

中山醫學大學毒理學研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Toxicology,
Chung Shan Medical University

指導教授：李 輝 博士 (Huei Lee, Ph. D.)

烹調油煙在台灣女性肺癌之 8-OH-dG 形成與 Cox-2 基
因表現之角色研究

The role of cooking oil fumes in 8-OH-dG formation and
Cox-2 expression in Taiwanese female lung cancer
patients

研究生：吳恆祥 (Heng-Hsiang Wu) 撰

中華民國九十二年七月

(July, 2003)

烹調油煙在台灣女性肺癌之 8-OH-dG 形成與 Cox-2 基因表現
之角色研究

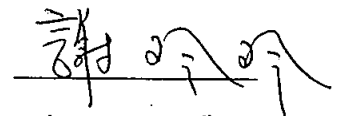
The role of cooking oil fumes in 8-OH-dG formation and Cox-2
Expression in Taiwanese female lung cancer patients

本論文為中山醫學大學授與理學碩士學位必備條件之一，經中山醫學
大學醫學院毒理研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

私立長庚大學公共衛生學科

謝玲玲 博士



鄭雅文 博士

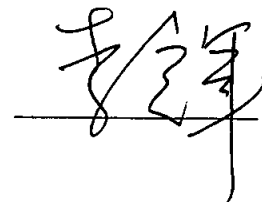
中山醫學大學醫學研究所



中山醫學大學毒理研究所

李輝 博士

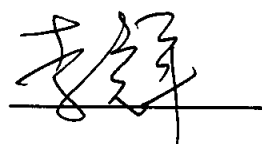
(本論文指導教授)



中華民國九十二年七月八日

學生吳恆祥論文題目為「烹調油煙在台灣女性肺癌患者之 8-OH-dG 形成與 Cox-2 基因表現之角色研究」，其論文已經中山醫學大學醫學院毒理所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李輝博士

簽名：

中華民國九十二年七月

謝 誌

在大家的指導與關愛下，兩年的碩士班生涯終於來到一個段落。回首這段時日，感謝恩師 李 輝教授不論在處世的態度或從事研究時所應有之堅持與思惟上，都讓我深深地感受到研究工作的神聖，此外，完善的環境與材料設施，使我受益良多，進而引領我走進浩瀚的研究領域。撰寫論文期間，恩師不辭辛勞、犧牲假期，對論文的架構及內容悉心斧正，在此致上最高的敬意與謝意。

文稿初成，復蒙長庚大學公衛科謝玲玲教授及本校醫研所鄭雅文助理教授撥冗審閱，對本論文悉心審查、詳加斧正，並提供諸多寶貴之意見，使本論文得以更臻完善，在此致上誠摯的謝意。兩年的研究生活，感謝柯俊良老師、林嬪嬪老師、蔡菁華老師、張耀仁老師、許國堂老師及吳文俊老師在課業及實驗上的指導與協助。同時感謝邊老師在日常生活的關心與問候，一切銘感於心。

感謝台中榮總外科病理科陳榮達主任在研究檢體上的提供，更感謝牟小姐不厭其煩地幫我收集檢體及整理資料，使研究得以順利進行。

特別感謝雅文學姐兩年來在實驗上不遺餘力指導及生活上的照料，同時感謝吉慶學長和淑媛學姊、敏智學長在實驗上的幫忙，以及平時的鼓勵與關照，感謝你們的熱心協助與包容使論文順利完成。另

感謝怡慧學姊、茂文學長、建皇學長、牟小姐及一路走來相互扶持的同窗伙伴文斌、孝誠給我的支援與砥礪，以及肇偉、志欣、威超、松鎔、建勳、盛宏、建志、建良、玉儒、玉純及紅雅的幫忙與鼓勵。

芳君多年來無怨的幫我打理生活中的瑣事，安撫我焦躁不安的心緒，使我能心無旁騖專注於研究工作，不論結果如何，感激之心，仍無法言述。

最後僅以此文獻給一直在背後默默奉獻的家人，父母親辛苦的栽培與弟弟的支持與鼓勵，讓我能安心地完成學業，由衷地感謝您們為我所做的一切。最後，僅以此謝誌感謝一路與我相伴相隨的家人、師長及朋友們。

吳恆祥 謹誌於

中山醫學大學毒理所

中華民國九十二年七月

目 錄

壹、中文摘要	1
貳、文獻綜論	3
一、油煙暴露與女性肺癌	3
1. 台灣女性肺癌之流行病學	4
2. 烹調油煙 (Cooking oil fumes, COF)與女性肺 癌之相關性	6
2.1 COF 生物毒性、基因毒性與致癌性	8
2.1.1 COF 與 DNA 鍵結物	9
2.1.2 COF 與氧化性壓力 (oxidative stress)	11
2.2 COF 成分與女性肺癌的關係	14
二、Cox-2 蛋白的功能及在癌症的相關研究	15
1. Cox-2 表現與肺癌發生之相關性	17
1.1 Cox-2 表現與肺腺癌之相關性	17
1.2 Cox-2 表現與氧化性壓力	18
2. 誘發 Cox-2 表現及 Cox-2 參與腫瘤生成之分子 機轉	20
3. Cox-2 表現與免疫抑制	24

參、研究動機	27
肆、材料與方法	29
一、化學藥品與材料	29
二、肺腫瘤組織切片之來源	31
三、免疫組織化學染色法	32
四、COF 的製備、萃取與純化	33
五、臺灣肺腺癌 CL-3 細胞與非腫瘤氣管上皮細胞 Beas-2B 之培養	34
六、細胞解凍與保存	35
七、MTT 細胞毒性分析	36
八、RNA 的萃取與純化	36
九、反轉錄聚合酶鏈反應	38
十、西方點墨分析法 (Western Blot)	40
十一、凝膠遲滯分析法 (Gel Retardation assay)	43
十二、統計分析	45
伍、結果與討論	46
一、肺腫瘤組織中 Cox-2 蛋白與 8-OH-dG DNA 鍵 結物之表現	46
1. 氧化性壓力生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物	46

與肺腫瘤臨床因子之相關性	
2. Cox-2 蛋白的表現與肺腫瘤臨床因子之相關性	49
3. Cox-2 蛋白的表現與氧化性壓力指標 8-OH-dG DNA 鍵結物之相關性	51
二、COF 誘發 Cox-2 與 IL-6 之表現	54
1. COF 對台灣肺腺癌細胞 CL-3 與非腫瘤氣管上皮細胞 Beas-2B 之毒性分析	55
2. COF 誘發細胞 Cox-2 與 IL-6 mRNA 之表現	56
3. COF 誘發 CL-3 細胞 Cox-2 表現之分子機制	59
3.1 NF- κ B 訊號傳遞路徑	59
3.2 MAPKs 訊號傳遞路徑	61
陸、參考文獻	64
柒、表與圖	80
捌、英文摘要	98

ABBREVIATION

Adenocarcinomas	AD
Anti-7 β ,8 α -dihydroxy- 9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-b enzo[a]pyrene	BPDE
Benzo[a]pyrene	BaP
Cooking oil fumes	COF
Cyclooxygenase-2	Cox-2
Diethyl pyrocarbonate	DEPC
Dimethylsulfoxide	DMSO
DL-dithiothreitol	DTT
Element mobility shift assay	EMSA
Extracellular signal-regulated kinase1/2	ERK1/2
Human 8-oxoguanine DNA glycosidase 1	<i>h</i> OGG1
8-hydroxy-deoxyguanosine	8-OH-dG
Immunohistochemistry	IHC
Inhibitor of NF- κ B	I κ B
Interleukin-6	IL-6
Mitogen-activated protein kinases	MAPKs

Non-small cell lung cancer	NSCLC
Nuclear factor κ B	NF- κ B
Polycyclic aromatic hydrocarbons	PAHs
Prostaglandin H synthase	PGHS
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Squamous cell carcinoma	SQ

壹、中文摘要

自從民國七十一年以來，惡性腫瘤一直高居臺灣地區十大死因之首。女性方面肺癌更是超過子宮頸癌而躍居為癌症死因之冠。已知吸菸為導致肺癌發生最重要的危險因子，且偏好導致鱗狀上皮細胞癌之發生，然而女性肺癌患者絕大多數為不吸菸者 (>90%)，且傾向罹患肺腺癌，因此無法以吸菸行為來解釋台灣女性肺癌患者之成因。流行病學研究顯示烹調油煙暴露與台灣女性肺癌發生有關，但都沒有進一步的毒理學證據，能證實其間之相關性。本研究室最近發現油煙在肺癌細胞 CL-3，所引起之基因毒性主要可能是氧自由基，而非多環芳香煙類化合物。因此本研究將進一步探討女性肺腫瘤組織中 8-OH-dG 之含量是否與 Cox-2 的表現有關？以及以細胞學實驗探討 Cox-2 基因表現是否與油煙暴露有關？以及氧化性壓力是經由何種訊號調控 Cox-2 基因的表現？

本研究先以免疫組織化學染色分析法，分析肺腫瘤組織中氧化性壓力之生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物以及 Cox-2 蛋白的表現是否相關？結果發現僅在女性肺癌患者之 8-OH-dG DNA 鍵結物和 Cox-2 蛋白之表現具有正相關性 ($P = 0.042$)，而在男性吸菸或不吸菸肺癌患者者皆無法觀察到相關性的存在，亦即氧化性壓力對於女性患者肺癌之形成可能較男性肺癌有關。

已知 Cox-2 與 IL-6 參與肺腺癌之形成，因此為探討油煙暴露是否會誘發 Cox-2 與 IL-6 基因的表現，我們以油煙處理人類肺腺癌細胞 CL-3 以及正常呼吸道上皮細胞株 Beas-2B 後，以半定量 RT-PCR 偵測下游 Cox-2 基因、IL-6 基因的表現，結果發現油煙可同時誘發此二株細胞 Cox-2 以及 IL-6 mRNA 的表現且呈劑量與時間效應關係。又以西方點墨法 (Western blot) 分析 Cox-2 之蛋白表現與 mRNA 表現一致。已知 Cox-2 可經由 NF- κ B 以及 MAPKs 訊號傳遞路徑而被轉錄活化，進一步以西方點墨法分析以油煙及 ERK/MEK 之抑制劑 PD98059 或 p38/MAPK 之抑制劑 SB203580 共同處理之 CL-3 細胞中 Cox-2 蛋白之表現，並採凝膠遲滯分析法 (Gel retardation assay; EMSA) 以了解 NF- κ B 與 Cox-2 基因的轉錄啟動區之結合能力是否改變？結果發現油煙確實可經由 NF- κ B 促進 Cox-2 基因的表現，而以 PD98059、SB203580 之抑制劑處理時，同樣會抑制 NF- κ B 調控 Cox-2 基因的轉錄活化。而 Western blot 的數據則顯示，Cox-2 蛋白之表現主要經由 p38/MARK，而非 ERK/MEK 訊號傳遞路徑。

關鍵字：女性肺癌、氧化性壓力、8-OH-dG DNA 鍵結物、Cox-2

貳、文獻綜論

一、油煙暴露與女性肺癌

流行病學調查結果指出，癌症的發生與居住環境、飲食習慣、職業類別、生活習性和文化背景等因子皆有密切的關係。根據行政院衛生署統計資料顯示，自從民國七十一年以來，惡性腫瘤一直高居臺灣地區十大死因之首。在臺灣的所有癌症中，肺癌的死亡率位居男性癌症死因之第二位（僅次於肝癌），女性方面自民國七十五年肺癌更超過子宮頸癌而躍居為癌症死因之首 (Department of Health, ROC)，因此肺癌已經是嚴重威脅我國居民健康的惡性腫瘤之一。在臺灣地區，1982年男、女性肺癌之死亡率，分別為每十萬人口有16.7及7.8人，而依據民國九十二年資料指出，男性肺癌死亡率增為十萬人口有40.28人，女性肺癌死亡率則增加為十萬人口有17.91人 (Department of Health, ROC, 2001)。在歐美地區，肺癌的死亡率亦有顯著增加的趨勢。此外，肺癌的組織形態有數種，大多不易早期發現，且腫瘤進展快速等特性，導致肺癌的治療結果至今不理想，存活率仍相當低。

1. 台灣女性肺癌之流行病學特徵

已知吸菸為導致肺癌發生最重要的危險因子 (Schneiderman *et al.*, 1989; Zaridze *et al.*, 1986)。據統計，台灣地區女性肺癌患者大多數為不吸菸者，其中不到 10 % 為吸菸者，可是肺癌死亡率竟達到每十萬人有十八人，此外男性吸菸人口雖高達 54.75 %，但其肺癌死亡率僅較女性高出一倍左右 (Department of Health, R.O.C., 1996)。從台灣的肺癌患者之抽菸習慣來分析，約有 80 % 之男性肺癌其病因可歸咎於吸菸行為，然而對於女性肺癌則有 90 % 以上之患者，無法以吸菸行為來解釋。再者，亦有流行病學研究指出，在華人女性之癌症死因中，肺癌死亡率高居所有癌症之首，但相對於歐美國家女性，華人女性吸煙率明顯偏低，而肺癌盛行率卻逐年升高 (Deng and Gao, 1985)。且吸菸主要與肺鱗狀上皮細胞癌及小細胞癌的發生有關，而與肺腺癌的發生關係較低 (Lubin and Blot, 1984; Gao *et al.*, 1987; Brownson *et al.*, 1992)。過去的研究發現，中國女性罹患肺腺癌的比率較其他型式的肺癌為高 (Kung *et al.*, 1984; Gao *et al.*, 1987)，本實驗室所分析之台灣女性肺癌患者中亦以罹患肺腺癌居多，且與吸菸之相關性較少。本實驗室先前的研究發現，吸菸與不吸菸的肺癌患者在 DNA 鍵結物含量，並無統計之差異，吸菸量與 DNA 鍵結物含量兩者

間亦無統計之相關性。而不吸菸的女性肺癌肺組織中，DNA 鍵結物含量較不吸菸的男性為高 (Cheng *et al.*, 2001b)。更由公賣局的統計資料指出，近年來台灣地區香菸銷售總額雖逐年增加，但肺癌患者仍以肺腺癌為主，因此單靠吸菸似乎無法解釋為何台灣肺腺癌增加之速度較肺鱗狀上皮細胞癌快。

台灣女性肺癌具有相當獨特的流行病學特徵，包括：(1) 女性肺癌的死亡率國際排名 (第 9/18 位) 高於男性肺癌 (第 17/18 位) (Chen *et al.*, 1990)，(2) 與其他國家或其他地區之華人婦女族群相似，吸菸率雖低 (9.8-56.1%)，但是肺癌死亡率卻較高 (14.4-25.1/100,000) (Ko *et al.*, 1997; Koo and Ho, 1990)，(3) 台灣男、女性吸菸比率差異相當大 (男性: 50-60%，女性: 3-4%)，但兩性間肺癌死亡率之比值卻一直維持於兩倍左右 (Chen *et al.*, 1990)，換言之應有其他因子參與了台灣不抽菸女性肺癌，(4) 台灣女性肺癌病患之吸菸比率 (9-10%) 遠低於美國國家 (70-90%) (Ko *et al.*, 1997; Koo and Ho 1990; Ger *et al.*, 1992)，(5) 台灣女性罹患肺癌的癌症形態，主要為與吸菸有較低相關的肺腺癌 (佔 64.8 – 68.4%)，不同於男性肺癌患者，以鱗狀上皮細胞癌為主 (Wu *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Koo and Ho, 1990)。綜合這些研究結果似乎顯示主動吸菸與女性肺癌的高死亡率較無相關，而暗示可能其他環境因子如廚房油煙、二手菸等環境污染物暴露與女性肺癌

的發生有較密切之相關性，因此找出女性肺癌的致病因子，實為降低台灣女性肺癌之死亡率之當務之急。

2. 烹調油煙 (Cooking oil fumes, COF) 與女性肺癌之相關性研究

近來已有不少研究在探討可能參與不吸菸婦女肺癌發生的環境因素。其中包括：

(1) 不吸菸婦女肺癌之危險因素

以烹調暴露之病例-對照研究發現，婦女在主要煮食年齡時期 (20-40 歲)，家中廚房未安裝排油煙機之罹患肺癌之危險性較裝者高 3.7-4.8 倍 (Lee *et al.*, 2000)，因此推測婦女之高肺癌危險性可能與高濃度之烹調油煙暴露有關 (Ko *et al.*, 1997)。

(2) 台灣婦女的烹煮方法及習慣與不吸菸女性肺癌之關係

廚師與婦女為肺癌的高危險群。經研究發現烹煮餐點時，習慣等待高溫、油煙形成再行煮食，或喜歡煎、炒和油炸方法煮食之台灣婦女，其肺癌危險性會分別是沒有煮食者之 1.7、1.8 以及 1.9 倍，且都具有統計上之顯著差異 (Ko *et al.*, 2000)。因此不吸菸女性肺癌之發生與其使用的烹飪方法及習慣可能有關。

(3) 台灣常用烹調用油油煙物質之致突變性、基因毒性及其組成分析

研究發現，經高溫加熱 (約 270°C – 300°C) 之油煙物質，對沙門氏菌 TA 100 菌株具有顯著的致突變作用 (Qu *et al.*, 1992; Chiang *et al.*, 1998)，且與其含有的多種多環芳香烴及雜環胺類有關 (Chiang *et al.*, 1997; 1999)。Chiang 等人 (1998, 1999) 的研究報告指出，廚房中安裝排煙機不但可減少烹調油煙所造成的致突變性，而且排煙機安裝位置的高低也會影響烹調油煙造成的致突變性強度。

(4) 二手菸對不吸菸女性肺癌危險性之評估

Correa (1983) 已於先前的研究中指出二手菸的暴露為不吸菸女性肺癌形成之危險因子。婚後配吸菸也會增加不吸菸女性肺癌發生之危險性 (Lee *et al.*, 2000)。然而，也有研究發現，中國不抽菸女性肺癌之發生與烹調食物的方式有關，但卻與二手暴露無關 (Gao *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1993)。因此到目前為止，二手菸與中國不吸菸婦女肺癌之罹患率間之關係，仍有極大的爭議性。

2.1 COF 生物毒性、基因毒性與致癌性

已知 COF 為混合性的環境污染物，綜合先前的研究其中又可大致區分為粒狀以及氣狀污染物兩大類。粒狀污染物中主要的基因毒物為多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) (Chiang et al., 1997)，而氣狀污染物則有甲醛、乙醛及丙烯醛等化合物 (Zhu et al., 2001)。

Hsu (1999)將國人常用之油品在高溫下加熱、攪拌，發現沙拉油之油煙中含有多種多環芳香烴，且其毒性高於相當濃度之花生油及豬油。Wu 等人 (1998)發現，將各種油品加熱到 250 ± 10 °C 時所產生的油煙具有致突變性。有學者發現會引起姐妹染色分體交換 (Sister-Chromatin exchange; SCE) (Wang et al., 1998)。而 Berg 等人 (1990)證實烹調不同肉類所生成的煙霧，具有不同程度的致突變性。Chiang 等人 (1998)指出，加熱豬油以及沙拉油所生成的油煙，對於外加有代謝活化酵素之沙門氏桿菌 TA98 具有致突變性。Lofroth 等人 (1991)則發現，油煙中致突變物含量與烹調時間呈正相關性。且油煙中所測得的多環芳香烴，除了 Anthracene 以外，皆已被證明具有基因毒性 (McCann et al., 1975)。Qu 等人 (1992)則指出，加熱棉子油或大豆沙拉油，所收集到的揮發性氣體具有致突變性，但此毒性可在抗

氧化劑-BHA 或氫化油脂共同處理下而受到抑制。

2.1.1 COF 與 DNA 鍵結物

由於多環芳香烴的種類很多，含量也不盡然相同，如 B[a]A、chrysene、BaP 等具有間接致突變性，而 B[e]P、naphthalene、fluorene 等則不具有致突變性 (McCann *et al.*, 1975)。多環芳香烴在生物體內首先會經由微粒體單氧合酶 (monooxygenase) 或前列腺素 H 合成酶 (prostaglandin H synthase, PGHS) 代謝活化成環氧化物 (epoxide)，然後再水解為二酚 (diols) 的活化型中間產物，而形成 DNA 鍵結物 (DNA adduct) 造成基因突變並引起癌症 (Dipple *et al.*, 1987)，其中又以 BaP 為代表，BaP 有許多的代謝活化路徑，主要經由細胞色素 cytochrome P-450 IA1 (CYP IA1) 等酵素作用活化而形成 anti-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyrene (BPDE)，它會直接攻擊 DNA 上 dG 之 N² 位置因此具有致突變性 (Jeffrey *et al.*, 1976, 1977)。此外亦可經由單電子氧化作用，使 BaP 產生自由基正離子 (radical cation) 並攻擊 DNA 上 dG 之 N⁷ 位置形成 DNA 鍵結物 (Cavalieri and Rogan, 1992)。至於 BaP 的解毒路徑則主要是經由 glutathione S-transferase (GST) 酵素系統，此酵素具有多種異構物，

在不同的生物體中重要性亦不同，如倉鼠細胞內主要參與 BaP 解毒作用的是 GST pi (Swedmark *et al.*, 1992)。

在許多人類之器官以及組織如肺臟、胰臟和乳房組織等 (Dunn and Stich, 1986; Phillips *et al.*, 1988, 1990a, 1990b; Everson *et al.*, 1986; Manchester *et al.*, 1988; Seidman *et al.*, 1988; Schoket *et al.*, 1990)都能偵測到 DNA 鍵結物的存在。Roggeband 等人 (1993)以及 Gupta 等人 (1988) 分別以 BaP 處理不同之細胞，發現在外加酵素活化下 DNA 鍵結物會顯著增加。Hughes 等人 (1993)則以焦煤爐排放物連續暴露老鼠 24 小時，發現其心臟及肺臟會有 BPDE-DNA 鍵結物產生。此外，van Schoote 等人 (1990)發現肺癌病患的正常肺組織中含有 BPDE-dG DNA 鍵結物。而 Harris (1991)發現 BaP 會造成原致癌基因 (protooncogene) *ras* 之第 12 密碼 (codon)發生 G→T 的 transversion 突變。Cherpillod 和 Amstad (1995)的研究結果亦顯示，BaP 會造成 p53 抑癌基因之第 248 及 249 密碼發生 G→T 的 transversion 突變。綜合上述實驗結果可知，BaP 確實會造成基因體發生突變，進而引起癌症的發生。

然而在過去的研究發現，台灣女性肺癌患者 p53 之突變率偏低，且有不同於其他國家之 p53 突變輿圖 (Wang *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 2000)，且本實驗室近來的研究發現，儘管絕大多數之台灣女性肺癌

