

R  
068.8  
7531

# 中山醫學院生化學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Biochemistry, Chung Shan  
Medical and Dental College

指導教授：李 輝 博士 (Huei Lee, Ph. D.)

台灣地區肺癌病患肺組織中芳香族 DNA 鍵結物  
之分析及雌性激素對人類肺腺癌細胞株 CL-3 中  
Benzo[a]pyrene-DNA 鍵結物之影響研究

Analysis of the Aromatic DNA Adducts in Lung Tissues from Lung  
Cancer Patients in Taiwan and Effect of 17 $\beta$ -Estradiol on the  
Benzo[a]pyrene-DNA Adduct Levels in CL-3 Lung Adenocarcinoma Cell



研究生：陳兆平 (Chao-Ping Chen) 撰

中華民國八十五年六月  
(June, 1996)

中山醫學院圖書館



C036191

# 授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所  
組 84 學年度第 2 學期所撰 碩士學位論文。

論文名稱：臺灣地區肺癌病患肺組織中芳香族 DNA 鏈結物之分析及對人類肺腺癌細胞株 CL-3 中 Benzo[a]pyrene-DNA 鏈結物之影響研究

同意  不同意  
本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會技術資料中心，得重製成電子資料後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意  不同意  
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技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心之縮小之服務。本論文報告、獎勵及專利等因涉後再公開。

同意  不同意  
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，或為上述目的再授他人以各種方法重製，不限時間與地域，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。

指導教授姓名：李輝

研究生簽名：陳兆平 學號：R8302103  
(親筆正楷)

日期：民國 85 年 2 月 29 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄立若未鉤選，本人同意視同授權。  
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。  
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

# 簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先取得著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。屬權重複授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚將權重授與他人，請勿簽署本授權書。
2. 在國內授與權利與義務：予 U M I 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金。在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，在資博中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、5 項代表著作、面博唯一人論或全文論之微縮片整合計畫的宏觀效益：論上可保存八百年，實證全在個人逾百年的論文的因被充中孤本，在國家總體與外借與您，將因而助經學弟與學妹完成保存，破損全去，之不便，(02)7377746 江守田、王淑貞
3. 裝訂性上的整資料電地址：台北和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室
4. 裝訂性上的整資料電地址：台北和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室
5. 裝訂性上的整資料電地址：台北和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

-----  
研究生姓名：陳兆平 聯絡電話：(02) 299-1115

地址：台北市內湖區文德路 81 號 2 戶  
-----

台灣地區肺癌病患肺組織中芳香族 DNA 鍵結物  
之分析及雌性激素對人類肺腺癌細胞株 CL-3 中  
Benzo[a]pyrene-DNA 鍵結物之影響研究

Analysis of the Aromatic DNA Adducts in Lung Tissues from Lung  
Cancer Patients in Taiwan and Effect of 17 $\beta$ -estradiol on the  
Benzo[a]pyrene-DNA Adduct Levels in CL-3 Lung Adenocarcinoma Cell  
Line

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位必備條件之一，經中山醫  
學院生化學研究所碩士論文考試委員會審查及口試通過。

論文考試委員

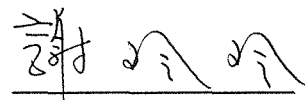
台大醫學院毒理學研究所

蕭水銀 博士



長庚醫工學院醫學院公共衛生學科

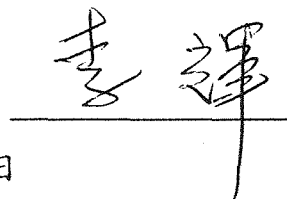
謝玲玲 博士



中山醫學院生化學研究所

李輝 博士

(本論文指導教授)

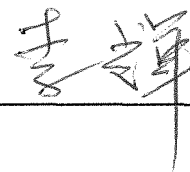


中華民國八十五年六月六日

學生陳兆平論文題目為：台灣地區肺癌病患肺組織中  
芳香族 DNA 鍵結物之分析及雌性激素對人類肺腺癌  
細胞株 CL-3 中 Benzo[a]pyrene-DNA 鍵結物之影響  
研究，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論  
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：

A handwritten signature in black ink, appearing to be '李輝', written over a horizontal line. A vertical line extends downwards from the end of the horizontal line.

中華民國八十五年七月二十九日

## 謝 誌

兩年來承蒙恩師 李輝博士在待人處事及研究治學上之教誨與指導，使學生能夠克服實驗障礙，完成此一階段的研究工作。於論文撰寫期間，恩師更是不辭辛勞的對本論文的架構與內容悉心斧正、圈點眉批，字字句句均蘊含著恩師的愛護之情。師恩浩瀚，永銘在心，謹誌卷首，以表謝忱！

文稿初成，復蒙台大醫學院毒理學研究所蕭水銀博士及長庚醫工學院醫學院公共衛生學科謝玲玲博士之撥冗審閱，對本論文細心審查、詳加斧正，並提供諸多寶貴意見，以及公衛系王理老師對於實驗數據統計分析的協助，使本文得以更臻完善，在此致上誠摯謝意。

研究期間，感謝本實驗室邊樹萱老師於實驗技術的協助與生活上的照料，郝菊副教授在研究上的鼓勵以及王憶卿副教授在實驗及課業上的殷切指導，國立中興大學食品科學研究所博士班鄭信男學長、康志強學長與石名貴學長，劉瑞玲學姐與研究室中的淑慧學姐、建仲學長、忠錡學長在實驗和課程上的幫助，還有同窗好友文澈、建富、德瑋以及森智、雅文、秋月、國豪、怡如等學弟妹在實驗上的切磋與討論，使本論文得以順利完稿，在此一併致謝。

最後，謹以此論文獻給我最親愛的父、母親及姊姊、哥哥，感謝您們的關懷與鼓勵，成為我在研究期間最大的支持力量。還要謝謝劉伯伯、劉媽媽在飲食上的悉心照料。更感謝建宏的體諒、包容與精神支援，讓我在研究期間能夠心無旁騖勇往直前。由衷的感激您們為我所做的一切。

陳兆平

謹誌於

中山醫學院生化學研究所

中華民國八十五年七月二十九日

# 目 錄

壹、 中文摘要	1
貳、 文獻綜論	
一、 肺癌之流行病學的研究	4
二、 空氣污染物	
(一) 多環芳香烴 (Polycyclic aromatic hydrocarbons)	8
(二) Benzo[a]pyrene	
1. 來源、分佈及含量	10
2. 代謝活化和解毒路徑	11
3. 生物活性	12
(三) DNA 鍵結物	13
(四) 與肺癌發生之可能關係	
1. 動物實驗	14
2. 職業曝露	15
三、 不同性別對致癌物的生物反應	16
參、 研究動機	19

## 肆、材料與方法

### 第一部分

- 一、化學藥品與材料 20
- 二、肺癌病患之正常組織檢體來源 21
- 三、肺組織 DNA 之萃取 21
- 四、<sup>32</sup>P-postlabeling 分析法
  - (一) 以 PAH-DNA 鍵結物之移動相分析 Aromatic /hydrophobic DNA 鍵結物 22
  - (二) 以 Nitro-PAH 鍵結物之移動相分析 1-NP 及 DNP 之 DNA 鍵結物 23

### 第二部分

- 一、藥品與材料 24
- 二、人類肺細胞株之來源 24
- 三、細胞培養 25
- 四、細胞毒性分析 (Cytotoxicity test) 25
- 五、萃取 DNA 26
- 六、B[a]P-DNA 鍵結物之分析 26
- 七、高效層析儀之分析 (High performance liquid chromatography) 26
- 八、細胞週期分析 (Cell cycle assay) 27
- 九、細胞增生試驗 (Cell proliferation assay) 27



十、 蛋白定量分析	28
十一、 西方墨點法 (Western blotting analysis)	28
伍、 結果與討論	
第一部分	
一、 吸菸對肺癌病患之肺組織中 DNA 鍵結物形成 之影響	30
二、 台灣地區男女性肺癌病患肺組織中之 DNA 鍵結 物含量及色層分析圖譜之比較	34
三、 肺癌的組織學分類 (tumor type) 及腫瘤分期 (tumor stage) 與 DNA 鍵結物含量之相關性	38
四、 不同年齡之病患及 DNA 鍵結物含量之統計 分析	40
五、 肺癌病患肺組織中 Nitro-PAH DNA 鍵結物之 偵測	41
第二部分	
一、 比較不同人類肺細胞株中形成 B[a]P-DNA 鍵結物 之能力及其與細胞週期、細胞增生和細胞色素 P450 IA1 的相關性分析	
(一) 不同人類肺細胞株中形成 B[a]P-DNA 鍵結物之含量	43
(二) B[a]P 對細胞週期之影響	45

(三) B[a]P 對細胞增生的影響	46
(四) Cytochrome P450 IA1 之誘導劑 BNF 和抑制劑 ANF 對肺細胞形成 B[a]P-DNA 鍵結物之影響	47
二、 雌性激素在 CL-3 肺癌細胞中對 B[a]P-DNA 鍵結物形 成之影響	49
陸、 參考文獻	52
柒、 圖表	72
捌、 英文摘要	107

## ABBREVIATIONS

Acenaphthylene	Acen
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	4-MeIQx
Anthracene	Anth
Benzo[a]anthracene	B[a]A
Benzo[a]pyrene	B[a]P
anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy -7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene	BPDE
N-(deoxyguanosine-8-N2-yl)-anti-7,8-dihydroxy -9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene	BPDE-N2-dG
Benzo[c]phenanthrene	B[c]P
Benzo[e]pyrene	B[e]P
Benzo[b]fluoranthene	B[b]F
Benzo[g,h,i]perylene	B[g,h,i]P
Benzo[b]fluoranthene	B[b]F
Benzo[j]fluoranthene	B[j]F
Benzo[k]fluoranthene	B[k]F
Chrysene	Chr
Cytochrome P450 IA1	CYP IA1
Diagonal radioactive zone	DRZ
Dibenz[a,c]anthracene	DB[a,c]A
Dibenz[a,h]anthracene	DB[a,h]A
Dibenzo[a,h]pyrene	DB[a,h]P
Dibenzo[a,l]pyrene	DB[a,l]P

$\beta$ -blocker DL-1-(2-nitro-3-methyl-phenoxy)- 3-tert-butylamino-propan-2-ol	DL-ZAMI 1305
7,12-dimethylbenz[a]anthracene	DMBA
Dimethylsulfoxide	DMSO
Dinitropyrenes	DNPs
1,3-Dinitropyrene	1,3-DNP
1,6-Dinitropyrene	1,6-DNP
1,8-Dinitropyrene	1,8-DNP
Fetal bovin serum	FBS
Fluorene	Fluo
Fluoranthene	FA
Glutathione S-transferase	GST
High performance liquid chromatography	HPLC
$\alpha$ -Naphthoflavone	ANF
$\beta$ -Naphthoflavone	BNF
1-Nitropyrene	1-NP
Nuclease P1	NP1
Phenanthrene	Phen
Phosphate buffer saline	PBS
Pyrene	Pyr
Thin-layer chromatography	TLC

## 壹、中文摘要

自民國七十一年以來，癌症一直是台灣地區的第一大死亡原因，其中肺癌的死亡率在女性及男性分別佔癌症死亡率的首位及第二位。令人驚訝的是，台灣地區女性吸菸人口僅有百分之三左右，但是肺癌的死亡率卻高居第一位。近年來本實驗室分析台灣地區環境中之空氣污染物發現，空氣懸浮微粒中多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons) 的含量較其他國家為高。因此，本實驗利用  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 的方法分析六十三位台灣地區肺癌病人經外科手術所獲取之正常肺組織中的芳香族化合物所形成之 DNA 鍵結物 (aromatic DNA adduct) 的含量，並且與其他國家肺癌病人的 DNA 鍵結物之含量做一比較，以瞭解空氣污染物和肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物含量之相關性。分析的結果顯示，六十三位台灣地區肺癌患者之 DNA 鍵結物的含量最高可達  $165.92 \text{ adducts} / 10^8 \text{ nucleotides}$ ，含量最低者僅  $2.8 \text{ adducts} / 10^8 \text{ nucleotides}$ ，所有肺癌患者之 DNA 鍵結物的平均含量為  $53.11 \pm 38.98 \text{ adducts} / 10^8 \text{ nucleotides}$ ，比先前所發表之其他國家的肺癌患者之 DNA 鍵結物的含量高了 5~16 倍。同時也發現吸菸的數量對吸菸之肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的含量並無影響。此外，我們分析所有的十四位不吸菸女性肺癌患者之肺組織中 DNA 鍵結物的平均含量為所有四十九位男性的 DNA 鍵結物平均含量的 1.5 倍，更有趣的是，若僅將所有八位男性不吸菸肺癌患者之 DNA 鍵結物平均含量與女性肺癌病患的 DNA 鍵結物含量比較，則發現兩者之間的差異就更為顯著 ( $p = 0.014$ )。因此推測香菸在台灣地區肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的形成量上可能不是重要的因子，

而台灣地區可能有特殊的環境污染物，例如：空氣污染物、烹調時產生的油煙或是點燃拜香所產生的煙霧等環境因子或許與台灣地區肺癌患者肺組織中有高量的 DNA 鍵結物含量有些關係。

B[a]P 是已知的致癌物，過去的研究結果顯示 B[a]P 會在人類肺組織中形成 DNA 鍵結物。本實驗以 B[a]P 處理六種人類肺細胞株，以探討不同來源之肺細胞株對 B[a]P 形成 DNA 鍵結物的感受性有何不同？然後才進一步分析其可能機轉。結果發現六種人類肺細胞株對於 B[a]P 的感受性差異很大，其中以由台灣肺腺癌病患所分離之 CL-3 細胞產生 B[a]P-DNA 鍵結物的能力 ( $1105.2 \text{ adducts} / 10^8 \text{ nucleotides}$ ) 明顯高於其他五種細胞株 ( $0 \sim 2.6 \text{ adducts} / 10^8 \text{ nucleotides}$ )。為了確定其 DNA 鍵結物的種類，我們利用高效率色層分析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 將 CL-3 細胞中之 B[a]P-DNA 鍵結物加以分析，結果與標準品 BPDE-N<sub>2</sub> dG 在四十六分鐘處有相同的滯留時間，因此推測 CL-3 細胞中所形成之主要的 B[a]P-DNA 鍵結物可能是 BPDE-N<sub>2</sub> dG。至於為何細胞株之間形成 DNA 鍵結物的能力會有如此大的差異，我們進一步探討細胞週期、細胞增生以及 cytochrome P450 IA1 的表現對 CL-3 及 A-427 這兩種肺腺癌細胞株中 B[a]P-DNA 鍵結物形成之影響。結果發現當 CL-3 細胞以 B[a]P 處理之後細胞週期呈明顯的休止狀態，若以 cytochrome P450 IA1 的誘導劑  $\beta$ -naphthoflavone 前處理 CL-3 細胞後，B[a]P-DNA 鍵結物的形成量較未加誘導劑的控制組增加 226%，而這些現象在 A-427 細胞中都未出現。由以上的結果推測 CL-3 及 A-427 這兩種肺腺癌細胞株中 B[a]P-DNA 鍵結物形成能力會不同，可能主要是由於 cytochrome P450 IA1 的表現不同而造成的。

此外，我們也研究雌性激素 (17 $\beta$ -estradiol) 對於 CL-3 細胞之

DNA 鍵結物形成量之影響，結果發現當 CL-3 細胞以雌性激素和 B[a]P 共同處理時，所產生的 B[a]P-DNA 鍵結物含量，較單獨處理 B[a]P 時明顯增高，這個結果似乎可以用來解釋女性對於化學致癌物的敏感性高，而使其即使沒有吸菸，在肺組織中生成的 DNA 鍵結物之含量還是高於男性的原因之一。

綜合以上的研究結果，或許能有助於了解環境污染物與雌性激素在台灣地區肺癌發生上的重要性，尤其是女性肺癌的發生。

## 貳、文獻綜論

### 一、肺癌之流行病學的研究

根據衛生署統計資料顯示，自民國七十一年以來，惡性腫瘤一直是國內十大死亡原因之首位(衛生署、生命統計, 1984-1992)。而15%至20%癌症死亡人數是由肺癌所造成的。1955年台灣地區男性與女性中，每十萬人口中分別有2.67人和1.25人是因罹患肺癌而導致死亡的，然而，1991年台灣男女性肺癌死亡率已經升高為每十萬人中有25.42人及10.85人(Yang et al., 1984; Department of Health, R.O.C., 1993)，在這不到四十年的時間中，肺癌的死亡率已經增加了十倍之多，而這樣的增加速度是所有惡性腫瘤中最為顯著的。在惡性腫瘤的死亡率中，女性以肺癌為第一大致死原因，而男性為第二位，僅次於肝癌，而肝癌在每十萬人的死亡率僅較肺癌高不到一人(Department of Health, R.O.C., 1993)，因此台灣地區肺癌致病原因之研究是當前必須積極推動的研究主題之一。

至今引起肺癌發生的最重要環境因子仍是吸菸，在美國85%的肺癌死亡、30-40%的心臟疾病死亡以及所有癌症死亡人數之30-40%都是由香菸所造成(U.S. Department of Health and Human Services, 1982; Loeb et al., 1984; IARC, 1986)。它所引起的肺癌即使經過治療，其五年的存活率亦僅有10%。然而，台灣地區女性肺癌患者絕大多數都沒有吸菸(僅3%吸菸)，可是肺癌死亡率竟達到每十萬人有十一人，而台灣地區男性的吸菸人口高達60%，但其肺癌死亡率僅較女性高一倍(Department of Health, R.O.C., 1993)。這顯台



灣地區女性罹患肺癌而死亡的危險率較其他歐美先進國家為高。而流行病學調查也提出，中國女性吸菸人口比率比其他種族女性低，但是肺癌發生率卻依然逐年增高 (Deng and Gao, 1985)。另一方面，組織病理學的分析發現中國女性罹患腺腫瘤 (adenocarcinoma) 的比率也較其他型態的肺癌為高 (MacLennan et al., 1977; Kung et al., 1984; Gao et al., 1987)，而肺腺癌的發生與香菸較無關係 (Lubin and Blot, 1984; Zheng and Gao, 1986)。因此推測除了香菸之外可能還有其他環境因子與中國女性之高肺癌發生率有關。

有關引起肺癌之污染源的研究除了香菸之外，至今已知肺癌的發生和生活習性、飲食習慣、居住環境、職業曝露 (occupational exposure) 等因子也都有密切的關係。近幾年來有學者對於一些潛在的環境危險因子，例如二手菸 (Koo et al., 1985; Chen et al., 1990)、點燃拜香及蚊香所產生的煙霧 (MacLennan et al., 1977; Chen et al., 1990; Ger et al., 1993) 與家庭中烹調時所產生的油煙 (Decoufle et al., 1978) 等空氣污染物與肺癌之間的關係進行研究。

雖然有些研究發現二手菸可能會提高肺癌發生，但是到目前為止，二手菸與中國婦女罹患肺癌之間的關係仍然具有極大的爭議性。有學者研究香港婦女罹患肺癌與其丈夫為吸菸者之間的相關性，結果發現二手菸並不會增加罹患肺癌的危險性 (Koo et al., 1985)。在中國大陸上海地區的研究報告也有相同的結果 (Gao et al., 1987)。但是 Chen et al. (1990) 調查分析台北地區民眾生活環境中的二手菸與肺癌的發生可能有相關性。以上報告研究二手菸與肺癌的關係會有相反的結果，可能與評估二手菸之曝露標準不同有關 (Ger et al., 1993)。

炒菜油煙對中國婦女可能是較特殊的環境污染物。流行病學調查結果顯示，中國大陸地區室內空氣污染物與女性罹患肺癌率有很

大的關係 (Liu et al., 1991, 1993)，特別是廚房產生的空氣污染物。過去的研究顯示，烹調所產生的油煙與鼻咽癌和肺癌的發生有相關性 (Decoufle et al., 1978)。而本研究室也發現中式快炒肉類食品時，所生成的油煙中含有大量的 benzo[a]pyrene (B[a]P), dinitropyrene (DNP) 以及 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) (Lee and Yang, unpublished data)，而過去的結果已知 B[a]P, DNP 與 MeIQx 在動物實驗上會引起肺癌 (Dogra et al., 1985; Ohgaki et al., 1985; Kato et al., 1988, 1989)。因此本實驗室的發現似乎可以印證過去有關油煙會引起肺癌的流行病學的研究結果。

在台灣地區由於傳統文化背景、宗教活動等因素的影響，大數家庭都有點香祭祖和祭神的習慣，其所生成的煙霧懸浮微粒可能是家庭中重要的室內污染源之一。在中國大陸南部之調查結果發現拜香與鼻煙癌可能有關 (Dobson, 1924)，但是香港與廣州等地的報告卻發現兩者之間並無關係 (Yu et al., 1986, 1988)。就拜香與肺癌的關係而言，MacLennan et al. (1977) 發現室內點燃拜香會增加肺癌發生率。而且在性別上因點燃拜香而罹患肺癌的危險明顯不同，在女性方面會增加肺癌罹患率，但是男性卻降低 (Ger et al., 1993)。而其他報告卻顯示點燃拜香與肺腺癌發生呈負相關性，而且兩者並無關係 (Chen et al., 1990; Ger et al., 1993)。這可能由於曝露多種空氣污染源而無法正確估計其曝露量、或曝露拜香的時間不同及受到其他飲食、吸菸、其他空氣污染物等環境因子干擾而造成不同的結果。另外，本研究室最近也發現室內點燃拜香所生成之煙懸浮微粒的基因毒性並不低於香菸，因此拜香或許也是造成台灣婦女罹患肺癌機率較高的特殊環境污染物之一 (Chen and Lee, 1996)。

除此之外，家庭中點燃蚊香與肺鱗狀上皮癌及肺腺癌的發展也

有相關性，尤其是在夜晚睡眠時間仍然點著蚊香入睡者與肺癌的發生之間有更明顯的相關性 (Chen et al., 1990)。

雖然眾所皆知引起肺癌的最主要原因是吸菸，而吸菸也是造成所有癌症死亡的百分之三十到四十 (Loeb et al., 1984)。但是美國近二十年來，吸菸人口由百分之五十降到百分之三十，四十五歲以下的族群肺癌死亡率確實有降低的趨勢，而五十歲以上的人則沒有降低反而有增高的現象 (Devesa et al., 1989)。同樣的在日本吸菸人口也在逐年降低，可是肺癌的罹患率卻逐年大幅增加，即使戒菸者仍然還會罹患肺癌，因此除了吸菸因子之外，可能還有其他的環境因子參與 (Sobue et al., 1991)，特別是來自環境中的空氣污染物。

Doll (1976) 發現住在市區的居民罹患肺癌的機率為居住在鄉村的兩倍，這可能與工業及商業活動頻繁，會產生較多的空氣污染物使得都會區的居民發生肺癌機率大增。因此空氣懸浮微粒中的基因毒物，可能與肺癌發生率是有些相關性的。

由於台灣女性吸菸的比率較男性低得多，可是肺癌的死亡率卻沒有相對的較低，反而有全世界最低的男女性肺癌死亡比 (2.5:1, Chen, et al., 1990)，這些現象都值得我們去探討為何不吸菸的女性會有如此高的肺癌死亡率？是否台灣女性曝露了何種特殊的環境因子，而造成女性罹患肺癌的機會增高。已有流行病學的數據顯示中國婦女罹患肺臟疾病除了二手菸之外，荷爾蒙因子與烹調所生成之油煙可能有些相關性 (Gao et al., 1987)。因此本實驗擬比較男女台灣肺癌患者的肺組織中，DNA 鍵結物的含量有何不同？來初步了解環境污染物和女性罹患肺癌的相關性。

## 二、空氣污染物

### (一) 多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)

多環芳香烴是一種廣泛分佈於環境中的污染物，它的種類相當多，通常是經由有機物不完全燃燒所產生的。其來源包括香菸煙霧懸浮微粒、汽車、運輸貨車、飛機、機車及割草機引擎所排放的廢氣 (Venier et al., 1985; Masclet et al., 1986)，發電廠石化燃料以及焚化爐中廢棄物的高溫燃燒，以及家庭用的瓦斯加熱器、煤油加熱器等燃燒也會產生多環芳香烴，另外鎔煉廠、鑄造工廠以及電鍍工廠等所排放之污染物 (Hazardous Substances Data Bank, 1988; Lee et al., 1994 a,b)，也都是空氣中多環芳香烴之主要來源。除此之外，每日進食的食物，如餅乾、燒烤牛肉 (Liroy et al., 1988, 1990; Rothman et al., 1990) 和食用油加熱所生成的油煙中也都含有多環芳香烴 (Li et al., 1994)。

一般空氣中多環芳香烴的含量約有 80% 是來自於石化燃料的燃燒，而機動車排放物中之多環芳香烴，以美國而言，約佔全年排放總量的 36% (Bjorseth and Ramdahl, 1985)。通常多環芳香烴會透過呼吸道、食道和皮膚進入人體，以美國人為例，每日從空氣中得到 0.207  $\mu\text{g}$  的多環芳香烴，從水中獲得 0.027  $\mu\text{g}$ ，食物中攝取到 0.16 - 1.6  $\mu\text{g}$  (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1990)，如果人們再多抽一根菸則所獲得的多環芳香烴可達到 0.248  $\mu\text{g}$ 。因此人類曝露於多環芳香烴的機會是相當多的。

多環芳香烴在生物體內會經由微粒體單氧化酵素系統

(monooxygenase) 或前列腺素 H 合成酵素 (prostaglandin H synthase) 代謝活化成 epoxide，然後再經水合作用轉變為 diols 型的活化中間產物 (Sims et al., 1974)，此中間產物具有攻擊 DNA 的能力可與 DNA 共價結合形成 DNA 鍵結物，造成基因突變而引起癌症發生 (Dipple et al., 1987)。

由於多環芳香煙的種類繁多，且經過代謝活化之後會產生不同程度的致突變性和致癌性，例如：benzo[a]anthracene (B[a]A), chrysene, benzo[a]pyrene (B[a]P), dibenzo[a,h]pyrene (DB[a,h]P), dibenz[a,h]anthracene (DB[a,h]A) 等是具有間接致突變性的多環芳香煙，而 phenanthrene, benzo[e]pyrene (B[e]P), naphthalene 和 fluorene 等不具有致突變性 (McCann et al., 1975; Pahlman and Pelkonen, 1987; Mersch-Sundermann et al., 1992)。但是多環芳香煙於不同生物分析系統表現的基因毒性也不盡相同，如 anthracene 在 TA98, TA100 和 TA1538 三種菌株中都不具有致突變性，但是在 TA97 菌株卻會表現出致突變性 (Sakai et al., 1985)。

