

R
008.8
3621

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.)

空氣污染物 1,6-Dinitropyrene 在不同人類肺細胞株上
形成 DNA 鍵結物能力之比較分析及其在中國倉鼠卵
巢細胞之 HPRT 基因所引起的致突變特異性之研究

Comparison of 1,6-Dinitropyrene DNA Adducts in Different
Human Lung Cell Lines and Its Mutation Spectrum in The
hprt Locus of Chinese Hamster Ovary K1 Cells



研究生：湯德瑋 (Te-Wei Tang) 撰

中華民國八十五年六月
(June, 1996)

中山醫學院圖書館



C036199

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：空氣污染物 1,6-Dinitropyrene 在不同人類肺細胞株上形成 DNA 鍵結物能力之比較
分析及其在中國倉鼠卵巢細胞之 HPRT 基因所引起的致突變特異性之研究

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
國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之
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科學技術資
料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微
縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰
元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至
民國 __ 年 __ 月後再公開。

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，或為上述目的再授權
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：李輝博士

研究生簽名：湯德祥 學號：R8302104
(親筆正楷)

日期：民國 85 年 7 月 15 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄立若未鈎選，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，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；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，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：湯德璋 聯絡電話：(02)891-6245

地址：台北市北投區大屯路1巷28號3F

空氣污染物 1,6-Dinitropyrene 在不同人類肺細胞株上
形成 DNA 鍵結物能力之比較分析及其在中國倉鼠卵巢
細胞之 HPRT 基因所引起的致突變特異性之研究

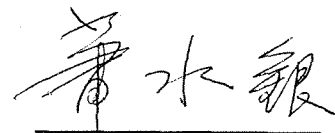
Comparison of 1,6-Dinitropyrene DNA Adducts in Different
Human Lung Cell Lines and Its Mutation Spectrum in the hprt
Locus of Chinese Hamster Ovary K1 Cells

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



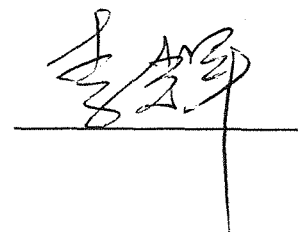
長庚醫工學院醫學院公共衛生學科

謝玲玲 博士



中山醫學院生化學研究所
(本論文指導教授)

李輝 博士



中華民國八十五年六月六日

學生湯德瑋論文題目為：空氣污染物 1,6-Dinitropyrene 在不同人類肺細胞株上形成 DNA 鍵結物能力之比較分析及其在中國倉鼠卵巢細胞之 HPRT 基因所引起的致突變特異性之研究，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：李輝

中華民國八十五年七月十五日

謝 誌

碩士班兩年來承蒙恩師 李輝博士的悉心指導，不論在待人處事與研究治學上之啓發薰陶及精神上之鼓勵關懷，都令學生永銘在心。論文撰寫期間，承蒙恩師對論文架構、觀念的突破，研究結果之整理歸納及治學之方法，皆賜予莫大的啓迪。文稿初成，恩師連夜斧正、圈點眉批，字字句句均蘊含著恩師莫大恩情，令學生由衷感激不已，在此謹於卷首致上最深的謝意。

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，對本論文細心審閱、詳加斧正，並提供許多寶貴意見，使本論文得以更密實周延，在此謹申誠摯的謝意。

研究期間，感謝本實驗室邊樹萱老師在實驗技術上的指導及生活、心理上的關懷呵護，郝菊副教授在研究上的鼓勵以及王憶卿老師在實驗設計上的協助、課業上的指導，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、石名貴學長，研究室中的淑慧學姐、忠錡學長、建仲學長，他們在實驗和生活上的幫助與指導，還有建富、文澈、兆平這些同窗好友，森智、靜卿、玉怡、雅鳳、雅文、盈帆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最親愛的爸、媽以及兄姊們，感謝您們的關懷與開導，成爲我在研究期間最大的毅力支柱。還有繼勝，謝謝你的付出與犧牲。由衷感激您們對我所做的一切，祝您們身體健康，永遠平安快樂！

湯德璋 謹誌於

中山醫學院生化學研究所

中華民國八十五年六月六日

目錄

壹、中文摘要	1
貳、文獻綜論	4
一、前言	4
二、空氣污染物中主要的基因毒物-硝基多環芳香煙 (Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons, NitroPAHs)	5
(一) 來源與分佈	5
(二) 代謝活化	6
(三) 1,6-雙硝基多環芳香煙 (1,6-dinitropyrene, 1,6-DNP)	7
1. 1,6-DNP 在原核細胞的致突變性	8
2. 1,6-DNP 在真核細胞的基因毒性	9
3. 動物之致癌性實驗	11
三、真核細胞的基因毒性與次黃嘌呤鳥糞嘌呤轉磷酸核糖基 酵素基因 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene, HPRT gene) 突變之分析	12
參、研究動機	15
肆、材料與方法	16
一、化學藥品和材料	16
二、細胞株的來源	17
三、細胞解凍與保存	17
四、細胞培養	18

五、1,6-DNP 在不同細胞中形成 DNA 鍵結物之比較研究	19
(一) 1,6-DNP DNA 鍵結物標準品的製備	19
(二) 1,6-DNP 在不同細胞株的處理	20
(三) DNA 鍵結物之分析	20
六、1,6-DNP 在中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary-K1 cells, CHO-K1 cells) 之 HPRT gene 突變之分析	22
(一) 1,6-DNP 的處理與細胞毒性分析	22
(二) 細胞突變性之分析及突變株的選擇	23
(三) 自 mRNA 利用反轉錄酵素 (Reverse Transcriptase, RTase) 直接合成第一股 cDNA	24
(四) 聚合酵素鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)	24
(五) DNA 直接定序	25
伍、結果	
一、比較 1,6-DNP 在不同細胞株中形成之 DNA 鍵結物	27
(一) 在小牛胸腺 (calf thymus) DNA 上合成 1,6-DNP-DNA 鍵結物	27
(二) 比較人類各種細胞株之 1,6-DNP-DNA 鍵結物 之形成能力	27
(三) 動物細胞株形成 1,6-DNP-DNA 鍵結物之能力	29
二、1,6-DNP 在 CHO-K1 細胞之 HPRT 基因所造成 突變特異性之研究	30
(一) 細胞毒性之分析	30
(二) 致突變率之分析	30
(三) 突變株之 RT-PCR 分析	31
(四) 突變株 HPRT 基因之 DNA 定序	31

陸、討論	34
柒、參考文獻	44
捌、圖表	59
玖、英文摘要	97
附錄	99

ABBREVIATIONS

6-Aminochrysene	6-AC
2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline	IQ
Ammonium formate	AF
Ammonium persulfate	APS
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	4dNTPs
ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP	4ddNTPs
Benzo[a]pyrene	B[a]P
Benzo[a]pyrene diolepoxide	BPDE
Bovine serum albumin	BSA
Chinese hamster ovary cell	CHO cell
Chrysene	Chr
Cyclopenta[cd]pyrene	CPP
N-(deoxyguanosin-8-N2-yl)-2-Amino-3,8-Dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	dG-N2-MeIQx
N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene	dG-C8-ANP
Dimethylsulfoxide	DMSO
Dinitropyrene	DNP
1,3-Dinitropyrene	1,3-DNP
1,6-Dinitropyrene	1,6-DNP
1,8-Dinitropyrene	1,8-DNP
Dithiothreitol	DTT
Ethanol	EtOH
Ethylmethanesulfonate	EMS
N-ethyl-N-nitrosourea	ENU
Fetal bovine serum	FBS
Hypoxanthine, aminopterin, thymidine	HAT
N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea	HOENU

Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT
Methanesulfonate	MMS
Micrococcal endonuclease	MN
6-Nitrochrysene	6-NC
6-Nitrosochrysene	6-NOC
Nitropyrene	NP
1-Nitropyrene	1-NP
1-Nitrosopyrene	1-NOP
Nonidet P-40	NP-40
Phosphate buffer saline	PBS
Polycyclic aromatic hydrocarbon	PAH
Potato apyrase	PA
Pyrene	Pyr
Sister chromatid exchange	SCE
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Spleen phosphodiesterase	SPD
Sprague Dawley rat	SD rat
Tetrabutylammonium chloride	TBAC
Tetramethylethylenediamine	TEMED
Thin layer chromatography	TLC
6-Thioguanine	6-TG
Thymidine kinase	TK
Trypsin and EDTA	T/E
Unscheduled DNA synthesis	UDS

壹、中文摘要

1,6-DNP 是一種具有基因毒性和致癌性的硝基多環芳香煙，廣泛存在於空氣懸浮微粒中，主要來自柴油車和汽機車之排放廢氣。已知 1,6-DNP 對細菌、哺乳類細胞都具非常強的致突變性，在動物實驗方面，也可促使老鼠的肺臟、肝臟或其他器官的腫瘤發生。過去本研究室在分析台灣地區四個主要都會區—台北、新竹、台中和高雄，均發現空氣懸浮微粒中主要的致突變化合物可能是 DNP_s，同時也證明高雄縣茄萣鄉之廢五金回收區燃燒廢電纜會產生高量的 1,6-DNP 和 1,8-DNP，是該地區空氣中主要的空氣污染物。另外，燃燒塑膠廢棄物和保麗龍等人工合成物也會產生高量的 1,6-DNP 和 1,8-DNP，因此推測露天燃燒垃圾等廢棄物可能是造成 DNP_s 含量較其他國家高 100-1000 倍的原因之一。因此本研究以 ³²P-postlabeling 方法，探討 1,6-DNP 在人類肺細胞上形成 DNA 鍵結物的能力和在動物肺細胞有何不同？同時亦欲了解 1,6-DNP 在 HPRT/CHO-K1 的致突變分析上，所引發的突變株的 HPRT 基因有何基因突變的特異性 (mutational specificity)，擬由以上實驗了解 1,6-DNP 在台灣地區肺癌發生上是否扮演重要的角色。

在 1,6-DNP 引起 DNA 鍵結物的實驗，本研究共使用了七種人類肺細胞株和兩種動物細胞株，各以 34.2 μM 1,6-DNP 處理細胞 24 小時，並以 ³²P-postlabeling 的方法，分析各種細胞所產生之 1,6-DNP-DNA 鍵結物和標準品 1,6-DNP-DNA 鍵結物 dG-C8-ANP 之圖譜 (profile) 是否相似，同時也比較其形成量。初步結果顯示，1,6-DNP 在人類肺細胞株上所形成的主要 DNA 鍵結物，與我們製備之小牛胸

腺 DNA 所形成的 dG-C8-ANP 標準品，在 TLC 片上的移動位置明顯不同，而 1,6-DNP 在動物細胞株上所形成的主要 DNA 鍵結物，則與標準品 dG-C8-ANP 具有相似的移動位置，同時也發現 1,6-DNP 在九株實驗細胞株中，對 MRC-5 正常肺細胞株會形成最高量的 DNA 鍵結物，其次是倉鼠肺細胞 V79 和另一種人類正常肺細胞 WI-38，而 CaLu-1、CL1-0、CL1-2 和 CL-3 等四種人類肺癌細胞株，在本實驗所用的 1,6-DNP 最高濃度下並沒有偵測到任何 1,6-DNP-DNA 鍵結物的含量，其他五種細胞株則各形成二到三個 1,6-DNP-DNA 鍵結物。

另外，1,6-DNP 在 HPRT/CHO-K1 所造成的基因突變特異性上，發現 1,6-DNP 所引起的 23 個獨立突變株有 18 個是單一鹼基更換突變 (single base substitution mutation)，4 個是剪輯錯誤突變 (splice site mutation)，還有 2 個是缺失突變 (deletion mutation)。進一步分析 18 個鹼基更換突變的突變形式，發現有 72% (13 / 18) 是屬於換異突變 (transversion)，其中又以 A : T → C : G 和 G : C → C : G 鹼基更換突變為主要的突變形式，各佔 28% (5 / 18)。而 2 個缺失突變，都是移除一個 C 鹼基，且都發生於 C 鹼基的重覆序列。另外 4 個突變株所造成的剪輯錯誤大多發生於 exon 4 上，其頻率高達 75% (3 / 4)。由以上分析結果得知，1,6-DNP 所造成之 HPRT 基因的突變特異性，以鹼基更換突變為主，佔了 75% (18 / 24)，而其中又以 A : T → C : G 以及 G : C → C : G 的換異突變為主要的突變形式。若分析單一鹼基更換突變發生的位置時，發現有 78% (14 / 18) 是發生在 HPRT 基因的 exon 5 到 exon 8 之間，而因剪輯作用 (splicing process) 錯誤發生的突變有 75% (3 / 4) 是發生在 exon 4。

由以上兩個實驗結果可初步了解 1,6-DNP 會在人類正常肺細胞株上，尤其是 MRC-5 細胞上形成一個和已知 1,6-DNP-DNA 鍵結物

dG-C8-ANP 不同的未知 DNA 鍵結物。另又知 1,6-DNP 所引起之哺乳類細胞的基因突變主要是 A:T → C:G 以及 G:C → C:G 兩種鹼基更換突變，這結果和過去學者所做的也有不同。或許本研究結果能在 1,6-DNP 與人類肺癌關係上提供一些訊息。

貳、文獻綜論

一、前言

過去十幾年來，台灣地區工商業發達、經濟發展迅速，造成人口集中都會區，致使汽機車大幅成長，郊區又工廠林立，這使得台灣地區空氣品質急速惡化。根據衛生署統計資料顯示，自民國七十一年以來惡性腫瘤已成為台灣地區十大死亡原因之首位，其中又以肺癌死亡率增加的幅度最為顯著。目前流行病學之研究已能證實空氣污染和罹患肺癌是有些相關性。例如在污染的環境中，肺癌發生率確實有明顯增加的趨勢，而推測空氣懸浮微粒中所發現的致癌物可能是造成肺癌的主要元凶 (Carnow and Meier, 1973; Menck et al., 1974)。最近 Tokiwa 等人 (1993) 曾報告在肺癌病人的肺組織中找到 1-NP, B[a]P 和 1,3-DNP 等三種主要致突變物。但這些報告都沒有直接的證據能夠證實空氣污染物會引起人類肺癌。空氣污染物的來源相當複雜，但主要污染源是來自汽機車等引擎所排放出來的廢氣，而工廠排放的廢氣以及人為燃燒垃圾廢棄物產生的懸浮微粒也是台灣地區空氣污染的重要來源 (Lee et al., 1994a)。有關這些污染物之分析、基因毒性、致癌性的研究已相當的多，其中主要的基因毒物大多屬於多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 和硝基多環芳香烴 (nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, nitro-PAHs) (Garner et al., 1986; Gallagher et al., 1990; Jones et al., 1993; Tokiwa et al., 1986) 兩大類，由於本實驗所研究的化合物為 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP)，是屬於硝基多環芳香烴類化合物，因此以下僅就硝基多環芳香烴之發生、來源、分佈及其基因毒性分述於后。

二、空氣污染物中主要的基因毒物—硝基多環芳香烴

(Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, Nitro-PAHs)

(一) 來源與分佈

硝基多環芳香烴是一群廣泛存在於環境中的污染物，為多環芳香烴經硝化作用加上一個或多個硝基取代基而生成。Fu 等人 (1990) 指出在大氣環境中，硝基多環芳香烴可藉由下列兩種過程而生成：(1) 大氣中的自然反應：多環芳香烴會與 NO 在大氣環境中，藉由光能量生成自由基，而進行硝化反應產生硝基多環芳香烴。(2) 各種燃料燃燒不完全時所產生的 NO₂⁺ 離子會與多環芳香烴進行親電子性的硝化作用而生成硝基多環芳香烴。

硝基多環芳香烴的分佈非常廣，包括有柴油車、汽機車、飛機等排放的廢氣 (Tokiwa et al., 1986; Robbat et al., 1986)，液化石油氣、氣體燃料的燃燒不完全 (Kinouchi et al., 1988; IARC 1989)、影印機碳粉夾 (Lofroth et al., 1980)、甚至家庭用的瓦斯加熱器、煤炭的灰爐、燒烤雞肉的熱油以及茶葉中 (Li et al., 1982; Dennis et al., 1984; Ohnishi et al., 1985) 都可發現硝基多環芳香烴的存在。

(二) 代謝活化

雖然有些硝基多環芳香烴，例如 1-nitropyrene (1-NP) 和 6-nitrochrysene (6-NC)，在 19 世紀後期就已被合成出來，但興起研究硝基多環芳香烴類的代謝及生物活性，卻始於 1970 年 (Fu et al., 1990 ; IARC, 1994)。最早 Ames (1975) 發現在不需外加活化酵素的情形下，許多硝基多環芳香烴對沙門氏桿菌具有致突變性。其致突變性的表現可能是藉由硝基取代基的還原作用或環氧化作用，所形成的代謝活化物鍵結上 DNA 而造成基因突變 (Chou et al., 1985; Delclos et al., 1988)。現在已知有兩類硝基還原酵素 (nitroreductase) 可催化一個和兩個電子的轉移，而代謝活化硝基多環芳香烴：一類是轉移單一電子的典型硝基還原酵素 (classical nitroreductase) 例如 xanthine oxidase，所生成的代謝物之致突變性較低，例如 1-NP，1,3-dinitropyrene (1,3-DNP)；另一類是轉移雙電子的硝基還原酵素，例如 NAD(P)H-quinone oxidoreductase，當硝基多環芳香烴被還原之後，會接著進行酯化反應而產生乙醯化衍生物，其所生成的代謝物之致突變性就很強，例如 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP)，1,8-dinitropyrene (1,8-DNP) 的代謝活化即是以此還原酵素進行 (Rosenkranz et al., 1986)。Shimada (1990) 指出硝基還原作用所轉移之電子數會影響硝基多環芳香烴的致突變能力，例如 NADPH-P450 reductase 是一種轉移單電子的還原酵素，會使 1,6-DNP 和 1,8-DNP 的直接致突變力減低，但對 1,3-DNP 的致突變性卻沒有影響。由此可知三種不同異構物的雙硝基多環芳香烴，1,6- 與 1,8-DNP，跟 1,3-DNP 是具有不同代謝活化路徑的。

雖然在大氣環境中 1-NP 的含量較 DNPs 為多，但 DNPs 卻是硝基多環芳香烴類中，最具基因毒性的致突變或致癌化合物。由過去的研究顯示，DNPs 所表現的致突變性，約佔柴油引擎廢氣在細菌的直接致突變性之 10-50%、各種加熱器之 40-75%、空氣樣品之 1-18% (Busby et al., 1994)。而過去本研究室在分析台灣地區四個主要都會區—台北、新竹、台中和高雄，均發現空氣懸浮微粒中主要的致突變化合物可能是 DNPs (Chou and Lee, 1990; Lee et al., 1994a, b)，同時也證明高雄縣茄萣鄉之廢五金回收區燃燒廢電纜，會產生高量的 1,6-DNP 和 1,8-DNP，是該地區空氣中主要的空氣污染物。另外，燃燒塑膠廢棄物和保麗龍等人工合成物也會產生高量的 1,6-DNP 和 1,8-DNP，因此推測露天燃燒垃圾等廢棄物，可能是造成 DNPs 含量較其他國家高 100-1000 倍的可能原因之一 (Lee et al., 1995a)。由以上的討論可知，1,6-DNP 無論在致突變力和含量上，均顯示它可能是台灣地區空氣中主要的基因毒物。為了解 1,6-DNP 在台灣地區空氣污染之重要性，茲將其他國家研究空氣懸浮微粒中 1,6-DNP 的含量整理於 Table 1 中做一比較。

(三) 1,6-雙硝基多環芳香烴 (1,6-Dinitropyrene, 1,6-DNP)

1,6-DNP 是由多環芳香烴 pyrene 與空氣中的氫氧自由基 ($\text{OH}\cdot$) 或氮氧化合物 (NO_x) 進行光氧化反應而生成 (Lewtas et al., 1990)，整個代謝活化路徑，主要是經由還原酵素與乙醯化酵素來完成。詳

見 Fig. 1 (Neft et al., 1993)。目前已知參與 1,6-DNP 代謝活化之還原酵素主要存在於肝臟微粒體中，包括還原型之 cytochrome P-450 和 NAD(P)H-cytochrome P-450 還原酵素。在肝細胞之細胞質層中有 aldehyde oxidase, xanthine oxidase 和 DT diaphorase 等單電子還原酵素 (Djuric et al., 1989)，至於進行乙醯化作用的 N-Acetyltransferase 主要也是存在於細胞質層中 (Djuric et al., 1985)。最近研究結果又發現肝臟細胞質層之還原酵素 NAD(P)H-quinone oxidoreductase 也能將 1,6-DNP 進行雙電子還原作用 (Hajos et al., 1991)。還原後的 N-hydroxy-1-amino-6-nitropyrene 可直接攻擊 DNA，或再被乙醯化成 N-acetoxy-1-amino-6-nitropyrene，進而質子化為具有正電荷的 nitrenium ion，此不穩定的質子化中間物會直接攻擊 DNA 之鳥糞嘌呤鹼基 C8 的位置，所形成的 DNA 鍵結物已被鑑定為 N-(deoxyguanosine-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene (dG-C8-ANP) (Neft et al., 1993)，這種 DNA 鍵結物與 1,6-DNP 的基因毒性表現有密切的相關性 (Beland et al., 1993)。

1. 1,6-DNP 在原核細胞的致突變性

1,6-DNP 對原核生物沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98 菌株會產生非常強的致突變性，由於 TA98 具有 nitroreductase 與 N-acetyltransferase 兩種代謝活化 1,6-DNP 的酵素活性，能將 1,6-DNP 還原成 N-hydroxy-1-amino-6-nitropyrene，再乙醯化成為 N-

acetoxy-1-amino-6-nitropyrene，此會對 TA98 菌株產生非常強的致突變性，可達 174,842 rev./nmol (Rosenkranz et al., 1985)，但在缺乏 nitroreductase 表現的 TA98NR 菌株和缺乏 N-acetyltransferase 表現的 TA98/1,8-DNP6 菌株中，1,6-DNP 就不會表現其致突變性 (Table 2)。而在有兩倍 N-acetyltransferase 酵素活性表現的菌株 YG1024，則其致突變性的表現可達到 4780,000 rev./nmol (Watanabe et al., 1990)。最近發展出的 NM3009 菌株，會表現 13 倍的 N-acetyltransferase 及 3 倍 nitroreductase 兩種酵素活性，Oda et al. (1993) 利用高敏感的 umu 測試系統以 NM3009 菌株分析 1,6-DNP 的致突變性的表現，結果發現 1,6-DNP 僅需 0.04 ng/ml 即具有致突變性的表現。這些結果都顯示乙酰化作用對於 1,6-DNP 在原核生物的致突變能力具有相當重要的影響。另外，以沙門氏桿菌 TM677 菌株進行 8-azaguanine resistance 正突變分析法來研究 1,6-DNP 的致突變性，也發現 1 nmol 的 1,6-DNP 可產生 3.2×10^6 個突變株，為自發性突變頻率的 2.3 倍 (Busby et al., 1994)。可見 1,6-DNP 對原核生物確實具有非常強的致突變性。

