

中文摘要

由衛生署的統計資料中得知，近十幾年來肺癌為我國惡性腫瘤死因之首，尤其是女性癌症死因第一位。根據流行病學的調查，罹患肺癌的危險因子包括抽煙習慣、空氣污染、職業暴露等因子。據調查台灣地區的婦女抽煙比例只有 3 %，華裔非吸煙婦女比歐美各國非吸煙婦女具有較高的肺癌發生率，因此華裔婦女中可能存在與抽煙無關之肺癌危險因子。近年來暴露中國式烹調油煙霧與肺癌發生的探討受到人們的關注。已有報告指出吸入食物烹調煙霧及食用油煙霧明顯影響人的肺功能，另外食用油加熱後所產生的煙霧對細菌具有致突變性，食用油煙霧可能具有遺傳毒性。食用油煙霧的成分，大部分為脂肪酸、醛類、酮類或 B[a]P。本實驗室發現當肺癌細胞株 CL3 暴露食用油煙萃取物後，細胞生長被抑制。已知許多環境污染物不只造成生物損傷而且改變基因表現，例如柴油燃燒廢氣顆粒、空氣中懸浮微粒，會促使細胞株分泌 cytokines。所以本研究欲以 RT-PCR 方法檢測，肺癌細胞株 CL3 暴露食用油煙萃取物或 B[a]P 後，對 *cytochrome P4501A1*、*1B1*、*2E1* 及 cytokines 和生長因子基因表現之影響。

CL3 細胞暴露食用油煙霧後細胞 *cytochrome P4501A1* 和 *1B1* 等的基因表現程度於 4 小時內短暫增加為對照組的 2 至 4 倍；*cytochrome P4502E1* 基因表現程度於 24 小時後增加為 2 倍；*Tumor*

growth factor 1 (TGF 1) 基因表現程度於 24 小時後增為對照組的 4 倍。cytokines 包括 *IL-2*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-8*、*IL-13*、*interferon-* 及 *tumor necrosis factor-* 及 *TGF 2* 等基因表現程度並無明顯改變。細胞暴露於 B[a]P 也有相似的情形, B[a]P 會增加 *CYP1A1*、*CYP1B1* 和 *TGF 1* mRNA 表現約 3-4 倍, 而 *IL-2*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-8*、*IL-13*、*interferon-* 及 *tumor necrosis factor-* 及 *TGF 2* 等基因表現程度並無明顯改變。

接著我們以 ELISA 定量培養液中之 TGF 1, 證實 CL3 細胞經食油煙霧或 B[a]P 處理後, 不僅會改變 TGF 1 mRNA 程度, 也會刺激細胞分泌 TGF 1。我們又發現處理食用油煙霧或 B[a]P, 會誘導細胞產生氧化緊迫之作用, 由此可知細胞處理食用油煙霧或 B[a]P 誘導細胞產生氧化緊迫, 或許與 *TGF 1* mRNA 表現增加有關。

已知 B[a]P 經由活化多環芳香烴類受器 (aryl hydrocarbon receptor, AhR), 增加細胞 *CYP1A1* 基因表現及其酵素活性, 我們利用三種對 B[a]P 敏感性不同的肺癌細胞株 CL3、A549 和 H1355 細胞來探討 B[a]P 誘導 TGF 1 基因表現是否與 AhR 訊息傳遞路徑相同。CL3 和 H1355 細胞經 B[a]P 處理後細胞生長受抑制, 但 A549 細胞生長速率並未受影響。比較 B[a]P 對三種細胞株之 *CYP1A1* 和 *TGF 1* 基因表現的影響, 發現 10 μ M B[a]P 處理 24 小時後, 皆會使 CL3、

A549、H1355 細胞 CYP1A1 基因表現增加，為對照組的 2、1.8、5 倍，比較 CYP1A1 酵素活性也分別增加為對照組的 7.4、2.5、56.3 倍，B[a]P 在 H1355 細胞中誘導 CYP1A1 酵素活性的能力最高，但是檢測三種細胞之 *TGF- β 1* 基因表現，只有 CL3 細胞的 *TGF- β 1* 基因表現有增加情形。再觀察 B[a]P 在三種細胞株中誘導氧化緊迫之情形，只有在 CL3 細胞中發現細胞有氧化緊迫的情形，A549 和 H1355 細胞則無氧化緊迫的現象出現。綜合以上的結果發現，B[a]P 誘導 CL3 細胞之 *TGF- β 1* 基因表現增加，可能與氧化緊迫有關，但是與 AhR 所調控之路徑可能無關。

由本研究結果得知，人類肺癌細胞株暴露食用油煙萃取物後能增加 cytochrome P450 與 *TGF- β 1* 基因表現，刺激細胞分泌 *TGF- β 1* 且產生氧化緊迫；處理 B[a]P 也可看到相同的影響。進一步探討 B[a]P 增加 *TGF- β 1* 基因表現之機轉時發現，B[a]P 增加 CL3 之 *TGF- β 1* 基因表現可能與氧化緊迫有關，但是與 AhR 所調控之路徑可能無關。

Abstract

Lung cancer is the most common cause of cancer death worldwide around 1990. Lung cancer mortality among Chinese females was above the world average. Cigarette smoking has been associated with the development of lung cancer. However, the prevalence of cigarette smoking is low among Chinese females. The high mortality among Chinese females was unexplained by the habit of cigarette smoking. Thus, other risk factors may contribute the lung cancer incidence among Chinese females. Exposure to air pollutants, such as cooking oil fumes (COF), has been considered as an important risk factor for lung cancer. It was recently demonstrated that many environmental pollutants not only inhibited cell growth but also altered gene expression in lung cells. For example, diesel exhaust particle and air pollution particles induced cytokines production in human lung epithelial cells. Benzo[a]pyrene (B[a]P), a pulmonary carcinogen, was detected in COF and air particulates. Therefore, in the present study we investigated whether COF and B[a]P alter gene expression of cytokines, growth factors, and cytochrome P450 in human lung cancer cells CL3. CL3 cells were exposed to COF or B[a]P for 24 hrs and then the mRNA levels were measured with the RT-PCR method. When CL3 cells were treated with 200 μ g/ml COF, the mRNA level of *TGF- β 1* was increased to 4 fold of

controls. The mRNA level of *cytochrome P4502E1 (CYP2E1)* was increased to 2 fold 24 hr after treatment. The mRNA levels of *cytochrome P4501A1 (CYP1A1)* and *cytochrome P4501B1 (CYP1B1)* were transiently increased to 2-4 fold of control, but returned to the basal levels at 24 hr. However, the mRNA levels of *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-13*, *IFN- γ* , *TNF- α* and *TGF- β 2* were similar between control and treated cells. Similarly, treatment with 10 μ M B[a]P for 24hr also increased the mRNA levels of *TGF- β 1*, *CYP1A1* and *CYP1B1* to approximately 3-4 folds of controls in CL3 cells. The mRNA levels of *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-13*, *IFN- γ* , *TNF- α* and *TGF- β 2* were not changed after treatment with 10 μ M B[a]P. In summary, treatment with COF and B[a]P increased *TGF- β 1* mRNA levels in human lung CL3 cells. CL3 cells treated with COF or B[a]P also increased *TGF- β 1* secretion (measured by ELISA assay) in the dose- and time-dependent manner. It suggests that *TGF- β 1* may involve in the mechanism of COF and B[a]P-induced lung carcinogenesis. We further found that COF and B[a]P increased oxidative stress in CL3 cells. It implies that COF and B[a]P-induced *TGF- β 1* mRNA expression may relate to oxidative stress generation.

B[a]P induced gene expression of cytochrome P4501A1 gene

expression and enzyme activity through activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) . We used three lung cancer cell lines CL3, A549 and H1355, with differential sensitivity to B[a]P, to study whether B[a]P-induced *TGF- 1* gene expression is AhR-dependent. After treatment with 10 μ M B[a]P, growth of H1355 cells was significantly inhibited, but not A549 cells. In consistent with growth inhibition, *CYP1A1* gene and enzyme inducibility by B[a]P was higher in H1355 cells than in CL3 and A549 cells. However, treatment with 10 μ M B[a]P increase *TGF- 1* mRNA levels only in CL3 cells, but not in H1355 and A549 cells. When we examined the generation of oxidative stress by B[a]P treatment in these cell lines, oxidative stress was increased only in CL3 cells, but not in H1355 and A549 cells. These results suggest that *TGF- 1* induction by B[a]P is AhR-independent, but may depend on the generation of oxidative stress. In summary, COF and B[a]P induced *TGF- 1* production and oxidative stress generation in human lung CL3 cells. Therefore, *TGF- 1* and oxidative stress may play a role in COF and B[a]P-related lung carcinogenesis.

第一章 文獻總論

第一節 肺癌流行病學特徵和危險因子

近十多年來，惡性腫瘤一直高居台灣地區十大死因之首（衛生署生命統計, 1984-1992），和其他癌症比較，肺癌是台灣地區惡性腫瘤增加率最快的癌症，男女性肺癌幾乎都增加八倍，是世界上增加最快的地區（衛生署生命統計, 1991-1996）。肺癌在台灣的癌症死亡率中，男性僅次於肝癌；女性則已超過子宮頸癌，躍居女性癌症死亡率第一位（Yang et al., 1984; 陸坤泰與張登斌, 1992），因此肺癌已是嚴重威脅我國居民健康的惡性腫瘤之一。影響癌症發生的原因十分複雜，目前已知和生活習性、飲食習慣、居住環境、職業類別等因子均有相關。依據流行病學調查顯示，肺癌的發生和吸煙、職業暴露、空氣污染、營養因素、放射線物質、遺傳或其他危險因子有關。

1761 年 Dr. Hill 對兩名因吸鼻煙而引起鼻癌病例的研究，是最早對香煙有危害的報導（Redmond, 1761）。接著的研究指出香煙和肺癌的發生有明顯的劑量反應關係，發生肺癌的相對危險性吸煙者比不吸煙者高出 10 倍，而且重度吸煙者的相對危險性為不吸煙者的 15-25 倍（US Public Health Service, 1982）。隨著吸煙的年數、每天吸煙量、吸入的深度和焦油含量的增加罹患肺癌的危險性也會增加（International Agency for Research on cancer, 1987）。

石綿是纖維狀的矽酸鹽結晶，具有多種的工業用途，長久以來被廣泛應用在建築上。長久以來，人們知道採礦工或製造石綿會使人罹患塵肺症。石綿造成肺癌的相對危險性大約為五倍，而且和吸煙具有加成的作用；若同時又吸煙危險性可達 50 倍(Selikoff et al., 1968)

近年來隨著工業化和都市化之進展，肺癌發生率也急速上升。以台灣地區而言，台灣城鄉間肺癌發生率，城市肺癌發生率較鄉間高四倍，但是兩個地區的吸煙率並無顯著差異，兩者間的肺癌發生率差異可能是因為空氣污染所造成 (Rylander et al., 1990; Folinsbee et al., 1992)。台灣의 空氣污染型態和國外並不相同，機車廢氣污染佔相當重要之角色，機車燃料因為燃燒溫度較低所以致癌物含量較高。

根據近年來的醫學報導知道吸入食用油煙霧對健康人或慢性支氣炎病人的肺功能均有很明顯的影響，會使得 PEF_R、V₇₅、V₅₀、V₂₅ 均顯著下降 (朱還奎等人, 1993)。食用油煙霧對氣管有十分強的刺激作用，吸入會引起咳嗽、氣悶、氣短等症狀 (Simposon, 1985; 朱還奎等人, 1993, 1994)。高溫煎炒是我國居民傳統的烹調習慣，所以烹調油煙霧可能是我國居民室內常見的空氣污染物之一，近年來烹調油煙霧所引起的危害已漸漸被重視，它也是一項非吸煙引起肺癌的危險因子 (Li et al., 1994)。

去分化是癌症細胞重要生長特徵之一，而維生素 A 具有協調

細胞生長分化的生理功能，所以也有學者推測維生素 A 可能在致癌過程中扮演著特殊的角色。自然界中有兩種主要的維生素 A：視黃醇（retinol）只存於動物性食品，β-胡蘿蔔素則大多數來自植物性物質。先前的研究報告利用重疊病例對照或病例對照利用血清指標來看維生素 A 和肺癌之關係（Nomura et al., 1985; Willet et al., 1985; Salonen et al., 1985; Menkes et al., 1986; Pastorino et al., 1987; Kune et al., 1989）。大家對β-胡蘿蔔素得到的結論具有一致性，β-胡蘿蔔素對肺癌具有保護作用。但是檢測血清中視黃醇的濃度並不是一個很好的視黃醇飲食攝取量指標，所以絕大多數的研究都看不到相關性。

和肺癌最有關係的游離性輻射是氡氣的暴露（International Agency for Resresearch on Cancer, 1988）。研究指出鈾礦工人通常具有較高的肺癌發生率，可能是和礦坑中氡氣及其衰變物有關。但是目前流病研究針對居家氡氣暴露和肺癌間的相關性，結果多顯示只具有微弱或無相關（International Agency for Resresearch on Cancer, 1988）。

第二節 食用油煙霧成份與肺癌的關係

新加坡學者發現華人廚師罹患肺炎的機率較高（Law et al., 1976），Coggon 等人（1986）也發現華裔廚師罹患呼吸道癌症的機率較其他癌症的機會高。Gao 等人（1987）對中國大陸上海 672 位女性

肺癌病患進行調查，發現只有 1/4 的人有吸煙習慣，而且女性病患大多是罹患與吸煙較無關係的肺腺癌，所以華裔女性肺腺癌發病率較高的原因可能是因烹調油煙所造成。一項調查研究也發現，烹調時所產生的油煙與鼻咽癌、口腔癌、膀胱癌、肺癌、胃癌和前列腺癌等癌症發生有關（Hederson et al., 1978; Dickson, 1981; Hargraves and Pariza, 1984; Hansson et al., 1993; Coggon and Wield, 1993; Shirai et al., 1997）。

Chiang 等人（1997）認為，一般的中國傳統炒菜方式都是習慣先將油的溫度升至 200 以上，再將食物放入烹調，油溫升高的過程所產生的油煙霧，其中的多環芳香類化合物、醛類及酮類可能具有基因毒性，會影響人體健康，可能也是台灣地區婦女肺癌發生的危險因子之一。

食用油煙經過高溫加熱後會進行熱氧化及熱裂解，所產生的化合物物質成份甚為複雜，不同的食用油經加熱後產生的物質也不同。一般而言其主要產物大多是，醛類、酮類、烴類、脂肪酸、芳香烴化合物及雜環類化合物等。在中國大陸上海的研究發現，肺癌和烹調的方式（煎、炒、煮）烹調的餐數、烹調時的油煙大小及烹調用油種類都有相關（Gao et al., 1987）。Li 等人（1994）將三種不同的食用油（蔬菜油、大豆油和提煉後的蔬菜油）加熱到 265 後，收集所產生

的油煙霧進行分析，發現三者的煙霧中皆含有多環芳香烴類化合物（polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs）類的物質，如 benzo[a]pyrene（B[a]P）dibenzo[a,h]-anthracene（DB[a,h]A）等，其中 B[a]P 的含量高達 0.305-0.463 $\mu\text{g/g}$ ，而 DB[a,h]A 含量為 3.725-5.736 $\mu\text{g/g}$ ，兩者的含量均為未加熱食用油的幾十倍至幾百倍。所以他們認為食用油煙煙霧因含有大量的 PAHs 類的物質而具有毒性。

許多研究指出，食用油加熱所產生的烹調油煙霧具有遺傳毒性。Qu 等人（1992）的研究中指出，發現大豆油加熱後所產生的油煙會促使小鼠骨髓細胞產生微核（micronucleus）及姊妹染色體交換（sister chromatid exchange），也有報導指出烹調油煙霧會使鼠傷寒沙門氏菌菌落回變數增高（致突變性增高），及增加 V79 細胞姊妹染色體交換之頻率（Shield et al., 1995）。Chiang 等人（1997, 1998）也證實，豬油經加熱至 200、300 或大豆油加熱至 300 所產生的油煙霧，在 S9 存在下對沙門桿菌 TA98 具有致突變性。

也有研究報導指出，食用油煙霧會降低體內免疫功能。老鼠吸入廚房空氣污染物 3 個月後，再檢測老鼠體中免疫反應，發現老鼠肺部巨噬細胞之抗腫瘤能力降低，自然殺手細胞的活性及脾臟 T 淋巴細胞誘導 IL-2 的活性也有下降的情形（王瑾等人, 1992）。另一項研究調查，以南京市內職業與飲食有相關的男性從業人員為調查對象共

72 人，其中 44 人職業為廚師，以他們為暴露組，其餘 28 人分別為倉庫保管人員及其他管理人員為對照組，問卷調查研究對象的基本資料後，測量其血清中 IgG、IgA、IgM 及分析血液裏 T 淋巴細胞的分化能力等免疫功能的指標，結果發現暴露組人員其體內血清的 IgG、IgA 和 T 淋巴細胞的分化能力皆較對照組低，且與職業暴露年限有關，也就是說暴露烹調油煙霧會使人體免疫功能受損（南京鐵道醫學院碩士研究生論文）。