有關多環芳香煙致癌性的研究方面，已知 B[a]P 是一種典型的強致癌物，除此之外，DB[a,h]P 和 DB[a,h]A 也具有非常強的致癌性 (Richard et al., 1990)。為了證實多環芳香煙的致癌性，將多環芳香煙塗抹在老鼠的皮膚上，以觀察動物是否會發生腫瘤，結果顯示有些多環芳香煙，例如 B[a]A, B[a]P 和 DB[a,h]A 都會引起動物的皮膚產生腫瘤 (Verschueren, 1983; IARC, 1983)。它們的基因毒性和致癌性已整理於 Table 1 中。有些多環芳香煙如 B[e]P, dibenz[a,c]anthracene (DB[a,c]A) 只能表現較弱的致癌性 (Pahlman et al., 1988)。Hughes et al. (1993) 以 1.0  $\mu\text{mol}$  的 benzo[g,h,i]perylene (B[g,h,i]P) 處理雄性小白鼠，結果發現 B[g,h,i]P 會與 DNA 結合形成鍵結物，因此認為

B[g,h,i]P 可能是一種弱的腫瘤起始劑 (tumor initiator)。另外，有些多環芳香煙不具致癌性如 fluorene, fluoranthene, naphthalene, anthracene, phenanthrene 等，但是有些多環芳香煙如 acenophthlene, pyrene 和 coronene 等的致癌性目前尚不明瞭，仍待進一步研究。

至於證實會引起人類癌症的研究中，除了香菸外，最重要的可能是中國大陸雲南及貴州地區婦女罹患肺癌與燃燒濕煤有關的研究 (Mumford et al., 1987; Chuang et al., 1992)，他們以高效率液態層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 純化分析燃燒煤球產生的煙塵之主要致突變區中含有高量的 B[a]A 和 Chrysene，因此推測這些多環芳香煙可能是引起中國婦女罹患肺癌之原因。

## (二) B[a]P

### 1. 來源、分佈及含量

曾有學者估計美國每年產生的 B[a]P 高達 900 - 1300 公噸，其中有 37 - 38% 是發電廠在製造能量時產生的，42 - 46% 是由廢棄物燃燒所生成的，15 - 19% 是在烹調食物過程中產生，至於剩下的 1 - 1.5 % 才是來自汽、機車排放的廢氣 (Dipple, 1983)。B[a]P 實際上在環境中的含量分佈為：空氣含有 1 - 100 ng/m<sup>3</sup>、河川水含有 10 - 100 ng/L、一般的飲用水含有 0.1 - 23 ng/L、土壤中的含量則高於 2000 μg/kg，而食品中的蔬菜、海產生物、燒烤的肉類內之 B[a]P 含量大約為 1 - 25 μg/kg (Dipple, 1990)。而有的學者發現每日從食物攝取到的 B[a]P 含量約達到 30 - 1,600 ng (Buckley et al., 1992)。

## 2. 代謝活化和解毒路徑

有關 B[a]P 的代謝活化和解毒路徑已有相當多的研究 (Jeffrey et al., 1976, 1977; Plakunov et al., 1987; Cavalieri and Rogan, 1991, 1992; Flowers-Geary et al., 1995)。B[a]P 有許多代謝路徑，其中主要是經由 cytochrome P450 IA1 酵素系統代謝活化先生成 (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene，然後再繼續氧化形成 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE) 最終代謝物，它會直接攻擊 DNA，因此具有致突變性、致癌性和致腫瘤性。而代謝物主要攻擊 DNA 的 dG 之 N2 位置 (Jeffrey et al., 1976, 1977)。另一個主要代謝路徑是單電子氧化 B[a]P，而產生 radical cation，它就會攻擊 DNA 的 deoxyguanosine 之 N7 胺基的位置，而形成 DNA 鏈結物 (Cavalieri and Rogan, 1992)。至於在動物體中不同器官組織代謝 B[a]P 的能力有何不同？Weyand and Bevan (1986) 的實驗結果顯示，將 B[a]P 直接噴入老鼠氣管內，五分鐘之後，無論在老鼠的肝臟或是肺臟中都可以測到較高濃度 Quinone 類的 B[a]P 代謝物，例如：B[a]P-1,6-quinone, B[a]P-3,6-quinone 及 B[a]P-6,12-quinone。而且肺臟中 B[a]P 的代謝速率也比肝臟較為快速。而 B[a]P 的解毒作用主要是經由 glutathione S-transferase (GST)，此酵素有許多成員，例如 alpha, mu, theta 以及 pi，而其中在細胞內參與 B[a]P 的解毒作用則以 GST pi 為主 (Swedmark et al., 1992)。而此型 GST 會與 B[a]P 的最終代謝物 BPDE 進行結合反應 (conjugation reaction)，而抑制其致突變性和致癌性。在人類細胞株和動物細胞的 GST pi 基因表現就有很大的不同，同時在不同的人類細胞之間可能也有些差異 (Romert et al., 1989; Moscow et al., 1989; Castro et al., 1990; Lee et al.,

1994)。

### 3. 生物活性

B[a]P 的致突變性和致癌性是多環芳香煙中研究最清楚的，已知除了對沙門氏桿菌會表現致突變性外，對 *E. coli* 也會引起基因毒性。將人類白血球細胞以 100  $\mu\text{M}$  B[a]P 處理，在外加酵素活化下，可產生 1.3 adducts /  $10^8$  nucleotides (Roggeband et al., 1993)，相同的 Gupta et al., (1988) 以 30  $\mu\text{g}$  B[a]P 處理，就會生成 2.6 - 48.0 adducts /  $10^8$  nucleotides，其中都具有相同的 BPDE-dG 鍵結物。

在實驗動物上，B[a]P 會引起小老鼠的皮膚癌、胃癌、胃腫瘤及白血病 (Culp and Beland, 1994)。將倉鼠和大白鼠之氣管分離後曝露於 B[a]P 中或以氣管插管法處理倉鼠，結果發現形成的 DNA 鍵結物主要都是 dG-(+)-BPDE (Wolterbeek et al., 1993; Roggeband et al., 1994)。以焦煤爐排放物處理老鼠 24 小時，會在肺臟及心臟測到 B[a]P 的鍵結物，含量分別為 16.3 及 12.9 adducts /  $10^9$  nucleotides，此外，牛皮癬病患每天以含有 10 mg B[a]P 的瀝青治療，在其白血球中，可測到 7.7 adducts /  $10^8$  nucleotides。Harris et al. (1991) 也發現 B[a]P 會造成 ras 原致癌基因 (protooncogene) 之第 12 密碼 (codon) 發生 G  $\rightarrow$  T transversion。Cherpillod and Amstad (1995) 的研究結果顯示 B[a]P 會造成 p53 抑癌基因之第 248 及 249 密碼發生 G  $\rightarrow$  T transversion。這些結果都證實 B[a]P 確實會引起人類和動物的基因發生突變，甚至可能引起人類癌症。



### (三) DNA 鍵結物

Miller (1951) 就提出多環芳香烴會鍵結到老鼠皮膚的蛋白分子上。Brookes 和 Lawley (1964) 證明致癌性之代謝活化物會與皮膚的 DNA 形成 DNA 鍵結物。至此以後，PAHs-DNA 鍵結物在人類各器官都被偵測到，例如肺臟、支氣管、皮膚、胰臟、口腔黏膜、子宮頸和乳房等 (Dunn et al., 1986; Phillips et al., 1988,1990a,b; Everson et al., 1986; Manchester et al., 1988; Seidman et al., 1988; Schoket et al., 1990)。最近在體外和體內實驗中，學者利用敏感性較高的  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 之方法，分析人體曝露在香菸、煤炭和冶煉金屬過程所產生的污染物、引擎廢氣和都會區其他來源之空氣污染物等形成的 DNA 鍵結物，結果顯示香菸在實驗動物 (Randerath E. et al., 1986, 1989) 和人體內 (Randerath K. et al., 1986; Everson et al., 1986; Bond et al., 1989; Garner et al., 1990) 會形成許多 nonpolar / aromatic DNA 鍵結物。van Schooten et al., (1990) 發現肺癌病人的正常肺組織含有 dG-BPDE-DNA 鍵結物，含量介於 2 - 42 adducts /  $10^9$  nucleotides 之間，Izzotti et al. (1991) 分析吸菸者之支氣管洗出液內的巨噬細胞 (macrophage) 中是否存在 DNA 鍵結物，結果也發現了 BPDE - DNA 鍵結物，這表示香菸中的多環芳香烴成份會在肺組織中形成 DNA 鍵結物，可能因而引起肺癌。其他如鑄鐵、建築、鋁工廠的作業工人的白血球中都曾分析到 PAHs-DNA adducts 的存在。

有些報告指出曝露於各種不同污染源之污染物後，體內標的細胞，例如：肺臟內 DNA 鍵結物之含量比非標的細胞，例如：淋巴球來得高，同時也發現 DNA 鍵結物的形成量與其基因毒性的強度有關 (Lewtas et al., 1993)。Perera et al., (1992) 比較分析居住在波蘭環境污

染嚴重的工業區和鄉村地區的人們之白血球細胞，發現工業區居民的白血球中 B[a]P-DNA 鍵結物之含量、姐妹染色分體交換頻率、染色體變異頻率和 ras 致癌基因發生過度表現 (overexpression) 的機率等皆明顯的比污染較低的地區高，但卻發現環境中致癌物之濃度與白血球內 DNA 鍵結物之含量沒有線性的關係，這可能有其他污染物造成 DNA 的傷害或白血球細胞不適宜做為環境污染曝露之標的細胞，以及致癌物彼此之間交互作用影響所致 (Hemminki et al., 1990; Hughes et al., 1993; Heussen et al., 1994)。

現在已知致癌物會在 DNA 上形成 DNA 鍵結物，這可能是引起基因突變，進而引發癌症發生的重要分子機轉。因此環境污染物是否能引起致癌的機制，由標的組織內的 DNA 鍵結物和所引起的主要基因突變，可用來了解環境污染物和癌症的關係。

#### (四) 空氣污染物與肺癌發生之可能關係

##### 1. 動物實驗

在實驗動物上，有些多環芳香烴具有很強的致癌性。若將倉鼠和大白鼠之氣管分離後曝露於 B[a]P 中或以氣管插管處理倉鼠，結果發現形成的 DNA 鍵結物主要都是 dG-(+)-BPDE (Wolterbeek et al., 1993; Roggeband et al., 1994)。Hughes et al., (1993) 以煤焦油 (coal tar) 處理雄性 Parkes 種小白鼠後，發現可引起小白鼠的腫瘤發生，同時與處理人工合成且已知含量之多環芳香烴所形成的鍵結物作一比較，也發現了體內產生 B[g,h,i]P、B[a]P、B[b]F、B[k]F、B[j]F 等的

DNA 鍵結物。

爲了證實多環芳香烴的致癌性，將多環芳香烴塗抹在老鼠的皮膚上，以觀察動物是否會發生腫瘤，結果顯示有些多環芳香烴，例如 B[a]A, B[a]P 和 DB[a,h]A 都會引起動物的皮膚上長出腫瘤。最近也發現 dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P) 是一種很強的致癌物，在 1, 0.25  $\mu\text{mol/gland}$  濃度，就會誘發小老鼠皮膚及乳腺的發生腫瘤，較 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 及 B[a]P 的致癌性還要強 (Higginbotham et al., 1993)。

## 2. 職業曝露

流行病學的研究顯示由於職業而曝露於特定污染源的人，肺癌發生率亦較一般人高。例如已知會引起人類肺癌的相關職業有：曝露於柴油引擎廢氣之鐵路工人 (Howe et al., 1983; Garshick et al., 1988)，與砷、鐵、鎳、銅、鎘、鉻煉礦廠、石棉礦廠、電池工廠和煉鋼廠等相關職業之工人 (Simonato et al., 1988)。其中鎳鎘煉廠的工人，每 418 個人就有兩個人發生肺癌 (Karjalainen et al., 1992)。另外也發現可能會造成肺癌發生的工作有鋁製品、油漆、印刷、橡膠業、洗衣業等。有學者發現在罹患鱗狀細胞癌 (Squamous cell carcinoma) 的肺腫瘤組織中有高濃度的鉻金屬存在 (Adachi et al., 1991)，這顯示鉻鎘煉廠的作業工人，在工作時曾污染到金屬成分而發生肺癌。Clonfero et al. (1995) 從操作煤炭鍋爐工人的尿液中也發現具有致突變性的多環芳香烴之代謝物。而且從冶煉工廠、金屬鑄造工廠和電鍍工廠排放出的廢氣中，也發現致突變物與致癌物的存在 (Venier et al., 1985; Masclat et al., 1986)。

此外，新加坡學者發現華人廚師罹患肺癌的機率較高 (Law et al., 1976)。Dubrow et al. (1984) 和 Coggon et al. (1986) 也發現廚師罹患呼吸道癌症的機率也較其他癌症的機會高。流行病學調查研究結果發現，烹調時所產生的油煙會引起鼻咽癌、口腔癌、膀胱癌和肺癌 (Coggon and Wield, 1993)。而廚房烹調油煙污染物主要是來自燒烤及油煎肉類食品 (Sflomos et al., 1989; Lofroth et al., 1991)。當烹調肉類時，溫度達到 200°C 前的 6 分鐘，油煙會隨著蒸汽蒸發至空氣中 (Husgafvel-Puriainen et al., 1986; Berg et al., 1990)，所生成的油煙懸浮微粒是有致突變性的。

中國大陸地區室內空氣污染物與女性罹患肺癌率有些關係 (Liu et al., 1991, 1993)，特別是廚房產生的空氣污染物，燃燒煙煤 (smoky coal) 所生成的懸浮微粒較燃燒木炭較易引起吸菸女性罹患肺癌，尤其是肺腺癌，它所產生的室內空氣的 B[a]P 含量平均高達 627  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  及 46  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，若婦女在廚房烹調的時間愈久，則罹患肺癌的機率即愈高，同時也發現若廚房改善通風設備後，會明顯降低罹患肺癌的危險率。

以上這些研究結果都推測環境中的基因毒物可能是引起肺癌的主要致癌因子，因此了解這些環境致癌物的來源、含量及其致癌機制都是研究肺癌發生的重要工作。

### 三、不同性別對致癌物的生物反應

過去許多學者以不同的致癌物做動物致癌性研究，有時會發現不同性別在不同器官會有不同的致癌性反應 (Guo et al., 1990; Zu and

Schut, 1991)。有的學者認為是不同性別之器官中有不同程度的代謝酵素及活性 (Zu and Schut, 1991)。因此代謝活化產生最終代謝活化物的能力不同，而造成致癌性不同。但有的學者則發現性激素對致癌物引起 DNA 的傷害有不同的影響。例如僅會引起雌性老鼠發生肝癌的致癌物 —  $\beta$ -blocker DL-1-(2-nitro-3-methyl-phenoxy)-3-tert-butylamino-propan-2-ol (DL-ZAMI 1305)，若將雌鼠除去卵巢或注射雄性激素 testosterone 一星期，則此致癌物所引起的 DNA 傷害會完全消除。相反的，若將雄鼠進行睪丸摘除手術後，再給予雌性激素 17 $\beta$ -estradiol，則 DL-ZAMI 1305 所造成的肝臟 DNA 傷害程度與雌鼠相似 (Ragnotti et al., 1987)。由此可知性別不同所造成之生物反應不同，和性激素不同有關，其作用機轉可能是性激素會調控微粒體混合功能氧化酵素 (microsomal mixed function oxidase system) 的活性，而改變致癌物的代謝活化。Han 和 Liehr (1994) 發現長期皮下注射給予雄性 Syrian 倉鼠雌性激素會引起腎臟癌，這是由於雌性激素和其衍生物間會進行 redox cycling 造成 DNA 單股斷裂 (single-strand breaks) 之傷害。同樣的 estrogen 刺激造成 VP-16 誘發 DNA 斷裂之現象也被發現於人類乳癌細胞中 (Epstein et al., 1988)。至於致癌物在雌雄性動物體中產生之 DNA 鍵結物是否不同？Levy 和 Weber (1992) 以 2-aminofluorene 處理 20-23 週後，發現雄性老鼠之膀胱 DNA adducts 較雌性老鼠高很多，可能由於雄鼠腎臟代謝 2-AF 的 N-acetyltransferase 活性較雌鼠高兩倍，同時也發現雄性激素會促進環胺類致癌物在腎臟中的代謝活化。Randerath et al.(1989) 發現未經致癌物處理的雌老鼠肝臟中非極性之未知 DNA 鍵結物 — I compounds 遠較雄鼠為高。I compounds 的來源可能不是環境污染物，而是內在機轉過程中所生成的。這種 DNA 的傷害也會干擾 DNA 的複製，同

時可能在自然或化學致癌和衰老上扮演一定的角色。由以上的討論可知許多致癌物在不同性別的動物會有不同的生物反應。因此引起癌症發生的分子機轉中除了應探討環境致癌物所造成之傷害外，還須注意到生物體之內生性的性激素對環境污染物的生物活性表現之影響。

## 參、研究動機

多環芳香烴是一種廣泛存於空氣中的環境污染物，由過去的研究顯示，香菸、煤炭和冶煉金屬過程所產生的污染物以及引擎廢氣和都會區中其他來源之空氣污染物，會在實驗動物及人體內形成許多芳香族 DNA 鍵結物 (aromatic DNA adducts) (Randerath K. et al., 1986,1989; Everson et al., 1986; Bond et al., 1989; Garner et al., 1990)。目前已知致癌物或其代謝物與 DNA 產生 DNA 鍵結物是化學致癌的起始步驟 (Singer and Grunberger, 1983)，因此在致癌過程中，分析標的組織內的 DNA 鍵結物的種類和含量，將有助於瞭解污染物與腫瘤發生之相關性。

由於台灣女性吸菸的比率 (3%) 較男性低得多 (Department of Health, R.O.C., 1993)，可是肺癌的死亡率卻沒有相對的較低，這些現象都值得我們去探討為何不吸菸女性的肺癌死亡率，卻沒有較吸菸男性相對減低許多？換言之，台灣地區女性之肺癌死亡率比較其他西方國家高的多 (Chen et al., 1990)。這是否與台灣女性曝露特殊的環境因子，或是有內在因子，例如雌性激素，促使女性罹患肺癌的機會增高。有許多流行病學的數據顯示中國婦女罹患肺癌除了與二手菸有關之外，體內激素與烹調所生成之油煙可能也有些相關性 (Gao et al., 1987)。因此本實驗擬比較男女台灣肺癌患者的肺組織中，DNA 鍵結物的含量有何不同？吸菸對 DNA 鍵結物形成之影響以及雌性激素對 B[a]P 在人類肺細胞細胞株形成 DNA 鍵結物的影響，來初步了解環境污染物和女性罹患肺癌的相關性。

## 肆、材料與方法

### 第一部份

#### 一、化學藥品與材料

多環芳香烴 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 標準品由美國 Supelco 公司購得。1,6-Dinitropyrenes (1,6-DNP), micrococcal endonuclease (MN), potato apyrase (PA), bicine solution, ammonium formate (AF), 由美國 Sigma 化學藥品公司購得。Sodium sulfate anhydrous, sodium hydrogen sulfide monohydrate, tetrabutylammonium chloride (TBAC) 由瑞士 Fluka 化學藥廠購得。Sodium dodecyl sulfate (SDS), isoamyl alcohol, sodium acetate, ammonium sulfate, 由日本 Wako 公司購得。Phenol 由美國 Amresco 公司購得。Formic acid 由 Riedel-de Haen 公司購得。Calf thymus DNA, proteinase K, nucleas P1, RNase A, RNase T1, spleen phosphodiesterase (SPD), EDTA, Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris), Tris-hydrochlorid (Tris-HCl) 由德國 Boehringer Mannheim 公司購得。T4 polynucleotide kinase 由美國 Bio-Labs 公司購得。[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 由英國 Amersham International Plc. 公司購得。X-ray film 購自美國 Kodak 公司。PEI-cellulose TLC plate 由德國 Macherey-Nagel 公司購得。其它實驗藥品和有機溶劑均屬分析級和光譜級，大多購自德國 E. Merck 藥品化學公司及台灣皓峰公司。



## 二、肺癌病患之正常組織檢體來源

63 位肺癌病患之正常肺組織是由台中榮總胸腔外科所提供。所有組織都是經由外科手術取下位於腫瘤週邊的組織，並經過病理檢驗確定為正常之肺組織。當組織取下後被迅速保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中，以保持組織的新鮮。

## 三、肺組織 DNA 之萃取

將適當大小的肺組織剪下置於 eppendorf 管內，加入  $500\ \mu\text{l}$  含有  $25\ \text{mM}$  EDTA,  $100\ \text{mM}$  NaCl,  $0.5\%$  SDS 和  $10\ \text{mM}$  Tris 的 digestion buffer，然後於液態氮中迅速冷凍，再放入  $45^{\circ}\text{C}$  的溫水中快速回溫，重複此步驟三至五次，使外圍的結締組織變脆，再加入  $5\ \mu\text{l}$  proteinase K ( $10\ \text{mg/ml}$ ) 在  $56^{\circ}\text{C}$  培育數小時。以等體積 phenol : chloroform : isoamyl alcohol ( $25 : 24 : 1$ , v/v/v) 混合液萃取，經混和均勻後，以  $12,000\ \text{rpm}$  的速度離心 10 分鐘，取上清液後，再重覆做同樣動作二次，以完全去除蛋白。再加入等體積 chloroform : isoamyl alcohol ( $24 : 1$ , v/v) 混合液萃取，經混和均勻 5 分鐘後，以  $12,000\ \text{rpm}$  的速度離心 5 分鐘，以去除 phenol。取上清液加入 1/10 體積的  $3\ \text{M}$  sodium acetate 及 2 倍體積  $100\%$  cold ethanol 混和均勻，靜置於  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱中 2 小時。以  $5,000\ \text{rpm}$  離心 5 分鐘，收集 DNA 沈澱物，再以  $70\%$  cold ethanol 洗去殘留的鹽類兩次，離心留下 DNA 沈澱物，以滅菌水於  $56^{\circ}\text{C}$  溶解 2 小時。最後以紫外線光譜儀測定 DNA 在  $260\ \text{nm}$  和  $280\ \text{nm}$  的吸光值，其  $A_{260} / A_{280}$  之比值應在

1.8 左右，若小於 1.8 則表示蛋白質含量太高，若大於 1.8 則表示 RNA 含量太多，則需要 RNase A 和 RNase T1 處理以水解多餘的 RNA。DNA 的濃度以下列的公式計算： $\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{稀釋倍數}$ 。

四、 $^{32}\text{P}$ -postlabeling 分析法 (Gupta et al.,1982; Gupta, 1985; Roy et al., 1989; Geneste et al., 1991)

(一) 以 PAH-DNA 鍵結物之移動相分析 Aromatic/hydrophobic DNA 鍵結物

首先取 2  $\mu\text{g}$  DNA 加入至含有 0.75 unit micrococcal endonuclease 和 7.75  $\mu\text{g}$  spleen phosphodiesterase 之 succinate buffer 中，於 37°C 水浴中培育 4 小時，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotides 3'-monophosphate。以 nuclease P1 方式進行 DNA adduct enrichment，則加入 6  $\mu\text{g}$  nuclease P1, sodium acetate,  $\text{ZnSO}_4$  於 37°C 水浴中培育 1 小時。然後加入含有 5 units 之 T4 polynucleotide kinase 和 1  $\mu\text{l}$  之 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP 的混合液，於 37°C 水浴中培育 1 小時以進行 postlabeling 反應，最後將此放射性標記過的 DNA 鍵結物點在 PEI-cellulose TLC plate 上，利用下列移動相展開：D1- 2.4 M sodium phosphate (pH 6.0); D3- 3.6 M lithium formate, 8.5 M urea (pH 3.5); D4- 0.8 M lithium chloride, 0.5 M Tris base, 8.0 M urea (pH 8.0)。展開後的 TLC 片先以 counter 測定其放射性強度後放入 X 光片夾中，以 TLC 片子上的放射性強度決定置於 -80°C 冰櫃中穩定顯影的時間，

曝光後，X 光片上會顯出 DNA 鍵結物之位置。另外，稀釋 DNA 水解溶液並以 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP 標記所有核苷酸 (total nucleotides)，然後利用 40 mM ammonium sulfate (pH 5.27) 展開，確定所有核苷酸之位置。定量時則依照 X 光底片上的相對位置，將 PEI plate 上的 DNA 鍵結物與所有核苷酸剪下，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。以下列公式計算 DNA 鍵結物之相對含量：

$$\text{Relative adduct labeling (RAL)} = \text{cpm in adducts} / \text{cpm in total nucleotides} / \text{dilution factor} \circ$$

## (二) 以 Nitro-PAH 鍵結物之移動相分析 1-NP 及 DNP 之 DNA 鍵結物

首先 10  $\mu\text{g}$  DNA 加入至含有 1.5 units micrococcal endonuclease 和 15.5  $\mu\text{g}$  spleen phosphodiesterase 之 succinate buffer 中，於 37°C 水浴中培育 4 小時，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotides 3'-monophosphate。加入 10 mM tetrabutylammonium chloride 和 100 mM ammonium formate (pH 3.5)，以等體積的 1-butanol 萃取兩次，收集上層液 (1-butanol 層)，接著以 Speed Vac 減壓濃縮後，溶於 18  $\mu\text{l}$  的無菌水中，然後進行 postlabeling 的步驟。利用下列移動相展開：  
D1- 0.65 M sodium phosphate (pH 6.0); D3- 3.6 M lithium formate, 8.5 M urea (pH 3.5); D4- 1.2 M lithium chloride, 0.5 M Tris base, 8.0 M urea (pH 8.0); D5- 0.9 M sodium phosphate (pH 6.8)。顯影與定量的步驟同上節所述。

## 第二部分

### 一、材料與藥品

F-12 medium, RPMI-1640 medium, McCoy's 5A medium, BME medium, DMEM medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids (NEAA), trypsin 均由美國 Gibco BRL 公司購得。細胞培養皿由丹麥 Nunc 公司購得。Methylene blue, 17 $\beta$ -estradiol, bovine serum albumin (BSA), 6-amino-n-hexanoic acid, tween 20,  $\beta$ -naphthoflavone,  $\beta$ -naphthoflavone 由美國 Sigma 公司購得。Pyridine 由美國 Aldrich 公司購得。Acrylamide, boric acid, sodium phosphate, methanol 由德國 E. Merck 公司購得。Antibody, AEC chromophores 由美國 Calbiochem 公司購得。Nitrocellulose paper 由美國 Schleicher & Schuell 公司購得。Ammonium persulfate (APS), tetramethyle thylenediamine (TEMED) 由 Bio Rad 公司購得。其他藥品與第一部份相同。

### 二、人類肺細胞株之來源

台灣肺腺癌細胞株 CL-3 及 CL1-0, CL1-2 是由台大醫院內科楊泮池醫師分離培養出來，並由其提供本研究室使用。人類正常肺細胞株 MRC-5 由台北榮總醫學研究部所贈與。人類肺鱗狀上皮癌細胞株 Calu-1 以及美國肺腺癌細胞株 A-427 則由美國 American type culture collection (ATCC) 購得。