患者無吸菸習慣，但其肺腫瘤周邊之正常組織中，DNA 鍵結物含量卻不低於吸菸男性肺癌患者，且較不吸菸男性肺癌患者為高。但 p53 基因的突變率僅 21.6 % (Cheng et al., 2003 unpublished data)，因此推測女性對於環境污染物有較高之感受性，因此若以 DNA adduct 含量做肺癌之生物指標，台灣女性雖然不吸菸，但仍然有較高之罹患肺癌之危險性 (Cheng et al., 2001)。

2.1.2 COF 與氧化性壓力 (oxidative stress)

已知加熱或油炸食品容易促使油脂氧化，油脂氧化所生成的過氧化物 (hydroperoxide) 在體內會導致 $O_2\cdot^-$ 或 $\cdot OH$ 等游離基的產生 (如 Fig. 1 所示)，並對 DNA 造成傷害而生成氧化性鹼基，如 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)，而此鍵結物已被公認為是 DNA 氧化性傷害的生物指標 (Marnett et al., 1998)。又知 COF 含有多環芳香烴類與酮類、醛類化合物 (Chung et al., 1993; Shield et al., 1995; Takeoka et al 1996; Yang et al., 2000)，而酮類與醛類物質會造成細胞氧化性壓力的產生 (Roman et al., 2000)，且 COF 中的主要致癌物 BaP，會經由 Cox-2 和細胞色素 P-450 單氧酵素系統之代謝活化形成 BaP 自由基和超氧陰離子自由基，而進一步引起氧化性壓力。近年來

已有許多的研究指出，活性氧會使細胞明顯誘發環氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, Cox-2) 基因的表現和其蛋白質的活性。而經油脂過氧化作用而生成的 malondialdehyde (MDA)，會對 DNA 造成氧化性傷害，亦可能參與了 Cox-2 基因的誘發 (Marnett *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2001)。

本實驗室先前已發現，COF 會增加人類肺腺癌 CL-3 細胞內 xanthine oxidase 的活性，藉此提高細胞之氧化性壓力 (Yang, 1997)。在以高濃度之 COF 及其經 Baker-10 管柱純化之 PAHs 區分物 (COF-B) 處理人類肺腺癌 CL-3 細胞，抽取 DNA 進行 ^{32}p -postlabeling BPDE-DNA 鍵結物質譜分析，確認可生成 BPDE-N2-dG DNA 鍵結物 (Yang, 1997)，且在 S9 酵素系統存在下將不同濃度 COF 和 Cu^{2+} 共同處理小牛胸腺 (calf thymus) DNA，經 2 小時後分別進行 8-OH-dG 含量與 PAH-DNA 鍵結物的分析，結果顯示 8-OH-dG 含量與 PAH-DNA 鍵結物含量，會隨著 COF 濃度的增加而增高，且 8-OH-dG 增加的速率較 PAH-DNA 鍵結物為快速。由先前的研究發現，在結直腸癌腫瘤組織中可偵測到參與氧化性傷害之修補基因 human 8-oxoguanine DNA glycosidase 1 (*hOGG1*) mRNA 以及 8-OH-dG DNA 鍵結物之表現量會增加 (Kondo *et al.*, 1999, 2000)，因此 *hOGG1* mRNA 之表現亦可做為細胞氧化性壓力的生物指標 (Hollenbach *et al.*, 1999; Tsurudome

et al., 1999), 此外, 本研究室於近來的研究中 (Cherng *et al.*, 2002) 收集了 37 名家庭主婦、67 名專業廚師以及 97 名學生之血球 RNA, 以 RT-PCR 分析 hOGG1 mRNA 的表現情形, 結果發現油煙暴露與氧化性壓力以及 hOGG1 mRNA 表現呈正相關性。因此氧化性壓力之生物指標 hOGG1 mRNA 的表現, 可作為油煙暴露之生物指標。

本實驗室近來的研究發現, 當以 COF 以及活性氧捕捉劑共同處理 CL-3 細胞後 (Lin *et al.*, 2002), 以 DCFda 螢光分析法測量細胞內氧化性壓力之程度, 以單細胞電泳 (comet assay) 偵測 COF 對於細胞 DNA 造成的傷害, 發現 COF 對於 CL-3 細胞 DNA 所造成之傷害和 CL-3 細胞中氧化性壓力的程度, 會隨著 COF 濃度以及處理時間的增加而增高, 同時不同之活性氧捕捉劑均可有效地降低 CL-3 細胞內 COF 引起之氧化性壓力, 而降低 COF 所造成之 DNA 鏈斷裂之頻率。另外發現 COF 會誘發 CL-3 細胞內產生活性氧, 其中又以單重態氧 (singlet oxygen; $^1\text{O}_2$)、超氧陰離子 (superoxide anion; $\text{O}_2^{\cdot-}$) 及過氧化氫 (hydrogen peroxide; H_2O_2) 為主, 而羥自由基 (hydroxyl radicals; $\cdot\text{OH}$) 次之 (Lin *et al.*, 2002)。

綜合過去的研究可知, 油煙暴露為中國婦女罹患肺癌之重要危險因子, 又本實驗室近來的研究發現, 油煙暴露可促使細胞發生氧化性壓力, 因此推測台灣婦女之油煙暴露, 可能會造成體內氧化性壓力增

加，進而參與肺癌之形成，但仍需更多的實驗數據支持。

2.2 COF 成分與女性肺癌的關係

流行病學調查研究顯示，烹調所產生的油煙與鼻咽癌、口腔癌、膀胱癌和肺癌有關 (Cole *et al.*, 1972; Hederson and Louie, 1978; Dickson, 1981; Hargraves and Pariza, 1984)。東方國家尤其是華人地區，烹調食物的方法喜愛油炸、煎、炒及紅燒等調理方法，所產生的油煙可能與肺癌發生有關。Gao 等人 (1987)曾收集 672 位中國大陸上海地區女性肺癌患者及 735 位對照進行一項病例對照研究，結果發現，肺癌的發生與烹調方法、烹調的餐數、烹調時油煙的大小、烹調用油的種類等均有相關性，且感覺眼睛常受刺激者，得到肺癌的相對危險性最高。1990 年 Wu 等人在瀋陽和哈爾濱地區以 965 位女性肺癌患者及 959 位對照進行類似的研究，也發現油炸食物次數愈多的婦女愈容易罹患肺癌。Dubrow 等人 (1984)的報告指出，廚師罹患呼吸道癌症的機率較其他癌症的機率高。Liu 等人 (1993)以中國廣州 316 個肺癌病人作為研究對象，發現除了香菸以外，廚房污染源亦為參與肺癌發生之危險因子，尤其是長期接觸 COF 的女性。瑞典學者 Berg 等人 (1988)證實，烹調各類肉類食品所生成的油煙之致突變物和烹調

時間有正相關，且所生成的油煙之致突變物種類和烹調溫度有關，隨著溫度升高，油煙內間接致突變物有增加的趨勢。大陸學者 Li 等人 (1994) 指出，蔬菜油和沙拉油分別加熱到 $205\pm 5^{\circ}\text{C}$ 時，所生成的油煙中含有高量的 BaP 和 DB[a,h]A，且發現炸油豆腐店、炸麻花店和炸油條店的空氣樣品中含有高量的 BaP 和 DB[a,h]A，因此認為這兩種已知的致癌物，可能就是造成廚師和中國婦女罹患肺癌的起始因子。

二、COX-2 蛋白的功能及在癌症的相關研究

人類之環氧酶 (Cyclooxygenase; Cox) 主要有 Cox-1 和 Cox-2 兩種異構酶。而此兩種異構酶皆可催化花生四烯酸 (arachidonic acid) 以合成類前列腺素 (prostaglandin)，包括前列腺素 (prostaglandin)、白烯胺酸 (thromboxane) 和 prostacyclin (Fig. 2)。其中 Cox-1 廣泛且穩定地存在於大部分的細胞與組織中，可參與生物體之正常生理功能，如調控腎臟的再吸收作用、血小板的凝集與體內平衡以及促腺細胞分泌黏液以保護胃壁細胞。而 Cox-2 為 immediate-early/ inducible 基因，Cox-2 表現主要參與腫瘤生成、發炎反應，且可經生物體內、外在之刺激，如氧化性壓力、生長因子、細胞激素、腫瘤促進物和內毒素等因子所誘發 (Jones *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1994; Endo *et al.*, 1995;

Subbaramaiah *et al.*, 1996; Mestre *et al.*, 1997; Eckmann *et al.*, 1997; Buckman *et al.*, 1998; Kelley *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2000)。已知 Cox-2 同時具有環氧酶 (cyclooxygenase) 以及過氧化氫酶 (hydroperoxidase) 之酵素活性，前者可將花生四烯酸 (arachidonic acid) 催化為 PGG₂ 並釋出超氧陰離子，過去研究發現，該超氧陰離子不但會增進細胞之氧化性壓力 (Feng *et al.*, 1995)，在和二手煙中主要致癌物質之一的 BaP-7,8-diol 作用後亦會使之形成 BaP-7,8-diol-9,10-oxide，而生成 DNA 鍵結物 (Marnett L. J., 1990)。而後者過氧化氫酶之酵素活性則會進一步將 PGG₂ 還原成 PGH₂。另有研究發現，Cox 可經由過氧化氫酶之酵素活性而將烹調油煙中所含致癌物 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) 活化而造成大腸癌的發生 (Wiese *et al.*, 2001)。此外，PGH₂ 會受其他類前列腺素合成酶的作用而形成 PGE₂、PGI₂... 等類前列腺素，以調控生物體之正常生理功能以及免疫反應 (Huang *et al.*, 1996; Stolina *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2003)，進而參與腫瘤之形成 (Eberhart *et al.*, 1994; Sano *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998)。

1. Cox-2 表現與肺癌發生之相關性

由過去發現在肺腫瘤組織中，可偵測到 Cox-2 蛋白的大量表現 (Hida *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998; Achiwa *et al.*, 1999)，而在非細小細胞肺癌早期 (Stage I) 患者之腫瘤組織中，Cox-2 蛋白或 RNA 的表現量較高者，其預後較差 (Achiwa *et al.*, 1999; Brabender *et al.*, 2002)。Subbaramaiah 等人 (1996) 則將 ras 高度活化或經病毒感染之細胞送入老鼠體內生成腫瘤，發現所新生成之腫瘤中 Cox-2 mRNA 與蛋白亦會大量表現。綜合上述研究可推論，Cox-2 的表現可能參與了非細小細胞肺癌的形成。

1.1 Cox-2 表現與肺腺癌之相關性

根據世界衛生組織的分類 (WHO, 1982)，原發性肺癌主要分為二大類：小細胞肺癌 (small cell lung cancer; SCLC) 及非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer; NSCLC)，其中 NSCLC 可再分為鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma; SQ)、腺癌 (adenocarcinomas; AD) 以及大細胞癌 (large cell carcinomas)，吸菸主要與鱗狀上皮細胞癌及小細胞癌的發生有關 (Lubin and Blot, 1984; Gao *et al.*, 1987; Brownson *et al.*,

1992)，不抽菸女性肺癌患者則以腺癌為主 (Kung *et al.*, 1984; Gao *et al.*, 1987)。

Hida 等人 (1998) 首先分析了 59 個原發性肺癌組織，其中包括 9 個細小細胞腺癌、23 個腺細胞癌、22 個鱗狀上皮細胞癌以及 2 個腺癌混和鱗狀上皮細胞癌之患部組織，並以免疫組織化學染色分析腫瘤組織中 Cox-2 蛋白的表現，結果發現 COX-2 的表現與年齡、性別、抽煙習慣乃至腫瘤分期間，都無統計上之相關性。然而 Cox-2 蛋白的表現與腫瘤細胞形態間具有顯著之相關性，Cox-2 蛋白在肺腺癌組織內之表現率為 70% (16/23)，顯著高於在肺鱗狀上皮細胞癌腫瘤組織內之表現率 (14%, 3/22)。以上結果顯示 Cox-2 蛋白的高度表現，可能參與肺腺癌之形成。又由於肺腺癌為台灣不抽煙女性肺癌患者主要罹患之肺癌種類，因此 Cox-2 的表現可能於台灣不抽煙女性肺腺癌之形成過程，扮演著重要的角色。

1.2 Cox-2 表現與氧化性壓力

由先前的研究可發現，生物體之內在因子如老化、心理壓力、運動習慣、發炎反應以及腫瘤生成，外在因子如抽煙、喝酒、放射線照射以及重金屬、環境污染物之暴露，皆會促使體內活性氧累積乃至氧

化性壓力發生 (Moller *et al.*, 1996)，進而引起 DNA、蛋白質以及脂質發生過氧化而造成氧化性傷害，當傷害形成的速率大於修復時，會造成細胞死亡或走向癌化 (Shibutani *et al.*, 1991; Ji *et al.*, 1998; Efrati *et al.*, 1999; Kumagai *et al.*, 2000)。Toyokuni (1999) 指出當氧化性壓力過高時，會誘使細胞走向凋亡、壞死，然而相對低度之氧化性壓力，則會使細胞週期停滯，甚至促進細胞之增生 (Toyokuni *et al.*, 1995; Burdon *et al.*, 1995)。

過去的研究發現 Cox-2 的表現可經由氧化性壓力而誘發，Feng 等人 (1995) 以 interleukin-1 (IL-1)、lipopolysacchride (LPS) 與 tumor necrosis factor alpha (TNF- α) 誘發細胞 Cox-2 表現，並以羥自由基捕捉劑 dimethylsulfoxide (DMSO) 共同處理細胞，發現 DMSO 可有效地抑制 IL-1、LPS、TNF- α 誘發 Cox-2 mRNA 以及蛋白之表現，此外發炎反應所產生之活性氧，不僅刺激 COX-2 表現，也會增加 COX-2 酵素活性。Yan 等人 (2000) 以香菸之主要致突變物 BaP 和抗氧化劑 N-acetylcystein (NAC) 共同處理細胞，發現 NAC 亦可抑制由 BaP 所誘發之 Cox-2 蛋白的表現。Kim 等人 (2000) 的報告指出，隨著老化的發生小鼠體內的氧化性壓力會持續累積，而 Cox-2 上游之轉錄因子 NF- κ B 會被活化，因而 Cox-2 蛋白會大量表現。Gottschling 等人 (2001) 則使小鼠長期暴露於致突變物 indium phosphide (IP) 中，發現

IP 暴露會造成小鼠呼吸系統慢性發炎以及氧化性壓力相關之生物指標如 8-OH-dG DNA 鍵結物、Cox-2 蛋白、GST-Pi 蛋白以及 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 蛋白大量表現。Taidieu 等人 (2000) 以可促自由基產生之藥物與 Cox-2 抑制劑 nimesulide 共同餵食小鼠，發現 Cox-2 的抑制劑，可抑制組織中過氧化物以及 8-OH-dG 的產生。由此可知 Cox-2 表現與氧化性壓力之生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物的生成間具有重要之相關性。

而在本實驗室先前的研究中 (Lin *et al.*, 2002) 以 COF 和數種活性氧捕捉劑共同處理 CL-3 細胞，發現 COF 誘發 CL-3 細胞中 Cox-2 的大量表現，是透過細胞經 COF 刺激後所產生的活性氧，特別是羥自由基和超氧陰離子。

2. 誘發 Cox-2 表現之分子機轉

綜觀過去的相關研究可發現，在不同的環境下以及不同的細胞、組織中 Cox-2 除執行著不同之生理作用外，可誘發其表現之因子與所經由之路徑亦多有不同 (Smith *et al.*, 2000)。儘管我們尚無法完全釐清可誘發 Cox-2 表現之因子與路徑間之關係，然而根據可誘發 Cox-2 表現之發炎因子如 LPS、TNF- α 、IL-1 β 、phorbol ester 以及生長因子

來看，Cox-2 的表現主要是經由 NF- κ B、MAPKs cascade 以及 C/EBP 三條路徑而來調控：

(1) Cox-2 的 NF- κ B 訊號傳遞路徑調控

已知轉錄因子 nuclear factor κ B (NF- κ B) 主要是由 p50 與 p65 所組成，先前的研究指出細胞激素如 IL-1 β 、TNF- α ，環境暴露如 LPS、phorbol ester、UV-light，以及氧化性壓力，與流行性感冒病毒、痘病毒等病毒感染，可分別經由促進細胞質 p50、p65 蛋白之前驅物 p100、p105 蛋白表現或降解成 p50、p65 蛋白，或者是活化 I κ B kinase 以促進 NF- κ B 之抑制物 inhibitor of NF- κ B protein (I κ B) 降解，並使 NF- κ B 自細胞質轉移至細胞核內，以調控下游基因如細胞激素和成長因子：IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、G-CSF、GM-CSF 以及 TNF- α/β ，轉錄因子：c-rel 和 c-myc，細胞表面受體：T-cell receptor，以及主要參與發炎反應之酵素：Cox-2、iNOS、phospholipase-A₂ (PLA₂) 等之轉錄活性 (Barnes and Karin, 1997; Ghosh *et al.*, 1998; Neurath *et al.*, 1998; Pahl *et al.*, 1999) (如 Fig. 3 所示)。

由先前的研究可知，在成骨細胞、關節滑膜細胞、表皮細胞、內皮細胞以及肝細胞中，當細胞處於缺氧的環境下或受到發炎因子如 TNF- α 、IL-1 β 以及 LPS 刺激，Cox-2 的表現，會經由 NF- κ B 訊號傳

遞路徑而被活化 (Roshak *et al.*, 1996; Crofford *et al.*, 1997; Schmedtje *et al.*, 1997; Gallois *et al.*, 1998; Jobin *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999)。

Yamamoto 等人首先以 luciferase reporter assay 分析了大鼠之 Cox-2 基因的 promoter 上影響其轉錄活性之區域，發現 Cox-2 之 promoter 上具有兩個 NF- κ B 結合區域。Inoue 與 Tanabe (1998) 則將 Cox-2 promoter 進行點突變並接上 reporter plasmid 後送入 U937 細胞中，再以 LPS 進行處理，發現 LPS 確實可經由 NF- κ B 調控 Cox-2 的表現。

(2) Cox-2 的 MAPKs 訊號傳遞路徑調控

過去的研究顯示，mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 訊號傳遞路徑為成長因子與致癌基因如 *v-src* 和 *v-ras* 主要活化之訊號傳遞路徑 (Su and Karin, 1996)，此外發炎因子如 LPS、TNF- α 、IL-1 β 以及 phorbol ester 等可將其活化 (Subbaramaiah *et al.*, 1998; Wallach *et al.*, 1999)。而參與 Cox-2 表現之 MAPKs 訊號傳遞路徑，可再大致區分為 extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2)、p38/MAPK 以及 c-Jun NH₂-terminal/stress-activated protein kinases (JNK/SAPK) 三條可分別受不同因子所調控之路徑 (如 Fig. 4 所示)。

Guan 等人 (1997, 1998) 以及 Ridley 等人 (1997, 1998) 先以 p38/MAPK 之抑制劑 SC68176、SB203580 處理細胞，或將顯著無效

之 MAPKs 上游的調控因子 SEK1 轉染至細胞中，再以 IL-1 β 共同處理，結果發現 IL-1 β 主要經由 p38/MAPK 以及 JNK/SAPK 兩條 MAPKs 訊號傳遞路徑調控 Cox-2 的表現。Adderley 和 Fitzgerald (1999) 以 ERK1 之抑制劑 PD98059、氧化性自由基捕捉劑和 H₂O₂ 共同處理細胞，發現 H₂O₂ 主要可經由 ERK1/2 訊號傳遞路徑，以調控 Cox-2 的表現。Scherle 等人(1998) 以及 Dean 等人 (1999) 則分別以位在上游可調控 ERK1/2 路徑之 MEK1/2 的抑制劑 U0126 或 p38/MAPK 之抑制劑 SB203580 和 LPS 共同處理細胞，發現 LPS 可分別經由 ERK1/2 以及 p38/MAPK 兩條 MAPKs 訊號傳遞路徑調控 Cox-2 的表現。綜合以上 Cox-2 表現與 MAPKs 訊號傳遞路徑的相關研究可發現，諸如 IL-1 β 、H₂O₂、LPS 等因子在不同的細胞中，可經由不同之 MAPKs 訊號傳遞路徑誘發 Cox-2 表現。

(3) Cox-2 的 C/EBP 訊號傳遞路徑調控

由過去的研究可發現無論是在大鼠或人類 Cox-2 基因之 promoter 上除了 NF- κ B 結合區域外，尚包括一 NF/IL6 調控區域 (Yamamoto *et al.*, 1995; Inoue and Tanabe, 1998)，在過去的研究中發現 NF/IL6 調控區域，存在於其他發炎反應相關基因之 promoter 上，而轉錄因子 CAAT Enhancer Binding Protein α/β (C/EBP α/β) 雖無法直接調控下游基

因，但可藉著結合至 NF/IL6 調控區域，以協同其它轉錄活化因子促進下游基因的表現，因此過去的研究發現 C/EBP 蛋白可協同轉錄因子 NF- κ B 以及 c-Jun *cis*-regulatory protein 活化 Cox-2 的表現 (Inoue *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995)。

在過去 Cox-2 的相關研究中，NF- κ B 以及 MAPKs 訊號傳遞路徑多被分開討論，但近來開始有研究，將此二訊號傳遞路徑一同討論。Yang 等人 (2002) 以 IL-1 β 與 NF- κ B 之抑制劑 PDTC 或 MAPKs 之抑制劑 PD98059、SB203580 共同處理氣管平滑肌細胞，發現 IL-1 β 會同時經由 p38/MAPK 和 NF- κ B 兩條各自獨立之訊號傳遞路徑，誘發 Cox-2 的表現。Vermeulen 等人 (2003) 進一步以 TNF- α 以及細胞核內之激酶 mitogen-/stress-activated protein kinase-1 (MSK-1) 之抑制劑 H89，或 MAPK 之抑制劑 SB203580、PD98059、U0126 共同處理纖維母細胞，發現 p38/MAPK 和 MEK/ERK 可經由活化 MSK-1 而將核內之 NF- κ B 磷酸化，進而促進 NF- κ B 調控轉錄作用的能力。

3. Cox-2 表現與免疫抑制

已知腫瘤細胞必須逃脫免疫系統的抑制生長以及殺死方可形成

腫瘤，哺乳類動物之免疫反應主要可分為細胞性以及體液性免疫反應，其中細胞性免疫反應為主要執行抗腫瘤生成之免疫反應，由先前的研究可知，細胞性免疫反應主要是受細胞激素 interleukin-10 (IL-10) 以及 interleukin-12 (IL-12) 之共同調控 (D'Andrea *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993)。IL-12 會促進細胞性抗腫瘤免疫反應以及細胞激素之分泌 (Nabioullin *et al.*, 1994; Nastala *et al.*, 1994; Colombo *et al.*, 1996; Handel-Fernandez *et al.*, 1997)，IL-10 則可促進胖細胞 (mast cell)、B 細胞以及 T 細胞之分化與成熟，然而 IL-10 會廣泛地抑制發炎反應與抗原呈現作用、細胞激素 (如 IL-12) 之分泌以及 T 細胞之增生等正常免疫反應 (Moore *et al.*, 1993)。因此由腫瘤細胞或浸潤於腫瘤組織中可參與發炎反應之細胞，所分泌的 IL-10 在癌細胞逃脫抗腫瘤免疫反應中扮演著重要的角色 (Yamamura *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1999)。