2. 1,6-DNP 在真核細胞的基因毒性

許多研究顯示 1,6-DNP 在不同的真核細胞有不同的基因毒性表現。這可能是由於各種哺乳類細胞對 1,6-DNP 的代謝活化能力不同所致。例如在人類及老鼠的肝細胞都會代謝活化 1,6-DNP 成為基因毒物，而引起肝細胞產生非程序性 DNA 合成 (unscheduled DNA

synthesis, UDS) (Butterworth et al., 1983), 但在人類肝癌細胞 HepG2 中, 則因缺乏適當的 arylhydroxylamine-O-esterificase 來活化 1,6-DNP, 而無法顯現出基因毒性 (Silvers et al., 1994)。同樣的, 在人類纖維母細胞株 HSBP, 1,6-DNP 僅會引起極低的染色體損傷 (clastogenicity), 但在中國倉鼠肺細胞株 CHL cells, 僅需 0.03 μ M 的 1,6-DNP 就能造成 CHL 細胞 55% 的染色體斷裂 (Matsuoka et al., 1991) (Table 3)。1,6-DNP 對中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cells, CHO cells) 和 HSBP 細胞一樣, 僅能引起弱基因毒性, 但在外加大白鼠肝臟酵素系統 S9 的情形下, 就能代謝活化 1,6-DNP 引起較控制組高 2-3 倍的姐妹染色體交換頻率 (sister chromatid exchange, SCE); Edgar et al. (1985) 發現 1,6-DNP 在沒有 S9 存在下, 亦可引起 CHO 細胞 HPRT 基因的突變。雖然在沙門氏桿菌 1,6-DNP 的致突變性, 主要決定於是否有乙醯化作用, 但在 CHO 細胞卻決定於硝基還原作用是否進行, 這可能是因為 CHO 細胞沒有 acetyltransferase 的活性表現所致 (Fifer et al., 1986)。另外, 在中國倉鼠肺細胞 V79 細胞上, 1,6-DNP 會引起微核仁分裂 (micronuclei), 但在缺乏 N-acetyltransferase 的突變種 V79 細胞則無此現象。故推測 V79 具有使 1,6-DNP 代謝成 N-acetylating 1-amino-6-nitropyrene 的能力 (Roscher et al., 1992; Wiebel et al., 1992)。在其他造成染色體損傷的基因毒性分析上, 1,6-DNP 還具有使 V79 細胞染色體斷裂及紡錘體紊亂 (spindle disturbances) 等毒性反應, 但其能力則較 1-NP 為低, 這或許是 V79 細胞會使 1,6-DNP 進行較強的雙電子還原作用, 而使其代謝產物較無法和氧分子進行 redox cycle 所致 (Saito et al., 1984; Bauchinger et al., 1988)。在人類 B 淋巴細胞 MCL-5 cells 中, 由於有完整的 cytochrome P-450 酵素活性, 因此經 1,6-DNP 處理後, 發現會

造成極高的胸腺核甘活動酵素 (thymidine kinase) 基因突變率，且其突變率高於其他雙硝基多環芳香烴與單硝基多環芳香烴 (Busby et al., 1994)。

3. 動物之致癌性實驗

1,6-DNP 不只對真核細胞具有基因毒性，在動物實驗上，它還具有致癌性，將這些相關資料整理於 Table 4 中，可以很清楚的知道，若將 6.3 μmol (1.8 mg) 1,6-DNP 由肩胛部位注射於剛出生的雌性 CD 大白鼠，會使所有的實驗老鼠在注射部位長出惡性纖維組織細胞瘤 (malignant fibrous histocytomas) (Imaida et al., 1995)。若以 16 μmol 1,6-DNP 以口服方式，直接給予斷奶的雌性 CD 大白鼠，結果在肝臟、腎臟、腦下腺、甲狀腺等腺體皆可發現腫瘤的生成 (Imaida et al., 1991)；13 mg 1,6-DNP 以氣管滴入的方式，給予雌性 Syrian 黃金倉鼠，則會使 95% 的實驗動物產生肺腺癌 (Takayama et al., 1985)，另外，僅給予 0.15 mg 低劑量的 1,6-DNP，也會引起 82% 的老鼠發生上皮性肺癌 (Maeda et al., 1986)。Iizasa 等人 (1993) 在人類氣管上皮細胞株 BEAS-2B 處理 1,6-DNP 後，先將此處理過的細胞，植入沒有氣管上皮細胞的 F344 老鼠之氣管上培養一段時間，再將此細胞經腹腔注射入裸鼠體內，結果 40% 裸鼠的氣管上皮細胞會長出侵入性腺癌 (invasive adenocarcinomas)。若將雌性 SD 大白鼠腹腔注射 32 μg 1,6-DNP，發現在動物的肝臟、乳腺、膀胱、白血球等器官組織和細

胞，會形成 1,6-DNP-DNA 鍵結物，同時也發現 1,6-DNP 會造成 SD 大白鼠之 DNA 發生氧化性傷害 (Djuric et al., 1993)。Iwagawa et al., (1989) 以不同劑量的 1,6-DNP 和 B[a]P 直接注射於 F344 老鼠的肺部，來比較這兩種化合物的致癌性，結果顯示兩種化合物對腫瘤的生成，皆有濃度效應的關係，且 1,6-DNP 引起肺癌的能力較 B[a]P 強過三倍之多，同時也發現 1,6-DNP 所引起的肺癌，多屬於未分化型的贅生性腫瘤 (neoplasms)，而 B[a]P 則為完全分化的上皮性肺癌。最近 Smith 等人 (1994, 1995) 利用相同的技術，將不同劑量的 1,6-DNP 直接注射於 F344 老鼠的肺部，結果發現在肺臟與其他器官組織，例如肝臟、腎臟和白血球細胞等，都有 dG-C8-ANP 鍵結物的產生，而肺臟之 DNA 鍵結物含量，還較肝臟高了 10 倍之多。在實驗動物的肺腫瘤生成數和 DNA 鍵結物的產生量，都隨著 1,6-DNP 濃度的增加而有濃度效應的關係，另外，脾臟 T 淋巴細胞的突變率也會升高。由以上的結果顯示，1,6-DNP 在動物致癌的實驗中，可能是一種會引起肺腫瘤發生頻率較其他器官組織為強的肺癌致癌物。

三、真核細胞的基因毒性與次黃嘌呤鳥糞嘌呤轉磷酸核糖基酵素基因 (hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene, HPRT gene) 突變之分析

致突變物或致癌物會造成 DNA 不同形式的損傷，例如鹼基改變 (base substitution)、單股或雙股斷裂 (single-strand DNA or double

-strand DNA break)、鹼基缺失 (deletion)、鹼基插入 (insertion) 及股連接 (crosslink)，若這些基因損傷沒有被正確的修補，就會引起基因突變或造成細胞死亡。利用哺乳類細胞來探討細胞是否會因致癌物的作用而具有癌化之傾向，通常可利用兩種生物分析法來評估。(1) 分析染色體之損傷 (DNA damage, clastogenicity)。已有報告指出致癌物的暴露量與 DNA 鏈結物的形成有正相關性，同時也發現與腫瘤的發生亦有關係 (Beland et al., 1993)。(2) 分析基因突變 (gene mutation) 的形式與頻率。基因毒性的傷害可歸因於核酸序列上遺傳訊息的改變，一個致癌物造成 DNA 序列改變之種類與分佈，可能與它癌化的特性有關 (Lambert et al., 1994)。因此在分析某種環境毒物，是否會引起細胞突變或癌化，可藉由上述兩種生物分析法進行評估，始能獲得較完整的基因毒性之訊息。

自1977年以後，*hprt* 基因位 (loci) 的基因突變生物檢定法即被廣泛應用在致突變性的分析 (O'Neill et al., 1977)。*hprt* 基因屬於分子致突變過程中的內源性基因系統 (endogenous molecular mutagenesis system)，具有 HPRT 酵素的活性，為一種合成嘌呤核苷酸的捷徑酵素 (Salvage enzyme)，這個酵素在生化代謝路徑所扮演的角色，是可促使次黃嘌呤核苷酸 (hypoxanthine) 和鳥糞嘌呤核苷酸進行磷酸核糖化反應 (phosphoribosylation)，而形成 IMP 和 GMP，但它同時也具有將嘌呤近似物，例如 6-thioguanine (6-TG) 磷酸核糖化的能力而代謝成具有細胞毒性的核酸，因此若沒有 HPRTase 酵素活性的細胞，便不會有這種傷害而存活下來。故透過細胞表現型對 6-TG 的代謝抗性來篩選，便可得到 HPRT 基因的突變株，再將這些突變株細胞的 HPRT

基因之 cDNA 合成出來，直接做 DNA 序列的分析，即可了解基因毒物在 HPRT 基因所造成的突變之種類與分佈位置 (Yang et al., 1989)。茲將近幾年來，多環芳香烴類及甲基化劑等致突變劑利用 HPRT 基因作為標的分子，所造成的鹼基更換突變之特異性整理於 Table 5-6 中。

參、研究動機

過去本研究室一直從事台灣地區空氣懸浮微粒中主要致突變物的研究，在分析台灣地區四個主要都會區—台北、新竹、台中和高雄，均發現空氣懸浮微粒中，主要的致突變化合物可能是 DNP_s (Chou and Lee, 1990; Lee et al., 1994a, b)。本研究室也發現燃燒廢電纜、塑膠保麗龍等人工合成物，會產生大量的 1,6-DNP 和 1,8-DNP，因此推測露天燃燒垃圾等廢棄物，可能是台灣地區空氣中 DNP_s 含量較其他國家高 100-1000 倍的可能原因之一 (Lee et al., 1995a)。最近本研究室初步結果顯示國人在廚房大火炒肉所生成的油煙中，也含有 1,6-DNP (Lee and Yang, unpublished data)。由以上的結果，無論在致突變力和含量上，均顯示 1,6-DNP 可能是台灣地區空氣中重要的基因毒物，因此爲了了解 1,6-DNP 與台灣地區民眾發生肺癌上可能扮演的角色，本實驗即欲探討 1,6-DNP 在人類肺細胞上，形成 DNA 鍵結物的能力和在動物肺細胞有何不同？同時亦欲了解 1,6-DNP 在 HPRT/CHO-K1 的致突變分析上，所生成的突變株之 HPRT 基因有何基因突變的特異性？這些初步結果或許可用來評估 1,6-DNP 在台灣地區民眾肺癌的發生，是否扮演重要的角色。

肆、材料與方法

一、化學藥品和材料

1,6-Dinitropyrene (1,6-DNP), xanthine oxidase Grade III, catalase, hypoxanthine, micrococcal endonuclease (MN), potato apyrase (PA), bicine solution, ammonium formate (AF), Giemsa 染料, L-glutamine, 6-thioguanine (6-TG), ethidium bromide, mineral oil (light), dithiothreitol (DTT) 由美國 Sigma 化學藥品公司購得。

Tetrabutylammonium chloride (TBAC) 由瑞士 Fluka 化學藥廠購得。

Sodium dodecyl sulfate (SDS), isoamyl alcohol, sodium acetate, ammonium sulfate, EDTA, formic acid 由 Riedel-de Haen 公司購得。

Calf thymus DNA, proteinase K, RNase A, Tris base, Tris-HCl, 4dNTPs, 4ddNTPs, 7-deaza-dGTP, HAT medium, primer (dT) 15, RNase T1, spleen phosphodiesterase (SPD) 由德國 Boehringer Mannheim 公司購得。

[α -³⁵S] dATP, [γ -³²P] dATP 由英國 Amersham 公司購得。

T4 polynucleotide kinase, sequencing kit 由美國 Bio-Labs 公司購得。

McCoy's 5A、DMEM、BME、F12、RPMI-1640 等 medium, fetal bovine serum (FBS), trypsin, penicillin, streptomycin, 123 bp ladder marker 購自 Gibco 公司。

Methanol, ethanol, dimethylsulfoxide (DMSO), acrylamide, bis-acrylamide, xylene cyanole FF, bromophenol blue, deionized formamide, urea 及配製緩衝液之化學試劑皆購自德國 Merck 公司。

Ribonuclease inhibitor (rRNasin), Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMuLV RTase), DNA purification system,

Taq polymerase 購自 Promega 公司。PCR 之 primer, DNA 定序之 primer 購自台灣 Cashmere 公司。X-ray film 購自美國 Kodak 公司。Nonidet P-40 (NP-40) 購自日本 Wako 公司。ammonium persulfate (APS), tetramethylethylenediamine (TEMED), agarose 購自美國 Bio Rad 公司。細胞培養皿購自丹麥 Nunc 公司。

二、細胞株的來源

MRC-5 細胞由台北榮民總醫院醫學研究部劉宗榮博士提供，V79 細胞由中山醫學院藥理科所提供，CL1-0、CL1-2、CL-3 細胞由中央研究院生物醫學研究所楊泮池醫師所提供，CHO-K1 細胞由中央研究院生物醫學研究所李德章博士所提供，WI-38、A-427、CaLu-1 細胞購自美國 American Type Culture Collection (ATCC) 公司。茲將所使用到之細胞株之特性整理於 Table 7 中。

三、細胞解凍與保存

儲存之細胞由液態氮中取出，立刻放入 37°C 水浴，使其快速解凍，將解凍的細胞移至含有 37°C 培養液的離心管中，以 800 rpm 離

心 5 分鐘，除去上清液後，以完全培養液均勻混合之，然後移到 100 mm 的培養皿中，放入 37°C 的 5% CO₂ 的培養箱中培育。欲保存之細胞用胰蛋白酶 (Trypsin/EDTA, T/E) 處理，以單離細胞，再取部份完全均勻的細胞懸浮液，以細胞自動計數器計算細胞數目，並取 1×10^6 個細胞到無菌離心管中以 800 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液並以含有 10% dimethylsulfoxide (DMSO) 之 1 ml 完全培養液混合均勻後移到 cryotube 中，放於 -80°C 冰櫃中靜置二小時後，再移至液態氮桶中儲存。

四、細胞培養

CHO-K1 和 CaLu-1 細胞是以 McCoy's 5A 培養液培養，而 MRC-5 和 V79 細胞培養於 DMEM 培養液，CL1-0、CL1-2 細胞則用 RPMI-1640 培養液培養，CL-3 細胞培養於 F-12 培養液，WI-38 細胞培養於 BME 培養液，A-427 細胞則培養於 MEM 培養液中，以上各種不同的培養液中均含有 10% 胎牛血清 (FBS)、1.22% w/v 碳酸氫鈉、兩種抗生素 (penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml) 和 0.03% L-glutamine。細胞在含有 5% CO₂ 之 37°C 培養箱中培養。

五、1,6-DNP 在不同細胞中形成 DNA 鍵結物之比較研究

(一) 1,6-DNP DNA 鍵結物標準品的製備

首先利用 Speed Vac 濃縮機 (Speed Vac Plus SC 210A, Savant) 將 1 mg 的 calf thymus DNA 乾燥，再以 500 μ l 的 50 mM KH_2PO_4 溶解之，然後加入 10 μ l hypoxanthine (50 mg/ml)、10 μ l catalase (1 mg/ml) 和 25 μ l 1,6-DNP (1 mg/ml)，最後加入 0.1 unit xanthine oxidase 後，於 37°C 水浴中培育 3 小時，之後再加入相同劑量的 hypoxanthine 和 xanthine oxidase 繼續培育 18 小時。反應終止後，以 phenol / chloroform 萃取出反應後之 DNA，其詳細步驟如下：以等體積 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, v/v/v) 混合液混合均勻後，以 12,000 rpm 的速度離心 10 分鐘，取上清液後，再重覆此步驟兩次，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，混合均勻 5 分鐘後，以 12,000 rpm 的速度離心 5 分鐘，以去除 phenol。最後取上清液加入 1/10 倍體積的 3 M sodium acetate 及 2 倍體積 100% 的冰乙醇混合均勻，靜置於 -20°C 的冰箱中 2 小時。以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，收集 DNA 沈澱物，再以 75% 乙醇洗去殘留的鹽類兩次，離心所得之 DNA 沈澱物，以滅菌水於 37°C 溶解 2 小時。最後以紫外線光譜儀，測定 DNA 在 260 nm 和 280 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 1 小時以水解多

餘的 RNA。DNA 的濃度以下列的公式計算： $\text{DNA} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{A}_{260} \times 50 \times \text{稀釋倍數}$ 。

(二) 1,6-DNP 在不同細胞株的處理

加藥前一天將 1×10^6 的細胞培養在 100 mm 培養皿中，在 37°C 培養箱中培養 18 小時後，以磷酸緩衝液 (1 x PBS) 洗去培養液，再換入新鮮培養液後，即加入不同濃度的 1,6-DNP，並置入 CO_2 培養箱中培育 24 小時，之後以 1 x PBS 重複洗兩次，以除去含 1,6-DNP 之培養液，然後以胰蛋白酶單離細胞，將此細胞懸浮液以 800 rpm 離心 10 分鐘以收集細胞，再用 1 x PBS 重複洗兩次之後，將細胞移至 eppendorf 中，以 3,500 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液，立即加入 500 μl 含有 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% SDS, 10 mM Tris 和 1 mg/ml proteinase K 的 digestion buffer，然後於 56°C 反應 18 小時。反應終止後以 phenol/chloroform 萃取 DNA，步驟同前。

(三) DNA 鍵結物之分析

DNA 鍵結物之分析是以 ^{32}P -postlabeling 方法進行 (Gupta et al.,

1982, 1985; Roy et al., 1989; Lee et al., 1994b)。整個流程如 Fig. 2 所示。首先取 10 μg DNA 加入含有 5 μg micrococcal endonuclease 和 5 μg spleen phosphodiesterase 之 succinate buffer 中，於 37°C 水浴中培育 4 小時，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotide 3'-monophosphate。用 1-butanol 萃取 DNA 鍵結物以增強鍵結物的含量，加入 10 mM tetrabutylammonium chloride 和 100 mM ammonium formate (pH 3.5)，並以等體積的 1-butanol 萃取兩次，收集上層液 (1-butanol 層)，接著以 Speed Vac 減壓濃縮至乾後，加入 18 μl 的無菌水溶之。然後再加入含有 5 units 之 T4 polynucleotide kinase 和 1 μl 之 10 μCi [γ - ^{32}P]-dATP 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 片上，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-HCl, 8.0 M urea (pH 8.0); D5: 0.9 M sodium phosphate (pH 6.8)。展開後將 TLC 片放入 X 光底片增強片夾中，以 X 光底片顯影。另外，稀釋 DNA 水解溶液並以 [γ - ^{32}P]-dATP 標記所有核苷酸，然後利用 40 mM ammonium sulfate (pH 5.27) 展開。定量時則依照 X 光底片上的位置剪下 DNA 鍵結物與所有核苷酸，溶於閃爍計數液中以 Beckman L-6500 Scintillation Counter 測定其放射性強度。並以下列公式計算 DNA 鍵結物之相對含量：

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

六、1,6-DNP 在中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary-K1 cells, CHO-K1 cells) 之 HPRT gene 突變之分析

(一) 細胞毒性分析

細胞毒性分析的原理，主要是將待測化合物處理細胞後，視細胞存活所形成細胞聚落之數目，以測定此化合物對細胞的傷害程度 (Lee et al., 1989)。本實驗是以中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO-K1 cells) 來進行，先將 1×10^5 個細胞種在含有 HAT ($100 \mu\text{M}$ hypoxanthine, $2 \mu\text{M}$ aminopterin, 及 $30 \mu\text{M}$ thymidine) 的完全培養液中培養三天，以減低原先存在的 HPRT 功能缺失的細胞數目。三天後洗去含有 HAT 的培養液，換成一般的完全培養液，再繼續培養三天。加藥前一天在 100 mm 培養皿中，種 1×10^6 個細胞，培養 18 小時後，以磷酸緩衝液 ($1 \times \text{PBS}$) 洗去培養液，再換入新鮮培養液後，即加入不同濃度的 1,6-DNP，並置入培養箱中處理 5 小時。然後以 $1 \times \text{PBS}$ 重複洗兩次，以除去含 1,6-DNP 之培養液，防止 1,6-DNP 繼續與細胞作用。細胞立即以胰蛋白酶 (Trypsin / EDTA) 處理，以單離細胞，將此細胞懸浮液以自動細胞計數器計算其中之細胞數目，並取 1×10^6 個細胞種到新的 100 mm 的培養皿中，做突變細胞株的篩選。另外，再取一部份用連續稀釋法，將細胞稀釋成 100 cells / ml 的濃度，在三個 60 mm 培養皿中，各種 200 個細胞後，將培養皿移到 5% CO_2 之 37°C 培養箱中靜置培養七天，做細胞存活率分析。整個實

驗流程如 Fig. 3 所示。七天後取出細胞以 95% 酒精固定，再以 10% Giemsa 染劑染色，以自動聚落計數器計算細胞聚落的數目，結果如下表示： $\text{Relative cell survival (\%)} = \text{number of colony of sample} / \text{number of colony of control} \times 100\%$ 。(Lee et al., 1989)

(二) 細胞突變性之分析及突變株的選擇

上述經 1,6-DNP 處理過的 1×10^6 個細胞持續培養 10 天，期間做三次次培養 (subculture)，每次次培養後，再重新將單離的 1×10^6 個細胞種在新的 100 mm 培養皿內，使突變細胞株能充分表現。最後才將 1×10^6 個細胞均勻分種在十個 100 mm 培養皿中 (1×10^5 cells / plate)，並以含有 11 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的 6-thioguanine (6-TG) 的培養液培育七天，如 Fig. 3 所示。同時每個 60 mm 培養皿，種 200 個細胞在完全培養液培育七天，做種植效率 (plating efficiency) 之測定。七天後把每一處理組之培養皿拿到燈光上方，用筆選定對 6-TG 有抗性的突變株，再如前所述，用 1 x PBS 沖洗一次，利用吸管吸去細胞聚落周圍之 PBS，以 5 μl 的 T/E 直接點在細胞群落上，在顯微鏡下觀察，當細胞變圓亮時，以 tip 直接吸取種入 24 wells 的培養皿中培養，待細胞長滿後再依上述 1 x PBS、T/E 的方式處理突變細胞，把它轉移至 6 wells 的培養皿中繼續培養，待細胞又長滿時，將這些突變細胞一部份於 -80°C 冰櫃中保存起來，一部份以連續稀釋方式，取 500 個細胞做下一個實驗。

