

# 肝組織核染色體套數變化與肝細胞癌的關係

張照勤<sup>1</sup> 陳建仁<sup>2</sup>

在哺乳動物的肝組織中，含有一個相當重要的特色，即在正常的狀態之下，便會產生多倍套體的肝細胞存在於肝組織中，且因年齡增長而有多倍套體細胞比例增加的趨勢，即所謂的「年齡相關多倍套體化」現象，其被認為是肝臟為了自身保護作用而演化形成。動物研究進一步顯示，在化學致癌物的作用下，由癌前組織逐漸惡化為肝細胞癌的過程中，雙套染色體肝細胞比例會逐漸增加；此在人體研究自慢性肝炎轉為肝癌的進程裡，也有相同的結果發現。由於雙套染色體肝細胞比例的增加易於導致致癌基因的活化與抑癌基因功能的喪失，因此被認為與肝癌的發生有密切的關係。近來，更利用染色體含量的變化來診斷臨床上癌症病患的預後狀況與探討腫瘤的單株增生。人體肝癌的產生，大多是由病毒長期作用所引起，而且其產生是屬於多重因子的共同作用，與動物化學致癌作用迥異，因之本文乃對以上相關研究做一綜論，以俾了解染色體套數變化在致肝癌過程中所扮演的角色。(中華衛誌 1997; 16(3): 185-197)。

**關鍵詞：**核染色體套數，多倍套體化現象，雙套染色體，肝細胞癌。

## 前 言

癌的產生來自於細胞不正常的增生，而細胞生長控制失調的現象則被認為與基因功能的喪失有關。化學致癌的動物實驗研究中，發現在化學啟動子(initiator)及促進子(promoter)誘發之後，逐漸發展為癌前病變的肝結節(nodule)，到最終發展為肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)的過程中，肝組織會由正常的高比例多套體細胞(polyploid cell)狀態逐漸轉變成非多套體細胞(non-polyploid cell)

比例增加的現象，致使在肝癌組織當中，90%以上係由雙套(2N)肝細胞所取代[1-6]。對人類肝癌所作的研究，也有相同的發現[7,8]。多套體化現象(polyploidization)被認為對正常肝組織有保護作用，可避免肝臟在解毒過程中受到外來化學物質作用，而造成致癌基因的活化與抑癌基因的去活化。肝組織轉變為非多套狀態的結果，高比例的雙套細胞被認為具有原始幹細胞(stem cell)的特性，既有相當旺盛的增生分裂能力[6,9,10]，也容易受到化學物質作用而破壞基因的正常功能，這些現象被認為與肝癌的發生有相當密切的關係。

## 染色體套數(chromosomal ploidy) 與正常肝組織的關係

哺乳動物在正常的狀態下，便會產生多倍套體(polyploid)的肝細胞存在於肝組織中，

<sup>1</sup> 國立台灣大學公共衛生研究所

<sup>2</sup> 國立台灣大學流行病學研究所

聯絡人：陳建仁

聯絡地址：台北市仁愛路一段一號

台大流行病學研究所

聯絡電話：(02)397-0800 轉 8359

傳 真：(02)351-1955

投稿日期：84年9月

接受日期：85年10月



但其所含的數目和百分比會隨著動物品系不同以及年齡的變化而有所改變[10-12]。正常發育成熟(鼠齡在2-3個月)的大鼠(rat)，其肝臟組織以不破壞細胞膜的完整肝細胞(whole liver cell)方法分析後，約5-10%之肝細胞為雙套染色體(2N)細胞，70-80%為4套染色體(4N)細胞，其餘10-25%為8套染色體(8N)肝細胞。若以破壞細胞膜所獲得的細胞核分析結果，則有35%屬2N細胞核，65%屬4N細胞核。造成2N細胞核比例增加，4N細胞核百分比下降，以及8N細胞核比例趨近於零的原因，係肝組織中含有20-35%雙核細胞(binuclear cell)所致。雙核細胞包括有兩個2N細胞核的4N細胞，或兩個4N細胞核的8N細胞；在經細胞膜破解之後，即會產生2N或4N細胞核，導致完整細胞與分離細胞核(isolated nuclei)的差異[1,3,9,13]。人類肝臟完細胞，亦有類似的結果，但其所含多倍套體細胞比例似乎較低，約佔10-40%左右，其中雙核細胞佔10-15%，亦即佔全部肝組織約1-6%左右[7,14]。這些多倍套體細胞及雙核細胞的比例，會隨著生物體肝組織的不斷分化而有所變化。由於人類正常肝組織獲得來源有限，目前相關研究的證據大多數來自於動物模式。

Ohtsubo[15]等人研究發現，年齡不同的鼯鼠(mice)肝組織中所含各類不同染色體套數細胞核的比例，會隨年齡變化而改變；不論是在雄鼠或雌鼠，2N細胞核比例皆隨年齡之增加而減少，而4N及8N細胞核百分比卻隨年齡增加而增加。將多套染色體細胞核所佔的比例，除以2N細胞核比例，所得到之比值的對數值稱之為多倍套體化指數(polyploidization index)，該指數與年齡的對數值呈現正向的線性關係，亦即存在所謂的「年齡相關的多倍套體化」(age-related polyploidization)現象。

在正常狀況下，經有絲分裂後的細胞應皆為2N細胞，而正常的肝細胞是如何形成具有多倍套體的細胞核的細胞呢？Styles等人[16]所提出的假說指出，2N肝細胞由G0/G1期進入S期之後，染色體會因複製而成為4N肝細胞，正常狀況下會再進入M期(mitosis)而使4N細胞核分成2個2N肝細胞核，接著細胞膜兩側凹陷的細胞質移動(cytokinesis)，會使細