過去 Dr. Dubinett 的實驗室的研究指出，Cox-2 之下游產物 Prostaglandin E₂ (PGE₂) 可誘發免疫細胞 IL-10 並抑制 IL-12 的表現進而影響生物體免疫系統抗腫瘤發展之能力。Huang 等人 (1996, 1998) 以 IL-1 β 處理非細小細胞肺癌細胞株 24 小時後收集培養基，再以之處理分離自周邊血液的淋巴球或巨噬細胞，發現經由細胞內之 Cox-2 所衍生之 PGE₂ 可誘發淋巴球和巨噬細胞中 IL-10 的分泌並抑制 IL-12

的表現。同樣地，Stolina 等人 (2000)以及 Sharma 等人 (1999, 2003) 分別收取培養過轉染有 Cox-2 基因之肺腫瘤細胞株的培養基，再進一步地以之處理分離自脾臟或骨髓之抗原呈現細胞 (antigen presenting cells, APCs) 和樹突狀細胞 (dendritic cell, DC)，或將該 Cox-2 基因轉殖細胞株注入大鼠皮下並以 Cox-2 之抑制劑餵食，發現腫瘤細胞中 Cox-2 的高度表現，不但會影響組織中 IL-10 以及 IL-12 的平衡，更可進一步地抑制生物體免疫系統抗腫瘤發展之能力。

此外，王和胡 (1992a, 1992b) 以廚房空氣污染物持續暴露大鼠 3 個月後，發現其脾臟 T 淋巴細胞分泌 IL-12 的能力也有下降的趨勢，且其肺部巨噬細胞之抗腫瘤能力以及自然殺手細胞的活性會大大地降低。本實驗室近來則發現 COF 可誘發肺腺癌細胞株 CL-3 之 Cox-2 基因大量表現，因此推測 COF 應可經由促進生物體呼吸道細胞 Cox-2 的表現以降低生物體之免疫力，進而使腫瘤細胞逃脫免疫系統監視而走向癌化。

參、 研究動機

肺癌是台灣女性癌症死因的第一位，且有逐年增加的趨勢。過去的流行病學研究指出，吸菸乃是導致肺癌發生最重要的危險因子，然而絕大多數之台灣女性肺癌患者無法以吸菸行為來解釋，此外，本實驗室先前的研究亦發現，台灣女性肺癌患者之肺部非腫瘤組織中 DNA 鍵結物含量雖高，但 p53 基因的突變率僅 3.9%，因此推論婦女對於環境污染物有較高之感受性，且應有較 DNA 鍵結物更重要的因子參與了台灣女性不吸菸患者肺癌之形成。

流行病學相關研究發現女性在烹調的過程中所暴露到的油煙與女性肺癌發生有關。本研究室近來亦有研究指出，相較於吸菸以及飲酒等可能促進氧化性壓力的因子，油煙暴露和可作為氧化性壓力生物指標之氧化性傷害修補基因 human 8-oxoguanine DNA glycosidase 1 (hOGG1) 之 mRNA 間具有顯著之相關性，此外，經油煙處理後細胞內 8-OH-dG DNA 鍵結物的含量會顯著增加，且相較於相當濃度之 BaP，油煙可有效地促進細胞之氧化性壓力進而誘發 Cox-2 基因的大量表現以及造成 DNA 傷害，因此推測油煙主要是經由氧化性傷害以及誘發 Cox-2 等基因之表現而促進肺癌的發展。

研究發現 Cox-2 在肺腫瘤組織中會大量表現，其中又以肺腺癌腫

瘤組織中 Cox-2 之表現量最高，而女性不吸菸肺癌患者又傾向於罹患肺腺癌，因此 Cox-2 蛋白可能在女性不吸菸肺癌患者的腫瘤發展中扮演著重要的角色；再者，已知氧化性壓力可誘發 Cox-2 的大量表現，因此推測在台灣女性不吸菸肺癌患者腫瘤組織中，Cox-2 蛋白的高度表現可能是經由氧化性壓力所誘發。

綜合上述研究結果與推論，本研究假設台灣不吸菸女性肺癌患者是由於油煙暴露而造成氧化性壓力乃至 Cox-2 蛋白的大量表現，進而導致肺腺癌的發生。故擬觀察肺腫瘤組織中 Cox-2 的高度表現與氧化性壓力 (8-OH-dG DNA 鍵結物) 之相關性，和油煙誘發細胞 Cox-2 表現之機轉，從而探討台灣女性肺癌形成的可能原因與路徑，因此本研究或許可從另一個角度提供油煙暴露、氧化性壓力、Cox-2 的表現和台灣不吸菸女性肺癌間之相關證據。

肆、材料與方法

一、化學藥品與材料

1. RNA 製備

RareRNA Kit 購自台灣真興公司。DEPC (diethyl pyrocarbonate), Isopropanol, NaOAc (sodium acetate) 購自美國 Sigma 公司。DNase I 及 RNasin 購自美國 Promega 公司。SDS (sodium dodecyl sulfate), EDTA (ethylenedinitroilo tetra-acetic disodium salt), Tris-base 購自德國 Merck 公司。Chloroform, Ethanol, Phenol 則購自台灣皓峰公司。

2. 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry)

Alcohol, Xylene 購自台灣皓峰公司。H₂O₂, NP-40 購自美國 Sigma 公司。Citrate, EDTA, Entellan (封片膠), Hematoxyline, NaCl (sodium chloride), Tris-base 購自德國 Merck 公司。Monoclonal anti-COX-2 primary antibody 購自 Alexis Biochemical 公司。Anti-8-oxo-dG primary antibody 購自美國 Trevigen 公司。Primary anti-body diluent, DAB (3,3'-diaminobenzidine) , Dako Pen, LSAB (labeled streptavidin- biotin reagent) 則購自丹麥 DAKO 公司。

3. 細胞培養

NEAA (non-essential amino acid), penicillin-streptomycin solution, RPMI-1640 medium, Sodium pyruvate 購自美國 HyClone 公司。FBS (fetal bovine serum) 購自美國 GIBCO-BRL 公司。L-glutamine, NaHCO₃ (sodium bicarbonate), trypan blue solution, PD98059, SB203580 購自美國 Sigma 公司。LHC-9 medium 購自美國 BIOSOURCE 公司。DMSO 則購自德國 Merck 公司。

4. MTT assay

DMSO (dimethyl sulfoxide), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 購自美國 Sigma 公司。

5. RT-PCR

M-MLV Reverse Transcriptase 購自美國 Promega 公司。

Oligo d(T)₁₈ primer 購自美國 BioLabs 公司。100bp Ladder, dNTP, Taq DNA polymerase 購自台灣真興公司。PCR primers 購自台灣伯森公司。Bromophenol blue, EtBr (ethidium bromide) 則購自美國 Sigma 公司。

6. Western blot

Bio-Rad protein assay kit 購自 Bio-Rad 公司。SDS, NaCl, Tis-base 購自德國 Merk 公司。2-mercaptoethanol, Anti-β-actin primary antibody, Tween-20 購自美國 Sigma 公司。

Monoclonal anti-COX-2 primary antibody 購自 Alexis Biochemical 公司。APS (ammonium persulfate) 購自美國 GIBCO-BRL 公司。TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) 購自瑞典 Pharmacia 公司。PVDF membrane, ECL(enhancechemiluminescence) 購自英國 Amersham 公司。X-film 則購自美國 Koda 公司。

7. Gel Retardation assay

Glycine, Tris-base, Glycerol, polyacrylamide 購自德國 Merck 公司。LiCl (lithium chloride), MgCl₂(manganese chloride), NaOAc, NH₄OAc (ammonium acetate) , tRNA (ribonucleic acid) 購自美國 Sigma 公司。APS (ammonium persulfate) 購自美國 GIBCO-BRL 公司。TEMED (N,N,N',N'-tetra- methylethylenediamine) 購自瑞典 Pharmacia 公司。[γ -³²P]-dATP 購自英國 Amersham 公司。X-film 則購自美國 Koda 公司

二、肺腫瘤組織切片之來源

肺癌患者腫瘤組織切片由台中榮總病理部取得。將手術切除下來的肺腫瘤組織以 4%福馬林隔夜固定後，以不同濃度酒精進行脫水，順序、濃度及時間如下：50%酒精 5 分鐘、75%酒精 15

分鐘、85%酒精 15 分鐘、95%酒精 15 分鐘、100%酒精 15 分鐘、100%酒精 15 分鐘、以及 xylene 15 分鐘。將脫水後的組織放入以 60°C 預溶的石蠟中浸泡 20 分鐘，將 xylene 置換出來後，再將組織放入溶好的石蠟中進行包埋，整個過程中應避免氣泡的產生，待石蠟凝固後隔天便可進行切片。將包埋好的組織以切片機切成每片厚度為 3-5 μ m，並保存於乾燥區域以便日後使用。

三、免疫組織化學染色法

將石蠟包埋後的組織以 5 μ m 的厚度加以切片，並進行免疫組織染色。先將切片置於 60°C 烘箱約 10 分鐘，再放入 xylene 中進行脫蠟，而後浸以 100%, 95%, 80%, 75% 等不同濃度的酒精各 5 分鐘進行覆水，並於室溫下、3% H₂O₂ 中反應 15 分鐘以阻斷內生性過氧化酵素(oxidase)反應 (8-OH-dG 要待一抗反應後方可置入 H₂O₂ 中反應) 後，將玻片放入 0.01 M citrate buffer 中以微波加熱 3 到 5 分鐘，接著於室溫冷卻直到 citrate buffer 恢復澄清，再放入 TBS buffer 中恢復 pH 值。以 1/200 倍稀釋之 Anti-COX-2 或 1/800 稀釋之 Anti-8-oxo-dG 在室溫下、潮濕盒中反應 1 或 2 小時後，以 PBS 洗三次每次五分鐘，再以 LSAB Kit

(DAKO, LSAB 2 Kit peroxidase)連結呈色劑 DAB 加以呈色，並以 hematoxylene 進行背景染色後，將切片以介於 75% - 100%的四種不同濃度酒精加以脫水。再以 xylene 將酒精置換出來後，封片並進行判讀。

COX-2 蛋白免疫組織化學染色結果的判讀是經由 3 位以上人士(包括一位臨床病理醫師)，依照 DAB 於組織呈色的範圍來判斷蛋白表現情況。以沒有腫瘤細胞表現的情形視為負反應，以(-)表示；介於 1%至 10 %的腫瘤細胞有表現，以(+)表示；介於 11%至 50 %的腫瘤細胞有表現，以(++)表示；介於 51%至 100 %的腫瘤細胞有表現，則以(+++)表示。

四、COF 的製備、萃取與純化

取四條白鯧魚共重 1042 公克，每次以 15 ml 沙拉油煎一條魚，其所生成之油煙先用排油煙機過濾油脂，然後在排氣口處裝設空氣採樣器採得樣品。將採得樣品的玻璃纖維濾紙剪成一公分見方的小塊泡在 200 ml 丙酮中，以振盪器振盪一小時，然後再以 Whatman No. 1 濾紙過濾取得丙酮萃取液，以上述方法重複三次，將所有的丙酮萃取液集中起來，再加入無水硫酸鈉脫水、過濾，再經減壓濃縮，所得濃縮殘留物即為 COF 懸浮微粒丙酮萃取物，溶於一定體積之有機溶劑—DMSO 中，以此為樣品進行各

項分析。

煎魚所得之 COF 粗萃取物以 Baker-10 Solid Phase Extraction system 純化，所使用的管柱為 octadecyl (C₁₈)管柱。將 10 mg 之油煙丙酮萃取物以氮氣吹乾，先溶於 3.5 ml isopropanol 再加入 20 ml H₂O。購得之 Baker-10 管柱先以 6 ml methanol 濕潤後，再以 9 ml isopropanol / H₂O (15 / 85, v/v) 將管柱活化，並使溶劑保持在管柱固相物的上方，然後注入樣品直至所有溶液通過管柱，然後再以幫浦抽五分鐘，直至管柱全乾為止。接著以 6 ml 甲醇沖提出結合在管柱上的物質，沖提液以氮氣吹乾後，溶於 1 ml 甲醇中儲存於 -20°C 冰箱中備用，此即稱為 COF 粗萃取物之 Baker-10 多環芳香烴純化物 (COF-B)。

五、臺灣肺腺癌 CL-3 細胞與非腫瘤氣管上皮細胞 Beas-2B 之培養

臺灣肺腺癌 CL-3 細胞是台大醫院楊泮池醫師殖株培養成功之人類肺癌細胞株，CL-3 細胞在形態學上屬於 epithelial-like cell。以含有 10 % FBS，0.03 % penicillin / streptomycin (100 U / ml)，5.5 % sodium bicarbonate 之 RPMI medium 培養於 37°C、

5% CO₂ 的培養箱中。

Beas-2B 細胞為正常人類肺部支氣管上皮細胞 (virus transformed) ，形態學上同屬於 epithelial-like cell ，仍保有在血清的刺激下而進一步分化的能力，因此以未添加血清之 LHC-9 medium 培養於 37°C 、5% CO₂ 的培養箱中。

六、細胞解凍與保存

儲存之細胞由液態氮中取出，立刻放入 37°C 水浴，使其快速解凍，將解凍的細胞移至含有 37°C 培養液的離心管中，以 800 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液後，以完全培養液均勻混合之，然後移到 100 mm 的培養皿中，置於 5% CO₂ 的 37°C 培養箱中培育。

欲保存之細胞用胰蛋白酶 (Trypsin / EDTA, T/ E) 處理，以單離細胞，再取部份完全均勻的細胞懸浮液，以細胞自動計數器計算細胞數目，並取 1×10^6 個細胞到無菌離心管中以 800 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液並以含有 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) 之 1 ml 完全培養液混合均勻後移至抗凍管 (cryotube) 中，放於 -80°C 冰櫃中靜置二小時後，再移至液態氮桶中儲存。

七、MTT 細胞毒性分析

取 5×10^3 個 CL-3 細胞或 1×10^4 個 Beas-2B 細胞種於 96 well 的培養盤中，置於 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的恆溫培養箱內保溫培養 24 小時，以不同濃度的 COF 處理細胞 1 至 24 小時後，將含不同濃度 COF 之培養液移除，以 $1 \times \text{PBS}$ 清洗二次，再以含有 MTT ($625 \mu\text{g/ml}$) 之培養液避光培養 4 小時，將培養液移除，加入 $100 \mu\text{l}$ DMSO 溶解經活細胞粒腺體還原酶作用所形成之 MTT 藍色 formazen，再加入 $12.5 \mu\text{l}$ Sorensin's glycine buffer (0.1 M glycine plus 0.1 M NaCl, pH 10.5)，以波長 570 nm 測定其吸光直(Plumb *et al.*, 1989)。

八、RNA 的萃取與純化

將加藥處理過的細胞，參照 RareRNA 所附的說明書步驟進行 RNA 之萃取，首先加入 1 ml RareRNA 試劑混合均勻，在室溫下作用 10 - 15 分鐘後，加入 $200 \mu\text{l}$ chloroform 輕輕搖晃使之充分混合均勻，以 12000 rpm ， 4°C 離心 15 分鐘，取上層液至新的 eppendorf，加入 0.5 ml isopropanol，輕輕搖晃使之充分混合均勻後置於 -20°C 冰箱等待 RNA 沉澱出來，再以 12000 rpm ， 4°C 離心 20 分鐘，吸去上清液，加入 1 ml 75%冰酒精，洗去殘留的鹽

類及 isopropanol，以 7500 rpm, 4°C 離心 5 分鐘，去除上層液，加入 50 μ l 的 DEPC 滅菌水使 RNA 溶解後，進行 RNA 純化之步驟。

將上述的 RNA，加入 10 μ l 100 mM MgCl₂/ 1 M DTT，0.1 μ l Rnasin (200 U)，0.1 μ l DNase I (6.94 mg/ml)，40 μ l DEPC H₂O 於 37°C 反應 30 分鐘以去除多餘的 DNA，並以 5 mM EDTA，750mM sodium acetate，0.1 % SDS 中止 DNase I 反應。phenol / chloroform 萃取 RNA，方法如下：125 μ l phenol、25 μ l chloroform、12.5 μ l NaOAc (3M) 混合均勻後，以 12000 rpm，4°C 離心 15 分鐘，取上層液至新的 eppendrof，再加入 125 μ l chloroform 混合均勻，以 12000 rpm，4°C 離心 10 分鐘後，加入 0.5 ml isopropanol，輕輕搖晃使之充分混合均勻後置於 -20°C 冰箱等待 RNA 沉澱出來，再以 12000 rpm，4°C 離心 20 分鐘，吸去上清液，加入 1 ml 75% 冰酒精，洗去殘留鹽類及 isopropanol，以 7500 rpm, 4°C 離心 5 分鐘，去除上層液，加入適量的 DEPC 滅菌水使 RNA 溶解，最後以紫外線光譜儀測定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A_{260/280} 之比值應在 1.8 左右。RNA 的濃度以下列公式計算：RNA (μ g/ml) = A₂₆₀ x 40 x 稀釋倍數 / 1000。

九、反轉錄聚合酶鏈反應

1. 反轉錄反應(Reverse Transcription : RT)

大部份真核細胞 mRNA 分子在 3' 端的序列都是 Poly (A), 因此可以藉由提供一個與此序列互補的 oligo d(T) primer, 使反轉錄酶(reverse transcriptase: RTase)利用 mRNA 當模板去合成互補 DNA (complement DNA : cDNA)。詳細步驟如下: 首先混合 5 μ g RNA、5 pmole / μ l oligo d(T)₁₈ 及 DEPC 處理過的無菌水共 12 μ l, 以 oligo d(T)₁₈ 為 primer, 先於 72°C 反應 10 分鐘, 使 Oligo d(T)₁₈ 接到 RNA 的模板上, 接著將溫度降至 4°C, 並加入 4 μ l 緩衝溶液、1 μ l 1M DTT、1 μ l 10 mM dNTP, 之後將溫度升至 42°C 並作用 2 分鐘後, 加入 1 μ l MMLV 反轉錄酶, 於 42°C 下作用 90 分鐘將 mRNA 反轉錄成 cDNA, 最後再以 65°C 下加熱 15 分鐘以破壞反轉錄酶活性, 完成後將其保存於 -20°C, 以便進行 PCR 之用。

2. 聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction : PCR)

PCR 反應是以上述所得的 cDNA 1 μ l, 加入反應試劑: 0.5 mM primer(sense, antisense) 1 μ l, 0.5mM dNTP 1 μ l, PCR reaction buffer (10 x) 5 μ l, 2.5U Taq polymerase, 再以滅菌水將體積調成 50 μ l。反應條件為 94°C、5 分鐘使雙股 DNA 變性, 接著以 94°C、40 秒; 依 primer 序列 而計算出 annealing 的溫度、30 秒; 72°C、50 秒的條件以熱循環儀重覆上述步驟共 29 次, 最後以 72°C、10 分鐘使產物延長完全。由於兩株細胞中之 Cox-2 以及 IL-6 表現量不一, 又為求能在線性範圍內進行 multi-PCR 反應, 因此四組 PCR 所採之 primer 的比例 (Cox-2/IL-6:GAPDH) 以及 PCR 時所採之 cycle 數皆不盡相同:

	Primer ratio : Cox-2(IL-6) : GAPDH	numbers of PCR cycle
CL-3 -- Cox-2	10 : 3	32
CL-3 -- IL-6	10 : 2	31
Beas-2B -- Cox-2	10 : 2	29
Beas-2B -- IL-6	10 : 5	29

產物經 2 至 3% 之 agarose gel 進行電泳後，最後以 ethidium bromide 染色，然後再以紫外光數位顯像儀拍照紀錄。primer 序列如下列所示：

GAPDH :

Primer : S 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

AS 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

COX-2 :

Primer : S 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'

AS 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'

IL-6 :

Primer : S 5'-CTCTCACCTCTTCAGAACG-3'

AS 5'-ATTTGTGGTTGGGTCAGGG-3'

結果判讀如下所示：

GAPDH : 452 bp product

COX-2 : 304 bp product

IL-6 : 380 bp product

3. Semiquantitative PCR

將紫外光數位顯像儀拍照紀錄以數位化影像處理系統 (Densitometer, Alpha Imager 2000) 比較其相對亮度 (integrity density value, IDV)。最後，將所得之結果帶入下面公式以求得各組間之相對表現量 (以 GAPDH 作為參考，並將以 DMSO 之表)：

$$\text{Relative expression level} = \frac{\text{IDV}_{\text{target}} - \text{IDV}_{\text{background}}}{\text{IDV}_{\text{DMSO}} - \text{IDV}_{\text{background}}}$$

十、西方墨點分析法 (Western Blot)

1. 總蛋白質之製備

將 8×10^5 個細胞種於 6 cm^2 培養皿中，經 48 小時後，加藥處理適當時間，然後將細胞收下，加入 1 ml 新鮮配製的 lysis buffer (1% SDS、100mM Tris-HCl, pH8.0)，置於 94°C 之 dry bath 反應 25 分鐘，以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液即為總蛋白質，整個過程應保持在冰浴以免變性之蛋白再復性。取 $5\mu\text{l}$ 用作蛋白定量。分析時取一定量蛋白質加 $5\mu\text{l}$ sample buffer，置於 94°C 之 dry bath 反應 10 分鐘再使蛋白質變性，取出置於冰浴中而後 loading 之。

2. SDS - PAGE 的製備

本實驗選用 Hoefer 之器材製備 SDS-PAGE，其步驟如下：首先製備分離膠 10 % SDS gel，依序加入 7.4 毫升二次水、4 毫升 1.5M Tris pH8.8、4 毫升 29 : 1 acrylamide – bisacrylamide (40 %)、0.2 毫升 10% SDS、0.4 毫升 10 % ammonium persulfate (APS)、10 微升 TEMED 混合均勻後，然後緩緩加入 1.5mm 厚度的直立式電泳槽膠台座中，加到約佔膠台四分之三高度時，加水壓平分離膠並靜置 30~40 分鐘後，再開始製備 5 % 的上膠，依序加入二次水 3.54 毫升、0.5M Tris pH6.8 1.5 毫升、29:1 acrylamide-bis acrylamide 0.6 毫升、10% SDS 0.06 毫升、10% ammonium persulfate (APS) 0.3 毫升、TEMED 15 微升混合均勻後，緩緩加入直立式電泳槽膠台座中，然後將梳狀膠片 (comb)放入，待凝固後小心取出梳狀膠片，所留下的凹槽可做為樣品加入之用。