雖然食用油煙霧的成分很複雜，造成細胞或細菌的毒性機轉也不是很清楚，但是我們可以將食用油煙霧已知有毒成份分為兩類：多環芳香 類化合物與酮類、醛類。目前已知酮類、醛類物質易造成細胞氧化緊迫的傷害。這兩類有毒物質可能會經由不同的機轉，造成細胞和組織傷害。

第三節 多環芳香烴類化合物之毒性

多環芳香烴類化合物（PAHs）是一種廣泛分布於環境中的污染物，通常是因有機物不完全燃燒所生成。其來源包括：發電廠石化燃料、焚化爐中廢棄物的高溫燃燒、家庭用的瓦斯加熱器、煤油加熱器、電鍍工廠、鑄造工廠及熔煉工廠等所排出的污染物（Hazardous Substances Data Bank, 1988; Lee et al., 1994）。另外香煙煙霧懸浮微

粒、汽機車或飛機引擎所排放的廢氣 (Venier et al., 1985) 也含有 PAHs。除此之外 , Li 等人 (1994) 發現食用油經加熱後所產生的油煙霧中也含有許多 PAHs。B[a]P (一種 PAHs 類化合物) , 被發現於汽機車排放廢氣、香煙煙霧、燃燒煤或瀝青所製造出的廢氣 (Nesnow et al., 1993; Petry et al., 1995)。

以 B[a]P 為例 , B[a]P 進入體內後有許多代謝路徑 , 主要是經由 cytochrome P4501A1 酵素系統代謝活化先形成 (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene , 然後再繼續氧化形成最終代謝物 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10 tetrahydrobenzo[a] pyrene (BPDE) , 它會直接攻擊 DNA 與 DNA 鍵結 (Shimada et al., 1992)。BPDE 主要是攻擊 DNA 的 deoxyguanosine(dG) 之 N₂ 位置(Jeffrey et al., 1976, 1977)。B[a]P 經代謝活化後另一個產物是單氧電子氧化 B[a]P , 是一種自由基 , 它會攻擊 DNA deoxyguanosine 之 N₇ 胺基位置 , 而形成 DNA 鍵結物 (Cavalieri and Rogan, 1992)。B[a]P 經代謝活化後的代謝物可以經由 glutathione-S-transferase (GST) 酵素代謝解毒 (Mannervik et al., 1988) , 此酵素有許多成員 , 例如 alpha、mu、theta 及 pi , 在倉鼠細胞內參與 B[a]P 的解毒作用則以 GST pi 為主 (Swedmark et al., 1992)。

已有許多研究指出 , PAHs 具有致癌性。煙囪中灰燼含大量

PAHs, 早在 1775 年就發現掃煙囪的工人較易罹患陰囊癌, 後來許多流行病學研究調查也指出, 暴露在混合型多環芳香烴類化合物的從業人員, 如廚師及麵包烘培師, 罹患腫瘤致死之機率較其他從業人員高 (Tuchsen and Nordholm, 1986; Teschke et al., 1989)。Bjoreth 等人 (1985) 研究指出, 一般空氣中 PAHs 的含量約有 80 % 是來自石化燃料的燃燒。通常 PAHs 會經由呼吸道、食道和皮膚接觸進入人體, 經代謝活化後與 DNA 形成鍵結物, 在人類許多組織包括肺臟、支氣管、皮膚、胰臟、口腔粘膜、子宮頸和乳房組織等都可偵測到 PAHs-DNA 鍵結物累積 (Dunn and Stich., 1986; Phillips et al., 1988; Schoket et al., 1990)。Sohodet 等人 (1989) 研究指出, 以柴油引擎廢氣處理人類淋巴球細胞後會產生五種 DNA 鍵結物, 其中 B[a]P-DNA 是最主要的 DNA 鍵結物。Harris 等人 (1991) 發現 B[a]P 會造成 ras 原致癌基因 (protooncogene) 之第 12 密碼 (codon) 處發生 G→T transversion。Cherpillod 等人 (1995) 的研究結果指出 B[a]P 會造成人類肝細胞, p53 抑癌基因之第 248 及 249 密碼發生 G→T transversion。這些結果都證實 B[a]P 會引起人類和動物細胞的基因發生突變, 甚至可能會引起癌症產生。TCDD 是一種毒性很強的 PAH, 在動物實驗中發現, TCDD 會造成胎兒畸型、降低免疫能力、表皮組織變形、胸腺退化, 且會誘發一些致腫瘤基因表現, 促進腫瘤形成 (Moses et al., 1985;

Suskind et al., 1985; Vanden et al., 1993)

第四節多環芳香烴類化合物對基因表現的影響

B[a]P 可與細胞質 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 結合並活化之，活化的 AhR 轉移進入細胞核內，與細胞核內 Ah receptor nuclear translocator (Arnt) 鍵結，形成複合體，與 xenobiotic-responsive elements (XRE) 鍵結，誘導其下游之基因表現，例如 CYP1A1、CYP1B1 與 NQO1 等代謝藥物之酵素基因 (Israel et al., 1984; Nguyen et al., 1994; Hakkola et al., 1997)。Hoffer 等人 (1996) 的研究中指出，在老鼠肝癌細胞中處理 TCDD 或 B[a]P 後會誘導 c-fos、c-jun、junB 和 junD 的表現，且 TCDD 或 B[a]P 調控 fos 和 jun 基因表現是藉由 AhR 所調控。另有實驗結果顯示 PAH 除了活化 AhR 之外，同時也會啟動其他訊息傳遞路線，例如 protein kinase C (PKC) (Whitlock et al., 1996)。Bombick 等人 (1985)，對天竺鼠及老鼠肝臟細胞處理 TCDD，在 48 小時內 c-AMP 及 protein kinase 的活性，尤其是 PKC 活性會明顯的提高，而使 EGF receptor 及受 PKC 調控之蛋白功能發生改變。David 等人 (1997) 研究發現以 TCDD 處理老鼠肝細胞後，會引起鈣離子流入細胞內，並活化 PKC 而誘導 c-jun、c-fos 之基因表現。另外 Ou 等人 (1995) 研究指出以 PKC 抑制劑 (staurosporine) 處理細胞後，

staurosporine 會抑制 TCDD 誘導細胞傷害的機制。另外，PAHs 也會與 estrogen receptor 作用，影響體內賀爾蒙的表現，造成賀爾蒙失調 (Kharat et al., 1996)；在原代培養的人類肝細胞裏，PAHs 會調控一些生長因子，如：EGF、TGF- β 、TGF β 及 cytokine 基因的表現，而影響細胞的增生 (Abdel-Razzak et al., 1994)

第五節 TGF β 分類、結構及功能

Transforming growth factors beta (TGF β s) 最初是由 murine sarcoma virus-transformed fibroblasts 中分離出來 (De Larco and Todaro, 1978)。TGF β 也在老鼠的一些正常組織，如 submaxillary gland、腎臟、肝臟、肌肉、心臟和腦中 (Roberts et al., 1981)，及人類胎盤 (Frolik et al., 1983) 和血小板 (Assoian and Sporn, 1986) 中被發現。

在人類細胞株中發現，TGF β s 通常具有三種 isoforms：TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3 (Derynck et al., 1985; de Martin et al., 1987; ten Dijke et al., 1988)。TGF β s isoforms 中以 TGF β 1 最廣泛被研究。Derynck 等人 (1985) 已成功基因轉殖出人類 TGF β 1 基因。之後科學家在 globlastoma 和 BSC-1 細胞株中轉殖出 TGF β 2 (de Martin et al., 1987; Hanks et al., 1988)。Derynck 等人 (1988) 以 low-stringency screening 從人類 cDNA 庫中轉殖出 TGF β 3。ten Dijke 等人 (1988) 研究發現，

大部分細胞培養的細胞株通常是表現 TGF β 1 和 TGF β 3 而 TGF β 2 較不廣泛被製造。

TGF β 1-3 的 promoter 序列已在 1989-1991 年間，已被科學家找出 (Kim et al., 1989; Geiser et al., 1991; Noma et al., 1991)，三者 promoter 序列並不完全相同。TGF β 1 的 promoter 序列裏不包含 TATA 或 CATT box 的序列，但是含有 AP-1 和 Egr-1 transcription factors binding sites (Kim et al., 1990; Scotto et al., 1990)。TGF β 2 的 promoter 序列含有 AP-1, AP-2 sites, cAMP regulatory element 和 TATAA consensus start site (Noma et al., 1991)。TGF β 3 promoter 序列含有 TATA box, cAMP response element, 一個 3xTCCC motif, 和一個 AP-2 site (Lafyatis et al., 1990, 1991)。

通常 TGF β s 是以 latent form (不活化型態) 被分泌出來，latent form TGF β s 包含兩種蛋白質：TGF β 蛋白和 TGF β 的 prodomain (又可稱作 TGF β latency-associated protein (β -LAP)) (Lawrence et al., 1984, 1985; Gentry et al., 1988)。包含有 β -LAP 蛋白和 TGF β 蛋白的 latent form TGF β complex 被稱為 small latent TGF β ，大部分細胞株分泌的 latent form TGF β 是屬於 large latent TGF β complex，這是因為 β -LAP 蛋白上又額外接有一些大分子量的蛋白質 (Miyazono et al., 1988; Wakefield et al., 1988; Olofsson et al., 1992)。目前已知外來物質

調控 TGF 活化的機轉是：外來物質活化 serine proteinase , serine proteinase 使 extracellular matrix (ECM) 釋放出 large latent TGF complex (Taipale et al., 1992) , proteinase 作用使 large latent TGF complex 上的 -LAP 被分解下來 , 而活化 large latent TGF (Lyon et al., 1988, 1990; Sato and Rifkin., 1992) , 活化的 TGF complex 與細胞表面上 TGF receptor 結合 , 誘發下游訊息傳遞 (Lopez-Casillas et al., 1994; Lamarre et al., 1994) 。

在試管中 , 過酸或過鹼的溶液 (Lawrence et al., 1984, 1985; Miyazono et al., 1988; Lyons et al., 1988) 加熱處理 (Brow et al., 1990) 和 chaotropic 試劑或 sodium dodecyl sulfate (SDS) (Miyazono et al., 1988) 處理能活化 latent TGF 。少部分的 latent TGF 會因 sialidase 作用 , 使 -LAP 被 deglycosylation 而使 TGF 被活化 (Miyazono and Heldin, 1989) 。已有研究指出 , retinoids , vitamin D₃ 相似物 , antiestrogens 及 corticosteroids 能活化細胞之 TGF 。皮膚角質細胞經 retinoids (Glick et al., 1989) 或 vitamin D₃ 相似物處理 (Koli and keski-Oja, 1993) ; 癌細胞株或正常纖維母細胞經 antiestrogens 處理 (Knabbe et al., 1987; Coletta et al., 1990) 皆會使 latent TGF 被活化。Corticosteroids 處理 MG-63 osteosarcoma 或 bone osteoblasts 細胞 , 會誘導 TGF 活化 (Oursler et al., 1993; Boulanger et al., 1995) 。

目前已知 TGF 最主要的生物功能有三種：(1) 抑制上皮細胞 (epithelial) 內皮細胞 (endothelial) 造血細胞 (hematopoietic) 生長(2) 刺激細胞外基質合成(3) 抑制免疫反應 (immunosuppression)。

體外實驗中已經證實，TGF 會抑制上皮細胞增生。Silberstein 等人(1987) 將 TGF 1 打入老鼠的乳腺中會抑制老鼠乳腺 branching morphogenesis 之生長。接著在 1992 年時，更證實 TGF 1 會停止乳腺的末端芽生輸送管 (ductal end buds) invasion，而使乳腺 branching morphogenesis 生長受抑制 (Silberstein et al., 1992)。其他學者也發現 TGF 和細胞週期調控有相關。TGF 會使細胞週期停留在 G1 期，停止細胞分裂 (Laiho et al., 1990; Moses, 1992)。目前已知 TGF 控制細胞週期進行的可能機制有許多：(1) TGF 會抑制 retinoblastoma (Rb) 磷酸化，使 Rb 蛋白無法正常調控細胞週期 (Laiho et al., 1990)；(2) TGF 會抑制 cyclin-dependent kinase Cdc2 (Howe et al., 1991)，Cdk2 (Koff et al., 1993) 及 Cdk4 (Ewen et al., 1993) 的活性。且 TGF 會增加 cyclin-dependent kinase inhibitors 的表現，如 p15^{INK4B} (Hannon and Beach, 1994)，p21^{Cip1} (Li et al., 1995; Datto et al., 1995) 和 p27^{Kip1} (Polyak et al., 1994)；(3) Iavarone 和 Massagué (1997) 發現 TGF 也會抑制 CDK tyrosine phosphatase Cdc25A 的活性。

TGF 對 extracellular matrix 的合成、分解與再生之調控扮演

了很重要的角色。TGF 會刺激多數 extracellular matrix 合成，包括：collagens、fibronectin、vitronectin、tenascin、thrombospondin 和 proteoglycans 等(Ignotz and Massagu'e, 1987; Raghov et al., 1987; Koli et al., 1991; Pearson et al., 1988; Penttinen et al., 1988; Bassols and Massagu'e, 1988)，進而影響組織的粘著性 (adhesion)。

TGF 另一影響 matrix 的作用機轉是，減少 proteinase 的表現，如：plasminogen activators(Laiho et al., 1986) collagenase (Edwards et al., 1987) 和 stromelysin (Kerr et al., 1990)；誘導 proteinase 抑制者的表現，如：plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)(Laiho et al., 1986, 1987) tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)(Edwards et al., 1987) 和 cystatin C (Solem et al., 1990)。

TGF 具有抑制免疫反應 (immunosuppression) 的功能，誘導發炎反應並促使組織纖維化 (Sanderson et al., 1995; Roberts et al., 1980)。TGF 和組織纖維化有關，所以異常的 TGF 代謝可能和一些因組織纖維化所引起的疾病有關，如：glomerulonephritis(Border and Ruoslahti, 1992) Alzheimer's disease (Flander et al., 1995) lung fibrosis (Broekelmann et al., 1991; Anscher et al., 1993) liver cirrhosis (Czaja et al., 1989; Castilla et al., 1991) 和組織異體移植排斥所引起的纖維化 (Waltenberger et al., 1993)。另外也有研究發現心肌梗塞引

起的冠狀動脈硬化 (Thompson et al., 1988) 冠狀動脈 angioplasty (Majesky et al., 1991; Nikol et al., 1992) 和動脈硬化 (Nabel et al., 1993) 組織中 TGF β 1 表現程度比正常組織高。

第六節 調控 TGF β 1 表現或活化之因子

TGF β 1 表現或活化受到許多因子調控，目前已知一些調控細胞癌化的致癌基因 (oncogenes)，如：c-Ha-Ras、src、jun、fos、abl 和 ras 濾過性病毒的 transactivating 蛋白，HTLV-I Tax 和 HBVX 等皆和調控 TGF β 1 表現有關 (Kim et al., 1990, 1994; Birchenall-Roberts et al., 1990; Geiser et al., 1991; Yoo et al., 1996)。TGF β 1 promoter 序列上含有 AP-1 和 Egr-1 transcription factors 的 binding sites (Kim et al., 1990, 1994; Scotto et al., 1990)，處理 phorbol ester 或外加 TGF β 1 可能透過 AP-1 transcription factor complex 而 up-regulation TGF β 1 轉錄反應 (Van Obberghen-Schilling et al., 1989, 1991)；外加 NGF 所誘導 TGF β 1 表現增加，則可能是藉由 Egr-1 site 調控有關 (Kim et al., 1994)。另外也有研究發現在細胞裏處理 WT1 (Wilms' tumor suppressor gene 產物) 反而會抑制 TGF β 1 表現。Liyang 和 Kathleen 等人 (1997) 以 B[a]P 或 TCDD 處理人類胎盤絨毛癌細胞 (JEG3 細胞)，比較二者對細胞基因表現之影響。B[a]P 10 μ M 會增加 TGF β 1

mRNA 表現，減少 c-myc mRNA 表現，但是 TCDD 並不影響 TGF- β 1 及 c-myc 的 mRNA 表現。以柴油排出廢氣（DE）處理人類支氣管上皮細胞（BET-1 細胞），再利用 RT-PCR 方式檢測細胞 cytokine 的表現，結果發現 DE 會增加細胞 IL-8 及 TGF- β 1 mRNA 表現(Shinji et al., 2000)。

第七節 TGF- β 1 與氧化緊迫之關係

近年來也有研究報告指出，氧化緊迫（reactive oxygen species, ROS）也會誘導 TGF- β 1 基因表現。4-Hydroxy-2,3-nonenal (HNE) 是一種膜脂質醛類氧化後的產物，已知高劑量的 HNE 會引起肝硬化、動脈硬化等疾病（Leonarduzzi et al., 1995）。將人類及老鼠的淋巴球細胞處理 HNE 後，以 RT-PCR 和 Western blot 方法檢測 TGF- β 1 mRNA 及蛋白合成量，結果發現處理 HNE 會增加 TGF- β 1 表現增加（Leonarduzzi et al., 1997）。Crohn's disease 是一種因氧化壓力所引起的腸道發炎疾病，通常將其視為趨癌化的疾病，Scavazza 等人(1997) 也發現檢測 10 個 Crohn's disease 病人的直腸癌組織，TGF- β 1 表現很高，且 HNE-protein adducts 和 MDA-protein adducts 的量也較正常組高，所以推測氧化緊迫與 TGF- β 1 表現二者間應有相關性。