胞分成兩個2N的單核肝細胞。但是肝組織中卻有相當比例的細胞於完成S期及M期之後，並未藉細胞質移動而分成兩個單核細胞，反而形成雙核4N ( $2 \times 2N$ )肝細胞，這些細胞可再重覆上述過程，形成雙核8N ( $2 \times 4N$ )肝細胞。此外，雙核8N細胞有時可因細胞質移動作用，而形成兩個帶有4N的單核肝細胞。Wheatley [13]發現在30-35天左右的大鼠，雙核細胞的百分比有突然下降的現象，同時伴隨多倍套體細胞核的百分比提高，而認為可能是雙核細胞中的細胞核發生融合(fusion)現象，藉此形成多倍套體細胞核。雙核細胞百分比在35天之後漸趨穩定，佔整個肝組織細胞的百分比維持在20-30%。除非細胞受外界刺激而引發旺盛的有絲分裂(active mitosis)，才會使其百分比略為上升，但不久又會下降至原來穩定狀況下的百分比。

在肝切除而且不加以任何處理之後的7天之內，再生肝組織的2N肝細胞比例的急速升高，是未做肝切除手術之對照組的8.1倍。在經過1-6週以後，2N肝細胞比例為對照組的0.5倍，而4N肝細胞比例則為對照組的1.6倍，顯示又回復正常肝組織穩定時的狀態。這現象表示再生過程的開始階段與肝組織開始發育階段相似，肝組織主要處在非多倍套體時期(non-ployploidizing stage)，而隨組織再生修補完成後，又使肝臟回復到成熟肝臟的多倍套體階段(polyploidizing stage)[3]。

肝細胞染色體套數分佈的百分比與其他器官中的細胞不同，引發許多研究探討肝組織中多倍套體細胞所扮演的生物功能。至今，對於肝細胞為何形成多倍套體的解釋，仍無定論，根據肝臟所扮演的生理角色，有下列的假說：(1)肝臟是各種哺乳動物最重要的解毒中心，時常承受各種化學物質的侵害，可能在長期演化的過程之後，肝細胞便演化成多倍套體的形態，以加強其解毒保護作用。(2)多倍套體的肝細胞可免於受到致突變物質(mutagen)活化致癌基因(oncogene)所帶來的危害，即使多倍套體細胞中有一套染色體因受破壞而啟動致癌基因的作用，另外數套正常染色體的作用仍可正常發揮功能。(3)抑癌基因(tumor suppressor gene)對細胞生長扮

演相當重要的調節角色。以往的研究指出，若抑癌基因所在的兩個染色體當中，有一個染色體因致癌物質而造成突變，便可能在細胞有絲分裂作用時引起另一對等部位基因漏失(allelic loss)，而造成抑癌基因喪失功能。肝細胞形成多倍套體細胞核，即可避免此狀況的發生。

如果多倍套體細胞是肝臟為了自身保護作用而演化形成，那麼外來的化學致癌物或病毒感染，是否會造成肝細胞中染色體含量的改變，或多倍套體細胞比例的重新分配，進而增加肝臟疾病的危險性？

### 肝細胞染色體套數比例變化 與化學致癌物的關係

探討化學毒性物質對肝細胞染色體套數比例分布的實驗，發現化學毒性物質會促使肝細胞由多倍套體轉變為非多倍套體狀況，綜合如表一所示。在各種實驗設計當中，最常被採用的是Seglen標準流程(Seglen protocol) [3]，它是在將大鼠肝切除約2/3之後，以腹腔注射方式注入diethylnitrosamine (DEN)為起動子(initiator)，1個禮拜之後再於飼料換加0.02%

2-acetylaminofluorene (AAF)餵食4週做為促進子(promoter)，再改以正常餵食4週後，即可見2N肝細胞百分比的提高。當2-AAF停止使用後，2N肝細胞百分比會再下降而漸趨向於原來狀態；這表示需要促進子的持續存在，才會導致肝組織長期維持在2N肝細胞百分比偏高的狀態。只有起動子與促進子的共同作用，才可導致2N肝細胞百分比偏高的現象 [3]。

毒性化學物質造成2N肝細胞百分比提高的機制，目前並不清楚。Tulp等人[20]的研究中，發現4N細胞核所鍵結的化學致癌物之含量為2N細胞核的兩倍，多倍套體細胞可能因解毒作用無法及時達成而死亡，2N細胞所佔比例也因此提高。其他後續研究也發現相同的結果，亦即具有抗毒外表型(toxicant-resistant phenotype)的肝細胞(即2N肝細胞)在毒性環境比4N肝細胞更具生存優勢[21,22]。最近的一項研究，以離心方法分離出2N及多倍套體的肝細胞，分別研究其肝細胞的酵素活性，結果發現2N肝細胞的cytochrome P-450-dependent monooxygenase活性，較多套體肝細胞為低[23]，這差異雖未達統計顯著水準，但卻表示2N肝細胞似乎並不是因酵素活性與

表一 不同化學毒性物質對肝細胞中染色體多倍套體比例的影響

作者 〔參考文獻〕	結 果
Gonzalez-Mujica et al. [17]	以thioacetamide處理，造成大鼠肝中4N細胞核百分比的下降，進而抑制肝中多倍套體作用。
Neal and Bulter [18]	黃麴毒素B <sub>1</sub> 導致大鼠肝中4N細胞核比例下降。
Steele et al. [19]	四氯化碳可引起大鼠肝中多倍套體核比例急速降低。
Schwarze et al. [1]	將大鼠肝部份切除後，先施以diethylnitrosamine (DEN)再加上2-acetylaminofluorene (2-AAF)處理後，發現2N細胞核百分比急速上升。
Styles et al. [2]	3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'M)可導致大鼠肝中4N/2N比例下降。
Saeter et al. [3]	同Schwarze et al.的處理方法，亦有相同結果。而且若2-AAF不使用後，2N肝細胞百分比會下降，4N肝細胞百分比會上升，趨近原來正常狀態。