### 三、細胞培養

CL-3, CL1-0, CL1-2 及 Calu-1 細胞分別以含有 10% fetal bovine serum (FBS), 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03% L-glutamine 和 0.03% penicillin/streptomycin (100 U/ml) 之 F-12, RPMI-1640 及 McCoy's 5A medium 培養。MRC-5 細胞及 A-427 細胞則分別培養於含有 1 mM sodium pyruvate 及 100  $\mu$ M non-essential amino acids (NEAA) 之 DMEM 和 basal medium eagle (BME) medium 中 (其餘配方同上)。將細胞置於 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 恆溫培養箱內培養。

### 四、細胞毒性分析 (Cytotoxicity test)

本實驗是依照 Freshney (1992) 之方法進行。其步驟如下：在每一個 60 mm 培養皿中種  $1 \times 10^6$  的肺細胞隔夜培養後，以含有不同濃度之 B[a]P 的新鮮細胞培養液處理，每種濃度各處理三個 60 mm 培養皿，24 小時後，將含有 B[a]P 之培養液移除，並以磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 沖洗二次，以除去殘留的 B[a]P。加入 2 ml 甲醇固定細胞 10 分鐘，以 2 ml borate buffer 洗過兩次後，用 2 ml methylene blue 染色 10 分鐘，再以 borate buffer 沖洗數次，將多餘的 methylene blue 完全洗淨，再將此培養皿留置室溫下乾燥 2-3 小時後，加入 2 ml 0.1 M HCl 置於迴旋式震盪器上緩緩搖動 15 分鐘，以溶出染料，取此溶出液在 660 nm 下讀出其吸光值，以此數值和負控制組比較，計算出其相對細胞毒性。

## 五、細胞株 DNA 之萃取

經過處理的肺細胞以 standard phenol 方法萃取 DNA。首先以 phenol 變性蛋白，然後再以 chloroform 去除水層殘餘的 phenol。最後以 100% cold ethanol 和 3 M sodium acetate 沈澱 DNA (步驟同第一部份第三節)。

## 六、B[a]P-DNA 鍵結物之分析

經過處理的肺細胞取 2  $\mu$ g DNA 以  $^{32}$ P-postlabeling 方法分析 B[a]P-DNA 鍵結物，步驟同第一部份第四節。

## 七、高效率液態層析儀分析 B[a]P-DNA 鍵結物 (high performance liquid chromatography, HPLC)

利用前述的方法將 DNA 以酵素水解為單一核苷酸後以 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP 標記 DNA 鍵結物，然後利用 0.65 M sodium phosphate (pH 6.0) 展開，將正常的核苷酸移除。將展開後的 TLC 片子上原點位置的 PEI 刮下置於 1.5 ml 的 eppendorf 管內，加入 500  $\mu$ l 4.0 M pyridinium formate (pH 4.5) 以 vortex mixer 激烈震盪以萃取附著於 PEI 上的 DNA 鍵結物，然後以 12000 rpm 的速度離心 10 分鐘，取上清液，接著以 Speed Vac 減壓濃縮後溶於 500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.5) 中。以 Waters 600 E 之 HPLC 分析其中的 BPDE-DNA 鍵結物。

HPLC 分析的條件大致如 Robertson (1986) 所述。所用之管柱為 Merck RP-18 column (particle size 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.d.)，流速為 1 ml/min，以 A =  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$  (500 mM, pH 2.5) 和 B = methanol 為移動相，以 linear gradient 的方式分離，分析時間為 90 分鐘。收集每分鐘的沖出液，加入閃爍計數液以 Beckman L-6500 Scintillation Counter 測定其放射性強度。

#### 八、細胞週期分析 (Cell cycle assay)

將  $1 \times 10^6$  細胞種於 100 mm 培養皿中隔夜培養後，以含有不同濃度之 B[a]P 的新鮮細胞培養液處理 24 小時後，將含有 B[a]P 之培養液移除，並以 PBS 沖洗二次，以除去殘留的 B[a]P，防止 B[a]P 與細胞繼續作用。然後將此經過化學物處理過的細胞取  $2 \times 10^5$  細胞種至新的十個 60 mm 培養皿中，之後每隔一日收穫兩盤計數其細胞數目，以 log phase 計算出該細胞的細胞數增殖兩倍的時間 (doubling time)，這即是該細胞一個細胞週期所需的時間。

#### 九、細胞增生試驗 (Cell proliferation assay)

取適當數量細胞種於 60 mm 培養皿中，隔夜培養後，同樣處理不同濃度之 B[a]P，之後每隔一天換一次含有 B[a]P 的新鮮培養液繼續培養，直至第七天，將細胞收穫 (harvested)，以血球計數器計算細胞數目 (Chaloupka et al., 1992)。

## 十、蛋白定量分析

肝臟微粒體酵素 (microsome) 及細胞均質液中蛋白質之含量採用 Lowry (1951) 所述的方法測定，原理與方法簡述如下：利用 alkaline copper-phenol 試劑和 tyrosine/tryptophan 反應形成藍黑色複合物，以 720 nm 波長測定其吸光值，並以蛋白質標準品 bovine serum albumin (BSA) 所測得的標準曲線來計算樣品中蛋白質的濃度。利用 0.5 M NaOH 稀釋 BSA 標準品及欲測之樣品，製備成 1 ml 之蛋白-NaOH 溶液，再分別加入 Lowry 試劑靜置於室溫下 10 分鐘，然後加入 0.5 ml phenol reagent 立刻混和均勻，於室溫下靜置 30 分鐘，使之反應呈色。在測其吸光值前，須再混和均勻，然後以紫外線光譜儀在 720 nm 光波下測定其吸光值，並將蛋白標準品測得之吸光值畫成標準曲線，利用此線計算出樣品中蛋白質的相對濃度。

## 十一、西方墨點轉漬法 (Western blotting analysis)

取細胞均質液加入等體積的 loading buffer 混合均勻，100°C 加熱 5 分鐘使蛋白變性，然後取 10  $\mu$ l 放入含有 SDS 的 10 % acrylamide gel 以進行蛋白電泳 (protein electrophoresis)。電泳完畢後，將硝化纖維紙 (nitrocellulose paper) 蓋在以 Tris buffer 浸溼的濾紙上，然後再將膠體平鋪於上面，再蓋上以含有 40 mM 6-amino-n-hexanoic acid 的 Tris buffer 浸溼的濾紙，以玻璃棒趕走其間的氣泡，然後放入 Semi-Dry 內以進行蛋白轉移 (transfer)。

蛋白轉移結束後，將硝化纖維紙取出浸入 5% 牛奶中，先在室溫



下緩慢搖動 2 小時，然後在 4°C 中繼續作用 18 小時。隔日，將牛奶倒掉後，加入含有 Anti-CYP IA1 antibody 的 5% 牛奶，在室溫下搖動 2 小時，然後以含有 0.05% tween 20 的 PBS 清洗 6 次，每次 10 分鐘。以純水將硝化纖維紙稍微沖洗，再進一步與以 peroxidase 結合的 secondary antibody 作用 2 小時，再重複沖洗步驟，最後，將呈色劑加入進行呈色反應，待色帶 (band) 出現後，終止反應，再用蒸餾水清洗之。

## 伍、結果與討論

### 第一部分

#### 一、吸菸對肺癌病患肺組織中之 DNA 鍵結物形成之影響

爲了探討吸菸對於台灣地區肺癌病人肺組織中 DNA 鍵結物形成之影響，本實驗由臺中榮總胸腔外科提供經由外科手術所得之 63 位肺癌病人的正常肺組織，利用 phenol 萃取肺組織之 DNA，再以  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 的方法偵測芳香族化合物所生成之 DNA 鍵結物 (aromatic/hydrophobic DNA adducts) 的含量。在  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 分析的過程中，利用 nuclease P1 酵素水解 DNA 的方式來增強樣品中 DNA 鍵結物的含量。Table 2 顯示 63 位肺癌病患正常肺組織中 DNA 鍵結物的含量，並列出病患的年齡、性別、吸菸量、肺癌的組織學分類及腫瘤的分期等基本資料。在 63 位病患中有 41 位吸菸者，都是男性，年齡最長者爲 83 歲，最年輕者爲 43 歲，平均年齡爲  $66.76 \pm 7.46$  歲。所有肺癌病患中每日吸菸支數最多的是 50 支 (2.5 包)，最少的每日僅抽 5 支，有 78% 的病患每日至少抽 20 支以上的香菸 (平均吸菸支數爲  $20.99 \pm 9.17$ )。菸齡最長爲 60 年，而終身吸菸量則介於 1,800 包到 45,600 包香菸之間，其平均吸菸量爲  $14,200 \pm 8,500$  包。在 63 位肺癌病患中不吸菸者共有 22 位，平均年齡爲  $59.32 \pm 10.86$  歲 (Table 3)。

將吸菸與不吸菸之肺癌病患肺組織的 DNA 鍵結物之 PEI 色層分析圖譜做一比較，發現吸菸者並沒有任何特異的 DNA 鍵結物圖譜

(profiles) 出現，然而過去有學者發現吸菸者肺組織 DNA 鍵結物之色層分析圖譜會有兩個帶狀區域圖譜 (diagonal radioactivity zone, DRZ)，且此 DRZ 的 DNA 鍵結物之含量會隨著吸菸的總量增加而增多 (Randerath et al., 1989; Geneste et al., 1991)，但本實驗發現台灣地區肺癌病患肺組織的 DNA 鍵結物之圖譜呈多點狀居多，最多者出現 7 個圓點 (Fig. 9A)，最少者只有兩個圓點 (Fig. 9B)，但都沒有發現類似 DRZ 的圖譜，這可能是本實驗在進行色層分析時，所使用的移動相 (mobile phase) 含有較高濃度的尿素，增強溶液中正電子的數目，而使帶有負電子的一些移動較慢的芳香族 DNA 鍵結物較易分開所致。

若將吸菸者與不吸菸者之 DNA 鍵結物的含量做一分析，發現台灣地區不吸菸之肺癌病患的 DNA 鍵結物平均含量 ( $54.94 \pm 44.58$  adducts /  $10^8$  nucleotides) 較吸菸者 ( $51.66 \pm 36.24$  adducts /  $10^8$  nucleotides) 稍高，但兩者之間沒有統計學上的差異 ( $p = 0.814$ )。若僅比較吸菸及不吸菸男性 DNA 鍵結物平均含量時，卻發現不吸菸男性的 DNA 鍵結物之含量 ( $29.82 \pm 13.13$  adducts /  $10^8$  nucleotides,  $n = 8$ ) 比吸菸者 ( $51.66 \pm 36.24$  adducts /  $10^8$  nucleotides,  $n = 41$ ) 低的多，但可能由於不吸菸和吸菸男性肺癌病患之樣品數差異太大或個體間差異，而造成兩者間在統計上仍然是沒有意義的 ( $p = 0.172$ )。

爲了瞭解吸菸量和肺組織中 DNA 鍵結物形成量上的關係，我們將病患的每日吸菸量與 DNA 鍵結物的含量做一比較，令人驚訝的發現是，每日吸菸的數量對 DNA 鍵結物的形成量並無影響 (Fig. 1,  $p = 0.21$ )，爲了避免影響吸菸量的重要性，在這個分析中我們並未將不吸菸者一併計算。此外，爲了瞭解吸菸病患的菸齡及終身吸菸的總量是否會影響吸菸病患之 DNA 鍵結物形成量，因此分析了終身吸菸總

數量、吸菸年數和 DNA 鍵結物形成多寡之間的相關性，但此二者與 DNA 鍵結物形成量之間仍然沒有任何的相關性 (Fig. 2,  $p = 0.18$  和 Fig. 3,  $p = 0.88$ )。由以上的結果顯示，吸菸在台灣地區肺癌病患肺組織中形成之 DNA 鍵結物的含量上，可能不是重要的影響因子。

Table 4 是將台灣地區吸菸病患終身吸菸總數量與過去許多學者 (Phillips et al., 1988; Geneste et al., 1991; Alexandrov et al., 1992; Ryberg et al., 1994) 所分析不同國家肺癌患者的吸菸總量做一統計比析，結果發現台灣地區肺癌患者與其他各國肺癌病患的吸菸量沒有差異 ( $p = 0.19$ )，然而台灣地區吸菸的肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的含量，竟然比其他地區的病患高出 5~10 倍。這結果暗示台灣地區肺癌病患可能曝露較多的吸菸以外之環境污染物，而造成台灣肺癌病患的 DNA 鍵結物含量較其他國家為高。另外，本實驗室先前對台灣本地及美國品牌的香菸進行分析，發現台灣的香菸萃取物對沙門氏桿菌造成的基因突變的形式 (Mutational type) 與美國香菸並不相同，台灣香菸萃取物主要是對 TA98 菌株產生致突變性，而美國香菸則是對 TA100 菌株產生較強的致突變性 (Chen and Lee, 1996)，已知引起 TA 98 菌種發生突變的致突變物應屬結構移位 (Frameshift) 致突變物，TA100 菌種主要是測試鹼基互換 (Base substitution) 致突變物。至於台灣和美國香菸所含致突變物的基因突變形式不同與肺組織中 DNA 鍵結物的差異是否有相關性，是值得進一步探討的研究課題。

過去有許多學者針對肺癌病患所作的研究結果顯示吸菸患者肺組織中 DNA 鍵結物的含量比不吸菸患者高 (Randerath et al., 1989; Cuzick et al., 1990; Geneste et al., 1991; Ryberg et al., 1994)，由這個結果他們認為吸菸對肺臟中 DNA 鍵結物的形成扮演了重要的角色。Phillips et al.(1988) 首先提出 DNA 鍵結物的含量和病人每日吸菸的

支數及終身吸菸的總量有線性濃度效應關係，同時 Randerath et al. (1989) 也提出相同的論點，因此香菸和肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的形成似乎有密不可分的關係。然而最近幾年許多報告卻顯示 DNA 鍵結物的含量與每日吸菸的支數之間並沒有相關性 (van Schooten et al., 1990; Geneste et al., 1991; Ryberg et al., 1994)，而且 DNA 鍵結物的含量與吸菸的時間竟呈反比的關係 (Ryberg et al., 1994)，亦即吸菸愈久之肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的含量則反而愈少。本實驗結果亦顯示台灣地區吸菸和不吸菸肺癌病患之間，DNA 鍵結物的含量沒有差異 ( $p = 0.814$ )，而且吸菸的數量和 DNA 鍵結物的含量也無相關性，這些結果似乎顯示吸菸在台灣地區肺癌發生的重要性，可能沒有其他環境或內在因子來得重要。

本實驗的 41 位吸菸肺癌患者中，有 56% 的患者每日有 20 支的吸菸量，但是其 DNA 鍵結物的含量有 5 倍的差異。Ryberg et al. (1994) 對吸菸的肺癌患者所做的分析顯示，每日吸菸量在 15 至 20 支的病患之肺組織中 DNA 鍵結物含量的差異卻高達 25 倍，作者推測造成 DNA 鍵結物形成量差異如此大的原因可能與各病患之解毒能力不同有關。最近也有許多研究顯示，個體之間對於致癌物的代謝和解毒能力不同，會影響個體間產生不同程度的 DNA 傷害 (Harris et al., 1989)。Ryberg 的實驗結果可用來解釋雖然有許多的環境因子會影響 DNA 鍵結物的形成，但是，個體之間遺傳因子的差異也是不可忽略的重要因素 (Alexandrov et al., 1992; Shield et al., 1993; Grinberg-Funes et al., 1994)。因此即使是環境致癌物的曝露量相同，但是所形成的 DNA 鍵結物含量可能會有很大的差異。然而分析台灣地區每日吸 20 支菸的 23 位肺癌病患之正常肺組織中 DNA 鍵結物的含量雖然有差異，但僅有五倍的差異，這個結果似乎暗示著台灣地區肺癌病患

正常肺組織中 DNA 鍵結物生成量與遺傳因子之間的相關性，似乎不是那麼的重要。

## 二、台灣地區男、女性肺癌病患肺組織中之 DNA 鍵結物含量及色層分析圖譜之比較

爲了探討台灣男、女性肺癌病患肺組織中之 DNA 鍵結物含量及色層分析圖譜有何差異，本實驗所分析 63 位台灣肺癌病患的正常肺組織中之 DNA 鍵結物的含量，其中男性有 49 位，女性有 14 位，平均年齡分別爲  $65.96 \pm 7.97$  歲及  $57.86 \pm 11.54$  歲。男性僅 8 位爲不吸菸者，女性皆爲不吸菸者 (Table 5)。

首先，在 DNA 鍵結物含量的分析上，發現台灣女性肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的平均含量爲  $70.65 \pm 49.41$  adducts /  $10^8$  nucleotides，而男性是  $48.10 \pm 34.44$  adducts /  $10^8$  nucleotides，女性 DNA 鍵結物之平均量約是男性的 1.5 倍 (Fig. 4)，但由統計學上分析的結果顯示，男、女性肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的平均含量並沒有差異 ( $p = 0.098$ )。若將吸菸的因子排除，男性不吸菸患者肺組織中的平均 DNA 鍵結物之含量爲  $29.82 \pm 13.13$  adducts /  $10^8$  nucleotides，與女性肺癌病患 DNA 鍵結物的平均含量具有明顯的差異 ( $p = 0.014$ )。

Table 6 是將全部 63 位無論吸菸與否之台灣肺癌病患 DNA 鍵結物的含量與過去許多學者 (Phillips et al., 1988; Cuzick et al., 1990; van Schooten et al., 1990; Geneste et al., 1991; Alexandrov et al., 1992; Shield et al., 1993; Ryberg et al., 1994) 分析不同國家肺癌患者肺組織

中 DNA 鍵結物的含量做一比較，結果發現台灣肺癌病患 DNA 鍵結物含量較其他國家高 5 - 16 倍。這個結果似乎又一次暗示台灣地區可能存在一些特殊的環境因子或其他內在因子而使得台灣肺癌患者肺組織之中具有高含量之 DNA 鍵結物。

Ryberg et al. (1994) 的分析結果顯示，只有在吸菸的女性肺癌患者中 DNA 鍵結物的含量才會比男性高。若再將吸菸量做一校正，則更突顯出吸菸女性肺癌的 DNA 鍵結物的含量較男性為高。因此 Ryberg 認為女性對於香菸中基因毒物的敏感性較男性為高，才會造成吸菸女性的 DNA 鍵結物比男性多。Ryberg 又發現不吸菸的女性 DNA 鍵結物的平均含量 ( $1.70 \pm 0.80$  adducts /  $10^8$  nucleotides) 還是較男性不吸菸者為低 ( $2.72 \pm 1.23$  adducts /  $10^8$  nucleotides)。但是本實驗所分析的 14 位女性肺癌患者皆為不吸菸者，DNA 鍵結物的平均含量卻比 Ryberg 所分析的不吸菸女性高出 42 倍，比吸菸女性也高約 5.2 倍。這都顯示台灣女性肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的含量比其他國家為高，這結果可能暗示國內女性可能曝露一些特殊的環境污染物。若進一步僅比較台灣不吸菸的男、女性肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的含量時，發現女性肺癌患者的 DNA 鍵結物的含量更明顯的比男性為高 (Table 5)，這可能與女性對環境致癌物的敏感性較高有關 (Ryberg et al., 1994)。另外一些流行病學報告結果顯示中國婦女比其他國家婦女有較高的肺癌發生率可能和曝露一些特殊的環境因子，例如二手菸、燃燒煤炭、烹調食物所生成之油煙、燃燒拜香等有關 (Gao et al., 1987; Ger et al., 1993)。Scherer et al. (1992) 分析二手菸的基因毒性，將二手菸分為揮發性物質與懸浮微粒兩大類，結果發現存在於揮發態內的物質才是進入人體的主要部份，但是真正具有基因毒性的物質卻是存在於懸浮微粒中，故推測僅有少量的基因毒物能由

二手菸提供，因此他們認為二手菸並不是引起肺癌的主要污染物。Takagi et al.(1995) 發現香港女性肺癌患者 p53 基因發生突變的比例比日本女性低，僅有 20% 的突變率，而且有 43% 的 p53 基因突變圖譜屬於單一鹼基刪除 (single-base deletion) 突變。這個特異的 p53 基因突變圖譜在日本或是其他國家很少發現，因而推論可能是由於存在著一些特別的環境因子，才會造成香港女性肺癌患者之 p53 基因突變有別於其他國家。而本實驗室最近發現台灣地區肺癌病患 p53 基因發生突變的頻率低於 10%，而且是屬於單一或多鹼基刪除突變 (Lee et al., unpublished data)。由以上的結果都顯示台灣地區環境中，很可能存在著一些特殊來源的環境污染物，使得肺癌患者肺組織中的 DNA 鍵結物的含量較其他國家為高。也可能是台灣地區肺癌病患對環境致癌物的代謝、解毒的能力和其他國家有所不同所致。這些推測都有待進一步的研究。不過由本實驗的初步數據已顯示台灣女性可能曝露一些有異於其他國家的特殊環境污染物，以及對於環境污染物的敏感性確實較男性為高。因此環境污染物與台灣女性高肺癌發生率之間應該是有些關係的。

在男、女性肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物之 PEI 色層分析圖譜的比較上，發現無論是男性或是女性其圖譜中間下方都有一個放射性較強的區域，整體而言並無明顯的差異。但是在 13 位男性及 5 位女性的圖譜上，都出現了一個特殊的 DNA 鍵結物 (adduct 1, Fig.10)，將此 DNA 鍵結物與本實驗室所有的標準品比對其移動位置，發現這個特異的 DNA 鍵結物和 B[g,h,i]P, B[a]P, Chrysene, B[b]FA, B[a]A 等多環芳香煙所造成的 DNA 鍵結物 (Fig. 11) 移動的位置不同。此外，由它的位置較偏圖譜的左上方，可知此 DNA 鍵結物的極性應較 B[g,h,i]P, B[a]P, Chrysene 的 DNA 鍵結物極性強。



Phillips et al.(1988) 分析肺癌病患正常肺組織中 DNA 鍵結物的圖譜，發現吸菸者的 DNA 鍵結物之色層分析圖譜的左上方有一個特殊的 DNA 鍵結物，與點燃香菸所得到的煙霧懸浮微粒在老鼠肺臟的 DNA 鍵結物圖譜所出現的特殊的 DNA 鍵結物相似 (Randerath et al., 1988)，因而推測此 DNA 鍵結物為香菸中的基因毒物所造成的。而此 DNA 鍵結物與本實驗中的 adduct 1 位置也很相似，但是本實驗在不吸菸的女性肺癌病患的 DNA 鍵結物圖譜上也發現 adduct 1 的存在，因此推測此特異的鍵結物並不單純是由香菸中的致癌物可以造成的。至於是由何種基因毒物造成的 DNA 鍵結物則有待進一步分析。

將 63 位病患之 DNA 鍵結物的色層分析圖譜與 BPDE-dG 鍵結物的圖譜做一比對，結果發現僅有 13 位病患 DNA 鍵結物的色層分析圖譜與 BPDE-dG 鍵結物相對位置幾乎一致，其含量介於 1.66 ~ 19.97 adducts /  $10^8$  nucleotides 之間 (Table 7)。其他肺癌患者有 18 位的圖譜與 BPDE-dG 鍵結物有部份位置重疊，因此可推測肺癌病患的 DNA 鍵結物有部份來自 BPDE-dG 鍵結物 (Fig. 12)。但是這結果僅能顯示這些肺癌病患的肺組織中可能有 BPDE-dG 鍵結物存在，仍須進一步利用特異性較高的免疫分析法 (Immunological assay) (van Schooten et al., 1990) 定量以及利用液相層析質譜儀 (LC-MS) 確定是否是 BPDE-dG 鍵結物。

van Schooten et al.(1990) 發現在肺癌病患的正常肺組織中含有 BPDE-dG 鍵結物，其含量介於 2 - 42 adducts /  $10^9$  nucleotides 之間。Alexandrov et al.(1992) 分析 13 位肺癌病患，結果在 11 位病患的肺組織中偵測到 BPDE-dG 鍵結物，但是 BPDE-dG 鍵結物的含量與吸菸量之間並無相關性。此外 Tokiwa et al.(1993) 分析肺癌病人肺組織中 B[a]P 含量，結果發現日本人肺組織中 B[a]P 的平均含量為  $180.2 \pm$

103.7 pg / g，而中國大陸地區不吸菸的肺癌婦女肺組織中 B[a]P 的平均含量竟高達  $608.7 \pm 477.1$  pg / g，他們推測可能由於中國人燃燒煤球所造成 B[a]P 之污染較日本人為高所致。由這些研究報告顯示，肺癌的發生確實與環境污染物之曝露量有相當程度的關係。

由於本實驗所分析的 63 位病患多為中部地區的民眾，而目前本實驗室以高效率液態層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析全年度七個採樣點每週收集來的所有台中地區空氣懸浮微粒中十種常見的多環芳香烴 (PAHs) 的含量，結果發現其中以 B[g,h,i]P 的含量最多，其次為 B[b]FA 和 B[a]P。目前已知 B[b]FA, B[a]P 都是致癌物質 (Grimmer et al., 1983)，而 B[g,h,i]P 為一弱的腫瘤起始劑 (Tumor initiator) (Hughes et al., 1993)，且這三者在小白鼠體內皆會產生 DNA 鍵結物 (Randerath et al., 1986; Hughes et al., 1993)。Table 8 是將台中地區空氣懸浮微粒分析結果與台北、高雄兩個都會區和日本、阿根廷兩國的空氣懸浮微粒中的 PAHs 含量做一比較，可明顯獲知台中空氣樣品中的 B[g,h,i]P, B[b]FA, B[a]P 含量較日本和阿根廷高出許多 (Lee and Chen, unpublished data)。雖然我們無法得知 63 位肺癌病患過去生活的台灣中部地區空氣污染狀況，但由最近本研究室的研究結果推測本實驗所分析的 63 位肺癌病人肺組織內產生 DNA 鍵結物的含量較其他國家為高，或許與台灣地區空氣污染較嚴重有關。

### 三、肺癌的組織學分類 (Tumor type) 及腫瘤分期 (Tumor stage) 與 DNA 鍵結物含量之相關性

我們分析了 DNA 鍵結物的含量與肺癌的分類 (tumor type) 是否有相關性。將 63 位病患依照肺癌的組織學分類分為鱗狀上皮細胞癌 (Squamous cell carcinoma)、腺癌 (Adenocarcinoma)、大細胞癌 (Large cell carcinoma)、小細胞癌 (Small cell carcinoma) 及腺鱗狀上皮細胞癌 (Adenosquamous cell carcinoma) 五大類。由於大細胞癌、小細胞癌及腺鱗狀上皮細胞癌這三類肺癌病患分別只有 2 位, 1 位和 4 位, 在整個分析的 63 位肺癌病患中僅佔小部份, 因此在進行腫瘤分類與 DNA 鍵結物含量的統計時, 僅分析鱗狀上皮細胞癌與腺癌兩類。本實驗所分析的 63 位肺癌病患中, 有 31 位為鱗狀上皮細胞癌, 其中男性有 29 位, DNA 鍵結物的平均含量為  $51.05 \pm 37.88$  adducts /  $10^8$  nucleotides, 而腺癌病患共有 25 位, DNA 鍵結物的平均含量為  $62.71 \pm 41.37$  adducts /  $10^8$  nucleotides。在鱗狀上皮細胞癌和腺癌患者之間 DNA 鍵結物含量並沒有差異 ( $p = 0.349$ ), 由此結果得知, 肺癌的組織學分類與 DNA 鍵結物含量之間可能沒有相關性。