3. SDS-PAGE 之電泳操作及轉漬

將製備好的膠，先用 1x Tris-glycine running buffer 填滿，之後需先將 sample (cell extract 蛋白)以 95°C (denature)處理 5 分鐘後，再以每個 well loading 15 微克蛋白的樣品，先用 80 volt 跑 10 分鐘，接著繼續以 100 volt 跑，直到樣品接近底部即可停止。在膠快跑完的前 10 分鐘，準備一張大小恰當的 PVDF

membrane, 先用甲醇洗一下 (約 15 秒), 再換成清水振盪 5 分鐘。將膠卸下後, 同時與 PVDF membrane 及兩片濾紙一起浸在 transfer 緩衝溶液中, shaking 5 分鐘。利用半乾式轉漬槽以 150 mA 轉漬 150 分鐘, 將膠上的蛋白以負往正極的方式轉移到 PVDF membrane 上。將 transfer 好的 PVDF membrane 浸在含 5% 脫脂奶粉 (skim milk) 的 1 X-TTBS 緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.2 % Tween 20, 150 mM NaCl, PH 7.5) 中, 置於室溫下緩慢搖動 120 分鐘。在 blocking 的溶液中加入 Histidine (0.1 g/30 ml TTBS-milk), 以避免 nonspecific band 產生。再加入可辨識欲觀察之蛋白的一次抗體 anti-COX-2 (1/500 倍稀釋), anti- β -actin mouse (1/50000 倍稀釋), 於 4°C 下經過一夜振盪或室溫振盪 1.5 小時, 抗體皆由 1 X-TTBS-脫脂牛奶稀釋, 且在加入 1/100 的 2% sodium azide 後保存於 4°C, 可回收再利用。將處理完一次抗體之 PVDF membrane 用含 5% 脫脂奶粉的 1 X-TTBS 緩衝溶液清洗兩次, 再用 1 X-TTBS 緩衝溶液清洗兩次, 接著在室溫下用 1/5000X anti-mouse IgG 之二次抗體反應 1 小時。將處理完二次抗體之 PVDF membrane 用含 5% 脫脂奶粉的 1 X-TTBS⁺ 緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.5 % Tween 20, 300 mM NaCl, PH 7.5) 清洗兩次, 再用不含脫脂奶粉 1 X-TTBS⁺ 緩衝溶液清洗兩次。最後用 1 X-PBS 緩衝溶液

(0.8 % NaCl, 0.002 % KCl, 0.14 % Na₂HPO₄, 0.02 % KH₂PO₄)稍微洗一下，即可利用 E.C.L. 呈色劑，將經過抗體作用之蛋白影像呈現在 X-光底片上，約 5~30 分鐘。

十一、凝膠遲滯分析法 (Gel Retardation assay)

1. Probe 5'-end labeling

將兩股 NF- κ B oligonucleotides 鍵結成 double strand，經 65°C denature 10 分鐘，於室溫下靜置冷卻。取上述製備好的 NF- κ B probe (100ng) 加入含有 T4 kinase 及 [γ -³²P]-ATP 之混合液中於 37°C 水浴反應 30 分鐘，接著加入 100 μ l 2.5M NaOAc，於 70°C 反應 15 分鐘後冷卻至室溫，加入 1 μ l tRNA(6.0 mg/ml)及預冷之酒精，混勻後於 12,000 rpm 離心 20 分鐘。將上清液去除並於室溫下將殘留之酒精風乾，接著加入 200 μ l TE buffer 及 200 μ l phenol/chloroform (1:1) 混勻後於 12,000 rpm 離心 20 分鐘。將上清液移至另一新的 eppendorf，加入適量體積之 3M NaOAc 及預冷之酒精，經 12,000 rpm 離心 20 分鐘後，將上清液去除並於室溫下將殘留之酒精風乾，最後溶於適量體積之 TE buffer，並取 1 μ l 置於 Mini poly-Q vial 內，再加入閃爍計數液以 Beckman L-6500 Scintillation Counter 測定其放射性強度。NF- κ B oligonucleotide 的序列如下所示：

Probe : 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'

2. 細胞核蛋白之製備 (Qu *et al.*, 1995)

將加藥處理過之細胞以冰的 PBS 清洗兩次，將細胞收下來，加入 125 μ l 之 TD buffer (25mM Tris, 2mM MgCl₂) 並稍加混合後，置於冰上 5 分鐘，再加入 0.62 μ l 5% NP-40，並再置回冰上 2 分鐘，在 4°C、2000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，加入 60 μ l BL buffer (10mM Tris pH8.0, 0.4M LiCl, 20% glycerol) 並進行震盪，而後再置於冰上 5 分鐘，在 4°C、13000 rpm 離心 10 分鐘後收集上清液，並以 Bio-Rad protein assay 定量細胞核蛋白質含量。

3. gel retardation 分析 (Merchant *et al.*, 1993)

本實驗是在測定蛋白質受體 (protein receptor) 與 ³²P 標定的 DNA oligonucleotides 鍵結的能力。取 15 μ g 核蛋白加入 15 μ l HEGD buffer 及 2 μ l 1 μ g/ μ l poly d[I-C] 於室溫下反應 15 分鐘後，再加入 2.5 μ l (20 pg/ μ l) ³²P 標定的 NF- κ B oligonucleotides 混合後，於室溫下反應 15 分鐘，最後加入 5 μ l loading dye (40% glycerol, 0.1% bromophenol blue) 混合均勻後於 5 % acrylamide gel (29ml ddH₂O, 5ml 40 % acrylamide, 4 ml 10 x Tris-Glycine, 2 ml 100 % glycerol, 100 μ l APS, 50 μ l TEMED)，以 80V 電泳 3.5 小時後，將膠片烘乾並置於 X 光片上曝光，最後以數位化影像處理系統 (Densitometer, Alpha Imager 2000) 比較其相對亮度 (integrity density value, IDV)。

十二、統計分析

本研究之統計是以 SPSS 統計軟體對各臨床因子與 COX-2 蛋白表現及 8-oxo-dG DNA 鍵結物含量統計分析，以卡方檢定 (χ^2 -test) 方法分析。

本實驗結果皆經由三次以上個別的實驗結果得到平均值及標準偏差，而量化的結果再經由 Student's *t* test 加以統計分析，並檢測其差異性，當 *p* 值小於 0.05 代表具有統計上的意義。

伍、 結果與討論

一、 肺腫瘤組織中 8-OH-dG 鍵結物與 Cox-2 蛋白之表現

由過去的研究發現氧化性壓力 (oxidative stress) 可誘發 Cox-2 之表現 (Feng *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 2002)。為了探討肺腫瘤組織中 Cox-2 表現與氧化性壓力之相關性，以釐清肺腫瘤組織中 Cox-2 蛋白之表現是否為氧化性壓力所誘導？本研究以免疫組織化學染色 (immunohistochemistry) 分析 117 個非細小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer) 腫瘤組織中 (如 Table 1.所示)，氧化性壓力之生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物的生成量與 Cox-2 蛋白之表現量，結果如下：

1. 氧化性壓力生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物與肺腫瘤臨床因子之相關性

已知持續的氧化性壓力可誘發下游發炎反應相關基因的表現，並造成 DNA 傷害累積，而加速生物體的老化 (Ames *et al.*, 1993; Wiseman *et al.*, 1995; Poulsen *et al.*, 1998)。氧化性傷害在氧化性壓力參與之細胞癌化的過程中扮演著重要的角色，如 8-OH-dG DNA 鍵結物會誘使細胞於複製的過程中發生 G:C→T:A 之 transversion 基因突變 (Wood *et al.*, 1990; Shibutani *et al.*, 1991 ; Cheng *et al.*, 1992; Kamiya *et*

al., 1992)，因此近來有越來越多的研究以 DNA 之氧化性傷害作為癌症發生之風險指標，並藉以尋找、利用抗氧化物來預防癌症的發生 (Halliwell et al., 1998; Noroozi et al., 1998; Welch et al., 1999)。

為了解肺腫瘤組織中氧化性壓力與腫瘤發展之相關性。本實驗針對氧化性壓力之生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物進行免疫組織化學染色，觀察 117 個非細小細胞肺癌腫瘤組織中 8-OH-dG DNA 鍵結物的表現頻率，並採 SPSS 統計軟體分析組織中 8-OH-dG DNA 鍵結物之表現量與臨床腫瘤因子間之相關性。8-OH-dG DNA 鍵結物免疫組織化學染色的代表圖如 Fig. 5.所示，8-OH-dG DNA 鍵結物都表現於細胞核中。Table 2.的結果顯示，僅有 13 個腫瘤組織中沒有偵測到 8-OH-dG DNA 鍵結物，即 88.9 % (117 of 104) 的肺癌病人之腫瘤組織中，可偵測到 8-OH-dG DNA 鍵結物的存在。其中有高達 43.6 % 之肺腫瘤組織呈高度表現，亦即該腫瘤組織中有 50 % 以上之腫瘤細胞可偵測到 8-OH-dG DNA 鍵結物存在，而當分析 8-OH-dG DNA 鍵結物與臨床腫瘤因子間之相關性時發現，年齡、性別、腫瘤型態和吸菸習慣等，皆和 8-OH-dG DNA 鍵結物之表現無統計之相關性。雖未達統計之相關性，但仍可觀察到肺鱗狀上皮細胞癌腫瘤組織中 8-OH-dG DNA 鍵結物高度表現的頻率 (54.0 %, 27 of 50)，高於腺細胞癌組織 (31.5 %, 17 of 54)。而有趣的是，可觀察到在女性患者之肺腫瘤組織

中，可偵測到 8-OH-dG DNA 鍵結物的頻率，非但不低於抽菸之男性患者，且高度表現 8-OH-dG DNA 鍵結物的頻率反而較男性為高的現象。

過去已有研究指出，生物體的老化、紫外光的照射、細胞激素的刺激以及環境污染物如廚房油煙、香菸等暴露，皆會促進氧化性壓力發生，然而由 Table 2. 免疫組織化學染色的實驗結果，並無法觀察到氧化性壓力之生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物的表現量與年齡、性別、吸菸等臨床腫瘤因子有相關性，此外，過去已有研究指出吸菸量與 8-OH-dG DNA 鍵結物之形成量呈正相關性，然而在本研究的結果中，並無法觀察到此一現象，由此推測除吸菸外，可能還有其他重要的因子，參與台灣肺腫瘤組織中 8-OH-dG DNA 鍵結物之形成。已知活性氧自由基除會促進 8-OH-dG DNA 鍵結物的形成，進而發生 G:C→T:A 之 transversion 基因突變外，亦會造成 DNA 發生斷裂或與蛋白交叉結合 (cross-link) 以致突變發生。另外抗氧化物如 glutathion 和抗氧化酵素如, manganese superoxide dismutase (MnSOD)、catalase 和 glutathione peroxidase 為生物體抗氧化之重要機制，而 Ho 等人 (2001) 亦於肺腫瘤組織中偵測到 MnSOD 的表現量增加以及 catalase 表現量的減少，並推論當細胞內 MnSOD 之酵素活性增加而 catalase 的酵素活性降低時，會導致細胞內過氧化氫累積，進而造成氧化性壓力乃至

肺腫瘤之發展。此外，近來亦有許多氧化性傷害與腫瘤發展之相關研究，著重於探討參與修補氧化性傷害 8-OH-dG DNA 鍵結物之基因如 *hOGG1*、*hMTH1* 等與癌症發生之相關性。Arai 等人 (2002) 以低度氧化性壓力處理缺乏 *OGG1* 表現之小鼠，發現 8-OH-dG DNA 鍵結物在 *OGG1* 基因剔除之小鼠之堆積量較 *OGG1* 基因表現正常之對照組高出許多。Sugimura 等人 (1999) 以及 Le Marchand 等人 (2002) 的報告皆指出，*hOGG1* 之基因多形性呈 Cys/Cys 者，由於對 8-OH-dG DNA 鍵結物之修補能力較差，故較易罹患肺癌。此外，8-OH-dG DNA 鍵結物雖可能直接造成突變進而導致腫瘤的生成，然而其亦一直被視為氧化性壓力之生物指標，換言之油煙所誘發之氧化性壓力，應不僅止於造成基因體之傷害，更進一步地可誘發其他機轉而參與腫瘤的發展，如誘使發炎基因、抗凋亡基因以及參與細胞週期之基因表現。

2. Cox-2 蛋白的表現與肺腫瘤臨床因子之相關性

為了解肺腫瘤組織中 Cox-2 蛋白的表現與腫瘤形成之相關性。本實驗以免疫組織化學染色法偵測 100 個非細小細胞肺癌腫瘤組織中 Cox-2 蛋白的表現，以 SPSS 統計軟體分析肺腫瘤組織中，Cox-2 蛋白的表現與臨床因子間之相關性。Cox-2 蛋白免疫組織化學染色的代表圖如 Fig. 5，可觀察到 Cox-2 蛋白都表現於細胞質中。Table 3. 的

結果顯示，在肺腫瘤組織中 Cox-2 蛋白會大量表現，其表現率可高達 93.2 % (99 of 117)。且 56.4 % 之肺腫瘤組織可偵測到 Cox-2 蛋白呈高度表現，即腫瘤組織切片有 50 % 以上之腫瘤細胞有 Cox-2 蛋白表現。當比較 Cox-2 蛋白與腫瘤臨床因子之相關性時發現，Cox-2 蛋白的表現具有腫瘤形態的差異，即肺腺癌 Cox-2 蛋白表現頻率顯著高於肺鱗狀上皮細胞癌之腫瘤組織 (P=0.004)，這結果與過去之研究結果一致(Hida *et al.*, 1998 ; Wolff *et al.*, 1998)，因此 Cox-2 在肺腺癌的形成上扮演著重要的角色。然而 Cox-2 蛋白的表現與其他臨床因子如年齡、性別和吸菸習慣間皆無顯著之相關性，但仍可觀察到年齡大於 65 歲高度表現 Cox-2 蛋白的頻率 (63.5 %, 33 of 52) 高於年齡小於 65 歲者 (47.3 %, 26 of 55)。女性肺癌患者之腫瘤組織中 Cox-2 蛋白高度表現的頻率 (65.0 %, 26 of 40) 亦高於男性肺癌患者之腫瘤組織 (51.9 %, 40 of 77)，但二者都未達統計上之差異。

Hida 等人 (1998) 發現 Cox-2 蛋白的表現與年齡、性別等因子間均無顯著相關，但發現肺腺癌有較高之 Cox-2 蛋白的表現，而本研究亦觀察到相同結果，Wolff 等人 (1998) 的研究中雖未觀察到 Cox-2 蛋白的表現頻率和腫瘤形態之相關性，但卻發現肺腺癌 Cox-2 表現之腫瘤細胞對 Cox-2 抗體之反應較強，即肺腺癌細胞有較高之 Cox-2 蛋白表現。已知台灣不吸菸女性多為肺腺癌，且於本研究之結果，雖未

達統計之意義，但女性肺癌患者之 Cox-2 蛋白高度表現的頻率確實較男性為高 (65 % vs 51.9 %)。似乎可支持 Cox-2 可能在台灣不吸菸女性肺癌之形成過程中扮演著一定角色的推測。

3. Cox-2 蛋白的表現與氧化性壓力指標 8-OH-dG DNA 鍵結物之相關性

由 Table 4.的結果得知，無論氧化性壓力之生物指標 8-OH-dG DNA 鍵結物的表現高低與否，Cox-2 蛋白表現量之分布情況大多沒有任何的差異，換言之，在本實驗之樣本中 Cox-2 蛋白的表現與氧化性壓力之間，至少在 8-OH-dG 生物指標上，是不具有相關性的。但是為了解台灣不吸菸女性肺癌之 Cox-2 表現是否與 8-OH-dG DNA 鍵結物有關？進一步分析不吸菸女性肺癌患者腫瘤組織中 8-OH-dG DNA 鍵結物與 Cox-2 蛋白表現之相關性。由 Table 5.結果顯示在不抽菸女性患者肺腫瘤組織中，8-OH-dG DNA 鍵結物與 Cox-2 蛋白的表現有顯著之相關性 ($P = 0.042$)，其中 8-OH-dG DNA 鍵結物高度表現的樣本有 84.2 % (16 of 19)，可同時偵測到 Cox-2 高度表現，這或許是台灣女性肺癌患者因暴露較多烹調油煙所致，而引起肺腫瘤組織中 8-OH-dG DNA 鍵結物增加，並誘發 Cox-2 蛋白的大量表現。因此似乎可進一步支持烹調油煙暴露與不吸菸女性肺癌發生之流行病學結

果。已知吸菸會引起 8-OH-dG DNA 鍵結物之大量形成 (Preme et al., 1998)。當比較吸菸男性肺癌患者之 8-OH-dG 與 Cox-2 表現之相關性，以比較吸菸和油煙暴露對肺腫瘤組織中 8-OH-dG 形成之影響有何不同？由 Table 6. 結果顯示，男性吸菸肺癌患者的腫瘤組織中，8-OH-dG DNA 鍵結物與 Cox-2 蛋白之表現並無統計上之差異，無論 8-OH-dG DNA 鍵結物表現量高或低，皆有 53 % 左右之樣本可同時偵測到 Cox-2 蛋白的高度表現。換言之，在吸菸男性肺癌患者 Cox-2 蛋白與 8-OH-dG DNA 鍵結物的表現間並無相關性。因此推測烹調油煙之暴露對女性肺癌患者，在肺組織中 8-OH-dG 形成之貢獻度，較二手菸為重要。這似乎也呼應流行病學之研究，即油煙暴露與中國女性肺癌之相關性，但二手煙暴露與女性肺癌之相關性，則眾說紛紜 (Gao et al., 1987; Liu et al., 1993)。

已知氧化性壓力可誘發 Cox-2 的表現，而其他發炎因子如 IL-1 β 、LPS、TNF- α 等誘發 Cox-2 表現亦扮演著重要的角色。在台灣約有六成以上之男性肺癌患者有吸菸習慣，而女性則不到一成。又知暴露二手菸與烹調油煙均會造成氧化性壓力以及 Cox-2 蛋白表現。而本研究所取之男、女性患者的比例過於懸殊，如吸菸男性佔 46 %，遠較不吸菸男性 (19 %) 以及女性 (34 %) 為高，因而以所有樣本分析，無法觀察到氧化性壓力以及 Cox-2 蛋白表現的相關性。另外，已知氧化

性傷害所造成之鏈結物可誘發自體抗體的產生，Mooney 等人 (2001) 分析不同年齡以及抽菸習慣相似之男、女性受測者的血漿之抗氧化性傷害 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (HMdU) 之自體抗體 anti-HMdU 的效價，發現年齡低於 50 歲的女性對吸菸引起之 HMdU DNA 鏈結物形成之感受性較男性為高，作者推測雌性素可能影響此感受性。Proteggente 等人 (2002) 的研究報告指出，男、女性對於不同之氧化性傷害具有不同的感受性，例如女性對於 5-OH Cytosine 以及 5-OH Adenine 之感受性較男性為高，而男性對於 FAPy Guanine 之感受性則較女性為高。本研究之主要目標在探討油煙暴露，所引起之 DNA 氧化性傷害，是否會經由 NF- κ B 等訊號傳遞路徑，以誘發 Cox-2 和 IL-6 表現，進而參與不吸菸女性肺癌之形成？因此僅觀察不吸菸女性肺癌患者之腫瘤組織中 8-OH-dG DNA 鏈結物以及 Cox-2 蛋白表現之相關性，並和男性吸菸患者之結果做一比較，發現在女性不吸菸肺癌患者中 Cox-2 蛋白的表現與氧化性傷害 8-OH-dG 間，才具有顯著之相關性，在男性吸菸肺癌患者中則完全無關 ($P=0.944$)，因此油煙暴露引起之氧化性壓力，會經由誘發 Cox-2 蛋白的表現，參與不吸菸女性肺腺癌的形成。又由本研究室先前的研究可發現，油煙所誘發之氧化性壓力中以羥自由基和過氧化氫對於 Cox-2 的誘發最為重要 (Lin *et al.*, 2002)。因此推測油煙產生之羥自由基可能參與女性肺癌

8-OH-dG DNA 鍵結物，因而誘發較高之 Cox-2 表現，而促進肺腺癌之形成。

綜合上述研究結果可知，會造成氧化性壓力發生之環境因子眾多，然而在個體間造成之影響與傷害的程度卻多有不同。儘管經由本研究之實驗結果推論，台灣不吸菸女性肺癌患者，可能是由於長期受到烹調油煙之暴露所造成之氧化性壓力，以參與肺腺癌之形成。但油煙暴露所造成之氧化性傷害，其成因應不僅只於其組成之化合物如醛類所衍生之活性氧自由基，或當細胞受到刺激時所釋出之自由基，其他相關之生理機能如生物體之抗氧化系統、修補系統的完整性，甚至是在性別上對於氧化性傷害的感受性等之差異，皆可能在氧化性傷害形成的過程中扮演著某種角色。此外油煙暴露所誘發之氧化性壓力可促進下游基因的表現，而可能參與肺癌之形成。

二、COF 誘發 Cox-2 與 IL-6 之表現

由 Table 4.和 Table 5.可知在女性肺癌患者中 Cox-2 的高度表現與 8-OH-dG DNA 鍵結物之含量呈正相關性，但吸菸男性則不然。本研究室先前的研究指出烹調油煙處理肺腺癌細胞會產生 reactive oxygen

species (ROS), 造成 DNA 氧化性傷害, 而引起 Cox-2 的大量表現 (Lin *et al.*, 2002)。為了進一步釐清油煙如何參與肺癌的形成, 本研究比較油煙對於肺腫瘤細胞株以及非腫瘤氣管上皮細胞株之毒性, 以及 Cox-2 和已知可促進細胞抗凋亡反應之細胞激素 IL-6 的表現情形, 以了解油煙是否同樣經由 NF- κ B 訊號傳遞路徑而促進 IL-6 的表現?