Martin 等人(1997) 也證實，人類纖維母細胞和皮膚角質細胞

經 γ -ray 照射處理後會增加 TGF β 1 transcripts , AP-1 transcription factor (Fos/Jun) 蛋白量表現及其與 AP-1 consensus 序列鍵結能力。再利用免疫染色法發現 TGF β 1 蛋白表現也會增加 , 又因為 TGF β 1 promoter 上含有 AP-1 binding site , 故推測 γ -ray 引起的氧化緊迫應是透過活化 AP-1 而誘導 TGF β 1 表現增加。

第八節 TGF β 與細胞癌化的關係

TGF β 會影響上皮細胞 (epithelial) 內皮細胞 (endothelial) 造血細胞 (hematopoietic) 生長 , 對這些種類的細胞而言 , 若喪失對 TGF β 的敏感性 , 細胞生長會異常 , 可能會助長細胞癌化發生。除了一些鱗狀癌細胞 (Shipley et al., 1986; Reiss et al., 1993) 和 retinoblastoma 細胞 (Kimchi et al., 1988) 大部分的癌細胞株之生長會被 TGF β 抑制 (Moses et al., 1985 ; Moses, 1992) 比較癌細胞與正常細胞對 TGF β 的敏感性 , 癌細胞對 TGF β 的敏感性較正常細胞差。原代培養上皮細胞 , 內皮細胞與肝細胞處理 TGF β 會引起細胞生長停止 , 但對這些細胞的癌化細胞株處理 TGF β , 癌化細胞的生長並未因 TGF β 而停止 (Fynan and Reiss, 1993) 這可能是因為癌細胞株對 TGF β 敏感性較差 , 癌細胞生長無法受 TGF β 調控 , 才會造成癌細胞不正常的增生。Kadin 等人 (1994) 發現 , Mac-2A 和 Mac-2B (從皮膚癌

組織分離) 這兩株癌細胞對 TGF β 不敏感性(具有抗性), 可能是因為 Mac-2 細胞 TGF β type II receptor 發生突變, 喪失功能所致(Knaus et al., 1996)。

此外 TGF β 可促進癌細胞的 invasion, metastasis、angiogenesis (Laiho et al., 1986, 1987; Sato and Rifkin, 1989)。Melanoma 黑色素腫瘤的老鼠, 其表現 TGF β 較正常組高, 且 TGF β 與癌細胞的 invasion 具有相關性 (Reed et al., 1994)。TGF β 也可誘導 epithelial-mesenchymal transdifferentiation 使細胞轉變成具有較高侵入性或變成細長的惡性癌細胞 (Miettinen et al., 1994; Caulin et al., 1995; Cui et al., 1996)。Picon A 等人 (1998) 檢測 31 個大腸癌細胞轉移至淋巴結的案例發現 TGF β 1 表現竟高達 74 % , 檢測原位大腸癌細胞 TGF β 1 表現只有 33 % , TGF β 1 表現與癌細胞轉移具有正相關。癌細胞或癌化纖維母細胞所分泌的 TGF β 也可誘導 angiogenesis(Roberts et al., 1986), 臨床例子顯示 TGF β 誘導癌細胞 angiogenesis, 對胰臟癌而言這是一個很重要的影響因子 (Hahn et al., 1996; Bottinger et al., 1997), 但是 TGF β 如何影響 angiogenesis 其中的機制目前仍不清楚。TGF β 1 與胃癌癌化過程有關, 檢測 101 位胃癌病人, 有 23 (22.8 %) 被偵測到有 TGF β 1 表現, 而且和胃癌 invasion 程度及胃癌分期有相關, 而且不表現 TGF β 1 的病人癒後情形較佳 (Hiroaki Saito et al.,

1999)。

也有研究指出, TGF- β 1 的表現和肺癌也具有相關性。Takanami 等人 (1994) 利用免疫螢光染色法檢測 88 位肺腺癌病人組織切片, 其中 45 位為 TGF- β 1 positive, TGF- β 1 negative 組手術後存活率達 5 年以上占 56%, 但是 TGF- β 1 positive 組手術後存活率達 5 年以上只有 16%, TGF- β 1 或許可當作肺癌患者手術後的預後指標。接著 Takanami 等人 (1997), 檢測 120 位肺腺癌病人的肺癌組織中 TGF- β 1 與其 receptors (T beta RI、 T beta RII) 的表現, 發現 TGF- β 1 和其 receptors 與腫瘤的 progression 具有正相關 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。另一項研究報告指出, 比較正常人和肺癌病人血漿中 TGF- β 1 的表現量, 結果發現肺癌病人血漿中 TGF- β 1 較正常人高, 且具有統計上的意義 (Kong et al., 1999)。

研究動機

吸煙是罹患肺癌的重要危險因子，衛生署流行病學的調查結果顯示，台灣地區 60 % 男性為吸煙者，女性抽煙的比例僅占女性總人口數的 3 % (中華民國台灣地區公共衛生, 衛生署, 1993), 但是肺癌為台灣地區女性癌症死亡之首。因此台灣女性肺癌患者，除了抽煙之外，應還有更重要的罹患肺癌危險因子。許多的流行病學調查結果顯示，暴露烹調油煙和女性肺癌的發生有相關性 (Koo and Ho, 1990)。高溫煎炒是華人一般的烹調習慣，食用油加熱的溫度愈高、加熱時間愈長，所產生的烹調油煙霧毒性就愈高。食用油在高溫下熱分解的揮發性物質成分十分複雜，包括 B[a]A、DB[a, h]A 和 B[a]P 及醛類或脂肪酸等化合物。前人的研究已證實，食用油煙霧具有遺傳毒性，本實驗室學長之實驗結果得知，CL3 細胞暴露 200 μ g/ml 食用油煙霧 4 天後，細胞生長速率降低 (附圖一)。

已知暴露於柴油燃燒廢氣 (diesel exhaust, DE) 或空氣懸浮微粒 (PM₁₀) 會增加罹患肺癌的危險性，而且 DE 與 PM₁₀ 均會使 cytokines 如 IL-6、IL-8、tumor necrosis factor 表現增加，這些 cytokines 與調控免疫發炎反應有關。

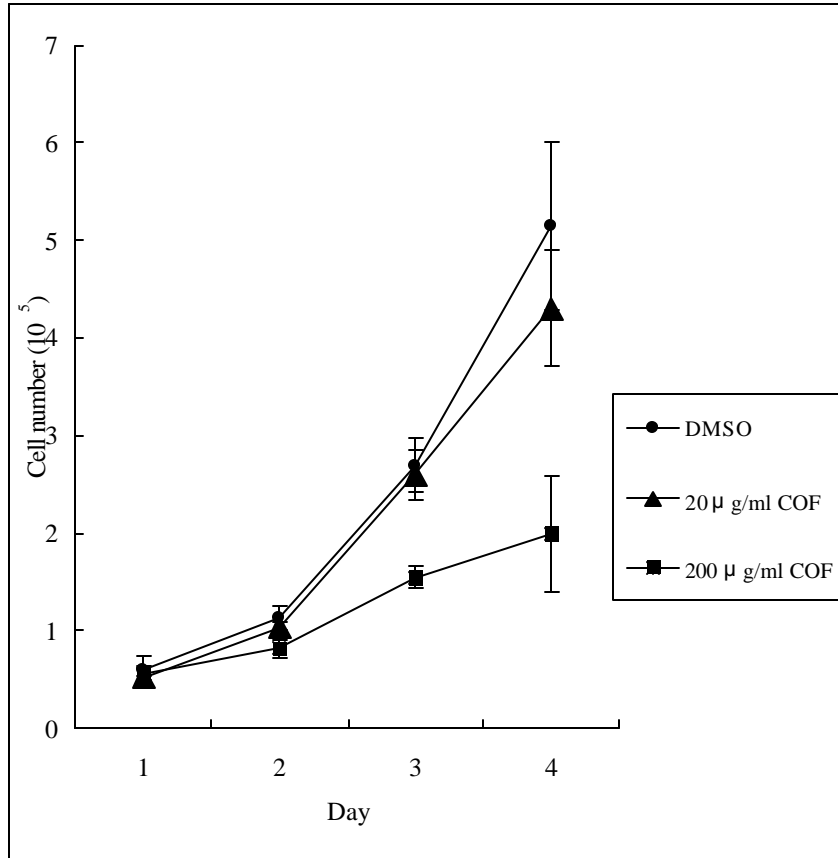
所以本實驗以人類肺癌細胞株探討：

(1) 食用油煙霧 (COF) 是否也會造成 cytokines 表現異常。

- (2) 食用油煙霧的成分中含有 B[a]P、醛類等化合物，B[a]P 及醛類分別會誘導 *cytochrome P450 CYP1A1*、*CYP1B1* 及 *CYP2E1* 基因表現。因此探討食用油煙霧是否也會增加 *CYP1A1*、*CYP1B1* 及 *CYP2E1* 基因表現。
- (3) B[a]P 是 COF 的成分之一，因此探討 B[a]P 對 cytokines 基因表現的影響是否也和 COF 相同。
- (4) 已知許多 cytokines 基因表現與氧化緊迫有關，因此探討 COF 與 B[a]P 是否造成氧化緊迫。

藉此評估食用油煙霧對肺癌細胞株是否具有非遺傳毒性。

附圖一 食用油煙霧對 CL3 細胞株生長之影響



第二章、材料與方法

壹．材料：

一、材料與藥品：

附圖一 食用油煙霧對 CL3 細胞株生長之影響 1 bovine serum (FBS), penicillin , streptomycin , sodium pyruvate , non-essential amino acid (NEAA), glutamine , Super Script TM II RT , TRIzol reagent 購自美國 GIBCO BRL 公司 ; Oligotex mRNA mini kit 購自德國 QIAGEN 公司 ; 細胞培養皿由丹麥 Nunc 公司購得 ; 96 微孔盤由美國 CORNING 公司購得 ; trypsin , dimethyl sulfoxide (DMSO) , benzo[a]pyrene (B[a]P) , ethidium bromide (EtBr) , (0.4%) trypan blue solution , glutathione , MOPS 由美國 Sigma 公司購得 ; normal melting agarose (NMA) 由美國 FMC 公司購得 ; potassium acetate 由日本和光純藥工業公司購得 ; Formamide , 37 % formaldehyde , Sulfuric acid 由 MERCK 公司購得 ; [γ - 32 P] dCTP 由英國 Amersham International 公司購得 ; 有機溶液由台灣皓峰公司及聯工化學股份有限公司購得。ELISA (TGF β 1) kit 購自美國 R&D Systems 公司。

本研究中使用的食用油煙霧收集方法，將食用蔬菜油加溫至 265 ± 5 ，抽油煙機上先放好濾紙收集產生的油煙霧，以 13-15 l/ml 的抽風速度收集 2-4 小時。再將濾紙上收集的油煙霧溶至丙酮中，再

利用環己烷萃取純化，以氣相層析儀（GC）分析食用油煙霧的成分。食用油煙霧成分中主要是脂肪酸、PAHs 類化合物及雜環類化合物，B[a]P 濃度為 0.305 $\mu\text{g/g}$ 、DB[a,h]A 濃度為 4.565 $\mu\text{g/g}$ （Li et al., 1994）。

二．人類肺癌細胞株之來源：

台灣肺腺癌細胞株 CL3 是由台大醫院內科楊泮池醫師提供本實驗室使用。A549 細胞株購自食品工業發展研究所菌種中心國家衛生研究院細胞庫。H1355 細胞株則由台北榮民總醫院胸腔腫瘤科主任蔡俊明醫師所贈予。

貳．方法

一、細胞培養、分盤

CL3 細胞株以含有 10 % FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine 和 100 unit/ml penicillin/streptomycin 之 F12 細胞培養液培養, A549 細胞株則培養於含有 10 % FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine, 100 unit/ml penicillin/streptomycin, 100 μ M sodium pyruvate 及 100 μ M NEAA, 100 μ M EAA 之 F12 細胞培養液中, H1355 細胞株以含有 5 % FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine, 100 unit/ml penicillin/streptomycin, 100 μ M sodium pyruvate 及 100 μ M NEAA 之 RPMI 細胞培養液中, 將細胞株置於含 5 % CO₂ 的 37 恆溫培養箱內培養, 每二天更換一次新鮮的培養液, 每種細胞株均約隔三 四天分盤培養。

細胞分盤, 首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出, 加入 10 ml 的 phosphate buffered saline 【PBS, 0.02 % KCl, 0.02 % KH₂PO₄, 0.8 % NaCl, and 0.216 % Na₂HPO₄】緩衝溶液洗一下 (CL3 細胞株則需用含 0.05 % EDTA 之 PBS 緩衝溶液先浸 1 分鐘), 然後將 PBS 緩衝溶液吸出, 再加入 1ml trypsin (含 0.05 % trypsin, 0.02 % EDTA, 為一種內切, 能幫助細胞 trypsin 覆蓋所有細胞後, 即馬上吸出 (盡量吸乾, 因為 trypsin 對細胞會有傷害), 置於 37 培

養箱 5 分鐘，使細胞能脫離培養皿，5 分鐘可利用顯微鏡 (OLYMPUS-CK40) 觀察細胞是否已脫離培養皿(若尚未完全脫離，可用手輕輕拍打培養皿邊緣，以幫助細胞脫落)，細胞脫落後，以 10ml 含血清的細胞培養液 (抑制 trypsin 繼續作用) 沖洗細胞，將細胞懸浮液移至 15ml 離心管中，於 4 離心 900 rpm (KUBOTA 2010 Centrifuge) 5 分鐘後，將上清液去除 (盡量吸乾)，再加入適當細胞培養液，待混合均勻後，以 2×10^6 個細胞/10 公分培養皿為培養密度種入培養皿中 (Boukamp et al., 1988; Paramio and Jorcano, 1997)。

二 . RNA 純化與 RT-PCR

將 DMSO (solvent control) COF 200 μ g/ml 或 B[a]P 10 μ M 加入 CL3、A549 或 H1355 細胞，培養 24 小時後以 TRIzol Reagent (GIBCO BRL)，抽取 RNA (Chomczynski et al., 1987)。步驟如下：移除 10cm 培養皿中舊的培養液，以 PBS 洗二次後，加入 1ml 的 TRIzol Reagent 使其完全覆蓋住培養皿，在室溫下靜置 5 分鐘 (TRIzol Reagent 和細胞作用後會呈現黏稠狀)，再利用括杓將細胞刮下，將細胞移至以預先滅菌過的微量離心管中，加入 200 μ l 的 chloroform/ isoamyl alcohol (49:1)，震盪混和後，於室溫靜置 10 分鐘；以 4 離心 12,000 rpm (HERMLE z323kCentrifuge) 20 分鐘，將上層透明液吸出移至

新的乾淨的微量離心管中，再加入 1ml 的 isopropanol 混合均勻，置於-20 1 小時以上，使 RNA 沉澱下來後，於 4 離心 12,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 20 分鐘，將上清液去除 (盡量吸乾) 離心後 RNA 沉澱物以 1 ml 75 % cold ethanol 洗去殘餘鹽類，再於 4 離心 7,500 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 5 分鐘，將上清液去除 (盡量吸乾)，於室溫下風乾。

為了避免 DNA 污染 RNA 須再用 DNase 處理。RNA 溶於 200 μ l 1x TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) 與等體積 DNase working solution 混合【20mM MgCl₂, 2mM DTT, 0.4 μ l of ribonuclease inhibitor (20-25U/ μ l) 和 2 μ g Dnase, 以 1x TE buffer 將體積補至 200 μ l】，於 37 水浴 15 分鐘。加入 100 μ l DNase stop solution 【50 mM EDTA, 1.5 mM sodium acetate, 1 % SDS】終止 Dnase 反應。加入 500 μ l 的 phenol、100 μ l 的 chloroform : isoamylalcohol (49:1, v/v) 混合液，混合均勻後在 4 離心 12,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 20 分鐘，將上層透明液吸出移至新的乾淨的微量離心管中，再加入 1ml 的 isopropanol 混合均勻，置於-20 約 1 小時以上，使 RNA 沉澱下來後，於 4 離心 12,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 20 分鐘，將上清液去除 (盡量吸乾)，離心後 RNA 沉澱物以 1ml 75 % cold ethanol 洗去殘餘鹽類，再於 4 離心 7,500 rpm (HERMLE z323k