此外, 我們更進一步的分析腫瘤分期 (tumor stage) 與 DNA 鍵結物含量之間的相關性。臨床上, 依照對肺癌的判斷及決定治療的方法將肺癌分為四期, 本實驗所分析 63 位病患中, 第一期有 29 位, 其 DNA 鍵結物的平均含量為  $64.94 \pm 45.61$  adducts /  $10^8$  nucleotides, 第二期有 11 位, 第三期 20 位, 第四期 3 位, DNA 鍵結物的平均含量分別為  $46.51 \pm 26.40$ ,  $40.04 \pm 32.41$  和  $50.11 \pm 23.03$  adducts /  $10^8$  nucleotides (Fig. 5)。由分析的結果顯示, 腫瘤分期為第一期的肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物的含量雖然較第二期及第三期患者之 DNA 鍵結物的含量高, 但在統計上卻沒有明顯的差異 ( $p = 0.355$ ,  $p = 0.059$ )。而第四期的肺癌病患的 DNA 鍵結物平均含量較第二、三期肺癌病患為高, 可能是由於第四期肺癌患者樣本數較少 (僅有三位)

有關。

van Schooten et al.(1990) 分析同一個肺癌病患腫瘤組織及非腫瘤組織內的 DNA 鍵結物含量，發現肺腫瘤組織內所偵測到的 DNA 鍵結物含量比非腫瘤組織中低了許多。在本實驗中所偵測的雖然是腫瘤組織周圍的正常組織，但是由本實驗的結果可知肺癌的腫瘤分期並不會影響肺癌病患正常肺組織中的 DNA 鍵結物的含量。

#### 四、不同年齡之病患及 DNA 鍵結物含量之統計分析

爲了瞭解不同年齡之病患 DNA 鍵結物含量有何差異，因此我們將台灣地區 63 位肺癌病患的年齡與肺組織中 DNA 鍵結物含量之間做一統計分析。在所分析的 63 位病患中最年輕者爲 37 歲，年紀最長者爲 83 歲，平均年齡爲  $64.16 \pm 9.41$  歲，肺組織中 DNA 鍵結物的平均含量爲  $53.11 \pm 38.98$  adducts /  $10^8$  nucleotides。比較肺癌病患年齡與肺組織中 DNA 鍵結物的含量，結果發現兩者之間沒有任何相關性 (Fig. 6,  $r = 0$ )。此外我們將 63 位肺癌病患依照年齡分爲三大組，其中 60 歲以下的病患有 14 位，他們的平均年齡爲  $49.36 \pm 6.38$  歲，肺組織中 DNA 鍵結物的平均含量爲  $52.97 \pm 6.38$  adducts /  $10^8$  nucleotides。而 60 至 69 歲的病患人數最多，有 33 位佔全部病患人數的 52%，平均年齡爲  $65.85 \pm 2.39$  歲。70 歲以上有 16 位，平均年齡爲  $65.85 \pm 2.39$  歲。發現年紀最大的這一組病患的 DNA 鍵結物含量較其他兩組病患稍高，然而在統計上與 60 歲以下的病患 ( $p = 0.752$ ) 及 60 至 69 歲的病患 ( $p = 0.737$ ) 之間的 DNA 鍵結物含量都沒有統計上的差異。

Shields et al. (1993) 的研究結果顯示，肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的含量與年齡之間完全沒有相關性，這個結果與我們的分析結果是一致的。因此推測年齡對肺癌病患肺組織中的 DNA 鍵結物的形成量是沒有關係的。由此結果，我們更相信在比較男、女性肺癌患者的 DNA 鍵結物的含量不同，不會是因分析的樣本中男、女性年齡間的差異所導致。

### 五、肺癌病患肺組織中 Nitro-PAH DNA 鍵結物之偵測

由於本研究室發現台灣地區空氣懸浮微粒中含有較其他國家為多的 1-NP 和 DNPs (Lee et al., 1994; 1995)，因此也想探討台灣地區肺癌病患肺組織中是否有硝基多環芳香烴之 DNA 鍵結物 (Nitro-PAH DNA adducts) 的存在。本實驗利用  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 的方法偵測肺癌病患肺組織中硝基多環芳香物所形成的 DNA 鍵結物。在分析的過程中，以 1-butanol 萃取 DNA 鍵結物的方式，來增強樣品中 Nitro-PAH DNA 鍵結物的含量，以區別 nuclease P1 的酵素水解方式增強芳香族 DNA 鍵結物的分析法。我們在男女性肺癌病患中各取八個具有較高芳香族 DNA 鍵結物的樣品進行分析，結果如 Fig. 13 所示，在 PEI 色層分析圖譜上，都沒有發現任何類似 DNPs 或是 1-NP 所形成的 DNA 鍵結物。

硝基多環芳香烴 (Nitro-PAHs) 是環境中另一類主要的空氣污染物。目前已知四種硝基多環芳香烴 1-NP, 1,3-DNP, 1,6-DNP 以及 1,8-DNP 會在老鼠的乳腺、膀胱、腎臟、肝臟、肺臟等器官形成 DNA 鍵結物 (Djuric et al., 1988; Norman et al., 1990)，且在動物實驗

上也證實會誘發肉瘤、腫瘤、肺癌及鱗狀細胞癌等的形成 (Ohgki et al., 1985; Tokiwa et al., 1986; Wislocki et al., 1986)。最近本研究室發現炒肉油煙的主要致突變物可能是 1,6-DNP 及 1,8-DNP，油煙中所含 DNPs 的含量約為於台灣都會空氣中的 81,000 倍 (Lee and Yang, unpublished data; Chou and Lee, 1990)。新加坡學者發現華人廚師罹患肺癌的機率較其他職業的人高 (Law et al., 1976)，Dubrow et al. (1984) 和 Coggon et al. (1986) 發現廚師罹患呼吸道癌症的機會也較其他癌症高。這些都暗示廚房之工作環境中，可能有特殊的環境污染物。而且本研究室發現 1,6-DNP 在人類正常肺細胞 MRC-5 形成 DNA 鍵結物的能力較其他細胞株為強 (Tang and Lee, unpublished data)。雖然本實驗並沒有在這十六位肺癌病患的肺組織中找到硝基多環芳香煙的 DNA 鍵結物，但硝基多環芳香煙在台灣地區肺癌發生的角色仍有待進一步的研究。

## 第二部分

### 一、比較不同人類肺細胞株中形成 B[a]P-DNA 鍵結物之能力及其與細胞週期、細胞增生和細胞色素 P450 IA1 的相關性分析

#### (一) 不同人類肺細胞株中形成 B[a]P-DNA 鍵結物之含量

爲了瞭解多環芳香烴類在肺細胞中形成 DNA 鍵結物的能力，本實驗以典型的多環芳香烴 — benzo[a]pyrene (B[a]P) 處理細胞，以  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 方法偵測細胞中 B[a]P-DNA 鍵結物的含量。首先利用 methylene blue 染色的方式 (Freshney et al., 1992)，分析 B[a]P 由  $0.4\ \mu\text{M}$  至  $20\ \mu\text{M}$  之濃度處理細胞二十四小時之後，對各種肺細胞之細胞毒性，結果顯示各種肺細胞經過 B[a]P 處理二十四小時後存活率均在 88% 以上，因此 B[a]P 在此濃度範圍之內對不同的肺細胞幾乎沒有細胞毒性反應 (數據未列出)。然後以此濃度範圍作 B[a]P-DNA 鍵結物的分析，結果如 Table 10 所示，在六種不同的肺細胞中，由台灣肺腺癌病患肺組織所分離出來的 CL-3 細胞的 B[a]P-DNA 鍵結物形成量竟高達  $1105.15\ \text{adducts} / 10^8\ \text{nucleotides}$ ，而另外四種肺癌細胞株的形成量僅爲  $0.2 \sim 2.6\ \text{adducts} / 10^8\ \text{nucleotides}$ 。CL-3 細胞所造成的 B[a]P-DNA 鍵結物之含量遠高於 B[a]P 在其他四種肺癌細胞株上而造成之 B[a]P-DNA 鍵結物的 425 ~ 5,000 倍之多。此外，人類正常肺細胞 MRC-5 無論是在何種濃度的 B[a]P 存在下，都無法形成足以讓我們能夠偵測到的 DNA 鍵結物含量。

在 DNA 鍵結物圖譜 (profiles) 分析方面，將所有細胞所形成之

B[a]P-DNA 鍵結物的 PEI 色層分析圖譜與標準品 BPDE-N<sub>2</sub> dG (此標準品由美國國家毒理學研究中心生化系符必成博士提供) 互相比對位置，發現肺細胞中所形成之 B[a]P-DNA 鍵結物的移動位置與標準品非常近似 (Fig. 14)。此外我們將 CL-3 細胞所形成之 DNA 鍵結物自 PEI plate 上萃取下來並利用 HPLC 分析，結果發現在四十六分鐘時出現了一個具有高放射性強度的物質，此滯留時間 (retention time) 與 BPDE-N<sub>2</sub> dG 標準品的滯留時間是相同的 (Fig. 7)，因此在本實驗所使用的 CL-3 肺癌細胞中形成之 DNA 鍵結物可能是 BPDE-N<sub>2</sub> dG。

由先前的研究已知，B[a]P 主要是經由 cytochrome P450 IA1 酵素系統代謝活化形成 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro- benzo[a]pyrene (BPDE) 最終代謝物，是主要攻擊 DNA 的 deoxyguanosine 的 N<sub>2</sub> 位置形成 BPDE-N<sub>2</sub> dG 的最終代謝物 (Jeffrey, 1976, 1977)。由台灣肺腺癌病患肺組織所分離出來的細胞 CL-3, CL1-0, CL1-2 以及由美國 ATCC 所購得之肺腺癌細胞 A-427 與肺鱗狀上皮細胞 Calu-1 均具有活化 B[a]P 並形成 BPDE-N<sub>2</sub> dG 鍵結物之能力，但有相當大的差異。

本實驗中所使用的五種肺癌細胞株形成 BPDE-N<sub>2</sub> dG 鍵結物的能力有明顯之差異。爲了瞭解不同細胞株形成 DNA 鍵結物含量不同的原因，除了細胞代謝活化 B[a]P 的能力，可能影響 DNA 鍵結物的形成量之外 (Liu et al., 1993)。細胞經過 B[a]P 處理後，是否會改變細胞株的細胞週期或細胞增生的速度，也都可能影響 DNA 鍵結物的形成量 (Roggeband et al., 1994)。因此以下實驗將探討 CL-3, CL1-0, A-427 及 Calu-1 細胞之 BPDE-N<sub>2</sub> dG 鍵結物的形成能力爲何不同。



## (二) B[a]P 對細胞週期 (Cell cycle) 之影響

爲了瞭解肺癌細胞受到 B[a]P 處理後是否細胞週期因而改變，而影響 DNA 鍵結物的形成量。於是我們將細胞以 B[a]P 處理二十四小時之後，進行細胞週期的分析，結果如 Fig. 8 所示，CL1-0, A-427 及 Calu-1 三種細胞，無論是以 10  $\mu$ M 或是以 0.4  $\mu$ M 的 B[a]P 處理，細胞仍然維持正常的生長速度，細胞週期不受到影響。但是 CL-3 細胞曝露在 B[a]P 二十四小時後，即使在低濃度的處理狀態下，細胞的生長也幾乎完全呈休止狀態。

本實驗中 CL1-0 與 Calu-1 均已知是 p53 基因突變的細胞株 (Yang et al., 1994; Reiss et al., 1992)。由過去的研究得知，p53 基因負責調控細胞週期，當細胞受到損傷時，細胞週期就會停留在 G1 / S 期進行修補工作，這稱爲 G1 期細胞週期休止 (G1 phase arrest) (Levine et al., 1991; Lane et al., 1992)。而 Ramet et al.(1995) 的研究結果顯示，當細胞以 B[a]P 處理時，如果細胞仍然可以不斷的進行複製，那麼合成出來的 DNA 將增多，而使得 DNA 鍵結物之含量被稀釋掉。由於 CL1-0 與 Calu-1 細胞的 p53 基因發生突變，使得 DNA 即使遭受化學物質的攻擊，細胞週期也不會停止，於是細胞就會不斷的進行分裂與複製。這可能是 CL1-0 與 Calu-1 細胞的 DNA 鍵結物生成量非常少的原因之一。而 CL-3 細胞的 p53 基因沒有發生突變，可以執行正常的功能，因此當大量的 DNA 鍵結物產生時，DNA 受到嚴重的損傷，細胞週期因而停止而進行 DNA 修補作用。至於 A-427 細胞 p53 基因也沒有發生突變 (Lehman et al., 1991)，但是以 B[a]P 處理後，細胞週期卻仍然不斷的進行，因此以下的實驗僅探討台灣肺腺癌細胞 CL-3 與美國肺腺癌細胞 A-427 對於 B[a]P 之敏感性

不同的可能原因。

### (三) B[a]P 對細胞增生的影響

由於 A-427 與 CL-3 細胞之 p53 基因皆沒有發生突變，但是 B[a]P 處理二十四小時後，細胞所產生的反應卻完全不同，因此推測可能是 B[a]P 在短時間內，無法對 A-427 細胞產生傷害，於是進行細胞增生的實驗。本實驗以 B[a]P 連續處理細胞七天，再計算活細胞的數目。結果如 Table 11 和 12 所示，經過 0.4  $\mu$ M B[a]P 或是 10  $\mu$ M B[a]P 長時間處理的 CL-3 細胞其存活率僅為控制組細胞的 13.04% 與 10.41%。然而 A-427 細胞經過 B[a]P 連續處理七天之後，細胞數目不但沒有減少，反而增加為控制組細胞數目的 131.79% 與 131.84%。

Bjelogric et al. (1994) 以 B[a]P 處理老鼠的皮膚，結果發現在 B[a]P 處理後的十二至四十八小時都可以明顯的偵測到 B[a]P-DNA 鍵結物的形成以及 p53 蛋白的表現，而且 p53 蛋白的表現與 B[a]P-DNA 鍵結物的含量呈正比關係，這個結果似乎暗示著在 B[a]P 所誘發之老鼠皮膚的 DNA 損傷中，p53 蛋白的增加使得細胞週期得以停留在 G1 期進行修補 DNA 的工作。Ramet et al. (1995) 在各種不同的癌細胞株之中觀察 B[a]P-DNA 鍵結物與 p53 蛋白表現之間的關係，結果發現在兩種能夠形成 BPDE-DNA 鍵結物的細胞株之中，BPDE-DNA 鍵結物先形成到某含量後，p53 蛋白才會表現出來，換言之，細胞先有 DNA 損傷，p53 基因才會表現。Wolterbeek et al. (1995) 將 B[a]P 直接噴入倉鼠 (hamster) 的氣管內，結果在倉鼠的氣管上皮細胞

中發現 B[a]P-DNA 鍵結物的形成，而且 DNA 鍵結物的形成量與細胞增生及 p53 蛋白的表現三者之間有相關性，他推測 B[a]P 在倉鼠氣管上皮中所誘發的細胞增生，可能與 B[a]P 造成 p53 基因發生突變，導致異常的 p53 蛋白表現而失去控制細胞週期的功能有關。因此我們推測 A-427 細胞經過 B[a]P 處理，會有細胞增生的現象，可能和 Wolterbeek 的解釋相似。

#### (四) Cytochrome P450 IA1 之誘導劑 BNF 和抑制劑 ANF 對肺細胞形成 B[a]P-DNA 鍵結物之影響

另外我們也探討 CL-3 細胞形成 BPDE-N<sub>2</sub> dG 鍵結物的能力較 A-427 細胞為強，是否與細胞本身對於的 B[a]P 代謝活化能力有關。因此以不同濃度之 cytochrome P450 IA1 (CYP IA1) 的專一抑制劑  $\beta$ -naphthoflavone (ANF) 與誘導劑  $\beta$ -naphthoflavone (BNF) 處理 CL-3 和 A-427 細胞，以觀察 DNA 鍵結物形成量是否有改變，以初步了解 CL-3 細胞之 CYP IA1 是否參與 B[a]P 的代謝活化以及 B[a]P-DNA 鍵結物的形成。首先以抑制劑 ANF 處理 CL-3 細胞，當加入 1  $\mu$ M ANF 時，即能抑制 64.63% 的 DNA 鍵結物的形成，當濃度增高 10 倍至 10  $\mu$ M 時，其抑制性會增至 81.44% (Table 13, Fig. 15)。另一方面，將 CL-3 與 A-427 細胞加入誘導劑 BNF 做前處理之後再給予 B[a]P，結果如 Table 14 顯示，CL-3 細胞以不同濃度的 BNF 處理後，由於 CYP IA1 的活性被誘發，因此 DNA 鍵結物的形成量也隨之增加，其中 1  $\mu$ M BNF 誘發 DNA 鍵結物的形成最為明顯，形成量為 2025.72 adducts / 10<sup>8</sup> nucleotides，約為單獨給予 B[a]P 處理的

226% (Fig. 15)。然而 A-427 細胞以 1  $\mu$ M BNF 處理後，DNA 鍵結物的形成量為 1.39 adducts /  $10^8$  nucleotides 與單獨給予 B[a]P 所形成之 DNA 鍵結物的含量 1.15 adducts /  $10^8$  nucleotides 之間並沒有明顯的差異 (Table 15, Fig. 15)，由以上的兩個實驗均顯示 CYP IA1 基因確實會參與 B[a]P 的代謝活化和 DNA 鍵結物的形成。而 CL-3 細胞的 CYP IA1 基因的表現顯然較 A-427 細胞為明顯。

有學者的研究報告指出，在人類肺臟組織中 CYP IA1 是代謝活化 B[a]P 成為具有攻擊 DNA 能力的 BPDE 之最主要的酵素 (Shimada et al., 1989; Guengerich et al., 1992)。Quan et al. (1994) 在人類纖維母細胞中發現，BPDE 的前驅物 benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol (BPD) 所造成的細胞毒性與基因毒性都和細胞內 CYP IA1 表現的程度有關，而且在缺乏修補系統的細胞中這種相關性比在修補系統完整的細胞中更為明顯，因此多環芳香烴所造成的癌化過程中，CYP IA1 的酵素活性被誘發是造成細胞癌化的重要危險因子。McLemore et al. (1989) 以 B[a]P 處理十五種人類非小細胞肺癌細胞株 (human non-small cell lung carcinoma cell lines)，結果在九種細胞株中偵測到 CYP IA1 mRNA 的表現，而且 CYP IA1 mRNA 的表現與 CYP IA1 酵素活性有相關性。由本實驗得知，當 B[a]P 進入 CL-3 細胞後 cytochrome P450 IA1 的酵素活性迅速的被誘發，於是產生高量的 BPDE-N<sub>2</sub> dG 鍵結物。相反的，A-427 細胞由於代謝活化 B[a]P 的酵素表現較差，因此 BPDE-N<sub>2</sub> dG 鍵結物的形成量也明顯的低了許多。因此我們初步推測 CL-3 與 A-427 細胞中的 CYP IA1 酵素的表現明顯不同，因此造成 DNA 鍵結物的形成量會有不同。我們進一步以西方墨點轉漬法，分析 CL-3 細胞在不同濃度的 BNF 下，CYP IA1 蛋白的含量，初步結果顯示 CL-3 細胞在 0.1 - 10  $\mu$ M BNF 存在

下，都能偵測到 CYP IA1 蛋白，且其含量有隨著 BNF 的濃度的增加而增多 (Fig. 16)，但經過 B[a]P 處理的 CL-3 細胞的 CYP IA1 蛋白的含量是否有增加以及 CL-3 細胞 CYP IA1 mRNA 的表現，我們將儘速做進一步的分析。

## 二、雌性激素在 CL-3 肺癌細胞中對 B[a]P-DNA 鍵結物形成之影響

本實驗第一部份已發現女性對環境污染物的化學感受性較男性為強，因此本實驗擬以 B[a]P 較敏感的 CL-3 細胞來探討雌性激素 (17 $\beta$ -estradiol) 是否在化學感受性上扮演某種角色。因此我們在雌性激素 (17 $\beta$ -estradiol) 存在下，分析 B[a]P 對 CL-3 肺癌細胞上形成 DNA 鍵結物的能力是否會改變。本實驗選擇女性體內之正常生理濃度 0.3 ng/ml 和 0.15 ng/ml 的雌性激素和 B[a]P 同時處理 CL-3 細胞。結果顯示當單獨給予 1.0  $\mu$ M B[a]P 處理二十四小時後的 CL-3 細胞中，偵測到 396.24 adducts / 10<sup>8</sup> nucleotides 的 B[a]P -DNA 鍵結物形成，但若給予 B[a]P 的同時也給予 0.15 ng/ml 和 0.30 ng/ml 的雌性激素時，細胞中 B[a]P-DNA 鍵結物的含量會增加為 632.99 adducts / 10<sup>8</sup> nucleotides 與 774.84 adducts / 10<sup>8</sup> nucleotides，其含量分別是單獨處理 B[a]P 時所形成之 DNA 鍵結物含量的 160% 與 196% (Table 16, Fig. 17)。

過去有學者將 B[a]P 直接塗抹於 Swiss 種的母鼠或是公鼠的皮膚上，處理一段時間之後，發現母鼠皮膚上 DNA 鍵結物的形成量較公鼠高 (Baer-Dubowska and Alexandrov, 1981; Alexandrov et al., 1983; Rojas et al., 1986)。Huggins et al., (1961) 將 DMBA 餵食 Sprague-

Dawley 種的母鼠，結果發現年紀較小的母鼠發生乳癌的機率較出生大於一百天的母鼠高，而這個現象被解釋為可能與母鼠年紀增長或是荷爾蒙分泌的改變，造成母鼠乳腺對於 DMBA 的敏感性不同有關 (Sinha and Dao, 1980)。由本實驗的結果可知，在 CL-3 細胞中 B[a]P 原本即可以產生不小的 DNA 損傷，當雌性激素存在時，細胞所產生的 DNA 損傷會更增強，這個結果似乎暗示著雌性激素與女性肺組織中 DNA 鍵結物的形成量上有一些關聯。其中的機轉如何，仍有待進一步的研究。

### 三、結論

在第一部份的實驗中，我們分析了六十三位台灣地區肺癌患者正常肺組織中 DNA 鍵結物的含量，結果發現台灣的肺癌病患吸菸的數量上與其他國家之間並沒有明顯的差異，但是台灣地區肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物的含量，卻比其他國家高了 5~16 倍，這似乎暗示著台灣的環境污染的程度可能較其他國家嚴重，或是台灣地區的民眾可能曝露某些特異的環境污染物以及國人的遺傳性或其他內在因子和其他國家不同所致。此外，也發現不吸菸的女性病患肺組織中的 DNA 鍵結物的平均含量與吸菸的男性病患之 DNA 鍵結物含量沒有明顯差異。由此推測香菸對於台灣地區肺癌患者正常肺組織中 DNA 鍵結物的形成量，並不是一個重要的因素。由以上的兩個結果，使我們相信台灣地區環境中的污染物，可能是台灣肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物的主要提供者，至於其他的內在因子或許也是重要的影響因素。

另外，我們發現雌性激素在台灣肺腺癌細胞 CL-3 中，會促進 BPDE-N<sub>2</sub> dG 鍵結物的形成，這個發現將有助於日後了解雌性激素對環境污染物在肺癌細胞上造成基因毒性的可能毒理機轉，並以此為基礎，進一步探討複雜的環境污染物 B[a]P 在女性肺癌發生上的角色。

因此，本實驗的研究結果初步了解台灣不吸菸的女性肺癌患者肺組織中鍵結物含量比不吸菸的男性高，除了本身對污染物質的敏感性較高之外，雌性激素可能也是一個重要的影響因子。

## 陸、参考文献

- Adachi, S., Takemoto, K., Ohshima, S., Shimizu, Y. and Takahama, M. (1991) Metal concentrations in lung tissue of subjects suffering from lung cancer. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, **63**, 193-197.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1990) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Atlanta, Ga., TP-90-20, December.
- Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, O., Castegnaro, M., Camus, A-M., Petruzzelli, S., Giuntini, C. and Bartsch, H. (1992) An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers lung: comparison with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.*, **52**, 6248-6253.
- Alexandrov, K., Rojas, M., Bourgeois, Y. and Chouroulinkov, I. (1983) The persistence of benzo[a]pyrene diol-epoxide deoxyguanosine adduct in mouse skin and its disappearance in rat skin. *Carcinogenesis*, **4**, 1655-1657.
- Baer-Dubowska, W. and Alexandrov, K. (1981) The binding of benzo[a]pyrene to mouse and rat skin DNA. *Cancer Lett.*, **13**, 47-52.
- Benner, B.A., Gordon, G.E. and Wise, S.A. (1989) Mobile sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: a roadway tunnel study. *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 1269-1278.
- Berg, I., Overvik, E. and Gustafsson, J.-A. (1990) Effect of cooking time on mutagen formation in smoke, crust and pan residue from panbroiled pork. *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 421-426.
- Bjelogrić, N.M., Makinen, M., Stenback, F. and Vahakangas, K. (1994) Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts and increased p53 protein



- in mouse skin. *Carcinogenesis*, **15**, 771-774.
- Bjoreth, A. and Ramdahl, T. (1985) *In Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons : emissino sources and recent progrss in analytical chemistry*. Bjoreth, A. and Ramdahl, T. (eds) Marcel Dekker, New York, 1-20.
- Bond, J.A., Chen, B.T., Griffith, W.C. and Mauderly, J.L. (1989) Inhaled cigarette smoke induces the formation of DNA adducts in lungs of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 161-172.
- Buckley, T.J. and Liroy, P.J. (1992) An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *Br. J. Ind. Med.*, **49**, 113-117.
- Castro, V.M., Soderstrom, M., Carlberg, I., Widersten, M., Platz, A. and Mannervik, B. (1990) Difference among human tumor cell lines in expression of glutathione transferases and other glutathione-linked enzymes. *Carcinogenesis*, **11**, 1569-1576.
- Catoggio, J.A., Succar, S.D. and Roca, A.E. (1989) Polynuclear aromatic hydrocarbon content of particulate matter suspended in the atmosphere of La Plata, Argentina. *Sci. Total Environ.*, **89**, 43-58.
- Cavalieri, E.L., Higginbotham, S., Ramakrishnan, N.V.S., Devanesan, P.D., Todorovic, R., Rogan, E.G. and Salmasi, S. (1991) Comparative dose-response tumorigenicity studies of dibenz[a]pyrene versus 7,12-dimethylbenz[a]pyrene, benzo[a]pyrene and two dibenzo[a,l]pyrene dihydrodiols in mouse skin and rat mammary gland. *Carcinogenesis*, **12**, 1939-1944.
- Cavalieri, E.L. and Rogan, E.G. (1992) The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations im metabolic activation. *Pharmac. Thr.*, **55**, 183-190.
- Chaloupka, K., Krishnan, V. and Safe, S. (1992) Polynuclear aromatic hydrocarbon carcinogens as antiestrogen in MCF-7 human breast cancer cells: role of the Ah

- receptor. *Carcinogenesis*, **13**, 2233-2239.
- Chen, C-C. and Lee, H. (1996) Genotoxicity and DNA adduct formation of incense smoke condensates: Comparison with environmental tobacco smoke condensates *Mutation Res.*, **367**, 105-114.
- Chen, C.J., Wu, H.Y., Chuang, Y.C., Chang, A.S., Luh, K.T., Chao, H.H., Chen, K.Y., Chen, S.G., Lai, G.M., Huang, H.H, and Lee, H.H. (1990) Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res.*, **10**, 971-976.
- Chen, P.S., Shieh, H.H. and Gaw, J.M. (1980) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates at various sites in Taipei city by GC/MS and glass capillary GC. *Proc. Natl. Sci. Council R.O.C.*, **4**, 180-184.
- Cherpillod, P. and Amstad, P.A. (1995) Benzo[a]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes. *Mol. carcinogenesis*, **13**, 15-20.
- Chou, M.C. and Lee, H. (1990) Mutagenicity of airborne particles from four cities in Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Council B R.O.C.*, **14**, 142-150.
- Chuang, J.C., Wise, S.A., Cao, S. and Mumford, J.L. (1992) Chemical characterization of mutagenic fractions of particles from indoor coal combustion: a study of lung cancer Xuan Wei, China. *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 999-1004.
- Clonfero, E., Granella, M., Marchioro, M., Barra, E.L., Nardini, B., Ferri, G. and Foa, V. (1995) Urinary excretion of mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, **16**, 547-554.
- Coggon, D., Pannett, B., Osmond, C. and Acheson, E.D. (1986) *A survey of cancer and occupation in young and middle aged men*. I. Cancer of the respiratory tract. *Brit. J. Ind. Med.*, **43**, 332-338.
- Coggon, D. and Wield, E.D. (1993) Mortality of army cooks. *Scand. J. Work Environ.*

*Health*, **19**, 85-88.