1. COF 對台灣肺腺癌細胞 CL-3 與非腫瘤氣管上皮細胞 Beas-2B 之毒性分析

為了解油煙在何種處理時間與濃度對肺癌細胞以及正常肺上皮細胞不會造成細胞毒性, 以便進行 Cox-2 和 IL-6 基因表現之研究。本研究利用 MTT 細胞毒性分析了解細胞之存活率。Methylthiazol-tetrazolium bromide (MTT) 能通過細胞膜進入細胞內, 經由細胞內粒腺體之氧化還原酶的作用形成 Formazan, 而 Formazan 可溶於 DMSO 中並在 OD₅₇₀ 呈現最大吸光, 因此可藉由偵測 OD₅₇₀ 以得知細胞之存活率。在這次的實驗中, 將會導致細胞存活率低於 80 % 之劑量定義為具有細胞毒性。首先將 5×10^3 之 CL-3 細胞或 10^4 之 Beas-2B 細胞分盤種於 96-well 之培養皿中培養一天後, 以不同濃度之油煙處理不同時間, 以 MTT 細胞毒性試驗分析細胞之存活率。結果如 Fig. 6. (A) 所示, 就算以高劑量 (100 μ g/ml) 之油煙處理 CL-3

細胞 4 小時後，CL-3 細胞尚無顯著之細胞毒性產生，然而如 Fig. 6. (B) 所示，當以高劑量或相對低劑量之油煙 (50 $\mu\text{g/ml}$) 處理 Beas-2B 細胞後，Beas-2B 細胞之存活率會大幅下降，換言之，相較於對正常氣管上皮細胞所造成之毒性，肺腫瘤細胞對油煙具有較高的耐受性，因此以下的實驗中將分別以不同劑量的油煙處理 CL-3 以及 Beas-2B 細胞。

2. COF 誘發細胞 Cox-2 與 IL-6 mRNA 之表現

由本研究室先前的研究發現，油煙可經由促進細胞內氧化性壓力的發生而活化 Cox-2 的表現。已知 Cox-2 以及 interleukin-6 (IL-6) mRNA 的表現皆可經由 NF- κ B 訊號傳遞路徑所調控。過去研究發現 IL-6 可經由活化抗凋亡蛋白如 Mcl-1 的表現而參與腫瘤形成。因此以下實驗將以不同濃度之油煙，分別處理肺腺癌細胞株 CL-3 和正常氣管上皮細胞 Beas-2B 兩小時後，萃取、純化出經處理細胞之 RNA，並以分光比色計進行定量，再以 RT-PCR 的方式同時偵測 Cox-2/GAPDH 以及 IL-6/GAPDH mRNA 的表現。結果如 Fig. 7. 和 Fig. 8. 所示，以 Glutaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 的表現作為各組定量的內標，並和 DMSO 組進行比較，發現無論在 CL-3 或 Beas-2B 細胞中，Cox-2 以及 IL-6 mRNA 的表現皆會被油煙所誘發，在分別以 100 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 之油煙處理 CL-3 細胞後觀察 Cox-2

以及 IL-6 的表現量，發現 Cox-2 的表現量分別上升 15.7 和 5.5 倍，IL-6 的表現量則分別上升 12.8 和 7.4 倍。當以 50 $\mu\text{g/ml}$ 之油煙處理 Beas-2B 細胞後觀察 Cox-2 以及 IL-6 的表現量，發現二者在 Beas-2B 細胞中，被誘發的程度分別為 4.4 以及 4.5 倍。兩株細胞之 Cox-2 以及 IL-6 半定量 RT-PCR 的實驗結果以柱狀圖並列於 Fig. 9. 中。此外由於油煙暴露在腫瘤細胞或正常上皮細胞皆會誘發 Cox-2 和 IL-6 的表現，但腫瘤細胞對於油煙刺激的敏感性以及對於油煙產生之細胞毒性的耐受性較高，再者本實驗室先前的研究結果亦指出，台灣不吸菸女性肺癌患者腫瘤組織中 DNA 鍵結物含量雖高，但 *p53* 基因之突變率卻不高，因此推測在腫瘤發展的過程中，油煙所扮演之角色在腫瘤啟動階段 (tumor promotion stage) 之影響可能較起始階段 (initiation stage) 來的重要。而由 Fig. 10. 西方墨點法之實驗結果可知，在肺腺癌細胞 CL-3 中油煙暴露與 Cox-2 蛋白的表現呈劑量時間關係效應，亦驗證了經免疫組織化學染色法分析之結果所作出的推論，油煙可經由誘發 Cox-2 蛋白之表現，以參與不吸菸女性肺癌的形成。

由先前的研究以及本實驗之結果可知當細胞受到油煙的刺激，會造成細胞內氧化性壓力的持續累積以活化轉錄因子如 NF- κ B 等，而促進下游基因如 Cox-2 以及 IL-6 的表現。而在 Quay 等人 (1998) 的研究中亦有類似的發現，空氣污染微粒可經由促進 Beas-2B 細胞內之氧

化性壓力，而活化 NF- κ B 訊號傳遞路徑，進而誘導 IL-6 之表現。在過去已有研究發現，除了與肺腺癌間具有顯著之相關性外，肺腫瘤組織中 Cox-2 的高度表現，會促進癌細胞之轉移並降低患者之預後，此外 Cox-2 的大量表現亦可增加肺癌細胞株抗凋亡的能力，而透過 Cox-2 催化而生成之下游產物 PGE₂ 可誘發 IL-10 並抑制 IL-12 的表現，進而影響免疫系統抗腫瘤發展之能力。已知 IL-6 之正常生理功能為促進免疫系統之分化，如由 B 細胞分化為漿細胞 (plasma cell)、以及 CD4⁺ T 細胞分化為 T helper 1/2 細胞的過程。但先前研究發現肺癌、腎細胞癌、卵巢癌和攝護腺癌患者之血清中，皆可高度偵測到 IL-6 的分泌量增加 (Miki *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1990; Borsellino *et al.*, 1995; Yanagawa *et al.*, 1995)。又發現 IL-6 具有促進細胞抗凋亡之能力，Kuo 等人 (2001) 以及 Wei 等人 (2001) 指出 IL-6 可經由 PI3K/Akt 訊號傳遞路徑以誘發細胞中抗凋亡蛋白 Mcl-1 表現，進而抑制由 H₂O₂ 以及 UV 光所誘發之細胞凋亡。而 Puthier 等人 (1999) 和 Spets 等人 (2002) 則進一步指出，IL-6 可同時經由誘發抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-x_L 和 Mcl-1 的表現，並抑制凋亡蛋白如 Bax 的表現，以促進腫瘤細胞抗凋亡之能力。Tai 等人 (1997) 以及 Lahiri 等人 (2001) 指出，IL-6 可促進骨髓母細胞以及氣管平滑肌細胞 Cox-2 表現，而 Hinson 等人 (1996)、Fiebich (2001) 等人與 Williams J.A. 和 Shacter E. (1997) 指

出，Cox-2 可經由下游產物 PGE₂ 而誘發 IL-6 之表現。當 DNA 受到氧化性傷害時，會造成肺細胞基因之不穩定性 (Zienolddiny *et al.*, 2002)，且經由脂質過氧化物所誘發的氧化性傷害，可促進細胞轉形 (Takabe *et al.*, 2001)。綜合上述研究可發現，當細胞暴露到油煙，不但會造成 PAH 類 DNA 鍵結物之傷害外，細胞內、外發生之氧化性傷害以及下游基因如 Cox-2、IL-6 的大量表現所造成之影響，可能較 PAH-DNA 鍵結物之影響為大，這個推測可由台灣女性肺癌患者 *p53* 基因突變之頻率以及突變位置大多與 PAH-DNA 鍵結物無關之結果所支持 (Cheng, 2002)。

3. COF 誘發 CL-3 細胞 Cox-2 表現之可能參與之訊號路徑

3.1 NF-κB 訊號傳遞路徑

根據免疫組織化學染色的實驗結果，我們推論不吸菸女性會由於受到油煙暴露所引起之氧化性壓力，而誘發 Cox-2 的表現，可能參與肺腺癌之形成。由 Fig. 9 之比較可發現，無論在 CL-3 細胞或 Beas-2B 細胞中，COF 誘發相同程度的 Cox-2 以及 IL-6 之表現，又知氧化性壓力可活化 NF-κB 訊號傳遞路徑，且 Cox-2 以及 IL-6 的表現，會經由 NF-κB 訊號傳遞路徑而被活化，因此為確定 NF-κB 訊號傳遞路徑，是否參與了油煙誘發 Cox-2 以及 IL-6 表現的過程，故以油煙處理 CL-3

細胞不同時間後，將核蛋白分離出來，並以 EMSA 分析 NF- κ B 與 Cox-2 轉錄啟動子之結合能力，結果如 Fig. 11. 之 lane 1—lane 5 所示，細胞核內的 NF- κ B 會隨著時間而增加，而與啟動子之結合能力增加，而在 lane 4 中也就是第 1.5 個小時能達到最高之結合能力，因此推測油煙會經由 NF- κ B 訊號傳遞路徑，促進下游基因 Cox-2 以及 IL-6 的表現。已知 BaP 為油煙中主要之多環芳香煙 (Chiang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000)，且 BaP 可誘發口腔上皮細胞以及血管平滑肌細胞 Cox-2 的大量表現 (Kelley *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2000)，而 Yan 等人指出 BaP 同樣是經由誘發細胞內氧化性壓力，而造成 Cox-2 基因的表現。本研究室先前的研究發現，油煙誘發人類肺腺癌 CL-3 細胞之 Cox-2 的表現，卻無法以與油煙內相當濃度之 BaP 來解釋。又有研究發現煎魚油煙中所含之醛類化合物，會增強 NF- κ B 和 AP-1 轉錄因子結合至啟動子 (Roman *et al.*, 2000)，因此 Lin 等人 (2002) 以自由基捕捉劑、抗氧化劑和 COF 共同處理細胞後，發現油煙可誘發 CL-3 細胞產生羥自由基和超氧陰離子等活性氧以活化 NF- κ B 訊號傳遞路徑。由上述以及本研究之結果可進一步推論，油煙所誘發之氧化性壓力，可經由活化 NF- κ B 訊號傳遞路徑，促進 Cox-2 以及 IL-6 的表現。而此推測或許可經由以 NF- κ B 之抑制劑和油煙共同處理細胞後做更進一步的驗證。

3.2 MAPKs 訊號傳遞路徑

已知 MAPKs 訊號傳遞路徑亦為誘發 Cox-2 表現之重要路徑，且 MAPKs 訊號傳遞路徑又可分為 ERK1/2、p38/MAPK 以及 JNK/SAPK 等三條路徑，由過去的研究發現，氧化性壓力主要經由 p38/MAPK 與 ERK1/2 兩條路徑造成 Cox-2 表現。在以下的實驗中，先以不含血清之 RPMI 培養 CL-3 細胞一小時後，外加 p38 之抑制劑 SB203580 或 MEK 之抑制劑 PD98059 處理一小時，最後以 50 μ g/ml 油煙處理一定時間後萃取總蛋白，以西方墨點法觀察 Cox-2 蛋白的表現。結果如 Fig. 12.所示，發現 SB203580 可有效地抑制 Cox-2 蛋白的表現，而 PD98059 在處理 2 小時，雖可抑制 COF 誘發 Cox-2 蛋白的表現，但經 4 小時之共同處理後，Cox-2 蛋白之表現會回復，因此推測 p38/MAPK 以及 ERK1/2/MEK 訊號傳遞路徑皆參與了油煙誘發 Cox-2 蛋白表現的過程，然而油煙刺激 CL-3 細胞誘發 Cox-2 蛋白表現，主要是經由 p38/MAPK 訊號傳遞路徑。

已知 MAPKs 訊號傳遞路徑在調控原致癌基因 (proto-oncogene) 表現的過程中，扮演著重要的角色 (Pages *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1999; Cobb *et al.*, 1999)。由過去的研究可發現 p38/MAPK 訊號傳遞路徑，可經由前發炎因子如 IL-1、TNF- α 、LPS 等刺激而活化，參與細胞骨架重整 (Guay *et al.*, 1997)、血小板凝集 (Saklatvala *et al.*, 1996)

和促進發炎反應相關蛋白如 Cox-2、IL-1、IL-6、TNF- α 、matrix metalloproteinases (MMPs)以及 iNOS 之基因表現 (Lee *et al.*, 1994; Ridly *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 1997)，而誘發發炎反應與腫瘤發展。而 ERK1/2 訊號傳遞路徑則可被氧化性壓力、生長因子、細胞激素以及 phorbol ester 所活化，進而促進細胞之增生與分化 (Adderley S. R. and Fitzgerald D. J., 1999; Davis *et al.*, 1993; Boulton *et al.*, 1991)。綜合上述研究結果可推知，當 MAPKs 訊號傳遞路徑被油煙所活化後，不僅會造成 Cox-2 蛋白的表現量增加，而抑制生物體之抗腫瘤免疫反應以及促進癌細胞侵襲、轉移之能力，亦可促進腫瘤細胞之增生和抗凋亡的能力並促使發炎反應的發生，從而加速肺腺癌之惡化 (malignancy)。

此外，儘管於過去的研究中 NF- κ B 和 MAPKs 訊號傳遞路徑多被分開來討論，然而已知 MAPKs 需經由磷酸化下游訊息傳遞分子，而將訊息傳導下去，且 NF- κ B 訊號傳遞路徑中 I κ B (inhibitor of NF- κ B) 之磷酸化與降解，是造成 NF- κ B 訊號路徑活化之關鍵步驟，因此在本實驗中先以不含血清之培養基於 37°C、5%CO₂ 的環境下培養一個小時後，再分別以不添加或添加 p38/MAPK 之抑制劑 SB203680 或 MEK 之抑制劑 PD98059 之培養基，預先處理 CL-3 細胞一小時，最後以 50 μ g/ml 之油煙共同處理細胞 1.5 個小時後，萃取核蛋白，並以

EMSA 偵測 NF- κ B 轉錄因子結合至啟動子之能力是否改變？結果如 Fig. 11.所示，相較於 lane 4 僅以油煙處理 1.5 小時之結果，lane 6、lane 7 為先分別以 p38/MAPK 之抑制劑 SB203580 以及 ERK/MEK 之抑制劑 PD98059 處理細胞一小時後，再以油煙共同處理 1.5 個小時之結果，發現 SB203580 以及 PD98059 皆可有效抑制油煙誘發 NF- κ B 活化，轉移至細胞核內。換言之，油煙需透過 MAPKs 以活化 NF- κ B 訊號傳遞路徑。而為了進一步地驗證此結果，我們將來會進行 dominant negative p38 或 MEK 轉染至細胞中，再以油煙進行處理並偵測 I κ B α 磷酸化、降解以及 NF- κ B 之轉錄活性之實驗，若 MAPKs 確實參與了 NF- κ B 之活化，當以油煙處理轉染以 dominant negative p38 或 MEK 之 CL-3 細胞，可發現 I κ B α 之磷酸化、降解以及 NF- κ B 之活性將受到抑制，且 Cox-2 之表現亦將受到抑制。因此油煙暴露主要影響訊號路徑之探討，將有助解釋油煙是如何參與了肺癌之發展，進而減少油煙引起台灣女性肺癌之發生。

陸、參考文獻

- 王瑾 和 胡紹明。1992a。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，26，86-91
- 王瑾 和 胡紹明。1992b。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.
- 陸坤泰 和 張登斌 1992 台灣的肺癌 台灣醫誌 91: s1-s6.
- 楊森智。1997。油煙萃取物中主要致突變物之鑑定及其對台灣肺腺癌 CL-3 細胞造成 DNA 傷害之研究。私立中山醫學院生化研究所 碩士論文
- 廖國盟 和 陳建仁。1997。肺癌之流行病學特徵、危險因子及防治策略。中華公共衛生學會雜誌，16(5)，375-395
- 鄭雅文。2002。環境致癌物暴露和人類乳突瘤病毒感染與台灣女性肺癌形成之研究。中山醫學大學醫學研究所 博士論文
- Achiwa, H., Y. Yatabe, et al. (1999). "Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas." *Clin Cancer Res* 5(5): 1001-5.
- Adderley, S. R. and D. J. Fitzgerald (1999). "Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2." *J Biol Chem* 274(8): 5038-46.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17): 7915-22.
- Arai, T., V. P. Kelly, et al. (2002). "High accumulation of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, in Mmh/Ogg1 deficient mice by chronic oxidative stress." *Carcinogenesis* 23(12): 2005-10.
- Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." *N Engl J Med* 336(15): 1066-71.
- Berg, I., E. Overvik, et al. (1990). "Effect on cooking time on mutagen formation in smoke, crust and pan residue from pan-broiled pork." *Food Chem Toxicol* 28(6): 421-6.
- Berg, I., E. Overvik, et al. (1988). "Mutagenic activity in smoke formed

- during broiling of lean pork at 200, 250 and 300 degrees C." *Mutat Res* 207(3-4): 199-204.
- Borsellino, N., A. Belldegrun, et al. (1995). "Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines." *Cancer Res* 55(20): 4633-9.
- Boulton, T. G., S. H. Nye, et al. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." *Cell* 65(4): 663-75.
- Brabender, J., J. Park, et al. (2002). "Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer." *Ann Surg* 235(3): 440-3.
- Brownson, R. C., J. C. Chang, et al. (1992). "Gender and histologic type variations in smoking-related risk of lung cancer." *Epidemiology* 3(1): 61-4.
- Brownson, R. C., T. S. Loy, et al. (1995). "Lung cancer in nonsmoking women. Histology and survival patterns." *Cancer* 75(1): 29-33.
- Buckman, S. Y., A. Gresham, et al. (1998). "COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer." *Carcinogenesis* 19(5): 723-9.
- Burdon, R. H. (1995). "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation." *Free Radic Biol Med* 18(4): 775-94.
- Cavalieri, E. L. and E. G. Rogan (1992). "The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation." *Pharmacol Ther* 55(2): 183-99.
- Chen, C. J., H. Y. Wu, et al. (1990). "Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan." *Anticancer Res* 10(4): 971-6.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, et al. (1992). "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions." *J Biol Chem* 267(1): 166-72.
- Cheng, Y. W., L. L. Hsieh, et al. (2001). "Gender difference in DNA adduct levels among nonsmoking lung cancer patients." *Environ Mol Mutagen* 37(4): 304-10.
- Cherng, S. H., K. H. Huang, et al. (2002). "Human 8-oxoguanine DNA

- glycosylase 1 mRNA expression as an oxidative stress exposure biomarker of cooking oil fumes." *J Toxicol Environ Health A* 65(3-4): 265-78.
- Cherpillod, P. and P. A. Amstad (1995). "Benzo[a]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes." *Mol Carcinog* 13(1): 15-20.
- Chiang, T. A., P. F. Wu, et al. (1998). "Prevention of exposure to mutagenic fumes produced by hot cooking oil in Taiwanese kitchens." *Environ Mol Mutagen* 31(1): 92-6.
- Chiang, T. A., P. F. Wu, et al. (1999). "Identification of carcinogens in cooking oil fumes." *Environ Res* 81(1): 18-22.
- Chiang, T. A., P. F. Wu, et al. (1997). "Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbon content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan." *Mutat Res* 381(2): 157-61.
- Cole, P., R. Hoover, et al. (1972). "Occupation and cancer of the lower urinary tract." *Cancer* 29(5): 1250-60.
- Colombo, M. P., M. Vagliani, et al. (1996). "Amount of interleukin 12 available at the tumor site is critical for tumor regression." *Cancer Res* 56(11): 2531-4.
- Cobb, M. H. (1999). "MAP kinase pathways." *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4): 479-500.
- Correa, P., L. W. Pickle, et al. (1983). "Passive smoking and lung cancer." *Lancet* 2(8350): 595-7.
- Crofford, L. J., B. Tan, et al. (1997). "Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes." *Arthritis Rheum* 40(2): 226-36.
- Chung T. Y., Eiserich J. P., and Shibamoto T., 1993 Volatile compounds identified in headspace samples of peanut oil heated under temperatures ranging from 50 to 200°C. *J Agri. Food Chem.* 41: 1467-1470
- D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, et al. (1993). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells." *J Exp Med* 178(3): 1041-8.

- Davis, R. J. (1993). "The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." *J Biol Chem* 268(20): 14553-6.
- Dean, J. L., M. Brook, et al. (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes." *J Biol Chem* 274(1): 264-9.
- Dickson, R. I. (1981). "Nasopharyngeal carcinoma: an evaluation of 209 patients." *Laryngoscope* 91(3): 333-54.
- Dipple, A., M. A. Pigott, et al. (1987). "Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA." *Nature* 327(6122): 535-6.
- Dubrow, R. and D. H. Wegman (1984). "Cancer and occupation in Massachusetts: a death certificate study." *Am J Ind Med* 6(3): 207-30.
- Dunn, B. P. and H. F. Stich (1986). "³²P-postlabelling analysis of aromatic DNA adducts in human oral mucosal cells." *Carcinogenesis* 7(7): 1115-20.
- Eberhart, C. E., R. J. Coffey, et al. (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." *Gastroenterology* 107(4): 1183-8.
- Eckmann, L., W. F. Stenson, et al. (1997). "Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production." *J Clin Invest* 100(2): 296-309.
- Efrati, E., G. Tocco, et al. (1999). "'Action-at-a-distance" mutagenesis. 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine causes base substitution errors at neighboring template sites when copied by DNA polymerase beta." *J Biol Chem* 274(22): 15920-6.
- Endo, T., F. Ogushi, et al. (1995). "Induction of cyclooxygenase-2 is responsible for interleukin-1 beta-dependent prostaglandin E2 synthesis by human lung fibroblasts." *Am J Respir Cell Mol Biol* 12(3): 358-65.
- Everson, R. B., E. Randerath, et al. (1986). "Detection of smoking-related covalent DNA adducts in human placenta." *Science* 231(4733): 54-7.

- Feng, L., Y. Xia, et al. (1995). "Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide." *J Clin Invest* 95(4): 1669-75.
- Fiebich, B. L., S. Schleicher, et al. (2001). "Mechanisms of prostaglandin E2-induced interleukin-6 release in astrocytes: possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C." *J Neurochem* 79(5): 950-8.
- Gallois, C., A. Habib, et al. (1998). "Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2." *J Biol Chem* 273(36): 23183-90.
- Gao, Y. T., W. J. Blot, et al. (1987). "Lung cancer among Chinese women." *Int J Cancer* 40(5): 604-9.
- Ger, L. P., S. H. Liou, et al. (1992). "[Risk factors of lung cancer]." *J Formos Med Assoc* 91 Suppl 3: S222-31.
- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.
- Guan, Z., L. D. Baier, et al. (1997). "p38 mitogen-activated protein kinase down-regulates nitric oxide and up-regulates prostaglandin E2 biosynthesis stimulated by interleukin-1beta." *J Biol Chem* 272(12): 8083-9.
- Guan, Z., S. Y. Buckman, et al. (1998). "Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells." *J Biol Chem* 273(44): 28670-6.
- Guan, Z., S. Y. Buckman, et al. (1998). "Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* 273(21): 12901-8.
- Gupta, R. C. and K. Earley (1988). "32P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures." *Carcinogenesis* 9(9): 1687-93.
- Halliwell, B. (1998). "Can oxidative DNA damage be used as a

- biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies." *Free Radic Res* 29(6): 469-86.
- Handel-Fernandez, M. E., X. Cheng, et al. (1997). "Down-regulation of IL-12, not a shift from a T helper-1 to a T helper-2 phenotype, is responsible for impaired IFN-gamma production in mammary tumor-bearing mice." *J Immunol* 158(1): 280-6.
- Harris, C. C. (1991). "Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s." *Cancer Res* 51(18 Suppl): 5023s-5044s.
- Hida, T., Y. Yatabe, et al. (1998). "Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas." *Cancer Res* 58(17): 3761-4.
- Hinson, R. M., J. A. Williams, et al. (1996). "Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 4885-90.
- Hollenbach, S., A. Dhenaut, et al. (1999). "Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis." *Carcinogenesis* 20(9): 1863-8.
- Huang, M., S. Sharma, et al. (1996). "Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production." *J Immunol* 157(12): 5512-20.
- Huang, M., M. Stolina, et al. (1998). "Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production." *Cancer Res* 58(6): 1208-16.
- Huang, M., J. Wang, et al. (1995). "Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern." *Cancer Res* 55(17): 3847-53.
- Hughes, N. C., W. Pfau, et al. (1993). "Covalent binding of polycyclic aromatic hydrocarbon components of coal tar to DNA in mouse skin." *Carcinogenesis* 14(1): 135-44.