(三) 自 mRNA 利用反轉錄酵素 (Reverse Transcriptase, RTase) 直接合成第一股 cDNA

每一突變株取 500 個細胞重複三次，分別置於 0.5 ml Eppendorf tube 中，在 4°C 以 12,000 rpm 離心 10 分鐘。用 yellow tip (RNase-free) 吸去上清液後，其中 2 支細胞冷凍於 -80°C 冷凍櫃中備用，剩下的一支，則將細胞懸浮在 5 μ l 的第一股 cDNA 合成溶液中，其中含有 5 x RT buffer, 50 mM DTT, 各 0.5 mM 的 4 dNTPs, 0.1 μ g/ μ l BSA, 10 ng/ μ l oligo-(dT) 15 primer, 1 U/ μ l RNase inhibitor, 2 U/ μ l MMuLV RTase 及 2.5 % NP-40。此反應溶液在 37°C 下反應 45 分鐘。NP-40 可使細胞膜破裂並在 MMuLV RTase、oligo-(dT) 15 primer 作用下與 mRNA 合成第一股 cDNA (Yang et al., 1989)。整個流程如 Fig. 4 所示。

(四) 聚合酵素鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)

直接將上述合成好的第一股 cDNA 當做聚合酵素鏈反應的模版，並配製內含 Taq 緩衝液, 1 ng/ μ l 引子 (P1, P2), 各 0.4 mM 的 4dNTPs, 2.75 mM MgCl₂ 及 0.04 U/ μ l Taq 聚合酵素的水溶液，進行 PCR 反應。在反應前，水溶液上要覆蓋一層礦物油以防止反應溫度升高時水溶液的蒸發。將 cDNA-mRNA 混合反應液以 95°C 加熱五分鐘後，就

重複三十次的下列步驟：先 95°C 處理一分鐘使 DNA 雙股分開，以 55°C 處理一分鐘使 primer 與 DNA 模版黏合，再以 72°C 處理一分鐘使核酸複製。如此循環反應三十次結束後，再以 72°C 反應 10 分鐘。取此次反應複製好之十分之一量的 cDNA，加入第二種含 2nd primers (P3, P4) 的反應液中，以上述相同的方法，進行第二次的聚合酵素鏈反應，以進一步提高 cDNA 的生成量及其特異性。反應完成後，再取複製好的 cDNA 產物十分之一量，以 1.2 % 凝膠 (agarose) 在 100 伏特的電壓下，進行電泳分析，完成後，凝膠片以 0.5 µg/l ethidium bromide 染色 (Yang et al., 1989) 來觀察反應產物的分子量大小及合成量的多寡。將第二次聚合反應產物 (45 µl) 以 promega kit 純化，並溶於滅菌的去離子水中，以做為核酸定序之用。聚合酵素鏈反應所用之兩對引子的鹼基序列，如 Fig. 5 所示。

(五) DNA 直接定序

爲了避免干擾 DNA 定序的進行，所以要先將合成好的 cDNA 純化，以去除 PCR 反應後剩餘的引子及 4dNTP。將 100 至 200 ng 複製好的雙股 cDNA 分別加入四條核酸定序引子 (Sequencing primer, S1, S2, S3, S4)，如 Fig. 5 所示。並在加入 Annealing mixture (含 Sequencing buffer, 0.5% NP-40) 後，放入沸水中加熱五分鐘，使雙股 DNA 模版解鏈成單股 DNA，再快速移入 -20°C 冰箱中作用八分鐘，使引子與單股 DNA 黏合，八分鐘後從冰箱取出樣品離心 20 秒，即加

入 sequence buffer mixture (內含 5 x sequence buffer, 20 mM DTT, 1:10 labeling buffer, 0.6 U sequenase, α -[³⁵S]-dATP) 室溫下作用 5 分鐘開始進行 DNA 序列的分析，之後將此反應溶液分裝至 4 個分別含 2.5 μ l 37°C 的 dideoxy NTPs (ddNTPs) (G: 150 μ M 4dNTPs, 15 μ M ddGTP; C: 150 μ M 4dNTPs, 15 μ M ddCTP; A: 150 μ M 4dNTPs, 10 μ M ddATP; T: 150 μ M 4dNTPs, 10 μ M ddTTP) 的 0.5 ml Eppendorf tube 中。在 37°C 進行 5 分鐘反應後，即加入 3.6 μ l 的中止反應溶液 (內含 95% formamide, 0.15% xylene cyanole FF, 0.15% bromophenol blue 及 0.37 % EDTA) 以停止反應繼續進行。之後完成反應之產物再以 95°C 加熱 3 分鐘並立即冰浴，即將樣品加到 6% acrylamide-bisacrylamide/7M urea 凝膠中，以 70 瓦輸出功率電泳 2.5 小時。凝膠在 80°C 抽真空乾燥 (gel dryer, Model 538 Bio-Rad, USA) 後，放入 X 光底片增強片夾中，以 X 光底片顯影。

伍、結果

一、比較 1,6-DNP 在不同細胞株中形成之 DNA 鍵結物

(一) 小牛胸腺 (calf thymus) DNA 之 1,6-DNP-DNA 鍵結物之合成

1,6-DNP 在 xanthine oxidase 和 catalase 活化酵素存在下，與裸露的小牛胸腺 DNA 反應 21 小時後所得到之 DNA 鍵結物，以 ^{32}P -postlabeling 的方法在 TLC 片展開，發現主要的 DNA 鍵結物 (Fig. 12-D spot 1) 在 TLC 片上移動的位置，與過去已發現之 1,6-DNP-DNA 鍵結物所移動的位置相似 (Neft et al., 1993)。這個 DNA 鍵結物已用質譜鑑定為 N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene (dG-C8-ANP)，它是攻擊在 deoxyguanosin 的 C8 位置，也是目前唯一被確定的 1,6-DNP-DNA 鍵結物 (Beland et al., 1990)。另外在原點附近還有另一個 1,6-DNP 的 DNA 鍵結物，其含量就遠低於 spot 1 的 dG-C8-ANP，其化學構造至今尚未被確定。

(二) 比較人類各種細胞株之 1,6-DNP-DNA 鍵結物之形成能力

比較 1,6-DNP 在人類細胞株上形成 DNA 鍵結物的能力，以了解 1,6-DNP 在人類細胞株上之基因毒性。首先要了解 1,6-DNP 在何種濃度和作用時間，是造成 DNA 鍵結物的最適當實驗條件，因此先選擇 MRC-5、WI-38 和 A-427 等三種細胞株來做初步實驗，結果發現三種細胞株形成 1,6-DNP-DNA 鍵結物的能力，都是在本實驗的最高濃度 34.2 μM 1,6-DNP 和處理 24 小時時產生最多的鍵結物含量。同時也發現三株細胞所形成之鍵結物的含量，會隨著處理 1,6-DNP 的濃度或作用時間的增加而有濃度和時間效應的關係 (Fig. 6-10)。

因此我們依據前面濃度與時間效應的結果，以下實驗都取 34.2 μM 1,6-DNP 和作用 24 小時的實驗最佳條件來進行，比較不同細胞中生成 1,6-DNP 鍵結物的種類和產生能力有何不同？

本實驗使用了七種人類肺細胞株，包括有 MRC-5、WI-38、A-427、CaLu-1、CL1-0、CL1-2 以及 CL-3，以 34.2 μM 1,6-DNP 處理各種細胞 24 小時後，以 ^{32}P -postlabeling 的方法，分析其 DNA 中所產生之 1,6-DNP-DNA 鍵結物和 dG-C8-ANP 的已知 1,6-DNP-DNA 鍵結物有何不同？同時也分析其形成量。結果如 Table 8 所示，在 A-427、CaLu-1、CL1-0、CL1-2 和 CL-3 等五種人類肺癌細胞株中，僅有 A-427 細胞株會生成三個 DNA 鍵結物，但其產生量甚低，總量僅有 2.56 adducts/ 10^8 nucleotides，其中一個 DNA 鍵結物 (spot 1)，與已知之 1,6-DNP 鍵結物 dG-C8-ANP 在 TLC 片上具有相似的移動位置，另一個 DNA 鍵結物 (spot 2) 則與 dG-C8-ANP 明顯不同，是 A-427 細胞的主要 DNA 鍵結物。而其他四種肺癌細胞株並沒有偵測到任何 DNA 鍵結物產生。另外，1,6-DNP 在兩種正常人類肺細胞株 MRC-5 及 WI-38 細胞上，與 A-427 細胞一樣，不但會形成與 dG-C8-ANP 在 TLC 片具有相似移動位置的 spot 1，還會形成另一個含量較 spot 1

還高 2-3 倍的主要 DNA 鍵結物 (spot 2)，此點移動的位置與 1,6-DNP-DNA 鍵結物標準品 dG-C8-ANP 的位置完全不同。經定量後比較這些細胞株在處理 1,6-DNP 後，所生成之 1,6-DNP 鍵結物總量，結果以 MRC-5 的 DNA 鍵結物含量最高，為 26.37 adducts/10⁸ nucleotides，其次為 WI-38 細胞株有 8.72 adducts/10⁸ nucleotides。比較三種會形成 1,6-DNP 鍵結物之肺細胞株 (MRC-5, WI-38 和 A-427) 之間形成 DNA 鍵結物的能力相差了 3.0-10.3 倍之多。

(三) 動物細胞株形成 1,6-DNP-DNA 鍵結物之能力

本實驗選用了兩種動物細胞株，分別為中國倉鼠肺 (V79) 細胞與卵巢 (CHO-K1) 細胞，同樣以 34.2 μ M 1,6-DNP 處理細胞 24 小時，結果在中國倉鼠肺細胞上可發現三種 1,6-DNP-DNA 鍵結物，而中國倉鼠卵巢細胞僅能生成兩種 DNA 鍵結物。兩種細胞株所形成的主要 DNA 鍵結物，與我們製備之小牛胸腺 DNA 所生成的 dG-C8-ANP 標準品，在 TLC 片上具有相似的移動位置。V79 細胞也有 spot 2 DNA 鍵結物的形成，經定量後發現 spot 2 DNA 鍵結物的含量較 spot 1 低了 1.3 倍，且 V79 的 DNA 鍵結物總量較 CHO-K1 高，為 15.52 adduct levels/10⁸ nucleotides，其形成量是所有實驗細胞株中僅次於 MRC-5 的細胞株。(Table 8, Fig. 11-12)

二、1,6-DNP 在 CHO-K1 細胞之 HPRT 基因所造成突變特異性之研究

(一) 細胞毒性之分析

以細胞形成聚落 (colony) 的能力來分析 1,6-DNP 對中國倉鼠卵巢細胞 (CHO-K1 cells) 的細胞毒性。經 0.17—17.1 μM 的 1,6-DNP 處理五小時後，取 200 個細胞種於 60 mm 的培養皿中，經七天後，計算其形成細胞聚落的數目，發現 1,6-DNP 的四個處理濃度對 CHO-K1 細胞有 88.0—94.0% 的細胞存活率，這表示在低於 17.1 μM 的濃度下，1,6-DNP 對 CHO-K1 細胞僅有極弱的細胞毒性反應 (Table 9)。

(二) 致突變率之分析

1,6-DNP 以 0.17-17.1 μM 的濃度處理 CHO-K1 細胞做 HPRT 基因致突變的分析，結果如 Table 10 所示，四個處理濃度都會產生對 6-TG 具有抗性的突變株，本實驗前後做過四次獨立實驗共獲得 90 個突變株，所造成的突變率介於 $2.7-14.0 \times 10^{-6}$ 之間，但此突變率並沒有隨著 1,6-DNP 濃度的增加而有濃度效應的關係。

(三) 突變株之 RT-PCR 分析

經由 1,6-DNP 處理的突變株稱為 DNP 突變株 (DNP-mutants)，而未經 1,6-DNP 處理卻對 6-TG 有抗性的突變株則稱為自發性突變株 (spontaneous mutants)。我們將四次獨立實驗所獲得的 90 個突變株各取 500 個突變細胞，利用反轉錄酵素及 RT-PCR 方法，將所有突變細胞株的 HPRT cDNA 大量合成出來。Fig. 13 即顯示一些代表性的突變株，經 RT-PCR 所放大合成出來之 HPRT cDNA 之電泳分析結果。這些 HPRT cDNA 在凝膠片所移動的位置和正常的野生株細胞 (正控制組，Lane 2) 相似，若比對分子量標記，發現這些突變株之 HPRT cDNA 也都位於 band 5 (MW 615) 與 band 6 (MW 738) 之間。但是 DNP-19 (Lane 9) 和 DNP-20 (Lane 10) 突變株在凝膠上所移動的位置卻明顯的比正控制組低的多，這結果顯示 DNP-19 與 DNP-20 突變株的 HPRT cDNA 可能有大段缺失突變 (deletion) 發生。

(四) 突變株 HPRT 基因之 DNA 定序

將所有突變株之 HPRT cDNA 純化後，利用四條 end-labeling primer 以直接定序法 (modified Sanger dideoxynucleotide procedure)

分四次將 HPRT 基因的九個 exon 完全定序，然後將所得之 HPRT 基因 DNA 序列與正常之序列 (Konecki et al., 1982; 附錄二) 做一比較，即可得知各突變株 HPRT cDNA 序列的突變位置。在所有收集到的 90 個突變細胞株中，至今共篩選了 52 個突變株完成 DNA 序列分析。結果發現其中 24 個突變株是完全獨立的，其中還包括一個自發性的突變。我們將這 23 個完全獨立的突變株發生突變的位置、種類、附近的 DNA 序列以及因誤意突變所造成的胺基酸改變等相關數據，整理於 Table 11 中。結果發現 1,6-DNP 所引起的 23 個突變株有 18 個是單一鹼基更換突變 (single base substitution mutation)，4 個是剪輯錯誤突變 (splice site mutation)，還有 2 個是缺失突變 (deletion mutation)。18 個鹼基更換突變，分別為 T:A → G:C (4 個)，G:C → C:G (3 個)，A:T → G:C (2 個)，G:C → T:A (2 個)，T:A → C:G (2 個)，C:G → G:C (2 個)，G:C → A:T (1 個)，A:T → C:G (1 個)，T:A → A:T (1 個) 等。一株自然發生的突變株，所造成的突變是在第 211 個鹼基上，發生 G:C → C:G 的換異突變 (transversion mutation)。分析所有的鹼基更換突變發生的位置時，發現有 78% (14/18) 是發生在 HPRT 基因的 exon 5 到 exon 8 之間，而因剪輯作用 (splicing process) 錯誤發生的突變有 75% (3/4) 是發生在 exon 4。另外，我們比較發生鹼基更換突變附近的 DNA 序列，發現攻擊在鳥糞嘌呤鹼基上的鹼基更換突變，其 5' 端都會有個胸腺嘧啶，但若攻擊在胸腺嘧啶鹼基上的，則發現附近大部分都有重覆胸腺嘧啶的現象 (Tandem repeat sequence)。發生鹼基更換突變後所造成之誤意突變中，大多是將 Leu 改變為其他胺基酸，其次是 Gly 和 Ser。在缺失突變方面，DNP-23 和 DNP-24 突變株所產生之缺失突變，

是在一有連續 C 鹼基的 DNA 序列造成一個鹼基缺失的結構移位突變 (-1 frameshift mutation)。

我們進一步分析 1,6-DNP 所引起的 18 個鹼基更換突變的突變形式，發現有 72% (13/18) 是屬於換異突變 (transversion)，其中又以 A:T → C:G 和 G:C → C:G 為最多，各佔 28% (5/18)。其他 5 個突變株是發生轉變突變 (transition)，其中 A:T → G:C 就佔了 4 個 (80%)。在 23 個突變株中有兩株發生了另一種點突變—缺失突變，都是丟掉一個 C，也都發生於 C 的重覆序列。除了以上的點突變外，在本實驗中也找到 4 個突變株發生剪輯錯誤突變，其所造成的剪輯錯誤大多發生於 exon 4 上，其頻率高達 75% (3/4)。由以上分析得知，1,6-DNP 所造成之 HPRT 基因的突變特異性，以鹼基更換突變為最主要，佔了 78% (18/23)，而其中又以 A:T → C:G 以及 G:C → C:G 的換異突變為主要的突變形式 (Table 12)。Fig. 15-19 為一些突變的代表圖。

陸、討論

已知 1,6-DNP 的代謝活化路徑，主要是經由還原酵素與乙醯化酵素來進行。位於肝臟細胞質層之還原酵素 NAD(P)H-quinone oxidoreductase 對 1,6-DNP 會進行雙電子還原作用 (Hajos et al., 1991)，而生成 N-hydroxy-1-amino-6-nitropyrene 活化代謝物，此可直接攻擊 DNA，或繼續被乙醯化成 N-acetoxy-1-amino-6-nitropyrene，再攻擊 DNA 之鳥糞嘌呤鹼基 C8 的位置，此代謝物所形成的 DNA 鍵結物已被鑑定為 N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene (dG-C8-ANP) (Neft et al., 1993)，這種 DNA 鍵結物已證明與 1,6-DNP 的基因毒性表現有密切的相關性 (Beland et al., 1993)。本實驗首先分析 1,6-DNP 在人類肺細胞上形成 DNA 鍵結物的能力和在動物肺細胞有何不同？我們初步結果顯示，1,6-DNP 在人類肺細胞株上會生成新的未知 DNA 鍵結物，同時也發現 1,6-DNP 在九株細胞中，對 MRC-5 正常肺細胞株會生成最高量的 DNA 鍵結物。分析三種人類肺細胞中的 1,6-DNP DNA 鍵結物在 PEI 片上的圖譜時，除了一個 spot 1 DNA 鍵結物，我們推測即 1,6-DNP 經代謝活化後攻擊上 DNA 鳥糞嘌呤鹼基 C8 位置的 dG-C8-ANP 之外，還有一個特別的 spot 2 DNA 鍵結物，它對 MRC-5、WI-38 以及 A-427 細胞來說是主要的 1,6-DNP-DNA 鍵結物，在 PEI 片上的移動位置與 dG-C8-ANP 明顯不同 (Fig. 12)，且此 DNA 鍵結物在這三種人類肺細胞中的含量，分別佔其總量的 58%、59% 以及 40% (Table 8)。這表示 1,6-DNP 在人類肺細胞的主要 DNA 鍵結物和過去的發現是不同的。Norman (1989) 曾利用 1,8-

DNP 處理兔子氣管上皮細胞，探討此細胞形成何種 1,8-DNP-DNA 鍵結物，結果除了發現主要 DNA 鍵結物 dG-C8-ANP 形成之外，還有一個約佔 DNA 鍵結物總量 5% 的第二種 DNA 鍵結物的形成，此點與 1,8-DNP 的還原代謝物 1,8-NONO2 單獨處理 poly (dA.dT) 時在 TLC 片上具有相同的移動位置，與我們未知第二點的位置也相似 (Fig. 20)。因此推測 1,6-DNP 對 MRC-5、WI-38 以及 A-427 細胞，可能主要是攻擊在 A:T 鹼基對上，但這項推測仍需進一步的以液相層析質譜儀確定。MRC-5 是在本實驗所用之細胞株中產生 1,6-DNP-DNA 鍵結物含量最高的，表示 1,6-DNP 在 MRC-5 細胞中，攻擊 DNA 的能力較其他細胞株來的強，同時也發現 MRC-5 所形成之鍵結物的含量，會隨著處理 1,6-DNP 的濃度或作用時間的增加，而有濃度和時間效應的關係 (Fig. 6-7)。這與 Smith et al. (1995) 的動物實驗結果相似，他以 0.3-150 μ g 1,6-DNP 處理 F344 老鼠，結果所造成的肺腫瘤生成數和 DNA 鍵結物產量，都會隨著 1,6-DNP 濃度的增加，而有濃度效應的關係。在作用時間方面，1,6-DNP 在 MRC-5 細胞的 DNA 鍵結物含量，會隨著作用時間的增加而有兩段 (biphasic) 線性增加的現象 (Fig. 8)，在處理時間 8-16 小時的 DNA 鍵結物產生的量兩倍於其他作用時間，這可能是由於 8 小時前 1,6-DNP 主要進行代謝活化作用，到了 16 小時之後，則因代謝活化作用已漸趨飽和 (metabolic saturation)，解毒作用和 DNA 修補作用也達到穩定程度，而使 DNA 鍵結物產量漸趨於平緩。

比較 MRC-5、WI-38 以及 A-427 這三種人類肺細胞株所生成之

1,6-DNP 鍵結物總量時，發現這三株細胞的 1,6-DNP-DNA 鍵結物的產生能力竟相差了 3.0-10.3 倍之多。已知 A-427 為肺腺癌細胞，MRC-5 和 WI-38 細胞則分別為男性與女性的正常肺細胞，我們的實驗結果顯示 1,6-DNP 攻擊正常肺細胞的能力似乎比攻擊肺癌細胞來的強。在實驗過程中，我們觀察 MRC-5、WI-38 以及 A-427 這三種人類肺細胞株的生長速率，發現若三種細胞均種 2×10^6 的細胞數在 100 mm 培養皿中培養，三天後 A-427 細胞株會完全長滿（約 1×10^7 cells / 100 mm），而另兩種細胞株僅長至七成左右，因此推測，也許是因為肺癌細胞株的增生速度較正常細胞快，使所萃取到的 DNA 總量多，而相對稀釋掉了 DNA 鍵結物的含量，結果造成 A-427 細胞株形成 DNA 鍵結物的量較低。Bond et al. (1990) 發現同樣是屬於肺組織，但不同的細胞型態其所形成 DNA 鍵結物的含量就會有所不同，也許是因為具有不同代謝活化能力所致。Bond 將動物放在暴露箱中，以自然吸入的方式投予老鼠柴油引擎廢氣，來比較整個肺組織細胞形成 DNA 鍵結物的含量有否不同，結果發現以肺組織的第二型肺泡細胞 (alveolar type II) 形成的 DNA 鍵結物含量較其他類細胞為多。本實驗所使用之 MRC-5 細胞是由 14 週大的男嬰所分離培養出來的，而 WI-38 細胞則衍生自 3 個月大的女性胚胎，雖然這兩種細胞株皆為正常肺細胞，但也許因為細胞分化的程度不同或性別差異，以致代謝能力有所不同，而造成 MRC-5 的 DNA 鍵結物含量較 WI-38 細胞為高，但這些都需要進一步研究分析。

MRC-5 細胞的主要 1,6-DNP-DNA 鍵結物位置 (spot 2) 與已知

標準品 dG-C8-ANP 位置 (spot 1) 有所不同，另兩種動物細胞 V79 與 CHO-K1，1,6-DNP 所造成的主要 DNA 鍵結物皆為 dG-C8-ANP，V79 細胞也有 spot 2 的生成，經定量後發現 spot 2 的含量較 spot 1 低了 1.3 倍，但鍵結物總生成量是所有實驗細胞株中僅次於 MRC-5 細胞的。V79 和 CHO-K1 細胞分別為中國倉鼠的肺細胞和卵巢細胞，已知 1,6-DNP 對 CHO-K1 細胞僅能引起低的基因毒性 (Edgar et al., 1985); Smith et al. (1995) 將不同劑量的 1,6-DNP 直接注射於 F344 老鼠的肺部，結果發現在肺臟與肝、腎等其他器官組織，都有 dG-C8-ANP 鍵結物的產生，但肺臟之 DNA 鍵結物含量較其他器官，例如較肝臟高了 10 倍之多; Lechner (1982) 發現在正常狀態的細胞培養下，人類細胞生長的細胞週期較動物細胞為慢。這些似乎都暗示了人類與動物細胞對同一種致癌物的代謝活化能力可能不同。因此，細胞週期和代謝活化能力都會造成不同細胞有不同之 DNA 鍵結物生成量。又 1,6-DNP 可能是一種會引起肺腫瘤發生頻率較其他器官組織為強的肺癌致癌物 (Smith et al., 1995)，本實驗發現 1,6-DNP 對人類肺細胞 MRC-5 能生成最高量的 DNA 鍵結物，而在動物肺細胞 V79 的 DNA 鍵結物也較卵巢細胞 CHO-K1 高了三倍之多。這些結果都顯示 1,6-DNP 對肺臟組織細胞所造成的 DNA 傷害可能較其他組織細胞為強。