Culp, S.J. and Beland, F.A. (1994) Comparison of DNA adduct formation in mice fed coal tar or benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **15**, 247-252.

Cuzick, J., Routledge, M.N., Jenkins, D. and Garner, C. (1990) DNA adducts in different tissues of smokers and non-smokers. *Int. J. cancer*, **45**, 673-678.

Deng, J. and Gao, Y.T. (1985) Prevalence of smoking among 110,000 adult residents in Shanghai urban area. *Chinese J. Prev. Med.*, **19**, 271-274.

Department of Health, Executive Yuan, Republic of China. (1993) Public Health in Taiwan Area, Republic of China.

Devesa, S.S., Blot, W.J. and Fraumeni, J.F.J. (1989) Declining lung cancer rates among young men and women in the United States: a cohort analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 1568-1571.

Dipple, A. (1983) Formation, metabolism, and mechanism of action of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Cancer Res.*, **43**, 2422-2425.

Dipple, A., Pigott, M.A., Agarwal, S.K., Yagi, H., Sayer, J.M. and Jerina, D.M. (1987) Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature*, **327**, 535-536.

Dipple, A., Cheng, S.C. and Bigger, C.A.H. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens, In Aeschbacher HU and Sato S (eds): "*Mutagens and Carcinogens in the diet.*" New York, Toronto, Singapore: Wiley-Liss Press, 109-127.

Djuric, Z., Fifer, E.K., Yamazoe, Y. and Beland, F.A. (1988) DNA binding by 1-nitropyrene and 1,6-dinitropyrene in vivo and in vitro: effects of nitroreductase induction. *Carcinogenesis*, **9**, 357-364.

Dobson, W.H. (1924) Cervical lympho-sarcoma. *Chin. Med. J.*, **38**, 786-787.

Dogra, S.C., Khanduja, K.L. and Gupta, M.P. (1985) The effect of Vitamin A deficiency on the initiation and postinitiation phase of benzo[a]pyrene-induced lung tumorigenesis in rats. *Br. J. Cancer*, **52**, 931-935.

- Doll, R. (1976) Epidemiology. In : Wynder, E.L. and Hecht, S. (eds), *Lung cancer*. UICC Technical Report Series 25, 3-41.
- Dubrow, R. and Wegmen, D.H. (1984) Cancer and occupation in Massachusetts: A death certificate study. *Am. J. Int. Med.*, **6**, 207-230.
- Epstein, R.J., Smith, P.J., Watson, J.V. and Bleehen, N.M. (1988). Characterization of VP-16-induced DNA cleavage in oestrogen-stimulated human breast cancer cells. *Br. J. Cancer*, **57**, 445-450.
- Everson, R., Randerath, E., Santella, R.M., Cefalo, R.C., Avitts, T.A. and Randerath, K. (1986) Detection of smoking-related covalent DNA adducts in human placenta. *Science*, **231**, 54-57.
- Everson, R.B., Randerath, E., Santella, R.M., Avitts, T.A., Weinstein, I.B. and Randerath, K. (1988) Quantitative associations between DNA damage in human placenta and maternal smoking and birth weight. *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 567-571.
- Flowers-Geary, L., Harvey, R.G. and Penning, T.M. (1995) Identification of benzo[a]pyrene -7,8-dione as an authentic metabolite of ( $\pm$ )-trans-7,8-dihydroxy -7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in isolated rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, **16**, 2707-2715.
- Freshney, R.I. (1992) *Animal Cell Culture*, A practical approach, 2 nd (ed.), IRL press, Oxford, New York, Tokyo.
- Gao, Y.T., Blot, W.J., Zheng, W., Ershow, A.G., Hsu, C.W., Levin, L.I., Zhang, R. and Fraumeni, Jr.J.F. (1987) Lung cancer among Chinese women. *Int. J. Cancer*, **40**, 604-609.
- Garner, R.C., Cuzick, J., Jenkins, D., Phillips, D.H., Hewer, A., King, M.M. and Routledge, M.N. (1990) Linear relationship between DNA adducts in human lung and cigarette smoking. In Vainio H, Sorsa M and McMichael AJ (eds): "*Complex Mixtures and Cancer Risk*." IARC Sci. Publ. No 104, International

Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 421-426.

- Garshick, E., Schenker, M.B., Munoz, A., Segal, M., Smith, T.J., Woskie, S.R., Hammond, S.K. and Speizer, F.E. (1988) A case control study of lung cancer and diesel exhaust exposure in railroad workers. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 1242-1248.
- Geneste, O., Camus, A.M., Castegnaro, M., Petruzzelli, S., Macchiarini, P., Angeletti, C.A., Giuntini, C. and Bartsch, H. (1991). Comparison of pulmonary DNA adduct levels, measured by <sup>32</sup>P-postlabeling and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in lung parenchyma of smokers and ex-smokers. *Carcinogenesis*, **12**, 1301-1305.
- Ger, L.P., Hsu, W.L., Chen, K.T. and Chen, C.J. (1993) Risk factors of lung cancer by histological category in Taiwan. *Anticancer Res.*, **13**, 1491-1500.
- Grinberg-Funes, R.A., Singh, V.N., Perera, F.P., Bell, D.A., Young, T.L., Dicky, C., Wang, L.W. and Santella, R.M. (1994) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in smokers and their relationship to micronutrient levels and the glutathione-S-transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, **15**, 2449-2454.
- Guengerich, F.P. (1992) Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol. Ther.*, **54**, 17-61.
- Guo, N., Conaway, C.C., Hussain, N.S. and Fiala, E.S. (1990) Sex and organ differences in oxidative DNA and RNA damage due to treatment of Sprague-Dawley rats with acetoxime or 2-nitropropane. *Carcinogenesis*, **11**, 1659-1662.
- Gupta, R.C., Reddy, M.V. and Randerath, K. (1982) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, **3**, 1081-1092.
- Gupta, R.C. (1985) Enhanced sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res.*, **45**, 5656-5662.
- Gupta, R.C. and Earley, K. (1988) <sup>32</sup>P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedure.

- Carcinogenesis*, **9**, 1687-1693.
- Harris, C.C. (1989) Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis*, **10**, 1563-1566.
- Harris, C.C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.*, Suppl. **51**, 5023s-5044s.
- Han, X. and Liehr, J.G. (1994) DNA single-strand breaks in kidneys of syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis*, **15**, 997-1000.
- Hazardous Substances Data Bank. (1988) National Library of Medicine. National Toxicology Program, Bethesda, MD. December 5.
- Hemminki, K., Grzybowska, E., Chorazy, M., Twardowska-Sauchka, K., Scoczynski, J.W., Putman, K.L., Randerath, K., Phillips, D.H., Hewer, A., Santella, R.M., Young, T.L. and Perera, F.P. (1990) DNA adducts in humans environmentally exposed to aromatic compound in an industrial area of Poland. *Carcinogenesis*, **11**, 1229-1231.
- Heussen, G.A.H., Bouman, H.G.M., Roggeband, R., Baan, R.A. and Alink, G.M. (1994) <sup>32</sup>P-Postlabelling analysis of DNA adducts in white blood cells of humans exposed to residential wood combustion particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen*, **23**, 121-127.
- Higginbotham, S., RamaKrishna, N.V.S., Johansson, S.L., Rogan, E.G. and Cavalieri E.L. (1993) Tumor-initiating activity and carcinogenicity of dibenzo[a,l]pyrene versus 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and benzo[a]pyrene at low doses in mouse skin. *Carcinogenesis*, **14**, 875-878.
- Howe, G.R., Fraser, D., Linsay, J., Presnal, B. and Yu, S.Z. (1983) Cancer mortality (1965-77) in relation to diesel fume and coal expore in a cohort of retired railway workers. *J. Int. Cancer Inst.*, **70**, 1015-1019.
- Hueper, W.C., Kotin, P., Tabor, E.C., Payne, W.W., Falk, H. and Sawicki, E.

- (1962) Carcinogenic bioassay on air pollutants. *Arch. Pathol.*, **74**, 89-116.
- Huggins, C., Grand, L.C. and Brillantes, F.P. (1961) Mammary cancer induced by single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. *Nature*, **189**, 204-207.
- Hughes, N.C., Pfau, W., Hewer, A., Jacob, J., Grimmer, G. and Phillips, D.H. (1993) Covalent binding of polycyclic aromatic hydrocarbon components of coal tar to DNA in mouse skin. *Carcinogenesis*, **14**, 135-144.
- Husgafvel-Pursiainen, K., Sorsa, M., Moller, M. and Benestad, C. (1986) Genotoxicity and polynuclear aromatic hydrocarbon analysis of environmental tobacco smoke samples from restaurants. *Mutagenesis*, **1**, 287-292.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1983) IARC monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, Polynuclear aromatic compounds. I. Chemicals, environmental, and experimental data, Vol 32, IARC, Lyon, France.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1986) IARC monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, Tobacco Smoking, Vol 38, IARC, Lyon, France.
- Izzotti, A., Rossi, G.A., Bagnasco, M. and de Flora, S. (1991) Benzo[a]pyrene dioepoxide-DNA adducts in alveolar macrophages of smokers. *Carcinogenesis*, **12**, 1281-1285.
- Jeffrey, A.M., Jennette, K.W., Blobstein, S.H., Weinstein, I.B., Beland, F.A., Harvey, R.G., Kasai, H., Miura, I. and Nakanishi, K. (1976) Benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: Structure of a benzo[a]pyrene-tetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5714-5715.
- Jeffrey, A.M., Weinstein, J.B., Gennette, K.W., Grzeskowiak, K., Nakanishi, K., Harvey, R.G., Autrup, H. and Harris, C. (1977) Structures of benzo[a]pyrene-nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature*,

269, 348-350.

- Jones, N.J., McGregor, A.D., and Waters, R. (1993). Detection of DNA adducts in human oral tissue : correlation of adduct levels with tobacco smoking and differential enhancement of adducts using the butanol extraction and nuclease P1 versions of <sup>32</sup>P-postlabeling. *Cancer Res.*, **53**, 1522-1528.
- Karjalainen, S., Kerttula, R. and Pukkala, E. (1992) Cancer risk among workers at a copper/nickel smelter and nickel refinery in Finland. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **63**, 547-551.
- Kato, T., Ohgaki, H., Sakamoto, H., Sato, S., Tkayama, S. and Sugimura, T. (1988) Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethyl imidazo[4,5-f]quinoxaline. *Carcinogenesis*, **9**, 71-73.
- Kato, T., Migita, H., Ohgaki, H., Sato, S., Tkayama, S. and Sugimura, T. (1989) Induction of tumors in the Zymba gland, oral cavity, colon, skin and mammary gland of F344 rats by a mutagenic compound, 2-amino-3,4-dimethyl imidazo[4,5-f]quinoxaline. *Carcinogenesis*, **10**, 601-603.
- Koo, L.C., Ho, J.H. and Lee, N. (1985) An analysis of some risk factors for lung cancer in Hong Kong. *Int. J. Cancer*, **35**, 149-155
- Kung, I.T.M., So, K.F. and Lam, T.H. (1984) Lung cancer in Hong Kong Chinese: Mortality and histological types, 1973-1982. *Br. J. Cancer*, **50**, 381-388.
- Lane, D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- Law, H. and Day, N.E. (1976) Incidence rates of specific histological types of lung cancer in Singapore Chinese dialect group and their aetiological significance, *Int. J. Cancer*, **17**, 304-309.
- Lee, H., Lin, T.-L., Shieh, R.-L. and Bian, S.-S. (1994a) Mutagenicity of airborne particulates from the waste metal retrieval area. *Mutat. Res.*, **324**, 77-84.
- Lee, H., Su, S.Y., Liu, K.S. and Chou, M.C. (1994b) Correlation between meteorological conditions and mutagenicity of airborne particulate samples in a



- tropical monsoon climate area from Kaohsiung city, Taiwan. *Environ. Mol. Mutagen*, **23**, 200-207.
- Lee, H., Wang, L. and Shih, J.F. (1995) Mutagenicity of particulates from the laboratory combustion of plastics. *Mutat. Res.*, **346**, 135-144.
- Lee, S.J., Friedman, S.L., Whalen, R. and Boyer, T.D. (1994) Cellular sources of glutathione S-transferase P in primary cultured rat hepatocytes: localization by in situ hybridization. *Biochem. J.*, **299**, 79-83.
- Levine, A.J., Momand, J. and Finlay, C.A. (1991) The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, **351**, 453-456.
- Levy, G.N. and Weber, W.W. (1992) 2-Aminofluorene-DNA adducts in mouse urinary bladder: effect of age, sex, and acetylator phenotype. *Carcinogenesis*, **13**, 159-164.
- Lewtas, J., Mumford, J., Everson, R., Hulka, B., Wilcosky, T., Kozumbo, W., Thompson, C., George, M., Dobias, L., Sram, R., Li, X. and Gallagher, J. (1993) Comparison of DNA adducts from complex mixture exposures in various human tissues and experimental systems. *Environ. Health Perspect.*, **99**, 89-97.
- Li, E.E., Heflich, R.H., Bucci, T.J., Manjanatha, M.G., Blaydes, B.S. and Delclos, K.B. (1994) Relationships of DNA adduct formation, K-ras activating mutations and tumorigenic activities of 6-nitrochrysene and its metabolites in the lungs of CD-1 mice. *Carcinogenesis*, **15**, 1377-1385.
- Li, S.G., Pan, D.H. and Wang, G.X. (1994) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch. Environ. Health*, **49**, 119-122.
- Lioy, P.L., Waldman, J.M., Greenberg, A., Harkov, R. and Pietarinen, C. (1988) The total human environmental exposure study (THEES) to benzo[a]pyrene: comparison of the inhalation and food pathways. *Arch. Environ. Health*, **43**, 304.

- Lioy, P.L. and Greenberg, G. (1990) Factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Ind. Health*, **6**, 209-215.
- Liu, Q., Sasco, A.J., Riboli, E. and Hu, M.X. (1993) Indoor air pollution and lung cancer in Guangzhou, People's Republic of China. *Amer. J. Epidemiology*, **137**, 145-154.
- Liu, T.Y., Chao, T.W., Chiang, S.H. and Chi, C.W. (1993) Differential sensitivity of human hepatoma cell line and primary rat hepatocyte culture to benzo(a)pyrene-induced unscheduled DNA synthesis and adduct formation. *Cell Biol. Inter.*, **17**, 441-447.
- Liu, Z., Xingzhou, H.E. and Chapman, R.S. (1991) Smoking and other risk factors for lung cancer in Xuanwei, China. *Int. J. Epidemiology*, **20**, 26-31.
- Loeb, L.A., Ernster, V.L., Warner, K.E., Abbotts, J. and Laszol, J. (1984) Smoking and lung cancer : an overview. *Cancer Res.*, **44**, 5940-5958.
- Lofroth, G., Stensman, C. and Brandhorst-Satzkorn, M. (1991) Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and incense burning. *Mutat. Res.*, **261**, 21-28.
- Lowengart, R.A., Peters, J.M., Cicioni, C., Buckley, J., Bernstein, L., Preston-Martin, S. and Rappaport, E. (1987) Childhood leukemia and parents' occupational and home exposures. *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 39-46.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lubin, J. and Blot, W.J. (1984) Assessment of lung cancer risk factors by histologic category. *J. Natl. Cancer Hist.*, **73**, 383-398.
- Manchester, D.K., Weston, A., Choi, J.-S., Trivers, G.E., Fennessly, P.V., Quintana, E., Farmer, P.B., Mann, D.L. and Harris, C.C. (1988) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9243.

- MacLennan, R., da Costa, J., Day, N.E., Law, C.H., Ng, Y.K. and Shanmugaratnam, K. (1977) Risk factors for lung cancer in Singapore Chinese, a population with high female incidence rates. *Int. J. Cancer.*, **20**, 854-850.
- Masclat, P., Mouvier, G. and Nikolaou, K. (1986) Relative decay index and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmos. Environ.*, **20**, 439-445.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 5135-5139.
- McLemore, T. L., Adelberg, S., Czerwinski, M., Hubbard, W.C., Yu, S.J., Storeng, R., Wood, T.G., Hines, R.N. and Boyd, M.R. (1989) Altered regulation of the cytochrome P4501A1 gene: novel inducer-independent gene expression in pulmonary carcinoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 1787-94.
- Mersch-Sundermann, V., Mochayed, S. and Kevekordes, S. (1992) Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutat. Res.*, **278**, 1-9.
- Moscow, J.A., Fairchild, C.R., Madden, M.J., Ransom, D.T., Wieand, H.S., O'Brien, E.E., Poplack, D.G., Cossman, J., Myers, C.E. and Cowan, K.H. (1989) Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res.*, **49**, 1422-1428.
- Mumford, J.L., He, X.Z., Chapman, R.S., Cao, S.R., Harris, D.B., Li, X.M., Xian, Y.L., Jiang, W.Z., Xu, C.W., Chuang, J.C., Wilson, W.E. and Cooke, M. (1987) Lung cancer and indoor air pollution in Xuan Wei, China. *Science*, **235**, 217-220.
- Mumford, J.L., Williams, R.W., Walsh, D.B., Burton, R.M., Svendsgaard, D.J., Chuang, J.C., Houk, V.S. and Lewtas, J. (1991) Indoor air pollutants from unvented kerosene heater. Emissions in mobile homes: studies on particles, semivolatile organics, carbon monoxide, and mutagenicity. *Environ. Sci.*

*Technol.*, **25**, 1732-1736.

Norman, C.A., Lambert, I.B., Davison, L.M., Bryant, D.W. and McCalla, D.R.

(1990) Formation and persistence of DNA adducts in rats following intraperitoneal administration of 1,8-dinitropyrene. *Carcinogenesis*, **11**, 1037-1040.

Ohgaki, H., Hasegawa, H., Kato, T., Negishi, C., Sato, S. and Sugimura, T. (1985) Absence of carcinogenicity of 1-nitropyrene, correction of previous results, and new demonstration of carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene in rats. *Cancer lett.*, **25**, 239-245.

Pahlman, R. and Pelkonen, O. (1987) Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structure. *Carcinogenesis*, **8**, 773-778.

Perera, F.P., Hemminki, K., Gryzbowska, E., Motykiewicz, G., Michalska, J., Santella, R.M., Young, T.L., Dickey, C., Brandt-Rauf, P., de Vivo, I., Blaner, W., Tsai, W.Y. and Chorazy, M. (1992) Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature (Lodon)*, **360**, 256-258.

Phillips, D.H., Hewer, A., Martin, C.N., Garner, R.C. and King, M.M. (1988).

Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature (Lond)*, **336** : 790-792.

Phillips, D.H., Schoket, B., Hewer, A., Bailey, E., Kostic, S. and Vincze, I. (1990a)

Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int. J. Cancer*, **46**, 569.

Phillips, H.D., Hewer, A., Malcolm, A.D.B., Ward, P. and Coleman, D.V. (1990b)

Smoking and DNA damage in cervical cells. *Lancet*, **335**, 417-421.

Plakunov, I., Smolarek, T.A., Fischer, D.L., Wiley, J.C.J. and Baird, W.M. (1987)

Separation ion-pair high-performance liquid chromatography of the glucuronide,

- sulfate and glutathione conjugates formed from benzo[a]pyrene in cell cultures from rodents, fish and humans. *Carcinogenesis*, **8**, 59-66.
- Quan, T., Reiners, J.J.J., Bell, A.O., Hong, N. and States, J.C. (1994) Cytotoxicity and genotoxicity of (±)-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol in CYP IA1-expressing human fibroblasts quantitatively correlate with CYP IA1 expression level. *Carcinogenesis*, **15**, 1827-1832.
- Ragnotti, G., Presta, J., Maier, A.M., Rusnati, M., Mazzoleni, G., Legati, F., Chiesa, R., Braga, M. and Calovini, D. (1987) Critical role of gonadal hormones on the genotoxic activity of the hepatocarcinogen DL-ZAMI 1305. *Cancer Lett.*, **36**, 253-261.
- Ramet, M., Castren, K., Jarvinen, K., Pekkala, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Soini, Y., Pakko, P. and Vahakangas, K. (1995) p53 protein expression is correlation with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, **16**, 2117-2124.
- Randerath, E., Avitts, T.A., Reddy, M.V., Miller, R.H., Everson, R.B. and Randerath, K. (1986) Comparative <sup>32</sup>P-analysis of cigarette smoke induced DNA damage in human tissues and mouse skin. *Cancer Res.*, **46**, 5869-5877.
- Randerath, E., Mittal, D. and Randerath, K. (1988) Tissue distribution of covalent DNA damage in mice treated dermally with cigarette tar : preference for lung and heart DNA. *Carcinogenesis*, **9**, 75-80.
- Randerath, E., Miller, R.H., Mittal, D., Avitts, T.A., Dunsford, H.A. and Randerath, K. (1989) Covalent DNA damage in tissues of cigarette smokers as determined by <sup>32</sup>P-postlabeling assay. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 341-347.
- Randerath, K., Reddy, M.V., Avitts, T.A., Miller, R.H., Everson, R.B. and Randerath, E. (1986) <sup>32</sup>P-postlabeling test for smoking-related DNA adducts in animal and human tissues. In Hoffmann, D. and Harris, C.C. (eds) "*Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis, Banbury Report 23, Cold Spring*

Harbor Laboratory." NY, Cold Spring Harbor, 85-98.

- Reiss, M., Brash, D.E., Munoz-Antonia, T., Simon, J.A., Ziegler, A., Vellucci, V.F. and Zhou, Z.L. (1992) Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Oncol. Res.*, **4**, 349-357.
- Richard, A.M. and Woo, Y.T. (1990) A Case-SAR analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenicity. *Mutat. Res.*, **242**, 285-303.
- Robertson, I.G.C., Jensson, H., Mannervik, B. and Jenstrom, B. (1986) Glutathione transferase in rat lung : the presence of transferase 7-7, highly efficient in the conjugation of glutathione with the carcinogenic (-)-7 $\beta$ ,8 $\delta$ -dihydroxy-9 $\beta$ ,10 $\delta$ -oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **7**, 295-299.
- Roggeband, R., Wolterbeek, A.P.M., Rutten, A.A.J.J.L. and Baan, R.A. (1993) Comparative <sup>32</sup>P-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**, 1945-1950.
- Roggeband, R., Wolterbeek, A.P.M., Melis, O.W.M. Wittekoek, M.E., Rutten, A.A. J.J.L., Feron, V.J. and Baan, R.A. (1994) DNA adduct formation and repair in hamster and rat tracheas exposed to benzo[a]pyrene in organ culture. *Carcinogenesis*, **15**, 661-665.
- Rojas, M. and Alexandrov, K. (1986) In vivo formation and persistence of DNA and protein adducts in mouse and rat skin exposed to ( $\pm$ )-benzo[a]pyrene-4,5-oxide. *Carcinogenesis*, **7**, 235-240.
- Romert, L., Dock, J., Jansen, D. and Jernstrom, B. (1989) Effects of glutathione transferase activity on benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol metabolism and mutagenesis studied in a mammalian cell co-cultivation assay. *Carcinogenesis*, **10**, 1701-1707.
- Rothman, N., Oirier, M.C., Baser, M.E., Hansen, J.A., Gentile, C., Bowman, E.D. and Strickland, P.T. (1990) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA

- adducts in peripheral white blood cells during consumption of charcoal-broiled beef. *Carcinogenesis*, **11**, 1241-1246.
- Roy, A.K., El-Bayoumy, K. and Hecht, S.S. (1989) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of 1-nitropyrene-DNA adducts in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, **10**, 195-198.
- Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D.H. and Haugen, A. (1994) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.*, **54**, 5801-5803.
- Sakai, M., Yoshida, D. and Mizusaki, S. (1985) Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutat Res*, **156**, 61-67.
- Scherer, G., Conze, C., Tricker, A.R. and Adlkofer, F. (1992) Uptake of tobacco smoke constituents on exposure to environmental tobacco smoke (ETS). *Clin. Investig.*, **70**, 352-367.
- Schoket, B., Horkay, I., Kosa, A., Paldeak, L., Hewer, A., Grover, P.L. and Phillips, D. H. (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**, 241-246.
- Seidman, L.A., Moore, C.J. and Gould, M.N. (1988) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adducts in human and rat mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, **9**, 1071-1076.
- Sflomos, C., Rapadopoulou, R. and Athanasiou, K. (1989) Temperature and time effects on mutagen production in cooked lamb meat. *Mutagenesis*, **4**, 228-229.
- Shields, P.G., Bowman, E.D., Harrington, A.M., Doan, V.T. and Weston, A. (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res.*, **53**, 3486-3492.
- Shimada, T., Martin, M.V., Pruess-Schwartz, D., Marnett, L.J. and Guengerich, F.P.

