

利用同步輻射紅外顯微光譜研究人類口腔癌之有機蠟吸附紅外動力學

An Infrared Kinetic Study of Wax Physisorption for Oral Cavity Cancer Detection Using Synchrotron-Based Infrared Microspectroscopy

李耀昌、黃佩瑜、張雅筑、陳慶曰

Yao-Chang Lee, Pei-Yu Huang, Ya-Chu Chang, Ching-lue Chen

本研究以同步輻射紅外顯微光譜為基礎的紅外動力學方法，探討有機蠟對人類口腔細胞組織的物理吸附能力與細胞組織癌化的關連性，藉由量測有機蠟殘留在細胞組織上動力學時間作為判定細胞組織癌化的依據。有機蠟吸附紅外動力學結果顯示石蠟分子對人類口腔正常角質細胞株及正常口腔組織有較強的物理吸附能力，而對癌細胞組織的吸附能力則明顯較弱。相反的，在蜜蠟吸附紅外動力學結果則顯示人類口腔上皮鱗狀癌細胞株及口腔癌組織與蜜蠟分子之間有較強的吸附能力，而對正常細胞組織卻較弱。因此我們認為石蠟及蜜蠟分別對正常細胞組織及癌化細胞組織具有專一選擇性的動力學吸附，所以有機蠟吸附紅外動力學法未來在臨床病理檢測上將是一個具有潛力的快速癌症篩檢方法。

The present study employed synchrotron-based infrared microspectroscopy (SR-IMS) to establish the correlation of kinetic physisorption between wax molecules and oral cavity cells/ tissues for diagnosing oral cavity cancer. The absorbance of $\nu_s\text{CH}_2$ and $\nu_{as}\text{CH}_2$ of waxed sample in the spectral range of $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ enabled to be a signpost of wax remained onto the cells or tissues during the kinetic dewaxing procedures. The results revealed that the cell line of oral epidermoid carcinoma cell meng-1 (OECM-1) showed a physisorption preference for beeswax ($\text{C}_{46}\text{H}_{92}\text{O}_2$) but not paraffin ($\text{C}_{25}\text{H}_{52}$). On the contrary, the cell lines of normal human oral keratinocytes (NHOK) exhibited a physisorption preference with paraffin but not beeswax. Expectably, the tissues of oral cavity cancer and normal oral cavity showed a consistency of physisorption preference of wax with the cell lines of OECM-1 and NHOK, respectively, in the infrared kinetic study of oral cavity tissue. According to our findings, paraffin and beeswax revealed a specific selectivity for normal and cancer of oral cavity tissue, respectively. Therefore, paraffin-beeswax-based infrared kinetics will be one of promise methods for detection oral cavity cancer.

一、前言

二十一世紀癌症仍然是人類重要的死亡原因，當癌細胞異常的分裂，會局部侵入 (invasion) 週遭正常組織，甚至經由體內循環系統或淋巴系統轉移 (metastasis) 到身體其他部分，是導致治療失敗的主要原因。若癌症能早期發現及快速判斷病變位置，則可正確治療並大幅提升存活率。

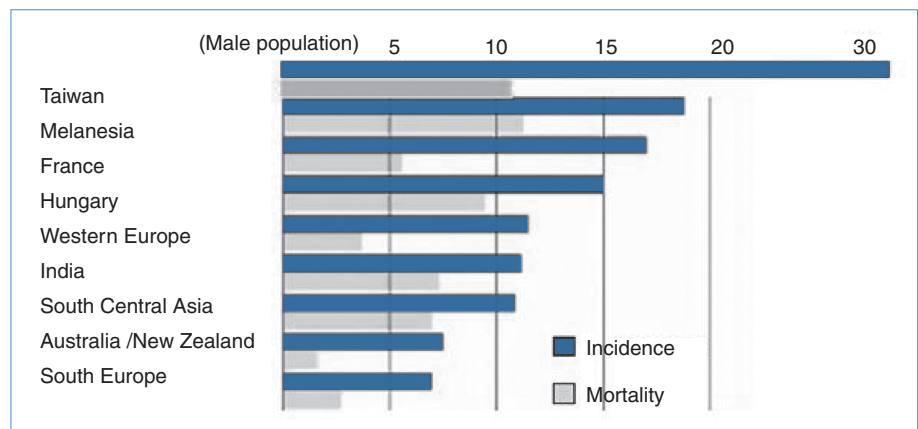
依據 2007 年世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 統計，全世界有七百九十萬人死於癌症，佔全世界死亡人口的 13%，其中以肺癌 (lung cancer)、胃癌 (gastric cancer)、肝癌 (liver cancer)、結腸癌 (colorectal cancer) 及乳癌 (breast cancer) 為造成死亡率高的主要病症⁽¹⁾。口腔癌 (oral cavity cancer) 雖然非主要死亡率的病症，但 2007 年美國癌症協會 (American Cancer Society, ACS) 統計罹患癌症人口達 1,444,920 人，其死亡率高達 40%，其中口腔癌及鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma) 罹患者有 34,360 人，其死亡率亦高達 22%⁽²⁾。在臺灣大部分口腔癌患者因有嚼食檳榔的習慣，所以造成每十萬人中就有高達 30 人以上的罹患率，如圖 1 所示，位居全球之冠，且 1995 年口腔癌罹患率及死亡率已超越鼻咽癌，並成為頭頸部癌症的第一位，其中口腔癌患者佔約 80% 是以頰黏膜癌和舌癌為主。目前口腔癌的早期病變不容易被發現，直到病患發覺口腔潰爛久不癒合、口腔中的紅斑及白斑的病徵陸續出現，最後導致組織癌化。口腔癌的檢查一般由病理醫師用眼睛看及用手觸摸口腔病變作完整的檢查，但最重要的診斷方法

是病理組織切片診斷檢查，病理醫師憑藉著病理知識及經驗判定組織切片為良性或惡性病變，若需獲得進一步的病理資訊則必須透過一連串的生物技術進行檢測。若能在發生病變初期及早發現，將能大幅提升治癒機率，因此建立一快速有效的口腔癌的篩檢方法是非常重要的。

紅外顯微光譜 (infrared microspectroscopy, IMS) 結合紅外吸收光譜法與顯微術，為一種非侵入式且快速分析樣品組成的技術，不需複雜的樣品製備又可快速取得微小樣品成分的光譜，其光譜可提供鑑別物質分子結構的指紋 (fingerprint) 振動頻率，藉此分析細胞組織樣品中的成分之官能機 (functional group)，如圖 2 所示。此外，以同步輻射為光源的同步輻射紅外顯微光譜 (synchrotron-radiation-based infrared microspectroscopy, SR-IMS)，提供接近繞射極限之空間解析度 (約 8 μm) 進行樣品的二維紅外光譜影像 (two dimensional infrared spectral images) 或化學影像 (chemical images) 的分析。此技術可快速分析人體細胞組織內生物成分之組成及其空間的分布，因此紅外顯微光譜將成為癌症篩選的有力工具之一。

在一般口腔癌之臨床病理分析上，病理醫師藉由分析 H&E 染色之組織切片的細胞形貌變化作為判斷癌組織的依據，但病理分析的結果會因分析人員經驗上的判斷而使得結果有所差異。因此，近十年來利用紅外顯微光譜為基礎的病理分析及癌症篩檢的研究報告有明顯增加趨勢⁽³⁻⁹⁾，亦有利用拉曼散射光譜 (Raman scattering spectroscopy) 及螢光光譜 (fluorescence spectroscopy) 進行口腔癌篩檢⁽¹⁰⁻¹⁴⁾。