由以上分析得知，1,6-DNP 在人類肺細胞所生成的鍵結物種類和含量與動物細胞有顯著的不同，在人類肺細胞中 1,6-DNP 的主要 DNA 鍵結物為一種可能是攻擊在 A:T 鹼基的一種未知 DNA 鍵結物，而不是 dG-C8-ANP 的 DNA 鍵結物。細胞中不同 DNA 鍵結物的形

成，除了細胞本身的代謝活化能力、代謝路徑會影響之外，不同細胞對於 1,6-DNP 所造成損傷之敏感性或修補能力亦可能使所生成之 DNA 鍵結物不同，這些都有待進一步的探討。

1,6-DNP 在 HPRT/CHO-K1 的致突變分析上所生成的突變株之 HPRT 基因有何基因突變的特異性？由我們的研究結果發現 1,6-DNP 所造成的基因突變特異性是以 A:T → C:G 以及 G:C → C:G 鹼基更換突變為主要的突變形式 (Table 12)，這與過去的多數多環芳香烴和硝基多環芳香烴，例如 B[a]P, 1-NP 等的主要突變形式 G:C → T:A 不同 (Yang et al., 1991; Newton et al., 1992)。更有趣的是，本實驗的結果也和以 shuttle vector 方法分析 1,6-DNP 的主要突變形式 G:C → T:A 不同 (Boldt et al., 1991)。

雖然 1,6-DNP 對 CHO 細胞僅能引起較弱的基因毒性，但在沒有 S9 存在下，亦可引起 CHO 細胞 HPRT 基因的突變 (Edgar et al., 1985)。因此我們以 1,6-DNP 處理 CHO-K1 細胞來探討 1,6-DNP 引起之 HPRT 基因 cDNA 突變之特異性。結果在 23 株已做 DNA 序列分析且完全獨立的突變細胞中，鹼基更換突變佔了 78% (18/23)，其中換異突變就佔了 72% (13/18) 且以 A:T → C:G 以及 G:C → C:G 為主要的鹼基更換突變，此結果與其他 PAH 類如 BPDE 和 1-nitrosopyrene (1-NOP)，對 V79 和 CHO-K1 細胞之 HPRT 基因所造成之鹼基更換突變有相當大的差異，這些結果整理於 Table 5，由此

表可知 Wei et al. (1994) 以 V79 細胞分別處理不同劑量的 (+)-BPDE，結果顯示所有的鹼基更換突變中都以 G:C→T:A 的換異突變為主 (42-72%)。Yang et al. (1991) 以 BPDE 處理人類纖維母細胞所得到的突變株中 G:C→T:A 的換異突變也佔了 60%。同樣是 CHO-K1 細胞加入 1-NOP 作用，也是以 G:C→T:A 的換異突變為主 (54%)。1,6-DNP 所造成的 18 個鹼基更換突變中有 8 個 (44%) 與 G:C 鹼基對有關，但其中僅有兩個是 G:C→T:A 的突變。Watanabe 和 Ohta (1993) 認為 G:C→T:A 換異突變可能是引起原致癌基因 (protooncogene) c-H-ras 以及抑癌基因 p53 去活化的主要原因，Tahira et al. (1986) 的實驗有上述相似的結果，他發現 1,8-DNP 會引起 F344 大白鼠的纖維肉瘤組織中之致癌基因 c-ki-ras 在 codon 12 的位置發生 G:C→T:A 的換異突變，此結果已在人類肺癌組織中之同一基因中被發現 (Nakano et al., 1984; Varmus, 1984)。另一方面，同屬於 PAH 類化合物的 6-nitrochrysene，在 CHO-K1 細胞所造成的鹼基更換突變有近 80% 和 A:T 鹼基對有關，而 G:C→T:A 僅佔 6%，此點與我們的實驗結果有部份相似。至於發生點突變的機轉，可能和其形成之鍵結物有某些關係，當 BPDE 攻擊 DNA 產生 N7-dG-BPDE 時，這個鍵結物常會發生 G:C→T:A 的鹼基更換突變，原因可能和 Strauss (1991) 所提之 "A rule" 有關，也就是 DNA 聚合酵素在損傷的 dG 之對側較易併入 dA。過去的研究顯示，BPDE 和 DNA 形成鍵結時，有 95% 攻擊在鳥糞嘌呤上 (Osborne et al., 1981; Straub et al., 1977)，這結果與 Yang et al. (1991) 由 BPDE 產生之 G:C pair 鹼基更換突變中佔 94% 的結果是一致的。而 6-nitrochrysene 與 DNA 形成之鍵結物中，則有 73% 是 N-(deoxyguanosin-8-yl)-6-aminochrysene (dG-C8-

AC), 6% 是 5-(deoxyguanosin-N²-yl)-6-aminochrysene (dG-N²-AC), 20% 才是 N-(deoxyinosin-8-yl)-6-aminochrysene (dI-C8-AC), 但結果卻顯示在 A:T pair (78%) 上發生的突變比 G:C pair 上發生的頻率高了 3 倍之多。Manjanatha et al. (1993) 推測由 6-nitrosochrysene 引起之鹼基突變, 儘管有 79% 的鍵結物發生在鳥糞嘌呤上, 但 DNA 序列改變的最終結果卻有 78% 發生在 A:T pair 上, 其可能的原因有二: (1) 6-nitrosochrysene 發生在 G:C pair 上之突變較易被修補移除, (2) dG-C8-AC 或 dG-N²-AC 鍵結物在 DNA 聚合酵素行聚合作用時, 並不會對其 "fidelity" 造成太大的影響, 因而較不易產生錯誤, 反而是發生鍵結物頻率最低之 dI-C8-AC 對基因造成的傷害最為明顯。1,6-DNP 所造成的另一種主要突變形式是 G:C→C:G 之鹼基更換突變, 這個鹼基更換突變在 Cole and Skopek (1994) 所整理的人類體內、體外實驗之 HPRT 基因的自然突變株序列中從未被發現過, 若由 Manjanatha et al. (1993) 所提的觀點來看, 除了符合鳥糞嘌呤是 1,6-DNP 易攻擊的目標分子外, 經 1,6-DNP 所產生之 G:C→C:G 之鹼基更換突變可能不那麼容易被細胞內 DNA 修補系統移除, 而使得此種鹼基更換突變頻率增加, 本實驗結果也顯示 1,6-DNP 在 CHO 細胞形成 dG-C8-adduct 的機率為 61% (3.04 spot 1 adduct levels / 5 total adduct levels), 但只有 45% 的鹼基突變發生在 G:C pair 上, 而形成 dI-C8-adduct 的機率, 在我們所使用的分析方法上無法偵測到的情況下卻有 55% 的鹼基突變發生在 A:T pair 上。Boldt et al. (1991) 也發現發生突變最多的區域, 卻不是 DNA 鍵結物產生最多的區域, 表示基因突變的表現不僅和 DNA 鍵結物的多寡有關, 同時也與細胞的修補 (DNA repair) 能力有關。以上可能是 1,6-DNP 造成 HPRT 基因 A:T→C:

G 以及 G:C→C:G 之鹼基更換突變特異性的原因之一。

將鹼基更換突變與 Table 13 中所列之致癌基因發生之突變做一比較，可發現 G:C→C:G 之突變分別與肺腺癌之 K-ras (Robert et al., 1991) 和 Zymbal's gland 腫瘤之 H-ras (Takahashi, 1993) 活化有關。若與 Table 14 中所列之抑癌基因 p53 的鹼基更換突變做一比較，則可發現 G:C→C:G 的改變與人類小細胞型肺癌 (small cell lung cancer)、非小細胞型肺癌 (non-small cell lung cancer)、乳癌、膀胱癌、卵巢癌之發生有關，而 A:T→C:G 的改變也與人類小細胞型肺癌 (small cell lung cancer)、乳癌、淋巴癌、卵巢癌之發生有關。Negishi 和 Weidong (1992) 曾指出受到強光照射之單股 phage M13 mp2 之 DNA 會明顯產生 G:C→C:G 之鹼基更換突變。他們認為鄰近於鳥糞嘌呤之胸腺嘧啶如 -CTGG- 易受光照而產生突變，進而影響到旁邊之鳥糞嘌呤產生鹼基更換突變。此點與我們在實驗所獲知的在發生鹼基更換突變位置附近的 DNA 序列，發現攻擊在鳥糞嘌呤鹼基上的鹼基更換突變，其 5' 端都會有個胸腺嘧啶的結果似乎相符。

1,6-DNP 引起的突變中有 17% 與剪輯錯誤突變有關。這結果與 Manjanatha et al. (1993) 以 6-nitrochrysene 處理 CHO-K1 細胞造成 17% 的剪輯錯誤是相似的，另一個例子也是以 CHO-K1 細胞來進行，處理 1-nitrosopyrene 後造成 57% 發生剪輯錯誤突變 (Newton et al., 1992)，而人類纖維母細胞處理 BPDE 則完全沒有發生剪輯錯誤突變 (

Yang et al., 1991)。本實驗結果顯示 1,6-DNP 所造成之 exon 缺失的突變中，1,6-DNP 引起之缺失有 75% 位於 exon 4，而 1-nitrosopyrene 所造成缺失突變 88% 發生於 exon 5 以前，但 6-nitrochrysene 所引起之缺失則有 60% 分佈在 exon 6-8 之間，因此 1,6-DNP 所造成之剪輯錯誤突變還是與其他的硝基多環芳香烴有些不同。至於造成剪輯錯誤突變的可能原因可能是在 intron 的 3' 或 5' 端的 splicing site 發生了鹼基替換，導致剪輯機制發生錯誤 (Vrieling et al., 1989)。Yang et al. (1991) 利用去氧核糖核酸—聚合酵素鏈反應法來證實人類表皮纖維母細胞經 MNNG 誘發的突變株中，所有剪輯錯誤突變都是由於鹼基更換突變所造成的，大部分造成 exon 缺失的鹼基更換突變都是發生在 donor 或 acceptor 的 5' 端或 3' 端的位置。此外，Anderson et al. (1992) 利用 BPDE 處理人類 T 細胞所產生之 HPRT 突變株中，發生剪輯錯誤之突變細胞 DNA 序列之分析也有相似的結果。

Boldt et al. (1991) 曾以 shuttle vector 的方法探討 1,6-DNP 對 supF gene 的突變特異性，他以帶有 tyrosine amber suppressor tRNA 基因 (supF gene) 的 shuttle vector PS189 處理 1,6-DNP 後，再送進人類腎細胞 293，結果顯示 1,6-DNP 主要是造成 G : C → T : A 的換異突變，同時在一連續五個鳥糞嘌呤的 DNA 序列引起 -1 結構移位突變，這個結果與我們使用 6-TG 的分析法來探討 1,6-DNP 在 CHO-K1 細胞 HPRT 基因上造成之 DNA 序列改變有些差異。Lamber et al. (1990, 1991) 發現 1,8-DNP 對大腸桿菌所引起的突變是 G : C → C : G 鹼基更換突變，而在沒有 DNA 修補能力的大腸桿菌中，所生成的突變卻是

-1 結構移位突變。最近本實驗室也以 CHO cells 的 HPRTase 基因做為標的，研究食物致癌物 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) 的突變特異性，結果發現 IQ 主要會造成 G:C → C:G 的鹼基更換突變和剪輯錯誤突變 (Lee and Shih, 1995b)，而 Endo et al. (1994) 以 shuttle vector 的方法研究 IQ 的一種活化代謝物 N-hydroxy-IQ 的突變特異性，發現主要是引起 G:C → T:A 的轉換突變，其次才是 G:C → A:T 和 G:C → C:G 鹼基更換突變。Table 16 是將 shuttle vector 和 HPRT/CHO assay 兩種系統分析同一種致癌物的致突變性做一概略整理，可發現同樣的致癌物，在不同的分析系統或細胞株，其基因毒性的表現還是有些不同，因而所引起之基因突變特異性也有所差異。

由 1,6-DNP 引起 CHO-K1 細胞之 HPRT 基因突變特異性的結果顯示，A:T → C:G 的主要突變形式，確實有別於目前之環境污染物在哺乳類細胞上所造成之基因毒性。而 G:C → C:G 之鹼基更換突變相信和致癌基因之活化、抑癌基因之去活化有關，雖然 1,6-DNP 的突變特異性已在 shuttle vector 中得到一些結果，但直接分析 1,6-DNP 所誘發之哺乳類細胞的突變株的突變形式，可能使我們更清楚了解 1,6-DNP 在哺乳類細胞基因突變的特異性。

柒、參考文獻

- Ames, B.N., McCann, J., Choi, E., and Yamasaki, E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135
- Andersson, B., Hou, S-M., and Lambert, B. (1992) Mutations causing defective splicing in the human HPRT gene. *Environ. Mol. Mutagen.*, **20**, 89-95.
- Bauchinger, M., Schmid, E., Wiebel, F. J., and Roscher, E. (1988) 1,6-Dinitropyrene causes spindle disturbances and chromosomal damage in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, **208**, 213-218.
- Beland, F.A., and Poirier, M.C. (1993) Significance of DNA adduct studies in animal models for cancer molecular dosimetry and risk assessment. *Environ. Health Perspect.*, **99**, 5-10.
- Beland, F.A., and Kadlubar, F.F. (1990) Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons. In: Cooper, C.S., Grover, P.L. (eds), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 94/1. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 267-325.
- Bold, J., Mah, M., Wang, C.M., Wang, T.C., Smith, B.A., Beland, F.A., Maher, V.M., and McCorkick, J.J. (1991) Kinds of mutations found when a shuttle vector containing adducts of 1,6-dinitropyrene replicates in human cells. *Carcinogenesis*, **12**, 119-126.
- Bond, J.A., Johnson, N.F., Snipes, M.B., and Mauderly, J.L. (1990) DNA adduct formation in rat alveolar type II cells: cells potentially at risk for inhaled diesel exhaust. *Environ. Mol. Mutagen.*, **16**, 64-69.
- Busby, W.F., Smith, H., Bishop, W.W. and Thilly, W.G. (1994) Mutagenicity of

- mono- and dinitropyrenes in the *Salmonella typhimurium* TM677 forward mutation assay. *Mutat. Res.*, **322**, 221-232.
- Butterworth, B.E., Earle, L.L., Strom, S., Jirtle, R., and Michalopoulos, G., (1983) Induction of DNA repair in human and rat hepatocytes by 1,6-dinitropyrene. *Mutat. Res.*, **122**, 73-82.
- Carnow, B.W. and Meier, P. (1973) Air pollution and pulmonary cancer. *Arch. Environ. Health*, **27**, 207-218.
- Chou, M.C. and Lee, H. (1990) Mutagenicity of airborne particles from four cities in Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Council B ROC*, **14**, 142-150.
- Cole, J., and Skopek, T.R. (1994) Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.*, **304**, 33-105.
- Danford, N., Wilcox, P., and Parry, J.M. (1982) The clastogenic activity of dinitropyrenes in a rat-liver epithelial cell line. *Mutat. Res.*, **105**, 349.
- Delclos, K.B., Manjanatha, M.G., Li, E.E., Newton, R.K., Mittelstaedt, R.A., and Heflich, R.H. (1993) ³²P-postlabeling in studies of arylamine and nitroaromatic hydrocarbon activation and mutagenesis. *IARC Scientific Publications.*, **124**, 79-86.
- Delclos, K.B., Bayoumy, K. E., Hecht, S.S., Walke, R., and Kadlubar, F.F. (1988) Metabolism of the carcinogen [³H]6-nitrochrysene in the preweanling mouse: identification of 6-aminochrysene-1,2-dihydrodiol as the probable proximate carcinogenic metabolite, *Carcinogenesis*, **9**, 1875-1884.
- Dennis, M.J., Massey, R.C., McWeeny, D.J., and Knowles, M.E. (1984) Estimation of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Food Additives Contaminants*, **1**, 29.

- Djuric, Z.(1993) Formation of DNA adducts and oxidative DNA damage in rats treated with 1,6-dinitropyrene. *Cancer Lett.*, **71**, 51-56.
- Djuric, Z.(1989) Metabolism and DNA binding of nitropyrene. In: *Reviews in Biochemical Toxicology*, Hodgson E, Bend JR and Philpot RM (eds.), **10**, 1-40.
- Djuric, Z., Fifer, E.K., and Beland, F.A. (1985) Acetyl coenzyme A-dependent binding of carcinogenic and mutagenic dinitropyrenes to DNA. *Carcinogenesis*. **6**, 941-944.
- Edgar, D.H., and Brooker, P.C. (1985) Induction of 6-thioguanine resistance, chromosome aberrations and SCE by dinitropyrenes in Chinese hamster ovary cells in vitro. *Mutat. Res.*, **158**, 209-215.
- Endo, H., Schut, H.A.J., and Snyderwine, E.G. (1994) Mutagenic specificity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the *sup* F shuttle vector system. *Cancer Res.*, **54**, 3754-3751.
- Fifer, E.K., Heflich, R.H., Djuric, Z., Howard, P.C., and Beland, F. A. (1986) Synthesis and mutagenicity of 1-nitro-6-nitrosopyrene and 1-nitro-8-nitrosopyrene, potential intermediates in the metabolic activation of 1,6- and 1,8-dinitropyrene. *Carcinogenesis*., **62**, 135-142.
- Fusco, J.C., Zimmerman, L.J., Fekete, A., setzer, R.W., and Rossiter, B.J. (1992) Analysis of X-ray-induced HPRT mutations in CHO cells : insertion and deletions. *Mutat. Res.*, **269**, 171-183.
- Fu, P.P. (1990) Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metabolism Review*, **22**, 209-268.
- Gallagher, J.E., Kohan, M.J., George, M.H., Jackson, M.A., and Lewtas, J. (1990) Validation/application of ³²P-postlabeling analysis for the detection of DNA adducts resulting from complex air pollution sources containing PAHs and nitrated

- PAHs. In: *Nitroarenes occurrence, metabolism, and biological impact*. Howard PC, Hecht SS and Beland FA (eds), Plenum press, New York and London, 201-209.
- Garner, R.C., Stanton, C.A., Martin, C.N., Chow, F.L., Thomas, W., Hubner, D., and Herrmann, R. (1986) Bacterial mutagenicity and chemical analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and some nitro derivatives in environmental samples collected in West Germany. *Environ. Mutagen.*, **8**, 109-117.
- Gibson, T.L. (1986) Sources of nitroaromatic mutagens in atmosphere polycyclic organic matter. *J. Air Pollut. Control Assoc.*, **36**, 1022-1025.
- Gupta, R.C., Reddy, M.V. and Randerath, K. (1982) ³²P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, **3**, 1081-1092.
- Gupta, R.C. (1985) Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res.*, **45**, 5656-5662.
- Hajos, A.K., and Winston, G.W. (1991) Dinitropyrene nitroreductase activity of purified NAD(P)H-quinone oxidoreductase: role of rat liver cytosol and induction Aroclor-1254 pretreatment, *Carcinogenesis*, **12**, 697-702.
- Haugen, A., Aune, T., and Deilgaug, T. (1986) Nitropyrene-induced DNA repair in Clara cells and alevolar type-II cells isolated from rabbit lung. *Mutat. Res.*, **175**, 259-262.
- IARC (1994) *IARC DNA Adducts: Identification and Biological Significance*, Vol. 125, *DNA Adducts of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 229-244
- IARC (1989), *Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes* IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC, Lyon, France, **46**, 189-387, .

- Iizasa, T., Momiki, S., Bauer, B., Caamano, J., Metcalf, R., Lechner, J., Harris, C.C., and Klein-Szanto A.J.P., (1993) Invasive tumors derived from xenotransplanted , immortalized human cells after *in vivo* exposure to chemical carcinogens. *Carcinogenesis.*, **14**, 1789-1794.
- Imaida, K., Lee, M-S., Land, S.J., Wang, C.Y., and King, C.M. (1995) Carcinogenicity of nitropyrenes in the newborn female rat. *Carcinogenesis.* **16**, 3027-3030.
- Imaida, K., Hirose, M., Tay, L., Lee, M.S., Wang, C.Y., and King, C.M. (1991) Comparative carcinogenicities of 1-, 2-, 4-nitropyrene and structurally related compounds in the female CD rat. *Cancer Res.*, **51**, 2902-2929.
- Ishikawa, F., Takaku, F., Nagao, M., Ochiai, M., Hayashi, K., Takayama, S., Sugimura, T. (1987) Activated oncogenes in a rat hepatocellular carcinoma induced by IQ. *Jpn. J. Cancer Res.*, **76**, 425-428.
- Iwagawa, M., Maeda, T., Izumi, K., Otsuku, H., Nishiguji, K., Ohnishi, Y., and Aoki, S. (1989) Comparative dose-responsibility on the pulmonary carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene and benzo[a]pyrene in F344 rats, *Carcinogenesis*, **10**, 1285-1290.
- Jansen, J.G., Vrieling, H., van Teijlingen, C.M., Mohn, G.R., Tate, A.D., and van Zeeland, A.A. (1995) Marked differences in the role of O⁶-alkylguanine in *hprt* mutagenesis in T-lymphocytes of rats exposed *in vivo* to ethylmethanesulfonate, n-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea, or n-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Res.*, **55**, 1875-1882.
- Jones, N.J., McGregor, A.D., and Water, 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 ³²P-postlabeling. *Cancer Res*, **53**, 1522-1528.
- Keohavong, P., Melacrinis, A., and Shukla, R. (1995) *In vitro* mutational spectrum of cyclopenta[cd]pyrene in the human HPRT gene. *Carcinogenesis*. **16**, 855-860.
- King, C.M. (1988) *Metabolism and Biological Effects of Nitropyrene and Related Compounds (Research Report No.16)* Cambridge, M.A. Heath Effects Institute.
- Kinouchi, T., Nishifuji, K., Tsutsui, H., Hoare, S.L., and Ohnishi, Y. (1988) Mutagenicity and nitropyrene concentration of indoor air particulates exhausted from a kerosene heater, *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 32-41.
- Klungland, A., Laake, K., Hoff, E., and Seeberg, E. (1995) Spectrum of mutations induced by methyl and ethyl methanesulfonate at the *hprt* locus of normal and tag expressing Chinese hamster fibroblasts. *Carcinogenesis*. **16**, 1281-1285.
- Konecki, D. S., J. Brennard, J. C., Fuscoe, C. T., Caskey and A. C. Chinault. (1982) Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase gene of mouse and Chinese hamster: construction and sequence analysis of cDNA recombinants. *Nucleic Acid Res.*, **10**, 6763-6775.
- Lambert, B., Andersson, B., Baselova, T., Hou, S-M., Hellgren, D., and Kolman, A., (1994) Mutations induced in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by three urban air pollutants : acetaldehyde, Benzo[a]pyrene diolepoxide, and ethylene oxide. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 135-138.
- Lambert, I.B., Gordon, A.J.E., Bryant, D.W., Glickman, B.W. and McCalla, D.R. (1991) The action of 1-nitroso-8-nitropyrene in *Escherichia coli*: DNA adduct formation and mutational consequences in the absence of nucleotide excision-repair. *Carcinogenesis*, **12**, 879-884.
- Lambert, I.B., Gordon, A.J.E., Chin, T.A., Bryant, D.W., Glickman, B.W. and McCalla, D.R. (1991) Mutations induced in the *lac I* gene of *E. coli* by 1-nitroso-

- 8-nitropyrene and furylfuramide: the influence of plasmid pKM101 and excision repair on the mutational spectrum. In: Howard, P.C. Hecht, S.S. and Beland, F.A., eds, *Nitroarenes: Occurrence, Metabolism, and Biological Impact*, New York, Plenum Press, pp. 167-180.
- Lechner, J.F., Haugen, A., McClendon, I.A., and Pettis, E.W. (1982) Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cell in a serum-free medium. *In Vitro*, **18**, 633-642.
- Lee, H., Wang, L., and Shih, J.F. (1995a) Mutagenicity of particulates from the laboratory combustion of plastics. *Mutat. Res.*, **346**, 135-144.
- Lee, H., and Shih, M-K. (1995b) Mutational specificity of 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline in the *hprt* locus of CHO-K1 cells. *Mol. Carcinogenesis*, **13**, 122-127.
- Lee, H., Lin, T-L, Shieh, R-L and Bian, SS (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., Cherng, S.H., and Liu, T.Y. (1994c) Bacterial mutagenicity, metabolism, and DNA adduct formation by binary mixtures of benzo[a]pyrene and 1-nitropyrene. *Environ. Mol. Mutagen.*, **24**, 229-234.
- Lee, H., Law, S.M., and Lin, S.T. (1991) The effect of extraction solvent on the mutagenicity of airborne particles. *Toxicol. Lett.*, **58**, 59-67.
- Lee, T.C., Ko, J.L. and Jan, K.Y. (1989) Differential cytotoxicity of sodium arsenite in human fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Toxicology*. **56**, 289-199.