- (1989) Roles of individual human cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of benzo[a]pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, **49**, 6304-6312.
- Simonato, L., Vineis, P. and Flecher, A.C. (1988) Estimates of the proportion of lung cancer attributable to occupational exposure. *Carcinogenesis*, **9**, 1677-1681.
- Sims, P, Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K. and Hewer, A. (1974) Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol epoxide. *Nature* (London), **252**, 326-328.
- Singer, B. and Grunberger, D. (1983). *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, New York : Plenum Press.
- Sinha, D.K. and Gao, T.L. (1980) Induction of mammary tumors in aging rats by 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene: role of DNA synthesis during carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 519-521.
- Sobue, T., Suzuki, T. and Fujimoto, I. (1991) Lung cancer risk among exsmokers. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 273-279.
- Swedmark, S., Romert, L., Morgenstern, R. and Jenssen, D. (1992) Studies on glutathione transferases belonging to class pi in cell lines with different capabilities for conjugating (+)-7 $\beta$ ,8 $\delta$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **13**, 1719-1723.
- Takagi, Y., Koo, L.C., Osada, H., Ueda, R., Kyaw, K., Ma, C.-C., Suyama, M., Saji, S., Takahashi, T., Tominaga, S. and Takahashi, T. (1995) Distinct mutational spectrum of the p53 gene in lung cancers from Chinese women in hong kong. *Cancer Res.*, **55**, 5354-5357.
- Tokiwa, H. and Ohnishi, Y. (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.
- Tokiwa, H., Sera, N., Horikawa, K., Nakanishi, Y. and Shigematu, N. (1993) The



- presence of mutagens/carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction. *Carcinogenesis*, **14**, 1933-1938.
- United States Department of Health and Human Services (1982). The Health Consequences of Smoking : Cancer. A Report of the Surgeon General, Office on Smoking and Health, Rockville, M.D.
- Vahakangas, K., Nevasaari, K., Pelkonen, O. and Karki, T. (1979) Effect of various *in vitro* inhibitors of benzo[a]pyrene metabolism in isolated rat lung perfusions. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 1-8.
- van Leeuwin, F.E., Lutgerink, J.T., van Zandwijk, N., Jansen, H.M. and Kriek, E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis*, **11**, 1677-1681.
- van Schooten, F.J., Hillebrand, M.J.X., van Leewen, F.E., Lutgerink, J.T., van Zandwijk, N., Jansen, H.M. and Kriek, E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis*, **11**, 1677-1681.
- van Schooten, F.J., Hillebrand, M.J., van Leeuwin, F.E., van Zandwijk, N., Jansen, H.M., den Engelse, L. and Kriek, E. (1992) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells from lung cancer patients : no correlation with adduct levels in lung. *Carcinogenesis*, **13**, 987-993.
- Venier, P., Clonfero, E., Cottica, D., Gava, C., Zordan, M., Pozzoli, L. and Levis, A.G. (1985) Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis*, **6**, 749-752.
- Verschueren, K., *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. Van Nostrand Reinhold, New York. (1983) 1310-1314.
- Wang, P., Yen, V.O. and Tsai, H.T. (1988) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate by high performance liquid chromatograph.

*J. Chin. Chem. R.O.C.*, **35**, 13-21.

Weyand, E.H. and Bevan, D.R. (1986) Benzo[a]pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer Res.*, **46**, 5655-5661.

Wilson, V.L., Weston, A., Manchester, D.K., Trivers, G.E., Roberts, D.W., Kadlubar, F.F., Wild, C.P., Montesano, R., Willey, J.C., Mann, D.L. and Harris, C.C. (1989) Alkyl and aryl carcinogen DNA adducts detected in human peripheral lung. *Carcinogenesis*, **10**, 2149-2153.

Wislocki, P.G., Bagan, E.S., Lu, A.Y.H., Dooley, K.L., Fu, P.P., Han-Hsu, H., Beland, F.A. and Kadlubar, F.F. (1986) Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, and benzo[a]pyrene in the newborn mouse assay. *Carcinogenesis*, **7**, 1317-1322.

Wolterbeek, A.P.M., Roggeband, R., Steenwinkel, M.J.S.T., Bann, R.A. and Rutten, A.A.J.J.L. (1993) Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by <sup>32</sup>P-postlabeling analysis and unscheduled DNA synthesis. *Carcinogenesis*, **14**, 463-467.

Wolterbeek, A.P.M., Roggeband, R., Bann, R.A., Feron, V.J. and Rutten, A.A.J.J.L. (1995) Relation between benzo[a]pyrene-DNA adducts, cell proliferation and p53 expression in tracheal epithelium of hamsters fed a high  $\beta$ -carotene diet. *Carcinogenesis*, **16**, 1617-1622.

Yang, S.P., Luh, K.T., Kuo, S.H. and Lin, C.C. (1984) Chronological observation of epidemiologic characteristics in Taiwan with etiological consideration : a 30-years consecutive study. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **14**, 7-19.

Yu, M.C., Ho, J.H.C., Lai, S.H. and Henderson, B.E. (1986) Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case-control study in Hong Kong. *Cancer Res.*, **46**, 956-961.

Yu, M.C., Mo, C.C., Chong, W.X., Yeh, F.S. and Henderson, B.E. (1988) Preserved foods and nasopharyngeal carcinoma: case-control study in Guangxi, China.

*Cancer Res.*, **48**, 1954-1959.

Zheng, W. and Gao, Y.T. (1986) A hospital-based case-control study on association of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma with smoking. *Tumor*, **6**, 17-20.

Zu, H.-X. and Schut, H.J. (1991) Sex difference in the formation and persistence of DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in CDF1 mice. *Carcinogenesis*, **12**, 2163-2168.

## 柒、圖表

Table 1. The Genotoxicity and carcinogenicity of some PAHs frequently found in airborne particulates samples.

PAHs	Carcinogenicity	Genotoxicity
Ant	-	-
Fluo	-	-
Pyr	-, ?	+/? Ames + UDS + SCE
B[a]A	+	+ Ames + UDS + SCE
Chr	+w	+ Ames + SCE + CA
B[b]FA	+	+ Ames + SOS
B[a]P	++++	+ Ames + UDS + SCE + CA + DA
DB[a,h]A	++	+ Ames + <i>E. coli</i> + DNA damage + CA
B[g,h,i]P	?	+ Ames + SOS

Ames = *Salmonella typhimurium* reversion assay, CA = chromosomal aberrations, DA = DNA adducts, SCE = sister chromatid exchange, UDS = unscheduled DNA synthesis, SOS = SOS chromotest, ? = inadequate/inconclusive, +w = weak carcinogenicity, ++ = middle, ++++ = very strong.

Data compiled from Verschueren, K., 1983; IARC, 1983.

Table 2. Characteristics of study subjects and parameter analysed in this study.

Patient No.	Sex	Age	Smoking habits		Tumor		DNA adducts <sup>c</sup> / 10 <sup>8</sup> nucleotides
			Cig./ day	Total packs <sup>a</sup> (x 10 <sup>4</sup> )	Type <sup>b</sup>	Stage	
1	F	55	0	0	LC	IIIa	11.95 ± 0.13
2	F	37	0	0	SQ	I	72.58 ± 7.03
3	F	70	0	0	SQ	I	11.63 ± 0.26
4	F	50	0	0	A	I	162.69 ± 2.80
5	F	55	0	0	A	I	57.00 ± 2.72
6	F	56	0	0	A	I	32.90 ± 2.60
7	F	65	0	0	A	I	51.70 ± 2.95
8	F	66	0	0	A	I	53.56 ± 4.74
9	F	73	0	0	A	I	128.93 ± 4.43
10	F	73	0	0	A	I	165.92 ± 8.65
11	F	41	0	0	A	IIIa	64.46 ± 6.92
12	F	60	0	0	A	IIIa	59.18 ± 3.59
13	F	64	0	0	A	IIIa	82.01 ± 8.11
14	F	45	0	0	A&SQ	IV	34.61 ± 2.74
15	M	77	0	0	SQ	I	43.70 ± 2.06
16	M	66	0	0	SQ	II	35.24 ± 3.93
17	M	64	0	0	A	I	42.15 ± 2.07
18	M	66	0	0	A	I	33.00 ± 3.07
19	M	45	0	0	A	IIIa	10.53 ± 0.71
20	M	53	0	0	A	IV	39.15 ± 3.37
21	M	66	0	0	A&SQ	IIIa	22.65 ± 0.98

Table 2. (continued)

22	M	58	0	0	A&SQ	IIIa	12.14 ± 0.96
23	M	64	10	0.18	SQ	I	16.14 ± 1.43
24	M	72	20	1.10	SQ	I	79.67 ± 4.55
25	M	43	20	0.37	SQ	I	11.46 ± 0.97
26	M	68	50	4.56	SQ	I	122.65 ± 5.30
27	M	71	20	0.37	SQ	I	82.85 ± 3.03
28	M	72	30	2.19	SQ	I	105.65 ± 8.03
29	M	68	50	3.65	SQ	I	47.42 ± 3.11
30	M	69	20	1.46	SQ	I	52.77 ± 3.09
31	M	53	20	0.73	SQ	I	122.66 ± 7.23
32	M	69	20	1.10	SQ	I	120.76 ± 2.40
33	M	65	20	1.10	SQ	I	31.18 ± 0.80
34	M	73	20	1.46	SQ	I	13.46 ± 0.79
35	M	62	20	1.46	SQ	II	14.97 ± 0.95
36	M	68	20	1.46	SQ	II	60.44 ± 4.64
37	M	66	20	1.46	SQ	II	74.27 ± 3.75
38	M	74	5-10	0.77	SQ	II	28.27 ± 4.10
39	M	47	20-40	1.64	SQ	II	72.40 ± 4.50
40	M	72	20	1.83	SQ	II	50.63 ± 1.16
41	M	74	20	1.46	SQ	II	32.24 ± 1.25
42	M	69	30	2.19	SQ	IIIa	7.72 ± 0.98
43	M	71	20-40	2.74	SQ	IIIa	7.72 ± 0.36
44	M	64	30	1.64	SQ	IIIa	12.34 ± 0.70
45	M	69	10	?	SQ	IIIa	80.01 ± 6.81
46	M	66	20	1.10	SQ	IIIa	114.43 ± 6.71
47	M	69	20	1.83	SQ	IIIa	10.70 ± 0.83

Table 2. (continued)

48	M	67	10	0.73	SQ	IIIa	17.44 ± 3.00
49	M	66	20	1.83	SQ	IIIb	43.21 ± 0.90
50	M	64	20	1.10	A	I	33.68 ± 1.74
51	M	72	20-40	2.19	A	I	100.37 ± 5.79
52	M	66	20	1.46	A	I	39.58 ± 5.76
53	M	53	20	0.37	A	I	37.00 ± 1.90
54	M	83	10	0.73	A	I	10.10 ± 0.61
55	M	80	10	0.91	A	II	48.89 ± 6.06
56	M	62	20	1.46	A	II	89.88 ± 4.76
57	M	68	13	1.22	A	IIIa	22.08 ± 1.81
58	M	66	10	0.82	A	IIIa	89.99 ± 1.62
59	M	67	20	1.46	A	IIIa	44.99 ± 1.84
60	M	71	20	1.83	A	IIIa	54.96 ± 2.07
61	M	68	10	0.91	A&SQ	IIIa	32.26 ± 2.64
62	M	65	20-40	0.55	A&LC	II	4.42 ± 0.93
63	M	61	20	1.46	SC	IV	76.57 ± 5.02

<sup>a</sup> (Number of cigarettes smoked per day x years of smoking) x 365 / 20.

<sup>b</sup> LC, large cell carcinoma; SQ, squamous cell carcinoma; A, adenocarcinoma; SCC, small cell carcinoma.

<sup>c</sup> Values are means ± SD.

Table 3. Comparison of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay result and questionnaire data in smokers and non-smokers.

Parameters	Smokers	Non-smokers
Number	41	22
Age		
Mean	66.76 $\pm$ 7.46	59.32 $\pm$ 10.86
Range	43 - 83	37 - 77
Total Packs <sup>a</sup>		
Mean <sup>b</sup>	1.42 $\pm$ 0.85	-
Range <sup>b</sup>	0.18 - 4.56	
Cigarettes / day		
Mean	20.99 $\pm$ 9.17	-
Range	5 - 50	
DNA adducts		
Mean $\pm$ SD <sup>c</sup>	51.66 $\pm$ 36.24	54.94 $\pm$ 44.85
Range <sup>c</sup>	4.42 - 122.66	10.53 - 165.92

<sup>a</sup> Total packs  $\times 10^4$

<sup>b</sup> (Number of cigarettes smoked per day  $\times$  years of smoking)  $\times 365 / 20$

<sup>c</sup> Adducts /  $10^8$  nucleotides



Table 4. Comparison of pack years and total aromatic DNA adduct levels in normal lung tissue of smoker from various countries.

No. of Patients	Pack years	DNA adducts / 10 <sup>8</sup> nucleotides	Reference
17	38.63 ± 18.63	11.12 ± 7.53	Phillips et al. (1988)
21	50.78 ± 21.76 <sup>a</sup>	4.65 ± 6.50	Geneste et al. (1991)
13	50.08 ± 25.87 <sup>b</sup>	5.60 ± 3.46	Alexandrov et al. (1992)
38	42.00 ± 20.20	9.75 ± 7.86	Ryberg et al. (1994)
40	39.69 ± 22.74 <sup>c</sup>	50.96 ± 36.42	Present study

No significant differences between a and c (p = 0.08) or b and c (p = 0.19).

Values are means ± SD.

Table 5. Comparison of <sup>32</sup>P-postlabeling assay result and questionnaire data in male and female.

Parameter	Males	Females	p value
DNA adducts <sup>a</sup>			
Smokers	51.66 ± 36.24 <sup>b</sup> (N = 41)	-	
Non-smokers	29.82 ± 13.13 (N = 8)	70.65 ± 49.41 (N = 14)	0.014
Total	48.10 ± 34.44 (N = 49)	70.65 ± 49.41 (N = 14)	0.098
Age			
Smokers	66.76 ± 7.46	-	
Non-smokers	61.88 ± 9.73	57.86 ± 11.54	0.442
Total	65.96 ± 7.97	57.86 ± 11.54	0.029
Tumor type <sup>c</sup>			
A	15	10	
SQ	29	2	
A&SQ	3	1	
LC	1	1	
SCC	1	0	

<sup>a</sup> Adducts / 10<sup>8</sup> nucleotides

<sup>b</sup> Values are means ± SD.

<sup>c</sup> A, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma; LC, large cell carcinoma; SCC, small cell carcinoma.

Table 6. Prevalence of total aromatic DNA adduct levels in normal lung tissue analyzed by the nuclease P1 enhanced <sup>32</sup>P-postlabeling assay.

No. of patients	DNA adducts / 10 <sup>8</sup> nucleotides		Reference
	Range	Mean ± S.D	
29	1.5 ~ 34.3	9.21 ± 7.53	Phillips et al. (1988)
19	0.1 ~ 23.0	9.30 ± 6.50	Cuzick et al. (1990)
20	1.9 ~ 34.3	11.30 ± 8.46	van Schooten et al.(1990)
23	0.2 ~ 13.4	4.63 ± 3.34	Geneste et al. (1991)
13	1.3 ~ 13.4	5.60 ± 3.46	Alexandrov et al. (1992)
38	ND ~ 38.0	3.35 ± 8.90	Shield et al. (1993)
63	-	8.74 ± 6.34	Ryberg et al. (1994)
63	4.4 ~ 165.9	53.11 ± 38.98	Present study

Table 7. The levels of total DNA adducts and BPDE-DNA in normal lung tissue from some lung cancer patients which have a similar BPDE-DNA adduct on PEI plate.

Patient no.	Total DNA adducts /10 <sup>8</sup> nucleotides	BPDE spot /10 <sup>8</sup> nucleotides
4	162.69	15.40
6	32.90	10.11
13	82.01	15.40
14	34.61	19.97
16	35.24	14.17
23	16.14	2.24
24	79.67	9.04
32	120.76	6.85
35	14.97	2.37
39	72.4	10.8
42	7.72	1.66
44	12.34	3.42
50	33.68	4.57
52	39.58	9.78
63	76.57	14.35

Table 8. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in air particles from various cities.

Source <sup>a</sup>	Anth	Fluo	Pyr	B[a]A	Chr	B[b]FA	B[a]P	DB[a,h]A	B[g,h,i]P	Reference
Argentina	0.5	1.1	4.9	1.7	0.9	-	2.3	-	-	Catoggio et al. (1989)
Japan	5.3	-	29.2	-	-	-	-	-	-	Benner et al.(1989)
Taipei	-	-	-	3.4	5.1	-	13.8	6.4	18.6	Wang et al. (1988)
Kaoshung <sup>b</sup>	-	-	13.0	-	4.3	41.0	6.0	323.0	117.4	Lee et al.(1994)
Taichung	ND	ND	1.4	3.4	3.5	<b>47.1</b>	<b>34.0</b>	0.9	<b>172.2</b>	Lee et al.(unpublished)

a : ng / m<sup>3</sup>, b : ng / 100 m<sup>3</sup>, - : not analyzed, ND : not detected.

Table 9. General linear regression model for DNA adduct levels.

Parameter	Number	R value <sup>a</sup>	P value (Wilcoxon rank test)
Age	63	0	1.00 <sup>a</sup>
Sex	63	-	0.098
Smoking	63	-	0.814
Cig / day	41	0.200	0.21 <sup>a</sup>
years	40	0.025	0.88 <sup>a</sup>
Total packs (x10 <sup>4</sup> packs)	40	0.216	0.18 <sup>a</sup>
Tumor type	56	-	0.349
Tumor stage	63	-	> 0.05

<sup>a</sup> Linear regression analysis.

Table 10. Comparison of B[a]P-DNA adduct levels in different human lung cell lines exposed to various concentration B[a]P for 24 hrs.

Cells	B[a]P ( $\mu\text{M}$ )	DNA adduct levels / $10^8$ nucleotides
MRC-5	2	ND
	10	ND
	20	ND
Calu-1	2	2.57
	10	1.92
	20	1.68
A-427	2	0.63
	10	0.36
	20	0.51
CL1-0	2	ND
	10	0.21
	20	0.27
CL1-2	2	ND
	10	ND
	20	0.55
CL-3	2	944.27
	10	367.63
	20	1105.15

Table 11 The effect of B[a]P on the cell proliferation of CL-3 lung adenocarcinoma cells.

B[a]P ( $\mu$ M)	Cell no.(x10 <sup>5</sup> )	PC <sup>a</sup> (%)
0	10.66 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	
0.4	1.39 $\pm$ 0.07	13.04
10.0	1.11 $\pm$ 0.04	10.41

<sup>a</sup> PC(%), percent of control = (the cell numbers in the presence of B[a]P) / (the cell numbers in the presence of DMSO) x 100.

<sup>b</sup> Values are means  $\pm$  SD.

5  $\mu$ l DMSO / ml of medium for the solvent control.



Table 12. The effect of B[a]P on the cell proliferation of A-427 lung adenocarcinoma cells.

B[a]P ( $\mu\text{M}$ )	Cell no.( $\times 10^5$ )	PC <sup>a</sup> (%)
0	20.57 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	
0.4	27.11 $\pm$ 0.71	131.79
10.0	27.12 $\pm$ 4.49	131.84

<sup>a</sup> PC(%), percent of control = (the cell numbers in the presence of B[a]P) / (the cell numbers in the presence of DMSO)  $\times$  100.

<sup>b</sup> Values are means  $\pm$  SD.

5  $\mu\text{l}$  DMSO / ml of medium for the solvent control.

Table 13 The B[a]P-DNA adduct levels in CL-3 lung adenocarcinoma cells exposed to B[a]P with or without cytochrome P450 IA1 specific inhibitor  $\beta$ -naphthoflavone (ANF).

ANF ( $\mu$ M)	DNA adduct levels / $10^8$ nucleotides	Percent inhibition (%)
0	916.07	
1.0	324.00	64.63
10.0	170.03	81.44

Cells were treated with ANF for 24 hrs, after which the medium were removed and replaced with medium containing 2.5  $\mu$ M B[a]P for an additional 24 hrs.

Table 14 The B[a]P-DNA adduct levels in CL-3 lung adenocarcinoma cells exposed to B[a]P with or without cytochrome P450 IA1 specific inducer  $\beta$ -naphthoflavone (BNF).

BNF ( $\mu$ M)	DNA adduct levels / $10^8$ nucleotides	Percent of control (%)
0	894.46	
0.01	1180.05	132
0.1	1914.38	214
1.0	2025.72	226
10.0	1359.67	152

Cells were treated with BNF for 24 hrs, after which the medium were removed and replaced with medium containing 2.5  $\mu$ M B[a]P for an additional 24 hrs.

Table 15 The B[a]P-DNA adduct levels in A-427 lung adenocarcinoma cells exposed to B[a]P with or without cytochrome P450 IA1 specific inducer  $\beta$ -naphthoflavone (BNF).

BNF ( $\mu$ M)	DNA adduct levels / $10^8$ nucleotides	Percent of control (%)
0	1.01	
1.0	1.39	138
10.0	1.15	114

Cells were treated with BNF for 24 hrs, after which the medium were removed and replaced with medium containing 10  $\mu$ M B[a]P for an additional 36 hrs.

Table 16 The B[a]P-DNA adduct levels in CL-3 lung adenocarcinoma cells exposed to B[a]P with or without 17 $\beta$ -estradiol.

B[a]P ( $\mu$ M)	17 $\beta$ -estradiol <sup>a</sup> (ng/ml)	DNA adduct levels / 10 <sup>8</sup> nucleotides	PC (%) <sup>b</sup>
0.4	0	47.21	
	0.15	101.78	216
	0.3	49.37	105
1.0	0	396.24	
	0.15	632.99	160
	0.3	774.84	196
2.5	0	700.63	
	0.15	758.11	108
	0.3	783.12	112
5.0	0	590.30	
	0.15	609.61	103
	0.30	709.91	120

<sup>a</sup> Cells were treated with B[a]P and 17 $\beta$ -estradiol for 24hr.

<sup>b</sup> PC(%), percent of control = (the DNA adduct levels in the presence of B[a]P and 17 $\beta$ -estradiol) / (the DNA adduct levels in the presence of B[a]P alone) x 100

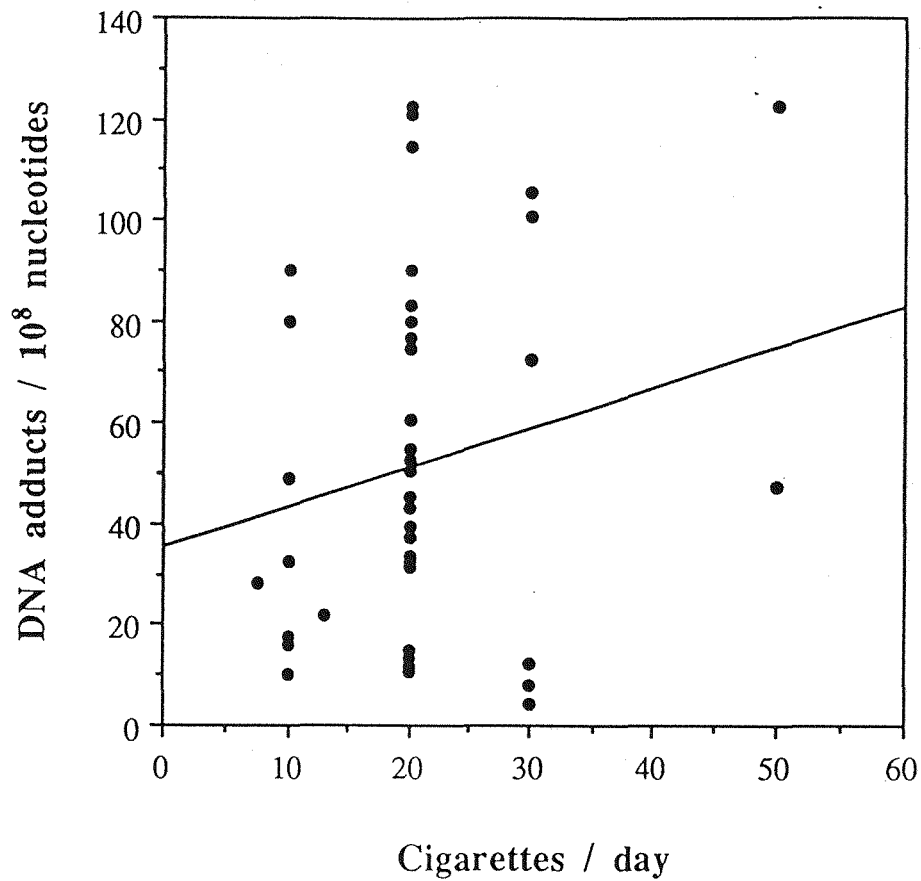


Fig. 1 Correlation between cigarettes smoked per day and DNA adduct levels in human normal lung tissue from 41 smoker's lung cancer patients. ( $r = 0.200$ ,  $P = 0.21$ , 39 degrees of freedom, linear regression)

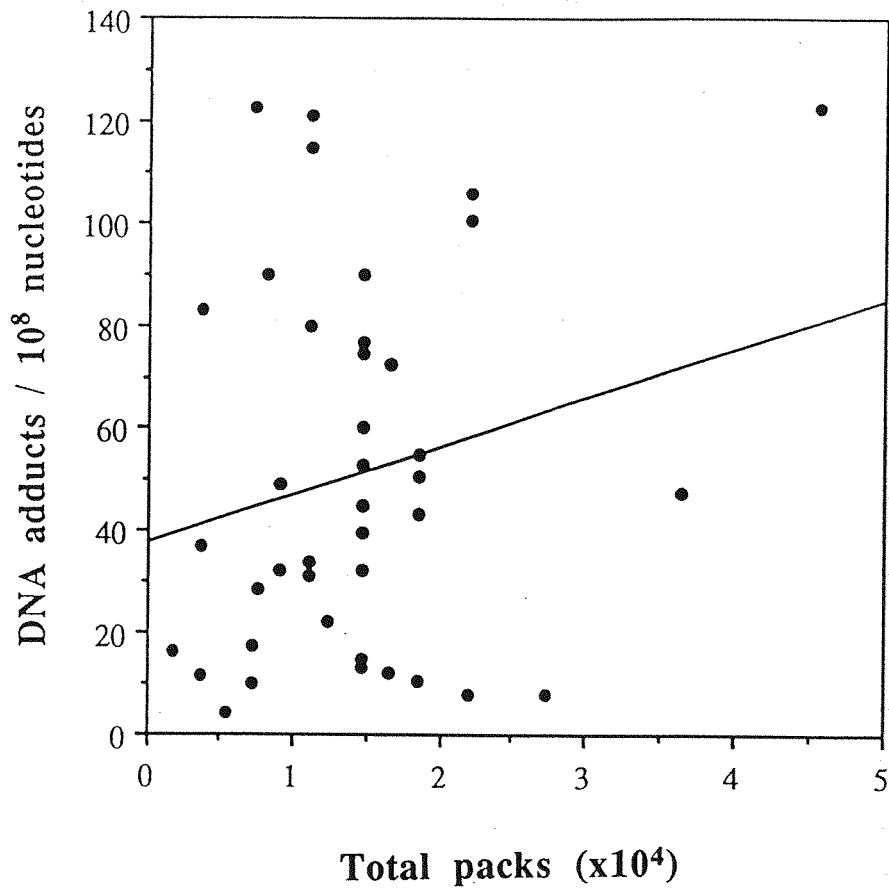


Fig. 2 Correlation between total packs smoked and DNA adduct levels in human normal lung tissue from 41 smoker's lung cancer patients. One patient did not have the information about total packs smoked. ( $r = 0.216$ ,  $p = 0.18$ , 38 degrees of freedom, linear regression)

