaF 此舉並非絕對安全的等語⁴⁾。Paff & Boyd (1952) 及 Miyazaki (1957)¹²⁾ 都曾經培養過雞胚股骨以觀察 NaF 對其生長的影响；Miyazaki 報告說在培養基中含有 1 ppm 及 10 ppm NaF 時都對於孵育第七天卵的雞胚股骨的生長都有抑制的作用，但是對於孵育第九天者則否；如 NaF 的濃度高達 100 ppm 時當然更有顯著的抑制作用，他並以組織化學的方法來觀察，發現了軟骨細胞的 alkaline phosphatase 消失，及骨化作用受到抑制等。但是美國自 1945 年開始實施 Water fluoridation 以來已經有二十多年了，這期間許多學者曾以種種方法研究追蹤 NaF 對於人體的作用，至今不但尚未發現有人提出任何對人體為害的報告，而是對於抑制小兒齲齒發生率的成績是卓著的。本篇實驗的結果雖然也證明了 1 ppm NaF 對於細胞株的增殖沒有影響，但是因為此次實驗時所擁有的細胞株的種類不多，故擬於第 II 報時再對其他各種細胞做更進一步的實驗檢討。由於 Water fluoridation 還牽涉有設備，費用及管理上的種種困難，將來預防齲齒的方法或許會由其他更理想的方法所取代亦未可知。

結 論

茲為檢定 NaF 對於哺乳動物細胞增殖的影響，以簡易同型培養法於短試管內培養 MK 2, McCoy, HeLa 及 L-929 四種細胞株，培養液為 Eagle's MEM + 10% Calf serum，添加 0 ppm (對照群)，1 ppm, 10 ppm 及 50 ppm 四種不同濃度的氟化鈉，試管以 5° 的傾斜放在 37°C 的恆溫器內靜置培養一星期，各群間細胞增殖率之差別應用統計學二元分類法來檢定之，其結果如下：(1) 含有 1 ppm NaF 該實驗群與對照群之間細胞的增殖情形沒有顯著的差別，(2) 含有 10 ppm NaF 該群對於 MK 2 及 HeLa 細胞已有抑制作用，而含有 50 ppm NaF 者則對於四種細胞株有更大的抑制作用；即 NaF 的濃度越高時，其對於細胞增殖的抑制作用也越大。

誌 謝

本篇實驗之進行承蒙蔡滋理校長及周德程教授之鼓勵及指導，簡易同型培養法係著者獲日本武田獎學金的資助在東京大學醫科學研究所癌細胞學部進修時承蒙勝田 甫部長所殷切教導，特以深表謝忱。

Calf serum 為高雄縣縣農會獸疫血清製造所郭登志先生所贈送。MK 2, McCoy 及 HeLa 三種細胞株是美國海軍第二研究所洪紹貞督導所提供。染色準備工作承劉克明助教不少的協助。特此一并謹表謝意。

參考文獻

- 1). BLAYNEY J. R. and HILL, I. N.: Fluorine and dental caries. J.A.D.A. Vol. 74, 2. p.233-302, 1967.
大森郁朗：氟化物の齒質にわよぼす影響。齒界展望 25, 6, p.939-956, 1966.

- 3). Knutson, J.W.: Water Fluoridation after 25 years. J.A.D.A. Vol.80, p.765-769, 1970.
- 4). 上田喜一: 水道弗素の問題点・歯界展望: 25, 6, p.927-936, 1966.
- 5). Katsuta, H., Takaoka, T., Oishi, Y., Baba, T. and Chang, K.C.: Cultivation of fibroblasts from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture. Japan. J. Exp. Med. Vol.24, 3, p.125-139, 1954.
- 6). Katsuta, H., Takaoka, T., Kuwabara, H. and Kuwabara, S.: Cultivation of strain HeLa cells (Human cervical carcinoma) in the simplified replicate tissue culture. Japan. J. Exp. Med. Vol.29, 5, p.493-505, 1959.
- 7). Takaoka, T. and Katsuta, H.: Long-term cultivation of mammalian cell strains in protein- and lipid-free chemically defined synthetic media. Exptl. Cell Research, 67, p.295-304, 1971.
- 8). Takaoka, T., Katsuta, H., Ishiki, S. and Konishi, T.: Effects of lysozyme on the proliferation of fibroblasts in tissue culture. Japan J. Exp. Med., Vol. 42, 3, p.221-232, 1972.
- 9). Katsuta, H. and Takaoka, T.: Parabiologic cell culture IV. Interaction between normal and ascites tumor cells of rats. J. Nat. Cancer Inst. 32, p.963-980. 1964.
- 10). Walpole, R. E. and Myers, R.H.: Probability and statistics for engineers and scientists. p.396-407. The Macmillan Co. New York, 1972.
- 11). 上田喜一, 飯塚喜一, 高江洲義矩, 森崇, 近藤武, 鈴木隆男, 矢崎武, 上野真人, 小西保, 樋出守世: 日本の斑状歯. 歯界展望: 31, 1, p.9-17, 1969.
- 12). Miyazaki, Y., Katsuta, H., Aoyama, Y., Endo, H., Takaoka, T. and Oishi, Y.: Studies on the mechanism of ossification in tissue culture. Japan J. Exp. Med. Vol. 27, 5, p.331-342, 1957.