圖 1. 世界健康組織統計部分國家發生口腔癌之罹患率及其死亡率。



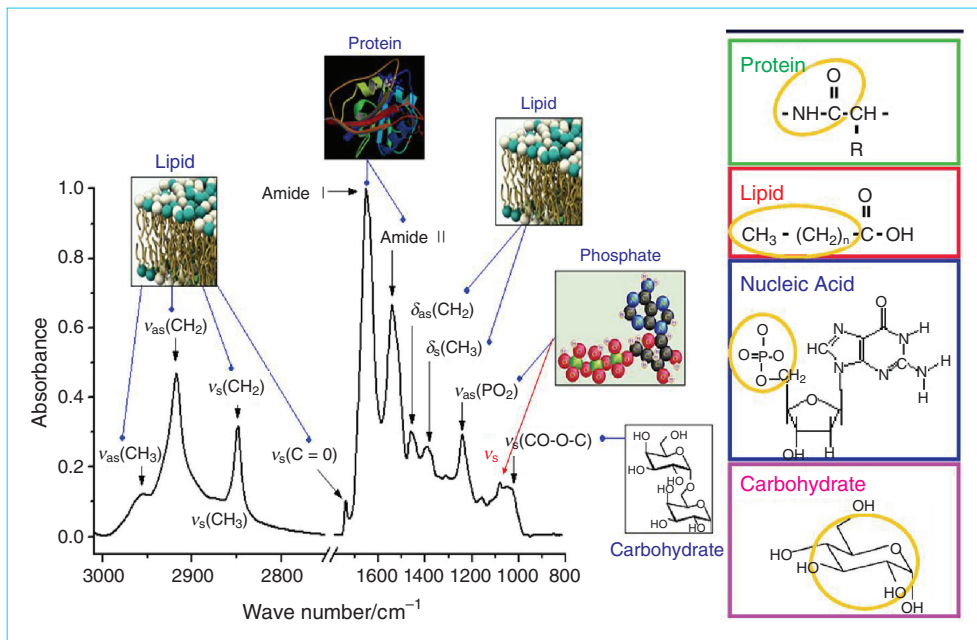


圖 2. 生物組織樣品中蛋白質、脂質、核酸及醣類之紅外特徵吸收光譜。

2001 年 Wu 等人結合中紅外光纖及衰減式全反射之傅立葉轉換紅外光譜法 (attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, ATR FT-IR) 量測口腔病變組織之紅外吸收光譜，其結果顯示癌組織的酯鍵對稱伸張振動 ($\nu_s \text{C}=\text{O}$, symmetric stretching vibration of ester bond) 之波數為 1745 cm^{-1} ，其紅外吸收較正常口腔組織為弱。Wu 等人亦利用在 $\nu_s \text{C}=\text{O}$ 與 amide II (1550 cm^{-1}) 的吸收度的比值 (absorbance ration) 作為篩檢癌組織的紅外生物標誌 (infrared biomarker)，其鑑別率高達 95%。雖然 ATR FT-IR 技術可進行在原位 (*in situ*) 的量測，但此技術的空間解析度 (spatial resolution) 受限於 ATR 探頭與樣品的接觸面積大小，且限於組織表面的量測，因此無法在內層組織及細胞層次進行病理的分析⁽¹⁵⁾。

另外，Conti 等人及 Tobin 等人分別利用傳統的 FT-IR 紅外顯微光譜及同步輻射紅外顯微光譜技術量測口腔黏膜組織與口腔腫瘤組織之切片，其結果顯示口腔腫瘤組織之核酸 (DNA/ RNA) 的吸收明顯較正常口腔上皮組織為強。但膠原 (glycogen) 的紅外吸收則呈下降的趨勢，其可能是因癌細胞造成組織的角質化，使得口腔腫瘤組織之膠原下降所導致。另外，值得一提的是，癌組織中之脂質 (lipid) 吸收亦明顯偏低⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。相同地，在消化道系統的胃

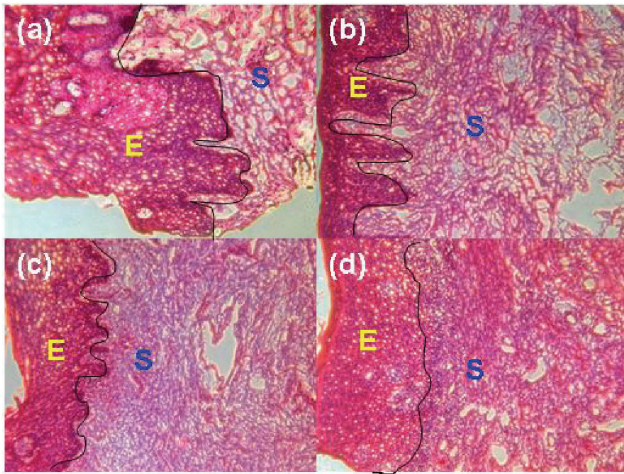
癌及結腸癌組織中，其脂質分布亦被發現有偏低的現象⁽¹⁹⁻²⁰⁾。

本研究利用紅外顯微光譜篩選人類口腔癌組織中可為癌症之生物標誌，並量測生物標誌在病變組織中的分布作為臨床組織病理分析的參考。依據口腔癌組織脂質含量偏低的現象，本研究利用與脂質結構相似的有機蠟 (wax) 與細胞組織進行物理吸附反應 (physisorption)，藉由細胞組織吸附有機蠟能力之差異，進行癌細胞的判定及癌組織的分布區域。本研究採用非極性的石蠟 ($\text{C}_{25}\text{H}_{52}$, paraffin) 與極性較強之蜜蠟 ($\text{C}_{46}\text{H}_{92}\text{O}_2$, beeswax) 對正常、癌化細胞株及組織進行物理吸附。在統計方面，本研究亦利用線性判別區分法 (linear discriminant analysis, LDA) 分析癌細胞之紅外吸收光譜與有機蠟間吸附能力之關連性⁽²¹⁾。由於有機蠟在中紅外光區 $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ 有明顯的吸收，因此結合紅外顯微光譜及有機蠟吸附動力學，進行量測細胞組織脫附有機蠟之動力學時間，作為判別細胞組織癌化的依據。

二、實驗材料方法

1. 組織切片樣品

依據國際癌症協會 (International Union Against Cancer, UICC) 及美國癌症協會 (American Joint

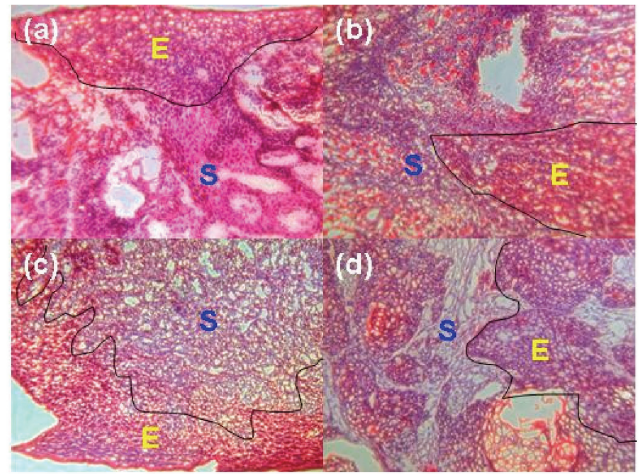


200 μm

圖 3. 人類口腔正常黏膜組織 (a) 126 N、(b) 82 N、(c) 134 N 及 (d) 89 N 的 H&E 染色可見光像，其標示 E 為上皮組織，S 則為間質組織。

Committee on Cancer, AJCC) 在臨床上對口腔癌的分期中，N0 代表無局部淋巴腺轉移，T1 為腫瘤直徑小於 2 cm，T2 為腫瘤直徑介於 2–4 cm 之間，T3 是腫瘤最長直徑大於等於 4 cm，T4 則是癌細胞已侵襲至骨頭、肌肉、皮膚、神經、血管及咀嚼肌等部位而無論腫瘤大小⁽²²⁻²³⁾。本研究之口腔癌黏膜組織分別為 T1N0G1、T2N0G1、T2N1G1 及 T4N0G1 之病理切片 (成功大學附設醫學院及奇美醫院提供)。口腔黏膜組織切片之上皮層 (epithelium)、基底層 (basal layer) 及間質 (stroma) 的位置可經由組織染色呈現。為了進行組織間的差異性比較，組織切片均有個別來自此四種期別的口腔癌病患之口腔黏膜組織，且每一癌黏膜組織切片均有其對應病患之正常黏膜組織切片，以作為紅外吸收光譜比對，如圖 3 及 4 所示。

病理組織經以冷凍包埋劑 (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura, Tissue-Tek, USA) 進行組織固定再以冷凍切片機 (RM2125RT, Leica, Germany) 將組織樣品切成厚度為 5 μm 的病理切片。為利於實驗上的觀察，本研究將組織樣品相鄰上下層切片分別置於一般的載玻片及紅外載玻片 (low-e slide, Kevley Technologies, Chesterfield, OH, USA) 上，前者以蘇木紫–伊紅 (hematoxyline and eosin, Energy Beam Sciences Inc., CT, USA) 染色作為病理分析比



200 μm

圖 4. H&E 染色之人類口腔癌黏膜組織切片。(a) 126 (T1N0G1)、(b) 82 (T4N0G1)、(c) 134 (T2N1G1) 及 (d) 89 (T2N0G1)，標示 E 為上皮組織，而 S 則為間質組織。

對之用，後者則為不染色之病理切片，只為紅外顯微術量測之用。此外，由於口腔之黏膜組織切片以冷凍包埋劑進行固定，因此進行紅外光譜量測前，必須先以二次蒸餾水進行脫附冷凍包埋劑，去除包埋劑在紅外吸收光譜上的干擾，樣品經二次蒸餾水浸泡 30 分鐘後，其紅外吸收光譜則明顯不再受含有冷凍包埋劑吸收信號的干擾，如圖 5 所示。