Centrifuge) 5 分鐘，將上清液去除 (盡量吸乾)，於室溫下風乾。最後將 RNA 溶於 30 μ l 之 1x TE 即可。利用分光光譜儀於 260nm / 280nm 時測其吸光值 (注意：a. OD260 / 280 比值必須高於 1.5 以上，b. OD260 若高於 2.0 則必須稀釋後再測)，必須注意的是所有與 RNA 有關的試劑必須用 DEPC water【0.1 % DEPC 在室溫中攪拌至完全混合以破壞 RNase 後 (約 3-4 小時)，再經溼熱高壓滅菌除去 DEPC】，所有的器皿、用具都必須滅菌。

公式： μ gRNA = 吸光值(OD260nm) \times 40 μ g/ml \times 稀釋倍數

混合 10 μ g 的 total RNA、2ng 的 oligo(dT)₁₈ 及 DEPC 處理過的無菌水共 12 μ l，先加熱 70 $^{\circ}$ C 15 分鐘破壞 RNA 二級結構後，立即置於冰上，接著加入 8 μ l 緩衝溶液【50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、5mM DTT、5 mM dNTP】再加入 400 U MMLV Reverse transcriptase (SuperScriptTMII, GIBCO) 在 37 $^{\circ}$ C 加熱一小時，將 mRNA 反轉錄成 cDNA，最後再以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘破壞 reverse transcriptase 活性，完成後將 cDNA (total 20 μ l) 保存於 -20 $^{\circ}$ C。

RT-PCR 主要是利用 1 μ l cDNA (大約 0.5 μ g 的 total RNA) 為模版，在總反應體積為 30 μ l 的 1x 緩衝溶液中【10mM Tris-HCl(pH 8.8)、1.5mM MgCl₂、50 mM KCl、0.1 % Triton X-100】，加入特定的 primer 0.2 μ M (primer 序列見附表二)、0.2mM dNTP

(GIBCO-BRL,USA) 與 1U Taq polymerase (DyNAzymeTMII, Finland)。使用 UNO (Biometra) 熱循環儀將基因放大，反應條件如附表三。

定量方式：以 2 % 洋菜膠(agarose)並加入 0.5 μ g/ml ethidium bromide 於 running buffer 中染色，在 120 伏特電壓下進行電泳分析，再利用數位化影像分析系統 (AlphaImager TM 200 , Alpha Innotech corporation)在 UV 燈下依據染色強度定量。計算公式以 10 μ M B[a]P 對 TGF β 1 mRNA 影響為例：

處理 B[a]P 10 μ M-TGF β 1 定量值 / 處理 B[a]P 10 μ M- β -actin 定量值

處理 DMSO-TGF β 1 定量值 / 處理 DMSO- β -actin 定量值

附表二 RT-PCR 引子 (primers) 序列

Gene	Primer	PCR 產物大小
<i>CYP2E1</i>	5' -TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG -3'	410 bps
	5' -GAGCTCTGATGGAAGTATCGCA -3'	
<i>CYP1B1</i>	5' -AACGTCATGAGTGCCGTGTGT -3'	360 bps
	5' -GGCCGGTACGTTCTCCAAATC -3'	
<i>CYP1A1</i>	5' -TCCCTATTCTTCGCTACCTAC -3'	210 bps
	5' -TCTCTGTACCCTGGGGTT -3'	
<i>TGF 1</i>	5' -AAGTGGATCCACGAGCCCAA -3'	274 bps
	5' -GCTGCACTTGCAGGAGCGCAC -3'	
<i>TGF 2</i>	5' -AAATGGATACACGAACCCAA -3'	250 bps
	5' -GCTGCATTTGCAAGACTTTAC -3'	
<i>IL-2</i>	5' -CTACAACTGGAGCATTACTG -3'	230 bps
	5' -TTGCTGATTAAGTCCCTGGG -3'	
<i>IL-4</i>	5' -GTAATGGGTCTCACCTCC -3'	468 bps
	5' -TATTCAGCTCGAACACTT -3'	

Gene	Primer	PCR産物大小
<i>IL-6</i>	5' -AGTACCCCCAGGAGAAGATTCC -3'	550 bps
	5' -CTACATTTGCCGAAGAGCCCT -3'	
<i>IL-8</i>	5' -TTCTGCAGCTCTGTGTGAAGG -3'	248 bps
	5' -GAAGAAGGCTGAGAA -3'	
<i>IL-13</i>	5' -GTCATGGCGCTTTTGTGACC -3'	402 bps
	5' -TCAGTTGAACCGTCCCTCGCG -3'	
<i>TNF-</i>	5' -CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG -3'	475 bps
	5' -CCTTGGTCTGGTAGGAGACG -3'	
<i>IFN-</i>	5' -GGTCTCTTGGCTGTACTGC -3'	225 bps
	5' -ACTCTTTTGGATGCTCTGGTC -3'	
<i>-actin</i>	5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA -3'	541 bps
	5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC -3'	

附表三 各種引子 (primer) 的 PCR 條件

Gene	Thermocycle Predenature	conditions Thermocycle	Further extention	Cycles
CYP2E1	94 - 3 min	94 - 50 sec 53 - 50 sec 72 - 1 min 10 sec	72 - 5 min	31
CYPIB1	94 - 3 min	94 - 50 sec. 56 - 1 min 72 - 1min 30 sec	72 - 5 min	35
CYP1A1	94 - 3 min	94 - 50 sec. 54 - 50 sec 72 - 1 min	72 - 5 min	35
TGF 1	94 - 3 min	94 - 50 sec 59 - 40 sec 72 - 45 sec.	72 - 10 min	30
TGF 2	94 - 3 min	94 - 50 sec 58 - 40 sec 72 - 45 sec.	72 - 10 min	32
cytokine	94 - 3 min	94 - 50 sec. 56 - 40 sec 72 - 45 sec.	72 - 10 min	28

三、Poly (A) mRNA 純化

利用德國 QIAGEN 公司 Oligotex mRNA mini kit 純化 Poly(A) mRNA。將 RNA (約 40 μ g) 補 DEPC water 至 250 μ l , 加入 250 μ l Buffer OBB 【20mM Tris-Cl,pH7.5 , 1M NaCl , 2 mM EDTA , 0.2 % SDS】 , 再加入 15 μ l 已混合均勻的 Oligotex 溶液 , 混合均勻後置於 70 加熱 3 分鐘 , 再移至室溫放置 10 分鐘 , 離心 4 14,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 2 分鐘 , 去除上清液 , 加入 400 μ l Buffer OW2 【10mM Tris-Cl,pH7.5 , 150 mM NaCl , 1 mM EDTA】 , 混合均勻 , 將 1.5 ml 微量離心管套上 small spin column 離心 4 14,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 1 分鐘 , 將 small spin column 再套入另一個新的 1.5 ml 微量離心管 , 加入 Buffer OW2 400 μ l , 4 離心 14,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 1 分鐘 , 再將 small spin column 套入新的 1.5 ml 微量離心管 , 再加入已預先加熱至 70 30 μ l Buffer OEB 【5 mM Tris-Cl,pH7.5】 稍稍混合一下 , 4 離心 14,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 1 分鐘 , 將離心下的液體再加回 small spin column 中 , 4 離心 14,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 1 分鐘。利用分光光譜儀於 260 nm / 280 nm 測量其吸光值以便定量。每個 1.5 ml 微量離心管分裝 1 μ g 抽好的 Poly (A) mRNA , 再加入 500 μ l 100 % 酒精於 poly (A) mRNA 中 , 將其保存於- 20 。

四、北方墨點法 (Northern blotting)

北方墨點法是一種偵測 mRNA 表現程度的方法。製備 1 % 膠,取 3.3 g agarose 加入 242 ml ddH₂O, 置於微波爐中加熱至沸騰(約 3 分鐘),再微波一次至沸騰(約 20-30 秒),隨及加入 35 ml 10X MOPS buffer【0.2M MOPS, 0.05 M sodium acetate, 0.013 M EDTA, pH 7.0】,待溫度冷卻至手可以碰觸之溫度後再加入 55 ml 37 % formaldehyde, 混合均勻後倒入已調好水平之製膠槽內, 清除液面氣泡待其凝固即可使用。將 RNA 樣品置於 4 離心 12,000 rpm (HERMLE z323kCentrifuge) 20 分鐘, 倒掉上清液後於室溫下風乾, 加入 20 μ l solution B【50 % formamide, 16.7 % 的 37 % formaldehyde, 10 % 10X MOPS buffer, 0.1 % EtBr (10 mg/ml)】, 混合均勻, 置於 75 作用 15 分鐘, 立即放置冰上冷卻, 稍稍離心後再加入 4 μ l loading buffer【0.25 % bromophenol blue, 0.25 % xylene cyanol, 30 % glycerol】混合均勻即可進行電泳。將凝固的膠體置於電泳槽內, 倒入約 1L 1X MOPS 使其剛好蓋住膠, 再將製備好的 RNA 樣品注入齒槽中, 先以 75 伏特電壓跑 30 分鐘, 再改以 25 伏特電壓進行電泳 15-16 小時。在進行轉印之前先將膠浸於 200ml 20X SSC buffer【3M NaCl, 0.65M sodium acetate, pH 7.0】搖晃清洗 20 分鐘, 洗去鹽類。剪一張硝化纖維紙、兩張濾紙, 將其置於 20X SSC buffer 中稍稍浸泡至濕。再將膠

置於由濾紙及 20X SSC buffer 組成之鹽橋上，依序再蓋上硝化纖維紙及濾紙，以玻璃棒趕走各層間的氣泡。最後再放上一疊吸水紙，以重物壓在上面，於室溫下轉印 24 - 48 小時。

將轉印好的硝化纖維紙取出，浸泡於 2X SSC solution 中浸泡片刻，置於紙巾上風乾，再將硝化纖維紙的轉印面朝上置於 UV 燈上照射進行 cross-link (使 RNA 與轉印膜緊密結合) 5-10 分鐘，乾淨的封口袋內放入 10 ml prehybridization solution 【25 % 20X SSPE】與硝化纖維紙，趕出氣泡後將塑膠袋封口，將其置於 42 °C 水浴槽中 1-2 小時，進行 prehybridization。製備 probe，取 2 μl TGF-β1 cDNA (當作 template) 與 31 μl ddH₂O 混合均勻，於 95 °C 加熱 5 分鐘 (進行 denature)，立刻放入冰上冷卻 5 分鐘 (以維持構形)，再加入 5 μl 10X Labeling buffer、6 μl dNTP mixture (含 dATP、dTTP 及 dGTP 各 2 μl)、1 μl DNA polymerase 及 5 μl ³²P (3000 ci/mmol, 50 μCi)，置於 37 °C 水浴 1 小時，加入 200 μl TE buffer，將其通過以 Sephadex G-50 填充形成的 column，再置於 95 °C 加熱 5 分鐘，立刻置於冰上冷卻 5 分鐘，即完成 probe 製備。將製備好的 probe 加入已經完成 prehybridization 的塑膠袋中，趕出氣泡並封口，再置於 42 °C 水浴 16-24 小時，進行 hybridization。

將以完成 hybridization 的硝化纖維紙置於 solution I 【0.05 %

SDS, 2X SSC】中清洗 3-4 次，每次約 5 分鐘，再將其置於 solution II 【0.1 % SDS, 0.1X SSC】清洗 1-2 次，每次 3-5 分鐘（蓋格計數器檢測，直到游離之放射線同位素清洗乾淨為止）。將硝化纖維紙固定於感光夾中，置入 X-光底片，將感光夾放在- 80 冰箱內，壓片時間長短由放射線強弱決定，壓片結束後沖洗 X-光底片即可。

五、ELISA 測定

將細胞分盤至 12 well plate 上，每個 well 種入細胞 $9 \times 10^4 / 2$ ml，培養一天，加藥處理 DMSO、 $10 \mu\text{M}$ B[a]P、 $200 \mu\text{g/ml}$ COF 或 100 nM TPA 各 0.5 ml（溶於 serum free 細胞培養液），置於培養箱培養 24 或 48 小時。收集細胞培養液（約 0.5 ml），放入 1.5 ml 微量離心管，加入 1N HCl 0.1 ml，混合均勻，於室溫靜置 10 分鐘後，再加入 1.2N NaOH/ 0.5 M HEPES 0.1 ml 混合均勻【這一些步驟是為了將 latent form TGF β_1 轉變為 active form】，完成樣品製備。取樣品 $100 \mu\text{l/well}$ 放入已預先 coating anti-TGF β_1 antibody 的 96 孔盤中，在室溫下培養 2 小時，利用微孔盤清洗機（NICHIMATE Washer）以洗液【0.05 % Tween 20 in PBS, pH 7.4】洗 2 次，再加入 detection antibody 300ng/ml $100 \mu\text{l}$ 培養 2 小時，用微孔盤清洗機（NICHIMATE Washer）以洗液洗 2 次，加入 Streptavidin-HRP $100 \mu\text{l/well}$ ，於室溫靜置 20 分

鐘，以洗液洗 2 次，加入 tetramethylbenzidine (TMB) 100 μ l/well 於室溫下反應 20 分鐘 (需避光)，樣品顏色會轉變為水藍色，加入 stop solution 【2N H₂SO₄】 50 μ l/well，樣品顏色會變為黃色，以微孔盤讀值機 (BIO-RAD model 550 microplate reader) 在波長 450 nm 下測吸光值。

六、DCF fluorescence 測定

利用 DCFdA fluorescence 測量細胞內 oxidative stress 之程度。細胞分盤後，以 0.7×10^6 個細胞/6 cm 培養皿之細胞密度置於培養箱中培養一天。將培養皿中舊的細胞培養液吸出，分別加入 200 μ g/ml COF、10 μ M B[a]P、100 nM TPA 或 2 mM TBH，放入培養箱中培養 15 min。(以下步驟需避光) 移除培養液，再分別加入 5 ml 含 50 μ M DCFdA 之培養液，放入培養箱中繼續培養 15 min。移除培養液後，以 1 ml PBS 洗 2 次後，加入 1 ml PBS 以刮杓將細胞刮下，收集細胞液於 15 ml 離心管中，以 800 rpm 離心 5 min (KUBOTA 2010 Centrifuge) 將離心後上清液去除，加入 1 ml PBS 和離心後的細胞沉澱物混合均勻，以 flow-cytometer (FACSCalibur™ system) 測量單位細胞內 DCFdA fluorescence 之螢光強度。

七、Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 酵素活性測定

(Kiyohara et .al., 1996)

此方法是測試細胞內 CYP1A1 的酵素活性。將細胞培養於 10 公分的培養皿，待生長至七、八分滿時，加藥處理不同時間後，移除培養液，以 PBS 洗兩次，並加入 1 ml PBS，用刮勺刮下細胞並置入 1.5 ml 微量離心管，4 離心 7,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 5 分鐘，將離心下的細胞加入 0.5 ml 細胞緩衝溶液【100 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$ 】再利用超音波 (SONICS & MATERIALS INC. VCX 600, 購自 DANBURY, CT. U.S.A) 將細胞均質化，4 離心 12,500 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 30 分鐘後取上層液，以 Bio-Rad protein assay 定量蛋白量濃度，取細胞蛋白萃取液 100 μg 及 1 ml 之緩衝液【0.1 ml 1M HEPES, 10 μl 40 mM NADPH, 1 μl 1 M $MgCl_2$ 】，震盪混和後，靜置 2 分鐘，再加入 20 μl 1 mM B[a]P 於 37 水浴 10 分鐘，以 1 ml 冷的丙酮中止反應，並用 3.25 ml 正己醚萃取 (震盪混和並靜置 5 分鐘)，取上層液 2 ml 加入含 2 ml 1N NaOH 的玻璃試管中，連續震盪 15 秒後，離心於室溫下 900 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 5 分鐘，去除上層液，以螢光分光光譜儀 (HITACHI F-4500) 於 excitation = 396nm, 與 emission = 522nm 時測其吸光值，並與已知濃度的 3-OH B[a]P 來比較，得知 cytochrome P450 1A1 的酵素活性，其

酵素活性單位為 3-OH B[a]P 形成量 pmol/min/mg protein。

公式：

$eq = \text{標準品吸光值} / \text{標準品濃度 (ng/ml)}$

$F_u = \text{樣品吸光值} - \text{標準品吸光值}$

$\text{CYPIA1 酵素活性} = F_u / eq \times 2\text{ml} \times 2 \times (100/80) \times 1/268.3 \times 1000 \times 1/\text{mg protein}$

八、統計分析

本實驗結果皆經由三次以上個別的實驗得到平均值及標準差，而量化的結果經由 *Student's t test* 加以分析，並檢測其差異性。*Student's t test* 主要是在分析兩組間的差異性，P 值小於 0.05 代表具有統計上的意義。