- Li, A.P., and Dutcher, J.S. (1983) Mutagenicity of mono-, di- and tri-nitropyrenes in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.*, **139**, 115.
- Li, A. P., Clark, R.L., Hanson, R.L., Henderson, T.R., and Hobbs, C.H. (1982) *Environ. Mutagenesis*, **4**, 407.
- Liu, T.Y., Chao, T.W., Chiang, S.H., and Chi, C.W.,(1993) Differential sensitivity of human hepatoma cell line and primary rat hepatocytes culture to benzo[a]pyrene-induced unscheduled DNA synthesis and adduct formation. *Cell Biol. Inter.*,**17**, 441-447.
- Lofroth, G., Hefner, E., Alfheim, I., and Moller, M. (1980) Mutagenic activity in photocopies. *Science*, **209**, 1037.
- Lewtas, J., and Nishioka, M.G. (1990) Nitroarene: their detection, mutgenicity and occurrence in the environment. In: Nitroarenes occurrence, metabolism, and biological impact., Howard P.C., Hecht S.S. and Beland F.A. (eds), Plenum press, New York and London, pp. 61-71.
- Lukash, L.L., Boldt, J., Pegg, A.E., Dolan, M.E., Maher, V.M., and McCormick, J.J., (1991) Effect of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Mutat. Res.*, **250**, 397-409.
- Maeda, T., Izumi, K., Otsuka, H., Manabe, Y., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y. (1986) Induction of squamous cell carcinoma in the rat lung by 1,6- dinitropyrene, *J. Natl. Cancer Inst*, **76**, 693-701.
- Manjanatha, M.G., Newton, R.K., Mittelstaedt, R.A., Villani, G.R.D., Delclos, K.B. and Heflich, R.H. (1993) Molecular analysis of DNA adducts and hprt mutations produced by 6-nitrosochrysene in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, **14**, 1863-1870.

- Matsuoka, A., Sofuni, T., Miyata, N., and Ishidate, Jr .M. (1991) Clastogenicity of 1-nitropyrene, dinitropyrene, fluorene and mononitrofluorenes in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, **259**, 103-110.
- McCoy, E.C., Anders, M., Rosenkranz, H.S., and Mermelstein, R. (1985) Mutagenicity of nitropyrenes for *Escherichia coli*: requirement for increased cellular permeability. *Mutat. Res.*, **90**, 21.
- McGregor, W.G., Maher ,V.M., and McCormick, J.J. (1994) Kinds and locations of mutations induced in the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene of human T-lymphocytes by 1-nitrosopyrene including those caused by V(D) J recombinase. *Cancer Res.*, **54**, 4207-4213.
- Menck, H.R., Casagrande, J.T., and Henderson, B.E. (1974) Industrial air pollution: possible effect on lung cancer. *Science*, **183**, 210-212.
- Mermelstein, R., Kiriazides, D.K.,Butler, M., McCoy, E.C., and Rosenkranz, H.S., (1981) The extraordinary mutagenicity of nitropyrene in bacteria. *Mutat. Res.*, **89**, 187.
- Moller, M.E., and Thorgeirsson, S.S.(1985) DNA damage induced by nitropyrenes in primary mouse hepatocytes and in rat H4-II-E hepatoma cells. *Mutat. Res.*, **151**, 137-146.
- Nakano, H., Yamamoto, F., Neville, C., Evans, D., Mizuno, T., and Perucho,. M (1984) Isolation of transforming sequences of two human lung carcinomas: structural and functional analysis of the activated c-K-ras oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 71-75.
- Nakayasu, M., Sakamoto, H., Wakabayashi, K., Terada, M., Sugimura, T., and Rosenkranz, H.S. (1982) Potent mutagenic activity of nitropyrenes on Chinese hamster lung cells with diphtheria toxin resistance as a selective marker.

Carcinogenesis, **3**, 917.

- Neft, R.E., Roe, A.L., Smith, B.A., and Beland, F.A. (1993) Dinitropyrene metabolism, DNA adduct formation, and DNA amplification in an SV40-transformed Chinese hamster embryo cell line. *Mol. Carcinogenesis*, **7**, 221-227.
- Negishi, K., and Hao, W. (1992) Spectrum of mutations in single-stranded DNA phase M13mp2 exposed to sunlight : predominance of G-to-C transversion. *Carcinogenesis*, **13**, 1615-1618.
- Newton, R.K., Mittelstaadt, R.A., Manjanatha, M.G., and Heflich, R.H. (1992) DNA sequence analysis of 1-nitrosopyrene induced mutations in *hprt* gene of Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, **13**, 819-825.
- Norman, C.A., Lambert, I.B., Davison, L.M., Bryant, D.W., and McCalla, D.R. (1989) DNA adduct formation in primary rabbit tracheal epithelial cells following treatment with 1,8-dinitropyrene and its partially reduced derivative , 1-nitro-8-nitrosopyrene. *Carcinogenesis*, **10**, 1323-1327.
- Oda, Y., Yamazaki, H., Watanabe, M., Nohmi, T., and Shimada, T. (1993) Highly sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella yphimurium* NM3009 having high O-acetyltransferase and nitroreductase activities. *Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, 357-364.
- 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.
- Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., Tsutsui, H., Nishifuji, K., Otsuka, H., Maeda, T., Beland, F.A., Morotomi, M., and Mutai, M. (1985) Detection of nitropyrenes in complex mixtures and metabolism of 1-nitropyrene in germfree

and conventional rats, paper presented at U.S. Japan Environmental Panel Conf., Mutagenesis and Carcinogenesis by Nitropyrene and Cancer Chemotherapeutics, Shi-modu, Japan, January 8 to 10.

O'Neill, J. P., Brimer, P.A., Machanoff, R., Hirsch, G. P., and Hsie, A. W. (1977)

A quantitative assay of mutation induction at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system); development and definition of the system. *Mutat. Res.*, **45**, 91-101.

Osborne, M.R., Jacobs, S., Harvey, R.G., and Brookes, P. (1981) Minor products from the reaction of (+) or (-) benzo[a]pyrene-anti-diolepoxide with DNA. *Carcinogenesis*, **2**, 553-558.

Ohnishi, Y., Kinouchi, T., Manabe, Y., Tsutsui, H., Otsuka, H., Tokiwa, H., and Otofujii, T. (1985) Nitro compounds in environmental mixtures and foods. In Waters MD et al., (eds) "Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV." New York 195.

Pederson, T.C., and Siak, J.S. (1981) The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts, *J. Appl. Toxicol.*, **1**, 54.

Robbat, Jr.A., Corso, N.P., Doherty, P.J., and Wolf, M.H. (1986) Gas chromatographic chemiluminescent detection and evaluation of predictive models for identifying nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in a diesel fuel particulate extract. *Anal. Chem.*, **58**, 2078-2084.

Roscher, E., and Wiebel, F.J. (1992) Genotoxicity of 1,3- and 1,6-dinitropyrene: induction of micronuclei in a panel of mammalian test cell lines. *Mutat. Res.*, **278**, 11-17.

Rosenkranz, H.S., and Howard, P.C. (1986) Structure basis of the activity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. In Ishinishi N, Koizumi A, McClellan RO and

- Stober W (eds) "*Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust.*"
Amsterdam. 141-148.
- Rosenkranz, H.S., and Mermelstein, R. (1985) The genotoxicity, metabolism and carcinogenicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Sci. Health, C3*, 221-272.
- Rosenkranz, H.S., McCoy, E.C., Sanders, D.R., Butler, M., Kiriazides, D.K., and Mermelstein, R. (1980) Nitropyrenes:isolation, identification, and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners. *Science*, **209**,1039.
- Roy, A.K., El-Bayoumy, K. and Hecht, S.S. (1989) ³²P-postlabeling analysis of 1-nitropyrene-DNA adducts in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, **10**, 195-198.
- Saito, K., Mita, S., Kamataki, T., and Kato, R. (1984) DNA single-strand breaks by nitropyrenes and related compounds in Chinese hamster V79 cells. *Cancer Lett*, **24**, 121-127.
- Shimada, T., and Guengerich, F.P. (1990) Inactivation of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene by cytochrome P450 enzymes in human and rat liver microsomes. *Cancer Res.*, **50**, 2036-2043.
- Siak, J., Chan, T.L., Gibson, T.L., and Wolff, G.T. (1985) Contribution to bacterial mutagenicity from nitro-PAH compounds in ambient aerosols. *Atmos. Environ.*, **19**, 369-376.
- Silver, K.J., Eddy, E.P., McCoy, E.C., Rosenkranz, H.S., and Howard, P.C. (1994) Pathway for the mutagenesis of 1-nitropyrene and dinitropyrenes in the human hepatoma cell line HepG2. *Environ. Health. Persp.*, **102**, Suppl 6, 195-200.
- Skandalis (1992) Investigation of the mutagenic specificity of X-rays using a retroviral shuttle vector in CHO cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, **20**, 271-276.

- Smith, B.A., Beland, F.A., Fullerton, F., and Heflich, R.H. (1995) DNA adduct formation and T-lymphocyte mutation induction in F344 rats implanted with tumorigenic doses of 1,6-dinitropyrene. *Cancer Res.*, **55**, 2316-2324.
- Smith, B.A., Beland, F.A., Fullerton, F., and Heflich, R.H. (1994) Formation of DNA adducts and induction of mutations in rats treated with tumorigenic doses of 1,6-dinitropyrene. *Environ. Health Perspect* , **102**, 185-189.
- Stry (1992) Description of a new amplifiable shuttle vector for mutagenesis studies in human cells : application to N-methyl-N'-nitrosoguanidine-induced mutation spectrum. *Mutat. Res.*, **272**, 101-110.
- Straub, K.M., Meeham, T., Burlingame, A.L., and Calvin, M. (1977) Identification of major products formed by reaction of benzo[a]pyrene diol epoxide with DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5285-5289.
- Strauss, B.S. (1991) The ' A rule ' of mutagen specificity : a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions. *Bio. Assays.*, **13**, 79-84.
- Tahira, T., Hayashi, K., Ochiai, M., Tsuchida, N., Nagao, M., and Sugimura, T. (1986) Structure of the c-Ki-ras gene in a rat fibrosarcoma induced by 1,8-dinitropyrene. *Mol. Cell Biol.*, **6**, 1349-1351.
- Takahashi, M., Minamoto, T., Sugimura, T., and Esumi, H. (1993) High frequency and low specificity of ras gene mutations in rat Zymbal's gland tumors induced by IQ. *Carcinogenesis*, **14**, 1355-1357.
- Takayama, S., Ishikawa, T., Nakajima, H., and Sato, S. (1985) Lung carcinoma induction in Syrian golden hamsters by intratracheal instillation of 1,6-dinitropyrene. *Gann.*, **76**, 457-461.
- Tanabe, K., Matsushita, H., Kuo, C.T., and Imamiya, S. (1986) Determination of carcinogenic nitropyrenes in airborne particulates by high performance liquid

- chromatography (Jpn.). *Taiki. Osen. Gakkaishi.* (J. Jpn. Soc. Air Pollut.), **21**, 535-544.
- 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.
- 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., Otofujii, T., Horikawa, R., Kitamori, S., Otsuka, H., Manabe, T., Kinouchi, T., and Ohnishi, Y. (1984) 1,6-Dinitropyrene: mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in BALB/c mice, *J.Natl.Cancer Inst.*, **73**, 1359.
- Tokiwa, H., Kitamori, S., Nakagawa, R., Horikawa, R., and Matamala, L.(1983) Demonstration of a powerful mutagenic dinitropyrene in airborne particulate matter. *Mutat. Res.*, **121**, 107-116.
- Tokiwa, H., Nakagawa, R., and Ohnishi, Y. (1981) Mutagenic assay of aromatic nitro compounds with *Salmonella typhimurium* . *Mutat. Res.*, **91**, 321.
- Varmus, H.E. (1984) The molecular genetics of cellular oncogene. *Annu Rev. Genet.*, **18**, 553-612.
- Watanabe, M., and Ohta, T. (1993) Analysis of mutational specificity induced by heterocyclic amines in the *lac Z* gene of *Escherichia coli*. *Carcinogenesis*, **14**, 1149-1153.
- Watanabe, M., Nohmi, T., and Ishidate, M. (1990) Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.*, **234**, 337-348.
- Wei, S.J.C., Chang, R.L., Hennig, E., Cui, X.X., Merkler, K.A., Wong, C.Q., Yagi,

- H., Jerina, D.M., and Conney, A.H. (1994) Mutagenic selectivity at the HPRT locus in V-79 cells : comparison of mutations caused by bay-region benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide enantiomers with high and low carcinogenic activity. *Carcinogenesis*, **15**, 1729-1735.
- Wiebel, F.J., Kiefer, F., and Cumpelik, O. (1992) Expression of monomorphic and polymorphic acetyltransferase in V79 cells differing in sensitivity to 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP) . *Cancer Res.*, **33**, 20-23.
- Yang, J. L., Chen, R. H., Maher, V. M., and McCormick, J. J. (1991) Kinds of location of mutations induced by (\pm)-7 β -8- α -dihydroxy-9 α , 10- α -epoxy-7,8,9,10,-tetrahydrobenzo[a]pyrene in the coding region of the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase gene in diploid human fibroblasts. *Carcinogenesis*, **12**, 71-75.
- Yang, J. L., Maher, V. M., and McCormick, J. J. (1989) Amplification and direct nucleotide sequencing of cDNA from the lysate of low numbers of diploid human cells. *Gene*, **83**, 347-354.
- Yang, J. L., Maher, V. M., and McCormick, J. J. (1988) Kinds and spectrum of mutations induced by 1-nitrosopyrene adducts during plasmid replication in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3364-3372.
- Yang, J. L., Maher, V. M., and McCormick, J. J. (1987) Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of (\pm)-7 β -8- α -dihydroxy-9 α , 10- α -epoxy-7,8,9,10,-tetrahydrobenzo[a]pyrene replicates in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 3787-3791.

Table 1. The amounts of 1,6-dinitropyrene in atmospheric particulates from different countries.

Sample source	Concentration		Reference
	Particulate extract (mg / kg)	Atmosphere (pg / m ³)	
Tokyo, Japan	0.0047-0.105	0.33-8.74	Tanabe et al. (1986)
Taipei, Taiwan	0.20		Chou and Lee (1990)
Taichung, Taiwan	1.02		Lee et al. (1991)
Kaoshiung, Taiwan		1-20	Lee et al. (1994a)
Chierding, Taiwan		270-4900	Lee et al. (1994b)
Bermuda (remote)			Gibson (1986)
Summer	0.0081	0.15	
Winter	0.0083	0.12	
Delaware, USA (rural)			Gibson (1986)
Summer	0.0049	0.12	
Warren, MI, USA (suburban)			Gibson (1986)
Winter	<0.006	0.15	
Summer	0.0046	0.30	
Detroit, MI, USA (urban)	0.0036	0.48	Gibson (1986)
Summer			
River Rouge, MI, USA (industrial)			Gibson (1986)
Summer	0.046	4.44	
Dearborn, MI, USA (industrial)			Gibson (1986)
Summer	0.041	7.50	
Southeast, MI, USA			Siak et al.(1985)
Summer	0.31	0.026	
Santiago, Chile (urban)	0.20	—	Tokiwa et al. (1983)

Table 2. The Mutagenicity of 1,6-DNP in the strains of *Salmonella typhimurium* .

Tested strains	Revertants / nmol
TA98	174,842
TA100	21,616
TA98NR	95,931
TA98/1,8-DNP6	32,670
TA1537	22,392
TA1538	11,928

Tokiwa et al., 1981, 1984; Rosenkranz et al., 1980;
Mermelstein et al., 1981; Pederson et al., 1981.

Table 3. The mutagenicity and chromosome damages of 1,6-DNP in culture mammalian cells.

Dose (μM)	Cell lines	Mutants or chromosome damages	Genotoxic type
0.7	CHO ^a	17	Mutants/ 10^6 survivors
1.0	CHL ^b	210	Diphtheria toxin-resistant mutants/ 10^6 survivors
0.03	CHL ^c	55%	Chromosomal aberration
0.4	RL4 ^d	64%	Chromatid aberration
0.4	RL4 ^d	10%	Chromosomal aberration
5-20	hepatocytes ^e	—	Single-strand DNA breaks
15	V79 ^f	17%	Single-strand DNA breaks

^aChinese hamster ovary cells. Li et al., 1983

^bChinese hamster lung fibroblast. Nakayasu et al., 1982

^cChinese hamster lung fibroblast. Matsuoka et al., 1991

^dRat epithelial RL4. Danford et al., 1982

^ePrimary mouse hepatocytes. Moller et al., 1985

^fChinese hamster V79 cells. Saito et al., 1984

Table 4. The tumorigenicity of 1,6-DNP in various strains of animals treated by different route.

Strain of animal	Route*	Total Dose (mg)	Incidence of tumors (%)	Histological features	Ref.
Male F344/ DuCrj rat	S.c.	4	100	Sarcoma	Ohgaki et al., 1985
Male BALB/ c mouse	S.c.	2	50	Malignant fibrous histiocyoma	Tokiwa et al., 1984
Female newborn CD rat	S.c.	1.8	100	Malignant fibrous histiocyoma	Imaida et al., 1995
Male F344/ DuCrj rat	Lung	0.15	82	Squamous cell carcinoma (75%) and undifferentiated carcinoma (7%)	Ohnishi et al., 1985
Female weanling CD rat	I.p.	4.7	64	Malignant fibrous histiocyoma	King et al., 1988
Female Syrian golden hamster	I.i.	13	95	Lung adenocarcinoma	Takayama et al., 1985

*S.c.= Subcutaneous; I.p.= Intraperitoneal; I.i.= Intratracheal instillation

Table 5. Summary of the base substitution mutations in HPRT induced by various polycyclic aromatic hydrocarbons and their active metabolite.

Chemicals	Cell lines	Mutation types	Frequency (%)	Reference
1,6-DNP	CHO-K1	A→C	28	present work
		G→C	28	
		A→G	22	
		G→T	11	
		A→T	6	
		G→A	6	
6-NOC	CHO-K1	A→T	56	Manjantha et al., 1993
		A→G	22	
		G→A	11	
		G→T	6	
6-AC	CHO-K1	G→T	71	Delclos et al., 1993
		G→C	18	
		G→A	6	
		A→T	6	
1-NOP	T-lymphocyte, human	G→A	41	McGregor et al., 1994
		G→T	32	
		G→C	9	
		A→T	9	
		A→G	4.5	
		A→G	4.5	
1-NOP	CHO-K1	G→T	54	Newton et al., 1992
		G→A	38	

Table 5. (Continued)

(+)BPDE V79				Wei et al., 1994
low dose		G→T	42	
		A→C	25	
		G→C	14	
		G→A	8	
		A→G	7	
		A→T	4	
high dose		G→T	72	
		G→C	20	
		G→A	5	
		A→T	2	
		A→C	1	
BPDE	fibroblast,	G→T	60	Yang et al., 1991
	human	G→A	19	
CPP	MCL-5	G→T	30	Keohavong et al., 1995
		A→T	30	
		G→A	20	
		A→G	10	
		G→C	10	

1,6-DNP : 1,6-Dinitropyrene

6-NC : 6-Nitrosochrysene

6-AC : 6-aminochrysene

1-NOP : 1-Nitrosopyrene

BPDE : Benzo[a]pyrene diolepoxide

CPP : Cyclopenta[cd]pyrene

Table 6. Summary of the base substitution mutations in HPRT induced by alkylating agents.

Chemical	Cell lines	Mutation	Frequency (%)	Reference
ENU	T-lymphocyte, rat spleen	A→T	47	Jansen et al., 1995
		A→G	27	
		G→A	17	
		A→C	7	
		G→T	3	
EMS	T-lymphocyte, rat spleen	G→A	79	Jansen et al., 1995
		A→T	16	
		A→G	5	
HOENU	T-lymphocyte, rat spleen	A→T	53	Jansen et al., 1995
		G→A	21	
		A→C	16	
		A→G	11	
MMS	RJKO hamster fibroblast	G→A	89	Klungland et al., 1995
		A→G	10	
		A→C	2	

ENU : N-ethyl-N-nitrosourea

EMS : Ethylmethanesulfonate

HOENU : N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea

MMS : Methanesulfonate

Table 7. Characteristics of cell lines used in this study.