多套體肝細胞的差異，而使其比例提高；但從另一觀點來看，酵素活性強的多套體細胞也有可能因鍵結較多的毒性物質而死亡，造成鍵結較少的2N肝細胞比例提高。因此，由酵素活性來解釋肝細胞染色體比例的變化還有待進一步研究。Styles [16]則認為化學致癌物質的誘導作用，造成雙核肝細胞產生細胞分裂，而使2N肝細胞比例提高。其他研究卻發現化學物質的引入會引起多倍套體肝細胞比例的增加[24-28]。由於各研究使用之藥物配方及劑量、動物品系及年齡並不一致，而無法做比較。但大部份的研究結果仍認為，在基因毒性(genotoxic)物質長期誘導下，會引發2N肝細胞的增生。

#### 探討致癌物引發肝結節及肝細胞癌與染色體套數變化關係之動物實驗

前述的研究發現化學致癌物會誘導肝組織中2N肝細胞(核)比例的增高，根據正常肝組織的發展來看，它們似乎又回復到胎兒期肝組織(fetal liver)的狀況。如果多倍套體細胞的形成，是為了保護肝細胞不受外來化學物質的作用而影響其正常生理功能，是否在化學致癌物誘導2N肝細胞形成增加之後，便使肝細胞染色體上基因被破壞的機會增加，更有可能導致腫瘤細胞的形成呢？許多研究即著手探討肝癌前期(precancerous)與肝細胞癌組織中2N細胞比例的變化情形[1,2,4,6,9,29-35]。

在Schwarze [1]等人的研究中發現，經由DEN及2-AAF二者共同引發所產生的癌前病變肝結節中，2N細胞核所佔比例為83.5%，較不經任何處理的正常肝組織所佔的36.7%，及以化學致癌物處理但尚未產生癌前病變的肝組織所佔的75.9%為高。另一項研究中更詳細的比較正常肝組織、腫瘤周圍正常組織、肝結節、肝癌組織當中，2N肝細胞分別所佔的比例，依次是8.2%、22.9%、69.7%及79.3%[4]。

在肝癌演進的過程中，2N細胞的比例似乎是隨著病程的惡化而增加，此種現象亦在其他化學致癌模式中被觀察到[5]。

Schwarze等人[1]發現，腫瘤組織中除了有相當顯著的2N肝細胞百分比昇高的現象之外，若以平均每細胞中蛋白質含量(mean protein content)來估計細胞的大小，發現在化學致癌物處理之前的細胞，較處理之後的細胞所含之平均蛋白質含量為高，經處理之後的肝細胞較正常肝細胞要小；另以細胞酵素化學染色法(enzyme cytochemistry)來偵測肝組織中r-glutamyltranspeptidase (GGT)的陽性呈色細胞，利用其只在轉型(transformed)細胞才可反應的特性，發現經化學致癌物處理過的癌前組織，此GGT陽性細胞百分比亦較正常對照組為高。

在腫瘤組織與2N肝細胞的相關研究方面，Saeter等人[4]研究發現2N細胞的比例與腫瘤大小之間呈正向相關，顯示2N細胞生長分裂速率會影響腫瘤生長。Gerlyng等人[6]，Seglen和Gerlyng [9]，及Saeter等人[4]的研究中，利用BrdU來探討不同染色體套數細胞的增生速率及能力，發現2N肝細胞具有最強的增生能力，而4N及8N肝細胞增生能力較2N肝細胞顯著為低。這表示多倍套體肝細胞具有增生能力的限制，2N肝細胞則具有旺盛的分裂能力。雖然有些以thymidine標記法來比較2N及4N肝細胞核之DNA合成能力的研究，並未發現兩者間的差異[12]；但以Brd U標記法來探討增生能力的強弱，似乎是較好的方法。研究者乃認為多倍套體細胞由演化觀點及細胞學證據來看，屬於高度分化的細胞，因此降低了細胞分裂與增生的能力[36]；而2N肝細胞則近似於分化較低的幹細胞(stem cell)，具有原始旺盛的分裂能力。

儘管大多數的研究皆支持肝癌組織或癌症前期的肝組織，會產生大量2N肝細胞取代多倍套體肝細胞的狀況。然而另外的研究卻發現在誘導致癌作用早期及肝腫瘤中，出現較高比例的多倍套體肝細胞或非整倍套體(aneuploid)肝細胞[37-41]。這些研究大多根據組織切片，以Feulgen方法染色，再藉分光顯微鏡(microspectrophotometry, MSP)分析所得的結果，此方法與前述研究中所用之流式細胞計數儀(Flow cytometry, FCM)分析法有很大的差異：

- (一) 以MSP方法分析Feulgen法染色的組織切片，往往由於切片厚度約8-20  $\mu\text{m}$ ，極易因細胞重疊造成核中染色體DNA含量的估計偏差，導致高估多倍套染色體(polyploid)或非整倍套染色體(aneuploid)的結果。
- (二) MSP方法是先觀察到被認為可以分析的細胞之後，再以儀器掃描讀出DNA含量，極易因個人的主觀成分而影響結果。
- (三) MSP方法極為費時費力，其所分析的細胞數一般只達FCM所能分析細胞數的1% (FCM一次可分析數萬細胞的結果，而且FCM耗時極短)。因此以MSP分析數百個細胞所得的結果，似乎不易代表組織中細胞DNA含量的比例。

利用非肝癌的腫瘤組織比較FCM與MSP分析結果的研究[42-45]，發現以FCM分析所得的2N細胞百分比，皆較MSP分析為高。雖然這結果曾被懷疑是2N良性間質細胞(benign stromal cell)被同時計數造成；但是在肝癌組織中，間質細胞所佔的比例相當小，應不足以解釋二者之分析結果的顯著差異[35]。