2. 細胞樣品製作

將人類口腔正常角質細胞株 (normal human oral keratinocytes cells, NHOK, 國立成功大學附設醫學院提供) 和口腔上皮鱗狀癌細胞株 (oral epidermoid carcinoma cell Meng-1, OECM-1, 國立成功大學附設醫學院提供) 種植在紅外載玻片上，並泡置於培養基中 (RPMI1640, Invitrogen Corporation, USA)，於 37 °C 含 5% CO₂ 的培養箱中 (Revo Elite II Series CO₂ Incubators, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 進行培養，俟細胞繁殖占滿培養皿 80% 的面積 (約 100 mm²) 時，此時細胞總數量約為 1 × 10⁶ 個，移除培養皿中的培養基，再以 PBS (phosphate-buffered saline, PBS, Sigma-Aldrich Corporation, Box, USA) 液洗滌細胞，再吸除洗滌液，隨即以濃度為 4% 福馬林 (paraformaldehyde,

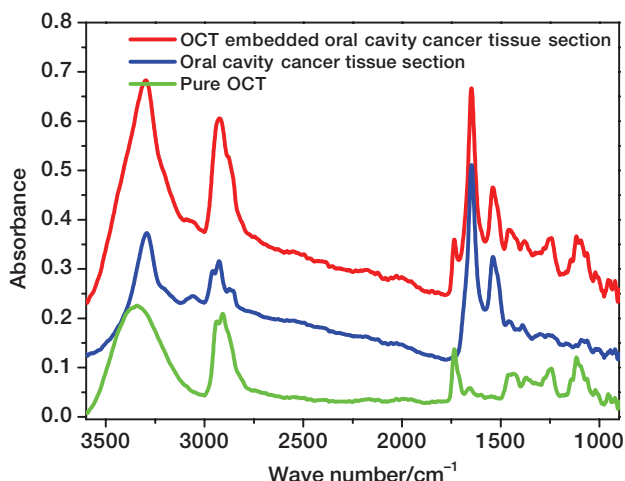


圖 5. 口腔黏膜組織切片脫附冷凍包埋劑前後及冷凍包埋劑之紅外吸收光譜。(— 未去冷凍包埋劑之黏膜組織光譜；— 去冷凍包埋劑之黏膜組織光譜；— 冷凍包埋劑之光譜)。

Sigma-Aldrich Corporation, USA) 並在 4 °C 的恆溫槽中進行細胞固定⁽²⁴⁾。5 分鐘後移除福馬林，並以 4 °C PBS 洗滌細胞 2 次各 5 分鐘，再利用二次蒸餾水浸置細胞樣品 5 分鐘，使其表面鹽分溶出後，靜置細胞樣品玻片，俟乾燥後進行光譜量測。

3. 細胞組織之有機蠟吸附紅外動力學

(1) 細胞樣品之吸附紅外動力學量測

為量測吸附紅外動力學之樣品的有機蠟殘留，細胞樣品預先以二甲苯溶劑浸泡 60 分鐘，以去除樣品表面上可被二甲苯溶解之有機物，直至樣品在光區 3000–2800 cm^{-1} 的吸收不再有明顯變化。因此將已乾燥之細胞株樣品 NHOK 及 OECM-1 玻片浸泡於二甲苯溶劑 (xylenes, Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA) 中，並於每間格 10 分鐘取出樣品，俟樣品上之二甲苯溶劑完全揮發後，量測其紅外吸收光譜，重複此一步驟直至細胞樣品於光區 3000–2800 cm^{-1} 之吸收不再受到二甲苯溶劑的影響為止，如圖 6(a)、(b) 所示。

在恆溫 25 °C 下，將石蠟及蜜蠟分別溶於二甲苯溶劑中，配製成 5 wt% 的石蠟及蜜蠟溶液，並分別取其中之有機蠟溶液適量覆蓋樣品，靜置約 10 分鐘，俟樣品上之二甲苯溶劑完全揮發後，再

將細胞樣品浸泡於二甲苯溶劑中，進行有機蠟脫附動力學的步驟，亦即將細胞樣品浸泡二甲苯溶劑 5 秒並取出，俟樣品上之二甲苯完全揮發後，進行量測石蠟或蜜蠟於區間 3000–2800 cm^{-1} 之紅外吸收強度之變化，來判定有機蠟的殘留。

(2) 組織切片之吸附紅外動力學量測

相同於細胞樣品進行紅外動力學量測前之二甲苯浸泡之步驟，紅外吸收光譜顯示黏膜組織樣品浸泡二甲苯 1 小時後，於光譜區間 3000–2800 cm^{-1} 的吸收不再有變化，如圖 6(c) 所示，並以黏膜組織樣品浸泡二甲苯 1 小時後之紅外吸收光譜及其影像做為後續紅外動力學之背景光譜或影像。在石蠟吸附紅外動力學方面，將蠟液滴置組織切片上，並靜置 2 小時後，隨之將切片浸泡在二甲苯溶劑中進行脫附石蠟 (deparaffinization)，並於黏膜組織脫附石蠟 5 秒、10 秒、15 秒、20 秒、25 秒、30 秒及 60 秒時擷取其紅外吸收光譜。在蜜蠟吸附動力學方面，將蜜蠟溶液滴置黏膜組織切片上，並靜置 1 小時，隨之再以二甲苯溶劑脫附蜜蠟，每間格 5 秒擷取紅外吸收光譜，並在每脫附蜜蠟 5 秒、10 秒、15 秒、20 秒、25 秒、30 秒及 60 秒時擷取其紅外吸收光譜。並量測細胞之有機蠟於光區 3000–2800 cm^{-1} 之吸收強度，作為有機蠟殘留在黏膜組織上的依據。

4. 同步輻射紅外顯微光譜實驗站及共焦面傅立葉轉換紅外顯微光譜儀

本實驗在國家同步輻射中心的紅外顯微光譜實驗站 BL14A1 進行，實驗站係將同步輻射光源、傅立葉轉換紅外光譜儀 Nicolet Magna-860 (Thermo-Nicolet Instruments, Madison, WI, USA) 及共軛焦紅外顯微鏡 Continuum (Spectra Tech, Oak Ridge, TN, USA) 結合而成，其中傅立葉轉換紅外光譜儀之分光鏡為溴化鉀 (KBr) 材質，紅外光的信號檢測則是以液氮冷卻 (77 K) 的汞鎘碲化物 (mercury cadmium telluride, MCT) 偵測器進行擷取，其感測面積、偵測靈敏度 (detectivity, D^*) 及光譜量測範圍分別為 50 × 50 μm^2 、5.0 × 10¹⁰ $\text{cm} \cdot \text{Hz}^{1/2} \cdot \text{W}$ 及 4000–650 cm^{-1} (25)。

同步輻射光源的部分則由紅外光束線引至實驗室，經由傅立葉轉換紅外光譜儀調制後，引入共軛焦紅外顯微鏡，並以光學放大倍率為 32 倍之反射式顯微物鏡 (Cassegrain objective) 於樣品表面聚焦，並進行光譜量測，其聚焦光點的半高寬大小約為 $13 \times 10 \mu\text{m}^2$ 。

本實驗以反射模式進行細胞組織之紅外吸收光譜量測，其光譜解析度為 4 cm^{-1} ，移動鏡速率為 $1.8988 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ，樣品之紅外吸收光譜均累加 128 次掃描，並以紅外載玻片空白處為吸收光譜的背景。此外，實驗中所取得的干涉圖譜 (interferogram) 均利用 Happ-Genzel 削足方程式 (apodization function) 將理論無限空間之快速傅立葉轉換所引起的誤差進行修正。

細胞組織之紅外光譜影像的擷取則是採用紅外共焦面偵測器 (focal-plane-array detectors, FPA) 之紅外顯微光譜系統 (Hypersion 3000, Bruker)，此系統之偵測器是一個液氮冷卻的互補性氧化金屬半導體偵測器 (complementary metal-oxide semiconductor, CMOS)，其為一 64×64 畫素之汞鎘碲化物共焦面陣列偵測器 (64×64 pixels mercury-cadmium-telluride focal-plane array detector)。本研究利用此系統所擷取的光譜，其解析度為 4 cm^{-1} ，累積 64 次的光譜掃描，並利用光學放大倍率為 $15\times$ 之紅外顯微物鏡，將紅外光源聚焦在量測的樣品區域上，則其成像面積為 $170 \times 170 \mu\text{m}^2$ 。若利用掃描模式取得多重區域影像時，則最大面積可達 $680 \times 340 \mu\text{m}^2$ 。

5. 紅外光譜分析及光譜影像的建立

本研究的口腔細胞組織之紅外吸收光譜是利用 OMNIC 7.3 (Thermo-Fisher-Nicolet, USA) 或 OPUS 6.5 (Bruker, Germany) 進行光譜分析及光譜影像的建立。

紅外光譜影像是藉由細胞組織樣品之生物分子在每一二維空間之量測點的紅外特徵吸收 (infrared characteristic absorption) 為基礎的影像，意即利用生物分子之官能機的特徵吸收光譜之峰值 (peak height of one peak)、峰值比 (peak height ratio of two peaks)、吸收度 (absorbance of one peak) 或吸收度比