Cell Lines	Sex	Countries or Species	p53 status	Morphology	Characteristics
MRC-5	male	English	normal	fibroblast-like	diploid normal lung cells
WI-38	female	Caucasian	normal	fibroblast-like	diploid normal lung cells
A-427	male	Caucasian	normal	epithelial-like	lung adenocarcinoma
CaLu-1	male	Caucasian	defect	epithelial-like	lung epidermoid carcinoma grade III metastasis to pleura
CL-3	—	Chinese	normal	epithelial-like	lung adenocarcinoma
CL1-0	—	Chinese	mutant	epithelial-like	lung adenocarcinoma
CL1-2	—	Chinese	mutant	epithelial-like	lung adenocarcinoma
V79	male	Chinese hamster	normal	fibroblast-like	lung
CHO-K1	female	Chinese hamster	normal	epithelial-like	ovary

Table 8. The DNA-adduct levels of 1,6-DNP in mammalian cells tested in this study.

Cell type	DNA adduct levels / 10^8 nucleotides			
	1	2	3	total
MRC-5	5.26	15.26	5.85	26.37
WI-38	1.87	5.18	1.67	8.72
A-427	0.56	1.02	0.98	2.56
V79	6.08	4.63	4.81	15.52
CHO-K1	3.04	ND	1.96	5.00
CaLu-1	ND	ND	ND	ND
CL-3	ND	ND	ND	ND
CL1-0	ND	ND	ND	ND
CL1-2	ND	ND	ND	ND

The nine kinds of cell lines were separately treated with $34.2 \mu\text{M}$ 1,6-DNP for 24h and then the DNA was extracted for the detect DNA adduct levels.

ND : not detected.

Table 9. The cytotoxicity of 1,6-DNP in CHO-K1 cells.

Concentration (μM)	Colony number	Survival (%)*
0	217 \pm 39	100.0
0.17	191 \pm 48	88.0
1.71	202 \pm 30	93.1
3.42	198 \pm 29	91.2
17.10	204 \pm 30	94.0

The cytotoxicity data are averaged from four independent experiments for each dose and the colony number values are mean \pm SD.

*Relative cell survival (%)=(the number of survival colonies in the present of 1,6-DNP)/(the number of survival colonies in the absence of 1,6-DNP) \times 100.

Table 10. The mutagenicity of 1,6-DNP in CHO-K1 cells.

Concentration (μM)	6-Thioguanine-resistant cells / 10^6 plated cells	Mutant frequency* (%)
0	2	0.9
0.17	31	14.0
1.71	6	2.7
3.42	25	11.2
17.10	26	12.9

The mutagenicity data are averaged from four independent experiments for each dose.

*Mutant frequency (%) = (the number of mutant colonies)/(the cells of plating efficiency) \times 100.

Table 11. Kinds and locations of mutations observed in the coding region of the *hprt* gene in mutants derived from 1,6 DNP-treated Chinese Hamster Ovary K1 cells.

Mutant	Position	Exon	Type of mutation	Surrounding ^a sequence	Amino acid change
Base substitution (18 mutants)					
DNP-1	124	2	A:T → C:G	GTG <u>A</u> TT ATG	Ile → Leu
DNP-2 ^b	306	3	G:C → T:A	AGA CT <u>G</u> AAG	Leu → Leu
DNP-3	357	4	G:C → C:G	GGT G <u>G</u> G GAT	Gly → Gly
DNP-4	392	5	T:A → C:G	GTC T <u>T</u> G ATT	Leu → Ser
DNP-5	392	5	T:A → C:G	GTC T <u>T</u> G ATT	Leu → Ser
DNP-6	400	5	G:C → A:T	GTT <u>G</u> AG GAC	Gly → Lys
DNP-7	439	6	C:G → G:C	CTG <u>C</u> TT TCC	Leu → Val
DNP-8	442	6	T:A → G:C	CTT <u>T</u> CC CTG	Ser → Ala
DNP-9	442	6	T:A → G:C	CTT <u>T</u> CC CTG	Ser → Ala
DNP-10	442	6	T:A → G:C	CTT <u>T</u> CC CTG	Ser → Ala
DNP-11	464	6	C:G → G:C	AAC <u>C</u> CC AAA	Pro → Arg
DNP-12 ^b	488	7	T:A → G:C	AGC T <u>T</u> G CTG	Leu → Trp
DNP-13	491	7	T:A → A:T	TTG <u>C</u> TG GTG	Leu → Gln
DNP-14	497	7	A:T → G:C	GTG <u>A</u> AA AGG	Lys → Arg
DNP-15	497	7	A:T → G:C	GTG <u>A</u> AA AGG	Lys → Arg
DNP-16	568	8	G:C → C:G	TGT T <u>G</u> G ATA	Trp → Ser
DNP-17	568	8	G:C → C:G	TGT T <u>G</u> G ATA	Trp → Ser
DNP-18	634	9	G:C → T:A	ACT <u>G</u> GG AAA	Gly → Trp
Splice site mutation (4 mutants)					
DNP-19	28-134	2	delete 107 bp		
DNP-20	319-384	4	delete 66 bp		
DNP-21	319-384	4	delete 66 bp		
DNP-22	319-384	4	delete 66 bp		
Deletion (2 mutants)					
DNP-23	465	6	AAC <u>C</u> CC AAA		
DNP-24	577	8	GCC <u>C</u> TT GAC		

^a This refers to the sequence of the coding strand (non-transcribed strand).

^b This mutant contained two types of base-substitution mutation. The latter was a silent mutation.

Table 12. Summary of mutations observed in the coding region of the *hprt* gene in mutants derived from 1,6-DNP treated CHO-K1 cells.

Types of mutation	No. of mutations	%
Base substitution	18	78
Transversion	13	57
A:T → C:G	5	22
G:C → C:G	5	22
G:C → T:A	2	9
A:T → T:A	1	4
Transition	5	22
A:T → G:C	4	17
G:C → A:T	1	4
Splice-site mutation	4	17
Deletion	2	9
Total	23	--*

* Total percentage is not given because the categories of mutations overlap and so the sum of the percentages is not 100%.

Table 13. The base substitution mutations occurring at oncogenes in various cancers.

cancer	oncogene	mutation	reference
Gastric adenoma	<i>K-ras</i>	G→T	Toshimasa et al., 1991
Adenocarcinoma	<i>K-ras</i>	G→T, G→A	
HB ^a	<i>N-ras</i>	A→T	Hsu et al., 1993
Lung adenocarcinoma	<i>K-ras</i>	G→T, G→C G→A	Robert et al., 1991
Hamster lung tumor	<i>K-ras</i>	G→A, A→G	Victor et al., 1993
Glastic adenocarcinoma ^b	<i>N-ras</i>	G→T	Ishikawa et al., 1987
Zymbal gland tumors ^c	<i>H-ras</i>	G→T, G→C G→A, A→T	Takahashi, 1993

^aHB: hepatoblastoma.

^bGastric adenocarcinoma: Glu-P-2 induced tumor.

^cZymbal's gland tumors: IQ induced tumor.

Table 14. Nature of p53 gene base substitution occurring in various cancers.

Cancer location	Total mutations	Mutations at G:C			Transition at CpG	Mutation at A:T			Reference
		→A:T	→T:A	→C:G		→T:A	→G:C	→C:G	
Lung:SCLC ⁼	13	6(46)*	2(15)	2(15)	4(31)	1(8)	0(0)	2(15)	(a,b,e,v)
non-SCLC ⁼	30	6(20)	17(57)+	4(13)	3(10)	2(7)	1(3)	0(0)	(a,b,c,e,q,v)
Breast	31	13(40)	7(23)	6(20)	4(13)	0(0)	3(10)	2(6)	(b,g,n,o,p)
Colon	39	31(79)+	0(0)	1(3)	26(67)+	1(3)	6(15)	0(0)	(b,c,k,l)
Esophagus	37	16(43)	9(24)	0(0)	7(19)	5(14)	4(11)	3(8)	(s,t,w,y)
Liver	19	3(16)	14(74)+	1(5)	0(0)+	0(0)	1(5)	0(0)	(j,m,z)
Bladder	15	7(47)	2(13)	3(20)	5(33)	0(0)	2(13)	1(7)	(q)
Ovary	11	4(36)	1(9)	3(27)	0(0)	0(0)	1(9)	2(18)	(o)
Sarcoma	12	8(66)	2(17)	2(17)	7(53)	0(0)	0(0)	0(0)	(b,h,i,q,r,x)
Brain	20	15(75)	1(5)	1(5)	9(45)	0(0)	3(15)	0(0)	(b,q,#)
All solid tumor	227	109(48)	55(24)	23(10)	65(29)	9(4)	21(9)	10(4)	
Lymphomas and leukemias	53	30(57)	2(4)+	2(4)	25(47)+	3(6)	10(19)	6(11)	(f,u)
All tumors	280	139(50)	57(20)	25(9)	90(32)	12(4)	31(11)	16(6)	

*Numbers in parentheses are percentage of mutations. ⁼SCLC: small cell lung cancer.

+The difference between this value and corresponding number for all other solid tumors grouped together is significant (χ^2 , $p < 0.01$).

a:Takahashi et al. (1985) b:Nigro et al. (1989) c:Baker et al. (1990) d:Chiba et al. (1990)
 e:Lehman et al., Cancer Res. f:Gaidano et al., PNAS. g:Prosser et al. (1990)
 h:Mulligan et al. (1990) i:Menon et al., *ibid.*, p.5435. j:Bressac et al. (1991)
 k:Malkin et al. (1990) l:Baker et al. (1989) m:Murakami and Sekiya, personal communication.
 n:Bartek et al. (1990) o:Prosser, personal communication. p:Theillet, personal communication.
 q:Vogelstein, unpublished data. r:Lane, personal communication. s:Bennett et al., unpublished data.
 t:Chang, personal communication. u:Cheng et al. (1990) v:Minna, personal communication.
 w:Casson et al. (1991) x:Romano et al. (1990) y:Hollestein et al. (1990)
 z:Hsu et al. (1991) #:Mashiyama et al., *ibid.*

Table 15. Types of gene mutations derived from 1,6-DNP-treated CHO-K1 and 293 Cells.

Types of mutation	Number of mutation	
	1,6-DNP (%) ^a CHO K1	1,6-DNP (%) ^b 293
Base substitution		
Transversion		
G:C →T:A	2	52
G:C →C:G	5	10
A:T →C:G	5	0
A:T →T:A	1	1
Transition		
G:C →A:T	1	15
A:T →G:C	4	2
Total	18 (75)	81 (79)
Insertion	0	2 (2)
Deletion	2 (8)	19 (19)
Splicing error	4 (17)	0

^aPresent study.

^bBoldt et al. (1991).

Table 16. Comparison of the kinds of mutation occurred in supF during replication of carcinogen-treated plasmid in human cells and *hprt* gene with 6-TG assay.

Chemical	Mutation types	Shuttle vector		HPRT	
		Cell line	Frequency (%)	Cell line	Frequency (%)
1,6-DNP	base substitutions	293 ^a	74	CHO-K1 ^b	75
	splicing error		0		17
	deletions		19		8
	insertions		2		0
IQ	base substitutions	GM0637 ^c	93	CHO-K1 ^d	57
	splicing error		0		52
	deletions		7		4
	insertions		0		0
1-NOP	base substitutions	293 ^e	85	CHO-K1 ^f	62
	splicing error		0		57
	deletions		10		5
	insertions		5		10

Table 16. (continued)

BPDE	base substitutions	293 ^g	70	diploid ^h	93
	splicing error		0	human	0
	deletions		24	fibroblasts	7
	insertions		6		0
MNNG	base substitutions	293 ⁱ	75	SL68 ^j	81
	splicing error		16		13
	deletions		6		3
	insertions		3		3
X-ray	base substitutions	CHO ^k	67	CHO ^l	0
	splicing error		0		63
	deletions		19		10
	insertions		14		2

^a present work

^c Lee et al. (1995b)

^e Yang et al. (1988)

^g Yang et al. (1987)

ⁱ Stary et al. (1992)

^k Skandalis et al. (1992)

^b Boldt et al. (1991)

^d Endo et al. (1994)

^f Newton et al. (1992)

^h Yang et al. (1991)

^j Lukash et al. (1991)

^l Fuscoe et al. (1992)

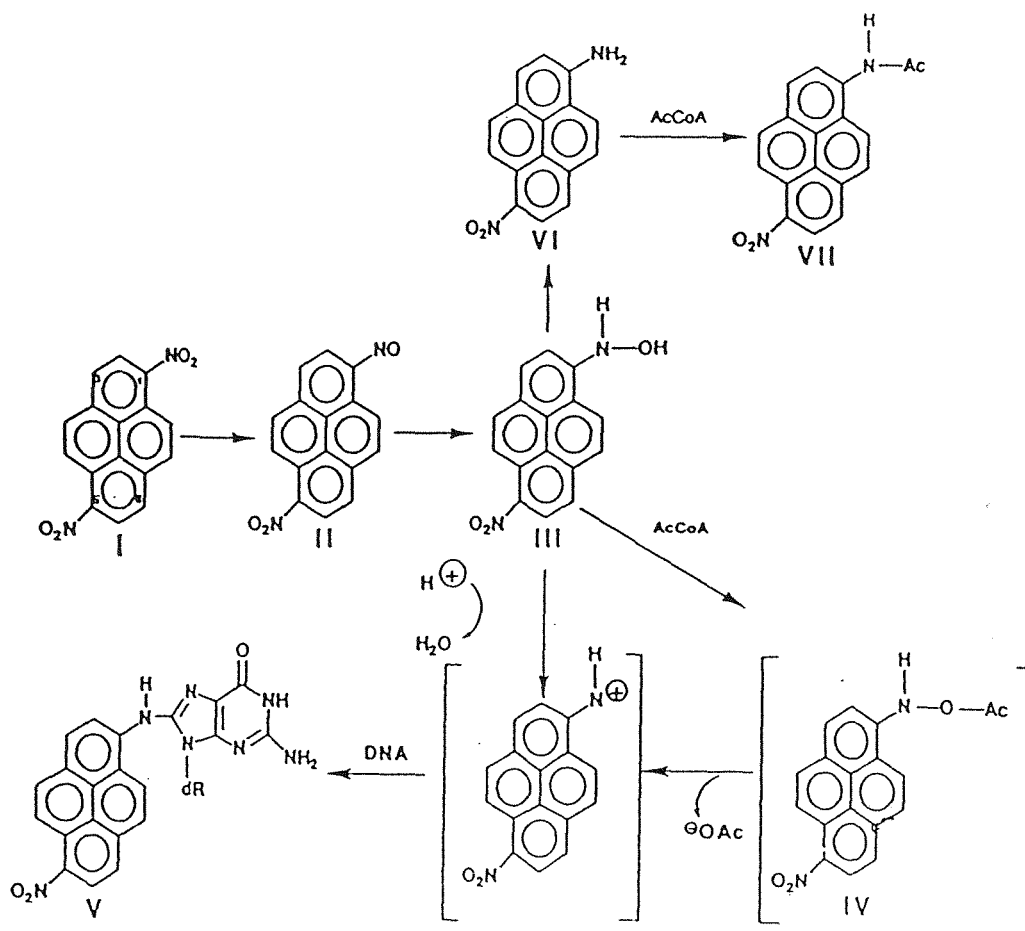


Fig. 1 Proposed mechanism for metabolic pathways of 1,6-dinitropyrene to DNA-binding species. 1,6-dinitropyrene (I) undergoes sequential reduction to 1-nitroso-6-nitropyrene (II) and N-hydroxy-1-amino-6-nitropyrene (III). The N-hydroxy intermediate can react directly with DNA or undergo further activation by O-acetylation to N-acetoxy-1-amino-6-nitropyrene (IV). Reaction of the N-hydroxy or N-acetoxy intermediates with DNA yields N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene (V). The N-hydroxy intermediate can also be further reduced to 1-amino-6-nitropyrene (VI) and acetylated to 1-acetylamino-6-nitropyrene (VII).

Cells (2×10^6 / 10 cm dish) treated with $34.2 \mu\text{M}$ 1,6-DNP
incubated at 37°C for 24 h



DNA was isolated by phenol extraction / enzyme digestion



$5 \mu\text{g}$ micrococcal endonuclease, $5 \mu\text{g}$ spleen phosphodiesterase and
 $10 \mu\text{g}$ DNA incubated at 37°C for 4 h



1-Butanol extraction (100 mM ammonium formate, pH 3.5
and 10 mM tetrabutyl ammonium chloride)



^{32}P -postlabeling (5 units T4 polynucleotide kinase and
 $10 \mu\text{Ci}$ [$r\text{-}^{32}\text{P}$]-dATP)



Development by PEI-cellulose TLC plate

mobile phase:

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 : 8.0 M urea : 0.5 M Tris-HCl, pH 8.0

D5 : 0.9 M sodium phosphate, pH 6.8



$\text{RAL} = \text{cpm in adducts} / \text{cpm in total nucleotides} / \text{diluted factor}$

Fig. 2 The protocol of ^{32}P -postlabeling for 1,6-DNP-DNA adduct
analysis.

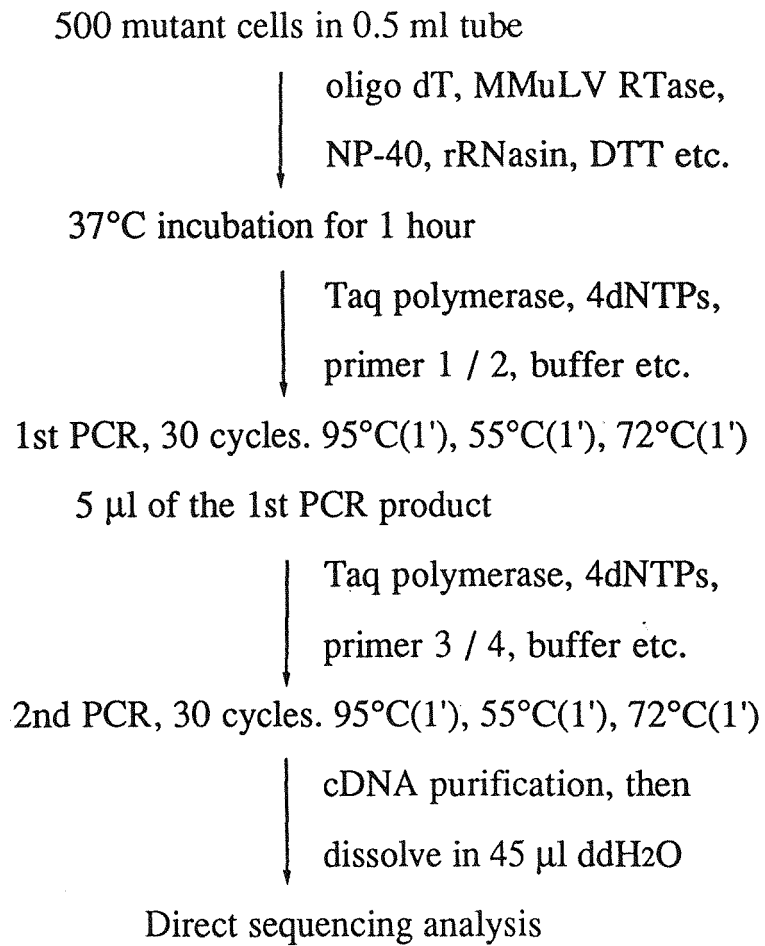
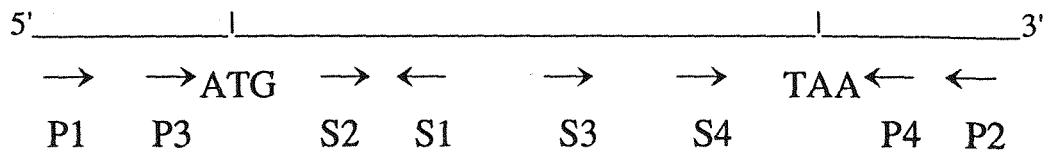


Fig. 4 The RT-PCR protocol for HPRT cDNA.

HPRT cDNA



PCR primers:

P1 : ₋₆₈CTCGGCGCCTCCTCTGCGGG₋₄₉

P2 : ₇₂₁GGTAATTTTACTGGGAACAT₇₀₂

P3 : ₋₄₄CTCCTCACACCGCTCTTCGC₋₂₅

P4 : ₆₉₃CTCCTCGTGTTTGCAGATTC₆₇₄

DNA sequencing primers:

S1 : ₂₈₃TGGGAATGGATCT₂₇₁

S2 : ₁₈₂ACATTGTGGCCCT₁₉₄

S3 : ₃₄₉ATTGGTGGGGATG₃₆₁

S4 : ₄₉₇AAAGGACCTCTCG₅₀₉

Fig. 5 Sequence and location of primers used in PCR amplification and DNA sequencing of the coding region on the HPRT gene /CHO. The sequence is shown to be the direction from 5' to 3'.

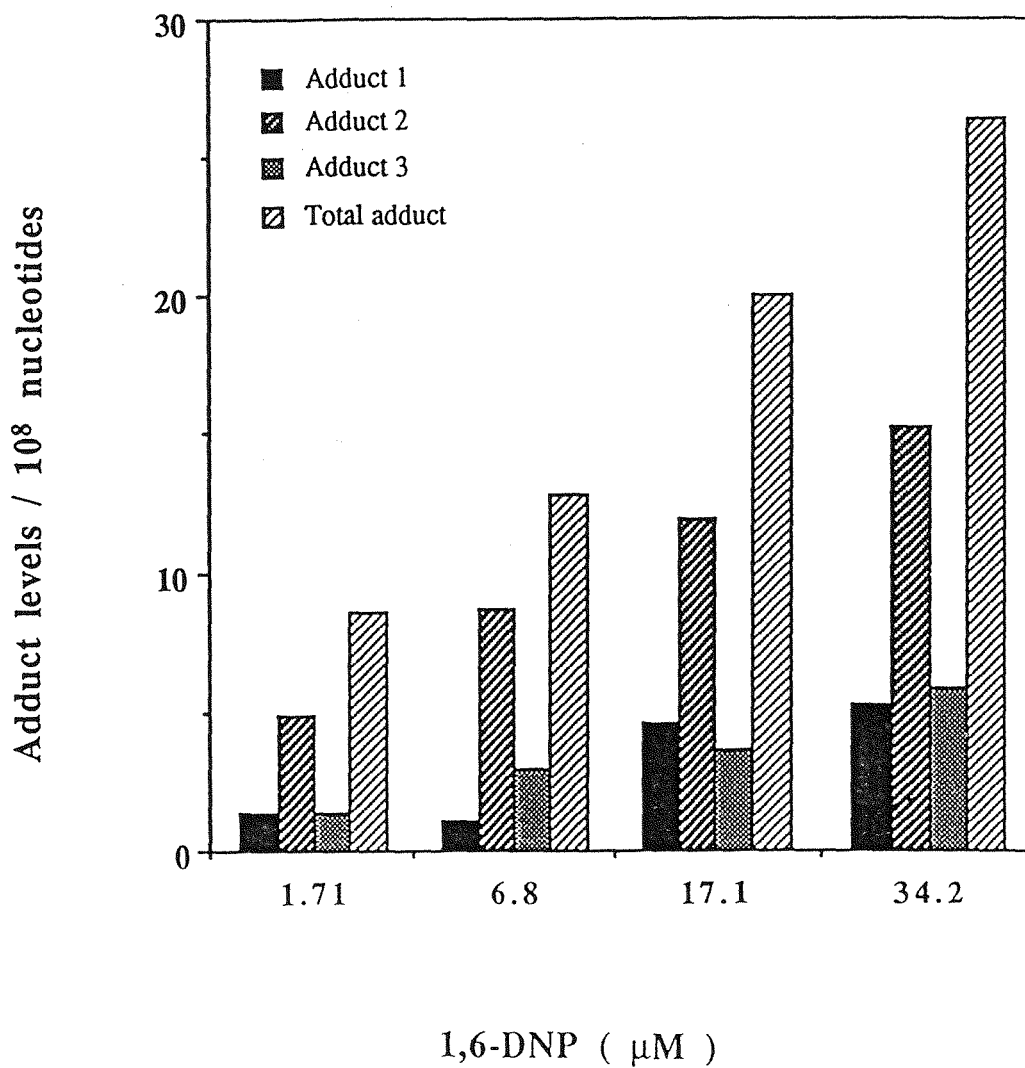


Fig. 6 Dose responses for 1,6-DNP-DNA adducts formation treated with different concentrations of 1,6-DNP in MRC-5 cells.