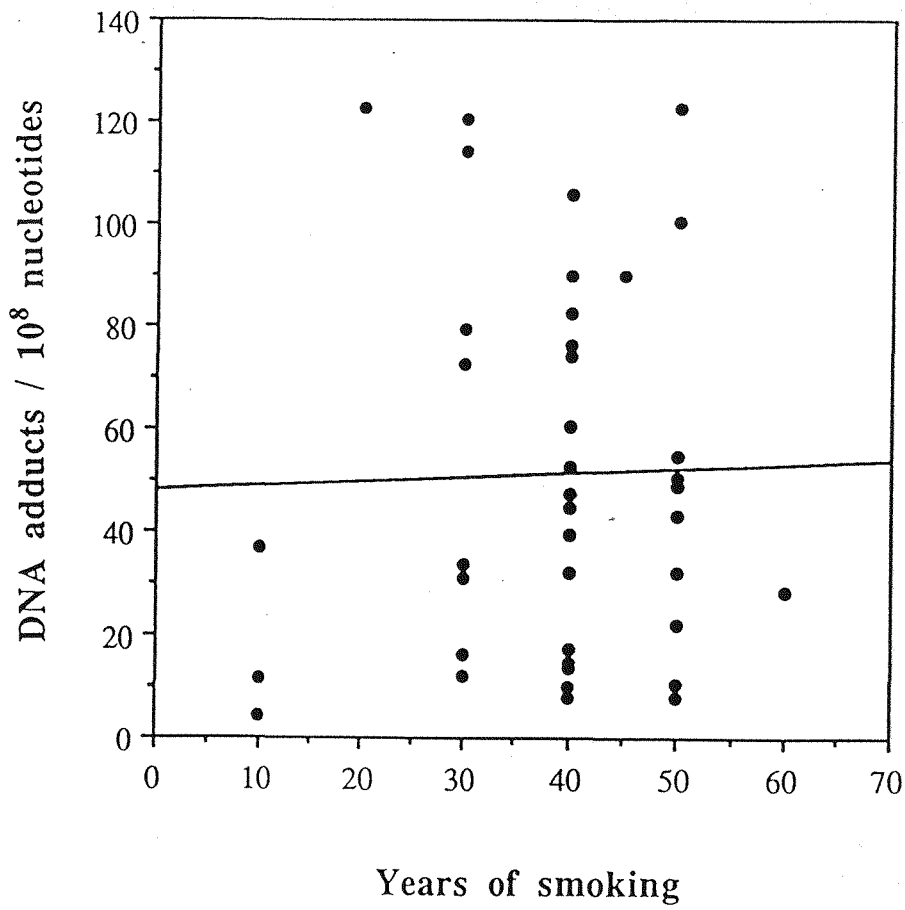


Fig. 3 Correlation between years of smoking and DNA adduct levels in human normal lung tissue from 41 lung cancer patients. One patient did not have the information about years of smoking. ( $r = 0.025$ ,  $p = 0.88$ , 38 degrees of freedom, linear regression)



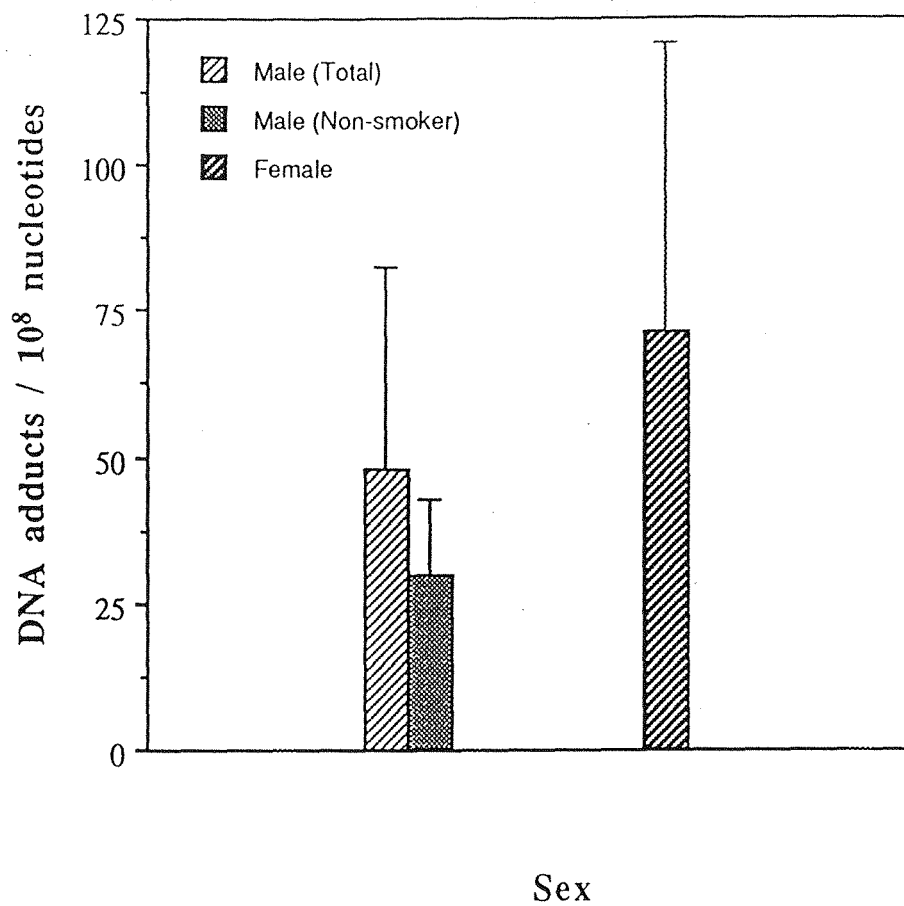


Fig. 4 The DNA adduct levels of female lung cancer patients (all non-smokers, n = 14) were significantly higher than non-smoker's male (n = 8, p = 0.014; Wilcoxon rank test).

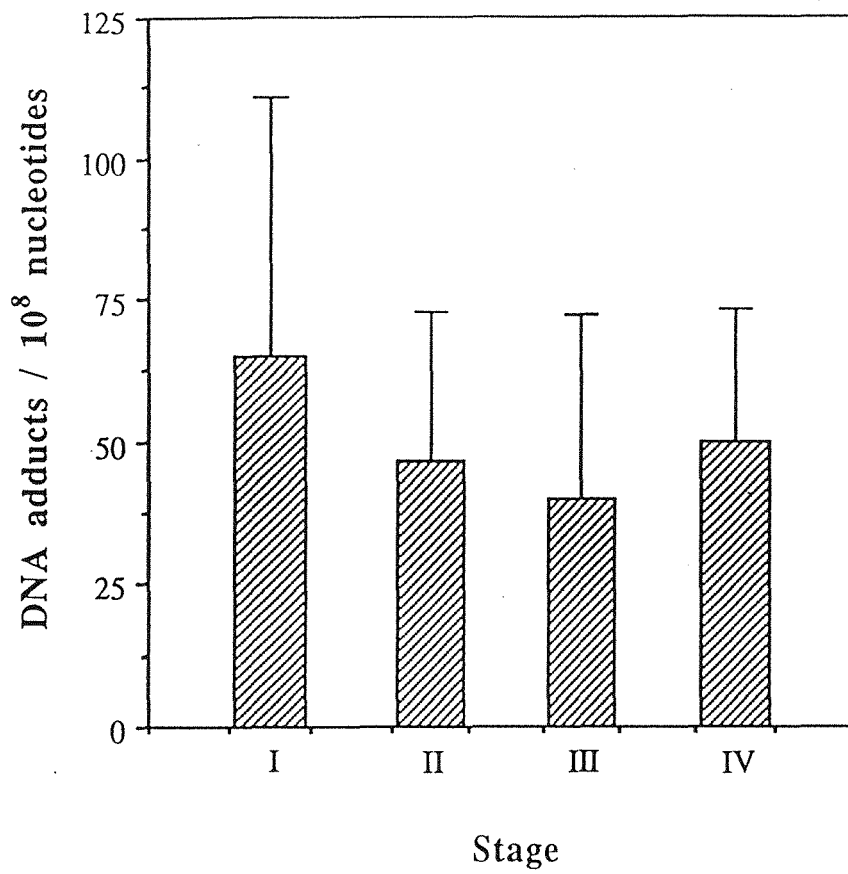


Fig. 5 The DNA adduct levels of different tumor stage ( $p > 0.05$ ; Wilcoxon rank test).

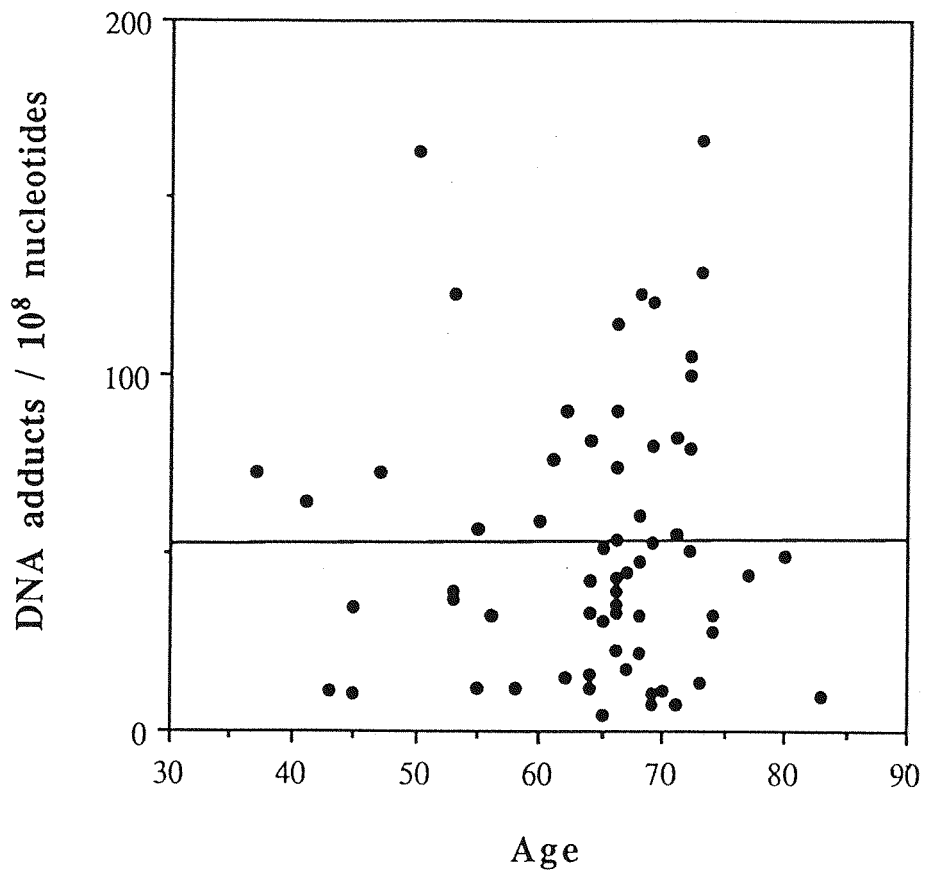
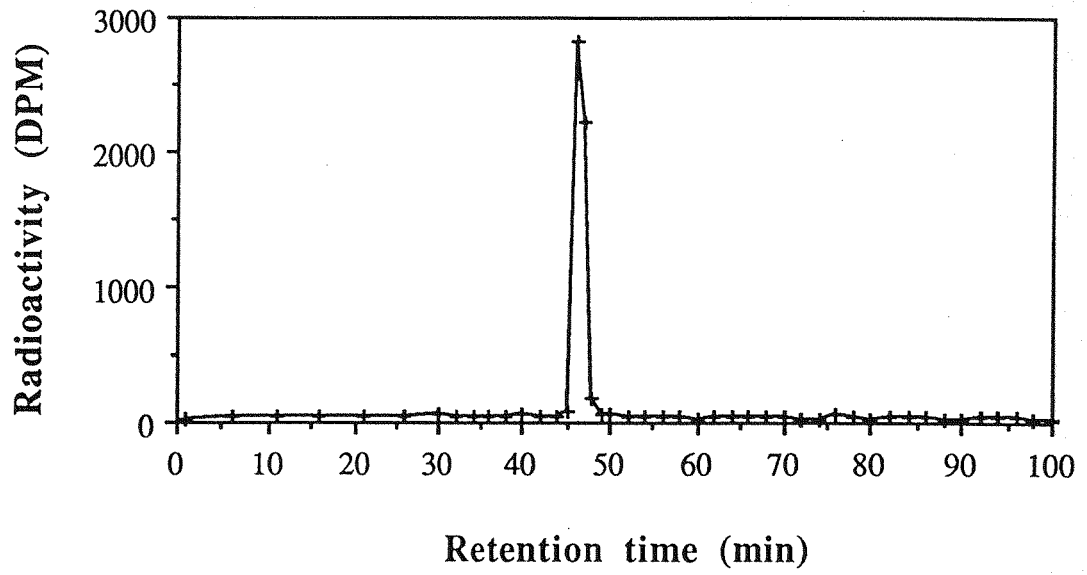


Fig. 6 Correlation between age of lung cancer patients and DNA adduct levels in human normal lung tissue from 63 lung cancer patients. ( $r = 0$ , 61 degrees of freedom, linear regression)

(A)



(B)

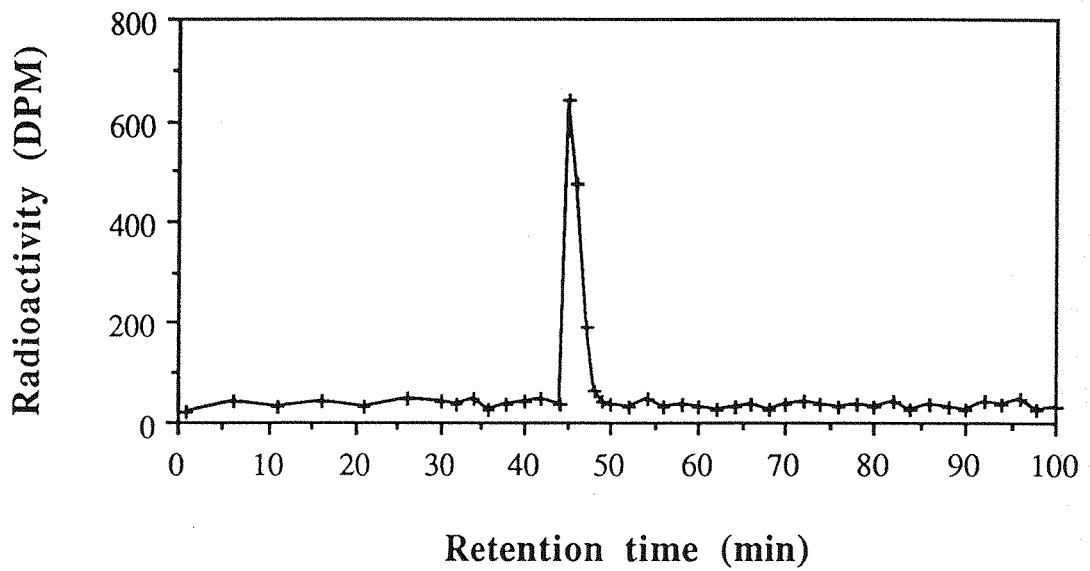


Fig. 7 HPLC profiles of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. (A) standard BPDE-N2 dG and (B) B[a]P-DNA adducts formed in cultured human lung adenocarcinoma cell CL-3.

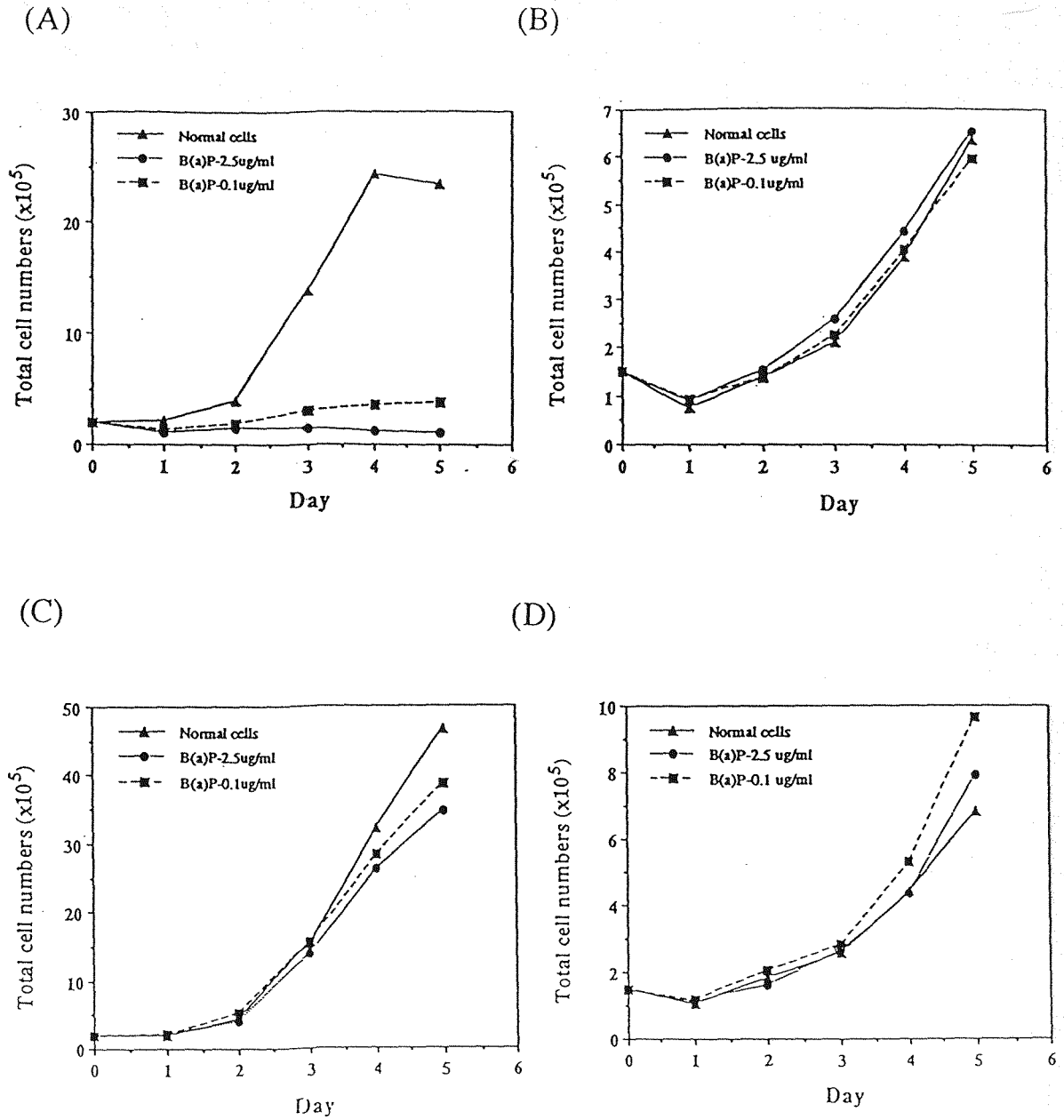


Fig. 8 Effect of B[a]P on the cell cycle of various human lung carcinoma cell lines. (A) CL-3 cells, (B) A-427 cells, (C) CL1-0 cells, and (D) Calu-1 cells.

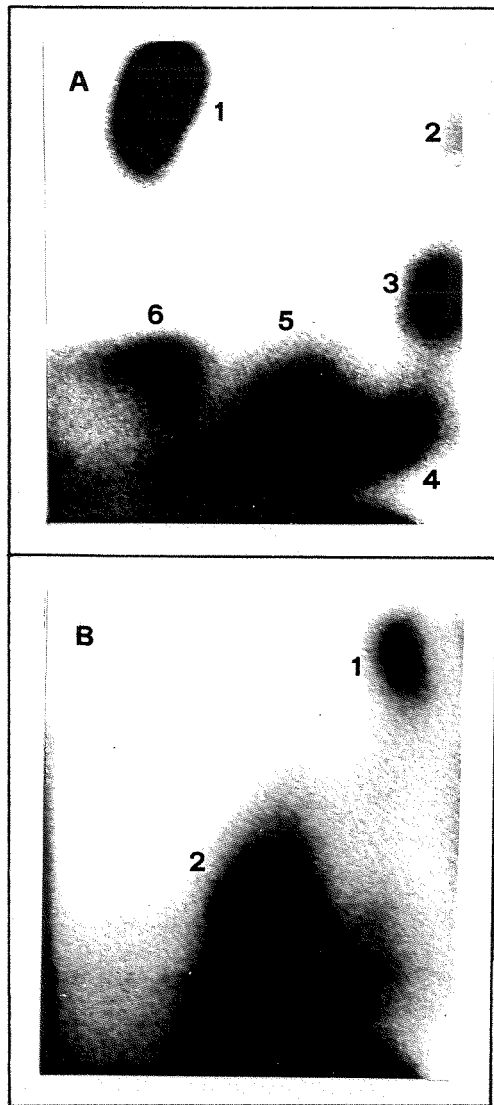


Fig. 9 Autoradiographic profiles of DNA adducts in normal lung tissue surgical resected from lung cancer patients. (A) # Sample 51 , (B) # Sample 18 .

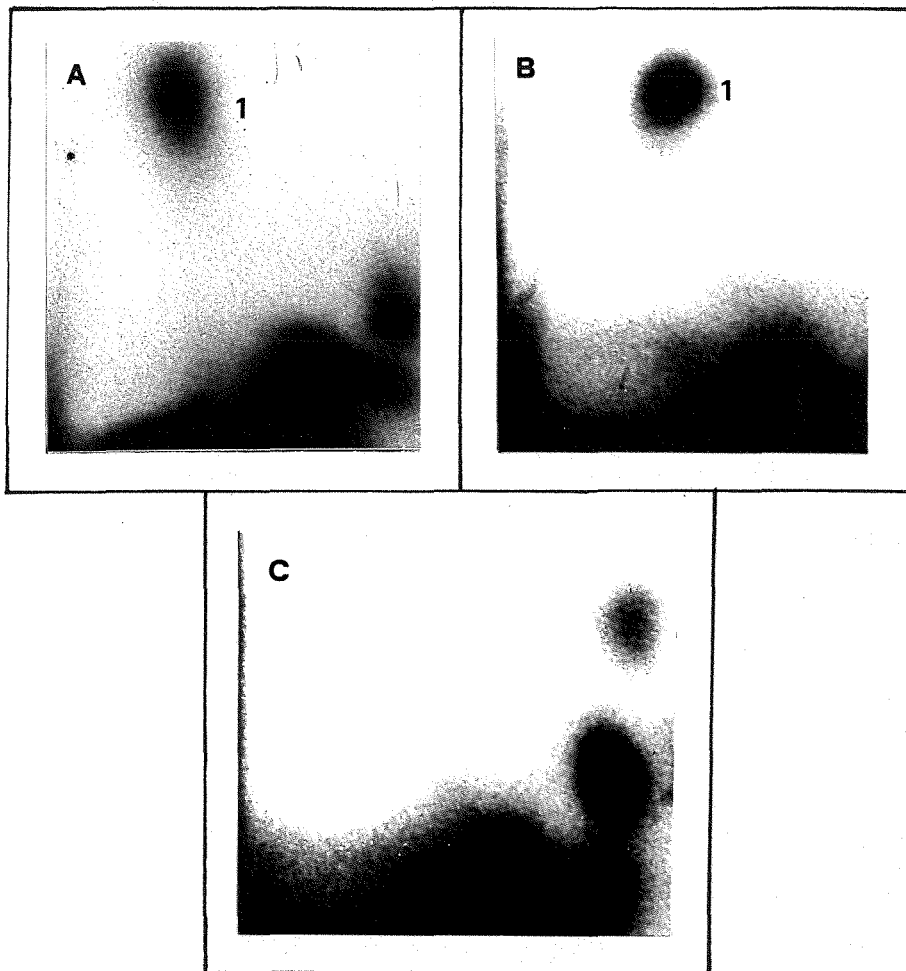


Fig.10 Autoradiographies of DNA adducts in normal lung tissue from lung cancer patients as determined by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. Adduct 1 was a faster migrating adduct which was found in 13 male and 5 female lung cancer patients.