綜合以上的研究結果，2N肝細胞比例的轉變在整個肝癌的致癌過程(carcinogenesis)中所扮演角色如下：

- (一) 經由化學致癌起動子及促進子的共同作用後，肝組織會發展成含高比例2N肝細胞的狀態。若化學致癌物作用立刻停止，肝臟會經再生過程慢慢再回復為原本含高比例多倍套體肝細胞的情況；若化學致癌作用持續進行，將繼續維持高比例2N肝細胞的狀態。這些被認為具有原始低度分化幹細胞特性的2N肝細胞，由於具有更旺盛的分裂與增生能力，會進而生成肝癌；而且2N肝細胞所佔比例愈高，腫瘤生長速率愈快。
- (二) 致癌基因的活化、突變、或漏失，在2N肝細胞更利於作用，進而使細胞正常生長調節受到破壞而產生肝癌。
- (三) 與非腫瘤組織中的高比例多倍套體環境比較起來，腫瘤組織內高比例的2N肝細胞，似乎更容易藉其生長的特性而被選

擇進行單株增生(clonal expansion)。

- (四) 由於4N細胞結合的致癌物含量為2N細胞的兩倍，在長期作用下，4N細胞可能更容易受化學毒性物質破壞而死亡，造成2N細胞的比例增加，而易導致肝癌的產生。

由動物實驗來看，2N肝細胞(核)的比例變化與產生肝癌過程有相當密切的關係。Ohtsubo等人[15]的研究指出多倍套體形成指數在雄鼠與雌鼠之間有顯著差異，而Leuchtenberger等人[46]發現腦下垂體分泌的生長激素可調控多倍套體細胞的形成。這些結果在探討人類性別與年齡對於肝癌發生的作用時，是相當重要的參考數據。

#### 染色體套數變化與人體慢性肝病、肝硬化及肝癌的關係

人類正常肝組織有10-40%的多倍套體肝細胞，其中雙核細胞佔全部肝組織的1-6%，表示人類肝細胞也有多倍套體化的現象(polyploidization)。一般而言，這些正常肝組織的來源是取自因車禍等意外死亡的個案，或是來自肝膽結石的病患經開刀所取得的一小部份正常組織，因此正常肝組織來源有限。根據Watanabe等人[14]的研究，人類亦有隨著年齡的增高，而肝組織中多倍套體細胞比例增高的現象，與動物模式的觀察相符合。人類隨著年齡的增長，2N肝細胞比例逐漸下降，而4N及8N肝細胞比例卻漸漸上升。唯在人類正常肝組織中，肝細胞多倍套體化的現象，比動物實驗的結果來得不顯著，正常肝組織中所含多倍套體細胞比例也不大。因此，在人類肝細胞染色體含量的研究中，此現象常會被忽視。但以細胞生物學的觀點來看，多倍套體化確實在肝臟的生物功能上扮演相當重要的角色。

人類肝細胞DNA含量的研究可以分成三大類：第一類是利用肝細胞DNA含量的變化做為病患的預後指標(prognostic predictor)，此項研究已廣泛應用在其他癌症(表二)；第二類是用來研究肝癌的單株增生(clonal expansion)現象，比較同一人不同位置的腫瘤組織，或

表二 肝細胞DNA含量與肝癌病患預後的研究

作 者 (參考文獻)	研 究 對 象 及 設 計	DNA含量分析法	結 果
Ezaki et al. [47]	在日本以手術取得45名男性及15名女性肝癌病人組織。平均年齡為56.8歲。將肝癌組織以DNA含量分成雙套型及非雙套型兩種加以比較。	MSP	雙套型及非雙套型肝癌病人的存活率無顯著差異
Fujimoto et al. [48]	自1973年7月到1987年9月之間收集以手術切除的203名肝癌病人組織。88%為男性，平均年齡為57歲。將肝癌組織以DNA含量分成雙套型及非倍套體型，非倍套體型又再以D. I. 值1.5為分界，作5年存活率比較。	FCM	調整性別、年齡、HBsAg、AFP值、腫瘤大小、侵襲型態及病理學分類之後，DNA含量與肝癌存活率仍有顯著相關。雙套型較非倍套體型肝癌，5年存活率要高。D. I. 值大於1.5以上者較小於1.5者，5年存活率高。5公分以上大型腫瘤以非倍套體型為主。
Cong and Wu. [49]	自1975年5月到1987年11月之間在上海地區以手術方式取得61名男性及5名女性肝癌病人組織。平均年齡48.5歲。將腫瘤組織以DNA含量分成雙套型及非倍套體型；以3公分大小為界，將腫瘤分成大型腫瘤(LHCC)及小型腫瘤(SHCC)。	Image analysis	雙套型較非倍套體型之肝癌患者有較高的5年存活率。SHCC中75%屬雙套型，LHCC中85%屬非倍套體型，SHCC較LHCC有較高的5年存活率。
Chen et al. [50]	自1983年到1986年於台灣收集50名肝癌病人石蠟包埋組織，包括41名男性及9名女性。年齡在14-76歲之間。將腫瘤組織以DNA含量分成雙套型及非倍套體型。	FCM	肝癌DNA型態與5年存活率無顯著相關。
McEntee et al. [51]	自1975年到1986年之間以手術取得的46名肝癌病人之石蠟包埋組織，包括28名男性及18名女性。將腫瘤組織分成雙套體型及非倍套體型。	FCM	肝癌DNA型態與5年存活率無顯著相關。
Nagasus et al. [52]	自1986年到1991年收集以手術切除的91名肝癌病人組織，將腫瘤組織分成雙套體型及非倍套體型。	FCM	肝癌DNA型態與存活率無顯著相關。
Chiu et al. [53]	自1985年到1990年之間在台灣以手術取得的130名肝癌病人組織，將肝癌組織以DNA含量分成三種型態： 型態 I：雙套體型 型態 II：非倍套體型但只具有一個G0/G1峰 型態 III：非倍套體型但具有一個以上G0/G1峰	FCM	型態 III較型態 II及型態 I有較低的5年存活率，及較高的肝癌復發率。再同時配合S期比率來看，S期比例愈高，5年存活率愈低。