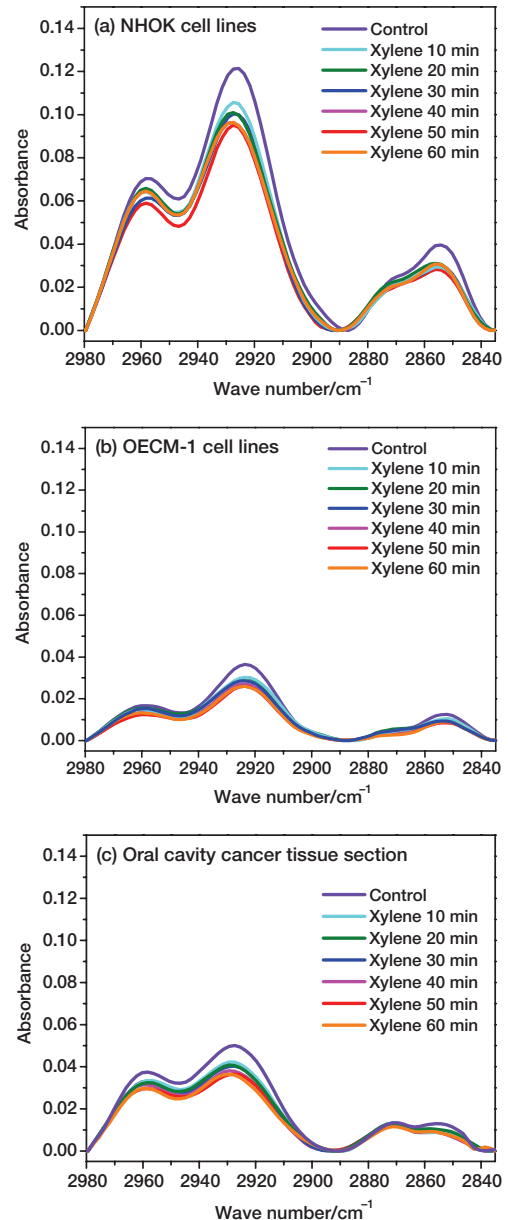


圖 6. 人類口腔細胞株浸泡二甲苯溶劑之紅外吸收光譜，(a) NHOK、(b) OECM-1 及 (c) 口腔癌組織切片。

(absorbance ratio of two peaks)，作為其生物分子在量測區域中的相對含量值，匯集量測區域中所有二維空間之數值，並利用色表 (color table) 將每一數值所代表的顏色結合二維座標，即成為生物分子的分布之紅外影像。本實驗結果將針對組織之脂質、膠原 (collagen)、核酸 (DNA/RNA) 及肝醣 (glycogen) 之吸收特徵進行分析，並建立其光譜影像。

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment of vibration mode
3300	Amide A (N-H stretching)
3050	Amide B
2960	CH ₃ antisymmetric stretch ($\nu_{as}CH_3$)
2922	CH ₂ antisymmetric stretch ($\nu_{as}CH_2$)
2870	CH ₃ symmetric stretch (ν_sCH_3)
2852	CH ₂ symmetric stretch (ν_sCH_2)
1690–1590	Amide I (C=O stretching, C-N & N-H bending)
1590–1480	Amide II (N-H bending, C-N stretching)
1452	CH ₂ symmetric bend (δ_sCH_2)
1444	CH ₃ antisymmetric bend ($\delta_{as}CH_3$)
1397	CH ₃ symmetric bend (δ_sCH_3)
1380	CH ₂ antisymmetric bend ($\delta_{as}CH_2$)
1340–1240	Amide III
1235–1240	O-P=O antisymmetric stretch ($\nu_{as}PO_2^-$)
1150	C-O stretch, C-O-H bend (carbohydrates, mucin)
1079	O-P=O symmetric stretch (PO_2^-)
1025	C-O stretch (glycogen)

表 1.

生物分子的官能基之振動波數及模式。

三、結果與討論

1. 口腔黏膜組織之紅外光譜

人類正常口腔黏膜組織之紅外吸收光譜如圖 7 所示，其振動波數峰值在 3300 cm⁻¹、3050 cm⁻¹、1654 cm⁻¹、1550 cm⁻¹、1150–1350 cm⁻¹ 及 1150–950 cm⁻¹，分別指派為 amide A、amide B、amide I、amide II、膠原及肝醣的紅外特徵吸收，其他的振動模式之指派則如表 1 所示。脂質在口腔黏膜組織切片的伸縮振動之紅外特徵吸收則分布在 3000–2800 cm⁻¹ 光區，並指派 2960 cm⁻¹、2922 cm⁻¹、2870 cm⁻¹ 及 2852 cm⁻¹ 分別為 $\nu_{as}CH_3$ (-CH₃ asymmetric stretching vibration)、 $\nu_{as}CH_2$ (-CH₂ asymmetric stretching vibration)、 ν_sCH_3 (-CH₃ symmetric stretching vibration) 及 ν_sCH_2 (-CH₂ symmetric stretching vibration)，其中 $\nu_{as}CH_2$ 及 ν_sCH_2 之吸收度主要的貢獻來自脂質，而 $\nu_{as}CH_3$ 及 ν_sCH_3 則主要貢獻來自蛋白質，如圖 7(a) 所示。

經由比較口腔正常與癌化黏膜組織之光譜，Wu 等人的結果顯示正常黏膜組織中有明顯的 $\nu_sC=O$ (1745 cm⁻¹) 吸收信號，而癌化黏膜組織中則明顯下降⁽¹⁵⁾。但在 Conti, *et. al.* 及本研究中並無此明顯特徵吸收，且本研究結果顯示癌化黏膜組織中上

皮組織的脂質 (2800–3000 cm⁻¹) 吸收信號下降，與 Conti 等人指出癌化黏膜組織其 2853 (ν_sCH_2)/2963 (ν_sCH_3) 吸收峰值比下降的結果一致⁽¹⁷⁾。另外，在口腔癌化黏膜組織中因為正常細胞的角質化，使其 1338 cm⁻¹、1280 cm⁻¹、1204 cm⁻¹ 及 1030 cm⁻¹ 等相關膠原吸收信號下降⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。除此之外，我們發現癌化黏膜組織之脂質的 $\nu_{as}CH_2$ 與 $\nu_{as}CH_3$ 之紅外吸收度比值較正常黏膜組織為高，這可能是癌化黏膜組織之脂質的碳鏈長度 (aliphatic length) 長於正常黏膜組織之脂質所引起的光譜行為，如圖 7(b) 與 (c) 所示。但正常口腔上皮組織之核酸及肝醣的吸收卻比癌化之口腔表皮組織為強，此與前人的結果並不一致，此一結果應為不同個體之口腔黏膜組織間的差異所導致，因此口腔黏膜組織中核酸及肝醣的含量多寡並不適合做為判定口腔黏膜組織癌化的生物標誌，如圖 8 所示。

2. 口腔細胞之有機蠟吸附紅外動力學

基於口腔癌化黏膜組織中偏低的含脂量，且脂質分子具有較長之碳鏈，我們利用結構與脂質相近的有機蠟對口腔細胞進行吸附，藉此做為判定細胞癌化的依據。

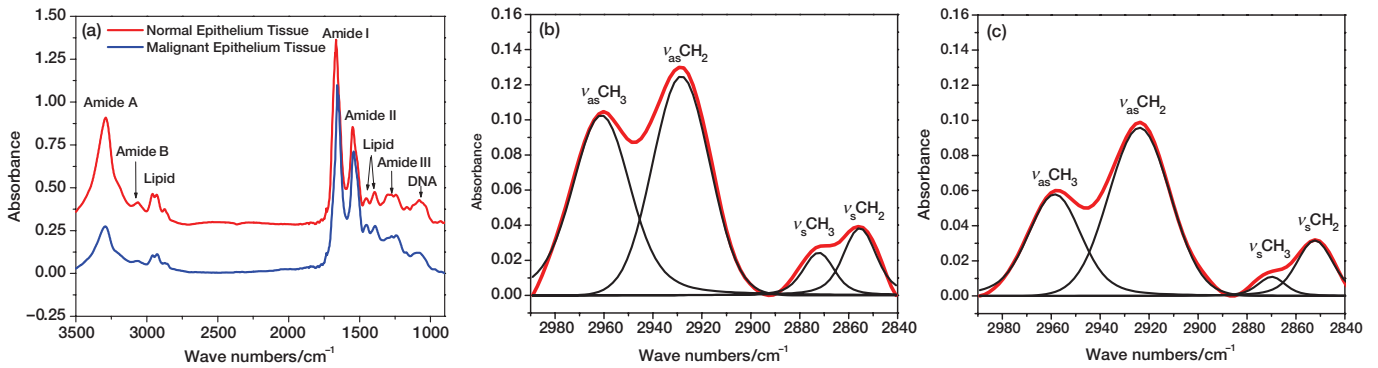


圖 7. (a) 人類正常口腔黏膜及口腔癌黏膜之表皮組織在光區 $3500-950\text{ cm}^{-1}$ 之吸收光譜。組織切片於光區 $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ 之吸收光譜的指派，(b) 正常口腔黏膜組織，(c) 口腔癌黏膜組織。

