類胡蘿蔔素和維生素 E 對口腔癌症預防之研究

計劃編號：NSC87-2314-B-038-003

執行期限：86 年 7 月 31 日至 87 年 6 月 30 日

主持人：謝明哲、黃士懿　台北醫學院　保健營養學研究所

一、中文摘要

本研究以倉鼠口頰囊腫(Hamster cheek pouch)為實驗模型，目的在了解塗抹維生素 E (Vitamin E)和若干胡蘿蔔素(β -carotene、lycopene、lutein)單獨或混合使用時對口腔癌症之預防其有效性評估。在 16 週處理後口腔細胞微核化及白斑症，因病鼠之口腔囊袋因口腔纖維化嚴重影響判定結果。而組織病理的變化中，塗抹 DMBA solution 組中，8 隻老鼠中有 6 隻出現腫瘤(乳突狀腫瘤& squamous cell carcinoma)，且大多數表面都有 ulceration。在添加 vitamin E、β -carotene、lycopene、Lutein 等組中，以混合組預防效果最好，其次為 lycopene 組，再其次是 vitamin E 組、β -carotene 組，預防效果較不明顯的是 Lutein 組。而腫瘤的種類是 papilloma、squamous cell carcinoma 及 inflammatory nodule，epithelial dysplasia 的現象亦常見。以抗氧化劑抑制誘發之 tumor burden 的數量及生成 tumor burden 之平均體積(mm^3)而言，實驗結果以混合組的預防效果最好，其餘依次為 vitamin E、lycopene、β-carotene、lutein 等組中。然而整體抗氧化劑組之效果而言則有明顯的抑制效果，混合組則有協同作用。

二、緣由與目的

檳榔(Betel quid or Areca nut)為人類所嚼食已有數百年歷史，而檳榔文化則為臺灣社會中

特殊的一環。根據統計，世界上已有超過 1/4 人口(約有 4 億 5 仟萬人)曾經或經常咀嚼檳榔以上的咀嚼過檳榔、菸葉或可可葉等植物產品 (1)。雖然口腔癌症的發生有著地域性的差別，但在若干開發中國家如:印度、斯里蘭卡、菲律賓、臺灣、甚至巴西等國都有著較高的罹患率。仔細探究其中原因，機械性地咀嚼檳榔、菸葉或可可葉等植物及不正常的飲食習慣可能是造成口腔癌症的主要原因 (1)。反觀歐美先進國家，以美國 1996 年為例，約有超過 30,000 名新診斷出的病例，其主要原因則與長期使用菸草產品(抽煙、嚼菸草)、過度飲酒和不當飲食有關 (2)。以現代醫學眼光來看，長期食用檳榔、菸草和酒與口腔癌症的發生有著密切的關係。因此如何提供正確的飲食訊息應是預防癌症的主要課題。

若干天然抗氧化營養素包括: 維生素 C、E、類胡蘿蔔素和類異黃酮素在口腔癌症之預防研究上已引起廣泛的注意。若干動物實驗 (3-5) 亦證實這類具有抗氧化性質的營養素或天然萃出物，有遲緩或抑制口腔癌症細胞發生的能力。若干類胡蘿蔔素如:蕃茄紅素(Lycopene)、木質紅素(Lutein)不但具備有優於β -胡蘿蔔素的抗氧化能力並且沒有毒性，這些廣泛存在吾人食物中的類胡蘿蔔素則仍尚未被應用於口腔癌症之預防研究。本研究以倉鼠口頰囊腫(Hamster cheek pouch)為實驗模型，目的在了解塗抹維生素 E (Vitamin E)和若干胡蘿蔔素(β -carotene、lycopene、lutein)單獨或混合使用時對口腔癌症之預防其有效性評估。

三、 實驗方法

本研究以倉鼠口頰囊袋腫瘤(Hamster cheek pouch tumor)為實驗模型(6)。**[實驗一]** 塗抹可誘發口腔癌症之 DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene; 0.5% in mineral oil) solution 及維生素 E、類胡蘿蔔素劑(抗氧化組) (計有 DMBA、vitamin E、β -carotene、lycopene、lutein & mixed group)，每週各三次，

交替塗抹共計 16 週，以試驗不同類胡蘿蔔素對預防口腔癌症之情形。**[實驗二]** 實驗先期 (wk 1 to 4) 以塗抹 DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene; 0.5% in mineral oil) solution 誘發口腔癌症，中後期 (wk 5 to wk 16) 則交替塗以維生素 E、類胡蘿蔔素或濃縮檳榔萃出物等，每週各三次，交替塗抹共計 16 週，以測試各組對預防口腔癌症之情形。統計方法則依各實驗組在不同時期(various time interval)所產生之口腔白斑及囊腫數目，將與對照組進行 Student's *t* 試驗，藉由比較 *p* value 來評估類胡蘿蔔素和維生素 E 單獨或混合使用時對口腔白斑症和口腔癌症預防之有效性。