MSP：microspectrophotometry 分光顯微鏡

FCM：flow cytometry 流式細胞計數儀

D.I.：DNA index

HBsAg：hepatitis B surface antigen，B型肝炎表面抗原

AFP：α-fetoprotein，甲型胎兒蛋白

Taiwan Public Health Association  
台灣公共衛生學會



比較復發腫瘤(recurrent tumor)與前次腫瘤的肝細胞DNA含量，來探討其腫瘤是否來自同一細胞起源(表三)；第三類為探討染色體套數變化與人類慢性肝病或肝癌的關係，這一類研究並不多，結果的差異性也很大(見表四)。

由表二所示，利用肝細胞DNA含量作為肝癌病患預後的指標，所得研究結果並不一致。以雙套型(diploidy pattern)與非倍體型(aneuploidy pattern)來預測預後狀況似乎過於單純，應再配合S期百分比及腫瘤大小作整體考量，並且嘗試以2N或非倍套體細胞的比例列入考慮分析。若能配合超音波技術做腫瘤周圍組織採集分析，並與腫瘤組織比較，可能會更有預測價值。

以往在探討肝癌是否來自異株增生的研究(見表三)，有的是比較B型肝炎病毒的嵌入位置來加以斷定，單株增生理論上應具有相同的B型肝炎病毒嵌入位置[61-63]。近年來亦利用流式細胞計數儀測定細胞DNA含量，以比較同一肝臟的不同位置腫瘤，或是比較原

發與復發腫瘤的DNA含量差異，作為探討單株增生的依據。但是流式細胞計數儀有其基本的限制，其測得的是細胞核「總DNA含量」，對於基因易位(gene translocation)的現象，或是染色體因病毒基因植入而DNA含量增加，但又引起基因脫失致使二者相互補償的狀況，則無法被偵測出染色體套數的異常。站在細胞學立場來看，增生分裂過度旺盛的細胞，有可能因此造成染色體分配不均，而引起非倍體細胞的產生。因此在較大的腫瘤中，原本是以雙套細胞為起源，但最後卻成為非倍體細胞，以致被誤認為是來自不同的起源細胞。以流式細胞計數儀來討論腫瘤細胞的起源，似乎有很大的限制，也可能因此造成各研究結果並不一致。

在實驗動物的致癌機轉中，2N細胞(核)比例的變化似乎佔有相當重要的地位，2N細胞(核)比例的增加可能會因此提高化學物質活化致癌基因或喪失抑癌基因功能的機會。由於人類肝癌，大多數為病毒所引起，與化學

表三 肝細胞DNA含量與肝癌組織的異株增生(clonal heterogeneity)研究

作者 (參考文獻)	研究對象及設計	DNA含量分析法	結果
Kuo et al. [54]	利用超音波導向所取得的36名肝癌病人成對肝癌組織，包括有： 第一組：17名肝癌者同一位置先後採兩次的成對肝癌組織。 第二組：14名多發性肝癌者，不同位置肝癌組織取得的成對肝癌組織。 第三組：2名肝癌者取得肝癌部位及轉移部位的成對肝癌組織。 第四組：2名肝癌者取得肝癌部位及復發肝癌部位的肝癌成對組織。	Feulgen-DNA 分析法	第一組肝癌病患的成對肝癌組織中有88%具有相同DNA型態。 第二組肝癌病患的成對肝癌組織中有71%具有相同DNA型態。 第三及第四組肝癌病患的成對肝癌組織中，皆與原發部位肝癌組織具有相同的DNA型態。 DNA型態的株異生性只佔19%，故大部肝癌皆源自同一單源細胞。
Nagasue et al. [55]	利用手術切除的19名男性及9名女性肝癌組織，比較當中14名多發性肝癌的不同部位組織及14名原發及復發的肝癌組織中DNA型態。其DNA型態分為雙套型及非倍體型。	FCM	多發性肝癌患者成對肝癌組織36%屬不同DNA型態；而復發肝癌者中，前後兩次的成對肝癌組織有64%屬不同DNA型態。
Nagasue et al. [56]	利用手術切除取得的31名肝癌組織，比較同一腫瘤中是否有不同DNA型態來源的細胞族群	FCM	各腫瘤中為來自同一DNA型態細胞族群。