- Hwang, D., D. Scollard, et al. (1998). "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer." *J Natl Cancer Inst* 90(6): 455-60.
- Inoue, H. and T. Tanabe (1998). "Transcriptional role of the nuclear factor kappa B site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 244(1): 143-8.
- Inoue, H., C. Yokoyama, et al. (1995). "Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element." *J Biol Chem* 270(42): 24965-71.
- Jeffrey, A. M., K. W. Jennette, et al. (1976). "Letter: Benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: structure of a benzo[a]pyrenetetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct." *J Am Chem Soc* 98(18): 5714-5.
- Jeffrey, A. M., I. B. Weinstein, et al. (1977). "Structures of benzo(a)pyrene--nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants." *Nature* 269(5626): 348-50.
- Ji, C., C. A. Rouzer, et al. (1998). "Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde." *Carcinogenesis* 19(7): 1275-83.
- Jobin, C., O. Morteau, et al. (1998). "Specific NF-kappaB blockade selectively inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells." *Immunology* 95(4): 537-43.
- Jones, D. A., D. P. Carlton, et al. (1993). "Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines." *J Biol Chem* 268(12): 9049-54.
- Kamiya, H., K. Miura, et al. (1992). "c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions." *Cancer Res* 52(12): 3483-5.
- Kelley, D. J., J. R. Mestre, et al. (1997). "Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells." *Carcinogenesis* 18(4): 795-9.

- Ko, Y. C., L. S. Cheng, et al. (2000). "Chinese food cooking and lung cancer in women nonsmokers." *Am J Epidemiol* 151(2): 140-7.
- Ko, Y. C., C. H. Lee, et al. (1997). "Risk factors for primary lung cancer among non-smoking women in Taiwan." *Int J Epidemiol* 26(1): 24-31.
- Kondo, S., S. Toyokuni, et al. (1999). "Persistent oxidative stress in human colorectal carcinoma, but not in adenoma." *Free Radic Biol Med* 27(3-4): 401-10.
- Kondo, S., S. Toyokuni, et al. (2000). "Overexpression of the hOGG1 gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA." *Clin Cancer Res* 6(4): 1394-400.
- Koo, L. C. and J. H. Ho (1990). "Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers." *Int J Epidemiol* 19 Suppl 1: S14-23.
- Kumagai, T., Y. Kawamoto, et al. (2000). "4-hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* 273(2): 437-41.
- Kung, I. T., K. F. So, et al. (1984). "Lung cancer in Hong Kong Chinese: mortality and histological types, 1973-1982." *Br J Cancer* 50(3): 381-8.
- Kuo, M. L., S. E. Chuang, et al. (2001). "The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6." *Oncogene* 20(6): 677-85.
- Lahiri, T., J. D. Laporte, et al. (2001). "Interleukin-6 family cytokines: signaling and effects in human airway smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(6): L1225-32.
- Le Marchand, L., T. Donlon, et al. (2002). "Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(4): 409-12.
- Lee, C. H., Y. C. Ko, et al. (2000). "Lifetime environmental exposure to tobacco smoke and primary lung cancer of non-smoking Taiwanese women." *Int J Epidemiol* 29(2): 224-31.
- Li, S., D. Pan, et al. (1994). "Analysis of polycyclic aromatic

- hydrocarbons in cooking oil fumes." *Arch Environ Health* 49(2): 119-22.
- Lin, S. Y., S. J. Tsai, et al. (2002). "Protection by Quercetin Against Cooking Oil Fumes-Induced DNA Damage in Human Lung Adenocarcinoma CL-3 Cells: Role of COX-2." *Nutr Cancer* 44(1): 95-101.
- Liu, Q., A. J. Sasco, et al. (1993). "Indoor air pollution and lung cancer in Guangzhou, People's Republic of China." *Am J Epidemiol* 137(2): 145-54.
- Lofroth, G., C. Stensman, et al. (1991). "Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and incense burning." *Mutat Res* 261(1): 21-8.
- Lubin, J. H. and W. J. Blot (1984). "Assessment of lung cancer risk factors by histologic category." *J Natl Cancer Inst* 73(2): 383-9.
- Manchester, D. K., A. Weston, et al. (1988). "Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in human placenta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 9243-7.
- Marnett, L. J. (1990). "Prostaglandin synthase-mediated metabolism of carcinogens and a potential role for peroxy radicals as reactive intermediates." *Environ Health Perspect* 88: 5-12.
- Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." *Mutat Res* 424(1-2): 83-95.
- McCann, J., E. Choi, et al. (1975). "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(12): 5135-9.
- Mestre, J. R., K. Subbaramaiah, et al. (1997). "Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells." *Cancer Res* 57(14): 2890-5.
- Miki, S., M. Iwano, et al. (1989). "Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas." *FEBS Lett* 250(2): 607-10.
- Mitchell, J. A., M. G. Belvisi, et al. (1994). "Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone." *Br J Pharmacol* 113(3): 1008-14.

- Moller, P., H. Wallin, et al. (1996). "Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors." *Chem Biol Interact* 102(1): 17-36.
- Mooney, L. A., F. P. Perera, et al. (2001). "Gender differences in autoantibodies to oxidative DNA base damage in cigarette smokers." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(6): 641-8.
- Moore, K. W., A. O'Garra, et al. (1993). "Interleukin-10." *Annu Rev Immunol* 11: 165-90.
- Nabioullin, R., S. Sone, et al. (1994). "Induction mechanism of human blood CD8+ T cell proliferation and cytotoxicity by natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12)." *Jpn J Cancer Res* 85(8): 853-61.
- Nastala, C. L., H. D. Edington, et al. (1994). "Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production." *J Immunol* 153(4): 1697-706.
- Neurath, M. F., C. Becker, et al. (1998). "Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut." *Gut* 43(6): 856-60.
- Noroozi, M., W. J. Angerson, et al. (1998). "Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes." *Am J Clin Nutr* 67(6): 1210-8.
- Pages, G., J. Milanini, et al. (2000). "Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade." *Ann N Y Acad Sci* 902: 187-200.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* 18(49): 6853-66.
- Phillips, D. H., A. Hewer, et al. (1990). "Smoking and DNA damage in cervical cells." *Lancet* 335(8686): 417.
- Phillips, D. H., A. Hewer, et al. (1988). "Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking." *Nature* 336(6201): 790-2.
- Phillips, D. H., B. Schoket, et al. (1990). "Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells." *Int J Cancer* 46(4): 569-75.
- Poulsen, H. E., H. Prieme, et al. (1998). "Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion." *Eur J Cancer Prev* 7(1): 9-16.

- Preme, H., H. E. Poulsen, et al. (1998). "Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion." *Carcinogenesis* 19(2): 347-51.
- Proteggente, A. R., T. G. England, et al. (2002). "Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals." *Free Radic Res* 36(2): 157-62.
- Puthier, D., S. Derenne, et al. (1999). "Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells." *Br J Haematol* 107(2): 392-5.
- Qu, Y. H., G. X. Xu, et al. (1992). "Genotoxicity of heated cooking oil vapors." *Mutat Res* 298(2): 105-11.
- Quay, J. L., W. Reed, et al. (1998). "Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kappaB activation." *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(1): 98-106.
- Ridley, S. H., J. L. Dean, et al. (1998). "A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA." *FEBS Lett* 439(1-2): 75-80.
- Ridley, S. H., S. J. Sarsfield, et al. (1997). "Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels." *J Immunol* 158(7): 3165-73.
- Roggeband, R., A. P. Wolterbeek, et al. (1993). "Comparative ³²P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene--DNA adducts formed in vitro upon activation of benzo[a]pyrene by human, rabbit and rodent liver microsomes." *Carcinogenesis* 14(9): 1945-50.
- Roman, J., A. Gimenez, et al. (2000). "Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells." *J Biol Chem* 275(19): 14684-90.
- Roshak, A. K., J. R. Jackson, et al. (1996). "Manipulation of distinct NFkappaB proteins alters interleukin-1beta-induced human rheumatoid synovial fibroblast prostaglandin E2 formation." *J Biol Chem* 271(49): 31496-501.
- Sano, H., Y. Kawahito, et al. (1995). "Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer." *Cancer Res* 55(17): 3785-9.
- Scherle, P. A., E. A. Jones, et al. (1998). "Inhibition of MAP kinase kinase

- prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes." *J Immunol* 161(10): 5681-6.
- Schmedtje, J. F., Jr., Y. S. Ji, et al. (1997). "Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells." *J Biol Chem* 272(1): 601-8.
- Schneiderman, M. A., D. L. Davis, et al. (1989). "Lung cancer that is not attributable to smoking." *Jama* 261(18): 2635-6.
- Schocket, B., I. Horkay, et al. (1990). "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." *J Invest Dermatol* 94(2): 241-6.
- Sharma, R. A., A. Gescher, et al. (2001). "Cyclooxygenase-2, malondialdehyde and pyrimidopurinone adducts of deoxyguanosine in human colon cells." *Carcinogenesis* 22(9): 1557-60.
- Sharma, S., M. Stolina, et al. (1999). "T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function." *J Immunol* 163(9): 5020-8.
- Sharma, S., M. Stolina, et al. (2003). "Tumor Cyclooxygenase 2-dependent Suppression of Dendritic Cell Function." *Clin Cancer Res* 9(3): 961-8.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1991). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* 349(6308): 431-4.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1991). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* 349(6308): 431-4.
- Shields, P. G., G. X. Xu, et al. (1995). "Mutagens from heated Chinese and U.S. cooking oils." *J Natl Cancer Inst* 87(11): 836-41.
- Smith, D. R., S. L. Kunkel, et al. (1994). "Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma." *Am J Pathol* 145(1): 18-25.
- Smith, W. L., D. L. DeWitt, et al. (2000). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." *Annu Rev Biochem* 69: 145-82.
- Spets, H., T. Stromberg, et al. (2002). "Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal

- plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival." *Eur J Haematol* 69(2): 76-89.
- Stolina, M., S. Sharma, et al. (2000). "Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis." *J Immunol* 164(1): 361-70.
- Su, B. and M. Karin (1996). "Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression." *Curr Opin Immunol* 8(3): 402-11.
- Subbaramaiah, K., W. J. Chung, et al. (1998). "Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells." *J Biol Chem* 273(34): 21875-82.
- Subbaramaiah, K., N. Telang, et al. (1996). "Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells." *Cancer Res* 56(19): 4424-9.
- Sugimura, H., T. Kohno, et al. (1999). "hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(8): 669-74.
- Swedmark, S., L. Romert, et al. (1992). "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(10): 1719-23.
- Tai, H., C. Miyaura, et al. (1997). "Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation." *Endocrinology* 138(6): 2372-9.
- Takabe, W., E. Niki, et al. (2001). "Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein." *Carcinogenesis* 22(6): 935-41.
- Takeoka G, Perrino C. Jr., and Buttery R., 1996 Volatile Constituents of used frying oils
- Thomson, S., L. C. Mahadevan, et al. (1999). "MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction." *Semin Cell Dev Biol* 10(2): 205-14.
- Toyokuni, S. (1999). "Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology." *Pathol Int* 49(2): 91-102.

- Toyokuni, S., K. Okamoto, et al. (1995). "Persistent oxidative stress in cancer." *FEBS Lett* 358(1): 1-3.
- Tsurudome, Y., T. Hirano, et al. (1999). "Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles." *Carcinogenesis* 20(8): 1573-6.
- van Schooten, F. J., M. J. Hillebrand, et al. (1990). "Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients." *Carcinogenesis* 11(9): 1677-81.
- Vermeulen, L., G. De Wilde, et al. (2003). "Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)." *Embo J* 22(6): 1313-24.
- Wallach, D., E. E. Varfolomeev, et al. (1999). "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." *Annu Rev Immunol* 17: 331-67.
- Wang, X., C. Chen, et al. (1998). "[Detection of sister chromatic exchange in workers exposed to coal tar pitch and to coke oven volatiles]." *Wei Sheng Yan Jiu* 27(4): 220-1.
- Watson, J. M., J. L. Sensintaffar, et al. (1990). "Constitutive production of interleukin 6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures." *Cancer Res* 50(21): 6959-65.
- Wei, L. H., M. L. Kuo, et al. (2001). "The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway." *Oncogene* 20(41): 5799-809.
- Welch, R. W., E. Turley, et al. (1999). "Dietary antioxidant supplementation and DNA damage in smokers and nonsmokers." *Nutr Cancer* 34(2): 167-72.
- Wiese, F. W., P. A. Thompson, et al. (2001). "Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2." *Carcinogenesis* 22(1): 5-10.
- Williams, J. A. and E. Shacter (1997). "Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2." *J Biol Chem* 272(41): 25693-9.
- Wiseman, H., H. Kaur, et al. (1995). "DNA damage and cancer:

- measurement and mechanism." *Cancer Lett* 93(1): 113-20.
- Wolff, H., K. Saukkonen, et al. (1998). "Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma." *Cancer Res* 58(22): 4997-5001.
- Wood, M. L., M. Dizdaroglu, et al. (1990). "Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome." *Biochemistry* 29(30): 7024-32.
- Wu, C. Y., C. Demeure, et al. (1993). "IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells." *J Immunol* 151(4): 1938-49.
- Wu, P. F., T. A. Chiang, et al. (1999). "Genotoxicity of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan." *Environ Res* 80(2 Pt 1): 122-6.
- Wu, P. F., T. A. Chiang, et al. (1998). "Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon contents of fumes from heated cooking oils and prevention of mutagenicity by catechin." *Mutat Res* 403(1-2): 29-34.
- Wu-Williams, A. H., X. D. Dai, et al. (1990). "Lung cancer among women in north-east China." *Br J Cancer* 62(6): 982-7.
- Yamamoto, K., T. Arakawa, et al. (1995). "Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells." *J Biol Chem* 270(52): 31315-20.
- Yamamura, M., R. L. Modlin, et al. (1993). "Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer." *J Clin Invest* 91(3): 1005-10.
- Yan, Z., K. Subbaramaiah, et al. (2000). "Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB." *J Biol Chem* 275(7): 4949-55.
- Yanagawa, H., S. Sone, et al. (1995). "Serum levels of interleukin 6 in patients with lung cancer." *Br J Cancer* 71(5): 1095-8.
- Yang, C. M., C. S. Chien, et al. (2002). "Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated through activation of p42/44 and p38 MAPKS, and NF-kappaB pathways in canine tracheal smooth muscle cells." *Cell Signal* 14(11): 899-911.
- Yang, S. C., S. N. Jenq, et al. (2000). "Identification of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-deoxyguanosine in human lung

- adenocarcinoma cells exposed to cooking oil fumes from frying fish under domestic conditions." *Chem Res Toxicol* 13(10): 1046-50.
- Yang, S. P., K. T. Luh, et al. (1984). "Chronological observation of epidemiological characteristics of lung cancer in Taiwan with etiological consideration--a 30-year consecutive study." *Jpn J Clin Oncol* 14(1): 7-19.
- Young, J. F., S. E. Nielsen, et al. (1999). "Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status." *Am J Clin Nutr* 69(1): 87-94.
- Zhang, F. X., C. J. Kirschning, et al. (1999). "Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes." *J Biol Chem* 274(12): 7611-4.
- Zhu X., Wang K., Zhu J., and Koga M., 2001 Analysis of cooking oil fumes by ultraviolet spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Agri Food Chem.* 49:4790-4794.
- Zienolddiny, S., D. Ryberg, et al. (2000). "Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines." *Carcinogenesis* 21(8): 1521-6.

柒、表與圖

Table 1. Demographic and clinical characteristics of lung cancer patients.

Characteristics	Number (n=117)	%
Age(years)	63.72 ± 10.20	
≤65	55	51.4
>65	52	48.6
Gender		
Female	40	34.2
Male	77	65.8
Tumor type		
AD ^a	54	51.9
SQ	50	48.1
Smoking status		
Non-smoking	61	54.5
Smoking	51	45.5

^a AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma

Table 2. Relationships between 8-OH-dG IHC and clinicopathological parameters in 117 NSCLC patients.

Clinical		8-OH-dG IHC				P
Characteristic	Number	— (%)	+	++ (%)	+++ (%) ^a	
Total patients	117	13 (11.1)	13 (11.1)	40 (34.2)	51 (43.6)	
Age(years)						
≤65	55	5 (9.1)	8 (14.5)	19 (34.5)	23 (41.8)	0.512
>65	52	6 (11.5)	3 (5.8)	19 (36.5)	24 (46.2)	
Gender						
Female	40	2 (7.7)	2 (7.7)	9 (34.6)	13 (50.0)	0.441
Male	77	11 (14.3)	9 (11.7)	26 (33.8)	31 (40.3)	
Tumor type						
AD ^b	54	6 (11.1)	6 (11.1)	25 (46.3)	17 (31.5)	0.107
SQ	50	5 (10.0)	5 (10.0)	13 (26.0)	27 (54.0)	
Smoking status						
Non-smoking	61	4 (6.6)	7 (11.5)	21 (34.4)	29 (47.5)	0.633
Smoking	51	7 (13.7)	6 (11.8)	17 (33.3)	21 (41.2)	

^a The presence of cells expressing positive reactions is seen in >50% (+++), 10-50%(++), 0-10%(+), 0 (—)

^b AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma

Table 3. Relationships between COX-2 IHC and clinicopathological parameters in 117 NSCLC patients.

Clinical		COX-2 IHC				P
Characteristic	Number	- (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%) ^a	
Total patients	117	8 (6.8)	17 (14.5)	26 (22.2)	66 (56.4)	
Age(years)						
≤65	55	6 (10.9)	11 (20.0)	12 (21.8)	26 (47.3)	0.172
>65	52	2 (3.8)	5 (9.6)	12 (23.1)	33 (63.5)	
Gender						
Female	40	2 (5.0)	4 (10.0)	8 (20.0)	26 (65.0)	0.554
Male	77	6 (7.8)	13 (16.9)	18 (23.4)	40 (51.9)	
Tumor type						
AD ^b	54	1 (1.9)	4 (7.4)	11 (20.4)	38 (70.4)	0.004
SQ	50	7 (14.0)	11 (22.0)	12 (24.0)	20 (40.0)	
Smoking status						
Non-smoking	61	5 (8.2)	6 (9.8)	13 (21.3)	37 (60.7)	0.502
Smoking	51	3 (5.9)	10 (19.6)	11 (21.6)	27 (52.9)	

^a The presence of cells expressing positive reactions is seen in >50% (+++), 10-50%(++), 0-10%(+), 0 (-)

^b AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma

Table 4. Relationships between 8-OH-dG IHC and COX-2 IHC in 117 NSCLC patients.

	Number	Cox-2 IHC				P
		— (%)	+	++ (%)	+++ (%) ^a	
8-OH-dG IHC						
—	13	1 (7.7)	3 (23.1)	2 (15.4)	7 (53.8)	0.722
+	13	2 (15.4)	3 (23.1)	2 (15.4)	6 (46.2)	
++	40	1 (2.5)	6 (15.0)	11 (27.5)	22 (55.0)	
+++	51	4 (7.8)	5 (9.8)	11 (21.6)	31 (60.8)	

^a The presence of cells expressing positive reactions is seen in >50% (+++), 10-50%(++), 0-10%(+), 0 (—)

Table 5. Relationships between 8-OH-dG IHC and COX-2 IHC in 37 non-smoking female NSCLC patients.

Non-smoking female (N=37)		Cox-2 IHC				P
	Number	- (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%) ^a	
8-OH-dG IHC						
-	2	1 (50.0)	0 (0)	0 (0)	1 (50.0)	0.042 ^b
+	3	1 (33.3)	1 (33.3)	0 (0)	1 (33.3)	
++	13	0 (0)	2 (15.4)	5 (38.5)	6 (46.2)	
+++	19	0 (0)	1 (5.3)	2 (10.5)	16 (84.2)	

^a The presence of cells expressing positive reactions is seen in >50% (+++), 10-50% (++)
0-10%(+), 0 (-)

^b The P value was from likelihood ratio. Fisher's exact test was further used and the P value was 0.015.

Table 6. Relationships between 8-OH-dG IHC and COX-2 IHC in 50 smoking-male NSCLC patients.