第三章、實驗結果與討論

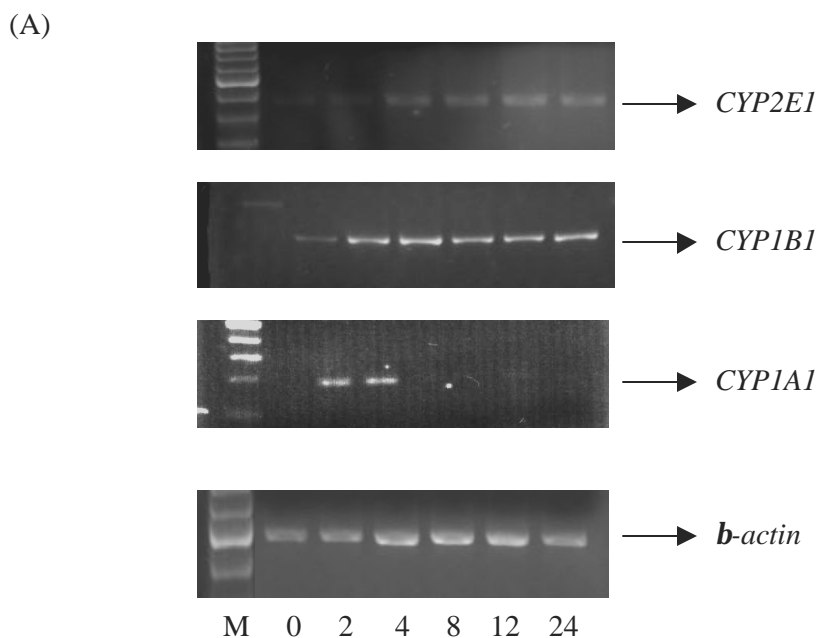
第一節 COF 在 CL3 細胞株中對 *CYP2E1*、*CYP1B1* 和 *CYP1A1* 基因之影響

將人類肺腺癌 CL3 細胞處理食用油煙霧 (COF) 24 小時後，檢測 *cytochrome P4502E1*、*1B1* 和 *1A1* 等基因表現之影響。我們先將 CL3 細胞株分盤至 10 公分培養皿中，待細胞生長至約 8 分滿時，再加入 200 μ g/ml 食用油煙霧繼續培養 2、4、8、12、24 小時後，停止培養並抽取 RNA。利用 RT-PCR 方法測定細胞 *CYP2E1*、*CYP1B1* 和 *CYP1A1* 的基因表現。

CL3 細胞處理 COF 12 小時後 *CYP2E1* 基因表現增加至原來的 2 倍；*CYP1B1* 基因表現在處理 COF 2 小時後基因表現增加為原本的 2.5 倍；*CYP1A1* 基因表現在處理 COF 4 小時後基因表現增加為原本的 4 倍。處理 COF 24 小時後 *CYP2E1*、*CYP1B1* 及 *CYP1A1* 基因表現程度分別為原來的 2.0，1.5 及 0.6 倍 (圖一)。

PAHs 類化合物活化 AhR 誘導 *CYP1A1*、*CYP1B1* 基因表現 (Shimada, 1996)。本實驗的結果發現，CL3 細胞處理 COF 後，隨著處理時間增加 *CYP1A1*、*CYP1B1* 基因表現也增加 (在 4 小時內)，可能是因為 COF 中含有 PAHs 之緣故，但是 24 小時後基因表現下降，可能是因為 COF 中含有未知之成份而抑制 PAHs 誘導 *CYP1A1*、

CYP1B1 基因表現之作用。*CYP2E1* 亦屬於 cytochrome P450 家族，它會參與一些低分子量化合物，如乙醇、酮類、亞硝基胺、氯化乙烯等的第一階段氧化反應，產生具有致癌性代謝物(Yang et al., 1992; Koop, 1992)，亞硝基胺在環境中最常見，除了可在香煙中發現外，鹹魚、發酵食品及醃漬食物中也含有該成份 (Guengerich et al., 1991)。CYP2E1 會將乙醇氧化成為乙醛 (Bell et al.,1997)。動物實驗中發現，若以乙醇誘導 CYP2E1 表現，再暴露於 N-nitrosodimethylamine 中，會有較高的肝癌發生機率(Tsutsumi et al.,1993)。將 Dichloroacetic acid 打入老鼠體內培養 24 小時後，Dichloroacetic acid 經由 CYP2E1 代謝活化後造成肝損傷 (Yang et al., 1996)。我們推論食用油煙霧的成分中應含有誘導 CYP2E1 基因表現的物質，一旦 CYP2E1 酵素活性增加後，可能會增強個體對 nitrosamines 等致癌物之敏感性。



(B)

gene	0	2	4	8	12	24	(hr)
<i>CYP2E1</i>	1.0	1.0	1.6	1.6	2.2	2.0	
<i>CYP1B1</i>	1.0	2.4	2.2	2.1	1.5	1.5	
<i>CYP1A1</i>	1.0	3.8	4.0	1.2	0.5	0.6	

圖一 COF 對 CL3 細胞 *CYP2E1*, *CYP1B1*, *CYP1A1* 基因表現的影響

細胞處理 200 μ g/ml COF 0, 2, 4, 8, 12, 24 小時。抽出 RNA 經反轉錄成 cDNA, 再利用 PCR 放大基因, 2 % 洋菜膠電泳分離後經 ethidium bromide 染色, 再利用 AlphaImager 2000 影像分析儀依染色強度定量。(A) PCR 產物跑膠結果(B)利用 AlphaImager 2000 量化後計算的結果。COF 處理後 *CYP2E1* mRNA 基因表現增為 2 倍; *CYP1B1* 和 *CYP1A1* mRNA 基因表現增為 2-4 倍, 但處理 24 小時後基因表現恢復到原先值。

第二節 COF 或 B[a]P 在 CL3 細胞株中對 *TGF 1*、*TGF 2*、*IL-2*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-8*、*IL-13*、*TNF* 和 *IFN* 基因表現的影響

先前的研究指出，暴露 COF 或 B[a]P 均會影響免疫功能（王瑾等人, 1992; Abdel-Razzak et al.,1994），或許也會影響發炎反應，因此本實驗探討 COF 和 B[a]P 對細胞激素 *IL-2*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-8*、*IL-13*、*TNF*、*IFN*、*TGF 1* 及 *TGF 2* 基因表現之影響。實驗方法和圖一相似，先將 CL3 細胞株分盤至 10 公分培養皿中，待細胞生長至約 8 分滿時，再加入 200 μ g/ml COF 或 10 μ M B[a]P 培養 24 小時後將細胞收下，抽取 RNA。利用 RT-PCR 方法，測定細胞 *IL-2*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-8*、*IL-13*、*TNF*、*IFN*、*TGF 1* 及 *TGF 2* 的基因表現。

CL3 細胞處理 200 μ g/ml COF 或 10 μ M B[a]P 24 小時後，皆會增加 CL3 細胞 *TGF 1* 基因表現（圖二-1）：COF 使 *TGF 1* 基因表現增加約 4.5 倍，而 B[a]P 使 *TGF 1* 基因表現增加約 4 倍（和處理 DMSO 組比較），但是比較其他的細胞激素 *IL-2*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-8*、*IL-13*、*TNF*、*IFN* 和 *TGF 2*，處理 COF 或 B[a]P 24 小時對其基因表現與處理 DMSO 組比較並無明顯的差異（圖二-1）。接著我們以 1、10 μ M B[a]P 處理 CL3 細胞 24 小時後，發現 B[a]P 誘導 *TGF 1* 基因表現之程度呈劑量反應關係，而且我們以 Northern blot 方法再次

證實 B[a]P 的確能增加 *TGF-1* mRNA 量 (圖二-2)

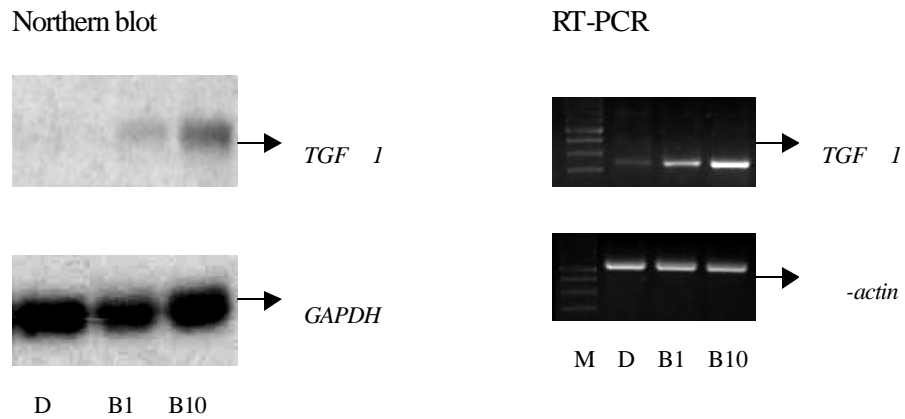
本實驗結果顯示，處理 COF 或 B[a]P 皆會增加 *TGF-1* 基因表現，但是 cytokine 的基因表現不受 COF 或 B[a]P 的影響。Zhang 等人 (1997) 指出，JEG-3 細胞處理 10 μ M B[a]P 24 小時之後，*TGF-1* 基因表現增加，且呈現時間反應關係，隨著處理 B[a]P 的時間增加，基因表現也會增加。前人實驗證實 COF 中含有 0.305 μ g/g B[a]P (Li et al., 1994)，因此 200 μ g/ml COF 中含有 6.1×10^{-5} μ g/ml B[a]P，相當於 0.024 μ M B[a]P，與本人實驗中所用的濃度 (10 μ M) 的濃度相差甚多，所以 COF 中可能不只因為 B[a]P，應還有其他的 PAHs 或未知成份促使 *TGF-1* 基因表現增加。

Thomas 等人 (1998) 證實空氣懸浮微粒會增加老鼠肺部 cytokine-induced neutrophil 所引起的發炎反應，刺激正常肺細胞株製造 *IL-6*、*IL-8*，增加 *IL-8* mRNA 的量。Shinji 等人 (2000) 證實柴油燃燒廢氣 (DE) 會誘導人類正常肺細胞株 BET 細胞 *IL-8*、*TGF-1* mRNA 表現增加，但本實驗中 CL3 細胞未處理 COF 之前即有 *IL-6*、*IL-8* 基因表現，而 COF 無法增加其基因表現程度，可能是因為我們選用的細胞株 CL3，是一種癌化的肺細胞株，本身 *IL-6*、*IL-8* 基因表現已經被誘導，而無法進一步再增加，因此我們必須以正常肺細胞株確認 COF 的確不會誘導 *IL-6*、*IL-8* 基因表現。

M: maker D: DMSO C: 200 μ g/ml COF B: 10 μ M B[a]P

圖二-1、處理 COF 或 B[a]P 對 CL3 細胞 *TGF-1*、*TGF-2*、*IL-2*、*IL-4*、*IL-6*、*IL-8*、*IL-13*、*TNF* 及 *IFN* 基因表現的影響

細胞處理 200 μ g/ml COF 或 10 μ M B[a]P 培養 24 小時。抽出 RNA 經反轉錄成 cDNA，再利用 PCR 放大基因，2 % 洋菜膠電泳分離經 ethidium bromide 染色後，再利用 AlphaImager 2000 影像分析儀依染色強度定量。(A)處理 COF (B)處理 B[a]P。處理 COF 或 B[a]P 24 小時後，皆會誘導 CL3 細胞 *TGF-1* 基因表現增加，COF 使細胞 *TGF-1* 基因表現增加約 4.5 倍；B[a]P 使細胞 *TGF-1* 基因表現增加約 4 倍（三次實驗結果之平均）。

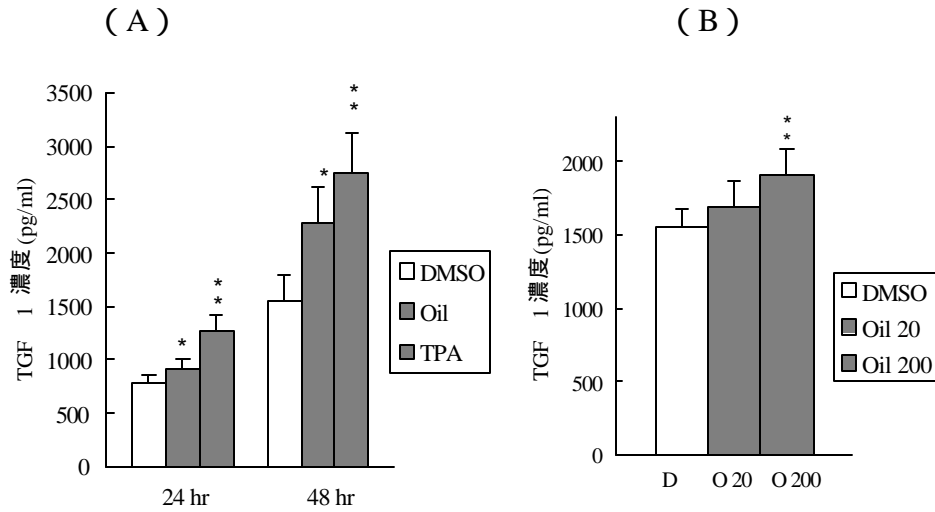


圖二-2、細胞經 $10\ \mu\text{M}$ B[a]P 處理 24 小時後，以 Northern blot 及 RT-PCR 方法檢測 B[a]P 對基因表現的影響（呈劑量反應關係），M 代表 marker, D 代表 DMSO, B1 代表 $1\ \mu\text{M}$ B[a]P, B10 代表 $10\ \mu\text{M}$ B[a]P

第三節 COF 誘導 CL3 細胞株分泌 TGF- β 1

前面實驗結果顯示，COF 及 B[a]P 均會誘導 CL3 細胞中 TGF- β 1 基因表現（圖二），因此本實驗進一步以 ELISA 方法證實，處理 COF 及 B[a]P 是否促進細胞分泌 TGF- β 1。將 CL3 細胞分盤至 12 well plate 中（細胞密度為 9×10^4 /well），培養隔夜後，再加入 200 μ g/ml COF、20 μ g/ml COF 或 10 μ M B[a]P 處理 24 小時或 48 小時，收集細胞培養液，以 ELISA 方法定量 TGF- β 1。

由圖三結果顯示，CL3 細胞處理 200 μ g/ml COF，隨著加藥時間越久細胞分泌的 TGF- β 1 量越多：未加藥細胞之 TGF- β 1 分泌量在 24、48 小時培養後分別為 781.8、1547.8 pg/ml，經 COF 處理 24、48 小時後，細胞分泌 TGF- β 1 量分別增加為 929.8、2282.6 pg/ml（圖三 A）。除了有時間反應關係外，還有劑量反應關係，對照組細胞的 TGF- β 1 分泌量為 1559 pg/ml，處理 20 μ g/ml 或 200 μ g/ml COF 48 小時後，細胞分泌 TGF- β 1 量分別增加為 1688.7 或 1906.2 pg/ml（圖三 B）。因此本實驗結果更進一步證實 COF 的確能增加 TGF- β 1 的分泌。



圖三、COF 促進 CL3 細胞株分泌 TGF-1

細胞處理 20、200 μg/ml COF 或 100nM TPA 培養 24 或 48 小時，以 ELISA 方式測細胞培養液中 TGF-1 濃度。(A) COF 促進 TGF-1 分泌呈時間反應關係 (B) COF 促進 TGF-1 分泌呈劑量反應關係。COF 及 B[a]P 均會增加細胞分泌 TGF-1 (三次實驗結果之平均)，D, O20, O200 分別表示 DMSO, 20 μg/ml COF, 200 μg/ml COF 處理。
 “*” P<0.05, “**” P<0.01

第四節 COF 和 B[a]P 在 CL3 細胞株中誘導氧化緊迫

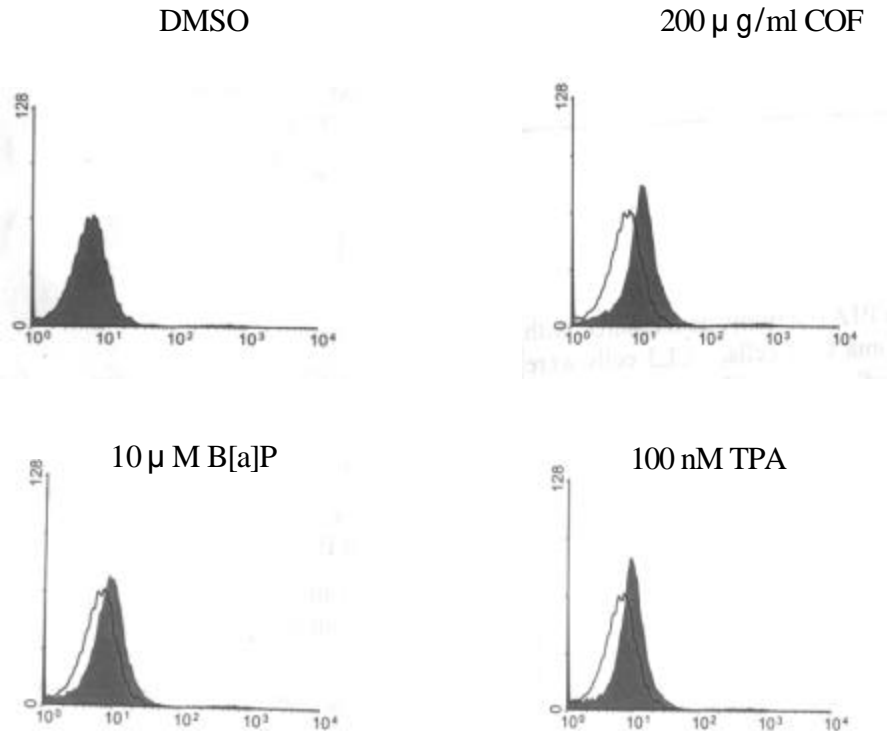
前人研究指出，過氧化物（ROS）尤其是 H_2O_2 會刺激誘發細胞 *TGF-1* 基因表現（Ohba et al., 1994）。食用油煙霧的有毒成份中可分為兩部分：多環芳香烴類化合物與酮類、醛類。其中酮類和醛類物質易造成細胞氧化緊迫的傷害，而 B[a]P 經代謝活化會產生單氧電子氧化 B[a]P，它是一種自由基，可能會導致細胞產生氧化緊迫。因此我們接著探討處理 $200 \mu g/ml$ COF 或 $10 \mu M$ B[a]P（以 $100 nM$ TPA 為陽性對照組）是否會誘導 CL3 細胞氧化性緊迫。將 CL3 細胞分盤至 6 公分培養皿（細胞密度為 $1 \times 10^6/5ml$ ）培養隔夜後，分別加入 COF 或 B[a]P 處理 15 分鐘後，以 DCFdA 螢光法測定細胞內的過氧化物。