EXPLANATION OF PHOTOMICROGRAIHS

All the specimens were fixed with methanol, MK 2 cells stained with Papanicolaou method, while HeLa (Calf) cells stained with Jenner-Giemsa, and photographed by the use of 10X FK eyepiece and 40X objective lenses (Vanox).

Photo 1. MK 2 cells cultured for 7 days in the control medium consisting of 10% Calf serum and 90% Eagle s MEM.

Photo 2. MK 2 cells cultured for 7 days in the medium containing 1 ppm NaF.

Photo 3. MK 2 cells cultured for 7 days in the medium containing 10 ppm NaF.

Little difference is observed in cell morphology from Photo 1.

Photo 4. MK 2 cells cultured for 7 days in the medium containing 50 ppm NaF. Morphological differences and the inhibition of cell proliferation can be found.

Photo 5. HeLa cells cultured for 7 days in the control medium.

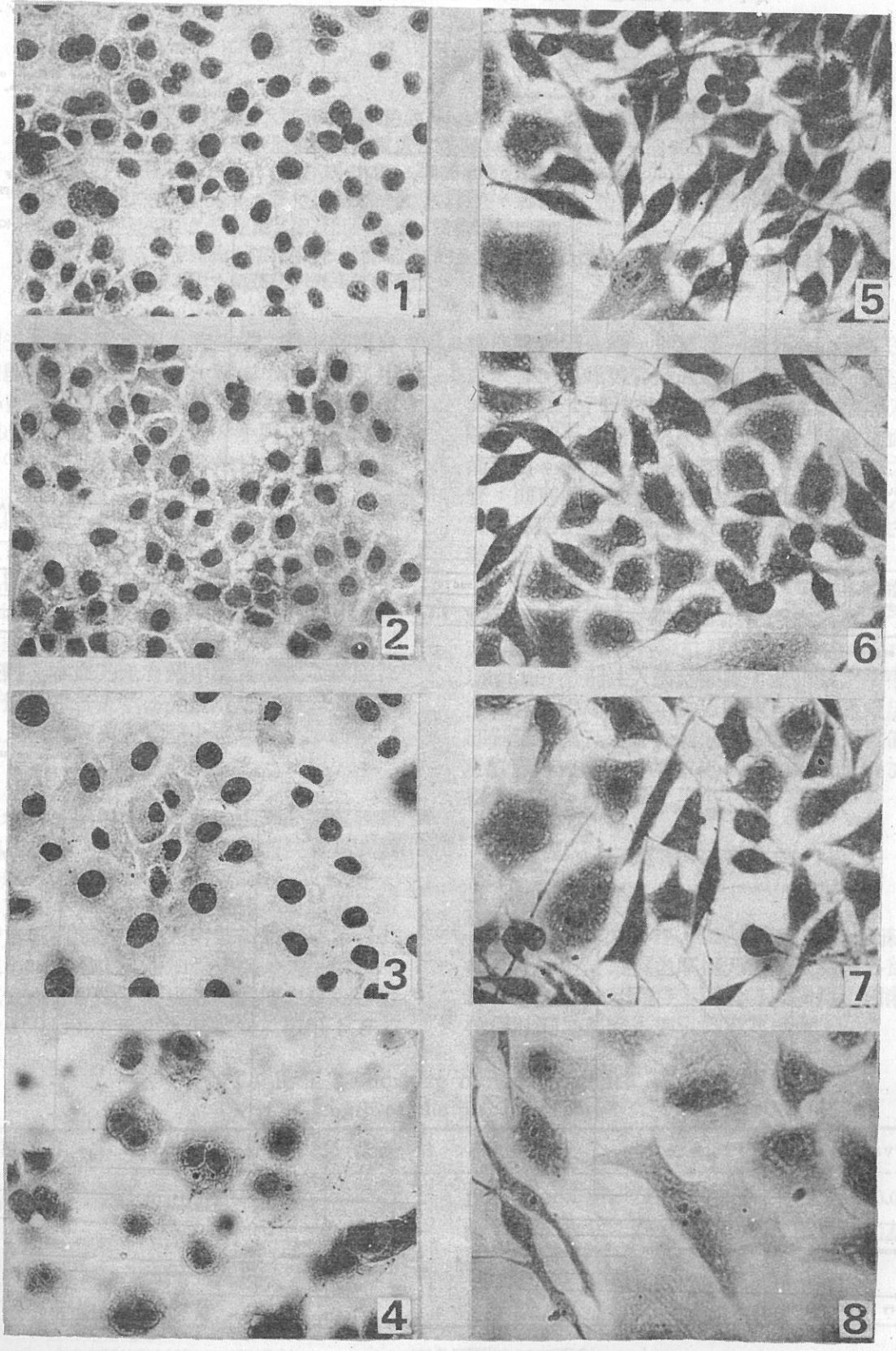
Photo 6. HeLa cells cultured for 7 days in the medium containing 1 ppm NaF.