Smoking male (N=50)		Cox-2 IHC				P
	Number	— (%)	+	++ (%)	+++ (%) ^a	
8-OH-dG IHC						
—	7	0 (0)	2 (28.6)	1 (14.3)	4 (57.1)	0.944
+	6	0 (0)	2 (33.3)	1 (16.7)	3 (50.0)	
++	17	1 (5.9)	3 (17.6)	4 (23.5)	9 (52.9)	
+++	20	2 (10.0)	3 (15.0)	5 (25.0)	10 (50.0)	

^a The presence of cells expressing positive reactions is seen in >50% (+++), 10-50% (++)
0-10% (+), 0 (—)

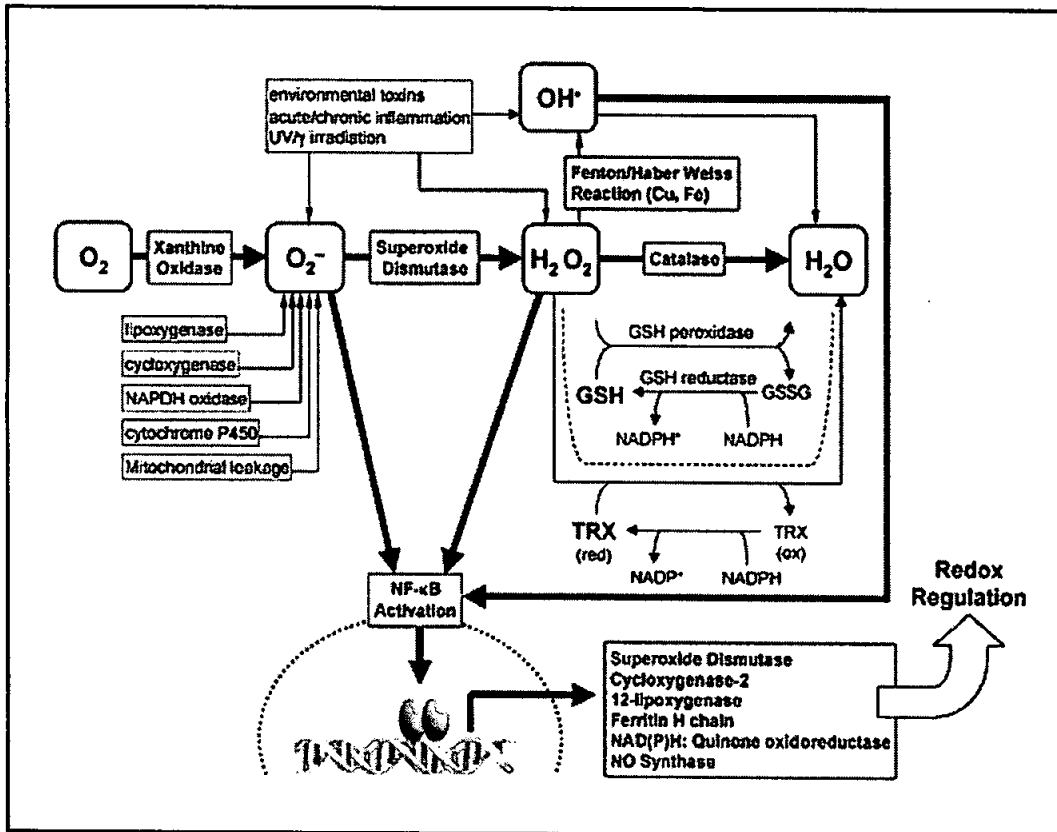


Fig. 1. Schematic representation of reactive oxygen intermediate generation systems and mechanisms of activation of NF-κB

(Mercurio, F. and Manning, A. M., 1999)

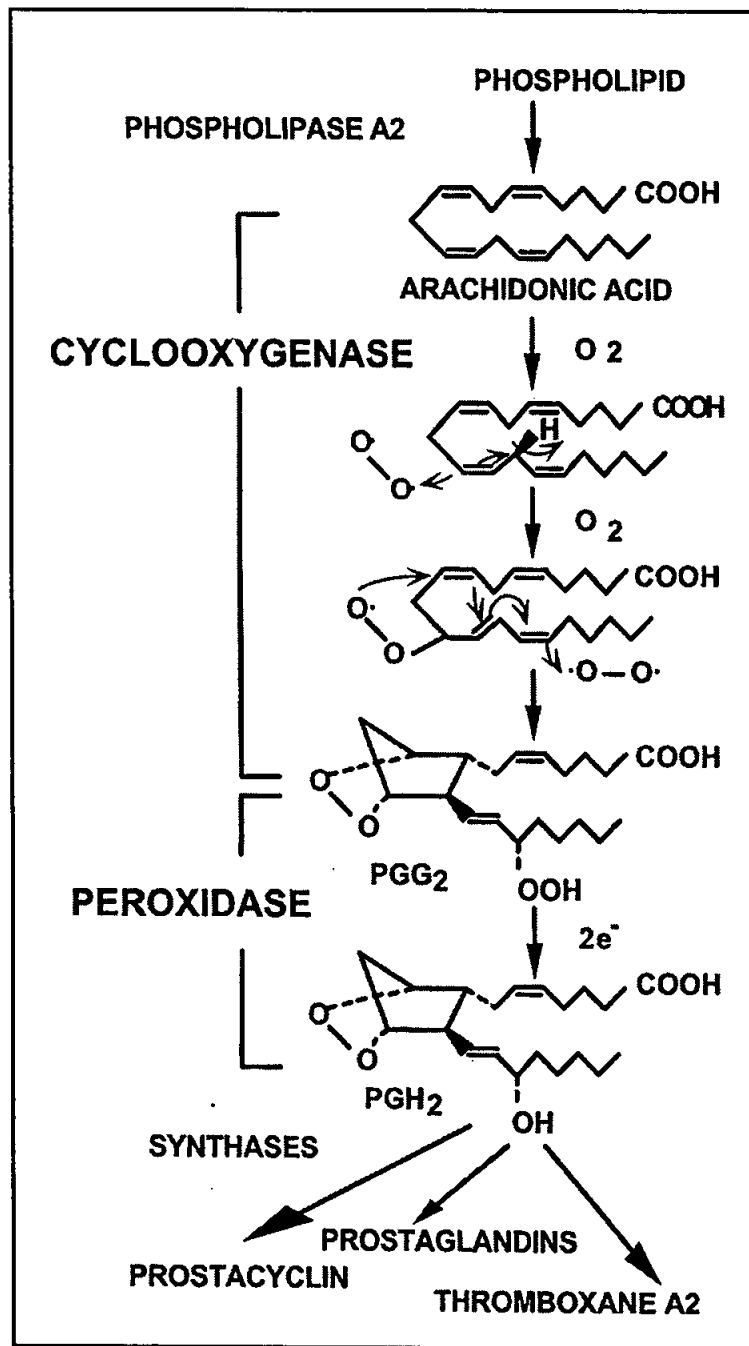


Fig. 2. Biosynthetic pathway for the formation of prostaglandins derived from arachidonic acid.

(Smith et al., 2000)

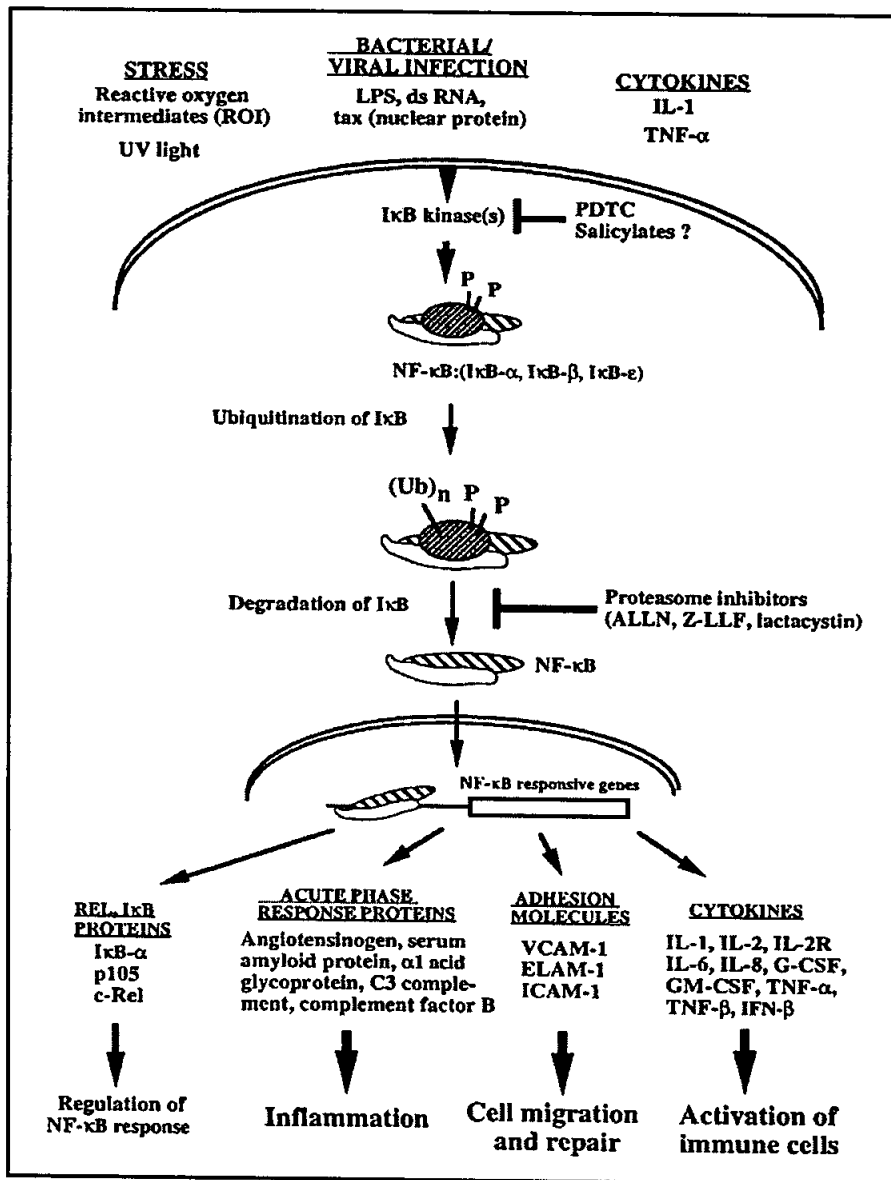


Fig. 3. Schematic diagram of NF-κB signaling pathway and the proteins regulated by NF-κB. Activation of NF-κB involves the phosphorylation and subsequent proteolytic degradation of the inhibitory protein IκB kinases. The free NF-κB then passes into the nucleus, where it binds to the κB sites in the promoter regions of genes for inflammatory proteins such as cytokines, enzymes, and adhesion molecular.

(Ghosh et al., 1998)

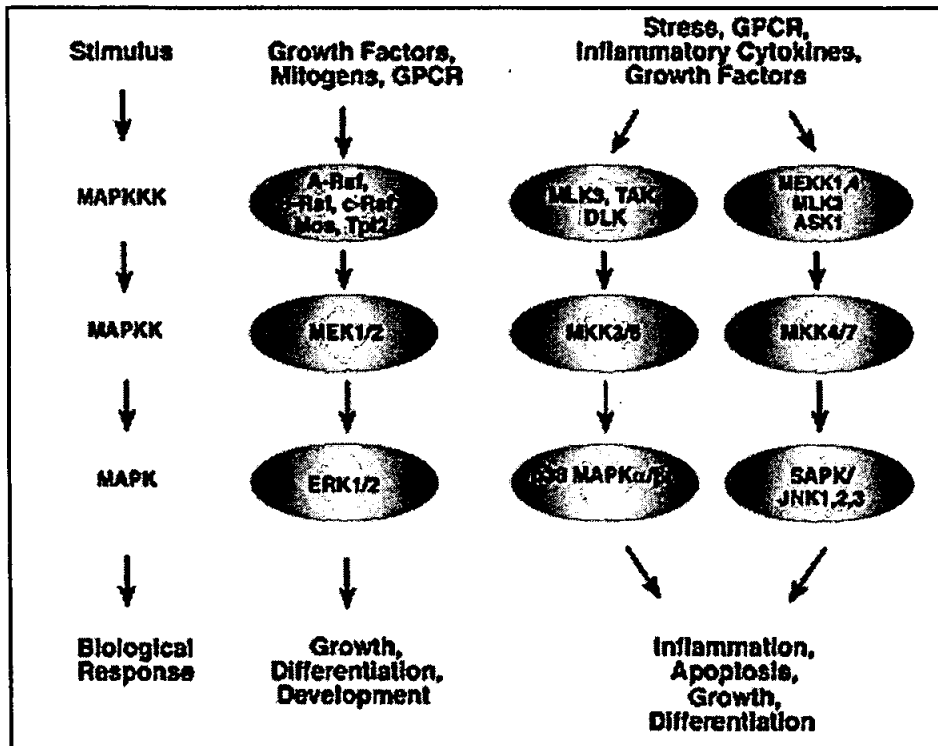


Fig. 4. Schemic diagram of MAPK signaling pathway. Mitogen activated protein kinases (MAPK) are a family of serine/threonine protein kinases widely conserved among eukaryotes and are involved in many cellular programs such as cell proliferation, cell differentiation, cell movement and cell death. MAPKs signaling cascades are organized hierarchically into three-tiered modules. MAPKs are phosphorylated and activated by MAPK-kinases (MAPKKs), which in turn are phosphorylated and activated by MAPKK-kinases (MAPKKKs). The MAPKKK is in turn activated by interaction with a family of small GTPases and/or other protein kinases connecting the MAPK module to the cell surface receptor or external stimuli.

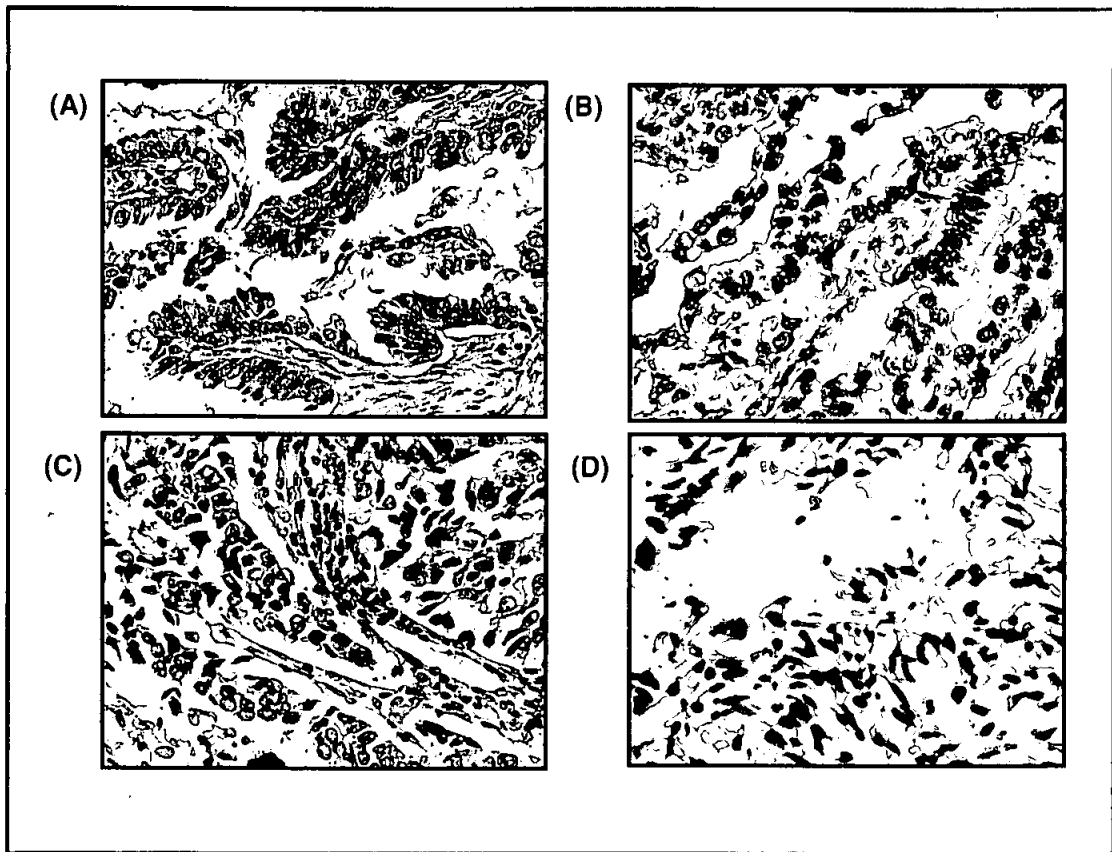


Fig. 5. Representation of Cox-2 and 8-OH-dG immunohistochemistry analysis in lung tumors. Lung tumor cells showing positive cytoplasmic staining for the high expression of Cox-2 protein (A) and negative immunostaining of Cox-2 protein expression (B). Lung tumor cells showing positive nuclear staining for the high expression of 8-OH-dG DNA adduct (C) and negative immunostaining of 8-OH-dG DNA adduct (D).

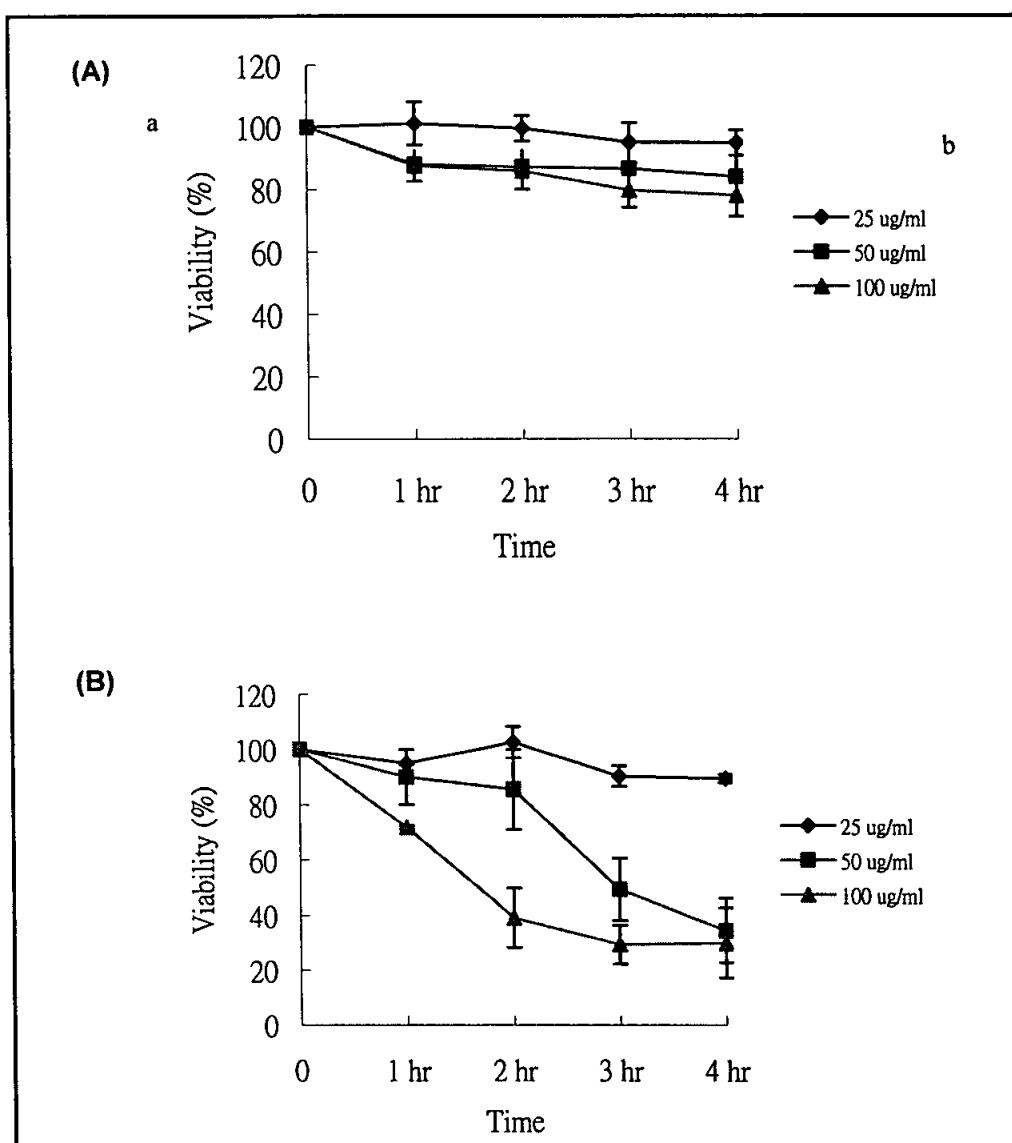


Fig. 6. Cytotoxicity of CL-3 (A) and Beas-2B (B) with various concentrations of COF treatment measured by MTT assay.

^a Cell viability (%) = (The absorbance of treatment of sample – the absorbance of medium blank)/(The absorbance of DMSO control – the absorbance of the treatment of medium blank)

^b The final DMSO concentration is 0.05 % in medium (0.5 μl/ml medium)×100

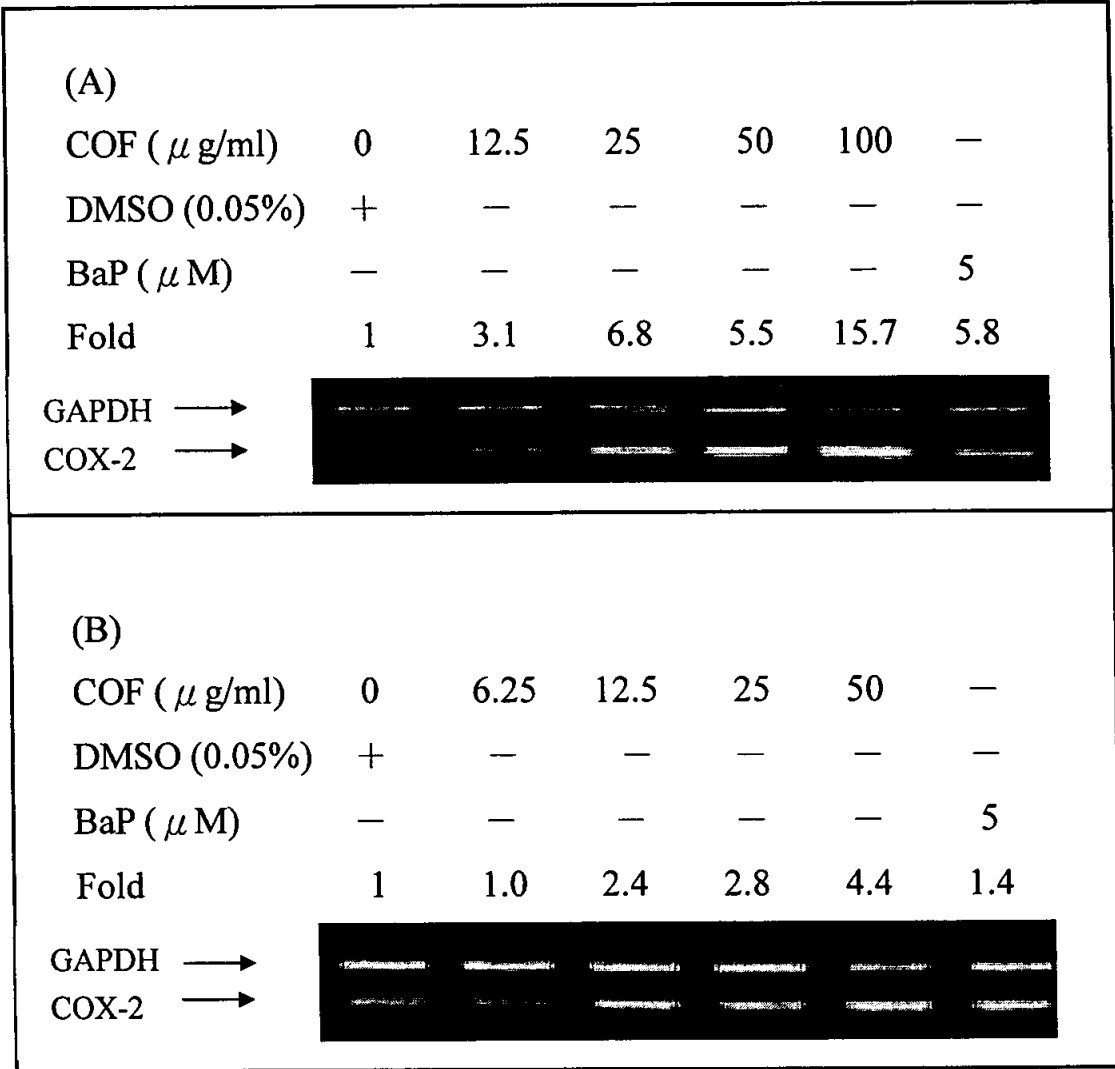


Fig. 7. Effect of COF on Cox-2 mRNA levels in CL-3 (A) and Beas-2B (B) cells. Cells were treated with various concentrations of COF for 2 hrs. Total RNA were isolated, cDNA was synthesized, and the amount of Cox-2 mRNA was determined by RT-PCR as described in Material and Methods. Data were quantified by desitometry with GAPDH mRNA levels