由圖四結果顯示，CL3 細胞經 $200 \mu g/ml$ COF 或 $10 \mu M$ B[a]P 處理後皆會導致細胞產生氧化緊迫，與 DMSO 組比較，處理 COF 組的 DCF 螢光值增加 55 %；處理 B[a]P 組的 DCF 螢光值增加 50 %，處理 TPA 組則增加 46 %。因此處理 COF 及 B[a]P 確實會誘導細胞產生氧化緊迫。

Kim 等人（1997）指出，讓大鼠口服 75mg B[a]P 24 小時後，取下肝、腎、肺等組織，利用 HPLC 方式偵測 8-hydroxydeoxyguanosine（8-OHdG）的含量（8-OHdG 為細胞 DNA 遭受氧化傷害之指標），發現 B[a]P 會增加組織中 8-OHdG 的含量，顯示處理 B[a]P 會造成氧

化性傷害。Yan 等人 (2000) 指出, 以 B[a]P 處理人類和老鼠的血管平滑肌細胞, 會增加 cyclooxygenase (COX-2) 基因表現 (COX-2 在前列腺素的合成及發炎反應上扮演重要的角色, 其過程中會產生過氧化物), 進一步檢測細胞內 glutathione 含量 (glutathione 是一種內生性的抗氧化物質) 發現 B[a]P 會使細胞內 glutathione 含量明顯減少, 即表示處理 B[a]P 會使細胞產生氧化緊迫, 消耗體內的抗氧化物質, 如 glutathione。COF 的成份除了 B[a]P 外, 還含有大量的脂肪酸或酮類物質, 如: oleic acid、hexadecanoic acid 等 (見附表一), 脂肪酸和酮類物質易受氧化作用裂解產生自由基 (Cunnane et al.,1994), 所以我們推測這一些成份也是造成 COF 產生氧化緊迫的原因之一。

除了氧化緊迫作用會促使細胞 *TGF 1* 基因表現增加外, 因為 *TGF 1* 基因 promoter 序列上含有 AP-1 responsive element, 或許將來我們也可以朝此方向進一步作研究。



橫軸: DCF 螢光讀值 縱軸: 細胞數

圖四、處理 COF 或 B[a]P 誘導 CL3 細胞氧化緊迫

細胞處理 200 $\mu\text{g/ml}$ COF 或 10 μM B[a]P 15 分鐘，再加入 50 μM DCFdA 15 分鐘後，利用流式細胞儀 (FACSCaliburTM system) 測量單位細胞之 DCF 螢光強度。以 DCF 螢光強度代表細胞的氧化緊迫程度。CL3 細胞處理 200 $\mu\text{g/ml}$ COF 或 10 μM B[a]P 皆會導致細胞氧化緊迫：處理 COF 使 DCF 螢光增加 55 %，處理 B[a]P 使 DCF 螢光增加 50 %，處理 TPA 使 DCF 螢光增加 46 %。

第六節 比較 B[a]P 對人類肺腺癌細胞株 CL3、A549 和

H1355 細胞生長之影響

PAHs 類化合物是煙霧懸浮微粒中的主要污染物，特別是 B[a]P。由前人的研究及本實驗室先前研究結果中均發現，B[a]P 能增加細胞的 *CYP1A1* 基因表現及 *CYP1A1* 酵素活性，而 *CYP1A1* 可將 B[a]P 轉變為各種代謝物。因此本實驗利用三株肺腺癌細胞株 CL3、A549 和 H1355，探討 B[a]P 誘導 *TGF-1* 及 *CYP1A1* 基因表現間是否具有相關性。首先比較 CL3、A549 和 H1355 細胞對 B[a]P 敏感性的差異。將 CL3、A549 和 H1355 細胞，分別以細胞密度 2.5×10^4 、 1.5×10^4 、 4.0×10^4 個細胞種入 6-well plate 中，培養 24 小時後，再加入 DMSO 或 $10 \mu\text{M}$ B[a]P，每隔兩天更換一次培養液再重新加入新的 B[a]P，加藥持續培養 4 天後，收下細胞以 trypan blue 染色法測定存活細胞數目。

由圖六的 CL3 細胞生長情形來看，處理 B[a]P 4 天後存活的細胞數減少為對照組的 30.8 %；處理 B[a]P 4 天，H1355 細胞株存活的細胞數減少為對照組的 9.1 %；但是對 A549 細胞株而言，處理 B[a]P 組與對照組的存活細胞數比較並無明顯差異。由上述結果可知處理 B[a]P 會抑制 CL3 和 H1355 細胞細胞生長，但是 B[a]P 不會影響 A549 細胞生長。

Cell type	Treatment		% of control
	DMSO ($\times 10^5$)	B[a]P ($\times 10^5$)	
CL3	3.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	30.8
A549	4.3 \pm 0.2	4.4 \pm 0.1	100
H1355	23.8 \pm 0.5	2.2 \pm 0.1	9.1

圖六 B[a]P 對人類肺腺癌細胞株 CL3、A549 和 H1355 細胞生長之影響

將(0.25-0.4) $\times 10^5$ 細胞種入 6well-plate 裏培養 24 小時後，加入 10 μ M B[a]P 連續培養 4 天，每隔兩天換一次培養液再重新加入 B[a]P，收下細胞後以 trypan blue 染色法測定存活細胞數目。B[a]P 會使 CL3、H1355 細胞生長受抑制，但 A549 細胞生長速率並未受影響。

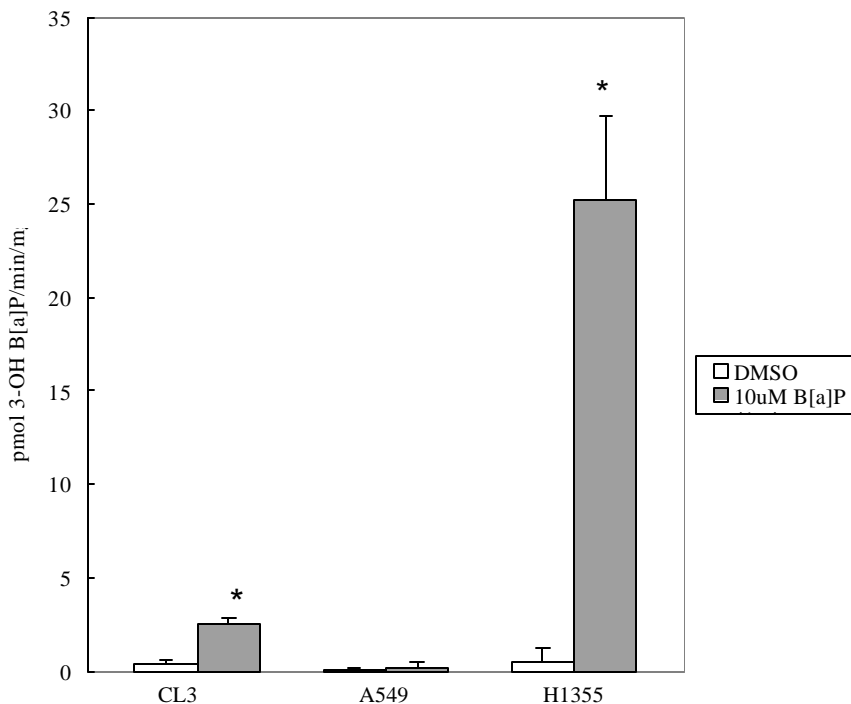
第七節 比較 B[a]P 在人類肺腺癌細胞株 CL3、A549 和 H1355 細胞中誘導 CYP1A1 的能力

由圖六得知，B[a]P 對三種肺腺癌細胞株的細胞生長影響不同，已知 *CYP1A1* 參與 B[a]P 的代謝活化路徑，將 B[a]P 轉變為具有攻擊 DNA 能力之代謝物，而且 *CYP1A1* 被 B[a]P 誘導之程度與 B[a]P 造成 DNA 損傷、抑制細胞生長之作用有關。因此我們比較 B[a]P 在這三株細胞株中誘導 *CYP1A1* 酵素活性之能力。將三株細胞處理 10 μ M B[a]P 24 小時後，以 AHH 方法測量 *CYP1A1* 酵素活性。

如圖七所示，B[a]P 誘導 CL3、A549、H1355 細胞株之 *CYP1A1* 酵素活性分別為對照組的 7.4、2.5、56.3 倍。B[a]P 對三種細胞株誘導 *CYP1A1* 的能力不同，以 H1355 細胞株的 *CYP1A1* 酵素活性被誘導之程度最高。

將圖七結果與圖六結果比較後發現，B[a]P 抑制細胞生長之作用與其誘導 *CYP1A1* 酵素活性之能力成正相關，例如 H1355 細胞中 *CYP1A1* 酵素活性被 B[a]P 誘導的程度最高，同時細胞生長被 B[a]P 抑制的程度也最大。B[a]P 經 *CYP1A1* 代謝活化後之代謝物會與細胞 DNA 形成鍵結物，如 Benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) 等，造成 DNA 損傷使細胞週期無法繼續，而使細胞生長速率減慢，已知 *CYP1A1* 參與 B[a]P 的代謝活化，所以 *CYP1A1* 酵素活性越高代

表 B[a]P 代謝之 DNA 鍵結物越多。本實驗中所使用的三種細胞株之 *CYP1A1* 被 B[a]P 誘導之程度依序為 H1355>CL3>A549, 相同地 B[a]P 抑制細胞生長的順序為 H1355>CL3>A549, 因此在肺癌細胞株中, *CYP1A1* 活性被誘導之程度會影響 B[a]P 抑制細胞生長之作用。

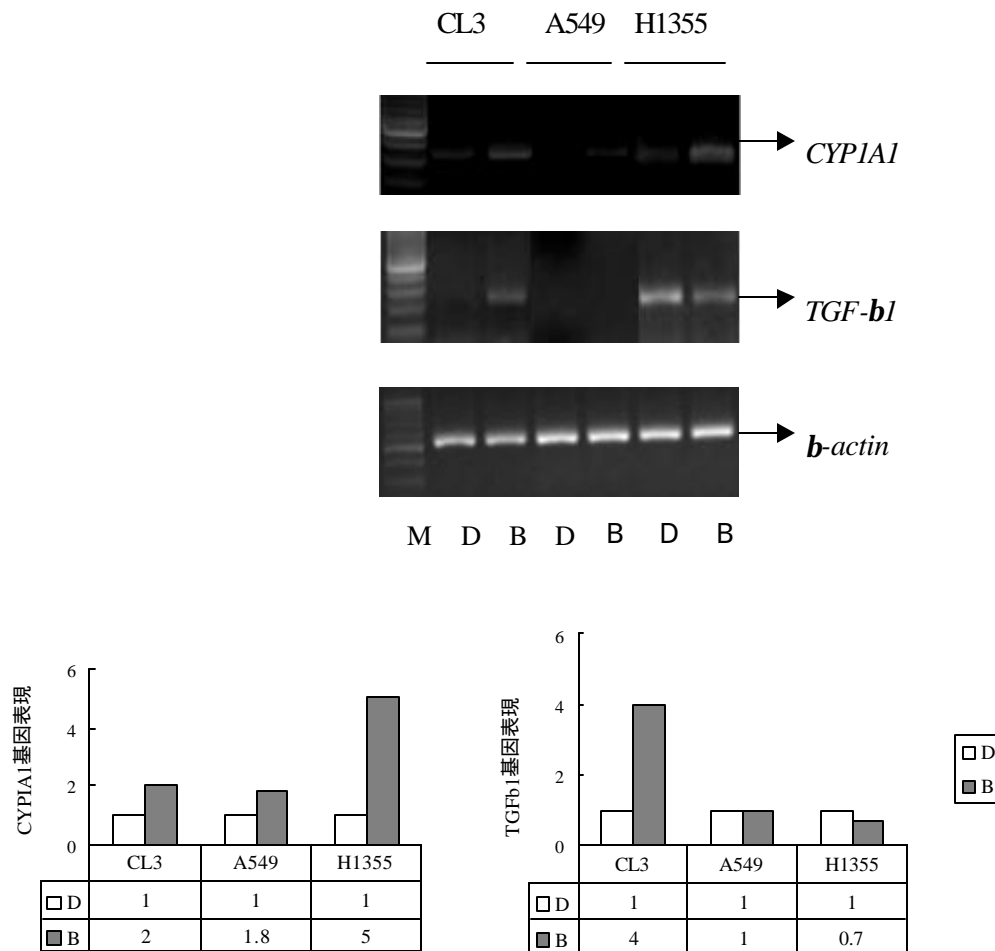


圖七 B[a]P 在 CL3、A549 和 H1355 細胞株中誘導 CYP1A1 酵素活性能力之比較

將三株細胞分別處理 10 μM B[a]P 培養 24 小時後，以 AHH 方式測定 CYP1A1 酵素活性。B[a]P 誘導 H1355 細胞株之 CYP1A1 酵素活性高達 56.3 倍（和 DMSO 比較），而 B[a]P 誘導 CL3 細胞株之 CYP1A1 酵素活性的能力為 7.4 倍，A549 細胞被誘導的能力為 2.5 倍。B[a]P 誘導 CYP1A1 酵素活性的能力因細胞不同而不同，對 H1355 的誘導能力最高，“*” P<0.01。

第八節 比較 B[a]P 對肺腺癌細胞株 CL3、A549 和 H1355 之 *CYP1A1* 和 *TGF 1* 基因表現的影響

已知 B[a]P 經由活化 AhR，增加 *CYP1A1* 基因表現，而增加 *CYP1A1* 酵素活性。本實驗比較 B[a]P 增加 *CYP1A1*、*TGF 1* 基因表現之作用是否具有相關性。CL3 細胞經 10 μ M B[a]P 處理 24 小時後，*CYP1A1* 基因表現增為 2 倍（與 DMSO 組相比），*TGF 1* 基因表現增為 4 倍（圖八）。在 A549 細胞中 *CYP1A1* 基因表現略增為 1.8 倍，*TGF 1* 基因表現並沒有被誘導（圖八）。H1355 細胞處理 B[a]P 後 *CYP1A1* 基因表現增為 5 倍，但是 *TGF 1* 基因表現並沒有被誘導，H1355 細胞未經 B[a]P 處理前即有 *TGF 1* 基因表現。因此我們推論 B[a]P 經由不同機轉誘導 *TGF 1* 與 *CYP1A1* 基因表現，B[a]P 誘導 *CYP1A1* 基因表現是經由活化 AhR，與 xenobiotic responsive element (XRE) 作用所致，但 *TGF 1* promoter 上無 XRE 序列，所以 *TGF 1* 基因表現應不會經由 AhR 直接調控。已知 *CYP1A1* 會將 B[a]P 代謝成 (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene、anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene 等代謝物，*CYP1A1* 表現愈高，則產生的代謝物越多，由本實驗結果我們推測經 *CYP1A1* 代謝所產生的 B[a]P 代謝物不會誘導 *TGF 1* 表現。



M: marker D: DMSO B: 10 μM B[a]P

圖八、處理 B[a]P 對肺腺癌細胞株 CL3、A549 和 H1355 之 *CYP1A1* 和 *TGF-β1* 基因表現的影響

CL3、A549 和 H1355 細胞長至八分滿時分別加入 DMSO、B[a]P 10 μM 培養 24 小時後，抽出 RNA 經反轉錄成 cDNA，再利用 PCR 放大基因，2% 洋菜膠電泳分離經 ethidium bromide 染色後，再利用 AlphaImager 2000 影像分析儀依染色強度定量（三次實驗結果之平均）。