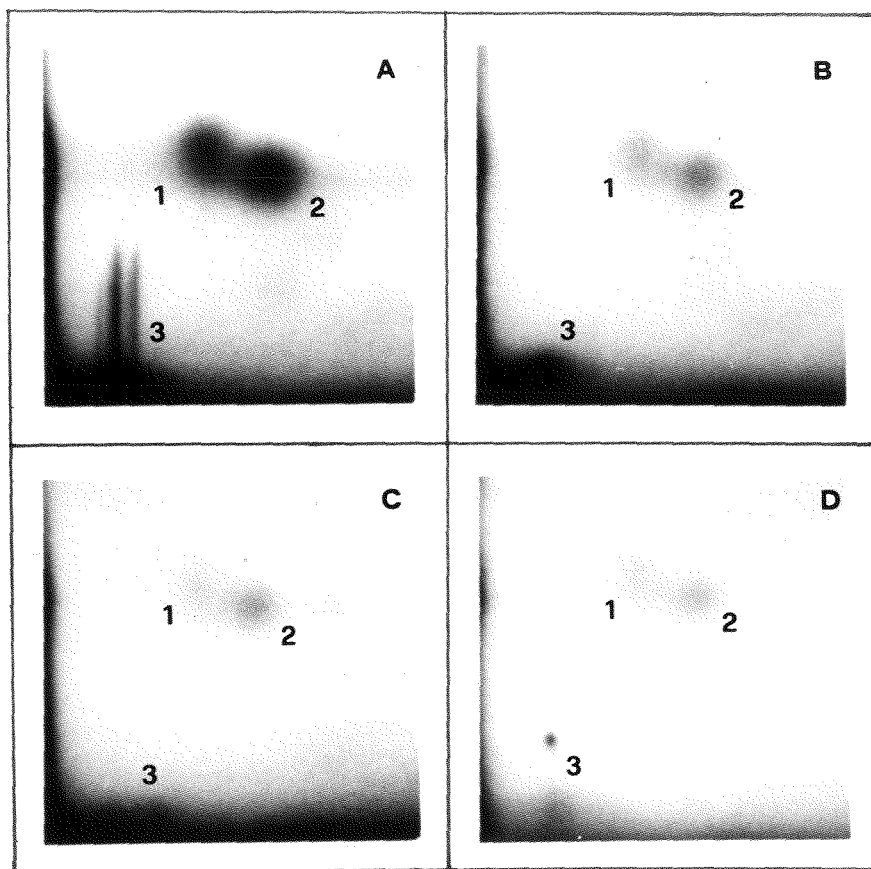


Fig. 7 ^{32}P -postlabeling analysis of 1,6-DNP-DNA adducts formed in MRC-5 cell line exposed to different concentrations of 1,6-DNP. The DNA adducts were enriched with 1-butanol and then were chromatographed on PEI-cellulose plates. The chromatographic origin is at the lower left corner of the films. Films were exposed at -80°C for 3 days. (A) $34.2\ \mu\text{M}$ 1,6-DNP, (B) $17.1\ \mu\text{M}$ 1,6-DNP, (C) $6.8\ \mu\text{M}$ 1,6-DNP, and (D) $1.71\ \mu\text{M}$ 1,6-DNP.

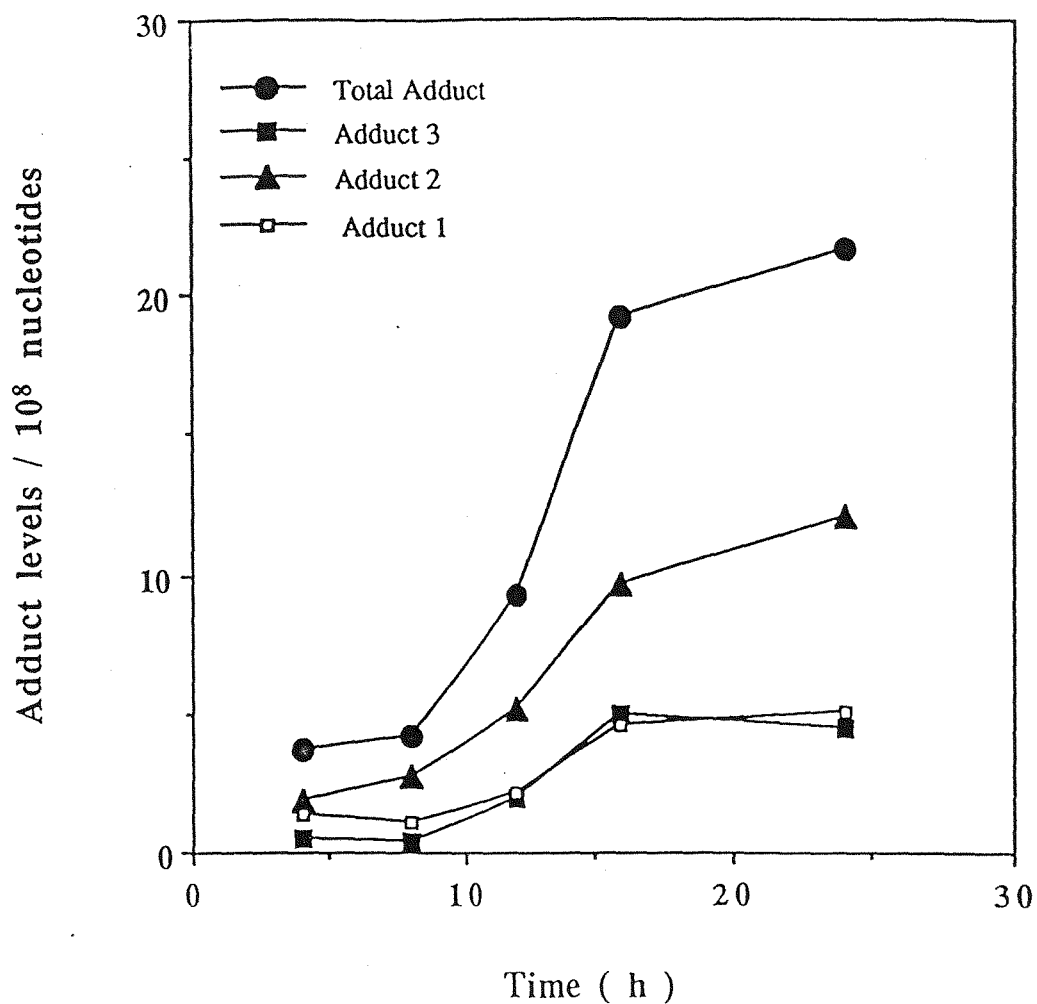


Fig. 8 The DNA adduct levels of 1,6-DNP in MRC-5 cells treated with 34.2 μM 1,6-DNP for different times.

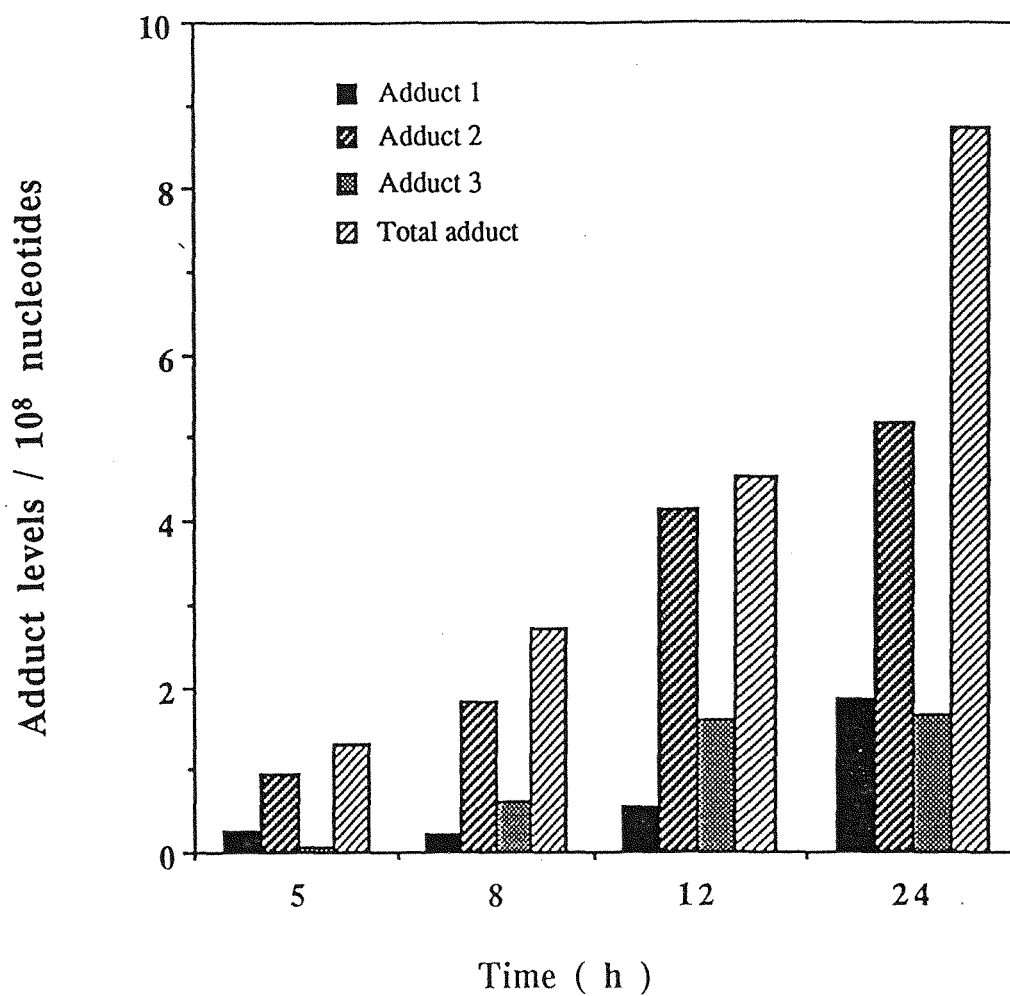


Fig. 9 The DNA adduct levels of 1,6-DNP in WI-38 cells treated with 34.2 μ M 1,6-DNP for different times.

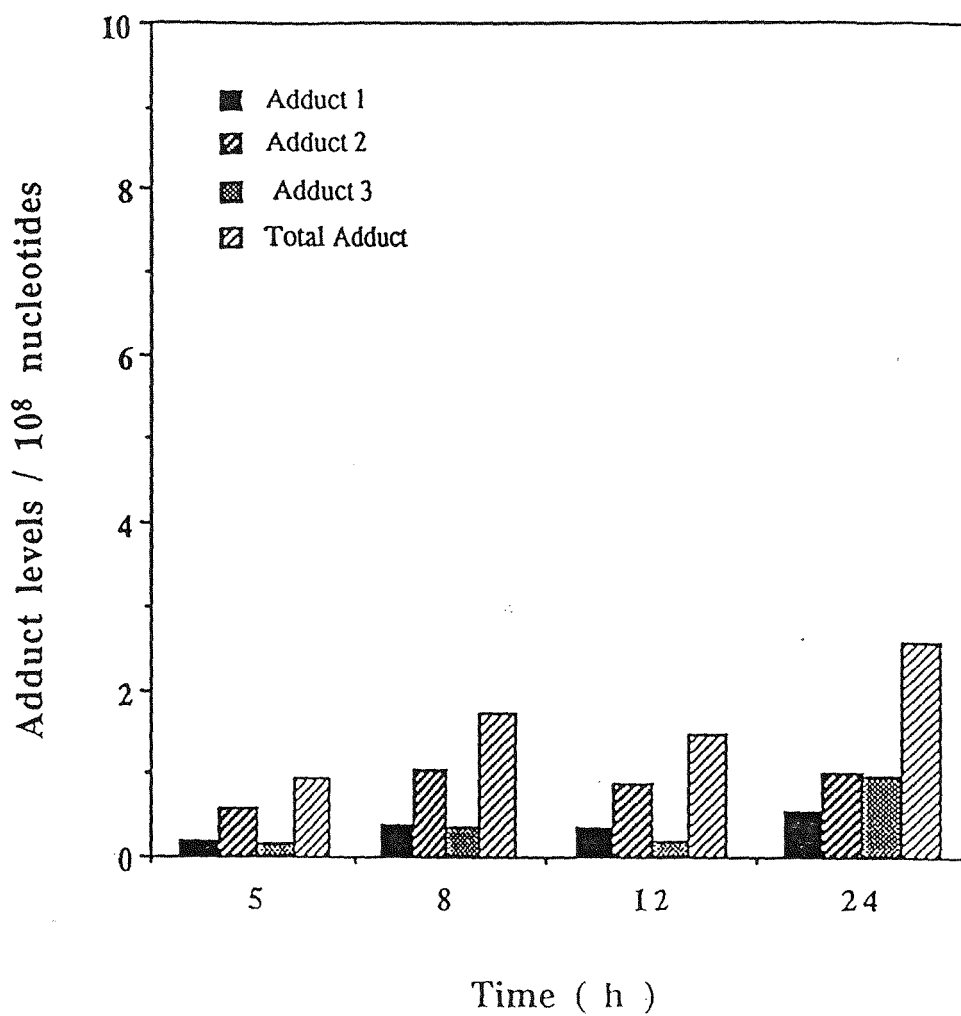


Fig. 10 The DNA adduct levels of 1,6-DNP in A-427 cells treated with 34.2 μ M 1,6-DNP for different times.

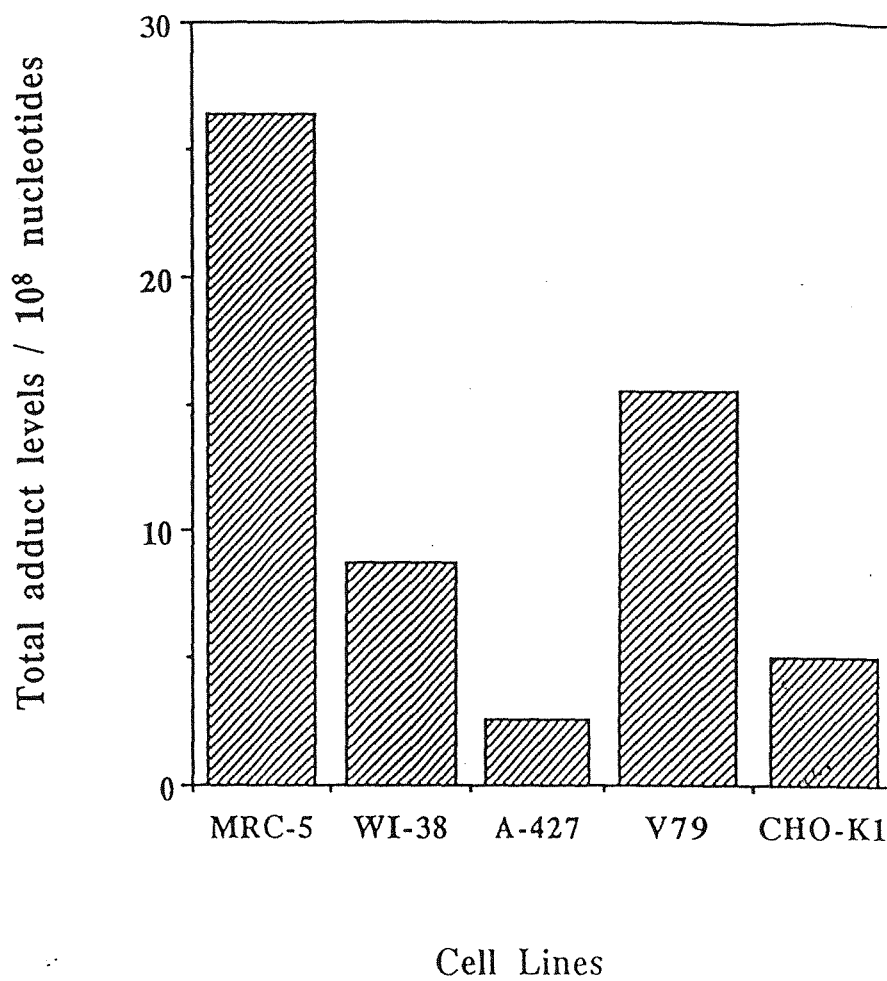


Fig. 11 The DNA adduct levels of 1,6-DNP in different cell lines treated with 34.2 μ M 1,6-DNP for 24h.

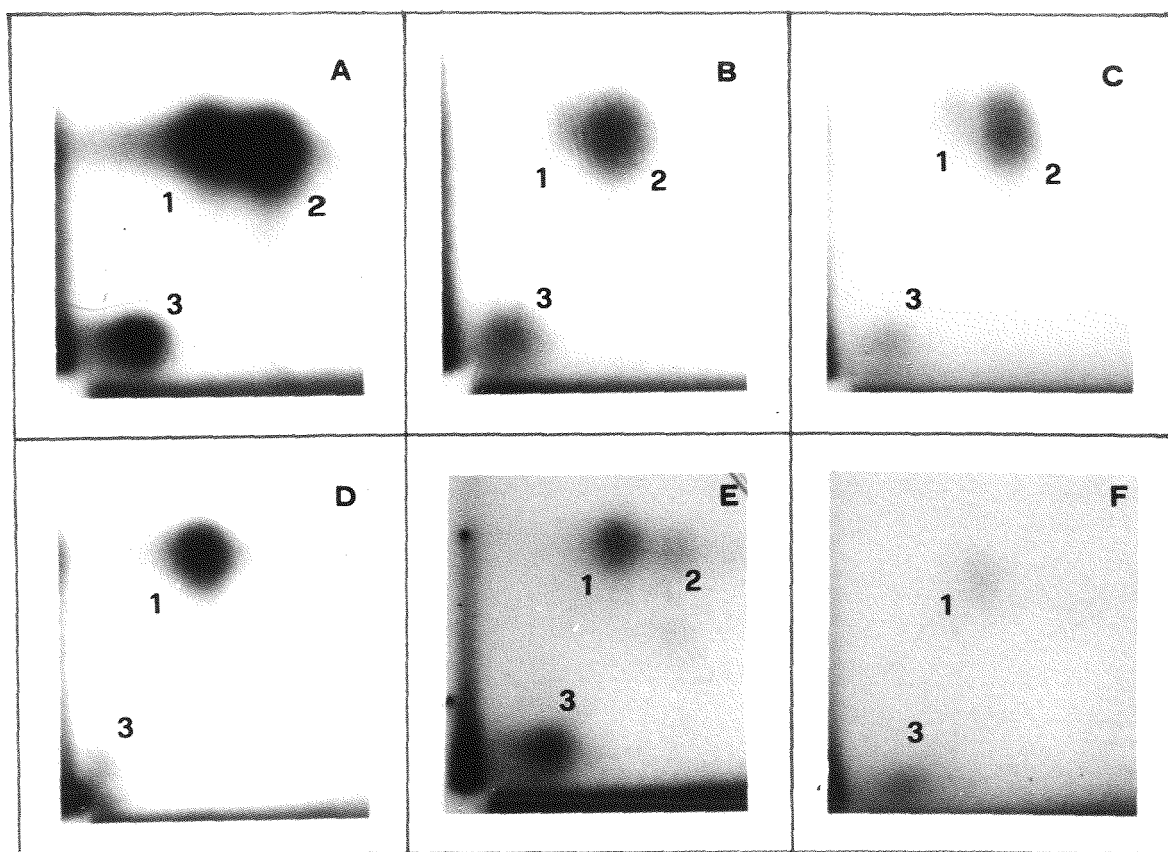


Fig. 12 ^{32}P -postlabeling analysis of 1,6-DNP-DNA adducts formed in different cell lines exposed to $34.2 \mu\text{M}$ 1,6-DNP. The DNA adducts were enriched with 1-butanol and then were chromatographed on PEI-cellulose plates. The chromatographic origin is at the lower left corner of the films. Films were exposed at -80°C for 1 day (D), 3 days (A and E), and 4 days (B, C, and F). MRC-5 (A), WI-38 (B), A-427 (C), 1,6-DNP-DNA adducts in calf thymus DNA (suspected to be DNA standard modified with N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene) (D), V79 (E), and CHO-K1 (F).

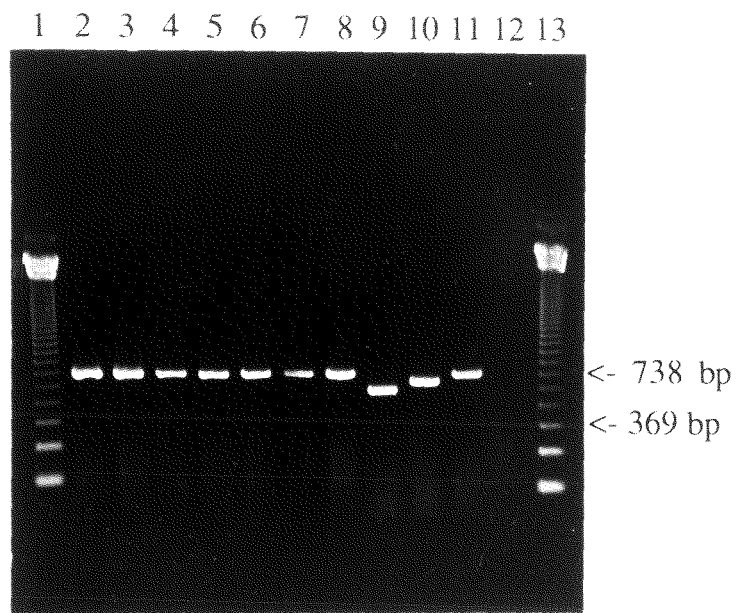


Fig. 13 Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction products amplified from the *hprt* protein-coding region of 1,6-DNP-induced mutants. Lane 1, 13: 123 MW marker; Lane 2: Positive control; Lane 12: Negative control; Lane 3: DNP-1; Lane 4: DNP-16; Lane 5: DNP-14; Lane 6: DNP-18; Lane 7: DNP-13; Lane 8: DNP-6; Lane 9: DNP-19; Lane 10: DNP-20; Lane 11: DNP-23.