FCM: flow cytometry 流式細胞計數儀

表四 肝細胞DNA含量與人體慢性肝病及肝癌的研究

作 者 〔參考文獻〕	研 究 對 象 及 設 計	DNA含量分析法	結 果
Koike et al. [57]	以採針或手術方式取得的69個肝組織樣本，包含有正常肝組織，肝硬化組織，轉移部位肝組織，肝癌組織及其旁的非肝癌組織。一部份做DNA含量分析，一部份做DNA合成分析。	MSP (DNA合成以 thymidine 放射法分析)	隨病灶的嚴重程度增加，肝癌組織DNA含量愈趨向多套體變化，且染色體中DNA含量分布愈寬；隨病灶嚴重程度增加，DNA合成愈旺盛。
Koike et al. [58]	4個正常肝組織，5個肝硬化組織，8個於追蹤5年後產生肝癌的肝硬化組織，12個於追蹤3年內產生肝癌的肝硬化組織，9個肝癌旁非肝癌組織，及6個肝癌部位組織。	MSP	隨正常肝、肝硬化、肝硬化五年及三年內產生肝癌者的不同，而漸有高比例多套體變化現象。肝癌周圍的組織中，雙核細胞具有不同比例的核，可能是造成產生肝癌的原因。
Kuo et al. [59]	將超音波導向取得的54名肝癌個案組織，包括52名男性及2名女性，平均年齡為57歲。	Feulgen-DNA 分析法	92.6%肝癌組織屬於多套體及非倍套體細胞。多四倍體細胞(hypertetraploidy)型式則佔肝癌中的46.3%。DNA變化與年齡、HBsAg狀態、腫瘤大小及病理等級無關。S期比例在病理分類等級高者比低者為高。
Ezaki et al. [47]	在日本45名男性及15名女性病人以手術取得的肝癌組織，平均年齡為56.8歲。將肝癌組織以DNA型態分成雙套型及非雙套型。	MSP	五公分以上腫瘤以非雙套型為主(82%)，五公分以下腫瘤以雙套型為主(65%)。腫瘤病理分級及肝癌者的年齡與DNA型態有關，年紀愈大(>55歲者)以雙套型為主，HBsAg狀態及肝硬化則與DNA含量型態無關。
Saeter et al. [7]	自1986年到1987年間於台灣及挪威收集的19個肝組織(包括正常肝組織、肝癌旁肝硬化組織、肝癌組織等)，進行肝細胞核及全細胞的分析。	FCM	以肝細胞核染色體套數為指標，與病灶並無顯著相關。以全細胞中染色體套數為指標，則發現於肝癌組織中2N肝細胞百分比，較正常肝組織中顯著升高(73.1% vs. 54.9%)。雙核細胞百分比於肝癌組織中顯著減少。
Lin et al. [60]	利用1987年到1988年間取得的48名慢性肝炎，17名肝硬化、及8名肝癌病人之檢體進行比較分析。包括63名男性及10名女性個案，平均年齡為36.4歲。	FCM	肝癌細胞染色體比例較各組有顯著增加(肝癌組織>2.5C細胞佔57.56±32.10%，而肝硬化及肝炎中只佔4-3%)肝癌組織傾向多套體化現象。
Anti et al. [8]	以採針取得的68個肝檢體，分成四組比較：正常肝組織、慢性肝炎組織、肝硬化組織、肝硬化中的結節組織。	FCM	肝硬化及慢性肝炎組織中2N/(4N+8N)比值較正常組織中顯著升高(22.7 vs. 7.7; 23.5 vs. 7.7)。肝硬化及慢性肝炎組織雙核細胞百分比較正常組織顯著減少(4.8% vs. 8.6%; 4.2% vs. 8.6%)。

MSP：microspectrophotometry 分光顯微鏡

FCM：flow cytometry 流式細胞計數儀

Taiwan's Health Association  
台灣公共衛生學會



致癌作用不大相同，是否病毒亦可提高2N比例而增加未來發展為肝癌的危險性，是探討病毒致癌機轉的重要方向。

表四所列為近年來探討肝癌組織或不同階段的肝臟病變與染色體套數的研究。以MSP和FCM方法所得的結果有很大的差異：利用MSP方法的研究幾乎皆發現隨著病灶嚴重程度，細胞會因加速DNA合成，使得細胞DNA含量愈趨向多套體化現象；而利用FCM方法的研究則發現人類肝癌的演進過程如動物致癌模式一樣，有2N細胞比例增高的現象。由於MSP會因個人主觀的選擇、製作切片時的細胞重疊、或是觀察細胞的數目過少而造成誤差，但此方法具有可以確實觀察到肝實質細胞的優點，以減少非實質細胞的干擾。利用相同組織比較兩種方法之優劣相當重要，如以Seglen等人[64]先分離出高純度的肝臟實質細胞，再以FCM方式作分析，可能方是最正確而又靈敏的方法。

由Saeter等人[7]的研究發現，併用完整肝細胞的分析結果相當重要，原因是肝組織當中原本就含有不少比例的雙核細胞。以4N雙核細胞( $2 \times 2N$ )為例，若正常組織較腫瘤組織中含有較高比例的4N雙核細胞，便有可能在破壞了細胞膜釋放出2N肝細胞核之後，使2N細胞核的比例增加，導致以細胞核分析的結果，在正常組織與腫瘤組織2N比例無顯著差異，但事實上4N雙核細胞是屬於多倍套體細胞，在保護功能上亦扮演相當重要的角色。

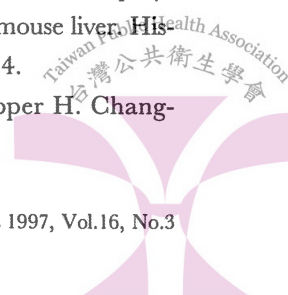
## 結 論

動物化學致癌模式，係在短時期內引起腫瘤發生，與人類病毒長期致癌的過程，確實是有相當大的差異。染色體攜帶著可調控細胞生長的基因，而細胞分裂異常又會導致染色體比例的不正常。導致人類肝癌的病毒是否亦會引發染色體套數的變化而造成癌細胞的生成，值得日後進一步探究。

## 參考文獻

1. Schwarze PE, Pettersen EO, Shoaib MC? Seglen PO. Emergence of a population of small, diploid hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1984; **5**:1267-1275.
2. Styles J, Elliott BM, Lefevre PA, et al. Irreversible depression in the ratio of tetraploid: diploid liver nuclei in rats treated with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'M). *Carcinogenesis* 1985; **6**:21-28.
3. Saeter G, Schwarze PE, Seglen PO. Shift from polyploidizing to nonpolyploidizing growth in carcinogen-treated rat liver. *J Natl Cancer Inst* 1988; **80**:950-958.
4. Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, Juul N, Pettersen EO, Seglen PO. The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis* 1988; **9**:939-945.
5. Schwarze PE, Saeter G, Armstrong D, et al. Diploid growth pattern of hepatocellular tumors induced by various carcinogenic treatments. *Carcinogenesis* 1991; **12**:325-327.
6. Gerlyng P, Grotmol T, Erikstein B, Stokke T, Seglen PO. Reduced proliferative activity of polyploid cells in primary hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 1992; **13**:1795-1801.
7. Saeter G, Lee CZ, Schwarze PE, et al. Changes in ploidy distributions in human liver carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1988; **80**:1480-1485.
8. Anti M, Marra G, Rapaccini GL, et al. DNA ploidy pattern in human chronic liver diseases and hepatic nodular lesions. *Cancer* 1993; **73**:281-288.
9. Seglen PO, Gerlyng P. Growth-related al