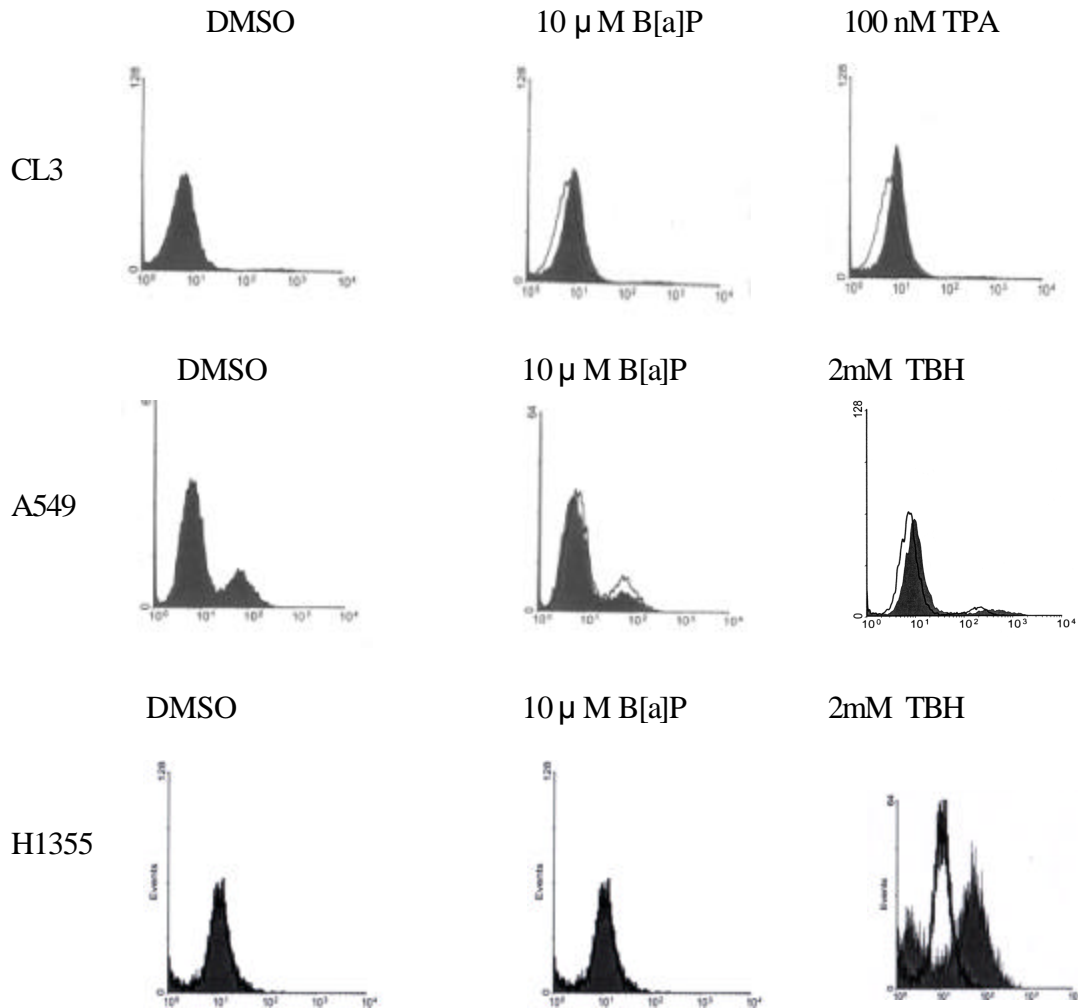
第九節 比較 B[a]P 在 CL3、A549 和 H1355 細胞株中誘導氧化緊迫之情形

由圖四及圖八結果顯示，B[a]P 會誘導 *CYP1A1*、*TGF-1* 基因表現，也會使細胞產生氧化緊迫。接著我們比較，B[a]P 在 CL3、A549 和 H1355 細胞株中誘導氧化緊迫之情形，是否與 *TGF-1* 基因表現及 *CYP1A1* 酵素活性有關。將 CL3、A549 和 H1355 細胞分盤至 6 公分培養皿，細胞密度為 $1 \times 10^6/5\text{ml}$ 培養隔夜後，分別加入 COF 或 B[a]P 處理 15 分鐘後，以 DCF 螢光法偵測細胞內過氧化物。由圖九顯示，CL3 細胞處理 B[a]P 後會產生氧化緊迫，DCF 螢光強度增加 50 %。但是，A549 和 H1355 細胞經 B[a]P 處理後的 DCF 螢光強度和 DMSO 組比較，皆沒有增加的情形。此結果和先前的 *TGF-1* 基因表現（圖八）及 *CYP1A1* 酵素活性（圖七）結果相比較，似乎可以說明，處理 B[a]P 誘導 *TGF-1* 基因表現增加和產生氧化緊迫有相關，但是和 *CYP1A1* 酵素活性可能沒有相關性。

前人研究報導指出，PAHs 經 epoxide hydrolase 和 dihydrodiol dehydrogenase 作用後產生的 PAHs 代謝物，易進行氧化還原作用生成自由基，造成細胞氧化緊迫（Smithgall et al., 1986, 1988），以 B[a]P 為例，B[a]P 經代謝後會產生單電子氧化 B[a]P，我們推測 CL3 細胞內 dihydrodiol dehydrogenase 酵素活性較其他兩株細胞高，較易將

B[a]P 氧化成自由基 (Cavalieri and Rogan, 1992), 但我們必須再進一步作實驗證實。另外我們在本實驗中也可以發現 B[a]P 產生氧化緊迫似乎與 *CYP1A1* 無關。氧化緊迫與 *TGF- β 1* 之相關性, 根據前人的研究結果得知, 以 γ -ray 照射使細胞產生氧化緊迫, 結果發現 *TGF- β 1* transcripts, AP-1 transcription factor (Fos/Jun) 蛋白量表現均會增加, 因此 γ -ray 可能是經由增加 Fos/Jun 的表現而使 *TGF- β 1* 表現增加, 但是 B[a]P 誘導的氧化緊迫與 *TGF- β 1* 分泌之相關性, 我們必須再進一步證實。

在本實驗中 CL3 細胞株的陽性對照組為 TPA, A549 和 H1355 細胞的陽性對照組為 TBH。A549 和 H1355 細胞處理 TPA 後 DCF 螢光強度沒有增加, 所以我們推測 B[a]P 誘導 CL3 細胞株產生氧化緊迫的路徑應與 TPA 相同。Jang 等人 (1998), 對老鼠處理 TPA 發現會產生較多的 H_2O_2 、glutathione 和 SOD 含量減少、glutathione reductase 酵素活性增加, 處理 resveratrol 後則可以減少因 TPA 引起的氧化緊迫, 將來我們也可以嘗試以此抗氧化劑來作實驗, 進一步探討 B[a]P 誘導 CL3 細胞株產生氧化緊迫的路徑是否與 TPA 相同。



橫軸: DCF fluorescence 讀值 縱軸: 細胞數

圖九、比較處理 B[a]P 對 CL3、A549 和 H1355 細胞產生氧化緊迫的影響

實驗步驟如實驗三。以 DCF fluorescence 代表細胞的氧化緊迫。CL3 細胞 10 μM B[a]P 會導致細胞氧化緊迫，DCF fluorescence 增加 50% (TPA 代表陽性對照組，增加 47%)。但是 A549 和 H1355 細胞，DCF 螢光並沒有增加的情形 (以 tert-butyl hydroperoxide 為陽性對照組，在這兩株細胞裏分別增加 67% 及 350%)。

第十節 總結

- (1) 人類肺腺癌細胞株 CL3 處理 200 μ g/ml 食用油煙霧 (COF) 24 小時後, *CYP2E1* 基因表現程度增為 2 倍, *CYP1A1* 與 *CYP1B1* 基因表現程度於 4 小時內短暫增加為對照組的 2 至 4 倍。
- (2) 處理 200 μ g/ml COF 或 10 μ M B[a]P 24 小時, 均會增加 *TGF 1* 基因表現, 表現程度分別為對照組的 4.5 或 4 倍, 而且 COF 刺激細胞分泌 *TGF 1* 之作用呈劑量反應及時間反應關係
- (3) 處理 200 μ g/ml COF 或 10 μ M B[a]P 15 分鐘會刺激 CL3 細胞產生氧化緊迫。
- (4) B[a]P 增加 CL3 之 *TGF 1* 基因表現可能與氧化緊迫有關, 但是與 AhR 所調控之路徑可能無關。

參考文獻

- Anscher, M. S., Peters, W. P., Reisenbichler, H., Petros, W. P., and Jirtle, R. L. Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine* 328:1592-8, 1993.
- Assoian, R. K., and Sporn, M. B. Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology* 102:1217-23, 1986.
- Bassols, A., and Massague, J. Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 263:3039-45, 1988.
- Birchenall-Roberts, M. C., Ruscetti, F. W., Kasper, J., Lee, H. D., Friedman, R., Geiser, A., Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Kim, S. J. Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the AP-1 complex. *Molecular & Cellular Biology* 10:4978-83, 1990.
- Bjoreth, A., and Ramdahl, T. In Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbon: emission sources and recent progress in analytical chemistry. *Marcel Dekker, New York* 1-20, 1985.
- Bombick, D. W., Madhukar, B. V., Brewster, D. W., and Matsumura, F. TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) causes increases in protein kinases particularly protein kinase C in the hepatic plasma membrane of the rat and the guinea pig. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 127:296-302, 1985.
- Border, W. A., and Ruoslahti, E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *Journal of Clinical Investigation* 90:1-7, 1992.
- Boulanger, J., Reyes-Moreno, C. and Koutsilieris, M. Mediation of glucocorticoid receptor function by the activation of latent transforming growth factor beta 1 in MG-63 human osteosarcoma cells. *International Journal of Cancer*. 61:692-7, 1995.
- Boulanger, J., Reyes-Moreno, C., and Koutsilieris, M. Mediation of glucocorticoid receptor function by the activation of latent transforming growth factor beta 1 in MG-63 human osteosarcoma cells. *International Journal of Cancer* 61:692-7, 1995.

- Broekelmann, T. J., Limper, A. H., Colby, T. V., and McDonald, J. A. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:6642-6, 1991.
- Brown, P. D., Wakefield, L. M., Levinson, A. D., and Sporn, M. B. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 3:35-43, 1990.
- Castilla, A., Prieto, J., and Fausto, N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *New England Journal of Medicine* 324:933-40, 1991.
- Cavalieri, E. L., and Rogan, E. G. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacology & Therapeutics* 55:183-99, 1992.
- Cherpillod, P., and Amstad, P. A. Benzo[a]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes. *Molecular Carcinogenesis* 13:15-20, 1995.
- Chiang, T. A., Wu, P. F., and Ko, Y. C. Prevention of exposure to mutagenic fumes produced by hot cooking oil in Taiwan kitchens. *Environ. Mol. Mutagen* 31 : 92-96,1994.
- Chiang, T. A., Wu, P. F., Wang, L. F., Lee, H., Lee, C. H., and Ko, Y. C. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbon content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Mutation Research* 381:157-61, 1997.
- Coggon, D., Pannett, B., Osmond, C., and Acheson, E. D. A survey of cancer and occupation in young and middle aged men. II. Non-respiratory cancers. *British Journal of Industrial Medicine* 43:381-6, 1986.
- Coggon, D., and Wield, G. Mortality of army cooks. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 19:85-8, 1993
- Cunnane, S. C. Antioxidants, free radicals and PUFA. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 50:363-4, 1994
- Czaja, M. J., Weiner, F. R., Flanders, K. C., Giambrone, M. A., Wind, R., Biempica, L., and Zern, M. A. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *Journal of Cell Biology* 108:2477-82, 1989.
- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y. and Wang X. F. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5545-9, 1995.

- de Larco, J. E., and Todaro, G. J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:4001-5, 1978.
- de Martin, R., Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., Gaugitsch, H., Wrann, M., Schlusener, H, Seifert, J. M., Bodmer, S., Fontana, A. and Hofer, E. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *EMBO Journal* 6:3673-7, 1987.
- Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Goeddel, D. V. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316:701-5, 1985.
- Derynck, R., Lindquist, P. B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J. L., Rhee, L., Mason, A. J., Miller, D. A., and Coffey, R. J. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO Journal* 7:3737-43, 1988.
- Dickson, R. I. Nasopharyngeal carcinoma: an evaluation of 209 patients *Laryngoscope* 91:333-54, 1981.
- Dipple, A., Pigott, M. A., Agarwal, S. K., Yagi, H., Sayer, J. M., and Jerina, D. M. Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature* 327:535-6, 1987.
- Dunn, B. P., and Stich, H. F. 32P-postlabelling analysis of aromatic DNA adducts in human oral mucosal cells. *Carcinogenesis* 7:1115-20, 1986.
- Edwards, D. R., Murphy, G., Reynolds, J. J., Whitham, S. E., Docherty, A. J., Angel, P., and Heath, J. K. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO Journal* 6:1899-904, 1987.
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Whitehouse, L. L. and Livingston, D. M. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74:1009-20, 1993.
- Flanders, K. C., Lippa, C. F., Smith, T. W., Pollen, D. A., and Sporn, M. B. Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1561-9, 1995.
- Folinsbee, L. J. Does nitrogen dioxide exposure increase airways responsiveness? *Toxicology & Industrial Health* 8:273-83, 1992.
- Frolik, C. A., Dart, L. L., Meyers, C. A., Smith, D. M. and Sporn, M. B. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 80:3676-80, 1983.

- Gao, Y. T., Blot, W. J., Zheng, W., Ershow, A. G., Hsu, C. W., Levin, L. I., Zhang, R., and Fraumeni, J. F., Jr., Lung cancer among Chinese women. *International Journal of Cancer* 40:604-9, 1987.
- Geiser, A. G., Kim, S. J., Roberts, A. B. and Sporn, M. B. Characterization of the mouse transforming growth factor-beta 1 promoter and activation by the Ha-ras oncogene. *Molecular & Cellular Biology* 11:84-92, 1991
- Geiser, A. G., Kim, S. J., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. Characterization of the mouse transforming growth factor-beta 1 promoter and activation by the Ha-ras oncogene. *Molecular & Cellular Biology* 11:84-92, 1991.
- Gentry, L. E., Lioubin, M. N., Purchio, A. F., and Marquardt, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Molecular & Cellular Biology* 8:4162-8, 1988.
- Gentry, L. E., Lioubin, M. N., Purchio, A. F., and Marquardt, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Molecular & Cellular Biology* 8:4162-8, 1988.
- Glick, A. B., Flanders, K. C., Danielpour, D., Yuspa, S. H. and Sporn, M. B. Retinoic acid induces transforming growth factor-beta 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regulation* 1:87-97, 1989.
- Hakkola, J., Pasanen, M., Pelkonen, O., Hukkanen, J., Evisalmi, S., Anttila, S., Rane, A., Mantyla, M., Purkunen, R., Saarikoski, S., Tooming, M., and Raunio, H. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18:391-7, 1997.
- Hanks, S. K., Armour, R., Baldwin, J. H., Maldonado, F., Spiess J. and Holley, R. W. Amino acid sequence of the BSC-1 cell growth inhibitor (polyergin) deduced from the nucleotide sequence of the cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:79-82, 1988.
- Hannon, G. J. and Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257-61, 1994.
- Hansson, L. E., Nyren, O., Bergstrom, R., Wolk, A., Lindgren, A., Baron,

- J., and Adami, H. O. Diet and risk of gastric cancer. A population-based case-control study in Sweden. *International Journal of Cancer* 55:181-9, 1993.
- Hargraves, W. A., and Pariza, M. W. Mutagens in cooked foods. *Journal of Environmental Science and Health* 2:1-49, 1984.
- Harris, C. C. Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res. Suppl.* 51:5023-5044s, 1991.
- Hazardous Substances Data Bank, National library of Medicine. National Toxicology Program, Bethesda, MD. December 5.
- Henderson, B. E., and Louie, E. Discussion of risk factors for nasopharyngeal carcinoma. *IARC Scientific Publications* 20: 251-60, 1978.
- Hoffer, A., Chang, C. Y., and Puga, A. Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways. *Toxicology & Applied Pharmacology* 141:238-47, 1996.
- Howe, P. H., Draetta, G. and Leof, E. B. Transforming growth factor beta 1 inhibition of p34cdc2 phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. *Molecular & Cellular Biology* 11:1185-94, 1991.
- Iavarone, A., and Massague, J. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 387:417-22, 1997.
- Ignotz, R. A., and Massague, J., Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action *Cell* 51:189-97, 1987.
- International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. vol 1 to 42, supplement 7, 1987.
- International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: manmade mineral fibers and rad. vol 43 lyon: international agency for research on cancer, 1988.
- Israel, D. I., and Whitlock, J. P., Jr. Regulation of cytochrome P1-450 gene transcription by 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in wild type and variant mouse hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 259:5400-2, 1984.
- Jeffrey, A. M., Jennette, K. W., Blobstein, S. H., Weinstein, I. B., Beland, F. A., Harvey, R. G., Kasal, H., Miura, I., and Nakanishi, K. Letter:

Benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: structure of a benzo[a]pyrenetetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *Journal of the American Chemical Society* 98:5714-5, 1976.