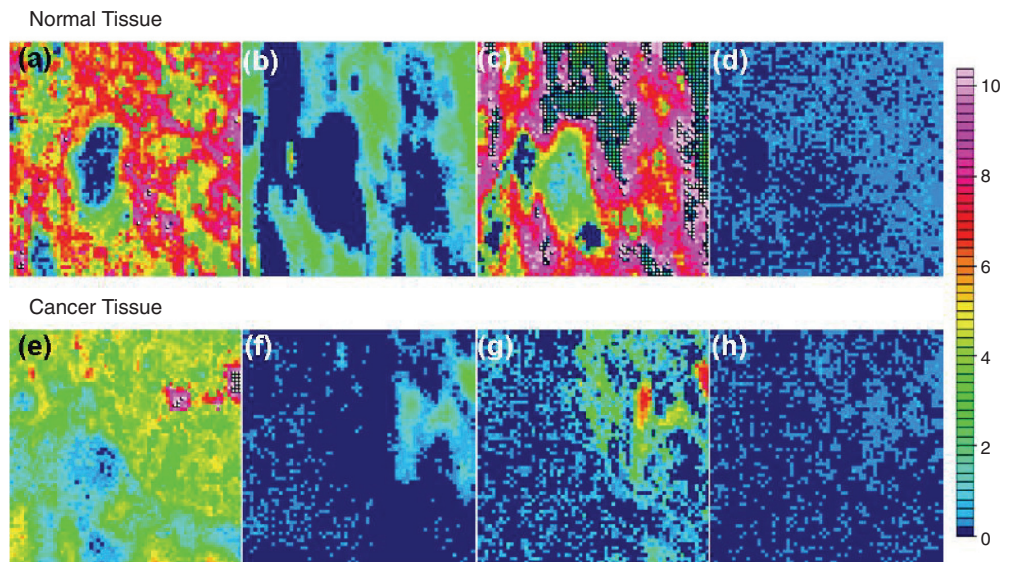
(1) 石蠟吸附紅外動力學

正常口腔細胞株 NHOK 上蠟並以二甲苯進行脫蠟 (deparaffinization) 5 秒，細胞之紅外吸收光譜顯示在波數 2922 cm^{-1} 與 2852 cm^{-1} 的紅外吸收度明顯增強，但隨著細胞株 NHOK 脫附石蠟的時間增長，細胞上殘留石蠟的量逐漸下降，因此細胞株 NHOK 在 5 秒的石蠟脫附後仍有石蠟吸附在細胞上。然而，口腔癌細胞株 OECM-1 在 5 秒的石蠟脫附之後，細胞在振動波數 2922 cm^{-1} 與 2852 cm^{-1} 的吸收強度卻無明顯增加，此一結果顯示石蠟對於癌細胞株的吸附能力較正常口腔細胞株 NHOK 為弱，如圖 9 所示。另一方面，我們利用紅外光譜影像進行紅外動力學分析，將脂質之特徵吸收的光區 $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ 進行積分並建立紅外光譜影像，

在經過石蠟吸附及脫附程序後，圖 10 之紅外光譜影像顯示細胞株 NHOK 上有明顯的石蠟殘留，而細胞株 OECM-1 則無明顯殘留。

另一方面，為避免細胞樣本取樣所造成的誤差，我們各擷取 10 顆 NHOK 及 OECM-1 細胞株進行石蠟吸附動力學實驗，結果顯示細胞株 NHOK 在 $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ 區間仍有明顯的石蠟殘留信號，而細胞株 OECM-1 則無明顯的石蠟的殘留信號，如圖 11 所示。因此，依據細胞株 NHOK 在振動波數 2922 cm^{-1} 與 2852 cm^{-1} 的吸收峰值分布進行分析，數據顯示其平均峰值分別增加 74.1% 及 196.7%，而細胞株 OECM-1 之平均峰值卻只增加 6.8% 及 6.2%，如表 2 所示。進一步以 LDA 分析細胞株之紅外吸收光譜在統計上的分布，結果顯

圖 8. 人類正常口腔黏膜組織與口腔癌黏膜組織之特徵生物分子紅外光譜影像。(a、e) 脂質，(b、f) 膠原，(c、g) DNA/ RNA，(d、h) 肝醣。



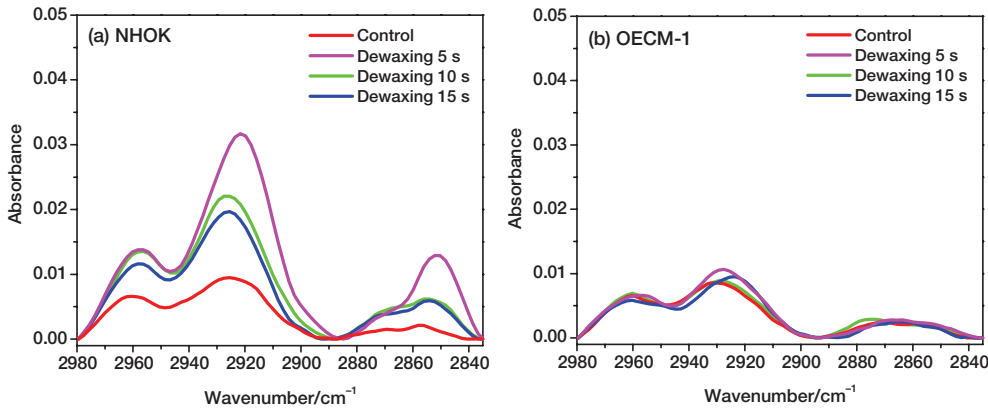


圖 9. 人類口腔組織細胞株在不同石蠟吸附動力學時間之紅外吸收光譜，(a) NHOK，(b) OECM-1。

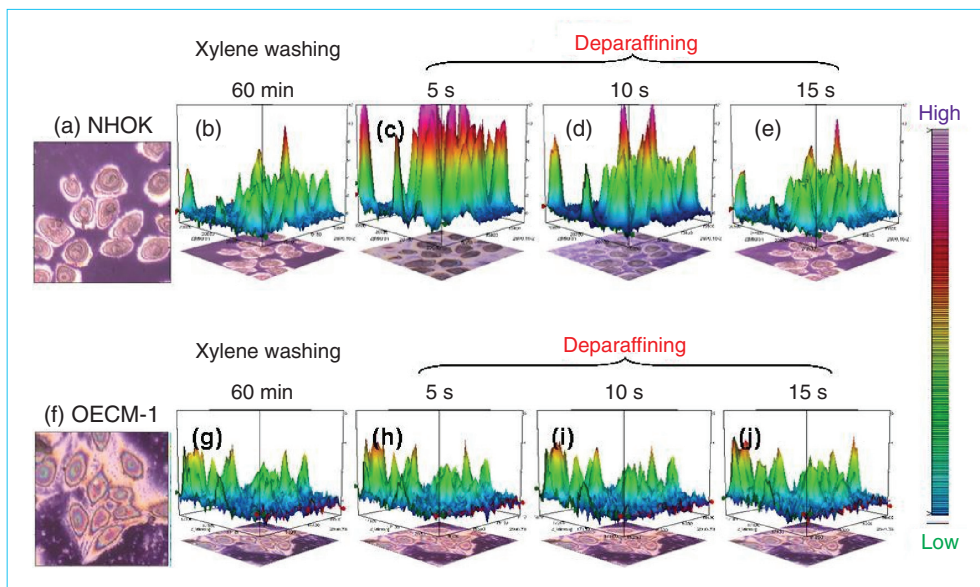


圖 10. 人類口腔正常角質細胞株 NHOK 及口腔癌細胞株 OECM-1 之石蠟吸附紅外動力學光譜影像。(a-d) 及 (e-h) 分別為細胞株 NHOK 與 OECM-1 浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘、脫蠟 5 秒、脫蠟 10 秒及脫蠟 15 秒後之脂質分布影像。

示細胞株 NHOK 與 OECM-1 在未經石蠟吸附程序前，其光譜即可被區分成二個不同分布的族群。但經過石蠟脫附 5 秒後，細胞株 NHOK 則因吸附石蠟後，其光譜在 LDA 的分布區域發生明顯的偏移，而細胞株 OECM-1 卻因與石蠟分子的吸附能力較弱，所以其光譜之 LDA 分布區域幾乎沒有偏移的現象，如圖 12 所示。因此藉由 LDA 分析法可以區分石蠟吸附對細胞株 NHOK 與 OECM-1 的影響，此現象與細胞樣品之石蠟殘留的吸收峰值增加率的結果相當一致。基於這些結果，我們認為石蠟對正常口腔細胞株 NHOK 的吸附具有專一性。