- terations during liver carcinogenesis: effect of promoters *Environ Health Persp* 1990; **88**:197-205
10. Epstein R, Gatens EA. Nuclear ploidy in mammalian parenchymal liver cells. *Nature* 1967; **214**:1050-1051.
  11. Carriere R. The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation. *Int Rev Cytol* 1969; **25**:201-277.
  12. Brodsky WY, Uryvaeva IV. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int Rev Cytol* 1977; **50**:275-332.
  13. Wheatley DN. Binucleation in mammalian liver. *Exp Cell Res* 1972; **74**:455-465.
  14. Watanabe T, Tanaka Y. Age-related alterations in size of human hepatocytes. *Virch Arch Cell Pathol* 1982; **39**:9-20.
  15. Ohtsubo K, Nomaguchi TA. A flow cytofluorometric study on age-dependent ploidy class changes in mouse hepatocyte nuclei. *Mech Aging Develop* 1986; **36**:125-131.
  16. Styles JA, Kelly M, Elcombe CR. A cytological comparison between regeneration, hyperplasia, and early neoplasia in the rat liver. *Carcinogenesis* 1987; **8**:391-399.
  17. Gonzalez-Mujica F, Mathias AP. Studies of nuclei separated by zonal centrifugation from liver of rats treated with thioacetamide. *Biochem J* 1973; **132**:163-183.
  18. Neal GE, Bulter WH. A comparison of the changes induced in rat liver by feeding low levels of aflatoxin B1 or an azo dye. *Br J Cancer* 1976; **37**:55-60.
  19. Steele PRM, Yim APC, Herbertson BM, Watson J. Some flow cytofluorimetric studies of the nuclear ploidy of mouse hepatocytes following carbon tetrachloride administration: evidence for polyploid nuclei arrested in telophase. *Br J Exp Pathol* 1981; **62**:474-479.
  20. Tulp A, Welagen JJMN, Westra JG. Binding of the chemical carcinogen Nhydroxy-acetylaminofluorene to ploidy classes of rat liver nuclei as separated by velocity sedimentation at unit gravity. *Chem Biol Interactions* 1978; **23**:293-303.
  21. Farber E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. *Cancer Res* 1984; **44**:5463-5474.
  22. Farber E. The biochemistry of preneoplastic liver: a common metabolic pattern in hepatocyte nodules. *Can J Biochem Cell Biol* 1984; **62**:486-494.
  23. Watkins JB, Thierau D, Schwarz LR. Biotransformation in carcinogen-induced diploid and polyploid hepatocytes separated by centrifuged elutriation. *Cancer Res* 1992; **52**(5):1149-1154.
  24. Wiest L. The effect of diethylnitrosamine on the distribution of cell classes in the parenchyma of the liver of newborn rats. *Eur J Cancer* 1972; **8**:121-125.
  25. Digernes V. Nuclear ploidy of the growing mouse liver: age variations and effects of a carcinogen (dimethylnitrosamine). *Flow Cytometry* 1980; **4**:300-303.
  26. Faktor VM, Uryvaeva IV. Polyploidization of mouse hepatocytes after repeated exposure to carbon tetrachloride. *Bull Exp Biol Med* 1980; **11**:614-616.
  27. Wanson JC, Bernaert D, Penasse W, Mosselmans R, Bannash P. Separation in distinct subpopulations by elutriation of liver cells following exposure of rats to N nitrosomorpholine. *Cancer Res* 1980; **40**:459-471.
  28. Bohm N, Noltemeyer N. Excessive reversible phenobarbital induced nuclear DNA-polyploidization in the growing mouse liver. *Histochemistry* 1981; **72**:63-74.
  29. Holzner JH, Barka T, Popper H. Chang-



- es in deoxyribonucleic acid content of rat liver cells during ethionine intoxication. *J Natl Cancer Inst* 1959; **23**:1215-1225.
30. Laird AK, Barton AD. Cell proliferation in precancerous liver: relation to presence and dose of carcinogen. *J Natl Cancer Inst* 1961; **27**:827-839.
31. Simard A, Cousineau G, Daoust R. Variations in the cell cycle during azo dye hepatocarcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1968; **41**:1257-1263.
32. Neal GE, Godoy HM, Judah DJ, Butler WH. Some effects of acute and chronic dosing with aflatoxin B1 on rat liver nuclei. *Cancer Res* 1976; **36**:1771-1778.
33. Seglen PO, Schwarze PE, Saeter G. Changes in cellular ploidy and autophagic responsiveness during rat liver carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 1986; **14**:342-348.
34. Deleener A, Castelain P, Peat V, de Gerlache J, Alexandre H, Kirsch-Volders M. Changes in nuclear transcriptional activity and nuclear DNA content during the first steps of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1987; **8**:195-201.
35. Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, Seglen PO. Diploid nature of hepatocellular tumors developing from transplanted preneoplastic liver cells. *Br J Cancer* 1989; **59**:198-205.
36. Lajtha LG. Stem cell concepts. Differentiation 1979; **14**:23-24.
37. Stich HF. The DNA content oftumor cells. II. Alterations during the formation of hepatomas in rats. *J Natl Cancer Inst* 1960; **24**:1283-1297.
38. Christie GS, Le Page RN. Enlargement of liver cell nuclei: effect of dimethylnitrosamine on size and deoxyribonucleic acid content. *Lab Invest* 1961; **10**:729-743
39. Koulisch S, Lessler MA. Cytological aspects of normal and tumorous liver. *Cancer Res* 1962; **22**:1188-1196.
40. Inui N, Takayama S, Kuwabara N. DNA measurement on cell nucleus of normal liver, adenoma and hepatoma in mice: histologic features. *J Natl Cancer Inst* 1971; **47**:47-58.
41. Mori H, Tanaka T, Sugie S, Takahashi M, Williams GM. DNA content of liver cell nuclei of N-2-fluorenylacetamide-induced altered foci and neoplasms in rats and human hyperplastic foci. *J Natl Cancer Inst* 1982; **69**:1277-1282.
42. Auer G, Tribukait B. Comparative single cell and flow DNA analysis in aspiration biopsies from breast carcinomas. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A* 1980; **88**:355-358.
43. Kreicberg A, Cewrien G, Tribukait B, Zetterberg A. Comparative single-cell and flow DNA analysis of bone sarcoma. *Anal Quant Cytol* 1981; **3**:121-127.
44. Fossa SD, Thoru E, Vaage S, Shoaio HC. DNA cytometry of primary breast cancer. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A* 1983; **91**:235-243.
45. Cornelisse CJ, de Koning HR, Moolenaar AJ, van de Velde CJ, Ploem JS. Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer. *Anal Quant Cytol* 1984; **6**:9-18.
46. Leuchtenberger C, Helweg-Larsen HF, Murmanis L. Relationship between hereditary pituitary dwarfism and the formation of multiple deoxyribose nucleic acid (DNA) classes in mice. *Lab Invest* 1954; **3**:245-260.
47. Ezaki T, Kanematsu T, Okamura T, Sonoda T, Sugimachi K. DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. *Cancer* 1988; **61**:106-109.
48. Fujimoto J, Okamoto E, Yamanaka N.