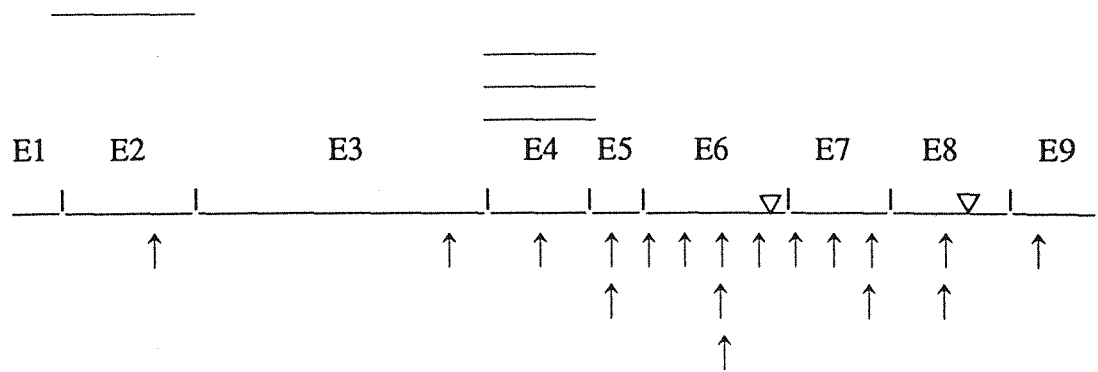


Fig. 14 The distribution of basepair substitutions (↑), deletions (▽) and putative splicing error region (—) in the coding region of the *hpert* cDNA in 1,6-DNP-induced mutants.

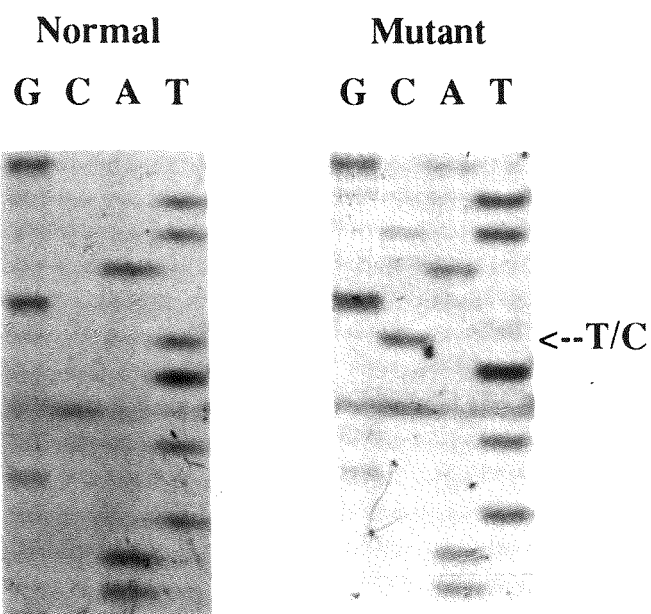


Fig. 15 PCR sequence analysis of base substitution mutation (T : A → C : G) in the *hprt* protein-coding region of wild type cells and DNP-4 mutants.

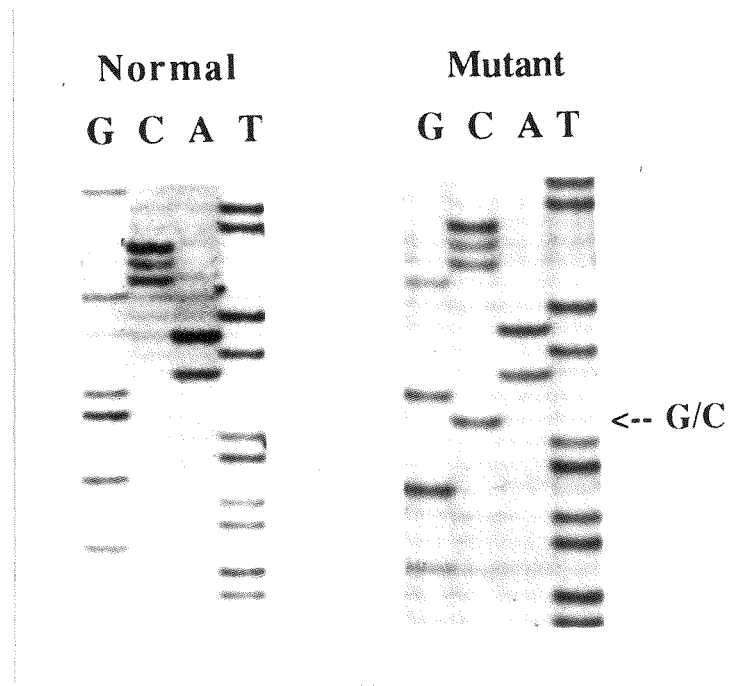


Fig. 16 PCR sequence analysis of base substitution mutation (G : C → C : G) in the *hprt* protein-coding region of wild type cells and DNP-16 mutants.

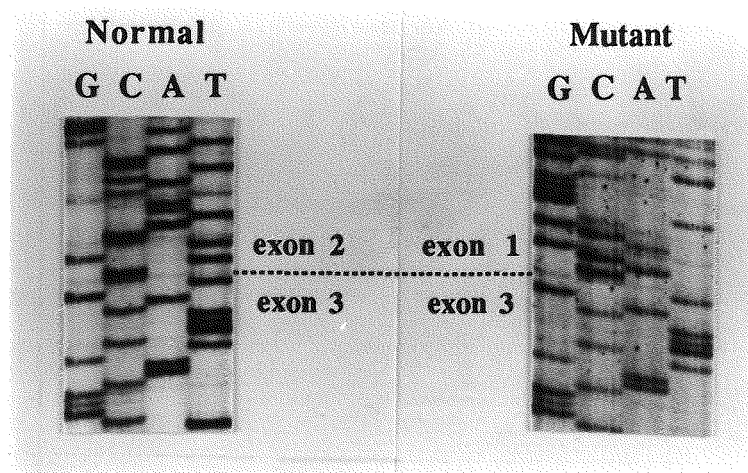


Fig. 17 PCR sequence analysis of the putative splicing error in the *hprt* protein-coding region of wild type cells and DNP-19 mutants.

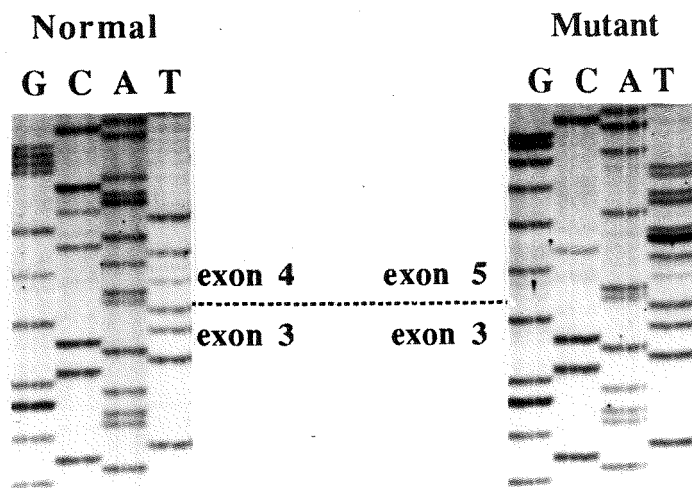


Fig. 18 PCR sequence analysis of the putative splicing error in the *hpert* protein-coding region of wild type cells and DNP-20 mutants.

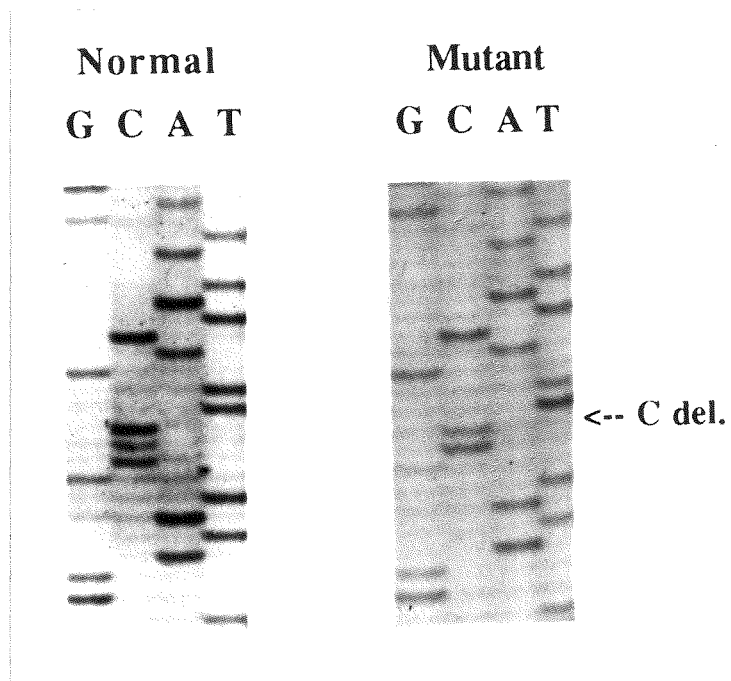


Fig. 19 PCR sequence analysis of deletion in the *hprt* protein-coding region of wild type cells and DNP-23 mutants.

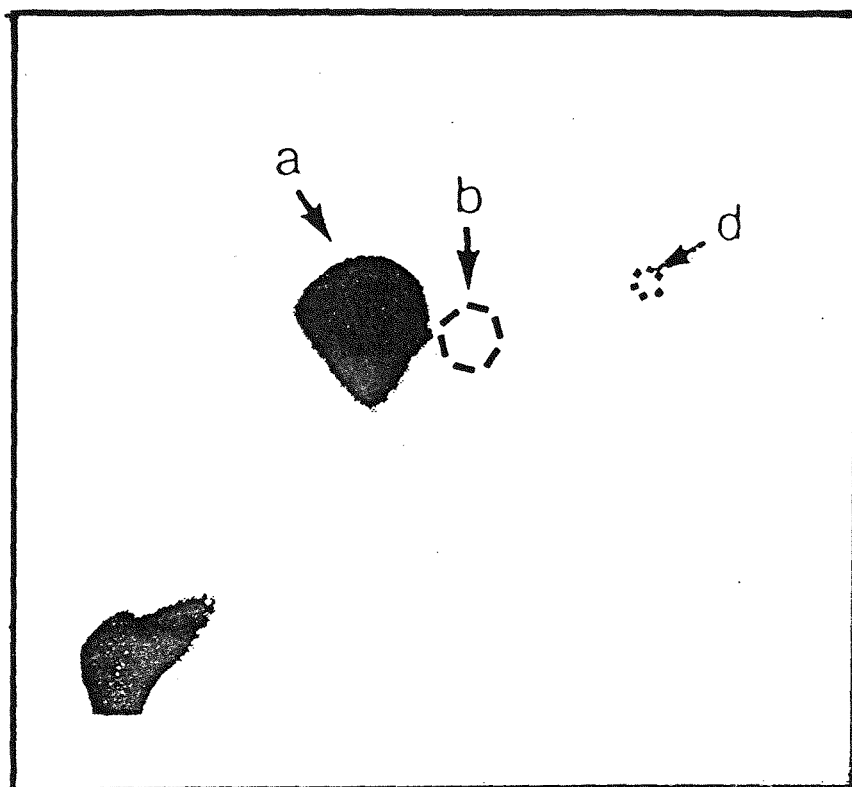


Fig. 20 The major adduct (spot a) as the major nucleoside adduct in calf thymus DNA has previously been identified as 1-N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-amino-8-nitropyrene. A minor adduct (spot b), which accounts for 5% of the total DNA binding in tracheal cells, migrated to the same position on the TLC plate as a major adduct seen following treatment of poly (dA.dT) with 1,8-NONO₂ under reducing conditions. The identity of spot "d" is not known.

玖、英文摘要

1,6-dinitropyrene (1,6-DNP) is widely distributed in the environment, being diesel exhaust, airborne particles, and indoor pollutants. It is strongly mutagenic to bacteria and mammalian cells. Moreover, 1,6-DNP has been reported to induce sarcomas at the site of injection when injected s.c. into rats and mice. As 1,6-DNP is present in the atmosphere, the respiratory tract, especially the lungs, is considered to be the most important target organ. Our previous studies indicated that 1,6-DNP is the major mutagenic compound in the airborne particulate samples from Taipei City, Kaoshiung City, and the waste metal retrieval area at Chierding Village in Kaoshiung County. The amount of 1,6-DNP was 100-1000 folds higher than that of Cities in the United States and Japan. Thus , 1,6-DNP may be one of the risk factors, other than cigarette smoke, of the high incidence of lung cancer in Taiwan. Recently, the DNA adducts and mutation at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase gene (*hprt*) are currently of great interest because mutations at this locus are being used as a biomarker of human mutagen exposure. The ³²P-postlabeling method and Chinese hamster ovary cells / HPRT mutation assay was used for the quantitation of DNA adducts and the selection of the mutants induced by 1,6-DNP. The *hprt* cDNAs of the mutants were synthesized by RT-PCR and the products were directly sequenced by the dideoxynucleotide chain termination method. In the present study, nine experiment cell lines (two human normal lung cell lines: MRC-5 and WI-38; four human lung cancer cell lines: A-427, CL-3,

CL1-0 and CL1-2; two animal cell lines: V79 and CHO-K1) were exposed with 1,6-DNP for 24 hrs to compare the DNA adduct forming ability using ^{32}P -postlabeling assay. The highest 1,6-DNP adduct levels were observed in MRC-5 cells following by V79 and MI-38 cells. The CL-3, CL1-0 and CL1-2 were not detectable 1,6-DNP-DNA-adduct. The major 1,6-DNP-DNA-adduct of V79 and CHO-K1 cells were similar to that of standard adduct of N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene. However, the major 1,6-DNP-DNA adduct formed in human lung cells MRC-5, WI-38 and A-427 cells were different from the standard 1,6-DNP-DNA adduct. In addition, 1,6-DNP can induce gene mutations at the *hprt* locus of CHO-K1 cells. The preliminary data showed twenty-three primary mutations induced by 1,6-DNP were found that eighteen (78%, 18/23) were point mutations, four (17%, 4/23) were splicing error mutations, and two (9%, 6/23) were deletion mutations. The majority of point mutations (56%, 10/18) occurred at A:T base pair and the splicing error mutations (75%, 3/4) occurred at exon 4. The -1 frameshifts mutations located in a unique run of three to four Cs in the gene. The result reveals a specificity for the induction of mutation in the *hprt* gene of CHO-K1 cell by 1,6-DNP.

The cDNA sequence of CHO *hprt* gene

```

-90  TTACCTCACC  GCTTTCCTCGT  GCCTCGGGGC  CTCCCTCTGGC  GGCTTCCTCC
-40  TCACACCGCT  CTTCCGCTCCC  GCCAGCCGAC  CGATTCCGTC  ATGGCGACCC
  11  GCAGCCCCAG  CGTCGTGATT  AGTGTATGATG  AACCAGGCTA  TGACCTAGAT
  61  TTATTTTGTG  TTCCCTAATCA  CTATGTTCGAG  GATTTGGAAA  AGGIGITTTAT
 111  TCCTAATGGA  GTGATTTATGG  ACAGGACTGA  AAGACTTGCC  CGAGATGTCA
 161  TGAAAGAGAT  GGGAGGCCAT  CACATTGTGG  CCCCTCTGTGT  GCTGAAGGGG
 211  GGCTATAAAT  TCTTTGCTGA  CCTGCTGGAT  TACATTTAAAG  CACTGAATAG
 261  AAATAGTGTG  AGATCCATTC  CCATGACTGT  AGATTTTATC  AGACTGAAGA
 311  GCTACTGTAA  TGATCAGTCA  ACAGGGGACA  TAAAAGTTAT  GTTGTGGGAT
 361  GATCTCTCAA  CTTTAACTGG  AAAGAATGTC  TTGATTGTGTG  AGGACATAAT
 411  TGACACTGGT  AAAACAATGC  AAACCTCTGCT  TTCCCIGGIC  AAGCGGTACA
 461  ACCCCAAAAT  GGTTAAGGTT  GCAAGCTTGC  TGGTGAAAAG  GACCTCTCGA
 511  AGTGTGTGGT  ATAGGCCAGA  CTTTGTGTGGA  TTTGAAATTC  CAGACAAGTT
 561  TGTGTGTGGA  TATGCCCTTG  ACTATAATGA  GIACCTCAGG  GATTTGAATC
 611  ATATTTGTGT  CATTAGTGAA  ACTGGGAAAG  CCAAATACAA  AGCCTAAGAT
 661  GAGAGTTCAA  GTTGAATCTG  CAAACACGAC  GAGTCCCATT  CATGTTCCCA
 711  GTAAAATTAC  CAAGCATTCT  AGTTCCTGCAG  CCATCTGCTT  AGTACAGCTT
 761  TTTGCATGAA  CCTTCTAAGA  ATTTTATGGT  TTTTATTTTT  TAGAAATGIC
 811  AGTGTCTGCA  TTCCTAAACT  TTTTATTTGC  ACTATGAGCC  TTCGATAGAT
 861  TGTCGCTTAC  CTTGTGAGCA  AAGTAAATCT  CTTAAATTAC  CACTATTAAA
 911  AATGCTGAGA  TTGTATCTGT  AAGAAACATT  TAAAGAGGAG  ATATATTAGT
 961  TTTTAAATTG  GTATTTTAAAT  TTTTATATAT  TCGGAAAGA  AAGCTGTGAT
1011  TGAATATTGT  TAATTATACC  ACCATGTGTT  TAGAACAGTG  TGAAGCACTC
1061  AGTTTCATGT  CAGTAACCAT  CTAAGAAGTT  TTCCTCAGTG  GAATAAACAT
1111  ATGTTTTIATC  AGTGTTCCTT  ATATTTTCCC  ACTTGGATTTC  TTTTCAGTAC
1161  TCATTGTCAA  CAGTTCCTTT  AAATGCAAAT  AAATTCIAAA  AATTTACCAC
1211  T

```

The coding region of CHO *hprt* gene

3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51
ATG	GCG	ACC	CGC	AGC	CCC	AGC	GTC	GIG	ATT	AGT	GAT	GAT	GAA	CCA	GGC	TAT
Met	Ala	Thr	Arg	Ser	Pro	Ser	Val	Val	Ile	Ser	Asp	Asp	Glu	Pro	Gly	Tyr
54	57	60	63	66	69	72	75	78	81	84	87	90	93	96	99	102
GAC	CIA	GAT	TIA	TTT	TGT	ATT	CCT	AAT	CAC	TAT	GIC	GAG	GAT	TTG	GAA	AAG
Asp	Leu	Asp	Leu	Phe	Cys	Ile	Pro	Asn	His	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Glu	Lys
105	108	111	114	117	120	123	126	129	132	135	138	141	144	147	150	153
GIG	TTT	ATT	CCT	AAT	GGA	GIG	ATT	ATG	GAC	AGG	ACT	GAA	AGA	CTT	GCC	CGA
Val	Phe	Ile	Pro	His	Gly	Val	Ile	Met	Asp	Arg	Thr	Glu	Arg	Leu	Ala	Arg
156	159	162	165	168	171	174	177	180	183	186	189	192	195	198	201	204
GAT	GIC	ATG	AAA	GAG	ATG	GGA	GGC	CAT	CAC	ATT	GIG	GCC	CIC	TGT	GIG	CTG
Asp	Val	Met	Lys	Glu	Met	Gly	Gly	His	His	Ile	Val	Ala	Leu	Cys	Val	Leu
207	210	213	216	219	222	225	228	231	234	237	240	243	246	249	252	255
AAG	GGG	GCC	TAT	AAA	TTC	TTT	GCT	GAC	CTG	CTG	GAT	TAC	ATT	AAA	GCA	CTG
Lys	Gly	Gly	Thr	Lys	Phe	Phe	Ala	Asp	Leu	Leu	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ala	Leu
258	261	264	267	270	273	276	279	282	285	288	291	294	297	300	303	306
AAT	AGA	AAT	AGT	GAT	AGA	TCC	ATT	CCC	ATG	ACT	GTA	GAT	TTT	ATC	AGA	CTG
Asn	Arg	Asn	Ser	Asp	Arg	Ser	Ile	Pro	Met	Thr	Val	Asp	Phe	Ile	Arg	Leu
309	312	315	318	321	324	327	330	333	336	339	342	345	348	351	354	357
AAG	AGC	TAC	TGT	AAT	GAT	CAG	TCA	ACA	GGG	GAC	ATA	AAA	GIT	ATG	TTG	TGG
Lys	Ser	Tyr	Cys	Asn	Asp	Gln	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Lys	Val	Ile	Gly	Gly

360 363 366 369 372 375 378 381 384 387 390 393 396 399 402 405 408
GAT GAT CTC TCA ACT TTA ACT GGA AAG AAT GTC TTG ATT GGT GAG GAC ATA
Asp Asp Leu Ser Thr Leu Thr Gly Lys Asn Val Leu Ile Val Glu Asp Ile

411 414 417 420 423 426 429 432 435 438 441 444 447 450 453 456 459
ATT GAC ACT GGT AAA ACA ATG CAA ACT CTG CTT TCC CTG GTC AAG CGG TAC
Ile Asp Thr Gly Lys Thr Met Gln Thr Leu Leu Ser Leu Val Lys Arg Tyr

462 465 468 471 474 477 480 483 486 489 492 495 498 501 504 507 510
AAC CCC AAA ATG GGT AAG GGT GCA AGC TTG CTG GTG AAA AGG ACC TCT CGA
Asn Pro Lys Met Val Lys Val Ala Ser Leu Leu Val Lys Arg Thr Ser Arg

513 516 519 522 525 528 531 534 537 540 543 546 549 552 555 558 561
AGT GGT GGA TAT AGG CCA GAC TTT GGT GGA TTT GAA ATT CCA GAC AAG TTT
Ser Val Gly Tyr Arg Pro Asp Phe Val Gly Phe Glu Ile Pro Asp Lys Phe

564 567 570 573 576 579 582 585 588 591 594 597 600 603 606 609 612
GTT GGT GGA TAT GCC CTT GAC TAT AAT GAG TAC TTC AGG GAT TTG AAT CAT
Val Val Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Asn Glu Tyr Phe Arg Asp Leu Asn His

615 618 621 624 627 630 633 636 639 642 645 648 651 654 657
ATT TGT GTC ATT AGT GAA ACT GGG AAA GCC AAA TAC AAA GCC TAA
Ile Cys Val Ile Ser Glu Thr Gly Lys Ala Lys Tyr Lys Ala