Jeffrey, A. M., Weinstein, I. B., Jennette, K. W., Grzeskowiak, K., Nakanishi, K., Harvey, R. G., Autrup, H., and Harris, C. Structures of benzo(a)pyrene--nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature* 269:348-50, 1977.

Kerr, L. D., Miller, D. B., and Matrisian, L. M. TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61:267-78, 1990.

Kharat, I., and Saatcioglu, F. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *Journal of Biological Chemistry* 271:10533-7, 1996.

Kim S. J., Kehrl, J.H., Burton, J., Tendler, C. L., Jeang K. T., Danielpour, D., Thevenin, C., Kim, K. Y., Sporn, M. B. and Roberts, A. B. Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 172:121-9, 1990.

Kim, S. J., Angel, P., Lafyatis, R., Hattori, K., Kim, K. Y., Sporn, M. B., Karin, M., and Roberts, A. B. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Molecular & Cellular Biology* 10:1492-7, 1990.

Kim, S. J., Jeang K.T., Glick, A. B. Sporn, M.B. and Roberts, A. B., Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *Journal of Biological Chemistry* 264:7041-5, 1989.

Kim, S. J., Kehrl, J. H., Burton, J., Tendler, C. L., Jeang, K. T., Danielpour, D., Thevenin, C., Kim, K. Y., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 172:121-9, 1990.

Kim, S. J., Park, K., Rudkin, B. B., Dey, B. R., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. Nerve growth factor induces transcription of transforming growth factor-beta 1 through a specific promoter element in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 269:3739-44, 1994.

- Knabbe, C., Lippman, M. E., Wakefield, L. M., Flanders, K. C., Kasid, A., Derynck, R. and Dickson, R. B. Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 48:417-28, 1987.
- Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J. M. and Massague, J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* 260:536-9, 1993
- Koli, K. and Keski-Oja, J. Vitamin D3 and calcipotriol enhance the secretion of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in cultured murine keratinocytes. *Growth Factors* 8:153-63, 1993.
- Koli, K., Lohi, J., Hautanen, A., and Keski-Oja, J. Enhancement of vitronectin expression in human HepG2 hepatoma cells by transforming growth factor-beta 1. *European Journal of Biochemistry* 199:337-45, 1991.
- Kune, G. A., Kune, S., and Waston, L. F. Serum level of beta-carotene, vitamin A, and zinc in male lung cancer cases and controls. *Nutr. Cancer* 12:169-76, 1989.
- Kune, G. A., Kune, S., Watson, L. F., Pierce, R., Field, B., Vitetta, L., Merenstein, D., Hayes, A., and Irving, L. Serum levels of beta-carotene, vitamin A, and zinc in male lung cancer cases and controls. *Nutrition & Cancer* 12:169-76, 1989.
- L'opez-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. and Massague, J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *Journal of Cell Biology* 124:557-68, 1994.
- Lafyatis, R., Denhez, F., Williams, T., Sporn, M. and Roberts, A. Sequence specific protein binding to and activation of the TGF-beta 3 promoter through a repeated TCCC motif. *Nucleic Acids Research* 19:6419-25, 1991.
- Lafyatis, R., Lechleider, R., Kim, S. J., Jakowlew, S., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. Structural and functional characterization of the transforming growth factor beta 3 promoter. A cAMP-responsive element regulates basal and induced transcription. *Journal of Biological Chemistry* 265:19128-36, 1990.
- Laiho, M., DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M., and Massague, J. Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62:175-85, 1990.
- Laiho, M., Saksela, O., and Keski-Oja, J. Transforming growth

- factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *Journal of Biological Chemistry* 262:17467-74, 1987.
- Laiho, M., Saksela, O., Andreasen, P. A., and Keski-Oja, J. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. *Journal of Cell Biology* 103:2403-10, 1986.
- Lamarre, J., Vasudevan, J. and Gonias, S. L. Plasmin cleaves betaglycan and releases a 60 kDa transforming growth factor-beta complex from the cell surface. *Biochemical Journal* 302:199-205, 1994.
- Law, C. H., Day, N. E., and Shanmugaratnam K. Incidence rates of specific histological types of lung cancer in Singapore Chinese dialect groups, and their aetiological significance. *International Journal of Cancer* 17:304-9, 1976.
- Lawrence, D. A., Pircher, R., and Jullien, P. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 133:1026-34, 1985.
- Lawrence, D. A., Pircher, R., Kryceve-Martinerie C., and Jullien, P. Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *Journal of Cellular Physiology* 121:184-8, 1984
- Lee, H., Cheng, S. H., and Liu, T. Y. Bacterial mutagenicity, metabolism, and DNA adduct formation by binary mixtures of benzo[a]pyrene and 1-nitropyrene. *Environmental & Molecular Mutagenesis* 24:229-34, 1994.
- Leonarduzzi, G., Parola, M., Muzio, G., Garramone, A., Maggiora, M., Robino, G., Poli, G., Dianzani, M. U., and Canuto, R. A. Hepatocellular metabolism of 4-hydroxy-2,3-nonenal is impaired in conditions of chronic cholestasis. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 214:669-75, 1995.
- Leonarduzzi, G., Scavazza, A., Biasi, F., Chiarpotto, E., Camandola, S., Vogel, S., Dargel, R., and Poli, G. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB Journal* 11:851-7, 1997.
- Li, C. Y., Suardet, L., and Little, J. B. Potential role of WAF1/Cip1/p21 as a mediator of TGF-beta cytoinhibitory effect. *Journal of Biological*

Chemistry 270:4971-4, 1995.

Li, S. G., Pan, D. G., and Wang, G. X. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch. Environ. Health* 49:119-122, 1994.

Lyons, R. M., Gentry, L. E., Purchio, A. F., and Moses, H. L. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *Journal of Cell Biology* 110:1361-7, 1990.

Lyons, R. M., Keski-Oja, J., and Moses, H. L. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *Journal of Cell Biology* 106:1659-65, 1988.

Majesky, M. W., Lindner, V., Twardzik, D. R., Schwartz, S. M., and Reidy, M. A. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *Journal of Clinical Investigation* 88:904-10, 1991.

Mannervik, B., and Danielson, U. H. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 23:283-337, 1988.

Menkes, M. S., Comstock, G. W., Vuilleumier, J. P., Helsing, K. J., Rider, A. A., and Brookmeyer, R. Serum beta-carotene, vitamins A and E, selenium, and the risk of lung cancer. *New England Journal of Medicine* 315:1250-4, 1986.

Miyazono, K., and Heldin, C. H. Role for carbohydrate structures in TGF-beta 1 latency. *Nature* 338:158-60, 1989.

Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., Heldin, C. H. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *Journal of Biological Chemistry* 263:6407-15, 1988.

Moses, H. L. TGF-beta regulation of epithelial cell proliferation. *Molecular Reproduction & Development* 32:179-84, 1992.

Moses, M., and Prioleau, P. G. Cutaneous histologic findings in chemical workers with and without chloracne with past exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of the American Academy of Dermatology* 12:497-506, 1985.

Nabel, E. G., Shum, L., Pompili, V. J., Yang, Z. Y., San, H., Shu, H. B., Liptay, S., Gold, L., Gordon, D., and Derynck, R. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:10759-63, 1993.

Nesnow, S., Ross, J., Nelson, G., Holden, K., Erexson, G., Kligerman, A., and Gupta, R. C. Quantitative and temporal relationships between DNA adduct formation in target and surrogate tissues: implications for biomonitoring. *Environmental Health Perspectives* 101 Suppl. 3:37-42, 1993.

Nguyen, T., Rushmore, T. H., and Pickett, C. B. Transcriptional

- regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Journal of Biological Chemistry* 269:13656-62, 1994.
- Nikol, S., Isner, J. M., Pickering, J. G., Kearney, M., Leclerc, and G., Weir, L. Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *Journal of Clinical Investigation* 90:1582-92, 1992.
- Noma, T., Glick, A. B., Geiser, A. G., O'Reilly, M. A., Miller, J., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. Molecular cloning and structure of the human transforming growth factor-beta 2 gene promoter. *Growth Factors* 4:247-55, 1991.
- Nomura, A. M., Stemmermann, G. N., Heilbrun, L. K., Salkeld, R. M., and Vuilleumier, J. P. Serum vitamin levels and the risk of cancer of specific sites in men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Research* 45:2369-72, 1985.
- Olofsson, A., Miyazono, K., Kanzaki, T., Colosetti, P., Engstrom, U., and Heldin, C. H. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. *Journal of Biological Chemistry* 267:19482-8, 1992.
- Oursler, M. J., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C. Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 133:2187-96, 1993.
- Pastorino, U., Pisani, P., Berrino, F., Andreoli, C., Barbieri, A., Costa, A., Mazzoleni, C., Gramegna, G., and Marubini, E. Vitamin A and female lung cancer: a case-control study on plasma and diet. *Nutrition & Cancer* 10:171-9, 1987.
- Pearson, C. A., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J., and Chiquet-Ehrismann, R. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *EMBO Journal* 7:2977-82, 1988.
- Penttinen, R. P., Kobayashi, S., and Bornstein, P. Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:1105-8, 1988.
- Petry, H. Recognizing different living environments. *Krankenpflege - Soins Infirmiers* 88:24, 1995.
- Phillips, D. H., Hewer, A., Martin, C. N., Garner, R. C., and King, M. M. Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature* 336:790-2, 1988.

- Picon, A., Gold, L. I., Wang, J., Cohen, A., and Friedman, E. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor beta1. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7:497-504, 1998.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M. and Koff, A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Development* 8:9-22, 1994.
- Qu, Y. H., Xu, G. X., Zhou, J. Z., Chen, T. D., Zhu, L. F., Shields, P. G., Wang, H. W., and Gao, Y. T. Genotoxicity of heated cooking oil vapors. *Mutation Research* 298:105-11, 1992.
- Raghow, R., Postlethwaite, A. E., Keski-Oja, J., Moses, H. L., and Kang, A. H. Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation* 79:1285-8, 1987.
- Redmond, D. E., Tobacco and cancer: the first clinical report, 1761. *New England Journal of Medicine* 282: 18-23, 1970.
- Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., and Sporn, M. B. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:5339-43, 1981.
- Roberts, A. B., Lamb, L. C., Newton, D. L., Sporn, M. B., De, Larco, J. E., and Todaro, G. J. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:3494-8, 1980.
- Rylander, R. Environmental exposures with decreased risks for lung cancer? *International Journal of Epidemiology*. 19 Suppl. 1:S67-72, 1990.
- Salonen, J. T., Salonen, R., Lappetelainen, R., Maenpaa, P. H., Alfthan, G., and Puska, P. Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamins A and E: matched case-control analysis of prospective data. *British Medical Journal Clinical Research Ed.* 290:417-20, 1985.
- Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., Roberts, A. B., Sporn, M. B., and Thorgeirsson, S. S. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

92:2572-6, 1995.

- Schoket, B., Horkay, I., Kosa, A., Paldeak, L., Hewer, A., Grover, P. L., and Phillips, D. H. Formation of DNA adducts in the skin of psoriasis patients, in human skin in organ culture, and in mouse skin and lung following topical application of coal-tar and juniper tar. *Journal of Investigative Dermatology* 94:241-6, 1990.
- Scotto, L., Vaduva, P. I., Wager, R. E., and Assoian, R. K. Type beta 1 transforming growth factor gene expression. A corrected mRNA structure reveals a downstream phorbol ester responsive element in human cells. *Journal of Biological Chemistry* 265:2203-8, 1990.
- Selikoff, I. J., Hammond, E. C., and Churg, J. Asbestos exposure, smoking, and neoplasia. *JAMA*. 204:106-12, 1968.
- Shields, P. G., Xu, G. X., Blot, W. J., Fraumeni, J. F., Jr., Trivers, G. E., Pellizzari, E. D., Qu, Y. H., Gao, Y. T., and Harris, C. C. Mutagens from heated Chinese and U.S. cooking oils. *Journal of the National Cancer Institute* 87:836-41, 1995.
- Shimada, T., Yun, C. H., Yamazaki, H., Gautier, J. C., Beaune, P. H., and Guengerich, F. P. Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Molecular Pharmacology* 41:856-64, 1992.
- Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T., and Ito, N. The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Research* 57:195-8, 1997.
- Silberstein, G. B., and Daniel, C. W. Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. *Science* 237:291-3, 1987.
- Silberstein, G. B., Flanders, K. C., Roberts, A. B., and Daniel, C. W. Regulation of mammary morphogenesis: evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor-beta 1. *Developmental Biology (Orlando)* 152 : 354-62 , 1992.
- Simpson, F. G., Belfield, P. W., and Cooke, N. J. Chronic airflow limitation after inhalation of overheated cooking oil fumes. *Postgraduate Medical Journal* 61:1001-2, 1985.
- Solem, M., Rawson, C., Lindburg, K., and Barnes, D. Transforming growth factor beta regulates cystatin C in serum-free mouse embryo (SFME) cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 172:945-51, 1990.
- Suskind, R. R. Chloracne, "the hallmark of dioxin intoxication". *Scandinavian Journal of Work,*

Environment & Health 11(3 Spec No):165-71, 1985.

Swedmark, S., Romert, L., Morgenstern, R., and Jenssen, D. Studies on glutathione transferases belonging to class pi in cell lines with different capacities for conjugating (+)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy -9 alpha, 10 alpha-oxy -7, 8, 9, 10 - tetrahydrobenzo [a] pyrene. *Carcinogenesis* 13:1719-23, 1992.

Taipale, J., Koli, K., and Keski-Oja, J. Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *Journal of Biological Chemistry* 267:25378-84, 1992.

ten Dijke, P., Hansen, P., Iwata, K. K., Pieler, C., and Foulkes, J. G. Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:4715-9, 1988.

Teschke, K., Hertzman, C., Van Netten, C., Lee, E., Morrison, B., Cornista, A., Lau, G., and Hundal, A. Potential exposure of cooks to airborne mutagens and carcinogens. *Environmental Research* 50:296-308, 1989.

Thompson, K. L., Assoian, R., and Rosner, M. R. Transforming growth factor-beta increases transcription of the genes encoding the epidermal growth factor receptor and fibronectin in normal rat kidney fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 263:19519-24, 1988.

Tuchsen, F., and Nordholm L. Respiratory cancer in Danish bakers: a 10 year cohort study. *British Journal of Industrial Medicine* 43:516-21, 1986.

Vanden, Heuvel, J. P., and Lucier, G. Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environmental Health Perspectives* 100:189-200, 1993.

Venier, P., Clonfero, E., Cottica, D., Gava, C., Zordan, M., Pozzoli, L., and Levis, A. G. Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis* 6:749-52, 1985.

Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C., and Sporn, M. B. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *Journal of Biological Chemistry* 263:7646-54, 1988.

Waltenberger, J., Lundin, L., Oberg, K., Wilander, E., Miyazono, K., Heldin, C. H., and Funai, K. Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart

- disease. *American Journal of Pathology* 142:71-8, 1993.
- Waltenberger, J., Miyazono, K., Funahashi, K., Wanders, A., Fellstrom, B., and Heldin, C. H. Transforming growth factor-beta and organ transplantation. *Transplantation Proceedings* 25:2038-40, 1993.
- Waltenberger, J., Wanders, A., Fellstrom, B., Miyazono, K., Heldin, C. H., and Funahashi, K. Induction of transforming growth factor-beta during cardiac allograft rejection. *Journal of Immunology* 151:1147-57, 1993.
- Whitlock, J. P. Jr., Okino, S. T., Dong, L., Ko, H. P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q. and Li, H. Cytochromes P450 :induction of cytochrome P4501A1:a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.* 10:809-818,1996.
- Willet, W. C., Polk, B. F., and Underwood, B. A. Relation of serum vitamin A and E and carotenoids to the risk of cancer. *New England Journal of Medicine* 310 : 430-434,1985.
- Yang H. M., Houser, W. H., and Davis, M. E. Dichloroacetic acid treatment increases hepatic CYP2E1 in male and female rats. *Toxicology & Applied Pharmacology* 141:382-8, 1996.
- Yang, S. P., Luh, K. T., and Kuo, S. H. Chronological observation of epidemiological characteristics of lung cancer in Taiwan with etiologically consideration-A 30-year consecutive study. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 14:7-19,1984.
- Yoo, Y. D., Ueda, H., Park, K., Flanders, K. C., Lee, Y. I., Jay, G., and Kim, S. J. Regulation of transforming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 97:388-95, 1996.
- 王瑾, 胡紹明. 廚房空氣污染物對動物免疫功能的影響. 中國預防醫學雜誌. 26:86,1992.
- 王瑾, 胡紹明. 廚房空氣污染物對肺癌巨噬細胞毒殺效應的影響. 中國公共衛生學報. 11 : 296,1992.
- 朱還奎, 張紹儀, 夏鋼. 吸入食用油煙霧對肺功能的急性影響. 廣州醫學院學報. 20: 82-83, 1994.
- 朱還奎, 張紹儀, 夏鋼. 菜籽油煙霧對肺功能的急性影響. 中華預防醫學雜誌, 27: 125, 1993.
- 陸坤泰與張登斌(1992)台灣的肺癌,台灣醫誌,91 卷附冊 1:s1-s6.