(2) 蜜蠟吸附紅外動力學

有別於石蠟吸附紅外動力學實驗程序，改以極

性蜜蠟對細胞株 NHOK 及 OECM-1 進行吸附及脫附的動力學程序。當細胞脫附蜜蠟 5 秒後，結果顯示細胞株 OECM-1 之振動波數 2922 cm^{-1} 與 2852 cm^{-1} 的吸收有相當明顯的增強。而細胞株 NHOK 脫附蜜蠟 5 秒後，其振動波數 2922 cm^{-1} 與 2852 cm^{-1} 的吸收強度幾乎不變，如圖 13 所示。此一現象恰與石蠟的吸附動力學結果呈現相反的趨勢。因此我們認為極性蜜蠟對癌細胞株 OECM-1 具有相當程度專一性的吸附能力。而積分 $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ 光區之吸收光譜的細胞紅外影像亦顯示細胞株 OECM-1 有明顯的蜜蠟殘留信號，相反的，細胞株 NHOK 則無明顯殘留，如圖 14 所示。

同樣的，圖 15 顯示 10 顆細胞株 NHOK 及 OECM-1 進行蜜蠟吸附及脫附之紅外動力學的結

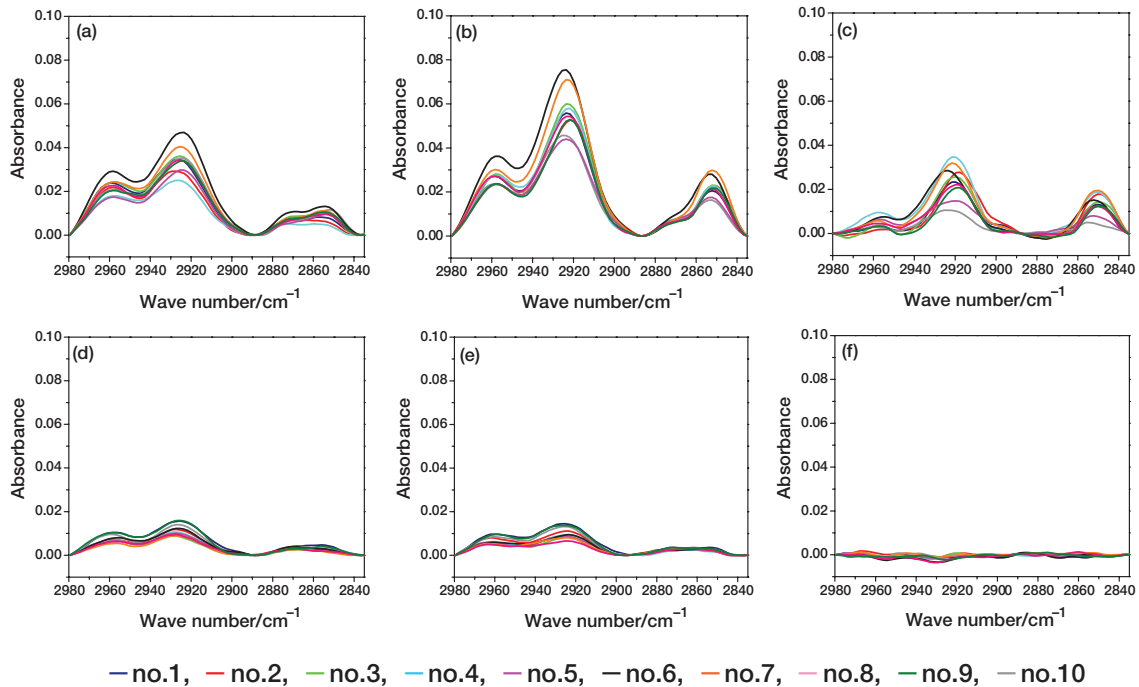


圖 11. 人類口腔正常角質細胞株 NHOK 及口腔癌細胞株 OECM-1 之石蠟吸附紅外動力學之吸收光譜。(a) NHOK 細胞浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘，(b) 為 NHOK 細胞脫蠟 5 秒，(c) NHOK 細胞脫蠟 5 秒與細胞浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘之吸收的強度變化，(d) OECM-1 細胞浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘，(e) OECM-1 細胞脫蠟 5 秒及 (f) OECM-1 細胞脫蠟 5 秒與細胞浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘之吸收的強度變化。

果，細胞株 OECM-1 在 $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ 區間有明顯蜜蠟殘留信號。表 1 中細胞株 OECM-1 在振動波數 2922 cm^{-1} 與 2852 cm^{-1} 的吸收峰值平均分別增加 1004.4% 及 2853.7%，但相較於細胞株 OECM-1 卻只增加 45.5% 及 17.6% 的峰值吸收。在 LDA 分析結果方面，圖 11(b) 顯示細胞株 NHOK 及 OECM-1 進行蜜蠟吸附動力學程序後細胞株 OECM-1 群組的分布在進行蜜蠟吸附動力學前後有明顯的偏移，相反的，在石蠟吸附動力學的結果上細胞株 OECM-1 族群的分布幾乎不受影響。

依據細胞株之有機蠟吸附紅外動力學的結果，我們發現石蠟及蜜蠟分別對細胞株 NHOK 及 OECM-1 具有專一性的吸附。另外，除了藉由細胞的有機蠟吸附紅外動力學的時間可作為區分正常細胞株 NHOK 及癌細胞株 OECM-1 的依據，更可結合 LDA 的分析進一步判定細胞疾病或癌化的狀態。

3. 口腔黏膜組織與有機蠟吸附紅外動力學

在口腔黏膜組織切片之石蠟吸附紅外動力學結果方面，口腔黏膜組織切片經去離子水 (deionized water) 去除冷凍包埋膠後，並擷取經二甲苯溶劑浸泡 1 小時的黏膜組織切片之光譜影像作為紅外動力學的參考影像。再將口腔黏膜組織切片於 5 wt% 的石蠟溶液中進行吸附程序。圖 16(a-e) 顯示以二

表 2. 有機蠟對人類口腔正常角質細胞株 (NHOK) 與口腔癌細胞株 (OECM-1) 吸附有機蠟的能力。

Cell line	Wavenumber (cm^{-1})	Relative increase of absorption of beeswax after 5 s debeeswaxing $\% = (I - I_0) / I_0$	Relative increase of absorption of paraffin after 5 s deparaffining $\% = (I - I_0) / I_0$
NHOK	2852	45.5%	196.7%
	2922	17.6%	74.1%
OECM-1	2852	2853.7%	6.8%
	2922	1004.4%	6.2%

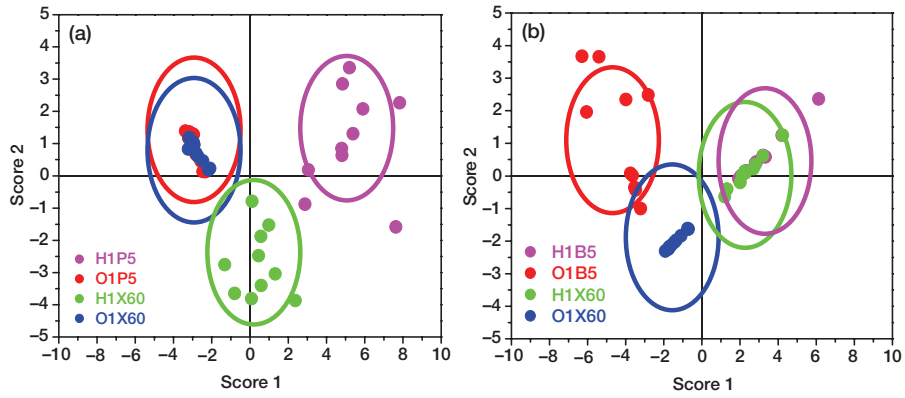


圖 12. 人類口腔正常角質細胞株 NHOK 及口腔癌細胞株 OECM-1 上蠟前與脫附蠟 5 秒後在光區 $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ 之紅外吸收光譜之 LDA 分布圖。(a) 石蠟吸附動力學, (b) 蜜蠟吸附紅外動力學。(● 細胞株 NHOK 脫蠟 5 秒; ● 細胞株 OECM-1 脫蠟 5 秒; ● 細胞株 NHOK 浸泡二甲苯 60 分鐘之參考組; ● 細胞株 OECM-1 浸泡二甲苯 60 分鐘之參考組)