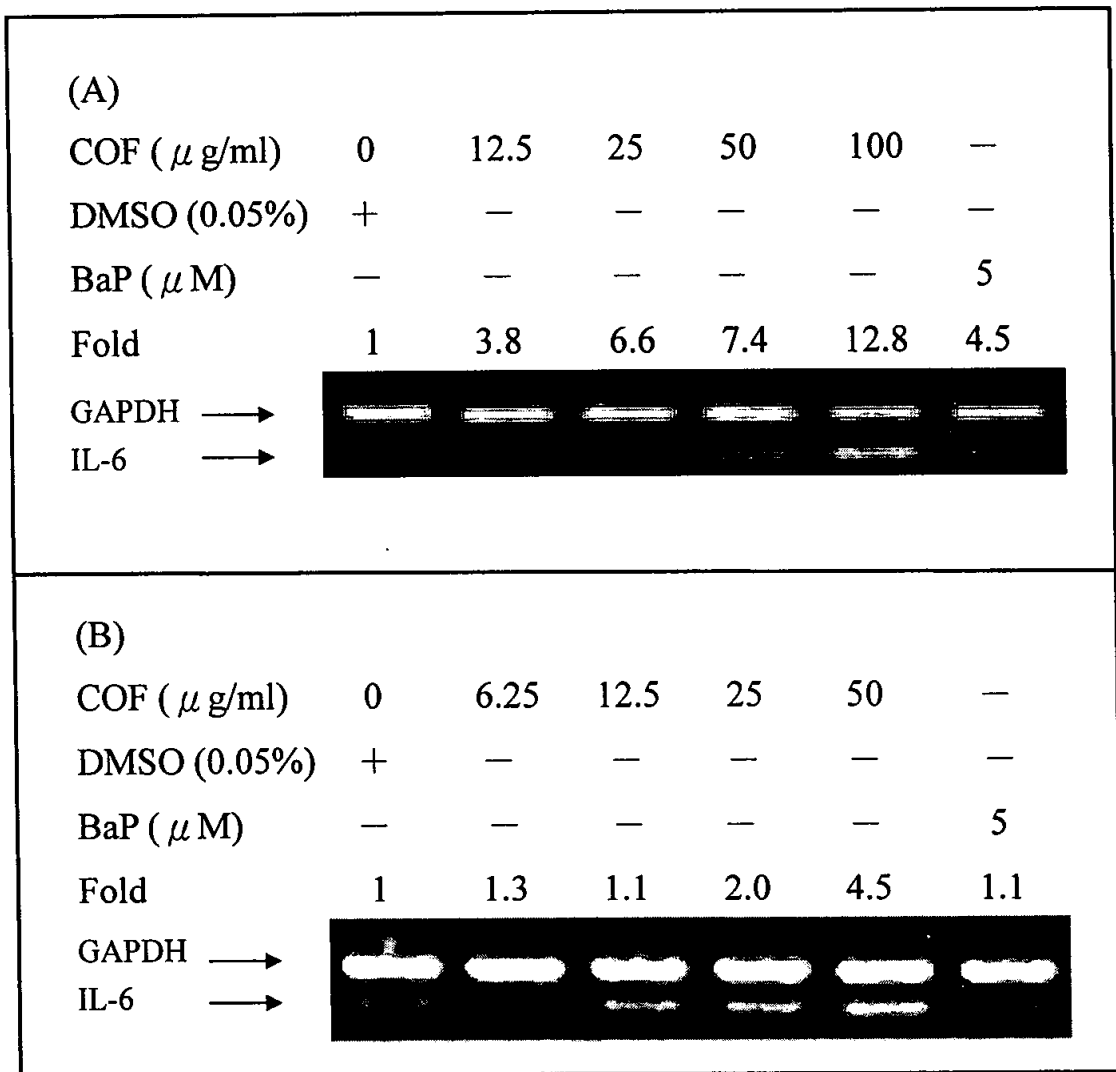


Fig. 8. Effect of COF on IL-6 mRNA levels in CL-3 (A) and Beas-2B cells (B). Cells were treated with various concentrations of COF for 2 hrs. Total RNA were isolated, cDNA was synthesized, and the amount of IL-6 mRNA was determined by RT-PCR as described in Material and Methods. Data were quantified by desitometry with GAPDH mRNA levels

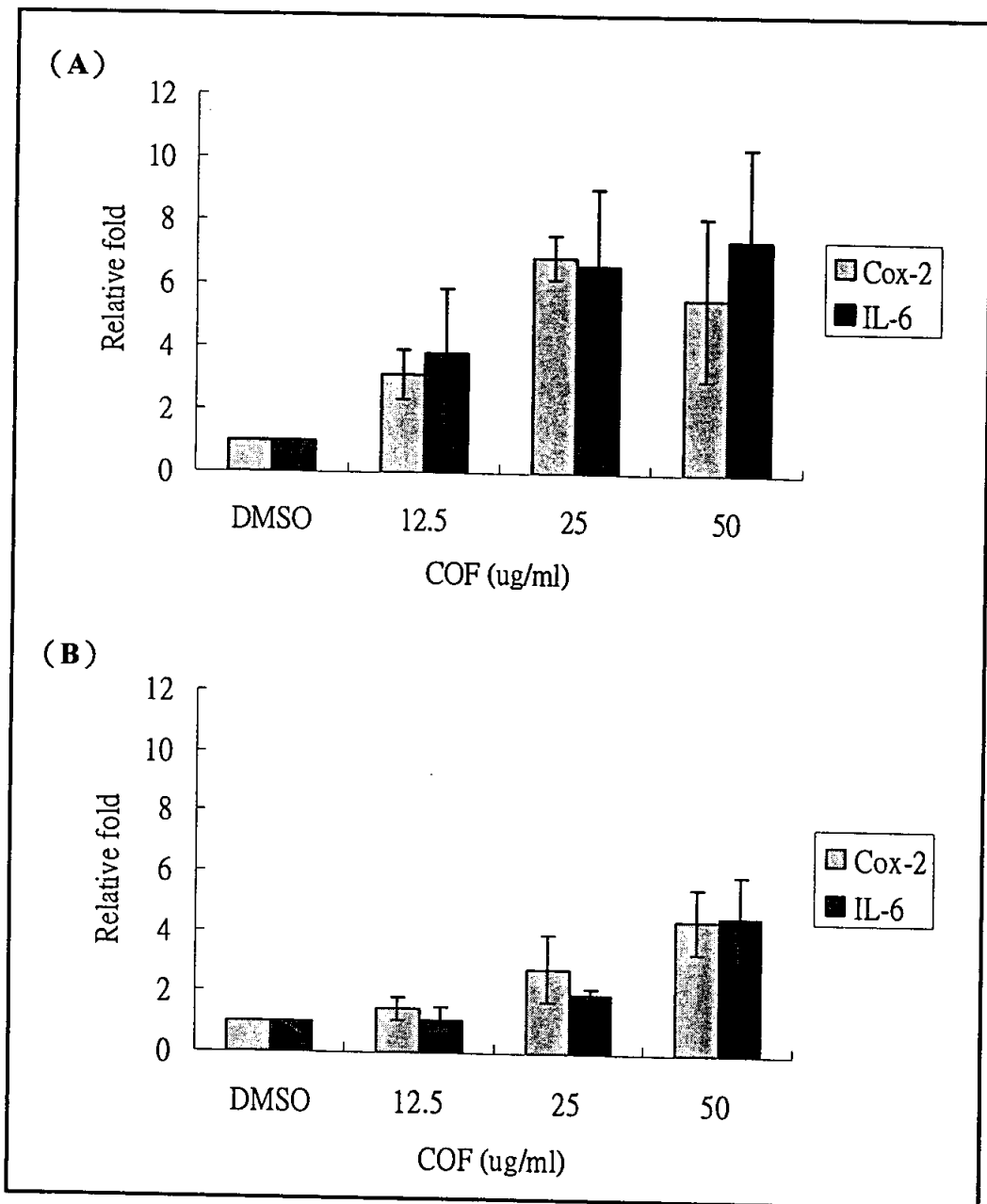


Fig. 9. Comparison of effects on mRNA expression of Cox-2 and IL-6 induced by treatment of various concentrations of COF in both human lung adenocarcinoma CL-3 cell (A) and normal airway epithelial Beas-2B cell (B). Values (mean \pm SD from more than three separate experiments) in a row sharing a common letter are no significantly different ($p > 0.05$).

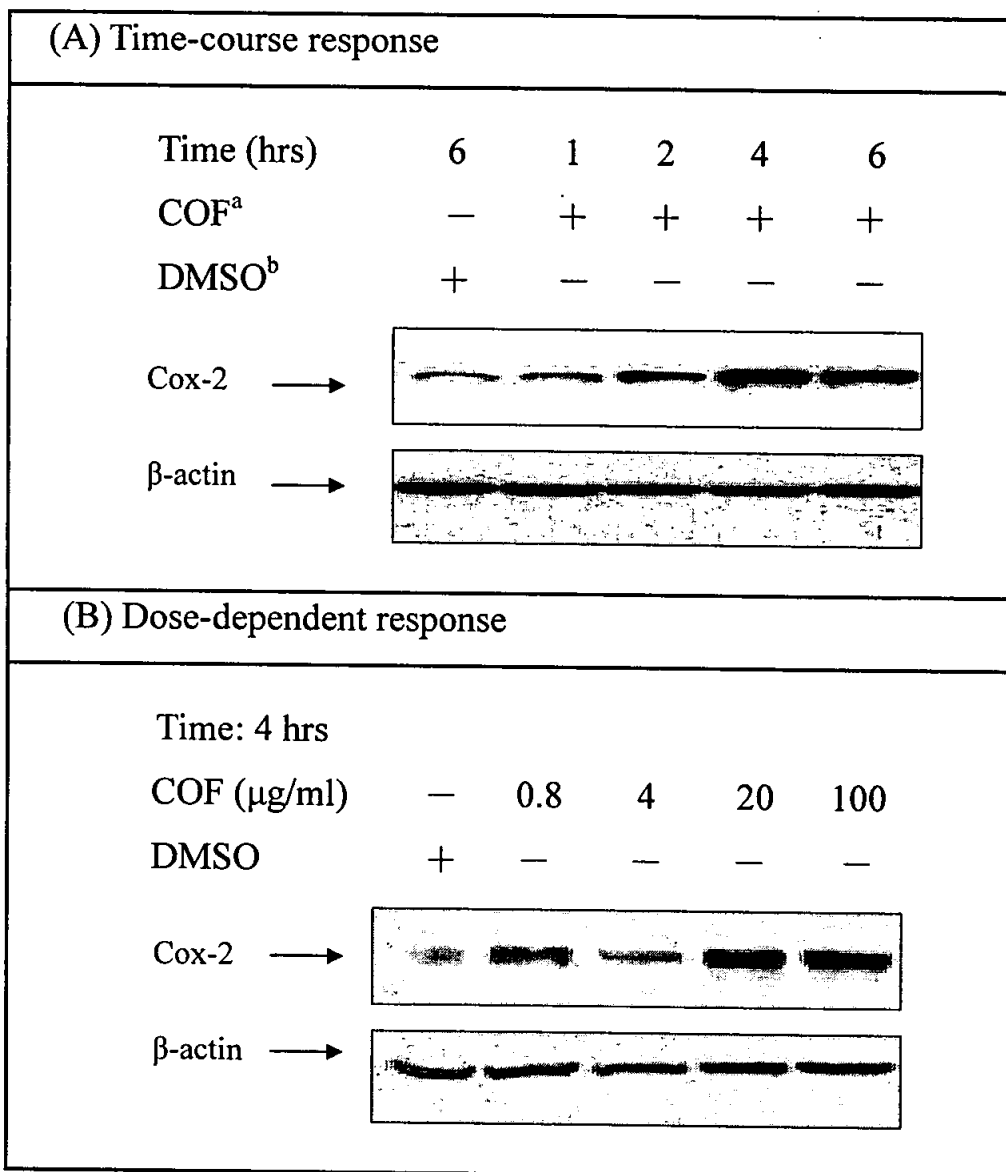


Fig. 10. Immunoblot analysis for cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in CL-3 cells after various concentrations of COF treatment.

^a the concentration of COF was 50 μg/ml

^b the concentration of DMSO as solvent control was 0.05 %

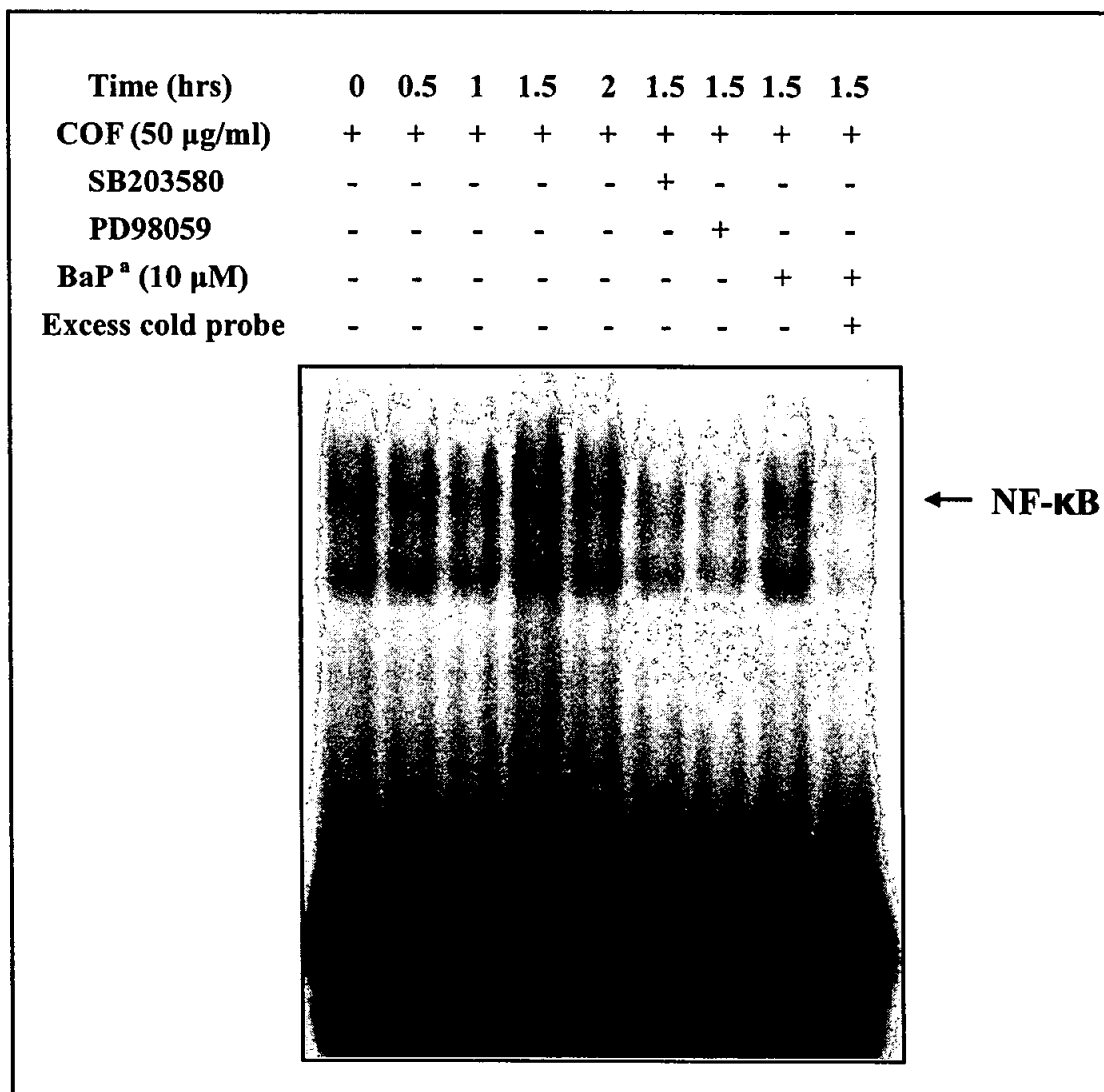


Fig. 11. Gel retardation assay for COF induced NF- κ B activation which suppressed by the MAPKs inhibitors. Cells, pretreated with p38 inhibitor SB203580 (5 μ M) or MEK inhibitor PD98059 (20 μ M) for 1 hr or not, were treated with 50 μ g/ml COF for 0 to 2 hrs. Nuclear extract was prepared and incubated with ³²p-NF- κ B, analyzed with 5 % polyacrylamide gel electro-phoresis. The 10 μ M of BaP was used as positive control, and the specificity of NF- κ B DNA binding was confirmed by competing with 200X cold NF- κ B. ^a positive control.

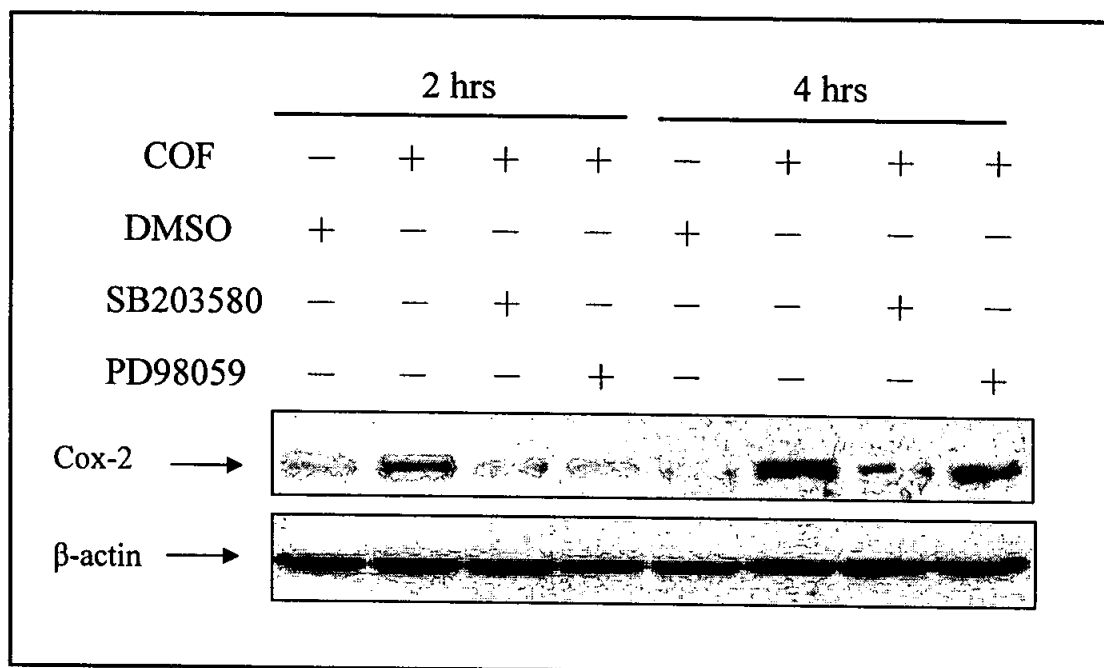


Fig. 12. Role of p38 inhibitor SB203580 and MEK inhibitor PD98059 on COF induced Cox-2 protein in CL-3 cells. The cells were serum-free starved for 1 hr. The cells were treated with 5 μ M of p38 inhibitor SB203580 or 20 μ M of MEK inhibitor PD98059 in serum-free RPMI for 1 hr. The cells were continually cultured in serum-free RPMI containing 50 μ g/ml of COF and the same amount of inhibitor until the cells were harvested at the indicated times. The cell lysates were prepared and western analysis was performed with a Cox-2 antibody.

捌、 英文摘要

Lung cancer is the leading cause of cancer death in Taiwanese women since 1982. Cigarette smoking has been considered to be the most important etiological factor of lung cancer. In Taiwan, most of female lung cancer patients were non-smoker (>90%) and most of their tumor type were adenocarcinomas. Previous epidemiological studies had shown that the exposure of cooking oil fumes (COF) was associated with the incidence of Taiwanese female lung cancer. However, few toxicological evidence was provided to further demonstrate the epidemiological finding. Our recent report showed that oxidative DNA damage induced by COF in CL-3 cells was more important than that of bulky DNA adducts. To verify the correlation between oxidative DNA damage marker – 8-OH-dG and Cox-2 protein expression in lung tumors, 100 lung tumor specimens were collected for immunohistochemistry analysis to detect the adduct levels and Cox-2 immunostainings in this study. Our results indicated that a significant correlation between 8-OH-dG DNA adduct and Cox-2 protein expression ($P=0.042$) in non-smoking female lung cancer patients was observed, but no such phenomena were observed in either smoking or non-smoking male lung cancer patients. These results suggest that oxidative DNA damage may be associated with Cox-2 protein expression and this correlation may be involved in the development of COF associated-female lung cancer in Taiwan. It has been suggested that Cox-2 and IL-6 overexpressions may be associated with development of lung adenocarcinomas. To elucidate the role of COF in lung tumorigenesis, Cox-2 and IL-6 gene expressions induced by COF were

evaluated by RT-PCR in lung adenocarcinoma CL-3 cells and normal bronchial epithelial Beas-2B cells, respectively. Our data showed that Cox-2 and IL-6 mRNA expressions induced by COF were in a time- and dose-dependent manner in both cells. And the results from Western blot analysis also showed elevated Cox-2 protein expression. To understand the signaling pathways involved in COF-induced Cox-2 expression, EMSA was used to evaluate the COF-induced NF- κ B activation and whether p38/MAPK and ERK/MEK involved in the signaling pathway of NF- κ B in COF-induced Cox-2 expression. The results showed that NF- κ B signaling pathway was involved in Cox-2 induction. In addition, p38/MAPK and ERK/MEK also participated in COF-induced activation of NF- κ B signaling pathway. However, the western blot results revealed that p38/MAPK pathway was more important, compared with ERK/MEK pathway, regarding COF-induced Cox-2 expression. In summary, the above evidence supported that COF exposure played roles in female lung cancer development.

博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本，92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在中山醫學大學(學院)毒理系所
_____組 九十一學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文名稱：烹調油煙在台灣女性肺癌患者之 8-OH-dG 形成與 Cox-2 基因表現之角色
研究

同意 不同意 (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：

研究生簽名：
(親筆正楷)

吳、恆、祥

學號：9015002
(務必填寫)

日期：民國 92 年 7 月 31 日