四、結果和討論

[實驗一]

口腔細胞微核化及白斑症：經由 DMBA 誘發產生的口腔內膜病變細胞的病鼠，經均勻地刮取口腔內膜細胞染色處理後發現受誘發之倉鼠其口腔內膜病變細胞(口腔微核化細胞 Micronuclei ; MN)並不易發現，因此在各組中並無明顯差異。病鼠之口腔囊袋之白斑症的判定因口腔纖維化嚴重影響判定結果。

組織病理的變化：在實驗組中，塗抹 DMBA solution 組，16 週後的變化如下：其中，8 隻老鼠中有 6 隻出現腫瘤，而這些腫瘤絕大多數是突起的乳突狀腫瘤，2 個為 papilloma，17 個為 squamous cell carcinoma，且大多數表面都有 ulceration，潰瘍下可見發炎細胞侵入，另有 2 處為潰瘍性病變 (ulcerated area)，但並無顯明的 carcinoma 出現，只是有 dysplasia 的變化出現在週邊的上皮細胞，侵入的發炎細胞和 squamous cell carcinoma 發生 ulcer，引起的發炎一樣，主要為淋巴球及中性白血球；其他沒有腫瘤的地方，口腔黏膜上皮細胞仍有部分可以見到 basal cell hyperplasia、dysplasia，或甚至於 carcinoma *in situ*。

在添加 vitamin E、β -carotene、lycopene、lutein 等組中，以混合組預防效果最好，其中 8 隻老鼠中僅 2 隻出現腫瘤（一隻有兩個，一為 papilloma，另一為早期的 squamous cell carcinoma；另一隻為一個 ulcerated squamous cell carcinoma）。其次為 lycopene 組，其中 7 隻老鼠中有 4 隻不出現腫瘤。而腫瘤的種類是 papilloma 3 個、squamous cell carcinoma 2 個，在其他地方亦出現 epithelial dysplasia 的變化。再其次是 vitamin E 組，其中 7 隻老鼠中有 4 隻不出現腫瘤。而腫瘤的種類是 papilloma 3 個, squamous cell carcinoma 4 個及一個 inflammatory nodule，在其他地方出現 epithelial dysplasia 的變化。其次是β -carotene 組，其中 8 隻老鼠中有 2 隻不出現腫瘤。出現的腫瘤是 papilloma 3 個、squamous cell carcinoma 8 個及 4 個 inflammatory nodule，在其他地方 epithelial dysplasia 的情形可見到。預防效果較不明顯的是 lutein 組，其中 8 隻老鼠中有 3 隻不出現腫瘤。出現腫瘤的種類是 papilloma 10 個、squamous cell carcinoma 6 個，在其他地方出現 epithelial dysplasia 的變化（如附表一至三）。

以抗氧化劑抑制誘發之 tumor burden 的數量而言，實驗結果以混合組的預防效果最好，其餘依次為 vitamin E、lycopene、β -carotene、lutein 等組中；而以生成 tumor burden 之平均體積(mm^3) 而言，混合組的預防效果最佳，其餘依次為 vitamin E，類胡蘿蔔素 (lycopene、β -carotene、lutein) 等組則預防效果較弱。然而整體抗氧化劑組之效果則有明顯的抑制效果，混合組則有協同作用（如附表四）。由結果發現，由抗氧化劑抑制誘發之 tumor burden 的數量和生成之平均體積 (mm^3) 之能力略有差異，可能是因為 vitamin E 和不同類胡蘿蔔素介入抑制腫瘤發生的階段和效力不同，因此造成不同類胡蘿蔔素對腫瘤發生數量和平均體積之一致性不足。

[實驗二]

口腔細胞微核化及白斑症：實驗結果發現 DMBA 處理 4 週後略有口腔細胞微核化的現象，但連續塗抹 12 週濃縮檳榔萃出物之口腔細胞微核化的現象則有消失的趨勢。而病鼠之口腔囊袋之白斑症的判定因口腔纖維化嚴重影響判定結果。