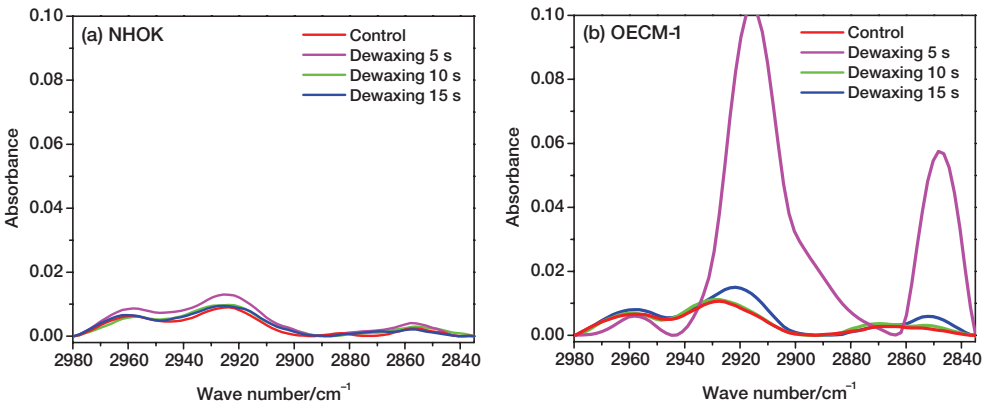


圖 13. 人類口腔細胞株在不同蜜蠟吸附紅外動力學時間之吸收光譜, (a) NHOK, (b) OECM-1。

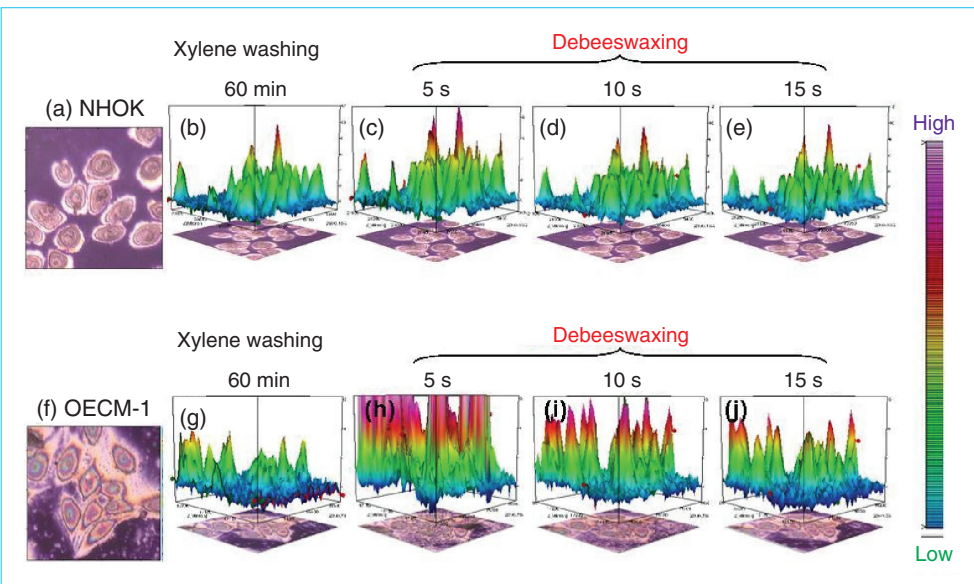


圖 14. 人類口腔正常角質細胞株 NHOK 及口腔癌細胞株 OECM-1 之蜜蠟吸附紅外動力學之光譜影像。(a-d) 及 (e-h) 分別為細胞株 NHOK 與 OECM-1 浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘、脫蠟 5 秒、脫蠟 10 秒及脫蠟 15 秒之脂質分布影像。

甲苯溶劑進行石蠟脫附 30 秒後，部分石蠟仍然吸附在組織切片之正常黏膜組織上，但癌黏膜組織在 30 秒的石蠟脫附後，其石蠟幾乎已被二甲苯所脫附，而正常黏膜組織在脫附 60 秒後仍有部分的石蠟殘留。

在口腔黏膜組織切片之蜜蠟吸附紅外動力學的結果方面，圖 16(f-j) 顯示正常黏膜組織切片進行 30 秒的蜜蠟脫附程序後，黏膜組織上的蜜蠟已幾乎被二甲苯溶劑脫附。相反的，癌黏膜組織於蜜蠟脫附 30 秒後仍有明顯的殘留，且直至 60 秒的脫附

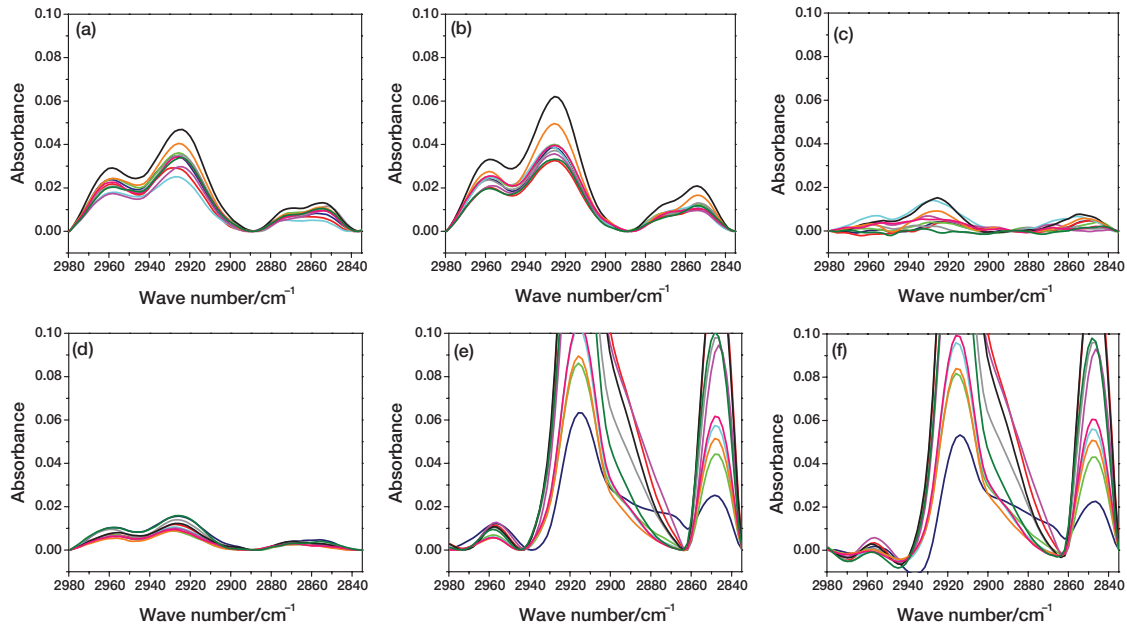


圖 15. 篩選十顆人類口腔正常角質細胞株 NHOK 及口腔癌細胞株 OECM-1 的蜜蠟吸附紅外動力學之吸收光譜。(a) NHOK 細胞株浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘，(b) NHOK 細胞株脫附蜜蠟 5 秒，(c) NHOK 細胞株脫附蜜蠟 5 秒與其細胞株浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘之吸收的強度變化，(d) OECM-1 細胞株浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘，(e) OECM-1 細胞株脫附蜜蠟 5 秒，(f) OECM-1 細胞株脫附蜜蠟 5 秒與其細胞株浸泡二甲苯溶劑 60 分鐘之吸收的強度變化。

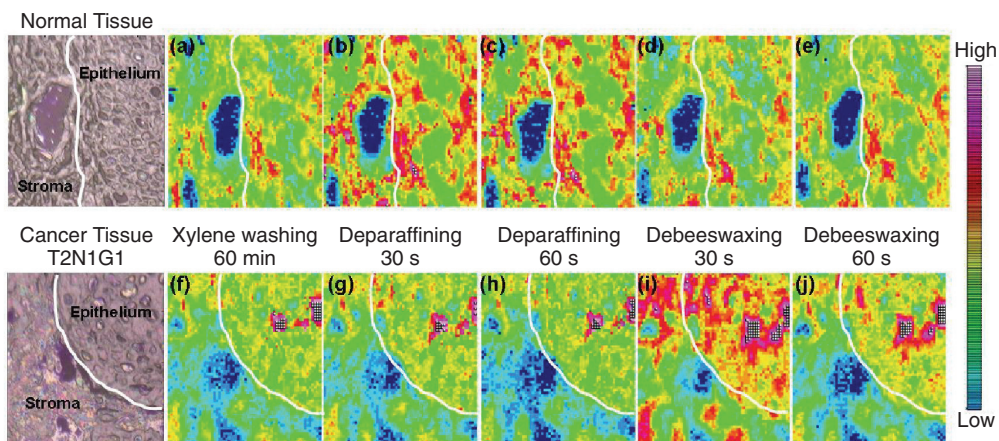


圖 16. 人類口腔黏膜組織之有機蠟吸附紅外動力學之光譜影像。(a-e) 及 (f-j) 分別為人類口腔正常黏膜組織及口腔癌黏膜組織切片經二甲苯溶劑浸泡 60 分鐘、脫附石蠟 30 秒、脫附石蠟 60 秒、脫附蜜蠟 30 秒及脫附蜜蠟 60 秒之脂質分布影像。