Photo 7. HeLa cells cultured for 7 days in the medium containing 10 ppm NaF. Morphological difference is hardly found among photos 5 to 7.

Photo 8. HeLa cells cultured for 7 days in the medium containing 50 ppm NaF. Decreased number of cells is noticed. All the cells exhibit a healthy morphology.

關於中國人胎盤之解剖學的研究

第 I 報：胎盤之外形及其胎兒面之血管分佈



吉以和
山田
葉鏡
皮

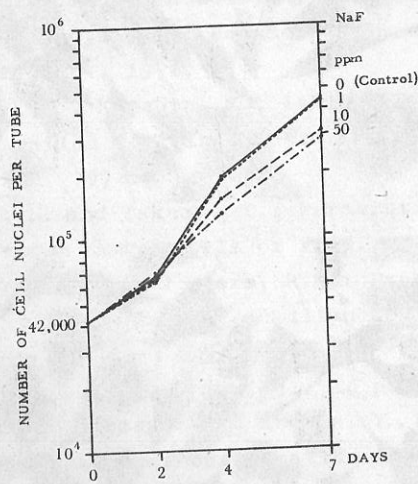
形體
細之研
血管分
之其他

之研究
結果
2.

胎盤
之研究
結果
3.

胎盤
之研究
結果
4.

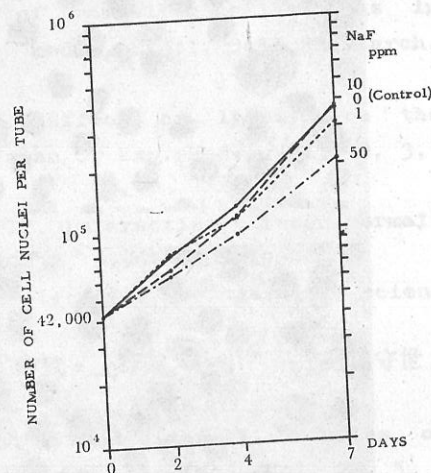
Fig. 2. The effect of NaF in the medium on the multiplication of rhesus monkey kidney cells, strain MK 2.



The group containing NaF (ppm) in the medium	Difference between							
	0 and 1		1 and 10		10 and 50		0 and 10	
	F _s	P	F _s	P	F _s	P	F _s	P
	0.82	>0.05	18.10	<0.01*	1.08	>0.05	15.89	<0.01*

* Very significant difference
 $F_{12}^1 (0.01) = 9.33$. $F_{12}^1 (0.05) = 4.75$

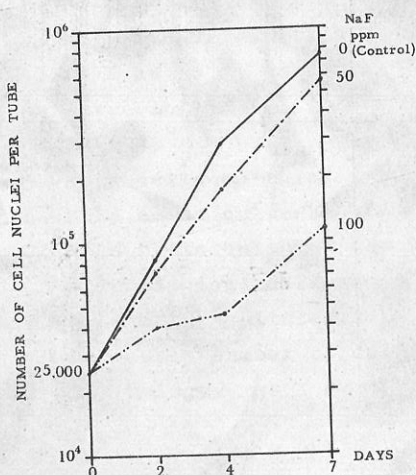
Fig. 3. The effect of NaF in the medium on the multiplication of human synovial cells, strain McCoy.



The group containing NaF (ppm) in the medium	Difference between											
	0 and 1		1 and 10		10 and 50		0 and 10		1 and 50			
	F _s	P	F _s	P	F _s	P	F _s	P	F _s	P		
	1.27	>0.05	1.32	>0.05	19.61	<0.01*	0.15	>0.05	22.91	<0.01*	6.21	<0.05#

* Very significant difference
 # Significant difference

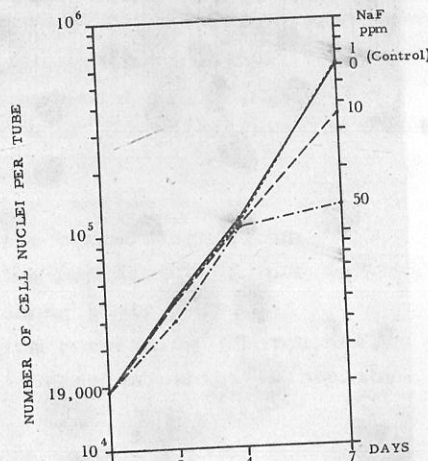
Fig. 5. The effect of NaF in the medium on the multiplication of mouse fibroblasts, strain L-929.



The group containing NaF (ppm) in the medium	Difference between 0 and 50	
	F _s	P
		350.88

* Very Significant Difference

Fig. 4. The effect of NaF in the medium on the multiplication of human carcinoma cells of cervix, strain HeLa (Call).



The group containing NaF (ppm) in the medium	Difference between							
	0 and 1		1 and 10		10 and 50		0 and 10	
	F _s	P	F _s	P	F _s	P	F _s	P
	0	>0.05	72.56	<0.01*	55.68	<0.01*	77.56	<0.01*

* Very significant difference