組織病理的變化：判讀中。

五、參考文獻

1. Stich, H.F., Mathew, B., Sankaranarayanan, R., & Nair, M.K. (1991) "Remission of precancerous lesions in the oral cavity of tobacco chewer and maintenance of the protective effect of beta-carotene or Vitamin A" *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: 298S-304S.
2. Oral Cancer Background Papers, Working Draft (1996). Introduction, Prevention and Control of Oral and Pharyngeal Cancer, Chicago, Illinois, USA
3. Som, S. Chatterjee, M. Bannerjee, M.R. (1984) Beta-carotene inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracence-induced transformation of marine mammary cells in vitro. *Carcinogenesis* **5**: 937-940.
4. Bertram, J.S., Peng, A., Rundhaug J.E. (1988) Carotenoids have intrinsic cancer preventive action. *FASEB J.* 1413A (abstr).
5. Stich, H.F. Dunn, B.P. (1986) Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *Int. J. Cancer* **38**: 713-717.
6. Salley, J.J. (1954) Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J. Dent. Res.* **33**:243-262.

Table 1. Summary of the epithelial response (Histopathological changes)

Group	Type of treatment	No. of animals	Atrophy	Hyper-plasia	Hyperortho-keratosis	Hyperpara-keratosis	Dysplasia	Inflammatory exudate	Lymphocytic proliferation	Submucosal fibrosis
A	DMBA	8	+	+ to ++	+ to ++	+	+ to ++	+ to ++	+	++ to +++
B	DMBA+vitamin E	7	+	+	+ to ++	--	+	+	+	++ to +++
C	DMBA+β-carotene	8	+	+	+ to ++	+	+	+ to ++	+	++ to +++
D	DMBA+lycopene	7	+	+ to ++	+ to ++	+	+	+	+	++ to +++
E	DMBA+lutein	8	+	+ to ++	+ to ++	+	+ to ++	+ to ++	+	++ to +++
F	DMBA+mixed	8	+	+	+ to ++	--	+	+	+	++ to +++

+ = mild, ++ = moderate, +++ = marked, ++++ = massive.

Table 2. Summary of the induction of papillomas and tumor

（marcoscopic and microscopic observations）

Group	Type of treatment	No. of animals	Papilloma or nodules	Carcinoma *in situ*	Ulcerated Lesion squamous cell carcinoma	Tumor
A	DMBA	8	0.13 ± 0.35（1/8）	0.25 ± 0.46（2/8）	1.25 ± 1.28（6/8）	2.63 ± 3.29（6/8）
B	DMBA+vitamin E	7	0.43 ± 0.53（3/7）	0.29 ± 0.49（2/7）	0.43 ± 1.13（1/7）	1.29 ± 1.89（3/7）
C	DMBA+β-carotene	8	0.50 ± 0.53（4/8）	0.25 ± 0.71（1/8）	0.88 ± 1.36（3/8）	2.25 ± 2.43（7/8）
D	DMBA+lycopene	7	0.29 ± 0.49（2/7）	0.14 ± 0.38（1/7）	0.14 ± 0.38（1/7）	0.86 ± 1.07（4/7）
E	DMBA+lutein	8	0.50 ± 0.76（3/8）	0.38 ± 0.74（2/8）	0.75 ± 0.87（4/8）	2.38 ± 3.25（6/8）
F	DMBA+mixed	8	0.25 ± 0.71（1/8）	0	0.13 ± 0.35（1/8）	0.50 ± 1.07（2/8）

Table 3: Incidence of preneoplastic lesion of Hamster pouch of each group

Group	Type of treatment	No. of animals	No. of rats with hyperplasia lesions (%)		
			Simple	Papillary	Dysplasia
A	DMBA	8	7 (88)	2 (25)	5 (63)
B	DMBA+vitamin E	7	5 (71)	0	3 (43)
C	DMBA+β-carotene	8	5 (63)	0	4 (50)
D	DMBA+lycopene	7	5 (71)	0	4 (57)
E	DMBA+lutein	8	7 (88)	1 (13)	5 (63)
F	DMBA+mixed	8	5 (63)	0	2 (25)

Table 4. Tumor burden (mm^3) after 16 weeks of carcinogen application.

Group	Type of treatment	No. of animals	No. of tumors	Mean Tumor Volume	Tumor Burden
A	DMBA	8	21	0.41	8.51 ± 1.89
B	DMBA+Vitamin E	7	9	0.05	0.44 ± 0.17
C	DMBA+β-carotene	8	11	0.21	2.29 ± 0.75
D	DMBA+lycopene	7	5	0.76	3.81 ± 2.18
E	DMBA+lutein	8	18	0.11	2.05 ± 0.49
F	DMBA+mixed	8	2	0.08	0.17 ± 0.07