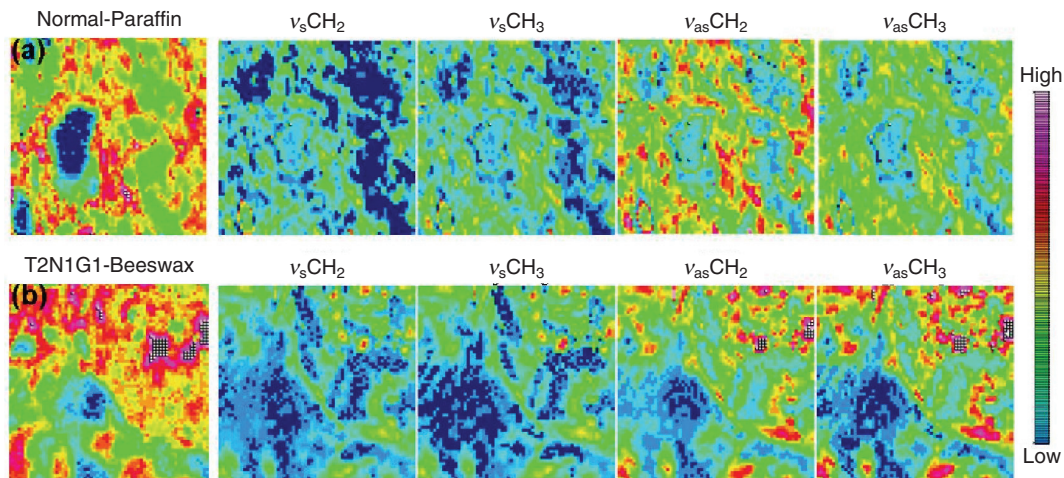


圖 17. (a) 正常口腔黏膜組織經石蠟吸附並脫附 30 秒後之紅外光譜影像，(b) 口腔癌黏膜組織經蜜蠟吸附並脫附 30 秒後之紅外光譜影像。與未吸附有機蠟之黏膜組織切片其紅外振動吸收度在 $\nu_s\text{CH}_2$ 、 $\nu_s\text{CH}_3$ 、 $\nu_{as}\text{CH}_2$ 及 $\nu_{as}\text{CH}_3$ 之紅外光譜影像。

時間仍無法以二甲苯溶劑完全脫附。因此我們認為有機蠟對不同疾病狀態之口腔黏膜組織有專一性的吸附，可藉此區分病理組織切片中癌黏膜組織與正常黏膜組織的分布位置。另外，圖 17 顯示蜜蠟在黏膜組織上的分布區域與為上蜜蠟之黏膜組織之脂質的 $\nu_{as}\text{CH}_2$ 吸收度分布影像的結果亦相當一致，因此我們認為黏膜組織中 $\nu_{as}\text{CH}_2$ 吸收度的強弱再結合蜜蠟吸附動力學，將可作判定黏膜組織癌化的指標。

四、結論

口腔黏膜組織脂質 $\nu_{as}\text{CH}_2$ 的紅外吸收是一具有判別癌化組織的紅外吸收之生物標誌，並可進一步作為篩檢病變組織的依據。此外，根據有機蠟吸附紅外動力學的結果顯示，蜜蠟及石蠟分別對口腔上皮鱗狀癌細胞株與口腔正常細胞株的專一性之吸附現象。我們認為有機蠟之專一物理吸附現象是由於不同疾病狀態之組織的細胞膜脂質結構上的差異所造成。因此，以有機蠟吸附紅外動力學法為基礎的檢測方法是具有潛力成為一般口腔癌的基礎篩檢，此一有機蠟吸附紅外動力學法是一個非常值得發展的技術與方法。

誌謝

感謝國立成功大學口腔醫學研究所副教授謝達斌醫師及台南奇美醫院口腔顎面外科主治醫師蔣維凡先生在製備組織樣品上的協助及組織切片的病理分析，同時感謝國家同步輻射研究中心的支持與經費的補助。

參考文獻

1. World Health Organization, Global Incidence of Oral Cancer (2007).
2. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures (2007).
3. D. C. Fernandez, R. Bhargava, S. M. Hewitt, and I. W. Lwvin, *Nature Biotechnology Letter*, **23**, 469 (2005).
4. C. C. Yuan, P. H. Wang, H. T. Ng, Y. F. Li, T. S. Huang, C. Y. Chen, L. C. Tsai, and W. Y. Shyong, *Gynecol. Oncol.*, **85**, 148 (2002).
5. C. C. Yuan, H. C. Huang, L. C. Tsai, H. T. Ng, and T. S. Huang, *Apoptosis*, **2**, 101 (1997).
6. S. Neviliappan, L. F. Kan, T. T. L. Walter, S. Arulkumaran, and P. T. T. Wong, *Gynaecologic Oncology*, **85** (1), 170 (2002).
7. L. Chiriboga, P. Xie, H. Yee, V. Vigorita, D. Zarou, D. Zakim, and M. Diem, *Biospectroscopy*, **4**, 47 (1998).
8. B. Rigas, S. Morgello, I. S. Goldman, and P. T. T. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8140 (1990).
9. M. J. Romeo, M. A. Quinn, F. R. Burden, and D. McNaughton, *Biopolymers*, **67** (4-5), 362 (2002).

10. C. C. Tin, C. Y. Wang, Y. S. Kuo, H. H. Chiang, S. N. Chow, and C. P. Chiang, *Proc. Natl. Sci. Council, ROC, Part B: life Sci.*, **20** (1996).
 11. C. T. Chin, H. K. Chiang, S. N. Chow, C. Y. Wang, Y. S. Lee, J. C. Tsai, and C. P. Chiang, *J. Oral Pathol. Med.*, **27**, 470 (1998).
 12. T. H. Yang, C. T. Chen, C. P. Wang, and P. J. Lou, *Oral Oncology*, **43** (2007).
 13. C. M. Krishna, G. D. Sockalingum, J. Kurien, L. Rao, L. Venteo, M. Pluot, M. Manfait, and V. B. Kartha, *Applied Spectroscopy*, **58**, 1128 (2004).
 14. N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow, and H. Barr, *Faraday Discuss*, **126**, 141 (2004).
 15. J. G. Wu, Y. Z. XU, C. W. Sun, R. D. Soloway, D. F. Xu, Q. G. Wu, K. H. Sun, S. F. Weng, and L. X. Xu, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, **62**, 185 (2001).
 16. C. Conti, E. Giorgini, T. Pieramici, C. Rubini, G. Tosi*, *J. Molecular Structure*, **744**, 187 (2005).
 17. C. Conti, P. Ferraris, E. Giorgini, T. Pieramici, L. Possati, R. Rocchetti, C. Rubini, S. Sabbatini, G. Tosi, M. A. Mariggio, and L. Lo Muzio, *J. Molecular Structure*, **86**, 834 (2007).
 18. M. J. Tobin, M. A. Chesters, J. M. Chalmers, F. J. M. Rutten, S. E. Fisher, I. M. Symonds, A. Hitchcock, R. Allibone, and S. D. Gunasekara, *Faraday Discuss*, **126**, 27 (2004).
 19. X. F. Ling, Y. Z. Xu, S. F. Weng, W. H. Li, X. U. Zhi, R. M. Hammaker, W. G. Fateley, F. Wang, X. S. Zhou, R. D. Soloway, J. R. Ferraro, and J. G. Wu, *Applied Spectroscopy*, **56** (5), 570 (2002).
 20. R. K. Sahu, S. Argov, A. Salman, U. Zelig, M. Huleihel, N. Grossman, J. Gopas, J. Kapelushnik, and S. Mordechai, *Journal of Biomedical Optics*, **10** (5), 054017 (2005).
 21. E. K. Kemsley, *Discriminant Analysis and Class Modelling of Spectroscopic Data*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England (1998).
 22. *International Union Against Cancer* (http://www.uicc.org/index.php?Itemid=197&id=14275&option=com_content&task=view).
 23. *American Joint Committee on Cancer* (<http://www.cancerstaging.org/mission/whatis.html>).
 24. M. Moloney, L. McDonnell, and H. O'Shea, *Ultramicroscopy*, **100**, 153 (2004).
 25. 李耀昌, 陳慶曰, *科儀新知*, **27** (3), 149 (2005).
-
- 李耀昌先生為國立清華大學化學博士，現任國家同步輻射研究中心助理研究員。
 - 黃佩瑜小姐為國立成功大學醫學工程碩士，現任國家同步輻射研究中心研究助理。
 - 張雅筑小姐為國立新竹教育大學應用科學系學生。
 - 陳慶曰先生為國立台灣師範大學物理碩士，現任國家同步輻射研究中心副研究員。
 - Yao-Chang Lee received his Ph.D. in chemistry from National Tsing Hua University. He is currently an assistant scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
 - Pei-Yu Huang received her M.S. in biomedical engineering from National Cheng Kung University. She is currently a research assistant at National Synchrotron Radiation Research Center.
 - Ya-Chu Chang is a student in the Department of Applied Science at National Hsinchu University of Education.
 - Ching-Iue Chen received his M.S. in physics from National Taiwan Normal University. He is currently an associate scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.