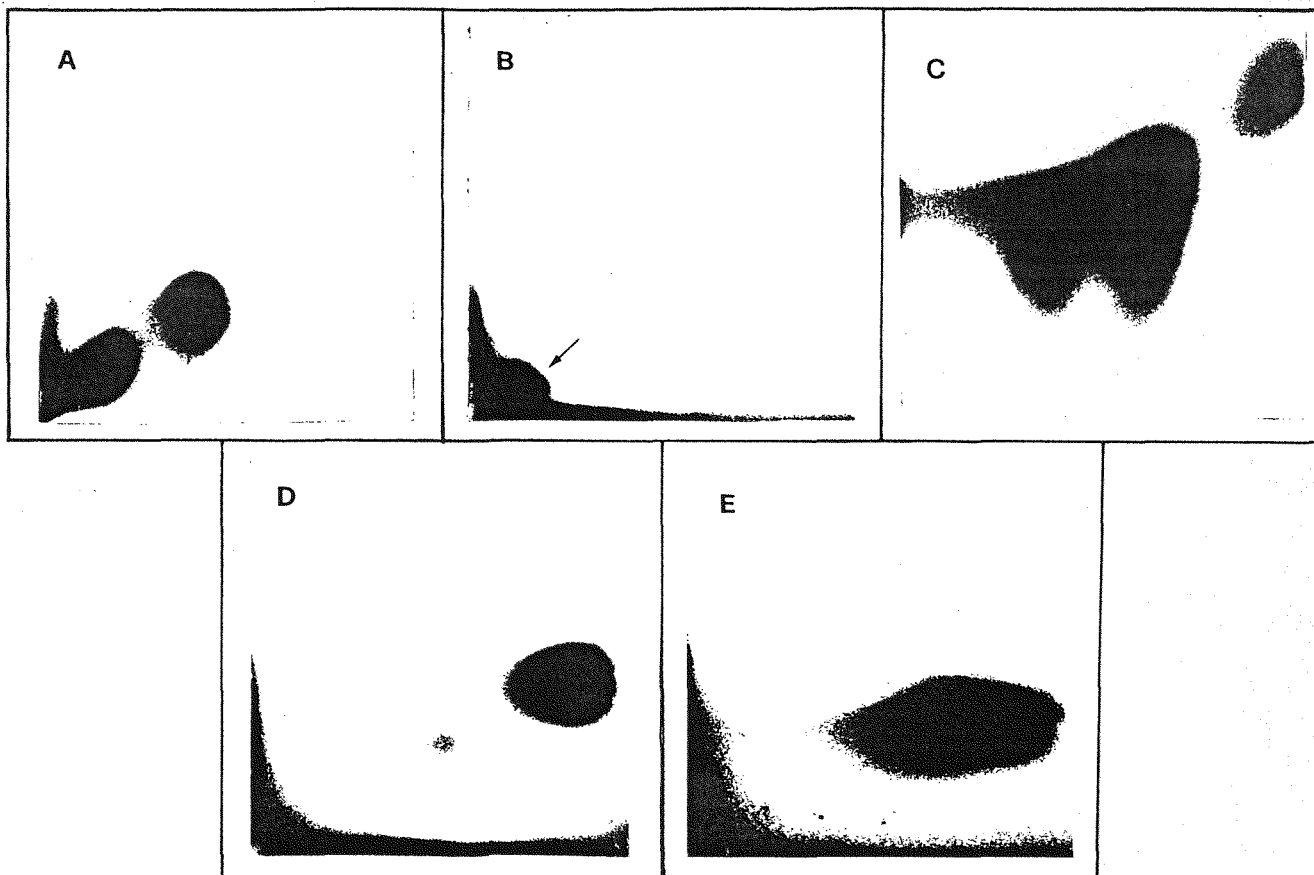


Fig. 11 Representative autoradiograms of DNA adducts in calf thymus DNA exposed to (A) B[a]P, (B) B[g,h,i]P, (C) B[a]A, (D) Chrysene, and (E) B[b]FA.



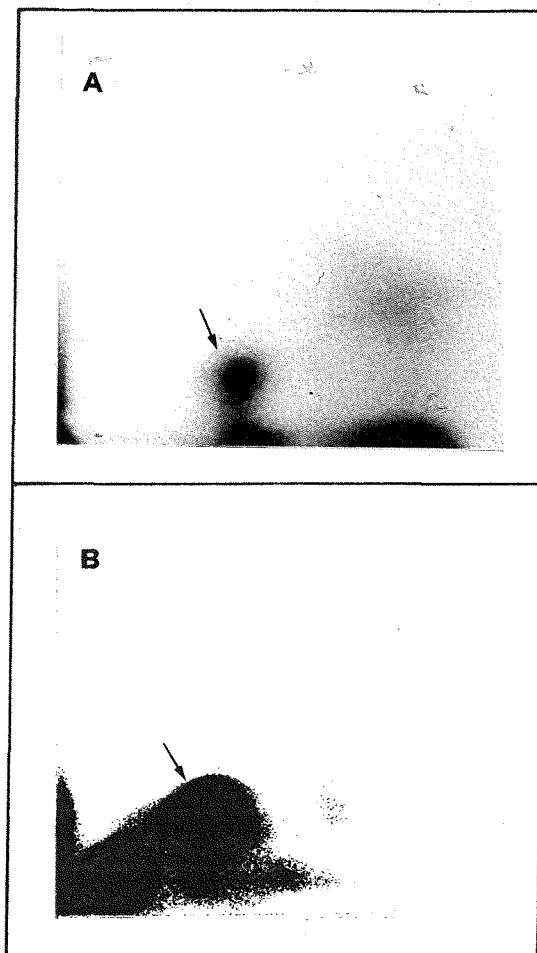


Fig.12 Autoradiographies of DNA adducts in normal lung tissue from lung cancer patients as determined by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. (A) Lung sample containing a spot co-chromatographed with the major BPDE-DNA adduct, (B) B[a]P-DNA adduct.

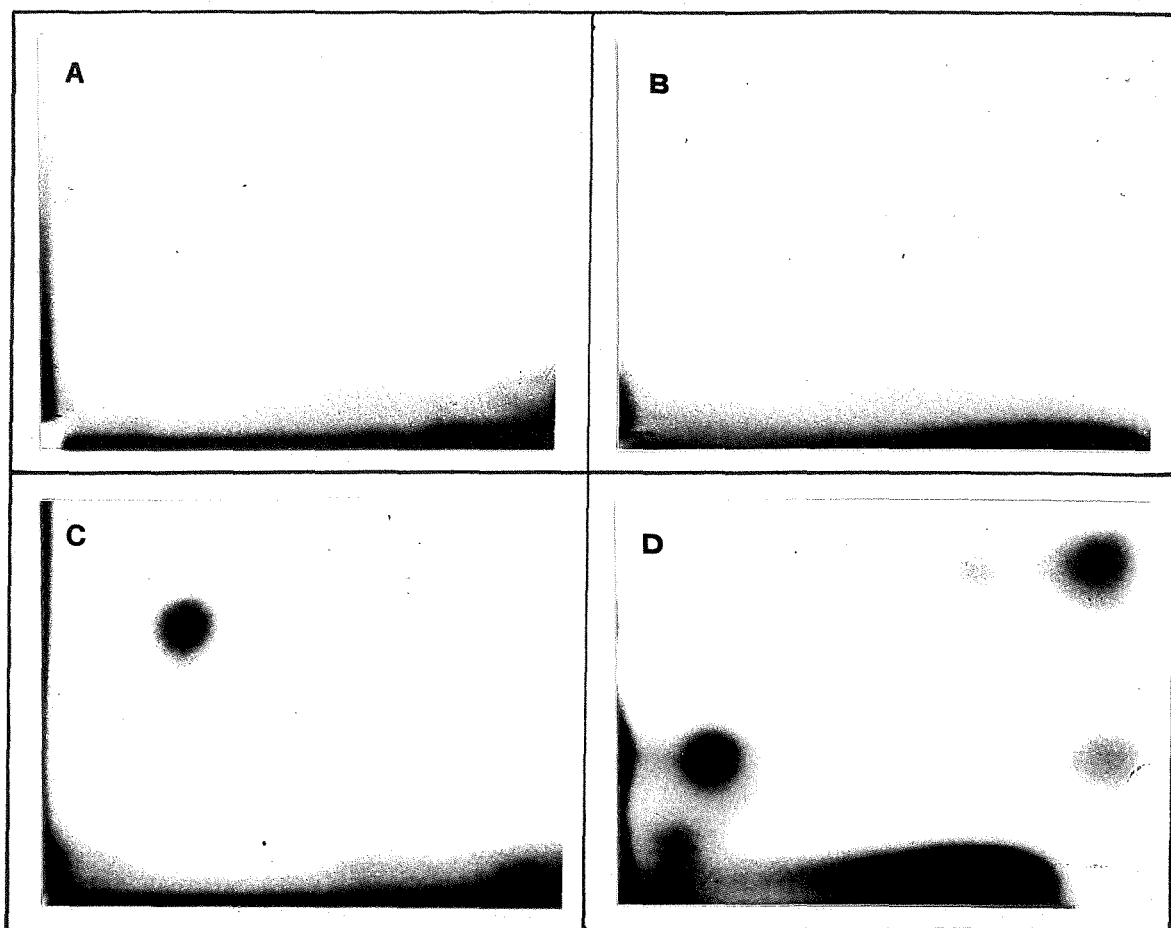


Fig. 13 Autoradiographies of nitro-PAH DNA adducts in normal lung tissue from lung cancer patients as determined by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. The 1-butanol extractants were chromatographed on PEI-cellulose plates. Films were exposed at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 4 days. (A) # Sample 4 (female), (B) # Sample 24 (male), (C) 1,6-DNP-DNA adducts in calf thymus DNA, (D) 1-NP-DNA adducts in calf thymus DNA.

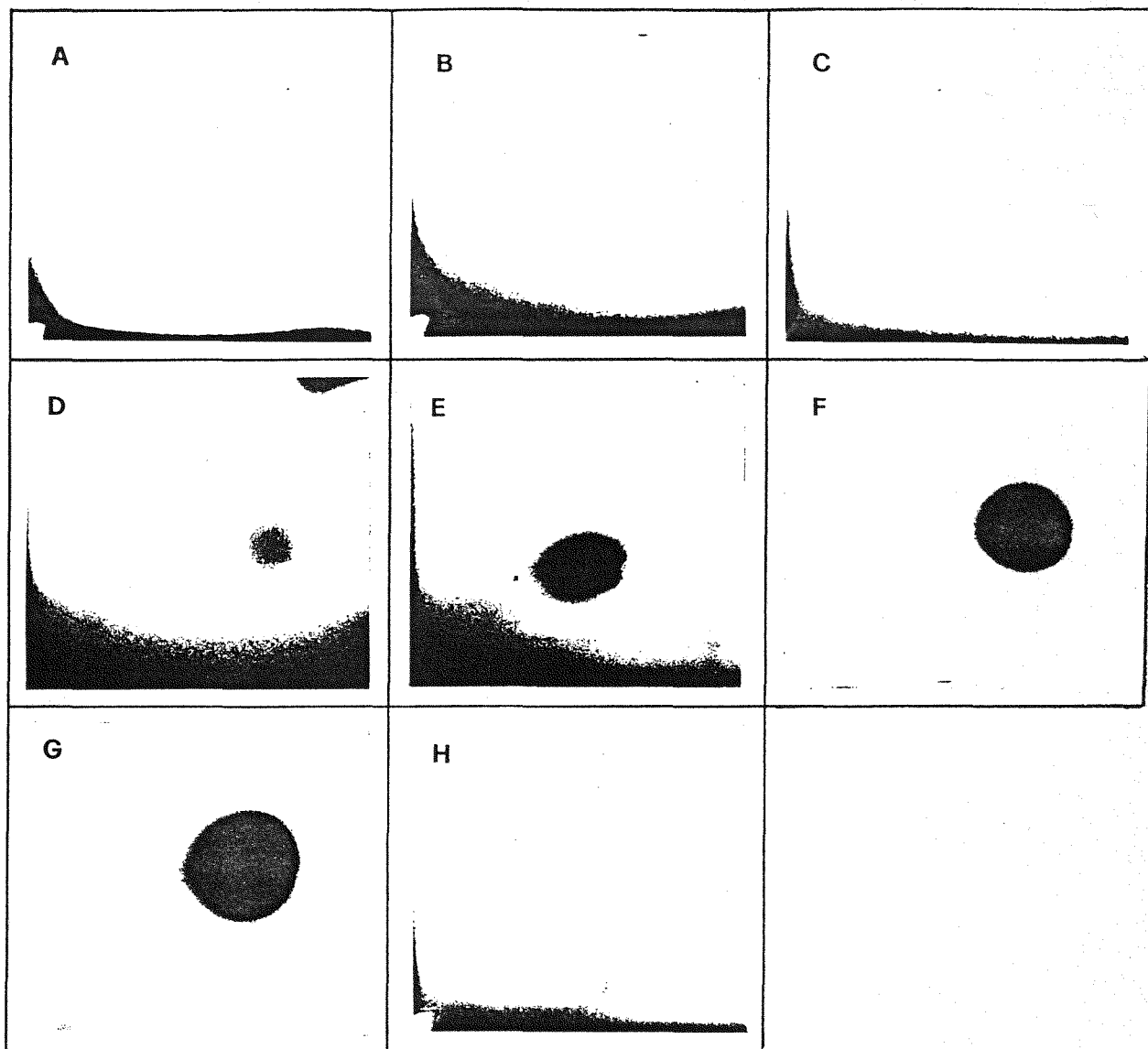


Fig. 14  $^{32}\text{P}$ -postlabeling analysis of B[a]P-DNA adducts formed in different human lung cell lines exposed to  $10\ \mu\text{M}$  B[a]P. The nuclease P1 for enrichment the DNA adducts and adducts were chromatographed on PEI-cellulose plates. The chromatographic origin is at the lower left corner of the films. Films were exposed at  $-80^\circ\text{C}$  for 4 days (A-E) or 6 hrs (F-G). (A) MRC-5 normal lung cells, (B) CL1-2 lung adenocarcinoma cells, (C) CL1-0 lung adenocarcinoma cells, (D) A-427 lung adenocarcinoma cells, (E) Calu-1 lung epidermoid carcinoma cells, (F) CL-3 lung adenocarcinoma cells, (G) standard BPDE-N<sub>2</sub> dG, and (H) Solvent control.

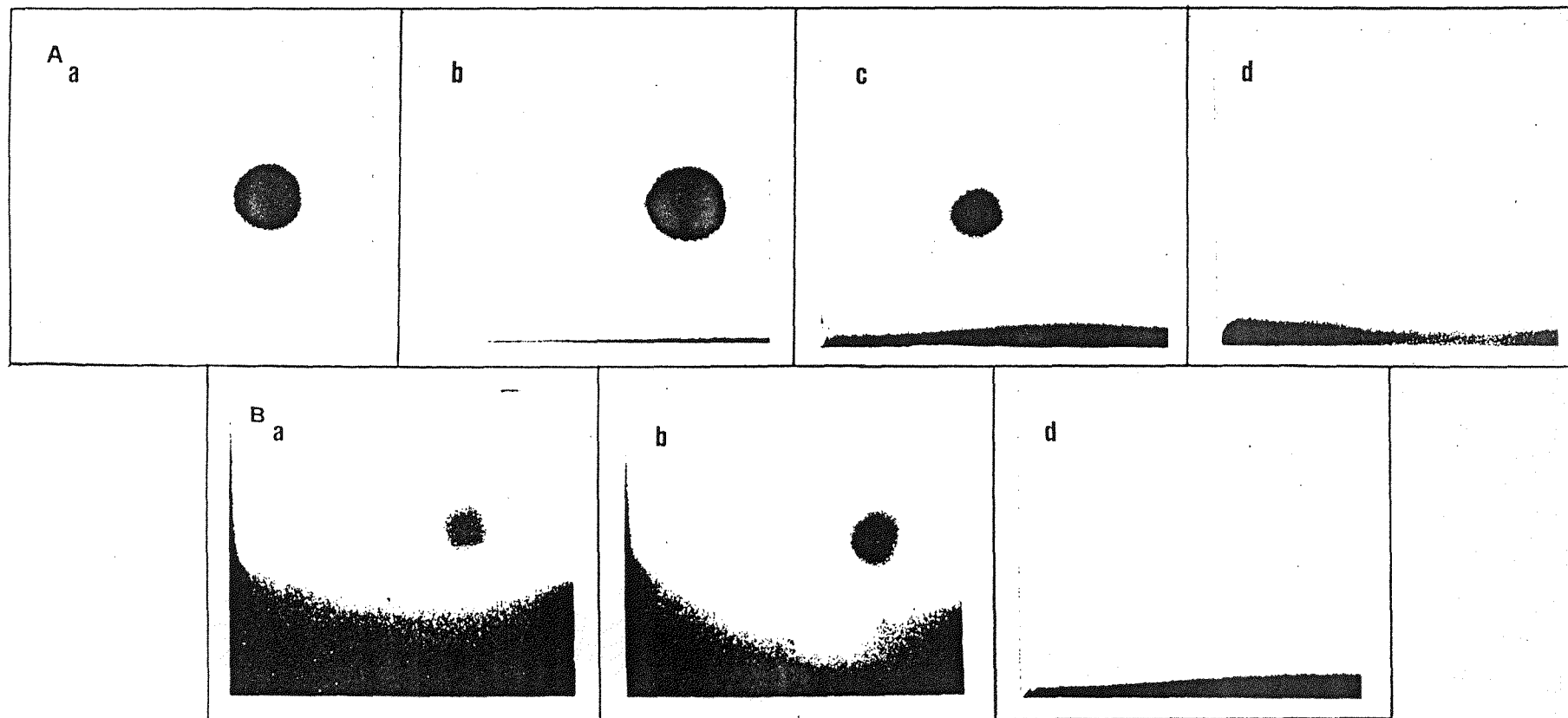


Fig. 15  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of B[a]P-DNA adducts in the presence and absence of ANF or BNF. The films of CL-3 cells (A) and A-427 cells (B) were exposed at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 7 hrs and 4 days, respectively. Cells were treated with B[a]P and ANF or BNF. (a) B[a]P alone, (b) B[a]P+BNF, (c) B[a]P+ANF, and (d) Solvent control.

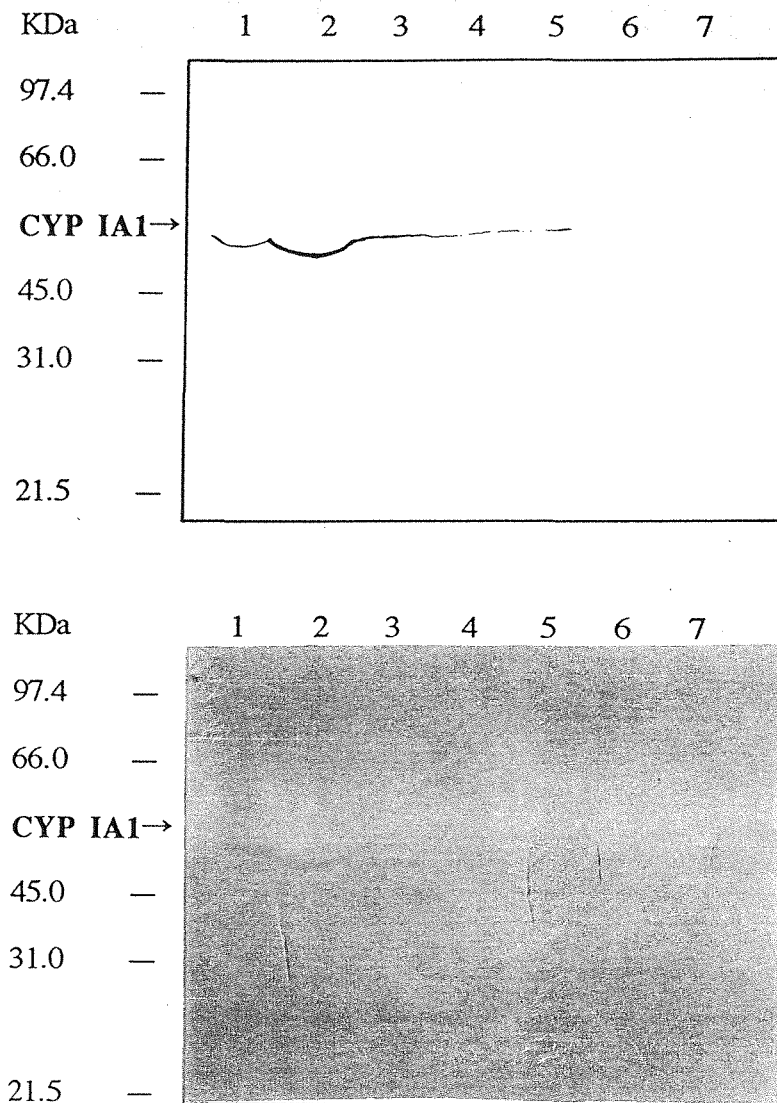


Fig. 16 Expressions of the cytochrome P450 IA1 protein induced by BNF in CL-3 cells. Lane 1, Aroclor 1254 induced rat liver S9 fraction (S9); Lane 2, rat microsome CYP IA1; Lane 3, 10  $\mu$ M BNF; Lane 4, 1  $\mu$ M BNF; Lane 5, 0.1  $\mu$ M BNF; Lane 6, 0.01  $\mu$ M BNF; Lane 7, Solvent control (DMSO). Molecular marker are indicated on the left.

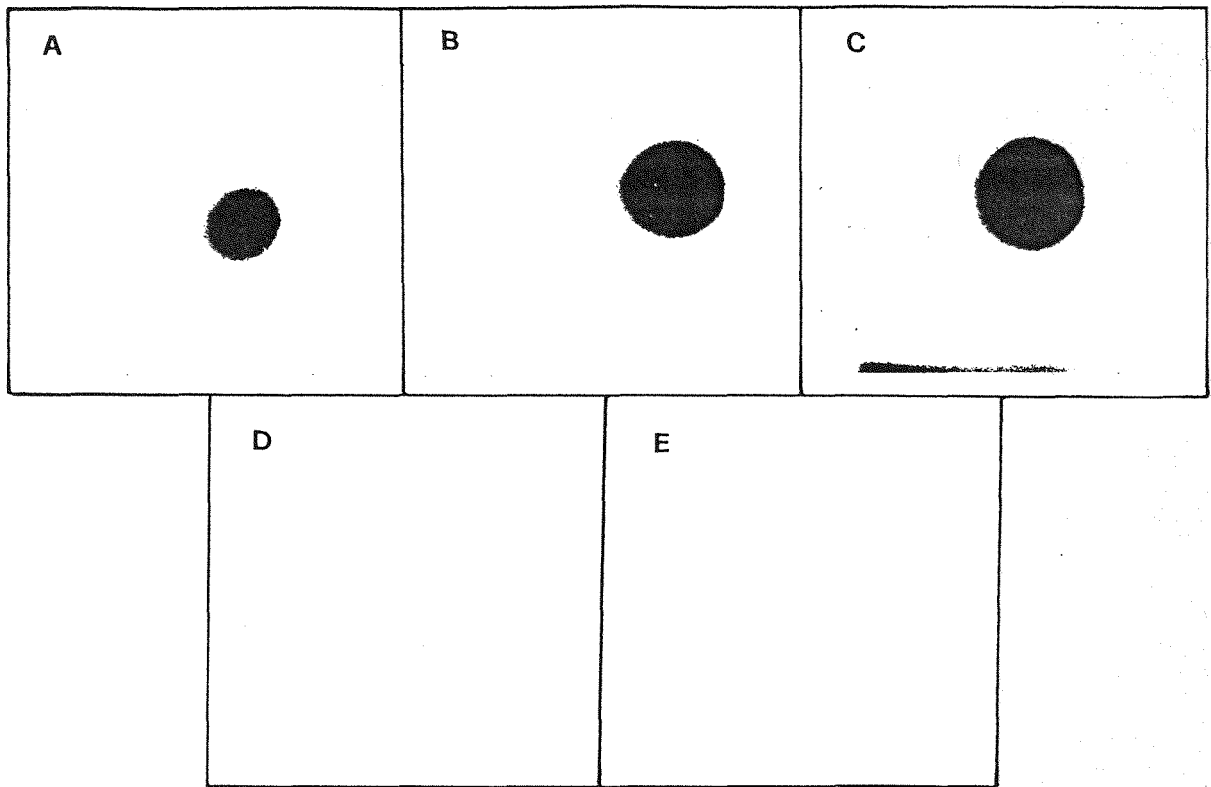


Fig. 17 <sup>32</sup>P-postlabeling autoradiograms of B[a]P-DNA adducts in CL-3 cells after the treatment of B[a]P (1.0  $\mu$ M) with and without 17 $\beta$ -estradiol. (A) B[a]P alone, (B) 0.64 nM 17 $\beta$ -estradiol alone, (C) B[a]P + 0.15 ng/ml 17 $\beta$ -estradiol, (D) B[a]P + 0.30 ng/ml 17 $\beta$ -estradiol, and (E) Solvent control.

## 捌、英文摘要

Lung cancer is the leading and second cause of cancer death among women and men in Taiwan, respectively. The high mortality rate of lung cancer of women is particularly surprising because few Taiwanese women smoke cigarettes (3 %). Our previous studies showed that some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are abundant in airborne particulates in Taiwan. To compare DNA adduct levels in lung tissues from lung cancer patients among Taiwan and other countries, the DNA adduct levels in the normal lung tissues surgically resected from sixty-three Taiwanese lung cancer patients were evaluated by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling method. The DNA adduct levels were varied from 2.8 to 165.92 adducts /  $10^8$  nucleotides. The average level was  $53.11 \pm 38.98$  adducts /  $10^8$  nucleotides to be higher than that found by others. The DNA adduct levels were not correlation with their amounts of cigarette smoking. Surprisingly, the adduct levels of female lung cancers (all of non-smokers,  $n = 14$ ) were significantly higher than non-smoker's male ( $n = 8$ ,  $p = 0.014$ ). Therefore, we suggest that certain particular environmental pollutants, such as oil smokes from cooking and incense smoke, other than cigarette smoke may be responsible for the higher adduct levels of Taiwanese lung cancer patients, especially for non-smoker's women.

Benzo[a]pyrene (B[a]P) is a well know carcinogen which has been found to form DNA adducts in human lung tissue. To reveal their

chemical susceptibility to B[a]P, six human lung cell lines were separately treated with 2-20  $\mu$ M B[a]P for 24 hours and the DNA adduct levels were determined by  $^{32}$ P-postlabeling. Very different susceptibility to B[a]P among the six cell lines were observed. Remarkably higher B[a]P-DNA adduct levels were shown in CL-3 from Taiwanese lung adenocarcinoma patient (1105.2 adducts /  $10^8$  nucleotides) compared to the other five cell lines (0 ~ 2.6 adducts /  $10^8$  nucleotides). To characterize the B[a]P-DNA adduct formed in CL-3 cells, the radioactive zone corresponding to the standard BPDE-N<sub>2</sub> dG adduct were eluted from PEI-cellulose plates. The elutants were further analyzed by high performance liquid chromatography. B[a]P-DNA adducts from CL-3 cells were detected with a retention time of 46 min which was corresponded to the retention time of standard BPDE-N<sub>2</sub> dG. The result suggest that BPDE-N<sub>2</sub> dG may be the major DNA adduct found in CL-3 cells. Moreover, we attempt to understand the roles of the cell cycle, cell proliferation and expression of cytochrome P450 IA1 involving in the formation of B[a]P-DNA adducts between CL-3 and A-427 cell lines. The cell cycle arrest was only observed CL-3 after the treatment with B[a]P. In addition, the levels of BPDE-DNA adduct in CL-3 cells were remarkably increased (226%) by the addition of cytochrome P450 IA1 specific inducer BNF. However, the above two appearances did not be found in A-427 cells. These results indicate that the different BPDE-DNA adduct levels between CL-3 and A-427 cells may be caused by different capability of metabolism activation mediating through cytochrome P450 IA1. Furthermore, we also investigate the influence of



17 $\beta$ -estradiol on the formation of B[a]P-DNA adducts in CL-3 cells. The formation of BPDE-DNA adducts in the CL-3 cells significantly increased by the addition of 17 $\beta$ -estradiol. This may explain the reason why the chemical susceptibility of female was higher than that of male.

Overall, the result from this study may be helpful to elucidate the possible significance of environmental pollutants and endogenous hormone on the lung carcinogenesis in Taiwanese women.