- Toyosaka A, Mitsunobu M. Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1991; **67**:939-944.
49. Cong W, Wu M. The biopathologic characteristics of DNA content of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1990; **66**:498-501.
50. Chen MF, Hwang TL, Tsao KC, Sun CF, Chen TJ. Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma: preliminary report. *Surgery* 1991; **109**:455-458.
51. McEntee GP, Batts KA, Katzmann JA, Ilstrup DM, Nagomey DM. Relationship of nuclear DNA content to clinical and pathologic findings in patients with primary hepatic malignancy. *Surgery* 1992; **111**:376-379.
52. Nagasue N, Yamanoi A, Takemoto Y, et al. Comparison between diploid and aneuploid hepatocellular carcinomas: a flow cytometric study. *Br J Surg* 1992; **79**:667-670.
53. Chiu IH, Kao HL, Wu LH, Chang HM, Lui WF. Prediction of relapse or survival after resection in human hepatomas by DNA flow cytometry. *J Clin Invest* 1992; **89**:539-545.
54. Kuo SH, Sheu JC, Chen DS, Sung JL, Lin CC, Hsu HC. DNA clonal heterogeneity of hepatocellular carcinoma demonstrated by Feulgen-DNA analysis. *Liver* 1987; **7**:359-363.
55. Nagasue N, Kohno H, Chang YC, et al. DNA ploidy pattern in synchronous and metachronous hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 1992; **16**:208-214.
56. Nagasue N, Kohno H, Hayashi T, et al. Lack of intratumoral heterogeneity in DNA ploidy pattern of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 1993; **105**:1449-1454.
57. Koike Y, Suzuki Y, Nagata A, Furuta S, Nagata T. Studies on DNA content of hepatocytes in cirrhosis and hepatoma by means of microspectrophotometry and radioautography. *Histochemistry* 1982; **73**:549-562.
58. Koike Y, Kamijyo K, Suzuki Y, et al. DNA content of hepatocytes in various stages of liver cirrhosis. *Liver* 1985; **5**:156-161.
59. Kuo SH, Sheu JC, Chen DS, Sung JL, Lin CC, Hsu HC. Cytophotometric measurements of nuclear DNA content in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1987; **7**:330-332.
60. Lin HH, Shyu WC, Chen GL, Lin YH, Chen TJ, Liaw YF. DNA measurements in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Liver* 1990; **10**:313-318.
61. Esumi M, Aritaka T, Arii M, et al. Clonal origin of human hepatoma determined by integration of hepatitis B virus DNA. *Cancer Res* 1986; **46**:5767-5771.
62. Chen PJ, Chen DS, Lai MY, et al. Clonal origin of recurrent hepatocellular carcinomas. *Gastroenterol* 1989; **96**:527-529.
63. Hsu HC, Chiou TJ, Chen JY, Lee CS, Lee PH, Peng SY. Clonality and clonal evolution of hepatocellular carcinoma with multiple nodules. *Hepatol* 1991; **13**:923-928.
64. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Meth Cell Biol* 1976; **13**:29-83.

## CHANGES IN HEPATIC CHROMOSOMAL PLOIDY AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA

CHAO-CHIN CHANG<sup>1</sup>, CHIEN-JEN CHEN<sup>2</sup>

In normal livers of mammals, hepatocytes proceed polyploidization which is thought to evolve for self-protection of livers. The polyploidization is age-dependent. Animal studies showed an increase in diploid proportion gradually from precancerous stage to hepatocellular carcinoma (HCC) induced by chemicals; similar findings were also observed in hepatocarcinogenesis of human studies. Because the increasing diploid proportion is inclined to activate oncogenes and lose tumor suppressor genes, it is believed to be related to the de-

velopment of cancer. Changes of DNA content has been used in predicting the prognosis of patients affected with HCC and also in studies of clonal expansion of HCC. As most human HCC is related to hepatitis viral infection and multifactorial in origin, its ploidy changes may be different from chemical-induced HCC in animal models. This review summarizes the role of chromosomal ploidy changes during hepatocarcinogenesis. (*Chin J Public Health. (Taipei): 1997; 16(3): 185-197*)

**Key words:** *chromosomal ploidy; polyploidization, diploidy, hepatocellular carcinoma.*

<sup>1</sup> Graduate Institute of Public Health, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

<sup>2</sup> Graduate Institute of Epidemiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan