



## 暗色上皮細胞與口腔癌前期病灶之關係

賴德榮 林立民 陳鴻榮

高雄醫學院牙醫學系

暗色上皮細胞 (dark epithelial cells) 已被發現於經化學致癌劑誘導之鼠類氣管上皮性癌前期病灶，同樣地，人類呼吸道之癌前期病灶亦被證實可觀察到這些細胞之存在。本研究乃針對 24 例發生於口腔之癌前期病灶 (pre-malignant lesions)，先按其病理組織學上之發育異常 (dysplasia) 程度，分成輕度、中等、嚴重發育異常及原位癌四類，再計算暗色細胞出現於各類發育異常上皮基底細胞層中之百分率，其結果如下：輕度者 (slight dysplasia)  $10.6 \pm 0.6\%$ ，中等者 (moderate dysplasia)  $22.9 \pm 0.8\%$ ，嚴重者 (severe dysplasia)  $23.9 \pm 0.4\%$ ，及原位癌 (carcinoma in situ)  $31.4 \pm 0.9\%$ 。由此結論可知(1)暗色細胞出現於上皮基底層之百分率會隨著病灶的發育異常程度之嚴重性而相對顯著的增加，(2)暗色細胞可能當做一種初期腫瘤病灶嚴重性之指標。

**Key words:** dark epithelial cells, leukoplakia, dysplasia, carcinogenesis, toluidine blue.

暗色上皮細胞，白斑症，發育異常，癌化過程，甲苯胺藍。

在正常人與齧齒類動物之表皮，經由電子顯微鏡下觀察，可發現具有暗色上皮細胞<sup>1,2</sup> (dark epithelial cells)，爾後，一系列之文獻相繼證實這些細胞除了出現於正常之表皮外，其他如胚胎<sup>3</sup>和傷口<sup>4</sup>上皮及以致癌與促癌劑誘導處理之上皮性病灶<sup>5,6</sup>中，亦可被發現。

所謂暗色上皮細胞，簡稱暗色細胞 (dark cells, D-cells)，具有下列兩點組織學上特徵<sup>7</sup>：(1)對於鹽基性染料有很強之親和力 (affinity)，(2)核大且顯著核仁與含有許多游離性核酸醣小體之胞體漿，均為高電子密度 (high electron-density)，這些細胞曾一度被認為是屬於腫瘍性角質化細胞的一種去分化性前質<sup>8</sup> (dedifferentiated precursors)。

有關暗色細胞在口腔病灶方面之研究文獻並不多見，祇有 Banoczy<sup>9</sup>於白斑症 (leukoplakia) 之上皮基底層發現這些細胞，與 Klein-Szanto<sup>7</sup>等學者之研究報告指出白斑症之臨床類型中之疣狀型 (verrucosa) 與糜瘍型 (erosi-

va) 的基底層具有較高之暗色細胞百分率 (分別為 27.0%，28.0%) 而多於簡單型 (simplex) 者 (10.0%)。此外，他們另外所進行之暗色上皮細胞在鼠類與人類之呼吸道黏膜上皮之癌前期病灶的幾篇研究報告<sup>10,11</sup>其結果皆一致，即暗色細胞數目之多寡與癌前期病灶組織的發育異常 (dysplasia) 程度，有著密切關係，而認為暗色細胞不失為一種良好之發育異常指標。

由於有關口腔方面暗色細胞之研究不多<sup>12</sup>，因此本篇研究乃要探討有關暗色細胞在基底層之出現百分率與口腔黏膜上皮性病性由癌前期 (pre-malignancy) 至原位癌 (carcinoma in situ) 階段之異常程度是否呈現正比例之關係；同時，與其他學者們的研究結果做一相對性比較。

### 材料與方法

24 位 (男性 23 位，女性 1 位) 罹患頰部之口腔癌前期病灶之患者，根據 MacDonald,

Katz, Pindborg 等學者所報告之病理組織學上發育異常程度標準<sup>1,2</sup>將病灶分為：輕度者 (slight dysplasia) 6 位、中等者 (moderate dysplasia) 6 位、嚴重者 (severe dysplasia) 6 位、及原位癌 6 位；另外，正常者 6 位。經由文獻回顧<sup>3,4</sup>，我們除了以傳統之福馬林固定液與石臘包埋處理標本外，且利用 Epon 樹脂包埋經戊二醛 (glutaraldehyde) 固定液處理過之病灶組織標本，先切成 1 micron 厚之切片，經甲苯胺藍 (toluidine blue) 染色後，於一般光學顯微鏡下，即可清晰分辨出這些暗色細胞。而計數這些細胞之方法是依照學者所提出之報告<sup>5</sup>於每個病灶組織切片上所有基底細胞群中，將組織病灶區隨意抽樣分成 4 個界面 (section)，而每個單位界面約有 250 個基底細胞，計數時輔以 (100 $\mu$ m<sup>2</sup>) 之單位網狀格子 (reticular eyepiece) 每個病例所有計數基底細胞總共約 1000 個，一般於光學顯微鏡放大倍率 400x 下即可計算之。若再經由細薄切片並以 uranyl acetate 及 lead citrate 行雙重染色，即可在穿透式電子顯微鏡下 (transmission electron microscopy) 觀察到這些暗色細胞之超顯微特徵。本研究統計方法利用 Wilcoxon signed rank test,  $\alpha$  值定於 0.05，若 P 值小於 0.05，表示在統計學上有顯著差異。

## 結 果

1 micron 厚之切片經甲苯胺藍染色後，於一般光學顯微鏡下，可看出些許梭形暗色細胞分散於基底層之上皮細胞群中 (圖 1)。而在穿透式電子顯微鏡下可觀察這些波狀細胞之超顯微特徵 (圖 2)，包括具有高電子密度之核仁與胞體漿，主要基於前者具有緻密的染色質，而後者則具有大量堆積之線粒體與游離性核酸醣小體；另外在核周邊可見胞體漿性纖維束與細胞間些許之胞橋小體 (desmosome)。有時，在暗色細胞之旁邊亦可發現另一種較大而呈卵圓形之基底上皮性細胞，稱之為白晰細胞 (clear



圖 1. 頰部黏膜之中等發育異常的白斑病灶上皮基底層可見一些暗色上皮細胞 (箭頭所指) (甲苯胺藍染色, 150x)。



圖 2. 圖中所見之暗色細胞 (D) 來自中等發育異常之頰部黏膜病灶，具波浪狀外形，內含高電子密度之核仁，核周邊有胞體漿性纖維束 (fb)；而胞體漿內可見堆積之核酸醣小體 (rs) 及線粒體 (m)；此外，細胞上方之胞橋小體 (ds) 亦為清晰可見。(2800x)



圖 3. 暗色細胞 (D) 與白晰細胞 (C) 同時出現於嚴重性發育異常病灶，兩者具有相似之超顯微結構特徵，後者呈卵圓外形，內含物較不緻密。(2100x)

有較多之高氏複合體與分解微粒等；此種具電子透晰性 (electron-lucent) 胞體漿中另含稀疏之細胞器、纖維小束及染色質等。

暗色細胞出現於正常之口腔黏膜上皮之基底層約  $3.0 \pm 0.2\%$  左右，而在癌前期病灶中具有組織學上輕度發育異常者約為  $10.6 \pm 0.6\%$ ，至於其他具有中等與嚴重程度發育異常者之百分率分別約為  $22.9 \pm 0.8\%$  及  $23.9 \pm 0.4\%$ ，而以原位癌之  $31.4 \pm 0.9\%$  為最高 (表 1)。由表 1 各組間加以比較，除了第 III 組 (中等程度發育異常) 與第 IV 組 (嚴重發育異常) 比較並無顯著的差別 ( $P > 0.05$ ) 外，其餘皆有顯著的差別 ( $P < 0.05$ )。

### 討 論

檢視暗色細胞於基底細胞群中之出現百分率是依據口腔黏膜病灶之病理組織切片在光學顯微鏡所分之輕度、中等、嚴重上皮細胞發育異常之情形而決定，本檢視方法與 Klein-Szanto<sup>7</sup> 等學者依白斑病之臨床類型不同，根據

cells) (圖 3)，其具有與暗色細胞相類似之超顯微細胞構造，但較為不緻密性，其內另外含

表 1. 暗色細胞在正常及癌前期病灶上皮出現之百分率

組別	暗色細胞在基底層出現之百分率 (%) *
I. 正常頰部 (6) †	$3.0 \pm 0.2$ ‡
II. 輕度發育異常 (6)	$10.6 \pm 0.6$
III. 中等發育異常 (6)	$22.9 \pm 0.8$
IV. 嚴重發育異常 (6)	$23.9 \pm 0.4$
V. 原位癌 (6)	$31.4 \pm 0.9$

\* 每個病例之基底細胞群中，隨意抽樣分成 4 個界面，每單位界面約有 250 個基底細胞，而所有計數基底細胞總共有 1000 個。

† 括弧內數字即病例數。

‡ 數值表示平均值 ± 標準差，本研究統計採用 Wilcoxon signed rank test.

顯著差異 ( $P < 0.05$ ) : I vs II, I vs III, I vs IV, I vs V, II vs III, II vs IV,

II vs V, III vs V, IV vs V.

無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) : III vs IV.

Raick<sup>4,5</sup>及多位學者所述在其他上皮性癌化過程 (carcinogenesis) 模式中, 腫瘍發展過程可發現某些原始細胞群體之細胞各具特異外型, 有如胚胎細胞般之生理與形態上之狀況, 而這些新細胞表型 (phenotype) 具有許多游離性核酸醣小體, 正是去分化型細胞之特徵, 其意味著這些細胞喪失一部份之分化功能, 相對的此與腫瘍性之快速成長為肉眼可見之腫瘤塊, 有著密切關係。因此, 我們主張以病理組織學上之發育異常程度做為分類等級似乎較為準確合理。

本實驗與 Klein-Szanto<sup>7</sup> 等學者之實驗比較, 對口腔之癌前期病灶裏計數基底細胞層暗色細胞之數目, 我們發現兩者之百分率約略相近, 且皆呈現相同之增加傾向; 即愈嚴重之病灶, 基底層之暗色細胞出現百分率愈高。另一方面, 根據他們<sup>12</sup>之系列研究有關暗色細胞之實驗結果顯示先經福馬林或其他非緩衝固定液處理過之舊標本組織腊塊, 經重新熔腊、固定及以 Epon 包埋處理後將會影響減低這些細胞數目之百分率。因此, 他們認為戊二醛固定液為檢視暗色細胞之理想的緩衝固定液。一般而言, 目前進行電子顯微鏡檢之標本固定處理, 普遍皆以戊二醛為固定液之選擇。

同為癌前期病灶之鼠類與人類基底層暗色細胞, 在一般光學顯微鏡下所見特徵均為一致性<sup>17</sup> (homogeneous), 但在超顯微鏡下, 暗色細胞之外型結構等特徵却不一致; 根據 Klein-Szanto 等學者<sup>11</sup>將這些細胞區分成 5 種不同之類型, 其中大部份會出現於不同程度之發育異常病灶上皮, 尤以第 III 類型 (去分化型) 暗色細胞在致癌質所誘導之病灶中, 最具病徵的 (pathognomonic), 他們認為這些細胞在基底層出現之百分率似乎是變異性病灶之一種良好指標。本研究之口腔黏膜癌前期病灶上皮所發現者, 並無涵蓋所有類型, 這種差異性是否在於人類與動物實驗中, 因外在環境不同之致癌質的化學毒性? 抑或某種維生素缺乏等因素

之緣故? 則有待進一步於不同動物族系來加以研究探討暗色細胞之本質。作者等<sup>18</sup>已進行倉鼠之口腔頰袋黏膜癌化過程之實驗, 其中有一組涉及添加促癌劑巴豆油之主成份 12-o-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) 後, 在電子顯微鏡下檢視發現病灶上皮之基底層細胞中有些許奇異型之暗色細胞, 這初步證實了致癌質或促癌劑的化學毒性確實會引致具病徵性暗色細胞之出現。

總結本研究發現暗色細胞出現於上皮基底層中之百分率和口腔癌前期病灶發育異常之嚴重程度呈正比例關係, 即病灶由發育異常進展至更嚴重時, 暗色細胞愈顯著增加, 此與 Klein-Szanto 等位學者之報告相一致。在癌化過程中, 暗色細胞所扮演之角色及其本質如何有待更進一步研討; 根據本實驗的初期結果判斷, 它們可能做為癌初期病灶中有關發育異常程度之參考指標; 若能再配合其他如細胞學與組織學上之特徵, 做一綜合性之參考比較, 則將有助於吾人對口腔黏膜癌初期之病灶診斷上更加趨於正確之分類等級。

本文曾以摘要形式發表於民國 77 年台灣醫學學會總會。

## 參考文獻

1. Klein-Szanto AJP. Clear and dark basal keratinocytes in human epidermis. A stereologic study. *J Cutan Pathol*, 4: 275-280, 1977.
2. Klein-Szanto AJP, Major SK, Slaga TJ. Induction of dark keratinocytes by TPA and mezerein as an indicator of tumor-promoting efficiency. *Carcinogenesis*, 1: 399-406, 1980.
3. Matsunaka M, Mishima Y. Electron microscopy of embryonic human epidermis at seven and ten weeks. *Acta Dermato-Veneriol*, 49: 241-250, 1969.
4. Raick AN. Ultrastructural, histological and biochemical alterations produced by TPA on mouse epidermis and their relevance to skin tumor promotion. *Cancer Res*, 33: 269-286, 1973.
5. Raick AN. Cell differentiation and tumor-promoting action in skin carcinogenesis. *Cancer Res*, 34: 2915-2925, 1974.
6. Lupulescu A, Pinkus H. Electron microscopic

- observations on rat epidermis during experimental carcinogenesis. *Oncology*, 33: 24-28, 1976.
7. Klein-Szanto AJP, Sega M, Banoczy J, Albrecht M. Dark cells in human oral leukoplakias. *J Oral Pathol*, 11: 228-236, 1982.
  8. Banoczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Maxillofac Surgery*, 5: 69-75, 1977.
  9. Klein-Szanto AJP, Nettesheim P, Topping DC, Olson A. Quantitative analysis of disturbed cell maturation in dysplastic lesions of the respiratory tract epithelium. *Carcinogenesis*, 1: 1007-1016, 1980.
  10. Klein-Szanto AJP, Topping DC, Heckman CA, Nettesheim P. Ultrastructural characteristics of carcinogen-induced non-dysplastic changes in tracheal epithelium. *Am J Pathol*, 98: 61-82, 1980.
  11. Klein-Szanto AJP, Topping DC, Heckman CA, Nettesheim P. Ultrastructural characteristics of carcinogen-induced dysplastic changes in tracheal epithelium. *Am J Pathol*, 98: 83-100, 1980.
  12. Klein-Szanto AJP, Saccomanno G, Nettesheim P. Dark epithelial cells in preneoplastic lesions of the human respiratory tract. *Cancer*, 50: 107-113, 1982.
  13. MacDonald DG. Comparison of epithelial dysplasia in hamster cheek pouch carcinogenesis and human oral mucosa. *J Oral Pathol*, 10: 186-191, 1981.
  14. Katz HC, Shear M, Altini M. A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. *J Oral Pathol*, 14: 476-482, 1985.
  15. Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Subjectivity in evaluation oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol*, 14: 698-708, 1985.
  16. Lin LM, Goepf RA. Diurnal variation of DNA synthesis in premalignant hamster cheek pouch. *Cell Tissue Kinet*, 16: 593, 1983.
  17. Klein-Szanto AJP, Nettesheim P, Pine A, Martin D. Distribution and ultrastructural characteristics of dark cells in squamous metaplasia of the respiratory tract epithelium. *Am J Pathol*, 103: 263-270, 1981.
  18. 賴德榮. 倉鼠之口腔頰袋黏膜癌化過程中致癌與促癌作用之研究. 碩士論文, 高雄醫學院牙醫學研究所, 高雄台灣, 1988.

## Dark epithelial cells in oral premalignant lesions

DER-RONG LAI, LI-MIN LIN AND HONG-RONG CHEN

*School of Dentistry, Kaohsiung Medical College, Kaohsiung, Taiwan, ROC.*

Dark basal epithelial cells (D cells) are characterized by a strong affinity for basic dyes and by the high electron density of the cytoplasm and nucleus. These cells have been considered to be putative dedifferentiated precursors of a neoplastic keratinocyte. They are significantly increased in preneoplastic lesions of the human airway and rat trachea induced with chemical carcinogens and/or tumor promoters. Twenty-four cases of oral premalignant lesions were classified as slight, moderate and severe dysplasia, and carcinoma in situ according to the histologic criteria proposed by MacDonald, Katz and Pindborg. The percentage of appearance in D-cells of the dysplastic basal layer was calculated and shown as follows: in slight dysplasia  $10.6 \pm 0.6\%$ , in moderate dysplasia  $22.9 \pm 0.8\%$ , in severe dysplasia  $23.9 \pm 0.4\%$ , and in carcinoma in situ  $31.4 \pm 0.9\%$ .

This result revealed that the increase in the number of D-cells in the basal epithelial layer was in proportion to the severity of the epithelial dysplasia. Thus, the D-cells probably can be used as an indicator in premalignant lesions of the oral cavity.

---

*Received: December 2, 1989*

*Accepted: February 28, 1990*

*Reprint requests to: Dr. Der-Rong Lai, School of Dentistry, Kaohsiung Medical College, No. 100, Su-Chuen 1st Road, Kaohsiung, Taiwan 80731, ROC.*

Katz, Pindborg 等學者所報告之病理組織學上發育異常程度標準<sup>13-15</sup>將病灶分為：輕度者 (slight dysplasia) 6 位、中等者 (moderate dysplasia) 6 位、嚴重者 (severe dysplasia) 6 位、及原位癌 6 位；另外，正常者 6 位。經由文獻回顧<sup>7, 12</sup>，我們除了以傳統之福馬林固定液與石腊包埋處理標本外，且利用 Epon 樹脂包埋經戊二醛 (glutaraldehyde) 固定液處理過之病灶組織標本，先切成 1 micron 厚之切片，經甲苯胺藍 (toluidine blue) 染色後，於一般光學顯微鏡下，即可清晰分辨出這些暗色細胞。而計數這些細胞之方法是依照學者所提出之報告<sup>16</sup>於每個病灶組織切片上所有基底細胞群中，將組織病灶區隨意抽樣分成 4 個界面 (section)，而每個單位界面約有 250 個基底細胞，計數時輔以 (100um<sup>2</sup>) 之單位網狀格子 (reticular eyepiece) 每個病例所有計數基底細胞總共約 1000 個，一般於光學顯微鏡放大倍率 400x 下即可計算之。若再經由細薄切片並以 uranyl acetate 及 lead citrate 行雙重染色，即可在穿透式電子顯微鏡下 (transmission electron microscopy) 觀察到這些暗色細胞之超顯微特徵。本研究統計方法利用 Wilcoxon signed rank test,  $\alpha$  值定於 0.05，若 P 值小於 0.05，表示在統計學上有顯著差異。

## 結 果

1 micron 厚之切片經甲苯胺藍染色後，於一般光學顯微鏡下，可看出些許梭形暗色細胞分散於基底層之上皮細胞群中 (圖 1)。而在穿透式電子顯微鏡下可觀察這些波狀細胞之超顯微特徵 (圖 2)，包括具有高電子密度之核仁與胞體漿，主要基於前者具有緻密的染色質，而後者則具有大量堆積之線粒體與游離性核酸醣小體；另外在核周邊可見胞體漿性纖維束與細胞間些許之胞橋小體 (desmosome)。有時，在暗色細胞之旁邊亦可發現另一種較大而呈卵圓形之基底上皮性細胞，稱之為白晰細胞 (clear

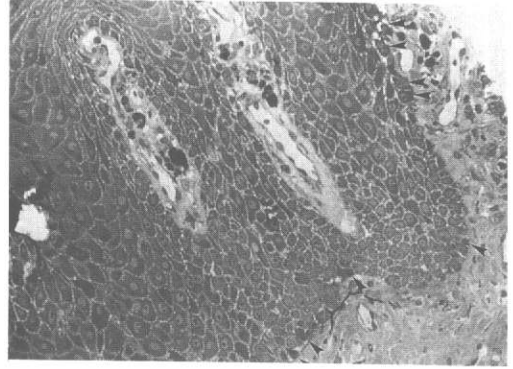


圖 1. 頰部黏膜之中等發育異常的白斑病灶上皮基底層可見一些暗色上皮細胞 (箭頭所指) (甲苯胺藍染色, 150x)。

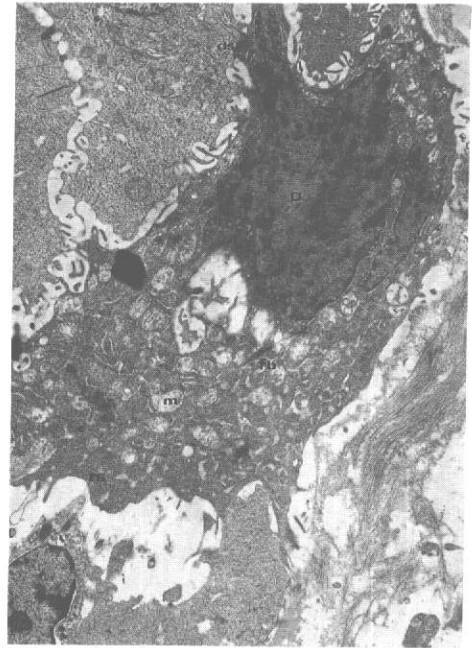


圖 2. 圖中所見之暗色細胞 (D) 來自中等發育異常之頰部黏膜病灶，具波狀外形，內含高電子密度之核仁，核周邊有胞體漿性纖維束 (fb)；而胞體漿內可見堆積之核酸醣小體 (rs) 及線粒體 (m)；此外，細胞上方之胞橋小體 (ds) 亦為清晰可見。(2800x)

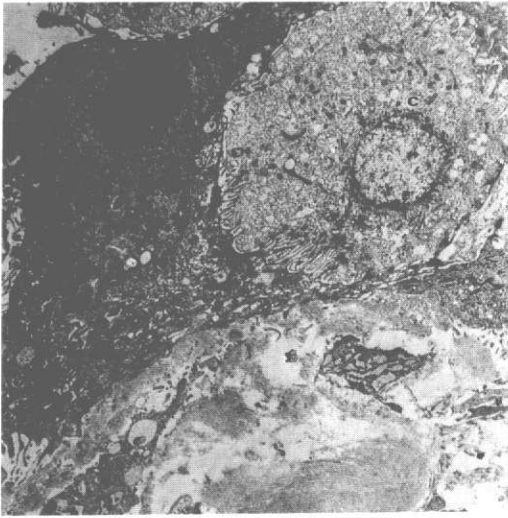


圖 3. 暗色細胞 (D) 與白晰細胞 (C) 同時出現於嚴重性發育異常病灶，兩者具有相似之超顯微結構特徵，後者呈卵圓外形，內含物較不緻密。(2100x)

cells) (圖 3)，其具有與暗色細胞相類似之超顯微細胞構造，但較為不緻密性，其內另外含

有較多之高氏複合體與分解微粒等；此種具電子透晰性 (electron-lucent) 胞體漿中另含稀疏之細胞器官、纖維小束及染色質等。

暗色細胞出現於正常之口腔黏膜上皮之基底層約  $3.0 \pm 0.2\%$  左右，而在癌前期病灶中具有組織學上輕度發育異常者約為  $10.6 \pm 0.6\%$ ，至於其他具有中等與嚴重程度發育異常者之百分率分別約為  $22.9 \pm 0.8\%$  及  $23.9 \pm 0.4\%$ ，而以原位癌之  $31.4 \pm 0.9\%$  為最高 (表 1)。由表 1 各組間加以比較，除了第 III 組 (中等程度發育異常) 與第 IV 組 (嚴重發育異常) 比較並無顯著的差別 ( $P > 0.05$ ) 外，其餘皆有顯著的差別 ( $P < 0.05$ )。

## 討 論

檢視暗色細胞於基底細胞群中之出現百分率是依據口腔黏膜病灶之病理組織切片在光學顯微鏡所分之輕度、中等、嚴重上皮細胞發育異常之情形而決定，本檢視方法與 Klein-Szanto<sup>7</sup> 等學者依白斑病之臨床類型不同，根據

表 1. 暗色細胞在正常及癌前期病灶上皮出現之百分率

組別	暗色細胞在基底層出現之百分率(%)*
I. 正常頰部 (6)†	$3.0 \pm 0.2 \ddagger$
II. 輕度發育異常 (6)	$10.6 \pm 0.6$
III. 中等發育異常 (6)	$22.9 \pm 0.8$
IV. 嚴重發育異常 (6)	$23.9 \pm 0.4$
V. 原位癌 (6)	$31.4 \pm 0.9$

\* 每個病例之基底細胞群中，隨意抽樣分成 4 個界面，每單位界面約有 250 個基底細胞，而所有計數基底細胞總共有 1000 個。

† 括弧內數字即病例數。

‡ 數值表示平均值 ± 標準差，本研究統計採用 Wilcoxon signed rank test.

顯著差異 ( $P < 0.05$ ) : I vs II, I vs III, I vs IV, I vs V, II vs III, II vs IV, II vs V, III vs V, IV vs V.

無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) : III vs IV.